



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월07일
(11) 등록번호 10-1508580
(24) 등록일자 2015년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0054585
(22) 출원일자 2013년05월14일
심사청구일자 2013년05월14일
(65) 공개번호 10-2014-0134547
(43) 공개일자 2014년11월24일
(56) 선행기술조사문헌
JP2010538610 A
WO2010065156 A1
Molecular Cancer, 7권, 35호, 1-14면(2008)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
남은지
서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교 의과대학 434호 산부인과학교실
(74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 문동현

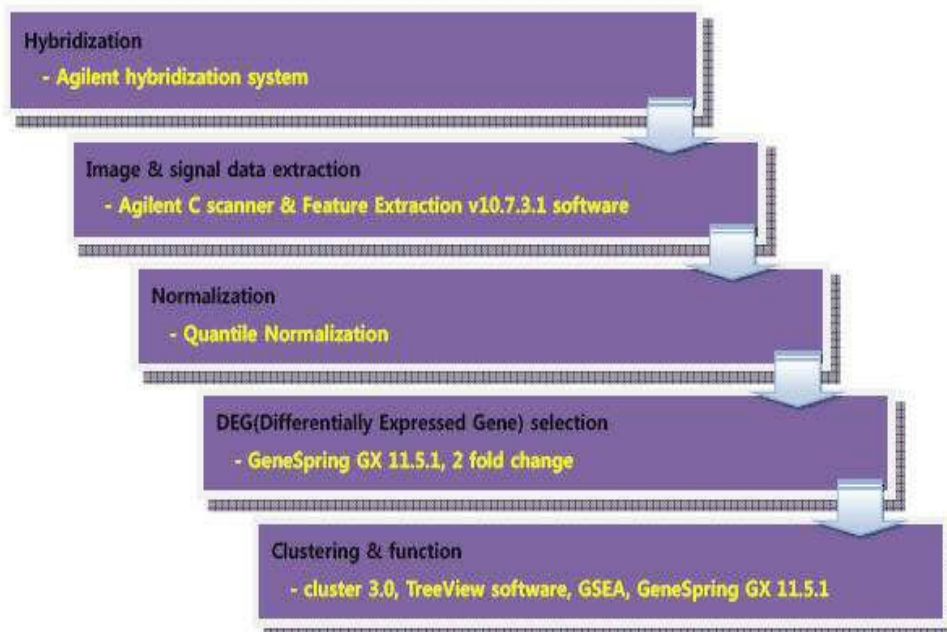
(54) 발명의 명칭 **재발성 난소암의 예측 또는 진단 방법**

(57) 요약

본 발명은 재발성 난소암의 예측 또는 진단 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, (a) 난소암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 miRNAs의 발현을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 miRNAs의 발현 양을 분석하여 재발성 난소암의 예측 또는 진단하는 단계를 포함하는 재발성 난소암의 예측 또는 진단 방법을 제공한다. 상기 예측 또는 진단

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



단은 일차성 난소암(primary ovarian cancer) 조직의 miRNAs 발현 양상과 비교하여 재발성 난소암을 판정한다; (i) miR-630, miR-370, miR-575, miR-3692-5p, miR-4270, miR-548q, miR-135a-3p, miR-1207-5p, miR-4281, miR-671-5p, miR-638, miR-1225-5p, miR-196b-5p, miR-1915-3p, miR-483-5p 및 miR-3656으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA가 상향-조절(up-regulated)되는 경우; 또는 (ii) miRNA-509-3p, miRNA-514a-3p, miR-506-3p, miRNA-508-3p, miR-509-3-5p, miR-95, miR-30a-3p, miR-362-5p, miR-30b-5p, miR-30e-3p, miR-1271-5p, miR-3607-3p, miR-30c-5p, miR-182-5p, miR-17-5p 및 miR-509-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA가 하향-조절(down-regulated)되는 경우에 재발성 난소암으로 판정한다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0010800

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 한국과학재단 일반연구자지원 신진연구

연구과제명 재발성, 항암제 내성을 가진 난소암에서의 miRNA의 발현 연구

기여율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 재발성 난소암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법:

- (a) 난소암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 miRNAs의 발현을 측정하는 단계; 및
- (b) 상기 miRNAs의 발현 양을 분석하는 단계로서 일차성 난소암(primary ovarian cancer) 조직의 miRNAs 발현 양상과 비교하여 재발성 난소암을 판정한다; 상기 miRNA로서 miR-630가 상향-조절(up-regulated)되는 경우에 재발성 난소암으로 판정한다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 생물학적 시료는 난소암 조직인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 miRNAs의 발현은 마이크로어레이를 실시하여 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

miR-630에 대한 프라이머 또는 프로브를 포함하는 재발성 난소암의 예측 또는 진단용 키트.

청구항 5

다음의 단계를 포함하는 난소암 재발 억제용 의약 후보물질(drug candidate)의 스크리닝 방법:

- (a) 난소암 환자로부터 분리된 난소암 세포에 분석시료를 접촉하는 단계; 및
- (b) 상기 난소암 세포의 miRNA 발현 수준을 측정하여 분석시료를 판정하는 단계; 상기 miRNA로서 miR-630가 상향-조절(up-regulated)되는 경우에 상기 분석시료는 난소암 재발 억제용 의약 후보물질로 판정한다.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 다음의 miRNA 발현 양을 분석하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (i) miR-575, miR-3692-5p, miR-4270, miR-548q, miR-135a-3p, miR-1207-5p, miR-4281, miR-671-5p, miR-638, miR-1225-5p, miR-196b-5p, miR-1915-3p, miR-483-5p 및 miR-3656으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA가 상향-조절(up-regulated)되는 경우; 또는 (ii) miRNA-509-3p, miRNA-514a-3p, miR-506-3p, miRNA-508-3p, miR-509-3-5p, miR-95, miR-30a-3p, miR-362-5p, miR-30b-5p, miR-30e-3p, miR-1271-5p, miR-3607-3p, miR-30c-5p, miR-182-5p, miR-17-5p 및 miR-509-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA가 하향-조절(down-regulated)되는 경우에 재발성 난소암으로 판정한다.

