(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0049139
(43) 공개일자 2024년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 11/096 (2020.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 11/096 (2020.01)
C12N 5/0686 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0064666
(22) 출원일자 2023년05월18일
심사청구일자 2023년05월18일
(30) 우선권주장
1020220126445 2022년10월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)
(72) 발명자
이원종
세종특별자치시 나성북1로 51, 603동 2003호(나성동, 나릿재마을 6단지)
함유민
경기도 안산시 단원구 광덕2로 74, 1206동 1201호(초지동, 그린빌주공12단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

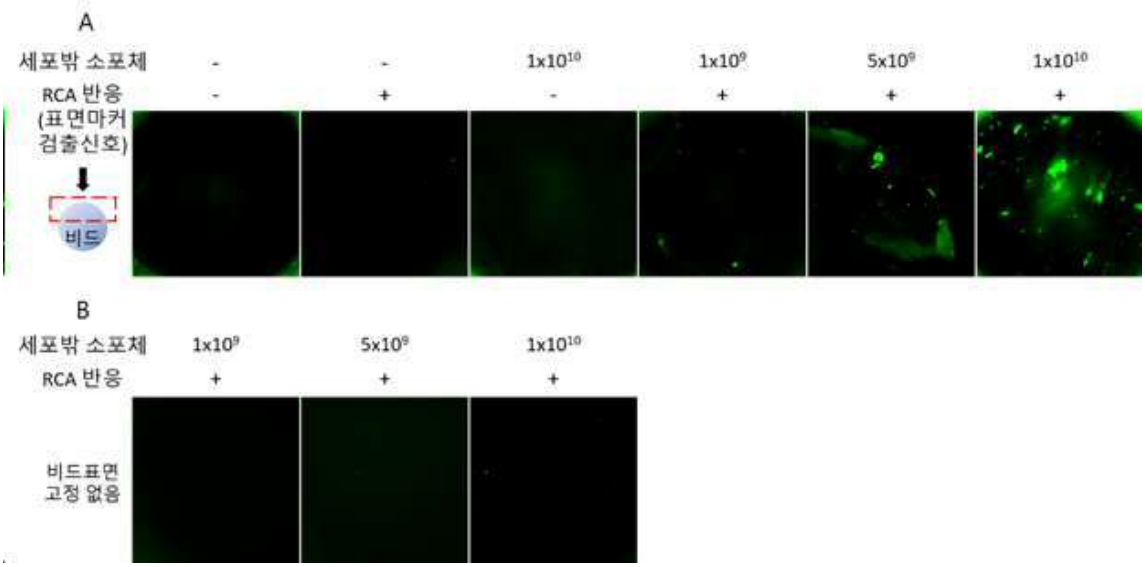
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **세포밖 소포체 또는 세포의 고흡수성 수지 기반 표면 고정 기술**

(57) 요 약

본 발명은 세포밖 소포체 또는 세포의 고흡수성 수지 기반 표면 고정 기술에 관한 것으로, 더 상세하게는 고흡수성 수지에 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액을 첨가하고 인큐베이션하여 세포밖 소포체 또는 세포를 고흡수성 수지 표면에 고정하는 기술과 그 응용에 관한 것이다. 본 발명은 세포밖 소포체 또는 세포를 고흡수성 수지 표면에 고정함으로써, 세포밖 소포체 또는 세포를 고흡수성 수지 표면에 고정한 상태로 간편하고 신속하게 세포밖 소포체 또는 세포 내에 존재하는 다양한 바이오마커 검출이 가능하고, 세포밖 소포체 또는 세포의 활용 목적에 따라 세포밖 소포체 또는 세포를 용해시키는 용매를 간편하게 교체할 수 있어, 세포밖 소포체 또는 세포를 이용한 다양한 연구와 의약품, 화장품, 식품 소재 개발에 활용할 수 있는 장점이 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
C12N 2509/10 (2013.01)
C12Q 2531/125 (2013.01)
(72) 발명자
이지윤
인천광역시 남동구 예술로360번길 19-4, 201호(간석동)
강유빈
경상남도 김해시 분성로727번길 16, 104동 1001호(지내동, 지내동원1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711167889
과제번호 2016R1A5A1010148
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 나노-생체유체 검사 연구단
기 여 율 3/4
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.09.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711188699
과제번호 2022R1A2C1091989
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업-개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 식물 세포밖소포체 생산 공정 및 엔지니어링 플랫폼 기술 개발
기 여 율 1/4
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2022.09.01 ~ 2023.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 또는 세포를 고정하는 방법:

(a) 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액을 고흡수성 수지와 혼합하는 단계; 및

(b) 상기 혼합 단계 후, 1 시간 내지 10 시간 인큐베이션 하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 전분(starch)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 모노머를 공중합시킨 전분계 고분자; 카르복시메틸 셀룰로오스(CMC)에 상기의 모노머를 공중합시킨 셀룰로오스계 고분자; 및 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)-메타아크릴산(methacrylic acid) 블록공중합체, 스티렌(stryene)-무수말레인산(maleic anhydride) 공중합체, 폴리아크릴아미드계(polyacryl amide) 또는 폴리옥시에틸렌계(polyoxyethylene)를 포함하는 합성수지계 고분자;로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 고흡수성 폴리머(SAP)로 제조되는 것을 특징으로 하는, 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 또는 세포를 고정하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 폴리(아크릴아미드-코-아크릴산)((Poly(acrylamide-co-acrylic acid))) 고흡수성 수지인 것을 특징으로 하는, 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 또는 세포를 고정하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액은 세포밖 소포체를 1×10^{6} 내지 1×10^{13} 입자수 또는 1×10^{4} 내지 $\times 10^{8}$ 세포수로 포함하는 것을 특징으로 하는, 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 또는 세포를 고정하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 1 내지 10㎜의 직경을 가지는 것을 고흡수성 수지 비드인 것을 특징으로 하는, 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 또는 세포를 고정하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 세포밖 소포체 또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지.

