(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0007017
(43) 공개일자 2023년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0087745
(22) 출원일자 2021년07월05일
심사청구일자 없음
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박용
서울특별시 강남구 압구정로 151, 108동 1306호(압구정동, 현대아파트)
강가원
서울특별시 중구 난계로21길 39, 905호(황학동)
김정안
경기도 안양시 동안구 부림로 80, 609동 705호(평촌동, 초원한양아파트)
(74) 대리인
위병갑

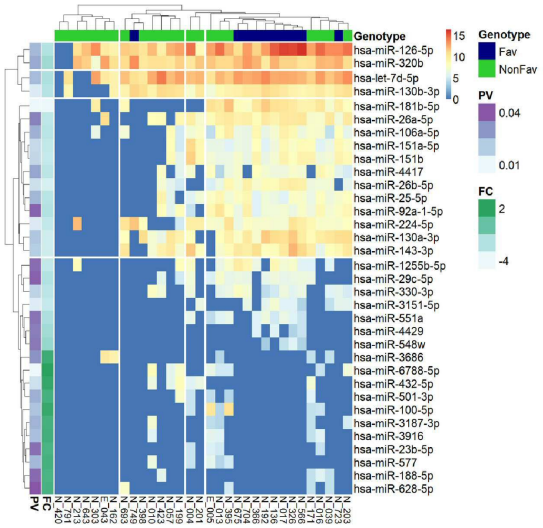
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **급성 골수성 백혈병 예후 예측용 마커**

(57) 요 약

본 발명은 급성 골수성 백혈병의 예후에 특이적인 바이오마커에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 본 발명의 마이크로 RNA 마커들은 급성 골수성 백혈병의 예후에 따라 특이적으로 그 발현이 상향 또는 하향 조절되므로, 이를 급성 골수성 백혈병의 예후 진단 용도로 유용하게 활용할 수 있으며, 특히, 세포가 아닌 세포외소포에서 상기 마커들의 발현 변화를 확인하기 때문에, 종래의 급성 골수성 백혈병 세포를 이용한 검사 방법에 비해 시간과 비용이 절약된 효율적인 효과가 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465026064
과제번호 HR14C0007060018
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원육성(R&D)
연구과제명 미래의료수요 대응 의료기기 개발 및 글로벌화를 위한 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축
기 여 율 1/1
과제수행기관명 고려대학교 안암병원
연구기간 2014.12.11 ~ 2023.01.10

명 세 서

청구범위

청구항 1

hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-151b, hsa-miR-3151-5p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-1255b-5p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-4417, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-29c-5p, hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-551a, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-4429, hsa-miR-320b, hsa-miR-548w, hsa-miR-23b-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-577, hsa-miR-3916, hsa-miR-3686, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-432-5p 및 hsa-miR-6788-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마이크로 RNA(microRNA, miR)를 포함하는 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 마커.

청구항 2

제 1항에 있어서, 예후 불량(in non-favorable risk group)한 급성 골수성 백혈병에서 특이적으로 발현이 변화하는, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 마커.

청구항 3

제 1항에 있어서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수단구성 백혈병(CMMoL), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 호지킨 병(HD), 비-호지킨 림프종(NHL), 급성 림프성 백혈병(ALL), 급성 전골수성 백혈병(APL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 호중구성 백혈병(CNL), 급성 미분화 백혈병(AUL), 역성형 대세포림프종(ALCL), 전림프성 백혈병(PML), 청소년 골수단구성 백혈병(JMML), 성인 T-세포 ALL, 삼계열 골수이형성증을 지니는 AML(AML/TMDS), 혼합된 계통백혈병(MLL), 골수이형성 증후군(MDS), 골수증식성 장애(MPD) 및 다발성 골수종(MM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 마커.

청구항 4

제 1항에 있어서, 마커는 혈청 또는 혈장의 세포외소포 유래인, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 마커.

청구항 5

제 1항에 있어서, HOXA9 유전자, CPNE8 유전자, SIX3 유전자, ADAMTS3 유전자 및 SLC14A1 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 추가로 포함하는, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 마커.

청구항 6

hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-151b, hsa-miR-3151-5p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-1255b-5p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-4417, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-29c-5p, hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-551a, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-4429, hsa-miR-320b, hsa-miR-548w, hsa-miR-23b-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-577, hsa-miR-3916, hsa-miR-3686, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-432-5p 및 hsa-miR-6788-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마이크로 RNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 혈액암의 예후 예측용 마커에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브인, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 발현 수준 측정은 중합효소연쇄반응, 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), 역전사 중합효소연

쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 노던블랏 또는 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행되는, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 9

제 6항에 있어서, HOXA9 유전자, CPNE8 유전자, SIX3 유전자, ADAMTS3 유전자 및 SLC14A1 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현양을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 추가로 포함하는, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 유전자의 발현양을 단백질 수준에서 측정하는 제제는, 상기 마커의 단백질 전장 또는 그 단편을 특이적으로 인식하는 항체, 항체단편, 앱타머(aptamer), 아비머(avidity multimer) 또는 펩티도모방체(peptidomimetics)인, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 11

제 6항에 있어서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수단구성 백혈병(CMMoL), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 호지킨 병(HD), 비-호지킨 림프종(NHL), 급성 림프성 백혈병(ALL), 급성 전골수성 백혈병(APL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 호중구성 백혈병(CNL), 급성 미분화 백혈병(AUL), 역성형 대세포림프종(ALCL), 전림프성 백혈병(PML), 청소년 골수단구성 백혈병(JMML), 성인 T-세포 ALL, 삼계열 골수이형성증을 지니는 AML(AML/TMDS), 혼합된 계통백혈병(MLL), 골수이형성 증후군(MDS), 골수증식성 장애(MPD) 및 다발성 골수종(MM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 12

제 6항의 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 조성물을 포함하는, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 13

a) 검사 대상체로부터 분리된 골수 혈액에서 엑소좀을 분리하는 단계;

b) 분리한 엑소좀에서 제 1항에 따른 혈액암의 예후 예측용 마커의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

c) b) 단계에서 측정된 혈액암의 예후 예측용 마커의 발현 수준을 예후 양호(favorable) 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계를 포함하는 혈액암의 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 골수 혈액의 혈청 또는 혈장에서 세포외소포를 분리하는, 혈액암의 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 15

