(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0117723
(43) 공개일자 2021년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/538 (2006.01) *C12Q 1/6876* (2018.01)
G01N 1/40 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/538 (2013.01)
C12Q 1/6876 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0034326
(22) 출원일자 2020년03월20일
심사청구일자 2020년03월20일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
이원종
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 102동 202호(전민동, 엑스포아파트)
양희철
인천광역시 연수구 원인재로 56, 118동 506호(동춘동, 현대아파트)
함유민
경기도 안산시 단원구 광덕2로 74(초지동, 그린빌주공12단지아파트)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

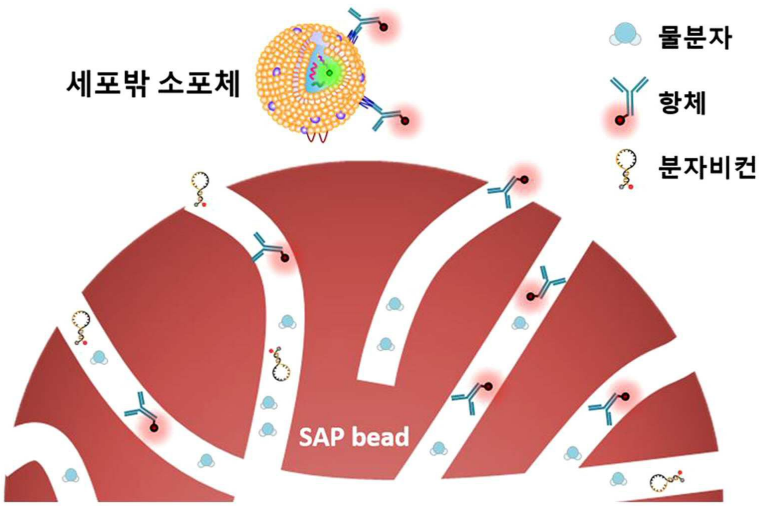
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **고흡습성 수지를 이용한 세포 또는 이의 분비물의 분리 및 농축방법**

(57) 요 약

본 발명은 항체와 핵산 분자로 다중 검출된 세포 또는 이의 분비물을 효과적으로 분리 및 농축하는 방법에 관한 것으로, 쉽고 효율적으로 목적하는 세포 또는 이의 분비물을 빠르게 농축시켜 형광신호를 증폭함으로써 세포 또는 이의 분비물을 이용한 다양한 연구에 활용할 수 있으며, 특히 다양한 병변 조직 및 세포에서 유래하여 특정 질환 마커를 발현하는 세포 또는 이의 분비물을 신속하게 검출함으로서 해당 질환에 대한 신뢰도 높은 진단 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
G01N 1/405 (2013.01)
C12Q 2523/308 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1A5A1010148
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	나노-생체유체 검사 연구단
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2016.06.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 세포 또는 이의 분비물을 포함하는 생물학적 샘플에, 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자 또는 이들의 조합을 첨가하는 단계; 및

2) 상기 1) 단계의 생물학적 샘플에 고흡수성 수지를 접촉시켜 상기 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하는 단계;를 포함하는 생물학적 샘플로부터 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고흡수성 수지(SAP)는 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리아크릴아미드 공중합체(polyacrylamide copolymer), 에틸렌 말레산 무수물 공중합체(ethylene maleic anhydride copolymer), 가교결합 카복시메틸셀룰로스(cross-linked carboxymethylcellulose), 폴리비닐알콜 공중합체(polyvinylalcohol copolymer), 가교결합 폴리에틸렌 산화물(cross-linked polyethylene oxide), 폴리아크릴로니트릴(polyacrylonitrile)의 전분 그라프트 공중합체(starch-grafted copolymer) 및 알지네이트(alginate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포는 혈액순환세포(circulating cell)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 세포의 분비물은 세포밖 소포체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 세포밖 소포체는 종양-유래 세포밖 소포체 또는 종양-유래 엑소좀인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 타겟 표면 단백질 검출용 항체는 CD9, CD63, CD81, EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule), EGFR(Epidermal growth factor receptor), Survivin 및 IGF-1R(Insulin-like growth factor 1 receptor)로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자는 분자비컨인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 분자비컨은 상기 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산을 중심으로 양 말단 각각에 형광물질과 퀀처가

표지되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 타겟 유전자는 miR-21, miR-574, miR-205, miR-92, miR-147, miR-141 및 miR-547로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 종양-유래 세포밖 소포체 또는 종양-유래 엑소좀은 유방암(breast cancer), 간암(liver cancer), 방광암(bladder cancer), 뇌암(brain cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 대장암(colorectal cancer), 식도암(esophageal cancer), 담낭암(gallbladder cancer), 두경부암(head and neck cancer), 신장암(kidney cancer), 폐암(소세포 또는 비-소세포)(lung cancer (small or non-small cell)), 흑색종(melanoma), 난소암(ovarian cancer), 생식세포암(ovary (germ cell) cancer), 전립선암(prostate cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 음경암(penile cancer), 피부암(skin cancer), 연조직 육종(soft-tissue sarcoma), 편평상피세포암(squamous cell carcinomas), 위암(stomach cancer), 고환암(testicular cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 담도암(bile duct cancer) 및 자궁암(uterine cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

a) 세포 또는 이의 분비물을 포함하는 생물학적 샘플에, 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자 또는 이들의 조합을 첨가하는 단계;

b) 상기 생물학적 샘플에 고흡수성 수지를 접촉시켜 질환 상기 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하는 단계; 및

c) 상기 분리 및 농축액의 형광강도를 측정하는 단계;를 포함하는 생물학적 샘플로부터 세포 또는 이의 분비물을 검출하는 방법.

청구항 12

세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자 또는 이들의 조합을 포함하는 제1상; 및

고흡수성 수지를 포함하는 제2상;을 포함하는 세포 또는 이의 분비물의 분리 및 농축용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 목적하는 세포 또는 이의 분비물을 신속, 정확하게 검출하기 위해, 항체와 핵산 분자로 다중검출된 이들 세포 또는 이의 분비물을 효과적으로 분리 및 농축하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 고흡수성 수지를 이용하여 미결합 항체 및 핵산 분자를 제거함으로써 검출 목적물을 분리 및 농축방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 혈액이나 세포 또는 다양한 생물학적 시료로부터 핵산, 세포 또는 이의 분비물을 분리 또는 농축하기 위한 장치는 생물학, 생화학, 분자의학, 법의학, 진단의학 등과 같은 다양한 분야에 널리 적용되고 있다. 시료의 분석 및 진단 분야가 비약적으로 성장하면서, 특정 표지 단백질 또는 유전자를 함유하는 세포 또는 이로부터 분리된 분비물들을 효율적으로 신속하게 분리 및 분류하고 정량하는 분석방법에 대한 개발 필요성이 높아지고 있다.

[0003] 세포밖 소포체는 대부분 세포에서 분비되는 크기가 50 내지 1,000 nm 사이의 작은 형태의 소포체(membrane vesicle)로, 혈액, 소변 등 체액에 존재하며 세포밖 소포체 내부에는 그 세포에서 유래된 다양한 종류의

단백질, 유전물질(DNA, mRNA, miRNA), 지질 등이 포함되어 있다.

[0004] 시료에서 세포 또는 이의 분비물을 분리할 때, 가장 중요한 것은 타겟 유전자 또는 타겟 표면 단백질에 대한 신호는 증가시키고, 배경신호는 감소(background signal을 낮춤)하여 signal to background(S/B) 신호를 높이는 데 있다. 그러나, 시료 내에 존재하는 세포 또는 세포밖 소포체(특히 엑소좀)는 소량 존재할 뿐만 아니라, 그 크기도 매우 작기 때문에 원심분리 등과 같은 일반적인 분리방법으로는 충분한 양을 얻을 수 없다. 충분한 양을 얻더라도, 검출 과정에서 세포밖 소포체와 같은 생체물질과 결합하지 않은 프로브로 인해 배경신호가 높아지게 된다.

