

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2019년 5월 9일 (09.05.2019)

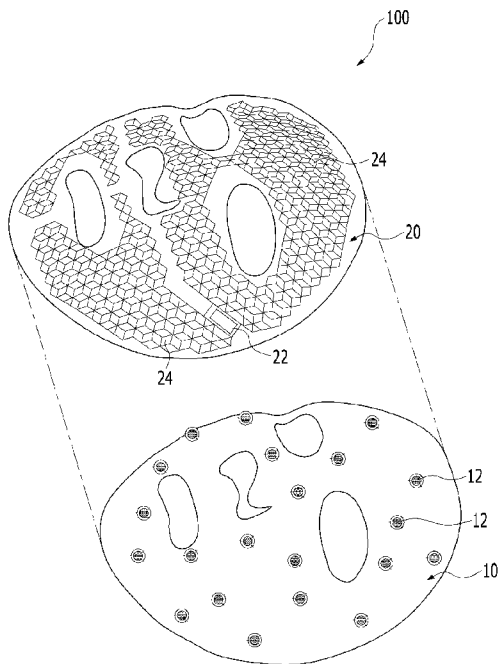


(10) 국제공개번호  
**WO 2019/088545 A1**

- (51) 국제특허분류: *A61K 8/98* (2006.01) *A61K 35/28* (2006.01)  
*A61K 8/14* (2006.01) *A61K 9/127* (2006.01)  
*A61K 8/02* (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/012549
- (22) 국제출원일: 2018년 10월 23일 (23.10.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0143358 2017년 10월 31일 (31.10.2017)KR
- (71) 출원인: 주식회사 엑소코바이오 (EXOCOBIO INC.) [KR/KR]; 08594 서울시 금천구 가산디지털1로 19, 306호, Seoul (KR). 바이오센서연구소 주식회사 (BIOSENSOR LABORATORIES INC.) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, 105-205 (신림동, 서울대학교 유전공학연구소), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이용원 (YI, Yong Weon); 07976 서울시 양천구 목동중앙본로2길 38-12, 202호, Seoul (KR). 조병성 (CHO, Byong Seung); 15835 경기도 군포시 변영로550번길 5, 137동 102호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 이동기 (LEE, Dong-Ki); 07997 서울시 양천구 목동동로 293, 14층 1415호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: EXOSOME KIT AND METHOD FOR ENHANCING TRANSDERMAL PERMEATION OF EXOSOMES BY USING SAME

(54) 발명의 명칭: 엑소좀 키트 및 이를 이용한 엑소좀의 경피 투과 증진 방법



(57) Abstract: Provided in the present invention is an exosome kit for enhancing transdermal permeation of exosomes, comprising an iontophoresis device, a mask pack and a mask sheet or patch on which a composition containing exosomes as an active ingredient is coated or deposited. The present invention facilitates the application of exosomes, which can function as a functional cosmetic product or a quasi-drug, to the skin, and allows exosomes to penetrate deeply into the skin while effectively passing through the skin barrier. Therefore, the present invention can exhibit excellent effects when applied to skin treatment for alleviating deteriorated skin conditions or returning the same to a normal state, and can exhibit excellent effects on skin disease treatment allowing a skin state in a diseased state to be mitigated, alleviated, or return to a normal state.

(57) 요약서: 본 발명은 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물이 도포되거나 침적된 마스크팩, 마스크시트 또는 패취와, 이온토포레시스 (iontophoresis) 디바이스를 포함하는 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트를 제공한다. 본 발명은 기능성 화장품이나 의약 외품으로서의 기능을 가질 수 있는 엑소좀의 피부 적용을 간편하게 하고 엑소좀이 피부 장벽을 효과적으로 통과하게 하면서도 피부 내부 깊숙이 침투시키는 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 나빠진 피부 상태를 개선 또는 정상상태로 회복시키는 피부 미용에 응용되어 우수한 효과를 나타낼 수 있으며, 피부 상태가 병적 상태인 것을 완화, 개선 내지는 정상 상태로 회복시켜 주는 피부질환 치료효과에 있어서도 우수한 효과를 나타낼 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2019/088545 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

## 명세서

### 발명의 명칭: 엑소좀 키트 및 이를 이용한 엑소좀의 경피 투과 증진 방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물이 도포되거나 침적된 마스크팩, 마스크시트 또는 패취와, 이온토포레시스(iontophoresis) 디바이스를 포함하는 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트에 관한 것이다.
- [2] 또한, 본 발명은 상기 엑소좀 키트를 이용하여, 엑소좀이 피부 장벽을 효과적으로 통과하게 하고 피부 내부 깊숙이 전달되도록 하는 엑소좀의 경피 투과 증진 방법 및 이의 용용에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [3] 피부는 표피, 진피, 피하지방의 3층 구조로 되어 있는데, 피부의 가장 바깥에 위치한 표피의 각질층은 피부의 수분 증발을 억제하고, 피부장벽 역할을 한다. 그러나 각질층의 피부 장벽은 기능성 화장품이나 의약 외품을 피부에 도포시 유효성분의 침투를 방해하여 기능성 화장품이나 의약 외품의 효능을 떨어뜨리는 문제가 있다.
- [4] 피부 표면에 도포되는 유효성분이 피부 장벽을 용이하게 통과하게 하고 피부 내부 깊숙이 전달하기 위한 도구가 경피전달시스템(Transdermal Delivery System)이다. 대표적으로 알려진 경피전달시스템으로는 리포솜이 있다. 리포솜은 세포막 또는 각질층의 세포 간 지질과 구조적으로 유사한 지질이 이중층으로 구성되어 있어 세포막과 융합하여 리포솜 내부의 유효성분을 효과적으로 피부 내부로 전달할 수 있다. 그러나 인공적으로 합성된 리포솜은 안정성 문제 및 피부 침투의 한계가 있다.
- [5] 피부 흡수율을 높이고 피부 침투 시 피부 각질층을 잘 투과할 수 있도록 탄력적으로 변형이 쉬운 소포체를 만들고자 하는 시도가 이루어졌는데, 그 예가 에토솜이다. 에토솜은 피부 투과 증진제로 알려진 에탄올에 인지질을 용해시켜 만든다. 에토솜의 에탄올은 피부 각질층의 세포간 지질막을 약화시켜 유효성분의 피부 흡수율을 높여주며, 소포체 자체의 막을 유연하게 만든다. 이러한 특징으로 에토솜은 유효성분의 피부 내부 전달에 있어 효과적이고 더 깊은 곳까지 유효성분을 전달할 수 있다. 그러나 에토솜 역시 나노입자의 경화로 인한 입자의 합일, 층분리 현상 등의 문제점이 있다.
- [6] 한편, 최근 세포 분비물(secretome)에 세포의 행동(behavior)을 조절하는 다양한 생체활성인자가 포함되어 있다는 연구가 보고되고 있으며, 특히 세포 분비물 내에는 세포 간 신호전달 기능을 갖는 '엑소좀(exosome)'이 포함되어 있어 그 성분과 기능에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다.
- [7] 세포는 세포외 환경에 다양한 막(membrane) 유형의 소포체를 방출하는데, 통상

이러한 방출 소포체들을 세포외 소포체(Extracellular vesicles, EV)라고 부르고 있다. 세포외 소포체는 세포막 유래 소포체, 엑토솜(ectosomes), shedding 소포체(shedding vesicles), 마이크로파티클(microparticles), 엑소솜 등으로 불려지기도 하며, 경우에 따라서는 엑소솜과는 구별되어 사용되기도 한다.

- [8] 엑소솜은 세포막의 구조와 동일한 이중인지질막으로 이루어진 수십 내지 수백 나노미터 크기의 소포체로서 내부에는 엑소솜 카고(cargo)라고 불리는 단백질, 핵산(mRNA, miRNA 등) 등이 포함되어 있다. 엑소솜 카고에는 광범위한 신호전달 요소들(signaling factors)이 포함되며, 이들 신호전달 요소들은 세포 타입에 특이적이고 분비세포의 환경에 따라 상이하게 조절되는 것으로 알려져 있다. 엑소솜은 세포가 분비하는 세포 간 신호전달 매개체로서 이를 통해 전달된 다양한 세포 신호는 표적 세포의 활성화, 성장, 이동, 분화, 탈분화, 사멸(apoptosis), 괴사(necrosis)를 포함한 세포 행동을 조절한다고 알려져 있다. 엑소솜은 유래된 세포의 성질 및 상태에 따라 특이적인 유전물질과 생체활성 인자들이 포함되어 있다. 증식하는 줄기세포 유래 엑소솜의 경우 세포의 이동, 증식 및 분화와 같은 세포 행동을 조절하고, 조직 재생과 관련된 줄기세포의 특성이 반영되어 있다(Nature Review Immunology 2002 (2) 569-579).

- [9] 그러나 엑소솜을 이용한 특정 질환의 치료에 대한 가능성 제시 등 다양한 연구가 이루어지고 있음에도 불구하고, 엑소솜을 안정적으로 유지·보관할 수 있는 새로운 제형 개발과 엑소솜의 사용 편의성 및 효능 증대 등을 위한 다양한 의료 내지는 미용기술과의 접목은 상대적으로 주목받고 있지 못하고 있다. 특히, 엑소솜의 피부 침투 능력 향상과 관련한 응용기술의 개발은 미진한 상황이다.

- [10] 본 발명자들은 엑소솜의 새로운 응용분야 및 의료 내지는 미용기술과의 접목에 대해 예의 연구를 거듭하던 중, 엑소솜의 경피 투과를 획기적으로 촉진하는 엑소솜의 경피 투과 증진을 위한 엑소솜 키트를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

- [11] 한편, 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 본 발명의 "선행 기술"로서 이용될 수 있다는 승인으로서 인용한 것은 아님을 이해하여야 한다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [12] 본 발명의 목적은 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물이 도포되거나 침적된 마스크팩, 마스크시트 또는 패취와, 이온토포레시스(iontophoresis) 디바이스를 포함하는 엑소솜의 경피 투과 증진을 위한 엑소솜 키트를 제공하는데 있다.

- [13] 본 발명의 다른 목적은 상기 엑소솜 키트를 이용하여, 엑소솜이 피부 장벽을 효과적으로 통과하게 하고 피부 내부 깊숙이 전달되도록 하는 엑소솜의 경피 투과 증진 방법 및 이의 용용을 제공하는데 있다.

- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 엑소솜 키트를 이용하여, 치료용을 제외한

포유동물 피부의 상태를 조절하는 미용방법 또는 피부질환 치료방법을 제공하는데 있다.

- [15] 그러나, 전술한 바와 같은 본 발명의 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 과제 해결 수단

- [16] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물이 도포되거나 침적된 마스크팩, 마스크시트 또는 패취와, 이온토포레시스(iontophoresis) 디바이스를 포함하는 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트를 제공한다.
- [17] 본 명세서에서 용어, "엑소좀(exosomes)"은 세포막의 구조와 동일한 이중인지질막으로 이루어진 수십 내지 수백 나노미터(바람직하게는 대략 30~200 nm) 크기의 소포체를 의미한다(단, 분리 대상이 되는 세포 종류, 분리방법 및 측정방법에 따라 엑소좀의 입자 크기는 가변될 수 있음)(Vasiliy S. Chernyshev et al., "Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes", Anal Bioanal Chem, (2015) DOI 10.1007/s00216-015-8535-3). 엑소좀에는 엑소좀 카고(cargo)라고 불리는 단백질, 핵산(mRNA, miRNA 등) 등이 포함되어 있다. 엑소좀 카고에는 광범위한 신호전달 요소들(signaling factors)이 포함되며, 이들 신호전달 요소들은 세포 타입에 특이적이고 분비세포의 환경에 따라 상이하게 조절되는 것으로 알려져 있다. 엑소좀은 세포가 분비하는 세포 간 신호전달 매개체로서 이를 통해 전달된 다양한 세포 신호는 표적 세포의 활성화, 성장, 이동, 분화, 탈분화, 사멸(apoptosis), 괴사(necrosis)를 포함한 세포 행동을 조절한다고 알려져 있다.
- [18] 본 명세서에서 용어, "생물학적 용액"은 생물기원의 액체 용액으로서 엑소좀이 분산, 현탁, 침전, 부유 또는 혼합되어 있는 용액을 의미하고, 예를 들어 세포 배양액, 세포 배양 상청액, 줄기세포 배양액, 줄기세포 배양 상청액, 전혈, 혈청, 제대혈, 혈장, 복수액, 뇌 및 뇌척수액, 태반 추출액 및 골수 흡입물 등을 들 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고 다양한 동물, 식물, 세균(bacteria), 균류(fungi), 조류(algae) 등 다양한 생물 기원의 용액을 배제하는 것이 아님은 물론이다. "생물학적 용액"은 엑소좀을 방출 및/또는 분비시키는 조건 하에서 배양 또는 인큐베이션될 수 있고, 냉동 및 해동될 수도 있다.
- [19] 한편, 본 명세서에서 사용된 "엑소좀"이란 용어는 다양한 동물, 식물, 세균(bacteria), 균류(fungi), 조류(algae) 등의 세포, 바람직하게는 줄기세포에서 분비되어 세포외 공간으로 방출된 나노 크기의 베지클 구조를 갖고 있고 엑소좀과 유사한 조성을 갖는 베지클(예를 들어, 엑소좀-유사 베지클)을 모두 포함하는 것을 의미한다.
- [20] 그러나 본 발명에서 사용되는 엑소좀은 피부에 적용가능하고 인체에 불리한

작용을 일으키지 않는 것이라면 당업계에서 사용되고 있거나 향후 사용될 수 있는 다양한 엑소좀을 사용할 수 있음은 물론이다. 따라서, 후술하는 실시예들의 분리방법에 따라 분리된 엑소좀은 본 발명에서 사용될 수 있는 엑소좀의 일례로서 이해되어야 하며, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아님을 명백히 밝혀 둔다.

[21] 본 명세서에서 용어, "피부 상태의 개선"이란 피부의 외관 및/또는 느낌에 있어 시각적 및/또는 촉각적으로 지각할 수 있는 긍정적인 변화로서, 피부 조직 재생을 포함하며, 예를 들어 노화와 관련된 피부 상태를 개선하거나 피부 노화를 예방하거나, 또는 피부 상태가 병적 상태인 것을 완화, 개선 내지는 정상 상태로 회복시켜 주는 것을 포함한다. 본 발명을 한정하지 않는 예시로서, "피부 상태의 개선"은 피부 처짐, 피부 주름, 피부 탄력감소, 잔주름, 주름살, 거칠고 깊은 주름, 균열, 융기(bumps) 및 모공 확대 등의 완화, 개선 또는 제거; 피부의 두꺼워짐 감소(예를 들어, 피부의 표피층, 진피층, 피하층, 손발톱 및 모간의 각질층 제거); 기능성 피부 엘라스틴의 손실, 손상 및/또는 불활성화로 인한 피부 또는 모발 탄력성 손실의 방지; 셀룰라이트의 감소; 창백함, 기미, 주근깨, 잡티, 피부, 모발 또는 손발톱에 대한 변색, 예를 들어 흑자, 눈밑 다크서클, 홍반, 점, 까페오레반점, 베커반점, 오타모반, 색소성 모반, 표피모반, 멜라닌 색소반점, 색소침착, 모세혈관 확장증 또는 거미상 혈관에 의해 야기된 변색 등의 완화, 개선 또는 제거; 피부 건조 및 푸석푸석함(brittleness)의 개선, 완화 또는 방지를 포함할 수 있다.

[22] 본 명세서에서 용어, "피부 미용"은 피부 처짐, 움푹 들어간 뺨, 패인 눈, 피부 주름, 피부 탄력감소, 잔주름, 모공 확대 등의 피부노화를 감소, 완화 또는 개선시키는 것 또는 이러한 피부노화에 의해 나빠진 피부 상태를 정상상태로 회복시키는 것; 피부 박피, 피부 재생, 미백, 주근깨, 다크서클, 기미, 문신, 여드름, 엘라스틴층 자국, 튜살, 흉터, 확대된 모공, 창백함, 잡티, 흑자, 눈밑 다크서클, 홍반, 점, 까페오레반점, 베커반점, 오타모반, 색소성 모반, 표피모반, 멜라닌 색소반점, 색소침착 등의 다양한 피부 결점들의 제거 내지는 보정; 탈모 예방, 발모 촉진, 두피 관리, 셀룰라이트 감소, 얼굴 축소, 윤곽교정, 연부조직의 결합 보정, 조직확대, 볼륨업(volume-up), 피부팽만, 피부 보습 및 진정(soothing), 홍조 및 혈관확장증의 감소 내지 개선 등을 의미한다. 그러나, 본 발명에 있어서 "피부 미용"은 전술한 것에 제한되지 않고 다양한 피부결점들을 제거 내지는 보정하는 것을 포함하는 것임은 물론이다.

[23] 본 명세서에서 용어, "피부질환 치료"는 안면 홍조, 기미, 주근깨, 잡티, 흑자, 눈밑 다크서클, 홍반, 점, 까페오레반점, 베커반점, 오타모반, 색소성 모반, 표피모반, 멜라닌 색소반점, 색소침착 등의 색소성 피부 병변을 제거, 완화 또는 개선시키는 것 또는 이러한 색소성 피부 병변에 의해 나빠진 피부 상태를 정상상태로 회복시키는 것; 화염상 모반, 모세혈관 확장증, 주사, 혈관종, 포도색모반 등과 같은 혈관성 피부 병변을 제거, 완화 또는 개선시키는 것 또는

이러한 혈관성 피부 병변에 의해 나빠진 피부 상태를 정상상태로 회복시키는 것; 접촉피부염, 자극 접촉피부염, 알레르기 접촉피부염, 광독성 및 광알레르기 접촉피부염, 접촉 두드러기 증후군, 아토피성 피부염, 지루성 피부염, 자가감작 피부염, 자가면역 프로그레스티브 피부염, 울체 피부염, 여드름 또는 습진과 같은 다양한 피부염을 완화, 개선 또는 정상상태로 회복시켜 주는 것; 발작성 가려움증, 동계 가려움증, 항문 가려움증, 외음 가려움증, 음낭 가려움증, 수인성 가려움증, 두피 가려움증, 코 가려움증, 목 가려움증, 만성단순태선, 가려움발진, 발모벽, 신경성 긁은 상처, 피부를 침범하는 행동장애 및 기생충증상 등 다양한 정신키투질환과 같은 다양한 가려움증을 완화, 개선 또는 정상상태로 회복시켜 주는 것; 피부경화증을 포함하는 다양한 섬유성 피부 질환을 완화, 개선 또는 정상상태로 회복시켜 주는 것 등을 포함한다. 그러나, 본 발명에 있어서 "피부질환 치료"는 전술한 것에 제한되지 않고 다양한 피부질환들의 병적상태를 완화, 개선 내지는 정상상태로 회복시켜 주는 것을 포함하는 것임은 물론이다.

- [24] 본 명세서에서 용어, "이온토포레시스(iontophoresis)"는 유효물질이 적용된 피부에 미세전류를 흐르게 하여 전위차를 주어 피부의 전기적 환경을 변화시킴으로써 이온화된 유효성분을 전기적 반발력으로 피부를 투과하게 하는 방법을 의미한다. 본 발명의 일 구체예에 사용되는 이온토포레시스(iontophoresis)는 피부 위의 전극 패치에 외부전원으로부터의 전류가 흘러들어가 피부에 미세전류가 도입되는 방식, 전극 패치 자체에 배터리가 장착되어 피부에 미세전류가 도입되는 방식, 고농도 전해질 용액 및 저농도 전해질 용액 간의 이온 농도 차이를 통해 전류를 발생시키는 역전기투석(Reversed Electrodialysis) 수단이 장착된 패치를 통해 피부에 미세전류가 도입되는 방식 등을 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니며, 다양한 방식의 이온토포레시스가 사용될 수 있음은 물론이다.
- [25] 본 발명의 일 구체예의 엑소솜의 경피 투과 증진을 위한 엑소솜 키트는, 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 조성물이 도포되거나 침적된 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취와, 상기 조성물이 적용된 포유동물의 피부에 미세전류를 흘려 주는 이온토포레시스 디바이스를 포함한다.
- [26] 예를 들어, 본 발명의 일 구체예의 엑소솜의 경피 투과 증진을 위한 엑소솜 키트는, 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취를 포유동물의 피부 위에 접촉 또는 부착시키고, 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취 위에 상기 이온토포레시스 디바이스를 위치시킴으로써, 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취가 접촉 또는 부착되어 상기 조성물이 적용된 포유동물의 피부에 미세전류를 흘려 주는 방식으로 사용될 수 있다.
- [27] 또한, 상기 조성물은 엑소솜 이외에, 그 작용(피부 상태의 개선, 피부 미용 또는 피부질환 치료 등)을 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용된 피부 개선제 및/또는 보습제를 함께 혼합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은

하이드로겔, 히알루론산, 히알루론산 염(예를 들어 히알루론산 나트륨 등), 또는 히알루론산 겔 중 적어도 1종에 담지되거나 혼합될 수 있다. 상기 하이드로겔의 종류는 제한되지 않으나, 바람직하게는 겔화 고분자를 다가 알코올에 분산시켜 얻은 하이드로겔일 수 있다. 상기 겔화 고분자는 플루로닉, 정제한천, 아가로오스, 젤란검, 알긴산, 카라기난, 카시아검, 잔탄검, 갈락토만난, 글루코만난, 펙틴, 셀룰로오스, 구아검 및 로커스트빈검으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종일 수 있고, 상기 다가 알코올은 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 이소부틸렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 소르비톨, 자일리톨 및 글리세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종일 수 있다.

