

명세서

발명의 명칭: 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀 생산방법 및 이로부터 제조된 배양액

기술분야

- [1] 본 출원은 2020년 5월 25일에 한국 특허청에 제출된 한국 특허 출원 제10-2020-0062365호의 출원일의 이익을 주장하며, 그 내용 전부는 본 명세서에 포함된다.
- [2] 본 출원은 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 인간의 골수에는 몇 가지 종류의 전구세포(progenitor)가 존재하는 것이 발견되었으며, 이들 중 다분화능을 나타내는 전구세포를 중배엽줄기세포(Mesenchymal Stem Cells; MSC)라 칭한다. 중배엽줄기세포는 골수뿐 아니라 지방, 간, 근육 등 신체 대부분의 장기에 존재하는 것으로 알려져 있다.
- [4] 중배엽줄기세포는 자가증식능이 있고, 골아세포(osteoblasts), 연골세포(chondrocytes), 근세포(myocytes), 골수기질세포(marrow stromal cells), 건-인대 섬유아세포(tendonligamentfibroblasts), 지방세포(adipocytes) 등으로 분화할 수 있고, 높은 증식성의 부착성 세포로 항염증 및 면역조절능력이 있는 것으로 알려져 있다. 특히, T 세포와 B 세포의 증식 및 분화 억제, 수지상 세포(dendritic cell), 자연살해(natural killer, NK) 세포 및 대식세포(macrophage)와 같은 면역 세포들의 기능 억제 등 면역 억제 효과를 나타낸다.
- [5] 이러한 중배엽줄기세포는 중배엽줄기세포 자체의 분화 기능보다는 중배엽줄기세포가 분비하는 여러 가지 인자들(paracrine/secretory factors), 예를 들어 케모카인(chemokine), 사이토카인(cytokine), 성장인자(growth factors) 등이 줄기세포의 효과를 대변하는 것으로 주목받고 있다. 또한, 중배엽줄기세포는 이러한 인자들뿐만 아니라 세포외 소포체(extracellular vesicle; EV)를 분비하는 것으로 알려져 있으며 세포외 소포체가 세포간의 신호전달을 통해 세포의 운명, 기능, 분화 등 다방면으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.
- [6] 여러 가지 인자들 중 엑소좀(Exosome)은 지질-이중층으로 구성된 소포(vesicle)로, 세포가 세포 외로 분비하는 물질의 구성체이다. 엑소좀은 세포-세포 간의 커뮤니케이션(cell-cell communication) 및 세포성 면역을 중재하는 기능적인 역할을 수행하기 위해, 세포 내의 생체분자인 단백질, 생체활성 지질 및 RNA(miRNA)를 수송(운반)하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 엑소좀은 알츠하이머 등 신경질환의 바이오마커로도 연구되고 있으며, 뇌척수액과 혈액을 분리하는 혈액뇌관문(blood-brain barrier, BBB)을 투과할 정도로 선택적 투과성이 높아 특정 약물의 나노전달체(nanocarrier)와

같은 약물 전달 시스템의 개발에도 활용되고 있다.

- [7] 한편, 중배엽줄기세포로부터 분리된 엑소좀은 세포-세포 커뮤니케이션(cell-to-cell communication)에 관여하고 줄기세포가 가지는 재생의학적인 치료 효능을 보인다고 알려져 있으며, 최근에는 중배엽줄기세포 자체를 사용하지 않고 중배엽줄기세포가 분리하는 엑소좀을 이용하여 다양한 질환의 치료효과에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다.
- [8] 그러나, 엑소좀 분리방법 중 가장 보편적으로 쓰이는 초원심분리(Ultracentrifugation)는 한 번에 다량의 엑소좀을 분리할 수 있는 장점이 있지만, 고가의 장비가 필요하고 분리하는데 많은 시간이 소요되며 강한 원심분리로 인해 엑소좀에 물리적으로 손상이 발생할 수 있고, 특히 분리된 엑소좀의 순도가 떨어지는 등의 문제가 있다. 이러한 문제를 개선하기 위한 방법 중, 엑소좀의 막(membrane)에 존재하는 단백질인 포스파티딜세린(phosphatidylserine, PS)에 특이적으로 결합하는 물질을 이용함으로써 분리되는 엑소좀의 순도를 높인 PS 친화성 방법(PS affinity method)이 있지만 이는 초원심분리 방법에 비해 높은 순도의 엑소좀을 분리할 수 있지만 수율이 낮다는 단점이 있다. 또한, 컬럼 크로마토그래피(chromatography)를 이용한 엑소좀 수득 방법이 종래에 보고되었지만 세포 배양액 또는 혈액 내에 부유하고 있는 엑소좀과 비슷한 크기, 밀도를 가진 지질단백질(lipoprotein)이 함께 용출된다는 문제가 있다.
- [9] 따라서, 중배엽줄기세포로부터 불순물 없이 순도 높은 엑소좀을 높은 고농도로 얻을 수 있는 분리방법을 개발할 필요가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 출원의 일 실시예에 따른 생산방법은 상기한 바와 같은 종래 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 중배엽줄기세포로부터 불순물 없이 고순도, 고농도로 엑소좀을 추출하기 위한 것이다.
- [11] 본 출원은, 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀 생산방법을 제공하고자 한다.
- [12] 본 출원은, 상기 생산방법을 이용하여 제조한 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 배양액을 제공하고자 한다.
- [13] 본 출원은, 상기 생산방법을 이용하여 생산된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공하고자 한다.
- [14] 본 출원은, 상기 생산방법을 이용하여 생산된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물을 제공하고자 한다.
- [15]

과제 해결 수단

- [16] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 출원의 하나의 실시예는, 중배엽줄기세포로부터 세포 샘플을 수득하는 단계; 상기 세포 샘플을 저농도

글루코스 DMEM(low-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 계대배양하는 단계; 상기 배양된 세포를 단백질 합성저해효소가 포함된 기질배지에서 배양시킨 후 세포 배양액을 수득하는 단계; 및 상기 세포 배양액에서 엑소좀을 분리하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀 생산방법을 제공한다.

