



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월23일  
(11) 등록번호 10-2412581  
(24) 등록일자 2022년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/70 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/701 (2013.01)  
C12Q 2600/106 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-7022175  
(22) 출원일자(국제) 2014년01월17일  
심사청구일자 2018년12월14일  
(85) 번역문제출일자 2015년08월17일  
(65) 공개번호 10-2015-0109407  
(43) 공개일자 2015년10월01일  
(86) 국제출원번호 PCT/IB2014/058359  
(87) 국제공개번호 WO 2014/111892  
국제공개일자 2014년07월24일  
(30) 우선권주장  
13305053.4 2013년01월17일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
(56) 선행기술조사문헌  
JP2012520891 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
아비박스  
프랑스 75008 파리 뒤편 드 라 보메 5  
상뜨로 나쇼날 드 라 러쉐르쉐 샹띠피크  
프랑스 파리 에프-75016 뒤편 미셀 앙즈 3  
(뒷면에 계속)  
(72) 발명자  
타지, 자말  
프랑스 에프-34380 클라피에르 4 뒤편 콩도르쎈  
세레호, 디디에호  
프랑스 에프-34170 카텔노 레 레즈 26 아베뉴 테  
사비네  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인필앤은지

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 miRNA-124 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 적어도 하나의 miRNA의 용도에 관한 것으로, 상기 적어도 하나의 miRNA는 특히 바이러스 감염, 또는 상기 바이러스 감염의 치료학적 처치의 효능의 바이오마커로서 miR-124이다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/112 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

(73) 특허권자

**유니베르시테 드 몽펠리에**

프랑스 34090 몽펠리에 뤼 어거스트 브로우스네트  
163

**앵스띠뛰 퀴리**

프랑스 에프-75248 파리 섀텍 05 뤼 뢰르 26

(72) 발명자

**가흐셀, 오드**

프랑스 에프-34920 레 크레 르 팔레 방씨 데02 5  
아비뉴 몽테로니 다르비아

**킴포, 노엘리**

프랑스 에프-34920 레 크레 빌라 보흐에즈 아32 뤼  
데 드루아드 롬르 레지당스 20

**나즈맹, 로망**

프랑스 에프-94240 레이-레-로쎬 29비 뤼 두 11 노  
뎀브레 1918

**마흐테아우-베트제르, 플로렌스**

프랑스 에프-78470 세인트 레미 레스 슈브르즈 36  
에비뉴 오슈

## 명세서

## 청구범위

### 청구항 1

HIV(Human Immunodeficiency Virus) 감염, 또는 상기 HIV 감염의 치료학적 처치(therapeutic treatment)의 효능을 평가하기 위한 인 비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*) 방법으로서, 생물학적 샘플에서 miRNA의 발현의 존재 또는 수준을 결정하는 단계를 포함하며, 상기 miRNA는 miR-124인 것인 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 분리된 생물학적 샘플에서 상기 miR-124의 측정된 발현의 수준은 대조군 기준값(reference value)과 비교되며, 상기 대조군 기준값에 비해 상기 측정된 수준의 조절(modulation)은 HIV 감염, 또는 상기 HIV 감염의 치료학적 처치의 효능을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 miR-124는 단백질 또는 세포의 생리학적 활성을 변화시키기 위한 약물 후보 또는 백신 후보의 생물학적 효과를 평가하기 위한 바이오마커인 것인 방법.

### 청구항 4

HIV 감염의 예방 및/또는 치료에 효과적인 것으로 예상되는, 약물 후보 또는 백신 후보를 스크리닝하기 위한 인 비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*) 방법으로서, 생물학적 샘플에서 miRNA의 발현의 존재 또는 수준을 결정하는 단계를 포함하며, 상기 miRNA는 miR-124인 것인 방법.

### 청구항 5

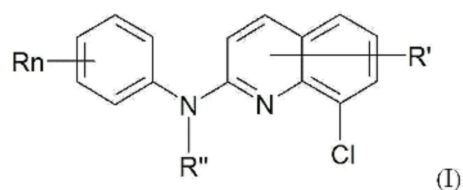
제4항에 있어서, 상기 약물 후보 또는 백신 후보가 존재하는 분리된 생물학적 샘플에서 상기 miR-124의 측정된 발현의 수준은 대조군 기준값과 비교되며, 상기 대조군 기준값에 비해 상기 측정된 수준의 조절은 HIV 감염의 예방 및/또는 치료에 있어서 상기 약물 후보 또는 백신 후보의 생물학적 효능을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제2항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 생물학적 조직(biological tissue) 샘플, 전혈(whole blood) 샘플, 먼봉(swab) 샘플, 혈장(plasma) 샘플, 혈청(serum) 샘플, 침(saliva) 샘플, 질액(vaginal fluid) 샘플, 정자(sperm) 샘플, 인두 유체(pharyngeal fluid) 샘플, 기관지 유체(bronchial fluid) 샘플, 배설물 유체(fecal fluid) 샘플, 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 샘플, 눈액(lacrymal fluid) 샘플 및 조직 배양 상청액(tissue culture supernatant) 샘플로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제4항에 있어서, 상기 약물 후보 또는 백신 후보는 하기 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 하나인 것을 특징으로 하는 방법:



상기

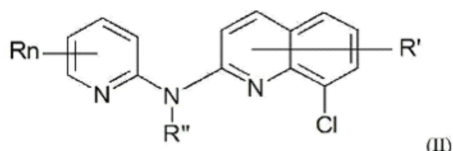
- n은 1 또는 2이며, R은 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기; R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 독립적으로 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기인 -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>기; (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알콕시기; -NO<sub>2</sub> 기; 페녹시 기; 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가

운데 선택된 기(group)를 나타내며,

- R'은 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기이며,
- R''은 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기임.

#### 청구항 8

제4항에 있어서, 상기 약물 후보 또는 백신 후보는 하기 화학식 (II)의 퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 하나인 것을 특징으로 하는 방법:



상기

- n은 1 또는 2이며, R은 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기; -CN 기; 하이드록실기; -COOR<sub>1</sub> 기; (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알킬기; -NO<sub>2</sub> 기; R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)알킬기인 -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> 기; 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기이며,
- R'은 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기이며,
- R''은 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기임.

#### 청구항 9

하기의 단계를 포함하는, HIV에 감염된 것으로 추정되는 환자 내 HIV 감염을 측정하기 위한 인 비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*) 방법:

- a- 상기 환자로부터 미리 수득한 생물학적 샘플 내, miRNA의 존재 또는 발현 수준을 측정하며, 상기 miRNA는 miR-124인, 단계; 및
  - b- 대조군 기준값에 상기 존재 또는 발현 수준을 비교하는 단계,
- 상기 대조군 기준 값에 비해 상기 miRNA의 조절된 존재 또는 발현의 수준은 HIV 감염을 나타냄.

#### 청구항 10

퀴놀린 유도체의 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 하나의 활성을 평가하기 위한 인 비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*) 방법으로서, 생물학적 샘플에서 miRNA의 발현의 존재 또는 수준을 결정하는 단계를 포함하며, 상기 miRNA는 miR-124인 것인 방법에 있어서,

상기 방법은 상기 퀴놀린 유도체로 치료된 환자 내 HIV 감염을 예방 및/또는 치료하기 위하여, 다음의 단계를 포함하는 것인 퀴놀린 유도체의 활성을 측정하는 인 비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*) 방법:

- a- 상기 퀴놀린 유도체의 투여 전의 상기 환자로부터 미리 수득한 첫번째 생물학적 샘플 및 상기 퀴놀린 유도체 투여 후의 상기 환자로부터 미리 수득한 두번째 생물학적 샘플 내에, miRNA의 존재 또는 발현 수준을 측정하며, 상기 miRNA는 miR-124인 단계; 및
- b- 상기 존재 또는 발현 수준이 치료 전에 수득된 두번째 생물학적 샘플에 비해 치료 이후에 수득된 두번째 생물학적 샘플 내에서 조절되는지 결정하는 단계;

상기 miRNA의 조절된 존재 또는 발현 수준은 상기 퀴놀린 유도체의 활성을 나타냄.

#### 청구항 11

하기 단계를 포함하는 HIV 감염을 예방 및/또는 치료하는데 효과적인 것으로 추정되는 후보 화합물의 생물학적 효과를 측정하기 위한 인 비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*) 방법:

a- 상기 후보와 함께, miRNA를 발현할 수 있는 분리된 세포를 처리하며, 상기 miRNA는 miR-124이며, 상기 세포는 상기 miRNA를 발현하는데 적절한 조건 하에 있는, 단계,

b- 상기 miRNA의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계,

c- 비처리된 분리된 세포 내 상기 miRNA의 존재 또는 발현 수준과 상기 측정된 존재 또는 발현 수준을 비교하는 단계,

상기 miRNA의 조절된 존재 또는 발현의 수준은 HIV 감염에 대한 상기 후보 화합물의 생물학적 효과를 나타냄.

#### 청구항 12

miR-124의 존재 또는 발현 수준을 측정하기 위하여, 혼성화될 수 있는 분리된 핵산 프로브를 miR-124에 특이적으로 혼성화시키는 단계를 포함하는, HIV 감염에 대한 정보를 처리하는 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 핵산 프로브는 SEQ ID NO: 6 내지 SEQ ID NO: 87로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

삭제

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

삭제

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

### 발명의 설명

## 기술분야

- [0001] 본 발명은 바이오마커에 관한 것으로, 특히 바이러스 감염과 관련된 것이다.
- [0002] 보다 특히, 본 발명은 바이러스 감염에 대한 진단 마커로서 유용한 신규의 바이오마커에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명에서 고려되는 바이러스 감염은 RNA 스플라이싱을 요구하는 바이러스 감염이며, 특히 HIV 및 AIDS 관련된 상태와 같은 레트로바이러스 감염이다. 또한, 본 발명은 상기 감염, 및 특히 HIV 및 AIDS 관련된 상태의 치료를 위한 하기 마커와 관련된다.

## 배경기술

- [0003] 고등 진핵생물(higher eukaryotes)에서, 메신저 RNAs는 그들의 기능적인 형태로 직접적으로 전사되지 않으나, 프리(pre)-메신저 RNAs로서 세포 번역 기관에 의해 읽혀지도록 많은 가공 이벤트를 거친다. 스플라이싱은 원하지 않는 서열(인트론)을 제거하고 의미있는 것(엑손)을 결합하는 가공이다. 매우 조직화된 스플라이싱 이벤트는 스플라이소좀이라는 이름의 라지 콤플렉스(large complex)에서 발생한다. 이러한 기능적 메가콤플렉스(megacomplex)의 형성은 단백질 및 엑손-인트론 경계의 식별을 요구하는 RNA의 조율된 결합이다. 엑손은 일반적으로 선택적으로 스플라이스(alternatively spliced)되고, 이들은 최종 성숙 mRNA 전사체로부터 포함되거나 제외됨을 의미한다. 최근 종합적인 시퀀싱 연구는 유전자의 90% 이상이 선택적 스플라이싱을 겪는 것을 발견하였다. 선택적으로 스플라이스된 mRNAs의 생산은 프리-mRNA 자체에 시스-액팅(cis-acting) 자리에 결합하는 트랜스-액팅 단백질(trans-acting proteins)의 시스템에 의해 조절된다. 이러한 단백질은 스플라이싱 인핸서 자리(인트론 스플라이싱 인핸서, ISE 및 엑손 스플라이싱 인핸서, ESE) 및 스플라이싱 사일렌서 자리(인트론 스플라이싱 사일렌서, ISS 및 엑손 스플라이싱 사일렌서, ESS)에 각각 결합하는 특정한 스플라이스 자리의 사용을 촉진하는 스플라이싱 활성화자, 및 특정한 자리의 사용을 감소시키는 스플라이싱 억제자를 포함한다.
- [0004] 바이러스, 특히 레트로바이러스 패밀리는 세계적으로 질병의 주요 원인 중 하나이다. 세가지 서브패밀리는 레트로바이러스 패밀리 내에서 구별될 수 있다: 온코바이러스(oncoviruses), 렌티바이러스(lentiviruses), 및 스푸마바이러스(spumaviruses).
- [0005] 온코바이러스는 이들이 암 및 악성 감염과 관련될 수 있기 때문에, 이로 명명된다. 예를 들어, 백혈병 유발성 바이러스(leukemogenic viruses) (조류 백혈병 바이러스(avian leukemia virus, ALV)와 같은), 무린 백혈병 바이러스(murine leukemia virus, MLV), 소위 몰로니 바이러스(Moloney virus), 고양이 백혈병 바이러스(feline leukemia virus, FELV), HTLV1 및 HTLV2와 같은 인간 백혈병 바이러스, 원숭이 백혈병 바이러스(simian leukemia virus) 또는 STLV, 소 백혈병 바이러스(bovine leukemia virus) 또는 BLV, 영장류 타입 D 온코바이러스, 유방 종양의 유도자인 타입 B 온코바이러스, 또는 급성 암(라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus 또는 RSV)와 같은)을 유발하는 온코바이러스가 언급될 수 있다.
- [0006] 스푸마바이러스는 주어진 세포 타입 또는 주어진 종에 대해 상당히 낮은 특이성을 나타내며, 그들은 종종 면역 억제 현상과 관련된다: 예를 들어, 원숭이 포미 바이러스(simian foamy virus 또는 SFV)에 대한 경우.
- [0007] HIV와 같은 렌티바이러스는 AIDS를 포함하는 면역억제 현상을 매우 종종 포함하는 병리학적 상태를 느리게 진전시키는 원인이므로, 이로 명명된다.
- [0008] 바이러스, 및 특히 HIV와 같은 레트로바이러스는 감염된 개체의 세포 및 조직 내에서 퍼지고 전파하기 위해 RNA 스플라이싱 및 스플라이싱 조절에 의존하는 것으로 알려져 있다.
- [0009] 최근, HIV가 주요 바이러스 단백질을 발현하기 위해 RNA 스플라이싱을 필요로 하는 레트로바이러스라는 사실은 바이러스 감염, 특히 AIDS와 싸우기 위해 스플라이싱 억제에 기초한 새로운 전략을 개발하기 위해 이용되었다(WO 2010/143169). 실제로, HIV-1 유전체는 9kb의 일차(primary) 전사체를 발현하며, 자손(progeny) 바이러스에 대한 유전자 RNA로서 제공할 뿐만 아니라, 40가지 다른 mRNAs를 발생시킨다. HIV-1는 스플라이스된 mRNA 중을 발생시키는데 네개의 다중 선택적(multiple alternative) 5' 스플라이스 자리 및 여덟개의 다중 선택적 3' 스플라이스 자리를 사용한다. 이들 스플라이스된 mRNAs는 두가지 종류로 나눌 수 있다: 다중적으로 스플라이스된(2 kb) 및 단일 스플라이스된(4 kb) RNAs. HIV-1 선택적 스플라이싱의 조절은 스플라이스 신호의 세포성 스플라이싱 기관의 인식을 감소시키는 차선의(suboptimal) 스플라이싱 자리의 존재에 의해 일차적으로 발생한다. 나아가, 바이러스 스플라이스 자리에 스플라이싱은 ESEs, ESSs 및 ISSs의 존재에 의해 조절된다.
- [0010] 이러한 맥락에서, 퀴놀린 유도체, 특히 HIV-1 및 HIV-2 T 세포 속성(tropic) 실험 균주 뿐만 아니라 nM 농도

범위에 다른 서브타입의 임상적 분리물(clinical isolates)의 말초혈액 단구세포(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)에 복제를 억제하는 것으로 나타난 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민(8-chloro-N-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]quinolin-2-amine)이 개발되었다 (WO 2010/143169).

