(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0136977
(43) 공개일자 2020년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Q 1/6886 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-7030983
(22) 출원일자(국제) 2019년03월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년10월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/024584
(87) 국제공개번호 WO 2019/191429
국제공개일자 2019년10월03일
(30) 우선권주장
62/649,042 2018년03월28일 미국(US)

(71) 출원인
보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 텍사스주 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트 210
(72) 발명자
칼루리 라구
미국 텍사스주 77030 휴스턴 홀콤 블러바드 1515 유닛 # 0065 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터 스템 셀 트랜스플랜테이션 앤드 셀 테라피
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **엑소좀으로부터 단리된 DNA에서의 후성유전학적 변화의 식별**

(57) 요 약

본 발명은 엑소좀 DNA의 메틸화 상태를 분석함으로써 질환을 진단 및 예후하는 방법을 제공한다. 특히, 엑소좀 DNA, 특히 병든 세포로부터 유래된 엑소좀으로부터 단리된 엑소좀 DNA는 하나 이상의 게놈 유전자좌에서 전역 메틸화 지문 또는 특정 메틸화 상태에 대해 분석되어, 본래 세포의 질병 상태에 관한 정보를 제공한다.

(52) CPC특허분류
C12Q 2600/154 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

환자의 질환을 진단하는 방법으로서,

(a) 환자로부터 체액 샘플을 얻는 단계;

(b) 상기 체액 샘플의 엑소좀 분획을 단리하는 단계; 및

(c) 적어도 하나의 DNA 분자의 메틸화(methylation) 또는 하이드록시메틸화(hydroxymethylation) 상태 또는 상기 엑소좀 분획에 존재하는 히스톤의 변형을 판정하는 단계로서, 상기 메틸화 상태가 질환 상태의 메틸화 상태에 해당하면 상기 환자는 질환을 갖는 것으로 진단되는, 단계

를 포함하는, 환자의 질환을 진단하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태는 단일 게놈 유전자좌에서 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50개의 게놈 유전자좌에서 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태는 전역(global) 메틸화 또는 하이드록시메틸화 지문인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태는 과메틸화인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태는 저메틸화인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 히스톤 변형은 메틸화, 아세틸화, 또는 인산화인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 판정 단계는 감소된 표현 중아황산염 시퀀싱(reduced representation bisulfite sequencing)을 수행하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 판정 단계는 상기 메틸화 상태를 상기 질환과 관련된 것으로 알려진 메틸화 상태와 비교하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 환자는 완화(remission) 상태에 있고 상기 방법은 재발을 검출하는 방법인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 체액 샘플은 혈액, 림프, 타액, 객담, 소변, 뇌척수액, 골수 흡인물, 눈 삼출물/눈물, 또

는 혈청인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 질환은 암, 유전적 각인 장애, 신경계 장애, 자가면역 질환, 또는 대사 장애인, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 질환은 암이며, 상기 방법은 상기 엑소좀 분획으로부터 글리피칸 1-함유 엑소좀을 단리시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 뇌암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 환자에게 치료제를 치료 유효량으로 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 질환은 암이며, 상기 치료제는 항암 요법인, 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 환자의 진단을 보고하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 보고는 서면 또는 전자 보고서 작성을 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 환자, 의사, 병원 또는 보험사에 상기 보고서를 제공하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 환자는 사람인, 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 방법을 2회 수행하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 2회는 상기 방법의 초기 수행 후 적어도 1일, 1주일, 또는 1개월인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 참조**

[0002] 본 출원은 2018년 3월 28일자로 출원된 미국 가출원 제62/649,042호의 우선권 이익을 주장하며, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로 의학 및 종양학 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 엑소좀(exosome) DNA에서의 메틸화(methylation) 마크의 검출과 관련이 있다. 더욱 구체적으로는, 본 발명은 바이오마커 분석 및 질환 치료에 있어서의 엑소좀 DNA의 메틸화 마크 검출과 관련이 있다.

배 경 기 술

[0005] 후성유전학(epigenomics), 즉 세포의 유전 물질에 대한 후성유전학적 변형(epigenetic modification)의 완전한 세트에 대한 연구는 후성유전학적 변형(예를 들어, DNA 메틸화)이 포유류 발달 및 질환에 역할을 할 수 있음을 밝혀내었다. 예를 들어, DNA 메틸화는 전사 활성, 염색질 구조 및 염색질 안정성의 조절을 통한 배아 발달, 게놈 각인(genomic imprinting) 및 X-염색체 비활성화와 관련이 있다(Robertson, 2005). 유전자의 프로모터(promoter) 영역에서 증가된 DNA 메틸화(과메틸화(hypermethylation))는 전사 침묵(transcriptional silencing)과 연관될 수 있는 반면, 프로모터 영역에서 감소된 메틸화(저메틸화(hypomethylation))는 증가된 유전자 활성과 연관될 수 있다. 비정상적인 메틸화 패턴은 종양 형성 및 진행을 포함한 다양한 인간 병리와 관련될 수 있다(Feinberg and Fogelstein, 1983; Esteller, 2007; Jones and Paylin, 2007). 따라서, 인간 게놈에 걸친 DNA 메틸화 상태의 분석이 흥미로울 수 있다.

발명의 내용

[0006] 따라서, 본 발명은 인간 혈청 샘플로부터 단리된 엑소좀에서 발견되는 게놈 DNA의 후성유전학적 변화를 분석하고 검출하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 환자의 질환을 진단하는 방법이 제공되며, 이 방법은 (a) 환자로부터 체액 샘플을 얻는 단계; (b) 상기 체액 샘플의 엑소좀 분획을 단리하는 단계; 및 (c) 적어도 하나의 DNA 분자의 메틸화 또는 하이드록시메틸화(hydroxymethylation) 상태 또는 상기 엑소좀 분획에 존재하는 히스톤(histone)의 변형을 판정하는 단계로서, 상기 메틸화 상태가 질환 상태의 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태에 해당하면 상기 환자는 질환을 갖는 것으로 진단되는, 단계를 포함한다.

[0007] 일부 측면에서, 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태는 단일 게놈 유전자좌(genomic locus)에서 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태이다. 일부 측면에서, 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50개의 게놈 유전자좌에서 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태이다. 일부 측면에서, 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태는 전역(global) 메틸화 또는 하이드록시메틸화 지문(fingerprint)이다. 일부 측면에서, 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태는 과메틸화이다. 일부 측면에서, 메틸화 또는 하이드록시메틸화 상태는 저메틸화이다.

[0008] 일부 측면에서, 판정 단계는 감소된 표현 중아황산염 시퀀싱(reduced representation bisulfite sequencing)을 수행하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 판정 단계는 메틸화 상태를 질환과 관련된 것으로 알려진 메틸화 상태와 비교하는 것을 포함한다.

[0009] 일부 측면에서, 환자는 완화 상태에 있고 상기 방법은 재발을 검출하는 방법이다. 일부 측면에서, 체액 샘플은 혈액, 림프, 타액, 객담, 소변, 뇌척수액, 골수 흡인물, 눈 삼출물/눈물, 또는 혈청이다.

[0010] 일부 측면에서, 질환은 후성유전학적 변화와 관련되고/되거나 이에 의해 야기되는 것으로 알려진 질환이다. 일부 측면에서, 질환은 암, 유전적 각인 장애, 신경계 장애, 자가면역 질환, 또는 대사 장애이다. 일부 측면에서, 질환은 암이고, 상기 방법은 엑소좀 분획으로부터 글리피칸 1-함유 엑소좀을 단리시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 암은 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암(tracheal cancer), 뇌암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암이다. 일부 측면에서, 유전적 각인 장애는 안젤만 증후군, 프라더-빌리(Prader-Willi) 증후군, 또는 벡위트-비데만(Beckwith-Wiedemann) 증후군이다. 일부 측면에서, 신경계 장애는 알츠하이머병, 자폐증, 취약한 X(Fragile X) 증후군, 헌팅턴병, 파킨슨병, 조현병, ATR-X 증후군, ICF 증후군, BWS, 레트(Rett) 증후군, 알파-지중해빈혈(alpha-Thalassaemia), 루빈슈타인-테비(Rubinstein-Taybi) 증후군, 또는 코핀-로우리(Coffin-Lowry) 증후군이다. 일부 측면에서, 자가면역 질환은 전신 홍반 루푸스 또는 류머티스 관절염이다. 일부 측면에서, 대사 장애는 2형 당뇨병이다.

[0011] 일부 측면에서, 방법은 환자에게 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 질환은 암이고, 치료제는 항암 요법이다. 일부 측면에서, 환자는 사람이다. 일부 측면에서, 방법은 상기 방법을 2회 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 상기 2회는 이 방법의 초기 수행 후 적어도 1일, 1주일, 또는 1개월이다.

[0012] 일부 측면에서, 방법은 환자의 진단을 보고하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 보고는 서면 또는 전자 보고서 작성을 포함한다. 일부 측면에서, 환자, 의사, 병원 또는 보험사에 보고서를 제공하는 단계를 추가로 포함한.

[0013] 본원에 사용된 바와 같이, 특정 성분과 관련하여 "본질적으로 없는"은 특정 성분 중 어느 것도 의도적으로 조성물로 제형화되지 않았고/않았거나 오염물로서 또는 미량으로만 존재함을 의미하기 위해 본원에 사용된다. 따라서 조성물의 의도하지 않은 임의의 오염으로 인한 특정 성분의 총량은 0.01% 미만이다. 특정 성분의 양이 표준 분석 방법으로 검출될 수 없는 조성물이 가장 바람직하다.

[0014] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "a" 또는 "an"은 하나 이상을 의미할 수 있다. 본원의 청구범위(들)에서 사용된 바와 같이, "포함하는(comprising)"이라는 단어와 함께 사용될 때, 단어 "a" 또는 "an"은 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다.

[0015] 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은, 본 개시내용이 오직 대안 및 "및/또는"을 지칭하는 정의를 지지하더라도, 대안만을 지칭하는 것으로 명시적으로 표시되거나 대안이 상호 배타적이지 않는 한 "및/또는"을 의미하는 것으로 사용된다. 본원에 사용된 바와 같이 "또 다른"은 적어도 두 번째 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0016] 본 출원 전반에 걸쳐, 용어 "약"은 값이 장치에 대한 오류의 고유한 변동, 값을 결정하기 위해 사용되는 방법, 또는 연구 대상 사이에 존재하는 변동을 포함함을 나타내기 위해 사용된다.

[0017] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 하기 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 특정 실시예는, 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내지만, 본 발명의 사상 및 범주 내에서 이 상세한 설명으로부터 다양한 변경 및 수정이 당업자에게 명백할 것이므로 단지 예시로서 제공되는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 여기에 제시된 특정 구현예의 상세한 설명과 함께 하나 이상의 이러한 도면을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1. 감소된 표현 중아황산염 시퀀싱 분석 파이프라인.

도 2. 상이한 세포 유형들로부터 세포 DNA와 엑소좀 DNA를 분리하고, 샘플에서 중아황산염 변환을 수행하고, 감소된 표현 중아황산염 시퀀싱을 수행하여 DNA에 존재하는 메틸화 패턴을 판정하기 위한 계획.

도 3a 내지 도 3b. 엑소좀 DNA에서 DNA 메틸화 검출. 도 3a는 감소된 표현 중아황산염 시퀀싱(RRBS)을 위해 세포 DNA와 엑소좀 DNA를 제조하는 데 사용되는 프로토콜을 나타내는 도식을 제공한다. 도 3b는 결과 데이터의 분석을 제공한다. 패널 panc1_C는 2개 세포 DNA에 대한 CpG 메틸화(%)(빈도수(frequency) 대 염기당 메틸화(%))의 히스토그램을 제공한다. 패널 panc1_E는 2개 엑소좀 DNA에 대한 CpG 메틸화(%)(빈도수 대 염기당 메틸화(%))의 히스토그램을 제공한다. 샘플 상관관계(correlation)를 판정하고 묘사된 산점도(scatter plot)(좌측 아래 패널) 및 상관 계수(0.94, 사람 상관 시험)로 표현하였다.

도 4. Samtools Flagstat를 사용하여 그래픽으로 표시되는 정렬 속도(alignment rate).

도 5. FastQC를 사용하여 그래픽으로 표시되는 판독치 기반 품질.

도 6. FastQC를 사용하여 그래픽으로 표시되는 서열 중복 수준(sequence duplication level).

도 7. 샘플들 간의 Panc1 대 HPDE 상관관계 분석.

도 8. CpG 메틸화에 의해 군집화(clustering)된 샘플.

도 9. 주요 성분 분석.

도 10. 거리 방법을 사용하여 군집화된 샘플.

도 11a 내지 도 11h. 모든 염색체에서의 메틸화 마크의 검출. 각각의 막대는 도 11h에 도시된 바와 같이 염색체를 나타낸다. 각각의 그래프는 샘플을 나타낸다. Y-축은 CpG_num을 나타낸다. 도 11a는 BXPC3이다. 도 11b는 Capan1이다. 도 11c는 HPDE이다. 도 11d는 HPNE이다. 도 11e는 MiaPaCa2이다. 도 11f는 Panc1이다. 도 11g는 PSN1이다. 도 11h는 T3M4이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 엑소좀 DNA는, 엑소좀을 흘리는(shedding) 세포에서 발견되는 DNA 중아황산염 시퀀싱에 의해 식별된 세포 DNA 메틸화 마크를 보존한다. 따라서, 액체 생검(혈액, 소변, 타액, 객담)으로부터 엑소좀 DNA의 차등(differential) 메틸화를 검출하면, 조기 질환 검출(early disease detection), 감별 진단(differential

diagnosis), 질환 모니터링 및 예후에 신규한 정밀도(precision)를 제공한다.

[0020] **I. 엑소좀**

[0021] 본원에 사용된 용어 "미세소포(microvesicle)" 및 "엑소좀"은 직경(또는 입자가 회전타원체가 아닌 경우 가장 긴 치수)이 약 10nm 내지 약 5000nm, 더 통상적으로 30nm 내지 1000nm, 가장 통상적으로 약 50nm 내지 750nm인 막 입자를 나타내며, 여기서 엑소좀 막의 적어도 일부는 세포로부터 직접 얻어진다. 가장 일반적으로, 엑소좀은 공여 세포 크기의 최대 5% 크기(평균 직경)를 가질 것이다. 따라서, 특히 고려되는 엑소좀은 세포로부터 흘러나온 엑소좀이 포함된다.

[0022] 엑소좀은, 예를 들어, 체액과 같은 임의의 적합한 샘플 유형에서 검출되거나 이로부터 단리될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "단리된"은 자연 환경으로부터의 분리를 나타내고, 적어도 부분적인 정제를 포함하는 것을 의미하며, 실질적인 정제를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "샘플"은 본 발명에 의해 제공되는 방법에 적합한 임의의 샘플을 나타낸다. 샘플은 검출 또는 단리에 적합한 엑소좀을 포함하는 임의의 샘플일 수 있다. 샘플 공급원으로는 혈액, 골수, 흉수, 복막액, 뇌척수액, 소변, 타액, 양수, 악성복수, 기관지-폐포 세척 유체, 활액, 모유, 땀, 누액, 관절액, 및 기관지 세척액이 포함된다. 일 측면에서, 샘플은 예를 들어 전혈 또는 이의 임의의 분획 또는 성분을 포함하는 혈액 샘플이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 혈액 샘플은 정맥, 동맥, 말초, 조직, 탯줄 등과 같은 혈액 세포 또는 이의 성분을 포함하는 임의의 알려진 공급원으로부터 추출될 수 있다. 예를 들어, 잘 알려진 일상적인 임상 방법(예를 들어, 전혈 채취 및 처리 절차)을 사용하여 샘플을 얻고 처리할 수 있다. 일 측면에서, 예시적인 샘플은 암에 걸린 대상체로부터 채취한 말초 혈액일 수 있다.

[0023] 엑소좀은 또한 수술 샘플, 생검 샘플, 조직, 대변 및 배양된 세포와 같은 조직 샘플로부터 단리될 수 있다. 조직 공급원에서 엑소좀을 단리할 때 단일 세포 현탁액을 얻기 위해 조직을 균질화한 다음 세포를 용해시켜 엑소좀을 방출하는 것이 필요할 수 있다. 조직 샘플에서 엑소좀을 단리할 때 엑소좀을 파괴하지 않는 균질화 및 용해 절차를 선택하는 것이 중요하다. 본원에서 고려되는 엑소좀은 바람직하게는 생리학적으로 허용되는 용액, 예를 들어, 완충 염수, 성장 배지, 다양한 수성 배지 등에서 체액으로부터 단리된다.

[0024] 엑소좀은 새로 수집된 샘플 또는 동결 또는 냉동 보관된 샘플에서 단리될 수 있다. 일부 구현예에서, 엑소좀은 세포 배양 배지에서 단리될 수 있다. 필수적이지는 않지만, 샘플에서 임의의 잔해물을 제거하기 위해 용적-제외 중합체로 침전시키기 전에 유체 샘플을 정화하면 더 높은 순도의 엑소좀을 얻을 수 있다. 정화 방법으로는 원심분리, 초원심분리, 여과 또는 한외여과가 포함된다. 가장 통상적으로, 엑소좀은 당업계에 잘 알려진 수많은 방법에 의해 단리될 수 있다. 한 가지 바람직한 방법은 체액 또는 세포 배양 상청액으로부터의 분별 원심분리이다. 엑소좀의 예시적인 단리 방법은 문헌(Losche et al., 2004; Mesri and Altieri, 1998; Morel et al., 2004)에 기재되어 있다. 대안적으로, 엑소좀은 문헌(Combes et al., 1997)에 기재된 대로 유세포 분석을 통해 단리될 수 있다.

[0025] 엑소좀의 단리를 위해 허용되는 한 가지 프로토콜은 종종 상대적으로 저밀도인 엑소좀을 부유시키기 위해 수크로스 밀도 구배 또는 수크로스 쿠션과 조합된 초원심분리를 포함한다. 순차적 분별 원심분리에 의한 엑소좀의 단리는 다른 미세소포 또는 거대분자 복합체와 크기 분포가 겹칠 가능성으로 인해 복잡하다. 또한, 원심분리는 이의 크기에 따라 소포를 분리하는 수단으로 불충분할 수 있다. 그러나, 순차적 원심분리는, 수크로스 구배 초원심분리와 조합될 때, 높은 엑소좀 농축을 제공할 수 있다.

[0026] 초원심분리 경로에 대한 대안을 사용한 크기에 따른 엑소좀의 분리는 또 다른 선택사항이다. 초원심분리보다 시간이 덜 걸리고 특수 장비를 사용할 필요가 없는 한외여과 절차를 사용한 엑소좀의 성공적인 정제가 보고되었다. 마찬가지로, 하나의 마이크로필터에서 세포, 혈소판 및 세포 잔해물을 제거하고 양압을 사용하여 유체를 구동시키는 두 번째 마이크로필터에서 30nm보다 큰 소포를 포획할 수 있는 상용 키트(엑소미르(EXOMIR)™, 비오 사이언티픽(Bioo Scientific))가 이용 가능하다. 그러나, 이 과정에서 엑소좀은 회수되지 않고, 두 번째 마이크로필터에서 포착된 물질에서 RNA 내용물을 직접 추출하여 PCR 분석에 사용할 수 있다. HPLC-기반 프로토콜을 사용하면 잠재적으로 고순도 엑소좀을 얻을 수 있지만, 이러한 과정은 전용 장비가 필요하고 확장이 어렵다. 중요한 문제는 혈액 및 세포 배양 배지 모두 엑소좀과 동일한 크기 범위의 많은 수의 나노입자(일부 비-소포성)를 포함한다는 것이다. 예를 들어, 일부 miRNA는 엑소좀이 아닌 세포외 단백질 복합체 내에 포함될 수 있지만; 프로테아제(예를 들어, 프로테이나제 K)를 사용한 처리는 "엑스트라엑소좀" 단백질에 의한 모든 가능한 오염을 제거하기 위해 수행될 수 있다.

[0027] 또 다른 구현예에서, 암세포 유래 엑소좀은 면역특이적 상호작용(예를 들어, 면역자기 포획)을 포함하는 것과

같이, 엑소좀에 대해 샘플을 농축시키기 위해 일반적으로 사용되는 기술에 의해 포획될 수 있다. 면역자기 세포 분리라고도 알려진 면역자기 포획은 통상적으로 특정 세포 유형에서 발견되는 단백질에 대한 항체를 작은 상자성 비드에 부착하는 것을 포함한다. 항체-코팅된 비드가 혈액과 같은 샘플과 혼합되면, 이는 특정 세포에 부착되어 주변을 둘러싼다. 이어서 샘플을 강한 자기장에 배치하여 비드가 한쪽으로 펠렛화되도록 한다. 혈액을 제거한 후 포획된 세포는 비드와 함께 유지된다. 이러한 일반적인 방법의 많은 변형은 당업계에 잘 알려져 있으며, 엑소좀을 단리하는 데 사용하기에 적합하다. 일례로, 엑소좀은 자기 비드(예를 들어, 알데하이드/설페이트 비드)에 부착될 수 있고, 이어서 항체가 혼합물에 첨가되어 비드에 부착된 엑소좀의 표면상의 에피토프를 인식한다. 암세포 유래 엑소좀에서 발견되는 것으로 알려진 단백질의 예는 ATP-결합 카세트 서브-패밀리 A 구성원 6(ABCA6), 테트라스파닌-4(TSPAN4), SLIT 및 NTRK-유사 단백질 4(SLITRK4), 추정 프로토카드헤린 베타-18(PCDHB18), 골수 세포 표면 항원 CD33(CD33) 및 글리피칸-1(GPC1)을 포함한다(미국 특허 9,921,223, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함되어 있다). 예를 들어, 이들 단백질 중 하나 이상에 대한 항체 또는 압타머를 사용하여 암세포 유래 엑소좀을 단리할 수 있다.

