



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0118326
(43) 공개일자 2018년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 35/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/502761 (2013.01)
B01L 3/50273 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0051473
(22) 출원일자 2017년04월21일
심사청구일자 2017년04월21일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
신세현
서울시 서초구 방배로 270, 바동406호 (방배동, 신삼호아파트)
장대호
경기도 안산시 단원구 광덕동로 26, 101동606호 (고잔동, 고잔1차푸르지오아파트)
(74) 대리인
특허법인남춘

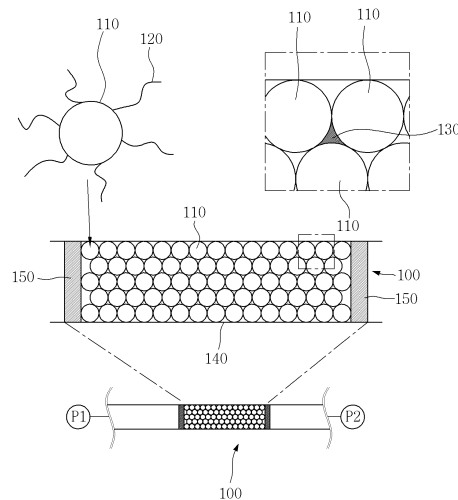
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 미세 소포체의 분리 장치 및 방법

(57) 요약

본 발명은 미세 소포체의 분리 장치 및 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 미세 소포체 분리 장치는 미세 소포체가 포함된 시료 용액이 유동하는 유동 채널과; 상기 유동 채널에 설치되고, 상기 시료 용액이 통과 가능하게 3차원의 다공성 구조를 갖는 다공성 매질부와; 상기 다공성 매질부의 다공성 구조 표면에 형성되어 상기 다공성 매질부를 통과하는 상기 시료 용액 내의 상기 미세 소포체와의 특이적 결합을 통해 상기 시료 용액 내의 상기 미세 소포체를 포획하는 소포체 마커를 포함하는 것을 특징으로 한다. 이에 따라, 3차원의 다공성 구조를 이용하여 엑소좀(Exosome)과 같은 미세 소포체를 분리함으로써, 단백질에 의한 오염없이 매우 높은 수율로 미세 소포체를 분리할 수 있을 뿐만 아니라, 간단한 방법으로 인해 분리에 소요되는 시간을 현저히 줄일 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/54313 (2013.01)

G01N 35/085 (2013.01)

B01L 2200/0652 (2013.01)

B01L 2200/0668 (2013.01)

B01L 2400/0433 (2013.01)

(72) 발명자

나원휘

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 228동1404호 (신천동, 파크리오)

서창덕

경기도 의정부시 시민로157번길 64, 3층 (의정부동)

이호윤

경기도 과천시 조리읍 능안로 37, 110동1302호 (한라비탈디아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

미세 소포체의 분리 장치에 있어서,

미세 소포체가 포함된 시료 용액이 유동하는 유동 채널과;

상기 유동 채널에 설치되고, 상기 시료 용액이 통과 가능하게 3차원의 다공성 구조를 갖는 다공성 매질부와;

상기 다공성 매질부의 다공성 구조 표면에 형성되어 상기 다공성 매질부를 통과하는 상기 시료 용액 내의 상기 미세 소포체와의 특이적 결합을 통해 상기 시료 용액 내의 상기 미세 소포체를 포획하는 소포체 마커를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미세 소포체와 상기 소포체 마커 간의 특이적 결합은 면역 반응에 의한 결합을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 미세 소포체는 엑소좀(Exosome)을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 소포체 마커는 tCD9, CD63 및 CD81을 포함하는 테트라스판닌(Tetraspanin), 상피세포부착분자(EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule), IGF-1R, CA125, CD41b, 및 E-카데린(Cadherin) 중 적어도 하나를 포함하여 형성되는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 시료 용액이 상기 유동 채널 내에서 왕복 유동하도록 상기 유동 채널의 양측으로 음압을 인가하는 음압 형성 유닛을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 유동 채널과 연결되고, 상기 소포체 마커와 상기 미세 소포체 간의 결합을 해제시키기 위한 일루션 버퍼 용액이 수용되는 일루션 챔버와,

상기 유동 채널과 연결되어 상기 미세 소포체를 수집하기 위한 수집 챔버를 더 포함하며;

상기 소포체 마커와 상기 미세 소포체 간의 결합 과정이 완료된 후, 상기 음압 형성 유닛에 의한 음압이 상기 일루션 챔버로 인가되어 상기 일루션 버퍼 용액이 상기 유동 채널을 통해 상기 다공성 매질부를 왕복 통과하면서 상기 소포체 마커를 분리한 후 상기 수집 챔버로 유동하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 유동 채널과 연결되고 내부에 세척 용액이 수용되는 세척 챔버를 더 포함하며;

