



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0081952  
(43) 공개일자 2013년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/574 (2006.01) C12N 5/095 (2010.01)  
(21) 출원번호 10-2012-0003081  
(22) 출원일자 2012년01월10일  
심사청구일자 없음

(71) 출원인  
삼성전자주식회사  
경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)  
아주대학교산학협력단  
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)  
(72) 발명자  
김연정  
경기도 용인시 기흥구 농서동 삼성종합기술원 기  
숙사  
김유선  
경기도 수원시 영통구 매탄2동 이편한세상아파트  
106-1604  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
리앤목특허법인

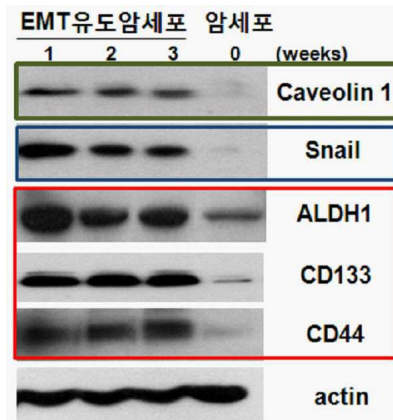
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **암 진단용 바이오마커 및 이를 이용한 암세포 분리 방법**

**(57) 요약**

암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 검출용 바이오마커 및 이를 포함하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 검출 키트, 이를 이용한 암 진단 방법 및 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 분리 방법에 관한 것이다. 일 구체예에 따른 암 진단용 바이오마커 및 그의 항체를 포함하는 키트에 따르면, 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 효율적으로 검출, 분리할 수 있다.

**대표도** - 도4



(72) 발명자

**이정건**

서울특별시 송파구 문정2동 휘미리아파트 223-406

**백상현**

경기도 화성시 반송동 시범한빛마을동탄아이파크아파트 228-204

**오진미**

경기도 수원시 영통구 영통2동 벽적골9단지아파트 944-1512

**정효영**

인천광역시 부평구 산곡2동 경남3차아파트 303-101

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

정상 세포와 비교하여 암세포에서 발현이 상대적으로 증가하는 카베올린-1(Caveolin-1)을 포함하는 암 줄기세포(cancer stem cell) 또는 상피-간엽 전환(epithelial-mesenchymal transition)된 혈중 종양세포 검출용 바이오마커.

**청구항 2**

카베올린-1 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 검출용 키트.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키트.

**청구항 4**

제2항에 있어서, 상기 항체는 단일클론 항체인 것인 키트.

**청구항 5**

암의 발병이 의심되는 생물학적 시료로부터 카베올린-1의 발현이 정상세포에 비해 상대적으로 증가하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 검출하는 단계; 및

상기 검출 결과로부터 상기 생물학적 시료의 암의 발병 여부를 판단하는 단계를 포함하는, 암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 생물학적 시료로부터 카베올린-1을 검출하는 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 뇨, 점막액, 양수 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 7**

생물학적 시료로부터 세포 표면에 카베올린-1이 발현된 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 검출하는 단계; 및

상기 생물학적 시료로부터 상기 검출된 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 분리하는 단계를 포함하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 분리 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 뇨, 점막액, 양수 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 검출용 바이오마커 및 이를 포함하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 검출 키트, 이를 이용한 암 진단 방법 및 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 분리 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 종양의 전이는 고형암을 가진 환자에서 종양의 일부분이 떨어져 나와 혈액을 통해 체내의 다른 부분으로 이동하

는 현상으로 암과 관련된 사망에서 중요한 부분을 차지하고 있다. 현재 암을 진단하는 일반적인 방법은 초기 전이상태에서 조직의 일부분을 떼어내어 조사하는 생검(biopsy)인데, 정확한 생검부위를 결정하는 것은 쉽지 않은 단점이 있다. 이에 반해 근래에 들어 주목받고 있는 액체생검(liquid biopsy) 방법은 간단히 혈액시료만을 채취하여 혈액내에 존재하는 혈중종양세포를 검출하는 것으로 암의 진행과 암의 치료의 경과를 가늠할 수 있을 뿐만 아니라 초기의 검출과 진단에도 유용하다고 여겨지고 있다.

