



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0007922
(43) 공개일자 2015년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) C12Q 1/06 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0004524
(22) 출원일자 2014년01월14일
심사청구일자 2014년01월14일
(30) 우선권주장
1020130082060 2013년07월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인
권영아
서울 강남구 압구정로29길 71, 12동 1403호 (압구정동, 현대아파트)
(72) 발명자
권성필
서울특별시 송파구 동남로 193, 103동 103호 (가락동, 가락쌍용아파트)
전현정
미국 매사추세츠주 소머빌, 19 센트럴 스트리트, 아파트 28호, 02143
권영아
서울 강남구 압구정로29길 71, 12동 1403호 (압구정동, 현대아파트)
(74) 대리인
이치영, 장제환

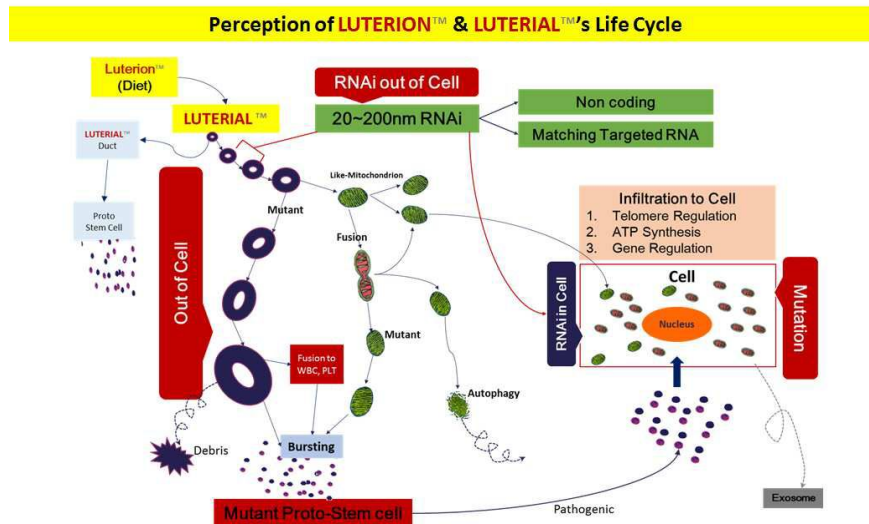
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 루테리알의 형태특성을 이용한 질병의 진단방법

(57) 요약

본 발명은 혈액에 존재하는 루테리알의 형태학적 특성을 이용한 질병의 진단방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 질병의 종류 및 진행도에 따라 루테리알의 수, 크기나 모양과 같은 형태학적 특성 및 움직임(나노 트래킹 속도)이 달라지는데, 이러한 혈액내 루테리알의 특성을 관찰 및 측정함으로써 질병(특히, 암)의 진단 및 예후를 효과적으로 판단할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 수, 크기(직경또는 면적), 형태, 피막형성여부 및 나노 트래킹 속도 중 하나 이상을 현미경을 이용하여 측정하는 단계; 및

(b) 상기 측정된 루테리알의 수, 크기(직경 또는 면적), 형태, 피막형성여부 및 나노 트래킹 속도 중 하나 이상을 정상인의 루테리알; 정상 루테리알; 또는 적혈구와 비교하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 체액은 혈액인 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는 루테리알을 로다민123(Rhodamine123), 미토트랙커(Mito-tracker), 아크리딘 오렌지(Acridine Orange), DAPI, 및 야누스 그린 B (Janus green B)로 구성되는 군에서 선택되는 1 이상의 염색약으로 염색하여 발색하고, 측정하는 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 루테리알은 혈액에서 혈청을 분리하는 단계; 상기 분리된 혈청에서 100nm~2mm의 직경의 공극을 구비하는 필터를 통과하지 않는 침전물을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 침전물을 세정하는 단계를 포함하는 방법에 의해 분리되는 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (b)단계는 측정된 루테리알의 직경이 적혈구의 직경의 8~30배; 또는 측정된 루테리알의 면적이 적혈구의 면적의 8~30배일 경우, 질병을 암 의심상태로 결정하는 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (b)단계는 측정된 루테리알의 수가 정상인의 20%이하이고, 장 직경이 20 μ m이상인 경우 암 의심상태로 결정하는 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (b)단계는 루테리알의 외부에 피막이 형성된 경우, 암 의심상태로 결정하는 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (b)단계에서 루테리알의 형태는 정상형, 외부에 편모가 구비된 편모형, 매스(Mass)형, 로드(Rod)형, 및 복합형을 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 정상형은 루테리알의 장직경:단직경의 비가 1:1~3:1이고, 상기 매스(Mass) 형은 장직경:단직경의 비가 3:1~5:1이며, 상기 로드(Rod) 형은 장직경:단직경의 비가 5:1~12:1이고, 상기 복합형은 로드형간, 매스형간 또는 로드형과 매스형의 융합형태인 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 (b)단계는 측정된 루테리알의 형태가 (i) 로드형일 경우, 폐암, 유방암, 췌장암, 담관암, 용막중피종, 갑상선암, 난소암, 담도암, 전립선암, 또는 림프구성 혈액암 발생상태로 결정하며, (ii) 매스형일 경우, 간암, 간혈관육종, 대장암, 자궁암, 소화기암(위암), 신장암, 직장암 또는 골수성 혈액암 발생상태로 결정하고, (iii) 복합형일 경우, 중증 혈액암 또는 전이암 의심상태로 결정하며, (iv) 편모형이 나타날 경우, 말기 종양 의심상태로 결정하는 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (b)단계는 측정된 루테리알의 나노 트래킹 속도가 8.0~11 μ m/sec인 경우 1기암 의심상태로, 2.5~8.0 μ m/sec인 경우 2기암 의심상태로, 0.5~2.5 μ m/sec인 경우 3기암 의심상태로, 0.5 μ m/sec 미만인 경우 4기암 의심상태로 결정하는 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

- (a) 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 형태를 전자현미경으로 측정하는 단계;
- (b) 상기 측정된 루테리알의 형태를 단일형, 융합형, 다중 융합형 및 막이 터진 융합형으로 구성된 군에 선택되는 형태로 결정하는 단계; 및
- (c) 상기 결정된 형태를 기준으로 질병상태를 결정하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 체액은 혈액인 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 루테리알은 로다민123(Rhodamine123), 미토타랙커(Mito-tracker), 아크리딘 오렌지(Acridine Orange), DAPI, 및 야누스 그린 B (Janus green B)로 구성되는 군에서 선택되는 1 이상의 염색약으로 염색하여 발색이 확인되며, 전자현미경 상에서 이중막 및 크리스테 구조가 확인되는 것을 특징으로 하는 질

병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (c)단계는 상기 측정된 루테리알의 형태가 단일형의 형태와 80~100% 일치할 경우 정상으로 결정하고, 융합형의 형태와 80~100% 일치할 경우 질병 의심상태로 결정하고, 다중 융합형의 형태와 80~100% 일치할 경우 중양 의심상태로 결정하고, 막이 터진 융합형의 형태와 80~100% 일치할 경우 중중 중양 의심상태로 결정하는 것을 특징으로 하는 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 형태학적 특성을 이용한 질병의 진단방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 혈액 내 미소포 등의 미세물질은 예전에는 특별한 기능을 가지지 않는 물질로 인식되어 왔다. 그러나, 미소포(microvesicle)도 다양한 생물활성을 가진다는 사실이 여러 실험 데이터를 통하여 알려지고 있다. 예를 들면, 혈소판 유래의 미소포는 소포상의 표면 단백질을 통하여 특정 세포를 자극하는 기능을 한다는 사실이 밝혀진바 있으며 (CD154, RANTES and/or PF-4; Thromb.Haemost.(1999) 82:794, or J.Boil.Chem. (1999) 274:7545), 혈소판 미소포에 있어서의 생리활성 지질(예를 들어, HETE, 또는 아라키돈산)이 특성의 표적 세포에 대하여 특정 효과가 있음이 보고된 바 있다 (J.Biol.Chem.(2001) 276:19672; 또는 Cardiovasc.Res.(2001) 49(5):88를 참조). 이와 같이, 생물학적 시료 안에 존재하는 소낭 등의 물질의 특징 (가령, 크기, 표면 항원들, 기원 세포의 결정, 페이로드)은 질병의 진단, 예후 또는 치료진단 정보를 제공할 수 있으므로 질환을 탐지하고 치료하는데 이용될 수 있는 생물학적 지표를 확인할 필요가 대두되고 있다.

[0003] 한편, 암(cancer)은 아직까지도 대부분의 산업화 국가에서 사망률 제1위의 난치성 질환이다. 암 완치율은 여전히 낮고 암으로 인한 사망자는 지속적으로 증가함으로써 이에 따른 가계부담 및 국가 의료비 부담 또한 많이 증가하였다. 암은 세포가 무한히 증식해 정상적인 세포의 기능을 방해하는 질병으로, 폐암, 위암(gastric cancer, GC), 유방암(breast cancer, BRC), 대장암(colorectal cancer, CRC) 등이 대표적이나, 실질적으로는 어느 조직에서나 발생할 수 있다.

[0004] 초창기 암 진단은 암 세포의 성장에 따른 생체 조직의 외적 변화에 근거하였으나, 근래에 들어 혈액, 당체(glyco chain), DNA 등 생물의 조직 또는 세포에 존재하는 미량의 생체분자를 이용한 진단 및 검출이 시도되고 있다. 그러나 가장 보편적으로 사용되는 암 진단 방법은 생체 조직 검사를 통해 얻어진 조직 샘플을 이용하거나, 영상을 이용한 진단이다. 그 중 생체 조직 검사는 환자에게 큰 고통을 야기하며, 고비용이 들 뿐만 아니라, 진단까지 긴 시간이 소요되는 단점이 있다. 또한 환자가 실제 암에 걸린 경우, 생체 조직 검사 과정 중 암의 전이가 유발될 수 있는 위험이 있으며, 생체 조직 검사를 통해 조직 샘플을 얻을 수 없는 부위의 경우, 외과적인 수술을 통해 의심되는 조직의 적출이 이루어지기 전에는 질병의 진단이 불가능한 단점이 있다. 또한, 영상을 이용한 진단에서는 엑스레이(X-ray) 영상, 질병 표적 물질이 부착된 조영제를 사용하여 획득한 핵자기 공명(nuclear magnetic resonance, NMR) 영상 등을 기반으로 암을 판정하고 있으나, 이러한 영상 진단은 임상적 또는 관독의 숙련도에 따라 오진의 가능성이 있으며, 영상을 얻는 기기의 정밀도에 크게 의존하는 단점이 있다. 더 나아가, 가장 정밀한 기기조차도 수 mm 이하의 종양은 검출이 불가능하여, 발병 초기 단계에서는 검출이 어려운 단점이 있다. 또한, 영상을 얻기 위해 환자 또는 질병 보유 가능자가 유전자의 변이를 유발할 수 있는 고에너지의 전자기파에 노출되므로, 또 다른 질병을 야기할 수 있을 뿐만 아니라, 영상을 통한 진단 횟수에 제한이 있는 단점이 있다.

[0005] 즉, 암의 진단을 위한 생체 조직 검사는 많은 시간, 비용, 불편, 고통 등을 수반하므로, 불필요한 생체 조직 검사의 대상자 수를 획기적으로 줄일 수 있는 방법, 조기에 암을 진단할 수 있는 방법이 요구되고 있다.

[0006] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 환자에서 기 배출된 체액 내에 존재하는 미세물질인 루테리알(Luterial)의 형태학적 특성을 관찰함으로써 질병을 진단 및 예측할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 형태학적 특성을 이용한 질병의 진단방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 수, 크기(직경 또는 면적), 형태, 피막형성여부 및 나노 트랙킹 속도 중 하나 이상을 현미경을 이용하여 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 루테리알의 수, 크기(직경 또는 면적), 형태, 피막형성여부 및 나노 트랙킹 속도 중 하나 이상을 정상인의 루테리알; 정상 루테리알; 또는 적혈구와 비교하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, (a) 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 형태를 전자현미경으로 측정하는 단계; (b) 상기 측정된 루테리알의 형태를 단일형, 융합형, 다중 융합형 및 막이 터진 융합형으로 구성된 군에 선택되는 형태로 결정하는 단계; 및 (c) 상기 결정된 형태를 기준으로 질병상태를 결정하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, (a) 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 수, 크기(직경 또는 면적), 형태, 피막형성여부 및 나노 트랙킹 속도 중 하나 이상을 현미경을 이용하여 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 루테리알의 수, 크기(직경 또는 면적), 형태, 피막형성여부 및 나노 트랙킹 속도 중 하나 이상을 정상인의 루테리알; 정상 루테리알; 또는 적혈구와 비교하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 또는 예후 예측 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, (a) 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 형태를 전자현미경으로 측정하는 단계; (b) 상기 측정된 루테리알의 형태를 단일형, 융합형, 다중 융합형 및 막이 터진 융합형으로 구성된 군에 선택되는 형태로 결정하는 단계; 및 (c) 상기 결정된 형태를 기준으로 질병상태를 결정하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 또는 예후 예측 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 미세물질인 루테리알을 질병의 진단 및 예후예측의 마커로서 활용함으로써, 특히 암환자의 진단, 수술법 및 치료법의 효과여부, 치료전후의 비교, 및 치료 받은 환자의 장기생존여부를 판단하는데 효과적으로 사용할 수 있다. 특히, 암 종과 상관없이 암세포 조직 크기가 5mm 이하이더라도 암 질환의 현재 상태, 재발가능성, 장기생존 가능성에 대한 판단이 가능하다는 이점이 있다.

[0013] 또한 별도의 유전자 분석, 고가의 장치를 이용하지 않고 현미경 관찰만으로 자동으로 질병의 진단 및 예후예측을 가능하게 하므로 생체 조직 검사 또는 고가의 영상 진단이 불필요하므로 경제적인 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 루테리알의 life cycle을 개략적으로 도시하여 나타낸 것이다.

도 2a는 비소세포성 폐암 말기 환자의 혈액 유래 루테리알을 공초점 레이저 주사현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이고, 도 2b는 비소세포성 폐암 말기 환자의 혈액 유래 루테리알을 로다민 123으로 형광염색한 후 촬영한 공초점 레이저 주사현미경 사진을 나타낸 것이고, 도 2c는 비소세포성 폐암 말기 환자의 혈액 유래 루테리알을 전자현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 3은 혈액 유래 루테리알을 전자현미경으로 촬영하여 100~1000nm 이상까지 직경의 크기순으로 배열한 사진을 나타낸 것이다.

도 4a는 정상인 혈액의 루테리알(1단계)을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이고, 도 4b는 정상인 혈액의 루테리알(2단계)을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이고, 도 4c는 정상인 혈액의 루테리알(3단계)을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이고, 도 4d는 메틸화(methylation) 이상의 단계에서 혈액의 루테리알(4단계)을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이고, 도 4e는 유전자 변이 발생 단계에서 혈액의 루테리알(5단계)을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이고, 도 4f는 유전자 변이 발생 단계에서 혈액의 루테리알(6단계)을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이고, 도 4g는 종양관련 유전자 변이 단계에서 혈액의 루테리알(7단계)을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이고, 도 4h는 종양관련 유전자 복합 변이 단계에서 혈액의 루테리알(8단계)을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이고, 도 4i는 말기암 환자유래 혈액의 루테리알(9단계)을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 5는 매스형의 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 6은 로드형의 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 7은 폐암 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(a: 초기; b~e: 2~3기).

도 8은 유방암 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(a/b: 초기, c/d: 중기; e: 림프, 복막 및 심막 전이).

도 9는 췌장암 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(a: 초기; b~d: 중기).

도 10은 담관암(Common Bile Duct Cancer) 뼈/폐 전이 환자 유래 루테리알을 공초점 레이저 주사현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 11은 흉막중피종(Pleural Mesothelioma) 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 12는 갑상선암(중기) 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 13은 난소암 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(a/b: 중기).

도 14는 담도암 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 15는 전립선암 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 16은 급성림프구성 백혈병 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(a: 중기; b: 로드-매스 복합 진행형).

도 17a~c는 간암 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이고(a: 초기; b/c: 중기), 도 17d는 폐 전이된 간암 환자 유래 루테리알을 공초점 레이저 주사현미경 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 18은 간 혈관육종(angiosarcoma of liver) 환자 유래 루테리알을 공초점 레이저 주사현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 19a~c는 대장암 위암 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 20은 자궁암 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 21은 위암 초기 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 22는 직장암 초기 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(a: 매스-로드 진행형; b: 매스형).

도 23은 급성 골수성 백혈병 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(a: 매스-로드 진행형; b/c: 중기).

도 24는 급성 골수성 백혈병 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(매스-로드 진행형).

도 25a는 간전이 위암환자 유래 루테리알을 나타낸 것이고; 도 25b는 복막전이 위암환자 유래 루테리알을 나타

낸 것이며; 도 25c는 복막 및 간 전이 위암환자 유래 루테리알을 나타낸 것이다.

도 26은 뼈 및 폐 전이 직장암 환자 유래 루테리알을 나타낸 것이고, 도 27은 뼈 전이 전립선암 환자 유래 루테리알을 나타낸 것이며, 도 28은 림프전이 비소세포성폐암(NSCLC) 환자 유래 루테리알을 나타낸 것이고, 도 29는 뼈 전이 신장암 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이며, 도 30은 급성 림프구성 백혈병 환자 유래 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 31은 나노트랙커를 이용하여 루테리알의 이동속도(나노트래킹 속도)를 측정된 사진을 나타낸 것이다.

