

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 9월 29일 (29.09.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/153187 A1

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/24 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01) *C12M 1/26* (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002134

(22) 국제출원일: 2016년 3월 3일 (03.03.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0040684 2015년 3월 24일 (24.03.2015) KR

(71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH
ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR];
37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동),
Gyeongsangbuk-do (KR).

(72) 발명자: 박재성 (PARK, Jae Sung); 790-751 경상북도
포항시 남구 지곡로 155, 7동 1601호 (지곡동, 교수아
파트), Gyeongsangbuk-do (KR). 신현우 (SHIN, Hyun
Woo); 604-806 부산시 사하구 사하로 81, 가동 205호
(감천동, 감천공원맨션), Busan (KR). 김종민 (KIM,
Jong Min); 150-102 서울시 영등포구 선유서로 67, 101
동 507호 (양평동 2가, 신동아하이패리스), Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인(유) 화우 (YOON & YANG (IP)
LLC); 135-502 서울시 강남구 테헤란로 108길 11, 4층
(대치동, 삼호빌딩), 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, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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.

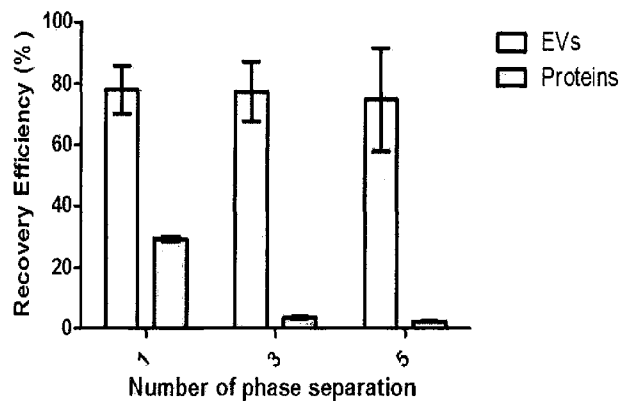
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MULTI-STAGE PURIFICATION METHOD AND APPARATUS OF EXTRACELLULAR VESICLES USING
AQUEOUS SOLUTION TWO-PHASE SYSTEM

(54) 발명의 명칭: 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법 및 장치

[도 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a multi-stage purification method and apparatus of extracellular vesicles using an aqueous solution two-phase system that can separate and purify a large amount of extracellular vesicles, contaminated due to being mixed with proteins, at high purity in a short time through a multi-stage purification method using an aqueous solution two-phase system, wherein it is possible to remove 95% or more proteins and obtain extracellular vesicles with high purity, thereby having very high efficiency in comparison with the prior art. In particular, the method costs less and is economical, and thus is capable of increasing competitiveness because expensive equipment or materials such as a high-speed centrifugal separator or antibodies are not required. Also, the isolated and purified extracellular vesicles can be used in analysis methods such as RT-PCR or western blot, thereby being utilized in the areas of research and diagnosis of diseases using the same.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2016/153187 A1



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, **공개:**

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).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 단백질과 혼합되어 오염된 세포 밖 소포체를 수용액 이상계를 이용한 다단계 정제방법을 통하여 짧은 시간 안에 고순도로 많은 양을 분리 및 정제할 수 있는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법 및 장치에 관한 것으로, 95 % 이상의 단백질을 제거할 수 있으며, 고순도의 세포 밖 소포체를 획득할 수 있어 종래의 기술에 비하여 매우 높은 효율을 갖는다. 특히 초고속 원심분리 장치나 항체와 같은, 고가의 장비나 재료가 필요 없기에, 비용이 적게 들어 경제적이므로, 경쟁력을 높일 수 있는 방법이다. 또한, 이렇게 분리 및 정제된 세포 밖 소포체는 RT-PCR 이나 western blot 과 같은 분석 방법에 이용할 수 있어, 이를 이용한 연구 분야 및 질병 진단에도 활용할 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법 및 장치

【기술분야】

본 발명은 단백질과 혼합되어 오염된 세포 밖 소포체를 수용액 이상계를 이용한 다단계 정제방법을 통해 짧은 시간 안에 고순도로 많은 양을 분리 및 정제 과정을 수행할 수 있는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법 및 장치에 관한 것이다.

【배경기술】

세포 밖 소포체에는 엑소좀(exosomes) 또는 마이크로베지클(microvesicles) 등이 있으며 크기는 50 ~ 1000 nm 정도로, 원래의 세포가 가지고 있던 특성들을 가지고 있기 때문에 질병의 진단 마커로 주목받고 있다.

종래의 세포 밖 소포체를 분리하는 기술로는 초고속원심분리법, 항체분리법, 미세유체 기술 및 고분자를 이용한 침전법이 있다. 이 중에서, 초고속원심분리법은 세포 밖 소포체를 분리하는데 가장 널리 쓰이는 방법이고, 원리가 간단하여 가장 신뢰성 있는 분리 방법이다.

하지만, 이러한 초고속원심분리법을 이용해서 세포 밖 소포체를 분리할 경우에는 세포 밖 소포체의 수율이 낮고, 분리하는데 시간이 많이 소요되며, 비싼 기기가 필요하다는 단점이 있다.

항체분리법은 항원항체 반응을 이용한 분리 방법으로, 높은 선택성을 가지지만 소포체에 붙은 항체를 제거하는 데 어려움이 있고 항체의 높은 가격으로 인하여

대량생산에 적합하지 않다.

미세유체 기술은 상기의 항체분리법과 미세유체 칩을 접목시켜 적은 양의 샘플에서도 빠르게 소포체를 분리시킬 수 있는 방법이지만, 항체를 미세유체칩에 접목시키는 데 많은 준비과정이 필요하다.

고분자를 이용한 침전법은 간단하게 소포체를 분리할 수 있는 방법이지만, 샘플에 존재하고 있는 모든 물질을 침전시키기에 단백질과 같은 불순물 또한 같이 분리된다는 단점이 있다.

이러한 종래기술의 문제점을 극복하고자 본 발명자들은 공개특허 제2014-0050465호에서 세포 밖 소포체를 분리하는 미세유체 칩에 관한 기술을 제시한 바 있다. 상기 특허문헌에 기재된, 항체로 코팅된 미세유체 칩을 이용해서 세포 밖 소포체를 혈청으로부터 분리해내는 방법은 세포 밖 소포체의 분리에 따른 소요시간이 적고, 연구실이 따로 필요하지 않아 경제적인 면에서 유리하다는 장점이 있으나, 이 방법 역시 수율이 낮다는 점에서 실용적이면서도 경제적인 진단 방법으로 활용하기에는 여전히 개선해야할 문제점들이 존재한다.

한편, 폴리머를 이용한 방법은 체액(body fluid)의 용해도를 낮춰 줌으로써 세포 밖 소포체를 가라앉게 만들어 주는 기술로서, 긴 준비시간(incubation time)이 필요하며 단백질도 함께 가라앉기에 침전물의 순도가 좋지않아 진단을 위한 활용에 적합하지 않다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 이러한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 세포

박 세포체를 포함한 수용액에서 세포 박 세포체를 분리 및 정제시, 수용액 이상계를 이용한 다단계 정제방법을 사용함으로써, 불순물인 단백질을 제거하고 고순도의 세포 박 세포체를 획득하는 것을 그 목적으로 한다.

