



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0093205
(43) 공개일자 2020년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57426 (2013.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0010393
(22) 출원일자 2019년01월28일
심사청구일자 2019년01월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
강가원
서울특별시 성북구 인촌로 73(안암동5가, 고려대병원 혈액종양내과)
박용
서울특별시 성북구 인촌로 73(안암동5가, 고려대병원 혈액종양내과)
(74) 대리인
특허법인 무한

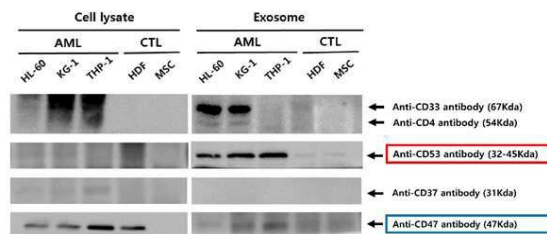
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 엑소좀 유래 면역표현형을 이용한 급성 골수성 백혈병의 치료 반응성 예측방법

(57) 요약

본 발명은 1) 급성 골수성 백혈병의 완치 판정을 받은 환자로부터 채취한 시료에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및 2) 상기 엑소좀의 CD53 및 CD47 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는, 급성 골수성 백혈병의 재발을 예측하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

G01N 33/6872 (2013.01)
G01N 2333/70596 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)
G01N 2800/54 (2013.01)

(72) 발명자

최연호

서울특별시 강남구 선릉로 221, 405동 603호(도곡동, 도곡렉슬아파트)

김현구

서울특별시 서초구 반포대로39길 63-8, A동 402호(반포동, 반포서래월드메르디앙라스칼라)

홍성희

서울특별시 광진구 아차산로70길 61, 503동 1202호(광장동, 광장현대아파트)

박지호

대전광역시 유성구 대학로 291, C동 501호(구성동, 한국과학기술원 외국인교수아파트)

김광표

서울특별시 노원구 초안산로5길 22, 106동 402호(월계동, 대우아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 Z1400360

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술개발사업

연구과제명 [연구중심병원6세부]엑소좀 기반 실시간 혈액암 조기진단 바이오칩 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 의료원 연구지원팀

연구기간 2014.12.11 ~ 2015.07.10

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 급성 골수성 백혈병의 완치 판정을 받은 환자로부터 채취한 시료에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및
- 2) 상기 엑소좀의 CD53 및 CD47 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는, 급성 골수성 백혈병의 재발을 예측하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 환자는 세포독성 항암제 치료를 받은 환자인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 세포독성 항암제는 안트라사이클린 계열 화합물, 씨타라빈(cytarabine) 및 ATRA(all-trans-retinoic acid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 엑소좀의 CD53 및 CD47 발현 수준은 엑소좀-ELISA로 측정되는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 엑소좀에서 CD53 및 CD47이 과발현 되는 경우, 세포독성 항암제에 대한 치료 반응성이 낮을 것으로 예측하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 엑소좀에서 CD53 및 CD47이 과발현 되는 경우, 세포독성 항암요법 치료 후 재발 가능성이 높을 것으로 예측하는, 방법.

