



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0159543  
(43) 공개일자 2024년11월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/09 (2010.01) C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 5/0693 (2013.01)  
C07K 16/2842 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0057197  
(22) 출원일자 2024년04월29일  
심사청구일자 2024년04월29일
- (30) 우선권주장  
1020230056510 2023년04월28일 대한민국(KR)
- (71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자  
김승일  
경기도 성남시 수정구 복정로134번길 22-1, 202호(복정동)  
김지예  
서울특별시 서초구 신반포로 270, 130동 2303호(반포동, 반포자이아파트)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인이름리온

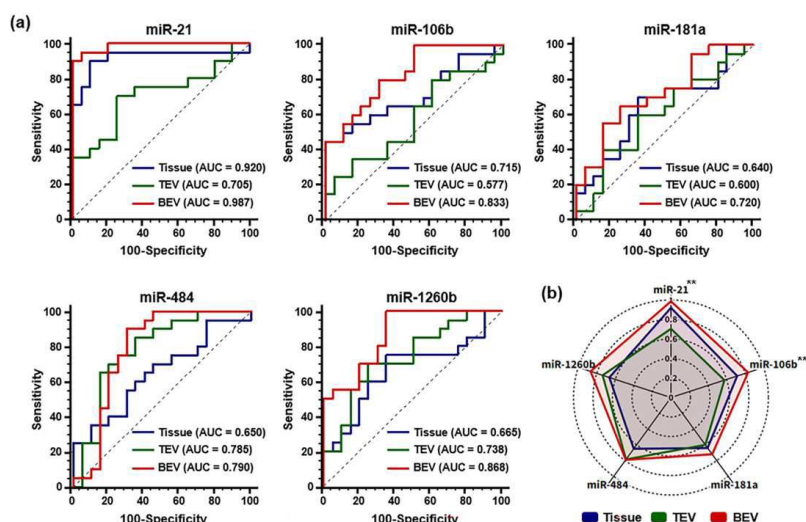
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법

(57) 요약

본 발명은 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 유방암 세포 표면 마커에 특이적인 항체를 이용한 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 조성물, 키트, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리방법 및 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체로부터 마이크로 RNA(microRNA)를 추출하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

**C07K 16/2848** (2013.01)

**C07K 16/30** (2013.01)

**C12N 15/1013** (2013.01)

**C12N 2509/00** (2013.01)

(72) 발명자

**김민우**

서울특별시 성북구 서경로 106-10, 102호(정릉동,  
한성쁘렛뜨빌연립주택)

**김용**

충청남도 천안시 서북구 봉정로 324, 113동 704호  
(두정동, 두정역 효성해링턴 플레이스)

**이수지**

서울특별시 영등포구 도신로12길 2, 402호(대림동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711171177
과제번호	2022R1F1A1074605
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	종양유래 세포막소포체 담지 miRNA 분석기반 유방암 혈액진단법 개발
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2022.06.01 ~ 2023.02.28

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

다음의 (a) 내지 (c)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중 2종 이상의 항체를 포함하는 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 조성물:

- (a) EpCAM(epithelial cell adhesion molecule)에 결합하는 항체;
- (b) CD49b(cluster of differentiation 49b)에 결합하는 항체; 및
- (c) CD51(Cluster of Differentiation 51)에 결합하는 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유방암은 내강 A형, 내강 B형, HER2 과발현형 및 삼중음성유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아형을 포함하는, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 조성물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항의 조성물; 및

자기 비드;를 포함하는, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 키트.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 EpCAM에 결합하는 항체, 상기 CD49b에 결합하는 항체 및 상기 CD51에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 항체는 상기 자기 비드에 결합되어 있는, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 키트.

#### 청구항 5

제3항에 있어서, 상기 각 항체 : 자기 비드의 중량비는 1:60 내지 1:120인, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 키트.

#### 청구항 6

제3항의 키트를 이용한 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 다음의 (a) 내지 (c) 단계를 포함하는 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법:

- (a) 생물학적 시료에 EpCAM에 결합하는 항체, 상기 CD49b에 결합하는 항체 및 상기 CD51에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 항체가 결합된 자기 비드를 처리한 후 반응시키는 단계;
- (b) 반응 완료 후 원심분리를 수행하여 침전물을 수득하는 단계; 및
- (c) 침전물로부터 자기 비드를 분리하는 단계.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계의 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 세포 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법.

#### 청구항 9

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계는 1시간 내지 24시간 동안 반응시키는 것인, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법.

#### 청구항 10

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계는 15℃ 내지 30℃에서 반응이 이루어지는, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법.

#### 청구항 11

제7항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 반응이 완료된 생물학적 시료 내 자기 비드에는 항원-항체 결합 반응에 의해 항원-항체 복합체가 결합되어 있는, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법.

#### 청구항 12

제3항의 키트를 이용하여 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체로부터 miRNA를 분리하는 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 다음의 (a) 내지 (d) 단계를 포함하는 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체로부터 마이크로 RNA(microRNA)를 추출하는 방법:

- (a) 생물학적 시료에 EpCAM에 결합하는 항체, 상기 CD49b에 결합하는 항체 및 상기 CD51에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 항체가 결합된 자기 비드를 처리한 후 반응시키는 단계;
- (b) 반응 완료 후 원심분리를 수행하여 침전물을 수득하는 단계
- (c) 침전물로부터 자기 비드를 분리하는 단계; 및
- (d) 상기 자기 비드에 결합된 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체로부터 microRNA를 추출하는 단계.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 (d) 단계의 자기 비드에 결합된 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체는 miR-21, miR-106b, miR-181a, miR-484, 및 miR-1260b로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로 RNA를 포함하는, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체로부터 microRNA를 추출하는 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 유방암 세포 표면 마커에 특이적인 항체를 이용한 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 조성물, 키트, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리방법 및 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체로부터 마이크로 RNA(microRNA)를 추출하는 방법을 제공한다.

#### 배경 기술

[0002] 세포의 소포체(extracellular vesicles, EV)는 종양 유래 바이오마커, 특히 고농도의 miRNA를 제공할 수 있고, 혈액에서 이들의 카르고(cargo)를 보호할 수 있다. 그러나, EV는 거의 모든 종류의 세포에서 방출되기 때문에 EV를 사용하는 생물학적 환경에서 상당한 이질성이 관찰될 수 있다. 현재 PEG 침전(Total Exosome Isolation kit 및 ExoQuick) 및 초원심분리(UC)를 기반으로 하는 여러 상용 EV 분리 키트가 전체 EV(total EV, TEV) 분리에 사용된다. TEV 분리는 면역 포획 기반 EV 분리 기술에 비해 더 높은 수율을 나타내지만, TEV는 암 이질성을 포착하거나 종양 특성을 반영할 수 없다.

[0003] 한편, 특허문헌 1에는 엑소좀 표면 상에 발현되는 N-글리코릴뉴라민산(Neu5Gc)을 마커로 하여 이에 결합하는 결합 분자를 이용해 종양 유래 세포의 소포체를 분리하는 방법이 개시되어 있으나, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체만을 특이적으로 분리하는 방법에 대해서는 언급된 바 없다.

[0004] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 후보 암 표면 마커 EpCAM, CD49b 및 CD51을 사용하여 TEV와 BEV를 효과적으로 구분할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2024-0019095호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 유방암 유래 세포의 소포체 표면 바이오마커에 결합하는 항체를 이용한 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물 또는 키트를 이용한 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물 또는 키트를 이용한 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체로부터의 마이크로 RNA 분리 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 다음의 (a) 내지 (c)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중 2종 이상의 항체를 포함하는 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 조성물을 제공한다:

[0010] (a) EpCAM(epithelial cell adhesion molecule)에 결합하는 항체;

[0011] (b) CD49b(cluster of differentiation 49b)에 결합하는 항체; 및

[0012] (c) CD51(Cluster of Differentiation 51)에 결합하는 항체.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 유방암은 내강 A형, 내강 B형, HER2 과발현형 및 삼중음성유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아형을 포함할 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 전술한 조성물 및 자기 비드를 포함하는 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 키트를 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 EpCAM에 결합하는 항체, 상기 CD49b에 결합하는 항체 및 상기 CD51에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 항체는 상기 자기 비드에 결합될 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 각 항체 : 자기 비드의 중량비는 1:60 내지 1:120일 수 있다.

[0017] 추가로, 본 발명은 전술한 조성물 또는 키트를 이용한 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 다음의 (a) 내지 (c) 단계를 포함할 수 있다:

[0019] (a) 생물학적 시료에 EpCAM에 결합하는 항체, 상기 CD49b에 결합하는 항체 및 상기 CD51에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 항체가 결합된 자기 비드를 처리한 후 반응시키는 단계;

[0020] (b) 반응 완료 후 원심분리를 수행하여 침전물을 수득하는 단계; 및

[0021] (c) 침전물로부터 자기 비드를 분리하는 단계.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 세포 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 1시간 내지 24시간 동안 반응시킬 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 15℃ 내지 30℃에서 반응이 이루어질 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서 반응이 완료된 생물학적 시료 내 자기 비드에는 항원-항체 결합 반응에 의해 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체가 결합될 수 있다.