- [28] 본 발명의 일 구체예의 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트에 있어서, 상기 이온토포레시스 디바이스는 가요성 배터리, 리튬이온 이차 전지, 알칼리 전지, 건전지, 수은 전지, 리튬 전지, 니켈-카드뮴 전지, 및 역전기 투석 전지로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 1종의 전지를 포함하거나, 상기 적어도 1종의 전지가 장착된 제2 마스크팩, 마스크시트 또는 패취일 수 있다.
- [29] 본 발명의 일 구체예의 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트에 있어서, 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취 위에 상기 제2 마스크팩, 마스크시트 또는 패취가 적층되어 사용될 수 있다.
- [30] 본 발명의 일 구체예의 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트에 있어서, 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취의 적어도 일면(一面)에는 하이드로겔, 히알루론산, 히알루론산 염(예를 들어 히알루론산 나트륨), 또는 히알루론산 겔 중 적어도 1종이 도포될 수 있다. 상기 하이드로겔의 종류는 제한되지 않으나, 바람직하게는 겔화 고분자를 다가 알코올에 분산시켜 얻은 하이드로겔일 수 있다. 상기 겔화 고분자 및 다가 알코올은 앞선 설명들에서 예시된 것일 수 있다.
- [31] 본 발명의 일 구체예의 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트에 따르면, 상기 이온토포레시스 디바이스로부터 미세전류가 흐름으로써 엑소좀이 표피를 효과적으로 통과하고 피부 내부 깊숙이 침투할 수 있게 된다.
- [32] 본 발명의 일 구체예의 엑소좀의 경피 투과 증진 방법은, 전술한 바와 같은 엑소좀 키트를 이용하여 수행될 수 있다.
- [33] 예를 들어, 본 발명의 일 구체예의 엑소좀의 경피 투과 증진 방법은 (a) 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물이 도포되거나 침적된 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취를 포유동물의 피부 위에 접촉 또는 부착하는 단계와, (b) 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취 위에 이온토포레시스 디바이스를 위치시키는 단계와, (c) 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취가 접촉 또는 부착되어 상기 조성물이 적용된 포유동물의 피부에 미세전류를 흘려 주는 이온토포레시스를 수행하는 단계와, (d) 상기 미세전류를 통하여 상기 엑소좀을 포유동물 피부 내부로 전달하는 단계를 포함한다.
- [34] 본 발명의 일 구체예의 엑소좀의 경피 투과 증진 방법에 있어서, 상기 제1

- 마스크팩, 마스크시트 또는 패취의 적어도 일면(一面)에는 하이드로겔, 히알루론산, 히알루론산 염(예를 들어 히알루론산 나트륨 등), 또는 히알루론산 겔 중 적어도 1종이 도포될 수 있다. 상기 하이드로겔의 종류는 제한되지 않으나, 바람직하게는 겔화 고분자를 다가 알코올에 분산시켜 얻은 하이드로겔일 수 있다. 상기 겔화 고분자 및 다가 알코올은 앞선 설명들에서 예시된 것일 수 있다.
- [35] 본 발명의 일 구체예의 엑소좀의 경피 투과 증진 방법에 있어서, 상기 이온토포레시스 디바이스는 가요성 배터리, 리튬이온 이차 전지, 알칼리 전지, 건전지, 수은 전지, 리튬 전지, 니켈-카드뮴 전지, 및 역전기 투석 전지로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 1종의 전지를 포함하거나, 상기 적어도 1종의 전지가 장착된 제2 마스크팩, 마스크시트 또는 패취일 수 있다. 상기 (b) 단계는 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취 위에 상기 제2 마스크팩, 마스크시트 또는 패취를 적층하여 수행될 수 있다.
- [36] 본 발명을 한정하지 않는 하나의 예시로서, 상기 엑소좀은 하기의 단계들을 수행하여 수득될 수 있다: (a) 생물학적 용액에 트레할로오스를 첨가하는 단계, (b) 상기 트레할로오스가 첨가된 생물학적 용액을 여과하는 단계, (c) 상기 여과된 생물학적 용액으로부터, TFF(Tangential Flow Filtration)를 이용하여 엑소좀을 분리하는 단계, 및 (d) 탈염과 버퍼교환(diafiltration)에 사용되는 완충용액에 트레할로오스를 첨가하고, 상기 트레할로오스가 첨가된 완충용액을 이용한 TFF(Tangential Flow Filtration)를 이용하여, 상기 분리된 엑소좀에 대한 탈염과 버퍼교환(diafiltration)을 수행하는 단계.
- [37] 한편, 상기 (d) 단계에서 탈염과 버퍼교환(diafiltration)에 사용되는 완충용액에 트레할로오스를 첨가하면, 입자크기 분포가 균일하고 순도가 높은 엑소좀을 효과적으로 수득할 수 있다(도 6A 내지 도 6E 참조). TFF에 의한 엑소좀 분리 전의 사전 여과 과정((b) 단계)과 엑소좀 분리 후 TFF에 의한 탈염 및 버퍼교환 과정((d) 단계)에서 트레할로오스를 사용하는 것에 의해 고순도의 입자크기 분포가 균일한 엑소좀을 높은 수율로 수득할 수 있다. 한편, 트레할로오스는 세포 잔해물, 노폐물, 단백질 및 거대 입자와 같은 불순물에 대해 엑소좀을 효율적으로 분별할 수 있는 기능을 부여한다.
- [38] 상기 탈염과 버퍼교환은 연속적으로 수행하거나 단속적으로 수행할 수 있다. 시작 부피(starting volume)에 대하여 적어도 4배, 바람직하게는 6배 내지는 10배 이상, 보다 바람직하게는 12배 이상의 부피를 갖는 완충용액을 이용하여 탈염과 버퍼교환을 수행할 수 있다. 또한, TFF를 위해 MWCO(molecular weight cutoff) 100,000 Da(Dalton), 300,000 Da, 500,000 Da 또는 750,000 Da의 TFF 필터, 또는 0.05  $\mu\text{m}$  TFF 필터를 사용할 수 있다. 상기 (c) 단계는 TFF(Tangential Flow Filtration)를 이용하여 1/100 내지 1/25의 부피까지 농축하는 과정을 더 포함할 수 있다.
- [39] 본 발명을 한정하지 않는 하나의 예시로서, 상기 생물학적 용액은 줄기세포 배양액일 수 있다. 상기 줄기세포의 종류는 제한되지 않으나, 바람직하게는

중간엽 줄기세포, 예를 들어 지방, 골수, 제대 또는 제대혈 유래 줄기세포일 수 있으며, 보다 바람직하게는 지방 유래 줄기세포일 수 있다. 상기 지방 유래 줄기세포의 종류는 병원체에 의한 감염의 위험이 없고 면역 거부 반응을 일으키지 않는 것이라면 제한되지 않으나, 바람직하게는 인간지방 유래 줄기세포일 수 있다.

[40] 그러나 본 발명에서 사용되는 엑소솜은 전술한 바와 같은 분리방법에 따라 수득된 엑소솜에 제한되는 것이 아니며, 당업계에서 사용되고 있거나 향후 사용될 수 있는 다양한 엑소솜을 사용할 수 있음은 물론이다. 상기 분리방법에 따라 분리된 엑소솜은 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 엑소솜의 일례로서 이해되어야 하며, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아님을 명백히 밝혀 둔다.

[41] 본 발명의 다른 구체예는 (a) 전술한 바와 같은 엑소솜의 경피 투과 증진 방법을 수행하는 단계와, (b) 상기 (a) 단계를 통해, 피부 상태를 개선시키는 단계를 포함하는, 치료용을 제외한 포유동물 피부의 상태를 조절하는 미용방법을 제공한다. 본 발명의 미용방법에 있어서, 피부의 상태 조절이란 피부의 상태를 개선시키고/시키거나 피부의 상태를 예방적으로 조절하는 것을 의미하고, 피부의 상태 개선이란 피부 조직의 외관 및 느낌의 시각적 및/또는 촉각적으로 지각할 수 있는 긍정적인 변화를 의미한다. 예를 들어, 피부의 상태 개선이란 피부 재생, 주름 제거 또는 개선, 미백, 흉터 제거, 피부 텍스처(skin texture) 개선, 홍조 감소, 피부의 상태를 촉촉하게 하거나 매끈하게 하는 것, 또는 피부를 긁거나 문질러서 나빠진 피부 상태의 개선일 수 있다.

[42] 본 발명의 또 다른 구체예는 (a) 전술한 바와 같은 엑소솜의 경피 투과 증진 방법을 수행하는 단계와, (b) 상기 (a) 단계를 통해, 피부질환의 병적상태를 완화, 개선 내지는 정상상태로 회복시켜 주는 단계를 포함하는, 피부질환 치료방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[43] 본 발명은 기능성 화장품이나 의약 외품으로서의 기능을 가질 수 있는 엑소솜의 피부 적용을 간편하게 하고 엑소솜이 피부 장벽을 효과적으로 통과하게 하면서도 피부 내부 깊숙이 침투시키는 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 나빠진 피부 상태를 개선 또는 정상상태로 회복시키는 피부 미용에 응용되어 우수한 효과를 나타낼 수 있으며, 피부 상태가 병적 상태인 것을 완화, 개선 내지는 정상 상태로 회복시켜 주는 피부질환 치료효과에 있어서도 우수한 효과를 나타낼 수 있다.

[44] 한편, 전술한 바와 같은 효과들에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

[45] 도 1은 본 발명의 일 구체예에 따라 생물학적 용액으로부터 엑소솜을 제조하는 방법에 있어서 엑소솜을 분리 및 정제하는 과정을 설명하는 플로우차트이다.

[46] 도 2는 본 발명의 일 구체예에 따라 생물학적 용액, 예를 들어 줄기세포

배양액으로부터 엑소좀을 제조하는 단계(step)별로 용액 내에 포함되어 있는 단백질의 총량 비율(Relative amount of protein)을 측정한 결과를 나타낸다. 각 단계별 단백질 총량의 비율은 생물학적 용액 전체에 대한 단백질 총량의 상대적 비율로 나타내었다. 실험 결과는 2개의 서로 다른 배치에서 얻어진 결과를 각각 도시하였다.

- [47] 도 3은 본 발명의 일 구체예에 따라 얻어진 엑소좀의 생산성(productivity)과 순도(purity)를 측정한 결과를 도시한 것이다. 엑소좀의 생산성은 "생물학적 용액, 예를 들어 줄기세포 배양액(CM) 단위 mL 당 얻어진 엑소좀의 입자수"로 계산하였고, 엑소좀의 순도는 "최종 분획물에 포함되어 있는 단백질 단위  $\mu\text{g}$  당 엑소좀의 입자수"로 계산하였다. 실험 결과는 5개의 서로 다른 배치(batch)에서 얻어진 결과를 도시하였다.
- [48] 도 4A 내지 도 4E는 본 발명의 일 구체예에 따라 얻어진 엑소좀의 물리적 특성 분석 결과를 도시한 것이다. "도 4A"는 TRPS(tunable resistive pulse sensing) 분석에 의한 입자 크기 분포와 입자수를 나타낸다. "도 4B"는 NTA(nanoparticle tracking analysis) 분석에 의한 입자 크기 분포와 입자수를 나타낸다. "도 4C"는 TEM(transmitted electron microscopy) 분석에 의한 입자 이미지를 배율에 따라 도시하였다. "도 4D"는 본 발명의 일 구체예에 따라 얻어진 엑소좀의 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. "도 4E"는 본 발명의 일 구체예에 따라 얻어진 엑소좀에 대한 마커 분석에 있어서 CD63 및 CD81에 대한 유세포분석 결과를 나타낸다.
- [49] 도 5A 내지 도 5C는 트레할로오스 첨가에 따라 입자크기 분포가 균일하고 순도가 높은 엑소좀이 수득되는 것을 보여주는 입자 크기 분포에 관한 NTA 분석 결과를 도시한다. 첨가된 트레할로오스의 양이 증가함에 따라 단일한 피크를 갖는 입자 크기 분포 결과를 얻을 수 있다.
- [50] 도 6A 내지 도 6C는 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소좀의 제조과정에서 트레할로오스 첨가 여부에 따른 입자 크기 분포를 나타내는 NTA 분석 결과를 도시한다. "도 6A"는 제조 과정 전과정에서 트레할로오스를 첨가한 경우, "도 6B"는 세포 배양액을 동결 보관하였다가 해동한 후 트레할로오스를 첨가한 경우, "도 6C"는 트레할로오스를 첨가하지 않고 제조한 결과를 나타낸다. "도 6D"에는 도 6A 내지 도 6C 방법에 의하여 분리한 엑소좀의 상대적인 생산성(Relative productivity)과 상대 농도(Relative concentration)를 비교한 결과를 도시하였다. "도 6E"에는 도 6A 내지 도 6C 방법에 의하여 분리한 엑소좀의 평균 입자크기(Mean size)를 도시하였다.
- [51] 도 7은 인체 피부섬유아세포인 HS68 세포에 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소좀을 처리한 후 세포 독성이 없음을 확인한 결과를 도시한다.
- [52] 도 8은 PKH67로 염색된 엑소좀을 확인한 형광강도 측정 결과를 도시한다.
- [53] 도 9는 돼지 피부조직 내부로, 형광염색된 엑소좀이 전달된 정도를 확인한 형광현미경 이미지이다.
- [54] 도 10은 생쥐 피부조직 내부로, 형광염색된 엑소좀이 전달된 정도를 확인한

공초점형광현미경 이미지이다.

- [55] 도 11은 도 10의 각 이미지 상의 형광강도를 측정하여 얻은 총 형광강도를 비교하여 도시한 그래프이다.
- [56] 도 12는 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소솜 키트(100)의 구성을 나타내는 사시도이다.
- [57] 도 13은 본 발명의 엑소솜 키트를 사람 피부에 처리하고 처리 전후의 피부 상태를 비교하는 사진이다.
- [58] 도 14는 본 발명의 엑소솜 키트에 사용되는 엑소솜을 포함하는 조성물을 사람의 피부(환부)에 도포한 후 상기 조성물이 도포된 피부(환부)에 미세전류를 흘려주는 이온토포레시스를 수행한 결과, 피부(환부)의 홍반 등이 현저히 개선된 것을 보여주는 사진이다.
- [59] 도 15는 본 발명의 엑소솜 키트를 여드름 증상이 있는 사람의 얼굴에 처치하고 처치 전후의 피부 상태를 비교하는 사진이다.
- [60] 도 16a 내지 도 16i는 본 발명의 엑소솜 키트를 사람 피부에 처치한 경우, 피부주름 개선, 피부탄력 개선, 피부 보습 및 진피 치밀도가 개선된 결과를 도시한다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [61] 이하 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 기술한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아니다. 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다. 본 발명에 인용된 참고문헌들은 본 발명에 참고로서 통합된다.
- [62] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[63]

#### [64] 실시예

##### [65] 실시예 1: 세포의 배양

- [66] 인체 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast)인 HS68 세포는 ATCC에서 구입하여, 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum: ThermoFisher Scientific에서 구입) 및 1% 항생제-항진균제 (antibiotics-antimycotics: ThermoFisher Scientific에서 구입)가 함유된 DMEM (ThermoFisher Scientific에서 구입) 배지에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 계대 배양하였다.

- [67] 당해 발명이 속하는 기술분야에 알려진 세포배양 방법에 따라 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 지방 유래 줄기세포를 배양하였다. 그 다음, 인산염 완충용액(phosphate-buffered saline)(ThermoFisher Scientific에서 구입)으로 세척

후, 무혈청, 무페놀레드 배지로 교체하여 1일 내지 10일간 배양하고 그 상층액(이하, 배양액)을 회수하였다.

- [68] 엑소좀의 분리 과정에서 입자크기 분포가 균일하고 순도가 높은 엑소좀을 수득하기 위하여 배양액에 트레할로오스를 2 중량% 첨가하였다. 트레할로오스를 첨가한 후 배양액을 0.22  $\mu\text{m}$  필터로 여과하여 세포 잔해물, 노폐물 및 거대 입자 등의 불순물을 제거해 주었다. 여과된 배양액은 즉시 분리 과정을 통해 엑소좀을 분리하였다. 또한, 여과된 배양액은 냉장고(영상 10°C 이하)에서 보관한 후 엑소좀 분리에 사용하였다. 또한, 여과된 배양액은 -60°C 이하의 초저온 냉동고에서 동결 보관하였다가 해동시킨 후 엑소좀 분리를 수행하였다. 이후, 배양액으로부터 접선흐름여과장치(Tangential Flow Filtration; TFF)를 이용하여 엑소좀을 분리하였다.

[69]

[70] 실시예 2: TFF 방법에 의한 엑소좀의 분리 및 정제

- [71] 실시예 1에서 0.22  $\mu\text{m}$  필터로 여과된 배양액으로부터 엑소좀을 분리, 농축, 탈염과 버퍼교환(diafiltration)을 위해 TFF(Tangential Flow Filtration) 방법을 사용하였다. TFF 방법을 위한 필터로는 카트리리지 필터(cartridge filter, 일명 hollow fiber filter; GE Healthcare에서 구입) 또는 카세트 필터(cassette filter; Pall 또는 Sartorius 또는 Merck Millipore에서 구입)를 사용하였다. TFF 필터는 다양한 분자량 차단(molecular weight cutoff; MWCO)에 의해 선택될 수 있다. 선택된 MWCO에 의해 선별적으로 엑소좀을 분리, 농축하였고, MWCO보다 작은 입자나 단백질, 지질, 핵산, 저분자 화합물 등은 제거하였다.

- [72] 엑소좀을 분리, 농축하기 위하여 MWCO 100,000 Da(Dalton), 300,000 Da, 또는 500,000 Da의 TFF 필터를 사용하였다. 배양액을 TFF 방법을 이용하여 1/100 내지 1/25 정도의 부피가 될 때까지 농축하면서, MWCO보다 작은 물질들은 제거하여 엑소좀을 분리하였다.

- [73] 분리, 농축된 엑소좀 용액은 TFF 방법을 이용하여 추가로 탈염과 버퍼교환(diafiltration)을 수행하였다. 이때, 탈염과 버퍼교환은 연속적으로 수행(continuous diafiltration)하거나 단속적으로 수행(discontinuous diafiltration)하였으며, 시작 부피(starting volume)에 대하여 적어도 4배, 바람직하게는 6배 내지는 10배 이상, 보다 바람직하게는 12배 이상의 부피를 갖는 완충용액을 이용하여 수행하였다. 완충용액에는 입자크기 분포가 균일하고 순도가 높은 엑소좀을 수득하기 위하여 PBS에 녹인 2 중량%의 트레할로오스를 첨가하였다. 트레할로오스 처리에 따라 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 엑소좀을 높은 수율로 수득할 수 있는 효과를 확인한 결과는 도 6A 내지 도 6E에 도시하였다.

[74]

[75] 실시예 3: 분리된 엑소좀의 특성 분석

- [76] 분리된 엑소좀, 배양액, 및 TFF 분리과정의 분획물에서 단백질의 양은 BCA

발색법(ThermoFisher Scientific에서 구입) 또는 플루오로프로파일(FluoroProfile) 형광법(Sigma에서 구입)을 이용하여 측정하였다. 본 발명의 일 구체예의 TFF 방법에 의해 엑소솜이 분리, 농축되고 단백질, 지질, 핵산, 저분자 화합물 등이 제거되는 정도는 단백질 정량법에 의하여 모니터링하여 그 결과를 도 2에 도시하였다. 그 결과 본 발명의 일 구체예의 TFF 방법에 의하여 매우 효과적으로 배양액에 존재하는 단백질이 제거됨을 알 수 있었다.

- [77] 본 발명의 일 구체예의 TFF 방법에 의해 엑소솜을 분리하는 경우 생산성과 순도를 독립적인 다섯 배치에서 비교한 결과를 도 3에 도시하였다. 독립적인 다섯 배치로부터 얻어진 결과를 분석한 결과, 본 발명의 일 구체예의 TFF 방법에 의하여 매우 안정적으로 엑소솜을 분리할 수 있음을 확인하였다.
- [78] 분리된 엑소솜은 나노입자 트래킹 분석(nanoparticle tracking analysis: NTA; Malvern에서 구입) 또는 가변 저항펄스 감지(tunable resistive pulse sensing: TRPS; Izon Science에서 구입)에 의해 입자의 크기와 농도를 측정하였다. 분리된 엑소솜의 균일도와 크기는 투과전자현미경(transmitted electron microscopy: TEM)을 이용하여 분석하였다. 본 발명의 일 구체예에 따라 분리된 엑소솜의 TRPS, NTA, TEM 분석 결과는 도 4A 내지 도 4C에 도시하였다.
- [79] TFF 방법으로 엑소솜을 분리한 후, 트레할로오스의 첨가 여부에 따른 엑소솜의 크기 분포를 NTA 분석한 결과를 도 5A 내지 도 5C에 도시하였다. 트레할로오스 농도를 0 중량%, 1 중량% 및 2 중량%로 증가시켰고(도 5A 내지 도 5C의 위에서부터 아래), 3회 반복하여 실험하였다. 트레할로오스가 존재하지 않은 경우 300 nm 이상의 크기를 갖는 입자가 확인되는 반면, 트레할로오스의 첨가량을 늘려주면 300 nm 이상의 크기를 갖는 입자가 줄어들고 엑소솜의 크기 분포가 균일해지는 것을 확인하였다.
- [80] TFF 방법으로 엑소솜을 분리하는 과정에 트레할로오스의 첨가에 따른 효과를 추가로 조사하였다. 도 6A 내지 도 6C에서 보는 바와 같이 엑소솜의 제조과정 전과정에 PBS에 녹인 2 중량%의 트레할로오스를 첨가한 경우, 균일한 크기 분포를 갖는 엑소솜을 얻을 수 있었다(도 6A). 반면 트레할로오스를 첨가하지 않고 동결 보관하였던 배양액을 사용하되, 탈염과 버퍼교환 과정에서만 트레할로오스를 첨가하여 TFF 과정을 진행한 경우나, 트레할로오스를 전혀 첨가하지 않고 TFF 과정을 진행한 경우, 크기가 큰 입자가 많이 포함된 불균일한 엑소솜을 얻었다(도 6B 및 도 6C).
- [81] 분리된 엑소솜의 상대적인 생산성과 농도를 비교한 결과, 엑소솜의 제조과정 전과정에 트레할로오스를 첨가한 경우 매우 높은 생산성으로 엑소솜을 얻을 수 있었으며, 얻어진 엑소솜의 농도도 5배 이상 높았다(도 6D). NTA 분석 결과에서 나타난 바와 같이, 분리된 엑소솜의 평균 크기도 엑소솜의 제조과정 전과정에 트레할로오스를 첨가한 경우 200 nm로 균일하게 확인되었다(도 6E).
- [82] 도 4D는 본 발명의 일 구체예의 방법에 따라 분리된 엑소솜에 대해 웨스턴 블랏을 수행한 결과로서, CD9, CD63, CD81 및 TSG101 마커의 존재를

확인하였다. 각 마커에 대한 항체로는 각각 항-CD9 (Abcam에서 구입), 항-CD63 (System Biosciences에서 구입), 항-CD81 (System Biosciences에서 구입), 및 항-TSG101 (Abcam에서 구입)을 사용하였다.

[83] 도 4E는 본 발명의 일 구체예의 방법에 따라 분리된 엑소솜에 대해 유세포분석기를 이용하여 분석한 결과로서 CD63 및 CD81 마커의 존재를 확인하였다. CD63에 대해 양성(positive)인 엑소솜을 분리하기 위하여 엑소솜-휴먼 CD63 분리/검출 키트(ThermoFisher Scientific에서 구입)를 제조사의 방법에 따라 사용하였고, PE-마우스 항-인간 CD63 (PE-Mouse anti-human CD63)(BD에서 구입) 및 PE-마우스 항-인간 CD81 (PE-mouse anti-human CD81)(BD에서 구입)을 사용하여 마커를 염색한 후, 유세포분석기 (ACEA Biosciences)를 이용하여 분석하였다.

