(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월12일
(11) 등록번호 10-2706271
(24) 등록일자 2024년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/60 (2015.01) *A23K 10/22* (2016.01)
A23K 10/24 (2016.01) *A61P 37/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/60 (2013.01)
A23K 10/22 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2024-0071660
(22) 출원일자 2024년05월31일
심사청구일자 2024년05월31일
(56) 선행기술조사문헌
Fish & Shellfish Immunology, 128, 2022.9, pp.196-205

(73) 특허권자
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
마하나마 디조이사
대전광역시 유성구 배울1로 35, 409동 501호 (관평동, 대덕테크노밸리4단지아파트)
김태환
세종특별자치시 집현서로 16, 807동 101호 (집현동, 새나루마을8단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

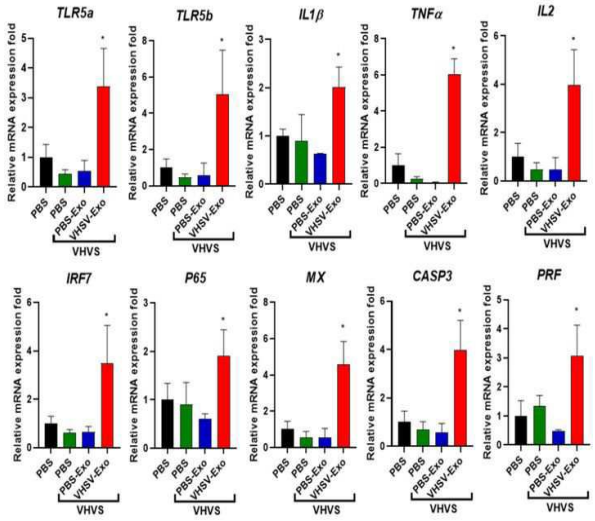
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 **바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 면역증진용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 면역증진용 조성물에 관한 것으로, 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(VHSV)가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 처리한 대식세포에서의 면역조절 활성이 증진된 효과가 있으므로, 면역조절제 또는 어류에서 VHSV 감염에 의한 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A23K 10/24 (2016.05)
A61P 37/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/2042 (2013.01)

(72) 발명자
차밀라니 라란티 니카피티야
대전광역시 유성구 죽동로279번길 69, 203호 (죽동)
샨 락말 에디리싱헤
캐나다 온타리오주 아타와 데일리 애비뉴 450번지 103호
애리야와라 헤와게 디미라 툴샨 자야디라가
대전광역시 유성구 한밭대로313번길 42, 302호 (장대동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180670
과제번호	2021R1A2C1004431
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	면역 활성 넙치로부터 분리된 면역원성 엑소좀의 어류 약리학적 적용연구
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 면역증진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀은 면역 관련 유전자의 발현량을 증진시키는 것을 특징으로 하는 면역증진용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 면역 관련 유전자는 Tlr2, Tlr4, IL6, IL10, Muc1, Ifnβ, Ifnα, Isg15 및 Hsp70 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 면역증진용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 면역 관련 유전자는 TLR5a, TLR5b, IL1β, TNFα, IL2, IRF7, P65, MX, CASP3 및 PRF 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 면역증진용 조성물.

청구항 5

바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 어류의 면역증진용 사료 첨가제.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 어류는 양식용 넙치 또는 가자미인 것을 특징으로 하는 어류의 면역증진용 사료 첨가제.

청구항 7

제5항의 사료 첨가제를 포함하는 어류 양식용 사료.

청구항 8

제7항의 사료를 양식중인 어류에게 급이하는 단계를 포함하는 어류의 면역증진 방법.

청구항 9

제7항의 사료를 양식중인 어류에게 급이하는 단계를 포함하는 양식 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염을 예방하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 면역증진용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역은 세균이나 바이러스 같은 병원체가 침입하지 못하도록 방어하거나, 병원체가 침입하더라도 이를 인식하고 저항할 수 있는 중요한 생체방어시스템으로, 몸 안에 들어온 병원체인 항원에 대하여 항체가 만들어져서 다음에 같은 항원이 침입하여도 다시 발병하지 않도록 저항력을 가지게 된 것 즉, 면역시스템이 전제된 생물이 감염이

나 질병에 대항하여 병원균을 죽이거나 무력화하는 작용 또는 그 상태를 말한다.

[0003] 면역계는 자연저항, 비특이성 면역체계 및 특이성 면역체계로 구분할 수 있다. 자연저항(1차 방어선)이란 미생물을 위시한 모든 침입자들을 그들의 종류에 관계없이 막아내는 해부 생리학적 요소들을 말하며, 비특이적 면역(2차 방어선)은 자연저항을 돌파하여 체내로 들어온 침입자들을 제거하는 식세포로 구성된 방어체계 및 특이성 면역계(3차 방어선)는 림프구들로 구성된 면역체계를 말하는데, 이 중 특이성 면역계는 기억능 및 자기와 비자기를 구분할 수 있는 능력을 지닌 고도로 발달한 면역체계이다. 또한, 백혈구는 2차 또는 3차 방어선을 구성하여 1차 방어선을 돌파하여 체내에 들어온 이물을 담당하게 되며, 세균, 바이러스 감염 또는 염증 반응 시, 대식세포 및 림프구 활성의 조절은 의약품의 치료 효과 결정에 있어서 중추적인 역할을 한다. 면역기능조절은 면역기능 증진과 면역기능 억제로 분류된다. 면역기능 증진은 저하된 인체의 면역기능을 증진하는 데 기여하는 것을 의미하고, 정상 면역기능을 증진시키는 경우도 포함될 수 있다. 면역기능 억제는 과도한 면역반응을 억제하는 기능이다. LPS와 같은 외부 유해인자의 자극에 의해 대식세포가 과대 생성하는 면역인자인 사이토카인과 일산화질소들은 만성염증을 유발하고, 그 결과 만성염증관련 질환을 유발한다고 알려져 있다. 그러나 천연물에 의한 정상상태의 대식세포가 생성하는 면역인자의 증가는 면역력을 증진시키고 면역저하와 관련된 질환을 억제한다고 알려져 있다.

[0004] 한편, 엑소좀(exosome)은 세포 내에서 생성되어 외부로 방출되는 세포 밖 소포체 (extracellular vesicles, EVs)의 일종으로, 진핵생물 체에서 세포 사이의 정보교환을 위해 분비되는 소포체로서 세포 외부로 방출되는 EV에는 엑소좀 외에도 미세소포(microvesicles, MVs), 세포사멸소포(apoptotic body) 등이 있으며, 이들은 각각 다른 크기의 구조적 다양성과 특징적인 내용물, 세포 기원 등의 다양성이 있다.

