



[UCI]1804:24011-200000278521



2020년 2월 석사학위 논문

클릭 반응을 통한 ⁶⁴Cu 표지 엑소좀의 림프절 이미징 연구

조선대학교 대학원

약 학 과

김 도 희





클릭 반응을 통한 ⁶⁴Cu 표지 엑소좀의 림프절 이미징 연구

Lymph Node Imaging Using ⁶⁴Cu-labeled Exosomes via Click Reaction in Mouse

2020년 2월 25일

조선대학교 대학원

약 학 과

김 도 희



클릭 반응을 통한 ⁶⁴Cu 표지 엑소좀의 림프절 이미징 연구

지도교수 황 승 림

이 논문을 약학 석사학위신청 논문으로 제출함

2019년 10월

조선대학교 대학원

약 학 과

김 도 희



김도희의 석사학위논문을 인준함



2019년 11월

조선대학교 대학원



Contents

List of Tables
List of Figures
ABSTRACT
I. Introduction 1
I-1. 클릭 화학 (click chemistry) 2
I-1-(1). Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC) 3
I-2. Positron emission tomography/computed tomography
(PET/CT) imaging 3
II. Materials and Methods7
II-1. Materials7
II-2. Cell culture
II-3. Triacetylated <i>N</i> -azidoacetylmannosamine (Ac₃ManNAz)
treatment
II-4. Isolation of exosomes
II-5. Characterization of exosomes
-5-(1). BCA assay를 활용한 엑소좀의 단백질 정량
-5-(2). NanoDrop을 활용한 엑소좀의 단백질 정량 10
-5-(3). Western blot을 통한 엑소좀의 tetraspanins 검출 10
II-6. Radioisotope labeling of exosomes
II-6-(1). DOTA-Lys-PEG₄-DBCO의 합성 11
-6-(2). ⁶⁴ Cu와 DOTA-Lys-PEG₄-DBCO의 결합



-6-(3). ⁶⁴ Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBC0를 이용한 엑소좀의 표지 14
II-7. Analysis of radio-thin layer chromatography
(radio-TLC) 15
II <i>-</i> 8. <i>In vivo</i> PET/CT imaging15
III. Results and Discussion 16
III-1. Characterization of exosomes
-2. Radio-TLC 20
-3. <i> n vivo</i> PET/CT imaging
IV. Conclusion 22
V. References



List of Tables

Table 1.	BCA assay를 활용한	엑소좀의 단백질	정량	 17
Table 2.	NanoDrop을 활용한	엑소좀의 단백질	정량	 17



List of Figures

Figure 1	1. 클릭 화학을 이용한 엑소좀 표지 및 생체 내 거동 평가의 개요 5
Figure 2	2. 엑소좀 표지에 대한 개략도 6
Figure 3	3. DOTA-Lys-PEG₄-DBCO의 합성 12
Figure 4	4. ⁶⁴ Cu와 DOTA-Lys-PEG₄-DBCO의 결합 13
Figure 5	5. ⁶⁴ Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO를 이용한 엑소좀의 표지
Figure 6	6. BCA assay를 활용한 엑소좀의 단백질 정량 standard curve graph 16
Figure 7	7. DLS를 이용한 엑소좀 시료의 직경 측정 18
Figure 8	8. TEM 이미지 촬영 18
Figure 9	9. Western blot을 통한 엑소좀의 tetraspanins 검출
Figure 1	10. Radio-TLC를 활용한 엑소좀 시료의 표지 여부 및 수율 확인 20
Figure 1	11. PET/CT에 의한 엑소좀 시료의 생체영상 21



ABSTRACT

Lymph Node Imaging Using ⁶⁴Cu-labeled Exosomes via Click Reaction in Mouse

Kim Do Hee Advisor : Prof. Seung Rim Hwang Department of Pharmacy, Graduate School of Chosun University

Exosomes are double-layered lipid vesicles which are generated from endosomes and released outside cells. Recently, drug delivery and development of biomarker using exosomes are actively studied by many researchers. Although establishment of biodistribution of exosomes is required for clinical use of exosomes, difficulty in bioimaging of exosomes and damage to exosome viability remain challenges in pharmacokinetic evaluation of exosomes. For biomedical application of exosomes, we need safer and more accurate method monitoring biodistribution of exosomes.

Meanwhile, tumor-derived exosomes can present antigen to immune cells, which are localized to lymph node. Dendritic cells are activated to antigen-presenting cells, when they meet tumor-associated antigens. Antigen-presenting cells induce formation of cytotoxic CD8+ T cells. Thus, visualizing distribution of exosomes to lymphatic system is important to research on immunotherapy.

In this study, we performed lymph node imaging using exosomes labeled with



radioisotope via click reaction in mouse.



I. Introduction

엑소좀 (exosome)은 세포의 엔도좀 (endosome)에서 생성되는 지질 이중층 막 소포체 로, 약 30-200 nm 정도의 직경 크기를 가지고 있다.^[1-2] 초기에는 엑소좀이 세포로부 터 불필요한 성분을 배출하기 위한 것으로만 여겨졌으나, 모세포로부터 유래한 단백 질, mRNA, miRNA, DNA 등의 활성 성분을 지니고 있어 세포 사이의 생물학적 신호 전달 및 커뮤니케이션에 기여한다는 것이 알려지면서 그 개념이 변화하였다.^[3-7] 엑소좀에 의한 세포 간 통신은 수용 세포의 기능적 상태를 직접적으로 변화시키며 다양한 생리 적, 병리학적 과정을 조절한다.^[8-10] 이런 특성으로 인해 엑소좀을 나노 수송체 (nanocarrier)로 활용, 약물을 전달하여 질병을 치료하거나 엑소좀의 특정 단백질 또 는 유전자를 질병 진단을 위한 새로운 생체지표 (biomarker)로 개발하는 연구가 활발 히 이루어지고 있다.^[11-13]

종양 세포 유래 엑소좀은 정상 세포에서 분비되는 엑소좀보다 높은 수율로 얻어지 며, 종양 미세 환경 연관 세포로부터 성장 인자와 사이토카인의 분비를 자극함으로써 종양 관련 면역 억제를 중재하고 종양 발생이나 성장 등의 종양 미세 환경을 변경하는 데 필수적인 역할을 한다.^[14-18] 일반적인 나노 입자를 이용하여 항원을 전달하고자 하 는 경우에는 나노 입자와 항원 사이의 인위적인 결합이 필요하고, 인위적인 결합으로 인하여 항원의 전달 과정 중 나노 입자와 항원의 결합이 끊길 가능성이 있는 반면에 종양 세포 유래 엑소좀은 종양 특이적 항원을 포함하고 있어 일반적인 나노 입자에 항 원을 인위적으로 접합시키는 경우와는 달리 본질적으로 항원 제시 기능을 할 수 있음 을 암시한다.^[19-22]

