



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월26일

(11) 등록번호 10-2220777

(24) 등록일자 2021년02월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 69/40 (2006.01) *C08G 69/08* (2006.01)
C08L 77/00 (2006.01) *C12Q 1/24* (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C08G 69/40 (2013.01)
C08G 65/325 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0101766
- (22) 출원일자 2019년08월20일
 심사청구일자 2019년08월20일
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2019518428 A*
- G. Hwang et al.. pH-Responsive robust polymer micelles with metal-ligand coordinated core cross-links. Chem. Commun.. 2014, Vol. 50, pp. 4351-4353*
- H. Lee et al.. Synthesis of Poly(ethylene glycol)/Polypeptide/Poly(D,L-lactide) Copolymers and Their Nanoparticles. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. 2011, Vol. 49, pp. 2859-2865*
- M. Yuan et al.. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol)-block-poly(amino acid) copolymer. European Polymer Journal. Vol. 37, pp. 1907-1912*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
 최지혜
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1
 김지혜
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1
 양재문
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1
- (74) 대리인
 특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 3 항

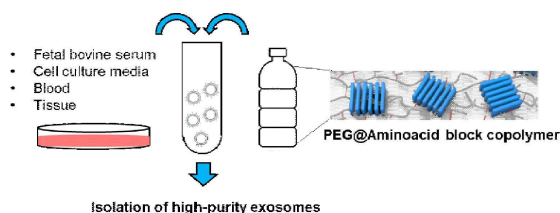
심사관 : 서진화

(54) 발명의 명칭 아미노산계 블록 코폴리머, 이를 포함하는 소포를 분리하기 위한 조성물 또는 키트, 및 이를 이용하여 소포를 분리하는 방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 아미노산계 블록 코폴리머를 제공하고, 이를 포함하는 소포를 분리하기 위한 조성물 또는 키트, 및 이를 이용하여 소포를 분리하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C08G 69/08 (2013.01)

C08L 77/00 (2013.01)

C12Q 1/24 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2018R1C1B6008799
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구자지원사업
연구과제명	항암 혼합제 전달을 위한 암세포/암 관련 섬유아세포 유래 엑소좀 막 나노-에디팅
기술 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 의과대학
연구기간	2018.03.21 ~ 2021.02.28

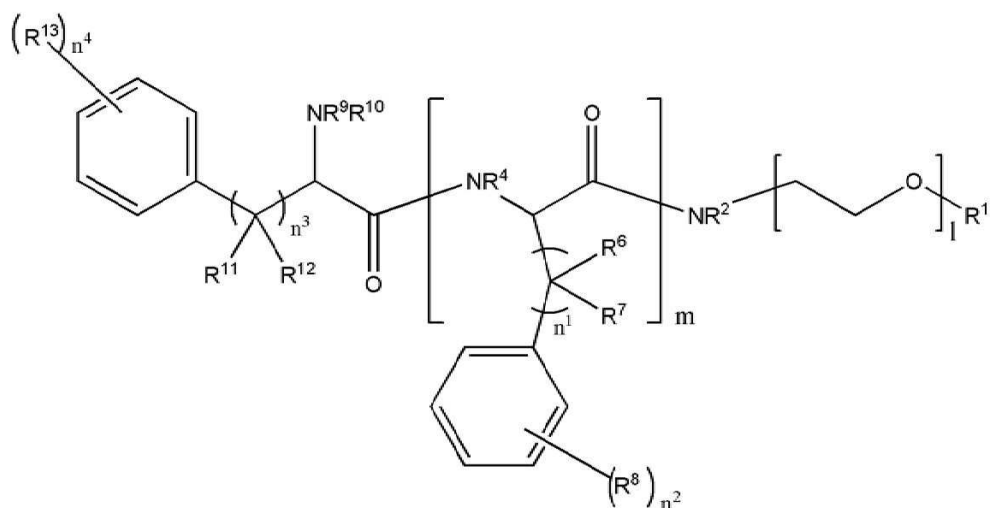
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 아미노산계 블록 코폴리머를 포함하는, 소포를 분리하기 위한 조성물.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

상기 R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^7 및 R^9 내지 R^{12} 는 각각 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설폰닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고,

상기 R^8 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설폰닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고,

상기 l은 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위의 반복 횟수로서, 40 내지 460이고,

상기 m은 상기 아미노산계 반복 단위의 반복 횟수로서, 5 내지 280이고,

상기 n^1 및 n^3 은 탄소 사슬의 반복 횟수로서, 각각 독립적으로 1 내지 3이고,

상기 n^2 및 n^4 는 벤젠 고리에 치환된 치환기의 개수로서, 각각 독립적으로 0 내지 5이다)

청구항 2

삭제

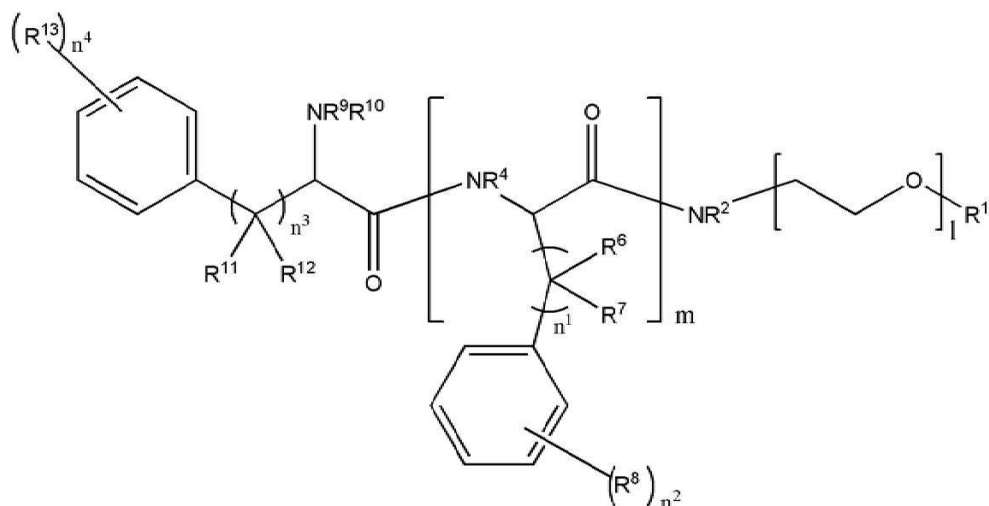
청구항 3

삭제

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 아미노산계 블록 코폴리머를 포함하는, 소포를 분리하기 위한 키트.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

상기 R¹, R², R⁴, R⁶, R⁷ 및 R⁹ 내지 R¹²는 각각 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설폰닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고,

상기 R⁸ 및 R¹³은 각각 독립적으로 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설폰닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고,

상기 l은 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위의 반복 횟수로서, 40 내지 460이고,

