



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0074738
(43) 공개일자 2022년06월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/38 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 1/38 (2013.01)
G01N 33/4833 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0153022
(22) 출원일자 2021년11월09일
심사청구일자 2021년11월09일
(30) 우선권주장
1020200163071 2020년11월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
이원종
세종특별자치시 나성북1로 51, 603동 2003호(나성동, 나릿재마을 6단지)
강수진
경기도 안산시 상록구 안산천서로4길 14, 402호(월피동, 중앙맨션)
(74) 대리인
특허법인이름리온

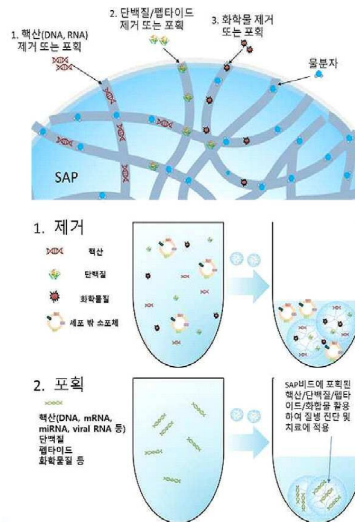
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **고흡수성 수지를 이용한 시료 내 불순물 제거 및 유용물질 포획 방법**

(57) 요약

본 발명은 고흡수성 수지를 이용하여 시료 내 불순물을 흡수하여 제거하는 방법 및 시료 내 유용물질을 흡수하여 포획하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 고비용의 재료나 장비를 사용하지 않고, 단일 과정으로 단백질, 항체, 핵산, 화합물 등의 불순물을 효율적으로 제거할 수 있고, 세포막 세포체에 탑재되지 않은 이들 불순물 제거시 세포막 세포체의 손실이나 파괴를 최소화할 수 있다. 또한, 본 발명은 시료 중 존재하는 핵산(DNA, RNA), 단백질, 펩타이드, 화합물 등을 고흡수성 수지 비드 내로 흡수시켜 포획함으로써, 이들 물질을 농축 하거나 공간을 한정하여 검출 신호를 증폭시킬 수 있으며, 포획 후 분리하여 농축된 유용 물질을 생산해 낼 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C08J 2300/14 (2013.01)

G01N 2001/385 (2013.01)

(72) 발명자

함유민

경기도 안산시 단원구 광덕2로 74, 1206동 1201호
(초지동, 그린빌주공12단지아파트)

양희철

인천광역시 연수구 원인재로 56, 118동 506호(동춘
동, 현대아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

시료에 포함된 핵산, 항체, 단백질 및 화합물 중에서 선택된 1종 이상의 불순물을 고흡수성 수지(super absorbent polymer)를 이용하여 제거하는 단계를 포함하는, 시료의 불순물 제거방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 시료는 세포밖 소포체(extracellular vesicles) 또는 세포를 포함하는 생물학적 시료인 것을 특징으로 하는 시료의 불순물 제거방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 불순물은 상기 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 화합물인 것을 특징으로 하는 시료의 불순물 제거방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 시료는 질병 진단 또는 질병 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 시료의 불순물 제거방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 비드(bead)형인 것을 특징으로 하는 시료의 불순물 제거방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 비드는 입자 직경이 1 내지 3 mm 인 것을 특징으로 하는 시료의 불순물 제거방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 상기 시료의 용액 1L를 기준으로 100 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 하는, 시료의 불순물 제거방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 직경 1.5 내지 30 nm인 이동통로(water channel)가 형성된 것을 특징으로 하는, 시료의 불순물 제거방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 전분(starch)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 모노머를 공중합시킨 전분계 중합체;

카르복시메틸셀룰로오스(CMC)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 단량체를 공중합시킨 셀룰로오스계 중합체; 및

폴리아크릴아미드(polyacryl amide)-이타콘산(itaconic acid) 공중합체, 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)-메타아크릴산(methacrylic acid) 블록 공중합체, 스티렌(styrene)-무수말레인산(maleic anhydride) 공중합체, 폴리아크릴산계(polyacryl acid) 또는 폴리옥시에틸렌계(polyoxyethylene)를 포함하는 합성수지계 중합체;

중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 시료의 불순물 제거방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴산계(polyacryl acid) 중합체 또는 폴리아크릴아미드(polyacryl amide)-이타콘산(itaconic acid) 공중합체인 것을 특징으로 하는, 시료의 불순물 제거방법.

청구항 11

제2항에 있어서,

상기 세포막 소포체는 엑소좀(exosome), 아그로좀(argosomes), 텍소좀(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), 세포막 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(promininosome), 텍소좀(texosome) 및 아키오좀(archeosome) 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 시료의 불순물 제거방법.

청구항 12

제2항에 있어서,

상기 불순물은 항체 또는 단백질이고,

상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴아미드-이타콘산 공중합체 비드이고,

상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,

상기 비드에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,

상기 시료 용액 1L를 기준으로 상기 폴리아크릴아미드-이타콘산 공중합체 비드 200 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 하는, 시료의 불순물 제거방법.

청구항 13

제3항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드이고,

상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,

상기 비드에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,

상기 시료 용액 1L를 기준으로 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 100 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 하는, 시료의 불순물 제거방법.

청구항 14

시료에 포함된 핵산, 항체, 단백질 및 화합물 중에서 선택된 1종 이상의 유용물질을 고흡수성 수지(super absorbent polymer)에 포획하는 단계를 포함하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 비드(bead)형인 것을 특징으로 하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 비드는 입자 직경이 1 내지 3 mm 인 것을 특징으로 하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법.

청구항 17

제6항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 상기 시료의 용액 1L를 기준으로 100 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 직경 1.5 내지 30 nm인 이동통로(water channel)가 형성된 것을 특징으로 하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법.

청구항 19

제14항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 전분(starch)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 모노머를 공중합시킨 전분계 중합체;

카르복시메틸셀룰로오스(CMC)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드

(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 단량체를 공중합시킨 셀룰로오스계 중합체; 및

폴리아크릴아미드(polyacryl amide)-이타콘산(itaconic acid) 공중합체, 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)-메타아크릴산(methacrylic acid) 블록 공중합체, 스티렌(styrene)-무수말레인산(maleic anhydride) 공중합체, 폴리아크릴산계(polyacryl acid) 또는 폴리옥시에틸렌계(polyoxyethylene)를 포함하는 합성수지계 중합체;

중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴산(polyacryl acid)계 중합체 또는 폴리아크릴아미드(polyacryl amide)-이타콘산(itaconic acid) 공중합체인 것을 특징으로 하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법.

청구항 21

제14항에 있어서,

상기 유용물질은 항체 또는 단백질이고,

상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴아미드-이타콘산 공중합체 비드이고,

상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,

상기 비드에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,

상기 시료 용액 1L를 기준으로 상기 폴리아크릴아미드-이타콘산 공중합체 비드 200 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법.

청구항 22

제14항에 있어서,

상기 유용물질은 화합물이고,

상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드이고,

상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,

상기 비드에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,

상기 시료 용액 1L를 기준으로 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 100 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고흡수성 수지를 이용하여 시료 내 불순물을 흡수하여 제거하는 방법 및 시료 내 유용물질을 흡수하여 포획하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 세포의 배양액이나 임상 시료, 그리고 생물학적 분석을 위한 다양한 분석 시료 내에는 세포를 포함하는 목적하는 소재 이외에 작은 크기의 불순물들이 존재한다. 이들 불순물들은 목적 소재를 활용한 질병 진단에서는 검출

에 방해 요인이 될 수 있으며, 질병 치료 등에서는 인체 내에서 각종 부작용 및 독성을 나타낼 수 있다.

