



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월09일

(11) 등록번호 10-1535737

(24) 등록일자 2015년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0002931

(22) 출원일자 2014년01월09일

심사청구일자 2014년01월09일

(56) 선행기술조사문헌

US20130245135 A1*

JP2010534480 A

JP2013188212 A

US20100298151 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

서광선

대전광역시 유성구 지족로 362, 311동 1604호 (지족동, 반석마을아파트)

최송이

충청북도 진천군 진천읍 생거진천로 1459

(74) 대리인

특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 신원혜

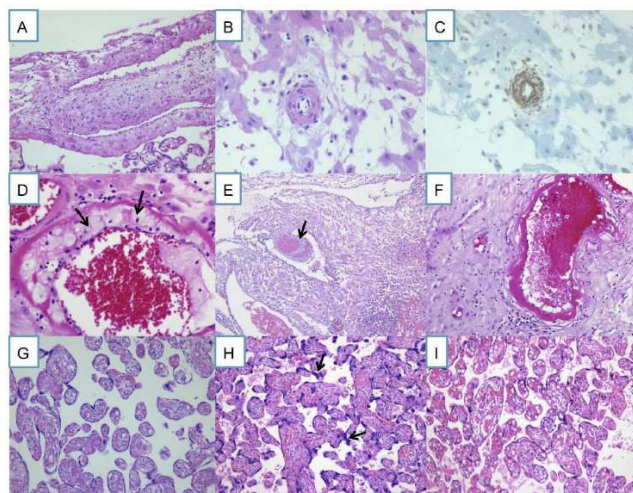
(54) 발명의 명칭 **miRNA를 포함하는 자간전증 진단 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 정상 대조군에 비해 자간전증 태반에서 발현이 증가 또는 감소하는 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자간전증 진단용 조성물, 및 이를 포함하는 진단용 키트에 관한 것이다. 또한, 상기 miRNA를 이용한 자간전증 예방 또는 치료용 조성물, 자간전증 진단을 위한 정보제공방법, 및 자간전증 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 정상 대조군과 비교하여 자간전증(PE) 태반에서 miRNA 발현 프로파일을 분석한 결과, 13개의 miRNA가 상향-조절되고 2개의 miRNA가 하향-조절됨을 밝혀내었다. 따라서 자간전증의 진단 및 치료 분야에서 해당 miRNA를 이용하는 본 발명의 기술이 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 염기서열로 표시되는 miR-197의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자간전증 진단용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 miRNA의 발현 수준은 자간전증이 의심되는 환자의 태반 또는 모체 혈액에서 측정하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 제제는 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 따른 조성물을 포함하는 자간전증 진단용 키트.

청구항 5

진단 대상 환자의 생물학적 시료로부터 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 miR-197의 발현을 측정하는 것을 포함하는 자간전증 진단에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 miRNA의 발현은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 유전자 칩을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

서열번호 2의 염기서열로 표시되는 miR-197의 발현 억제제를 유효성분으로 함유하는 자간전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 miRNA의 발현 억제제는 상기 miRNA 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열로 이루어진 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

- a) 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 miR-197를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및
- b) 비처리 대조군과 비교하여, 상기 세포에서 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 miR-197의 발현이 감소하면 상기 시험물질을 자간전증 치료제로 판단하는 단계를 포함하는 자간전증 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 정상 대조군에 비해 자간전증 태반에서 발현이 증가 또는 감소하는 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자간전증 진단용 조성물, 및 이를 포함하는 진단용 키트에 관한 것이다. 또한, 상기 miRNA를 이용한 자간전증 예방 또는 치료용 조성물, 자간전증 진단을 위한 정보제공방법, 및 자간전증 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

자간전증(preeclampsia, PE)은 세계적으로 임산부와 신생아의 사망률과 이환율의 주요 원인이다. PE는 임신적으로 단백뇨를 동반한 임신-관련 고혈압으로 특징되어 진다. PE는 모든 임신부의 약 5-8%에 발생하고 모든 PE의 대략 25%는 자궁내 발육지연(intrauterine growth retardation, IUGR)을 경험한다 (Chelbi ST, et al., *Mol Cell Endocrinol* 2008;282(1-2):120-9). 병인(pathogenesis)을 확인하기 위한 노력에도 불구하고, PE의 주된 원인은 여전히 이해하지 못한 채 남아있다. 그러나 태반이 PE의 병인에서 중추적인 역할을 함은 분명하다 (Noack F, et al., *J Perinat Med* 2011;39(3):267-71). PE는 불충분한 면역내성(insufficient immune tolerance), 손상된 태반형성(impaired placentation), 내피세포 기능장애(endothelial cell dysfunction) 및 전신성 염증(systemic inflammation)을 포함하는 다양한 과정들의 결과로서 발생하는 것으로 인식되어 있다 (White LJ, et al., *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:98). 태반은 이러한 과정들에 대한 매개인자들의 근원(source) 역할을 한다 (Enquobahrie DA, et al., *Am J Obstet Gynecol* 2011;204(2). 178.e12-e21).

