



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월23일

(11) 등록번호 10-2181103

(24) 등록일자 2020년11월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/1013 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7015578
- (22) 출원일자(국제) 2014년11월25일
 심사청구일자 2019년07월24일
- (85) 번역문제출일자 2016년06월13일
- (65) 공개번호 10-2016-0089398
- (43) 공개일자 2016년07월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/067321
- (87) 국제공개번호 WO 2015/094609
 국제공개일자 2015년06월25일
- (30) 우선권주장
 61/909,834 2013년11월27일 미국(US)
 61/985,000 2014년04월28일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 US20130197206 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 시그마-알드리치 컴퍼니., 엘엘씨
 미국 미주리 63103 세인트 루이스 스프러스 스트리트 3050
- (72) 발명자
 크레테르, 카롤
 미국, 미주리 63103, 세인트 루이스, 스프러스 스트리트 3050, 시그마-알드리치 컴퍼니., 엘엘씨
- (74) 대리인
 강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 생물학적 유체로부터 마이크로 RNA 분리

(57) 요약

본 발명은 생물학적 유체로부터 miRNA를 분리하기 위한 방법과 키트를 제공한다. 구체적으로, 상기 방법은 생물학적 유체를 표면 활성제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉시키고, 여기서 표면 활성제는 생물학적 유체 성분을 해리하고, 그리고 항-miRNA-결합 단백질 시약은 miRNA와 연관된 miRNA-결합 단백질과 상호작용하여 면역침전된 miRNA 복합체를 형성하고; 그리고 miRNA를 면역침전된 miRNA 복합체로부터 방출하는 것을 포함한다. 순환하는 miRNA와 연관될 수 있는 miRNA-결합 단백질의 실례가 더욱 제공된다.

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6806 (2018.05)

C12Y 304/21014 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

생물학적 유체로부터 마이크로RNA (miRNA)를 분리하기 위한 방법에 있어서, 상기 방법은 (a) 생물학적 유체를 표면 활성제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉시키고, 여기서 표면 활성제는 생물학적 유체 성분을 해리하고, 그리고 항-miRNA-결합 단백질 시약은 miRNA와 연관된 miRNA-결합 단백질과 상호작용하여 면역침전된 miRNA 복합체를 형성하고; 그리고 (b) 면역침전된 miRNA 복합체를 프로테아제와 실온에서 접촉시켜 miRNA를 면역침전된 miRNA 복합체로부터 정제 없이 방출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 생물학적 유체는 소포성 miRNA 및 비-소포성 miRNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 생물학적 유체는 혈장 또는 혈청인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 표면 활성제는 비이온성 표면 활성제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 생물학적 유체는 표면 활성제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 동시에 접촉되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 생물학적 유체, 표면 활성제, 그리고 항-miRNA-결합 단백질 시약은 30 분 동안 항온처리된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 생물학적 유체, 표면 활성제, 그리고 항-miRNA-결합 단백질 시약은 실온에서 항온처리된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 항-miRNA-결합 단백질 시약은 고체 지지체에 부착된 항-Argonaut 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 고체 지지체는 자성 비드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

청구항 1에 있어서, 프로테아제는 단백질분해효소 K인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 프로테아제와의 접촉은 10 분 동안 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

청구항 1에 있어서, 면역침전된 miRNA 복합체로부터 방출된 miRNA는 다른 유형의 RNA 분자가 없는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

마이크로RNA를 생물학적 유체로부터 분리하기 위한 키트에 있어서, 상기 키트는 (a) 제 1 표면 활성제, (b) 테옥시콜레이트 나트륨과 황산 라우릴 나트륨 염을 포함하는 제 2 표면 활성제, (c) 항-Argonaut 항체, 그리고 (d) 프로테아제 K를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 항-miRNA-결합 단백질 시약은 고체 지지체에 부착된 항-Argonaut 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 항-Argonaut 항체는 Ago1, Ago2, Ago3 및/또는 Ago4에 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 18

삭제

청구항 19

청구항 16에 있어서, 고체 지지체는 자성 비드인 것을 특징으로 하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 발명의 분야

[0002] 본 발명은 생물학적 유체로부터 마이크로RNA를 분리하기 위한 수단에 관계한다.

배경 기술

[0003] 배경

[0004] 마이크로RNA (miRNAs)는 특정한 염기 대합 상호작용을 통한 특정한 전령 RNA (mRNA) 표적의 전사후 조절에 의해 유전자 조절 네트워크에 영향을 주는 작은, 비코딩 RNA이다. miRNA는 인간 생체액 내에서 무세포 형태로 존재하는 것으로 밝혀졌다. 이들 무세포 miRNA는 비-소포성이고, miRNA-단백질 복합체 내에 단백질에 의해 결합되고 보호되며, 막-결합된 소포, 예를 들면, 엑소좀 또는 마이크로소포, 또는 둘 모두에 동봉된다. 질환에서 miRNA의 중요한 기능적 역할을 고려하면, 이러한 세트의 핵산 분자는 쉽게 가용한 생물학적 표본, 예를 들면, 혈액, 혈청 및 혈장, 소변, 또는 타액에서 질환 현성에 앞서, 매우 다양한 환자에서 및 개체에서 질환을 진단하고 예측하기 위한, 그리고 요법에 대한 반응을 모니터링하기 위한 후보를 내포한다. miRNA를 분리하는 현재 방법은 세포와 조직에서 상대적으로 풍부한 miRNA에 관계하고, 쉽게 자동화되거나 또는 정량증가되지 않는, 복잡적이고 독성 화합물을 수반하는, 또는 소포성 또는 비-소포성 miRNA를 특이적으로 분리할 수 있는 스핀 칼럼을 이용한다. 게다가, 진단적 또는 예후적 관심의 miRNA는 종종, 생체액 내에 낮은 존재비에서 존재하고, 현재 분리 방법을 이용한 그들의 검출을 어렵게 만든다. 이런 이유로, 생체액 내에 모든 또는 대다수의 miRNA를 분리하기 위한 단순하고, 효율적이고, 자동화가능하고, 그리고 확장가능한 방법이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] **발명의 요약**

[0006] 본 발명의 한 가지 양상은 생물학적 유체로부터 마이크로RNA (miRNA)를 분리하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 생물학적 유체를 표면 활성제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 표면 활성제는 생물학적 유체 성분을 해리하고, 그리고 항-miRNA-결합 단백질 시약은 miRNA와 연관된 miRNA-결합 단백질과 상호작용하여 면역침전된 miRNA 복합체를 형성한다. 상기 방법은 면역침전된 miRNA 복합체로부터 miRNA를 방출하는 것을 더욱 포함한다.

[0007] 본 발명의 다른 양상은 생물학적 유체로부터 마이크로RNA를 분리하기 위한 키트를 포괄한다. 상기 키트는 표면 활성제, 항-miRNA-결합 단백질 시약, 그리고 miRNA 방출 시약을 포함한다.

[0008] 본 발명의 다른 양상과 반복은 아래에 더욱 상세하게 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0009] **도면의 간단한 설명**

도면 1은 Tri Reagent[®] BD 또는 RNA 면역침전 (RIP)을 이용하여 0.2 ml 혈장으로부터 miRNA 단리를 비교하는 2가지 플롯을 제공한다. RIP에 의해 분리된 miRNA의 양은 Tri Reagent[®] BD를 이용하여 분리된 miRNA로부터 배수적 차이로서 표시된다. (A)는 let-7a-5p, 23a-3p 및 191-5p miRNA의 수준을 묘사하고, 그리고 (B)는 142-3p 및 451a miRNA의 수준을 보여준다.

도면 2는 Ago-RIP 또는 Qiagen 칼럼 정제 키트를 이용하여 혈장으로부터 분리된 miRNA의 수준을 보여주는 3가지 플롯을 제공한다 (Q1, Q2). 용리된 miR/μl의 사본으로서 분리된 miRNA의 양이 let-7a, 23a 및 142 miRNA (A), 191 miRNA (B), 그리고 451a miRNA (C)에 대해 도시된다.

도면 3은 스트렙타비딘 또는 단백질 A 비드로 비오틴화된 (b-Ago2 또는 b-Ago) 또는 비-비오틴화된 (Ago2) 항체로 RIP를 이용하여 혈장으로부터 분리된 miRNA의 수준을 보여주는 3가지 플롯을 제공한다. let-7a (A), 23a (B), 그리고 191 (C) miRNA에 대한 용리된 miR/μl의 사본으로서 표현된 분리된 miRNA의 양이 도시된다. 이용된 항체 (팔호 안에 클론)는 x 축 상에 표시된다.

도면 4는 열 방출과 함께 Ago-RIP를 이용하여 혈장으로부터 분리된 miRNA의 수준을 보여주는 2가지 플롯을 제공한다. Q는 Qiagen 칼럼 정제를 나타낸다; RIP-Q는 면역침전, 그 이후에 Qiagen 칼럼 정제를 나타낸다; bRIP-Q는 비오틴화된 항체를 이용한 면역침전, 그 이후에 Qiagen 칼럼 정제를 나타낸다. (A) Qiagen 칼럼 정제, 칼럼 정제와 합동으로 RIP, 그리고 프로테아제 K 방출과 함께 RIP를 이용하여 합성 cel-miR-39-3p 스파이크-인의 수준을 묘사한다. 스파이크-인의 수준은 분리 동안 합성 cel-miR-39-3p 스파이크-인의 총 퍼센트로서 표현된다. (B) Qiagen 칼럼 정제, 칼럼 정제와 합동으로 RIP, 그리고 프로테아제 K 방출과 함께 RIP를 이용하여, 혈장으로부터 분리된 let7a miRNA의 수준을 묘사한다. let7a의 수준은 1 μl의 회수된 표본에서 let7a의 사본으로서 표현된다.

도면 5는 다양한 온도에서 프로테아제 K 방출과 함께 Ago-RIP를 이용하여 혈장으로부터 분리된 miRNA의 수준을 보여주는 2가지 플롯을 제공한다. (A) 프로테아제 K에 의해 방출된 let7a miRNA의 수준 (각 온도에서 왼쪽 막대), 그리고 비드 상에서 유지된 수준 (각 온도에서 오른쪽 막대)을 묘사한다. let7a miRNA의 수준은 Qiagen의 miRNeasy 혈청/혈장 키트로 분리된 0.2 ml의 동일한 혈장에서 let7a miRNA의 총 퍼센트로서 표현된다. (B) 프로테아제 K에 의해 방출된 miR451a miRNA의 수준 (각 온도에서 왼쪽 막대), 그리고 비드 상에서 유지된 수준 (각 온도에서 오른쪽 막대)을 묘사한다. miR451a miRNA의 수준은 Qiagen의 miRNeasy 혈청/혈장 키트로 분리된 0.2 ml의 동일한 혈장에서 miR451a miRNA의 총 퍼센트로서 표현된다.

도면 6은 miRNA 단리의 상업적으로 가용한 방법, 또는 표준 튜브에서 프로테아제 K 방출과 함께 RIP를 이용하여 단리를 이용하여 혈장으로부터 분리된 let7a (A) 또는 miR451a (B) miRNA의 수준을 보여주는 2가지 플롯을 제공한다. E1과 E2는 Exiqon으로부터 miRCury RNA 분리 키트-생체액을 이용한 miRNA 단리를 나타낸다. Q1과 Q2는 Qiagen으로부터 miRNeasy 혈청/혈장 키트를 이용한 miRNA 단리를 나타낸다. RIP-std-Q는 면역침전, 그 이후에 Qiagen 칼럼 정제를 나타낸다. miRNA의 수준은 0.2 ml 혈장으로부터 회수된 전체 사본으로서 표현된다.

도면 7은 miRNA 단리의 상업적으로 가용한 방법, 또는 프로테아제 K 방출과 함께 Ago-RIP를 이용한 분리 (RIP1-4)를 이용하여 혈장으로부터 분리된 let7a miRNA의 수준을 보여주는 2가지 플롯을 제공한다. (A)는 시험 1을 보여주고, 그리고 (B)는 시험 2를 보여준다. E1과 E2는 Exiqon으로부터 miRCury RNA 분리 키트-생체액을 이용한

miRNA 단리를 나타낸다. Q1과 Q2는 Qiagen으로부터 miRNeasy 혈청/혈장 키트를 이용한 miRNA 단리를 나타낸다. let7a의 수준은 0.2 ml 혈장으로부터 회수된 let7a의 전체 사본으로서 표현된다.

도면 8은 Ago-RIP, 그 이후에 프로테아제와 RNA분해효소 저해제와 함께 또는 이들 없이, 그리고 세정제 선처리와 함께 또는 이런 선처리 없이 프로테아제 K 방출을 이용하여 혈장으로부터 단리된 miRNA의 수준을 보여주는 2가지 플롯을 제공한다. +pre,+inh; 이계팔 및 저해제가 혈장에 첨가되고, 그리고 Ago2-비드에 첨가하기 전 ~30분에 항온처리됨. +pre,-inh; 이계팔이 저해제 없이 혈장에 첨가되고 Ago2-비드에 첨가하기 전 ~30분에 항온처리됨. -pre,+inh; 이계팔 및 저해제가 Ago2-비드와 동시에 혈장에 첨가됨. -pre,-inh; 이계팔이 저해제 없이, Ago2-비드와 동시에 혈장에 첨가됨. (A)는 회수된 let7a miRNA의 사본을 묘사하고, 그리고 (B)는 회수된 miR451a miRNA의 사본을 묘사한다.

도면 9는 % 총 이계팔 처리된 miRNA로서 지정된 miRNA에 대한 유리 (각 miRNA에 대해 왼쪽 막대) 및 소포 (각 miRNA에 대해 오른쪽 막대)의 수준을 보여주는 플롯을 제공한다.

도면 10은 Ago-RIP, 그 이후에 프로테아제 K 방출 (RIP)을 이용하여 0.2 또는 0.4 ml 혈장으로부터, 또는 Exiqon (E)으로부터 miRCury RNA 단리 키트-생체액을 이용하여 0.2 ml 혈장으로부터 단리된 miRNA의 수준을 보여주는 3가지 플롯을 제공한다. (A)는 회수된 let7a miRNA의 사본을 묘사하고, (B)는 회수된 miR191 miRNA의 사본을 묘사하고, 그리고 (C)는 회수된 miR451a miRNA의 사본을 묘사한다.

도면 11은 Ago-RIP, 그 이후에 프로테아제 K 방출을 이용하여 혈장으로부터 단리된 let7a의 수준을 보여주는 플롯을 제공한다. RIP 항온처리는 실온에서 5, 15, 30, 또는 60 분 (5', 15', 30', 60') 동안이었다. 5, 15, 또는 30 분 동안 항온처리된 것들 모두 단백질분해효소 K 방출 전 5 회 세척되었다. 60 분 동안 항온처리된 것들은 5, 4, 3, 2, 또는 1 회 (5w, 4w, 3w, 2w, 1w) 세척되었다. 0.2 ml 혈장으로부터 회수된 let7a의 총 수율이 도시된다.

도면 12A는 Ago-RIP 또는 칼럼-기초된 miRNA 단리 키트를 이용하여 혈장으로부터 단리된 let7a miRNA의 수준을 보여준다. 3가지 상이한 실험 (Exp)이 제공된다. S1과 S2는 Ago-RIP를 이용한 단리를 나타낸다; E1과 E2는 Exiqon으로부터 miRCury RNA 단리 키트-생체액을 이용한 단리를 나타낸다; 그리고 Q1과 Q2는 Qiagen으로부터 miRNeasy 혈청/혈장 키트를 이용한 단리를 나타낸다.

도면 12B는 Ago-RIP 또는 칼럼-기초된 miRNA 단리 키트를 이용하여 혈장으로부터 단리된 RNU6 작은 핵 RNA 및 SNORD48 작은 인 RNA의 수준을 제공한다. 3가지 상이한 실험이 제공된다. S1과 S2는 Ago-RIP를 이용한 단리를 나타낸다; E1과 E2는 Exiqon으로부터 miRCury RNA 단리 키트-생체액을 이용한 단리를 나타낸다; 그리고 Q1과 Q2는 Qiagen으로부터 miRNeasy 혈청/혈장 키트를 이용한 단리를 나타낸다.

도면 12C는 Ago-RIP 또는 칼럼-기초된 miRNA 단리 키트를 이용하여 혈장으로부터 단리된 GAPDH 전령 RNA, RN18S 리보솜 RNA, 그리고 RN28S 리보솜 RNA의 수준을 보여준다. 3가지 상이한 실험이 제공된다. S1과 S2는 Ago-RIP를 이용한 단리를 나타낸다; E1과 E2는 Exiqon으로부터 miRCury RNA 단리 키트-생체액을 이용한 단리를 나타낸다; 그리고 Q1과 Q2는 Qiagen으로부터 miRNeasy 혈청/혈장 키트를 이용한 단리를 나타낸다.

