

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0059970
(43) 공개일자 2020년05월29일(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) C08L 101/14 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)(52) CPC특허분류
C12N 5/0696 (2013.01)
C08L 101/14 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0145371

(22) 출원일자 2018년11월22일

심사청구일자 2018년11월22일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)(72) 발명자
이원중
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 102동 202호(전민동, 엑스포아파트)양희철
인천광역시 연수구 원인재로 56, 118동 506호(동춘동, 현대아파트)(74) 대리인
특허법인충현

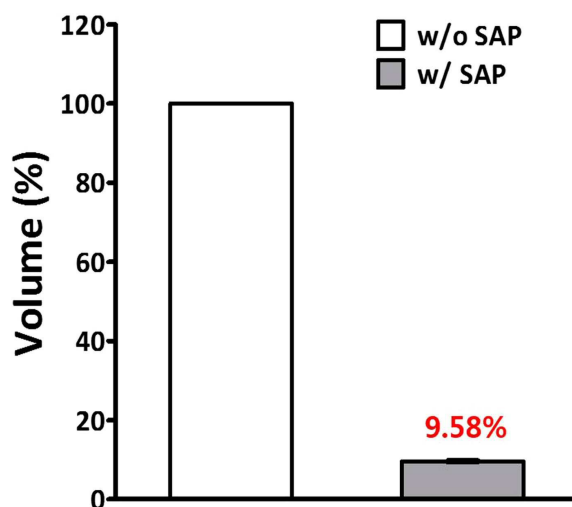
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 고흡습성 폴리머를 이용한 세포 밖 소포체의 농축방법

(57) 요약

본 발명은 고흡습성 폴리머(Super absorbent polymer bead, SAP bead)을 이용한 세포 밖 소포체의 농축방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 고흡습성 수지를 이용하여 세포 배양액이나 임상 시료에서 세포 밖 소포체를 짧은 시간 안에, 단일 과정으로 간단하게 농축시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 1/16 (2013.01)

C12N 1/20 (2013.01)

C12N 2509/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A5A1010148

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원

연구과제명 나노-생체유체 검사 연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

세포 밖 소포체를 포함하는 용액에 고흡습성 폴리머를 혼합하여, 세포 밖 소포체를 농축하는 단계;를 포함하는 세포 밖 소포체의 농축방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포 밖 소포체를 포함하는 용액은 생물학적 시료로부터 세포 밖 소포체 분리용 키트를 사용하여 얻어진 저농도의 세포 밖 소포체를 포함하는 용액인 것을 특징으로 하는 세포 밖 소포체의 농축방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 고흡습성 폴리머(SAP)는 전분(starch)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 모노머를 공중합시킨 전분계 고분자; 카르복시메틸 셀룰로오스(CMC)에 상기의 모노머를 공중합시킨 셀룰로오스계 고분자; 및 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)-메타아크릴산(methacrylic acid) 블록공중합체, 스티렌(styrene)-무수말레인산(maleic anhydride) 공중합체, 폴리아크릴아미드계(polyacryl amide) 또는 폴리옥시에틸렌계(polyoxyethylene)를 포함하는 합성수지계 고분자;로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것을 특징으로 하는 세포 밖 소포체의 농축방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 세포 밖 소포체는 고세균(Archaea), 원핵생물(Prokarya) 또는 진핵생물(Eukarya)의 세포로부터 유래한 생체 나노입자를 통칭하며, 엑소좀(exosome), 아그로솜(argosomes), 텍소좀(dexosomes), 엑토솜(ectosomes), 엑소베지클(exovesicle), 온코솜(oncosome), 프로미노솜(prominosome), 프로스타솜(prostasome), 톨레로솜(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), 에피디디모솜(epididimosome), 프로미노솜(prominosome), 텍소솜(texosome) 및 아키오솜(archeosome)을 포함할 수 있고, 바람직하게는 엑소솜(exosome), 미세소포(microvesicle) 및 미세입자(microparticle)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 세포 밖 소포체의 농축방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 세포 밖 소포체를 포함하는 용액은 pH 7.0 내지 8.0인 것을 특징으로 하는, 세포 밖 소포체의 농축방법.

청구항 6

고흡습성 폴리머를 포함하는 세포 밖 소포체의 농축용 키트.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 고흡습성 폴리머(Super absorbent polymer, SAP)을 이용한 세포 밖 소포체의 농축방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 고흡습성 수지를 이용하여 세포 배양액이나 임상 시료에서 세포 밖 소포체를 짧은 시간 안

[0001]

에, 단일 과정으로 간단하게 농축시킬 수 있다.

배경 기술

- [0002] 세포 밖 소포체(extracellular vesicle)은 적혈구 세포의 배양액에서 세포막 수용체를 함유한 미세수포로, 1980년대 중반에 처음 발견되었다. 세포 밖 소포체는 유래된 세포에 따라 텍소솜(dexosome, 수지상세포에서 유래), 온코솜(oncosome, 암세포에서 유래), 프로타솜(prostasome, 전립선세포에서 유래), 카르디오솜(cardiosome, 심근세포에서 유래) 등으로 불리며, 세포에서 만들어지는 방법에 따라 엑소솜(exosome), 엑토솜(ectosome), 미세수포(microvesicle), 세포자멸체(apoptotic body) 같은 여러 이름으로 불려진다. 이들은 유래되는 세포나 세포 내 소기관에 따라 다양한 표지 단백질을 포함하고 있고, 다양한 명칭의 문제점으로 인해 최근에는 세포 밖 소포체로 통칭하도록 권장하고 있다.
- [0003] 이러한 세포 밖 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 치료적 적용에 활용가능할 것이라 예상되고 있다.
- [0004] 상기 세포 밖 소포체들은 통상적으로 초원심분리(ultra centrifugation), 유세포 분석(flow cytometry), 여과, 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 장 흐름 분획(field flow fractionation) 및 중합체 침전법(polymer base precipitation)과 같은 기술들에 의해 정제된다. 상술한 방법들은 전처리를 통한 분리 및 추출 과정이 필요하고, 크기배제 크로마토그래피와 같은 방법의 경우에는 최종농도가 낮아지는 문제가 존재한다. 이에 세포 밖 소포체를 활용하기 위해 효율적이고 간단한 세포 밖 소포체 농축법에 대한 필요성이 대두되었다. 또한 세포 밖 소포체의 농축방법을 개발하기 위해서는 우선 세포 밖 소포체의 기능에는 영향을 미치지 않으면서, 별다른 장치의 도움없이 단일 과정만으로 세포 밖 소포체를 농축해야하는데, 기존의 세포 배양액 또는 분리된 세포 밖 소포체 수용액에서 세포 밖 소포체가 차지하는 비율은 현저히 낮기 때문에 기존에 사용해오던 농축 방법만으로 개발에 한계가 있다.
- [0005] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록특허공보 제10-1875594호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 낮은 농도로 세포 밖 소포체가 포함되어 있는 세포 배양액으로부터 세포 밖 소포체를 고농도가 되도록 쉽고 빠르면서 효율적으로 농축할 수 있는 새로운 방법을 발굴하고자 예의 노력하였다. 그 결과, 고흡습성 폴리머를 활용한 농축 전략을 고안하였고, 이를 이용하여 세포 밖 소포체를 포함하는 수용액에서의 세포 밖 소포체 농도 변화를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서 본 발명의 목적은 고흡습성 폴리머를 활용하여 세포 밖 소포체를 포함하는 용액에서 세포 밖 소포체를 효율적으로 농축시킬 수 있는 방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 세포 밖 소포체를 포함하는 용액에 고흡습성 폴리머를 혼합하여, 세포 밖 소포체를 농축하는 단계;를 포함하는 세포 밖 소포체의 농축방법을 제공한다.
- [0011] 세포 밖 소포체는 대부분의 세포에 존재하는 30~1000 nm 크기를 갖는 작은 소포체(membrane vesicle)이다. 이는 혈액, 소변 등 체액에 존재하며 특히, 엑소솜 내부에는 그 세포에서 유래된 다양한 종류의 단백질, 유전물질

