



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0010659

(43) 공개일자 2024년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/258 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/258 (2013.01)

A61K 2236/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0087587

(22) 출원일자 2022년07월15일

심사청구일자 2023년07월11일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이연희

서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 25동 1306호(압구정동, 현대아파트)

김연경

서울특별시 종로구 낙산길 198, 207동 1208호(창신동, 창신쌍용아파트 2지구)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인정진

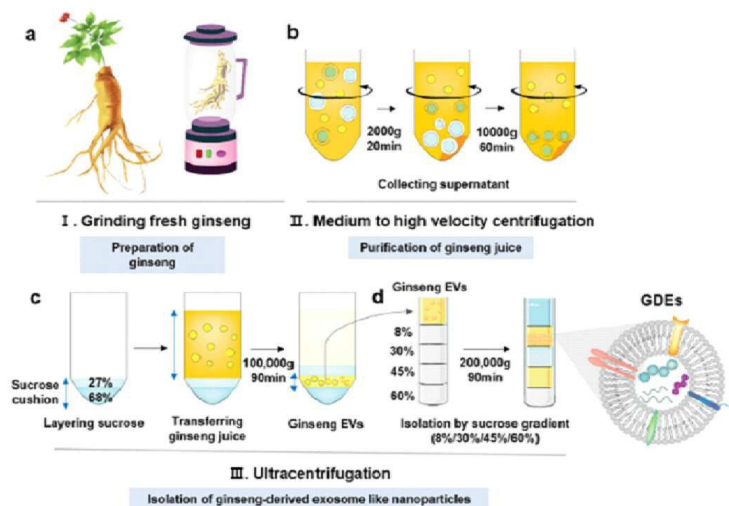
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 인삼-유래 엑소좀-유사 나노베지클 제조 방법은 별도의 장비 공급이나 인력없이도 용이하게 획득할 수 있고, 또한, 대량 수득이 가능한 바, 이를 활용할 경우 경제성이 우수하며, 엑소좀-기반 개발 분야의 핵심기술로 이용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

권일근

서울특별시 노원구 마들로 31, 109동 305호(월계동, 그랑빌아파트)

김지수

경기도 수원시 장안구 경수대로1073번길

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711164586

과제번호 2020R1F1A1070072

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 턱관절 관절염에 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 이용한 새로운 재생 치료전략에 대

한 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경희대학교

연구기간 2020.06.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE) 제조 방법:

(a) 인삼액을 획득하는 단계; 및

(b) 상기 인삼액을 수크로즈 밀도 구배(sucrose gradient) 및 초원심분리하여 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 획득하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계의 수크로즈 밀도 구배 및 초원심분리는 다음 단계를 포함하는 것인, 방법:

(b-1) 65 내지 70% 수크로즈를 용기에 첨가하는 단계;

(b-2) 20 내지 35%의 수크로즈를 상기 (b-1)의 수크로즈와 층을 이루도록 첨가하여 수크로즈 쿠션층을 형성시키는 단계;

(b-3) 상기 (b-2) 단계의 수크로즈 쿠션층 상부에 (a) 단계의 인삼액을 첨가하는 단계;

(b-4) 80,000 내지 150,000g 에서 60 내지 100분 동안 초원심분리를 수행하는 단계; 및

(b-5) 상기 수크로즈 쿠션층 사이에 형성된 인삼 유래 엑소좀 유사 나노베지클 층을 획득하는 단계.

청구항 3

제2항에 있어서,

(b-6) 상기 (b-5) 단계에서 수득된 엑소좀 유사 나노베지클 층을 수크로즈 층 상부에 첨가하고, 150,000 내지 250,000g 에서 60 내지 100분 동안 초원심분리를 수행하여 엑소좀 유사 나노베지클을 획득하는 단계;를 더 포함하며,

상기 수크로즈 층은 용기 하단에서 상부 방향으로

55 내지 65% 수크로즈 층;

40 내지 50% 수크로즈 층;

25 내지 35% 수크로즈 층; 및

5 내지 10% 수크로즈 층; 이 순차적으로 적층된 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 엑소좀 유사 나노베지클은 25 내지 35% 수크로즈 층 및 5 내지 10% 수크로즈 층의 중간층에서 수득하는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계의 인삼액은, 인삼 분쇄물을 1500g 내지 2000g에서 10 내지 30분 동안 원심분리한 후, 5000g 내지 15,000g에서 30분 내지 90분 동안 원심분리하는 단계; 를 통해 제조된 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계는 1회 내지 10회 실시하는 것인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 제조 방법으로 제조된, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE).

