

(43) 공개일자 2024년10월16일

- (71) 출원인

고려대학교 산학협력단

- 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박경화
서울특별시 성북구 보국문로 116, 310동 1004호
(정릉동, 정릉힐스테이트3차)

- 이지민

- 경기도 용인시 수지구 죽전로193번길 35, 106동
503호 (죽전동, 성현마을반도유보라)

- (74) 대리인

- 특허법인 무한

1020230046160 2023년04월07일 대한민국(KR)

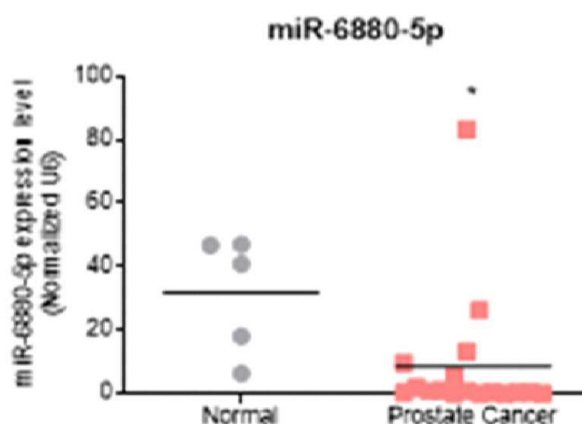
전체 청구항 수 : 총 8 항

- (54) 발명의 명칭 전립선암 진단용 바이오마커로서 암 세포 유래 엑소좀 내 miR-6880-5p

(57) 요약

본 발명은 암 세포 유래의 엑소좀 내 miR-6880-5p의 전립선암 진단 용도에 관한 것으로서, 본 발명은 혈액을 이용한 진단법으로써 조직 생검의 위험 부담을 줄이고 종래기술인 PSA gray zone에서 낮은 정확률을 극복하고자 보다 정확하고 신속하게 전립선암을 진단한다. 뿐만 아니라 내분비 요법의 치료 반응에 대한 예후를 예측하는 것에 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711167889
과제번호	2016R1A5A1010148
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	나노-생체유체 검사 연구단
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

암 세포 유래 엑소좀 내의 miR-6880-5p를 유효성분으로 포함하는 전립선암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암 세포 유래 엑소좀은 혈장에서 분리된 것이고,

상기 암 세포 유래 엑소좀은 CD63을 발현하는 것인, 바이오마커 조성물.

청구항 3

암 세포 유래 엑소좀의 miR-6880-5p의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 전립선암 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 miR-6880-5p의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 miR-6880-5p의 일부 또는 전부와 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드인, 전립선암 진단용 조성물.

청구항 5

(1) 전립선암의 진단이 필요한 개체로부터 분리된 액체 생검으로부터 암 세포 유래 엑소좀을 분리하는 단계;

(2) 상기 엑소좀 내의 miR-6880-5p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(3) 상기 miR-6880-5p의 발현 수준이 정상인의 그 그것과 비교하여 낮은 경우 전립선암인 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 전립선암 진단 방법 및 전립선암 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 (1) 단계는 CD63 항체와 결합된 면역-마그네틱 비드를 이용하여 수행되는 것인, 정보제공방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 액체 생검은 혈액, 혈장, 또는 혈청인 것인, 정보제공방법.

청구항 8

전립선암 환자에서 암 치료 단계 전 및 후에 아래 단계를 수행하여 치료방법의 적합성을 판단하는 방법:

(a) 상기 환자로부터 분리된 액체 생검으로부터 암 세포 유래 엑소좀을 분리하는 단계;

(b) 상기 엑소좀 내의 miR-6880-5p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 치료 후의 상기 miR-6880-5p의 발현 수준이 치료 전의 그것과 비교하여 유의하게 높은 경우 치료 예후가 좋을 것으로 판정하고, 상기 발현 수준이 치료 전의 그것과 비교하여 유의하게 낮은 경우 치료 예후가 나쁠 것으로 판정하는 단계.