[0011] 가장 종합적인(comprehensice) 논코딩(noncoding) 그룹인 microRNAs (miRNA)는 타겟 mRNA 전사체의 비번역 부위(UnTranslated Region, UTR)에 결합을 통해 유전자 발현을 억제하는 약 22 nt 논코딩 RNAs의 종류이다(Lai *et al.*, Nature Genetics, vol. 30, no. 4, pp. 363-364, 2002; Bartel *et al.*, Cell, vol. 136, no. 2, pp. 215-233, 2009). miRNA 유전자는 알려진 진핵생물 유전체의 약 1-2%를 나타낸다. 예측은 각 miRNA가 200 이상의 전사체를 타겟으로 할 수 있으며 단일 mRNA는 다중 miRNAs에 의해 조절될 수 있음을 제안한다. miRNAs는 내생의(endogenous) 헤어핀 형태의 전사체로부터 발생되고 염기쌍의 정도에 의존하는, mRNA 절단(cleavage) 또는 번역 억제를 유도하는, 타겟 mRNAs와의 염기쌍을 이루어 활동한다. 두가지 가공 이벤트는 성숙 miRNA 형성을 유도한다: 첫째, 초기의 miRNA 전사체(pri-miRNA)는 핵으로부터 배출되고 짧은(약 22 뉴클레오티드 길이) 성숙 miRNAs를 발생시키기 위해 세포질 내로 쪼개지는 70 뉴클레오티드 전구체(pre-miRNA)로 가공된다 (LEE, EMBO J., vol. 21, p; 4663-4670, 2002). miRNAs는 유전자 간 또는 유전자 내에 위치할 수 있다. 유전자 간 일 때, 그들의 발현은 무리(cluster)로서 다른 miRNAs와 협동된다(Altuvia *et al.*, Nucleic Acids Research, vol. 33, no. 8, pp. 2697-2706, 2005, Oszolak *et al.*, Genes and Development, vol. 22, no. 22, pp. 3172-3183, 2008). 유전자 내 일 때, 즉, 단백질 코딩 유전자 내에 위치할 때(거의 인트론에 독점적으로), 그들은 종종 그들의 숙주 유전자처럼(Liu *et al.*, Cell Research, vol. 18, no. 10, pp. 985-996, 2008, Kim *et al.*, EMBO Journal, vol. 26, no. 3, pp. 775-783, 2007) 상관된(correlated) 수준에서(Baskerville *et al.*, RNA, vol. 11, no. 3, pp. 241-247, 2005) 동일한 가닥으로부터 발현된다.

[0012] 최근 miRNAs는 바이러스 감염에 숙주 및 병원균 사이의 복잡한 크로스-토크(cross-talk)에 관여함을 보였고 바이러스의 발병에 주요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다(NAIR, Trends in Microbiol., vol. 14, p. 169-175, 2006). 실제로, 바이러스는 그들의 생존 및 복제를 위해 세포 기관을 사용하는 필수(obligate) 세포내 기생(parasites)이며, 따라서 이러한 의존성은 그들을 숙주 유전자 조절 메커니즘에 민감하게 만든다. 세포 miRNA는 항바이러스 방어 메커니즘에 참여할 수 있으나, 일부 경우에 또한 바이러스 양성 조절자일 수 있다. 반면, 바이러스 그 자체는 또한 세포 공정 또는 바이러스 유전자를 조절하는 miRNA를 생산할 수 있다. HIV-1 감염에 포함된 miRNAs는 HIV-1 코딩된 또는 생물발생(biogenesis)의 그들의 원천에 따라 숙주 코딩된 것과 같이 정의될 수 있다. 나아가, 그들은 바이러스 생활 주기에 포함되는 숙주 인자(factors)를 타겟팅함으로써 또는 HIV-1 RNA 유전체 및 HIV-1 감염에 필수적인 숙주 인자 모두를 타겟팅함으로써 그들이 HIV-1 전사체를 직접적으로 타겟으로 하는지 또는 간접적으로 HIV-1에 영향을 미치는지 여부에 따라 나누어질 수 있다. 일부 데이터는 HIV-1 감염이 miRNA 생물발생 동요(perturbation)에 따라 또한 miRNA 발현 프로파일의 변형에 의해 개별적으로 miRNA 경로에 광범위하게(globally) 영향을 미침을 증명한다 (Houzet *et al.*, Biochim Biophys Acta. 2011 Nov-Dec; 1809(11-12): 686-693). 게다가, 숙주 miRNAs는 HIV-1을 조절하는 것으로 설명되었다.

[0013] 주어진 약물 또는 백신의 개발에 성공을 위한 한가지 주요한 요소는 이의 효능을 효과적이고 빠르게 측정하는 가능성이다. 실제로, 주어진 약물 또는 백신이 너무 높은 투여량으로 인해 원치 않는 효과를 회피하거나 또는 너무 낮은 투여량에 의해 효능이 부족함을 회피하기 위해 이의 치료 범위(therapeutic window)로 투여되는 것은 중요하다. 또한, 적절한 약물 또는 백신이 적절한 환자에게 투여되어야 하고, 이러한 환자가 실제로 약물 또는 백신에 반응하는 것은 확실해야 한다. 따라서, 단순히 주어진 환자 및 주어진 약물 또는 백신을 서로 연결하는 것만으로 유익한 치료 효과를 항상 얻기 위해서는 충분하지 않다. 따라서, 약물 또는 백신의 효율성을 측정할 수 있는, 특정한 바이오마커와 같이, 적절한 도구를 갖는 것은 중요하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0014] 따라서, 바이러스 감염 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV (Human Immunodeficiency Virus) 감염, 뿐만 아니라 이러한 상태의 치료 효능을 측정하는 새롭고 민감한 도구에 대한 필요성이 있다.

[0015] 바이러스 감염, 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염의 치료 효능을 측정하는 새로운 바이오마커에 대한 필요성이 있다.

[0016] 바이러스, 특히 HIV, 보다 특히 HIV-1 및 HIV-2와 같은 레트로바이러스의 억제자인 퀴놀린 유도체의 효능을 측



정하는 새로운 민감한 도구에 대한 필요성이 있다.

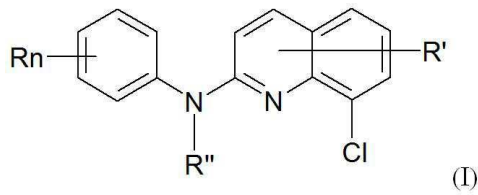
- [0017] 바이러스 감염, 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염을 예방 또는 치료하는 퀴놀린 유도체에 대한 환자의 반응성을 측정하는 새로운 바이오마커에 대한 필요성이 있다.
- [0018] 바이러스 감염, 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염을 예방 또는 치료하는 퀴놀린 유도체의 치료 효능을 측정하는 새로운 바이오마커에 대한 필요성이 있다.
- [0019] 또한, 바이러스 감염, 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염을 예방 및/또는 치료에 효과적인 약물 후보 또는 백신을 스크리닝하는 새로운 바이오마커에 대한 필요성이 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0020] 본 발명은 이러한 필요성을 충족시키는 것을 목적으로 한다.
- [0021] 본 발명의 목적 중 하나에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 miRNA의 용도에 관한 것이며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 바이러스 감염 또는 상기 바이러스 감염의 치료학적 처치(therapeutic treatment) 효능의 바이오마커로서, miR-124이다.
- [0022] 예기치 않게, 본 발명자들은 하기 실시예에서 상세히 설명된 바와 같이, HIV 균주, 특히 ADA-M R5 HIV 균주로 감염된 PBMCs에서, miR-124의 발현 수준이 비감염된 PBMCs에 비해 감소하는 것을 발견하였다.
- [0023] 더욱이, 본 발명자들은 예기치 않게 바이러스의 제거 및 miR-124 발현의 현저한 증가(대조군에 비해 13배)를 초래하는 화학식 (I) 또는 (II)의 퀴놀린 유도체, 및 특히 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민(8-chloro-N-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]quinolin-2-amine)와 같은 퀴놀린 유도체로, HIV 균주, 특히 ADA-M R5 HIV로 감염된 말초혈액 단구세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)의 치료를 발견하였다. 퀴놀린 유도체는 WO 2010/143169에 설명되고 나아가 하기에 설명된 화합물 가운데 선택될 수 있다. 따라서, 상기 바이러스 감염의 치료학적 처치는 퀴놀린 유도체로 처치될 수 있다.
- [0024] 따라서, miR-124는 강한 도구로서 그 자체로, 그렇지 않으면 바이러스 감염, 특히 HIV 감염과 같은 레트로바이러스 감염을, 특히 이러한 감염을 겪는 개체 내에, 모니터링하는데 뿐만 아니라, 바이러스, 특히 HIV로 감염과 같이 레트로바이러스로 감염된 개체를 모니터링하고, 특히 하기 설명된 화학식 (I) 또는 (II)의 퀴놀린 유도체 및, 특히 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민으로 항바이러스 약물로 이러한 개체를 치료하는 것을 모니터링하기 위한 바이오마커와 같이 나타난다.
- [0025] 따라서, miR-124의 발현 수준을 모니터링 함으로써, 인간 연구 시험(human research trials)에서 품질 관리를 추적하거나 수행하거나, 적절한 약물 또는 백신 치료를 받는, 즉 투여량 및 시간의 관점에서, 환자를 확인하기 위한 수단을 제공함으로써, 약물 요법(drug regimen) 또는 백신에 환자의 순응(compliance)을 모니터링 할 수 있다. miR-124 바이오마커는 또한 투여 요법(dosing regimens)을 최적화하는데 사용될 수 있다. 따라서, miR-124 바이오마커는 예를 들어, 환자 치료, 임상 진료, 및 세포 기초 연구의 관리와 관련되어 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 목적에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 miRNA의 용도와 관련되며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 바이러스, 바람직하게 레트로바이러스, 더욱 바람직하게 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염의 바이오마커인 miR-124이다.
- [0027] 본 발명의 다른 목적에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 miRNA의 용도와 관련되며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 바이러스 감염, 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염을 예방 및/또는 치료하는데 효과적인 것으로 추정되는 약물 후보 또는 백신 후보를 스크리닝하는 바이오마커인 miR-124이다.
- [0028] 본 발명의 다른 목적에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 miRNA의 용도와 관련되며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 생물학적 효과, 특히 세포 또는 단백질의 생리학적 활성을 변화시키는 후보 화합물의 약학적인 잠재성을 측정하는 바이오마커인 RNA-124이다.
- [0029] 이러한 점에서, 본 발명에서 miR-124의 발현 수준은 약학적 활성을 갖는 것으로 알려진 다양한 화합물의 투여에 따라 다른 것으로 나타난다. 따라서, 본 발명자들은 miR-124가 후보 화합물의 잠재적 약학적 활성의 관련된 바이오마커로 이루어지는 것을 발견하였다.
- [0030] 특히, 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는데 효과적인 것으로 추정되는 약물 후보 또는 백신 후보는 퀴놀린 유도체일 수 있다.



[0031] 특히, 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는데 효과적인 것으로 추정되는 약물 후보 또는 백신 후보는 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 하나일 수 있다:



[0032]

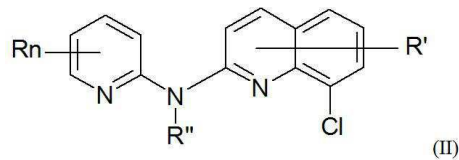
[0033]

[0034] - n은 1 또는 2이며, R은 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기; R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 독립적으로 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기인 -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>기; (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알콕시기; -NO<sub>2</sub> 기; 페녹시 기; 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기(group)를 나타내며,

[0035]

[0036]

[0037] 바이러스 감염 예방 및/또는 치료에 효과적인 것으로 추정되는 약물 후보 또는 백신 후보는 또한 화학식 (II)의 퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 하나일 수 있다:



[0038]

[0039]

[0040] - n은 1 또는 2이며, R은 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기; -CN 기; 하이드록실기; -COOR<sub>1</sub> 기; (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알킬기; - NO<sub>2</sub> 기; R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)알킬기인 -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> 기; 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기이며,

[0041]

[0042]

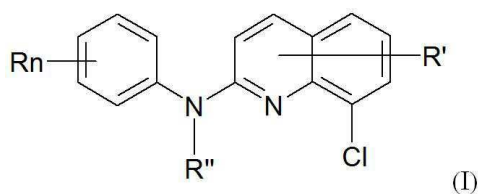
[0043] 본 발명에 있어서, 용어 "예방"은 주어진 이벤트(event)에, 즉, 본 발명의 맥락에서 바이러스 감염의 발병 가능성을 감소시키는 것을 의미한다.

[0044]

[0045] 본 발명의 다른 목적에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 miRNA의 용도와 관련되며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 바이러스 감염, 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염에, 퀴놀린 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 하나의 활성의 바이오마커인 miR-124이다.

[0045]

[0045] 본 발명의 다른 목적에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 miRNA의 용도와 관련되며, 상기 적어도 하나의 miRNA는, 바이러스 감염, 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염에, 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 활성의 바이오마커인, miR-124이다:



[0046]

[0047]

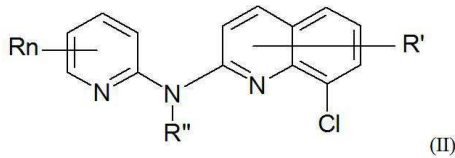
[0048] - n은 1 또는 2이며 R은 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기; R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 독립적으로 수소

원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)알킬기인 -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>기; (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알콕시기; -NO<sub>2</sub>기; 페녹시기; 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기를 나타내며,

- R'은 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기이며,

- R''은 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기임.

본 발명의 다른 목적에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 miRNA의 용도에 관한 것이며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 바이러스 감염, 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염에, 화학식 (II)의 퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 활성의 바이오마커인, miR-124이다:



상기

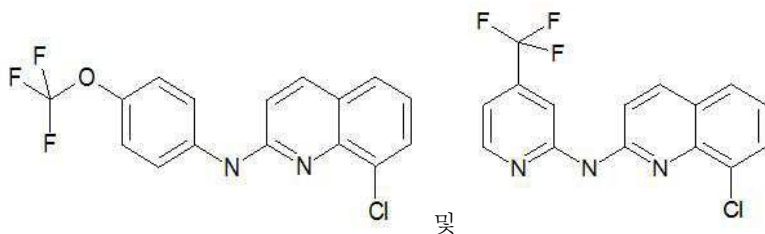
- n은 1 또는 2이며 R은 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기; -CN기; 하이드록실기; -COOR<sub>1</sub> 기; (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알킬기; -NO<sub>2</sub> 기; R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)알킬기인 -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>기; 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기를 나타내며,

- R'은 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기이며,

- R''은 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기임.