청구항 7

- 1) 급성 골수성 백혈병의 완치 판정을 받은 환자로부터 채취한 시료에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및
- 2) 상기 엑소좀의 CD53 및 CD47 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는, 급성 골수성 백혈병 환자의 재발을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 환자는 세포독성 항암제 치료를 받은 환자인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 엑소좀 유래 면역표현형을 이용한 급성 골수성 백혈병의 재발을 예측하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 환자의 치료에서 분리된 엑소좀에서 과발현되는 면역표현형을 마커로 이용함으로써, 표준 치료요법의 적용을 통해 완치판정을 받은 환자의 재발 가능성을 예측하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 급성 골수성 백혈병은 골수성 백혈구의 분화 단계 중 초기 단계에 있는 전구세포 (progenitor cell) 또는 줄기 세포 (stem cell)의 증식, 분화, 세포자연사 등과 관련된 유전자 변이에 의해 발생하는 혈액암 중 하나이다. 국내 중앙암등록본부 자료에 의하면 2015년 기준 전체 암 발생의 1.0%, 인구 10만 명 당 4.4건의 발생률을 보이고 있으며 연도별 신규 진단자가 가장 많은 혈액암으로 최근으로 오면서 전반적으로 그 수가 증가하고 있다.
- [0004] 급성 골수성 백혈병 치료의 기반은 안트라사이클린 (Anthracyclin) 포함 복합 세포독성 항암요법이며, 해당 치료는 약 40년 동안 표준 치료요법으로 인정받고 있다. 한편, 2000년대 중반 저 메틸화 작용제 (Hypomethylating agents)에 이어 2017년 FLT3 억제제 (fms-like tyrosine kinase 3 inhibitors)가 미국 FDA의 승인을 받아 임상에서 사용되고 있으며 최근 10년 간 급성 골수성 백혈병에 대한 다양한 표적 치료제 (Targeted therapy) 들이 개발되어 임상 적용을 기다리고 있다.
- [0005] 표준 치료요법을 받은 환자의 약 70%에서 결국 재발을 경험하게 되며 현재는 재발에 대한 명백한 구제 요법이 없어 재발한 환자의 대부분 사망에 이르게 되는 문제가 있다. 이에, 재발이 일어날 것으로 예상 또는 의심되는 환자들을 선별적으로 확인하여 최적의 치료법을 결정하는 것이 매우 중요하다. 한편, 엑소좀 기반의 바이오 마커를 이용하여 급성 골수성 백혈병을 진단하는 기존의 연구가 있으나, 완치 판정을 받은 환자의 재발 가능성을 예측하는 바이오 마커의 개발은 미흡한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 엑소좀의 단백질 분석을 통해 세포독성 항암제 치료를 통해 급성 골수성 백혈병의 완치 판정을 받은 후 재발한 환자의 엑소좀에서 CD53, CD47이 과발현되고, 표준 치료요법 전, 후 엑소좀 내 CD53 및 CD47 발현양의 변화도가 적다는 것을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 급성 골수성 백혈병의 완치 판정을 받은 환자의 엑소좀 내 CD53 및 CD47의 발현 수준을 측정하여 급성 골수성 백혈병의 재발을 예측하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 급성 골수성 백혈병의 완치 판정을 받은 환자의 엑소좀 내 CD53 및 CD47의 발현 수준을 측정하여 급성 골수성 백혈병의 재발을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 1) 급성 골수성 백혈병의 완치 판정을 받은 환자로부터 채취한 시료에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및 2) 상기 엑소좀의 CD53 및 CD47 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는, 급성 골수성 백혈병의 재발을 예측하는 방법이 제공된다.
- [0013] 일 측에 따르면, 상기 환자는 세포독성 항암제 치료를 받은 환자일 수 있다.
- [0014] 일 측에 따르면, 상기 세포독성 항암제는 안트라사이클린 계열 화합물, 씨타라빈(cytarabine) 및 ATRA(all-trans-retinoic acid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0015] 일 측에 따르면, 상기 엑소좀의 CD53 및 CD47 발현 수준은 엑소좀-ELISA로 측정되는 것일 수 있다.
- [0016] 일 측에 따르면, 상기 엑소좀에서 CD53 및 CD47이 과발현 되는 경우, 세포독성 항암제에 대한 치료 반응성이 낮을 것으로 예측할 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 엑소좀에서 CD53 및 CD47이 과발현 되는 경우, 세포독성 항암요법 치료 후 재발 가능성이 높을 것으로 예측할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 1) 급성 골수성 백혈병의 완치 판정을 받은 환자로부터 채취한 시료에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및 2) 상기 엑소좀의 CD53 및 CD47 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는, 급성 골수성 백혈병의 재발을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 급성 골수성 백혈병 환자의 재발을 예측하는 방법은 표준 치료요법인 세포독성 항암제 치료를 통해 완치 판정을 받은 환자로부터 채취한 시료 내 엑소좀의 CD53 및 CD47 발현 수준을 확인함으로써, 추후 환자의 재발 가능성을 간단하게 확인할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1A는 세포의 배양액과 환자로부터 채취한 시료에서 엑소좀을 분리하는 방법을 단계적으로 도식화한 것이고, 도 1B는 엑소좀 분리에 이용되는 다중 컬럼의 모식도이며, 도 1C는 기존 단일 컬럼과 상기 다중 컬럼을 이용한 엑소좀의 분리 결과를 비교하여 나타낸 것이다.
- 도 2는 다중 컬럼을 이용한 크기 배제 크로마토그래피를 수행하여 분리된 엑소좀을 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.
- 도 3은 인간 급성 골수성 백혈병 세포주인 HL60, KG-1, THP-1과 인간 골수 내 정상 세포주인 HDF, MSC 유래 엑소좀의 액체 크로마토그래피-질량분석 (LC-MS)을 이용한 단백질 분석 결과이다.
- 도 4는 인간 급성 골수성 백혈병 세포주 유래 엑소좀의 단백질 분석 결과로부터 각각 과발현, 저발현된 면역 표현형을 확인한 것이다.
- 도 5는 인간 급성 골수성 백혈병 세포주의 세포 용해물 및 엑소좀에서의 CD53, CD47 발현을 웨스턴블롯으로 확인한 것이다.
- 도 6은 표준 치료요법을 적용한 두 환자군에서 치료 전 후 CD53 또는 CD47의 발현양 차이에 따른 생존율 차이를 나타낸 것이다.
- 도 7은 표준 치료요법을 적용한 두 환자군에서 치료 전 후 CD53 및 CD47의 발현양 차이를 종합하였을 때 생존율 차이를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에