도 32a~c는 막이 터진 융합형의 형태를 순서대로 전자현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0016] 본 발명에서 사용하는 용어 "루테리알(luterial)"은 모든 동물에 존재하는 생명인자 (living organism)로서, 바이러스와 유사한 정도부터 약 500nm까지 (정상 피전단계 50~500nm/ 비정상 피전단계 800nm이상)의 크기를 가지는 미세물질을 본 발명자가 명명한 것이다. 상기 루테리알은 DNA와 RNA를 모두 포함하며, 부착성과 운동성을 가진다는 점에서 엑소좀(exosome)이나 미소포(microvesicle)와는 구별된다.
- [0017] 인간을 포함한 동물의 경우에는 혈액, 타액, 림프관, 정액, 질액, 모유(특히, 초유), 체대혈, 뇌세포, 척수, 골수에 존재하며 "루테리알"로 지칭된다. 아울러, 식물에 존재하는 물질은 "루테리온(Luterion)"으로 지칭되며, 혈액 등에서 발견되는 루테리알의 기원은 식물유래 루테리온인 것으로 추정된다 (도 1).
- [0018] 미토콘드리아는 야누스 그린B(Janus green B) 및 형광염색인 로다민123(Rhodamine123), 미토트랙커(Mitotracker), 아크리딘 오렌지(Acridine Orange), 및 DAPI에 의해 발색이 확인되는데, 상기 루테리알도 미토콘드리아와 동일한 염색약에 의해 발색이 확인되며, 미토콘드리아와 유사하게 이중막을 가진 막구조로서 내부 크리스테(cristae) 구조를 완성하지 않은 상태의 구조를 가지고, 미토콘드리아와 동일한 레이저 파장 범위에서 관찰된다는 점에서 "유사 미토콘드리아", "미토콘드리아 유사체" 혹은 "미토콘드리아 전구체 (proto-mitochondria)"라고도 지칭할 수도 있다.
- [0019] 루테리알은 인간을 포함한 동물의 경우에는 혈액, 타액, 림프관, 정액·질액, 모유(특히, 초유), 체대혈, 뇌세포, 척수, 골수에 존재한다. 그 외, 빨이 있는 동물의 경우에는 빨 내에도 루테리알이 존재한다.
- [0020] 상기 루테리알은 또한, 시그널링, 세포 분화, 세포 사멸 뿐 아니라 세포 사이클 및 세포 성장의 조절과도 관련이 있을 것으로 예상되는데, 본 발명자는 그 중에서도 루테리알이 암의 진단에 밀접한 관련이 있음을 발견하였다.
- [0021] 정상적인 루테리알 (normal luterial)은 암세포의 성장을 막고, 세포를 건강한 면역체계로 되돌리는 역할을 하는 것으로 예상되는데, 그 역할은 유전자를 정상화시키는 가능성을 지닌 RNAi(RNA interference; RNA 간섭)에 의해 수행된다. 이와 같이, 건강한 사람이나 동물 유래의 루테리알의 경우, RNA 내에 있는 정보체계가 정상세포에서 벗어나 이상 질환을 유발하는 단백질을 생산하도록 지시할 경우 이를 인위적으로 간섭하여 암 등의 질병 발생을 억제하도록 작용하며, 크기가 200~500nm 이상으로 성숙하였을 때에는 에너지 대사에도 관여하므로 이러한 루테리알이 정상적인 역할을 수행하지 못할 경우에는 항상성 및 ATP 생산에 결정적인 장애를 유발하여, 호흡 및 에너지 대사 모두에 질병을 야기시킬 수 있다.
- [0022] 이와 같이, 정상적인 역할을 수행하지 못하는 변이 루테리알은, 정상적인 루테리알과는 생태 및 특성이 상이하여 그 크기나 형태가 다양하다. 구체적으로, 정상적인 루테리알의 경우는 이중포자 (double-spore)를 형성한 후 더 이상 증식하지는 않으나, 암 환자나 만성 질병을 가지는 환자의 혈액 내에서 발견되는 변이 루테리알의 경우에는 줄기세포와 유사하게 무한히 증식하는 특성을 가져 600~800nm 이상부터, 어떤 것은 200 μm(200,000nm) 이상의 크기를 가진다. 또한, 바이러스와 유사하게 적혈구, 백혈구, 혈소판 등에 침입하여 성장하거나, 다른 루테리알과 응집하는 특성을 보인다.
- [0023] 한편, 루테리알은 개체의 질병 유무에 따라 그 수, 크기(직경 또는 면적), 형태, 피막형성여부 및 나노 트랙킹 속도가 상이하여, 상기 특성 중 하나 또는 둘 이상의 조합을 통하여 질병의 진단이나 예후를 예측할 수 있다. 이는, 질병이 없는 건강한 사람으로부터 유래한 루테리알과 질병이 있는 사람으로부터 유래한 루테리알의 수,

크기(직경 또는 면적), 형태, 피막형성여부, 나노 트래킹 속도 등이 상이함을 통해 알 수 있다. 이러한 차이는 루테리알의 변이 유무에 의해 기인한 것으로, 질병이 있는 사람으로부터 유래한 루테리알을 건강한 사람으로부터 유래한 정상적인 루테리알과 구분하기 위하여 "변이 루테리알(mutant luteria)"로 명명하였다.

- [0024] 결국, 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 수와 형태학적 특성 또는 생화학적 특성을 관찰함으로써 질병의 진단 및 예후예측이 가능하다.
- [0025] 보다 구체적으로, 환자의 경우 루테리알의 수, 특히 4,000nm 이하 크기의 루테리알 수가 정상인에 비해 적어지는 특성이 있고, 중증환자의 경우 20~80%까지도 적어진다. 따라서, 루테리알의 수가 정상인의 20%이하일 경우에는 중양 의심상태로 결정할 수 있다.
- [0026] 아울러, 루테리알의 크기(장직경)가 20um인 뮤턴트 루테리알이 발견될 경우 중양 의심상태로 결정할 수 있다. 특히, 루테리알의 장직경이 20um이하라 하더라도, 뮤턴트 루테리알 외부에 피막이 형성될 경우에는 악성 중양 의심상태로 결정할 수 있다. 다만, 뮤턴트 루테리알의 장직경이 20um이상이라 하더라도, 피막이 완성되지 않은 경우에는 양성 중양 의심상태로 결정할 수 있다.
- [0027] 또한, 환자유래 루테리알의 경우 그 움직임이 정상인 유래 루테리알에 비해 현저히 낮아진다. 이러한 루테리알의 움직임은 나노트래킹 속도를 통해 정량할 수 있다.
- [0028] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 수, 크기, 형태, 피막형성여부 및 나노 트래킹 속도 중 하나 이상을 현미경을 이용하여 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 루테리알의 수, 크기, 형태, 피막형성여부 및 나노 트래킹 속도 중 하나 이상을 정상인의 루테리알; 정상 루테리알; 또는 적혈구와 비교하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 수, 크기, 형태, 피막형성여부 및 나노 트래킹 속도 중 하나 이상을 현미경을 이용하여 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 루테리알의 수, 크기, 형태, 피막형성여부 및 나노 트래킹 속도 중 하나 이상을 정상인의 루테리알; 정상 루테리알; 또는 적혈구와 비교하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 또는 예후 예측 방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명에서 관찰되는 루테리알은 환자에서 기 배출된 체액에서 분리될 수 있다. 본 발명의 "환자에서 기 배출된 체액"은 혈액, 타액, 림프관, 정액, 질액, 모유(특히, 초유), 제대혈, 뇌세포, 척수 또는 골수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 혈액 유래의 루테리알을 사용할 수 있다. 구체적으로, 채취된 혈액 샘플내에 존재하는 루테리알 또는 혈액으로부터 분리된 루테리알을 현미경으로 관찰함으로써 질병을 진단하고, 예후를 예측할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에서는 혈액에서 혈청을 분리하는 제1분리단계; 상기 분리된 혈청에서 100nm~2mm의 직경의 공극을 구비하는 필터를 통과하지 않는 침전물을 분리하는 제2분리단계; 및 상기 분리된 침전물을 세정하는 단계를 포함하여 루테리알을 수득하였다.
- [0032] 더욱 자세하게는, 상기 제1분리단계는 환자에게서 혈액을 채취하고 원심분리 1200~5000rpm에서 5~15분간 원심분리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 제2분리단계는 혈청에서 원심분리 등을 이용하여 엑소좀(exosome)과 같은 일반 마이크로 베지클을 제거하여 상등액을 획득하는 단계; 및 상기 획득된 상등액을 100nm~2mm의 직경의 공극을 구비하는 필터를 통과시켜 이를 통과하지 않는 침전물을 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 엑소좀을 제거하기 위하여 엑소소크를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 세정하는 단계는 상기 침전물이 분리된 혈청(이는 엑소좀일 수 있음)을 생리 식염수(Normal Saline)로 세정하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 세정하는 단계는 이후 아이싱(4도 이하)을 유지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 (b) 단계에서 관찰 또는 촬영된 루테리알의 장직경이 적혈구 직경의 8~30배; 또는 관찰 또는 촬영된 루테리알의 면적이 적혈구 면적의 8~30배일 경우 질병을 암 의심상태로 결정할 수 있다.
- [0034] 루테리알의 크기를 관찰 또는 촬영하여 측정하는 경우, 정상인의 루테리알은 100~250nm이나, 피로중후군이 있는 경우 250~800nm, 질병이 있는 경우 800nm 이상, 최대 수백 μm(약 200 μm)의 크기를 가진다.
- [0035] 상기 (b) 단계에서 관찰 또는 촬영된 루테리알의 수가 정상인의 20%이하이고, 크기(직경)가 0.8~1 μm일 경우 질병 발생 의심상태로, 20 μm일 경우 암 의심상태로 결정할 수 있다. 뮤턴트 루테리알의 외부에 피막이 형성된 경우에는 그 크기와 무관하게 암의 표식인자로 결정할 수 있다. 특히, 피막이 형성되고 편모(촉수)가 관찰되면 악

성종양 중증인자로 결정할 수 있다. 피막형성 여부는 암시야 현미경이나 전자현미경으로 관찰이 가능하다.

- [0036] 상기 (a)단계에서는 루테리알의 형태를 관찰 또는 촬영하고 상기 (b)단계에서는 관찰 또는 촬영된 루테리알의 형태에 따라 질병을 결정할 수 있다.
- [0037] 상기 (b)단계에서, 루테리알의 형태는 정상형, 외부에 편모가 구비된 편모형, 매스(Mass:M)형, 로드(Rod:L)형, 및 복합형을 포함하는 군에서 선택될 수 있다.
- [0038] 상기 정상형은 루테리알의 장직경:단직경의 비가 1:1~3:1일 수 있다.
- [0039] 상기 매스(Mass)형은 둥그런 형상으로 밀집되어 있고, 대다수 막이 열린 구조로, 장직경:단직경의 비가 3:1~5:1일 수 있다.
- [0040] 상기 로드(Rod)형은 뾰족하고 각진 형상을 가지고, 대다수 막이 닫힌 구조로, 장직경:단직경의 비가 5:1~12:1일 수 있다.
- [0041] 상기 로드(Rod)형은 원형 또는 타원형의 단일 사슬로 이루어지는 로드 1형 또는 단일 사슬이 2개 이상 결합하여 이루어지는 로드 2형일 수 있다.
- [0042] 상기 복합형은 로드형과 매스형의 융합형태, 로드형과 로드형의 융합 형태 또는 매스형과 매스형의 융합형태일 수 있다.
- [0043] 상기 (b)단계에서는 관찰 또는 촬영에 의해 측정된 루테리알의 형태가 로드형일 경우, 폐암, 유방암, 췌장암, 담관암, 용막중피종, 갑상선암, 난소암, 담도암, 전립선암, 또는 림프구성 혈액암 발생 표식인자로 결정하며, 매스형일 경우, 간암, 간혈관육종, 대장암, 자궁암, 소화기암(위암), 신장암, 직장암 또는 골수성 혈액암 발생 표식인자로 결정하고, 복합형일 경우, 중증 혈액암 또는 전이암 의심상태 표식인자로 결정하며, 편모형이 나타날 경우, 말기 종양 의심 표식인자로 결정하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0044] 이러한 뮤턴트 루테리알의 형태를 통해 발생부위를 추적할 수도 있다. 로드형일 경우, 암 발생부위를 폐, 유방, 췌장, 담관, 갑상선, 난소, 담도, 전립선, 또는 림프구성 혈액으로 결정할 수 있고, 매스형일 경우, 암 발생부위를 간, 대장, 자궁, 소화기(위), 신장, 직장 또는 골수성 혈액으로 결정할 수 있다. 아울러, 로드형에서 매스형으로 복합형 진행중인 경우, 암의 원래 발생부위는 로드형과 동일하며, 매스형에서 로드형으로 복합형 진행중인 경우에는 암의 원래 발생부위는 매스형과 동일하다.
- [0045] 본 발명은 또한, 루테리알의 운동성을 의미하는 나노 트래킹 속도를 측정하여 그 속도에 따라 1기암 내지 4기암 의심상태로 결정할 수 있다. 상기 (b)단계에서, 관찰 또는 촬영에 의해 측정된 루테리알의 나노 트래킹 속도가 8.0~11nm/sec인 경우 1기암 의심상태로, 2.5~8.0nm/sec인 경우 2기암 의심상태로, 0.5~2.5nm/sec인 경우 3기암 의심상태로, 0.5nm/sec 미만인 경우 4기암 의심상태로 결정할 수 있다.
- [0046] 본 발명은 또 다른 관점에서는, (a) 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 형태를 전자현미경으로 측정하는 단계; (b) 상기 측정된 루테리알의 형태를 단일형, 융합형, 다중 융합형 및 막이 터진 융합형으로 구성된 군에 선택되는 형태로 결정하는 단계; 및 (c) 상기 결정된 형태를 기준으로 질병상태를 결정하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 환자에서 기 배출된 체액에 존재하는 루테리알의 형태를 전자현미경으로 측정하는 단계; (b) 상기 측정된 루테리알의 형태를 단일형, 융합형, 다중 융합형 및 막이 터진 융합형으로 구성된 군에 선택되는 형태로 결정하는 단계; 및 (c) 상기 결정된 형태를 기준으로 질병상태를 결정하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 또는 예후 예측 방법에 관한 것이다.
- [0048] 상기 혈액 유래 루테리알은 로다민 123(Rhodamine123), 미토타랙커(Mitotracker), 아크리딘 오렌지(Acridine Orange), DAPI, 및 야누스 그린 B (Janus green B)로 구성되는 군에서 선택되는 1 이상의 염색약으로 염색하여 발색이 확인되며 전자현미경 상에서 이중막 및 크리스테 구조가 확인되는 것을 특징으로 한다.
- [0049] 상기 (c)단계는 상기 관찰 또는 촬영에 의해 측정된 루테리알의 형태가 단일형의 형태와 80~100% 일치할 경우 정상으로 결정하고, 융합형의 형태와 80~100% 일치할 경우 질병 의심상태로 결정하고, 다중 융합형의 형태와 80~100% 일치할 경우 중양 의심상태로 결정하고, 막이 터진 융합형의 형태와 80~100% 일치할 경우 중증 중양 의심상태로 결정할 수 있다.

- [0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0051] 실시예 1: 혈액 유래 루테리알의 분리
- [0052] 비소세포성 폐암 말기 환자로부터 채취된 혈액 250 μ l을 1600rpm로 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이 혈청에 SBI사의 ExoQuick를 63 μ l 첨가하고 3000rpm으로 15분간 원심분리한 다음, 추가로 15분을 유지시킨 후 ExoQuick와 반응하지 않는 상층부를 분리하였다. 분리된 상층부(상등액)를 100nm 마이크로필터로 필터링해서 통과하지 않은 침전물을 분리하였다. 이를 생리 식염수로 수차례 세정후 아이싱(4 $^{\circ}$ C 이하)을 유지하여 미세물질인 루테리알을 분리하였다.
- [0053] 실시예 2: 현미경 관찰 및 루테리알의 확인
- [0054] 실시예 1에서 분리된 루테리알은 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 관찰이 가능하였고(도 2a), 로다민 123에 염색시킨 다음, 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 확인이 가능하였으며(도 2b), 야누스 그린 B에 의하여 염색되는 양성 반응을 광학현미경으로 확인하였다.
- [0055] 아울러, 상기 분리된 루테리알을 전자현미경 샘플로 만들어 관찰하였다(도 2c). 혈구를 MICA로 고정시킨 후 막을 프로브(Probe)로 벗겨 내어 DNA와 RNA를 확인할 수 있었다(원자현미경 이용). MICA 대신 고정액 Cell-Tack BD(Bioscience 사), 또는 Glutaraldehyde/poly-L-lysine을 사용할 수 있다. 암시야 현미경에서 로다민123 형광 염색 시약을 도포 후 5분 뒤 세척 후 오렌지 필터(506nm~520nm 대역과장 필터)로 관찰하여 초록색으로 관찰됨을 확인하였다.
- [0056] 도 2a 내지 도 2c는 실시예 1에 분리된 루테리알을 촬영한 사진으로, 도 2b와 같이, 상기 루테리알을 로다민 123으로 형광염색할 경우 특이적으로 염색되며 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰된다. 상기 루테리알은 야누스 그린 B (Janus green B)로 특이적으로 염색되어 광학 현미경으로 관찰 가능하다. 형광염색 시약인 미토트랙커(Mitotracker), 아크리딘 오렌지(Acridine Orange), 및 DAPI에 의해서도 발색을 확인할 수 있다.
- [0057] 도 2a에 나타난 루테리알은 최대 718nm, 즉 0.718 μ m의 직경을 보이며, 도 2c와 같이 외부에 피막이 형성된 것을 확인할 수 있었다. 실제로 실험군인 환자는 비소세포성 폐암 말기로 진단받았다. 따라서 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 관찰 또는 촬영된 루테리알의 직경이 0.5 μ m 이상이고, 외부에 피막이 형성된 경우 암 의심상태로 결정할 수 있다.
- [0058] 도 2c는 상기 루테리알의 전자현미경 사진으로, 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법에 사용되는 루테리알은 외부에 피막이 형성되어 있는 이중막을 가진 막구조로서 완성되지 않은 내부 크리스테 구조를 확인할 수 있다.
- [0059] 실시예 3: 다양한 피험자 유래 루테리알의 직경 측정(전자현미경)
- [0060] 정상인부터 말기암 환자까지 다양한 피험자 30명의 혈액으로부터 실시예 1과 같은 방법으로 루테리알을 분리한 다음, 전자현미경을 이용하여 루테리알의 직경을 측정하였다.
- [0061] 도 3은 관찰된 루테리알을 100nm부터 1 μ m까지 직경의 크기순으로 배열한 것이다. 융합 또는 변이된 루테리알은 직경 450nm 이상에서부터 발견되었으며(대체로는 800nm이상에서 발견), 이중 대다수는 질병진단을 받았다. 따라서 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 루테리알의 직경을 현미경으로 관찰 또는 촬영하여, 관찰 또는 촬영된 루테리알의 직경이 800nm, 즉 0.8 μ m 이상일 경우 질병 발생 의심상태로 결정할 수 있다(전자현미경 또는 원자 현미경으로는 0.45 μ m에서도 관찰이 가능). 현미경으로는 최대 관찰된 크기는 200 μ m이었으나, 최대치는 환자에 따라 증가할 수 있다.
- [0062] 도 3의 800nm(0.8 μ m)의 피막형성 루테리알은 암환자 유래 혈액에서 다수 발견되었다. 따라서 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 루테리알의 직경을 현미경으로 관찰 또는 촬영하여, 관찰 또는 촬영된 루테리

알의 직경이 0.8 μm 이상이고, 피막이 형성된 경우 질병을 암 의심상태로 결정할 수 있다.