- [0004] 한편, 세포막 소포체(extracellular vesicle, EV)는 적혈구 세포의 배양액에서 세포막 수용체를 함유한 미세수포로, 1980년대 중반에 처음 발견되었다. 세포막 소포체는 유래된 세포에 따라 수지상 세포에서 유래된 텍소솜(dexosome), 암세포에서 유래된 오킨솜(oncosome), 전립선 세포에서 유래된 프로타솜(prostasome), 심근세포에서 유래된 카르디옴(cardiosome) 등으로 불리며, 세포에서 만들어지는 방법에 따라 엑소솜(exosome), 엑토솜(ectosome), 미세수포(microvesicle), 세포자멸체(apoptotic body) 등의 여러 이름으로 불린다. 이들은 유래되는 세포나 세포 내 소기관에 따라 다양한 표지 단백질을 포함하고 있고, 다양한 명칭으로 사용되어 혼동이 생길 수 있으므로 최근에는 세포막 소포체로 통칭하도록 권장되고 있다. 이와 같은 세포막 소포체는 DNA, 지질, 단백질, mRNA, microRNA 등을 함유하고, 특히 자신이 유래한 세포의 특징적인 단백질이나 RNA 등을 가지고 있어, 생물학적 기능들이 완전히 특정되지는 않았지만 다양한 진단 및 치료에 적용될 수 있을 것으로 예상된다.
- [0005] 최근에는 세포막 소포체에 핵산, 단백질, 펩타이드, 화합물 등의 약물을 탑재하여 질병 치료 소재로 개발하는 연구가 많이 진행되고 있다. 그러나, 세포막 소포체를 포함하는 시료에서는 원심 분리 등을 통해 불순물을 제거할 수 없기 때문에, 불순물을 용이하게 제거할 수 있는 방법 또는 소재가 필요하다. 현재 통상적으로 시료 중에서 세포막 소포체에 미탑재된 약물(free unloaded drug)을 제거하기 위해서 한외 여과(ultrafiltration) 또는 초고속 원심 분리 방법 등을 사용하고 있다.
- [0006] 그러나, 이와 같은 방법들은 고비용의 재료 또는 장비의 사용을 동반하며, 불순물 제거 효율이 낮고, 불순물 제거 중 세포막 소포체의 손실 또는 파괴가 발생되기 때문에 사용에 제약이 따르는 문제점이 있다.
- [0007] 따라서 고비용의 재료나 장비를 사용하지 않고, 공정이 간편하면서도 불순물의 제거 효율이 높고 세포막 소포체의 손실이나 파괴를 줄일 수 있는 새로운 불순물 제거 방법과 이와 같이 제거를 위해 흡수된 물질을 유용물질로 활용할 수 있는 방법이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허공보 제10-1816288호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 시료로부터 불순물을 효과적으로 제거할 수 있는 신규한 불순물 제거방법을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 시료로부터 유용물질을 효과적으로 포획할 수 있는 신규한 유용물질 포획방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 시료에 포함된 핵산, 항체, 단백질 및 화합물 중에서 선택된 1종 이상의 불순물을 고흡수성 수지(super absorbent polymer)를 이용하여 제거하는 단계를 포함하는, 시료의 불순물 제거방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 세포막 소포체(extracellular vesicles) 또는 세포를 포함하는 생물학적 시료인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 불순물은 상기 세포막 소포체에 탑재되지 않은 화합물인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 질병 진단 또는 질병 치료에 사용되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 비드(bead)형인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 비드는 입자 직경이 1 내지 3 mm 인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 상기 시료의 용액 1 L를 기준으로 100 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 직경 1.5 내지 30 nm인 이동통로(water channel)가 형성된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 전분(starch)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 모노머를 공중합시킨 전분계 중합체;
- [0021] 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 단량체를 공중합시킨 셀룰로오스계 중합체; 및
- [0022] 폴리아크릴아미드(polyacryl amide)-이타콘산(itaconic acid) 공중합체, 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)-메타아크릴산(methacrylic acid) 블록 공중합체, 스티렌(styrene)-무수말레인산(maleic anhydride) 공중합체, 폴리아크릴산계(polyacryl acid) 또는 폴리옥시에틸렌계(polyoxyethylene)를 포함하는 합성수지계 중합체; 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴산(polyacryl acid)계 중합체 또는 폴리아크릴아미드(polyacryl amide)-이타콘산(itaconic acid) 공중합체인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 세포막 소포체는 엑소좀(exosome), 아그로좀(argosomes), 텍소좀(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), 세포막 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(promininosome), 텍소좀(texosome) 및 아키오좀(archeosome) 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서,
- [0026] 상기 불순물은 항체 또는 단백질이고,
- [0027] 상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴아미드-이타콘산 공중합체 비드이고,
- [0028] 상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,
- [0029] 상기 비드 에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,
- [0030] 상기 시료 용액 1L를 기준으로 상기 폴리아크릴아미드-이타콘산 공중합체 비드 200 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서,
- [0032] 상기 불순물은 화합물이고,
- [0033] 상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드이고,
- [0034] 상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,
- [0035] 상기 비드에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,
- [0036] 상기 시료 용액 1L를 기준으로 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 100 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명은 또한, 시료에 포함된 핵산, 항체, 단백질 및 화합물 중에서 선택된 1종 이상의 유용물질을 고흡수성 수지(super absorbent polymer)에 포획하는 단계를 포함하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 비드(bead)형인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 비드는 입자 직경이 1 내지 3 mm 인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 상기 시료의 용액 1L를 기준으로 100 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 직경 1.5 내지 30 nm인 이동통로(water channel)가 형성된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서,
- [0044] 상기 고흡수성 수지는 전분(starch)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 모노머를 공중합시킨 전분계 중합체;
- [0045] 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 단량체를 공중합시킨 셀룰로오스계 중합체; 및
- [0046] 폴리아크릴아미드(polyacryl amide)-이타콘산(itaconic acid) 공중합체, 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)-메타아크릴산(methacrylic acid) 블록 공중합체, 스티렌(styrene)-무수말레인산(maleic anhydride) 공중합체, 폴리아크릴산계(polyacryl acid) 또는 폴리옥시에틸렌계(polyoxyethylene)를 포함하는 합성수지계 중합체; 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서,
- [0048] 상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴산계(polyacryl acid)계 중합체 또는 폴리아크릴아미드(polyacryl amide)-이타콘산(itaconic acid) 공중합체인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 있어서,
- [0050] 상기 유용물질은 항체 또는 단백질이고,
- [0051] 상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴아미드-이타콘산 공중합체 비드이고,
- [0052] 상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,
- [0053] 상기 비드에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,
- [0054] 상기 시료 용액 1L를 기준으로 상기 폴리아크릴아미드-이타콘산 공중합체 비드 200 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0055] 본 발명에 있어서,
- [0056] 상기 유용물질은 화합물이고,
- [0057] 상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드이고,
- [0058] 상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,
- [0059] 상기 비드에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,
- [0060] 상기 시료 용액 1L를 기준으로 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 100 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

- [0061] 본 발명은 고비용의 재료나 장비를 사용하지 않고, 단일 과정으로 단백질, 항체, 핵산, 화합물 등의 불순 물을 효율적으로 제거할 수 있고, 세포막 소포체에 탑재되지 않은 이들 불순물 제거 시 세포막 소포체의 손실이나 파괴를 최소화할 수 있다. 또한, 본 발명은 시료 중 존재하는 핵산(DNA, RNA), 단백질, 펩타이드, 화합물 등을 고흡수성 수지 비드 내로 흡수시켜 포획함으로써, 이들 물질을 농축 하거나 공간을 한정하여 검출 신호를 증폭시킬 수 있으며, 포획 후 분리하여 농축된 유용 물질을 생산해 낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0063] 도 1은 본 발명의 고흡수성 수지를 이용한 시료 내 유용물질 포획 및 불순물 제거 원리를 나타낸 개략도이다.

도 2는 실시예 1에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 단백질 흡수 전후의 세포밖 소포체 용액 내 단백질 총량 (μg)을 측정된 결과이다.

도 3은 실시예 2에 따라 Poly(AM-co-IA) 고흡수성 수지 비드를 이용한 단백질 흡수 전후의 단백질 총량 (μg)을 분석한 결과이다.

도 4는 실시예 3에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 BSA 단백질 흡수 전후의 용액의 부피감소 및 BSA 단백질의 총량을 분석한 결과이다.

도 5는 실시예 4에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 항체 흡수 전후의 항체 용액의 부피, 형광 강도, 항체의 총량의 분석 결과이다.

도 6은 실시예 5에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 항체 흡수 전후의 항체 용액의 부피, 형광 강도, 항체의 총량 측정 결과이다.

도 7은 실시예 6에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 핵산 (DNA) 흡수 전후의 핵산의 양 측정 결과이다.

도 8은 실시예 6에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 핵산 (DNA) 흡수 전후의 핵산 제거량 측정 결과이다.

도 9는 실시예 7에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용하여 (a) PBS, (b) 화합물로써 독소루비신, (c) 화합물로써 폴리스티렌 미립구의 흡수 여부를 확인한 결과이다.

도 10은 실험예 1에 따라 고흡수성 수지 비드를 이용한 방법과 한외여과법에 따른 화합물 제거 효과를 비교한 결과이다.

도 11은 실험예 2에 따라 고흡수성 수지 비드를 이용한 방법과 한외여과법에 따른 화합물 제거시 세포밖 소포체 손실 정도를 비교한 결과이다.

도 12는 실시예 8에 따라 항체를 흡수한 고흡수성 수지의 전체 및 단면 사진이다.

도 13은 실시예 4에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드에 포획된 항체의 총량을 나타낸 결과이다.

도 14는 실시예 9에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드에 포획된 펩타이드의 총량을 측정된 결과이다.

도 15는 실시예 9에 따라 펩타이드를 흡수한 고흡수성 수지의 전체 및 단면 사진이다.

도 16은 실시예 10에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드에 포획된 DNA의 총량을 측정된 결과이다.

도 17은 실시예 10에 따라 DNA를 흡수한 고흡수성 수지의 전체 또는 단면 사진이다.

도 18은 실시예 11에 따라 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드에 포획된 RNA의 총량을 측정된 결과이다.

도 19는 실시예 11에 따라 RNA를 흡수한 고흡수성 수지의 전체 또는 단면 사진이다.

도 20은 실시예 12에 따라 Trypan blue를 흡수한 고흡수성 수지의 전체 또는 단면 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 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 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0066] 본 발명에서는 고흡수성 수지를 이용하는 경우, 고비용의 재료나 장비를 사용하지 않고 단일 과정으로 단백질, 항체, 핵산, 화합물 등의 불순물을 효율적으로 제거할 수 있을 뿐만 아니라, 불순물을 제거하는 과정에서 세포밖 소포체의 손실이나 파괴를 최소화할 수 있음을 확인하였다.

[0067] 따라서, 본 발명은 제1 관점에서, 시료에 포함된 핵산, 항체, 단백질 및 화합물 중에서 선택된 1종 이상의 불순물을 고흡수성 수지(super absorbent polymer)를 이용하여 제거하는 단계를 포함하는, 시료의 불순물 제거방법에 관한 것이다.

- [0069] 또한, 본 발명에서는 고흡수성 수지를 이용하는 경우, 시료 중에 존재하는 핵산(DNA, RNA), 단백질, 펩타이드 또는 화합물 등을 고흡수성 수지 비드 내로 효과적으로 흡수시켜 포획할 수 있음을 확인하였다.
- [0070] 따라서, 본 발명은 제2 관점에서, 시료에 포함된 핵산, 항체, 단백질 및 화합물 중에서 선택된 1종 이상의 유용 물질을 고흡수성 수지(super absorbent polymer)에 포획하는 단계를 포함하는, 시료로부터 유용물질 포획 방법에 관한 것이다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 고흡수성 수지(SAP)는 자기 무게보다 수십 배에서 최대 300배까지 물을 흡수할 수 있고, 재료 자체가 물을 흡수하여 탈지면이나 무명천 등과 비교하여서도 흡수량이 현저히 우수하며, 통상적인 압력으로 는 물을 방출하지 않아, 유아용, 성인용 및 동물용 기저귀에 많이 사용되고 있다.
- [0073] 고흡수성 수지(SAP)는 가교들이 이루고 있는 이동 통로 (water channel)의 모세관 현상과 같은 물리적 원리와 가교 사이에 갇혀 있는 나트륨 이온의 삼투압, 고흡수성 수지 내에 $-COOH$, $-NH_2$, $-COO^-$ 등의 친수성기와 물분자의 상호작용과 같은 화학적 원리에 의하여 물을 흡수할 수 있다.
- [0075] 한편, 시료 내 미량으로 존재하는 물질을 고흡수성 수지 내부로 포획하는 경우, 미량의 물질이 농축되거나 해당 물질이 존재하는 공간이 한정되기 때문에 해당 물질을 검출하고자 하는 경우 검출 신호가 증폭되는 장점이 있으며, 이후 포획된 물질을 분리하는 단계를 통해 유용물질을 효과적으로 농축 후 분리해 낼 수 있는 장점이 있는 바, 고흡수성 수지를 이용하는 본 발명에 따른 방법은 다양한 진단 및 치료 분야에 적용이 가능하다.
- [0077] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 단백질, 항체, 핵산 및/또는 화합물을 포함하는 용액 형태의 시료는 제한없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 생물학적 시료일 수 있다.
- [0078] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 화학물질을 포함하는 용액 형태의 시료는 제한없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 생물학적 시료일 수 있다.
- [0079] 상기 생물학적 시료는 바람직하게는 액체 중에 세포밖 소포체를 함유하거나 함유할 가능성이 있는 것이라면 특별히 한정되지 않으며, 예컨대 원핵세포, 진핵 세포, 박테리아, 진균, 효모, 줄기세포 및 식물, 동물로부터 분리된 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 배양한 배양액; 또는 혈액, 타액, 소변, 유즙, 양수, 복수 등의 체액 또는 이를 배양한 배양액일 수 있다.
- [0081] 따라서 본 발명에 있어서, 상기 시료는 세포밖 소포체 (extracellular vesicles) 또는 세포를 포함하는 생물학적 시료인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0083] 본 발명은 일 양태로서, 세포밖 소포체에 핵산, 항체, 단백질, 또는 화합물 기타 약물이나 시약 등을 탑재하여 이용하고자 하는 약물 전달 등의 기술에 활용이 가능할 것이며, 이 경우, 세포밖 소포체에 핵산, 항체, 단백질, 또는 화합물 기타 약물이나 시약 등을 탑재하는 과정에서, 시료, 바람직하게는 생물학적 시료에 포함된, 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 단백질, 항체, 핵산, 화합물 등의 불순물을 제거할 수 있고, 이 때 핵산, 항체, 단백질, 또는 화합물, 기타 약물이나 시약이 탑재되어 있는 세포밖 소포체의 손실이나 파괴를 최소화할 수 있는 바, 본 발명은 세포밖 소포체를 포함하는 시료에서 불순물을 제거하는데 특히 유용하다 할 것이다. 또한, 고흡수성 수지는 합성이 용이하고, 가격이 저렴하며, 단일 과정으로 단시간 내에 불순물을 제거할 수 있다는 추가의 이점을 갖는다.
- [0084] 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 불순물인 microRNA를 포함한 작은 크기의 핵산, 항체를 포함하여 단백질, 독소 루비신(doxorubicin)과 같은 항암제를 포함하는 화합물 등은 물과 함께 고흡수성 수지 안으로 들어갈 수 있다. 반면에, 약물이 탑재된 세포밖 소포체는 상기 불순물에 비해 크기가 크기 때문에 고흡수성 수지 내로 흡수되지 않는다.