- [17] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 줄기세포 배양액을 수득하는 단계에서, 상기 기질배지는 TNF α 를 더 포함할 수 있다.
- [18] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 TNF α 는 5~500 ng/mL의 농도로 포함될 수 있다.
- [19] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 단백질 합성저해효소는, 시클로헥사미드(Cycloheximide), 아니소마이신(Anisomycin), 아우린트리카르복실산(Aurintricarboxylic acid), 디프테리아독소(Diphtheria toxin), 에데인(Edeine), 푸시딘산(Fusidic acid), 팩타마이신(Pactamycin), 퓨로마이신(Puromycin), 리신(Ricin), 플루오르화나트륨(Sodium fluoride), 스파르소마이신(Sparsomycin), 테트라사이클린(Tetracycline) 및 트리코더마(Trichoderma)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.
- [20] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 기질배지는, TNF α : 단백질 합성저해효소의 비율이 1:10 내지 1:2000일 수 있다.
- [21] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 TNF α 및 단백질 합성저해효소의 처리 시간은 30~100시간일 수 있다.
- [22] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 세포 배양액은, 엑소좀의 수, 엑소좀 유래 단백질 및 엑소좀 유래 RNA 중 어느 하나 이상의 함량을 증가될 수 있다.
- [23] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 세포 배양액 1ml 당 1.1×10^{11} 개 이상의 엑소좀이 분리될 수 있다.
- [24] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 세포 샘플을 계대 배양하는 단계에서, 상기 배지는 EGF, FGF-2, GDF11, KGF, HGF, PDGF, VEGF, IGF 및 TGF- β 로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [25] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 세포 샘플을 계대 배양하는 단계는 4 내지 10계대로 배양할 수 있다.
- [26] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 엑소좀 마커는, CD63, CD9, CD81, S1PR1 및 S1PR3으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [27] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 샘플을 수득하는 단계에서, 상기 중배엽줄기세포는, 지방조직 또는 태반조직으로부터 수득될 수 있다.
- [28] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 줄기세포는, 배아 줄기세포, 성체 줄기세포 또는 유도만능줄기세포(Induced pluripotent stem cell, IPS)일 수 있다.
- [29] 본 출원의 하나의 실시예는 상기 방법을 이용하여 생산된 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 배양액을 제공한다.

[30] 본 출원의 하나의 실시예는 상기 방법을 이용하여 생산된 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[31] 본 출원의 하나의 실시예는 상기 방법을 이용하여 생산된 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.

[32]

발명의 효과

[33] 본 출원의 하나의 실시예에 따른 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀 생산방법은 고순도의 엑소좀을 보다 높은 수율로 수득할 수 있다는 장점이 있다.

[34] 본 출원의 하나의 실시예에 따른 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀 생산방법은 기질배지에 TNF α 및/또는 단백질 합성저해효소를 처리함으로써, 엑소좀을 대량 분리할 수 있다는 장점이 있다.

[35] 본 출원의 하나의 실시예에 따른 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀을 포함하는 배양액은 분화능과 증식능이 증가되었다는 장점이 있다.

[36] 본 출원의 하나의 실시예에 따른 배양액을 이용하여 약학 조성물 또는 화장료 조성물을 제공할 수 있다는 장점이 있으며, 상기 약학 조성물은 엑소좀이 무세포라는 특성으로 약에 대한 부작용이 발생할 확률이 줄어들 수 있다는 장점이 있다.

[37]

도면의 간단한 설명

[38] 도 1은 TNF α 및 Cycloheximide 비율에 따른 줄기세포 엑소좀 생산량의 변화를 나타낸 그래프이다.

[39] 도 2는 TNF α 및 Cycloheximide를 처리한 중배엽줄기세포에서 시간에 따른 엑소좀 생산량의 변화를 나타낸 그래프이다.

[40] 도 3은 본 출원의 실시예 및 비교예에 따른 엑소좀의 농도를 NTA(Nanoparticle-Tracking Analysis)로 측정하여 나타낸 그래프이다.

[41] 도 4는 본 출원의 실시예 및 비교예에 따른 엑소좀의 단백질 농도를 Bradford assay로 측정하여 나타낸 그래프이다.

[42] 도 5는 본 출원의 실시예 및 비교예에 대하여 실시예 14(a), 실시예 15(b) 및 비교예 1(c)의 엑소좀의 크기와 엑소좀 크기에 따른 입자 분포 히스토그램을 NTA로 측정하여 나타낸 그래프이다.

[43] 도 6은 본 출원의 실시예 및 비교예에 대하여 비교예 2(d), 비교예 3(e) 및 비교예 4(f)의 엑소좀의 크기와 엑소좀 크기에 따른 입자 분포 히스토그램을 NTA로 측정하여 나타낸 그래프이다.

[44] 도 7은 본 출원의 실시예 및 비교예에 대하여 비교예 5(g), 비교예 6(h) 및 비교예 7(i)의 엑소좀의 크기와 엑소좀 크기에 따른 입자 분포 히스토그램을 NTA로 측정하여 나타낸 그래프이다.