상기 수집 챔버로의 수집 과정 전에, 상기 음압 형성 유닛에 의한 음압이 상기 세척 챔버로 인가되어 상기 세척 용액이 상기 유동 채널을 통해 상기 다공성 매질부를 통과하여 상기 다공성 매질부를 세척하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 다공성 매질부는

상기 유동 채널 상에 배치되는 패킹 도관과,

상호 간의 사이에 공극이 형성되어 3차원의 다공성 구조가 형성되도록 상기 패킹 도관 내에 상호 밀착되도록 수용되는 복수의 미세 구슬을 포함하며;

상기 소포체 마커는 각각의 상기 미세 구슬의 표면에 적어도 하나씩 형성되는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 패킹 도관의 양측에 각각 설치되어 상기 미세 구슬의 유실을 방지하는 메쉬를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 다공성 매질부는 3차원의 다공성 구조를 갖는 아가로즈 겔(Agarose gel)을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치.

청구항 11

미세 소포체의 분리 방법에 있어서,

(a) 3차원 다공성 구조를 갖는 다공성 매질부를 미세 소포체가 포함된 시료 용액이 통과하는 단계와;

(b) 상기 다공성 매질부의 다공성 구조 표면에 형성된 소포체 마커에 상기 시료 용액 내의 상기 미세 소포체가 특이적 결합을 통해 포획되는 단계와;

(c) 상기 소포체 마커에 포획된 상기 미세 소포체를 분리하여 수집하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 상기 미세 소포체와 상기 소포체 마커 간의 특이적 결합은 면역 반응에 의한 결합을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 미세 소포체는 엑소좀(Exosome)을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 소포체 마커는 tCD9, CD63 및 CD81을 포함하는 테트라스판닌(Tetraspanin), 상피세포부착분자(EpCAM :

Epithelial cell adhesion molecule), IGF-1R, CA125, CD41b, 및 E-카테린(Cadherin) 중 적어도 하나를 포함하여 형성되는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 (a) 단계 및 상기 (b) 단계에서는 상기 시료 용액이 상기 다공성 매질부를 왕복 유동하면서 상기 미세 소포체와 상기 소포체 마커가 특이적 결합하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 방법.

청구항 16

제11항에 있어서,

상기 (c) 단계는

(c1) 상기 (a) 단계 및 상기 (b) 단계 완료 후, 세척 용액이 상기 다공성 매질부에 투입되어 상기 다공성 매질부가 세척되는 단계와;

(c2) 상기 다공성 매질부에 일루션 버퍼 용액이 투입되어 상기 소포체 마커로부터 상기 미세 소포체가 분리되는 단계와;

(c3) 상기 소포체 마커로부터 분리된 상기 미세 소포체가 수집 채널로 유동하여 수집되는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 방법.

청구항 17

제11항에 있어서,

상기 다공성 매질부는

상기 유동 채널 상에 배치되는 패킹 도관과,

상호 간의 사이에 공극이 형성되어 3차원의 다공성 구조가 형성되도록 상기 패킹 도관 내에 상호 밀착되도록 수용되는 복수의 미세 구슬을 포함하며;

상기 소포체 마커는 각각의 상기 미세 구슬의 표면에 적어도 하나씩 형성되는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 패킹 도관의 양측에 각각 설치되어 상기 미세 구슬의 유실을 방지하는 메쉬를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 방법.

청구항 19

제11항에 있어서,

상기 다공성 매질부는 3차원의 다공성 구조를 갖는 아가로스 겔(Agarose gel)을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세 소포체의 분리 장치 및 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 3차원의 다공성 구조를 이용하여 엑소좀(Exosome)과 같은 미세 소포체를 분리하는 미세 소포체의 분리 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생체 내의 미세 소포체(Micro vesicle)는 여러 종류의 세포들에 존재하거나 세포로부터 분비되는 막 구조의 작

은 소포이다. 세포 외로 분비되는 미세 소포체로는 엑소좀(Exosome), 웨딩 미세 소포체(Shedding micr vesicle : SMVs), 세포자살성 수포(Apoptotic blebs) 등이 있다. 여기서, 엑소좀은 식균 기원의 직경 30 내지 100nm의 막성 소포체이고, 웨딩 미세 소포체는 원형질막으로부터 직접 흘러지고 직경 50 내지 1000nm의 큰 막성 소포체이고, 세포자살성 수포는 죽어가는 세포에 의해 유출된 직경 50 내지 5000nm의 소포체이다.