[84] 한편, 본 발명에서 사용되는 엑소솜은 전술한 바와 같은 실시예들의 엑소솜에 제한되는 것이 아니며, 당업계에서 사용되고 있거나 향후 사용될 수 있는 다양한 엑소솜을 사용할 수 있음은 물론이다. 상기 실시예들에 따라 분리된 엑소솜은 본 발명에서 사용될 수 있는 엑소솜의 일례로서 이해되어야 하며, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아님을 명백히 밝혀 둔다.

[85]

[86] **실시예 4: 엑소솜 처리에 따른 세포 독성 측정**

[87] 인체 피부 섬유아세포인 HS68 세포에서 본 발명의 일 구체예의 분리 방법에 따라 수득된 엑소솜의 독성을 평가하기 위해 세포에 농도별로 엑소솜을 처리하고 세포의 증식률을 확인하였다. HS68 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 80 내지 90%의 밀집도(confluency)를 갖도록 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배양액을 제거하고 실시예 2에서 준비된 엑소솜을 농도 별로 처리하여 24 내지 72시간 동안 배양하면서 세포 생존율을 평가하였다. 세포 생존율을 WST-1 시약(WST-1 reagent)(Takara에서 구입), MTT 시약(Sigma에서 구입), 셀타이터-글로 시약(CellTiter-Glo reagent)(Promega에서 구입), 또는 아라마르 블루 시약(AlamarBlue reagent)(ThermoFisher Scientific에서 구입)과 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Molecular Devices에서 구입)를 이용하여 측정하였다.

[88] 비교군은 엑소솜이 처리되지 않은 일반 세포배양배지에서 배양된 세포수를 기준으로 하였고, 시험된 농도 범위 내에서 엑소솜에 의한 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다(도 7).

[89]

[90] **실시예 5: 형광염색된 엑소솜의 제조**

[91] 형광염색된 엑소솜을 제조하기 위하여 PKH67 염료(Sigma에서 구입)를 사용하였다. 1 mM의 PKH67을 Diluent C (Sigma에서 구입)에 희석하여 10 µM의 PKH67 용액을 제조한 후, 적정 농도의 엑소솜 용액과 혼합하여 상온에서 빛을 차단한 상태로 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, PKH67로 염색된

엑소솜(이하, "PKH-엑소솜"으로 약칭)으로부터 잔여 PKH67 염료를 제거하기 위하여 MW3000 스핀 컬럼(ThermoFisher Scientific에서 구입)을 사용하였다. 형광측정기(Molecular Devices에서 구입)를 이용하여 확인한 결과, 엑소솜과 반응하지 않은 PKH67을 제거한 후 PKH-엑소솜에서 충분한 강도의 형광이 검출됨을 확인하였다(도 8).

[92]

[93] 실시예 6: 본 발명의 엑소솜 키트에 사용되는 엑소솜의 피부 투과 능력 시험

[94] PKH-엑소솜을 적정 농도, 예를 들어  $1 \times 10^5$  입자/mL 내지  $1 \times 10^9$  입자/mL 농도로 인산완충용액(PBS)에 분산시킨 후, 돼지 피부 바깥면에 도포하였다. 도포된 PKH-엑소솜의 건조를 막기 위하여 부직포를 덮어 준 후 적정 시간, 예를 들어 30분 내지 1시간 동안 반응시켜 PKH-엑소솜이 피하 조직에 전달되도록 하였다. 또한, PKH-엑소솜을 돼지 피부 바깥면에 도포하고 부직포를 덮어 준 후, 일정 시간, 예를 들어 30분 내지 1시간 동안 미세 전류를 흘려주었다. 반응이 종료된 후, 돼지 피부조직을 3.7% 포름알데히드 용액에 담궈 하룻밤 동안 반응시키고, 인산완충용액으로 5분씩 3회 세척하였다. 세척된 돼지 피부조직을 30% 수크로오스 용액에 담가 처리한 후, OCT 화합물을 처리하였다. 다시 인산완충용액으로 5분씩 3회 세척한 후, 마이크로톰을 이용하여 종단면으로 절편을 제작하여 슬라이드글라스 위에 조직 절편을 위치시켰다. 한편 조직 절편의 제작은 포름알데히드 용액으로 조직을 고정하기 전에 진행할 수도 있다. 조직 절편에서 PKH-엑소솜으로부터 검출되는 형광은 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 이상의 방법으로 돼지 피부조직의 표피를 투과하여 피하 조직으로 전달된 PKH-엑소솜을 확인하였다. 그 결과, 미세 전류를 흘려주는 경우(active transdermal delivery), 엑소솜이 표피를 보다 효과적으로 통과하여 피부조직 내부로 깊숙이 전달되었고, 피부에 대해 보다 효과적으로 흡수되는 것을 확인할 수 있었다(도 9 참조). 도 9에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 엑소솜 키트에 사용되는 엑소솜은 표피를 효과적으로 통과하여 피부조직 내부로 깊숙이 전달될 수 있고, 피부에 대해 효과적으로 흡수될 수 있다.

[95] 다음으로, 헤어리스 마우스의 피부조직을 적출하여 프란츠 확산셀(Franz Diffusion Cell)의 챔버 위쪽에 위치시켰다. 이때, 확산셀의 내부는 인산완충용액으로 채워주었다. PKH-엑소솜을 적정 농도, 예를 들어  $1 \times 10^5$  입자/mL 내지  $1 \times 10^9$  입자/mL 농도로 인산완충용액(PBS)에 분산시킨 후, 생쥐의 피부조직 바깥쪽에 도포하였다. 이때, PKH-엑소솜의 건조를 막기 위하여 부직포를 생쥐 피부조직 바깥쪽에 미리 위치시키고, 부직포와 피부조직 사이에 PKH-엑소솜을 주입하였다. 그 후 30분 내지 1시간 동안 반응시켰다. 또한, PKH-엑소솜을 부직포와 피부조직 사이에 주입한 후, 일정 시간, 예를 들어 30분 내지 1시간 동안 미세 전류를 흘려주었다. 반응이 끝난 후, 즉시 공초점형광현미경(Leica, SP8X)을 이용하여 피부조직 내부로 전달된 PKH-엑소솜을 확인하거나, 1시간 내지 6시간 동안 피부조직과 PKH-엑소솜

용액을 추가로 반응시킨 후, 공초점형광현미경으로 PKH-엑소좀을 확인하였다. 그 결과, 미세 전류를 흘려주는 경우(active transdermal delivery), 엑소좀이 표피를 보다 효과적으로 통과하여 피부조직 내부로 깊숙이 전달되었고, 피부에 대해 보다 효과적으로 흡수되는 것을 확인할 수 있었다(도 10 및 도 11).

[96]

[97] 실시예 7: 사람 피부에 대한 엑소좀 키트의 처치

[98] 도 12에 도시된 바와 같이, 본 발명의 일 구체예에 따른 엑소좀 키트(100)는 액상 침적 시트 마스크(10)(실시예 2에서 준비된 엑소좀을 함유하는 조성물이 도포되거나 침적된 흰색 시트 마스크)와 이온토포레시스 디바이스인 경피투과 촉진 시트 마스크(은색 시트 마스크)(20)로 구성되어 있다. 액상 침적 시트 마스크(10)의 표면 내지는 내부에는 엑소좀(12)이 도포되거나 침적되어 있다. 또한, 경피투과 촉진 시트 마스크(20)에는 미세전류를 발생시키는 전지(22)가 장착되어 있고, 이러한 전지(22)와 전기적으로 연결되어 있는 도전성 패턴(24)이 경피투과 촉진 시트 마스크(20) 상에 형성되어 전지(22)로부터 발생된 미세전류를 경피투과 촉진 시트 마스크(20) 전반에 골고루 전달할 수 있다. 도전성 패턴(24)은 금, 은, 또는 구리 등의 도전성 금속이 프린팅되거나 도금(plating)되어 형성된다.

[99] 상기와 같은 구성을 갖는 "엑소좀 키트(100)"를 홍조 증상과 피부 트러블이 심한 사람(이하, "case 1"이라 함)의 얼굴에 1회 적용하여 피부 트러블과 홍조 증상이 완화 내지는 개선되는지를 평가하였다. 또한, 본 발명의 엑소좀 키트(100)를 홍조 증상이 있는 사람(이하, "case 2"라 함)의 얼굴에 1회 적용하여 전체적인 피부톤과 홍조 증상이 개선되는지를 평가하였다.  $5 \times 10^5$  입자의 엑소좀(12)이 포함된 액상 침적 시트 마스크(10)를 눈과 입 부분에 맞추어 case 1 및 2의 얼굴 전체에 고르게 밀착시킨 다음, 약 0.3~0.4 mA의 미세 전류가 흐르도록 액티베이션된 경피투과 촉진 시트 마스크(20)를 액상 침적 시트 마스크(10) 위에 적층시켜 25~30분 정도 사용하였다.

[100] 그 결과, 엑소좀(12)을  $5 \times 10^5$  입자/마스크의 농도로 함유하는 액상 침적 시트 마스크(10)와 경피투과 촉진 시트 마스크(20)로 구성된 "엑소좀 키트(100)"의 한번의 사용만으로 "case 1"에서 홍조 및 피부 트러블이 현저히 개선되었고(도 13의 case 1 참조), "case 2"에서도 전체적인 피부톤이 개선되었으며 홍조가 완화되었다(도 13의 case 2 참조). 따라서, 엑소좀을 유효성분으로 함유하는 조성물이 침적된 액상 침적 시트 마스크(10)와 경피투과 촉진 시트 마스크(이온토포레시스 디바이스)(20)로 구성된 본 발명의 엑소좀 키트(100)는 홍조 증상 및 피부트러블을 예방, 억제, 완화 내지는 개선시키는 피부미용 효과 내지는 피부질환 치료 효과가 있다고 할 수 있다.

[101] 또한, 실시예 2에서 준비된 엑소좀을  $0.29 \times 10^8$  입자/mL의 농도로 함유하는 조성물(엑소좀 현탁액)을, 가려움증을 호소하는 중증 아토피 환자 3인의 환부(손, 목, 팔 등)에 도포한 후 이온토포레시스 장비(IONZYME DF

MACHINE)(Environ에서 구입)를 사용하여 상기 조성물이 도포된 환부에 20분 동안 0.4 mA의 미세전류를 흘려주는 이온토포레시스를 수행하였다. 상기와 같은 처치를 2주 동안 주3회에 걸쳐 시행한 결과, 환자들의 극심한 가려움증이 현저히 완화되었고, 홍반 증상 역시 현저히 개선되었다(도 14). 엑소솜을 함유하는 조성물을 적용한 환자들 모두 극심한 가려움증과 홍반이 완화되어 스테로이드나 항히스타민 제제의 처방을 중단해도 될 정도로 증상이 개선되었다.

[102] 따라서, 본 발명의 엑소솜 키트(100)는 상기와 같은 임상시험을 통해 확인되는 바와 같이 피부 가려움증 및 홍반을 예방, 억제, 완화 내지는 개선시키는 피부미용 효과 내지는 피부질환 치료 효과가 있다고 할 수 있다.

[103]

[104] 실시예 8: 여드름 증상을 갖는 실험대상자의 안면에 대한 엑소솜 키트의 처리

[105] 실시예 7에서 설명된 "엑소솜 키트"를 여드름 증상이 있는 사람의 얼굴에 4일에 한번씩 총 4회 적용하여 여드름 증상 및 이와 관련된 피부 트러블이 완화 내지는 개선되는지를 평가하였다.  $5 \times 10^5$  입자의 엑소솜(12)이 포함된 액상 침적 시트 마스크(10)를 눈과 입 부분에 맞추어 여드름 증상이 있는 사람의 얼굴 전체에 고르게 밀착시킨 다음, 약 0.3~0.4 mA의 미세 전류가 흐르도록 액티베이션된 경피투과 촉진 시트 마스크(20)를 액상 침적 시트 마스크(10) 위에 적층시켜 25~30분 정도 사용하였다.

[106] 그 결과, 본 발명의 엑소솜 키트(100)의 사용에 의해 염증 부위가 사라졌고 뾰루지가 발생하지 않았으며, 피부가 부드럽고 매끄럽게 되었으며 피부톤이 깨끗하게 되었다(도 15 참조).

[107] 따라서, 본 발명의 엑소솜 키트(100)는 여드름 증상 및 이와 관련된 피부트러블을 예방, 억제, 완화 내지는 개선시키는 피부미용 효과 내지는 피부질환 치료 효과가 있다고 할 수 있다.

[108]

[109] 실시예 9: 사람 피부에 대한 주름개선, 탄력개선, 보습 효과 등의 시험

[110] 주름이 있는 여성으로서 피부 질환을 포함하는 급·만성 신체 질환이 없는 건강한 여성 20명(만 35~59세)에 대해, 실시예 2에서 준비된 엑소솜을  $1 \times 10^7$  입자/mL의 농도로 함유하는 앰플(반투명 유액상)과 본 발명의 엑소솜 키트(100)를 3일에 한번 저녁에 사용하여 피부주름 개선, 피부탄력 개선, 보습, 피부재생 효과 등의 피부미용 효과를 시험하였다.

[111] 세안 후 상기 앰플의 내용물을 얼굴에 골고루 바르고 액상 침적 시트 마스크(10)를 눈과 입 부분에 맞추어 얼굴 전체에 고르게 밀착시킨 다음, 약 0.3~0.4 mA의 미세 전류가 흐르도록 액티베이션된 경피투과 촉진 시트 마스크(20)를 액상 침적 시트 마스크(10) 위에 적층시켜 25~30분 정도 사용하였다.

[112] 상기 앰플 및 본 발명의 엑소솜 키트(100)의 사용 전, 사용 2주 후, 사용 4주

후에, 눈가 주름개선, 팔자 주름개선, 입가주름 개선을, 프리모스 프리미엄(Primos Premium) 및 프리모스 라이트(Primos Lite)(GM Messtechnik GmbH, Germany) 촬영 및 이미지프로 Ra(Average Roughness) 값 분석을 통해 평가하였다. Ra는 주름 프로파일의 평균 거칠기(Average Roughness)를 의미하며, 값이 감소할수록 주름이 개선된다고 볼 수 있다.

[113] 또한, 상기 앰플 및 본 발명의 엑소좀 키트(100)의 사용 전, 사용 2주 후, 사용 4주 후에, 피부 보습 개선을 수분측정기(Corneometer CM825)(Courage-Khazaka electronic GmbH, Germany)로 수분량을 측정하여 평가하였고, 피부 탄력 개선은 쿠토미터 CM580(Cutometer CM580)(Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)으로 음압을 측정하여 평가하였다. 상기 앰플 및 본 발명의 엑소좀 키트(100)의 사용 전, 사용 2주 후, 사용 4주 후에, 눈꼬리 리프팅 개선, 볼 리프팅 개선, 입꼬리 리프팅 개선은 F-ray 등고선 촬영 및 각도 분석을 통하여 평가하였고, 진피 치밀도 개선은 눈가에서 스킨 스캐너(Skin Scanner) 초음파 촬영 후 밀도(Density)(%)분석을 통해 평가하였다.

[114] 본 발명의 엑소좀 키트(100)의 사용 전후에 있어서 상기 각 시험 항목을 평가한 결과, 사용 전과 비교하여 사용 2주 후, 사용 4주 후에 모든 시험 항목에서 유의적인 개선 효과가 얻어졌다(도 16a ~ 도 16i 참조). 또한, 본 발명의 엑소좀 키트(100) 사용에 의한 임상에서의 유의적인 개선 효과를 노안 완화, 피부 보습 및/또는 리프팅 개선을 위한 다른 처치들의 평균 결과에 대비한 결과, 피부수분 함유량과 입꼬리 리프팅은 매우 좋은 것으로 확인되었고, 팔자주름, 피부탄력, 눈꼬리 리프팅 및 볼리프팅도 우수한 것으로 확인되었다(하기 표 1 참조).

[115] [표1]

다른 임상 처치들의 평균결과와 대비

시험항목	4주후(%)	평균(%)	평균대비
눈가주름	-5.647	-7~-5	평균
팔자주름	-7.415	-5	좋음
입가주름	-6.694	-7	평균
피부수분함유량	21.383	10	매우좋음
피부탄력	9.291	5-6	좋음
눈꼬리리프팅	16.342	10	좋음
볼리프팅	-12.053	-10	좋음
입꼬리리프팅	22.851	10	매우좋음
진피치밀도	19.715	15-20	평균

[116] 시험 종료 후 유효성 설문조사(Global Assessment of Efficacy)를 실시하였다. 시험대상자가 본 발명의 엑소좀 키트(100) 사용 후 상기 시험 항목들에 대하여

아주 좋음(4), 좋음(3), 보통(2), 나쁨(1), 아주 나쁨(0)의 5단계로 설문조사에 답하도록 하였다. 실시한 설문조사에서 각 시험항목 별로 설문 값의 평균값과 표준편차 및 답변에 대한 시험대상자 수의 백분율을 구하였다. 본 발명의 엑소좀 키트(100)의 사용에 대한 설문조사 결과, 모든 시험항목에 대하여 시험대상자의 100%가 보통이상으로 평가하였다. 또한, 시험 종료 후 본 발명의 엑소좀 키트(100) 사용감에 대한 설문조사에 대하여 시험대상자가 답하도록 하였다. 시험대상자가 피부 촉촉함, 매끄러움, 발림성, 흡수성, 향, 전반적 사용감에 대하여 아주 좋음(4), 좋음(3), 보통(2), 나쁨(1), 아주 나쁨(0)의 5단계로 평가하도록 하였다. 평가항목 별로 설문 값의 평균값과 표준편차 및 답변에 대한 시험대상자 수의 백분율을 구하였다. 본 발명의 엑소좀 키트(100)의 사용에 대한 설문평가 결과, 모든 평가항목에 대하여 시험대상자의 100%가 보통이상으로 평가하였다.

- [117] 한편, 시험대상자가 본 발명의 엑소좀 키트(100)를 사용하는 기간 동안 특별한 피부 이상반응에 대한 보고는 없었으며, 피부과 전문의에 의한 이학적 검사 상에도 이상소견은 관찰되지 않았다.
- [118] 따라서, 본 발명의 엑소좀 키트(100)는 상기와 같은 임상시험을 통해 확인되는 바와 같이 피부주름 개선, 피부탄력의 개선, 피부 재생 및 피부 보습 효과 등의 피부 미용 효과가 우수한 것을 알 수 있다.
- [119] 이상, 본 발명을 상기 실시예를 들어 설명하였으나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니다. 당업자라면 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수정, 변경을 할 수 있으며 이러한 수정과 변경 또한 본 발명에 속하는 것임을 알 수 있을 것이다.

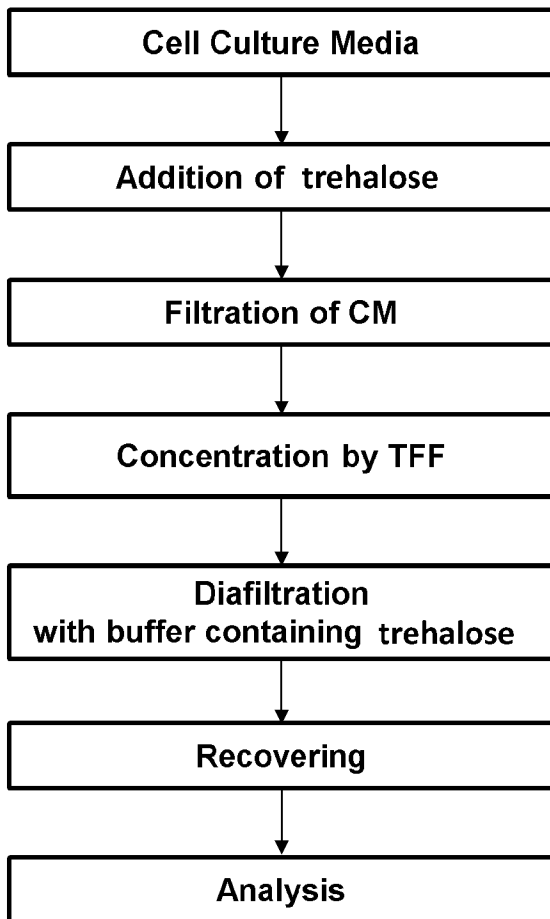
## 청구범위

- [청구항 1] 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물이 도포되거나 침적된 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취와,  
상기 조성물이 적용된 포유동물의 피부에 미세전류를 흘려 주는 이온토포레시스 디바이스를 포함하는, 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취를 포유동물의 피부 위에 접촉 또는 부착시키고, 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취 위에 상기 이온토포레시스 디바이스를 위치시킴으로써, 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취가 접촉 또는 부착되어 상기 조성물이 적용된 포유동물의 피부에 미세전류를 흘려 주는 것을 특징으로 하는, 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서,  
상기 이온토포레시스 디바이스는 가요성 배터리, 리튬이온 이차 전지, 알칼리 전지, 건전지, 수은 전지, 리튬 전지, 니켈-카드뮴 전지, 및 역전기 투석 전지로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 1종의 전지를 포함하거나, 상기 적어도 1종의 전지가 장착된 제2 마스크팩, 마스크시트 또는 패취인, 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,  
상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취 위에 상기 제2 마스크팩, 마스크시트 또는 패취가 적층되어 사용되는 것을 특징으로 하는, 엑소좀의 경피 투과 증진을 위한 엑소좀 키트.
- [청구항 5] (a) 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물이 도포되거나 침적된 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취를 포유동물의 피부 위에 접촉 또는 부착하는 단계와,  
(b) 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취 위에 이온토포레시스 디바이스를 위치시키는 단계와,  
(c) 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취가 접촉 또는 부착되어 상기 조성물이 적용된 포유동물의 피부에 미세전류를 흘려 주는 이온토포레시스를 수행하는 단계와,  
(d) 상기 미세전류를 통하여 상기 엑소좀을 포유동물 피부 내부로 전달하는 단계를 포함하는, 엑소좀의 경피 투과 증진 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,  
상기 이온토포레시스 디바이스는 가요성 배터리, 리튬이온 이차 전지, 알칼리 전지, 건전지, 수은 전지, 리튬 전지, 니켈-카드뮴 전지, 및 역전기 투석 전지로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 1종의 전지를 포함하거나,

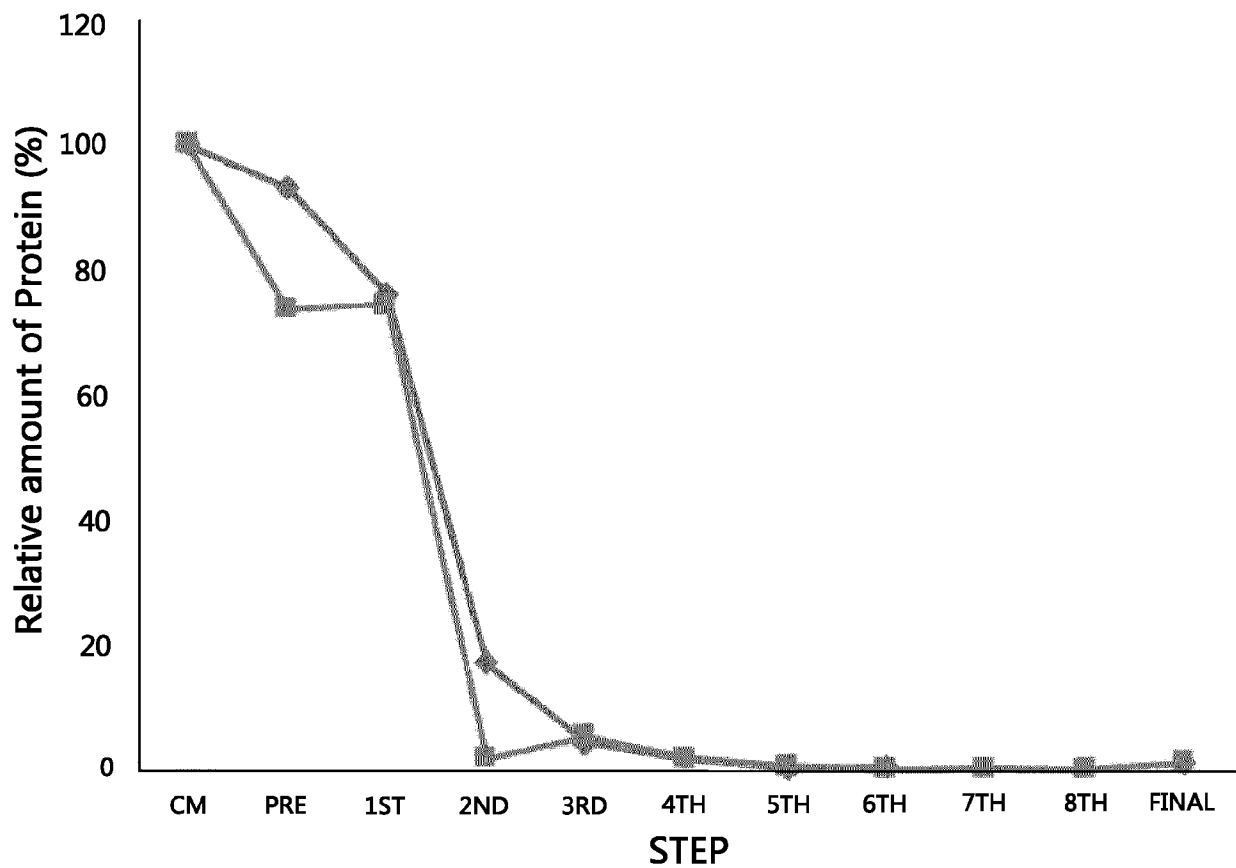
상기 적어도 1종의 전지가 장착된 제2 마스크팩, 마스크시트 또는 패취인, 엑소솜의 경피 투과 증진 방법.