청구항 8

제 4 항에 있어서, 상기 키트는 miR-575, miR-3692-5p, miR-4270, miR-548q, miR-135a-3p, miR-1207-5p, miR-4281, miR-671-5p, miR-638, miR-1225-5p, miR-196b-5p, miR-1915-3p, miR-483-5p, miR-3656, miRNA-509-3p, miRNA-514a-3p, miR-506-3p, miRNA-508-3p, miR-509-3-5p, miR-95, miR-30a-3p, miR-362-5p, miR-30b-5p, miR-30e-3p, miR-1271-5p, miR-3607-3p, miR-30c-5p, miR-182-5p, miR-17-5p 및 miR-509-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA에 대한 프라이머 또는 프로브를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 재발성 난소암의 예측 또는 진단용 키트.

청구항 9

제 5 항에 있어서, 상기 방법은 다음의 miRNA 발현 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법:

(i) miR-575, miR-3692-5p, miR-4270, miR-548q, miR-135a-3p, miR-1207-5p, miR-4281, miR-671-5p, miR-638, miR-1225-5p, miR-196b-5p, miR-1915-3p, miR-483-5p 및 miR-3656으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA가 상향-조절(up-regulated)되는 경우; 또는 (ii) miRNA-509-3p, miRNA-514a-3p, miR-506-3p, miRNA-508-3p, miR-509-3-5p, miR-95, miR-30a-3p, miR-362-5p, miR-30b-5p, miR-30e-3p, miR-1271-5p, miR-3607-3p, miR-30c-5p, miR-182-5p, miR-17-5p 및 miR-509-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA가 하향-조절(down-regulated)되는 경우에 상기 분석시료는 난소암 재발 억제용 의약 후보물질로 판정한다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재발성 난소암의 예측 또는 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 난소암(ovarian cancer)은 부인암 중에서도 가장 사망률이 높아서 발병한 환자의 50% 이상이 사망하게 된다. 임상적으로 가장 흔한 종류의 난소암으로 상피성 난소암(epithelial ovarian cancer)을 들 수 있는데 전체 난소암의 90%를 차지한다. 상피성 난소암은 80% 이상이 폐경기 여성에서 발생하며 가장 높은 발생빈도를 보이는 연령은 62세이다. 상피성 난소암과는 달리 20세 이하의 젊은 여성에서 주로 발생하는 악성 생식세포암(germ cell tumor)도 있다. 이 난소암은 30대에서도 간혹 발견되나 나이가 증가할수록 그 빈도가 감소하게 되며 드물게는 10세 이하에서도 발견된다. 침윤성 상피성 난소암(다른 부위 및 다른 장기로 전이된 난소암)의 5년 생존율은 15%에서 35%이다.

[0003] 난소암은 대부분의 경우 다른 장기로 전이된 상태에서도 증상이 나타나지 않기 때문에 상당히 진행된 상태, 즉 높은 임상기(임상3기)에서야 발견이 된다. 따라서 난소암은 대수술을 반드시 필요로 하며 동시에 복합적 치료 방법이 항시 요구된다. 그러므로 환자의 강한 투지와 더불어 신체적 에너지를 절대적으로 필요로 하는 질병이라 할 수 있다.

[0004] 난소암의 유발인자는 아직까지는 확실한 학술적 증거가 있는 것은 아니다. 여러 가지 화학물질이나 방사선 노출, 내분비적 인자, 바이러스, 혈액형, 영양상태 등이 있을 수 있으나 논란의 대상이 되고 있는 것은 사실이다. 그러나 주목할 것은 가족력으로 볼 때 친지 중에 난소암이 있는 가계에서는 난소암 발생위험률이 50%나 되기 때문에 출산 이후 예방적 난소절제가 고려되기도 한다. 따라서 이들은 20대 초반에 유전 상담을 시작해야하며, 실제적인 신체적 검진은 30대 초반에 이루어져야 한다. 이들은 25세부터 골반진찰 및 초음파, 난소암 진단을 위한 혈액검사가 주기적으로 이루어져야 한다. 신체적 검진은 매 6개월마다 골반 및 복부 진찰, 혈청검사로, 그리고 매 1년마다 골반초음파를 할 것을 권장한다.

[0005] 난소암은 수술 후 항암화학치료제에 비교적 민감하게 반응하나 이 질환으로 사망률이 매우 높은 까닭에 좀 더

새로운 개발이 절실한 상황이다. 수술요법은 적절한 제거(optimal surgery), 즉 제거 후 복강 내에 남아 있는 악성 종양의 크기가 지름 1 cm 미만으로 줄어졌느냐에 따라 그 성패가 좌우된다. 이러한 종양 감축술의 시행은 수술 받은 환자의 예후와도 직결되기 때문이다. 또한 수술 후 잔류 종양의 크기가 작으면 작을수록 수술 후 항암치료제 투여에 예후가 훨씬 좋아진다. 난소암 치료에서 방사선요법은 여러가지 검토가 이루어져야 한다. 일부 몇몇의 난소암을 제외하고는 방사선 단독요법은 부적절한 경우가 많으며 특히 생식 능력의 보존이라는 측면에서는 세부적인 검토가 필요하다. 최근 항암요법으로는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin)이 추가되며 탁솔(taxol), 토포테칸(topotecan)과 같은 약제가 부각되고 있다.