- [0003] 전이성 암환자들의 치료결과를 빨리 확인하고 약제의 효과를 민감하게 반영하는 검사기법의 필요성이 대두되면서 암이 전이되는 과정에서 종양 침습(tumor invasion) 과정을 거쳐 혈액 내에 존재하는 암세포(circulating tumor cell; CTC) 또는 다른 장기에 임상적으로 발견되지 않는 채로 존재하는 암세포 (disseminated tumor cell; DTC)의 검출에 주목하고 있다.
- [0004] 순환 종양세포(CTC)은 혈액 중에 존재하여 체내를 순환하는 희소의 종양세포를 일컫는 것으로 종양의 전이에 중요한 역할을 담당하므로 혈중 종양세포들을 검출하는 것은 암 진단과 치료에 오랫동안 중요한 숙제로 남아있다.
- [0005] 현재의 항암 치료는 이러한 CTC 나 DTC의 존재 유무의 확인 없이 거의 대부분의 환자들에게 일률적으로 항암제가 투여되고 있어 CTC의 발견(detection) 및 분석(analysis) 연구를 통해 CTC의 존재 유무에 따른 선별적인 항암제의 투여, 또는 CTC의 분자적 특성에 따른 맞춤형 약물 투여를 통해 약물 효능(efficacy)의 증진이 필요하다.
- [0006] 혈중 종양 세포는 암의 전이 및 재발에 관여하는 인자로 알려져 있으며, 특히 최근 암 연구의 큰 화두중 하나인 암 줄기 세포(cancer stem cell)를 포함하고 있을 가능성이 제시되면서 혈중 종양 세포에 대한 분석을 통해 기존의 조직 검사로 얻을 수 없는 새로운 암 예후 예측의 가능성 및 이를 바탕으로 한 환자 맞춤형 치료법의 개발이 가능할 것으로 기대된다.
- [0007] 하지만, 이러한 혈중 종양 세포는 혈액 내에서 그 양이 매우 적고 세포 자체가 연약하여 이를 감지하고 그 수를 파악하기가 매우 어렵다. 따라서, 환자의 체내에 존재하는 혈중 종양 세포, 암 세포 또는 암 줄기 세포를 검출할 수 있는 높은 민감성을 나타내는 진단 방법이 여전히 필요하며, 생물학적 시료 중에 포함된 혈중 종양 세포를 효율적으로 분리하는 방법 및 이와 관련된 장치가 여전히 요구되고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0008] 일 구체예는 카베올린-1(Caveolin-1)을 포함하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 검출용 바이오마커를 제공한다.
- [0009] 다른 구체예는 카베올린-1 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 검출용 키트를 제공한다.
- [0010] 또 다른 구체예는 암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 생물학적 시료로부터 카베올린-1을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0011] 다른 구체예는 카베올린-1을 바이오마커로 사용한 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 분리 방법을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

- [0012] 일 양상은 정상 세포와 비교하여 암세포에서 발현이 상대적으로 증가하는 카베올린-1(Caveolin-1)을 포함하는 암 줄기세포(cancer stem cell) 또는 상피-간엽 전환(epithelial-mesenchymal transition)된 혈중 종양세포 검출용 바이오마커를 제공한다.
- [0013] 카베올린-1은 CAV1 유전자로부터 발현되는 단백질로서, 인간 대부분의 세포 종류에서 발견되는 세포막에서의 함몰 구조인 카베올레(caveolae)에 존재하는 주 단백질이며, 세포 주기(cell cycle) 진행을 증진시키는 과정에 관여하는 단백질로 알려져 있으며, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질이다.
- [0014] 일 구체예에 따르면, 상기 카베올린-1은 암세포, 예를 들어, 암 줄기세포(cancer stem cell) 또는 상피-간엽 전환(epithelial-mesenchymal transition)된 혈중 종양세포에서 기존에 바이오마커로 사용되는 단백질들과 발현의 증가 패턴이 동일한 양상을 나타내므로, 암 진단용, 특히, 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를

검출할 수 있는 바이오마커로서 사용될 수 있다.