특정한 실시예에 따르면, 본 발명의 퀴놀린 유도체는 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민 (8-chloro-N-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]quinolin-2-amine) 또는 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메틸)피리딘-2-닐]퀴놀린-2-아민 (8-chloro-N-[4-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]quinolin-2-amine)일 수 있다.

따라서, 본 발명의 다른 목적에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 miRNA의 용도와 관련되며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 하기로부터 선택된 퀴놀린 유도체의 활성의 바이오마커인, miR-124이다:



본 발명에 있어서, 표현 "바이러스 감염" 및 "바이러스로 감염"은 본 발명의 바이오마커를 발현할 수 있는 세포, 조직, 기관 또는 개체(individual)에 발생할 수 있는, 어느 바이러스 감염, 특히 레트로바이러스 감염을 의미한다. 바람직하게, 레트로바이러스 바이러스 감염은 렌티바이러스 감염, 및 보다 바람직하게 HIV 감염일 수 있다. 본 발명에 있어서, 개체는 본 발명의 바이오마커를 발현할 수 있는 포유동물 및 바람직하게 인간일 수 있다. 본 발명에 있어서, 개체 및 환자는 교대해서 사용된다.

본 발명에 있어서, 용어 "바이러스"는 어느 바이러스, 특히 레트로바이러스 및 바람직하게 HIV 바이러스와 같은 렌티바이러스, 보다 바람직하게 HIV-1 또는 HIV-2를 의미한다.

본 발명의 다른 목적에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 단계에 포함하는, 바이러스에 감염된 것으로 추정되는 환자에 바이러스 감염, 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염을 측정하는 방법에 관련된다:

a- 상기 환자로부터 미리 수득한 생물학적 샘플 내, 적어도 하나의 miRNA의 존재 또는 발현 수준을 측정하며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 miR-124인, 단계; 및

b- 대조군 기준 값(reference value)에 상기 존재 또는 발현 수준을 비교하는 단계,

- [0065] 상기 대조군 기준 값에 비해 상기 miRNA의 조절된 존재(modulated presence) 또는 발현의 수준은 바이러스 감염을 나타냄.
- [0066] 본 발명의 다른 목적에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 단계를 포함하는, 하기 퀴놀린 유도체로 처리된 환자 내, 바이러스 감염, 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염을 예방 및/또는 치료하는 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체의 활성을 측정하는 방법에 관련된다:
- [0067] a- 상기 퀴놀린 유도체의 투여 전에 상기 환자로부터 미리 수득한 첫번째 생물학적 샘플 내 및 상기 퀴놀린 유도체 투여 후에 상기 환자로부터 미리 수득한 두번째 생물학적 샘플 내에, 적어도 하나의 miRNA의 존재 또는 발현 수준을 측정하며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 miR-124인, 단계; 및
- [0068] b- 상기 존재 또는 발현 수준이 치료 전에 수득된 두번째 생물학적 샘플에 비해 치료 이후에 수득된 두번째 생물학적 샘플 내에서 조절되는지 결정하는 단계;
- [0069] 상기 miRNA의 조절된 존재 또는 발현 수준은 상기 퀴놀린 유도체의 활성을 나타냄.
- [0070] 본 발명에 사용된 "생물학적 샘플"은 일반적으로 생물학적 조직 또는 유체 근원(fluid origin)의 샘플, 인비보(in vivo) 또는 인시추(in situ)에서 수득된, 도달한, 또는 수집된 것을 포함하는 생물학적 개체(subject)로부터 수득한 샘플을 의미한다. 이러한 샘플은 포유동물로부터 분리된 기관, 조직, 부분(fractions) 및 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 생물학적 샘플은 세포 용해물, 세포 배양물, 세포 라인, 조직, 구강 조직, 위장 조직, 기관, 세포 기관, 생물학적 유체, 혈액 샘플, 혈청 샘플, 소변 샘플, 피부 샘플 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, PBMC, 조직 생검, 구강 점막, 침, 간 질액, 또는 소변 샘플 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0071] 일 실시예에서, 본 발명에 적절한 생물학적 샘플은 생물학적 조직(biological tissue) 샘플, 전혈(whole blood) 샘플, 면봉(swab) 샘플, 혈장(plasma) 샘플, 혈청(serum) 샘플, 침(saliva) 샘플, 질액(vaginal fluid) 샘플, 정자(sperm) 샘플, 인두 유체(pharyngeal fluid) 샘플, 기관지 유체(bronchial fluid) 샘플, 배설물 유체(fecal fluid) 샘플, 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 샘플, 눈액(lacrymal fluid) 샘플 및 조직 배양 상청액(tissue culture supernatant) 샘플로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0072] 나아가 본 발명은 바이오마커를 포함하는 분리된 생물학적 샘플에 관련되며, 상기 생물학적 샘플은 조직 샘플, 전혈, 면봉 샘플, 혈장, 혈청, 침, 질액, 정자, 인두 유체, 기관지 유체, 배설물 유체, 뇌척수액, 눈액 및 조직 배양 상청액을 포함하는, 및 바람직하게 이루어진 그룹에서 선택되며, 상기 바이오마커는 miRNA 바이오마커, 및 바람직하게 miR-124이다.
- [0073] 본 발명에 다른 목적에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 단계를 포함하는 바이러스 감염, 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염을 예방 및/또는 치료하는데 효과적인 것으로 추정되는 후보 화합물의 생물학적 효과를 측정, 그리고 특히 약물 후보 또는 백신 후보를 스크리닝하기 위한 방법에 관련된다:
- [0074] a- 상기 후보와 함께, 적어도 하나의 miRNA를 발현할 수 있는 적어도 하나의 분리된 세포를 처리하며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 miR-124이며, 상기 세포는 상기 적어도 하나의 miRNA를 발현하는데 적절한 조건 하에 있는, 단계,
- [0075] b- 상기 적어도 하나의 miRNA의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계,
- [0076] c- 비처리된 분리된 세포 내 상기 적어도 하나의 miRNA의 존재 또는 발현 수준과 상기 측정된 존재 또는 발현 수준을 비교하는 단계,
- [0077] 상기 miRNA의 조절된 존재 또는 발현의 수준은 바이러스 감염에 대한 상기 후보 화합물의 생물학적 효과 및 특히 상기 약물 후보 또는 백신 후보의 효능을 나타냄.
- [0078] 본 발명에 있어서, 용어 "조절" 또는 "조절된 존재 또는 발현의 수준"은 본 발명의 바이오마커의 존재 또는 발현의 수준이 유도되거나 증가하는 것, 또는 그렇지 않으면 억제되거나 감소되는 것을 의미한다.
- [0079] 따라서, 이는 miR-124, 및 특히 miR-124의 발현 수준이, 유용한 약학적 효과를 구체화하는 세포의 대사 변화를 포함하는, 단백질 또는 세포의 생리학적 변화를 나타내는 관련된 바이오마커로 이루어지는 본 발명에 포함된 실험적 결과로부터 나온다.
- [0080] 그 다음, 앞서 언급한 것처럼, 본 발명은 또한 후보 화합물의 생물학적 효과, 특히 약학적 효과를 측정하기 위

한, 적어도 하나의 miRNA의 용도에 관련되며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 miRNA-124이다.

- [0081] 또한 본 발명은 단백질 또는 세포의 생리학적 활성을 변화시키는 후보 화합물의 능력을 측정하기 위한, 적어도 하나의 miRNA의 용도에 관련되며, 상기 적어도 하나의 miRNA는 miRNA-124이다.
- [0082] 단백질 또는 세포의 생리학적 활성의 변화는 전기생리학적 변화, 세포막 투과성 변화, 효소 활성 변화, 단백질 발현 변화, miRNA 발현 변화, 유전자 발현 변화, 세포내 pH 값 등을 포괄하는, 세포의 대사성 파라미터의 측정을 포함하는, 세포의 생리학적 파라미터의 측정에 어느 검출 가능한 변화를 식별함으로써 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0083] 본 발명에 사용된 용어 "결정(determining)", "측정(measuring)", "평가(evaluating)", "측정(assessing)", 및 "분석(assaying)"은 일반적으로 측정(measurement)의 어느 형태를 의미하며, 요소(element)가 존재하는지 아닌지를 결정하는 단계를 포함한다. 이들 용어는 양적 및/또는 질적 결정 모두를 포함한다. 측정(assessing)은 상대적이거나 절대적일 수 있다. 구절 "존재를 측정(assessing the presence of)"함은 존재하는 어떤 것의 양을 결정하는 것 뿐만 아니라, 이것이 존재 또는 부재하는지 결정하는 것을 포함할 수 있다.
- [0084] 바람직한 일 실시예에 따르면, 바이러스 감염을 측정할 때, 대조군 기준 값에 비해 상기 miRNA의 감소된 또는 억제된 존재, 또는 발현의 감소된 수준의 관찰은 바이러스 감염을 나타낼 수 있다.
- [0085] 바람직한 일 실시예에 따르면, 바이러스 감염의 치료를 위한 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체의 활성을 측정하거나 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는데 효과적인 것으로 추정되는 약물 후보 또는 백신 후보를 스크리닝할 때, 대조군 기준 값에 비해 상기 miRNA의 유도된 또는 증가된 존재, 또는 발현의 증가된 수준의 관찰은, 상기 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체의 활성 또는 상기 약물 후보 또는 백신 후보의 효율을 나타낼 수 있다.
- [0086] 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명의 용도 및 방법은 인비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*)에서 수행된다.
- [0087] 본 발명의 다른 목적에 따르면, 본 발명은 바이러스 감염, 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염을 진단하기 위하여 miR-124의 존재 또는 수준 발현을 측정하기 위한, 또는 바이러스 감염, 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염을 예방 및/또는 치료하기 위하여 효과가 추정되는 약물 후보 또는 백신 후보의 활성을 측정하기 위한, 진단 시약(diagnostic agent)으로서 miR-124에 특이적으로 혼성화할 수 있는 분리된 핵산 프로브와 관련된다.
- [0088] 본 발명에 사용된 용어 "프로브"는 일반적으로 특정한 타겟 miRNA 바이오마커 서열에 대한(directed to) 포획제(capture agent)를 의미한다. 따라서, 프로브 세트의 각 프로브는 각각 타겟 miRNA 바이오마커를 갖는다. 프로브/타겟 miRNA 듀플렉스(duplex)는 이의 타겟 miRNA 바이오마커에 프로브가 혼성화함으로써 형성된 구조이다.
- [0089] 본 발명에 적절한 분리된 핵산 프로브는 바람직하게 SEQ ID NO: 6 내지 SEQ ID NO: 87로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열로 이루어진 핵산 프로브일 수 있다.
- [0090] 본 발명의 장점 중 하나에 따르면, 본 발명은 바이러스, 특히 레트로바이러스, 및 보다 특히 HIV 바이러스에 감염된 환자의 후속 조치(follow-up)를 위한 유용하고 신뢰할 수 있는 바이오마커를 제공한다.
- [0091] 본 발명의 장점 중 하나에 따르면, 본 발명은 바이러스, 특히 레트로바이러스, 및 보다 특히 HIV 바이러스에 감염된 및 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체로 처리된 환자의 후속 조치를 위한 유용하고 신뢰할 수 있는 바이오마커를 제공한다.
- [0092] 본 발명의 다른 장점에 따르면, 본 발명은 환자의 침상에서 용이하게 사용될 수 있는 민감하고 신뢰할 수 있는(dependable) 바이오마커를 제공한다.
- [0093] **용도 및 방법(Uses and methods)**
- [0094] 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따르는 용도 및 방법은 특히 환자 내 바이러스 감염의 결정을 할 수 있으며, 특히 이러한 감염의 후속 조치를 할 수 있다.
- [0095] 일 실시예에 따르면, miR-124의 존재 또는 발현의 수준은 분리된 생물학적 샘플로 측정되고, 이후 대조군 기준 값에 비교된다.
- [0096] 대조군 기준값에 비해 miR-124의 존재 또는 발현의 수준의 조절은 바이러스 감염을 나타낼 수 있다. 특히 대조군 기준값에 비해 상기 miRNA의 감소된 또는 억제된 존재, 또는 발현의 감소된 수준은 바이러스 감염을 나타낼

수 있다.

- [0097] 일 실시예에서, 본 발명의 용도는 분리된 생물학적 샘플에 상기 miR-124의 발현의 측정된 수준을 수득하는 단계 및 대조군 기준값에 상기 측정된 발현의 수준을 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 대조군 기준값에 상대적인 상기 측정된 수준의 조절의 관측은 바이러스 감염, 또는 상기 바이러스 감염의 치료학적 처치의 효능을 나타낼 수 있다.
- [0098] 샘플로부터 miR-124가 대조군 기준값에 비해, 환자로부터 생물학적 샘플 내 "감소" 또는 "하향-조절(down-regulated)"될 때, 이러한 감소는 예를 들어, 비교 대조군 기준값(즉, 퀴놀린 유도체에 의한 처치 없이)의 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1,000%, 5,000% 또는 그 이상일 수 있다.
- [0099] 특히, miR-124의 측정된 수준 발현은 상기 대조군 기준값에 비해 적어도 두배, 바람직하게 적어도 네배, 바람직하게 적어도 여섯배, 바람직하게 적어도 여덟배, 및 더욱 바람직하게 적어도 10배 감소될 수 있다.
- [0100] 일 실시예에 따르면, 바이러스 감염, 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염에 바이오마커인 miR-124를 수행하는 용도 및 방법은, 상기 바이러스로부터 특이적인 펩타이드, 단백질 또는 핵산 서열 존재 또는 발현의 수준의 결정과 같이 상기 감염으로부터 특이적인 다른 바이오마커의 결정과 함께 조합될 수 있다. 바이러스 감염, 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염으로부터 특이적인 다른 바이오마커는 예를 들어, Tat, gp120 또는 gp41, 또는 레벨 T<sub>4</sub> 림프구를 코딩하는 단백질 또는 핵산 서열일 수 있다.
- [0101] miR-124 바이오마커는 바이러스 감염, 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염 또는 AIDS(후천적 면역 결핍증)를 겪고 있는 환자를 모니터 또는 관리하는데 사용될 수 있다.
- [0102] 일 실시예에 따르면, 치료를 시작하기 전에 동일한 환자로부터 수득된 생물학적 샘플에 비해, 바이러스 감염을 겪고 있고 이러한 감염의 치료를 받는 환자로부터 수득된 생물학적 샘플 내 miR-124의 존재 또는 발현의 수준의 증가는 상기 치료의 효능을 나타낼 수 있다.
- [0103] 일 실시예에 따르면, 본 발명의 용도 및 방법은 상기 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체와 함께 치료에 환자의 반응을 측정할 수 있다.
- [0104] 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 용도 및 방법은 상기 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체로 치료의 효과를 측정할 수 있다.
- [0105] 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 용도 및 방법은 바이러스 감염의 예방 및/또는 치료를 위한 치료제로서 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체의 치료 효능을 측정할 수 있다.
- [0106] 일 실시예에 따르면, 본 발명의 용도 및 방법은 화학식 (I)의 상기 퀴놀린 유도체로 치료함에 순응하는 환자를 측정할 수 있다.
- [0107] miR-124 바이오마커는 바이러스 감염, 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염 또는 AIDS (후천적 면역 결핍증)의 환자 치료 중에 화학식 (I) 활성의 퀴놀린 유도체를 모니터 또는 조절하는데 사용될 수 있다.
- [0108] 퀴놀린 유도체로 처리된 환자에 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체의 활성을 측정 또는 모니터링하는 방법은, 분리된 샘플, 바람직하게 분리된 PBMC (말초 혈액 단핵구 세포) 내 miR-124의 발현의 수준을 측정하는 단계, 및 치료 전에 환자로부터 수득된 분리된 샘플에 miR-124의 발현의 수준에 측정된 발현의 수준을 비교하는 단계를 포함할 수 있다. miR-124 수준에 따라, 퀴놀린 유도체의 활성은 시간이 지남에 따라 모니터링 될 수 있다.
- [0109] 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따르는 용도 또는 방법은 환자의 투여 요법을 최적화하는데 수행될 수 있다. 환자는 연령, 건강, 유전적 배경, 다른 합병증의 존재, 질병 진행, 및 다른 약물의 공동 투여와 같은 이러한 요소에 의존하는, 주어진 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체와 다르게 반응할 수 있다. 환자 내 퀴놀린 유도체의, 투여량 및/또는 투여 스케줄과 같은, 투여 요법을 측정하고 최적화하는데 miR-124 바이오마커를 활용하는 것은 유용할 수 있다. 이러한 관점에서, miR-124-기초의 바이오마커는 또한 시간에 따라 개별적인 환자 치료 효율을 추적하고 조정하는데 사용될 수 있다. 바이오마커는 필요한 제제의 투여량을 증가시키거나 감소시키는 환자의 치료를 조절하기 위해 필요한 정보를 모으는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 퀴놀린 유도체를 받는 환자는 투여량이 효과적인지, 또는 보다 적극적인 치료 계획이 장소(place)로 투여되어야 하는지 확인하기 위해 miR-124-기초의 바이오마커를 사용하여 시험될 수 있다. 투여되는 약물의 양, 투여 시간, 투여 빈도, 투여 기간(duration)은 miR-124 바이오마커 측정에 의존하여 이후 조정될 수 있다.



