

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2019-0027759 (43) 공개일자 2019년03월15일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 33/543</i> (2006.01) <i>C12Q 1/6886</i> (2018.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01) <i>G01N 33/574</i> (2006.01) <i>G01N 33/58</i> (2006.01) <i>G01N 33/68</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>G01N 33/54326</i> (2013.01) <i>C12Q 1/6886</i> (2018.05) (21) 출원번호 10-2018-0107262 (22) 출원일자 2018년09월07일 심사청구일자 2018년09월07일 (30) 우선권주장 1020170114337 2017년09월07일 대한민국(KR)		(71) 출원인 인천대학교 산학협력단 인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동) (72) 발명자 이원중 대전광역시 유성구 엑스포로 448, 102동 202호(전민동, 엑스포아파트) 조성철 인천광역시 부평구 갈월동로 34 (74) 대리인 특허법인충현

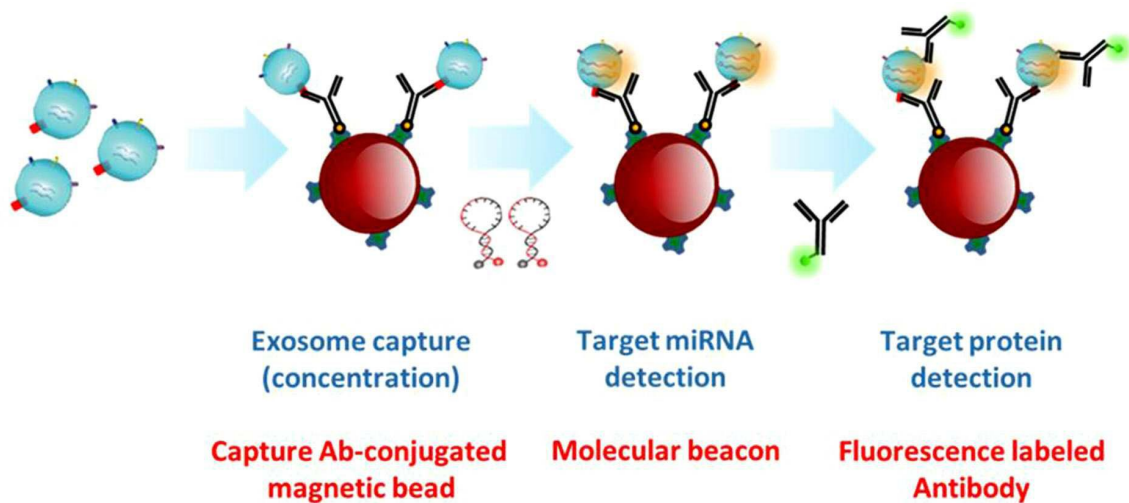
전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 **자성비드 및 분자비컨을 이용한 엑소좀의 다중검출방법**

(57) 요약

본 발명은 자성비드와 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 분자비컨을 이용한 엑소좀의 다중검출 방법 및 이를 위한 다중검출용 키트에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 본 발명의 다중검출방법은 항체가 부착된 자성비드와 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 분자비컨을 이용함으로써 엑소좀으로부터 표적 단백질 및 표적 유전자를 효율적으로 검출할 수 있기 때문에 특정 질환에 대한 진단용도로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/5308 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 33/6854 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1A5A1010148
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	나노-생체유체 검사 연구단
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교
연구기간	2016.06.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드와 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 동시에 첨가하는 단계; 및
- 2) 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계;를 포함하는, 자성비드 및 분자비컨을 이용한 다중검출방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 2) 단계에서 상기 피검자로부터 측정된 형광 강도로부터 표면 단백질과 타겟 유전자의 존재여부를 확인하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈액, 혈장, 혈청, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소솜의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 타겟 표면 단백질 검출용 항체는 CD63, EpCAM, EGFR, Survivin, IGF-1R로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 타겟 유전자는 miRNA인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 miRNA는 miR-21, miR-574, miR-205, miR-92, miR-147, miR-141 및 miR-547로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 분자비컨은 상기 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산을 중심으로 양 말단 각각에 형광물질과 퀀처가 표지되어 있는 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 miRNA는 서열번호 1 내지 서열번호 16 중에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 11

1') 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드를 처리하는 단계;

2') 상기 1') 단계의 혼합물에 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 첨가하는 단계; 및

3') 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계;를 포함하는, 자성비드 및 분자비컨을 이용한 다중검출방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 3') 단계에서 상기 피검자로부터 측정된 형광 강도로부터 표면 단백질과 타겟 유전자의 존재여부를 확인하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈액, 혈장, 혈청, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소솜의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 16

제11항에 있어서,

상기 타겟 표면 단백질 검출용 항체는 CD63, EpCAM, EGFR, Survivin 및 IGF-1R로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 17

제11항에 있어서,

상기 타겟 유전자는 miRNA인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 miRNA는 miR-21, miR-574, miR-205, miR-92, miR-147, miR-141 및 miR-547로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 19

제11항에 있어서,

상기 분자비컨은 상기 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산을 중심으로 양 말단 각각에 형광물질과 퀀처가 표지되어 있는 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 20

제18항에 있어서,

상기 miRNA는 서열번호 1 내지 서열번호 16 중에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 21

I) 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드와 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 첨가하는 단계;

II) 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계; 및

III) 상기 II) 단계에서 측정된 피검자에 있어서의 형광 강도를 대조자에 있어서의 형광 강도와 비교하는 단계;를 포함하는 피검자로부터 특정 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 22

제19항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈액, 혈장, 혈청, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제19항에 있어서,

상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소솜의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제21항에 있어서,

상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제21항에 있어서,

상기 타겟 표면 단백질 검출용 항체는 CD63, EpCAM, EGFR, Survivin, IGF-1R로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 26

제21항에 있어서,

상기 타겟 유전자는 miRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 miRNA는 miR-21, miR-574, miR-205, miR-92, miR-147, miR-141 및 miR-547로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제21항에 있어서,

상기 분자비컨은 상기 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산을 중심으로 양 말단 각각에 형광물질과 퀀처가 표시되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제27항에 있어서,

상기 miRNA는 서열번호 1 내지 서열번호 16 중에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제21항에 있어서,

상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암, 자궁경부암, 위암, 유방암, 비소 세포성폐암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

I') 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드를 처리하는 단계;

II') 상기 I') 단계의 혼합물에 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 첨가하는 단계;

III') 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계; 및

IV') 상기 III') 단계에서 측정된 피검자에 있어서의 형광 강도를 대조자에 있어서의 형광 강도와 비교하는 단계;를 포함하는 피검자로부터 특정 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈액, 혈장, 혈청, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제28항에 있어서,

상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소좀의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체가 부착되어 있

는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제31항에 있어서,

상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제31항에 있어서,

상기 타겟 표면 단백질 검출용 항체는 CD63, EpCAM, EFGR, Survivin, IGF-1R로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 36

제31항에 있어서,

상기 타겟 유전자는 miRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서,

상기 miRNA는 miR-21, miR-574, miR-205, miR-92, miR-147, miR-141 및 miR-547로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제31항에 있어서,

상기 분자비컨은 상기 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산을 중심으로 양 말단 각각에 형광물질과 퀀처가 표시되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제37항에 있어서,

상기 miRNA는 서열번호 1 내지 서열번호 16 중에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제31항에 있어서,

상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암, 자궁경부암, 위암, 유방암, 비소 세포성폐암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

항체가 결합된 자성비드; 및

형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체; 및

분자비컨;을 포함하고,

상기 항체는 엑소솜 표면에 존재하는 타겟 표면단백과 결합하는 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항

체이고,

상기 분자비컨은 엑소솜 내에 존재하는 타겟 유전자와 상보적으로 결합하는 핵산, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있는 형광물질 및 상기 핵산의 타단에 결합된 퀀처(quencher)를 포함하는 것을 특징으로 하는 다중검출용 키트.

청구항 42

제41항에 있어서,

상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소솜의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 다중검출용 키트.

청구항 43

제41항에 있어서,

상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 다중검출용 키트.

청구항 44

제41항에 있어서,

상기 타겟 표면 단백질 검출용 항체는 CD63, EpCAM, EFGR, Survivin, IGF-1R로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 다중검출방법.

청구항 45

제41항에 있어서,

상기 타겟 유전자는 miRNA인 것을 특징으로 하는 다중검출용 키트.

청구항 46

제37항에 있어서,

상기 miRNA는 miR-21, miR-574, miR-205, miR-92, miR-147, miR-141 및 miR-547로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 다중검출용 키트.

청구항 47

제41항에 있어서,

상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암, 자궁경부암, 위암, 유방암, 비소 세포성폐암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 다중검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 자성비드와 분자비컨을 이용한 엑소솜의 다중검출방법 및 이를 위한 다중검출용 키트에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 본 발명의 다중검출방법은 항체가 부착된 자성비드와 분자비컨을 이용하여 엑소솜으로부터 표적 단백질 및 표적 유전자를 효율적으로 검출할 수 있기 때문에 특정 질환에 대한 진단용으로 사용될 수 있다.

배경 기술

- [0002] 진단분야에서 가장 궁극적인 목적은 높은 정확도와 간단한 공정을 통해 해당 질병을 진단하는데 있다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 다양한 진단법, 키트 등이 개발되어 왔으나, 종래에 이르러서는 단일 검출방법에 대한 한계를 느끼고 이의 대체재로써 다중검출기술에 대한 관심이 증가하고 있다.
- [0003] 엑소좀은 대부분 세포에서 분비되는 작은 형태의 소포체(membrane vesicle)로, 엑소좀 내부에는 그 세포에서 유래된 다양한 종류의 단백질, 유전물질(DNA, mRNA, miRNA), 지질 등이 포함되어 있다. 이러한 엑소좀은 생체 유체 내에 존재하는 단백질, 유전물질과는 다른 특성을 지니게 된다. 구체적으로 엑소좀은 지질이중층으로 둘러싸여 있는 구형의 입자형태로 구성되어 있으며, 엑소좀 표면에는 다양한 세포 유래 단백질이 존재하고, 내부에는 세포 유래 유전물질들이 존재한다. 특히 혈청 내에는 과량의 RNA 분해 효소(RNase)가 존재하므로 세포로부터 분비되는 유전물질들이 쉽게 분해되어 측정하기 쉽지 않은 반면, 엑소좀 안에 존재하는 유전물질의 경우에는 RNA 분해효소로부터 보호되어 안정적으로 존재하는 것이 알려져 있다. 이와 같이, 조직 유래 엑소좀은 엑소좀을 분비한 조직의 상태를 반영하기 때문에, 질병의 진단에 이용될 수 있음이 보고된 바 있다.
- [0004] 혈액, 침, 소변 등의 생체시료로부터 질환 표지자를 검출하는 일반적인 진단방법은 앞서 설명한 바와 같이, 한계점이 존재한다. 구체적으로 생체시료에는 특정 조직뿐만 아니라, 여러 조직으로부터 유래된 다양한 농도의 단백질과 유전물질이 혼재되어 있기 때문에, 특정 질환에 대한 표지자(바이오마커;biomarker)가 검출되었다 하더라도, 어느 조직으로부터 유래한 것인지 알 수 없다. 게다가 각 조직마다 단백질과 유전물질이 발현되는 정도가 상이하므로, 단순히 생체시료에서 측정된 정량적인 양으로는 정확한 진단을 할 수 없다는 한계가 존재하게 된다.
- [0005] 따라서 본 발명에서는 상술한 문제점을 해결하여 다양한 생체시료로부터 정확하게 질병을 진단할 수 있는 다중 검출방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