[0063] 실시예 4: 정상인의 혈액 유래 루테리알의 현미경 관찰

[0064] 질병의 징후가 전혀 없는 정상인으로부터 채취된 혈액을 슬라이드 글라스에 묻히고 커버글라스로 덮은 다음, 암 시야용 오일을 한 방울 가하고 암시야 현미경(Nikon Eclipse Ni(1000배)을 사용하여 1000배율로 관찰하였다.

[0065] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, 반짝이는 점으로 나타나는 루테리알을 관찰되었다. 원형의 물질은 적혈구이며 나타내며, 정상인 유래의 미루테리알은 적혈구보다 매우 작게 관찰된다.

[0066] 실시예 5: 루테리알의 직경에 따른 질병의 진단 및 예후예측

[0067] 1기암, 2기암, 3기암, 및 4기암 환자 각 15명으로부터 채취된 혈액으로부터, 실시예 1과 같은 방법으로 루테리알을 분리하였다.

[0068] 분리된 루테리알을 버퍼 솔루션에 담아 로다민123으로 염색한 후 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 그 직경을 측정하였다. 2 μm이상의 루테리알 변이체, 즉 변이 루테리알의 관측 비율은 다음과 같다.

표 1

	직경 2 μm이상의 변이 루테리알 관측 비율
1기암	72.2%
2기암	83.5%
3기암	91.3%
4기암	93.6%

[0070] 조기암에서 말기암으로 발전할수록 직경 2 μm 이상의 변이 루테리알이 증가하였으며, 4기 암에서는 약 94%의 환자에서 직경 2 μm 이상의 변이 루테리알이 발견되었고 최대 크기는 200 μm 이상으로 관측되었다. 또한, 1기 내지 3기 암환자에서 직경 0.5~5 μm의 변이 루테리알의 관측비율이 높았다. 또한 말기암인 4기 암환자의 경우 5 μm 이상의 변이 루테리알의 관측 비율이 높았다.

[0071] 따라서 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 루테리알의 직경을 현미경으로 관찰 또는 촬영하여, 관찰 또는 촬영된 루테리알의 직경이 1.0~200 μm일 경우 암 의심상태로 결정하되, 20 μm이상이고 피막 형성시 암 의심상태로 결정할 수 있다.

[0072] 실시예 6: 루테리알의 형태에 따른 질병의 진단 및 예후예측

[0073] 정상인, 염색체 메틸화 이상 단계의 환자, 유전자 변이 발생 환자, 중앙 관련 유전자 변이 환자, 중앙관련 유전자 복합 변이 환자(전립선 암 말기 환자)의 혈액을 슬라이드 글라스에 묻히고 커버글라스로 덮은 다음 암시야용 오일을 한 방울 가하고 암시야 현미경으로 Nikon Eclipse Ni(1000배)를 사용하여 1000배율로 관찰하였다.

[0074] 또한, 상기 실험군 환자 중 1기암, 2기암, 3기암, 및 4기암 환자를 대상으로 루테리알의 형태가 편모형으로 관찰되는 비율을 계산하였다.

표 2

	편모형 관찰 비율
1기암	2.3%
2기암	7.2%
3기암	13.6%
4기암	99.1%

[0076] 도 4b 내지 도 4i는 실시예 6에 따라 촬영된 루테리알의 형태를 질병의 경증 순으로 2단계부터 9단계로 분류하여 나타낸 것이며, 1단계는 도 4a로 나타내었다.

- [0077] 도 4b 및 도 4c는 정상인 혈액 유래 루테리알(2단계 및 3단계), 도 4d는 메틸화(methylation) 이상 단계 환자의 혈액 유래 루테리알(4단계), 도 4e 및 도 4f는 유전자 변이 발생단계 환자 유래 루테리알(5단계 및 6단계), 도 4g는 종양관련 유전자 변이단계 환자 유래 루테리알(7단계), 도 4h는 종양관련 유전자 복합 변이단계 환자 유래 루테리알(8단계), 도 4i는 종양관련 유전자 복합 변이단계 환자(말기 전립선암) 유래 루테리알(9단계)을 촬영한 것이다. 도 4b 내지 도 4i에서 원형의 물질은 적혈구 또는 백혈구이다.
- [0078] 먼저, 도 4b 및 도 4c에서 원형의 물질 외에 반짝이는 은색의 미세물질들이 루테리알이다. 정상인 유래 루테리알에서는 적혈구보다 크기가 작으며, 융합되거나 변형된 군집형태가 발견되지 않았다.
- [0079] 도 4d는 염색체가 메틸화(methylation) 이상 단계를 보이기 시작하는 환자의 혈액 유래 루테리알을 촬영한 것으로, 도 4c의 분류 3단계와 비교할 때 크기는 커졌으나, 아직 변형된 군집형태가 발견되지 않았다.
- [0080] 도 4e 및 도 4f는 유전자 변이 발생 단계 환자의 혈액 유래 루테리알을 촬영한 것으로, 특히 도 4f의 분류 6단계의 경우 도 4d의 분류 4단계와 비교할 때 루테리알 간 융합이 진행된 것을 알 수 있다. 도 4e 및 도 4f의 유전자 변이 발생 단계 환자는 아직 종양관련 유전자에는 변이가 일어나지 않았다.
- [0081] 도 4g는 종양관련 유전자 일부에 변이가 발생한 환자의 혈액에서 유래한 루테리알을 촬영한 것으로(분류 7단계), 도 4e 및 도 4f에 비하여 적혈구 크기의 20배 이상의 압도적으로 큰 변이 루테리알(매스형) 군집이 관찰되었다(종양의 은색 물질).
- [0082] 도 4h는 종양관련 유전자에 복합 변이가 발생한 환자의 혈액에서 유래한 루테리알을 촬영한 것으로(분류 8단계), 분류 7단계에 비해 크기가 훨씬 커졌으며, 로드형으로 관찰되었다.
- [0083] 도 4i는 말기암 환자유래 혈액의 루테리알(9단계)을 촬영한 것으로, 8단계와 달리 편모형의 형태로 관찰되었다. 편모가 형성된 변이 루테리알이 관찰된 환자는 말기 암환자로 구분되며, 편모형 암환자의 생존기간은 1~4개월이었다. 또한, 도 4i와 같이 300nm이상의 편모가 방출되는 경우 생존기간이 2개월 이내였다.
- [0084] 실시예 6에 따른 현미경 관찰 결과, 혈액 유래 루테리알의 형태는 정상형, 편모형, 매스(Mass)형, 로드(Rod)형, 및 복합형으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.
- [0085] 정상형이란 관찰 또는 촬영된 루테리알이 별도의 융합이나 버스팅(Bursting) 등의 변형을 일으키지 않고 장직경:단직경의 비가 1:1~3:1인 형태로, 현미경 관찰 시 작은 점으로 나타난다. 도 4a 내지 도 4c에 나타난 형태가 정상형의 루테리알이다. 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 관찰 또는 촬영된 루테리알의 형태가 정상형의 형태와 80~100% 일치할 경우, 정상으로 결정할 수 있다.
- [0086] 편모형이란 관찰 또는 촬영된 루테리알이 변형 또는 융합을 일으켜 외부에 편모가 구비된 형태로, 도 4i에서 편모형의 루테리알이 관찰되었다. 말기암으로 갈수록 편모형 관찰 비율이 급격히 증가하며, 4기암에서는 99.1%로 거의 대부분의 4기암 환자에서 편모형의 루테리알이 관찰되었다. 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 관찰 또는 촬영된 루테리알의 형태가 편모형의 형태와 80~100% 일치할 경우, 말기 종양 의심상태로 결정할 수 있다. 상기 말기 종양으로 진단받은 환자의 생존 기간은 1~4개월일 수 있다. 특히, 편모형의 경우 장기생존이 불가능하다.
- [0087] 매스형(M)이란 관찰 또는 촬영된 루테리알이 버스팅(Bursting) 또는 융합을 일으켜 크기 및 형태가 정상형에서 변형된 것으로, 장직경 및 단직경의 차이가 크지 않은 불규칙적인 부피 형태로, 바람직하게는 장직경:단직경의 비가 3:1~5:1일 수 있다. 도 4g 및 도 5는 실시예 6에 따라 매스형의 루테리알을 암시야현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것으로, 다양한 형태의 매스형이 관찰된다. 이를 대조군으로 하여 관찰 또는 촬영된 루테리알의 형태를 비교하여 질병을 결정할 수 있다.
- [0088] 로드형(L)은 관찰 또는 촬영된 루테리알이 버스팅(Bursting), 변형, 또는 융합을 일으켜 막대(Rod) 형태를 나타내는 것으로, 단직경과 장직경의 길이 차이가 매스형 보다 크다. 바람직하게는 장직경:단직경의 비가 5:1~12:1일 수 있다. 로드형은 도 6과 같이 다양한 형태로 관찰된다. 원형 또는 타원형의 단일 사슬로 이루어지는 로드 1형; 및 단일 사슬이 2개 이상 결합하여 이루어지는 로드 2형을 포함할 수 있다. 상기 로드 1형은 단일의 루테리알이 막대 형태가 된 것으로, 이는 버스팅(Bursting) 및/또는 변형에 의한 것일 수 있다. 상기 로드 2형은 2이상의 루테리알이 결합하여 막대 형태가 된 것으로, 이는 버스팅(Bursting), 변형 및 융합 중 하나 이상에 의한 것일 수 있다.
- [0089] 편모형은 형상에 있어서 큰 범주에서 로드형에 포함될 수 있으나, 편모가 뻗어 나왔다는 점에서 차이를 가진다.

따라서 로드형인지 먼저 판단한 다음 편모형인지를 판단할 수 있다.

[0090] 복합형은 로드형과 매스형의 융합형태일 수 있다. 일체로 형성된 루테리알의 일부는 로드형이고 일부는 매스형인 형태를 일컬을 수 있다.

[0091] 실시에 7: 다양한 종류의 암환자 유래 루테리알의 형태에 따른 질병의 진단 및 예후예측

[0092] 다양한 암 진단을 받은 환자(표 3)로부터 채취된 혈액 또는 실시예 1과 같은 방법으로 상기 혈액으로부터 루테리알을 수득하여 관찰하였다.

[0093] 상기 혈액 샘플 또는 루테리알을 버퍼 솔루션에 담아 슬라이드 글라스에 묻히고 커버글라스로 덮은 다음 암시야용 오일을 한 방울 가하고 암시야 현미경(Nikon Eclipse Ni(1000배)) 및 공초점 주사현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0094] 그 결과, 표 4에 나타난 바와 같이, 폐암, 유방암, 췌장암, 담관암, 흉막중피종, 갑상선암, 난소암, 담도암, 전립선암, 및 급성림프구성 백혈병의 경우, 로드형(L)의 루테리알이 관찰되었다.

[0095] 또한, 간암, 간혈관육종, 대장암, 자궁암, 소화기암(위암), 직장암 및 급성 골수성 백혈병의 경우, 매스형(M)의 루테리알이 관찰되었다.

[0096] 전이암 환자의 경우, 매스형과 로드형이 복합된 복합형의 루테리알이 발견되었고, 말기암 환자의 경우에는 도 4i에 나타난 바와 같이, 편모형의 루테리알이 관찰되었다.

[0097] 로드형에서 로드-매스형으로 진행되는 경우(L-M), 암의 발생 부위는 L형과 동일하나, 전이가 진행되는 것으로 판단할 수 있다. 아울러, 매스형에서 매스-로드형으로 진행되는 경우(M-L) 암의 발생 부위는 M형과 동일하나, 전이가 진행되는 것으로 판단할 수 있다.

표 3

암 종류	진행상태	루테리알 형태	도면
폐암	초기	L	도7a
	중기	L	도7b~e
유방암	초기	L	도8a~b
	중기	L	도8c
	중기	L-M	도8d
	림프, 복막(Peritoneal) 및 심막(Pericardial) 전이	L	도8e
췌장암	초기	L	도9a
	중기	L-M	도9b
	중기	L	도9c~d
담관암(Common Bile Duct Cancer)	뼈/폐 전이	L	도10
흉막중피종 (Pleural Mesothelioma)		L	도11
갑상선암	초기	L	도6
	중기	L	도12
난소암		L-M	도13a~b
담도암		L	도14
전립선암		L	도15
급성림프구성 백혈병		L	도16a
		L-M	도16b
간암	초기	M	도17a
	중기	M	도17b~c
	폐전이	M	도17d
간 혈관육종 (angiosarcoma of liver)		M	도18
대장암		M	도19a~c
자궁암		M	도20

위암		M-L	도21
직장암	중기	M-L	도22a
	중기	M	도22b
급성골수성 백혈병	중기	M-L	도23a
		M	도23b-c
신장암	중기	M-L	도24
위암	간전이	복합형	도25a
위암	복막전이	복합형	도25b
위암	복막 및 간 전이	복합형	도25c
직장암	뼈/폐 전이	복합형	도26
전립선암	뼈전이	복합형	도27
비소성폐암(NSCLC)	림프전이	복합형	도28
신장암	뼈전이	복합형	도29
급성림프구성 백혈병		복합형	도30

[0099] 이 결과로부터, 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 관찰 또는 촬영된 루테리알의 형태가 로드형일 경우, 폐암, 유방암, 췌장암, 담관암, 용막중피종, 갑상선암, 난소암, 담도암, 전립선암, 또는 림프성 혈액암 발생상태로 결정할 수 있다.

[0100] 또한, 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 관찰 또는 촬영된 루테리알의 형태가 매스형일 경우, 간암, 간혈관육종, 대장암, 자궁암, 소화기암(위암), 직장암, 신장암 또는 골수성 혈액암 발생상태로 결정할 수 있다.

[0101] 아울러, 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 루테리알의 형태가 복합형일 경우, 중증 혈액암 또는 전이암 의심상태로 결정할 수 있고, 편모형이 검출될 경우, 말기암 의심상태로 결정할 수 있다.

[0102] 실시예 8: 루테리알의 나노 트래킹 속도에 따른 질병의 진단 및 예후 예측

[0103] 1기암, 2기암, 3기암, 및 4기암 환자(각각 15명)의 혈액으로부터 실시예 1과 같은 방법으로, 루테리알을 얻었다. 상기 루테리알을 버퍼 솔루션에 담아 Janus Green B에 염색시킨 후 광학현미경으로 관찰하였다.

[0104] 운동성 기준은 200nm 루테리알을 이용하여 미국 3i 사의 나노 트래킹으로 루테리알의 나노 트래킹 속도를 측정하였다. 구체적으로, 루테리알을 명시야 현미경으로 관찰한 후 루테리알 중심에 트래킹을 설정하고 나노 트래킹을 작동하면, 루테리알의 이동과 함께 실시간 이동궤적을 표기하여 초당 속도를 계산하였다(도 31).

표 4

	나노 트래킹 속도
정상인	12 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 이상
1기암	8.0~11 $\mu\text{m}/\text{sec}$
2기암	5.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 내외(2.5~8.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$)
3기암	0.5~2.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$
4기암	운동성 없음 (0~0.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$)

[0106] 본 실시예에 따른 암환자 유래 루테리알의 나노 트래킹 속도는 루테리알의 운동성을 나타낸다. 정상인의 경우 12 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 이상이나, 초기암인 1기암에서 말기암인 4기암으로 갈수록 운동성은 줄어들어 4기암에서는 거의 운동성이 없는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 관찰 또는 촬영된 루테리알의 나노 트래킹 속도가 8.0~11 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 인 경우 1기암, 2.5~8.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 인 경우 2기암, 0.5~2.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 인 경우 3기암, 0~0.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 인 경우 4기암으로 결정할 수 있다.