[0028] 본원에 사용된 바와 같이, 분석은 엑소좀의 직접 또는 간접 시각화를 허용하는 모든 방법이 포함되며, 생체내 또는 생체외일 수 있다. 예를 들어, 분석은 고체 기질에 결합된 엑소좀의 생체외 현미경 또는 혈구 계측 검출 및 시각화, 유세포 분석, 형광 이미징 등을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 예시적인 측면에서, 암세포 유래 엑소좀은 ATP-결합 카세트 서브-패밀리 A 구성원 6(ABCA6), 테트라스파닌-4(TSPAN4), SLIT 및 NTRK-유사 단백질 4(SLITRK4), 추정 프로토카드헤린 베타-18(PCDHB18), 골수 세포 표면 항원 CD33(CD33), 글리피칸-1(GPC1), 히스톤 H2A 유형 2-A(HIST1H2AA), 히스톤 H2A 유형 1-A(HIST1H1AA), 히스톤 H3.3(H3F3A), 히스톤 H3.1(HIST1H3A), 아연 핑거 단백질 37 동족체(ZFP37), 라미닌 서브유닛 베타-1(LAMB1), 요세관간질성신염 항원-유사(TINAGL1), 페록시레데옥신(Peroxiredeoxin)-4(PRDX4), 콜라겐 알파-2(IV) 사슬(COL4A2), 추정 단백질 C3P1(C3P1), 헤미센틴-1(HMCN1), 추정 로필린-2-유사 단백질(RHPN2P1), 안키린 반복 도메인-함유 단백질 62(ANKRD62), 트리파타이트 모티프-함유 단백질 42(Tripartite motif-containing protein 42)(TRIM42), 결합 플라코글로빈(Junction plakoglobin)(JUP), 튜불린 베타-2B 사슬(TUBB2B), 엔도리보뉴클레아제 다이서(DICER1), E3 유비퀴틴-단백질 리가아제 TRIM71(TRIM71), 카타닌 p60 ATPase-함유 서브유닛 A-유사 2(KATNAL2), 단백질 S100-A6(S100A6), 5'-뉴클레오티다아제 도메인-함유 단백질 3(NT5DC3), 발린-tRNA 리가아제(VARS), 카즈린(KAZN), ELAV-유사 단백질 4(ELAVL4), RING 핑거 단백질 166(RNF166), FERM 및 PDZ 도메인-함유 단백질 1(FRMPD1), 78kDa 글루코스-조절 단백질(HSPA5), 트래피킹 단백질 입자 복합체 서브유닛 6A(Trafficking protein particle complex subunit 6A)(TRAPPC6A), 스쿠알렌 모노옥시게나아제(SQLE), 종양 감수성 유전자 101 단백질(TSG101), 공포 단백질 분류 28 동족체(Vacuolar protein sorting 28 homolog)(VPS28), 프로스타글란딘 F2 수용체 음성 조절인자(PTGFRN), 이소부티릴-CoA 데하이드로게나아제, 미토콘드리아(ACAD8), 26S 프로테아제 조절 서브유닛 6B(PSMC4), 연장 인자 1-감마(EEF1G), 티틴(TTN), 티로신-단백질 포스파타아제 유형 13(PTPN13), 트리오스포스페이트 이소머라아제(TPI1), 또는 카복시펩티다아제 E(CPE) 중 하나 이상에 대한 항체를 사용하여 검출되고, 이어서 고체 기질에 결합되고/되거나 현미경 또는 혈구 계측 검출을 사용하여 시각화된다.

[0029] 세포에서 발현되는 모든 단백질이 그 세포에 의해 분비되는 엑소좀에서 발견되는 것은 아니라는 점에 유의해야 한다. 예를 들어, 칼넥신, GM130 및 LAMP-2는 모두 MCF-7 세포에서 발현되는 단백질이지만 MCF-7 세포에서 분비되는 엑소좀에서는 발견되지 않는다(Baietti et al., 2012). 또 다른 예로서, 한 연구에서는 190/190 췌관 선암 환자가 건강한 대조군보다 GPC1+ 엑소좀 수치가 더 높았음을 발견하였다(Melo et al., 2015, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 특히 건강한 대조군의 평균 2.3%만이 GPC1+ 엑소좀을 가졌다.

[0030] **A. 세포 배양으로부터 엑소좀을 수집하기 위한 예시적인 프로토콜**

[0031] 1일에, 10% FBS를 함유하는 배지 중에서 T225 플라스크에 충분한 세포(예를 들어, 약 5백만개의 세포)를 접종하여 다음날 세포가 약 70% 융합될 수 있도록 한다. 2일에, 세포 상의 배지를 흡인하고, PBS로 세포를 2회 세척한 다음 25 내지 30mL 기본 배지(즉, PenStrep 또는 FBS 없음)를 세포에 첨가한다. 세포를 24 내지 48시간 동안 항온배양한다. 48시간 항온배양이 선호되지만, 일부 세포주는 무혈청 배지에 더 민감하므로 항온배양 시간을 24시간으로 줄여야 한다. FBS에는 NanoSight 결과를 크게 왜곡할 수 있는 엑소좀이 포함되어 있다는 점에 유의한다.

[0032] 3/4일에, 800×g에서 5분 동안 실온에서 배지와 원심분리기를 수집하여 사멸된 세포와 큰 잔해물을 펠렛화한다. 상청액을 새로운 코니칼 튜브로 옮기고 배지를 다시 2000×g에서 10분 동안 원심분리하여 다른 큰 잔해물과 큰 소포를 제거한다. 0.2㎛ 필터를 통해 배지를 통과시킨 다음 튜브당 35mL를 사용하여 초원심분리기 튜브(예를 들어, 25×89㎜ 벡크만 울트라-클리어(Beckman Ultra-Clear))에 분취한다. 튜브당 배지의 용적이 35mL 미만인 경

우, 35mL에 도달하도록 튜브의 나머지 부분을 PBS로 채운다. SW 32 Ti 로터(k-인자 266.7, RCF 최대 133,907)를 사용하여 4℃에서 28,000rpm으로 2 내지 4시간 동안 배지를 초원심분리한다. 약 1인치의 액체가 남을 때까지 상청액을 조심스럽게 흡인한다. 튜브를 기울이고 나머지 매질이 흡인기 피펫에 천천히 들어갈 수 있게 한다. 원하는 경우, 엑소좀 펠렛을 PBS에 재현탁시키고 28,000rpm에서 1 내지 2시간 동안 초원심분리를 반복하여 엑소좀 집단을 추가로 정제할 수 있다.

[0033] 마지막으로, 210㎕ PBS에서 엑소좀 펠렛을 재현탁시킨다. 각 샘플에 대해 여러 개의 초원심분리기 튜브가 있는 경우, 동일한 210㎕ PBS를 사용하여 각 엑소좀 펠렛을 연속적으로 재현탁시킨다. 각 샘플에 대해, 10㎕를 취하고 990㎕ H_2O에 첨가하여 나노입자 추적 분석에 사용한다. 나머지 200㎕ 엑소좀-함유 현탁액을 다운스트림 공정에 사용하거나 즉시 -80℃에 보관한다.

[0034] **B. 혈청 샘플로부터 엑소좀을 추출하기 위한 예시적인 프로토콜**

[0035] 먼저, 혈청 샘플(또는 기타 체액)을 얼음에서 해동시킨다. 이어서, 11mL PBS에 250㎕의 무세포 혈청 샘플을 희석하고, 0.2㎛ 기공 필터를 통해 여과한다. 희석된 샘플을 150,000×g에서 밤새 4℃에서 초원심분리한다. 다음 날, 조심스럽게 상청액을 버리고 11mL PBS에서 엑소좀 펠렛을 세척한다. 2시간 동안 4℃에서 150,000×g에서 두 번째 초원심분리를 수행한다. 마지막으로, 상청액을 조심스럽게 버리고 분석을 위해 100㎕ PBS에 엑소좀 펠렛을 재현탁한다.

[0036] **II. DNA 메틸화**

[0037] 본원에 사용된 용어 "CpG 아일랜드(island)"는 계산된 CG % 조성이 50%를 초과하는 임의의 DNA 영역을 지칭한다.

[0038] 본원에 사용된 용어 "메틸화 바이오마커", "질환-특이적 메틸화 제한 부위 패턴" 또는 "메틸화 지문"은 임의의 뉴클레오티드 서열, 바람직하게는 CpG가 풍부한 임의의 뉴클레오티드 서열을 지칭하며, 여기서 임의의 사이토신 염기의 5' 위치가 메틸화된다. 이들 영역은 프로모터, 조절 요소, 인핸서(enhancer) 및 유전자 코딩 서열을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 뉴클레오티드 서열에서 발견될 수 있다. 메틸화 지문의 변화는 게놈 불안정성의 지표가 될 수 있으며 질환 진단에 유용할 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 메틸화 지문의 변화는 DNA 결합 단백질이 DNA에 결합하는 접근성을 변경할 수 있다.

[0039] 본원에 사용된 용어 "저메틸화"는 5' 메틸기를 함유하지 않는 CG 또는 CNG 디- 또는 트리-뉴클레오티드 부위에 임의의 사이토신이 존재하는 것을 지칭한다.

[0040] 본원에 사용된 용어 "과메틸화"는 5' 메틸기를 함유하는 CG 또는 CNG 디- 또는 트리-뉴클레오티드 부위에 임의의 사이토신이 존재하는 것을 지칭한다.

[0041] 본원에 사용된 용어 "전역(global) 메틸화"는 모든 CG 디뉴클레오티드, 특정 메틸화 민감성/불민감성(insensitive) 효소(들)에 대한 모든 제한 효소 절단 부위, 또는 통계적으로 설계된 프라이머 세트(들)를 갖는 모든 프라이머 사건과 관련된 게놈 전체의(genome-wide) 메틸화 사건을 의미한다.

[0042] 후성유전학(epigenetics)은 유전자 발현에 영향을 주지만 DNA 서열의 변화를 수반하지 않는(즉, 비-돌연변이원성(non-mutagenic)인) 안정적이고 잠재적으로 유전 가능한 형태의 세포 정보로 정의될 수 있다. 이러한 세포 정보는 히스톤과 핵산에 적용되는 공유 변형 형태이다. 히스톤 단백질에서, 이러한 세포 정보의 하나의 형태는 인산화, 아세틸화, 메틸화, 폴리-ADP 리보실화(ribosylation) 및 유비퀸화(ubiquination)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 해독후(post-translation) 변형에 의해 예시될 수 있다. 핵산에서, 이러한 세포 정보의 하나의 형태는 5' 메틸화된 사이토신을 포함하는 핵산에 의해 예시될 수 있다.

[0043] 상호 관련된 유형의 후성유전학적 유전에는 적어도 세 가지가 있다: i) 핵산 메틸화; ii) 게놈 각인; 및 iii) 히스톤 단백질 변형. 핵산 메틸화는 CpG 디뉴클레오티드에서 발생하며 유전자 발현의 조절과 게놈에서 반복 요소의 침묵에 역할을 한다. 게놈 각인은 생식계열(germline)에서 정상적으로 재프로그래밍될 수 있는 각인된 유전자 내 또는 그 근처에서 차별적으로 메틸화된 영역에 의해 매개되는 원부모-특이적 대립유전자 침묵(parent-of-origin-specific allele silencing)을 포함한다. 히스톤 변형은, 메틸화, 아세틸화 및 인산화가 전사 조절에 관여하며, 여기서 다수의 히스톤 변형이 세포 분열 동안 안정적으로 유지되는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 히스톤 변형을 매개하는 효소는 핵산 메틸화를 조절하는 것과 동일한 게놈 복합체(즉, 예를 들어, CpG 아일랜드) 내에서 종종 연관된다.

[0044] 핵산 수준에서의 후성유전학적 조절은 공유 변형(즉, 예를 들어, 5' 사이토신 메틸화)에 의해 매개되는 것으로 보고되었다. 예를 들어, 메틸 기는 CpG 디뉴클레오티드의 대칭 그룹의 일부인 사이토신 탄소-5 위치에 추가될 수 있다. 다수의 5-메틸 사이토신이 레트로트랜스포손(retrotransposon), 내인성 레트로바이러스 및 반복적 서열에서 발견되었으며, 이들 요소의 동원(mobilization)을 방지하고 염색체 재배열의 발생을 줄이기 위한 숙주 방어 기전(host defense mechanism)으로 진화했을 수 있다.

[0045] 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오티드는 일반적으로 CpG 아일랜드로 지칭되는 짧은 CpG가 풍부한 서열에서 발견될 수 있다. CpGi 아일랜드는 유전자의 프로모터 영역 또는 그 주변에서 군집화되는 것으로 관찰되었다. 단백질 암호화 유전자의 40% 이상은 프로모터 근처에서 발견되는 적어도 하나의 CpG 아일랜드를 갖는다.

[0046] CpG 아일랜드 메틸화는 인근 유전자의 발현 능력을 감소시킬 수 있다. 또한, 과메틸화가 발생하면, 유전자가 완전히 꺼질 수 있다. 결과적으로, 후성유전학적 조절은 유전자의 메틸화 상태를 점진적으로 변화시킴으로써 환경적 영향에 반응할 수 있다. 이러한 환경적 영향의 제거는, 유전자의 메틸화 상태를 역전시키고 세포에서 해당 유전자의 발현 프로파일을 적절하게 조정할 것으로 예상된다. 따라서, 후성유전학적 조절은 본질적으로 탄력적일 수 있으며 환경의 변동에 동적으로 반응할 수 있다. 핵산 유전자형이 이러한 제어 시스템을 수행할 수 있는 것으로는 여겨지지 않는다.

[0047] 후성유전학적 조절은 유전형 발현에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 이러한 능력은 위험에 처한 유전자 일배체형(gene haplotype) 또는 보호 유전자 일배체형을 활성화할 가능성이 있다. 결과적으로, 유전형 발현의 후성유전학적 변형은 복잡한 질환(즉, 예를 들어, 암)에 걸린 환자에서 관찰되는 광범위한 표현형을 설명하는 데 도움이 될 수 있다.

[0048] 핵산 불안정성과 질환 사이의 연관성을 뒷받침하는 데이터는 점점 더 강력해지고 있다. 예를 들어, 후성유전학적 핵산 조절은 노화 및 암과 관련된 생리적 및 병리적 사건에서 일부 역할을 한다.

[0049] 게놈의 안정성을 유지하기 위해, 핵산 메틸화의 두 가지 주요 변경, 즉 저메틸화 및 과메틸화가 관찰되었다. 일부 질환에서, 이들 메틸화 상태 중 하나 또는 다른 상태는 유전자 좌(gene locus)에 따라 만연할 수 있다. 예를 들어, 신생물(neoplasia)에서, 프로모터-관련 CpG 아일랜드의 과메틸화와 함께, 전체 게놈 저메틸화가 존재한다. 저메틸화된 상태는 일부 종양-억제 유전자 활동을 침묵시키는 것으로 여겨진다. 결과적으로, 저메틸화 및 과메틸화는 둘 다, 암 및/또는 종양의 발생, 발현 및 유지를 담당하는 후성유전학적 조절 장애를 나타낸다.

[0050] 5'-메틸 사이토신의 게놈 전체의(전역의) 손실은 사람 신생물에서 설명된 가장 초기의 분자 이상(molecular abnormality) 중 하나이다. 전역 탈메틸화는 CpG가 고갈된 영역의 프로모터 외부와 반복적인 요소 및 함동원체(pericentric) 벌크 DNA에서 대부분 발생하는 것으로 나타났다. 저메틸화는 기계적인 의미를 가지며 성장 촉진 유전자(즉, 예를 들어, HRAS)의 활성화 및 과발현을 통해 신생물에서 역할을 할 수 있다. 또한 저메틸화는 신생물로 이어지는 염색체 불안정성 유도에 역할을 하는 것으로 나타났다. 주변부 위성 영역(pericentromeric satellite region)은 저메틸화에 취약하여 불균형한 염색체 전위(chromosomal translocation)를 유발하며, 이는 난소 및 유방 암종에서 관찰되었다. L1 레트로트랜스포손의 저메틸화는 염색체 불안정성 결장직장암 세포주와 상관관계가 있는 것으로 나타났다.

[0051] 발현된 유전자의 60%는 CpG 디뉴클레오티드가 비정상적으로 풍부한 0.5 내지 3.0Kb 핵산 스트레치에 위치한 5' 영역 및 업스트림 프로모터를 갖는다. 이러한 CpG 부위 군집(cluster)은 CpG 아일랜드로 알려져 있으며 일반적으로 DNA 메틸화가 없다. 유전자 프로모터의 신규한 핵산 메틸화는 사람 신생물에서 일관된 비정상이었다. 촉진제 메틸화는 종양 억제 유전자(즉, 예를 들어 RB1, P16, BRCA1 및 VHL), DNA 복구 유전자(즉, 예를 들어 hMLH1 및 MGMT), 혈관신생 억제(즉, 예를 들어 THBS1) 및 성장 조절제(즉, 예를 들어 ER 및 PGR)의 불활성화에 연결되어 있다.

[0052] 예를 들어, 암을 검출하기 위한 과메틸화된 바이오마커는, 급성 림프 모구성 백혈병의 경우, DLC-1, PCDHGA12A, CDH1, HOXD10, RPIB9, CD44, COX2, SOX2, KLF4, SLC26A, RECK, HOXA9, HOXD11, HOXA6, ADAM12, 및 HOXC4; 만성 림프 모구성 백혈병의 경우, DLC-1, PCDHGA12A, HOXD10, CD44, COX2, HOXA9, HOXA4, HOXD11, 및 HOXA6; 여포성 림프종의 경우, DLC-1, PCDHGA12A, CDH1, HOXD10, RPIB9, COX2, KLF4, HOXA9, HOXA6, HOXC4, 및 SLC26A4; 맨틀 세포 림프종의 경우, DLC-1, PCDHGA12A, HOXD10, HOXA9, HOXD11, 및 HOXA6; 버켓(Burkett) 림프종의 경우, DLC-1, PCDHGA12A, CDH1, HOXD10, RPIB9, CD44, COX2, KLF4, HOXA9, HOXD11, HOXA6, HOXC4, 및 SLC26A4; 미만성(diffuse) 거대 B-세포 림프종의 경우, DLC-1, PCDHGA12A, CDH1, HOXD10, RPIB9, COX2, KLF4,

HOXA6, 및 SLC26A4; 다발성 골수종의 경우, DLC-1, PCDHGA12A, CDH1, COX2, KLF4, HOXA9, HOXD11, HOXA6, HOXC4, HOXD10, 및 SLC26A; 급성 골수성 백혈병의 경우, PCDHGA12A, CDH1, HOXD10, CD44, CXCR1, KLF4, SLC26A, CDH13, HOXA9, HOXD11, HOXA6, HOXC4, ADAM12, 및 SLC26A4; 골수이형성 증후군의 경우, PCDHGA12A, SOCS-1, 및 HIN1; 유방암의 경우, DLC-1, PCDHGA12A, HOXD10, RPIB9, COX2, RECK, HOXA11, HOXA7, HOXA9, HOXD9, HOXD11, PCDHB15, PCDHA6, PCDHA13, PTPN6, HIC1, CDH13, GSTP1, ADAM12, p16, GABRBA, 및 APC; 폐암의 경우, PCDHGA12A, HOXD10, HOXA7, HOXA6, HOXA9, PCDHB15, PCDHA6, PCDHA13, PTPN6, GSTP1, 및 HIC1; 결장암의 경우, DLC-1, PCDHGA12A, HOXD10, RPIB9, CD44, COX2, SOX2, CXCR1, SLC26A, RECK, HOXA7, HOXA6, HOXA9, PCDHB15, PCDHA6, PCDHA13, PTPN6, ADAM12, p16, 및 HIC1; 난소암의 경우, PCDHGA12A, HOXD10, SLC26A, CDH13, 및 RECK; 전립선암의 경우, PCDHGA12A, HOXD10, COX2, HOXA7, HOXA6, HOXA9, HOXD11, HOXD9, PCDHB15, PCDHA6, PTPN6, HIC1, APC, CDH13, CDH5, HOXA11, GSTP1, p16, GABRBA, 및 HOXA7; 및 흑색종의 경우, PCDHGA12A, HOXD10, KLF4, 및 COX2를 포함할 수 있다.

[0053] 알려진 메틸화 유전자좌와 관련된 추가 질환 및 장애는 유전적 각인 장애, 예컨대 프라더-빌리 증후군(사람 염색체 15의 15q11-q13 영역, 소핵 리보핵단백질 폴리펩티드 N(small nuclear ribonuclearprotein polypeptide N)(SNRPN)), 안젤만 증후군(사람 염색체 15의 15q11-q13 영역, 소핵 리보핵단백질 폴리펩티드 N(SNRPN)), 벡위트-비데만 증후군(염색체 영역 11p15.5, DMR2에서의 메틸화 손실), 및 실버-러셀 증후군(염색체 영역 11p15.5, DMR2에서의 메틸화 손실); 및 신경발달 장애, 예컨대 자폐 스펙트럼 장애(프롤린이 풍부한 막관통 단백질 1(proline-rich transmembrane protein 1)(PRRT1))를 포함한다.

[0054] 또한, 이들 및 다른 질환 또는 장애에 대한 메틸화 시그니처(signature)는 특정 질환 또는 장애를 갖는 것으로 알려진 환자로부터 단리된 엑소좀의 메틸화 마크를 조사함으로써 식별될 수 있다.

[0055] 메틸화, 아세틸화 및 인산화에 의한 히스톤의 변형은 유전자를 침묵시킴으로써 게놈의 안정성을 유지하는 역할을 하는 것으로 나타났다. 그러나, 히스톤 변형으로 인해 부적절한 유전자를 침묵시키는 것은 부작용을 일으킬 수 있다. 예를 들어, 히스톤 H3의 라이신 9(Lys9)의 메틸화는 일부 암세포에서 CDKN2A 종양 억제 유전자를 침묵시키는 것으로 나타났다.

[0056] 염색질 및 핵산의 변형을 담당하는 기계(machinery)는 정상 및 악성 세포에서 유전자를 침묵시키기 위해 협력 방식으로 작동한다. 이러한 다중-단백질 복합체를 환경 발암물질의 표적이 될 가능성이 있는 히스톤과 핵산 메틸화 기계 사이에 혼선이 있음을 나타내는 증거가 있다 (Feinberg A P. 2004. Seminars in Cancer Biology 14:427-432).

