(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0009332
(43) 공개일자 2022년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0087674
(22) 출원일자 2021년07월05일
심사청구일자 2021년07월05일
(30) 우선권주장
1020200087486 2020년07월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
국민대학교산학협력단
서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
임화선
서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 61호(여의도동, 여의도시범아파트)
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호(쌍용동, 현대아이파크홈타운)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

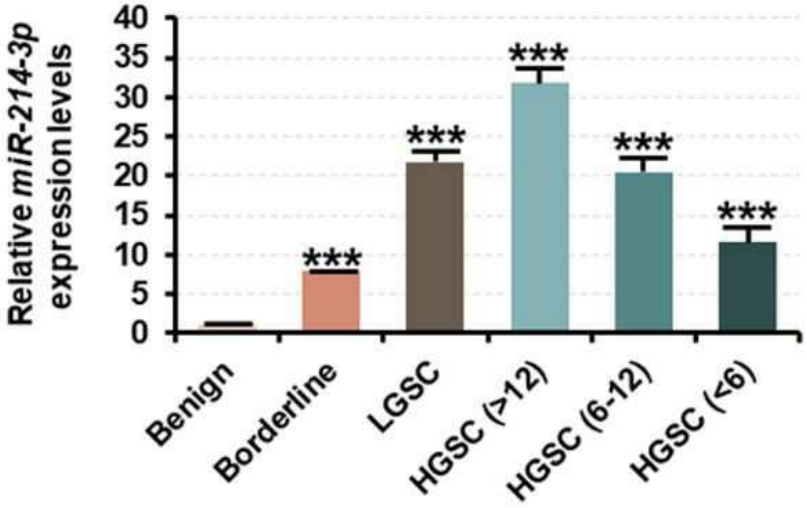
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **miR-214-3p를 포함하는 난소암에 대한 화학요법제의 저항성 예측용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 miR-214-3p를 포함하는 난소암에 대한 화학요법제 (chemotherapy)의 저항성 예측용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상피성 난소암 환자의 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현이 증가될수록 상피성 난소암의 항암제 저항성이 증가되는 것이 확인됨에 따라, 상기 miR-214-3p의 발현 수준 변화는 상피성 난소암 환자의 항암제 저항성에 대한 예후 예측용 조성물로 제공될 수 있으며, miR-214-3p 억제제가 처리된 상피성 난소암 세포의 세포사멸이 증가하고, 항암제 저항성이 조절되는 것이 확인됨에 따라, 상기 miR-214-3p 억제제는 상피성 난소암 세포의 항암 치료제 또는 항암제 민감화제로 제공될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

(72) 발명자
양창원
서울특별시 성북구 한천로 713, 501동 1202호(장위동, 래미안장위퍼스트하이)
김희승
서울특별시 서초구 서초중앙로24길 57, 101동 1001호(서초동, 서초롯데캐슬프레지던트)
박수진
서울특별시 용산구 백범로90길 74, 103동 1207호(문배동, 이안용산)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465028677
과제번호	HI17C0929
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발
연구과제명	액체생체검사 기반 난소암 조기 진단, 재발 예측 및 항암제 내성 관련 엑소좀 바이오마커 발굴 및 검증
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국민대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 miR-214-3p를 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 miR-214-3p는 엑소좀 유래인 것을 특징으로 하는, 난소암에 대한 화학요법제의 저항성 예측용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 화학요법제는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것을 특징으로 하는, 난소암에 대한 화학요법제의 저항성 예측용 조성물.

청구항 4

혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료로부터 miR-214-3p를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 miR-214-3p는 엑소좀 유래인 것을 특징으로 하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 제제는 miR-214-3p에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 키트는 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하여 정상 대조군에 비해 발현이 증가되었을 경우 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성인 것으로 결정하는 것을 지시하는 설명서를 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트.

청구항 8

청구항 4에 있어서, 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것을 특징으로 하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트.

청구항 9

(a) 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료에서 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 시료 내 miR-214-3p의 발현 수준을 정상 대조군의 발현 수준과 비교하여 정상 대조군의 발현 수준보다 높은 경우에 난소암 환자가 화학요법제(chemotherapy)의 저항성인 것으로 결정하는 단계;를 포함하는, 난소암 환자에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것을 특징으로 하는, 난소암 환자에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

miR-214-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물.

청구항 12

miR-214-3p 억제제 및 화학요법제(chemotherapy)를 유효성분으로 포함하며, 상기 miR-214-3p 억제제가 화학요법제(chemotherapy)의 치료효과를 증진시키는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물.

청구항 13

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서, 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것을 특징으로 하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물.

청구항 14

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서, 상기 miR-214-3p 억제제는 LHX6를 조절하는 것을 특징으로 하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물.

청구항 15

(a) 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청에서 얻은 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청에 후보물질을 처리한 후 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준이 (a) 단계의 엑소좀 유래 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준보다 낮은 경우에 상기 후보물질이 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제인 것으로 결정하는 단계;를 포함하는, 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 miR-214-3p를 포함하는 난소암에 대한 화학요법제 (chemotherapy)의 저항성 예측용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대부분의 난소암은 난소와 난관의 상피조직으로부터 유래하며 부인과 악성 종양 중에서 가장 낮은 5년 생존율을 나타낸다. 상피성 난소암은 서양에서 여성의 암에 의한 사망 원인 중 4위에 해당되며, 한국에서도 발생율이 점차 증가하고 있다.