청구항 7

제6항의 세포밖 소포체 또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 포함하는 질환 진단용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 질환은 암인, 질환 진단용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 암은 유방암, 난소암, 대장암, 위암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성 폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군에서 선택되는, 질환 진단용 조성물.

청구항 10

제6항의 세포밖 소포체 또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 포함하는 질환 진단용 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 질환은 암인, 질환 진단용 키트.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 암은 유방암, 난소암, 대장암, 위암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성 폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군에서 선택되는, 질환 진단용 키트.

청구항 13

다음 단계를 포함하는 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액의 용매 교체방법:

(a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 따라 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 또는 세포를 고정시키는 단계; 및

(b) 상기 세포밖 소포체 또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 교체용 용매에 재현탁시키는 단계.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 교체용 용매는 PBS, 증류수 또는 배양배지인 것을 특징으로 하는, 용매 교체방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 (b) 단계는 피펫팅(pipetting) 또는 보텍싱(vortexing)으로 재현탁시키는 것을 특징으로 하는, 용매 교체방법.

청구항 16

다음 단계를 포함하는 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액의 제조방법:

(a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 따라 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 또는 세포를 고정시키는 단계;

(b) 상기 세포밖 소포체 또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 교체용 용매에 재현탁시키는 단계; 및

(c) 교체용 용매에 재현탁된 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액을 회수하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포밖 소포체 또는 세포의 고흡수성 수지를 기반으로 하는 표면 고정 기술에 관한 것으로, 더 상세하게는 고흡수성 수지에 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액을 첨가하고 인큐베이션하여 세포밖 소포체 또는 세포를 고흡수성 수지 표면에 고정하는 기술과 그 응용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 세포밖 소포체는 나노 크기의 입자로 부모 세포의 단백질, 지질, 핵산 등 바이오 분자들을 포함하고 있다. 따라서 세포밖 소포체를 이용한 다양한 질병 진단법이 개발되고 있을 뿐만 아니라, 세포밖 소포체는 의약품, 화장품, 식품 소재로도 개발되고 있다.

[0004] 그러나, 체액 또는 배양액과 같은 용액 중에 포함된 세포밖 소포체는 그 농도가 낮아, 이를 이용하기 위해서는 세포밖 소포체를 농축하거나 용액으로부터 분리해내는 기술이 필요하다.

[0005] 세포밖 소포체를 정제하기 위한 방법으로는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)가 널리 사용되고 있는데, 이는 용출 과정에서 정제된 세포밖 소포체가 용출액에 오히려 희석되기 때문에 여전히 추가적인 분리 기술이 필요하다. 한편, 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol, PEG)을 이용한 침전 방법은 PEG라는 불순물이 첨가되고 세포밖 소포체의 성상에 인위적인 변화가 동반될 수 있기 때문에 이를 사용하는데 한계가 있다. 또한, 초고속 원심분리기를 이용하여 세포밖 소포체를 용액으로부터 분리하는 방법이 이용되기도 하지만, 이러한 방법으로는 세포밖 소포체의 수율이 매우 낮으며, 강력한 원심력이 작용하여 세포밖 소포체가 파괴될 수 있고, 고가 장비가 필요하면서도 분리에 많은 시간이 소요되는 단점이 있다.

[0006] 이에, 본 발명자는 고흡수성 수지(Super absorbent polymer bead, SAP bead)를 이용한 세포밖 소포체의 농축방법을 개발하여, 세포 배양액이나 임상 시료에서 세포밖 소포체를 짧은 시간 안에, 단일 과정으로 간단하게 농축시킬 수 있는 방법을 개발한 바 있다 (대한민국 등록특허 제10-2118509호).

[0007] 이처럼 종래에는 용액 내 세포밖 소포체를 농축하는 기술이 주를 이루었으나, 세포밖 소포체를 단순히 농축하는 것이 아닌 용액으로부터 완전히 분리하는 기술을 개발한다면 질병의 진단이나 치료제 개발에 더 유용하게 활용이 가능할 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2118509호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 고흡수성 수지를 기반으로 하여 세포밖 소포체 또는 세포를 고흡수성 수지의 표면에 고정하는 방법과 이를 활용하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 또는 세포를 고정하는 방법을 제공한다:

[0012] (a) 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액을 고흡수성 수지와 혼합하는 단계; 및

