

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0022017 (43) 공개일자 2016년02월29일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01) GO1N 33/574 (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0107508 (22) 출원일자 2014년08월19일 심사청구일자 2015년11월13일		(71) 출원인 주식회사 엠모니터 대구광역시 달서구 성서공단로11길 62 , 633호(호산동, 대구융합알앤디센터) (72) 발명자 전효성 대구광역시 수성구 범어로 61 한형수 대구광역시 수성구 청수로 214 (74) 대리인 박원미

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **재발 난소암 진단 또는 난소암 재발 예측용 MIRNA 마커 및 그 용도**

(57) 요약

본원은 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b로 구성되는 군으로부터 선택되는 재발 난소암 진단 또는 재발 예측용 마커, 상기 마커의 검출용 시약을 포함하는 조성물, 상기 마커를 검출하는 방법을 개시한다. 본원에 따른 마커, 조성물 및 방법은 재발 난소암 진단 및/또는 난소암 재발 예측에 유용하게 사용되어 난소암 치료 효율을 증대시킬 수 있다.

명세서

청구범위

청구항 1

miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 바이오마커 측정용 시약을 포함하는 난소암 재발 예측 또는 재발 난소암 진단용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 시약은 상기 각 바이오마커의 핵산서열, 상기 핵산서열에 상보적인 핵산서열, 상기 핵산서열의 단편을 포함하는 것인, 난소암 재발 예측 또는 재발 난소암 진단용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 핵산 서열 또는 핵산 서열의 단편은 상기 각 마커를 특이적 결합할 수 있는 프라이머, 또는 프로브, 또는 프라이머 및 프로브인, 난소암 재발 예측 또는 재발 난소암 진단용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 시약은 상기 각 바이오마커의 역전사 중합효소연쇄반응, 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응, Nuclease 보호 분석 (RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 라이게이션 기반 중합효소 연쇄반응, 마이크로어레이 또는 노던블랏에 사용되는 시약인, 난소암 재발 예측 또는 재발 난소암 진단용 조성물.

청구항 5

재발 난소암의 진단 또는 재발 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여,

난소암이 의심되는 대상체 유래의 시료를 제공하는 단계;

상기 시료에서 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 발현량을 측정하는 단계;

상기 측정 결과를 대조군의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계; 및

상기 대조군 시료와 비교하여, 상기 대상체 시료의 발현량에 변화가 있는 경우, 이를 난소암으로 판정하는 단계를 포함하는, 난소암 마커를 검출하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 검출은 교잡 또는 핵산 증폭 방법에 의한 것인, 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 교잡은 마이크로어레이 분석, 상기 핵산 증폭은 역전사효소중합연쇄반응법인, 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 난소암환자의 조직, 전혈, 혈장 또는 혈청인, 방법.

청구항 9

제 5 항에 있어서,

상기 방법은 초음파 검사, 복강경 검사, 조직검사, 난소암 표지 인자 CA-125 검사, 경정맥신우조영술, 대장내시경검사, 컴퓨터단층촬영, 자기공명영상, 또는 양전자단층촬영 중 하나 이상을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

제 5 항에 있어서,

상기 방법은 상기 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b 마커 발현량의 평균값을 사용하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 난소암 재발과 관련된 바이오마커 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 난소암, 여성 생식기에서 발생하는 악성 종양들 중 가장 나쁜 예후를 나타내는 질환으로 알려져 있다. 난소암 환자는 진단시 2/3의 환자에서 진행된 상태로 발견되며, 60% 이상의 환자가 3기 이상의 진행된 상태로 진단된다.

[0003] 또한 재발율이 높아 수술 및 항암치료후 완전 관해를 보인 환자의 경우라도 80%가 다시 재발하여 주요 암 가운데 난소암은 5번째로 낮은 5년 생존율을 나타내며, 생존율의 향상이 췌장암 다음으로 가장 낮으며, 2009년 보건복지부 중앙암등록본부 자료에 의하면 난소암 전체의 5년 상대 생존률은 60.2%이다. 하지만 병기에 따라 5년 생존률이 급격히 감소하여 조기 진단 및 효과적 치료를 위한 재발 마커의 발굴이 시급하다.

[0004] 난소암은 항암제, 방사선 및/또는 수술의 치료법이 사용된다. 난소암 중 가장 많은 부분을 차지하는 상피성 난소암의 1차 항암제로 쓰이는 파클리탁셀-카보플라틴의 경우, 10-30% 환자는 6개월 내에 재발해 항암제에 저항성을 보이며, 더욱이 20% 내에서는 위의 항암제에 반응하지 않는다.