[0006] 그러나, 난소암은 부인암 중 가장 치명적인 암으로 3기 이상의 진행성 난소암의 경우 초기 치료에서 60-70 % 정도의 관해율을 보이지만, 결국 대부분의 환자가 재발성, 항암제 내성암으로 진행되어 사망에 이르게 된다. 암 줄기세포는 현재 재발성, 항암제 내성암을 발생시키는 주요 원인으로 추정되며, microRNA의 발현은 암줄기세포의 유전자 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 추정된다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 난소암의 재발(recurrence) 및 항암제 내성을 유발하는 주요한 원인인 암줄기세포의 유전자 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 추정되는 마이크로 RNA(miRNA)의 발현 양을 조사하여, 재발성 난소암의 조기 진단 및 예방하고자 노력하였다. 그 결과, 일차성 난소암 및 재발성 난소암의 마이크로 RNA 발현 양을 분석하여 재발성 난소암 특이적인 마이크로 RNA를 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 재발성 난소암의 예측 또는 진단 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 재발성 난소암의 예측 또는 진단용 키트를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 난소암 재발 억제용 의약 후보물질(drug candidate)의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 난소암 재발 억제용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 재발성 난소암의 예측 또는 진단 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명자들은 난소암의 재발(recurrence) 및 항암제 내성을 유발하는 주요한 원인인 암줄기세포의 유전자 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 추정되는 마이크로 RNA(miRNA)의 발현 양을 조사하여, 재발성 난소암의 조기 진단 및 예방하고자 노력하였다. 그 결과, 일차성 난소암 및 재발성 난소암의 마이크로 RNA 발현 양을 분석하여 재발성 난소암 특이적인 마이크로 RNA를 규명하였다.

[0016] 본 발명의 재발성 난소암의 예측 또는 진단 방법을 단계별로 상세하게 설명한다.

[0017] 단계 (a): miRNAs의 발현을 측정하는 단계

- [0018] 난소암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 miRNAs의 발현을 측정한다.
- [0019] 본 발명에서 예측 또는 진단하고자 하는 “재발성 난소암(recurrent ovarian cancer)”은 일차성 난소암(primary ovarian cancer) 발생 후에 재발되는 난소암으로, 가장 큰 특징은 항암제 내성을 갖는 점이다. 보다 상세하게는, 일차성 난소암을 진단받고 병기결정(staging) 수술 후 항암제(예컨대, 탁신계 항암제, 플래티늄계 항암제)를 투여한 후에 재발된 난소암을 “재발성 난소암”이라고 한다. 재발성 난소암의 경우 항암제 내성을 갖고 있어 한 번 난소암이 재발하면 환자는 결국 난소암으로 사망에 이르게 된다. 현재까지 재발성 난소암을 치료하는 방법이 개발되어 있지 않으며, 이에 관련된 유전자 등의 변화 양상에 대한 연구도 매우 제한적이다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 난소암 조직이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 난소암 조직의 동결건조 조직(fresh frozen tissue or snap frozen tissue) 또는 포르말린-고정 파라핀 포매 조직(formalin-fixed paraffin embedded tissue; FFPE)로부터 RNA를 추출하여 이용한다.
- [0021] 본 발명의 재발성 난소암을 예측 또는 진단하기 위해 miRNAs의 발현 양을 분석한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 miRNAs의 발현 양의 분석은 마이크로어레이를 실시하여 측정한다.
- [0022] 상기 마이크로어레이는 고상표면에 프로브 또는 프라이머가 고정화 되어 있다.
- [0023] 본 발명에서 이용되는 프로브 또는 프라이머는 miR-630, miR-370, miR-575, miR-3692-5p, miR-4270, miR-548q, miR-135a-3p, miR-1207-5p, miR-4281, miR-671-5p, miR-638, miR-1225-5p, miR-196b-5p, miR-1915-3p, miR-483-5p, miR-3656, miRNA-509-3p, miRNA-514a-3p, miR-506-3p, miRNA-508-3p, miR-509-3-5p, miR-95, miR-30a-3p, miR-362-5p, miR-30b-5p, miR-30e-3p, miR-1271-5p, miR-3607-3p, miR-30c-5p, miR-182-5p, miR-17-5p 및 miR-509-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 본 명세서에서 용어 “상보적(complementary)”은 어떤 특정한 혼성화(hybridization) 또는 어닐링 조건 하에서 상술한 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화 할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 용어 “상보적”은 용어 완전 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 상술한 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화 할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다. 프라이머 또는 프로브 제작 시 참조하여야 하는 본 발명의 miRNA의 뉴클레오티드 서열은 GenBank에서 확인할 수 있으며, 이 서열을 참조하여 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 키트 또는 방법에 의해 분석된 상기 miRNA의 발현 정도, 예컨대, RT(reverse transcriptase)-PCR 또는 실시간(real-time)-PCR 방법(참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))에 의해 측정된 발현 정도가 정상 대조군과 비교하여 1.5배 이상, 본 발명의 일 구현예에 따르면 2배 이상, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 3배 이상의 발현도를 나타내는 경우에는 분석 시료를 채취한 대상(subject)이 재발성 난소암을 가지고 있거나 발병 위험도가 높은 것으로 판정한다.
- [0025] 단계 (b): 재발성 난소암의 예측 또는 진단 단계
- [0026] 다음, 상기 miRNAs의 발현 양을 분석하여 재발성 난소암의 예측 또는 진단한다.
- [0027] 상기 예측 또는 진단은 일차성 난소암(primary ovarian cancer) 조직의 miRNAs 발현 양과 비교하여 재발성 난소암을 판정한다; (i) miR-630, miR-370, miR-575, miR-3692-5p, miR-4270, miR-548q, miR-135a-3p, miR-1207-5p, miR-4281, miR-671-5p, miR-638, miR-1225-5p, miR-196b-5p, miR-1915-3p, miR-483-5p 및 miR-3656으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA가 상향-조절(up-regulated)되는 경우; 또는 (ii) miRNA-509-3p, miRNA-514a-3p, miR-506-3p, miRNA-508-3p, miR-509-3-5p, miR-95, miR-30a-3p, miR-362-5p, miR-30b-5p, miR-30e-3p, miR-1271-5p, miR-3607-3p, miR-30c-5p, miR-182-5p, miR-17-5p 및 miR-509-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA가 하향-조절(down-regulated)되는 경우에 재발성 난소암으로 판정한다.
- [0028] 본 발명은 miRNAs의 발현 정도와 재발성 난소암 사이의 상관성에 기초한다. 즉, miR-630, miR-370, miR-575, miR-3692-5p, miR-4270, miR-548q, miR-135a-3p, miR-1207-5p, miR-4281, miR-671-5p, miR-638, miR-1225-5p, miR-196b-5p, miR-1915-3p, miR-483-5p 및 miR-3656의 발현은 재발성 난소암 환자에서 상향-조절 되는 양상으로 나타나고, 일차성 난소암 환자에서는 하향-조절 되는 양상으로 나타난다. 또한, miRNA-509-3p, miRNA-514a-3p, miR-506-3p, miRNA-508-3p, miR-509-3-5p, miR-95, miR-30a-3p, miR-362-5p, miR-30b-5p,