- [0026] 나아가, 본 발명은 전술한 조성물 또는 키트를 이용하여 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체로부터 마이크로 RNA를 분리하는 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 다음의 (a) 내지 (d) 단계를 포함할 수 있다:
- [0028] (a) 생물학적 시료에 EpCAM에 결합하는 항체, 상기 CD49b에 결합하는 항체 및 상기 CD51에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 항체가 결합된 자기 비드를 처리한 후 반응시키는 단계;
- [0029] (b) 반응 완료 후 원심분리를 수행하여 침전물을 수득하는 단계
- [0030] (c) 침전물로부터 자기 비드를 분리하는 단계; 및
- [0031] (d) 상기 자기 비드에 결합된 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체로부터 마이크로 RNA를 추출하는 단계.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 (d) 단계의 자기 비드에 결합된 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체는 miR-21, miR-106b, miR-181a, miR-484, 및 miR-1260b로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로 RNA를 포함할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따른 BEV 분리 방법은 유방암 특이적 엑소좀 또는 세포외 소포체를 전체 세포외 소포체와 구분하여 효과적으로 분리할 수 있어, 이를 이용하여 다양한 아형의 유방암 환자군과 정상 대조군을 구분하는 임상적 성능이 우수하다. 또한, 본 발명의 방법으로 분리된 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체로부터 분리한 miRNA를 분석함으로써, 유방암 진단 또는 재발 여부를 보다 정확하게 예측할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1의 (a) 및 (b)는 유방암 진단을 위한 BEV 분리 방법의 개요를 나타낸 것이다.
- 도 2는 항체와 자기 비드의 중량비(왼쪽) 및 항체와 자기 비드를 처리한 후 반응 시간 및 반응 온도(오른쪽)에 따른 BEV 분리 효율을 확인하여 BEV 분리 방법을 최적화한 결과이다.
- 도 3의 (a)는 최적화된 BEV 분리방법을 통해 실제 혈장 내에서 분리한 BEV를 전자현미경으로 관찰한 결과이며, 도 3의 (b)는 분리한 BEV의 농도를 Nano tracking assay를 통해 확인한 결과이다.
- 도 4의 (a)는 다양한 유방암 아형을 대표하는 세포주의 표면 단백질(ITGA2, ITGAV, GPC1 및 EpCAM) 발현 수준을 확인한 결과이다. 도 4의 (b)는 다양한 유방암 아형을 대표하는 세포주를 삼중음성유방암과 비삼중음성유방암으로 구분하여 ITGA2, ITGAV 및 EpCAM의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- 도 5의 (a)는 공개 데이터베이스 상 조직 유래 miRNA 데이터 세트(GSE45666, GSE97811, GSE154255, GSE26659 및 GSE44124)와 순환 miRNA 데이터 세트(GSE42128, GSE118782, GSE73002, GSE98181 및 GSE110317)의 차등 발현 miRNA 비율을 볼케이노 플롯으로 나타낸 것이다. 빨간색 점(오른쪽 분포)은 유방 종양에서 고도로 발현된 miRNA를 나타내고 파란색 점(왼쪽 분포)은 낮게 발현된 miRNA를 나타낸다. 도 5의 (b)는 차등 발현 miRNA의 기준을  $P < 0.05$ , 배수 변화(fold change) 2이상으로 설정하였을 때 차등 발현 miRNA의 차이를 나타낸 것이다. 도 5의 (c)는 5개의 GEO 데이터 세트 사이에 중첩된 DEM의 분포를 나타내는 벤 다이어그램이다. 가로축의 막대는 각 비교에 의해 식별된 DEM의 수(DEG Scale)를 표시하고, 세로 막대는 유일한 발현 세트와 교차 세트에 miRNA가 포함된 DEM의 수를 표시한다. DEM = 차별적으로 발현된 miRNA, GEO = 유전자 발현 옴니버스.
- 도 6은 TCGA에서 차등적으로 발현된 miRNA 후보 12종의 발현 수준을 다양한 유방암 아형을 대표하는 세포주에서 확인한 결과이다.
- 도 7은 TCGA에서 차등적으로 발현된 miRNA 후보 12종의 발현 수준을 정상 대조군과 유방암 환자 유래 조직에서 확인한 결과이다.
- 도 8은 유방암 환자 20례와 정상 대조군(Non-BC) 20례의 조직, TEV, BEV에서 후보 miRNA의 발현 프로파일을 qRT-PCR로 분석하여 비교한 것이다. 대조군(조직 유래, TEV 유래)과 비교하여 BEV에서 후보 miRNA 발현의 배수 변화 및 통계적 유의성을 보여준다.
- 도 9의 (a)는 유방암 환자 20례와 정상인 20례로부터 확보한 조직 유래, TEV 유래, BEV 유래 miRNA의 임상적 성능을 수신자 조작 특성을 통해 비교한 결과이다. 도 9의 (b)는 조직 유래, TEV 유래, BEV 유래 miRNA의 AUC를



비교한 것이다.

도 10은 115명의 유방암 환자, 48명의 양성 중앙 환자 및 47명의 건강한 대조군을 포함한 220명의 혈장 샘플을 사용하여 BEV에서 차등적으로 발현된 miRNA 프로파일 분석을 TEV와 비교하여 나타낸 것이다

도 11은 유방암 환자군과 정상 대조군(Non-BC)의 TEV와 BEV에서 5종의 miRNA(miR-21, miR-106b, miR-181a, miR-484 및 miR-1260b)를 이용하여 유방암 환자와 정상 대조군을 구분하는 임상적 성능을 평가한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0036] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다.

[0037] 상술한 바와 같이, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체만을 특이적으로 분리할 수 있는 기술 개발이 요구되고 있다. 이에 따라, 본 발명자들은 유방암 세포 표면 마커인 EpCAM(epithelial cell adhesion molecule), CD49b(cluster of differentiation 49b) 및/또는 CD51(cluster of differentiation 51)에 특이적인 항체를 이용하는 경우 유방암 특이적 엑소좀 또는 세포의 소포체를 전체 세포의 소포체와 구분하여 효과적으로 분리할 수 있고, 분리된 엑소좀 또는 세포의 소포체를 이용하는 경우 다양한 아형의 유방암 환자군과 정상 대조군을 구분하는 임상적 성능이 우수하다는 것을 확인하고, 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다.

[0038] 구체적으로, 본 발명자들은 모든 아형의 유방암 세포 표면에서 EpCAM(epithelial cell adhesion molecule), CD49b(cluster of differentiation 49b) 및/또는 CD51(cluster of differentiation 51)이 발현됨을 확인하였고, 이를 자기 비드에 결합시켜 면역 캡처(immuno-capture)로 엑소좀 또는 세포의 소포체를 분리하는 경우, 유방암 특이적 엑소좀 또는 유방암 특이적 세포의 소포체(breast cancer-derived extracellular vesicle, BEV)를 분리할 수 있음을 확인하였다.

[0039] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 다음의 (a) 내지 (c)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중 2종 이상의 항체를 포함하는 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리용 조성물에 관한 것이다:

[0040] (a) EpCAM(epithelial cell adhesion molecule)에 결합하는 항체;

[0041] (b) CD49b(cluster of differentiation 49b)에 결합하는 항체; 및

[0042] (c) CD51(Cluster of Differentiation 51)에 결합하는 항체.

[0043] 본 발명에서는 후보 암 표면 마커 EpCAM, CD49b 및 CD51을 사용하여 TEV와 BEV를 구별하였다.

[0044] 상기 EpCAM은 상피세포부착분자로서 CD326으로도 알려져 있다. 상피에서  $Ca^{2+}$  비의존적 동형 세포-세포 접착을 매개하는 막횡단 당단백질이다. EpCAM은 상피 및 상피 유래 신생물에서만 발현되므로, 다양한 암의 진단 마커로 사용될 수 있다. 이는 암종의 중앙 형성 및 전이에 역할을 하는 것으로 나타나므로, 잠재적인 예후 지표 및 면역치료 전략의 잠재적 표적으로도 작용할 수 있다.

[0045] 본 발명에 있어서, 상기 EpCAM 단백질은 인간에서 NCBI Reference Sequence: NM\_002354.3의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 단백질, 또는 인간에서 GenBank: AAH14785.1, NCBI Reference Sequence: NP\_002345.2, GenBank: BDQ05174.1, GenBank: BDQ05173.1, GenBank: BDQ05172.1, GenBank: BDQ05171.1, GenBank: BDQ05170.1 또는 GenBank: BDQ05169.1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 EpCAM 단백질은 동형 단백질(isoform) 또는 이의 전구체를 포함할 수 있다.

[0046] CD49b 단백질은 인테그린 알파-2(integrin alpha-2, ITGA2)로도 알려져 있으며, 인간에서 CD49b에 의해 코딩되는 단백질이다. CD49b 단백질은 인테그린 알파 서브유닛으로, 이는  $\alpha 2 \beta 1$  인테그린 이중체(duplex)의 절반을 구성한다. 인테그린은 별개의 알파 사슬과 공통 베타 사슬로 구성된 이중이합체 통합 막 당단백질이다. 이들은 T 세포(NKT 세포), NK 세포, 섬유아세포 및 혈소판을 포함한 다양한 세포 유형에서 발견된다. 인테그린은 세포 부착에 관여하며 세포 표면 매개 신호 전달에도 참여한다. 본 발명에서, CD49b는 ITGA2와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 CD49b 단백질은 인간에서 NCBI Reference Sequence: NM\_002203.4의 뉴클레오타이드 서

열에 의해 암호화되는 단백질, 또는 인간에서 NCBI Reference Sequence: NP\_002194.2, GenBank: EAW54873.1 또는 GenBank: EAW54872.1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 CD49b 단백질은 동형 단백질(isoform) 또는 이의 전구체를 포함할 수 있다.

[0048] CD51 단백질은 인테그린 알파-V(Integrin alpha-V, ITGAV)로도 알려져 있으며, 인간에서 ITGAV 유전자에 의해 인코딩되는 단백질이다. ITGAV는 인테그린 알파 사슬 V를 코딩한다. 인테그린은 알파 사슬과 베타 사슬로 구성된 이종이합체 통합 막 단백질이다. 알파 V는 번역 후 절단을 거쳐 이황화물 연결된 중쇄 및 경쇄를 생성하며, 이는 여러 인테그린 베타 사슬과 결합하여 다양한 인테그린을 형성한다. 알려진 연관 베타 사슬(베타 사슬 1,3,5,6, 8; ITGB1, ITGB3, ITGB5, ITGB6 및 ITGB8) 중에서 각각은 세포외 기질 리간드와 상호작용할 수 있다. 부착 외에도 많은 인테그린이 신호 전달을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서, CD51은 ITGAV와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 CD51 단백질은 인간에서 NCBI Reference Sequence: NM\_002210.5, NCBI Reference Sequence: NM\_001144999.3, NCBI Reference Sequence: NM\_001145000.3, GenBank: BC136442.1, GenBank: BC126231.1 또는 GenBank: BC144100.1의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 단백질, 또는 인간에서 GenBank: AAI36443.1, GenBank: AAI26232.1, NCBI Reference Sequence: NP\_001138471.2, NCBI Reference Sequence: NP\_001138472.2, NCBI Reference Sequence: NP\_002201.2, 또는 GenBank: AAI44101.1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 CD51 단백질은 동형 단백질(isoform) 또는 이의 전구체를 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 3종의 단백질은 지방암 세포 표면에 발현되는 단백질로서, 지방암 유래 엑소솜 또는 지방암 유래 세포의 소포체(BEV)를 분리하는 바이오마커로 사용될 수 있다.

[0051] 본 발명에서, 용어 "세포의 소포체(EV)"는 조직 세포 및 종양 세포를 포함하여 세포로부터 생물학적 유체 내로 방출되거나 분비될 수 있는 세포 이하의 입자를 포함한다. EV는, 예를 들어, 엑소솜, 미세소포 및 세포자멸체를 포함한다.

[0052] 본 발명에서, 용어 "지방암 세포 특이적인" EV는 주로 지방암 세포에서 파생되거나 지방암 세포에서 파생되어 농축된 EV이다.