[0005] 엑소좀에는 다양한 생체 유래 물질이 포함되어 있으며, 이를 분비하는 모세포의 대략적인 특성과 상태를 반영하고 있다. 따라서 엑소좀 내 특정 생체분자의 존재 유무를 검출하여 질병을 진단하거나, 엑소좀에 약물이나 단백질을 인위적으로 포함시켜 암 등 난치성 질환 치료를 위한 차세대 수송체로 활용이 가능하다.

[0006] 엑소좀 관련 기술로서, 한국공개특허 제2020-0130410호에 면역-엑소좀 및 이의 사용 방법이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2023-0068231호에 엑소좀 기반 항바이러스 백신이 개시되어 있으나, 아직까지 본 발명의 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 면역증진용 조성물에 대하여 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 면역증진용 조성물을 제공하고, 대식세포에 상기 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(VHSV)가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 처리하여 면역조절 활성이 증진되는 효과가 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 면역증진용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 어류의 면역증진용 사료 첨가제를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 사료 첨가제를 포함하는 어류 양식용 사료를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 사료를 양식중인 어류에게 급이하는 단계를 포함하는 어류의 면역증진 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 사료를 양식중인 어류에게 급이하는 단계를 포함하는 양식 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염을 예방하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 면역증진용 조성물에 관한 것으로, 상기 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(VHSV)가 감염된 올리브 가자

미 혈장 유래 엑소좀은 대식세포에서의 면역조절 활성을 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀의 특성을 확인한 결과이다. (A) PBS-Exo(a) 및 VHSV-Exo(b)의 대표적인 전자현미경 이미지이며, PBS-Exo 및 VHSV-Exo의 확대된 입자 이미지는 각각 a' 및 b'으로 표시하였다. (B) PBS-Exo 및 VHSV-Exo의 혈장 유래 엑소좀의 크기 분포 및 농도 프로파일을 나타낸 것이고, (C) PBS-Exo 및 VHSV-Exo의 혈장 유래 엑소좀의 제타-포텐셜을 확인한 결과이며, (D) 폴리아크릴아마이드 겔 전기 영동법에 의한 PBS-Exo 및 VHSV-Exo의 단백질 프로파일링 결과이고, (E) PBS-Exo 및 VHSV-Exo의 엑소좀 단백질 마커의 면역블롯팅 분석이며, (F) PBS-Exo 및 VHSV-Exo의 AChE 효소 활성을 확인한 결과이다.

도 2는 Raw 264.7 세포에 PBS-Exo(50 및 100㎍/㎖) 및 VHSV-Exo(50 및 100㎍/㎖)를 처리한 후, 면역 관련 유전자의 발현량 변화를 비교한 결과이다. Vechicle은 엑소좀을 처리하지 않은 군이고, PBS-Exo는 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 처리한 군이며, VHSV-Exo는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 처리한 군이다. *은 PBS-Exo 처리군 대비 VHSV-Exo 처리군의 면역 관련 유전자의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.05$이다.

도 3은 제브라피쉬 동물 모델에, PBS-Exo 또는 VHSV-Exo를 10㎍/fish의 용량으로 투여한 후, 면역 관련 유전자(A); 및 Hsp90, Ifnγ 단백질(B);의 발현량 변화를 확인한 결과이다. PBS-Exo는 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 처리한 군이며, VHSV-Exo는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 처리한 군이다. *은 PBS-Exo 투여군 대비 VHSV-Exo 투여군의 면역 관련 유전자의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.05$이다.

도 4는 올리브 가자미 동물 모델에, PBS-Exo 또는 VHSV-Exo를 120㎍/fish의 용량으로 전처리(24 hpt)한 후, 면역 관련 유전자의 발현량 변화를 확인한 결과이다. PBS-Exo는 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 처리한 군이며, VHSV-Exo는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 처리한 군이다. *은 PBS-Exo 처리군 대비 VHSV-Exo 처리군의 면역 관련 유전자의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.05$이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 면역증진용 조성물에 관한 것이다.

[0016] 상기 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀은 면역 관련 유전자의 발현량을 증진시킬 수 있으며, 바람직하게는 Tlr2(toll like receptor 2), Tlr4(toll like receptor 4), IL6(Interleukin 6), IL10(Interleukin 10), Muc1, Ifnβ, Ifnα, Isg15 및 Hsp70 중에서 선택된 하나 이상의 면역 관련 유전자의 발현량을 증진시킬 수 있고, TLR5a(toll like receptor 5a), TLR5b(toll like receptor 5b), IL1β(Interleukin 1β), TNFα, IL2(Interleukin 2), IRF7, P65, MX, CASP3 및 PRF 중에서 선택된 하나 이상의 면역 관련 유전자의 발현량을 증진시킬 수 있다.

[0017] 상기 IL6는 전염증성 사이토카인이고, IL10는 항염증성 사이토카인이며, Muc1은 항미생물 활성(antimicrobial activity)을 나타내는 것이고, Ifnα, Ifnβ, Isg15 및 Mx는 항바이러스 활성 나타내는 유전자이다.

[0018] 또한, 본 발명은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 어류의 면역증진용 사료 첨가제에 관한 것이다. 상기 어류는 양식용 넙치 또는 가자미인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0019] 본 발명의 사료 첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다. 본 발명에서 용어 '사료'는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다. 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 이용되는 사료를 이용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 이용되거나 2종 이상을 혼합하여 이용될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 사료 첨가제를 포함하는 어류 양식용 사료를 제공한다.

[0021] 본 발명의 사료의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니며, 분말사료, 고형사료, 습윤 펠렛사료, 건조 펠렛사료, EP(extruder pellet) 사료, 날먹이 등 어떠한 사료라도 무방하다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 사료를 양식중인 어류에게 급이하는 단계를 포함하는 어류의 면역증진 방법을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 사료를 양식중인 어류에게 급이하는 단계를 포함하는 양식 어류의 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염을 예방하는 방법을 제공한다.

[0024] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0025] **실시예 1. 올리브 가자미(Olive flounder)의 VHSV(Viral hemorrhagic septicemia virus) 챌린지, 채혈 및 혈장 분리**

[0026] 올리브 가자미(784.33±62.8g, 41.21±2.54㎝)는 올리브 가자미 양식장에서 구입하여 해수(20ℓ 탱크/생선)에서 20±2℃의 온도로 유지하였다.