miR-30e-3p, miR-1271-5p, miR-3607-3p, miR-30c-5p, miR-182-5p, miR-17-5p 및 miR-509-5p는 재발성 난소암 환자에서 하향-조절 되는 양상으로 나타나고, 일차성 난소암 환자에서는 상향-조절 되는 양상으로 나타난다. 본 명세서에서 miRNAs를 언급하면서 사용되는 용어 “상향-조절”은 조사 대상의 시료(예컨대, 세포)에서의 상기 miRNA의 발현 정도가 일차성 난소암 세포의 miRNA 발현 정도와 비교하여 높은 경우를 의미한다. 본 명세서에서 상기 miRNA를 언급하면서 사용되는 용어 “하향-조절”은 조사 대상의 시료(예컨대, 세포)에서의 miRNA의 발현 정도가 일차성 난소암 세포의 miRNA 발현 정도와 비교하여 낮은 경우를 의미한다.

[0029] 본 발명의 재발성 난소암을 판정하는데 있어서, 상기 상향-조절은 1.5배 이상, 2.0 배 이상 또는 2.3배 이상 발현 양이 증가된 것을 의미하고, 상기 하향-조절은 1.5배 이상, 2.0배 이상 또는 3.0배 이상 발현 양이 감소된 것을 의미한다.

[0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 miR-630, miR-370, miR-575, miR-3692-5p, miR-4270, miR-548q, miR-135a-3p, miR-1207-5p, miR-4281, miR-671-5p, miR-638, miR-1225-5p, miR-196b-5p, miR-1915-3p, miR-483-5p, miR-3656, miRNA-509-3p, miRNA-514a-3p, miR-506-3p, miRNA-508-3p, miR-509-3-5p, miR-95, miR-30a-3p, miR-362-5p, miR-30b-5p, miR-30e-3p, miR-1271-5p, miR-3607-3p, miR-30c-5p, miR-182-5p, miR-17-5p 및 miR-509-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA에 대한 프라이머 또는 프로브를 포함하는 재발성 난소암의 예측 또는 진단용 키트를 제공한다.

[0031] 본 발명의 키트가 마이크로어레이인 경우에는, 마이크로어레이의 고상표면에 프로브가 고정화 되어 있다. 본 발명의 키트가 유전자 증폭 키트인 경우에는 프라이머를 포함한다.

[0032] 본 발명의 키트 또는 방법에 의해 분석된 상기 miRNA의 발현 정도, 예컨대, RT(reverse transcriptase)-PCR 또는 실시간(real-time)-PCR 방법(참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))에 의해 측정된 발현 정도가 정상 대조군과 비교하여 1.5배 이상, 바람직하게는 2배 이상, 가장 바람직하게는 3배 이상의 발현도를 나타내는 경우에는 분석 시료를 채취한 대상(subject)이 재발성 난소암을 가지고 있거나 발병 위험도가 높은 것으로 판정한다.

[0033] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 난소암 재발 억제용 의약 후보물질(drug candidate)의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 난소암 재발 억제용 의약 후보물질(drug candidate)의 스크리닝 방법을 단계별로 상세하게 설명한다.

[0035] 단계 (a): 난소암 세포에 분석시료를 접촉하는 단계

[0036] 본 발명의 난소암 재발 억제용 의약 후보물질을 스크리닝 하기 위해, 난소암 세포에 분석시료를 접촉한다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 난소암 세포는 UWB1.289(ATCC, CRL-2745), SK-OV-3(ATCC, HTB-77), UWB1.289+BRCA1(ATCC, CRL-2946) 또는 재발성 난소암 환자의 난소암 조직으로부터 분리된 세포이다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 분석시료는 화학물질, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시료는 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)이다. 시료는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시료는 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리 (spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디킨블루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et

al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

[0039] 단계 (b): miRNA 발현 수준을 측정하여 분석시료를 판정하는 단계

[0040] 상기 난소암 세포의 miRNA 발현 수준을 측정하여 분석시료를 판정한다. 보다 상세하게는, (i) miR-630, miR-370, miR-575, miR-3692-5p, miR-4270, miR-548q, miR-135a-3p, miR-1207-5p, miR-4281, miR-671-5p, miR-638, miR-1225-5p, miR-196b-5p, miR-1915-3p, miR-483-5p 및 miR-3656으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA가 상향-조절(up-regulated)되는 경우; 또는 (ii) miRNA-509-3p, miRNA-514a-3p, miR-506-3p, miRNA-508-3p, miR-509-3-5p, miR-95, miR-30a-3p, miR-362-5p, miR-30b-5p, miR-30e-3p, miR-1271-5p, miR-3607-3p, miR-30c-5p, miR-182-5p, miR-17-5p 및 miR-509-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA가 하향-조절(down-regulated)되는 경우에 상기 분석시료는 난소암 재발 억제용 의약 후보물질로 판정한다.

[0041] 본 발명의 스크리닝 방법을 상기 miRNAs의 발현을 분석하여 실시하는 경우, miRNAs의 발현량 변화의 측정은 당 업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufman et al., *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 또는 인 시투(*in situ*) 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.