(DNA, mRNA, miRNA), 지질 등을 포함한다. 세포 밖 소포체는 약한 음성의 표면 전하를 띄고 있다. 세포 밖 소포체는 다양한 연구를 통해 여러 질병의 진단과 치료제로써의 활용가능성이 밝혀지고 있어, 해당 분야에서 점차 중요성이 높아지고 있는 실정이다.

- [0012] 현재, 생물학적 시료로부터 세포 밖 소포체를 분리하는 다양한 기술들이 존재하나, 이로부터 분리된 세포 밖 소포체 용액은 낮은 농도의 세포 밖 소포체를 포함하고 있어, 추가적인 정제 및 농축과정이 필수적이다.
- [0013] 허나 저농도의 세포 밖 소포체 용액을 간단하고 빠르게 효율적으로 고농축시킬 수 있는 농축방법으로는 초원심 분리, 유세포 분석, 여과, 크로마토그래프와 같이 장비나 장치가 필요하고, 복잡하며 시간이 오래 걸리고, 정제하는 과정에서 오히려 농도가 낮아지게 되므로, 새로운 농축기술의 개발이 절실히 요구되고 있다. 이에 고흡습성 폴리머를 활용하여 상술한 문제점을 해결하고자 노력하였고, 그 결과 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0014] 본 발명의 일 측면은 세포 밖 소포체를 포함하는 용액에 고흡습성 폴리머를 혼합하여, 세포 밖 소포체를 농축하는 단계;를 포함하는 세포 밖 소포체의 농축방법에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명은 세포 밖 소포체의 농축을 위한 것으로, 생물학적 시료로부터 세포 밖 소포체 분리용 키트 또는 종래의 방법을 통해 세포 밖 소포체를 분리한 후, 이를 분석하거나 사용하기 위해 원심분리, 한외여과 등을 이용하여 농축하는 기존의 방법들과 달리, 소요시간이 적고 별도의 장비나 장치 및 기술이 요구되지 않으면서도 효율적인 고농도 세포 밖 소포체를 얻기 위한 방법이다.
- [0016] 따라서 상기 세포 밖 소포체를 포함하는 용액은 생물학적 시료로부터 세포 밖 소포체 분리용 키트를 사용하여 얻어진 저농도의 세포 밖 소포체를 포함하는 용액일 수 있다.
- [0017] 상기 세포 밖 소포체 분리용 키트로써 세포 배양액으로부터 세포 밖 소포체를 분리하는데 중점이 맞춰진 제품이면 특별히 제한되지 않으며, 일 예로 Exoquick, Exo-spin 등 세포 밖 소포체 분리용 키트들일 수 있다.
- [0018] 상기 생물학적 시료는 액체 중에 세포 밖 소포체를 함유하거나 함유할 가능성이 있는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 원핵세포, 진핵세포, 박테리아, 진균, 효모, 줄기세포 및 식물, 동물로부터 분리된 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 배양한 배양액이거나, 혈액, 타액, 소변, 유즙, 양수, 복수 등의 체액 또는 이를 배양한 배양액일 수 있다.
- [0019] 상기 세포 밖 소포체는 고세균(Archaea), 원핵생물(Prokarya) 또는 진핵생물(Eukarya)의 세포로부터 유래한 생체 나노입자를 통칭하며, 엑소좀(exosome), 아그로솜(argosomes), 텍소솜(dexosomes), 엑토솜(ectosomes), 엑소베지클(exovesicle), 온코솜(oncosome), 프로미노솜(prominosome), 프로스타솜(prostasome), 톨레로솜(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), 에피디디모솜(epididimosome), 프로미노노솜(prominosome), 텍소솜(texosome) 또는 아키오솜(archeosome)을 포함할 수 있고, 바람직하게는 엑소솜(exosome), 미세소포(microvesicle) 및 미세입자(microparticle)일 수 있고, 가장 바람직하게는 엑소솜(exosome)일 수 있다.
- [0020] 상기 고흡습성 폴리머(SAP)는 자기 무게보다 수십배에서 수백 배(최대 300배)까지의 물을 흡수하는 수지로, 재료 자체가 물을 빨아들이므로 탈지면이나 무명천 같은 것보다 흡수량이 많으며 웬만한 압력에는 물을 방출하지 않아, 유아용, 성인용 및 동물용 기저귀에 가장 많이 사용되고 있다.
- [0021] 상기 고흡습성 폴리머는 이동통로 크기(water channel size)가 2.6 내지 5 nm이다. 이에 반해 본 발명에서 농축하고자 하는 대상인 세포 밖 소포체 바람직하게는 엑소솜의 평균 직경은 10~200 nm인 것으로 알려져 있고, 후술하는 실험예에서 엑소솜의 평균직경이 약 80 nm인 것을 확인하였는 바, 세포 밖 소포체는 고흡습성 폴리머(SAP)의 기공 내로 유입되지 않고, 외부에 잔존할 것으로 예상되며, 이는 후술하는 실험예를 통해서도 확인할 수 있다.
- [0022] 게다가 고흡습성 폴리머(SAP)가 물을 흡수하는 원리는 물리적 원리인 가교들이 이루고 있는 water channel의 모세관현상과 화학적 원리인 가교 사이사이에 갇혀있는 나트륨 이온의 전기적 인력에 의하여 물을 흡수하게 되는 2가지 원리가 있다. 따라서 흡수할 용액의 전해질 이온의 강도가 작으며, pH가 5~11일 경우 용액의 흡수가 잘 된다. 따라서, 본 발명에서의 세포 밖 소포체를 포함하는 용액이나 여기에 더 첨가될 수 있는 용매는 pH 7 내지 9의 것이면 특별히 이에 제한되지 않는다 예를 들어 상기 용매로는 정제수, 예를 들어 pH 7.0 ~ 8.0, 바람직하