[0027] 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(VHSV)는 10% 소 태아 혈청(FBS)(Welgene, 경상북도 경산시, 한국)과 항생제(100IU/㎖ 페니실린 및 100㎍/㎖의 스트렙토마이신(Gibco, NY, 미국))가 보충된 L-15(Leibovitz) 배지를 이용하여 FHM(fathead minnow) 세포에서 배양하였다. 높은 세포변성 효과(CPE)를 나타내는 배양 웰을 채집하고 원심분리(4℃에서 10분 동안 4000×g)하였다. $TCID_{50}$은 상층액에서 계산되었고 향후 실험을 위하여, 상층액의 부분 시료를 -80℃에서 저장하였다.

[0028] 1㎖ 주사기를 이용하여, 1.33×10^{8} $TCID_{50}$/㎖ VHSV 200㎕(2.66×10^{7} $TCID_{50}$/fish)를 올리브 가자미의 복강 내 주입하였다(n=10). 대조군 (n=10)에는 1× 인산 완충 식염 완충액(PBS) 200㎕를 복강 내(i.p) 주입하였다. 96hpc(hour post challenge)후, 50mg/ℓ의 트리카인 메탄설포네이트(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)를 이용하여 제브라피쉬를 마취시키고, 물고기의 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액 채취는 0.5M의 EDTA 75㎕가 첨가된 10㎖ 주사기(21G 121×1 1/4")를 이용하였다. 혈액을 K2EDTA가 함유되고, Hemogard Closure(BD, 영국 플리머스)가 있는 BD 백터테이너 플라스틱 채혈 튜브(10㎖)에 넣고, 튜브를 8~10회 뒤집어서 적절하게 혼합하고 실온(RT; 25±2℃)에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 혈장 분리를 위하여, 혈액을 15㎖ 원추관에 넣고 스윙 버킷 원심분리를 이용하여 20℃에서 2000×g에서 15분 동안 원심분리하여 적혈구, 말초혈액 및 백혈구를 제거하였다. 상등액(혈장)을 새 튜브로 조심스럽게 옮기고, 20℃에서 2000×g에서 10분 동안 정제하여 세포 잔여물을 제거하였다. 생성된 혈장 상등액을 0.45㎛ 미니스타트(Ministart) 주사기 필터를 통해 분리 및 여과하고 즉시 이용할 수 있도록 1.5㎖ 마이크로튜브에 분주하여 엑소좀 분리 시까지 -80℃에서 보관하였다.

[0029] **실시예 2. 올리브 가자미의 혈장 유래 엑소좀 분리**

[0030] 상업적으로 이용 가능한 키트 또는 초원심분리 방법을 모두 이용하여 종래의 방법에 따라 대조군과 VHSV 챌린지 혈장에서 모두 엑소좀을 분리하였다. 엑소좀의 기본 특성에 대하여, 상업적으로 이용 가능한 exoEasy Maxi 키트(QIAGEN, Hilden, 독일)를 이용하여 분석하였다.

[0031] 3㎖의 PBS로 6㎖의 혈장을 희석하고(2:1), 0.2㎕ 미니스타트(Ministart) 주사필터를 이용하여 여과시킨 후, 400㎕의 XE 버퍼를 이용하여 엑소좀을 용출하였다. 12㎖의 PBS로 6㎖의 혈장을 희석하고(1:2), 2000×g에서 30분, 10,000×g에서 30분 동안 원심분리하여 세포 및 세포 잔여물을 제거하였다. 엑소좀을 펠렛화하기 위하여, 4℃에서 2시간 동안 100,000×g에서 초원심분리하였다. 오염된 단백질 엑소좀을 제거하기 위하여, PBS(12㎖)를 이용하여 세척하였고, 초원심분리(4℃에서 1시간 동안 100,000×g)한 후, 다시 펠렛화하였다. 최종적으로, 엑소좀 펠렛은 250㎕(~40㎕ 플라즈마)의 여과된 PBS에 재현탁되었다. 대조군과 VHSV 챌린지 혈장에서 분리된 엑소좀은 각각 'PBS-Exo' 및 'VHSV-Exo'로 명명하였다. 상기 분리된 엑소좀은 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0032] **실시예 3. PBS-Exo 및 VHSV-Exo의 면역조절 엑소좀의 특성 분석**

[0033] **(1) 투과전자현미경(TEM) 분석**

[0034] 엑소좀의 존재를 시각적으로 확인하기 위하여, PBS-Exo 및 VHSV-Exo를 300kV의 가속 전압에서 작동하는 전계 방출 건(FEG)(모델: Tecnai F30 G2 super-twin; FEI Company, Hillsboro, OR, USA)으로 투과전자현미경(TEM)을

이용하여 확인하였다.

[0035] 10㎕의 엑소좀을 폼바 탄소 코팅된 구리 그리드 디스크에 10분 동안 놓고 과잉 시료를 제거하였다. 30초 동안 그리드를 건조시키고, 5㎕의 2% 우라닐 아세테이트(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 그리드 상에 놓고 여과지를 이용하여 5초 이내에 제거하였다. 5분 동안 그리드를 건조시키고, TEM을 이용하여 확인하였다.

[0036] **(2) 나노입자 추적 분석(NTA) 및 제타 포텐셜 분석**

[0037] 입자 크기, 분포 및 입자 농도는 532nm 레이저(녹색)와 고감도 과학적 CMOS(sCMOS) 카메라로 구성된 NanoSight NS300 시스템(Malvern Technologies, Malvern, UK)을 이용하여 나노입자 추적 분석(NTA)으로 측정되었다. 앞서 설명한 종래의 방법에 따라 시료를 준비하였다. 입자 포획 및 데이터 분석은 NTA 3.4 소프트웨어를 이용하였다. NTA 분석에서는 개별 엑소좀 시료의 5회 반복 측정한 후 이들의 평균 값을 수집하였다.

[0038] 제타 포텐셜 입자 크기 분석기(Zetasizer Nano ZSP, Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK)를 이용하여 PBS-Exo 및 VHSV-Exo 모두의 제타 포텐셜을 측정하였다. 하나의 개별 엑소좀 시료를 제타 포텐셜 분석을 위하여, 3번 반복 분석하고 이들의 평균 값을 수집하였다.

