



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월03일

(11) 등록번호 10-2130023

(24) 등록일자 2020년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 30/60 (2006.01) B01D 15/34 (2006.01)

B01J 20/28 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 30/6034 (2013.01)

B01D 15/34 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0018605

(22) 출원일자 2019년02월18일

심사청구일자 2019년02월18일

(56) 선행기술조사문헌

D D. Taylor 등, Methos, 2015, 87권, 페이지 3-10.(2015.12.31.)*

홍창석 등, Journal of Extracellular Vesicle, 2016, 5권.(2016.12.31.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

(72) 발명자

박용

서울특별시 성북구 인촌로 73 혈액종양내과 (안암동5가)

최연호

서울특별시 강남구 선릉로 221, 405동 603호(도곡동, 도곡렉슬아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 12 항

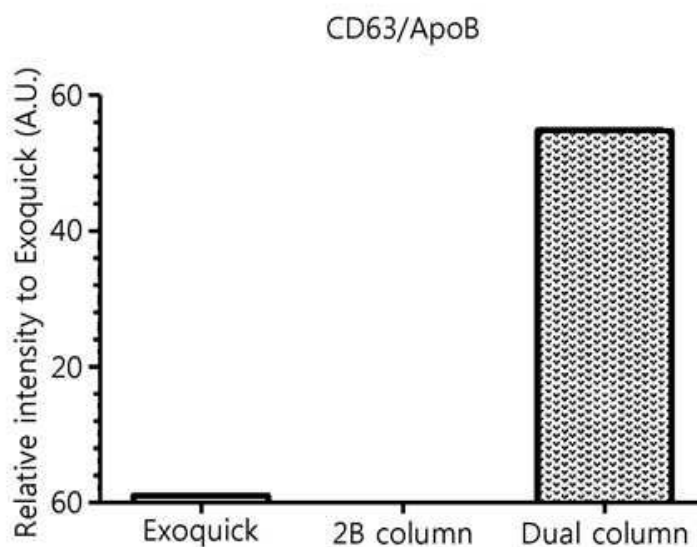
심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 엑소좀을 분리하기 위한 다중 컬럼 및 엑소좀 분리 방법

(57) 요약

본 발명은 지질 단백질, 수용성 단백질 등의 불순물 및 엑소좀이 혼합된 생체시료로부터 엑소좀을 분리하기 위한 다중 컬럼 및 엑소좀 분리 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

B01J 20/28054 (2013.01)

B01J 20/2808 (2013.01)

B01J 20/28085 (2013.01)

B01D 2221/10 (2013.01)

G01N 2030/8813 (2013.01)

(72) 발명자

홍성희

서울 광진구 아차산로70길 61, 현대아파트 5차 50
3동 1202호(광장동, 광장현대아파트)

김현구

서울특별시 서초구 반포대로39길 63-8 A동 402호
(반포동, 반포서래월드메르디앙라스칼라)

박지호

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동) 한국과학기술원
외국인교수아파트 C동 501호

정직한

인천광역시 연수구 먼우금로 19(동춘동, 동남아파
트) 104동 1504호

명세서

청구범위

청구항 1

엑소좀 분리용 다중 컬럼으로서,

공극의 크기가 20nm 내지 100nm인 다공성 비드 a), 상기 다공성 비드 a) 상부에 적층되고, 공극의 크기가 20nm 이하인 다공성 비드 b) 및 상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b) 사이에 위치하는 분리막을 포함하고,

상기 다공성 비드 a)는 세파로스 CL-6B이고, 상기 다공성 비드 b)는 세파크릴 200-HR이며, 상기 다공성 비드 a)는 생체시료 내 엑소좀과 지질 단백질을 분리하는 것이고, 상기 다공성 비드 b)는 생체시료 내 엑소좀과 수용성 단백질을 분리하는 것인, 엑소좀 분리용 다중 컬럼.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b)의 부피비는 95:5 내지 5:95 인, 엑소좀 분리용 다중 컬럼.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b)의 부피비는 5:5 내지 1:9 인, 엑소좀 분리용 다중 컬럼.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b)의 부피비는 3:7 내지 1:9 인, 엑소좀 분리용 다중 컬럼.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 다공성 비드 a)의 표면 음전하는 상기 다공성 비드 b)의 표면 음전하 보다 높은 음전하 값을 가지는 것인, 엑소좀 분리용 다중 컬럼.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 생체시료는 혈액, 림프액, 뇌척수액, 소변, 양수, 모유, 침, 정액 및 세포배양액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 엑소좀 분리용 다중 컬럼.

청구항 8

공극의 크기가 20nm 내지 100nm인 다공성 비드 a), 상기 다공성 비드 a) 상부에 적층되고, 공극의 크기가 20nm 이하인 다공성 비드 b) 및 상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b) 사이에 위치하는 분리막을 포함하는, 다중 컬럼을 이용한 엑소좀 분리 방법으로서,

엑소좀을 포함하는 생체시료를 상기 다공성 비드 b)에 통과시켜 엑소좀과 수용성 단백질을 분리하는 단계; 및 상기 다공성 비드 b)를 통과한 생체시료를 상기 다공성 비드 a)에 통과시켜 엑소좀과 지질 단백질을 분리하는 단계; 를 포함하고,

상기 다공성 비드 a)는 세파로스 CL-6B이고, 상기 다공성 비드 b)는 세파크틸 200-HR인, 엑소좀 분리 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b)의 부피비는 95:5 내지 5:95 인, 엑소좀 분리 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b)의 부피비는 5:5 내지 1:9 인, 엑소좀 분리 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b)의 부피비는 3:7 내지 1:9 인, 엑소좀 분리 방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 다공성 비드 a)의 표면 음전하는 상기 다공성 비드 b)의 표면 음전하 보다 높은 음전하 값을 가지는 것인, 엑소좀 분리 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제8항에 있어서,