제 13항에 있어서, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-151b, hsa-miR-3151-5p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-1255b-5p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-4417, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-29c-5p, hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-551a, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-4429, hsa-miR-320b 및 hsa-miR-548w로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마이크로 RNA의 발현 수준이 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과에 비해 하향 조절되는 경우, 검사 대상체의 예후가 불량할 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 혈액암의 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 16

제 13항에 있어서, hsa-miR-23b-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-577, hsa-miR-3916, hsa-miR-3686, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-432-5p 및 hsa-miR-6788-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마이크로 RNA의 발현 수준이 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과에 비

해 상향 조절되는 경우, 검사 대상체의 예후가 불량할 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 혈액암의 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 17

제 13항에 있어서, HOXA9 유전자 또는 CPNE8 유전자의 발현 수준이 대조군 시료의 해당 유전자의 상응하는 결과에 비해 상향 조절되는 경우, 검사 대상체의 예후가 불량할 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 혈액암의 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 18

제 13항에 있어서, SIX3 유전자, ADAMTS3 유전자 또는 SLC14A1 유전자의 발현 수준이 대조군 시료의 해당 유전자의 상응하는 결과에 비해 하향 조절되는 경우, 검사 대상체의 예후가 불량할 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 혈액암의 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 19

제 13항에 있어서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수단구성 백혈병(CMMoL), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 호지킨 병(HD), 비-호지킨 림프종(NHL), 급성 림프성 백혈병(ALL), 급성 전골수성 백혈병(APL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 호중구성 백혈병(CNL), 급성 미분화 백혈병(AUL), 역성형 대세포림프종(ALCL), 전림프성 백혈병(PML), 청소년 골수단구성 백혈병(JMML), 성인 T-세포 ALL, 삼계열 골수이형성증을 지니는 AML(AML/TMDS), 혼합된 계통백혈병(MLL), 골수이형성 증후군(MDS), 골수증식성 장애(MPD) 및 다발성 골수종(MM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 혈액암의 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 급성 골수성 백혈병의 예후에 특이적인 바이오마커에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 혈액암 상태는 혈액, 골수 및 림프계를 침범하는 백혈병 및 악성 림프구증식성 상태와 같은 암의 유형으로, 이 중 백혈병은 급성 백혈병과 만성 백혈병으로 분류될 수 있다. 급성 백혈병은 급성 골수성 백혈병(AML)과 급성 림프구성 백혈병(ALL)으로 더 분류될 수 있다. 만성 백혈병은 만성 골수성 백혈병(CML)과 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함한다. 다른 관련된 상태로는 골수 이형성 증후군(MDS, 이전에는 "전백혈병"으로 알려짐)이 있는데, 이것은 골수혈 세포의 비효과적인 생산(또는 이형성증)과 AML로의 변형 위험에 의해 결집되는 혈액학적 상태들의 다양한 집합이다.

[0003] 급성 골수성 백혈병의 치료는 관해유도항암요법(remission-induction therapy)과 관해 후 항암요법(post-remission therapy)로 나누어지게 되며, 아직까지 치료의 근간은 1900년대부터 사용하였던 안트라사이클린과 사이타라빈 병합요법 기반의 관해유도항암요법과 조혈모세포이식 기반의 관해 후 항암요법이다. 해당 치료 중 치료 독성으로 인한 사망률은 나이, 전신 상태에 따라 최대 80%까지 이를 수 있으며, 이러한 위험도를 가진 채 치료를 진행하더라도 반 수 이상의 환자들은 약제에 대한 반응이 없거나 백혈병의 재발을 경험하게 된다. 2000년대 이후 새로운 급성 골수성 백혈병 치료제가 임상에서 사용되기 시작하면서 이러한 미충족 의료수요(Unmet medical needs)가 다소 해결될 것으로 기대되나 어떤 환자에서, 어떠한 방식으로 새로운 치료제를 도입할 것인가에 대해서는 아직 연구가 필요하다.

[0004] 급성 골수성 백혈병은 가능한 빠른 시일 내 치료제를 결정하여 치료를 시작하지 않으면 질병 자체로 사망에 이를 수 있으며 반대로 치료를 너무 강하게 또는 약하게 하는 경우 치료 독성으로 인한 사망률 또는 질병의 재발로 이어지게 된다. 기존의 급성 골수성 백혈병의 진단 또는 예후 관련 검사의 경우 환자의 전신 상태 또는 검사 자체의 한계로 인해 검사 진행 자체가 어렵거나 시간 및 비용이 많이 소요되어 위의 임상적 요구를 만족할 수 없으며 이에 세포 기반의 검사법에서 탈피하여 세포외소포 기반의 급성 골수성 백혈병 예후예측용 바이오마커를 제시하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 마커를 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 아울러, 본 발명의 목적은 혈액암의 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 마커를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 혈액암의 예후 예측을 위한 정보를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 본 발명의 마이크로 RNA 마커들은 급성 골수성 백혈병의 예후에 따라 특이적으로 그 발현이 상향 또는 하향 조절되므로, 이를 급성 골수성 백혈병의 예후 진단 용도로 유용하게 활용할 수 있으며, 특히, 세포가 아닌 세포외소포에서 상기 마커들의 발현 변화를 확인하기 때문에, 종래의 급성 골수성 백혈병 세포를 이용한 검사 방법에 비해 시간과 비용이 절약된 효율적인 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a는 골수 혈액의 혈청 또는 혈장에서 분리된 세포외소포의 크기 분포를 NTA 분석을 통해 확인한 도이다.

도 1b는 골수 혈액의 혈청 또는 혈장에서 분리된 세포외소포의 크기 및 모양을 TEM으로 확인한 도이다.

도 1c는 골수 혈액의 혈청 또는 혈장에서 분리된 세포외소포에서 CD63 및 CD81의 발현을 웨스턴 블롯 분석으로 확인한 도이다.