도면 13은 항-Ago1 항체, 항-Ago2 항체, 또는 항-Ago1과 항-Ago2 항체 둘 모두의 조합을 이용한 Ago-RIP를 통해 혈장으로부터 단리된 지정된 miRNA의 수준을 보여주는 플롯을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 발명의 상세한 설명

순환하는 miRNA를 단리하기 위한 효율적이고 신속한 방법이 발견되었다. 실시예에서 예시된 바와 같이, 본 발명의 방법은 소포-연관된 및 비-소포 연관된 순환하는 miRNA 둘 모두를 동시에 단리할 수 있다. 유리하게는, 본 발명의 방법과 키트는 다른 유형의 RNA에 의한 오염 없이 miRNA의 순수한 제조물의 신속하고 특정한 단리를 허용한다. 추가적으로, 본원에서 개시된 방법과 키트는 높은 세포외액으로부터 높은 수율에서 miRNA의 단리를 허용한다. 게다가, 본 발명의 방법은 확장가능하고, 증가하는 용적의 세포의 생물학적 유체로부터 miRNA 단리를 허용한다.

miRNA의 수준은 암, 심혈관 질환을 비롯한 질환, 그리고 정신분열병, 알츠하이머병, 면역 세포 발달 및 적응성과 선천성 면역 둘 모두의 조정, 줄기 세포 유지와 다능성, 신경계 발달, 당뇨병을 비롯한 내분비 질환, 체장의 발달, 어린 X 증후군, 피부 상처 치유, 세포 주기 진행, 이식된 조직 거부, 저산소증, 골격근 분화를 비롯한 다

양한 다른 질환 및 발달 과정과 상관된다. 추가적으로, miRNA는 또한, 바이러스에 의해 발현되고, 그리고 이들 miRNA의 표적 유전자가 확인되었다. 따라서, 본 발명의 방법과 키트는 쉽게 가용한 생물학적 표본, 예를 들면, 혈액, 혈청, 또는 혈장을 이용하여 질환 또는 질환 상태를 진단하는 검정을 위한 miRNA를 제조하는데 이용될 수 있다.

[0013] **I. 방법**

[0014] 본 발명은 생물학적 유체로부터 마이크로RNA (miRNA)를 분리하기 위한 방법을 포괄한다. 상기 방법은 생물학적 유체를 표면 활성제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉시키는 것을 포함한다. 표면 활성제는 생물학적 유체 성분을 해리하고, 그리고 항-miRNA-결합 단백질 시약은 miRNA와 연관된 miRNA-결합 단백질(들)과 상호작용하여 면역침전된 miRNA 복합체를 형성한다. 상기 방법은 면역침전된 miRNA 복합체로부터 miRNA를 방출하는 것을 더욱 포함한다.

[0015] 본원에서 개시된 방법은 miRNA를 특이적으로 분리한다. 아래 실시예 12에서 상술된 바와 같이, 다른 유형의 작은 RNA (가령, 작은 핵 RNA 또는 작은 인 RNA)가 개시된 방법에 의해 분리되지 않고, 그리고 더욱 큰 RNA 분자 (가령, 전령 RNA 또는 리보솜 RNA)가 개시된 방법에 의해 분리되지 않는다.

[0016] **(a) 생물학적 유체**

[0017] 본 발명의 방법은 개체로부터 획득된 생물학적 유체 표본에서 세포의 순환 miRNA의 분리를 포함한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "개체"는 인간 또는 동물을 지칭한다. 개체는 태아, 소아, 또는 성체일 수 있다. 개체는 수컷 또는 암컷일 수 있다. 적합한 동물은 척추동물, 예를 들면, 포유동물, 조류, 파충류, 양서류, 그리고 어류를 포함한다. 적합한 포유동물의 실례는 제한 없이, 설치류, 반려 동물, 가축, 그리고 영장류를 포함한다. 설치류의 무제한적 실례는 생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스쥐, 그리고 기니 피그를 포함한다. 적합한 반려 동물은 고양이, 개, 토끼, 해피호그, 그리고 흰담비를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 가축의 무제한적 실례는 말, 염소, 양, 돼지, 소, 라마, 그리고 알파카를 포함한다. 적합한 영장류는 카푸친 원숭이, 침팬지, 여우원숭이, 마카크, 마모셋, 타마린, 거미 원숭이, 다람쥐 원숭이, 그리고 버빗 원숭이를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 조류의 무제한적 실례는 닭, 칠면조, 오리, 그리고 거위를 포함한다. 예시적인 개체는 인간이다.

[0018] 용어 "생물학적 유체"는 임의의 소정의 개체로부터 분리된 모든 생물학적 유체와 배출물을 지칭할 수 있다. 생물학적 유체의 무제한적 실례는 혈액 및 이의 분획물, 혈액 혈청, 혈액 혈장, 소변, 배설물, 정액, 정액, 정액, 전립선액, 사정전 유체 (쿠퍼액), 흉막 삼출액, 눈물, 타액, 객담, 땀, 생검, 복수, 뇌척수액, 양수, 림프, 골수, 경부 분비액, 질 분비액, 자궁내막 분비액, 위장관 분비액, 기관지 분비액, 유방 분비액, 난소낭 분비액, 조직액, 중앙 흡입, 그리고 조직액 표본을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 유체는 혈액 혈청이다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 혈액 혈장이다.

[0019] 개체로부터 혈액 혈장 또는 혈청 표본을 획득하는 방법은 당분야에서 널리 공지된다. 가령, 카테터와 함께 또는 카테터 없이 정맥천자가 혈청을 준비하기 위한 혈액 표본을 수집하는데 이용될 수 있다. 혈액 표본으로부터 혈장과 혈청을 준비하는 방법은 당분야에서 공지된다. 일반적으로, 혈액 표본은 아래에 더욱 설명된 바와 같이, 처리되는 혈장 또는 혈청의 충분한 양을 공급할 만큼 크다. 혈장 또는 혈청 표본은 표본을 수집한 직후에 처리될 수 있다. 대안으로, 혈장 또는 혈청 표본은 추후 처리를 위해 동결될 수 있다.

[0020] 생물학적 유체 표본은 표본을 새로 수집함으로써 개체로부터 획득될 수 있다. 대안으로, 생물학적 유체 표본은 이전에 수집되고 보관된 표본으로부터 획득될 수 있다. 가령, 생물학적 유체가 혈액 혈장 또는 혈청일 때, 표본은 보관되고 보존된 혈액 표본의 수집물로부터 획득될 수 있다. 일부 구체예에서, 표본은 표본을 새로 수집함으로써 획득된다. 다른 구체예에서, 표본은 이전에 수집되고 보관된 표본으로부터 획득된다.

[0021] 일부 구체예에서, 생물학적 유체 표본은 희석되지 않는다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체 표본은 miRNA의 분리 전에 희석된다. 희석의 정도는 miRNA, 표본 내에 생물학적 유체의 유형, 개체, 개체의 질환 상태, miRNA를 계측하는데 이용된 검정의 유형, 그리고 miRNA를 계측하는데 이용된 검정에서 활용된 시약을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다수의 인자에 의존할 수 있다. 한 구체예에서, 생물학적 유체 표본은 본래 표본 용적의 약 1/2 내지 본래 표본 용적의 약 50,000 배 범위에서 변하는 희석체의 용적을 첨가함으로써 희석된다. 희석체는 miRNA 분리 또는 차후 처리 단계에서 이용된 다른 방법을 간섭하지 않는 임의의 유체이다. 적합한 희석체의 무제한적 실례는 탈이온수, 증류수, 식염수, 링거액, 인산염 완충된 식염수 용액, TRIS-완충된 식염수, 표준 식염수 구연산염, 그리고 HEPES-완충된 식염수를 포함한다.

[0022] (b) 표면 활성화제

[0023] 생물학적 유체는 표면 활성화제 (대안으로 "계면활성제" 또는 "세정제"로서 지칭됨)와 접촉된다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "표면 활성화제"는 순환하는 miRNA를 포함할 수 있는 생물학적 유체 성분을 해리할 수 있는 임의의 작용제를 설명하는데 이용될 수 있다. 순환하는 miRNA를 포함할 수 있는 생물학적 유체 성분의 무제한적 실례는 세포의 소포, 예를 들면, 지질단백질, 엑소좀, 마이크로소포, 엑토솜, 아포토시스성 몸체, 그리고 다른 세포의 소포를 포함한다.

[0024] 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 생물학적 유체 성분을 해리할 수 있는 임의의 표면 활성화제가 이러한 표면 활성화제가 본 발명의 면역침전된 miRNA 복합체의 형성을 간섭하지 않는다면, 본 발명의 방법에서 이용될 수 있다. 가령, 표면 활성화제는 음이온성 표면 활성화제, 양이온성 표면 활성화제, 쌍성 이온성 표면 활성화제, 비이온성 표면 활성화제, 또는 이들의 조합일 수 있다. 본 발명의 표면 활성화제의 정제는 순환하는 miRNA를 포함할 수 있는 생물학적 유체 내에 생물학적 유체 성분의 정제, 항-miRNA-결합 단백질 시약, 그리고 단리된 miRNA에 따라, 변할 수 있고 변할 것이다.

[0025] 일부 구체예에서, 표면 활성화제는 음이온성 표면 활성화제이다. 적합한 음이온성 표면 활성화제는 아민 도데실벤젠 술포산염; 암모늄 카프릴레스 황산염; 암모늄 큐멘술포네이트; 암모늄 디히드록시 스테아르산염; 암모늄 도데실벤젠 술포산염; 암모늄 라우레스 황산염; 암모늄 라우레스-12 황산염; 암모늄 라우레스-30 황산염; 암모늄 라우릴 사르코시네이트; 암모늄 라우릴 황산염; 암모늄 라우릴 술포숙시네이트; 암모늄 리그노술포산염; 암모늄 미레스 황산염; 암모늄 나프탈렌 술포산염; 암모늄 노녹시놀-20 황산염; 암모늄 노녹시놀-30 황산염; 암모늄 노녹시놀-4 황산염; 암모늄 노녹시놀-6 황산염; 암모늄 노녹시놀-9 황산염; 암모늄 올레산 황산염; 암모늄 퍼플루오로옥타노에이트; 암모늄 스테아르산염; 암모늄 자일렌술포산염; 부틸 나프탈렌 술포산염; 부틸 인산염; 칼슘 도데실벤젠 술포산염; 칼슘 스테아로일 락틸레이트; 칼슘 테트라프로필렌벤젠 술포산염; 카프릴레스-9 카르복실산; 세틸 인산염; 큐멘 술포산; DEA-세틸 인산염; DEA-도데실벤젠 술포산염; DEA-라우릴 황산염; 데세스-4 인산염; 이암모늄 라우릴 술포숙시네이트; 이암모늄 스테아릴 술포숙시네이트; 디아밀 나트륨 술포숙시네이트; 디시클로헥실 나트륨 술포숙시네이트; 디헥실 나트륨 술포숙시네이트; 디이소부틸 나트륨 술포숙시네이트; 디라우레스-7 구연산염; 디메티코놀; 디노녹시놀-4 인산염; 디옥틸 암모늄 술포숙시네이트; 디옥틸 나트륨 술포숙시네이트; 이나트륨 세타아릴 술포숙시네이트; 이나트륨 코카미도 MEA-술포숙시네이트; 이나트륨 코카미도 PEG-3 술포숙시네이트; 이나트륨 데세스-6 술포숙시네이트; 이나트륨 데실 디페닐 에테르 디술포산염; 이나트륨 도데실옥시 프로필 술포숙시네이트; 이나트륨 이소데실 술포숙시네이트; 이나트륨 라네스-5 술포숙시네이트; 이나트륨 라우라미도 DEA-술포숙시네이트; 이나트륨 라우라미도 MEA-술포숙시네이트; 이나트륨 라우레스 술포숙시네이트; 이나트륨 라우릴 술포숙시네이트; 이나트륨 미리스타미도 MEA-술포숙시네이트; 이나트륨 올레아미도 MEA-술포숙시네이트; 이나트륨 올레아미도 PEG-2 술포숙시네이트; 이나트륨 올레스-3 술포숙시네이트; 이나트륨 PEG-4 코카미도 MIPA 술포숙시네이트; 이나트륨 리시놀레아미도 MEA-술포숙시네이트; 이나트륨 스테아릴 술포숙시네이트; 이나트륨 운데실렌아미도 MEA-술포숙시네이트; 디트리데실 나트륨 술포숙시네이트; 도데세닐숙신산 무수물; 도데실 디페닐 에테르 디술포산; 도데실 디페닐옥시드 디술포산; 도데실벤젠술포산; 글리세릴 디올리에이트 SE; 글리세릴 디스테아레이트 SE; 글리세릴 리시놀리에이트 SE; 글리세릴 스테아르산염 구연산염; 글리세릴 스테아르산염 SE; 글리콜 스테아르산염 SE; 헥실 인산염; 이소프로필 인산염; 이소프로필아민 도데실벤젠술포네이트; 이소스테아레스-2 인산염; 이소트리테세스-3 인산염; 이소트리테세스-6 인산염; 라우레스-1 인산염; 라우레스-12 카르복실산; 라우레스-3 인산염; 라우레스-4 인산염; 라우레스-6 인산염; 라우레스-7 구연산염; 라우레스-9 인산염; 라우릴 인산염; 리튬 라우릴 황산염; 마그네슘 라우레스 황산염; 마그네슘 PEG-3 코카미드 황산염; MEA-라우레스 인산염; MEA-라우릴 황산염; MIPA-라우레스 황산염; MIPA-라우릴 황산염; 미리스토일 사르코신; 나프탈렌-포르말데히드 술포산염; 노녹시놀-10 인산염; 노녹시놀-12 인산염; 노녹시놀-3 인산염; 노녹시놀-4 인산염; 노녹시놀-4 황산염; 노녹시놀-6 인산염; 노녹시놀-7 인산염; 노녹시놀-8 인산염; 노녹시놀-9 인산염; 노닐 노녹시놀-10 인산염; 노닐 노녹시놀-15 인산염; 노닐 노녹시놀-7 인산염; 올레스-10 카르복실산; 올레스-10 인산염; 올레스-3 카르복실산; 올레스-4 인산염; 올레스-5 인산염; 올레스-6 카르복실산; 올레스-7 인산염; PEG-2 디라우레이트 SE; PEG-2 디올리에이트 SE; PEG-2 디스테아레이트 SE; PEG-2 라우린산염 SE; PEG-2 올레산염 SE; PEG-2 스테아르산염 SE; PEG-9 스테라미드 카르복실산; 칼륨 세틸 인산염; 칼륨 데세스-4 인산염; 칼륨 도데실벤젠 술포산염; 칼륨 이소스테아레스-2 인산염; 칼륨 라우로일 사르코시네이트; 칼륨 라우릴 황산염; 칼륨 올레산염; 칼륨 올레산 황산염; 칼륨 퍼플루오로옥토에이트; 칼륨 리시놀산 황산염; PPG-2 라우린산염 SE; PPG-2 올레산염 SE; PPG-2 스테아르산염 SE; PPG-5-세세스-10 인산염; 프로필렌 글리콜 라우린산염 SE; 프로필렌 글리콜 올레산염 SE; 프로필렌 글리콜 리시놀리에이트 SE; 프로필렌 글리콜 스테아르산염