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 암 세포 유래의 엑소좀 내 miR-6880-5p의 전립선암 진단 용도에 관한 것으로서, 구체적으로, 혈장 샘플에서 엑소좀 내 miR-6880-5p의 발현 수준을 전립선암의 진단을 위한 바이오마커로 제공하고, miR-6880-5p를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 전립선암의 진단용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

배경기술

- [0003] 전립선암 (Prostate cancer, PCa)은 전세계적으로 남성 암 중에서 2번째로 흔히 발생하는 악성 종양이다. 2019년 국가암등록통계에 따르면 암 발생율은 전년 대비 3.6% 증가하였으며 전립선암은 암종별로 나누었을 때 6번째 (1만 6,803명)로 많이 발생하는 암으로 보고되었다. 전립선암보다 많이 발생하는 위암, 대장암, 간암 등의 발생률은 최근 10여 년간 감소 추세를 보이고 있으나 전립선암은 1999년 이후 지속적으로 증가하는 것으로 보고되었다.
- [0004] 전립선암은 다양한 종양 이질성 (intratumor heterogeneity)을 가지고 있다. 종양 이질성은 종양 내에 있는 세포들의 유전형 및 표현형에 대한 정보가 위치에 따라 다르게 관측되며 정도에 따라 약물 반응성, 치료 저항성 등에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 종양 이질성 정도를 통해 종양의 형성 및 진행 패턴을 파악하는 것은 환자의 치료 방법을 선택하는데 상당히 중요하다. 현재까지 전립선암은 PSA (Prostate Specific - Antigen) 측정, 초음파 검사, CT 검사, MRI 검사, 조직 샘플을 이용한 병리 조직 검사 등을 통해 진단 및 예후를 예측하고 있다.
- [0005] PSA는 전립선 세포에서 분비되는 효소가 정액으로 분비되고 소량의 효소가 혈액으로 분비된다. 따라서 혈중 PSA 수치를 통해 검사가 이루어지며 대부분의 정상인들은 4ng/ml 미만의 수치를 보인다. 이 수치가 비정상적으로 상승되어 있을 경우 전립선 비대증, 전립선염, 전립선암과 같은 질환이 있다고 판단된다. 그러나 PSA gray zone에서 전립선암 진단의 정확률은 약 30%이기 때문에 과진단 및 과잉치료가 이루어질 수 있다. 따라서 정확한 진단을 위해 조직 검사가 요구되고 병리 조직 검사를 통해 임상 병기, 암 세포의 악성도, 기타 질환 등을 고려하여 적절한 치료 방법이 선택된다. 하지만 조직 검사는 종양의 위치, 크기, 환자의 상태에 따라 시행하기 어려울 뿐만 아니라 인체에 침습적으로 시행하므로 환자와 의사에게 위험 부담이 있어 보다 간단하고 정확하게 진단할 수 있는 기술이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Haneul Lee et al., "Isolation and Characterization of Urinary Extracellular Vesicles from Healthy Donors and Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer", Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 7134