[0013] (b) 상기 혼합 단계 후, 1 시간 내지 10 시간 인큐베이션 하는 단계.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 전분(starch)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 모노머를 공중합시킨 전분계 고분자; 카르복시메틸 셀룰로오스(CMC)에 상기의 모노머를 공중합시킨 셀룰로오스계 고분자; 및 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)-메타아크릴산(methacrylic acid) 블록공중합체, 스티렌(stryene)-무수말레인산(maleic anhydride) 공중합체, 폴리아크릴아미드계(polyacryl amide) 또는 폴리옥시에틸렌계(polyoxyethylene)를 포함하는 합성수지계 고분자;로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 고흡수성 폴리머(SAP)로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 폴리(아크릴아미드-코-아크릴산)((Poly(acrylamide-co-acrylic acid))) 고흡수성 수지인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 용액은 세포밖 소포체를 1×10^{6} 내지 1×10^{13} 입자수 또는 1×10^{4} 내지 $\times 10^{8}$ 세포수로 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 1 내지 10㎜의 직경을 가지는 고흡수성 수지 비드인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 방법에 따라 제조된 세포밖 소포체 또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 세포밖 소포체 또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 포함하는 질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한, 세포밖 소포체 또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 포함하는 질환 진단용 키트를 제공한다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 질환은 암일 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 암은 유방암, 난소암, 대장암, 위암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0023] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액의 용매 교체방법을 제공한다:

[0024] (a) 상기 방법에 따라 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 또는 세포를 고정시키는 단계; 및

[0025] (b) 상기 세포밖 소포체 또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 교체용 용매에 재현탁시키는 단계.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 교체용 용매는 PBS, 증류수 또는 배양배지인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 피펫팅(pipetting) 또는 보텍싱(vortexing)으로 재현탁시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0028] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액의 제조방법을 제공한다:

[0029] (a) 상기 방법에 따라 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 또는 세포를 고정시키는 단계;

[0030] (b) 상기 세포밖 소포체 또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 교체용 용매에 재현탁시키는 단계; 및

[0031] (c) 교체용 용매에 재현탄된 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액을 회수하는 단계.

발명의 효과

[0032] 본 발명은 세포밖 소포체 또는 세포를 고흡수성 수지 표면에 고정함으로써, 세포밖 소포체 또는 세포를 고흡수성 수지 표면에 고정한 상태로 간편하고 신속하게 세포밖 소포체 또는 세포 내에 존재하는 다양한 바이오마커 검출이 가능하고, 세포밖 소포체 또는 세포의 활용 목적에 따라 세포밖 소포체 또는 세포를 용해시키는 용매를 교체 전 용매의 오염(contamination) 없이 간편하게 교체할 수 있어, 세포밖 소포체 또는 세포를 이용한 다양한 연구와 의약품, 화장품, 식품 소재 개발에 활용할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 PBS 용액, free dye 용액, 세포밖 소포체 용액, 세포 용액을 각각 고흡수성 수지 비드에 첨가하고 인큐베이션 시킨 후, 세포밖 소포체 또는 세포가 고흡수성 수지 표면에 고정될 수 있음을 확인한 결과이다.

도 2는 비드 표면에 고정된 세포밖 소포체를 회수하기 위한 온도를 비교한 결과이다.

도 3은 세포밖 소포체 표면 바이오 마커의 신호를 롤링 써클 증폭 후 (A) 비드 표면에 고정 또는 (B) 비드 표면에 고정하지 않은 상태에서 형광 마커 발현을 관찰하여, 비드 표면에 고정된 상태에서 바이오마커 진단의 효과가 현저히 우수함을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0037] 본 명세서에 기재된 농도 범위에 있어서, "내지"는 양 임계 범위를 포함(이상 및 이하)하는 의미로 사용되었으며, 양 임계 범위를 포함하지 않는 경우 "초과" 및 "미만"으로 농도 범위를 기재하였다. 본 명세서에서 수치에 사용된 "약"은 통상의 기술자에 의해 기재된 수치와 실질적으로 동등한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대되는 범위를 포함하는 의미로 사용되며, 예를 들어, 기재된 수치 값의 ±20%, ±10%, ±5% 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 세포밖 소포체는 대부분의 세포에 존재하는 30~1000 ㎚ 크기를 갖는 작은 소포체(membrane vesicle)이다. 이는 혈액, 소변 등 체액에 존재하며 특히, 엑소좀 내부에는 그 세포에서 유래된 다양한 종류의 단백질, 유전물질(DNA, mRNA, miRNA), 지질 등을 포함한다. 세포밖 소포체는 약한 음성의 표면 전하를 띄고 있다. 세포밖 소포체는 다양한 연구를 통해 여러 질병의 진단과 치료제로써의 활용가능성이 밝혀지고 있어, 해당 분야에서 점차 중요성이 높아지고 있는 실정이다.

[0040] 본 발명에서는, 세포밖 소포체를 포함하는 용액을 고흡수성 수지 비드와 인큐베이션 하면, 고흡수성 수지 비드 표면에 세포밖 소포체가 고정될 수 있음을 확인하였다.

[0041] 이와 같이, 세포밖 소포체가 고흡수성 수지의 표면에 고정될 수 있으면, 소변, 객담, 혈액, 침, 눈물, 땀과 같은 생물학적 임상 시료 내에 존재하는 세포밖 소포체를 별도의 분리 및 정제 과정 없이 간단한 희석 또는 분리

과정 후 고흡수성 수지와 인큐베이션 시킴으로써 고흡수성 수지의 표면에 세포밖 소포체가 고정되게 하여 그 고정된 상태에서 세포밖 소포체에 존재하는 종래 알려진 또는 앞으로 발견될 수 있는 다양한 바이오마커를 용이하게 검출하여 분자 진단의 편의성과 신속성을 개선할 수 있다.