상기 생체시료는 혈액, 림프액, 뇌척수액, 소변, 양수, 모유, 침, 정액 및 세포배양액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 엑소좀 분리 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 다양한 생체분자 및 엑소좀이 혼합된 생체시료로부터 엑소좀을 순도 높게 분리하기 위한 다중 컬럼

[0001]

및 엑소좀 분리 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 세포외 소포(extracellular vesicle)는 세포에서 방출 또는 분비되는 엑소좀(exosome), 엑토좀(ectosome), 미세소포(microvesicle) 및 세포자멸사 소체(apoptotic body)를 포함한 개념으로 그중 엑소좀은 20-150 nm 의 크기를 가지며 세포 내 다소포체(Multi vesicular bodies; MVB)로부터 생성되는 생체 나노 입자이다.
- [0004] 이들 세포외 소포는 혈액, 림프액, 뇌척수액, 소변, 양수, 모유, 침, 정액 같은 여러 종류의 다양한 생체액(biofluid)에서 비교적 쉽게 분리할 수 있으며, 유래된 세포에 따라, 텍소좀(dexosome; 수지상세포에서 유래), 온코좀(oncosome; 암세포에서 유래), 프로타좀(prostasome; 전립선세포에서 유래), 카디오좀(cardiosome; 심근세포에서 유래) 등으로 불린다. 세포외 소포는 그 유래되는 세포나 세포 내 소기관에 따라 다양한 뉴클레오타이드 또는 표지단백질을 포함하게 된다. 예를 들어, 암세포에서 유래된 세포외 소포인 온코좀은 암세포의 성장을 유도하는 유전자의 mRNA를, 항원제시세포(antigen-presenting cell)에서 유래된 세포외 소포는 주요조직합복합체를 포함한다. 이처럼 세포외 소포는 세포특이적인 단백질이나 뉴클레오타이드 같은 생체물질이 고농도로 농축되어 포함된 상태이므로 일반 생체액에선 전체 단백질체의 0.01% 정도로 존재하여 통상적인 분석방법으로는 검출이 어려운 단백질이나 뉴클레오타이드도 세포외 소포에선 비교적 쉽게 검출이 가능한 장점이 있다. 아울러 비록 세포외 소포에 존재하는 단백질이나 뉴클레오타이드의 종류가 전체의 극히 일부이긴 하나 세포외 소포의 물질은 자신이 유래한 세포의 고유의 특성을 나타낼 수 있으므로 엑소좀 분석은 특정 질환의 진단 목적으로 매우 유용하며, 이에 대한 연구가 최근 활발히 이루어지고 있다.
- [0005] 엑소좀을 이용한 진단이나 치료방법 연구에서는 순도 높은 엑소좀을 얻는 것이 중요하다. 엑소좀의 분리와 관련하여 대한민국 공개특허 제10-2016-0115988호를 포함하여 다양한 방법이 연구되어 오고 있다. 이의 예로는 초원심분리(ultracentrifuge), 밀도 원심분리(density centrifuge), 컬럼(column)의 이용, PEG 침전(PEG precipitation; ExoQuick™, Total Exosome Isolation™ 등 사용 포함), 크로마토그래피(chromatography), 면역-자기분리(immuno-magnetic separation, IMS) 및 음향정제(acoustic separation, acoustic purification) 등이 있다. 컬럼 크로마토그래피의 경우, 단시간에 비교적 높은 순도의 엑소좀을 수득할 수 있다는 점에서 최근에 많이 주목 받고 있다.
- [0006] 그러나, 종래 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 엑소좀을 분리하는 경우, 엑소좀과 함께 지질 단백질(lipoprotein)이 용출되거나, 두 번 이상의 분리 단계를 수행하면서 엑소좀이 손실되거나 시간이 오래 걸린다는 문제점이 있다. 기존의 컬럼 크로마토그래피 연구는 엑소좀 용출구간에만 집중되었고 지질 단백질 용출에 대한 심도 있는 분석은 거의 이루어지지 않았다. 그러나, 세포배양액 또는 혈액 내에는 엑소좀과 비슷한 크기, 밀도를 가진 지질 단백질이 항상 함께 존재하고 있기 때문에 엑소좀 연구에 있어서 지질 단백질 분리는 필수적이다.
- [0007] 이와 같은 배경하에서 본 발명자들은 생체시료에서 엑소좀과 함께 분리되는 지질 단백질, 수용성 단백질 등의 다양한 불순물의 분리 방법을 개발하고자 하였으며, 세포배양액 및 혈액에서 컬럼을 이용해 용출되는 각 구간의 입자를 분석함으로써 엑소좀과 불순물을 분리할 수 있는 조건을 최적화하고 이를 이용해 순수한 엑소좀을 얻을 수 있는 방법을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2016-0115988호

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Joanne Louise Welton, Jason Paul Webber, Laur-Alexandru Botos, Michael Jones & Aled Clayton (2015) Ready-made chromatography columns for extracellular vesicle isolation from plasma, Journal of Extracellular Vesicles, 4:1, DOI: 10.3402/jev.v4.27269