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 엑소좀 내 miR-6880-5p를 포함하는 전립선암의 진단 및 예후를 예측할 수 있는 방법을 제공한다. 혈액을 이용한 진단법으로써 조직 생검의 위험 부담을 줄이고 종래기술인 PSA gray zone에서 낮은 정확률을 극복하고자 보다 정확하고 신속하게 전립선암을 진단한다. 뿐만 아니라 본 발명의 목적은 내분비 요법의 치료 반응에 대한 예후를 예측할 수 있는 바이오마커를 제공하는 것이다. 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 전립선암 전이 또는 예후 예측용 키트 제공을 목적으로 한다.
- [0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 혈장에서 분리한 엑소좀 내의 miR-6880-5p를 전립선암의 진단 및 치료반응에 대한 예후 예측을 위한 바이오마커로 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 혈장에서 분리한 엑소좀 내의 miR-6880-5p를 유효성분으로 포함하는 전립선암의 진단 및 치료반응에 대한 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 엑소좀은 암 유래의 엑소좀일 수 있고, 상기 암 유래의 엑소좀은 CD63 특이적 항체를 이용하여 분리될 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 혈장에서 분리한 엑소좀의 miR-6880-5p의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 전립선암의 진단 및 치료반응에 대한 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 miR-6880-5p의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 miR-6880-5p의 일부 또는 전부와 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드일 수 있고, 그 비제한적인 예로는 상기 miR-6880-5p에 특이적인 프라이머 또는 프로브일 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명은 전립선암의 진단이 필요한 개체로부터 분리된 액체 생검으로부터 엑소좀을 분리하는 단계; 상기 엑소좀 내의 miR-6880-5p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 miR-6880-5p의 발현 수준이 정상에 그 그것과 비교하여 낮은 경우 전립선암인 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 전립선암 진단 방법 및 전립선암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 전립선암 환자에서 암 치료 단계 전 및 후에 아래 단계를 수행하여 치료방법의 적합성을 판단하는 방법을 제공한다: 상기 환자로부터 분리된 액체 생검으로부터 엑소좀을 분리하는 단계; 상기 엑소좀 내의 miR-6880-5p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 치료 후의 상기 miR-6880-5p의 발현 수준이 치료 전의 miR-6880-5p의 발현 수준과 비교하여 유의하게 높은 경우 치료 예후가 좋을 것으로 판정고, 상기 miR-6880-5p의 발현 수준이 치료 전의 miR-6880-5p의 발현 수준 그것과 비교하여 유의하게 낮은 경우 치료 예후가 좋지 않을 것으로 판정하는 단계.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 전립선암 환자에서 혈액 유래 엑소좀 miRNA가 특이적인 발현 양상을 나타내는 것을 이용하여 전립선암의 발병 및 치료법에 대한 반응을 미리 예측할 수 있는 진단용 바이오마커로서 사용될 수 있다. 혈액을 이용하여 분석함으로써 비침습적인 방법으로 보다 간단하고 신속하게 진단할 수 있다. 혈액 내의 엑소좀은 인지질 이중층 구조를 갖고 있으며 이로 인해 miRNA를 보다 안정적인 방법으로 qPCR을 이용하여 발현 양상을 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 전립선암 환자의 혈액에서 분리한 암세포 유래 엑소좀의 특성을 분석한 결과이다.
- 도 2는 전립선암 환자와 정상인의 혈액 유래 엑소좀 내의 차등발현 유전자를 확인한 것이다.
- 도 3은 전립선암 환자와 정상인의 혈액 유래 엑소좀에서 miR-6880-5p의 발현 수준을 비교한 그래프이다.
- 도 4는 치료반응이 좋은 PR 그룹과 그렇지 아닌 PD 그룹에서 내분비 요법 수행 전/후에 miR-6880-5p의 발현 수준 변화 양상을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 다양한 유형의 전립선암 세포에서 miR-6880-5p의 발현 수준을 비교확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명자들은 비침습적 방법으로 전립선암을 진단할 수 있는 방법에 대해 예의 연구하여, 전립선암 환자의 혈액에서 분리되는 엑소좀에서 낮은 수준의 miR-6880-5p를 확인하고, 전립선암 진단을 위한 바이오마커로서 miR-6880-5p를 제공한다.