[0003]

PE의 메커니즘은 유전적, 후성적(epigenetic) 및 환경적 인자들의 조합인 것으로 보인다. 실제로, 후성적 과정들은 ‘태아 프로그래밍’으로 알려진 현상을 통해 발달 및 환경적 신호의 기록에서 중요한 역할을 한다 (Krause B, et al., *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7(4):513-20). PE에서 서로 다른 유전자 발현을 밝혀낸 연구들이 있지만, 태반의 후성적 조절은 알려져 있지 않다 (Enquobahrie DA, et al., *Am J Obstet Gynecol* 2011;204(2). 178.e12-e21). DNA 메틸화 및 히스톤 변형 이외에, 다양한 병리학적 임신의 태반에서 miRNA의 서로 다른 발현 패턴이 최근 보고되어 있다 (Choudhury M, et al., *Clin Exp Hypertens* 2012;34(5):334e41).

[0004]

마이크로 RNA(miRNAs)는 짧은 (~22 뉴클레오티드), 단일가닥의, 비-코딩 RNA 분자이다. miRNA는 전사 후 유전자 조절에서 중요한 역할을 한다. miRNA는 상보적인 염기쌍 형성(base pairing)을 통해 메신저 RNA(mRNA) 분해 또는 번역 억제(translational repression)를 유도한다. 인간 게놈에서 1000개 이상의 miRNA가 동정되어 있다 (miRBase). 대부분의 miRNA는 하나 이상의 mRNA를 동시에 표적한다. 또한, 여러 miRNA는 동일한 mRNA를 표적하며, 이는 상승적 효과를 유도할 수 있다. miRNA는 분화, 증식, 세포자살, 대사 항상성, 종양형성 및 DNA 메틸화와 같은 다양한 세포 과정들에서 중요한 역할을 한다 (Li H, et al., *Hypertension* 2003;42(5):895-900). 따라서 miRNA 발현의 프로파일링은 생리학적, 병리학적 상태의 조사에 대한 중요한 정보를 제공할 수 있다.

[0005]

최근 연구는 miRNA의 조절장소가 PE의 병인에 관련되어 있는 것으로 보고하고 있다 (Hu Y, et al., *Clin Chem Lab Med* 2009;47(8):923-9). 또한, 태반의 miRNA가 모체 혈액(maternal circulation)에 분비되기 때문에 miRNA는 임신-관련 질환들의 진단 및 예측에 유용할 것으로 보인다 (Prieto DM, et al., *J Reprod Immunol* 2011;88(2):106-11). 그러나 PE에서 어레이-기반 miRNA 프로파일링의 연구는 일관된 결과가 부족함을 제시하고

있다 (Mayor-Lynn K, et al., *Reprod Sci* 2011;18(1):46-56). 따라서 이러한 차이를 해결하기 위해 더 많은 연구가 필요하다. 본 발명에서는, 태반의 miRNA와 PE의 병인 사이의 관련성을 조사하기 위해, 중증 PE 및 정상혈압의 임산부로부터 얻은 태반 조직에서 miRNA 발현 프로파일의 마이크로어레이 분석, 뿐만 아니라 실시간 qRT-PCR 분석이 수행되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 따라서 본 발명의 주된 목적은, 자간전증의 진단에 효과적으로 사용하기 위한 miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95, miR-204, miR-21 및 miR-223로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자간전증 진단용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은, 상기 진단용 조성물을 포함하는 자간전증 진단용 키트를 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은, 진단 대상 환자의 생물학적 시료로부터 상기 하나 이상의 miRNA의 발현을 측정하는 것을 포함하는 자간전증 진단에 필요한 정보 제공 방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 miRNA 또는 그 발현 억제제를 유효성분으로 함유하는 자간전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 miRNA를 이용한 자간전증 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95, miR-204, miR-21 및 miR-223로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자간전증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에서, 상기 miRNA의 발현 수준은 자간전증이 의심되는 환자의 태반 또는 모체 혈액에서 측정할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에서, 상기 제제는 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 진단용 조성물을 포함하는 자간전증 진단용 키트를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 진단 대상 환자의 생물학적 시료로부터 miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95, miR-204, miR-21 및 miR-223로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현을 측정하는 것을 포함하는 자간전증 진단에 필요한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 miRNA의 발현은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 유전자 칩을 이용하여 측정할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95 및 miR-204로 이루어진 군에서 선택되는 miRNA의 발현 억제제를 유효성분으로 함유하는 자간전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 miRNA의 발현 억제제는 상기 miRNA 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열로 이루어진 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 miR-21 또는 miR-223을 유효성분으로 함유하는 자간전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 miR-21 또는 miR-223은 발현벡터에 삽입되어 제공될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 a) miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95, miR-204, miR-21 및 miR-223로 이루어진 군에서 선택되는 miRNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및 b) 비처리 대조군과 비교하여, 상기 세포에서 miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95 또는 miR-204의 발현이 감소하거나, miR-21 또는 miR-223의 발현이 증가되면 상기 시험물질을 자간전증 치료제로 판단하는 단계를 포함하는 자간전증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따르면, 정상 대조군과 비교하여 자간전증(PE) 태반에서 miRNA 발현 프로파일을 분석한 결과, 13개의 miRNA가 상향-조절되었고 2개의 miRNA가 하향-조절됨을 밝혀내었다. 따라서 자간전증의 진단 및 치료 분야에서 해당 miRNA를 이용하는 본 발명의 기술이 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 자간전증 태반의 병리조직학적 특징을 보여주는 도면이다.