도 2a는 AML 예후 불량 그룹 특이적으로 발현이 하향 조절되는 것으로 나타난 세포외소포 유래 마이크로 RNA를 표시한 도이다:

*: Dead miRNA from miRBase; 및

음수의 fold change: 예후 불량 그룹에서 발현이 하향 조절.

도 2b는 AML 예후 불량 그룹 특이적으로 발현이 상향 조절되는 것으로 나타난 세포외소포 유래 마이크로 RNA를 표시한 도이다:

양수의 fold change: 예후 불량 그룹에서 발현이 상향 조절.

도 3은 AML 예후 연관 마커 miRNA의 발현량을 heatmap으로 확인한 도이다.

도 4는 본 발명에서 선발한 마커 miRNA와 연관된 mRNA을 TCGA 분석을 통해 발굴하고 이의 바이오마커로서의 유용성을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0016] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0017] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 테스트하기 위한 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에서 기술된다.

[0018] 본 발명에서 용어, "대상체" 또는 "환자"는 인간, 유인원, 원숭이, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.

[0019] 본 발명에서 용어, "시료(샘플)"는 대상 또는 환자로부터 얻은 생물학적 시료를 의미한다. 생물학적 시료의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다.

[0021] 일 측면에서, 본 발명은 hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-151b, hsa-miR-3151-5p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-1255b-5p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-4417, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-29c-5p, hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-551a, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-4429, hsa-miR-320b, hsa-miR-548w, hsa-miR-23b-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-577, hsa-miR-3916, hsa-miR-3686, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-432-5p 및 hsa-miR-6788-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마이크로 RNA(microRNA, miR)를 포함하는 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 마커에 관한 것이다.

[0022] 일 구현예에서, 예후 불량(in non-favorable risk group)한 급성 골수성 백혈병에서 상기 마커의 발현이 특이적으로 변화할 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, 상기 마커는 혈액암의 예후 예측용 마커일 수 있다.

[0024] 일 구현예에서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수단구성 백혈병(CMMoL), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 호지킨 병(HD), 비-호지킨 림프종(NHL), 급성 림프성 백혈병(ALL), 급성 전골수성 백혈병(APL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 호중구성 백혈병(CNL), 급성 미분화 백혈병(AUL), 역성형 대세포림프종(ALCL), 전림프성 백혈병(PML), 청소년 골수단구성 백혈병(JMML), 성인 T-세포 ALL, 삼계열 골수이형성증을 지니는 AML(AML/TMDS), 혼합된 계통백혈병(MLL), 골수이형성 증후군(MDS), 골수증식성 장애(MPD) 및 다발성 골수종(MM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 급성 골수성 백혈병인 것이 더욱 바람직하다.

[0025] 일 구현예에서, 상기 마커는 혈청 또는 혈장의 세포외소포에서 유래될 수 있다.

[0026] 일 구현예에서, HOXA9 유전자, CPNE8 유전자, SIX3 유전자, ADAMTS3 유전자 및 SLC14A1 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용된 용어, "예후 불량"은 "예후가 나쁜"과 혼용될 수 있으며, "예후 양호"는 "예후가 좋은"과 혼용될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 사용된 용어, "miRNA"는 부분적으로 이중나선을 이루는 헤어핀 RNA(hairpin RNA)로부터 생성되며, 일반적으로 생체 내의 여러 조절 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 작은 RNA(small RNA: 이하 "sRNA"라 칭함)로서, 생체 내에서 유전자 발현을 조절하는 역할을 리보핵산을 말한다. miRNA는 19-25 nt 길이의 단일 가닥 RNA(single strand RNA: 이하 "ssRNA"라 칭함) 분자로, 내재적(endogenous) 헤어핀-구조 전사체(hairpin-shaped transcript) (Bartel, D.P., Cell 116:281-297, 2004; Kim,V.N., Mol. Cells. 19:1-15, 2005)에 의해 생성된다. miRNA는 표적 mRNA의 3' 비번역 영역(UTRs)에 상보적으로 결합하여 전사 후 유전자 억압자(post-transcriptional gene suppressor)로서 작용하며, 번역 억제와 mRNA 불안정화를 유도함으로써 표적 유전자를 억제한다. miRNA는 발전(development), 분화, 증식, 세포사멸 및 신진대사(metabolism)과 같은 다양한

과정에서 중요한 역할을 한다.

[0029] 또한, miRNA 생합성은 RNA 폴리머레이즈 Ⅱ에 의한 전사를 통해 개시된다 (Cai. X., et al., RNA 10:1957-1966, 2004; Kim, V.N. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6:376-385, 2005; Lee, Y., et al., EMBO J 21:4663-4670,2002; Lee, Y., et al., EMBO J 23:4051-4060, 2004). 1차 miRNA(primary microRNA: 이하 "pri-miRNA"라 칭함)는 보통 수 Kb의 길이를 넘으며, 5' 캡(cap)과 폴리 A 테일(poly A teil)을 포함한다. pri-miRNA는 리보큐클레아제 Ⅲ, Drosha (Lee, Y., et al., Nature 425:415-419, 2003)와 이의 부요소인 DGCR8 (Gregory, R.I. et al., Nature 432:235-240, 2004; Han, J., et al., Genes Dev. 18:3016-3027, 2004; Landthaler, M., et al.,Curr. Biol. 14:2162-2167, 2004)로 구성된 마이크로프로세서(microprocessor)라는 복합체에 의해 맨 처음 절단되어 65 nt 정도의 헤어핀-구조 전구체(pre-miRNA)로 분리된다. pre-miRNA 프로세스는 miRNA 생합성에 중심적 단계로서, 길이가 긴 pre-miRNA에 mRNA 서열을 포함하는 분자의 한쪽 말단을 생성하는 과정으로 정의된다. 상기 개시 프로세스 이후 생성된 pre-miRNA는 핵 수송요소인 Exp5(exportin-5)에 의해 세포질로 수송된다 (Bohnsack, M.T., et al., RNA 10:185-191, 2004; Lund, E., et al., Science 303:95-98, 2004; Yi,R., et al., Genes Dev. 17:3011-3016, 2003). 세포질 안에서는 세포질내 RNase Ⅲ 타입 단백질인 다이서(Dicer)가 전달된 pre-miRNA를 절단하여 22 nt 정도의 miRNA 이중 가닥을 생성한다. 다이서 생성물의 한쪽 가닥(strand)은 성숙 miRNA로 세포질 속에 존재하여 miRNP(microribonucleoprotein) 또는 miRISC(miRNA-induced silencing complex)라 불리는 실행자 복합체(effector complex)와 조립된다 (Khvorova, A., et al., Cell 115:209-216, 2003; Schwarz,D.S., et al., Cell 115:199-208, 2003). sRNA에 의한 유전자 침묵 기작(gene silecing mechanism)인 RNAi 현상은 포유동물 시스템에서 효과적인 유전자 연구 수단으로 사용되고 있다. 효과적이며 안정한 유전자 넉다운(knockdown)은 작은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA: 이하 "shRNA"라 칭함)로 발현하여 작은 간섭 RNA(siRNA)로 프로세스 되면서 일어난다. 최근 RNAi 기술의 비약적인 전진은 자연적 miRNA 유전자를 모방한 shRNA 발현카세트를 제작하면서 이루어졌다 (Dickins, R.A., et al., Nat. Genet. 37:1289-1295, 2005; Silva, J.M. et al., Nat. Genet. 37:1281-1288, 2005: Zeng, Y., et al., Mol. Cell 9:1327-1333. 2002). RNA 폴리머라아제 Ⅱ 프로모터에 의해 조정되는 miRNA를 기초한 shRNA는 동물 모델 같은 배양 세포 내에서 효과적이며 안정적으로 유전자 침묵(gene silencing) 조절을 유도한다.