림프절 (lymph node)은 다수의 수지상세포 (dendritic cell)와 대식세포 (macrophage)가 존재하는 부위로 면역 요법에 있어서의 요충지이다.^[23-24] 수지상세포 는 종양 관련 항원 (tumor-associated antigen)을 만나면 항원을 T세포 (T cell)에 교 차 제시할 수 있는 항원제공세포 (antigen-presenting cell)로 활성화되며, 항원제공 세포는 종양 세포를 죽일 수 있는 종양 항원 특이성 CD8+ T세포의 생성을 유도한



다.^[25-26] 따라서 림프절을 표적으로 하여 전달되는 항원의 림프 이행을 시각화하는 일 은 면역 요법에 있어 매우 중요한 포인트가 될 것이다. 기존에 보고된 연구에 의하면, 개개의 항원분자가 유리된 상태로 전달될 때보다 나노 입자에 의해 항원이 운반될 때 림프절로의 항원 전달력이 향상되었다. 또한, 직경이 큰 나노 입자는 림프절을 통한 흡수율이 적은 반면, 크기가 작은 나노 입자일수록 흡수율이 향상되었다.^[27-30] 이러한 결과들을 바탕으로 보았을 때, 엑소좀의 림프 이행은 용이할 것으로 예상된다.

엑소좀이 임상에서 치료, 진단 및 약물 전달에 활용되도록 연구 개발을 진행되기 위 해서는 엑소좀의 생체 내 거동 평가를 위한 분석 기법이 필요하다.^[31] 전기 천공법 (electroporation)과 유전 공학 (genetic engineering)에 의한 방법은 엑소좀에 새로 운 분자 구성을 포함시켜 표지 (labeling)하기 위한 가장 효과적인 방법으로 여겨졌으 나, 이 방법들의 복잡한 과정 중에 엑소좀의 활성을 손상시킬 우려가 있다.^[32-33] 엑소 좀의 생의학적 응용을 위해서는 엑소좀의 활성을 손상시키지 않으면서도 엑소좀의 체 내 분포를 모니터링할 수 있는 비침습적이고 정확한 방법이 필요하다.

I-1. Click chemistry (클릭 화학)

클릭 화학이란 수용성 조건에서 발생하는 신속하고 선택적으로 반응하는 직교성의 두 작용기 사이의 반응이다.^[34] 클릭이라는 용어는 K. B. Sharpless가 두 분자 사이의 반응이 클릭을 하는 것처럼 간단하고 빠르게 진행된다는 의미에서 도입하였다. 최근에 클릭 화학의 개념은 생명과학, 약효물질 발견, 재료과학 등에서 널리 사용되는 두 분 자 사이의 2단계 결합 절차로 변화되었다.^[35-39] 원하는 생성물의 매우 높은 화학적 수 율을 제공하며, 신속하고 정량적인 표지가 가능하다는 장점이 있다. 클릭 화학은 구리 를 촉매로 사용하는 여부에 따라서 크게 두 가지로, 다시 세분화되어 Cu (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC), tetrazine-alkene ligation 반응으로 나누어진다. 이 중, CuAAC 반응은 Cu(I) 이온의 존재에 의존하여 촉매화되는 반응인 반면, SPAAC 반응과 tetrazine-alkene ligation 반응은 금속 촉매를 사용하지 않고 진행되는 반응이다. 본 연구에서는 SPAAC 반응을 이용하였다.



I-1-(1). Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC)

SPAAC 반응은 CuAAC 반응과는 달리 구리 촉매를 사용할 필요가 없는 표지법이 다.^[40-41] CuAAC 반응은 구리의 독성으로 인해 생체에 적용하기 어려우나, SPAAC 반응 은 구리 촉매가 사용되지 않기 때문에 독성의 위험성이 적어 적용이 가능하다.^[42] 이 반응은 CuAAC 반응에 쓰이는 말단 alkyne과는 대조적으로 두드러지게 감소된 활성화 에너지를 가지므로 외인성 촉매를 필요로 하지 않는 변형된 cyclooctyne을 사용한 다.^[43] 따라서, azide와 변형된 cyclooctyne이 click chemistry로 결합함과 동시에 두 작용기 사이에는 안정적인 1,2,3-triazole이 형성된다. SPAAC 반응은 살아있는 세포의 단백질과 지질의 glycan의 표지, 프로테오믹스를 위한 당단백질 강화, 단백질과 올리 고뉴클레오타이드의 변형 및 조직 reengineering에 광범위하게 유용하다고 보고되어 있다.^[44-45] 초기에 이 반응에 사용되던 cyclooctyne은 비교적 느린 반응 속도로 인해 많은 양의 시약이 필요하고 반응 시간이 길다는 단점이 있었으나, 변형된 cyclooctyne 의 개발로 반응성과 친수성이 향상되었다.^[46-47] 변형된 cyclooctyne은 주로 Azadibenzylcyclooctyne으로, DBCO, ADIBO, DIBO 등의 이름으로 불린다. SPACC 반응은 CuAAC 반응보다 훨씬 빠르며, dual-labeling이 가능하다는 장점이 있다.^[48]

I-2. Positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) imaging

체내 분포를 확인하는 영상 기법에는 여러 가지 기법이 있다. 그 중 형광 영상은 생체 내의 세포 또는 조직의 형광물질이 외부에서 조사되는 특정 파장의 빛을 흡수하 여 여기된 후 입사광보다 긴 파장의 빛을 방사할 때 이러한 형광의 강도를 감지하여 영상화하는 방법으로, 물질의 생체 내 거동을 비침습적으로 빠르게 스크리닝하고자 할 때 적용할 수 있는 방법이다. 영상장비의 사양에 따라서는 다중 채널로 여러 형광물질 을 동시에 모니터링하는 것도 가능하지만, 광학 신호의 낮은 침투 깊이 때문에 심부 조직 내 분자의 정확한 정량화에는 한계가 있다. 형광 영상의 한계를 극복할 수 있는 다양한 생체 영상 기법 중 positron emission tomography (PET)는 양전자를 방출하는 방사선 동위원소를 결합시킨 약물을 주입하여 체내 분포를 촬영할 수 있는 방법이며, 단층 촬영술 (computed tomography, CT)의 장 점을 결합시킨 PET/CT를 사용하면 기존의 PET보다 좀 더 정확하고 빠른 검출이 가능하 다. PET으로 약물의 체내 분포를 확인하고, CT를 촬영하여 둘을 결합시키면 약물의 위 치 파악이 훨씬 용이하다.