[0003] 난소암은 대부분 다른 장기로 전이된 상태에서도 증상이 나타나지 않기 때문에 상당히 진행된 상태, 즉 높은 임상기에서야 발견이 된다. 따라서 난소암은 대수수을 필요로 하며 동시에 복합적 치료방법이 요구된다. 난소암 치료는 플라티늄 계열의 화학적 치료법을 동반한 수술적 치료가 상피성 난소암에 대한 주 치료법으로 수행되지만 대부분의 환자는 1차 치료 후 12개월에서 18개월 안에 재발한다. 따라서, 상피성 난소암의 악성화와 재발에 대한 분자적 기전 규명과 함께 이를 진단할 수 있는 분자지표의 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 엑소좀은 세포간 상호작용을 담당하는 작은 크기의 소포로 엑소좀에 포함된 다양한 종류의 단백질, miRNA,

mRNA, 지질 등은 병리학적 특징을 담고 있어 질병에 대한 바이오마커의 소재로 각광받고 있다. miRNA는 엑소좀에 가장 많이 존재하는 작은 비번역 RNA (small non-coding RNA)로, 암세포에서 유래한 엑소좀 내 miRNA를 통해 다양한 종류의 암을 진단할 수 있을 것으로 추측된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1275266호 (2013.06.17. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 miR-214-3p의 발현 수준 확인을 통하여 난소암의 화학요법제 저항성을 예측하고, miR-214-3p의 발현 조절제를 난소암 치료제 및 화학요법제 민감제로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 miR-214-3p를 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명은 혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료로부터 miR-214-3p를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트를 제공한다.

[0009] 본 발명은 (a) 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료에서 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0010] (b) 상기 (a) 단계의 시료 내 miR-214-3p의 발현 수준을 정상 대조군의 발현 수준과 비교하여 정상 대조군의 발현 수준보다 높은 경우에 난소암 환자가 화학요법제(chemotherapy)의 저항성인 것으로 결정하는 단계;를 포함하는, 난소암 환자에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 miR-214-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 miR-214-3p 억제제 및 화학요법제(chemotherapy)를 유효성분으로 포함하며, 상기 miR-214-3p 억제제가 화학요법제(chemotherapy)의 치료효과를 증진시키는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 (a) 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청에서 얻은 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0014] (b) 상기 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청에 후보물질을 처리한 후 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0015] (c) 상기 (b) 단계의 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준이 (a) 단계의 엑소좀 유래 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준보다 낮은 경우에 상기 후보물질이 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제인 것으로 결정하는 단계;를 포함하는, 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따르면, 상피성 난소암 환자의 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현이 증가될수록 상피성 난소암의 항암제 저항성이 증가되는 것이 확인됨에 따라, 상기 miR-214-3p의 발현 수준 변화는 상피성 난소암 환자의 항암제 저항성에 대한 예후 예측용 조성물로 제공될 수 있으며, miR-214-3p 억제제가 처리된 상피성 난소암 세포의 세포사멸이 증가하고, 항암제 저항성이 조절되는 것이 확인됨에 따라, 상기 miR-214-3p 억제제는 상피성 난소암 세포의 항암 치료제 또는 항암제 민감화제로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 양성 장액낭샘종 (benign tumor, n=5), 경계성 장액성 종양 (borderline serous tumor, n=4), 저등급 장액성 난소암 (LGSO, n=5), 플라티늄 민감성 고등급 장액성 난소암 (HGSO, PFI > 12; n=5), 부분적 플라티늄 민감성 고등급 장액성 난소암 (HGSO, PFI 6-12; n=5) 및 플라티늄 저항성 고등급 장액성 난소암 (HGSO, PFI < 6; n=5) 환자군으로 구분된 상피성 난소암 환자 조직 내 악성화에 따른 miR-214-3p 발현 변화를 확인한 결과이다.

도 2는 양성 장액낭샘종 (benign tumor, n=5), 경계성 장액성 종양 (borderline serous tumor, n=4), 저등급 장액성 난소암 (LGSO, n=5), 플라티늄 민감성 고등급 장액성 난소암 (HGSO, PFI > 12; n=5), 부분적 플라티늄 민감성 고등급 장액성 난소암 (HGSO, PFI 6-12; n=5) 및 플라티늄 저항성 고등급 장액성 난소암 (HGSO, PFI < 6; n=5) 환자군으로 구분된 상피성 난소암 환자 혈액 유래 엑소좀 내 miR-214-3p 발현 변화를 확인한 결과이다.

도 3은 상피성 난소암 세포주인 OV90 및 ES2 세포에서 miR-214 조절에 의한 표적 유전자 LHX6의 발현 양상을 확인한 결과이다.

도 4는 상피성 난소암 세포주인 OV90 및 ES2 세포에 miR-214-3p 억제제 및 siLHX6 형질 주입 후 상피성 난소암 세포의 증식 변화를 확인한 결과이다.

도 5는 상피성 난소암 세포주인 OV90 및 ES2 세포에 miR-214-3p 억제제 형질주입 후 상피성 난소암의 세포사멸 수준을 확인한 결과이다.

도 6은 상피성 난소암 세포주인 OV90 및 ES2 세포에서 miR-214-3p 억제제 처리에 따른 세포주기, 이주성 및 미토콘드리아 기능 변화를 확인한 결과이다.

도 7은 상피성 난소암 세포주인 OV90 및 ES2 세포에서 miR-214-3p 억제제 처리에 따른 PCNA 단백질 발현 및 증식력 변화를 확인한 결과이다.

도 8은 난소암 세포주 유래 엑소좀 내 GW4869 처리에 따른 miR-214-3p의 발현 변화를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명의 발명자들은 상피성 난소암 환자 체액에서 동정한 엑소좀에서 miR-214-3p의 과발현과 miR-214-3p에 의해 발현이 조절되는 표적 유전자 LHX6의 발현 억제에 의해 상피성 난소암 세포주의 항암제 저항성이 증가되는 것을 확인하였으며, miR-214-3p에 대한 억제제는 난소암 세포의 증식을 억제하고 항암제의 사멸 효과를 향상시키는 효과를 나타내는 것을 확인함에 따라, 본 발명을 완성하였다.

