(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월11일
(11) 등록번호 10-2183406
(24) 등록일자 2020년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) *A61B 5/055* (2006.01)
A61B 6/03 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
G16B 20/00 (2019.01) *G16C 10/00* (2019.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
A61B 5/055 (2018.08)
(21) 출원번호 10-2015-7028765
(22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 2019년03월13일
(85) 번역문제출일자 2015년10월12일
(65) 공개번호 10-2016-0006673
(43) 공개일자 2016년01월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/027541
(87) 국제공개번호 WO 2014/152622
국제공개일자 2014년09월25일
(30) 우선권주장
61/791,301 2013년03월15일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20110172295 A1
US20150038549 A1

(73) 특허권자
보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 텍사스주 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트 210
베쓰 이스라엘 디코니스 메디칼 센터 인크
미국 매사추세츠 보스톤 브룩라인 애브뉴 330 (우편번호:02215)
(72) 발명자
칼루리 라구
미국 텍사스주 77025 휴스턴 마로닐 스트리트 3726
멜로 소니아
미국 텍사스주 77004 휴스턴 에이피티. 2606 패닌 스트리트 5253
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **진단 및 치료를 위한 엑소좀 내 miRNA 생합성**

(57) 요 약

miRNA 및 이들의 전구체를 포함하는 엑소좀을 이용함으로써 암을 진단하고 처리하기 위한 방법. 예를 들면, 일부 양태에서, 암은 개체로부터의 샘플 내 엑소좀의 miRNA 함량을 측정함으로써 또는 엑소좀 내 miRNA 프로세싱을 검출함으로써 진단되거나 평가될 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61B 6/03 (2020.08)
A61B 6/037 (2020.08)
G01N 33/57415 (2019.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
G06Q 10/10 (2013.01)
G16B 20/00 (2019.02)
G16H 15/00 (2018.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

개체에서 암 생체마커를 검출하는 시험관내(in vitro) 방법에 있어서, 다음을 포함하는 방법:

(a) 하기의 하나 이상의 수준을 측정하는 단계:

(i) 상기 개체로부터 단리된 생물학적 샘플의 엑소좀 분획 내 Dicer; 및

(ii) 상기 개체로부터 단리된 생물학적 샘플의 엑소좀 분획 내 전구체 miRNA의 Dicer 프로세싱 활성; 및

(b) 하기의 하나 이상의 수준을 측정하는 단계:

(i) 기준 샘플의 엑소좀 분획 내 Dicer; 및

(ii) 기준 샘플의 엑소좀 분획 내 전구체 miRNA의 Dicer 프로세싱 활성; 및

(c) 상기 생물학적 샘플의 Dicer 또는 Dicer 프로세싱 활성의 측정된 수준을 상기 기준 샘플의 Dicer 또는 Dicer 프로세싱 활성의 측정된 수준과 비교하여, 상기 개체가 암 생체마커를 가졌는지 아닌지 판별하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 샘플이 i) 10개 미만의 세포를 포함하거나 ii) 림프액, 침, 오줌 또는 혈장 샘플인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 샘플의 엑소좀 분획을 정제하는 단계 또는 샘플의 엑소좀 분획의 생산을 증가시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 암은 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관지암, 뇌암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

i) 상기 샘플의 엑소좀 분획 내, mmu-miR-709, hsa-miR-1308, mmu-miR-615-3p, hsa-miR-1260b, mmu-miR-1937a, mmu-mir-321-A, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-1979, mmu-miR-1937b, hsa-mir-373, mmu-miR-1937c, hsa-miR-1273d-P, mmu-miR-720, mmu-miR-1274a, hsa-mir-565-A, mmu-miR-1931, hsa-miR-1246, hsa-mir-594-P, hsa-mir-321-A, mmu-miR-2145-1-P, hsa-mir-639-P, hsa-miR-720, hsa-miR-1280, mmu-miR-3473, hsa-miR-1260, hsa-miR-1281, mmu-miR-1224-P, mmu-miR-690, hsa-miR-375-P, hsa-miR-4301, mmu-miR-700, mmu-miR-125b-5p, mmu-miR-1 191-P, hsa-miR-1274a, hsa-miR-3197, mmu-miR-1935, hsa-miR-1975-P, hsa-miR-4324, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-1274b, mmu-miR-1957, hsa-miR-933, hsa-mir-675, hsa-miR-595, mmu-miR-2137, hsa-mir-572-P, mmu-miR-1 195, hsa-miR-4294-P, mmu-mir-1899-P, mmu-miR-689-P, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-31 17-P, mmu-mir-321-P, mmu-miR-1961-P, hsa-mir-10a, mmu-miR-669d-P, mmu-miR-1937b-2-P, hsa-miR-3125-P, mmu-miR-1934-P, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-718, mmu-miR-1198, mmu-miR-2182-P, hsa-miR-1273, mmu-miR-2133-P, hsa-miR-92b*, hsa-miR-1290, hsa-miR-448, mmu-miR-689, mmu-miR-449a, mmu-miR-1937b-4-P, hsa-miR-4286, mmu-miR- 1947, mmu-miR-342-3p, hsa-miR-1303-P, mmu-miR-2132, hsa-miR-4321-P, hsa-miR-4256-P, hsa-miR-431 1, mmu-miR-130a, mmu-miR-1939, hsa-miR-1268-P, mmu-miR-31, mmu-miR-99b, mmu-miR-2141, hsa-miR-1202-P, mmu-miR-466b-3p, mmu-miR-2133, hsa-miR-1268, hsa-miR-466, mmu-miR-494, hsa-miR-1289, hsa-miR-320b, hsa-miR-4254, hsa-mir-7-3-P, hsa-miR-923, hsa-miR-764, mmu-miR-291a-3p, mmu-miR-883b-3p, hsa-mir-594-A, mmu-miR-1948-P, hsa-miR-206, hsa-mir-565-P, mmu-miR-467e*, hsa-miR-1826, mmu-miR-467a*, mmu-miR-1983, hsa-miR-324-5p, mmu-let-7c, mmu-miR-1965, hsa-mir-632-P, hsa-miR- 181 a*MM2GT/AC, hsa-miR-1265, hsa-miR-323b-5p, hsa-mir-1914, hsa-mir-1910, hsa-miR-21, hsa-miR-431*, hsa-miR-3135-P, mmu-miR-187-P, mmu-miR-126-3p, mmu-miR-669a-P, hsa-miR-367, mmu-mir-320-P, hsa-miR-181a*MM1G/C, mmu-miR-484-P, mmu-miR-467c-

P, hsa-miR-3154, mmu-miR-466d-3p, hsa-miR-3162-P, mmu-miR-201, mmu-miR-1946a, hsa-miR-937, hsa-miR-3147, hsa-mir-596-P, hsa-miR-3148, hsa-miR-1304, hsa-miR-222MM2GG/AC, mmu-miR-125 a-5p, hsa-miR-1272-P, hsa-miR-638, hsa-mir-320, hsa-miR-545*, hsa-mir-1908-P, hsa-let-7d-v2-P, mmu-mir-30d-P, hsa-miR-4297, mmu-miR-182, hsa-miR-3166-P, hsa-miR-494, mmu-miR-669o-P, hsa-miR-566, mmu-miR-1 188, mmu-miR-2134-AP, hsa-miR-4259-P, mmu-miR-152, mmu-miR-2134, hsa-miR-3193-AP, hsa-miR-125b, hsa-miR-3124-P, hsa-miR-10b, hsa-miR-455-5p, mmu-miR-144, hsa-miR-130a, hsa-miR-1285, hsa-miR-516b*, hsa-miR-27a, hsa-miR-138-1*, mmu-miR-471, hsa-miR-4298-P, hsa-miR-301b, hsa-mir-147-P, hsa-miR-362-5p, mmu-mir-471-P, mmu-miR-466a-3p, hsa-miR-561, hsa-miR-486-5p, mmu-miR-2861, hsa-miR-587, mmu-miR-375, hsa-mir-329-2-P, mmu-miR-2861-P, hsa-miR-144*, hsa-miR-1255a-P, hsa-mir-519a-2-P, hsa-miR-34c-5p, mmu-miR-466e-3p, mmu-miR-743b-5p, mmu-mir-350-P, mmu-miR-18 Id, hsa-miR-376a*, hsa-miR-1308-P, mmu-miR-467g, mmu-miR-1946a-P, hsa-miR-147-P, hsa-miR-923-P, mmu-miR-465c-5p, hsa-miR-891a, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-4292, mmu-miR-677-P, hsa-miR-4257, hsa-miR-4326, hsa-miR-17*MM2GG/AA, hsa-miR-939-P, mmu-miR-2182, hsa-miR-220c-P, hsa-miR-3132-P, hsa-miR-532-5p, mmu-miR-1947-P, mmu-miR-29a, hsa-miR-3162, hsa-miR-375MM1C/G, hsa-miR-768-3p, mmu-miR-182-P, mmu-miR-205-P, hsa-miR-505, hsa-miR-3146-P, mmu-miR-721, mmu-miR-376c, hsa-miR-1179-P, mmu-miR-1970, hsa-miR-3133-P, hsa-miR-200c, hsa-miR-220a, mmu-miR-100, hsa-miR-1255b, hsa-miR-222MM1G/A, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-517b, hsa-miR-200a, hsa-miR-3141, mmu-miR-669h-3p, hsa-miR-1301, hsa-miR-877, hsa-mir-941-2, hsa-mir-487b-P, hsa-miR-4302, hsa-miR-99b, hsa-miR-1253, hsa-let-7a*, hsa-miR-34aMM2CT/TC, hsa-miR-3181-P, hsa-miR-3200, hsa-miR-3129-P, hsa-miR-93*, hsa-miR-548q-P, mmu-miR-466g, mmu-miR-155, hsa-miR-2278-P, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-633, hsa-miR-4265, mmu-miR-2135-P, hsa-miR-190, mmu-miR-669f, hsa-miR-1323, hsa-miR-588, mmu-miR-183*, hsa-mir-941-4, hsa-mir-1913, hsa-miR-21 16*, hsa-miR-1 178, mmu-miR-196a, mmu-miR-574-3p, hsa-miR-346, mmu-miR-1 199, mmu-miR-681, hsa-miR-4292-P, hsa-miR-522, hsa-mir-61 1-P, hsa-miR-3171 , hsa-miR-635, hsa-miR-1197-P, hsa-miR-604, mmu-let-7a*, hsa-miR-335, mmu-miR-466c-3p, mmu-miR-466i, hsa-miR-1297, mmu-miR-338-5p, hsa-mir-526a-2-P, hsa-miR-181 aMM2GC/AG, hsa-miR-18, hsa-miR-924-P, mmu-miR- 190-P, hsa-miR-345, mmu-miR-71 1, hsa-miR-31 16-2-P, hsa-miR-99a, mmu-miR-26a, hsa-miR- 1248-P, mmu-miR-721-P, mmu-miR-801-P, hsa-miR-1826-P, hsa-miR-1236, hsa-miR-339-5p, mmu-miR-804, mmu-miR-467d*, mmu-miR-1 191, hsa-miR-148a, hsa-miR-141, mmu-miR-1937a-P, mmu-miR-696, 및 hsa-miR-302a으로부터 선택된 miRNA(들)로부터 선택된 하나 이상의 miRNA(들)의 수준을 측정하는 단계; 또는

ii) AGO2 또는 TRBP의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 제5항에 나열된 miRNA(들)로부터 선택된 miRNA(들)의 전구체의 수준을 측정함을 포함하는 전구체 miRNA의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 개체는

i) 이미 암치료를 받은 적이 있거나,

ii) 수술로 종양을 제거한 적이 있는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 다음을 추가로 포함하는 방법:

(a) 하기의 하나 이상의 수준을 측정하는 단계:

(i) 상기 생물학적 샘플 및 기준 샘플의 엑소좀 분획 내 Dicer, AGO2 또는 TRBP;

(ii) 상기 생물학적 샘플 및 기준 샘플의 엑소좀 분획 내 전구체 miRNA;

(iii) 상기 생물학적 샘플 및 기준 샘플의 엑소좀 분획 내 제5항에 나열된 miRNA(들)로부터 선택된 하나 이상의 miRNA(들); 및

(iv) 상기 생물학적 샘플 및 기준 샘플의 엑소좀 분획 내 miRNA 프로세싱 활성; 및

(c) 상기 개체로부터의 상기 생물학적 샘플 내 RISC, 전구체 miRNA, miRNA(들), 또는 miRNA 프로세싱 활성의 수준을 상기 기준 샘플 내 miRNA(들), 전구체 miRNA, RISC 또는 miRNA 프로세싱 활성의 수준과 비교함으로써 상기 개체가 암 생체마커를 가졌는지 아닌지 판별하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서,

i) Dicer, AGO2 또는 TRBP의 수준을 측정하는 단계는 웨스턴 블롯, ELISA 또는 항체 어레이에 대한 결합 분석을 수행하는 것을 포함하고;

ii) miRNA 수준을 측정하는 단계는 프로세싱된 miRNA 수준을 측정하는 것을 포함하고;

iii) miRNA 수준을 측정하는 단계는 RT-PCR, 노던 블롯 또는 어레이 혼성화를 수행하는 것을 포함하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 개체가 암 생체마커를 가졌는지 아닌지 보고하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 보고하는 단계는 서면 또는 전자 보고서를 작성하는 것을 포함하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 환자, 의사, 병원 또는 보험사에게 보고를 제공하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2013년 3월 15일에 출원된 미국 가출원 특허 제61/791,301호의 우선권 이익을 청구하며, 본 출원의 전체 내용은 본 명세서에서 참고로서 포함된다.

[0002] 본 발명은 미 국립보건원이 수여한 인가 번호 제EB003472호, 제EB006462호, 제CA135444호, 제CA125550호, 제CA155370호, 제CA151925호, 제DK081576호, 및 제DK055001호, 그리고 미 국립과학재단이 수여한 인가 번호 제EFRI-1240410호, 제CBET-0922876호, 및 제CBET-1144025호 하의 정부지원으로 이루어졌다. 정부가 본 발명의 특정한 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0003] **발명의 배경**

[0004] **1. 발명의 분야**

[0005] 본 발명은 일반적으로 분자생물학, 종양학 및 의학의 분야와 관련된다. 더 상세하게는, 본 발명은 암의 고유한 엑소좀 함량을 이용한 암검출 방법 및 향상된 저해성 RNA-기반 치료 방법에 관한 것이다.

[0006] **2. 관련 기술의 설명**

[0007] 모든 세포는 성장 인자, 사이토킨, 호르몬, 케모카인, 막-결합 단백질 및 지질을 비롯한 많은 다양한 경로를 통해 세포 주변 환경과 신호를 주고 받는다. 엑소좀은 그러한 신호전달을 매개할 수 있으며 거리가 먼 경우에도 이를 해낸다 (Mathivanan *et al.*, 2010; Kahlert 및 Kalluri, 2013). 엑소좀을 통한 신호전달은 성장 인자/사이토킨/케모카인/호르몬의 안정성 및 확산과 관련된 한계를 쉽게 넘을 수 있다 (Mathivanan *et al.*, 2010). 엑소좀은 30-140 nm 크기를 가진 나노-소포이며, 지질 이중층으로 보호된 단백질, mRNA, 및 마이크로RNA (miRNA)를 내포한다 (Cocucci *et al.*, 2009; Simons 및 Raposo, 2009; Simpson *et al.*, 2008; Thery *et al.*, 2002). 몇몇 최근 연구들은 엑소좀이 암세포, 줄기세포, 면역세포 및 뉴런을 비롯한 복합적인 세포 유형에 의해 분비됨을 밝혀냈다 (Simpson *et al.*, 2008; Thery, 2001). 암세포가 일반세포보다 더 많은 엑소좀을 분비한다는 사실이 주목된다 (Taylor 및 Gercel-Taylor, 2011). 게다가, 정상인 개체와 비교할 때 엑소좀은 암환자의 순환계에서 더 증가하지만 (Logozzi *et al.*, 2009; Taylor 및 Gercel-Taylor, 2008); 기능적 역할은 미지로 남아있다. 최근의 증거는 엑소좀이 암의 진행과 전이에 중요한 역할을 할 것이라는 점을 시사한다 (Luga *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011).

[0008] 엑소좀이 세포 사이에서 RNA와 miRNA의 전달을 매개한다는 생각은 신체의 세포-대-세포 신호전달의 복잡성을 더욱 증가시킨다. RNAi는 생존 세포 내에서 유전자 발현 및 활성의 조절에 관여하는 자연스러운 생물학적 과정이다. 세포외 miRNA는 처음에는 엑소좀 내부에만 함유되는 것으로 생각되었었다 (Valadi *et al.*, 2007). 그 후로, 몇몇 보고는 miRNA의 존재를 아폽토시스 소체 내 (Zernecke *et al.*, 2009), 고- 및 저-밀도 리포단백질 내 (Vickers *et al.*, 2011) (HDL/LDL), 거대 세포외 소포 내에서 확인하고 미소포 (microvesicle)라고 명명하였고, AGO2와 연관시켰다 (Arroyo *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Turchinovich *et al.*, 2011). 하지만, 최근 보고는 인간 혈청 및 타액에서 검출된 대부분의 miRNA가 주로 엑소좀 내에 농축되어 있음을 시사한다 (Gallo *et al.*, 2012). 엑소좀 내 miRNA의 존재는 원거리에 있는 세포의 유전자 발현을 조절할 수 있는 가능성을 제공한다 (Guescini *et al.*, 2010; Valadi *et al.*, 2007; Mittelbrunn *et al.*, 2011; van Balkom *et al.*, 2013). mRNA 번역을 조절함으로써, miRNA는 전체 유전자 세트의 발현을 조정하고 유기체의 전사체를 형성한다 (Bartel, 2009).

[0009] miRNA는 많은 상이한 세포 유형에서 유래된 엑소좀에 농축되어 있다 (Valadi *et al.*, 2007). 이들은 유전자 발현을 전사-후에 조절하는 18-24 뉴클레오티드 (nt) 길이의 작은 비-코딩 RNA이다. 이들은 Drosha와 Dicer 엔도뉴클레아제의 순차 작용으로 합성되며 RISC (RNA 유발성 침묵화 복합체)에 로딩되어 mRNA를 표적하게 된다 (Bartel, 2009; Maniataki 및 Mourelatos, 2005). Dicer 넉아웃 마우스에서, miRNA 생합성 불능은 불완전한 배아 줄기 세포 증식 및 분화를 일으켜 치사성을 유발한다 (Bernstein *et al.*, 2003; Fukagawa *et al.*, 2004).

[0010] 마이크로RNA는 서열-특이적 상호작용, 그리고 miRNA-연관 RISC (Dicer, TRBP 및 AGO2 단백질로 이루어짐)와 표

적 mRNA의 접합을 통해 작동한다 (Bartel, 2009). 이들의 작용은 결과적으로 번역의 억제 및/또는 mRNA 불안정화를 야기한다 (Filipowicz, 2005). miRNA와 이의 mRNA 표적의 상보성 정도는 mRNA 불안정화/분해를 통해 또는 번역 억제를 통해 mRNA 침묵 과정에 영향을 준다 (Ambros, 2004; Bartel, 2009). 만일 miRNA와 표적 mRNA 서열이 완전히 상보적인 경우에, RISC 복합체는 결합된 mRNA를 절단하여 분해시키도록 작용한다 (Ambros, 2004; Bartel, 2009). 동물 세포 내 miRNA의 대부분의 경우에서처럼, 완벽하게 상보적이지 않는 경우에는 번역이 차단되어 유전자 침묵이 일어난다 (Ambros, 2004; Bartel, 2009).

[0011] 만일 miRNA를 기능하게 하고 효율적인 miRNA-매개 유전자 침묵을 일으키게 하려면, 반드시 RLC (RISC로딩 복합체) 단백질 Dicer, TRBP 및 AGO2와 복합체를 이루게 해야 한다. RLC 내에서, Dicer와 TRBP는 miRNA 전구체(전구-miRNA)를 가공하기 위해 요망되며, 이들이 핵에서 엑스포틴(exportin)-5에 의해 방출된 후에는 miRNA를 생성하고 AGO2와 연합시키기 위해 요망된다. 성숙한 miRNA에 결합한 AGO2는 최소 RISC를 구성하며 이후에 Dicer와 TRBP로부터 분리될 수 있다 (Chendrimada *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2005; MacRae *et al.*, 2008; Maniataki 및 Mourelatos, 2005; Melo *et al.*, 2009). 단일-가닥 miRNA는 그 자체는 거의 RISC에 통합되지 않으며 따라서 전사-후 조절에 있어서 이의 표적 mRNA를 효율적으로 공략하지 못한다 (Tang, 2005; Thomson *et al.*, 2013).

[0012] 합성 siRNA(이중-가닥)는 이들의 표적 mRNA와 완벽하게 염기쌍을 이룸으로써 mRNA의 퇴화를 야기한다 (Ambros, 2004; Bartel, 2009). 그러한 siRNA는 이의 이중 가닥 성질로 인해 RISC 단백질 Dicer, TRBP 및 AGO2에 직접 로딩된다 (Tang, 2005). 단일-가닥 miRNA는 RISC에 통합되지 못하며 그러므로, 번역 저해 또는 분해에 있어서 이의 표적 mRNA를 공략하지 못한다 (Tang, 2005).

[0013] 일부 보고서는 엑소좀에 내포된 miRNA가 표적 세포 내 유전자 발현에 영향을 줄 수 있다고 시사해 왔지만 (Ismail *et al.*, 2013; Kogure *et al.*, 2011; Kosaka *et al.*, 2013; Narayanan *et al.*, 2013; Pegtel *et al.*, 2010; Valadi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010), 그러나 이들 miRNA가 RISC에 통합되지 않은 채 전구-miRNA로서 적절한 mRNA 인식 및 효율적인 번역 중지에 관하여 mRNA를 침묵시키는데 얼마나 효율적인지에 대한 물음이 남아있다. 성숙한 miRNA(단일-가닥)는 표적 세포의 RISC와 연합하지 못하는 반면, 엑소좀의 전구-miRNA는 표적 세포의 RISC 단백질을 끌어들임으로써 어느 정도까지는 유전자 침묵을 일으킬 수 있다. 그럼에도 불구하고, 그러한 과정은 표적 세포의 miRNA 생체내 합성 경로에 관여하는 단백질의 포화 전위 상태로 인해 고도로 비효율적이며 느리다. 최근의 보고는 HIV-1 감염 세포 및 HIV 환자 혈청의 세포 배양 상청액에서 유래된 엑소좀에 Drosha와 Dicer가 존재함을 알려주었다 (Narayanan *et al.*, 2013). 또한, 또다른 연구는 후기 엔도좀/MVB (multivesicular body, 다중소포체) 내에 Dicer, TRBP 및 AGO2가 동시에 분리되었음을 보여주었다 (Shen *et al.*, 2013).

발명의 내용

[0014] **발명의 요약**

[0015] 암 세포가 분비하는 엑소좀은 비-암 엑소좀에 비해 독특한데, 암 엑소좀은 고유한 miRNA 레퍼토리뿐만 아니라 활성 RNA 프로세싱 RISC 복합체를 포함한다. 그러한 캡슐화된 RNA-RISC 복합체는 또한 표적 세포에서 세포-독립적 miRNA 생합성 및 고도로 효율적인 mRNA 침묵을 위해 사용될 수 있다.

[0016] 한 구체예에서, 본 개시는 개체에서 암 생체마커(biomarker)를 검출하는 방법을 제공하며 상기 방법은 (a) 개체로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계, (b) (i) 샘플의 엑소좀 분획 내 표 5에 제공된 miRNA로부터 선택된 하나 이상의 miRNA(들); (ii) 전구체 miRNA; (iii) 샘플의 엑소좀 분획 내 RISC 단백질; 또는 (iv) 샘플의 엑소좀 분획 내 miRNA 프로세싱 활성 (*예컨대,* 일차 miRNA 및/또는 전구체-miRNA 프로세싱 활성) 중 어느 하나의 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 miRNA(들), 전구체 miRNA, RISC 단백질 또는 miRNA 프로세싱 활성의 측정된 수준을 기초로 하여 개체가 암 생체마커를 지녔는지 판별하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 상기 miRNA의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 수준을 측정하는 단계를 포함한다. 추가의 양태에서, 상기 방법은 AGO2, TRBP, 또는 DICER 단백질의 수준을 측정하는 단계를 포함한다.

[0017] 일부 양태에서, 생물학적 샘플은 본질적으로 세포가 없는 상태이다. 예를 들면, 샘플은 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 미만의 세포(들)를 가질 수 있다. 한 양태에서, 생물학적 샘플은 세포를 포함하지 않는다. 특정 양태에서, 생물학적 샘플은 림프액, 침, 오줌 또는 혈액 (*예컨대,* 혈장) 샘플일 수 있다. 추가의 양태에서, 상기 방법은 샘플의 엑소좀 분획을 정제하는 단계 및/또는 샘플의 엑소좀 분획의 생산을 증가시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0018] 특정 양태에서, 암은 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관지암, 뇌암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암이다. 특정 양태에서, 암은 유방암이다. 한 양태에서, 개체는 이미 암치료를 받은 적이 있거나 이미 수술로 종양을 제거한 적이 있다.

[0019] 일부 양태에서, 개체가 암 생체마커를 가졌는지 아닌지 판별하는 단계는 측정된 miRNA 수준(들), 전구체 miRNA 수준, RISC 수준 또는 miRNA 프로세싱 활성을 암 발생 위험과 상호연관시키는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 양태에서, 개체가 암 생체마커를 가졌는지 아닌지 판별하는 단계는 측정된 miRNA 수준(들), 전구체 miRNA 수준, RISC 수준 또는 miRNA 프로세싱 활성을 알고리즘을 이용하여 분석하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 분석은 컴퓨터로 수행될 수 있다.

[0020] 특정 양태에서, 상기 구체예의 방법은 (i) 샘플 및 기준 샘플의 엑소좀 분획 내 표 5에서 제공된 miRNA로부터 선택된 하나 이상의 miRNA(들); (ii) 전구체 miRNA; (iii) 샘플 및 기준 샘플의 엑소좀 분획 내 RISC 단백질; 또는 (iv) 샘플 및 기준 샘플의 엑소좀 분획 내 miRNA 프로세싱 활성 중 어느 하나의 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 개체로부터의 샘플 내 miRNA(들), 전구체 miRNA, RISC 또는 miRNA 프로세싱 활성의 수준을 기준 샘플 내 miRNA(들), 전구체 miRNA, RISC miRNA 프로세싱 활성의 수준에 비교함으로써 개체가 암 생체마커를 가졌는지 판별하는 단계를 추가로 포함한다.

[0021] 일부 양태에서, RISC 단백질 수준을 측정하는 단계는 웨스턴 블롯, ELISA 또는 항체 어레이에 대한 결합 분석을 수행하는 것을 포함한다. 다른 양태에서, miRNA 수준을 측정하는 단계는 프로세싱 miRNA 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 경우에서, miRNA 수준을 측정하는 단계는 RT-PCR, 노던 블롯 또는 어레이 혼성화를 수행하는 것을 포함한다.

[0022] 일부 양태에서, 상기 방법은 개체가 암 생체마커를 가졌는지 아닌지 보고하는 단계를 추가로 포함한다. 보고하는 단계는 서면, 구술 또는 전자 보고서를 작성하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들면, 보고는 환자, 의사, 병원 또는 보험사에게 제공될 수 있다.

[0023] 추가의 구체예에서, 본 개시는 개체를 치료하는 방법을 제공하며 상기 방법은 구체예에 따라 암 생체마커를 가진 것으로 확인된 개체를 선택하는 단계 및 항암 요법 상기 개체에 항암 요법을 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 상기 방법은 (a) 개체로부터의 샘플의 엑소좀 분획에서 (i) 표 5에서 제공된 miRNA로부터 선택된 하나 이상의 miRNA(들); (ii) 전구체 miRNA, (ii) RISC 단백질; 또는 (iii) miRNA 프로세싱 활성의 수준을 얻는 단계; (b) 상기 miRNA(들), 전구체 miRNA, RISC 단백질 또는 miRNA 프로세싱 활성의 수준을 기초로 하여 암 생체마커를 가지는 개체를 선택하는 단계; 및 (c) 선택된 개체를 항암 요법으로 치료하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 항암 요법은 화학 요법, 방사선 요법, 호르몬 요법, 표적 요법, 면역 요법 또는 수술 요법이다.

[0024] 추가의 구체예에서, 본 개시는 진단 절차를 위해 개체를 선택하는 방법을 제공하며 상기 방법은 (a) 개체로부터의 샘플의 엑소좀 분획에서 (i) 표 5에서 제공된 miRNA로부터 선택된 하나 이상의 miRNA(들); (ii) 전구체 miRNA 수준, (iii) RISC 단백질; 또는 (iv) miRNA 프로세싱 활성 중 어느 하나의 수준을 얻는 단계; (b) 상기 mRNA(들), RISC 단백질 또는 miRNA 프로세싱 활성의 수준을 기초로 하여 암 생체마커를 가지는 개체를 선택하는 단계; 및 (c) 상기 개체에 진단 절차를 수행하는 단계를 포함한다. 한 양태에서, 상기 진단 절차는 진단적 촬영을 포함한다. 상기 영상화는 생검(biopsy), X-선, CT, MRI 또는 PET 촬영일 수 있다.

[0025] 더욱 추가적인 구체예에서, 본 개시는 형태가 있는 컴퓨터-판독가능한 매체를 제공하며 상기 매체는 컴퓨터-판독가능한 암호를 포함하고, 컴퓨터에서 실행시켰을 때, 컴퓨터가 (a) 개체로부터의 샘플의 엑소좀 분획에서 (i) 표 5에서 제공된 miRNA로부터 선택된 하나 이상의 miRNA(들); (ii) 전구체 miRNA, (iii) RISC 단백질; 또는 (iv) miRNA 프로세싱 활성 중 어느 하나의 수준에 해당하는 정보를 받는 단계; 및 (b) 기준 수준과 비교하여 상기 miRNA, 전구체 miRNA, RISC 단백질 또는 miRNA 프로세싱 활성 중 하나 이상의 상대적 수준을 결정하는 단계를 포함하는 작업을 수행하게 만들고, 여기서 기준 수준과 비교하여 변화된 수준은 상기 개체가 암 생체마커를 가짐을 나타낸다.

[0026] 특정 양태에서, 상기 형태가 있는 컴퓨터-판독가능한 매체의 작업은 추가로 암이 없는 개체의 엑소좀 분획에서 (i) 표 5에서 제공된 miRNA로부터 선택된 하나 이상의 miRNA(들); (ii) 전구체 miRNA; (iii) RISC 단백질; 또는 (iv) miRNA 프로세싱 활성의 기준 수준에 해당하는 정보를 받는 단계를 포함한다.

[0027] 특정 양태에서, 상기 형태가 있는 컴퓨터-판독가능한 매체는 추가로 컴퓨터-판독가능한 암호를 포함하며, 상기 암호는 컴퓨터에서 실행시켰을 때, 컴퓨터가 miRNA; 전구체 miRNA, RISC 단백질 또는 miRNA 프로세싱 활성의 상대적인 수준에 해당하는 정보를 형태가 있는 데이터 저장 장치로 전송하는 것을 포함하는 하나 이상의 추가적인

작업을 실행하게 만든다.

[0028] 추가의 양태에서, 기준 수준은 상기 형태가 있는 컴퓨터-판독가능한 매체에 저장된다. 한 양태에서, 정보를 받는 단계는 형태가 있는 데이터 저장 장치로부터 개체의 샘플 내 miRNA; 전구체 miRNA 수준, RISC 단백질 또는 miRNA 프로세싱 활성의 수준에 해당하는 정보를 받는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 정보를 받는 단계는 추가로 개체로부터의 샘플 내 상기 miRNA의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 수준에 해당하는 정보를 받는 것을 포함한다.

[0029] 일부 양태에서, 컴퓨터-판독가능한 암호는, 컴퓨터에서 실행시켰을 때, 컴퓨터가 추가로 (c) 샘플에 대한 진단 점수를 계산하는 단계를 포함하는 작업을 수행하게 하며, 여기서 상기 진단 점수는 샘플이 암을 가진 개체로부터 왔는지에 관한 가능성 지표이다.

[0030] 추가의 구체예에서, 본 개시는 개체에서 암 생체마커를 검출하는 방법을 제공하며 상기 방법은 (a) 개체로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계; (b) 표 5에 제공된 miRNA로부터 선택된 샘플 내 하나 이상의 miRNA(들) 또는 이의 전구체 miRNA의 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 miRNA(들)의 측정된 수준을 기초로 하여 개체가 암 생체마커를 지녔는지 판별하는 단계를 포함한다. 한 양태에서, 생물학적 샘플은 본질적으로 세포가 없는 상태이다. 특정 양태에서, 생물학적 샘플은 림프액, 침, 오줌 또는 혈장 샘플일 수 있다. 한 양태에서, 상기 방법은 추가로 체액의 엑소좀 분획을 정제하는 단계를 포함할 수 있다.

[0031] 더욱 추가적인 구체예에서, 본 개시는 능동적 저해 RNA를 송달하는 방법을 제공하며 상기 방법은 RISC 단백질 복합체와 함께 제공되는 저해 RNA를 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다. 한 양태에서, RISC 단백질 복합체는 TRBP, DICER 및 AGO2를 포함한다. 일부 양태에서, 저해 RNA는 siRNA 또는 shRNA이다. 한 양태에서, 저해 RNA는 인간 miRNA이다.

[0032] 특정 양태에서, 저해 RNA와 RISC 단백질 복합체는 리포좀 내에, 지질 이중층을 포함하는 나노입자 또는 마이크로캡슐을 포함한다. 한 양태에서, 마이크로캡슐은 엑소좀이다.

[0033] 일부 양태에서, 방법은 추가로 저해 RNA와 RISC 단백질 복합체로 세포를 형질주입시키는 단계를 포함한다. 또다른 양태에서, 방법은 추가로 저해 RNA와 RISC 단백질 복합체를 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0034] 더욱 추가적인 구체예에서, 본 개시는 RISC 단백질 복합체와 연합된 재조합 또는 합성 저해 RNA를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 복합체는 리포좀, 나노입자 또는 마이크로캡슐 내에 포함된다. 한 양태에서, RISC 단백질 복합체는 TRBP, DICER 및 AGO2를 포함한다. 일부 양태에서, 저해 RNA는 siRNA 또는 shRNA이다. 일부 양태에서, 저해 RNA는 인간 miRNA이다. 특정 양태에서, 복합체는 합성 리포좀, 나노입자 또는 마이크로캡슐 내에 포함된다. 한 양태에서, 마이크로캡슐은 엑소좀이다.

[0035] 위에서 상세하게 설명된 구체예의 특정 양태는 표 5에 제공된 것들로부터 선택된 샘플의 엑소좀 분획 내 하나 이상의 miRNA(들) (또는 miRNA 전구체)의 수준을 측정하는 것과 연관된다. 예를 들면, 방법은 mmu-miR-709, hsa-miR-1308, mmu-miR-615-3p, hsa-miR-1260b, mmu-miR-1937a, mmu-mir-321-A, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-1979, mmu-miR-1937b, hsa-mir-373, mmu-miR-1937c, hsa-miR-1273d-P, mmu-miR-720, mmu-miR-1274a, hsa-mir-565-A, mmu-miR-1931, hsa-miR-1246, hsa-mir-594-P, hsa-mir-321-A, mmu-miR-2145-1-P, hsa-mir-639-P, hsa-miR-720, hsa-miR-1280, mmu-miR-3473, hsa-miR-1260, hsa-miR-1281, mmu-miR-1224-P, mmu-miR-690, hsa-miR-375-P, hsa-miR-4301, mmu-miR-700, mmu-miR-125b-5p, mmu-miR-1191-P, hsa-miR-1274a, hsa-miR-3197, mmu-miR-1935, hsa-miR-1975-P, hsa-miR-4324, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-1274b, mmu-miR-1957, hsa-miR-933, hsa-mir-675, hsa-miR-595, mmu-miR-2137, hsa-mir-572-P, mmu-miR-1195, hsa-miR-4294-P, mmu-mir-1899-P, mmu-miR-689-P, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-3117-P, mmu-mir-321-P, mmu-miR-1961-P, hsa-mir-10a, mmu-miR-669d-P, mmu-miR-1937b-2-P, hsa-miR-3125-P, mmu-miR-1934-P, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-718, mmu-miR-1198, mmu-miR-2182-P, hsa-miR-1273, mmu-miR-2133-P, hsa-miR-92b*, hsa-miR-1290, hsa-miR-448, mmu-miR-689, mmu-miR-449a, mmu-miR-1937b-4-P, hsa-miR-4286, mmu-miR-1947, mmu-miR-342-3p, hsa-miR-1303-P, mmu-miR-2132, hsa-miR-4321-P, hsa-miR-4256-P, hsa-miR-4311, mmu-miR-130a, mmu-miR-1939, hsa-miR-1268-P, mmu-miR-31, mmu-miR-99b, mmu-miR-2141, hsa-miR-1202-P, mmu-miR-466b-3p, mmu-miR-2133, hsa-miR-1268, hsa-miR-466, mmu-miR-494, hsa-miR-1289, hsa-miR-320b, hsa-miR-4254, hsa-mir-7-3-P, hsa-miR-923, hsa-miR-764, mmu-miR-291a-3p, mmu-miR-883b-3p, hsa-mir-594-A, mmu-miR-1948-P, hsa-miR-206, hsa-mir-565-P, mmu-miR-467e*, hsa-miR-1826, mmu-miR-467a*, mmu-miR-1983, hsa-miR-324-5p, mmu-let-7c, mmu-miR-1965, hsa-mir-632-P, hsa-miR-181a*MM2GT/AC, hsa-miR-1265, hsa-miR-323b-5p, hsa-mir-1914, hsa-mir-1910, hsa-miR-21,

hsa-miR-431*, hsa-miR-3135-P, mmu-miR-187-P, mmu-miR-126-3p, mmu-miR-669a-P, hsa-miR-367, mmu-mir-320-P, hsa-miR-181a*MM1G/C, mmu-miR-484-P, mmu-miR-467c-P, hsa-miR-3154, mmu-miR-466d-3p, hsa-miR-3162-P, mmu-miR-201, mmu-miR-1946a, hsa-miR-937, hsa-miR-3147, hsa-mir-596-P, hsa-miR-3148, hsa-miR-1304, hsa-miR-222MM2GG/AC, mmu-miR-125a-5p, hsa-miR-1272-P, hsa-miR-638, hsa-mir-320, hsa-miR-545*, hsa-mir-1908-P, hsa-let-7d-v2-P, mmu-mir-30d-P, hsa-miR-4297, mmu-miR-182, hsa-miR-3166-P, hsa-miR-494, mmu-miR-669o-P, hsa-miR-566, mmu-miR-1188, mmu-miR-2134-AP, hsa-miR-4259-P, mmu-miR-152, mmu-miR-2134, hsa-miR-3193-AP, hsa-miR-125b, hsa-miR-3124-P, hsa-miR-10b, hsa-miR-455-5p, mmu-miR-144, hsa-miR-130a, hsa-miR-1285, hsa-miR-516b*, hsa-miR-27a, hsa-miR-138-1*, mmu-miR-471, hsa-miR-4298-P, hsa-miR-301b, hsa-mir-147-P, hsa-miR-362-5p, mmu-mir-471-P, mmu-miR-466a-3p, hsa-miR-561, hsa-miR-486-5p, mmu-miR-2861, hsa-miR-587, mmu-miR-375, hsa-mir-329-2-P, mmu-miR-2861-P, hsa-miR-144*, hsa-miR-1255a-P, hsa-mir-519a-2-P, hsa-miR-34c-5p, mmu-miR-466e-3p, mmu-miR-743b-5p, mmu-mir-350-P, mmu-miR-181d, hsa-miR-376a*, hsa-miR-1308-P, mmu-miR-467g, mmu-miR-1946a-P, hsa-miR-147-P, hsa-miR-923-P, mmu-miR-465c-5p, hsa-miR-891a, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-4292, mmu-miR-677-P, hsa-miR-4257, hsa-miR-4326, hsa-miR-17*MM2GG/AA, hsa-miR-939-P, mmu-miR-2182, hsa-miR-220c-P, hsa-miR-3132-P, hsa-miR-532-5p, mmu-miR-1947-P, mmu-miR-29a, hsa-miR-3162, hsa-miR-375MM1C/G, hsa-miR-768-3p, mmu-miR-182-P, mmu-miR-205-P, hsa-miR-505, hsa-miR-3146-P, mmu-miR-721, mmu-miR-376c, hsa-miR-1179-P, mmu-miR-1970, hsa-miR-3133-P, hsa-miR-200c, hsa-miR-220a, mmu-miR-100, hsa-miR-1255b, hsa-miR-222MM1G/A, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-517b, hsa-miR-200a, hsa-miR-3141, mmu-miR-669h-3p, hsa-miR-1301, hsa-miR-877, hsa-mir-941-2, hsa-mir-487b-P, hsa-miR-4302, hsa-miR-99b, hsa-miR-1253, hsa-let-7a*, hsa-miR-34aMM2CT/TC, hsa-miR-3181-P, hsa-miR-3200, hsa-miR-3129-P, hsa-miR-93*, hsa-miR-548q-P, mmu-miR-466g, mmu-miR-155, hsa-miR-2278-P, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-633, hsa-miR-4265, mmu-miR-2135-P, hsa-miR-190, mmu-miR-669f, hsa-miR-1323, hsa-miR-588, mmu-miR-183*, hsa-mir-941-4, hsa-mir-1913, hsa-miR-2116*, hsa-miR-1178, mmu-miR-196a, mmu-miR-574-3p, hsa-miR-346, mmu-miR-1199, mmu-miR-681, hsa-miR-4292-P, hsa-miR-522, hsa-mir-611-P, hsa-miR-3171, hsa-miR-635, hsa-miR-1197-P, hsa-miR-604, mmu-let-7a*, hsa-miR-335, mmu-miR-466c-3p, mmu-miR-466i, hsa-miR-1297, mmu-miR-338-5p, hsa-mir-526a-2-P, hsa-miR-181aMM2GC/AG, hsa-miR-18, hsa-miR-924-P, mmu-miR-190-P, hsa-miR-345, mmu-miR-711, hsa-miR-3116-2-P, hsa-miR-99a, mmu-miR-26a, hsa-miR-1248-P, mmu-miR-721-P, mmu-miR-801-P, hsa-miR-1826-P, hsa-miR-1236, hsa-miR-339-5p, mmu-miR-804, mmu-miR-467d*, mmu-miR-1191, hsa-miR-148a, hsa-miR-141, mmu-miR-1937a-P, mmu-miR-696 및 hsa-miR-302a (즉, 표 5에 나열된 것들)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 miRNA의 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용된 "a" 또는 "an"은 하나 이상을 의미할 수 있다. 본 명세서의 청구범위(들)에서, "a" 또는 "an"은 단어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우 하나 또는 하나 이상을 의미할 수 있다.

[0037] 비록 본 개시가 단지 대안들과 "및/또는"을 나타내는 정의를 택하고 있지만, 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은 달리 분명하게 대안만 지칭하거나 대안들이 상호배타적임을 지칭한다고 나타내지 않은 경우 "및/또는"을 의미하기 위해 사용된다. 본 명세서에서 사용된 "또다른"은 적어도 차선 또는 후선의 것들을 의미할 수 있다.

[0038] 본 명세서 전반에 걸쳐, 용어 "약"은 수치가 장비, 수치를 측정하기 위해 사용된 방법, 또는 연구 개체 중에 존재하는 변화에 대한 고유한 오차를 포함함을 나타내기 위해 사용된다.

[0039] 본 발명의 다른 목표, 특징 및 장점이 이어지는 상세한 설명을 통해 명확해질 것이다. 그러나, 당해 분야의 숙련가에게는 본 발명의 사상 및 범위 내에서 다양한 변화와 변형이 상세한 설명으로부터 명백해질 것이기 때문에, 상세한 설명 및 특정한 예시가, 본 발명의 바람직한 구체예를 나타내긴 하지만, 단지 예시의 방식으로 제공됨이 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0040] **도면의 간략한 설명**

하기의 도면은 본 명세서의 일부를 구성하며 본 발명의 특정한 양태를 추가로 설명하기 위해 포함된다. 본 특허 또는 명세서 파일은 컬러로 된 도면을 하나 이상 포함하고 있다. 컬러 도면(들)을 포함하는 본 특허 또는 특허 공보의 복사본은 요청시 그리고 필수적인 수수료 납부시 특허청에 의해 제공될 것이다. 본 발명은 본 명세서에 제시된 특정한 구체예의 상세한 설명과 함께 하나 이상의 이들 도면을 참고하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1A-F. 엑소좀의 특징 분석 - 발암 소포(oncosome)는 정상 소포(normosome)에 비해 발암성 miRNA가 농축되어 있다. (A) 발암 소포의 투과 전자 현미경 사진 (왼쪽 상단 및 하단 사진 및 삽도 확대 사진; 점선은 확대한 부분을 도시한다). 하단 오른쪽 사진은 항-CD9 항체 및 투과 전자 현미경을 이용하여 면역금 표지법으로 생성되었다. 금 입자가 검은 점으로 나타난다. 그래프는 112개 TEM 사진으로부터 분석된 엑소좀 표본의 평균 크기를 나타낸다. (B) 유방암 세포로부터의 엑소좀의 원자력 현미경 사진. 가운데 그래프는 커버 슬립 내 입자의 분산을 엑소좀 크기 범위로 나타낸다. 오른쪽 그래프는 26개 AFM 사진으로부터 분석된 엑소좀 표본의 평균 크기를 나타낸다. (C) 다음으로부터 수확한 엑소좀 내 항-Dicer 항체를 이용한 면역 블롯: 비-종양형성 마우스 (NMuMG) 및 인간 (MCF10A) 세포주 (왼쪽 블롯, 첫 번째 패널); 마우스 암 세포주, 67NR 및 4T1 (중간 블롯, 첫 번째 패널); 인간 암 세포주 MCF7 및 MDA-MB231 (오른쪽 블롯, 첫 번째 패널). 사용된 대조군은 다음과 같다: 엑소좀의 용해를 유도하고 이어서 엑소좀의 단백질을 분해하기 위해 TritonX으로 처리 후 프로테이나제 K (Triton + PK)로 처리된 엑소좀; 나머지-엑소좀 단백질 (PK)을 분해하기 위해 프로테이나제 K로 처리된 엑소좀; 엑소좀을 수확하기 위해 초원심분리한 후의 상청액 (상청액). TSG101 (두 번째 줄) 및 CD9 (세 번째 줄) 면역 블롯을 사용하여 엑소좀의 존재를 확인하였다. (D) 엑소좀 마커 TSG101, CD9, 플로틸린(flotillin)-1 및 0.4 μm 비드와 연결된 MDA-MB231-유래 엑소좀의 CD63 항체를 이용한 유세포 분석기 분석. (E) 광산란 분광법 (LSS)을 이용한 엑소좀의 크기 분석. 시스템의 보정은 24 nm 및 100 nm의 명목 직경을 가진 유리 미소구체와 119 nm, 175 nm, 356 nm 및 457 nm의 명목 직경을 가진 폴리스티렌 미소구체의 인산 완충 식염수 (PBS) 분산액으로부터의 신호를 이용하여 완료하였다. 100 nm의 명목 직경을 가진 유리 미소구체 및 356 nm의 명목 직경을 가진 폴리스티렌 미소구체에 대한 실험 스펙트럼 및 정합 결과는 왼쪽 그래프에 나타난다. 오른쪽 그래프는 암 엑소좀의 PBS 현탁액의 크기 측정을 제시한다. 삽도는 세포 및 세포 파편으로 우리의 엑소좀 표본의 가능한 오염을 배제하기 위해 동일한 그래프를 10 μm로 확대한 것을 보여준다. (F) 나노사이트(NanoSight)를 이용한 엑소좀 크기 분포. 왼쪽 그래프는 105 nm의 중간 크기를 보여주며 더 큰 크기에서는 피크를 보이지 않은 용액 내 입자의 크기 분포를 나타낸다. 오른쪽 그래프는 나노사이트에 의한 용액 내 입자의 크기 분포 및 농도를 나타낸다. 도면에 나타난 데이터는 각각 세 가지 복제물을 이용한 세 번의 독립된 실험의 결과이며 ± 표준편차로서 표현된다.