SE; PVM/MA 공중합체; 나트륨 2-에틸헥실 인산염; 나트륨 2-에틸헥실 황산염; 나트륨 올레핀 술폰산염; 나트륨 알릴옥시 히드록시프로필 술폰산염; 나트륨 베헤노일 락틸레이트; 나트륨 부톡시에톡시 아세트산염; 나트륨 부틸 나프탈렌 술폰산염; 나트륨 부틸 올레산염 황산염; 나트륨 부틸 올레산염 술폰산염; 나트륨 부틸 인산염; 나트륨 카프로일 락틸레이트; 나트륨 카프릴릴 술폰산염; 나트륨 세틸 황산염; 나트륨 담즙산염; 나트륨 큐멘술포네이트; 나트륨 데세스 황산염; 나트륨 데실 디페닐 에테르 술폰산염; 나트륨 데실 황산염; 나트륨 테옥시콜레이트; 나트륨 디부틸 나프탈렌 술폰산염; 나트륨 디도데실벤젠 술폰산염; 나트륨 디이소옥틸 술포숙시네이트; 나트륨 디이소프로필 나프탈렌 술폰산염; 나트륨 디라우레스-7 구연산염; 나트륨 디노닐 술포숙시네이트; 나트륨 도데실 디페닐 에테르 디술폰산염; 나트륨 도데실 디페닐옥시드 디술폰산염; 나트륨 도데실벤젠술포네이트; 나트륨 글리세릴 트리올리에이트 황산염; 나트륨 헥사데실 디페닐 디술폰산염; 나트륨 헥사데실 디페닐옥시드 디술폰산염; 나트륨 헥실 디페닐옥시드 디술폰산염; 나트륨 이소티오네이트; 나트륨 이소데실 황산염; 나트륨 이소옥틸 황산염; 나트륨 이소스테아로일 락틸레이트; 나트륨 이소트리테세스-15 황산염; 젯산나트륨; 나트륨 라우라미도 DEA-술포숙시네이트; 나트륨 라우레스 인산염; 나트륨 라우레스 황산염; 나트륨 라우레스 술포숙시네이트; 나트륨 라우레스-10 인산염; 나트륨 라우레스-11 카르복실산염; 나트륨 라우레스-12 황산염; 나트륨 라우레스-13 아세트산염; 나트륨 라우레스-13 카르복실산염; 나트륨 라우레스-3 카르복실산염; 나트륨 라우레스-4 카르복실산염; 나트륨 라우레스-4 인산염; 나트륨 라우레스-6 카르복실산염; 나트륨 라우레스-7 카르복실산염; 나트륨 라우레스-7 황산염; 나트륨 라우레스-8 황산염; 나트륨 라우로일 글루타민산염; 나트륨 라우로일 락틸레이트; 나트륨 라우로일 락틸레이트; 나트륨 라우로일 메틸아미노프로피오네이트; 나트륨 라우로일 사르코시네이트; 나트륨 라우릴 인산염; 나트륨 라우릴 황산염; 나트륨 라우릴 술포아세테이트; 나트륨 리그네이트; 나트륨 리그노술폰산염; 나트륨 메탈릴 술폰산염; 나트륨 메틸 라우로일 타우레이트; 나트륨 메틸 미리스토일 타우레이트; 나트륨 메틸 올레오일 타우레이트; 나트륨 메틸 팔미토일 타우레이트; 나트륨 메틸 스테아로일 타우레이트; 나트륨 메틸나프탈렌술포네이트; 나트륨 m-니트로벤젠술포네이트; 나트륨 미레스 황산염; 나트륨 미리스토일 글루타민산염; 나트륨 미리스토일 사르코시네이트; 나트륨 미리스틸 황산염; 나트륨 노녹시놀 황산염; 나트륨 노녹시놀-10 황산염; 나트륨 노녹시놀-10 술포숙시네이트; 나트륨 노녹시놀-15 황산염; 나트륨 노녹시놀-4 황산염; 나트륨 노녹시놀-5 황산염; 나트륨 노녹시놀-6 인산염; 나트륨 노녹시놀-6 황산염; 나트륨 노녹시놀-8 황산염; 나트륨 노녹시놀-9 인산염; 나트륨 노녹시놀-9 황산염; 나트륨 옥톡시놀-2 에탄 술폰산염; 나트륨 옥톡시놀-3 황산염; 나트륨 옥틸 황산염; 나트륨 옥틸페녹시에톡시에틸 술폰산염; 나트륨 올레산 황산염; 나트륨 올레스-7 인산염; 나트륨 올레일 인산염; 나트륨 올레일 황산염; 나트륨 올레일 술포숙시나메이트; 나트륨 팔미토일 사르코시네이트; 나트륨 페닐 술폰산염; 나트륨 프로필 올레산염 황산염; 나트륨 스테아로일 락틸레이트; 나트륨 스테아릴 술포숙시나메이트; 나트륨 트리테세스 황산염; 나트륨 트리테세스-3 카르복실산염; 나트륨 트리테세스-6 카르복실산염; 나트륨 트리테세스-7 카르복실산염; 나트륨 트리테실 황산염; 나트륨 트리테실벤젠 술폰산염; 나트륨 자일렌술폰산염; 스테아로일 사르코신; TEA-라우로일 글루타민산염; TEA-라우릴 황산염; 테트라소듐 디카르복시에틸 스테아릴 술포숙시나메이트; TIPA-라우레스 황산염; 트리세테아레스-4 인산염; 트리세테스-5 인산염; 트리테세스-2 인산염; 트리테세스-3 인산염; 트리테세스-5 인산염; 트리테실 인산염; 그리고 트리라우레스-4 인산염; 그리고 트리옥틸 인산염을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0026] 다른 구체예에서, 표면 활성제는 양이온성 표면 활성제이다. 적합한 양이온성 표면 활성제의 실례는 알킬트리메틸암모늄 브롬화물; 벤잘코늄 염화물; 벤잘코늄 염화물; 벤질디메틸헥사데실암모늄 염화물; 벤질디메틸테트라데실암모늄 염화물; 벤질도데실디메틸암모늄 브롬화물; 벤질트리메틸암모늄 테트라클로로요오드산염; 세틸트리메틸암모늄 브롬화물 (CTAB); 디메틸디옥타데실암모늄 브롬화물; 도데실에틸디메틸암모늄 브롬화물; 도데실트리메틸암모늄 브롬화물; 도데실트리메틸암모늄 브롬화물; 도데실트리메틸암모늄 염화물; 에틸헥사데실디메틸암모늄 브롬화물; 지라드 시약 T; 헥사데실트리메틸암모늄 브롬화물; 헥사데실트리메틸암모늄 브롬화물; N,N',N'-폴리옥시에틸렌 (10)-N-탈로우-1,3-디아미노프로판; 톤조늄 브롬화물; 그리고 트리메틸(테트라데실)암모늄 브롬화물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0027] 또 다른 구체예에서, 표면 활성제는 쌍성 이온성 표면 활성제이다. 적합한 쌍성 이온성 표면 활성제는 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-2-히드록시-1-프로판술포네이트 (CHAPSO); 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판술포네이트 (CHAPS); 3-(4-헵틸)페닐-3-히드록시프로필)디메틸암모니오프로판술포네이트 (C7BzO); 3-(N,N-디메틸옥틸암모니오) 프로판술포네이트 내염 (SB3-8); 3-(데실디메틸암모니오) 프로판술포네이트 내염 (SB3-10; 카프릴릴 술포베타인); 3-(도데실디메틸암모니오) 프로판술포네이트 내염 (SB3-12); 3-(N,N-디메틸테트라데실암모니오)프로판술포네이트 (SB3-14); 3-(N,N-디메틸팔미틸암모니오) 프로판술포네이트 (SB3-16); 3-(N,N-디메틸옥타데실암모니오) 프로판술포네이트 (SB3-18); 3-[N,N-디메틸(3-미리스토일아미노프로필)암모니오]프로판술포네이트 (ASB-14)를 포함하지만 이들에

한정되지 않는다. 구체예에 따라, 다른 적합한 쌍성 이온성 세정제는 하기를 포함한다: 아세틸화된 레시틴; 아 프리코타미도프로필 베타인; 바바수아미도프로필 베타인; 베헤닐 베타인; 비스 2-히드록시에틸 탈로우 글리시네이트; C12-14 알킬 디메틸 베타인; 카놀라미도프로필 베타인; 카프르산/카프릴산 아미도프로필 베타인; 카프릴로아미도프로필 베타인; 세틸 베타인; 코카미도프로필 베타인; 코카미도프로필 디메틸아미노히드록시프로필 가수분해된 콜라겐; N-[3-코카미도]-프로필-N,N-디메틸 베타인, 칼륨 염; 코카미도프로필 히드록시술포네이트; 코카미도프로필 술포베타인; 코카미노부티르산; 코카미노프로피온산; 코카아포디프로피온산; 코코-베타인; 코코디메틸암모늄-3-술포프로필베타인; 코코이미노디글리시네이트; 코코이미노디프로피오네이트; 코코/올레아미도프로필 베타인; 코코일 사르코신아미드 DEA; DEA-코코아포디프로피오네이트; 디히드록시에틸 탈로우 글리시네이트; 디메티콘 프로필 PG-베타인; N,N-디메틸-N-라우르산-아미도프로필-N-(3-술포프로필)-암모늄 베타인; N,N-디메틸-N-미리스틸-N-(3-술포프로필)-암모늄 베타인; N,N-디메틸-N-팔미틸-N-(3-술포프로필)-암모늄 베타인; N,N-디메틸-N-스테아라미도프로필-N-(3-술포프로필)-암모늄 베타인; N,N-디메틸-N-스테아릴-N-(3-술포프로필)-암모늄 베타인; N,N-디메틸-N-탈로우-N-(3-술포프로필)-암모늄 베타인; 이나트륨 카프로아포디아세테이트; 이나트륨 카프로아포디프로피오네이트; 이나트륨 카프릴로아포디아세테이트; 이나트륨 카프릴로아포디프로피오네이트; 이나트륨 코코아포디아세테이트; 이나트륨 코코아포디프로피오네이트; 이나트륨 이소스테아로아포디프로피오네이트; 이나트륨 라우레스-5 카르복시아포디아세테이트; 이나트륨 라우리미노디프로피오네이트; 이나트륨 라우로아포디아세테이트; 이나트륨 라우로아포디프로피오네이트; 이나트륨 옥틸 b-이미노디프로피오네이트; 이나트륨 올레오아포디아세테이트; 이나트륨 올레오아포디프로피오네이트; 이나트륨 PPG-2-이소테세스-7 카르복시아포디아세테이트; 이나트륨 소이아포디아세테이트; 이나트륨 스테아로아포디아세테이트; 이나트륨 탈람포디프로피오네이트; 이나트륨 탈로우아포디아세테이트; 이나트륨 탈로우이미노디프로피오네이트; 이나트륨 맥아아미도프로필 베타인; N,N-디스테아릴-N-메틸-N-(3-술포프로필)-암모늄 베타인; 에루카미도프로필 히드록시술포네이트; 에틸헥실 디프로피오네이트; 에틸 히드록시메틸 올레일 옥사졸린; 에틸 PEG-15 코카민 황산염; 수소첨가된 레시틴; 가수분해된 단백질; 이소스테아르아미도프로필 베타인; 라우라미도프로필 베타인; 라우라미도프로필 디메틸 베타인; 라우라미노프로피온산; 라우로아포디프로피온산; 라우로일 리신; 라우릴 베타인; 라우릴 히드록시술포네이트; 라우릴 술포타인; 리놀레아미도프로필 베타인; 리소레시틴; 우유 지질 아미도프로필 베타인; 미리스타미도프로필 베타인; 옥틸 디프로피오네이트; 옥틸리미노디프로피오네이트; 올레아미도프로필 베타인; 올레일 베타인; 4,4(5H)-옥사졸레디메탄올, 2-(헵타데세닐)-; 팔미타미도프로필 베타인; 팔미타민 산화물; 리시놀레아미도프로필 베타인; 리시놀레아미도프로필 베타인/IPDI 공중합체; 세사미도프로필 베타인; 나트륨 C12-15 알콕시프로필 이미노디프로피오네이트; 나트륨 카프로아포아세테이트; 나트륨 카프릴로아포아세테이트; 나트륨 카프릴로아포히드록시프로필 술포네이트; 나트륨 카프릴로아포프로피오네이트; 나트륨 카르복시메틸 탈로우 폴리프로필아민; 나트륨 코카미노프로피오네이트; 나트륨 코코아포아세테이트; 나트륨 코코아포히드록시프로필 술포네이트; 나트륨 코코아포프로피오네이트; 나트륨 디카르복시에틸 코코포스포에틸 이미다졸린; 나트륨 수소첨가된 탈로우 디메틸 글리시네이트; 나트륨 이소스테아로아포프로피오네이트; 나트륨 라우리미노디프로피오네이트; 나트륨 라우로아포아세테이트; 나트륨 올레오아포히드록시프로필술포네이트; 나트륨 올레오아포프로피오네이트; 나트륨 스테아로아포아세테이트; 나트륨 탈람포프로피오네이트; 소이아미도프로필 베타인; 스테아릴 베타인; 탈로우아미도프로필 히드록시술포네이트; 탈로우아포폴리카르복시프로피온산; 트리나트륨 라우로아포 PG-아세트산염 인산염 염화물; 운데실렌아미도프로필 베타인; 그리고 맥아아미도프로필 베타인.

[0028] 다른 구체예에서, 표면 활성제는 바람직하게는, 비이온성 표면 활성제이다. 적합한 비이온성 표면 활성제의 실례는 폴리옥시에틸렌 (10) 세틸 에테르 (BRIJ® 56); 폴리옥시에틸렌 (20) 세틸 에테르 (BRIJ® 58); 폴리옥시에틸렌글리콜 도데실 에테르 (BRIJ® 35); 폴리옥시에틸렌 (9) p-t-옥틸 페놀 (NONIDET™ P-40); 폴리옥시에틸렌 (4-5) p-t-옥틸 페놀 (TRITON™ X-45); 폴리옥시에틸렌 (7-8) p-t-옥틸 페놀 (TRITON™ X-114); 폴리옥시에틸렌 (9-10) p-t-옥틸 페놀 (TRITON™ X-100); 폴리옥시에틸렌 (9-10) 노닐페놀 (TRITON™ N-101); 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비톨 모노라우레이트 (TWEEN® 20); 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비톨 모노팔미테이트 (TWEEN® 40); 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비톨 모노올리레이트 (TWEEN® 80); 디메틸테실포스핀 산화물 (APO-10); 디메틸도데실포스핀 산화물 (APO-12); 시클로헥실-n-에틸-β-D-말토시드; 시클로헥실-n-헥실-β-D-말토시드; 시클로헥실-n-메틸-β-D-말토시드; n-데카노일수크로오스; n-데실-β-D-글루코피라노시드; n-데실-β-D-말토피라노시드; n-데실-β-D-티오말토시드; n-도데카노일 수크로오스; 데카에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르; N-데카노일-N-메틸글루카민; n-데실 α-D-글루코피라노시드; 데실 β-D-말토피라노시드; n-도데카노일-N-메틸글루카미드; n-도데실 α-D-말토시드; n-도데실 β-D-말토시드; 헵탄-1,2,3-트리올; 헵타에틸렌 글리콜 모노데실 에테르; 헵타에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르; 헵타에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르; n-헥사데실 β-D-말토시드; 헥사에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르; 헥사에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르; 헥사에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에테르

르; 헥사에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르; 메틸-6-O-(N-헵틸카르바모일)- α -D-글루코피라노시드; 노나에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르; N-노나노일-N-메틸글루카민; N-노나노일-N-메틸글루카민; 옥타에틸렌 글리콜 모노데실 에테르; 옥타에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르; 옥타에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르; 옥타에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에테르; 옥타에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르; 옥틸- β -글루코시드; 옥틸- β -티오글루코시드; 옥틸- β -D-글루코피라노시드; 옥틸- β -D-1-티오글루코피라노시드; 펜타에틸렌 글리콜 모노데실 에테르; 펜타에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르; 펜타에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르; 펜타에틸렌 글리콜 모노헥실 에테르; 펜타에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에테르; 펜타에틸렌 글리콜 모노옥틸 에테르; 폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르; 폴리에틸렌 글리콜 에테르; 폴리옥시에틸렌 10 트리데실 에테르; 폴리옥시에틸렌 (100) 스테아르산염; 폴리옥시에틸렌 (20) 이소헥사데실 에테르; 폴리옥시에틸렌 (20) 올레일 에테르; 폴리옥시에틸렌 (40) 스테아르산염; 폴리옥시에틸렌 (50) 스테아르산염; 폴리옥시에틸렌 (8) 스테아르산염; 폴리옥시에틸렌 비스(이디다졸릴 카르보닐); 폴리옥시에틸렌 (25) 프로필렌 글리콜 스테아르산염; 키라야 나무껍질로부터 사포닌; 테트라데실- β -D-말토시드; 테트라에틸렌 글리콜 모노데실 에테르; 테트라에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르; 테트라에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르; 트리에틸렌 글리콜 모노데실 에테르; 트리에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르; 트리에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르; 트리에틸렌 글리콜 모노옥틸 에테르; 트리에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르; 틸록사폴; n-운데실 β -D-글루코피라노시드, (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올 (IGEPAL[®] CA-630); 폴리옥시에틸렌 (5) 노닐페닐에테르 (IGEPAL[®] CO-520); 그리고 폴리옥시에틸렌 (150) 디노닐페닐 에테르 (IGEPAL[®] DM-970)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 한 구체예에서, 표면 활성제는 폴리옥시에틸렌 (5) 노닐페닐에테르 (IGEPAL[®] CO-520)이다. 다른 구체예에서, 표면 활성제는 폴리옥시에틸렌 (150) 디노닐페닐 에테르 (IGEPAL[®] DM-970)이다. 한 구체예에서, 표면 활성제는 바람직하게는, (옥틸페녹시) 폴리에톡시에탄올 (IGEPAL[®] CA-630)이다.

[0029] 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 생물학적 유체에 첨가되는 표면 활성제의 양은 순환하는 miRNA를 포함할 수 있는 생물학적 유체 내에 생물학적 유체 성분의 정체에 따라 변할 수 있고 변할 것이다. 일부 구체예에서, 생물학적 유체에서 표면 활성제의 최종 농도는 약 0.001 내지 약 10%의 범위에서 변할 수 있다. 한 구체예에서, 표면 활성제의 농도는 약 0.001 내지 약 0.01%의 범위에서 변할 수 있다. 다른 구체예에서, 표면 활성제의 농도는 약 0.01% 내지 약 0.1%의 범위에서 변할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 표면 활성제의 농도는 약 0.1% 내지 약 1%의 범위에서 변할 수 있다. 다른 구체예에서, 표면 활성제의 농도는 약 1% 내지 약 5%의 범위에서 변할 수 있다. 추가 구체예에서, 표면 활성제의 농도는 약 5% 내지 약 10%의 범위에서 변할 수 있다.

[0030] (c) 항-miRNA-결합 단백질 시약

[0031] 생물학적 유체는 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉된다. 항-miRNA-결합 단백질 시약은 순환하는 miRNA와 연관된 miRNA-결합 단백질에 결합할 수 있는 임의의 작용제일 수 있다. 순환하는 miRNA와 연관된 miRNA-결합 단백질은 miRNA에 직접적으로 결합할 수 있거나, 또는 miRNA를 포함하는 RNA-단백질 복합체와 간접적으로 연관될 수 있다. 순환하는 miRNA와 연관될 수 있는 miRNA-결합 단백질의 무제한적 실례는 Argonaut, Dicer, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 전사촉진 반응 RNA 결합 단백질 (TRBP), 인터페론 유도된 단백질 키나아제의 단백질 활성제 (PACT), SMN 복합체, 어린 X 정신 지체 단백질 (FMRP), Tudor 포도상구균 뉴클레아제-도메인-내포 단백질 (Tudor-SN), 추정 DNA 헬리카아제 MOV10, 그리고 RNA 인식 모티프 내포 단백질 TNRC6B, 또는 RISC 복합체와 일시적으로 또는 영구적으로 연관할 수 있는 RISC 복합체의 다른 성분을 포함할 수 있다.

[0032] 일부 구체예에서, 생물학적 유체는 바람직하게는, 항-Argonaut 시약과 접촉된다. Argonaut 단백질의 무제한적 실례는 Ago1, Ago2, Ago3, 그리고 Ago4를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Ago1 시약과 접촉된다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Ago2 시약과 접촉된다. 또 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Ago3 시약과 접촉된다. 추가 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Ago4 시약과 접촉된다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 바람직하게는, 하나 이상의 Argonaut 단백질에 결합할 수 있는 시약과 접촉된다. 가령, 생물학적 유체는 항-Ago1 및 항-Ago2 시약과 접촉될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 바람직하게는, Ago1, Ago2, Ago3, 그리고 Ago4에 결합할 수 있는 시약과 접촉된다.