대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

- [0025] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0026] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0027] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0028] 본 발명자들은 이하의 실시예에 따라 표준 치료요법을 적용한 급성 골수성 백혈병 환자에서 CD53 또는 CD47의 발현양 차이에 따라 변화도가 큰 군(Group 1)과 변화도가 작은 군(Group 2)으로 나누어 무병생존율을 비교하였을 때 각각의 면역표현형 변화도에 따라 무병생존율의 차이가 발생함을 확인하였으며, 또한 CD53 과 CD47의 발현양의 변화를 병합하여 무병생존율 비교 시 각각의 면역표현형을 단독으로 이용하였을 때보다 정확하게 무병생존율을 구분할 수 있다는 것을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0029] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 1) 급성 골수성 백혈병의 완치 판정을 받은 환자로부터 채취한 시료에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및 2) 상기 엑소좀의 CD53 및 CD47 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는, 급성 골수성 백혈병의 재발을 예측하는 방법이 제공된다.
- [0030] 상기 환자로부터 채취한 시료는 혈액, 림프액, 뇌척수액, 소변, 타액, 뇌척수액 등일 수 있으나, 혈청 또는 혈장이 바람직하다.
- [0031] 본 발명에서 용어 "치료 반응성"이란 환자가 급성 골수성 백혈병의 표준 치료요법에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응하는 것을 의미한다.
- [0032] 본 발명에서 용어 "예측"이란 환자가 급성 골수성 백혈병의 표준 치료요법으로 치료된 후 재발할 가능성, 생존 여부 또는 생존할 가능성을 미리 판단하는 것을 의미한다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "엑소좀" 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 작은 크기(30-150nm)의 소포로, 막 구성요소, 단백질, RNA를 전달하는 등 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0034] 본 발명의 방법을 이용하는 경우, 표준 치료요법을 적용하여 완치 판정을 받은 환자 중 급성 골수성 백혈병의 재발 가능성이 높은 환자에게 새로운 약제에 대한 임상 실험 참여를 권고하거나 가장 적절한 치료 방법을 선택하도록 도움을 줄 수 있다.
- [0035] 상기 단계 1)에서, 엑소좀의 분리는 초원심분리(ultracentrifuge), 밀도 원심분리(density centrifuge), 컬럼(column)의 이용, PEG 침전(PEG precipitation), 크로마토그래피(chromatography), 면역-자기분리(immuno-magnetic separation, IMS) 및 음향정제(acoustic separation, acoustic purification) 등의 방법을 이용할 수 있으나, 공극의 크기가 20nm 내지 100nm인 다공성 비드 a), 상기 다공성 비드 a) 상부에 층착되고, 공극의 크기가 20nm 이하인 다공성 비드 b) 및 상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b) 사이에 위치하는 분리막을 포함하는 다중 컬럼을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행하는 것이 바람직하다. 이와 같이, 크기 배제 크로마토그래피에 다중 컬럼을 사용하는 것으로 환자의 시료로부터 단백질 및 지질이 섞이지 않은 엑소좀 만을 순도 높게 분리할 수 있다(도 1B 및 1C 참조).
- [0036] 보다 구체적으로, 상기 다공성 비드 a)는 생체시료 내 엑소좀과 지질단백질을 분리하는 것이고, 상기 다공성 비드 b)는 생체시료 내 엑소좀과 수용성 단백질을 분리하는 것이며, 상기 다공성 비드 a) 및 상기 다공성 비드 b)의 부피비는 95:5 내지 5:95 일 수 있다. 다중 컬럼에 이용되는 비드로는, 아가로오스(agarose), 알릴 텍스트란(allyl dextran)과 N, N'-메틸렌 비스아크릴아마이드(N, N'-methylene bisacrylamide) 화합물, 메타크릴(methacryl), 텍스트란(dextran) 및 폴리아크릴아마이드(polyacrylamide)로부터 선택된 하나 이상으로 이루어진

중합체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 세포독성 항암제는 급성 골수성 백혈병의 표준 치료요법에 사용되는 것으로 알려진 안트라사이클린 계열 화합물 화합물, 씨타라빈(cytarabine) 및 ATRA(all-trans-retinoic acid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0038] 상기 단계 2)에서 엑소좀의 CD53 또는 CD47 발현 수준은 엑소좀-ELISA로 측정되는 것일 수 있다. "엑소좀-ELISA"는 기존 ELISA와 달리 엑소좀 자체를 검체로 이용함으로써 엑소좀에서만 특이적으로 발현되는 면역표현형을 확인할 수 있고, 분리된 엑소좀 자체를 검체로 사용하는 엑소좀-ELISA로 마커의 발현 수준을 확인하므로 빠르게 결과를 확인할 수 있다.