본 연구에서는 엑소좀의 체내 거동 평가를 위한 새로운 방법으로서 copper free click reaction인 SPAAC 반응을 활용한 편리하고 효율적인 방사성 동위원소 표지 방법 의 유용성을 확인하기 위한 전략을 제시하고자 하였다. 종양 세포를 포함한 다수의 세 포가 표면에 sialylated glycan을 가지고 있고, 특정 sialic acid를 함유한 당 단백질 이 종양 세포 유래 엑소좀 내에서 확인되는 것으로 보고되어 있다. 따라서, glycan 생 합성 과정 동안 azide 작용기를 가지고 있는 당류는 대사되면서 엑소좀과 통합될 수 있다.^[49-50] 세포 배양 과정에서 triacetylated *N*-azidoacetylmannosamine (Ac₃ManNAz) 를 첨가하여 엑소좀에 azide 작용기를 통합하고 클릭 화학을 이용하여 표지한 엑소좀 을 림프계로 주입하였을 때 엑소좀의 체내 분포를 생체 영상 기법으로 확인하고자 하 였다 (Figure 1, 2).





Figure 1. 클릭 화학을 이용한 엑소좀 표지 및 생체 내 거동 평가의 개요





Figure 2. 엑소좀 표지에 대한 개략도



II. Materials and Methods

II-1. Materials

A549 lung cancer cell (Korean cell line bank, Seoul, Korea), RPMI-1640 medium with L-glutamine (1×) (Hyclone laboratory Inc., Logan, UT, USA), Gibco[™] Dulbec co's phosphate buffered saline (DPBS) 1× with calcium chloride and magnesium c hloride (Thermo fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA), X-VIVO 15 serum-free medium with gentamicin and phenol red (Lonza Inc., Basel, Switzerland), Premium fetal bovine serum (Biowest, Nuaillé, France), Gibco[™] 0.5% Trypsin-ethylenedia minetetraacetic acid (EDTA) (10×) (Thermo fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA), cell culture dishes (Thermo fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA), Pen icillin/streptomycin solution (100×) (Capricorn scientific GmbH, Ebsdorfergrun d, Germany), Corning[®] 500 mL vacuum filter/storage bottle system, 0.22 µm PES m embrane, sterile, 12/case (Corning Inc., Corning, NY, USA), PD-10 column (GE Hea Ithcare, Chicago, IL, USA), Ac₃ManNAz (α , β mixture (α : β =3:1), Future chem C o., Ltd., Seoul, Korea), Fmoc-Lys(Dde)-OH (Anaspec Inc., Frenont, CA, USA), 1,4, 7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-tris-(*t*-butyl acetate)-10-acetic acid (DOTA-tri s (*t*-Bu ester)) (Macrocyclics Inc., Dallas, TX, USA), DBCO-PEG₄-NHS ester (Click chemistry tools, Scottsdale, AZ, USA), ⁶⁴CuCl₂ (cyclotron at Korea institute of r adiological and medical sciences, Seoul, Korea), Ifran liquid (Hana Pharm. Co., Seoul, Korea), BD Ultra-Fine[™] II Insulin Syringe (BD Inc., Franlin Lakes, New J ersey, USA)

II-2. Cell culture

본 연구에서는 종양 세포 유래 엑소좀을 사용하여 연구를 진행하고자 lung cancer



cell인 A549 세포를 배양하였다. RPMI-1640 media 총 용량의 10%의 FBS와 총 용량의 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 세포배양에 사용하였다. A549 세포를 100 mm cell culture dish에 1×10⁶개로 seeding (각 dish의 volume 10 mL)하였으며, 37 °C, 5% CO₂ 환경의 CO₂ incubator (Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA)에서 배 양했다. 100 mm cell culture dish의 70-80%만큼 증식되었을 때 계대배양을 진행하였 으며, 계대배양을 할 때는 dish에 담겨있던 기존의 media를 제거하기 위해 suction으 로 media를 흡입한 뒤 PBS로 100 mm cell culture dish를 세척하였다. 10× Trypsin-EDTA는 PBS로 1×가 되도록 희석한 다음 100 mm cell culture dish에 도포하 여 세포를 떼어내었다. 계대배양을 하며 세포의 개체수를 증가시켜, media의 총 부피 가 200 mL이 되었을 때는 cell을 1×10⁵개로 seeding하고 다음 단계를 진행하였다.

II-3. Triacetylated *N*-azidoacetylmannosamine (Ac₃ManNAz) treatment

액소좀 표면을 수식하기 위해 cell culture 과정 중 모세포의 표면에 있는 sialylated glycan에 azide 그룹이 포함되어 있는 Ac₃ManNAz를 처리하였다. Ac₃ManNAz 10 mg을 DMSO 500 µL를 사용하여 농도가 50 mM이 되도록 용해하고 100 µL씩 갈색 micro tube에 소분하여 -20 ℃ 냉동고에서 보관하였다. 냉동 보관 중이던 50 mM Ac₃ManNAz를 해동하여 50 µL를 RPMI 1640 (10% FBS, 1% penicillin streptomycin) media에 첨가하고 균일하게 섞일 수 있도록 pipetting하여, Ac₃ManNAz의 최종 농도가 50 µM이 되도록 희석하였다. 세포가 seeding되어 있는 100 mm cell culture dish를 PBS 10 mL를 사용하여 두 번 세척한 후, 50 µM이 되도록 media에 희석하여 준비해둔 Ac₃ManNAz를 100 mm cell culture dish에 10 mL씩 넣고 37 ℃, 5% CO₂ 환경의 incubator에서 3일 동안 배양하였다.

II-4. Isolation of exosomes

Ac₃ManNAz을 처리한 지 3일이 지나고 100 mm cell culture dish에 있는 Ac₃ManNAz가 섞인 media를 suction으로 흡입하여 제거하였다. 그 후, PBS 10 mL를 사용하여 2회 세

- 8 -



척한 다음 serum free media를 cell culture dish에 채워주고 37 ℃, 5% CO₂ 환경에서 overnight incubation하였다. overnight incubation 과정이 끝나면 모든 cell culture dish의 serum free media를 모아서, 우선 cell debris를 제거하기 위해 2,000 x g, 4 ℃에서 20분 동안 Srovall ST 16R (Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 원심분리하였다. 그 후 microvesicle을 제거하기 위해 10,000 x g, 4 ℃에서 45분 동안 Supra R22 (Hanil scientific Inc., Gimpo, Korea)로 원심분리하고, 원심분 리 이후에도 존재할 수 있는 microvesicle 잔존물을 제거하기 위해 0.22 µm syringe filter로 여과하였다. 여과 과정이 끝난 이후에 엑소좀을 모으기 위해 100,000 x g, 4 °C에서 150분 동안 Optima L-100 XP centrifuge (Beckman coulter Inc., Brea, CA, USA)로 원심분리하였다. centrifuge tube 바닥에 모여 있는 pellet을 PBS에 재분산시 키고 하나의 centrifuge tube에 다시 모은 다음 엑소좀 세척을 위해 100,000 x g, 4 ℃에서 150분 동안 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후 centrifuge tube에 모인 엑소 좀을 PBS 1 mL로 재분산시키고 이것을 micro tube에 250 μL씩 나눠서 Bicinchoninic acid assay (BCA assay) 및 NanoDrop (Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA) 을 활용하여 총 단백질 정량을 한 뒤 -80 ℃의 초저온 냉동고에 보관하였다. 또한, 엑 소좀의 크기를 측정하고자 동적광산란 (dynamic light scattering, DLS (ELSZ-2000 Otsuka elctronics Co., Ltd., Osaka, Japan)) 및 투과전자현미경 (transmission electron microscopy, TEM (JEM-2100F, Jeol Ltd., Tokyo, Japan)) 분석을 수행하였 고, 엑소좀의 대표적인 단백질인 CD9, CD81 등의 tetraspanin을 검출하기 위해 western blot을 수행하였다.