[0022] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 miR-214-3p를 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 조성물을 제공할 수 있다.

[0023] 상기 miR-214-3p는 엑소좀 유래인 것일 수 있다.

[0024] 상기 화학요법제는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제일 수 있다.

[0025] 본 발명은 혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료로부터 miR-214-3p를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트를 제공할 수 있다.

[0026] 상기 miR-214-3p는 엑소좀 유래인 것일 수 있다.

[0027] 상기 제제는 miR-214-3p에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브 중 어느 하나인 것일 수 있다.

[0028] 상기 키트는 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하여 정상 대조군에 비해 발현이 증가되었을 경우 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성인 것으로 결정하는 것을 지시하는 설명서를 포함하는 것일 수 있다.

[0029] 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제일 수 있다.

[0030] 본 명세서에서 용어 "예후"는 병세의 진행, 회복에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 본 발명의 목적상, 예후란 상피성 난소암의 치료 후 해당 개체에서 치료 성공 여부, 생존, 재발, 전이, 약물반응성, 내성 등과 같은 여부를 판단하는 것을 의미한다.

[0031] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0034] 본 발명은 (a) 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료에서 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0035] (b) 상기 (a) 단계의 시료 내 miR-214-3p의 발현 수준을 정상 대조군의 발현 수준과 비교하여 정상 대조군의 발현 수준보다 높은 경우에 난소암 환자가 화학요법제(chemotherapy)의 저항성인 것으로 결정하는 단계;를 포함하는, 난소암 환자에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다.

[0036] 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제일 수 있다.

[0038] 본 발명은 miR-214-3p 억제제를 유효성분으로 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0039] 본 발명은 miR-214-3p 억제제 및 화학요법제(chemotherapy)를 유효성분으로 포함하며, 상기 miR-214-3p 억제제가 화학요법제(chemotherapy)의 치료효과를 증진시키는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0040] 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제일 수 있다.

[0041] 상기 miR-214-3p 억제제는 LHX6를 조절하는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0044] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감

미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0046] 상기 miR-214-3p 억제제의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 또한, 본 발명은 (a) 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청에서 얻은 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0050] (b) 상기 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청에 후보물질을 처리한 후 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0051] (c) 상기 (b) 단계의 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준이 (a) 단계의 엑소좀 유래 엑소좀 유래 miR-214-3p의 발현 수준보다 낮은 경우에 상기 후보물질이 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제인 것으로 결정하는 단계;를 포함하는, 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[0053] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0055] <실험예>

[0056] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0058] 1. 환자 조직 및 혈청 동정

[0059] 양성종양(benign), 경계성종양(borderline), 저등급 장액성 난소암(low grade serous adenocarcinoma, LGSG), 플라티늄 저항성 고등급 장액성 난소암(high grade serous adenocarcinoma, HGSG: 플라티늄 약물의 primary treatment에 의한 재발 기간에 따라 6개월 미만, 6개월~12개월, 12개월 초과로 구분) 환자의 조직과 혈액 샘플을 사용하여 이하 실험을 수행하였다.

[0060] 난소암 환자의 조직은 29명의 환자로부터 수술 직후 동정하였으며 액체 질소에 보관하였다. 동정한 조직은 양성 장액낭샘종 (n=5), 경계성 장액성 종양 (n=4), 저등급 장액성 난소암 (LGSO, n=5), 고등급 장액성 난소암 (HGSO, n=15)로 분류된다. 또한 고등급 장액성 난소암은 플라티늄 계열의 화학적치료 이후 재발 기간 (PFI)에 기반한 분류에 따라 저항성 (PFI < 6개월; n=5), 부분적 민감성 (6개월 ≤ PFI < 12개월; n=5), 민감성 (PFI > 12개월; n=5)로 분류되었다. 혈액 샘플은 수술 직후 같은 환자에게서 동정하였으며 원심분리를 통해 얻어낸 혈청을 액체 질소에 보관하였다. 모든 조직과 혈액 샘플은 서울대병원 인체자원은행을 통해 얻었으며 서울대학교병원 생명윤리위원회(IRB)의 승인을 받았다 (No. 1708-053-876).

[0062] 2. microRNA 발현 분석

[0063] 난소암 조직 및 상피성 난소암 세포의 전체 RNA는 Trizol reagent (Invitrogen)을 이용하여 추출하였다. 후보 microRNA 발현 분석을 위한 cDNA 합성을 위해 miRNA first-strand cDNA syntehsis kit (Agilent Technologies)를 이용하였으며, miRNA 발현 분석은 High-Specificity miRNA QPCR Core Reagent Kit (Agilent Technologies)를 이용하였다. miRNA 발현량은 U6 snRNA 발현량에 기반하여 정규화하였다.

[0065] 3. mRNA 발현 분석

[0066] 1 μg의 RNA와 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma)과 StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 측정하였다. PCR 조건은 95℃에서 3분동안 인큐베이션 후 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 3분 조건을 40회 증폭하였으며 GAPDH 발현량에 기반하여 정규화하였다.

[0068] 4. 엑소좀 추출

[0069] 상피성 난소암 환자의 혈청으로부터 엑소좀을 동정하기 위해 Total Exosome Isolation Reagent (from serum) (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 4478360)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 또한 엑소좀으로부터 RNA를 추출하기 위해 Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, catalog nuber: 4478545)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 사용하였다.