[0003] 이와 같은 생체 내의 미세 소포체, 예를 들어 엑소좀은 세포에서 분비되는 수십 나노미터 크기의 소포체로서, 지질 이중층(Lipid bilayer) 또는 지질 단층(Lipid monolayer) 내부에 세포질 또는 세포에서 생성되는 단백질과 RNA가 포함되어 있는 구조이다.

[0004] 엑소좀의 경우, 단백질 및 RNA의 교환을 통한 세포 간 의사소통의 수단으로, 세포 내 불필요한 물질의 배출 기능도 담당하고 있으며, 마이크로RNA(microRNA, miRNA)를 포함하고 있어 암 등의 질병 조기진단과 같은 분자 진단에 있어서 유용한 마커로 그 활용이 기대되고 있다.

[0005] 그러나, 상기와 같이 생체 내 미세 소포체의 중요성 및 가치가 밝혀지고 있지만 미세 소포체를 분리하여 수집하는데는 많은 어려움이 따른다.

[0006] 미세 소포체를 분리하는 기존의 기술로는, 밀도차 분리법, 입자 크기 분리법, 면역친화적 분리법 등이 알려져 있는데, 예를 들어, 초원심 분리(Ultra-centrifugation isolation), 크기별 제외법(Size exclusion), 면역친화성 분리(Immunoaffinity isolation), 미세유체 기술(Micro-fluidics chip) 및 폴리머를 이용한 방법(Polymeric method) 등이 이에 속한다.

[0007] 이 중에서, 밀도차 분리법은 미세 소포체 중 엑소좀의 밀도가 1.13 ~1.19 정도인데 반하여 액체의 밀도가 1.0 정도인 것을 착안하여 분리하는 방법으로, 대표적으로는 초원심 분리(Ultra-centrifugation isolation)방법이 있다. 이러한 초원심 분리는 세포 밖 미세 소포체를 분리하는데 가장 널리 쓰이는 방법이고, 원리가 간단하여 가장 신뢰성 있는 분리 방법이다. 하지만, 초원심 분리를 이용해서 미세 소포체를 분리할 경우에는 미세 소포체의 수율이 낮고, 분리하는데 시간이 많이 소요되며, 상대적으로 고가의 분리 장치가 필요하다는 단점이 있다.

[0008] 밀도차 분리의 또 다른 방법은 시료 용액에 친수성 폴리머를 추가함으로써 엑소좀의 친수도를 감소시켜 침전시키는 방법으로 적은 원심력으로 분리시킬 수 있는 장점을 지니고 있다. 대신, 첨가된 폴리머에 의해서 시료 용액 내부에 존재하는 단백질들이 함께 침전하면서 단백질에 의한 오염 문제가 발생한다.

[0009] 이와 같이, 친수성 폴리머를 이용하는 방법이 현재 상용화로 가장 많이 개발되었으며 높은 회수율을 보이고 있다. 또한 최근에는 동일한 방법의 연장선에서 개발된 수용액 이상계를 이용한 세포 밖 소포체의 분리 방법이 한국공개특허공보 제10-2016-0116802호를 통해 제안되었다.

[0010] 한편, 크기별 제외법의 경우 주로 초원심 분리법과 함께 사용되어, 미세 소포체의 순도를 간단히 높일 수 있다는 장점이 있지만, 미세 소포체가 필터에 달라붙어 분리 후의 수율이 낮다는 한계가 있다.

[0011] 그리고, 면역친화성 분리법은 항체를 세포 밖 소포체에 붙여서 분리하는 방법으로 매우 높은 선별성(Specificity)으로 분리 가능하지만, 항체를 만드는 과정이 오래 걸리며 많은 비용이 들기 때문에 실용적인 진단에 어려움이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이에, 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해소하기 위해 안출된 것으로서, 3차원의 다공성 구조를 이용하여 엑소좀(Exosome)과 같은 미세 소포체를 분리함으로써, 단백질에 의한 오염없이 매우 높은 수율로 미세 소포체를 분리할 수 있을 뿐만 아니라, 간단한 방법으로 인해 분리에 소요되는 시간을 현저히 줄일 수 있는 미세 소포체의 분리 장치 및 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적은 본 발명에 따라, 미세 소포체의 분리 장치에 있어서, 미세 소포체가 포함된 시료 용액이 유동하는 유동 채널과; 상기 유동 채널에 설치되고, 상기 시료 용액이 통과 가능하게 3차원의 다공성 구조를 갖는 다공성 매질부와; 상기 다공성 매질부의 다공성 구조 표면에 형성되어 상기 다공성 매질부를 통과하는 상기 시료 용액 내의 상기 미세 소포체와의 특이적 결합을 통해 상기 시료 용액 내의 상기 미세 소포체를 포획하는 소포체 마커를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 소포체의 분리 장치에 의해서 달성된다.