- [0110] miR-124 바이오마커는 또한 개체 치료 요법 중에, 또는 임상 시험 중에 순응하는 환자를 추적하는 데 사용될 수 있다. 이는 시험에 포함된 환자가 지시받은 대로 약물을 섭취하는지 확인하기 위해 세트 시간 간격에 따를 수 있다. 나아가, 퀴놀린 유도체를 받는 환자는 환자가 치료 계획의 투여 요법을 준수하는지 결정하기 위해 miR-124 바이오마커를 사용하여 시험될 수 있다. 비처리된 대조군 샘플에 비해 증가된 바이오마커의 발현 수준은 프로토폴에 따른 준수를 나타낸다.
- [0111] 본 발명의 바이오마커는 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체의 효능을 측정하고 따르는 데 수행될 수 있다. 따라서, miR-124의 존재 또는 발현의 수준은 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체로 이미 치료받은 환자로부터 수득된 분리된 생물학적 샘플에서 측정될 수 있다. 이후, 분리된 생물학적 샘플에 miR-124의 존재 또는 수준 발현은 대조군 기준값에 비교될 수 있다.
- [0112] 대조군 비교값에 비해 측정된 수준의 증가가 관찰될 때, 이후 측정은 상기 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체의 활성을 나타낸다.
- [0113] 다른 실시예에서, 대조군 비교값에 비해 측정된 수준이 증가가 관찰될 때, 이후 측정은 상기 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체와 함께 치료에 환자의 반응을 나타낼 수 있다.
- [0114] 다른 실시예에서, 대조군 비교값에 비해 측정된 수준이 증가가 관찰될 때, 이후 측정은 상기 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체로 치료의 효능을 나타낼 수 있다.
- [0115] 다른 실시예에서, 대조군 비교값에 비해 발현의 측정된 수준의 증가가 관찰될 때, 이후 측정은 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 치료제로서 상기 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체의 치료 효능을 나타낼 수 있다.
- [0116] 샘플로부터 miR-124가 퀴놀린 유도체로 처리한 이후에 비처리된 대조군 기준값에 비해, "증가" 또는 "상향조절"될 때, 이러한 증가는 비교 대조군 기준값(즉, 퀴놀린 유도체의 처리 없음)에 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1,000%, 5,000% 또는 그 이상일 수 있다.
- [0117] 특히, 측정된 miR-124의 발현 수준은 상기 대조군 기준값에 비해 적어도 두배, 바람직하게 적어도 네배, 바람직하게 적어도 여섯배, 바람직하게 적어도 여덟배, 및 더욱 바람직하게 적어도 열배 증가할 수 있다.
- [0118] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 바이러스 감염을 모니터링하거나 바이러스 감염 치료, 특히 화학식 (I)의 퀴놀린 유도체로 치료의 효능을 측정할 때, 환자는 매시간, 하루에 두번, 매일, 일주일에 두번, 매주, 한달에 두번, 매달, 일년에 두번, 매년, 및 격년으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 시간 간격에 본 발명의 방법 또는 용도로 시험될 수 있다. 이후 수집된 샘플은 즉시 시험되거나 향후 시험을 위해 저장될 수 있다.
- [0119] 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따르는 용도 및 방법은 특히 약물 후보로서 잠재적 활성제를 스크리닝, 식별 또는 평가할 수 있다.
- [0120] 특히, 본 발명에 따르는 용도 및 방법은 약물 후보 또는 바이러스 감염에 대해 효과가 있는 것으로 추정되는 백신과 같은, 잠재적 활성화제(active agents)의 스크리닝, 식별 또는 평가에 특히 유용하다.
- [0121] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, miR-124 바이오마커는 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는데 효과적인 것으로 추정되는 약물 후보 또는 백신 후보를 스크리닝하는데 수행될 수 있다. 이러한 실험예에서, miR-124의 존재 또는 발현의 수준은 분리된 생물학적 샘플 또는 스크리닝되는 약물 또는 백신과 함께 이미 접촉된 분리된 세포에서 측정될 수 있다. 이후, 수득된 측정은 대조군 비교값에 비교될 수 있다.
- [0122] 스크리닝되는 화합물, 약물 또는 백신 후보와 이미 접촉된, 분리된 생물학적 샘플 또는 분리된 세포에서, 대조군 비교값에 비해 측정된 수준의 증가가 관찰될 때, 그 다음 측정은 생물학적 효과를 갖는, 특히 세포의 생리학적 활성을 변화시키기 위해 효율적인 상기 후보를 나타낼 수 있다.
- [0123] 특히, 약물 후보 또는 백신 후보는 바이러스 감염, 및 특히 레트로바이러스 감염, 및 보다 특히 HIV 감염을 예방 및/또는 치료하는데 효과적인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0124] 샘플로부터 miR-124가 비처리된 대조군 기준값에 비해, 약물 후보 또는 백신으로 처리한 후 "증가" 또는 "상향조절"될 때, 이러한 증가는 비교 대조군 기준값(즉, 퀴놀린 유도체로 처리하지 않음)의 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1,000%, 5,000% 또는 그 이상일 수 있다.
- [0125] 특히, miR-124의 측정된 수준 발현은 상기 대조군 기준값에 비해 적어도 두배, 바람직하게 적어도 네배, 바람직하게 적어도 여섯배, 바람직하게 적어도 여덟배, 및 보다 바람직하게 적어도 열배 증가할 수 있다.

- [0126] 본 발명의 용도 및 방법은 분리된 생물학적 샘플에 miR-124의 발현의 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 어느 적절한 샘플은 miR-124 바이오마커를 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0127] 특히, 본 발명에 적절한 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 침, 간질액, 또는 소변 샘플과 같은 생물학적 유체; 세포 배양물, 세포 라인, 또는 PBMC 샘플과 같은 세포 샘플, 구강 조직, 위장 조직, 피부, 구강 점막 샘플, 또는 임상 시험으로부터 다양한 샘플과 같은 조직 생검일 수 있다. 샘플은 미가공 샘플(crude sample)일 수 있거나, 저장, 가공, 또는 측정 전에 다양한 정도로 정제될 수 있다.
- [0128] 본 발명의 용도 및 방법을 위한 생물학적 샘플을 수집하는 단계는 본 발명을 수행하기 전에 수행되며, 본 발명에 따르는 용도 또는 방법의 단계가 아니다.
- [0129] miRNA 측정을 위한 샘플은 어느 바람직한 간격 동안 수득될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 매시간, 하루에 두번, 매일, 매주, 매달, 격월, 매년 등으로 수득될 수 있다. 샘플은 즉시 시험되거나, 또는 향후 시험을 위해 저장될 수 있다.
- [0130] 샘플은 시험 전에 정제될 수 있다. 일부 실시예에서, miR-124는 시험 전에 남아있는 세포 내용물로부터 분리될 수 있다. 나아가, miR-124 분자는, 만약 필요한 경우 샘플 내 mRNA의 잔여물로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, miR-124는 시험 전에 사이즈 차이에 기초하여 mRNA로부터 분리될 수 있다.
- [0131] 시험되는 생물학적 샘플 내 miR-124의 측정된 발현의 수준을 비교하는데 사용되는 대조군 기준값은 대조군 샘플로부터 수득되었다.
- [0132] 대조군 샘플은 다양한 원천으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시예에서, 대조군 샘플은 치료 전 또는 질병의 존재 전에(기록의 혈액 샘플과 같은) 환자로부터 수득된다. 다른 실시예에서, 대조군 샘플은 개체군(population)의 일반적인, 비-발명된 구성원의 세트(set)로부터 수득된다. 다른 실시예에서, 세포 분석은 예를 들어, 시험 화합물로 처리되지 않은 또는 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민(8-chloro-N-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]quinolin-2-amine)과 같은 기준(reference) 화합물로 처리된, 대조군 세포 배양물에서 수행될 수 있다.
- [0133] 일 실시예에 따르면, 환자 내 바이러스 감염의 결정 또는 모니터링을 위해, 대조군 기준값은 이러한 상태를 겪지 않는 것으로 알려진 개체 또는 개체의 그룹에서 수득된 분리된 생물학적 샘플로부터 수득될 수 있다.
- [0134] 다른 실시예에 따르면, 환자 내 바이러스 감염의 치료의 효율의 결정 또는 모니터링을 위해, 대조군 기준값은 이러한 상태를 겪지 않는 것으로 알려지며, 결정 또는 모니터링되는 것의 치료 효과를 받지 않는, 개체 또는 개체의 그룹에서 수득된 분리된 생물학적 샘플로부터 수득될 수 있다. 그렇지 않으면, 대조군 기준값은 바이러스 감염을 겪고 있으며 결정 또는 모니터링되는 것의 치료 효과를 받고 있는, 환자로부터 수득된 분리된 생물학적 샘플로부터 수득될 수 있으며, 분리된 생물학적 샘플은 치료의 투여 전에 환자로부터 수득된다.
- [0135] 다양한 방법이 miR-124 바이오마커의 존재 또는 발현 수준을 측정하는데 통상의 기술자에게 가능하다.
- [0136] 예를 들어, 핵산 분석 또는 어레이(arrays)는 샘플 내 miR-124의 존재 및/또는 발현 수준을 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0137] miR-124의 서열은 이에 한정되지 않으나, 노던 블롯(Northern blots) 및 PCR 기초의 방법 (예를 들어, 실시간 역전사 PCR(Real-Time Reverse Transcription-PCR) 또는 qRT-PCR)과 같이, 샘플 내 miR-124 바이오마커의 발현 또는 존재를 검출하기 위한, 다른 핵산 분석에 사용되는 상보적인 프로브 또는 프라이머로서 활동하는, 상응하는 핵산을 제조하는 데 사용될 수 있다. qRT-PCR과 같은 방법은 샘플 내 miRNA의 양을 정확하게 정량하는데 사용될 수 있다.
- [0138] 본 발명에 따르는 센스 및 안티센스 프로브 또는 프라이머는 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 모든 방법, 특히 Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ED., 2001, Cold Spring Harbour, N. Y.)에 설명된 것을 사용하여 수득될 수 있다.
- [0139] RNA 또는 DNA의 검출 및 정량에 관련된 방법은 기술분야에서 잘 알려져 있다. 기술분야의 통상의 기술자는 예를 들어, Wang et al. (1989, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 86 : 917-921), de Wong et al. (2005, Bio Techniques, Vol. 39 (1): 75-85), de Nolan et al. (2006, Nat Protoc, Vol. 1(3) : 1559-1582) et de Klinck et al. (2008, Cancer Research, Vol. 68 : 657-663), 또는 Bustin (2000, Journal of Molecular Endocrinology, Vol. 25 : 169-193)에 의해 공개된 총평(general review)을 언급할 수 있다.