- [0006] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허공보 제10-1997-0705753호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 피검자의 조직이나 생물학적 샘플로부터 특정 질환과 관련된 바이오마커를 쉽고 빠르면서 정확하게 검출할 수 있는 새로운 검출방법을 발굴하고자 예의 노력하였다. 그 결과, 엑소좀으로부터 특정 질환과 관련된 복수의 바이오마커들을 효율적으로 검출할 수 있는 다중검출방법을 고안하였고, 이를 이용하여 전립선암세포에서 CD63, EpCAM, EGFR, Survivin, IGF-1R 표면 단백질과 miR-21, miR-574-3p를 함께 발현하는 엑소좀을 검출하고, 정확도를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 생물학적 샘플로부터 효율적으로 엑소좀의 특정 표면 단백질과 내부에 존재하는 특정 유전자를 검출할 수 있는 다중검출방법을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 생물학적 샘플로부터 특정 질환을 진단할 수 있는 정보를 제공하기 위한 방법을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 생물학적 샘플로부터 효율적으로 엑소좀의 특정 단백질과 특정 유전자를 검출할 수 있는 다중검출용 키트를 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 아래 단계를 포함하는 다중검출방법을 제공한다.
- [0014] 1) 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드와 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 동시에 첨가하는 단계 및
- [0015] 2) 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 아래 단계를 포함하는 다중검출방법을 제공한다.
- [0017] 1') 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드를 처리하는 단계;
- [0018] 2') 상기 1') 단계의 혼합물에 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 첨가하는 단계; 및
- [0019] 3') 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계.
- [0020] 상기 3') 단계에서 상기 피검자로부터 측정된 형광 강도로부터 표면 단백질과 타겟 유전자의 존재여부를 확인하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 생물학적 샘플은 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈액, 혈장, 혈청, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0022] 상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소솜의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체가 부착되어 있는 것일 수 있다.
- [0023] 상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체일 수 있다.
- [0024] 자성비드의 항체에 결합된 엑소솜을 검출하는 타겟 표면단백질 검출용 항체는 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule), EGFR(Epidermal growth factor receptor), Survivin, IGF-1R(Insulin-like growth factor 1 receptor)으로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체일 수 있다.
- [0025] 상기 타겟 유전자는 miRNA이며, 상기 miRNA는 miR-21, miR-574, miR-205, miR-92, miR-147, miR-141 및 miR-547일 수 있다.
- [0026] 상기 분자비컨은 상기 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산을 중심으로 양 말단 각각에 형광물질과 퀀처가 표지되어 있는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 핵산은 서열번호 17 내지 서열번호 32 중에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 염기서열일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 아래 단계를 포함하는 피검자로부터 특정 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0029] I) 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드로 엑소솜을 분리한 후 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 첨가하는 단계;
- [0030] II) 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계; 및
- [0031] III) 상기 II) 단계에서 측정된 피검자에 있어서의 형광 강도를 대조자에 있어서의 형광 강도와 비교하는 단계.
- [0032] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 아래 단계를 포함하는 피검자로부터 특정 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0033] I') 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드를 처리하는 단계;
- [0034] II') 상기 I') 단계의 혼합물에 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨(Molecular beacon)을 첨가하는 단계;
- [0035] III') 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계; 및
- [0036] IV') 상기 III') 단계에서 측정된 피검자에 있어서의 형광 강도를 대조자에 있어서의 형광 강도와 비교하는 단계.

- [0037] 상기 생물학적 샘플은 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈액, 혈장, 혈청, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 남성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0038] 상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소좀의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체가 부착되어 있는 것일 수 있다.
- [0039] 상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체일 수 있다.
- [0040] 상기 타겟 표면 단백질 검출용 항체는 EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule), EGFR (Epidermal growth factor receptor), Survivin, IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor)로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체일 수 있다.
- [0041] 상기 타겟 유전자는 miRNA이며, 바람직하게 상기 miRNA는 miR-21, miR-574, miR-205, miR-92, miR-147, miR-141 및 miR-547일 수 있다.
- [0042] 상기 분자비컨은 상기 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산을 중심으로 양 말단 각각에 형광물질과 퀀처가 표지되어 있는 것일 수 있다.
- [0043] 상기 miRNA는 서열번호 1 내지 서열번호 16 중에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 염기서열일 수 있다.
- [0044] 상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암, 자궁경부암, 위암, 유방암, 비소 세포성폐암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 항체가 결합된 자성비드; 형광물질이 결합된 항체; 및 분자비컨; 을 포함하고, 상기 분자비컨은 엑소좀 내에 존재하는 타겟 유전자와 상보적으로 결합하는 핵산, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있는 형광물질 및 상기 핵산의 타단에 결합된 퀀처(quencher)를 포함하는 것을 특징으로 하는 다중검출용 키트를 제공한다.
- [0046] 상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소좀의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체가 부착되어 있는 것일 수 있다.
- [0047] 상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체일 수 있다.
- [0048] 상기 타겟 표면 단백질 검출용 항체는 EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule), EGFR (Epidermal growth factor receptor), Survivin, IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor)로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체일 수 있다. 구체적으로 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule)은 tumour-promoting functions을 가지는 signalling molecule로써 전립선암 조직 및 세포주에서 mRNA 및 단백질이 과발현되는 것으로 알려져 있고, EGFR(상피세포 성장인자 수용체)은 대장암, 폐암, 췌장암 등에서 과발현되어 종양을 유발하고, 또한 전립선암세포(in vitro) 전립선암환자(in vivo)의 엑소좀에서 과발현되는 것으로 알려져 있다. Survivin은 inhibitor-of-apoptosis(IAP) 단백질로 survivin이 전립선암 종양에서 과발현되면 좋지 않은 예후와 종양재발을 일으키는 것으로 보고되어 있다. IGF-1R(insulin-like growth factors 1 receptor)은 전립선 상피세포 증식을 자극하며, 전립선암 발생의 중요한 역할을 한다고 보고된 것으로써, 상기 타겟 표면 단백질들의 발현정도는 암 위험정도의 예측할 수 있는 암 바이오마커이다.
- [0049] 상기 타겟 유전자는 miRNA이며, 바람직하게 상기 miRNA는 miR-21, miR-574, miR-205, miR-92, miR-147, miR-141 및 miR-547일 수 있다.
- [0050] 상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암, 자궁경부암, 위암, 유방암, 비소 세포성폐암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS;

central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

- [0051] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다 :
- [0052] (i) 본 발명은 피검자의 조직이나 생물학적 샘플로부터 특정 질환과 관련된 바이오마커를 항체가 부착된 자성 비드와 형광물질이 결합된 항체 및 분자비컨을 이용하여 다중으로 검출하기 위한 방법을 제공한다.
- [0053] (ii) 또한 본 발명은 체가 부착된 자성비드와 형광물질이 결합된 항체 및 분자비컨을 이용한 다중검출용 키트를 제공한다.
- [0054] (iii) 본 발명의 다중검출방법은 피검자의 조직이나 생물학적 샘플로부터 엑소좀의 표면 단백질과 타겟 유전자를 쉽고 빠르면서 정확하게 검출할 수 있으며, 이 방법을 통해 암과 같은 질환을 비침습적으로 쉽고 빠르게 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0055] 도 1은 본 발명에 따른 다중검출방법을 개략적으로 도시한 도면이다.
- 도 2는 PC3 세포 배양액을 실험예 1의 다중검출방법(조건 1; 4 °C, 2~12 시간 반응)에 따라 분석한 결과이다.
- 도 3은 PC3 세포 배양액을 실험예 1의 다중검출방법(조건 2; 37 °C, 4 시간 반응)에 따라 분석한 결과이다.
- 도 4는 다양한 농도의 엑소좀 용액으로부터 실험예 2의 다중검출방법(조건 1; 4 °C, 12 시간 반응)에 따라 분석한 결과이다.
- 도 5는 다양한 농도의 엑소좀 용액으로부터 실험예 2의 다중검출방법(조건 2; 37 °C, 4 시간 반응)에 따라 분석한 결과이다.
- 도 6은 엑소좀 혹은 항체가 부착된 자성입자의 존재유무에 따라 실험예 3의 다중검출방법으로 측정된 형광세기 그래프이다.
- 도 7은 정상 전립선 세포(RWPE-1), 전립성 암세포(DU145 및 PC3)의 배양액으로부터 실험예 4의 다중검출방법(CD63, miR-21)을 수행한 결과이다.
- 도 8은 정상 전립선 세포(RWPE-1), 전립성 암세포(DU145 및 PC3)의 배양액으로부터 실험예 4의 다중검출방법(EpCAM, miR-21 또는 EGFR, miR-21)을 수행한 결과이다.
- 도 9는 정상 전립선 세포(RWPE-1), 전립성 암세포(DU145 및 PC3)의 배양액으로부터 실험예 5의 다중검출방법(CD63, miR-21 또는 CD63, Mir-574-3p)을 수행한 결과이다.
- 도 10은 정상인의 소변으로부터 실험예 6의 다중검출을 실시하여 측정된 형광세기를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0056] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.
- [0057] 본 발명의 일 측면은 아래 단계를 포함하는 다중검출방법에 관한 것이다.
- [0058] 1') 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드를 처리하는 단계;
- [0059] 2') 상기 1') 단계의 혼합물에 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 첨가하는 단계; 및
- [0060] 3') 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계.
- [0061] 상기 다중검출방법은 개략적으로 도 1에 나타내었다. 이하, 도 1을 참고로 하여 구체적으로 설명하고자 한다.
- [0062] 본 발명자들은 질환 진단을 위한 단백질 혹은 유전자와 같은 바이오마커의 검출방법의 정확도를 향상시키고자

노력한 결과, 항체가 부착된 자성비드 및 타겟 유전자와 타겟 단백질을 검출하기 위한 형광물질이 결합된 항체 및 분자비컨을 이용하여 효율적이고 정확하게 엑소솜으로부터 특정 질환의 진단에 사용되는 단백질과 유전자를 다중검출할 수 있음을 확인하였다.

- [0063] 우선 1') 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드를 처리한다. 이를 통해 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플로부터 엑소솜 특이적, 질병 특이적, 또는 조직 특이적 표면 단백질을 검출할 수 있다. 구체적으로 상기 항체가 부착된 자성비드가 상술한 표면 단백질을 가지고 있는 엑소솜에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하면, 상기 복합체는 이후 자석을 통해 분리할 수 있게 된다. 또한 상기 복합체로부터 자성비드를 분리하면, 특정 표면 단백질을 가지고 있는 엑소솜을 1차적으로 검출할 수 있을 뿐만 아니라 분리 및 농축할 수 있다.
- [0064] 상기 생물학적 샘플이란 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈액, 혈장, 혈청, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0065] 상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소솜의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 어느 하나 이상의 항체가 부착되어 있는 것으로, 상기 항체는 엑소솜을 검출 또는 포착할 수 있는 항체라면 특별히 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 단클론 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성화된 단편, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 분자, 키메릭 항체 또는 인간화 항체 등일 수 있다. 바람직하게 상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체일 수 있고, 보다 바람직하게는 엑소솜의 막 단백질에 존재하는 CD63 항원에 대한 항체인 것일 수 있다.
- [0066] 상기 항체와 상기 자성비드는 직접 결합되거나, 링커를 통해 결합된 것일 수 있는데, 상기 링커는 단백질 G, 단백질 A, 단백질 A/G, Fc 수용체, 바이오틴, 아비딘, 히스티딘, Ni-NTA, 또는 스트렙타아비딘으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 상기 항체가 부착된 자성비드는 자성비드의 표면에 항체를 고정화함으로써 엑소솜의 표면에 존재하는 특정 단백질(항원)을 표적하고, 자력 분리를 이용하여 쉽게 수집 및 분리할 수 있다.
- [0068] 상기 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에 상기 항체가 부착된 자성비드를 처리할 경우, 상기 자성비드에 부착된 항체와, 상기 조직 혹은 샘플 내에 존재하는 엑소솜의 표면 단백질(항원)이 결합된다. 즉 상기 항체에 대한 항원을 갖는 엑소솜-항체-자성비드 복합체가 형성된다. 상기 복합체는 자력분리를 통해 쉽게 수집할 수 있기 때문에 비특이적 반응을 줄이고, 검출 효율을 극대화할 수 있다.
- [0069] 상기 자성비드는 자성을 갖는 물질로, 통상적으로 사용되는 자성비드라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 Fe(III), Mg, Mn, Ni, Zn 및 Co로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0070] 다음으로 2') 상기 1') 단계의 혼합물에 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 첨가한다. 이 과정에서 상기 1') 단계로부터 얻어진 엑소솜의 혼합물에 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨을 첨가하여, 표적 단백질과 타겟 유전자를 모두 가지고 있는 엑소솜을 검출할 수 있다.
- [0071] 본 발명에서 '타겟 유전자'란 피검자로부터 특정 질환을 진단할 수 있는 물질로, 보다 바람직하게는 핵산 바이오마커이고, 가장 바람직하게는 miRNA이다. 엑소솜 내에는 DNA보다 RNA 양이 많기 때문에 miRNA를 이용할 경우 기존의 DNA를 이용하는 기술보다 효율적으로 검출이 가능하다.
- [0072] 상기 miRNA는 miR-21(hsa-miR-21), miR-574(hsa-miR-574), miR-205(hsa-miR-205), miR-92(hsa-miR-92), miR-147(hsa-miR-147), miR-141(hsa-miR-141) 및 miR-547(hsa-miR-547)일 수 있다.
- [0073] 상기 miR-21(hsa-miR-21)는 서열번호 1 또는 2, miR-574(hsa-miR-574)는 서열번호 3 또는 4, miR-205(hsa-miR-205)는 서열번호 5 또는 6, miR-92(hsa-miR-92)는 서열번호 7 내지 10 중에서 선택되는 어느 하나의 염기서열, miR-147(hsa-miR-147)는 서열번호 11 또는 12, miR-141(hsa-miR-141)은 서열번호 13 또는 14, miR-547(hsa-miR-547)는 서열번호 15 또는 16에 개시된다.
- [0074] 본 발명에서 '분자비컨(molecular beacon)'이란 헤어핀 형태의 2차 구조를 형성하고 있는 핵산으로, 상보적인

영역의 특이적인 혼성화에 의하여 분자비컨 구조의 변화를 일으켜 형광을 발하게 된다. 이하에서 본 발명에 따른 분자비컨의 구체적인 구조를 설명하기로 한다.