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 2 종류의 비드를 특정 순서와 비율로 적층 하였을 때 엑소좀의 분리 효율이 현저히 뛰어나다는 것을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 목적은 생체시료에 포함된 엑소좀을 지질 단백질, 수용성 단백질로부터 분리하기 위한 다중 컬럼 및 이를 이용한 엑소좀 분리 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 엑소좀 분리용 다중 컬럼으로서, 공극의 크기가 20nm 내지 100nm인 다공성 비드 a), 상기 다공성 비드 a) 상부에 적층되고, 공극의 크기가 20nm 이하인 다공성 비드 b) 및 상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b) 사이에 위치하는 분리막을 포함하고, 상기 다공성 비드 a)는 생체시료 내 엑소좀과 지질 단백질을 분리하는 것이고, 상기 다공성 비드 b)는 생체시료 내 엑소좀과 수용성 단백질을 분리하는 것인, 엑소좀 분리용 다중 컬럼이 제공된다.
- [0016] 일 측에 따르면, 상기 다공성 비드 a) 및 다공성 비드 b)의 부피비는 95:5 내지 5:95 일 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 다공성 비드 a) 및 다공성 비드 b)의 부피비는 5:5 내지 1:9 일 수 있다.
- [0018] 일 측에 따르면, 상기 다공성 비드 a) 및 다공성 비드 b)의 부피비는 3:7 내지 1:9 일 수 있다.
- [0019] 일 측에 따르면, 상기 다공성 비드 a)의 표면 음전하는 상기 다공성 비드 b)의 표면 보다 높은 음전하 값을 가지는 것일 수 있다.
- [0020] 일 측에 따르면, 상기 다공성 비드는 아가로스, 세파로스, 셀룰로오스, 실리카 겔, 텍스트란, N, N'-메틸렌 비스아크릴아마이드, 메타크릴, 폴리아크릴아마이드 및 폴리스티렌으로부터 선택되는 1종 이상의 물질로 구성된 것일 수 있다.
- [0021] 일 측에 따르면, 상기 생체시료는 혈액, 림프액, 뇌척수액, 소변, 양수, 모유, 침, 정액 및 세포배양액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 공극의 크기가 20nm 내지 100nm인 다공성 비드 a), 상기 다공성 비드 a) 상부에 적층되고, 공극의 크기가 20nm 이하인 다공성 비드 b) 및 상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b) 사이에 위치하는 분리막을 포함하는 다중 컬럼을 이용한 엑소좀 분리 방법으로서, 엑소좀을 포함하는 생체시료를 상기 다공성 비드 b)에 통과시켜 엑소좀과 수용성 단백질을 분리하는 단계; 및 상기 다공성 비드 b)를 통과한 생체시료를 상기 다공성 비드 a)에 통과시켜 엑소좀과 지질 단백질을 분리하는 단계; 를 포함하는, 엑소좀 분리 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명의 엑소좀 분리용 다중 컬럼 및 이를 이용한 엑소좀 분리 방법은 생체시료 내 포함된 지질 단백질, 수용성 단백질 등의 불순물 양을 크게 감소시켜 분리된 엑소좀의 순도를 높일 수 있다.
- [0025] 특히, 본 발명의 다중 컬럼을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행하는 경우 지질 단백질 대비 엑소좀의 분리 효율이 우수하므로 시료 중의 엑소좀 만을 분리하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0026] 설명되는 실시예들을 통해 얻을 수 있는 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 아래에 기재된 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 컬럼의 모식도이다.
- 도 2는 종래 단일 컬럼과 본 발명의 다중 컬럼을 이용한 엑소좀의 분리 결과를 나타낸다 (2B: 2B 단일 컬럼, Dual column: 본 발명의 다중 컬럼).

A: 컬럼별 분획 시료의 흡광도

B: 동적 광 산란법(dynamic light scattering; DLS)을 통해 확인된 컬럼별 분획 시료에서 입자의 Z-평균 크기.

도 3은 본 발명의 다중 컬럼을 이용하여 분리한 혈청 시료의 실제 분획에서 엑소좀과 지질 단백질의 검출 결과이다(ApoB: 지질 단백질, CD63: 엑소좀 마커 단백질, 9-15: 컬럼 분획번호 #9-#15).

A: SDS-PAGE

B: 웨스턴 블롯

C: 지질 단백질과 엑소좀의 상대적 검출 강도

도 4는 종래 단일 컬럼과 본 발명의 다중 컬럼을 이용하여 분리한 혈청 시료의 각 분획 별 엑소좀과 지질 단백질의 검출 결과를 나타낸 것이다(serum: 별도의 처리가 되지 않은 혈청, Marker: 분자량 확인용 표준 마커, ExoQuick: ExoQuick 분리방법, 2B column: 2B 단일 컬럼, Dual column: 본 발명의 다중 컬럼).

A: 분획물 내의 총단백질 정량 결과

B: SDS-PAGE

C: 웨스턴 블롯

도 5는 종래 단일 컬럼과 본 발명의 다중 컬럼을 이용하여 분리한 혈청 시료의 분획물 내 지질 단백질에 대한 엑소좀의 상대적 비율을 비교한 것이다(ExoQuick: ExoQuick 분리방법, 2B column: 2B 단일 컬럼, Dual column: 본 발명의 다중 컬럼).

도 6은 세파로스 CL-6B 와 세파크릴 200-HR의 적층 순서가 서로 다른 다중 컬럼을 이용한 엑소좀과 지질 단백질의 검출 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 혈청 시료의 분획에서 검출된 수용성 단백질인 알부민의 양을 나타낸 것이다.

도 8은 세파로스 CL-6B 와 세파크릴 200-HR의 부피비를 다르게 하여 제조된 다중 컬럼을 이용한 엑소좀과 지질 단백질의 검출 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 혈청 시료의 분획 구간 11 ~ 12에서 검출된 엑소좀과 지질 단백질의 양을 세파로스 CL-6B 와 세파크릴 200-HR의 부피비에 따라 나타낸 것이다.