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 GDE는, 50 내지 500 nm의 직경을 갖는 것인, GDE.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 GDE는, 음의 표면 전하가 -100 내지 -10 mV인 것인, GDE.

청구항 10

다음 단계를 포함하는, 인삼으로부터 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE) 분리 방법:

(a) 인삼액을 획득하는 단계; 및

(b) 상기 인삼액을 수크로즈 밀도 구배(sucrose gradient) 및 초원심분리하여 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 획득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 엑소좀은 세포막의 구조와 동일한 이중인지질막으로 이루어진 수십 내지 수백 나노미터 크기의 소포체로서 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.

[0004] 엑소좀은 유래된 세포의 성질 및 상태에 따라 특이적인 유전물질과 생체활성 인자들이 포함되어 있는데, 엑소좀

은 분비하는 기원 세포(공여 세포)의 상태를 반영하며, 어떤 세포에서 분비되었는가에 따라 다양한 생물학적 활성을 나타내고, 세포들 사이에 유전 물질과 단백질을 옮기면서 세포 간 상호작용에 중요한 역할을 한다.

[0005] 이러한 엑소좀이 어떤 분자적 기작에 의해 만들어지는지 확실히 밝혀진 바가 없으나, 적혈구 세포뿐만 아니라, B-림프구, T-림프구, 수지상 세포, 혈소판, 대식 세포 등을 포함한 다양한 종류의 면역 세포들과 종양 세포, 줄기세포 등도 살아 있는 상태에서 엑소좀을 생산하여 분비한다고 알려졌다.

[0006] 종래 엑소좀은 주로 바이오마커로 사용되어 왔을 뿐, 엑소좀 자체의 효능을 이용하여 엑소좀을 특정 용도로 사용하는 기술은 아직 개발이 미흡한 실정이다.

[0007] 또한, 엑소좀 관련 연구의 대부분을 차지하고 있는 동물의 줄기세포에서 분리되는 엑소좀은 포함된 인자가 목적 이외의 효과를 나타낼 수 있고, 엑소좀의 분리에 있어 줄기세포가 포함될 수 있다는 점에서 안정성의 문제가 있다.

[0008] 이에 대한 대안으로 식물세포의 엑소좀에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직 미진한 상태이다. 최근 연구에서 식물 세포에서 유래된 엑소좀-유사 나노 입자(exosome-like nanovesicles)는 포유동물 세포에서 유래된 엑소좀과 나노 크기의 소낭 구조 및 나노 입자 조성물이 유사한 것으로 보고된 바 있으나(An, Q, Huckelhoven, R, Kogel, KH and van Bel, AJ (2006). Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. Cell Microbiol 8: 1009-1019)(Regente, M, Pinedo, M, Elizalde, M and de la Canal, L (2012). Apoplastic exosome-like vesicles: a new way of protein secretion in plants Plant Signal Behav 7: 544-546), 식물 세포에서 유래된 엑소좀 유사 막 구조 소낭체의 특정 용도에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.

[0009] 인류가 오랜 기간 섭취해 온 인삼 역시, 면역 증강에 유익한 것으로 검증된 식물로, 인삼 유래 추출물이나 단일 성분의 항노화와 같은 일부 효능은 보고된 바 있으나, 복합 생리 활성 물질인 인삼 유래 엑소좀 유사 막 구조 소낭체(GDE; Ginseng-derived exosome like nanoparticles)의 특정 효능에 관해서는 보고된 바가 없다.