게는 pH 7.2 ~ 7.6 에 완충 작용을 갖는 완충액(예를 들어 PBS, TBS, HBS 등) 을 들 수 있다. 또, 이들 완충액 중의 완충제 농도로는, 통상 5.0 ~ 50 mM, 바람직하게는 10 ~ 30 mM 의 범위로부터 적절히 선택되고, NaCl 농도는 통상 100 ~ 200 mM, 바람직하게는 140 ~ 160 mM 의 범위로부터 적절히 선택될 수 있다. 전해질 이온의 강도와 pH를 고려하면 PBS 완충액(pH 7.4)을 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0023] 상기 고흡습성 폴리머(SAP : super absorbed polymer)는 통상 백색의 분말 또는 구형의 비드이고, 물을 흡수하고 팽윤되어 겔화되는 성질을 갖고 있다. 상기 전분(starch)에 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 아크릴산(acrylic acid), 아크릴아미드(acrylamide) 또는 메타크릴레이트(methacrylate)의 모노머를 공중합시킨 전분계 고분자; 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)에 상기의 모노머를 공중합시킨 셀룰로오스계 고분자; 및 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)-메타아크릴산(methacrylic acid) 블록공중합체, 스티렌(styrene)-무수말레인산(maleic anhydride) 공중합체, 폴리아크릴아미드계(polyacryl amide) 또는 폴리옥시에틸렌계(polyoxyethylene)를 포함하는 합성수지계 고분자;로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것일 수 있다.

[0024] 상기 고흡습성 폴리머의 일예로는 폴리아크릴 아마이드, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리에틸렌 옥사이드, 젤라틴, 폴리사카라이드, 셀룰로오스 또는 이의 유도체, 및 키토산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것일 수 있고, 바람직하게는 폴리메타크릴산 또는 폴리에틸렌옥사이드일 수 있다.

[0025] 본 발명에서는 입자크기가 1 내지 2 mm인 것을 사용하였고, 담지효율(expansion coefficient, g/g, D.I. water)이 자체 중량 대비 100~250배에 이르는 "고흡수성 수지"를 상아사이언스로부터 구입하여 사용하였다. 상기 고흡습성 폴리머는 0~100℃의 범위에서 빠르게 물을 흡수하며 팽윤겔이 된 후에도 외부의 압력 등에 의해 쉽게 물을 방출하지 않는 특성을 가진다. 또한 물을 흡수한 후, 송풍, 가열 등의 간단한 조작에 의해 쉽게 고체상의 고흡수성 고분자를 회수하여 재사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 농축방법은 세포 밖 소포체를 분리하고, 이를 농축하는 과정에 적용하고자 한 것으로, 세포 밖 소포체를 농축하기 위해서는 세포 밖 소포체를 포함하는 용액 1 중량부에 대하여 고흡습성 폴리머가 0.05 내지 0.5 중량부 혼합될 수 있고, 더욱 바람직하게는 0.09 내지 0.2 중량부로 혼합될 수 있으며, 가장 바람직하게는 0.12 중량부일 수 있다.

[0027] 만약 세포 밖 소포체를 포함하는 용액 1 중량부(약 220mg)에 대하여 고흡습성 폴리머가 0.09 중량부(3개 비드 약 19.9mg) 미만이면 충분히 농축되지 못해 여러 단계로 농축을 진행해야 하므로, 농축시간이 길어지고 세포 밖 소포체의 유실과 활성이 저하되는 등의 문제가 발생한다. 세포 밖 소포체를 포함하는 용액 1 중량부(약 220mg)에 대하여 고흡습성 폴리머가 0.2 중량부(7개 비드 약 45.8mg)를 초과하면 농축이 과도하게 이루어져 고흡습성 폴리머와 세포 밖 소포체의 분리가 용이하지 않아, 농축된 세포 밖 소포체의 활용이 어려워지는 문제가 있다.

[0028] 또한 상기 고흡습성 폴리머는 water channel의 크기가 세포 밖 소포체의 크기인 30~1000 nm보다 작고, 흡습성이 고흡습성 폴리머 중량의 10배 이상 흡수가능한 것이면 특별히 이에 제한되지 않는다. 고흡습성 폴리머는 인체에 대하여 독성이 없으므로, 생체물질에 대한 사용에 제한되지 않는다.

[0029] 또한 상기 고흡습성 폴리머는 평균 입경이 작을수록 흡수 효율이 좋아지는 장점이 있으나, 과도하게 평균입경이 작아 가루 형태인 것은 너무 과도하게 농축되므로, 고흡습성 폴리머와 세포 밖 소포체의 분리가 용이하지 않아, 농축된 세포 밖 소포체의 활용이 어려워지는 단점이 발생할 수 있다.

[0030] 따라서, 고흡습성 수지가 비드형태인 것이 바람직하고, 하나당 중량이 2~40 mg, 더 바람직하게는 5~10 mg일 수 있다.

[0031] 본 발명의 농축방법을 이용하여 세포 밖 소포체를 농축할 경우에는 정량의 고흡습성 폴리머를 혼합하는 10 내지 30 분의 단일 공정만으로 $0.99 \sim 1.3 \times 10^{10}$ 농도까지 농축이 가능하며, 농축률(%)은 최대 719 ~ 814%인 것으로 확인되었다. 즉, 상술한 조건으로 농축공정을 진행한다면 수차례 반복하여 농축을 진행하거나 농축 시간을 30 분 이상 배분하지 않아도 단일 공정으로 현저히 높은 농축률을 얻을 수 있다.