도 2A-F. 발암 소포에는 miRNA가 농축된다. (A) MDA-MB231 엑소좀 및 MCF10A 엑소좀에서 발현된 miRNA의 상관관계 그래프. (B) 72h의 무-세포 배양 후에 정상 소포 및 발암 소포 사이에서 차등하게 발현된 6가지 miRNA (miR-10a, miR-10b, miR-21, miR-27a, miR-155, 및 miR-373)를 이용한 세포 및 각각의 엑소좀 내 miRNA간의 상관관계 그래프. (C) 정상 소포 및 발암 소포를 DMEM 배지에 재현탁시키고 24 및 72h 동안 무-세포 배양을 유지하였다. 24 및 72h 후에, 엑소좀을 회수하고 15가지 miRNA (표 4 참고)를 qPCR로 정량하였다. 72h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 각각의 miRNA의 배수-변화를 24h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 동일한 miRNA에 비교하여 정량하였다. 그래프 도표는 24h 후에 수확된 것들과 비교하여 72h 후에 수확된 엑소좀 내 종양 억제제 (TS) 및 발암성 (ONC) miRNA에 대한 배수-변화의 평균을 나타낸다. (D) 24 및 72h의 무-세포 배양 후의 정상 소포 및 무배양된 및 24h, 72h 및 96h의 무-세포 배양된 발암 소포로부터의 miR-10b 및 miR-21의 노던 블롯. tRNAMet는 로딩 대조로서 사용하였다. 정량화는 이미지제이(Image J) 소프트웨어로 수행하였다. (E) 72h의 무세포 배양 후 MCF10A, MDA-MB231 및 4T1 세포 및 이들의 각각의 엑소좀 내 15가지 정량화된 miRNA간의 상관관계 도표. 발암 소포는 정상 소포와 비교할 때 (왼쪽 그래프) 이들이 유래한 세포와는 낮은 상관관계 수치를 나타낸다 (중간 및 오른쪽 그래프). (F) 초 (s)당 형광 단위 (FU)로 나타낸 생체분석 그래프 표현 및 정상 소포 및 발암 소포의 엑소좀 RNA 함량의 겔 사진.

도 3A-E. 엑소좀은 전구-miRNA를 함유한다. (A) 연구된 성숙 miRNA에 상응하는 열다섯 가지 전구-miRNA를 MCF10A 및 MDA-MB231 엑소좀의 qPCR을 이용하여 정량하였다. 각각의 전구-miRNA에 대한 ΔCt 값의 역수를 도시하여 이들의 많음을 나타내었고 수치는 ± 표준편차로서 표현된다. (B) 발암 소포 및 정상 소포를 DMEM 배지에 재현탁시키고 24 및 72h 동안 무-세포 배양 조건을 유지하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 다시 회수하고 15가지 전구-miRNA를 qPCR로 정량하였다. 그래프는 24h 무-세포 배양에 비교하여 72h의 무-세포 배양 후의 MCF10A 및 MDA-MB231 엑소좀 내 각각의 전구-miRNA의 배수-변화를 보여주며 수치는 ± 표준편차로서 표현된다. (C) 24h 및 72h의 무-세포 배양 후의 MCF10A 정상 소포, 및 0h, 24h, 72h 및 96h의 무-세포 배양 후의 MDA-MB231 발암 소포를 이용한 전구miR-10b 및 전구-miR-21의 노던 블롯. tRNAMet는 로딩 대조로서 사용하였다. 정량화는 이미지제이(Image J) 소프트웨어로 수행하였다. (D) 상단 그래프: 발암 소포 (MDA-MB231)의 발암성 전구-miRNA (왼쪽 그래프) 및 발암성 miRNA (오른쪽 그래프)를 24h 및 72h 무-세포 배양 조건 후에 정량하였다. 상이한 시점에서 각각의 전구-miRNA (왼쪽 그래프) 및 miRNA (오른쪽 그래프)에 대한 ΔCt 값의 역수를 도시하여 이들의 많음을 나타내었고 기하급수적 경향이 특징적이다. 제시된 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. 하단 그래프: 발암 소포 (MDA-MB231)의 전구-miRNA (왼쪽 그래프) 및 성숙 miRNA (오른쪽 그래프)를

6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h 및 96h의 무-세포 배양 조건 후에 정량하였다. 상이한 시점에서 각각의 전구-miRNA (왼쪽 그래프) 및 miRNA (오른쪽 그래프)에 대한 ΔCt 값의 역수를 도시하였고 기하급수적 경향이 특징적이다. 도면에 나타난 데이터는 각각 세 가지 복제물을 이용한 세 번의 독립된 실험의 결과이며 ± 표준편차로서 표현된다. (E) 발암 소포 및 정상 소포를 DMEM 배지에 재현탁시키고 0h, 24h, 72h 및 96h 동안 무-세포 배양 조건을 유지하였다. 엑소좀을 상이한 시점에 추출하였고 전구-miRNA를 qPCR에 의해 정량하였다. 각각의 전구-miRNA에 대한 ΔCt 값의 역수를 도시하여 이들의 많음을 나타내었다.

도 4A-N. 발암 소포는 RLC 단백질을 함유한다. (A) 다음으로부터 수확한 엑소좀 내 항-Dicer 항체를 이용한 면역 블롯: 비종양형성 마우스 (NMuMG) 및 인간 (MCF10A) 세포주; 마우스 암 세포주, 67NR 및 4T1; 및 인간 암 세포주 MCF7 및 MDAMB231. 사용된 대조군은 다음과 같다: 엑소좀의 용해를 유도하고 이어서 엑소좀의 단백질을 분해하기 위해 TritonX으로 처리 후 프로테이나제 K (Triton + PK)로 처리된 엑소좀; 및 나머지-엑소좀 단백질 (PK)을 분해하기 위해 프로테이나제 K로 처리된 엑소좀. TSG101 (두 번째 줄) 및 CD9 (세 번째 줄) 면역 블롯을 사용하여 엑소좀의 존재를 확인하였다. (B) 발암 소포 (MDA-MB231) 내 항-Dicer 항체를 이용한 면역금 표지법의 투과 전자 현미경 사진. 오른쪽 상단 사진은 추출물의 새로운 독립적인 사진을 디지털로 확대한 것이다. 음성 대조는 IgG를 지칭한다. 금 입자는 검은 점으로 나타나며 하단 사진에서 검은 화살표로 표시된다. 그래프는 왼쪽에 있는 두 개의 상단 사진을 정량한 것을 나타낸다. (C) 빈 벡터 (pCMV-Tag4B; 각각 첫 번째 및 세 번째 열) 및 Flag-Dicer 벡터 (두 번째 및 네 번째 열)로 형질주입된 세포로부터 수확한 MCF10A 및 MDA-MB231 엑소좀 내 항-플래그(flag) 항체 (상단 패널)를 이용한 면역 블롯. 엑소좀의 존재를 확인하고 로딩 대조(하단 패널)로서 사용하기 위해 CD9 면역 블롯을 이용하였다. (D) 칼슘 이온투과담체 A23187 로 처리한 MCF10A 및 MDA-MB231 세포로부터 수확한 엑소좀 내 Dicer에 대한 면역 블롯(상단 패널). 처리되지 않은 세포에서 추출한 엑소좀을 대조로서 사용하였다. CD9 면역 블롯 (하단 패널)을 대조로 사용하여 증가된 엑소좀 분비를 알아보았다. (E) shScramble 및 shDicer 플라스미드로 형질주입된 MCF10A 및 MDA-MB231 모 세포 및 세포로부터 추출한 엑소좀 내 Dicer에 대한 면역 블롯 (상단 블롯). 엑소좀의 존재를 알아보고 로딩 대조(하단 블롯)로 사용하기 위해 CD9 면역 블롯을 이용하였다. 면역 블롯 정량화는 이미지제이(Image J) 소프트웨어로 수행하였다. (F) MDAMB231shDicer 세포로부터 유래된 발암 소포 내 항-Dicer 항체를 이용한 면역금 표지법의 투과 전자 현미경 사진. 금 입자가 검은 점으로 나타난다. 오른쪽 그래프는 EM 사진에서 금 입자의 정량화를 도시한다. (G) 발암 소포 (MCF7 및 MDA-MB231) 및 정상 소포 (MCF10A)로부터 수확한 엑소좀 내 항-AGO2 항체를 이용한 면역 블롯. 사용된 대조군은 다음과 같다: 엑소좀의 용해를 유도하고 이어서 엑소좀의 단백질을 분해하기 위해 Triton X으로 처리 후 프로테이나제 K (Triton X + PK)로 처리된 엑소좀; 나머지-엑소좀 단백질 (PK)을 분해하기 위해 프로테이나제 K로 처리된 엑소좀; 및 엑소좀을 수확하기 위해 초원심분리한 후의 상청액 (상청액). TSG101 (두 번째 줄) 및 CD9 (세 번째 줄) 면역 블롯을 사용하여 엑소좀의 존재를 확인하였다. (H) 발암 소포 (MCF7 및 MDA-MB231) 및 정상 소포 (MCF10A)로부터 수확한 엑소좀 내 항-TRBP 항체를 이용한 면역 블롯. 사용된 대조군은 다음과 같다: 엑소좀의 용해를 유도하고 이어서 엑소좀의 단백질을 분해하기 위해 Triton X으로 처리 후 프로테이나제 K (Triton X + PK)로 처리된 엑소좀; 나머지-엑소좀 단백질 (PK)을 분해하기 위해 프로테이나제 K로 처리된 엑소좀; 및 엑소좀을 수확하기 위해 초원심분리한 후의 상청액 (상청액). TSG101 (두 번째 줄) 및 CD9 (세 번째 줄) 면역 블롯을 엑소좀 마커로서 사용하였다. (I) GFP-AGO2 플라스미드로 형질주입된 MCF10A 및 MDA-MB231 세포 내 항-GFP 항체를 이용한 면역 블롯 (상단 패널). 베타 액틴을 로딩 대조(하단 패널)로 사용하였다. (J) GFP-AGO2 플라스미드로 형질주입된 MCF10A 및 MDA-MB231 세포로부터 추출한 엑소좀 내 항-GFP 항체를 이용한 면역 블롯 (상단 패널). TSG101 (중간 패널) 및 CD9 (하단 패널)을 엑소좀 마커 및 로딩 대조로서 사용하였다. (K) siAGO2 플라스미드로 형질주입된 MCF10A 및 MDA-MB231 세포 내 AGO2 mRNA 발현. MCF10A 및 MDA-MB231 모세포를 배수 변화 비교를 위한 비교 대조로 사용하였다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. (L) si대조군 또는 siAGO2로 형질주입된 MCF10A 및 MDA-MB231 모세포 또는 세포로부터 추출한 엑소좀 내 AGO2 항체를 이용한 면역 블롯 (상단 패널). TSG101 (중간 블롯) 및 CD9 (하단 블롯)을 엑소좀 마커 및 로딩 대조로서 사용하였다. 정량화는 이미지제이(Image J) 소프트웨어로 수행하였다. (M) Dicer 항체 또는 IgG로 면역침강시킨 MCF10A 및 MDA-MB231 세포로부터 추출한 엑소좀 단백질 내 AGO2 항체를 이용한 면역 블롯 (상단 패널). MDA-MB231 세포로부터 추출한 엑소좀의 용해물을 5% 투입하여 대조로서 사용하였다. Dicer의 면역 블롯을 면역 침강에 대한 대조로서 사용하였다 (하단 패널). (N) Dicer 항체 또는 IgG로 면역침강시킨 MCF10A 및 MDA-MB231 세포로부터 추출한 엑소좀 단백질 내 항-TRBP 항체를 이용한 면역 블롯 (상단 패널). MDA-MB231 세포로부터 추출한 엑소좀의 용해물 투입(5%)을 대조로서 사용하였다. Dicer의 면역 블롯을 대조로서 사용하였다 (하단 패널).

도 5A-E. 발암 소포는 전구-miRNA를 프로세싱하여 성숙 miRNA를 생성한다. (A) 엑소좀을 MCF10A, MCF10A

shScramble, MCF10A shDicer 세포 (상단 그래프), MDA-MB231, MDA-MB231 shScramble 및 MDA-MB231 shDicer 세포 (하단 그래프)로부터 수확하고 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 유지하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 회수하고 15가지 전구-miRNA를 qPCR로 정량하였다. 그래프는 24h 무-세포 배양에 비교하여 72h의 무-세포 배양 후의 서로 다른 엑소좀 내 각각의 전구-miRNA의 배수-변화를 보여주며 수치는 ± 표준편차로서 표현된다. (B) 엑소좀을 MCF10A, MCF10A shScramble, MCF10A shDicer 세포 (상단 그래프), MDA-MB231, MDA-MB231 shScramble 및 MDA-MB231 shDicer 세포 (하단 그래프)로부터 수확하고 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 유지하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 다시 회수하고 15가지 miRNA를 qPCR로 정량하였다. 그래프는 24h 무-세포 배양에 비교하여 72h의 무-세포 배양 후의 서로 다른 엑소좀 내 각각의 miRNA의 배수-변화를 보여주며 수치는 ± 표준편차로서 표현된다. (C) MDA-MB231 세포의 엑소좀 내로 전기천공된 중사슬 (HC) 및 경사슬 (LC) 일차 Dicer 항체 및 일차 액틴 항체를 검출하기 위해 항토끼 및 항-마우스 이차 항체를 이용한 면역 블롯. MDA-MB231 세포에서 유래한 항체가 없는 전기천공된 엑소좀을 음성 대조로 사용하였다. 엑소좀에 포함되지 않는 항체를 완전히 고갈시키기 위해 전기천공 후에 프로테이나제 K 처리를 수행하였다. (D) 발암 소포 (MDA-MB231)를 이중복 (하단 그래프) 또는 사중복 (상단 그래프)으로 수확하였다. 샘플을 항-Dicer 항체, 항-액틴 항체, 또는 항-TRBP 항체로 전기천공하였다. 샘플 더하기 대조를 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 방치하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 다시 추출하고 6가지 발암성 전구-miRNA (맨위 그래프) 또는 15가지 전구-miRNA (아래 그래프)를 qPCR로 정량하였다. 72h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 각각의 전구-miRNA의 배수-변화를 각 샘플에서 24h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 동일한 전구-miRNA에 비교하여 정량하였다. 그래프 도표는 24h 엑소좀에 비하여 72h 엑소좀 내 전구-miRNA에 대한 평균 배수-변화(하단 그래프 - TS = 종양 억제제; ONC = 발암성)를 나타내며 수치는 ± 표준편차로서 표현된다. (E) 발암 소포 (MDAMB231)를 사중복 (상단 그래프) 또는 이중복 (하단 그래프)으로 수확하였다. 샘플을 항-Dicer 항체, 항-액틴 항체, 또는 항-TRBP 항체로 전기천공하였다. 샘플 더하기 대조를 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 방치하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 다시 추출하고 6가지 발암성 miRNA (맨위 그래프) 또는 15가지 miRNA (아래 그래프)를 qPCR로 정량하였다. 72h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 각각의 miRNA의 배수-변화를 각 샘플에서 24h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 동일한 miRNA에 비교하여 정량하였다. 그래프 도표는 24h 엑소좀에 비하여 72h 엑소좀 내 miRNA에 대한 평균 배수-변화(하단 그래프 - TS = 종양 억제제; ONC = 발암성)를 나타내며 수치는 ± 표준편차로서 표현된다.

도 6A-E. 발암 소포는 전구-miRNA를 프로세싱하여 성숙 miRNA를 생성한다. (A) MDA-MB231 세포로부터의 엑소좀을 수확하고 젤다나마이신(Geldanamycin)으로 전기천공시켰다. 샘플을 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 방치한 뒤, 엑소좀을 추출하고 6가지 miRNA를 qPCR로 정량하였다. 72h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 각각의 miRNA의 배수-변화를 각 샘플에서 24h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 동일한 miRNA에 비교하여 정량하였다. 그래프 도표는 24h 엑소좀에 비하여 72h 엑소좀 내 miRNA에 대한 평균 배수-변화를 나타내며 수치는 ± 표준편차로서 표현된다. (B) 합성 전구-miRNA -10b, -21 및 -cel-1을 MCF10A (MCF10A 전기천공물), MCF10AshDicer (MCF10AshDicer 전기천공물), MDAMB231 (MDA-MB231 전기천공물) 및 MDA-MB231shDicer (MDAMB231shDicer 전기천공물) 세포로부터 수확한 엑소좀 내로 전기천공시켰다. 무-세포 배양 조건에서 72h 동안 배양한 후에 엑소좀을 회수하였다. 전구-miR-10b, -21 및 -cel-1을 72h의 전기천공 및 배양 전후에 qPCR로 정량하였다. 도표 상의 각각의 막대는 전기천공 후 0h에 비하여 전기천공 후 72h에서 전구-miR-10b, -21 및 -cel-1의 배수-변화를 나타내며 ± 표준편차로서 표현된다. 전구-miRNA의 부재에서 전기천공시킨 MCF10A 및 MDA-MB231 엑소좀 전기천공물을 기저 수준을 강조하기 위한 대조로서 사용하였다. (C) 합성 전구-miRNA -10b, -21 및 -cel-1을 MCF10A (MCF10A 전기천공물), MCF10AshDicer (MCF10AshDicer 전기천공물), MDA-MB231 (MDA-MB231 전기천공물) 및 MDAMB231shDicer (MDA-MB231shDicer 전기천공물) 세포로부터 수확한 엑소좀 내로 전기천공시켰다. 무-세포 배양 조건에서 72h 동안 배양한 후에 엑소좀을 회수하였다. MiR-10b, -21 및 -cel-1을 72h의 전기천공 및 배양 전후에 qPCR로 정량하였다. 도표 상의 각각의 막대는 전기천공 후 0h (위쪽 그래프) 또는 24h (아래쪽 그래프)에 비하여 전기천공 후 72h에서 miR-10b, -21 및 -cel-1의 배수-변화를 나타내며 ± 표준편차로서 표현된다. 전구-miRNA의 부재에서 전기천공시킨 MCF10A 및 MDA-MB231 엑소좀 전기천공물을 정해진 기저 수준에 대한 대조로서 사용하였다. (D) 검출 프로브 없이, 다이싱 분석으로부터의 샘플을 이용하는 노던 블롯. 상이한 엑소좀 단백질 추출물 및 내부에 비오틴으로 표지한 합성 전구-miR-10b를 다이싱 분석을 위해 사용하였다. 사용된 샘플은 MCF10A, MCF10AshDicer, MDA-MB231 엑소좀 (MDA231 엑소좀), MDA-MB231shDicer 클론 1 및 클론2로부터의 엑소좀 (각각 MDA231shDicer 1 엑소좀 및 MDA231shDicer 2 엑소좀), MDA-MB231shDicer 세포 및 Dicer 항체로 전기천공시킨 MDA-MB231 엑소좀 (MDA231 엑소좀 + Dicer AB)였다. (E) 검출 프로브 없이, 다이싱 분석으로부터의 샘플을 이용하는 노던 블롯. 상이한 엑소좀 단백질 추출물 및 내부에 비오틴으로 표지한 합성 전구-miR-21를 다이싱 분석을 위해 사용하였다. 사용된 샘플은 MCF10A, MCF10AshDicer, MDA-MB231 엑소좀 (MDA231 엑소좀), MDA-

MB231shDicer 클론 1 및 클론2로부터의 엑소좀 (각각 MDA231shDicer 1 엑소좀 및 MDA231shDicer 2 엑소좀), MDA-MB231shDicer 세포 및 Dicer 항체로 전기천공시킨 MDA-MB231 엑소좀 (MDA231 엑소좀 + Dicer AB)였다. (F) 검출 프로브 없이, 다이싱 분석으로부터의 샘플을 이용하는 노던 블롯. 상이한 엑소좀 단백질 추출물 및 내부에 비오틴으로 표지한 합성 전구-cel-miR-1을 다이싱 분석을 위해 사용하였다. 사용된 샘플은 MCF10A, MCF10AshDicer, MDA-MB231 엑소좀 (MDA231 엑소좀), MDA-MB231shDicer 엑소좀 (MDA231shDicer 엑소좀) 및 Dicer 항체로 전기천공시킨 MDAMB231 엑소좀 (MDA231 엑소좀 + Dicer AB)였다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다.

도 7A-H. 발암 소포는 수취 세포에서 Dicer-의존 방식으로 전사체 변형 및 종양 형성을 유발한다. (A) 무-세포 배양 후 0, 30분, 1h, 12h 및 24h동안 MDA-MB231 발암 소포로 처리한 MCF10A 세포의 항-PTEN 항체 및 단백질 추출물을 이용한 면역 블롯. 베타 액틴을 로딩 대조로서 사용하였다. (B) 무-세포 배양 조건 후 0, 30분, 1h, 12h 및 24h동안 MDA-MB231 발암 소포로 처리한 MCF10A 세포의 항-HOXD10 항체 및 단백질 추출물을 이용한 면역 블롯. 베타 액틴을 로딩 대조로서 사용하였다. (C) 3'UTR-PTEN-WT, 3'UTRPTEN-Mut, 3'UTR-HOXD10-WT 및 3'UTR-HOXD10-Mut로 일시적으로 형질주입된 및 MDA-MB231 세포에서 유래한 발암 소포로 처리한 MCF10A 세포에서 루시페라아제 리포터(reporter) 활성을 보여주는 그래프. (D) 무-세포 배양 조건 후 Dicer 항체로 전기천공시킨 MDAMB231 발암 소포로 0, 30분, 1h, 12h 및 24h동안 처리한 MCF10A 세포의 항-PTEN 항체 (상단 패널) 및 항-HOXD10 항체 (중간 패널) 및 단백질 추출물을 이용한 면역 블롯. 베타 액틴을 로딩 대조로서 사용하였다. (E) 무-세포 배양 시간 없이 MDA-MB231 엑소좀과 항-miR-182-5p 및 MDA-MB231 엑소좀으로 처리한 항-Smad4 항체 (상단 패널) 및 MCF10A 세포 및 MCF10A 세포의 단백질 추출물을 이용한 면역 블롯. 베타 액틴을 로딩 대조로서 사용하였다. (F) MCF10A 세포, 무-세포 배양 시간 없이 MDA-MB231 엑소좀으로 처리한 MCF10A 세포 (MCF10A + MDA231 엑소좀), 무-세포 배양 시간을 가지고 MDA-MB231 엑소좀으로 처리한 MCF10A 세포 (MCF10A 세포 + MDA231 엑소좀 배양) 및 무-세포 배양 시간을 가지고 Dicer 항체로 전기천공시킨 MDA-MB231 엑소좀으로 처리한 MCF10A 세포 (MCF10A 세포 + MDA231 엑소좀 Dicer AB)를 5일의 배양 동안 MTT 어세이로 세포 생존능을 측정했으며 수치는 ± 표준편차로서 표현된다 * p=0.0027. (G) 콜로니 형성 어세이는 8일 후 배양 접시 내 MTT 시약으로 표지된 MCF10A 세포 배양물, 무-세포 배양 시간 없이 MDA-MB231 엑소좀으로 처리한 MCF10A 세포 (MCF10A + MDA231 엑소좀), 무-세포 배양 시간을 가지고 MDA-MB231 엑소좀으로 처리한 MCF10A 세포 (MCF10A 세포 + MDA231 엑소좀 배양) 및 무-세포 배양 시간을 가지고 Dicer 항체로 전기천공시킨 MDA-MB231 엑소좀으로 처리한 MCF10A 세포 (MCF10A 세포 + MDA231 엑소좀 Dicer AB) 콜로니의 형성을 보여준다. (H) 상단 그래프: MCF10A 세포, MDA-MB-231 발암 소포에 노출된 MCF10A 세포 (MCF10A 세포 + MDA231 엑소좀 배양물), Dicer 항체로 전기천공시킨 MDA-MB-231 발암 소포에 노출된 MCF10A 세포 (MCF10A 세포 + MDA231 엑소좀 Dicer AB) 및 액틴 항체로 전기천공시킨 MDAMB231발암 소포에 노출된 MCF10A 세포 (MCF10A 세포 + MDA231 엑소좀 액틴 AB)를 무흉선 누드 마우스의 유방 패드에 동소위(orthotopically) 주사하였다. 그래프는 시간에 따른 종양 부피를 도시하며 ± 표준편차로서 표현된다 *p=0.005. 하단 그래프: MCF10A 세포, MDA-MB231 세포 및 발암 소포 (MDA-MB231)에 노출된 MCF10A 세포를 무흉선 누드 마우스의 유방 패드에 동소위 주사하였다. 그래프는 시간에 따른 종양 부피를 도시한다.

도 8A-I. 유방암 환자로부터의 혈청은 Dicer를 함유하며 전구-miRNA를 프로세싱한다. (A) 인간 및 마우스 Dicer를 인식하는 항-Dicer 항체, 및 인간 종양을 이종이식받은 마우스에게서 수확한 혈청 엑소좀의 단백질 추출물을 이용한 면역 블롯 (도 18A에 나타난 바와 같음). OVA1-5는 인간 난소 이종이식편을 나타내고; END1-3은 인간 자궁내막 이종이식편을 나타내며; BRST1 및 2는 인간 유방 이종이식편을 나타낸다. 4T1 엑소좀 및 세포를 쥐의 Dicer에 대한 대조로서 사용하였다. hsa-Dicer는 인간 Dicer 분자량을 나타내고 mmu-Dicer는 쥐의 Dicer 분자량을 나타낸다. 막의 쿠마시(Comassie) 염색에 대한 로딩 대조에 대하여는 도 18D를 참조하라. (B) 8명의 건강한 공여자 (왼쪽 그래프) 및 11명의 유방암 환자 (오른쪽 그래프)의 혈청에서 추출한 엑소좀의 크기 분포를 나타내는 나노사이트 입자 추적 분석. 크기를 더 잘 나타내기 위해 샘플의 농도를 표준화하였다. (C) 유방암 환자의 혈청에서 수확한 엑소좀의 투과 전자 현미경 사진. (D) 나노사이트 입자 추적 분석으로 평가한 8명의 건강한 공여자 및 11명의 유방암 환자의 혈청으로부터의 엑소좀의 농도. *p=0.012 (E) 엑소좀을 8명의 건강한 공여자 및 11명의 유방암 환자의 혈청으로부터 수확하였다. 추출한 샘플을 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 방치하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 회수하고 6가지 전구-miRNA를 qPCR로 정량하였다. 72h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 각각의 전구-miRNA의 배수-변화를 각 샘플에서 24h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 동일한 전구-miRNA에 비교하여 정량하였다. 그래프 점 도표는 24h 엑소좀에 비하여 72h 엑소좀 내 전구-miRNA에 대한 평균 배수변화를 나타내며 수치는 ± 표준편차로서 표현된다. (F) 엑소좀을 8명의 건강한 공여자 및 11명의 유방암 환자의 혈청으로부터 수확하였다. 추출한 샘플을 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 방치하였다. 24 및 72h 후에 엑소

좀을 회수하고 6가지 miRNA를 qPCR로 정량하였다. 72h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 각각의 miRNA의 배수변화를 각 샘플에서 24h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 동일한 miRNA에 비교하여 정량하였다. 그래프 점 도표는 24h 엑소좀에 비하여 72h 엑소좀 내 miRNA에 대한 평균 배수-변화를 나타낸다. 패널 E와 F는 둘다 각각 세 가지 복제물을 이용한 세 번의 독립된 실험의 결과이며 ± 표준편차로서 표현된다. (G) MCF10A 세포, 건강한 공여자 (H1-8)의 엑소좀과 혼합된 MCF10A 세포 및 유방암 환자 (BC1-11)의 엑소좀과 혼합된 MCF10A 세포를 무흉선 누드 마우스의 유방 패드에 동소위 주입하였다. 사용된 엑소좀의 수는 혈청으로부터 수집한 최초 농도를 반영하여 체중당 산출하였다. 종양을 형성하지 않은 샘플은 그래프의 x축에 겹쳐진 것으로 보인다. 그래프는 시간에 따른 종양 부피를 도시하며 ± 표준편차로서 표현된다. (H) CD9 블롯을 로딩 대조로 사용하고 5명의 건강한 개체(C46, C45, C44, C43 및 C41) 및 4명의 전이성 유방 암종(Met219, Met354, Met299 및 Met356)로부터 수확한 혈청 엑소좀으로부터의 항-Dicer 항체 및 단백질 추출물을 이용한 면역 블롯. HDF와 발암 소포 (MDA-MB231)로 처리한 HDF의 배가 시간(doubling time). * p=0.0114. 면역 블롯 정량화는 이미지제이(Image J) 소프트웨어로 수행하였다.

도 9A-B. Dicer는 다포성 소체로 존재하며 세포질의 CD43가 Dicer를 엑소좀 내로 이동시킨다. (A) Dicer 항체 (IP Dicer) 또는 IgG로 (상단 패널, 각각 오른쪽과 중간 열) 면역침강시킨 MDA-MB231 세포의 단백질 추출물 내 CD43의 면역 블롯. Dicer 단독의 면역 블롯을 대조로서 사용하였다 (하단 패널). (B) MDA-MB231 유래 엑소좀 및 MDA-MB231 siCD43 유래 엑소좀의 단백질 추출물 내 Dicer의 면역 블롯. CD9 면역 블롯을 로딩 대조로서 사용하였다. 정량화는 이미지제이(Image J) 소프트웨어로 수행하였다.

도 10A-E. 엑소좀 특징 분석. (A) 초원심분리 튜브 하단에 있는, PKH26 염색된 엑소좀의 사진. 삽도는 엑소좀의 디지털 확대 사진을 나타낸다. (B) LSS 스펙트럼을 수집하기 위해 사용한 실험 시스템의 모식도. (C) MCF10A, NMuMG, MDA-MB231 및 4T1 세포를 5일 배양하는 동안 MTT 어세이로 측정한 세포 생존능. (D) MDA-MB231 및 4T1 세포의 프로피듐 아이오다이드 (PI) 및 아넥신(Anexin) V에 대한 유세포 분석. 에토포시드로 처리한 MDA-MB231 세포를 아폽토시스에 대한 양성 대조로서 사용하였다. (E) 엑소좀에 대하여 MDA-MB231 세포를 양성 대조로서 및 TSG101를 로딩 대조로서 사용하는 엑소좀 내 시토크롬 C의 면역 블롯 분석. 도면에 나타난 데이터는 각각 세 가지 복제물을 이용한 세 번의 독립된 실험의 결과이며, ± 표준편차로서 표현된다.

도 11A-E. 발암 소포는 정상 소포에 비해 miRNA가 농축되어 있다. (A) 생체분석기 뉴클레오티드 (nt)당 형광 단위 (FU)로 도시된 그래프 도식 (그래프) 및 인간 유방 MCF10A (비-종양형성) 및 MDA-MB231 (유방암) 세포주의 RNA 함량의 겔 사진 (오른쪽 사진). (B) 4T1, MCF10A 및 MDA-MB231 세포로부터 수확한 엑소좀을 DMEM 배지에 재현탁시키고 24 및 72h 동안 무-세포 배양 조건을 유지하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 회수하고 15가지 miRNA (표 4 참고)를 qPCR로 정량하였다. 그래프는 각각 24 및 72h의 무-세포 배양 후의 정상 소포에 비해 24h (상단 그래프) 및 72h (하단 그래프)의 무-세포 배양 후의 발암 소포 내 각각의 miRNA의 배수 변화를 나타낸다. 제시된 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. (C) 열다섯 가지의 성숙 miRNA (표 4를 참조)를 MCF10A (왼쪽 그래프), MDA-MB231 (중간 그래프) 및 4T1 (오른쪽 그래프) 세포 및 이들의 각각의 엑소좀에서 qPCR로 정량하였다. 엑소좀 내 각각의 miRNA의 배수 변화를 세포 내 동일한 miRNA에 비교하여 정량하였다. TS: 종양 억제제 miRNA; ONC: 발암성 miRNA. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. (D) MCF10A, MDA-MB231 및 4T1 세포에서 수확한 엑소좀을 DMEM 배지에 재현탁시키고 24 및 72h 동안 무-세포 배양 조건을 유지하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 다시 회수하고 15가지 miRNA(표 4를 참조)를 qPCR로 정량하였다. 72h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 각각의 miRNA의 배수 변화를 24h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 동일한 miRNA에 비교하여 정량하였다. 데이터는 도 2C의 배수 변화 평균 그래프들 중 상세한 그래프에 해당된다. 도면에 나타난 데이터는 각각 세 가지 복제물을 이용한 세 번의 독립된 실험의 결과이며, ± 표준편차로서 표현된다. (E) 72h의 무세포 배양 후 MCF7 및 67NR 세포 및 이들의 각각의 엑소좀 내 정량화된 15가지 miRNA간의 상관관계 도표.

도 12A-E. 엑소좀은 전구-miRNA를 함유한다. (A) 앞서 정량화된 성숙 miRNA에 상응하는 열다섯 가지 전구-miRNA (표 4를 참조)를 NMuMG 및 4T1 엑소좀에서 qPCR로 정량하였다. 각각의 전구-miRNA에 대한 ΔCt 값의 역수를 도시하여 이들의 많음을 나타내었다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 ± 표준편차로서 표현된다. (B) NMuMG 및 4T1 세포에서 수확한 엑소좀을 DMEM 배지에 재현탁시키고 24 및 72h 동안 무-세포 배양 조건을 유지하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 다시 회수하고 15가지 전구-miRNA를 qPCR로 정량하였다. 그래프는 24h 무-세포 배양에 비교하여 72h의 무-세포 배양 후의 NMuMG 및 4T1 엑소좀 내 각각의 전구-miRNA의 배수 변화를 보여준다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. (C) 대조 세포에 비하여 배수 변화로서 두 가지 일시적으로 형질주입된 XPO5를 표적하는 siRNA를 갖는 MDAMB231 세포 내 XPO5 mRNA 발현. (D) MDA-

MB231 세포를 XPO5 siRNA 구조체로 형질주입시키고 12h 형질주입-후 여러 시점(0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h 및 96h)에서 miR-21 발현을 평가하였다. 긴 원심분리 기간의 영향을 보기 위한 비교로서 XPO5 siRNA 구조체를 형질주입한 MDA-MB231 세포를 3h 동안 4° C에서 원심분리하고 배양액에 원위치시켰다. MiR-21 발현을 원심분리후 여러 시점(0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h 및 96h)에서 평가하였다. 전구miR21에서 miR21로의 프로세싱이 원심분리된 세포에서 지연된다(녹색 막대). 도면에 나타난 데이터는 각각 세 가지 복제물을 이용한 세 번의 독립된 실험의 결과이며 ± 표준편차로서 표현된다. (E) NMuMG 및 4T1 세포에서 수확한 엑소좀을 DMEM 배지에 재현탁시키고 0, 24, 72 및 96h 동안 무-세포 배양 조건을 유지하였다. 엑소좀을 상이한 시점에 추출하였고 전구-miRNA를 qPCR에 의해 정량하였다. 각각의 전구-miRNA에 대한 ΔCt 값의 역수를 도시하여 이들의 많음을 나타내었다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다.

도 13A-H. 발암 소포는 Dicer를 함유한다. (A) MCF10A 세포-유래 엑소좀에서 항-Dicer 항체 (오른쪽 사진) 및 음성 대조 (왼쪽 사진)을 이용하여 면역금 표지법으로 생성한 투과 전자 현미경 사진. MDA-MB231 엑소좀의 양성 면역금 표지에 대하여는 도 4B를 비교하라. (B) 항-GFP 항체 MDA-MB231-유래 엑소좀을 이용하여 면역금 표지법으로 생성한 투과 전자 현미경 사진. (C) 빈 벡터 (pCMV-Tag4B; 각각 첫 번째 및 세 번째 열) 및 Flag-Dicer 벡터 (두 번째 및 네 번째 열)로 형질주입된 MCF10A 및 MDAMB231 세포 내 항-플래그 항체 (상단 패널)를 이용한 면역 블롯. 베타 액틴 면역 블롯을 로딩 대조로서 사용하였다 (하단 패널). (D) 각각 MCF10A, MCF10AshScramble 및 MCF10AshDicer 클론 1 및 2 (MCF10AshDicer 클론1 및 MCF10AshDicer 클론2) 세포 내 항-Dicer 항체 (상단 패널)를 이용한 면역 블롯. 베타 액틴 면역 블롯을 로딩 대조로서 사용하였다 (하단 패널). (E) 각각 MDA-MB231, MDA-MB231shScramble 및 MDA-MB231shDicer 클론 1 및 2 (MDA-MB231shDicer 클론1 및 MDA-MB231shDicer 클론2) 세포 내 항-Dicer 항체 (상단 패널)를 이용한 면역 블롯. 베타 액틴 면역 블롯을 로딩 대조로서 사용하였다 (하단 패널). 면역 블롯 정량화는 이미지제이(Image J) 소프트웨어로 수행하였다. (F) Dicer 항체 또는 IgG로 면역침강시킨 MCF10A 및 MDA-MB231 세포로부터 추출한 엑소좀 단백질 내 AGO2 항체를 이용한 면역 블롯 (상단 패널). MDA-MB231 세포로부터 추출한 엑소좀의 용해물을 5% 투입하여 대조로서 사용하였다. Dicer의 면역 블롯을 면역 침강에 대한 대조로서 사용하였다 (하단 패널). (G) Dicer 항체 또는 IgG로 면역침강시킨 MCF10A 및 MDA-MB231 세포로부터 추출한 엑소좀 단백질 내 항-TRBP 항체를 이용한 면역 블롯 (상단 패널). MDA-MB231 세포로부터 추출한 엑소좀의 용해물 투입(5%)을 대조로서 사용하였다. Dicer의 면역 블롯을 면역 침강에 대한 대조로서 사용하였다 (하단 패널). (H) A549 (인간 폐암), SW480 (인간 결장암), HeLa (인간 자궁경부암) 및 4T07 (쥐의 유방암) 세포주 (상단 블롯)로부터의 발암 소포 내 Dicer의 면역 블롯. 엑소좀 및 로딩(하단 블롯)의 존재를 확인하기 위해 TSG101 면역 블롯을 이용하였다.

도 14A-F. 엑소좀 내 Dicer 검출. (A) 4T1, 4T1shScramble 및 4T1shDicer 세포 및 4T1 (4T1 엑소좀) 및 4T1shDicer (4T1shDicer 엑소좀) 세포 (상단 블롯)으로부터 수확한 엑소좀 내 항-Dicer 항체를 이용한 면역 블롯. GADPH 면역 블롯을 로딩 대조로서 사용하였다 (하단 블롯). 정량화는 이미지제이(Image J) 소프트웨어로 수행하였다. (B) 엑소좀을 4T1, 4T1shScramble 및 4T1shDicer 세포로부터 수확하고 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 유지하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 다시 회수하고 15가지 전구-miRNA를 qPCR로 정량하였다. 그래프는 24h 무-세포 배양에 비교하여 72h의 무-세포 배양 후의 서로 다른 엑소좀 내 각각의 전구-miRNA의 배수 변화를 보여준다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. (C) 엑소좀을 4T1, 4T1shScramble 및 4T1shDicer 세포로부터 수확하고 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 유지하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 다시 회수하고 15가지 miRNA를 qPCR로 정량하였다. 그래프는 24h 무-세포 배양에 비교하여 72h의 무-세포 배양 후의 서로 다른 엑소좀 내 각각의 miRNA의 배수 변화를 보여준다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. (D) 엑소좀을 MDA-MB231 세포로부터 이중복으로 수확하였다. 샘플 중 하나를 항-Dicer 항체로 전기천공시켰다. 양 샘플을 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 방치하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 다시 회수하고 15가지 전구-miRNA(표 4를 참조)를 qPCR로 정량하였다. 72h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 각각의 전구-miRNA의 배수 변화를 각 샘플에서 24h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 동일한 전구-miRNA에 비교하여 정량하였다. 그래프 도표는 24h 엑소좀에 비하여 72h 엑소좀 내 전구-miRNA의 배수 변화를 나타내며 그래프의 자세한 분석은 도 5D에 제시된다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. (E) 엑소좀을 MDA-MB231 세포로부터 이중복으로 수확하였다. 샘플 중 하나를 항-Dicer 항체로 전기천공시켰다. 양 샘플을 무-세포 배양 조건 하에 24 및 72h 동안 방치하였다. 24 및 72h 후에 엑소좀을 다시 회수하고 15가지 miRNA(표 4를 참조)를 qPCR로 정량하였다. 72h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 각각의 miRNA의 배수 변화를 각 샘플에서 24h 무-세포 배양 후 엑소좀 내 동일한 miRNA에 비교하여 정량하였다. 그래프 도표는 24h 엑소좀에 비하여 72h 엑소좀 내 miRNA의 배수 변화를 나타내며 그래프의 자세한 분석은 도 5E에 제시된다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. (F) MDA-MB231 엑소좀 (MDA-MB231 엑소좀)와

비교하여 Dicer (MDA-MB231 엑소좀 Dicer AB)로 전기천공시킨 MDA-MB231 엑소좀 내 하향 조절된 miRNA의 카테고리(발암성, 종양 억제성 및 암에 관해 비-결정성)의 그래프 도표. 마이크로RNA는 문헌을 기초로 하여 각각의 카테고리에 배정하였다. 도면에 나타난 데이터는 각각 세 가지 복제물을 이용한, 세 번의 독립된 실험의 결과이며 ± 표준편차로서 표현된다.

도 15A-C. 엑소좀 내 Dicer 검출. (A) 엑소좀을 MCF10, MCF10AshDicer, MDA-MB231 및 MDA-MB231shDicer 세포로부터 수확하고 합성 전구-miRNA-10b, -21 및 -cel-1로 전기천공시켰다. 전기천공시킨 엑소좀 내 각각의 전구-miRNA를 qPCR로 정량하고 전기천공 완충액으로만 전기천공시킨 엑소좀에 비한 배수 변화로서 나타내었다. (B) 전구-miR-21, -10b 및 -cel-1로 내부적으로 표지시킨 비오틴의 점 블롯. (C) 전구-miR-10b, -21 및 -cel-1로 형질주입시킨 MCF10A 세포의 miR-10b, -21 및 -cel-1 발현 분석. 각각의 막대는 미형질주입 세포에 비한 형질주입 세포의 배수 변화를 나타낸다. 도면에 나타난 데이터는 각각 세 가지 복제물을 이용한, 세 번의 독립된 실험의 결과이며 ± 표준편차로서 표현된다.

도 16A-I. Dicer는 다포성 소체로 존재하며 세포질의 CD43가 Dicer를 엑소좀 내로 이동시킨다. (A) 그래프는 이미지제이 소프트웨어를 이용하여 정량한 바와 같이 공초점 사진에서 공존 백분율을 나타낸다. (B) Hrs 및 TSG101에 대한 두 가지 상이한 siRNA 및 BiG2에 대한 두 가지 상이한 sh 클론을 이용한 하향 조절 후 Hrs, TSG101 및 BiG2 mRNA 발현. 미형질주입 세포 및 shScramble 형질주입 세포를 대조로서 사용하였다. (C) MCF10A, MCF10AsiHrs, MDA-MB231 및 MDA-MB231siHrs (왼쪽 그래프), MCF10shScramble, MCF10AshBiG2, MDA-MB231shScramble, MDA-MB231shBiG2 (중간 그래프) 및 MCF10AsiTSG101 및 MDA-MB231siTSG101 (오른쪽 그래프)로부터 추출한 엑소좀의 브래드포드(Bradford) 어세이에 의한 단백질 정량화. 미형질주입 모세포를 배수 변화 분석을 위한 비교 대조로 사용하였다. 데이터는 세포수에 의해 정상화되며 세 개의 생물학적 복제 결과가 표준편차(SD)로서 표현된다. (D) MCF10A, MCF10AsiTSG101 (siTSG101), MCF10AsiHrs (siHrs) 및 MCF10AshBiG2 (shBiG2) 세포의 엑소좀의 단백질 추출물 내 CD9의 면역 블롯 (상단 블롯); MDA-MB231, MDA-MB231siTSG101 (siTSG101), MDA-MB231siHrs (siHrs) 및 MDA-MB231shBiG2 (shBiG2) 세포의 엑소좀의 단백질 추출물 내 CD9의 면역 블롯 (하단 블롯). (E) Hrs, TSG101 및 BiG2 하향 조절된 세포에서의 엑소좀 수의 하향 조절 및 엑소좀의 추정 크기 분포를 나타내는 MDA-MB231, MDA-MB-231siTSG101, -siHrs 및 shBiG2-유래 엑소좀의 나노사이트 입자 추적 분석. (F) MCF10A, MCF10AshScramble, MCF10AsiHrs, MCF10AshBiG2, MCF10AsiTSG101, MDA-MB231, MDA-MB231shScramble, MDA-MB231siHrs, MDA-MB231shBiG2, MDA-MB231siTSG101, 4T1, 4T1siHrs, 4T1shBiG2 및 4T1siTSG101 세포 내 Dicer의 mRNA 발현. 모세포를 배수 변화 비교를 위한 비교 대조로 사용하였다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. (G) 항-Dicer 항체로 면역침강시킨 MDA-MB231 및 4T1 암 세포의 단백질 추출물 (상단 블롯, 왼쪽 두개 열)과 더불어 면역침강을 위해 사용한 단백질 용해물에 해당하는 5% 투입물 (상단 블롯, 오른쪽 두개 열) 내 Dicer의 면역 블롯. 항-Dicer 항체로 면역침강시킨 MDA-MB231 및 4T1 세포의 단백질 추출물 (하단 블롯, 왼쪽 두개 열)과 더불어 면역침강을 위해 사용한 단백질 용해물에 해당하는 5% 투입물 (하단 블롯, 오른쪽 두개 열) 내 다중 유비퀴틴의 면역 블롯. (H) MCF10A, MCF10AsiCD43, MDA-MB231 및 MDA-MB231siCD43 세포 내 CD43의 mRNA 발현. MCF10A 및 MDA-MB231 모세포를 배수 변화 비교를 위한 비교 대조로 사용하였다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다. (I) MCF10A, MCF10AsiCD43, MDA-MB231 및 MDA-MB231siCD43 세포 내 Dicer의 mRNA 발현. MCF10A 및 MDA-MB231 모세포를 배수 변화 비교를 위한 비교 대조로 사용하였다. 데이터는 세 개의 생물학적 복제 결과이며 표준편차(SD)로서 표현된다.