- [0075] 상기 분자비컨(molecular beacon)은 엑소좀 내에 존재하는, 특정 질환의 바이오마커인 타겟 유전자와 상보적으로 결합하는 핵산, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있는 형광물질 및 상기 핵산의 타단에 결합된 퀀처(quencher)를 포함한다.
- [0076] 상기 분자비컨은 타겟 유전자와 결합할 수 있는 부분인 고리(loop)부분과 타겟 유전자가 존재하지 않는 환경에서 헤어핀 고리를 형성하도록 하는 줄기(stem)부분으로 구성된다. 고리(loop)부분은 특정 miRNA 종류와 miRNA 전체서열을 타겟하는지, 부분을 타겟하는지 등에 따라서 달라질 수 있으며, 줄기(stem)부분은 각 분자비컨마다 효율에 따라 달라질 수 있다(변경가능하다).
- [0077] 상기 핵산은 엑소좀 내에 존재하면서 특정 miRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 서열을 갖는 선형의 DNA 또는 RNA일 수 있고, 상기 RNA는 mRNA, miRNA, snoRNA, snRNA, rRNA, tRNA, siRNA, hnRNA, shRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있는데, 바람직하게는 특정 miRNA가 존재하지 않는 환경에서 헤어핀 고리를 형성하도록 핵산의 양 말단이 상보적인 5' 및 3' 서열을 갖는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 핵산은 주쇄 폴리뉴클레오타이드를 중심으로 양 말단에 헤어핀 구조를 형성하도록 상보적인 5' 및 3' 서열을 가지는 것일 수 있다. 상기 주쇄 폴리뉴클레오타이드는 타겟 유전자에 대해 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도로도 충분히 상보적인 서열로 이루어진 것일 수 있다. 이는 본 발명의 서열번호 17 내지 32로 표시되는 서열 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0078] 본 발명에서 상기 용어 "상보적"은 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건하에서 본 발명의 타겟 유전자에 대하여 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 상기 용어 "상보적"은 완전히 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 핵산이 miR-21(hsa-miR-21), miR-574(hsa-miR-574), miR-205(hsa-miR-205), miR-92(hsa-miR-92), miR-147(hsa-miR-147), miR-141(hsa-miR-141) 또는 miR-547(hsa-miR-547)의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.
- [0079] 또한 상기 핵산의 양 말단에 각각 형광물질과 퀀처가 결합되어 있고, 구체적으로 상기 핵산의 말단에는 형광물질이 결합되어 있고, 상기 핵산의 타단에는 퀀처가 결합되어 있다. 보다 구체적으로 상기 핵산의 5' 말단에는 형광물질이 결합되고, 3' 말단에는 퀀처가 결합되거나, 상기 핵산의 3' 말단에 형광물질이 결합되고, 5' 말단에 퀀처가 결합되어 있을 수 있고, 바람직하게는 하기 서열번호 17 내지 32로 표시되는 것 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0080] 상기 핵산은 구체적으로 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하고, 타겟 유전자에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다.
- [0081] 상기 형광물질은 Cyanine 계열 형광분자, Rodamine 계열 형광분자, Alexa 계열 형광분자, FITC(fluorescein isothiocyanate) 형광분자, FAM(5-carboxy fluorescein) 형광분자 및 Texas Red 형광분자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 플루오레세인(Fluorecein), 플루오레세인 이소티오시아나이트(fluorescein isothiocyanate), 바이오디피-FL(Biodipy-FL), 알렉사 플루오르 그린(Alexa Fluor Green), R-피코에리트린(R-phycoerythrin), 텍사스레드(TexasRed), 피코에리트린-텍사스 레드(Phycoerythrin-Texas Red), 로다민(rhodamine), 알렉사(alexa), 시아닌(cyanine; Cy3, Cy3.5, Cy5), 피코에리트린-시아닌5(Phycoerythrin-cyanine5), 피코에리트린-시아닌7(Phycoerythrin-cyanine7), 페리딘-클로로필 단백질(Peridinin-chlorophyll protein), 알로피코시아닌(Allophycocyanin), 알로피코시아닌-시아닌7(Allophycocyanin-cyanine7), o-프탈데히드(phthaldehyde), 플루오르카민 (fluorescamine), 보디피(BODIPY), 쿠마린(coumarin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 FAM(5-carboxy fluorescein)일 수 있다.
- [0082] 상기 퀀처는 QSY계 dye, dabsyl, dabcy1, 블랙홀 퀀처(blackhole quencher, BHQ) 및 블랙베리 퀀처(blackberry quencher, BBQ)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 블랙홀 퀀처(blackhole quencher, BHQ)일 수 있으며, 보다 바람직하게는 BHQ2일 수 있다.
- [0083] 상기 분자비컨은 타겟 유전자(바람직하게는 특정 miRNA)가 존재하지 않는 환경에서, 상기 핵산의 양 말단(구체적으로, 프라이머 부분)이 서로 밀접하게 상호작용하여 결합을 형성함에 따라 상기 핵산이 헤어핀 구조로 형성되게 된다. 이로 인해 상기 핵산의 양 말단 각각에 결합되어 있는 형광물질과 퀀처가 FRET가 발생하도록 근접하

기 때문에 상기 분자비컨은 형광을 발하지 않는다.

- [0084] 생물학적 샘플 혹은 시료(항체가 부착된 자성비드로 1차 검출한 후의 혼합물) 내에 타겟 유전자가 존재할 경우에는, 상기 분자비컨과 타겟 유전자가 혼성화되어 상기 분자비컨의 헤어핀 형태 2차 구조가 붕괴되고, 선형으로 구조가 개방되면서, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있던 형광물질과 퀀처도 거리가 멀어지게 된다. 이로 인해 형광물질에 영향을 미치던 퀀처의 FRET 효과가 사라지게 되므로, 분자비컨은 형광을 발하게 되는 것이다.
- [0085] 상기 분자비컨의 핵산은, 본 발명의 분자비컨을 이용하여 수득될 수 있는 신호 대 노이즈의 비율 수준을 고려하여 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 하기 서열번호 1 내지 16 중에서 선택되는 타겟 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산일 수 있다.
- [0086] 상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암, 자궁경부암, 위암, 유방암, 비소 세포성폐암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hod gkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환일 수 있고, 바람직하게 상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0087] 상기 1') 단계 및 2') 단계는 순차적으로 수행하거나, 또는 상기 단계들을 동시에 수행하여 질병 특이적 또는 조직 특이적 엑소솜 포획 및 특정 질병의 진단을 1 번의 과정으로 신속히 수행할 수도 있다.
- [0088] 상기 1'), 2') 단계가 동시에 수행될 경우에는, 1) 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드와 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)를 첨가하는 단계; 및 2) 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계를 포함한다고 할 수 있다.
- [0089] 최종적으로 상기 3') 단계에서 상기 피검자로부터 측정된 형광 강도로부터 표면 단백질과 타겟 유전자의 존재 여부를 확인한다. 타겟 유전자가 샘플 혹은 시료 내에 존재할 경우에는, 상기 분자비컨과 타겟 유전자가 혼성화되어 상기 분자비컨의 헤어핀 형태 2차 구조가 붕괴되고, 선형으로 구조가 개방되면서, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있던 형광물질과 퀀처도 거리가 멀어지게 된다. 이로 인해 형광물질에 영향을 미치던 퀀처의 FRET 효과가 사라지게 되므로, 분자비컨은 형광을 발하게 되므로, 분자비컨의 형광 강도를 측정하여 '표면 단백질을 가지고 있는 엑소솜'에서 타겟 유전자가 존재하는지 여부를 검출할 수 있는 것이다.
- [0090] 본 발명의 다른 측면은 아래 단계를 포함하는 피검자로부터 특정 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데, 항체가 부착된 자성비드와 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 순차적으로 첨가할 수도 있고, 동시에 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에 첨가할 수도 있다. 동시에 첨가할 경우 질병 특이적 또는 조직 특이적 엑소솜 포획 및 특정 질병의 진단을 1 번의 과정으로 신속히 수행할 수 있다는 장점이 있다.
- [0091] 우선 동시에 첨가할 경우에는 I) 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드와 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 첨가하는 단계; II) 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계; 및 III) 상기 II) 단계에서 측정된 피검자에 있어서의 형광 강도를 대조자에 있어서의 형광 강도와 비교하는 단계;를 통해 수행된다.
- [0092] 순차적으로 첨가할 경우에는 I') 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드를 처리하는 단계; II') 상기 I') 단계의 혼합물에 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 첨가하는 단계; III') 상기 혼합액으로부터 형광 강도를 측정하는 단계; 및 IV') 상기 III') 단계에서 측정된 피검자에 있어서의 형광 강도를 대조자에 있어서의 형광 강도와 비교하는 단계;를 통해 수행된다.
- [0093] 우선 I') 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에, 항체가 부착된 자성비드를 처리한다. 이를 통해 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플로부터 엑소솜 특이적, 질병 특이적, 또는 조직 특이적 표면 단백질을 검출할 수 있다. 구체적으로 상기 항체가 부착된 자성비드가 상술한 표면 단백질을 가지고 있는 엑소솜에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하면, 상기 복합체는 이후 자석을 통해 분리할 수 있게 된다. 또한 상기 복합체로부터 자성비드를 분

리하면, 특정 표면 단백질을 가지고 있는 엑소좀을 1차적으로 검출할 수 있을 뿐만 아니라 분리 및 농축할 수 있다.

