(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0146453
(43) 공개일자 2024년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 5/078* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12M 47/12 (2013.01)
C12N 5/0634 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-0041455
(22) 출원일자 2023년03월29일
심사청구일자 2023년03월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
신세현
서울시 서초구 서운로 62 래미안리더스원 106동 503호
박준수
서울특별시 동대문구 안암로 84-16(제기동) 107호
(74) 대리인
최훈식

전체 청구항 수 : 총 16 항

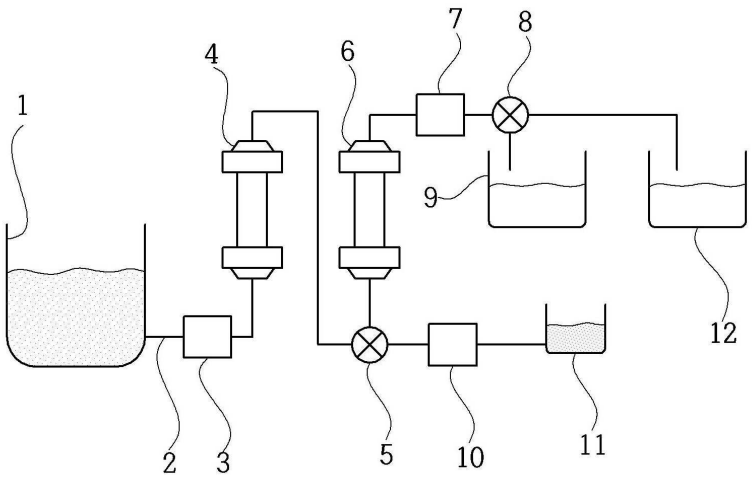
(54) 발명의 명칭 **생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법 및 장치**

(57) 요 약

본 발명은 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법 및 장치에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 세포외 소포체를 대용량의 배양액으로부터 분리하고 추출하기 위해 세포외 소포체가 양이온 물질로 표면이 개질된 다공성 매질로 구성된 필터를 통과하면서 흡착 및 추출되도록 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법 및 장치에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 엑소좀 또는 세포외 소포체를 고순도로 경제적이고 효율적으로 분리 및 정제할 수 있으며, 대량으로 미세 소포체의 분리 및 정제가 가능해져서 GMP에도 적합해지며, 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 엑소좀 또는 세포외 소포체를 높은 수율로 경제적이면서 효율적으로 분리 및 정제할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2509/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

미세 소포체 용액으로부터 미세 소포체를 추출하는 방법으로서,

미세 필터 구조체(6)에 상기 미세 소포체 용액을 통과시키면서 미세 소포체가 상기 미세 필터 구조체(6)에 하전 결합되도록 하는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미세 소포체가 하전 결합된 상기 미세 필터 구조체(6)에 용리액을 투입하여 상기 미세 필터 구조체(6)에 하전 결합된 상기 미세 소포체를 분리하는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미세 필터 구조체(6)는 멤브레인 구조, 메쉬 구조, 구형 비드(beads)의 적층 구조 중 어느 하나의 미세 다공성 구조체로 형성되는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 멤브레인 구조 또는 상기 메쉬 구조의 미세 필터 구조체(6)는 둘 이상의 미세 다공성 구조체 막이 적층된 다중층으로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 미세 다공성 구조체의 표면은 다가 양이온 물질에 의해 개질화된 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 다가 양이온 물질은 폴리라이신, 프로타민, 폴리아르기닌, 폴리히스티딘, 양이온성 덱스트란, 양이온성 덴드리머, 양이온성 폴리사카라이드, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌이민, 폴리쿼터늄, 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(PDMAEMA), 폴리-2-다이메틸아미노메틸 스티렌(PDMAMS), 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP), 폴리 다이에틸아미노에틸 아크릴레이트(pDEAEA), 폴리 다이메틸아미노에틸 아크릴레이트(pDMAEA), 폴리 다이에틸아미노에틸 메타크릴레이트(pDEAMA), 리포폴리아민(lipopolyamines), 4급 암모늄(quaternary ammoniums), 구아니딘(guanidine), 이미다졸(imidazole), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리피롤(polypyrrol) 및 키토산(chitosan) 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 용리액을 투입하여 상기 미세 소포체를 분리하는 단계는

제1시약을 상기 미세 필터 구조체(6)에 투입하고, 제1조건으로 상기 미세 필터 구조체(6)를 세척하는 단계와,

제2시약을 상기 미세 필터 구조체(6)에 투입하고, 제2조건으로 상기 미세 필터 구조체(6)를 세척하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 제1시약은 Cl^-, CH_3COO^-, SO_4^{2-}, HCO^-, SiO^- 및 OH^- 중 어느 하나 이상을 포함하는 물질이며,

상기 제1조건은 pH 5.5 내지 6.5, pH 7.5 내지 9.5 중 어느 하나의 pH 범위 내에서 1회 이상 수행되는 것으로 설정되는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 제2시약은 Cl^-, CH_3COO^-, SO_4^{2-}, HCO^-, SiO^- 및 OH^- 중 어느 하나 이상을 포함하는 것으로서 0.01 M 내지 3 M의 농도의 물질이며,

상기 제2조건은 1분 내지 60분의 시간 동안 500rpm 내지 2000rpm으로 혼합하면서 1회 이상 수행되는 것으로 설정되는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 미세 다공성 구조체는

폴리아크릴레이트, 폴리아크릴아미드, 폴리메타크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜, 폴리스틸렌비닐벤젠, 폴리스티렌, 하이드로겔, 아가로오스, 세라믹, 실리카, 라텍스, 금속 입자, 유리 입자 및 자성 입자 중 어느 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 11

제3항에 있어서,

상기 멤브레인 구조 및 상기 메쉬 구조는 나일론, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate; PET), 폴리락틴산 (Polylactic acid; PLA), Polyethersulfone(PES), Cellulose acetate(CA), Polyvinylidene fluoride(PVDF), Polycarbonate(PC) 중 어느 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 12

미세 소포체 용액으로부터 미세 소포체를 추출하는 방법으로서,

추출 및 정제 대상이 되는 미세 소포체가 포함된 미세 소포체 용액을 준비하는 제1단계와;

상기 미세 소포체 용액을 1차로 여과하는 제2단계와;

1차 여과된 상기 미세 소포체 용액을 2차로 여과하는 제3단계와;

2차 여과된 상기 미세 소포체 용액에 용리액을 투입하여 상기 미세 소포체를 분리하는 제4단계;를 포함하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 제2단계는 예비여과필터(4)에 상기 미세 소포체 용액을 통과시키면서 상기 미세 소포체 용액에 포함된 이

물질, 세포 조각(debris), 프로틴 중 하나 이상을 걸러내는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 제3단계는 미세 필터 구조체(6)에 상기 미세 소포체 용액을 통과시키면서 미세 소포체가 상기 미세 필터 구조체(6)에 하전 결합되도록 하는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 제4단계는 상기 미세 소포체가 하전 결합된 상기 미세 필터 구조체(6)에 용리액을 투입하여 상기 미세 필터 구조체(6)에 하전 결합된 상기 미세 소포체를 분리하는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법.