[0010] 이러한 인삼 유래 엑소좀-유사 나노베지클의 효능을 결정하려면, 이를 분리하여 특성화해야 하므로, 인삼으로부터의 분리 방법의 객관적이고 표준화된 정립이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이에, 본 발명자들은 인체에 안전하면서 우수한 각종 효능을 갖는 인삼 유래 엑소좀-유사 나노베지클을 효율적으로 분리하는 방법을 개발하고자 예의연구 노력 결과, 수크로즈(sucrose) 완충 방법 및 순차적 이중 분획 초원심분리법을 사용하는 경우, 인삼 유래의 엑소좀 유사 나노베지클이 균질하고 재현 가능하며 고순도 및 고수율로 획득됨을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서, 본 발명의 일 목적은, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE) 제조 방법 및 이에 의해 제조된 GDE를 제공하는 데 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은, 인삼으로부터 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE) 분리 방법을 제공하는 데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또

는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

- [0019] 또한, 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 인삼 유래의 엑소솜-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE) 제조 방법 및 이에 의해 제조된 GDE를 제공한다:
- [0024] (a) 인삼액을 획득하는 단계; 및
- [0025] (b) 상기 인삼액을 수크로즈 밀도 구배(sucrose gradient) 및 초원심분리하여 인삼 유래의 엑소솜-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 획득하는 단계.
- [0026] 본 발명의 인삼은 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 임의의 인삼 종류 및 부위를 이용할 수 있다.
- [0027] 예컨대, 인삼속(*Panax species*) 식물의 종자, 뿌리, 줄기, 잎 및 열매로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 구체적인 인삼속 식물로는 고려인삼(*Panax ginseng*), 화기삼(*Panax quinquefolium*), 전칠삼(*Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonicum*), 삼엽삼(*Panax trifolium*), 히말라야삼(*Panax pseudoginseng*) 또는 베트남삼(*Panax vietnamensis*) 등이 있고, 가공여부와 생육환경에 따른 홍삼, 수삼, 백삼, 재배삼, 장뇌삼 또는 산양산삼, 산삼배양근을 포함하는 산삼 등 품종이나 종류에 제한이 없이 사용 가능하다.
- [0028] 본 명세서에서 "엑소솜-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)"은 세포에서 분비되어 세포의 공간으로 방출된 나노크기의 세포외 소낭, 즉 세포밖 베지클(extracellular vesicle)을 의미하는 것으로서, 상기 엑소솜 유사 나노베지클은 엑소솜을 포함하며 나노 크기의 베지클 구조 및 그 조성물이 엑소솜과 유사한 베지클을 모두 포함하는 것을 의미한다.
- [0029] 상기 엑소솜 유사 나노베지클은 다포체(multivesicular body)가 외포 작용으로 원형질막과 융합하여 세포의 공간으로 방출된다. 또한, 상기 엑소솜 유사 나노베지클은 세포막 성분으로 이루어진 지질 이중막에 의해 내부와 외부가 구분되며, 세포의 세포막 지질과 막 단백질, 유전 물질 및 세포질 성분을 가지고 있어 세포의 성질과 상태를 간접적으로 파악할 수 있게 해준다. 또한, 상기 엑소솜 유사 나노베지클은 다른 세포 및 조직에 결합하여 막 구성요소, mRNAs, miRNAs, 단백질(성장 호르몬, 사이토카인 등) 등을 전달해 주고, 이들 전달 물질을 수용 세포에 전달해 줌으로써 세포-세포 간 소통을 매개하는 세포외 전달체로 작용한다.
- [0030] 본 명세서에서 "인삼 유래의 엑소솜-유사 나노베지클"은 인삼 세포에서 분비된 나노 크기의 엑소솜 유사 베지클을 의미한다. 상기 엑소솜 유사 베지클은 인삼의 세포외액(extracellular fluid)으로부터 분리될 수 있으며, 분리된 엑소솜 유사 나노베지클은 전체적으로 또는 부분적으로 본래 존재하는 조직 또는 세포로부터 물리적으로 분리될 수 있다.
- [0031] 밀도 구배는 밀도가 다른 물질을 구분할 때 가장 많이 사용되는 방법으로서, 본 명세서에 따른 엑소솜 유사 나노베지클은 밀도가 구분되어 밀도 구배를 통해 분리할 수 있다. 구체적인 예로는 수크로즈(sucrose), 피콜(ficoll), 글리세롤(glycerol), 염화세슘(cesium chloride), 이오딧사놀(iodixanol) 등의 밀도 기울기 분리재료를 이용하여 실시할 수 있으나, 바람직하게는 수크로즈(sucrose)이다.
- [0032] 따라서, 본 발명의 엑소솜 유사 나노베지클은, 인삼액에 수크로즈 밀도 구배(sucrose gradient) 및 초원심분리를 함께 실시하여 제조(분리)된 것을 특징으로 한다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 제조 방법의 상기 (b) 단계는 다음 단계를 포함한다:
- [0034] (b-1) 65 내지 70% 수크로즈를 용기에 첨가하는 단계;
- [0035] (b-2) 20 내지 35%의 수크로즈를 상기 (b-1)의 수크로즈와 층을 이루도록 첨가하여 수크로즈 쿠션층을 형성시