[0053] 본원에서 사용된 용어 "바이오마커"는 샘플에서 검출될 수 있는 지표, 예컨대, 예측적, 진단적, 및/또는 예후적 지표를 지칭한다. 마커 또는 바이오마커는 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 핵산 분자뿐만 아니라 지질 또는 당지질 또는 약물 또는 약물 대사산물일 수 있다. 바이오마커는 특정, 분자, 병리, 조직 및/또는 임상적 특징으로 특성화되는 특정 하위 유형의 질병 또는 장애 (예컨대, 지방암)의 지표로서 역할을 할 수 있다. 바이오마커는 EV의 표면 상에 적어도 부분적으로 노출되거나 EV의 루멘 내에 존재할 수 있다.

[0054] 예를 들어, "세포 표면 마커"는 막횡단(membrane-spanning) 단백질 또는 당지질과 같이 세포 표면 상에 적어도 부분적으로 노출되는 일종의 바이오마커이며, 따라서 EV가 존재하는 세포의 EV 표면 상에 적어도 부분적으로 노출될 것으로 예상된다. 본 발명에서 사용된 용어 "지방암 바이오마커" 또는 "지방암 마커"는 단백질, 폴리펩타이드, 핵산, 지질, 당지질, 약물, 약물 대사산물, 또는 지방암 세포가 풍부하고, 차례로 다른 세포의 EV(특히, TEV)와 비교하여 지방암 세포에서 유래된 EV가 풍부할 수 있는 다른 분자들을 지칭한다.

[0055] 예를 들어, "세포 표면 마커"는, 예를 들어, 혈액 또는 혈액 세포에서 유래하는 EV와 대조적으로, 하나 이상의 조직의 세포와 같은 특정 세포 유형 또는 병들지 않은 세포에서 유래할 수 있는 EV를 표시하는 데 사용할 수 있다. 따라서, 일부 구현예들에서, "세포 표면 마커"는 특정 기능을 갖는 세포 또는 다른 세포에서 유래한 EV와 비교하여, 하나 이상의 특정 신체 조직 또는 기관으로부터의 세포, 또는 병든 세포의 표면 상에 풍부하고, 일부 구현예들에서, 특정 기능을 갖는 세포와 같은 특정 유형의 세포에서 유래하고, 특정 조직 유형이나 기관, 또는 병든 세포에서 유래한 EV를 식별하는 역할을 할 수 있는 단백질 또는 기타 분자를 포함한다. 본 발명의 목적 상 세포 표면 마커는 지방 세포 또는 지방암 세포에서 유래하고, 지방 또는 지방암 조직에서 유래한 EV를 식별하는 역할을 할 수 있는 단백질을 지칭한다.

[0056] 본 발명에서 상기 "발현(expression)"은 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다. "단백질"은 "폴리펩타이드(polyptide)" 또는 "펩타이드(peptide)"와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다. "폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)" 또는 "핵산"은 단일 또는 이중 가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오타이드(DNA) 또는 리보뉴클레오타이드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오타이드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적



뉴클레오타이드의 공지된 아날로그도 포함된다. "mRNA"는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자로부터 아미노산 서열을 특정하게 되는 리보솜으로 유전 정보(유전자 특이적 염기 서열)를 전달하는 RNA를 의미한다.

- [0057] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 전술한 바이오마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현 벡터에 클로닝하여 상기 바이오마커 유전자가 암호화하는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩타이드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩타이드로는, 최소한 7개의 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 이러한 본 발명의 바이오마커 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 항체는 당업계의 공지된 방법으로 제조될 수 있는 모든 항체가 될 수 있다. 예를 들어, 전술한 바이오마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태 뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 3종의 바이오마커에 결합하는 각 항체를 이용하는 경우, 유방암의 모든 아형, 예를 들어, 내강 A형, 내강 B형, HER2 과발현형 및 삼중음성유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아형 유래의 엑소솜 또는 세포외 소포체를 효과적으로 분리할 수 있다.
- [0059] 본 발명에 따른 상기 3종의 바이오마커에 결합하는 항체를 이용한 면역친화방법은 CD63에 결합하는 항체를 이용한 면역친화방법에 비해 유방암 유래 엑소솜 또는 세포외 소포체를 효과적으로 분리할 수 있다. CD63 단백질은 인간에서 CD63 유전자에 의해 암호화되는 단백질로 세포 표면 발현이 유도될 수 있지만, 주로 세포내 소포의 막과 연관되어 있다.
- [0060] 상기 바이오마커는 유방암 유래 엑소솜 또는 유방암 유래 세포외 소포체, 즉 유방암 특이적 엑소솜 또는 유방암 특이적 세포외 소포체의 표면에서 검출될 수 있으며, 상기 유방암 특이적 엑소솜 또는 유방암 특이적 세포외 소포체는 혈액, 혈장, 세포, 조직, 타액, 객담, 머리카락, 소변, 대변 또는 유즙으로부터 분리될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는 상기 유방암 특이적 엑소솜 또는 유방암 특이적 세포외 소포체는 혈액, 혈장, 세포 및 조직으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 생물학적 시료로부터 분리될 수 있고, 이때, 상기 세포는 유방 세포일 수 있고, 상기 조직은 유방 조직일 수 있다.
- [0061] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 상기 유방암 유래 엑소솜 또는 유방암 유래 세포외 소포체는 혈액 또는 혈장으로부터 분리될 수 있다. 액체 생검(liquid biopsy)을 이용하면, 조직 검사와 같은 침습적인 방법과 달리 검사자에게 고통을 주지 않으면서 질병을 진단하는 것이 가능하다. 또한, 액체 생검을 이용하는 경우, 유방암 진단을 진단하거나, 유방암 환자를 대상으로 치료 반응성 또는 예후를 예측하거나, 환자의 치료 경과를 주기적으로 관찰하는데 있어 조직검사에 비하여 큰 이점을 가진다.
- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 유방암 특이적 엑소솜 또는 유방암 특이적 세포외 소포체는 EpCAM, CD49b 및 CD51로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질을 발현하는 것일 수 있고, 가장 바람직하게는 EpCAM, CD49b 및 CD51을 모두 발현하는 것일 수 있다.
- [0063] 상기 제1 측면과 관련하여, 본 발명은 전술한 조성물 및 자기 비드를 포함하는 유방암 유래 엑소솜 또는 세포외 소포체 분리용 키트를 제공한다.
- [0064] 본 발명에 있어서, 상기 조성물에 포함된 3종의 항체, 즉 EpCAM에 결합하는 항체, CD49b에 결합하는 항체 및 CD51에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 항체는 비드, 바람직하게는 자기 비드에 결합될 수 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서, 상기 자기 비드로는 자성 물질을 포함하는 입자라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 시판되는 자기 비드를 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 자기 비드로 폴리스티렌 입자가 사용될 수 있다. 상기 비드 표면에는 스트렙타비딘 또는 비오틴이 코딩되어 있을 수 있다.
- [0066] 본 발명에 있어서, 상기 자기 비드의 바람직한 평균 입자 크기는 3.0 내지 3.4  $\mu\text{m}$ 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0067] 상기 자기 비드는 항체에 의해 인식되는 시료의 물질이 항체를 통해 자기 비드에 결합된 상태로 남아 있고, 시료의 나머지 부분으로부터 분리되도록 하기 위해 샘플로부터 쉽게 분리되도록 하는 특성을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 3종의 항체가 결합된 자기 비드는 자성에 의해 쉽게 분리될 수 있다. 구체적으로, 자기 비드를 사용하면 이의 자기 특성을 기반으로 시료로부터 쉽게 분리될 수 있다. 시료를 항체 결합 자기 비드와 접촉시키고, 이어서 시료로부터 자기 비드를 분리하여 자기 비드 상에서 항체-결합 엑소좀 또는 세포의 소포체의 분리를 초래하는 것은 자기와 같은 기질의 물리적 이점을 이용하는 기기에서 실시할 수 있다. 이러한 방식으로, 시료의 나머지 부분으로부터 세포 표면 마커에 특이적인 항체를 분리하면, 시료의 나머지 부분에서 항체-결합 유방암 특이적 엑소좀 또는 세포의 소포체가 분리되어 해당 엑소좀 또는 세포의 세포체가 풍부해질 것이다. 항체 결합에 의해 분리된 유방암 특이적 엑소좀 또는 세포의 소포체는, 예를 들어, 유방암 세포에 특이적일 수 있는 하나 이상의 제2 바이오마커의 존재에 대해 분석함으로써 추가로 연구할 수 있다.
- [0068] 세포 표면 마커를 검출하기 위해 사용되는 항체는 자기 비드에 공유적으로 결합되거나, 비공유적으로 결합될 수 있다. 일부 구현예들에서, 상기 항체는 다른 개체 또는 연결 분자를 통해 자기 비드에 간접적으로 부착될 수 있다. 예를 들어, 항체는 먼저 비오틴 또는 스트렙타비딘과 같은 분자에 부착될 수 있으며, 이는 차례로 기질 입자 표면의 결합 파트너에 의해 인식될 수 있다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 상기 3종의 각 항체와 자기 비드는 1:60 내지 1:120의 중량비로 포함될 수 있다. 바람직하게는 1:70 내지 1:110, 보다 바람직하게는 1:70 내지 1:100, 가장 바람직하게는 1:70 내지 1:90일 수 있다. 상기 중량비를 벗어나는 경우, 유방암 특이적 엑소좀 또는 세포의 소포체의 분리 효율이 현저하게 낮아질 수 있다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 방법들과 관련된 시약을 추가로 포함하는 키트를 포함할 수 있다. 상기 키트는 특정 목적을 위해 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체를 특성화하는 데 필요한 시약의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 내 하나 이상의 이차 바이오마커를 검출하기 위한 검출 시약, 예컨대, 항체, 핵산 분자, 및 또한 선택적으로 상기 검출 시약과 관련된 색상 표지 시약을 포함할 수 있다. 상기 키트는 또한 대조군 샘플 및 대조군 샘플과 함께 사용되는 시약을 포함할 수 있다. 예를 들어, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체를 함유하는 용액의 세척 또는 재현탁을 위한 하나 이상의 완충액 또는 용액을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서, 상기 키트는 사용 지침을 추가로 포함할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 제2 측면은 전술한 키트를 이용한 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체 분리 방법에 관한 것이다.
- [0072] 구체적으로 상기 방법은 다음의 (a) 내지 (c) 단계를 포함할 수 있다:
- [0073] (a) 생물학적 시료에 EpCAM에 결합하는 항체, 상기 CD49b에 결합하는 항체 및 상기 CD51에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 항체가 결합된 자기 비드를 처리한 후 반응시키는 단계;
- [0074] (b) 반응 완료 후 원심분리를 수행하여 침전물을 수득하는 단계; 및
- [0075] (c) 침전물로부터 자기 비드를 분리하는 단계.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 세포 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 이때, 상기 세포는 유방 세포일 수 있고, 상기 조직은 유방 조직일 수 있다.
- [0077] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 생물학적 시료는 인간을 포함한 포유동물로부터 분리된 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 포유동물은 인간, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 말, 돼지, 소, 염소, 양, 마우스 또는 래트일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이때, 상기 포유동물은 유방암을 가질 수 있거나, 유방암을 갖는 것으로 의심되는 포유동물일 수 있다.
- [0078] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 1시간 내지 24시간 동안 반응시킬 수 있다. 바람직하게는 1시간 내지 5시간, 가장 바람직하게는 1시간 내지 3시간일 수 있다.
- [0079] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 15℃ 내지 30℃, 바람직하게는 20℃ 내지 30℃에서 반응이 이루어질 수 있다. 바람직하게는 상기 (a) 단계는 상기 온도 범위에서 1시간 내지 24시간 동안 반응시킬 수 있다. 바람직하게는 1시간 내지 5시간, 가장 바람직하게는 1시간 내지 3시간 동안 수행될 수 있다. 상기 온도 범위를 벗어나는 경우 반응 시간이 과도하게 길어질 수 있거나, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포의 소포체의 분리 효율이 낮아질 수 있다.
- [0080] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서 반응이 완료된 생물학적 시료 내 자기 비드에는 항원-항체 결합 반응에 의해 항원-항체 복합체가 결합되어 있는 것일 수 있다.