도 10은 혈청 시료의 분획 구간 11 ~ 12에서 검출된 CD63밀도(%) / ApoB밀도(%)를 세파로스 CL-6B 와 세파크릴 200-HR의 부피비에 따라 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 다른 설명이 없는 한, 각 도면에 제시된 동일한 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0030] 아래 설명하는 실시예에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 발명의 범위를 설명된 실시 형태로 한정하려는 것이 아니며, 본 출원을 통해 권리로서 청구하고자 하는 범위는 이들에 대한 모든 변경, 균등 물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0031] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0032] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

- [0033] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0034] 본 명세서에서 용어, "엑소좀(exosome)"은 세포 배양들을 포함하여 많은 종류의 세포로부터 분비되는 20nm 내지 150nm 직경의 세포 유래 소포(vesicle)를 의미하며, 막 구성요소, 단백질, RNA를 전달하는 등 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 엑소좀 분리용 다중 컬럼으로서, 공극의 크기가 20nm 내지 100nm인 다공성 비드 a), 상기 다공성 비드 a) 상부에 적층되고, 공극의 크기가 20nm 이하인 다공성 비드 b) 및 상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b) 사이에 위치하는 분리막을 포함하고, 상기 다공성 비드 a)는 생체시료 내 엑소좀과 지질 단백질을 분리하는 것이고, 상기 다공성 비드 b)는 생체시료 내 엑소좀과 수용성 단백질을 분리하는 것인, 엑소좀 분리용 다중 컬럼이 제공된다.
- [0036] 상기 다공성 비드 a)는 생체시료 내 엑소좀과 지질 단백질을 분리하기 위한 것으로서 10MDa 이하 크기의 분자를 분리할 수 있고, 상기 다공성 비드 b)는 생체시료 내 엑소좀과 수용성 단백질을 분리하기 위한 것으로서 500kDa 이하 크기의 분자를 분리할 수 있으며, 각각의 비드는 음전하를 띠는 것이 바람직하다. 또한, 컬럼 하부로 먼저 도달하는 지질 단백질이 전하의 영향으로 더욱 빠르게 용출되도록 하기 위해, 하부에 적층되는 다공성 비드 a)는 상부에 적층되는 다공성 비드 b)에 비해 더 낮은 평균 표면 전하를 가지는 것이 바람직하다(실시예 5 참조).
- [0037] 상기 분리막은 여러 종류의 비드를 컬럼 용기에 연속적으로 충전할 때에, 서로 다른 종류의 비드가 섞이지 않도록 상기 다공성 비드 a) 및 b) 사이에 위치한다. 상기 분리막은 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 등의 수지로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 다중 컬럼에 충전되는 다공성 비드는, 아가로스, 세파로스, 셀룰로오스, 실리카 겔, 텍스트란, N, N'-메틸렌 비스아크릴아마이드, 메타크릴, 폴리아크릴아마이드 및 폴리스티렌으로부터 선택되는 1종 이상의 물질로 구성된 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 상기 다공성 비드의 구체적인 예로는, 세파로스(Sephacryl) 2B, 4B, 6B, CL-2B, CL-4B 및 CL-6B; 세파크릴(Sephacryl) S-200 HR, S-300 HR, S-400 HR 및 S-500 HR; 및 토요펠(Toyopearl) HW-55, HW-65 및 HW-75 및 Superdex75을 들 수 있으며, 바람직하게는 세파로스 CL-6B 및 세파크릴 200-HR이다.
- [0040] 한편, 다공성 비드 a) 및 다공성 비드 b)는 95:5 내지 5:95의 부피비, 바람직하게는 5:5 내지 1:9의 부피비, 보다 바람직하게는 3:7 내지 1:9의 부피비로 충전된 것일 수 있다.
- [0041] 이와 같이, 공극의 크기와 표면 음전하 값이 상이한 2 종류의 비드를 특정 부피비로 충전하여 제조된 다중 컬럼을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행하는 경우, 지질 단백질, 엑소좀 및 수용성 단백질 각각의 용출 속도차이에 따라 엑소좀을 순도 높게 분리할 수 있다.
- [0042] 엑소좀이 포함된 생체시료는 혈액, 림프액, 뇌척수액, 소변, 양수, 모유, 침, 정액 및 세포배양액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 엑소좀은 상기 크로마토그래피 후 전체 용출액 중 20% 내지 80% 구간에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 엑소좀 분리 방법에 따르면 29% 내지 57% 구간에서 지질 단백질 대비 엑소좀의 비율이 높은 것으로 나타났다.
- [0044] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 공극의 크기가 20nm 내지 100nm인 다공성 비드 a), 상기 다공성 비드 a) 상부에 적층되고, 공극의 크기가 20nm 이하인 다공성 비드 b) 및 상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b) 사이에 위치하는 분리막을 포함하는 다중 컬럼을 이용한 엑소좀 분리 방법으로서, 엑소좀을 포함하는 시료를 상기 다공성 비드 b)에 통과시켜 엑소좀과 수용성 단백질을 분리하는 단계; 및 상기 다공성 비드 b)를 통과한 시료를 상기 다공성 비드 a)에 통과시켜 엑소좀과 지질 단백질을 분리하는 단계; 를 포함하는, 엑소좀 분리 방법이 제공된다.
- [0045] 상기 엑소좀 분리 방법에서 이용되는 다중 컬럼에 대한 설명은 앞서 설명한 바와 같다.
- [0046] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 도 1에 나타난 바와 같은 다중 컬럼 분획물 중 엑소좀은 9 내지 15 구간에서 나타났으며, 특히 10 내지 12 구간에서는 지질 단백질 및 수용성 단백질에 비해 상대적으로 높은 엑소좀 함량을

나타냈다(도 3). 상기 다중 컬럼을 이용하는 경우 PEG precipitation을 이용한 분획법 및 종래의 단일 컬럼에 버금가는 단백질 수율로 단일 컬럼에 비해 현저하게 높은 순도의 엑소좀 분획을 수득할 수 있어 엑소좀 분리에 유용하게 이용될 수 있다.