[0039] 단계 2)에서 확인된 결과에 따라, 상기 엑소좀에서 CD53 또는 CD47이 과발현 되는 경우, 세포독성 항암제에 대한 치료 반응성이 낮을 것으로 예측할 수 있고, 세포독성 항암요법 이후 재발 가능성이 높을 것으로 예측할 수 있다.

[0040] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 1) 급성 골수성 백혈병의 완치 판정을 받은 환자로부터 채취한 시료에서 엑소좀을 분리하는 단계; 및 2) 상기 엑소좀의 CD53 및 CD47 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는, 급성 골수성 백혈병의 재발을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법이 제공된다.

[0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 실시예 1: 세포주의 선정 및 배양

[0045] 인간 급성 골수성 백혈병 세포주인 HL60, KG-1, THP-1, 인간 골수 내 정상 세포주로 HDF를 American Type Culture Collection (Manassasm VA, USA)에서 구입하였으며 인간 골수 내 정상 세포주로 Human bone marrow derived mesenchymal stem cell (hMSC)은 정상인의 골수에서 초대배양 (primary culture)하여 얻었다. HL60, KG-1 은 IMDM, THP-1 은 RPMI-1640, HDF는 DMEM 배양액에 10% 엑소좀 제거 소태아혈청 (Gibco, CA, USA), 1% 페니실린 (Gibco), 1% 스트렙토마이신 (Gibco)을 혼합하여 배양하였다. hMSC는 Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (Lonza, Walkersville, USA)를 이용하여 배양하였다. 엑소좀 제거 소태아혈청은 일반 소태아혈청을 초원심분리기 100,000 xg에서 3시간 동안 원심분리하여 엑소좀을 제거하였으며, 추가로 0.2마이크로미터 필터에 여과한 후 사용하였다.

[0047] 실시예 2: 엑소좀의 분리

[0048] 2-1. 다중 컬럼의 제작

[0049] 크로마토그래피용 컬럼(직경: 10mm, 높이: 50mm)의 하부에 세파로오스 CL-6B를 70%(v/v)로 충전한 후 상부에 세파크릴 200-HR을 30%(v/v) 충전하여 하부와 상부의 높이 비율이 7:3이 되도록 다중 컬럼을 제작하였다

[0051] 2-2. 크기 배제 크로마토그래피

[0052] 상기 실시예 1의 HL60, KG-1, THP-1, HDF, MSC 세포주를 48-72시간동안 배양한 뒤 배양액을 채취하고, 300 xg에서 10분간, 5,000 xg에서 30분 간, 10,000 xg에서 30분 간 순차적인 원심분리를 시행하여 세포 및 세포 사멸체, 세포파편을 제거한 상층액을 얻었다(도 1). 이후 Amicon® ultrafilter 100 kDa (Merch Millipore, Temecula, CA, USA)를 이용하여 농축한 다음, 상기 실시예 2-1에서 제작한 다중 컬럼을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다.

[0053] 환자 혈장 (plasma) 또는 혈청 (serum) 시료를 이용하는 경우에는 농축 과정 없이 실시예 2-1에서 제작한 다중 컬럼을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다.

[0055] 2-3. 엑소좀 분리 결과 확인

[0056] 상기 실시예 2-2를 통해 분리한 엑소솜은 PRO-PREP Protein Extraction Solution (Intron Biotech)를 이용하여 용해한 다음, BCA Protein Assay 방법으로 정량 하였다. 단백질 30 마이크로그램을 전기영동하였으며 5% Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide stocjing gel 과 8-12% SDS-polyacrylamide separating gel을 이용하였다. Mouse monoclonal anti-CD4 antibody (1:1000), Mouse monoclonal anti-CD9 antibody (1:1000), Mouse monoclonal anti-CD33 antibody (1:1000), Mouse monoclonal anti-CD47 antibody (1:1000), Mouse monoclonal anti-CD53 antibody (1:1000)(모두 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit monoclonal anti-calnexin antibody (1:1000)(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 일차 항체로 사용하였으며 peroxidase-conjugated anti-mouse (1:2000), anti-rabbit (1:2000)을 이차 항체로 사용하였다.

[0057] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 엑소솜이 순수하게 분리된 것을 확인할 수 있었다.

