

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 8월 20일 (20.08.2020)

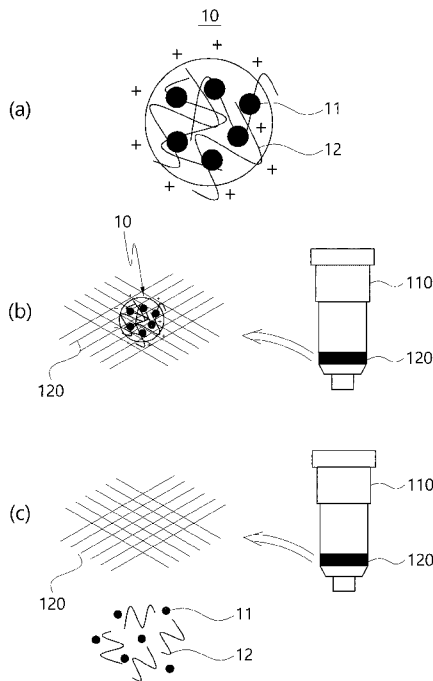


(10) 국제공개번호
WO 2020/166978 A2

- (51) 국제특허분류: *B01L 3/00* (2006.01) *B01D 37/03* (2006.01) *B01D 21/01* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/001987
- (22) 국제출원일: 2020년 2월 12일 (12.02.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0017053 2019년 2월 14일 (14.02.2019) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 신세현 (SHIN, Sehyun); 06574 서울시 서초구 방배로 270, 바동 406호, Seoul (KR). 이호윤 (LEE, Ho Yoon); 02858 서울시 성북구 안암로9나길 14, 3동 332호, Seoul (KR). 나원휘 (NA, Won-Hwi); 05119 서울시 광진구 광나루로56길 29, 14동 401호, Seoul (KR). 김진현 (KIM, Jin-Hyun); 03089 서울시 종로구 창신9길 14, 102호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 정은열 등 (JUNG, Eun Youl et al.); 06149 서울시 강남구 테헤란로55길 21, 402호 (정앤김 특허법률사무소), 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, 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).

(54) Title: METHOD FOR EXTRACTING MICROVESICLES FROM BIOLOGICAL SAMPLE

(54) 발명의 명칭: 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for extracting microvesicles from a biological sample, the method comprising the steps of: adding a polyvalent cationic material to the biological sample to form an aggregate in which the microvesicles and the polyvalent cationic material are aggregated by electrical force; capturing the aggregate by a capture filter while the biological sample including the aggregate passes through the capture filter; and extracting the microvesicles by allowing an elution solution to pass through the capture filter with the aggregate captured therein to isolate the microvesicles from the aggregate. Accordingly, microvesicles can be extracted using a polyvalent cationic material, without a centrifugation process.

(57) 요약서: 본 발명은 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법에 관한 것으로, 상기 생물학적 샘플에 다가 양이온 물질이 첨가되어 상기 미세 소포체와 상기 다가 양이온 물질이 전기적 힘에 의해 응집한 응집체가 형성되는 단계와; 상기 응집체를 포함하는 상기 생물학적 샘플이 포획 필터를 통과하면서 상기 응집체가 상기 포획 필터에 포획되는 단계와; 상기 응집체가 포획된 상기 포획 필터에 용리 용액을 통과시켜 상기 응집체로부터 상기 미세 소포체를 분리하여 상기 미세 소포체를 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다. 이에 따라, 다가 양이온 물질을 이용하여 원심 분리 과정없이 미세 소포체를 추출할 수 있다.

WO 2020/166978 A2

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 다량 양이온 물질을 이용하여 원심 분리 과정없이 미세 소포체를 추출할 수 있는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 생체 내의 미세 소포체(Micro vesicle)는 여러 종류의 세포들에 존재하거나
- [3] 세포로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포이다. 세포 외로 분비되는 미세 소포체로는 엑소좀(Exosome), 쉼딩 미세 소포체(Shedding micro vesicle : SMVs), 세포자살성 수포(Apoptotic blebs) 등이 있다. 여기서, 엑소좀은 식균 기원의 직경 30 내지 100nm의 막성 소포체이고, 쉼딩 미세 소포체는 원형질막으로부터 직접 흘러지고 직경 50 내지 1000nm의 큰 막성 소포체이고, 세포자살성 수포는 죽어가는 세포에 의해 유출된 직경 50 내지 5000nm의 소포체이다.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 그러나, 상기와 같이 생체 내 미세 소포체의 중요성 및 가치가 밝혀지고 있지만, 상술한 바와 같이, 미세 소포체는 나노미터 단위의 매우 작은 크기를 갖기 때문에 이를 추출하는데 많은 어려움이 있다.
- [7] 기존의 미세 소포체를 분리하는 기술로는 초고속 원심분리(Ultracentrifugation isolation), 크기별 제외법(Size exclusion), 면역친화성 분리(Immunoaffinity isolation), 미세유체 기술(Microfluidics chip) 및 폴리머를 이용한 방법(Polymeric method) 등이 있다.
- [8] 상기와 같은 기존의 방법 중 초고속 원심분리 방법은 미세 소포체를 분리하는 가장 널리 사용되고 있는 방법으로, 원리 자체가 간단할 뿐만 아니라 가장 신뢰성이 높은 방법으로 인식되고 있다.
- [9] 하지만, 초고속 원심분리 방법을 이용해서 미세 소포체를 분리하는 경우, 미세 소포체의 수율이 낮을 뿐만 아니라, 미세 소포체를 분리하는데 많은 시간, 예컨대 8시간 이상의 많은 시간이 소요되는 단점이 있다.

- [10] 또한, 초고속 원심분리기의 경우 10만~20만 RPM으로 회전 가능한 원심분리기를 사용하여야 하는데, 일반적인 실험실에서 사용되는 원심분리기가 5천~1만 RPM임을 가만할 때, 고가의 원심분리기를 사용하여야 하는 문제점이 있다.
- [11] 크기별 제외법의 경우, 주로 초고속 원심분리 방법과 함께 사용되며, 미세 소포체의 순도를 높일 수 있는 장점이 있으나, 미세 소포체가 필터에 달라붙는 현상으로 인해 수율이 낮아질 뿐만 아니라, 초고속 원심분리 방법을 사용하여야 하므로 이에 따른 단점을 그대로 안게 된다.
- [12] 면역친화성 분리 방법은 항체를 미세 소포체에 붙여서 분리하는 방법으로, 특정 미세 소포체를 매우 높은 선별성(Specificity)으로 분리 가능하지만, 일반적인 미세 소포체에 대해 범용적으로 활용 가능한 항체가 없기 때문에 추출 효율이 낮은 한계가 있다. 또한, 항체를 만드는 과정이 오래 걸리며 많은 비용이 들기 때문에 실용적인 진단에 적용하는 것은 적합하지 않다.
- [13] 한편, 폴리머를 이용한 방법은 PEG(polyethylene glycol)을 샘플에 추가하여 용해도를 낮춰 줌으로써 미세 소포체를 가라앉게 만들어 주는 방법이다. 이 방법의 경우, 원심 분리기를 활용한 침전법으로 침전 효율을 높일 수 있으나, 원심 분리기를 그대로 사용하고 있다는 점에서 검사 비용이 비싸질 뿐만 아니라, EV와 같은 불순물도 함께 가라앉기에 침전물의 순도가 좋지 않아 진단을 위한 활용에 적합하지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 이에, 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해소하기 위해 안출된 것으로서, 다가 양이온 물질을 이용하여 원심 분리 과정없이 미세 소포체를 추출할 수 있는 생물학적 샘플로부터 미소 소포체를 추출하는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결 수단

- [15] 상기 목적은 본 발명에 따라, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법에 있어서, 상기 생물학적 샘플에 다가 양이온 물질이 첨가되어 상기 미세 소포체와 상기 다가 양이온 물질이 전기적 힘에 의해 응집한 응집체가 형성되는 단계와; 상기 응집체를 포함하는 상기 생물학적 샘플이 포획 필터를 통과하면서 상기 응집체가 상기 포획 필터에 포획되는 단계와; 상기 응집체가 포획된 상기 포획 필터에 용리 용액을 통과시켜 상기 응집체로부터 상기 미세 소포체를 분리하여 상기 미세 소포체를 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법에 의해서 달성된다.
- [16] 한편, 상기 목적은 본 발명의 다른 실시 형태에 따라, 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법에 있어서, 상기 생물학적 샘플에 다가 양이온 물질이 첨가되어 상기 미세 소포체와 상기 다가 양이온 물질이 전기적 힘에 의해 응집한

응집체가 형성되는 단계와; 상기 응집체를 포함하는 상기 생물학적 샘플이 포획 필터를 통과하면서 상기 응집체가 상기 포획 필터에 포획되는 단계와; 상기 응집체가 포획된 상기 포획 필터에 음 전하를 갖는 버퍼 용액을 통과시켜 상기 포획 필터로부터 상기 응집체를 이탈시키는 단계와; 상기 포획 필터로부터 이탈된 상기 응집체에 용리 용액을 투입하여 상기 응집체로부터 상기 미세 소포체를 분리하여 상기 미세 소포체를 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법에 의해서 달성된다.

- [17] 여기서, 상기 다가 양이온 물질은 폴리 라이신, 폴리아르기닌, 폴리 히스티딘, 프로타민, 양이온성 덱스트란, 양이온성 덴드리머, 양이온성 폴리사카라이드, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌이민, 폴리쿼터늄, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [18] 또한, 상기 용리 용액은 카오토로픽 물질 또는 프로테아제(Protease)를 포함할 수 있다.
- [19] 상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 침, 뇌척수액, 눈물, 땀, 대변, 복수, 양수, 정액, 유(milk), 세포 배지, 조직 추출물 또는 암 조직일 수 있다.
- [20] 상기 카오토로픽 물질은 구아니디늄(Guanidinium) 이온을 포함하는 염, n-부탄올, 에탄올, 과염소산 리튬, 아세트산 리튬, 염화마그네슘, 페놀, 2-프로판올, 소듐 도데실 설페이트, 티오우레아, 우레아, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [21] 또한, 상기 프로테아제(Protease)는 프로테나제 K(Proteinase K), 펩신(Pepsin), 트립신(Trypsin) 또는 키모트립신(Chymotrypsin)를 포함할 수 있다.
- [22] 또한, 상기 포획 필터는 상기 응집체가 포획 가능한 사이즈의 공극이 형성될 수 있다.
- [23] 여기서, 상기 포획 필터는 상기 공극이 형성된 멤브레인과, 상기 공극이 형성되도록 복수의 마이크로 비드가 3차원적으로 밀착된 비드 패킹 필터 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [24] 또한, 상기 포획 필터는 친수성 물질 또는 양이온 교환 수지로 마련될 수 있다.
- [25] 그리고, 상기 포획 필터는 친수성 물질 또는 양이온 교환 수지로 마련되어 상기 응집체가 전기적인 힘에 의해 상기 포획 필터에 포획되며; 상기 버퍼 용액은 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ 이온 중 적어도 하나, 또는 2 이상의 조합을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [26] 상기와 같은 구성에 따라, 본 발명에 따르면, 다가 양이온 물질을 이용하여 원심 분리 과정없이 미세 소포체를 추출할 수 있는 생물학적 샘플로부터 미소 소포체를 추출하는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 본 발명에 따른 생물학적 샘플로부터 미소 소포체를 추출하는 방법을