[0033] 항-miRNA-결합 단백질 시약은 에피토프 결합 작용제일 수 있다. 표적 분자에 따라, 적합한 에피토프 결합 작용제의 무제한적 실례는 앵타머, 항체, 항체 단편, 이중 가닥 DNA 서열, 변형된 핵산, 핵산 모방체, 리간드, 리간드 단편, 수용체, 수용체 단편, 폴리펩티드, 펩티드, 보조효소, 조절매개체, 알로스테릭 분자, 그리고 이온으로 구성된 군에서 선택되는 작용제를 포함한다.

- [0034] 일부 구체예에서, 에피토프 결합 작용제는 항체이다. 이용될 수 있는 항체의 무제한적 실례는 다중클론 항체, 복수, Fab 단편, Fab' 단편, 단일클론 항체, 단일 사슬 항체, 단일 도메인 항체, 인간화 항체, 그리고 항체의 에피토프 결합 부위를 내포하는 다른 단편을 포함한다.
- [0035] 일부 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Argonaut 항체와 접촉된다. 한 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Ago1 항체와 접촉된다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Ago2 항체와 접촉된다. 또 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Ago3 항체와 접촉된다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Ago4 항체와 접촉된다. 추가 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Ago1, 항-Ago2, 항-Ago3, 또는 항-Ago4 항체에서 선택되는 2가지 항-Ago 항체와 접촉된다. 가령, 생물학적 유체는 항-Ago1 및 항-Ago2 항체와 접촉된다. 추가 구체예에서, 생물학적 유체는 항-Ago1, 항-Ago2, 항-Ago3, 또는 항-Ago4에서 선택되는 3가지 항-Ago 항체와 접촉된다. 또 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 4가지 모든 항-Ago 항체와 접촉된다. 추가 구체예에서, 생물학적 유체는 하나 이상의 Argonaut 단백질을 인식할 수 있는 항체와 접촉된다. 이런 항체는 1, 2, 3, 또는 4가지 Argonaut 단백질을 인식할 수 있다. 한 구체예에서, 생물학적 유체는 4가지 모든 인간 Argonaut 단백질을 인식할 수 있는 항-Argonaut 항체와 접촉된다.
- [0036] 생물학적 유체를 본 발명의 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉시키는 것은 면역침전된 miRNA 복합체를 형성한다. 따라서, 항-miRNA-결합 단백질 시약은 생물학적 유체가 고정된 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉될 때, 정상적으로 고체 지지체에 부착되어 면역침전된 miRNA 복합체를 형성한다. 고체 지지체는 항-miRNA-결합 단백질 시약의 부착 또는 연관에 적절한 구별된 개별 부위를 내포하도록 변형될 수 있는 물질일 수 있다. 고체 지지체 물질의 무제한적 실례는 유리, 변형된 또는 기능화된 유리, 아크릴 섬유, 폴리스티렌 및 스티렌과 다른 물질의 공중합체, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리부틸렌, 폴리우레탄, 또는 TeflonJ를 비롯한 플라스틱, 나일론, 니트로셀룰로오스, 다당류, 수지, 실리카 또는 실리콘 및 변형된 실리콘을 비롯한 실리카-기초된 물질, 탄소, 금속, 무기 유리 및 플라스틱을 포함한다. 고체 지지체의 크기와 모양은 발명의 범위로부터 벗어나지 않으면서 변할 수 있다. 고체 지지체는 평면일 수 있거나, 고체 지지체는 웰, 다시 말하면, 364 웰 평판일 수 있거나, 또는 대안으로, 고체 지지체는 비드 또는 슬라이드일 수 있다. 일부 구체예에서, 고체 지지체는 다중벽 평판의 웰이다. 다른 구체예에서, 고체 지지체는 피펫 첨단부의 내측 표면이다. 또 다른 구체예에서, 고체 지지체는 바람직하게는, 비드이다. 일부 구체예에서, 고체 지지체는 바람직하게는, 자성 비드이다.
- [0037] 항-miRNA-결합 단백질 시약은 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 매우 다양한 방식으로 고체 지지체에 부착될 수 있다. 항-miRNA-결합 단백질 시약 및 고체 지지체는 이들 둘의 차후 부착을 위해 화학적 기능기로 유도체화될 수 있다. 가령, 고체 지지체는 아미노 기, 카르복실 기, 옥소 기 또는 티올 기를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 화학적 기능기로 유도체화될 수 있다. 이들 기능기를 이용하여, 항-miRNA-결합 단백질 시약은 링커를 직접적으로 또는 간접적으로 이용하는 기능기를 이용하여 부착될 수 있다. 대안으로, 항-miRNA-결합 단백질 시약은 또한, 고체 지지체에 비공유적으로 부착될 수 있다. 가령, 비오틴화된 항-miRNA-결합 단백질 시약이 제조될 수 있는데, 이것은 부착을 유발하는 스트렙타비딘으로 공유적으로 코팅된 고체 지지체에 결합할 수 있다. 항-miRNA-결합 단백질 시약을 고체 지지체에 부착하는 추가 방법은 당분야에서 널리 공지되고, 그리고 공개된 실험실 매뉴얼, 예를 들면, "Current Protocols in Molecular Biology" Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York, 2003 또는 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 3rd edition, 2001에서 설명된 바와 같을 수 있다. 일부 구체예에서, 비오틴화된 항-miRNA-결합 단백질 시약이 제조되는데, 이것은 부착을 유발하는 스트렙타비딘으로 공유적으로 코팅된 비드 고체 지지체에 결합할 수 있다. 아래 **색션 I(d)**에서 설명된 바와 같이, 항-miRNA-결합 단백질 시약은 본 발명의 방법에서 생물학적 유체에 접촉하기 전에, 고체 지지체에 부착될 수 있다. 대안으로, 본 발명의 생물학적 유체는 항-miRNA-결합 단백질 시약 및 고체 지지체와 동시에 접촉될 수 있는데, 여기서 항-miRNA-결합 단백질 시약은 고체 지지체에 부착한다. 본 발명의 생물학적 유체는 또한, 생물학적 유체를 고체 지지체와 접촉시키기 전에, 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉될 수 있는데, 여기서 항-miRNA-결합 단백질 시약은 고체 지지체에 부착한다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 항-miRNA-결합 단백질 시약의 양과 농도는 다른 인자 중에서도 특히, 항-miRNA-결합 단백질 시약의 정제, 이용된 생물학적 유체의 용적, 생물학적 유체 내에 miRNA의 농도, 그리고 miRNA-결합 단백질에 따라 변할 수 있고 변할 것이고, 그리고 실험적으로 결정될 수 있다. 항-miRNA-결합 단백질 시약이 정제된 항체일 때, 약 0.5 내지 약 10 μ g의 항체가 각 0.2 ml 혈장 또는 혈청 표본에 대해 이용될 수 있다.
- [0038] **(d) 생물학적 유체를 접촉시키고 miRNA를 분리**
- [0039] 본 발명의 방법에서, 생물학적 유체는 표면 활성제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉된다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 생물학적 유체는 발명의 범위로부터 벗어나지 않으면서 다양한 다른 작용제와 접촉될 수

있다. 가령, 생물학적 유체는 miRNA 단리 동안 이황화 결합의 형성을 차단하고 리보핵산분해효소 활성을 저해하는 티올-환원제와 접촉될 수 있다. 적합한 티올-환원제는 디티오프레이톨 (DTT), 2-메르캅토에탄올, 2-메르캅토에틸아민, 그리고 트리스(카르복시에틸) 포스핀 (TCEP)을 포함한다. 생물학적 유체는 또한, 항기포제와 접촉될 수 있다. 항기포제의 실례는 안티폼 204와 안티폼 0-30, 안티폼 A, 안티폼 B, 안티폼 C, 안티폼 Y-30, 그리고 Sag 471을 포함한다. 생물학적 유체는 또한, miRNA 및 miRNA-단백질 복합체를 보존하는 RNA와 단백질 분해 저해제와 접촉될 수 있다.

[0040] 일부 구체예에서, 완충제가 miRNA를 단리하는데 적합한 pH를 유지하는데 이용될 수 있다. 무제한적 실례에 의하여, 완충제는 트리자마 아세트산염, EDTA, 트리스, 글리신, 그리고 구연산염을 포함할 수 있지만 이들에 한정되지 않는다.

[0041] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 생물학적 유체를 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉시켜 면역침전된 miRNA 복합체를 형성하기 전에, 생물학적 유체를 표면 활성화제와 접촉시켜 생물학적 유체 성분을 해리하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 동시에 접촉된다.

[0042] 일부 구체예에서, 생물학적 유체의 희석되지 않은 표본이 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉된다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉하기 전에 희석된다. 생물학적 유체의 희석은 상기 섹션 I(a)에서 설명된 바와 같을 수 있다.

[0043] 생물학적 유체, 표면 활성화제, 그리고 항-miRNA-결합 단백질 시약 사이에 접촉은 일반적으로, 면역침전된 miRNA 복합체의 형성을 허용하는 항온처리의 기간을 포함한다. 생물학적 유체는 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉되고 약 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 또는 480 분 또는 그 이상 동안 항온처리될 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 유체는 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉되고 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 약 15 분 동안 항온처리된다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉되고 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 약 30 분 동안 항온처리된다. 또 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉되고 약 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 또는 약 90 분 동안 항온처리된다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉되고 약 90, 120, 240 또는 480 분 또는 그 이상 동안 항온처리된다. 한 구체예에서, 생물학적 유체는 바람직하게는, 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉되고 약 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 약 60 분 동안 항온처리된다.

[0044] 생물학적 유체는 약 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 약 30°C 또는 그 이상의 온도에서 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉될 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 유체는 약 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 약 6°C의 온도에서 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉된다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 약 15°C의 온도에서 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉된다. 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 약 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 약 25°C의 온도에서 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉된다. 또 다른 구체예에서, 생물학적 유체는 약 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 약 30°C의 온도에서 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 접촉된다.

[0045] 전형적으로, 생물학적 유체는 표면 활성화제 및 항-miRNA-결합 단백질 시약과 교반 하에 접촉된다. 추가적으로, 생물학적 유체는 일반적으로, 복합체를 형성한 후에, 면역침전된 miRNA 복합체를 단리하기 위해 이전될 수 있고, 그리고 면역침전된 miRNA 복합체는 세척될 수 있다.

[0046] (e) miRNA 방출

[0047] 본 발명의 방법에 따라, miRNA는 면역침전된 miRNA 복합체로부터 방출된다. 단백질 복합체로부터 핵산, 예를 들면, miRNA를 방출하는 방법은 당분야에서 널리 공지되고, 그리고 프로테아제 소화 및 핵산-단백질 복합체에서 단백질의 변성을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, miRNA는 면역침전된 miRNA 복합체로부터 단백질 변성에 의해 방출된다. 가령, miRNA는 면역침전된 miRNA 복합체를 구아니디늄 티오시안산염-페놀-클로로포름 용액과 함동함으로써, 면역침전된 miRNA 복합체로부터 방출될 수 있다. 방출된 miRNA는 이후, 침전에 의해 또는 스핀 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있다.

[0048] 다른 구체예에서, miRNA는 바람직하게는, 면역침전된 miRNA 복합체로부터 프로테아제 소화에 의해 방출된다. 용

어 "프로테아제", "단백질분해효소", 그리고 "펩티드분해효소"는 본원에서 교체가능하게 이용되고, 그리고 공유 펩티드성 결합의 가수분해를 촉매작용하는 효소의 군을 지칭한다. 프로테아제 효소는 당분야에서 널리 공지되고 산 프로테아제 및 세린 프로테아제를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법에서 miRNA를 방출하는데 이용될 수 있는 프로테아제는 산 프로테아제이다. 한 구체예에서, 본 발명의 방법에서 miRNA를 방출하는데 이용될 수 있는 산 프로테아제는 켈신이다.

[0049] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법에서 miRNA를 방출하는데 이용될 수 있는 프로테아제는 산 프로테아제이다. 세린 프로테아제의 6가지 집단이 확인되었는데, 이들 중에서 가장 큰 2가지는 키모트립신-유사 집단 및 서브틸리신-유사 집단이다. 다수의 서브틸라아제가 알려져 있다. 광범위하게 연구된 서브틸라아제 중에서 일부는 서브틸리신 DY, 서브틸리신 칼스버그, 서브틸리신 BPN' (또한, 나가제로 불림), 메센테리코펩티다아제뿐만 아니라 트리티라치움 알BUM 림버 (*Tritirachium album* Limber)으로부터 획득되는 단백질분해효소 K 및 테르모악티노미세스 불가리스 (*Thermoactinomyces vulgaris*)로부터 획득되는 테르미타아제를 비롯하여, 바실루스 (*Bacillus*)의 다양한 종으로부터 획득된 것들을 포함한다. 본 발명의 일정한 구체예에서, 단백질분해효소 K가 프로테아제 효소로서 선호된다. 하지만, 다른 프로테아제 효소, 예를 들면, 예로서 나가제 역시 일정한 구체예에서 이용될 수 있다. 따라서, 프로테아제 효소는 miRNA가 방출되도록, 면역침전된 miRNA 복합체에서 단백질의 최소한 부분적인 파괴를 발생시키는 다수의 프로테아제 중에서 한 가지일 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법에서 miRNA를 방출하는데 이용될 수 있는 프로테아제는 바람직하게는, 프로테아제 K이다.

[0050] 본질적으로, miRNA는 면역침전된 miRNA 복합체를 프로테아제 효소와 접촉시킴으로써, 이들 복합체로부터 방출된다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, miRNA를 방출하는데 이용된 프로테아제의 양은 다른 인자 중에서도 특히, 프로테아제, 면역침전된 miRNA 복합체의 존재비, 프로테아제 소화 동안 온도, 소화에 이용된 완충액 조건 및 소화의 지속 기간에 따라 변할 수 있고 변할 것이다. 일반적으로, 면역침전된 miRNA 복합체는 약 0.3 단위의 효소 활성 내지 약 30 단위의 효소 활성과 접촉될 수 있다. 일정한 구체예에서, 면역침전된 miRNA 복합체와 접촉된 프로테아제의 양은 약 0.3 내지 약 1 단위, 약 1 내지 약 3 단위, 약 3 단위 내지 약 10 단위, 또는 약 10 단위 내지 약 30 단위 범위에서 변할 수 있다.

[0051] 일부 구체예에서, 실시예 1에서 설명된 바와 같이 프로테아제 소화를 실온에서 이용함. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "실온"은 약 10°C 내지 약 30°C의 온도를 설명하는데 이용된다.

[0052] 면역침전된 miRNA 복합체는 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 또는 약 30 분 또는 그 이상 동안 프로테아제와 함께 항온처리될 수 있다. 일부 구체예에서, 면역침전된 miRNA 복합체는 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 또는 약 5 분 동안 프로테아제와 함께 항온처리된다. 다른 구체예에서, 면역침전된 miRNA 복합체는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 약 15 분 동안 프로테아제와 함께 항온처리된다. 또 다른 구체예에서, 면역침전된 miRNA 복합체는 약 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 또는 약 30 분 또는 그 이상 동안 프로테아제와 함께 항온처리된다.

[0053] 방출된 miRNA는 추가 정제 없이, 하류 이용에 적절할 수 있다. 대안으로, 방출된 miRNA는 하류 이용을 위해 더욱 정제될 수 있다. 핵산 정제의 방법, 예를 들면, 스핀 칼럼 크로마토그래피 또는 여과 기술은 예로서, 공개된 실험실 매뉴얼에서, 예를 들면, "Current Protocols in Molecular Biology" Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York, 2003 또는 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 3rd edition, 2001에서 설명된 방법에 따라 당분야에서 널리 공지된다.

[0054] 방출된 miRNA의 하류 이용은 변할 수 있다. 방출된 miRNA의 무제한적 이용은 정량적 실시간 PCR, 마이크로어레이 분석, 염기서열결정, 제한 단편 길이 다형성 (RFLP) 분석, 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP) 분석, 미소부수체 분석, 짧은 일렬 반복 (STR) 분석, 그리고 비교 유전체 혼성화 (CGH)를 포함한다.

[0055] II. 키트

[0056] 본 발명은 표면 활성제, 항-miRNA-결합 단백질 시약, 그리고 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 다른 시약을 포함하는 키트를 더욱 제공한다. 일부 구체예에서, 키트는 miRNA를 생물학적 유체로부터 분리하기 위해 제공되고, 상기 키트는 항-miRNA-결합 단백질 시약 및 표면-활성 작용제를 포함한다. 항-miRNA-결합 단백질 시약 및 표면 활성제는 상기 섹션 (I)에서 설명된 바와 같을 수 있다. 일부 구체예에서, 키트에서 항-miRNA-결합 단백질 시약은 고체 지지체에 부착된 항-Ago 항체이다. 일정한 구체예에서, 고체 지지체는 비드, 자성 비드, 또는 다중벽 평판의 웰일 수 있다. 또 다른 구체예에서, 고체 지지체는 피펫 첨단부의 내측 표면일 수 있다. 일부 구체예

에서, 키트 내에 표면-활성 작용제는 이계팔이다. 키트는 miRNA를 면역침전된 miRNA 복합체로부터 방출하기 위한 수단을 더욱 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 키트는 miRNA를 면역침전된 miRNA 복합체로부터 방출하기 위한 프로테아제, 예를 들면, 프로테아제 K를 포함한다.

[0057] 정의

[0058] 달리 정의되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 평균적 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 다음의 참고문헌은 당업자에게 본 발명에서 이용된 용어 중에서 많은 것의 일반적인 정의를 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 그리고 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본원에서 이용된 바와 같이, 다음의 용어는 달리 명시되지 않으면, 그들에 생득된 의미를 갖는다.