[0005] 따라서 효과적 치료를 위해서는 난소암 재발의 발견이 시급하며, 국내 뿐 아니라 국외에서도 원발성 상피성 난소암과 재발성 상피성 난소암간의 miRNA 발현을 연구한 보고는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 공개특허공보 2011-0068695 (2011년 6월22일 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 난소암의 재발을 검출할 수 있는 바이오마커를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 한 양태에서 본원은 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 바이오마커를 제공한다.

[0009] 다른 양태에서 본원은 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 바이오마커 측정용 시약을 포함하는 난소암 재발 예측 또는 재발 난소암 진단용 조성물을 제공한다.

[0010] 본원의 조성물에 포함될 수 있는 시약은 상기 각 바이오마커의 핵산서열, 상기 핵산서열에 상보적인 핵산서열, 상기 핵산서열의 단편을 포함할 수 있으며, 상기 핵산 서열 또는 핵산 서열의 단편은 상기 각 마커를 특이적 결합할 수 있는 프라이머, 또는 프로브, 또는 프라이머 및 프로브일 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0011] 본원에 따른 조성물에 포함될 수 있는 시약은 상기 각 바이오마커의 역전사 중합효소연쇄반응, 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응, Nuclease 보호 분석 (RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 라이게이션 기반 중합효소 연쇄반응, 마이크로어레이 또는 노던블랏에 사용될 수 있는 시약을 포함하며, 이러한 시약은 당 업계에 공지된 것으로 시중에서 구입할 수 있으며, 당업자라면 본 발명의 특징을 고려하여 적절한 것을 선택할 수 있을 것이다.

[0012] 다른 양태에서 본원은 또한 재발 난소암의 진단 또는 재발 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 난소암이 의심되는 대상체 유래의 시료를 제공하는 단계; 상기 시료에서 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 발현량을 측정하는 단계; 상기 측정 결과를 대조군의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계; 및 상기 대조군 시료와 비교하여, 상기 대상체 시료의 발현량에 변화가 있는 경우, 이를 난소암으로 판정하는 단계를 포함하는, 난소암 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0013] 본원에 따른 방법에서 검출은 교잡 또는 핵산 증폭 방법, 예를 들면 핵산 증폭은 역전사효소 중합연쇄반응법 또는 실시간 역전사효소 중합연쇄반응법으로 수행될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0014] 본원에 따른 방법은 대상체의 생물학적 시료 예를 들면 난소암 조직 또는 전혈, 혈청 또는 혈장에서 수행될 수 있으며, 상기 방법은 초음파 검사, 복강경 검사, 조직검사, 난소암 표지 인자 CA-125 검사, 경정맥신우조영술, 대장내시경검사, 컴퓨터단층촬영, 자기공명영상, 또는 양전자단층촬영 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0015] 본원에 따른 방법에서는 하나 이상의 마커가 사용될 수 있으며, 일 구현예에서는 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b 마커 발현량의 평균값이 사용된다.

발명의 효과

[0016] 본원에 따른 바이오마커는 재발 난소암의 조기 진단 및/또는 난소암의 재발여부를 조기에 진단 또는 예측할 수 있어 효과적인 암의 치료를 가능하게 하여 암 완치 및 환자의 생존율의 가능성을 높일 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본원은 난소암의 재발여부 예측 및/또는 재발 난소암의 정확한 조기진단을 가능하게하는 바이오마커로 사용될 수 있는 miRNA와 같은 비코딩 RNA 마커의 발견에 근거한 것이다.

[0018] 따라서 한 양태에서 본원은 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b로 구성되는 군으로부터 선택되는 하

나 이상의 마커의 검출용 시약을 포함하는 재발 난소암 및/또는 난소암 재발 예측/검출/진단용 조성물에 관한 것이다.