청구항 16

미세 소포체 용액으로부터 미세 소포체를 추출하는 장치로서,

추출 및 정제 대상이 되는 미세 소포체가 포함된 미세 소포체 용액을 저장 및 공급하는 제1공급용기(1)와;

상기 제1공급용기(1)로부터 유입되는 상기 미세 소포체 용액을 1차로 여과하여 상기 미세 소포체 용액에 포함된 이물질, 세포 조각(debris), 프로틴 중 하나 이상을 걸러내는 예비여과필터(4)와;

1차 여과된 상태로 상기 예비여과필터(4)로부터 유입되는 상기 미세 소포체 용액을 2차로 여과하여 상기 미세 소포체가 하전 결합되도록 하는 미세 필터 구조체(6)와;

상기 미세 필터 구조체(6)에 하전 결합된 상기 미세 소포체를 분리하는 용리액을 저장 및 공급하는 제2공급용기(11)와;

상기 미세 필터 구조체(6)에서 분리된 상기 미세 소포체를 함유하는 상기 용리액을 저장하는 제2저장용기(12);를 포함하는, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 장치.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법 및 장치에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 세포외 소포체를 대용량의 배양액으로부터 분리하고 추출하기 위해 세포외 소포체가 양이온 물질로 표면이 개질된 다공성 매질로 구성된 필터를 통과하면서 흡착 및 추출되도록 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법 및 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 세포 분비물(secretome)에 세포의 행동을 제어하는 다양한 생체활성인자가 포함되어 있다는 연구가 보고되고 있으며, 특히 세포 분비물 내에는 세포 간 신호전달 기능을 갖는 나노 소포체인 '엑소좀(exosome)' 또는 '세포외 소포체(extracellular vesicles; EV)'가 포함되어 있어 그 성분과 기능에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다.

[0003] 세포는 세포외 환경에 다양한 막(membrane) 유형의 소포체를 방출하는데, 통상 이러한 방출 소포체들을 세포외 소포체라고 부르고 있다. 세포외 소포체는 세포막 유래 소포체, 엑토좀(ectosomes), 쉐딩 소포체(shedding vesicles), 마이크로파티클(microparticles), 엑소좀 등으로 불려지기도 하며, 경우에 따라서는 엑소좀과는 구별되어 사용되기도 한다.

[0004] 본 발명에서는 세포외 소포체와 엑소좀을 합쳐서 미세 소포체라고 정의한다.

[0005] 엑소좀은 세포막의 구조와 동일한 이중 인지질막으로 이루어진 수십 내지 수백 나노미터 크기의 소포체로서, 내

부에는 엑소좀 카고(cargo)라고 불리는 단백질, mRNA, miRNA 등이 포함되어 있다. 엑소좀 카고에는 광범위한 신호 전달 요소들(signaling factors)이 포함되며, 이들 신호전달 요소들은 세포 타입에 특이적이고 분비세포의 환경에 따라 상이하게 조절되는 것으로 알려져 있다.

[0006] 엑소좀은 세포가 분비하는 세포 간 신호전달 매개체로서 이를 통해 전달된 다양한 세포 신호는 표적 세포의 활성화, 성장, 이동, 분화, 탈분화, 사멸(apoptosis), 괴사(necrosis)를 포함한 세포 행동을 조절한다고 알려져 있다.

[0007] 엑소좀은 유래된 세포의 성질 및 상태에 따라 특이적인 유전물질과 생체활성 인자들이 포함되어 있다. 증식하는 줄기세포 유래 엑소좀의 경우 세포의 이동, 증식 및 분화와 같은 세포 행동을 조절하고, 조직 재생과 관련된 줄기세포의 특성이 반영되어 있다(Nature Review Immunology 2002 (2) 569-579).

[0008] 이와 같은 엑소좀 또는 세포외 소포체를 분리하는 종래 기술로는 초원심분리법(ultracentrifugation), 밀도구배원심법(density gradient centrifugation), 초미세여과법(ultrafiltration), 사이즈 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography), 면역친화성 분리법(immunoaffinity capture), 미세유체기술 분리법(microfluidics-based isolation), 침전법(exosome precipitation), 총엑소좀 추출 키트(total exosome isolation kit), 또는 폴리머 기반 침전법(polymer based precipitation), 접선 유동 여과법 (Tangential Flow Filtration) 등이 있다.

[0009] 초원심분리법(ultracentrifugation)은 엑소좀 또는 세포외 소포체를 분리하는데 지금까지 가장 널리 사용되었던 방법이나, 수율이 낮고, 분리하는데 시간이 많이 소요되며 노동집약적이고, 비싼 기기가 필요하다는 단점이 있다. 또한, 초원심분리법은 분리과정에서 엑소좀 또는 세포외 소포체에 손상을 줄 수 있어 후속 분석 과정이나 응용에 지장을 줄 수 있는 단점이 있다.

[0010] 초미세여과법(ultrafiltration)은 초원심분리법과 함께 사용되어, 엑소좀 또는 세포외 소포체의 순도를 높일 수 있지만, 엑소좀 또는 세포외 소포체가 필터에 달라붙어 분리 후의 수율이 낮다는 문제점이 있다.

[0011] 면역친화성 분리법은 항체를 엑소좀 또는 세포외 소포체에 붙여서 분리하는 방법으로 특이도가 높은 장점이 있지만, 항체를 만드는 과정과 분리 후 항체를 제거하는 과정이 필요하고 비용이 많이 드는 단점이 있으며 스케일-업(scale-up)에 부적합한 방식이다.

[0012] 한편, 최근에는 엑소좀을 분리하는 방법으로 침전법(exosome precipitation), 총엑소좀 추출 키트(total exosome isolation kit), 또는 폴리머 기반 침전법(polymer based precipitation) 등의 다양한 엑소좀 분리 키트가 상업적으로 판매되고 있으나, 사용이 간편한 대신 시약값이 고가여서 실험실 수준에서 엑소좀 또는 세포외 소포체를 분리하기 위해 사용될 수는 있어도 대량으로 엑소좀 또는 세포외 소포체를 분리 및 정제하기에는 적합하지 않은 문제가 있다.

[0013] 접선 유동 여과법 (Tangential Flow Filtration)은 멤브레인 필터 표면과 평행하게 유체를 이동시키며 타겟물질을 여과시키는 방식으로서 연속 공정으로 대용량의 시료를 처리할 수 있는 장점을 가지고 있으나, 회수율은 앞선 사용기술인 침전법 대비 매우 낮은 것으로 알려져 있다.

[0014] 무엇보다도 엑소좀 또는 세포외 소포체의 분리과정에서 문제가 되는 것은 단백질과 같은 불순물이 섞여 함께 분리되면서 순도나 수율이 낮다는 점이다.