- [0014] 여기서, 상기 미세 소포체와 상기 소포체 마커 간의 특이적 결합은 면역 반응에 의한 결합을 포함할 수 있다.
- [0015] 또한, 상기 미세 소포체는 엑소좀(Exosome)을 포함할 수 있다.
- [0016] 그리고, 상기 소포체 마커는 tCD9, CD63 및 CD81을 포함하는 테트라스판닌(Tetraspanin), 상피세포부착분자(EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule), IGF-1R, CA125, CD41b, 및 E-카테린(Cadherin) 중 적어도 하나를 포함하여 형성될 수 있다.
- [0017] 그리고, 상기 시료 용액이 상기 유동 채널 내에서 왕복 유동하도록 상기 유동 채널의 양측으로 음압을 인가하는 음압 형성 유닛을 더 포함할 수 있다.
- [0018] 또한, 상기 유동 채널과 연결되고, 상기 소포체 마커와 상기 미세 소포체 간의 결합을 해제시키기 위한 일루션 버퍼 용액이 수용되는 일루션 챔버와, 상기 유동 채널과 연결되어 상기 미세 소포체를 수집하기 위한 수집 챔버를 더 포함하며; 상기 소포체 마커와 상기 미세 소포체 간의 결합 과정이 완료된 후, 상기 음압 형성 유닛에 의한 음압이 상기 일루션 챔버로 인가되어 상기 일루션 버퍼 용액이 상기 유동 채널을 통해 상기 다공성 매질부를 왕복 통과하면서 상기 소포체 마커를 분리한 후 상기 수집 챔버로 유동할 수 있다.
- [0019] 또한, 상기 유동 채널과 연결되고 내부에 세척 용액이 수용되는 세척 챔버를 더 포함하며; 상기 수집 챔버로의 수집 과정 전에, 상기 음압 형성 유닛에 의한 음압이 상기 세척 챔버로 인가되어 상기 세척 용액이 상기 유동 채널을 통해 상기 다공성 매질부를 통과하여 상기 다공성 매질부를 세척할 수 있다.
- [0020] 그리고, 상기 다공성 매질부는 상기 유동 채널 상에 배치되는 패킹 도관과, 상호 간의 사이에 공극이 형성되어 3차원의 다공성 구조가 형성되도록 상기 패킹 도관 내에 상호 밀착되도록 수용되는 복수의 미세 구슬을 포함하며; 상기 소포체 마커는 각각의 상기 미세 구슬의 표면에 적어도 하나씩 형성될 수 있다.
- [0021] 또한, 상기 패킹 도관의 양측에 각각 설치되어 상기 미세 구슬의 유실을 방지하는 메쉬를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 그리고, 상기 다공성 매질부는 3차원의 다공성 구조를 갖는 아가로즈 겔(Agarose gel)을 포함할 수 있다.
- [0023] 한편, 상기 목적은 본 발명의 다른 실시 형태에 따라, 미세 소포체의 분리 방법에 있어서, (a) 3차원 다공성 구조를 갖는 다공성 매질부를 미세 소포체가 포함된 시료 용액이 통과하는 단계와; (b) 상기 다공성 매질부의 다공성 구조 표면에 형성된 소포체 마커에 상기 시료 용액 내의 상기 미세 소포체가 특이적 결합을 통해 포획되는 단계와; (c) 상기 소포체 마커에 포획된 상기 미세 소포체를 분리하여 수집하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0024] 여기서, 상기 (b) 단계에서 상기 미세 소포체와 상기 소포체 마커 간의 특이적 결합은 면역 반응에 의한 결합을 포함할 수 있다.
- [0025] 또한, 상기 미세 소포체는 엑소좀(Exosome)을 포함할 수 있다.
- [0026] 그리고, 상기 소포체 마커는 tCD9, CD63 및 CD81을 포함하는 테트라스판닌(Tetraspanin), 상피세포부착분자(EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule), IGF-1R, CA125, CD41b, 및 E-카테린(Cadherin) 중 적어도 하나를 포함하여 형성될 수 있다.
- [0027] 그리고, 상기 (a) 단계 및 상기 (b) 단계에서는 상기 시료 용액이 상기 다공성 매질부를 왕복 유동하면서 상기 미세 소포체와 상기 소포체 마커가 특이적 결합할 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 (c) 단계는 (c1) 상기 (a) 단계 및 상기 (b) 단계 완료 후, 세척 용액이 상기 다공성 매질부에 투입되어 상기 다공성 매질부가 세척되는 단계와; (c2) 상기 다공성 매질부에 일루션 버퍼 용액이 투입되어 상기 소포체 마커로부터 상기 미세 소포체가 분리되는 단계와; (c3) 상기 소포체 마커로부터 분리된 상기 미세 소포체가 수집 채널로 유동하여 수집되는 단계를 포함할 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 다공성 매질부는 상기 유동 채널 상에 배치되는 패킹 도관과, 상호 간의 사이에 공극이 형성되어 3차원의 다공성 구조가 형성되도록 상기 패킹 도관 내에 상호 밀착되도록 수용되는 복수의 미세 구슬을 포함하며; 상기 소포체 마커는 각각의 상기 미세 구슬의 표면에 적어도 하나씩 형성될 수 있다.
- [0030] 그리고, 상기 패킹 도관의 양측에 각각 설치되어 상기 미세 구슬의 유실을 방지하는 메쉬를 더 포함할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 다공성 매질부는 3차원의 다공성 구조를 갖는 아가로즈 겔(Agarose gel)을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0032] 상기와 같은 구성에 따라, 3차원의 다공성 구조를 이용하여 엑소좀(Exosome)과 같은 미세 소포체를 분리함으로써, 단백질에 의한 오염없이 매우 높은 수율로 미세 소포체를 분리할 수 있을 뿐만 아니라, 간단한 방법으로 인해 분리에 소요되는 시간을 현저히 줄일 수 있는 미세 소포체의 분리 장치 및 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명에 따른 미세 소포체의 분리 장치를 설명하기 위한 도면이고,
 도 2는 본 발명에 따른 미세 소포체의 분리 장치를 구체화한 예를 나타낸 도면이고,
 도 3은 본 발명에 따른 미세 소포체의 분리 방법을 설명하기 위한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하에서는 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 실시예들을 상세히 설명한다.