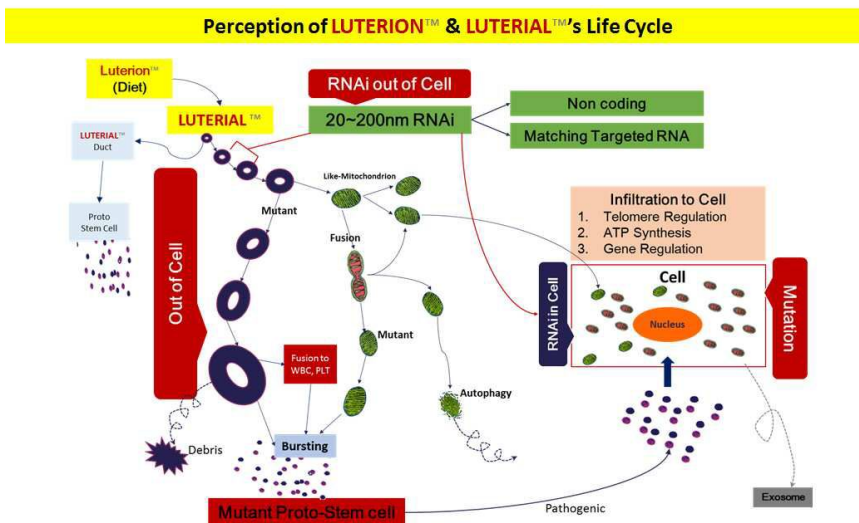
[0107] 실시예 9: 전자현미경을 이용한 루테리알의 형태에 따른 질병의 진단 및 예후예측

[0108] 루테리알은 전자현미경으로 관찰할 경우, 단일형, 융합형, 다중 융합형, 또는 막이 터진 융합형의 형태를 나타낼 수 있으며, 이를 기준으로 하여 질병을 진단 및 예후예측 할 수 있다.

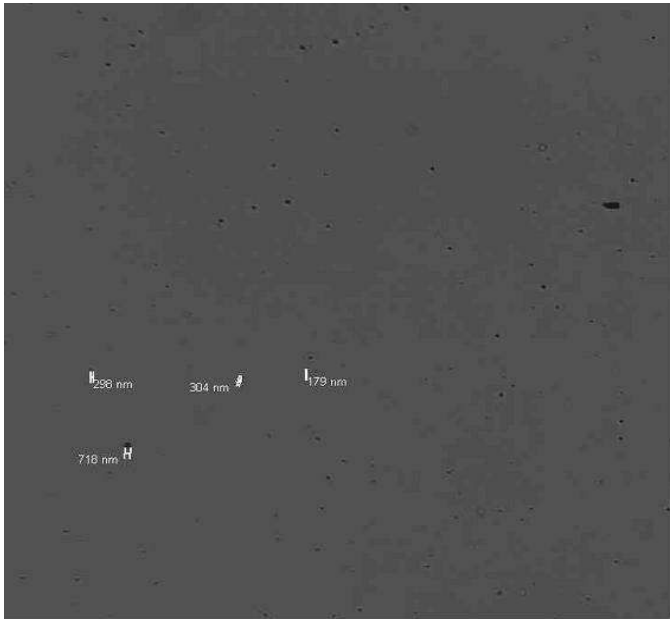
- [0109] 단일형은 단일의 루테리알이 관찰되는 형태이고, 융합형은 2~4개의 루테리알 군집이 융합되어 관찰되는 형태이며, 다중 융합형은 상기 융합형 루테리알 군집이 여러 겹으로 겹쳐서 융합되어 관찰되는 형태이고, 막이 터진 융합형은 상기 융합형의 루테리알의 막이 터지고 내부 물질이 빠져나온 형태이다.
- [0110] 정상인부터 말기암환자까지 다양한 피험자(30명) 혈액으로부터 실시예 1과 같은 방법으로 루테리알을 수득하였다. 수득된 루테리알을 슬라이드 글라스에 고정시키고 전자현미경을 이용하여 형태를 관찰 또는 촬영하였다.
- [0111] 그 결과, 정상인의 경우, 단일형의 루테리알이 관찰되었다. 암 이외의 질병을 가지는 환자의 경우, 융합형의 루테리알이 관찰되었는바, 융합형의 루테리알은 질병 의심상태로 판단된다.
- [0112] 다중 융합형의 루테리알이 발견된 다수의 환자에게서 종양이 발견되었다. 따라서 다중 융합형의 루테리알은 종양 의심상태로 판단된다.
- [0113] 도 32a~c는 막이 터진 융합형의 형태를 순서대로 전자현미경으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다. 도 32a부터 막을 형성한 루테리알 군집이 점점 증식하여(도 32b), 최종적으로 막이 터져 내부의 변형된 입자들이 터져 나왔다(도 32c). 이러한 막이 터진 융합형의 루테리알이 발견된 다수의 환자에게서 증중암이 발견되었다. 따라서 막이 터진 융합형의 루테리알은 증중 암 의심상태로 판단된다.
- [0114] 따라서 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 혈액에 존재하며 전자현미경 상에서 이중막 및 크리스테 구조가 확인되는 루테리알의 형태와 비교하여 단일형의 형태와 80~100% 일치할 경우 정상으로 결정하고, 융합형의 형태와 80~100% 일치할 경우 질병 의심상태로 결정하며, 다중 융합형의 형태와 80~100% 일치할 경우 종양 의심상태로 결정하고, 막이 터진 융합형의 형태와 80~100% 일치할 경우 증중 종양 의심상태로 결정할 수 있다.
- [0115] 따라서 본 발명에 따른 질병의 진단 및 예후예측 방법은 루테리알을 질병의 진단 및 예후예측의 마커로서 활용함으로써, 특히 암환자의 진단, 치료법의 효과여부, 치료전후의 비교, 및 치료 받은 환자의 장기생존여부를 판단하는데 효과적으로 사용할 수 있다.
- [0116] 이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

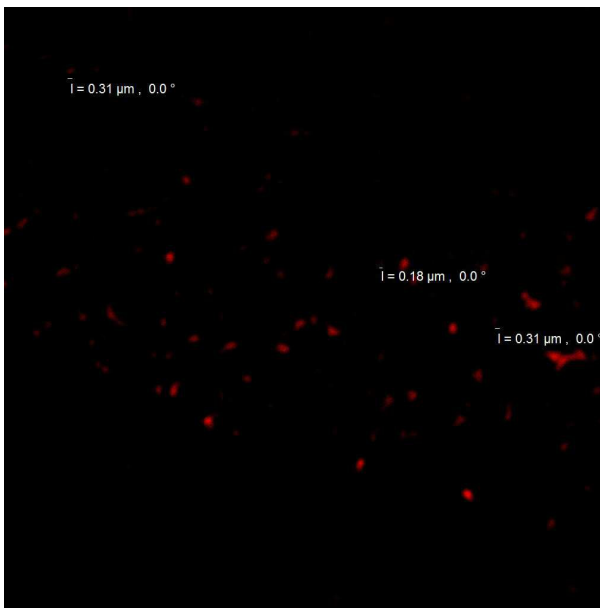
도면1



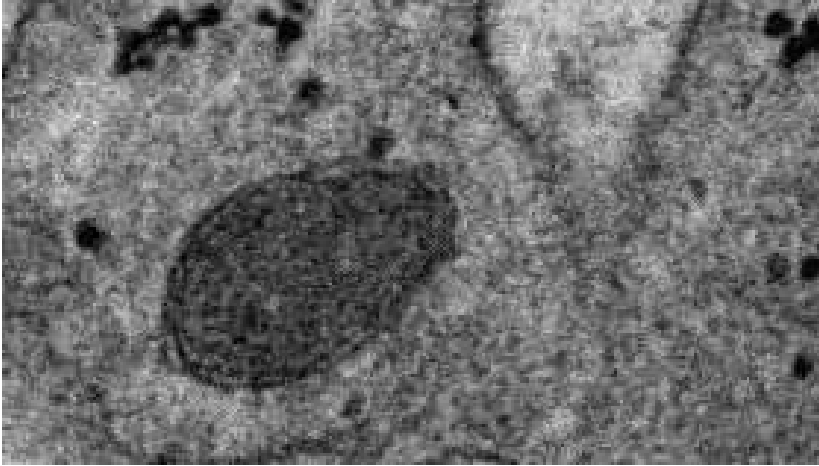
도면2a



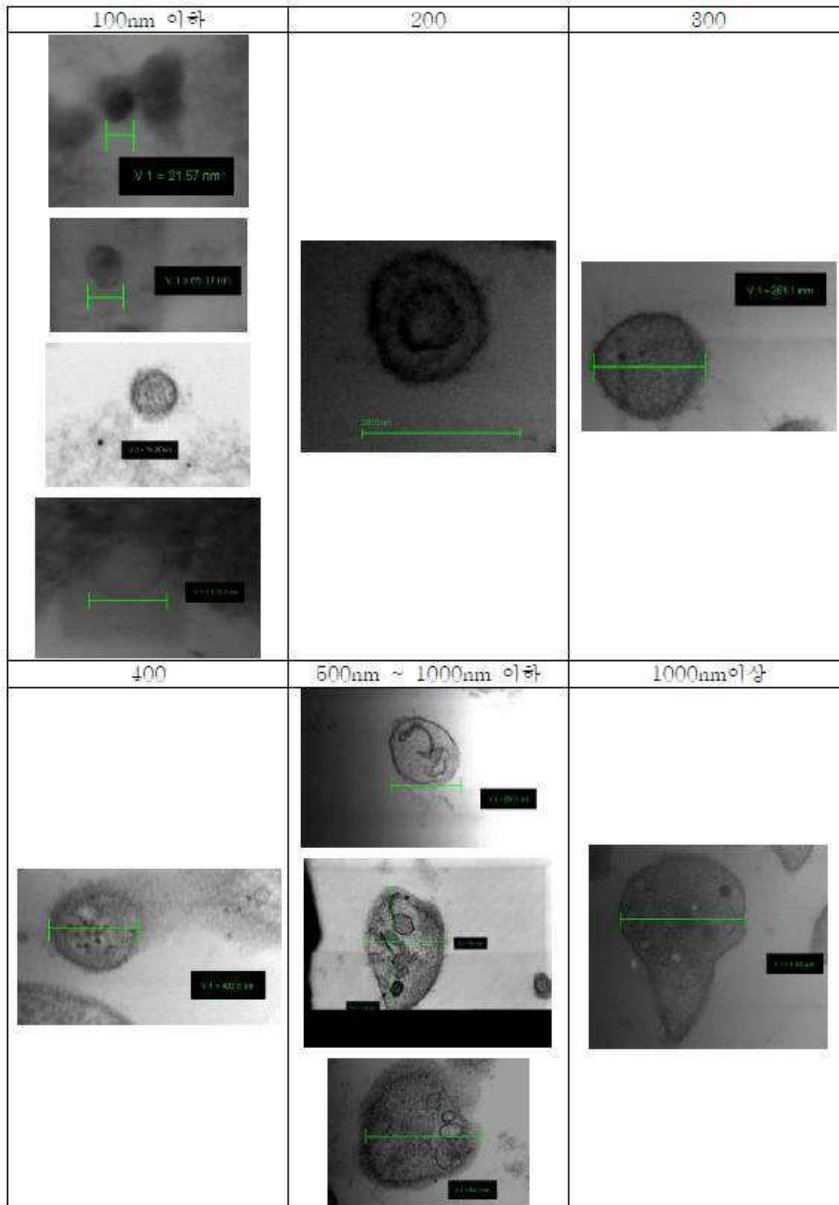
도면2b



도면2c



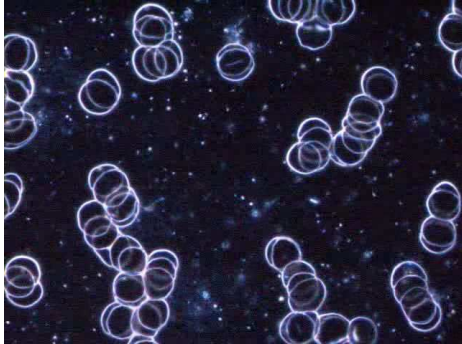
도면3



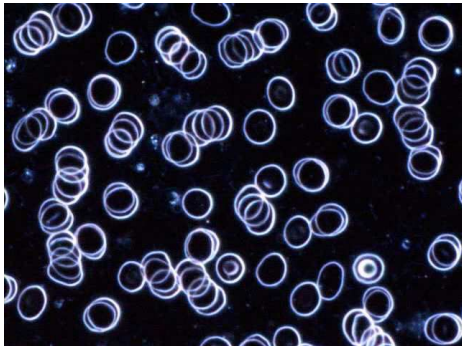
도면4a



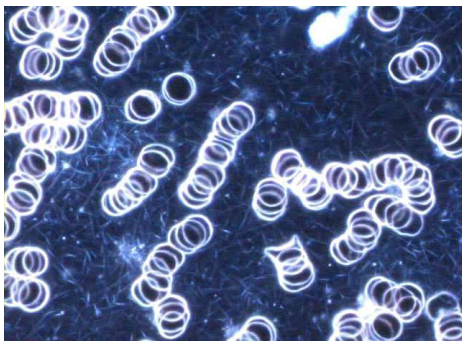
도면4b



도면4c



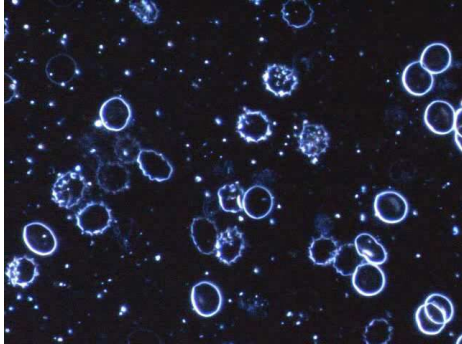
도면4d



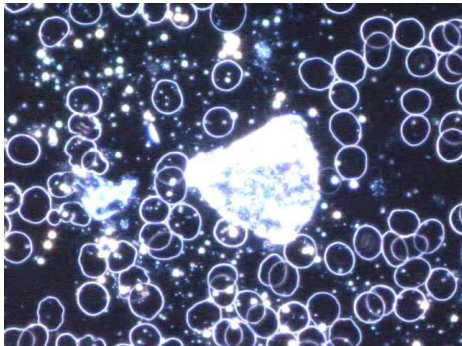
도면4e



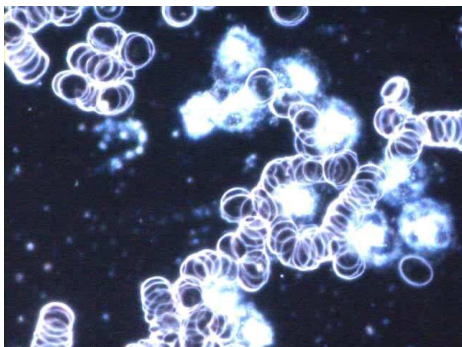
도면4f



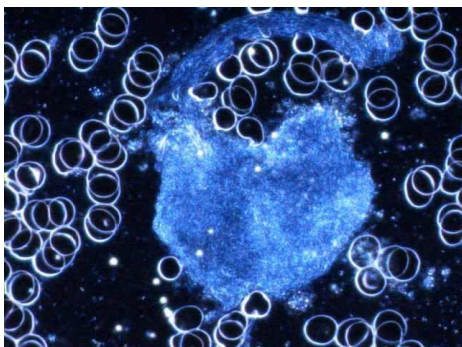
도면4g



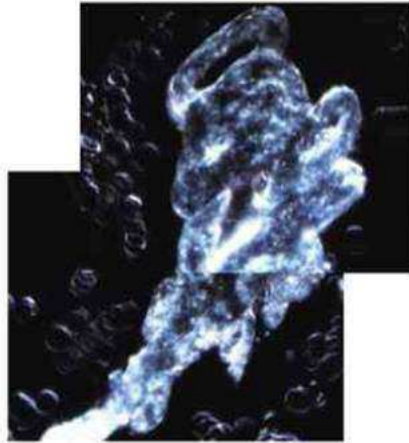
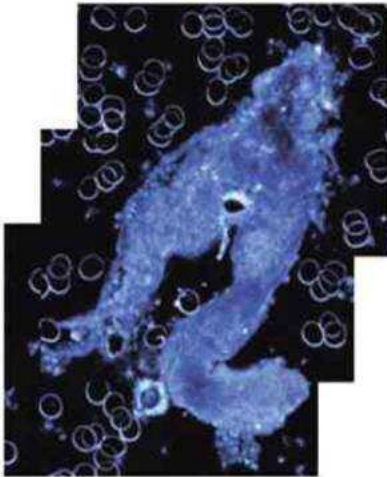
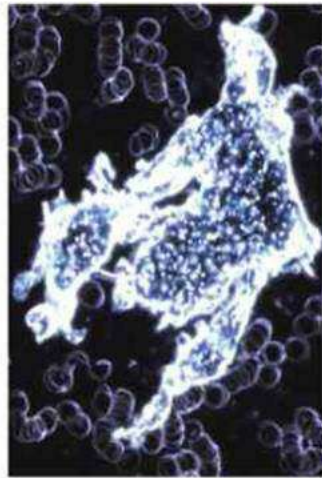
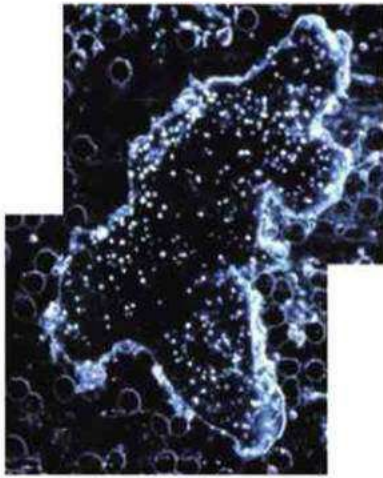
도면4h