[0042] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 miR-630, miR-370, miR-575, miR-3692-5p, miR-4270, miR-548q, miR-135a-3p, miR-1207-5p, miR-4281, miR-671-5p, miR-638, miR-1225-5p, miR-196b-5p, miR-1915-3p, miR-483-5p 및 miR-3656으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 microRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 난소암 재발 억제용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0043] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 타겟으로 하는 miRNA, 특히 miRNA의 씨드 서열에 대한 상보적인 서열을 가지고 있어 miRNA와 이합체(duplex)를 형성할 수 있는 핵산-기반 분자를 포괄한다. 따라서, 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 “상보적 핵산-기반 억제제”로 기재될 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0045] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 점막 투여 및 점안 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0046] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg(체중)이다.

[0047] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며,

분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0048]

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0049]

(a) 본 발명은 재발성 난소암의 예측 또는 진단 방법, 난소암 재발 억제용 의약 후보물질(drug candidate)의 스크리닝 방법 및 난소암 재발 억제용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0050]

(b) 본 발명은 재발성 난소암, 즉 항암제 내성 난소암 환자에서 고발현 또는 저발현 되는 miRNAs를 규명하여, 항암제 내성이 생기는 기전을 이해하고 재발성 난소암 환자의 생존률을 높일 수 있는 새로운 치료방법에 대한 기초 연구를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0051]

도 1은 마이크로 RNA 마이크로어레이의 작업플로우를 보여준다.

도 2는 난소암 환자 선별을 나타내는 것으로, 환자에서 처음 난소암을 진단받고 병기결정 수술을 시행할 때 채취한 조직(일차성 난소암 조직)과, 재발 판정 후 시행한 두번째 수술에서 채취한 조직(재발성 난소암 조직)이 있는 경우를 대상으로 한다.

도 3은 마이크로어레이를 실시한 시료를 도식적으로 나타낸다.

도 4a 및 도 4b는 동결건조 조직(fresh-frozen tissue)와 포르말린-고정 파라핀 포매(FFPE; Formalin-fixed paraffin embedded)의 마이크로 RNA 발현 결과를 비교한 그래프로, 두 샘플에서 거의 동일한 패턴을 나타낸다. p 값은 0.001 미만이다.

도 5는 일차성 난소암 및 재발성 난소암의 마이크로어레이 결과를 나타낸다.

도 6은 정상군과 비교하여 4배 이상 상향-조절(up-regulated)된 일차성 난소암 관련 마이크로 RNA 및 재발성 난소암 관련 마이크로 RNA를 나타낸다.

도 7은 정상군과 비교하여 4배 이상 하향-조절(down-regulated)된 일차성 난소암 관련 마이크로 RNA 및 재발성 난소암 관련 마이크로 RNA를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0053]

실시예

[0054]

실험 재료 및 실험 과정

[0055]

샘플 수집(biosample collection)

[0056]

환자에서 처음 난소암을 진단받고 병기결정 수술을 시행할 때 채취한 조직(일차성 난소암 조직)과, 재발 판정 후 시행한 두번째 수술에서 채취한 조직(재발성 난소암 조직)이 있는 경우를 대상으로 하였다.

[0057]

재발 후 조직은 동결보존 조직(snap frozen tissue) 및 파라핀 포매 조직으로 보관되어 있는 형태를 사용하였고, 그 근거는 다음과 같다. 다른 종류의 RNA와 달리 MicroRNA의 경우 동결보존되어 있는 조직에서와 마찬가지로, 포르말린으로 고정시킨 파라핀 포매 조직에서도 MicroRNA의 발현이 일정하게 보존되는 것으로 알려져 있다(Hasemeier B, et al, BMC Biotechnol. 2008 Nov 27;8:90). 따라서, 본원 병리과에 보관 중인 난소암 환자의 조직을 이용하여 실험을 진행하였다.

- [0058] *MicroRNA 마이크로어레이*
- [0059] 총 RNA 샘플은 100 ng을 사용하였고, 포함된 microRNA는 아질런트 miRNA 컴플리트 라벨링 및 하이브리드(Agilent miRNA Complete Labeling and HybKit, AgilentTechnologies, CA)를 이용하여 Cyanine3-pGp(Cy3)으로 표지 (labeling)하였다.
- [0060] 샘플들을 아질런트 휴먼 miRNAv14 칩(AMDID029297, Agilent, CA) 상에 위치시키고, 가스킷(Gasket) 슬라이드 (Agilent Technologies, CA)로 덮었다. 슬라이드를 아질런트 혼성화 시스템에서 42°C에서 16시간 동안 혼성화 (hybridization) 하였다. 부합된 슬라이드를 세척 완충액(0.0005% Triton X-102)로 5분 동안 세척 후 5분 뒤 한번 더 세척을 실시하였다. 세척을 마친 후 슬라이드를 상온에서 3000 rpm으로 원심분리한 후, 건조하였다.
- [0061] MicroRNA 어레이는 GeneSpring GX v11.5(Agilent technologies, CA)를 이용하여 분석하였다. 데이터는 원-채널 마이크로어레이(one-channel microarrays)를 위한 표준적인 표준화(normalization) 과정을 거쳤다.
- [0062] 원-채널 마이크로어레이를 위해 백분위 중간값 표준화(percentile median normalization), 폴드-변화 값(Fold-change values)을 시료와 대조군 사이의 언페어 비교법(unpaired comparison)을 이용하여 계산하였고, 평균 폴드-변화 값을 계산하기 위해 평균화 하였다. 웰치's t-시험법을 이용하여 *p*-값을 계산하여 유의한 발현 정도를 판단하였다.
- [0063] 발굴된 microRNA의 표적 예측(Target prediction)을 위하여 TargetScan 5.1 및 miRBase v16 데이터베이스를 사용하였다(도 1).
- [0064] *정량적 실시간 RT-PCR(qRT-PCR)*
- [0065] MicroRNA 마이크로어레이 실험 결과 및 트랜스펙션(transfection) 실험의 유효성 검증을 위해 qRT-PCR을 실시하였다.
- [0066] TaqMan MicroRNA 분석법(Applied Biosystems)을 이용하여 microRNA를 정량하였다(Johnson CD, et al). 시료로부터 총 RNA를 분리하여 200 뉴클레오타이드 미만의 작은 RNA들을 mirVANA PARIS miRNA 분리 키트(Ambion)를 이용하여 추출하였다. 260 nm의 흡광도를 이용하여 RNA의 농도를 측정하고, 표적 microRNA를 정량하였다. microRNA의 정량을 위하여 Ct(threshold cycle)값을 각각 고정된 threshold 0.2를 넘을 때마디의 부분 주기 수 (fractional cycle number)로 정의하였다.
- [0067] 각 microRNA의 정량을 위해 각각 10 ng의 총 RNA를 사용하였다.
- [0068] **실험 결과**
- [0069] *환자의 종양 샘플 및 RNA QC*
- [0070] 총 RNA 추출은 4명의 정상 난소 조직(fresh-frozen) 및 8명의 난소암 환자를 대상으로 진행하였다. 난소암 환자의 경우 본원 종양 샘플을 보관하고 있는 중에 본원에서 사전 항암요법을 시행 받지 않고 일차로 병기결정수술을 진행하면서 채취한 종양 샘플을 보관하고 있고, 이후 재발 후 이차적 종양감축술이나 기타 병증으로 인해 고식적 수술을 진행하면서 채취한 종양 샘플을 보관하고 있는 환자를 대상으로 진행하였다(도 2, 도 3 및 표 1). 이들 샘플 중 8명은 파라핀-포매 조직으로 총 RNA 추출을 시행하였다.
- [0071] 하기 표 1의 FFPE는 포르말린-고정 파라핀 포매(Formalin-fixed Paraffin embedded)이고, PFS는 무진행 생존기간(Progression-free Survival)이며, PS는 백금 민감성(Platinum sensitive)이고, PR은 백금 내성 재발(Platinum Resistant Recurrence)이다.