키는 단계;

- [0036] (b-3) 상기 (b-2) 단계의 수크로즈 쿠션층 상부에 (a) 단계의 인삼액을 첨가하는 단계;
- [0037] (b-4) 80,000 내지 150,000g 에서 60 내지 100분 동안 초원심분리를 수행하는 단계; 및
- [0038] (b-5) 상기 수크로즈 쿠션층 사이에 형성된 인삼 유래 엑소좀 유사 나노베지클 층을 획득하는 단계.
- [0039] 또한, 상기 (b) 단계는 (b-6) 상기 (b-5) 단계에서 수득된 엑소좀 유사 나노베지클 층을 수크로즈 층 상부에 첨가하고, 150,000 내지 250,000g 에서 60 내지 100분 동안 초원심분리를 수행하여 엑소좀 유사 나노베지클을 획득하는 단계;를 더 포함하며, 상기 수크로즈 층은 용기 하단에서 상부 방향으로 55 내지 65% 수크로즈 층; 40 내지 50% 수크로즈 층; 25 내지 35% 수크로즈 층; 및 5 내지 10% 수크로즈 층; 이 순차적으로 적층된 것이다.
- [0040] 또한, 상기 (b-6) 단계의 상기 엑소좀 유사 나노베지클은 25 내지 35% 수크로즈 층 및 5 내지 10% 수크로즈 층의 중간층에서 수득된 것이다.
- [0041] 또한, 상기 (a) 단계의 인삼액은 상기 (a) 단계의 인삼액은, 인삼 분쇄물을 1500g 내지 2000g에서 10 내지 30분 동안 원심분리한 후, 5000g 내지 15,000g에서 30분 내지 90분 동안 원심분리하는 단계;를 통해 제조된 것이다.
- [0042] 상기 (b) 단계는 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 적절하게 실시될 수 있으며, 1회 내지 10회 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명에서, 본 발명의 제조 방법에 따라 획득된 상기 엑소좀 유사 나노베지클은 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 그 크기(직경)에 제한없이 이용할 수 있으나, 바람직하게는 50 내지 500 nm의 직경을 갖는 세포막 베지클일 수 있다. 예컨대, 상기 엑소좀 유사 베지클은 50 nm 이상, 60 nm 이상, 70 nm 이상, 80 nm 이상, 90 nm 이상 또는 100 nm 이상이면서, 500 nm 이하, 450 nm 이하, 400 nm 이하, 350 nm 이하, 300 nm 이하, 250 nm 이하, 200 nm 이하, 150 nm 이하 또는 100 nm 이하의 직경을 갖는 세포막 베지클일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 바람직하게는 100 내지 110 nm의 직경을 갖는다.