[0071] 5. 형질 주입 (Transfection)

[0072] 상피성 난소암 OV90, ES2 세포를 6 웰에 배양하고, 비특이적 대조군과 표적 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide)을 리포펙타민 (Lipofectamine) 2000 (Invitrogen)을 이용하여 형질주입하였다. 모든 올리고뉴클레오타이드는 바이오니아에서 합성하였다. 올리고뉴클레오타이드와 리포펙타민 2000은 Opti-MEM reduced serum media (Gibco, catalog number: 32985070)에 희석한 뒤 세포에 처리되었다. 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 6시간 배양한 후 배지는 FBS가 포함된 배지로 교체되었다.

[0074] 6. BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0075] 상피성 난소암 세포의 증식 능력 변화를 확인하기 위하여 BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 분석을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 후, 10 μM BrdU를 각 웰에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 상피성 난소암 세포에 BrdU를 라벨링하고 세포를 고정하여 항-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션시킨 후 3회 세척하였다. 마지막으로 100 μL의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응시키고 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm 및 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0077] 7. 프로피디움 아이오다이드 (Propidium iodide) 염색을 이용한 세포 주기 분석

[0078] miR-214-3p 억제제에 의한 난소암 세포의 세포주기 변화를 확인하기 위하여 5×10^5 세포를 6 웰에 70 ~ 80% 풍부도가 나타날때 까지 배양하였다. 이 후, miR-214-3p 억제제를 용량 의존적(10, 20 및 40 nM)으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 배양한 후 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 세척하고, 1 mL의 1× binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합한 후 원심분리하여 세포 펠렛을 얻었다. 다음으로 200 μL의 1× binding buffer로 세포를 현탁배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μL 넣고 RNase 5 μL, PI 5 μL를 함께 혼합하여 세포를 1시간 동안 실온에 두어 염색하였다. 이 후 1× binding buffer를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮기고, 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 각 세포 주기에 해당하는 세포의 수를 측정하였다.

[0080] 8. 아넥신 (Annexin) V와 프로피디움 아이오다이드 염색을 통한 세포사멸 분석

[0081] 상피성 난소암 세포의 사멸 효과 변화를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 세척한 후 1 mL의 1× binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 펠렛을 얻었다. 다음으로 200 μL의 1× binding buffer으로 세포를 현탁배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μL 넣고 Annexin V 5 μL 및 PI 5 μL와 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이 후 1× binding buffer를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 담은 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0083] 9. Fluo-4와 rhod-2 염색을 통한 세포 및 미토콘드리아 내부 칼슘 농도 분석

[0084] 난소암 세포의 세포 내 칼슘 농도를 확인하기 위하여 3 μM의 fluo-4 acetoxymethyl ester (AM) (Invitrogen)을 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 5 × 10^5 세포를 6 웰에 배양하였다. 이 후, miR-214-3p 억제제를 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 배양하고, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 세척한 후 3 μM의 fluo-4를 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 20분간 염색하고 PBS로 세척한 후 FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 담고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0086] 10. 면역형광법

[0087] Transfection이 진행된 상피성 난소암 세포를 메탄올로 10분간 고정하고, 1:100으로 희석된 PCNA 항체를 처리하였다. 이 후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A11017, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 antibody dilution buffer에 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간동안 배양하였다. 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 타겟 단백질뿐만 아니라 핵을 동시에 관찰할 수 있도록 하였다. 실험 종료 후 LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0089] 11. JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0090] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 5 × 10^5 개의 ES2 및 OV90 세포를 6 웰에 배양하고 배양 접시에 70 ~ 80% 풍부도가 나타날 때까지 배양하였다. 이 후, miR-214-3p 억제제를 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 배양하고, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 펠렛을 얻었다. 세포는 JC-1 staining solution에 현탁시킨 후 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 20 분간 인큐베이션하였다. 염색된 세포를 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 세척한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0092] 12. DCFH-DA를 이용한 세포내 ROS 측정

[0093] 난소암 세포주 내 ROS 생성에 miR-214-3p 억제제가 미치는 영향을 확인하기 위해, peroxide 존재 하에 DCF (2',7'-dichlorofluorescin)로 변환되어 형광을 띠는 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescin diacetate, Sigma)를 사용하였다. ES2 및 OV90 세포를 트립신으로 떼어내고 원심분리하여 세포 펠렛을 얻었다. 이후 PBS로 한번 세척하고 10 μM의 DCFH-DA를 37℃ 인큐베이터에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 이 후 세포를 PBS에 의해 두 번 세척하고 miR-214-3p 억제제를 첨가하여 1 시간 동안 37℃ 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 처리된 세포를 PBS로 다시 세척하고 유세포 분석기를 사용하여 DCF 형광 강도를 분석하였다.

[0095] 7. 통계분석

[0096] 모든 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0098] **<실시예 1> 악성화 정도에 다른 상피성 난소암 조직 내 miR-214-3p의 발현 변화 확인**

[0099] 난소암 환자 조직에서 전체 RNA를 추출하여 miR-214-3p 발현을 확인하였다. 그 결과, 도 1과 같이 miR-214-3p의 발현이 양성 종양 (benign tumor) 환자군과 비교하여 경계성 장액성 종양(borderline serous tumor), 저등급 장액성 난소암 (LGSO) 및 플라티늄 저항성 고등급 장액성 난소암 (HGSO) 환자의 조직에서 높게 나타나는 것이 확인되었다. 특히, miR-214-3p 발현은 경계성 조직에서 7.9배 ($p < 0.001$), 저등급 장액성 난소암 조직에서 21.8배 ($p < 0.001$) 플라티늄 민감성 고등급 장액성 난소암 조직(HGSC: > 12)에서 31.8배 ($p < 0.001$) 증가하였다. 그러나 고등급 장액성 난소암 조직에서 플라티늄 저항성에 따른 재발환자에서(6개월~12개월, 6개월 미만) miR-214-3p의 발현 변화는 명확하지 않다.