표 1

환자 번호	샘플 종류	병기	분화도	1차 수술	2차 수술	PFS (개월)	재발 유형
P1	snap frozen	IIIc	G3	2010-02-08	2011-12-01	16	PS
P2	snap frozen	IIIc	G2	2010-12-09	2011-12-16	8	PS
P3	snap frozen	IIIc	G2	2011-11-23	2012-07-10	0	PR
P4	snap frozen	IIIc	G3	2009-10-05	2012-05-16	27	PS

P5	FFPF	IIIc	G3	2006-05-30	2009-12-02	6	PR
P6	FFPF	IV	G3	2010-12-24	2011-12-06	6	PR
P7	FFPF	IV	G2	2011-08-18	2012-08-23	7	PS
P8	FFPF	IIIc	G3	2010-04-01	2011-03-23	8	PS

[0073] 파라핀-포매 조직에서 추출한 *microRNA*의 정량적 확인

[0074] 이를 위해 2011년에 4명의 정상 난소 조직(fresh-frozen), 8명의 난소암 환자의 fresh-frozen 조직 및 파라핀 포매 조직을 비교 하였고, 이들로부터 채취한 총 RNA의 질은 실험을 진행하기 적합하였고, 이 샘플들의 상관 계수(correlation coefficient)는 신뢰할만 하였다(도 4a 및 도 4b).

[0075] *microRNA* 마이크로어레이

[0076] MicroRNA 마이크로어레이를 시행하여 대조군(정상난소 군)과 최초 진단 시 난소암(일차성 난소암) 및 재발성 난소암의 세 그룹 간의 *microRNA* 발현을 비교하였다(도 5 및 표 2).

표 2

	-	상향-조절된 miRNAs	하향-조절된 miRNAs
정상 vs. 일차성 난소암		57	73
정상 vs. 재발성 난소암		80	119
일차성 난소암 vs. 재발성 난소암		60	52

[0078] 상기 표 2는 2배 이상 차이 나는 상향-조절 또는 하향-조절된 miRNA를 개수하여 나타내었다.

[0079] 하기 표 3은 정상군과 일차성 난소암의 마이크로어레이 결과를 비교하여 상향-조절 또는 하향-조절된 miRNA를 나타내었다.

표 3

상향-조절	폴드 변화	하향-조절	폴드 변화
hsa-miR-200c-3p	8.81541	hsa-miR-204-5p	-4.1174
hsa-miR-200b-3p	8.60846	hsa-miR-424-5p	-3.4337
hsa-miR-141-3p	7.84507	hsa-miR-129-2-3p	-3.3847
hsa-miR-200a-3p	7.43825	hsa-miR-101-3p	-3.3685
hsa-miR-205-5p	7.15762	hsa-miR-362-3p	-3.3642
hsa-miR-429	6.94852	hsa-miR-136-3p	-3.238
hsa-miR-96-5p	6.02251	hsa-miR-136-5p	-3.1687
hsa-miR-135b-5p	5.54003	hsa-miR-4324	-3.0473
hsa-miR-224-5p	5.31541	hsa-miR-195-5p	-3.0079
hsa-miR-183-5p	4.63187	hsa-miR-125b-5p	-3.0068
hsa-miR-203	4.33837	hsa-miR-532-3p	-2.8097
hsa-miR-130b-3p	3.76493	hsa-miR-376c	-2.7559
hsa-miR-200a-5p	3.13566	hsa-miR-99a-5p	-2.7459
hsa-miR-21-3p	3.09003	hsa-miR-377-3p	-2.7412
hsa-miR-221-3p	2.97981	hsa-miR-214-3p	-2.6489
hsa-miR-200b-5p	2.94678	hsa-miR-145-5p	-2.6145
hsa-miR-95	2.84731	hsa-miR-29c-3p	-2.5987

[0081] 일차성 난소암 및 재발성 난소암에서 발현되는 miRNA 패턴을 비교하였다(도 6, 도 7 및 표 4).