【기술적 해결방법】

이러한 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 수용액 이상계를 이용한 세포 박 세포체의 다단계 정제방법은 (a) 체액 또는 세포 박 세포체가 존재하는 수용액에 제1물질과 제2물질을 혼합하는 단계; (b) 상기 혼합물을 상층액과 하층액으로 상분리시켜 수용액 이상계를 제조하는 단계; (c) 상기 수용액 이상계 중, 제1물질이 포함된 상층액을 제거하는 단계; (d) 잔류하는 하층액에 제1물질을 포함하는 새로운 상층액을 공급하여 혼합하는 단계; 및 (e) 상기 (b) 내지 (d) 단계를 적어도 한번 또는 두번 이상 수행한 후, 상기 하층액으로부터 세포 박 세포체를 회수하는 단계;를 포함한다.

이때, 제1물질은 물, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 폴리비닐피로리돈, 폴리비닐 알코올 또는 피콜 중에서 선택되는 것이며, 제2물질은 EOPO(ethylene oxide propylene oxide), 덱스트란(dextran), 고농도염, 레반, Poly(vinyl methyl ethyl ether), 황산암모늄, 황산나트륨, 황산마그네슘, 인산칼륨 또는 탄산나트륨 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

더욱 상세하게는 제1물질이 물일 경우, 제2물질은 EOPO이고, 제1물질이 폴리에틸렌 글라이콜일 경우, 제2물질은 덱스트란, 레반, Poly(vinyl methyl ethyl ether), 황산암모늄, 황산나트륨, 황산마그네슘, 인산칼륨, 탄산나트륨 중에서 선택될 수 있다. 또한 제1물질이 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리비닐피로리돈, 폴리비닐

알코올 또는 피콜 중에서 선택될 경우에는, 제2물질로 덱스트란인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 제1물질은 폴리에틸렌 글리콜이고, 제2물질은 덱스트란인 것이다.

한편, (a)단계 이후 및 (b)단계 이전에, 상기 수용액 이상계에 첨가제를 추가하여 수용액 이상계 내 분자들 사이의 인력 또는 반발력을 조절하는 단계를 더 포함할 수 있다.

상기 (b)단계에서 수용액 이상계의 상 분리는 $500 \sim 2,000 \times g$ -force의 원심분리법을 수행하는 단계를 더 포함하여 가속화할 수 있으며, 상기 수용액 이상계에 초음파 조사 혹은 미세 기포를 주입하는 단계를 더 포함할 수 있다.

또한, 상기 체액은 전혈(whole blood), 혈청, 복강액, 모유 및 소변으로 이루어진 군 중에서 선택되는 적어도 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

이렇게 본 발명의 수용액 이상계를 사용하여 다단계 정제 방법으로 분리된 세포 밖 소포체는 ELISA, RT-PCR, western blot, proteomics 또는 genomics 등의 분석 방법에 사용될 수 있다.

본 발명의 수용액 이상계를 이용하여 세포 밖 소포체를 분리하는 장치는 수용액 이상계를 형성하는 제1물질 및 제2물질을 주입하는 주입부(10); 체액 또는 세포밖 소포체가 포함된 수용액을 투입하는 투입부(20); 상기 주입부 및 투입부와 연결되어 체액 또는 세포 밖 소포체가 포함된 수용액과 제1물질 및 제2물질을 원심분리하여 상 분리하는 본체(30); 상기 상 분리 후 제1물질이 포함된 상층액을 제거하는 제거부(40); 및 상기 본체(30)에서 획득되는 세포 밖 소포체를 회수하는 회수부(50);를 포함한다.

주입부(10)는 제1물질과 제2물질이 각각 주입될 수 있도록 제1주입부(10a)와 제2주입부(10b)로 분리될 수 있으며, 주입부(10)와 투입부(20) 사이에 채액 또는 세포 밖 소포체가 포함된 수용액과 제1물질 및 제2물질을 혼합하는 혼합부(60)를 더 포함할 수 있다. 이때 상기 혼합부(60)에 진동장치가 장착되어 있는 것이 바람직하다. 또한 본체(30)에는 초음파 조사 장치 또는 미세 기포 발생장치가 더 포함될 수 있으며, 이러한 본체(30)의 형상은 원통형이거나 호리병형인 것을 특징으로 한다.

【발명의 효과】

본 발명에 따른 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법은 95 % 이상의 단백질을 제거할 수 있으며, 고순도의 세포 밖 소포체를 획득할 수 있는 것으로, 종래의 기술에 비하여 매우 높은 효율을 가진다. 특히 초고속 원심분리 장치나 항체와 같은 고가의 장비나 재료가 필요 없으므로, 비용이 적게 들어 경제적이다. 따라서 경쟁력이 매우 높은 다단계 정제방법 및 장치에 관한 것이다.

또한, 본 발명에 의해 분리 및 정제된 세포 밖 소포체는 RT-PCR이나 western blot과 같은 분석 방법에 이용할 수 있어, 이를 이용한 연구 분야 및 질병 진단에도 활용할 수 있다는 장점이 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 상분리 횟수에 따른 세포 밖 소포체 및 단백질의 회수율을 나타내는 그래프이다.

도 2에서 (a)와 (b)는 각각 초고속원심분리법 및 본 발명의 수용액 이상계를 이용한 다단계 정제방법으로 획득한 세포 밖 소포체의 TEM(transmission electron

microscope) 이미지이다.

도 3에서 (a)와 (b)는 본 발명의 수용액 이상계를 이용한 다단계 정제방법 및 초고속원심분리법으로 획득한 세포 밖 소포체를 western blot 분석을 통해 이미지화한 결과이다.

도 4는 본 발명의 수용액 이상계를 이용한 다단계 정제방법으로 획득한 세포 밖 소포체의 mRNA인 MelanA를 RT-PCR을 실행하고 이미지화한 결과이다.

도 5는 본 발명의 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제장치에 대한 이미지이다.

도 6은 도 5에서 혼합부가 더 포함된 장치에 대한 이미지이다.

도 7은 도 6에서 주입부가 두 개로 분리된 장치에 대한 이미지이다.

도 8은 본 발명의 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제장치에서 본체의 형상이 호리병 형인 장치에 대한 이미지이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하에서는 본 발명의 기술적 특징을 좀 더 구체적으로 살펴보기 위해 실시예와 도면을 참조하여 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 발명의 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

본 발명은 (a) 체액 또는 세포 밖 소포체가 존재하는 수용액에 제1물질과 제2물질을 혼합하는 단계; (b) 상기 혼합물을 상층액과 하층액으로 상분리시켜 수용

액 이상계를 제조하는 단계; (c) 상기 수용액 이상계 중, 제1물질이 포함된 상층액을 제거하는 단계; (d) 잔류하는 하층액에 제1물질을 포함하는 새로운 상층액을 공급하여 혼합하는 단계; 및 (e) 상기 b) 내지 (d) 단계를 적어도 한번 또는 두번 이상 수행한 후, 상기 하층액으로부터 세포 밖 소포체를 회수하는 단계;를 포함하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법에 관한 것이다.