[0042] 또한, 세포밖 소포체가 고흡수성 수지의 표면에 고정될 수 있으면, 목적에 따라 원하는 용액에 재현탁시킴으로써 세포밖 소포체를 포함하는 용액을 용이하게 교체하여 회수할 수 있다.

[0043] 같은 맥락에서, 세포 또한 고흡수성 수지의 표면에 고정될 수 있고, 목적에 따라 원하는 용액에 재현탁시킴으로써 세포를 포함하는 용액을 용이하게 교체하여 회수할 수 있다.

[0045] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 다음 단계를 포함하는 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 및/또는 세포를 고정하는 방법에 관한 것이다:

[0046] (a) 세포밖 소포체 및/또는 세포를 포함하는 용액을 고흡수성 수지와 혼합하는 단계; 및

[0047] (b) 상기 혼합 단계 후, 1 시간 내지 10 시간 인큐베이션 하는 단계.

[0048] 본 발명에서, 상기 인큐베이션 하는 단계는, 약 1 시간 내지 약 10 시간, 예컨대, 약 1 시간 내지 약 5 시간, 예컨대, 약 1 시간 내지 약 3 시간 동안 인큐베이션 하는 것일 수 있다.

[0049] 본 발명에서, 상기 고흡수성 수지와 세포밖 소포체 및/또는 세포를 포함하는 용액을 1시간 미만으로 인큐베이션하는 경우, 세포밖 소포체 및/또는 세포가 농축될 수는 있지만, 고흡수성 수지 표면에 고정되는 특징은 발휘하지 못하며 (대한민국 공개특허 10-2022-0074738, 대한민국 등록특허 10-2329816, 대한민국 등록특허 10-2118509 참조), 본 발명에서와 같이 1시간 이상 인큐베이션하는 경우, 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 및/또는 세포가 효과적으로 고정되어 유지될 수 있는 특징이 발휘된다.

[0050] 한편, 본 발명에서, 상기 인큐베이션하는 단계가 10시간 초과인 경우 세포밖 소포체 및/또는 세포가 고정되는 효율이 크게 향상되지는 않는바, 10시간 이상의 인큐베이션 시간은 효율성 면에서 바람직하지 못하다.

[0051] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 전분(starch)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 모노머를 공중합시킨 전분계 고분자; 카르복시메틸 셀룰로오스(CMC)에 상기의 모노머를 공중합시킨 셀룰로오스계 고분자; 및 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)-메타아크릴산(methacrylic acid) 블록공중합체, 스티렌(stryene)-무수말레인산(maleic anhydride) 공중합체, 폴리아크릴아미드계(polyacryl amide) 또는 폴리옥시에틸렌계(polyoxyethylene)를 포함하는 합성수지계 고분자;로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 고흡수성 폴리머(SAP : super absorbed polymer)로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 폴리(아크릴아미드-코-아크릴산)((Poly(acrylamide-co-acrylic acid))) 고흡수성 수지인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체 또는 세포를 포함하는 용액은 세포밖 소포체를 1×10^{6} 내지 1×10^{13} 입자수 또는 1×10^{4} 내지 $\times 10^{8}$ 세포수로 포함할 수 있다.

[0053] 상기 세포밖 소포체 또는 상기 세포는 100 μL 내지 10 mL의 용액에 포함될 수 있다. 일 양태로서, 상기 세포밖 소포체 또는 상기 세포는 100 μL 내지 5 mL의 용액에 포함될 수 있고, 다른 양태로서, 상기 세포밖 소포체 또는 상기 세포는 100 μL 내지 3 mL의 용액에 포함될 수 있으며, 또 다른 양태로서, 상기 세포밖 소포체는 100 μL 내지 2 mL 용액에 포함될 수 있다.

[0054] 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 및/또는 세포를 고정하는 바람직한 양태로서, 상기 1×10^{6} 내지 1×10^{13} 입자수 또는 1×10^{4} 내지 $\times 10^{8}$ 세포수로 포함하는 100 내지 2000 μL 부피의 용액으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0055] 다른 양태로서, 상기 세포밖 소포체를 포함하는 용액은 세포밖 소포체를 약 1×10^{6} 내지 약 1×10^{13} 입자수로 포함하는 100 내지 2000 μL 부피, 예컨대, 약 100 내지 약 500 μL 부피의 용액으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 약 5×10^{9} 내지 약 5×10^{11} 입자수로 포함하는 약 100 내지 약 500 μL 부피의 용액으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 예컨대, 약 1×10^{10} 입자수로 포함하는 약 200 μL 부피의

용액으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0056] 일 양태로서, 상기 세포밖 소포체를 포함하는 용액은 세포밖 소포체를 1×10^{6} 내지 1×10^{13} 입자수로 포함하는 100 내지 2000 μL 부피의 용액으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0057] 상기 세포를 포함하는 용액은 세포를 약 1×10^{4} 내지 1×10^{8} 세포수로 포함하는 100 내지 2000 μL 부피, 예컨대, 약 100 내지 약 500 μL 부피의 용액으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 약 5×10^{4} 내지 약 5×10^{7} 세포수로 포함하는 약 100 내지 약 500 μL 부피의 용액으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 예컨대, 약 6×10^{5} 세포수로 포함하는 약 200 μL 부피의 용액으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0058] 일 양태로서, 상기 세포를 포함하는 용액은 1×10^{4} 내지 $\times 10^{8}$ 세포수로 포함하는 100 내지 2000 μL 부피의 용액으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체를 포함하는 용액은 생물학적 시료로부터 세포밖 소포체 분리용 키트를 사용하여 얻어진 저농도의 세포밖 소포체를 포함하는 용액일 수 있다.