- [0086] 본 발명은 다른 양태로서, 세포 배지로부터 세포밖 소포체를 분리하거나 혈액, 소변 등의 임상 시료에서 유래한 세포밖 소포체 또는 세포 등을 이용하고자 하는 경우, 임상 시료에는 높은 농도의 불순물 (단백질, 항체, 핵산 등)이 포함되어 있다는 점에서 착안된 것이다. 분리한 세포밖 소포체 또는 세포 등을 진단 또는 치료 목적으로 이용할 때 정확한 진단 또는 효과적인 치료 효과를 달성하기 위하여 불순물은 제거되어야 하는데, 예를 들면, 항체를 이용하여 세포밖 소포체의 표면 바이오마커를 검출하고자 하는 경우, 미결합 항체를 제거하기 위해 종래에는 초고속 원심분리나 한외여과 등의 방법을 이용하였으나, 이 경우 세포밖 소포체의 손실이 발생하는 문제점이 있었다. 그러나, 본 발명에 따르면 세포밖 소포체의 손실 없이 미결합 항체를 제거하여 세포밖 소포체 표면 바이오마커를 효과적으로 검출 및 분석할 수 있다.
- [0088] 본 발명에 있어서, 상기 불순물은 상기 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 단백질, 항체, 핵산 또는 화합물인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 바람직하게는, 상기 불순물은 상기 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 화합물이다.
- [0089] 본 발명에 있어서, 세포밖 소포체(EV)는 대부분의 세포에 존재하는 작은 소포체 (membrane vesicle)이다. 이와 같은 세포밖 소포체는 혈액, 소변 등 체액에 존재하며 특히, 엑소좀과 같은 세포밖 소포체 내부에는 그 세포에서 유래된 다양한 종류의 단백질, 유전물질 (DNA, mRNA, microRNA), 지질 등을 포함한다. 세포밖 소포체는 약한 음성의 표면 전하를 띠는 것을 특징으로 할 수 있다. 세포밖 소포체는 다양한 질병의 진단과 치료에 사용되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0090] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 엑소좀(exosome), 아그로좀(argosomes), 텍소좀(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(promininosome), 텍소좀(texosome) 및 아키오좀 (archeosome) 중에서 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0091] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 질병 진단 또는 질병 치료에 사용되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0092] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 비드(bead)형인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0093] 본 발명에 있어서, 상기 비드는 입자 직경이 0.1 내지 5 mm, 바람직하게는 1 내지 3 mm 인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0094] 본 발명에 있어서, 상기 비드의 단위 개수당 중량은 2 내지 40mg 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 10 내지 25mg 일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 상기 시료의 용액 1L를 기준으로 바람직하게는 100 내지 1000 mg/mL, 더욱 바람직하게는 150 내지 500 mg/mL를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 용액, 불순물 및/또는 유용물질의 흡수 속도를 향상시키기 위하여 더 많은 양의 고흡수성 수지를 사용할 수도 있을 것이다.
- [0096] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 직경 1.5 내지 30 nm, 바람직하게는 5 내지 20 nm, 더욱 바람직하게는 8 내지 15 nm인 이동통로(water channel)가 형성된 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0097] 한편, 상기 세포밖 소포체의 평균 직경은 10 내지 1000 nm, 바람직하게는 20 내지 200 nm, 더욱 바람직하게는 50 내지 150 nm 일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0099] 본 발명에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 전분(starch)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic

acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트 (methacrylate)의 모노머를 공중합시킨 전분계 중합체;

- [0100] 카르복시메틸셀룰로오스 (CMC)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 단량체를 공중합시킨 셀룰로오스계 중합체; 및
- [0101] 폴리아크릴아미드(polyacryl amide)-이타콘산(itaconic acid) 공중합체, 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)-메타아크릴산(methacrylic acid) 블록 공중합체, 스티렌(stryene)-무수말레인산(maleic anhydride) 공중합체, 폴리아크릴산계(polyacryl acid) 또는 폴리옥시에틸렌계(polyoxyethylene)를 포함하는 합성수지계 중합체; 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0102] 본 발명의 제1 및 제2 관점에 있어서, 상기 고흡수성 수지는 바람직하게는 폴리아크릴산계(polyacryl acid)계 중합체 또는 폴리 아크릴아미드(polyacryl amide)-이타콘산(itaconic acid) 공중합체인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0104] 일 양태로서, 본 발명에서, 상기 불순물이 항체 또는 단백질인 경우, 이를 제거하기 위하여
- [0105] 상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴아미드-이 타콘산 공중합체 비드이고,
- [0106] 상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,
- [0107] 상기 비드 에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,
- [0108] 상기 시료 용액 1L를 기준으로 상기 폴리아크릴아미드-이타콘산 공중합체 비드 200 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0109] 다른 양태로서, 본 발명에서, 상기 불순물이 화합물인 경우, 이를 제거하기 위하여
- [0110] 상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드이고,
- [0111] 상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,
- [0112] 상기 비드에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,
- [0113] 상기 시료 용액 1L를 기준으로 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 100 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0115] 또 다른 양태로서, 본 발명에서, 상기 유용물질이 항체 또는 단백질인 경우, 이를 포획하기 위하여,
- [0116] 상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴아미드-이 타콘산 공중합체 비드이고,
- [0117] 상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,
- [0118] 상기 비드 에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,
- [0119] 상기 시료 용액 1L를 기준으로 상기 폴리아크릴아미드-이타콘산 공중합체 비드 200 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0120] 또 다른 양태로서, 본 발명에서, 상기 유용물질이 화합물인 경우, 이를 포획하기 위하여,
- [0121] 상기 고흡수성 수지는 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드이고,
- [0122] 상기 비드의 직경은 1 내지 3 mm이고,
- [0123] 상기 비드에 형성된 이동통로의 직경은 8 내지 15 nm이고,
- [0124] 상기 시료 용액 1L를 기준으로 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 100 내지 1000 mg/mL를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0126] 본 발명에서는, 특히 상기와 같은 양태들에 의할 때, 다른 조건 및 다른 수치 범위와 비교하여 생물학적 시료의 불순물 제거율 또는 유용물질 포획율이 현저히 높은 것으로 확인되었다.

[0128] 이하에서는 본 발명에 따른 실시예를 들어 구체적으로 설명하도록 한다.

[0130] [실시예]

[0131] 제조예 1: 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 준비

[0132] 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 (Poly(acrylamide-co-acrylic acid), CAS: 9003-06-9, 준사이언스)는 에탄올을 이용하여 3회 연속으로 세척 후 50 °C 오븐에서 건조시켰다. 30nm 직경을 갖는 입자가 제조예 1의 비드에 들어가지 않으므로 비드에 형성된 이동통로의 직경은 최대 30nm로 추측된다.

[0134] 제조예 2: Poly(AM-co-IA) 고흡수성 수지 비드 합성

[0135] Poly(AM-co-IA)(Poly(acrylamide-co-itaconic acid)) 고흡수성 수지 비드는 밀리미터-유체 시스템을 이용해 합성하였다.

[0136] 아크릴아미드 (Acrylamide, AM)(Merck), itaconic acid (IA) (Sigma-Aldrich, USA), 암모늄 퍼설페이트 (Ammonium persulfate) (Bio- Rad), N,N'-methylenebis(acrylamide) (Sigma-Aldrich)를 증류수에 용해시켜 모노머 용액을 준비하였다. 오일상 (Oil phase)은 미네랄 오일 (Sigma-Aldrich)을 이용하였다. 모노머 용액과 미네랄 오일을 T-junction을 통해 주입시켜 1/16-inch 지름의 테프론 튜브로 흐르게 하였다. 이 때, 유중수 (water-in-oil) 방울이 생성된다. 유사한 크기를 나타내는 25 μl 의 방울을 생성시키기 위해 실린지 펌프 (NE1000_syringe Pump; New Era Pump System Inc.)를 이용하였다. 방울 내 모노머는 튜브에서 80 °C로 4시간 동안 중합하였다. 합성된 비드는 체에 걸러 미네랄 오일과 분리하고, 증류수와 에탄올을 이용해 세척한 후, 50 °C의 오븐에서 건조시켰다. 30nm 직경을 갖는 입자가 제조예 2의 비드에 들어가지 않으므로 비드에 형성된 이동통로의 직경은 최대 30nm으로 추측된다.

[0138] 실시예 1: 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드에 의한 불순물 단백질 제거

[0139] HeLa 세포 (한국세포주은행)에서 세포막 소포체를 분리하기 위해 HeLa 세포를 10% (v/v) 세포막 소포체가 제거된 소태아혈청(Gibco) 및 1% (v/v) 페니실린-스트렙토마이신을 포함한 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM; Cellgro)으로 5% CO₂와 37 °C의 습한 환경에서 2~3일간 배양하였다. 상층액을 모은 후 제조사의 지침에 따라 ExoQuick^{TC} EV precipitation solution (System Biosciences)을 이용하여 HeLa 세포 유래 세포막 소포체를 분리하였다.

[0140] 1×10^{10} particles/ml의 세포막 소포체 용액 1 ml에 제조예 1의 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 200 mg/ml로 첨가하여 상온에서 30분간 흡수시켰다. 흡수가 완료된 세포막 소포체 용액을 피펫으로 분리하여 부피를 측정하고, 흡수 전후의 세포막 소포체 용액의 단백질 농도를 분석하였다.

[0141] 세포막 소포체의 농도는 Nanosight NS300 system (Malvern Instruments)을 사용한 nanoparticle tracking analysis (NTA) 방법으로 분석하였고, 단백질의 농도는 BCA assay (Thermo Scientific)로 분석하였다.