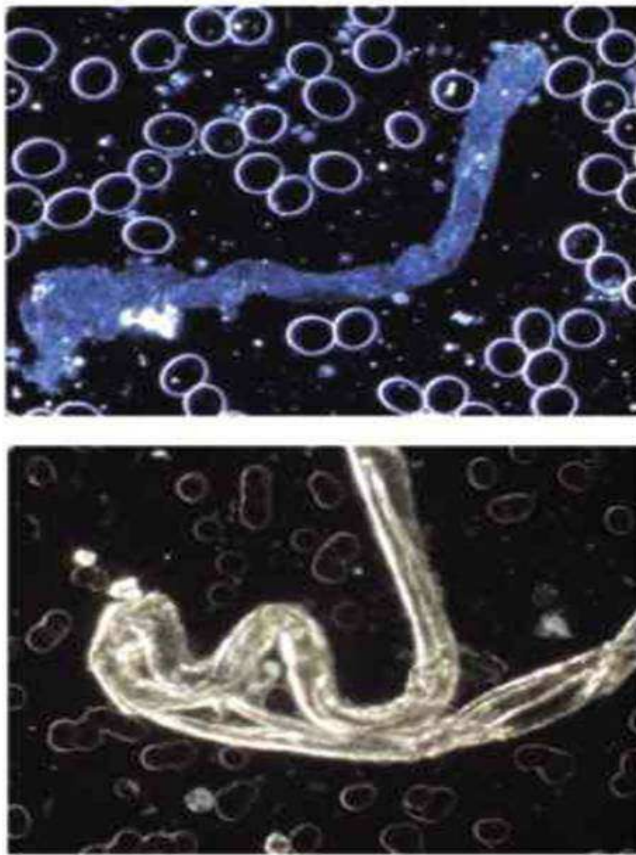
도면4i



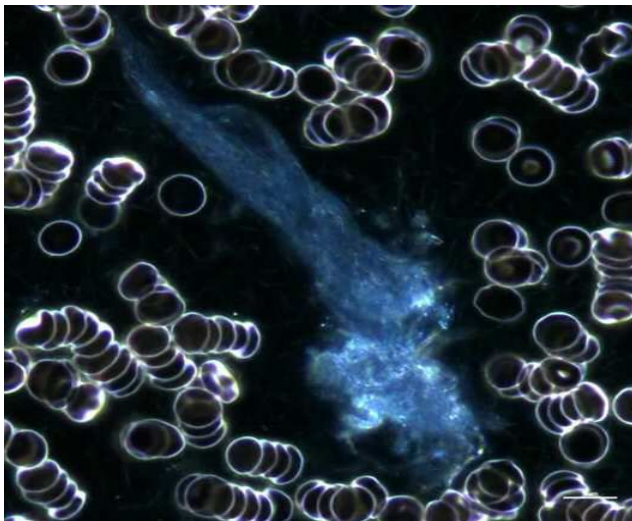
도면5



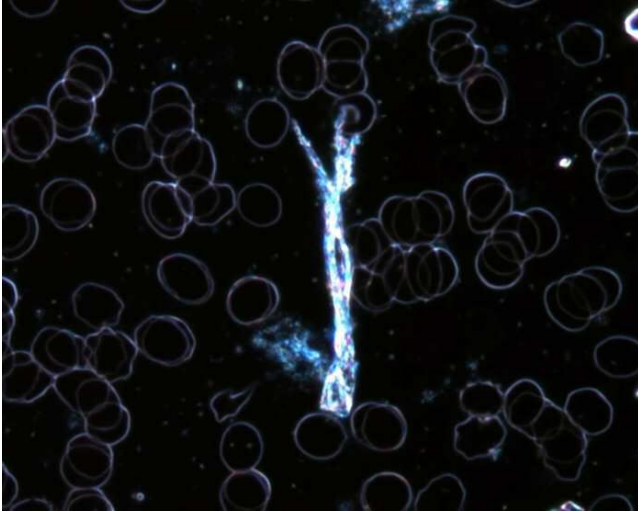
도면6



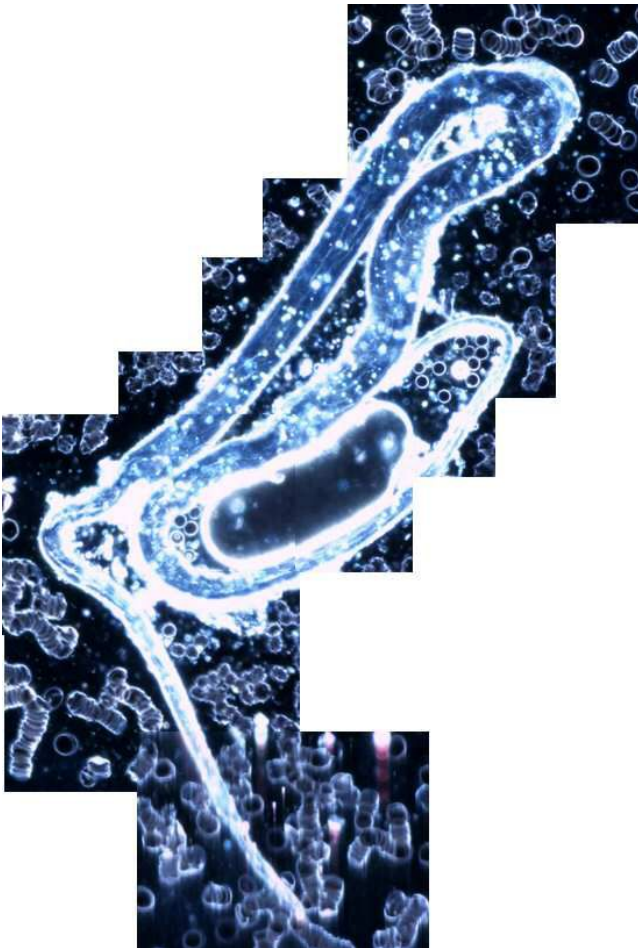
도면7a



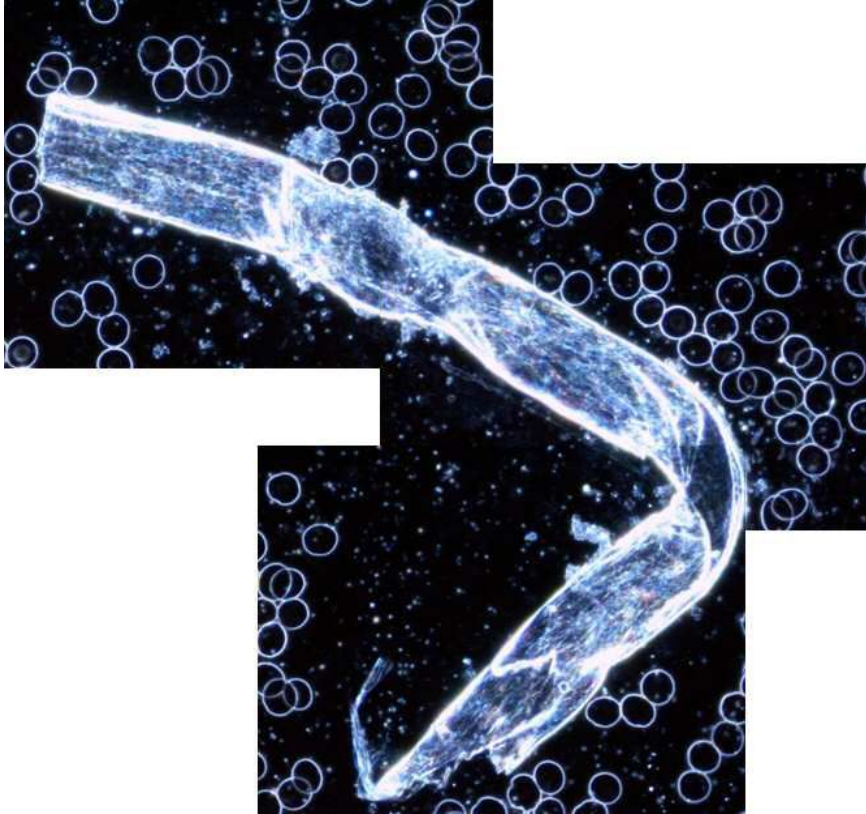
도면7b



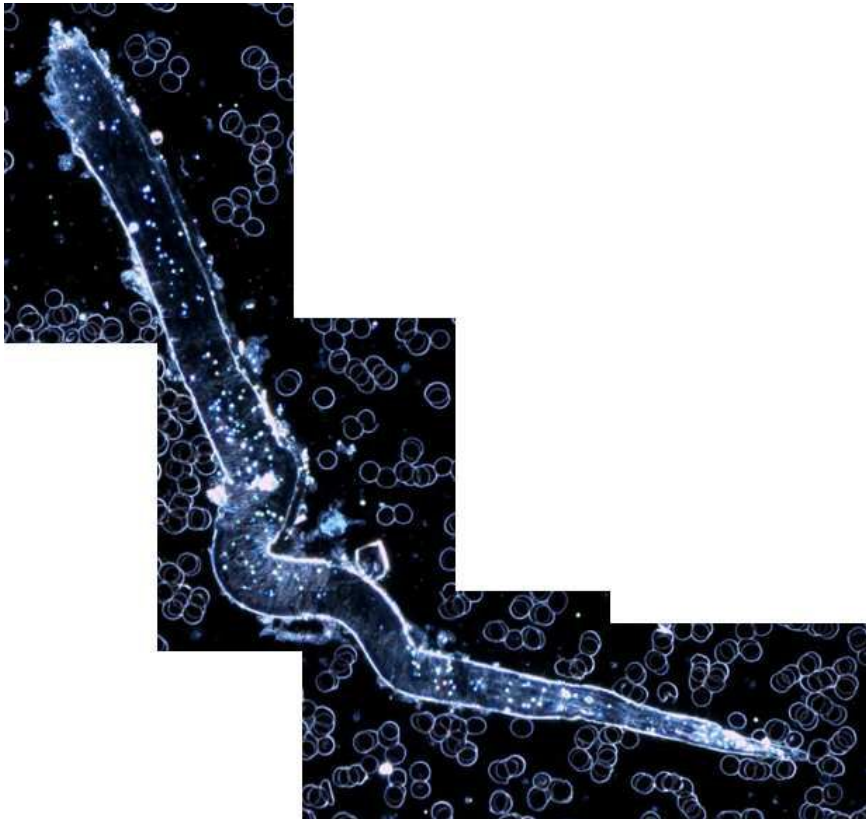
도면7c



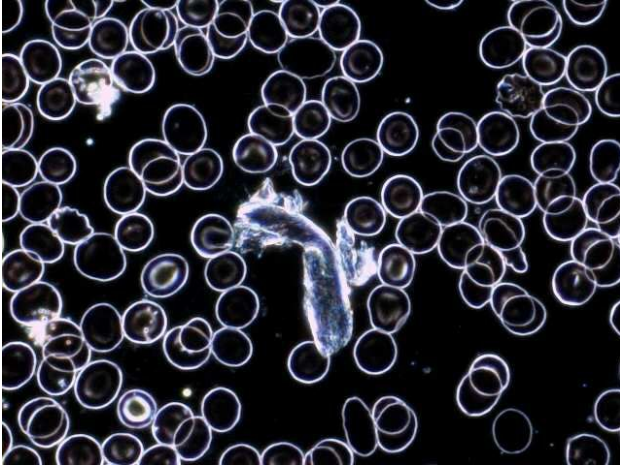
도면7d



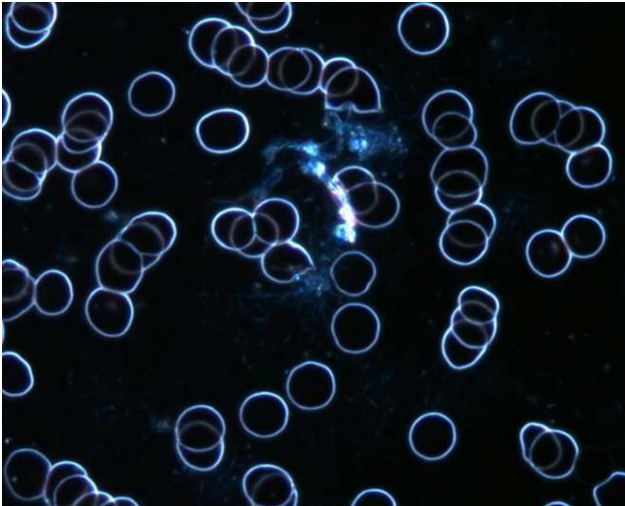
도면7e



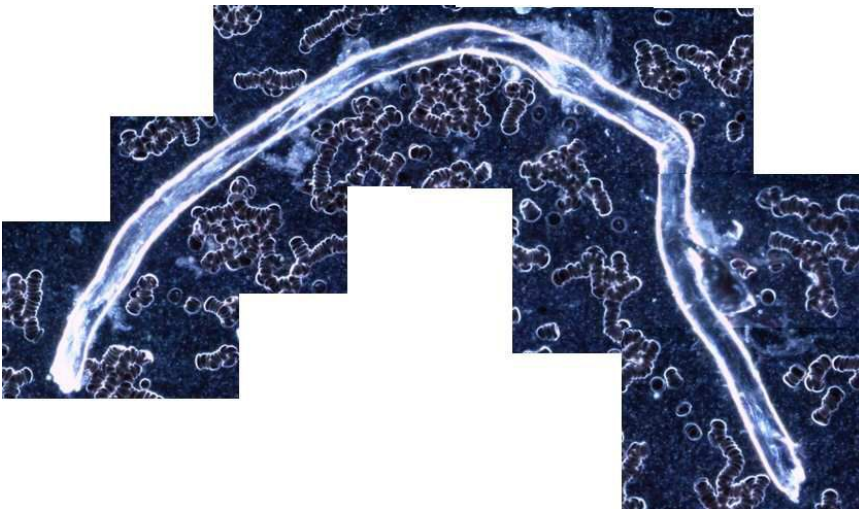
도면8a



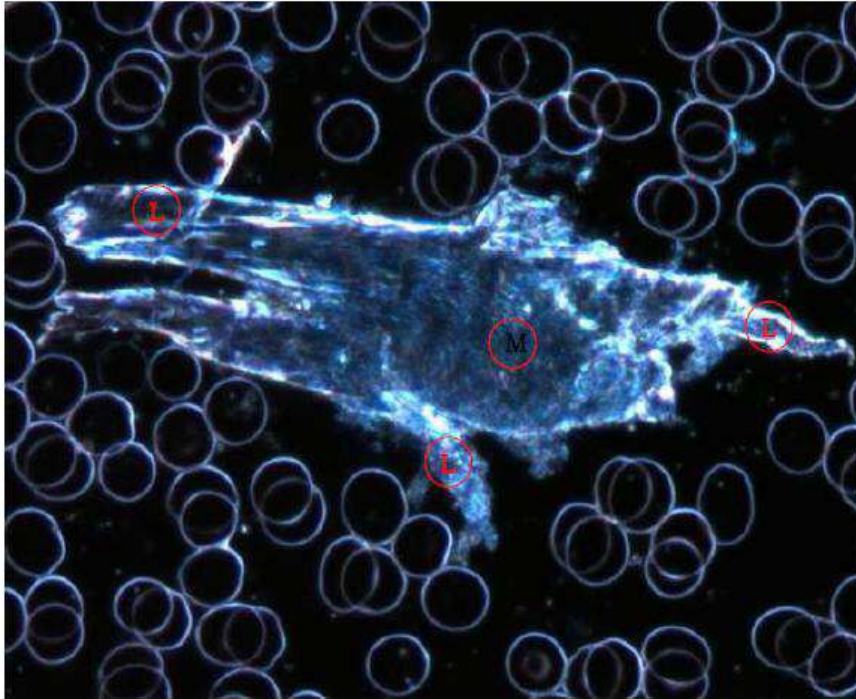
도면8b



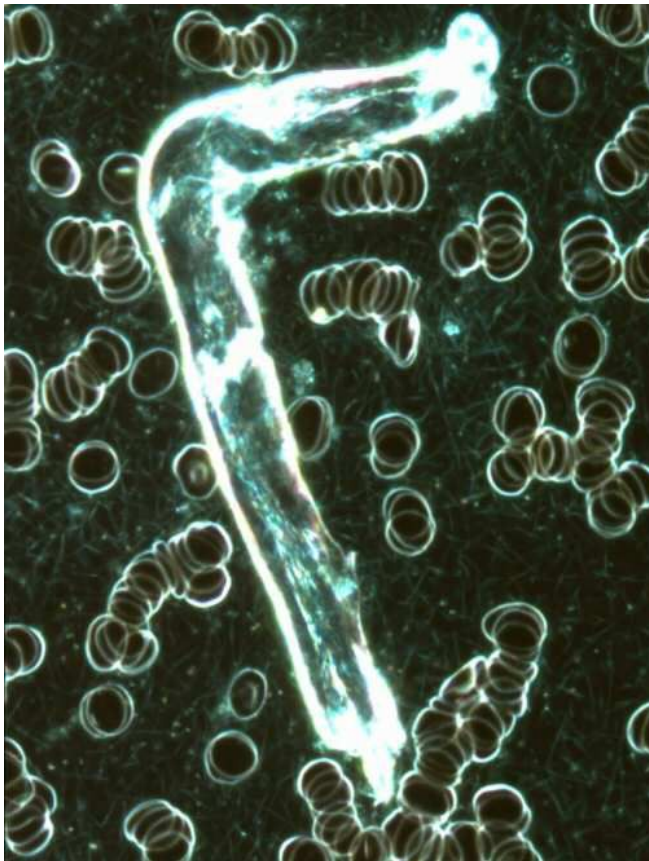
도면8c



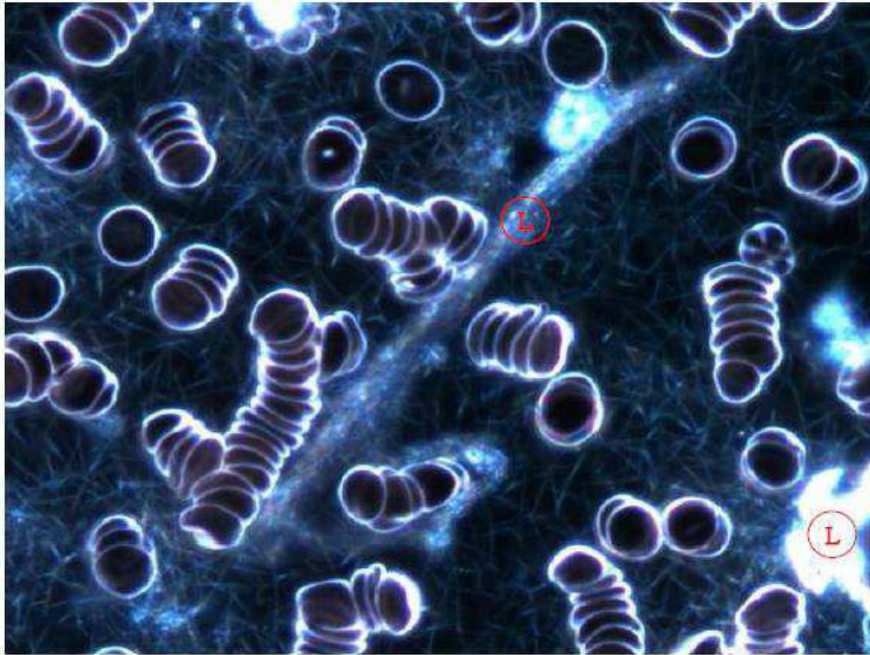
도면8d