- [0015] 다른 양상은 카베올린-1 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 검출용 키트를 제공한다.
- [0016] 상기 카베올린-1의 단편은 예를 들어, 면역원성 단편일 수 있으며, 이는 상기 바이오마커 단백질인 카베올린-1에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 에피토프(epitope)를 가지고 있는 바이오마커 단백질의 단편을 의미한다.
- [0017] 일 구체예에 따른 암 진단용 키트는 당업자에 알려진 종래의 제조방법에 의해 제조될 수 있으며, 전형적으로 동결 건조 형태의 항체와 버퍼, 안정화제, 불활성 단백질 등을 포함할 수 있다. 상기 항체는 방사종(radionuclides), 형광원(fluorescens), 효소(enzymes) 등에 의해 표지화될 수 있다.
- [0018] 일 구체예에 따르면, 상기 키트는 암세포, 예를 들어, 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 검출하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0019] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 폴리클론 항체 또는 단일클론 항체일 수 있다.
- [0020] 상기 폴리클론 항체는 당업자에 알려진 종래 방법에 따라 면역원인 바이오 마커 단백질 또는 그 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유 동물을 사용할 수 있다. 상기 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사 방법으로 주사되는 경우, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여될 수 있다. 이후, 외부 숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리, 정제할 수 있다.
- [0021] 상기 단일클론 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술에 의해 제조될 수 있다. 단일클론 항체의 제조 방법에 대해 간단히 설명하면, 상기 단백질을 정제하여 적당량(약 10 $\mu$ g)을 Balb/C 마우스에 면역화를 시키거나, 상기 단백질의 폴리펩티드 단편을 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 마우스에 면역화시킨 다음, 마우스에서 분리된 항원-생산 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 융합하여 불멸화된 하이브리도마를 생성하며, ELISA 방법을 사용하여 원하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포만을 선택하여 증식한 후 배양물로부터 단일클론 항체를 분리, 정제할 수 있다.
- [0022] 한편, 일 구체예에 따른 단일클론 항체는 면역분석 키트(예를 들어, ELISA, antibody coated tube test, lateral-flow test, potable biosensor)에 다양하게 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 보다 높은 특이도와 민감도를 나타내는 항체의 개발을 통한 다양한 암세포 검출 스펙트럼을 갖는 단백질 칩 개발에도 이용될 수 있다.
- [0023] 일 구체예에 따르면, 상기 항원 결합 단편은 scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다. 용어, "항원 결합 단편"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩티드의 일부를 의미한다. 상기 항원 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(C<sub>H1</sub>)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C<sub>H1</sub> 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')<sub>2</sub> 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [0024] 또 다른 양상은 암의 발병이 의심되는 생물학적 시료로부터 카베올린-1의 발현이 정상세포에 비해 상대적으로 증가하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 검출하는 단계; 및 상기 검출 결과로부터 상기 생물학적 시료의 암의 발병 여부를 판단하는 단계를 포함하는, 암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 생물

학적 시료로부터 카베올린-1을 검출하는 방법을 제공한다.