상기 m은 상기 아미노산계 반복 단위의 반복 횟수로서, 5 내지 280이고,

상기 n¹ 및 n³은 탄소 사슬의 반복 횟수로서, 각각 독립적으로 2 내지 3이고,

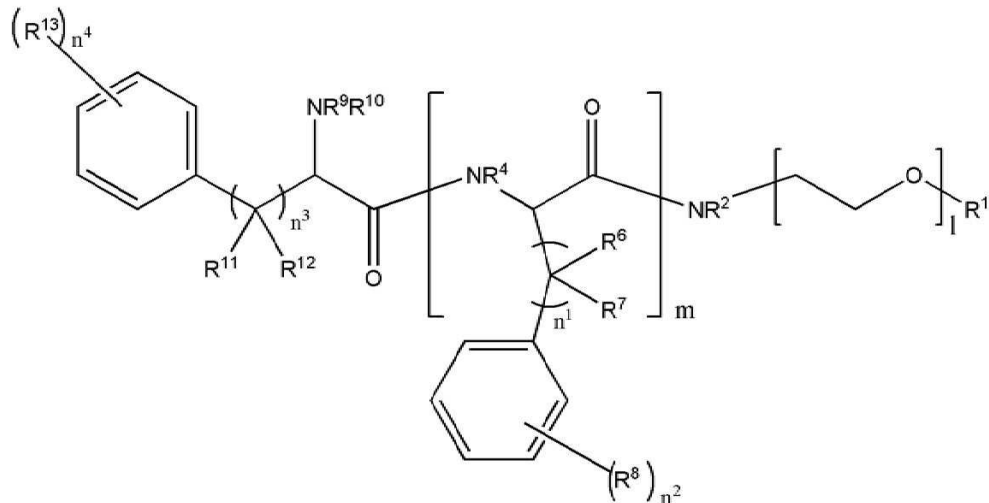
상기 n² 및 n⁴는 벤젠 고리에 치환된 치환기의 개수로서, 각각 독립적으로 0 내지 5이다)

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 아미노산계 블록 코폴리머를, 소포를 포함하는 시료와 인큐베이션하여 상기 아미노산계 블록 코폴리머를 소포 내 아미노산에 결합시키는 단계, 그리고

반응 혼합물로부터 소포를 분리하는 단계를 포함하는, 시료 중 소포를 분리하는 방법.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

상기 R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^7 및 R^9 내지 R^{12} 는 각각 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설폰닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고,

상기 R^8 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설폰닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고,

상기 l은 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위의 반복 횟수로서, 40 내지 460이고,

상기 m은 상기 아미노산계 반복 단위의 반복 횟수로서, 5 내지 280이고,

상기 n^1 및 n^3 은 탄소 사슬의 반복 횟수로서, 각각 독립적으로 2 내지 3이고,

상기 n^2 및 n^4 는 벤젠 고리에 치환된 치환기의 개수로서, 각각 독립적으로 0 내지 5이다)

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아미노산계 블록 코폴리머, 이를 포함하는 소포를 분리하기 위한 조성물 또는 키트, 및 이를 이용하여 소포를 분리하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 신규한 아미노산계 블록 폴리머를 이용하여, 세포 밖 소포체를 안정하게 고효율로 분리할 수 있는 조성물 또는 키트, 및 이를 이용하여 소포를 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생체 내 마이크로베지클은 여러 종류의 세포들에 존재하거나 세포로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포이다. 세포 외로 분비되는 마이크로베지클은 (i) 엑소솜: 식균 기원의 직경 30 nm 내지 100 nm의 막성 소포, (ii) 엑토솜(셰딩 마이크로베지클(shedding microvesicles, SMVs)이라고도 함): 원형질막으로부터 직접 흘러지고 직경 50 nm 내지 1000 nm의 큰 막성 소포, (iii) 세포자살성 수포(apoptotic blebs): 죽어가는 세포에 의해 유출된 직경 50 nm 내지 5000 nm의 소포를 포함한다.

[0003] 그 중 엑소솜(exosome)은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포이다. 엑소솜의 직경은 대략 30 nm 내지 100 nm일 수 있다. 엑소솜은 전자 현미경을 통한 연구에서 원형질막(plasma membrane)으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포내 특정 구획에서 기원하며

세포밖으로 방출, 분비되는 것으로 관찰되었다. 즉, 다당체와 원형질막의 융합이 일어나면, 그러한 소포들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소솜이라고 부른다. 이러한 엑소솜이 어떤 분자적 기작에 의해 만들어지는지 확실히 밝혀진 바가 없으나, 적혈구뿐만 아니라, B-림프구, T-림프구, 수지상 세포, 혈소판, 대식 세포 등을 포함한 다양한 종류의 면역 세포들과 종양 세포 등도 살아 있는 상태에서 엑소솜을 생산하여 분비한다고 알려져 있다. 엑소솜은 정상 상태, 병적 상태, 또는 이 두 상태하에서 다수의 다른 세포 유형으로부터 분리되어 방출된다고 알려져 있다.

[0004] 또한, 엑소솜은 마이크로 RNA(microRNA, miRNA)를 포함할 수 있다. miRNA는 그를 포함하는 세포 또는 개체의 상태를 확인하는데 사용될 수 있다. 상기 상태는 질병, 예를 들면 암, 유전병, 심장병, 또는 정신분열과 같은 신경성 질환일 수 있다.

[0005] 기존 마이크로베지클을 분리하는 방법은 마이크로베지클과 항체를 결합시켜 마이크로베지클을 면역-캡처하여 분리하는 방법이다. 이러한 방법은 단백질 구조 변화 등에 의한 항체 인식 부위의 마스킹(masking), 마이크로베지클 이질성(heterogeneity), 단백질 상호 작용 등에 의해 분리 또는 검출 타겟에 따라 편향(bias)이 발생할 수 있다. 분리 또는 검출을 위해 복잡한 프로세스나 고가의 장비가 필요할 수 있고, 시료의 소모량이 높을 수 있다.

[0006] 또한, 기존 마이크로베지클을 분리하는 방법으로는 초원심분(ultracentrifugation isolation), 크기별 제외법(size exclusion), 면역친화성 분리(immunoaffinity isolation), 미세유체 기술(microfluidics chip)이 있다.

[0007] 이 중 초원심분리는 세포 밖 소포체를 분리하는데 가장 널리 쓰이는 방법이고, 원리가 간단하여 가장 신뢰성 있는 분리 방법이지만, 이러한 초원심분리를 이용해서 세포 밖 소포체를 분리할 경우에는 세포 밖 소포체의 수율이 낮고, 분리하는데 시간이 많이 소요되며, 비싼 기기가 필요하다는 단점이 있다.

발명의 내용

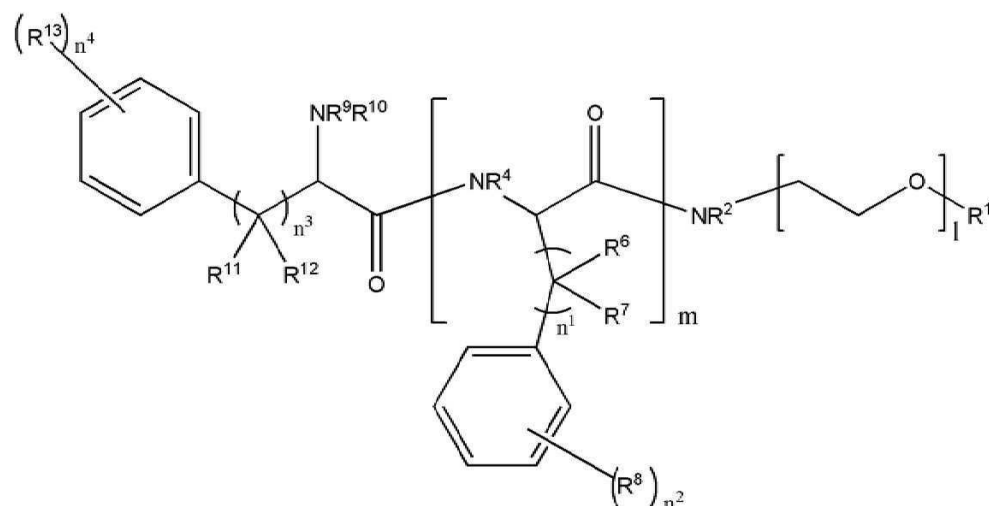
해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 신규한 아미노산계 블록 폴리머를 이용하여, 세포 밖 소포체를 안정하게 고효율로 분리할 수 있는 조성물 또는 키트, 및 이를 이용하여 소포를 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 아미노산계 블록 코폴리머를 제공한다.