- [0081] 본 발명에 있어서, 상기 항원-항체 복합체는 EpCAM 단백질을 인지하는 항체, CD49b 단백질을 인지하는 항체 또는 CD51 단백질을 인지하는 항체가 유방암 세포의 표면에 발현하는 각 마커와 결합하여 형성될 수 있다. 따라서, 상기 (b) 단계에서 반응이 완료된 생물학적 시료 내 자기 비드에는 EpCAM 단백질 및 이를 인지하는 항체에 의한 항원-항체 복합체, CD49b 단백질 및 이를 인지하는 항체에 의한 항원-항체 복합체, 또는 CD51 단백질 및 이를 인지하는 항체에 의한 항원-항체 복합체가 결합되어 있을 수 있다. 바람직하게는 상기(b) 단계에서 반응이 완료된 생물학적 시료 내 자기 비드에는 상기 3종의 항원-항체 복합체 중 2종 이상 또는 3종 이상의 복합체가 결합되어 있을 수 있다.
- [0082] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계는 항체에 결합되지 않은 유방암 특이적 엑소좀 또는 세포외 소포체로부터 항체-결합 유방암 특이적 엑소좀 또는 세포외 소포체를 분리하는 단계로서, 이는 자성을 사용하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 유방암 특이적 엑소좀 또는 세포외 소포체가 결합된 항체를 포함하는 자기 비드가 중력에 의해 침전되도록 하고 상청액을 제거하거나, 또는 침전 과정을 가속화하기 위해 회전 컬럼에서와 같은 원심 분리를 사용함으로써 상기 자기 비드를 시료의 나머지 부분(즉, 상청액)으로부터 분리하여 분리를 실시할 수 있다.
- [0083] 본 발명에 있어서, 상기 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체의 분리 방법은 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체를 농축하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0084] 본원의 모든 방법들 중 임의의 것은 적어도 부분적으로 자동화될 수 있도록 컴퓨터 제어 장치에서 실시할 수 있다. 예를 들어, 자기 비드와 시료 사이의 접촉이 컴퓨터 및 적절한 소프트웨어에 의해 자동으로 제어될 수 있도록 자동화 또는 반자동 시스템에서 조작할 수 있다. 예를 들어, 세포 표면 마커에 대한 항체로 코팅된 자기 비드는 이의 자기 특성을 기반으로 부분 자동화 시스템에서 조작되어 샘플과 혼합된 다음, 컴퓨터 및 적절한 소프트웨어의 제어에 의해 샘플에서 분리할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 제 3 측면은 전술한 키트를 이용하여 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체로부터 마이크로 RNA(microRNA)를 분리하는 방법에 관한 것이다.
- [0086] 구체적으로, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체로부터 microRNA를 추출하는 방법은 다음의 (a) 내지 (d) 단계를 포함할 수 있다:
- [0087] (a) 생물학적 시료에 EpCAM에 결합하는 항체, 상기 CD49b에 결합하는 항체 및 상기 CD51에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 2종 이상의 항체가 결합된 자기 비드를 처리한 후 반응시키는 단계;
- [0088] (b) 반응 완료 후 원심분리를 수행하여 침전물을 수득하는 단계
- [0089] (c) 침전물로부터 자기 비드를 분리하는 단계; 및
- [0090] (d) 상기 자기 비드에 결합된 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체로부터 miRNA를 추출하는 단계.
- [0091] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 내지 (c) 단계는 상기 제2 측면에서 기술한 바와 동일하므로 그 기재 생략한다.
- [0092] 본 발명의 제2 측면에 따른 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체 분리 방법으로부터 분리된 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체에는 추가적인, 즉, 제2 바이오마커가 존재할 수 있다.
- [0093] 본 발명에 있어서, 상기 제2 바이오마커는 유방암 세포에서 발현되거나 과발현되는 폴리펩티드 또는 miRNA일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0094] 본 발명에 있어서, 상기 (d) 단계는 당업계에서 사용되는 통상적인 방법으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 시판되는 miRNA 정제 키트를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 (d) 단계의 자기 비드에 결합된 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체는 miR-21, miR-106b, miR-181a, miR-484, 및 miR-1260b로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로 RNA를 포함할 수 있다.
- [0096] 상기 제2 바이오마커의 존재 또는 수준을 결정하기 위한 시험은 컴퓨터 및 소프트웨어가, 예를 들어, 유방암 유래 엑소좀 또는 세포외 소포체가 추가 바이오마커에 대한 검출 시약과 접촉하는 방법을 결정하고, 또한 선택적으로 관찰되는 바이오마커의 수준을 정량화하도록 허용함으로써 적어도 부분적으로 자동화될 수 있다.
- [0097] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 단, 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는바, 이하에서 기술하는 특정 실시예 및 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니다. 본 발명의 범위는 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함

되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

## 실시예 1

### 분리 조건 확립

#### 1-1. 항체 및 자기 비드의 비율

항체와 자기 비드 비율에 따른 BEV 분리 효율을 확인하기 위해 다음과 같이 실험을 수행하였다. BEV의 프로파일링 및 분리를 수행하기 전에 효과적인 EV 포획을 위해 항체와 자기 비드의 이상적인 비율을 설정하였다. EV 분리를 위해 유방암 각 표면 마커 후보군[상피 세포 접착 분자(EpCAM), 글리피칸-1(GPC-1), 인테그린  $\alpha 2$ (ITGA2), 인테그린  $\alpha v$ (ITGAV) 및 인테그린  $\alpha 6$ (ITGA6)]을 표적으로 하는 2.5  $\mu$ g의 비오틴화 항체와 최적 자기 비드 양을 확인하기 위해 항체와 자기 비드의 비율을 1:20(50  $\mu$ g), 1:40(100  $\mu$ g), 1:80(200  $\mu$ g), 1:120(300  $\mu$ g), 1:160(400  $\mu$ g)으로 결합된 3  $\mu$ m 스트렙타비딘 표지된 자기 비드(Dynabeads™ M-270 Streptavidin, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 반응시키고, 흡광도를 측정하였다. 시험에 사용된 항체의 출처는 표 1에 나타내었다.

표 1

항체명	출처	Catalog No.	숙주 종 (Host species)
항-ITGA2 항체, 비오틴화됨(biotinylated)	R&D Systems	BAM1233	마우스
항-ITGAV 항체, 비오틴화됨(biotinylated)	STEMCELL	60043BT	마우스
항-GPC1 항체, 비오틴화됨(biotinylated)	R&D Systems	BAF4519	염소
항-EpCAM 항체, 비오틴화됨(biotinylated)	Abcam	Ab79079	마우스

그 결과, 도 2의 왼쪽 그래프에 나타난 바와 같이, 2.5  $\mu$ g의 비오틴화 항체와 3  $\mu$ m 스트렙타비딘 표지된 자기 비드의 최적 비율은 1: 80(2.5  $\mu$ g: 200  $\mu$ g)으로 확인되었다.

#### 1-2. 반응 온도 및 반응 시간

항체가 결합된 자기 비드를 반응시키는 시간에 따른 BEV 분리 효율을 확인하기 위해 다음과 같이 실험을 수행하였다. 실시예 1-1에서 확인된 최적의 항체:자기 비드 비율인 1:80(중량/중량)으로 반응 시간 및 온도에 차이를 두어 흡광도를 측정하였다. 4℃에서 각각 1, 8, 16, 24 및 48시간 반응시켰고, 25℃에서 2시간 반응시켰다. 그 결과, 도 2의 오른쪽 그래프에 나타난 바와 같이, 가장 효과적인 반응 온도 및 반응 시간은 25℃, 2시간으로 확인되었다.

#### 1-3. BEV 분리방법 검증

BEV에 결합된 면역 비드는 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4)에 용해된 2% 글루타르알데히드(cat. 354400; Merck KGaA, Darmstadt, Germany)와 2% 파라포름알데히드(cat. 818715; Merck KGaA)로 구성된 Karnovsky 고정액에서 24시간 동안 고정하였다. 고정 후, 샘플을 0.1M 인산염 완충액으로 매회 30분 동안 두 번 세척하여 잔류 고정액을 제거하였다. 그 후, 비드를 1% 사산화오스뮴( $\text{OsO}_4$ )에 2시간 동안 후고정하였다. 지질막을 안정화하고 전자 현미경 관찰을 위해 샘플을 추가 보존하였다. 그 후, 임계점 건조기(cat. CPD300; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 사용하여 점진적으로 상승하는 에탄올 시리즈(50-100%)로 탈수하고 이온 스퍼터(cat. ACE600; Leica Microsystems)를 사용하여 백금으로 코팅하였다. 그 후, 샘플을 주사 전자 현미경(SEM, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany, 모델 MERLIN)으로 x10,000 배율로 검사하여 BEV 형태를 자세히 시각화하였다. 그리고 PBS에 재현탁된 BEV의 농도와 크기 분포를 나노입자추적분석기(Nanoparticle Tracking Analyser, NTA; NanoSight NS300 system, Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK)를 사용하여 정량적으로 평가하였다. 이 분석은 제조업체의 지침에 따라 NTA 3.1 소프트웨어(Malvern Panalytical Ltd.)를 사용하여 수행하였다. NTA 시스템 내의 카메라는 BEV를 나타내는 고유한 신호를 방출하는 입자만 측정되도록 미세 조정되어 소포의 정확한 정량화 및 크기 분포 분석을 보장한다. 전체 EV 집단 중 BEV의 백분율은 하기 수식식 1과 같이 계산하였다.