- [0025] 상기 카베올린-1을 검출하는 방법에 따르면, 상기 방법은 우선, 암의 발병이 의심되는 생물학적 시료로부터 카베올린-1의 발현이 정상세포에 비해 상대적으로 증가하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0026] 상기 검출하는 단계는 상기 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 검출용 키트를 사용할 수 있으며, 상기 카베올린-1의 검출 방법은 면역분석 방법을 사용할 수 있다. 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석(immunoassay) 또는 면역염색(immunostaining) 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 또는 면역염색 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예를 들어,  $C^{14}$ ,  $I^{125}$ ,  $P^{32}$  및  $S^{35}$ )로 표지된 항체가 카베올린-1을 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [0027] 상기 키트가 예를 들어, ELISA 방법을 이용하도록 제작되는 경우, 상기 키트를 이용한 특정 실시예는 (i) 정상인 개체와 암이 의심되는 개체의 혈액 시료를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 이차항체로서의 카베올린-1 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체와 상기 혈액 시료를 접촉시켜 항원-항체 반응을 유도시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0028] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예를 들어, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다. 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제,  $\beta$ -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬  $P_{450}$ 을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl 및 pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0029] 상기 키트가 예를 들어, 캡처-ELISA 방법을 이용하도록 제작되는 경우, 상기 키트를 이용한 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 카베올린-1 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 암이 의심되는 개체의 혈액 시료를 접촉시켜 항원-항체 반응을 유도하는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 표지가 결합되어 있고, 카베올린-1에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 표지로부터 발생하는 시그널을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 표지를 가질 수 있다. 상기 표지는 화학물질(예를 들어, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제,  $\beta$ -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬  $P_{450}$ ), 방사능물질(예를 들어,  $C^{14}$ ,  $I^{125}$ ,  $P^{32}$  및  $S^{35}$ ), 형광물질(예를 들어, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널이 검출은 카베올린-1의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 표지로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.
- [0032] 한편, 상기 키트는 카베올린-1 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 마이크로칩 상에 고정시킨 후, 개체로부터 분리된 생물학적 시료와 반응시켜 상기 항체 단백질에 대한 항원을 검출할 수 있는 마이크로칩

및 자동화된 마이크로어레이 시스템(microarray system)으로 제작되어, 한 번의 분석으로 대량의 시료를 분석할 수도 있다.

[0033] 일 구체예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 암세포, 예를 들어, 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양 세포를 포함하는 어떠한 시료라도 가능하며, 상기 생물학적 시료는 예를 들어, 혈액, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 뇨, 점막액, 양수 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

[0034] 이후, 상기 방법은 상기 검출 결과로부터 상기 생물학적 시료의 암의 발병 여부를 판단하는 단계를 포함할 수 있다.

[0035] 즉, 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 암을 진단할 수 있다. 예를 들어, 암이 의심되는 개체의 시료(예를 들어, 혈액)에서 카베올린-1에 대한 시그널이 정상 개체의 시료보다 강하게 나오는 경우에는 암으로 진단될 수 있다.

[0036] 다른 양상은 생물학적 시료로부터 세포 표면에 카베올린-1이 발현된 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 검출하는 단계; 및 상기 생물학적 시료로부터 상기 검출된 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 분리하는 단계를 포함하는 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 분리 방법을 제공한다.

[0037] 상기 암세포 분리 방법에 따르면, 상기 방법은 우선, 생물학적 시료로부터 세포 표면에 카베올린-1이 발현된 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0038] 일 구체예에 따르면, 상기 암세포는 예를 들어, 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포일 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

[0039] 상기 설명한 바와 같이, 카베올린-1은 암세포, 특히, 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 검출하기 위한 바이오마커로서 사용될 수 있으므로, 카베올린-1의 검출은 카베올린-1의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 사용하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 상기 검출은 카베올린-1의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 형광 물질과 같은 검출 가능한 표지가 결합된 비드를 사용하여, 생물학적 시료 내에 포함된 암세포 표면의 카베올린-1과의 항원-항체 반응을 통해 이루어질 수 있다.

[0040] 이후, 상기 방법은 상기 생물학적 시료로부터 상기 검출된 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0041] 예를 들어, 상기와 같이 카베올린-1의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 형광 물질과 같은 검출 가능한 표지가 결합된 비드를 사용하여 암세포를 검출한 경우라면, 상기 분리는 원심 분리, 여과, 크로마토그래피 등과 같은 방법을 통해 상기 검출된 암세포를 분리할 수 있으며, 또한, 상기 분리된 암세포는 당업계에 널리 알려진 배양 방법을 통해 배양되어 실험의 목적에 적합하도록 사용될 수 있다.