- 설명하기 위한 도면이고,
- [28] 도 2 내지 도 4는 본 발명에 따른 생물학적 샘플로부터 미소 소포체를 추출하는 방법의 구현 예들을 설명하기 위한 도면이고,
- [29] 도 5는 본 발명에 따른 미소소포체 추출 방법에 따라 생성된 미소소포체 응집체 및 분리된 미소소포체의 크기 및 형태를 나타내고;
- [30] 도 6은 본 발명의 실시예 및 비교예를 통해 추출된 미소소포체의 크기 및 형태를 나타내고;
- [31] 도 7은 실시예 및 비교예에 따라 추출된 미소소포체 내 단백질 마커 및 RNA를 측정된 결과를 나타내고;
- [32] 도 8은 생물학적 샘플 내 성분에 대한 제타 포텐셜 측정 결과를 나타내고;
- [33] 도 9는 다가성 양이온 물질 농도에 따른 미소소포체 응집체 형성 결과를 나타내고;
- [34] 도 10은 인큐베이션 시간 및 온도에 따른 미소소포체 응집체 형성 결과를 나타내고;
- [35] 도 11은 용리 용액 내 카오트로픽 물질 농도에 따른 미소 소포체 크기 및 수율을 나타내고;
- [36] 도 12는 세척 용액 내 카오트로픽 물질 농도에 따른 단백질 불순물 및 미세 소포체 양을 나타내고;
- [37] 도 13은 용리 용액 내 프로테아제 양에 따른 미소 소포체 응집체 분리 정도를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [38] 이하에서는 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 실시예들을 상세히 설명한다.
- [39] 본 발명에서, 용어 “미세 소포체(microvesicle)”는 고세균(Archaea), 원핵생물(Prokarya) 또는 진핵생물(Eukarya)의 세포막으로부터 방출되는 세포외 소포체(extracellular vesicle)와 동일한 의미로 사용된다. 상기 미소소포체는 본 발명에서 엑소솜(exosome), 아그로솜(argosomes), 텍소솜(dexosomes), 엑토솜(ectosomes), 엑소베지클(exovesicle), 온코솜(oncosome), 프로미노솜(prominosome), 프로스타솜(prostosome), 톨레로솜(tolerosome), 미세입자(microparticle), 나노소포(nanovesicle), 수포성 소포(blebbing vesicle), 출아성 소포(budding vesicle), 엑소솜-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), 에피디디모솜(epididimosome), 프로미니노솜(promininosome), 텍소솜(texosome) 또는 아키오솜(archeosome)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [40] 도 1은 본 발명에 따른 생물학적 샘플로부터 미소 소포체를 추출하는 방법을

설명하기 위한 도면이고, 도 2는 본 발명에 따른 생물학적 샘플로부터 미소 소포체를 추출하는 방법의 구현 예를 나타낸 도면이다.

- [41] 도 1 및 도 2를 참조하여 설명하면, 본 발명에 따른 미소 소포체를 추출하는 방법은 먼저 미세 소포체(11)를 포함하는 생물학적 샘플에 다가 양이온 물질(12)을 첨가한다(S10). 본 발명에서 생물학적 샘플은 미세소포체를 포함하는 생체 시료 또는 세포 배양액, 조직 시료 등을 포함할 수 있으며, 구체적으로 동물, 식물 또는 미생물 유래 세포 배지, 조직 추출물, 암 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 침, 뇌척수액, 눈물, 땀, 대변, 복수(ascite), 양수(amniotic fluid), 정액, 유(milk)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [42] 미세 소포체(11)는 전기적으로(-) 특성을 가지므로, 다가 양이온 물질(12)이 생물학적 샘플에 첨가되는 경우, 다가 양이온 물질(12)과 미세 소포체(11)가 전기적인 힘에 의해 응집하여, 도 2의(a)에 도시된 바와 같이, 응집체(10)를 형성하게 된다(S11).
- [43] 본 발명에서 다가 양이온 물질은 양이온성 폴리머(cationic polymer)를 포함한다. 구체적으로, 상기 다가 양이온 물질은 폴리 라이신(폴리-L-라이신 하이드로브로마이드 또는 폴리-L-라이신 하이드로클로라이드 등 염의 형태로 제공 가능), 폴리아르기닌, 폴리 히스티딘, 프로타민(프로타민 클로라이드 또는 프로타민 설페이트와 같은 염의 형태로 제공 가능), 양이온성 덱스트란, 양이온성 덴드리머, 양이온성 폴리사카라이드, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌이민, 폴리쿼터늄, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 실시양태에서, 다가 양이온 물질은 폴리 라이신 염일 수 있다.
- [44] 본 발명의 실시예에서는 다가 양이온 물질로서 분자량 150-300 kDa의 폴리-L-라이신(poly-L-lysine; PLL)을 0.02 내지 2.00 mg/mL의 농도로 사용하였다(실시예 1).
- [45] 상술한 바와 같이, 미세 소포체(11)의 크기는 나노미터 단위로 미세하여 그 자체 만으로 추출하기 어려운 문제점이 있는 바, 본 발명에서는(-) 특성의 미세 소포체(11)를 다가 양이온 물질(12)과 전기적인 힘에 의해 응집시켜 그 크기를 크게 함으로써, 포획을 용이하게 한다.
- [46] 여기서, 다가 양이온 물질(12)과 미세 소포체(11)의 응집을 위한 인큐베이션 과정은 일정 시간과 일정 온도 조건 하에서 이루어진다.
- [47] 일 실시양태에서, 상기 인큐베이션 과정은 0.1 내지 40°C의 온도 조건 하에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 25°C 미만에서 수행될 수 있다. 예컨대, 상기 인큐베이션 과정은 20°C 미만, 또는 15°C 미만, 또는 12°C 미만, 또는 10°C 미만에서 수행될 수 있으며, 예컨대 1 내지 8°C의 온도 조건 하에서 수행될 수 있다.
- [48] 일 실시양태에서, 상기 인큐베이션 과정은 0.5 내지 100분 동안 수행될 수 있고, 바람직하게는 30분 미만 동안 수행될 수 있다. 예컨대, 상기 인큐베이션 과정은 25 분 미만, 또는 20 분 미만, 또는 15 분 미만에서 수행될 수 있으며, 예컨대 5

- 내지 15 분 동안 수행될 수 있다.
- [49] 본 발명의 실시예에서는, 상기 인큐베이션을 4°C에서 10 분 동안 수행할 경우 미세소포체 응집체가 효과적으로 형성된다는 점을 확인하였다(도 10).
- [50] 여기서, 응집을 위한 인큐베이션 시간은 실험적으로 결정될 수 있으나, 종래의 면역친화성 분리(Immunoaffinity isolation) 방법에서 소요되는 시간에 대비할 때, 전기적인 힘에 의한 응집으로 그 소요 시간은 현저히 줄일 수 있다.
- [51] 본 발명에서는 다가 양이온 물질(12)로 폴리 라이신 염(Poly lysine salt), 폴리 아르기닌(Poly lysine salt), 폴리 히스티딘 염(Poly histidine salt), 프로타민 클로라이드(Protamine chloride), 프로타민 설페이트(Protamine sulfate), 양전하 덱스트란(Cationic dextran), 양전하 덴드리머(Cationic dendrimer), 양전하 폴리 사카라이드(Cationic polysaccharide), 폴리 아미도아민(Poly amidoamine), 폴리 에틸렌이민(Polyethylenimine) 또는 폴리 쿼터늄(Polyquaternium) 중 어느 하나, 또는 둘 이상의 조합이 적용되는 것을 예로 한다.
- [52] 상기와 같이, 생물학적 샘플 내에서 다가 양이온 물질(12)과 미세 소포체(11)가 응집하여 응집체(10)가 형성되면, 생물학적 샘플을 포획 필터(120)에 통과시키는데, 생물학적 샘플이 포획 필터(120)를 통과하면서 내부의 응집체(10)는 포획 필터(120)에 의해 포획된다(S12).
- [53] 본 발명에서는 도 2의(b)에 도시된 바와 같이, 포획 필터(120)가 추출 튜브(110) 내부에 설치된 상태로 생물학적 샘플이 중력 또는 음압에 의해 포획 필터(120)를 통과하는 것을 예로 한다.
- [54] 또한, 도 2에 도시된 실시예에서는 포획 필터(120)가 응집체(10)의 포획이 가능한 사이즈의 공극이 형성되는 것을 예로 한다. 이와 같은 포획 필터(120)는 공극이 형성된 멤브레인이나, 공극이 형성되도록 복수의 마이크로 비드가 3차원적으로 밀착된 비드 패킹 필터 형태로 마련되는 것을 예로 한다.
- [55] 상기 포획 필터는 미세소포체 응집체가 포획 가능한 크기의 공극을 그 안에 형성할 수 있다. 상기 포획 필터 내에 형성되는 공극의 크기는 미세소포체 응집체가 빠져나가지 못하는 크기를 고려하고, 후속하는 용리 단계에서 용리액에 의하여 응집체가 풀렸을 때 흘러갈 수 있는 크기를 고려하여 결정될 수 있다. 일 실시양태에서 상기 포획 필터 내 공극의 크기는 50 nm 내지 1,000 nm의 범위일 수 있고, 구체적으로 100 nm 내지 500 nm일 수 있으며, 보다 구체적으로 150 nm 내지 300 nm일 수 있다.
- [56] 상기 포획 필터는 미세소포체 응집체와 접촉하는 표면이 멤브레인, 비드, 컬럼, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일 실시양태에서 상기 포획 필터는 공극이 형성된 멤브레인이나, 공극이 형성되도록 복수의 마이크로 비드가 3차원적으로 밀착된 비드 패킹 필터 형태로 마련될 수 있다.
- [57] 여기서, 포획 필터(120)는 전기적 특성이(+) 특성을 갖는 응집체(10)가 보다 쉽게 포획되도록 친수성 물질이나 양이온 교환 수지로 마련될 수 있다.
- [58] 상기 포획 필터가 친수성 물질로 마련될 경우, 미세소포체 응집체가 공극에

쉽게 걸러 물리적으로 포획될 수 있다. 상기 친수성 물질은 실버 메탈(silver metal), 폴리에테르설폰(polyethersulfone), 유리 파이버(glass fiber), 폴리카보네이트 트랙 에치(polycarbonate track etch; PCTE), 폴리에스터(polyester), 혼합 셀룰로오스 에스터(mixed cellulose esters; MCE), 나일론(nylon), 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate) 또는 이들의 조합일 수 있다.