- [0140] 일 실시예에서, 핵산의 검출 및 정량을 위한 방법은 형광 염료 기초의 방법일 수 있으며, 상기 핵산 농도는 상기 핵산에 결합하는, 염료와 같은, 리간드의 형광 강도를 측정함으로써 측정된다. 형광 염료는 기술분야에서 잘 알려져 있다.
- [0141] 그렇지 않으면, 상기 핵산은 분광 광도계를 사용하여 정량될 수 있다.
- [0142] 다른 실시예에서, 핵산의 검출 및 정량을 위한 방법은 혼성화 기초의 방법일 수 있다. 상기 혼성화 기초의 방법은 PCR 및 정량적 PCR (qRT-PCR 또는 q-PCR) 기술 또는 역전사/중합효소 기초의 기술을 포함할 수 있다. 유용하게, 상기 방법은 시퀀싱(sequencing) 단계를 포함할 수 있거나, 나아가 조합될 수 있다.
- [0143] 이들 방법은 (i) 세포 mRNAs의 추출 단계, (ii) 역전사효소를 사용하여 mRNA를 DNA로 역전사하는 단계 및 (iii) 이전 단계에서 얻은 DNA로부터 DNA를 증폭시키는 단계를 포함할 수 있다. 보통, 동일한 샘플로부터 시작할 때, 그에 따르는 핵산은 증폭됨 : (a) 타겟 mRNA의 역전사 단계 이후 얻은 DNA 및 (b) 유전자 *MRPL19*, *PUM1* 및 *GADPH*에 의해 코딩되는 RNAs와 같이, 세포에 의해 본질적으로(constitutively) 및 지속적으로 발현되는 mRNAs의 역전사 이후 수득된 DNA 또는 다수의 DNAs(《하우스키핑 유전자(housekeeping genes)》).
- [0144] 증폭된 DNA는 전기영동에 의해 분리, 및 DNA 밴드의 측정 이후 정량될 수 있다. 타겟 mRNA(s)와 관련된 결과는 《하우스키핑》 유전자에 의해 코딩되는 mRNAs와 비교하여 상대적인 단위로 나타난다. 일부 실시예에서, 증폭된 DNAs의 분리 단계는 아가로스 겔 전기영동 후, 그 다음 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)로 DNA 밴드의 착색(coloration), 농도계로 이들 이동 밴드에 포함된 DNA의 정량 전에 수행된다. 다른 실시예에서, 하나는 레이저 빔을 사용하여 방출된 신호를 정량하기 전에, 증폭된 DNA가 모세관(capillary) 전기영동에 의해 분리되는 마이크로-채널 장치를 사용할 수 있다. 이러한 장치는 Caliper LifeSciences (Hopkinton, MA, USA) 사에 의해 시판 중인, 예를 들어 《GX》 시리즈로부터, LabChip® 장치일 수 있다.
- [0145] qRT-PCR에 의해 수득된 정량 결과는 정량 데이터에 비해 때때로 보다 유용한 정보를 줄 수 있으며, 분석 표준화 및 품질 관리를 간소화할 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서, qRT-PCR 기초의 분석은 세포 기초의 분석 동안 miRNA를 측정하는데 유용할 수 있다. qRT-PCR 방법은 또한 환자 치료를 모니터링하는데 유용할 수 있다. qRT-PCR 기초의 방법 {예를 들어, TaqmanR Array™}은 시판중이다.
- [0146] 어느 적절한 분석 플랫폼은 샘플 내 miRNA의 발현 또는 존재를 결정하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 분석은 계량봉(dipstick), 막, 칩, 디스크, 테스트 스트립(test strip), 필터, 마이크로스피어(microsphere), 슬라이드, 멀티웰 플레이트, 또는 광섬유의 형태일 수 있다. 분석 시스템은 miRNA에 상응하는 올리고뉴클레오티드가 부착된 고체 지지대를 가질 수 있다. 고체 지지대는 예를 들어, 플라스틱, 실리콘, 메탈, 레진, 유리, 막, 입자, 침전물, 겔, 폴리머, 시트(sheet), 스피어(sphere), 폴리사카라이드(polysaccharide), 모세관, 필름 플레이트, 또는 슬라이드를 포함할 수 있다. 분석 구성요소는 제조되고 miRNA를 검출하는 키트로서 서로 패키징될 수 있다.
- [0147] 일부 실시예에서, 생물학적 샘플 내 퀴놀린 유도체 또는 약물 후보 활성을 테스트하기 위한 올리고뉴클레오티드 분석은 제조 또는 구입될 수 있다. 분석은 전형적으로 고체 지지대 및 지지대에 접촉하는 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드를 포함하며, 올리고뉴클레오티드는 miR-124 바이오마커의 적어도 일부에 상응한다. 일부 실시예에서, miR-124 바이오마커의 일부는 적어도 5, 10, 15, 20 또는 그 이상 염기를 포함한다.
- [0148] 일 실시예에 따라, miR-124의 존재 또는 발현은 또한 바이오마커로 사용되는 다른 miRNA와 조합하여 분석될 수 있다. 이러한 실시예에서, 분석은 miRNA-124를 포함하는, 샘플 내 다중 miRNAs의 발현 또는 존재를 측정하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: a) 특이적인 결합이 일어나기 위해 충분한 조건 하에 프로브 세트를 포함하는 어레이(array)로 샘플을 접촉시키는 단계; 및 b) 어느 검출가능한 라벨(label)의 존재를 검출하기 위해 어레이를 시험하고, 그에 따라 샘플 내 각각의 타겟 miRNAs의 양을 평가하는 단계. 발현 어레이의 용도는 주어진 샘플에 대한 miRNA 발현 프로파일을 수득할 수 있다.
- [0149] 어레이 또는 miRNAs를 분석하기 위한 어레이를 제조하는 방법은 기술분야에서 잘 알려져 있으며 본 발명에 보다 상세한 설명이 필요하지 않는다.
- [0150] 핵산 어레이는 생물학적 샘플 내 miRNAs의 존재 또는 다른 발현을 검출하는데 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 어레이(DNA 또는 RNA 분석과 같은)는 전형적으로 지지대에 미리 결정된 배치에 정렬된 일반적으로 다른 서열 폴리뉴클레오티드 ("포획제")의 영역을 포함한다. 어레이는 이들 영역(종종 "어레이 특징"으로 참조되는)은 어레이의 지지대에 다른 미리 결정된 위치("어드레스(addresses)")를 가지는 점에서 "어드레스블(addressable)"이

다. 어레이 상 특정한 미리 결정된 위치(즉, "어드레스")에 영역(즉, 어레이의 "특징" 또는 "스팟(spot)")은 특정한 miRNA 타겟을 검출할 것이다. 폴리뉴클레오티드 어레이는 전형적으로 위치 특이적 방식으로 지지대에 미리 수득된 폴리뉴클레오티드를 놓음(depositing)을 통해 또는 지지대에 폴리뉴클레오티드의 위치 특이적 인식추(in situ) 합성을 통해 평면의 지지대에 조작된다. miRNA 발현을 검출하는 어레이는 전구체 단위(뉴클레오티드 또는 아미노산 모노머와 같은) 또는 미리 합성된 포획체를 놓음(예를 들어, 접촉(contact)- 또는 젯(jet)-기초의 방법 또는 사진 평판(photolithography)에 의해)으로써 조작될 수 있다. 지지대에 폴리뉴클레오티드 포획체를 놓은 이후에, 지지대는 전형적으로 가공(예를 들어, 실시예를 위해 세척 및 블록(blocked))되고 사용 전 저장된다.

[0151] miRNA 발현을 검출하기 위한 어레이는 적어도 둘, 셋, 넷, 또는 다섯가지 다른 개체 프로브를 갖는다. 그러나, 특정한 실시예에서, 개체(subject) 어레이는 miRNAs의 상응하는 수를 검출할 수 있는 적어도 10, 적어도 20, 적어도 50, 적어도 100, 적어도 200, 적어도 500, 또는 적어도 1,000 또는 그 이상의 프로브를 갖는 프로브 세트를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 개체 어레이는 유기체의 식별된 miRNAs의 적어도 일부 또는 전부를 검출하기 위한 프로브를 포함할 수 있거나, 다중 유기체로부터 이종상동성(orthologous) 프로브를 포함할 수 있다.

[0152] 핵산 어레이는 관찰된 결합 패턴을 보이는 어레이에 존재하는 포획체의 하나 또는 그 이상에 샘플 내 miRNA의 특이적인 결합을 촉진하는 조건 하에 miRNA 분석물질을 포함하는 샘플 또는 표지된(labeled) 샘플과 접촉될 수 있다. 이러한 결합 패턴은 어레이에서 정보를 얻어 검출될 수 있다. 예를 들어, 샘플 내 타겟 miRNAs는 적절한 표지(label)(형광 화합물과 같은)로 표지될 수 있으며, 그 다음 표지는 샘플에 어레이의 노출 이후에 어레이 상에 정확하게 관찰(형광 패턴을 관찰함에 의한 것처럼)될 수 있다. 관찰된 결합 패턴은 샘플의 하나 또는 그 이상의 miRNA 구성요소의 존재 및/또는 농도를 나타낼 수 있다.

[0153] miRNAs의 표지(labeling)은 DNA 연결효소(DNA ligase), 말단 전이효소(terminal transferase) 또는 RNA 백본(backbone)을 라벨링하는 등과 같이, 기술분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시예에서, miRNAs는 형광 라벨로 표지될 수 있다. 예시적인 형광 염료는 크산텐 염료(xanthene dyes), 플루오레세인 염료(fluorescein dyes), 로다민 염료(rhodamine dyes), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC), 6 카르복시플루오레세인(6 carboxyfluorescein, FAM), 6 카르복시-2,4,7-헥사클로로플루오레세인(6 carboxy-2,4,7-hexachlorofluorescein, HEX), 6 카르복시 4', 5' 디클로로 2'(6 carboxy 4', 5' dichloro 2'), 7' 디메톡시플루오레세인(7' dimethoxyfluorescein, JOE 또는 J), N,N,N',N' 테트라메틸 6 카르복시로다민(N,N,N',N' tetramethyl 6 carboxyrhodamine, TAMRA 또는 T), 6 카르복시 X 로다민(6 carboxy X rhodamine, ROX 또는 R), 5 카르복시로다민(5 carboxyrhodamine 6G, R6G5 또는 G5), 6 카르복시로다민 6G(6 carboxyrhodamine 6G, R6G6 또는 G6), 및 로다민 110(rhodamine 110); 시아닌 염료(cyanine dyes), 예를 들어 Cy3, Cy5 및 Cy7 염료; 알렉사 염료(Alexa dyes), 예를 들어 알렉사-플루오르-555(Alexa-fluor-555); 쿠마린(coumarin), 디에틸아미노쿠마린(Diethylaminocoumarin), 엄벨리페론(umbelliferone); 벤즈이미드 염료(benzimide dyes), 예를 들어 Hoechst 33258; 페난트리딘 염료(phenanthridine dyes), 예를 들어 Texas Red; 에티디움 염료(ethidium dyes); 아크리딘 염료(acridine dyes); 카르바졸 염료(carbazole dyes); 페녹사진 염료(phenoxazine dyes); 포르피린 염료(porphyrin dyes); 폴리메틴 염료(polymethine dyes), 보디피 염료(BODIPY dyes), 퀴놀린 염료(quinoline dyes), 피렌(Pyrene), 플루오레세인 클로로트리아지닐(Fluorescein Chlorotriazinyl), R1 10, 에오신(Eosin), JOE, R6G, 테트라메틸로다민(Tetramethylrhodamine), 리사민(Lissamine), ROX, 및 넵토 플루오레세인(Naptho fluorescein) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

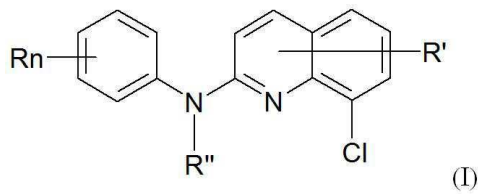
[0154] 일부 실시예에서, 면역조절 활성을 측정하기 위한 올리고뉴클레오티드 어레이는 제조되거나, 예를 들어 Affymetrix로부터 구입될 수 있다. 어레이는 고체 지지대 및 지지대에 접촉하는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 고체 지지대 상에 어드레스블(addressable) 위치에 특이적으로 존재할 수 있으며; 세포 또는 환자에서 퀴놀린 유도체 또는 약물 후보의 치료에 따라 다르게 발현될 수 있는 miRNA 서열의 적어도 일부에 각각 상응한다. miRNA 서열은 적어도 하나의 miR-124 서열을 포함한다.

[0155] 어레이가 miRNAs를 측정하는데 사용될 때, 전형적인 방법은 1) 표면 결합 개체(subject) 프로브를 포함하는 어레이를 수득하는 단계; 2) 특이적 결합을 제공하기 충분한 조건 하에 표면 결합 프로브에 miRNAs의 개체군(population)을 혼성화시키는 단계 (3) 혼성화되지 않은 핵산을 제거하기 위해 혼성화 이후 세척하는 단계; 및 (4) 혼성화된 miRNAs를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 시약(reagents)이 이들 단계의 각각에 사용되었으며, 사용을 위한 그들의 조건은 특정한 적용(application)에 의존하여 다양할 수 있다.

- [0156] 혼성화는 필요에 따라 엄격함이 다를 수 있는, 적절한 혼성화 조건 하에 수행될 수 있다. 전형적인 조건은 상보적인 결합 구성원 사이, 즉, 샘플 내 표면 결합 개체 프로브 및 상보적인 miRNAs 사이에서 어레이 표면 상에 프로브/타겟 복합체를 생성하기에 충분하다. 특정한 실시예에서, 엄격한 혼성화 조건이 이용될 수 있다. 혼성화는 전형적으로 엄격한 혼성화 조건 하에 수행된다. 기술분야에서 잘 알려진 표준 혼성화 기술 (예를 들어 어레이상 프로브에 샘플 내 타겟 miRNAs의 특이적 결합을 제공하기에 충분한 조건 하)은 핵산 어레이에 샘플을 혼성화하는데 사용된다. 온도, 염 농도, 폴리뉴클레오티드 농도, 혼성화 시간, 및 세척 조건의 엄격성 등을 포함하는 적절한 조건의 선택은 샘플의 원천, 포획제의 식별, 예상되는 상보성(complementarity)의 정도 등을 포함하는 실험적 디자인에 의존하며, 기술분야에서 통상의 기술자들에게 일반적인 실험의 문제로서 결정될 수 있다. 일반적으로, 핵산 혼성화의 맥락에서 "엄격한 혼성화" 및 "엄격한 혼성화 세척 조건"은 전형적으로 서열 의존적이며, 다른 실험적 조건 하에서 다르다. 혼성화는 약 12 내지 약 24시간 동안 수행될 수 있다. 세척 조건의 엄격성은 miRNA 서열이 상보적인 포획제에 특이적으로 혼성화되는 정도에 영향을 미칠 수 있다. 통상의 기술자들은 대체 가능하지만 비슷한 혼성화 및 세척 조건이 유사한 엄격성의 조건을 제공하는데 활용될 수 있음을 용이하게 인식할 것이다.
- [0157] 설명한 바와 같이, 일 실시예에서, miRNA 발현 프로파일링 실험은 Affymetrix Genechip miRNA Array 2.0를 사용하여 사용 설명서에서 설명된 프로토콜에 따라 수행될 수 있다.
- [0158] 일 특정한 실시예에서, 상기 혼성화는 GeneChip® 혼성화, 세척, 및 염색 키트(Stain Kit) (Affymetrix Ref. #900720)를 사용하여 수행될 수 있다. 유리하게, 상기 혼성화는 제조자의 프로토콜에 따라 수행된다.
- [0159] miRNA 혼성화 절차 이후, 어레이 표면에 결합된 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 비결합된 핵산을 제거하기 위해 세척된다. 세척은 세척 조건이 상기 설명과 같이 전형적으로 엄격한, 어느 간편한 세척 프로토콜을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 세척 단계는 Affymetrix (Ref. #900721 and #900722) 사에 의해 판매되는 세척 버퍼를 사용하여 수행될 수 있다. 프로브에 타겟 miRNAs의 혼성화는 이후 어레이를 판독하는 표준 기술을 사용하여 검출된다. 결과에 따른 혼성화된 어레이를 판독하는 것은 예를 들어, miRNA/프로브 결합 복합체를 검출하기 위해 어레이의 각 특징에서, 어레이를 분명하게 하고(illuminating) 결과 형광(resulting fluorescence)의 위치 및 강도를 판독함으로써 수행될 수 있다.
- [0160] **miRNA-124**
- [0161] 마이크로RNAs(miRNAs)는 그들의 동족(cognate) 타겟 메신저 RNAs의 발현 또는 mRNA의 단백질 생산물의 번역을 감소시키기 위해 세포의 세포질 내에서 활동할 수 있는 작은, 단일 가닥의 비코딩 RNAs이다. 성숙한 miRNAs는 전형적으로 약 19-23 뉴클레오티드 길이이다. 그들의 타겟 단백질의 생산을 억제하기 위한 miRNAs의 이러한 능력은 세포-운명(cell-fate) 결정, 세포자멸, 분화, 및 종양 형성과 같은, 세포 활동의 많은 형태의 조절을 초래한다.
- [0162] miR-124는 마우스에서 처음 복제되었다. 인간 miR-124 전구체 (또는 miRN-124 또는 miRNA-124 또는 마이크로RNA 124)는 배아 줄기 세포로부터 복제되었다. miR-124 전구체의 9가지 배체형(haplotypes)은 인간(Human), hsa-miR-124-1, hsa-miR-124-2 및 hsa-miR-124-3 (SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:3) 에 존재하는 3가지로부터, 지금까지 식별되었다 (Guo *et al.*, PLoS ONE, 2009, 4(11):e7944).
- [0163] miR-124 마이크로RNA 전구체는 작은 비코딩 RNA 분자이다. 성숙한 ~21 뉴클레오티드 마이크로RNAs는 다이스(Dicer) 효소에 의해 헤어핀 전구체 서열로부터 가공된다. 성숙 서열은 miR-124-3'에 SEQ ID NO: 4, UAAGGCACGCGGUGAUGCC 및 miR-124-5'에 SEQ ID NO: 5, CGUGUUCACAGCGGACCUUGAU이다.
- [0164] miRNA-124는 우선적으로 뇌에서 발현되며, SCP1 발현을 하향 조절을 통해 신경발생에 기여할 수 있다. 마우스 뉴런 세포 내 miR124의 발현은 PTBP1의 mRNA를 직접적으로 타겟팅함으로써 일반적인 것에서 뉴런 특이적인 대체적 스플라이싱으로 스위치(switch)를 유도한다. miR-124는 이들 mRNAs의 넌센스(nonsense) 매개성 붕괴(decay)를 유도하는 PTBP1-의존성 엑손 스킵핑(skipping)을 예방함으로써 뉴런 특이적 PTBP2 및 Gabbr1 mRNAs의 풍부함을 증가시킨다.
- [0165] 척추동물 신경 시스템 내 유사분열 종결 지점에서, 세포가 다분화능을 잃고 과다 성장(over life)를 지속하는 안정한 연결을 발달하기 시작할 때, ATP-의존적 크로마틴 리모델링 메커니즘에 스위치(switch)가 발생한다. 이러한 변화는 miR9\* (miR9 스템-루프 전구체의 반대 팔(opposite arm)로부터 가공된 miRNA) 및 miR-124에 의해 BAF53A의 억제에 의해 조절될 수 있다.