[0039] **(3) 쿠마쉬(Coomassie) 염색, SDS-PAGE 전기영동 및 면역블롯팅 분석**

[0040] 단백질 프로파일링 및 면역블롯팅을 위한 시료 준비는 분리된 온전한 엑소좀을 이용하여 표준 절차에 따라 실시하였다. 표준 브래드포드 검정(BioT-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)법으로, PBS-Exo 및 VHSV-Exo 용해물의 단백질 농도를 확인하였으며, 총 단백질량을 기반으로 수율을 계산하였다. 단백질 프로파일링 분석을 위하여, PBS-Exo 및 VHSV-Exo 용해물(30㎍)의 12% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 실시하였고, 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250 표준 탈염색 절차를 따랐다.

[0041] 엑소좀의 단백질 마커의 발현량을 확인하기 위하여, 앞서 설명한 대로 면역블롯팅 분석을 실시하였다. 12% SDS-PAGE에서 30㎍의 엑소좀 단백질 용해물에 대한 전기영동을 실시하였고, 이모빌론-P 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(Millipore Corp. Bedford, MA, 미국)으로 옮겼다. 상기 멤브레인을 상온(실온)에서 1시간 동안 0.05% 트윈-20을 포함하는 5%(w/w) 탈지유(Gibco™, Waltham, MA, USA)와 트리스 완충 식염수(TBS-T)를 이용하여 차단하였다. 이후, 멤브레인을 엑소좀 단백질 마커(CD9, CD63, CD81) 및 혈장 오염 단백질인 알부민(ALB)의 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 이후, 멤브레인을 0.05% 트윈-20(PBS-T)을 포함하는 PBS로 10분 동안 세 번 세척하고, RT에서 1시간 동안 2차 항체를 처리하였다. 상기 과정에서 멤브레인을 PBS-T로 10분 동안 3회 세척하였다. 웨스턴 블롯팅 검출 시약(Western Femto ECL Kit, LPS Solution, 대전, 한국)을 이용하여 HRP 결합 항체의 신호를 검출하였고, 화학발광 검출 시스템(Fusion Solo S, Vilber, Lourmat, 프랑스)을 이용하여 시각화하였다. 항체 정보는 표 1에 개시하였다.

표 1

[0042] 단백질 마커(CD9, CD63, CD81) 및 혈장 오염 단백질인 알부민(ALB)의 1차 항체 정보

1차 항체	희석 비율	Cat. No. 및 제조사	2차 항체	희석 비율	Cat. No. 및 제조사
CD9	1000	#EXOAB-CD9A-1 (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA)	Goat anti-rabbit IgG-HRP	20000	#EXOAB-HRP (System Biosciences, CA, USA)
CD63	1000	#A5271 (ABclonal, Woburn, MA, USA)	Goat anti-rabbit IgG-HRP	10000	AS014 (ABclonal, MA, USA)
CD81	1000	#EXOAB-CD81A-11 (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA)	Goat anti-rabbit IgG-HRP	20000	#EXOAB-HRP (System Biosciences, CA, USA)
ALB (F-10)	1000	#SC-271605 (Santa Cruz Biotechnology, INC., Texas, USA)	Mouse HRP	3000	#GTX213111-01 (GeneTex, Alton Pkwy Irvine, CA, USA)

[0043] PBS-Exo 및 VHSV-Exo에서 아세틸콜린에스테라아제(AChE) 활성을 정량화하기 위하여, AChE 활성 분석 키트(ab138872, ABCam, Cambridge, UK)를 제조업체 프로토콜을 약간 수정하여 분석하였다. 50㎕의 AChE 표준 및 시료(엑소솜 및 혈장)을 아세틸콜린, 엘먼 시약(5,5'-디티오-비스-2-니트로벤조산, DTNB) 및 분석 완충액을 포함하는 반응 혼합물 50㎕에 혼합하고, 96웰 플레이트에 로딩하였다. 암실에서 20분 동안 배양한 후, 형광은 각각

490nm 및 520nm의 여기 및 방출 파장에서 Glomax 다중 검출 시스템(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다. 시료의 AChE는 AChE 표준 곡선을 이용하여 정량화되었다.

[0044] 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이, 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀(PBS-Exo)과 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스가 감염된 올리브 가자미 혈장 유래 엑소좀(VHSV-Exo)의 특성을 확인하여 개시하였다.

[0045] **실시예 4. 엑소좀 내재화 확인**

[0046] 제조업체 프로토콜에 따라 엑소스파클러 엑소좀 막 라벨링 키트-그린(네덜란드 암스테르담 도진도 연구소)을 이용하여 어류 세포에 의해 PBS-Exo 및 VHSV-Exo가 내재화될 수 있는지를 조사하기 위하여, 엑소좀에 라벨을 부착하고 FHM(Fathead Minnow) 어류 상피 세포주에 노출시켰다.

[0047] 엑소좀(10㎍; Bradford 분석에 의한 단백질 농도 기준)의 최종 부피가 100㎕가 되도록 PBS로 희석하였다. 이후, 멤 염료 원액(2㎕)을 첨가하고 볼텍싱하였다. 30분 동안 배양한 후, 혼합물을 여과 관으로 옮기고 원심분리(RT에서 5분 동안 3000×g)하였다. 이후, 동일한 원심분리 조건으로 3회 동안 PBS(100㎕)를 이용하여 여과 관을 세척하였다. 라벨이 부착된 엑소좀을 회수하기 위하여, PBS(50㎕)를 여과 관에 첨가하였고, 10회 조심스럽게 피펫팅하였다. 종래의 방법에 따라 FHM 세포를 유지하였다. 12웰 플레이트에 1.25×10^4 세포/웰의 세포 밀도로 세포를 분주하였고, 20℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 신선한 배지로 교체하고 세포 상층액을 제거한 후, PBS로 세포를 세척하였다. 라벨이 부착된 엑소좀(50㎕)을 추가하고 신선한 배지로 교체하였다. 그런 다음 세포를 4'6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)로 핵을 염색하였다. 광학현미경(DMI8, Leica, Wetzlar, Germany)으로 라벨이 부착된 엑소좀의 녹색 형광을 확인하였다(Mem Dye -Green의 여기 및 방출 파장은 각각 488nm 및 490nm이다).

[0048] **실시예 5. VHSV-Exo의 체외 면역조절 활성 확인**

[0049] PBS-Exo 및 VHSV-Exo 처리 시, 마우스의 대식세포(Raw 264.7) 세포에서 면역 유전자의 발현량을 분석하여 VHSV-Exo의 면역 조절 효과 확인하였다.

[0050] 구체적으로, 톨라이크 수용체(Tlr2 및 Tlr4), 염증성 사이토카인(IL-6 및 IL-10), 항균 활성/뮤신(Muc1), 항-바이러스(IFN-α, IFN-β 및 Isg15)의 유전자 발현량을 확인하였다.