[0057] 전역 메틸화 및 메틸화 바이오마커를 검출하는 방법은 전체 내용이 본원에 참조로 포함되어 있는 미국 특허공개 US2007/0292866에 제공된 것을 포함한다. 특정 게놈 유전자좌에서 DNA 메틸화를 측정하는 방법은, 예를 들어, 메틸화된 DNA의 면역침강, 메틸화된 단편의 메틸-결합 단백질 농축, 메틸화에 민감하지 않은 제한 효소로의 분해, 중아황산염 전환 후 생어(Sanger) 시퀀싱(문헌(Laird, Nat Review Genet 11: 191-203, 2010)에서 검토됨)을 포함한다. 중아황산염 처리는 메틸화되지 않은 사이토신 잔기를 우라실로 전환시킬 수 있다(폴리머라제로 증폭한 후 판독값은 티민일 수 있다). 메틸사이토신은 중아황산염 처리에 의한 우라실로의 전환으로부터 보호될 수 있다. 중아황산염 처리 후, 주어진 사이토신 잔기의 메틸화 상태는, 서열을 변형되지 않은 참조 서열과 비교하여 추론할 수 있다.

[0058] 고처리량 시퀀싱 기술을 사용하여 단일-염기 분해능에서 전체 게놈, 즉 메틸롬(methylome)의 메틸화 상태를 프로파일링하는 기술이 개발되었다. 차세대 시퀀싱(next generation sequencing)(NGS), 또는 BS-seq와 결합된 게놈 DNA의 중아황산염 전환은 하나의 전략이다. 게놈 전체의 메틸화 시퀀싱과 여전히 관련된 높은 비용 때문에, 게놈 분할이 관심 영역을 풍부하게 할 수 있는 BS-seq 기술의 변형태를 사용할 수 있다. 이러한 변형태 중 하나는 감소된 표현 BS-seq(RRBS)로서, 이는, 이의 인식 부위의 일부로 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 메틸화에 민감하지 않은 제한 엔도뉴클레아제로 DNA 샘플을 분해한 다음, 선택된 단편들의 중아황산염 시퀀싱을 수행한다(Meissner et al., Nucleic Acids Res. 33(18):5868-5877, 2005). RRBS는 전체 게놈 중아황산염 시퀀싱보다 적은 적용범위를 제공하지만, 연구원은 약 50배 더 적은 시퀀싱 판독으로 다수의 특징에 걸쳐 정량적 DNA 메틸화 정보를 얻을 수 있으므로, 시퀀싱 비용이 크게 절감된다. RRBS 기술이 최초로 기술된 이후 (Meissner, et al. (2005) Nucleic Acids Res 33(18):5868, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함되어 있다), 많은 향상 및 개선이 있어 왔다 (예를 들어, 문헌(Boyle, et al. (2012) Genome Biol 13:R92)을 참조한다). 한 가지 접근법은, CCGG를 인식하는 메틸화에 민감하지 않은 제한 효소 MspI를 사용한다. 중아황산염 전환, PCR, 및 군집 생성 효율 동안의 부분적인 단편화(fragmentation)의 결과로, 통상적으로 길이가 300bp 미만인 이러한 단편의 하위집합

(subset)만이 시퀀싱될 수 있다. 그러나, 이러한 작은 단편은, 높은 빈도의 MspI 부위를 갖고 이에 따라 높은 빈도의 잠재적인 CpG 메틸화 부위를 갖는 게놈 DNA으로부터 파생된다. 이의 전체 내용이 본원에 참조로 포함되어 있는 미국 특허공개 US2015/0284769를 참조한다.

[0059] **III. 질환의 진단, 예후 및 치료**

[0060] 본 발명의 방법을 사용한 엑소좀의 검출, 단리 및 특성화는 질환 진단 및 예후를 평가하고 질환 재발로 이어질 수 있는 치료 실패의 조기 검출을 위한 치료 효능을 모니터링하는 데 유용한다. 또한, 본 발명에 따른 엑소좀 분석으로, 치료요법 과정을 완료한 전증상(presymptomatic) 환자에서의 조기 재발을 검출할 수 있다. 이는, 병든 세포에서 유래된 엑소좀의 존재가 질환 진행, 치료요법에 대한 열악한 반응, 질환의 재발, 및/또는 일정 기간 동안의 감소된 생존과 연관 및/또는 상관될 수 있기 때문에 가능하다. 따라서, 엑소좀의 열거 및 특성화는 치료요법에 대한 반응을 기반으로 초기 위험 및 후속 위험을 예측하는 기준 특성에 대해 환자들을 계층화하는 방법을 제공한다.

[0061] 예를 들어, 전술된 방법에 따라 단리된 암 세포 유래 엑소좀을 분석하여 대상체의 암을 진단하거나 예후할 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 방법은, 예를 들어, 암 세포 유래 엑소좀과 비-암 세포로부터 비롯된 엑소좀의 메틸화 상태를 비교함으로써 암 환자와 암 위험이 있는 환자를 평가하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 진단 또는 예후 방법 중 어느 하나에서, 암-특이적 메틸화 마크 또는 시그니처와 같은 하나 이상의 암 지표의 존재 또는 부재, 또는 임의의 다른 장애를 사용하여 진단 또는 예후를 생성할 수 있다.

[0062] 일측면에서, 체액(예를 들어, 혈액, 소변, 타액 등) 샘플이 환자로부터 추출되고 질환 세포에서 유래된 엑소좀이 본원에 기재된 바와 같이 검출 및/또는 단리된다. 예를 들어, 엑소좀은 ATP-결합 카세트 서브-패밀리 A 구성원 6(ABCA6), 테트라스파닌-4(TSPAN4), SLIT 및 NTRK-유사 단백질 4(SLITRK4), 추정 프로토카드헤린 베타-18(PCDHB18), 골수 세포 표면 항원 CD33(CD33), 및/또는 글리피칸-1 (GPC1)에 결합하는 하나 이상의 항체 또는 압타머로 표지될 수 있고, 항체는 공유 결합된 형광 표지를 가질 수 있다. 이어서, 샘플 내의 암 세포 유래 엑소좀의 수 및 특성을 판정하기 위한 분석을 수행할 수 있으며, 이러한 측정으로부터, 초기 혈액 샘플에 존재하는 암 세포 유래 엑소좀의 수를 판정할 수 있다. 암 세포 유래 엑소좀으로 식별된 엑소좀은, 암 세포 유래 엑소좀에서 선택적으로 또는 특이적으로 발견되는 것으로 알려진 제2(또는 그 이상의) 마커, 예를 들어, 히스톤 H2A 유형 2-A(HIST1H2AA), 히스톤 H2A 유형 1-A(HIST1H1AA), 히스톤 H3.3(H3F3A), 히스톤 H3.1(HIST1H3A), 아연 핑거 단백질 37 동족체(ZFP37), 라미닌 서브유닛 베타-1(LAMB1), 요세관간질성신염 항원-유사(TINAGL1), 페록시레데옥신-4(PRDX4), 콜라겐 알파-2(IV) 사슬(COL4A2), 추정 단백질 C3P1(C3P1), 헤미센틴-1(HMCN1), 추정 로필린-2-유사 단백질(RHPN2P1), 안키린 반복 도메인-함유 단백질 62(ANKRD62), 트리파타이트 모티프-함유 단백질 42(TRIM42), 결합 플라코글로빈(JUP), 튜불린 베타-2B 사슬(TUBB2B), 엔도리보뉴클레아제 다이서(DICER1), E3 유비퀴틴-단백질 리가아제 TRIM71(TRIM71), 카타닌 p60 ATPase-함유 서브유닛 A-유사 2(KATNAL2), 단백질 S100-A6(S100A6), 5'-뉴클레오티다아제 도메인-함유 단백질 3(NT5DC3), 발린-tRNA 리가아제(VARS), 카즈린(KAZN), ELAV-유사 단백질 4(ELAVL4), RING 핑거 단백질 166(RNF166), FERM 및 PDZ 도메인-함유 단백질 1(FRMPD1), 78 kDa 글루코스-조절 단백질(HSPA5), 트래피킹 단백질 입자 복합체 서브유닛 6A(TRAPPC6A), 스쿠알렌 모노옥시게나아제(SQLE), 종양 감수성 유전자 101 단백질(TSG101), 공포 단백질 분류 28 동족체(VPS28), 프로스타글란딘 F2 수용체 음성 조절인자(PTGFRN), 이소부티릴-CoA 데하이드로게나아제, 미토콘드리아(ACAD8), 26S 프로테아제 조절 서브유닛 6B(PSMC4), 연장 인자 1-감마(EEF1G), 티틴(TTN), 티로신-단백질 포스파타아제 유형 13(PTPN13), 트리오스포스페이트 이소머라아제(TPI1), 또는 카복시펩티다아제 E(CPE) 검출을 통해 그 자체로 검증될 수 있다. 암 세포 유래 엑소좀의 수는 세포측정 또는 현미경 기술에 의해 판정되어 엑소좀을 시각적으로 정량화하고 특성화할 수 있다. 암 세포 유래 엑소좀은 당업계에 공지된 다른 방법(예를 들어, ELISA)에 의해 검출되어 정량화될 수 있다.

[0063] 다양한 측면에서, 대상체의 암 세포 유래 엑소좀 수 및 메틸화 시그니처 특성의 분석은 대상체의 진행 및 병리를 평가하기 위해 다양한 간격으로 특정 시간 과정에 걸쳐 이루어질 수 있다. 예를 들어, 암 세포 유래 엑소좀의 수준 및 특성을 시간의 함수로서 추적하기 위해, 분석이 1일, 2일, 3일, 1주일, 2주일, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년과 같은 정기적인 간격으로 수행될 수 있다. 기존 암 환자의 경우, 이는 질환의 진행에 대한 유용한 지표를 제공하며, 암 세포 유래 엑소좀의 증가, 감소 또는 변화 부족에 따라 의료 종사자가 적절한 치료 선택을 하도록 지원한다. 시간이 지남에 따라 암 세포 유래 엑소좀이 2배, 5배, 10배 또는 그 이상 증가하면 환자의 예후가 감소하고, 이는, 환자가 치료요법을 변경해야 한다는 초기 지표가 된다. 유사하게, 2배, 5배, 10배 또는 그 이상의 증가는, 치료요법에 대한 예후 및 반응을 추가로 평가하기 위해 환자는 영상화와 같은 추가의 검사를 받아야 함을 나타낸다. 시간이 지남에 따라 암 세포 유래 엑소좀이 2배, 5배, 10배 또는 그 이상

감소하면 질환 안정화 및 치료요법에 대한 환자의 반응을 나타내며, 이는 치료를 변경하지 않는 지표이다. 암 위험에 처한 환자에게 있어서 암 세포 유래 엑소좀의 갑작스러운 증가는, 환자에게 종양이 발생하였음을 조기에 경고하여 조기 진단을 제공할 수 있다. 일 구현예에서, 암 세포 유래 엑소좀의 검출은 암의 병기(staging)에 따라 증가한다.

[0064] 본원에 제공된 임의의 방법에서, 추가의 임상 평가를 제공하기 위해 암 세포 유래 엑소좀을 특성화하기 위해 추가의 분석을 수행할 수도 있다. 예를 들어, 영상 분석 및 벌크 수 측정 이외에도, 특정한 암 마커에 특이적인 프라이머를 사용한 멀티플렉싱과 같은 PCR 기술을 사용하여, 암 세포 유래 엑소좀이 비롯된 종양 유형, 전이 상태, 및 악성 정도와 같은 정보를 얻을 수 있다. 또한, DNA 또는 RNA 분석, 단백체(proteome) 분석 또는 대사체(metabolome) 분석은 환자 암의 특성에 대한 추가 정보를 평가하는 수단으로서 수행될 수 있다.

[0065] 예를 들어, 후성유전학적 분석은 특정 치료요법에 대한 대상체의 반응성을 판정하거나 암 치료시 후보약제의 효과성을 판정하기에 충분한 데이터를 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 대상체의 암 세포 유래 엑소좀을 검출/단리하고 상기 암 세포 유래 엑소좀을 분석함으로써 특정 치료 요법에 대한 대상체의 반응성을 판정하거나 암 치료시의 후보약제의 효과성을 판정하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 약물 치료가 환자에게 투여되면, 본 발명의 방법을 사용하여 약물 치료의 효능을 판정하는 것이 가능하다. 예를 들어, 약물 치료 전에 환자로부터 채취한 샘플, 및 약물 치료와 동시에 또는 이후에 환자로부터 채취한 하나 이상의 샘플은 본 발명의 방법을 사용하여 처리될 수 있다. 처리된 각 샘플의 분석 결과를 비교하여, 약물 치료의 효능 또는 약물에 대한 환자의 반응성을 판정할 수 있다. 이러한 방식으로, 실패한 화합물을 조기 식별하거나 유망한 화합물을 조기 검증할 수 있다.

[0066] 본 발명의 특정 측면은 엑소좀으로부터 단리된 게놈 DNA에서 발견되는 메틸화 마크의 존재에 근거하여 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 측면은 치료제 또는 진단제를 발현하거나 포함하는 엑소좀으로 환자를 치료하는 것을 제공한다. 본원에서 사용되는 "치료제"는 암 또는 기타 병태의 치료에 유용한 원자, 분자, 또는 화합물이다. 치료제의 예는 약물, 화학요법제, 치료용 항체 및 항체 단편, 독소, 방사성 동위원소, 효소, 뉴클레아제, 호르몬, 면역조절제, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 킬레이터, 붕소 화합물, 광 활성제, 및 염료를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본원에서 사용된 "진단제"는 질환의 진단, 검출 또는 시각화에 유용한 원자, 분자, 또는 화합물이다. 본원에 기재된 구현예에 따라, 진단제는 방사성 물질(예를 들어, 방사성 동위원소, 방사성 핵종, 방사성 표지 또는 방사성 추적자), 염료, 조영제, 형광 화합물 또는 분자, 생물발광 화합물 또는 분자, 효소 및 강화 물질(예를 들어, 상자성 이온)을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

[0067] 일부 측면에서, 치료적 재조합 단백질은, 환자의 세포에서 손실된 활성을 갖는 단백질, 원하는 효소 활성을 갖는 단백질, 원하는 억제 활성을 갖는 단백질 등일 수 있다. 예를 들어, 전사 인자, 효소, 단백질성 독소, 항체, 단클론 항체 등일 수 있다. 단클론 항체는 세포내 항원에 특이적으로 또는 선택적으로 결합할 수 있다. 단클론 항체는 세포내 항원의 기능을 억제하고/하거나 단백질-단백질 상호작용을 방해할 수 있다. 본 발명의 다른 측면은 환자 샘플에서 암 세포 유래 엑소좀의 DNA에서 발견되는 특정 메틸화 마크의 존재에 근거하여 질환을 진단하는 것을 제공한다.

[0068] 본원에 사용된 용어 "대상체(subject)"는 본 방법이 수행되는 임의의 개인 또는 환자를 나타낸다. 일반적으로 대상체는 인간이지만, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 대상체는 동물일 수 있다. 따라서 설치류(마우스, 랫트, 햄스터 및 기니피그 포함), 고양이, 개, 토끼, 농장 동물(소, 말, 염소, 양, 돼지 등 포함) 및 영장류(원숭이, 침팬지, 오랑우탄 및 고릴라 포함)와 같은 포유류를 포함한 다른 동물이 대상체의 정의 내에 포함된다.

[0069] "치료" 및 "치료하는"은 질환 또는 건강-관련 상태의 치료적 이점을 얻기 위한 목적으로 대상체에 치료제의 투여 또는 적용, 또는 대상체에 대한 시술 또는 양식(modality)의 수행을 나타낸다. 예를 들어, 치료는 화학요법, 면역요법 또는 방사선 요법의 투여, 수술의 수행, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0070] 본원에 사용된 용어 "치료적 이점" 또는 "치료적으로 효과적인"은 이 상태의 의학적 치료와 관련하여 대상체의 웰빙을 촉진하거나 향상시키는 모든 것을 나타낸다. 여기에는 질환의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도 감소가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 암 치료는, 예를 들어, 종양 침습성 감소, 암 성장률 감소 또는 전이 예방을 포함할 수 있다. 암 치료는 또한 암에 걸린 대상체의 생존을 연장하는 것을 나타낼 수 있다.

[0071] 또한, 본 발명은 비-암성 질환을 진단하고, 특히 DNA 메틸화의 변경과 관련된 것으로 알려진 임의의 질환을 진단하는 데에도 사용될 수 있는 것으로 인식된다. DNA 메틸화의 변경과 관련된 사람 질병에 대한 검토는 전체 내

용이 본원에 참조로 포함되어 있는 문헌을 참조한다(Jin and Liu, Genes & Diseases, 5:1-8, 2018). 예를 들어, 본 발명은 자가면역 질환(예를 들어, 류머티스 관절염, 전신 홍반 루푸스, 다발성 경화증), 대사 장애(고혈당증, 고지혈증, 심혈관계 질환, 당뇨병), 신경 질환(예를 들어, 자폐증 스펙트럼 장애, 레트 증후군, 파킨슨병, 조현병), 또는 심리적 장애를 진단하는 데 사용될 수 있다.

[0072] 치료에 대한 환자의 효과적인 반응 또는 환자의 "반응성(responsiveness)"은 질환 또는 장애에 걸릴 위험이 있거나 이를 앓고 있는 환자에게 부여되는 임상적 또는 치료적 이점을 나타낸다. 이러한 이점에는 세포 또는 생물학적 반응, 완전 반응, 부분 반응, 안정한 질환(진행 또는 재발 없음) 또는 나중에 재발하는 반응이 포함될 수 있다. 예를 들어, 효과적인 반응은 암 진단을 받은 환자의 종양 크기 감소 또는 무진행 생존일 수 있다.

[0073] 치료 결과를 예측하고 모니터링할 수 있고/있거나 이러한 치료로부터 이익을 얻는 환자가 본원에 기재된 방법을 통해 식별되거나 선택될 수 있다.

[0074] 신생물 병태 치료와 관련하여, 신생물 병태의 단계에 따라, 신생물 병태 치료는 다음 요법 중 하나 또는 조합을 포함한다: 신생물 조직 제거 수술, 방사선 요법 및 화학 요법. 다른 치료 요법은 항암제, 예를 들어, 치료 조성물 및 화학 요법제의 투여와 조합될 수 있다. 예를 들어, 이러한 항암제로 치료될 환자는 또한 방사선 요법을 받을 수 있고/있거나 수술을 받을 수 있다.

[0075] 질환의 치료를 위해, 치료 조성물의 적절한 투여량은 상기 정의된 바와 같이 치료될 질환의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 환자의 임상 이력 및 작용제에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 따라 달라질 것이다. 작용제는 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다.

[0076] 치료 및 예방 방법 및 조성물은 원하는 효과를 달성하는 데 효과적인 조합된 양으로 제공될 수 있다. 조직, 종양 또는 세포는 하나 이상의 작용제를 포함하는 하나 이상의 조성물 또는 약리학적 제형(들)과 접촉되거나, 조직, 종양 및/또는 세포를 2개 이상의 별개의 조성물 또는 제형과 접촉시킴으로써 접촉될 수 있다. 또한, 이러한 병용 요법은 화학 요법, 방사선 요법, 외과적 요법 또는 면역 요법과 함께 사용될 수 있음이 고려된다.

[0077] 일부 측면에서, 질환은 암이다. 본원에 사용된 용어 "암"은 고형 종양, 전이성 암 또는 비-전이성 암을 기재하는 데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 암은 방광, 혈액, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 결장, 식도, 십이지장, 소장, 대장, 결장, 직장, 항문, 잇몸, 머리, 신장, 간, 폐, 비인두, 목, 난소, 췌장, 전립선, 피부, 위, 고환, 혀 또는 자궁에서 비롯될 수 있다.

[0078] 암은 구체적으로 다음과 같은 조직학적 유형일 수 있지만 이에 한정되지 않는다: 신생물, 악성; 암종; 암종, 미분화; 거대 및 방추 세포 암종; 소세포 암종; 유두모양 암종; 편평세포 암종; 림프상피성 암종; 기저세포 암종; 모발기질 암종; 이행세포 암종; 유두모양 이행세포 암종; 선암종; 가스트린종, 악성; 담관암종; 간세포 암종; 복합 간세포 암종 및 담관암종; 섬유주 선암종(trabecular adenocarcinoma); 샘낭암종; 선종폴립 내 선암종; 선암종, 가족성 대장폴립증; 고형 암종; 카르시노이드 종양, 악성; 세기관지-폐포 선암종; 유두모양 선암종; 혐색소성 암종; 호산성 암종; 호산세포 선암종; 호염기 암종; 투명세포 선암종; 과립상세포 암종; 여포상 선암종; 유두모양 및 여포상 선암종; 비캡슐화 경화성 암종; 부신피질 암종; 자궁내막양 암종; 피부 부속기관 암종; 아포크린 선암종; 피지 선암종; 귀지 선암종; 점막표피모양 암종; 낭샘암종; 유두모양 낭샘암종; 유두모양 장액낭샘암종; 점액 낭샘암종; 점액 선암종; 인환세포 암종; 침윤성 관상 암종; 수질 암종; 소엽 암종; 염증형 암종; 파제트병, 유방; 샘꽈리세포 암종; 샘평편상피 암종; 선암종 w/편평상피화생; 흉선종, 악성; 난소 기질종양, 악성; 협막세포종, 악성; 과립막세포종양, 악성; 남성아세포종, 악성; 세르톨리세포 암종; 라이디히세포종양, 악성; 지질세포종양, 악성; 부신경절종, 악성; 유방외 부신경절종, 악성; 갈색세포종; 사구맥관육종; 악성 흑색종; 멜라닌결핍 흑색종; 표재확산 흑색종; 거대색소 모반 내 악성 흑색종; 유상피세포 흑색종; 청색모반, 악성; 육종; 섬유육종; 섬유성 조직구증, 악성; 점액육종; 지방육종; 평활근육종; 횡문근육종; 배아 횡문근육종; 포상 횡문근육종; 간질 육종; 혼합 종양, 악성; 뮐러 혼합 종양; 신장모세포종; 간모세포종; 암육종; 중간엽종, 악성; 브레너 종양, 악성; 엽상 종양, 악성; 활막 육종; 중피종, 악성; 난소고환종; 배아 암종; 기형종, 악성; 난소갑상선종, 악성; 융모막암종; 중신종, 악성; 혈관육종; 혈관내피종, 악성; 카포시 육종; 혈관주위세포종, 악성; 림프관육종; 골육종; 뼈막 골육종(juxtacortical osteosarcoma); 연골육종; 연골아세포종, 악성; 간엽성 연골육종; 골거대세포종양; 유잉 육종; 치원성 종양, 악성; 법랑아세포성 치아육종; 법랑모세포종, 악성; 법랑아세포성 섬유육종; 송과체부종양, 악성; 척삭종; 신경교종, 악성; 상의세포종; 성상세포종; 원형질 성상세포종; 원섬유 성상세포종; 성아세포종; 교모세포종; 핍지교종; 희소돌기아교모세포종; 원시신경외배엽; 소뇌육종; 신경절아세포종; 신경아세포종; 망막모세포종; 후신경원성 종양; 수막종, 악성; 신경섬유육종; 신경집종, 악성; 과립상세포 종양, 악성; 악성 림프종; 호지킨병; 호지킨; 파라육아종; 악성 림프종,

소형림프구성; 악성 림프종, 대세포, 미만성; 악성 림프종, 여포상; 균상식육종; 다른 특정된 비-호지킨 림프종; 악성 조직구증; 다발성 골수종; 비만세포 육종; 면역증식성 소장 질환; 백혈병; 림프성 백혈병; 형질세포 백혈병; 적백혈병; 림프육종세포 백혈병; 골수성 백혈병; 호염기성 백혈병; 호산구성 백혈병; 단핵구성 백혈병; 비만세포 백혈병; 거대모구성 백혈병; 골수성 육종; 및 모발세포 백혈병.