[0030] 본 발명에서 사용된 용어, "예후 예측용 마커, 예후를 판단하기 위한 바이오 마커 또는 예후 진단 마커(diagnosis marker)"란 혈액암의 예후 (예후 불량/예후 양호)를 예측/진단할 수 있는 물질로, 혈액암의 예후와 유의미한 상관관계를 가지고 발현이 증가 또는 감소하는 양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 혈액암의 예후 예측용 마커는 hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-151b, hsa-miR-3151-5p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-1255b-5p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-4417, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-29c-5p, hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-551a, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-4429, hsa-miR-320b, hsa-miR-548w, hsa-miR-23b-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-577, hsa-miR-3916, hsa-miR-3686, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-432-5p 및 hsa-miR-6788-5p으로서, 혈액암의 예후에 따라 특이적으로 발현 정도가 상향 또는 하향 조절되는 마이크로 RNA들이다. 이러한 마커들은 뉴클레오티드뿐만 아니라 어느 하나의 마커와 상보적인 DNA 또는 mRNA을 포함하며, 이들 마커들이 함께 포함된 복합 마커인 것이 바람직하다.

[0031] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 혈액암의 예후 예측용 마커의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 조성물에 관한 것이다.

[0032] 일 구현예에서, 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 혈액암의 예후 예측용 마커에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[0033] 일 구현예에서, 발현 수준 측정은 중합효소연쇄반응, 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 노던블랏 또는 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행될 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 HOXA9 유전자, CPNE8 유전자, SIX3 유전자, ADAMTS3 유전자 및 SLC14A1 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현양을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있으며, 유전자의 발현양을 단백질 수준에서 측정하는 제제는, 상기 마커의 단백질 전장

또는 그 단편을 특이적으로 인식하는 항체, 항체단편, 앱타머(aptamer), 아비머(avidity multimer) 또는 펩티도모방체(peptidomimetics)일 수 있다.

[0035] 일 구현예에서, 상기 유전자의 발현양을 단백질 수준에서 측정하는 제제는, 상기 마커의 단백질 전장 또는 그 단편을 특이적으로 인식하는 항체, 항체단편, 앱타머(aptamer), 아비머(avidity multimer) 또는 펩티도모방체(peptidomimetics)를 포함할 수 있으며, 이의 측정은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 면역 전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 질량분석 또는 단백질 마이크로어레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행될 수 있다.

[0036] 일 구현예에서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수단구성 백혈병(CMMoL), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 호지킨 병(HD), 비-호지킨 림프종(NHL), 급성 림프성 백혈병(ALL), 급성 전골수성 백혈병(APL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 호중구성 백혈병(CNL), 급성 미분화 백혈병(AUL), 역성형 대세포림프종(ALCL), 전림프성 백혈병(PML), 청소년 골수단구성 백혈병(JMML), 성인 T-세포 ALL, 삼계열 골수이형성증을 지니는 AML(AML/TMDS), 혼합된 계통백혈병(MLL), 골수이형성 증후군(MDS), 골수증식성 장애(MPD) 및 다발성 골수종(MM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 급성 골수성 백혈병인 것이 가장 바람직하다.

[0037] 본 발명에서 사용된 용어, "검출" 또는 "측정"은 검출 또는 측정된 대상의 농도를 정량하는 것을 의미한다.

[0038] 본 발명에서 사용된 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기 (free 3 hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍 (base pair)를 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응 (즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 사용된 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 상기 마커와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 상기 유전자 발현 정도를 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 통상의 기술분야에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있으므로 본 발명에서는 이에 대해 특별히 한정하지 않는다.

[0040] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스소트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0041] 본 발명에서, 프로브를 마이크로 RNA 분자와 혼성화시키는 적합한 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타깃 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, NucleicAcidHybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO4, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate),1mM EDTA에서 65℃ 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다.

[0042] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커 유전자에서 발현되는 단백질에 대해 특이적으로 결

합하는 항체를 의미하며, 상기 항체의 제조방법은 널리 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

[0043] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 마커의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 혈액암의 진단 또는 예후 예측용 키트에 관한 것이다.

[0044] 일 구현예에서, 상기 키트는 DNA 중합효소 및 dNTP(dGTP, dCTP, dATP 및 dTTP), 형광물질 등의 표지 물질을 추가로 더 함유할 수 있다.