[0059] 실시예 3: 엑소솜의 단백질 분석

[0060] 3-1. FASP 방법을 이용한 Tryptic digestion

[0061] 상기 실시예 1에서 배양한 인간 급성 골수성 백혈병 세포주 HL60, KG-1, THP-1, 인간 골수 내 정상 세포주 HDF, MSC 유래 엑소솜 단백질의 30 μ g를 FASP 방법을 이용하여 펩티드로 분해하였다. FASP 방법을 간략히 요약하면 다음과 같다. 30 μ g의 엑소솜 단백질을 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6에서 4 % SDS 및 0.1 M DTT로 분해하여 환원 시킨 후 37 ° C에서 45 분 동안 배양하였으며 약한 진동 하에 7 분간 끓였다. 그 다음, Microcon Ultracel 30kDa (Millipore)을 이용하여 14,000 x g, 16 ° C 조건에서 40 분간 원심 분리하였으며, 준비된 시료는 FASP-urea 완충액 (0.2 mL of 8 M urea in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5)으로 세척하고 같은 조건으로 3 번 원심 분리하였다. 다음으로 55 mM IAA, 0.1 mL를 함유한 UA 용액에서 알킬화시키고 빛을 차단한 상태로 20 분 동안 배양한 후 14,000 x g, 16 ° C, 40 분 동안 원심 분리하였으며, 준비된 시료는 FASP-urea 완충액 (0.2 mL of 8 M urea in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5)으로 세척하고 같은 조건으로 3 번 원심 분리하였다. 트립신을 위한 완충 조건을 준비하기 위해 100 mM TEAB 0.2 mL 를 시료에 첨가하였다. Protein digestion 은 100 mM TEAB, 37 ° C, overnight 조건 하 Sequencing grade trypsin 필터를 사용하여 수행하였다. 이후, 펩티드는 14,000 xg, 16° C, 20분 간 원심 분리하여 환원하였으며, 100 mM TEAB, 75 μ L를 첨가하여 2 회 더 추가 환원하였다. 환원된 펩티드는 SpeedVac concentrator 를 이용하여 건조시켰다. 건조된 샘플은 5% ACN, 180 μ L를 포함한 물, 0.1 % Formic acid 로 용해시키고, C-18 Spin Column (Thermo Scientific, USA)을 사용하여 탈염 후 SpeedVac concentrator 로 다시 건조시켰다.

[0063] 3-2. TMT 5 plex labeling

[0064] Tandem Mass Tag (TMT) 라벨 시약 TMT-126, TMT-127, TMT-128, TMT-129, TMT-130의 0.8mg 바이알에 Anhydrous ACN 41 μ L를 추가하였으며 제작된 TMT 라벨 시약 41 μ L를 상기 실시예 3-1에서 준비한 펩티드 샘플에 첨가하고 1 시간 동안 반응시킨 다음, 각 샘플에 5 % hydroxylamine 8 μ L를 넣고 15 분 동안 반응시켰다.

[0065] 3-3. High pH fractionation

[0066] 시료에서 확인된 펩티드의 수를 증가시키고 액체 크로마토그래피-질량분석 (LC-MS) 시 Hydrophobicity를 이용하여 각 펩티드를 분리하기 위해 High pH fractionation을 시행하였다. 각 펩티드 시료는 Waters, XBridge BEH C18 컬럼, 3.5 μ m, 1.0 x 100 mm를 사용하는 Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 12 개의 분획으로 분리하였다. 구체적으로, 시료 주입 전에 완충액 A (10mM Ammonium formate in water (pH 10.0))에서 평형을 유지시켰으며, 0-70 % 의 완충액 B (10mM Ammonium formate in 90% ACN (pH 10))를 사용하여 분리하였다 (The gradient followed as : 0-10 min, 5% B; 10-20 min, 5% B; 20-80 min, 35% B; 80-95 min, 70% B; 95-105 min, 70% B; 105-115 min, 0% B).

[0068] 3-4. 질량분석기를 이용한 단백질의 확인

[0069] 상기 실시예 3-3에서 분획화한 펩티드 샘플을 0.1% formic acid를 포함한 물에 재현탁 한 후 Q-Exactive Orbitrap Hybrid Mass Spectrometry connected with EASY-nLC 1000 system (ThermoScientific, Bremen, Germany)를 이용하여 분석 하였다(The gradient was as follow: from 5% to 40% of solvent B for 120 min,

from 40% to 80% of solvent B for 5 min, maintaining at 80% of solvent B for 10 min, and equilibrating the column at 1% of B for 30% (Sol A: 0.1% formic acid in water, Sol B: 0.1% formic acid in acetonitrile)). 펩티드는 Trap column 으로 용리하고, 이온화는 2 μ m C18 입자로 충전된 EASY-spray column (50cm $\times$ 75 μ m ID), 전기 스프레이 전압 1.8kV으로 수행하였다. 질량분석 데이터는 1.0 x 10⁶의 자동 이득 제어 목표 값, 120 ms의 최대 이온 주입, m/z 200-70,000의 분해능, 400-2,000 m/z의 스캔 범위에서 수집되었다. MS/MS의 최대 이온 주입 시간은 해상도 17,500에서 60ms로 설정되었다. 동적 배제 시간은 30 초로 설정되었다.