- [59] 상기 포획 필터가 양이온 교환 수지로 마련될 경우, 미세소포체 응집체가 음전하로 하전된 포획 필터에 의해 전기적인 힘으로 필터 표면에 흡착된다. 상기 양이온 교환 수지는 카복시메틸(carboxymethyl), 메틸 설포네이트(methyl sulfonate), 설포닐 기(sulphonyl group), 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [60] 도 3의(b)에 도시된 실시예에서는 음전하를 갖는 양이온 교환 수지에 응집체(10)가 전기적인 힘에 의해 포획되도록 형성된 포획 필터(120a)의 예를 나타내고 있다.
- [61] 즉, 본 발명에서는 응집체(10)가 공극이 형성된 포획 필터(120)에 의해 포획되는 방식 및/또는 음전하를 갖는 양이온 교환 수지에 의한 전기적인 힘에 의해 포획되는 방식이 적용된다. 이를 통해, 나노미터 단위의 미세 소포체(11)가 다가 양이온 물질(12)과 응집하여 응집체(10)를 형성하여 공극에 쉽게 걸러 포집되거나 전기적인 힘에 의해 쉽게 포집 가능하게 된다.
- [62] 본 발명의 실시예에서는 약 220 nm의 공극 크기를 갖는 시린지 필터를 사용하여 미세소포체 응집체를 여과하였다(실시예 1).
- [63] 상기와 같이 응집체(10)가 포획 필터(120)에 포획된 상태에서 용리 용액을 통한 미세 소포체(11)의 추출 과정이 진행된다(S13 및 S14). 여기서, 본 발명에서는 용리 용액을 통한 미세 소포체(11)의 추출 과정의 진행 전에, 세척 용액을 포획 필터(120)에 통과시켜 포획 필터(120)를 세척하는 과정을 거칠 수 있다. 이를 통해, 응집체(10) 외에 미세 소포체(11)에 포집된 EV와 같은 잔존물을 제거함으로써, 최종적으로 추출되는 미세 소포체(11)의 순도를 향상시킬 수 있다.
- [64] 본 발명에서, 상기 세척 용액에는 후술할 카오토로픽 물질이 포함될 수 있다. 이 경우, 세척 용액에 포함되는 카오토로픽 물질은 용리 용액에 포함되는 카오토로픽 물질보다 낮은 농도로 포함되는 것이 바람직하다. 예컨대, 용리 용액이 구아니디늄 이온을 포함하는 염을 카오토로픽 물질로 포함할 경우, 세척 용액 역시 구아니디늄 이온을 포함하는 염을 카오토로픽 물질로 포함할 수 있다. 이 경우, 세척 용액에 포함되는 카오토로픽 물질의 농도는 용리 용액에 포함되는 카오토로픽 물질의 농도보다 낮으며, 예컨대 0.1 내지 4.5 M, 0.5 내지 4 M, 1 내지 3 M의 범위일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 구아니디늄 티오시아네이트를 0 내지 2 M 농도로 포함한 세척 용액을 사용하여 포획된 미세소포체 응집체를 세척하였다(도 12).
- [65] 상기 세척 용액은 불순물을 효과적으로 세척할 수 있는 적절한 염을 포함할 수

있다. 일 실시양태에서, 상기 염은 NH_4^+ , Na^+ , K^+ 와 같은 1가 양이온, Ca^{2+} , Mg^{2+} 와 같은 2가 양이온, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 세척 용액 내 염은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , NaCl , KCl , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 염은 세척 용액 내에 일정 농도 미만, 예컨대 10 mM 미만의 농도로 포함될 수 있다.

[66] 세척 과정이 완료되면, 용리 용액을 응집체(10)가 포획된 포획 필터(120)에 통과시켜(S13) 응집체(10)로부터 미세 소포체(11)를 분리하여 미세 소포체(11)를 추출한다(S14).

[67] 본 발명에서 용리 용액은 카오트로픽 물질(Chaotropic agent) 또는 프로테아제(Protease)를 포함할 수 있다.

[68] 본 발명에서 카오트로픽 물질이란 수용액내 물분자의 바구니구조(cargo structure)를 불안정하게 하거나 파괴하는 물질 또는 이온을 의미한다. 수용액 내에 카오트로픽 물질의 첨가로 인해, 물의 엔트로피가 증가되고 단백질 간, 수소결합 간, 반데르발스(Van der Waals force) 힘 또는 소수결합 등에 영향을 미치게 함으로서 그의 분자구조를 불안정하게 한다.

[69] 상기 카오트로픽 물질은 구아니디늄(Guanidinium) 이온을 포함하는 염, 예컨대 구아니디늄 이소티오시아네이트, 구아니디늄 티오시아네이트, 또는 구아니디늄 클로라이드, 또는 구아니딘 하이드로클로라이드; n-부탄올, 에탄올, 과염소산 리튬, 아세트산 리튬, 염화마그네슘, 페놀, 2-프로판올, 소듐 도데실 설페이트, 티오우레아, 우레아 또는 이들의 조합일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[70] 일 실시양태에서, 본 발명의 카오트로픽 물질은 구아니디늄 티오시아네이트(GuTc)를 포함하며, 1 내지 9 M, 구체적으로 2 내지 8 M, 보다 구체적으로 3 내지 7 M, 또는 4 내지 6 M의 농도로 용리 용액에 포함될 수 있다.

[71] 상기 프로테아제는 프로테나제 K(Proteinase K), 펩신(Pepsin), 트립신(Trypsin) 또는 키모트립신(Chymotrypsin)를 포함할 수 있다.

[72]

[73] 상기와 같은 용리 용액은 응집체(10)를 구성하는 미세 소포체(11)와 다가 양이온 간의 전기적 결합을 해제시켜 응집체(10)로부터 미세 소포체(11)를 분리함으로써, 미세 소포체(11)의 추출이 가능하게 된다. 즉, 용리 용액을 통해 응집체(10)로부터 미세 소포체(11)를 분리시킴으로써, 미세 소포체(11)를 추출하기 위한 원심리 공정을 제거함으로써, 기존의 원심 분리를 사용하던 방법에 비해, 적은 비용과 시간으로 미세 소포체(11)의 추출이 가능하게 된다.

[74] 한편, 도 4는 본 발명에 따른 생물학적 샘플로부터 미소 소포체를 추출하는 방법의 다른 구현 예를 나타낸 도면이다. 도 4에 도시된 실시예에서는, 도 4의(b)에 도시된 바와 같이, 포획 필터(120a)가 친수성 물질 또는 양이온 교환 수지로 마련되어 응집체(10)가 전기적인 힘에 의해 포획 필터(120a)에 포획되는 것을 예로 한다.

- [75] 그리고, 상술한 실시예에서와 같이 포획 단계 및 세척 단계가 완료되면, 도 4의(c)에 도시된 바와 같이, 응집체(10)가 포획된 포획 필터(120a)에 음 전하를 갖는 버퍼 용액을 통과시켜 포획 필터(120a)로부터 응집체(10)를 이탈시킨다. 그리고, 포획 필터(120a)로부터 이탈된 응집체(10)에 전술한 실시예에서와 같이 용리 용액을 투입하여 응집체(10)로부터 미세 소포체(11)를 분리하여 미세 소포체(11)를 추출하게 된다. 본 발명에서는 버퍼 용액으로 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ 이온 중 적어도 하나, 또는 2 이상의 조합을 포함하는 용액이 적용되는 것을 예로 한다.
- [76] 도 5 내지 도 13은 본 발명에 따른 생물학적 샘플로부터 미세 소포체(11)를 추출하는 방법의 실험 예를 설명하기 위한 도면이다. 이는, 생물학적 샘플로 혈장을 사용하고, 다가 양이온 물질(12)로 폴리-L-라이신 용액을 첨가하여 미세 소포체(11)와 다가 양이온 물질(12)이 응집하여 응집체(10)를 형성한 실험 예를 나타내며, 상세한 내용은 후술한다.
- [77] 도 5는 실시예에 따라 형성된 미세 소포체(11)에 비해 응집체(10)의 크기가 상당히 증가하였음을 나타낸다.
- [78] 도 6은 종래 기술로 사용되는 비교예 방법에 비해 실시예의 방법의 미세 소포체(11) 추출 수율 및 순도가 향상되었음을 나타낸다.
- [79] 도 7은 실시예에 따라 추출된 미세 소포체(11)에 세포외 소포체(EV)의 바이오마커가 잘 발현되어, 후속하는 분자진단 등의 분석에 유용하게 활용될 수 있음을 나타낸다.
- [80]
- [81] 도 9는 다가 양이온 물질(12)을 0, 0.10 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL, 1.0 mg/mL, 5.0 mg/mL를 각각 첨가한 실험 결과, 하단에 응집체(10)가 형성되는 것을 확인할 수 있다.
- [82] 도 10은 미세 소포체(11)의 응집체(10) 형성에 필요한 최적 온도 및 시간을 나타낸다.
- [83] 도 13은 혈장에 폴리-L-라이신 용액이 첨가되어 응집체(10)를 형성시킨 후, 용리 용액으로 프로테나제 K(Proteinase K)를 첨가한 후 응집체(10)가 분해되어 재부유하는지 여부를 실험한 결과이다. 실험에는 폴리-L-라이신 용액이 0.25 mg/mL가 첨가되었고, 프로테나제 K(Proteinase K)가 각각 100 μl , 200 μl 및 300 μl 가 첨가된 것을 예로 실험되었으며, 도 13에 도시된 바와 같이, 응집체(10)가 분해되어 재부유되는 것을 확인하였다.
- [84] 도 11의 (a)는 혈장에 폴리-L-라이신 용액이 첨가되어 응집체(10)를 형성시킨 후, 용리 용액으로 구아니디늄 티오시아나아트(Guanidinium thiocyanate) 용액을 첨가한 후 응집체(10)가 분해되어 재부유하는지 여부를 실험한 결과이다. 도 11 (a)의 좌측에서부터, 증류수, 1M, 2M, 3M, 4M의 구아니디늄 티오시아나아트(Guanidinium thiocyanate) 용액을 첨가하였는데, 농도가 높아질수록 응집체의 재부유가 향상됨을 확인할 수 있다.

- [85] 도 11의 (b)는 도 11의 (a)의 재부유된 용액 내의 입자의 크기를 나노 입자 추적 분석 장비를 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다. 도 11의 (b)에 도시된 바와 같이, 농도의 증가에 따라 응집체(10)가 재부유하여 입자의 크기가 농도가 증가함에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있다. 도 11의 (c)는 도 11의 (a)의 재부유된 용액의 농도가 구아니디늄 티오시아나이트(Guanidinium thiocyanate) 용액가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있다.
- [86] 도 12는 세척 용액 내 카오트로픽 물질(GuTc) 농도에 따른 단백질 불순물 및 미세 소포체 양을 측정해 준 것으로, 2M 농도의 GuTc로 세척할 경우 세척 과정이 효율적으로 진행됨을 확인하였다.