- [0166] 실험적 자가면역 뇌척수염(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)은 CNS, 또는 소교세포(microglia)에 존재하는 대식세포의 활성화와 관련된 중추 신경계(central nervous system, CNS)의 염증 및 CNS에 말초 면역 세포의 염증에 의한 다발성 경화증(multiple sclerosis)을 특징으로 하는 설치류(rodent) 모델이다. 이는 miR-124가 소교세포 및 뉴런에서 높게 발현되는 것으로부터 발견되었다. miR-124의 발현은 EAE 에피소드 동안 활성화된 소교세포 내 및 배양물 내 활성화된 소교세포 내에서 감소된다. miR-124의 형질도입(Transfection)은 골수 유도성 대식세포를 비활성화시키고, miR-124의 정맥내 투여는 병변의 발달을 억제하고 EAE의 3 마우스 모델 내 CNS 염증을 감소시켰다. miR-124는 CEBPA-PU.1 경로를 통해 대식 세포를 비활성화시킴으로써 소교세포 침묵(quiescence)을 촉진하는 것으로 발견되었다.
- [0167] 또한, 인간 섬유아세포 내 miR-124 발현은 뉴런으로 그들의 전환을 유도하는 것으로 입증되었다. 나아가, 뉴런성(neurogenic) 전사 인자 ASCL1 및 MYT1L의 추가는 전환 속도 및 전환된 뉴런의 성숙을 증가시키는 반면, 상기 언급된 마이크로RNA가 없는 이들 전사 인자의 발현은 비효과적이다.
- [0168] miR-124의 존재 또는 수준 발현을 측정하기 위해 적절한 분리된 핵산 프로브는 전구체 또는 성숙 miR-124와 같은, miR-124에 특이적으로 혼성화될 수 있는 핵산 프로브이다.
- [0169] 이러한 핵산 프로브는 18 내지 30 뉴클레오티드, 특히 20 내지 27, 바람직하게 20 내지 25, 바람직하게 22, 22 또는 25, 및 더욱 바람직하게 약 25 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 설명된 바와 같이, 이러한 핵산 프로브는 기술분야에서 알려진 어느 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0170] 방법 및 방식(formulas)은 주어진 프로브 및 주어진 타겟에 대한 최적의 혼성화 온도를 예견하는데 기술분야에서 잘 알려져 있다.
- [0171] 따라서, 기술분야의 통상의 기술자는 주어진 타겟 서열에, 프로브의 세트에 기초하고 혼성화의 특정한 조건으로 최적 혼성화 온도를 용이하게 계산할 수 있다.
- [0172] 유리하게, 상기 프로브의 최적 혼성화 온도는 40℃ 및 60℃ 사이, 및 보다 특히 45℃ 및 55℃ 사이이며, 바람직하게 약 48℃이다.
- [0173] 본 발명의 바이오마커에 본 발명의 핵산 프로브를 혼성화시키기 위해 유용한 버퍼의 예시로서, 혼성화 버퍼로서, 100mM MES, 1M [Na<sup>+</sup>], 20mM EDTA, 0.01% Tween-20를 포함하는 버퍼, 비염격한 세척 버퍼로서 6X SSPE, 0.01% Tween-20를 포함하는 버퍼, 및 엄격한 세척 버퍼로서 100mM MES, 0.1M [Na<sup>+</sup>], 0.01% Tween-20를 포함하는 버퍼가 언급될 수 있다.
- [0174] miR-124의 존재 또는 수준 발현을 측정하는데 적절한 핵산 프로브는 예를 들어, SEQ ID NO: 6 내지 SEQ ID NO: 87로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열로 이루어진 핵산 프로브일 수 있다.
- [0175] miR-124-1 전구체의 존재 또는 수준 발현을 측정하는데 적절한 핵산 프로브는 예를 들어, SEQ ID NO: 6 내지 SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO 86 및 SEQ ID NO 87로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열로 이루어진 핵산 프로브일 수 있다.
- [0176] miR-124-2 전구체의 존재 또는 수준 발현을 측정하는데 적절한 핵산 프로브는 예를 들어, SEQ ID NO: 35 내지 SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO 86 및 SEQ ID NO 87로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열로 이루어진 핵산 프로브일 수 있다.
- [0177] miR-124-3 전구체의 존재 또는 수준 발현을 측정하는데 적절한 핵산 프로브는 예를 들어, SEQ ID NO: 66 내지 SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO 86 및 SEQ ID NO 87로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열로 이루어진 핵산 프로브일 수 있다.
- [0178] 성숙 miR-124의 존재 또는 수준 발현을 측정하는데 적절한 핵산 프로브는 예를 들어, SEQ ID NO 86 및 SEQ ID NO 87로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 서열로 이루어진 핵산 프로브일 수 있다.
- [0179] **퀴놀린 유도체(Quinoline derivatives)**
- [0180] 본 발명에 유용한 퀴놀린 유도체는 WO 2010/143169에 설명된 하나와 같은, 바이러스 감염을 치료하는데 효과적인 퀴놀린 유도체일 수 있다.
- [0181] 특히, 본 발명에 유용한 퀴놀린 유도체는 하기 화학식 (I)로 표시될 수 있는 퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 하나이다:





[0182]

[0183]

상기

[0184]

- n은 1 또는 2이며 R은 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기; R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 독립적으로 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)알킬기인 -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>기; (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알콕시기; -NO<sub>2</sub>기; 페녹시기; 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기,

[0185]

- R'은 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기,

[0186]

- R''은 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기임.

[0187]

일 실시예에 따르면 R' 및 R''은 바람직하게 수소 원자이다.

[0188]

다른 실시예에 따르면, 본 발명에 적절한 퀴놀린 유도체는 R이 독립적으로 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기; R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 독립적으로 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기인 -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>기; (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알콕시기; 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기인, 화학식 (I)일 수 있다.

[0189]

다른 실시예에 따르면, R은 독립적으로 불소 또는 염소 원자 또는 메틸 또는 에틸기, -NH<sub>2</sub>기, 메톡시 또는 에톡시기, 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알콕시기 가운데 선택된 기를 나타낸다.

[0190]

다른 실시예에 따르면, n은 바람직하게 1이다.

[0191]

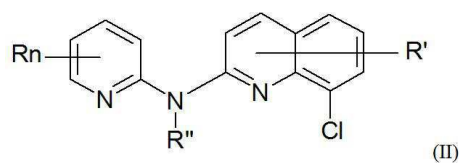
바람직한 실시예에 따르면, 본 발명에 적절한 퀴놀린 유도체는 n이 1이며, R은 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알콕시기, 및 R' 및 R''은 각각 수소 원자인, 화학식 (I)일 수 있다.

[0192]

바람직한 실시예에 따르면, R은 적어도 하나의 불소 원자로 치환된 메톡시, 에톡시, 또는 프로폭시기이다. 바람직하게, R은 모노, 바이(bi) 또는 트리플루오로메톡시기이다.

[0193]

그렇지 않으면, 본 발명에 유용한 퀴놀린 유도체는 화학식 (II)의 퀴놀린 유도체로 표시될 수 있는 퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 하나이다:



[0194]

[0195]

상기:

[0196]

- n은 1 또는 2이며 R은 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기; -CN기; 하이드록시기; -COOR<sub>1</sub>기; (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)플루오로알킬기; -NO<sub>2</sub>기; 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)알킬기인 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>를 갖는 -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>기; 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기를 나타내며,

[0197]

- R'은 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알콕시기 가운데 선택된 기이며,

[0198]

- R''은 수소 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알킬기임.

[0199]

일 실시예에 따르면, 본 발명에 적절한 퀴놀린 유도체는 R' 및 R''이 바람직하게 수소 원자인, 화학식 (II)일 수 있다.

[0200]

다른 실시예에 따르면, 본 발명에 적절한 퀴놀린 유도체는 R은 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기, (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알킬기, 하이드록시기, -CN기, -COOH기 및 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)알콕시기 가운데 선택된 기를 나타내

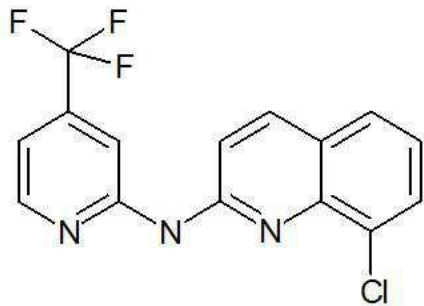
는 화학식 (II)일 수 있다.

[0201] 다른 실시예에서 따르면, 본 발명에 적절한 퀴놀린 유도체는 R은 독립적으로 수소원자, 할로젠 원자, -CN기, (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 알킬기, (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알킬기, 및 하이드록실기를 나타내는 화학식 (II)일 수 있다. 다른 실시예에서 따르면, 본 발명에 적절한 퀴놀린 유도체는 R이 독립적으로 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알킬기를 나타내는 화학식 (II)일 수 있다.

[0202] 다른 실시예에 따르면, n은 바람직하게 1이다.

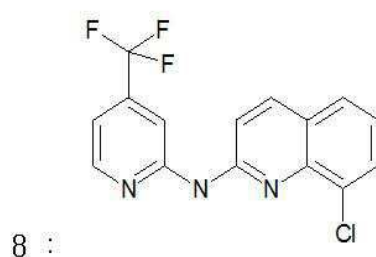
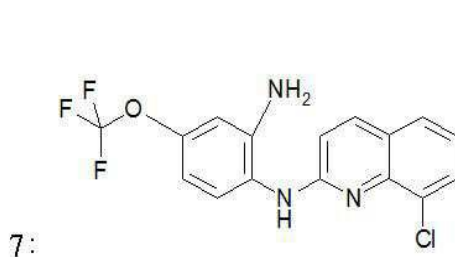
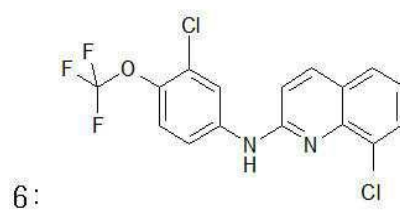
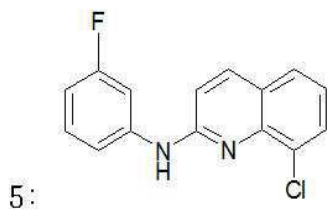
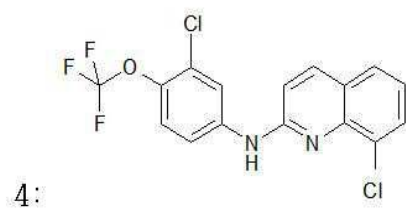
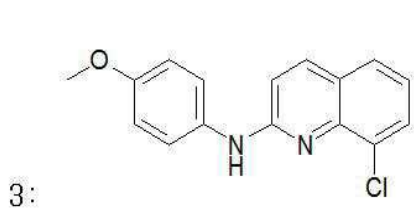
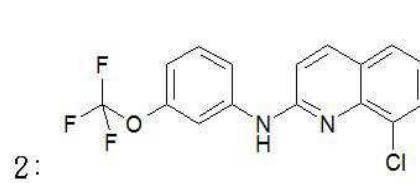
[0203] 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명에 적절한 퀴놀린 유도체는 n이 1, R이 (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) 플루오로알킬기, 및 R' 및 R''은 각각 수소 원자인 화학식 (II)일 수 있다.

[0204] 따라서, 상기 실시예에 따르면, 퀴놀린 유도체는 하기 화학식에 의해 나타낼 수 있다:



[0205]

[0206] 일 실시예에 따르면, 본 발명에 유용한 퀴놀린 유도체, 또는 이의 염은, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다:



[0207]

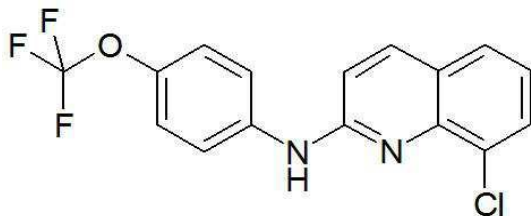
[0208] 본 발명의 퀴놀린 유도체의 약학적으로 허용가능한 염, 및 보다 특히 본 발명에 따르는 화학식 (I) 또는 (II)를 갖는 화합물은 화학식 (I) 또는 (II)를 갖는 화합물 및 알칼리 금속, 알칼리 토금속, 또는 유기 암모늄 염기로 수득된 염을 포함하는 암모늄의 염 또는 또는 화학식 (I) 또는 (II)를 갖는 화합물 및 유기 또는 무기산의 염일 수 있다.