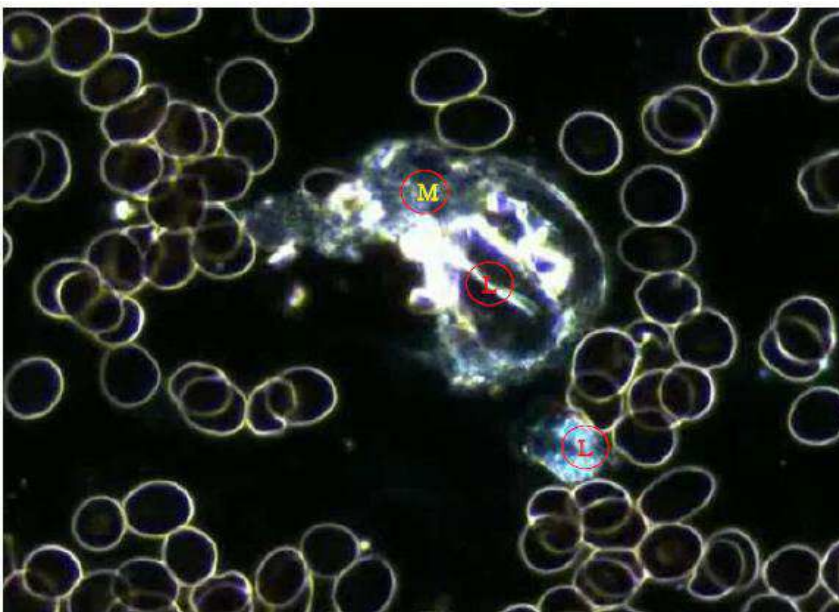
도면8e



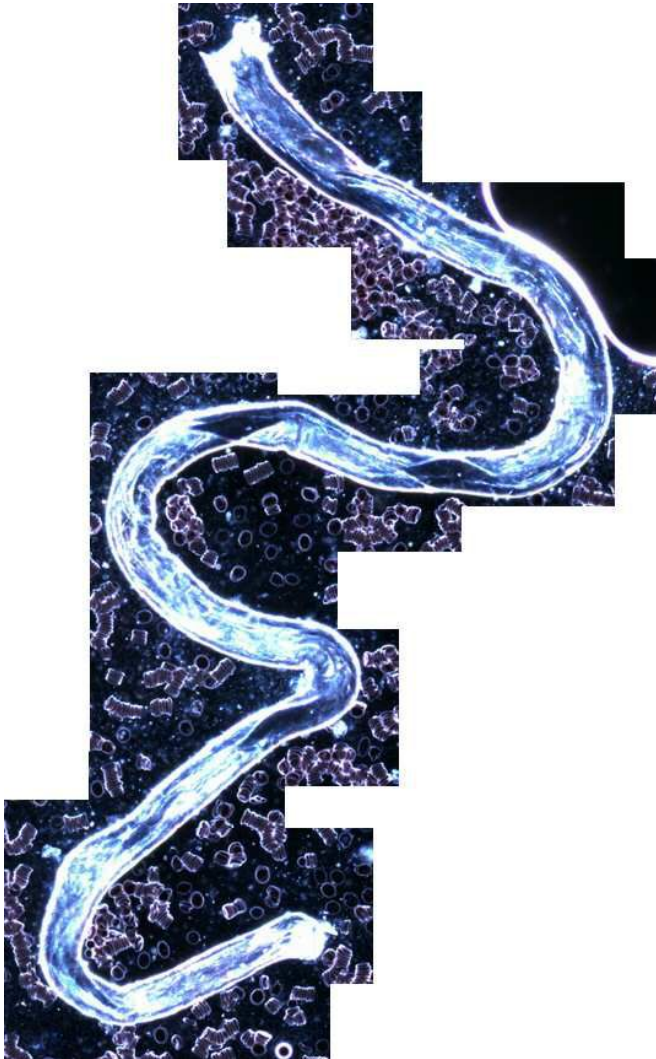
도면9a



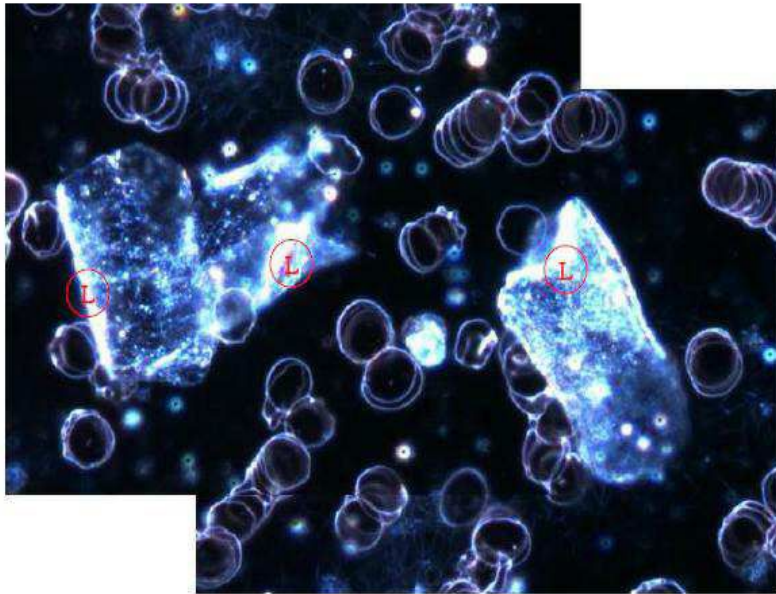
도면9b



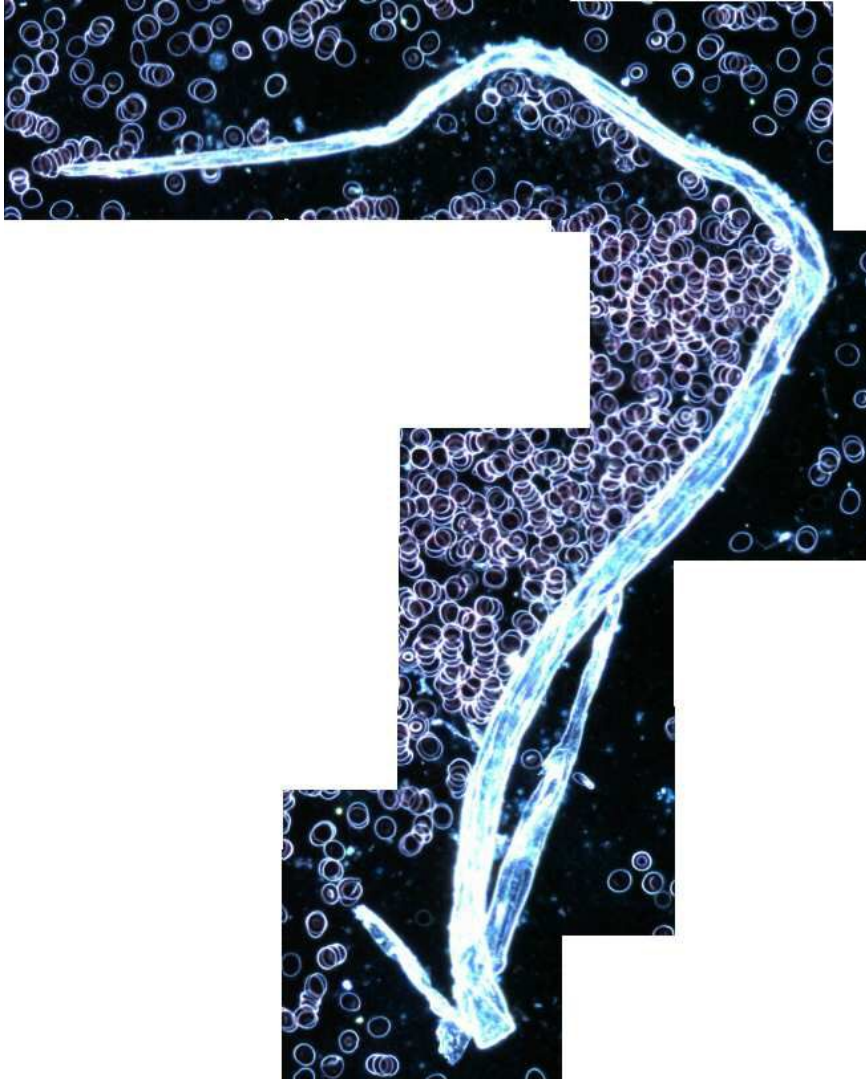
도면9c



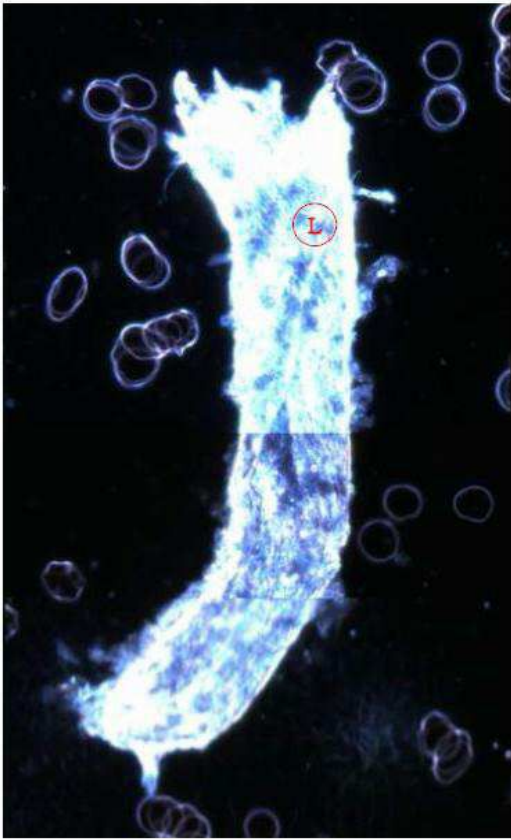
도면9d



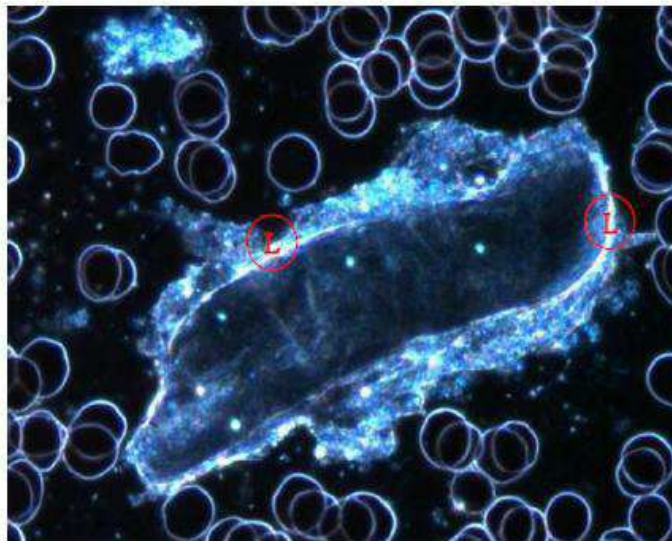
도면10



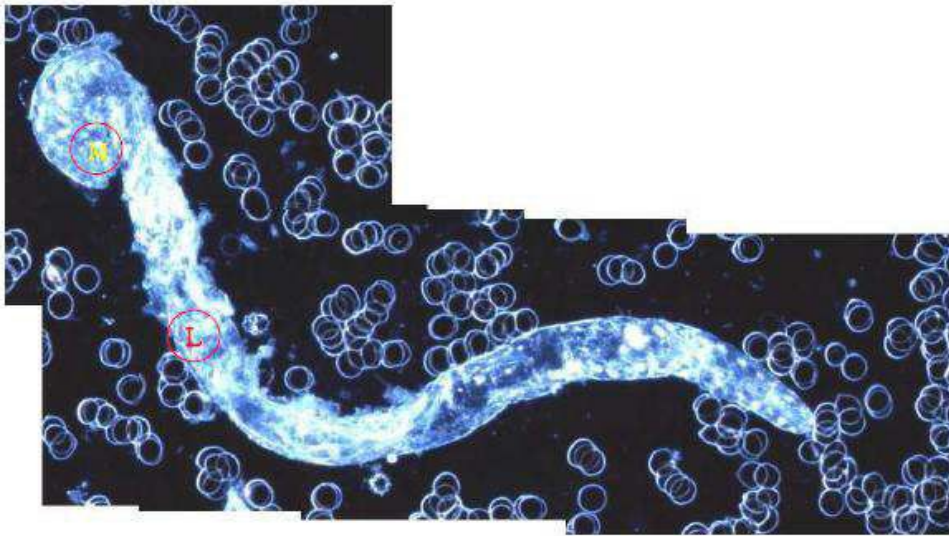
도면11



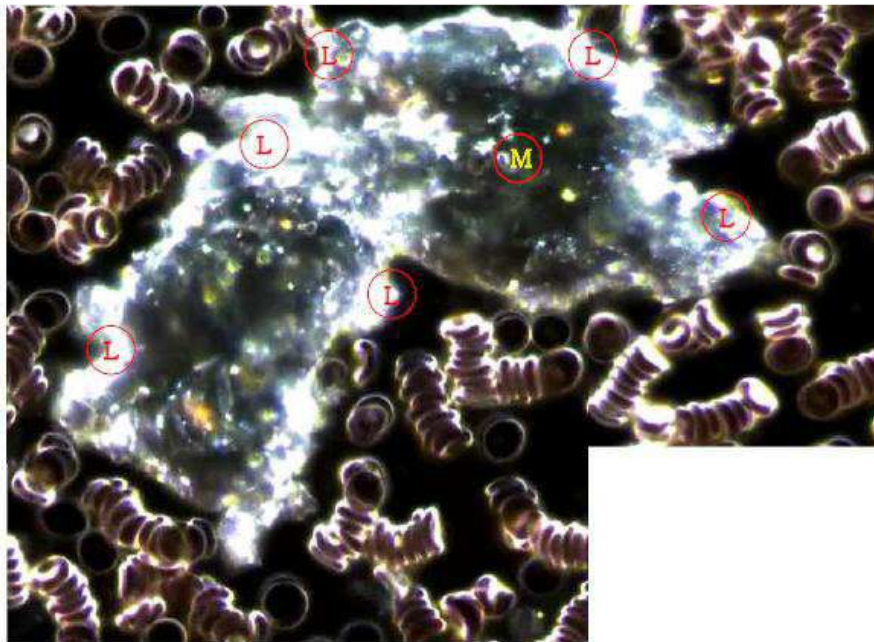
도면12



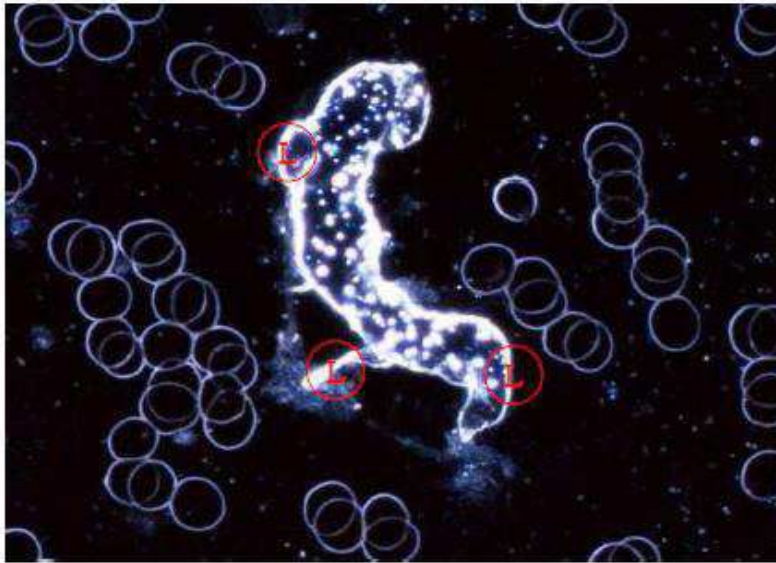
도면13a



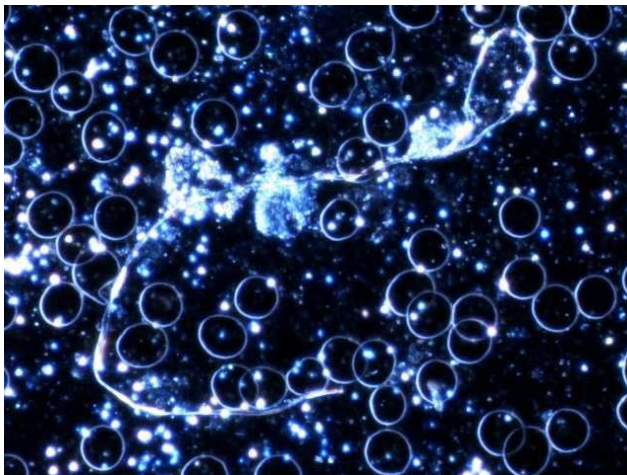
도면13b



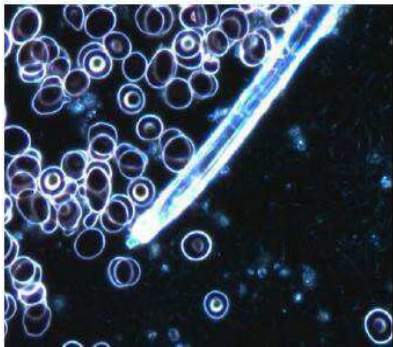
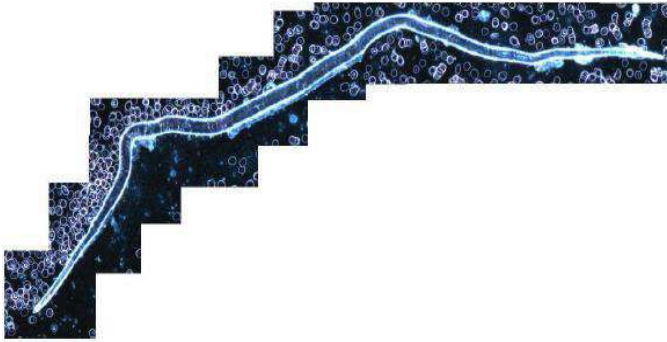
도면14