[0032] 또한 본 발명은 장소에 구애받지 않고, 세포 밖 소포체를 포함하는 용액을 농축할 수 있도록, 고흡습성 폴리머를 포함하는 농축용 키트를 제공할 수 있다. 상기 키트에서 고흡습성 폴리머는 공기 중의 수분에 노출되지 않도록 밀봉되어 있을 수 있다. 일부 경우에는 용액에 따라 적정량의 고흡습성 폴리머의 혼합을 돕기 위해 용량별로 밀봉되어 있을 수 있다.

[0033] 상기 키트는 생물학적 시료로부터 세포 밖 소포체를 분리할 수 있는 제품을 더 포함할 수 있고, 예를 들어 Exoquick, Exo-spin 등 세포 밖 소포체 분리용 제품일 수 있다.

[0034] 본 발명의 "키트"는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용설명서를 추가로 포함할 수 있다. 사용설명서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 키트를 이용하여, 낮은 농도로 세포 밖 소포체가 존재하는 용액을 고농도로 농축할 수 있다.

[0036] 상기 키트는 건조된 고흡습성 폴리머가 밀봉되어 포함되어 있는 키트일 수 있다. 상기 키트를 이용하는 방법은 생물학적 시료로부터 세포 밖 소포체를 분리하고, 분리된 세포 밖 소포체를 포함하는 용액에 상기 고흡습성 폴리머를 혼합하여 농축하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0038] (i) 본 발명은 세포 배양액이나 임상 시료로부터 키트 또는 별도의 처리과정을 통해 세포 밖 소포체를 분리하고, 여기에 고흡습성 폴리머를 이용하여 고농도의 세포 밖 소포체를 얻는, 농축방법을 제공한다.

[0039] (ii) 본 발명의 세포 밖 소포체의 농축방법은 별도의 장치나 장비없이 장소에 구애받지 않고 쉽고 간단하게 활용할 수 있으며, 이 방법을 통해 고농도의 세포 밖 소포체를 얻을 수 있으며, 이 기능을 이용하여 얻어진 세포 밖 소포체는 다양한 연구에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 실시예 1로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액의 초기 부피 대비 남아있는 부피량(%)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 2는 실시예 1로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액에 대한 농축률(%)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 3은 실시예 1로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액에서의 세포 밖 소포체(exosome) 크기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 4는 실시예 1로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액에서의 세포 밖 소포체(exosome) 크기분포를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 5는 실시예 2로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액의 초기 부피 대비 남아있는 부피량(%)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 6은 실시예 2로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액에 대한 농축률(%)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 7은 실시예 2로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액에서의 세포 밖 소포체(exosome) 크기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 8은 실시예 2로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액에서의 세포 밖 소포체(exosome) 크기분포를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 9는 실시예 3으로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액의 초기 부피 대비 남아있는 부피량(%)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 10은 실시예 3으로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액에 대한 농축률(%)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 11은 실시예 3으로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액에서의 세포 밖 소포체(exosome) 크기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 12는 실시예 3으로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액에서의 세포 밖 소포체(exosome) 크기분포를 측정하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [0042] 실시예
- [0043] <실시예 1> 고흡습성 폴리머를 이용한 HeLa 세포로부터 분리된 세포 밖 소포체의 농축
- [0044] 1-1. HeLa 세포로부터 세포 밖 소포체 분리
- [0045] 먼저, 세포 밖 소포체를 포함하는 용액(시료)을 확보하기 위하여 Exo-Quick exosome 분리 키트(Invitrogen)를 사용하여 HeLa 세포의 배양액으로부터 세포 밖 소포체(exosome)을 분리하였다. 구체적으로 HeLa 세포를 10% FBS(소태아혈청, Biowest, France) 및 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies, USA)을 함유하는 DMEM(Dulbecco's `modified Eagle's medium, Biowest, France) 배지에 배양하였다. HeLa 세포는 100 mm 배양접시로 37 °C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양되었다. 50 ml FALCON 튜브(SPL)에 상기 세포 배양액 10 ml를 넣고 15 분간 3,000 G force(Centrifuge, 한일과학산업, Combi-514R)로 원심분리하여 세포 파괴물(cell debris)을 제거하고, 상등액만 분리하였다. 상기 세포 상등액 10 ml에 Exo-Quick solution 2 ml(5 : 1 부피비)를 혼합한 후, 4 °C에서 16 시간 동안 배양하였다. 상기 세포 상등액과 Exo-Quick가 혼합된 혼합액을 다시 30분 간 1,500 G force로 원심분리 한 다음 상층액은 버리고, 남아있는 펠렛(pellet)에 33 μ l의 N.F.PBS(nuclease free phosphate buffered saline)를 첨가하여 피펫팅을 통해 pellet을 현탁하여 세포 밖 소포체(exosome)를 포함하는 용액을 제조하였다.
- [0046] 1-2. 세포 밖 소포체(exosome) 농축
- [0047] 실시예 1-1로부터 얻은 세포 밖 소포체를 포함하는 용액에 고흡습성 폴리머(super absorbent polymer, SAP) 비드(2 mm 지름의 비드, 4개)(상아사이언스)를 혼합하여 농축시킴으로써 세포 밖 소포체 농축용액을 얻었다.
- [0048] 농축조건으로 1×10^9 par/ μ l 세포 밖 소포체(exosome) 용액 200 μ l와 2 mm 지름을 갖는 SAP 비드 4 개(약 28.2 mg)를 첨가하여 4 °C에서 40분간 혼합하였다. 이때 마이크로튜브(Microtube)(AXYGEN)를 사용하였다. 농축이 완료된 후, 회수한 세포 밖 소포체 농축용액을 Micro Centrifuge Tube(SPL)에 분리하고, 농축용액의 부피를 피펫을 사용하여 측정하였다.
- [0049] <실시예 2> 고흡습성 폴리머를 이용한 HeLa 세포로부터 분리된 세포 밖 소포체의 농축
- [0050] 2 mm 지름의 SAP 비드 5개(약 34.3mg)를 사용하여 30 분간 농축하였다는 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 모두 동일하게 수행하여 세포 밖 소포체 농축용액을 얻었다.
- [0051] <실시예 2> 고흡습성 폴리머를 이용한 HeLa 세포로부터 분리된 세포 밖 소포체의 농축
- [0052] 500 μ l의 세포 밖 소포체(exosome)를 포함하는 용액과 2 mm 지름의 SAP 비드 12개(약 81.2mg)를 사용하였다는 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 모두 동일하게 수행하여 세포 밖 소포체 농축용액을 얻었다. 이때, 마이크로튜브(Microtube)(AXYGEN) 대신 50 ml FALCON 튜브를 사용하였다.
- [0053] <실험예 1> 고흡습성 폴리머의 존재 유무에 따른 농축 정도 분석
- [0054] 고흡습성 수지를 통해 세포 밖 소포체의 농축이 효율적으로 이루어지고 있음을 확인하기 위해, 고흡습성 수지로 농축한 실시예 1-3의 농축용액과 농축되기 전 용액(대조군)을 다양하게 분석하여 비교하였다.
- [0055] 상기 대조군(W/O SAP, 'without SAP')은 실시예 1-1의 농축되기 전 세포 밖 소포체를 포함하는 용액을 사용하였다.
- [0056] 1) 농축 정도 분석
- [0057] 세포 밖 소포체의 농도(exosome concentration(par/ μ l))는 실시예 1 내지 3의 세포 밖 소포체 농축용액과 대조군을 각각 Nano sight(Malvern사, NS300)을 사용한 NTA(nano particle tracking analysis) 방법으로 분석하여 하기 표 1, 도 1, 2, 5, 6, 9, 10에 나타내었다. 이때, nano sight 기기 사용시 camera level은 16으로 30 초간 3번 측정하였고, threshold 4로 분석하였다.
- [0058] 도 1, 2, 5, 6, 9, 10은 실시예 1 내지 3에서와 같이 세포 밖 소포체 용액과 고흡습성 폴리머를 혼합한 후, 남아있는 용액의 부피량(%)과 농축률(%)을 측정하여 나타난 그래프이다.