[0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해서 상세히 설명한다. 단 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0050] 실시예 1: 다중 컬럼의 제작

[0051] 크로마토그래피용 컬럼(직경: 10mm, 높이: 50mm)의 하부에 세파로스 CL-6B를 70%(v/v)로 충전한 후 상부에 세파크릴 200-HR을 30%(v/v) 충전하여 하부와 상부의 높이 비율이 7:3이 되도록 다중 컬럼을 제작하였다. 여기에 서, 세파로스 CL-6B와 세파크릴 200-HR의 평균 표면 전하 값은 각각 -30 및 -7이다.

[0053] 실시예 2: 기존 컬럼 조건에서 엑소좀 분리 능력 확인

[0054] 크로마토그래피용 컬럼(직경: 10mm, 높이: 50mm)에 충전 비드가 채워진 것을 이용하였으며, 시료로는 혈액을 10000 rcf, 4℃에서 30 min 동안 원심분리 후, 얻어진 상층액인 혈청을 이용하였다. 기존 단일 컬럼과 다중 컬럼에 의한 물질의 분리 효과를 확인하기 위해 상기 시료에 크기 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography; SEC)를 수행하였다.

[0055] 구체적으로, 컬럼에 충전된 비드는 단일 컬럼으로 세파로스 CL-2B를 이용하였으며(2B), 다중 컬럼으로는 실시예 1에서 제조된 것(Dual column)을 이용하였다. 시료를 로딩(loading)하기에 앞서, 300ml의 PBS로 충전된 비드를 세척(washing) 하고, 충전된 컬럼 비드 외에 이동상 버퍼가 다 소진되면 바로 준비된 시료를 로딩하였다. 컬럼에 로딩 되는 시료의 부피는 충전된 비드 전체부피의 5%를 넘지 않도록 하여, 상기 컬럼에 0.3 내지 0.5ml의 시료를 로딩(loading)했다. 이동상의 압력은 2-4 Pa 로 흘려주었다. 시료가 로딩된 시점부터 흘러나오는 용출액 0.5ml씩을 받은 용액구간을 1 구간으로 정의했으며, 채취된 용출액은 280 nm에서의 흡광도를 확인하고, 동적 광산란(dynamic light scattering; DLS)을 이용해 Z-평균 크기(Z-Average size)를 측정하여 도 2에 나타냈다. 상기 시료는 25-30 구간 내에 모두 용출되었다.

[0056] 그 결과, 흡광도(도 2A) 및 DLS분석(도 2B)에서 분획물 내의 엑소좀, 지질 단백질 및 수용성 단백질의 구분이 용이하지 않은 것으로 나타났다.

[0058] 실시예 3: 혈청에서 엑소좀과 지질 단백질 용출의 경향성 비교

[0059] 혈청 시료에서 각 구간별 엑소좀과 지질 단백질 및 수용성 단백질의 용출을 비교하기 위해 실시예 1의 다중 컬럼을 이용하여 실시예 2에 기재된 방법으로 분획하고, 각 분획에 대해 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하였다. 1차 항체로 엑소좀 마커 단백질인 CD63에 대한 항체(Santa Cruz사 제조 sc-15363)를 1:500으로 희석하고, 지질 단백질 항체인 ApoB-100 항체(Santa Cruz사 제조 sc-25542) 1:1000으로 희석한 다음 희석된 항체들을 사용하여 용출 여부를 확인하였다.

[0060] 그 결과, 수용성 단백질인 알부민(~65kDa)은 구간번호 #13 이후부터 검출되었으며(도 3A), 지질 단백질은 구간번호 #9에서 가장 뚜렷이 나타난 후 #11까지 검출되었다. 엑소좀은 #9에서 소량으로 검출되었고, #11 및 #12 구간에서 가장 진하게 나타난 후, 점차 검출되는 양이 감소했다(도 3B). #9 내지 #15 구간에서 각 구간의 분획물 내 지질 단백질과 엑소좀의 양을 상대적으로 비교하면, 9 구간(#9)에서는 지질 단백질이 주로 나타났지만, 10 구간부터 엑소좀이 지질 단백질보다 많이 검출되었으며, 11 구간(#11)에서는 분획물 내에서 엑소좀이 가장 많이 나타났고, 12 구간(#12)에서는 분획물 내의 지질 단백질이 거의 검출되지 않고, 13 구간(#13)부터는 수용성 단백질이 검출되었다. 따라서, 10 내지 12 구간(#10 - #12)이 엑소좀 수득에 더욱 적합한 것으로 확인되었다(도 3C).

[0062] 실시예 4: 분리 방법 및 컬럼에 따른 엑소좀과 지질 단백질의 분리 효율 확인

[0063] 실시예 2에 기재된 혈청 시료에 각각 원심분리를 이용한 침강법(Exoquick), 기존 단일 컬럼을 이용한 크기 배제 크로마토 그래피(2B column) 및 본 발명의 다중 컬럼을 이용한 크기 배제 크로마토그래피(Dual column)를 수행하여 분리된 엑소좀과 지질 단백질의 분획을 도 4에 나타냈다.