[0070] 질량분석 데이터는 Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Germany)의 SEQUEST®를 사용하여 Uniprot human database (released in June, 2017)에 대해 검색되었다. 시스테인의 Carbamidomethylation, Lysin의 TMT tag 및 N-말단, Methionine의 N-아세틸화 또는 산화를 각각의 탐색에 사용하였다. Peptide spectrum match와 단백질 수준에서 1 %의 False discovery rate 기준이 적용된다. 허용 오차는 전구체 질량에 대해 10ppm 및 단편 질량에 대해 0.8Da로 설정되었다.

[0071] 그 결과, 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이 인간 급성 골수성 백혈병 세포주 HL60, KG-1, THP-1와 인간 골수 내 정상 세포주 HDF, MSC 유래 엑소좀 단백질에서 유의한 발현양의 차이를 나타내는 마커 후보를 선정할 수 있었다.

[0073] 실시예 4: 표준 치료요법을 적용한 환자에서 CD53 또는 CD47의 발현양 차이에 따른 생존율 분석

[0074] 급성 골수성 백혈병 유래 엑소좀 단백질 중 과발현 된 면역표현형을 선정하여 ELISA는 방법으로 치료 반응 예측에 대한 실험을 진행하였으며 이에 Human leukocyte surface antigen CD47 ELISA (Cat. MBS926478, MyBiosource, Inc., CA, USA), Exo-TESTTM CD53-exosome ELISA (Cat. EKC34422, Lonza) 를 사용하였다. 실험 진행은 해당 회사에서 제공하는 프로토콜에 따라 진행하였다.

[0075] 표준 치료요법을 적용한 급성 골수성 백혈병 환자를 대상으로 CD53 또는 CD47의 발현양 차이에 따라 두 환자 군으로 나누어 무병생존율을 비교하였다. 독립변수는 전체 환자군의 CD53 또는 CD47의 발현양 차이에 대한 중위값을 기준으로, 전체 환자군의 중위 값 보다 큰 발현양의 차이를 보이는 군 (Group 1)과 전체 환자군의 중위 값 보다 작은 발현양의 차이를 보이는 군 (Group 2) 로 나누었다. 종속변수는 각 군에 따른 무병생존율로, 급성 골수성 백혈병의 진단 시부터 재발 또는 사망까지의 기간으로 설정하였다.

[0076] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 CD53 또는 CD47의 발현양 차이에 따라 표준 치료요법으로 완치 판정을 받은 후 무병생존율에 차이가 발생함을 확인하였다.

[0077] 다음으로, CD53과 CD47를 함께 이용하여 무병생존율에 대해 분석한 결과를 도7에 나타냈다. 도 7을 참고하면, 전체 환자군의 중위 값보다 CD53 과 CD47 발현양 차이가 모두 크거나 CD53또는 CD47의 발현양의 차이가 적고 큼이 서로 다르게 나타나는 환자 (Group 1), 전체 환자군의 중위 값보다 CD53 과 CD47 발현양 차이가 모두 적은 환자 (Group 2)를 비교하였을 때, CD53과 CD47를 모두 이용한 경우 무병생존율을 보다 정확하게 예측할 수 있음을 확인할 수 있었다.