II-5. Characterization of exosomes

Ⅱ-5-(1). BCA assay를 활용한 엑소좀의 단백질 정량

표면 수식된 엑소좀의 단백질 농도 측정을 위해 BCA assay를 실행하였다. 우선, -80 ℃ 초저온 냉동고에 보관되어 있던 엑소좀 현탁액 시료는 얼음이 담겨있는 통에 넣고 서서히 해동시킨 후, Pierce[™] BCA protein assay kit (Thermo fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA)의 BCA reagent A와 BCA reagent B를 50:1의 비율로 혼합하여 BCA 시약을 제조하였다. BCA 시약을 제조한 뒤에는 2 mg/mL의 농도를 가진 Pierce[™]



Bovine serum albumin standards (BSA) (Thermo fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 사용하여 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 순차적인 농도의 표준용액을 준 비하였다. 이렇게 만든 각 농도의 표준용액을 multichannel micropipette을 사용하여 20 µL씩 96 well plate에 가하였다. 해동된 엑소좀 현탁액 시료도 micropipette을 이 용하여 20 µL씩 96 well plate에 옮겨주고 제조해놓았던 BCA 시약을 100 µL씩 각 농 도의 표준용액과 엑소좀 현탁액 시료의 well에 넣고 거품이 생기지 않도록 조심스럽게 pipetting하여 섞어주었다. Pipetting 과정이 끝나면 37 ℃의 환경에서 30분 동안 반 응시키고, SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular devices Llc., San Jose, CA, USA)를 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분석된 표준용액의 농도에 따른 흡광도 데이터로 standard curve를 그린 후 엑소좀 현탁액 시료의 단백질 농도를 정량하였다.

II-5-(2). NanoDrop을 활용한 엑소좀의 단백질 정량

표면 수식된 엑소좀의 단백질 농도를 측정하기 위해 BCA assay를 실행한 후 데이터 의 신뢰성을 높이고자 NanoDrop을 이용하여 엑소좀 현탁액 시료의 단백질 농도를 측정 하였다. 증류수를 이용하여 NanoDrop의 Blank를 측정하고, 얼음이 담겨있는 통에서 해 동된 엑소좀 현탁액 시료를 micropipette을 사용하여 1.5 µL를 채취하여 NanoDrop의 측정 받침대에 도포한 뒤 측정하였다. 총 12번의 측정이 이루어졌으며, 엑소좀 현탁액 시료의 단백질 농도는 12번 측정한 값을 평균 내어 구하였다.

II-5-(3). Western blot을 통한 엑소좀의 tetraspanins 검출

분리한 엑소좀 시료의 tetraspanins인 CD9과 CD81 검출을 위하여 western blot을 진 행하였다. 먼저, 15% resolving gel과 15% stacking gel을 제조하였다. 증류수, 30% acrylamide mix, 1.5 M Tris (pH 8.8), 10% SDS, 10% ammonium persulfate, TEMED를 4.0, 3.3, 2.5, 0.1, 0.1, 0.004 mL씩 넣어 resolving gel을 제조하여 gel 제조용 유 리판에 옮겨 담고, resolving gel 위에 증류수를 적정량 가하여 gel의 표면을 매끄럽 게 만들어주었다. resolving gel이 굳고 나면 증류수, 30% acrylamide mix, 1.0 M Tris (pH 6.8), 10% SDS, 10% ammonium persulfate, TEMED를 2.7, 0.67, 0.5, 0.04, 0.04, 0.004 mL씩 넣어 stacking gel을 제조하고, resolving gel 위에 있던 증류수를 제거하고 그 위에 stacking gel을 채워 넣었다. 그 후, comb을 기포가 생기지 않게 꽂고 sample을 제조하였다. 얼음이 들어있는 통에서 서서히 녹인 엑소좀 시료를 4× SDS 염료와 3:1의 비율로 섞어주고 100 ℃ 끓는 물에서 3분 동안 반응시킨 뒤 vortexing하여 얼음이 담겨있는 통에 보관하였다. stacking gel이 다 굳고 나면 고정 판에서 gel 제조용 유리판을 분리해내고 약하게 흐르는 물에 조심스럽게 씻으면서 comb을 제거하였다. 물기를 제거한 뒤 gel 제조용 유리판은 다시 고정판에 고정시키고 이것을 전기영동장치에 넣은 뒤 1× SDS buffer를 채워주었다. ladder는 5 µL 정도의 용량으로, sample은 단백질 양이 약 30 μg 되게 계산한 용량을 gel의 각 칸에 넣어주 고 전기영동장치를 연결하여 60V로 1시간 동안 전기영동을 하였다. 1시간 후, stacking gel에 ladder와 sample이 다 내려오면 80V로 변경하여 ladder와 sample이 resolving gel의 끝까지 내려올 때까지 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝나면 gel을 분리해낸 다음, gel과 methanol에 담가둔 membrane을 접촉시킨 후, 스펀지, 3M paper, gel, membrane, 3M paper, 스펀지 순서로 고정하여 ice pack, transfer buffer와 함께 전기영동장치에 넣고 100V로 1시간 30분 동안 transfer시켰다. transfer 과정이 끝난 뒤에는 5% skim dry milk가 함유된 tris-buffered saline과 Tween 20 혼합액 (TBST)을 membrane이 담겨있는 통에 넣은 다음 10분씩 3번 membrane을 blocking하였다. blocking 과정이 끝나면 TBST로 5분씩 2번 세척해주고 primary antibody를 TBST에 희 석시켜 4 ℃에서 overnight shaking하였다. overnight 과정이 끝나면 10분씩 3번 TBST 로 세척하고 secondary antibody를 TBST에 희석시켜 실온에서 1시간 30분 동안 shaking하며 반응시켰다. 반응이 끝나면 TBST로 10분씩 3번 세척한 후 membrane을 꺼 내어 카세트에 고정시키고 ECL buffer를 뿌려주어 암실에서 developer와 fixer를 이 용, 필름 현상하였다. 현상된 필름은 잘 건조시켜 western blot band의 스캔 결과를 얻었다.