[0142] 세포막 소포체 농도와 단백질 농도를 측정한 결과를 표 1에 나타내었고, 흡수 전후 세포막 소포체 용액 내 단백질 총량 (μg)을 도 2에 나타내었다.

표 1

[0144]

구분	용액 상 세포막 소포체 농도 (par/ml)	용액 부피 (μl)	단백질 농도 ($\mu\text{g/ml}$)	용액 내 단백질 총질량 (%)
흡수 전	1.46×10^{10}	100	109	100

흡수 후	8.89×10^{10}	11.6	373	39
------	-----------------------	------	-----	----

[0146] 표 1에서, 단백질 총 질량 (%)는 흡수 전 세포밖 소포체 용액 (대조군)의 단백질 총질량 대비 흡수 후 용액의 단백질 총질량을 백분율(%)로 나타낸 것이다.

[0147] 이에 따르면, 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용해 세포밖 소포체 용액을 흡수시킨 결과 세포밖 소포체의 농도는 1.46×10^{10} par/ml에서 8.89×10^{10} par/ml로 617% 증가하였다. 세포밖 소포체는 크기가 크기 때문에 고흡수성 수지 비드 내로 들어가지 못하여 용액 중에 농축되면서 농도가 급격히 증가한 것을 확인할 수 있다. 이에 반해, 물 및 단백질의 경우 크기가 상대적으로 작기 때문에 고흡수성 수지 내부로 들어가게 되어 총량이 감소하게 된다. 물의 흡수도 함께 이루어진 결과, 단백질의 농도가 $109 \mu\text{g/ml}$ 에서 $373 \mu\text{g/ml}$ 로 348% 증가하였다.

[0148] 세포밖 소포체 용액 내 총 단백질의 질량을 비교한 결과, 초기 세포 밖 소포체 용액 내 총 단백질 질량에 비해 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드로 흡수시킨 용액의 총 단백질 질량의 상대적 비율은 39%로 나타나, 61%의 단백질이 제거되었음을 확인하였다.

[0150] 실시예 2: Poly(AM-co-IA) 고흡수성 수지 비드에 의한 불순물 단백질 제거

[0151] 제조예 1의 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 200 mg/ml 대신 제조예 2의 Poly(AM-co-IA) 고흡수성 수지 비드 450 mg/ml를 첨가한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 조건으로 세포밖 소포체 용액의 불순물 단백질을 흡수시켰다. 흡수 전후의 세포밖 소포체 용액의 단백질 농도를 비교하여 그 결과를 표 2에 나타내었고, 흡수 전후의 단백질 총량(μg)을 분석한 결과를 도 3에 나타내었다.

표 2

구분	용액 상 세포밖 소포체 농도 (par/ml)	용액 부피 (μl)	단백질 농도 ($\mu\text{g/ml}$)	용액 내 단백질 총 질량 (%)
흡수 전	1.20×10^{10}	1000	142	100
흡수 후	8.53×10^{10}	11.1	304	23

[0155] Poly(AM-co-IA) 고흡수성 수지 비드를 이용하여 세포밖 소포체 용액을 흡수시킨 결과, 세포밖 소포체의 농도는 흡수 전 1.20×10^{10} par/ml에서 흡수 후 8.53×10^{10} par/ml로 683%의 급격한 증가를 나타내었다.

[0156] 이에 반해, 용액의 단백질의 농도는 $142 \mu\text{g/ml}$ 에서 $304 \mu\text{g/ml}$ 로 216% 증가하였고, 이는 단백질이 흡수됨과 동시에 물도 흡수되었기 때문이다. 세포밖 소포체 용액 내 총 단백질의 질량을 비교한 결과, 흡수 전 세포밖 소포체 용액 내 총 단백질 질량에 비해 Poly(AM-co-IA) 고흡수성 수지 비드로 흡수시킨 용액의 총 단백질 질량은 23%로 나타나, 77%의 단백질이 제거되었음을 확인하였다.

[0158] 이와 같은 결과를 통하여 고흡수성 수지 비드를 이용하는 경우, 용액 내 불순물인 단백질을 효과적으로 제거할 수 있음을 확인하였다. 이는 고흡수성 수지 비드의 물 이동 통로의 크기가 작기 때문에 세포밖 소포체는 배제하면서 물 분자와 단백질을 흡수할 수 있고, Poly(AM-co-IA) 고흡수성 수지 비드는 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드보다 물 이동 통로의 크기가 크기 때문에, 불순물인 단백질을 더 효과적으로 흡수하여 제거할 수 있음을 확인하였다.

[0160] **실시예 3: 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드에 의한 BSA 단백질 제거**

[0161] 고흡수성 수지 비드의 단백질 불순물의 제거 효과를 추가적으로 검증하기 위하여, BSA를 포함한 용액에서 BSA (Bovine serum albumin)의 제거 효과를 관찰하였다.

[0162] 고흡수성 수지 비드를 이용하여 용액 중 BSA 제거 효과를 분석하기 위하여 다음의 실험을 진행하였다. 각각 0.2, 1 mg/mL BSA (Bovogen) 농도의 PBS 용액에 제조예 1의 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 200 mg/mL 농도로 첨가하여 흡수시켰다. 이때 Micro centrifuge Tube (SPL) (AXYGEN)를 사용하였다. 흡수가 완료된 BSA 용액은 피펫을 사용하여 분리하고 그 부피를 측정하였다. BSA 단백질의 농도는 BCA assay를 통하여 구하였다. 이에 따른 BSA 용액의 부피, 단백질량 분석 결과는 표 3과 도 4에 나타내었다.

표 3

[0164]

구분	용액 부피 (μ l)	0.2 mg/mL BSA 단백질 량 (μ g)	1 mg/mL BSA 단백질 량 (μ g)
흡수 전	500	100	500
흡수 후	50	37.9	194.1

[0166] BSA 용액을 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드로 흡수시킨 결과, 용액의 부피는 10%로 감소하였다. 용액 내 BSA 단백질량은 0.2 mg/mL BSA 용액의 경우 100 μ g에서 37.9 μ g으로, 1 mg/mL BSA 용액의 경우 500 μ g에서 194.1 μ g으로 감소되어, 단백질이 제거된 것을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과로부터, 고흡수성 수지가 시료 내 불순물 단백질을 효과적으로 제거할 수 있음을 확인하였다.

[0168] **실시예 4: 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 항체 제거**

[0169] 고흡수성 수지 비드의 단백질 불순물 제거 효과를 추가적으로 검증하기 위하여 항체를 포함한 용액에서 항체의 제거 효과를 관찰하였다.

[0170] 고흡수성 수지 비드를 이용하여 용액 중 항체 제거 효과를 분석하기 위해 다음의 실험을 진행하였다. 1:250의 부피 비율로 Alexa Fluor®647 Mouse Anti-Human CD63 항체 (BD Pharmingen)를 PBS로 희석한 500 μ l의 항체 용액에 제조예 1의 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 200 mg/mL 농도로 첨가하여 흡수시켰다. 이 때 Micro centrifuge Tube (SPL)(AXYGEN)를 사용하였다. 흡수가 완료된 항체 용액은 피펫을 사용해 분리하고 부피를 측정하였다. 항체의 농도는 항체에 결합된 형광 염료의 세기를 통해 분석하였다.

[0171] 항체의 형광 강도는 Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific)를 이용하여 측정하였다 (흡수 파장 650nm, 방출 파장 670nm). 대조군은 희석한 항체 용액을 고흡수성 수지 비드에 혼합하여 항체가 고흡수성 수지 비드에 흡수되기 전 용액을 사용하였다.

[0172] 형광 강도는 용액 내 항체의 농도와 비례하므로, 형광 강도와 용액의 부피를 곱하여 용액 내 항체의 총량을 나타내었으며, 흡수 전 항체 용액의 항체의 총량 대 비 흡수 후 항체 용액의 항체의 총량의 비율을 백분율(%)로 나타내었다.

[0173] 항체 용액의 부피, 형광 강도, 항체 총량의 분석 결과를 표 4와 도 5에 나타내었다.

표 4

[0175]

구분	용액 부피 (μ l)	형광 강도	용액 내 항체의 총량 (%)
흡수 전	500	2.27	100
흡수 후	50	9.25	40

[0177] 항체 용액을 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드로 흡수시킨 결과, 용액의 부피는 10%로 감소하였다. 용액 내 항체의 총량은 40%로 확인되어, 60%의 항체가 제거된 것을 알 수 있었다.

[0179] **실시예 5: Poly(AM-co-IA) 고흡수성 수지 비드 고흡수성 수지 비드를 이용한 항체 제거**

[0180] 제조예 1의 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 200 mg/ml 대신 제조예 2의 Poly(AM-co-IA) 고흡수성 수지 비드를 450 mg/ml 사용한 것을 제외하고, 실시예 4와 동일한 조건으로 항체 제거능을 측정하였다. 이에 따른, 항체 용액의 부피, 형광 강도, 항체의 총량 측정 결과를 아래의 표 5 및 도 6에 정리하였다.

표 5

[0182]

구분	용액 부피 (μ l)	형광 강도	용액 내 항체의 총량 (%)
흡수 전	500	1.95	100
흡수 후	66.7	2.00	14

[0184] 실험 결과, 용액의 부피는 13%로 감소하였고, 용액 내 항체의 총량은 14%로 감소하였으며, 따라서 86%의 항체가 제거되었음을 확인하였다.

[0185] 이는, 고흡수성 수지 비드의 물 이동 통로를 통해 항체가 흡수되어 제거될 수 있음을 의미하며, 제조예 2의 Poly(AM-co-IA) 고흡수성 수지 비드는 제조예 1의 아크릴산계 고흡수성 수지 비드 보다 물 이동 통로의 크기가 상대적으로 크므로 항체를 더 효과적으로 제거할 수 있음을 알 수 있었다. 고흡수성 수지를 이용한 항체 제거는 효소 면역 측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에서 결합되지 않은 항체를 제거하는 워싱(washing) 과정에 적용하면 효과적인 사용이 가능할 것으로 예상된다.

[0187] **실시예 6: 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 고흡수성 수지 비드를 이용한 핵산 제거**

[0188] 제조예 1의 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드(준사이언스)의 핵산 제거 효율을 확인하기 위하여, PBS(phosphate buffered saline)에 핵산과 고흡수성 수지 비드를 넣고 일정 시간이 경과한 후, 용액 내에 있는 핵산의 양을 확인하여 고흡수성 수지 비드의 핵산 제거율을 계산하였다. 구체적인 방법은 아래와 같다.