[0015] 또한, 엑소좀 또는 세포외 소포체의 분리 및 정제에는 시간이 많이 소모되고 번거롭고 비용이 많이 소모된다.

[0016] 또한, 순도를 높이기 위해 개발된 기존의 분리 방법은 스케일-업(scale-up)을 어렵게 하고, GMP(Good Manufacturing Practice)에 부적합한 문제가 있다.

[0017] 따라서, 본 발명이 속한 기술분야에서는 엑소좀 또는 세포외 소포체를 고순도로 경제적이고 효율적으로 분리 및 정제할 수 있는 동시에 스케일-업(scale-up)이 가능하고 GMP(Good Manufacturing Practice)에도 적합한 기술에 대한 요구가 꾸준히 계속되고 있다. 즉, 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 엑소좀 또는 세포외 소포체를 높은 수율로 경제적이면서 효율적으로 분리 및 정제하는 새로운 기술이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0018] (특허문헌 0001) KR 10-2020-0099489 A

(특허문헌 0002) KR 10-2018-0118326 A

(특허문헌 0003) KR 10-2021-0131905 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 전술한 문제점을 해결하기 위한 본 발명은 대용량의 미세 소포체 배양액에서 생성된 세포외 소포체 및 엑소좀이 음의 하전 특성을 갖는 것을 이용하여 미세입자나 멤브레인 등의 포획표면에 양이온 물질을 부착시키고, 표면에 미세 소포체가 효과적으로 흡착되도록 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법 및 장치를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0020] 또한 미세 소포체가 부착될 표면적을 증대시키기 위하여 미세 구조의 다공성 매질로 여과부를 구성하여 미세 소포체의 포획 효율을 획기적으로 증대시키도록 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법 및 장치를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0021] 또한, 다공성 매질로 구성된 장치가 필터 형태로 구성되도록 함으로써 연속 공정으로 대용량의 배양액을 처리하여 미세 소포체의 추출 및 정제 효율을 향상시키도록 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법 및 장치를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0022] 전술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 본 발명은 미세 소포체 용액으로부터 미세 소포체를 추출하는 방법으로서, 미세 필터 구조체(6)에 상기 미세 소포체 용액을 통과시키면서 미세 소포체가 상기 미세 필터 구조체(6)에 하전 결합되도록 하는 것을 특징으로 한다.

[0023] 상기 미세 소포체가 하전 결합된 상기 미세 필터 구조체(6)에 용리액을 투입하여 상기 미세 필터 구조체(6)에 하전 결합된 상기 미세 소포체를 분리하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 상기 미세 필터 구조체(6)는 멤브레인 구조, 메쉬 구조, 구형 비드(beads)의 적층 구조 중 어느 하나의 미세 다공성 구조체로 형성되는 것을 특징으로 한다.

[0025] 상기 멤브레인 구조 또는 상기 메쉬 구조의 미세 필터 구조체(6)는 둘 이상의 미세 다공성 구조체 막이 적층된 다중층으로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0026] 상기 미세 다공성 구조체의 표면은 다가 양이온 물질에 의해 개질화된 것을 특징으로 한다.

[0027] 상기 다가 양이온 물질은 폴리라이신, 프로타민, 폴리아르기닌, 폴리히스티딘, 양이온성 덱스트란, 양이온성 덴드리머, 양이온성 폴리사카라이드, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌이민, 폴리쿼터늄, 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(PDMAEMA), 폴리-2-다이메틸아미노메틸 스티렌(PDMAMS), 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP), 폴리 다이에틸아미노에틸 아크릴레이트(pDEAEA), 폴리 다이메틸아미노에틸 아크릴레이트(pDMAEA), 폴리 다이에틸아미노에틸 메타크릴레이트(pDEAMA), 리포폴리아민(lipopolyamines), 4급 암모늄(quaternary ammoniums), 구아니딘(guanidine), 이미다졸(imidazole), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리피롤(polypyrrol) 및 키토산(chitosan) 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0028] 상기 용리액을 투입하여 상기 미세 소포체를 분리하는 단계는 제1시약을 상기 미세 필터 구조체(6)에 투입하고, 제1조건으로 상기 미세 필터 구조체(6)를 세척하는 단계와, 제2시약을 상기 미세 필터 구조체(6)에 투입하고, 제2조건으로 상기 미세 필터 구조체(6)를 세척하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0029] 상기 제1시약은 Cl^-, CH_3COO^-, SO_4^{2-}, HCO^-, SiO^- 및 OH^- 중 어느 하나 이상을 포함하는 물질이며, 상기 제1조건은 pH 5.5 내지 6.5, pH 7.5 내지 9.5 중 어느 하나의 pH 범위 내에서 1회 이상 수행되는 것으로 설정되는 것을 특징으로 한다.

[0030] 상기 제2시약은 Cl^-, CH_3COO^-, SO_4^{2-}, HCO^-, SiO^- 및 OH^- 중 어느 하나 이상을 포함하는 것으로서 0.01 M 내지 3 M

의 농도의 물질이며, 상기 제2조건은 1분 내지 60분의 시간 동안 500rpm 내지 2000rpm으로 혼합하면서 1회 이상 수행되는 것으로 설정되는 것을 특징으로 한다.

[0031] 상기 미세 다공성 구조체는 폴리아크릴레이트, 폴리아크릴아미드, 폴리메타크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜, 폴리스틸렌비닐벤젠, 폴리스티렌, 하이드로겔, 아가로오스, 세라믹, 실리카, 라텍스, 금속 입자, 유리 입자 및 자성 입자 중 어느 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0032] 상기 멤브레인 구조 및 상기 메쉬 구조는 나일론, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate; PET), 폴리락틴산 (Polylactic acid; PLA), Polyethersulfone(PES), Cellulose acetate(CA), Polyvinylidene fluoride(PVDF), Polycarbonate(PC) 중 어느 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0033] 다른 실시예에 따른 본 발명은 미세 소포체 용액으로부터 미세 소포체를 추출하는 방법으로서, 추출 및 정제 대상이 되는 미세 소포체가 포함된 미세 소포체 용액을 준비하는 제1단계와; 상기 미세 소포체 용액을 1차로 여과하는 제2단계와; 1차 여과된 상기 미세 소포체 용액을 2차로 여과하는 제3단계와; 2차 여과된 상기 미세 소포체 용액에 용리액을 투입하여 상기 미세 소포체를 분리하는 제4단계;를 포함한다.

[0034] 상기 제2단계는 예비여과필터(4)에 상기 미세 소포체 용액을 통과시키면서 상기 미세 소포체 용액에 포함된 이물질, 세포 조각(debris), 프로틴 중 하나 이상을 걸러내는 것을 특징으로 한다.