발명의 실시를 위한 형태

- [87] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[88]

[89] 생물학적 샘플의 준비

- [90] 본 연구는 고려대학교 안암 병원의 기관생명윤리연구위원회 승인(IRB 프로젝트 No.: 2016AN0090) 및 혈액 샘플에 대한 모든 지원자의 동의서를 받은 후 진행하였다. 각 지원자의 주정중피정맥(median cubital vein)으로부터 혈액 샘플을 취하여 3 mL K2-EDTA 진공 채혈기(vacutainer)(Becton Dickinson, USA)에 수집하였다. 전혈을 1,900 g에서 10 분 동안 원심분리한 후 12,000g에서 15 분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 그 다음, 혈장을 800 nm 공극 크기의 메쉬로 여과하여 크기가 큰 잔해물을 제거하였다. 각 혈장 샘플을 1 mL씩 준비하였다.

[91]

[92] 실시예 1. 양이온성 폴리머에 의한 응집 및 카오트로픽 물질에 의한 용리를 통한 세포외 소포체 분리

- [93] 준비된 혈장 샘플에 양이온성 폴리머를 첨가하여, 전하간 상호작용에 의한 세포외 소포체 및 폴리머간 응집을 유발하고, 수백 나노미터 크기의 응집체를 형성하였다. 양이온성 폴리머로는 분자량 150-300 kDa의 폴리-L-라이신(PLL, Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다. 10 mg/mL 농도의 PLL 스톱 용액을 제조한 후, 스톱 용액을 추가로 첨가함으로써 각 혈장 샘플 내 최종 PLL 농도(0.02-2.00 mg/mL)를 조절하였다. 분리된 세포외 소포체의 수율 및 순도를 신중히 고려하여, 최종 PLL 농도를 0.5 mg/mL로 맞추었다. 혈장 및 PLL 용액의 혼합물을 4°C에서 10 분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 이후, 혼합물을 220 nm의 공극 크기를 갖는 시린지 필터를 사용하여 여과하였다. 여과 이후 커다란 응집된 입자가 필터에 남겨졌다.

- [94] PLL과의 응집체로부터 세포의 소포체를 수득하기 위해, 2mL의 세척 버퍼(GuTc, 2M) 및 200 μ L의 용리 버퍼(GuTc, 5M)를 동일한 메쉬에 사용하였다. 응집된 단백질에 세척 버퍼를 흐르게 하여 세척하였다. 그 다음, GuTc 용액을 사용하여 세포의 소포체를 분리하고, PLL 폴리머 및 혈장 단백질을 제거하였다.
- [95] 수득된 세포의 소포체를 확인하기 위해 SEM 이미지(Quanta 250 FEG; FEI, USA)를 촬영하고 분석하였다.

[96]

[97] 비교예 1. 초원심분리에 의한 세포의 소포체 분리

- [98] 초원심분리(Ultracentrifugation; UC) 방법은 세포의 소포체의 분리를 위해 전통적으로 널리 사용되어온 표준 방법이다. UC의 분리 프로토콜은 간단하지만 시간이 소모되며(6 시간 이상), 노동집약적이라는 단점이 있다. 혈장 및 PBS를 1:1 비율로 혼합하고, 혼합물을 원심분리하여 잔여 세포 성분들을 제거하였다(4°C, 12,000 g, 30 min). 상청액을 옮기고 원심분리를 동일 조건 하에서 1회 반복하였다. 상청액을 200 μ m 공극 크기를 갖는 시린지 필터(Merck Millipore, USA)를 이용하여 여과한 후, 120,000 g 및 4°C에서 2 시간 동안 초원심분리하였다(CP100WX; Hitachi, Japan). 상청액을 흡입해낸 후, 바닥의 펠렛을 120,000 g 및 4°C에서 1 시간 동안 PBS로 조심스럽게 세척한 다음, 50 μ L의 PBS로 재현탁하였다.

[99]

[100] 비교예 2. 세포의 소포체 침전을 유도하는 시판되는 PEG 용액에 의한 세포의 소포체 분리

- [101] 세포의 소포체 분리를 위해 시판되는 대표적인 제품인 ExoQuick™ 엑소솜 침전 용액(EXOQ5A-1; System Biosciences, USA)을 사용하였다. 표준 프로토콜로서 ExoQuick 사용자 매뉴얼을 참고할 수 있다.
- [102] 간략히 설명하면, 혈장 샘플을 PEG-기반 용액인 ExoQuick 용액으로 혼합한 다음, 4°C에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 이후, 혼합물을 1,500 g에서 30 분 동안 원심분리하고, 상층액을 조심스럽게 흡입해내어 펠렛을 바닥에 남겨두었다. 1,500 g에서 5 분 동안 추가로 원심분리한 후, 미량의 ExoQuick 용액을 모두 제거하였다. 그 다음, 남겨진 펠렛을 200 μ L의 PBS로 재현탁하였다.

[103]

[104] 비교예 3. 시판되는 스핀 컬럼을 통한 세포의 소포체 분리 방법

- [105] 또다른 세포의 소포체 분리 방법으로, 시판되는 세포의 소포체와 멤브레인 간의 전기적 상호작용을 활용한 스핀 컬럼 유형의 세포의 소포체 분리 키트인 exoEasy™ 방법을 사용하였다.

[106]

[107] 실험예 1. 미세소포체 응집체의 입자 크기 측정

- [108] 실시예 1에 따른 입자 지름을 동적 광 산란법(DLS)을 이용하여 측정하였다. 그

결과, 세포의 소포체 응집체(600 nm)는 세포의 소포체(200 nm)보다 현저히 큰 크기를 가짐을 확인하였다. 상기 결과는 세포의 소포체가 PLL과 응집되었음을 나타낸다. 분리된 세포의 소포체 및 PLL과 응집된 세포의 소포체는 SEM을 통해서도 시각화된다. 응집된 세포의 소포체에서, 세포의 소포체는 폴리머에 완전히 둘러싸였고, 세포의 소포체 및 세포의 소포체 응집체 크기는 각각 171 nm 및 815 nm로 확인되었다(도 5).

[109]

[110] 실험예 2. 미세소포체 추출 방법에 따른 미세소포체 크기 비교

[111] 실시예 1의 방법을 적용하여 혈장으로부터 분리한 세포의 소포체의 수율, 크기 및 순도를 비교예 1, 2, 3에 따른 방법과 비교하였다. 비교예 2는 세포의 소포체에 대한 폴리머(PEG) 기반의 침전 및 분리 방법이고, 비교예 3은 세포의 소포체와 멤브레인 간의 전기적 상호작용을 활용한 스핀 컬럼 유형의 세포의 소포체 분리 키트를 이용한 방법이다. 세포의 소포체의 크기 분포를 나노입자 트래킹 분석법(nanoparticle tracking analysis; NTA)으로 측정하였고(Malvern Panalytical, USA), 형태 및 크기를 cryo-TEM(TecnaiG2-F20, FEI, USA)으로 확인하였다.

[112] 비교예 1에 의해 분리된 세포의 소포체의 경우, SEM 측정 결과 ~20-130 nm의 크기 분포를 나타낸 반면, ExoCAS에 의해 분리된 세포의 소포체의 경우, ~30-100 nm의 크기 분포를 나타내었다(도 6의 d 및 e).

[113] 또한, 실시예 1에 따라 분리된 세포의 소포체의 TEM 이미지 형태를 비교예 1로부터 분리된 세포의 소포체와 비교하였다. 그 결과, 양 방법 모두에서, 지름 100-200 nm 소포에 대한 명확한 형태가 관찰되었다(도 6의 d 및 e). 더욱이, 비교예 1과 실시예 1 방법의 TEM 이미지간의 뚜렷한 차이가 발견되지 않았다.

[114] 세포의 소포체 회복 분석에서, 비교예 2 및 실시예 1 양 방법 모두 고 수율(각각 $41 \times 10^{10}/\text{mL}$ 및 $61 \times 10^{10}/\text{mL}$)을 가지는 반면, 비교예 1 및 비교예 3 방법은 비교적 낮은 수율(각각 $3.8 \times 10^{10}/\text{mL}$ 및 $9 \times 10^{10}/\text{mL}$)을 가짐을 확인하였다. 비교예 1 및 3과 비교하면, 실시예 1 방식은 6-17배 높은 세포의 소포체 수율을 가짐을 확인하였다(도 6의 b).

[115] 세포의 소포체 분리 성능을 가늠하는 파라미터 중에서, 후속 분석의 질을 결정하는 단백질 오염 역시 중요하다. 즉, 용리 버퍼 내에 단백질은 최소화되어야 하는 반면, 세포의 소포체는 고농도로 농축되어야 한다. BCA 단백질 어세이 방법(#23225; Thermo Scientific, USA)에 따라, 상이한 세포의 소포체 분리 방법에 따른 단백질 오염의 정도를 측정하였다. 테스트된 샘플은 각 방법에서 수득한 최종 용리액(eluent)이었다. 비교예 1, 비교예 3 및 실시예 1 방법에서 잔여 단백질의 양은 각각 232 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 301 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 및 0.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 반면, 비교예 2는 상당히 높았다(33,730 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(도 6의 a).

[116] 단백질 농도에 대한 분리된 입자의 수를 나타내는 순도 비율(purity ratio)을 UC 방법을 기준으로 살펴보면, 비교예 1이 1.0, 비교예 2가 0.1, 비교예 3이 1.8의 순도 비율을 나타낸 반면, 실시예 1은 이보다 현저히 높은 3.5의 순도비를

나타낸다(도 6의 c).

[117]

[118] 실험예 3. 단백질 마커 및 마이크로 RNA에 의한 세포외 소포체 분리 성능 비교

[119] 웨스턴 블롯팅으로 세 가지 상이한 방법(실시에 1, 비교예 1, 비교예 3)으로부터 분리된 세포외 소포체의 단백질 마커를 측정하였다. 엑소솜은 Alix (ALG-2-interacting protein X), TSG101 (tumor susceptibility gene 101 protein), HSP70 (heat shock protein), and the tetraspanins CD63, CD81, 및 CD9와 같은 단백질 마커를 함유한다는 것이 알려져있다. 본 발명자들은, 4 가지 기준 단백질 마커(ALIX, TSG101: inner protein markers; CD9, and CD81: surface protein markers)를 사용하여 분리된 세포외 소포체의 특성을 분석하였다(도 7의 a).

[120] 웨스턴 블롯팅 과정을 간략히 설명하면, 먼저 단백질 샘플을 SDS-PAGE Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel (456-1035; Bio-rad, USA)를 이용한 겔 전기영동으로 분리하고, 토끼 폴리클론 항체(1:2,000 희석) 항-CD9 (ab92726), 항-CD81 (ab109201), 항-ALIX (ab186429), 항-TSG101 (ab125011), 및 염소 항-토끼 IgG H&L (HRP) (ab205718) (Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 면역블롯팅하였다. 단백질 밴드를 강화 화학발광(enhanced chemiluminescence; ECL) 용액 및 ChemiDoc™ XRS + System (Bio-Rad, USA)을 이용하여 단백질 밴드를 분석하였다.