도 17A-G. 발암 소포는 수취 세포에서 Dicer-의존 방식으로 전사체 변형 및 종양 형성을 유발한다. (A) MDA-MB231 CD63-GFP 세포로부터 유래한 엑소좀의 나노사이트 입자 추적 분석. 검은 선은 총 엑소좀 군의 척도를 나타내며 녹색 선은 488nm 레이저 빔이 구비된 나노사이트를 이용하여 CD63-GFP로 표지시킨 엑소좀의 군을 도시한다. 옅은 회색과 옅은 녹색은 각각의 척도의 오차 막대를 나타낸다. (B) 0, 30분, 1h, 12h 및 24h동안 갓 추출한 MDA-MB231 발암 소포로 처리한 MCF10A 세포의 항-PTEN 항체 및 단백질 추출물을 이용한 면역 블롯. 베타 액틴을 로딩 대조로서 사용하였다. (C) 0, 30분, 1h, 12h 및 24h동안 갓 추출한 MDA-MB231 발암 소포로 처리한 MCF10A 세포의 항-HOXD10 항체 및 단백질 추출물을 이용한 면역 블롯. 베타 액틴을 로딩 대조로서 사용하였다. (D) MCF10A 세포를 XPO5에 대한 siRNA로 형질주입시켜 핵으로부터 세포질로 흐르는 전구-miRNA의 흐름을 하향 조절시켰다. Dicer 항체가 있는 및 없는 MDA-MB231 엑소좀으로 처리한 MCF10AsiXPO5 세포 및 MCF10AsiXPO5 세포에서 시간에 걸쳐 (6h, 12h, 24h, 36h 및 48h) miR-15의 수준을 측정하여 전구-miR15의 프로세싱을 평가하였다. 중요한 변화는 관찰되지 않았다. (E) miR182-5p 발현을 시간에 걸쳐 (0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h 및 96h) MDA-MB231 유래 엑소좀에서 관찰하였다. 각각의 막대는 0h에 비한 각 시점의 배수 변화를 나타낸다. 중요한 차이는 관찰되지 않았다. (F) 그래프는 도 7G의 콜로니 수 정량화를 제공한다. * p=0.0006. (G) 무-세포 배

양 조건 후 Dicer 항체로 전기천공시킨 MDA-MB231 발암 소포로 0, 30분, 1, 12h 및 24h동안 처리한 MCF10A 세포의 항-Dicer 항체 및 단백질 추출물을 이용한 면역 블롯. 알파 튜블린을 로딩 대조로서 사용하였다.

도 18A-D. 유방암 환자-엑소좀은 Dicer, 프로세싱 전구-miRNA를 함유하며 상이한 장기 내 세포로 들어간다. (A) 누드 마우스에 갓 이식한 원발성 인간 난소, 자궁내막 및 유방 종양 단편으로부터 유래한 동소위 이종이식편의 대표적인 사진. (B) 난소, 자궁내막 및 유방암 동소위 이종이식편의 헤마톡실린-에오신 (HE) 염색. (C) 동소위 종양 이종이식편을 지닌 마우스로부터 수확한 혈청 엑소좀의 투과 전자 현미경. (D) 도 8A에 도시된 면역 블롯의 막의 쿠마시 염색.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] **예시적인 구체예의 설명**

[0042] 암 진행은 종양 내 세포들 사이의 효과적인 신호전달에 의존적이다. 엑소좀은 모든 세포 유형에서 분비되는 나노-소포이며 단백질 및 핵산을 함유한다. 암 세포에서 분비되는 엑소좀은 특히 RNA 유도성 침묵화 복합체 (RISC; Dicer/TRBP/AGO2)와 연합한 마이크로RNA(miRNA)를 함유하며 전구체 마이크로RNA (전구-miRNA)를 성숙한 miRNA로 프로세싱하는 세포의 독자적인 능력을 갖는다. RISC-연합된 miRNA의 존재는, 노출된 miRNA 대신, 표적 세포 내 mRNA의 고도로 효율적이고 빠른 침묵화를 가능하게 하여, 이들의 전사체를 효과적으로 변형시킨다. 암 세포 내 RISC 단백질은 특이적으로 다포성 소체 (MVB)로 및 나아가 CD43-의존성 방식으로 엑소좀 내로 향한다. 엑소좀의 RISC-포함 miRNA는 발암성 경로의 특정한 유도를 통해 비-종양형성 상피 세포를 자극하여 종양을 형성하며 기질의 섬유아세포를 활성화시킨다. 이러한 연구는 나아가 정상 세포를 지배하여 암 발달 및 진행에 동참하게 하는 발암성 "전계 효과(field effect)"를 일으키는 암 엑소좀의 가능한 역할을 밝힌다. 게다가, miRNA 생합성은 엑소좀에서 세포-독립적 방식으로 일어날 수 있고, 이는 무수한 질환에 대하여 효율적인 miRNA-매개 표적 요법을 고안할 수 있는 새로운 기회를 제공한다.

[0043] **I. 암 유래 엑소좀**

[0044] 종양은 암 세포 및 기질 요소를 함유한다 (Tse 및 Kalluri, 2011). 최근의 증거들은 종양의 세포와 이들의 주변 사이의 신호 전달이 또한 암의 전신 전이의 속도와 강도를 결정함을 시사한다 (Luga *et al.*, 2012). 일부 연구는 원발성 종양이 학습을 할 수 있으며 암세포가 분비한 인자들을 통해 미래에 전이할 이차 종양 부위를 준비함을 시사한다 (Hood *et al.*, 2011; Peinado *et al.*, 2012). 몇몇 그러한 매개체가 규명된 바 있으며, 가용성 성장 인자, 글루코스 대사산물, 케모카인, 효소, 미세입자, 미소포, 엑소좀 및 유리 핵산이 포함된다 (Guermonprez *et al.*, 2002; Luga *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2012; Simons 및 Raposo, 2009; Thery 및 Casas, 2002).

[0045] 최근 수년간 엑소좀과 이들의 암과의 관련성에 관련된 간행물은 정말 많았다 (Yang 및 Robbins, 2011). 대부분의 연구들은 정상 세포와 비교할 때 암 세포가 더 많은 수의 엑소좀을 분비하는 것을 보여준다 (Yang 및 Robbins, 2011). 저산소 암 세포는 정상산소 암 세포에 비해 더 많은 엑소좀을 분비하였다 (King *et al.*, 2012). 암 유래 엑소좀은 miRNA를 비롯하여, 특정한 적재량의 단백질 및 핵산을 지니는 것으로 추측된다 (Valadi *et al.*, 2007). 매우 도발적인 내용이지만, 그러한 연구는 어떻게 단백질과 miRNA가 가깝거나 먼 표적 세포에서 중요한 기능적 변화를 유발시킬 수 있는지 충분히 설명하지 못한다. 대부분의 연구들이 엑소좀에서 성숙한 miRNA를 확인했지만 이들의 기능은 대체로 미지이다. 게다가, 단일-가닥 miRNA는 mRNA 인식을 용이하게 하는 RISC를 포함하지 않는 표적 mRNA를 침묵화하는데 고도로 비효율적이다. RLC의 단백질은 전구-miRNA를 인식하고 이를 22개-뉴클레오티드 RNA 이중가닥으로 프로세싱한다. AGO2가 이어지는 유전자 침묵을 위해 한 가닥을 선택하면 다른 가닥은 대개 분해된다. 전반적인 반응은 자발적으로 일어나며 세 개의 단백질과 포함된 전구-miRNA를 제외한 다른 인자들은 필요로 하지 않는다 (Maniataki 및 Mourelatos, 2005). 그러므로, miRNA가 충분히 기능성을 지니기 위해서는 이의 전구-miRNA의 RLC-포함된 프로세싱과 AGO- 매개 mRNA 인식 및 침묵화가 필요하다.

[0046] 본 명세서에서, 암 세포 (발암 소포) 및 대조 세포 (정상 소포)로부터의 엑소좀의 miRNA 프로파일은 탐침이 되었고 유전자 침묵화 및 표적 세포 전사체의 변형을 일으키는 엑소좀 miRNA의 기능적 능력을 평가하였다. 발암 소포는 특히 Dicer, TRBP 및 AGO2를 전구-miRNA를 miRNA로 프로세싱하는 능력을 가진 기능적 복합체로서 함유한다. 전구-miRNA는 모든 엑소좀에 존재하지만 RLC의 존재로 인해 발암 소포에서만 프로세싱된다. 흥미롭게도 발암 소포 내에 발암성 전구-miRNA/miRNA가 누적되려는 선호가 존재하며 이것은 단지 일반적으로 발암성 miRNA/전구-miRNA가 농축되어 있는 암 세포의 전구-miRNA 함량을 투영한 것일 수 있다 (Bartels 및 Tsongalis, 2009; Nicoloso *et al.*, 2009).

[0047] 이전의 보고서들은 엑소좀 내 miRNA의 존재를 시사했으며 이들의 기능을 추측하였다 (Valadi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). mRNA 표적의 적절한 침묵화를 위해 miRNA가 화학량론적 농도로 존재해야 한다는 것을 생각한다면, 순환계 내 엑소좀이 표적 전사체를 억제하기 위해 충분한 농도의 성숙 miRNA를 제공했을 것 같지 않다. 수용 세포 내 엑소좀으로부터 유래한 전구-miRNA의 프로세싱은 불가능한데 왜냐하면 수용 세포 내 miRNA 생합성은 세포 내에 이미 존재하는 프로세싱을 위해 이용가능한 전구-miRNA의 총량뿐만 아니라 필요한 효소의 속도-제한적인 양 때문에 속도-제한적이기 때문이다. 그러므로, 각각의 성숙 miRNA가 아닌 전구-miRNA가 수용 세포로 전달되는 경우에 발생하는 것처럼, 프로세싱 경로를 통과하는 대신 수용 세포에 성숙 miRNA를 들어가게 하여 전사-후에 유전자 발현을 직접 변화시키는 것이 더 효율적이다. 엑소좀 내 특정한 miRNA 생합성은 암 세포에 대한 이런 난제를 해결해준다. 발암 소포에는 RISC-연합된 성숙 miRNA의 부분집합들이 고도로 농축되며 표적 세포의 표현형을 만들어 내는 데 중요한 생물학적 역할을 수행할 수 있다.

[0048] 게다가, 암 세포는 발암 능력을 지닌 miRNA, 가령 miR-21 및 miR-155를 과발현하는데, 이들은 세포에게 증식 및 생존 이점을 제공하며 임상 단계의 발전, 전이 및 불량한 예후로 이어진다 (Yan *et al.*, 2008). 또한 이들 miRNA가 암 환자의 순환계에서 과발현된다는 것이 이미 보고된 바 있다 (Mao *et al.*, 2013). 세포 내 miRNA의 합성은 효소적 반응이며 그러므로 세포질에 존재하는 핵심 효소, 가령 Dicer의 양에 의존적이다. Dicer는 유방암 세포와 종양에서 하향 조절되는 것으로 서술되어 왔다 (Grelier *et al.*, 2009; Martello *et al.*, 2010). 그러므로, 이들 암 세포가 합성할 수 있는 miRNA의 양은 제한적이다. 엑소좀 생산은 연속적인 과정이므로, 암 세포가 RLC 단백질을 가진 특정한 전구-miRNA 를 축적하여 엑소좀 내 성숙 miRNA의 농축을 가능하게 하는 동시에, 이들 miRNA를 원래 세포에서 상향-조절되도록 유지시킨다고 가정된다. 발암 소포에는 RISC-연합된 성숙 miRNA이 고도로 농축되며 표적 세포의 표현형을 만들어 내는 데 중요한 생물학적 역할을 수행할 수 있다. 그와 동시에, 원래 세포는 유리한 발암성 miRNA의 과다발현을 유지하는 반면 수용 세포는 엑소좀을 통한 전구-miRNA의 유입으로 과포화된 생합성 경로를 인지하지 못한다.

[0049] 본 연구는 암 엑소좀이 miRNA의 부분집합으로 농축되는 RISC-의존성 메커니즘을 밝힌다. 암 세포 내 Dicer를 겨냥한 siRNA/shRNA를 이용하는 방법은 엑소좀 내 miRNA 함량을 검출하기에 실현가능한 방안이 아니었는데, 엑소좀 miRNA의 어떠한 감소도 단지 Dicer 억제로 인한 miRNA의 낮은 수준을 투영할 뿐이기 때문이다. 그러므로, 전기천공 방법을 개발하여 중화하는 항체를 직접 엑소좀으로 전달하였다. 이러한 방법은 엑소좀 내 Dicer 활성을 저해하고 전구-miRNA의 프로세싱을 차단하는데 효율적으로 작용했다.

[0050] 특정 miRNA가 특정한 종양에서 상향 조절되는 반면 (Volinia *et al.*, 2006), miRNA의 일반적인 감소가 또한 인간 암에서 일어나는 것으로 보고되어 있다 (Kumar *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2009; Ozen *et al.*, 2008). Dicer는 암 세포에서 억제되는 것으로 보고되지만 낮은 수준으로도 종양 성장을 유지하는데는 충분하다 (Kumar *et al.*, 2009). miR-103/107를 통한 부분적인 Dicer 하향 조절은 세포 증식에 영향을 주지 않고도 암 세포의 침습성을 향상시킨다 (Martello *et al.*, 2010). Dicer의 완전한 손실은 세포 생존에 좋지 않다 (Fukagawa *et al.*, 2004). 한편 낮은 수준의 Dicer는 폐암 및 난소암 환자의 낮은 생존율과 연관된다 (Karube *et al.*, 2005; Merritt *et al.*, 2008). 유사하게, Dicer의 이형접합 손실은 유방암 환자에서 전이와 상관관계가 있다 (Martello *et al.*, 2010). 유방암에서 Dicer의 하향 조절이 또한 전사-후에 일어나는데 mRNA 수준이 변하지 않고 남아있기 때문이다 (Grelier *et al.*, 2009; Wiesen 및 Tomasi, 2009). 암 세포에서, 일부 Dicer는 CD43-의존성 방식으로 엔도좀/MVB을 표적으로 한다. 궁극적으로 Dicer는 엑소좀을 통해 분비된다. 엑소좀의 생합성 경로의 성분들인 Hrs, BiG2 및 TSG101의 하향 조절은 Dicer 단백질의 세포 정착에 극적인 변화를 가져온다. 암 세포 내 억제된 Dicer 수준에 대해 가능한 한 가지 설명은 엑소좀을 통한 능동 수송 때문일 것이다. 만약 엑소좀 분비 경로가 차단되면, 암 세포는 Dicer 단백질의 증가를 감지하고 이들의 mRNA 발현을 하향 조절한다. 또한, 이들은 단백질이 성숙 miRNA의 생산에 더 이상 도움이 되지 않으면 단백질을 핵 내부로 이동시킨다. 따라서, 공격적인 암 세포에서 Dicer 상향-조절은 암을 더 느리게 진행하게 만든다 (Park *et al.*, 2011).

[0051] CD43은 백혈구에 매우 많이 존재하는 막관통 단백질이다. 일부 암 세포에서, 말단이 잘린 CD43이 세포질과 핵에서 관찰된다 (Shelley at al. 2012). CD43이 특정한 막 단백질을 엑소좀에 표적화할 수 있음이 이미 밝혀진 바 있다 (Shen *et al.*, 2011a). 마우스 모델의 동소위 유방암에서 CD43의 억제는 종양 총량을 76%까지 감소시켰다 (Shelley *et al.*, 2012). 임상 연구는 CD43 발현이 유방암 환자의 낮은 생존율과 상관관계가 있음을 시사한다 (de Laurentiis *et al.*, 2011). 상기 보고서는 CD43이 Dicer를 발암 소포로 가게 하는 과정에 기능적으로 관여함을 밝히고 있다.

[0052] 최근의 연구는 흑색종-유래 엑소좀이 전이에서 역할을 담당하며 섬유아세포에서 유래한 엑소좀이 유방암 세포의

이동에서 역할을 담당함을 밝히고 있다 (Luga *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2012). 암 세포에서 유래한 엑소좀은 mRNA 및 혈관형성-촉진 단백질의 전달과 관련된 종양-촉진 역할을 한다 (Luga *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2012; Skog *et al.*, 2008). 암 세포에서 유래한 엑소좀은 또한 EGFRvIII와 같은 발암유전자의 수평적 전달에 기여할 수 있다 (Skog *et al.*, 2008). 발암 소포는 RISC-연합된 miRNA를 통해 표적 세포에서 중요한 전사체 변화를 매개한다. 무수한 생물학적 과정들이 표적 세포에 영향을 주어, 증식을 유도하며 비-종양형성 세포를 종양-형성 세포로 전환시킨다. 그렇지만, 수용 세포에 발암 소포가 끼치는 잠재적인 생체내 영향은 몇몇 다른 환경적인 변수 및 접근성 장벽에 의존하는 것 같다.

[0053] 발암 소포는 또한 기질의 섬유아세포를 활성화시켜 근섬유아세포 표현형을 습득하게 한다. 한 예로서, 각각 발암 소포 유래 miR-21 및 miR-10b를 통해 종양 억제제 PTEN 및 HOXD10를 침묵시키는 발암 소포의 능력이 설명된 바 있다 (Ma *et al.*, 2007; Maehama, 2007). 이들 결과는 암 세포가 악성이 되기 위해 취하는 신호 전달의 복잡한 성질을 부각시킨다. 이들 데이터는 암 세포가 엑소좀을 이용하여 암 진행을 가속화하고 반응성 기질을 보충하기 위해 주변의 정상 세포를 조종할 수 있음을 나타낸다.

[0054] 많은 연구는 섬유아세포 및 정상 상피 세포, 또한 종양 억제제의 하향 조절 및 명백한 돌연변이가 없는 발암유전자의 활성화를 나타냄을 보여준다. 종합적으로, 이러한 연구는 나아가 주변의 정상 세포를 지배하여 암 발달 및 진행에 동참하게 하는 발암성 "전계 효과"를 일으키는 암 엑소좀의 가능한 역할을 밝힌다. 발암 소포는 발암 경로의 활성화를 통해 비-종양형성 세포를 종양 형성 세포로 전환시킬 수 있다. 추가적으로, 발암 소포는 또한 반응성 기질을 생성하는데 관여할 수 있다. 이것은 정해진 유전적 돌연변이를 요하지 않고도 얻어질 수 있으며 어떻게 돌연변이를 일으킨 암 세포가 주변의 미시- 및 거시-환경으로부터 지원을 받으려는 계획을 확장하는지에 관한 복잡한 성질을 설명해준다.

[0055] **II. 생체마커 검출**

[0056] 생체마커 또는 유전자의 발현은 당해 분야에 널리 공지된 다양한 기술에 의해 측정될 수 있다. 생체마커의 전령 RNA (mRNA)의 수준을 정량하는 방법을 사용하여 생체마커의 발현을 측정할 수 있다. 대안적으로, 생체마커의 단백질 산물의 수준을 정량하는 방법을 사용하여 생체마커의 발현을 측정할 수 있다. 하기에서 논의하는 방법에 관한 추가적인 정보는 Ausubel *et al.* (2003) 또는 Sambrook *et al.* (1989)에서 찾을 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 관심의 mRNA 또는 단백질의 검출을 최적화하기 위해 변수를 조작할 수 있음을 알 것이다.

[0057] 일부 구체예에서, 상기 발현 정보를 얻는 방법은 RNA 정량화, 예컨대 cDNA 마이크로어레이, 정량적 RT-PCR, 인시추(*in situ*) 혼성화, 노던 블로팅(Northern blotting) 또는 핵산분해효소 보호를 포함할 수 있다. 상기 발현 정보를 얻는 방법은 단백질 정량화를 포함할 수 있고, 예컨대, 단백질 정량화는 면역조직화학, ELISA, 방사면역측정법 (RIA), 면역방사계수측정법, 형광면역측정법, 화학발광 어세이, 생물발광 어세이, 겔 전기영동, 웨스턴 블롯 분석, 질량 분석법 분석, 또는 단백질 마이크로어레이를 포함한다.

[0058] 복수의 생체마커의 차등한 발현을 정량하기 위해 핵산 마이크로어레이가 사용될 수 있다. 마이크로어레이 분석은 시판되는 장비, 가령 Affymetrix GeneChip® 테크놀러지사 (Santa Clara, CA) 또는 Incyte사 (Fremont, CA)의 Microarray System를 이용하여, 제조사의 프로토콜에 따라 수행할 수 있다. 예를 들면, 단일-가닥 핵산 (예컨대, cDNA 또는 올리고뉴클레오티드)을 마이크로칩 기판 위에 도말하거나 배열할 수 있다. 배열된 서열은 이후 관심의 세포로부터의 특정한 핵산 탐침과 혼성화된다. 관심의 세포로부터 추출한 RNA의 역전사에 의해 형광 표지된 데옥시뉴클레오티드를 포함시켜 형광 표지된 cDNA 탐침을 생성할 수 있다. 대안적으로, RNA는 *시험관내* 전사로 증폭되고 마커, 가령 비오틴으로 표지될 수 있다. 표지된 탐침은 이후 매우 엄격한 조건 하에서 마이크로칩 위에 고정된 핵산과 혼성화된다. 비-특이적으로 결합된 탐침을 제거하기 위해 강하게 세척한 후에, 칩을 공초점 레이저 현미경 또는 또다른 검출 방법, 가령 CCD 카메라로 스캔한다. 혼성화 파일 내 무보정 형광 강도 데이터는 일반적으로 확정 멀티칩 평균 (RMA, robust multichip average) 알고리즘으로 전처리되어 발현 값을 생성시킨다.

[0059] 복수의 생체마커의 차등한 발현을 측정하기 위해 정량적 실-시간 PCR (qRT-PCR)이 또한 사용될 수 있다. qRT-PCR에서, RNA 주형은 일반적으로 cDNA로 역전사되고, 이는 이후 PCR 반응을 통해 증폭된다. PCR 산물의 양은 실시간으로 주기당(cycle-by-cycle)으로 추적되며, 이는 mRNA의 초기 농도 규명을 가능하게 한다. PCR 산물의 양을 측정하기 위해, 이중-가닥 DNA에 결합하는 SYBR Green과 같은 형광 염료의 존재에서 반응이 수행될 수 있다. 반응은 또한 증폭되는 DNA에 대해 특이적인 형광 리포터 탐침과 함께 수행될 수 있다.

[0060] 형광 리포터 탐침의 비-제한적인 예시는 TaqMan® 탐침 (Applied Biosystems, Foster City, CA)이다. 형광 리

포터 탐침은 PCR 신장 주기 도중 소광제가 제거되면 발광한다. 다중 qRT-PCR은 각각 상이한 형광단을 내포하는 다중 유전자-특이적 리포터 탐침을 이용하여 수행될 수 있다. 형광 수치는 각 주기 동안 기록되며 증폭 반응 중 그 지점까지 증폭된 산물의 양을 표시한다. 오류를 최소화하고 샘플 간의 어떠한 오차도 줄이기 위해, qRT-PCR은 기준 표준을 이용하여 수행될 수 있다. 이상적인 기준 표준은 상이한 조직 간에 불변의 수준으로 표현되며, 실험 처리에 영향받지 않는다. 적절한 기준 표준은 하우스키핑 유전자 글리세르알데히드-3-포스페이트-탈수소화효소 (GAPDH) 및 β-액틴에 대한 mRNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 원래의 샘플 내 mRNA 수준 또는 각각의 생체마커의 발현의 배수 변화는 당해 분야에 널리 공지된 계산법을 이용하여 결정될 수 있다.

[0061] 복수의 생체마커의 차등한 발현을 측정하기 위해 면역조직화학적 염색이 또한 사용될 수 있다. 이러한 방법은 특이적인 항체와 단백질의 상호작용에 의해 조직 절편 내 세포에서 단백질의 위치 확인을 가능하게 한다. 이를 위해, 조직은 포름알데히드 또는 또다른 적절한 고정액 내에 고정되고, 왁스 또는 수지 내에 매립되고, 조직절편기(microtome)를 이용하여 얇은 절편(약 0.1 ㎜ 내지 수 ㎜ 두께)으로 절삭될 수 있다. 대안적으로, 조직은 동결되고 동결조직절편기(cryostat)을 이용하여 얇은 절편으로 절삭될 수 있다. 조직의 절편은 고체 표면에 배열되고 고정될 수 있다 (즉, 조직 마이크로어레이). 조직의 절편은 관심의 항원에 대한 일차 항체와 함께 배양된 이후 미결합 항체를 제거하기 위해 세척된다. 일차 항체는 검출 시스템과 연결될 수 있거나, 또는 일차 항체는 검출 시스템에 연결된 이차 항체로 검출될 수 있다. 검출 시스템은 형광단일 수 있거나 또는 비색, 형광, 또는 화학발광 산물로 기질을 전환시킬 수 있는 효소, 가령 홀스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase) 또는 알칼리성 포스파타제일 수 있다. 염색된 조직 절편은 일반적으로 현미경 하에서 스캔된다. 암을 가진 개체로부터의 조직 샘플은 이종일 수 있으므로, 즉, 일부 세포가 정상이고 다른 세포는 암일 수 있으므로, 조직 내 양성으로 염색된 세포의 백분율이 측정될 수 있다. 이러한 측정은, 염색 강도의 정량화와 더불어, 생체마커에 대한 발현값을 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0062] 복수의 생체마커의 차등한 발현을 측정하기 위해 효소-연결 면역흡수 측정법 또는 ELISA가 사용될 수 있다. ELISA 어세이에는 많은 변형이 존재한다. 모두 고체 표면, 일반적으로 미세적정 플레이트 위에 항원 또는 항체를 부동화시키는 것을 기본으로 한다. 원래의 ELISA 방법은 관심의 생체마커 단백질을 함유하는 샘플을 제작하는 단계, 샘플을 담은 미세적정 플레이트의 웰(well)을 코팅하는 단계, 각각의 웰을 특정 항원을 인식하는 일차 항체로 배양하는 단계, 미결합 항체를 세척해내는 단계, 및 이후 항체-항원 복합체를 검출하는 단계를 포함한다. 항체-항체 복합체를 직접 검출할 수 있다. 이를 위해, 일차 항체는 검출 시스템, 가령 검출가능한 산물을 생산하는 효소에 공액결합된다. 항체-항체 복합체를 간접적으로 검출할 수 있다. 이를 위해, 일차 항체는 상기 기술된 바와 같은 검출 시스템에 공액결합된 이차 항체에 의해 검출된다. 미세적정 플레이트는 이후 스캔되고 무보정 강도 데이터는 당해 분야에 공지된 수단을 이용하여 발현값으로 전환될 수 있다.

[0063] 복수의 생체마커의 차등한 발현을 측정하기 위해 항체 마이크로어레이가 또한 사용될 수 있다. 이를 위해, 복수의 항체를 배열하고 마이크로어레이 또는 바이오칩의 표면에 공유적으로 부착시킨다. 관심의 생체마커 단백질을 함유하는 단백질 추출물은 일반적으로 형광 염료 또는 비오틴으로 표지한다. 표지한 생체마커 단백질을 항체 마이크로어레이와 함께 배양한다. 세척으로 미결합 단백질을 제거한 후에, 마이크로어레이를 스캔한다. 무보정 형광 강도 데이터를 당해 분야에 공지된 수단을 이용하여 발현값으로 전환할 수 있다.

[0064] 복수의 생체마커의 차등한 발현을 측정하기 위해 Luminex 다중화 미소구체가 또한 사용될 수 있다. 이들 현미경 폴리스티렌 비드는 내부적으로 형광 염료로 색-암호화되어, 각각의 비드가 고유한 스펙트럼 신호를 가진다 (최대 100가지 존재한다). 동일한 신호를 가진 비드는 관심의 표적에 결합하게 될 특정한 올리고뉴클레오티드 또는 특정한 항체로 태그된다(즉, 각각 생체마커 mRNA 또는 단백질). 상기 표적은, 다시, 형광 리포터로도 태그된다. 따라서, 비드로부터 하나 및 표적 상의 리포터 분자로부터 하나씩, 두 가지 색 원천이 존재한다. 비드는 이후 표적을 함유하는 샘플과 함께 배양되며, 그 중 최대 100개가 한 웰에서 검출될 수 있다. 표적에 대한 비드의 작은 크기/표면적 및 비드의 삼차원적 노출은 결합 반응 동안 거의 용액-상 동역학을 가능하게 한다. 포획된 표적은 유세포 분석을 기반으로 하는 첨단 유체공학으로 검출되며 여기서 레이저는 각각의 비드 및 또한 어세이 동안 포획된 임의의 리포터 염료를 확인해주는 내부 염료를 여기(excite)시킨다. 습득한 파일로부터의 데이터를 당해 분야에 공지된 수단을 이용하여 발현값으로 전환할 수 있다.

[0065] 복수의 생체마커의 차등한 발현을 측정하기 위해 인시추 혼성화가 또한 사용될 수 있다. 이러한 방법은 조직 절편의 세포에서 관심의 mRNA의 위치 확인을 가능하게 한다. 상기 방법을 위해, 조직을 동결시키거나, 또는 고정 및 매립할 수 있고, 이후 얇은 절편으로 절삭하여 고체 표면 위에 배열하고 고정한다. 조직 절편을 관심의 mRNA와 혼성화를 이루게 될 표지한 안티센스 탐침과 함께 배양한다. 혼성화 및 세척 단계는 일반적으로 고도로 엄격한 조건 하에 수행된다. 탐침은 또다른 단백질 또는 항체로 검출할 수 있어서 표지된 혼성체가 현미경으로 검출

되고 가시화될 수 있는, 형광단 또는 소형 태그 (가령 비오틴 또는 디곡시제닌)로 표지될 수 있다. 각각의 안티센스 탐침이 구별가능한 표지를 가지고 있다면 다중 mRNA는 동시에 검출될 수 있다. 혼성화된 조직 어레이는 일반적으로 현미경 하에서 스캔된다. 암을 가진 개체로부터의 조직 샘플은 이종일 수 있으므로, 즉, 일부 세포가 정상이고 다른 세포는 암일 수 있으므로, 조직 내 양성으로 염색된 세포의 백분율이 측정될 수 있다. 이러한 측정은, 염색 강도의 정량화와 더불어, 각 생체마커에 대한 발현값을 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0066] 추가의 구체예에서, 마커 수준을 대조군의 마커 수준과 비교할 수 있고, 여기서 대조군은 특정 전이성 종양을 가지거나 특정 전이성 종양을 가지지 않거나, 또는 둘다로 결정된 한 명 이상의 환자에서 취한 하나 이상의 종양 샘플을 포함할 수 있다.

[0067] 대조군은 환자의 개별적인 데이터와 동일한 시간(*예컨대*, 동일한 혼성화 실험 내)에 수득한 데이터를 포함할 수 있거나, 또는 저장된 수치 또는 수치들의 집합 *예컨대*, 컴퓨터, 또는 컴퓨터-판독가능한 매체에 저장된 수치일 수 있다. 후자가 사용될 경우, 초기 또는 후속 샘플에서 수득한, 선택된 마커(들)에 대한 새로운 환자 데이터를 추가로 대조군 실험을 할 필요없이 동일한 마커(들)에 대한 저장된 데이터와 비교할 수 있다.

[0068] **III. 정의**

[0069] 본 명세서에서 사용된, "생물학적 샘플을 수득하는 단계" 또는 "혈액 샘플을 수득하는 단계"는 생물학적 또는 혈액 샘플을, *예컨대*, 직접 또는 간접적으로 얻는 것을 가리킨다. 예를 들면, 일부 구체예에서, 생물학적 샘플, 가령 혈액 샘플 또는 말초혈 단핵세포 (PBMC)를 함유하는 샘플은 실험실 또는 실험실 부근 또는 생물학적 샘플이 분석될 장소에서 개체로부터 직접 얻는다. 다른 구체예에서, 생물학적 샘플은 제삼자에게서 받거나 취해진 후에 *예컨대*, 별개의 독립체 또는 장소로 분석을 위해 전달될 수 있다. 다른 구체예에서, 샘플은 수득되어 현장-현시(point-of care) 검사를 이용하여 동일한 장소에서 검사될 수 있다. 이들 구체예에서, 상기 수득하는 단계는 샘플을 얻는 단계, 예컨대, 환자로부터, 실험실로부터, 의사의 진료실로부터, 메일, 소포, 또는 우체국, 등으로부터 받는 것을 가리킨다. 일부 추가의 양태에서, 방법은 개체, 건강보험료 납부자, 주치의, 약사, 약제비 심사평가 전문평가기관, 또는 측정결과에 관심을 가질 수 있는 모든 사람에게 측정결과를 보고하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.

[0070] "개체" 또는 "환자"는 치료 또는 진단 검사가 필요한 한 명의 개인을 의미한다. 이러한 경우 개체 또는 환자는 일반적으로 인간을 지칭한다. 또한 개체로 포함되도록 의도된 것은 어떠한 질병의 임상 징후를 나타내지 않지만 임상적 연구 실험에 참여한 임의의 개체, 또는 역학 연구에 참여한 개체, 또는 대조군으로서 사용된 개체가 있다.

[0071] 본 명세서에서 사용된, "증가된 발현"은 적절한 대조 (*예컨대*, 비-암 조직 또는 세포 샘플, 기준 표준)에 비해 암 샘플에서 발현이 상승된 또는 증가된 수준을 가리키며, 여기서 유전자 발현 수준의 상승 또는 증가는 통계학적으로 유의하다($p < 0.05$). 대조에 비해 암 샘플 내 유전자 발현의 증가가 통계학적으로 유의한지 여부는 적절한 t-시험 (*예컨대*, 단일-샘플 t-시험, 두-샘플 t-시험, Welch의 t-시험) 또는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 다른 통계적인 시험을 이용하여 결정할 수 있다. 암에서 과발현되는 유전자는 예를 들면, 암에서 과발현되는 것으로 공지되어 있거나, 또는 이미 확인된 바 있는 유전자일 수 있다.

[0072] 본 명세서에서 사용된, "감소된 발현"은 적절한 대조 (*예컨대*, 비-암 조직 또는 세포 샘플, 기준 표준)에 비해 암 샘플에서 발현이 하락 또는 감소한 수준을 가리키며, 여기서 유전자 발현 수준의 하락 또는 감소는 통계학적으로 유의하다($p < 0.05$). 일부 구체예에서, 유전자 발현의 하락 또는 감소된 수준은 유전자 발현이 전혀 없거나, 또는 제로인 발현 수준일 수 있다. 대조에 비해 암 샘플 내 유전자 발현의 감소가 통계학적으로 유의한지 여부는 적절한 t-시험 (*예컨대*, 단일-샘플 t-시험, 두-샘플 t-시험, Welch의 t-시험) 또는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 다른 통계적인 시험을 이용하여 결정할 수 있다. 암에서 저발현되는 유전자는 예를 들면, 암에서 저발현되는 것으로 공지되어 있거나, 또는 이미 확인된 바 있는 유전자일 수 있다.

[0073] 용어 "항원 결합 단편"은 본 명세서에서 광범위한 의미로 사용되며 특히 적어도 두 가지 온전한 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 온전한 단클론 항체, 다클론 항체, 다중특이적 항체 (*예컨대*, 이중특이적 항체)를 포괄한다.

[0074] 본 명세서에서 사용된 용어 "프라이머"는 주형-의존적 과정에서 유리된 핵산의 합성을 예비할 수 있는 임의의 핵산을 아우르도록 의도된다. 프라이머는 열 개 내지 스무 개 및/또는 삼십 개 염기쌍의 길이의 올리고뉴클레오티드일 수 있으나, 더 긴 서열이 사용될 수도 있다. 프라이머는 비록 단일-가닥 형태가 바람직하지만, 이중-가닥 및/또는 단일-가닥 형태로 제공될 수 있다.

[0075] **IV. 실시예**

[0076] 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 구체예를 보여주기 위해 포함되었다. 당해 분야의 숙련가는 하기의 실시예에 개시된 기술이 본 발명의 실시에서 본 발명자에 의해 잘 기능하는 것으로 확인된 기술을 나타내며, 따라서 본 발명의 실시의 바람직한 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 이해해야 할 것이다. 그러나, 당해 분야의 숙련가는, 본 개시에 비추어, 개시된 특정 구체예에서 많은 변화가 이루어질 수 있으며 본 발명의 정신과 범위에서 벗어나지 않으면서도 유사하거나 비슷한 결과를 얻음을 이해해야 할 것이다.

[0077] **실시예 1 - 실험 절차**

[0078] *엑소좀 단리 및 정제*. 엑소좀을 앞서 기술한 것과 같이 분별 원심분리로 정제하였다 (Thery *et al.*, 2006; Luga *et al.*, 2012). 요약하면, 24 시간 동안 배양한 세포로부터의 상청액을 800g 및 2000g의 연속적 원심분리 단계를 거치게 하고 상청액을 0.2 μm 필터를 이용하여 배양 병에 여과해 내었다. 엑소좀을 SW40Ti 스윙 버킷 회전자(Beckman)에서 2 시간 동안 100,000g로 분리하여 펠렛을 얻었다. 상청액을 버리고 PBS를 추가하여 1 시간-세척 단계를 거쳤다. 펠렛은 엑소좀인 것으로 분석되었다. RNA 추출을 위한 엑소좀을 500ul의 Trizol에 재현탁시키고; 단백질 추출을 위한 엑소좀을 250ul의 용해 완충액 (8M 우레아/2,5%SDS, 5 μg/ml 류펩틴, 1 μg/ml 펩스타틴 및 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드)에 재현탁시키고; 처리를 위한 엑소좀을 PBS에 재현탁시켰다. 동결시킨 혈청 샘플을 얼음에서 해동시키고 500 μl를 12 mL PBS에 부가하고 앞서 언급한 동일한 절차를 따랐다. 원심분리로 정제한 엑소좀을 무-RNase 물에 용해된 500 g/mL 프로테이나제 K (Sigma-Aldrich)로 처리하고 (37℃, 60 분), 이후 프로테아제를 가열 비활성화하고(60℃, 10 분) 2g/mL의 무-프로테아제 RNaseA (Sigma-Aldrich)로 배양하고 (37℃, 15 분) 그 후에 10X 농축된 RNase 저해제 (Ambion)를 부가하였다. 엑소좀 처리를 위해, 엑소좀을 이중복으로 정제하고 한 펠렛을 단백질 정량화를 위해 사용하였다.

[0079] *엑소좀의 유세포 분석*. 엑소좀 표본 (5-10 μg)을 5 μl의 4-μm-직경 알데히드/설페이트 라텍스 비드 (Interfacial Dynamics, Portland, OR)와 함께 배양하고 2% BSA를 함유하는 400 μl PBS 내에 재현탁시켰다. 엑소좀-코팅된 비드 (20 μl)를 다음의 항체와 함께 배양하였다: 항-CD63 (Santa Cruz), 항-CD9 (abcam), 항-TSG101 (abcam), 항-플로틸린-1 (Santa Cruz)과 함께 30 분간 4℃에서, 이후 필요한 경우, FITC-공액결합된 이차 항체와 함께 배양하고 FACS Calibur 유세포 분석기(BD Biosciences)로 분석하였다.

[0080] *엑소좀 전기천공*. 100 μg의 총 단백질 농도의 엑소좀 (Bradford Assay로 측정됨) 및 5 μg의 Dicer 항체 (다클론 SC-30226, Santa Cruz, CA), 5 ug의 액틴 항체, 또는 10 μg의 전구-miRNA-21, -10b 및 -cell을 400 μl의 전기천공 완충액 (1.15 mM 칼륨 포스페이트 pH 7.2, 25 mM 칼륨 클로라이드, 21% Optiprep)에 혼합하고 앞서 기술한 바와 같이 Gene Pulser Xcell Electorporation System (Biorad)를 이용하여 4 mm 큐벳에서 전기천공시켰다 (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011). 전기천공 후에, 엑소좀을 프로테이나제 K 및/또는 바람직한 경우 RNA로 처리하였다.

[0081] *광산란 분광법 (LSS)*. 도 10B에 기술된 실험 시스템을 이용하여 LSS 스펙트럼을 수집하였다. Fianium SC-450-2 광대역 초연속 레이저를 백색광의 공급원으로 사용하였다. 초연속 레이저로부터의 빛을 장초점 렌즈를 이용하여 샘플에 집중시켰다. 엑소좀 또는 미소구체 중 어느 하나의 액체 현탁액으로 구성된 샘플을 특수제작한 입방체-형태의 석영 샘플 고정장치에 위치시켰다. 바탕 신호를 엑소좀 또는 미소구체가 없는 용매 샘플로부터 수집하였다. 입사 빔으로 90° 에서 엑소좀 또는 미소구체에 의해 산란된 빛을 다른 장초점 렌즈로 수집하고 고효율 Andor Technology iXon DV885 EMCCD 검출기가 연결된 Princiton Instrument Acton 2300i 영상화 분광기로 송출하였다. 검출은 470-870-nm 파장 범위에서 수행하였다. 검출기를 컴퓨터로 제어했고, 상기 컴퓨터를 이용하여 데이터를 받고, 저장하고, 및 처리하였다.

[0082] 시스템을 보정하고 파장보다 더 작을 수 있는 입자의 크기를 정확하게 측정할 수 있도록 설정하기 위해, 24 nm 및 100 nm의 명목 직경을 가진 유리 미소구체와 119 nm, 175 nm, 356 nm 및 457 nm의 명목 직경을 가진 폴리스티렌 미소구체의 인산 완충 식염수 (PBS) 분산액으로부터의 신호를 이용하여 완료하였다. Mie 이론으로 예측되는 스펙트럼을 이미 개발된 최소-자승 최소화 방법을 이용하여 데이터에 대입하였다 (Fang *et al.*, 2003). 100 nm의 명목 직경을 가진 유리 미소구체 및 356 nm의 명목 직경을 가진 폴리스티렌 미소구체에 대한 실험 스펙트럼 및 정합 결과는 도 1E에 나타난다. 여기서 파장의 4승으로 곱해진 레일리(Rayleigh) 산란으로부터의 편차는 LSS 스펙트럼의 비-레일리 거동을 강조하기 위해 나타난다. 미소구체에 대해 LSS 수득된 크기 분포를 제조사 제공 규격과 비교함으로써, LSS 방법의 정확도는 10 nm인 것으로 추정된다고 결론지어진다. 재구성된 크기 분포가 미소구체의 굴절성 지수 및 용매에 영향받지 않음이 또한 확실하였다. 여기서 소형 입자의 광산란은 크기의 6배에 비례하기 때문에, 더 큰 입자의 존재에서 50 nm보다 작은 입자의 검출은 실험 시스템의 신호-대-노이즈의 실

질적인 증가를 필요로 함을 지적해야 한다.

[0083] 엑소좀의 PBS 현탁액을 이용한 LSS 실험을 이후 수행하였다. 엑소좀의 실험상의 LSS 스펙트럼 및 상응하는 Mie 정합이 도 1B에 나타난다. 재구성한 스펙트럼의 정합도는 우수하다. 상기 언급된 재구성 기술 (Fang *et al.* 2003; Itzkan *et al.* 2007; Fang *et al.* 2007)을 이용하여 104 nm에서 피크를 기록한 엑소좀의 크기 분포를 찾았다 (도 1R 오른쪽 그래프 및 삽도를 참조). 이렇게 도출된 크기 분포를 유사한 엑소좀 샘플의 TEM 사진(도 1A)에서 수행한 형태측정 수치와 비교하였다. TEM 사진의 입자의 수가 통계적으로 유의한 분포를 도시할 만큼 충분하지 않기 때문에, 50 nm보다 큰 입자의 중간 크기를 TEM 사진으로부터 산출하였고 95 nm와 같음을 발견하였다. 따라서, 엑소좀의 TEM 사진에 수행된 LSS 재구성된 크기 분포 및 형태측정 측정치는 모든 데이터와 일치했다.

[0084] *N-Rh-PE 처리*. 세포를 매우-차가운 1X Hanks 완충액 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 희석시킨 8 μM N-Rh-PE (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)에 얼음 상에서 1 시간 배양시킴으로써 N-Rh-PE로 표지하였다. 세포를 이후 매우-차가운 Hanks 완충액으로 3 차례 세척한 후에 DMEM 배지에 다시 도말하였다. 표지 후 약 24 시간 후에 N-Rh-PE 세포를 공초점 영상화에 사용하였다.

[0085] *면역금 표지법 및 전자 현미경*. 최적 농도로 고정된 시편을 300 메쉬(mesh) 탄소/포름바르 코팅된 격자 위에 점적하고 최소 1분 동안 포름바르에 흡수되게 하였다. 면역금 염색을 위해 격자를 차단/투과화 단계를 위한 차단 완충액에 1 시간 동안 담가두었다. 씻어내지 않고, 격자를 즉시 4℃에서 밤새 적절히 희석된 일차 항체로 옮겼다 (다클론 항-Dicer 1:10 SC-30226, Santa Cruz; 단클론 항-CD9 1:10, Abcam). 대조로서, 일부 격자는 일차 항체에 노출시키지 않았다. 다음 날 모든 격자를 PBS로 헹궈내고 이후 10nm 금 입자가 부착된 적절한 이차 항체 (AURION, Hatfield, PA) 방울 상에 2 시간 동안 실온에서 띄워두었다. 격자를 PBS로 헹궈내고 15분간 0.1M 포스페이트 완충액 내 2.5% 글루타르알데히드로 옮겼다. PBS와 증류수로 헹궈낸 후 격자를 건조하고 대비를 위해 우라닐 아세테이트로 염색하였다. 샘플을 Tecnai Bio Twin 투과 전자 현미경 (FEI, Hillsboro, OR)로 관찰하고 AMT CCD 카메라 (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA)로 촬영하였다.