[0035] 상기 제3단계는 미세 필터 구조체(6)에 상기 미세 소포체 용액을 통과시키면서 미세 소포체가 상기 미세 필터 구조체(6)에 하전 결합되도록 하는 것을 특징으로 한다.

[0036] 상기 제4단계는 상기 미세 소포체가 하전 결합된 상기 미세 필터 구조체(6)에 용리액을 투입하여 상기 미세 필터 구조체(6)에 하전 결합된 상기 미세 소포체를 분리하는 것을 특징으로 한다.

[0037] 또 다른 실시예에 따른 본 발명은 미세 소포체 용액으로부터 미세 소포체를 추출하는 장치로서, 추출 및 정제 대상이 되는 미세 소포체가 포함된 미세 소포체 용액을 저장 및 공급하는 제1공급용기(1)와; 상기 제1공급용기(1)로부터 유입되는 상기 미세 소포체 용액을 1차로 여과하여 상기 미세 소포체 용액에 포함된 이물질, 세포 조각(debris), 프로틴 중 하나 이상을 걸러내는 예비여과필터(4)와; 1차 여과된 상태로 상기 예비여과필터(4)로부터 유입되는 상기 미세 소포체 용액을 2차로 여과하여 상기 미세 소포체가 하전 결합되도록 하는 미세 필터 구조체(6)와; 상기 미세 필터 구조체(6)에 하전 결합된 상기 미세 소포체를 분리하는 용리액을 저장 및 공급하는 제2공급용기(11)와; 상기 미세 필터 구조체(6)에서 분리된 상기 미세 소포체를 함유하는 상기 용리액을 저장하는 제2저장용기(12);를 포함한다.

발명의 효과

[0038] 본 발명에 따르면, 엑소좀 또는 세포외 소포체를 고순도로 경제적이고 효율적으로 분리 및 정제할 수 있으며, 대량으로 미세 소포체의 분리 및 정제가 가능해져서 GMP에도 적합해지며, 고순도이면서 입자크기 분포가 균일한 엑소좀 또는 세포외 소포체를 높은 수율로 경제적이면서 효율적으로 분리 및 정제할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 미세 소포체 추출장치의 구조를 나타낸 개념도.

도 2는 본 발명의 미세 소포체 추출방법의 과정을 나타낸 순서도.

도 3은 미세 소포체의 여과 과정을 나타낸 개념도.

도 4는 미세 소포체의 분리 과정을 나타낸 개념도.

도 5는 미세 필터 구조체의 구조를 나타낸 단면도.

도 6은 미세 필터 구조체에 미세 소포체가 흡착된 상태를 나타낸 단면도.

도 7은 메쉬 여과부에 미세 소포체가 흡착된 상태를 나타낸 단면도.

도 8은 메쉬 구조의 미세 필터 구조체의 적층 수량에 따른 추출 농도 결과를 나타낸 그래프.

도 9는 메쉬 구조의 미세 필터 구조체의 적층 수량에 따른 핵산 발현 결과를 나타낸 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하에서 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 따른 "생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 방법 및 장치"를 설명한다.

[0041] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 미세 소포체 추출장치의 구조를 나타낸 개념도이며, 도 2는 본 발명의 미세 소포체 추출방법의 과정을 나타낸 순서도, 도 3은 미세 소포체의 여과 과정을 나타낸 개념도, 도 4는 미세 소포체의 분리 과정을 나타낸 개념도이다.

[0042] 본 발명은 생물학적 샘플에 포함된 세포나 바이러스 등으로부터 세포외 소포체 또는 엑소좀을 대량으로 추출 및 정제하기 위한 기술로서, 연속적으로 대량의 배양액을 투입하면서 2단계에 걸친 여과 과정과 미세 소포체 분리 과정을 적용하는 것을 특징으로 한다.

[0043] 이를 위해 도 1에 도시된 바와 같은 "생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 대량으로 추출하고 정제하는 장치"(이하, '추출장치'라 한다)를 추출 및 정제 공정에 적용한다.

[0044] 본 발명의 추출장치는 대량의 미세 소포체 용액(세포외 소포체 또는 엑소좀이 배양된 상태의 용액)을 공급하는 수단과, 미세 소포체 용액에서 미세 소포체를 여과하는 수단과, 여과 후 필터에서 미세 소포체를 분리하는 수단으로 구성될 수 있다.

[0045] 제1공급용기(1)에는 미세 소포체 용액이 저장되며, 이송배관(2)을 통해 미세 소포체 용액을 연속적으로 공급한다. 본 발명의 추출장치에 포함된 각각의 구성요소는 모두 이송배관(2)을 통해 연결되며, 특별한 설명이 없는 한 동일한 구조의 이송배관(2)으로 연결되는 것으로 설명한다.

[0046] 제1펌프(3)는 양압 또는 음압의 발생을 통해 제1공급용기(1)에 저장된 대량의 미세 소포체 용액을 뒷부분에 연결된 필터로 이송한다.

[0047] 제1펌프(3)와 이송배관(2)으로 연결된 예비여과필터(4)의 유입구에는 미세 소포체 용액이 투입된다. 예비여과필터(4)는 미세 소포체 용액에 포함된 이물질이나 세포 조각(debris), 프로틴 등을 1차적으로 걸러준다. 예비여과필터(4)에는 여과 대상이 되는 물질의 평균적인 크기에 비해서 더 작은 통공이 형성된 멤브레인이나 메쉬, 미세입자층, 다공성물질 등이 적용될 수 있다. 예비여과필터(4)에 형성된 통공 보다 더 큰 크기를 갖는 이물질 등은 예비여과필터(4)를 통과하지 못하고 걸러진다.

[0048] 예비여과필터(4)의 유출구에 연결된 이송배관(2)은 제1밸브(5)에 연결된다. 제1밸브(5)는 3-way 밸브 구조로 되어 있는 것이 바람직하다. 제1밸브(5)는 두 개의 유입구와 한 개의 유출구로 이루어지는 것이 일반적이며, 예비여과필터(4)의 유출구에 연결된 이송배관(2)은 두 개의 유입구 중 첫 번째 유입구에 연결된다. 제1밸브(5)의 개폐동작에 의해 두 개의 유입구는 한 개의 유출구에 선택적으로 연결될 수 있다.

[0049] 제1밸브(5)의 유출구는 미세 필터 구조체(6)의 유입구에 연결된다. 따라서 예비여과필터(4)를 통과한 미세 소포체 용액은 이물질 등이 제거된 상태에서 제1밸브(5)를 거쳐서 미세 필터 구조체(6)에 유입된다.

[0050] 미세 필터 구조체(6)는 다수의 통공이 형성된 미세 다공성 구조체로 형성되며, 미세 다공성 구조체를 미세 소포체 용액이 통과하면서 미세 소포체가 미세 다공성 구조체에 잔류하는 방식으로 여과가 이루어진다. 미세 다공성 구조체의 표면에는 특정 전하를 갖는 물질이 부착된 형태로 제작되며, 미세 소포체가 필터의 물질의 표면에 전하에 의해 결합된다. 통상적으로 미세 소포체 용액에 포함된 세포외 소포체나 엑소좀은 음의 하전 특성을 가지므로, 미세 필터 구조체(6) 내부의 미세 다공성 구조체의 물질 표면에는 양의 하전 특성을 가지는 다가 양이온 물질로 개질화하는 것이 바람직하다.