- [0019] 본원은 난소암의 진단, 특히 재발 난소암 및/또는 난소암 재발 예측에 유용하다. 본원에서 난소암이란 난소에서 발생하는 원발암 및 재발암을 포함하는 것으로, 암이 발생하는 조직에 따라 상피세포암, 생식세포종양, 성삭기질 종양을 포함하며, 상기 상피성 난소암은 다시 장액성 난소암 (serous carcinoma), 점액성 난소암(mucinous carcinoma), 자궁내막양 난소암(endometrioid carcinoma), 투명세포암(clear cell carcinoma), 브레너종양(malignant Brenner tumor), 미분화세포암(undifferentiated carcinoma)으로 분류되는 암을 포함한다. 또한 난소암은 병기에 따라 1기, 2기, 3기, 3A, 3B, 3C 및 4기로 구분될 수 있으며, 이러한 난소암도 본원의 범위에 포함된다.
- [0020] 본원에서 난소암의 재발이란 원발 난소암에 대한 수술, 방사선 및/또는 항암 요법을 통해 의사의 소견에 따른 관해 판정 후에 다시 난소암 발병을 일컫는 것으로, 국소 재발 및 전이성 재발을 모두 포함한다.
- [0021] 본원에 사용된 용어 "miR" "miRNA" 또는 "마이크로 RNA" 또는 "마이크로알엔에이"는 표적 RNA의 분해(degradation)을 촉진시키거나 또는 그들의 번역을 억제시킴으로써 유전자 발현을 전사 후에 조절하는 21 내지 23개의 비코딩 RNA를 말한다. 본원에 사용된 miRNA의 성숙 서열은 miRNA 데이터베이스(<http://www.mirbase.org>)에서 얻을 수 있다. 2012년 8월 현재 miRNA 데이터베이스 (19판, miRBase)에 의하면 193개 종에서 유래한 25,141 개의 성숙 miRNA가 등록되어 있다. 일반적으로 마이크로 RNA는 pre-miRNA라 불리는 헤어핀 구조를 갖는 약 70-80 nt (nucleotide) 길이의 전구체로 전사된 후, RNase III 효소인 Dicer에 의해 잘려 성숙된 형태로 생성된다. 마이크로 RNA는 miRNP라 불리는 리보뉴클레오프합체를 형성하여 표적 부위에 상보적 결합을 통해 표적 유전자를 절단하거나, 번역을 억제한다. 30% 이상의 인간 miRNA는 클러스터로 존재하며, 하나의 전구체로 전사된 후, 절단과정을 거쳐 최종 성숙 miRNA가 형성된다.
- [0022] 본원에 따른 miRNA 마커는 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b로부터 선택되며, 그 전구체 및 성숙 miRNA를 포함하는 것이다. 본원에 따른 바이오마커는 하나 이상이 사용될 수 있으며, 예를 들면 두 개, 세 개 또는 네 개가 조합으로 사용될 수 있다. 일 구현예에서는 4개가 조합으로 사용되며, 이 경우, 각 miRNA의 발현량 및/또는 상기 네 개 miRNA의 발현량의 평균값을 대조값과 비교하여 본원에 따른 용도로 사용될 수 있다.
- [0023] 본원에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대하여 검사 대상자의 질환에 대한 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상자의 예후(prognosis)(예컨대, 트랜지션성 암 상태의 동정, 암의 단계 또는 진행상태 판별 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 질환의 치료 후 재발 여부 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0024] 본원에서 용어 "바이오마커" 또는 진단 마커(diagnosis marker)란 난소암이 발생한 조직 또는 세포를 정상 세포 또는 적절한 난소암 치료를 받은 조직 또는 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 검체 (대조군)에 비하여 질환이 발생한 조직이나 부위에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 비코딩 핵산을 포함한다.
- [0025] 본원에 따른 바이오마커는 하나 또는 두 개 이상의 조합, 예를 들면 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개의 조합으로 사용될 수 있으며, 기존의 마커 및/또는 진단방법등과 함께 사용될 수 있다. 당업자라면 본원 실시예에 기재된 방법과 같은 정상인 및 환자를 포함하는 대상체의 생물학적 시료를 사용한 분석 및/또는 Logistic regression 분석과 같은 방법을 통해 목적하는 민감도 및 특이성을 만족하는 마커의 조합을 선별할 수 있을 것이다. 본원에 따른 일 구현예에서는 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b의 조합이 사용된다.
- [0026] 본원에서 "생물학적 시료"란 생물유래의 장기, 조직, 세포 또는 체액을 일컫는 것이다. 생물학적 시료의 예로는 조직 절편, 전혈, 혈장, 혈청, 소변 또는 혈액 유래의 백혈구, 적혈구 또는 혈소판, 또는 조직 또는 세포 배양물을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 또한 하나 이상의 상기 시료가 혼합되어 사용될 수 있다. 이러한 생물학적 시료는 검사 직전에 난소암 재발이 의심되는 환자로부터 통상의 시료 획득방법에 의해 대상체로부터 직접 획득한 것이거나 또는 종전에 분리되어 보관된 것일 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서는 전혈, 혈청 또는 혈장과 같은 혈액시료가 사용된다. 본원에 따른 일 구현예에서 이러한 혈액시료는 방사선요법, 항암화학요법 또는 기타 치료 전에 획득된다. 일 구현예에서는 뇨, 전혈, 혈청 및/또는 혈장이 사용될 수 있다. 다른 구현예에서는 난소암이 발생한 또는 발생이 의심되는 또는 발생가능성이 있는 대상체에서 획득한 조직/세포 또는 인비트로 세포 배양물이 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 또한 상기 혈액, 세포 또는 조직의 분획 또는 유도물을 포함하는 것이다. 세포 또는 조직을 이용하는 경우, 세포 자체 또는 세포 또는 조직의 용해물이 사

용될 수 있다.