도 2는 miRNA들의 발현을 실시간 RT-PCR 분석을 이용하여 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 PNA-기반 마이크로어레이 방법을 이용하여 miRNA 발현 프로파일을 분석하였다. 그 결과, 정상 대조군과 비교하여 자간전증(PE) 태반에서 13개의 miRNA가 상향-조절되었고 2개의 miRNA가 하향-조절되었다.

[0025] 본 발명자들은 이러한 연구결과에 기초하여, 자간전증의 태반에서 발현 수준이 변화하는 miRNA의 신규한 진단 및 치료 용도를 제공하고자 한다.

[0026] 본 발명에서는, miRNA 프로파일은 PNA 프로브를 이용한 혼성화 기반 방법을 이용하여 분석하였다. 이러한 방법은 타겟 miRNA의 검출을 위한 고민감성 특이적 툴이다. 왜냐하면, PNA는 DNA와 달리 비전하성(uncharged)이고 PNA와 RNA 가닥 사이의 결합력은 강력하기 때문이다 (Gambari R. *Curr Pharm Des* 2001;7(17):1839-62). 또한, 이러한 플랫폼은 마이크로어레이 슬라이드에 혼성화한 후 성숙한 miRNA를 직접적으로 라벨링하는 ‘라벨링 온-칩’ 방법을 이용하였다. 그러므로 그 특이성은 증가된다. 3배 이상 변화를 나타낸 7개의 상향-조절된 miRNA(miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-4p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p)로 실시간 RT-PCR을 수행하여 마이크로어레이 데이터를 검증하였다. 또한, 모집단(training set) 뿐만 아니라 독립된 검증샘플(validation samples)을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 모든 7개의 miRNA는 마이크로어레이 데이터와 일치하게 PE 태반에서 현저히 증가하였다. MiR-92b는 본 발명의 PE 환자에서 가장 큰 변화(12.28 fold change)를 나타내었다 (표 2 참조). 그러나 이 분자는 많이 조사되어 있지 않았다. 하지만 miR-92b의 여러 예상된 타겟 유전자들은 PE의 병인에 관련되어 있는 것으로 보인다. KLF4는 세포주기 저해제이며 영양막(trophoblast) 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 영양막 분화의 방해(disruption)는 PE를 초래할 수 있다 (White LJ, et al., *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:98). 또한 TEF는 영양막세포층(cytotrophoblast)의 합포체영양막(syncytiotrophoblast)으로의 분화와 관련되어 있는 것으로 보고되어 있다 (Jacquemin P, et al., *Dev Dyn* 1998;212(3):423-36). 이러한 보고는 miR-92b가 PE의 병인에 매우 관련되어 있음을 뒷받침한다. 그러나 miR-92b와 이러한 분자들 사이의 상호작용을 조사하는 추가적인 기능 연구가 필요하다.

[0027] PE의 정확한 병인은 조사 대상으로 여전히 남아 있지만 태반이 PE의 발달에 결정적인 역할을 한다는 것은 명확하다. 지금까지의 가설에 따르면, 손상된 용모막의 영양세포(extravillous trophoblasts)는 자궁나선동맥(uterine spiral artery)의 생리적 전환(physiologic conversion)의 실패를 초래하여 순서대로 저산소증(hypoxia), 모체 혈액으로 합포체영양막 단편의 방출, 및 모체 염증반응을 일으킴으로써 임상 증상을 진행시킨다 (Huppertz B. *Hypertension* 2008;51(4):970-5).