[0005] 상기 미반응 프로브를 제거하기 위해서는 한외여과(Ultrafiltration)나 초원심분리(ultracentrifugation)등의 방법을 사용해왔으나, 소모성 재료와 고가 장치를 사용해야하는 등의 이슈가 있으며, 농축 및 세척 과정에서 상당량의 세포밖 소포체가 손실되거나 오염되는 등 또 다른 문제가 존재하였다.

[0006] 한편, 세포 또는 이의 분비물로부터 질병의 정확한 진단을 위해서는 이들 내부에 존재하는 핵산과 표면 단백질을 동시에 검출함으로써 신뢰도를 높일 수 있다. 종래에는 실시간 PCR과 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)를 각각 사용하였는데, 이는 핵산과 표면 단백질의 동시검출이 불가능하므로 여러 과정과 시간이 많이 소요되고, 실험자의 숙력도에 따라 결과가 달라지는 등 활용도가 매우 떨어지는 단점이 있다.

[0007] 따라서 본 발명에서는 고흡수성 수지를 활용하여 세포 또는 세포외 소포체와 같은 세포 분비물로부터 효과적으로 타겟 유전자와 표면 단백질을 동시에 검출할 수 있음에 착안하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허공보 제10-2012-0002943호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 항체와 핵산 분자를 통해, 높은 정확성과 재현성으로 생물학적 샘플로부터 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하고, 검출하기 위한 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 종래에 통상적으로 이용되는 초고속원심분리법 또는 항체 결합에 의한 단리 방법에서 벗어나 다중 바이오마커를 포함하는 세포 또는 이의 분비물을 고순도, 고품질로 회수할 수 있고, 이를 통해 목적세포 또는 이의 분비물의 양과 존재여부를 보다 정확하게 검출할 수 있음으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 생물학적 샘플로부터 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 목적은 생물학적 샘플로부터 세포 또는 이의 분비물을 검출하는 방법을 제공하는데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 목적은 세포 또는 이의 분비물의 검출용 키트를 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 1) 생체물질을 포함하는 생물학적 샘플에, 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자 또는 이들의 조합을 첨가하는 단계; 및

[0016] 2) 상기 1)의 생물학적 샘플에 고흡수성 수지를 접촉시켜 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하는 단계;를 포함하는 생물학적 샘플로부터 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하는 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 목적하는 세포 또는 이의 분비물의 특이적인 항체와 핵산분자를 검출하고, 이로부터 측정되는 형광신호를 쉽고 빠르면서 효율적으로 증폭시키며, 별도의 세척과정없이 배경신호는 감소시킴으로써, 높은 정확성과 재현성으로 생물학적 샘플로부터 목적하는 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하고, 검출하는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 종래에 통상적으로 이용되는 초고속원심분리법 또는 항체 결합에 의한 단리 방법에서 벗어나 고흡수성 수지를 사용하여 다중 바이오마커를 포함하는 세포 또는 이의 분비물을 고순도, 고품질로 회수할 수 있고, 이를 통해 특정 세포 또는 이의 분비물의 양과 존재여부를 보다 정확하게 검출할 수 있음을 발견하였다.

[0018] 본 발명에서 '분리'란 생물학적 샘플로부터 타겟 표면 단백질, 타겟 유전자 또는 이들을 동시에 함유하는 세포 또는 이의 분비물을 타겟 표면 단백질과 타겟 유전자를 함유하지 않은 불순물들과 구별하여 수득하는 것을 의미한다. 이때 타겟 표면 단백질 및/또는 타겟 유전자와 결합하지 않은 항체 및/또는 핵산분자가 흡수성 수지를 통해 제거되면서 시료 내 검출대상 물질의 농도 및 순도가 상승하게 된다.

[0019] 본 발명에서 '세포'란 혈액순환세포(circulating cell)로, 순환종양세포(circulating tumour cell), 순환내피세포(circulating endothelial cell) 및 순환내피전구세포(circulating endothelial progenitor cell)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 의미하며, 바람직하게는 순환종양세포(circulating tumour cell)일 수 있다.

[0020] 본 발명에서 순환종양세포(CTC)는 혈액 중에 종양세포가 순환하는 것으로, 순환종양세포의 분자적 특징 분석은 경과가 진전된 암환자들을 위한 새로운 진단 방법으로 활용되고 있다. 순환종양세포는 혈액 내 매우 적은 양이 포함되어 있어 종래 기술로는 검출이 어려웠으나, 본 발명을 통해서 간단한 공정을 통해, 특이적 표면 단백질과 유전자를 함유하는 순환종양세포의 신속한 분리 농축이 가능하다. 순환종양세포(CTC)는 10 내지 25 ㎛ 크기를 갖는다.

[0021] 본 발명에서 '세포의 분비물'이란 살아있는 세포로부터 분리되는, 세포 내에서 일정한 생물학적, 생리학적 작용을 담당하는 일련의 물질을 의미한다. 예를 들면, 세포의 분비물은 본 발명에서 분리 및 농축하고자 하는 단백질, 유전자, 핵산, 펩티드, 세포소기관, 지질, 당 또는 기타물질일 수 있다. 세포소기관은 핵, 미토콘드리아, 엽록체, 소포체, 골지체, 분비과립, 세포밖 소포체, 리소좀, 파고좀, 액포, 또는 퍼옥시좀일 수 있고, 바람직하게는 세포밖 소포체일 수 있다.

[0022] 상기 세포밖 소포체는 대부분 세포에서 분비되는 크기가 50 내지 1,000 ㎚ 사이의 작은 형태의 소포체(membrane vesicle)로, 혈액, 소변 등 체액에 존재하며 세포밖 소포체 내부에는 그 세포에서 유래된 다양한 종류의 단백질, 유전물질(DNA, mRNA, miRNA), 지질 등이 포함되어 있다.

[0023] 우선, 1) 세포 또는 이의 분비물을 포함하는 생물학적 샘플에, 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자 또는 이들의 조합을 첨가한다. 상기 1) 단계를 통해 특정 바이오마커(표면 단백질과 유전자)를 갖는 세포 또는 이의 분비물과 항체, 핵산 분자 및 이들의 혼합물이 결합하는 단계라고도 할 수 있다. 해당 바이오마커를 발현하지 않는 세포 또는 이의 분비물에서는 상기 항체와 핵산 분자가 결합되지 않고 용액 중에 잔류하게 된다.

[0024] 2) 상기 1)의 생물학적 샘플에 고흡수성 수지를 접촉시켜 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축한다. 도 1, 2를 참고하면 고흡수성 수지를 접촉시키면, 생물학적 샘플 중에서 미반응된 물질(상기 항체와 상기 핵산 분자 등)들은 물 분자와 함께 흡수되고, 항체와 핵산 분자로 포획된 세포 또는 이의 분비물은 고흡수성 수지 내에 흡수되지 않는다.

[0025] 따라서, 배경신호를 나타내는 미반응된 물질은 제거되고 특정 질환과 관련된 세포 또는 이의 분비물은 용액 중에 분리 및 농축된다. 이에 형광강도를 증폭시킬 수 있을 뿐만 아니라 배경신호 즉, 잡음의 감소로 정확한 형광신호를 제공할 수 있다.

[0026] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 분리 및 농축하고자 하는 세포 또는 이의 분비물은 병변 조직 및/또는 세포에서 유래하여 특정 질환 마커를 발현하는 질환 관련 세포 또는 이의 분비물일 수 있으며, 구체적으로 혈액순환세포(circulating cell) 또는 세포밖 소포체일 수 있고, 보다 바람직하게는 순환종양세포(CTC), 세포밖 소포체일 수 있다. 상기 세포 또는 이의 분비물이 순환종양세포(CTC), 세포밖 소포체인 경우 질환 특이적 표면 단백질 및/또는 유전자를 함유하는 세포 또는 이의 분비물의 신속한 분리 농축 및 이의 동정을 통해 해당 질환에 대한 신뢰도 높은 진단 정보를 얻을 수 있다.