- [청구항 7] 제6항에 있어서,  
 상기 (b) 단계는 상기 제1 마스크팩, 마스크시트 또는 패취 위에 상기 제2 마스크팩, 마스크시트 또는 패취를 적층하여 수행되는, 엑소솜의 경피 투과 증진 방법.
- [청구항 8] (a) 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 엑소솜의 경피 투과 증진 방법을 수행하는 단계와, (b) 상기 (a) 단계를 통해 피부 상태를 개선시키는 단계를 포함하는, 치료용을 제외한 포유동물 피부의 상태를 조절하는 미용방법.
- [청구항 9] (a) 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 엑소솜의 경피 투과 증진 방법을 수행하는 단계와,  
 (b) 상기 (a) 단계를 통해 피부질환의 병적상태를 완화, 개선 내지는 정상상태로 회복시켜 주는 단계를 포함하는, 피부질환 치료방법.

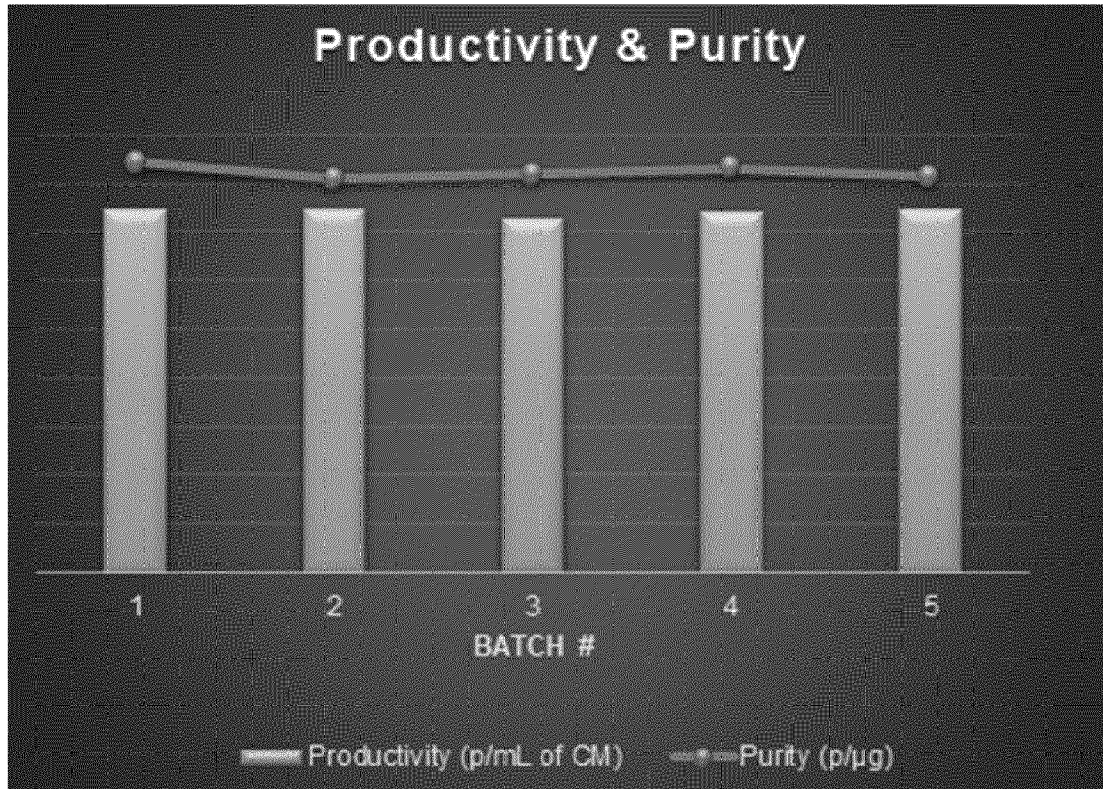
[도1]



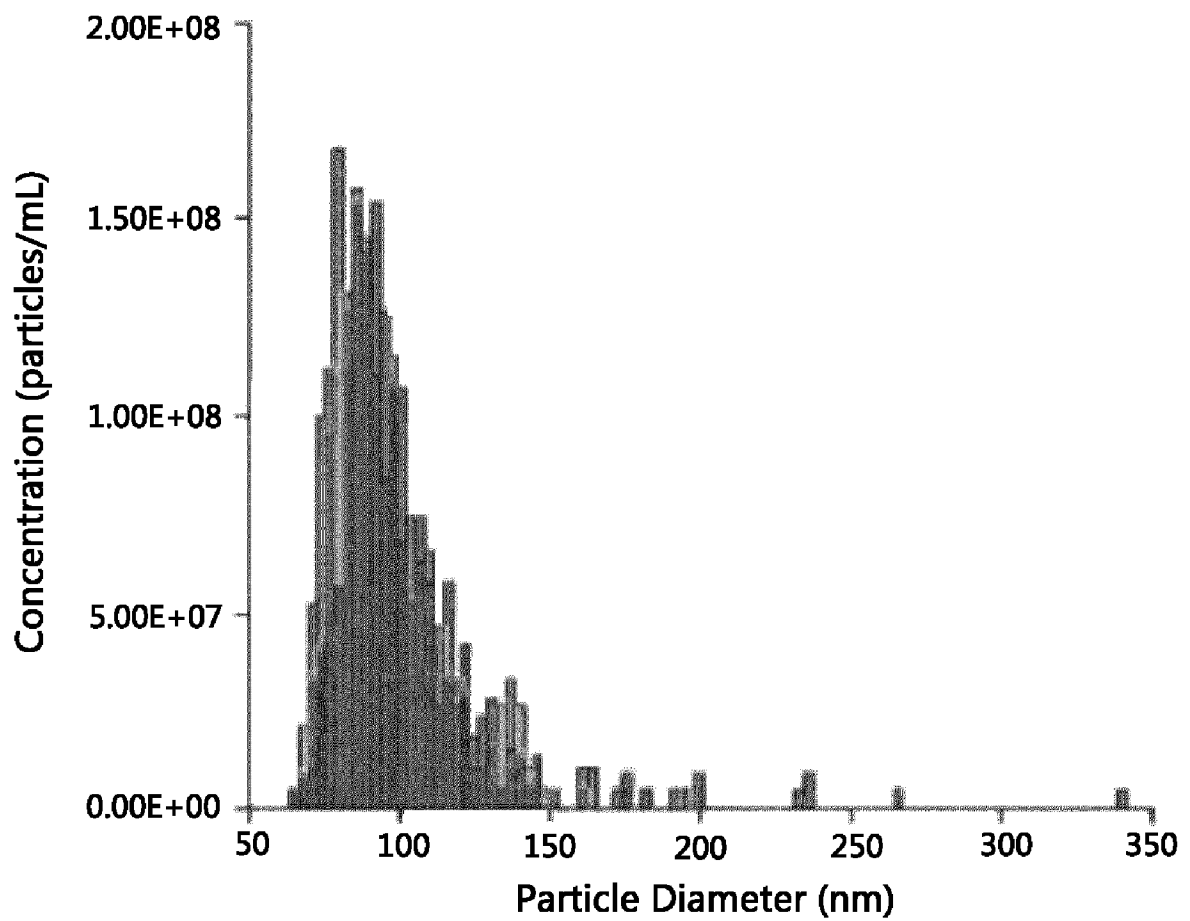
[도2]



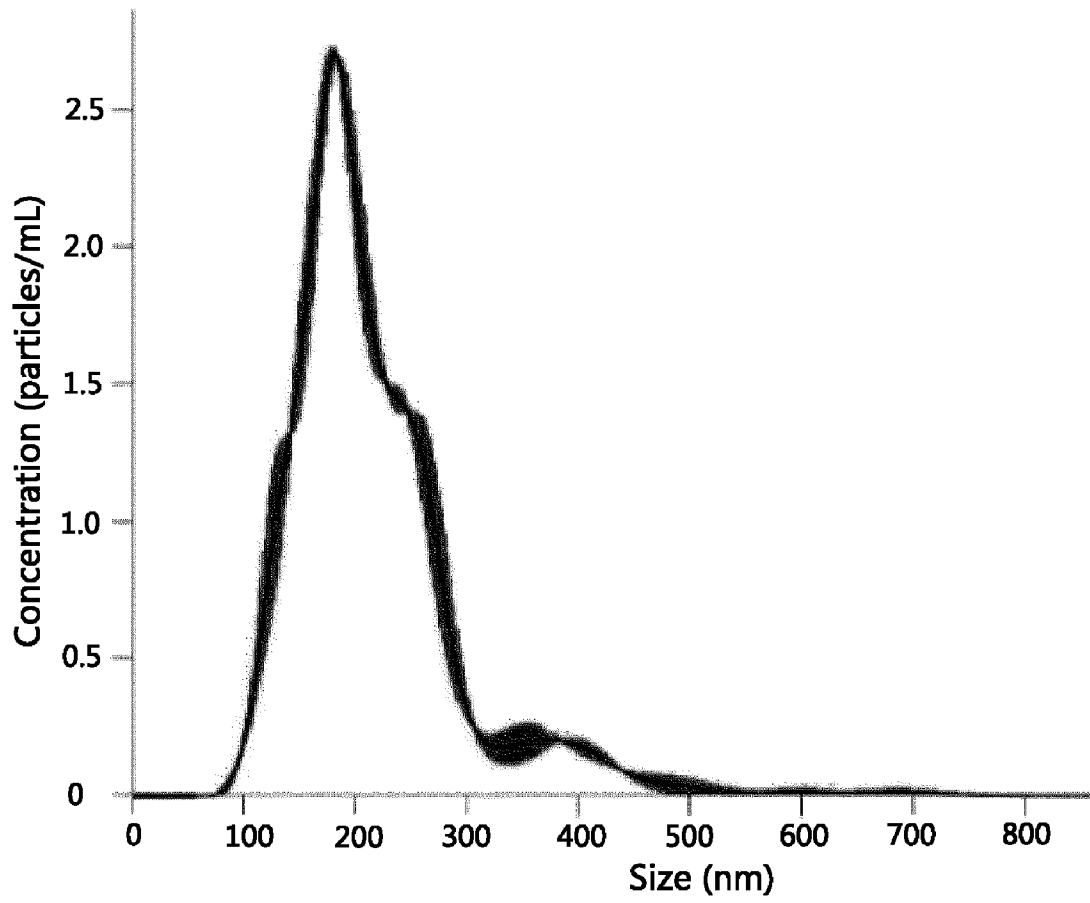
[도3]



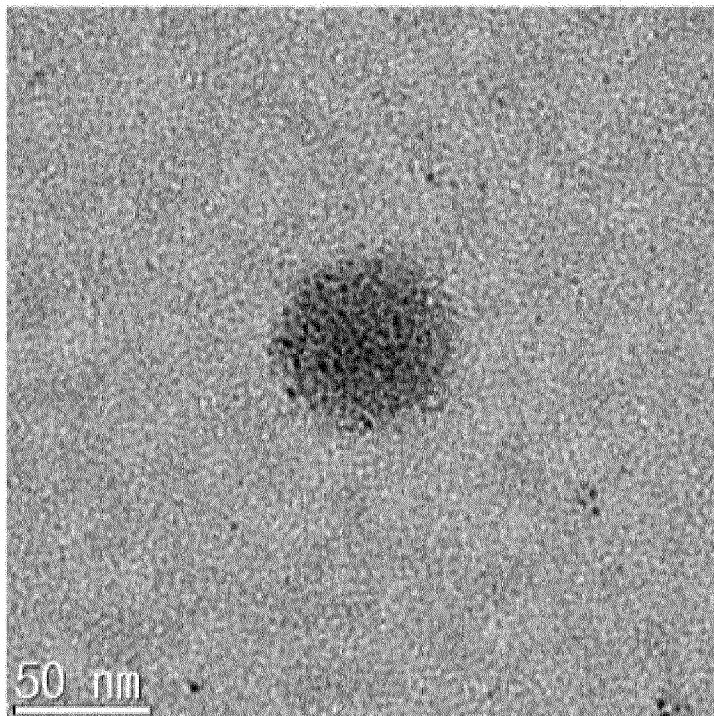
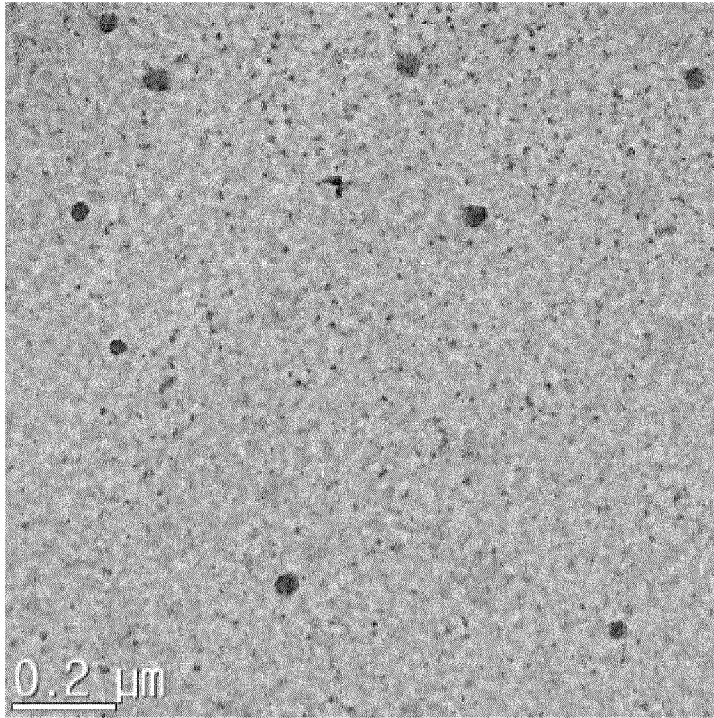
[도4a]



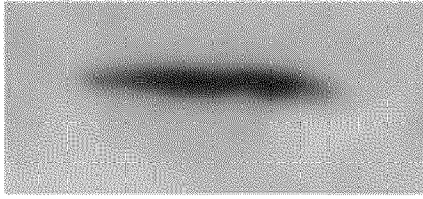
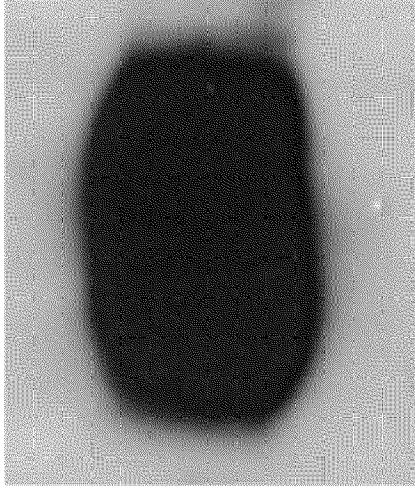
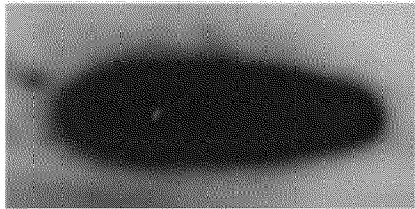
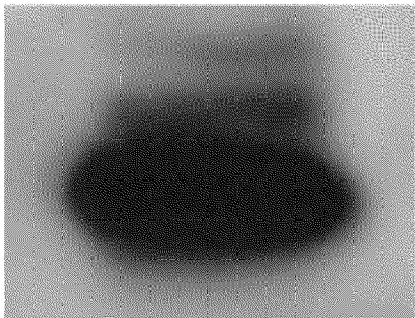
[도4b]



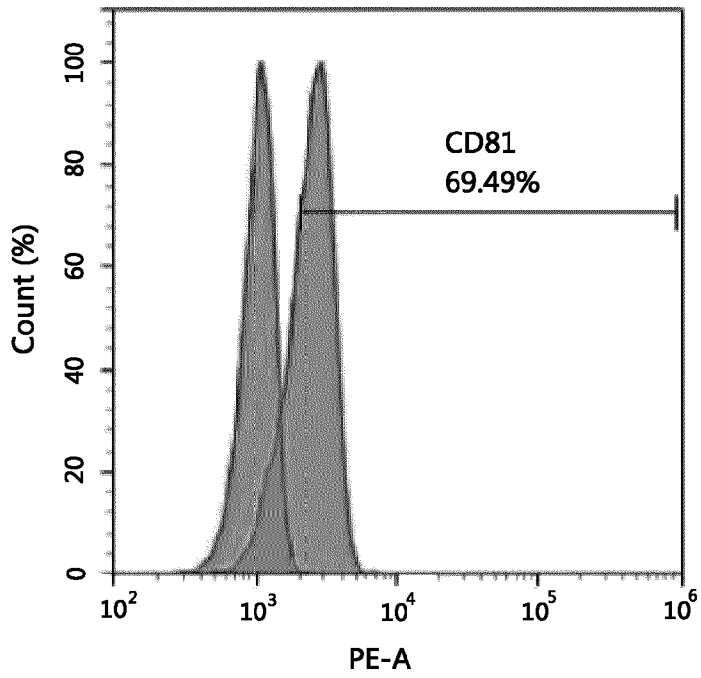
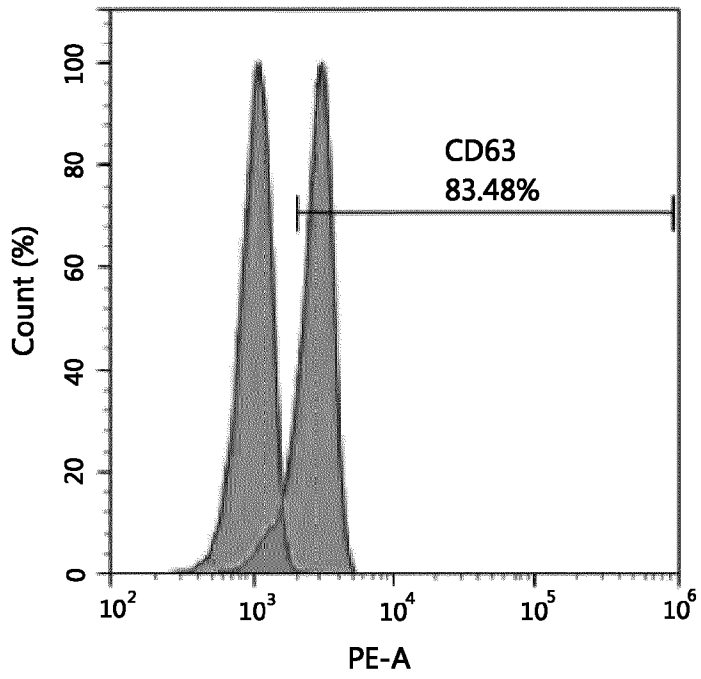
[도4c]