[0045] 일 측면에서, 본 발명은 a) 검사 대상체로부터 분리된 골수 혈액에서 세포외소포를 분리하는 단계; b) 분리한 엑소좀에서 제 1항에 따른 혈액암의 예후 예측용 마커의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 c) b) 단계에서 측정된 혈액암의 예후 예측용 마커의 발현 수준을 예후 양호(favorable) 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계를 포함하는 혈액암의 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0046] 일 구현예에서, 상기 단계 a)에서 골수 혈액의 혈청 또는 혈장에서 세포외소포를 분리할 수 있다.

[0047] 일 구현예에서, 상기 방법은 hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-151b, hsa-miR-3151-5p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-1255b-5p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-4417, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-29c-5p, hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-551a, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-4429, hsa-miR-320b 및 hsa-miR-548w로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마이크로 RNA의 발현 수준이 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과에 비해 하향 조절되는 경우, 검사 대상체의 예후가 불량할 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0048] 일 구현예에서, 상기 방법은 hsa-miR-23b-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-577, hsa-miR-3916, hsa-miR-3686, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-432-5p 및 hsa-miR-6788-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마이크로 RNA의 발현 수준이 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과에 비해 상향 조절되는 경우, 검사 대상체의 예후가 불량할 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0049] 일 구현예에서, 상기 방법은 HOXA9 유전자 또는 CPNE8 유전자의 발현 수준이 대조군 시료의 해당 유전자의 상응하는 결과에 비해 상향 조절되는 경우, 검사 대상체의 예후가 불량할 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0050] 일 구현예에서, 상기 방법은 SIX3 유전자, ADAMTS3 유전자 또는 SLC14A1 유전자의 발현 수준이 대조군 시료의 해당 유전자의 상응하는 결과에 비해 하향 조절되는 경우, 검사 대상체의 예후가 불량할 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0051] 일 측면에서, 본 발명의 hsa-miR-23b-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-577, hsa-miR-3916, hsa-miR-3686, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-432-5p 및 hsa-miR-6788-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마이크로 RNA에 대해 예측되는 표적 유전자들을 miRTarBase를 통해 확보하고, 각 암종의 TCGA 상에서 예후와 연관있을 mRNA을 선정하며, 및 환자의 생존율을 분석하는 단계를 포함하는, 환자의 예후를 판단하는 방법에 관한 것이다.

[0052] 일 구현예에서, 예후는 마이크로 RNA 발현량, 생존여부 및 최종 추적기간을 바탕으로 판단할 수 있다.

[0054] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0056] **실시예 1. 급성 골수성 백혈병 환자의 골수 검체 확보 및 세포외소포 분리**

[0057] 급성 골수성 백혈병을 진단받은 총 32명의 환자의 골수 혈액에서 혈청 또는 혈장을 분리한 뒤, 크기 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography; SEC) 방법을 이용하여 세포외소포를 분리하였다. 구체적으로, 기존 급성 골수성 백혈병의 진단 및 예후판정에 사용하는 세포기반 검사 상의 유전자 형에 따라 예후가 좋은 유전자

를 보였던 군을 예후 양호군, 그 외의 군을 예후 불량군으로 정의하여 예후가 나쁜 예후 불량(in non-favorable risk group)군 환자 22명 및 예후가 좋은 예후 양호(favorable)군 환자 10명으로 이루어진 총 32명의 환자의 골수 혈액에서 혈청 또는 혈장을 분리한 뒤 (모든 절차는 고려대학교 안암병원 기관생명윤리위원회의 심의에 따라 진행됨), 각 검체를 10,000g 및 4℃ 에서 30분 동안 원심분리하여 세포, 세포 사멸체 및 세포 파편을 제거한 상층액을 시료로서 준비하였다. 컬럼에 충전된 비드는 단일 컬럼으로 세파로오스 CL-2B 및 CL-6B을 이용하였으며, 크로마토그래피용 컬럼 (직경: 10mm, 높이: 50mm)의 하부에 세파로오스 CL-6B를 70%(v/v)로 충전한 후 상부에세파크릴 200-HR을 30%(v/v) 충전하여 하부와 상부의 높이 비율이 7:3이 되도록 제작한 다중 컬럼을 이용하였다. 시료를 로딩(loading)하기에 앞서, 300ml의 PBS로 충전된 비드를 세척(washing)한 후 충전된 컬럼 비드 외에 이동상 버퍼가 다 소진되면 바로 상기에서 준비한 각 환자 별 시료 0.5mL를 로딩하였다. 컬럼에 로딩 되는 시료의 부피는 충전된 비드 전체부피의 5%를 넘지 않도록 하며, 상기 컬럼에서는 0.3 내지 0.5ml의 시료를 로딩(loading)했다. 이동상의 압력은 2-4 Pa 로 흘려주었다. 이를 통해, PBS w/o 칼슘, 마그네슘 클로라이드(magnesium chloride)에 희석된 형태의 세포외소포를 분리하였으며, Amicon® ultra filter 100 kDa (Merch Millipore, Temecula, CA, USA)를 이용하여 세포외소포를 농축하였다.

[0059] **실시예 2. 세포외소포 확인**

[0060] 2-1. 세포외소포의 크기 분포 분석

[0061] NTA(Nanoparticle tracking analysis)을 수행하여 상기 실시예 1에서 혈청 또는 혈장에서 분리한 세포외소포의 크기 분포를 분석하였다. 구체적으로, Nanosight NS300 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK)을 시행한 뒤, NTA 3.4 software (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK)로 분석하였다 (도 1a).

[0063] 2-2. 세포외소포의 크기 및 모양 분석

[0064] TEM(Transmission electron microscopy)를 이용하여 상기 실시예 1에서 혈청 또는 혈장에서 분리한 세포외소포의 크기 및 모양을 분석하였다. 구체적으로, 분리한 세포외소포를 2.5% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)로 구리 격자 위에 고정 한 후 Tecnai G2 F20 (FEI, OR, USA)을 이용하여 세포외소포의 크기 및 모양을 분석하였다 (도 1b).