[0027] 종래에는 정확한 검출을 위해, 미반응 물질을 제거하는데 고가의 장비, 고도의 방법들이 고안되었으나, 이는 과도한 비용을 발생시켰고, 신속한 처리가 불가능하였으며, 게다가 시료의 손실도 다량 발생하여 오히려 신호의 정확도를 떨어뜨리는 문제가 있었다.

[0028] 그러나, 본 발명은 상술한 문제점을 극복하면서도, 시료의 손실을 최소화하면서 단일 공정만으로 효율적으로 질환 관련 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축할 수 있으며, 미반응된 물질(상기 항체와 상기 핵산 분자 등)까지도 한번에 제거할 수 있기 때문에 매우 유용하다.

[0029] 상기 1) 단계의 생물학적 샘플 100 ㎕ 고흡수성 수지를 15 내지 100 mg포함하는 것이 바람직하다.

[0030] 본 발명에서 상기 생물학적 샘플은 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액 및 세포로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상이거나, 상기 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액 및 세포 중에서 어느 하나로부터 분리 및 단리된 세포 또는 이의 분비물일 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명에서 세포밖 소포체는 다양한 크기를 가지며, 특히 이중 크기가 가장 작은 엑소좀(exosome)은 40 ~ 200 nm의 작은 세포막성 수포이다. 세포밖 소포체는 인간과 동물은 물론, 곤충, 식물, 미생물 세포에서 분비된다. 특히 이들은 세포가 갖고 있는 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 등 특정 분자들을 포함하고 있으며, 지질이중층으로 둘러싸여 있어 이들 분자들을 안정적으로 보호하면서, 분비 후 다른 세포로 이들을 전달할 수 있는 특징이 있다. 생체 내 혈액, 소변, 침 등과 같은 체액에서 고농도로 발견되는 세포밖 소포체는 이런 특징으로 인해 새로운 생물학적 소재로서 가능성을 갖고 있다.

[0032] 본 발명에서 세포밖 소포체는 세포에서 생성되어 세포밖으로 분비되는 소포체로써, 엑소좀(exosome), 마이크로베시클(microvesicle), 마이크로파티클(microparticle) 등을 포함하고, 바람직하게는 40 내지 200 nm 크기의 엑소좀(exosome)일 수 있다.

[0033] 상기 생물학적 샘플에는 정상 세포 또는 이의 분비물과 질환 관련 생세포 또는 이의 분비물이 혼재되어 있다. 본 발명의 상기 방법은 단일 공정으로 질환 관련 바이오마커를 적어도 2개 이상 갖는 질환 관련 세포 또는 이의 분비물을 분리하는 능력을 제공하기 때문에, 배양된 세포로부터 직접적으로 질환 관련 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하기 위해 종래 기술과 같이 시간과 노동과 비용이 소요되는 절차들을 생략할 수 있다.

[0034] 특히, 본 발명에서 제공되는 정상 세포 또는 이의 분비물과 특정 질환에 대한 바이오마커를 2개 이상 포함하는 세포 또는 이의 분비물을 분리하는 능력은 질환 관련 세포 또는 이의 분비물의 존재를 확인 및 검출함으로써, 피검체의 생물학적 샘플로부터 특정 질환을 진단하는데 있어 매우 중요한 능력이다. 특히, 이와 관련하여 종양 세포로부터 종양 관련 바이오마커(miR-21, CD63)을 동시에 갖는 세포밖 소포체를 분리하는데 현저히 효과적임을 실험을 통해 확인하였다. 또한 본 발명의 방법은 단순히 질환 관련 세포 또는 이의 분비물을 분리하는데 그치지 않고, 높은 신호 대 배경신호(S/B)의 값으로 검출할 수 있으므로, 여러 방면에 매우 유용하다 할 수 있다.

[0035] 상기 타겟 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 추후 검출단계에서의 용이성을 위해 형광염료로 표지된 것이 바람직하다.

[0036] 상기 항체는 CD9, CD63, CD81, EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule), EGFR(Epidermal growth factor receptor), Survivin, IGF-1R(Insulin-like growth factor 1 receptor)로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체일 수 있다. 구체적으로 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule)은tumour-promoting functions을 가지는 signalling molecule로써 전립선암 조직 및 세포주에서 mRNA 및 단백질이 과발현되는 것으로 알려져 있고, EGFR(상피세포 성장인자 수용체)은 대장암, 폐암, 췌장암 등에서 과발현되어 종양을 유발하고, 또한 전립선암세포(in vitro) 전립선암환자(in vivo)의 엑소좀에서 과발현되는 것으로 알려져 있다. Survivin은 inhibitor-of-apoptosis(LAP) 단백질로 survivin이 전립선암 종양에서 과발현되면 좋지 않은 예후와 종양재발을 일으키는 것으로 보고되어 있다. IGF-1R(insulin-like growth factors 1 receptor)은 전립선 상피세포 증식을 자극하며, 전립선암 발생의 중요한 역할을 한다고 보고된 것으로써, 상기 타겟 표면 단백질들의 발현정도는 암 위험정도의 예측할 수 있는 암 바이오마커이다.

[0037] 상기 형광염료는 분자 고유의 파장에서 광여기에 의해 여기(excitation) 상태가 되면, 흡수한 에너지를 특정 파장의 빛으로 방출(emission)하며 기저 상태(ground level)로 되돌아가는 것을 특징으로 하는 물질이다.

[0038] 상기 형광염료는 알렉사555(Alexa555), 알렉사647(Alexa647), 보디피 TMR(bodipy TMR), Cy3, DY500, 로다민 레드-X(rhodamine Red-X), 스펙트럼오렌지(spectrum orange), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC), 테트라메틸 로다민 이소티오시아네이트(tetramethylrhodamine isothiocyanate,

TRITC), 알렉사플루오르(alexa fluor), 텍사스 레드(texas red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), 캐스캐이드 블루(cascade blue), DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole), 쿠마린(coumarine), 루시퍼 옐로우(lucifer yellow) 및 단실아마이드(dansylamide)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 형광염료는 여기(excitation) 및 발광(emission) 파장이 Alexa545인 경우에는 546 nm 및 576 nm 이고, Alexa555는 555 nm 및 580 nm이며, Bodipy TMR은 540 nm 및 580 nm이고, Cy3은 550 nm 및 570 nm이며, DY500은 500 nm 및 575 nm이고, 로다민 레드-X(rhodamin Red-X)는 580 nm 및 590 nm이며, 스펙트럼 오렌지(spectrum orange)는 550 nm 및 590 nm이다.

[0040] 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자는 상기 타겟 유전자를 특이적으로 인식하여 결합할 수 있는 것이라면 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 발명에서 '타겟 유전자'란 피검자로부터 특정 질환을 진단할 수 있는 물질로, 보다 바람직하게는 핵산 바이오마커이고, 가장 바람직하게는 miRNA이다. 세포밖 소포체 내에는 DNA보다 RNA 양이 많기 때문에 miRNA를 이용할 경우 기존의 DNA를 이용하는 기술보다 효율적으로 검출이 가능하다.

[0042] 상기 핵산 분자는 세포 또는 이의 분비물에 존재하면서 특정 miRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 서열을 갖는 선형의 DNA 또는 RNA일 수 있고, 상기 RNA는 mRNA, miRNA, snoRNA, snRNA, rRNA, tRNA, siRNA, hnRNA, shRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있는데, 바람직하게는 상기 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산을 중심으로 양 말단 각각에 형광물질과 퀀처가 표지되어 있는 분자비컨일 수 있다.