표 1

구분	용액 상에 엑소좀 농도 (par/ $\mu\ell$)	용액 부피 ($\mu\ell$)	농축 후 남아있는 용액의 부피량(%) ^b	농축률(%) ^c
대조군	$1.1 \sim 1.6 \times 10^9$	200~500 ^a	-	-
실시예 1	1.07×10^{10}	19	10	814
실시예 2	1.3×10^{10}	19.83	9.9	719.3
실시예 3	9.9×10^9	50	10	753

a: 실시예 1, 2의 대조군은 200 $\mu\ell$ 을 사용하였고, 실시예 3의 대조군은 500 $\mu\ell$ 을 사용하였다.

b: 초기 부피(대조군) 대비 농축 후 남아있는 용액의 부피를 백분율(%)로 나타낸 값이다.

c: 초기 세포 밖 소포체의 농도(대조군)에 대한 농축 후 세포 밖 소포체의 농도를 백분율(%)로 나타낸 것이다.

도 1, 2, 5, 6, 9, 10와 표 1에 나타난 바와 같이, 고흡습성 폴리머를 사용하여 얻은 실시예 1 내지 3의 세포 밖 소포체 농축용액은 대조군에 비해 부피가 90% 감소하였으며, 이에 따라 용액에서 세포 밖 소포체의 농도도 1.1×10^9 particle/ $\mu\ell$ 에서 1.07×10^{10} particle/ $\mu\ell$ 로 증가하였음을 확인하였다. 즉 고흡습성 폴리머를 이용하여 농축할 경우 719~814%로 농축되는 것을 알 수 있다. 이를 통해 고흡습성 폴리머를 사용하면 세포 밖 소포체의 기능이나 구조에 영향을 거의 주지않으면서 30~40분의 짧은 시간에, 장치나 장비 및 기술없이도 700% 이상으로 농도가 농축되므로, 세포 밖 소포체를 농축하기 위한 새로운 농축방법으로 활용될 수 있음을 확인하였다.

2) 크기 분석

도 3, 4, 7, 8, 11, 12는 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 세포 밖 소포체 농축용액에서의 세포 밖 소포체(exosome) 크기와 크기분포를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 3, 4, 7, 8, 11, 12에 나타난 바와 같이, 대조군에서의 세포 밖 소포체(exosome)의 평균 크기는 101.1 nm였다. 한편 실시예 1 내지 3의 세포 밖 소포체 농축용액에서의 세포 밖 소포체의 평균 크기는 104.5 nm였다.

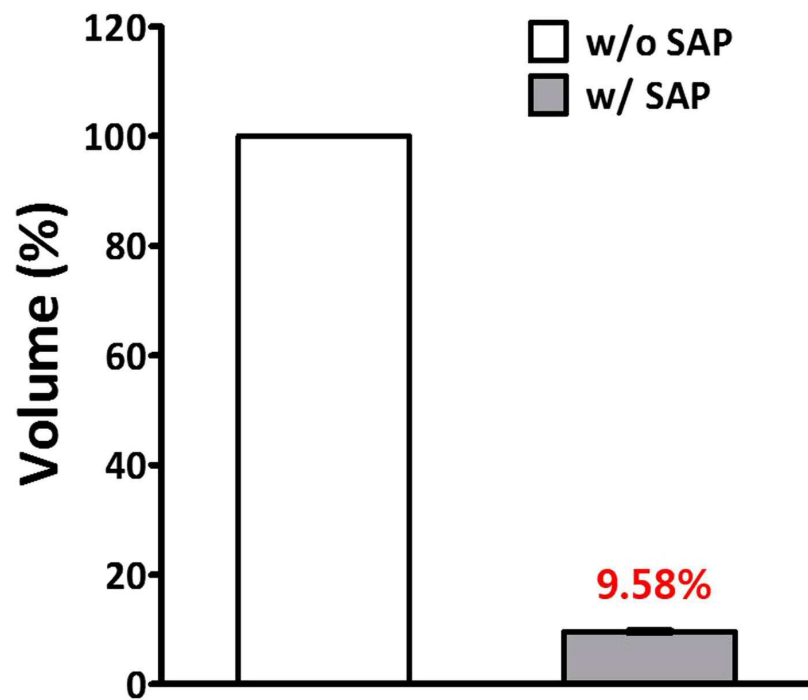
나아가, 대조군에서의 크기 분포와 실시예 1 내지 3에서의 크기 분포 역시 차이가 거의 없으므로, 고흡습성 폴리머를 이용한 농축과정에서 대조군과 실시예 1 내지 3에서의 세포 밖 소포체는 물리적 특성에 변화가 없음을 알 수 있다.