- [0023] 한편, 본 발명자들은 내분비 요법에 대한 예후가 좋은 그룹과 그렇지 못한 그룹에서 내분비 요법 치료 전/후에 miR-6880-5p의 발현수준 변화를 확인한 결과, 예후가 좋은 그룹의 경우 낮은 수준의 miR-6880-5p이 치료 후 증가하고, 예후가 좋지 못한 그룹의 경우 상대적으로 높은 miR-6880-5p 수준을 나타내고 치료 후 이의 발현 수준이 감소함을 확인하였다.
- [0024] 이에, 본 발명자들은 전립선암 환자의 치료반응성 예측을 위한 바이오마커로서 miR-6880-5p을 제공한다.
- [0025] 본 발명은 전립선암의 진단과 전립선암 환자의 내분비 요법에 대한 치료반응성 예측을 위한 비침습적인 도구로서 마이크로RNA 바이오마커를 사용함을 특징으로 한다.
- [0026] 보다 구체적으로, 본 발명은 시료 내 존재하는 miRNA-6880-5p의 발현 수준을 측정하여, miRNA-6880-5p가 상대적으로 저발현된 경우 해당 시료의 환자가 전립선암인 것으로 감별하는 기술을 제공한다.
- [0027] 본 발명에서 miRNA-6880-5p의 transcript 염기서열은 5'-UGGUGGAGGAAGAGGGCAGCUC-3'(서열번호1)이다 (Accession Number: MIMAT0027660).
- [0028] 본 발명에서 miRNA-6880-5p가 상대적으로 저발현된 경우란 정상인의 혈장에서 분리한 엑소솜 내의 miRNA-6880-5p 발현량을 기준으로 하며, 해당 시료의 환자가 전립선암인 것으로 판정하기 위해서는 정상인의 miRNA-6880-5p 발현량 보다 약 0.8 배 이하의 발현 수준을 나타내야 하며, 바람직하게는 약 0.6배 이하의 저발현을 확인하여야 한다.
- [0029] 시료 내 존재하는 miRNA-6880-5p의 발현 수준의 측정하기 위해서 마이크로RNA를 검출할 수 있는 각종 체제들을 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 “진단”이란 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.
- [0031] 또한, 본 발명의 전립선암 진단용 키트는 생물학적 시료로부터 miRNA-6880-5p를 발현 수준을 측정할 수 있는 체제를 포함할 수 있으며, 상기 체제란 miRNA-6880-5p의 발현 수준을 확인함으로써 본 발명의 바이오마커 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0032] 본 발명에서 miRNA-6880-5p 발현 수준 측정 체제로서 miRNA-6880-5p에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머, 프로브, 및/또는 항체를 사용할 수 있으며, 유전자 발현 정도를 측정하는데 이용되는 공지의 방법, 예를 들면 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하거나, 프로브를 이용한 혼성화 반응을 통하여 실시하여 miRNA-6880-5p의 발현 수준을 측정할 수 있다. 또한, 상기 키트에는 상기 측정 체제 이외에도 검출을 용이하게 하는 당업계에 공지된 여러 도구, 시약, 예를 들어 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 안정화제 등이 포함될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 miRNA-6880-5p의 발현 수준의 측정하기 위해 사용하는 생물학적 시료는 비침습적 시료일 수 있으며, 상기 비침습적 시료는 액체 생검, 즉 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 또는 타액일 수 있고, 바람직하게는 혈액, 혈청, 또는 혈장일 수 있고, 더욱 바람직하게는 혈장일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에서 miRNA-6880-5p는 이를 구성하는 올리고뉴클레오티드의 작용성 등가물, 예를 들어, miRNA-6880-5p 올리고뉴클레오티드의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 마이크로RNA-6880-5p 핵산분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants) 및 모방체(mimic)를 포함하는 개념이다.
- [0036] 본 발명에서 “프라이머”는 짧은 자유 수산화기를 가지는 핵산서열로서 상보적인 템플레이트와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산서열을 말한다. 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 “프로브”는 miRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백개의 염기로 이루어진 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어 특정 miRNA의 존재유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA 프로브, 이중쇄 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고 비오틴,

FITC, 로다민, DIG 등으로 표지되거나 방사선 동위 원소 등으로 표지될 수 있다.