[45] 도 8은 본 출원의 실시예 및 비교예에 따른 엑소좀의 Western blot을 나타낸

것이다.

[46] 도 9은 본 출원의 엑소좀을 투과전자현미경(Transmission microscopy, TEM) 사진으로 나타낸 것이다.

[47] 도 10은 본 출원의 엑소좀을 Exoview technique로 분석한 그래프를 나타낸 것이다.

[48]

발명의 실시를 위한 형태

[49] 이하, 본 출원을 보다 상세히 설명한다.

[50] 이하의 특정한 기능적 설명들은 단지 본 출원의 개념에 따른 실시예를 설명하기 위하여 예시된 것으로, 본 출원의 개념에 따른 실시예들은 다양한 형태로 실시될 수 있으며 본 명세서에 설명된 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

[51] 본 출원의 개념에 따른 실시예는 다양한 변경을 가할 수 있고 여러가지 형태를 가질 수 있으므로 특정 실시예들은 본 명세서에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 출원의 개념에 따른 실시예들을 특정한 개시 형태에 한정하려는 것이 아니며, 본 출원의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[52] 본 명세서에서 사용하는 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로 본 출원을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한 복수의 표현을 포함한다.

[53] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 출원이 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 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본 명세서에서 명백하게 정의하지 않는 한 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[54] 본 출원의 하나의 실시예는, 중배엽줄기세포로부터 세포 샘플을 수득하는 단계; 상기 세포 샘플을 저농도 글루코스 DMEM(low-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 계대배양하는 단계; 상기 배양된 세포를 단백질 합성저해효소가 포함된 기질배지에서 배양시킨 후 세포 배양액을 수득하는 단계; 및 상기 세포 배양액에서 엑소좀을 분리하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀 생산방법을 제공한다.

[55] 중배엽줄기세포로부터 세포 샘플을 수득하는 단계에서 상기 샘플은 멤브레인을 통과시켜 제조된 여과액을 원심분리하여 세포를 수득할 수 있다. 이때 멤브레인은 50 μm 내지 200 μm 나일론을 사용할 수 있으나, 특별히 제한되지는 않는다.

[56] 본 출원에서 용어 “원심분리”는 원심분리기를 이용한 분리법으로 축을

중심으로 물질을 회전시켜서 원심력을 가하는 것이다. 본 출원에서 원심분리는 편차 원심분리(Differential centrifugation), 밀도 기울기 원심분리(Density gradient centrifugation) 및 기체 원심분리(Gas centrifugation)로 이루어지는 군에서 선택되어지는 어느 하나일 수 있다.

- [57] 본 출원에서 용어 "줄기세포"란, 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 의미하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cells), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능(다능성) 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다. 상기 줄기세포로 인정되기 위해서는 미분화상태로 계속 복제 되어야하며, 특정 배양조건에서 특정 세포로 분화가 가능해야 한다. 상기 기술된 줄기세포는 분화능력과 자가복제능력 때문에 최근 세포 치료제 조성물 후보로 주목받고 많은 연구가 진행되고 있다. 이로부터 줄기세포의 유전정보, 단백질, 성장인자를 함유하고 있는 엑소좀을 추출할 수 있다는 장점이 있다.
- [58] 상기 줄기세포는 골수 줄기세포, 제대혈 줄기세포 또는 지방 유래 줄기세포일 수 있으며, 인체 유래 또는 동물이나 식물 유래 줄기세포일 수 있고, 예를 들어 인체 지방유래 줄기세포일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [59] 본 출원에서 용어 "엑소좀"이란 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 소낭체로, 다른 세포 및 조직에 결합하여 막 구성요소, 단백질, RNA를 전달하는 등 다양한 역할을 한다.
- [60] 본 출원에서 "DMEM 배지"는 돌베코의 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)를 의미하고, 가장 일반적으로 사용되는 동물 세포 배양용 배지이다. 세포 배양시, 저농도 글루코스(low glucose) DMEM 배지를 사용하지만, 이에 한정하지 않고, 고농도 글루코스(high glucose) DMEM 배지를 사용할 수도 있으며, 고농도 글루코스 배지로 cell이 80% 내지 100% 가득 될 때까지 키운 뒤, 저농도 글루코스 배지에서 배양할 수 있다. 상기 방법과 같이 고농도 글루코스 DMEM과 저농도 글루코스 DMEM을 혼합하여 배지에서 배양하면 세포의 빠른 수득이 가능하다는 장점이 있다. 상기 저농도 글루코스 DMEM 중 글루코스의 농도는 800 내지 1200 mg/L일 수 있고, 더불어 저농도 글루코스 DMEM 배지에 소태아혈청을 첨가하여 배양할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [61] 본 출원에서, 용어 "배양액"은 중배엽줄기세포 배양액으로 중배엽줄기세포를 배양한 세포배양 상등액을 지칭한다. 중배엽줄기세포 배양액은 중배엽줄기세포의 배양 과정에서 세포로부터 분비되는 여러 가지 생리활성 물질을 함유하고 있다.
- [62] 상기 멤브레인은 50 μ m 내지 200 μ m 일 수 있으나, 특별히 제한되지는 않는다. 상기 샘플이 멤브레인을 통과한 여과액을 100xg 내지 500xg에서 5분 내지 30분간 원심분리하여 세포 펠렛(Pellet)을 수득할 수 있다. 또한, 상기 멤브레인은 반투막 멤브레인이면 사용할 수 있고, 구체적으로는 나일론 멤브레인