상술한 결과를 종합하면, 고흡습성 폴리머를 사용하여 세포 밖 소포체를 포함하는 용액을 효율적으로 농축할 수 있음을 알 수 있다. 구체적으로 즉 본 발명의 농축방법은 세포 밖 소포체를 분리한 후 세포 밖 소포체에 물리적 화학적 변형을 야기하지 않으면서, 장치나 장비가 요구되지 않으므로 장소에 상관없이 단일공정으로 고농도의 세포 밖 소포체를 갖는 농축용액을 얻을 수 있다는 장점이 있음을 확인하였다. 특히 상술한 농축과정은 종래 농축방법들과 달리 세포 밖 소포체의 소실이 거의 야기되지 않는다는 장점이 있다.

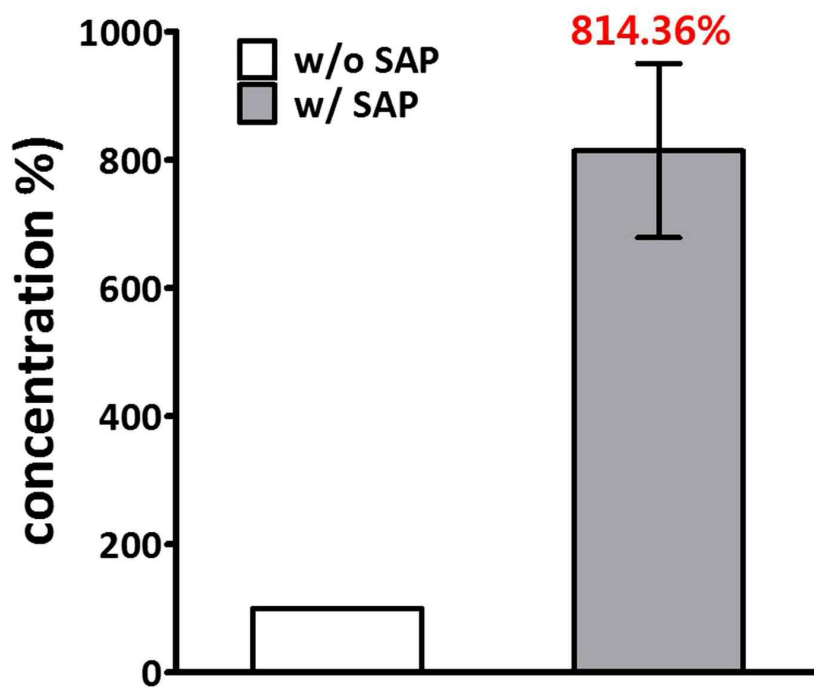
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