- [0038] 본 발명에서 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 예로서 RT-PCR 키트의 경우, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 전립선암의 진단이 필요한 개체로부터 분리된 액체 생검으로부터 엑소좀을 분리하는 단계; 상기 엑소좀 내의 miR-6880-5p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 miR-6880-5p의 발현 수준이 정상에 그 그것과 비교하여 낮은 경우 전립선암인 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 전립선암 진단 방법 및 전립선암 진단을 위한 정보제공방법을 제공할 수 있다.
- [0040] 상기 miRNA 발현 수준 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), 정량적 중합효소반응(quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 또는 DNA 칩 방식으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명에서 예방이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 전립선암의 발생을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, 치료란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 전립선암의 생존 및 증식이 억제되는 것을 의미하며, 본 발명에서 “전이”는 전립선암이 발생위치에서 벗어나는 것을 의미하며, 전이의 예방 또는 억제는 전립선암 세포의 이동능과 침투력을 감소시켜 발생 위치에서 암세포의 이탈을 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0042] 또한, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 대상 개체는 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간일 수 있고, 보다 구체적으로 전립선암 환자일 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 약학적 조성물(pharmaceutical composition)은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제, 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 “담체(carrier)”란 비이클(vehicle)이라고도 불리며, 세포 또는 조직 내로의 단백질 또는 펩타이드의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미하는 것으로서, 예를 들어 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기물의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.
- [0045] 본 발명에서 “희석제(diluent)”란 대상 단백질 또는 펩타이드의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 단백질 또는 펩타이드를 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다. 여기에 사용된 아젤라산을 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 약학적 조성물로서, 투여될 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명에 따른 비알코올 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 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 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 분해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로스테라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구, 바람직하게는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 근육 주입, 정맥내 주입, 피하 주입, 복강 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학적 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.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 내용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0052] **[실시예]**
- [0053] **실시예 1. 혈장 분리**
- [0054] 정상인 및 전립선암 환자의 혈액을 2500 rpm, 7분 동안 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장은 cryovial 튜브에 550 μ l씩 분주하여 실험에 이용하기 전까지 -80℃에 보관하였다.
- [0056] **실시예 2. 엑소좀 분리**
- [0057] 분리한 혈장 샘플은 3가지 단계를 거쳐 전처리하였다.
- [0058] 1) 1,200g, 20분, 4℃에서 원심분리 한 후 상층액을 취했다.
- [0059] 2) 상층액은 10,000g, 30분, 4℃에서 한번 더 원심분리 한 후 상층액을 취했다.
- [0060] 3) 마지막으로 분리한 상층액은 0.2 μ m 필터 주사기를 이용하여 크기가 큰 분자들을 제거하였다.
- [0061] 전처리 과정을 거친 샘플들은 엑소좀 표면 마커인 CD63 항체와 결합된 면역-마그네틱 비드와 2시간 동안 볼러를 이용하여 반응시키고, 용출 완충액 (Elution buffer)를 이용하여 엑소좀을 분리하였다. 분리된 엑소좀은 실험에 이용되기 전까지 -80℃에 보관하였다.
- [0063] **실시예 3. 엑소좀 확인**
- [0064] 분리한 엑소좀의 크기 및 농도를 분석하기 위해 나노사이트 LM10을 이용하여 분석하였다. PBS에 1:10으로 희석한 후 1 ml 주사기를 이용하여 버블 형성을 최소화하면서 샘플 측정 챔버에 주입하였다. 데이터 분석은 NTA Version 2.3 Build 0034 소프트웨어를 사용하여 수행되었다.
- [0065] 본 실시를 통해 분리한 엑소좀의 크기와 농도, 모양을 확인하여 엑소좀이 맞는지 확인하였다 (도 1).
- [0067] **실시예 4. 전립선암 진단을 위한 엑소좀 내 miRNA 선정**
- [0068] -80℃ 보관된 혈장을 녹인 후 CD63 항체가 결합된 면역 마그네틱 비드를 이용하여 엑소좀을 분리하였다. 엑소좀에서 miRNA는 Invitrogen (Cat No. 4478545) 제품을 이용하여 제조사의 지침에 따라 분리되었다. 엑소좀에서 추출한 총 RNA는 FlsachTag Biotin RNA Labeling Kit를 이용하여 형광 dye로 표지된 cDNA을 합성하고 혼성화를 위해 이중가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들어주었다. 그리고 GeneChip miRNA 4.0 마이크로어레이에 혼성화 (hybridization)시켰다. 모든 어레이들은 Affymetrix Gene Chip Scanner 3000에 의해 측정되었고 데이터는 Transcriptome Analysis Console™ (TAC) 소프트웨어에 의해 분석되었다. R 프로그래밍 언어를 사용하여 정규

화된 miRNA 데이터 세트에서 차등적으로 발현된 유전자를 확인하였다(도 2).

[0070] 본 실시를 통해 정상인과 전립선암 사이에서 차등적으로 발현되는 혈장 유래 엑소좀 내 miRNA를 확인할 수 있었다. 본 결과에서 PR은 Partial Response (부분 관해)의 약어로 치료에 반응이 좋은 환자를 말한다. PD는 Progressive disease (진행 병변)의 약어로 치료를 했음에도 한 개 이상의 새로운 병변이 생긴 경우를 말한다. 그러나 본 결과에서 전립선암 환자의 샘플은 내분비 요법 (Endocrine therapy) 전 환자의 혈액을 이용하였다. 실험 결과, miR-6880-5p가 PD 그룹에서 상당히 낮은 발현량을 보여주었고 정상인과 PR 그룹에서는 상대적으로 높은 발현량을 보여주었다. 따라서 엑소좀 내 miR-6880-5p의 발현에 따라 전립선암 환자와 정상인을 구분 및 전립선암 환자의 내분비 요법 (Endocrine therapy)에 대한 반응과 관련이 있다는 것을 알 수 있다 (도 4).