[0051] 10% (v/v) 소 태아 혈청 (FBS) 및 항생제를 포함하는 DMEM 용액(Gibco™, Grand Island, NY, USA)에서 2×10^5 cells/㎖의 농도로 Raw 264.7 세포를 6웰 플레이트(2㎖)에 접종하였고, 5% CO_2를 포함하는 가습 분위기에서 37℃에서 밤새 배양하였다.

[0052] 이후, 배지를 신선한 배지로 교체하고, 상기 세포에 50㎍/㎖ 및 100㎍/㎖의 PBS-Exo 및 VHSV-Exo (처리당 3회 반복)를 처리하였다. 엑소좀을 처리하지 않은 세포에는 1× PBS를 처리하여 음성대조군으로 사용하였다.

[0053] 엑소좀을 처리한 후, 세포를 37℃에서 24시간 동안 배양한 후 세포를 수확하였고, RNA 분리까지 액체 질소에서 냉동보관하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 NucleoSpin RNA Mini 키트(Machey-Nagel, Duren, 독일)를 이용하여 RNA를 분리하였다. cDNA 합성 및 역전사 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR) 분석은 종래의 방법에 따라 실시하였다. 표 2에 프라이머 서열을 개시하였다.

표 2

[0054] 마우스 모델에서의 qRT-PCR 분석에 사용된 프라이머 서열

Gene name	방향	서열(5'->3')	서열번호
Toll-like receptor 2(*Tlr2*)	정방향	CACTATCCGGAGGTTGCATATC	1
Toll-like receptor 2(*Tlr2*)	역방향	GGAAGACCTTGCTGTTCTCTAC	2
Toll-like receptor 4(*Tlr4*)	정방향	GCTTACACCACCTCTCAAACT	3
Toll-like receptor 4(*Tlr4*)	역방향	ACAGCCACCAGATTCTCTAAAC	4
Interleukin 6(*Il6*)	정방향	CTTCCATCCAGTTGCCTTCT	5
Interleukin 6(*Il6*)	역방향	CTCCGACTTGTGAAGTGGTATAG	6
Interleukin 10(*Il10*)	정방향	TTGAATTCCCTGGGTGAGAAG	7
Interleukin 10(*Il10*)	역방향	TCCACTGCCTTGCTCTTATTT	8
Mucin 1(*Muc1*)	정방향	GGCATTCGGGCTCCTTTCTT	9
Mucin 1(*Muc1*)	역방향	TGGAGTGGTAGTCGATGCTAAG	10
Interferon beta 1(*Ifnβ1*)	정방향	TCCAAGAAAGGACGAACATTCG	11

Interferon beta 1(*Ifnβ1*)	역방향	TGAGGACATCTCCCACGTCAA	12
Interferon alpha 1(*Ifnα1*)	정방향	GTGACCTTCCTCAGACTCATAAC	13
Interferon alpha 1(*Ifnα1*)	역방향	CAAAGTCCTTCCTGTCCTTCA	14
Interferon stimulated gene 15(*Isg15*)	정방향	CTGGGACCTAAAGGTGAAGATG	15
Interferon stimulated gene 15(*Isg15*)	역방향	CTTCTGGGCAATCTGCTTCT	16
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(*Gapdh*)	정방향	AGGTCATCCCAGAGCTGAACG	17
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(*Gapdh*)	역방향	CACCCTGTTGCTGTAGCCGTAT	18

[0055] 도 2에 개시한 바와 같이, Raw 264.7 세포에 PBS-Exo(50 및 100㎍/㎖) 및 VHSV-Exo(50 및 100㎍/㎖)를 처리한 후, 면역 관련 유전자의 발현량 변화를 비교한 결과, 아무것도 처리하지 않은 군(Vehicle) 대비 PBS-Exo 처리군의 면역 관련 유전자의 발현량은 약간 감소하거나 변화가 거의 나타나지 않았으나, PBS-Exo 처리군 대비 VHSV-Exo 처리군의 면역 관련 유전자의 발현량이 통계적으로 유의미하게 더 증가한 것을 확인하였다.

[0056] **실시예 6. VHSV-Exo의 생체 내 면역조절 활성 확인**

[0057] **(1) 성체 제브라피쉬의 후처리 시, 면역 관련 유전자 전사 및 단백질 발현 양상**

[0058] 모든 생체 내 실험은 기관 동물 윤리 지침에 따라 충남대학교(202310A-CNU-191) 위원회의 지침에 따라 실시하였다.

[0059] 온도가 28±1.5℃이고, 명/암(14/10시간) 주기 및 500±50㎲/sm에서 전도도를 가진 자동 물 재순환 시스템에서 야생형 AB 성체 제브라피쉬를 사육하였다. 제브라피쉬에게 하루에 체중의 4%에 해당하는 양의 먹이를 공급하였다. mRNA 발현량 평가 실험을 위하여, 제브라피쉬를 무작위로, 3개의 군(PBS(그룹 1), PBS-Exo(그룹 2) 및 VHSV-Exo(그룹 3))으로 분류하고, 각 군은 두 개의 16ℓ 탱크에, 탱크 당 15마리의 제브라피쉬를 할당하였다. 이후, 트리칸 완충용액(160㎍/㎖)을 이용하여 제브라피쉬를 마취하고, 상기 그룹 2 및 그룹 3에, 제브라피쉬 당 10㎍의 PBS-Exo와 VHSV-Exo를 각각 복강 내(ip)로 주입하였다. 그룹 1에는 그룹 2와 그룹 3에서 주입된 양과 동일한 부피(10㎍)의 PBS를 주입하였다. 제브라피쉬의 사육 환경은 27±1℃ 및 24hpt(h post-treatment)를 유지하였다. 이후, 각각 제브라피쉬(n=6)를 희생시키고, mRNA(n=3/replicate) 및 단백질 발현량 분석(n=3/replicate)을 위하여, 신장(kidney)을 수집하였다. 10㎕의 PBS가 주입된 대조군도 PBS-Exo군 및 VHSV-Exo군과 동일한 방법으로 처리하였다. 표 3에 프라이머 서열을 개시하였다.