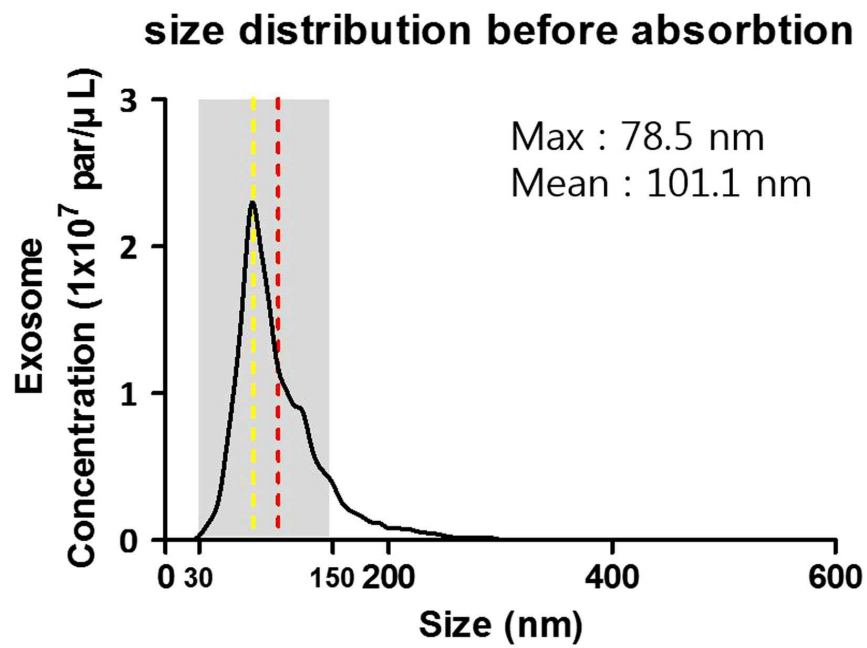
도면1



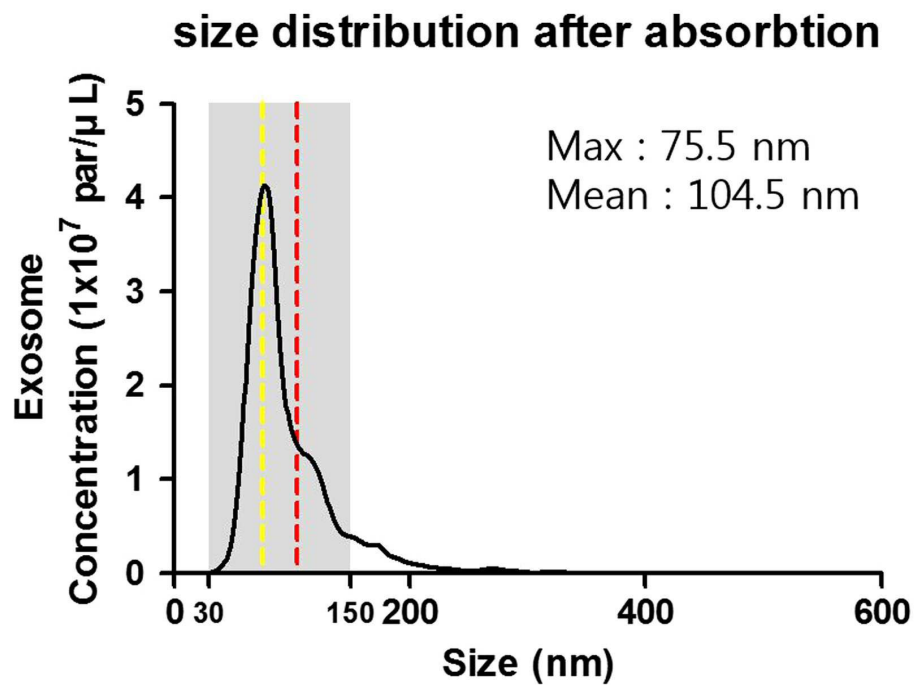
도면2



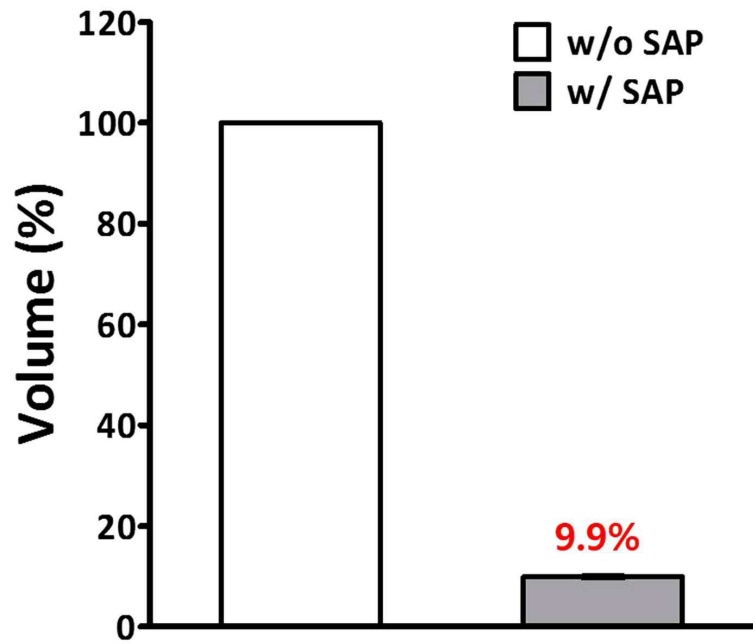
도면3



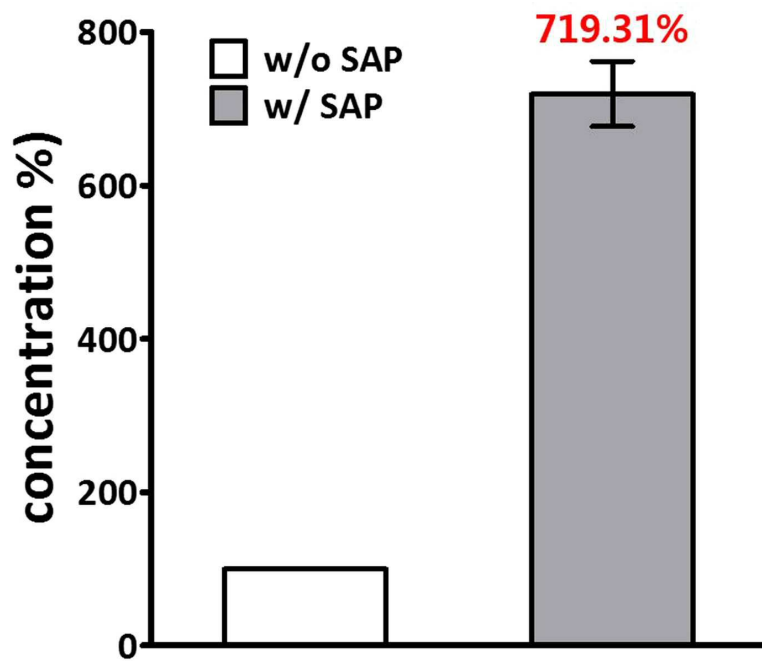
도면4



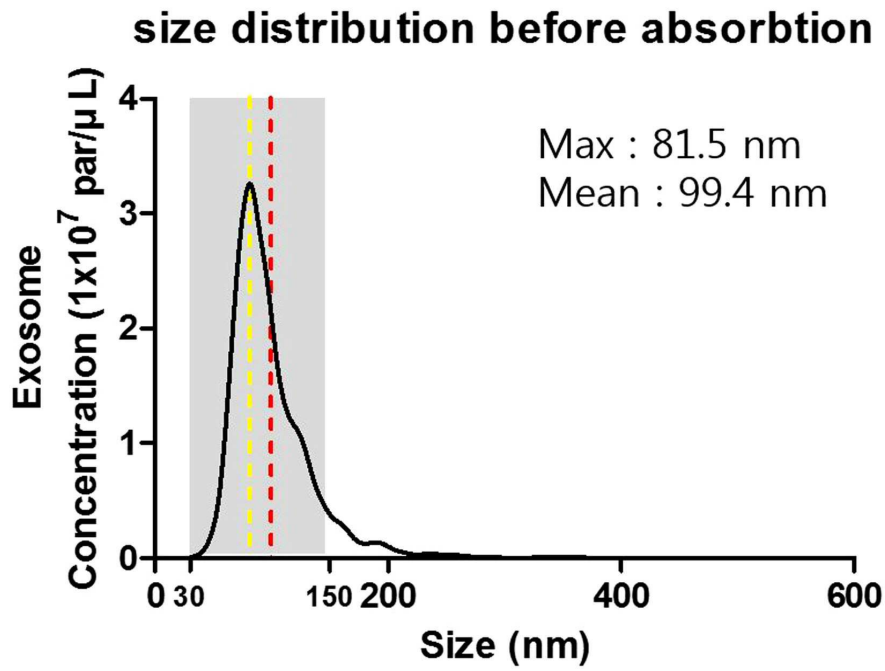