[0079] 이들 측면에서, 요법은 화학 요법, 방사선 요법, 면역 요법, 및 수술을 포함한다. 본 발명에 따라 매우 다양한 화학요법제가 사용될 수 있다. 용어 "화학요법"은 암을 치료하기 위한 약물의 사용을 나타낸다. "화학 요법제"는 암 치료에 투여되는 화합물 또는 조성물을 의미하기 위해 사용된다. 이러한 작용제 또는 약물은 세포 내 활동 모드, 예를 들어, 이들이 세포 주기에 영향을 미치는지 여부 및 어느 단계에서 이들이 세포 주기에 영향을 미치는지에 따라 분류된다. 대안적으로, 작용제는 DNA를 직접 교차 결합하거나, DNA에 삽입되거나, 핵산 합성에 영향을 줌으로써 염색체 및 유사분열 이상을 유도하는 능력에 따라 특성화될 수 있다.

[0080] 화학요법제의 예로는, DNA 손상 체크포인트 억제제, 예컨대 CHK 억제제 (AZD7762, 프렉사서팁(Prexasertib), GDC-0575, CCT245737), ATR 억제제 (AZD6738, BAY1895344, M4344, 버조세르팁(Berzosertib)), Wee1 억제제 (AZD1775), DNA-PK 억제제 (M9831, 네디세르팁(Nedisertib), CC-115); 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어 부설판, 임프로설판, 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카보퀴온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드, 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토게닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신(합성 유사물질 토포테칸 포함); 테모졸로마이드; 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카젤레신 및 비젤레신 합성 유사물질 포함); 크립토피신(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카마이신(합성 유사물질, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인(sarcodictyin); 스퐁기스타틴; 질소 머스터드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 및 우라실 머스터드; 니트로스우레아, 예를 들어 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님누스틴(ranimnustine); 항생제, 예를 들어 에네디인(enediyne) 항생제(예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마1I 및 칼리케아미신 오메가I1); 디네마이신(dynemicin) A를 포함하는 디네마이신; 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생제 발색단, 아클라시노마이신(aclacinomysin), 악티노마이신, 오트라르나이신(authrarnycin), 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르치노필린, 크로모미시니스(chromomycinis), 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라르나이신(nogalarnycin), 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 켈라마이신(quelamycin), 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 및 조루비신; 대사길항물질, 예를 들어 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사물질, 예를 들어 데노프테린, 프테로프테린, 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모퍼(carmofur), 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 및 플록수리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 및 테스토락톤; 항-부신(anti-adrenals), 예를 들어 미토탄 및 트리로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어 프로린산(frolinic acid); 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트랙세이트(edatraxate); 데포파민; 데메콜신; 디아지퀴온(diaziquone); 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌(lonidainine); 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰(mopidanmol); 니트라에린(nitraerine); 펜토스타틴; 페나멧; 피라루비신; 로소산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK폴리사카라이드 복합체; 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안가이딘(anguidine)); 우레탄; 빈데신; 데카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신(gacytosine); 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀 젬시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 백금 배위 착물, 예를 들어 시스플라틴, 옥살리플라틴, 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸(예를 들어, CPT-11); 토포이소머라아제 억제제 RFS 2000; 디플루오로

메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 카페시타빈; 카보플라틴, 프로카바진, 플리코마이신, 젬시타빈(gemcitabien), 나벨빈, 파네실-단백질 트랜스페라아제 억제제, 트랜스플라티넘, 및 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산, 또는 유도체가 포함된다.

[0081] DNA 손상을 유발하고 광범위하게 사용되는 다른 요인으로는 일반적으로 γ-선, X-선, 및/또는 종양 세포로의 방사성 동위원소의 직접 전달이라고 알려진 것이 포함된다. 마이크로파, 양성자 빔 조사(미국 특허 5,760,395 및 4,870,287) 및 UV-조사와 같은 다른 형태의 DNA 손상 요인도 고려된다. 이러한 모든 요인은 DNA, DNA의 전구체, DNA의 복제 및 복구, 및 염색체의 조립 및 유지에 대한 광범위한 손상에 영향을 미칠 가능성이 높다. X-선의 투여 범위는 장기간(3 내지 4주) 동안 50 내지 200 뢴트겐의 1일 선량부터 2000 내지 6000 뢴트겐의 단일 선량에 이르기까지 다양하다. 방사성 동위원소의 투여 범위는 매우 다양하며, 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도 및 유형, 신생물 세포의 흡수에 따라 달라진다.

[0082] 숙련가는 추가적인 면역요법이 본 구현예의 방법과 병용하여 또는 함께 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 암 치료의 맥락에서, 면역요법은 일반적으로 암세포를 표적으로 하고 파괴하기 위해 면역 효과기 세포와 분자의 사용에 의존한다. 리툭시맙(Rituximab)(리툭산(RITUXAN)®)이 이러한 예이다. 면역 효과기는, 예를 들어, 종양 세포 표면상의 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 항체는 단독으로 치료 효과기 역할을 할 수 있거나 다른 세포를 동원하여 실제로 세포 사멸에 영향을 미칠 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소(화학요법, 방사성 핵종, 리신 A 사슬, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)에 접합될 수 있으며, 표적화제로 작용할 수 있다. 대안적으로, 효과기는 종양 세포 표적과 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 운반하는 림프구일 수 있다. 다양한 효과기 세포에는 세포독성 T 세포 및 NK 세포가 포함된다.

[0083] 항체-약물 접합체는 암 치료제 개발에 대한 획기적인 접근방식으로서 등장하였다. 암은 세계에서 가장 큰 사망원인 중 하나이다. 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate)(ADC)는 세포 살상 약물에 공유 연결된 단클론 항체(단클론 antibody)(MAb)로 구성된다. 이러한 접근방식은 항원 표적에 대한 MAb의 높은 특이성을 매우 강력한 세포독성 약물과 조합하여, 항원 수준이 풍부한 종양 세포에 페이로드(약물)를 전달하는 "무장된" MAb를 생성한다 (Carter et al., 2008; Teicher 2014; Leal et al., 2014). 약물의 표적 전달은 또한 정상 조직에서의 노출을 최소화하여, 독성을 감소시키고 치료 지수를 향상시킨다. 두 가지 ADC 약물인 ADCETRIS®(브렌툭시맙 베도틴)는 2011년에 그리고 KADCYLA®(트라스투주맙 엠탄신 또는 T-DM1)는 2013년에 FDA 승인을 받았다. 현재 암 치료를 위한 다양한 임상 시험 단계에 30개 이상의 ADC 약물 후보가 있다 (Leal et al., 2014). 항체 엔지니어링 및 링커-페이로드 최적화가 점점 더 성숙해짐에 따라, 신규한 ADC의 발견 및 개발은 이러한 접근방식(Teicher 2009)에 적합한 신규한 표적의 식별 및 검증과 표적 MAb 생성에 점점 더 의존하고 있다. ADC 표적에 대한 두 가지 기준은 종양 세포에서의 상향조절/높은 수준의 발현과 강력한 내재화이다.

[0084] 면역요법의 일측면에서, 종양 세포는 표적화 가능한, 즉, 대부분의 다른 세포에 존재하지 않는 일부 마커를 보유해야 한다. 많은 종양 마커가 존재하며 이들 중 임의의 마커는 본 구현예의 맥락에서 표적화에 적합할 수 있다. 일반적인 종양 마커에는 CD20, 암배아 항원, 티로시나아제(p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스 항원, MucA, MucB, PLAP, 라미닌 수용체, erb B 및 p155가 포함된다. 면역요법의 대안적인 측면은 항암 효과와 면역 자극 효과를 결합하는 것이다. 사이토카인, 예를 들어, IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN, 케모카인, 예를 들어 MIP-1, MCP-1, IL-8, 및 성장 인자, 예를 들어 FLT3 리간드를 포함하는 면역 자극 분자도 존재한다.

[0085] 현재 연구중이거나 사용중인 면역요법의 예로는 면역 보조제, 예를 들어, 마이코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis), 플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum), 디니트로클로로벤젠, 및 방향족 화합물(미국 특허 5,801,005 및 5,739,169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998); 사이토카인 요법, 예를 들어, 인터페론 α, β, 및 γ, IL-1, GM-CSF, 및 TNF(Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998); 유전자 요법, 예를 들어, TNF, IL-1, IL-2, 및 p53(Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; 미국 특허 5,830,880 및 5,846,945); 모노클로날 항체, 예를 들어, 항-CD20, 항-강글리오사이드 GM2, 및 항-p185(Hollander, 2012; Hanibuchi et al., 1998; 미국 특허 5,824,311)가 있다. 하나 이상의 항암 요법이 본원에 기재된 항체 요법과 함께 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0086] 일부 구현예에서, 면역요법은 면역 체크포인트 억제제일 수 있다. 면역 체크포인트는 신호(예를 들어, 공-자극 분자)를 높이거나 신호를 낮추는 면역계 내의 분자이다. 면역 체크포인트 차단에 의해 표적화될 수 있는 억제 면역 체크포인트 분자로는 아데노신 A2A 수용체(A2AR), B7-H3(CD276으로도 공지됨), B 및 T 림프구 감쇠물(BTLA), 세포독성 T-림프구-관련 단백질 4(CTLA-4, CD152로도 공지됨), 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO), 살해-세포 면역글로불린(KIR), 림프구 활성화 유전자-3(LAG3), 예정된 사멸 1(PD-1), 예정된 사멸 리간드 1(PD-

L1), T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3(TIM-3) 및 T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제 인자(VISTA)가 포함된다. 특히, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 축 및/또는 CTLA-4를 표적화한다.

[0087] 면역 체크포인트 억제제는 약물 예를 들어 소분자, 리간드 또는 수용체의 재조합 형태일 수 있거나, 특히 항체, 예를 들어 인간 항체이다(예를 들어, 국제 특허 공보 WO 2015016718; Pardoll 2012; 둘 다 본원에 참조로 포함됨). 면역 체크포인트 단백질 또는 이의 유사체의 공지된 억제제가 사용될 수 있으며, 특히 키메라화, 인간화 또는 인간 형태의 항체가 사용될 수 있다. 숙련가가 알고 있는 바와 같이, 본 개시내용에 언급된 특정 항체에 대한 대안적인 및/또는 동등한 명칭이 사용될 수 있다. 이러한 대안적 및/또는 동등한 명칭은 본 발명의 맥락에서 상호교환 가능하다. 예를 들어, 람브롤리주맙(lambrolizumab)은 MK-3475 및 펨브롤리주맙의 대안적인 및 동등한 명칭으로도 공지되어 있음이 알려져 있다.

[0088] 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1이 이의 리간드 결합 파트너와 결합하는 것을 억제하는 분자이다. 구체적인 측면에서, PD-1 리간드 결합 파트너는 PDL1 및/또는 PDL2이다. 또 다른 구현예에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1이 이의 결합 파트너와 결합하는 것을 억제하는 분자이다. 구체적인 측면에서, PDL1 결합 파트너는 PD-1 및/또는 B7-1이다. 또 다른 구현예에서, PDL2 결합 길항제는 PDL2가 이의 결합 파트너와 결합하는 것을 억제하는 분자이다. 구체적인 측면에서, PDL2 결합 파트너는 PD-1이다. 길항제는 항체, 이의 항원 결합 단편, 면역접합체(immunoadhesin), 융합 단백질 또는 올리고펩티드일 수 있다. 예시적인 항체는 미국 특허 제8,735,553호, 제8,354,509호 및 제8,008,449호에 기재되어 있으며, 모두 본원에 참조로 포함되어 있다. 본원에 제공된 방법에 사용하기 위한 다른 PD-1 축 길항제는 미국 특허 제20140294898호, 제2014022021호 및 제20110008369호(모두 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 당업계에 공지되어 있다.

[0089] 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체(예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체)이다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 및 CT-011로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 면역접합체(예를 들어, 불변 영역(예를 들어, 면역글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PDL1 또는 PDL2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 면역접합체)이다. 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 PDR-001(스파탈리주맙(spartalizumab)), AMP-224 또는 AMP-514이다. MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558, 및 OPDIVO®로도 공지된 니볼루맙은 WO 2006/121168에 기재된 항-PD-1 항체이다. MK-3475, 머크(Merck) 3475, 람브롤리주맙, 키트루다(KEYTRUDA)®, 및 SCH-900475로도 공지된 펨브롤리주맙은 WO 2009/114335에 기재된 항-PD-1 항체이다. hBAT 또는 hBAT-1로도 공지된 CT-011은 WO 2009/101611에 기재된 항-PD-1 항체이다. B7-DCIg로도 공지된 AMP-224는 WO 2010/027827 및 WO 2011/066342에 기재된 PDL2-Fc 융합 가용성 수용체이다. 일부 구현예에서, PD-1 축 억제제는 항-PD-L1 항체, 예를 들어 아테졸리주맙, 아벨루맙, 두르발루맙, BMS-936559, 또는 CK-301이다.

[0090] 본원에 제공된 방법에서 표적화될 수 있는 또 다른 면역 체크포인트는 CD152로도 공지된 세포독성 T-림프구-관련 단백질 4(CTLA-4)이다. 인간 CTLA-4의 완전한 cDNA 서열은 젠뱅크(Genbank) 수탁 번호가 L15006이다. CTLA-4는 T 세포의 표면에서 발견되며, 항원-제시 세포의 표면에서 CD80 또는 CD86에 결합될 때 "오프(off)" 스위치 역할을 한다. CTLA4는 헬퍼 T 세포의 표면에서 발현되고 억제 신호를 T 세포에 전송하는 면역글로불린 수퍼패밀리의 일원이다. CTLA4는 T-세포 공-자극 단백질인 CD28과 유사하며, 두 분자 모두 항원-제시 세포에서 각각 B7-1 및 B7-2라고도 하는 CD80 및 CD86에 결합한다. CTLA4는 T 세포에 억제 신호를 전송하는 반면, CD28은 자극 신호를 전송한다. 세포내 CTLA4는 또한 조절 T 세포에서 발견되며, 이의 기능에 중요할 수 있다. T 세포 수용체와 CD28을 통한 T 세포 활성화는 B7 분자에 대한 억제 수용체인, CTLA-4의 발현을 증가시킨다.

[0091] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-CTLA-4 항체(예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체), 이의 항원 결합 단편, 면역접합체, 융합 단백질, 또는 올리고펩티드이다.

[0092] 항 본 방법에 사용하기에 적합한 항-인간-CTLA-4 항체(또는 이로부터 유래된 VH 및/또는 VL 도메인)는 당업계에 익히 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 대안적으로, 당업계에서 인정된 항-CTLA-4 항체가 사용될 수 있다. 예를 들어, US 8,119,129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504(CP675,206, 트레멜리무맙으로도 공지됨; 이전에 티실리무맙(ticilimumab)), 미국 특허 6,207,156; 문헌(Hurwitz et al., 1998; Camacho et al., 2004; Mokyr et al., 1998)에 개시된 항-CTLA-4 항체가 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있다. 각각의 전술된 간행물의 교시는 본원에 참조로 포함된다. CTLA-4와의 결합에 대해 이러한 당업계에서 인정된 임의의 항체와 경쟁하는 항체도 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간화 CTLA-4 항체는 국제 특허 출원 WO 2001014424, WO 2000037504, 및 미국 특허 8,017,114에 기재되어 있으며, 이들 모두 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0093] 예시적인 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙(10D1, MDX- 010, MDX- 101, 및 여보이(Yervoy)®로도 공지됨) 또는 이

의 항원 결합 단편 및 변이체이다(예를 들어, WO 01/14424 참조). 다른 구현예에서, 항체는 이필리무맙의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 일 구현예에서, 항체는 이필리무맙의 VH 영역의 CDR1, CDR2, 및 CDR3 도메인, 및 이필리무맙의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 전술된 항체와 동일한 CTLA-4 상의 에피토프와 결합에 대해 경쟁하고/하거나 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 전술된 항체와 적어도 약 90% 가변 영역 아미노산 서열 동일성(예를 들어, 이필리무맙과 적어도 약 90%, 95%, 또는 99% 가변 영역 동일성)을 갖는다.

[0094] CTLA-4를 조절하기 위한 다른 분자로는 미국 특허 US 5844905, US 5885796 및 국제 특허 출원 WO 1995001994 및 WO 1998042752(모두 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 CTLA-4 리간드 및 수용체; 및 미국 특허 US 8329867(본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 면역접합체가 포함된다.

[0095] 암 환자의 대략 60%는 예방, 진단 또는 병기결정, 치유 및 완화 수술을 포함하는 일부 유형의 수술을 받게 될 것이다. 치유 수술은 암 조직의 전부 또는 일부가 물리적으로 제거, 절제 및/또는 파괴되는 절제술을 포함하며, 본 구현예의 치료, 화학요법, 방사선 요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역요법 및/또는 대체 요법과 같은 다른 요법과 함께 사용될 수 있다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부를 물리적으로 제거하는 것을 나타낸다. 종양 절제술 외에도, 수술 치료는 레이저 수술, 냉동수술, 전기수술, 및 현미경-제어 수술(모스 수술(Mohs' surgery))을 포함한다.

[0096] 암 세포, 조직 또는 종양의 일부 또는 전부를 절제하면, 체내에 공동이 형성될 수 있다. 치료는 관류, 직접 주사, 또는 추가 항암 요법으로 부위의 국소 적용에 의해 달성될 수 있다. 이러한 치료는, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일마다, 또는 1, 2, 3, 4, 및 5주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월마다 반복될 수 있다. 이러한 치료는 투여량도 다양할 수 있다.

[0097] 치료의 치료 효능을 개선하기 위해 본 구현예의 특정 측면과 조합하여 다른 작용제를 사용할 수 있음이 고려된다. 이러한 추가 작용제로는 세포 표면 수용체 및 GAP 접합의 상향조절에 영향을 미치는 작용제, 세포증식 억제제 및 분화제, 세포 부착 억제제, 아폽토시스 유도제에 대한 과증식 세포의 민감도를 증가시키는 작용제, 또는 기타 생물 작용제가 포함된다. GAP 접합의 수를 증가시킴으로써 세포간 시그널링의 증가는 인접한 과증식 세포 집단에 대한 항-과증식 효과를 증가시킬 것이다. 다른 구현예에서, 세포증식 억제제 또는 분화제는 치료의 항-과증식 효능을 개선하기 위해 본 구현예의 특정 측면과 조합하여 사용될 수 있다. 본 구현예의 효능을 개선하기 위해 세포 부착 억제제가 고려된다. 세포 부착 억제제의 예로는 초점 부착 키나아제(FAK) 억제제 및 로바스타틴이 있다. 치료 효능을 개선하기 위해 항체 c225와 같은 아폽토시스에 대한 과증식 세포의 민감도를 증가시키는 다른 작용제가 본 구현예의 특정 측면과 조합하여 사용될 수 있다는 것이 추가로 고려된다.

[0098] 일부 측면에서, 질환은 유전적 각인 장애, 예컨대 안젤만 증후군, 프라더-빌리 증후군, 또는 벡위트-비데만 증후군이다. 이들 측면에서, 치료요법은 항-발작 약물(예를 들어, 나트륨 발프로에이트(에필림(Epilim)), 클로나제팜(리보트릴(Rivotril)), 라모트리진(라미탈(Lamictal)) 및 레베티라세탐(케프라(Keppra))), 인도테칸, 물리적 요법, 의사소통 요법, 행동 요법, 피라세탐(누트로필(Nootropil)), 카바마제핀(테그레톨(Tegretol)), 케톤생성 식단, 미주신경 자극(VNS), 사람 성장 호르몬 대체 요법, 성 호르몬 대체 요법 및 수술을 포함한다.

[0099] 일부 측면에서, 질환은 신경계 장애, 예컨대 알츠하이머병, 자폐증, 취약한 X 증후군, 헌팅턴병, 파킨슨병, 조현병, ATR-X 증후군, ICF 증후군, BWS, 레트 증후군, 알파-지중해빈혈, 루빈슈타인-테비 증후군, 또는 코핀-로우리 증후군이다. 이들 측면에서, 치료요법은 콜린에스테라제 억제제(예를 들어, 도네페질(Aricept), 리바스티그민(Exelon), 갈란타민(Razadyne)), 메만틴, 레보도파, 카비도파 및 항정신병제(예를 들어, 아리피프라졸(Abilify), 아세나핀(Saphris), 브렉스피프라졸(Rexulti), 카리프라진(브레일라(Vraylar)), 클로자핀(클로자릴(Clozaril)), 이로페리돈(파납트(Fanapt)), 루라시돈(라투다(Latuda)), 올란자핀(자이프렉사(Zyprexa)), 팔리페리돈(인베가(Invega)), 피마반세린(누플라지드(Nuplazid)), 쿠에티아핀(세로켈(Seroquel)), 리스페리돈(리스페르달(Risperdal)), 지프라시돈(지오돈(Geodon)))을 포함한다.