[0209] 본 발명에 보다 특히 적절한 염은 소듐, 포타슘, 칼슘, 마그네슘의 염, 테트라메틸암모늄 또는 테트라에틸암모늄과 같은 4차 암모늄 염, 및 암모니아 및 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 에틸아민, 트리에틸아민, 에타놀아민 및 트리스(2-하이드록시에틸)아민(tris(2-hydroxyethyl)amine)과 같은 약학적으로 허용가능한 유기 아민의 첨가 염일 수 있다.

[0210] 본 발명의 퀴놀린 유도체, 및 보다 특히 본 발명에 적절한 화학식 (I) 또는 (II)를 가지는 화합물 및 무기산의 염은 염산, 브롬산, 황산, 질산 또는 인산으로 수득될 수 있다.

[0211] 본 발명의 퀴놀린 유도체, 및 보다 특히 본 발명에 적절한 화학식 (I) 또는 (II)를 가지는 화합물 및 유기산의 염은 포름산, 아세트산, 옥살산, 시트르산, 락트산, 말산, 숙신산, 말론산, 벤조산, 말레산, 푸마르산, 타타르산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산 또는 p-톨루엔설폰산과 같은 카르복실산 및 설폰산으로 수득될 수 있다.

[0212] 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명에 유용한 퀴놀린 유도체는 하기 화학식으로 나타낼 수 있는 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민(8-chloro-N-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]quinolin-2-amine)이다:



[0213]

[0214] 본 발명에 적절한 퀴놀린 유도체는 WO 2010/143169에서 설명된 것처럼 제조될 수 있다.

[0215] 치료는 퀴놀린 유도체의 구강 또는 비경구 투여일 수 있다. 투여 및 요법의 적절한 방법은 WO 2010/143169에 개시되어 있다.

[0216] 어떤 투여 경로라도 사용될 수 있다. 예를 들어, 퀴놀린 유도체는 구강, 비경구, 정맥내, 경피, 근육내, 직장, 설하, 점막, 비강, 또는 다른 수단에 의해 투여될 수 있다. 나아가, 퀴놀린 유도체는 약학적 조성물의 형태 및/또는 단위 투여 형태로 투여될 수 있다.

[0217] 적절한 투여 형태는 캡슐, 정제(속봉해 및 지연 방출 정제 포함), 파우더, 시럽, 구강 현탁액(oral suspensions) 및 비경구 투여를 위한 용액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

### 발명의 효과

[0218] 본 발명의 신규의 바이오마커는 RNA 스플라이싱을 요구하는 바이러스 감염, 특히 HIV 및 AIDS 관련된 상태와 같은 레트로바이러스 감염에 대한 진단 마커로서 유용하며, 상기 바이오마커는 상기 감염, 및 특히 HIV 및 AIDS 관련된 상태의 치료에 유용하다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0219] 본 발명에 제공된 실시예들은 단순히 예시적인 의도이며, 기술분야의 통상의 지식을 가진자들은 단지 일반적인 실험에 지나지 않은, 특정한 화합물, 물질, 및 방법의 수많은 동등물(equivalents)을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 동등물 모두는 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 간주되며 첨부된 청구항에 포함된다.

[0220] **실시예**

[0221] **실시예 1**

[0222] 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민 (8-chloro-N-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]quinolin-2-amine)으로 miRNAs 발현의 조절

[0223] **재료 및 방법(Materials & Methods)**



- [0224] 퀴놀린 유도체, 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민에 의한 HIV-1 억제제의 맥락에서, 처치가 숙주 miRNAs 발현을 조절할 수 있는지 연구하였다.
- [0225] 그 목적을 위해, 다섯명의 건강한 기증자의 말초혈액 단구세포 (PBMCs)는 FICOLL 구배(gradient)에서 원심분리에 의해 분리되었다. 세포는 이후 10% 소 태아 혈청(fetal calf serum, FCS) (Thermo Fischer Ref SV30160.03) 1000 U/mL의 IL2 (Peprotech Ref 200-02) 및 5  $\mu$ g/mL의 PHA (Roche ref 1249738)로 보충된 RPMI Glutamax 배지(Life Technologies Ref 61870-010) 내  $1 \times 10^6$  cells/mL의 농도에 37° C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양되었다. 3일 후, 세포는 모으고(pooled) 10% 소 태아 혈청(FCS) 1000 U/mL의 IL-2로 보충된 RPMI Glutamax 배지에  $1 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 재현탁하였으며 1.2 mL/well (조건 당 4 웰)로 12 웰 플레이트 (Falcon Ref 353043)에 분배하였다.
- [0226] HIV-1 감염은 Ada-M R5 HIV 균주/웰의 1 ng으로 수행되었다. 세포는 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민의 60  $\mu$ M 용액의 1.2 mL/well로 또는 0.12% DMSO (음성 대조군으로 Sigma Ref D4818)로 6일 동안 처리되었다.
- [0227] 세포는 이후 조건(conditions)에 따라 모아졌고, 원심분리 되었으며, 펠렛은 Qiagen (Qiagen Ref 217004)으로부터 miRNeasy 키트 추출을 위해 Qiazol 용해 버퍼 (Qiagen Ref 217004)의 700  $\mu$ L에 재현탁되었다. RNAs는 제조자의 지시에 따라 추출되었다. 추출된 RNAs의 품질 및 양은 Agilent Bioanalyzer 2100 및 Nanodrop spectrophotometry ND-1000을 사용하여 조절되었다. 평균 RIN 값은 8.84 (7.2 내지 9.7)이었다. 샘플 당 90 ng의 총 RNA 양은 FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit (901911)를 사용하여 표지되었고 Affymetrix Genechip miRNA Array 2.0. (901753)에 밤새 혼성화되었다. 어레이는 표준 Affymetrix protocol을 사용하여 세척 및 염색되었고 Affymetrix Scanner를 사용하여 스캔되었다. 품질 조절은 Affymetrix (version 1.2)로부터 Expression Console 매트릭스를 사용하여 수행되었다.
- [0228] 데이터는 Expression Console "RMA+DABG" 일반화 방법을 사용하여 일반화되었고 miRNA는 DABG P-값이 0.05와 동일하거나 그 미만일 경우 발현되는 것으로 간주되었다. 만약 miRNA가 이러한 조건의 PBMCs 기증자의 적어도 75%에서 발현되는 경우에 miRNA는 하나의 조건에서 발현되는 것으로 간주된다. 한쌍의 스튜던트 테스트(paired Student's t-test)는 만약 배-변화(fold-change)가 1.5 이상일 경우에 T-Test P-값은 0.05 이하인 두 조건 사이에 다르게 발현되는 것으로 간주되어 발현된 miRNAs에 적용되었다.
- [0229] **결과**
- [0230] 감염 및 비감염된 세포 사이에 miRNA 발현의 비교는 HIV-1 감염의 원인인 다중 변형(상향 또는 하향 조절)을 강조하였다. 특히 miRNA-124는 HIV 감염된 PBMCs에서 하향 조절되는 것으로 관찰되었다.
- [0231] 대조적으로, 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민 처리된 또는 비처리된 HIV 감염된 PBMCs 사이에 비교는 발현이 처리 하에 명확하게 증가되는 (약 13배) 오직 하나의 miRNA, miR-124를 강조하였다.
- [0232] 따라서, miR-124는 AIDS 환자에 항 바이러스 약물로서 본 발명에 따르는 퀴놀린 유도체, 및 특히 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민의 효능을 모니터링하기 위한 관련된 바이오마커로서 입증되었다.
- [0233] **실시예 2**
- [0234] *miR-124 3p의 발현에 퀴놀린 유도체의 효능의 평가*
- [0235] HIV-1 감염의 맥락에서 mi-RNA 발현의 평가를 제공하는 실시예 1에 추가적으로, 실시예 2는 HIV-1의 부재에 miR-124 발현의 변화(variation)를 평가한다. 상기 스크리닝 방법은 퀴놀린 유도체의 세트 및 마라비록 (Maraviroc), 에파비렌즈(Efavirenz), 다루나빌(Darunavir) 및 아지도티미딘(azidothymidine, AZT)과 같은 알려진 항레트로바이러스 약물을 평가하기 위해 시험되었다.
- [0236] **재료 및 방법(Materials & Methods)**
- [0237] *FICOLL™ 구배를 사용한 PBMC의 추출*
- [0238] 상기 목적을 위해, 네명의 건강한 기증자의 말초혈액 단구세포 (PBMCs)는 표준 프로토콜에 따라 FICOLL™ 구배에서 원심분리에 의해 분리되었다.
- [0239] 간단히, 연막(buffy-coat)의 60-70 mL을 175 cm<sup>2</sup>의 플라스크에 따르고, 연막의 약 5배의 희석물을 수득하기 위해 PBS를 사용하여 부피는 300 mL로 조정되었다. 38 mL의 희석된 버퍼(Buffy)는 이후 주위 온도에서 12 mL의

FICOLL™ (Histopack-1077)을 포함하는 50 mL의 Falcon™ 튜브에 첨가되었다. 제조물은 주위 온도에서 1600 rpm (=515 rcf)에서 30분 동안 원심분리 되었다. 림프구 링은 이송 피펫(transfer pipette) (Pastette®)으로 Falcon™ 튜브로부터 회복되었고 이후 상청액이 투명해질 때 까지 주위 온도에서 1200 rpm (= 290 rcf)에서 10 분 동안 원심분리를 사용하여 PBS로 세척되었다.

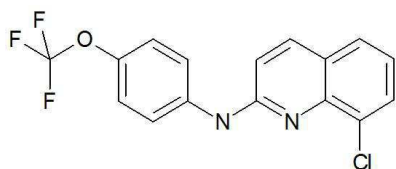
[0240] 세포는 이후 10% 소 태아 혈청(FCS) (Thermo Fischer Ref SV30160.03) 으로 보충되고 활성화가 없는 RPMI Glutamax 배지(Life Technologies Ref 61870-010) 내  $1.5 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 37° C에서 재현탁되었다. 세포는 5% CO<sub>2</sub> 하에 37° C에서 48시간 동안 배양되었다.

[0241] 스크리닝된 분자로 세포의 처리

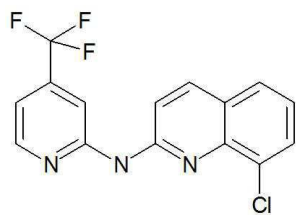
[0242] 여섯개의 웰 플레이트가 스크리닝을 위해 사용되었다.  $3.10^6$  cell/4 ml를 포함하는 각 웰 내 10% 소 태아 혈청 및 40 U/mL IL-2 (Peprotech Ref 200-02)으로 보충된 RPMI는 스크리닝된 분자가 첨가되었다. 100% DMSO (0,8 µL)를 웰에 첨가하고 음성 대조군으로 시험하였다.

[0243] 각 시험된 조건은 하기 설명된 것처럼 설정되었고 최종 상응하는 부피는 웰 내에 그에 따라 조정되었다:

[0244] 1) 퀴놀린 유도체 : 100% DMSO 내 (8-클로로-N-[4-(트리플루오로메톡시)페닐]퀴놀린-2-아민 및 8-클로로-N-[4-(트리플루오로메틸)피리딘-2-닐]퀴놀린-2-아민 - 각각 화합물 1 및 8) - (5 µM 및 최종 부피 0,4 µL):



[0245] 《 화합물 1 》 (5 µM)



[0246] 《 화합물 8 》 (5 µM)

[0247] 2) 다른 항레트로바이러스 약물: 마라비록(Maraviroc), 에파비렌즈(Efavirenz), 다루나빌(Darunavir), AZT (모두 10 µM - 최종 부피 0,8 µL).

[0248] 웰은 5% CO<sub>2</sub> 하에 37° C에서 3일 동안 배양되었다. 배지는 표준 프로토콜에 따라 변화되었다 (3일). 간단히, 플레이트는 5분 동안 1200 rpm에서 원심분리되고 상청액의 3 mL는 제거되었다. 10% 소 태아 혈청 및 40 U/mL IL-2로 보충된 3 mL의 RPMI는 이후 100% DMSO 내 50 nM 또는 음성 대조군으로서 100% DMSO 0,6 µL에서 스크리닝된 분자의 저장 용액의 0,6 µL (10 µM 최종 농도) 또는 0,3 µL (5 µM 최종 농도)으로 첨가되었다.

[0249] *miRNAs의 추출 (6일)*

[0250] 세포는 15 mL의 Falcon™ 튜브 내 회복되었고, 5분 동안 1200 rpm에서 원심분리되고, 이후 10 mL PBS에 세척되고 추가로 5분 동안 1200 rpm으로 원심분리 되었다. 세포는 이후 1 mL PBS에 재현탁되고 카운트 되었다.

[0251]  $6 \times 10^6$  세포가 회복되었고 5분 동안 1200 rpm으로 원심분리 되었다. 세포 펠렛은 Macherey Nagel Nucleospin® miRNA 추출 키트 (Macherey Nagel Ref 740971)로부터 300 µL의 ML 용해 버퍼에서 용해되었고, 추가로 -20° C에서 저장되었다.

[0252] 스파이크-인(spike-in) 대조군의  $2 \times 10^8$  카피 / µL의 5 µL (QIAGEN®으로부터 Ce\_miR-39 - reference 219610, 서열 5' UCACCGGUGUAAAUCAGCUUG 3')가 각 샘플에 첨가되었다. miRNA 추출은 50 µL의 RNAs 및 30 µL의 miRNAs의 용출 부피(elution volume)를 사용하여 Macherey Nagel Nucleospin® miRNA 추출 키트로부터 프로토콜을 사용하여 수행되고 나아가 -20° C에서 저장되었다.