[0035] 본 발명에 따른 미세 소포체의 분리 장치(300)는, 도 1에 도시된 바와 같이, 유동 채널(330), 다공성 매질부(100) 및 소포체 마커(120)를 포함한다.

[0036] 유동 채널(330)로는 미세 소포체가 포함된 시료 용액이 유동한다. 본 발명에 따른 미세 소포체가 엑소좀인 것을 예로 하며, 이하에서는 미세 소포체가 엑소좀인 것을 예로 하여 설명한다.

[0037] 다공성 매질부(100)는 유동 채널(330)에 설치된다. 여기서, 다공성 매질부(100)는 시료 용액이 통과 가능한 3차원의 다공성 구조를 갖는다. 여기서, '3차원'은 다공성 구조가 유동 채널(330)의 단면과 시료 용액의 유동 방향으로 일정 길이만큼 형성되는 것을 의미한다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 따른 다공성 매질부(100)는, 도 3에 도시된 바와 같이, 패킹 도관(140)과 복수의 미세구슬을 포함할 수 있다.

[0039] 패킹 도관(140)은 유동 채널(330) 상에 배치된다. 여기서, 패킹 도관(140)은 유동 채널(330)의 단면 형상에 대응하도록 형성되어, 패킹 도관(140)을 통해서만 시료 용액이 유동할 수 있도록 구성될 수 있다. 일 예로, 패킹 도관(140)이 유동 채널(330) 내부에 꽂힌 상태로 삽입되거나, 유동 채널(330)의 전단부와 후단부가 패킹 도관(140)을 통해 연결되도록 형성될 수 있다.

[0040] 복수의 미세 구슬(110)은 패킹 도관(140)에 상호 밀착되도록 수용된다. 도 1에 도시된 바와 같이, 미세 구슬(110)이 구형 형태를 가지는 경우, 밀착된 미세 구슬(110)들 사이에는 공극(130)이 형성되어 패킹 도관(140) 내에서 밀착된 미세 구슬(110)에 의해 3차원의 다공성 구조가 형성 가능하게 된다.

[0041] 여기서, 다공성 매질부(100)는 패킹 도관(140)의 양측에 각각 설치되어 미세 구슬(110)의 유실을 방지하는 메쉬(150)를 포함할 수 있다. 메쉬(150)에 형성된 구멍은 구슬의 직경보다 작게 마련되어 미세구슬의 유실이 방지될 수 있다.