본 발명에서 세포 밖 소포체란 세포에서 생성되어 세포 밖으로 분비되는 소포체로써, 엑소좀(exosome), 마이크로베지클(microvesicle) 및 마이크로파티클(microparticle) 등을 포함하나, 이들만으로 제한되는 것은 아니다.

본 발명에서 수용액 이상계를 형성하는 제1물질과 제2물질의 조합(제1물질/제2물질)은, 물/EOP(ethylene oxide propylene oxide), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)/덱스트란(dextran), 폴리에틸렌 글리콜/고농도 염, 폴리에틸렌 글리콜/레반(levan), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone)/덱스트란, 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol)/덱스트란, 피콜(ficoll)/덱스트란, 폴리에틸렌 글리콜/Poly(vinyl methyl ethyl ether), 폴리에틸렌 글리콜/황산암모늄(ammonium sulfate), 폴리에틸렌 글리콜/황산나트륨(sodium sulfate), 폴리에틸렌 글리콜/황산마그네슘(magnesium sulfate), 폴리에틸렌 글리콜/인산칼륨(potassium phosphate) 및 폴리에틸렌 글리콜/탄산나트륨(sodium carbonate) 중 어느 하나인 것이 바람직하나, 특별히 이들로 제한되는 것은 아니며, 수용액 이상계를 형성하는 제1물질과 제2물질의 다양한 조합이 사용될 수 있다.

한편, 상기 수용액 이상계를 형성하기 위한 서로 혼화되지 않는 두 가지 물질은 폴리에틸렌 글리콜/덱스트란인 것이 가장 바람직하며, 세포 밖 소포체는 덱스

트란 상에 농축이 되는 특징이 있고, 상기 텍스트란 상에 농축된 세포 밖 소포체는 피펫 등의 분리방법을 통해 분리될 수 있다.

이때, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 0.2 ~ 600 kDa이고, 농도는 5 ~ 15 wt%이며, 텍스트란의 분자량은 15 ~ 2,000 kDa이고, 농도는 1 ~ 10 wt%인 것이 바람직하다. 폴리에틸렌 글리콜 및 텍스트란의 농도가 상기 범위보다 낮으면 수용액 이상계가 형성되지 않고, 상기 농도 범위보다 높으면 이들 고분자를 녹이기 위해 많은 시간이 필요할 뿐 아니라 이상계 사이의 표면 장력이 너무 높아져서 채액과 같은 제 3의 용질이 녹아들기 어렵다.

(a)단계 이후 및 (b)단계 이전에, 수용액 이상계에 첨가제를 추가함으로써, 수용액 이상계 내 분자들 사이의 인력 또는 반발력을 조절할 수 있고, 이를 통해 세포 밖 소포체의 분리효율을 높일 수 있다. 특히 염을 추가함으로써 수용액 이상계의 전위를 조절하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0.05 mol K_3PO_4 를 추가할 수 있다.

(b)단계에서 수용액 이상계는 $500 \sim 2,000 \times g$ -force로 5 ~ 15분간 원심분리하여 상 분리 현상을 더욱 촉진할 수 있는데, $500 \times g$ -force 미만인 경우 분리 시 시간이 많이 소요되어 원심분리를 하는 의미가 없으며, $2,000 \times g$ -force 부터는 중력 가속도(g)를 올려도 분리 시 소요되는 시간에 큰 변화가 없으므로 바람직하지 않다.

또한 상기 수용액 이상계에 초음파를 조사하거나, 혹은 미세 기포를 주입하는 단계를 더 포함할 수 있는데, 두 개의 상 사이의 경계면에 트랩(trap)되어 있는

세포 밖 소포체 및 단백질을 더욱 효과적으로 분리해낼 수 있다.

상기 초음파 조사는 용액에 직접 또는 간접적으로 초음파를 가할 수 있으며, 200 W ~ 400 W의 강도에서 20 ~ 240 분 동안 수행하는 것이 바람직하다. 초음파의 강도가 400 W를 초과하는 경우에는 수용액의 온도가 급상승하여 세포 밖 소포체 및 단백질이 변성될 수 있고, 초음파의 강도가 200 W 미만인 경우에는 경계면에 트랩되어 있는 세포 밖 소포체 및 단백질의 분리가 잘 되지 않는 문제점을 초래한다. 또한 초음파 처리 시간의 경우, 240 분을 초과하는 시점부터는 처리 시간이 길어져도 분리 정도가 더 이상 증가하지 않으며, 20 분 미만인 경우 그 효율이 떨어진다.

이와 같은 방법으로 상분리된 수용액 이상계에서 상층액을 제거하고 다시 불순물이 섞이지 않은 새로운 상층액을 혼합하는 과정을 반복하여 세포 밖 소포체를 분리해낸다. 이러한 과정을 반복할수록 세포 밖 소포체의 순도가 높아지지만, 회수율은 줄어들이기에 바람직한 반복회수는 2 ~ 4회이다.

본 발명은 단백질에 의해 오염된 세포 밖 소포체의 순도를 손쉽게 보다 효율적으로 높일 수 있으며, 질병의 진단, 백신 연구 및 치료 등 다양한 분야에 응용될 수 있는 장점이 있다. 더욱 상세하게는, 체액으로부터 세포 밖 소포체를 분리한 후 세포 밖 소포체에 존재하는 유전자 발현량을 측정하여 질병을 진단할 수 있다. 이때 상기 체액은 전혈(whole blood), 혈청, 복강액, 모유, 또는 소변으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 질병은 암, 패혈증, 동맥경화증 및 류마티스 관절염으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

한편, 본 발명의 수용액 이상계를 사용하여 다단계 정제 방법으로 분리된

세포 밖 소포체는 ELISA, RT-PCR, western blot, proteomics 또는 genomics 등의 분석 방법에 사용될 수 있다.

세포 밖 소포체 내에 존재하는 유전자의 발현량 측정 시, 상기 유전자는 자극에 대해 발현 차이를 보이는 mRNA이며, 유전자의 분리 과정은 세포나 조직에서 유전자를 분리하는 종래의 방법과 동일하다. 더욱 상세하게는, 상기 유전자는 oligo(dT)를 이용하여 cDNA로 합성된 뒤에 real time PCR을 수행하나, real time PCR을 수행하는데 사용되는 주형이 cDNA에 제한되는 것은 아니다.