[0086] *단백질 블롯 및 항체*. 내인성 유전자 반응을 관찰하기 위해, 세포를 RIPA 완충액 내에 및 엑소좀을 8M 우레아/2.5%SDS, 5 μg /ml 류펩틴, 1 μg /ml 펩스타틴 및 1 mM 페닐메틸설포닐 불소 완충액 내에 수확하였다. 단백질을 Bradford 정량법에 따라 아크릴아미드 겔에 로딩하고 습윤 전기영동에 의해 PVDF 막 (ImmobilonP)으로 이동시켰다. 동소위 이종이식편 모델로부터 수집한 혈청 엑소좀의 단백질 샘플에 있어서, 15 cm 높이를 갖는 4% 아크릴아미드 겔을 사용하여 인간 및 마우스 Dicer 밴드를 전개시켰다. 일반적으로, 블롯을 1 시간 동안 RT에서 PBS/0.05% Tween 내 5% 무-지방 분유로 차단시키고 다음의 일차 항체와 함께 밤새 4℃에서 배양하였다: 1:500 항-Dicer (SC-30226) Santa Cruz; 1:1000 항-유비퀴티닐화 단백질, 클론 FK2 Millipore; 1:500 항-플래그 M2-퍼옥시다제 클론 M2 Sigma; 1:500 항-CD43 ab9088 Abcam; 1:500 항-PTEN, ab32199, Abcam; 1:300 항-CD9 ab92726, Abcam; 1:500 항-GADPH ab9483, Abcam; 1:250 항-TRBP ab72110, Abcam; 1:300 항-TSG101 ab83, Abcam; 1:400 항-AGO2 ab32381, Abcam; 1:4000 항-β-액틴 퍼옥시다제 클론 AC-15, Sigma; 1:500 항-GFP ab6556, Abcam; 1:500 항-HOXD10 ab76897 Abcam. 이차 항체를 RT에서 1 시간 동안 배양하였다. 항체 배양 후 회전교반기에서 10분 간격으로 1X PBS 0.05% Tween20으로 네 차례 세척하였다. 블롯을 Pierce사의 화학발광 시약으로 발전시켰다.

[0087] *실-시간 PCR 분석*. DNase 처리한 RNA를 MultiScribe 역전사효소 (Applied Biosystems) 및 올리고-d(T) 프라이머를 이용하여 레트로-전사한 후 총 RNA를 Trizol (Invitrogen)로 정제하였다. SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 및 β-액틴을 대조로서 사용하여 mRNA의 실-시간 PCR을 ABI PRISM 7300HT 서열 검출 시스템에서 수행하였다. 프라이머는 표 1에 열거된다.

[0088] 150ng의 DNase로 처리한 RNA 및 SuperScript III Platinum 한 단계 RT-qPCR 키트 (Invitrogen)를 이용하여 전구-miRNA를 정량화하였다 (Schmittgen *et al.*, 2004). 프라이머는 표 1에 열거된다.

[0089] miRNA 발현 분석을 위해, 10ng의 RNA를 특이적 miRNA 프라이머를 함유하는 TaqMan 마이크로RNA 역전사 키트 시약과 혼합하고 제조사의 설명서(Applied Biosystems)에 따라 역-전사하였다. 반응 혼합물을 16℃에서 30분간, 42℃에서 30분간 및 85℃에서 5분간 배양하였다. 실-시간 PCR을 각각의 연구되는 miRNA에 대해 요구되는 시중에서 입수가능한 어세이 (Applied Biosystems)를 이용하고 ABI PRISM 7300HT 서열 검출 시스템 장비 (Applied Biosystems)를 이용하여 수행하였다. miRNA의 발현을 RNA 양 및 온전성에 대한 내부 대조로서 기능하는 18S rRNA (TaqMan 선-활성화된 어세이 시약; Applied Biosystems)의 발현에 대해 정상화하였다. 각각의 측정은 삼중복으로 실시하였다. 증폭된 표적의 양이 고정된 역치에 도달하는 부분적인 주기의 수인 역치 주기 (Ct)를 측정

하고 발현을 앞서 보고된 $2^{-\Delta Ct}$ 식 (Livak 및 Schmittgen, 2001)을 이용하여 계산하였다.

[0090] **표 1.** qPCR 프라이머 서열.

표 1

[0091]

프라이머 명칭	프라이머 서열	서열 번호:
BiG2 F	5’ CAGGAGGTGGTGAAGGACAT3’	1
BiG2 R	5’ CCCGTTGGTCTGTGAGTTT3’	2
TSG101 F	5’ GATACCCTCCCAATCCCAGT3’	3
TSG101 R	5’ GTCACTGACCGCAGAGATGA3’	4
Hrs F	5’ AGTGGCTGTCGGGTATTCATC3’	5
Hrs R	5’ CCGTCCATATCCCTTGAAGAATC3’	6
CD43 F	5’ GCTGGTGGTAAGCCCAGAC3’	7
CD43 R	5’ GGCTCGCTAGTAGAGACCAAA3’	8
hsa-액틴 F	5’ CATGTACGTTGCTATCCAGGC3’	9
hsa-액틴 R	5’ CTCCTTAATGTCACGCACGAT3’	10
mmu-액틴 F	5’ GGCTGTATTCCCCTCCATCG3’	11
mmu-액틴 R	5’ CCAGTTGGTAACAATGCCATGT3’	12
전구-miR-let7-a F	5’ AGGTAGTAGGTTGTATAGTTTTAGG3’	13
전구-miR-let7-a R	5’ TAGGAAAGACAGTAGATTGTATAGT3’	14
전구-miR-15b F	5’ AGCACATCATGGTTTACATGC3’	15
전구-miR-15b R	5’ CTAGAGCAGCAAATAATGATTGG3’	16
전구-miR-26a F	5’ TTCAAGTAATCCAGGATAGGCTGT3’	17
전구-miR-26a R	5’ TGCAAGTAACCAAGAATAGGCC3’	18
전구-miR-31 F	5’ TGAGTGTGTTTTCCCTCCCT3’	19
전구-miR-31 R	5’ GCCATGGCTGCTGTCAG3’	20
전구-miR-125a F	5’ GTCCCTGAGACCCTTTAACC3’	21
전구-miR-125a R	5’ AACCTCACCTGTGACCCTG3’	22
전구-miR-125b F	5’ GTCCCTGAGACCCTAACTTG3’	23
전구-miR125b R	5’ AGCCTAACCCGTGGATTT3’	24
전구-miR-200a F	5’ TTCCACAGCAGCCCCTG3’	25
전구-miR-200a R	5’ GATGTGCCTCGGTGGTGT3’	26
전구-miR-200c F	5’ CTCGTCTTACCCAGCAGTGT3’	27
전구-miR-200c R	5’ GTCATCATTACCAGGCAGTATTAG3’	28
전구-miR-335 F	5’ GTCAAGAGCAATAACGAAAAATG3’	29
전구-miR-335 R	5’ GAGGTCAGGAGCAATAATGAA3’	30
전구-miR-10a,b F	5’ TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG3’	31
전구-miR-10a,b R	5’ ATTCCCCTAGATACGAATTTGTGA3’	32
전구-miR-21 F	5’ GCTTATCAGACTGATGTTGACTG3’	33
전구-miR-21 R	5’ CAGCCCATCGACTGGTG3’	34
전구-miR-27a F	5’ GCAGGGCTTAGCTGCTTG3’	35
전구-miR-27a R	5’ GGCGGAACTTAGCCACTGT3’	36
전구-miR-155 F	5’ GTTAATGCTAATCGTGATAGGG3’	37
전구-miR-155 R	5’ GCTAATATGTAGGAGTCAGTTGGA3’	38
전구-miR-373 F	5’ CTCAAAATGGGGGCGCTT3’	39
전구-miR-373 R	5’ CACCCCAAAATCGAAGCACT3’	40
전구-cel-1 F	5’ CCACCCCGTTCTACATACTTC3’	41
전구-cel-1 R	5’ ACCGTACCGAGCTGCATACT3’	42

[0092] *노던 블롯*. 성숙 miRNA에 대한 역상보서열의 3’ Bio[TEG] DNA 올리고뉴클레오티드를 탐침으로 사용하여 노던 블롯을 수행하였다 (표 2를 참조). 우레아/아크릴아미드 15% 겔을 사용하여 40 μg의 엑소좀 RNA (DNase 처리된 것)을 1X RNA 로딩 염료와 함께 로딩하고 95℃에서 2분 후에 얼음에서 2분간 두었다. 마이크로RNA 마커를 제조사의 설명서 (N2102, New England BioLabs)에 따라 사용하였다. TBE 1X를 사용하여 4℃에서 3 시간 동안 전기영동을 실시하였다. 이동은 Whatman 블로팅 페이퍼 및 BrightStar-Plus 양으로 하전된 나일론 막 (Ambion)을 이용하여 TBE 0.5X로 4℃에서 2 시간 동안 실시하였다. 20분 동안 UV 투과발광기(transilluminator)를 이용하여 RNA를 막에 가교-결합시켰다. 막을 42℃에서 Ambion사의 ULTRAhyb®-Oligo 혼성화 용액 (Ambion) 내에서 1 시

간 동안 교반시켜 예비-혼성화하였다. 탐침을 얼음에서 해동시키고 95℃에서 5분간 배양한 혼성화 완충액 mL당 150 ng를 부가하고, 그 후에 막을 42℃의 밤새 회전되게 하였다. 하기의 세척을 실시하였다: 2X SSPE/0.5%SDS - 15분간 2회, 0.2SSPE/0.5%SDS - 30분간 2회 및 2X SSPE - 5분. 이들 초기 세척 단계 이후 더 많은 세척이 뒤따랐으며 그 후에 블롯을 제조사의 설명서 (Ambion)에 따라 BrightStar BioDetect 키트를 이용하여 전개하였다. 블롯을 밤새 두 장으로 쌓은 필름과 함께 노출시켰다. 블롯을 잘 벗겨내고 두 차례 더 탐침으로 조사하였다.

[0093] **표 2.** 노던 탐침 서열.

표 2

[0094]

프라이머 명칭	탐침 서열	서열 번호:
miR-10b	5' CACAAATTCGGTTCTACAGGG3'	43
miR-21	5' TCAACATCAGTCTGATAAGCTA3'	44
miR-cel-1	5' AGTATGCAGCTCGGTACGGT3'	45
전구-miR-10b	5' TGAAGTTTTTGCATCGACCATATATTCCCCTAGAATCGAA3'	46
전구-miR-21	5' TGTCAGACAGCCCATCGACTGGTGTTGCCATGAGAT3'	47
tRNAMet	5' CAGCACGCTTCCGCTGCGCCACTCT3'	48

[0095] *세포 배양, 플라스미드, 전구-miRNA 및 siRNA.* MCF10A, MCF7, MDA-MB231, A549, SW480 및 HeLa 인간 세포주뿐만 아니라 NMuMG, 67NR 및 4T1 마우스 유방 세포주를 DMEM 10% FBS에서 배양하였다 (모든 세포는 미국 타입 배양 컬렉션(American Type Culture Collection - ATCC)로부터 유래하였다). siRNA를 위해 리포펙타민 2000 시약(Invitrogen)을 이용하여 형질주입을 수행하였다. 합성 전구-miRNA 형질주입을 위해 RNAiFect (Qiagen)를 모든 세포주에 사용하였다. siRNA의 서열은 표 3에 열거된다.

[0096] **표 3.** siRNA 서열.

표 3

[0097]

siRNA 명칭	siRNA 서열	서열 번호:
Hrs	5' GGAACGAGCCCAAGUACAATT3'	49
Hrs	5' UUGUACUUGGGCUCGUUCCGG3'	50
TSG101	5' GUUUAUCAUUCAAGUGUAATT3'	51
TSG101	5' UUACACUUGAAUGAUAAACTG3'	52
CD43	5' GGAGAGCCUUUGGUCUCUATT3'	53
CD43	5' UAGAGACCAAAGGCUCUCCGG3'	54
AGO2	5' GGCGUUACACGAUGCACUUTT3'	55
AGO2	5' AAGUGCAUCGUGUAACGCCTG3'	56

[0098] *플라스미드.* p-CMV-Tag4B-Dicer (Melo *et al.*, 2009); Origene사의 p-CMV6-CD63-GFP (RG217238); Addgene사의 GFP-hAGO2 (플라스미드 11590); Origene사의 pGFP-shBiG2 (TG314697); Origene사의 pGFP-shDicer (TG304991); 합성 전구-miR-10b, -21 및 -cel-1은 Ambion사에서 구입; 3' UTR-WTPTEN, 3' UTR-돌연변이-PTEN (Dr. Joshua Mendell 연구실 유래), 3' UTR-WTHOXD10 및 3' UTR-돌연변이-HOXD10 (Dr. Robert Weinberg 연구실 유래)은 Addgene사로부터 입수.

[0099] *면역세포화학 및 공초점 현미경.* 세포를 장착한 커버 슬립 상의 12 웰 플레이트에 적절한 컨플루언시(confluency)로 도말하고 밤새 배양하였다. 다음날 세포를 차가운 PBS 1X로 세척하고 RT에서 4% PFA/PBS로 20분간 고정시켰다. 슬라이드를 RT에서 PBS 0.5% Triton X-100로 10분간 투과화시키고, RT에서 BSA 5%로 1 시간 동안 차단시키고, 밤새 4℃에서 PBST 내 일차 항체 (PBS, 0.1% Triton) 2% BSA: 1:100 항-Dicer (SC-30226) Santa Cruz; 1:500 항-Flag Sigma; 1:50 항-CD43 ab9088 (Abcam); 1:100 항-TSG101 ab83 (Abcam); 1:500 항-GFP ab6556 (Abcam); 1:100 항-LAPM-1 ab25630 (Abcam); 1:100 항-Hrs ab56468 (Abcam); 1:100 항-BiG2 ab75001 (Abcam); 1:500 항-비오틴 ab66233 (Abcam)와 함께 배양하였다. 이차 항체 염소 항-토끼 Alexa 543 또는 염소 항-마우스 Alexa-488를 PBST 2% BSA 내 1:200으로 희석되어 RT에서 1 시간 동안 배양하였다. 핵을 염색하기 위해 DAPI를 사용하였다. 엑소좀 분석을 위해, 수확된 엑소좀을 RT에서 15분 동안 Triton X-0.05%으로 그 후에 1 시간 동안 5% BSA로 배양하였다. 첫 번째 일차 항체 (항-CD9, 1:50)를 밤새 4℃에서 100ul PBST 내에서

배양하고 두 번째 일차 항체인, 항-플래그 (1:50)를 다음 날 부가하고 RT에서 1 시간 동안 배양하였다. 이차 항체를 이어서 부가하고 다시 RT에서 1 시간 동안 배양하였다. 엑소좀을 45분간 4% PFA 내 12 웰 플레이트에서 커버 슬립의 상단에 올려두고 차가운 PBS로 세척하였다. 이상적인 세팅을 유지하기 위해 재순환 장비를 이용하고 Zeiss LSM510 상향 공초점 시스템으로 사진을 얻었다. 응집된 엑소좀은 공초점 현미경에서 200 nm보다 더 큰 구조로 보였다. 데이터 분석을 위해, 사진을 적어도 두 가지 독립적인 실험으로부터 얻은 풀로부터 선택하였다. 도면은 대표적인 장을 보여준다.

[0100] *시험관내 다이싱 분석*. 엑소좀의 단백질 추출물 (10 μg)을 37℃에서 pH 7.5으로 3 mM $MgCl_2$, 30 mM NaCl 및 100 mM Hepes의 존재에서 3 pmol의 전구-miR-10b, -21 및 -cel-1 비오틴-내부적으로 표지된 헤어핀과 함께 배양하였다. 각각의 반응물의 최종 부피는 10 μl였다. 10 μl의 포름아미드 겔 로딩 완충액을 부가하여 반응을 중지하였다. RNA를 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 이용하여 분해하고 BrightStar BioDetect 키트로 제조사의 설명서 (Ambion)에 따라 전개시켰다.

[0101] *세포 생존능 및 콜로니 형성 어세이*. 세포를 96 웰 플레이트에 도말하고 수확한 엑소좀을 제1일에 100 μg/mL의 농도로 부가하였다. 세포 생존능을 3-(4,5-디메틸-2-티아졸릴)-2,5-디페닐-2H-테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 어세이로 측정하였다. 콜로니 형성 실험을 위해, 세포를 12 웰 플레이트에 도말하고 엑소좀을 배양 제1 및 제5일에 100 μg/mL의 농도로 부가하였다. 8일 후에 콜로니를 고정하고 MTT 시약으로 염색하였다.

[0102] *Illumina 인간-HT12 mRNA 발현 분석*. RNA를 Illumina 인간-HT12 mRNA 발현 분석으로 혼성화하였다. 데이터를 R 패키지 "limma"에 의해 제공된 neqc 루틴을 이용하여 정상화하였다 (Shi *et al.*, 2010). 유전자 존재비를 유전자당 탐침의 평균값으로 측정하였다. 집단화는 유전자(가로) 및 샘플(세로)의 유클리드 거리의 산술 평균으로 수행한 것이다.

[0103] *miRNA 발현 어레이*. 특수제작한 miRNA 어레이를 9에 기술한 바와 같이 사용하였다. 상기 어레이는 1833개 인간 마이크로RNA 탐침, 1084개 마우스 마이크로RNA 탐침 및 다른 78 비암호화 RNA 탐침을 포함한다. 탐침은 이중복으로 프린팅된다. 각 탐침과 연관된 GenBank 접근 ID가 포함된다. R (버전 2.14.2) (웹페이지 주소는 r-project.org) 및 Bioconductor (웹페이지 주소는 bioconductor.org/)을 사용하여 생물정보학적 분석을 수행하였다. 각 탐침에 대한 무보정 강도는 평균 특징 픽셀 강도에서 평균 바탕값을 제한 것이다. 오프셋 1을 설정하는 것은 데이터를 로그-변환한 후에 음수가 존재하지 않게 해준다. 데이터를 분위(quantile) 정상화한 뒤 로그2 변환하였다. 동일한 miRNA를 측정하는 탐침으로부터의 신호를 평균내었다. LIMMA 라이브러리의 기능을 이용하여 분석을 수행하였다. 메이드4 라이브러리의 히트플롯 기능을 이용하여 히트맵(heatmap)을 생성하였다. 기술적 중복을 수행하였을 때, 히트맵은 중복 측정치로부터 입수한 평균 발현 수치를 나타내었다.

[0104] *난소, 자궁내막 및 유방 종양의 동소위 이종이식편*. 4 내지 6 주령의 암컷 무흉선 nu/nu 마우스 (Harlan)를 12-시간 명-암 주기를 가지며 21 내지 23℃ 및 40% 내지 60% 습도를 지닌 개별적으로 환기되는 우리에 넣었다. 마우스는 방사선 처리한 사료와 정제한 물에 자유롭게 접근할 수 있었다. 모든 동물 프로토콜은 스페인 공립 동물 실험 관리 위원회에서 검토하고 승인하였다.

[0105] 원발성 종양 시편을 벨비티지 대학병원 (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain)에서 입수하였다. 시설 내 연구심사위원회가 본 연구를 승인하였다. 정보를 듣고 서명한 동의서를 환자들에게서 수집하였다. 다섯 가지 대표적인 절제된 인간 상피 난소 종양 (EOC)로부터의 비-괴사성 조직 조각 (약 2-3mm^3): 장액성, 자궁내막양, 투명세포 종양 및 점액성을 선택하고 실온에서 10% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 DMEM (BioWhittaker)에 배치하였다. 이소플루오란-유도성 마취 하에서, 동물에게 측면 개복술을 행하고, 이들의 난소를 노출시키고 종양 조각을 프롤렌 7.0 봉합으로 난소 표면에 접합시켰다. 추가적으로, 인간 유방 및 자궁내막 종양의 조각을 유방 지방 패드와 자궁내막 벽에 각각 이식하였다.

[0106] 동소위 접목한 종양이 자라게 한 뒤 마취시킨 마우스를 희생시키면서 심장 천자로 2 ml의 혈액을 수득하였다. 샘플을 14,000 rpm으로 원심분리하고 -80℃에 동결시켰다.

[0107] *면역침강*. 세포 및 엑소좀을 수확하면, 각각 PBS로 세척하고 원심분리 또는 초원심분리하여 펠렛을 얻었다. 매우-차가운 RIPA 완충액 또는 8 M 우레아/SDS 완충액을 각각 세포와 엑소좀에 부가하였다. 현탁액을 4℃에서, 세포는 15 분간 및 엑소좀은 2 시간 동안 부드럽게 교반하였다. 용해물을 예비-냉각시킨 원심분리기에서 14,000 g로 15분간 원심분리하고 펠렛을 제거하였다. 단백질 A 또는 G 아가로스/세파로스 비드를 PBS로 두 차례 세척하고 PBS와 함께 50% 슬러리로 재저장하였다. 비드/슬러리 혼합물 (100 μl)을 1 mL의 세포 용해물 및 500 μl의 엑소좀의 용해물에 부가하고 10분간 4℃에서 배양하였다. 10분간 4℃에서 14,000 x g로 10분간 원심분리하여 비

드를 제거하고 펠렛을 제거하였다. Dicer 항체 (세포에는 5 μg 및 엑소좀에는 10 μg)를 500 μl의 세포 용해물 또는 250 μl의 엑소좀 용해물 (1 μg/μl 세포, 10 μg/μl 엑소좀)에 부가하고 밤새 4℃의 회전교반기에서 배양하였다. 100 μl의 단백질 A 또는 G 아가로스/세파로스 비드 슬러리를 부가하고 4℃에 밤새 방치하였다. 원심분리 후에 상청액을 제거하고 비드를 세포는 매우-차가운 RIPA 완충액으로 또는 엑소좀은 우레아/SDS 완충액으로 3 차례 세척하였다. 비드에서 면역복합체를 떨어뜨리기 위해 아가로스/세파로스 비드를 5분간 끓였다. 비드를 원심분리로 수집하고 상청액으로 단백질 블롯을 수행하였다.

[0108] *Ca^{2+} 이온투과담체 A23187의 존재에서 배양 조건.* 세포 (8×10^7 세포)를 DMEM 내 5×10^5 세포/ml로 시딩하였다. 세포를 처리하기 위해, A23187 (200 nM 최종 농도, Calbiochem, La Jolla, CA)를 네 시간 후에 배양액에 부가하였다. 처리된 및 미-처리된 세포로부터의 배지를 수확하고 엑소좀을 수집하였다.

[0109] *누드 마우스 내 세포의 동소위 주입.* 동소위 종양 성장을 MCF10A 비-종양형성 유방 상피 세포, MDA-MB231-유래 엑소좀에 노출된 MCF10A 비-종양형성 유방 상피 세포 및 MDA-MB-231 유방암 세포 (0.2 ml PBS 내 1×10^5 세포)를 3-주령 암컷 무흉선 누드 마우스의 유방 지방 패드에, 앞서 기술한 바와 같이 (Welch, 1997) 주입하여 측정하였다. 종양 성장은 캘리퍼로 종양의 길이와 폭을 측정하여 매주 관찰하고 앞서 기술한 바와 같이 (Welch, 1997) 평균 종양 직경을 기록하였다. 모든 동물을 종양 세포 주입 후 21일 째에 안락사시켰다.

[0110] *통계.* 오차 막대는 생물학적 복제물 간의 표준편차(S.D.)를 나타낸다. 각 실험은 기술적 및 생물학적으로 삼중복을 수행하였다. 통계적 유의성을 스튜던트 t-시험으로 산출하였다.

[0111] **실시예 2 - 결과**

[0112] *엑소좀의 단리 및 규명.* 암 세포 (MDA-MB231 삼중 음성 인간 전이성 유방 암종, MCF7 인간 유방 선암종, 67NR 마우스 비-전이성 유방 암종 및 4T1 마우스 전이성 유방 암종) 및 대조 세포 (MCF10A 비-종양형성 인간 상피 유방 및 NMuMG 비-종양형성 마우스 상피 유방)로부터 확립된 초원심분리 방법을 이용하여 엑소좀을 단리하였다(도 10A) (Luga *et al.*, 2012; Thery *et al.*, 2006). 수확한 엑소좀은 투과 전자 현미경 (TEM) 및 원자력 현미경 (AFM)으로 분석하였다. 40-140 nm 크기 사이의 입자를 확인하였다(도 1A-B) (Thery *et al.*, 2002). 추가로, 엑소좀의 정체를 두 엑소좀 마커인 TSG101 및 CD9를 검출하여 확인하였다 (도 1C) (Ostrowski *et al.*, 2010). 단리된 엑소좀은 면역금-표지 전자 현미경으로 분석할 때 또한 CD9 마커에도 양성을 나타내었다 (도 1A). 라텍스 비드에 연결된 엑소좀을 또한 유세포 분석기로 분석하였고, 흔히-사용되는 엑소좀 마커인 테트라스파닌 CD9, CD63, TSG101 및 플로틸린 1의 표면 발현이 나타났다 (도 1D). 추가적으로, 광산란 분광법 (LSS) (Fang *et al.*, 2007; Itzkan *et al.*, 2007; Bang 및 Setabutr, 2010; Benitez-vieyra *et al.*, 2009; Khairkar *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2010)을 사용하여 단리된 샘플이 104 nm 직경에서 조밀한 크기 분포 피크를 나타냄 (도 1E, 오른쪽 패널)을 보았다. LSS 시스템은 상이한 직경의 유리 미소구체를 내부 대조로 사용함으로써 엑소좀 추출물 내 모든 크기 입자의 정확한 검출을 가능하게 한다. LSS는 또한 이들 단리물 내에 가능한 미소포 및 박테리아 또는 세포 파편 오염을 배제시킨다 (도 1E, 오른쪽 그래프 내 삽도를 참조). 추가로, 및 LSS 데이터와 일치하게도, 나노사이트 나노입자 추적 분석은 105 ± 1.0 nm 직경의 크기 분포 피크를 갖는 입자를 밝혀내어 (도 1F) 추가로 여과하지 않았을 때 용액 내에 존재하는 상이한 크기 범위의 가능한 오염물질의 존재를 배제해주었다(도 1F, 오른쪽 그래프). 아폽토시스체 또는 무작위 세포 파편으로 단리물이 오염될 가능성을 제거하기 위해 엑소좀 추출 전에 비색 세포 생존능 어세이 (MTT), 말단 데옥시뉴클레오티딜 전이효소 dUTP 틈 말단 표지 (TUNEL) 어세이, 아넥신(Anexin) V 및 프로포듐 아이오다이드에 대한 유세포 분석, 및 엑소좀의 시토크롬 C 면역블롯 (도 10C-E)을 사용하여 세포의 생존능을 알아보았다. 암 세포에서 단리된 엑소좀을 앞서 정의한 바와 같이 총칭하여 발암 소포라고 부른다 (Lee *et al.*, 2011). 대조 세포에서 단리된 엑소좀을 총칭하여 정상 소포라고 부른다.

[0113] *정상 소포와 비교할 때 발암 소포는 특히 발암성 miRNA이 농축되어 있다.* 발암 소포 및 정상 소포의 전체 miRNA 함량을 조사하였다. 엑소좀으로부터 단리된 RNA의 미소유체역학 분석은 정상 소포와 비교할 때 발암 소포의 소형 RNA 함량의 증가를 보여주었다 (도 2F). 나아가, 정상 소포 (MCF10A-유래) 및 발암 소포 (MDA-MB-231-유래) 내 miRNA의 수준 사이의 낮은 상관관계가 0.35의 R^2 수치와 함께 관찰되었다(도 2A). 전체 miRNA 어레이 분석은 정상 소포와 비교할 때 발암 소포 내 miRNA 함량의 농축을 보여주었다. 이러한 분석은 또한 정상 소포와 비교할 때 발암 소포에서의 매우 돋보이는 miRNA 발현 프로파일을 밝혀내었다. miRNA 어레이 데이터는 정상 소포와 비교할 때 발암 소포 내 miRNA 함량의 전반적인 농축과 더불어, 발암 소포와 정상 소포 사이에 차등하게 발현된 305가지의 miRNA를 나타내었다 (표 5). 발암 소포 내 miRNA의 농축은 단지 암 세포 내 miRNA의 증가를 반영하는 것만은 아닌데 왜냐하면 암 세포가 비-종양형성 세포에 비하여 총 소형 RNA의 총량에서 감소를 나타내었기 때문

이다 (도 11A). 그러므로, 엑소좀 내 miRNA의 축적은 특이적이며 표적화된 것으로 보인다.

[0114] 발암 소포 및 정상 소포 간의 miRNA 어레이에서 차등하게 발현된 것으로 밝혀진 이들 세포로부터 유래한 암 세포 및 엑소좀 내 15가지 miRNA의 발현을 추가로 평가하였다(표 4 및 5). 이러한 조합으로부터의 여섯 개의 miRNA는 암 진행과 연관된 것으로 나타났고 (발암성 miRNA: miR-10a, miR-10b, miR-21, miR-27a, miR-155 및 miR-373) 아홉 개의 miRNA는 종양 억제 기능을 보유하는 것으로 기록되었으며 (종양 억제성 miRNA: let7a, miR15b, miR26a, miR31, miR125a, miR125b, miR200a, miR200c, miR335) 이들 세포로부터 유래된 세포 및 엑소좀에서 발현되었다 (도 11B-C 및 표 4). 엑소좀 내 miRNA의 반-감기를 측정하기 위해, 단리된 엑소좀에서 이들을 연구하기 위한 무-세포 시스템을 개발하였다. 세포에서 유리된, 정제된 엑소좀을 배양 배지에 배치하고 37℃에서 24h 또는 72h 동안 배양하였다. 배양 기간 후에, 엑소좀을 이들의 miRNA 함량에 대해 분석하고 이들이 유래한 원래 세포와 비교하였다. 24h와 비교했을 때 72h에서의 세포에 비교한 발암 소포 내 이들 miRNA의 상관관계 수치가 증가한 반면 (R^2 = 0.43 대비 R^2 = 0.60), 높은 상관관계가 정상 소포 및 MCF10A 세포 사이에 유지되었다 (정상 소포를 유도하기 위해 사용된 세포, R^2 = 0.98 대비 R^2 = 0.98) (도 2B). 여섯 개의 분석된 발암성 miRNA의 두드러지는 상향-조절이 24h 동안 배양된 발암 소포에 비해 배타적으로 72h 동안 배양된 발암 소포에서 관찰되었고, MDA-MB231 및 4T1 유래 발암 소포에 있어서, 각각 17.6 및 13.2의 평균 배수-변화를 나타내어, 시간에 따른 발암 소포 내 miRNA 함량이 특정하게 증가함을 더욱 지지하였다(도 2C 중간 및 하단 그래프 및 도 11D 오른쪽, 상단 및 하단 그래프). 발암 소포를 24h이나 72h 동안 배양하였을 때 종양 억제성 miRNA에 있어서는 유의한 차이를 보지 못하였다 (도 2C 및 도 11D). 정상 소포는 배양 시간과 상관 없이 이들의 miRNA 함량에 어떠한 차이도 나타내지 않았다 (도 2C 및 도 11D). 모든 15개 miRNA의 존재는 72h 배양된 정상 소포 및 이들이 유래한 세포에서 동일했으며, 0.93의 상관 계수를 나타내었다 (도 2E, 왼쪽). MDA-MB231 및 4T1 엑소좀의 상관계수는 상당히 더 낮았으며 (각각 r^2 = 0.56 및 0.42), 시간에 따른 발암 소포의 miRNA 수준의 특정한 변화를 더욱 지지하였다 (도 2E, 중간 및 오른쪽). 추가적으로, 상관관계 수준은 발암 소포를 MCF7 (r^2 = 0.76), MDA-MB231 (r^2 = 0.56), 67NR (r^2 = 0.64) 및 4T1 (r^2 = 0.42)와 비교했을 때 세포주의 악성이 증가함에 따라 감소한다 (도 2E 및 도 11E). 그러므로, 정상 소포의 miRNA 함량은 모든 시간에서 이들이 유래한 세포의 반영이었던 반면, 발암 소포는 시간에 따라 세포-비의존 방식으로 이들의 miRNA 함량이 변화하였다.

[0115] MDA-MB231 및 4T1 발암 소포의 miRNA 함량을 MCF10A 및 NMuMG 세포로부터의 정상 소포와 비교하였을 때, 24h 동안 배양된 발암 소포 내 발암성 miRNA의 농축이 각각 2.7 및 2.0의 평균 배수 변화와 함께 관찰되었다(도 11B). 72h 시점에, MCF10A and NMuMG 유래 정상 소포에 비교할 때, 30 및 18.2의 평균 배수-변화가 각각 MDA-MB231 및 4T1 유래 발암 소포 내 발암성 miRNA에서 검출되었다 (도 11B). 노던 블롯은 발암 소포에서 배타적인 발암성 miR-10b 및 miR-21의 상향 조절을 확인하였고, 이는 miRNA 어레이뿐만 아니라 qPCR 분석 모두를 지지한다(도 2D).

[0116] *발암 소포는 전구-miRNA 및 코어(Core) RLC 단백질을 함유한다.* 갓 단리된 발암 소포의 무-세포 배양은 miRNA 함량 증가로 나타나서, 엑소좀 내 능동적인 생합성을 지지하였다. 추가적으로, 유체역학 분석은 또한 더 큰 RNA 분자의 존재를 시사하였다 (도 2F). 그러므로, 정상 소포 및 발암 소포 표본 내 전구-miRNA의 가능한 존재를 연구하였다. 엑소좀을 단리 후 24h 또는 72h동안 무-세포 배양을 수행하고 RNA분해효소로 처리하여 임의의 가능한 엑소좀-외 RNA를 고갈시켰다. 그 후에 엑소좀에서 전구-miRNA를 검출하였다. 분석된 전구-miRNA는 앞서 평가한 15가지 성숙 miRNA에 상응하는 것이었다 (표 4).

[0117] **표 4.** 15가지 miRNA는 발암 소포 및 정상 소포 간에 차등하게 발현되었다.

표 4

[0118]

마이크로RNA ID	참고문헌
miR-let7-a	Kim *et al.*, 2012; Spizzo *et al.*, 2009
miR-15b	Cimmino *et al.*, 2005; Palamarchuk *et al.*, 2010
miR-26a	Kota *et al.*, 2009
miR-31	Valastyan *et al.*, 2009
miR-125a	Guo *et al.*, 2009; Spizzo *et al.*, 2009
miR-125b	Spizzo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011
miR-200a	Park *et al.*, 2008; Spizzo *et al.*, 2009
miR-200c	Park *et al.*, 2008; Spizzo *et al.*, 2009

miR-335	Heyn *et al.*, 2011; Scarola *et al.*, 2010; Tavazoie *et al.*, 2008
miR-10a	Tan *et al.*, 2009
miR-10b	Spizzo *et al.*, 2009; Yigit *et al.*, 2012
miR-21	Spizzo *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2008
miR-27a	Guttilla 및 White, 2009; Mertens-Talcott *et al.*, 2007
miR-155	Mattiske *et al.*, 2012
miR-373	Spizzo *et al.*, 2009; Voorhoeve *et al.*, 2006

[0119] 모든 분석된 15가지 전구-miRNA는 엑소좀 (정상 소포 및 발암 소포)에 존재하였다 (도 3A 및 도 12A). miRNA로 관찰된 바와 같이, 발암 소포는 발암성 전구-miRNA에 고도로 농축된 반면, 종양-억제성 전구-miRNA는 거의 나타나지 않는 것으로 드러났다 (도 3A 및 도 12A). 엑소좀을 24h 또는 72h 동안 배양했을 때, 24h동안 배양된 발암 소포와 비교할 때 발암성 전구-miRNA의 상당한 하향 조절이 72h 배양된 발암 소포에서 관찰되었다. 그러한 변화는 정상 소포에서는 나타나지 않았다 (도 3B 및 도 12B). 종양-억제성 전구-miRNA는 발암 소포 또는 정상 소포에서 어떠한 차이도 보이지 않았다 (도 3B 및 도 12B). 게다가, 정상 소포에서는 그렇지 않았지만, 발암 소포에서 발암성 전구-miRNA의 양 증가가 96h의 배양 후 나타났으며, 그 시점에서 발암성 전구-miRNA 수준은 종양-억제성 전구-miRNA의 수준에 도달하였다 (도 3E 및 도 12E). 발암 소포 내 발암성 전구-miRNA의 하향 조절을 전구-miR10b 및 전구-miR21에 대한 노던 블로팅으로 확인하였다 (도 3C). 다음으로, 전구-miRNA 및 엑소좀 내 miRNA의 시간-경과 분석을 수행하였다. 단리된 발암 소포를 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h 및 96h 배양함으로써, 상기 6가지 분석된 전구-miRNA의 수준이 배양 시간이 증가할 수록 이들 각각의 miRNA에 대해 역비례함을 관찰하였다 (도 3D). 성숙 miRNA가 24 내지 72h의 배양동안 양이 증가하였고, 이후 평형에 도달하였다 (도 3D). 그러므로, 발암 소포는 시간이 지날 수록 각각의 성숙 miRNA의 증가와 더불어 전구miRNA 함량은 고갈되었다. 상기 관찰은 발암 소포가 miRNA 생합성 능력을 가진다는 가설을 도출하였다.

[0120] 어째서 배양된 엑소좀 내 전구-miRNA의 프로세싱이 즉시 일어나지 않고 24h 후에 시작되는지 이해하기 위해, 엑스포틴-5 (XPO5)를 침묵시킨 MDA-MB-231 세포에서 모든 여섯 가지 miRNA를 관찰하였다 (도 12C 및 D). XPO5는 핵에서 세포질로 전구-miRNA를 수송하는 일을 담당한다 (Yi *et al.*, 2003). XPO5 침묵화는 핵에서 세포질로의 전구-miRNA의 흐름을 차단하며 핵으로부터 새로운 세포질 전구-miRNA를 도입하지 않고도 세포질 전구miRNA 프로세싱의 평가를 가능하게 한다. 마이크로RNA-21을 원심분리 전후의 MDA-MB-231siXPO5 세포에서 관찰하였고 (도 12C 및 D), 원심분리는 엑소좀 단리 조건을 모사하기 위해 3시간 동안 4℃에서 실시하였다. miR-21의 상당한 상향-조절은 같은 시점의 원심분리한 세포나 비-원심분리 세포에서 관찰되지 않았고, 여기서 앞의 세포는 24h의 지체 기간을 거쳤다 (도 12C 및 D). 그러므로, 세포 및 엑소좀 모두는 전구-miRNA의 프로세싱을 개시하기 위해서는 4℃에서 원심분리의 스트레스를 회복하기 위해 일정 시간이 필요하다. 그러한 적응이 조직 배양 과정 후 배양된 세포에서 효소적 활성을 위해 예상된다.

[0121] *발암 소포는 코어 RISC (RLC) 단백질을 함유한다.* 발암 소포는 시간이 지날 수록 각각의 성숙 miRNA의 증가와 더불어 전구-miRNA 농도가 고갈되었다. 이로 인해 우리는 엑소좀 내 miRNA 생합성 및 전구-miRNA 프로세싱 능력을 검사하기로 했다. 마이크로RNA 생합성은 핵심 단백질 성분인 RLC, Dicer, TRBP 및 AGO2를 필요로 한다 (Chendrimada *et al.*, 2005). Dicer 및 TRBP는 복합체를 형성하여 Dicer 단백질에 안정성을 부여하는 반면, AGO2는 차후에 생합성 경로에서 영입되어 가닥 선택 및 RNA 풀림(unwinding) 과정을 돕는다는 것이 이미 알려져 있다 (Chendrimada *et al.*, 2005). Dicer 단백질이 MCF7, MDA-MB231, 67NR 및 4T1 암 세포에서 유래된 발암 소포에서 검출되었다 (도 1C 및 도 4A-B). 앞서 기술한 바와 같이 (Montecalvo *et al.*, 2012) 엑소좀 단백질 추출을 하기 전에 모든 엑소좀 표본을 프로테이나제 K로 처리함으로써 오염물질인 엑소좀-외 Dicer 단백질이 검출될 가능성을 제거하였다 (도 1C 및 도 4A-B). 또한, 다양한 암 세포주 가령 A549 (인간 폐암), SW480 (인간 대장암), HeLa (인간 자궁경부암) 및 4T07 (마우스 유방암)이 또한 Dicer-함유 엑소좀을 생산한다 (도 13H). Dicer 단백질은 MCF10A (인간 비-종양형성 유방 상피 세포) 및 NMuMG (마우스 비-종양형성 유방 상피 세포) 세포주에 의해 생산된 정상 소포에서 검출되지 않았다 (도 1C 및 도 4A). 투과 전자 현미경을 이용한 엑소좀의 면역금 표지법은 Dicer 단백질이 발암 소포 내에는 존재하고 정상 소포에는 존재하지 않음을 확증하였다 (도 4B 및 도 13A). 추가적으로, 항-GFP 항체를 면역금 표지법 실험에서 또다른 음성 대조로서 사용하였고, 엑소좀에서는 어떤 것도 검출되지 않았다 (도 13B).

[0122] Dicer 단백질은 MCF10A 및 MDA-MB231 세포에서 N-말단 Flag 태그로 더욱 과발현되었다 (도 13C). 면역 블롯 및 공초점 현미경은 추가로 Flag-Dicer 단백질이 특정하게 발암 소포에 존재하고 정상 소포에는 존재하지 않음을 확인하였다 (도 4C). 세포내 Ca2+ 수준을 증가시키는 것은 엑소좀 분비를 촉진한다 (Savina *et al.*, 2003).

Ca^{2+} 이온투과담체 A23187를 MCF10A 및 MDA-MB231 세포의 배양 배지에 부가하고 엑소좀을 수집하였다. 우리는 CD9 발현으로 판단가능한 엑소좀 생산의 상당한 증가를 관찰하였다 (도 4D). Dicer 단백질은 발암 소포에서 검출되었지만 정상 소포에서는 검출되지 않았다 (도 4D). 이들 결과는 Dicer 축적을 유도하는 것은 함량을 결정짓는 엑소좀의 양이 아니라 특정한 메커니즘이라는 것을 더욱 시사하였다. 또한, Dicer 발현은 MCF10A 및 MDA-MB-231 세포 내 두 개의 짧은-헤어핀 구조체의 안정한 발현을 통해 감소하였다 (도. 13D-E). 면역블롯 및 면역금표지법으로 검출된 ShScramble 또는 모 MDA-MB-231 세포에 비해 MDA-MB-231shDicer 세포로부터 유래된 발암 소포는 상당히 더 적은 Dicer를 함유하였다 (도 4E-F). Dicer는 또한 MCF10AshDicer 세포에서 유래한 정상 소포에서는 검출되지 않았다 (도 4E).

[0123] 추가적으로, RLC 단백질, AGO2 및 TRBP는 또한 발암 소포에서는 검출되었으나 정상 소포에는 없었다 (도 4G-H). 엑소좀을 GFP 태그된 AGO2로 형질주입된 MCF10A 및 MDA-MB231 세포로부터 추출하였다 (도 4I). 항-GFP 항체를 이용하여, GFP-AGO2의 존재를 MDA-MB231-GFP-AGO2 세포에서 추출한 엑소좀에서 검출하였다 (도 4J). MCF10A 및 MDA-MB231 세포에서 AGO2의 siRNA 침묵을 시도했더니, MDA-MB231 유래 발암 소포에서 AGO2 단백질의 하향 조절이 관찰되었다 (도 4K-L). 우리는 면역침강법으로 AGO2가 발암 소포 내 Dicer와 결합하는 반면 둘다 정상 소포에서는 검출되지 않았음을 보았다 (도 4M). Dicer의 안정성을 유도하고 이의 전구-miRNA 절단 활성을 돕는 기본적인 조력자는 TRBP이다 (Chendrimada *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009). 면역침강법은 Dicer/TRBP 복합체가 발암 소포에는 존재하지만 정상 소포에는 없음을 밝혔다 (도 4N).

[0124] 항-Dicer 항체를 이용한 면역침강은 AGO2가 발암 소포 내 Dicer와 결합하는 반면 둘다 정상 소포에서는 검출되지 않았음을 밝혔다 (도 13F). Dicer의 안정성을 유도하고 이의 전구miRNA 절단 활성을 돕는 기본적인 조력자는 TRBP이다 (Chendrimada *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009). 항-Dicer 항체를 이용한 면역침강법은 Dicer/TRBP 복합체가 발암 소포에는 존재하지만 정상 소포에는 없음을 밝혔다 (도 13G).

[0125] *발암 소포는 RLC를 이용하여 전구-miRNA를 프로세싱하고 성숙 miRNA를 생성한다.* 발암 소포 내 RLC 단백질의 기능 (다이싱 및 침묵화 특성)을 시험하여 전구-miRNA로부터 성숙 miRNA를 생성하였다. Dicer가 결여된 엑소좀을 MCF10AshDicer, MDA-MB231shDicer 및 4T1shDicer 세포로부터 추출하였다 (도 14A). 전구-miRNA 및 miRNA 함량은 시간에 따라 Dicer 하향 조절된 엑소좀에서 어떠한 중요한 변화도 나타내지 않았고, 이는 발암 소포 내 Dicer의 부재에서 전구-miRNA가 프로세싱되지 않아 miRNA를 생성하지 않았음을 말해준다 (도 5A-B 및 도 14B-C). 다음으로, 항-Dicer 및 항-TRBP 항체를 전기천공으로 엑소좀에 삽입하고 전기천공 후 엑소좀 외 항체의 존재를 피하기 위해 프로테이나제 K로 처리한 항-액틴 대조 항체로 전기천공시킨 발암 소포 및 정상 소포와 비교하였다 (도 5C). 대조 항-액틴 항체로 전기천공시킨 발암 소포는 앞서 언급된 바와 같은 전구-miRNA 및 mirNA 수준의 변화를 나타내었다 (도 5D-E 및 도 14D-E). 항-Dicer 및 항-TRBP 항체를 가진 발암 소포에서, 시간에 따른 전구-miRNA 및 miRNA 수준의 중요한 변화는 관찰되지 않았고, 이는 전구-miRNA 프로세싱의 저해를 시사한다 (도 5D-e 및 도 14D-E). 72h의 무-세포 배양 후에 발암 소포 (MDA-MB-231 유래), 항-Dicer 항체 전기천공된 발암 소포 (MDA-MB231 유래) 및 정상 소포 (MCF10A 유래)의 miRNA 발현 어레이에 의해 총 miRNA 함량을 평가하였다. 항-Dicer 항체를 가진 발암 소포의 총 miRNA 함량은 MDA-MB231 유래 발암 소포 (R^2 = 0.48)보다 MCF10A 정상 소포 (R^2 = 0.79)와 더 밀접하게 유사했다. 발암 소포를 항-Dicer 항체를 갖는 발암 소포와 비교할 때, 198가지의 차등하게 발현되는 miRNA가 관찰되었고, 그 중 48%는 상당하게 하향조절되어 있었다 (표 6). 그 중에서, 19%는 발암성인 반면 단 1%가 앞서 간행된 문헌을 바탕으로 종양 억제 특성을 지니고 있다고 기록되어 있었다 (도 14F, 표 6).