[0101] **<실시예 2> 악성화 정도에 따른 상피성 난소암 환자 혈액 유래 엑소좀 내 miR-214-3p의 발현 변화 확인**

[0102] 다음으로, 난소암 환자의 혈청에서 유래한 엑소좀 내에서 miR-214-3p의 발현을 확인하였다.

[0103] 그 결과, 도 2와 같이 miR-214-3p는 경계성 종양 및 악성 종양 환자의 혈청 유래 엑소좀 내에서 발현이 유의적으로 증가하였다. miR-214-3p 발현은 양성 대조군에 비해 경계성 종양 (7.1배, $p < 0.001$), 저등급 장액성 난소암 (12.9배, $p < 0.001$), 플라티늄 민감성 고등급 장액성 난소암 (11.2배, $p < 0.001$: PFI <12), 부분적 플라티늄 민감성 고등급 장액성 난소암 (8.1배, $p < 0.001$: PFI 6-12), 플라티늄 저항성 고등급 장액성 난소암 (25.2배, $p < 0.001$: PFI < 6) 환자 유래 엑소좀 내에서 발현이 증가하였다.

[0104] 상기 결과로부터 엑소좀 유래 miR-214-3p는 상피성 난소암의 악성화와 재발 및 항암제 저항성을 예측할 수 있는 바이오마커로 제안될 수 있다.

[0106] **<실시예 3> 상피성 난소암 세포 내 miR-214-3p 조절에 따른 증식 및 사멸 조절 효과 확인**

[0107] miR-214-3p가 상피성 난소암 세포의 특성을 변화시킬 수 있는지 확인하기 위해, 상피성 난소암 세포주인 OV90과 ES2 세포에 miR-214에 대한 mimic과 miR-214-3p 억제제 (서열번호 2: 5'-ACU GCC UGU CUG UGC CUG CUG U-3')를 형질 주입(transfection)하였다.

[0108] 그 결과, 도 3A 내지 도 3D와 같이 miR-214-3p에 의해 발현이 조절되는 표적 유전자 LHX6는 miR-214 mimic 형질주입에 따라 발현이 감소된 반면, miR-214-3p 억제제가 형질주입된 세포에서는 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0109] BrdU incorporation 분석을 수행한 결과, 도 4와 같이 miR-214-3p 억제제는 OV90 및 ES2 세포의 증식력을 억제하는 것이 확인되었다. 반대로, LHX6의 발현을 억제하는 siRNA(siLHX6, 서열번호 3: Sense 5'-GAG UCA UCC UUU UUC AGU A-3', 서열번호 4: Antisense 5'-UAC UGA AAA AGG AUG ACU C-3')를 형질주입한 실험군에서는 OV90 및 ES2 세포의 증식력이 유의적으로 증가하는 것이 확인되었다. 40 nM의 siLHX6는 OV90과 ES2 세포의 증식력을 약 1.4배 증가시켰다.

[0110] 또한, 아넥신 V 및 프로피디움 아이오다이드 (propidium iodide) 염색을 수행하여 miR-214-3p 억제제 형질주입에 따른 OV90 및 ES2 세포의 사멸 효과를 확인한 결과, 도 5와 같이 대조군에 비해 miR-214-3p 억제제 40 nM은 OV90 및 ES2 세포의 사멸을 각각 2.6배 ($p < 0.001$) 및 1.7배 ($p < 0.001$) 증가시킨 것으로 확인됨에 따라, miR-214-3p 억제제는 OV90 및 ES2 세포의 사멸을 유의적으로 증가시킬 수 있음이 확인되었다.

[0112] **<실시예 4> 상피성 난소암 세포 내 miR-214-3p 억제제에 의한 세포 특성 변화 확인**

[0113] 상피성 난소암 세포주인 OV90 및 ES2 세포에 miR-214-3p 억제제를 형질주입하고, 상피성 난소암 세포주의 세포 변화를 확인하였다.

[0114] 그 결과, 도 6A 내지 도 6B와 같이 sub-G1 세포주기가 증가하며 사멸이 유도되는 것을 확인하였으며, 세포의 이

주성(migration)이 miR-214-3p 억제제에 의하여 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 도 6C 내지 도 6E와 같이 miR-214-3p 억제제의 형질주입은 난소암 세포 내 활성산소의 증가와 미토콘드리아 막 전위 변화 유도 및 세포 내 칼슘이온을 증가시켜 세포 사멸을 유도하는 것이 확인되었다.

[0116] **<실시예 5> 상피성 난소암 세포 내 항암제와 miR-214-3p 억제제 병용 처리에 의한 세포 증식 변화 확인**

[0117] miR-214-3p 억제제의 형질주입이 시스플라틴(cisplatin) 또는 파클리탁셀(paclitaxel)과의 병용 처리에 따라 상피성 난소암 세포주의 증식력에 영향을 미칠 수 있는지 확인하였다.

[0118] 그 결과, 도 7A 및 도 7B와 같이 OV90 및 ES2 세포 내 miR-214-3p 억제제 형질주입은 시스플라틴 또는 파클리탁셀 처리에 의해 감소했던 PCNA의 발현을 더욱 감소시키는 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라, 도 7C와 같이 miR-214-3p 억제제 형질주입은 시스플라틴 또는 파클리탁셀 처리에 의해 감소했던 OV90 및 ES2 세포의 증식력을 더욱 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0119] 상기 결과로부터 miR-214-3p 발현 조절에 따라 기존 항암제에 대한 세포 증식력 변화의 민감도가 달라지는 것이 확인되었다.