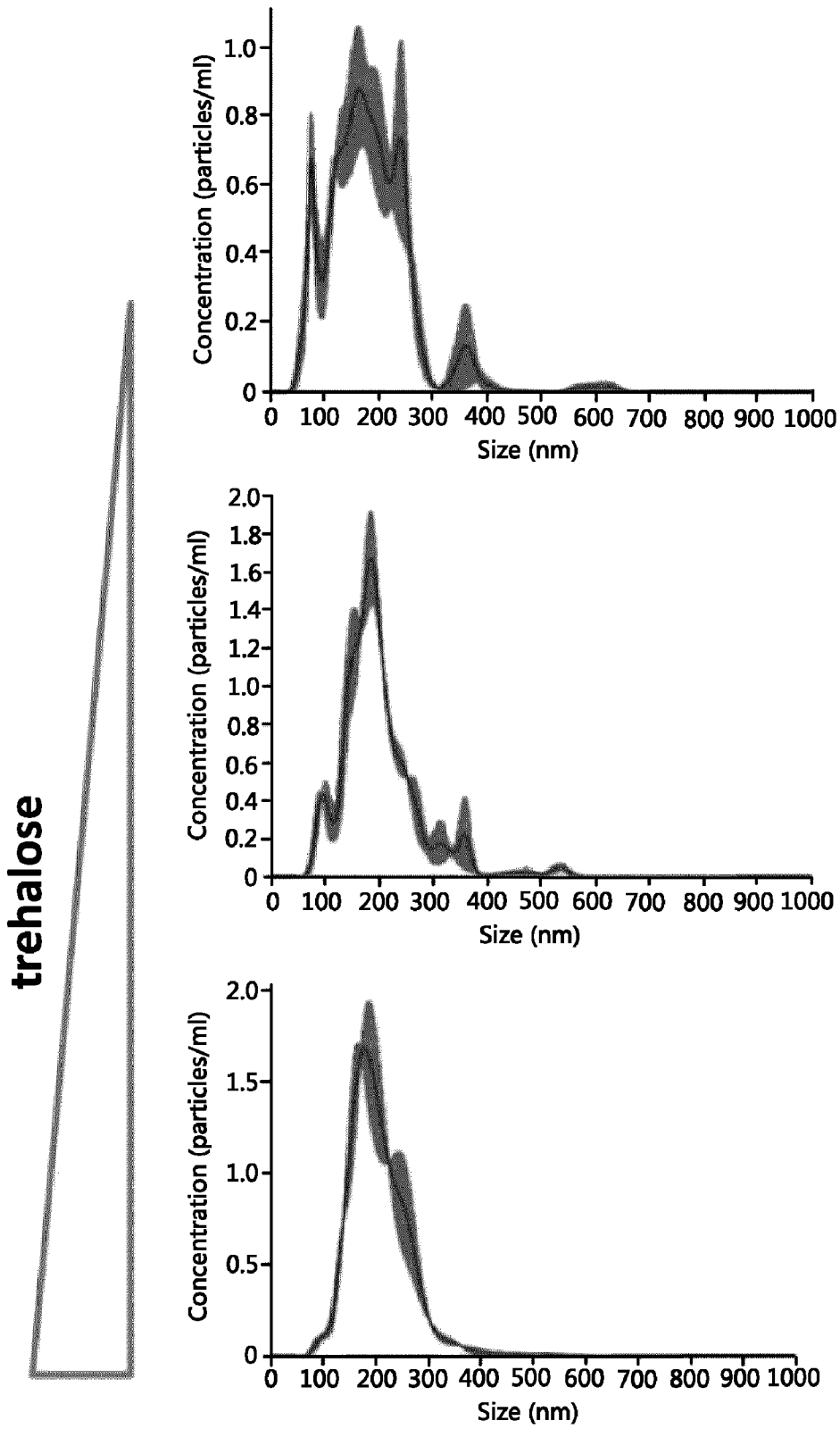
[도4d]

**CD9****CD63****CD81****TSG101**

[도4e]

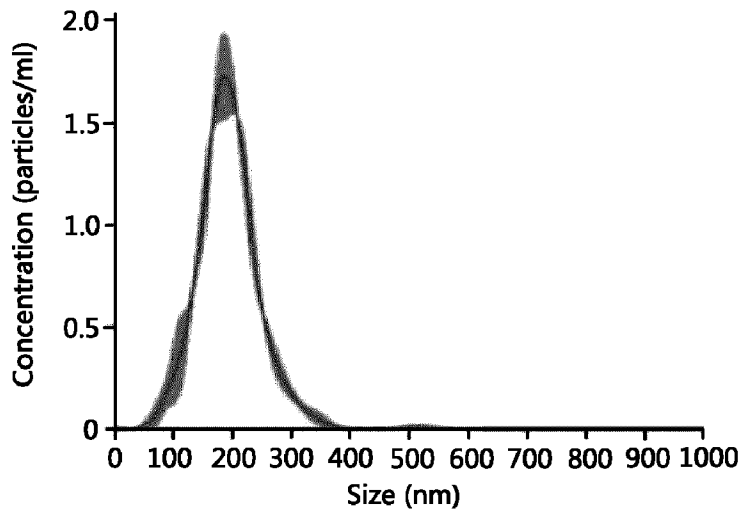
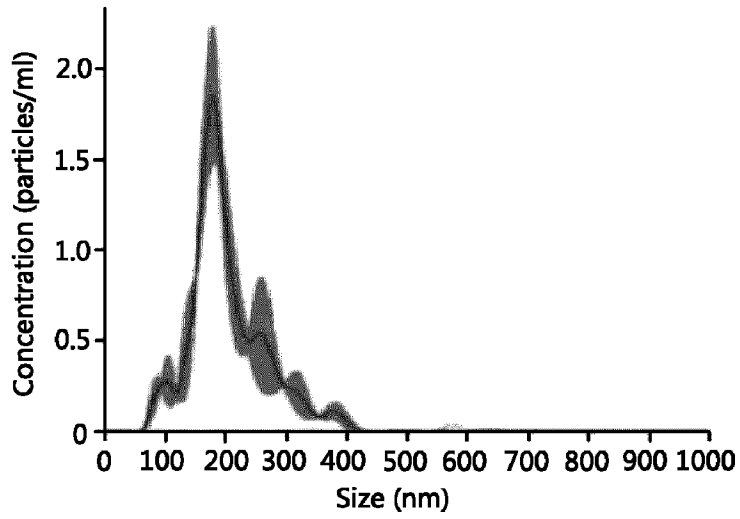
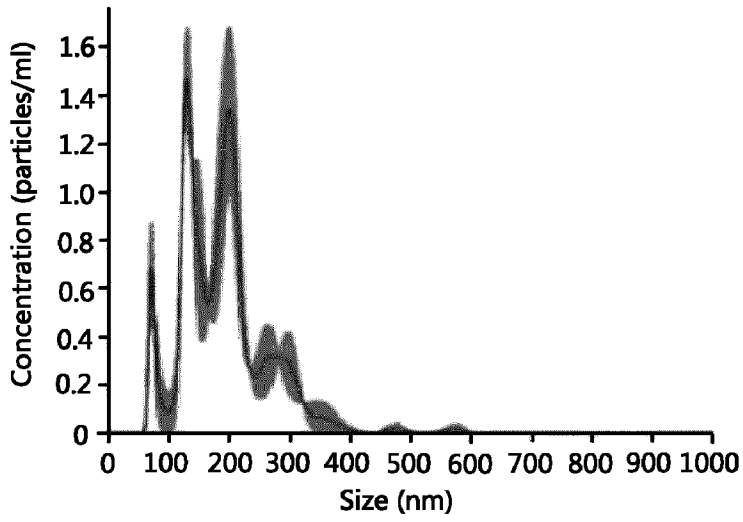


[도5a]



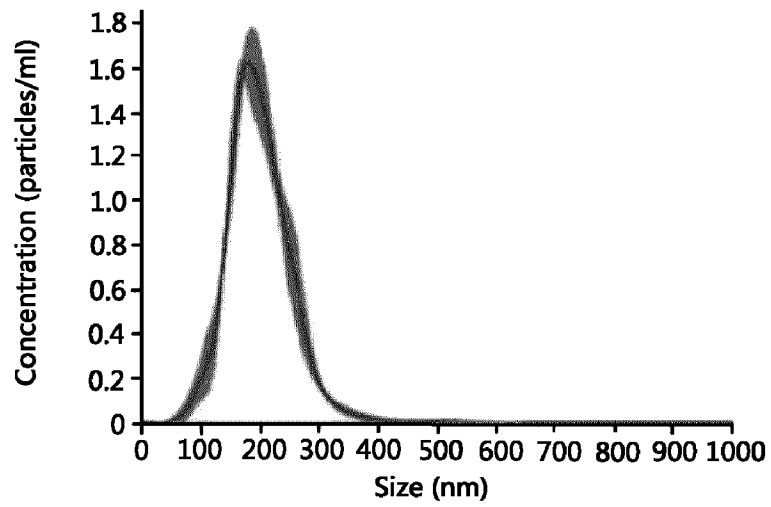
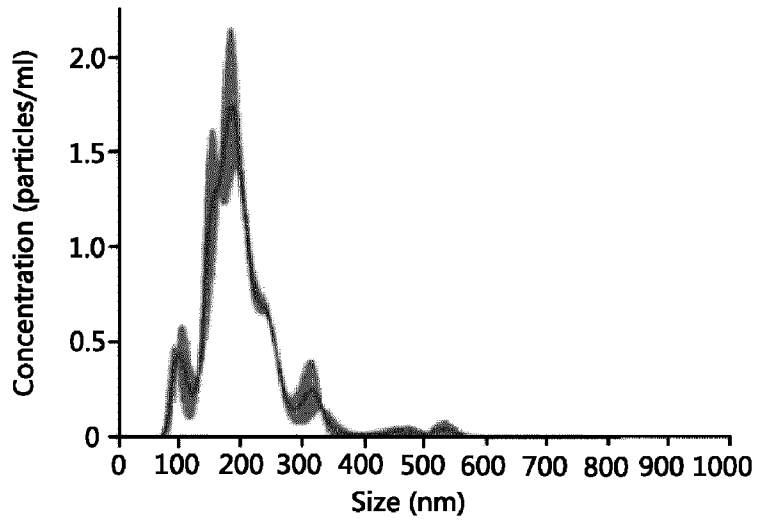
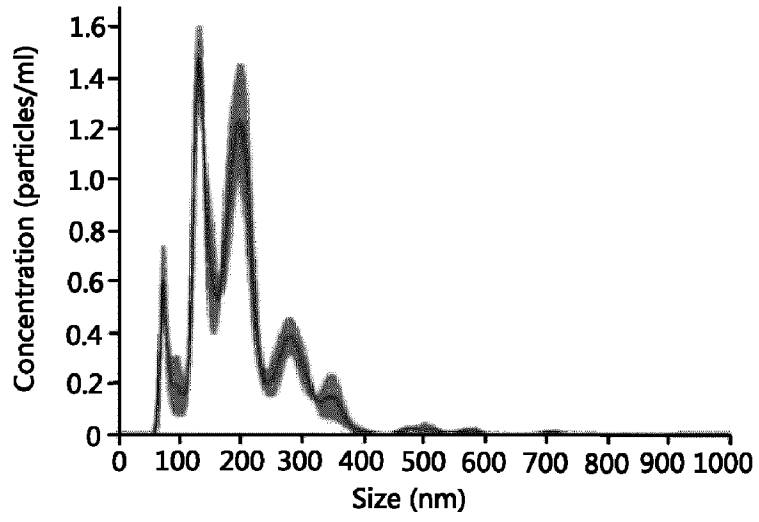
[도5b]

trehalose

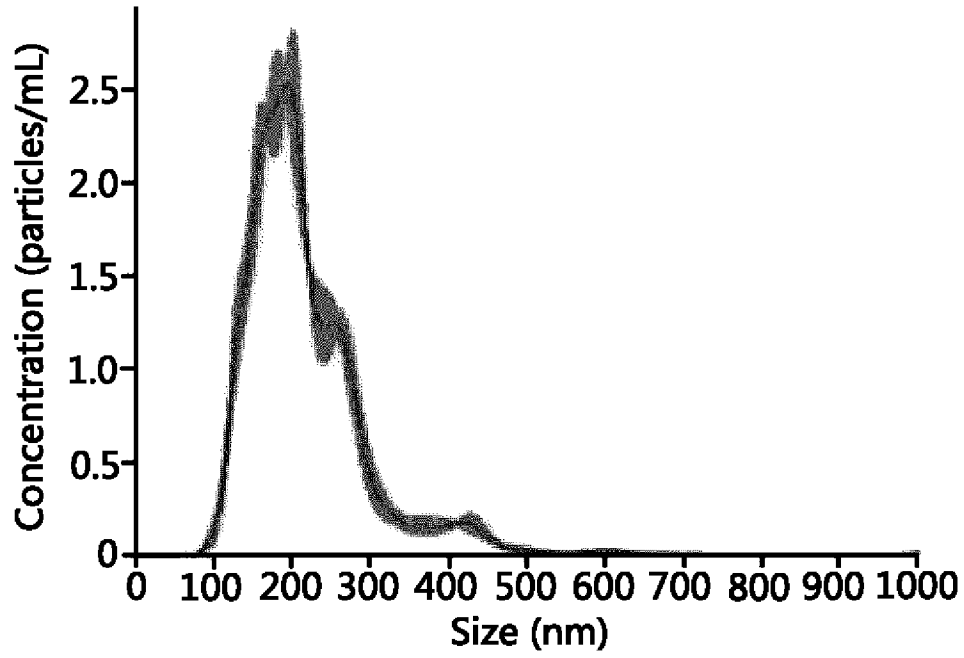


[도5c]

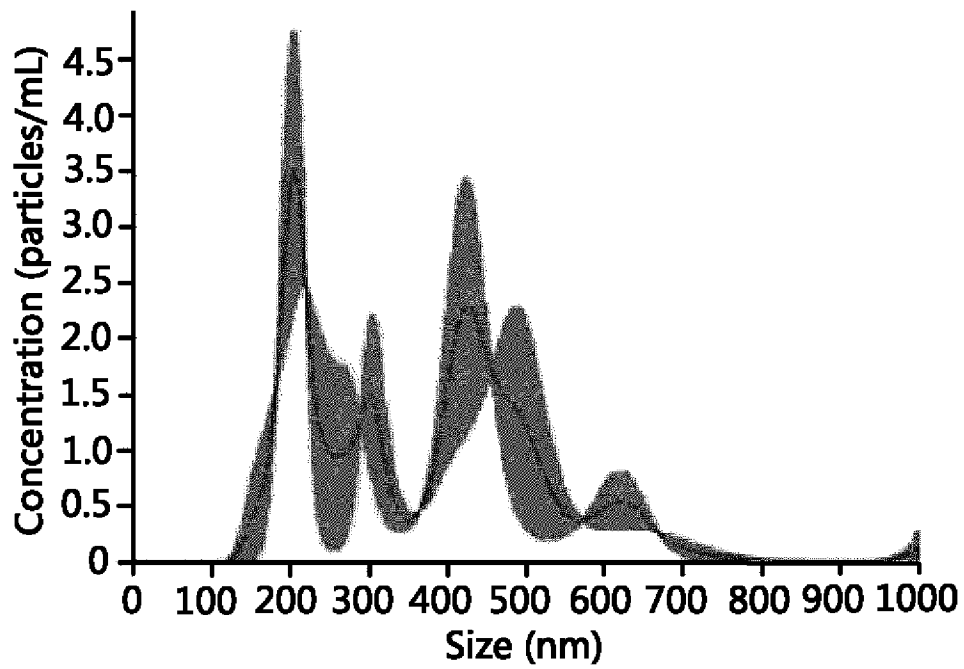
trehalose



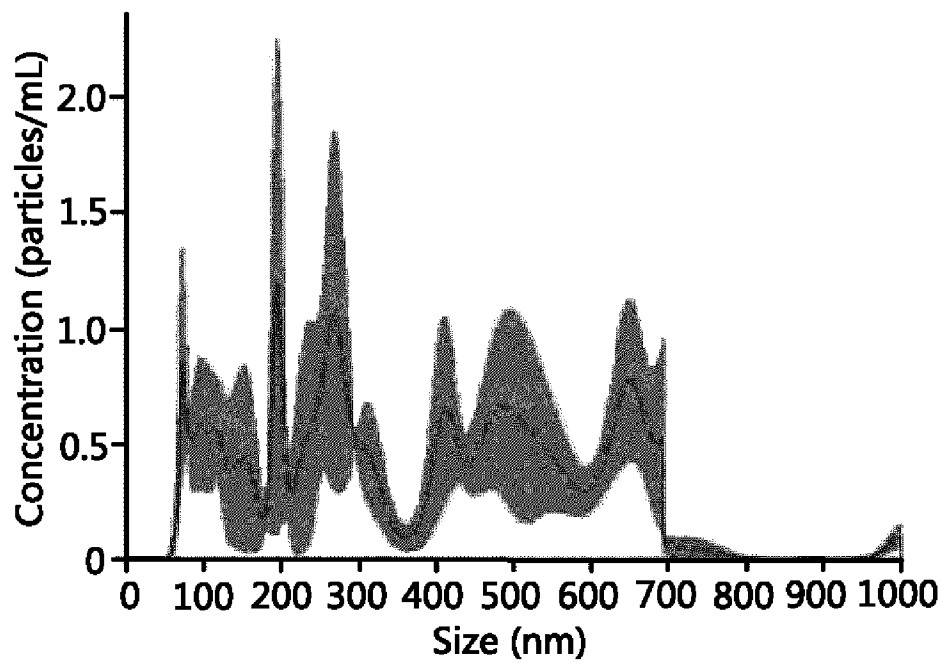
[도6a]



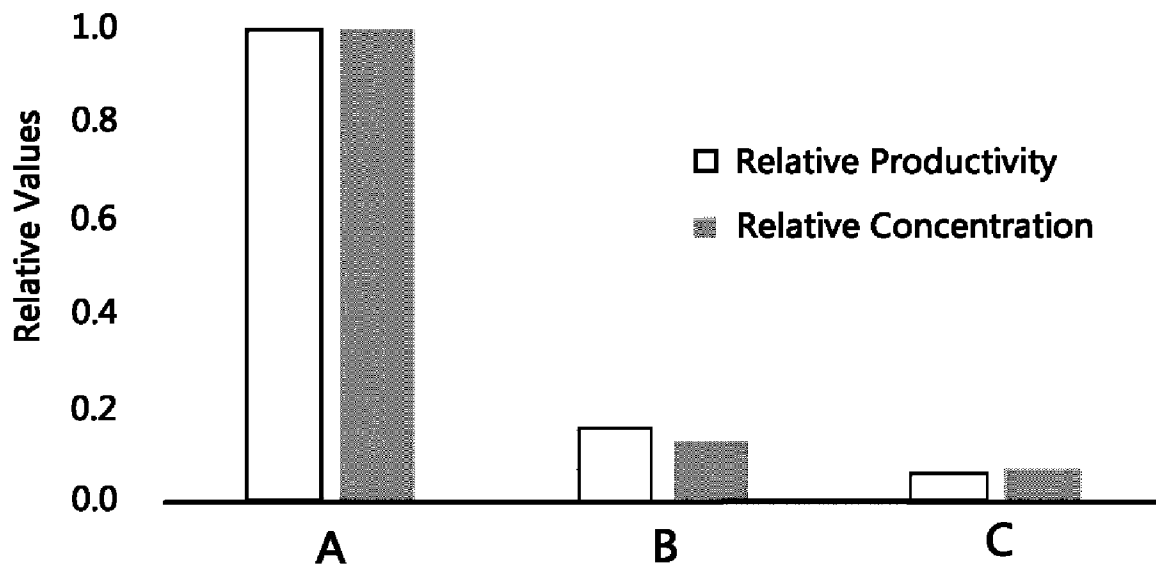
[도6b]



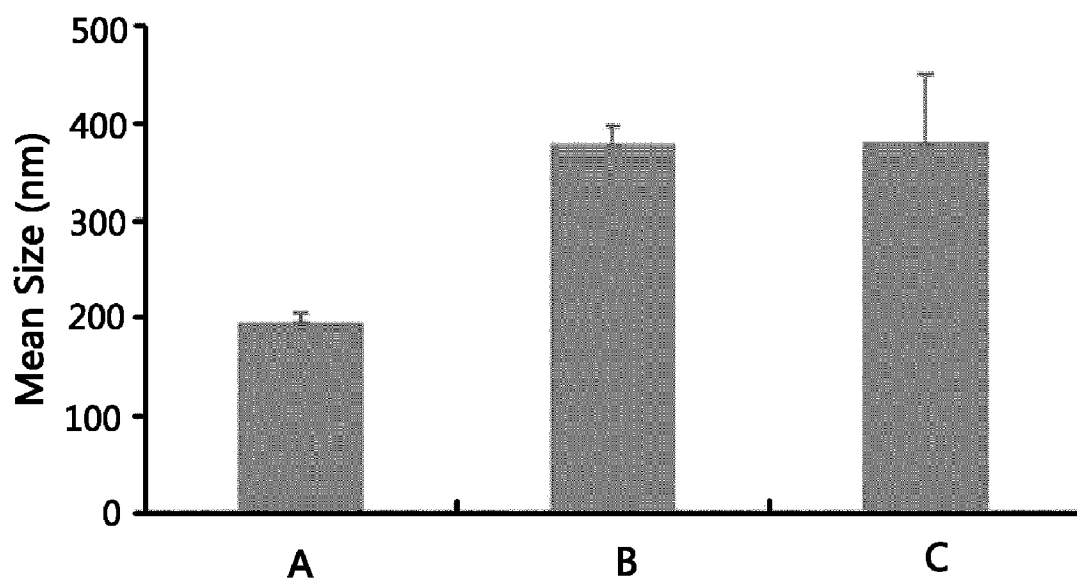
[도6c]



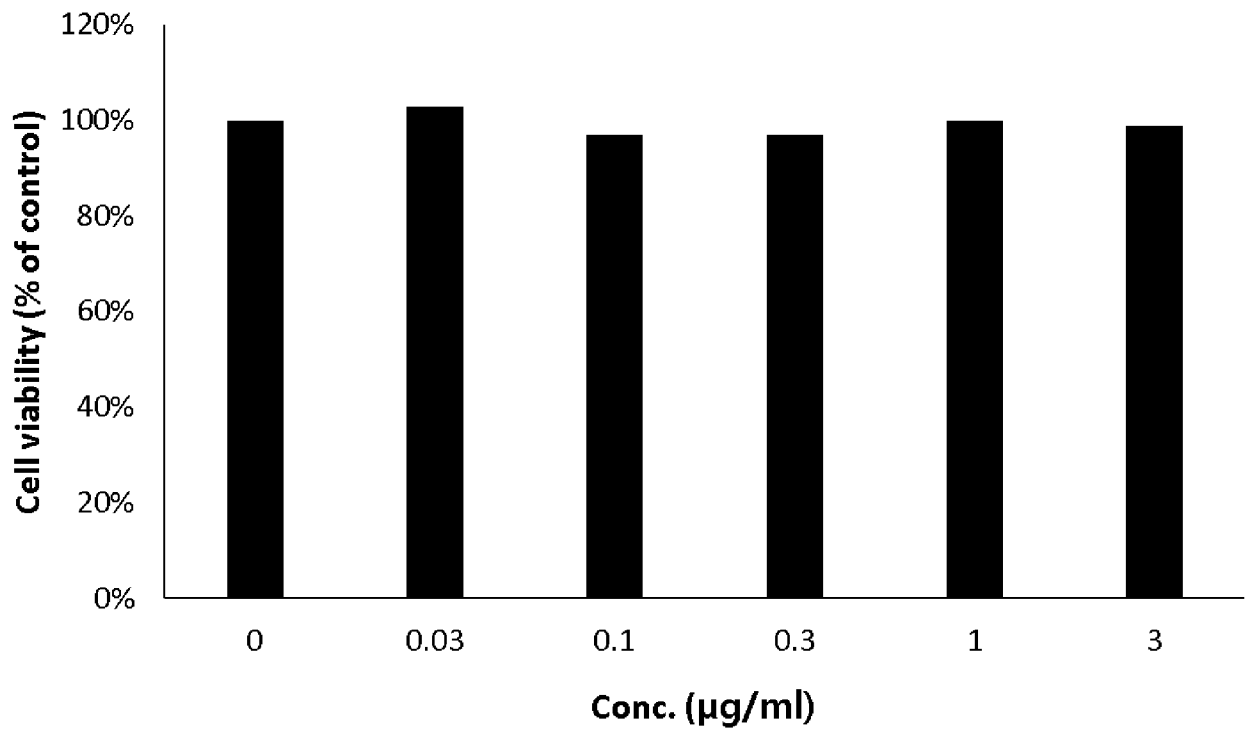
[도6d]