[0059] 본 발명의 원소 또는 이들의 바람직한 양상(들)을 소개할 때, 단수 관사 ("a", "an", "the")와 "상기"는 이들 원소 중에서 하나 또는 그 이상이 있다는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 용어 "포함하는", "내포하는" 및 "갖는"은 포괄적인 것으로 의도되고, 그리고 열거된 원소 이외에 추가 원소가 있을 수 있다는 것을 의미한다.

[0060] 본원에서 이용된 바와 같이, "마이크로RNA" 또는 "miRNA"는 생물학적 검체에서 검출될 수 있는 길이에서 5 내지 40개 뉴클레오타이드의 작은, 비코딩 RNA 서열을 의미한다. 일부 miRNA는 예로서, 효소 DICER에 의해 성숙 종류, 예를 들면, 약 18-25개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 21-23개 뉴클레오타이드로 처리되는 헤어핀 전구체로부터 유래된다. 마이크로RNA 변이체는 예로서, 상이한 동물 종 사이에서 공통적이다. 이에 더하여, miRNA의 5' 및 3' 단부에서 변이는 공통적이고, 그리고 성숙 동안 효소, 예를 들면, DICER에 의한 부정확한 개열의 결과일 수 있다. 이들 변이체는 miRNA(들)를 검출하는 기능 또는 능력을 손상시키지 않는, miRNA의 서열에서 허용되는 변이의 범위를 증명한다. 다른 유형의 변이체는 miRNA의 3' 단부에 비-주형 뉴클레오타이드(들)의 포스트-Dicer 처리 부가이다 (이들은 비-주형인데, 그 이유는 이들이 인간 유전체에 정합하지 않기 때문이다). 가장 흔한 변이체는 추가의 A 또는 U가 3' 단부에 부가된 miRNA 서열이다.

[0061] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "생물학적 유체" 또는 "체액"은 교체가능하게 이용될 수 있고 개체로부터 단리된 유체를 지칭한다.

[0062] 용어 "생물학적 유체", "생물학적 유체 표본", 또는 "생물학적 표본"은 교체가능하게 이용될 수 있고 임의의 소정의 개체로부터 단리된 모든 생물학적 유체와 배출물을 지칭한다. 본 발명의 문맥에서, 이런 표본은 혈액 및 이의 분획물, 혈액 혈청, 혈액 혈장, 소변, 배설물, 정액, 정액, 정액 장액, 전립선액, 사정전 유체 (쿠퍼액), 흉막 삼출액, 눈물, 타액, 객담, 땀, 생검, 복수, 뇌척수액, 양수, 림프, 골수, 경부 분비액, 질 분비액, 자궁 내막 분비액, 위장관 분비액, 기관지 분비액, 유방 분비액, 난소낭 분비액, 그리고 조직액 표본을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0063] "단리된" 폴리뉴클레오타이드는 이것이 이의 자연 공급원에서 통상적으로 연관되는 최소한 하나의 오염체로부터 확인되고 분리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 이것이 자연에서 발견되는 형태 또는 세팅이 아니다. 단리된 핵산 분자는 이런 이유로, 이것이 자연 세포 내에 존재할 때의 특정한 핵산 분자와 구별된다.

[0064] 상기 동물, 세포 및 방법에서 다양한 변화가 발명의 범위로부터 벗어나지 않으면서 만들어질 수 있기 때문에, 상기 설명에서 및 아래에 제공된 실시예에 내포된 모든 물질은 제한하는 의미가 아닌 예시적인 것으로 해석되는 것으로 의도된다.

[0065] 실시예

[0066] 다음 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 포함된다. 다음 실시예에서 개시된 기술은 발명의 실시에서 충분히 기능하는 것으로 발명자에 의해 발견된 기술을 대표하는 것으로 당업자에 의해 인지되어야 한다. 하지만, 당업자는 본 발명에 비추어, 본 발명에서 많은 변화가 만들어질 수 있으면서 발명의 사상과 범위로부터 벗어나지 않으면서 비슷한 또는 유사한 결과를 여전히 획득할 수 있고, 이런 이유로 진술된 모든 물질이 제한하는 의미가 아닌 예시적인 것으로 해석된다는 것을 인지할 것이다.

[0067] 실시예 1: 전반적인 miRNA 단리 프로토콜.

[0068] 순환하는 miRNA를 단리하는데 이용되는 대표적인 프로토콜은 소포-연관된 miRNA를 방출하기 위한 세정제의 존재에서 RNA 면역침전 (RIP)을 수행하는 것을 포함한다. 이러한 프로토콜에서, miRNA는 페놀, 카오토로프, 또는 칼

럼 정제의 이용 없이 다른 세포 성분, 예를 들면, 다른 RNA, 혈장 단백질 등으로부터 분리되고, 그리고 40-70 분 내에 완결될 수 있다.

[0069] 상기 프로토콜은 3 단계로 구성된다:

[0070] 1) 혈장 성분이 세정제로 처리되고,

[0071] 2) miRNA/단백질 복합체가 면역침전되고, 그리고

[0072] 3) miRNA가 면역침전된 miRNA 복합체로부터 방출된다.

[0073] 단백질 A (Sigma-Aldrich GE28-9670-56), 단백질 G (Sigma-Aldrich GE28-9670-66), 또는 스트렙타비딘 (Sigma-Aldrich GE28-9857-38) 비드는 20 μ l의 자성 비드 (10% 슬러리)를 0.1 ml RIP 세척 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.05% IGEPAL[®] CA-630)으로 이전하고, 비드를 RIP 세척 완충액으로 1회 세척하고, 그리고 용액으로부터 비드를 분리하기 위한 자성 스탠드를 이용함으로써 항-Ago 항체로 코팅되었다. 세척된 자성 비드는 이후, 2.5-10 μ g 비오틴화되지 않은 또는 비오틴화된 항-Ago (Sigma-Aldrich SAB4800048), 항-Ago2 (Sigma-Aldrich SAB4200085), 또는 항-Ago1 (Sigma-Aldrich SAB4200084) 항체를 첨가하기 전에, 0.1 ml RIP 세척 완충액에서 재현탁되었다. 비드 및 항체는 실온에서 약 30 분 동안 회전과 함께 항온처리되었다. 비드는 이후, 자성 스탠드를 이용하여 용액으로부터 분리되었다. 항체 비드는 이후, 0.5 ml RIP 세척 완충액으로 2회 세척되었다.

[0074] miRNA 단리 과정의 첫 번째 단계에서, 0.2 ml 혈장, 8 μ l 25% 이계팔 CA-630 (Sigma-Aldrich I8896; 1%의 최종 농도를 발생시키기 위해 ml 혈장당 40 μ l 25% 이계팔), 2 μ l 단백질분해효소 저해제 칵테일 (PIC; Sigma-Aldrich P8340; 10 μ l/ml 혈장), 그리고 0.8 μ l RNA분해효소 저해제 (Sigma-Aldrich R1158; 4 μ l/ml 혈장)가 제조된 Ago 항체 비드에 첨가되었다. 대안으로, 혈장은 비드를 제조하는 동안 세정제 및 저해제로 처리될 수 있고, 그리고 사전 처리된 혈장이 항체 비드에 차후 첨가될 수 있다.

[0075] 두 번째 단계에서, miRNA/단백질 복합체는 표본을 실온에서 1 시간 동안 또는 4°C에서 하룻밤 동안 회전과 함께 항온처리함으로써 면역침전되었다. 비드는 1 ml 세척 RIP 완충액으로 5X 세척되고, 그리고 상층액으로부터 비드를 분리하기 위해 자성 스탠드를 이용하여 수집되었다. 비드는 짧게 원심분리되고, 그리고 잔여 상층액을 제거하기 위해 자성 스탠드로 복귀될 수 있다.

[0076] 세 번째 단계에서, 항체 비드와 연관된 침전된 miRNA는 Sigma-Aldrich 각인 RNA 면역침전 키트 (RIP)에 대한 기술 회보에서 설명된 바와 같이, TRI Reagent[®] BD 또는 QIAzol 용해 시약으로 추출, 그 이후에 암모늄 아세트산염 및 선형 아크릴아미드의 존재에서 이소프로판올 침전에 의해 단백질 복합체 및 비드로부터 방출되거나, 또는 Qiagen의 miRNeasy 혈청/혈장 키트로 정제되었다. 대안으로, 그리고 바람직하게는, miRNA는 단백질분해효소 K 소화에 의해 방출되었다. 20 μ l 단백질분해효소 K 믹스 (14 μ l 물, 2 μ l 10X 단백질분해효소 K 방출 완충액, 그리고 4 μ l P4850 단백질분해효소 K)가 단계 2로부터 비드에 첨가되었고, 그리고 와동 지니 2, 세팅 4에서 실온에서 10 분 동안 항온처리되었다. 10X 단백질분해효소 K 방출 완충액은 100 mM Tris, pH 8.0, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 100 mM DTT, 그리고 1% 이계팔을 포함한다. 항온처리 직후에, 비드는 자성 스탠드 위에 배치하고, 그리고 유리 miRNA를 포함하는 상층액을 새로운 튜브에 이전함으로써 제거되었다. 상층액에서 단백질분해효소 K는 이후, 표본을 95°C에서 5 분 동안 항온처리함으로써 비활성화되었다. 특정한 miRNA는 10 μ l 폴리A-테일링 반응마다 5 μ l의 각 miRNA 제조물을 이용하는 Sigma-Aldrich의 MystiCq RT-qPCR 검정으로 검출되었다. 합성 miRNA, 다시 말하면, miRBase에서 열거된 성숙 miRNA와 동일한 서열을 갖는 단일 가닥 RNA는 260 nm에서 원액의 흡광도에 근거하여 공지된 사본수까지 0.02 mg/ml 선형 아크릴아미드에서 희석되고, 혈장으로부터 준비된 miRNA로 병렬적으로 검정되고, 그리고 절대적 정량을 위한 표준으로서 이용되었다.

[0077] **실시예 2: 혈장으로부터 miRNA의 면역침전이 Tri 시약 단독보다 효율적이다.**

[0078] RNA 면역침전 (RIP)을 이용한 혈장으로부터 miRNA 단리의 효율이 TRI Reagent[®] BD (Sigma-Aldrich)를 이용한 miRNA 단리와 비교되었다. TRI Reagent[®] BD는 혈액 유도체, 예를 들면, 혈청, 혈장 또는 전혈로부터 RNA, DNA 및 단백질의 동시적 단리에서 이용을 위한 시약이다.

[0079] TRI Reagent[®] BD를 이용한 miRNA의 단리는 제조업체의 사용설명서에 따랐다. 짧게 말하면, 0.2 ml 혈장이 TRI Reagent[®] BD와 혼합되었고, 그리고 miRNA가 암모늄 아세트산염 및 선형 아크릴아미드의 존재에서 이소프로판올 침전, 그리고 분석을 위한 RNA의 세척 전에 상 분리를 위해 클로로포름을 이용하여 추출되었다. RIP를 이용한

miRNA의 단리가 20 μ l 단백질 A 자성 비드에 결합된 2.5 μ g 항-Ago2 항체로 수행되었다. miRNA가 직접적인 혈장 추출에서처럼, TRI Reagent®로 추출, 그리고 암모늄 아세트산염 및 선형 아크릴아미드의 존재에서 이소프로판올 침전에 의해 비드로부터 회수되었다.

[0080] 제조된 표본 내에 let-7a-5p, miR23a-3p, miR191-5p, miR142-3p, 그리고 miR451a miRNA의 수준은 정량적, 실시간 RT-PCR에 의해 결정되었다. 혈장으로부터 miRNA의 RIP는 TRI Reagent® BD보다 약 5 내지 약 600 배 효율적이었다 (도면 1).

[0081] **실시예 3. 상업적인 키트로부터 수율과 유사한 RIP 수율.**

[0082] RNA 면역침전 (RIP)을 이용한 혈장으로부터 miRNA 단리의 효율은 Qiagen의 miRNeasy 혈청/혈장 키트 (Qiagen)를 이용한 miRNA 단리와 비교되었다. Qiagen miRNeasy는 DNA 또는 RNA에 선별적으로 결합하는 실리카 수지를 포함하는 스핀 칼럼을 이용하고, 그리고 ≤ 0.2 ml 혈청 또는 혈장으로부터 miRNA 단리에 권장된다.

[0083] Qiagen miRNeasy 혈청/혈장 키트를 이용한 miRNA의 단리는 제조업체의 사용설명서에 따랐다. 짧게 말하면, 0.2 ml 혈장이 QIAzol 시약과 혼합되었고, 그리고 miRNA가 제공된 스핀 칼럼을 이용하여 수성 층으로부터 정제되었다. RIP를 이용한 miRNA의 단리가 2.5 μ g 항-Ago2 항체가 결합된 20 μ l 단백질 A 자성 비드로 수행되었다. miRNA가 직접적인 혈장 추출에서처럼, QIAzol 시약으로 비드로부터 방출되고 Qiagen 키트로 정제되었다.

[0084] 제조된 표본 내에 let-7a, miR23a, miR191, miR142, 그리고 miR451a miRNA의 수준은 정량적, 실시간 RT-PCR에 의해 결정되었다. RIP를 이용한 miRNA의 수율은 Qiagen 키트 단독을 이용한 miRNA 수율과 유사하였다 (도면 2).

[0085] **실시예 4. 비오틴화된 및 비-비오틴화된 항-Ago 항체와 스트렙타비딘 비드를 이용한 RIP 비교.**

[0086] 단백질 A 및 단백질 G 비드 둘 모두 혈장에서 극히 풍부한 인간 IgG에 결합한다. IgG를 동시단리하는 것을 방지하기 위해, 항-Ago (클론 2A8)와 항-Ago2 (클론 11A9) 항체는 스트렙타비딘 비드로 RIP를 위해 Pierce EZ-링크 술포-NHS-LC-LC-비오틴 (Thermo Scientific)으로 비오틴화되었다. Ago-RIP는 2.5 μ g의 비오틴화된 항-Ago2 (b-Ago2) 또는 항-Ago (b-Ago) 항체 및 20 μ l 스트렙타비딘 자성 비드를 이용하여, 또는 2.5 μ g의 비-비오틴화된 항-Ago2 항체 및 20 μ l 단백질 A 비드로 수행되었다. 비오틴화된 항-Ago2 (b-Ago2) 항체 및 스트렙타비딘 비드로 RIP는 항-Ago2 항체 및 단백질 A 비드로 RIP에서와 동일한 수율의 miRNA를 제공하였다 (도면 3 참조). 비오틴화된 항-Ago로 RIP는 훨씬 낮은 miRNA 수율을 제공하였는데, 그 이유는 이들이 비오틴화되지 않은 항-Ago 및 단백질 A 비드로 진행되었기 때문이다.

[0087] **실시예 5. RIP를 이용하여 단리된 miRNA의 열 방출은 수율에 부정적으로 영향을 준다.**

[0088] 뉴클레아제-없는 물에서 가열이 RIP 이후에 miRNA를 방출하기 위한 수단으로서 시험되었다. Ago-RIP는 0.2 ml 혈장 및 2.5 μ g의 단백질 A 자성 비드 상에서 비오틴화되지 않은 항-Ago 또는 항-Ago2 항체, 또는 스트렙타비딘 자성 비드 상에서 비오틴화된 항-Ago 또는 항-Ago2 항체로 수행되었다. 14 μ l의 뉴클레아제-없는 물이 비드에 첨가되었고, 그리고 이들 혼합물은 비드를 제거하기 전에 2 분 동안 40°C, 50°C, 또는 60°C에서 가열되었다. RIP, 그 이후에 열 방출은 RIP, 그 이후에 Qiagen miRNeasy 혈청/혈장 키트로 miRNA 정제와 비교되었고, 그리고 miRNA는 Qiagen 키트로 혈장으로부터 직접적으로 정제되었다. 합성 cel-miR-39-3p (1.4e8 사본)는 Qiagen 프랩에 대한 QIAzol 첨가 후 또는 포스트-RIP 비드에 첨가된 물에서 스파이크-인되었다.

[0089] 합성 cel-miR-39-3p 스파이크-인은 비드 상에 RIP 산물에서 60°C에서 2 분 후 검출되지 않았다 (도면 4). 또한, 40°C, 50°C 또는 60°C에서 2 분 후, 내인성 miRNA가 검출되지 않았다. 유사한 결과가 miR23a, miR142, miR191, 그리고 miR451a에 대해 관찰되었다. 표본이 50°C 또는 60°C로 가열될 때, Let7a miRNA 역시 상실되었다. miRNA의 상실은 아마도, RIP에서 RNA분해효소 잔류 오염에 기인하는데, 그 이유는 혈액이 극히 높은 수준의 RNA분해효소를 내포하는 것으로 알려져 있기 때문이다.

[0090] **실시예 6. 단백질분해효소 K 소화를 이용한 miRNA의 방출.**

[0091] 단백질분해효소 K 소화가 Ago-RIP 후 miRNA를 방출하기 위한 수단으로서 시험되었다. RIP는 0.2 ml 혈장 및 20 μ l 스트렙타비딘 자성 비드에 결합된 2.5 μ g의 비오틴화된 항-Ago2 항체로 수행되었다. RIP 후, 비드는 4 μ l 단백질분해효소 K (Sigma-Aldrich P4850)를 내포하는 소화 완충액 (20 μ l의 10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 0.1% 이계판)에서, 실온 또는 37°C에서 10 분 동안 교반하면서, 또는 65°C에서 2 분 동안 교반하면서 항온처리되었다. 비드를 제거한 후에, 단백질분해효소 K는 95°C에서 5 분 동안 비활성화되었고, 그리고 5 μ l의 각 단백질분해효소 K 소화물이 Sigma-Aldrich의 MystiCq RT-qPCR 검정으로 특정한 miRNA

검출을 위해 10 μ l 폴리A-테일링 반응물에 첨가되었다. 비교를 위해, 포스트-RIP 비드의 병렬 제조물이 QIAzol 용해 시약으로 추출되고 miRNeasy 혈청/혈장으로 정제되었다 ("전체", 100%에서 세팅됨). RIP-단백질분해효소 K로부터 miRNA 수준은 miRNA가 miRNeasy 키트를 이용하여 방출된 RIP로부터 것들과 비교하여 표현되었다.