표 4

상향-조절	폴드 변화	하향-조절	폴드 변화
hsa-miR-630	2.48039	hsa-miR-509-3p	-3.6413
hsa-miR-370	2.09488	hsa-miR-514a-3p	-3.127

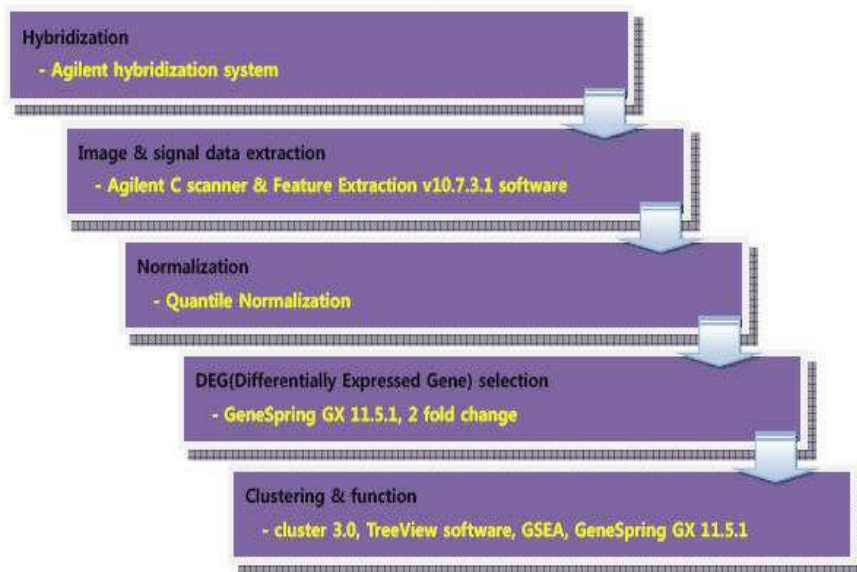
hsa-miR-575	2.08748	hsa-miR-506-3p	-2.4918
hsa-miR-3692-5p	1.72906	hsa-miR-508-3p	-2.3845
hsa-miR-4270	1.67729	hsa-miR-509-3-5p	-2.3436
hsa-miR-548q	1.67019	hsa-miR-95	-2.3274
hsa-miR-135a-3p	1.63426	hsa-miR-30a-3p	-2.2598
hsa-miR-1207-5p	1.62239	hsa-miR-362-5p	-2.0035
hsa-miR-4281	1.60895	hsa-miR-30b-5p	-2.0014
hsa-miR-671-5p	1.59902	hsa-miR-30e-3p	-1.9538
hsa-miR-638	1.59833	hsa-miR-1271-5p	-1.907
hsa-miR-1225-5p	1.58157	hsa-miR-3607-3p	-1.862
hsa-miR-196b-5p	1.56654	hsa-miR-30c-5p	-1.8293
hsa-miR-1915-3p	1.55372	hsa-miR-182-5p	-1.8284
hsa-miR-483-5p	1.54832	hsa-miR-17-5p	-1.8284
hsa-miR-3656	1.53763	hsa-miR-509-5p	-1.825

[0083]

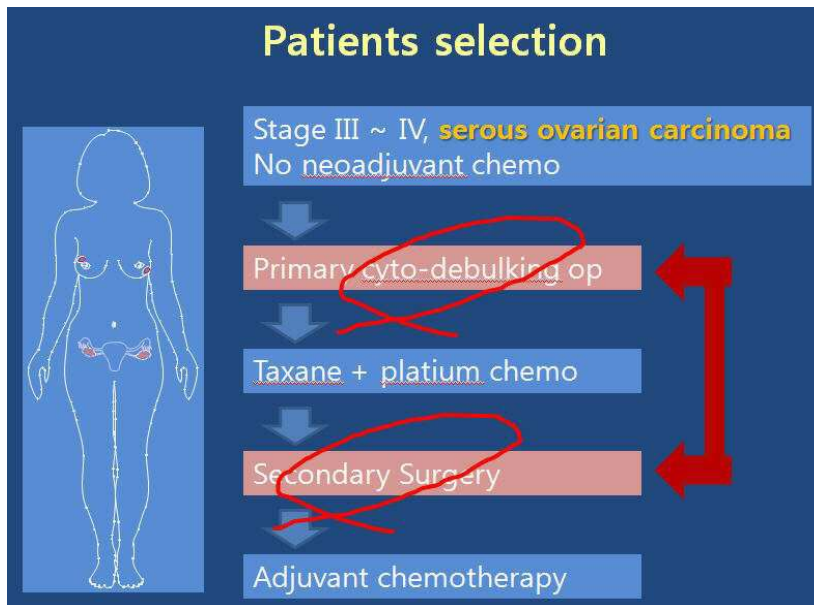
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