[0121] **<실시예 6> 난소암 세포주 유래 엑소좀 내 microRNA 발현 변화 확인**

[0122] GW4869 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) 처리에 따라 난소암 세포주 또는 난소암 세포주 유래 엑소좀 내에서 miR-214-3p의 발현을 분석하였다. DMSO에 희석된 GW4869를 난소암 세포주 OV90, ES2 및 OVCAR3 세포에 10 μM의 농도로 72시간 동안 처리하였다. 이 후, 난소암 세포주 또는 난소암 세포주 유래 엑소좀 내 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 miR-214-3p의 발현을 qPCR을 통해 측정하였다.

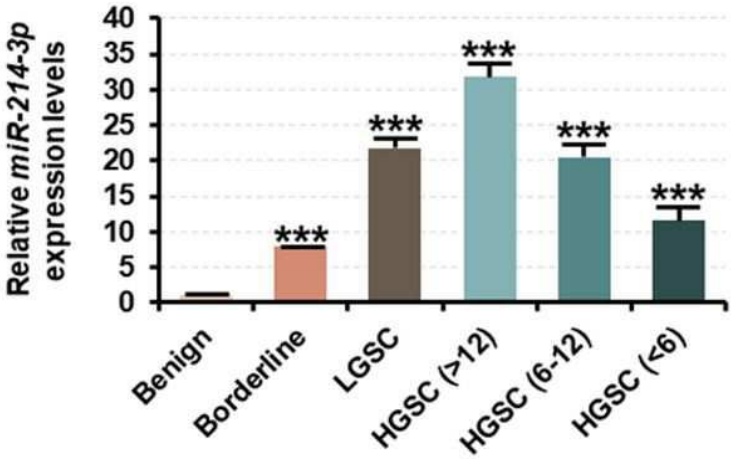
[0123] 그 결과, 도 8과 같이 난소암 세포주 자체에서는 GW4869 처리에 따라 miR-214-3p의 발현 차이가 없었으나 엑소좀 내에서는 GW4869 처리에 따라 유의적인 miR-214-3p의 발현 감소가 확인되었다.

[0124] 상기 결과로부터 miR-214-3p는 엑소좀을 통해 세포간 이동이 가능한 것이 확인되었다.

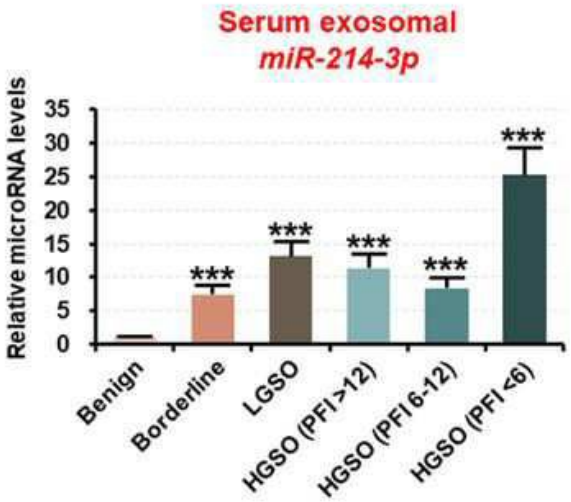
[0126] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