- [0044] 본 발명에서, 본 발명의 제조 방법에 따라 획득된 상기 엑소좀 유사 나노베지클은 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 그 음 표면 전하에 제한없이 이용할 수 있으나, 바람직하게는 -100 내지 -10 mV, 보다 바람직하게는 -50 내지 -10 mV, 가장 바람직하게는 -20 내지 -15 mV의 표면 전하를 갖는다.
- [0045] 본 발명의 엑소좀 유사 나노베지클은 예컨대, 표적 세포에서 원하는 기능을 효율적으로 수행할 수 있도록 막 성분이 화학적 또는 물리적으로 변형된 것일 수 있다. 예를 들어, 엑소좀 유사 나노베지클의 막 성분이 티올기(-SH) 또는 아민기(-NH₂)를 이용하여 화학적인 방법으로 변형되거나, 엑소좀 유사 나노베지클에 표적유도 물질, 세포막 융합 물질, 폴리에틸렌글리콜을 화학적으로 결합시켜 막 성분이 화학적으로 변형된 것을 포함할 수 있다.
- [0046] 또한, 추가적으로, 본 발명의 엑소좀 유사 나노베지클을 선별하기 위해 겔 여과(gel filtration) 또는 한외여과(ultrafiltration)를 사용할 수 있으며, 크기가 작은 분자를 제거하기 위해 여과 대신 투석을 사용할 수 있다.
- [0047] 본 발명자들은 생리학적으로 유효한 활성을 갖는 인삼-유래 엑소좀 유사 나노베지클을 분리 및 제조하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 이를 달성하는 최적 조건을 규명하였다.
- [0048] 본 발명의 방법에 따라 제조된 엑소좀 유사 나노베지클은 용이하고 안전하게 인삼으로부터 분리할 수 있어 생체에 적합하며, 이에 의약 또는 기능성 식품으로 개발하는 데 매우 유리할 수 있다.
- [0049] 또한, 종래의 엑소좀을 기반으로 하는 나노베지클은 균질하지 못하기 때문에 많은 한계를 가지고 있다. 예를 들어, 종래의 천연물 유래 엑소좀 유사 나노베지클은 의약 및 기능성 식품으로 개발하는 데 있어서 일정한 품질을 가지는 원료를 공급하는 것이 매우 어려웠다.
- [0050] 그러나, 본 발명의 최적 조건에 따라 분리된 엑소좀 유사 나노베지클은 균질하고 재현가능하며 고수율 및 고순도로 대량 생산이 가능하므로 상술한 문제점을 해결할 수 있는 방안을 제시한다.
- [0051] 본 발명의 일 실시예에서는, 확보된 인삼액에 68% 및 27% 수크로즈(sucrose) 쿠션 용액을 사용하여 초원심분리 후 두 개의 수크로즈 쿠션층 사이의 나노소포체(또는 extracellular vesicle; EV)를 포함하고 있는 층을 수집하고; 상기 EV에 차당 구배(8/30/45/60%)를 사용하여 초원심분리로 정제 후 8%와 30% 수크로즈 쿠션층 사이의 GDE를 포함하고 있는 층을 수집하고 이의 상층액을 분리함으로써, 순수 GDE를 획득하였다.