[0126] 전구-miRNA를 성숙 miRNA로 전환시키는 효소 반응은 자발적이며 세 가지 RLC 단백질, 포함된 전구-miRNA, 및 엑소좀 내에 존재하는 단백질인 Hsp90 외에 다른 어떤 요소도 요하지 않음이 공지되어 있다 (Maniataki 및 Mourelatos, 2005; McCready *et al.*, 2010). 이를 추가로 확인하기 위해, 발암 소포를 Hsp90 활성을 선택적으로 저해하는 약물인 젤다나마이신(Geldanamycin)으로 전기천공시켰다 (Miyata, 2005). 대조와 비교했을 때 젤다나마이신의 존재에서 합성된 성숙 miRNA의 양의 상당한 감소가 관찰되었다 (도 6A). 성숙 miRNA 발현에 대한 Hsp90 단백질의 효과는 두 가지 가능하게 겹치는 과정을 통해 매개될 것이다: miRNA 생합성에서 AGO2 활성을 돕는 능동적인 역할 및 RISC에서 AGO2 단백질에 결합하는 성숙 miRNA의 안정화.

[0127] 발암 소포의 특정한 전구-miRNA 프로세싱능력을 더욱 확인하기 위해, 합성 전구-miRNA -10b 및 -21뿐만 아니라 예쁜꼬마선충 (*C. elegans*) 전구체 전구-cel-1 전구-miRNA를 엑소좀에 전기천공시켜 이들의 프로세싱을 알아보았다 (도 15A). 전구-miRNA의 상당한 하향 조절 및 이들 각각의 miRNA의 상향-조절이 72h 배양 후 발암 소포에서 관찰되었다 (도 6B-C). Dicer 항체를 갖는 발암 소포는 72h 배양 후에 전구-miRNA 함량의 변화를 나타내지

않았다 (도 6B-C). shDicer 세포에서 유래한 발암 소포는 72h 배양 후에 전구- miRNA 함량의 변화를 나타내지 않았다 (도 6B-C). 추가적으로, 전구-miR-10b, -21 및 -cel-1를 내부적으로 비오틴-데옥시티미딘 (dT)으로 표지하고 이것을 MCF10A 세포에 형질주입하였다. 상기 dT-개질된 전구-miRNA를 프로세싱하여 성숙 miRNA를 생성하였고, 표지가 이들의 프로세싱 능력을 변화시키지 않음을 확인하였다 (도 15B-C). 개질된 전구-miRNA를 '다이싱' 어세이에 사용하여 Dicer 함유 엑소좀이 전구-miRNA를 특정하게 프로세싱하고 성숙 miRNA를 생성할 수 있음을 보았다 (도 6D-F).

[0128] *암 세포 내 세포질 CD43는 Dicer의 동원에 기여한다.* 다포성 소체 (MVB)는 혈장 막과 융합시 궁극적으로 엑소좀을 방출하는 엔도좀을 포함하는 세포 기관이다 (Pant *et al.*, 2012). RISC 단백질을 엔도좀 내로 끌어오는 것을 허용하고 이어서 엑소좀으로 방출시키는 가능한 메커니즘을 연구하였다. 먼저, Dicer가 대조 세포에 비해 암 세포 내 MVB와 연합하는지 알아보았다. Dicer의 세포 분포와 공동으로 MVB의 마커 및 엑소좀 생합성 경로를 비교하였다. Hrs 및 BiG2는 초기 엔도좀 마커이며 TSG101는 MVB에 대한 마커이다 (Razi 및 Futter, 2006; Shin *et al.*, 2004). Dicer는 MDA-MB231 및 4T1 세포 내에 Hrs, BiG2 및 TSG101와 공존한다(도 16A). 외생적으로 조달된 N-로다민-표지된 포스파티딜에타놀아민 (NRhPE)은 세포에 흡수되고 MVB 내에 유지된다 (Sherer *et al.*, 2003). MDA-MB231 및 4T1 세포에서 Dicer 염색은 주로 궁극적으로 엑소좀을 생성하는 MVB 내 NRhPE와 공존한다. 이들 데이터는 앞서 Dicer, TRBP 및 AGO2가 후기 엔도좀/MVB 부분에 나타났던 동시-분별 연구에서 관찰한 것과 일치한다 (Shen *et al.*, 2013). 그와 반대로, 대조 세포 (NMuMG 및 MCF10A)에서는 Dicer와 Hrs, BiG2, TSG101 또는 NRhPE의 공존이 존재하지 않았다 (도 16A). 추가로, MDA-MB231 및 MCF10A 세포에서, Hrs 및 TSG101 유전자는 두 가지의 상이한 siRNA를 이용하여, 그리고 BiG2는 두 가지의 상이한 shRNAS를 이용하여 침묵화되었고, Dicer 단백질 발현을 평가하였다(도 16B). Hrs, BiG2 및 TSG101의 침묵화는 MVB 형성을 손상시키며 엑소좀 생산을 하향 조절되게 유도한다 (도 16C-E). 증가된 Dicer 단백질을 siHrs, shBiG2 또는 siTSG101을 갖는 MDA-MB231 세포의 세포질과 핵에서 관찰하였다. MDA-MB231 세포 대신에 4T1 세포를 사용하였을 때도 유사한 결과를 얻었다. Hrs, BiG2 또는 TSG101 유전자가 MCF10A 세포에서 침묵화되었을 때, Dicer 단백질 발현 및 위치 (세포질) 변화는 관찰되지 않았다. 흥미롭게도, Dicer mRNA 발현은 siHrs, shBiG2 및 siTSG101 MDA-MB231 및 4T1 세포에서 감소하였다 (도 16F). 이는 세포 내 Dicer 단백질의 양 및 이의 전사 수준 사이의 음성 피드백 고리를 나타낼 수 있다. 이들 결과는 Dicer 단백질의 엑소좀-매개 방출이 암 세포 내 Dicer의 고갈에 있어서 가능하게는 속도-제한적 단계임을 시사한다. 손상된 MVB 형성은 Dicer 전사 수준을 증가시키지 않고 세포질 및 핵 전체에 Dicer 단백질 축적을 야기하였다.

[0129] MVB는 또한 추후 리소좀에 의한 분해를 위해 유비퀴틴화된 단백질을 고립시킨다(Luzio *et al.*, 2009). 우리는 Dicer 단백질이 유비퀴틴화되지 않고 리소좀에 대해 널리 사용되는 마커인 LAMP-1과 공존하지 않음을 관찰하였다. 이들 결과는 Dicer가 암 세포에서 분해되지 않고 오히려 엑소좀을 통해 분비된다는 것을 시사한다 (도 16G).

[0130] 단백질을 MVB 및 엑소좀으로 표적하는 신호는 거의 공지되어 있지 않다. 최근, 다양한 혈장 막 고정(anchor) 단백질, 가령 CD43이 MVB 및 엑소좀으로의 단백질 수송의 가능한 매개체로서 연구되었다 (Shen *et al.*, 2011b). CD43는 대부분 백혈구 막관통 시알로당단백질이며, 암 세포에서는 고도로 발현되며 (말단이 잘린 세포질 형태로) 대조 세포에서는 발현되지 않는다 (Shelley *et al.*, 2012). CD43는 유방암을 비롯한 많은 고체 종양에서 검출되며, 암 진행 및 전이와 상관관계가 있다 (Shelley *et al.*, 2012). 우리는 CD43이 RISC 단백질을 MVB로 수송하는데 기여하는지 알아보았다. 우리는 Dicer가 MDA-MB231에서 CD43 단백질과 함께 면역침강되는 것을 확인하였다 (도 9A). CD43이 MCF10A 및 MDA-MB231 세포에서 siRNA를 이용하여 하향 조절되면, Dicer 수준은 발암 소포에서 상당히 감소하며 (도 9B 및 16H), Dicer 단백질은 핵 및 세포질에 축적된다. Dicer mRNA 발현의 하향 조절을 MDA-MB231siCD43 암 세포에서 관찰하였으나 또한 앞서 siHrs, shBiG2 및 siTSG101에서 관찰한 바와 같이 MCF10AsiCD43 비-종양형성 세포에서는 관찰하지 못했다 (도 16I).

[0131] *발암 소포는 Dicer-의존성 방식으로 표적 세포의 전사체를 변화시킨다.* 암 세포 (MDA-MB231 세포)를 엑소좀에 대한 마커인 CD63-GFP로 형질주입하였다 (Escola *et al.*, 1998). CD63-GFP MDA-MB231 세포를 사용하여 GFP+ 엑소좀을 단리하였고, 이를 이후에 MCF10A 세포와 함께 배양하였다. MDA-MB231-CD63-GFP로부터의 엑소좀은 녹색 형광을 방출하는 입자를 검출하는 레이저 빔이 구비된 나노사이트를 이용하였을 때 녹색인 것으로 나타났다 (도 17A). CD63-GFP+ 발암 소포가 MCF10A 세포 내로 들어간 것이 보이며, 여기서 이들은 세포질에서 나타났다. miRNA 발현 어레이를 이용하여, MDA-MB231 유래 발암 소포에 노출된 MCF10A 세포는 모 MCF10A 세포와는 구별되지만 MDA-MB231 세포와는 닮은 새로운 miRNA 발현 프로파일을 습득한 것이 나타났다. miRNA 발현 어레이를 이용하여, MDA-MB-231-유래 발암 소포에 노출된 MCF10A 세포는 모 MCF10A 세포와는 구별되는 새로운 miRNA 발현 프

로파일을 습득한 것이 나타났다. 발암 소포로 처리된 MCF10A의 전체 전사체 프로파일링은 MDA-MB231 세포와 더 밀접하게 닮았다. 그러한 mRNA 발현 프로파일의 상당한 변화는 MCF10A 세포가 Dicer 항체를 갖는 MDA-MB231 발암 소포에 노출되었을 때 역전되며, 발현 패턴이 모 MC10A 세포와 다시 합쳐진다.

[0132] 모 MCF10A 세포에 비해 MDA-MB231 발암 소포에 노출된 MCF10A 세포의 miRNA 및 mRNA 발현 프로파일의 심도깊은 분석은 처리된 MCF10A 세포에서 특정 miRNA의 상당한 상향-조절 및 이들의 기술된 mRNA 표적의 하향-조절을 나타내었다. 한 예로서, miRNA-21 및 -10b는 처리된 MCF10A 세포에서, 다른 발암성 miRNA 중에서도 상향-조절되었다 (각각 4.6 및 2.3 배). 마이크로RNA-21 및 -10b은 유방암 진행, 침습성 및 전이의 원인으로 짐작되어 왔다 (Ma *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2011). 더 일찍 나타난 바와 같이, miR-21 및 -10b은 발암 소포에서 이들의 전구-miRNA로부터 합성되었다. PTEN 및 HOXD10는 miR-21 및 miR-10b 표적으로서 기술되며 대조 MCF10A 세포와 비교했을 때 발암 소포로 처리된 MCF10A 세포의 발현 어레이 분석에서 억제되었다. 웨스턴 블롯 분석은 PTEN 및 HOXD10 수준이 발암 소포에 노출된 MCF10A 세포에서 억제되었음을 나타내었다 (도 7A-B). 발암 소포 내 miR-21 및 miR-10b가 MCF10A 수용 세포에서 PTEN 및 HOXD10를 침묵시킬 수 있는지 알아보기 위해, MCF10A 세포에 miR-21 및 miR-10b를 결합시킬 수 있는 PTEN 또는 HOXD10 유전자의 야생형 3' UTR를 포함하는 루시페라아제 리포터를 일시적으로 형질주입하였다. PTEN 또는 HOXD10 벡터의 돌연변이 3' UTR을 대조로서 사용하였다. 루시페라아제 리포터 활성의 감소가 발암 소포와 배양한 MCF10A 세포에서 나타났고, 이로써 발암 소포로부터 수용 세포로의 miRNA의 기능적 송달을 확인했다 (도 7C). 발암 소포 배양된 MCF10A 세포에서, PTEN 및 HOXD10 발현 수준을 상이한 시점에서 평가하였다. 72h 배양한 엑소좀으로 세포를 처리한 후 즉시 PTEN 및 HOXD10 발현에서 상당한 감소가 검출되었다 (도 7A-B). PTEN 및 HOXD10 발현 수준은 갓 단리한 엑소좀으로 처리한 MCF10A 세포에서 최소로 변화하였고, 이는 성숙 miRNA의 충분한 농도가 이 시점에는 존재하지 않았을 것이라는 점을 시사하였다 (도 17B-C). 항-Dicer 항체를 갖는 72h 배양된 발암 소포로 처리한 MCF10A 세포는 PTEN 및 HOXD10의 별로 현저하지 않은 하향 조절을 나타내었다 (도 7D 및 도 17G). 추가적으로, MDA-MB231-유래 발암 소포에서 검출되지 않는 miRNA인 세포 내 miR-15는, Dicer 항체를 함유하는 MDA-MB-231 엑소좀으로 MCF10A 세포를 처리하였기 때문에 변하지 않았고, 이는 처리된 세포에서 Dicer 항체의 중요하지 않은 효과를 나타낸다 (도 17D). 동일한 보고는 긴 배양 시간의 필요 없이도 엑소좀과 함께 배양한 세포에서 miRNA 표적의 하향-조절을 보여준다 (Kosaka *et al.*, 2013; Narayanan *et al.*, 2013; Pegtel *et al.*, 2010). MiR-182-5p는 발암 소포 처리시 MCF10A 세포에서 상향-조절되는 miRNA 중 하나이며 miR-182-5p 표적인 Smad4 (Hirata *et al.*, 2012)는 이들 세포의 발암 소포 처리시 하향-조절되는 유전자 중 하나이다 (도 7E). 배양 기간 도중 발암 소포 내 miR-182-5p의 상향-조절은 관찰되지 않았으며 전구-miR182-5p를 발암 소포에서 검출하지 못했다 (도 17E). 그러므로, 발암 소포는 또한 전구-miR를 프로세싱할 필요없이 성숙 miRNA를 포섭한다. 만약 그러한 성숙 miR이 적절한 화학량론적 양인 경우에, 이들은 앞서 나타난 바와 같이 수용 세포의 유전자 발현을 조절할 수 있을 것이다 (Ismail *et al.*, 2013; Kogure *et al.*, 2011; Kosaka *et al.*, 2013; Narayanan *et al.*, 2013; Pegtel *et al.*, 2010; Valadi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). 그러나, 만일 일부 성숙 miRNA가 엑소좀에 존재하지 않지만 이들의 전구-miRNA는 존재하는 경우, 이들은 성숙 RLC 연합된 miRNA로 프로세싱될 것이기 때문에 여전히 이들의 표적에 생물학적 효과를 줄 수 있다.

[0133] 72h 배양된 발암 소포로 처리된 MCF10A 세포의 세포 생존능 및 증식은 증가하였고, 갓 단리된 발암 소포를 사용했을 때는 이런 것이 관찰되지 않았다 (도 7F). MCF10A 세포를 항-Dicer 항체를 함유하는 MDA-MB231 유래 발암 소포로 처리했을 때 차이는 관찰되지 않았다 (도 7F). 발암 소포로 처리한 MCF10A 세포의 콜로니 형성 능력에 있어서도 동일한 패턴이 유효하다 (도 7G 및 17F). 72h-배양된 발암 소포로 처리한 MCF10A 세포는 비-처리된 세포와 비교할 때 콜로니를 형성한다 (도 7G). 그러한 콜로니 형성은 갓 단리된 발암 소포 또는 AB Dicer 발암 소포를 사용하였을 때는 관찰되지 않았다 (도 7G).

[0134] *발암 소포는 비-종양형성 상피 세포의 종양 형성을 유도하고 섬유아세포를 활성화시킨다.* 최근 연구는 골수 간엽 기질 세포에서 유래한 엑소좀이 다중 골수종 세포 성장을 지원함을 시사한다 (Roccaro *et al.*, 2013). MCF10A 및 발암 소포에 미리 노출시킨 MCF10A 세포 (MCF10A 세포-발암 소포)의 기능적 '발암 능력'을 다루기 위해, 이들 세포를 최근 기술된 프로토콜과 유사하게 암컷 nu/nu 마우스의 유방 지방 세포에 동소위 주입하였다 (Luga *et al.*, 2012). MCF10A 세포는 앞서 역시 보고된 바와 같이 이들 마우스에서 종양을 형성하지 않았다 (Mavel *et al.*, 2002; Thery *et al.*, 2002) (도 7H). MCF10A 세포-발암 소포, 그리고 대조 MDA-MB231 세포는 21 일 후에 종양을 형성하였다 (도 7H). 항-Dicer 항체를 포함하는 (단, 대조 항-액틴 항체는 미포함) 발암 소포와 함께 배양시킨 MCF10A 세포는 종양 부피의 상당한 감소를 보였다 (도 7H). 이들 결과는 MCF10A 세포가 Dicer 단백질을 포함하는 발암 소포에 노출되었을 때 발암성으로 전환됨을 지지한다 (도 7F-H 및 도 17F).

[0135] *암 환자로부터의 혈청 엑소좀은 Dicer를 포함하며 전구miRNA를 프로세싱하여 성숙 miRNA를 생성한다.* 인간 종양의 엑소좀을 RISC 단백질에 대해 검사하였다. 암 세포 특이성을 얻기 위해, 갓 단리한 인간 원발성 난소, 유방 및 자궁내막 종양 조각을 암컷 무흉선 nu/nu 마우스의 적절한 장기에 동소위 이식하였다 (도 18A-B). 이들 마우스로부터의 혈청 엑소좀을 전자 현미경으로 평가하였다 (도 18C). 이들 엑소좀으로부터 단리한 내용물의 크기 배제 단백질 블롯은 배타적으로 인간 기원의 Dicer 단백질 (hsa-Dicer)의 존재를 나타내었다 (도 8A 및 도 18D). 4T1-유래 엑소좀 및 4T1 세포로부터의 단백질 추출물을 대조로서 사용하여 상이한 분자량을 나타내는 마우스 기원의 Dicer (mmu-Dicer)를 확인하였다 (도 8A).

[0136] MDA-MB231 세포로부터의 발암 소포를 인간 진피 섬유아세포 (HDF)와 함께 배양하였다. 발암 소포 배양된 섬유아세포의 전체적인 유전자 발현 프로파일링은 대조 세포와 비교할 때, 이들의 전사체에 대한 상당한 영향을 드러내었다. αSMA (ACTA) (18 배), COL1A1 (12 배), TGFβ1 (15 배), CTGF (8 배), Ras (6 배) 및 ERK (4 배)의 상향-조절을 관찰하였다. 발암 소포와 배양한 섬유아세포는 더 높은 속도로 증식하였다 (도 8I). 이들 결과는 발암 소포가 기질의 섬유아세포로 하여금 근섬유아세포 표현형과 닮아지게 하고 암종-연관 섬유아세포와 연관된 특징적인 특성을 보이도록 활성화시킴을 시사한다.

[0137] 다음으로, 엑소좀을 8명의 건강한 개체 (H) 및 11명의 유방 암종을 지닌 환자 (BC)로부터의 100 μl의 신선한 혈청 샘플로부터 단리하였다 (도 8B). 지질 이중층 막을 전자 현미경으로 엑소좀에서 구별하였다 (도 8C). 유방암 환자의 혈청은 건강한 공여자의 혈청에 비해 상당히 더 많은 엑소좀을 함유하였다 (도 8D). 동일한 수의 엑소좀을 24 및 72h을 위한 배양물에 배치하였을 때, 6가지 전구-miRNA가 배타적으로 유방암 환자에서 하향조절되어 있으며 이들의 각각의 성숙 miRNA가 72h의 배양 후에 상향-조절되어 있었음을 발견하였고, 이는 전구-miRNA가 유방암 환자의 신선한 혈청으로부터의 엑소좀에서 성숙 형태로 프로세싱되었으며 건강한 대조에서는 그렇지 못했음을 시사한다 (도 8E-F). 다음으로, 엑소좀 단독 또는 MCF10A 세포와 조합된 엑소좀을 암컷 nu/nu 마우스의 유방 지방 패드에 동소위 주입하였다. MCF10A 세포와 조합된 유방암 환자로부터 유래한 11개의 혈청 엑소좀 중 다섯에서 종양을 형성한 반면 건강한 공여자 엑소좀 또는 엑소좀 단독에서는 종양이 형성되지 않았다 (도 8G). 흥미롭게도, 종양을 형성하는 엑소좀은 또한 72h 배양 후 성숙 miRNA의 양에서 가장 높은 배수-변화 증가를 보였다 (도 8E-F).

[0138] 5명의 건강한 개체 (C46, C45, C44, C43, 및 C41) 및 4명의 전이성 유방 암종을 가진 환자 (Met219, Met354, Met299 및 Met356)로부터 취한 혈청 샘플의 새로운 집합으로부터 엑소좀을 추가로 단리하였다. 엑소좀 내 Dicer 발현이 전이성 유방 암종 샘플에서만 관찰되었고 건강한 개체의 혈청으로부터의 엑소좀에서는 그렇지 않았다 (도 8H).

[0139] **표 5.** 발암 소포 (MDA-MB231 유래) 및 정상 소포 (MCF10A 유래) 사이에 차등하게 발현된 miRNA.

표 5

[0140]

miRNA	p 값
mmu-miR-709	1.30E-06
hsa-miR-1308	3.71E-06
mmu-miR-615-3p	9.08E-06
hsa-miR-1260b	1.06E-05
mmu-miR-1937a	1.36E-05
mmu-mir-321-A	1.54E-05
hsa-miR-615-3p	1.80E-05
hsa-miR-1979	2.10E-05
mmu-miR-1937b	2.72E-05
hsa-mir-373	3.15E-05
mmu-miR-1937c	3.28E-05
hsa-miR-1273d-P	3.68E-05
mmu-miR-720	4.08E-05
mmu-miR-1274a	4.45E-05
hsa-mir-565-A	6.63E-05
mmu-miR-1931	6.77E-05
hsa-miR-1246	7.35E-05
hsa-mir-594-P	7.56E-05
hsa-mir-321-A	7.83E-05

mmu-miR-2145-1-P	9.36E-05
hsa-mir-639-P	9.54E-05
hsa-miR-720	0.000112771
hsa-miR-1280	0.000116
mmu-miR-3473	0.000136388
hsa-miR-1260	0.000178848
hsa-miR-1281	0.000193167
mmu-miR-1224-P	0.00019941
mmu-miR-690	0.000223064
hsa-miR-375-P	0.000242513
hsa-miR-4301	0.000254614
mmu-miR-700	0.000322167
mmu-miR-125b-5p	0.000333431
mmu-miR-1191-P	0.000412736
hsa-miR-1274a	0.000420621
hsa-miR-3197	0.00042765
mmu-miR-1935	0.000459256
hsa-miR-1975-P	0.000467699
hsa-miR-4324	0.000595518
hsa-miR-886-3p	0.00060906
hsa-miR-1274b	0.000643024
mmu-miR-1957	0.000679996
hsa-miR-933	0.000752624
hsa-mir-675	0.000775607
hsa-miR-595	0.000835784
mmu-miR-2137	0.000867405
hsa-mir-572-P	0.000935968
mmu-miR-1195	0.000971222
hsa-miR-4294-P	0.001008217
mmu-mir-1899-P	0.00104201
mmu-miR-689-P	0.001048727
hsa-miR-199b-3p	0.001330193
hsa-miR-3117-P	0.001331776
mmu-mir-321-P	0.001407081
mmu-miR-1961-P	0.001479699
hsa-mir-10a	0.001756816
mmu-miR-669d-P	0.001842801
mmu-miR-1937b-2-P	0.001855411
hsa-miR-3125-P	0.00206976
mmu-miR-1934-P	0.002222993
hsa-miR-574-3p	0.002231887
hsa-miR-718	0.002533178
mmu-miR-1198	0.002640837
mmu-miR-2182-P	0.002722356
hsa-miR-1273	0.002723198
mmu-miR-2133-P	0.002794947
hsa-miR-92b*	0.003046008
hsa-miR-1290	0.003307286
hsa-miR-448	0.003318093
mmu-miR-689	0.003367203
mmu-miR-449a	0.003657703
mmu-miR-1937b-4-P	0.004021961
hsa-miR-4286	0.004068181
mmu-miR-1947	0.00408589
mmu-miR-342-3p	0.004178728
hsa-miR-1303-P	0.004771531
mmu-miR-2132	0.004826438
hsa-miR-4321-P	0.004925885

hsa-miR-4256-P	0.004994658
hsa-miR-4311	0.005120539
mmu-miR-130a	0.005138148
mmu-miR-1939	0.005186979
hsa-miR-1268-P	0.005383176
mmu-miR-31	0.005491579
mmu-miR-99b	0.005498217
mmu-miR-2141	0.005742427
hsa-miR-1202-P	0.005825202
mmu-miR-466b-3p	0.005831681
mmu-miR-2133	0.005962416
hsa-miR-1268	0.006022349
hsa-miR-466	0.006338384
mmu-miR-494	0.006386665
hsa-miR-1289	0.006571828
hsa-miR-320b	0.006612583
hsa-miR-4254	0.006670963
hsa-mir-7-3-P	0.00673441
hsa-miR-923	0.006748425
hsa-miR-764	0.006790693
mmu-miR-291a-3p	0.007141562
mmu-miR-883b-3p	0.007204478
hsa-mir-594-A	0.00721747
mmu-miR-1948-P	0.007524668
hsa-miR-206	0.007553353
hsa-mir-565-P	0.007700663
mmu-miR-467e*	0.00778865
hsa-miR-1826	0.007812174
mmu-miR-467a*	0.007840082
mmu-miR-1983	0.007889552
hsa-miR-324-5p	0.008058633
mmu-let-7c	0.008070282
mmu-miR-1965	0.00810043
hsa-mir-632-P	0.008277449
hsa-miR-181a*MM2GT/AC	0.008292477
hsa-miR-1265	0.008367622
hsa-miR-323b-5p	0.008373161
hsa-mir-1914	0.008444953
hsa-mir-1910	0.008458754
hsa-miR-21	0.008557419
hsa-miR-431*	0.008595529
hsa-miR-3135-P	0.008851151
mmu-miR-187-P	0.009290275
mmu-miR-126-3p	0.009334952
mmu-miR-669a-P	0.00943601
hsa-miR-367	0.009568574
mmu-mir-320-P	0.009788835
hsa-miR-181a*MM1G/C	0.009821714
mmu-miR-484-P	0.009847016
mmu-miR-467c-P	0.010318688
hsa-miR-3154	0.010452692
mmu-miR-466d-3p	0.01047819
hsa-miR-3162-P	0.010642567
mmu-miR-201	0.010827783
mmu-miR-1946a	0.010877863
hsa-miR-937	0.011009279
hsa-miR-3147	0.011883963
hsa-mir-596-P	0.012205467

hsa-miR-3148	0.012245577
hsa-miR-1304	0.012451991
hsa-miR-222MM2GG/AC	0.012512207
mmu-miR-125a-5p	0.012630083
hsa-miR-1272-P	0.012893462
hsa-miR-638	0.012956727
hsa-mir-320	0.013366703
hsa-miR-545*	0.013713081
hsa-mir-1908-P	0.01374103
hsa-let-7d-v2-P	0.013846844
mmu-mir-30d-P	0.014771375
hsa-miR-4297	0.015365603
mmu-miR-182	0.015432962
hsa-miR-3166-P	0.015893116
hsa-miR-494	0.015960208
mmu-miR-669o-P	0.016133286
hsa-miR-566	0.01616152
mmu-miR-1188	0.016736136
mmu-miR-2134-AP	0.016811955
hsa-miR-4259-P	0.016856716
mmu-miR-152	0.01715464
mmu-miR-2134	0.017178929
hsa-miR-3193-AP	0.017496022
hsa-miR-125b	0.017917521
hsa-miR-3124-P	0.018466818
hsa-miR-10b	0.018671177
hsa-miR-455-5p	0.018771585
mmu-miR-144	0.019121516
hsa-miR-130a	0.019424172
hsa-miR-1285	0.019710834
hsa-miR-516b*	0.020003951
hsa-miR-27a	0.020049082
hsa-miR-138-1*	0.020302422
mmu-miR-471	0.020513954
hsa-miR-4298-P	0.020520647
hsa-miR-301b	0.0205242
hsa-mir-147-P	0.020570657
hsa-miR-362-5p	0.020602873
mmu-mir-471-P	0.020639505
mmu-miR-466a-3p	0.020737186
hsa-miR-561	0.020878532
hsa-miR-486-5p	0.021122352
mmu-miR-2861	0.021313137
hsa-miR-587	0.021396357
mmu-miR-375	0.021423748
hsa-mir-329-2-P	0.021718025
mmu-miR-2861-P	0.022230123
hsa-miR-144*	0.022500042
hsa-miR-1255a-P	0.022928296
hsa-mir-519a-2-P	0.023328916
hsa-miR-34c-5p	0.023452529
mmu-miR-466e-3p	0.023486196
mmu-miR-743b-5p	0.023621503
mmu-mir-350-P	0.023797354
mmu-miR-181d	0.024929082
hsa-miR-376a*	0.025160569
hsa-miR-1308-P	0.025400926
mmu-miR-467g	0.025684158

mmu-miR-1946a-P	0.025903246
hsa-miR-147-P	0.025981647
hsa-miR-923-P	0.026407247
mmu-miR-465c-5p	0.026498492
hsa-miR-891a	0.026826475
hsa-miR-28-5p	0.026908406
hsa-miR-4292	0.02699168
mmu-miR-677-P	0.027117156
hsa-miR-4257	0.027412394
hsa-miR-4326	0.027447003
hsa-miR-17*MM2GG/AA	0.02747134
hsa-miR-939-P	0.027590618
mmu-miR-2182	0.027770773
hsa-miR-220c-P	0.027834269
hsa-miR-3132-P	0.027949304
hsa-miR-532-5p	0.028123552
mmu-miR-1947-P	0.028342198
mmu-miR-29a	0.028448253
hsa-miR-3162	0.028472579
hsa-miR-375MM1C/G	0.028539316
hsa-miR-768-3p	0.028631264
mmu-miR-182-P	0.028668937
mmu-miR-205-P	0.029630816
hsa-miR-505	0.029688956
hsa-miR-3146-P	0.02981021
mmu-miR-721	0.029874269
mmu-miR-376c	0.030446032
hsa-miR-1179-P	0.030947356
mmu-miR-1970	0.030975459
hsa-miR-3133-P	0.031120572
hsa-miR-200c	0.031203313
hsa-miR-220a	0.031358991
mmu-miR-100	0.031556595
hsa-miR-1255b	0.031601448
hsa-miR-222MM1G/A	0.031650652
hsa-miR-885-3p	0.031822949
hsa-miR-517b	0.032138191
hsa-miR-200a	0.032181877
hsa-miR-3141	0.032551657
mmu-miR-669h-3p	0.033076965
hsa-miR-1301	0.033141515
hsa-miR-877	0.033292052
hsa-mir-941-2	0.033355824
hsa-mir-487b-P	0.033372231
hsa-miR-4302	0.033621907
hsa-miR-99b	0.033827759
hsa-miR-1253	0.034018422
hsa-let-7a*	0.034034943
hsa-miR-34aMM2CT/TC	0.034301895
hsa-miR-3181-P	0.034366501
hsa-miR-3200	0.034397879
hsa-miR-3129-P	0.034538091
hsa-miR-93*	0.03464146
hsa-miR-548q-P	0.035140723
mmu-miR-466g	0.035388049
mmu-miR-155	0.035624947
hsa-miR-2278-P	0.03584678
hsa-miR-3065-5p	0.035885091

hsa-miR-633	0.035994294
hsa-miR-4265	0.036055664
mmu-miR-2135-P	0.036119609
hsa-miR-190	0.036305474
mmu-miR-669f	0.036533893
hsa-miR-1323	0.036541729
hsa-miR-588	0.036661363
mmu-miR-183*	0.037276389
hsa-mir-941-4	0.037411697
hsa-mir-1913	0.037527439
hsa-miR-2116*	0.037682483
hsa-miR-1178	0.037847724
mmu-miR-196a	0.038163687
mmu-miR-574-3p	0.038418252
hsa-miR-346	0.038809144
mmu-miR-1199	0.039417628
mmu-miR-681	0.039465517
hsa-miR-4292-P	0.039841449
hsa-miR-522	0.040524939
hsa-mir-611-P	0.040860413
hsa-miR-3171	0.040895673
hsa-miR-635	0.041506047
hsa-miR-1197-P	0.041944121
hsa-miR-604	0.04380685
mmu-let-7a*	0.043829675
hsa-miR-335	0.043971349
mmu-miR-466c-3p	0.044407376
mmu-miR-466i	0.044504428
hsa-miR-1297	0.04456723
mmu-miR-338-5p	0.044824503
hsa-mir-526a-2-P	0.044992512
hsa-miR-181aMM2GC/AG	0.045005369
hsa-miR-15b*	0.0452752
hsa-miR-924-P	0.045840226
mmu-miR-190-P	0.046060702
hsa-miR-345	0.046092233
mmu-miR-711	0.046378698
hsa-miR-3116-2-P	0.046593825
hsa-miR-99a	0.046936625
mmu-miR-26a	0.04716311
hsa-miR-1248-P	0.047256233
mmu-miR-721-P	0.047540414
mmu-miR-801-P	0.048152879
hsa-miR-1826-P	0.048243592
hsa-miR-1236	0.048451235
hsa-miR-339-5p	0.048498093
mmu-miR-804	0.04863614
mmu-miR-467d*	0.048653868
mmu-miR-1191	0.048884442
hsa-miR-148a	0.048962197
hsa-miR-141	0.049152638
mmu-miR-1937a-P	0.049351966
mmu-miR-696	0.049529754
hsa-miR-302a	0.049722628

[0141] **표 6.** 발암 소포 (MDA-MB231 유래) 및 Dicer 항체를 갖는 발암 소포 (MDA-MB-231 유래) 사이에 차등하게 발현된 miRNA.

표 6

[0142]

miRNA	배수 변화
mmu-miR-3470a-P	-68.72008593
mmu-miR-1186	-37.7790082
mmu-miR-3470b	-25.9441337
mmu-miR-1935	-21.29735527
mmu-miR-3473-P	-17.73956758
hsa-miR-665-P	-11.30652094
mmu-miR-3470a	-21.53678167
hsa-miR-1975-P	-8.378567946
mmu-miR-1195	-14.95080951
mmu-miR-1196	-41.418791
mmu-miR-669h-3p	7.716169349
mmu-miR-4661	6.182505826
mmu-miR-1954-P	-8.004541887
mmu-miR-681-P	-5.576609952
mmu-miR-467a*	7.720120341
hsa-miR-4294-P	-6.14881956
hsa-miR-718	-5.926179859
hsa-mir-1910-P	-5.828360182
hsa-miR-3188-P	-7.974527314
hsa-miR-324-5p	-5.711776077
mmu-miR-1937b-4-P	-5.520796704
mmu-miR-669d-P	6.842367137
mmu-miR-3473	-5.977639047
hsa-miR-595	-6.658387264
hsa-miR-3197	-6.118703616
hsa-miR-4256-P	4.894289461
mmu-miR-201	5.429305446
mmu-miR-2861-P	-5.546034309
mmu-miR-3471-2-P	-5.968684885
hsa-miR-3120-P	-5.809647124
mmu-miR-494	-5.460136383
mmu-miR-690	-6.785641527
hsa-mir-591-P	-4.676566053
hsa-miR-943	-4.21472556
hsa-miR-24-2*	-5.267717705
hsa-miR-891a	3.970259655
mmu-miR-467e*	4.371589059
mmu-miR-196a	-4.673219124
mmu-miR-763-P	-4.837159778
mmu-miR-689-P	-4.006113822
mmu-miR-1961-P	-4.02458343
mmu-miR-709	-43.11955582
hsa-miR-3147	-4.083582871
hsa-miR-1323	3.866709935
mmu-miR-761	-4.758191473
hsa-miR-1979	-22.63130882
hsa-miR-1255b	3.856857003
mmu-miR-3072	-3.955191268
hsa-miR-1248-P	3.690795669
hsa-mir-147-P	4.119353729
hsa-miR-3195	-5.808376336
hsa-miR-1273d-P	-7.045907865
mmu-miR-207	-4.467339352
mmu-miR-689	-3.348018214
hsa-miR-4257	-4.323649906

mmu-miR-466d-3p	3.585840199
hsa-miR-923	-3.344759672
mmu-miR-1931	-4.744652197
hsa-mir-650-P	-6.161006285
mmu-miR-466g	3.874674458
mmu-miR-1191-P	-4.045803649
hsa-mir-1538	-3.744109297
hsa-miR-1246	-3.337472797
hsa-miR-124*	3.31414605
hsa-miR-4321-P	-7.691122096
mmu-miR-1946a-P	-6.219634371
hsa-miR-1972-2-P	-5.073720863
hsa-miR-3200	3.335177401
mmu-miR-1947	-7.215369611
mmu-miR-669o-P	3.389226018
mmu-miR-466e-3p	3.534048216
mmu-miR-707	3.877366764
hsa-miR-4297	-6.529597429
hsa-miR-4313	-4.609062464
mmu-miR-1935-AP	-10.94537064
mmu-miR-467g	4.667383343
mmu-miR-2133	-4.243694889
hsa-miR-923-P	-3.64025311
hsa-miR-1236	3.197494004
hsa-miR-1280	-6.234163314
mmu-miR-1937b-2-P	-5.358528363
mmu-miR-499-P	3.275110007
hsa-miR-1263-P	3.338653962
hsa-miR-466	3.265124658
hsa-mir-595-P	-3.780075724
hsa-miR-1285-1-P	-3.392089631
mmu-miR-338-5p	3.139715849
hsa-miR-3140	3.152896366
mmu-miR-2182	-4.235843782
hsa-miR-23b*	-5.32306966
hsa-mir-639-P	-7.052485203
mmu-miR-1947-P	-5.939897094
mmu-miR-22	-3.74236459
mmu-miR-1970	-3.108998272
mmu-miR-665-P	-3.597686151
hsa-miR-3065-5p	3.113930424
mmu-miR-467c-P	3.155074202
hsa-miR-1268	-2.922890303
mmu-miR-24-2*	-3.48139554
hsa-mir-1914	-3.832959976
hsa-miR-3118-5-P	2.977569863
mmu-miR-1306-P	-3.281316308
mmu-miR-669f	5.194629536
mmu-miR-466b-3p	3.438581421
hsa-miR-1268-P	-3.678227949
hsa-mir-1913	-3.946642192
mmu-miR-3470b-P	-4.037857355
mmu-miR-32	2.989834039
hsa-miR-1826-P	-4.872011411
hsa-miR-147-P	3.923947787
hsa-miR-3172-P	3.056599217
hsa-miR-801	-6.14009908
hsa-miR-941-1	-4.658601465

mmu-miR-301a-P	2.770796433
mmu-miR-669a-P	3.643950881
hsa-miR-1289	3.559525037
hsa-miR-548j	2.858203465
hsa-miR-877*	-3.015914917
hsa-miR-10a	-5.70499997
mmu-miR-181c	2.79663413
hsa-miR-3149-P	3.067063437
mmu-miR-3099*	-3.100792371
mmu-miR-705-P	-4.314489552
mmu-miR-2861	-3.008526128
hsa-miR-1976	-2.80557125
mmu-miR-1934-P	-6.614312993
hsa-miR-138-1*	2.769430194
hsa-miR-1243	2.78669354
hsa-miR-3160	-3.16046745
hsa-miR-500	2.766201976
mmu-miR-1945	-3.975181107
hsa-mir-941-4	-4.644133225
hsa-miR-4301	-16.10443714
hsa-miR-1208	-3.230411171
hsa-mir-565-A	-8.232319234
hsa-miR-1244	2.796864338
mmu-miR-669j	3.675114173
hsa-miR-4314	2.810648214
hsa-miR-502-5p	2.743400714
hsa-miR-371-5p	2.607678279
mmu-miR-10b	-3.034387515
mmu-miR-26a	-3.497092003
mmu-miR-483*	-2.743822775
hsa-mir-487b-P	4.073173842
mmu-miR-1930-P	-3.656852693
hsa-miR-1255a	2.690838416
hsa-miR-202	-3.352756633
hsa-miR-4311	-2.706852207
hsa-miR-1226*	2.753774039
mmu-miR-1943-P	2.568476663
hsa-mir-594-P	-7.693094002
hsa-miR-21	-3.331077571
mmu-miR-466a-3p	2.590518002
hsa-miR-1301-P	2.83454983
hsa-miR-638	-5.006318026
hsa-mir-320	-3.08053158
mmu-miR-667	-2.55941239
mmu-miR-27a	2.535988521
hsa-miR-937	-3.726272762
hsa-miR-1255a-P	3.247591046
mmu-miR-505	2.610666762
hsa-miR-1263	2.736571865
mmu-miR-302b*	2.945119065
mmu-miR-721-P	2.91504884
hsa-miR-18b	2.611682702
hsa-mir-31	-2.702014494
mmu-miR-801-A	-6.683601538
has-let-7f-1*	3.908401267
hsa-miR-1259-P	2.644459942
mmu-mir-320-P	-3.437080879
mmu-miR-1939	-4.465923575

hsa-miR-1228	-2.567882638
hsa-miR-483-3p	-2.775662208
hsa-miR-129-5p	2.655425404
mmu-miR-145*	2.552327584
hsa-miR-544	3.017286257
hsa-miR-3124-P	3.475660577
hsa-let-7a*	3.67482271
hsa-miR-1308-P	-2.815549142
hsa-miR-124	2.518148474
mmu-miR-500-P	2.439916722
hsa-miR-589	2.619270955
hsa-miR-155MM1G/T	-3.153648547
hsa-miR-1254	3.039211354
hsa-miR-1259	2.60142506
mmu-mir-1904	2.553756257
hsa-miR-320e	-3.6162361
hsa-mir-373	-9.005026193
hsa-miR-3191-P	2.777191568
mmu-miR-700	-4.536931094
hsa-mir-539-P	2.617416119
hsa-miR-4259-P	3.451286701
hsa-miR-548h	2.525655861
mmu-miR-669e-P	2.554714867
mmu-miR-207-P	-3.619675577
hsa-mir-1908-P	-3.739948569
hsa-miR-4254	-4.156361026

[0143] * * *

[0144] 본 명세서에 개시되고 청구된 모든 방법은 본 개시에 비추어 무수한 실험을 하지 않고도 이행하고 실시할 수 있다. 본 발명의 구성 및 방법이 바람직한 구체예의 방식으로 기술되었지만, 본 발명의 개념, 사상 및 범위에서 벗어나지 않고서 본 명세서에 기술된 방법 및 방법의 단계 또는 단계의 순서에서 변화들이 적용될 수 있음이 당해 분야의 숙련가에게는 명백할 것이다. 더 상세하게는, 화학적으로 및 생리학적으로 연관된 특정 물질이 본 명세서에 기술된 물질을 대체할 수 있으며 동시에 동일하거나 유사한 결과를 도출할 수 있음이 명백할 것이다. 당해 분야의 숙련가에게 명백한 그러한 모든 유사한 치환 및 변형은 첨부되는 청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 사상, 범위 및 개념 내에 속하는 것으로 간주된다.

[0145] **참고문헌**

[0146] 하기의 참고문헌은, 본 명세서에 제시된 것들에 예시적이고 절차적이거나 달리 세부 사항을 보충하는 내용을 제공하는 한도 내에서, 본 명세서에 참고로서 특정하게 포함된다.

[0147] Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. Nature cell biology 10, 619-624.

[0148] Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., and Wood, M.J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nature biotechnology 29, 341-345.

[0149] Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. Nature 431, 350-355.

[0150] Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., *et al.* (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 5003-

[0151] 5008.

[0152] Ausubel *et al.*, Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons Ltd, Wiley Interscience,

2003.

[0153] Bang, G.M., and Setabutr, P. (2010). Periocular capillary hemangiomas: indications and options for treatment. Middle East Afr J Ophthalmol 17, 121-128.

[0154] Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136, 215-233.

[0155] Bartels, C.L., and Tsongalis, G.J. (2009). MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. Clinical chemistry 55, 623-631.

[0156] Benitez-vieyra, S., Medina, A.M., and Cocucci, A.A. (2009). Variable selection patterns on the labellum shape of Geoblasta pennicillata, a sexually deceptive orchid. J Evol Biol 22, 2354-2362.

[0157] Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. Nature genetics 35, 215-217.

[0158] Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature 436, 740-744.

[0159] Cocucci, E., Racchetti, G., and Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends Cell Biol 19, 43-51.

[0160] Cosacov, A. *et al.* New insights into the phylogenetic relationships, character evolution, and phytogeographic patterns of Calceolaria (Calceolariaceae). Am J Bot 96, 2240-2255, (2009).

[0161] de Laurentiis, A., Gaspari, M., Palmieri, C., Falcone, C., Iaccino, E., Fiume, G., Massa, O., Masullo, M., Tuccillo, F.M., Roveda, L., *et al.* (2011). Mass spectrometry-based identification of the tumor antigen UN1 as the transmembrane CD43 sialoglycoprotein. Mol Cell Proteomics 10, M111 007898.

[0162] Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. The Journal of biological chemistry 273, 20121-20127.

[0163] Fang, H., Qiu, L., Vitkin, E., Zaman, M. M., Andersson, C., Salahuddin, S., Kimerer, L. M., Cipolloni, P. B., Modell, M. D., Turner, B. S., *et al.* (2007). Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy. Applied optics 46, 1760-1769.

[0164] Filipowicz, W. (2005). RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. Cell 122, 17-20.

[0165] Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T., and Oshimura, M. (2004). Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. Nature cell biology 6, 784-791.

[0166] Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., and Illei, G. G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. PloS one 7, e30679.

[0167] Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. Nature cell biology 11, 1143-1149.

[0168] Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell 123, 631-640.

[0169] Grelier, G., Voirin, N., Ay, A.S., Cox, D.G., Chabaud, S., Treilleux, I., Leon-Goddard, S., Rimokh, R., Mikaelian, I., Venoux, C., *et al.* (2009). Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype. British journal of cancer 101, 673-683.

[0170] Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol 20, 621-667.

[0171] Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., and Agnati, L.F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells

release exosomes carrying mtDNA. J Neural Transm 117, 1-4.

[0172] Gyorgy, B., Szabo, T.G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., *et al.* (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell Mol Life Sci 68, 2667-2688.

[0173] Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. EMBO reports 6, 961-967.

[0174] Hirata, H., Ueno, K., Shahryari, V., Tanaka, Y., Tabatabai, Z. L., Hinoda, Y., and Dahiya, R. (2012). Oncogenic miRNA-182-5p targets Smad4 and RECK in human bladder cancer. PloS one 7, e51056.

[0175] Hood, J.L., San, R.S., and Wickline, S.A. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. Cancer research 71, 3792-3801.

[0176] Ismail, N., Wang, Y., Dakhlallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T. D., Tridandapani, S., *et al.* (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. Blood 121, 984-995.

[0177] Itzkan, I., Qiu, L., Fang, H., Zaman, M. M., Vitkin, E., Ghiran, I. C., Salahuddin, S., Modell, M., Andersson, C., Kimerer, L. M., *et al.* (2007). Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy monitors organelles in live cells with no exogenous labels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 17255-17260.

[0178] Kahlert, C., and Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. J Mol Med (Berl) 91, 431-437.

[0179] Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., *et al.* (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. Cancer science 96, 111-115.