표 3

[0060] 제브라피쉬(Zebrafish) 모델에서의 qRT-PCR 분석에 사용된 프라이머 서열

Gene name	방향	서열(5'->3')	서열번호
Toll-like receptor 2(*tlr2*)	정방향	TCTCCGTCTTGGTTTCAC	19
Toll-like receptor 2(*tlr2*)	역방향	GGTCCCACAGTTGAGTATG	20
Toll-like receptor 4b(*tlr4b*)	정방향	GGAATAATGGGCAGCCGTAAG	21
Toll-like receptor 4b(*tlr4b*)	역방향	AGCGACACCAGGAACTATCAATG	22
Tumor necrosis factor alpha(*tnfα*)	정방향	AGAAGGAGAGTTGCCTTTACCGCT	23
Tumor necrosis factor alpha(*tnfα*)	역방향	AACACCCTCCATACACCCGACTTT	24
Interleukin 6(*il6*)	정방향	TCAACTTCTCCAGCGTGATG	25
Interleukin 6(*il6*)	역방향	TCTTTCCCTCTTTTCCTCCTG	26
Interleukin 10(*il10*)	정방향	CCCTATGGATGTCACGTCATG	27
Interleukin 10(*il10*)	역방향	CATATCCCGCTTGAGTTCCTG	28
Heat shock protein 70(*hsp70*)	정방향	CATGGTCCTGGTGAAGATGAA	29
Heat shock protein 70(*hsp70*)	역방향	GTCTGTGGGACTCGTTGAAATA	30
β-actin(*Zf*)	정방향	AATCTTGCGGTATCCACGAGACCA	31
β-actin(*zf*)	역방향	TCTCCTTCTGCATCCTGTCAGCAA	32

[0061] 도 3(A)에 개시한 바와 같이, 제브라피쉬 동물 모델에, PBS-Exo 또는 VHSV-Exo를 10㎍/fish의 용량으로 투여한 후, 면역 관련 유전자의 발현량 변화를 비교한 결과, 아무것도 처리하지 않은 군(Vehicle) 대비 PBS-Exo 처리군의 면역 관련 유전자의 발현량은 약간 증가하였으나, PBS-Exo 처리군 대비 VHSV-Exo 처리군의 면역 관련 유전자

의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가한 것을 확인하였다.

[0062] **② 단백질 발현 분석**

[0063] 단백질 발현량 변화를 확인하기 위하여, 96 hpc한 신장 조직을 이용하여 면역블롯 분석하였다. HSP90 및 IFNγ를 1차 항체로 사용하였다. 항체 정보는 표 4에 개시하였다.

표 4

[0064] HSP90 및 IFNγ 항체 정보

1차 항체	희석 비율	Cat. No. 및 제조사	2차 항체	희석 비율	Cat. No. 및 제조사
Hsp90	1000	#4874 (Cell signalling Technology, MA, USA)	Anti-rabbit IgG - HRP	3000	#7074 (Cell signalling Technology, MA, USA)
IFNγ	1000	KP1233Z-100 (Kingfisher Biotech, Inch, MI, USA)	Anti-rabbit IgG - HRP	3000	#7074 (Cell signalling Technology, MA, USA)
β-actin	1000	Sc-4778 (Santa Cruz Biology Inc, OR, USA)	Anti-rabbit IgG - HRP	3000	GTX2113111-01 (GeneTex, Quebec, Canada)

[0065] 도 3(B)에 개시한 바와 같이, 제브라피쉬 동물 모델에, PBS-Exo 또는 VHSV-Exo를 10㎍/fish의 용량으로 투여한 후, 면역 관련 Hsp90 및 Ifnγ 단백질의 발현량 변화를 확인한 결과, PBS-Exo 군 대비 VHSV-Exo 군의 Hsp90 및 Ifnγ 단백질의 발현량이 현저하게 증가하였다.

[0066] **(2) 처리 후 올리브 가자미의 면역유전자 전사 및 단백질 발현량 변화 확인**

[0067] 제브라피쉬를 4개 그룹[1)PBS; 2)PBS+VHSV, 3)PBS-Exo+VHSV, 4)VHSV-Exo+VHSV]으로 분류하였다. 총 12마리의 물고기 중에서, 각 그룹에 3마리씩 별도의 20ℓ 탱크(n=3/탱크)에 할당하였다. 그룹 3 및 그룹 4에, 각각 120㎍의 PBS-Exo 및 VHSV-Exo를 각각 복강 내 주사(60㎕)하였다. 그룹 1과 그룹 2에는 PBS(60㎕)를 엑소좀과 동일한 방법으로 주입하였다. 24시간 후, 그룹 2, 3, 4에 7.89×10^{8} $TCID_{50}$/㎖의 바이러스 저장용액에서 60㎕를 취해, 4.73×10^{7} $TCID_{50}$/물고기의 양으로, VHSV를 복강 내로 주입하였다. 그룹 1의 제브라피쉬는 바이러스를 감염시키지 않은 상태로 유지하였고, VHSV와 동일한 부피(60㎕)의 PBS를 주입하였다. 탱크의 수온은 20±1.5℃이다. 이후, 각 그룹으로부터, 면역 조절 및 단백질 발현 분석을 위하여, 96hpc 후, 신장 조직을 수집하였다

[0068] **① 유전자 발현량 분석에 의한 면역조절 특성**

[0069] 엑소좀의 면역 조절 효과를 확인하기 위하여, 올리브 가자미 신장 조직의 면역 유전자 전사 분석을 96 hpc(hour post challenge)에서 테스트하였다. 테스트한 면역 유전자는 수용체(*TLR5a* 및 *TLR5b*), 염증성 사이토카인(*IL1β*, *TNFα* 및 *IL2*), 전사인자/조절분자(*IRF7* 및 *p65*), 항바이러스제(*Mx*), 세포사멸(*CASP3* 및 *PRF*) 기능 관련 유전자이다. 상대적인 mRNA 발현량은 올리브 가자미의 β-actin을 하우스키핑 유전자로 이용하여 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 방법으로 계산하였다. 표 5에 프라이머 서열을 개시하였다.