### 발명의 효과

[0042] 일 구체예에 따른 암 진단용 바이오마커 및 그의 항체를 포함하는 키트에 따르면, 암 줄기세포 또는 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포를 효율적으로 검출, 분리할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 9종의 암세포주를 대상으로 Caveolin-1의 발현 정도를 확인한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸다.

도 2a 내지 도 2c는 MCF7 세포의 상피-간엽 전환이 유도되었음을 확인한 면역세포화학법(immunocytochemistry) 및 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸다. 도면에서 sphere는 상피-간엽 전환이 유도된 세포를 의미한다.

도 3은 상피-간엽 전환된 MCF-7과 정상 암세포에서 Caveolin-1 항체가 결합된 비드의 결합 정도를 비교한 결과를 나타낸다.

도 4는 상피-간엽 전환이 유도된 MCF7 세포에서 Caveolin-1, Snail, ALDH1, CD133 및 CD44의 발현 정도를 확인한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0044] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

**[0045] 실시예 1: 마이크로어레이를 통한 EpCAM 저발현 유방암 세포주에서 발현하는 단백질 검색**

[0046] Cancer Cell, 10(6):515-527), 2006을 참고하여 51종의 유방암 세포주를 EpCAM의 발현 유무로 나누고, 상기 세포주들의 표면에 발현되는 단백질을 마이크로어레이 데이터를 통해 분석하였다. EpCAM이 고발현되는 세포주는 R 75-1, SKBR3, MCF-7 등 총 20종이었고, EpCAM이 저발현되는 세포주는 MDA231, MDA436, MCF10A 등 총 31종이었다. 상기 분석 결과, EpCAM이 저발현되는 세포에서 Caveolin-1의 발현 수준이 높음을 확인할 수 있었다.

**[0047] 실시예 2: 암세포주에 따른 Caveolin-1의 발현 정도의 확인**

[0048] Caveolin-1의 발현 정도를 여러 암세포주에서 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다. 100 mm 컬처 디쉬에 DMEM 배지에서 유방암세포주(ZR75-1, SKBR3, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MCF10A)와 전립선암세포주(PC3, LnCAP, DU145)를 포함한 9종의 암세포주(ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입)를 배양시킨 다음, 세포 추출물(cell extract)을 얻었다. 20 ug의 세포 추출물을 Novex NuPAGE Bis-Tris Electrophoresis System (Invitrogen)을 이용하여 분리한 후, Nitrocellulose membrane (Invitrogen, cat.no #LC2006)에 옮겼다. 3%의 탈지유(skim milk)로 1시간 블로킹 후 Caveolin-1 항체(AbCAM, cat.no #2910)를 1:1000으로 희석하여 4℃에서 18시간 이상 반응시켰다. 이후, TBS-T 용액으로 충분히 세척하여 반응하지 않은 항체를 제거하고, 여기에 항체에 따라 염소 항-토끼 IgG-호스래디쉬 퍼옥시다제(goat anti-rabbit IgG-HRP)를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이후, TBS-T 용액으로 충분히 세척 후 퍼옥시다제의 기질용액(Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate, cat.no#32106)을 가하여 발생하는 형광을 측정하여 발현 정도를 비교하였다.

[0049] 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, 9종의 암세포주 중 EpCAM이 발현되지 않는 MDA-MB-231, MDA-MB-436, DU145 세포주에서 Caveolin-1이 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다.

**[0050] 실시예 3: Caveolin-1 항체가 결합된 비드의 제작**

[0051] 직경 1 또는 3 μm의 COOH 폴리스티렌 비드(Polysciences, Inc)를 EDC(N-hydroxysuccinimide)/NHS(1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)로 처리한 후, 상기 제작한 PBS 용액에 넣고, Caveolin-1에 특이적으로 결합하는 항체(0.65 mg/ml)를 첨가하여 2시간 동안 상온에서 천천히 흔들어 주어, Caveolin-1에 특이적으로 결합하는 항체가 결합된 비드를 제작하였다.