[0010] [화학식 1]



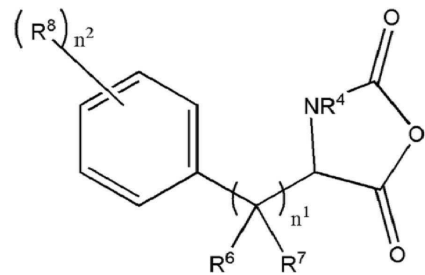
[0011]

[0012] (상기 화학식 1에서, 상기 R¹, R², R⁴, R⁶, R⁷ 및 R⁹ 내지 R¹²는 각각 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설폰닐기, 아실기, 할로겐화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고, 상기 R⁸ 및 R¹³은 각각 독립적으로 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설폰닐기, 아실기,

할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고, 상기 1은 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위의 반복 횟수로서, 40 내지 460이고, 상기 m은 상기 아미노산계 반복 단위의 반복 횟수로서, 5 내지 280이고, 상기 n^1 및 n^3 은 탄소 사슬의 반복 횟수로서, 각각 독립적으로 1 내지 3이고, 상기 n^2 및 n^4 는 벤젠 고리에 치환된 치환기의 개수로서, 각각 독립적으로 0 내지 5이다)

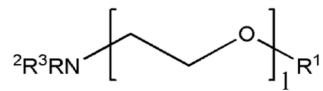
[0013] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물과 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물이 반응하여 하기 화학식 4로 표시되는 화합물이 제조되고, 상기 화학식 4로 표시되는 화합물과 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 반응하여 중합되어 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 아미노산계 블록 코폴리머의 제조 방법을 제공한다.

[0014] [화학식 2]



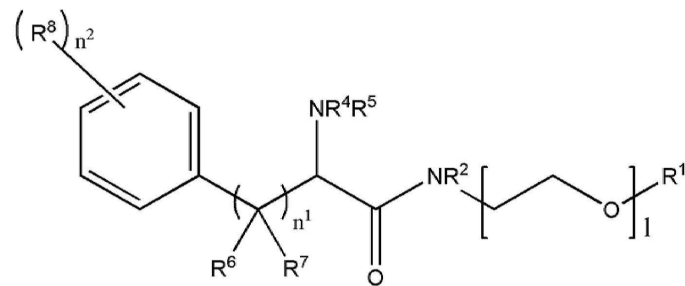
[0015]

[0016] [화학식 3]



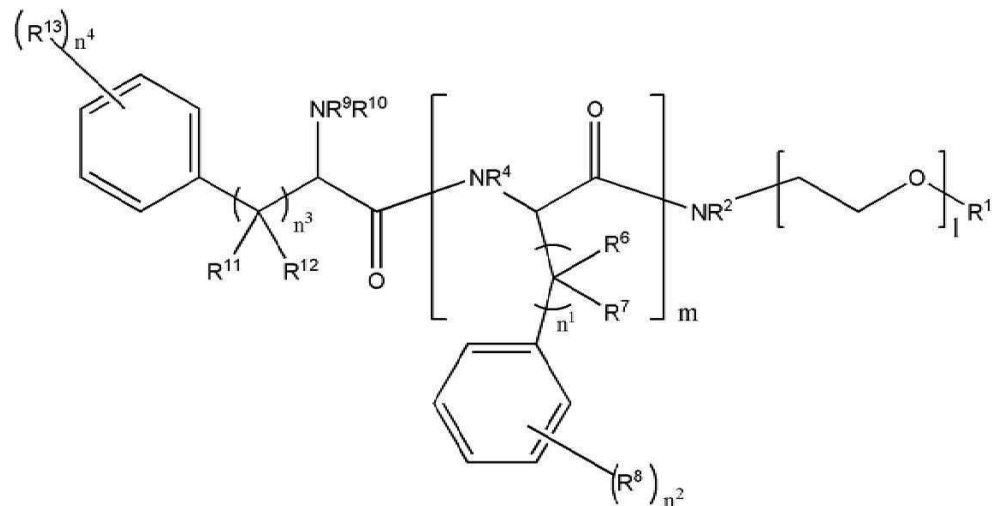
[0017]

[0018] [화학식 4]



[0019]

[0020] [화학식 1]



[0021]

[0022] (상기 화학식 1 내지 화학식 4에서, 상기 R^1 내지 R^7 및 R^9 내지 R^{12} 는 각각 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설퍼닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고, 상기 R^8 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설퍼닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고, 상기 1은 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위의 반복 횟수로서, 40 내지 460이고, 상기 m은 상기 아미노산계 반복 단위의 반복 횟수로서, 5 내지 280이고, 상기 n^1 및 n^3 은 탄소 사슬의 반복 횟수로서, 각각 독립적으로 1 내지 3이고, 상기 n^2 및 n^4 는 벤젠 고리에 치환된 치환기의 개수로서, 각각 독립적으로 0 내지 5이다)

[0023] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 소포를 분리하기 위해, 상기 아미노산계 블록 코폴리머를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 소포를 분리하기 위해, 상기 아미노산계 블록 코폴리머를 포함하는 키트를 제공한다.

[0025] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 아미노산계 블록 코폴리머를 소포를 포함하는 시료와 인큐베이션하여 상기 아미노산계 블록 코폴리머를 소포에 결합시키는 단계, 그리고 반응 혼합물로부터 소포를 분리하는 단계를 포함하는, 시료 중 소포를 분리하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명은 신규한 아미노산계 블록 폴리머, 및 이를 이용하여 세포 밖 소포체를 안정하게 고효율로 분리할 수 있는 조성물 또는 키트, 및 소포를 분리하는 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 실시예에서 진행한 엑소좀 분리 실험의 모식도이다.

도 2는 실험예 1에서 측정한 DLS(Dynamic Light Scattering) 결과이다.

도 3은 실험예 1에서 측정한 Zeta potential 결과이다.

도 4는 실험예 1에서 측정한 SEM(Scanning Electron Microscope) 결과이다.

도 5는 실험예 1에서 측정한 Bradford Assay를 이용한 단백질 정량 결과이다.