[0064] 구체적으로, 침강법은 상업화된 제품인 ExoQuickTM(System Biosciences, Inc.)의 첨가 및 원심분리를 통해 수행하였고, 기존 단일 컬럼은 세파로스 CL-2B가 충전된 것을 이용하였으며, 다중 컬럼은 실시예 1에 개시된 다중 컬럼을 이용하였다. 분획 전 시료 및 분획된 시료의 단백질 총량을 정량하고, 엑소좀과 지질 단백질의 검출량

과 엑소좀과 지질 단백질의 상대적 양이 어떻게 차이가 나는지 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯을 이용해 확인했다. 실시예 3과 마찬가지로, 엑소좀 마커 단백질인 CD63에 대한 항체 및 지질 단백질 마커 단백질인 ApoB에 대한 항체를 사용하였으며, CD63밀도(%) / ApoB밀도(%)는 Bio-Rad 사 ChemiDoc image software를 이용하여 blot된 시료 부분의 밀도계측을 통해 계산하였다.

[0065] 그 결과, 분획된 시료에 포함된 단백질의 총량에서는 2B column을 이용한 경우 가장 적은 것으로 나타났고(도 4A), Exoquick을 이용한 경우에는 지질 단백질이 다량 포함된 것으로 나타났다(도 4B).

[0066] 그러나, 웨스턴 블롯 결과에서는 2B column을 이용한 분획물에서 엑소좀이 가장 적게 검출되고, 지질 단백질은 많이 검출된 것을 확인할 수 있었다. 이와 달리, 실시예 1의 다중 컬럼(Dual column)을 이용한 실험군에서는 지질 단백질이 거의 검출되지 않은 것으로 나타났다(도 4C). 특히, 엑소좀과 지질 단백질의 분리 효율을 나타내는 CD63밀도(%) / ApoB밀도(%)를 확인한 결과에서는 실시예 1의 다중 컬럼을 이용하는 경우가 가장 높은 값을 나타냈다(도 5).

[0067] 즉, 본 발명의 다중 컬럼은 기존 단일 컬럼에 비해 시료에 포함된 지질 단백질을 제거하고, 엑소좀 만을 분리하는 능력이 뛰어나다.

[0069] 실시예 5: 비드 적층 순서에 따른 분리 효율 평가

[0070] 다중 컬럼에 충전되는 비드의 적층 순서에 따른 분리 효율을 평가하기 위해 실시예 1의 다중 컬럼(A)과 크로마토그래피용 컬럼(직경: 10mm, 높이: 50mm)의 하부에 세파크릴 200-HR 70%(v/v)를 적층 한 후, 상부에 세파로스 CL-6B 30%(v/v)를 적층한 다중 컬럼(B)을 준비하였다.

[0071] 준비된 두 개의 다중 컬럼을 이용하여 실시예 2에 기재된 방법으로 크기 배제 크로마토그래피를 수행하고, 용출 구간 별로 지질 단백질과 엑소좀의 검출량을 확인하여 도 6에 나타냈다. 그 결과, 실시예 1의 다중 컬럼(A)은 지질 단백질이 거의 검출되지 않은 반면, 다중 컬럼(B)는 대부분의 용출 구간에서 지질 단백질이 검출되었으며, 엑소좀의 검출량도 다중 컬럼(A)이 더 많은 것으로 확인되었다.

[0073] 실시예 6: 비드의 부피비에 따른 분리 효율 평가

[0074] 다중 컬럼에 충전되는 비드의 부피비에 따른 분리 효율을 평가하기 위해 크로마토그래피용 컬럼(직경: 10mm, 높이: 50mm)의 하부에서부터 세파로스 CL-6B 와 세파크릴 200-HR을 순서대로 부피비 9:1, 7:3, 5:5, 3:7, 1:9의 비율로 적층한 다중 컬럼과, 세파로스 CL-6B와 세파크릴 200-HR의 단일 컬럼을 준비하였다.

[0075] 준비한 컬럼을 이용하여 실시예 2에 기재된 방법으로 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 그 결과, 분자량이 낮아 2 종류의 비드를 모두 통과하는 수용성 단백질은 충전되는 비드의 부피비에 관계없이 13 구간 이후에 용출되므로(도 7), 11 내지 12 구간을 Region of interest (ROI)로 하여 지질 단백질과 엑소좀의 검출량을 분석하여 도 8 내지 10에 나타냈다.

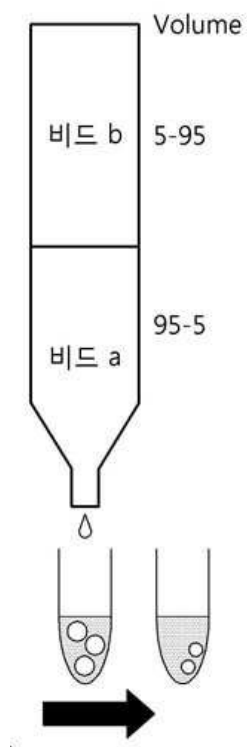
[0076] 도 8 및 도 9를 참고하면, 11 내지 12 구간인 Region of interest (ROI)에서 세파로스 CL-6B 와 세파크릴 200-HR의 부피비가 3:7인 경우 CD63밀도(%)와 ApoB밀도(%) 값이 차이가 가장 큰 것을 알 수 있고, 도 10을 참고하면, CD63밀도(%) / ApoB밀도(%) 값은 부피비 5:5 내지 1:9의 구간에서 증가하는 이차 함수의 경향을 보이는 것을 확인할 수 있다.