- [0027] 본원에서 대상체는 질환에 걸린 것으로 의심되는 포유류, 질환에 걸린 후 치료가 되었으나 재발이 의심되는 포유류, 특히 인간을 포함한다.
- [0028] 본원에서 용어 "상보적"은 소정의 혼성화 (교잡) 또는 어닐링 조건, 바람직하게는 생리학적 조건 하에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 본원에 따른 마이크로알엔에이의 표적에 선택적으로 혼성화 할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 일부 또는 부분적으로 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 실질적으로 상보적이란, 완전히 상보적인 것은 아니지만, 표적 서열에 결합하여 본원에 따른 효과 즉 마이크로알엔에이의 활성을 방해하기에 충분한 효과를 낼 정도의 상보성을 의미하는 것이다.
- [0029] 본원에서 용어 "핵산"은 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, DNA, RNA, 및 그 유사체 및 그 유도체를 포함하는 것으로 예를 들면 펩타이드 핵산 (PNA) 또는 그 혼합물을 포함한다. 또한 핵산은 단일 또는 이중가닥일 수 있으며, 폴리펩타이드, mRNA, microRNA 또는 siRNA 등을 포함하는 분자를 코딩할 수 있다.
- [0030] 본원에 따른 조성물은 생물학적 시료에서 상기 하나 이상의 miRNA의 발현량을 검출하고, 이를 대조군 또는 참조군과 비교하여, 그 발현량의 증가, 변화 정도에 따라 난소암 진단 또는 재발을 예측할 수 있다.
- [0031] 따라서, 본원에 따른 조성물은 다음과 같은 방법을 사용하여 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 측정/검출 할 수 있으며, 따라서, 이러한 방법에 사용되는 시약을 포함할 수 있다.
- [0032] 본원에 따른 miRNA의 측정은 목적하는 miRNA의 정성, 정량 및 반정량 검출 방법을 포함한다. 핵산 검출과 관련된 임의의 공지된 방법 예를 들면 후술하는 핵산 교잡 및/또는 증합 및/또는 증폭 방법 및/또는 교잡기반 라이게이션 방법이 사용될 수 있다. 본원에 따른 바이오마커는 정량적 또는 정성적 분석을 통해 핵산, 특히 miRNA의 존재 여부의 검출 및/또는 이의 발현량 자체, 발현량의 변화, 발현량 차이의 수준에서 검출될 수 있다.
- [0033] 핵산 교잡은 핵산 바이오칩 어레이 (마이크로어레이) 또는 인시츄 교잡을 이용하여 수행될 수 있다. miRNA 마이크로어레이 기술은 동시에 다수의 miRNA의 분석을 가능하게 한다. 본원에 따른 miRNA에 상보적인 뉴클레오타이드는 코딩된 캐리어에 스폿팅되거나 또는 인시츄 합성 방법으로 캐리어에 스폿팅 될 수 있다. 일 구현예에서 생물학적 시료로부터 분리된 miRNA는 상기 캐리어 상의 상보적인 서열과의 교잡 후에 효소반응에 의해 검출되는 표지 (예를 들면 바이오틴, 형광염료)의 혼입에 의해 검출될 수 있다. 다른 구현예에서, 생물학적 시료에서 분리된 miRNA는 형광물질로 표지되어, 상응하는 서열과 결합하고, 그 결과 방출된 형광신호는 특정 miRNA의 존재를 나타낸다. 마이크로어레이 제조 기술은 예를 들면 Schena et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA. 93(20):10614-9; Schena et al., 1995, Science 270(5235):467-70; 및 U.S. Pat. Nos. 5,599,695, 5,556,752 또는 5,631,734를 참조할 수 있다.
- [0034] 본원에 따른 miRNA의 검출에는 핵산 증합 또는 증폭 방법이 또한 사용될 수 있으며, 특히 미량으로 존재하는 miRNA 검출에 적합하다. 공지된 다양한 핵산 증폭 또는 합성 방법이 사용될 수 있으며, 예를 들면 역전사 반응, 역전사 증합효소연쇄반응 (RT-PCR), 실시간 RT-PCR, PCR, 실시간 PCR, 정량 RT-PCR, 정량 PCR, NASBA (Nucleic Acid Sequence-Base Amplification), LCR (Ligase Chain Reaction), 다중 연결 프로브 증폭 (Multiple ligatable probe amplification), Invader기술 (Third Wave), SDA(Strand Displacement Amplification), TMA (Transcription Mediated Amplification), 및 Eberwine RNA 증폭 등을 포함할 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0035] 일 구현예에서는 역전사 반응 후에 실시간 정량 PCR 방법이 사용되며 이는 예를 들면 Chen et al., Nucleic Acids Research, 33(20):e170, 2005를 참조하여 수행될 수 있다. RT-PCR은 검체의 RNA를 특히 miRNA를 분리한 후, 이로부터 cDNA를 합성 한 후, 특정 프라이머, 또는 프라이머 및 프로브의 조합을 사용하여, 검체 중의 특정 유전자를 검출하는 것으로, 특정 유전자의 존재/부존재 또는 발현량을 결정할 수 있는 방법이다. 이러한 방법은 예를 들면 (Han, H. et al, 2002. Cancer Res. 62: 2890-6)에 기재되어 있다.
- [0036] 전형적인 PCR 방법은 특정 표적 서열의 증폭을 위해, 주형의 변성, 포워드 및 리버스 프라이머가 표적 서열에 결합하는 어닐링 및 열안정 증합효소에 의한 신장의 단계로 구성되는 3 단계가 여러 주기 예를 들면 통상 20회 이상이 수행된다. 대안적으로 어닐링 및 신장은 동일한 단계에서 수행되기도 한다. 성숙한 miRNA는 단일가닥이기 때문에, PCR 전에 역전사 반응이 먼저 수행될 수 있다. 역전사 반응에는 프라이머와 역전사 효소의 사용을