[0072] **실시예 5. 엑소좀 내 miRNA 발현량 확인: qRT-PCR (Quantitative real-time polymerase chain reaction)**

[0073] 엑소좀 내의 총 RNA를 분리하고 TaqMan MicroRNA 역전사 키트와 has-miR-6880-5p의 서열을 가진 프라이머 (assay ID 467246_mat; 5'-UGGUGGAGGAAGAGGCAGCUC-3')를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 1 샘플 당 역전사 키트 혼합물 (100mM dNTPs, MultiScribe Reverse Transcriptase, 10X Reverse Transcription Buffer, RNase inhibitor, Nuclease-free water) 7 μ L, 5X RT primer 3 μ L, RNA 5 μ L를 넣었다 (표 1). 그리고 16 $^{\circ}$ C 30분, 42 $^{\circ}$ C 30분, 85 $^{\circ}$ C 5분, 4 $^{\circ}$ C ∞ 의 조건으로 PCR을 수행하였다. cDNA 합성을 위한 키트와 프라이머는 Applied Biosystems에서 구입하였으며 제조사 지침에 따라 PCR을 수행하였다. 합성된 cDNA 1.33 μ L와 TaqMan master mix (2x), TaqMan assay (20x)인 has-miR-6880-5p probe, 울트라 퓨어 워터 (Ultra pure water)를 총 20 μ L로 맞춘 뒤 96 well standard (0.2 mL) plate에 분주하였다 (표 2). qRT-PCR은 50 $^{\circ}$ C 2분 1 사이클, 95 $^{\circ}$ C 10분 1사이클, 95 $^{\circ}$ C 15초와 60 $^{\circ}$ C 60초를 40 사이클 수행하여 miR-6880-5p의 발현을 측정하였다.

[0075] 본 실시를 통해 정상인에 비해 전립선암 환자에서 혈액 유래 엑소좀 내 miR-68805p의 발현량을 확인하였다. 전립선암 환자에서 miR-6880-5p의 발현이 정상인보다 감소되는 것을 확인함으로써 엑소좀 내의 miR-6880-5p의 발현이 전립선암과 관련성이 있는 것을 알 수 있다 (도 3a). 또한 전립선암의 PR 및 PD 그룹에서 내분비 요법 (Endocrine therapy) 전후의 miR-6880-5p의 발현을 확인하였다. PR 그룹은 치료전 (BL, base-line)보다 치료 후 (FU, follow up)에 miR-6880-5p의 발현이 증가되었고, PD 그룹은 치료 전보다 치료 후에 miR-6880-5p의 발현이 감소되었다 (도 4).

표 1

[0077]

Component	Volume (1 reaction)
100mM dNTPs (with dTTP)	0.15 μ L
MutiScribe TM Reverse Transcriptase, 50 U/ μ L	1.00 μ L
10 X Reverse Transcription Buffer	1.50 μ L
RNase Inhibitor, 20 U/ μ L	0.19 μ L
Nuclease-free Water	4.16 μ L
Total RT Reaction Mix volume	7.00 μL

표 2

[0078]

Component	Volume per reaction	
	384-well or 96-well fast [0.1 mL] plate	96-well standard [0.2mL] plate
TaqMan TM Small RNA Assay [20X]	0.50 μ L	1.00 μ L
PCR Master Mix	5.00 μ L	10.00 μ L
Nuclease-free water	3.84 μ L	7.67 μ L
Total PCR Reaction Mix volume	9.34 μL	18.67 μL

[0079] 실시예 6. 세포 배양

[0080] 본 연구에서 정상 전립선 상피 세포주인 RWPE-1 세포주는, 호르몬 반응성 전립선암 세포주인 LNCaP, 거세내성 전립선암 세포주인 DU145, PC3는 이용되었다. RWPE-1은 0.05 mg/ml BPD, 0.005 µg/ml 상피성장인자, 1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유한 케라티노사이트 무혈청 배지에서 배양되었고, LNCaP, DU145, PC3 세포주들은 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 RPMI-1640 배지에서 배양되었다. 모든 세포들은 5% CO₂, 37°C 환경의 인큐베이터에서 배양되었다.