- [0053] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 상술한 인삼으로부터 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE) 분리 방법 및 및 이에 의해 분리된 GDE를 제공하는다:
- [0054] (a) 인삼액을 획득하는 단계; 및
- [0055] (b) 상기 인삼액을 수크로즈 밀도 구배(sucrose gradient) 및 초원심분리하여 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)을 획득하는 단계.
- [0056] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클을 획득하는 방법이므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0058] 본 발명의 인삼-유래 엑소좀-유사 나노베지클 제조 방법은 별도의 장비 공급이나 인력없이도 용이하게 획득할 수 있고, 또한, 대량 수득이 가능한 바, 이를 활용할 경우 경제성이 우수하며, 엑소좀-기반 개발 분야의 핵심기술로 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 도 1은 본 발명의 GDE의 분리방법을 도식화한 것이다.
- 도 2a 및 2b는 LC-MS/MS를 이용한 본 발명의 GDEs의 분석 결과를 보여준다.
- 도 3a 내지 3d는 본 발명의 GDEs의 분석 결과를 보여준다. 도 3a는 본 발명의 초원심분리 결과 분리 정제 산물인 GDEs를 보여주고, 도 3b는 상기 도 3a의 상기 GDEs (녹색 구간)의 농도를 보여주며, 도 3c는 본 발명의 GDEs의 NTA 검사 결과를 보여주고, 도 3d는 해당 구간의 DLS(dynamic light scattering) 결과를 보여준다. 해당 구간의 NTA, DLS로 농도, 크기 등을 보았을 때 순수 GDE임을 확인할 수 있다.
- 도 4는 본 발명의 GDE의 안정성을 확인한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0061] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 실시예 1. 본 발명의 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클 (GDE; Ginseng-derived exosome like nanoparticles) 제조
- [0064] 본 발명자들은 본 발명의 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클 (GDE; Ginseng-derived exosome like nanoparticles)을 하기와 같이 제조하였다(도 1).
- [0065] 먼저, 4년근 Panax 인삼을 1X PBS(phosphate-buffered saline)가 들어있는 블렌더에 넣어 갈고 순차적으로 2000g 에서 20분, 10000g 에서 60분의 2회 고속원심분리하여 파편을 제거한 인삼액(juice)을 제조하였다. 68% (v/v) 및 27% (v/v) 의 수크로즈 쿠션 용액을 두 층을 서로 혼합하지 않고 폴리카보네이트 병에 천천히 첨가하였다. 상기 두 개의 수크로즈 층 위로 인삼액을 쌓아 올려준 뒤 100,000g, 90 분 조건으로 초원심분리하였다. 이 후, 두 개의 수크로즈 쿠션층 사이의 나노소포체를 포함하고 있는 층(인삼 유래 EV)을 수집하였다. 이어서, 인삼 유래의 엑소좀-유사 나노베지클(Ginseng-derived exosome like nanoparticles, GDE)를 분리정제하기 위해 수크로즈 구배(8/30/45/60%)(v/v)를 사용하여 200,000g, 90 분 조건으로 첫번째 초원심분리하였다. 이때, 8% (v/v) 수크로즈층 위로 인삼유래 나노베지클층을 쌓아주었다. 두 번째 초원심분리 후 GDE를 포함하는 층을 8% (v/v)와 30% (v/v) 수크로즈 층 사이에서 얻을 수 있다.
- [0066] 상기 두 번째 초원심분리 후 8%와 30% 자당 층 사이에 위치한 GDE를 포함하는 층을 분리하고 상기 산물의 상층

액을 분리하여 최종산물로서 순수 GDE를 획득하였다.

[0068] **실시예 2. 본 발명의 GDE 성분 분석**

[0069] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 획득한 GDE의 성분을 확인하고자 통상적인 LC-MS/MS 방법을 이용한 정성적인 분석을 수행하였다.

[0070] 그 결과, 도 2a 및 2b에 나타난 바와 같이, 인삼의 유효성분인 진세노사이드(ginsenoside) 중 Rb1, Rg1, Rg3가 GDE에 얼마나 포함되어 있는지 분석했을 때, GDE 1ml를 기준으로 Rb1이 2475ng/ml로 가장 많이 포함되어 있었으며, Rg1 675ng/ml, Rg3 84ng/ml이 들어있는 것으로 확인되었다.

[0071] 또한, 본 발명자들은 DLS, NTA 및 TEM을 사용하여 GDE의 크기 분포, Zeta 전위 및 형태를 평가하였다.

[0072] 그 결과, 도 3b 내지 3d에 나타난 바와 같이, GDE는 1ml당 2.05×10^{13} 의 상당한 양의 갯수를 가지며, 200nm 미만의 크기를 가지고 있는 것을 알 수 있었다. 또한, GDE는 평균 직경이 105.8 nm이고 음의 표면 전하가 -20.7 mV 인 구형인 것으로 밝혀졌다. 또한, TEM을 이용하여 GDE는 베지클 형태의 나노입자임을 확인하였다.