II-6. Radioisotope labeling of exosomes

II-6-(1). DOTA-Lys-PEG₄-DBCO의 합성

엑소좀 시료에 표지를 하기 위하여 우선적으로 합성되어야 할 DOTA-Lys-PEG4-DBCO는



standard solid phase Fmoc strategy 방법을 적용하여 Peptron Inc. (Daejeon, Korea) 에서 합성되었다. Fmoc-Lys(Dde)-O-Resin의 Fmoc 그룹은 제거된 뒤에 Boc protection 그룹으로 대체되었다. DMF에 녹인 2% hydrazine을 사용하여 Dde그룹을 제거한 다음 DO TA-tris (*t*-Bu ester)를 (Boc)-Lys(H)-O-Resin과 결합하였다. 그 후, trifluoroacetic acid (TFA)와 triisopropylsilane (TIS), deionized water를 각각 95:2.5:2.5로 섞은 용액으로 처리하여 DOTA-Lys을 얻었다. 얻어진 DOTA-Lys을 DBCO-PEG₄-NHS와 결합하여 최종적으로 DOTA-Lys-PEG₄-DBCO를 생성하였다 (Figure 3). Crude 상태의 DOTA-Lys-PEG 4-DBCO를 (A) capcell pak C18 column, 이동상 0.1% TFA/ water 그리고 (B) 0.1% TFA/ acetonitrile로 하여 gradient condition을 2분 동안 0-10% (B), 이후 10분 동안 10-4 0% (B), 다시 2분 동안 40-70% (B) flow rate 1 mL/min의 조건으로 설정된 1290 Infin ity LC system (Agilent, Santa clara, CA, USA)를 사용하여 분석한 결과, DOTA-Lys-PEG₄-DBCO는 7.06분에 용출되었다. 정제된 DOTA-Lys-PEG₄-DBCO는 LC/MS (HP 1100)을 사용하여 분석되었으며, 주 LC/MS의 ion peak는 M+ (m/z): 1111 for DOTA-Lys-PEG₄-DBCO (calculated: 1111.27)이다.



Figure 3. DOTA-Lys-PEG4-DBCO의 합성



Ⅱ-6-(2). ⁶⁴Cu와 DOTA-Lys-PEG₄-DBCO의 결합

앞서 합성된 DOTA-Lys-PEG₄-DBCO를 증류수에 녹여 10⁻³ M (10⁻⁶ mol/mL)의 농도로 준 비해두었다. 이 용액을 다시 DOTA-Lys-PEG₄-DBCO가 10⁻⁸ mol이 되도록 100 μL, 50 mM 농도의 sodium acetate buffer (pH 5.5)와 혼합시키고 Cyclotron에서 생산된 ⁶⁴CuCl₂ 용액 (저장 용액: 0.01 N HCl 50 ul에 5 mCi)과 배합하였다. 이 때, 최종 농도는 5 mCi/mL (0.5 mCi/10⁻⁸ mol of DOTA-Lys-PEG₄-DBCO in 100 uL)이며, 40 ℃의 조건에서 30분간 반응하였다 (Figure 4). 그 후, 결과물은 이후 ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO로 표지 될 엑소좀의 표지 여부와 수율을 확인하기 위해 TLC silica gel 60 F₂₅₄ (Merck millipore, Burlington, MA, USA)에 도포한 뒤, 0.1 M citrate와 10% ammonium acetate/methanol (1:1, v/v)을 이동상으로 사용하여 radio-thin layer chromatography (radio-TLC)로 분석하였다.



Figure 4. ⁶⁴Cu와 DOTA-Lys-PEG₄-DBCO의 결합



Ⅱ-6-(3). ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBC0를 이용한 엑소좀의 표지

앞의 두 단계를 거친 후에는 엑소좀에 방사성 표지를 할 수 있다. 이전 단계에서 ⁶⁴Cu와 DOTA-Lys-PEG₄-DBCO를 결합하여 ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO를 얻었다. 엑소좀은 SPPAC 반응을 활용한 간편한 방법으로 ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO와 결합시킬 수 있다 (Figure 5). ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO (0.5 mCi/10⁻⁹ mol of DOTA-Lys-PEG₄-DBCO in 100 uL)를 표면 수식된 엑소좀과 함께 30분간 40 ℃의 조건으로 반응시켰다. 반응한 뒤에 는 PD-10 coulmn을 사용하여 정제하고, ⁶⁴Cu로 표지된 엑소좀의 표지 여부와 표지 수 율은 앞서 설명한 ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO처럼 radio-TLC를 사용하여 분석되었다.



Figure 5. ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO를 이용한 엑소좀의 표지



II-7. Analysis of radio-thin layer chromatography (radio-TLC)

엑소좀의 표지 여부와 표지 수율을 확인하기 위해서 radio-TLC를 진행하였다. TLC s ilica gel 60 F₂₅₄의 끝부분에서 1.5 cm 떨어진 부분을 start point로, 반대쪽 끝 편에 서 1 cm 떨어진 부분은 end point로 지정하였다. Start point의 중앙 부분에 ⁶⁴Cu-DOT A-Lys-PEG₄-DBCO와 ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO로 표지된 엑소좀 시료를 spotting하고, 0.1 M citrate와 10% ammonium acetate, methanol을 1:1 부피 비율로 섞은 용액 (10% ammonium acetate/methanol (1:1))을 각각 이동상으로 사용하여 전개시켰다. 시약이 e nd point에 도달하면 이동상에서 TLC silica gel 60 F₂₅₄을 분리시켜 AR-2000 Radio-TL C imaging scanner (Eckert & Ziegler radiopharma Inc., Hopkinton, MA, USA)을 사용 하여 분석을 진행하였다. 용매와 화합물이 이동한 거리인 보존 계수 (R_f) 값은 (복합 체가 이동한 거리)/(용매 전방에서 이동한 거리)로 계산하였다.

II-8. In vivo PET/CT imaging

6주령의 암컷 nude mouse를 isoflurane 용액을 사용하여 5분 동안 흡입 마취시킨 뒤 Holder에 고정시키고, PET/CT imaging을 위해 30 μL씩 insulin syringe에 loading하 여 준비해둔 ⁶⁴Cu로 표지된 엑소좀을 오른쪽 footpad와 mouse의 꼬리에 있는 정맥에 주입하였다. 주입한 지 1시간 및 12시간 후 nude mouse를 다시 isoflurane 용액으로 흡입 마취시킨 뒤 생체영상을 PET/CT (Simens, Erlangen, Germany)로 촬영하였다. 촬 영된 image data는 Inveon multimodality system (Simens, Erlangen, Germany)를 사용 하여 분석했다.