[0082] 실시예 7. 전립선암 세포 내 miRNA 발현량 확인

[0083] 전립선암 유형 별로 miR-6880-5p의 발현을 확인하기 위해 정상 전립선 상피 세포 및 전립선암 세포에서 miRNA는 QIAzol reagent, miRNeasy Mini kit (Qiagen, Cat No. 217004)를 이용하여 제조사 지침에 따라 분리되었다. 그리고 엑소좀에서 얻은 miRNA의 발현을 확인한 방법과 같은 방법으로 cDNA를 합성하고 qRT-PCR을 통해 전립선암 세포 내 miR-6880-5p의 발현을 확인하였다.

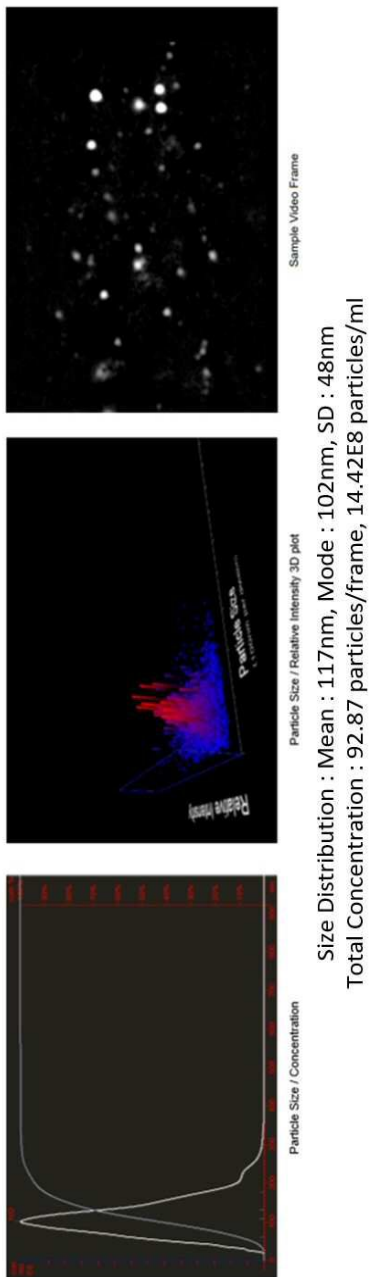
[0085] 그 결과, RWPE-1, LNCaP, DU145, PC3 순으로 miR-6880-5p의 발현이 낮은 것을 알 수 있었다 (도 5). 상기 결과를 통해 miR-6880-5p의 발현량에 따라 전립선암 유형 별 예후를 예측하는데 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0087] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