[0042] 소포체 마커(120)는 다공성 매질부(100)의 다공성 구조의 표면에 형성된다. 도 1에 도시된 실시예에서는 다공성 구조가 상호 밀착된 복수의 미세 구슬(110)에 의해 형성되는 바, 소포체 마커(120)는 각각의 미세 구슬(110)에 표면에 적어도 하나 이상씩 형성되는 것을 예로 한다.

[0043] 여기서, 소포체 마커(120)는 다공성 매질부(100)를 통과하는 시료 용액 내의 엑소좀과의 특이적 결합을 통해 시료 용액 내의 엑소좀을 포획하게 된다. 본 발명에서는 엑소좀과 소포체 마커(120) 간의 특이적 결합이 면역 반응에 의한 결합인 것을 예로 하는데, 엑소좀의 유형에 따라 다른 특이적 결합이 적용될 수 있음은 물론이다.

[0044] 소포체 마커(120)의 예로, 일반적인 엑소좀의 경우, tCD9, CD63 및 CD81 등과 같은 테트라스판닌(Tetraspanin)이 적용될 수 있다. 다른 예로, 종양 유래 엑소좀의 경우, 소포체 마커(120)로 상피세포부착분자(EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule), IGF-1R, CA125, CD41b, 및 E-카데린(Cadherin) 등이 적용 가능하다. 이외에도, 엑소좀의 유형에 따라 다른 물질이 소포체 마커(120)로 적용될 수 있음은 물론이다.

[0045] 상기와 같은 구성에 따라, 시료 용액이 통과하는 다공성 매질부(100)의 표면적은 3차원의 다공성 구조에 의해 현저히 증가하게 되어, 그 표면에 형성되는 소포체 마커(120)가 시료 용액 내의 엑소좀과 결합할 확률을 높임으로써, 구조가 간단하면서도 엑소좀의 분리 수율을 현저히 높일 수 있는 효과를 제공하게 된다.

[0046] 또한, 폴리머와 같은 부가적인 물질의 첨가없이 분리가 가능하게 되고, 다른 단백질들이 함께 포획되는 문제가

발생하지 않아 단백질에 의한 오염 문제가 발생하지 않게 된다.