- 필터(Nylon membrane filter) 일 수 있으나, 특별히 제한되지는 않는다.
- [63] 상기 세포 펠렛을 계대 배양하는 단계는 항생제를 포함할 수 있다. 항생제는 페니실린(penicillin) 및/또는 스트렙토마이신(Streptomycin)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 100 내지 150mm 의 세포배양 페트리디쉬(Petridish)에 1×10^5 cells/ 1ml 배지의 농도로 희석할 수 있고, 30°C 내지 40°C의 온도, 구체적으로 37°C의 온도에서, 3% 내지 10%, 구체적으로 5%의 CO₂ 배양기에서 배양할 수 있다. 또한, 세포배양을 위해 페트리디쉬를 사용하지 않고 간단한 형태의 바틀에서도 배양이 가능하며, 장기간 동안 세포를 안정하게 유지할 수 있어 다량의 세포 배양액을 생산할 수 있다는 장점이 있다.
- [64] 상기 세포 펠렛 샘플을 배지에서 계대 배양하는 단계는, 4 내지 10 계대로 배양할 수 있다. 4 계대 이하로 증식시에는 세포가 증폭이 되지 않아 발현 정도가 낮을 수 있고, 10 계대 이상으로 증식시에는 세포가 과발현할 수 있다는 문제가 있다.
- [65] 상기 계대 배양하는 단계에서, 상기 DMEM 배지는 성장분화인자(Growth and differentiation factor 11, GDF11), 상피세포성장인자(Epidermal growth factor, EFG), 혈관내피성장인자(Vascular endothelium growth factor, VEGF), 각질세포성장인자(Keratinocyte growth factor, KGF), 간세포성장인자(Hepatocyte growth factor, HGF), 형질변환성장인자(Transforming growth factor-beta, TGF-b), 섬유아세포성장인자(Fibroblast growth factor 2, FGF-2), IGF(Insulin growth factor) 및 혈소판유래증식인자(Platelet-derived growth factor, PDGF)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함할 수 있다.
- [66] 상기 계대 배양하는 단계에서 80% 내지 100% confluency까지 70~75시간마다 배지를 갈아주며 배양하는 것이 바람직하다. 구체적으로 72시간 마다 배지를 갈아주면서 배양하는 것이 바람직하며, 70시간 이내로 배지를 갈아주면 고순도의 펠렛을 수득할 수 없다는 문제가 있고, 75시간을 초과하는 시간마다 배지를 갈아주면 고농도의 펠렛을 수득할 수 없다는 문제가 있다. 본 출원의 중배엽줄기세포 유래의 고순도 엑소좀 추출을 위한 계대 배양 단계는 중배엽 줄기세포를 증폭하면서 엑소좀의 분화능과 증식능을 증가시킬 수 있다는 장점이 있다.
- [67] 상기 "배양액"은 중간엽줄기세포 배양액으로 중간엽줄기세포를 배양한 세포배양 상등액을 지칭한다. 중간엽줄기세포 배양액은 중간엽줄기세포의 배양 과정에서 세포로부터 분비되는 여러가지 생리활성 물질을 함유하고 있다.
- [68] 상기 기질배지는 무혈청 기질배지 또는 혈청 기질배지 일 수 있다. 상기 기질배지는 저농도 글루코스(low glucose) DMEM 배지를 사용하지만, 이에 한정하지 않고, 고농도 글루코스(high glucose) DMEM 배지를 사용하거나, 모두 포함하여 사용할 수 있다.
- [69] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 기질 배지에 포함되는 단백질 합성저해효소는, 시클로헥사미드(Cycloheximide), 아니소마이신(Anisomycin),

아우린트리카르복실산(Aurintricarboxylic acid), 디프테리아독소(Diphtheria toxin), 에데인(Edeine), 푸시딘산(Fusidic acid), 팩타마이신(Pactamycin), 퓨로마이신(Puromycin), 리신(Ricin), 플루오린화나트륨(Sodium fluoride), 스파르소마이신(Sparsomycin), 테트라사이클린(Tetracycline), 트리코더마(Trichoderma)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 같은 기전을 할 수 있는 단백질 합성저해효소이면 대체가 가능하다. 구체적으로, 상기 단백질 합성저해효소는 시클로헥사미드인 것이 바람직하다.