[0043] 상기 분자비컨(molecular beacon)은 세포 또는 이의 분비물에 존재하는, 특정 질환의 바이오마커인 타겟 유전자와 상보적으로 결합하는 핵산 영역, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있는 형광물질 및 상기 핵산의 타단에 결합된 퀀처(quencher)를 포함한다.

[0044] 상기 분자비컨은 타겟 유전자와 결합할 수 있는 부분인 고리(loop)부분과 타겟 유전자가 존재하지 않는 환경에서 헤어핀 고리를 형성하도록 하는 줄기(stem)부분으로 구성된다. 고리(loop)부분은 특정 miRNA 종류와 miRNA 전체서열을 타겟하는지, 부분을 타겟하는지 등에 따라서 달라질 수 있으며, 줄기(stem)부분은 각 분자비컨마다 효율에 따라 달라질 수 있다.

[0045] 구체적으로 상기 분자비컨은 특정 miRNA가 존재하지 않는 환경에서 헤어핀 고리를 형성하도록 핵산 영역의 양 말단이 상보적인 5' 및 3' 서열을 갖는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 분자비컨은 주쇄 폴리뉴클레오티드를 중심으로 양 말단에 헤어핀 구조를 형성하도록 상보적인 5' 및 3' 서열을 가지는 것일 수 있다. 상기 주쇄 폴리뉴클레오티드는 타겟 유전자에 대해 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도로도 충분히 상보적인 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0046] 본 발명에서 "상보적"은 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건하에서 본 발명의 타겟 유전자에 대하여 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 상기 용어 "상보적"은 완전히 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 핵산 영역이 miR-21(hsa-miR-21), miR-574(hsamiR-574), miR-205(hsa-miR-205), miR-92(hsa-miR-92), miR-147(hsa-miR-147), miR-141(hsa-miR-141) 또는 miR-547(hsa-miR-547)의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.

[0047] 상기 분자비컨의 핵산 영역은 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하고, 타겟 유전자에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것일 수 있다.

[0048] 상기 분자비컨의 형광물질은 Cyanine 계열 형광분자, Rodamine 계열 형광분자, Alexa 계열 형광분자, FITC(fluorescein isothiocyanate) 형광분자, FAM(5-carboxy fluorescein) 형광분자 및 Texas Red 형광분자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 플루오레세인(Fluorecein), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 바이오디피-FL(Biodipy-FL), 알렉사 플루오르 그린(Alexa Fluor Green), R-피코에리트린(R-phycoerythrin), 텍사스레드(TexasRed), 피코에리트린-텍사스 레드(Phycoerythrin-Texas Red), 로다민(rhodamine), 알렉사(alexa), 시아닌(cyanine; Cy3, Cy3.5, Cy5), 피코에리트린-시아닌5(Phycoerythrincyanine5), 피코에리트린-시아닌7(Phycoerythrin-cyanine7), 페리디닌-클로로필 단백질(Peridinin-chlorophyll protein), 알로피코시아닌(Allophycocyanin), 알로피코시아닌-시아닌7(Allophycocyanin-cyanine7), o-프탈데히드(phthaldehyde), 플루오르카민 (fluorescamine), 보디피(BODIPY), 쿠마린(coumarin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 보다 바람직

하게는 Cy3일 수 있다.

[0049] 본 발명은 보다 정확한 검출을 위해 상기 분자비컨의 형광물질은 상기 항체의 형광염료와 서로 상이한 소재인 것이 바람직하다.

[0050] 상기 분자비컨의 퀀처는 QSY계 dye, dabsyl, dabcyl, 블랙홀 퀀처(blackhole quencher, BHQ) 및 블랙베리 퀀처(blackberry quencher, BBQ)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 블랙홀 퀀처(blackhole quencher, BHQ)일 수 있으며, 보다 바람직하게는 BHQ2일 수 있다.

[0051] 상기 분자비컨은 타겟 유전자(바람직하게는 특정 miRNA)가 존재하지 않는 환경에서, 상기 분자비컨의 핵산 영역의 양 말단이 서로 밀접하게 상호작용하여 결합을 형성함에 따라 상기 핵산이 헤어핀 구조로 형성되게 된다. 이로 인해 상기 핵산의 양 말단 각각에 결합되어 있는 형광물질과 퀀처가 FRET가 발생하도록 근접하기 때문에 평상시에 분자비컨은 형광을 발하지 않는다.

[0052] 그러나, 생물학적 샘플의 세포 또는 이의 분비물 중에서, 타겟 유전자가 존재하는 세포 또는 이의 분비물이 있다면, 상기 분자비컨과 타겟 유전자가 혼성화되어 상기 분자비컨의 헤어핀 형태 2차 구조가 붕괴되고, 선형으로 구조가 개방되면서, 상기 분자비컨의 핵산 영역 말단에 결합되어 있는 형광물질과 퀀처의 거리도 멀어지게 된다. 따라서 형광물질에 영향을 미치던 퀀처의 FRET 효과가 사라짐에 따라 분자비컨으로부터 형광이 관찰되게 되는 것이다.

[0053] 본 발명에서 고흡수성 수지(Super Absorbent Polymer, SAP)란 함수율 및 물성조절을 위하여 고분자 사슬 간의 가교 결합을 한 3차원 망상구조를 갖는 것으로, 자체 무게의 최대 300배 까지 수분을 흡수할 수 있는 기능을 가진 합성 고분자 물질이다. 개발업체마다 SAM(Super Absorbency Material), AGM(Absorbent Gel Material) 등 각기 다른 이름으로 명명하고 있다. 상기와 같은 고흡수성 수지는 생리용구로 실용화되기 시작해서, 현재는 어린이용 종이기저귀 등 위생용품 외에 원예용 토양보수제, 토목, 건축용 지수재, 육묘용 시트, 식품유통분야에서의 신선도 유지제, 및 찜질용 등의 재료로 널리 사용되고 있다.

[0054] 가장 널리 사용되는 고흡수성 수지들 중 하나가 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 즉 폴리아크릴산(polyacrylic acid)의 염이다. 예를 들어, 폴리아크릴산의 나트륨 염(가교결합 폴리아크릴산나트륨, crosslinked sodium polyacrylate)이 개시제(initiator)의 존재 하에 수산화나트륨과 혼합된 아크릴산을 중합함으로써 제조될 수 있다.

[0055] 다른 고흡수성 수지로는 폴리아크릴아미드 공중합체(polyacrylamide copolymer), 에틸렌 말레산 무수물 공중합체(ethylene maleic anhydride copolymer), 가교결합 카복시메틸셀룰로스(cross-linked carboxymethylcellulose), 폴리비닐알콜 공중합체(polyvinylalcohol copolymer), 가교결합 폴리에틸렌 산화물(cross-linked polyethylene oxide) 및 폴리아크릴로니트릴(polyacrylonitrile)의 전분 그라프트 공중합체(starch-grafted copolymer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0056] 본 발명에 사용될 수 있는 다른 종류의 고흡수성 수지는 알지네이트(alginate), 즉 알긴산의 염이다. 이런 재료는 자연적으로 갈조류의 세포벽에 풍부한 점성검(viscous gum)으로 존재하며, 상업적인 형태는 해조류로부터 추출된다. 알긴산은 (1-4)-결합 β-D-마누로네이트((1-4)-linked β-D-mannuronate)와, 상이한 배열과 블록으로 함께 공유결합된 그 C-5 에피머 α-L-굴루로네이트 잔기(C-5 epimer α-L-guluronate residues)의 호모폴리머 블록들을 가진 선형 공중합체이다.