**[0052] 실시예 4: 유방암 세포주에 인위적인 상피-간엽 전환의 유도**

[0053] 유방암 세포주 MCF7에 상피-간엽 전환을 유도하기 위하여 기존의 attachment culture (DMEM + 10% FBS) 방법이 아닌 하기의 momosphere culture 방법을 이용하였다. 배양배지는 DMEM-F12와 1 x B27, 20 ng/ml FGF, 20 ng/ml EGF 및 5 ug/ml 인슐린이 혼합된 배지를 사용하였고, Bacteria 100 mm 디쉬에 2 x 10<sup>5</sup> 세포를 접종한 후, 1주일 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 면역세포화학법(immunocytochemistry)을 통해 확인한 결과, 도 2a에서 보는 바와 같이, epithelial marker인 EpCAM의 발현이 없어지고, mesenchymal marker인 vimentin 발현이 증가하였음을 확인하였다. 또한, 웨스턴 블롯팅 결과, 도 2a에서 보는 바와 같이, 기존에 상피-간엽 전환 유도시 발현이 감소한다고 알려진 단백질인 β-catein이 감소하였고, 상피-간엽 전환 유도시 발현이 증가한다고 알려진 단백질인 snail, N-cadherin, vimentin이 증가함을 통해, 상피-간엽 전환이 유도되었음을 확인하였다. 이때, 도 2b 및 도 2c에서 보는 바와 같이, caveolin-1의 발현 정도 또한 현저히 증가함을 확인할 수 있었다.

**[0054] 실시예 5: Caveolin-1 항체가 결합된 비드와 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포의 결합 반응의 확인**

[0055] 상피-간엽 전환된 MCF-7 표면에서 Caveolin-1의 발현 여부를 확인하기 위해, 먼저, EpCAM을 고발현하는 세포주



인 MCF7를 대상으로 상기 실시예 4와 같이, 상피-간엽 전환을 유도시켰다. 이후, 상기 실시예 3에서 제작된 Caveolin-1 항체가 결합된 비드 30  $\mu$ l를 DMEM 배지에 부유된  $1 \times 10^5$  개의 상피-간엽 전환된 MCF-7에 각각 첨가하여 1시간 동안 방치한 다음, MCF-7과의 결합 여부를 형광 현미경(Olympus IX-81)을 사용하여 플루오로세인의 형광 세기를 통해 확인하였으며, 이때, EpCAM 항체가 결합된 비드를 비교실험으로 사용하였다. 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이, 상피-간엽 전환된 MCF-7에서 Caveolin-1 항체가 결합된 비드의 결합이 정상 암세포와 비교하여 확연히 증가하였음을 확인할 수 있었다. 이후, 상기 Caveolin-1 항체가 결합된 비드를 원심분리를 통해 분리하였다.

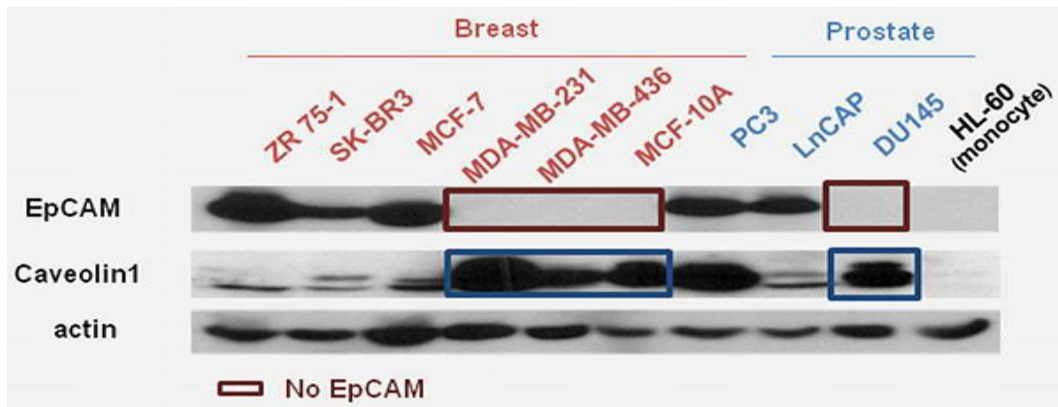
[0056] 실시예 6: 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 또는 암 줄기세포 마커로서 Caveolin-1의 확인