- [0094] 상기 생물학적 샘플이란 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈액, 혈장, 혈청, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0095] 상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소좀의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 어느 하나 이상의 항체가 부착되어 있는 것으로, 상기 항체는 엑소좀을 검출 또는 포착할 수 있는 항체라면 특별히 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 단클론 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성화된 단편, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 분자, 키메라 항체 또는 인간화 항체 등일 수 있다. 바람직하게 상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체일 수 있고, 보다 바람직하게는 엑소좀의 막 단백질에 존재하는 CD63 항원에 대한 항체인 것일 수 있다.
- [0096] 상기 항체와 상기 자성비드는 직접 결합되거나, 링커를 통해 결합된 것일 수 있는데, 상기 링커는 단백질 G, 단백질 A, 단백질 A/G, Fc 수용체, 바이오틴, 아비딘, 히스티딘, Ni-NTA, 또는 스트렙타아비딘으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0097] 상기 항체가 부착된 자성비드는 자성비드의 표면에 항체를 고정화함으로써 엑소좀의 표면에 존재하는 특정 단백질(항원)을 표적하고, 자력 분리를 이용하여 쉽게 수집 및 분리할 수 있다.
- [0098] 상기 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에 상기 항체가 부착된 자성비드를 처리할 경우, 상기 자성비드에 부착된 항체와, 상기 조직 혹은 샘플 내에 존재하는 엑소좀의 표면 단백질(항원)이 결합된다. 즉 상기 항체에 대한 항원을 갖는 엑소좀-항체-자성비드 복합체가 형성된다. 상기 복합체는 자력분리를 통해 쉽게 수집할 수 있기 때문에 비특이적 반응을 줄이고, 검출 효율을 극대화할 수 있다.
- [0099] 상기 자성비드는 자성을 갖는 물질로, 통상적으로 사용되는 자성비드라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 Fe(III), Mg, Mn, Ni, Zn 및 Co로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0100] 다음으로 II') 상기 I') 단계의 혼합물에 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨(molecular beacon)을 첨가한다. 이 과정에서 상기 I) 단계로부터 얻어진 표면 단백질을 가지고 있는 엑소좀의 혼합물에 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨을 첨가하여, 표적 단백질과 타겟 유전자를 모두 가지고 있는 엑소좀을 검출할 수 있다.
- [0101] 본 발명에서 '타겟 표면단백질'이란 피검자로부터 특정 질환을 진단할 수 있는 물질로, 보다 바람직하게는 엑소좀 표면에 많이 분포되어있는 단백질이다.
- [0102] 상기 타겟 표면단백질은 EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule), EGFR (Epidermal growth factor receptor), Survivin, IGF-1R(Insulin-like growth factor 1 receptor)일 수 있다.
- [0103] 본 발명에서 '타겟 유전자'란 피검자로부터 특정 질환을 진단할 수 있는 물질로, 보다 바람직하게는 핵산 바이오마커이고, 가장 바람직하게는 miRNA이다. 엑소좀 내에는 DNA보다 RNA 양이 많기 때문에 miRNA를 이용할 경우 기존의 DNA를 이용하는 기술보다 효율적으로 검출이 가능하다.
- [0104] 상기 miRNA는 miR-21(hsa-miR-21), miR-574(hsa-miR-574) miR-205(hsa-miR-205), miR-92(hsa-miR-92), miR-147(hsa-miR-147), miR-141(hsa-miR-141) 및 miR-547(hsa-miR-547)일 수 있다.
- [0105] 상기 miR-21(hsa-miR-21)는 서열번호 1 또는 2, miR-574(hsa-miR-574)는 서열번호 3 또는 4, miR-205(hsa-miR-205)는 서열번호 5 또는 6, miR-92(hsa-miR-92)는 서열번호 7 내지 10 중에서 선택되는 어느 하나의 염기서열, miR-147(hsa-miR-147)는 서열번호 11 또는 12, miR-141(hsa-miR-141)은 서열번호 13 또는 14, miR-547(hsa-miR-547)는 서열번호 15 또는 16에 개시된다.
- [0106] 본 발명에서 '분자비컨(molecular beacon)'이란 헤어핀 형태의 2차 구조를 형성하고 있는 핵산으로, 상보적인 영역의 특이적인 혼성화에 의하여 분자비컨 구조의 변화를 일으켜 형광을 발하게 된다. 이하에서 본 발명에 따른 분자비컨의 구체적인 구조를 설명하기로 한다.
- [0107] 상기 분자비컨(molecular beacon)은 엑소좀 내에 존재하는, 특정 질환의 바이오마커인 타겟 유전자와 상보적으로 결합하는 핵산, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있는 형광물질 및 상기 핵산의 타단에 결합된 퀀처(quencher)

를 포함한다.

- [0108] 상기 핵산은 엑소좀 내에 존재하면서 특정 miRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 서열을 갖는 선형의 DNA 또는 RNA일 수 있고, 상기 RNA는 mRNA, miRNA, snoRNA, snRNA, rRNA, tRNA, siRNA, hnRNA, shRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있는데, 바람직하게는 특정 miRNA가 존재하지 않는 환경에서 헤어핀 고리를 형성하도록 핵산의 양 말단이 상보적인 5' 및 3' 서열을 갖는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 핵산은 주쇄 폴리뉴클레오티드를 중심으로 양 말단에 헤어핀 구조를 형성하도록 상보적인 5' 및 3' 서열을 가지는 것일 수 있다. 상기 주쇄 폴리뉴클레오티드는 타겟 유전자에 대해 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도로도 충분히 상보적인 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0109] 본 발명에서 상기 용어 "상보적"은 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건하에서 본 발명의 타겟 유전자에 대하여 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 상기 용어 "상보적"은 완전히 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 핵산이 miR-21(hsa-miR-21), miR-574(hsa-miR-574), miR-205(hsa-miR-205), miR-92(hsa-miR-92), miR-147(hsa-miR-147), miR-141(hsa-miR-141) 또는 miR-547(hsa-miR-547)의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.
- [0110] 또한 상기 핵산의 양 말단에 각각 형광물질과 ??처가 결합되어 있고, 구체적으로 상기 핵산의 말단에는 형광물질이 결합되어 있고, 상기 핵산의 타단에는 퀀처가 결합되어 있다. 보다 구체적으로 상기 핵산의 5' 말단에는 형광물질이 결합되고, 3' 말단에는 퀀처가 결합되거나, 상기 핵산의 3' 말단에 형광물질이 결합되고, 5' 말단에 퀀처가 결합되어 있을 수 있다.
- [0111] 상기 핵산은 구체적으로 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하고, 타겟 유전자에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다.
- [0112] 상기 형광물질은 Cyanine계열 형광분자, Rodamine 계열 형광분자, Alexa 계열 형광분자, FITC(fluorescein isothiocyanate) 형광분자, FAM(5-carboxy fluorescein) 형광분자 및 Texas Red 형광분자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 플루오레세인(Fluorecein), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 바이오티피-FL(Biodipy-FL), 알렉사 플루오르 그린(Alexa Fluor Green), R-피코에리트린(R-phycoerythrin), 텍사스레드(TexasRed), 피코에리트린-텍사스 레드(Phycoerythrin-Texas Red), 로다민(rhodamine), 알렉사(alexa), 시아닌(cyanine; Cy3, Cy3.5, Cy5), 피코에리트린-시아닌5(Phycoerythrin-cyanine5), 피코에리트린-시아닌7(Phycoerythrin-cyanine7), 페리딘-클로로필 단백질(Peridinin-chlorophyll protein), 알로피코시아닌(Allophycocyanin), 알로피코시아닌-시아닌7(Allophycocyanin-cyanine7), o-프탈데히드(phthaldehyde), 플루오르카민 (fluorescamine), 보디피(BODIPY), 쿠마린(coumarin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 FAM(5-carboxy fluorescein)일 수 있다.
- [0113] 상기 퀀처는 QSY계 dye, dabsyl, dabcy1, 블랙홀 퀀처(blackhole quencher, BHQ) 및 블랙베리 퀀처(blackberry quencher, BBQ)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 블랙홀 퀀처(blackhole quencher, BHQ)일 수 있으며, 보다 바람직하게는 BHQ2일 수 있다.
- [0114] 상기 분자비컨은 타겟 유전자(바람직하게는 특정 miRNA)가 존재하지 않는 환경에서, 상기 핵산의 양 말단(stem 부분)이 서로 밀접하게 상호작용하여 결합을 형성함에 따라 상기 핵산이 헤어핀 구조로 형성되게 된다. 이로 인해 상기 핵산의 양 말단 각각에 결합되어 있는 형광물질과 퀀처가 FRET가 발생하도록 근접하기 때문에 상기 분자비컨은 형광을 발하지 않는다.
- [0115] 생물학적 샘플 혹은 시료(항체가 부착된 자성비드로 1차 검출한 후의 혼합물) 내에 타겟 유전자가 존재할 경우에는, 상기 분자비컨과 타겟 유전자가 혼성화되어 상기 분자비컨의 헤어핀 형태 2차 구조가 붕괴되고, 선형으로 구조가 개방되면서, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있던 형광물질과 퀀처도 거리가 멀어지게 된다. 이로 인해 형광물질에 영향을 미치던 퀀처의 FRET 효과가 사라지게 되므로, 분자비컨은 형광을 발하게 되는 것이다.
- [0116] 상기 분자비컨의 핵산은, 본 발명의 분자비컨을 이용하여 수득될 수 있는 신호 대 노이즈의 비율 수준을 고려하여 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 하기 서열번호 17 내지 32 중에서 선택되는 어느 하나의 염기서열일 수 있다.
- [0117] 상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암, 자궁경부암, 위암, 유방암, 비소 세포성폐암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종,

자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환일 수 있고, 바람직하게 상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0118] 상기 I') 단계 및 II') 단계는 순차적으로 수행하거나, 또는 상기 단계들을 동시에 수행하여 질병 특이적 또는 조직 특이적 엑소솜 포획 및 특정 질병의 진단을 1 번의 과정으로 신속히 수행할 수도 있다.

[0119] 최종적으로 IV') 상기 III') 단계에서 측정된 피검자에 있어서의 형광 강도를 대조자에 있어서의 형광 강도와 비교하여, 특정 질환을 진단하기 위한 정보를 제공한다.

[0120] 타겟 유전자가 샘플 혹은 시료 내에 존재할 경우에는, 상기 분자비컨과 타겟 유전자가 혼성화되어 상기 분자비컨의 헤어핀 형태 2차 구조가 붕괴되고, 선형으로 구조가 개방되면서, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있던 형광 물질과 퀀처도 거리가 멀어지게 된다. 이로 인해 형광물질에 영향을 미치던 퀀처의 FRET 효과가 사라지게 되므로, 분자비컨은 형광을 발하게 되므로, 분자비컨의 형광 강도를 측정하여 '표면 단백질을 가지고 있는 엑소솜'에서 타겟 유전자가 존재하는지 여부를 검출할 수 있는 것이다. 이를 통해 질병 특이적 또는 조직 특이적 엑소솜 포획 및 특정 질환의 진단을 수행할 수 있다.

[0121] 본 발명의 또 다른 측면은 항체가 결합된 자성비드; 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체; 및 분자비컨;을 포함하고, 상기 분자비컨은 엑소솜 내에 존재하는 타겟 유전자와 상보적으로 결합하는 핵산, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있는 형광물질 및 상기 핵산의 타단에 결합된 퀀처(quencher)를 포함하는 것을 특징으로 하는 다중검출용 키트에 관한 것이다.

[0122] 상기 항체가 부착된 자성비드는 엑소솜의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 어느 하나 이상의 항체가 부착되어 있는 것으로, 상기 항체는 엑소솜을 검출 또는 포착할 수 있는 항체라면 특별히 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 단클론 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성화된 단편, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 분자, 키메라 항체 또는 인간화 항체 등일 수 있다. 바람직하게 상기 항체는 CD9, CD63 및 CD81로 이루어지는 것 중에서 선택되는 어느 하나의 항원에 대한 항체일 수 있고, 보다 바람직하게는 엑소솜의 막 단백질에 존재하는 CD63 항원에 대한 항체일 수 있다.

[0123] 상기 항체와 상기 자성비드는 직접 결합되거나, 링커를 통해 결합된 것일 수 있는데, 상기 링커는 단백질 G, 단백질 A, 단백질 A/G, Fc 수용체, 바이오틴, 아비딘, 히스티딘, Ni-NTA, 또는 스트렙트아비딘으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0124] 상기 항체가 부착된 자성비드는, 자성비드의 표면에 항체를 고정화함으로써 엑소솜의 표면에 존재하는 특정 단백질(항원)을 표적하고, 자력 분리를 이용하여 쉽게 수집 및 분리할 수 있다.

[0125] 상기 피검자의 조직 또는 생물학적 샘플에 상기 항체가 부착된 자성비드를 처리할 경우, 상기 자성비드에 부착된 항체와, 상기 조직 혹은 샘플 내에 존재하는 엑소솜의 표면 단백질(항원)이 결합된다. 즉 상기 항체에 대한 항원을 갖는 엑소솜-항체-자성비드 복합체가 형성된다. 상기 복합체는 자력분리를 통해 쉽게 수집할 수 있기 때문에 비특이적 반응을 줄이고, 검출 효율을 극대화할 수 있다.

[0126] 상기 자성비드는 자성을 갖는 물질로, 통상적으로 사용되는 자성비드라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 Fe(III), Mg, Mn, Ni, Zn 및 Co로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0127] 본 발명에서 '타겟 표면단백질'이란 피검자로부터 특정 질환을 진단할 수 있는 물질로, 보다 바람직하게는 엑소솜 표면에 많이 분포되어있는 단백질이다.

[0128] 상기 타겟 표면단백질은 EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule), EGFR (Epidermal growth factor receptor), Survivin, IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor)일 수 있다.

[0129] 본 발명에서 '타겟 유전자'란 피검자로부터 특정 질환을 진단할 수 있는 물질로, 보다 바람직하게는 핵산 바이오마커이고, 가장 바람직하게는 miRNA이다. 엑소솜 내에는 DNA보다 RNA 양이 많기 때문에 miRNA를 이용할 경우

기존의 DNA를 이용하는 기술보다 효율적으로 검출이 가능하다.