이때 상기 유전자는 EDN1(Endothelin 1), VCAM1(Vascular cell adhesion molecule 1), ICAM1(Intercellular adhesion molecule 1), SELE(Selectin E), NOS3(Nitric oxide synthase 3), BMP4(Bone morphogenetic protein 4), VWF(Von Willebrand factor), MPZ(Myelin protein zero), IRF1(Interferon regulatory factor 1), TNF(Tumor necrosis factor), IL32(Interleukin 32), CFLAR(CASP8 and FADD-like apoptosis regulator), CXCL10(Chemokine(C-X-X motif) ligand 10), IL6(Interleukin 6), ICK(Intestinal cell (MAK-like) kinase), TNFAIP2(Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2), ARHGAP8(Rho GTPase activating protein 8) 및 F3(Coagulation factor III) 로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 수용액 이상계를 이용하여 세포 밖 소포체를 다단계로 분리 및 정제하는 장치는 도 5와 같으며, 더욱 상세하게는 주입부(10)를 통하여, 수용액 이상계를 형성하는 제1물질 및 제2물질이 주입되고, 투입부(20)를 통하여 체액 또는 세포 밖 소포체가 포함된 수용액이 투입된다. 상기 제1물질, 제2물질 및 체액 또는

세포 밖 소포체가 포함된 수용액은 주입부(10) 및 투입부(20)와 연결되어 있는 본체(30)로 들어가 원심분리를 통하여 상 분리가 되며, 상 분리 후 제1물질이 포함된 상층액은 제거부(40)를 통해 제거되고, 한번 또는 두번 이상의 다단계 분리정제 후 획득되는 세포 밖 소포체는 회수부(50)를 통해 회수된다.

주입부(10)와 투입부(20) 사이에는 도 6과 같이, 체액 또는 세포 밖 소포체가 포함된 수용액과 제1물질 및 제2물질의 혼합이 용이할 수 있도록 혼합부(60)를 더 포함할 수 있으며, 상기 혼합부(60)에는 진동장치가 장착되어 혼합이 효율적으로 될 수 있도록 하는 것이 바람직하다.

본체(30)에 초음파 조사 장치 또는 미세 기포 발생 장치가 더 포함되는 것이 바람직하며, 상기 장치는 상 분리 후 두 개의 상 사이의 경계면에 트랩되어 있는 세포 밖 소포체 및 단백질을 효과적으로 분리해내기 위하여 초음파를 조사하거나 미세 기포를 발생시키는 장치이다.

주입부(10)는 도 7과 같이 제1물질과 제2물질이 각각 주입될 수 있도록 제1주입부(10a)와 제2주입부(10b)로 분리되는 것이 바람직하며, 수용액 이상계 제조 시 제1물질 및 제2물질의 농도를 각각의 폴리머 및 체액의 종류에 따라 조절할 수 있다.

또한 본체(30)의 형상은 원통형일 수도 있고, 도 8과 같이 호리병형일 수도 있다. 본체(30)가 호리병형인 경우, 오목하게 들어간 부위에 수용액 이상계의 경계면이 형성되는 데, 이 경우 경계면이 좁기 때문에 트랩된 세포 밖 소포체의 두께가 두껍게 형성되어 분리가 용이해진다는 장점이 있다.

이하에서는 본 발명의 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 분리방법에 대하여 구체적인 실시예를 중심으로 설명하고자 한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 발명의 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[실시예 1]

세포 밖 소포체 분리 및 정제를 위한 수용액 이상계 준비

수용액 이상계를 만들기 위해 폴리에틸렌 글리콜 및 덱스트란을 인산 완충 식염수(PBS, Phosphate buffered saline)에 녹여 각각 10.5 wt% 및 4.5 wt%의 농도로 준비하였다. 이후 세포 밖 소포체를 포함하는 수용액에 폴리에틸렌 글리콜 및 덱스트란 혼합 수용액을 혼합하여 4 °C에서 3 시간 동안 셰이커를 사용하여 교반하였다.

[실시예 2]

수용액 이상계에서 세포 밖 소포체 정제

실시예 1에 의해 제조된 세포 밖 소포체를 포함한 수용액 이상계를 1,000 × g-force로 4 °C에서 10분 간 원심분리를 하여 폴리에틸렌 글리콜 상 및 덱스트란 상으로 상 분리를 가속화시켰다. 상 분리 후 경계층을 제외한 상층액인 폴리에틸렌 글리콜 상을 제거한 후 제거한 부피와 동일한 양의 새로운 폴리에틸렌 글리콜을 넣고 실시예 1에서와 같은 방법으로 교반하고 상 분리 과정을 수행하였다.

이러한 상 분리 과정을 각각 1회, 3회 및 5회 실시하였으며, 각각의 다단계 정제가 끝난 후 단백질과 세포 밖 소포체의 회수율을 아래의 식(1)에 따라 계산하였으며, 그 결과는 도 1과 같다.

이때 단백질의 양은 브래드포드 방법을 이용하였고 세포 밖 소포체는 RNA양을 이용하여 그 값을 구하였다.

$$\text{회수율(Recovery efficiency)} = (\text{텍스트란 층에 있는 단백질 또는 세포 밖 소포체의 양}) / (\text{전체 단백질 또는 세포 밖 소포체의 양}) \quad (1)$$

도 1에 따르면, 1회, 3회, 5회의 다단계 정제 후 세포 밖 소포체의 회수율은 각각 77.9%, 77.4% 및 74.7%으로 다단계 정제의 횟수가 반복될수록, 세포 밖 소포체의 회수율은 큰 차이 없이 근소하게 감소하였지만, 단백질의 회수율은 각각 29.4%, 3.6% 및 2.4%로 다단계 정제의 횟수가 반복될수록 크게 감소하였다. 따라서 다단계 정제의 횟수가 반복될수록 세포 밖 소포체의 순도가 급격하게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[실시예 3]

정제된 세포 밖 소포체의 분석

실시예 2에 따라 정제된 세포 밖 소포체와 종래의 기술인 초고속원심분리법을 이용하여 얻은 세포 밖 소포체의 동일성을 비교하고, 분석 방법에 사용하여 assay를 수행할 수 있는지 확인하기 위해서 아래와 같이 TEM, western blot, RT-

PCR 분석을 시행하였다.

a. 분리된 세포 밖 소포체의 동일성 비교(TEM)

실시에 2에서 정제된 세포 밖 소포체와 초고속원심분리법으로 획득한 세포 밖 소포체를 투과전자현미경(TEM, Transmission Electron Microscopy)을 이용하여 관찰하였고 그 결과는 도 2과 같다.

도 2의 결과를 보면 초고속원심분리기로 얻은 세포 밖 소포체와 본 발명에 의해 정제된 세포 밖 소포체의 형태는 동일함을 확인할 수 있다.

b. Western blot 분석

세포 밖 소포체에 존재하는 CD81 마커를 이용하여 Western blot을 수행하였다.

도 3(a)에서 STD는 standard로서 PBS에 세포 밖 소포체를 혼합한 것이며, Ultra는 초원심분리법, Ultra*5는 초원심분리법으로 얻은 샘플의 5배 부피를 뜻하고, ATPS-1, ATPS-3 및 ATPS-5는 실시예 2에서 나타난 바와 같이 상 분리를 각각 1회, 3회 및 5회 하여 얻은 샘플이다. 이때 세포 밖 소포체의 회수율을 알아보기 위하여 동일한 부피의 샘플을 로딩하였으며, 따라서 총 단백질량은 각 샘플별로 모두 상이하다.

도 3(b)에서는 세포 밖 소포체의 순도를 알아보기 위하여 총 단백질량이 동일한 샘플을 로딩하였으며, 따라서 각 샘플의 부피는 모두 상이하다.