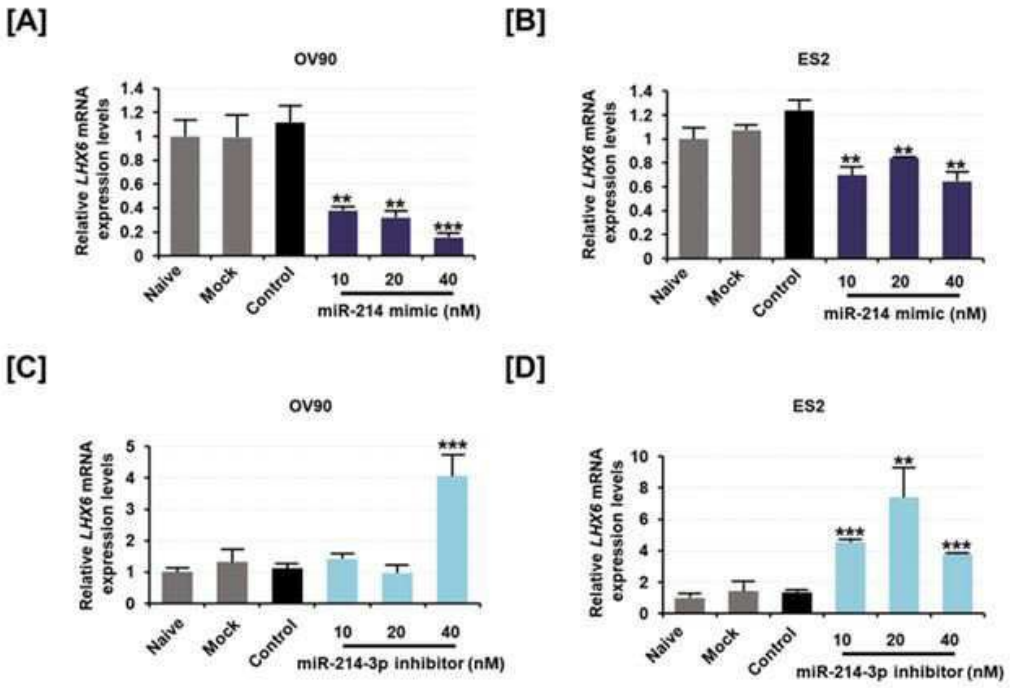
도면1



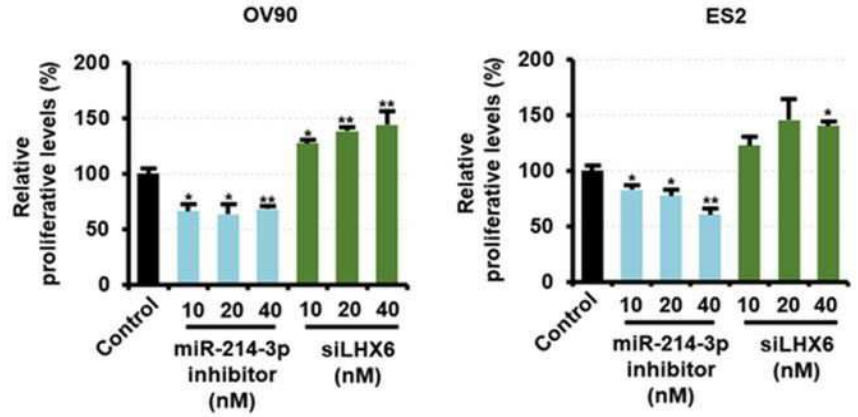
도면2


Serum exosomal
miR-214-3p
Relative microRNA levels
35
30
25
20
15
10
5
0
***
***
***
***
***
Benign
Borderline
LGSO
HGSO (PFI>12)
HGSO (PFI 6-12)
HGSO (PFI<6)

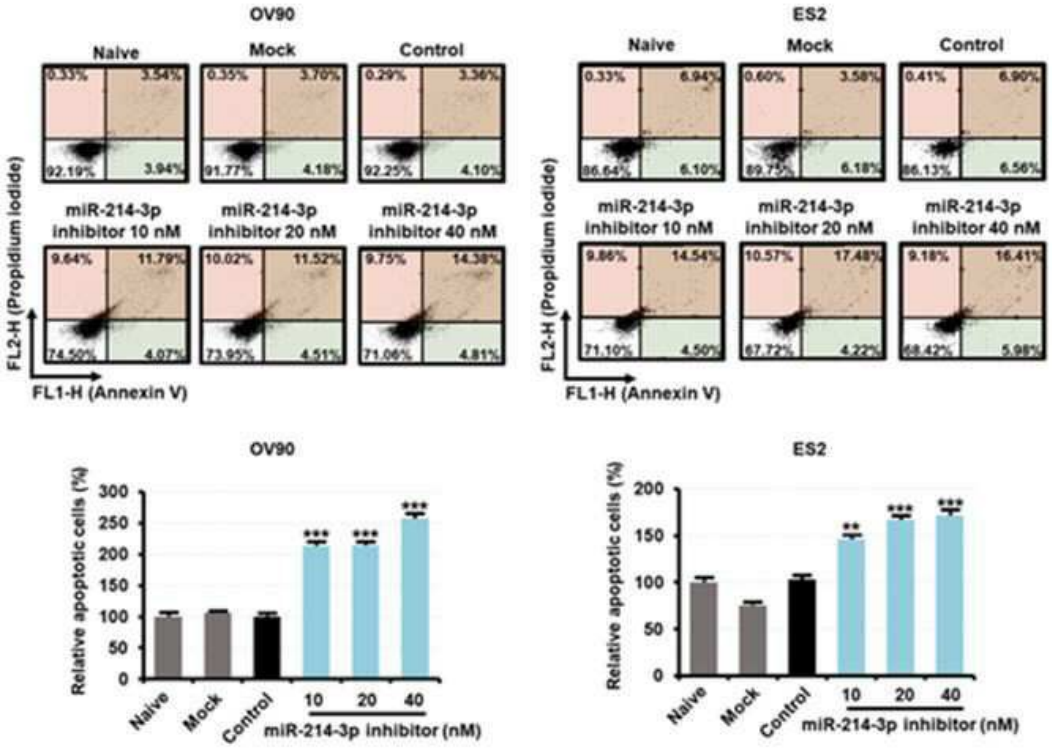
도면3


[A]
OV90
Relative LHX6 mRNA expression levels
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
**
**
***
Naive
Mock
Control
10
20
40
miR-214 mimic (nM)
[B]
ES2
Relative LHX6 mRNA expression levels
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
**
**
**
Naive
Mock
Control
10
20
40
miR-214 mimic (nM)
[C]
OV90
Relative LHX6 mRNA expression levels
5
4
3
2
1
0
***
Naive
Mock
Control
10
20
40
miR-214-3p inhibitor (nM)
[D]
ES2
Relative LHX6 mRNA expression levels
10
8
6
4
2
0
***
**
***
Naive
Mock
Control
10
20
40
miR-214-3p inhibitor (nM)