[0066] 2-3. 세포외소포 특이적 마커 발현 확인

[0067] 상기 실시예 1에서 혈청 또는 혈장에서 분리한 세포외소포에 세포외소포 특이적 단백질 마커인 CD63 또는 CD81이 발현되는지 확인하기 위해, 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1에서 혈청 또는 혈장에서 분리한 세포외소포 농축액을 BCA 단백질 분석 방법으로 정량하고 정량한 단백질 20 ㎍을 SDS-PAGE 젤 상에서 전기영동한 뒤, 래빗 다클론 항-CD63 항체 (1:1000) 및 래빗 다클론 항-CD81 항체 (1:1000) (Bioss Antibodies, MA, USA)를 일차 항체로 사용하고 퍼옥시데이즈-결합 항-래빗 항체 (1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 이차 항체로 사용하여 CD63 및 CD81의 발현을 확인하였다 (도 1c).

[0069] 이를 통해, 급성 골수성 백혈병 환자로부터 순도 높은 세포외소포가 분리되었음을 확인하였다.

[0071] **실시예 3. 세포외소포 내 miRNA 분석**

[0072] miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 상기 실시예 1에서 혈청 또는 혈장에서 분리하여 농축한 세포외소포 농축액에서 전체 RNA를 분리한 뒤, Illumina®HiSeq 2500 instrument (Illumina, San Diego, CA, USA)를 이용하여 NGS 기법으로 세포외소포 내 miRNA를 분석하였다.

[0074] **실시예 4. 급성 골수성 백혈병의 예후와 연관된 miRNA 선정**

[0075] 상기 실시예 3에서 NGS 기법으로 분석한 세포외소포내 miRNA들 중 급성 골수성 백혈병의 예후 (favorable/in

non-favorable risk group)와 관련된 miRNA를 선정하였다. 구체적으로, R에서 miRNA 발현값을 데이터 프레임(dataframe) 형태로 불러들이고, NGS 기법중 RNA-seq을 활용하고 RPM(Reads per million mapped reads)방식으로 각 miRNA들의 발현값들을 얻어, 예후가 나쁜 예후 불량(in non-favorable risk group) 환자 22명 및 예후가 좋은 예후 양호(favorable) 환자 10명으로 이루어진 총 32명의 환자로부터 분석된 총 965개의 miRNA에 대한 발현량을 확보한 후, 각 miRNA들의 발현값에 대해 log2(RPM+1)를 처리하였다. t-test 함수를 사용하여 예후 양호 및 예후 불량 그룹 간 발현이 차이나는 유전자들을 추출하였으며, 두 그룹 간 발현량 차이의 유의성을 확보하기 위하여 p-value가 0.05 이하인 miRNA들을 추출하여, 예후 불량(in non-favorable risk group)에서 특이적으로 발현이 변화하는 총 34개의 miRNA (발현이 하향 조절되는 23개의 miRNA 및 발현이 상향 조절되는 11개의 miRNA)를 선정하였다 (도 2a 및 b). 또한, 선정된 miRNA에 대하여 heatmap으로 발현량을 확인하였고, favorable 여부를 annotation bar 형태로 표시하였다 (도 3).

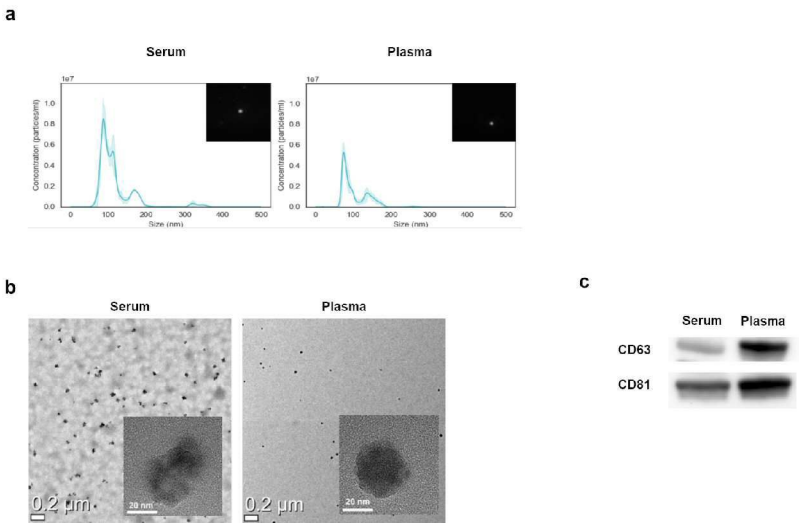
[0077] **실시예 5. 선정된 miRNA와 연관된 mRNA 분석**

[0078] 상기 실시예 4에서 선정한 miRNA에 대해 예측되는 표적 유전자들을 miRTarBase를 통해 확보한 뒤, TCGA-AML을 대상으로한 RNA-seq 결과에서 확보된 각 유전자들의 발현을 확인하였으며, 같은 기준 (유전자형의 예후 양호/예후 불량)을 대상으로 하여 DEGs(differently expressed genes)를 획득하여 mirTarBase를 통하여 선정된 miRNA와 관련 있을 것으로 예측되는 유전자와의 관련성을 확인하였다. 예후 불량 그룹에서 발현이 하향 또는 상향 조절된 유전자들 각 10개씩에 대해 miR-423-5p를 housekeeping miRNA로 보고 각 miRNA 발현량에 대해 정규화를 진행하였고, 각 발현량은 delta-delta Ct 계산법 (Livak et al., 2001)으로 확보하였다.

[0079] 그 결과, 예후 불량 그룹에서 발현이 상향 조절되는 것으로 나타난 miR-577에 의해 표적화되는 SIX3 유전자의 경우, 예후 불량 그룹에서 발현이 하향 조절될 것으로 분석되어, 이를 통해, SIX3 유전자의 발현이 하향 조절되면 급성 골수성 백혈병의 예후가 나쁠 것으로 예측하였다. 이에, TCGA에서 확인한 결과, SIX3 유전자 발현량에 중앙값(median)을 기준으로 발현이 하향 조절된 그룹에서 대한 급성 골수성 백혈병의 예후가 나쁜 것으로 분석되었다 (도 4). 또한, miR-577에 의해 표적화되는 ADAMTS3 유전자 및 miR-100-5p에 의해 표적화되는 SLC14A1 유전자의 경우에도 유사한 양상을 나타냈다 (도 4). 반면 miR-26b-5p에 의해 표적화되는 HOXA9 및 miR-224-5p에 의해 표적화되는 CPNE8의 경우 예후 불량 그룹에서 과발현될 것으로 예측되어, 예후가 안 좋을 것으로 예측되었으며 이를 TCGA에서 확인하였다 (도 4).