[0051] 미세 필터 구조체(6)의 표면 개질화에 사용되는 다가 양이온 물질은 폴리라이신, 프로타민, 폴리아르기닌, 폴리히스티딘, 양이온성 덱스트란, 양이온성 덴드리머, 양이온성 폴리사카라이드, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌이민, 폴리퀴터늄, 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(PDMAEMA), 폴리-2-다이메틸아미노메틸 스티렌(PDMAMS), 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP), 폴리 다이에틸아미노에틸 아크릴레이트(pDEAEA), 폴리 다이메틸아미노에틸 아크릴레이트(pDMAEA), 폴리 다이에틸아미노에틸 메타크릴레이트(pDEAMA), 리포폴리아민(lipopolyamines), 4급 암모늄(quaternary ammoniums), 구아니딘(guanidine), 이미다졸(imidazole), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리피롤(polypyrrol) 및 키토산(chitosan) 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0052] 미세 필터 구조체(6)에 적용되는 미세 다공성 구조체는 구형 비드(beads)의 적층 구조를 포함하는 미세입자 구조, 멤브레인 구조, 메쉬 구조 중 어느 하나의 구조로 형성될 수 있다.

[0053] 미세입자 구조인 경우에는 적층 구조 내부에 공극이 형성되어 미세 소포체 용액이 통과하면서 내부에 포함된 미세 소포체가 미세입자의 표면에 하전 결합되도록 구성된다. 미세입자의 표면에 부착된 양이온 물질은 음의 하전을 갖는 미세 소포체를 전기적인 인력으로 끌어당겨 결합하므로, 미세입자 사이의 공극의 크기가 미세 소포체의 크기에 비해 작을 필요가 없다. 오히려 미세 소포체 용액의 원활한 통과가 가능할 정도의 크기를 갖는 것이 바람직하다.

[0054] 미세입자와 공극의 크기는 소재에 따라 달라질 수 있으나, 구형의 미세입자를 기준으로 미세 소포체와 미세입자의 직경의 비율은 1:5 내지 1:10인 것이 바람직하다. 이러한 크기의 미세입자를 사용할 경우, 내부에 형성되는 공극의 크기는 미세 소포체의 직경에 비해서 2배 내지 5배 정도가 될 수 있다.

[0055] 본 발명에 사용되는 미세입자는 폴리아크릴레이트, 폴리아크릴아미드, 폴리메타크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜, 폴리스틸렌비닐벤젠, 폴리스티렌, 하이드로겔, 아가로오스, 세라믹, 실리카, 라텍스, 금속 입자, 유리 입자 및 자성 입자 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0056] 미세 필터 구조체(6)는 멤브레인 구조 또는 메쉬 구조로 형성될 수도 있으며, 이 경우에는 다가 양이온 물질이 흡착 가능한 소재가 사용된다. 멤브레인이나 메쉬의 소재로는 나일론, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate; PET), 폴리락틴산 (Polylactic acid; PLA), Polyethersulfone(PES), Cellulose acetate(CA), Polyvinylidene fluoride(PVDF), Polycarbonate(PC) 중 어느 하나 이상이 사용될 수 있다. 전술한 미세입자 구조와 동일하게 멤브레인이나 메쉬에도 다가 양이온 물질이 표면에 흡착된 상태로 제작된다.

[0057] 멤브레인 구조나 메쉬 구조는 단일층일 수 있으며, 경우에 따라서는 여과 효 율을 높이기 위해 다중층일 수도 있다. 다중층으로 구성하는 경우에는 10개 이상의 단일층을 적층한 구조로 형성하는 것이 바람직하다.

[0058] 미세 필터 구조체(6)의 유출구에 연결된 이송배관(2)은 제2펌프(7)에 연결된다. 제2펌프(7)는 양압 또는 음압의 발생을 통해 미세 소포체 용액 또는 용리액이 미세 필터 구조체(6)를 통과하도록 한다.

[0059] 제2펌프(7)는 제2밸브(8)에 연결된다. 제2밸브(8)는 제1밸브(5)와 동일하게 3-way 밸브 구조로 되어 있는 것이 바람직하지만 유입구와 유출구의 수는 다르게 구성된다. 제2밸브(8)는 한 개의 유입구와 두 개의 유출구로 이루어지는 것이 일반적이며, 미세 필터 구조체(6)의 유출구에 연결된 이송배관(2)은 한 개의 유입구에 연결된다. 제2밸브(8)의 개폐동작에 의해 두 개의 유출구는 한 개의 유입구에 선택적으로 연결될 수 있다.

[0060] 제2밸브(8)의 전환 동작에 의해 두 개의 유출구 중에서 첫 번째 유출구는 제1저장용기(9)에 연결된다. 미세 필터 구조체(6)를 통과한 미세 소포체 용액은 미세 소포체가 제거된 상태에서 제2밸브(8)를 거쳐서 제1저장용기(9)에 유입된다. 미세 소포체 용액에 포함된 세포외 소포체 및 엑소좀은 대부분 미세 필터 구조체(6)에 흡착된 상태이므로, 제1저장용기(9)에 저장되는 용액에는 세포외 소포체 및 엑소좀이 미량만 남아있는 상태가 된다.

[0061] 한편, 제3펌프(10)는 제1밸브(5)의 두 개의 유입구 중 두 번째 유입구에 연결된다. 그리고 제3펌프(10)는 제2공급용기(11)의 유출구에 연결된다. 따라서 제2공급용기(11)에 저장된 용리액이 제3펌프(10)의 압력에 의해 제1밸브(5)를 통과해서 미세 필터 구조체(6)에 유입된다. 미세 필터 구조체(6)에 유입된 용리액은 미세입자나 멤브레인, 메쉬에 흡착된 미세 소포체를 용해시킨다. 용해된 미세 소포체가 함유된 용리액은 제2밸브(8)를 통과한 후, 제2저장용기(12)에 유입된다. 이를 위해 제2밸브(8)는 두 개의 유출구 중에서 두 번째 유출구를 통한 이동경로가 형성되도록 전환된다. 이로 인해 용리액은 제2저장용기(12)에 저장된다.

[0062] 용리액을 사용한 용리과정은 단일 과정으로 구성될 수 있으나, 용리 효율을 높이기 위해 다중 과정으로 구성될 수도 있다. 본 발명에서는 두 종류의 용리액을 순차적으로 투입하여 용리 효율을 향상시킬 수 있다.