[121] 상기 마커에 대한 웨스턴 블롯팅 결과, 단백질 밴드의 세기로부터 단백질 마커의 전체 수준을 측정할 수 있다(도 7의 b 및 c). 엑소솜 단백질 마커의 수준과 관련하여, 실시에 1 > 비교예 3 > 비교예 1 순으로 엑소솜 단백질 마커의 수준이 높게 나타났다.

[122]

[123] RNA 추출 및 정량 과정을 간략히 설명하면, seraMir Exosome RNA 정제 키트(RA806A-1, SBI, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 모든 분리 과정은 제조자 프로토콜에 의거하여 수행하였다. EV miRNA 마커를 정량하기 위해, TaqMan MicroRNA RT 키트 (4366596, Life Technologies, USA) 및 TaqMan Micro RNA 어세이 (4427975, Life Technologies, USA)를 사용하여 RNA 용출물에 대한 역전사를 수행하였다. 이 과정에 TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (4440040, Life Technologies, USA)와 miRNA assays hsa-let-7a-5p, ID 000377, 및 hsa-miR-142-3p, ID 000464를 사용하였다. RNA 용출물에 대해 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) 상에서 Agilent Eukaryote Total RNA Pico chip를 이용하여 추가 실험을 수행하였다.

[124] 총 RNA를 추출하여 그 양을 비교한 결과, 실시에 1 > 비교예 3 > 비교예 1 > 비교예 2 순으로 RNA 양이 높게 나타났다(도 7의 d).

[125] 상기 결과는 PLL 응집화 방법이 다른 세포외 소포체 분리 방법에 비해 보다 풍부한 RNA를 함유한다는 것을 나타낸다. 또한, 공지된 세포외 소포체의 miRNA 마커인 hsa-let-7a-5p and hsa-miR-142-3p를 사용한 RT-qPCR 실험 결과,

PLL 응집 방법은 UC와 비교하여 유사한 Ct 수치를 나타냈다(도 7의 e).

[126]

[127] **실험예 4. 양이온성 폴리머로부터 유도된 세포외 소포체 응집체 형성**

[128]

세포외 소포체 및 폴리양이온성 폴리머의 제타 포텐셜의 분석법을 간략히 설명하면, 비교예 1에 따라 분리된 세포외 소포체, PLL 용액(10 mg/mL), 및 PLL과 세포외 소포체 응집체에 대한 제타 포텐셜을 제타 포텐셜 분석기(Zetasizer Pro; Malvern Panalytical; UK)를 이용하여 측정하였다. 응집체는 탈이온수로 재현탁하기 어렵기 때문에 1 mL의 혈장으로부터 응집된 펠렛(PLL 0.5 mg/mL)을 먼저 10 μ L의 GuTc 용액(10 M)에 재현탁한 다음, 990 μ L의 탈이온수를 용액에 첨가하였다. 혼합물을 볼텍스 믹서를 이용하여 5 분 동안 조심스럽게 분산시켰다.

[129]

그 결과를 도 8의 a에 나타나내었다.

[130]

세포외 소포체는 -19.7 mV의 음 전하를 나타내는 반면, PLL 용액 (10 mg/mL)은 42.4 mV의 강한 양전하 제타 포텐셜을 나타낸다. 세포외 소포체를 PLL 폴리머와 결합할 경우, 세포외 소포체-PLL 응집체의 제타 포텐셜은 -5.6 mV로 중화되었다. 상기 결과는 세포외 소포체의 음 전하와 PLL 폴리머의 양전하 간의 강한 정전기적 상호작용을 나타낸다. 알부민은 약한 음 전하를 나타내는 반면, η -글로불린은 약한 양 전하를 나타냈다. 한편, 피브리노젠은 세포외 소포체와 유사한 -18.7 mV의 음 전하를 나타내어, 양이온성 PLL과 강하게 상호작용할 수 있음을 보여준다(도 8의 a, b 및 도 9).

[131]

혈장 단백질 및 PLL의 제타 포텐셜을 이해한 후, 본 발명자들은 PLL 용액을 첨가함으로써 세포외 소포체-결핍된 혈장의 응집체 형성 가능성을 조사하였다(도 8의 d). 세포외 소포체가 없음에도 불구하고, 대조군 혈장과 비교하여 비교적 약한 응집체 형성이 발견되었다. 따라서, 본 발명자들은 혈청(피브리노젠이 배제됨) 및 PLL에 의해 세포외 소포체-결핍된 혈청에 대한 응집체 형성을 추가로 조사하였다(도 8의 e 및 f). 놀랍게도, 뚜렷한 응집체 형성이 나타나지 않았다. 상기 결과는 혈장 단백질 및 PLL이 전기적 상호작용에 의해 응집되고, 피브리노젠이 PLL과 응집하는 주요 단백질임을 보여준다.

[132]

그 다음, 세포외 소포체-PLL 응집체 형성에 대한 인큐베이션 온도의 영향을 조사하였다. 혈장-PLL 폴리머 혼합물을 4°C 및 25°C에서 10 분 동안 각각 인큐베이션 한 다음 원심분리하였다. 세포외 소포체 응집은 25°C보다 4°C에서 훨씬 더 효율적이었다(도 10)

[133]

PLL 농도가 증가할수록, 펠렛 크기 및 형태 역시 증가하였고, 펠렛은 보다 선명해졌다(도 8의 b 및 도 9).

[134]

[135] **실험예 5. 응집체로부터 세포외 소포체의 재현탁**

[136]

세포외 소포체 응집체를 혈장에 PLL 용액을 단순히 첨가함으로써 성공적으로 획득하였다. 후속 적용을 위한 세포외 소포체의 분리를 위해, 적절한 버퍼 내

세포의 소포체 응집체의 재현탁이 필요하였다. 그러나, 강력히 응집된 폴리머와 세포의 소포체는 탈이온수 또는 PBS 용액에 현탁될 수 없었다(도 11의 a).

따라서, PLL 및 세포의 소포체 침전물의 용해를 위해 카오토로픽 물질(GuTc)을 사용하였다. 다양한 농도의 GuTc 용액(0-4 M)에 따른 세포의 소포체-PLL 응집체의 용해 능력을 측정하였다(도 11의 a).

[137] GuTc 농도별로 분리된 세포의 소포체의 크기 및 입자 농도를 NTA를 이용하여 분석하였다(도 11의 b 및 c). GuTc 용액의 농도가 증가할수록, 세포의 소포체의 크기는 점진적으로 감소하였다. 저농도의 GuTc(1M, 2M)에서, 보다 큰 입자가 관측되었다(~300 nm). 1M GuTc에서 세포의 소포체 농도는 0.03×10^{10} 로 매우 낮았다. 반면, 고농도의 GuTc(4M)에서, 입자 크기는 피크 값이 102 nm으로 상당히 감소하여, 응집체로부터 완전히 용해되었다고 생각된다. 혈장 내 고정된 PLL 농도(0.2 mg/mL)에서, 4 M의 GuTc 용액은 응집체를 용해하는 농도들 중 최고의 효과를 나타냈다. 최적화된 GuTc 버퍼는 1 분 내에 세포의 소포체 응집체 펠렛을 성공적으로 용해시켰다.

[138] 세척 용액 내 카오토로픽 물질(GuTc) 농도에 따른 단백질 불순물 및 미세 소포체 양을 측정한 결과, 2M의 GuTc로 세척할 경우 세척 과정의 순도(입자/단백질 농도)가 가장 높음을 확인하였다(도 12).

[139] 상기 세포의 소포체 응집체 펠렛의 용해는 용리 용액으로 프로테아제 K를 사용하였을 경우에도 관찰되었다(도 13).

[140]

[141] 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.

[142]

[143] [부호의 설명]

[144] 10 : 응집체 11 : 미세 소포체

[145] 12 : 다가 양이온 물질 110 : 추출 튜브

[146] 120, 120a : 포획 필터

산업상 이용가능성

[147] 본 발명에 따른 방법은 다가 양이온 물질을 이용하여 원심 분리 과정 없이 미세 소포체를 추출할 수 있는 생물학적 샘플로부터 미소 소포체를 추출할 수 있는바, 미세 소포체가 활용되는 다양한 산업분야에서 유용하게 활용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법에 있어서,
 상기 생물학적 샘플에 다가 양이온 물질이 첨가되어 상기 미세 소포체와
 상기 다가 양이온 물질이 전기적 힘에 의해 응집한 응집체가 형성되는
 단계와;
 상기 응집체를 포함하는 상기 생물학적 샘플이 포획 필터를 통과하면서
 상기 응집체가 상기 포획 필터에 포획되는 단계와;
 상기 응집체가 포획된 상기 포획 필터에 용리 용액을 통과시켜 상기
 응집체로부터 상기 미세 소포체를 분리하여 상기 미세 소포체를
 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터
 미세 소포체를 추출하는 방법.
- [청구항 2] 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법에 있어서,
 상기 생물학적 샘플에 다가 양이온 물질이 첨가되어 상기 미세 소포체와
 상기 다가 양이온 물질이 전기적 힘에 의해 응집한 응집체가 형성되는
 단계와;
 상기 응집체를 포함하는 상기 생물학적 샘플이 포획 필터를 통과하면서
 상기 응집체가 상기 포획 필터에 포획되는 단계와;
 상기 응집체가 포획된 상기 포획 필터에 음 전하를 갖는 버퍼 용액을
 통과시켜 상기 포획 필터로부터 상기 응집체를 이탈시키는 단계와;
 상기 포획 필터로부터 이탈된 상기 응집체에 용리 용액을 투입하여 상기
 응집체로부터 상기 미세 소포체를 분리하여 상기 미세 소포체를
 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터
 미세 소포체를 추출하는 방법.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서,
 다가 양이온 물질이 폴리 라이신, 폴리아르기닌, 폴리 히스티딘,
 프로타민, 양이온성 텍스트란, 양이온성 텐드리머, 양이온성
 폴리사카라이드, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌이민, 폴리쿼터늄, 또는
 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를
 추출하는 방법.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서,
 상기 용리 용액은 카오토로픽 물질 또는 프로테아제(Protease)를 포함하는
 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법.
- [청구항 5] 제1항 또는 제2항에 있어서, 생물학적 샘플이 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 침,
 뇌척수액, 눈물, 땀, 대변, 복수, 양수, 정액, 유(milk), 세포 배지, 조직
 추출물 또는 암 조직인 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터 미세
 소포체를 추출하는 방법.
- [청구항 6] 제4항에 있어서,

상기 카오트로픽 물질은 구아니디늄(Guanidinium) 이온을 포함하는 염, n-부탄올, 에탄올, 과염소산 리튬, 아세트산 리튬, 염화마그네슘, 폐놀, 2-프로판올, 소듐 도데실 설페이트, 티오우레아, 우레아, 또는 이들의 조합인 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법.

[청구항 7]

제4항에 있어서,

상기 프로테아제(Protease)는 프로테나제 K(Proteinase K), 펩신(Pepsin), 트립신(Trypsin) 또는 키모트립신(Chymotrypsin)를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법.