[0189] 핵산을 대표하여 DNA 서열을 이용한 실험을 진행하였으며, DNA 존재와 농도는 형광물질로 표지하여 용이하게 확인할 수 있도록 하였다. 구체적으로 PBS 용액 500 μ l에 DNA를 추가하여 25 nM 용액을 제조하였다. DNA 제거 전(반응 전) 핵산의 양을 VarioskanTM Flash Multimode Reader를 이용하여 형광으로 측정하였다. DNA 제거 후(반응 후)의 핵산의 양은, 상기 용액을 Micro centrifuge Tube에 넣고 200 mg/ml의 고흡수성 수지 비드를 첨가하여 30분 동안 반응시킨 후, 남아 있는 용액의 양을 피펫을 이용하여 확인하고 형광 값을 측정하여 계산하였다.

[0190] 여기서, 상기 DNA 서열은 DNA 올리고뉴클레오타이드 1 (DNA ODN 1) (염기서열: 5' - FAM/CCG/CGT/CAA/CAT/CAG/TCT/GAT/AAG/CTA/CGC/GG - 3')를 사용하였으며, 핵산의 양을 측정한 결과는 도 7에 나타내었다.

[0191] DNA ODN 1의 경우 반응 전 부피는 500 μ l (100%)에서 반응 후 54 μ l (10.8%)로 감소되었다. 반응 전 형광 값은 3.07, 반응 후 형광 값은 7.07로 확인되었다. 따라서, 반응 전 핵산의 양은 부피 500 μ l에 형광 값 3.07을 곱하여 1535로 계산되었고, 반응 후 핵산의 양은 부피 54 μ l에 형광 값 7.07을 곱하여 381.8로 계산되었다. 구체적으로, 반응 전 용액 500 μ l에는 25 nM의 Oligo-FAM이 존재하므로 12.5 pmol의 핵산이 존재하고, 이에 해당하는 핵산의 상대적 양은 1535으로 계산되었기 때문에, 반응 후 용액에 존재하는 핵산의 절대량은 핵산의 상대적 양 381.8에 상응하는 3.11 pmol로 계산되었다. 따라서, 핵산은 반응 전 12.5 pmol에서 반응 후 3.11 pmol로 9.39 pmol 만큼 감소하여, 75.1 %의 핵산이 제거되었음을 확인하였다.

- [0193] 다른 DNA 서열로서 DNA ODN 2(염기서열: 5'-Cy3/GCG/CGR/CAA/CAT/CAG/TCT/GAT/AAG/CTA/CGC/GC-3')에 대해서도, 동일한 조건으로 핵산 제거 효과를 확인하고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0194] DNA ODN 2의 경우 반응 전 부피는 500 μ l (100%)에서 반응 후 63 μ l (12.6%)로 감소하였다. 반응 전 형광 값은 2.78, 반응 후 형광 값은 8.50 이었다. 따라서, 반응 전 핵산의 상대적인 양은 1390 (500 x 2.78), 반응 후 핵산의 상대적인 양은 535.5 (63 x 8.50)로 계산되었다. 반응 전 용액 500 μ l에는 25 nM의 ODN-Cy3 가 존재하므로 12.5 pmol의 핵산이 존재하고, 이에 해당하는 핵산의 상대적인 양이 1390으로 계산되었기 때문에, 반응 후 용액에 존재하는 핵산의 절대량은 핵산의 상대적 양 535.5에 상응하는 4.81 pmol로 계산되었다. 따라서, 핵산은 반응 전 12.5 pmol에서 반응 후 4.81 pmol로 7.69 pmol 만큼 감소하여, 61.49 %의 핵산이 제거되었음을 확인하였다.
- [0195] 이처럼, 두 가지 상이한 서열의 핵산으로 실험을 진행한 결과, 핵산 서열 및 형광 종류에 따라 약간의 차이는 있었지만, 고흡수성 수지를 이용하여 핵산을 효과적으로 제거할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0197] **실시예 7: 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 화합물 제거**
- [0198] 제조예 1의 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드의 화합물 제거 효과를 확인하기 위하여, 대조군으로는 (i) PBS 용액; 및 (ii) 고흡수성 수지 비드의 물 이동 통로의 크기를 확인하기 위하여 적색 염색된 폴리스티렌 미립구 (polystyrene microspheres; Lab261) 가 들어있는 PBS 용액을 사용하였다. 실험군으로는 화합물로 독소루비신 (Doxorubicin (Dox), LC Laboratories)이 들어있는 PBS 용액을 사용하였다. 독소루비신 (Dox, LC Laboratories)은 자체 형광을 나타내기 때문에 제거된 화합물의 양을 용이하게 측정할 수 있다.
- [0199] PBS 용액, 폴리스티렌 미립구가 들어있는 PBS 용액, 화합물이 들어있는 PBS 용액 각각에 고흡수성 수지 비드를 넣고 일정 시간이 경과한 후 용액 내에 있는 화합물의 양을 측정하여 고흡수성 수지 비드의 화합물 제거 여부를 확인하였다.
- [0200] 도 9a에서와 같이, 고흡수성 수지 비드는 PBS를 잘 흡수한 것을 확인할 수 있었으며, 도 9b에서와 같이, 독소루비신이 들어있는 PBS의 경우 고흡수성 수지 비드가 PBS와 함께 독소루비신을 흡수하여 고흡수성 수지 비드의 색이 붉게 변한 것을 확인할 수 있었다. 한편, 폴리스티렌 미립구가 들어있는 PBS의 경우 폴리스티렌 미립구의 크기가 고흡수성 수지 비드의 물 이동통로에 비해 커서 흡수되지 못한 것을 확인하였다 (도 9c). 독소루비신의 크기는 1.5 nm로 알려져 있으며, 폴리스티렌의 크기는 30 nm 이므로 고흡수성 수지 비드의 물 이동 통로의 크기는 1.5 nm보다 크며 30 nm보다 작다는 것을 알 수 있었다.
- [0201] 1×10^{11} particles/ml을 포함하는 세포박 소포체 용액 0.5 ml에 화합물의 농도가 100 μ M이 되도록 혼합하고, VarioskanTM Flash Multimode Reader를 이용하여 화합물 제거 전, 즉, 반응 전의 형광을 측정하였다. 이후 상기 용액을 Micro centrifuge Tube (SPL)에 넣은 후 고흡수성 수지 비드를 200 mg/ml 농도로 추가하고 30분 동안 반응시켜 화합물을 제거시킨, 반응 후 형광 값을 측정하였다.
- [0203] 화합물을 세포박 소포체에 탑재 후 탑재되지 않은 화합물을 분리하여 제거하는 과정에는 한외 여과나 초고속 원심분리 등의 방법이 사용된다. 그러나, 이러한 방법들은 고비용의 재료 또는 장비를 필요로 하며, 불순물 제거 효율이 낮고, 불순물 제거 중 세포박 소포체의 손실 또는 파괴가 발생되기 때문에 사용에 제약이 따른다. 따라서, 본 발명에서는 고흡수성 수지 비드를 이용하여 세포박 소포체에 탑재되지 않은 화합물을 분리하는 효과를 검증하고자 하였다.
- [0204] 실험 용액의 부피는 반응 전 500 μ l (100 %)에서 반응 후 150 μ l (30 %)로 감소되었고, 자체 형광을 나타내는 화합물의 형광 값을 이용하여 표준 곡선을 만든 후 측정 형광 값을 대입하여 화합물의 농도를 계산하였을 때, 반응 전 31.9 μ M, 반응 후 9.9 μ M로 나타나, 화합물이 고흡수성 수지 비드 내로 흡수됨을 확인할 수 있었다.
- [0205] 고흡수성 수지 비드가 세포박 소포체에 탑재되지 않은 화합물의 제거가 가능한지 확인하기 위하여 다음 실험을 진행하였다. 세포박 소포체가 들어있는 용액에 화합물을 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 반응을 진행하였다. 이후 고흡수성 수지 비드를 섞어서 탑재되지 않은 화합물을 흡수하였다. 반응 전 화합물의 양은 31.9 μ M, 반응

후 화합물의 양은 15.7 μM 로 나타나 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 화합물이 제거된 것을 확인할 수 있었다.

[0207] **비교예 1: 한외여과법에 의한 화합물 제거**

[0208] 고흡수성 수지 비드를 사용하여 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 화합물을 제거하는 본 발명의 효과를, 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 화합물 등의 약물을 제거할 때 사용하는 종래의 방법 중 하나인 한외여과법의 효과와 비교하는 실험을 진행하였다.

[0209] 한외여과는 30 내지 100 kDa의 컷오프 값을 가질 수 있다. 본 비교예에서는 Amicon Ultra-15 100 kDa을 이용하였다. 세포밖 소포체가 들어있는 용액에 화합물을 넣은 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 동안 반응을 진행하였다. 이후 7500 x g로 10분 동안 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 원심분리 후 화합물이 탑재된 세포밖 소포체만이 남았을 것이라 생각되는 상층액을 수득하여 Eppendorf 튜브 1.5 mL (SPL, Cat. No: 50015)에 옮겨 주었다.

[0210] 반응 후 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 화합물의 양을 확인한 결과 9.4 μM 인 것으로 나타났고, 화합물을 탑재한 세포밖 소포체를 한외 여과를 통해 탑재되지 않은 화합물을 제거한 경우 화합물의 양은 13.1 μM 로 탑재되지 않은 화합물이 제거된 것으로 나타났다.

[0212] **실험예 1: 고흡수성 수지 비드와 한외여과에 따른 화합물 제거 정도 비교**

[0213] 실시예 7과 비교예 1에 따른 화합물 제거 정도를 비교한 결과는 도 10에 나타내었으며, 고흡수성 수지 비드와 한외여과에 따른 화합물 제거 정도는 유사한 수준으로 확인되었다.

[0215] **실험예 2: 고흡수성 수지 비드와 한외여과에 따른 화합물 제거시 세포밖 소포체 손실 정도 비교**

[0216] 각각 고흡수성 수지 비드와 한외여과에 따라 화합물을 제거할 때 세포밖 소포체의 손실 정도를 비교하였다. 세포밖 소포체의 농도는 nanoparticle tracking analysis (NTA) 방법으로 분석하였다.

[0217] 실시예 7에서 고흡수성 수지 비드를 이용하여 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 화합물을 제거한 후와 비교예 1의 한외여과법을 이용하여 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 화합물을 제거한 후의 세포밖 소포체(EV) 농도는 각각 2.25×10^{10} particles/mL, 0.62×10^{10} particles/mL로 확인되었다 (도 11). 따라서, 한외여과법을 적용한 종래의 방법과 비교하여 본 발명의 고흡수성 수지 비드를 이용하는 경우, 세포밖 소포체에 탑재되지 않은 화합물을 제거할 때 발생하는 세포밖 소포체의 손실이 더 적다는 것을 알 수 있었다.

[0218] 상기 결과를 세포밖 소포체 효율 (EV yield) 로 계산해 보면, 본 발명의 고흡수성 수지 비드를 이용하는 경우, 한외여과법을 이용하는 종래 기술에 비해 4.9% 효율이 더 높은 것으로 확인되었다.

[0220] 상기 세포밖 소포체 효율 (EV yield)은 아래의 식으로 정의된다.