도 6은 실험예 2에서 아미노산계 블록 코폴리머를 이용하여 추출된 소포체가 엑소좀 특이적 단백질 마커를 가졌는지를 확인한 웨스턴블랏 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

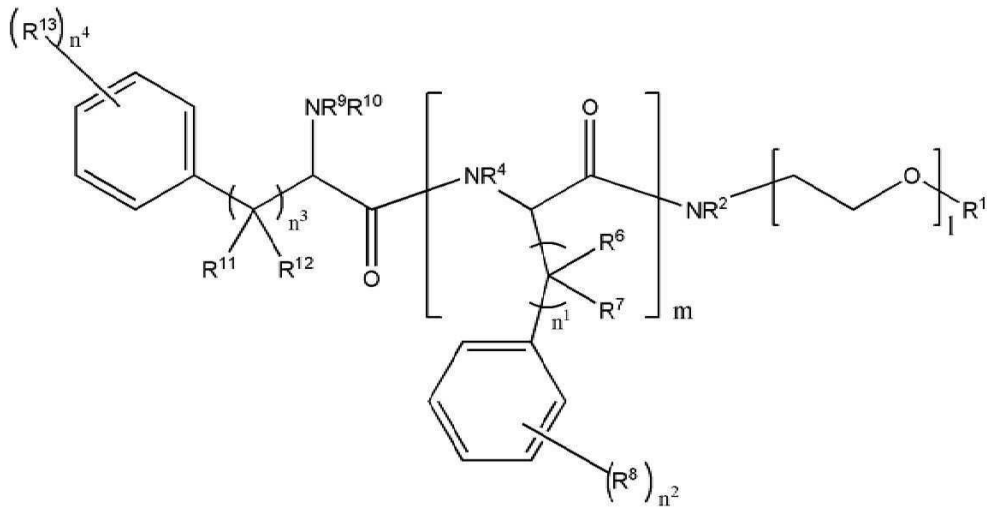
[0029] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한 알킬기는 1차 알킬기, 2차 알킬기 및 3차 알킬기를 포함하고, 직쇄(straight chain) 또는 분지쇄(branched chain)의 탄소수 1 내지 10인 알킬기, 할로젠화 알킬기는 직쇄 또는 분쇄의 탄소수 1 내지 10인 할로젠화 알킬기, 알릴기는 탄소수 2 내지 10인 알릴기, 아릴기는 탄소수 6 내지 30인 아릴기, 알콕시기는 탄소수 1 내지 10인 알콕시기, 알킬 설퍼닐기는 탄소수 1 내지 10인 알킬 설퍼닐기, 아실기는 탄소수 1 내지 10인 아실기, 및 알데하이드기는 탄소수 1 내지 10인 알데하이드기를 의미한다.

[0030] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한 아미노기는 1차 아미노기, 2차 아미노기 및 3차 아미노기를 포함하고, 2차 아미노기 또는 3차 아미노기는 탄소수 1 내지 10인 아미노기이다.

[0031] 본 명세서에서 모든 화합물 또는 치환기는 특별한 언급이 없는 한 치환되거나 비치환된 것일 수 있다. 여기서, 치환된이란 수소가 할로젠 원자, 하이드록시기, 카르복실기, 시아노기, 니트로기, 아미노기, 사이오기, 메틸사이오기, 알콕시기, 나이트릴기, 알데하이드기, 에폭시기, 에테르기, 에스테르기, 카르보닐기, 아세탈기, 케톤기, 알킬기, 퍼플루오로알킬기, 시클로알킬기, 헤테로시클로알킬기, 알릴기, 벤질기, 아릴기, 헤테로아릴기, 이들의 유도체 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 대체된 것을 의미한다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 따른 아미노산계 블록 코폴리머는 하기 화학식 1로 표시된다.

[0033] [화학식 1]



[0034]

[0035] 상기 화학식 1에서, 상기 R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^7 및 R^9 내지 R^{12} 는 각각 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설폰닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고, 일반적으로 수소 원자일 수 있다.

[0036] 상기 R^8 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설폰닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알데하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이다. 상기 R^8 및 R^{13} 은 벤젠 고리에 치환된 치환기로서, 상기 벤젠 고리의 수소를 치환한 것이다. 따라서, 상기 R^8 및 R^{13} 이 없는 경우 상기 벤젠 고리는 수소기만을 포함한다.

[0037] 상기 아미노산계 블록 코폴리머는 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위와 아미노산계 반복 단위를 포함하고, 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위와 상기 아미노산계 반복 단위의 질량 분율은 3 : 7 내지 7 : 3 일 수 있다.

[0038] 상기 1은 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위의 반복 횟수로서, 40 내지 460이고, 구체적으로 PEG의 수평균 분자량(Mn)이 2000, 5000, 10000, 20000일 때 상기 반복 횟수 1은 각각 45, 113, 227, 454일 수 있다.

[0039] 상기 m은 상기 아미노산계 반복 단위의 반복 횟수로서, 5 내지 280 이고, 구체적으로 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위의 질량 분율이 0.3 일 때, 상기 반복 횟수 m은(상기 PEG의 Mn이 각각 2000, 5000, 10000, 20000 일 때) 32, 79, 159, 317일 수 있고, 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위의 질량 분율이 0.5일 때, 상기 반복 횟수 m은(상기 PEG의 Mn이 각각 2000, 5000, 10000, 20000 일 때) 14, 34, 68, 136일 수 있고, 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)계 반복 단위의 질량 분율이 0.7일 때, 상기 반복 횟수 m은(상기 PEG의 Mn이 각각 2000, 5000, 10000, 20000 일 때) 6, 15, 29, 58일 수 있다.

[0040] 상기 n^1 및 n^3 은 탄소 사슬의 반복 횟수로서, 각각 독립적으로 1 내지 3이고, 일 예로 페닐알라닌 구조인 경우, n^1 및 n^3 는 1이다.

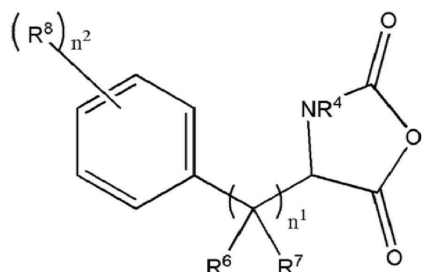
[0041] 상기 n^2 및 n^4 는 벤젠 고리에 치환된 치환기의 개수로서, 각각 독립적으로 0 내지 5이고, 구체적으로 1 내지 3일 수 있다.

[0042] 상기 화학식 1로 표시되는 아미노산계 블록 코폴리머는 폴리에틸렌글리콜계 블록과 아미노산계 블록을 포함한다. 상기 폴리에틸렌글리콜계 블록은 친수성으로, 유기용매 내에서 친수성 물질을 당겨 입자를 이루거나 수상에서 코폴리머가 잘 분산되도록 하는 역할을 할 수 있고, 상기 아미노산계 블록은 소수성으로, 코폴리머가 수상에서 입자를 형성하고 소수성의 물질을 가두거나 펩타이드 결합(-CO-NH-)의 원자와 수소결합하여 아미노산을 당기는 역할을 할 수 있고, 이에 따라 상기 아미노산계 블록 코폴리머는 물에 잘 분산되는 동시에 아미노산

계 블록이 소포 내 아미노산을 당겨 코폴리머로 둘러싸며 그러한 이유로 엑소좀 내 단백질을 포함하는 소포를 고효율로 분리할 수 있다.

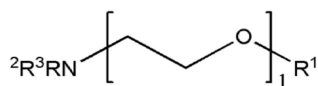
[0043] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 아미노산계 블록 코폴리머의 제조 방법은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물과 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물이 반응하여 하기 화학식 4로 표시되는 화합물이 제조되고, 상기 화학식 4로 표시되는 화합물과 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 반응하여 중합되어 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계를 포함한다.