[청구항 8]

제1항에 있어서,

상기 포획 필터는 상기 응집체가 포획 가능한 사이즈의 공극이 형성되는 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법.

[청구항 9]

제8항에 있어서,

상기 포획 필터는

상기 공극이 형성된 멤브레인과,

상기 공극이 형성되도록 복수의 마이크로 비드가 3차원적으로 밀착된 비드 패킹 필터 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법.

[청구항 10]

제8항에 있어서,

상기 포획 필터는 친수성 물질 또는 양이온 교환 수지로 마련되는 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법.

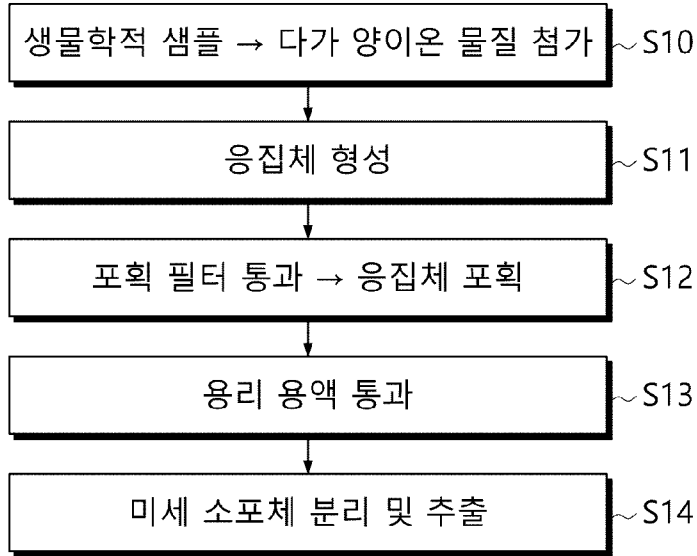
[청구항 11]

제2항에 있어서,

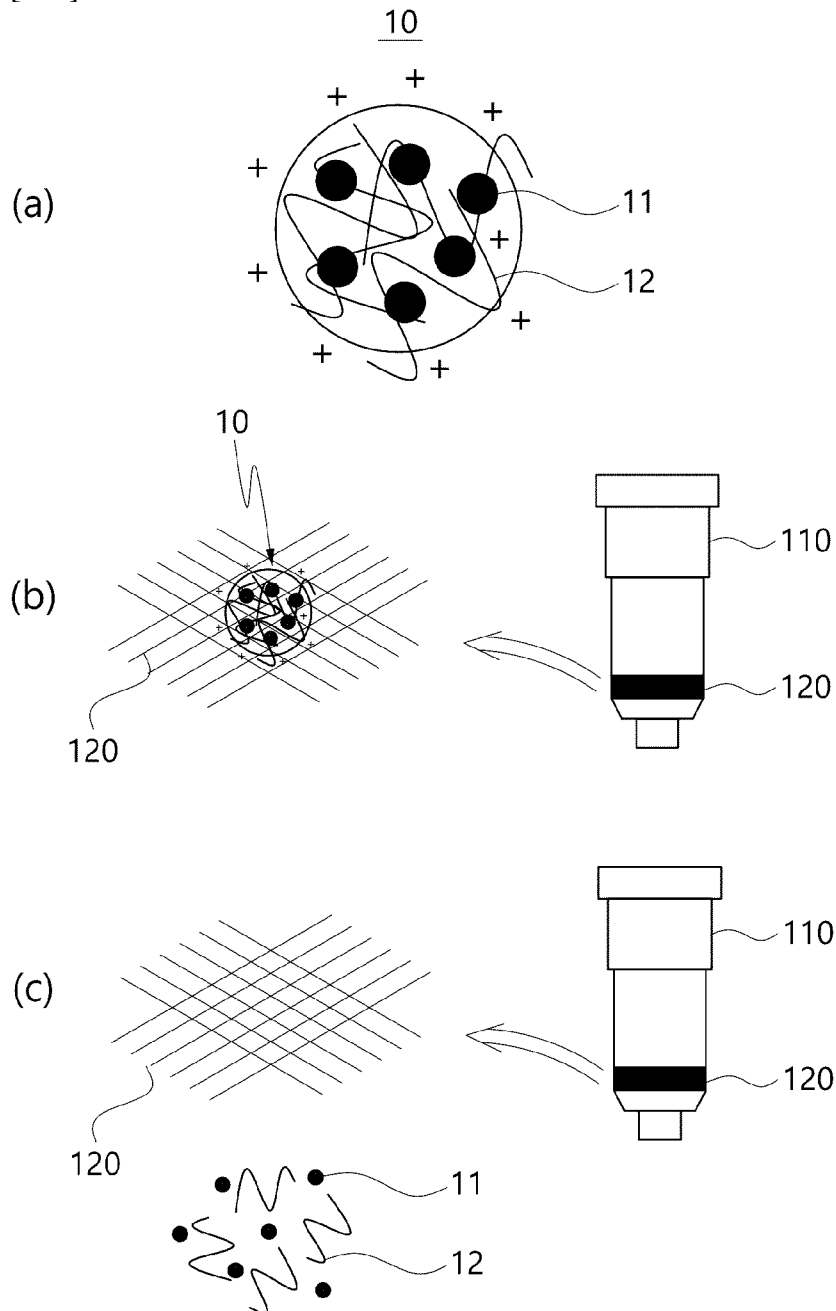
상기 포획 필터는 친수성 물질 또는 양이온 교환 수지로 마련되어 상기 응집체가 전기적인 힘에 의해 상기 포획 필터에 포획되며;

상기 버퍼 용액은 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ 이온 중 적어도 하나, 또는 2 이상의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 생물학적 샘플로부터 미세 소포체를 추출하는 방법.

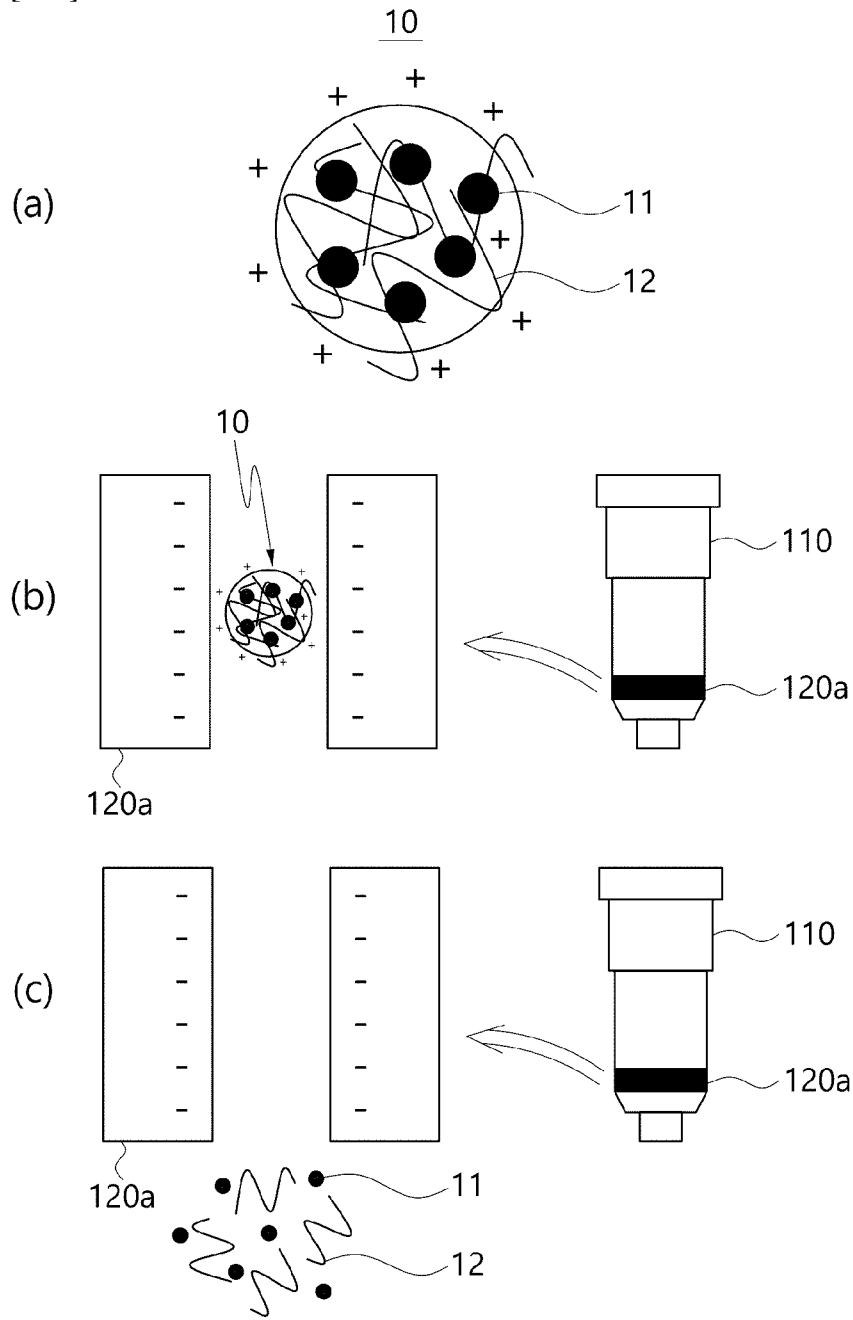
[도1]