[0057] 본 발명에서 상기 고흡수성 수지는 상기와 같은 통상적으로 사용가능한 고흡수성 수지라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게 1~5 nm 평균 직경의 이동통로 크기(water channel size)를 갖는 것일 수 있고, 본 발명의 실시예에서는 고흡수성 수지로 준사이언스(3006417364)로부터 구매한 2 nm 직경의 고흡수성 수지 비드를 사용하였다.

[0058] 상기 방법을 통해 분리 및 농축된 세포 또는 이의 분비물은 질환 관련 바이오마커를 갖는 세포 또는 이의 분비물일 수 있으며, 상기 질환은 세포 또는 이의 분비물에 존재하는 바이오마커를 통해 검출가능한 질환이라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 종양(cancer)일 수 있다.

[0059] 상기 종양은 유방암(breast cancer), 간암(liver cancer), 방광암(bladder cancer), 뇌암(brain cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 대장암(colorectal cancer), 식도암(esophageal cancer), 담낭암(gallbladder cancer), 두경부암(head and neck cancer), 신장암(kidney cancer), 폐암(소세포 또는 비-소세포)(lung cancer (small or non-small cell)), 흑색종(melanoma), 난소암(ovarian cancer), 생식세포암(ovary (germ cell)

cancer), 전립선암(prostate cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 음경암(penile cancer), 피부암(skin cancer), 연조직 육종(soft-tissue sarcoma), 편평상피세포암(squamous cell carcinomas), 위암(stomach cancer), 고환암(testicular cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 담도암(bile duct cancer) 및 자궁암(uterine cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0060] 상기 세포 분비물은 세포로부터 분리되는, 세포에서 작용하는 모든 물질을 의미하는 것일 수 있고, 바람직하게는 세포밖 소포체이며, 상기 세포밖 소포체는 질환 관련 바이오마커를 갖는 것일 수 있는데, 구체적으로 종양-유래 세포밖 소포체 또는 종양-유래 엑소좀일 수 있다. 이를 분석하기 위해, 문헌에 기재된 바와 같은 넓은 범위의 바이오마커 중 적어도 1개 이상, 바람직하게는 적어도 2개 이상이 존재하는 것일 수 있다.

[0061] 본 발명에서 상기 종양-유래 엑소좀은 유방암(breast cancer), 간암(liver cancer), 방광암(bladder cancer), 뇌암(brain cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 대장암(colorectal cancer), 식도암(esophageal cancer), 담낭암(gallbladder cancer), 두경부암(head and neck cancer), 신장암(kidney cancer), 폐암(소세포 또는 비-소세포)(lung cancer (small or non-small cell)), 흑색종(melanoma), 난소암(ovarian cancer), 생식세포암(ovary (germ cell) cancer), 전립선암(prostate cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 음경암(penile cancer), 피부암(skin cancer), 연조직 육종(soft-tissue sarcoma), 편평상피세포암(squamous cell carcinomas), 위암(stomach cancer), 고환암(testicular cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 담도암(bile duct cancer) 및 자궁암(uterine cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상으로부터 유래된 것일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 본 발명의 다른 양태에 따르면, a) 세포 또는 이의 분비물을 포함하는 생물학적 샘플에, 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 및 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자를 첨가하는 단계;

[0063] b) 상기 a) 단계의 생물학적 샘플에 고흡수성 수지를 접촉시켜 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하는 단계; 및

[0064] c) 상기 b) 단계로부터 회수된 분리 및 농축액의 형광강도를 측정하는 단계;를 포함하는 생물학적 샘플로부터 세포 또는 이의 분비물을 검출하는 방법을 제공한다.

[0065] 상기 a) 단계 및 b) 단계는 '생물학적 샘플로부터 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하는 방법'에 구체적으로 설명하고 있으므로, 이를 참고로 하고, 반복되는 내용은 생략하였다.

[0066] 최종적으로 c) 단계는, 상기 b) 단계로부터 회수된 분리 및 농축액의 형광강도를 측정하여, 생물학적 샘플로부터 세포 또는 이의 분비물의 존재여부 또는 정량적 농도를 분석하였다.

[0067] 상기 생물학적 샘플로부터 얻은 형광강도를 대조자의 형광강도와 비교하여, 특정 질환을 진단하기 위한 정보를 제공할 수도 있다.

[0068] 예컨대, 상기 생물학적 샘플에 존재하는 세포 또는 이의 분비물 중에서, 혈액순환세포, 특정 질환의 바이오마커를 포함하는 소포체를 포함하는 예를 들어 질환 관련 세포 또는 이의 분비물이 있다면, 상기 핵산 분자와 항체가 결합되어 질환 관련 세포 또는 이의 분비물을 포획한다. 이후 고흡수성 수지와의 접촉을 통해, 배경신호를 나타내는 미반응 물질(항체 또는 핵산분자)를 물분자와 함께 제거되면서, 상기 핵산 분자와 항체가 결합된 질환 관련 세포 또는 이의 분비물은 고농도로 남게 된다.

[0069] 따라서 형광강도를 측정하면 상기 핵산 분자와 항체로부터 형광을 발하게 되므로, 형광강도를 측정하여 '표면 단백질 및 타겟 유전자를 모두 가지고 있는 세포 또는 이의 분비물'이 존재하는지 여부를 검출할 수 있는 것이다. 이를 통해 특정 질환에 대한 진단에도 활용할 수 있다.

[0070] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 및 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자를 포함하는 제1상; 및 고흡수성 수지를 포함하는 제2상;을 포함하는 세포 또는 이의 분비물의 분리 및 농축용 키트를 제공하는 것이다.

[0071] 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 항체와 상기 세포 또는 이의 분비물에 포함된 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자 및 고흡수성 수지는 '생물학적 샘플로부터 질환 관련 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축하는 방법'에 구체적으로 설명하고 있으므로, 이를 참고로 하고, 반

복되는 내용은 생략하였다.

[0072] 제1상과 제2상은 별도의 용기에 개별 포장되어 있는 것이 바람직하다. 제1상을 투여하여 질환 관련 세포 또는 이의 분비물을 포획하고, 제2상을 투여하여 질환 관련 세포 또는 이의 분비물을 분리 및 농축할 수 있다. 상기 키트를 통해 농축된 용액의 형광강도를 측정하여 질환 관련 세포 또는 이의 분비물의 존재유무와 정량적인 농도까지 확인할 수 있다. 또한, 대조자와의 형광강도를 비교하여 질환 진단을 위한 정보도 제공할 수 있다.

[0073] 본 발명에 따라 항체와 핵산 분자로 포획된 세포 또는 이의 분비물은 고흡수성 수지에 흡수되지 않고, 미반응 물질들과 물 분자들이 고흡수성 수지를 통해 제거됨으로써, 형광강도 측정시 배경신호는 현저히 감소하고 신호는 증가함을 확인한 바, 이는 생물학적 샘플로부터 다중 바이오마커를 갖는 세포 또는 이의 분비물을 보다 정확하게 측정할 수 있음을 알 수 있다. 결국 극미량의 세포 또는 이의 분비물이라도 측정이 가능하며, 종래 기술의 문제점을 해결하고, 다중 바이오마커를 갖는 세포 또는 이의 분비물을 정확하게 측정하여 특정 질환의 정밀한 진단을 할 수 있게 되었다.

발명의 효과

[0074] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0075] (ⅰ) 본 발명은 목적하는 세포 또는 이의 분비물의 분리, 농축에 있어 고흡수성 수지(SAP)를 이용하여 세척과정 없이 배경신호를 감소시키고 형광신호를 증폭시킬 수 있다.

[0076] (ii) 본 발명의 방법은 쉽고 효율적으로 세포 또는 이의 분비물을 빠르게 농축시켜 형광신호를 증폭함으로써 질환 관련 세포 또는 이의 분비물을 이용한 다양한 연구에 활용할 수 있다.