표 5

[0070] 올리브 가자미(Olive flounder) 모델에서의 qRT-PCR 분석에 사용된 프라이머 서열

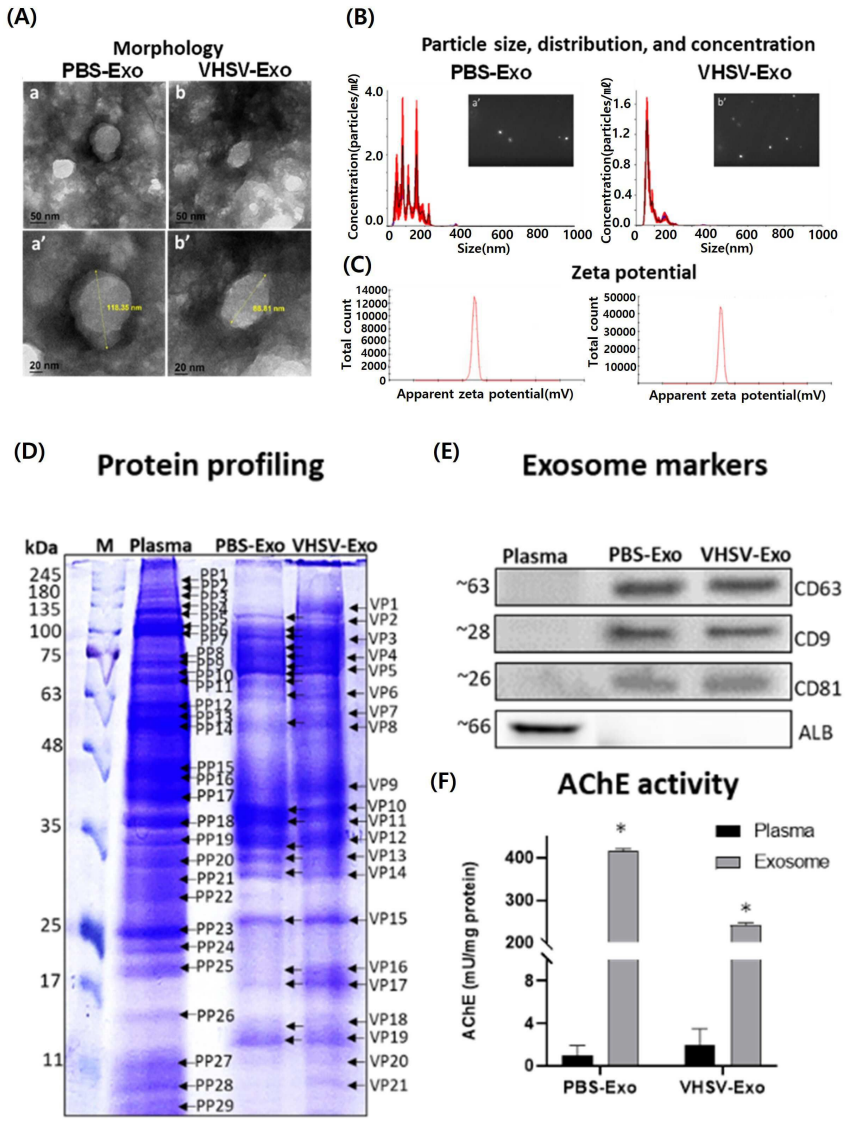
Gene name	방향	서열(5'->3')	서열번호
Toll-like receptor 5a(*TLR5a*)	정방향	CTGCTCTTCCTCCCAATATCAC	33
Toll-like receptor 5a(*TLR5a*)	역방향	GACTGCATGCCCAGATCTAAT	34
Toll-like receptor 5b(*TLR5b*)	정방향	AGTAGGTGGGTGGTGATTAGA	35
Toll-like receptor 5b(*TLR5b*)	역방향	CGCACAGAGTCGTTCTTCTT	36
Interleukin-1beta(*IL1β*)	정방향	GTCGTTCTGGGCATCAAAGA	37
Interleukin-1beta(*IL1β*)	역방향	TCCAGGTCGCATTTGTTCTC	38
Tumor necrosis factor alpha(*TNFα*)	정방향	AAACACCTCACGTCCATCA	39
Tumor necrosis factor alpha(*TNFα*)	역방향	GCGTCCTCCTGACTCTTCT	40
Interleukine 2(*IL2*)	정방향	AAGCCAGATGTTTACCCATAGAG	41
Interleukine 2(*IL2*)	역방향	TCACATTTGTTGGAGCGTAGA	42
Interferon regulatory factor 7(*IRF7*)	정방향	TCTGATCTGTCGGCACTTTC	43

Interferon regulatory factor 7(*IRF7*)	역방향	CCGAACACGGAGTTAATGAG	44
p65 NF-kB	정방향	ATTACCCCAACAGCATCGTC	45
p65 NF-kB	역방향	ACATCAACTCATCAAACTCATCC	46
Myxovirus resistance(Mx)	정방향	TCACTGGATTTCCCAACCTC	47
Myxovirus resistance(Mx)	역방향	TGTCACTCAAACTGCTGCTG	48
Caspase 3(*CASP3*)	정방향	ACATCATGACACGGGTGAAC	49
Caspase 3(*CASP3*)	역방향	TCCTTCGTCAGCATTGACAC	50
Perforin(*PRF*)	정방향	AACAACAACAACAACCCACAC	51
Perforin(*PRF*)	역방향	TGTCCCTGTCCCACACTT	52
β-actin(*Of*)	정방향	GCTGTCTTTCCCTCCATTGT	53
β-actin(*Of*)	역방향	CTCTTGCTCTGGGCTTCATC	54

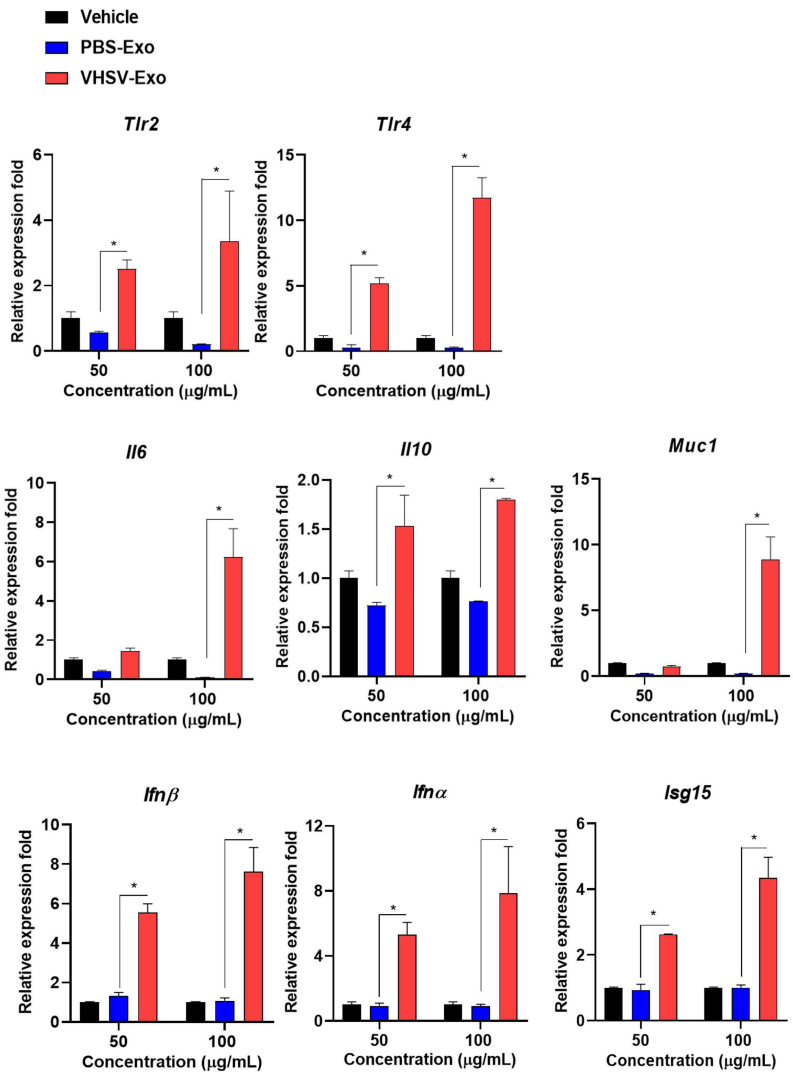
[0071] 도 4에 개시한 바와 같이, 올리브 가자미 동물 모델에, PBS-Exo 또는 VHSV-Exo를 120㎍/fish의 용량으로 전처리(24 hpt)한 후, 면역 관련 유전자의 발현량 변화를 확인한 결과, PBS-Exo 처리군 대비 VHSV-Exo 처리군의 면역 관련 유전자의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다.