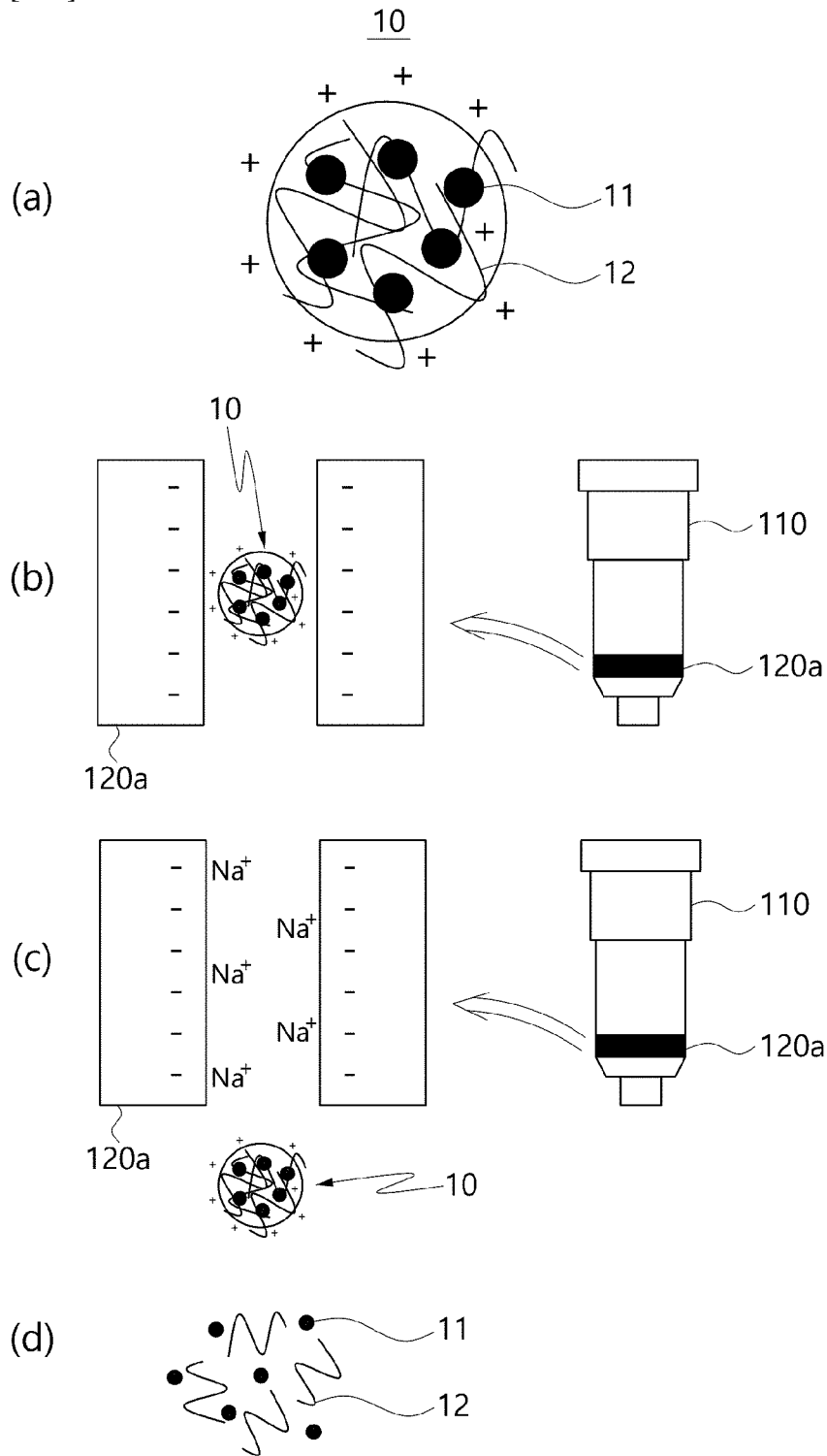
[도2]



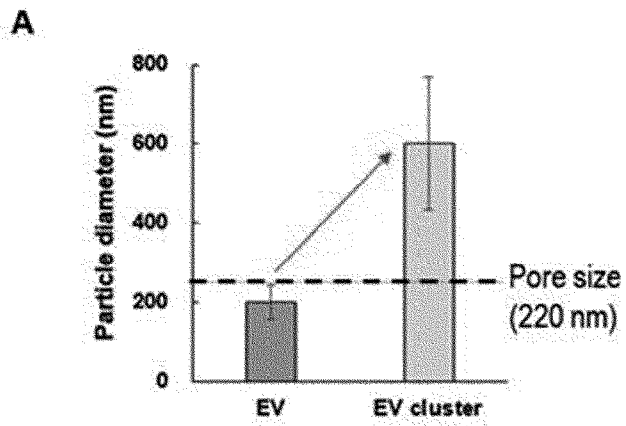
[도3]



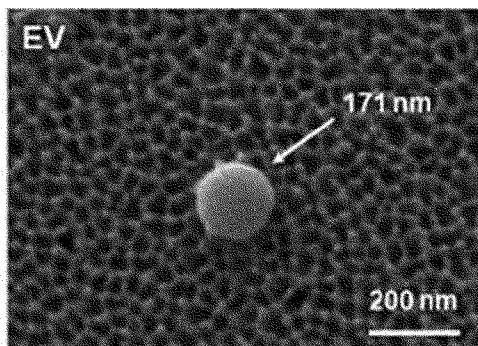
[도4]



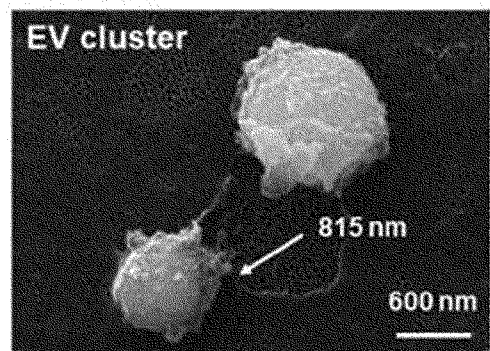
[도5]



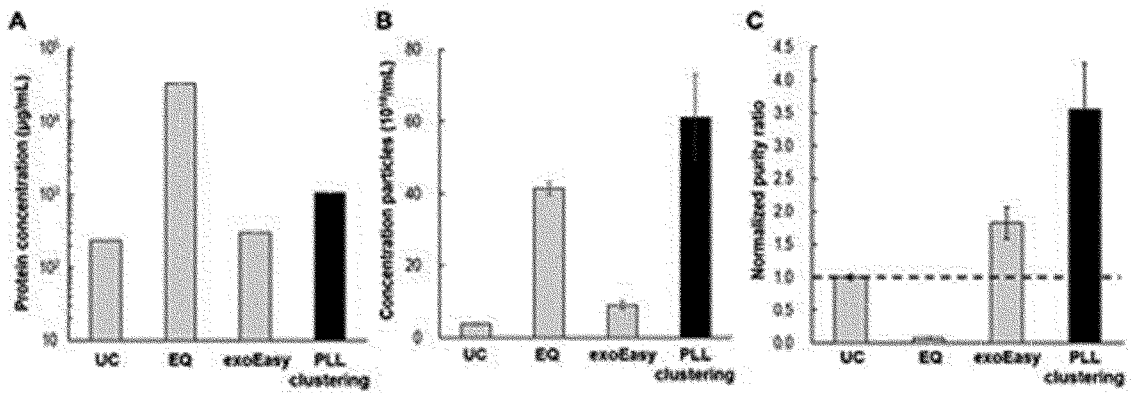
B



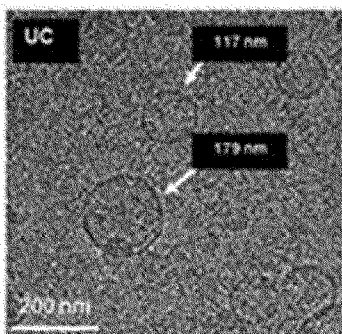
C



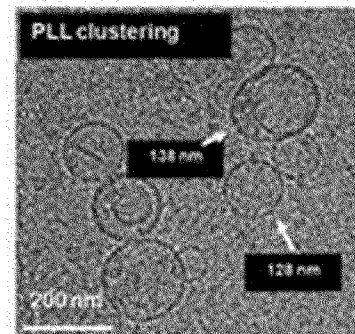
[도6]



D

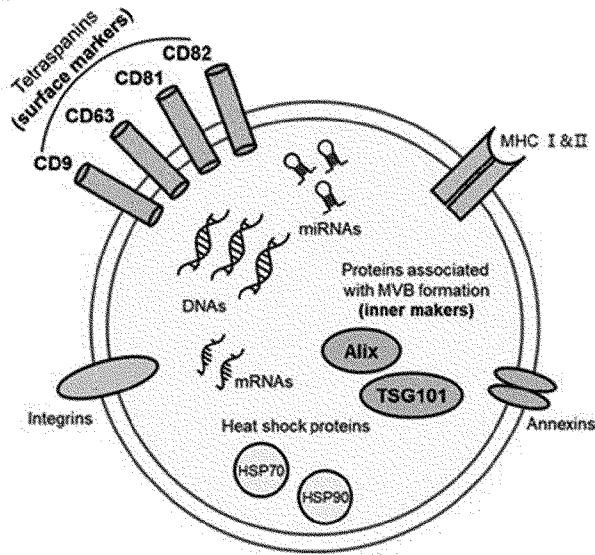


E

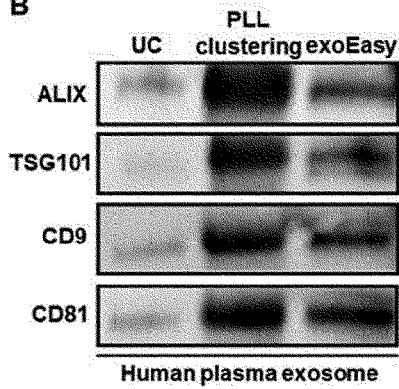


[도7]