- [70] 본 출원의 일 실시예의 세포 배양액을 획득하는 단계에서 기질배지는 TNF α 를 더 포함할 수 있다. 상기 TNF α 는 5~500 ng/mL의 농도로 포함될 수 있다.
- [71] 본 출원의 일 실시예에서, 상기 기질배지는, TNF α : 단백질 합성저해효소의 비율이 1:1~1:2,000일 수 있다. 상기 TNF α :단백질 합성저해효소의 첨가 비율은 1:1~1:2,000일 수 있으나, 구체적으로는, 1:10~1:1000 일 수 있으며, 더 구체적으로는, 1:20~1:500 일 수 있고, 1:50 내지 1:200 일 수 있다. 단백질 합성저해효소의 첨가 비율이 TNF α 보다 낮을시에는 추출되는 엑소좀의 크기와 양이 많지 않을 수 있다는 문제가 있고, TNF α :단백질 합성저해효소의 첨가 비율이 1: 2,000을 초과할시에는 단백질 합성저해효소의 비율이 과하여 세포 펠렛의 증폭이 저해될 수 있는 문제가 있다. 구체적으로, TNF α 와 단백질 합성저해효소를 모두 포함하면 TNF α 만을 첨가하거나 단백질 합성저해효소만을 첨가할 때보다 줄기세포로부터 추출되는 엑소좀의 크기, 수, 엑소좀 유래 단백질 또는 엑소좀 유래 RNA의 함량이 증가되어 고농도와 고순도의 엑소좀 추출이 가능하다는 장점이 있다.
- [72] 본 출원의 일 실시예에서, 상기 TNF α 및/또는 단백질 합성저해효소의 처리 시간은 30~100 시간 동안 배양하는 것일 수 있다.
- [73] 상기 TNF α 및/또는 단백질 합성저해효소의 처리 시간이 30시간 미만일시에는 충분한 줄기세포 펠렛의 배양이 일어나지 않는 문제가 있고, 100시간을 초과할 시에는 너무 많은 배양시간으로 인해 세포의 과발현이 될 수 있다는 문제가 있다.
- [74] 본 출원의 일 실시예에서, 상기 엑소좀을 분리하는 단계는, 수집한 줄기세포 배양액을 200~400xg에서 5~20분 간 원심분리하여 제 1 상등액을 획득하는 단계; 상기 상등액을 1800~2300xg에서 5~30분 간 원심분리하여 제2 상등액을 획득하는 단계; 상기 제2 상등액을 90,000~110,000xg에서 50~100분간 원심분리 또는 초원심분리하고 상등액을 제거하여 엑소좀 펠렛을 획득하는 단계; 및 상기 획득한 엑소좀 펠렛을 PBS 버퍼에 부유시키고 엑소좀 입자를 분리하는 단계;를 포함할 수 있다. 엑소좀 입자를 분리할 때 초음파를 처리할 수 있다.
- [75] 상기 엑소좀 펠렛을 획득하고 이를 PBS 버퍼에 부유시켜 초음파 처리하지 않으면 딱딱하게 뭉쳐있는 펠렛으로 인해 순도 높은 엑소좀을 추출할 수 없는 문제가 있다. 따라서, 획득한 엑소좀 펠렛으로부터 엑소좀 입자만을 분리하면

- 순도 높은 엑소좀 입자를 추출할 수 있다는 장점이 있다.
- [76] 본 출원의 일 실시예에서, 상기 중배엽줄기세포로부터 세포 샘플을 수득하는 단계는, 상기 샘플을 작은 절편으로 만들고, 콜라겐분해효소를 첨가하여 20~40분간 처리할 수 있다. 그 후, DMEM을 첨가하여 효소 반응을 불활성화할 수 있고, 이때 선택적으로 FBS(10% Fetal bovine serum)를 더 포함할 수 있다. 그리고, 200~400xg에서 3~20분 간 원심분리한 후, 상등액을 버리고 세포 펠렛 입자를 추출하고, 펠렛 입자를 FBS 및 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 부유시켜서 세포 샘플을 수득할 수 있다.
- [77] 상기 세포 샘플을 수득하는 단계는 얻어진 세포 샘플을 재현탁한 후, 재현탁한 세포를 시딩(Seeding)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 시딩하는 단계를 추가로 포함하면, 부유된 FBS 버퍼 내에서 세포 펠렛끼리 뭉치는 현상을 방지할 수 있다는 장점이 있다.
- [78] 본 출원의 일 실시예에서, 상기 샘플을 수득하는 단계에서, 상기 중배엽줄기세포는 지방조직 또는 태반조직으로부터 적출할 수 있는 것일 수 있다.
- [79] 상기 지방조직으로부터 적출할 수 있는 지방조직 유래 줄기세포는 인간의 지방세포로부터 유래된 줄기세포(human adipose-derived stem cells)를 의미한다. 이로부터 지방세포의 유전정보, 단백질, 성장인자를 함유하고 있는 엑소좀을 추출할 수 있다는 장점이 있다.
- [80] 본 출원의 일 실시예에서, 상기 줄기세포는, 배아 줄기세포, 성체 줄기세포 또는 유도만능줄기세포(Induced pluripotent stem cell, IPS)인 것일 수 있다.
- [81] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 세포 배양액은, 엑소좀의 수, 엑소좀 유래 단백질 및 엑소좀 유래 RNA 중 어느 하나 이상의 함량이 증가될 수 있다.
- [82] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 세포 배양액 1ml 당 1.1×10^{10} 개 이상의 엑소좀이 분리될 수 있다. 더욱 구체적으로 세포 배양액 1ml 당 1.1×10^{11} 개 이상 1.2×10^{12} 개 이하의 엑소좀이 분리될 수 있다.
- [83] 본 출원의 하나의 실시예에 따른 방법으로 분리한 엑소좀에 DNase I 처리시 순도가 10% 이상 높아지는 장점이 있다.
- [84] 본 출원의 일 실시예는, 상기 방법을 이용하여 제조된 중배엽줄기세포 유래의 고순도 엑소좀을 포함하는 배양액을 제공한다.
- [85] 본 출원의 일 실시예에서, 상기 배양액은, 엑소좀의 수, 엑소좀 유래 단백질 및 엑소좀 유래 RNA 중 어느 하나의 함량을 증가시키는 것일 수 있다.
- [86] 또한, 상기 엑소좀의 상태를 분석하기 위해 형광 물질로 표지할 수 있어, 형광 물질이 표지된 엑소좀의 형광 신호 값을 측정하여 엑소좀의 상태를 분석함으로써 추출값을 표지할 수 있다는 장점이 있다.
- [87] 본 출원에서 용어 "형광 물질"은 물리적 조건 변화, 화학적 처리에 의해 빛을 발생하는 물질을 의미한다. 예를 들어, 상기 형광 물질은 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP), 황색 형광 단백질(Yellow fluorescent protein, YFP),