도면

도면1



도면2a

a. Downregulated miRNAs in poor-risk groups

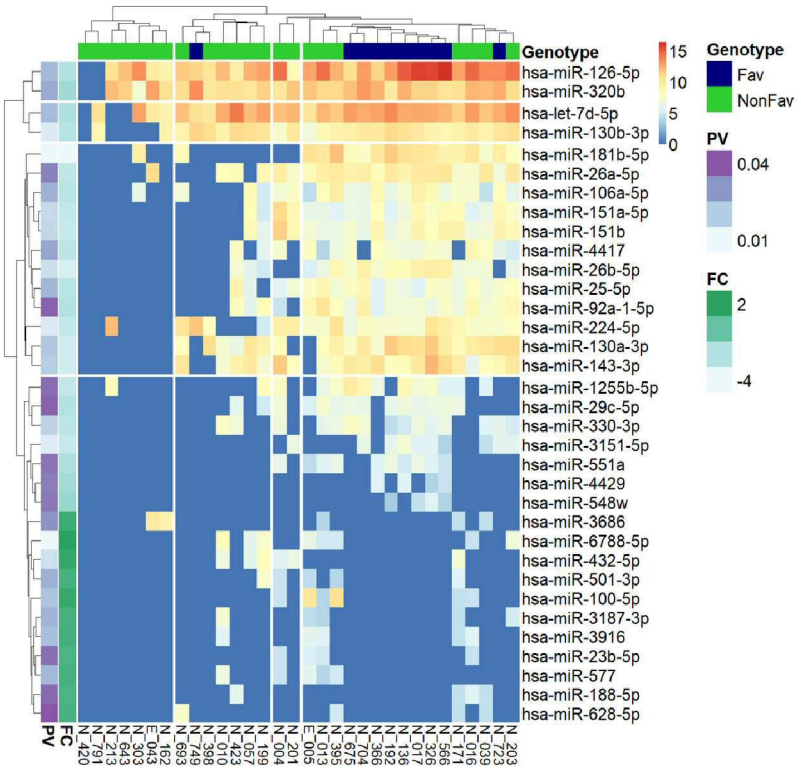
miRNAs name	Accession number	Predicted target genes	Fold change	*P*-value	Fold change, 95% CI
hsa-miR-181b-5p	MIMAT0000257	CALCRL, CD163, CRISPLD1, DDIT4, GPR126, HOXA11, HOXB5, INHBA, LGALSL, PLA2G4A, RAB27B, SCHIP1, SLC8A1	-4.86595	0.002649	[-1.860710693,-7.871193334]
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	CALCRL, CARMIL1, DDIT4, GPR126, HOXA5, HOXA9, HOXB6, INHBA, KCNJ2, KCNK1, LRRC16, LRRC16A, MPEG1, RTN1	-3.97035	0.011798	[-1.006409282,-6.934292972]
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	CLIP4, CRISPLD1, FAM155B, HOXA3, HOXA4, HOXA5, IITR1T, INHBA, KCNJ2, LGALSL, PDE7B, PRDM16, RTN1, SLC8A1, SORT1, SPOCK3, TMEM28, TSLP, ZFPM2	-3.70651	0.019761	[-0.645571023,-6.767443486]
hsa-miR-143-3p	MIMAT0000435	ABLIM3, CD109, DHRS9, HOXA5, HTR7, IL2RA, INHBA, LRRC16A, PDE7B, SORT1, SRPX2, THBS1, TSLP, WDR49, ZFPM2	-3.67306	0.017638	[-0.699659049,-6.646515376]
hsa-miR-151b	MIMAT0010211	(Not detected)	-3.28825	0.013929	[-0.726477682,-5.850014464]
hsa-miR-3151-5p	MIMAT0015021	(Not detected)	-3.24078	0.006773	[-1.062431033,-5.419129173]
hsa-miR-224-5p	MIMAT0000281	CPNE8, FHL1, HOXA11, HOXA5, HOXA7, IL1RN, KIAA0087, LGALSL, MEIS1, MPEG1, MS4A6A	-3.19268	0.007343	[-0.927125543,-5.458228911]
hsa-miR-1255b-5p	MIMAT0005945	(Not detected)	-3.16337	0.043645	[-0.102232781,-6.22450271]
hsa-miR-151a-5p	MIMAT0004697	(Not detected)	-3.13402	0.013409	[-0.708268594,-5.559768715]
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	CALCRL, CARMIL1, HOXA5, HOXA9, INHBA, KCNJ2, KCNK1, LRRC16, LRRC16A, RTN1	-3.02336	0.038334	[-0.17567745,-5.871043459]
hsa-miR-330-3p	MIMAT0000751	ABHD17C, CLIP4, CPNE8, CRISPLD1, FAM108C1, GPR126, HOXA3, HOXA6, HOXA7, HTR7, INHBA, OLFML2A, PDE7B, PRDM16, SLC8A1, SORT1, SPOCK3, SYTL4, THBS1	-2.93493	0.015633	[-0.621180196,-5.248589767]
hsa-miR-4417*	MIMAT0018929	(Not detected)	-2.89772	0.028909	[-0.329386742,-5.166049158]
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	ABLIM3, CD109, CLIP4, CNNM1, FHL1, HOPX, INHBA, KCNJ2, LAMA3, LGALSL, MMP7, MSR1, OLFML2A, PDE7B, PRDM16, RSNL2, RTN1, SPOCK3, SYTL4, THBS1, XIRP2, ZFPM2	-2.74702	0.025757	[-0.36252972,-5.131508352]
hsa-miR-25-5p	MIMAT0004498	(Not detected)	-2.734	0.024185	[-0.386321555,-5.0816783]
hsa-miR-130b-3p	MIMAT0000691	AREG, CLIP4, CRISPLD1, FAM155B, HOXA3, HOXA4, HOXA5, IITR1T, INHBA, KCNJ2, LGALSL, LRRC16A, PDE7B, PRDM16, RTN1, SLC8A1, SORT1, SPOCK3, TMEM28, TSLP, ZFPM2	-2.71124	0.007214	[-0.806575542,-4.61589833]
hsa-miR-126-5p	MIMAT0000444	CYP7B1, HOXA7	-2.57377	0.023213	[-0.37717291,-4.770360999]
hsa-miR-29c-5p	MIMAT0004673	(Not detected)	-2.50307	0.046446	[-0.044420612,-4.961940917]
hsa-miR-92a-1-5p	MIMAT0004507	(Not detected)	-2.4919	0.045741	[-0.050628587,-4.933162013]
hsa-miR-551a	MIMAT0003214	(Not detected)	-2.35569	0.04152	[-0.10436151,-4.607019781]
hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	ABHD17C, HOXA10, HOXA5, HOXA9, HOXB6, ITGB3, S100A8, SAGE1, THBS1	-2.31193	0.023155	[-0.345192243,-4.278569573]
hsa-miR-4429	MIMAT0018944	FAM155B, HOXA10, ITGB3, KCNK1, MPV17L, SRPX2	-1.96047	0.039084	[-0.122224883,-3.798724517]
hsa-miR-320b	MIMAT0005792	CTSL2, CTSV, FAM155B, HOXA10, HOXA3, ITGB3, KCNK1, MPV17L, MYOF, SCHIP1, SRPX2, SYTL4	-1.88915	0.027898	[-0.220090353,-3.558203429]
hsa-miR-548w	MIMAT0015060	CALCRL, CD109, CPNE8, DDIT4, MSR1, RTN1	-1.71528	0.040637	[-0.090934906,-3.339521294]