- [0047] 그리고, 단지 시료 용액을 다공성 매질부(100)를 통과시키는 과정만으로도 엑소좀의 분리가 가능하게 되어, 기존의 분리 방법들과 대비할 때 소요 시간을 현저히 감소시킬 수 있게 된다.
- [0048] 여기서, 유동 채널(330) 내에서 시료 용액은, 도 1에 도시된 바와 같이, 음압 형성 유닛, 예를 들어 시린지 펌프에 의해 인가되는 음압에 의해 유동하는 것을 예로 하는데, 본 발명에서는 시료 용액이 유동 채널(330) 내에서 왕복 유동하도록 음압 형성 유닛이 유동 채널(330)의 양측으로 각각 음압을 교대로 인가하는 것을 예로 한다. 이를 통해, 시료 용액이 다공성 매질부(100)를 여러번 통과하게 되어 보다 높은 수율로 엑소좀의 포획이 가능하게 된다.
- [0049] 상기와 같이, 다공성 매질부(100) 내의 소포체 마커(120)에 포획된 엑소좀은 일루션 퍼버 용액을 통해 분리되어 수집될 수 있는데, 이에 대한 상세한 설명은 도 2를 참조하여 설명한다.
- [0050] 도 2는 본 발명에 따른 미세 소포체의 분리 장치(300)를 구체화한 예를 나타낸 도면이다. 도 2에서는 분리 장치(300)가 마이크로 칩 형태로 구현된 것을 예로 하고 있다.
- [0051] 도 2를 참조하여 설명하면, 본 발명에 따른 미세 소포체의 분리 장치(300)는 유동 채널(330)이 형성된 마이크로 칩, 다공성 매질부(100), 소포체 마커(120) 및 음압 형성 유닛을 포함할 수 있다. 여기서, 유동 채널(330), 다공성 매질부(100) 및 소포체 마커(120)는 상술한 예에 대응하는 바, 구체적인 설명은 생략한다.
- [0052] 마이크로 칩에는 샘플 챔버(310), 일루션 챔버(340), 수집 챔버(320)가 형성될 수 있다. 또한, 마이크로 칩에는 세척 챔버(350) 및 폐 용액 챔버(360)가 형성될 수 있다. 여기서, 샘플 챔버(310), 일루션 챔버(340), 수집 챔버(320), 세척 챔버(350) 및 폐 용액 챔버(360)는 유동 채널(330)과 연결된다.
- [0053] 샘플 챔버(310)에는 엑소좀을 포함하는 시료 용액이 저장된다. 그리고, 일루션 챔버(340)에는 소포체 마커(120)와 엑소좀 간의 결합을 해제시키기 위한 일루션 버퍼 용액이 수용된다. 그리고, 세척 챔버(350)에는 PBS(Phosphate-Buffered Saline)와 같은 세척 용액이 수용된다. 여기서, 일루션 챔버(340), 세척 챔버(350), 수집 챔버(320) 및 폐 용액 챔버(360)에는 미세 밸브가 설치되어 그 유동을 단속할 수 있다.
- [0054] 상기와 같은 구성을 이용하여 본 발명에 따른 미세 소포체의 분리 방법을, 도 2 및 도 3을 참조하여 설명한다.
- [0055] 먼저, 일루션 챔버(340)의 미세 밸브(V1), 세척 챔버(350)의 미세 밸브(V2), 폐 용액 챔버(360)의 미세 밸브(V3)를 오픈시킨 상태에서, 음압 형성 유닛 P2를 통해 유동 채널(330)로 음압을 제공하게 되면, 샘플 챔버(310) 내의 시료 용액이 유동 채널(330)을 통해 유동하여 다공성 매질부(100)를 통과하게 된다(S10).
- [0056] 다공성 매질부(100)를 통과하는 시료 용액 내의 엑소좀은 다공성 매질부(100)의 표면에 형성된 소포체 마커(120)와 특이적 결합을 통해 결합되어(S20) 소포체 마커(120)에 포획된다.
- [0057] 여기서, 상술한 바와 같이, 음압 형성 유닛 P1 및 P2가 교대로 음압을 인가하여 시료 용액이 유동 채널(330)을 왕복 유동하도록 함으로써, 시료 용액이 다공성 매질부(100)를 정역 방향으로 교대로 통과하면서 보다 더 많은 양의 엑소좀이 소포체 마커(120)와 결합되어 포획되도록 할 수 있다.
- [0058] 상기와 같은 결합 과정이 완료되면, 소포체 마커(120)에 포획된 엑소좀을 분리하여 수집하는 과정이 진행된다(S30).
- [0059] 이에 앞서, 수집 챔버(320)의 미세 밸브(V4)를 오픈시키고, 폐 용액 챔버(360)의 미세 밸브 V3를 온시킨 후, 음압 형성 유닛 P3을 통해 음압을 가하여 유동 채널(330)에 잔존하는 시료 용액을 폐 용액 챔버(360)로 이동시킨다.
- [0060] 그리고, 세척 챔버(350)의 미세 밸브(V2)를 온시킨 후 음압 형성 유닛 P3을 통해 유동 채널(330)로 음압을 인가하게 되면, 세척 챔버(350) 내의 세척 용액이 유동 채널(330)을 통해 유동하여 다공성 매질부(100)와 유동 채널(330)을 세척하게 된다(S31). 이 때, 음압 형성 유닛 P1과 P3이 교대로 음압을 제공하여 세척 용액이 왕복 유동하도록 함으로써, 세척 효율을 높일 수 있다. 세척 과정이 완료되면, 음압 형성 유닛 P3에 의한 음압에 의해 세척 용액이 폐 용액 챔버(360)로 이동하게 된다.
- [0061] 그런 다음, 일루션 챔버(340)의 미세 밸브(V1)와 수집 챔버(320)의 미세 밸브(V4)를 온시키고 폐 용액 챔버(360)의 미세 밸브(V3)를 오픈시킨 후 음압 형성 유닛 P2를 통해 유동 채널(330)로 음압을 인가하게 되면, 일루션 챔버(340) 내의 일루션 버퍼 용액이 유동 채널(330)을 통해 유동하여 다공성 매질부(100)를 통과하게

되는데, 일루션 버퍼 용액에 의해 소포체 마커(120)와 엑소좀 간의 결합이 해제되어(S32), 엑소좀의 분리가 가능하게 된다. 이 때, 음압 형성 유닛 P1과 P2가 교대로 음압을 제공하여 일루션 버퍼 용액이 왕복 유동하도록 함으로써, 보다 많은 소포체 마커(120)와 엑소좀 간의 결합을 해제시킬 수 있다.

[0062] 그런 다음, 음압 형성 유닛 P2가 음압을 인가하게 되면, 일루션 버퍼 용액과 함께 분리된 엑소좀이 수집 챔버(320)로 이동하여 엑소좀이 수집된다(S33).