[0060] 상기 세포밖 소포체 분리용 키트로는 세포 배양액으로부터 세포밖 소포체를 분리하는데 중점이 맞춰진 제품이면 특별히 제한되지 않으며, 일 예로 Exoquick, Exo-spin 등 세포밖 소포체 분리용 키트들일 수 있다.

[0061] 상기 생물학적 시료는 액체 중에 세포밖 소포체를 함유하거나 함유할 가능성이 있는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 원핵세포, 진핵세포, 박테리아, 진균, 효모, 줄기세포 및 식물, 동물로부터 분리된 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 배양한 배양액이거나, 혈액, 타액, 소변, 유즙, 양수, 복수 등의 체액 또는 이를 배양한 배양액일 수 있다.

[0062] 상기 세포밖 소포체는 고세균(Archaea), 원핵생물(Prokarya) 또는 진핵생물(Eukarya)의 세포로부터 유래한 생체 나노입자를 통칭하며, 엑소좀(exosome), 아그로좀(argosomes), 덱소좀(dexosomes), 엑토좀(ectosomes), 엑소베지클(exovesicle), 온코좀(oncosome), 프로미노좀(prominosome), 프로스타좀(prostasome), 톨레로좀(tolerosome), 미세입자(microparticle), 미세소포(microvesicle), 나노소포(nanovesicle), 수포성 소포(blebbing vesicle), 출아성 소포(budding vesicle), 세포밖 소포체-유사 소포(exosome-like vesicle), 매트릭스 소포(matrix vesicle), 막 소포(membrane vesicle), 탈피성 소포(shedding vesicle), 막 입자(membrane particle), 탈피성 미세소포(shedding microvesicle), 막 수포(membrane bleb), 에피디디모좀(epididimosome), 프로미니노좀(prominino some), 텍소좀(texosome) 또는 아키오좀(archeosome)을 포함할 수 있고, 바람직하게는 엑소좀(exosome), 미세소포(microvesicle) 및 미세입자(microparticle)일 수 있고, 가장 바람직하게는 엑소좀(exosome)일 수 있다.

[0063] 상기 세포는 고세균(Archaea), 원핵생물(Prokarya) 또는 진핵생물(Eukarya)의 세포일 수 있다.

[0064] 상기 고흡수성 폴리머로 제조된 수지는 자기 무게보다 수십 배에서 수백 배(최대 300배)까지의 용매를 흡수할 수 있고, 재료 자체가 용매를 빨아들이므로 탈지면이나 무명천 같은 것보다 흡수량이 많으며 웬만한 압력에는 용매를 방출하지 않아, 유아용, 성인용 및 동물용 기저귀에 가장 많이 사용되고 있다.

[0065] 상기 고흡수성 폴리머는 통상 백색의 분말로, 이를 일정한 부피를 가지도록, 예컨대 구형의 비드 형태로 제작하면, 용매를 흡수하고 팽윤되어 겔화되는 성질을 가지고 있는데, 본 발명에서는 상기 팽윤된 비드의 표면에 세포밖 소포체 또는 세포가 고정된 상태로 존재할 수 있음을 최초로 발명한 점에 그 주요 특징 중 하나이다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 0.5 내지 10㎜의 직경을 가지는 것을 고흡수성 수지 비드인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 약 1㎜ 내지 약 3㎜ 일 수 있다.

[0068] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법에 따라 제조된 세포밖 소포체 및/또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지에 관한 것이다.

[0069] 상기 세포밖 소포체 및/또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지는 질환 진단 용도로 활용될 수 있다.

[0070] 따라서, 본 발명은 일 양태로서, 세포밖 소포체 및/또는 세포가 표면 고정된 질환 진단용 고흡수성 수지를 제공

할 수 있다.

[0071] 본 발명은 다른 양태로서, 세포밖 소포체 및/또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 포함하는 질환 진단용 조성물을 제공할 수 있다.

[0072] 본 발명은 또 다른 양태로서, 세포밖 소포체 및/또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 포함하는 질환 진단용 키트를 제공할 수 있다.

[0073] 상기 키트는, 시료로부터 세포밖 소포체 및/또는 세포를 분리하는 시약과 함께 고흡수성 수지를 포함하고, 추가적으로 시료로부터 세포밖 소포체 및/또는 세포를 분리하는 방법 및/또는 분리된 세포밖 소포체 및/또는 세포를 고흡수성 수지에 고정하는 방법을 지시하는 매뉴얼을 추가로 포함할 수 있다.

[0074] 본 발명에 있어서, 상기 질환은 암일 수 있다.