[0077] (iii) 본 방법은 검출에 필요한 조작 시간, 과정, 노동 및 비용을 획기적으로 절감할 수 있는 기술로서 특히 다양한 병변 조직 및 세포에서 유래하여 특정 질환 마커를 발현하는 세포 또는 이의 분비물을 신속하게 검출함으로서 질병 진단, 예후 및 치료 반응을 위한 고효율 분석에 매우 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 고흡수성 수지를 이용하여 생물학적 샘플로부터 질환 관련 세포밖 소포체를 분리 및 농축하는 방법의 원리를 간략하게 나타낸 모식도이다. 단일과정으로 생물학적 샘플로부터 질환 관련 세포밖 소포체를 제외한 미반응 물질들을 제거할 수 있음을 알 수 있다.

도 2는 고흡수성 수지를 이용하여 생물학적 샘플로부터 질환 관련 세포밖 소포체를 증폭, 검출하는 방법의 원리를 간략하게 나타낸 모식도이다. 상술한 미반응 물질들의 제거됨에 따라 질환 관련 세포밖 소포체 검출 신호가 증폭됨을 알 수 있다.

도 3은 초기 고흡수성 수지와 PBS 완충액과 접촉시켰을 때, 증가한 고흡수성 수지의 크기를 비교한 것이다.

도 4는 고흡수성 수지와 PBS 완충액과 접촉시켰을 때, 접촉시간에 따른 PBBS 완충액의 부피변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 5는 서로 다른 용량의 고흡수성 수지와 PBS 완충액과 접촉시켰을 때, 접촉시간에 따른 PBBS 완충액의 부피변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 6은 제1군(PBS), 제2군(exosome), 제3군(MB21) 및 제4군(exosome MB21)에 각각 고흡수성 수지를 넣은 것(W/ SAP)과 고흡수성 수지를 넣지 않은 것(W/O SAP)로부터 얻은 시료로부터 측정된 Cy3의 형광신호(signal)를 나타낸 그래프이다. 상기 형광신호는 분자비컨의 형광물질(Cy3)에 의한 것으로, 이는 세포밖 소포체에 핵산 바이오마커(miR-21)가 존재함을 나타내는 것이다.

도 7은 제1군(PBS), 제2군(exosome), 제3군(MB21) 및 제4군(exosome MB21)에 각각 고흡수성 수지를 넣은 것(W/ SAP)과 고흡수성 수지를 넣지 않은 것(W/O SAP)로부터 얻은 시료로부터 측정된 Alexa647의 형광신호(signal)를 나타낸 그래프이다. 상기 형광신호는 CD63-Alexa647의 형광물질(Alexa647)에 의한 것으로, 이는 세포밖 소포체에 CD63 표면 단백질이 존재함을 나타내는 것이다.

도 8은 제4군(exosome MB21)에 고흡수성 수지를 넣은 경우(W/ SAP), 고흡수성 수지를 넣지 않은 경우(W/O SAP)얻어진 시료에 대한 miR-21 signal to background(S/B) 값을 각각 계산하여 나타낸 그래프이다. 이때, 배경신호(background)는 제3군(MB21)의 시료에서 측정된 형광강도를 사용하였다.

도 9는 제4군(exosome MB21)에 고흡수성 수지를 넣은 경우(W/ SAP), 고흡수성 수지를 넣지 않은 경우(W/O SAP)얻어진 시료에 대한 CD63 signal to background(S/B) 값을 각각 계산하여 나타낸 그래프이다. 이때, 배경신호(background)는 제3군(Alexa647)의 시료에서 측정된 형광강도를 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0080] **실시예**

[0081] ***고흡수성 수지의 흡수율 확인***

[0082] 비드형태의 입자 크기가 2 mm인 고흡수성 수지(준사이언스 3006417364)의 흡수율을 확인하고자 하였다. 우선 PBS(phosphate buffered saline) 완충액에 서로 다른 용량의 고흡수성 수지를 넣고, 접촉시간과 고흡수성 수지의 용량에 따른 흡수율을 계산하였다.

[0083] 구체적으로 PBS 완충액 500 ㎕를 Micro Centrifuge Tube(SPL)에 담고, 여기에 1 개의 고흡수성 수지(19.2 mg)를 첨가한 다음, 80분 동안(접촉시간) 놓아두었다(도 3, 도 4). 반응시작 시점부터 10분 마다 남아있는 용액의 양을 피펫을 이용하여 측정하였다. 고흡수성 수지의 개수(5, 10, 12개)를 달리하여 30분 동안 PBS 완충액 500 ㎕과 접촉시키고, 최종 남아있는 PBS 완충액 부피를 측정하였다(도 5).

[0084] 도 3, 4에 따르면, 접촉시간이 증가할수록 PBS 완충액의 부피가 현저히 줄어들고, 고흡수성 수지의 부피는 증가함을 확인하였다.

[0085] 도 5에 나타낸 바와 같이, 고흡수성 수지의 사용량(개수)가 증가할수록 흡수율이 크게 증가함을 확인하였다. 검출시간을 고려하였을 때 시료 100 ㎕ 고흡수성 수지 19.2 내지 96 mg(1 내지 5개) 포함하는 것이 바람직하고, 38.4mg(2개)인 것이 가장 바람직하다.

[0086] ***HeLa 세포로부터 질환 관련 세포밖 소포체 분리, 농축 및 검출***

[0087] 1) 암 질환 세포밖 소포체를 분리, 농축 및 검출하고자 하였다. 이를 위해 우선 HeLa 세포로부터 세포밖 소포체를 분리하기 위하여, 우선 Exo-Quick exosome 분리키트(Invitrogen)를 사용하였다. HeLa 세포를 10% FBS(소태아혈청, Biowest, France) 및 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies, USA)을 함유하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Biowest, France)에서 배양하였다. 상기 세포들을 100 mm 접시(dish)에서 37℃ 및 5% CO_2 조건으로 유지하였다. 50 ㎖ FALCON tube(SPL)에 상기 세포 배양액 10 ㎖ 넣고 15분간 3000 G force로 (Centrifuge, 한일과학산업, Combi-514R) 원심분리하여 cell debris(세포 파괴물)를 제거하였다. 상기 세포 파쇄물의 상층액 10 ㎖를 회수하고, 여기에 Exo-Quick solution 2 ㎖(5 : 1 비율)를 혼합한 다음, 4℃에서 16 시간동안 배양하였다. 세포 파쇄물의 상층액과 Exo-Quick 혼합액을 30 분동안 1500 G force로 원심분리한 후, 상층액은 제거하고 바닥에 남아있는 펠렛(pellet)을 회수하였다. 상기 펠렛에 33 ㎕의 N.F.PBS(nuclease free phosphate buffered saline)를 첨가하여 피펫팅을 통해 용해하였다. 분리된 세포밖 소포체에는 암 질환 세포밖 소포체와 그렇지 않은 세포밖 소포체가 혼재되어 있다. 이로부터 암 질환을 진단하기 위해서는 암 질환과 관련된 복수의 바이오마커(CD63, miR-21)를 갖는 세포밖 소포체(질환 관련 세포밖 소포체, 또는 표적 세포밖 소포체라고도 한다)를 검출해야 한다. 본 발명의 실시예에서는 다중 바이오마커 검출을 위해 하기의 분자비컨과 형광표지된 항체를 사용하였다.

[0088] 2) Cy3 형광물질이 표지되어 있는 분자비컨(Molecular beacon)(IDT, 5'-Cy3-GCG CGT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA CGC GC-BHQ2-3') 및 Alexa647 형광물질이 표지되어있는 CD63(BD Bioscience)(이하, 'CD63-Alexa647'이라고도 한다)을 준비하였다. 이후 상기 분자비컨과 CD63-Alexa647을 하기 반응조건에 따라 상기 1) 단계를 통해 얻은 세포밖 소포체에 첨가하였다. 하기 4개의 실험군을 Micro Centrifuge Tube에 각각 넣은 후, 37℃에서 1시간 동안 반응키고, 50 ㎕ 씩 회수하여 형광을 측정하였다.