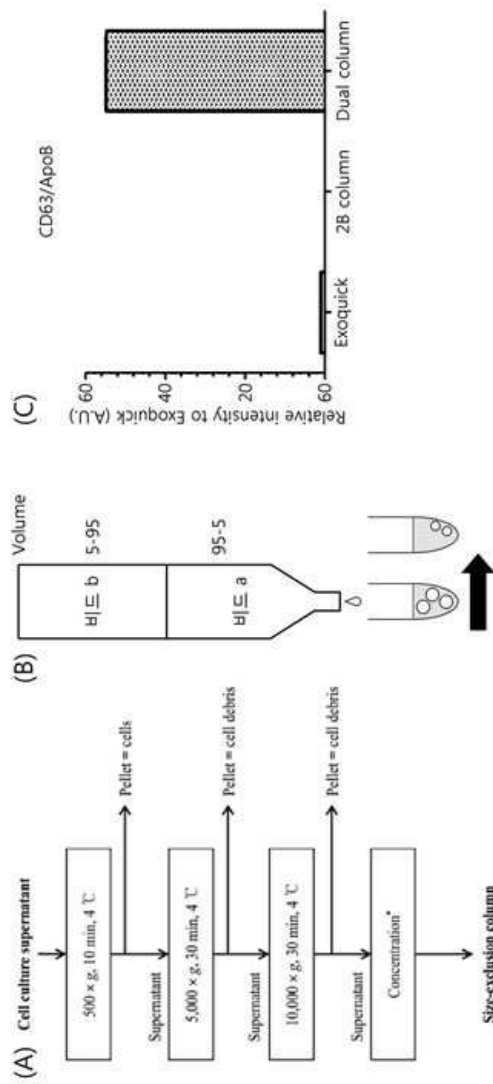
[0078] 이러한 결과는 CD53 및 CD47의 발현양 차이가 전체 환자군의 중위 값 보다 모두 적은 환자는 표준 치료요법 적용 후에도 CD53 및 CD47이 과발현되고 있음을 시사한다.

[0080] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

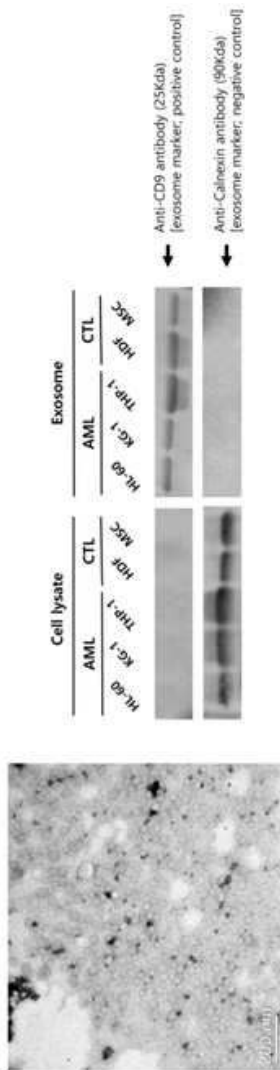
[0081] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