[0180] Khairkar, P.H., Bang, G.M., Singh, A.B., and Tiple, P.G. (2010). Possible cross-sensitivity between sertraline and paroxetine in a panic disorder patient. Indian J Pharmacol 42, 110-111.

[0181] King, H.W., Michael, M.Z., and Gleadle, J.M. (2012). Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. BMC Cancer 12, 421.

[0182] Kogure, T., Lin, W. L., Yan, I. K., Braconi, C., and Patel, T. (2011). Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. Hepatology 54, 1237-1248.

[0183] Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., and Ochiya, T. (2013). Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. The Journal of biological chemistry 288, 10849-10859.

[0184] Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. Nature genetics 39, 673-677.

[0185] Kumar, S., Ansari, F.A., and Scaria, V. (2009). Prediction of viral microRNA precursors based on human microRNA precursor sequence and structural features. Virol J 6, 129.

[0186] Lee, T.H., D'Asti, E., Magnus, N., Al-Nedawi, K., Meehan, B., and Rak, J. (2011). Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. Semin Immunopathol 33, 455-467.

[0187] Li, L., Zhu, D., Huang, L., Zhang, J., Bian, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, C. Y., and Zen, K. (2012). Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. PloS one 7, e46957.

[0188] Liu, C. G., Calin, G. A., Volinia, S. & Croce, C. M. MicroRNA expression profiling using microarrays.

Nat Protoc 3, 563-578, (2008).

[0189] Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402-408.

[0190] Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., Iessi, E., *et al.* (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. PloS one 4, e5219.

[0191] Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 435, 834-838.

[0192] Luga, V., Zhang, L., Viloria-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M., and Wrana, J.L. (2012). Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration. Cell 151, 1542-1556.

[0193] Luzio, J.P., Parkinson, M.D., Gray, S.R., and Bright, N.A. (2009). The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. Biochemical Society transactions 37, 1019-1021.

[0194] Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R.A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. Nature 449, 682-688.

[0195] MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., and Doudna, J. A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 512-517.

[0196] Maehama, T. (2007). PTEN: its deregulation and tumorigenesis. Biological & pharmaceutical bulletin 30, 1624-1627.

[0197] Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. Genes & development 19, 2979-2990.

[0198] Mao, X., Sun, Y., and Tang, J. (2013). Serum miR-21 is a diagnostic and prognostic marker of primary central nervous system lymphoma. Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology.

[0199] Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., *et al.* (2010). A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. Cell 141, 1195-1207.

[0200] Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. Journal of proteomics 73, 1907-1920.

[0201] Mavel, S., Thery, I., and Gueiffier, A. (2002). Synthesis of imidazo[2,1-a]phthalazines, potential inhibitors of p38 MAP kinase. Prediction of binding affinities of protein ligands. Arch Pharm (Weinheim) 335, 7-14.

[0202] McCready, J., Sims, J. D., Chan, D., and Jay, D. G. (2010). Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. BMC cancer 10, 294.

[0203] Melo, S., Villanueva, A., Moutinho, C., Davalos, V., Spizzo, R., Ivan, C., Rossi, S., Setien, F., Casanovas, O., Simo-Riudalbas, L., *et al.* (2011). Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 4394-4399.

[0204] Melo, S.A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G., *et al.* (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. Cancer cell 18, 303-315.

[0205] Melo, S.A., Ropero, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A., Rossi, S., Fernandez,

A.F., Carneiro, F., Oliveira, C., *et al.* (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. Nature genetics 41, 365-370.

[0206] Merritt, W.M., Lin, Y.G., Han, L.Y., Kamat, A.A., Spannuth, W.A., Schmandt, R., Urbauer, D., Pennacchio, L.A., Cheng, J.F., Nick, A.M., *et al.* (2008). Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. The New England journal of medicine 359, 2641-2650.

[0207] Min, M., Bang, G.S., Lee, H., and Yu, B.C. (2010). A photoswitchable methylene-spaced fluorinated aryl azobenzene monolayer grafted on silicon. Chem Commun (Camb) 46, 5232-5234.

[0208] Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M. A., Bernad, A., and Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. Nature communications 2, 282.

[0209] Miyata, Y. (2005). Hsp90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents. Current pharmaceutical design 11, 1131-1138.

[0210] Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., *et al.* (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. Blood 119, 756-766.

[0211] Narayanan, A., Iordanskiy, S., Das, R., Van Duyne, R., Santos, S., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Dalby, E., Iglesias-Ussel, M., *et al.* (2013). Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA. The Journal of biological chemistry 288, 20014-20033.

[0212] Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., and Calin, G.A. (2009). MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. Nature reviews Cancer 9, 293-302.

[0213] Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., *et al.* (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. Nature cell biology 12, 19-30; sup pp 11-13.

[0214] Ozen, M., Creighton, C.J., Ozdemir, M., and Ittmann, M. (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. Oncogene 27, 1788-1793.

[0215] Pant, S., Hilton, H., and Burczynski, M.E. (2012). The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. Biochemical pharmacology 83, 1484-1494.

[0216] Park, H.J., Bang, G., Lee, B.R., Kim, H.O., and Lee, P.H. (2011). Neuroprotective effect of human mesenchymal stem cells in an animal model of double toxin-induced multiple system atrophy parkinsonism. Cell Transplant 20, 827-835.

[0217] Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruijl, T. D., Wurdinger, T., and Middeldorp, J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 6328-6333.

[0218] Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., *et al.* (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. Nat Med 18, 883-891.

[0219] Razi, M., and Futter, C. E. (2006). Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. Molecular biology of the cell 17, 3469-3483.

[0220] Roccaro, A. M., Sacco, A., Maiso, P., Azab, A. K., Tai, Y. T., Reagan, M., Azab, F., Flores, L. M., Campigotto, F., Weller, E., *et al.* (2013). BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. The Journal of clinical investigation.

[0221] Rothstein, D. M. *et al.* Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and

promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models. J Immunol 166, 322-329 (2001).

[0222] Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[0223] Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. The Journal of biological chemistry 278, 20083-20090.

[0224] Schmittgen, T.D., Jiang, J., Liu, Q., and Yang, L. (2004). A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. Nucleic acids research 32, e43.

[0225] Shen, B., Fang, Y., Wu, N., and Gould, S.J. (2011a). Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. The Journal of biological chemistry 286, 44162-44176.

[0226] Shen, B., Wu, N., Yang, J.M., and Gould, S.J. (2011b). Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. The Journal of biological chemistry 286, 14383-14395.

[0227] Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y. B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S. O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W. C., Chen, C. H., *et al.* (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. Nature 497, 383-387.

[0228] Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Ingmundson, A., Horner, S.M., Cicchetti, G., Allen, P.G., Pypaert, M., Cunningham, J.M., and Mothes, W. (2003). Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. Traffic 4, 785-801.

[0229] Shi, W., Oshlack, A., and Smyth, G.K. (2010). Optimizing the noise versus bias trade-off for Illumina whole genome expression BeadChips. Nucleic acids research 38, e204.

[0230] Shin, H. W., Morinaga, N., Noda, M., and Nakayama, K. (2004). BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. Molecular biology of the cell 15, 5283-5294.

[0231] Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. Curr Opin Cell Biol 21, 575-581.

[0232] Simpson, R.J., Jensen, S.S., and Lim, J.W. (2008). Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. Proteomics 8, 4083-4099.

[0233] Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nature cell biology 10, 1470-1476.

[0234] Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. Trends Biochem Sci 30, 106-114.

[0235] Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecologic oncology 110, 13-21.

[0236] Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2011). Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. Semin Immunopathol 33, 441-454.

[0237] Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 3, Unit 3 22.

[0238] Thery, C. *et al.* Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. Nat Immunol 3, 1156-1162, (2002).

[0239] Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol 2, 569-579.

[0240] Thery, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. F1000 biology reports 3, 15.

[0241] Thery, M., and Casas, J. (2002). Predator and prey views of spider camouflage. Nature 415, 133.

[0242] Thomson, D. W., Bracken, C. P., Szubert, J. M., and Goodall, G. J. (2013). On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors. PloS one 8, e55214.

[0243] Tse, J.C., and Kalluri, R. (2011). Waking up dormant tumors. Breast cancer research : BCR 13, 310.

[0244] Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. Nucleic acids research 39, 7223-7233.

[0245] Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nature cell biology 9, 654-659.

[0246] van Balkom, B. W., de Jong, O. G., Smits, M., Brummelman, J., den Ouden, K., de Bree, P. M., van Eijndhoven, M. A., Pegtel, D. M., Stoorvogel, W., Wurdinger, T., and Verhaar, M. C. (2013). Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. Blood 121, 3997-4006, S3991-3915.

[0247] Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., and Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nature cell biology 13, 423-433.

[0248] Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., *et al.* (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 2257-2261.

[0249] Welch, D.R. (1997). Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. Clinical & experimental metastasis 15, 272-306.

[0250] Wiesen, J.L., and Tomasi, T.B. (2009). Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. Mol Immunol 46, 1222-1228.

[0251] Yan, L. X., Huang, X. F., Shao, Q., Huang, M. Y., Deng, L., Wu, Q. L., Zeng, Y. X., and Shao, J. Y. (2008). MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. RNA 14, 2348-2360.

[0252] Yan, L.X., Wu, Q.N., Zhang, Y., Li, Y.Y., Liao, D.Z., Hou, J.H., Fu, J., Zeng, M.S., Yun, J.P., Wu, Q.L., *et al.* (2011). Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. Breast cancer research : BCR 13, R2.

[0253] Yang, C., and Robbins, P.D. (2011). The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. Clin Dev Immunol 2011, 842849.

[0254] Yang, X., Meng, S., Jiang, H., Zhu, C., and Wu, W. (2011). Exosomes derived from immature bone marrow dendritic cells induce tolerogenicity of intestinal transplantation in rats. J Surg Res 171, 826-832.

[0255] Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes & development 17, 3011-3016.

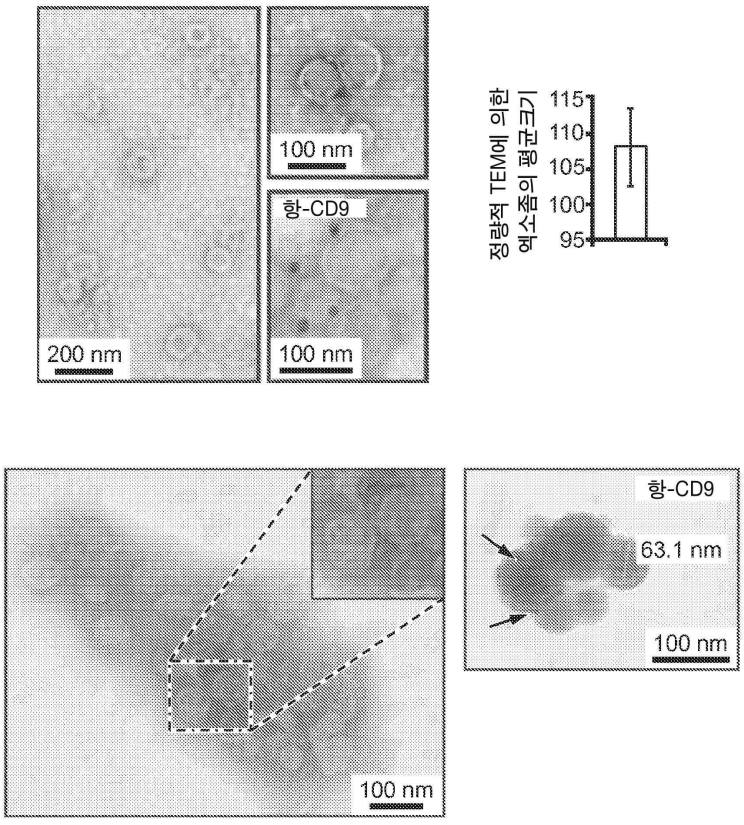
[0256] Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jahantigh, M. N., Lutgens, E., *et al.* (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. Science signaling 2, ra81.

[0257] Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., *et al.* (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. Molecular cell 39,

133-144.

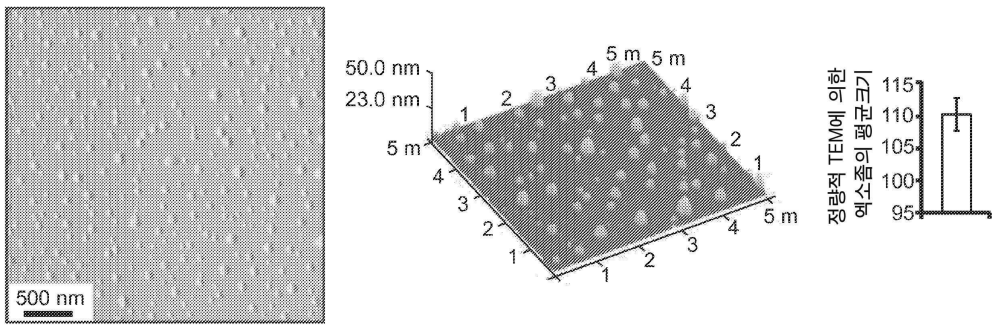
도면

도면1a



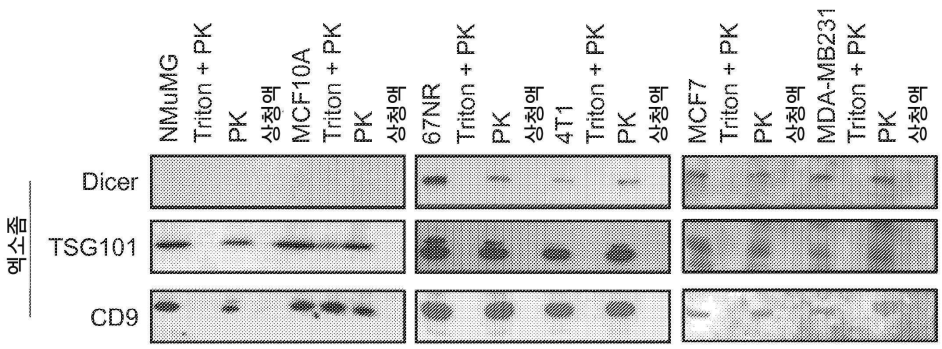
도 1A

도면1b



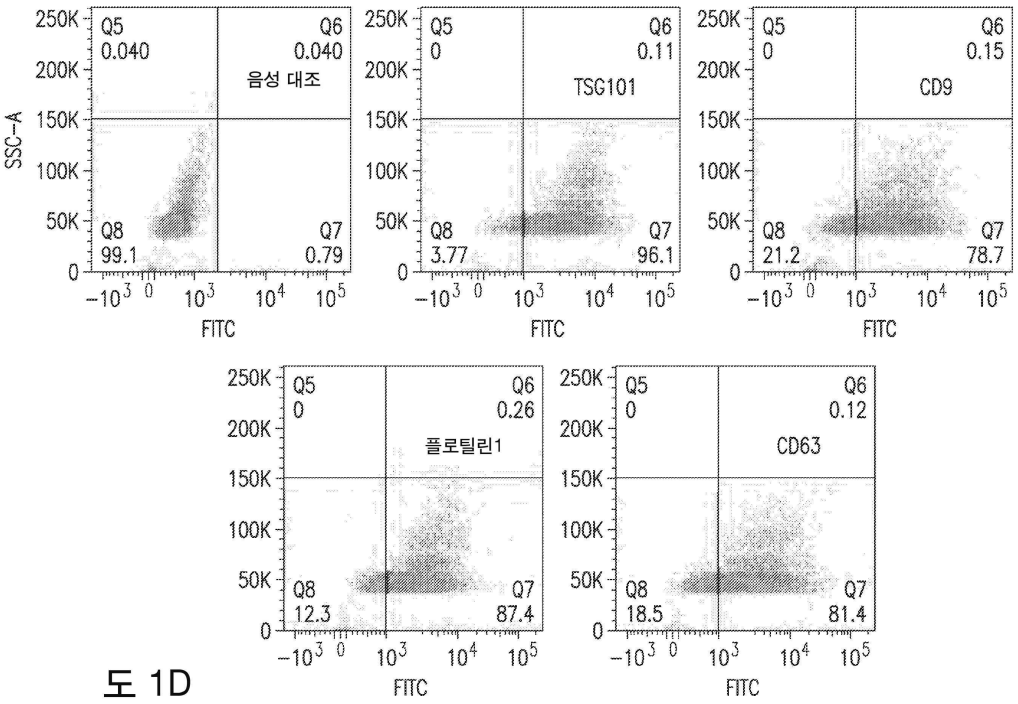
도 1B

도면1c



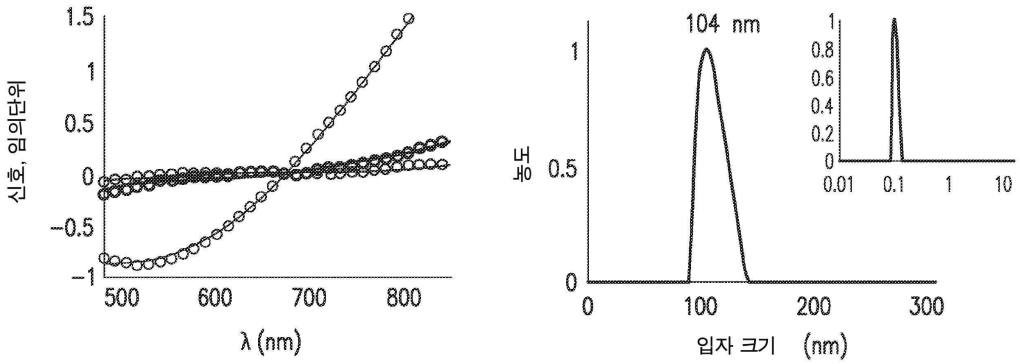
도 1C

도면1d



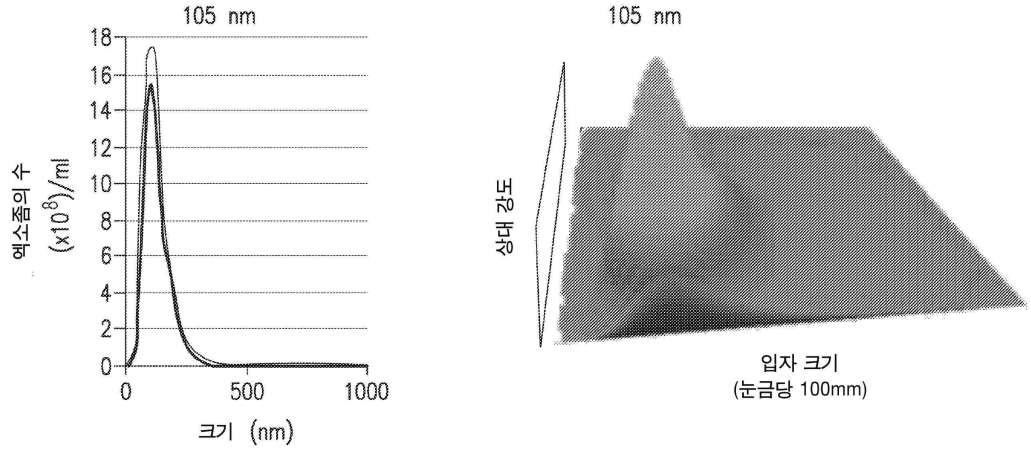
도 1D

도면1e



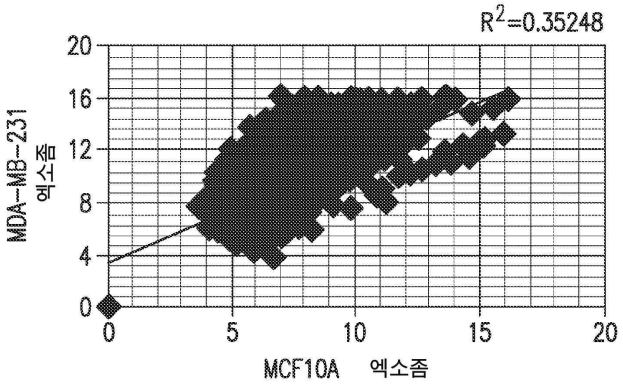
도 1E

도면1f



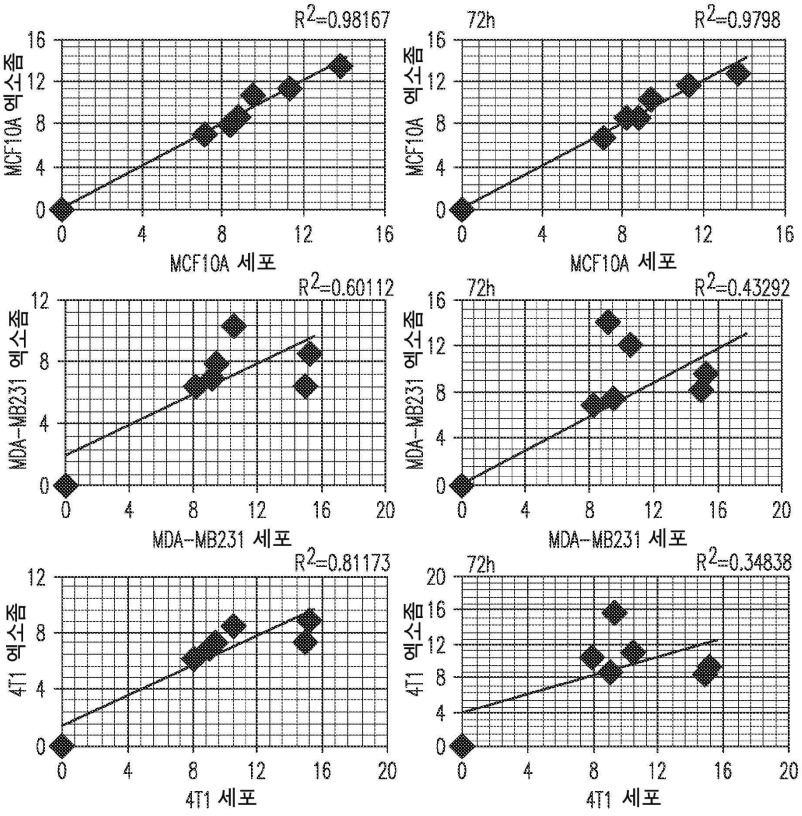
도 1F

도면2a



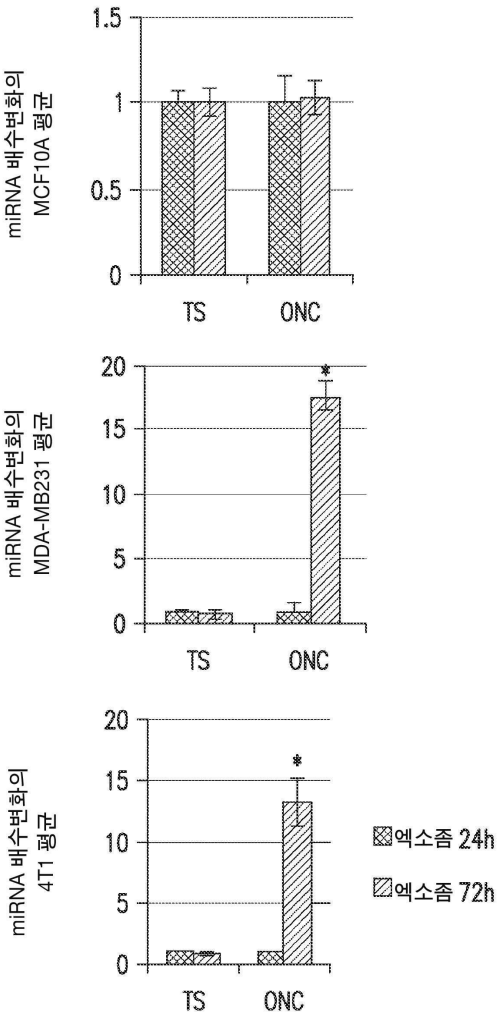
도 2A

도면2b



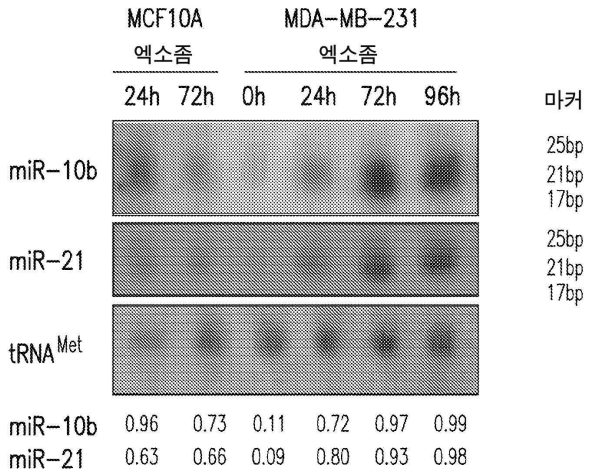
도 2B

도면2c


miRNA 배수변화의 MCF10A 평균
1.5
1
0.5
0
TS
ONC
miRNA 배수변화의 MDA-MB231 평균
20
15
10
5
0
TS
ONC
*
miRNA 배수변화의 4T1 평균
20
15
10
5
0
TS
ONC
*
엑소좀 24h
엑소좀 72h