III. Results and Discussion

III-1. Characterization of exosomes

분리한 표면 수식된 종양 세포 유래 엑소좀의 정량 및 정성 분석을 위해 BCA assay 및 NanoDrop을 활용한 단백질 정량, DLS, TEM, Western blot을 실행하였다. 분리한 표 면 수식된 엑소좀의 단백질 정량 분석을 진행한 결과 약 1 mg/mL의 총 단백질 농도를 가지고 있음을 확인하였다 (Figure 6, Table 1, Table 2). 표면 수식된 엑소좀 시료의 DLS 측정 결과 입자들의 평균 직경은 165.6 nm였으며, polydispersity index 값은 0.125였다. 1000 nm 정도의 크기를 가진 소수의 입자가 포착되는 것으로 보아 초원심 분리 과정에서 소량의 불순물이 공침되었거나 엑소좀 현탁액 보존 중 응집물이 형성되 었을 가능성이 있다 (Figure 7). 평균 크기는 165.6 nm로 확인되었지만 100 nm 내외의 입자들이 대다수 존재하는 것으로 확인되었다. TEM 이미지로 엑소좀 및 표면 수식된 엑소좀의 크기 및 모양을 확인할 수 있었는데, 두 엑소좀 사이의 특별한 차이점이 없 어 표면 수식 과정에서 엑소좀 외형의 손상이 거의 없음을 확인할 수 있었다 (Figure 8). 또한, western blot을 수행해본 결과 CD9, CD81과 같은 엑소좀의 단raspanin 단 백질의 band를 확인할 수 있었으나, 정량화를 위해서는 추가적인 실험이 필요할 것으 로 보인다 (Figure 9).



Figure 6. BCA assay를 활용한 엑소좀의 단백질 정량 standard curve graph



Standard		Exosome	Protein	Unit
0	0.0716	0.7576	1.1300	mg/mL
0.125	0.1673	0.6969	1.0282	mg/mL
0.25	0.2446	0.7088	1.0481	mg/mL
0.5	0.3738			
1	0.6802			

Concentration	1.0688	mg/mL

Table 1. BCA assay를 활용한 엑소좀의 단백질 정량

순차	Sample Type	Protein	Unit
1	BSA	0.966	mg/mL
2	BSA	1.004	mg/mL
3	BSA	0.912	mg/mL
4	BSA	1.133	mg/mL
5	BSA	0.986	mg/mL
6	BSA	1.008	mg/mL
7	BSA	1.100	mg/mL
8	BSA	1.066	mg/mL
9	BSA	1.071	mg/mL
10	BSA	1.015	mg/mL
11	BSA	0.999	mg/mL
12	BSA	1.067	mg/mL

Concentration

1.027 mg/mL

Table 2. NanoDrop을 활용한 엑소좀의 단백질 정량



Distribut	ion Results (Cont	in)						
Intensit	y Distribution		Volume	Distribution		Number	Distribution	
Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.	Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.	Peak	Diameter (nm)	Std. Dev
1	116.1	60.4	1	57.4	27.0	1	40.9	11.7
2	1,348.6	271.5	2	1,247.9	230.2	2	1,145.2	185.2
3	0.0	0.0	3	0.0	0.0	3	0.0	0.0
4	0.0	0.0	4	0.0	0.0	4	0.0	0.0
5	0.0	0.0	5	0.0	0.0	5	0.0	0.0
Averag	e 186.1	298.4	Averag	e 413.3	559.8	Average	e 41.0	12.9

Cumulants Results

Diameter	(d)	:165.6	(nm)
Polydispersity Index	(P.I.)	:0.125	



Figure 7. DLS를 이용한 엑소좀 시료의 직경 측정







Figure 8. TEM 이미지 촬영 (a) 엑소좀 시료의 TEM 이미지 , (b) 표면 수식된 엑소좀 시료의 TEM 이미지



Figure 9. Western blot을 통한 엑소좀의 tetraspanins 검출 (a) 엑소좀 시료의 CD9 검출 , (b) 엑소좀 시료의 CD81 검출



III-2. Radio-TLC

표지된 엑소좀의 표지 여부와 표지 수율을 확인하기 위해 ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO와 ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO로 표지된 엑소좀을 각각 분석한 결과 ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO 의 R_f값은 0.1 M citrate를 이동상으로 사용했을 때는 0.1이었고 10% ammonium acetate/methanol (1:1)을 이동상으로 사용했을 경우는 0.2로 나타났다. ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO로 표지된 엑소좀 시료는 0.1 M citrate와 10% ammonium acetate/methanol (1:1)을 이동상으로 사용했을 경우 각각 R_f 값이 0.0으로 나타났으 며, 표지 수율은 99% 이상으로 확인되었다 (Figure 10). 이러한 결과를 바탕으로 엑소 좀의 표지가 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.



Figure 10. Radio-TLC를 활용한 엑소좀 시료의 표지 여부 및 수율 확인 (a) ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO의 결과 ,

(b) ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO로 표지된 엑소좀 시료의 결과



III-3. In vivo PET/CT imaging

종양 세포 유래 엑소좀의 생체 내 거동평가를 확인하기 위해 ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBC 0를 사용하여 방사성동위원소로 표지한 엑소좀을 각각 nude mouse의 footpad와 꼬리에 있는 정맥에 주입하여 PET/CT 영상을 촬영하였다. 엑소좀 시료의 림프 이행 특성을 확 인하고자 주입한 지 1시간째와 12시간째에 PET/CT 생체영상을 촬영하였다 (Figure 1 1). Figure 11의 생체영상 사진에 의하면, footpad로 주입된 엑소좀은 주입된 지 12시 간 후에 림프계를 따라 이행하므로 간 초회통과효과를 피할 수 있으나. 정맥 주사된 엑소좀은 상당량이 간으로 이행한 것을 확인할 수 있었다.





Footpad injection 1 h Footpad injection 12 h







I.V injection 1 h

1.V injection 12 h

Figure 11. PET/CT에 의한 엑소좀 시료의 생체영상 (a) ⁶⁴Cu 표지된 엑소좀을 footpad에 주입하였을 때 영상, (b) ⁶⁴Cu 표지된 엑소좀을 꼬리 정맥에 주입하였을 때 영상



IV. Conclusion

본 연구에서는 모세포의 생물 활성 성분을 지니고 있어 세포 간의 생물학적 전달 및 커뮤니케이션에 기여하며 종양 특이적 항원을 포함하고 있는 종양 세포 유래 엑소좀의 생의학적 응용을 위해 종양 세포 유래 엑소좀의 활성을 손상시키지 않으면서도 정확하 한 체내 분포를 확인하는 방법으로 클릭 화학을 통해 표지한 종양 세포 유래 엑소좀을 mouse의 footpad에 주입하여 림프 이행 특성을 확인하였다.