[0074] (3) GDE 안정성

[0075] 본 발명자들은 동결건조된 GDE의 단백질과 총 RNA 농도를 측정하여 정량 분석을 수행하였고 90일 동안 GDE의 안정성을 평가하였다.

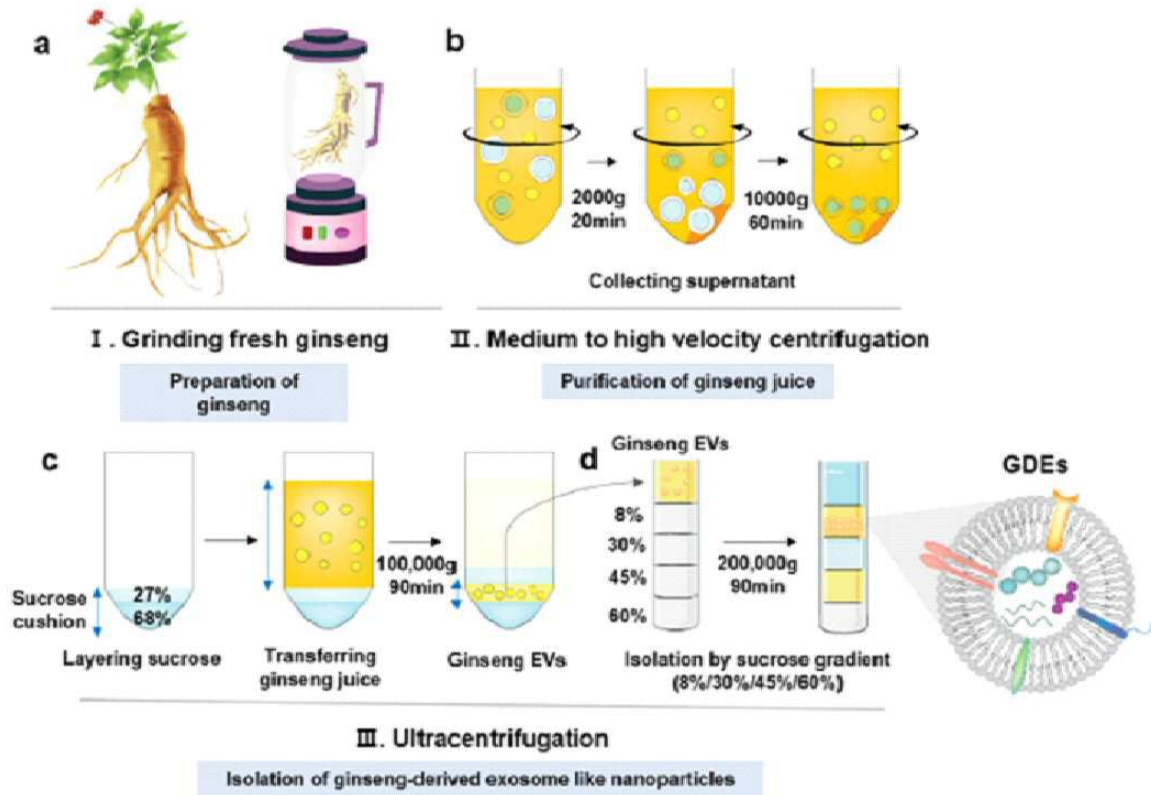
[0076] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, 동결건조된 GDE의 단백질과 총 RNA 농도 측정 결과 60일까지 안정성이 유지되는 것을 확인하였다.

[0078] 결론적으로, 본 발명에서는 인삼 유래 엑소좀 유사 나노베지클의 대량 생산에 사용할 수 있는 수크로즈 이중 분획 초원심분리법을 사용한 간단한 분리 프로토콜을 확립하였고, 동결건조 후 60일 동안 보관시에도 GDE의 안정성이 유지되었음을 확인하였다. 따라서, 다양한 효능을 가진 생리 활성 물질이 다량 포함된 엑소좀의 분리가 중요한 단계인 식물 유래 엑소좀 유사 나노입자 연구에 범용적으로 적용될 수 있다.

[0080] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