[0044] [화학식 2]



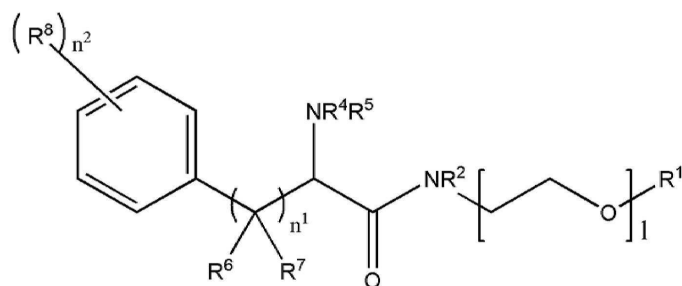
[0045]

[0046] [화학식 3]



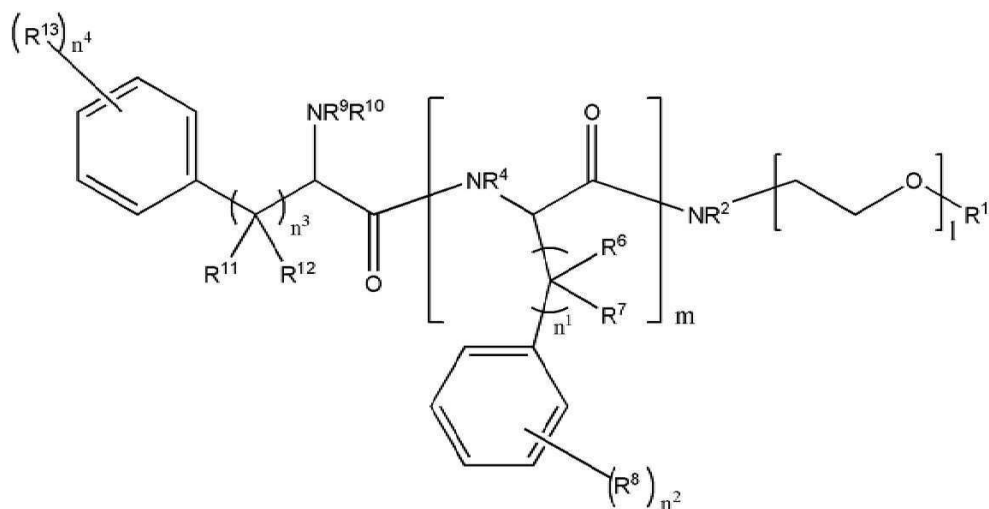
[0047]

[0048] [화학식 4]



[0049]

[0050] [화학식 1]



[0051]

[0052] 상기 화학식 1 내지 화학식 4에서, 상기 R^1 , R^2 , R^4 , R^6 내지 R^{13} , l, m, 및 n^1 내지 n^4 에 대한 설명은 상기한 바와 동일하므로 반복적인 설명은 생략한다.

- [0053] 상기 R^3 및 R^5 는 각각 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 알릴기, 아릴기, 아미노기, 하이드록시기, 알콕시기, 알킬 설포닐기, 아실기, 할로젠화 알킬기, 알테하이드기, 니트로기, 니트로소기 및 니트릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고, 일반적으로 수소 원자일 수 있다.
- [0054] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 일 예로, N-카르복시-L-페닐알라닌 무수물(N-Carboxy-L-phenylalanine anhydride, Phe-NCA)일 수 있고, 이는 일 예로 페닐알라닌(Phenylalanine)을 트라이포스젠(Triphosgene)과 반응시켜 제조할 수 있다.
- [0055] 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물은 일 예로, 아민기가 치환된 메톡시 폴리에틸렌글리콜(methoxy polyethylene glycol-amine, mPEG-amine)일 수 있다.
- [0056] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계는 상기 화학식 2로 표시되는 화합물과 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 용매에 녹인 후 교반하면서 반응시키면, 우선 상기 화학식 2로 표시되는 화합물과 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물이 반응하여 상기 화학식 4로 표시되는 화합물이 제조되고, 계속해서 상기 화학식 4로 표시되는 화합물과 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 반응하여 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 중합되면서 상기 아미노산계 블록이 형성된다.
- [0057] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물과 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물은 6 : 1 내지 280 : 1의 질량비로 반응시킬 수 있다. 상기 화학식 2로 표시되는 화합물의 질량비가 6 미만인 경우 mPEG 분율이 높은 코폴리머가 생성되고 코폴리머의 장점인 단백질 분리효율이 낮아질 수 있고, 280을 초과하는 경우 mPEG의 분율이 낮은 코폴리머가 생성되어 수용상 분산능이 낮아질 수 있다.
- [0058] 상기 중합 반응은 25 °C 내지 40 °C의 온도에서 48 시간 내지 168 시간 동안, 구체적으로 30 °C 내지 37 °C의 온도에서 48 시간 내지 72 시간 동안 반응시켜 이루어질 수 있다. 상기 중합 반응 온도가 25 °C 미만인 경우 합성 반응이 진행되지 않을 수 있고, 40 °C를 초과하는 경우 아미노산에 손상을 줄 수 있다. 상기 중합 반응 시간이 48 시간 미만인 경우 설정한 것보다 mPEG 분율이 높아질 수 있고, 72 시간을 초과하는 경우 부반응에 의한 부산물이 다량 생성될 수 있다.
- [0059] 상기 용매는 벤젠, 노말부탄올, 부틸아세테이트, 사염화탄소, 시클로헥산, 디클로로에탄, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 디에틸에스터, 헵탄, 헥산, tert-부틸메틸에스터, 메틸에틸케톤, 펜탄, 디이소프로필에스터, 테트라하이드로퓨란, 톨루엔, N-메틸-2-피롤리돈, 아세톤, 아세토니트릴, 디메틸 포름아마이드, 디메틸 설펝사이드, 1,4-디옥산, 에탄올, 에틸 아세테이트, 메탄올, 메틸 3급 부틸 에테르(methyl-tert-butyl ether), 1-프로판올, 2-프로판올, 2,2,4-트리메틸펜탄, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 본 발명이 이에 제한되지는 않는다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 소포를 분리하기 위한 조성물 또는 키트는 상기 아미노산계 블록 코폴리머를 포함한다.
- [0061] 이때, 상기 아미노산계 블록 코폴리머는 고체 지지체에 고정된 것일 수 있다. 상기 고체 지지체는 당업계에 알려진 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 고체 지지체는 자성 비드, 실리카 비드, 폴리스티렌 플레이트, 폴리스티렌 비드, 유리 비드, 셀룰로오스 비드, 금(Au) 입자 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0062] 상기 소포(vesicle) 또는 소낭은 지질 이중층으로 둘러싸인 막 구조를 말한다. 예를 들면, 소포는 리포솜 또는 마이크로베지클일 수 있다. 상기 마이크로베지클(microvesicle)은 세포로부터 유래한 막 구조의 작은 소포를 말한다. 상기 마이크로베지클은 순환 마이크로베지클(circulating microvesicle) 또는 마이크로입자(microparticles)와 교환 가능하게 사용된다. 상기 마이크로베지클은 세포에 존재하거나 세포로부터 분비될 수 있다. 세포 외로 분비되는 마이크로베지클은 엑소솜(exosome), 엑토솜(shedding microvesicles, SMVs)이라고도 함), 세포자살성 수포(apoptotic blebs), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 엑소솜은 식균 기원의 직경 30 nm 내지 100 nm의 막성 베지클일 수 있다. 상기 엑토솜은 원형질막으로부터 직접 흘러지고 직경 50 nm 내지 1,000 nm의 큰 막성 베지클일 수 있다. 상기 세포자살성 수포는 죽어가는 세포에 의해 유출된 직경 50 nm 내지 5,000 nm의 베지클일 수 있다.
- [0064] 상기 생체 내 마이크로베지클은 마이크로RNA(miRNA) 또는 mRNA(messenger RNA)를 포함할 수 있다. 상기 마이크로베지클의 표면 단백질은 질병 특이적 마커일 수 있다.