[0092] 실온에서 단백질분해효소 K 소화를 이용한 miRNA의 방출은 더욱 높은 온도에서 방출보다 더욱 많은 miRNA를 산출하였다 (도면 5). 모든 사례에서, 전체 miRNA의 유의미한 양이 상실되었다. 이러한 상실은 아마도, 표본 내에 잔여 RNA분해효소에 기인하였다.

[0093] 유사한 실험이 단백질분해효소 K 대신에, miRNA의 방출을 위한 pH 2, 3, 또는 4의 완충액에서 펩신 소화를 이용하여 수행되었다. 펩신을 이용한 miRNA 방출은 1% 보다 적은 miRNA를 회수하였다 (데이터 제시되지 않음).

[0094] **실시예 7. 생체액으로부터 miRNA 추출을 위한 다른 방법과 RIP의 비교.**

[0095] miRNA는 실시예 6에서 본질적으로 설명된 바와 같이, 비오틴화된 항-Ago2 및 스트렙타비딘 자성 비드 및 프로테아제 K 방출을 이용하여 분리되었다. 비교를 위해, miRNA는 또한, Exiqon으로부터 miRCury™ RNA 분리 키트 - 생체액, 또는 Qiagen으로부터 miRNeasy 혈청/혈장 키트를 이용하여, 혈장으로부터 직접적으로 정제되었다 (도면 6). 이들 데이터는 Exiqon의 키트를 이용하여 정제된 RNA로부터 let7a miRNA 수율이 Qiagen의 키트를 이용하여 정제된 것보다 3-4 배 높았다는 것을 보여준다. Ago-RIP 및 단백질분해효소 K 방출을 이용하여 제조된 대부분의 miRNA의 수율은 대부분의 실험에서 Exiqon과 Qiagen의 것들 사이에 중간이었다. let7a에 대한 결과는 도면 6 및 도면 7에서 도시되는데, miR23a, miR142, 그리고 miR191에 대한 결과가 유사하였다. 다른 한편, miR451a의 수율은 Ago-RIP 및 Exiqon의 경우에 유사하였다. miR451a는 성숙 miRNA로의 처리를 위해 Ago2 슬라이서 활성을 필요로 하고, 그리고 이런 이유로, 단지 Ago2 복합체에서만 발생한다. 다른 miRNA는 Ago2에 더하여 Ago1, Ago3, 또는 Ago4와 연관될 수 있다. 이용된 항체가 Ago2에 특이적이기 때문에, 이것은 모든 다른 성숙 miRNA보다 miR451a를 더욱 효율적으로 분리한다.

[0096] **실시예 8. 단백질분해효소 저해제 및 RNA분해효소 저해제가 있거나 또는 없는 RIP.**

[0097] Ago-RIP가 단백질분해효소 저해제 및 RNA분해효소 저해제의 존재 (+inh) 또는 부재 (-inh)에서 miRNA를 분리하는데 이용되었고, 그리고 miRNA가 프로테아제 K로 비드로부터 방출되었다. 저해제의 존재에서 수행된 Ago-RIP는 저해제로 처리되지 않은 표본보다 더욱 많은 let7a miRNA를 산출하였다. 유사한 결과가 miR191에 대해 밝혀졌다. miR451a의 경우에 어떤 유의미한 차이도 없었다 (도면 8).

[0098] 저해제와 함께 또는 저해제 없이 이계팔로 혈청의 선처리 (+pre) 역시 수행되었고, 그리고 항체 비드의 첨가와 동시에 저해제와 함께 또는 저해제 없이 이계팔로의 첨가 (-pre)와 비교되었다. 이들 결과는 프로테아제 및 RNA분해효소 저해제로 혈청의 선처리가 공동처리와 비교할 때, let7a 또는 miR451a의 수율을 향상시키지 못하였다는 것을 보여준다 (도면 8).

[0099] **실시예 9. 세정제의 존재 또는 부재에서 miRNA 회수.**

[0100] miRNA의 분리에 대한 세정제의 효과를 결정하기 위해, Ago-RIP가 10 μ g의 비오틴화된 항-Ago2 항체/스트렙타비딘 자성 비드를 이용하여, 이계팔 세정제의 존재 또는 부재에서 수행되었다 (0.2 ml 혈장으로). 세정제의 부재에서 분리된 임의의 miRNA는 유리이고 (즉, 소포 내에 있지 않음), 그리고 세정제의 존재에서 분리된 임의의 miRNA는 소포성인 것으로 가정되었다. 전체 miRNA는 이계팔-처리된 혈장으로부터 회수된 miRNA의 수준이었고, 그리고 100%에 세팅되었다. 유리 miRNA (소포와 연관되지 않은 miRNA)는 이계팔로 처리되지 않은 혈장으로부터 회수된 miRNA의 수준이었다. 소포-연관된 miRNA는 유리 miRNA 표본 내에 상기 miRNA의 수준에 의해 감소된 전체 miRNA 표본 내에 miRNA의 수준으로서 계산되었다. 도면 9는 let7a, miR23a, miR142, 그리고 miR451a miRNA의 유리와 소포-연관된 수준을 보여준다. 이들 결과는 세정제 처리가 일부 miRNA를 혈장으로부터 RIP에 의해 효율적으로 회수하는데 바람직할 수 있다는 것을 증명한다.

[0101] **실시예 10. RIP는 확장가능하다.**

[0102] RIP가 0.2 ml 혈장 및 10 μ g 비오틴화된 항-Ago2/스트렙타비딘 비드, 또는 0.4 ml 혈장 및 20 μ g 비오틴화된 항-Ago2/스트렙타비딘 비드, 그 이후에 단백질분해효소 K 소화로 방출에 의해 수행되었다. 비교를 위해, miRNA가 Exiqon의 miRCury RNA 분리 키트 - 생체액으로 0.2 ml의 동일한 혈장으로부터 분리되었다. 각 제조 방법으로 회수된 let7a, miR191, 그리고 miR451a의 총 수율은 도면 10에서 도시된다. Ago-RIP로, 2배 많은 혈장 (즉, 0.2 ml와 대비하여 0.4 ml)이 1.5-2배 많은 시험된 miRNA를 산출하였고, 반면 칼럼-기초된 키트 (가령, Exiqon과 Qiagen으로부터 것들)는 능력-제한되고 0.2 ml 이내의 혈장의 이용을 권고한다.

[0103] **실시예 11. RIP를 위한 최소 항온처리와 세척 시간.**

[0104] RIP가 실온에서 5, 15, 30, 또는 60 분 동안 회전과 함께 항온처리된 0.2 ml 혈장 및 5 µg 비오틴화된 항-Ago2/스트렙타비딘 비드로 수행되었다. 5, 15, 또는 30 분 동안 항온처리된 것들 모두 항온처리가 완결된 후 5 회 세척되었다. 60 분 항온처리된 것들은 RIP 세척 완충액으로 5, 4, 3, 2, 또는 1 회 세척되었다. 이들 모두 단백질을 분해효소 K로 방출되었다. let7a에 대한 수율은 **도면 11**에서 제공된다. 이들 결과는 15 분보다 많은 항온처리 기간이 이용된 조건 (가령, 항체와 비드의 유형과 양) 하에 최대 miRNA 회수를 위해 필요한 것으로 보이지만, Sigma-Aldrich의 MystiCq 검정 (폴리A 테일링, RT, qPCR)으로 miRNA 검출 전에 단지 1회 세척만 필요하다는 것을 보여준다. miR122, miR191, 그리고 miR451a에 대해 유사한 결과가 획득되었다.

[0105] **실시예 12. RIP는 miRNA에 특이적이다.**

[0106] 다음 실시예는 Ago-RIP가 miRNA에 특이적인 지 또는 Ago-RIP가 또한, 다른 RNA를 분리하는 지를 결정하기 위해 수행되었다. 0.2 ml 새로운 혈장 (실험 1과 2) 또는 0.2 ml 동결된 혈장 (실험 3)으로부터 단리가 Ago-RIP (S), Exiqon의 miRCury RNA 분리 키트 - 생체액 (E), 또는 Qiagen의 miRNeasy 혈청/혈장 키트 (Q)를 이용하여 수행되었다. 실험 1은 2.5 µg 비오틴화된 항-ago2 항체/20 µl 스트렙타비딘 비드로 수행되었다. 실험 2 및 3은 2.5 µg 비오틴화된 항-ago2 항체/20 µl 스트렙타비딘 비드로 수행되었다. 실시예 6에서 본질적으로 설명된 바와 같은 단백질 분해효소 K 소화가 miRNA를 비드로부터 방출하는데 이용되었다. 특정한 miRNA (가령, let7a) 및 특정한 작은 핵 또는 인 RNA (가령, RNU6 또는 SNORD48)는 MystiCq RT-qPCR 검정을 이용하여 검출되었고, 그리고 더욱 긴 mRNA 또는 rRNA (가령, GAPDH, RN18S, RN28S)는 KiCqStart[®] RT-qPCR (Sigma-Aldrich) 검정을 이용하여 검출되었다. HeLa 세포로부터 전체 RNA (TRI Reagent[®] BD를 이용하여 분리됨)가 정량 표준에 이용되었다.

[0107] 예상한 대로, miRNA, 예를 들면, let7a는 Ago-RIP 또는 칼럼-기초된 키트 중에서 어느 하나를 이용하여 분리되었다 (**도면 12A**를 참조한다). 하지만, 다른 작은 RNA 또는 큰 RNA는 Ago-RIP에 의해 분리되지 않았지만, Exiqon과 Qiagen 키트로 분리되었다. **도면 12B** 및 **도면 12C**에서 보여지는 바와 같이, Ago-RIP를 이용하면 RNU6, SNORD48, GAPDH, RN18S, 또는 RN28S RNAs가 거의 또는 전혀 분리되지 않았지만, 이들 다른 유형의 RNA 모두 Exiqon과 Qiagen 키트로 분리되었다. 따라서, Ago-RIP는 miRNA만을 특이적으로 분리한다.

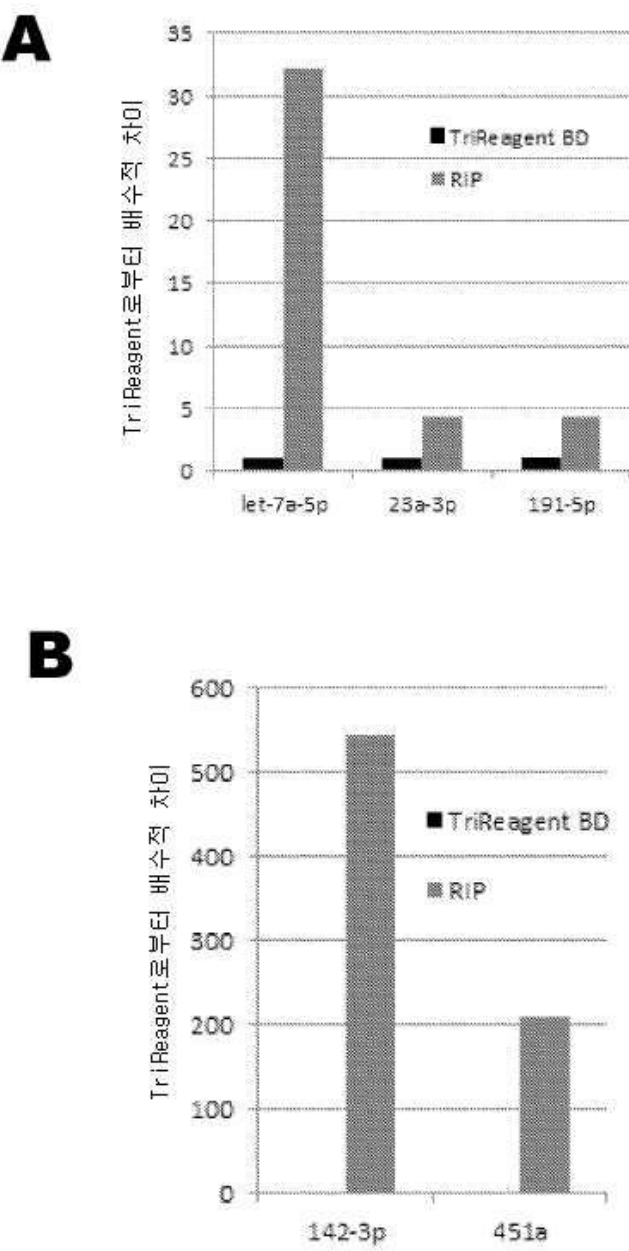
[0108] **실시예 13. 항-Ago1과 항-Ago2 항체 둘 모두의 이용은 RIP 수율을 증가시킨다.**

[0109] 상이한 miRNA가 상이한 Ago 단백질과 연관되기 때문에, 일정한 miRNA의 수율이 상이한 Ago 단백질에 대한 항체의 합동된 이용을 통해 향상될 수 있다는 것이 가능하다. 따라서, miRNA가 10 µg 항-Ago1 항체/20 µl 단백질 A 비드, 10 µg 항-Ago2 항체/20 µl 단백질 A 비드, 또는 20 µl의 각 유형의 항체 비드의 1:1 혼합물을 이용하여 0.2 ml의 혈장으로부터 분리되었다. 비드로부터 miRNA의 방출은 QIAzol 용해 시약을 이용하여 수행되고 실시예 3에서 본질적으로 설명된 바와 같이 Qiagen 키트로 정제되었다. 특정한 miRNA (가령, let7a, miR142-3p, miR122, miR191, 그리고 miR451a)는 MystiCq RT-qPCR 검정을 이용하여 검출되었다.

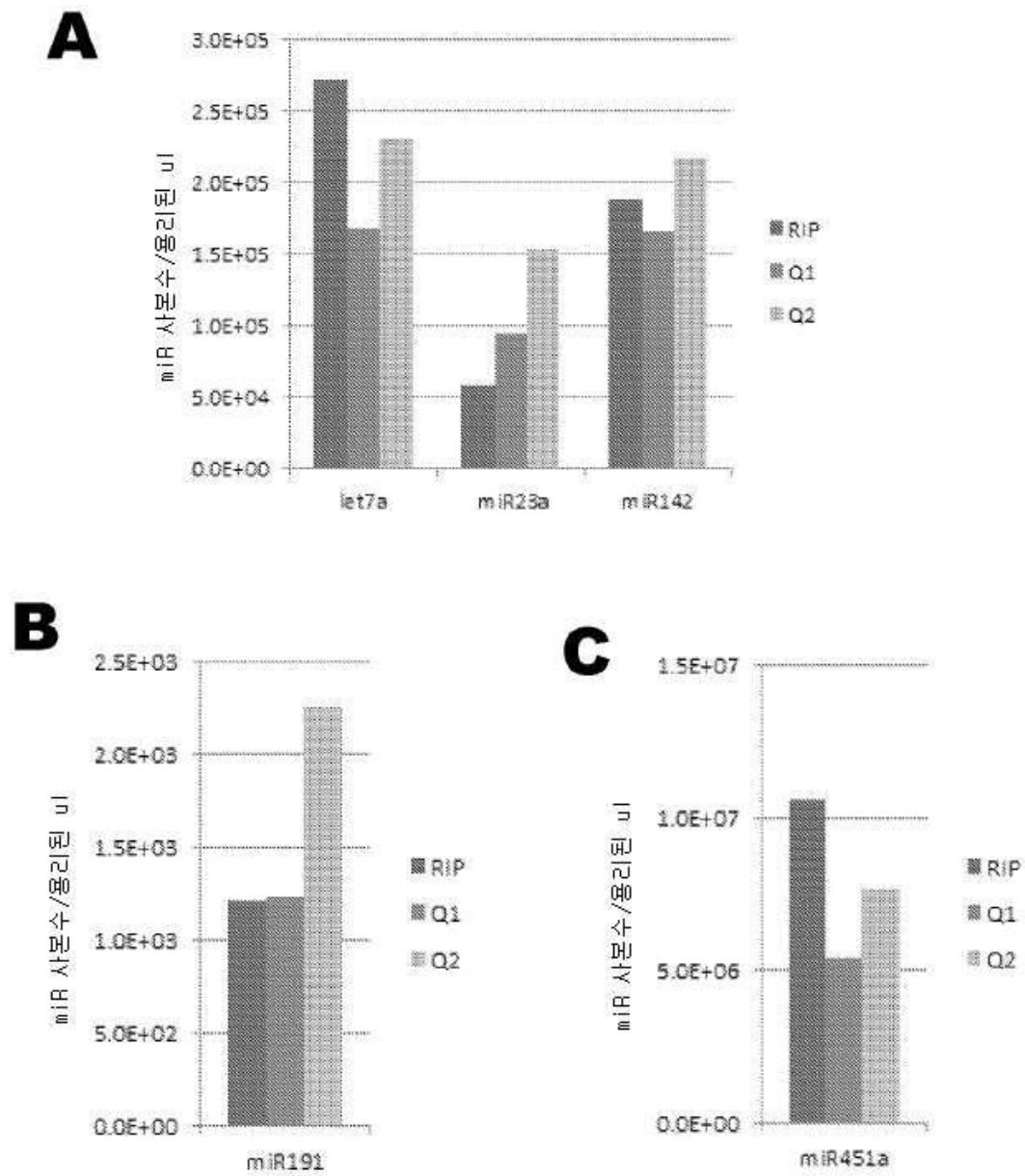
[0110] **도면 13**에서 보여지는 바와 같이, 양쪽 항체를 함께 이용한 수율은 대략, 별개로 이용된 각 항체의 합계이다. 대부분의 miRNA의 경우에, 항-Ago2의 이용은 항-Ago1의 이용보다 더욱 큰 수율을 유발하였다. 하지만, 항-Ago1이 이용될 때 더욱 많은 miR122가 회수되었는데, 이것은 Turchinovich et al., 2012, RNA Biology 9(8):1066-75와 일치한다. 또한, miR451a는 실시예 7에서 앞서 설명된 바와 같이, 항-Ago2로만 회수되었다.