먼저 엑소좀의 표면을 수식하기 위해 cell culture 과정 중 azide 그룹이 포함되어 있는 Ac₃ManNAz를 사용하여 엑소좀에 azide 그룹을 통합시켰고, 클릭 화학, 그 중에서 도 SPAAC 반응을 통해 표면 수식된 종양 세포 유래 엑소좀을 ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO 를 이용하여 표지하였다. 보존 계수 값의 변화로 엑소좀의 성공적인 표지를 확인할 수 있었으며, 표지 수율은 99% 이상으로 확인되었다.

표지된 종양 세포 유래 엑소좀은 종양 관련 항원을 만나면 항원제공세포로 활성화되 어 종양 항원 특이성 CD8+ T세포의 생성을 유도하는 수지상세포와 대식세포가 존재하 여 면역 요법에 있어서 요충지인 림프절로의 이행을 보고자 mouse의 footpad로 주입하 였다. 꼬리 정맥에 종양 세포 유래 엑소좀이 주입된 mouse와 1시간, 12시간째의 /*n vivo* PET/CT 영상을 비교해보았을 때, 엑소좀을 footpad에 주입한 mouse는 림프 이행 이 확인되었으나 꼬리 정맥에 주입한 mouse는 대부분이 간으로 이행된 것을 확인할 수 있었다.

앞서 본 결과들을 통해 클릭 화학을 활용하여 종양 세포 유래 엑소좀에 방사성동위 원소 표지가 가능하다는 것을 알 수 있었으며, 이것이 엑소좀의 활성을 손상시키지 않 는다는 것 또한 확인되었다. 이는 엑소좀의 생체 내 거동 평가에 유용한 기법이 될 수 있을 것으로 예상된다. 표지한 엑소좀을 마우스에 주입한 다음 생체영상기법을 통해 종양 세포 유래 엑소좀의 림프 이행을 확인하였고, 면역 요법에 있어서 요충지인 림프 절에 종양 특이 항원을 지닌 종양 세포 유래 엑소좀의 림프 이행 시각화는 면역 요법 에 있어서도 중요성을 지닐 것으로 기대된다.



V. References

[1] EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles:
biology and emerging therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov. 2013
May; 12(5):347-57.

[2] van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. Pharmacol Rev. 2012 Jul;64(3):676-705.

[3] Alipoor SD, Mortaz E, Garssen J, Movassaghi M, Mirsaeidi M, Adcock IM. Exosomes and Exosomal miRNA in Respiratory Diseases. Mediators Inflamm. 2016;2016:5628404.

[4] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. J Clin Invest.2016 Apr 1;126(4):1208-15.

[5] Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007 Jun;9(6):654-9.

[6] Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J, Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva JM, Zhang W, Hearn S, Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. Cell Res. 2014 Jun;24(6):766-9.

[7] Sun D, Zhuang X, Zhang S, Deng ZB, Grizzle W, Miller D, Zhang HG. Exosomes are endogenous nanoparticles that can deliver biological information between



cells. Adv Drug Deliv Rev. 2013 Mar;65(3):342-7.

[8] Vader P, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. Trends Mol Med. 2014 Jul;20(7):385-93.

[9] Im H, Shao H, Park YI, Peterson VM, Castro CM, Weissleder R, Lee H. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. Nat Biotechnol. 2014 May;32(5):490-5.

[10] Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M, Furuta K, Nakajima T, Hayashi H, Sugisaki H, Higashimoto H, Kato T, Takeshita F, Ochiya T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. Nat Commun. 2014 Apr 7;5:3591.

[11] Yeo RW, Lai RC, Zhang B, Tan SS, Yin Y, Teh BJ, Lim SK. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2013 Mar;65(3):336-41.

[12] Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, Ju S, Mu J, Zhang L, Steinman L, Miller D, Zhang HG. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. Mol Ther. 2011 Oct;19(10):1769-79.

[13] Lakhal S, Wood MJ. Exosome nanotechnology: an emerging paradigm shift in drug delivery: exploitation of exosome nanovesicles for systemic in vivo delivery of RNAi heralds new horizons for drug delivery across biological barriers. Bioessays. 2011 Oct;33(10):737-41.

[14] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecol Oncol. 2008



Jul;110(1):13-21.

[15] Rosell R, Wei J, Taron M. Circulating MicroRNA Signatures of Tumor-Derived Exosomes for Early Diagnosis of Non-Small-Cell Lung Cancer. Clin Lung Cancer. 2009 Jan; 10(1):8-9.

[16] Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. Cancer Res. 2006 May 1;66(9):4795-801.

[17] Lee EY, Park KS, Yoon YJ, Lee J, Moon HG, Jang SC, Choi KH, Kim YK, Gho YS. Therapeutic effects of autologous tumor-derived nanovesicles on melanoma growth and metastasis. PLoS One. 2012;7(3):e33330.

[18] Zhang Y, Luo CL, He BC, Zhang JM, Cheng G, Wu XH. Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response in vitro: a novel vaccine for renal cell carcinoma. Int J Oncol. 2010 Jan;36(1):133-40.

[19] Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. Nat Med. 2001 Mar;7(3):297-303.

[20] Lee IH, Kwon HK, An S, Kim D, Kim S, Yu MK, Lee JH, Lee TS, Im SH, Jon S. Imageable antigen-presenting gold nanoparticle vaccines for effective cancer immunotherapy in vivo. Angew Chem Int Ed Engl. 2012 Aug 27;51(35):8800-5.

[21] Sloat BR, Sandoval MA, Hau AM, He Y, Cui Z. Strong antibody responses induced by protein antigens conjugated onto the surface of lecithin-based nanoparticles. J Control Release. 2010 Jan 4;141(1):93-100.



[22] Li H, Li Y, Jiao J, Hu HM. Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response. Nat Nanotechnol. 2011 Sep 18;6(10):645-50.

[23] Jeanbart L, Ballester M, de Titta A, Corthésy P, Romero P, Hubbell JA, Swartz MA. Enhancing efficacy of anticancer vaccines by targeted delivery to tumor-draining lymph nodes. Cancer Immunol Res. 2014 May;2(5):436-47.

[24] Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, Lee LK, Swartz MA, Hubbell JA. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. Nat Biotechnol. 2007 Oct;25(10):1159-64.

[25] Bu N, Wu H, Sun B, Zhang G, Zhan S, Zhang R, Zhou L. Exosome-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8+ cytotoxic T cells in patients with glioma. J Neurooncol. 2011 Sep;104(3):659-67.

[26] Desch AN, Gibbings SL, Clambey ET, Janssen WJ, Slansky JE, Kedl RM, Henson PM, Jakubzick C. Dendritic cell subsets require cis-activation for cytotoxic CD8 T-cell induction. Nat Commun. 2014 Aug 19;5:4674.