[0075] 본 발명에서 진단의 대상이 되는 질환으로 상기 "암"은 포유류에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징 지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리킨다. 본 발명에서 진단의 대상이 되는 암은 유방암, 난소암, 대장암, 위암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 세포밖 소포체 또는 세포에 포함된 바이오마커로 진단 가능한 암은 제한없이 본 발명에 따른 조성물 또는 키트로 진단이 가능하다.

[0076] 하지만, 본 발명은 세포밖 소포체 및/또는 세포에 포함된 바이오마커로 진단 가능한 모든 질병 또는 질환에 적용될 수 있을 것이다.

[0077] 본 발명에서 상기 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 상기한 암의 발병 여부 또는 발병 가능성(위험성)을 확인하는 것이다.

[0078] 본 발명에서, 상기 진단은 고흡수성 수지 표면에 고정된 세포밖 소포체 및/또는 세포는 핵산 분자 증폭 반응을 이용한 바이오마커 진단에 사용될 수 있으며, 예컨대, 상기 단일 핵산 분자 증폭 반응은 지수함수적 증폭 반응(EXPAR), 롤링 써클 증폭(RCA), 또는 앱타머 저지제-DNA-효소(IDE), 또는 앱타머-IDE 시스템일 수 있다.

[0079] 일 양태로서, 고흡수성 수지 표면에 고정된 세포밖 소포체 또는 세포에 존재하는 핵산 표적이 롤링 써클 증폭(RCA) 또는 EXPAR를 이용하여 증폭되어 진단에 사용될 수 있다.

[0080] 상기 고흡수성 수지 표면에 고정된 세포밖 소포체의 함유량은 1×10^{3} 내지 1×10^{13} 입자수, 바람직하게는 1×10^{6} 내지 1×10^{13} 입자수인 것이 진단의 민감도 면에서 바람직하다.

[0082] 본 발명은 또 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는 세포밖 소포체 및/또는 세포를 포함하는 용액의 용매 교체 방법에 관한 것이다:

[0083] (a) 상기 방법에 따라 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 및/또는 세포를 고정시키는 단계; 및

[0084] (b) 상기 세포밖 소포체 및/또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 교체용 용매에 재현탁시키는 단계.

[0085] 본 발명에 있어서, 상기 교체용 용매는 상기 세포밖 소포체 및/또는 세포를 용해시키거나, 이후의 실험이나 진단 단계에 활용하기에 적합한 용매일 수 있으며, 예컨대 PBS, 증류수 또는 배양배지일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0086] 다른 양태로서, 상기 용매는 완충 용액이나 실험용 시약일 수 있다.

[0087] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 물리적인 방법, 예컨대, 피펫팅(pipetting) 또는 보텍싱(vortexing)으로 재

현탁시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0088] 본 발명은 또한 다음 단계를 포함하는 세포밖 소포체 및/또는 세포를 포함하는 용액의 제조방법을 제공한다:

[0089] (a) 상기 방법에 따라 고흡수성 수지 표면에 세포밖 소포체 및/또는 세포를 고정시키는 단계;

[0090] (b) 상기 세포밖 소포체 및/또는 세포가 표면 고정된 고흡수성 수지를 교체용 용매에 재현탁시키는 단계; 및

[0091] (c) 교체용 용매에 재현탄된 세포밖 소포체 및/또는 세포를 포함하는 용액을 회수하는 단계.

[0093] **실시예**

[0095] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0097] **실시예 1. HEK293T cell 유래 세포밖 소포체 분리**

[0098] HEK293T cell(ATCC)을 100 mm cell culture dish (SPL Life Sciences, Korea)에서 10% Exosome-Depleted Fetal bovine serum (Gibco, USA), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)을 포함한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Cellgro, USA)으로 37℃ 및 5% CO_2 조건으로 유지하며 2~3일간 배양하였다. 50 mL conical tube (SPL Life Sciences)에 세포배양배지를 회수하여 3,000 x g에서 15분간 원심분리하여 cell debris를 제거하였다. 0.22-μm cellulose acetate syringe-filter (GVS, Italy)로 필터링 하였다. ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution(System Bioscience, USA)을 15 ml conical tube (SPL Life Sciences)에서 위 세포배양배지와 1:5 부피 비율로 혼합한 후 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션 하였다. 위 용액을 30분 동안 1,500 x g에서 원심분리한 후 상층액을 제거한 후 생기는 pellet에 1X N.F PBS를 첨가하여 피펫팅 하여 용해시켜 세포밖 소포체 용액을 수득하였다.

[0100] **실시예 2. 세포밖 소포체 형광 염색**

[0101] 세포밖 소포체 용액 297 μL에 BODIPY™FL C5-Ceramide (Invitrogen) 3 μL (100:1 부피비)를 첨가하여 혼합하고, 37℃에서 20분간 인큐베이션 하였다. Pierce™ Protein Concentrators PES, 100K MWCO, 0.5 mL (Thermo scientific)에 로딩 후 15,000 × g에서 10분간 원심분리하였다. 필터 위에 남아있는 용액을 회수하였다.