[0100] 일부 측면에서, 질환은 자가면역 질환, 예컨대 전신 홍반 루푸스 또는 류머티스 관절염이다. 이들 측면에서, 치료요법은 비스테로이드성 항염증 약물(예를 들어, 이부프로펜, 나프록센), 항말라리아 약물(예를 들어, 하이드록시클로로퀸), 코르티코스테로이드 및 면역 억제제(예를 들어, 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 사이클로스포린), 벨리무맙, 항류마티즘 약물(예를 들어, 메토트렉세이트, 레플루노마이드, 설파살라진), 바타셉트(오렌시아(Orencia)), 아달리무맙(휴미라(Humira)), 아나킨라(키너레트(Kineret)), 바리시티닙(올루미언트(Olumiant)), 세르톨리주맙(심지아(Cimzia)), 에타너셉트(엔브렐(Enbrel)), 골리무맙(심포니(Simponi)), 인플릭시맙(레미카데(Remicade)), 리툭시맙(리툭산(Rituxan)), 사릴루맙(케브자라(Kevzara)), 토실리주맙(악템라

(Actemra)), 및 토파시티닙(젤잔즈(Xeljanz))을 포함한다.

[0101] 일부 측면에서, 질환은 대사 장애, 예컨대 2형 당뇨병이다. 이들 측면에서, 치료요법은 메트포르민, 설포닐 우레아(예를 들어, 글리부리드, 글리피지드, 글리메피리드), 메글리티니드(예를 들어, 레파글리니드, 나테글리니드), 티아졸리딘디온(예를 들어, 로시글리타존, 피오글리타존), DPP-4 억제제(예를 들어, 시타글립틴, 삭사글립틴, 리나글립틴), 및 GLP-1 수용체 작용제(예를 들어, 엑세나티드, 리라글루티드, 세마글루티드), SGLT2 억제제(카나글리플로진, 다파글리플로진, 엠파글 리플로진), 및 인슐린을 포함한다.

[0102] **IV. 키트 및 진단법**

[0103] 본 발명의 다양한 측면에서, 체액 또는 조직 배양 배지에서 엑소좀을 정제하는 데 필요한 성분을 함유하는 키트가 구상된다. 다른 측면에서, 엑소좀을 단리하고 단리된 엑소좀 내에서 하나 이상의 질환 세포 유래 엑소좀 특이적 메틸화 마크(들)의 존재를 판정하는 데 필요한 성분들을 함유하는 키트가 구상된다.

[0104] 키트는 이러한 성분 중 어느 것을 함유하는 하나 이상의 밀봉된 바이알을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 또한 에펜도르프 튜브, 검정 플레이트, 주사기, 병 또는 튜브와 같은 키트의 구성 요소와 반응하지 않을 용기인 적절한 용기 수단을 포함할 수 있다. 용기는 플라스틱 또는 유리와 같은 멸균 가능한 재료로 만들어질 수 있다. 키트는 본원에 기재된 방법의 절차 단계를 개괄적으로 설명하는 지침 시트를 추가로 포함할 수 있으며, 본원에 기재되거나 숙련가에게 알려진 것과 실질적으로 동일한 절차를 따를 것이다. 지침 정보는, 컴퓨터를 사용하여 실행될 때, 샘플로부터 엑소좀을 정제하고/하거나 하나 이상의 질환 세포 유래 메틸화 마크(들)을 식별하는 실제 또는 가상의 절차를 표시하는 기계-판독 가능한 지침을 함유하는 컴퓨터 판독 가능한 매체에 있을 수 있다.

[0105] **V. 실시예**

[0106] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 다음 실시예에 개시된 기술은 본 발명의 실행에서 잘 기능하기 위해 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내며, 따라서 이의 실행을 위한 바람직한 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 당업자는 인식해야 한다. 그러나, 당업자는 본 개시내용에 비추어 볼 때, 개시된 특정 구현예에서 많은 변경이 이루어질 수 있고, 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않고 여전히 같거나 유사한 결과를 얻을 수 있음을 인식해야 한다.

[0107] **실시예 1 - 엑소좀 DNA에서의 DNA 메틸화의 검출**

[0108] DNA 메틸화를 조사하기 위해 가장 널리 사용되는 기술은 중아황산염 시퀀싱으로, 이는, 중아황산나트륨 처리를 사용하여 메틸화되지 않은 사이토신을 우라실로 전환한 다음 PCR 증폭 동안 티미딘으로 전환시키는 것이다. 메틸화된 사이토신은 중아황산염 처리 후에도 그대로 유지되므로, 참조를 위해 본래의 게놈과 다시 비교할 때, 메틸화된 부위는, 서열이 "T" 대신 "C"를 함유하는 위치를 관찰하여 판정할 수 있다 (Meissner et al., 2005).

[0109] 중아황산염 기술은 게놈 전체의 사이토신 메틸화 분석에 사용될 수 있지만, CpG 아일랜드는 게놈의 ~2%에만 존재하므로 전체 게놈 중아황산염 시퀀싱은 매우 비효율적이다. 따라서, 통상의 CpG 농축 계획은, CpG가 풍부한 영역을 표적으로 삼아 CpG 아일랜드의 적어도 70%를 포획하고 소량의 입력 DNA만을 필요로 하는, 감소된 표현 중아황산염 시퀀싱이며, 이는 단편화되거나 농도가 낮은 엑소좀 DNA와 같은 샘플에 매우 유용하다. 중아황산염 전환 후, 게놈의 CpG 풍부 영역을 표적으로 하는 프라이머 라이브러리가 사용되어, 부위별 DNA 단편이 생성된다. 분석 과정에서 이들 단편 또는 "판독치"는 참조 서열을 사용하여 DNA의 특정 영역에 맵핑(mapping)된다. 이어서, 맵핑된 모든 판독치에 대해 C에서 T 로의 전환 수를 계수하여, 각 부위에서의 메틸화에 대한 베타 값을 생성한다. 이어서, 샘플에서 조건들을 예를 들어 엑소좀과 세포 DNA를 부위 특이적 방식으로 비교할 수 있다(도 1).

[0110] 이들 실험을 위해, 계획은, 상이한 세포 유형들로부터 세포 DNA와 엑소좀 DNA를 단리하고, 샘플에 대해 중아황산염 전환을 수행하고, DNA 상에 존재하는 메틸화 패턴을 결정하기 위해 감소된 표현 중아황산염 시퀀싱을 수행하는 것이었다(도 2). 제1 실험은 엑소좀 DNA가 본래 세포의 메틸 지형을 충실하게 재현할 수 있는지, 그리고 이것이 시퀀싱에 의해 검출될 수 있는지를 판정하는 것을 목표로 하였다. 초기 파일럿 실험을 위해, 비-종양유발 HPDE 세포와 PDAC panc1 세포로부터 DNA를 단리하였다. 이어서, 동일한 세포의 엑소좀으로부터 DNA를 단리하였다. 이어서, DNA를 중아황산염 전환에 적용하여, 메틸화되지 않은 사이토신을 우라실로 변경시키고, 이는 PCR 증폭 과정에서 티민이 되어, 시퀀싱에 의해 검출될 수 있게 된다. 메틸화된 사이토신은 변하지 않는다. 중아황산염의 한계(메틸화되지 않은 사이토신을 탈아미노화시키는 데 요구되는 높은 온도 및 낮은 pH)는 DNA를 분해할 수 있으며, 이는 이미 단편화된 엑소좀 DNA의 과제이다. 따라서, 이 방법은 낮은 품질의 입력 DNA로부터의 결과

를 극대화하는 데 도움이 될 수 있는 판독 시퀀싱을 줄인다.

[0111] 하나의 실험에서, 세포 DNA는 Panc-1 세포로부터 추출되고, 세포로부터 배양 상청액을 수확하고 엑소좀 농축(NanoSight™ 분석)을 위해 처리한 후 엑소좀 DNA를 추출하였다(도 3a). 샘플(C, 세포; 및 E, 엑소좀)은, 단일 뉴클레오티드 분해능 수준에서 게놈 전체 DNA 메틸화 프로파일의 분석을 가능하게 하는, 감소된 표현 중아황산염 시퀀싱(RRBS)을 위해 처리되었다(도 3a). 세포 DNA와 엑소좀 DNA 둘 다에 대한 CpG 메틸화(%)(빈도수 대 염기당 메틸화(%))의 히스토그램(각각, 패널 panc1_C 및 panc1_E)은 유사한 메틸화 패턴을 나타낸다(도 3b). 샘플 상관관계를 확인하고, 이를, 묘사된 산점도와 상관 계수로 표현하였다(0.94, 피어슨(Pearson) 상관관계 시험, 도 3b). 결과는 2개 샘플간에 DNA 메틸화 지문 패턴이 강하게 일치하는 매우 높은 상관관계를 나타낸다(도 3b). 상세한 비교 분석은 엑소좀 대 세포에서의 N = 27 차등 저메틸화된 유전자, 및 엑소좀 대 세포에서의 N = 3519 차등 과메틸화된 유전자를 나타내었다. 따라서, 엑소좀 DNA는 탈메틸화 효소로부터 엑소좀 DNA를 보호하기 때문에, 과메틸화된 DNA에 대해 약간 풍부하다.

[0112] 이어서, 8개의 상이한 췌장 세포주(종양형성 세포주: Panc1, BXPC3, Capan1, T3M4, MiaPaCa2, 및 PSN1; 비-종양형성 세포주: HPNE 및 HPDE) 및 이들의 엑소좀을 3회 시험하였다. 우선, 모든 샘플에 대해 품질 관리 분석을 실행하였다. 정렬 속도는 높았고, CpG가 풍부한 영역의 부위 특이적 분석에 대해 우수한 적용범위를 제공하였다(도 4). 두 번째로, 판독 품질이 높은 것으로 판정되어, 시퀀싱 오류가 적어 판독치를 정확하게 분석할 수 있었다(도 5). 또한, 특정 부위를 증폭하기 위해 프라이머 라이브러리가 사용되었기 때문에 감소된 판독 시퀀싱으로 예상되는 높은 중복(duplication) 수준이 존재하였다(도 6). 모든 단편이 정확히 동일한 게놈 위치에서 여러 번 완벽하게 정렬될 것으로 예상되기 때문에, RRBS 라이브러리가 이처럼 높은 중복 수준을 특징으로 할 것으로 예상된다(예를 들어, 게놈에 MspI 제한 인식 부위가 너무 많기 때문이다).

[0113] 도 7의 특정 분석은 HPDE와 Panc1 샘플 간의 비교를 제공한다. 설명된 바와 같이, 메틸화 프로파일은 각 세포 유형 내에서 훨씬 더 높은 상관관계 비율을 갖기 때문에, 상이한 메틸화 패턴들은 세포 및 엑소좀 DNA를 둘 다 사용하는 세포주로부터 구별될 수 있으며, 동일한 세포주로부터의 세포 및 엑소좀 DNA는 상당히 관련된 메틸화 패턴을 갖고, 엑소좀 DNA가 본래의 세포에서 보이는 메틸화 패턴을 유지한다는 가설을 뒷받침한다.

[0114] 도 8은 상관관계를 시각화하는 또 다른 방식을 제공하여 샘플이 세포 유형별로 분리됨을 보여준다. 중아황산염 전환의 각각의 뱃치(batch)는 약간 상이할 수 있다. 따라서, 초기 연구로부터의 Panc1 샘플(Panc1_C3 및 Panc1_E3)은 다른 Panc1 복제와 약간 상이하지만, 여전히 세포주와 군집된다.

[0115] 배치 분리의 추가 예로는 도 9에 제공된 주요 성분 분석이 있으며, 이는, 인구들 간의 유전적 거리와 관계성(relatedness)을 시각화하는 데 사용된다. HPDE는 모든 군집을 매우 가깝게 샘플링한다.

[0116] 도 10에 제공된 플롯은, 시험된 모든 8개 라인으로부터의 각각의 세포주로부터의 샘플이 함께 군집화되어, DNA가 세포 또는 엑소좀인지 여부에 관계없이 샘플들이 세포 유형별로 분리됨을 보여준다. 여기에서도, 중아황산염 전환의 각각의 뱃치가 약간 상이할 수 있으므로, 파일럿 연구로부터의 Panc1 샘플이 다른 Panc1 복제와는 약간 상이하지만 이들은 여전히 세포주와 군집화된다. 각 샘플에 대해, 메틸화 패턴은 모든 염색체에 대한 적용범위를 보여준다(도 11a 내지 도 11h).

[0117] 본원에 개시되고 청구된 모든 방법은 본 개시내용에 비추어 과도한 실험 없이 만들어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 구현예의 관점에서 설명되었지만, 본 발명의 개념, 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 본원에 기재된 방법 및 방법의 단계 또는 단계의 순서에 변형이 적용될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적 및 생리학적으로 관련된 특정 작용제가 본원에 기재된 작용제를 대체할 수 있는 한편 동일하거나 유사한 결과가 달성될 수 있음이 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체 및 변형은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 본 발명의 사상, 범주 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

[0118] **참조문헌**

[0119] 하기 참조문헌은 본원에 기재된 것들에 보충적인 예시적인 절차적 또는 다른 세부사항을 제공하는 범위 내에서 구체적으로 본원에 참조로 포함된다.

미국 특허 4,870,287
미국 특허 5,739,169
미국 특허 5,760,395
미국 특허 5,801,005
미국 특허 5,824,311
미국 특허 5,830,880
미국 특허 5,846,945

[0120]

Almoguera et al., Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53:549-554, 1988.

Alvarez-Erviti et al., Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29:341-345, 2011.

Austin-Ward and Villaseca, Gene therapy and its applications. *Rev. Med. Chil.*, 126:838-845, 1998.

Baietti et al., Syndecan-syntenin-ALIX regulated the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.*, 14:677-685, 2012.

Biankin et al., Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, 491:399-405, 2012.

Bukowski *et al.*, Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy. *Clin. Cancer Res.*, 4:2337-2347, 1998.

Chang et al., Pancreatic cancer genomics. *Current Opinion in Genetics & Development*, 24:74-81, 2014.

Christodoulides *et al.*, Immunization with recombinant class 1 outer-membrane protein from Neisseria meningitidis: influence of liposomes and adjuvants on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci. *Microbiology*, 144:3027-3037, 1998.

[0121]

Clayton et al., Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *European Journal of Immunology*, 33:522-531, 2003.

Collins et al., Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122:639-653, 2012a.

Collins *et al.*, Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic Kras in mice. *PLoS One*, 7:e49707, 2012b.

Combes *et al.*, A new flow cytometry method of platelet-derived microvesicle quantitation in plasma, *Thromb. Haemost.*, 77:220, 1997.

Cooper et al., Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Movement Disorders*, 29:1476-1485, 2014.

Davidson *et al.*, Intralesional cytokine therapy in cancer: a pilot study of GM-CSF infusion in mesothelioma. *J. Immunother.*, 21:389-398, 1998.

Du et al., A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Research*, 33:1671-1677, 2005.

El-Andaloussi et al., Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12:347-357, 2013.

El-Andaloussi *et al.*, Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. Nat*ure Protocols*, 7:2112-2126, 2012.

Eser et al., Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 111:817-822, 2014.

Esteller, *Nat Review Genet* 8: 286-298, 2007.

Feinberg and Fogelstein, *Nature* 301:89-92, 1983.

Gomes-da-Silva et al., Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges. *Accounts of Chemical Research*, 45:1163-1171, 2012.

Gysin et al., Therapeutic strategies for targeting ras proteins. *Genes & Cancer*, 2:359-372, 2011.

Hanibuchi *et al.*, Therapeutic efficacy of mouse-human chimeric anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody against multiple organ micrometastases of human lung cancer in NK cell-depleted SCID mice. *Int. J. Cancer*, 78:480-485, 1998.

Hellstrand *et al.*, Histamine and cytokine therapy. *Acta Oncol.*, 37:347-353, 1998.

Hingorani et al., Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7:469-483, 2005.

[0122]

Hollander, Immunotherapy for B-cell lymphoma: current status and prospective advances. Front *Immunol.*, 3:3, 2013.

Howlader et al., SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, National Cancer Institute. Bethesda, MD. On the World Wide Web at seercancergov/csr/1975_2011/, 2013.

Hruban et al., K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *The American Journal of Pathology*, 143:545-554, 1993.

Hui and Hashimoto, Pathways for Potentiation of Immunogenicity during Adjuvant-Assisted Immunizations with Plasmodium falciparum Major Merozoite Surface Protein 1. *Infec. Immun.*, 66:5329-5336, 1998.

Ji et al., Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. *Gastroenterology*, 137:1072-1082, 82 e1-6, 2009.

Johnsen et al., A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1846:75-87, 2014.

Jones and Paylin, *Cell* 128:683-692, 2007.

Kahlert et al., Identification of Double Stranded Genomic DNA Spanning all Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer. The Journal of biological chemistry 2014.

Kowal et al., Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29:116-125, 2014.

Luga *et al.*, Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*, 151:1542-1556, 2012.

Ma et al., Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 429:318-322, 2004.

Marcus and Leonard, FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver. *Pharmaceuticals* (Basel), 6:659-680, 2013.

Meissner et al., Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nuc. Acids. Res.*, 33:5868-5877, 2005.

Melo et al., Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 523:177-182, 2015.

[0123]

Ozdemir et al., Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 25:719-734, 2014.

Pecot et al., Therapeutic Silencing of KRAS using Systemically Delivered siRNAs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13:2876-2885, 2014.

Peinado et al., Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18:883-891, 2012.

Poliseno et al., A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465:1033-1038, 2010.

Qin *et al.*, Interferon-beta gene therapy inhibits tumor formation and causes regression of established tumors in immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:14411-14416, 1998.

Rachagani et al., Activated KrasG12D is associated with invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through inhibition of E-cadherin. *Br. J. Cancer*, 104:1038-1048, 2011.

Rejiba et al., K-ras oncogene silencing strategy reduces tumor growth and enhances gemcitabine chemotherapy efficacy for pancreatic cancer treatment. *Cancer Science*, 98:1128-1136, 2007.

Robertson, *Nat Review Genet* 6:597-610, 2005.

Siegel et al., Cancer statistics, 2014. *CA: A cancer journal for clinicians*, 64:9-29, 2014.

Simoes et al., Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2:237-254, 2005.

Smakman et al., Dual effect of Kras(D12) knockdown on tumorigenesis: increased immune-mediated tumor clearance and abrogation of tumor malignancy. *Oncogene*, 24:8338-8342, 2005.

Sun et al., Characterization of the mutations of the K-ras, p53, p16, and SMAD4 genes in 15 human pancreatic cancer cell lines. *Oncology Reports*, 8:89-92, 2001.

Thery et al., Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2:569-579, 2002.

Valadi et al., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9:654-659, 2007.

van den Boorn et al., Exosomes as nucleic acid nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65:331-335, 2013.

[0124]

van der Meel et al., Extracellular vesicles as drug delivery systems: Lessons from the liposome field. *Journal of Controlled Release*, 195:72-85, 2014.

Wahlgren et al., Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Research*, 40:e130, 2012.

Xue et al., Small RNA combination therapy for lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111:E3553-3561, 2014.

Ying et al., Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149:656-670, 2012.

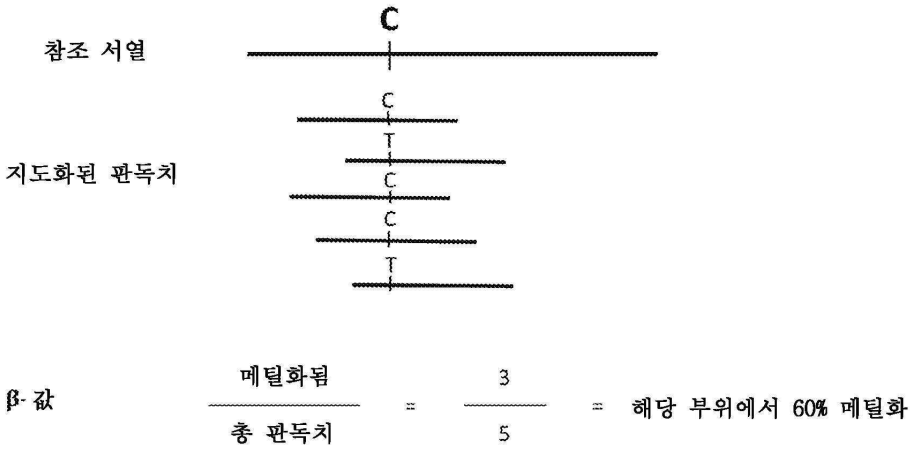
Yuan et al., Development of siRNA payloads to target KRAS-mutant cancer. *Cancer Discovery*, 4:1182-1197, 2014.

Zorde Khvalevsky et al., Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110:20723-20728, 2013.