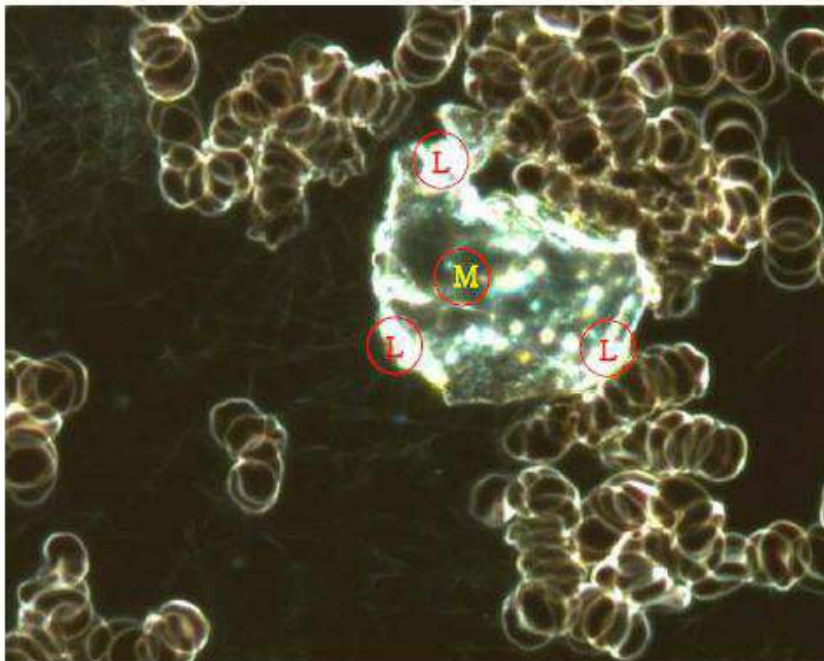
도면15



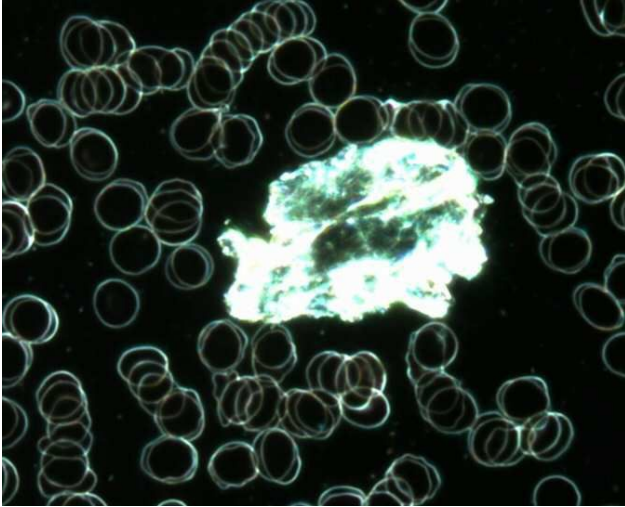
도면16a



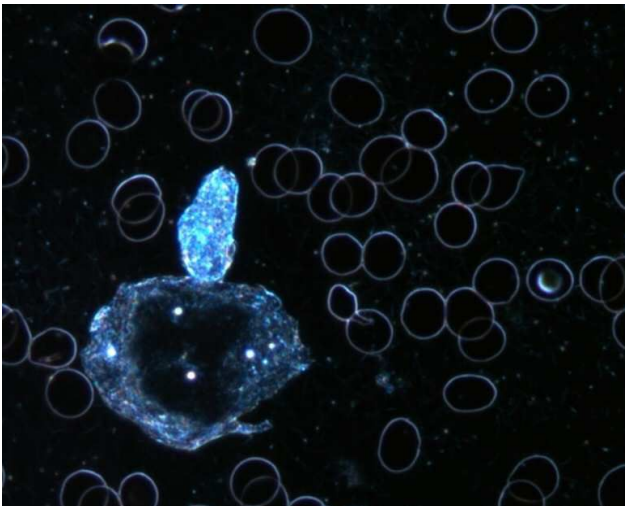
도면16b



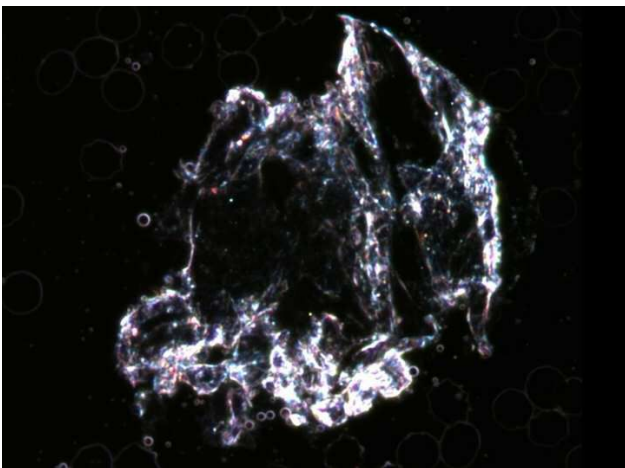
도면17a



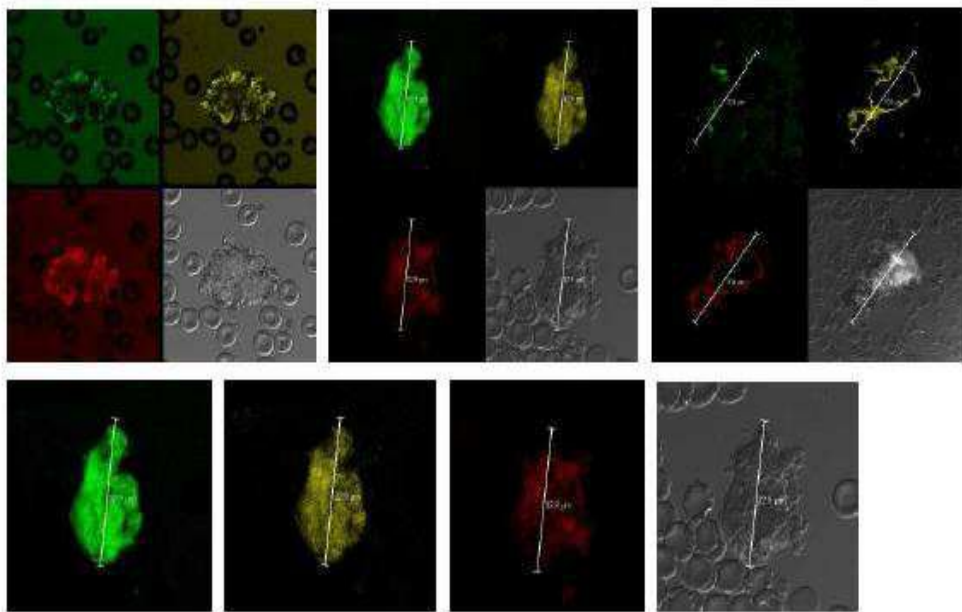
도면17b



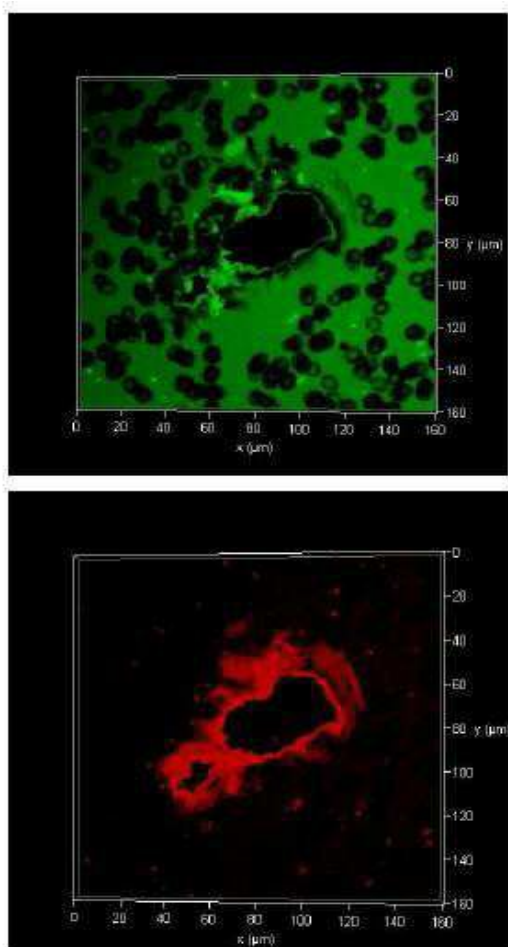
도면17c



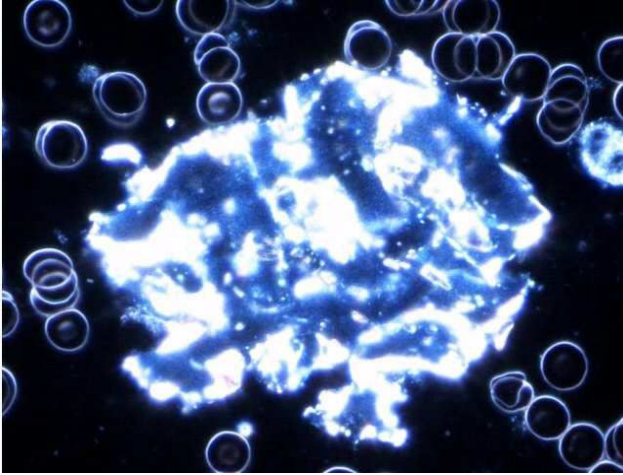
도면17d



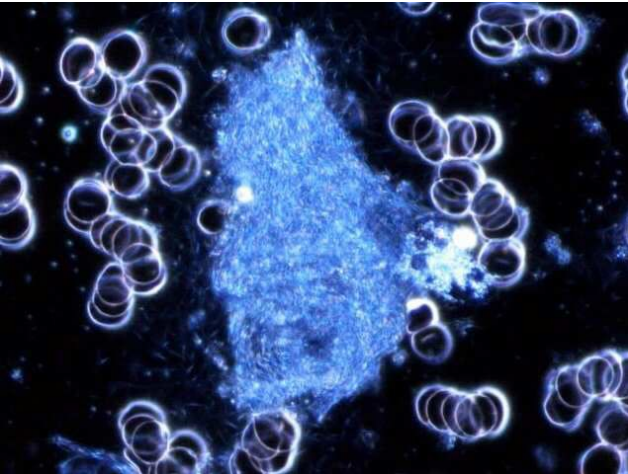
도면18



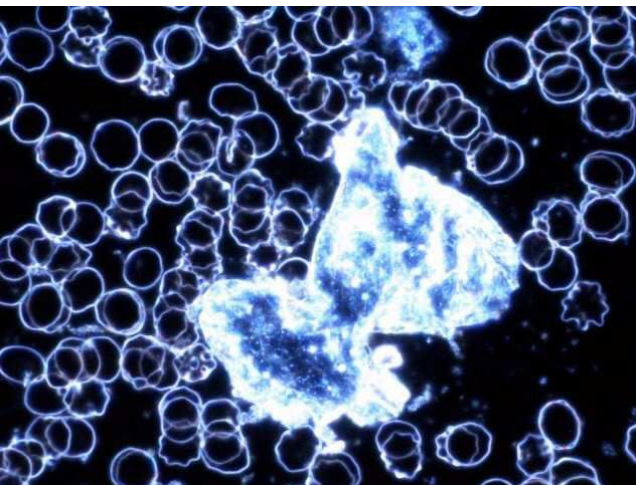
도면19a



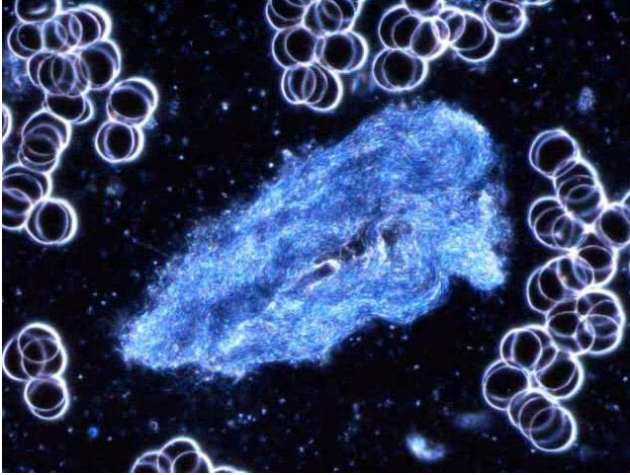
도면19b



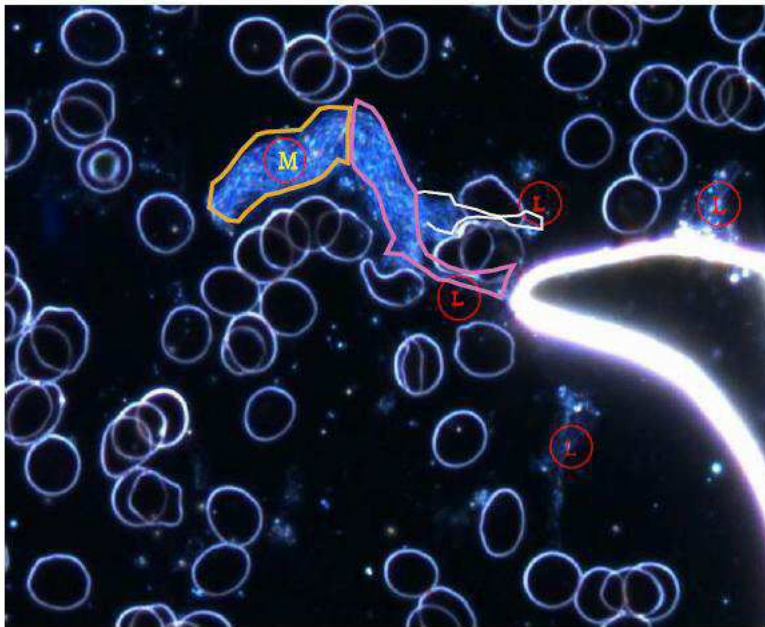
도면19c



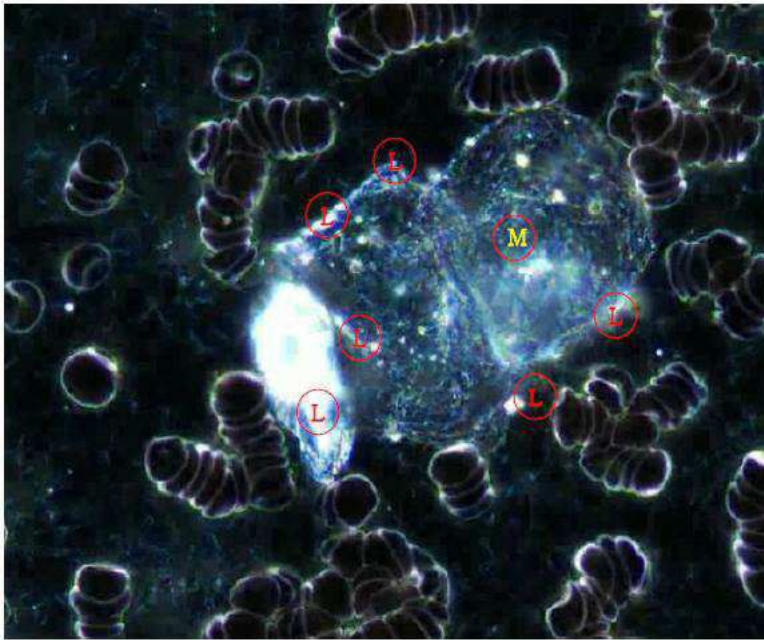
도면20



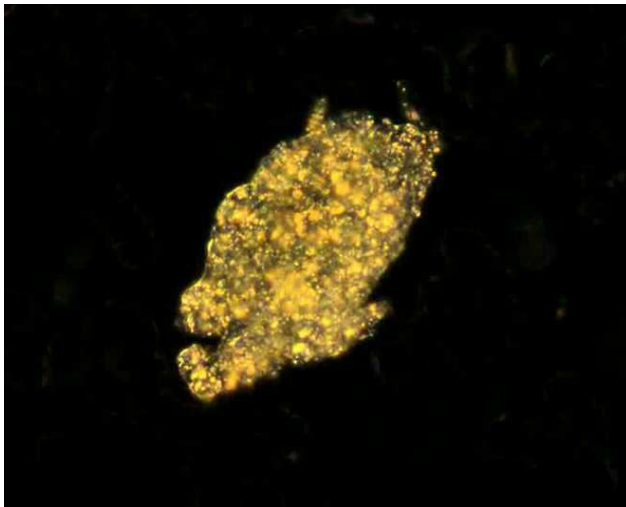
도면21