[27] Jewell CM, López SC, Irvine DJ. In situ engineering of the lymph node microenvironment via intranodal injection of adjuvant-releasing polymer particles. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 20;108(38):15745-50.

[28] Cobaleda-Siles M, Henriksen-Lacey M, Ruiz de Angulo A, Bernecker A, Gómez Vallejo V, Szczupak B, Llop J, Pastor G, Plaza-Garcia S, Jauregui-Osoro M, Meszaros LK, Mareque-Rivas JC. An iron oxide nanocarrier for dsRNA to target lymph nodes and strongly activate cells of the immune system. Small. 2014 Dec 29;10(24):5054-67.

[29] Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF.



Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. Eur J Immunol. 2008 May;38(5):1404-13.

[30] Xie Y, Bagby TR, Cohen MS, Forrest ML. Drug delivery to the lymphatic system: importance in future cancer diagnosis and therapies. Expert Opin Drug Deliv. 2009 Aug;6(8):785-92.

[31] Rashid MH, Borin TF, Ara R, Angara K, Cai J, Achyut BR, Liu Y, Arbab AS. Differential in vivo biodistribution of ¹³¹I-labeled exosomes from diverse cellular origins and its implication for theranostic application. Nanomedicine. 2019 Aug 1;21:102072.

[32] Fuhrmann G, Herrmann IK, Stevens MM. Cell-derived vesicles for drug therapy and diagnostics: opportunities and challenges. Nano Today. 2015 Jun 1;10(3):397-409.

[33] Lai CP, Mardini O, Ericsson M, Prabhakar S, Maguire C, Chen JW, Tannous BA, Breakefield XO. Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. ACS Nano. 2014 Jan 28;8(1):483-494.

[34] Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angew Chem Int Ed Engl. 2001 Jun 1;40(11):2004-2021.

[35] Lallana E, Riguera R, Fernandez-Megia E. Reliable and efficient procedures for the conjugation of biomolecules through Huisgen azide-alkyne cycloadditions. Angew Chem Int Ed Engl. 2011 Sep 12;50(38):8794-804.

[36] Grammel M, Hang HC. Chemical reporters for biological discovery. Nat Chem Biol. 2013 Aug;9(8):475-84.

[37] Xie R, Hong S, Chen X. Cell-selective metabolic labeling of biomolecules



with bioorthogonal functionalities. Curr Opin Chem Biol. 2013 Oct; 17(5):747-52.

[38] Su Y, Ge J, Zhu B, Zheng YG, Zhu Q, Yao SQ. Target identification of biologically active small molecules via in situ methods. Curr Opin Chem Biol. 2013 Oct;17(5):768-75.

[39] Zeng D, Zeglis BM, Lewis JS, Anderson CJ. The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals. J Nucl Med. 2013 Jun;54(6):829-32.

[40] Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. Angew Chem Int Ed Engl. 2002 Jul 15;41(14):2596-9.

[41] Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. J Org Chem. 2002 May 3;67(9):3057-64.

[42] Dommerholt J, Rutjes FPJT, van Delft FL. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. Top Curr Chem (Cham). 2016 Apr;374(2):16.

[43] Ess DH, Jones GO, Houk KN. Transition states of strain-promoted metal-free click chemistry: 1,3-dipolar cycloadditions of phenyl azide and cyclooctynes.Org Lett. 2008 Apr 17;10(8):1633-6.

[44] Sletten EM, Bertozzi CR. Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. Angew Chem Int Ed Engl. 2009;48(38):6974-98.

[45] Debets MF, van der Doelen CW, Rutjes FP, van Delft FL. Azide: a unique



dipole for metal-free bioorthogonal ligations. Chembiochem. 2010 Jun 14;11(9):1168-84.

[46] Saxon E, Bertozzi CR. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. Science. 2000 Mar 17;287(5460):2007-10.

[47] Ning X, Guo J, Wolfert MA, Boons GJ. Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast huisgen cycloadditions. Angew Chem Int Ed Engl. 2008;47(12):2253-5.

[48] Liang Y, Mackey JL, Lopez SA, Liu F, Houk KN. Control and design of mutual orthogonality in bioorthogonal cycloadditions. J Am Chem Soc. 2012 Oct 31;134(43):17904-7.

[49] Wang M, Altinoglu S, Takeda YS, Xu Q. Integrating Protein Engineering and Bioorthogonal Click Conjugation for Extracellular Vesicle Modulation and Intracellular Delivery. PLoS One. 2015 Nov 3;10(11):e0141860.

[50] Escrevente C, Grammel N, Kandzia S, Zeiser J, Tranfield EM, Conradt HS, Costa J. Sialoglycoproteins and N-glycans from secreted exosomes of ovarian carcinoma cells. PLoS One. 2013 Oct 24;8(10):e78631.



국문초록

클릭 반응을 통한 ⁶⁴Cu 표지 엑소좀의 림프절 이미징 연구

김 도 희

지 도 교 수 : 황 승 림

조선대학교 대학원 약학과

엑소좀은 세포의 엔도좀에서 기원하여 세포 밖으로 분비되는 지질 이중층 막 소포체 이다. 최근 나노 수송체로서의 엑소좀을 활용한 약물 전달 연구와 엑소좀의 특정 단백 질 또는 유전자를 질병 진단을 위한 생체지표로 활용하고자 하는 연구가 활발히 이루 어지고 있다. 엑소좀이 임상에서 활용되도록 하기 위해서는 엑소좀의 생체 내 거동 평 가법의 확립이 필요하다. 그러나, 영상화의 어려움과 시각화를 위한 표지 과정에서의 엑소좀 활성 손상 등 엑소좀의 체내 동태 파악에 있어 아직 해결해야 할 난제들이 남 아 있다. 엑소좀의 생의학적 응용을 위해서는 엑소좀의 효능을 손상시키지 않으면서도 엑소좀의 체내 분포를 모니터링할 수 있는 비침습적이고 정확한 방법이 필요하다.

한편, 종양 세포 유래 엑소좀은 항원 제시 기능을 할 수 있으며, 다수의 면역세포들 이 폐색되어 있는 림프로 이행 가능하다. 수지상세포는 종양 관련 항원을 만나면 항원 을 T세포에 교차 제시할 수 있는 항원제공세포로 활성화되며, 항원제공세포는 종양 세 포를 죽일 수 있는 종양 항원 특이성 CD8+ T세포의 생성을 유도한다. 따라서 종양 세 포 유래 엑소좀의 림프 이행을 시각화하는 일은 면역 요법 연구에 있어서도 중요성을 가진다.

본 연구에서는 클릭 화학을 통하여 엑소좀에 방사성동위원소를 표지한 후 마우스 체 내에 주입하였을 때 림프 이행 여부를 PET/CT로 모니터링하였다.