[0063] 첫 번째는 제1시약을 이용하여 제1조건으로 미세 필터 구조체(6)를 1차 세척하도록 구성한다. 제1시약은 Cl^-, CH_3COO^-, SO_4^{2-}, HCO^-, SiO^- 및 OH^- 중 어느 하나 이상을 포함하는 물질이 사용될 수 있다. 그리고, 제1조건은 pH 5.5 내지 6.5, pH 7.5 내지 9.5 중 어느 하나의 pH 범위 내에서 1회 이상 수행되는 것으로 설정할 수 있다.

[0064] 두 번째는 제2시약을 이용하여 제2조건으로 미세 필터 구조체(6)를 2차 세척하도록 구성한다. 제2시약은 Cl^-, CH_3COO^-, SO_4^{2-}, HCO^-, SiO^- 및 OH^- 중 어느 하나 이상을 포함하는 물질이 사용될 수 있는데, 0.01 M 내지 3 M의 농도로 사용하는 것이 바람직하다. 그리고 제2조건은 1분 내지 60분의 시간 동안 500rpm 내지 2000rpm으로 혼합하면서 1회 이상 수행되는 것으로 설정할 수 있다.

[0065] 이와 같은 추출장치를 이용한 추출방법과 그 순서는 도 2에 도시된 내용과 동일하다.

[0066] 먼저, 추출 및 정제 대상이 되는 미세 소포체가 포함된 미세 소포체 용액을 준비한다.(S102)

[0067] 그리고 제1펌프(3) 또는 제2펌프(7)를 동작시키면서 제1공급용기(1)에 저장된 미세 소포체 용액이 예비여과필터(4)와 미세 필터 구조체(6)를 거치면서 여과되도록 하고, 배출된 용액을 제1저장용기(9)에 저장한다.(S104, S106) 이 상태에서 제1밸브(5)는 예비여과필터(4)와 미세 필터 구조체(6) 사이에 이동경로가 형성되도록 제어되며, 제2밸브(8)는 제2펌프(7)와 제1저장용기(9) 사이에 이동경로가 형성되도록 제어된다.

[0068] 미세 필터 구조체(6)의 여과가 완료되면, 제2공급용기(11)에 저장된 용리액을 미세 필터 구조체(6)에 투입한다.(S108) 이 상태에서 제1밸브(5)는 제3펌프(10)와 미세 필터 구조체(6) 사이에 이동경로가 형성되도록 전환되며, 제2밸브(8)는 제2펌프(7)와 제2저장용기(12) 사이에 이동경로가 형성되도록 전환된다.

[0069] 전술한 바와 같이, 용기 과정은 제1시약을 제1조건으로 투입하는 단계와, 제2시약을 제2조건으로 투입하는 단계로 진행될 수 있다.

[0070] 이와 같이 미세 소포체가 분리된 상태로 저장된 제2저장용기(12)의 분리 용액을 별도의 공정을 거쳐 처리함으로써 미세 소포체의 추출 및 정제 과정이 완료된다.

[0071] 한편, 도 5는 미세 필터 구조체의 구조를 나타낸 단면도이며, 도 6은 미세 필터 구조체에 미세 소포체가 흡착된 상태를 나타낸 단면도이다.

[0072] 전술한 바와 같이, 여과막(61)이 미세입자(63) 구조로 이루어지는 경우에는 미세입자(63) 사이의 공극(64)의 크기가 미세 소포체(EV)의 크기 보다 상대적으로 더 크게 형성한다. 미세입자(63)는 여과막(61)과 측벽(62)의 사이에 적층된다. 그리고 여과막(61)은 다중층으로 형성될 수 있다.

[0073] 미세 소포체(EV)는 미세입자(63)의 표면에 흡착된 양이온 물질에 의해 하전 결합된다. 미세 소포체의 크기가 공극(64)의 크기에 비해 상대적으로 더 작기 때문에 미세 소포체가 충분히 흡착된 상태에서도 미세 소포체 용액은 원활하게 통과할 수 있다.

[0074] 한편, 도 7은 메쉬 여과부에 미세 소포체가 흡착된 상태를 나타낸 단면도이다.

[0075] 멤브레인 구조 또는 메쉬 구조인 경우에도 격자 형태의 원사(65)에 의해 형성되는 공극의 크기가 여전히 미세 소포체의 크기에 비해 상당히 크기 때문에 원사(65)에 미세 소포체가 충분히 흡착된 상태에서도 미세 소포체의 용액은 원활하게 이동할 수 있다.

[0076] 도 8은 메쉬 구조의 미세 필터 구조체의 적층 수량에 따른 추출 농도 결과를 나타낸 그래프이며, 도 9는 메쉬 구조의 미세 필터 구조체의 적층 수량에 따른 핵산 발현 결과를 나타낸 그래프이다.

[0077] 도 8은 메쉬 구조의 적층 수량에 따라 세포밖 소포체가 회수된 수를 보여주는 입자 농도 결과를 나타낸 그래프이며, 도 9는 메쉬 구조의 적층 수량에 따라 회수된 세포밖 소포체 내부에 존재하는 두 개의 특정 miRNA에 대한 핵산증폭 결과를 나타낸 그래프이다. 본 실험에서는 1㎖의 혈장(Plasma)을 분석해서 나온 데이터를 사용하였다.

[0078] 도 8에 도시된 그래프는 메쉬로 구성된 미세 다공성 구조체 막을 단일층(1장)으로 구성했을 때와 둘 이상의 다중층(특히 10장, 20장, 30장)으로 구성했을 때의 세포밖 소포체 회수율이 지수함수적으로 증가하는 것을 나타내고 있다. 즉, 미세 다공성 구조체 막의 적층 수가 많아질수록 단위 질량당 추출되는 미세 소포체의 수가 증가한다는 점을 알 수 있다.

[0079] 도 9에 도시된 그래프는 메쉬로 구성된 미세 다공성 구조체 막을 단일층(1장)으로 구성했을 때와 다중층(10장, 20장, 30장)으로 구성했을 때의 ΔCt 값의 변화를 나타내고 있다. 즉, 미세 다공성 구조체 막의 적층 수가 많아질수록 미세 소포체 등 핵산량이 많아져서 일정 값까지 증폭하는데 소요되는 PCR의 사이클 수가 적게 소요된다는 점을 알 수 있다.

[0080] 도 8과 9를 통해 알 수 있는 바와 같이, 단일층 보다 다중층으로 구성했을 때, 여과막의 적층 수가 많아질수록 미세 소포체 등의 회수율이 크게 향상된다. 혈장에 대한 추출실험을 통해 대략 30-50 정도의 미세 다공성 구조체 막의 다중층을 형성하는 것이 가장 효율적인 것으로 생각된다.

[0081] 그리고 미세 다공성 구조체 막의 다중층 형성에 따른 성능향상은 멤브레인 구조로 된 미세 다공성 구조체 막에도 동일하게 적용될 수 있다. 멤브레인 구조에 있어서도 단일층 보다 다중층으로 구성했을 때 미세 소포체의 추출 및 회수 효과가 증대된다.