- [0130] 상기 miRNA는 miR-21(hsa-miR-21), miR-574(hsa-miR-574) miR-205(hsa-miR-205), miR-92(hsa-miR-92), miR-147(hsa-miR-147), miR-141(hsa-miR-141) 및 miR-547(hsa-miR-547)일 수 있다.
- [0131] 상기 miR-21(hsa-miR-21)는 서열번호 1 또는 2, miR-574(hsa-miR-574)는 서열번호 3 또는 4, miR-205(hsa-miR-205)는 서열번호 5 또는 6, miR-92(hsa-miR-92)는 서열번호 7 내지 10 중에서 선택되는 어느 하나의 염기서열, miR-147(hsa-miR-147)는 서열번호 11 또는 12, miR-141(hsa-miR-141)은 서열번호 13 또는 14, miR-547(hsa-miR-547)는 서열번호 15 또는 16에 개시된다.
- [0132] 본 발명에서 '분자비컨(molecular beacon)'이란 헤어핀 형태의 2차 구조를 형성하고 있는 핵산으로, 상보적인 영역의 특이적인 혼성화에 의하여 분자비컨 구조의 변화를 일으켜 형광을 발하게 된다. 이하에서 본 발명에 따른 분자비컨의 구체적인 구조를 설명하기로 한다.
- [0133] 상기 분자비컨(molecular beacon)은 엑소좀 내에 존재하는, 특정 질환의 바이오마커인 타겟 유전자와 상보적으로 결합하는 핵산, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있는 형광물질 및 상기 핵산의 타단에 결합된 퀀처(quencher)를 포함한다.
- [0134] 상기 핵산은 엑소좀 내에 존재하면서 특정 miRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 서열을 갖는 선형의 DNA 또는 RNA일 수 있고, 상기 RNA는 mRNA, miRNA, snoRNA, snRNA, rRNA, tRNA, siRNA, hnRNA, shRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있는데, 바람직하게는 특정 miRNA가 존재하지 않는 환경에서 헤어핀 고리를 형성하도록 핵산의 양 말단이 상보적인 5' 및 3' 서열을 갖는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 핵산은 주쇄 폴리뉴클레오티드를 중심으로 양 말단에 헤어핀 구조를 형성하도록 상보적인 5' 및 3' 서열을 가지는 것일 수 있다. 상기 주쇄 폴리뉴클레오티드는 타겟 유전자에 대해 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도로도 충분히 상보적인 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0135] 본 발명에서 상기 용어 "상보적"은 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건하에서 본 발명의 타겟 유전자에 대하여 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 상기 용어 "상보적"은 완전히 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 핵산이 miR-21(hsa-miR-21), miR-574(hsa-miR-574), miR-205(hsa-miR-205), miR-92(hsa-miR-92), miR-147(hsa-miR-147), miR-141(hsa-miR-141) 또는 miR-547(hsa-miR-547)의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.
- [0136] 또한 상기 핵산의 양 말단에 각각 형광물질과 퀀처가 결합되어 있고, 구체적으로 상기 핵산의 말단에는 형광물질이 결합되어 있고, 상기 핵산의 타단에는 퀀처가 결합되어 있다. 보다 구체적으로 상기 핵산의 5' 말단에는 형광물질이 결합되고, 3' 말단에는 퀀처가 결합되거나, 상기 핵산의 3' 말단에 형광물질이 결합되고, 5' 말단에 퀀처가 결합되어 있을 수 있다.
- [0137] 상기 핵산은 구체적으로 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하고, 타겟 유전자에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다.
- [0138] 상기 형광물질은 Cyanine계열 형광분자, Rodamine 계열 형광분자, Alexa 계열 형광분자, FITC(fluorescein isothiocyanate) 형광분자, FAM(5-carboxy fluorescein) 형광분자 및 Texas Red 형광분자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 플루오레세인(Fluorecein), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 바이오디피-FL(Biodipy-FL), 알렉사 플루오르 그린(Alexa Fluor Green), R-피코에리트린(R-phycoerythrin), 텍사스레드(TexasRed), 피코에리트린-텍사스 레드(Phycoerythrin-Texas Red), 로다민(rhodamine), 알렉사(alexa), 시아닌(cyanine; Cy3, Cy3.5, Cy5), 피코에리트린-시아닌5(Phycoerythrin-cyanine5), 피코에리트린-시아닌7(Phycoerythrin-cyanine7), 페리딘-클로로필 단백질(Peridinin-chlorophyll protein), 알로피코시아닌(Allophycocyanin), 알로피코시아닌-시아닌7(Allophycocyanin-cyanine7), o-프탈데히드(phthaldehyde), 플루오르카민(fluorescamine), 보디피(BODIPY), 쿠마린(coumarin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 FAM(5-carboxy fluorescein)일 수 있다.
- [0139] 상기 퀀처는 QSY계 dye, dabsyl, dabcy1, 블랙홀 퀀처(blackhole quencher, BHQ) 및 블랙베리 퀀처(blackberry quencher, BBQ)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 블랙홀 퀀처(blackhole quencher, BHQ)일 수 있으며, 보다 바람직하게는 BHQ2일 수 있다.

- [0140] 상기 분자비컨은 타겟 유전자(바람직하게는 특정 miRNA)가 존재하지 않는 환경에서, 상기 핵산의 양 말단(구체적으로, 프라이머 부분)이 서로 밀접하게 상호작용하여 결합을 형성함에 따라 상기 핵산이 헤어핀 구조로 형성되게 된다. 이로 인해 상기 핵산의 양 말단 각각에 결합되어 있는 형광물질과 퀀처가 FRET가 발생하도록 근접하기 때문에 상기 분자비컨은 형광을 발하지 않는다.
- [0141] 생물학적 샘플 혹은 시료(항체가 부착된 자성비드로 1차 검출한 후의 혼합물) 내에 타겟 유전자가 존재할 경우에는, 상기 분자비컨과 타겟 유전자가 혼성화되어 상기 분자비컨의 헤어핀 형태 2차 구조가 붕괴되고, 선형으로 구조가 개방되면서, 상기 핵산의 말단에 결합되어 있던 형광물질과 퀀처도 거리가 멀어지게 된다. 이로 인해 형광물질에 영향을 미치던 퀀처의 FRET 효과가 사라지게 되므로, 분자비컨은 형광을 발하게 되는 것이다.
- [0142] 상기 분자비컨의 핵산은, 본 발명의 분자비컨을 이용하여 수득될 수 있는 신호 대 노이즈의 비율 수준을 고려하여 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 하기 서열번호 17 내지 32 중에서 선택되는 어느 하나의 염기서열일 수 있다.
- [0143] 본 발명의 일 실시예에 따르면 항체가 부착된 자성비드로 처리한 후, 분리된 엑소솜에서 miR-21 염기서열과 혼성화에 의한 분자비컨 구조의 변화 및 형광강도의 증가를 확인하였다(실험예 1, 2).
- [0144] 상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암, 자궁경부암, 위암, 유방암, 비소 세포성폐암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's gkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0145] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항체가 부착된 자성비드 및 타겟 유전자 검출용 분자비컨을 포함하는 엑소솜으로부터 표면단백질과 타겟유전자 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0146] 본 발명에 따른 조성물은, 의학 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함할 수 있다. 예를 들면, 구체적으로 이온 교환수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(ex. 사람혈청 알부민 등), 완충물질(ex. 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 및 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물 등), 물, 염 또는 전해질(ex. 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연염 등), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리 에틸렌 글리콜 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물은 또한 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제 또는 보존제들을 추가로 포함할 수 있다.
- [0147] 본 발명의 조성물은, 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충용액 등을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 솔비톨 또는 데스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [0148] 또한, 본 발명의 조성물의 바람직한 양태는 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 상기 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(ex. 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 이 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한, 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(ex. 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액 등이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 상기 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이적인 비휘발성 오일은 그 어느 것이라도 사용할 수 있다.
- [0149] 본 발명에서 사용되는 용어, "진단"이란 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 엑소솜에 존재하는 단백질 및 유전자를 검출하는 다중검출을 통하여 관련 질환을 진단할 수 있으며, 바람직하게는 폐암, 난소암, 피부암, 결장암, 자궁경부암, 위암, 유방암, 비소 세포성폐암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자

근대막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 바람직하게 상기 질환은 폐암, 난소암, 피부암, 결장암 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0150] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[0151] 또한 이하에서 제시되는 실험 결과는 상기 실시예 및 비교예의 대표적인 실험 결과만을 기재한 것이며, 아래에서 명시적으로 제시하지 않은 본 발명의 여러 구현예의 각각의 효과는 해당 부분에서 구체적으로 기재하도록 한다.

[0152] 실시예 1. 세포 준비

[0153] 실험에 사용된 PC3(전립선암세포) 세포는 10% FBS(소태아혈청, Biowest, France) 및 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies, USA)을 함유하는 RPMI 1640 Medium(w/ HEPES, Gibco™)를 사용하여 배양하였고, 100 mm dish에서 37°C, 5% CO₂ 공급한 상태로 배양하여 실험에 사용하였다.

[0154] 실시예 2 및 3. 분자비컨(molecular beacon, MB) 설계 및 제조

[0155] 실험에 사용된 암세포에 대해 바이오마커로 쓸 수 있는 miRNA-21 또는 miRNA-574를 선정하였다. 선정된 microRNA를 검출할 수 있는 특이적인 분자비컨을 합성하기 위하여, 다음과 같은 서열을 설계하였고, 이를 Integrated DNA Technologies, Inc를 통해 합성하였다.

[0156] [miR-21-MB-Cy5 분자비컨 서열번호 17]

[0157] Cy5-GCGCGTCAACATCAGTCTGATAAGCTACGCGC-BHQ2

[0158] [miR-574-3p-MB-Cy5 분자비컨 서열번호 20]

[0159] Cy5-GCGCGTTGTGGGTGTGTGCATGAGCGTGACGCGC-BHQ2

[0160] 상기 분자비컨은 miRNA-21 또는 miRNA 574와 특이적 결합을 형성하는 핵산의 양쪽 말단에 형광 물질과 켄처가 각각 결합되어 있고, 형광물질로는 Cy5를 사용하였고, 켄처로는 BHQ2가 사용되었다.

[0161] 실험예 1. 전립선암세포(PC3)으로부터 반응조건에 따른 다중검출을 통해 CD63과 miR-21 분석

[0162] 1) 항체가 부착된 자성비드 처리

[0163] 세포로부터 엑소좀을 분리 및 검출하기 위해, 항체가 부착된 자성비드를 처리하였다. 이때, 항체가 부착된 자성 나노입자는 Exosome-human CD63 분리/검출 키트(ExoCap™ Exosome Isolation and Enrichment Kits)(MBL)을 사용하였다.

[0164] 반응시키기 전에 가장 먼저, 항체가 부착된 자성나노입자를 30 초간 볼텍싱(vortexing)하여 부유시켜준 후, 30 μ l의 항체가 부착된 자성나노입자를 1.5 ml eppendorf tube(Axygen)에서 엑소좀 분리 완충액(exosome isolation buffer; 0.1% BSA 농도의 PBS 용액을 만든 후, 0.2 μ m 시린지 필터로 여과하여 제조된 용액) 200 μ l로 세척하였다. 세척방법은 상기 eppendorf tube를 DynaMag™-2 Magnet(Thermo Fisher Scientific사, 12321D)에 위치시킨 뒤, 자석을 1 분간 접촉시켜 펠렛은 남기고 상층액을 제거하는 방식으로 수행된다.