도면5



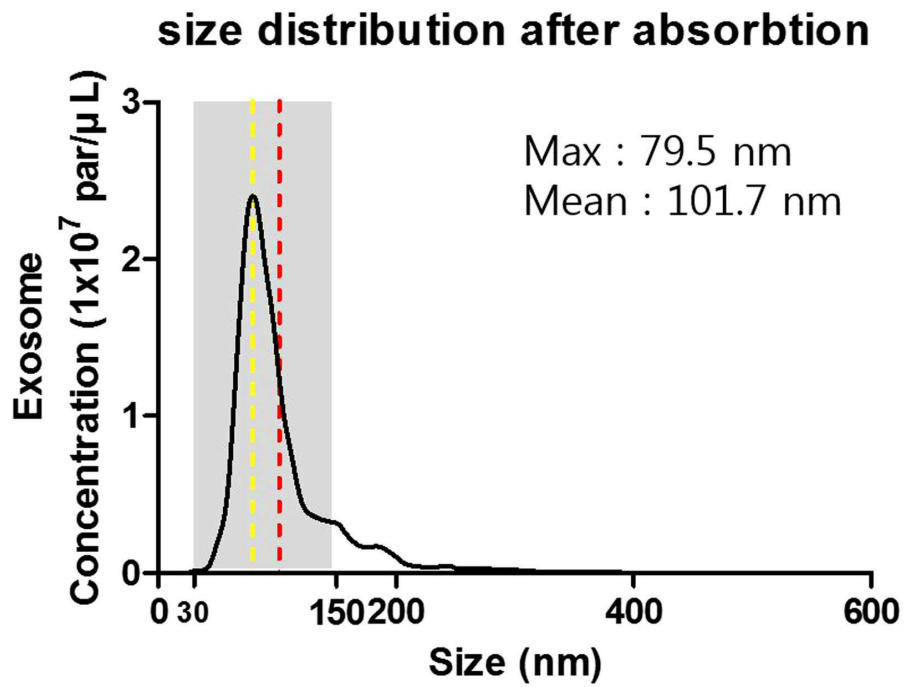
도면6



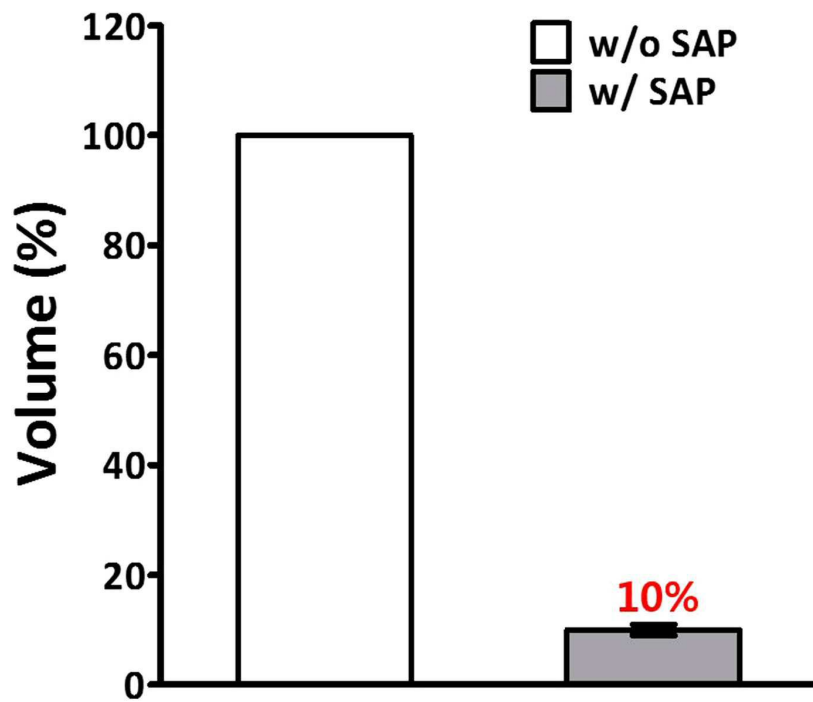
도면7



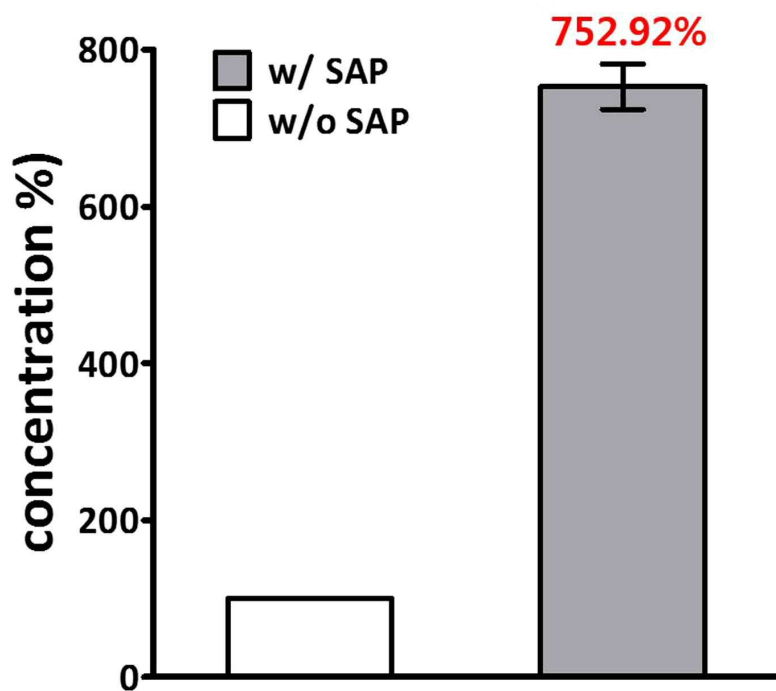
도면8



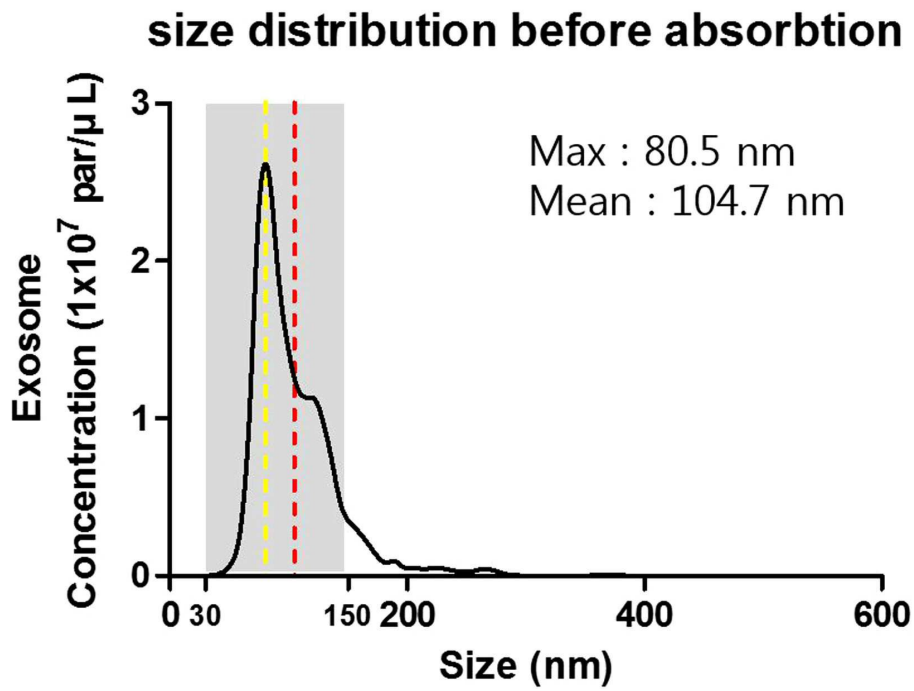
도면9



도면10



도면11



도면12