[0082] 이와 같은 구조의 추출장치 및 추출방법을 사용함으로써 300L 이상의 대용량 용액을 시간당 100L 이상 처리하는 장치를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

[0083] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 설명하였지만, 상술한 본 발명의 기술적 구성은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자가 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해되어야 하고, 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

부호의 설명

[0084] 1 : 제1공급용기 2 : 이송배관

3 : 제1펌프 4 : 예비여과필터

5 : 제1밸브 6 : 미세 필터 구조체

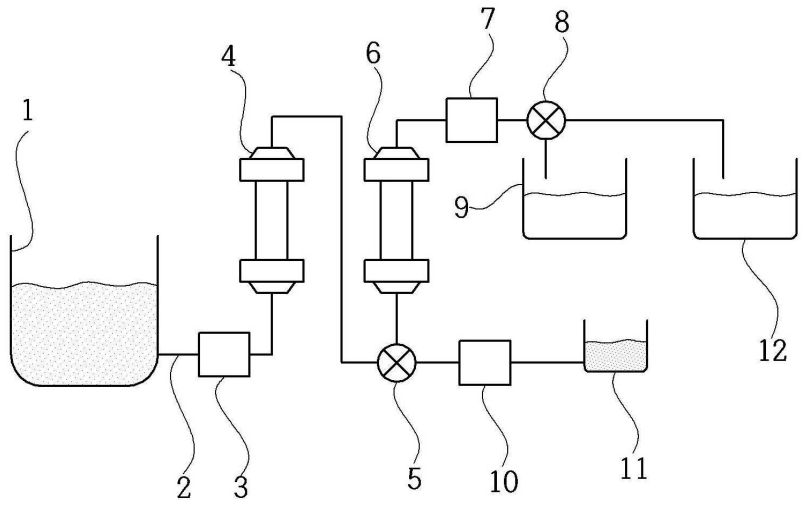
7 : 제2펌프 8 : 제2밸브

9 : 제1저장용기 10 : 제3펌프

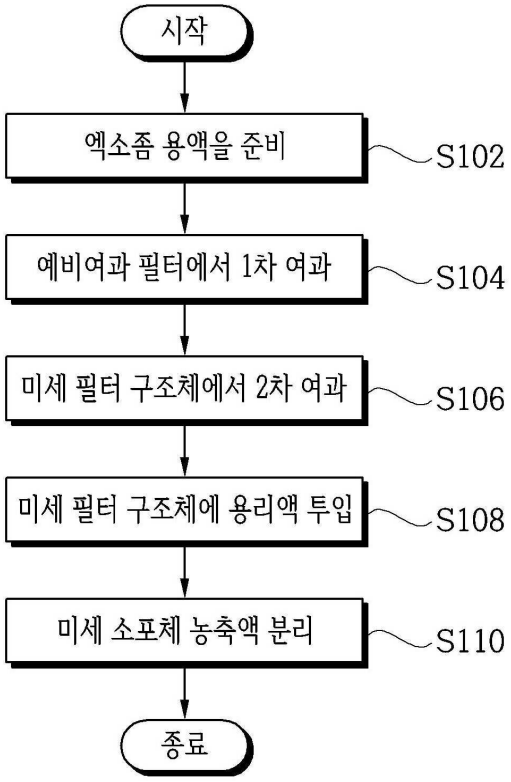
11 : 제2공급용기 12 : 제2저장용기

도면

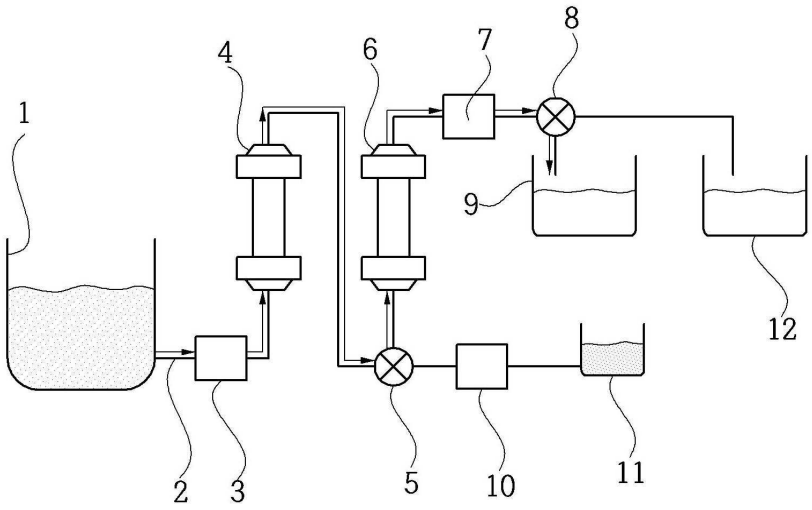
도면1



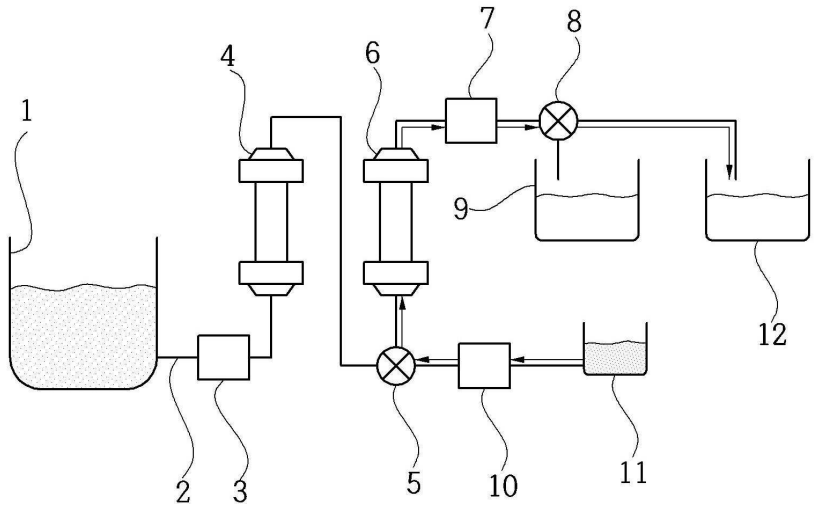
도면2


시작
엑소좀 용액을 준비
S102
예비여과 필터에서 1차 여과
S104
미세 필터 구조체에서 2차 여과
S106
미세 필터 구조체에 용리액 투입
S108
미세 소포체 농축액 분리
S110
종료