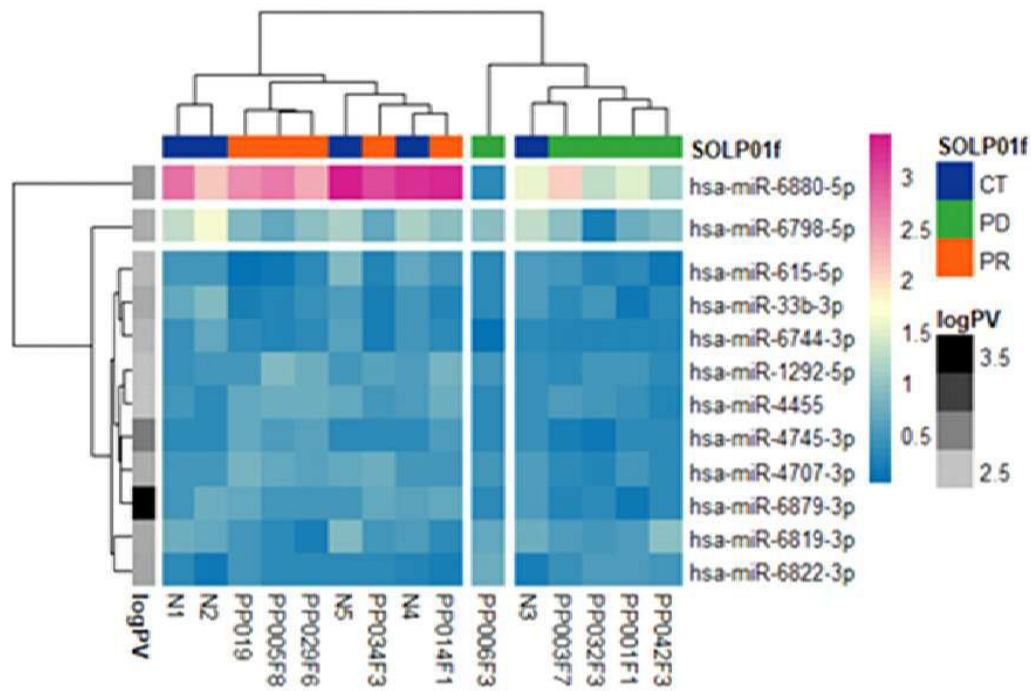
[0088] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

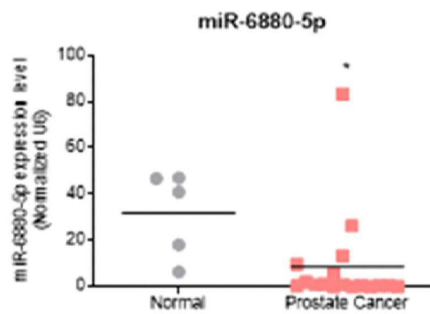
도면1



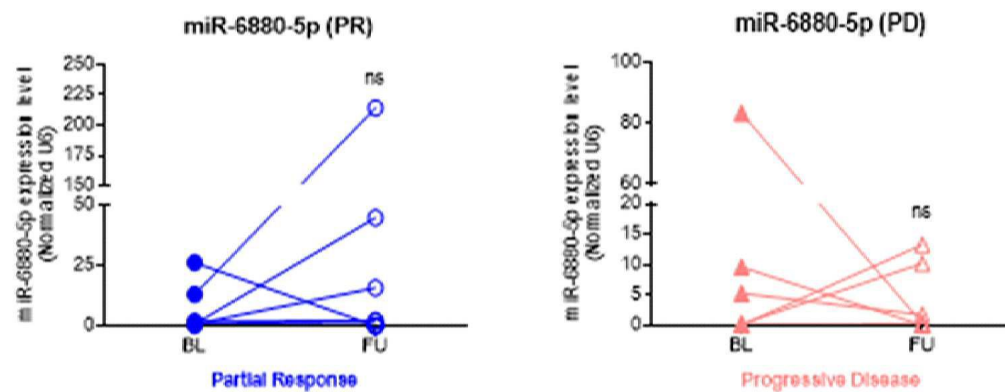
도면2



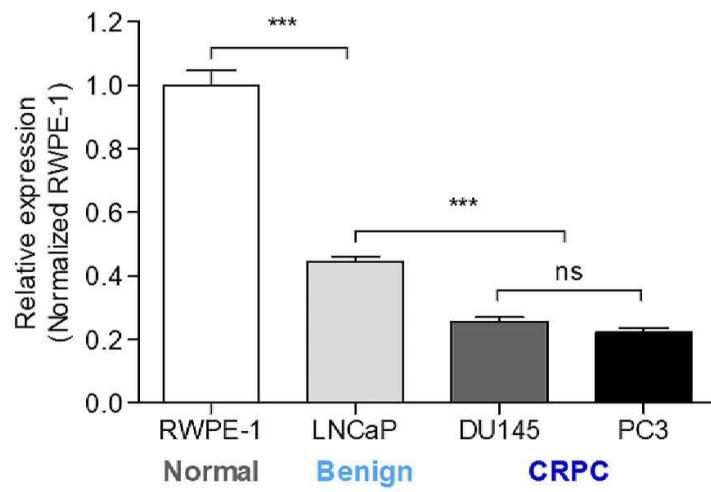
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.