필요로 한다.

- [0037] PCR 및 정량 PCR에서는 포워드 및 리버스의 한 세트의 프라이머가 사용된다. 프라이머의 길이는 교잡온도, 표적 서열의 구성, 표적 서열의 복잡성 등과 같은 다양한 요소에 따라 결정된다. 일 구현예에서는 프라이머의 길이는 약 10 내지 35 뉴클레오타이드, 예를 들면 15, 20, 25, 30 또는 35 뉴클레오타이드이다. 포워드 프라이머는 바이오마커 miRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 서열을 포함하며, 5' 쪽에 비상보적 서열을 추가로 포함할 수 있다. 리버스 프라이머의 서열은 바이오마커의 서열과는 독립적일 수 있으며, 다수의 miRNA 바이오마커가 한 종류의 리버스 프라이머로 증폭될 수 있거나, 또는 바이오마커에 특이적인 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.
- [0038] 일 구현예에서는 다중 정량 PCR, 다중 정량 RT-PCR 방법을 사용하여 두 개 이상의 miRNA가 하나의 반응으로 증폭된다. 이 경우 한쌍 이상의 프라이머 및/또는 프로브가 사용되며, 예를 들면 각 쌍의 프라이머는 각각 특이적 miRNA를 특이적으로 증폭하며, 프로브는 증폭된 각 miRNA를 구분하는데 사용되어 다중 증폭을 가능하게 한다.
- [0039] 역전사 정량 PCR에서 역전사 및 PCR이 함께 수행될 수 있으며, 이 경우 반응물은 역전사효소 및 열안정중합효소를 모두 포함하며, 화학적 또는 열적 방법으로 열안정중합효소의 활성을 조절하는 “hot start” 반응 방법 (예를 들면 미국 특허 5,411,876, 5,550,044 등 참조)이 사용될 수 있다.
- [0040] 증폭된 산물은 주형으로 사용한 분자와 상응하는 서열을 가지며, 당업계에 공지된 다양한 방법으로 분석될 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 공지된 것으로서 예를 들면 젤 전기영동, 실시간 PCR 분석, SSCP (single strand conformational polymorphism), RFLP(restriction fragment length polymorphism), CZE(capillary zone electrophoresis), WAVE (HPLC-based nucleic acid analyzing technology), 마이크로칩을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0041] 또한 교잡에 기반한 라이게이션 기술이 miRNA의 정량 분석에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면 OLA (oligonucleotide ligation) 및 예를 들면 미국공개공보 2006-0078894에 기재된 HARP-유사 프로브를 사용한 방법과 같은 표적 핵산 서열에 결합한 검출가능한 프로브를 결합하지 않은 프로브로부터 분리해내는 방법 등을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0042] 라이게이션을 이용한 다른 기술은 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)(Schouten et al., Nucleic Acids Research 30:e57 (2002))을 들 수 있다. 상기 기술은 한 쌍의 프르브가 표적서열에 나란히 결합한 경우에만 라이게이션이 일어나는 방식으로 결합하며, 라이게이션된 프로브는 PCR에 의해 증폭될 수 있도록 프라이머 결합부위를 포함한다.
- [0043] 상술한 바와 같은 교잡, 증폭 및/또는 교잡 기반 라이게이션 반응 후의 miRNA는 예를 들면 표적의 염색 또는 표지, 프라이머 또는 프로브의 염색 또는 표지를 통해 교잡 또는 증폭된 miRNA 산물을 검출할 수 있다. 검출에는 당업계의 공지의 기술이 사용될 있으며, 당업자라면 검출의 민감도 및/또는 표적의 양을 고려하여 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다. 검출 방법의 민감도 및/또는 표적의 양에 따라 검출 전에 증폭이 필요하지 않을 수도 있다.
- [0044] 또한 miRNA는 직접적 또는 간접적 방법에 의해 검출될 수 있다. 직접적 방법에서 miRNA는 이에 결합된 검출가능한 표지로 표지되고 이어 비드와 같은 고정지지체에 연결된 프로브에 결합된 후 표지된 miRNA를 스크리닝하여 검출된다. 대안적으로 직접 검출에 표지된 프로브가 사용될 수 있으며, miRNA와 특이적 결합 후 표지된 프로브의 스크리닝을 통해 검출된다. 일 구현예에서는 증폭된 miRNA는 목적하는 핵산을 캡처할 수 있는 프로브와 컨쥬게이션된 비드를 이용하여 검출된다. 다른 구현예에서 프로브는 형광물질로 표지될 수 있다.
- [0045] 간접적 검출방법이 또한 사용될 수 있다. 예를 들면 바이오틀화 프로브를 스트렙타비딘 컨쥬게이트된 염료와 사용하여 결합된 핵산을 검출할 수 있다. 스트렙타비딘 분자는 증폭된 miRNA의 바이오틀 표지에 결합하며, 결합된 miRNA는 스트렙타비딘에 컨쥬게이트된 염료에 의해 검출된다. 이러한 스트렙타비딘에 컨쥬게이트된 염료는 당업계에 공지되어 있으며 예를 들면 Phycolink(R) Streptavidin R-Phycoerythrin (PROzyme)이 사용될 수 있다.
- [0046] 검출을 위한 표지자 (label)는 이로 제한하는 것은 아니나, 광방출, 광산란, 광흡수 물질과 같은 검출가능한 형광, 화학발광 또는 생발광 신호를 생성 또는 소거할 수 있는 화합물을 포함하며, 예를 들면 Garman A., Non-Radioactive Labeling, Academic Press 1997을 참조할 수 있다. 형광 물질은 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니다 플루오레신 (예를 들면 미국특허 6,020,481), 로다민 (예를 들면 미국 특허 6,191,278), 벤조페논사진 (예를 들면 미국특허 6,140,500), 공여체와 수용체를 포함하는 에너지 전이 형광 염료 (예를 들면 미국특허