- [0107] [수학식 1]
- [0108]  $BEV(\%) = (EV_{before} - EV_{after} / EV_{before}) \times 100$
- [0109] 여기서, EV<sub>before</sub>는 면역 비드 추가 전 환자 혈장 내 EV 농도이고 EV<sub>after</sub>는 면역 비드 추가 후 환자 혈장의 EV 잔류 농도이다.
- [0110] 도 3의 (a)에서 나타난 바와 같이 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과, 대조군 비드와 비교하여 EpCAM, CD49b 및 CD51 항체의 조합으로 BEV 표적 비드를 사용할 때 비드 표면에 더 많은 수의 EV가 있음을 확인하였다. 또한, 도 3의 (b)에서 확인되는 바와 같이 혈장 내 BEV 분리의 효과는 나노입자 추적 분석(NTA)을 통해 확인되었으며, 상기 수학식으로 계산한 결과, 면역 포획 과정 전후의 EV 농도 측정을 기준으로 추정 수율은 12.0%였다.

## 실시예 2

- [0111] BEV의 표면 바이오마커 선정
- [0112] 2-1. 분자 아형 별 유방 세포주 배양
- [0113] 다양한 유방암 아형을 반영할 수 있는 각 유방암 세포주의 표면 단백질을 확인하여 모든 유방암 아형에서 발현하는 바이오마커를 선정하고자 하였다. 유방암의 각 아형을 대표하는 세포주는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0114]

유방암 아형		세포주	입수처
유방 양성 세포주 (정상세포주)		MCF10a	ATCC CRL-10317™
내강 A형		MCF7	ATCC HTB-22™
내강 B형		BT-474	ATCC HTB-20™
HER2 과발현형		SK-BR-3	ATCC HTB-30™
삼중음성 유방암 형	중간엽 유사 TNBC	MDA-MB-231	ATCC HTB-26™
		Hs578T	ATCC HTB-126™
	기저양 1형	HCC1937	ATCC CRL-2336™
		MDA-MB-468	ATCC HTB-132™
	기저양 2형	HCC70	ATCC CRL-2315™
	내강 안드로겐 수용체	MDA-MB-453	ATCC HTB-131™
	면역조절	HCC1187	ATCC CRL-2322™
	분류되지 않음	HCC1395	ATCC CRL-2324™

- [0115] 표 2의 모든 세포주는 10% 소태아혈청(FBS, cat. 12483-020)과 1% 페니실린-스트렙토마이신(cat. 15140-122)이 보충된 RPMI-1640 배지(Roswell Park Memorial Institute-1640, cat. 22400-089)에서 배양하였다(모두 Gibco 제품, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). 모든 세포는 단층 배양으로 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다.
- [0116] 세포주 유래 EV 수득을 위해 유방 세포주를 10% FBS가 포함된 RPMI 배지에서 70-80% 컨플루언시까지 성장시켰다. 배지를 제거하고, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 3회 세척하고, 혈청이 고갈된 배지에서 배양하였다. 5% CO<sub>2</sub>와 함께 37℃에서 72시간 동안 배양한 후 EV가 풍부한 배지를 수득하고 600 x g에서 30분 동안 한 번 원심분리하여 세포를 제거하였다. EV는 Macrosep Advance Centrifugal Device(cat. MAP100C37, 100 K, Pall Life Science, Port Washington, NY, USA)를 사용하여 무 세포 상등액으로부터 추가로 농축하였다.
- [0117] 2-2. 분자 아형 별 세포주의 표면 바이오마커 발현 분석
- [0118] 유세포 분석기(FACS LSR Fortessa 시스템, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 최적의 BEV 분리를 위한 EV 표면 바이오마커를 평가하였다. 면역 비드를 준비하고 MCF10a, MCF7, BT-474, SK-BR-3, HCC1395, MDA-MB-231, Hs578T, HCC70, MDA-MB-453, HCC1187, MDA-MB-468, 및 HCC193을 포함한 다양한 유방 세포주로부터 유래된 EV와 함께 25℃에서 2시간 동안 배양하였다. 과도한 결합 반응을 방지하기 위해 PBS 완충액으로 후속 세척을 두 번 수행하였다. 그 후, 샘플을 5 μL의 항-CD63-PE-Cy7 항체(cat. 561982; Becton Dickinson)와 함께 4℃에서 30분 동안 빛을 차단하여 배양하였다. 도 4의 (a) 및 (b)에 나타난 바와 같이, 상기 와 같은 포괄적인 유동 세포 계측법 분석을 통해 EpCAM, ITGA2(CD49b) 및 ITGAV(CD51)가 유방 종양의 특성을 상

대적으로 정확히 반영하는 BEV를 분리하기 위한 가장 효과적인 바이오마커 조합임을 확인하였다.

## 실시예 3

### [0119] BEV의 miRNA 분석

#### [0120] 3-1. 임상 코호트 연구

[0121] 총 220명의 대상자(유방암 환자 115명, 유방 양성 질환 환자 48명, 유방 관련 질환이 없는 여성 47명)는 연구 목적으로 인체 유래물 활용에 대한 사전 동의 후 본 연구에 등록되었다. 본 연구에 등록된 임상 샘플은 연세대학교 의과대학 연구윤리위원회로부터 심의를 받았다(IRB No. 4-2020-1292, 2021년 1월 4일 승인). 유방암 환자 근치적 외과 수술 전, 외래를 통해 채혈하여 샘플을 확보하였다. 분석에 포함하기 위한 대상자 선정 기준은 다음과 같다: (1) 채혈 전, 화학 요법 또는 방사선 요법 등의 치료를 받지 않음, (2) 암 코호트 등록을 위한 유방암 또는 유방 양성 질환으로 확인된 영상의학적, 병리학적 진단 결과 확인, (3) 육안 검사를 통해 용혈이 되지 않음, (4) 다른 악성 종양 및 병력이 없음.

#### [0122] 3-2. 샘플 준비

[0123] 혈액을 EDTA 튜브(0.02%)에 수집하고 1500 x g에서 15분 동안 원심분리하였다. 그 후, 상층액(혈장)을 분리하여 -80℃에 보관했다. EV 분리를 위해 혈장 샘플을 해동하고, 먼저 4℃에서 10분 동안 2000 x g에서 원심분리한 다음 30분 동안 10,000 x g에서 원심분리하여 사전 정화하였다. 그런 다음 0.22 μm Millipore 필터(cat. SLGPR33RB, Merck Millipore Ltd., Billerica, MA, USA)를 통한 여과를 수행하고, 200 μL의 정제된 혈장 분취량을 추가 EV 분리 단계에 사용하였다.

[0124] 임상 샘플을 사용하는 실험 세팅에서, EV 분리는 전체 EV (TEV) 분리와 유방암 유래 EV(BEV) 분리로 분류되었다. 구체적으로, TEV는 상용 침전 기반 Total Exosomes Isolation 키트(Invitrogen, Pleasanton, CA, USA)를 사용하여 200 μL의 혈장으로부터 분리하였고, BEV는 면역 친화성 기반 방법을 사용하여 분리하였다. BEV의 면역학적 포획을 위해, EpCAM, CD49b 및 CD51에 대한 비오틴화된 항체와 결합된 자기 비드(Dynabeads™ M-270 Streptavidin, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였다.

#### [0125] 3-3. 유방암에서 과발현하는 miRNA 선정

[0126] 유방암(BC)의 발병 및 진행과 관련된 microRNA(miRNA)를 탐색하기 위해, NCBI(National Center for Biotechnology Information) GEO(Gene Expression Omnibus) 데이터베이스의 10개 데이터 세트를 활용하여 miRNA에 대한 광범위한 차등 발현 분석을 수행하였다. 조직 유래 miRNA 데이터 세트(GSE26659, GSE44124, GSE45666, GSE97811 및 GSE154255)와 순환 miRNA 데이터 세트(GSE42128, GSE73002, GSE98181, GSE110317 및 GSE118782)에서 과발현 임상 데이터를 평가하였다.

[0127] 도 5의 (a) 및 (b)에 나타난 바와 같이, 볼케이노 플롯을 활용하여 유방암 환자와 대조군 사이의 miRNA 발현 차등을 시각화하여 유방암과 관련하여 상당히 상향 조절되거나 하향 조절된 miRNA를 식별하였다. 도 5의 (c)에 나타난 바와 같이 차등적으로 발현된 miRNA(DEM)의 초기 식별에 이어 벤 다이어그램 비교를 통해 분석을 더욱 개선하였다. 이 단계는 앞서 언급한 데이터 세트의 DEM 목록 교차를 허용하는 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>에서 사용할 수 있는 온라인 도구를 사용하여 수행하였다.

#### [0128] 3-4. 유방암 세포주 및 조직을 이용한 유방암 특이적 miRNA의 발현 패턴 분석

[0129] 본 발명자들은 유방암 특이적 막단백질을 이용하여 분리한 BEV 내 miRNA 발현이 TEV와 다를 수 있다고 추측하였고, 유방암에 보다 특이적일 것으로 예상하였다. TCGA 공개 데이터베이스와 연구 문헌의 검토를 통해 13종의 후보 miRNA를 선정하고, 다양한 유방암 세포주와 임상 검체(조직)에서 이들 후보 miRNA의 발현 수준을 확인하였다.

[0130] BEV의 miRNA 프로파일을 검증하기 위해, 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 수행하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 Total Exosome RNA and Protein Kit(cat. 4478545, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 세포 배지 또는 혈장에서 miRNA를 추출하였다. Qubit® 2.0 형광계(cat. Q32866; Thermo Fisher Scientific Inc.)와 함께 Qubit™ microRNA Assay 키트(cat. Q32880; Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 RNA 농도를 측정하였다. 추출된 RNA는 TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit(cat. 4366597; Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 역전사하였다. 후보 miRNA(miR-21-5p, miR-106b-5p, miR-155, miR-181a, miR-484 및 miR-1290)의 차등 발현 수준은 TaqMan Universal PCR Master Mix, No



AmpErase UNG(cat. 4324018, Thermo Fisher Scientific Inc.) 및 TaqMan microRNA Assay 키트 (cat. 4440887, Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용한 cDNA 증폭 반응을 통해 측정하였다. 각 miRNA는 CFX96 실시간 PCR 시스템(cat. 3600037; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)에서 다음 조건으로 역전사되었다: 프라 이머를 어닐링하기 위해 16 °C에서 30분, 확장을 위해 42 °C에서 30분, 반응을 중지하기 위해 85°C에서 5분.