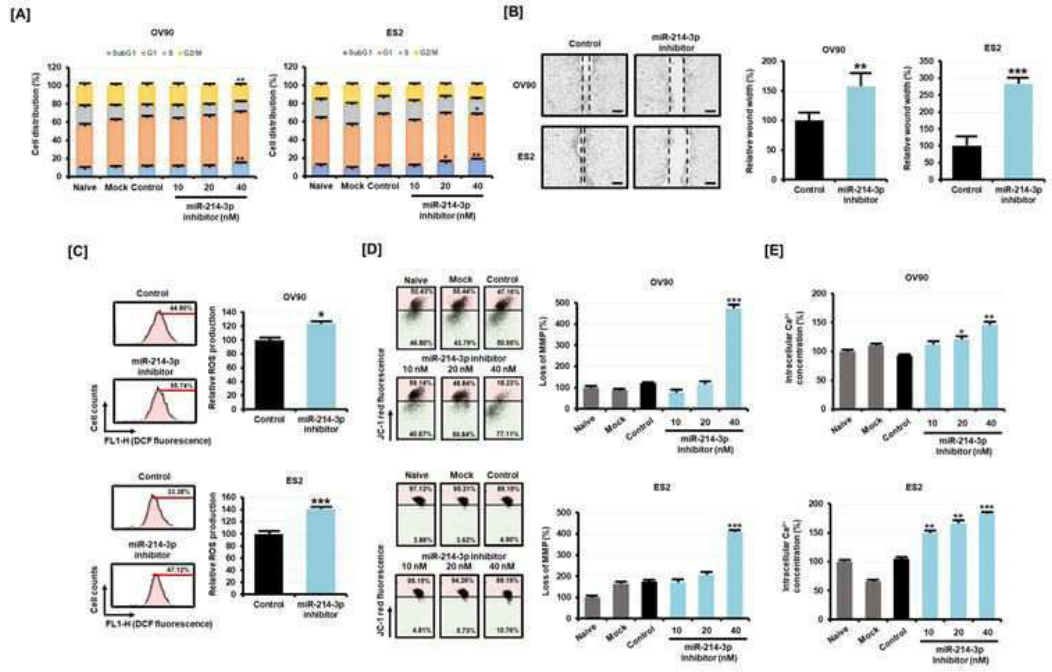
도면4


OV90
ES2
Relative proliferative levels (%)
200
150
100
50
0
Control
10 20 40 10 20 40
miR-214-3p inhibitor (nM)
siLHX6 (nM)

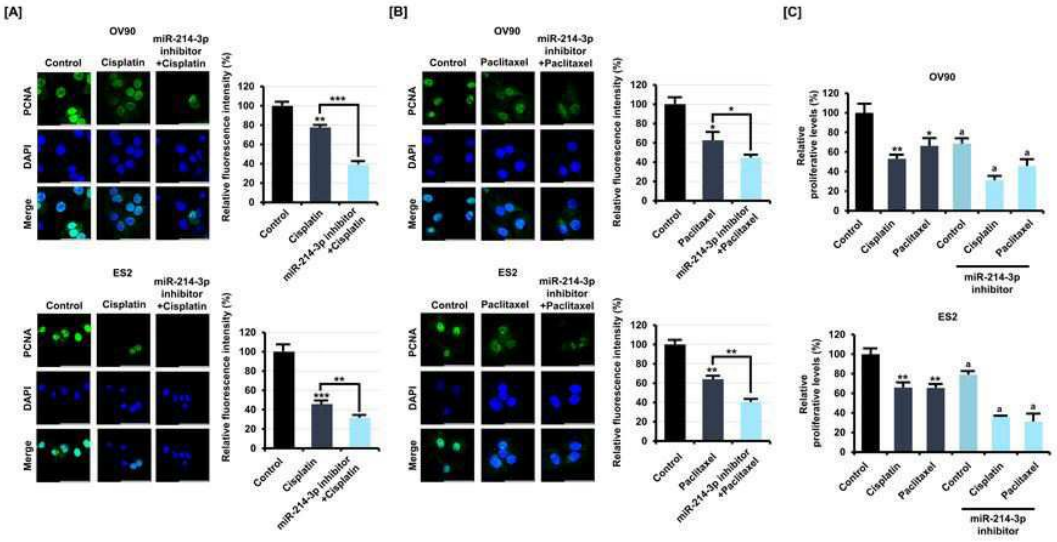
도면5


OV90
ES2
Naive
Mock
Control
miR-214-3p inhibitor 10 nM
miR-214-3p inhibitor 20 nM
miR-214-3p inhibitor 40 nM
FL2-H (Propidium Iodide)
FL1-H (Annexin V)
Relative apoptotic cells (%)
miR-214-3p inhibitor (nM)

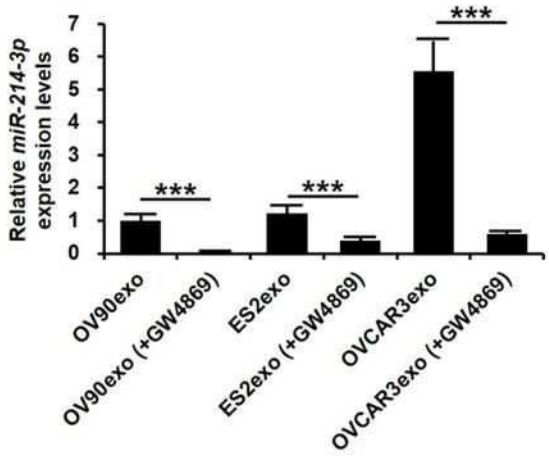
도면6


[A]
OV90
ES2
Cell distribution (%)
Naive
Mock
Control
10
20
40
miR-214-3p inhibitor (nM)
[B]
Control
miR-214-3p inhibitor
OV90
ES2
Relative wound width (%)
[C]
Control
miR-214-3p inhibitor
Cell counts
FL1-H (DCF fluorescence)
Relative ROS production
[D]
Naive
Mock
Control
miR-214-3p inhibitor
10 nM
20 nM
40 nM
JC-1 red fluorescence
Loss of MMP (%)
[E]
Intracellular Ca2+ concentration (%)

도면7


[A]
OV90
ES2
Control
Cisplatin
miR-214-3p inhibitor +Cisplatin
PCNA
DAPI
Merge
Relative fluorescence intensity (%)
[B]
Paclitaxel
miR-214-3p inhibitor +Paclitaxel
[C]
Relative proliferative levels (%)
miR-214-3p inhibitor

도면8



서 열 목 록

<110> Kookmin University Industry Academy Cooperation Foundation

<120> Composition for predicting chemotherapy resistance of ovarian cancer and use thereof

<130> AOP-2021-0036

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223> miR-214-3p

<400> 1

acagcaggca cagacaggca gu 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-214-3p inhibitor

<400> 2

acugccuguc ugugccugcu gu 22

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siLHX6 Sense

<400> 3

gagucauccu uuuucagua 19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siLHX6 Antisense

<400> 4

uacugaaaaa ggaugacuc 19