- [0165] 세척과정이 완료된 후 자석을 제거하고, 1×10^8 입자(particle)의 농도, 총 부피 500 μ l로 전립선암세포(PC3)로부터 얻은 엑소좀을 엑소좀 분리용 완충액에 혼합해준 다음, 항체가 부착된 자성나노입자와 함께 4 $^{\circ}$ C(조건 1) 또는 37 $^{\circ}$ C(조건 2) 다양한 시간동안 반응시켰다. 반응시간동안에 반응용액이 들어있는 eppendorf tube를 MyLab Intelli Mixer without rack(서린바이오사, SLRM-3)으로 회전(rotation)시켰다(모드: 90, RPM: 60). 다음 200 μ l의 엑소좀 분리용 완충액을 첨가하여 약하게 피펫팅하고, 앞서 설명한 바와 같은 방식으로 자석을 통하여 자성비드에 포획된 엑소좀을 분리한 후, 엑소좀 분리용 완충액 45 μ l에 부유시켰다(도 1 'exosome capture' 참조).
- [0166] **2) 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨 처리**
- [0167] 상기 1) 단계로부터 얻은 혼합물(전립선암세포(PC3)의 엑소좀과 항체가 부착된 자성비드)에 형광물질이 결합된 항체 및 miR-21-MB-Cy5(실시예 2)을 첨가함으로써, PC3 세포의 엑소좀 외부에 존재하는 표면단백질 CD63과 엑소좀 내부에 존재하는 질환 표지자(종양 진단을 위한 생물학적 표지자)인 miR-21을 동시에 검출하고자 하였다(도 1 'target miRNA detection', 'target protein detection' 참조).
- [0168] 구체적으로 상기 1) 단계로부터 얻은 혼합물(PC3 세포로부터 분리/농축된 엑소좀) 45 μ l에 10 μ M 농도의 miR-21-MB-Cy5(실시예 1) 5 μ l를 첨가하여 빛이 차단된 37 $^{\circ}$ C 조건하에서 1 시간동안 반응시켰다. 다음, CD63 Antibody, Alexa Fluor[®] 488(MEM-259, Thermo 사) 1 μ l를 첨가하여 빛이 차단된 37 $^{\circ}$ C 조건하에서 1 시간동안 반응시켰다.
- [0169] 상기 형광물질이 결합된 항체와 실시예 2의 타겟 유전자 검출용 분자비컨은 동시에 첨가하여도 무방하나, 반응의 정밀함을 위해 본 실험에서는 순차적으로 첨가하였다.
- [0170] **3) 형광 분석**
- [0171] 반응 후 엑소좀에 결합하지 못한 CD63 Antibody, Alexa Fluor[®] 488 또는 분자비컨을 제거하기 위해, 200 μ l의 엑소좀 분리 완충액을 첨가하고, 약하게 피펫팅한 다음, 자석을 이용하여 상층액을 제거하는 과정을 2 차례 반복수행하였다. 본 발명의 다중검출방법으로 분리된, 암 표지인자(CD63, miR21)를 갖고있는 엑소좀을 검출하기 위해, Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader(Thermo Fisher Scientific Inc., Billerica, MA, USA)로 각각의 형광세기를 측정하였다. 구체적으로 CD63은 excitation: 650 nm, emission: 670 nm로 측정하였고, miR21은 excitation: 495 nm, emission: 519 nm로 측정하였다.
- [0172] **4) PC3(전립선암세포)의 다중검출 분석 결과**
- [0173] 도 2는 PC3 세포 배양액을 실험예 1의 다중검출방법(조건 1; 4 $^{\circ}$ C, 2~12 시간 반응)에 따라 분석한 결과이고, 도 3은 PC3 세포 배양액을 실험예 1의 다중검출방법(조건 2; 37 $^{\circ}$ C, 4 시간 반응)에 따라 분석한 결과이다. 이때, 대조군인 '0'은 엑소좀이 포함되어 있지 않은 PBS 완충액을 사용하였다.
- [0174] 도 2 및 3을 살펴보면, 항체가 부착된 자성비드로 세포 배양액에서 엑소좀을 분리·농축하는 과정은, 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안(조건 1) 수행하는 것이 최종적으로 측정된 형광세기의 S/B 값이 대조군에 비하여 약 10배 정도 높았으며, 37 $^{\circ}$ C에서 4 시간동안 수행하는 경우에는 형광세기의 S/B 값이 대조군에 비하여 약 2~6배 높게 측정되었다. 이를 통해 본 발명에 따른 다중검출방법을 통해 전립선암세포로부터 암 바이오마커인 CD63(표면 단백질), miR21(타겟 유전자)의 존재여부를 동시에 확인할 수 있다는 것을 알 수 있다. 특히, 항체가 부착된 자성비드를 처리하는데 있어서, 4 $^{\circ}$ C에서는 12시간 이상, 37 $^{\circ}$ C에서는 4 시간 이상 수행되는 것이 바람직함을 확인하였다.
- [0175] 또한, 본 발명의 다중검출방법을 통해 측정된 시료 속의 특정 질환에 대한 표면단백질 및 타겟 유전자의 함량을 형광세기로 분석하고, 이를 정상 대조군과 비교한다면 그 차이를 통해 특정 질환을 진단하는데 필요한 정확하고 신뢰성 높은 정보를 제공할 수 있음을 알 수 있다.
- [0176] **실험예 2. 다양한 농도의 엑소좀 용액으로부터 다중검출을 통해 CD63과 miR-21 분석**
- [0177] 앞서 실험예 1을 통해 항체가 부착된 자성비드로 엑소좀을 1차 분리하고, 여기에 특정 질환에 대한 바이오마커인 표면단백질 및 유전자를 검출하는 것이 가능함을 확인하였다. 이에 시료 내에 존재하는 엑소좀의 농도에 따른 본 발명의 다중검출방법의 민감도를 살펴보고자 하였다.
- [0178] 실험예 1과 같이 항체가 부착된 자성비드로 엑소좀(조건 1 또는 조건 2)을 1차 분리하고, 분리된 엑소좀에 완충

액(PBS)을 첨가하여 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 개 엑소좀/ μL 농도가 되도록 희석하여, 단계별 엑소좀 용액을 준비하였다.

[0179] 상기 다양한 농도의 엑소좀 용액을 사용하였다는 것을 제외하고는 실험예 1과 동일하게 2) 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨 처리 및 3) 형광 분석을 수행하였고, 분석결과를 도 4, 5에 나타내었다.

[0180] 도 4는 다양한 농도의 엑소좀 용액으로부터 실험예 2의 다중검출방법(조건 1; 4 °C, 12 시간 반응에 따라 분석한 결과이고, 도 5는 다양한 농도의 엑소좀 용액으로부터 실험예 2의 다중검출방법(조건 2; 37 °C, 4 시간 반응)에 따라 분석한 결과이다. 이때, 대조군인 '0'은 엑소좀이 포함되어 있지 않은 PBS 완충액을 사용하였다.

[0181] 도 4 및 5을 살펴보면, 본 발명에 따른 다중검출방법은 엑소좀의 농도에 비례하여 S/B 값이 높게 측정됨을 확인하였다. 본 발명의 다중검출방법은 10^{6-7} 개/ μL 농도의 엑소좀부터 검출이 가능함을 확인하였다. 즉 본 발명에 따른 다중검출방법을 통해, 세포 배양액으로부터 엑소좀을 분리하고, 특정 질환에 대한 표면 단백질과 miRNA를 검출하였으며, 측정된 검출신호인 형광세기의 S/B 값은 엑소좀의 농도가 증가함에 따라 높아지는 것을 확인하였다.

[0182] 실험예 3. 본 발명의 다중검출방법이 엑소좀에 대해 특이성을 갖는지 여부

[0183] 본 발명에 따른 다중검출방법이 검출하고자 하는 특정 질환의 엑소좀에 특이으로 작용하는지를 확인하고자 하였다.

[0184] 실험예 1과 같이 항체가 부착된 자성비드로 엑소좀(조건 1)을 1차 분리하고, 분리된 엑소좀에 완충액(PBS)을 첨가하여 10^8 개 엑소좀/ μL 농도로 제조된 엑소좀 용액을 사용하였다는 것을 제외하고는 실험예 1과 동일하게 2) 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨 처리 및 3) 형광 분석을 수행하였고, 분석결과를 도 6에 나타내었다. 이는 그래프 상에 capture Ab; 0, Exosome; 0로 표기되어 있다.

[0185] 본 발명에 따른 다중검출방법은 세포의 내부에 존재하는 엑소좀에 특이적으로 반응하고 있음을 구체적이고 명확하게 확인하기 위해, 아래와 같이 비교예를 제작하여 분석하였다. 우선, 실험예 1의 1) 단계에서 엑소좀 용액 대신 PBS 완충액을 사용하고, 항체가 부착되지 않은 자성입자를 처리한 것을 제외하고는 모두 실험예 3과 동일하게 수행한 비교예 1(capture Ab; X, Exosome; X), 실험예 1의 1) 단계에서 엑소좀 용액 대신 PBS 완충액을 사용한 비교예 2(capture Ab; 0, Exosome; X), 실험예 1의 1) 단계에서 항체가 부착되지 않은 자성입자를 처리한 비교예 3(capture Ab; X, Exosome; 0)를 제조하여 모두 실험예 3과 동일하게 수행하여 형광세기 측정하고, 이로부터 S/B 값을 분석하였다.

[0186] 도 6은 엑소좀 혹은 항체가 부착된 자성입자의 존재유무에 따라 실험예 3의 다중검출방법으로 측정한 형광세기 그래프이다. 이때, 대조군 PBS(w/o exosome)은 엑소좀이 포함되어 있지 않은 PBS 완충액을 사용하였다.

[0187] 도 6에 나타난 바와 같이 엑소좀이 첨가되어 있지 않거나, 항체가 부착되지 않은 자성입자를 사용한 경우에는 본 발명의 다중검출방법을 동일하게 수행하여도 신호가 측정되지 않음을 확인하였다. 이에 반해, 항체가 부착된 자성입자에 엑소좀이 존재하는 경우에는 본 발명에 따른 다중검출방법을 수행하면 형광세기가 검출됨을 확인하였다. 즉, 본 발명의 다중검출방법으로 측정된 형광세기의 S/B 값은 세포 배양액으로부터 분리된 엑소좀에 존재하는 표면 단백질과 miRNA의 신호이고, 자성입자 등에 의한 가짜양성신호나 엑소좀과의 비특이적인 면역반응에 의한 신호가 아님을 알 수 있다. 본 발명에 따른 다중검출방법은 세포의 엑소좀에 특이적으로 존재하는 표면단백질과 miRNA만 검출하므로, 항체가 부착된 자성입자를 이용해 단순히 엑소좀을 분리하는 것보다 정확성이나 신뢰성이 현저히 우수할 뿐만 아니라, 검출시간(2) 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체와 타겟 유전자 검출용 분자비컨 처리 단계의 소요시간이 1~2시간)도 단축하고, 실험장소가 장치에도 구애받지 않으므로, 활용가능성이 매우 높다.

[0188] 실험예 4. 전립선정상세포(RWPE-1) 및 전립선암세포(DU145, PC3)로부터 다중검출을 통해 CD63, EpCAM 또는 EGFR 표면단백질과 miR-21 분석

[0189] 본 발명에 따른 다중검출방법이 정상세포와 특정질환(암)을 갖는 세포를 정확히 비교할 수 있는지를 확인하고자

하였다. 또한 본 발명에 따른 다중검출방법이 암의 여러 바이오마커(CD63, EpCAM 또는 EGFR 표면단백질과 miR-21 또는 miR574 타겟 유전자)에 대해서도 검출가능한지를 분석하고자 하였다. 이때, 전립선정상세포(RWPE-1)와 전립선암세포(DU145, PC3)를 실시예 1과 동일하게 배양하여 준비하였다.

[0190] 각각의 세포로부터 수득한 엑소좀을 완충액(PBS)을 첨가하여 10^8 개 엑소좀/ μ l 농도로 제조한 후, 형광물질(Alexa Fluor[®] 488(MEM-259, Thermo 사))이 결합된 항체(CD63 Antibody, EpCAM Antibody 또는 EGFR Antibody) 및 분자비컨(실시예 2)을 각각 사용하였다는 것을 제외하고는 실험예 1과 모두 동일하게 하여 다중검출을 수행하였다.

[0191] 도 7은 정상 전립선 세포(RWPE-1), 전립성 암세포(DU145 및 PC3)의 배양액으로부터 실험예 4의 다중검출방법(CD63, miR-21)을 수행한 결과이고, 도 8은 정상 전립선 세포(RWPE-1), 전립성 암세포(DU145 및 PC3)의 배양액으로부터 실험예 4의 다중검출방법(EpCAM, miR-21 또는 EGFR, miR-21)을 수행한 결과이며, 이때, 대조군 PBS(w/o exosome)는 엑소좀이 포함되어 있지 않은 PBS 완충액을 사용하였다.

[0192] 도 7 내지 8에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 다중검출방법은 세포의 엑소좀 내에 존재하는 여러 암 바이오마커를 정확히 검출하여, 정상세포와 암세포를 판별할 수 있는 정보를 제공할 수 있음을 확인하였다. 구체적으로 다중검출시, miR-21 검출용 분자비컨은 고정하고, 형광물질이 결합된 타겟 표면단백질 검출용 항체(CD63, EpCAM, EGFR)는 달리하여 조합하였을 때에도, 형광세기가 모두 동일한 양상으로 일정하게 측정되었다.