5,945,526) 및 사이아나인 (예를 들면 W01997-45539), 리사민, 파이크에리쓰린, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX (Amersham), Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, 6-FAM, Fluorescein Isothiocyanate, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, Renographin, ROX, SYPRO, TAMRA, Tetramethylrhodamine, 및/또는 Texas Red는 물론 기타 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 임의의 형광 모이어티를 포함한다. 형광염료는 6-carboxyfluorescein; 2',4',1,4,-tetrachlorofluorescein; 및 2',4',5',7',1,4-hexachlorofluorescein를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 일 구현예에서는 형광 표지로 SYBR-Green, 6-carboxyfluorescein ("FAM"), TET, ROX, VICTM, 또는 JOE가 사용된다. 일 구현예에서는 리포터 형광물질과 소거형광물질의 두 개의 형광물질로 표지된 프로브가 사용되며, 이 경우 형광물질은 구분이 가능한 파장이 스펙트럼을 방출하는 형광물질이 사용된다.

[0047] 또한 표지자는 핵산의 결합을 향상, 안정화 또는 핵산의 결합에 영향을 미칠 수 있는 화합물 예를 들면 에씨디움 브로마이드 및 SYBR-Green을 포함하는 인터칼레이터, 마이너그루브 결합체 및 가교가능한 작용기가 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니며, Blackburn et al., eds. "DNA and RNA Structure" in Nucleic Acids in Chemistry and Biology (1996)을 참조할 수 있다.

[0048] 따라서 본원에 따른 조성물은 상술한 방법 중 어느 하나 이상의 방법에 사용되는 시약을 포함할 수 있다.

[0049] 일 구현예에서는 상기 miRNA 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 RT-PCR로 측정하기 위한 방법에 필요한 시약을 포함하여, 예를 들면 본원 마커의 mRNA에 특이적인 프로브 및/또는 프라이머쌍을 포함한다. "프라이머" 또는 "프로브"는 주형과 상보적으로 결합할 수 있고 역전사효소 또는 DNA 중합효소가 주형의 복제를 개시할 수 있도록 하는 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열을 의미한다. 본원에 사용되는 상기 시약은 증폭된 산물의 검출을 위해 상술한 바와 같은 발색, 발광 또는 형광물질과 같은 것으로 표지될 수 있다. 일 구현예에서는 miRNA 검출을 위해 역전사 PCR (중합효소연쇄반응)이 사용된다.