[0078] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

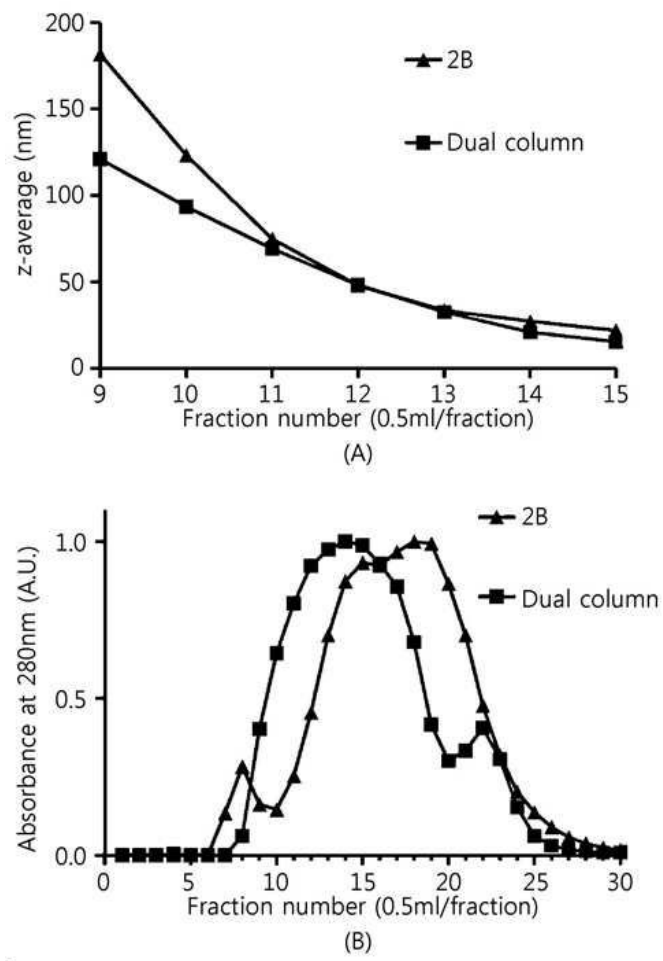
[0079] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