[0193] 구체적으로 CD63는 특정 질환의 바이오마커가 아닌 엑소좀에 존재하는 표면단백질이므로, CD63의 발현 수준은 정상세포, 암세포 구분없이 유사한 수준으로 발현되고 있는데, 이를 통해서는 엑소좀의 정량정보를 판단할 수 있다. 또한 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule)와 EGFR(상피세포 성장인자 수용체)의 경우 정상세포에서는 관찰되지 않으나, 암세포에서는 분명한 발현이 확인되므로, 이를 통해서는 암질환 또는 암세포를 진단, 판별할 수 있다.

[0194] 즉, 본 발명에 따른 다중검출방법을 통해 시료 내에 존재하는 세포의 엑소좀 정량정보(CD63) 뿐만 아니라 질병 정보(EpCAM, EGFR)도 제공할 수 있음을 의미하는 것이다. 즉, 본 발명에 따른 다중검출방법을 통해, 세포 배양액으로부터 특정 질환과 관련된 바이오마커(엑소좀의 표면 단백질 및 miRNA)를 갖는 엑소좀을 정확하고 신속히 검출 가능할 수 있고, 정상세포와의 형광세기 비교를 통해 해당 시료에서 특정 질환을 진단 및 판별에 근거자료로 활용할 수 있음을 알 수 있다.

[0195] 실험예 5. 전립선정상세포(RWPE-1) 및 전립선암세포(DU145, PC3)로부터 다중검출을 통해 CD63과 miR-21 또는 miR574-3p 분석

[0196] 정상세포와 특정질환(암)을 갖는 세포에 대하여, 다양한 miRNA를 타겟으로 하였을 때, 정확히 측정가능한지를 확인하고자 하였다. 본 실험예에서는 전립선정상세포(RWPE-1)와 전립선암세포(DU145, PC3)를 실시예 1과 동일하게 준비하였고, 각각의 배양액을 시료로 사용하였다.

[0197] 각각의 세포로부터 수득한 엑소좀을 완충액(PBS)을 첨가하여 10^8 개 엑소좀/ μ l 농도로 제조한 후, 형광물질이 결합된 항체(CD63 Antibody, Alexa Fluor[®] 488(MEM-259, Thermo 사)) 및 분자비컨(실시예 2 또는 실시예 3)을 각각 사용하였다는 것과 기존의 4℃에서 12 시간의 조건에서 37℃에서 4 시간으로 반응시간조건을 개선하였다는 것을 제외하고는 실험예 1과 모두 동일하게 하여 다중검출을 수행하였다.

[0198] 도 9는 정상 전립선 세포(RWPE-1), 전립성 암세포(DU145 및 PC3)의 배양액으로부터 실험예 5의 다중검출방법(CD63, miR-21 또는 CD63, Mir-574-3p)을 수행한 결과이다. 이때, 대조군 PBS(w/o exosome)는 엑소좀이 포함되어 있지 않은 PBS 완충액을 사용하였다.

[0199] 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명의 다중검출방법에서 분자비컨(실시예 2 또는 실시예 3)을 달리하였음에도 불구하고, 측정된 형광세기 S/B 값(대조군 대비)이 유사한 경향(전립성 암세포에서 높음)으로 나타남을 확인하였다. 구체적으로 다중검출방법에서 검출하고자 하는 타겟 표면단백질을 CD63으로 고정하고, 타겟 유전자를 miR-21(실시예 2) 또는 miR-574-3p(실시예 3)로 변경하였을 때, 각각의 조합에서도 모두 전립성 암세포에서 높

은 형광세기 S/B 값이 측정되었다.

[0200] 이를 통해 전립선정상세포와 전립선암세포로부터 분리된 엑소좀을 정량할 수 있고, 질병 특이적 바이오마커 (엑소좀의 표면단백질, miRNA) 발현정도를 분명하게 검출할 수 있음을 확인하였다. 생체시료 혹은 세포 배양액에 실험에 1 내지 5 중에서 어느 하나의 다중검출방법이 적용될 경우, 이들의 엑소좀에 암 관련 바이오마커(표면단백질과 miRNA)들이 존재하는지 여부를 동시에 확인할 수 있고, 측정된 수치(형광세기 또는 이로부터 얻은 S/B 값)를 정상세포와 비교하여 암 질환 여부를 진단하는 근거로 사용할 수 있다. 구체적으로 정상세포보다 암 바이오마커의 발현이 높으면(형광세기가 높으면), 암 질환으로 진단 또는 암세포로 판별할 수 있다.

[0201] 실험예 6. 생체시료(소변)로부터 다중검출을 통해 CD63과 miR-21 분석

[0202] 본 발명에 따른 다중검출방법이 인간 유래 생체시료(소변)에 적용가능한지를 확인하고자 하였다.

[0203] 세포 배양액 대신에 정상인으로부터 소변을 15 ml를 얻은 후, 이를 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units(Merck사)을 사용하여 500 μ l까지 농축한 다음 사용하였고, 1) 단계는 37 $^{\circ}$ C, 0~4 시간으로 반응시간조건을 적용한 것을 제외하고는 실시예 1과 모두 동일하게 하여 다중검출을 수행하였다.

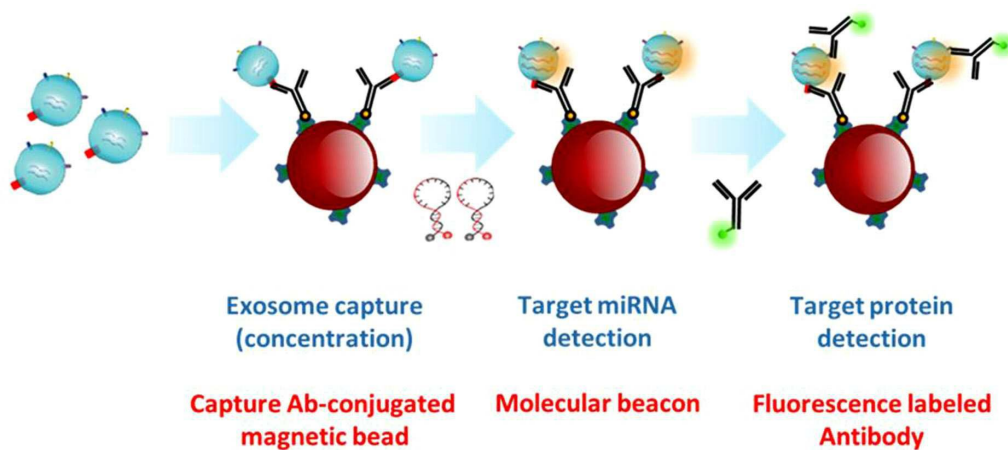
[0204] 도 10은 정상인의 소변으로부터 실험예 6의 다중검출을 실시하여 측정된 형광세기를 나타낸 그래프이다. 이때, 대조군 PBS(w/o exosome)는 엑소좀이 포함되어 있지 않은 PBS 완충액을 사용하였다.

[0205] 도 10 나타난 바와 같이, 본 발명의 다중검출방법을 통해 정상인의 생체 시료로부터 엑소좀 내에 표면단백질 (CD63)과 타겟 유전자(miR-21)가 존재하는지를 검출하였고, 그 결과 대조군에 비해 높은 S/B 값을 확인하였다. 즉, 본 발명의 다중검출방법은 실질적 임상(생체시료) 적용이 가능하며, 생체시료 내의 엑소좀에 존재하는 표면단백질과 miRNA를 동시에 검출하여 확인할 수 있음을 알 수 있다.

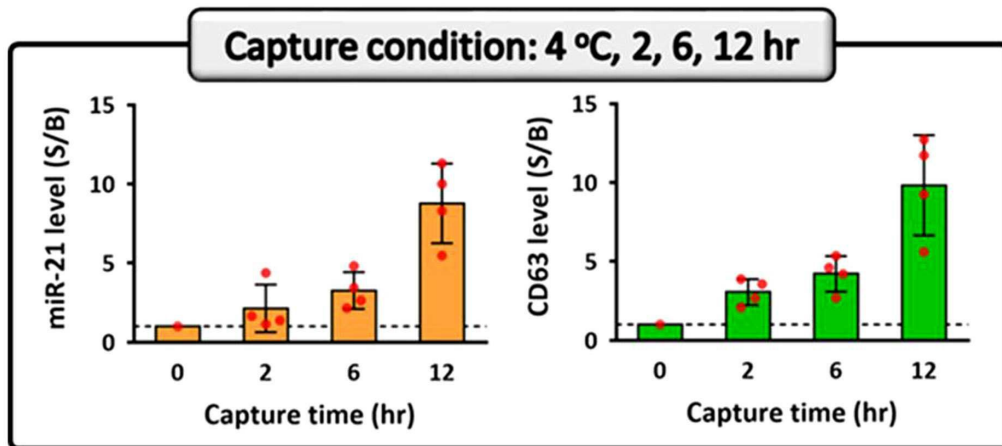
[0206] 암 질환 진단을 위해서는, 정상인과 환자에서의 miRNA 21 발현량을 비교하여 판별할 수 있으므로, 정상인과 환자에서 miRNA21 발현량의 정확한 측정이 선행되어야 한다. 따라서 본 발명에서 정상인에서 miRNA21이 분명하게 검출됨이 확인되었으므로 본 발명을 통해 엑소좀 분리-엑소좀에 존재하는 질병 특이적 바이오마커 발현 정도 분석이 별도의 추가과정없이도 실질적으로 적용가능하다는 것을 알 수 있다.