[0050] 다른 구현예에서, 검출시약은 마이크로어레이를 포함하는 어레이 또는 칩의 형태로 제공될 수 있다. 검출시약은 검출을 위해 직접적 또는 샌드위치 형태로 간접적으로 표지될 수 있다. 직접적 표지방법의 경우, 어레이 등에 사용되는 혈청 시료는 Cy3, Cy5와 같은 형광 표지로 표지된다.

[0051] 본원에 따른 바이오마커 또는 이를 포함하는 조성물은 난소암의 진단, 재발 예측 및/또는 예후 측정에 유용하게 사용될 수 있다.

[0052] 이러한 맥락에서 본원의 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 또는 방법에 관한 것이다.

[0053] 상기 키트에 포함될 수 있는 시약 및 이를 이용한 검출은 앞서 언급한 바를 참조할 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서, 본원의 키트는 핵산 증폭에 사용되며, 특히 RT-PCR을 이용한 증폭에 사용된다. 이 경우 키트는 RT-PCR의 반응에 필요한 완충액, 역전사 효소, Taq 폴리머라제 및 MgCl₂를 포함한다. 당업계에 공지된 다양한 완충액이 사용될 수 있으며, 예를 들면 Tris-HCl, pH 9.0 완충액이 사용될 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다. 역전사 효소 및 Taq 폴리머라제는 시중에서 구입할 수 있으며, 예를 들면 폴리머라제로 hot start 반응이 가능한 AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, USA)와 같은 것을 사용할 수 있으며, 적절한 농도 예를 들면 1.5mM 내지 2.5mM의 MgCl₂가 포함될 수 있다.

[0054] 본원에 따른 키트는 양성대조군, 음성대조군 및 사용설명서를 추가로 포함한다. 음성대조군으로는 miRNA를 포함하지 않는 시료, 양성대조군은 검출대상 miRNA 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0055] 이런 측면에서 본원은 또한 난소암의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 난소암이 의심되는 대상체 유래의 시료를 제공하는 단계; 상기 시료에서 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 및 miR-196b로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 발현량을 측정하는 단계; 상기 측정 결과를 대조군의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계; 및 상기 대조군 시료와 비교하여, 상기 대상체 시료의 발현량에 변화가 있는 경우, 이를 난소암으로 판정하는 단계를 포함하는, 난소암 마커를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0056] 본원의 방법에 사용되는 시약 등은 앞서 기술한 바를 참조할 수 있다.

[0057] 본원에 따른 방법에서 대조군은 특히 재발의 예측 또는 재발된 난소암의 조기 진단을 위해, 원발암 난소암 시료가 사용될 수 있다.

[0058] 본 방법은 특정 기간 동안 예를 들어 1년에 걸쳐 수차례 수행될 수 있으며, 발현 패턴의 변화 추이 모니터링에

사용될 수 있다. 마커의 종류에 따라 발현의 증가 또는 감소를 난소암 상태와 연관지을 수 있다. 동일 대상체에 대한 종전의 검사수치 또는 대조군의 수치와 비교하여, 난소암 특히 재발 난소암의 발병, 진행, 악화 등의 판단에 사용될 수 있다. 시간의 경과에 따른 난소암 마커의 변화를 근거로 난소암의 진행 또는 재발을 막기 위한 예방적 조치를 취할 수 있다. 또한 난소암의 확진을 위해, 바이오마커는 보조 수단으로 사용될 수 있으며, 다른 진단 방법 예를 들면 조직검사, 초음파, 컴퓨터단층촬영 (computerized axial tomography (CT scan)) 또는 자기공명영상(magnetic resonance imaging (MRI)) 검사와 함께 사용될 수 있다.

[0059] 이하 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명하나, 본 실시예는 예시적인 것일 뿐 어떤 식으로든 본원의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0060] 본 발명은 달리 언급이 없는 한 세포생물학, 세포배양, 분자생물학, 유전자 형질전환 기술, 미생물학, DNA 재조합기술에 관한 당업자의 기술수준 내인 통상의 기술을 사용하여 실시될 수 있다. 또한, 일반적인 기술에 관한 보다 자세한 설명은 Molecular Biotechnology: (Bernard et al., ASM press 1994); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985)을 참고할 수 있다.

[0061] **실시예**

[0062] **실시예 1 miRNA 분석**

[0063] 임상연구윤리위원회(IRB)의 승인을 받아 칠곡경북대학교 병원에서 2013년 9월부터 2014년 5월까지 난소암으로 수술을 받은 초기 난소암 환자 및 재발 난소암 환자 각각 5명 (총 10명)의 조직 샘플을 인체자원은행을 통해 취득하였다.

[0064] 이어 수득한 조직으로부터 Trizol® (Life Technology, USA) 및 Qiagen RNA extraction Kit를 제조자의 방법대로 사용하여 총 RNA를 분리하였으며, 분리된 총 RNA의 질은 Agilent RNA Bioanalyzer를 제조자의 방법대로 사용하여 확인하였다.