[0103] **실시예 3. 비드 표면에 세포밖 소포체 고정**

[0104] PBS를 이용하여 5 × 10^{10} particles/200 μL 농도의 형광 염색된 세포밖 소포체 용액을 제조하였다. 대조군으로는 PBS 198 μL에 BODIPY™FL C5-Ceramide 2 μL를 혼합한 용액(free dye 용액)과 PBS를 사용하였다. 고흡수성 수지 비드(Poly(acrylamide-co-acrylic acid) sap beads, CAS no. 9003-06-9) 16 mg (1개)를 상기 용액 200 μL에 첨가하고 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 칼을 이용하여 위 고흡수성 수지 비드를 2 mm 두께로 자른 후 24 well plate (SPL Life Sciences) 위에 올려 형광현미경으로 분석하였다.

[0105] 그 결과, 도 1에서와 같이 대조군인 free dye는 고흡수성 수지 비드 내부로 침투하여 비드 전체가 형광을 나타내었으나, 본 발명에 따른 세포밖 소포체는 비드 표면에 고정되어 있었으며, 따라서 비드 표면에서만 강한 형광이 관찰되었다.

[0107] **실시예 4. 비드 표면에 세포 고정**

[0108] PBS를 이용하여 HEK293T cell을 3 × 10^3 cells/μL 농도가 되도록 형광 염색된 세포 용액을 제조하였다. 고흡수성 수지 비드(Poly(acrylamide-co-acrylic acid) sap beads, CAS no. 9003-06-9) 16 mg (1개)를 상기 용액

200 μL에 첨가하고 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 칼을 이용하여 위 고흡수성 수지 비드를 2 ㎜ 두께로 자른 후 24 well plate (SPL Life Sciences) 위에 올려 형광현미경으로 분석하였다.

[0109] 그 결과, 도 1에서와 같이 대조군인 free dye는 고흡수성 수지 비드 내부로 침투하여 비드 전체가 형광을 나타내었으나, 본 발명에 따른 세포 역시 비드 표면에 고정되어 있었으며, 따라서 비드 표면에서만 강한 형광이 관찰되었다.

[0111] **실시예 5. 비드 표면에 고정된 세포밖 소포체의 회수 온도 비교**

[0112] 실시예 3에서 기술된 바와 같이 비드 표면에 세포밖 소포체를 고정하였다. 이 때, 온도의 영향을 확인하기 위하여 세포밖 소포체 고정 온도를 각각 4℃와 25℃로 설정하였다. 이후, 세포밖 소포체가 고정된 비드에 PBS 용액 1 mL을 첨가한 후 pipetting을 통해 고정된 세포밖 소포체를 회수하였다. 회수된 용액 내 세포밖 소포체의 개수는 nanoparticle tracking analysis를 이용하여 분석하였다. 고정에 사용된 세포밖 소포체(Input)의 개수를 100%으로 하여 회수된 세포밖 소포체(Output)의 개수를 백분율로 환산하였다.

[0113] 도 2에서와 같이, 고정 및 회수 온도와는 무관하게 대부분의 고정된 세포밖 소포체가 회수될 수 있음을 알 수 있다.

[0115] **실시예 6. 세포밖 소포체 표면 바이오 마커 신호 증폭 후 비드 표면에 고정을 통한 진단**

[0116] 비드 표면에 세포밖 소포체를 고정하는 상기 방법을 이용한 세포밖 소포체 기반 질병 진단 효율을 확인해 보고자, 세포밖 소포체의 표면 단백질 바이오 마커(CD63)를 롤링 써클 증폭 (RCA)을 이용하여 형광 검출하였다. 각각 1×10^9, 5×10^9 또는 1×10^{10} 입자수의 세포밖 소포체를 대표적인 표면 단백질인 CD63에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머(CAC CCC ACC TCG CTC CCG TGA CAC TAA TGC TAT TTT TCG TAT CTG TGC TCA GTA AGA, 바이오니아) 100 nM 로 타겟팅 하였다. DNA 압타머는 상보적으로 설계된 동일 농도의 패드락 프로브(Phosphate-CAC AGA TAC GTT ATA CCC GGT CGC TTT AGC CTT CTT ACT GAG, 바이오니아)에 혼성화되고, T4 DNA 리가제(Thermo Scientific)에 의해 패드락 프로브가 연결되어 반응 주형으로 작용하는 단일가닥 환형 DNA가 형성되도록 하였다.

[0117] 상기 단일가닥 환형 DNA에 10U phi29 polymerase (Thermo Scientific), 10X reaction buffer (Thermo Scientific), 10mM dNTP mix (New England Biolabs)를 첨가하여 롤링 써클 증폭 용액 180 μL을 제조하였다. 이어 30℃에서 4시간을 인큐베이션하여 증폭을 하였으며, 검출을 위해 상기 용액에 형광 dye (SYBR™ Green II RNA Gel Stain, Thermo Scientific) 20 μL를 첨가하여 실험군을 제조하였다.

[0118] 시료 대조군으로는 PBS 180 μL에 10 × SYBR™ Green II RNA Gel Stain 20 μL를 혼합한 용액(free dye 용액), 세포밖 소포체를 포함하지 않는 동일 부피의 롤링 써클 증폭 용액에 SYBR™ Green II RNA Gel Stain이 혼합된 용액을 사용하였다.