[0131] 그런 다음 cDNA를 사용하여 다음 조건으로 실시간 PCR을 실행하였다. 95°C에서 10분 동안 효소 활성화를 수행한 후 95°C에서 15초 동안 변성시키고 60°C에서 10분 동안 어닐링 및 신장으로 구성된 40주기를 수행하였다. miRNA 발현 수준은 EV 유래 miRNA에 대한 내부 대조군으로 miR-16-5p를 사용하여 표준화하였다.  $2^{-\Delta \Delta CT}$  방법으로 BEV에서 miRNA의 상대적 발현을 결정하였다.

[0132] 그 결과, 도 6 및 7에 나타난 바와 같이, 7개의 miRNA(miR-21, miR-155, miR-1290, miR-106b, miR-181a, miR-484, miR-1260b)가 유방암 조직 및 유방암 세포주에서 공통적으로 과발현하는 것으로 확인되었다.

#### 실시예 4

[0133] **면역친화방법의 임상적 성능 검증**

[0134] 실시예 3-4에서 확인된 7개의 miRNA를 이용하여 BEV를 분리하는 방법의 임상적 성능을 평가하였다. 유방암 유래 BEV 내 선정된 후보 miRNA의 발현 패턴을 분석하기 위해, 총 40명(유방암 환자 20명, 유방암이 아닌 여성 20명)의 혈장을 이용하여 qRT-PCR 분석 및 비교를 수행하였다. 도 8은 최종 결과물을 요약한 것이다. BEV와 TEV에서 유래한 7종의 후보 miRNA의 발현 수준을 비교한 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 TEV 대비 BEV에서 miR-21, miR-106b, miR-181a, miR-484 및 miR-1260b의 발현이 유의적으로 상향 조절되는 것을 확인하였다. BEV와 TEV에서 유래한 7종의 후보 miRNA의 임상적 성능 비교 분석한 결과, 도 9에서 확인되는 바와 같이 BEV 유래 miR-21, miR-106b, miR-181a, miR-484 및 miR-1260b가 TEV 대비 높은 AUC(area under the curve)를 보였고, 특히 miR-21과 miR-106b는 통계적으로 유의미한 차이를 보였다.

#### 실시예 5

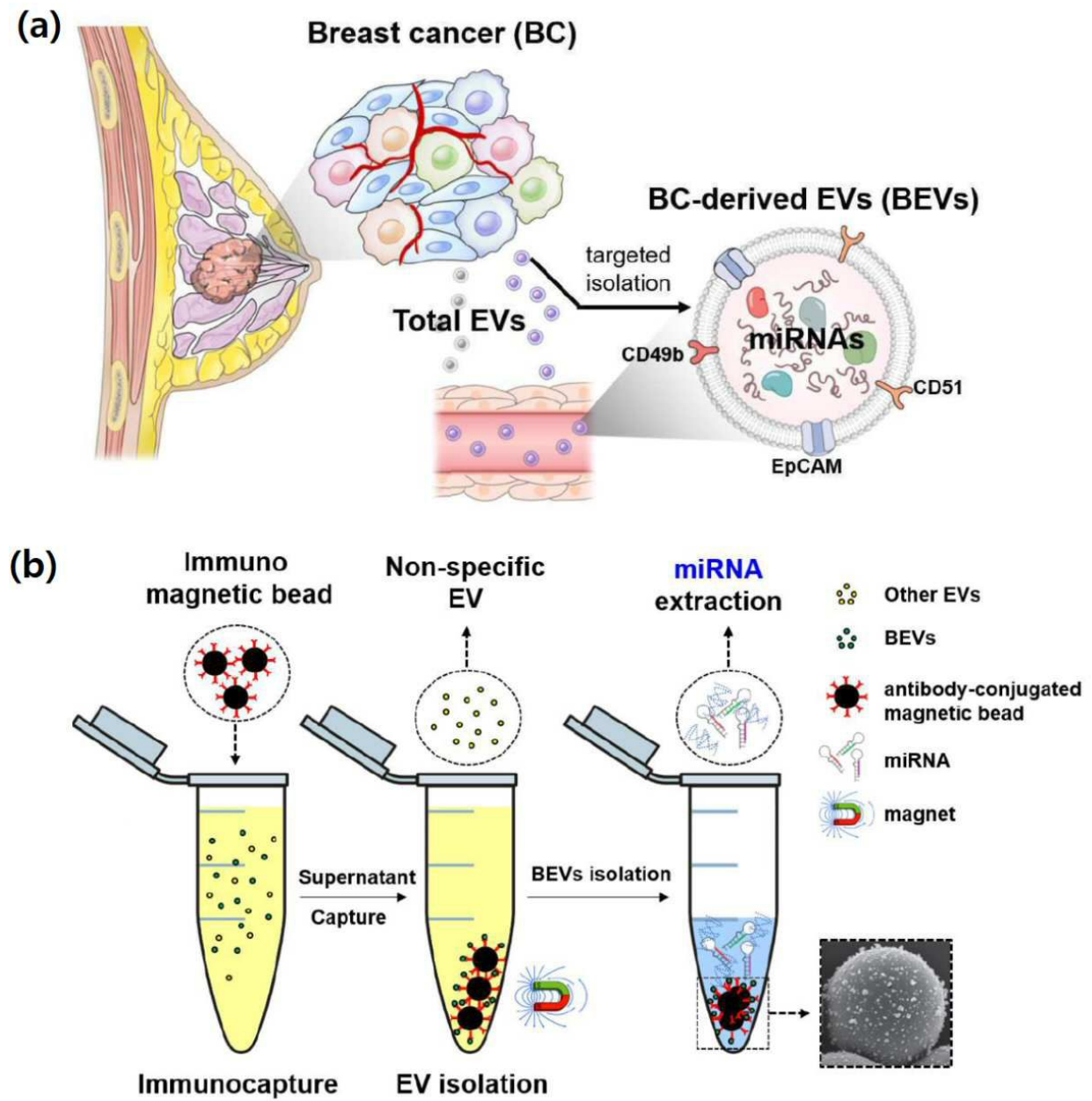
[0135] **면역친화방법의 유효성 검증**

[0136] 실시예 4를 통해 BEV 분리 방법에 따른 miRNA 분석의 임상적 성능이 검증되었고, 유효성을 확인하기 위해 총 220명(유방암 환자 115명, 유방 양성 질환 환자 48명, 정상 대조군 47명)의 혈장으로부터 TEV와 BEV를 분리하고, 각 miRNA를 qRT-PCR을 통해 비교 분석을 수행하였다. 분석 결과, 도 10에서 확인되는 바와 같이 면역친화방법으로 수득된 유방암 유래 BEV 내 5개의 후보 miRNA (miR-21, miR-106b, miR-181a, miR-484 및 miR-1260b)의 발현이 TEV 대비 유방암 환자의 혈장에서 상향 조절되었고, 통계적으로 유의미한 차이를 보였다.

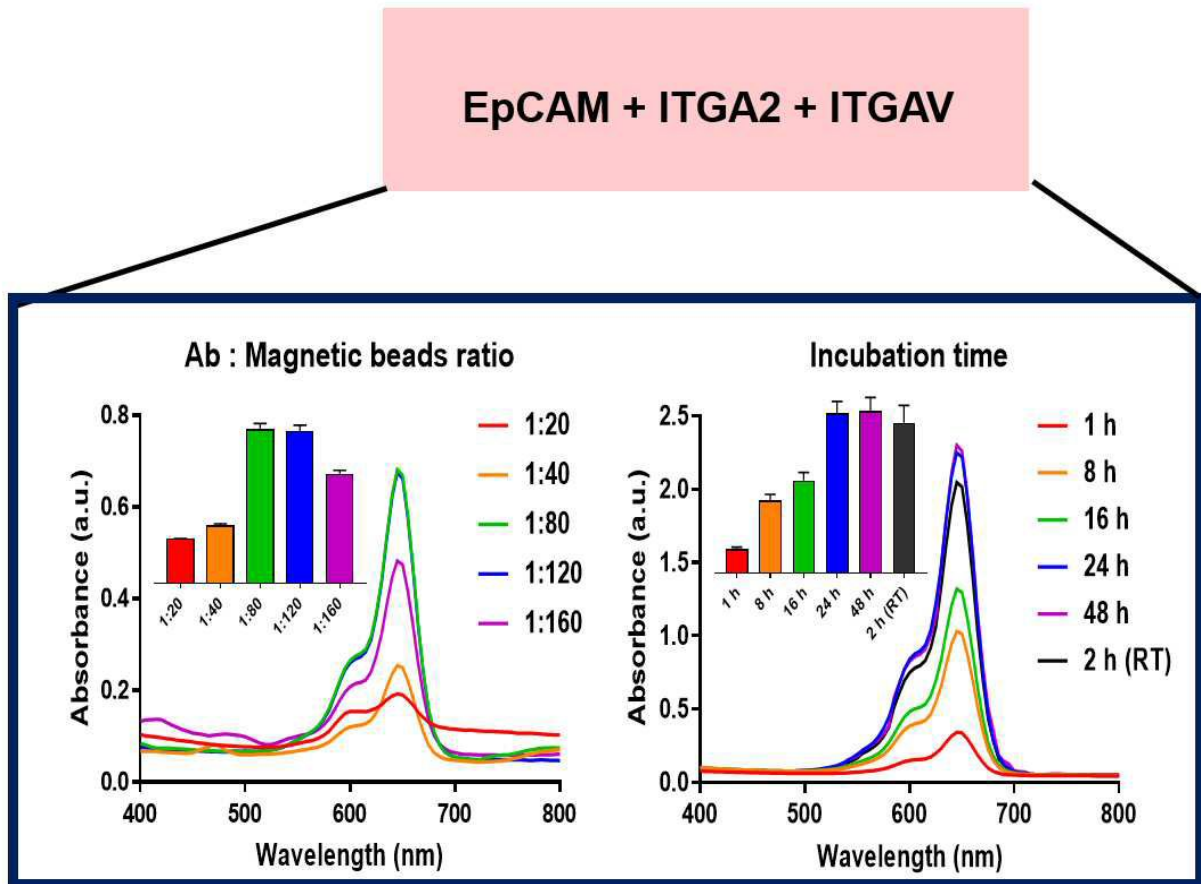
[0137] BEV 분리방법과 TEV 분리방법의 임상적 성능의 차이를 확인하기 위해 각 miRNA에 대한 수신자 조작 특성 분석을 수행하였다. 전체 EV와 유방암 유래 EV의 임상적 성능의 차이를 분석 결과, 도 11에서 확인되는 바와 같이 miR-181a를 제외한 모든 miRNA의 AUC 차이는 유방암 유래 EV에서 통계적으로 유의하게 높았다. 따라서, 유방암 진단을 위한 BEV 분리 및 분석의 효과를 확인하였다.