[0065] **실시예 2 재발 난소암 특이적 miRNA 마커 발굴**

[0066] 실시예 1에서 분리한 총 RNA (10 µg)로부터 Affymetrix small sample labeling protocol VII (Affymetrix)를 이용하여 바이티닐화된 cRNA를 합성하였다. 이어 상기 cRNA를 제조자의 표준 방법에 따라 Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0에 교잡하였다. 교잡 후 형광광도의 측정 및 분석은 Genechip operating software (Affymetrix)를 제조자의 방법대로 이용하여 수행하였다. 총 6658개의 인간 miRNA를 각각 5건의 원발암(primary ovarian cancer)과 재발암에서 비교 분석 하여, 원발암과 비교하여 재발암에서 로그 변환 발현량이 적어도 2배 이상 차이가 있는 전사체를 선별하였다. 그 결과 재발암에서 특이적으로 과발현하는 4 종 (hsa-miR-551b-3p, hsa-miR-19b-1-5p, hsa-miR-3198, 그리고 hsa-miR-196b-5p)의 microRNA를 발굴하였으며, 결과는 표 1에 기재되어 있다.

[0067] 통계분석은 Student's t-test를 이용하여 수행되었으며, 통계적 유의성은 <0.05이다.

[0068] [표 1]

miRNA	Fold change Recurrent/ primary	Average		Primary ovarian cancer samples					Recurrent ovarian cancer samples					t-test P-value
		Primary cancer	Recurrent cancer	OT56	OT63	OT95	OT101	OT103	44T	52T	75T	OT80	OT97	
hsa-miR-551b-3p	40.565	3.2	130.1	5.1	2.9	3.0	1.6	3.5	52.5	389.3	16.3	39.7	152.5	0.0046
hsa-miR-19b-1-5p	27.558	2.8	76.5	1.5	4.0	4.0	2.1	2.2	96.1	131.1	124.9	27.9	2.2	0.0197
hsa-miR-3198	18.056	2.0	36.7	3.5	1.9	1.5	1.6	1.6	140.2	8.2	13.1	20.3	1.8	0.0291
hsa-miR-196b-5p	14.881	12.0	178.2	43.7	8.5	1.7	4.3	1.7	83.1	629.2	4.7	120.9	53.1	0.0244

[0069]

[0070] 표 1에서 보는바와 같이, hsa-miR-551b-3p miRNA는 재발암에서 평균 130.1 발현량, 원발 난소암에서 평균 3.2의 발현량을 보였다 ($P = 0.0046$). hsa-miR-19b-1-5p miRNA는 재발 난소암에서 평균 76.5 발현량, 원발 난소암에

서 평균 2.8의 발현량을 보였다 ($P = 0.0197$). hsa-miR-3198 miRNA는 재발 난소암 평균 36.7 발현량, 원발 난소암에서 평균 2.0의 발현량을 보였다 ($P = 0.0291$). hsa-miR-196b-5p miRNA는 재발 난소암 평균 178.2 발현량, 원발 난소암에서 평균 12.0의 발현량을 보였다 ($P = 0.0244$).

실시예 3 재발 난소암 마커의 특이성 분석

실시예 1에서 준비한 각 환자 조직 유래의 총 RNA를 사용하여 각 조직에서의 hsa-miR-551b-3p, hsa-miR-19b-1-5p, hsa-miR-3198, 그리고 hsa-miR-196b-5p의 발현량을 분석하였다. 상기 miRNA의 발현은 Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 을 이용한 마이크로레이를 이용하여 분석하였다. 그 결과 miR-551b, miR-19b-1, miR-3198, 그리고 miR-196b의 발현이 난소암 재발의 유의미한 바이오마커임을 확인하였으며, 재발 난소암의 조기 진단 및/또는 난소암 재발 예측 마커로서 유용하게 사용될 수 있다.

또한 각 조직별로 4개의 miRNA 발현량의 평균값을 계산하여 비교한 결과 표 2에서 나타난바와 같이, 재발된 난소암은 평균 84.5 발현량, 원발 난소암은 평균 4.2의 발현량을 보였다 ($P = 1.03 \times 10^{-7}$). 원발성 난소암, OT56, OT63, OT95, OT101, OT103의 발현량은 각각 11.0, 3.7, 2.2, 2.1, 2.0 이었으며, 재발성 난소암, 44T, 52T, 75T, OT80, OT97의 발현량은 각각 74.6, 231.8, 32.0, 42.0, 42.1이었다. 이러한 결과는 miRNA 4개를 조합하여 사용할 경우, 난소암 재발 판단에 있어 보다 정확한 바이오마커로서 사용될 수 있음을 나타낸다.

이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.