[0222] [식]

[0223] 세포밖 소포체 효율 = $(A-B)/A \times 100$

[0224] A: 초기 세포밖 소포체 농도

[0225] B: 한외여과, 고흡수성 수지 등을 사용한 후 세포밖 소포체 농도 (손실로 인해 초기 농도보다 낮음)

[0227] 상기와 같은 결과로부터, 고흡수성 수지 비드를 이용하면 종래 한외여과법과 비교하여 세포밖 소포체의 손실을 줄이며 화합물을 효율적으로 제거할 수 있음을 알 수 있었다.

[0229] **실시예 8. 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 항체의 흡수**

- [0230] 제조예 1의 고흡수성 수지 비드를 이용하면, 항체를 포함하는 용액에서 고흡수성 수지 비드 내로 항체를 효과적으로 포획할 수 있는지 확인해 보고자 하였다.
- [0231] 항체를 포함하는 용액 중에서 고흡수성 수지 비드를 이용하여 항체 흡수 효과를 분석하기 위하여 다음의 실험을 진행하였다. 항체는 Goat Anti-Mouse IgG H&L를 사용하였으며, 항체를 용이하게 확인하기 위하여 형광물질인 Alexa Fluor®488로 표지된 항체를 이용하였다.
- [0232] PBS를 이용하여 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor®488) (abcam) 용액 300 μl 를 제조한 후, 제조예 1의 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드 16 mg을 첨가하여 1시간 동안 흡수시켰다. 이 때 Micro centrifuge Tube를 사용하였다. 남은 용액을 피펫으로 제거한 후 항체를 흡수한 고흡수성 수지 비드를 PBS로 3회 세척하였다. 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 항체는 항체에 결합된 형광물질의 형광을 이용하여 이미지화하였다. 또한 내부로 흡수된 항체를 확인하기 위하여 고흡수성 수지 비드를 2mm 두께로 잘라 형광 이미지도 확인하였다. 항체의 형광은 ChemiDoc XRS+ imaging system (Bio-Rad)를 이용하여 이미지화하였다 (흡수 파장 495nm, 방출 파장 519nm). 대조군은 항체용액이 아닌 PBS를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 진행하였다.
- [0233] 대조군과 실험군의 형광 이미지는 도 12에 나타낸 바와 같다. 항체를 포함하는 용액을 고흡수성 수지 비드로 흡수시킨 결과, 대조군에서는 형광을 확인할 수 없었으나 실험군에서는 고흡수성 수지 비드 내로 항체가 흡수되어 형광을 확인할 수 있었으며, 고흡수성 수지 비드 단면에서도 형광이 확인되어, 항체가 표면에 묻어 있는 것이 아닌 비드 내부로 항체가 흡수된 것을 알 수 있었다.
- [0235] 한편, 실시예 4 (표4, 도5)의 데이터를 재구성하여 용액에 남아 있는 항체의 양, 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 항체의 양을 표 6과 도 13에 나타내었다.

표 6

구분	첨가해 준 항체의 총량	용액 내 항체의 양	고흡수성 수지 비드 내 항체의 양
항체의 양 (%)	100	40	60

- [0239] 표 6에 나타낸 바와 같이, 용액에 남아 있는 항체의 양은 40%이므로 고흡수성 수지 비드 내로 60%의 항체가 흡수된 것을 알 수 있다.
- [0241] 상기와 같은 결과로부터, 고흡수성 수지 비드는 항체를 효과적으로 흡수하여 그 내부에 포획할 수 있음을 알 수 있었다.

[0243] 실시예 9: 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 펩타이드의 흡수

- [0244] 제조예 1의 고흡수성 수지 비드를 이용하면, 펩타이드를 포함하는 용액에서 고흡수성 수지 비드 내로 펩타이드를 효과적으로 포획할 수 있는지 확인해 보고자 하였다.
- [0245] 펩타이드를 포함하는 용액 중에서 고흡수성 수지 비드를 이용하여 펩타이드 흡수 효과를 분석하기 위하여 다음의 실험을 진행하였다. 펩타이드를 용이하게 확인하기 위하여 형광물질인 FITC로 표지된 FITC-linker-MRTACWMRER 펩타이드 서열을 이용하였다. 펩타이드의 형광 강도는 Varioskan™ Flash Multimode Reader를 이용하여 측정하였다 (흡수 파장 490nm, 방출 파장 520nm).
- [0246] PBS를 이용하여 100 nM 농도의 펩타이드 용액을 제조한 후 고흡수성 수지 비드와 반응시키기 전 펩타이드 양을 측정하였다. 이후 Micro centrifuge Tube에 500 μl 의 펩타이드 용액과 고흡수성 수지 비드 220 mg/ml를 첨가하여 30분동안 반응시켰다. 남아있는 용액을 피펫으로 분리하여 부피를 측정한 후 형광을 측정하여 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 펩타이드의 양을 계산하였다.

[0247] 펩타이드 용액의 부피는 반응 전 500 μl (100%)에서 반응 후 75 μl (15%)로 감소하였으며, 형광 강도는 반응 전 0.235, 반응 후 0.156로 확인되었다. 형광 강도는 용액 내 펩타이드 농도와 비례하므로 용액의 부피와 형광 강도를 곱하여 용액 내 펩타이드의 상대적인 양을 계산하였다. 반응 전 펩타이드 용액 내 펩타이드의 상대적인 양은 117, 반응 후 남아있는 펩타이드의 상대적인 양은 11.7로 계산되었다. 반응 전 용액 내 펩타이드의 양은 50 pmol, 반응 후 남아있는 펩타이드의 양은 4.98 pmol로, 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 펩타이드의 양은 45 pmol 임을 알 수 있었다. 이를 백분율 (%)로 나타내어 표 7과 도 14에 나타내었다. 고흡수성 수지 비드 내로 90%의 펩타이드가 흡수된 것을 알 수 있다.

표 7

[0249]

구분	용액 부피 (μl)	형광 강도	용액 내 펩타이드의 총량 (%)
흡수 전	500	0.235	100
흡수 후	75	0.156	9.96

[0251] 고흡수성 수지 비드 내로 펩타이드가 흡수되는 것을 형광 이미지를 통해 확인하였다. 10 μM 농도의 펩타이드 용액 300 μl 에 고흡수성 수지 비드 16 mg을 첨가하고 1시간 동안 흡수시켰다. 이 때 Micro centrifuge Tube를 사용하였으며 남은 용액은 피펫으로 제거한 후 펩타이드를 흡수한 고흡수성 수지 비드를 PBS로 3회 세척하였다. 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 펩타이드는 펩타이드에 결합된 형광물질을 이용하여 이미지화하여 확인하였다. 펩타이드의 형광은 ChemiDoc XRS + imaging system를 이용하여 이미지화하였다 (흡수 파장 495nm, 방출 파장 519nm). 대조군은 펩타이드 용액이 아닌 PBS를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 진행하였다.

[0252] 대조군과 실험군의 형광 이미지는 도 15에 나타내었다. 대조군에서는 전체 이미지와 단면 이미지에서 형광을 거의 확인할 수 없었으나, 실험군에서는 전체 및 단면 이미지 모두에서 형광을 확인할 수 있었고 단면 형광 이미지에서 고흡수성 수지 비드의 내부까지 형광을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터, 펩타이드는 고흡수성 수지 비드 내부까지 흡수된 것이 확인된 바, 고흡수성 수지 비드는 펩타이드를 효과적으로 흡수하여 그 내부에 포획할 수 있음을 알 수 있었다.

[0254] **실시예 10: 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 DNA의 흡수**

[0255] 제조예 1의 고흡수성 수지 비드를 이용하면, DNA를 포함하는 용액에서 고흡수성 수지 비드 내로 DNA를 효과적으로 포획할 수 있는지 확인해 보고자 하였다.

[0256] DNA를 포함하는 용액 중에서 고흡수성 수지 비드를 이용하여 DNA 흡수 효과를 분석하기 위하여 다음의 실험을 진행하였다. DNA 존재와 농도를 용이하게 확인하기 위하여 형광물질인 FAM으로 표지한 DNA 염기서열: 5' - FAM/GCT/GTG/CGA/AAG/TGA/TGA/CG - 3' (Integrated DNA Technologies, Inc.) 을 이용하였다. DNA에 표지된 형광물질의 형광 강도는 VarioskanTM Flash Multimode Reader를 이용하여 측정하였다 (흡수 파장 488nm, 방출 파장 519nm).

[0257] PBS를 이용하여 100 nM 농도의 DNA 용액을 제조한 후 고흡수성 수지 비드와 반응시키기 전 DNA 양을 측정하였다. 이후 Micro centrifuge Tube에 500 μl 의 DNA 용액과 고흡수성 수지 비드 220 mg/ml을 첨가하여 30 분동안 반응시켰다. 남아있는 용액을 피펫으로 분리하여 부피를 측정한 후 형광을 측정하여 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 DNA의 양을 계산하였다.

[0258] DNA 용액의 부피는 반응 전 500 μl (100%)에서 반응 후 53 μl (10.6%)로 감소하였으며, 형광 강도는 반응 전 22.7, 반응 후 19.3으로 확인되었다. 형광 강도는 용액 내 DNA 농도와 비례하므로 용액의 부피와 형광 강도를 곱하여 용액 내 DNA의 상대적인 양을 계산하였다. 반응 전 DNA 용액 내 DNA의 상대적인 양은 11346, 반응 후 남아있는 DNA의 상대적인 양은 1025로 계산되었다. 반응 전 용액 내 DNA의 양은 50 pmol, 반응 후 남아있는 DNA의 양은 4.52 pmol로, 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 DNA의 양은 45.5 pmol 임을 알 수 있었다. 이를 백분율 (%)로 나타내어 표 8과 도 16에 나타내었다. 고흡수성 수지 비드 내로 91%의 DNA가 흡수된 것을 알 수 있다.

표 8

구분	용액 부피 (μl)	형광 강도	용액 내 DNA의 총량 (%)
흡수 전	500	22.7	100
흡수 후	53	19.3	9.03

고흡수성 수지 비드 내로 DNA가 흡수되는 것을 형광 이미지를 통해 확인하였다. 10 μM 농도의 DNA 용액 300 μl 에 고흡수성 수지 비드 16 mg을 첨가하고 1시간 동안 흡수시켰다. 이 때 Micro centrifuge Tube를 사용하였으며 남은 용액은 피펫으로 제거한 후 DNA를 흡수한 고흡수성 수지 비드를 PBS로 3회 세척하였다. 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 DNA는 DNA에 결합된 형광물질을 이용하여 이미지화하여 확인하였다. DNA의 형광은 ChemiDoc XRS + imaging system를 이용하여 이미지화하였다 (흡수 파장 495nm, 방출 파장 519nm). 대조군은 DNA 용액이 아닌 PBS를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 진행하였다.