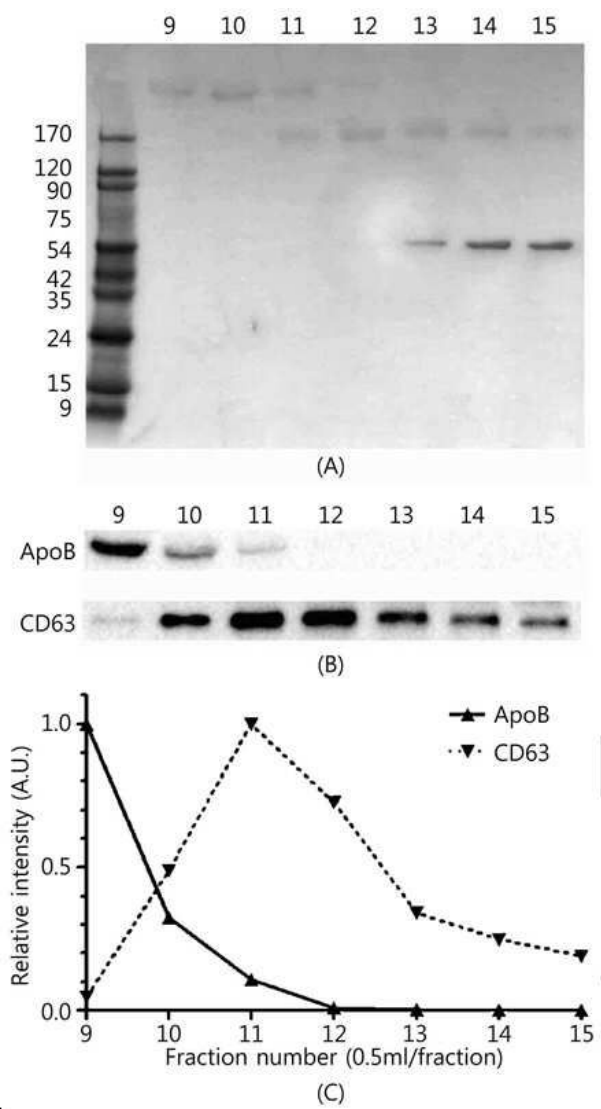
도면1



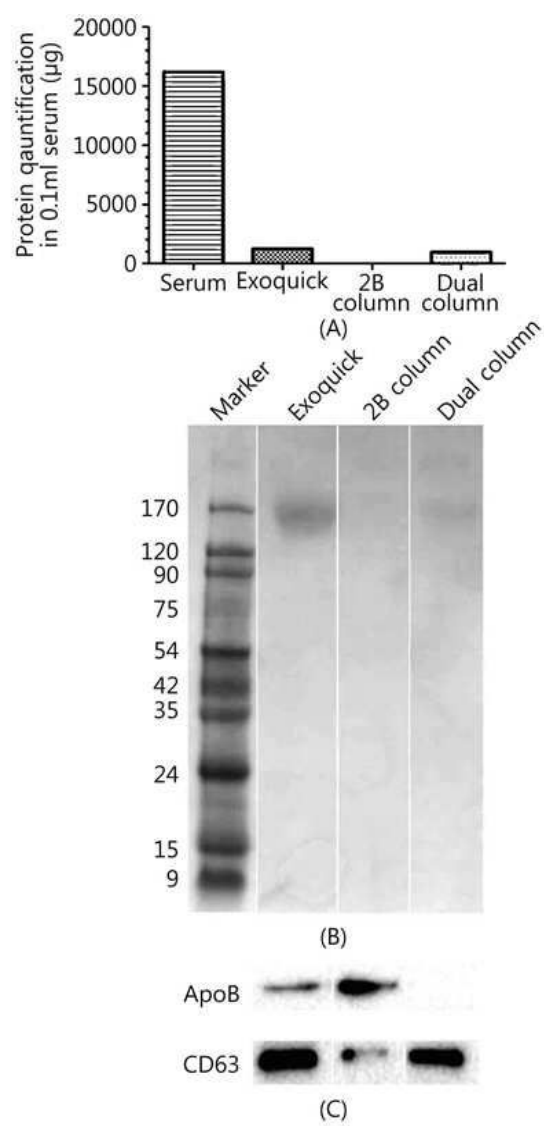
도면2



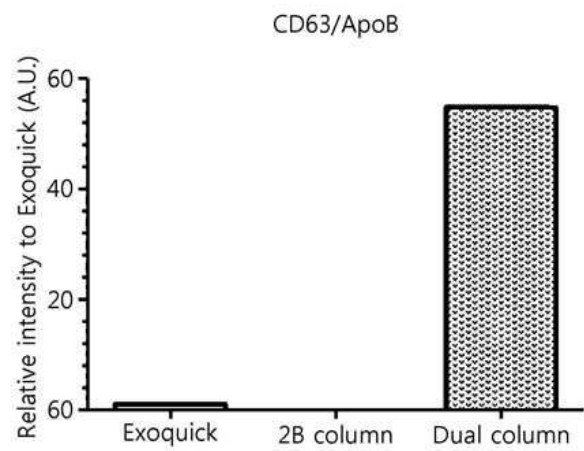
도면3



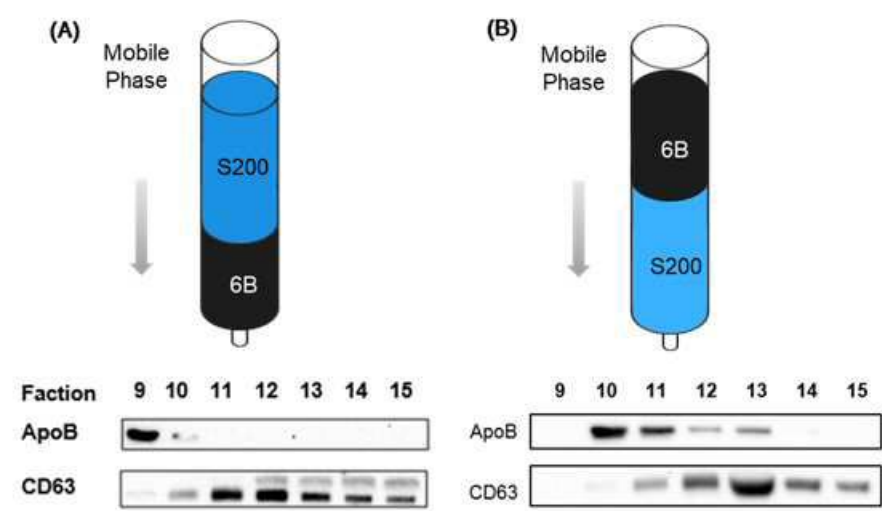
도면4



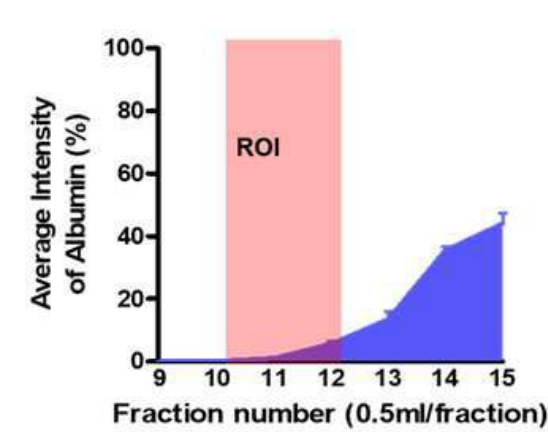
도면5



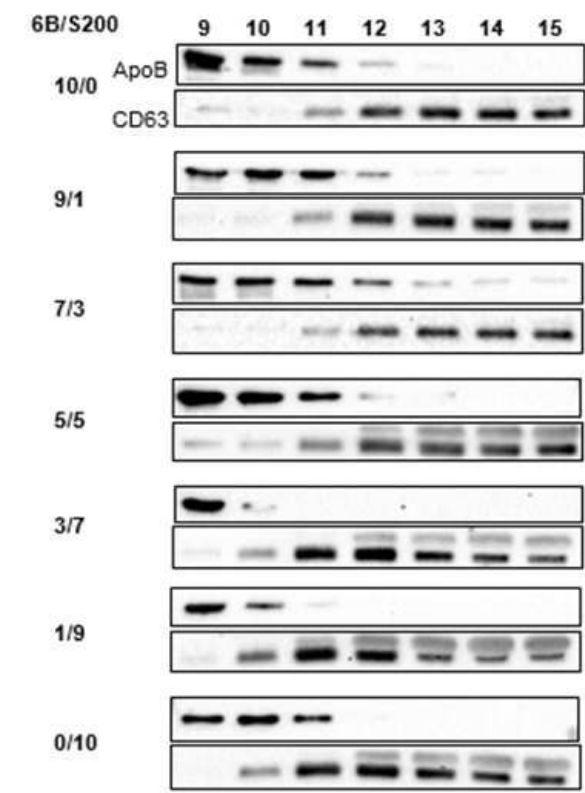
도면6



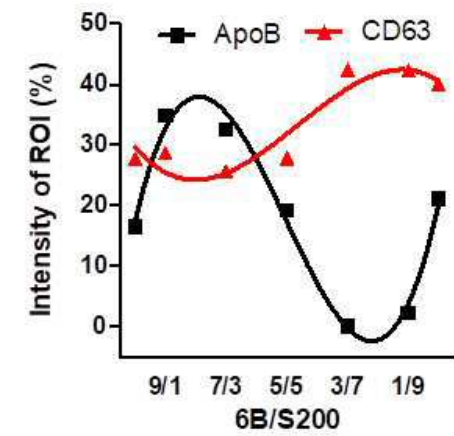
도면7



도면8



도면9



도면10