[0089] 제1군(PBS) : PBS 용액 500 ㎕만 첨가함

[0090] 제2군(exosome) : PBS 완충액에 2 x 10^7 par/㎕의 농도로 세포밖 소포체가 혼합된 용액 500 ㎕를 첨가함

[0091] 제3군(MB21, Alexa647) : 100 nM 농도의 분자비컨이 용해된 PBS 완충액 500 ㎕에, CD63-Alexa647 1 ㎕를 첨가

함

[0092] 제4군(exosome, MB21, Alexa647) : PBS 완충액에 2 x 10^7 par/㎕ 농도의 세포밖 소포체, 100 nM 농도의 분자비컨을 혼합한 용액 500 ㎕를 준비하고, 여기에 CD63-Alexa647 1 ㎕을 혼합하여 제조함

[0093] 3) 상기 4개의 실험군을 이등분한 후, 하나에는 고흡수성 수지(SAP bead)를 첨가하고(W/ SAP), 다른 하나에는 SAP bead를 첨가하지 않고(W/O SAP), 4℃에서 30분 동안 반응시킨 총 8개의 시료에 대한 최종 용액의 부피와 형광강도를 측정하였다. 이때 고흡수성 수지(SAP bead)는 500 ㎕에 10개를 첨가하였다.

[0094] ***고흡수성 수지의 존재 유무에 따른 형광 신호 증폭 정도 분석***

[0095] 상기 제1군(PBS), 제2군(exosome), 제3군(MB21, Alexa647) 및 제4군(exosome, MB21, Alexa647)에 각각 고흡수성 수지를 넣어 분리 및 농축한 시료(W/ SAP)에는, 각각 최종 용액의 부피가 약 50 ㎕만 남아있음을 확인하였다. 고흡수성 수지를 넣지 않은 시료(W/O SAP)에는 500 ㎕ 그대로 존재하였다.

[0096] 상기 각각의 군으로부터 회수한 시료를 384 웰 플레이트(corning)의 각 웰에 넣고, varioskan flash(Thermo)를 이용하여 각각의 형광물질에 대한 형광세기를 측정하였다(도 6, 7).

[0097] 도 6, 7에 나타난 바와 같이, 고흡수성 수지로 분리, 농축한 시료(W/ SAP)는 고흡수성 수지로 분리 및 농축하지 않은 시료(W/O SAP)에 비해 2~3 배 이상 현저히 신호세기가 강함을 알 수 있다.

[0098] ***고흡수성 수지의 존재 유무에 따른 signal to background(S/B) 분석***

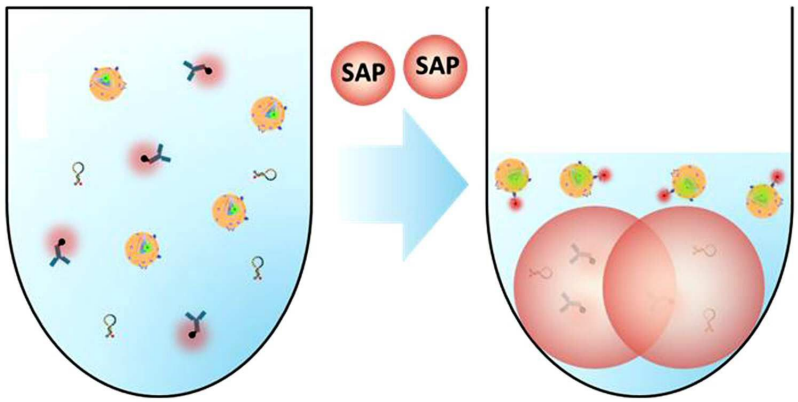
[0099] 제4군(exosome, MB21, Alexa647)에 고흡수성 수지를 넣어 분리 및 농축한 시료(W/ SAP)와 고흡수성 수지를 넣지 않은 시료(W/O SAP)를 회수하고, 각각의 형광물질에 대한 형광세기를 측정하였다. 이후 signal to background(S/B) 신호를 구하기 위해, 각 시료로부터 측정된 형광신호를 신호(signal)로 하였다. 이때, 형광물질(Cy3 및 Alexa647)만을 넣은 제3군의 형광신호를 배경신호(background signal)로 함으로써, 신호를 배경신호로 나누어 signal to background(S/B)를 계산하였다(도 8, 9).

[0100] 도 8 및 9에 나타난 바와 같이, 고흡수성 수지로 질환 관련 세포밖 소포체를 분리 및 농축한 시료(W/ SAP)의 S/B가 크게 증가하였음을 확인하였다. 이를 통해 신호(signal)의 증가가 배경신호(background)의 증가보다 더 높으며 이는 배경신호(background signal)를 나타내는 미반응 물질들이 고흡수성 수지를 통해 제거되고, 질환 관련 세포밖 소포체가 분리 및 정제되었기 때문인 것을 알 수 있다.

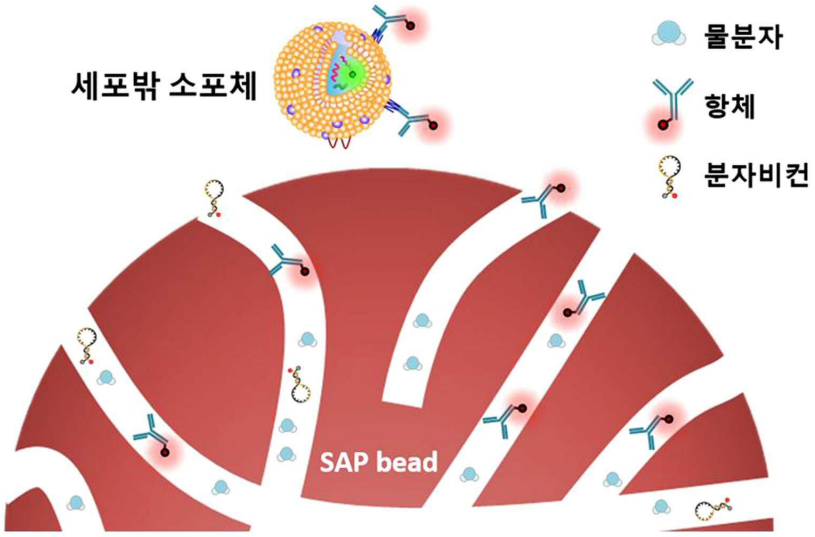
[0101] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