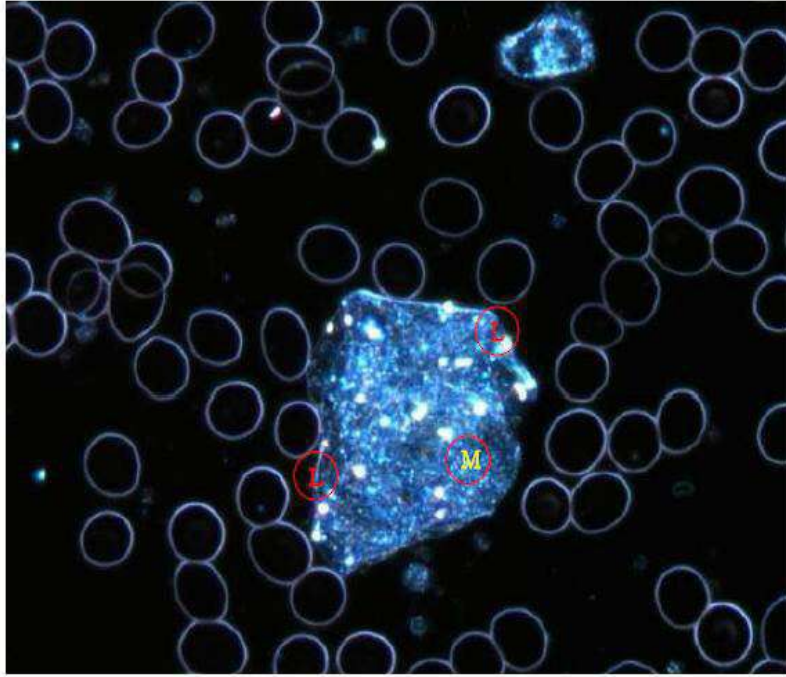
도면22a



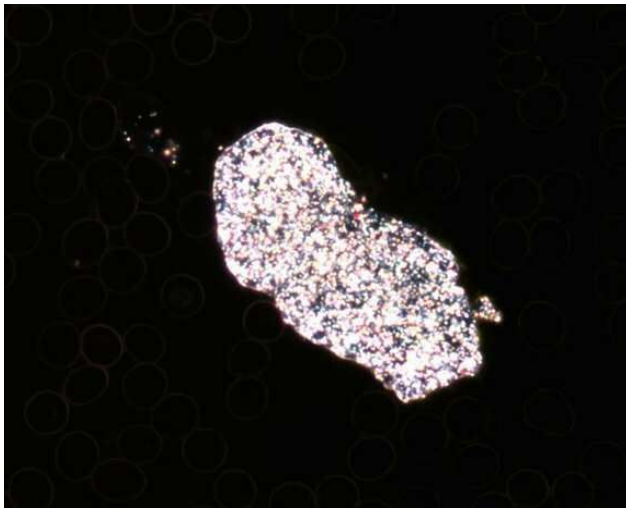
도면22b



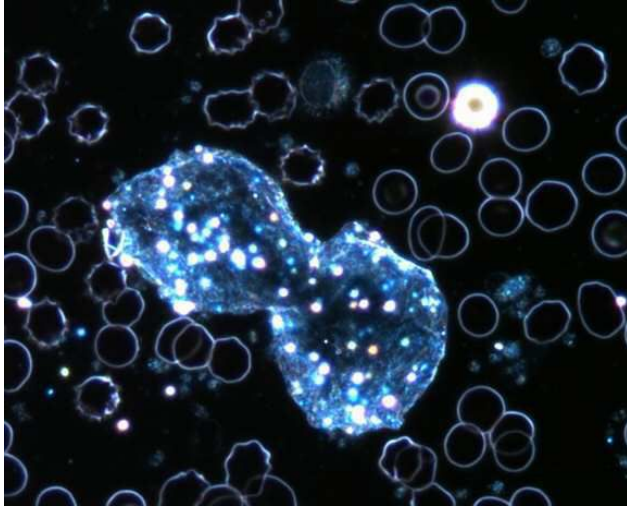
도면23a



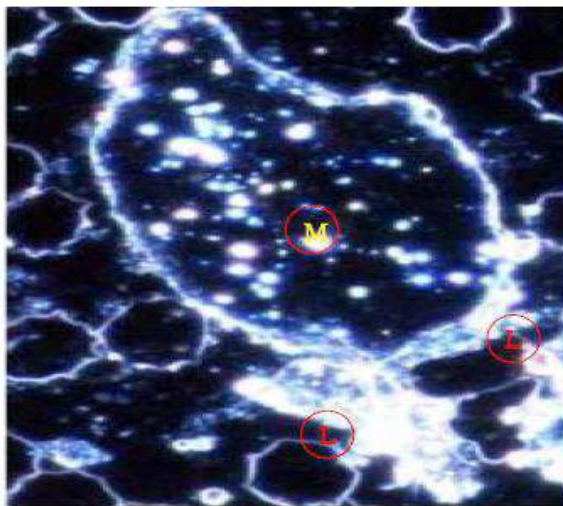
도면23b



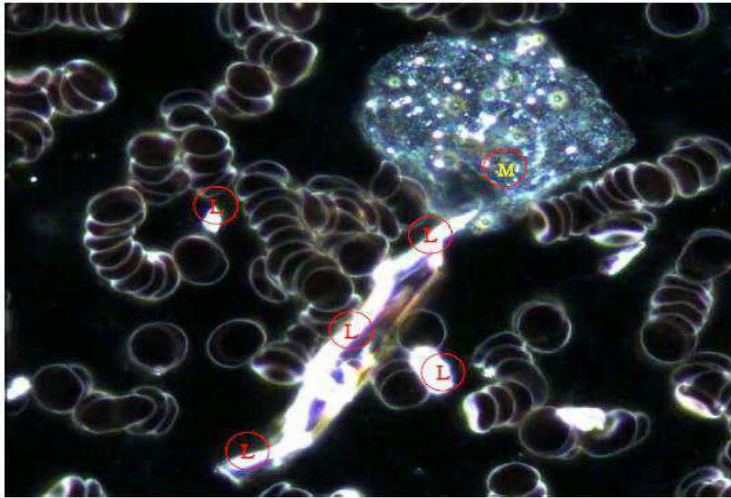
도면23c



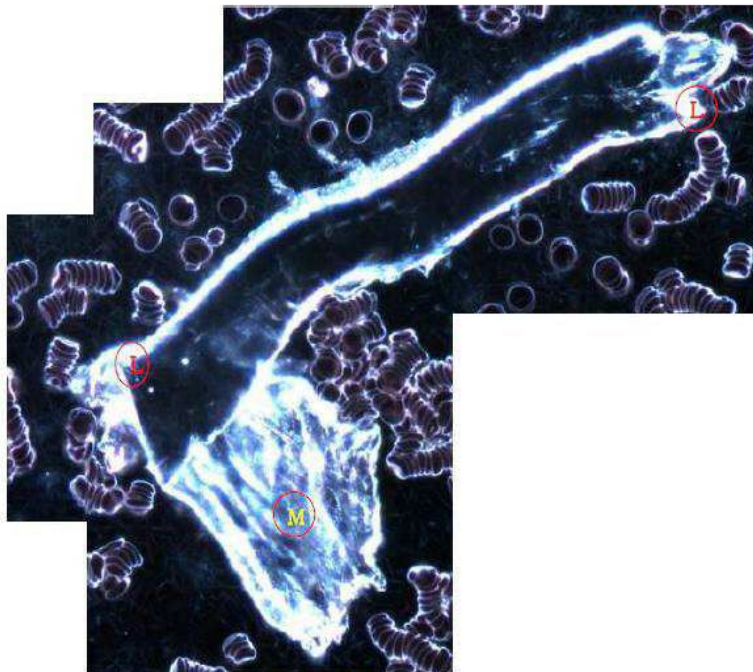
도면24



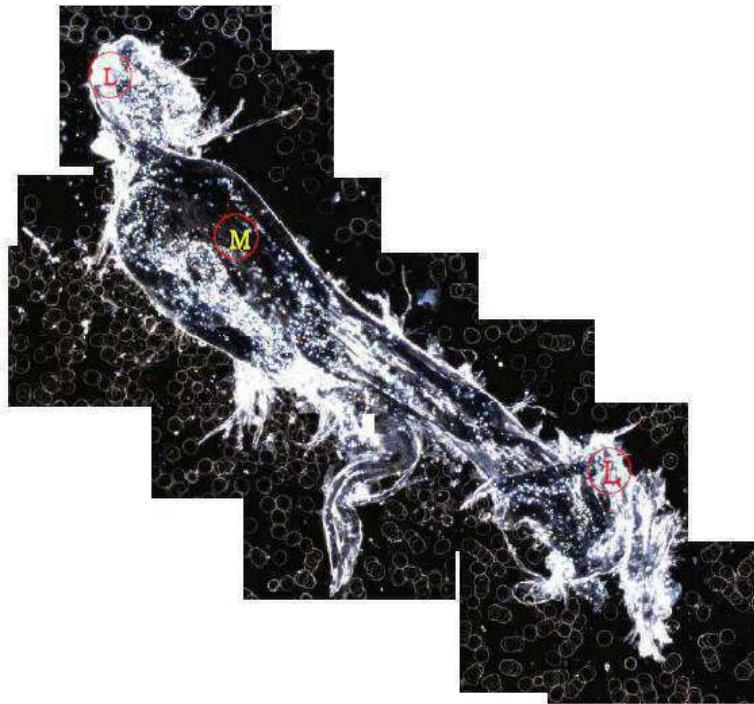
도면25a



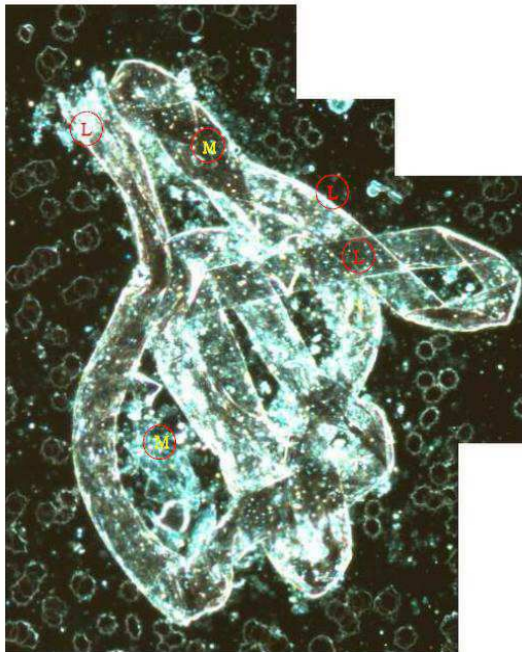
도면25b



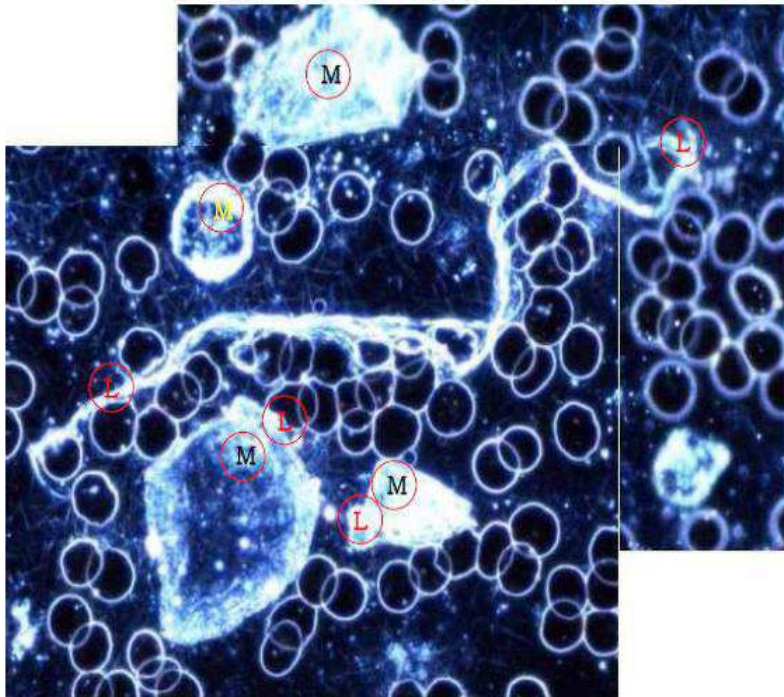
도면25c



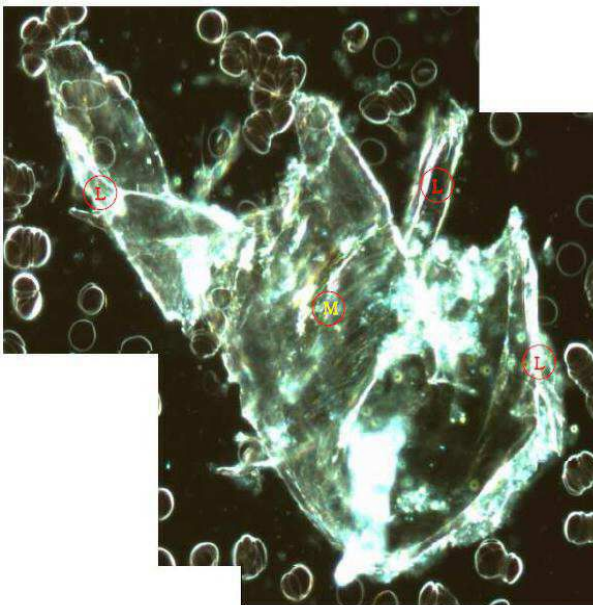
도면26



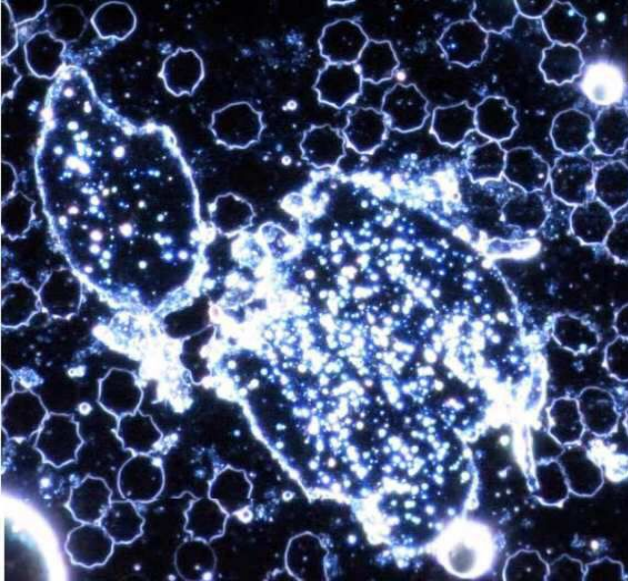
도면27



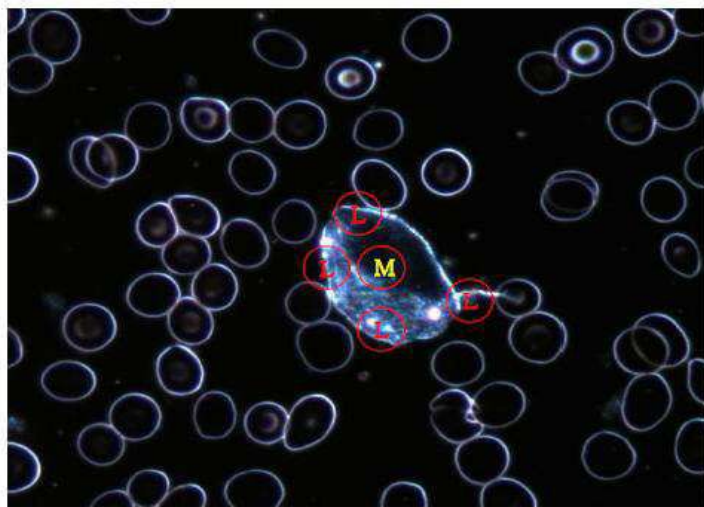
도면28



도면29



도면30



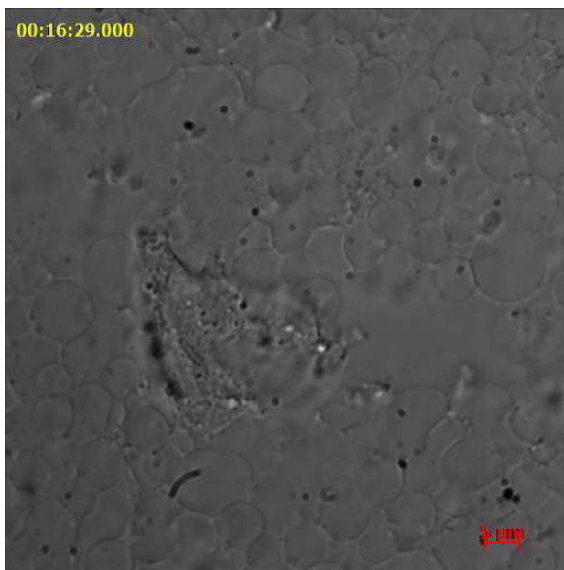
도면31



도면32a



도면32b



도면32c