- [0065] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 소포를 분리하는 방법은 상기 아미노산계 블록 코폴리머를 소포를 포함하는 시료와 인큐베이션하여 상기 아미노산계 블록 코폴리머를 소포에 결합시키는 단계, 그리고 반응 혼합물로부터 소포를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0066] 상기 시료는 체액 또는 세포 배양액일 수 있다. 체액은 예를 들면, 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈장, 혈청, 뇨, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계 내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 또는 그의 조합일 수 있다.
- [0067] 상기 시료는 세포 또는 세포 잔해가 제거된 시료일 수 있다. 세포는 온전한 세포 또는 죽은 세포일 수 있다. 세포 또는 세포의 잔해를 제거하는 방법은 당업계에 알려진 방법일 수 있다. 예를 들면, 시료는 고체 지지체 또는 원심력을 이용한 분리, 밀도구배법, 초원심분리, 여과, 투석, 항체를 이용한 면역친화성결합, 자유유동전기이동법 또는 이들을 조합한 방법을 수행하여 전처리된 것일 수 있다.
- [0068] 상기 인큐베이션은 인 비트로에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 상온(20 ℃)에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 인큐베이션은 반응물을 혼합하면서 수행될 수 있다.
- [0069] 상기 방법은 반응 혼합물로부터 소포를 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 소포를 분리하는 단계는 예를 들면, 반응 혼합물의 제거, 세척 또는 이들의 조합으로 수행될 수 있다. 상기 분리하는 단계는 고체 지지체에 고정된 아미노산계 블록 코폴리머로부터 소포를 분리하는 것일 수 있다.
- [0070] 상기 방법은 분리된 소포를 검출하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 검출은 당업계에 알려진 다양한 방법이 이용될 수 있다. 일 예로, 동적 광산란법을 이용하여 액체에 분산되어 있거나 용해되어 있는 입자, 예멸전 또는 분자의 크기 특성 분석 장비인 DLS(Dynamic Light Scattering)로 검출할 수 있다. 또한, 소포를 염색하거나, 전자현미경으로 확인하거나, 또는 형광 물질이 접합된 리간드를 이용하여 검출할 수 있다. 예를 들면, 형광 물질이 형광 단백질(fluorescent protein)일 경우, 자외선을 조사하여 발생하는 형광광도를 형광광도계(fluorophotometer)를 사용하여 검출할 수 있다.
- [0071] 상기 방법은 분리된 소포를 용해시켜 소포로부터 핵산을 분리하는 단계, 및 분리된 핵산을 증폭하여 소포의 핵산을 분석하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0072] 상기 소포의 용해는 예를 들면, 카오트로픽 염(chaotropic salt), 유기 용매 또는 계면 활성제를 포함하는 용매의 존재 하에 수행될 수 있다. 소포의 용해는 예를 들면, 가열, 교반, 회전, 볼텍싱 또는 이들의 조합으로 수행될 수 있다. 핵산(nucleic acid)은 퓨린 염기 또는 피리미딘 염기와, 당 및 인산으로 이루어진 고분자 물질을 말한다. 핵산은 예를 들면, mRNA(messenger RNA) 또는 마이크로RNA(microRNA, miRNA)일 수 있다. 예를 들면, 역전사-중합효소 연쇄 반응(reverse-transcription polymerase chain reaction)으로 핵산을 증폭할 수 있다. 증폭된 핵산을 분석함으로써 소포의 핵산을 분석할 수 있다.
- [0074] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0075] **[제조예: 고분자 엠피이지 폴리페닐알라닌 블록 코폴리머(mPEG-b-pPhe)의 합성]**
- [0076] **1) N-카르복시-L-페닐알라닌 무수물(N-Carboxy-L-phenylalanine anhydride, Phe-NCA)의 합성**
- [0077] (i) 플라스크에 페닐알라닌(Phenylalanine) 2 g과 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran) 15 ml를 담고 마개로 밀봉한 뒤 오일배스에 담그고 온도를 50 ℃로 설정하였다.
- [0078] (ii) 마그네틱 바를 이용하여 (i)을 혼합하였다.
- [0079] (iii) 트라이포스젠(Triphosgene) 3.5 g을 테트라하이드로퓨란 10 ml에 녹였다.
- [0080] (iv) (i)이 설정 온도에 다다르면 주사기를 이용하여 (iii)을 (i)에 빠르게 첨가하였다.
- [0081] (v) 용액의 색이 맑아지고 1 시간 뒤 반응을 종결하였다. 오일배스에서 플라스크를 꺼내고 마개를 열어 용액의 온도가 식기를 기다렸다.
- [0082] (vi) 소수성 필터를 거쳐 용액을 거른 후 냉동실에서 차갑게 보관한 n-헥산(n-Hexane)에 떨어뜨리고 냉동실에서 12 시간 이상 보관하였다.

[0083] (vii) 차가운 n-헥산으로 여러 차례 씻어 불순물을 제거한 뒤 감압분리로 광택이 있는 백색의 파우더 형태의 Phe-NCA를 얻었다.

[0084] (viii) 하루 간 실온에 두어 용매를 건조한 후 사용하였다.

[0085] **2) mPEG-b-pPhe의 합성**

[0086] (ix) 목표 mPEG 분율을 f 라고 했을 때 mPEG-amine과 Phe-NCA를 각각 f : (1-f) 3 : 7, 5 : 5, 7 : 3의 질량비로 맞춰 정량하고 플라스크에 담아 디메틸포름아마이드(N,N-Dimethylformamide)에 녹였다.