[0063] 전술한 실시예에서는 다공성 매질부(100)가 패킹 도관(140), 미세 구슬(110)로 구성되는 것을 예로 하여 설명하였다. 이외에도, 다공성 매질부(100)는 3차원의 다공성 구조를 갖는 아가로스 겔(Agarose gel)로 형성할 수 있으며, 3차원의 다공성 구조를 갖는 다른 물질 또는 구조도 본 발명의 기술적 사항에 포함될 수 있음은 물론이다.

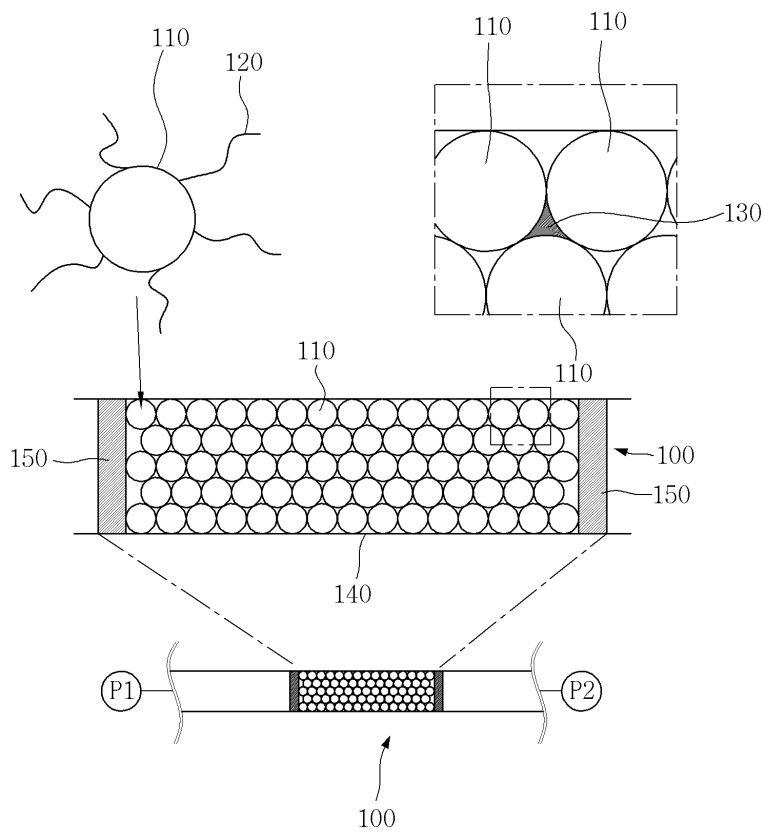
[0064] 비록 본 발명의 몇몇 실시예들이 도시되고 설명되었지만, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 당업자라면 본 발명의 원칙이나 정신에서 벗어나지 않으면서 본 실시예를 변형할 수 있음을 알 수 있을 것이다. 발명의 범위는 첨부된 청구항과 그 균등물에 의해 정해질 것이다.

부호의 설명

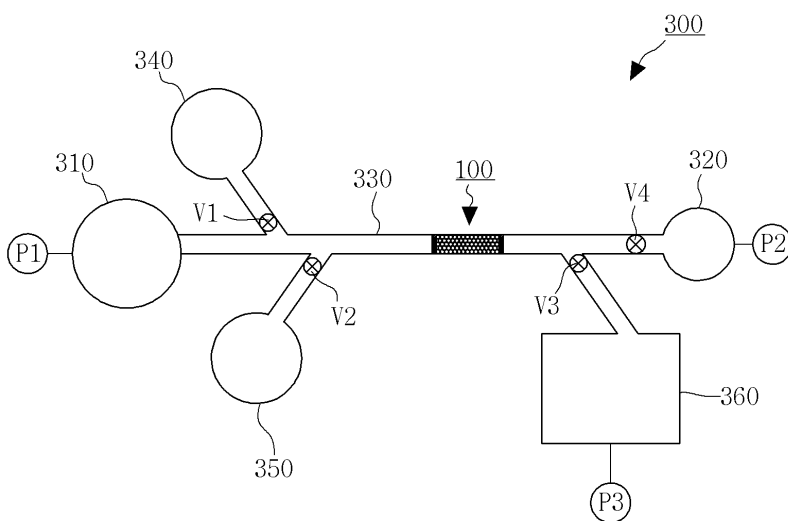
[0065]	100 : 다공성 매질부	110 : 미세 구슬
	120 : 소포체 마커	130 : 공극
	140 : 패킹 튜브	150 : 메쉬
	300 : 분리 장치	310 : 샘플 챔버
	320 : 수집 챔버	330 : 유동 채널
	340 : 일루션 챔버	350 : 세척 챔버
	360 : 폐 용액 챔버	

도면

도면1



도면2



도면3