[0057] 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포 또는 암 줄기세포의 마커로 Caveolin-1이 사용될 수 있음을 확인하기 위하여 상피-간엽 전환이 유도된 MCF7을 대상으로 기존에 알려진 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포의 마커인 Snail 단백질과 암 줄기세포의 마커로 알려진 ALDH1, CD133 및 CD44의 발현 여부를 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다. 웨스턴 블롯팅은 1차 항체로 각각 Caveolin-1 항체(AbCAM, cat.no #2910), Snail 항체 (Cell signaling cat.no #3879), ALDH1 항체(AbCAM, cat.no #23375), CD133 항체 (AbCAM, cat.no #27699) 및 CD44 항체(Cell signaling cat.no #5640)를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하였다.

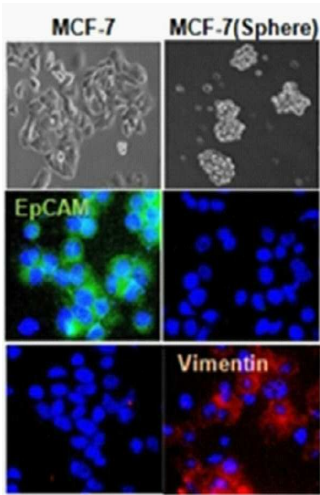
[0058] 실험 결과, 도 4에서 보는 바와 같이, 상피-간엽 전환이 유도된 MCF7 세포에서 Caveolin-1, Snail, ALDH1, CD133 및 CD44의 발현 정도가 증가하였음을 확인할 수 있었으며, 이는 Caveolin-1의 발현이 기존에 알려진 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포의 마커인 Snail, 또는 암 줄기세포의 마커인 ALDH1, CD133 및 CD44와 그 증가 패턴이 동일한 것으로 보아, Caveolin-1 또한 상피-간엽 전환된 혈중 종양세포의 마커 또는 암 줄기세포의 마커로 사용될 수 있음을 나타내는 결과이다.