도 3(a)와 도 3(b)에 따라 초원심분리법과 본 발명의 다단계 정제방법을 비교해보면, 초원심분리법으로 획득한 세포 밖 소포체의 경우 순도는 더 높지만, 회수율에서 매우 낮은 효율을 가지므로 바람직하지 못하다. 또한 본 발명의 다단계

정제방법에서 상 분리 횟수가 1회, 3회, 5회로 증가하여도 세포 밖 소포체의 회수율은 크게 변화가 없지만, 순도의 경우 상 분리 횟수가 증가할수록 높아지게 된다.

c. RT-PCR 분석

본 발명의 다단계 정제방법으로 RNA의 손상없이 세포 밖 소포체를 분리 및 정제할 수 있음을 아래와 같은 방법으로 확인하였다.

멜라노마(melanoma)에서 얻은 세포 밖 소포체에 혈청단백질을 섞어서 생체유체와 유사하게 단백질에 의해 오염된 세포 밖 소포체 샘플을 제조하였다. 이후, 상기 세포 밖 소포체 샘플을 다단계 정제방법으로 분리 및 정제하고, Melan A라는 mRNA를 추출하여 RT-PCR(reverse transcription PCR)을 실행하였으며, 이를 항존 유전자인 GAPDH의 RT-PCR 결과와 비교하였다.

도 4의 RT-PCR 결과에 따르면, Melan A와 GAPDH는 동일함을 확인할 수 있는데, 이는 본 발명에 따른 세포밖 소포체의 다단계 분리 및 정제 방법을 통해서 분리된 세포 밖 소포체가 RNA의 손상 없이 분리되었음을 의미한다(도 4의 Negative는 세포 밖 소포체가 없는 경우이며, 이때 세포 밖 소포체가 포함된 시료 대신 DW(distilled water)를 사용하였다).

이상과 같이 실시예 1 내지 3의 실험결과를 통해, 본 발명의 다단계 정제방법은 RNA 손상없이 세포 밖 소포체를 분리 및 정제할 수 있으며, 종래의 초고속원심분리법과 비교하였을 때, 동일한 세포 밖 소포체를 고순도로 얻을 수 있어 효율적이다. 또한 다단계 정제 시, 상 분리 횟수가 반복될수록 세포 밖 소포체의 회수율은 약간 줄어들지만, 단백질의 회수율은 크게 줄어들어, 세포 밖 소포체의 순도는 점점 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

【산업상 이용가능성】

본 발명은 세포막 소포체를 포함한 수용액에서 세포 밖 소포체를 분리 및 정제시, 수용액 이상계를 이용한 다단계 정제방법을 사용함으로써, 불순물인 단백질을 제거하고 고순도의 세포 밖 소포체를 획득하는 것을 기술적 특징으로 하고 있어, 본 발명에 따른 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법은 95 % 이상의 단백질을 제거할 수 있으며, 고순도의 세포 밖 소포체를 획득할 수 있는 것으로, 기존의 정제 방법에 비하여 매우 높은 효율을 가지며, 특히 초고속 원심분리 장치나 항체와 같은 고가의 장비나 재료가 필요 없으므로, 비용이 적게 들어 경제적인 효과가 있다. 또한, 본 발명에 의해 분리 및 정제된 세포 밖 소포체는 RT-PCR이나 western blot과 같은 분석 방법에 이용할 수 있어, 이를 이용한 연구 분야 및 질병 진단에도 활용할 수 있다는 장점이 있으므로, 산업상 이용 가능성이 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

- (a) 체액 또는 세포 밖 소포체가 존재하는 수용액에 제1물질과 제2물질을 혼합하는 단계;
- (b) 상기 혼합물을 상층액과 하층액으로 상분리시켜 수용액 이상계를 제조하는 단계;
- (c) 상기 수용액 이상계 중, 제1물질이 포함된 상층액을 제거하는 단계;
- (d) 잔류하는 하층액에 제1물질을 포함하는 새로운 상층액을 공급하여 혼합하는 단계; 및
- (e) 상기 (b) 내지 (d) 단계를 적어도 한번 또는 두번 이상 수행한 후, 상기 하층액으로부터 세포 밖 소포체를 회수하는 단계;를 포함하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 제1물질은 물, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피로리돈, 폴리비닐 알코올 또는 피콜 중에서 선택되는 것이며,

상기 제2물질은 EPO(ethylene oxide propylene oxide), 덱스트란, 고농도 염, 레반, Poly(vinyl methyl ethyl ether), 황산암모늄, 황산나트륨, 황산마그네슘, 인산칼륨 또는 탄산나트륨 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법.

【청구항 3】

제2항에 있어서,

상기 제1물질은 물이고, 상기 제2물질은 EOPO인 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법.

【청구항 4】

제2항에 있어서,

상기 제1물질은 폴리에틸렌 글라이콜이고, 상기 제2물질은 덱스트란, 레반, Poly(vinyl methyl ethyl ether), 황산암모늄, 황산나트륨, 황산마그네슘, 인산칼륨, 탄산나트륨 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법.

【청구항 5】

제2항에 있어서,

상기 제1물질은 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리비닐피로리돈, 폴리비닐 알코올 또는 피콜 중에서 선택되는 것이고, 상기 제2물질은 덱스트란인 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법.

【청구항 6】

제2항에 있어서,

상기 제1물질은 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)이며, 상기 제2물질은 덱스트란(dextran)인 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법.

【청구항 7】

제1항에 있어서,

상기 (a)단계 이후 및 (b)단계 이전에,

상기 수용액 이상계에 첨가제를 추가하여 수용액 이상계 내 분자들 사이의 인력 또는 반발력을 조절하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법.

【청구항 8】

제1항에 있어서,

상기 (b)단계의 상 분리는 $500 \sim 2,000 \times g$ -force의 원심분리법으로 수행되는 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법.

【청구항 9】

제1항에 있어서,

상기 (b)단계에서,

상기 수용액 이상계에 초음파 조사 혹은 미세 기포를 주입하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법.

【청구항 10】

제1항에 있어서,

상기 채액은 전혈(whole blood), 혈청, 복강액, 모유 및 소변으로 이루어진 군 중에서 선택되는 적어도 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제방법.

【청구항 11】

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 방법을 통해 분리 및 정제된 세포 밖 소포체로 ELISA, RT-PCR, western blot, proteomics 또는 genomics으로 assay를 수행하는 방법.

【청구항 12】

수용액 이상계를 이용하여 세포 밖 소포체를 다단계 정제하는 장치에 있어서,

수용액 이상계를 형성하는 제1물질 및 제2물질을 주입하는 주입부(10);

체액 또는 세포 밖 소포체가 포함된 수용액을 투입하는 투입부(20);

상기 주입부 및 투입부와 연결되어 체액 또는 세포 밖 소포체가 포함된 수용액과 제1물질 및 제2물질을 원심분리하여 상 분리를 하는 본체(30);

상기 상 분리 후 제1물질이 포함된 상층액을 제거하는 제거부(40);

상기 본체(30)에서 획득되는 세포밖 소포체를 회수하는 회수부(50);를 포함하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제장치.