도면

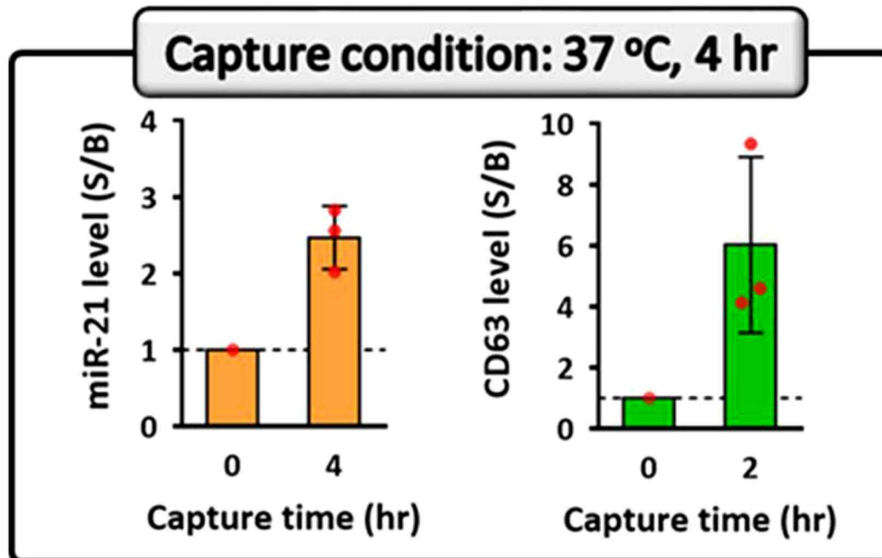
도면1



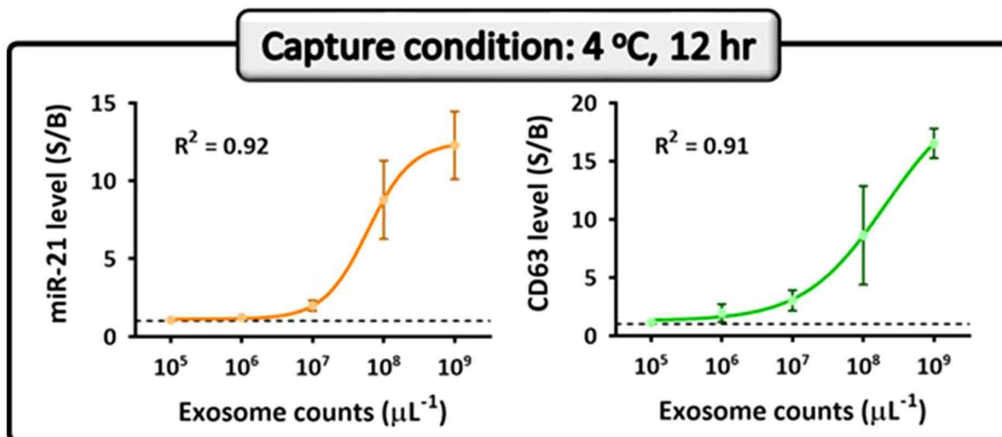
도면2



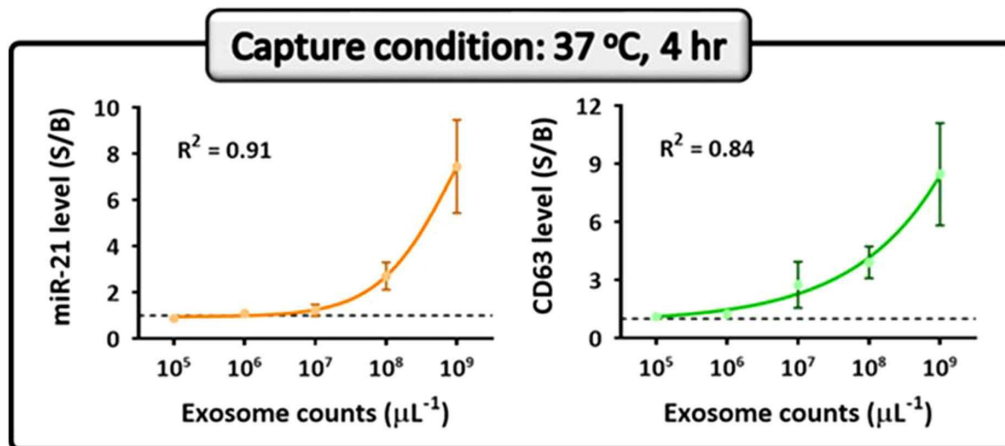
도면3



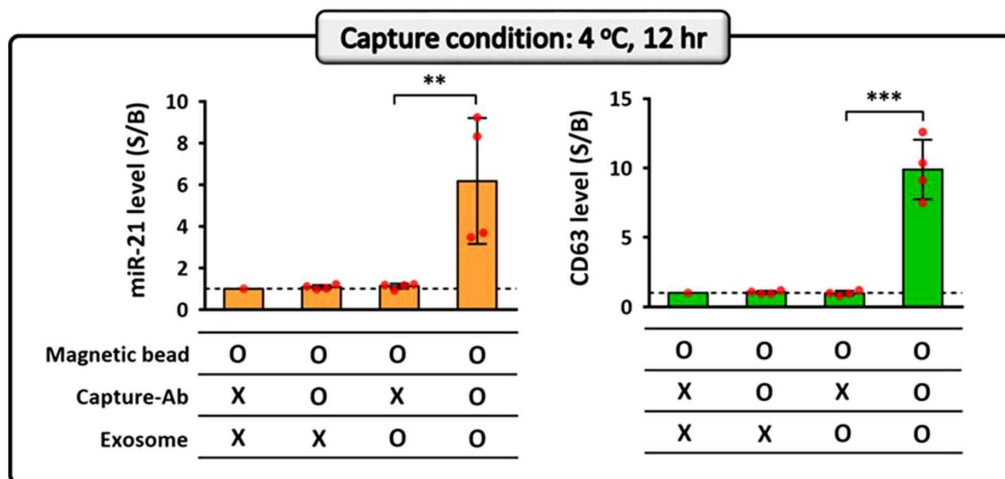
도면4



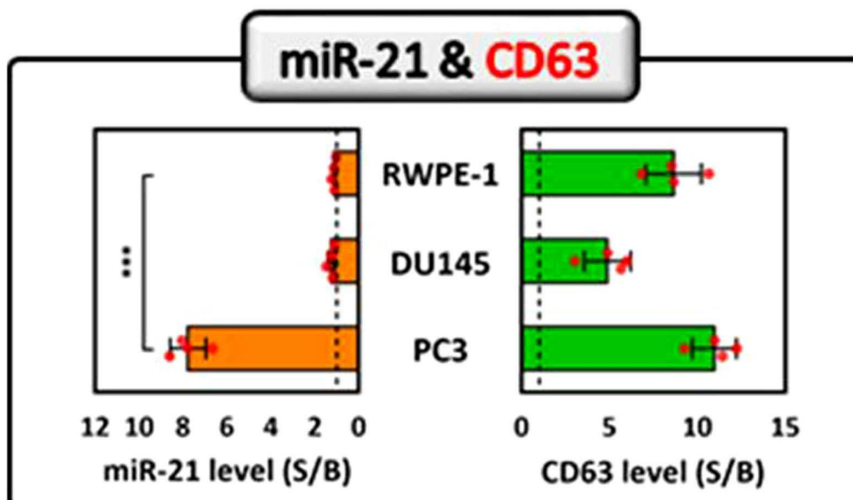
도면5



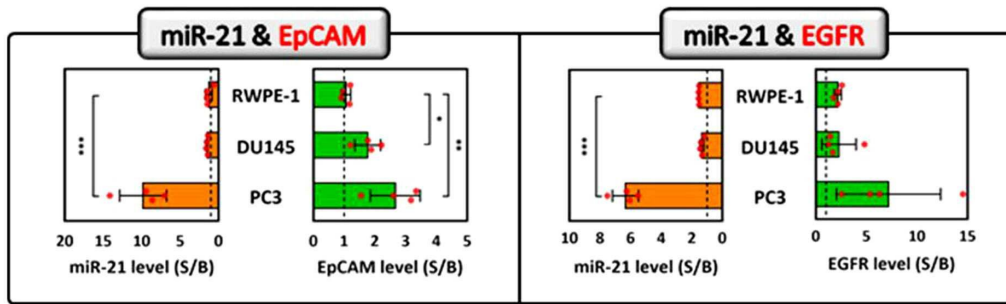
도면6



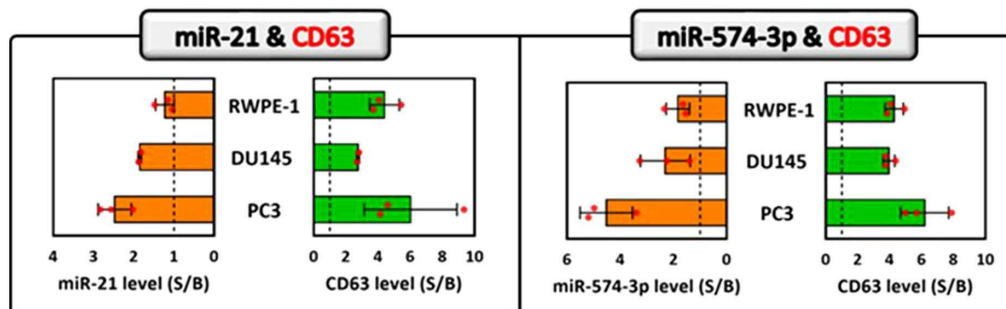
도면7



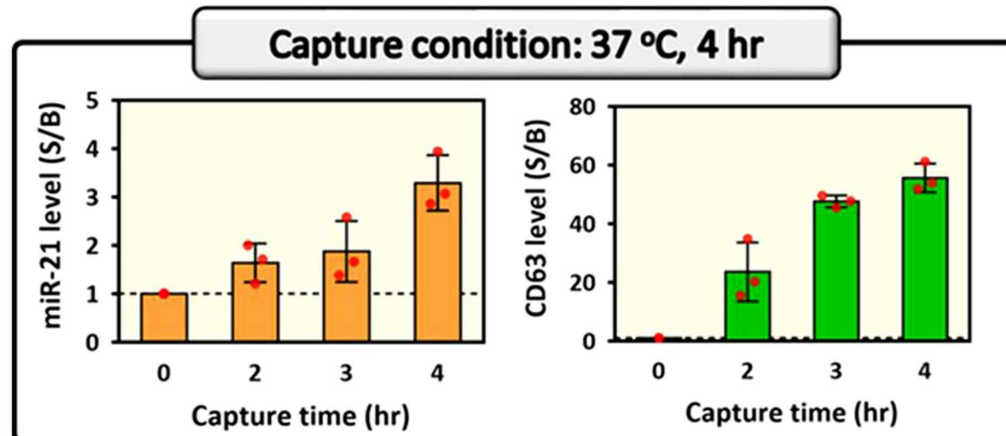
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> INCHEON UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> A method for multiplexed detection of exosome miRNA and cell-surface protein by Magnetic beads and molecular beacon
- <130> HPC7426
- <160> 32
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature sequence hsa-miR-21-5p

<400> 1

uagcuuauca gacugauguu ga 22

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature sequence hsa-miR-21-3p

<400> 2

caacaccagu cgaugggcug u 21

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature sequence hsa-miR-574-5p

<400> 3

ugagugugug ugugugagug ugu 23

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature sequence hsa-miR-574-3p

<400> 4

cacgcucaug cacacacca ca 22

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature sequence hsa-miR-205-5p

<400> 5

uccuucauuc caccggaguc ug 22

<210> 6
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mature sequence hsa-miR-205-3p
 <400> 6
 gauuucagug gagugaaguu c 21
 <210> 7

 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mature sequence hsa-miR-92a-1-5p
 <400> 7
 agguugggau cgguugcaau gcu 23
 <210> 8
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mature sequence hsa-miR-92a-2-5p
 <400> 8
 ggguggggau uuguugcauu ac 22
 <210> 9
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mature sequence hsa-miR-92b-5p

 <400> 9
 agggacggga cgcgugcag ug 22
 <210> 10
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mature sequence hsa-miR-92b-3p

<400>	10	
uauugcacuc gucccggccu cc		22
<210>	11	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mature sequence hsa-miR-147a	
<400>	11	
guguguggaa augcuucugc		20
<210>	12	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mature sequence hsa-miR-147b	
<400>	12	
gugugcggaa augcuucugc ua		22
<210>	13	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mature sequence hsa-miR-141-5p	
<400>	13	
caucuuccag uacaguguug ga		22
<210>	14	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mature sequence hsa-miR-141-3p	
<400>	14	
uaacacuguc ugguaaagau gg		22
<210>	15	
<211>	22	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature sequence rno-miR-547-5p

<400> 15

ucacuucagg auguaccacc ca 22

<210> 16

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature sequence rno-miR-547-3p

<400> 16

auugguacuu cuuuuaguga ga 22

<210> 17

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-21 targeting MB: miR-21-5p sequence

<400> 17

gcgcgtcaac atcagtctga taagctacgc gc 32

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-21 targeting MB: miR-21-3p sequence

<400> 18

gcgcgtacag cccatcgact ggtgttgacg cgc 33

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-574 targeting MB

<400> 19

gcgcgtacac actcacacac acacactcaa cgcgc 35

<210> 20

<211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-574 targeting MB
 <400> 20
 gcgcgttgtg ggtgtgtgca tgagcgtgac gcgc 34
 <210> 21
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-205 targeting MB:miR-205-5p sequence
 <400> 21
 gcgcgtcaga ctccggtgga atgaaggaac gcgc 34

 <210> 22
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-205 targeting MB:miR-205-3p sequence
 <400> 22
 gcgcgtgaac ttactccac tgaaatcacg cgc 33
 <210> 23
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-92 targeting MB : miR-92a-1-5p sequence
 <400> 23
 gcgcgtagca ttgcaaccga tccaacctta cgcgc 35
 <210> 24
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> miR-92 targeting MB : miR-92a-2-5p sequence
 <400> 24

gcgcgtgtaa tgcaacaaat cccacccac gcgc 34

<210> 25

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-92 targeting MB :miR-92b-5p sequence

<400> 25

gcgcgtcact gcaccgcgtc ccgtccctac gcgc 34

<210> 26

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-92 targeting MB : miR-92b-3p sequence

<400>

> 26

gcgcgtggag gccgggacga gtgcaataac gcgc 34

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-147 targeting MB : miR-147a sequence

<400> 27

gcgcgtgcag aagcatttcc acacacacgc gc 32

<210> 28

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-147 targeting MB : miR-147b sequence

<400> 28

gcgcgttagc agaagcattt ccgcacacac gcgc 34

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-141 targeting MB : miR-141-5p sequence

<400> 29

gcgcgttcca acactgtact ggaagatgac gcgc

34

<210> 30

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-141 targeting MB : miR-141-3p sequence

<400> 30

gcgcgtccat cttaccaga cagtgttaac gcgc

34

<210> 31

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-547 targeting MB : miR-547-5p sequence

<400> 31

gcgcgttggg tggatcatcc tgaagtgaac gcgc

34

<210> 32

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-547 targeting MB : miR-547-3p sequence

<400> 32

gcgcgttctc acttaaagaa gtaccaatac gcgc

34