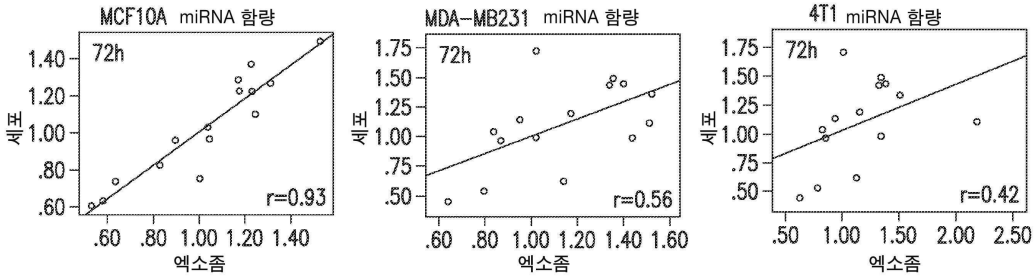
도 2C

도면2d



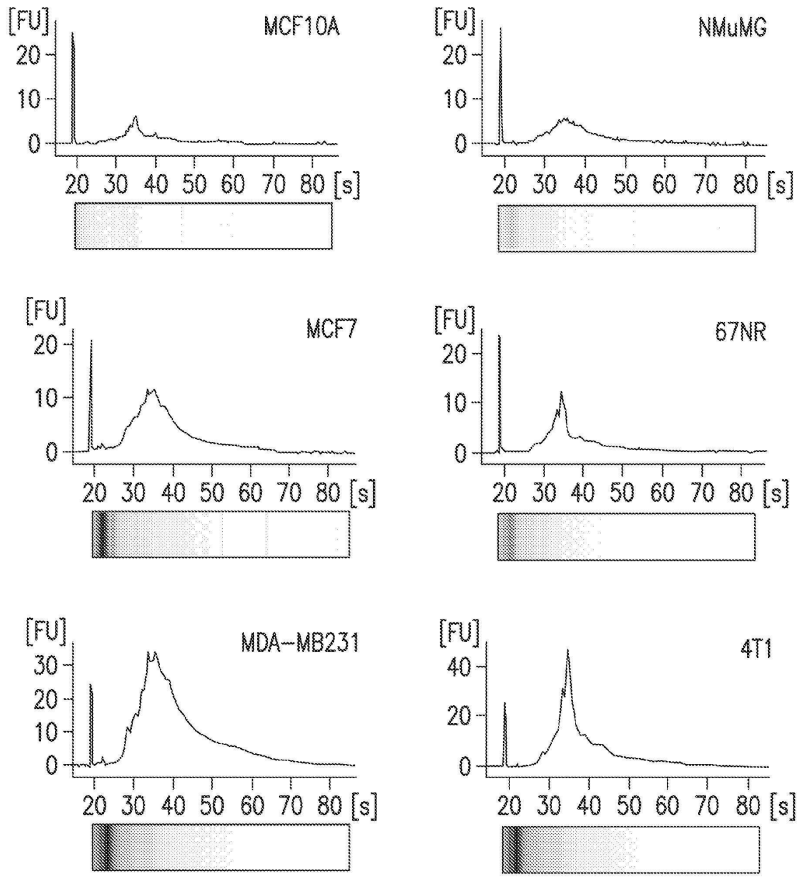
도 2D

도면2e



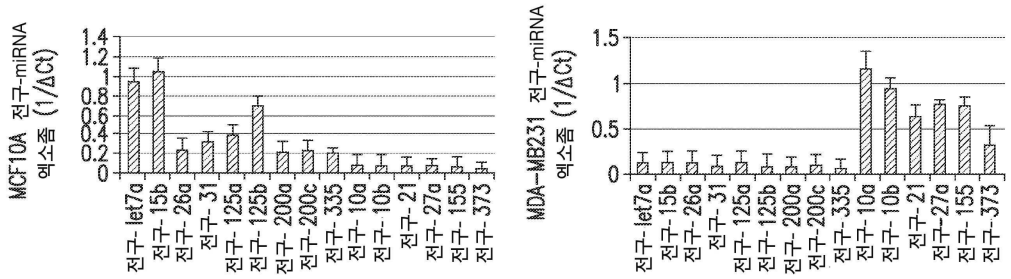
도 2E

도면2f



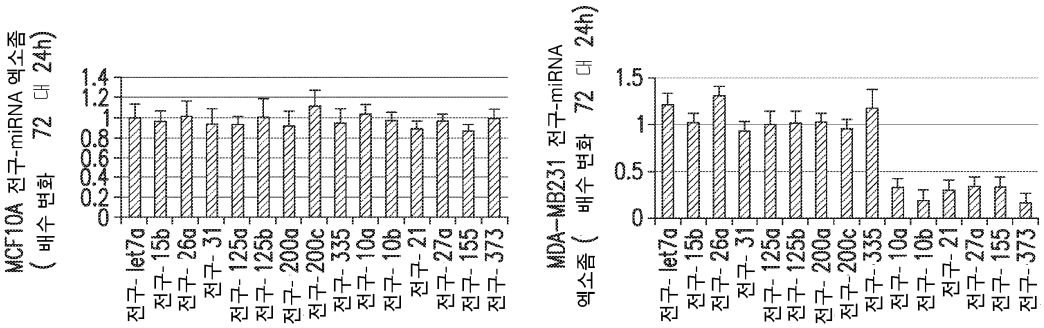
도 2F

도면3a



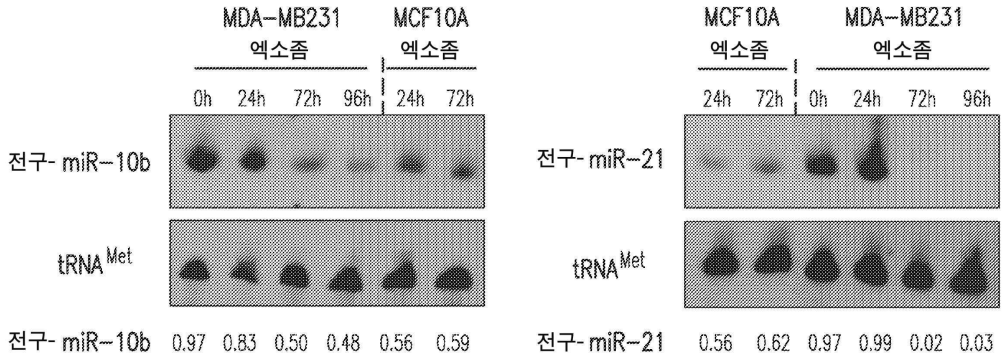
도 3A

도면3b



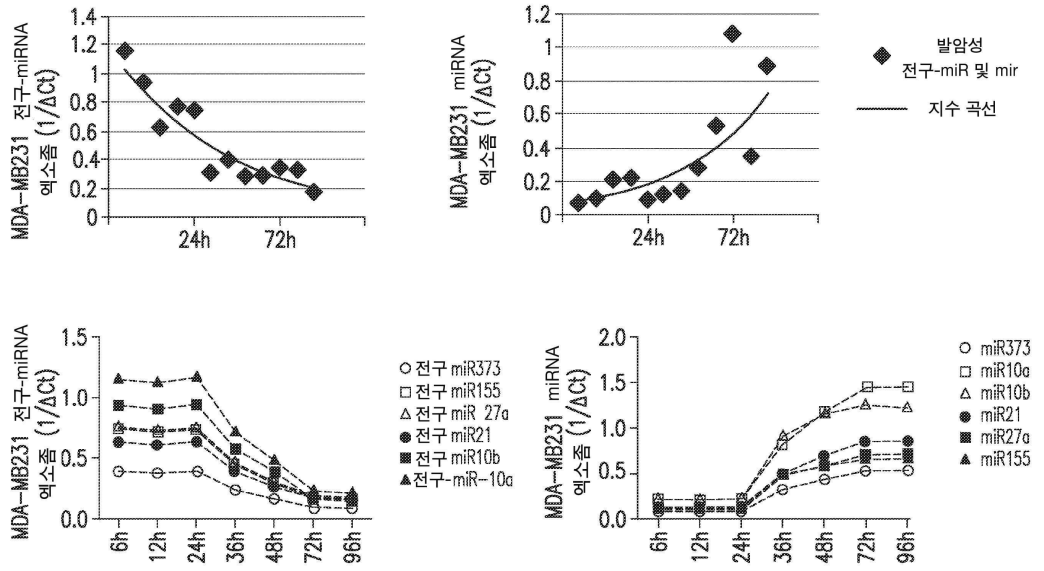
도 3B

도면3c



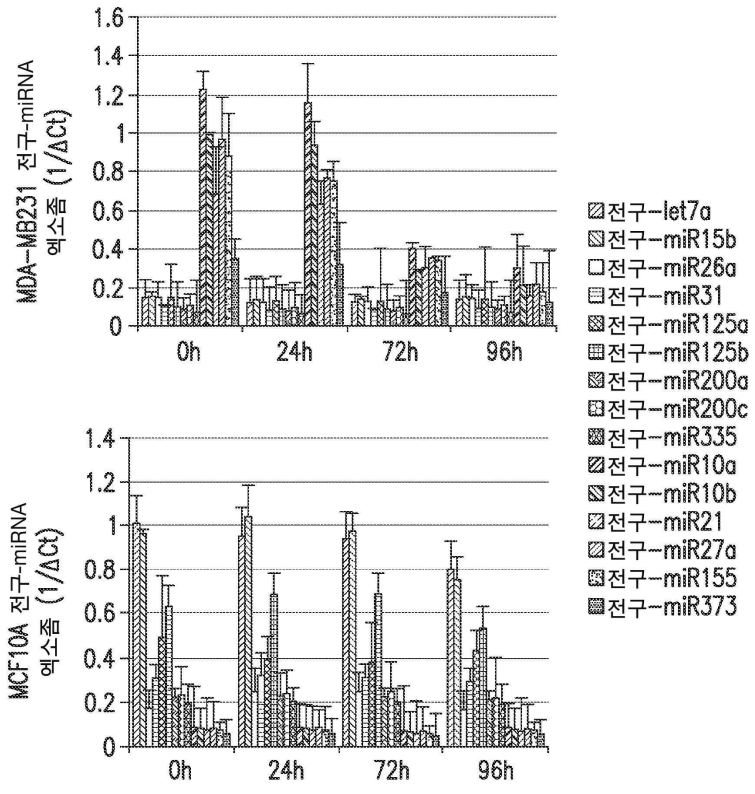
도 3C

도면3d



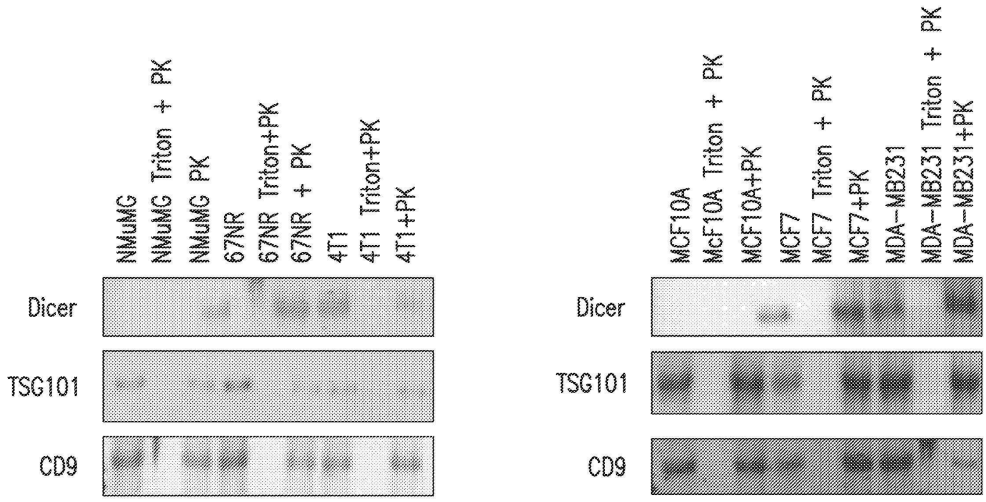
도 3D

도면3e



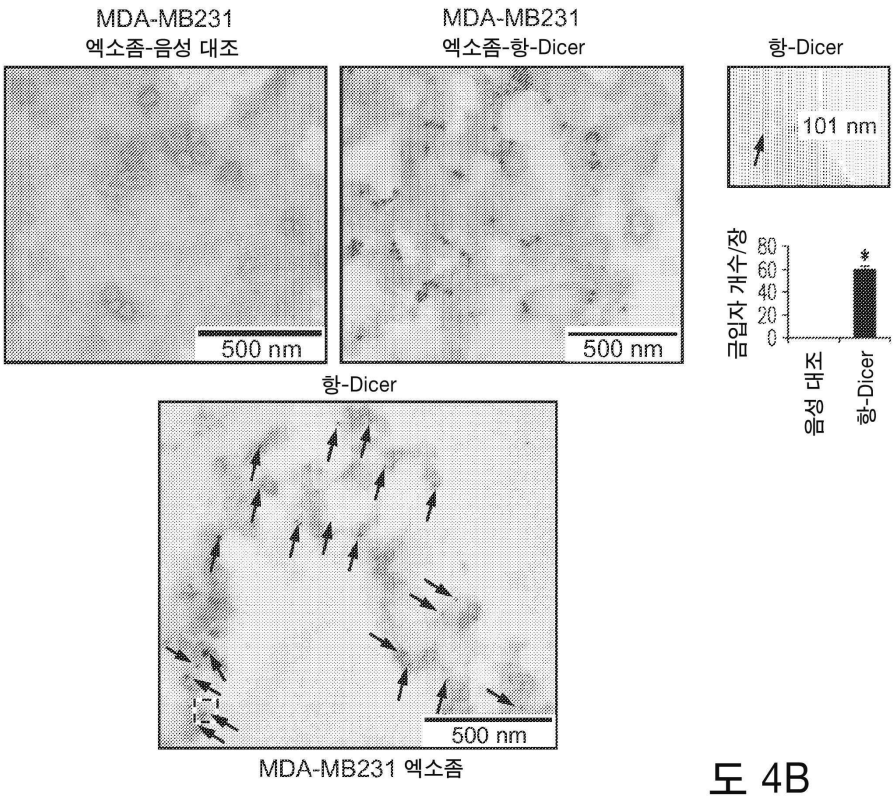
도 3E

도면4a



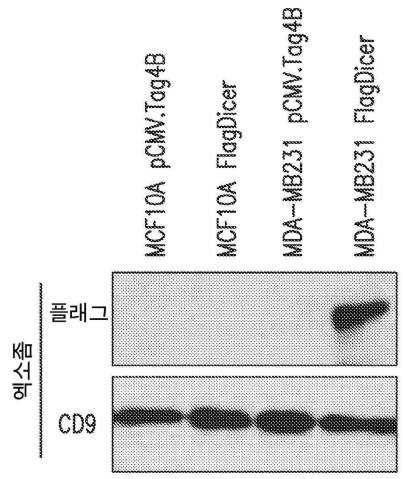
도 4A

도면4b



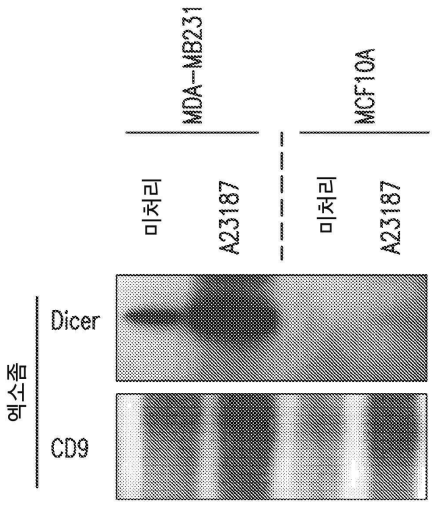
도 4B

도면4c



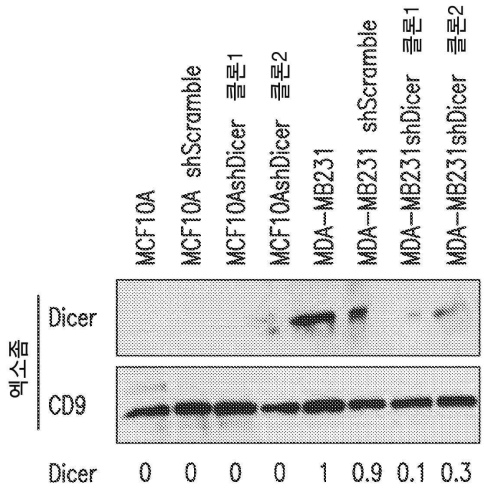
도 4C

도면4d



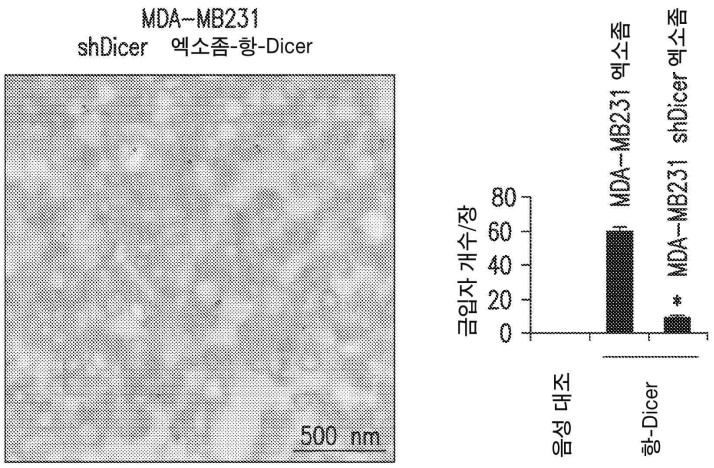
도 4D

도면4e



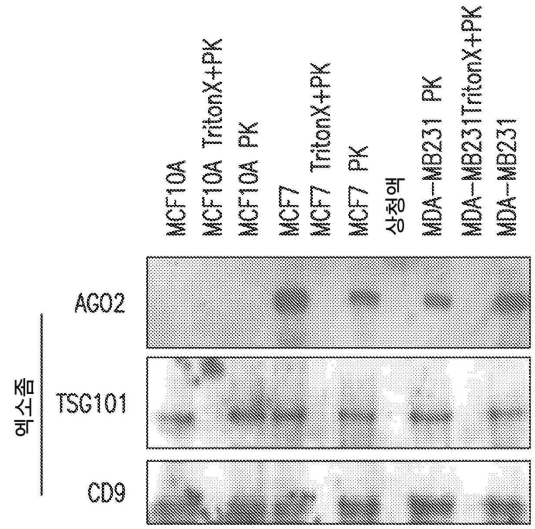
도 4E

도면4f



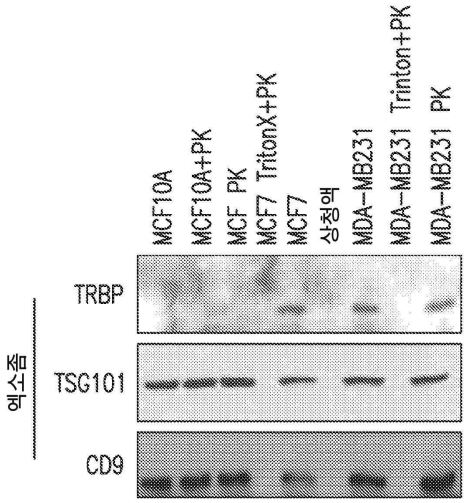
도 4F

도면4g



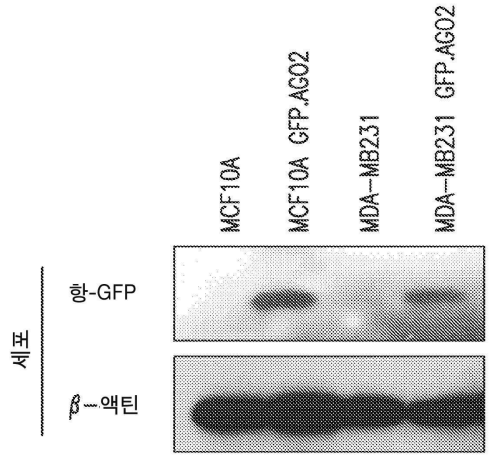
도 4G

도면4h



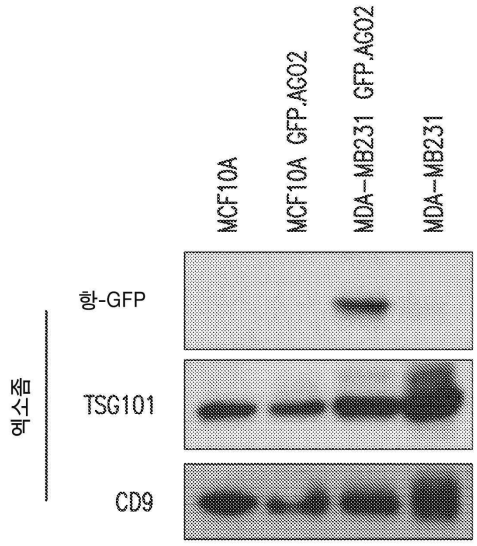
도 4H

도면4i



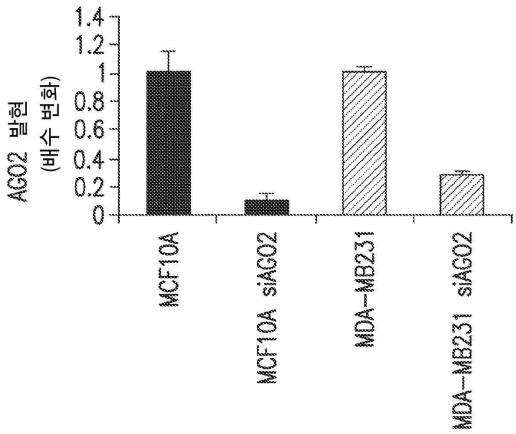
도 4I

도면4j



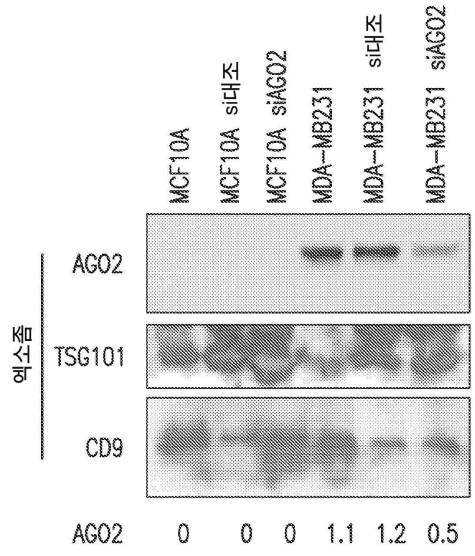
도 4J

도면4k



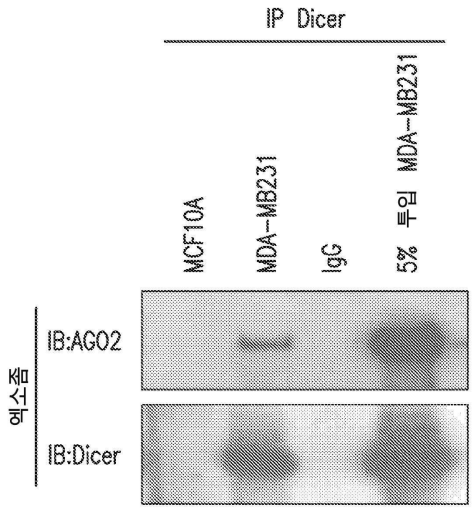
도 4K

도면4l



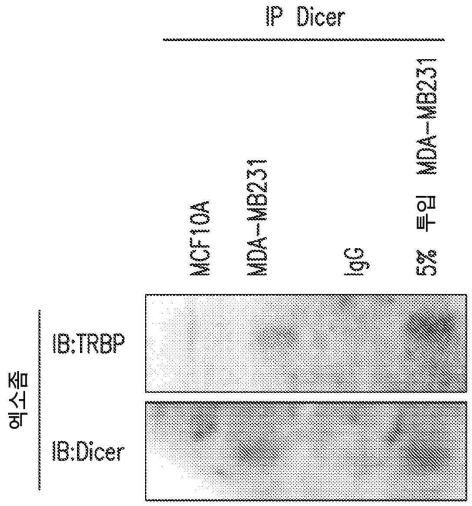
도 4L

도면4m



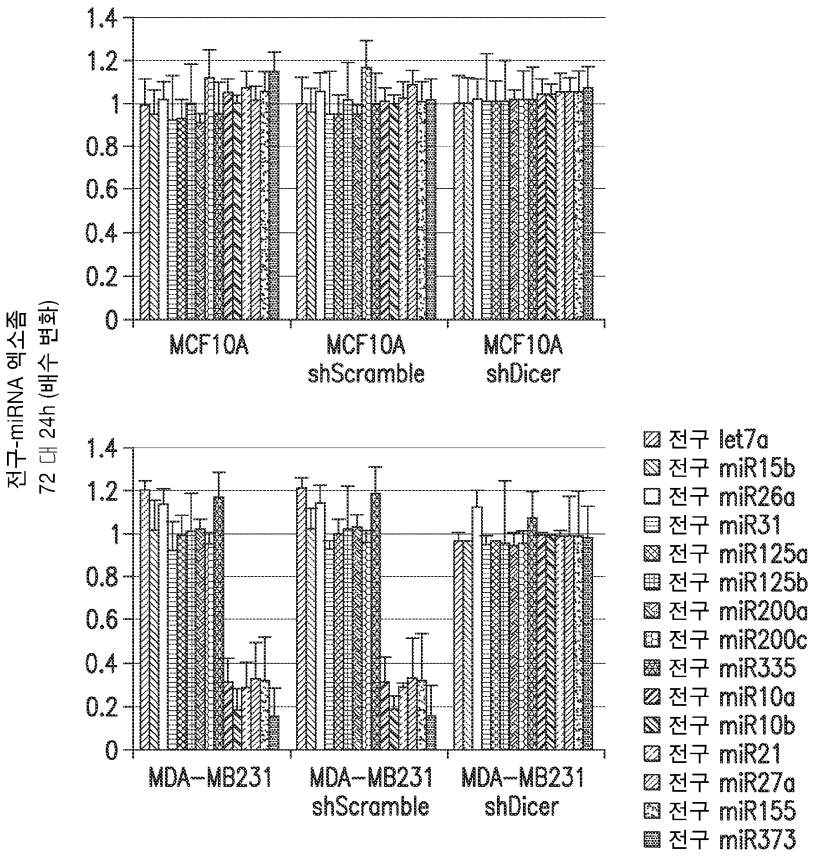
도 4M

도면4n



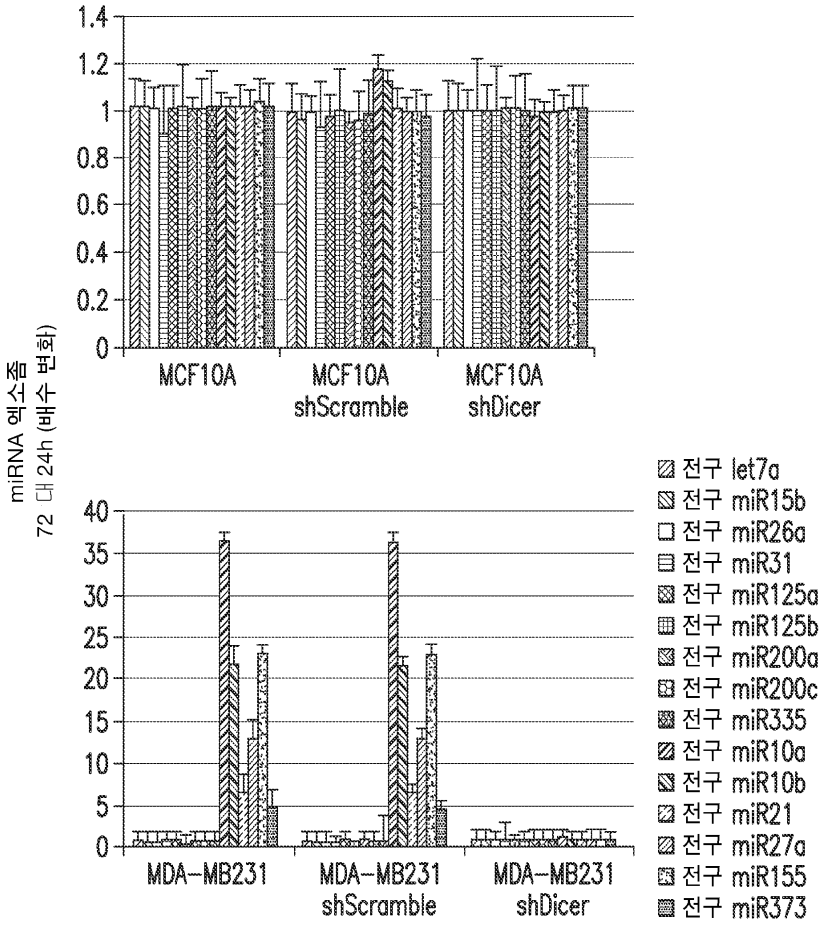
도 4N

도면5a



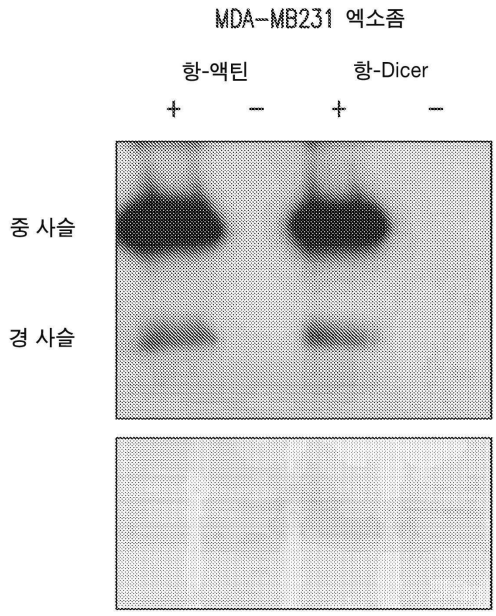
도 5A

도면5b


miRNA 엑소좀
72 대 24h (배수 변화)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A shScramble
MCF10A shDicer
40
35
30
25
20
15
10
5
0
MDA-MB231
MDA-MB231 shScramble
MDA-MB231 shDicer
전구 let7a
전구 miR15b
전구 miR26a
전구 miR31
전구 miR125a
전구 miR125b
전구 miR200a
전구 miR200c
전구 miR335
전구 miR10a
전구 miR10b
전구 miR21
전구 miR27a
전구 miR155
전구 miR373

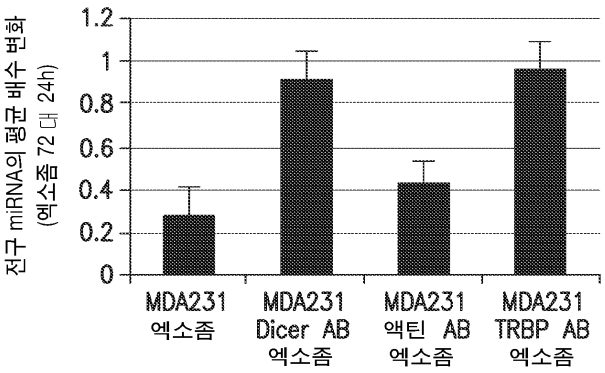
도 5B

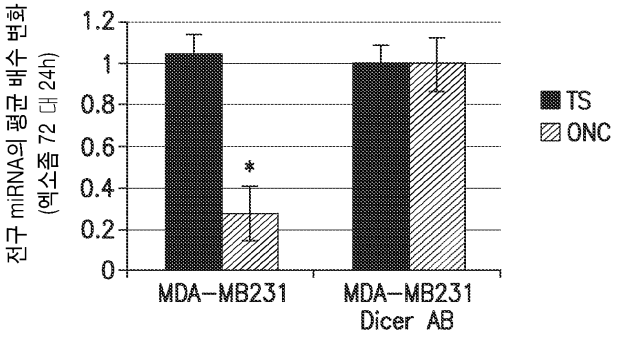
도면5c



도 5C

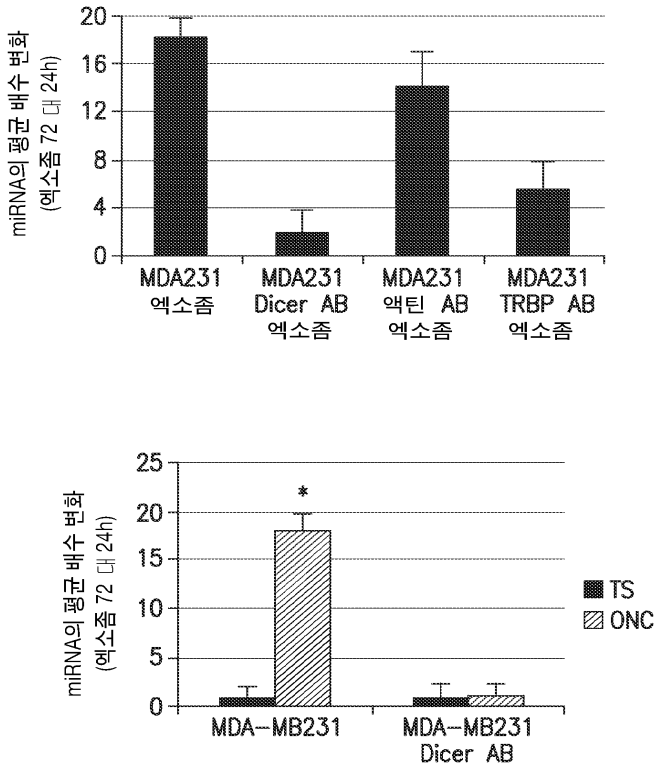
도면5d


전구 miRNA의 평균 배수 변화
(엑소좀 72 대 24h)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MDA231 엑소좀
MDA231 Dicer AB 엑소좀
MDA231 액틴 AB 엑소좀
MDA231 TRBP AB 엑소좀


전구 miRNA의 평균 배수 변화
(엑소좀 72 대 24h)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
MDA-MB231
MDA-MB231 Dicer AB
TS
ONC