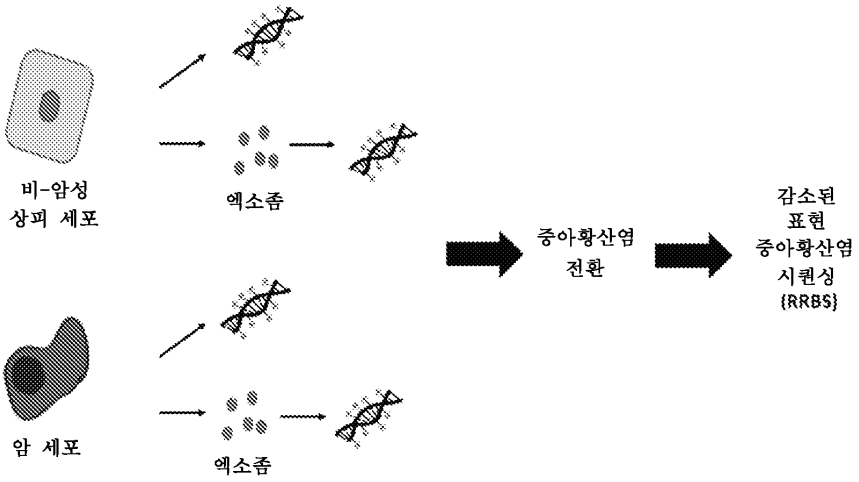
[0125]

도면

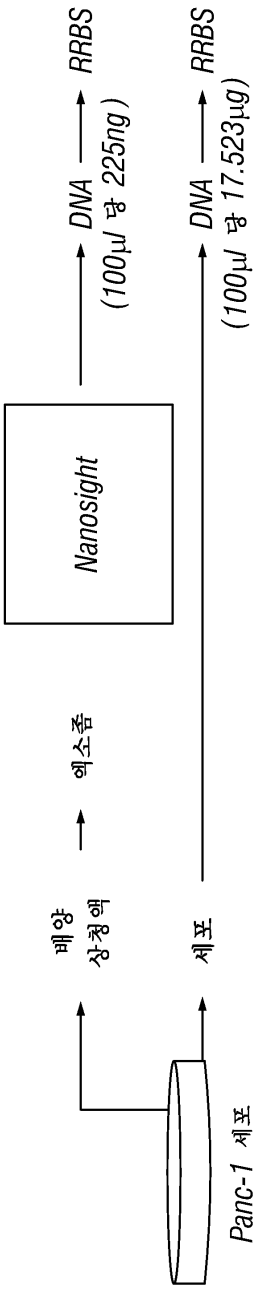
도면1


참조 서열
C
지도화된 판독치
C
T
C
C
T
β-값
메틸화됨
총 판독치
=
3
5
=
해당 부위에서 60% 메틸화

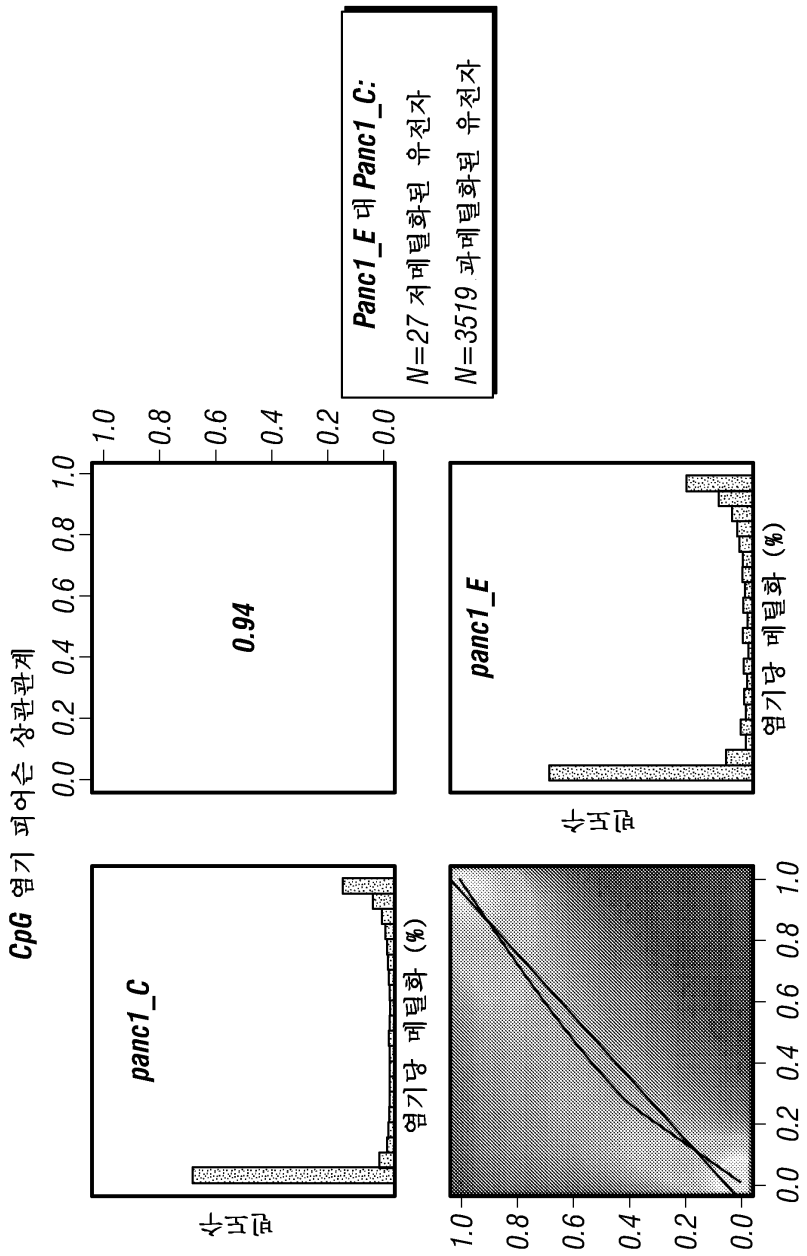
도면2


비-암성
상피 세포
엑소좀
암 세포
엑소좀
증아황산염
전환
감소된
표현
증아황산염
시퀀싱
(RRBS)

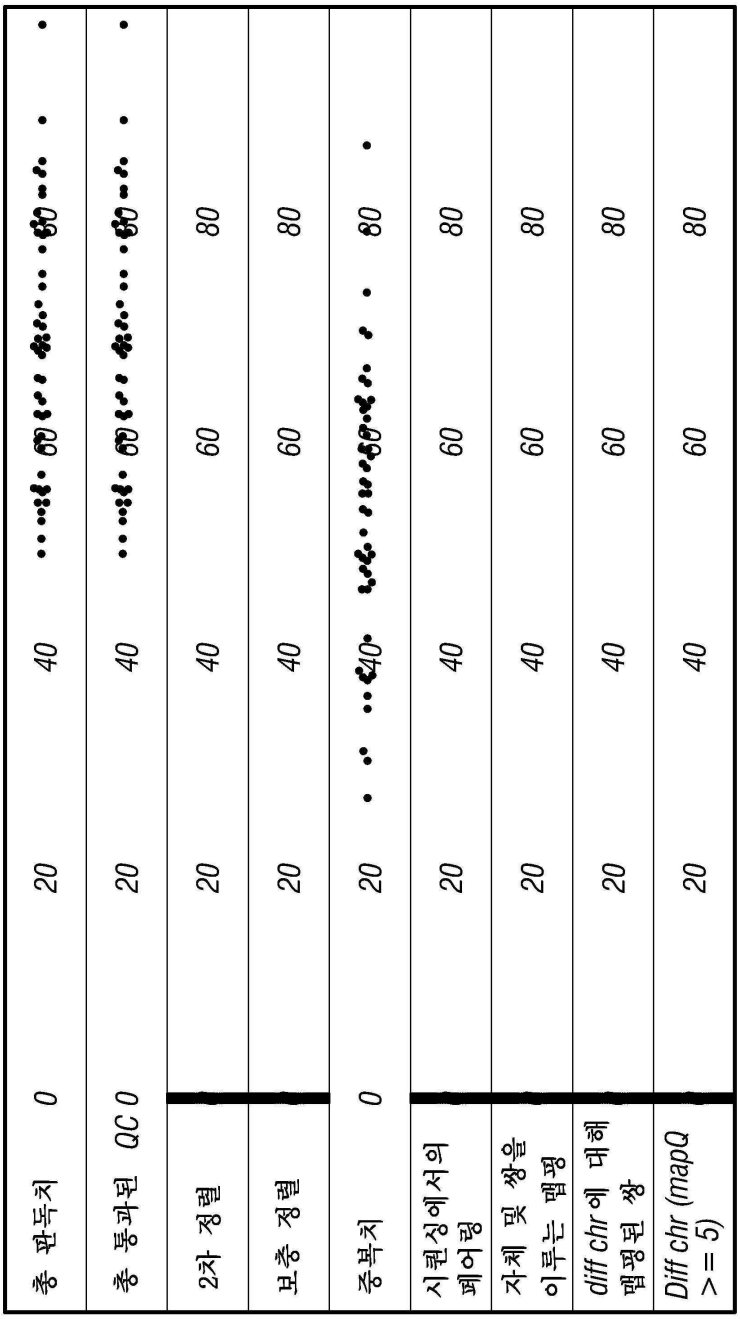
도면3a


Panc-1 세포
배양 상청액
엑소좀
Nanosight
DNA (100μl 당 225ng)
RRBS
세포
DNA (100μl 당 17.523μg)
RRBS

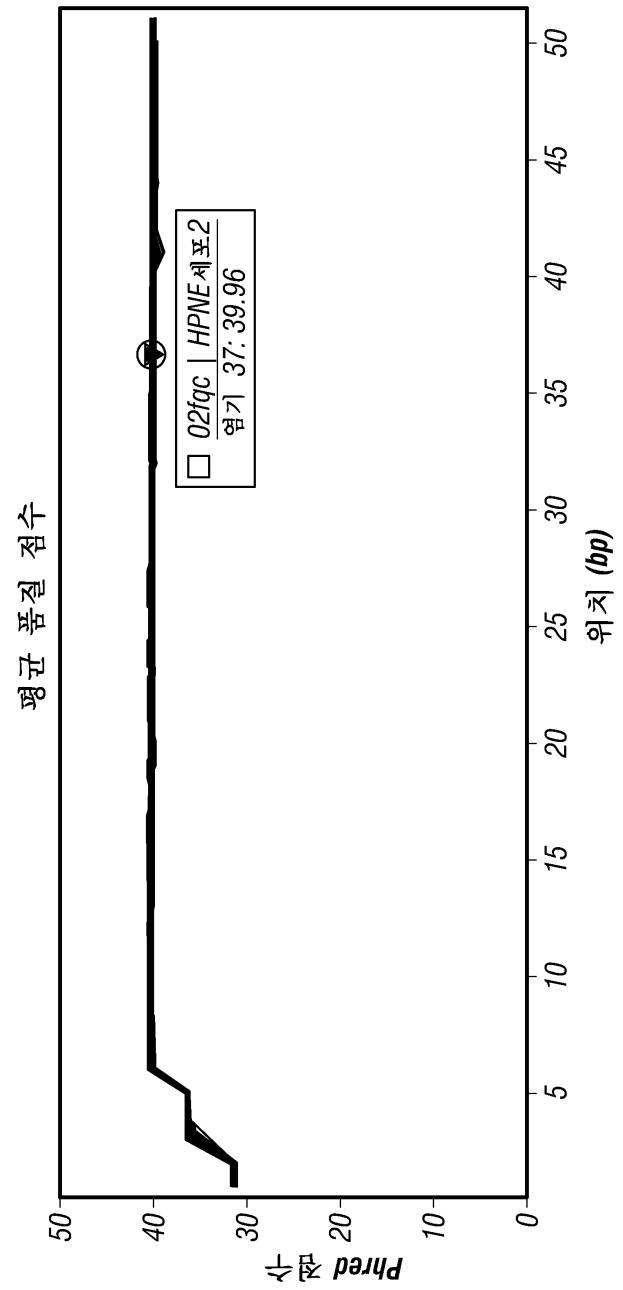
도면3b


CpG 염기 페어은 상관관계
0.94
panc1_C
panc1_E
빈도수
염기당 메틸화 (%)
Panc1_E 대 Panc1_C:
N=27 저메틸화된 유전자
N=3519 과메틸화된 유전자

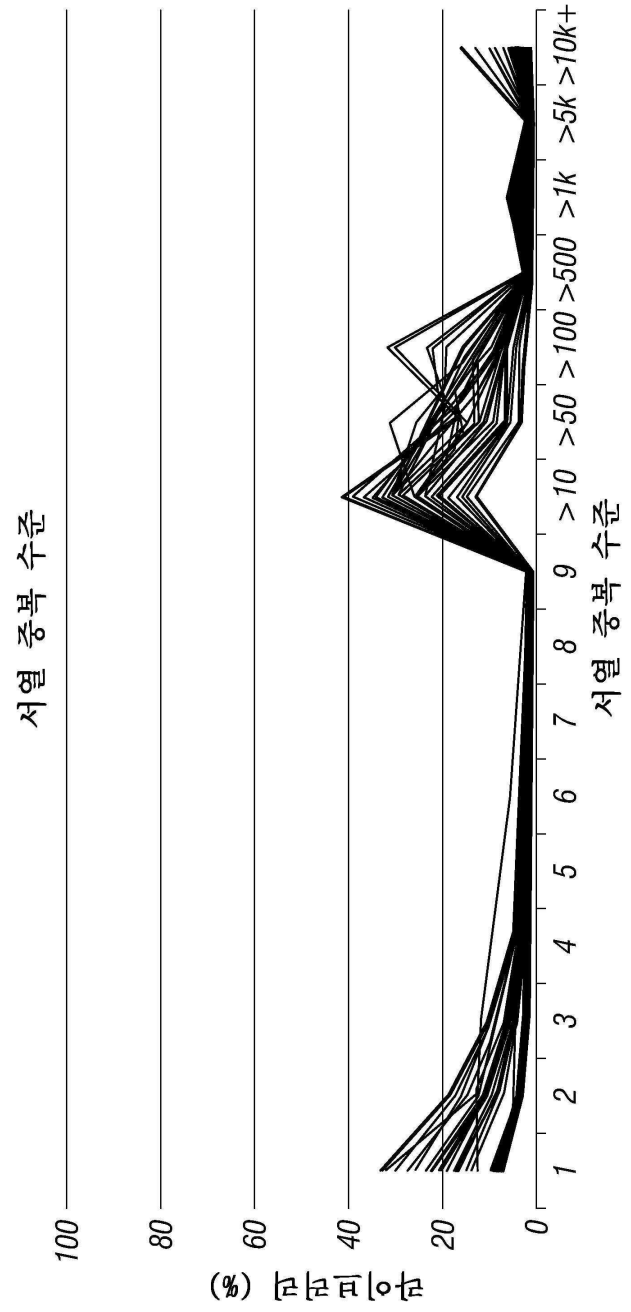
도면4


총 판독치 0 20 40 60 80
총 통과된 QC 0 20 40 60 80
2차 정렬 20 40 60 80
보충 정렬 20 40 60 80
중복치 0 20 40 60 80
시퀀싱에서의 페어링 20 40 60 80
자체 및 쌍을 이루는 맵핑 20 40 60 80
diff chr에 대해 맵핑된 쌍 20 40 60 80
Diff chr (mapQ >= 5) 20 40 60 80

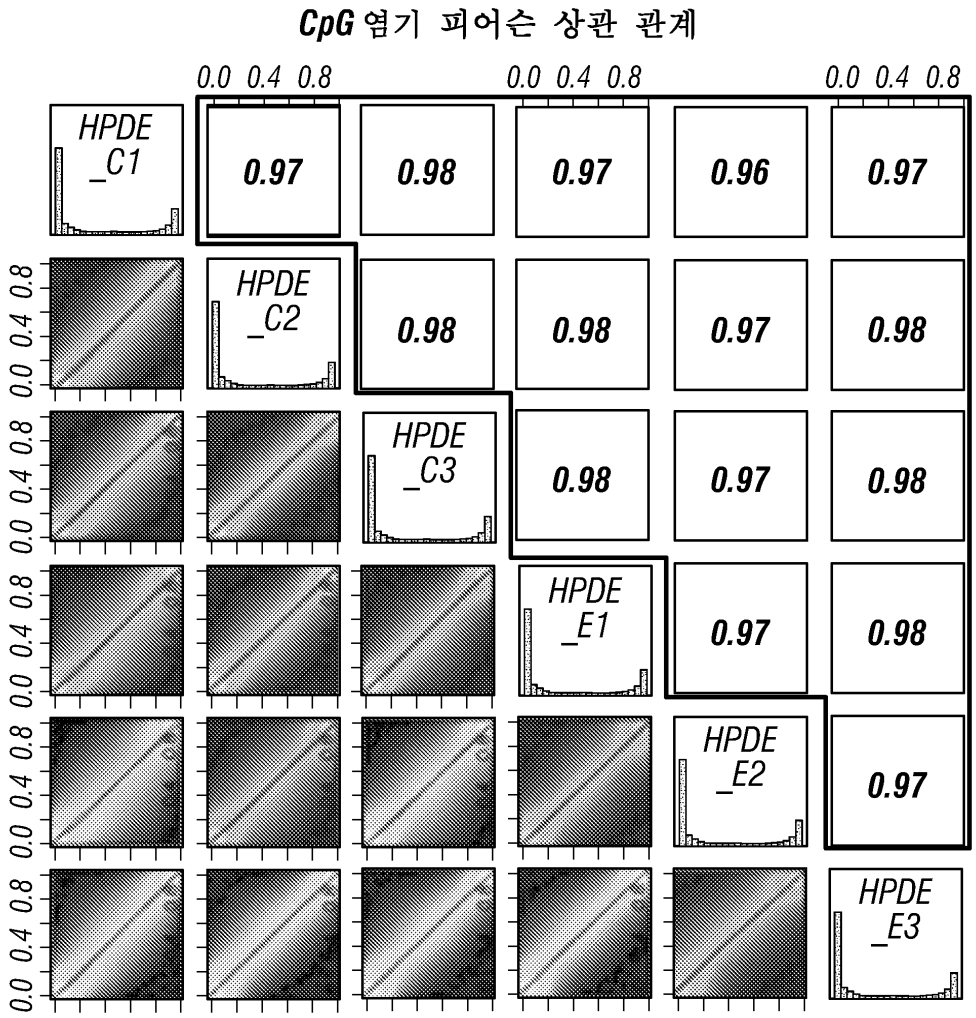
도면5


평균 품질 점수
02fqc | HPNE세포2
옆기 37: 39.96
Phred 점수
0
10
20
30
40
50
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
위치 (bp)

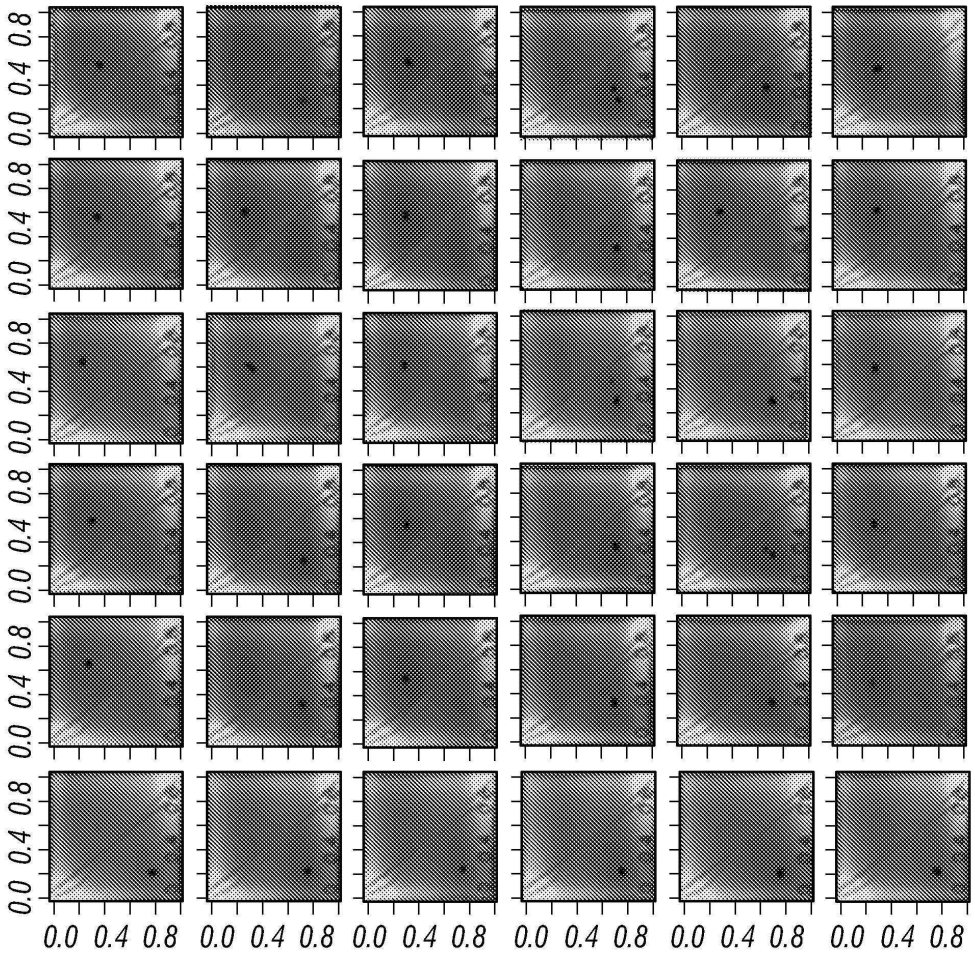
도면6


커버리지 (%)
100
80
60
40
20
0
서열 중복 수준
1
2
3
4
5
6
7
8
9
>10
>50
>100
>500
>1k
>5k
>10k+
서열 중복 수준