[0119] 15 mg (1개) 고흡수성 수지 비드 (Poly(acrylamide-co-acrylic acid) sap beads, CAS no. 9003-06-9)를 상기 증폭반응에 따른 각 용액(실험군 또는 시료 대조군)에 첨가하고 용액을 완전 흡수한 뒤 칼을 이용하여 위 고흡수성 수지 비드를 반으로 자른 후 형광현미경으로 분석하였다.

[0120] 한편, 또 다른 대조군으로는 상기 실험군을 고흡수성 수지 비드와 반응시키지 않고 형광현미경으로 분석하였다.

[0121] 그 결과, 도 3A에서와 같이 대조군인 free dye 용액과 세포밖 소포체를 포함하지 않고 롤링 써클 증폭한 경우에는 고흡수성 수지 비드로 고정하여도 세포밖 소포체의 형광 신호가 확인되지 않은 반면, 본 발명에서와 같이 각각 1×10^9, 5×10^9 또는 1×10^{10} 입자수로 세포밖 소포체를 포함하여 롤링 서클 증폭하고 고흡수성 수지 비드로 고정한 경우, 세포밖 소포체 농도 의존적인 형광 신호의 증가가 관찰되었다.

[0122] 한편, 도 3B에서와 같이 각각 1×10^9, 5×10^9 또는 1×10^{10} 입자수로 포함하여 롤링 서클 증폭한 경우에도 고흡수성 수지 비드로 고정하지 않은 경우에는 형광 신호가 관찰되지 않았다.

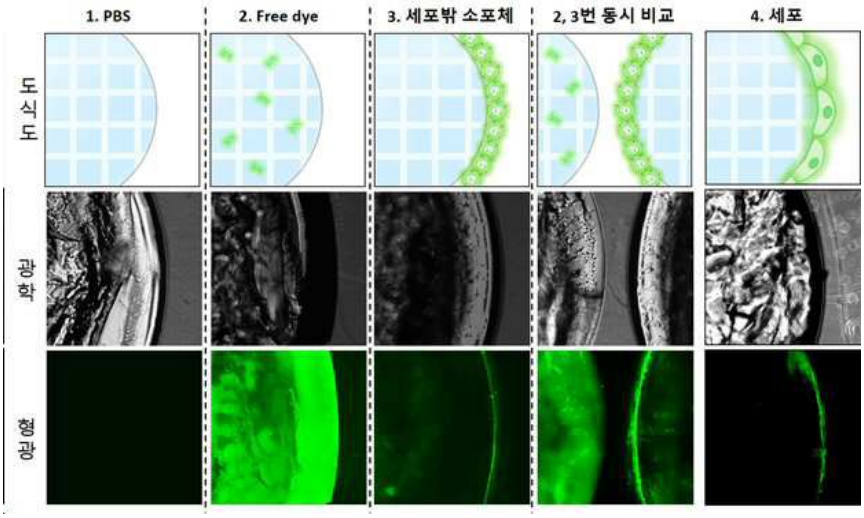
[0123] 상기와 같은 결과로부터, 본 발명에서와 같이 세포밖 소포체를 비드에 고정된 상태로 바이오마커 진단시 진단

성능이 현저히 개선됨을 확인할 수 있었다.

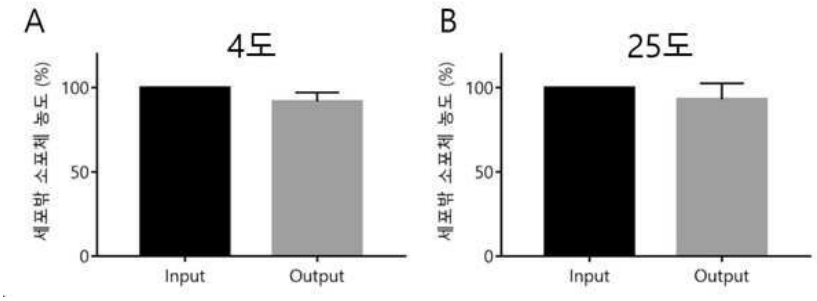
[0125] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

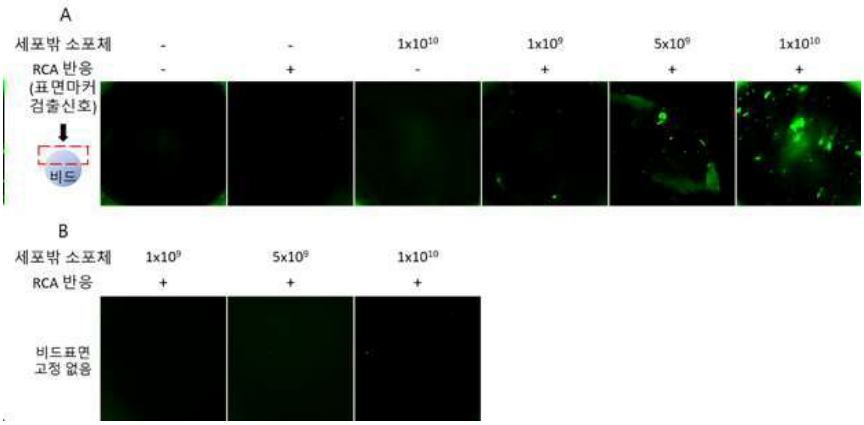
도면1



도면2



도면3



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.