도면

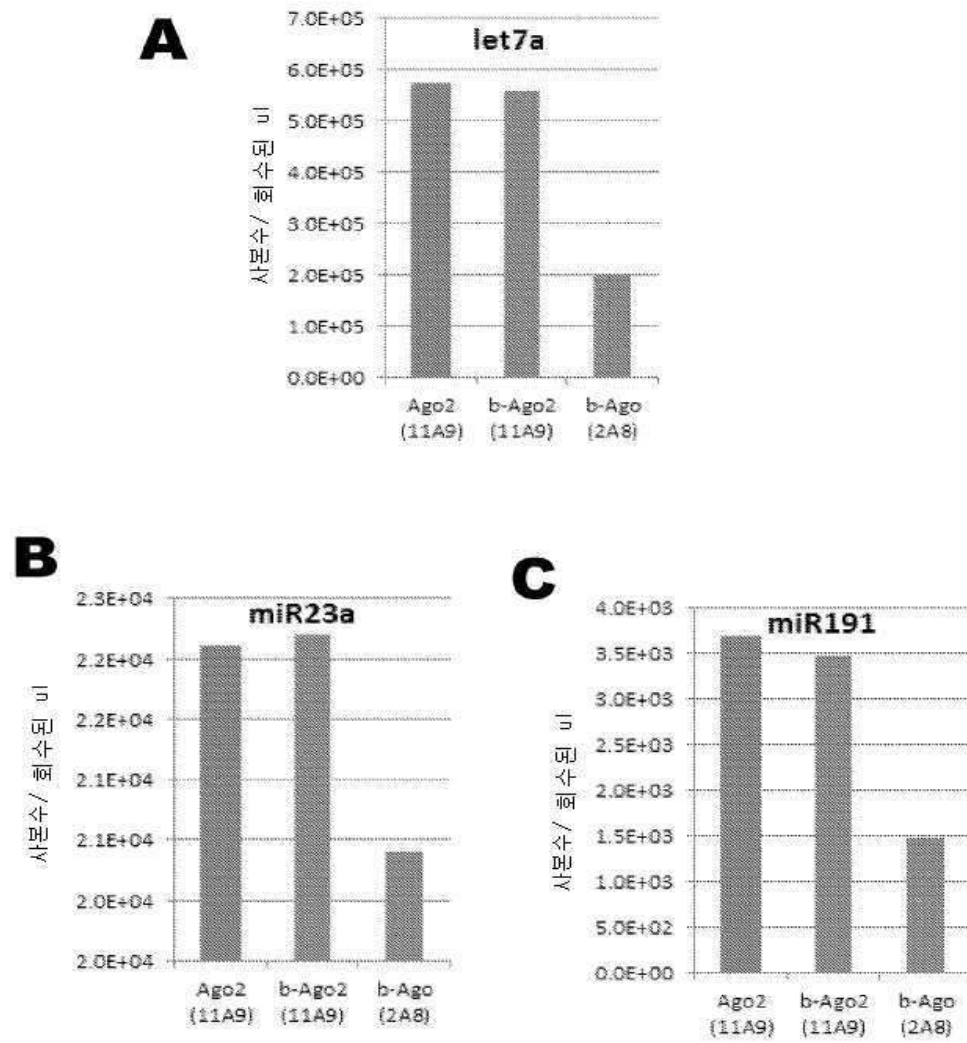
도면1



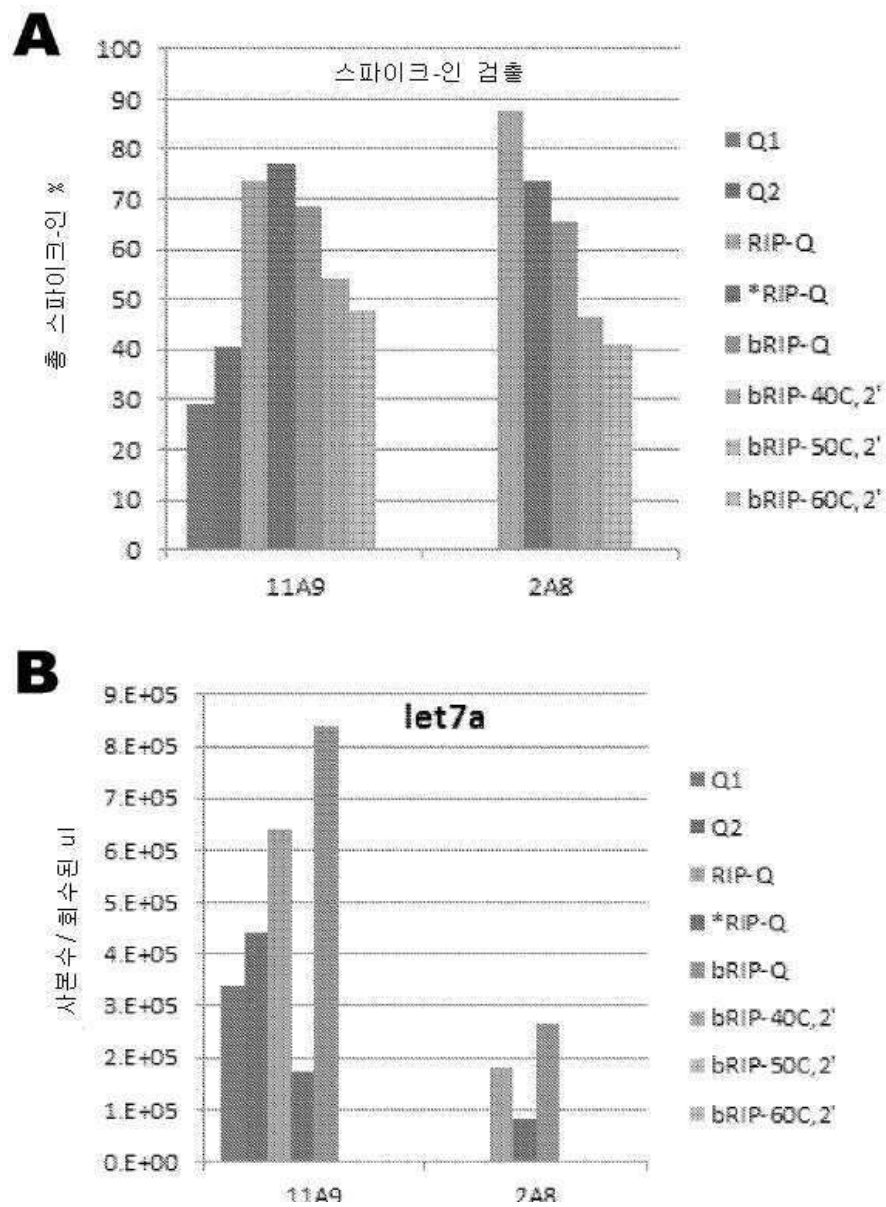
도면2



도면3

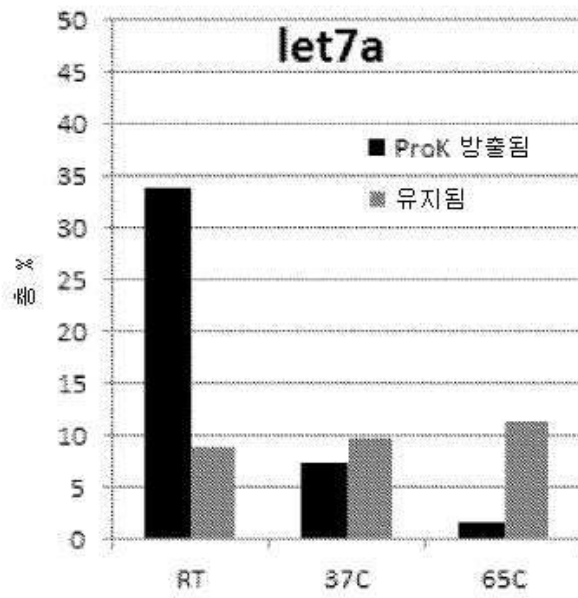


도면4

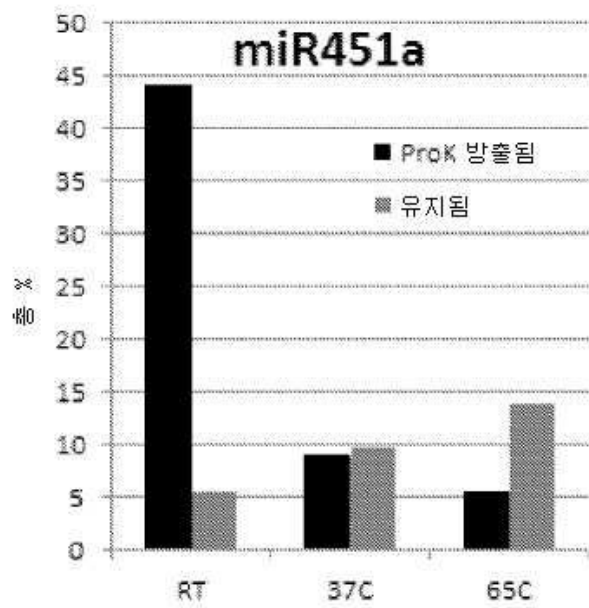


도면5

A

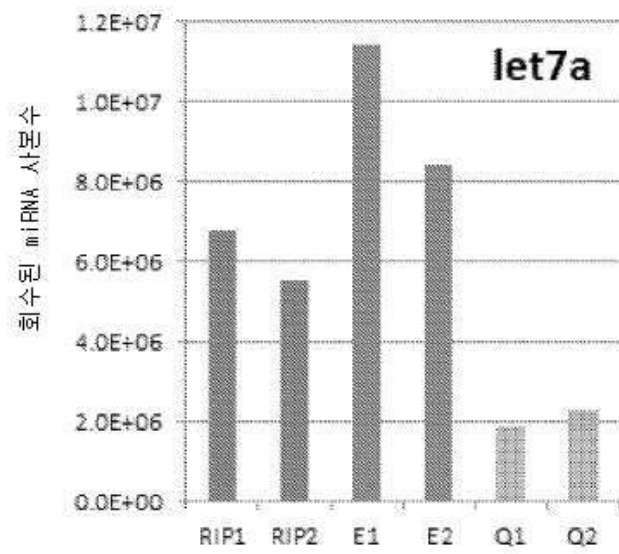


B

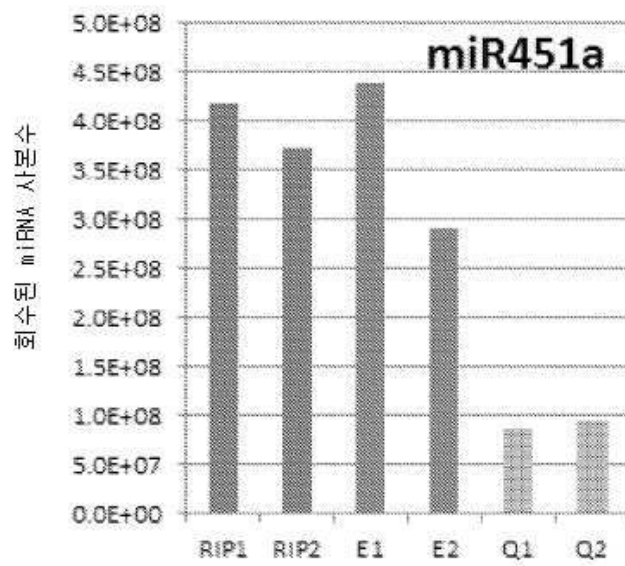


도면6

A

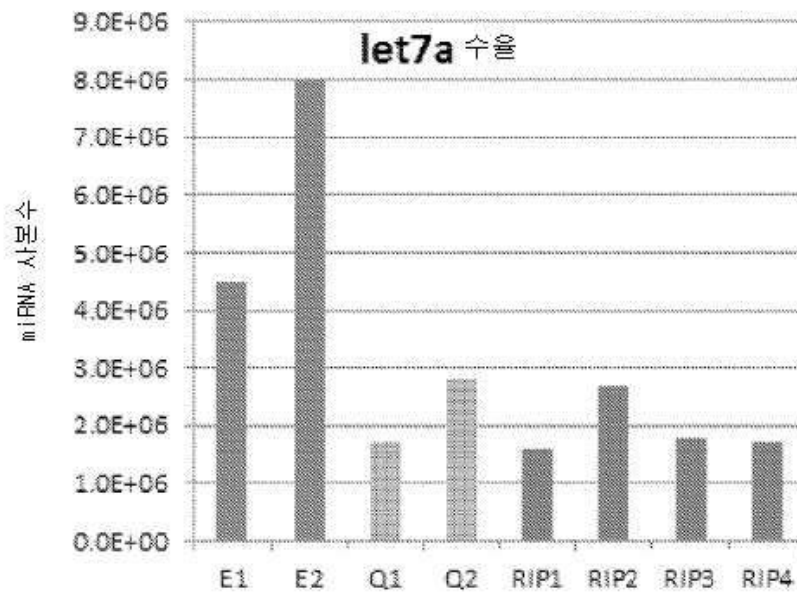


B

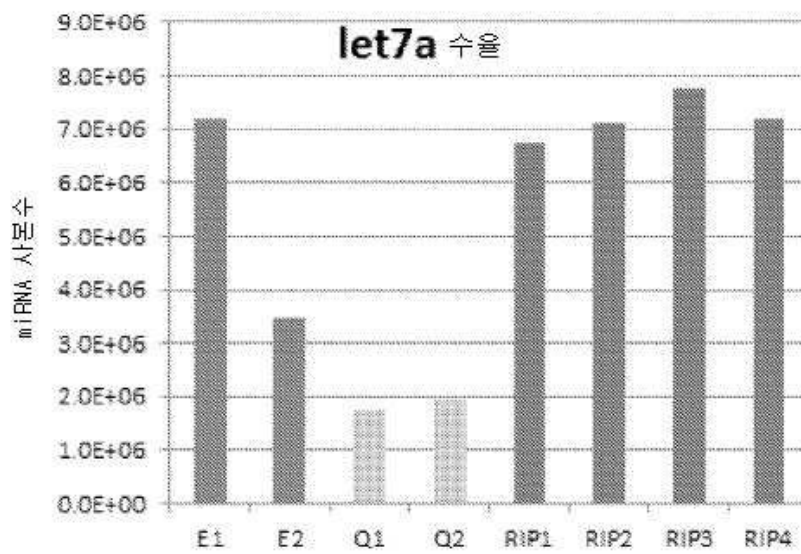


도면7

A

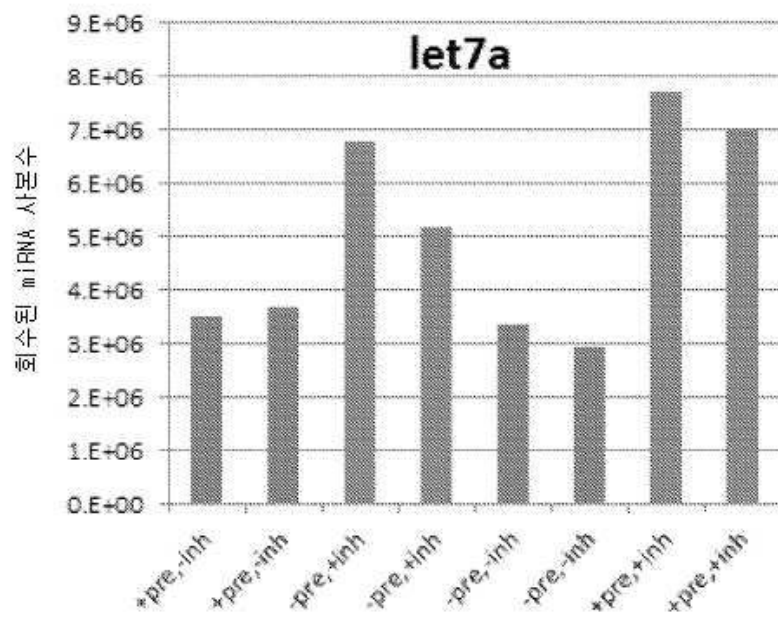


B

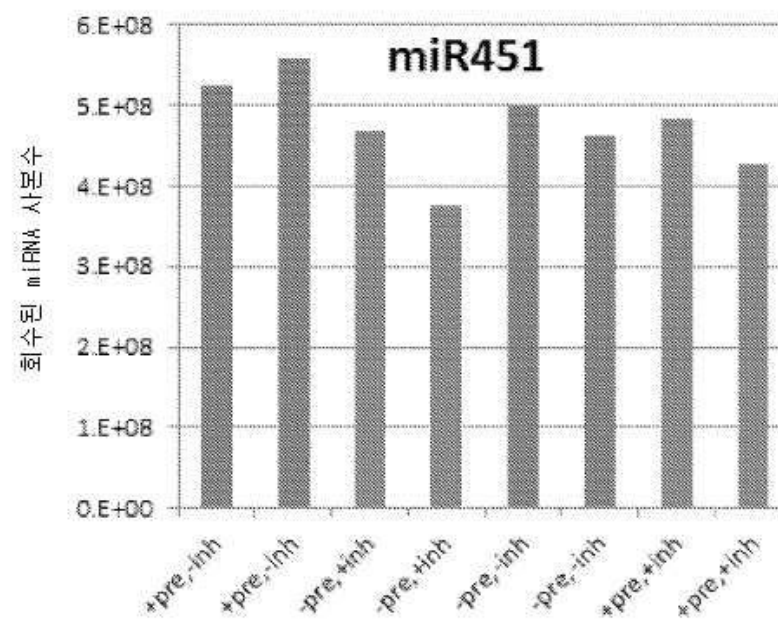


도면8

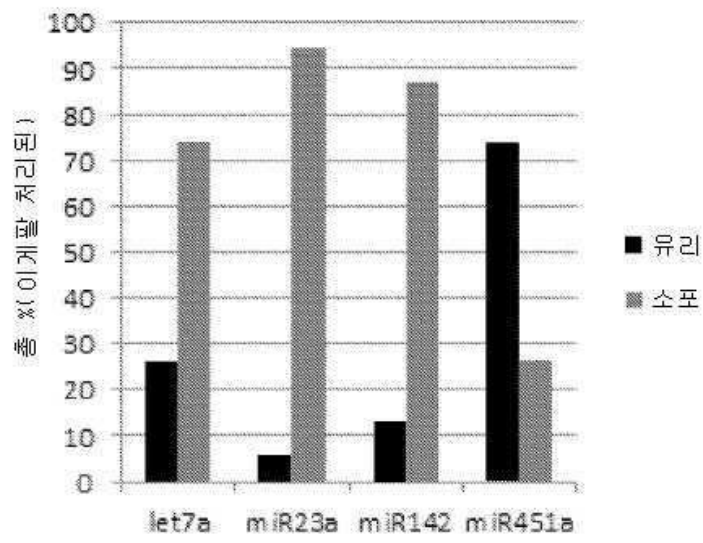
A