【청구항 13】

제12항에 있어서,

상기 주입부(10)와 투입부(20) 사이에 체액 또는 세포 밖 소포체가 포함된 수용액과 제1물질 및 제2물질을 혼합하는 혼합부(60)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제장치.

【청구항 14】

제13항에 있어서,

상기 혼합부(60)에 진동장치가 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 수용액

이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제장치.

【청구항 15】

제12항에 있어서,

상기 본체(30)에 초음파 조사 장치가 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제장치.

【청구항 16】

제12항에 있어서,

상기 본체(30)에 미세 기포 발생 장치가 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제장치.

【청구항 17】

제12항에 있어서,

상기 주입부(10)는 제1물질과 제2물질이 각각 주입될 수 있도록 제1주입부(10a)와 제2주입부(10b)로 분리되는 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제장치.

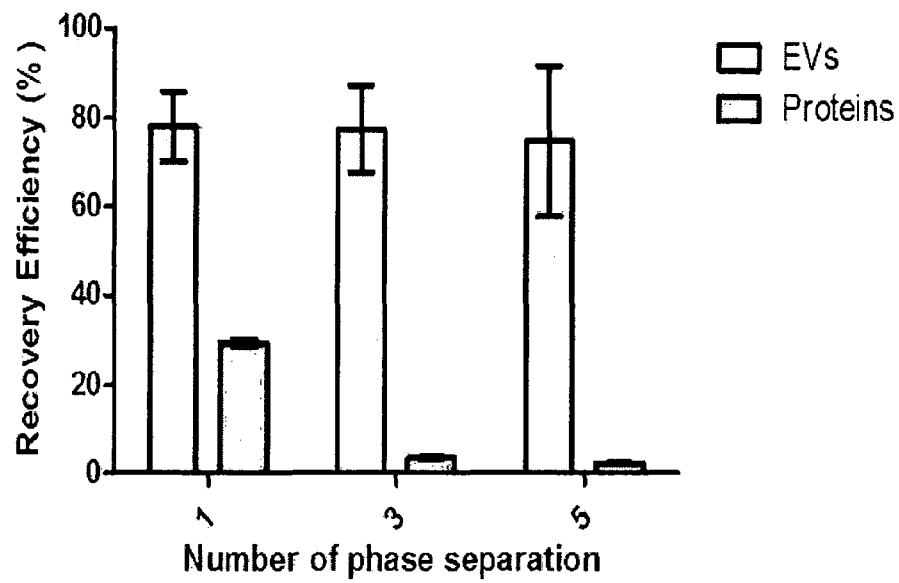
【청구항 18】

제12항에 있어서,

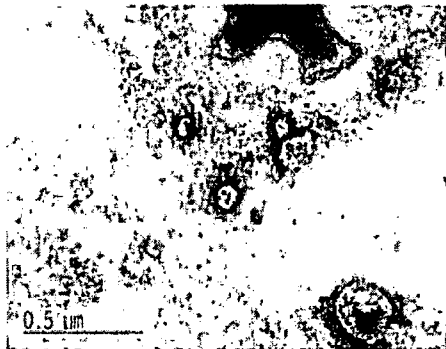
상기 본체(30)의 형상은 원통형이거나 호리병형인 것을 특징으로 하는, 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 다단계 정제장치.

【도면】

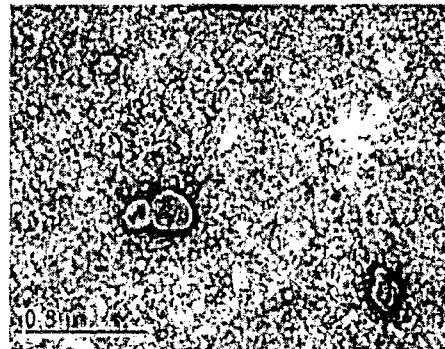
【도 1】



【도 2】

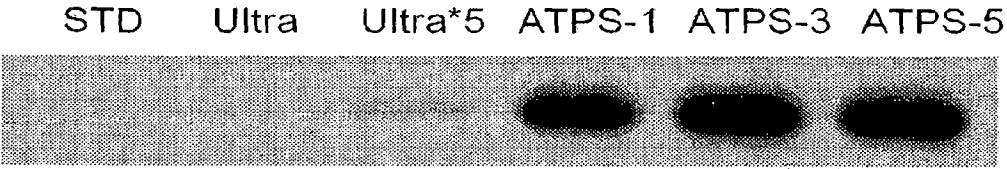


(a)

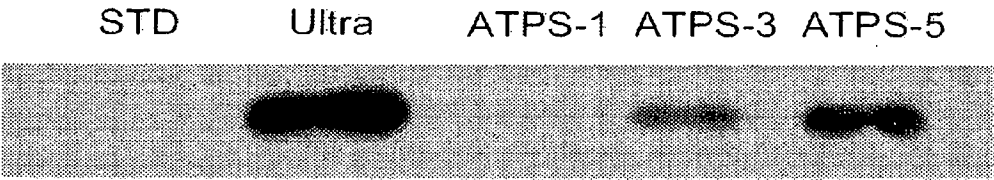


(b)

【도 3】

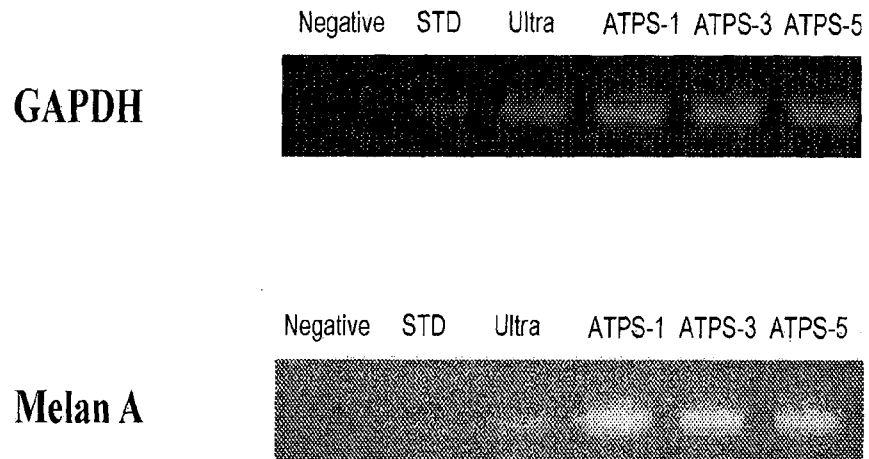


(a)