- 적색형광단백질(Red fluorescent protein, RFP)과 같은 형광 단백질(fluorescent protein)이거나, 발광 단백질(photoprotein) 또는 루시페라제(luciferase) 일 수 있다.
- [88] 또한, 상기 형광 물질이 표지된 엑소좀은 엑소좀의 내부에 형광 물질이 단독으로 위치하거나, 막 단백질과 형광 물질이 결합된 융합 단백질을 포함할 수 있다. 상기 융합 단백질은 형광 물질이 막단백질에 직접 혹은 링커를 통하여 결합될 수 있어 엑소좀의 양과 신호값을 정확하게 파악할 수 있다는 장점이 있다.
- [89] 본 출원의 일 실시예는, 상기 방법을 이용하여 제조된 중배엽줄기세포 유래의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [90] 본 출원의 약학 조성물에는 일반적으로 공지되고 사용되는 보조제 및 추가의 적합한 담체 또는 희석제가 사용될 수 있다. 본 출원의 약학 조성물은 고형제, 용액제, 유제, 분산제, 미셀, 리포솜 등의 형태로 사용될 수 있고, 여기서 얻어진 조성물은 장내 또는 비경구 적용하기에 적합한 유기 또는 무기 담체 또는 부형제와 함께 활성 성분으로서 본 출원의 약학 조성물을 포함한다. 활성 성분은, 예를 들면 정제, 펠렛제, 캡슐제, 좌약제, 용액제, 유제, 현탁제 및 사용하기에 적합한 임의의 기타 형태에 대해 일반적으로 비독성인 제약상 허용되는 담체와 함께 혼합될 수 있다. 사용 가능한 담체에는 고체상, 반고체상 또는 액체상의 포도당, 유당, 아라비아 고무, 젤라틴, 만니톨, 전분 페이스트, 삼규산 마그네슘염, 활석, 옥수수 전분, 코로이드성 실리카, 감자 전분, 우레아, 쇠 길이가 중간 정도인 트리글리세리드, 텍스트란, 및 제제의 제조에 사용하기에 적합한 기타 담체가 포함된다. 또한, 보조제, 안정화제, 증점제 및 착색 제 및 향료제가 사용될 수 있다.
- [91] 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 본 발명의 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 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, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이

사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [92] 본 출원에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다. 본 출원에서 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 출원의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [93] 본 출원의 약학 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있도록 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 주사제이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액, Hank 용액 또는 멸균된 수용액 등의 수성용제, 올리브 오일 등의 식물유, 에틸올레인산 등의 고급 지방산 에스테르 및 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 또는 글리세린 등의 비수성용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 점막 투과를 위해, 통과할 배리어에 적합한 당업계에 공지된 비침투성제가 사용될 수 있으며, 변질방지를 위한 안정화제로 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등과, 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등의 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 등의 약학적 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [94] 본 출원의 약학 조성물은 사용된 특정 유효성분의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [95] 본 출원의 일 실시예는, 상기 방법을 이용하여 제조된 중배엽줄기세포 유래의 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [96] 본 출원에 따른 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 세안제, 트리트먼트, 미용액, 미용팩, 연고제, 겔제, 리니먼트제, 액제, 패치 및 분무제로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형일 수 있으나, 특정 제형에 한정되는 것은 아니고 통상적인 화장료 조성물의 제형을 가질 수 있다.
- [97] 상기 각각의 제형에 첨가물 역시 한정되지 않으며 화장료 분야의 일반적인

첨가물이 첨가될 수 있다. 상기 화장품 분야의 일반적인 첨가물의 예로는 향생제, 결합제, 붕해제, 희석제, 활택제, 안정제, 보존료, 향료, 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급알콜, 증점제, 킬레이트제, 색소 및 방부제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있다.

[98] 이하 본 발명을 실시예 및 비교예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 비교예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[99]

[100] **1. 인간 지방유래 중배엽줄기세포의 분리 및 배양**

[101] 지방 조직은 보통 지방 흡입술로 얻을 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 지방 흡입에 의해 얻어진 지방 조직으로부터 다음과 같이 인간 지방유래 중배엽줄기세포를 분리하였다:

[102] 적출한 지방조직을 Phosphate buffered saline(PBS)로 세척하였다. 세척한 지방 조직을 작은 절편으로 만든 후, 0.1% type II collagenase를 첨가하였다. 37°C에서 30 분간 처리한 후, 10% fetal bovine serum(FBS)와 저농도 글루코스 DMEM(low-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(10% FBS low-glucose DMEM)를 첨가하여 효소 반응을 불활성화하고 300xg에서 10분간 2회 원심분리를 하였다. 상등액(supernatant)을 버리고 남은 펠렛을 10% FBS 저농도 글루코스 DMEM으로 부유한 후, 100um 나일론 멤브레인(nylon membrane)을 통과한 여과액을 300xg에서 10분간 원심분리하여 펠렛을 모았다.

[103] 또한, 세포 펠렛에 페니실린(penicillin) 및 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가한 10% fetal bovine serum(FBS)를 포함한 저농도 글루코스 DMEM(complete media)을 부유한 후, 150 mm 세포배양 페트리디쉬(petridish)에 1×10^5 cells / 1 ml 배지의 농도로 희석하고 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[104] 매 72시간마다 새로운 complete media로 배지를 교환해 주었으며, 세포의 농도가 80%를 넘어가는 시점에 Trypsin-EDTA로 세포를 분리한 후, 새로운 150 mm 세포배양 petridish에 1×10^5 cells / 1 ml 배지의 농도로 계대배양을 실시하였다.