대조군과 실험군의 형광 이미지는 도 17에 나타내었다. 대조군에서는 전체 이미지와 단면 이미지에서 형광을 거의 확인할 수 없었으나, 실험군에서는 전체 및 단면 이미지 모두에서 형광을 확인할 수 있었고 단면 형광 이미지에서 고흡수성 수지 비드의 내부까지 형광을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터, DNA는 고흡수성 수지 비드 내부까지 흡수된 것이 확인된 바, 고흡수성 수지 비드는 DNA를 효과적으로 흡수하여 그 내부에 포획할 수 있음을 알 수 있었다.

실시예 11: 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 RNA의 흡수

제조예 1의 고흡수성 수지 비드를 이용하면, RNA를 포함하는 용액에서 고흡수성 수지 비드 내로 RNA를 효과적으로 포획할 수 있는지 확인해 보고자 하였다.

RNA를 포함하는 용액 중에서 고흡수성 수지 비드를 이용하여 RNA 흡수 효과를 분석하기 위하여 다음의 실험을 진행하였다. RNA 존재와 농도를 용이하게 확인하기 위하여 형광물질인 FAM으로 표지한 RNA 염기서열 5'-FAM/UGC/AGC/UGU/UCU/CGU/UGU/UUU/UUU/UUU/UUU/CAC/UCU/UCC/ACU/U - 3' (BIONEER) 이용하였다. RNA에 표지된 형광 물질의 형광 강도는 VarioskanTM Flash Multimode Reader를 이용하여 측정하였다 (흡수 파장 488nm, 방출 파장 519nm).

PBS를 이용하여 100 nM 농도의 RNA 용액을 제조한 후 고흡수성 수지 비드와 반응시키기 전 RNA 양을 측정하였다. 이후 Micro centrifuge Tube에 500 μl 의 RNA 용액과 고흡수성 수지 비드 220 mg/ml을 첨가하여 30 분 동안 반응시켰다. 남아있는 용액을 피펫으로 분리하여 부피를 측정한 후 형광을 측정하여 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 RNA의 양을 계산하였다.

RNA 용액의 부피는 반응 전 500 μl (100%)에서 반응 후 74.7 μl (14.9%)로 감소하였으며, 형광 강도는 반응 전 31.0, 반응 후 32.3으로 확인되었다. 형광 강도는 용액 내 RNA 농도와 비례하므로 용액의 부피와 형광 강도를 곱하여 용액 내 RNA의 상대적인 양을 계산하였다. 반응 전 RNA 용액 내 RNA의 상대적인 양은 15507, 반응 후 남아있는 RNA의 상대적인 양은 2414로 계산되었다. 반응 전 용액 내 RNA의 양은 50 pmol, 반응 후 남아있는 RNA의 양은 7.78 pmol로, 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 RNA의 양은 42.2 pmol임을 알 수 있었다. 이를 백분율(%)로 나타내어 표 9와 도 18에 나타내었다. 고흡수성 수지 비드 내로 84.4%의 RNA가 흡수된 것을 알 수 있다.

표 9

구분	용액 부피 (μl)	형광 강도	용액 내 RNA의 총량 (%)
흡수 전	500	31.0	100
흡수 후	74.7	32.3	15.6

[0273] 고흡수성 수지 비드 내로 RNA가 흡수되는 것을 형광 이미지를 통해 확인하였다. 5 μ M 농도의 RNA 용액 300 μ l 에 고흡수성 수지 비드 16 mg을 첨가하고 1시간 동안 흡수시켰다. 이 때 Micro centrifuge Tube를 사용하였으며 남은 용액은 피펫으로 제거한 후 RNA를 흡수한 고흡수성 수지 비드를 PBS로 3회 세척하였다. 고흡수성 수지 비드 내로 흡수된 RNA는 RNA에 결합된 형광물질을 이용하여 이미지화하여 확인하였다. RNA의 형광은 ChemiDoc XRS + imaging system를 이용하여 이미지화하였다 (흡수 파장 495nm, 방출 파장 519nm). 대조군은 RNA 용액이 아닌 PBS를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 진행하였다.

[0274] 대조군과 실험군의 형광 이미지는 도 19에 나타내었다. 대조군에서는 전체 이미지와 단면 이미지에서 형광을 거의 확인할 수 없었으나, 실험군에서는 전체 및 단면 이미지 모두에서 형광을 확인할 수 있었고 단면 형광 이미지에서 고흡수성 수지 비드의 내부까지 형광을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터, RNA는 고흡수성 수지 비드 내부까지 흡수된 것이 확인된 바, 고흡수성 수지 비드는 RNA를 효과적으로 흡수하여 그 내부에 포획할 수 있음을 알 수 있었다.

[0276] 실시예 12: 폴리아크릴산계 고흡수성 수지 비드를 이용한 화합물의 흡수

[0277] 제조예 1의 고흡수성 수지 비드를 이용하면, 화합물을 포함하는 용액에서 고흡수성 수지 비드 내로 화합물을 효과적으로 포획할 수 있는지 확인해 보고자 하였다.

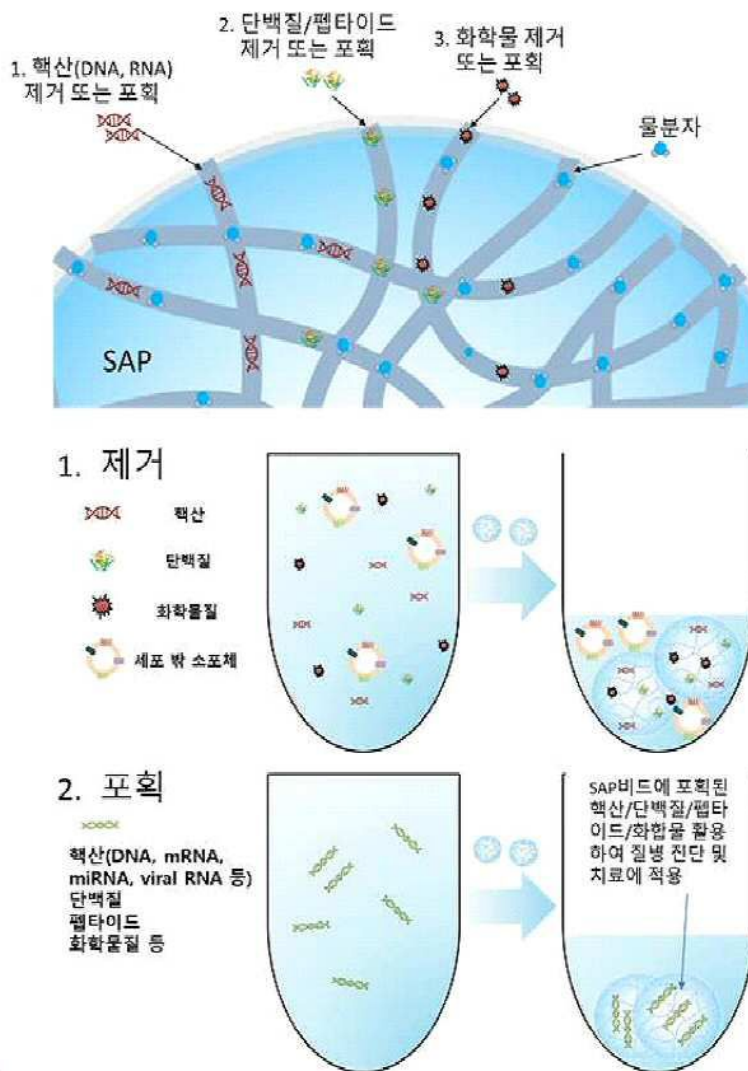
[0278] 화합물을 포함하는 용액 중에서 고흡수성 수지 비드를 이용하여 화합물 흡수 효과를 분석하기 위하여 Trypan blue를 고흡수성 수지 비드 내로 흡수시킨 후 고흡수성 수지 비드의 색변화를 확인하였다. PBS를 이용하여 0.04%의 Trypan blue 용액을 제조한 후 제조한 용액 300 μ l에 고흡수성 수지 비드 16 mg을 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 남아있는 용액을 피펫으로 제거한 후, Trypan blue를 흡수한 고흡수성 수지 비드는 PBS를 이용하여 3회 세척하였다. 대조군은 Trypan blue 용액이 아닌 PBS를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 진행하였다.

[0279] 대조군과 실험군의 광학 이미지를 도 20에 나타내었다. Trypan blue는 파란색의 염료이다. 대조군에서는 전체 이미지와 단면 이미지에서 파란색을 거의 확인할 수 없었으나, 실험군에서는 전체 및 단면 이미지 모두에서 파란색을 확인할 수 있었고 단면 이미지에서 고흡수성 수지 비드의 내부까지 파란색을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터, 화합물은 고흡수성 수지 비드 내부까지 흡수된 것이 확인된 바, 고흡수성 수지 비드는 화합물을 효과적으로 흡수하여 그 내부에 포획할 수 있음을 알 수 있었다.

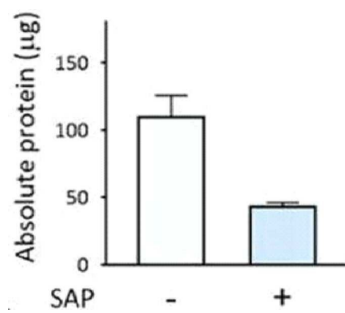
[0281] 이상, 본 발명의 실시예들에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다 할 것이다.