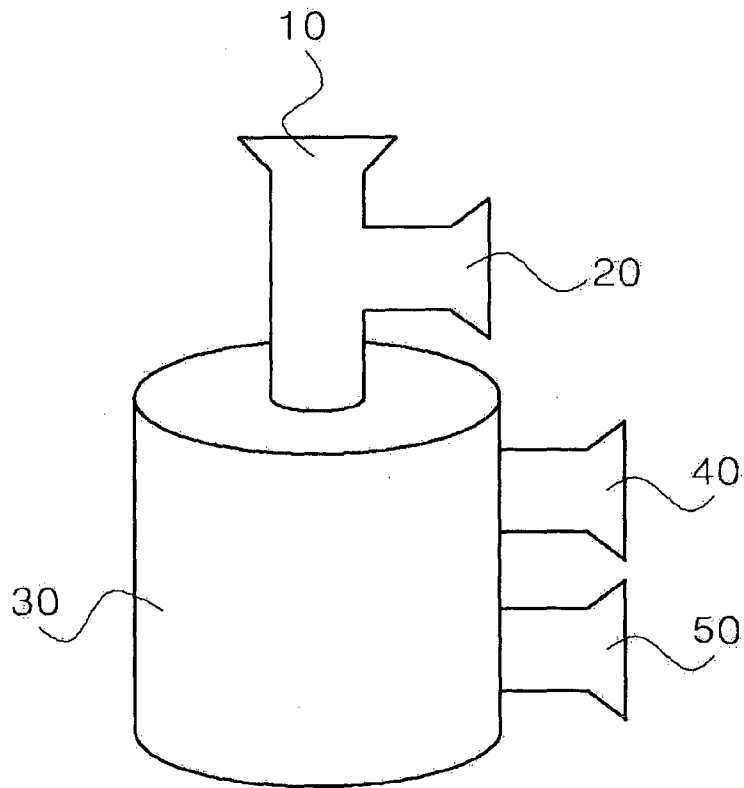


(b)