도면

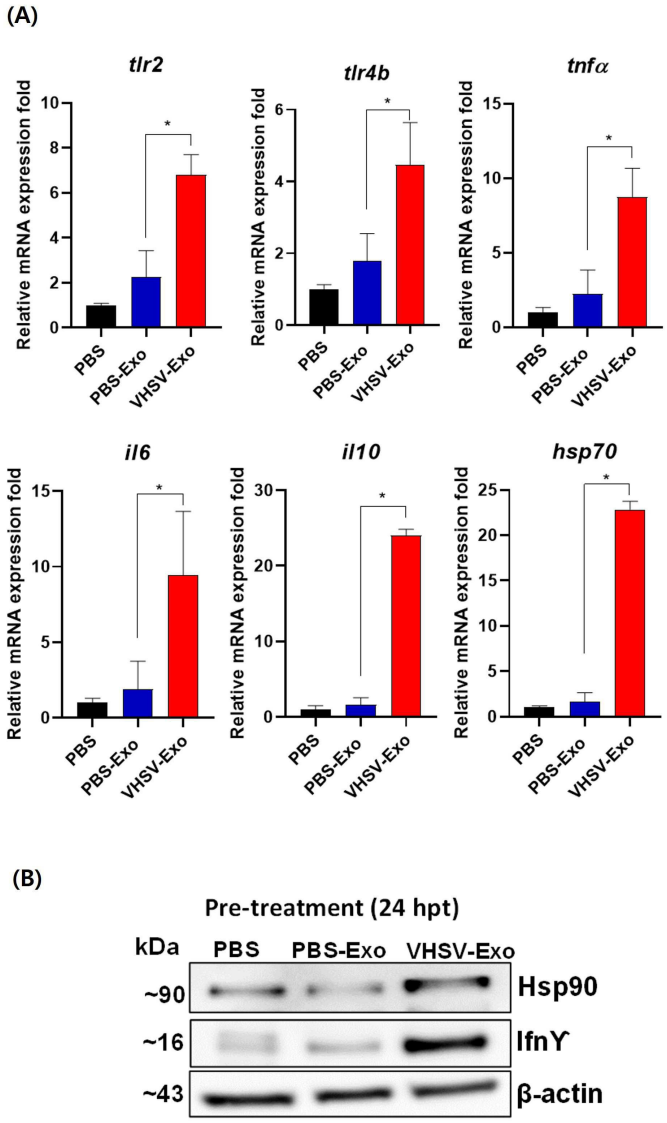
도면1



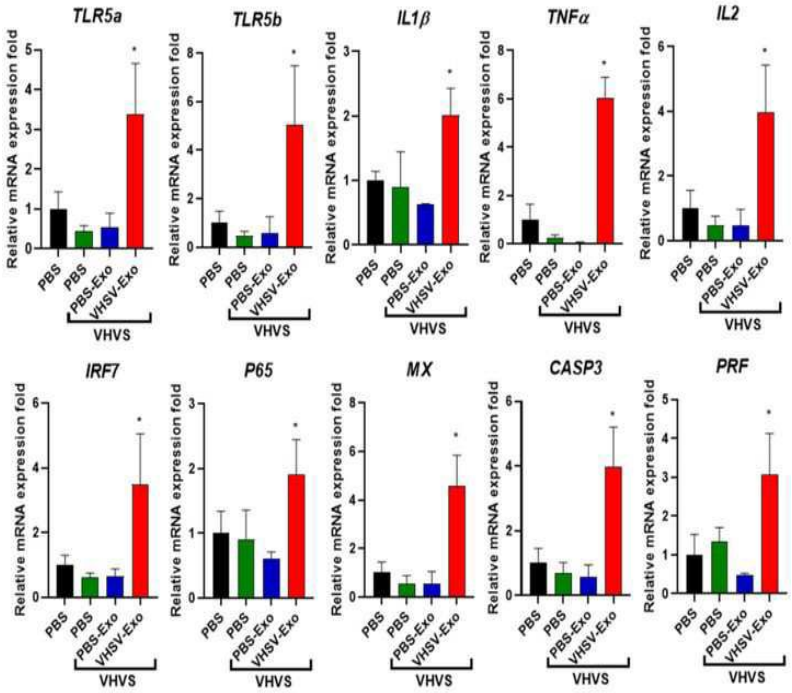
도면2


Vehicle
PBS-Exo
VHSV-Exo
Tlr2
Tlr4
Il6
Il10
Muc1
Ifnβ
Ifnα
Isg15
Relative expression fold
Concentration (μg/mL)
50
100

도면3


(A)
tlr2
tlr4b
tnfα
il6
il10
hsp70
Relative mRNA expression fold
PBS
PBS-Exo
VHSV-Exo
(B)
Pre-treatment (24 hpt)
kDa
PBS
PBS-Exo
VHSV-Exo
~90
Hsp90
~16
IfnY
~43
β-actin

도면4


TLR5a
TLR5b
IL1β
TNFα
IL2
IRF7
P65
MX
CASP3
PRF
Relative mRNA expression fold
PBS
PBS
PBS-Exo
VHSV-Exo
VHVS

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.