도면

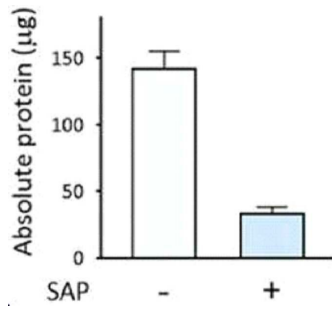
도면1



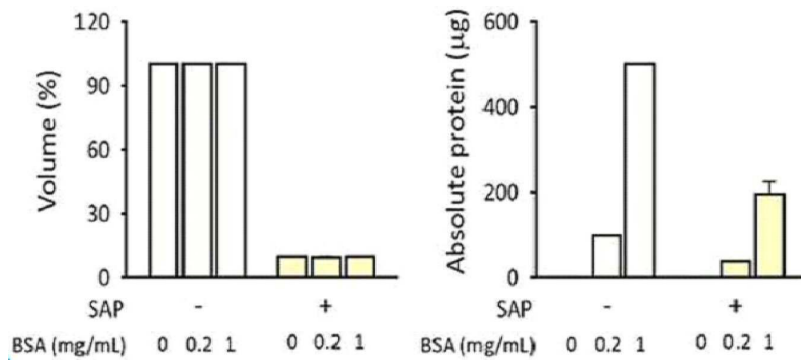
도면2



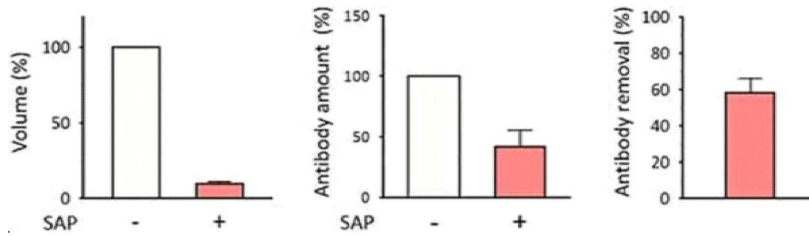
도면3



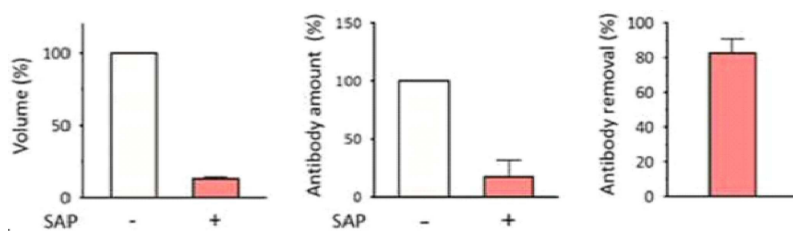
도면4



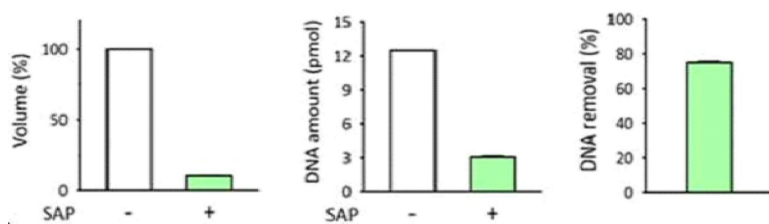
도면5



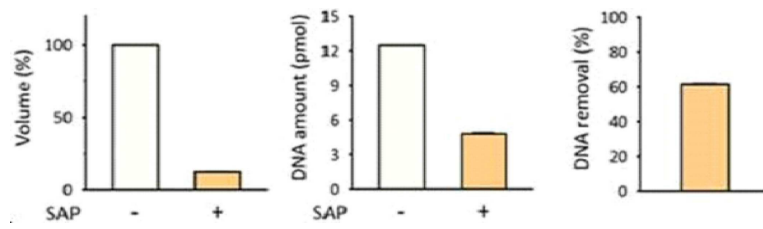
도면6



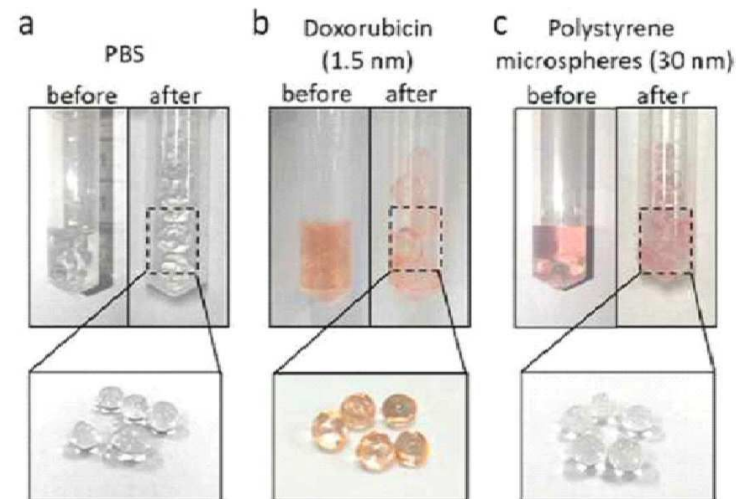
도면7



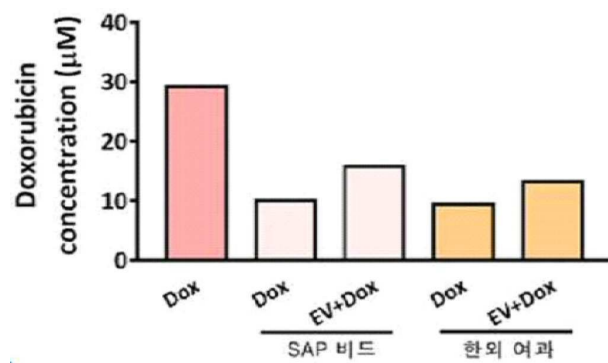
도면8



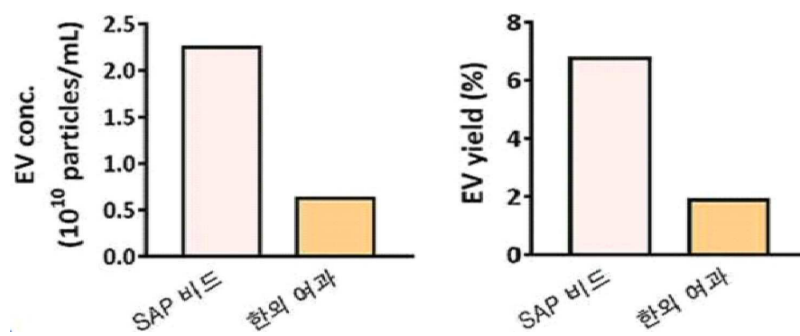
도면9



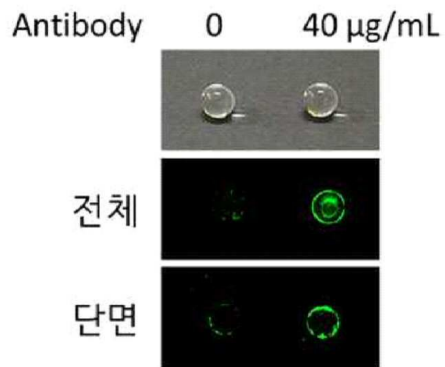
도면10



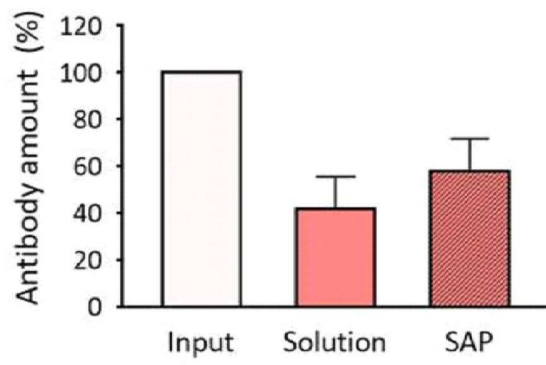
도면11



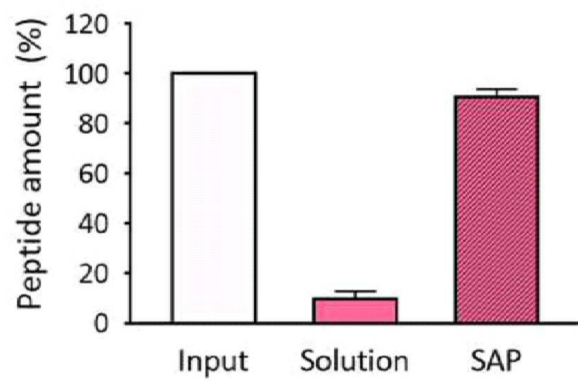
도면12



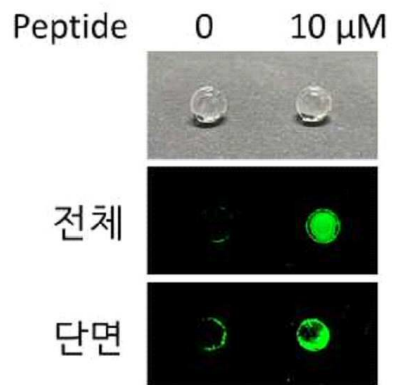
도면13



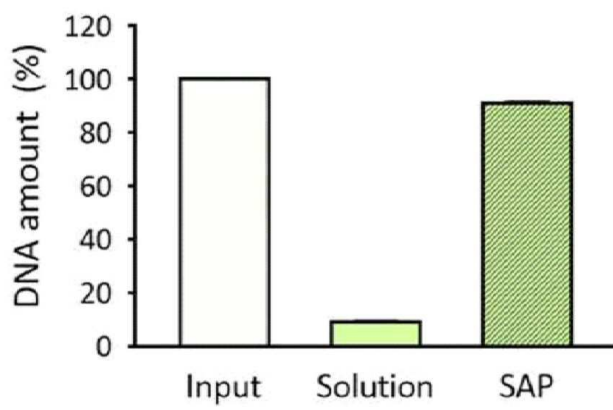
도면14



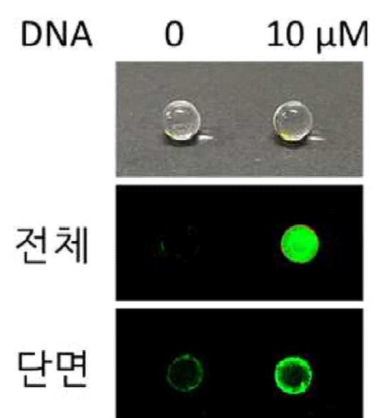
도면15



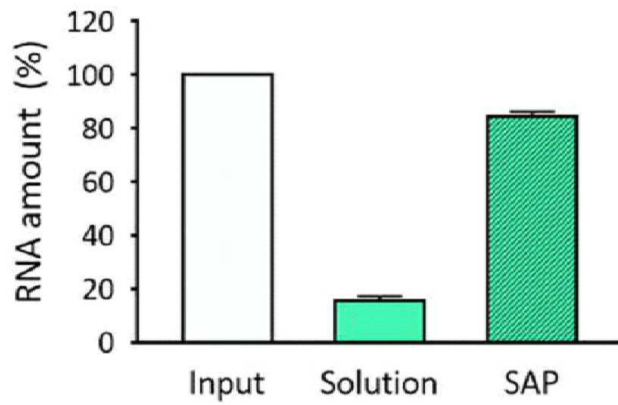
도면16



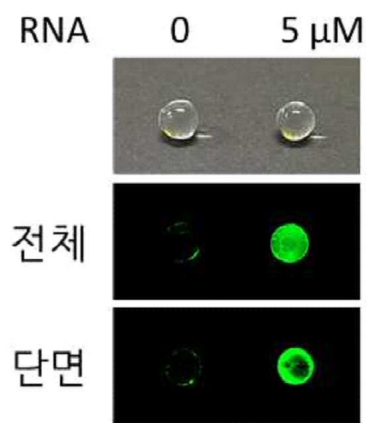
도면17



도면18



도면19



도면20



서 열 목 록

- <110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH and BUSINESS FOUNDATION
- <120> Method for removing impurities and capturing useful materials using super absorbent polymer from sample
- <130> 1069824
- <150> KR 1020200163071

<151> 2020-11-27

<160> 4

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA ODN 1

<400> 1

ccgcgtcaac atcagtctga taagctacgc gg 32

<210> 2

<211

> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA ODN 2

<400> 2

gcgcgrcaac atcagtctga taagctacgc gc 32

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Random sequence

<400> 3

gctgtgcgaa agtgatgacg 20

<210> 4

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Random sequence

<400> 4

ugcagcuguu cucguuguuu uuauuugcac ucuuccacuu 40