도면

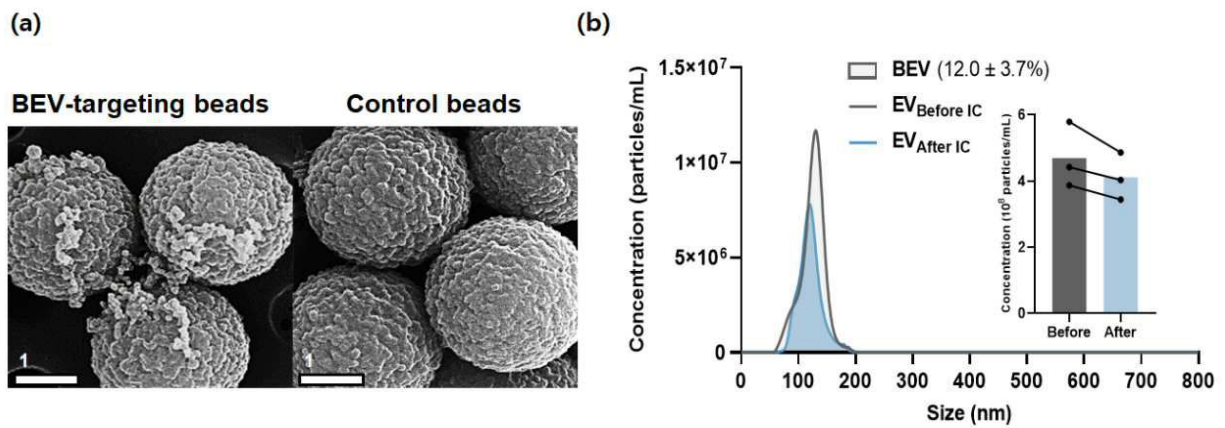
도면1



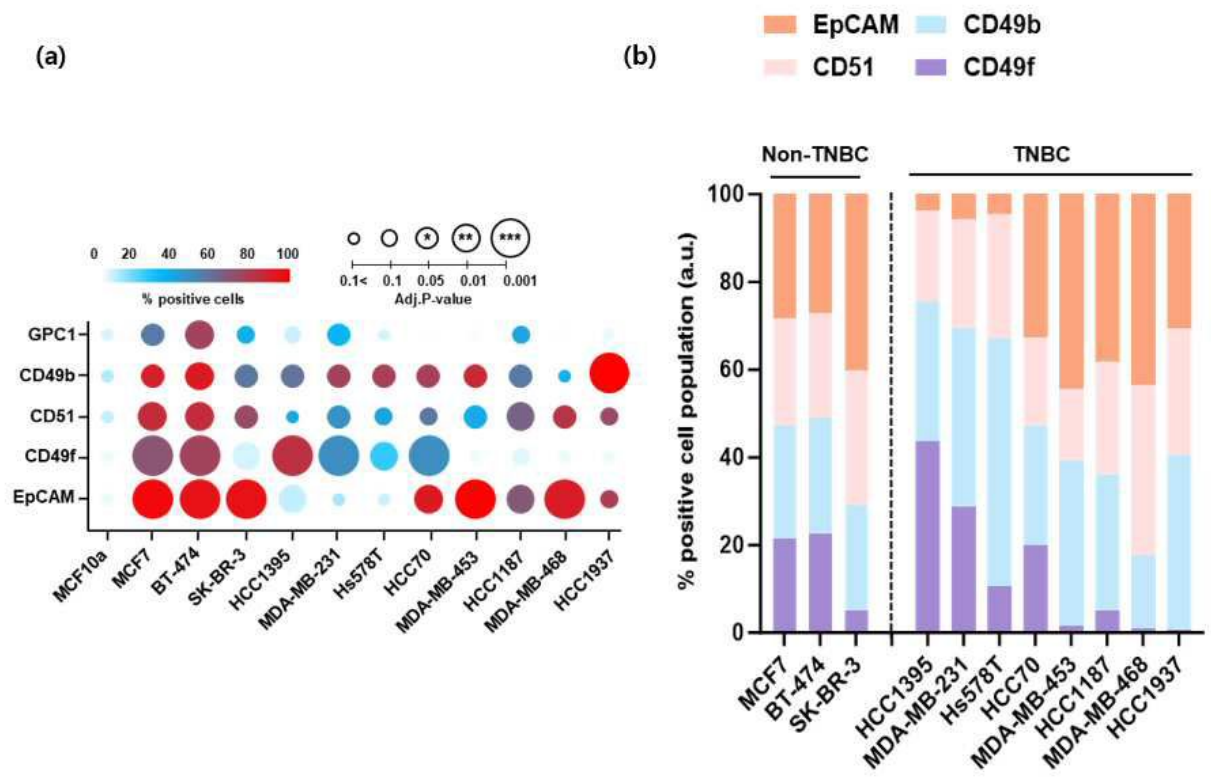
도면2



도면3

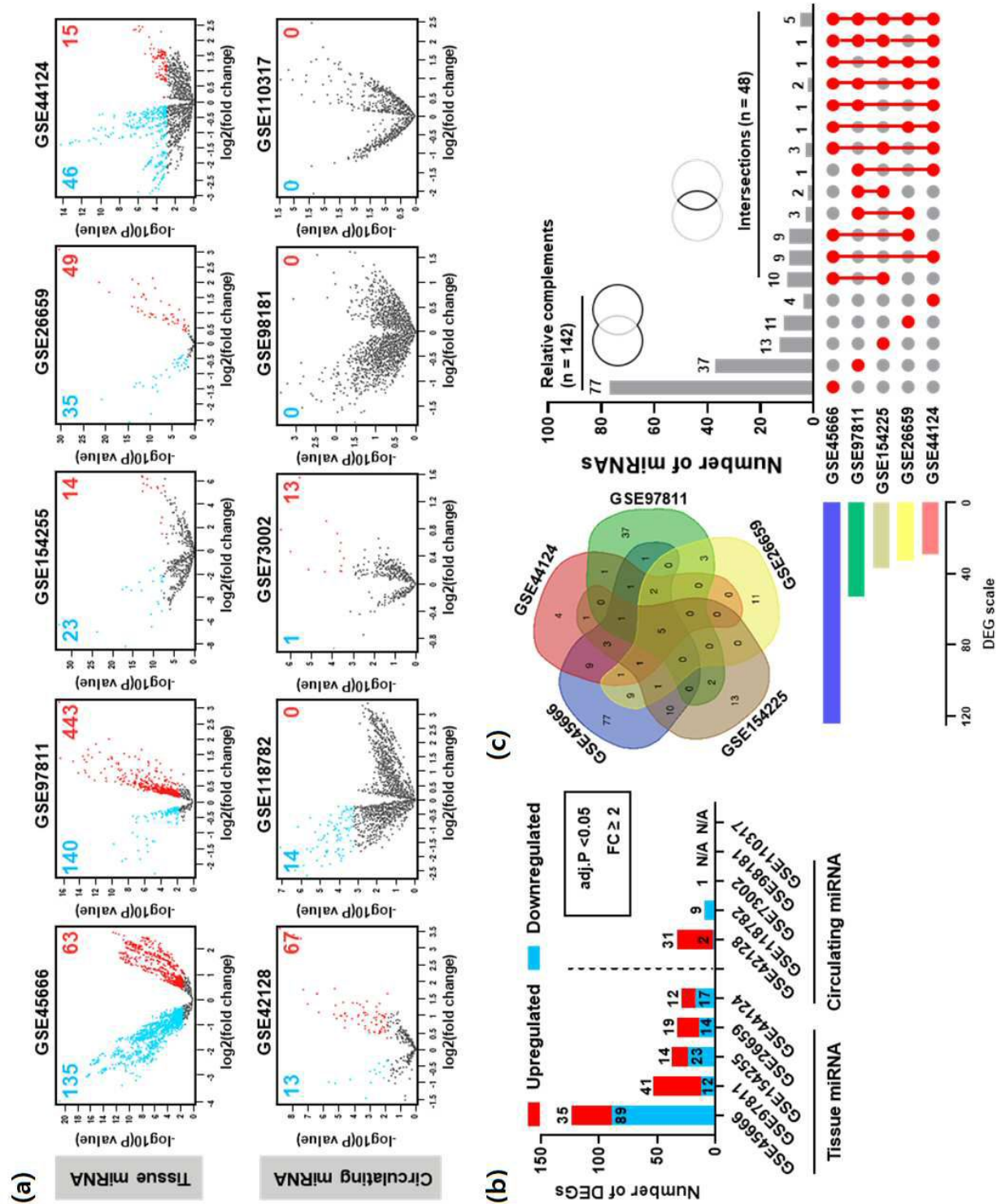


도면4

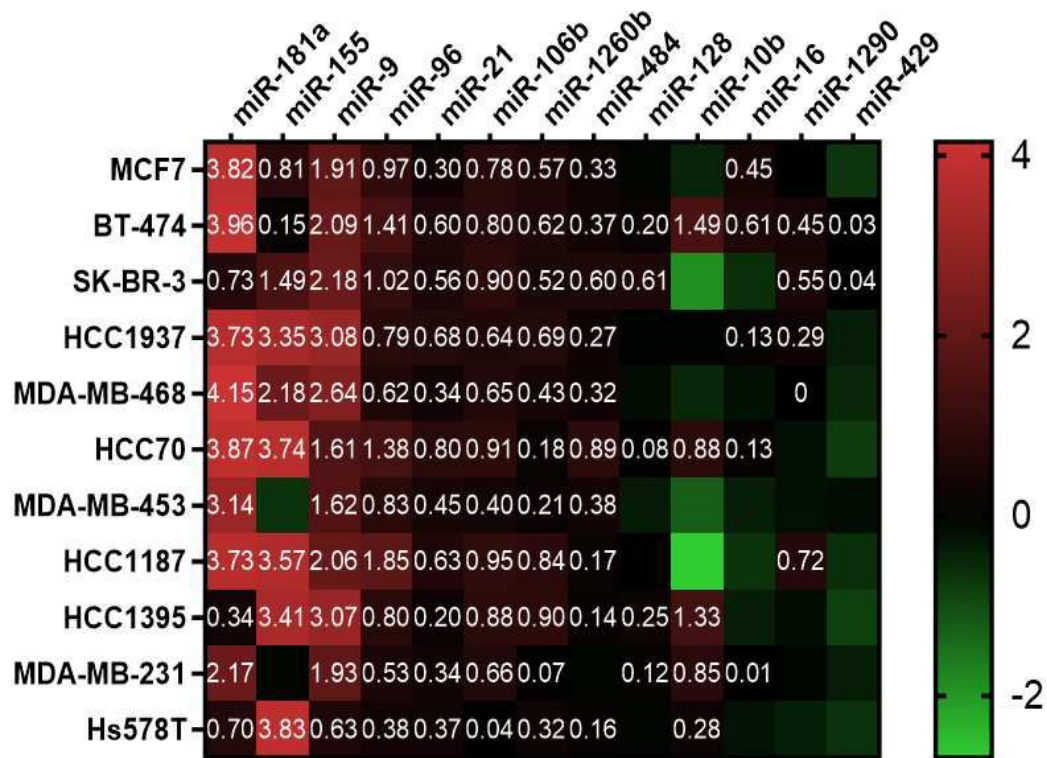