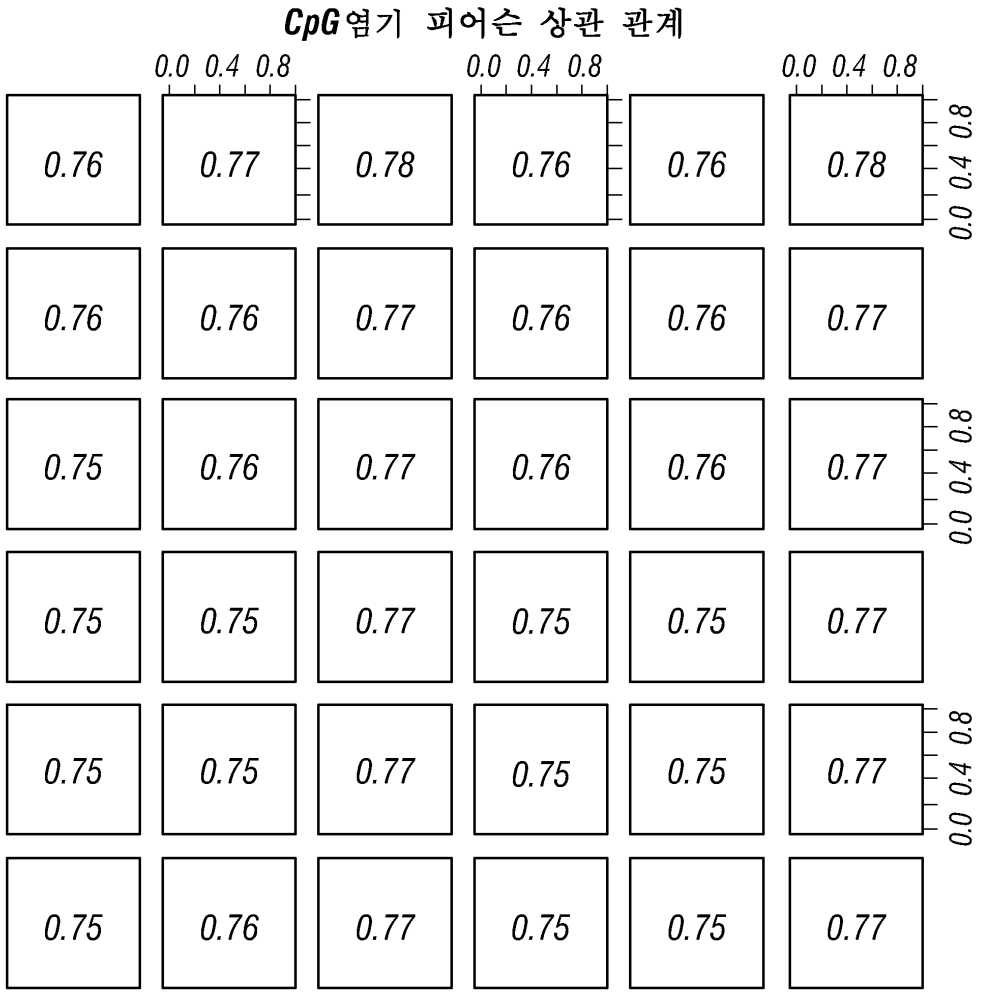
도면7a


CpG 염기 피어슨 상관 관계
0.0 0.4 0.8
HPDE _C1
HPDE _C2
HPDE _C3
HPDE _E1
HPDE _E2
HPDE _E3
0.97
0.98
0.97
0.96
0.97
0.98
0.98
0.97
0.98
0.98
0.97
0.98
0.97

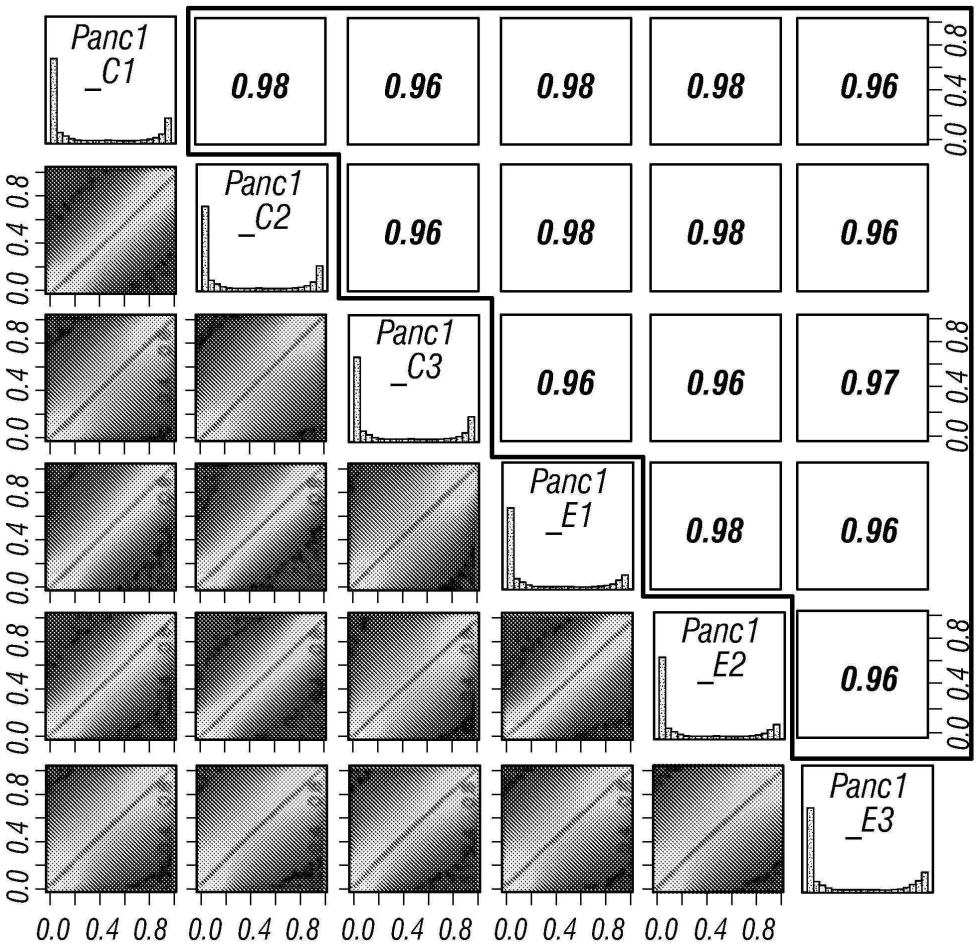
도면7b


0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8
0.0 0.4 0.8

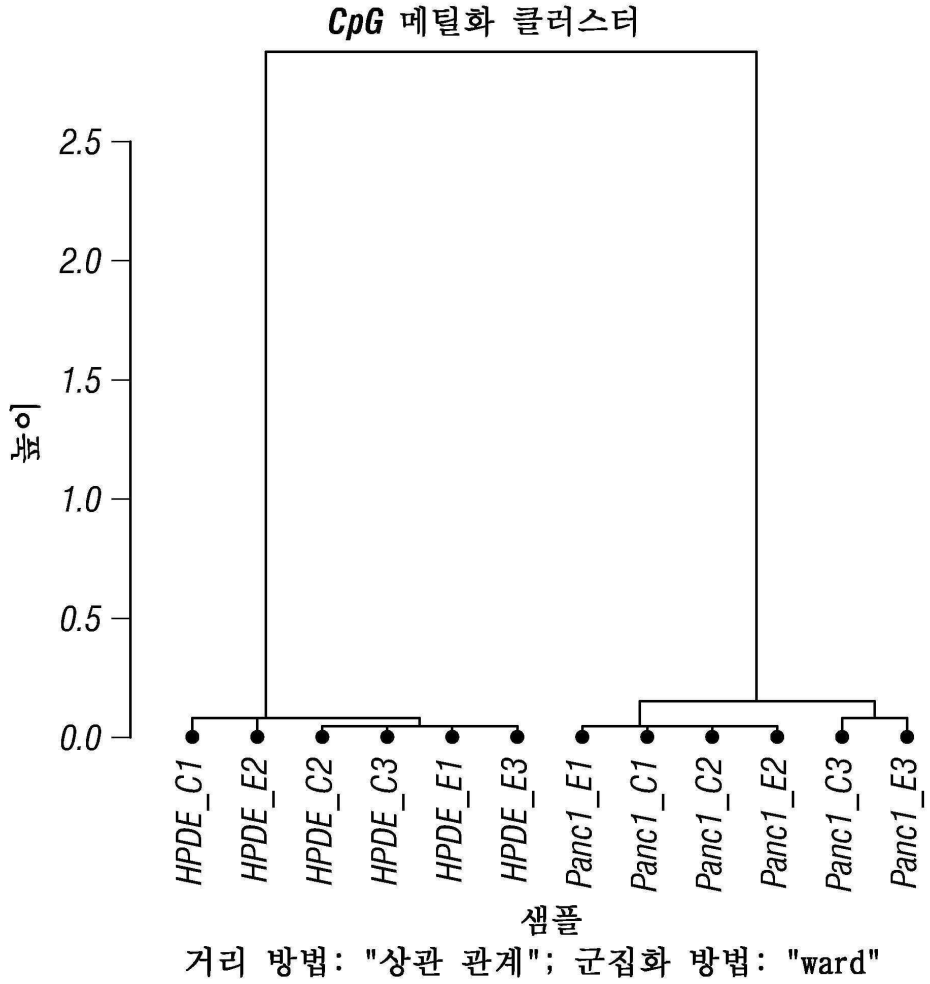
도면7c


CpG염기 피어슨 상관 관계
0.0 0.4 0.8
0.76 0.77 0.78 0.76 0.76 0.78
0.76 0.76 0.77 0.76 0.76 0.77
0.75 0.76 0.77 0.76 0.76 0.77
0.75 0.75 0.77 0.75 0.75 0.77
0.75 0.75 0.77 0.75 0.75 0.77
0.75 0.76 0.77 0.75 0.75 0.77

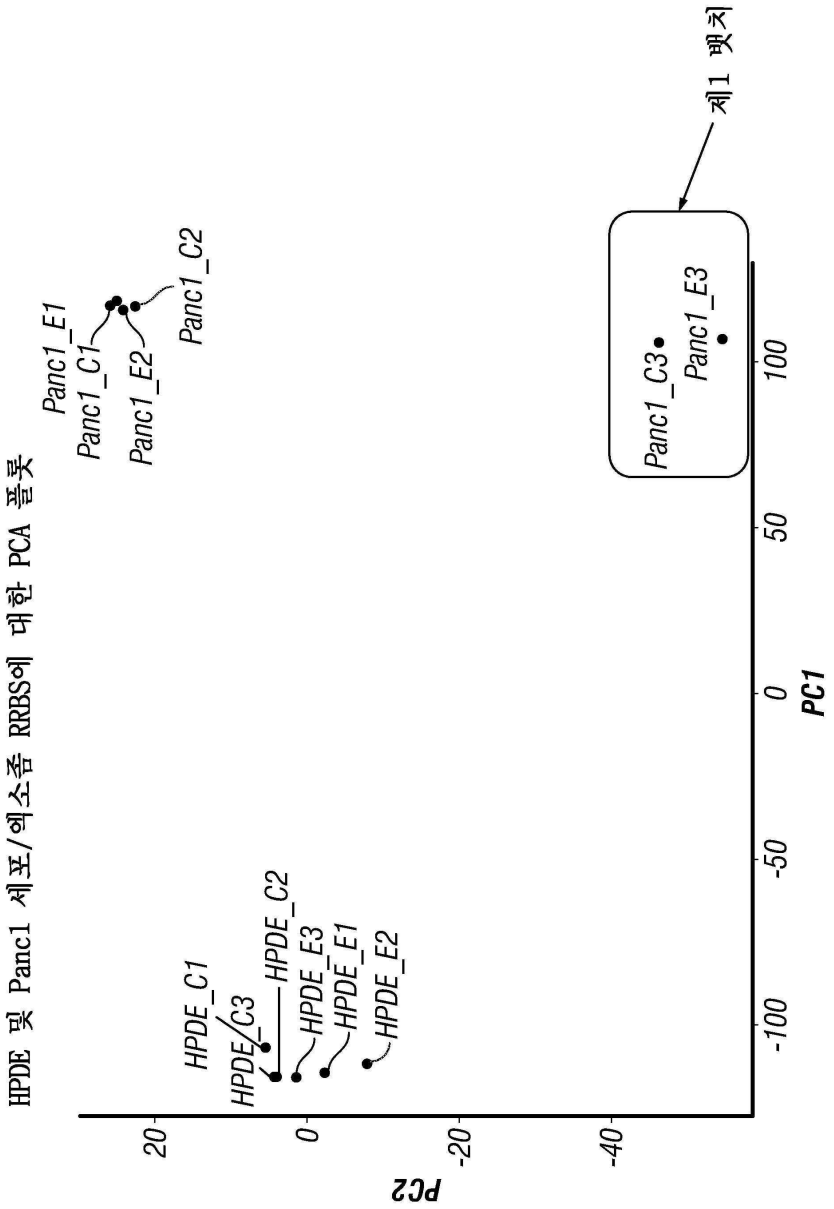
도면7d


Panc1_C1
Panc1_C2
Panc1_C3
Panc1_E1
Panc1_E2
Panc1_E3
0.98 0.96 0.98 0.98 0.96
0.96 0.98 0.98 0.96
0.96 0.96 0.97
0.98 0.96
0.96
0.0 0.4 0.8

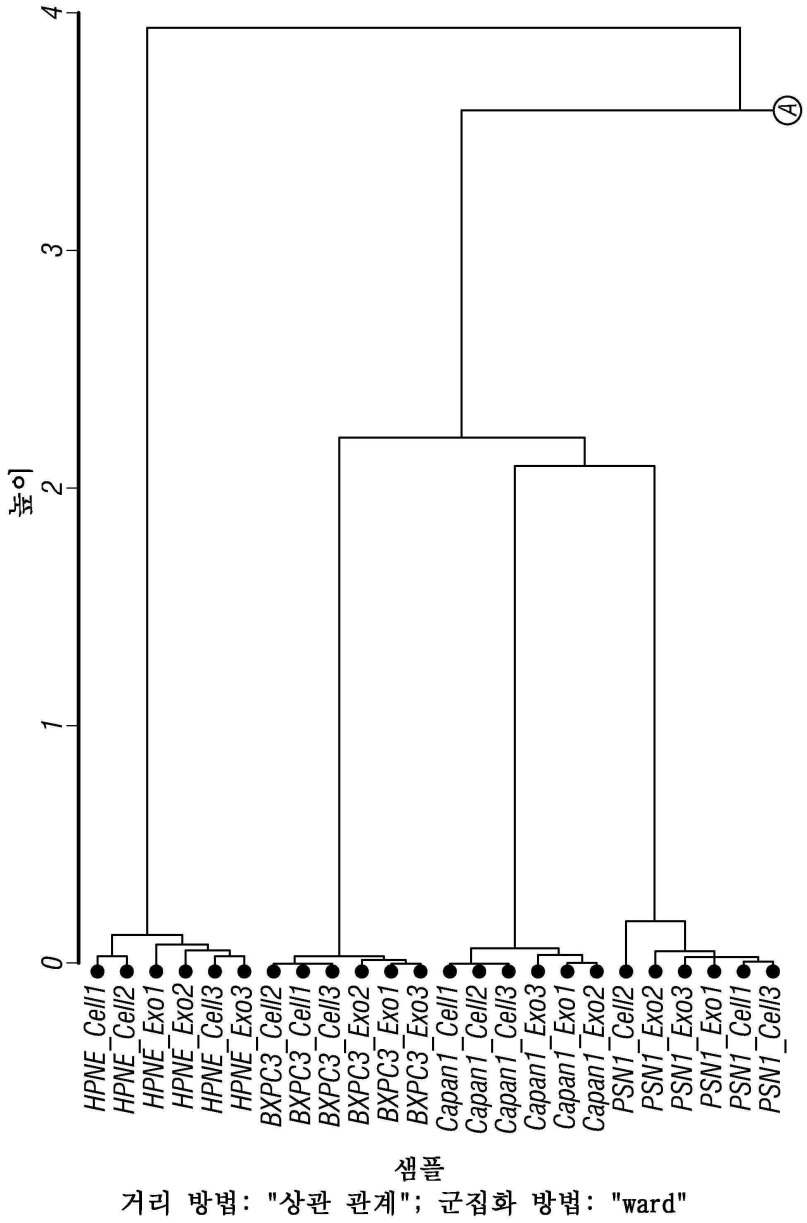
도면8


CpG 메틸화 클러스터
높이
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
HPDE_C1
HPDE_E2
HPDE_C2
HPDE_C3
HPDE_E1
HPDE_E3
Panc1_E1
Panc1_C1
Panc1_C2
Panc1_E2
Panc1_C3
Panc1_E3
샘플
거리 방법: "상관 관계"; 군집화 방법: "ward"

도면9

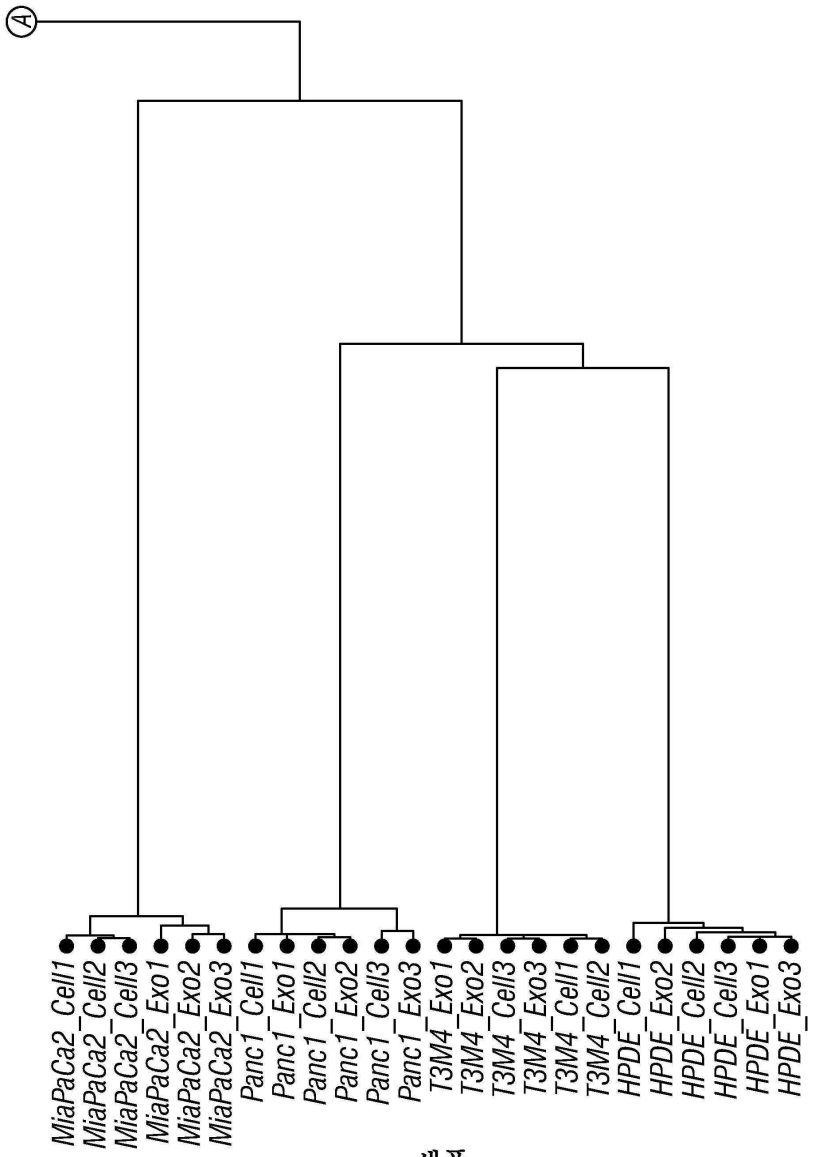

HPDE 및 Panc1 세포/엑소좀 RRBS에 대한 PCA 플롯
Panc1_E1
Panc1_C1
Panc1_E2
Panc1_C2
HPDE_C1
HPDE_C3
HPDE_C2
HPDE_E3
HPDE_E1
HPDE_E2
Panc1_C3
Panc1_E3
제1 뭇치
PC2
PC1
20
0
-20
-40
-100
-50
0
50
100

도면10a



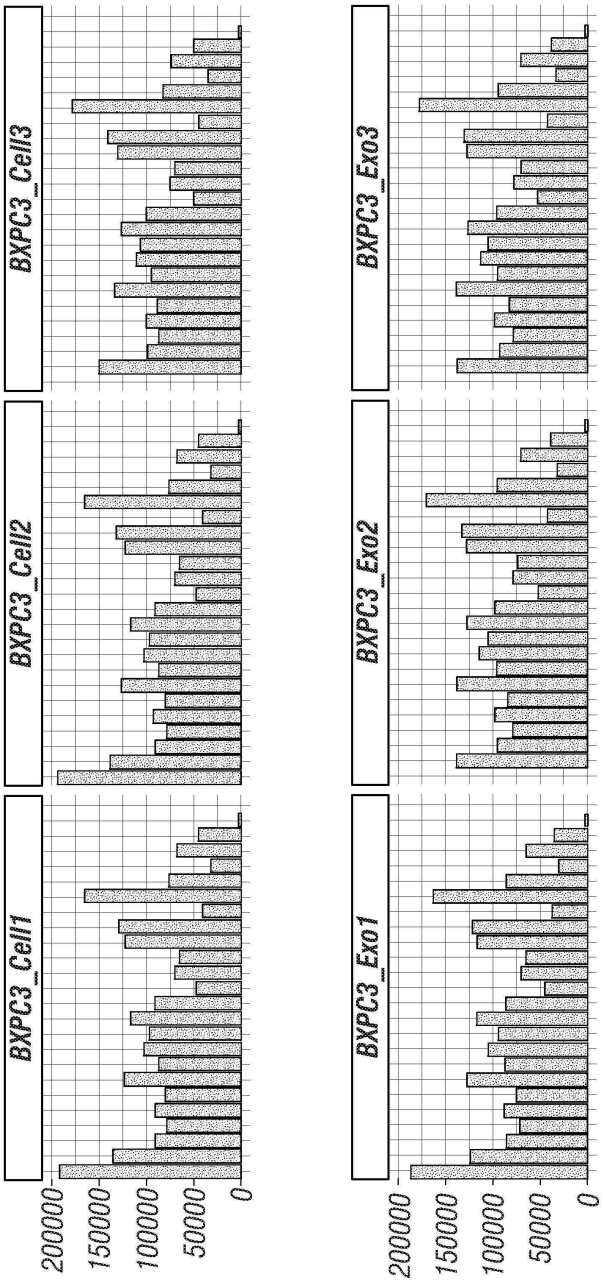
거리 방법: "상관 관계"; 군집화 방법: "ward"