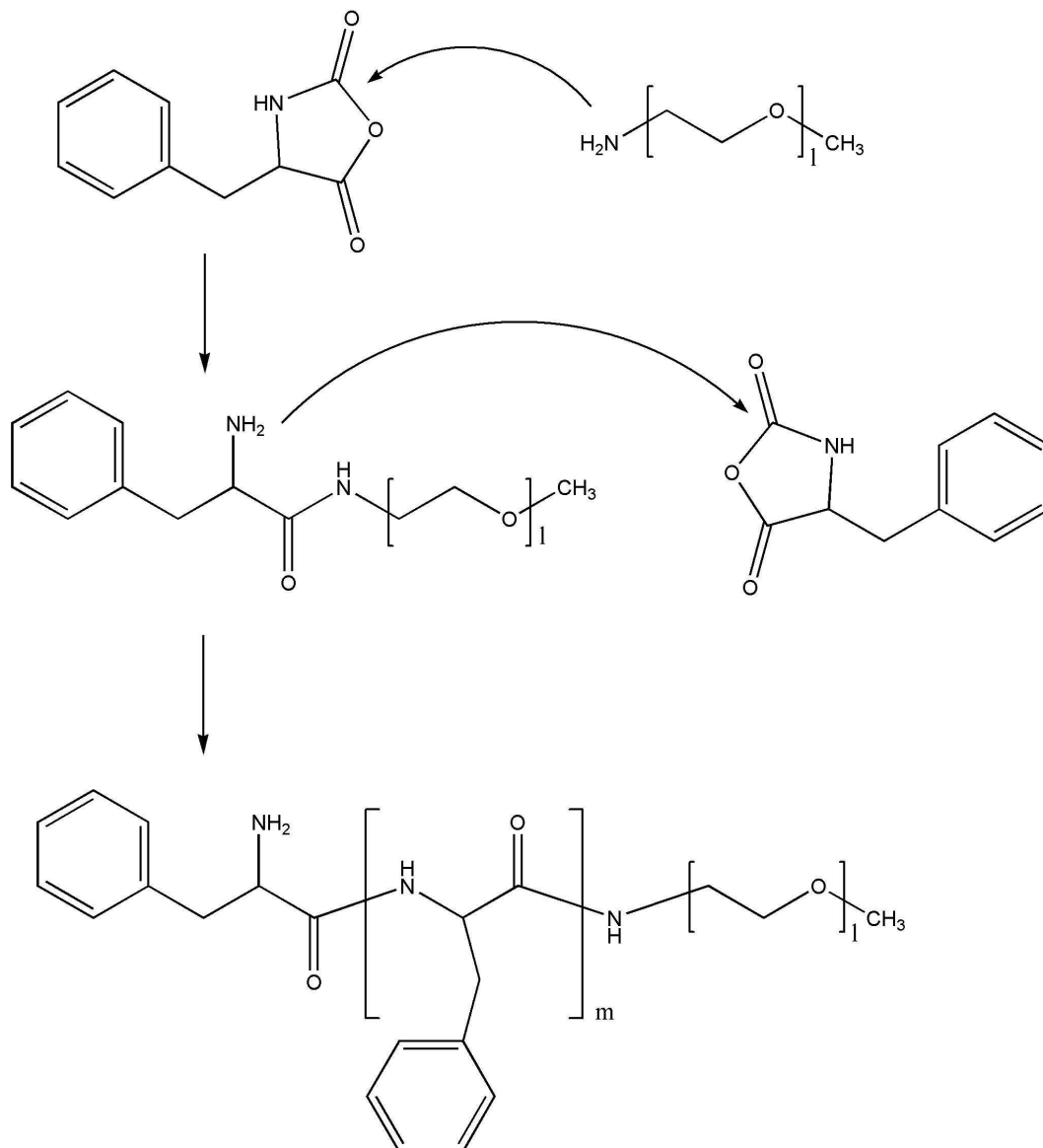
[0087] (x) 플라스크를 오일배스에 담그고 온도를 30 ℃로 설정하였다.

[0088] (xi) 마그네틱 바를 이용하여 (ix)를 혼합하여 3 일간 반응시켰다.

[0089] (xii) 반응이 종결되면 차가운 에틸에테르(Diethyl ether)에 떨어뜨렸다.

[0090] (xiii) 20 분 내지 30 분마다 감압분리와 침전을 반복하여 불순물을 제거하고 감압분리로 백색의 파우더 형태의 mPEG-b-pPhe를 얻었다. 하루 간 실온에 두어 용매를 건조한 후 사용 또는 보관하였다.

[0091] [반응식 1]



[0092]

[0093] [실시예: 엑소좀 분리 실험]

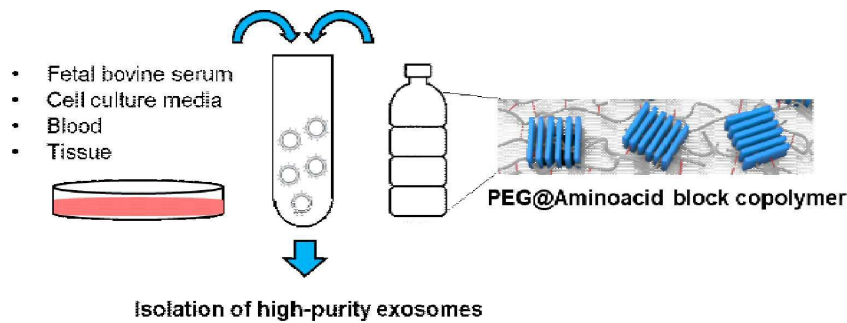
[0094] (실시예 1)

- [0095] 실시예에서 진행한 엑소좀 분리 실험의 모식도를 도 1에 나타내었다.
- [0096] 도 1을 참조하면, 우선 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을 원심분리(500 g/30 min, 2000 g/30 min)하여 세포 등을 제거하였다.
- [0097] 상기 제조예에서 제조된 mPEG-b-pPhe를 클로로포름(Chloroform)에 녹이고 클로로포름의 10 배 용량의 물에 떨어 뜨려 하루간 클로로포름을 증발시켜 조성물을 제조하였다.
- [0098] 상기 조성물의 물과 같은 용량의 상기 세포를 제거한 FBS를 첨가하고 흔들어 혼합한 후, 냉장고에서 24 시간 동안 두었다.
- [0099] 이후, 원심분리(4000 g/60 min)하여 상층액을 버렸다.
- [0100] 침전물에 석출된 고분자가 섞여 있는 경우, 침전물을 물에 녹여 냉장고에 잠시 두었다.
- [0101] 녹지 않는 고분자로부터 엑소좀 용액을 덜어냈다.
- [0102] **(비교예 1)**
- [0103] 실시예 1에서 mPEG-b-pPhe를 대신하여 PEG(중량평균분자량 각각 1000 g/mol, 6000 g/mol, 8000 g/mol, 10000 g/mol, 20000 g/mol, Sigma-Aldrich에서 구입)를 물에 녹여 조성물을 제조한 후, 실시예 1과 같이 FBS와 혼합하여 엑소좀 분리 실험을 진행하였다.
- [0104] **[실험예 1: 아미노산계 블록 코폴리머의 물성 측정]**
- [0105] 상기 제조예에서 mPEG-amine의 분자량을 각각 2000 g/mol 및 5000 g/mol로 변경하여 상기 아미노산계 블록 코폴리머를 제조하였다.
- [0106] 상기 제조된 아미노산계 블록 코폴리머 각각에 대하여 물성을 측정하였고, 그 결과를 도 2 내지 도 5에 나타내었다.
- [0107] 도 2는 수상에 분산, 셀 타입: 일회용, 온도: 25 ℃, 가속시간: 25 초, 측정횟수: 5 회인 조건으로 측정한 DLS(Dynamic Light Scattering) 결과이다. 상기 도 2에서 좌측 그래프는 분자량이 2000 g/mol인 mPEG-amine를 이용하여 제조한 아미노산계 블록 코폴리머에 대한 결과이고(PEG₂₀₀₀@Phe block copolymer), 우측 그래프는 분자량이 5000 g/mol인 mPEG-amine를 이용하여 제조한 아미노산계 블록 코폴리머에 대한 결과이다(PEG₅₀₀₀@Phe block copolymer).
- [0108] 도 2를 참조하면 제조된 두 아미노산계 블록 코폴리머를 이용하면 나노사이즈의 소포체를 안정하게 고효율로 분리할 수 있음을 알 수 있다.
- [0109] 도 3은 수상에 분산, 셀 타입: 저농도용 Zeta 셀, 온도: 25 ℃, 반복횟수: 5 회인 조건으로 측정한 Zeta potential 결과이다. 도 3을 참조하면 분리된 소포체가 세포 표면 인지질과 같은 음성전하임을 알 수 있다.
- [0110] 도 4는 10 분간 Au/Pt coating을 조건으로 측정한 SEM(Scanning Electron Microscope) 결과이다. 상기 도 4에서 좌측 그래프는 분자량이 2000 g/mol인 mPEG-amine를 이용하여 제조한 아미노산계 블록 코폴리머에 대한 결과이고(PEG₂₀₀₀@Phe block copolymer), 우측 그래프는 분자량이 5000 g/mol인 mPEG-amine를 이용하여 제조한 아미노산계 블록 코폴리머에 대한 결과이다(PEG₅₀₀₀@Phe block copolymer).
- [0111] 도 4를 참조하면 균일한 나노사이즈의 구형 소포체가 추출되었음을 알 수 있다.
- [0112] 도 5는 Bradford Assay를 이용한 단백질 정량 결과이다. 도 5를 참조하면 단백질을 포함한 나노사이즈의 소포체임을 알 수 있다.
- [0114] **[실험예 2: 소포체 특이적 단백질의 측정]**
- [0115] 본 실험예 2는 상기 제조예에서 제조된 아미노산계 블록 코폴리머를 이용하여 추출된 소포체가 엑소좀 특이적 단백질 마커를 확인한 웨스턴블랏 결과이다.
- [0116] 구체적으로, 소포체로부터 단백질을 분리(tween 20-containing PBS를 얼음에서 1 시간 동안 반응시킨 후 원심분리를 통해 상등액만 추출)한 후, Bradford 방법을 통해 단백질을 정량한 다음, 각 샘플당 동량(20 ug)의 단백질을 전기 영동하였다.