도면

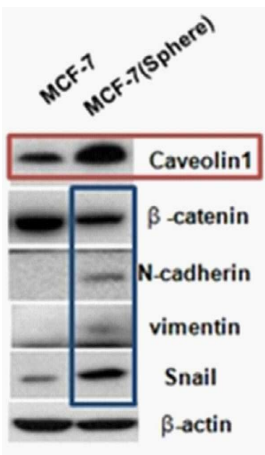
도면1



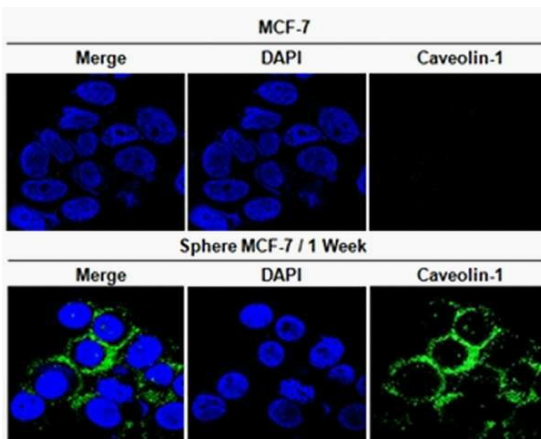
도면2a



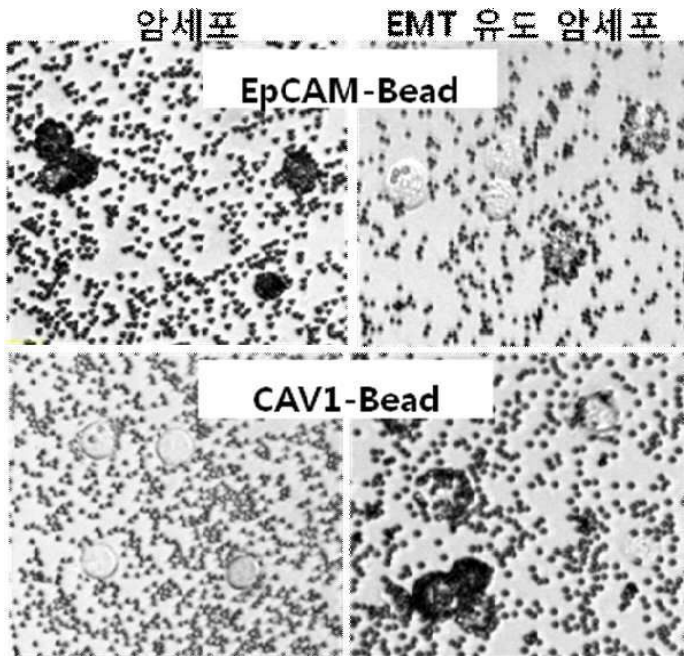
도면2b



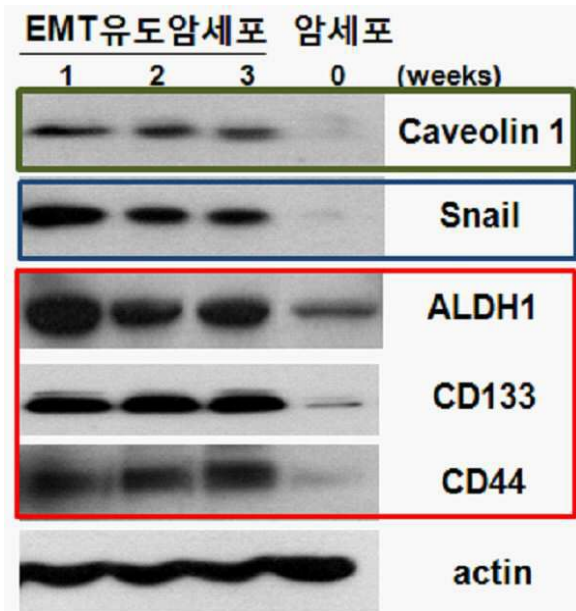
도면2c



도면3



도면4



서열목록

- <110> Samsung Electronics Co. Ltd
- <120> Biomarkers for diagnosing cancer and method for isolating cancer cell using the same
- <130> PN094922
- <160> 1
- <170> KopatentIn 1.71

<210> 1  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 Met Ser Gly Gly Lys Tyr Val Asp Ser Glu Gly His Leu Tyr Thr Val  
 1 5 10 15  
 Pro Ile Arg Glu Gln Gly Asn Ile Tyr Lys Pro Asn Asn Lys Ala Met  
 20 25 30  
 Ala Asp Glu Leu Ser Glu Lys Gln Val Tyr Asp Ala His Thr Lys Glu  
 35 40 45  
 Ile Asp Leu Val Asn Arg Asp Pro Lys His Leu Asn Asp Asp Val Val  
 50 55 60  
 Lys Ile Asp Phe Glu Asp Val Ile Ala Glu Pro Glu Gly Thr His Ser  
 65 70 75 80  
 Phe Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys  
 85 90 95  
 Tyr Trp Phe Tyr Arg Leu Leu Ser Ala Leu Phe Gly Ile Pro Met Ala  
 100 105 110  
 Leu Ile Trp Gly Ile Tyr Phe Ala Ile Leu Ser Phe Leu His Ile Trp  
 115 120 125  
 Ala Val Val Pro Cys Ile Lys Ser Phe Leu Ile Glu Ile Gln Cys Ile  
 130 135 140  
 Ser Arg Val Tyr Ser Ile Tyr Val His Thr Val Cys Asp Pro Leu Phe  
 145 150 155 160  
 Glu Ala Val Gly Lys Ile Phe Ser Asn Val Arg Ile Asn Leu Gln Lys  
 165 170 175  
 Glu Ile