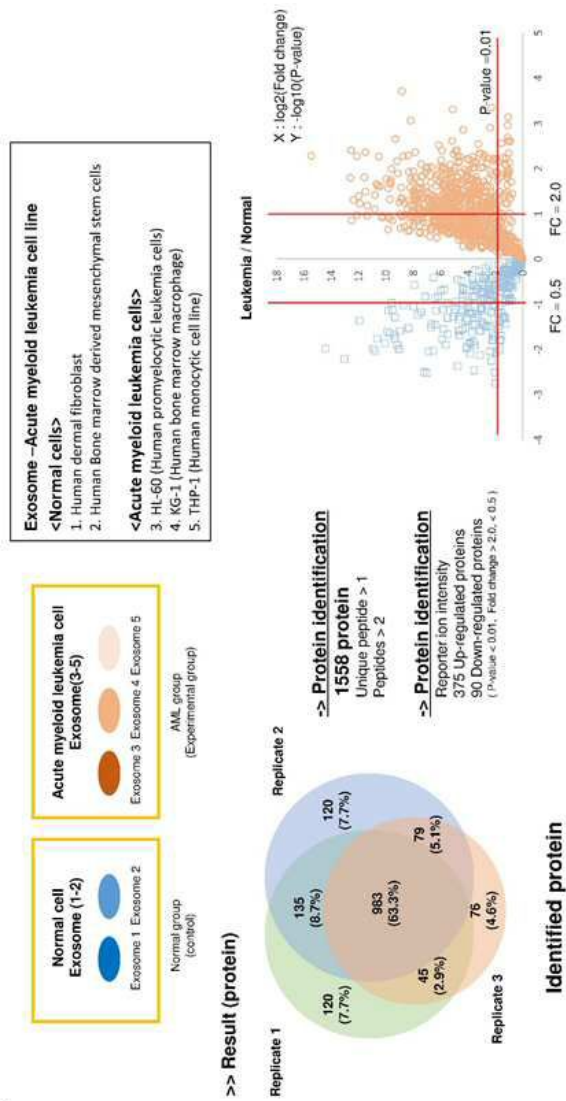
도면1



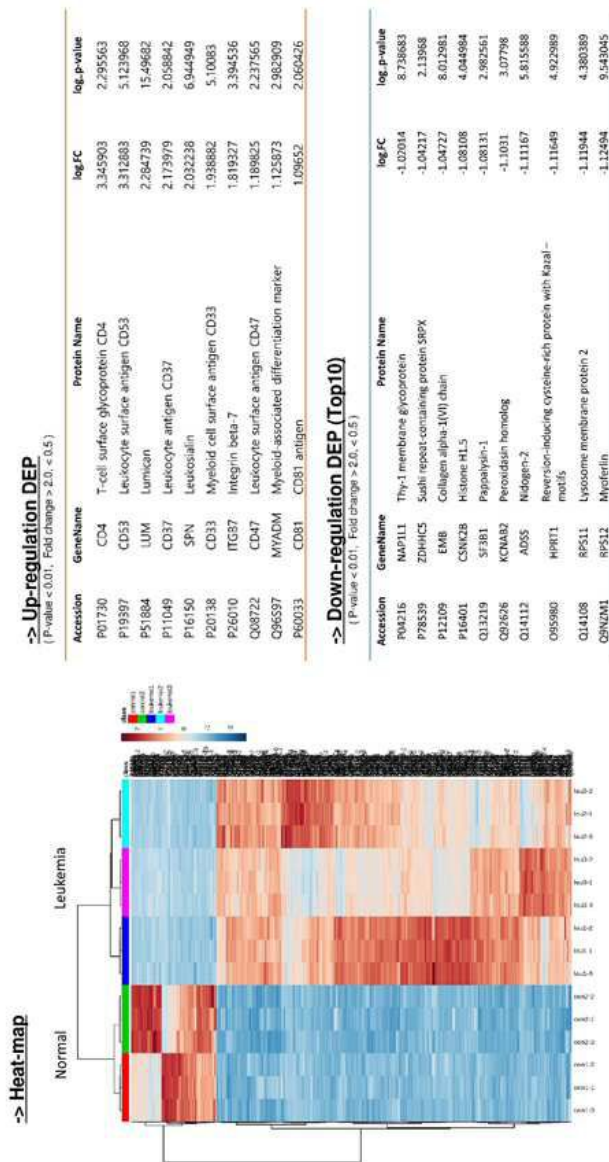
도면2



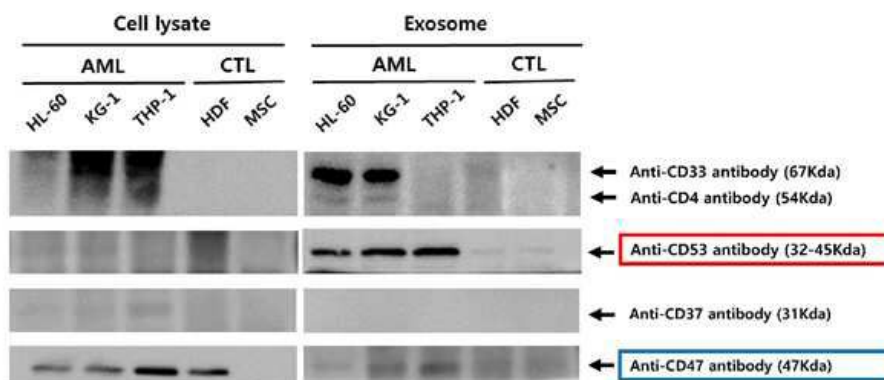
도면3



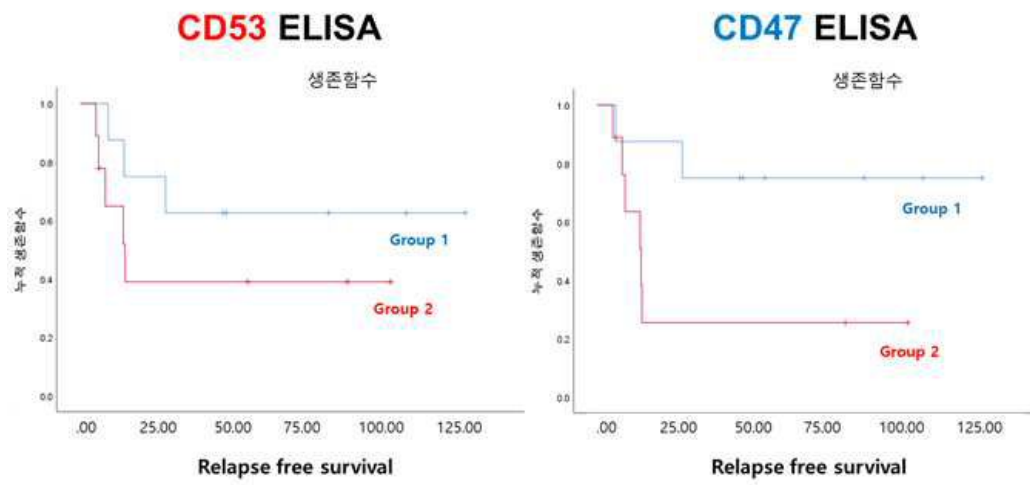
도면4



도면5



도면6



도면7