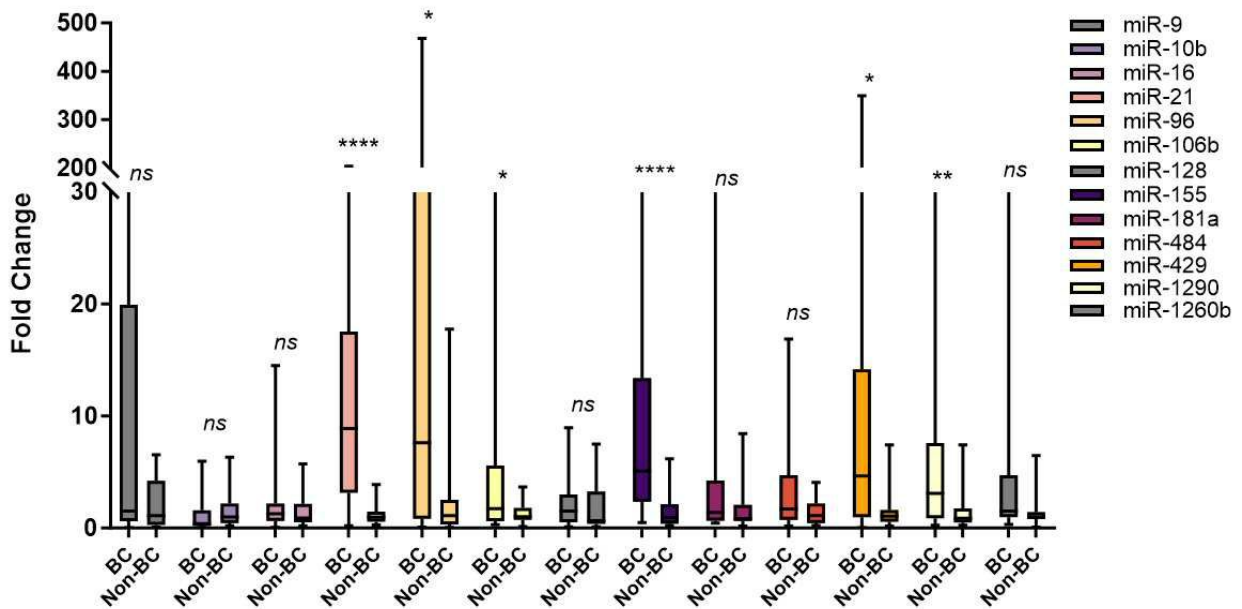
도면5



도면6

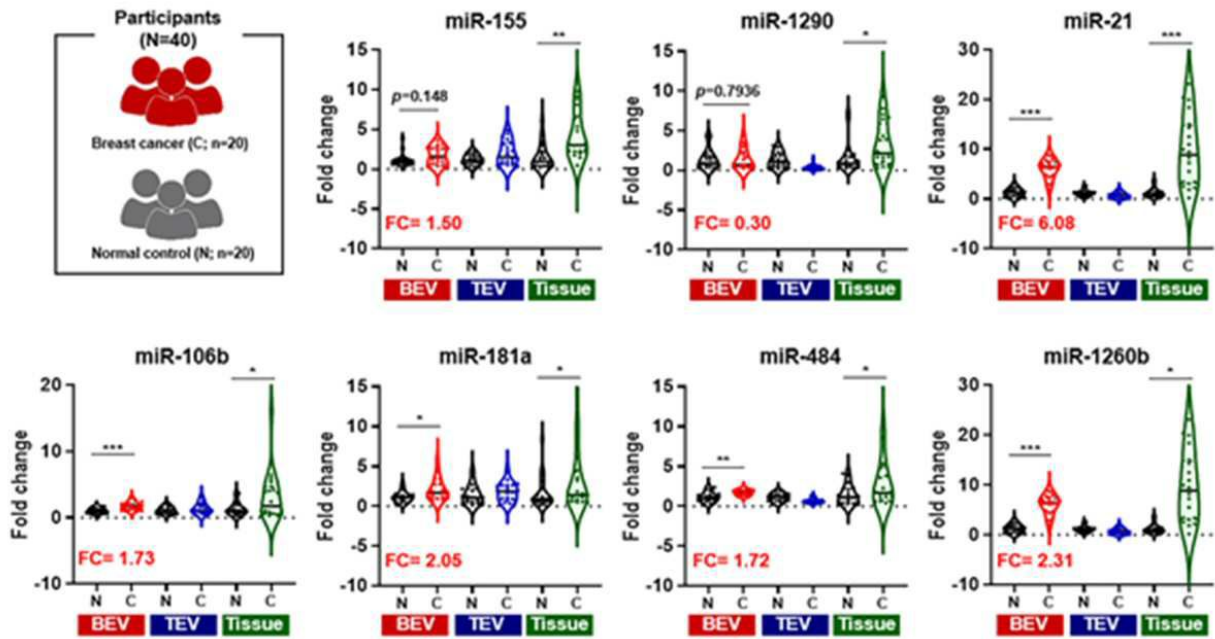


도면7

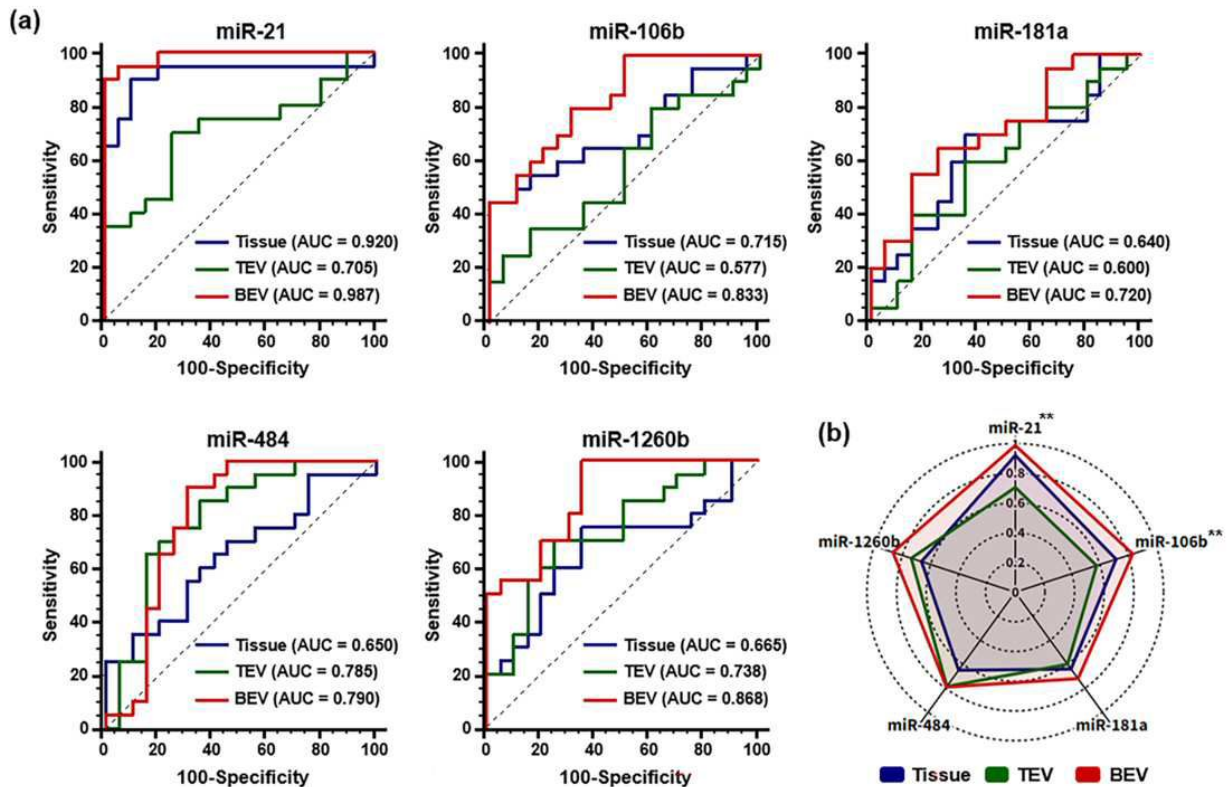




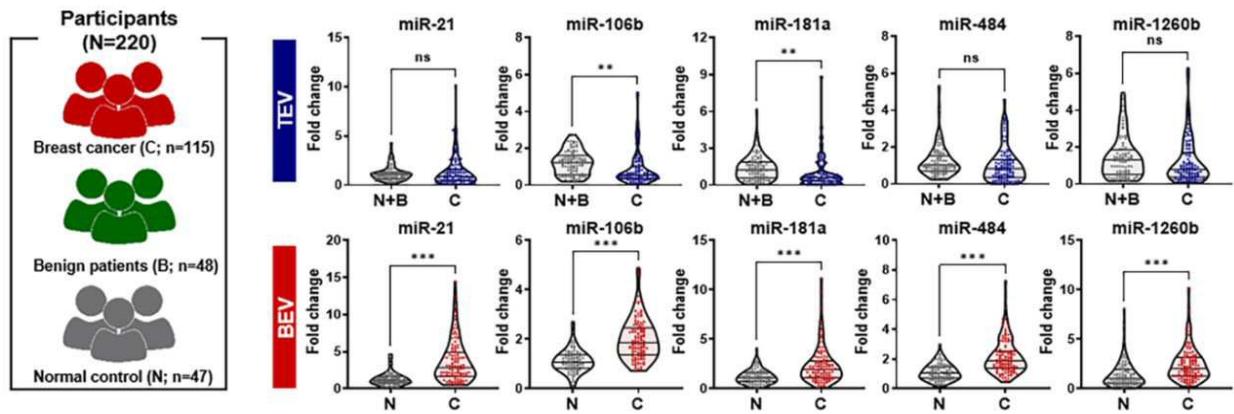
도면8



도면9



도면10



도면11