도면2b

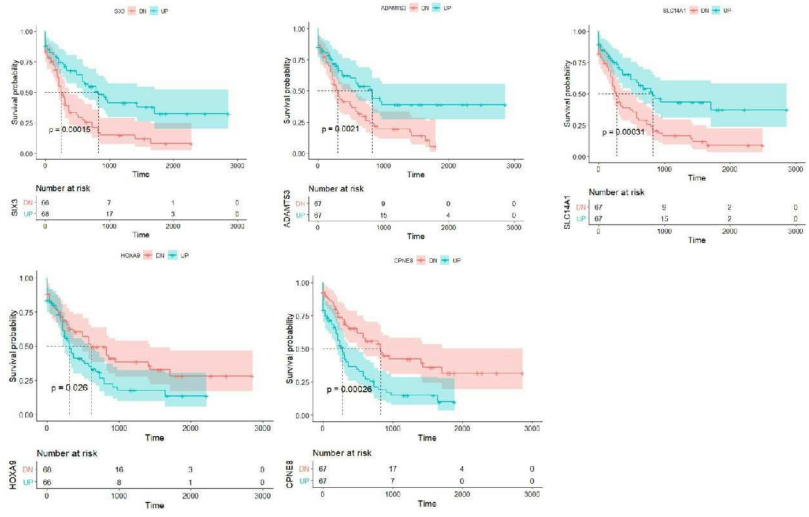
b. Upregulated miRNAs in poor-risk groups

miRNAs name	Accession number	Predicted target genes	Fold change	*P*-value	Fold change, 95% CI
hsa-miR-23b-5p	MIMAT0004587	(Not detected)	0.888698	0.042873	[1.746089824,0.031305994]
hsa-miR-188-5p	MIMAT0000457	GLIS3, STOX2	0.936382	0.044256	[1.816360429,0.026404389]
hsa-miR-628-5p	MIMAT0004809	LAMC3	0.982317	0.049352	[1.961579116,0.003055339]
hsa-miR-3187-3p	MIMAT0015069	(Not detected)	1.149035	0.02537	[2.141805052,0.156264312]
hsa-miR-501-3p	MIMAT0004774	ADAMTS3, ARPP-21	1.178979	0.0261	[2.20329078,0.154667917]
hsa-miR-577	MIMAT0003242	ADAMTS3, ARPP21, IGFBP5, SIX3, ZNF711	1.185345	0.023891	[2.197654697,0.173035394]
hsa-miR-3916	MIMAT0018190	(Not detected)	1.237243	0.022037	[2.27778738,0.196697711]
hsa-miR-3686	MIMAT0018114	IRX5	1.455449	0.034108	[2.790902054,0.119996764]
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	SLC14A1	1.749682	0.020838	[3.205920043,0.293443867]
hsa-miR-432-5p	MIMAT0002814	(Not detected)	1.826905	0.011412	[3.197252146,0.456557854]
hsa-miR-6788-5p	MIMAT0027476	(Not detected)	2.261496	0.002995	[3.663100046,0.859890541]

도면3


Genotype
hsa-miR-126-5p
hsa-miR-320b
hsa-let-7d-5p
hsa-miR-130b-3p
hsa-miR-181b-5p
hsa-miR-26a-5p
hsa-miR-106a-5p
hsa-miR-151a-5p
hsa-miR-151b
hsa-miR-4417
hsa-miR-26b-5p
hsa-miR-25-5p
hsa-miR-92a-1-5p
hsa-miR-224-5p
hsa-miR-130a-3p
hsa-miR-143-3p
hsa-miR-1255b-5p
hsa-miR-29c-5p
hsa-miR-330-3p
hsa-miR-3151-5p
hsa-miR-551a
hsa-miR-4429
hsa-miR-548w
hsa-miR-3686
hsa-miR-6788-5p
hsa-miR-432-5p
hsa-miR-501-3p
hsa-miR-100-5p
hsa-miR-3187-3p
hsa-miR-3916
hsa-miR-23b-5p
hsa-miR-577
hsa-miR-188-5p
hsa-miR-628-5p
15
10
5
0
Genotype
Fav
NonFav
PV
0.04
0.01
FC
2
-4
PV
FC

도면4


Survival probability
Time
Number at risk
p = 0.00015
p = 0.0021
p = 0.00031
p = 0.026
p = 0.00026