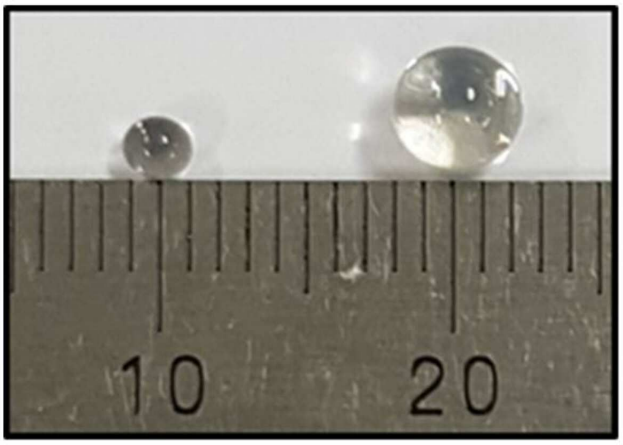
도면1



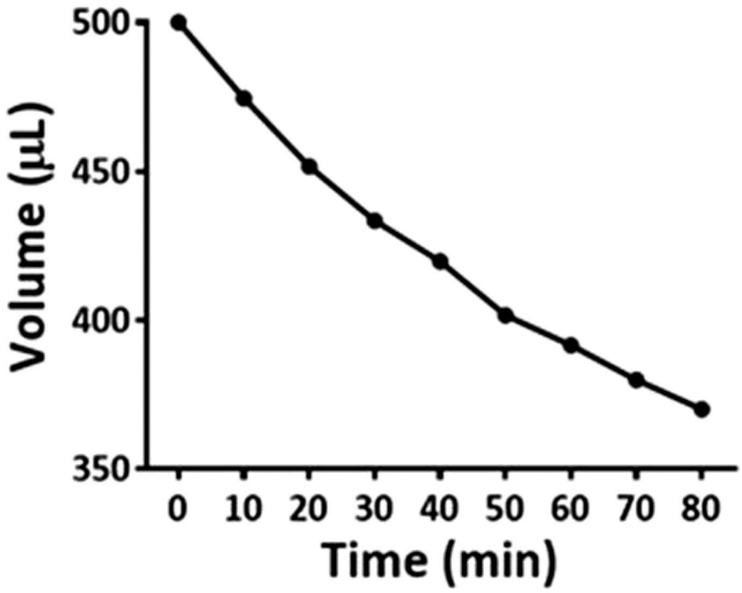
도면2



도면3



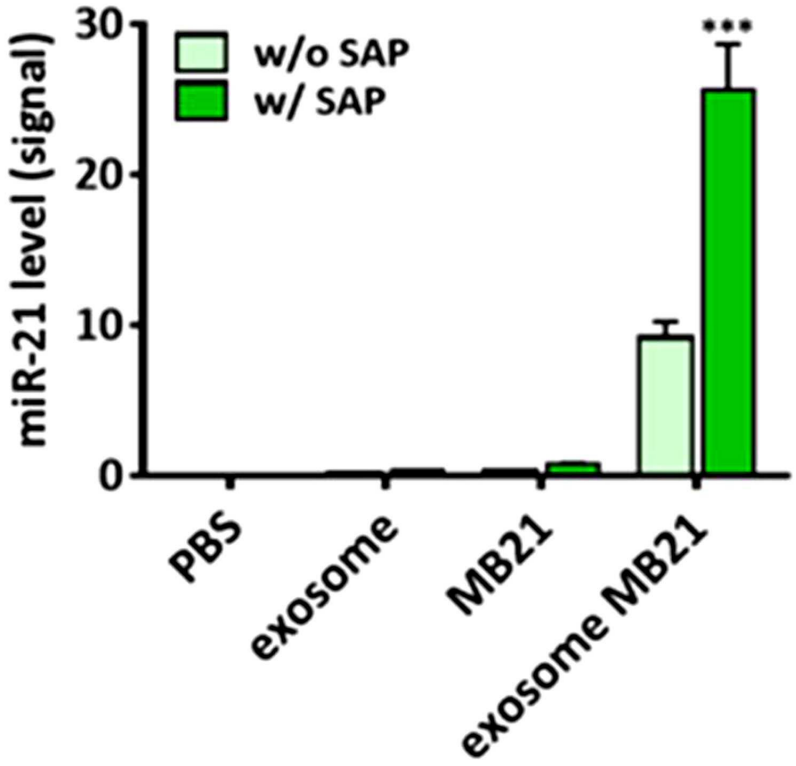
도면4


500
450
400
350
Volume (μL)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Time (min)

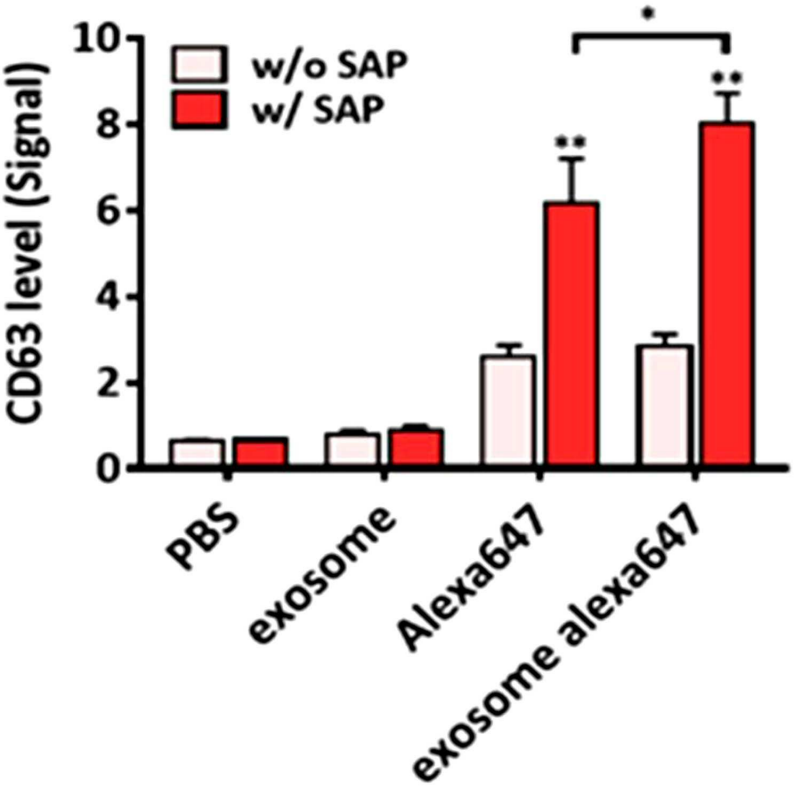
도면5


120
80
40
0
Volume (%)
before
after
1
5
10
12
Bead No.

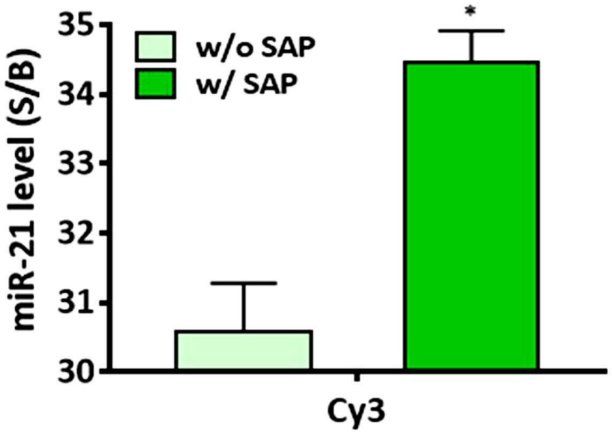
도면6


miR-21 level (signal)
30
20
10
0
w/o SAP
w/ SAP
***
PBS
exosome
MB21
exosome MB21

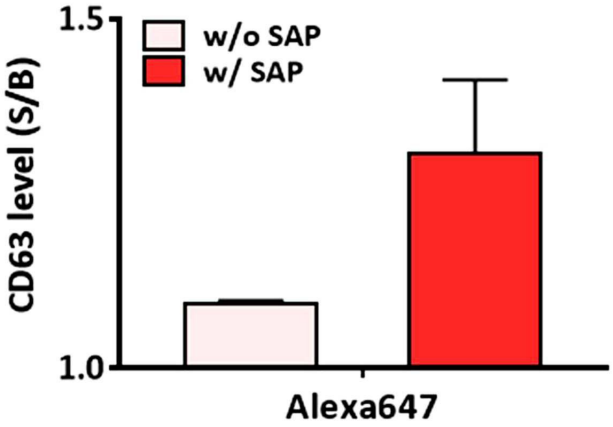
도면7


CD63 level (Signal)
10
8
6
4
2
0
w/o SAP
w/ SAP
*
**
**
PBS
exosome
Alexa647
exosome alexa647

도면8


35
34
33
32
31
30
miR-21 level (S/B)
w/o SAP
w/ SAP
*
Cy3

도면9


1.5
1.0
CD63 level (S/B)
w/o SAP
w/ SAP
Alexa647