[105]

[106] **2. 중배엽 줄기세포의 증폭**

[107] 상기 배양된 줄기세포로부터 엑소좀의 분리를 위해서 4~10계대의 중배엽줄기세포를 계대 배양시에 EGF 5ng/ml를 첨가한 완전배지(complete media)에서 80% 내지 100% 컨플루언시(confluency)까지 72시간마다 배지를 갈아주며 배양하여 분화능과 증식능을 증가시켰다.

[108]

[109] **3. 기질 배지에 첨가된 TNFα와 cycloheximide 비율에 따른 줄기세포 엑소좀 생산량의 변화**

[110] 100 mm 페트리디쉬에서 배양한 100% confluency의 중배엽줄기세포(5×10^6

Cells)를 PBS로 3회 세척 하고 저농도 글루코스 DMEM으로 기질 배지를 갈아 주었다. 상기 기질 배지에 TNF α 를 50 ng/ml의 농도로 처리하면서 시클로헥사미드(cycloheximide)의 농도를 증가시켜 함께 처리한 중배엽줄기세포로부터 분리한 엑소좀의 농도를 NTA로 측정하였다.

- [111] 상기 고정된 농도 50 ng/ml TNF α 에 대하여, cycloheximide의 농도를 1:1의 비율인 50 ng/ml cycloheximide, 1:5의 비율인 250 ng/ml cycloheximide, 1:20의 비율인 1,000 ng/ml cycloheximide, 1:100의 비율인 5,000 ng/ml cycloheximide, 1:500의 비율인 25,000 ng/ml cycloheximide, 1:1000의 비율인 50,000 ng/ml cycloheximide, 1:2000의 비율인 100,000 ng/ml cycloheximide로 처리하였다. 48 시간 배양 후, 줄기세포 배양액을 모은 후, 다음과 같이 엑소좀을 순수 분리하였다. 중배엽줄기세포 배양액을 모은 후, 300 xg에서 10분간 원심분리하고 상청액을 분리한 후, 분리된 상등액을 2,000 xg에서 20분간 원심분리 한 후, 상청액을 분리하였다. 분리한 상등액을 다시 100,000 xg에서 70분간 초원심분리한 후, 상청액을 제거한 pellet(엑소좀)을 PBS에 부유하고 sonication하여 엑소좀 입자를 분리하고 분리한 엑소좀의 농도를 Nanoparticle-Tracking Analysis(NTA)로 측정하였다. 상기 NTA로 측정한 결과를 표 1에 나타내었다.
- [112] 하기 표 1를 살펴보면, 세포 배양액 1 ml 당 $1.58 \times 10^9 \pm 3.2 \times 10^9$ 내지 $1.26 \times 10^{11} \pm 2.8 \times 10^9$ 의 입자를 분리할 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

[113]

[114] [표1]

	TNF α (ng/ml)	Cycloheximide (ng/ml)	Ratio(Cyclohexi mide/TNF α)	Particles/ml Media
실시예1	50	50	1	$1.58 \times 10^9 \pm 3.2 \times 10^8$
실시예2	50	250	5	$3.2 \times 10^9 \pm 3.6 \times 10^8$
실시예3	50	1000	20	$1.2 \times 10^{10} \pm 2.2 \times 10^8$
실시예4	50	5,000	100	$1.26 \times 10^{11} \pm 2.8 \times 10^9$
실시예5	50	25,000	500	$1.86 \times 10^{10} \pm 1.28 \times 10^9$
실시예6	50	50,000	1000	$2.2 \times 10^{10} \pm 1.22 \times 10^9$
실시예7	50	100,000	2000	$1.94 \times 10^{10} \pm 1.18 \times 10^9$

- [115] **4. 기질 배지에 첨가된 TNF α 와 cycloheximide 처리 시간에 따른 줄기세포 엑소좀의 분리** 실시예 3의 기질 배지에 TNF α (50 ng/ml)와 Cycloheximide(5,000 ng/ml)를 처리한 후, 지정된 시간동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양한

배양액에서 줄기세포 엑소좀을 분리하고 엑소좀의 농도를 Nanoparticle-Tracking Analysis(NTA)로 측정하여 표 2에 나타내었다. 하기 표 2를 살펴보면, 30시간 내지 100시간 동안 TNF α (50 ng/ml)와 Cycloheximide(5,000 ng/ml)를 처리하였을 때 세포 배양액 1ml 당 1.1×10^{11} 이상의 엑소좀이 분리되는 것을 확인할 수 있었다.

[116] [표2]

	Incubation Time(hours)	Particles/ml Media
실시예 8	12	$1.52 \times 10^{10} \pm 1.28 \times 10^9$
실시예 9	24	$8.8 \times 10^{10} \pm 2.08 \times 10^9$
실시예 10	48	$1.14 \times 10^{11} \pm 7.3 \times 10^9$
실시예 11	72	$1.12 \times 10^{11} \pm 6.8 \times 10^9$
실시예 12	96	$1.12 \times 10^{11} \pm 7.04 \times 10^9$
실시예 13	120	$7.36 \times 10^{10} \pm 6.4 \times 10^9$

[117] 5. 기질 배지의 첨가물 종류에 따른 줄기세포 엑소좀의 분리

[118] 150 mm 페트리디쉬에서 배양한 100% confluency(1.5×10^7 Cells)의 중배엽줄기세포를 PBS로 3회 세척 하였다. 저농도 글루코스 DMEM으로 갈아준 중배엽줄기세포에 TNF α (50 ng/ml)와 cycloheximide(5 ug/ml)의 병용 첨가(실시예 14), cycloheximide(5 ug/ml) 첨가(실시예 15), TNF α (50 ng/ml) 첨가(비교예 1), 1 uM Staurosporine 첨가(비교예 2), 2 uM Staurosporine 첨가(비교예 3), Thapsigargin(5 uM)을 첨가(비교예 4), 아미노산 결핍 배지(HBSS: Hank's balanced salt solution)(비교예 5), 포도당 결핍 배지 [Gluc(-): Glucose-depleted media](비교예 6), 기질 배지(10% PBS low-glucose-DMEM)(비교예 7)에서 48 시간 배양하였다. 그 후 상술한 분리 방법에 따라 배양액으로부터 엑소좀을 분리하였다.