[0253] *miRNAs의 역전사 (6일)*

- [0254] 역전사 단계는 miScript HiSpec 버퍼를 사용하여 QIAGEN<sup>®</sup>으로부터 miScript RT II 역전사 (RT) 키트를 사용하여 12  $\mu$ L의 miRNA에 따랐고, 나아가 -20° C에서 저장되었다.
- [0255] *miRNAs의 정량적 PCR (6일)*
- [0256] 정량적 PCR 단계는 제조자의 프로토콜에 따라 QIAGEN<sup>®</sup> miScript SYBR<sup>®</sup> Green PCR 키트 및 miScript Primer Assays를 사용하여 수행되었다.
- [0257] 384-웰 플레이트에 대한 miScript 반응 혼합물의 조성물:
- |        |   |                      |
|--------|---|----------------------|
| [0258] | 혼합물(Mix)                                      | $\mu$ L/반응(reaction) |
| [0259] | 2X SYBR <sup>®</sup> Green mix                | 5                    |
| [0260] | 10X Universal Primer                          | 1                    |
| [0261] | 10X Primer Assay                              | 1                    |
| [0262] | H <sub>2</sub> O                              | 2                    |
| [0263] | <u>총 혼합물 부피:</u>                              | 9                    |
| [0264] | <u>H<sub>2</sub>O 내 주형(Template) cDNA (*)</u> | 1                    |
| [0265] | <u>최종 부피:</u>                                 | 10                   |
| [0266] | (*) miScript II RT 키트를 사용하여 제조된 cDNA          |                      |
- [0267] 반응은 LightCycler<sup>®</sup> 380 Roche Real-Time PCR 시스템에서 제조자의 지시에 따라 384-웰 플레이트에서 세번(triplicates) 반복되었다.
- [0268] 사이클링 조건은 또한 제조자의 프로토콜에 따라 설정되었다:
- |        |                  |           |           |
|--------|------------------|-----------|-----------|
| [0269] | <u>단계</u>        | <u>시간</u> | <u>온도</u> |
| [0270] | <u>초기 활성화 단계</u> | 15 min    | 95° C     |
- [0271] 3-단계 사이클링:
- |        |                  |      |       |
|--------|------------------|------|-------|
| [0272] | 변성(Denaturation) | 15 s | 94° C |
| [0273] | 어닐링(Annealing)   | 30 s | 55° C |
| [0274] | 연장(Extension)    | 30 s | 70° C |
- [0275] 사이클 수(number) 40 사이클
- [0276] qPCR의 상대적 및 절대적 정량은 기술분야에서 알려진 기술이며 나아가 하기에 설명된 것처럼 수행될 수 있다.
- [0277] 1) 상대적 정량
- [0278] miScript Primer Assays (Hs\_miR-124a, Hs\_miR-26a 및 Hs\_miR-191)를 사용하여, 희석(dilution)으로부터 miR-124 qPCR (Hs\_miR-124a)에 대해 H<sub>2</sub>O에 1/10<sup>th</sup>까지 또는 참조(reference)/하우스키핑 유전자(housekeeping gene) qPCR (Hs\_miR-26a 및 Hs\_miR-191)에 대해 1/100<sup>th</sup>까지.
- [0279] 분석은 miR-124의 삼배체(triplicates)로부터 교차점 (Cp) 값의 평균 및 miR-26a 및 miR-191의 삼배체의 평균의 평균을 사용하여 효율 수정(correction) (2<sup>-DDCp</sup>) 없이 상대적 정량 모델을 사용하여 수행된다.
- [0280] 2) 절대적 정량
- [0281] 희석으로부터 miR-124 qPCR 및 miScript Primer Assays (Hs\_miR-124a et Ce\_ miR-39)에 대하여 H<sub>2</sub>O 내 1/10<sup>th</sup>까지. 검량 곡선은 표준 프로토콜에 따라 수행되었다. 상기 분석은 miR-39 삼배체의 평균과 함께 miR-124 삼배체

의 평균을 일반화 및 나아가 세포의 수로 일반화함으로써 수행되었다.

[0282] **결과(Results)**

[0283] 결과는 모든 분자에서 상대적 및 절대적 정량 사이에 바람직한 일치를 보였다. DMSO 대조군 샘플은 miR-124a 발현에 변화가 없음을 의미하는, 1 배-변화를 가진다. 모든 시험된 퀴놀린 유도체는 miR-124의 발현의 10배 증가에 상응하는 miR-124의 조절을 보였다.

[0284] 이에 비해, 다른 항레트로바이러스 약물은 miR-124의 발현의 현저한 조절을 유도하지 않는다.

[0285] 따라서, 이러한 실시예는 miR-124가 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는데 효과적인 것으로 추정되는 약물 후보 또는 백신 후보를 스크리닝 하기 위한 적절한 바이오마커임을 보인다. 또한, 본 발명의 퀴놀린 유도체의 활성을 평가하는 것은 특히 유용하다.

**서열 목록**

SEQUENCE LISTING

<110> Centre National de la Recherche Scientifique

SPLICOS

Universite de Montpellier 2

<120> miRNA-124 as a biomarker

<130> IMP152542FR

<150> EP13305053.4

<151> 2013-01-17

<160> 87

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 85

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..85

<223> /mol\_type="DNA"

/organism="Homo sapiens"

<400> 1

aggcctctct ctcggtgttc acagcggacc ttgatttaaa tgtccataca attaaggcac 60

gcggtgaatg ccaagaatgg ggctg 85

<210> 2

<211> 109

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<220>
<221> source
<222> 1..109
<223> /mol_type="DNA"
        /organism="Homo sapiens"
<400> 2
atcaagatta gaggtctctgc tctccgtgtt cacagcggac cttgatttaa tgtcatacaa      60
ttaaggcacg cggatgaatgc caagagcggg gcctacggct gcacttgaa                  109
<210> 3
<211> 87
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> source
<222> 1..87
<223> /mol_type="DNA"
        /organism="Homo sapiens"
<400> 3
tgaggggccc tctgcgtgtt cacagcggac cttgatttaa tgtctataca attaaggcac      60
gcggtgaatg ccaagagagg cgcctcc                                           87
<210> 4
<211> 20
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="RNA"
        /organism="Homo sapiens"
<400> 4
uaaggcacgc ggugaauGCC                                                    20
<210> 5
<211> 22
<212> RNA

```

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..22

<223> /mol\_type="RNA"

/organism="Homo sapiens"

<400> 5

cguguucaca gcggaccuug au

22

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 6

gcacaagtgt cgcctggaac taaat

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 7

cacaagtgtc gcctggaact aaatt

25

<210> 8

```

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 8
tatgttaatt ccgtgcgcca cttac
25
<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 9
atgttaattc cgtgcgccac ttacg
25

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 10

```



tggttaattcc gtgcgccact tacgg 25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 11

gttaattccg tgcgccactt acggt 25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 12

ttaattccgt gcgccactta cgggt 25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

```

        /organism="Artificial Sequence"
<400> 13
taattccgtg cgccacttac ggttc
25

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 14
aattccgtgc gccacttacg gttct
25

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 15
gcctggaact aaatttacag gtatg
25

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source

```

```

<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"
<400> 16
cctggaacta aatttacagg tatgt                25
<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"
<400> 17
ctggaactaa atttacaggt atgtt                25

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"
<400> 18
ggaactaaat ttacaggtat gttaa                25
<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 19
gaactaaatt tacaggtatg ttaat

```

25

```

<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 20
aactaaattt acaggtatgt taatt

```

25

```

<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 21
ctaaatttac aggtatgtta attcc

```

25

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 22

taaatttaca ggtatgttaa ttccg

25

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 23

aaatttacag gtatgttaat tccgt

25

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

```

        /organism="Artificial Sequence"
<400> 24
tccggagaga gaggcacaag tgtcg
25
<210> 25
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 25
agagaggcac aagtgtcgcc tggaa
25

<210> 26
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 26
acaagtgtcg cctggaacta aattt
25
<210> 27
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25

```

```
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"
<400> 27
gcctggaact aaatttacag gtatg
```

25

```
<210> 28
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"
<400> 28
```

```
ctggaactaa atttacaggt atgtt
```

25

```
<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"
<400> 29
```

```
ggaactaaat ttacaggtat gttaa
```

25

```
<210> 30
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```



```

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"
<400> 30
taaatttaca ggtatgttaa ttccg
25
<210> 31
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"
<400> 31
aaatttacag gtatgttaat tccgt
25
<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"
<400> 32
caggtatgtt aattccgtgc gccac
25
<210> 33
<211> 25

```

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
         /note="probe"  
         /organism="Artificial Sequence"

<400> 33  
 ggtatgttaa ttccgtgcgc cactt

25

<210> 34  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
         /note="probe"  
         /organism="Artificial Sequence"

<400> 34  
 ttccgtgcgc cacttacggt tctta

25

<210> 35  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
         /note="probe"  
         /organism="Artificial Sequence"

<400> 35

gcacaagtgt cgcctggaac taaat

25

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 36

tatgttaatt ccgtgcgcca cttac

25

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 37

cacaagtgtc gcctggaact aaatt

25

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

```

        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 38
atgttaattc cgtgcgccac ttacg
25
<210> 39
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 39
tgttaattcc gtgcgccact tacgg
25

<210> 40
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 40
gttaattccg tgcgccactt acggt
25
<210> 41
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source

```

<222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
     /note="probe"  
     /organism="Artificial Sequence"  
 <400> 41  
 ttaattccgt gcgccactta cggtt 25

<210> 42  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
     /note="probe"  
     /organism="Artificial Sequence"  
 <400> 42  
 taattccgtg cgccacttac ggttc 25

<210> 43  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
     /note="probe"  
     /organism="Artificial Sequence"  
 <400> 43  
 aattccgtgc gccacttacg gttct 25

<210> 44  
 <211> 25  
 <212> DNA

```

<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 44
tagtttctaat ctccgagacg agagg                25
<210> 45
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 45
ccacttacgg ttctcgctc ggatg                25

<210> 46
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 46
gttctaattct ccgagacgag aggca                25
<210> 47

```

```

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 47
acttacggtt ctgcctcgg atgcc
25

```

```

<210> 48
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 48
tctaattctcc gagacgagag gcaca
25

```

```

<210> 49
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 49

```

tacggttctc gcctcggatg ccgac

25

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 50

aatctccgag acgagaggca caagt

25

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 51

ttctcgctc ggatgccgac gtgaa

25

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"



```

        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 52
tctccgagac gagaggcaca agtgt                25
<210> 53
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 53
ctcgctcgga atgccgacgt gaact                25

<210> 54
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 54
tcgcctcgga tgccgacgtg aactt                25
<210> 55
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source

```

<222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
     /note="probe"  
     /organism="Artificial Sequence"  
 <400> 55  
 tagtttctaattctccgagacg agagg 25

<210> 56  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
     /note="probe"  
     /organism="Artificial Sequence"  
 <400> 56  
 tctaattctcc gagacgagag gcaca 25

<210> 57  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
     /note="probe"  
     /organism="Artificial Sequence"  
 <400> 57  
 aatctccgag acgagaggca caagt 25

<210> 58  
 <211> 25  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 58

tctccgagac gagaggcaca agtgt

25

<210> 59

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 59

acaagtgtcg cctggaacta aatta

25

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 60

acagtatgtt aattccgtgc gccac

25

<210> 61

```

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 61
ccacttacgg ttctgcctc ggatg
25

```

```

<210> 62
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 62
acttacgggtt ctgcctcgg atgcc
25

```

```

<210> 63
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 63

```

tacggttctc gcctcggatg ccgac

25

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 64

ttctcgcctc ggatgccgac gtgaa

25

<210> 65

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"

/note="probe"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 65

ctcgcctcgg atgccgacgt gaact

25

<210> 66

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

```

<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 66
gcacaagtgt cgcctggaac taaat
25

<210> 67
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 67
tatgttaatt ccgtgcgcca cttac
25

<210> 68
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="probe"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 68
cacaagtgtc gcctggaact aaatt
25

<210> 69
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

```

```
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 69
atgttaattc cgtgcgccac ttacg                25
```

```
<210> 70
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 70
tgttaattcc gtgcgccact tacgg                25
```

```
<210> 71
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 71
gttaattccg tgcgccactt acggt                25
```

```
<210> 72
<211> 25
```



```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 72
ttaattccgt gcgcactta cggtt                25
<210> 73
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 73
taattccgtg gccacttac ggttc                25

<210> 74
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 74
aattccgtgc gccacttacg gttct                25

```

```

<210> 75
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 75
actcccgggg agacgcacaa gtgtc

```

25

```

<210> 76
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 76
ctcccgggga gacgcacaag tgtcg

```

25

```

<210> 77
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"

```

<400> 77  
ccgggggagac gcacaagtgt cgcct 25

<210> 78  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<222> 1..25  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="probe"  
/organism="Artificial Sequence"

<400> 78  
acgcacaagt gtcgcctgga actaa 25

<210> 79  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<222> 1..25  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="probe"  
/organism="Artificial Sequence"

<400> 79  
gtgtcgctg gaactaaatt acaga 25

<210> 80  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"  
 /note="probe"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 80

gcctggaact aaattacaga tatgt

25

<210> 81

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"  
 /note="probe"  
 /organism="Artificial Sequence"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 81

ttacagatat gttaattccg tgcgc

25

<210> 82

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol\_type="DNA"  
 /note="probe"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 82

agatatgtta attccgtgcg ccact

25

<210> 83

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

```

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 83
ttccgtgcgc cacttacggt tctct
25

```

```

<210> 84
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 84
gccacttacg gttctctcgg cggag
25

```

```

<210> 85
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 85
ccacttacgg ttctctcgc ggagg
25

```

```

<210> 86

```

```

<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 86
gcacaagtgt cgcctggaac ta                22
<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
        /note="probe"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 87
attccgtgcg ccacttacgg                20

```

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 10

【변경전】

퀴놀린 유도체의 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 하나의 활성을 평가하기 위한 인 비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*) 방법으로서, 생물학적 샘플에서 miRNA의 발현의 존재 또는 수준을 결정하는 단계를 포함하며, 상기 miRNA는 miR-124인 것인 방법에 있어서,

상기 방법은 상기 퀴놀린 유도체로 치료된 환자 내 HIV 감염을 예방 및/또는 치료하기 위하여, 다음의 단계를 포함하는 것인 퀴놀린 유도체의 활성을 측정하는 인 비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*) 방법:

a- 상기 퀴놀린 유도체의 투여 전의 상기 환자로부터 미리 수득한 첫번째 생물학적 샘플 및 상기 퀴놀린 유도체 투여 후의 상기 환자로부터 미리 수득한 두번째 생물학적 샘플 내에, miRNA의 존재 또는 발현 수준을 측정하며, 상기 miRNA는 miR-124인 단계; 및

b- 상기 존재 또는 발현 수준이 치료 전에 획득된 두번째 생물학적 샘플에 비해 치료 이후에 획득된 두번째 생물학적 샘플 내에서 조절되는지 결정하는 단계;

상기 miRNA의 조절된 존재 또는 발현 수준은 상기 퀴놀린 유도체의 활성을 나타냄.

**【변경후】**

퀴놀린 유도체의 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 하나의 활성을 평가하기 위한 인 비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*) 방법으로서, 생물학적 샘플에서 miRNA의 발현의 존재 또는 수준을 결정하는 단계를 포함하며, 상기 miRNA는 miR-124인 것인 방법에 있어서,

상기 방법은 상기 퀴놀린 유도체로 치료된 환자 내 HIV 감염을 예방 및/또는 치료하기 위하여, 다음의 단계를 포함하는 것인 퀴놀린 유도체의 활성을 측정하는 인 비트로(*in vitro*) 또는 엑스 비보(*ex vivo*) 방법:

a- 상기 퀴놀린 유도체의 투여 전의 상기 환자로부터 미리 수득한 첫번째 생물학적 샘플 및 상기 퀴놀린 유도체 투여 후의 상기 환자로부터 미리 수득한 두번째 생물학적 샘플 내에, miRNA의 존재 또는 발현 수준을 측정하며, 상기 miRNA는 miR-124인 단계; 및

b- 상기 존재 또는 발현 수준이 치료 전에 수득된 두번째 생물학적 샘플에 비해 치료 이후에 수득된 두번째 생물학적 샘플 내에서 조절되는지 결정하는 단계;

상기 miRNA의 조절된 존재 또는 발현 수준은 상기 퀴놀린 유도체의 활성을 나타냄.