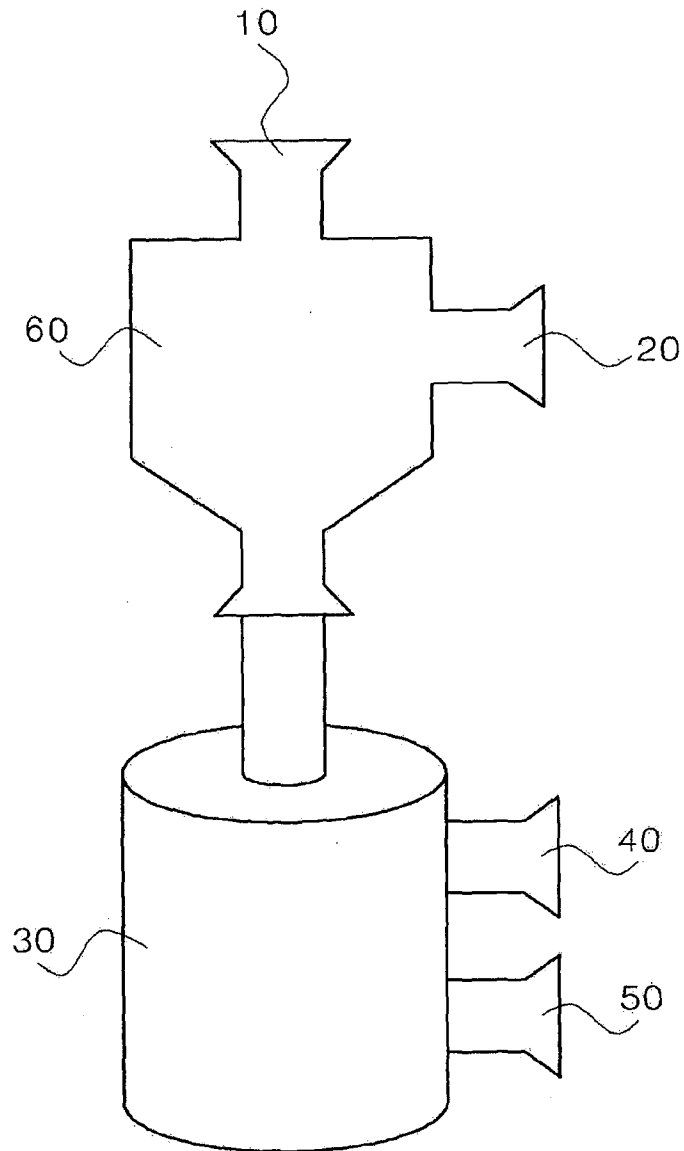
【도 4】



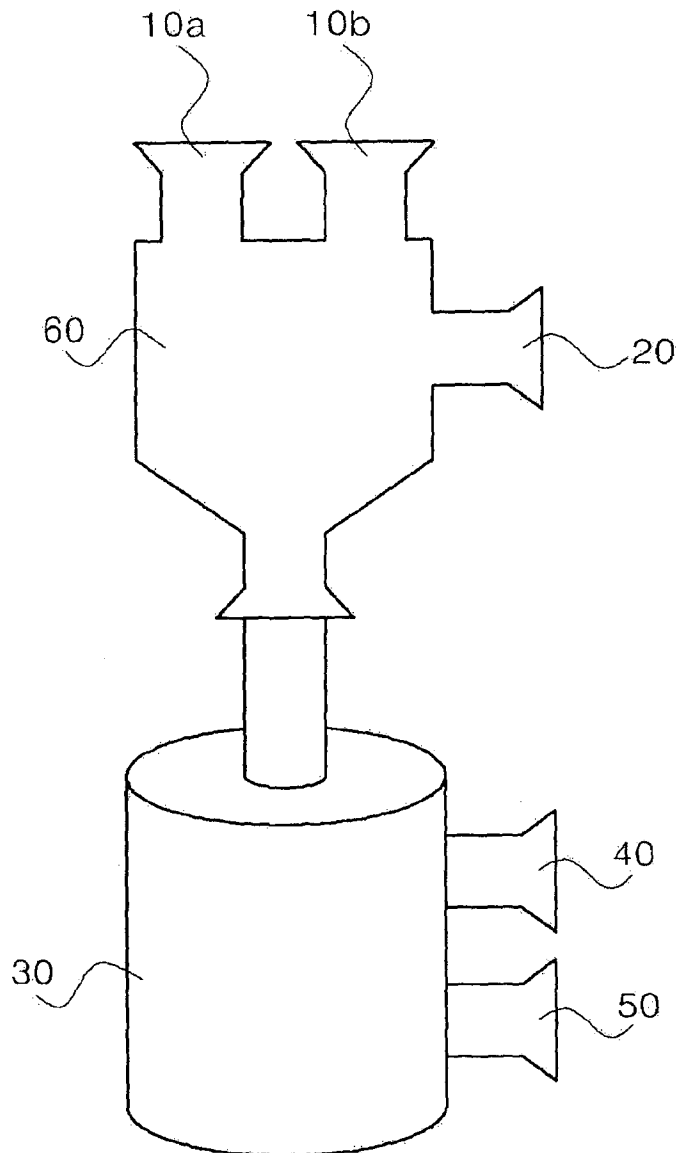
【도 5】



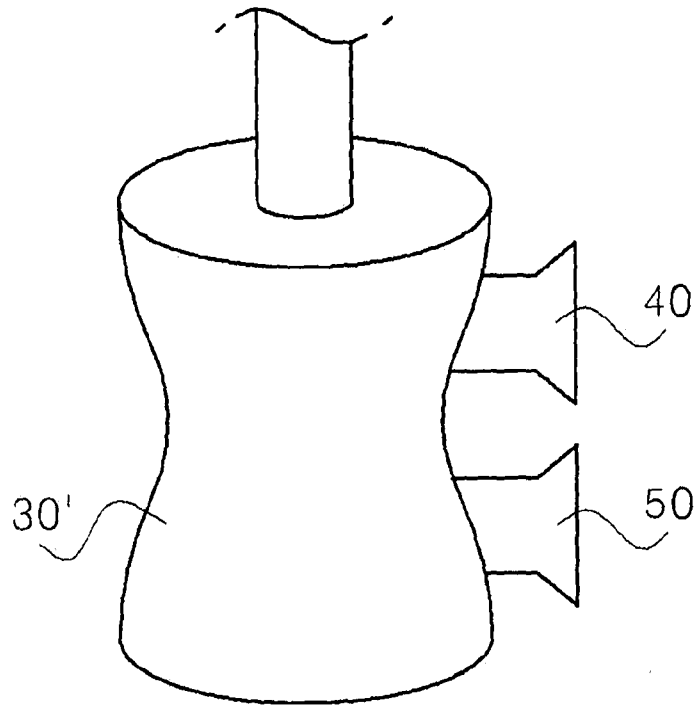
【도 6】



【도 7】



【도 8】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/002134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/24(2006.01)i, C12N 5/00(2006.01)i, C12N 13/00(2006.01)i, G01N 33/535(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C12M 1/26(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)

C12Q 1/24; C12N 5/071; C07K 1/14; C07K 1/02; C12N 5/00; C12N 13/00; G01N 33/535; C12Q 1/68; G01N 33/68; C12M 1/26

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: endoplasmic reticulum, separation, aqueous two-phase system, dextran, polyethylene glycol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIN et al., "Cancer-derived Extracellular Vesicle Isolation by Aqueous Two-Phase System", Abstract from the Third International Meeting of ISEV 2014, Journal of Extracellular Vesicles, Vol. 3, Article 24214 (2014) See page 120, poster no. 09A-346.	1-18
A	MORRE et al., "Aqueous Two-Phase Partition Applied to the Isolation of Plasma Membranes and Golgi Apparatus from Cultured Mammalian Cells", Journal of Chromatography B, vol. 743, pages 377-387 (2000) See the entire document.	1-18
A	KR 10-0863466 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 16 October 2008 See the entire document.	1-18
A	KR 10-0194075 B1 (SAMYANG GENEX CORPORATION) 15 June 1999 See the entire document.	1-18
A	KR 10-0836171 B1 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE) 09 June 2008 See the entire document.	1-18



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

31 MAY 2016 (31.05.2016)

Date of mailing of the international search report

01 JUNE 2016 (01.06.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

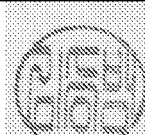
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/002134

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0863466 B1	16/10/2008	NONE	
KR 10-0194075 B1	15/06/1999	KR 10-1997-0070016 A	07/11/1997
KR 10-0836171 B1	09/06/2008	EP 2125864 A1	02/12/2009
		JP 2010-501552 A	21/01/2010
		JP 5303464 B2	02/10/2013
		US 2009-0209735 A1	20/08/2009
		US 8192942 B2	05/06/2012
		WO 2008-088200 A1	24/07/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/24(2006.01)i, C12N 5/00(2006.01)i, C12N 13/00(2006.01)i, G01N 33/535(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C12M 1/26(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/24; C12N 5/071; C07K 1/14; C07K 1/02; C12N 5/00; C12N 13/00; G01N 33/535; C12Q 1/68; G01N 33/68; C12M 1/26 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: 소포체, 분리, 수용액 이상제, 텍스트란, 폴리에틸렌글리콜																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>SHIN 등, 'Cancer-derived extracellular vesicle isolation by aqueous two-phase system' Abstract from the Third International Meeting of ISEV 2014, Journal of Extracellular Vesicles, Vol.3, Article 24214 (2014) 페이지 120, 포스터 번호 09A-346 참조.</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>MORRE 등, 'Aqueous two-phase partition applied to the isolation of plasma membranes and Golgi apparatus from cultured mammalian cells' Journal of Chromatography B, 743권, 페이지 377-387 (2000) 전체 문헌 참조.</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-0863466 B1 (고려대학교 산학협력단) 2008.10.16 전체 문헌 참조.</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-0194075 B1 (주식회사삼양제넥스) 1999.06.15 전체 문헌 참조.</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-0836171 B1 (인하대학교 산학협력단) 2008.06.09 전체 문헌 참조.</td> <td>1-18</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	SHIN 등, 'Cancer-derived extracellular vesicle isolation by aqueous two-phase system' Abstract from the Third International Meeting of ISEV 2014, Journal of Extracellular Vesicles, Vol.3, Article 24214 (2014) 페이지 120, 포스터 번호 09A-346 참조.	1-18	A	MORRE 등, 'Aqueous two-phase partition applied to the isolation of plasma membranes and Golgi apparatus from cultured mammalian cells' Journal of Chromatography B, 743권, 페이지 377-387 (2000) 전체 문헌 참조.	1-18	A	KR 10-0863466 B1 (고려대학교 산학협력단) 2008.10.16 전체 문헌 참조.	1-18	A	KR 10-0194075 B1 (주식회사삼양제넥스) 1999.06.15 전체 문헌 참조.	1-18	A	KR 10-0836171 B1 (인하대학교 산학협력단) 2008.06.09 전체 문헌 참조.	1-18
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X	SHIN 등, 'Cancer-derived extracellular vesicle isolation by aqueous two-phase system' Abstract from the Third International Meeting of ISEV 2014, Journal of Extracellular Vesicles, Vol.3, Article 24214 (2014) 페이지 120, 포스터 번호 09A-346 참조.	1-18																		
A	MORRE 등, 'Aqueous two-phase partition applied to the isolation of plasma membranes and Golgi apparatus from cultured mammalian cells' Journal of Chromatography B, 743권, 페이지 377-387 (2000) 전체 문헌 참조.	1-18																		
A	KR 10-0863466 B1 (고려대학교 산학협력단) 2008.10.16 전체 문헌 참조.	1-18																		
A	KR 10-0194075 B1 (주식회사삼양제넥스) 1999.06.15 전체 문헌 참조.	1-18																		
A	KR 10-0836171 B1 (인하대학교 산학협력단) 2008.06.09 전체 문헌 참조.	1-18																		
☐ 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 2016년 05월 31일 (31.05.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 06월 01일 (01.06.2016)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 																		

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2016/002134

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0863466 B1	2008/10/16	없음	
KR 10-0194075 B1	1999/06/15	KR 10-1997-0070016 A	1997/11/07
KR 10-0836171 B1	2008/06/09	EP 2125864 A1	2009/12/02
		JP 2010-501552 A	2010/01/21
		JP 5303464 B2	2013/10/02
		US 2009-0209735 A1	2009/08/20
		US 8192942 B2	2012/06/05
		WO 2008-088200 A1	2008/07/24