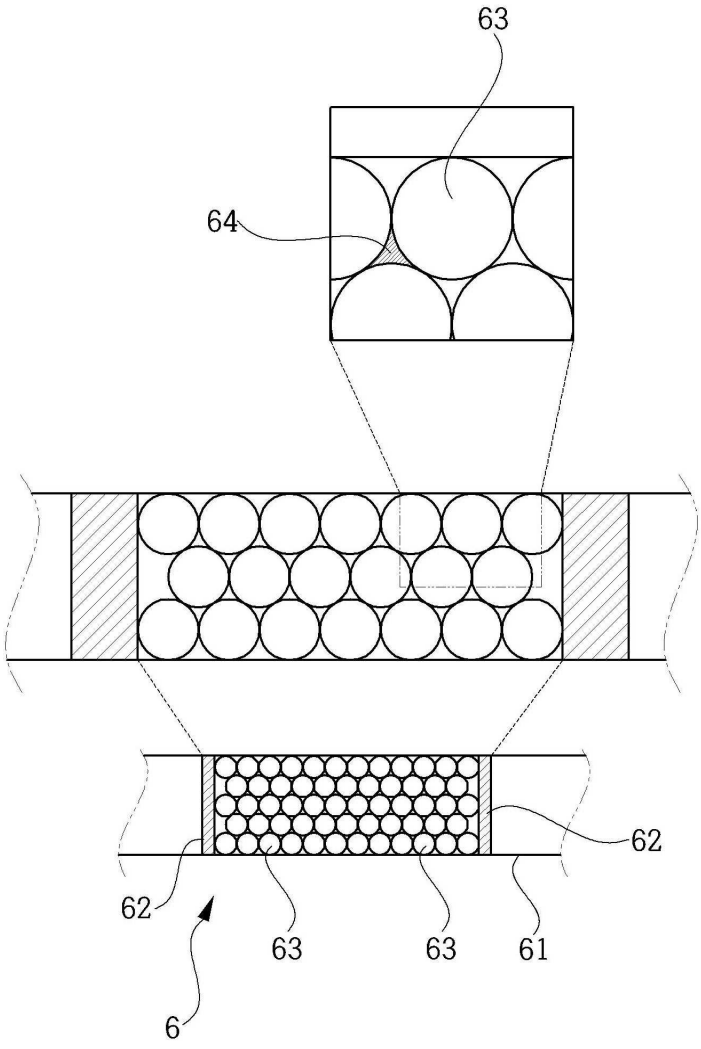
도면3


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

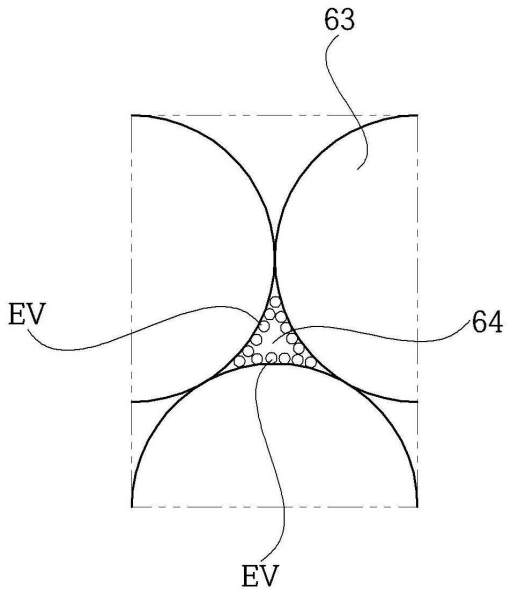
도면4



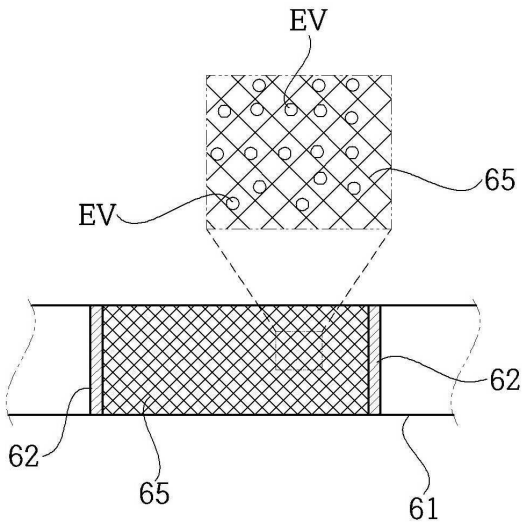
도면5



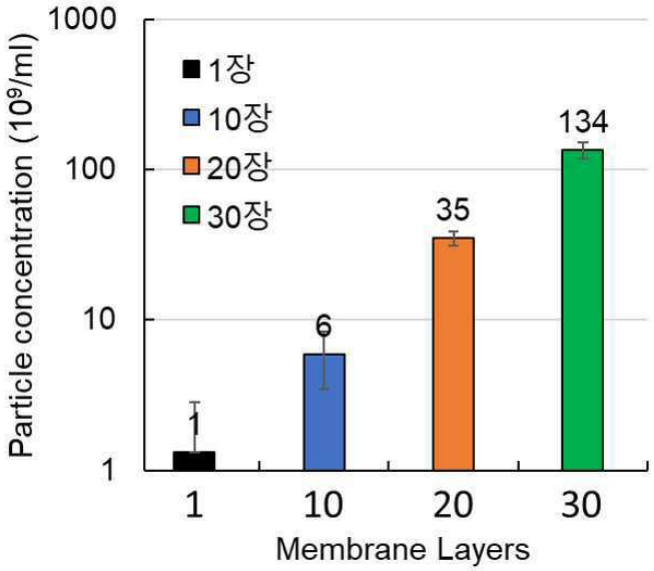
도면6



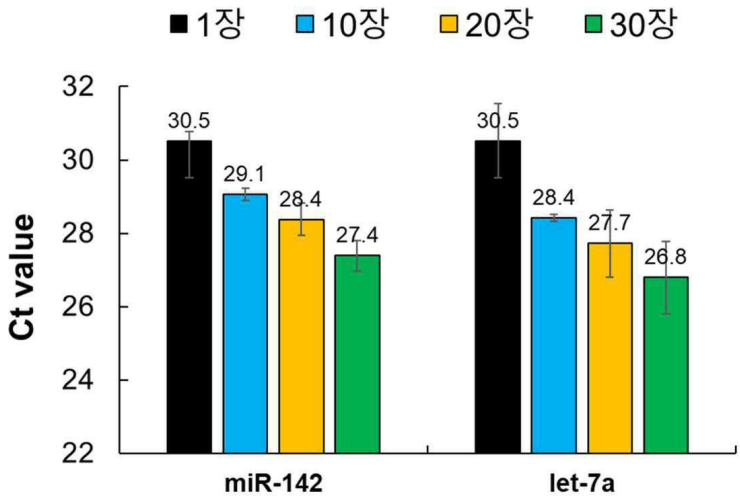
도면7



도면8


1000
100
10
1
Particle concentration (10⁹/ml)
1장
10장
20장
30장
1
6
35
134
1
10
20
30
Membrane Layers

도면9


1장
10장
20장
30장
32
30
28
26
24
22
Ct value
30.5
29.1
28.4
27.4
30.5
28.4
27.7
26.8
miR-142
let-7a