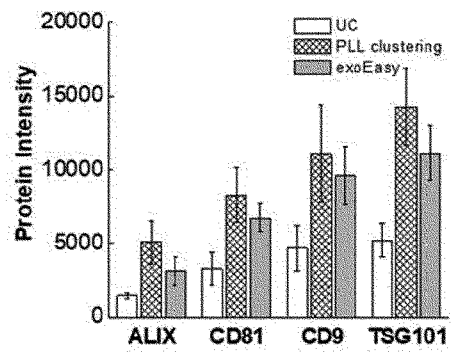
A



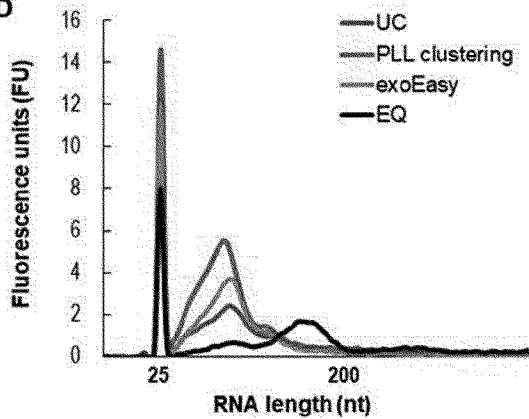
B



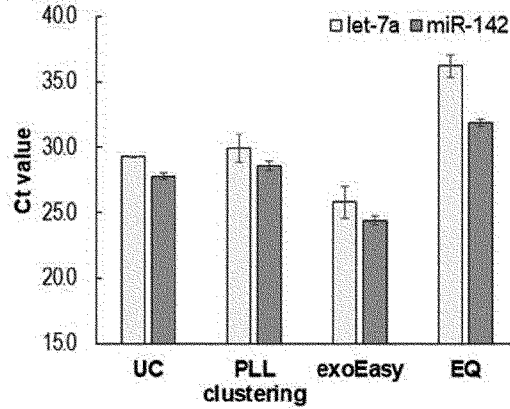
C



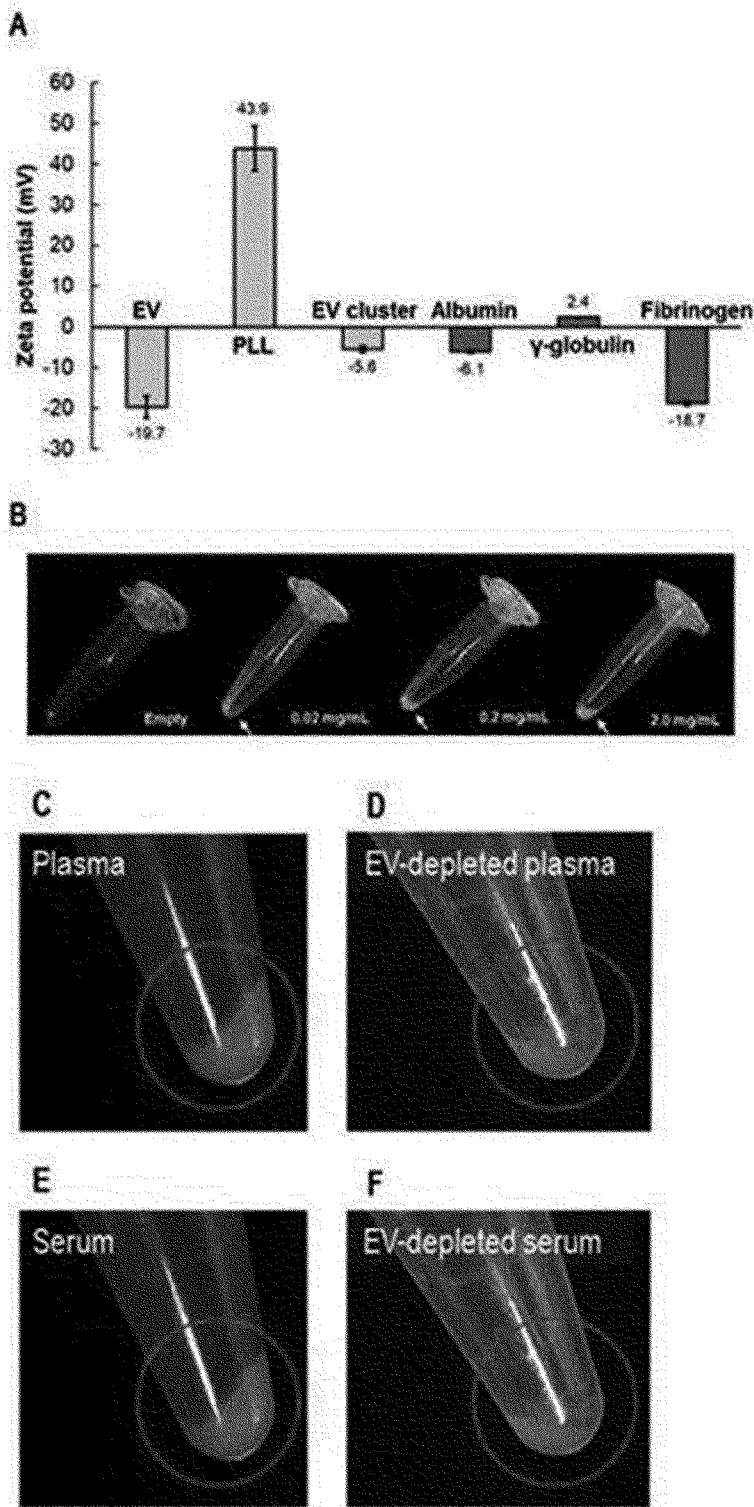
D



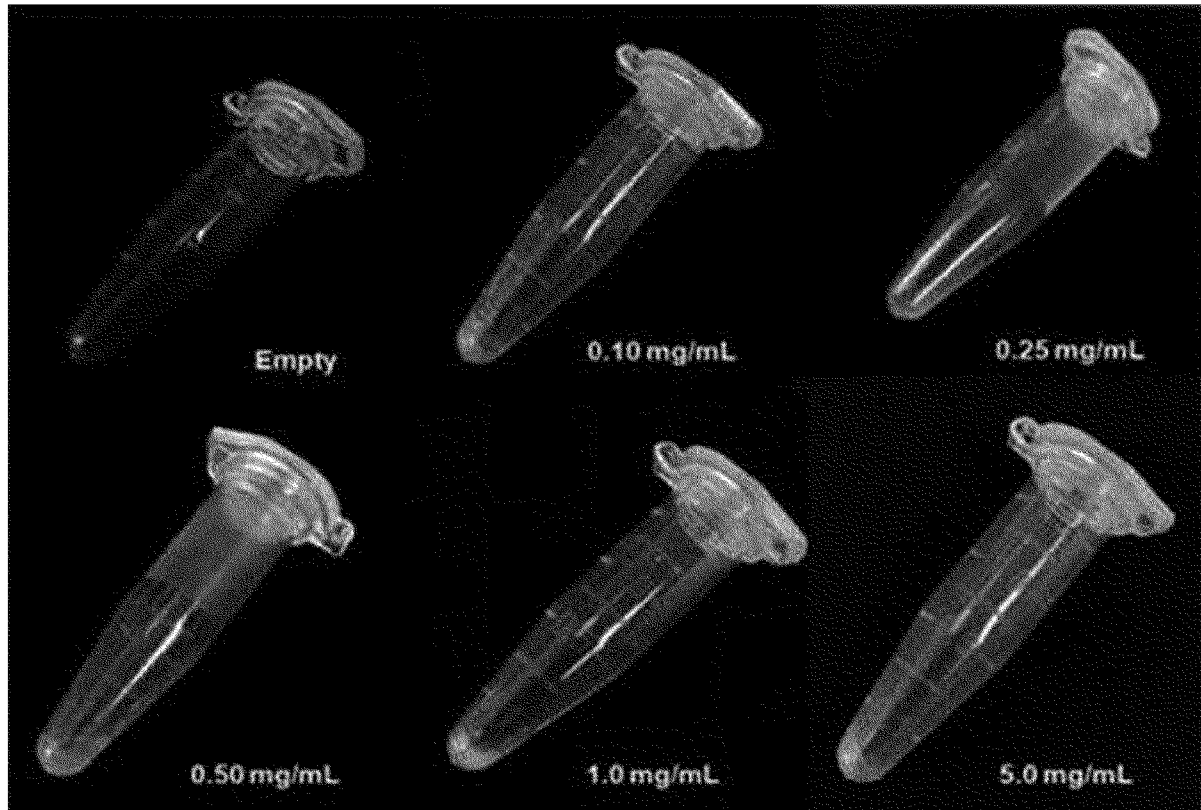
E



[도8]



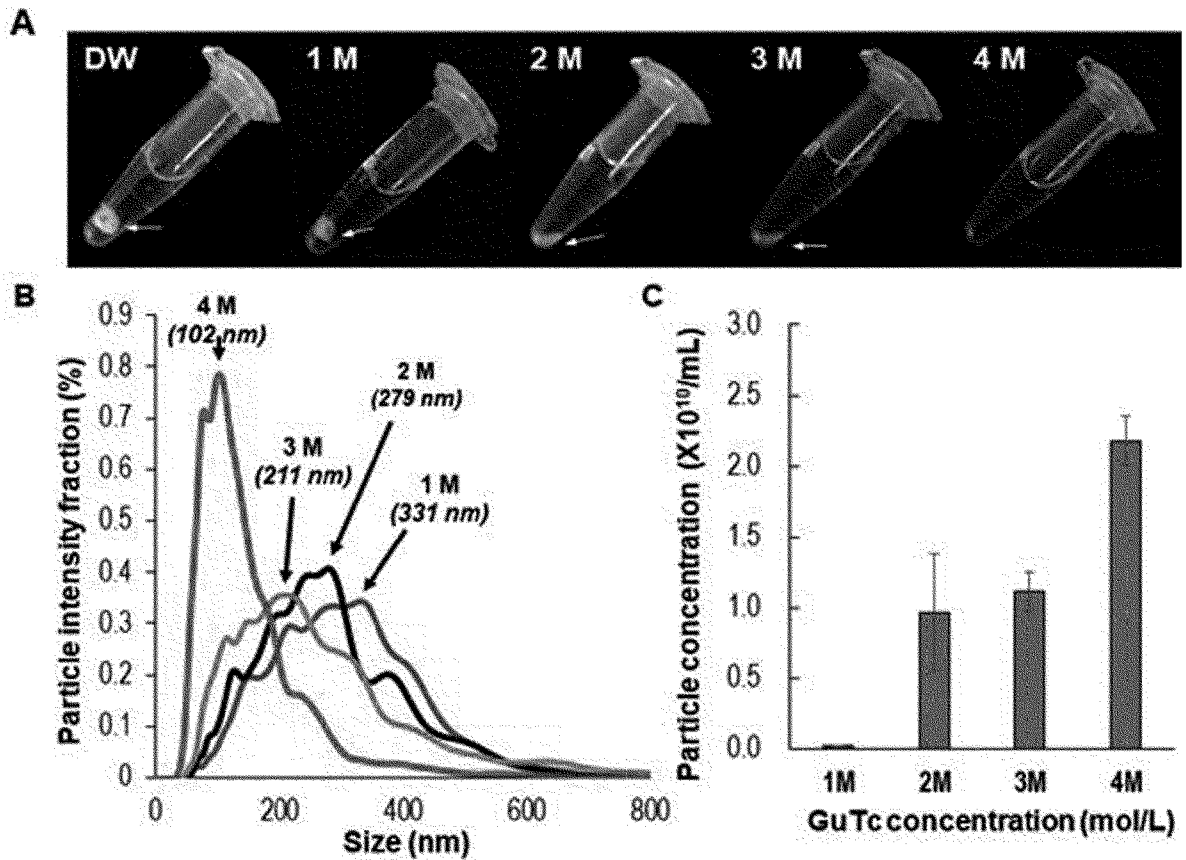
[도9]



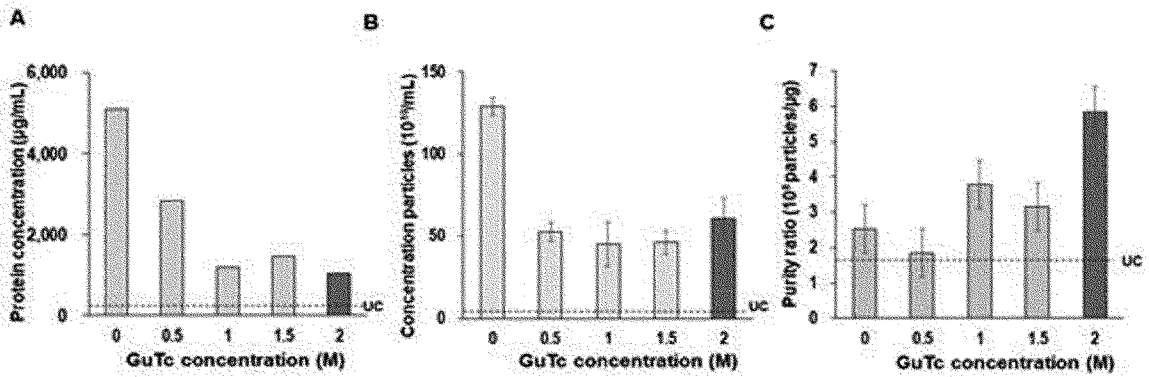
[도10]

Incubation Time	10 min	30 min	60 min	90 min
24°C				
4°C				

[도11]



[도12]



[도13]