[119] 분리한 엑소좀은 Nanoparticle-Tracking Analysis(NTA)에 의해 입자수와 입자 크기를 정량하였고, Bradford Assay에 의해 단백질을 정량하였다. 또한, Western blot을 이용하여 엑소좀 마커를 측정하였다. 분리한 엑소좀의 입자수를 도 3 및 도 4에 나타내었고, 하기 표 3에 나타내었다. 엑소좀의 단백질 양과 입자 크기는 도 5 내지 도 7 및 표 4에 나타내었다. 또한, 엑소좀 마커 CD63, S1PR1(Sphingosine-1-phosphate receptor 1), 그리고 S1PR3(Sphingosine-1-phosphate receptor 3)의 발현을 도 8에 나타내었다.

[120] 실시예 14의 TNF α (50 ng/ml)와 cycloheximide(5 ug/ml)를 처리 조건은 mode value 141.6 ± 58.4 nm 크기의 입자를 중배엽줄기세포로부터 유도하여 표 4와 도 5(a)에 나타내었다. 도 9를 참조하면, 엑소좀 입자가 이중지질막으로 싸여 있고 엑소좀의 마커인 CD63의 발현을 transmission electron microscopy(TEM)으로 확인하였다. 도 10을 참조하면, Exoview을 이용한 엑소좀의 표면 마커 발현

테스트에서 중배엽줄기세포 유래 엑소솜은 CD63(Cluster of Differentiation 63), CD9(Cluster of Differentiation 9) 및 CD81(Cluster of Differentiation 81)의 엑소솜 마커를 나타내었다.

[121] [표3]

	Conditions	Particles/ml Media	Particles/ 10^7 Cells
실시예 14	TNF α (50 ng/ml), Cycloheximide(5 ug/ml)	$1.144 \times 10^{11} \pm 7.304 \times 10^9$	$2.288 \times 10^{12} \pm 1.461 \times 10^{11}$
실시예 15	Cycloheximide(5 ug/ml)	$1.900 \times 10^{10} \pm 1.140 \times 10^9$	$3.800 \times 10^{11} \pm 2.280 \times 10^{10}$
비교예 1	TNF α (50 ng/ml)	$3.400 \times 10^8 \pm 1.740 \times 10^7$	$6.800 \times 10^{10} \pm 3.480 \times 10^9$
비교예 2	Staurosporine(1 uM)	$2.450 \times 10^9 \pm 2.650 \times 10^8$	$4.900 \times 10^{10} \pm 5.300 \times 10^9$
비교예 3	Staurosporine(2 uM)	$5.500 \times 10^9 \pm 7.000 \times 10^8$	$1.100 \times 10^{11} \pm 1.400 \times 10^{10}$
비교예 4	Thapsigargin(5 uM)	$5.000 \times 10^8 \pm 1.050 \times 10^8$	$1.000 \times 10^{10} \pm 2.100 \times 10^9$
비교예 5	HBSS	$3.350 \times 10^8 \pm 4.800 \times 10^7$	$6.700 \times 10^9 \pm 9.600 \times 10^8$
비교예 6	Gluc(-)	$5.500 \times 10^8 \pm 4.750 \times 10^7$	$1.100 \times 10^{10} \pm 9.500 \times 10^8$
비교예 7	10% PBS low-glucose-DME M	$1.200 \times 10^8 \pm 1.040 \times 10^7$	$2.400 \times 10^9 \pm 2.080 \times 10^8$

[122]

[표4]

	Conditions	$\mu\text{g Protein/ml Media}$	Size in diameter(mode value $\pm$ SD)
실시예 14	TNF α (50 ng/ml), Cycloheximide(5 $\mu\text{g/ml}$)	69.847 $\pm$ 0.841	141.6 $\pm$ 58.4
실시예 15	Cycloheximide(5 $\mu\text{g/ml}$)	16.667 $\pm$ 0.135	141.7 $\pm$ 56.3
비교예 1	TNF α (50 ng/ml)	2.982 $\pm$ 0.024	129.8 $\pm$ 55.2
비교예 2	Staurosporine(1 μM)	0.780 $\pm$ 0.025	145.7 $\pm$ 62.3
비교예 3	Staurosporine(2 μM)	2.950 $\pm$ 0.050	136.3 $\pm$ 64.4
비교예 4	Thapsigargin(5 μM)	0.600 $\pm$ 0.025	145.6 $\pm$ 63.8
비교예 5	HBSS	0.291 $\pm$ 0.025	148.2 $\pm$ 59.2
비교예 6	Gluc(-)	3.630 $\pm$ 0.125	139.8 $\pm$ 82.7
비교예 7	10% PBS low-glucose-DMEM	0.105 $\pm$ 0.006	141.6 $\pm$ 58.4

- [123] 이상으로 본 출원의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 출원의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 출원의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.