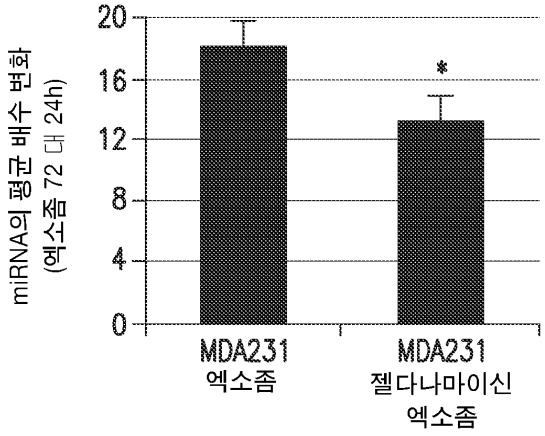
도 5D

도면5e



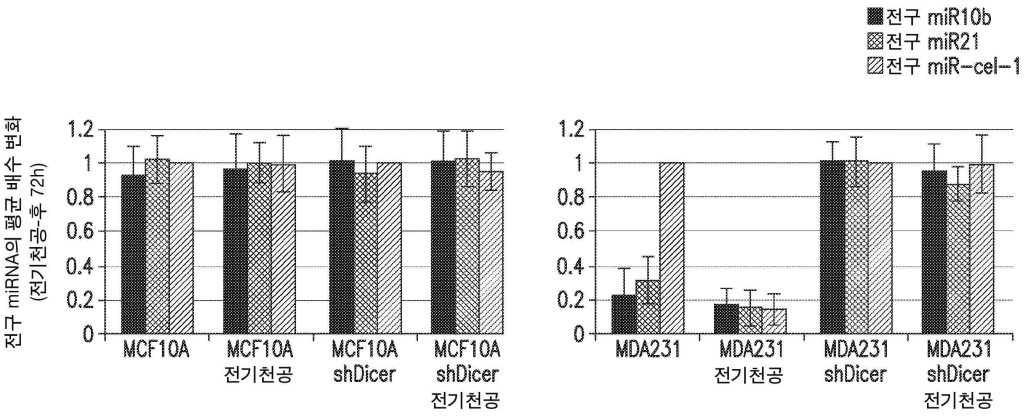
도 5E

도면6a



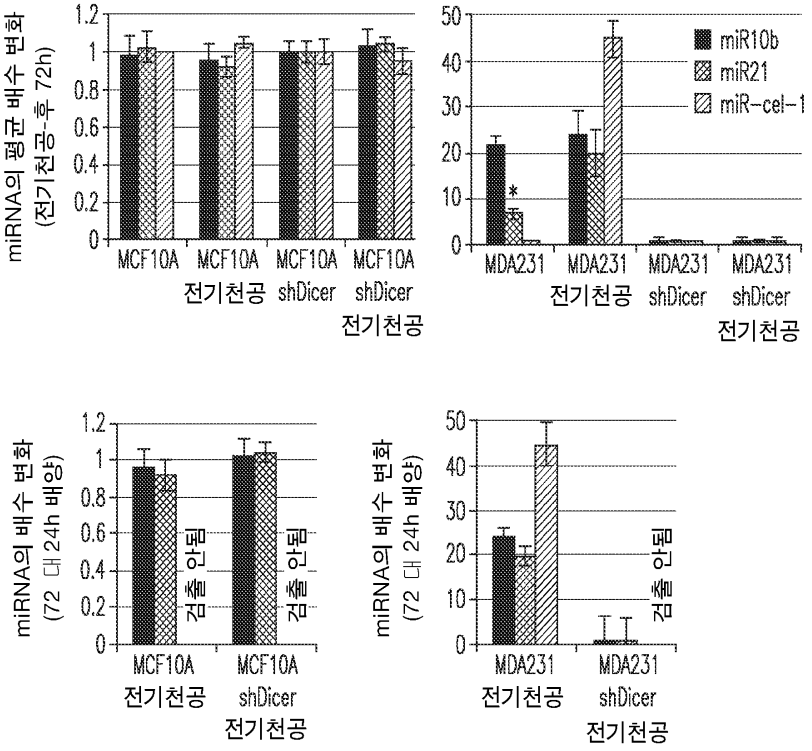
도 6A

도면6b



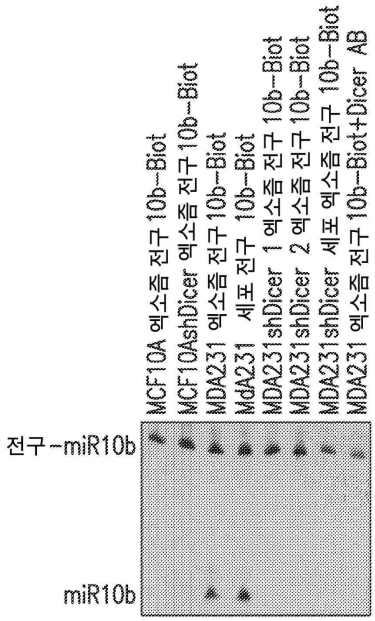
도 6B

도면6c



도 6C

도면6d

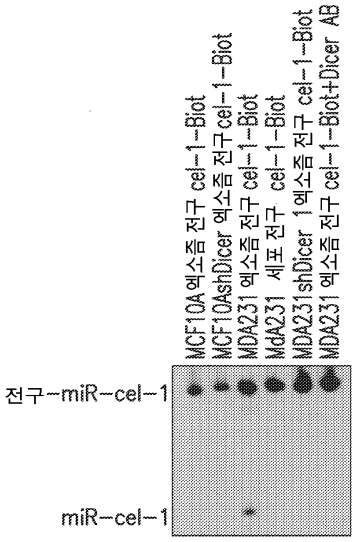


도 6D

도면6e

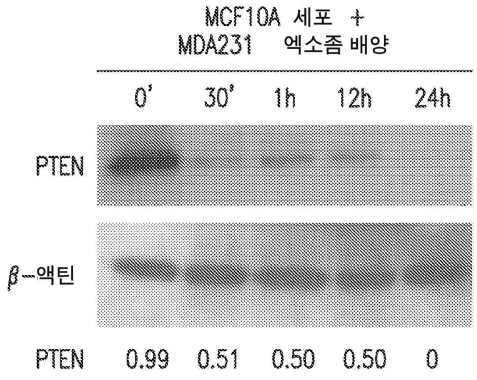
도 6E

도면6f



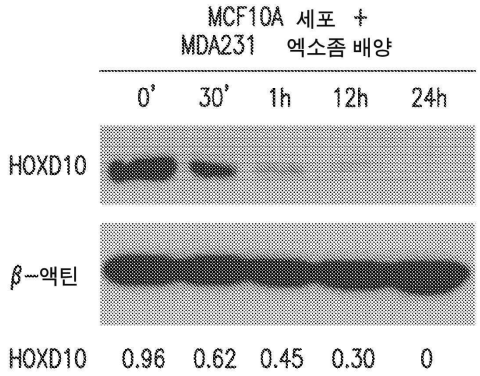
도 6F

도면7a



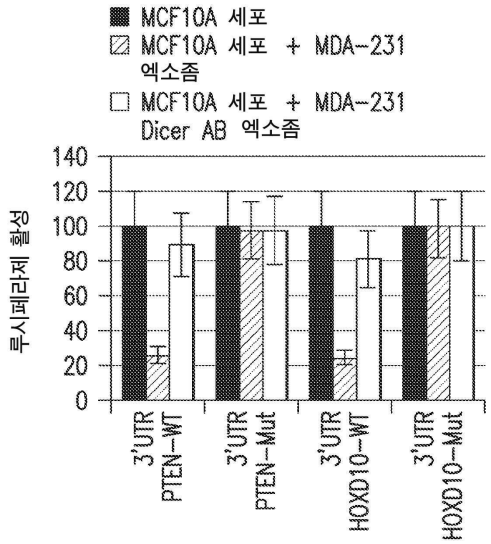
도 7A

도면7b



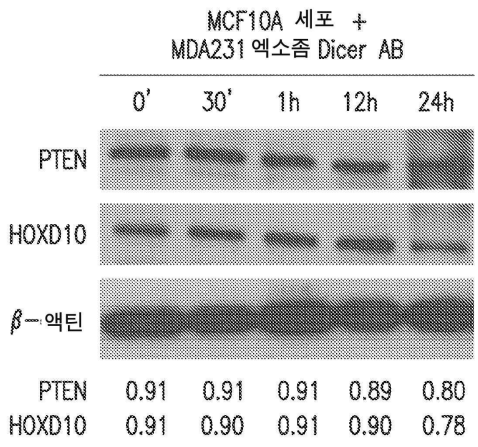
도 7B

도면7c



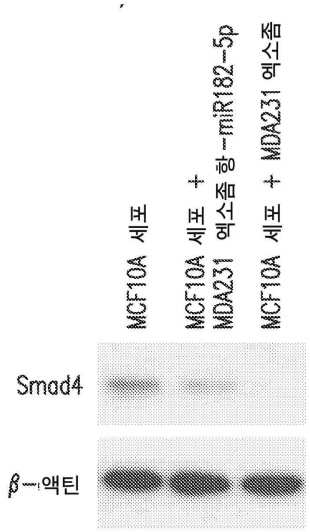
도 7C

도면7d



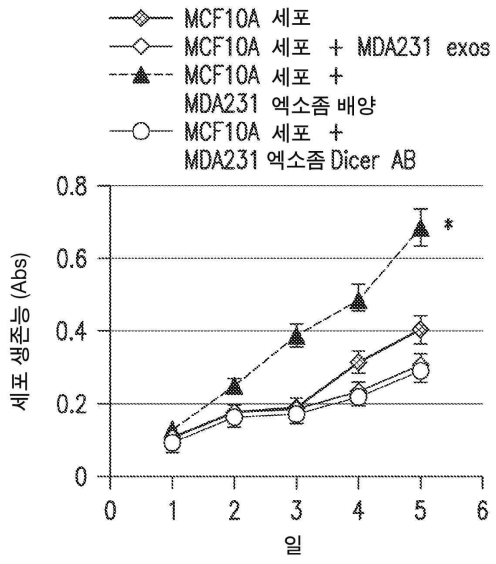
도 7D

도면7e



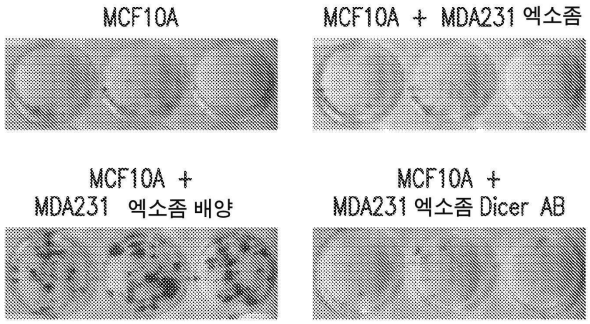
도 7E

도면7f



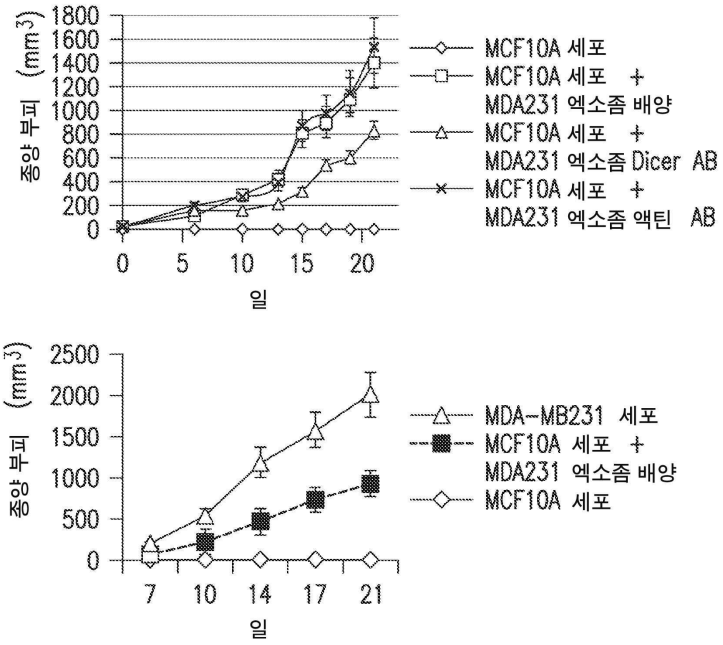
도 7F

도면7g



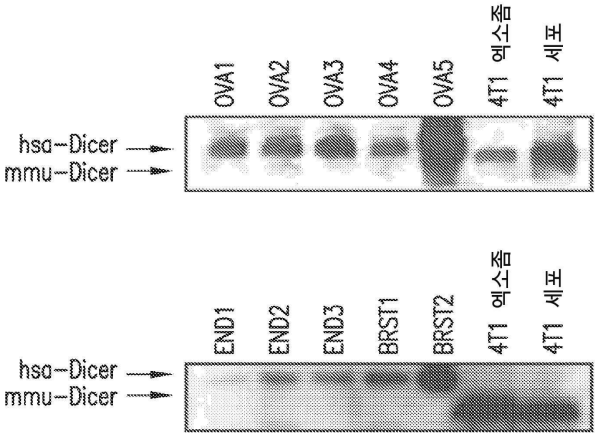
도 7G

도면7h



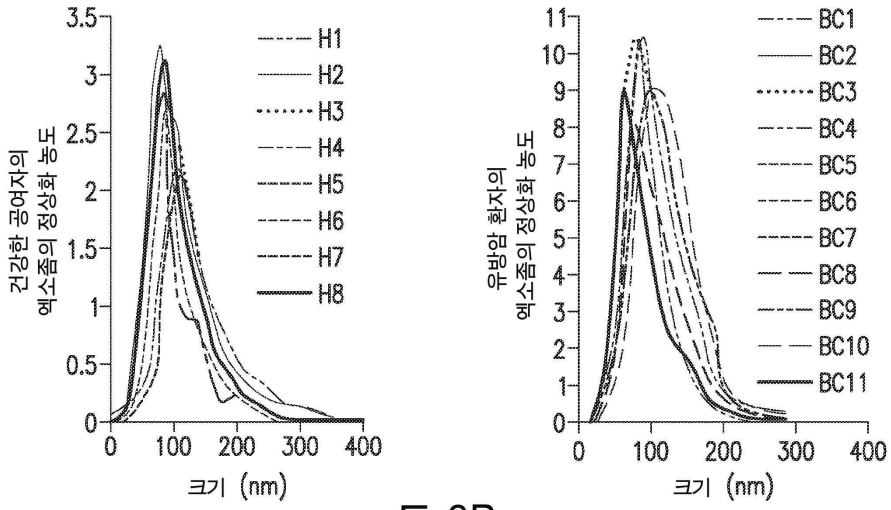
도 7H

도면8a



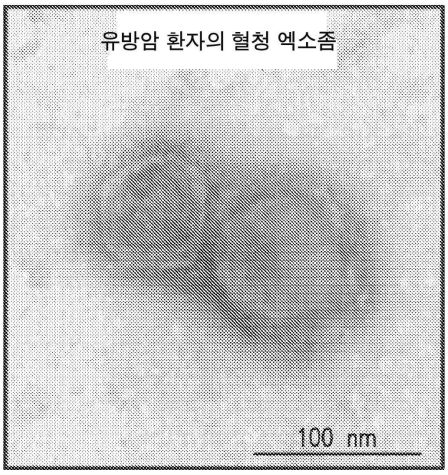
도 8A

도면8b



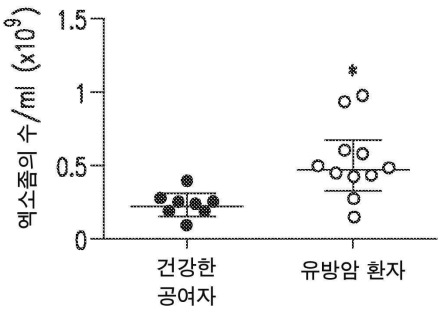
도 8B

도면8c



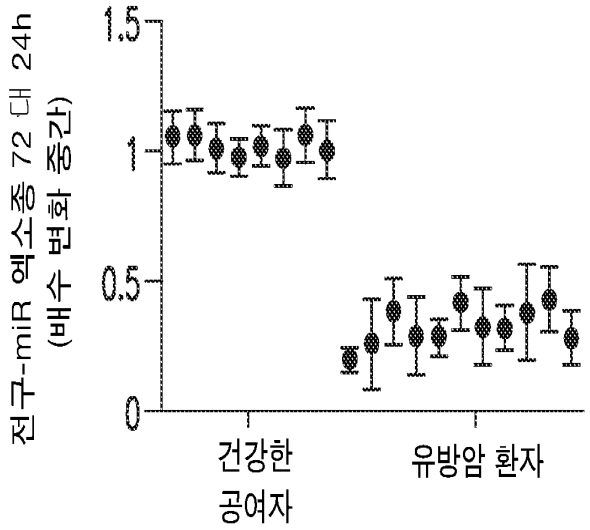
도 8C

도면8d



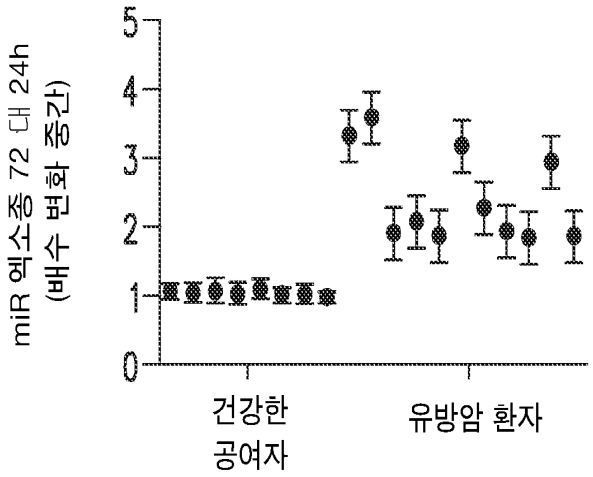
도 8D

도면8e



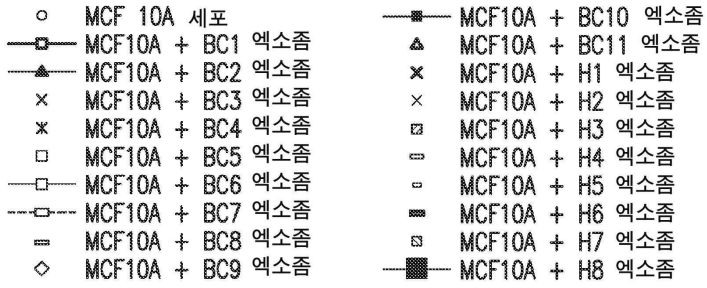
도 8E

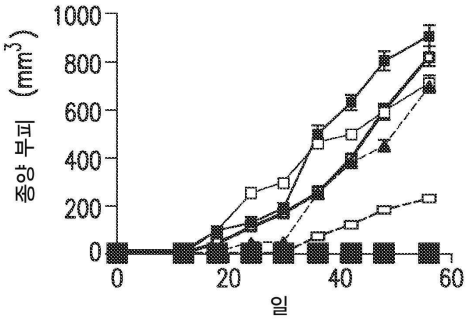
도면8f



도 8F

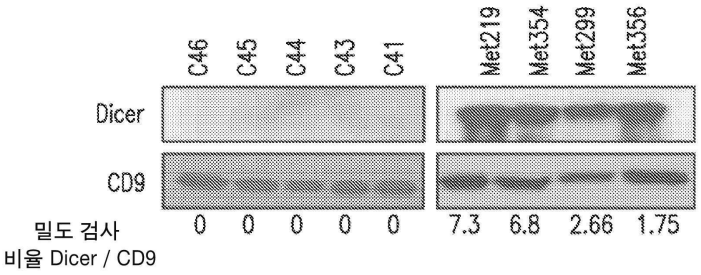
도면8g





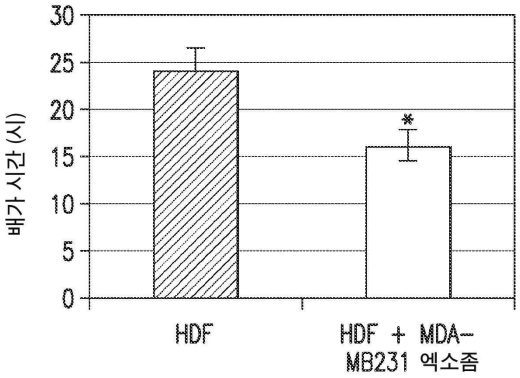
도 8G

도면8h



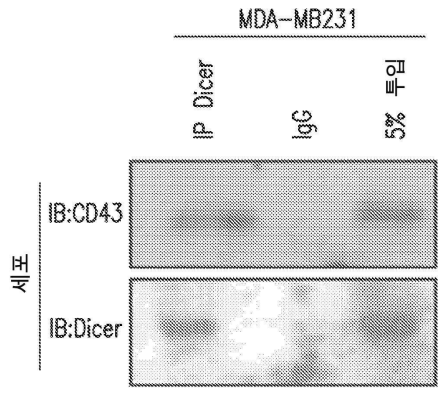
도 8H

도면8i



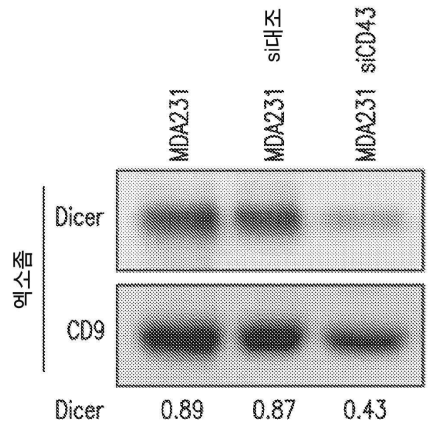
도 8I

도면9a



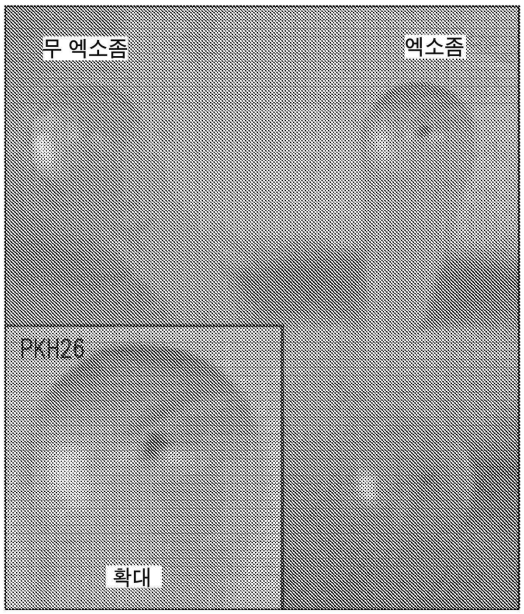
도 9A

도면9b



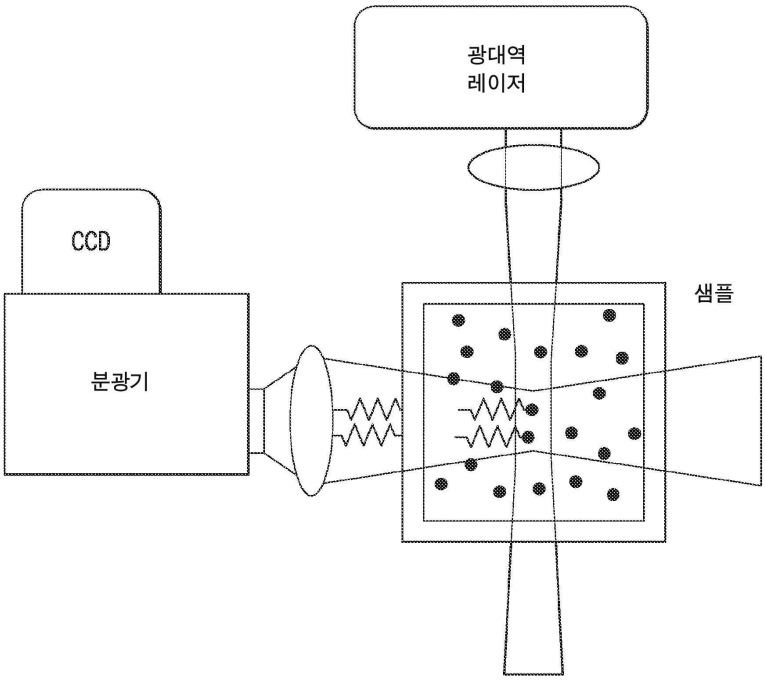
도 9B

도면10a



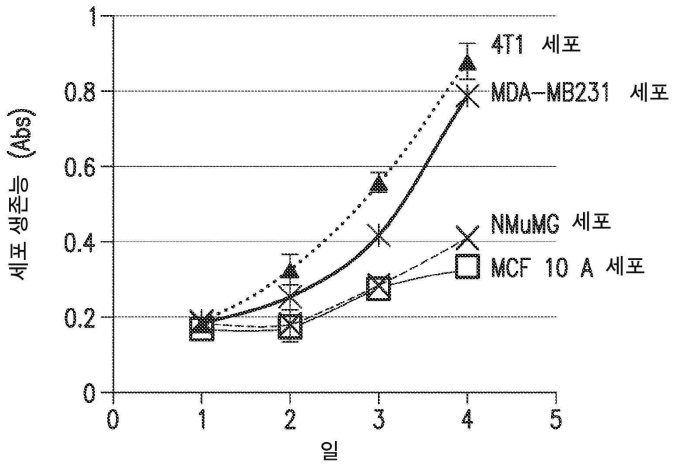
도 10A

도면10b



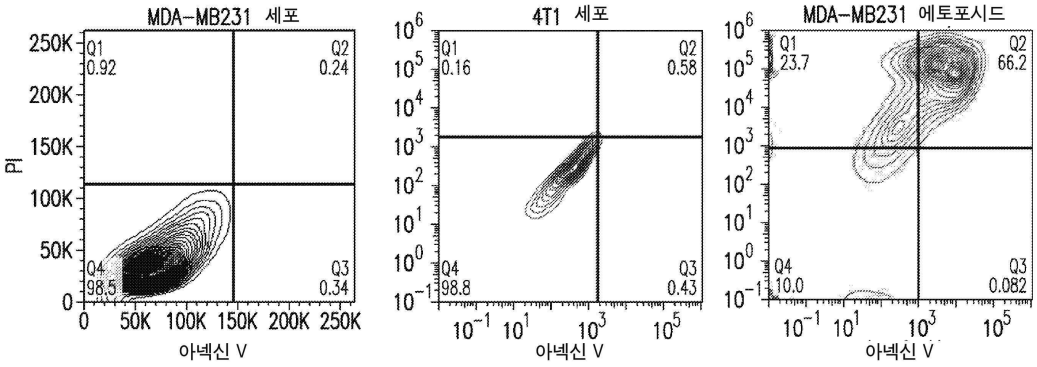
도 10B

도면10c



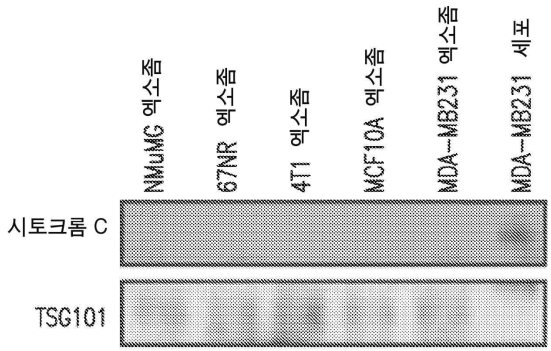
도 10C

도면10d



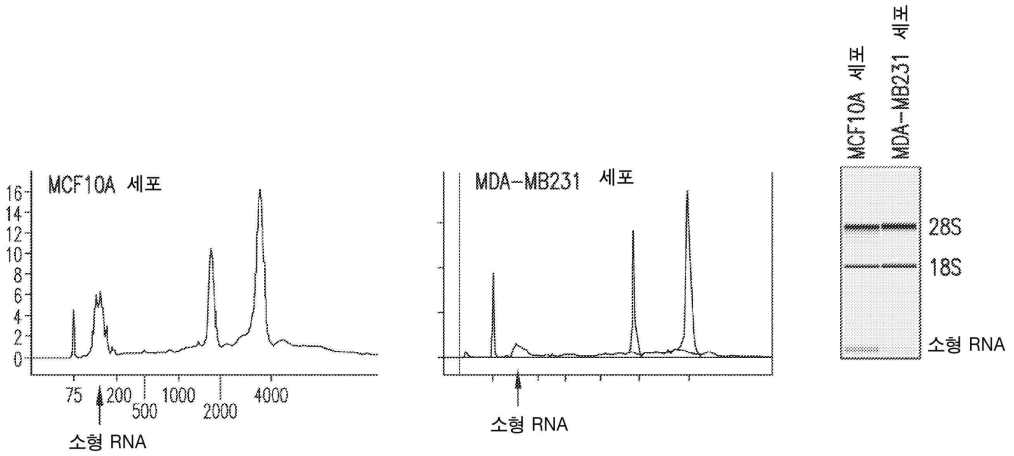
도 10D

도면10e



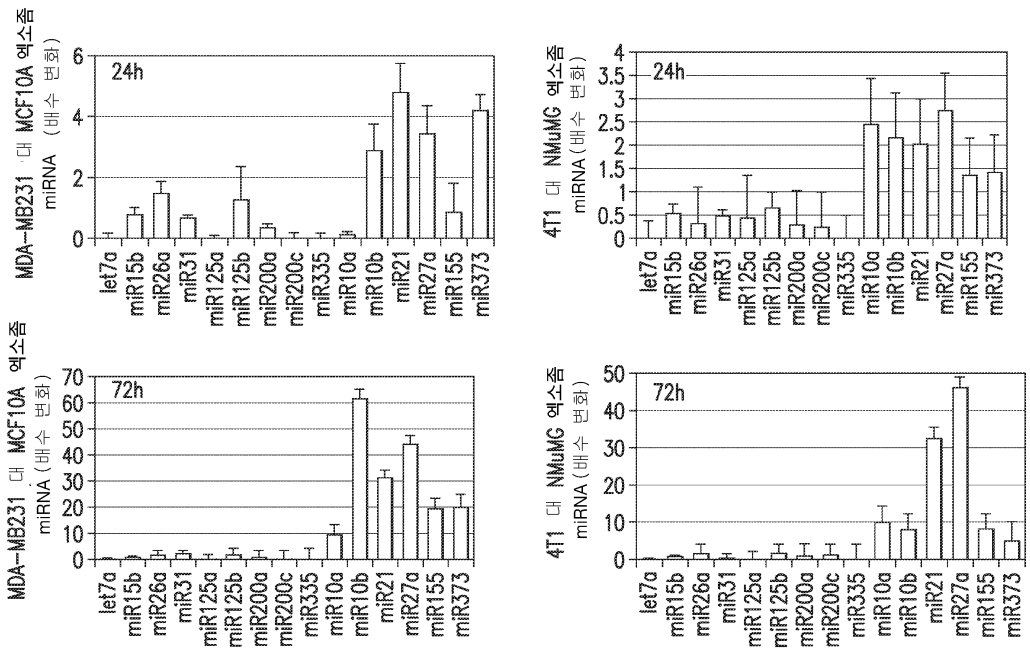
도 10E

도면11a



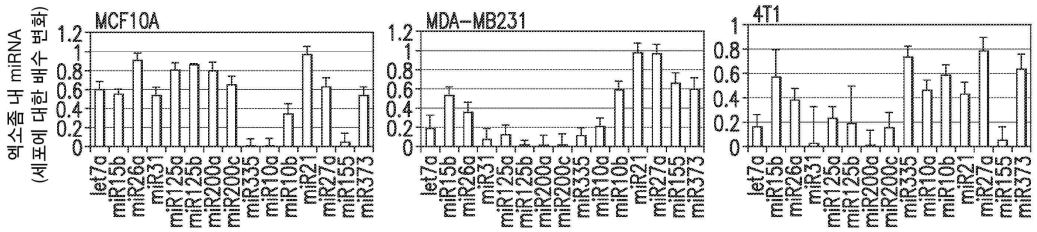
도 11A

도면11b



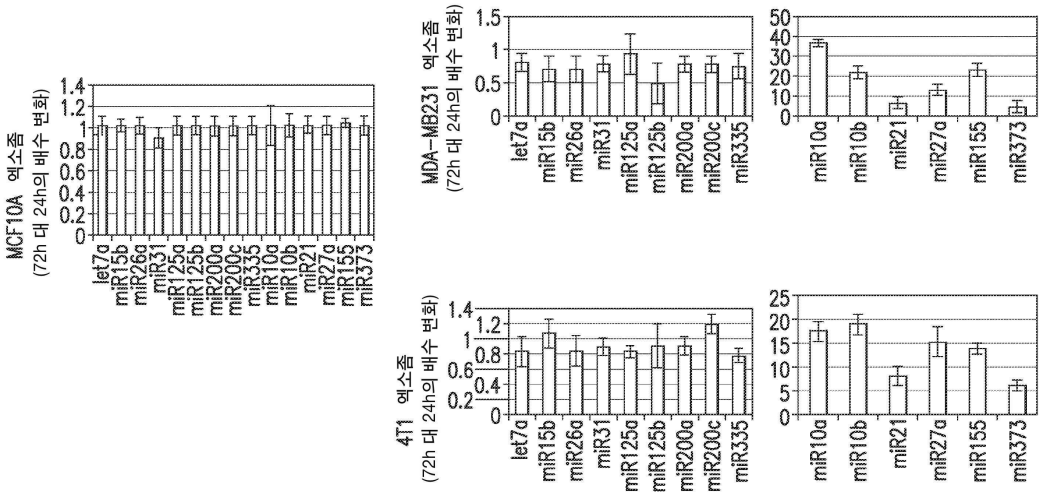
도 11B

도면11c



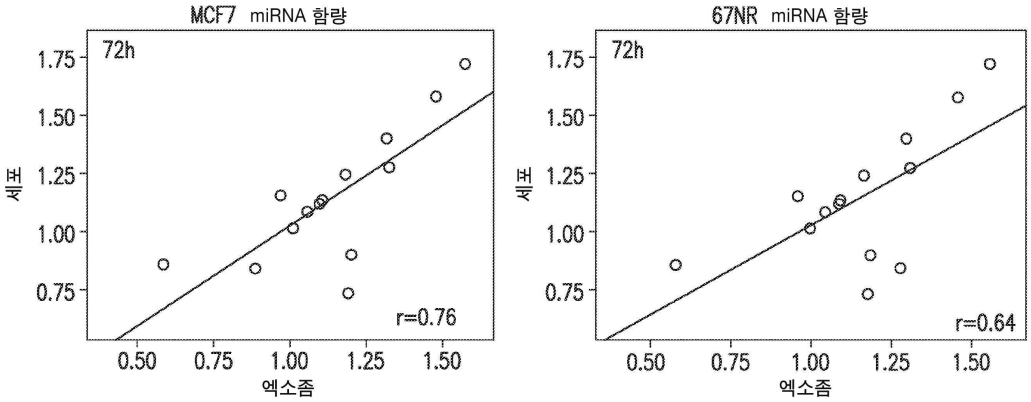
도 11C

도면11d



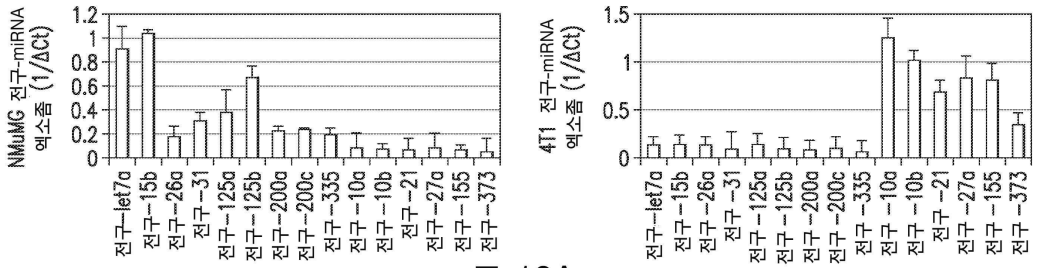
도 11D

도면11e



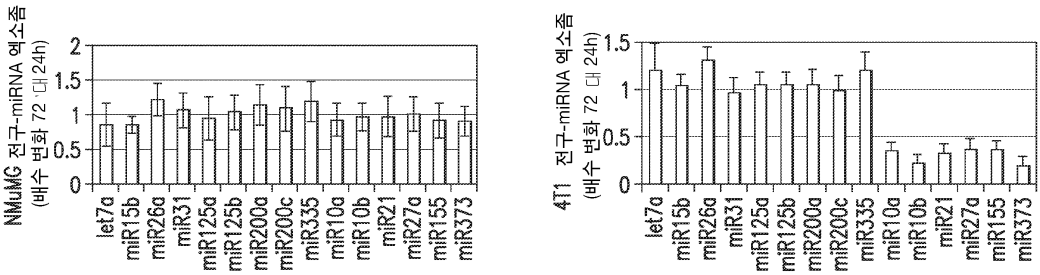
도 11E

도면12a



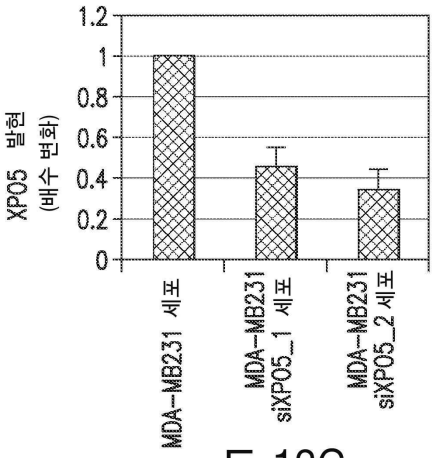
도 12A

도면12b



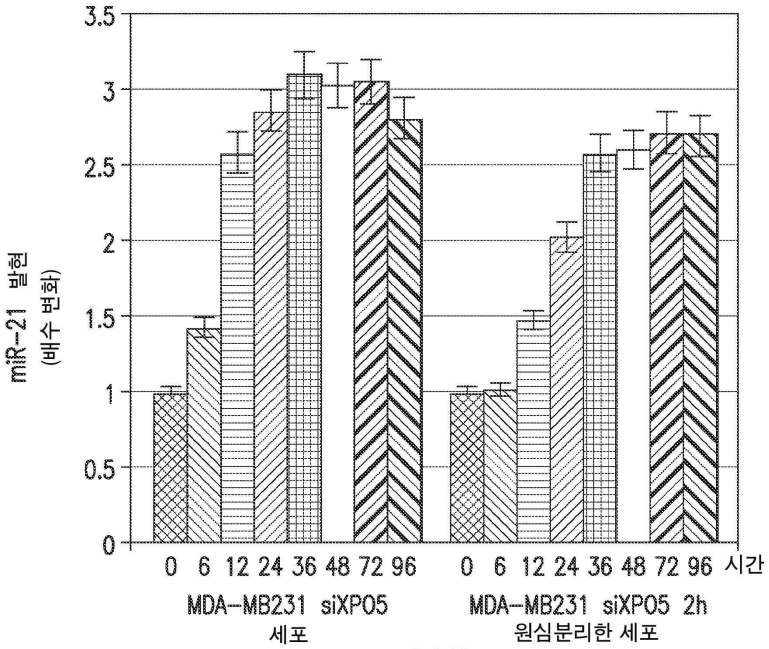
도 12B

도면12c



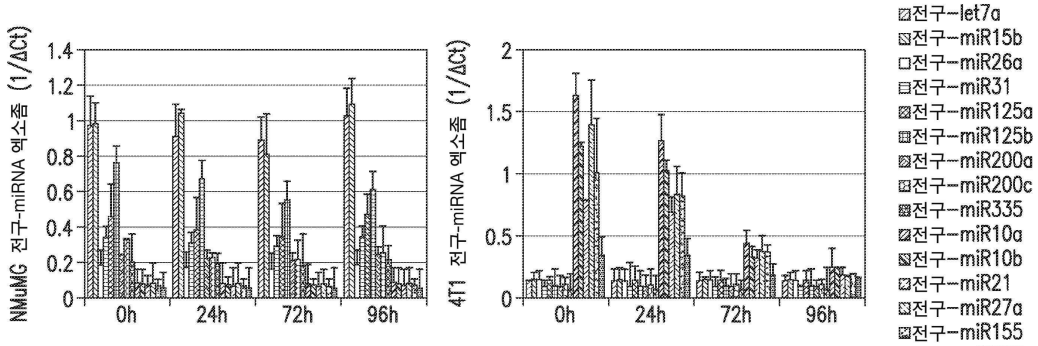
도 12C

도면12d



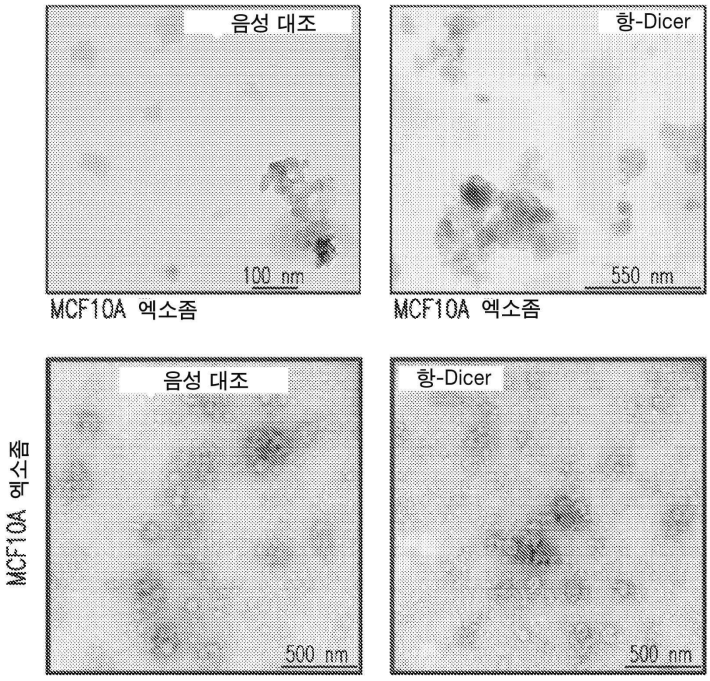
도 12D

도면12e



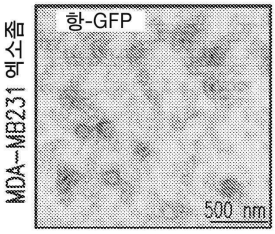
도 12E

도면13a



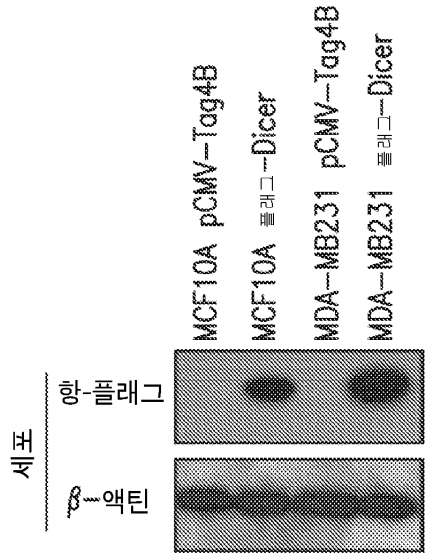
도 13A

도면13b



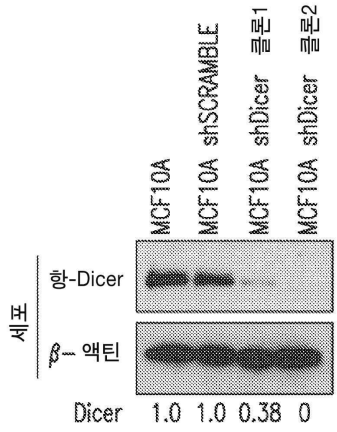
도 13B

도면13c



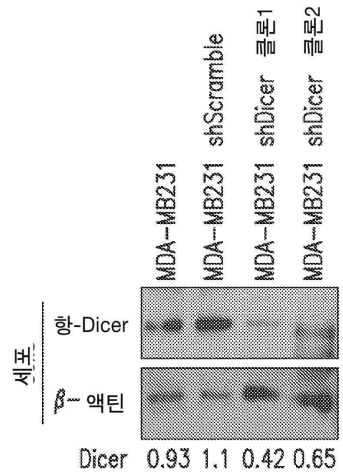
도 13C

도면13d



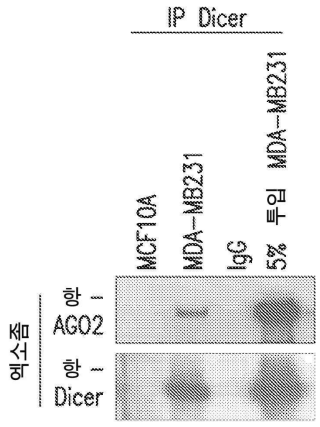
도 13D

도면13e



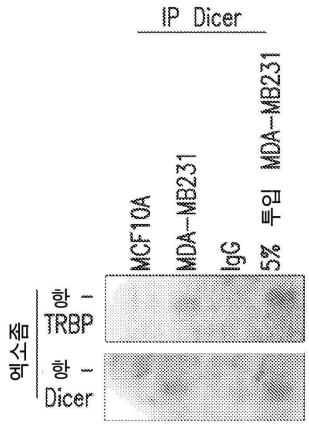
도 13E

도면13f



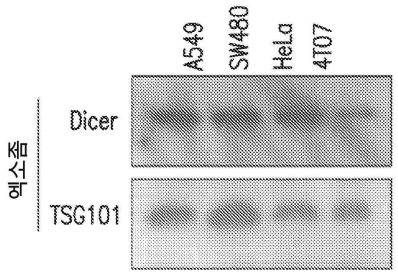
도 13F

도면13g



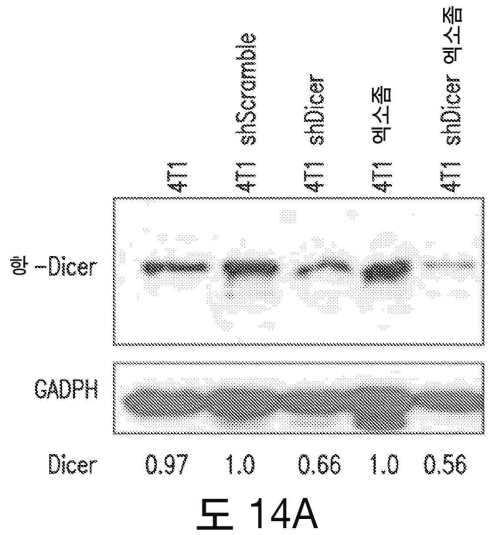
도 13G

도면13h



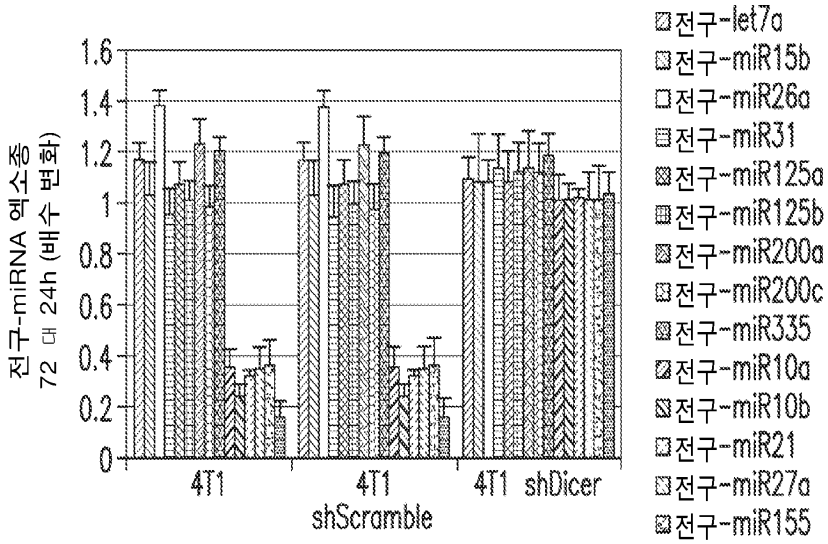
도 13H

도면14a



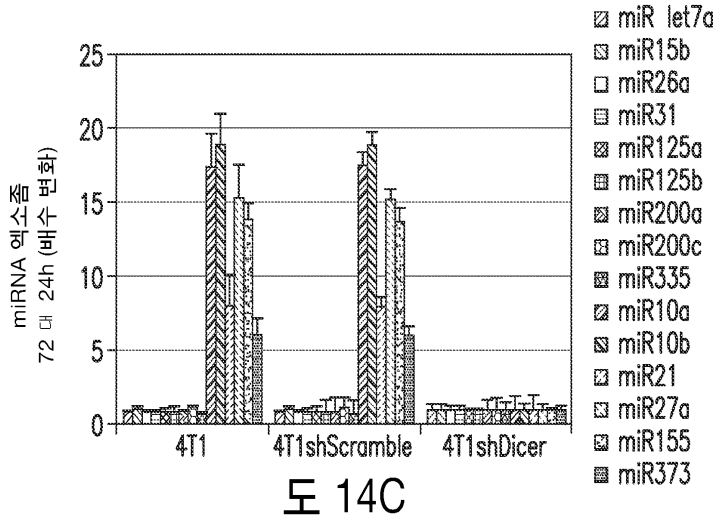
도 14A

도면14b



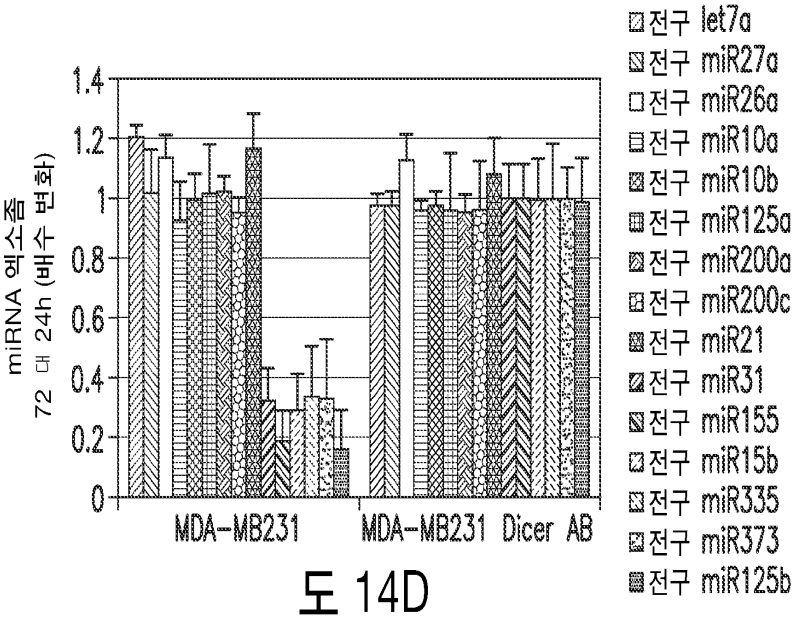
도 14B

도면14c



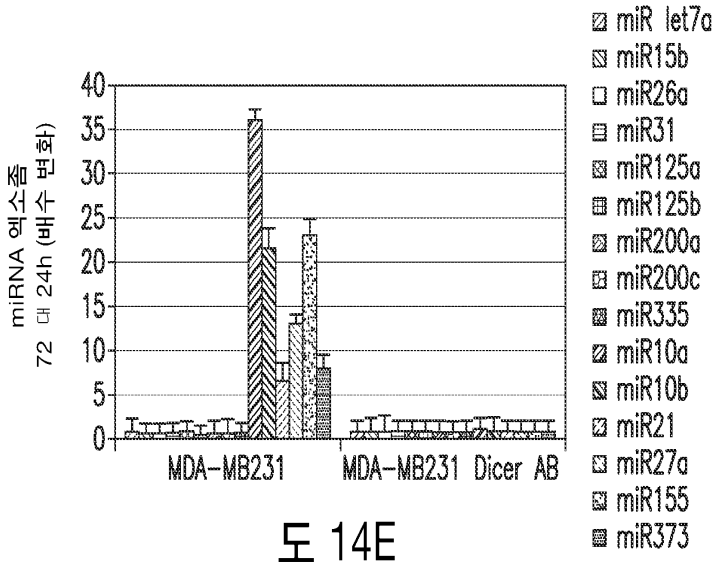
도 14C

도면14d



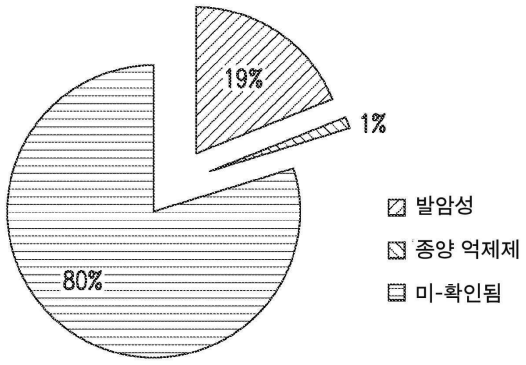
도 14D

도면14e



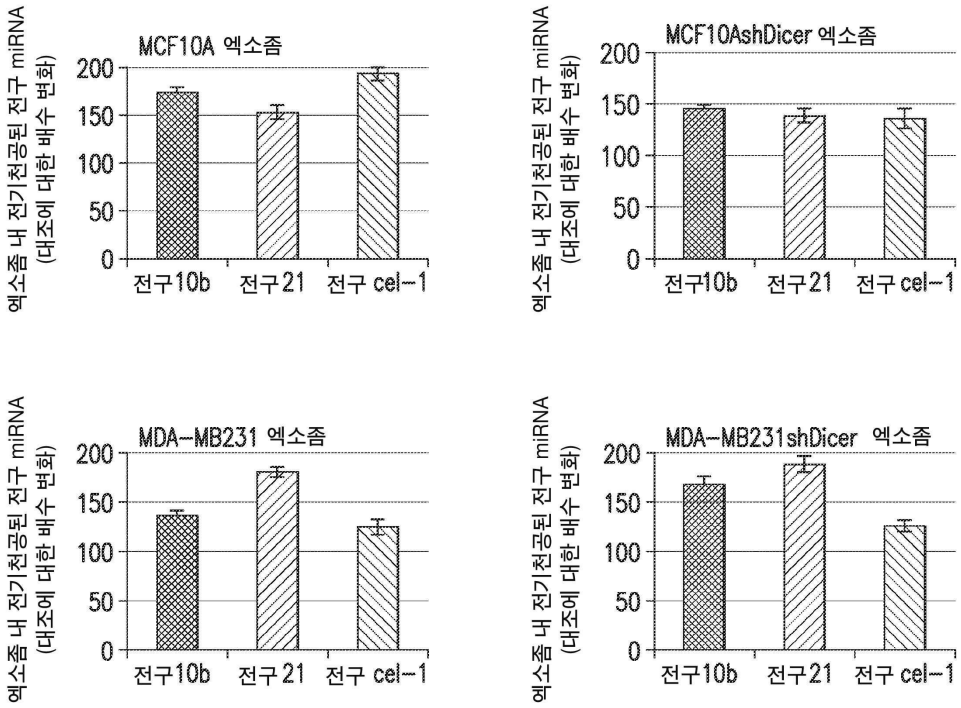
도 14E

도면14f



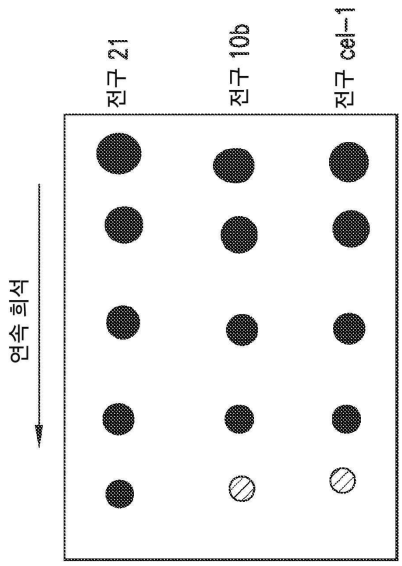
도 14F

도면15a



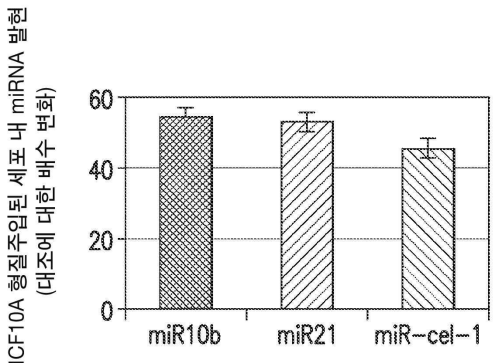
도 15A

도면15b



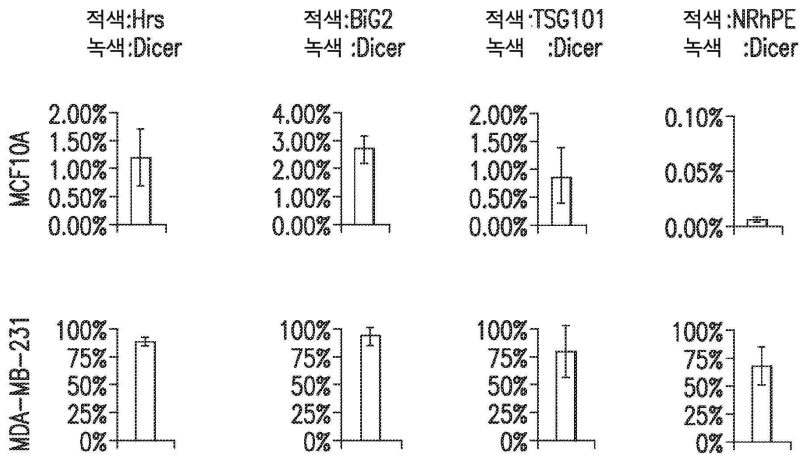
도 15B

도면15c



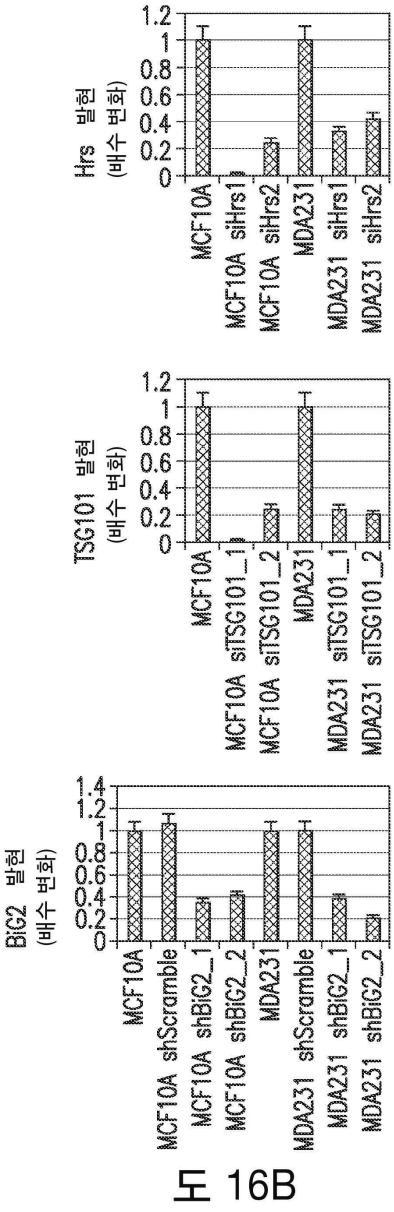
도 15C

도면16a


적색:Hrs
녹색:Dicer
적색:BiG2
녹색 :Dicer
적색 :TSG101
녹색 :Dicer
적색 :NRhPE
녹색 :Dicer
MCF10A
2.00%
1.50%
1.00%
0.50%
0.00%
4.00%
3.00%
2.00%
1.00%
0.00%
2.00%
1.50%
1.00%
0.50%
0.00%
0.10%
0.05%
0.00%
MDA-MB-231
100%
75%
50%
25%
0%
100%
75%
50%
25%
0%
100%
75%
50%
25%
0%
100%
75%
50%
25%
0%

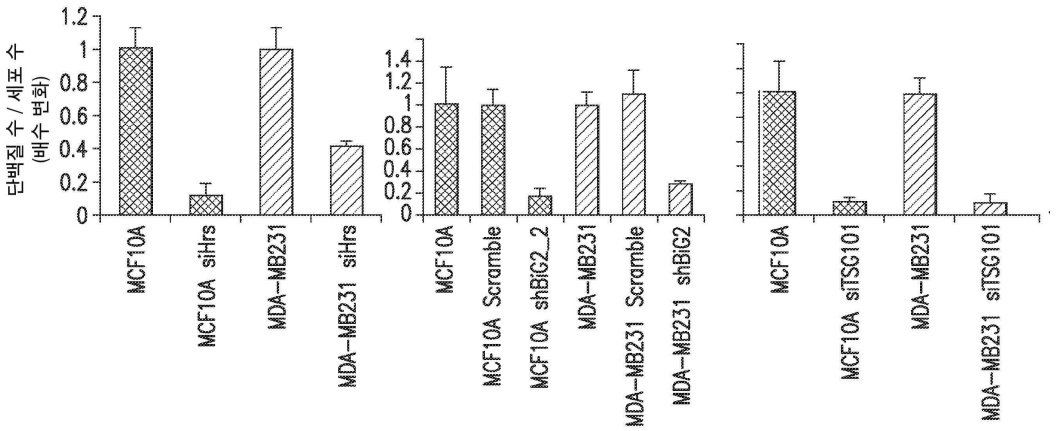
도 16A

도면16b


Hrs 발현
(배수 변화)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A siHrs1
MCF10A siHrs2
MDA231
MDA231 siHrs1
MDA231 siHrs2
TSG101 발현
(배수 변화)
MCF10A
MCF10A siTSG101_1
MCF10A siTSG101_2
MDA231
MDA231 siTSG101_1
MDA231 siTSG101_2
BiG2 발현
(배수 변화)
1.4
1.2
MCF10A
MCF10A shScramble
MCF10A shBiG2_1
MCF10A shBiG2_2
MDA231
MDA231 shScramble
MDA231 shBiG2_1
MDA231 shBiG2_2

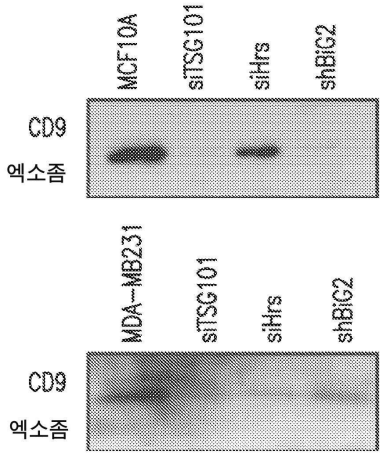
도 16B

도면16c



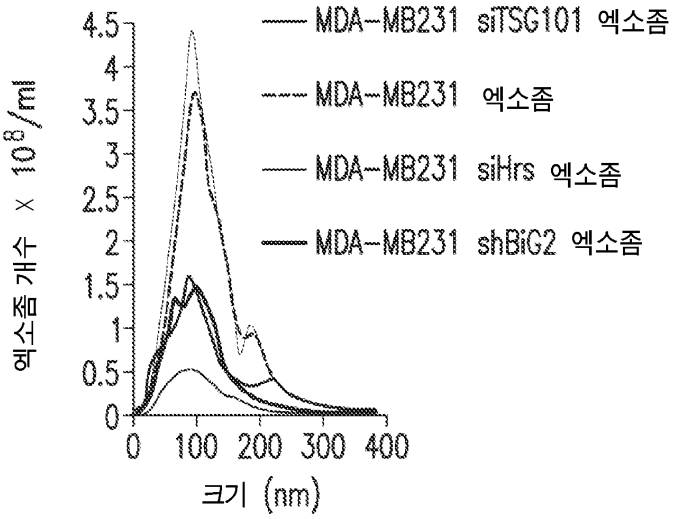
도 16C

도면16d



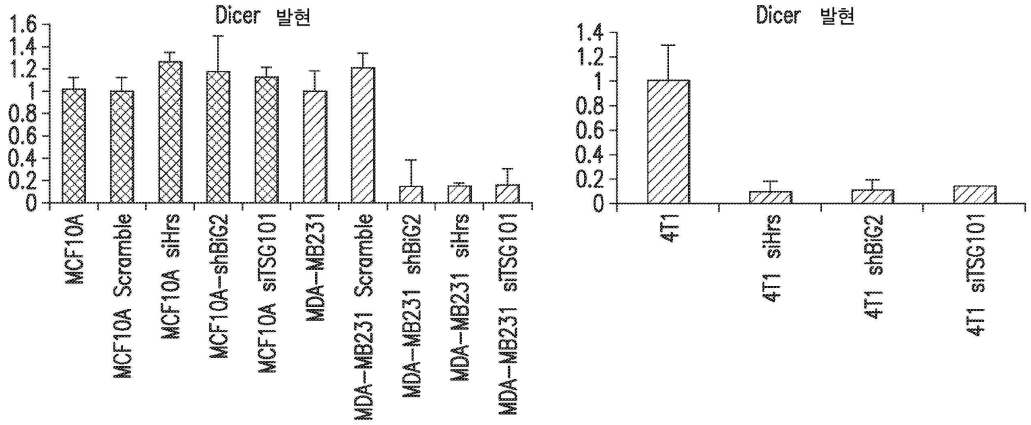
도 16D

도면16e



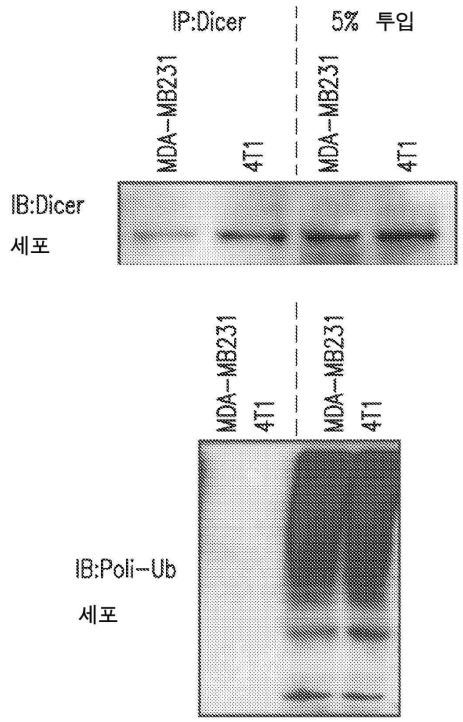
도 16E

도면16f



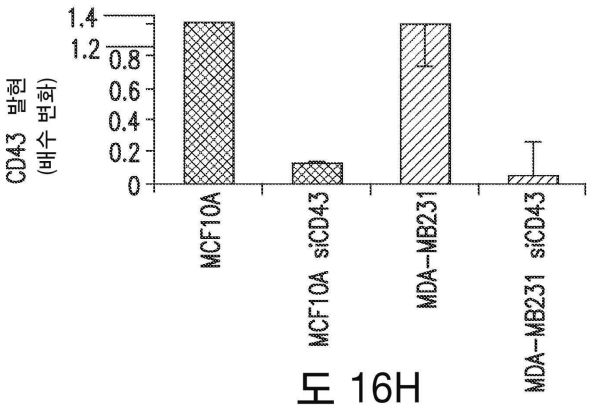
도 16F

도면16g



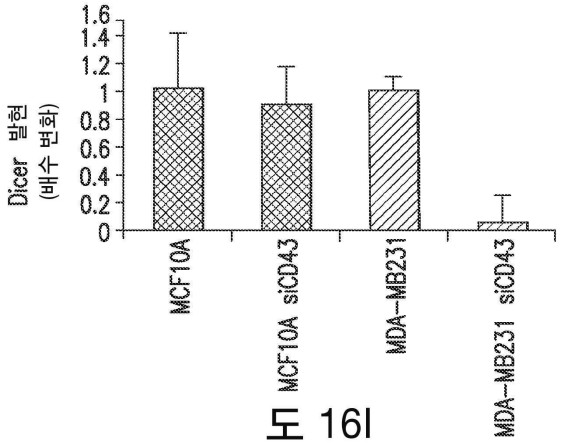
도 16G

도면16h



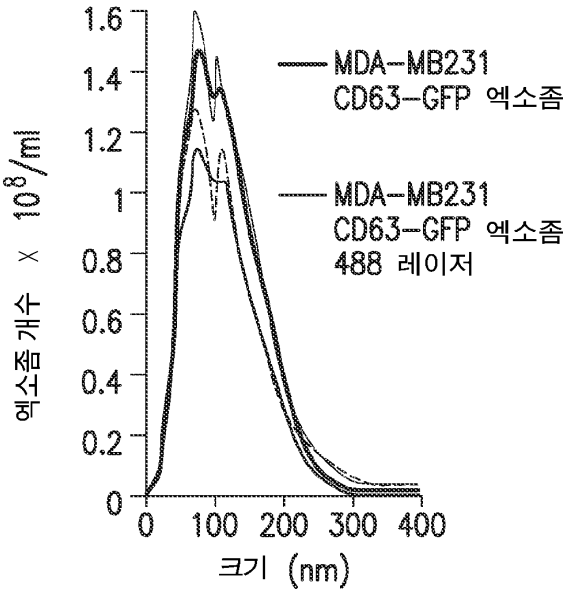
도 16H

도면16i



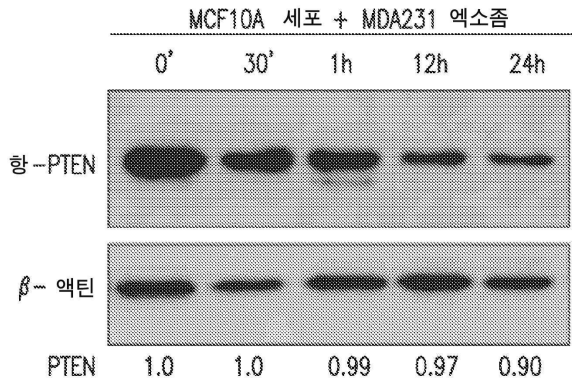
도 16I

도면17a



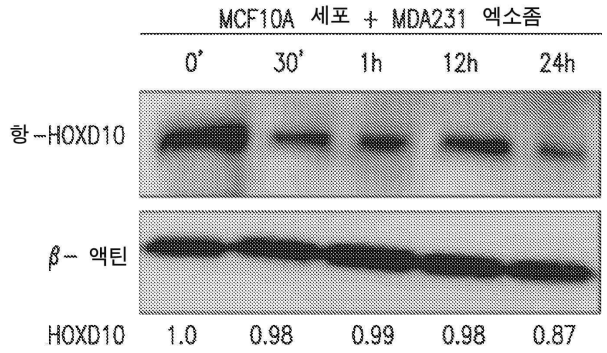
도 17A

도면17b



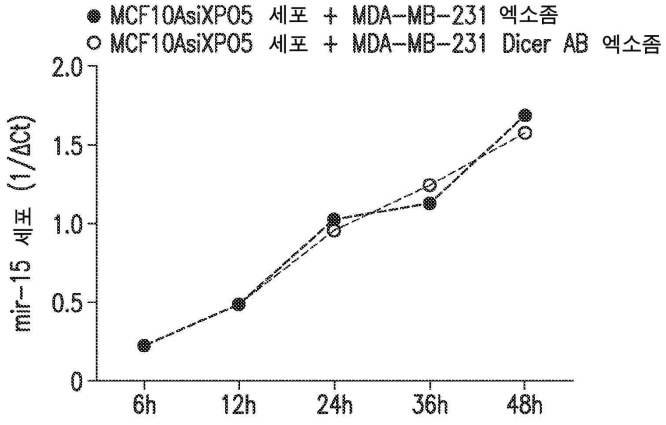
도 17B

도면17c



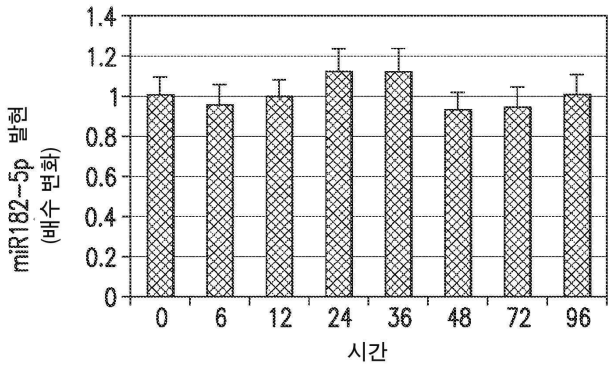
도 17C

도면17d



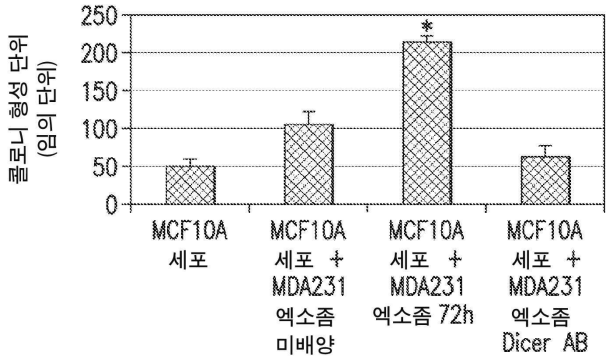
도 17D

도면17e



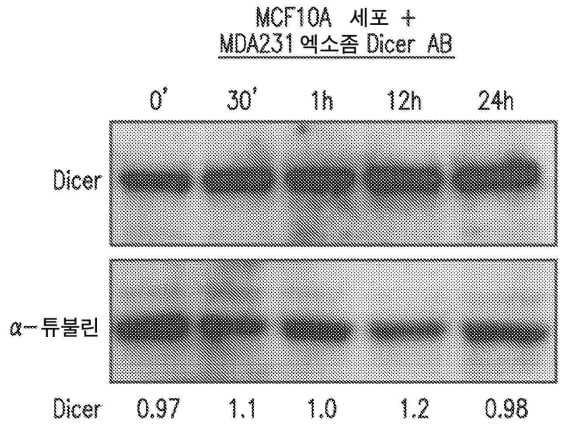
도 17E

도면17f



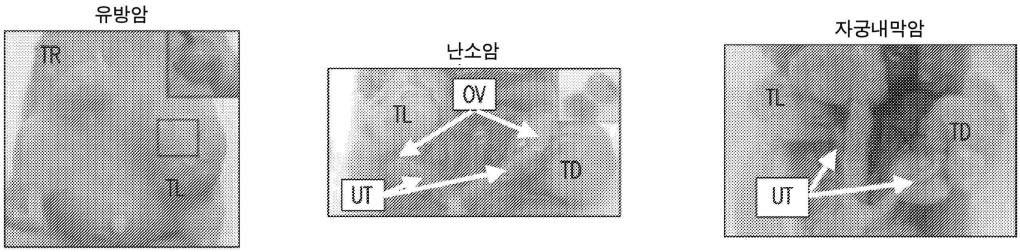
도 17F

도면17g



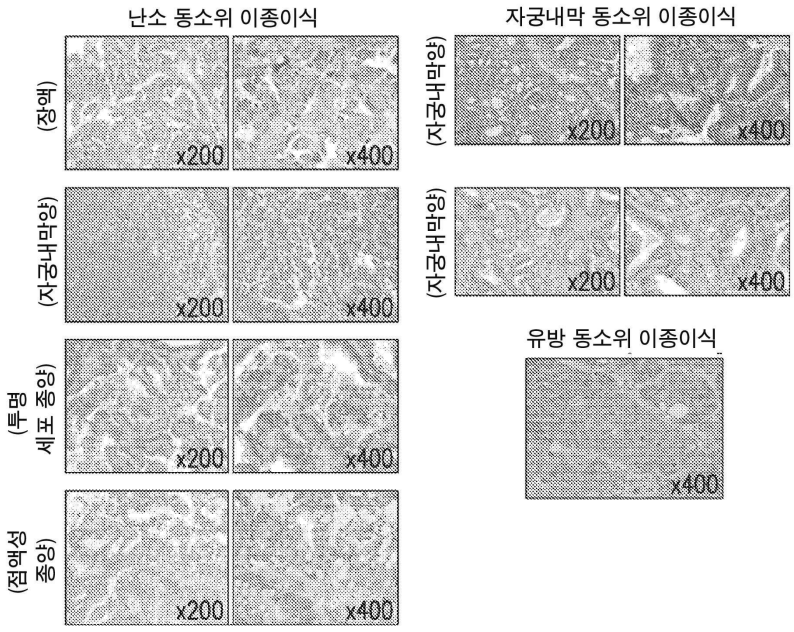
도 17G

도면18a



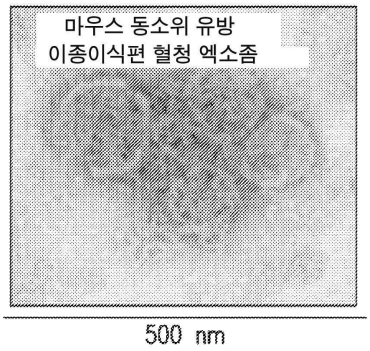
도 18A

도면18b



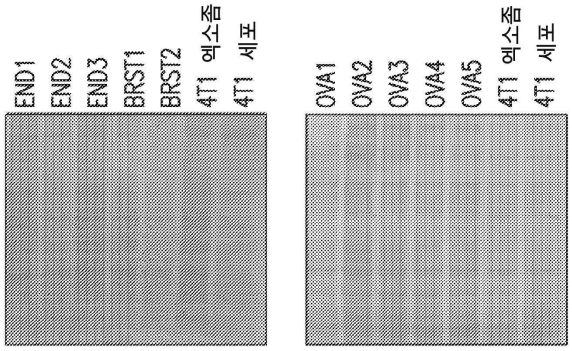
도 18B

도면18c



도 18C

도면18d



도 18D

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Board of Regents, The University of Texas System

Beth Israel Deaconess Medical Center, Inc.

KALLURI, Raghu

MELO, Sonia

<120> MIRNA BIOGENESIS IN EXOSOMES FOR DIAGNOSIS AND THERAPY

<130> UTFC.P1218WO

<140> unknown

<141> 2014-03-14

<150> 61/791,301

<151> 2013-03-15

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 1

caggaggtgg tgaaggacat 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 2

cccgttggtc tgtgagttt 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 3

gataccctcc caatcccagt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 4

gtcactgacc gcagagatga 20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 5

agtggctgtc gggtattcat c 21

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 6

ccgtccatat cccttgaaga atc 23

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 7

gctggtggta agcccagac 19

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 8

ggctcgctag tagagaccaa a 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 9

catgtacgtt gctatccagg c 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 10

ctccttaatg tcacgcacga t 21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 11

ggctgtattc ccctccatcg 20

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 12

ccagttggta acaatgccat gt 22

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 13

aggtagtagg ttgtatagtt ttagg 25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 14

taggaaagac agtagattgt atagt 25

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 15

agcacatcat ggtttacatg c 21

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 16

ctagagcagc aaataatgat tgg 23

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 17

ttcaagtaat ccaggatagg ctgt 24

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 18

tgcaagtaac caagaatagg cc 22

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 19

tgagtgtgtt ttccctccct 20

<210> 20

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 20

gccatggctg ctgtcag 17

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 21

gtccctgaga ccctttaacc 20

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 22

aacctcacct gtgaccctg 19

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 23

gtccctgaga ccctaacttg 20

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 24

agcctaaccc gtggattt 18

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 25

ttccacagca gcccctg 17

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 26

gatgtgcctc ggtggtgt 18

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 27

ctcgtcttac ccagcagtgt 20

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 28

gtcatcatta ccaggcagta ttag 24

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 29

gtcaagagca ataacgaaaa atg 23

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 30

gaggtcagga gcaataatga a 21

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 31

taccctgtag atccgaattt gtg 23

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 32

attcccctag atacgaattt gtga 24

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 33

gcttatcaga ctgatgttga ctg 23

<210> 34

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 34

cagcccatcg actggtg 17

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 35

gcagggctta gctgcttg 18

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 36

ggcggaactt agccactgt 19

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 37

gttaatgcta atcgtgatag gg 22

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 38

gctaatatgt aggagtcagt tgga 24

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 39

ctcaaaatgg gggcgctt 18

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 40

caccccaaaa tcgaagcact 20

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 41

ccaccccgtt ctacatactt c 21

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 42

accgtaccga gctgcatact 20

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic probe

<400> 43

cacaaattcg gttctacagg g 21

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic probe

<400> 44

tcaacatcag tctgataagc ta 22

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic probe

<400> 45

agtatgcagc tcggtacggt 20

<210> 46

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic probe

<400> 46

tgaagttttt gcatcgacca tatattcccc tagaatcgaa 40

<210> 47

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic probe

<400> 47

tgtcagacag cccatcgact ggtgttgcca tgagat 36

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic probe

<400> 48

cagcacgctt ccgctgcgcc actct 25

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligo

<400> 49

ggaacgagcc caaguacaat t 21

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligo

<400> 50

uuguacuugg gcucguuccg g 21

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligo

<400> 51

guuuaucauu caaguguaat t 21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligo

<400> 52

uuacacuuga augauaaact g 21

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligo

<400> 53

ggagagccuu uggucucuat t 21

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligo

<400> 54

uagagaccaa aggcucuccg g 21

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligo

<400> 55

ggcguuacac gaugcacuut t 21

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligo

<400> 56

aagugcaucg uguaacgcct g 21

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 5

【변경전】

hsa-mir-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-375MM1C/G, mmu-miR-2145-1-P, hsa-miR-181a*MM1G/C, 엑소좀, hsa-miR-222MM1G/A

【변경후】

hsa-mir-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-375MM1C/G, mmu-miR-2145-1-P, hsa-miR-181a*MM1G/C, 엑소좀, hsa-miR-222MM1G/A