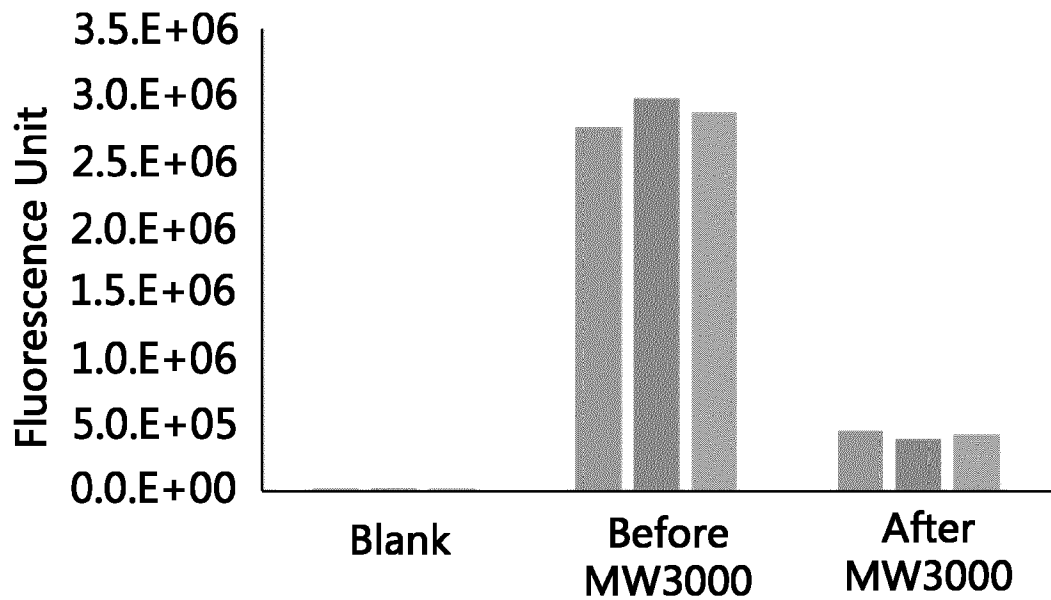
[도6e]



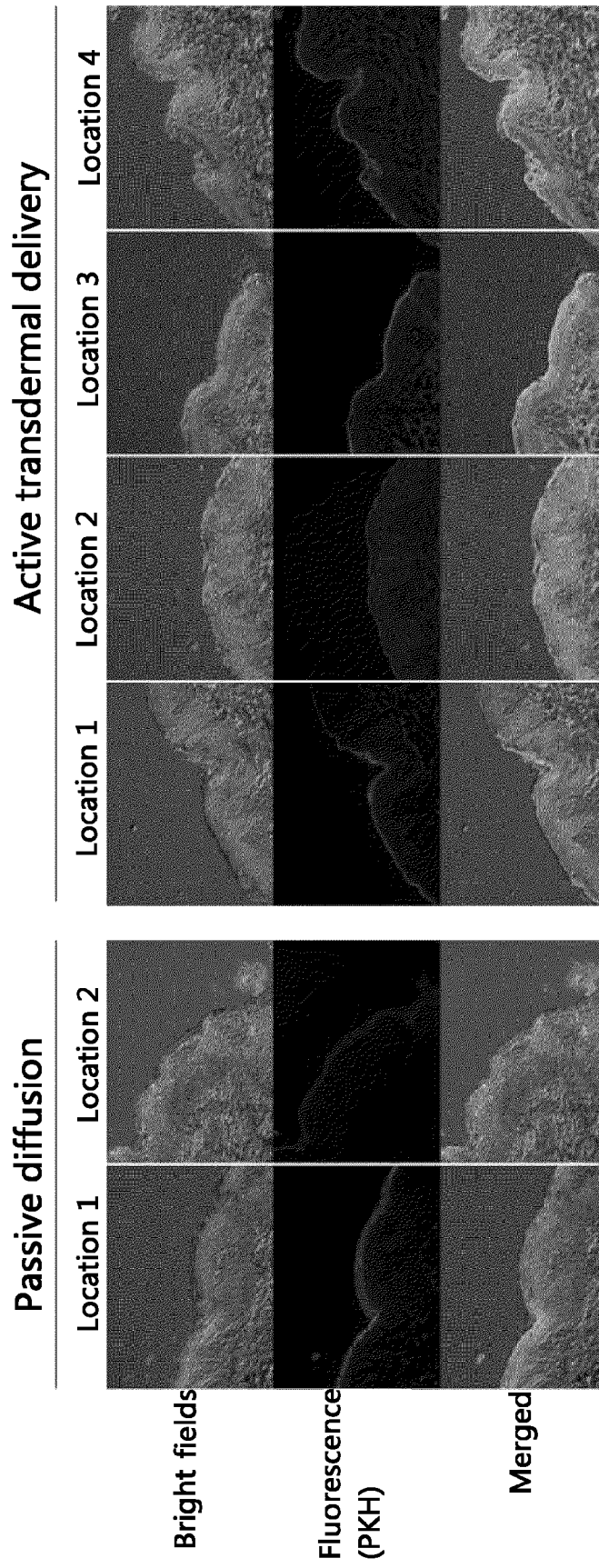
[도7]



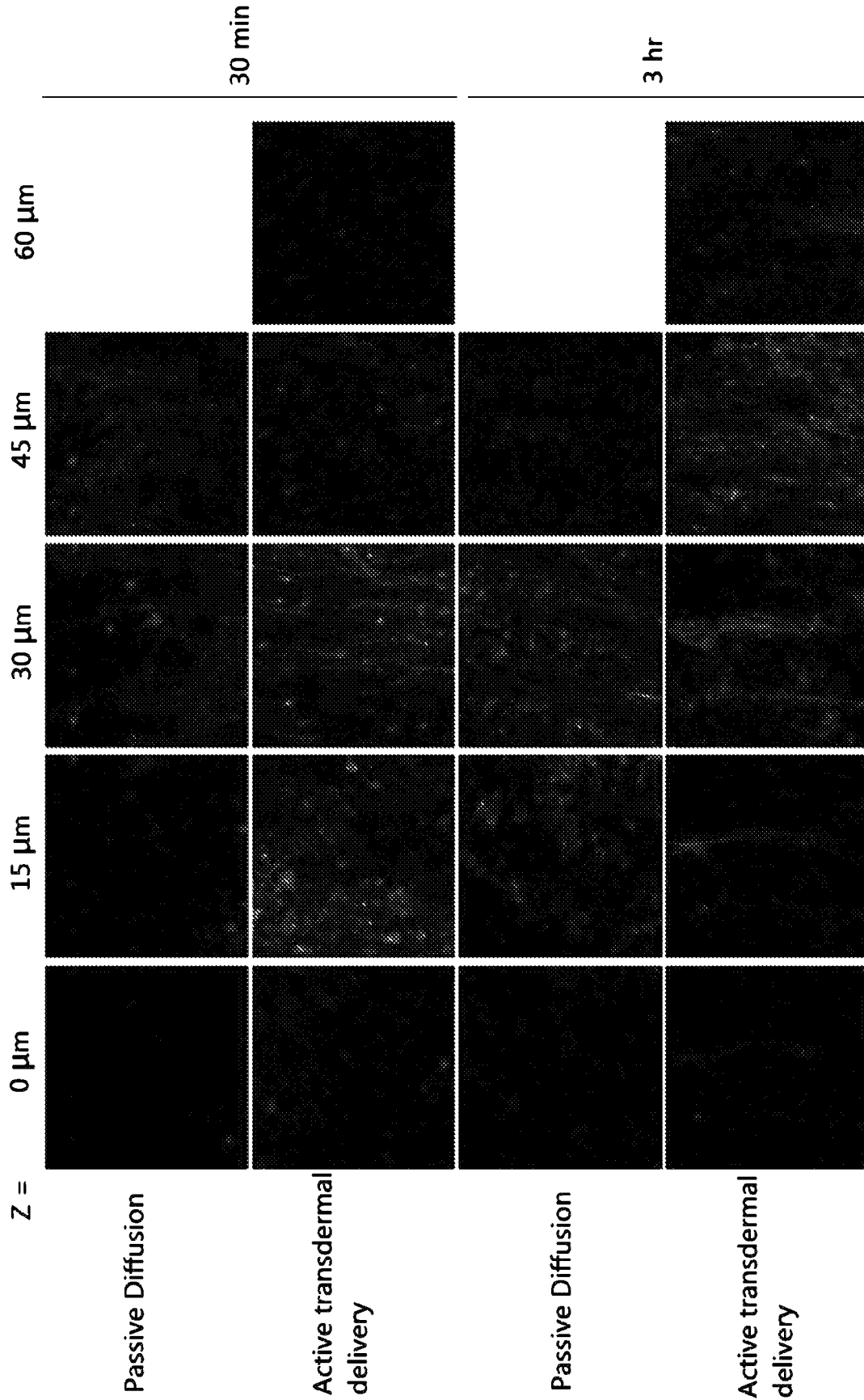
[도8]



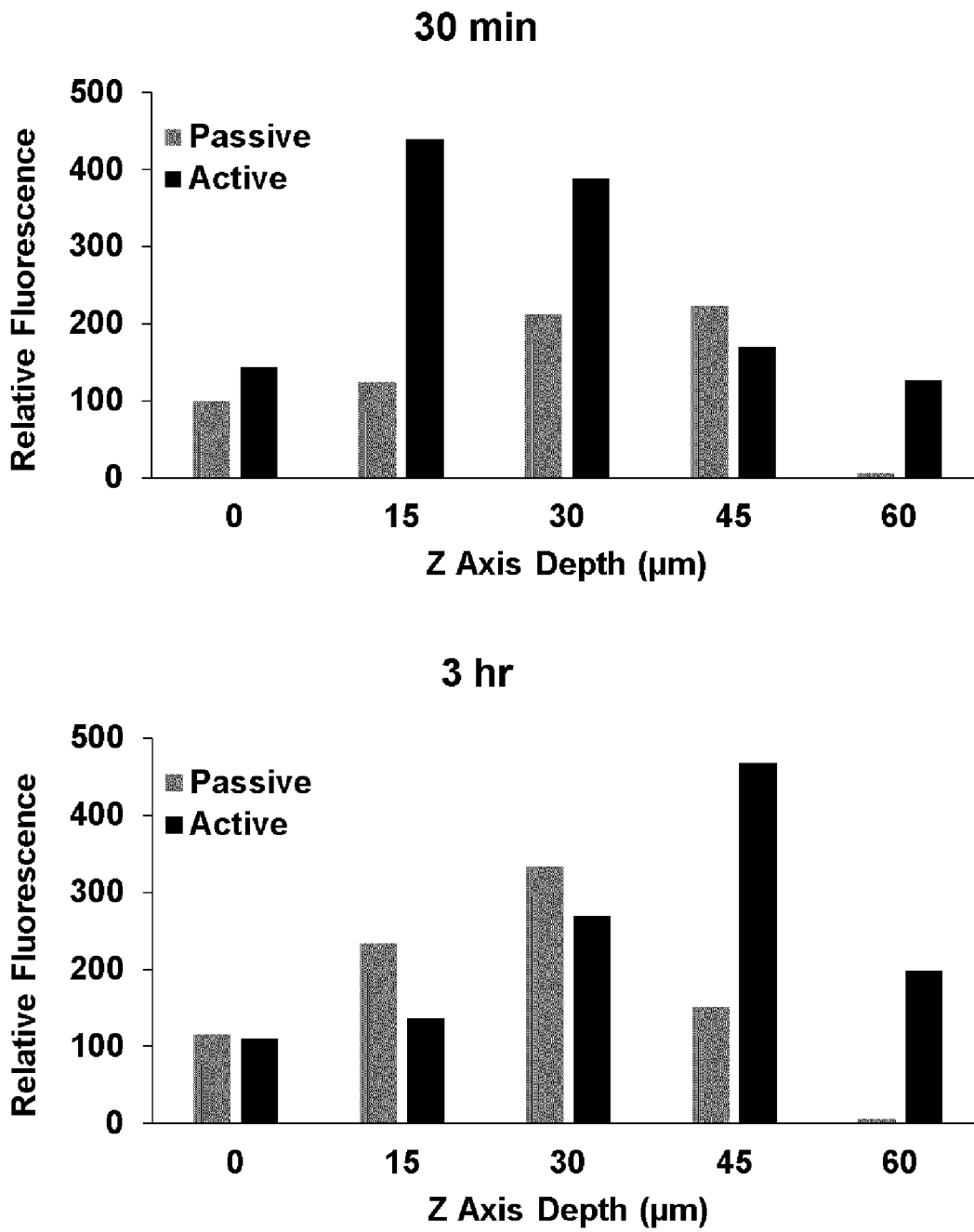
[도9]



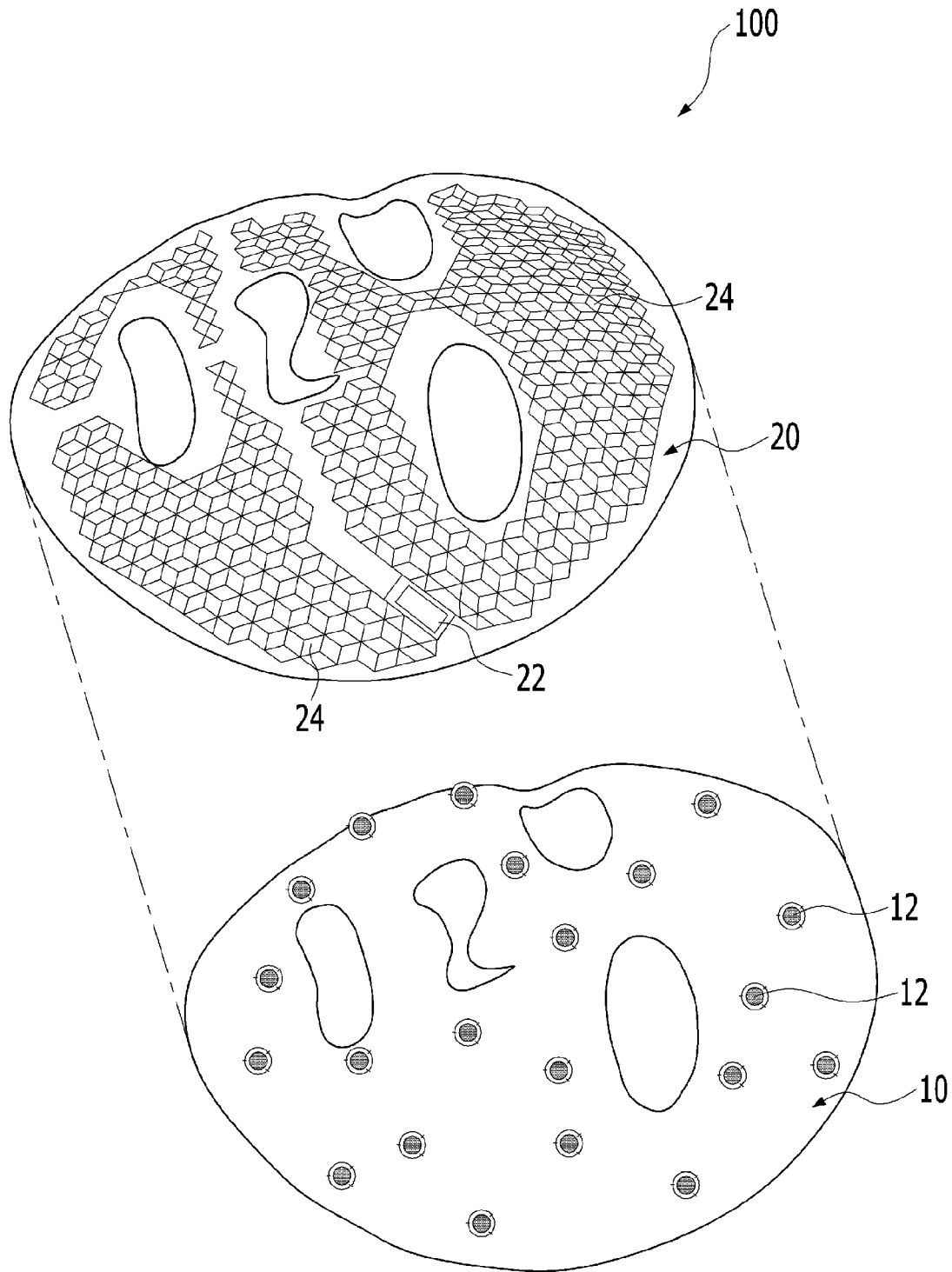
[도10]



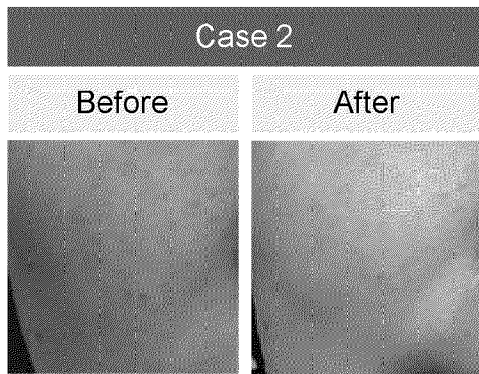
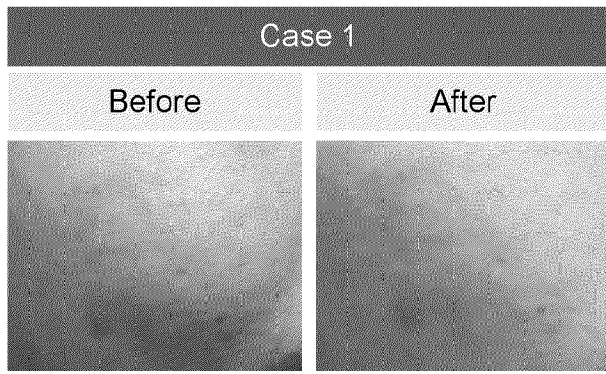
[도11]



[도 12]



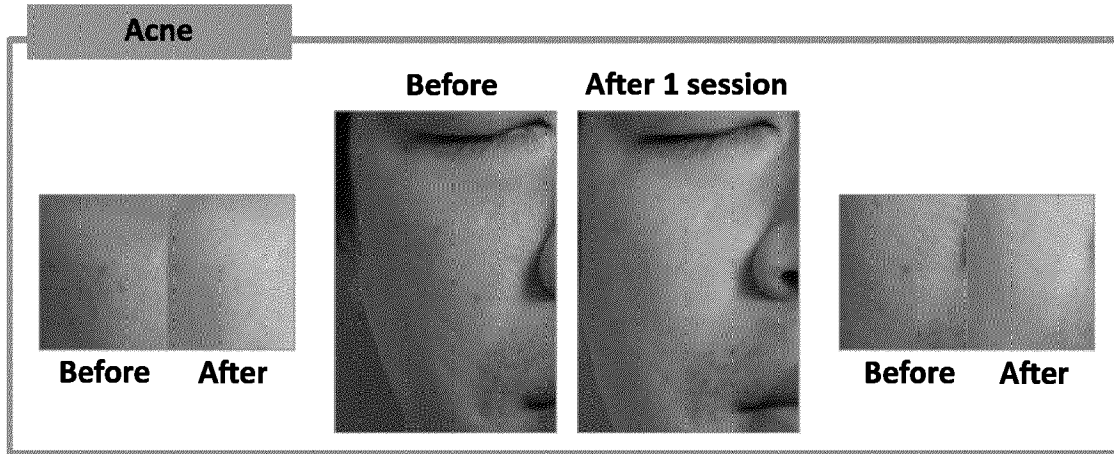
[도13]



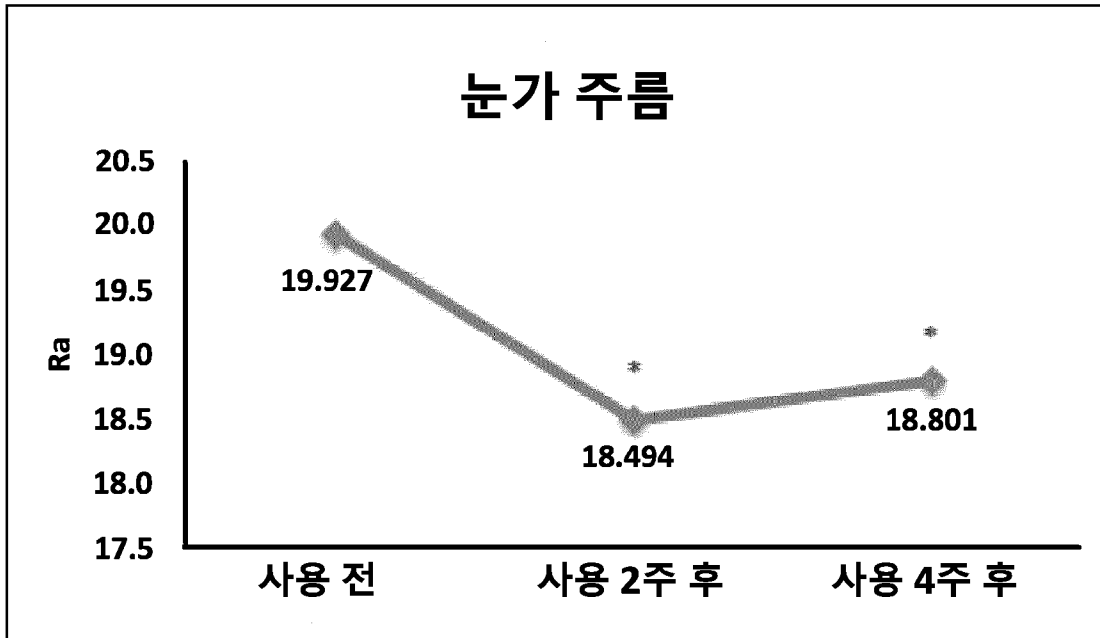
[도14]