도면10b

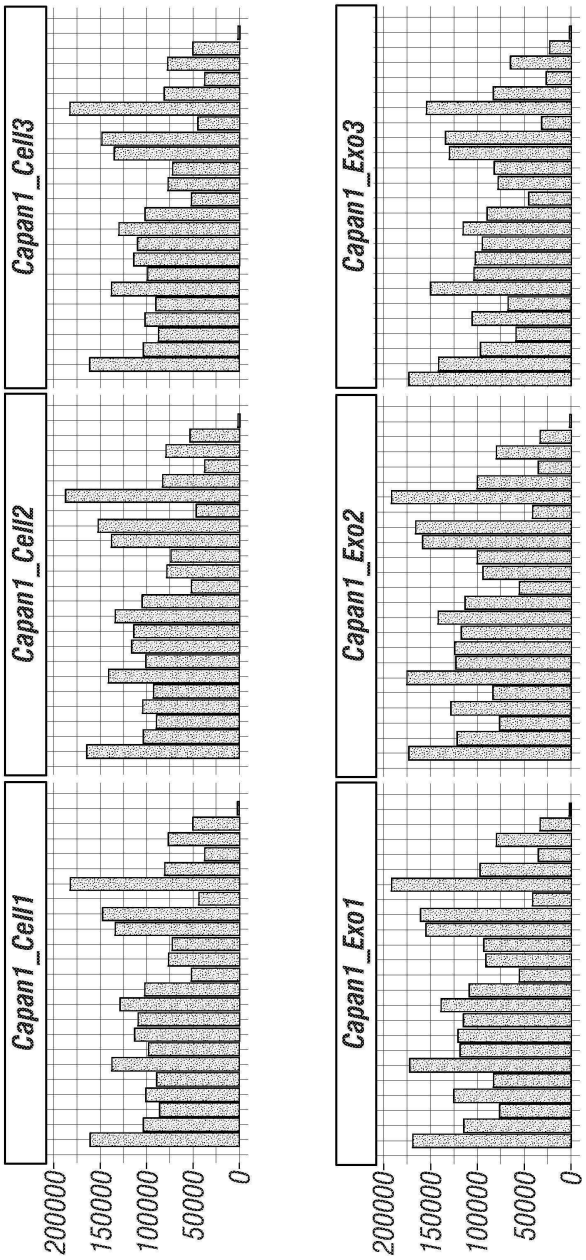


거리 방법: "상관 관계"; 군집화 방법: "ward"

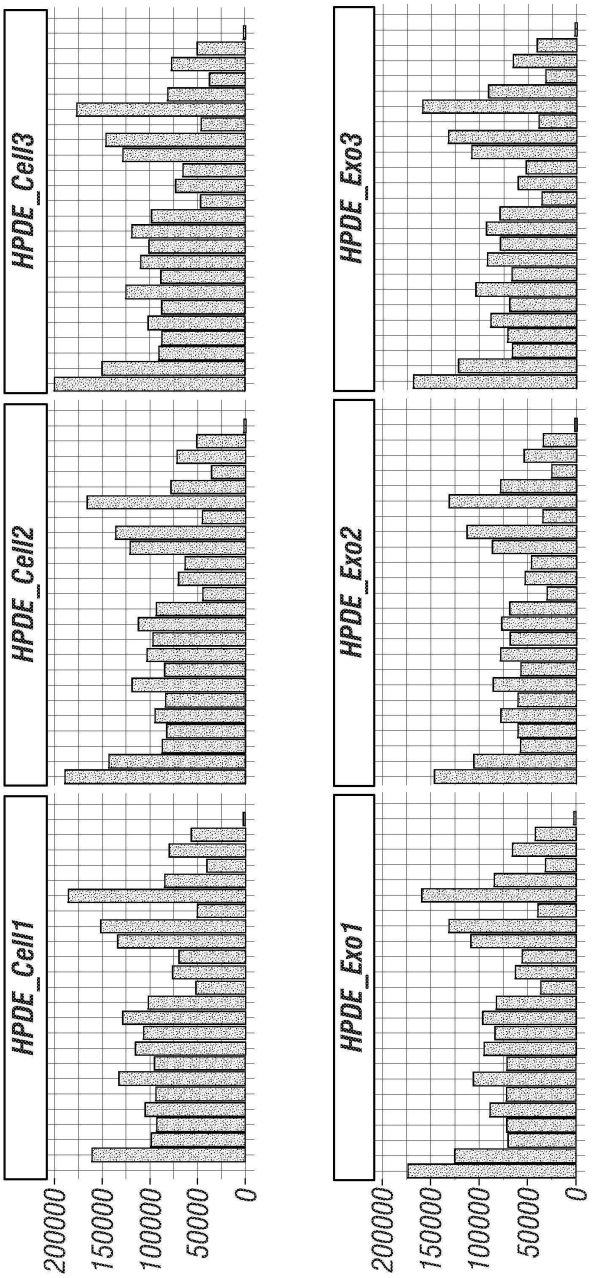
도면11a


BXPC3_Cell1
BXPC3_Cell2
BXPC3_Cell3
BXPC3_Exo1
BXPC3_Exo2
BXPC3_Exo3
200000
150000
100000
50000
0

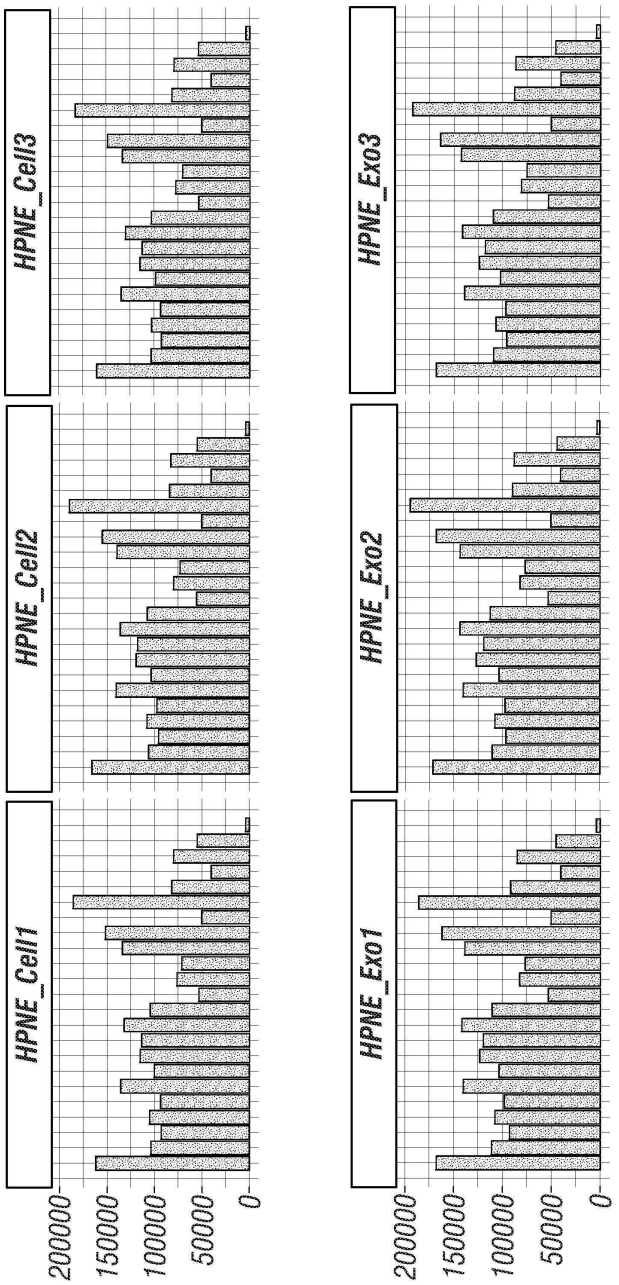
도면11b


Capan1_Cell1
Capan1_Cell2
Capan1_Cell3
Capan1_Exo1
Capan1_Exo2
Capan1_Exo3
200000
150000
100000
50000
0

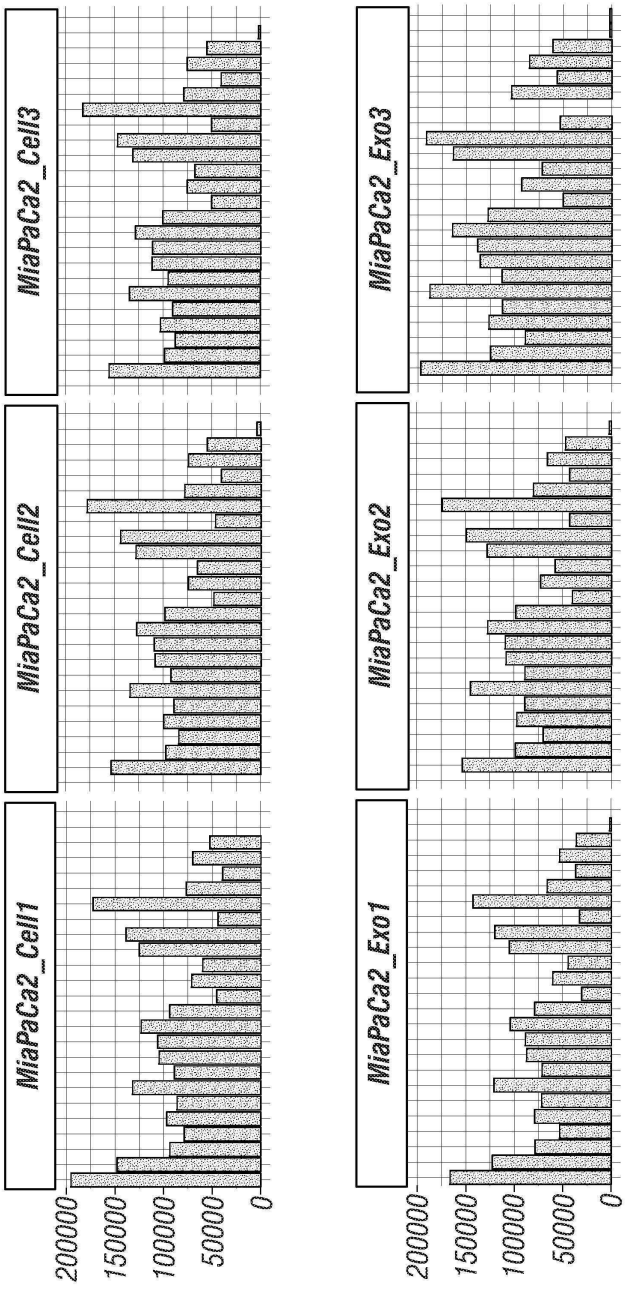
도면11c


HPDE_Cell1
HPDE_Cell2
HPDE_Cell3
HPDE_Exo1
HPDE_Exo2
HPDE_Exo3
200000
150000
100000
50000
0

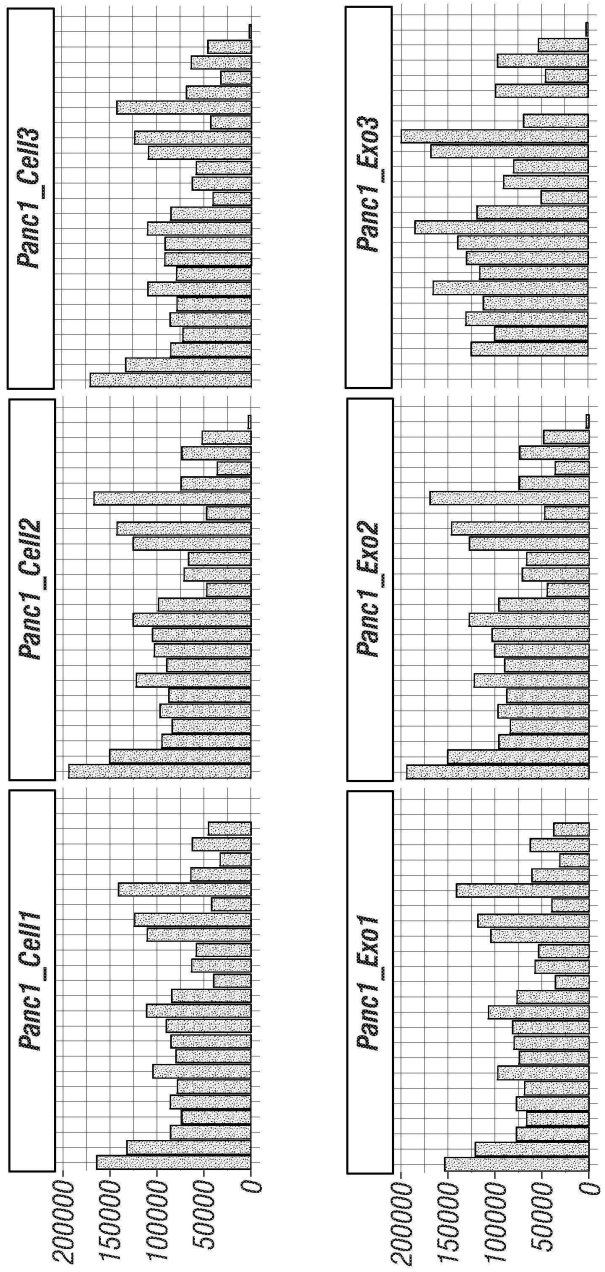
도면11d


HPNE_Cell1
HPNE_Cell2
HPNE_Cell3
HPNE_Exo1
HPNE_Exo2
HPNE_Exo3
200000
150000
100000
50000
0

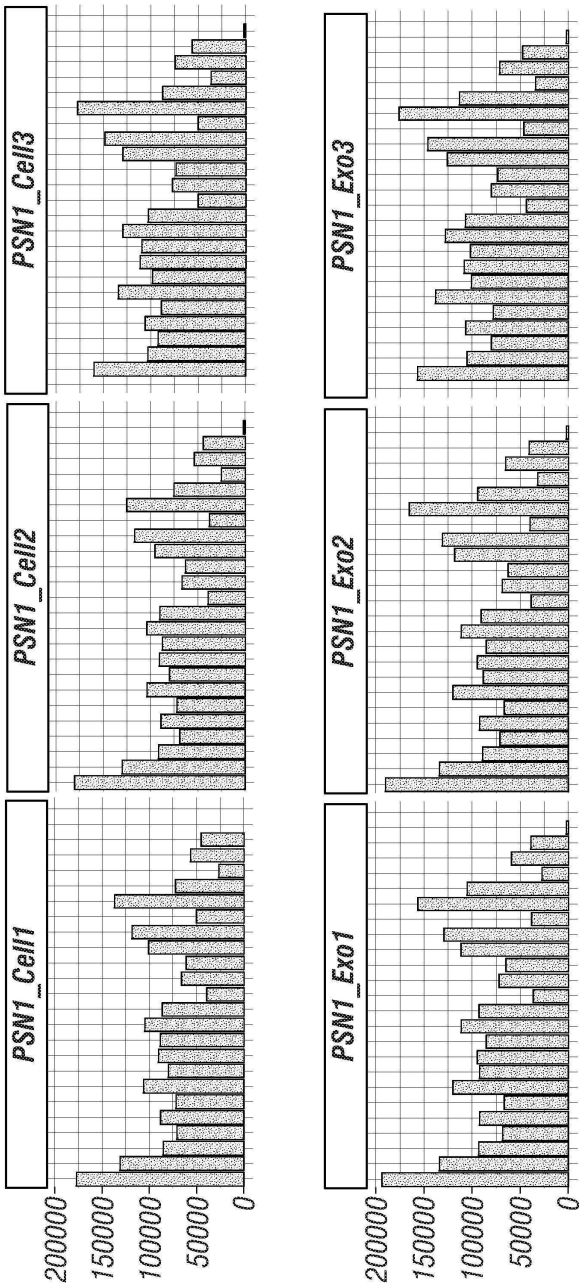
도면11e


MiaPaCa2_Cell1
MiaPaCa2_Cell2
MiaPaCa2_Cell3
MiaPaCa2_Exo1
MiaPaCa2_Exo2
MiaPaCa2_Exo3
200000
150000
100000
50000
0

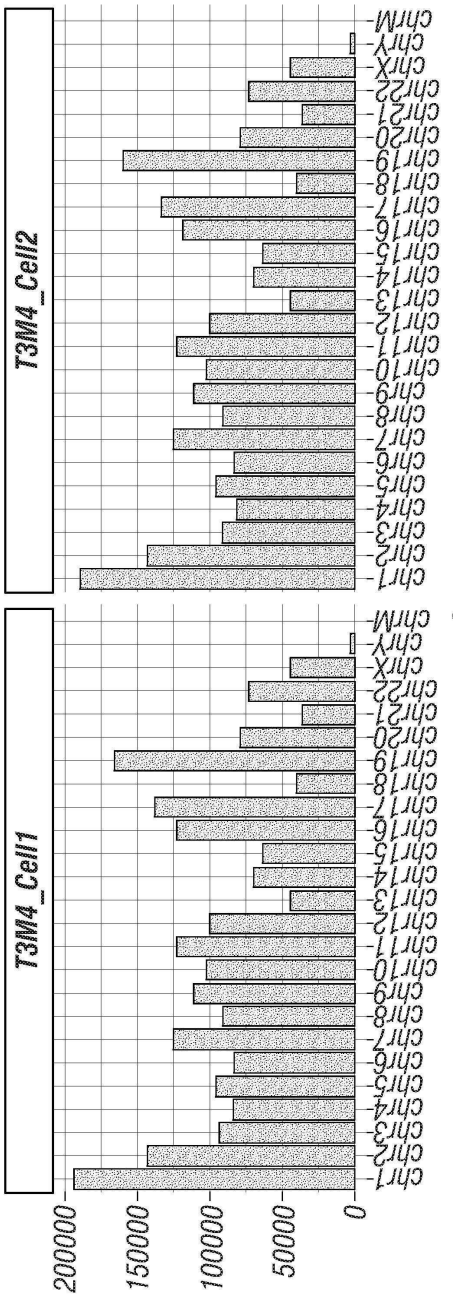
도면11f


Panc1_Cell1
Panc1_Cell2
Panc1_Cell3
Panc1_Exo1
Panc1_Exo2
Panc1_Exo3
200000
150000
100000
50000
0

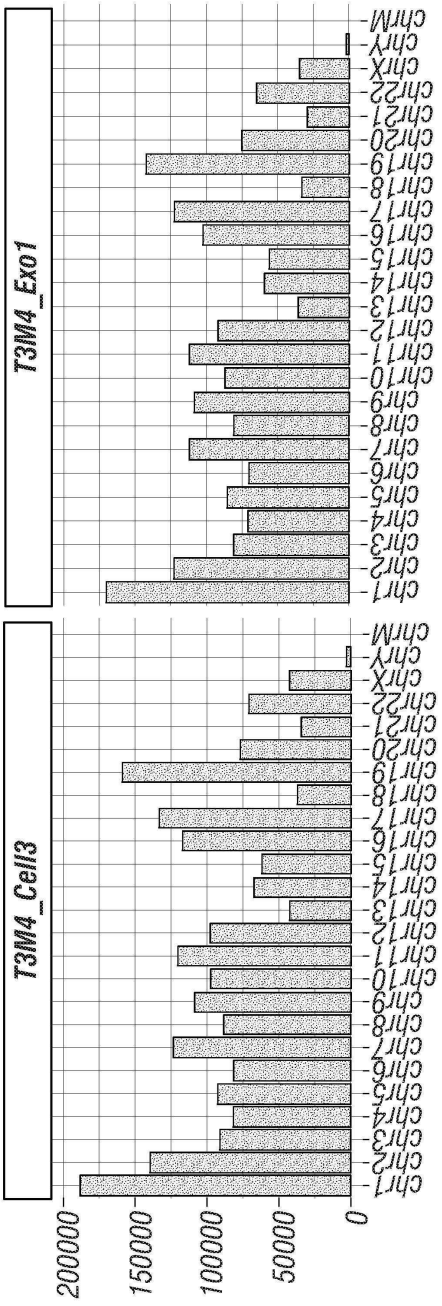
도면11g


PSN1_Cell1
PSN1_Cell2
PSN1_Cell3
PSN1_Exo1
PSN1_Exo2
PSN1_Exo3
200000
150000
100000
50000
0

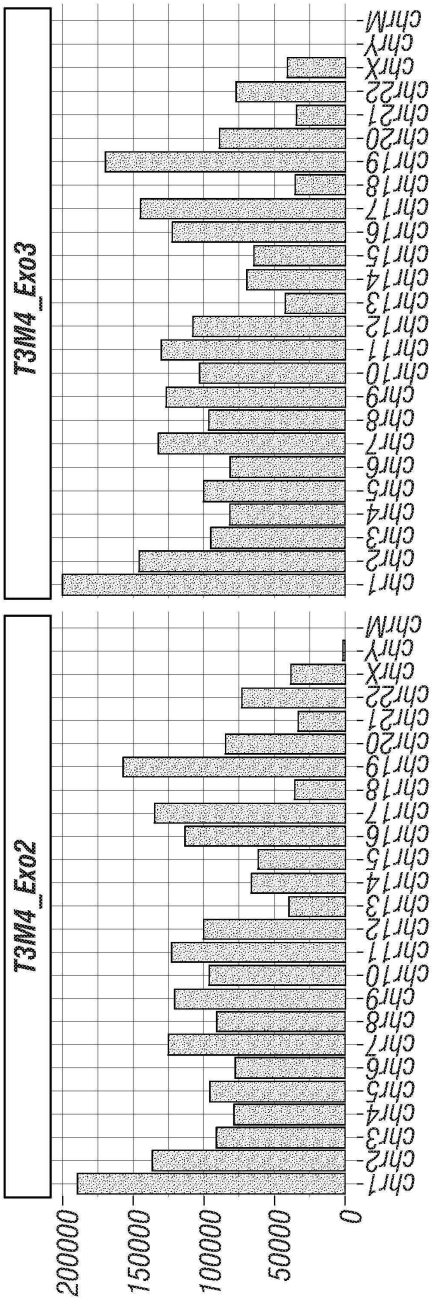
도면11ha


T3M4_Cell2
T3M4_Cell1
chr1
chr2
chr3
chr4
chr5
chr6
chr7
chr8
chr9
chr10
chr11
chr12
chr13
chr14
chr15
chr16
chr17
chr18
chr19
chr20
chr21
chr22
chrX
chrY
chrM
200000
150000
100000
50000
0

도면11hb


T3M4_Exo1
T3M4_Cell3
chr1
chr2
chr3
chr4
chr5
chr6
chr7
chr8
chr9
chr10
chr11
chr12
chr13
chr14
chr15
chr16
chr17
chr18
chr19
chr20
chr21
chr22
chrX
chrY
chrM
200000
150000
100000
50000
0

도면11hc


T3M4_Exo3
T3M4_Exo2
chr1
chr2
chr3
chr4
chr5
chr6
chr7
chr8
chr9
chr10
chr11
chr12
chr13
chr14
chr15
chr16
chr17
chr18
chr19
chr20
chr21
chr22
chrX
chrY
chrM
200000
150000
100000
50000
0