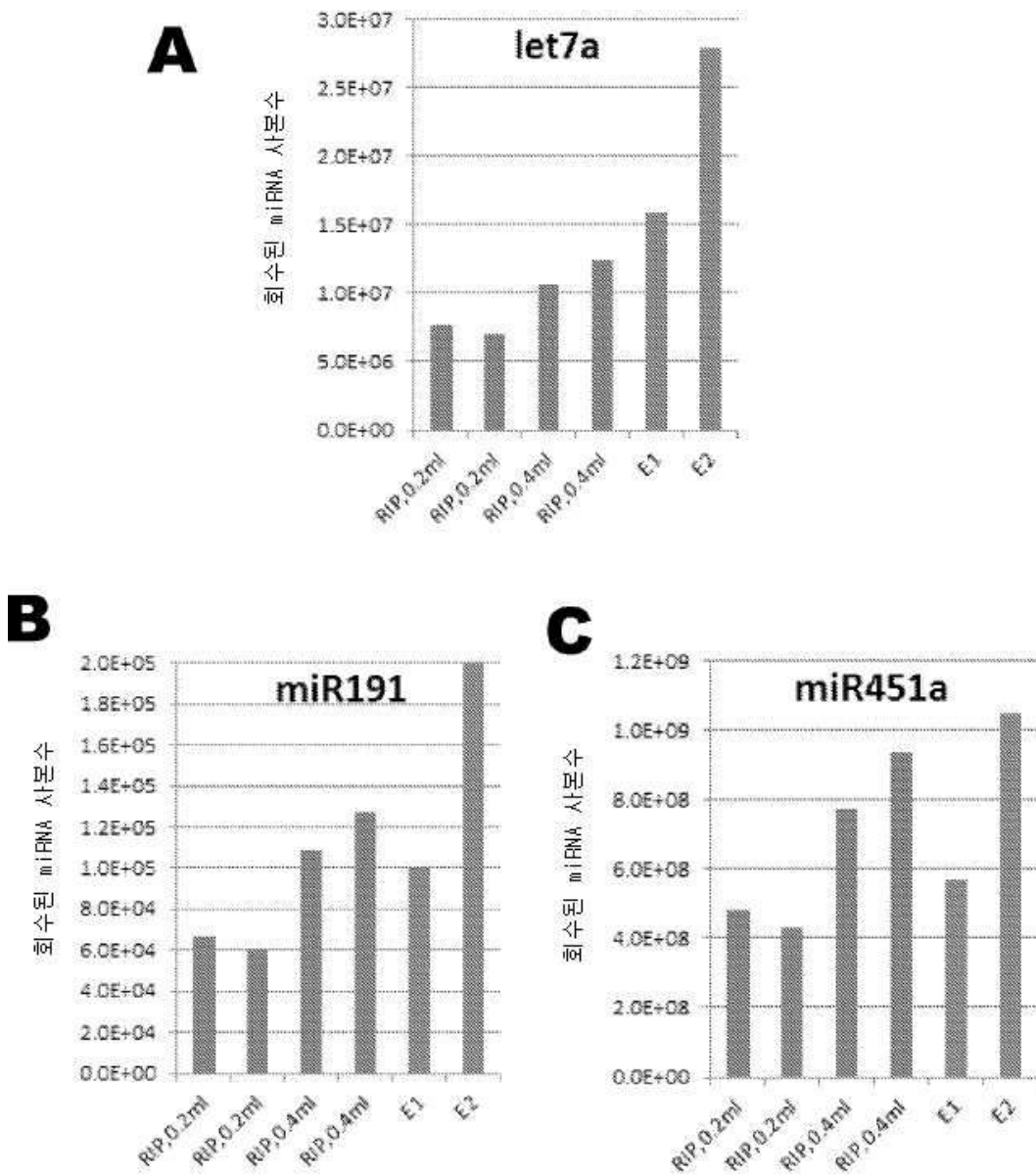
B



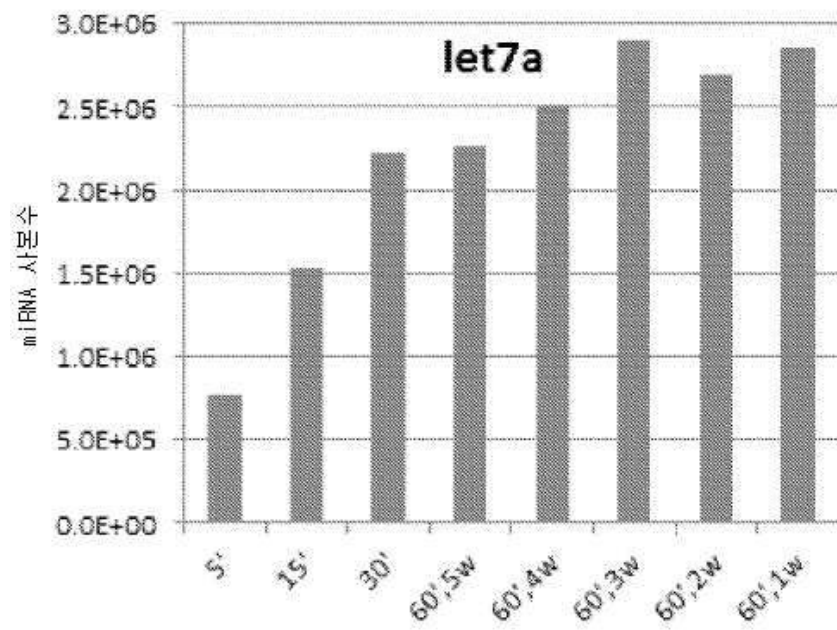
도면9



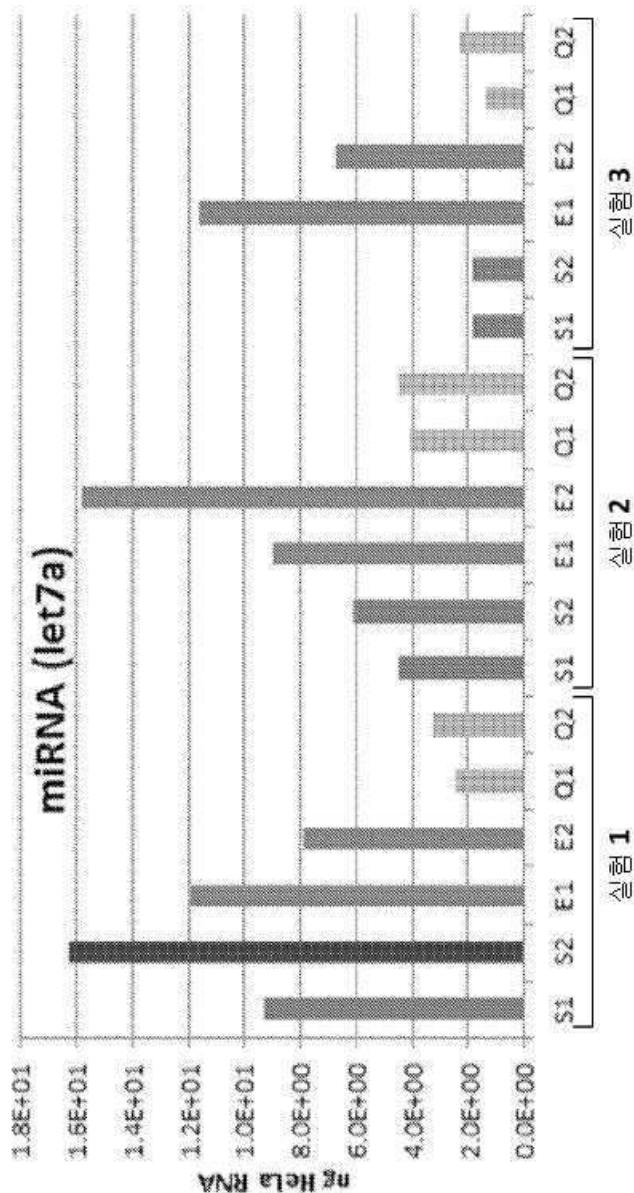
도면10



도면11

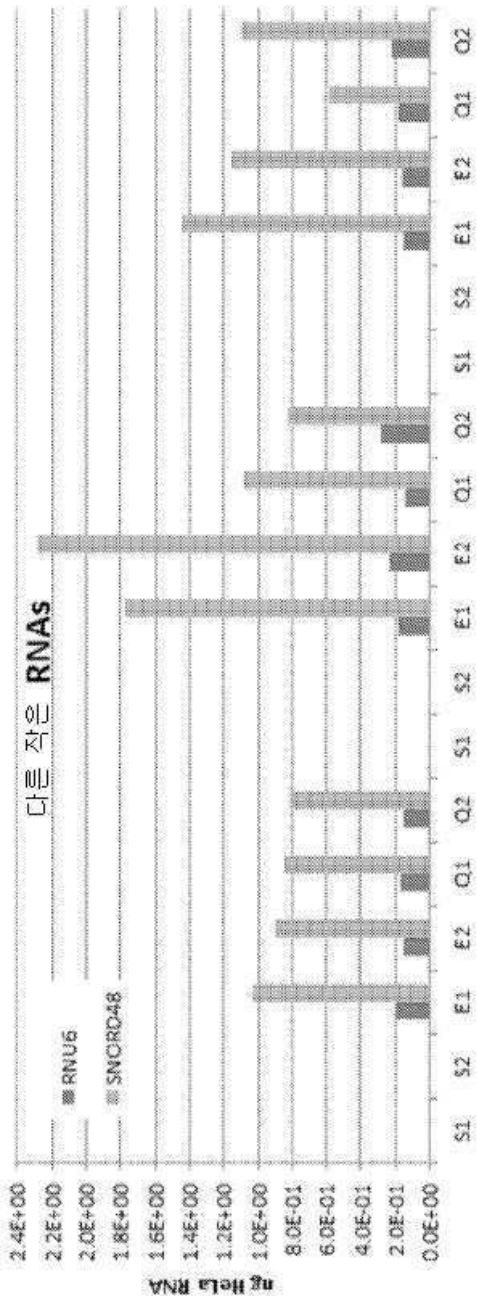


도면12a



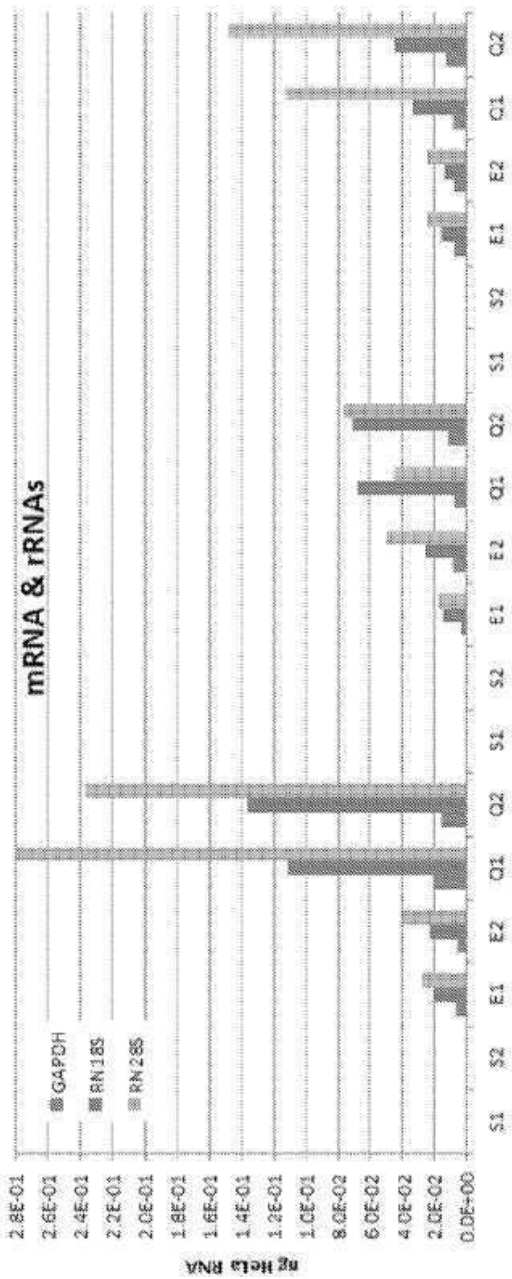
도 12A

도면12b



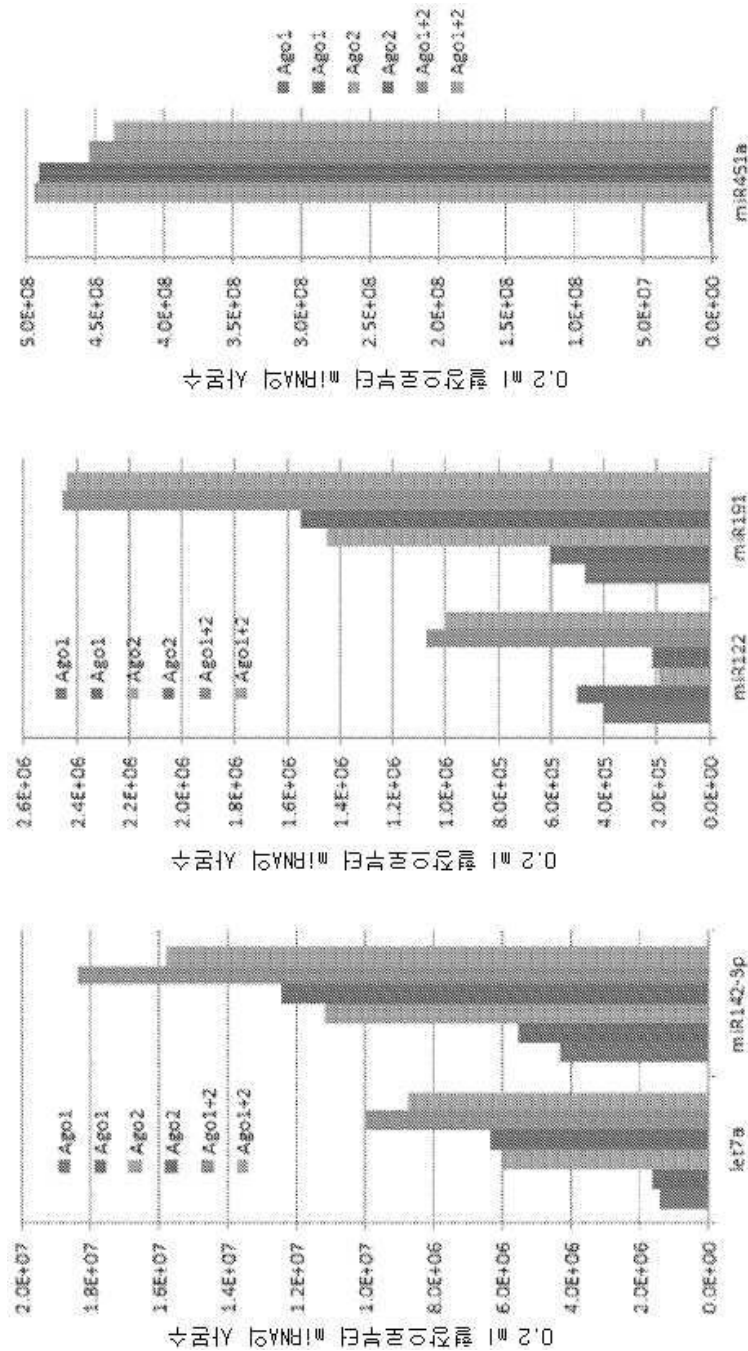
도 12B

도면12c



도 12C

도면13



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

【변경전】

청구항 1에 있어서, 생물학적 유체, 표면 활성제, 그리고 항-miRNA-결합 단백질 시약은 약 30 분 동안 항온처리된 것을 특징으로 하는 방법.

【변경후】

청구항 1에 있어서, 생물학적 유체, 표면 활성제, 그리고 항-miRNA-결합 단백질 시약은 30 분 동안 항온처리된 것을 특징으로 하는 방법.