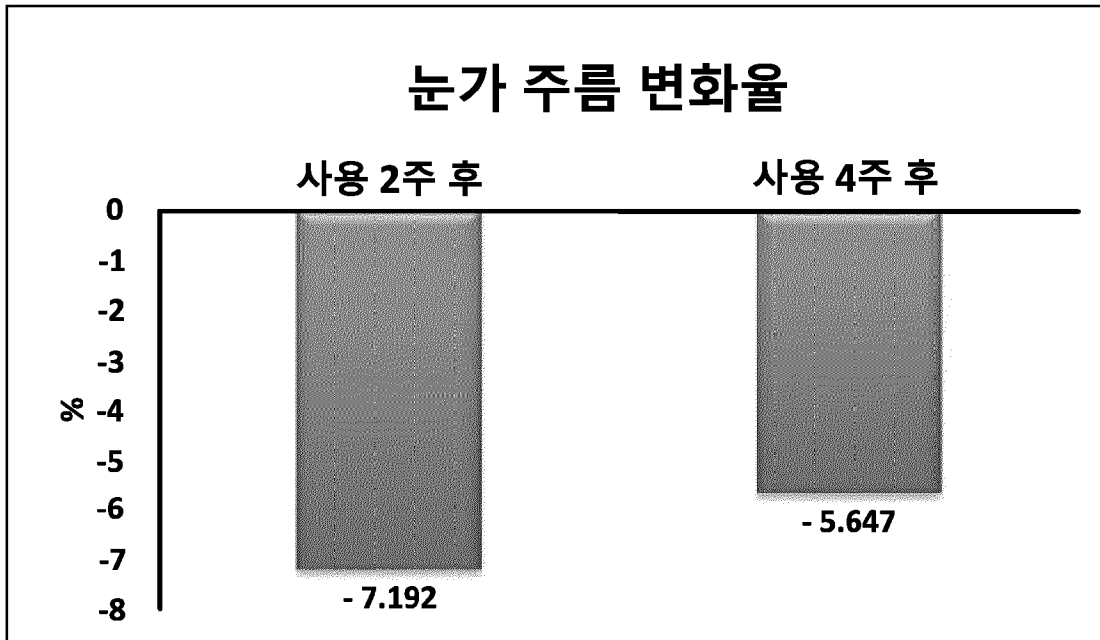
[도 15]



[도 16a]

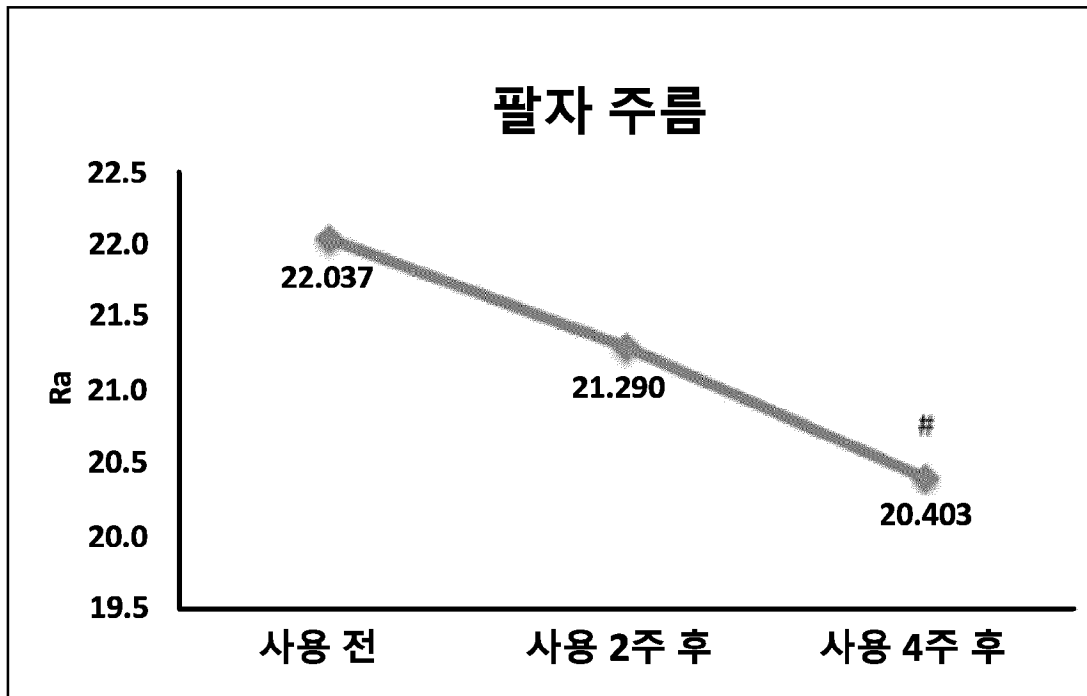


\* : P<0.05 by repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni correction

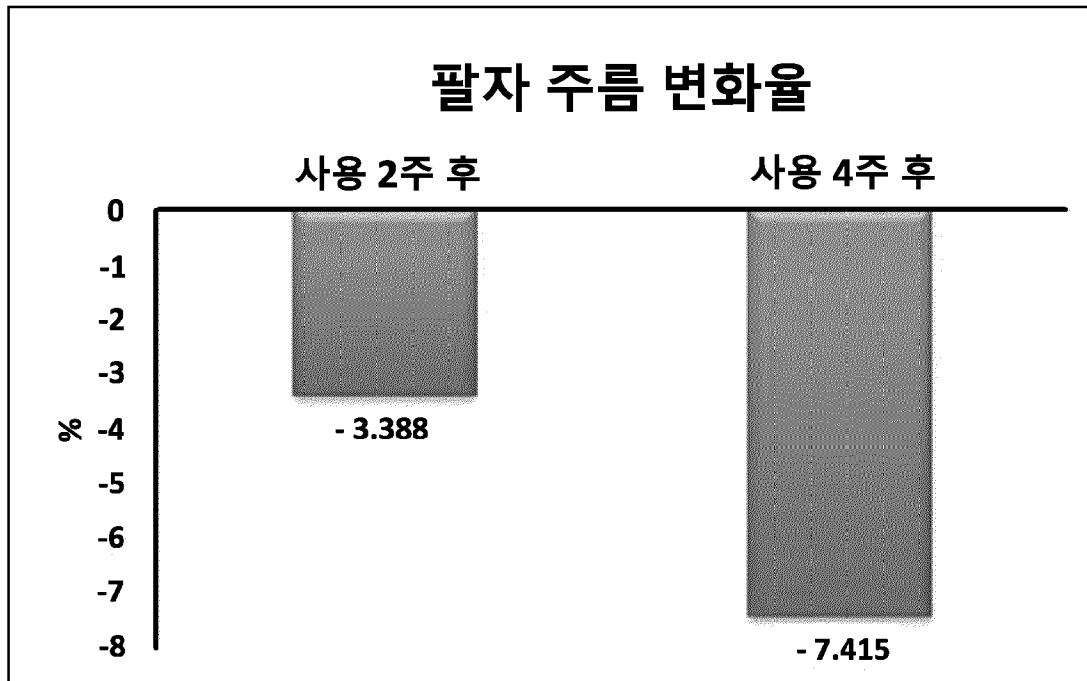


\* 변화율(%) = (after - before)/before × 100

[도16b]

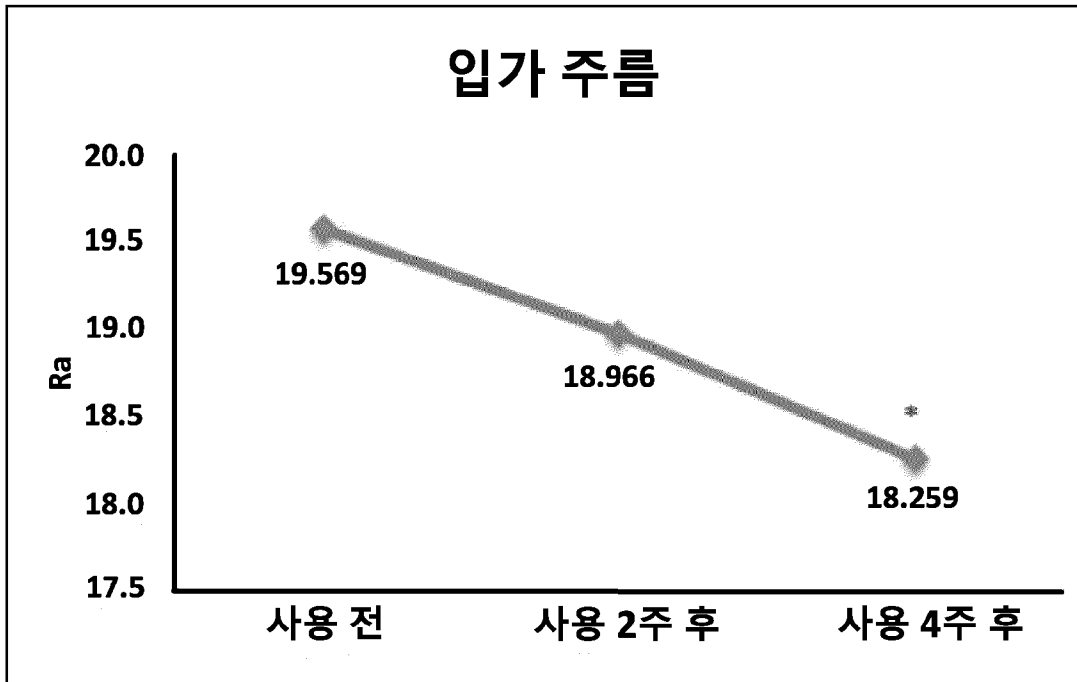


#:  $p < 0.025 (= 5\%/2)$  by Friedman test, post hoc Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction

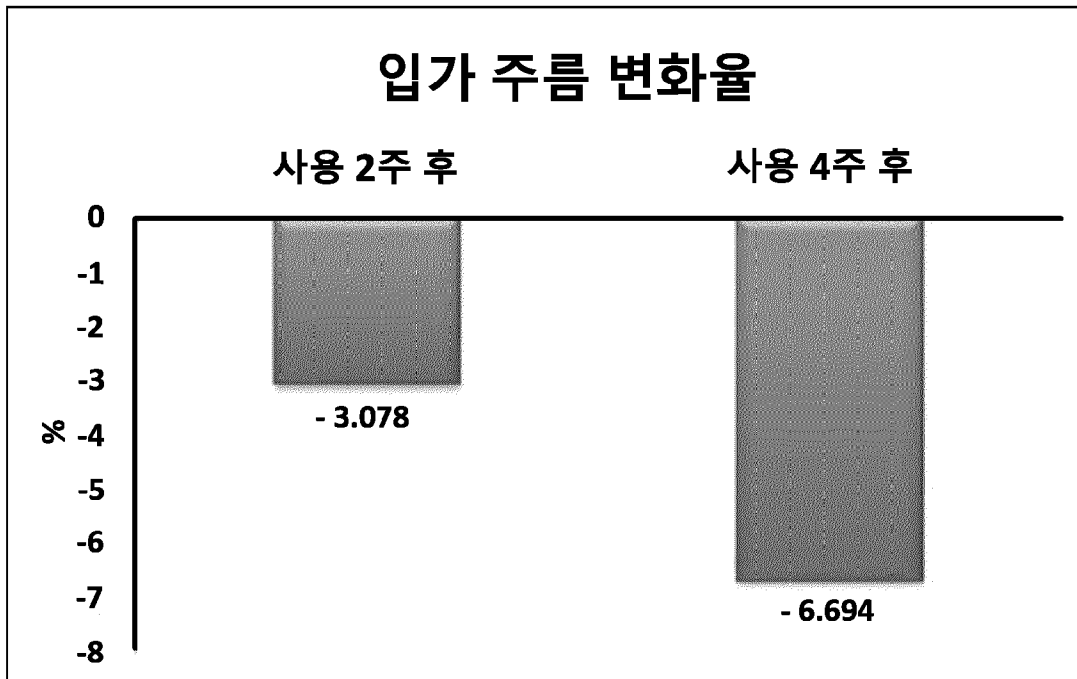


\* 변화율(%) =  $(\text{after} - \text{before}) / \text{before} \times 100$

[도 16c]

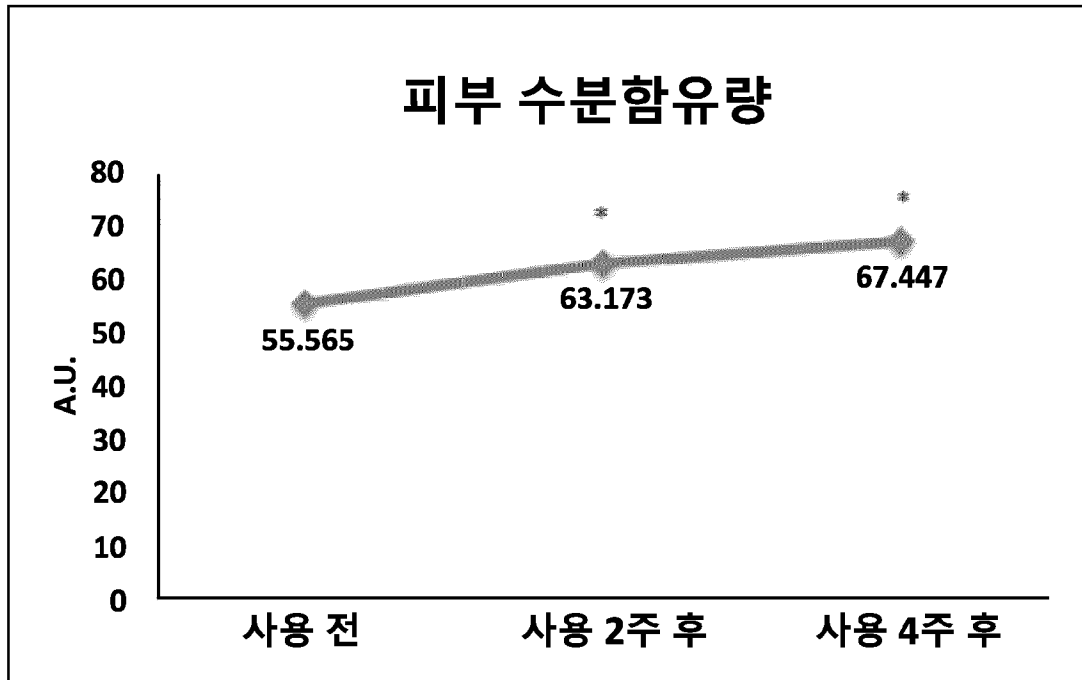


\* : P<0.05 by repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni correction

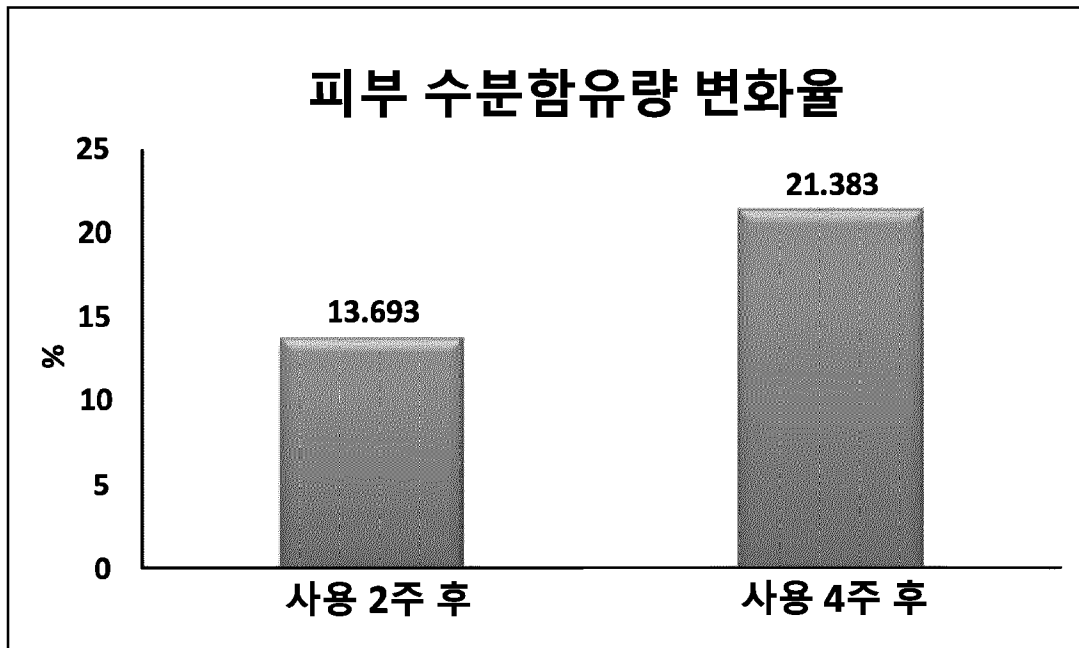


\* 변화율(%) = (after - before)/before × 100

[도16d]

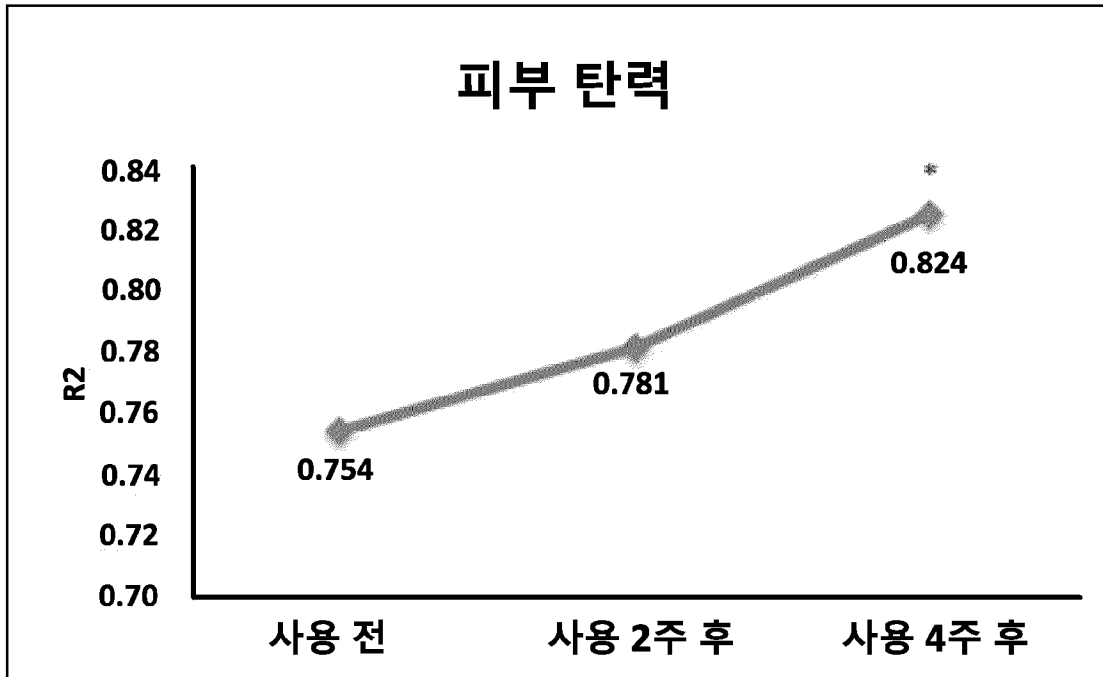


\* : P<0.05 by repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni correction

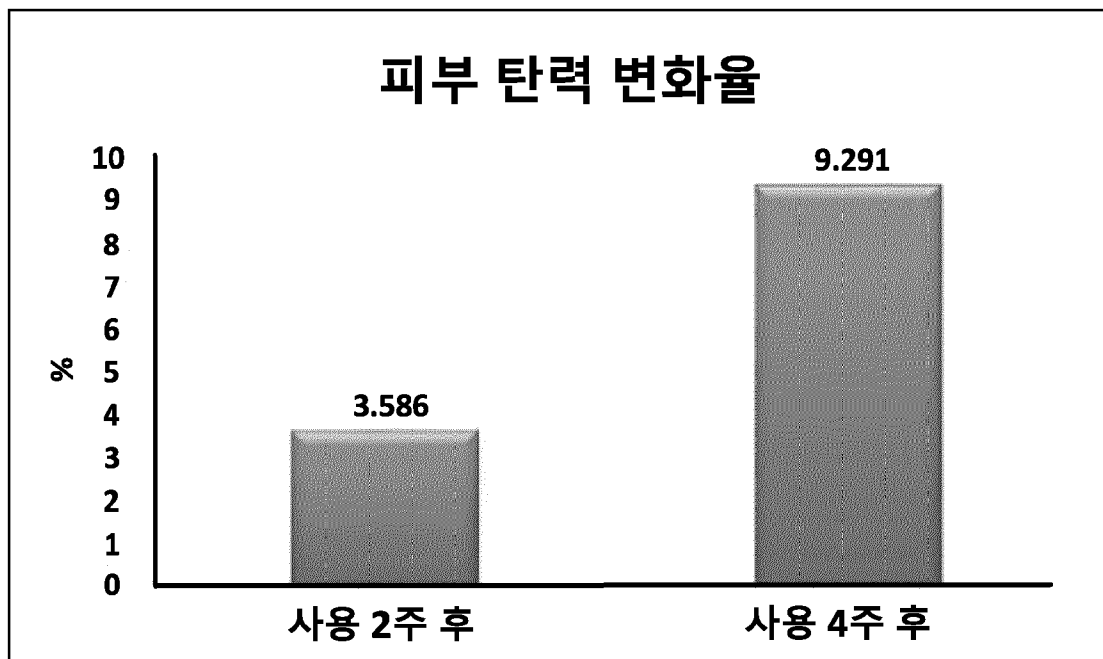


\* 변화율(%) = (after - before)/before × 100

[도 16e]

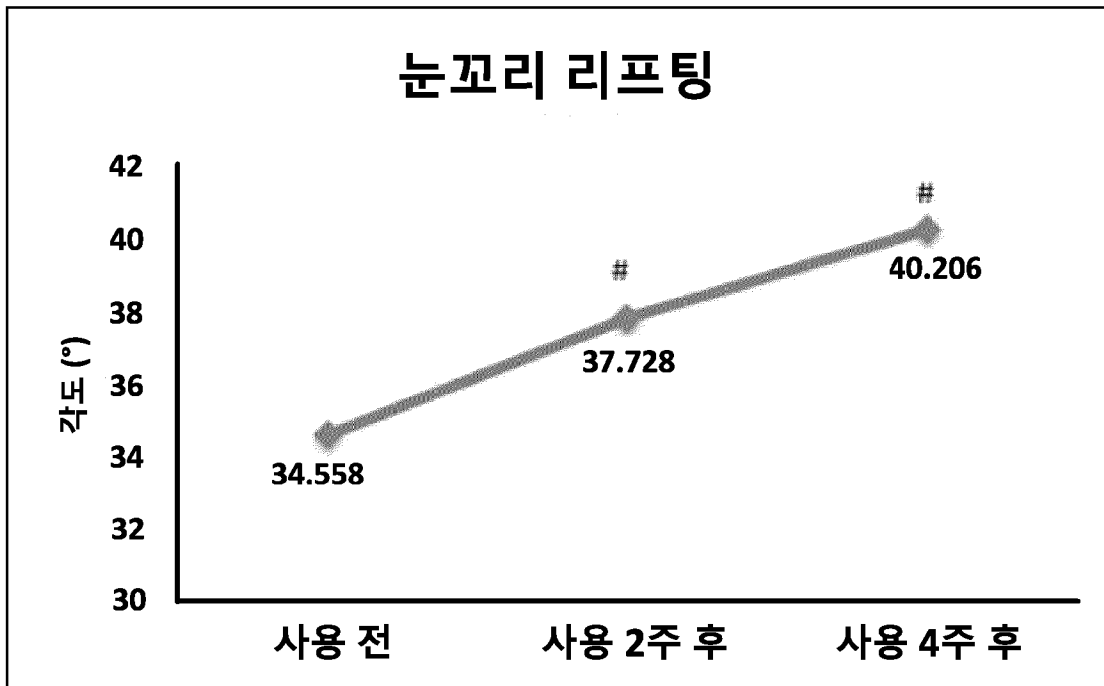


\* : P<0.05 by repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni correction