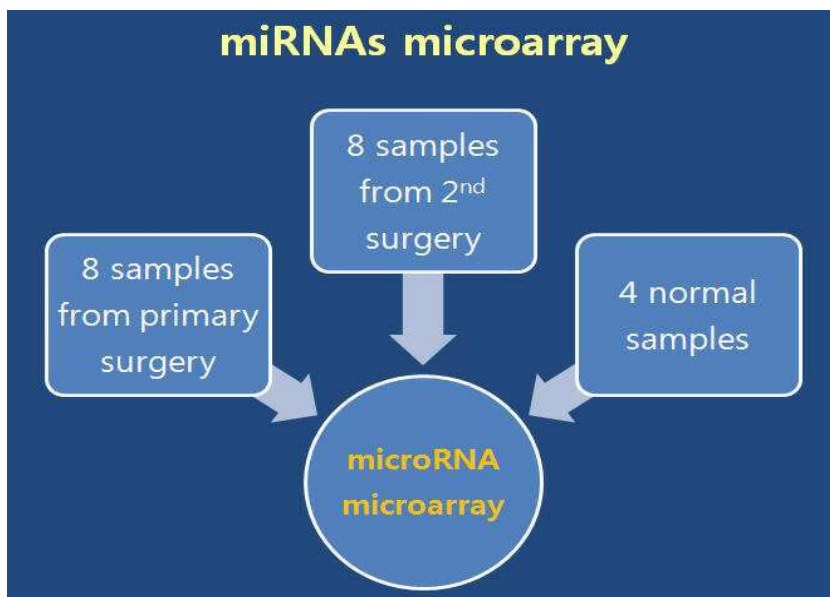
도면1



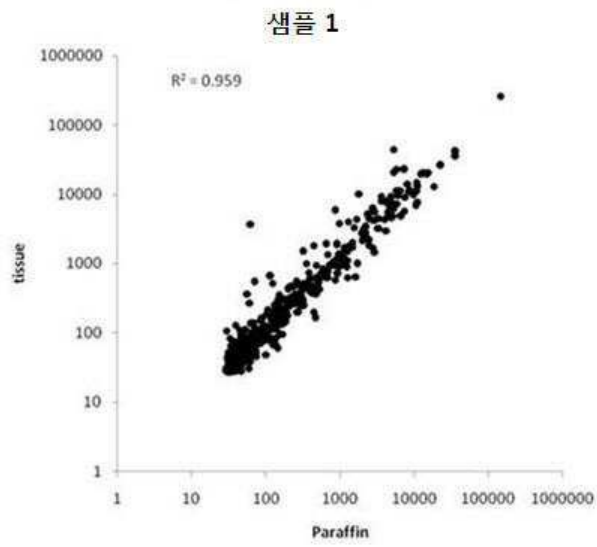
도면2



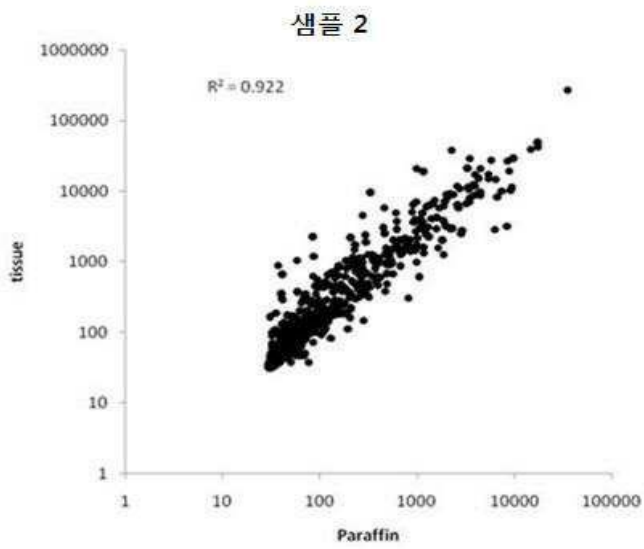
도면3



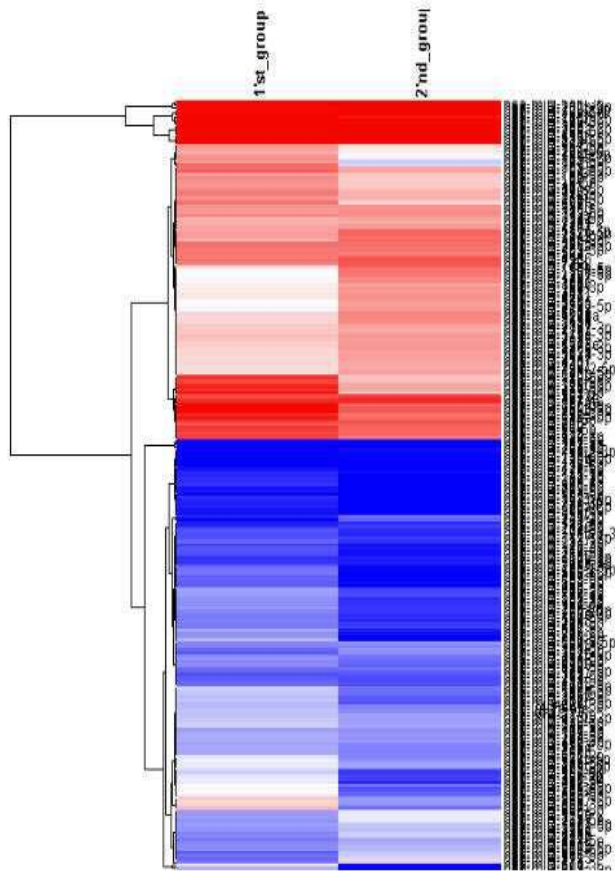
도면4a



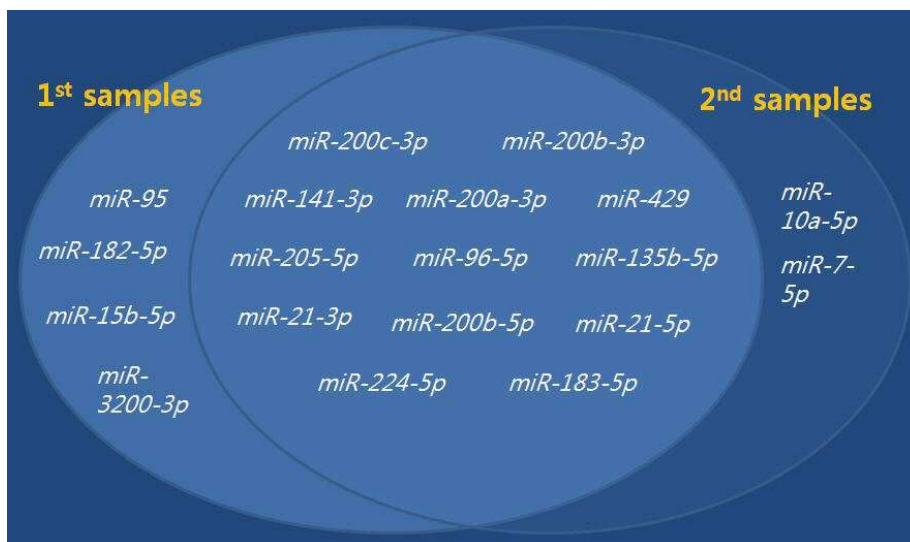
도면4b



도면5



도면6



도면7