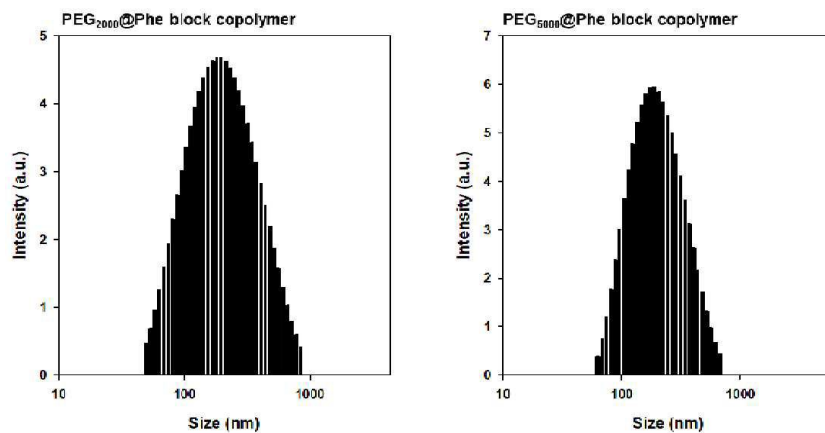
- [0117] 크기에 따라 분리된 단백질은 니트로셀룰로스(nitrocellulose) 같은 멤브레인에 옮겨 붙인 다음, 관찰하려는 단백질에 대해 소포체 특이적 단백질에 결합할 수 있는 1 차 항체 CD63과 대조군 단백질인 Beta-actin을 24 시간 동안 -10 ℃ Cold room에서 반응시켰다.
- [0118] 1 차 항체와 결합할 수 있는 2 차 항체(anti-rabbit Ig-HRP, anti-mouse Ig-HRP)를 2 시간 동안 반응시킨 후 최종적으로 2 차 항체에 붙어있는 효소(Horse radish peroxidase, HRP)와 반응할 수 있는 기질을 넣어주었고, 이 멤브레인을 X-ray 필름에 노출시킴으로써 형성되는 검정색 밴드를 develop을 통해 관찰하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0119] 상기 도 6에서 좌측 그래프는 추출된 결과물에 소포체에 엑소좀 특이적 단백질 유무를 확인하기 위한 결과이고 (CD63), 우측 그래프는 대조군으로 인지질로 구성된 세포가 보유하고 있는 단백질 유무를 확인한 결과이다(β -actin).
- [0120] 상기 도 6을 참조하면 추출된 소포체에는 인지질로 구성되어있는 세포가 가지고 있는 단백질뿐만 아니라 엑소좀 특이적 단백질을 보유하고 있음을 알 수 있다.
- [0122] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

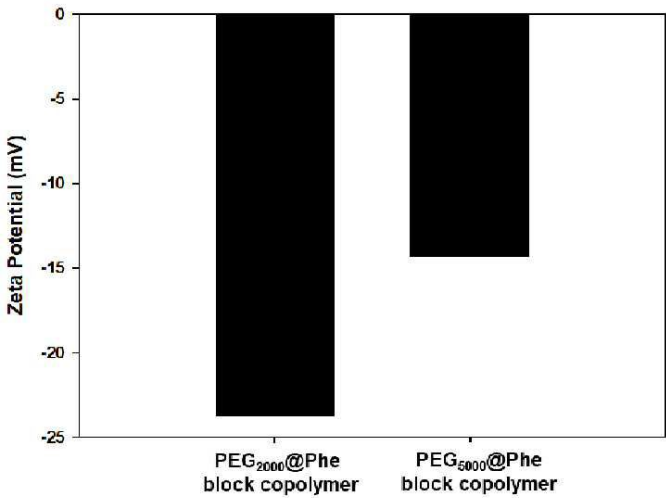
도면1



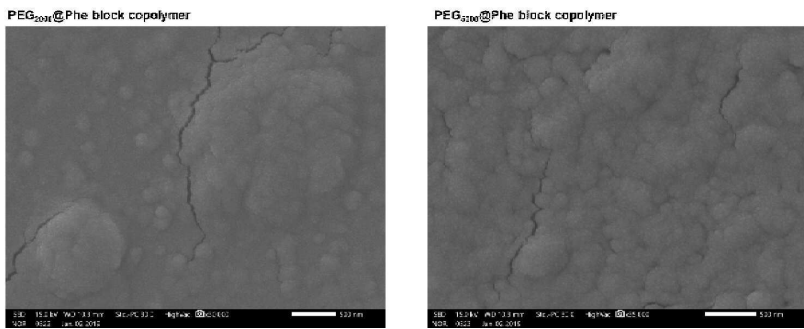
도면2



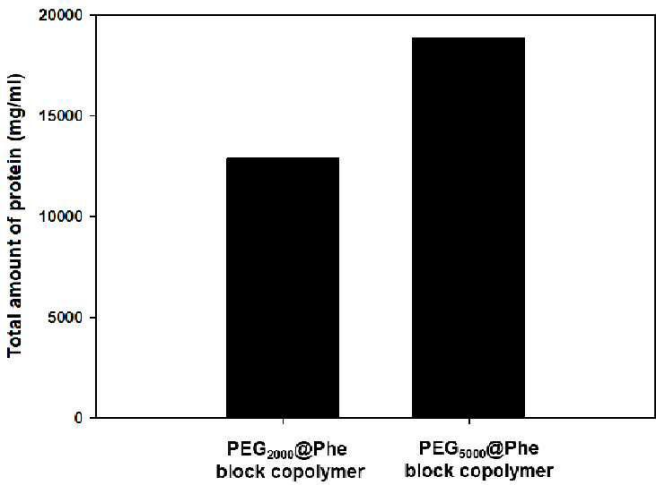
도면3



도면4



도면5



도면6