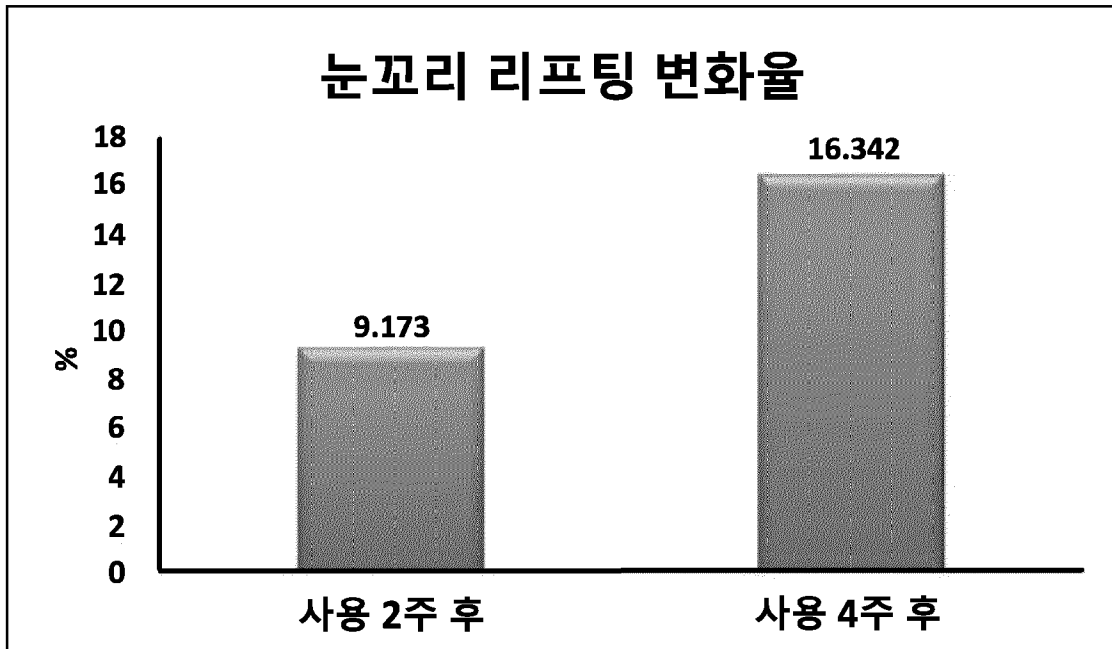


\* 변화율(%) = (after - before)/before × 100

[도16f]

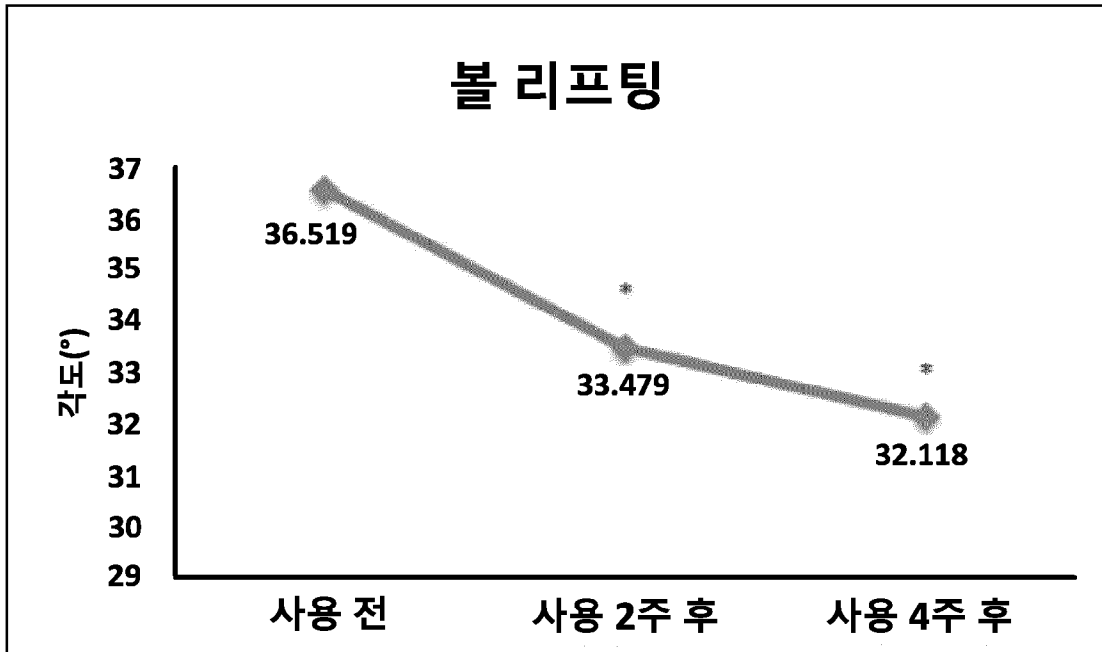


#:  $p < 0.025 (= 5\%/2)$  by Friedman test, post hoc Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction

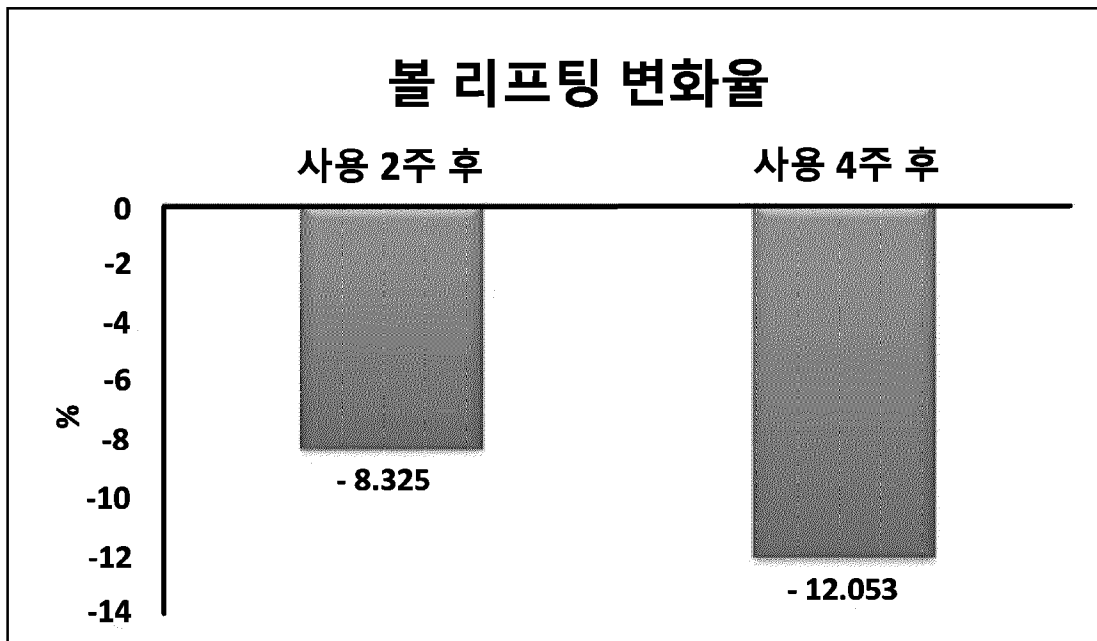


\* 변화율(%) =  $(\text{after} - \text{before}) / \text{before} \times 100$

[도16g]

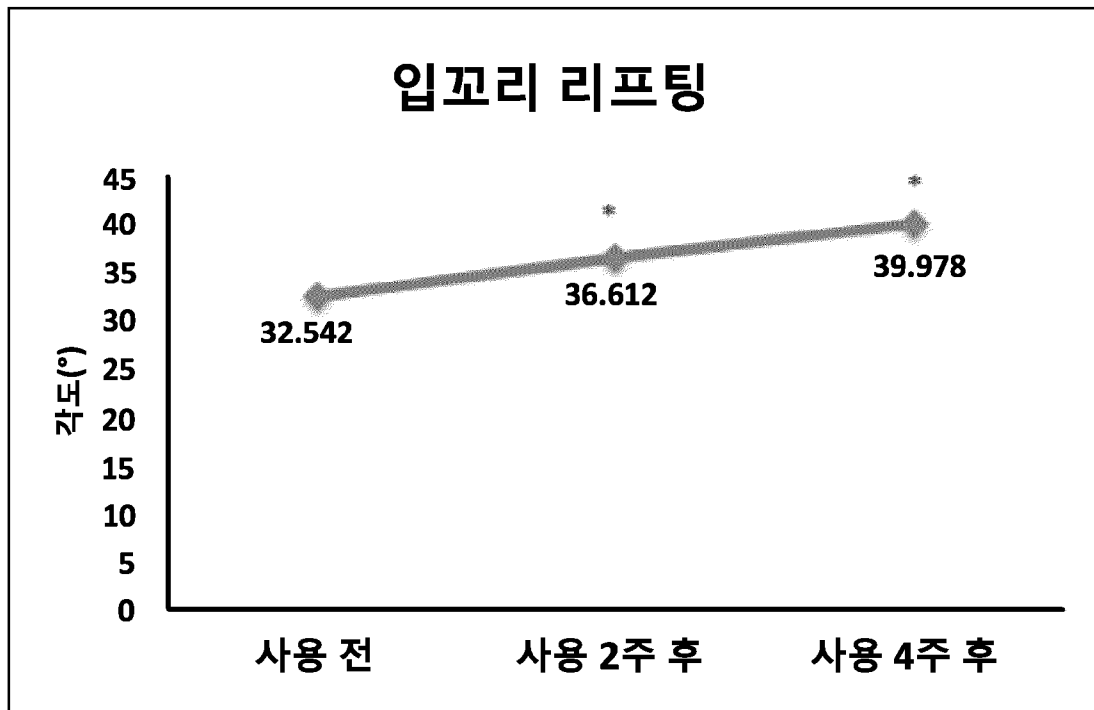


\* : P<0.05 by repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni correction

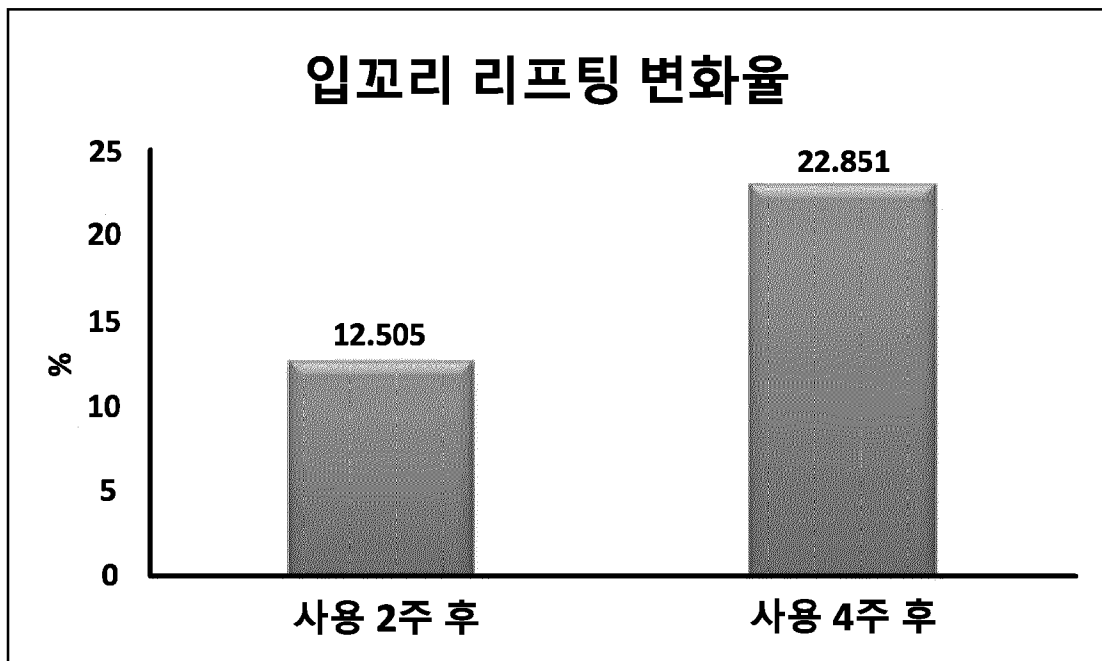


\* 변화율(%) = (after - before)/before × 100

[도 16h]

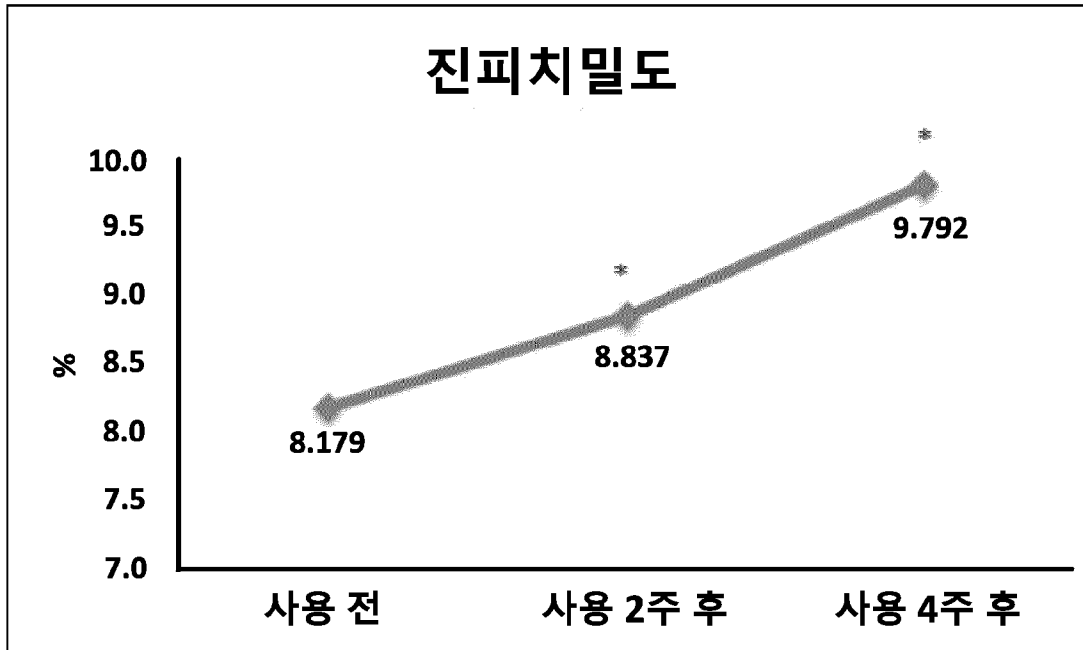


\* : P<0.05 by repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni correction

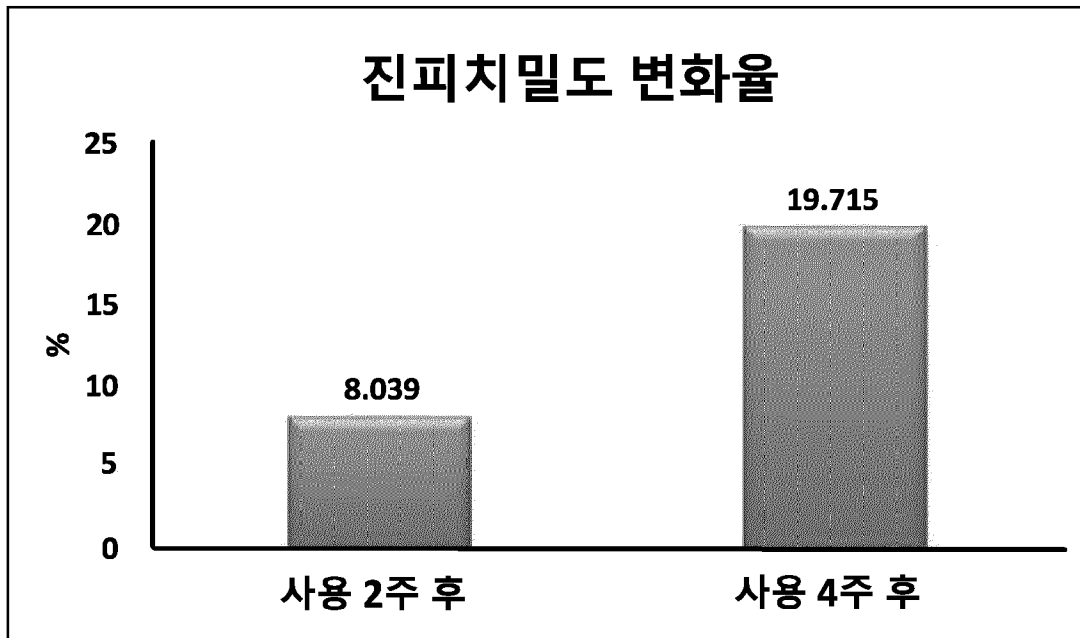


\* 변화율(%) = (after - before)/before × 100

[도 16i]



\* : P<0.05 by repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni correction



\* 변화율(%) = (after - before)/before × 100

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/012549

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K 8/98(2006.01)i, A61K 8/14(2006.01)i, A61K 8/02(2006.01)i, A61K 35/28(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 8/98; A45D 44/00; A45D 44/22; A61F 13/02; A61K 35/14; A61K 35/28; A61K 8/02; A61N 1/30; A61K 8/14; A61K 9/127; A61Q 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above  
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: exosome, mask pack, iontophoresis, skin, electric current, penetration

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2016-0086253 A (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS) 19 July 2016 See abstract; claims 1-5.	1-4
Y	KR 10-2017-0104821 A (IBOSON INC.) 18 September 2017 See abstract; claim 1; paragraphs [0004], [0054]-[0056]; figure 1.	1-4
Y	KR 10-2016-0116491 A (JO, Jeong Ho) 10 October 2016 See abstract; claims 1-3; paragraphs [0002]-[0010]; figures 1, 2.	1-4
Y	KR 10-2017-0044999 A (PROSTEMICS CO., LTD.) 26 April 2017 See abstract; claims 1-8; paragraph [0055].	1-4
Y	KR 10-0628946 B1 (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.) 27 September 2006 See claims 1-4, 19-25; pages 4, 6, 7; figures 1-4.	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

07 FEBRUARY 2019 (07.02.2019)

Date of mailing of the international search report

08 FEBRUARY 2019 (08.02.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

 Korean Intellectual Property Office  
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,  
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/KR2018/012549**

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **5-9**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 5-9 include a method invention including a direct treatment step for the human body and capable of providing a treatment effect, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2018/012549**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date		
KR 10-2016-0086253 A	19/07/2016	AU 2015-343845 A1	12/05/2016		
		AU 2015-343845 B2	08/11/2018		
		AU 2017-202287 A1	27/04/2017		
		CN 107106613 A	29/08/2017		
		EP 3189828 A1	12/07/2017		
		JP 2017-534629 A	24/11/2017		
		JP 2018-184446 A	22/11/2018		
		KR 10-1629151 B1	10/06/2016		
		US 2017-0152484 A1	01/06/2017		
		US 2017-0209365 A1	27/07/2017		
		WO 2016-072821 A1	12/05/2016		
		KR 10-2017-0104821 A	18/09/2017	NONE	
		KR 10-2016-0116491 A	10/10/2016	KR 10-1689345 B1	26/12/2016
KR 10-2017-0044999 A	26/04/2017	KR 10-2018-0127280 A	28/11/2018		
KR 10-0628946 B1	27/09/2006	NONE			

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
**A61K 8/98(2006.01)i, A61K 8/14(2006.01)i, A61K 8/02(2006.01)i, A61K 35/28(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i**

**B. 조사된 분야**  
 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
 A61K 8/98; A45D 44/00; A45D 44/22; A61F 13/02; A61K 35/14; A61K 35/28; A61K 8/02; A61N 1/30; A61K 8/14; A61K 9/127; A61Q 19/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌  
 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))  
 eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 엑소좀, 마스크팩, 이온토포레시스, 피부, 전류, 투과

**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2016-0086253 A (한양대학교 에리카산학협력단) 2016.07.19 요약; 청구항 1-5 참조.	1-4
Y	KR 10-2017-0104821 A ((주)아이보손) 2017.09.18 요약; 청구항 1; 단락 [0004], [0054]-[0056]; 도면 1 참조.	1-4
Y	KR 10-2016-0116491 A (조정호) 2016.10.10 요약; 청구항 1-3; 단락 [0002]-[0010]; 도면 1, 2 참조.	1-4
Y	KR 10-2017-0044999 A ((주)프로스테믹스) 2017.04.26 요약; 청구항 1-8; 단락 [0055] 참조.	1-4
Y	KR 10-0628946 B1 (주식회사 엘지생활건강) 2006.09.27 청구항 1-4, 19-25; 페이지 4, 6, 7; 도면 1-4 참조.	1-4

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.  대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:  
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌  
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌  
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌  
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌  
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌  
 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌  
 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.  
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2019년 02월 07일 (07.02.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 02월 08일 (08.02.2019)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 이기철 전화번호 +82-42-481-3353
---	------------------------------------

**제2기제란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1.  청구항: 5-9  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 5-9는 인체에 대한 직접적인 처치 단계를 포함하며, 치료 효과를 동반할 수 있는 방법 발명을 포함하고 있으므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2.  청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3.  청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

**제3기제란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1.  출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2.  추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3.  출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4.  출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에  
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0086253 A	2016/07/19	AU 2015-343845 A1	2016/05/12
		AU 2015-343845 B2	2018/11/08
		AU 2017-202287 A1	2017/04/27
		CN 107106613 A	2017/08/29
		EP 3189828 A1	2017/07/12
		JP 2017-534629 A	2017/11/24
		JP 2018-184446 A	2018/11/22
		KR 10-1629151 B1	2016/06/10
		US 2017-0152484 A1	2017/06/01
		US 2017-0209365 A1	2017/07/27
		WO 2016-072821 A1	2016/05/12
KR 10-2017-0104821 A	2017/09/18	없음	
KR 10-2016-0116491 A	2016/10/10	KR 10-1689345 B1	2016/12/26
KR 10-2017-0044999 A	2017/04/26	KR 10-2018-0127280 A	2018/11/28
KR 10-0628946 B1	2006/09/27	없음	