[0028] 조기 검출로 적절한 관리와 예방은 가능하지만, PE는 임상 증상이 나타날 때까지 검출될 수 없다. 상당한 이점에도 불구하고, PE의 조기 진단 및 예방은 중요한 과제로 남아있다. 최근 수십년간, PE의 조기 검출에 대한 혈청 마커를 찾기 위한 막대한 노력이 있었다. 가용성 VEGF 수용체-1(vascular endothelial growth factor

receptor-1), 가용성 PIGF(placental growth factor), 가용성 엔도글린(endoglin: an antiangiogenic protein)이 PE에 대한 잠재적인 마커로서 제안되어 왔다. 그러나 이들은 낮은 검출 비율과 임신 후기에서의 진단으로 인해 기대에 미치지 못하고 있다 (Thadhani R, et al., *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(2):770-5). 따라서 PE의 조기 검출을 위한 비침습적 바이오마커를 동정하는 것은 시급하게 필요하다.

[0029]

상술한 바와 같이, 가장 먼저 확인가능한 병리학적 특징은 탈락막의 나선동맥의 생리적 전환의 결핍으로 일어나는 빈약한 용모막외 영양세포 이동이다 (Lala PK, et al., *Placenta* 2003;24(6):575-87). 본 발명은 PE에서 15 개의 서로 다르게 발현되는 miRNA의 타겟 유전자가 세포이동 신호전달 경로, 접착결합(adherens junction), 국소부착(focal adhesion) 및 TGF 신호전달 경로와 관련되어 있음을 설명하고 있다. 또한, 본 발명의 공통 타겟 유전자들 중에서 HGF 및 ADM은 더 연구될 필요가 있다. 두 유전자는 PE에서의 발현이 감소되고 영양막 이동 및 합포체화(syncytialization)와 관련되어 있다 (Kauma SW, et al., *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(11):4092-6). 이러한 결과에 기초하면, miRNA의 조절장애는 병인의 초기 단계에서 영양막의 기능장애를 일으킬 것이다.

[0030]

또한, 태반 miRNA는 모체 혈액으로 방출되어 임신성 질환을 일으킬 가능성이 있다 (Prieto DM, et al., *J Reprod Immunol* 2011;88(2):106-11). 따라서 혈장 miRNA의 농도와 패턴은 자간전증의 조기 진단에 대한 바이오마커가 될 수 있다. 본 발명에서, miR-92b는 PE에서 가장 큰 변화를 나타내므로, miR-92b를 포함하는 이들 miRNA들의 혈청 발현의 측정에 대한 대규모 연구가 수행되어야 한다. 또한, 후성적 치료법은 후성적 변화의 가역성으로 인해 관리 툴(management tool)을 근본적으로 제공할 수 있다 (Nelissen EC, et al., *Hum Reprod Update* 2011;17(3):397-417).

[0031]

환경적인 자극은 태반의 후성유전학(epigenetics)을 방해할 수 있다. 또한, 최근 연구는 모체의 내피세포 장애가 장기간 동안 계속될 수 있고 노후에 심혈관 질환을 유도할 수 있는 것으로 보고하고 있다 (Steinberg G, et al., *Thromb Res* 2009-123(Suppl. 2):S93-9). 추가적으로, PE는 '후생유전학 마커'로 알려져 있는, 성인 시기에서 낮은 출생시 체중과 관련된 대사증후군 발달의 위험에 기여한다 (Wu L, et al., *Reproduction* 2012;143(3):389-97). miR-198의 과발현은 관상동맥질환에 관련되어 있는 것으로 보고되어 있다 (Hoekstra M, et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394(3):792-7). 또한 miR-223은 제2형 당뇨병 환자에서 낮은 수준으로 발현되는 것으로 보고되어 있다 (Zampetaki A, et al., *Circ Res* 2010;107(6):810-7).

[0032]

이와 같은 본 발명의 실험결과와 함께 관련 기술내용에 기초하여, 본 발명은 miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95, miR-204, miR-21 및 miR-223로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 자간전증 진단용 조성물을 제공한다.

[0033]

상기 miRNA들은 암(cancer) 또는 줄기세포(stem cell)와 연관이 있다고 알려져 있는 158개의 인간 miRNA들로부터, 본 발명자들이 태반의 miRNA와 자간전증(PE)의 병인 관련성을 밝혀내기 위해 PNA 기반 프로파일링 분석을 이용하여 선별해낸 것이다. 따라서 본 발명자들이 선별한 상기 miRNA들은 신규한 의학적 용도로서 자간전증의 진단 및 치료에 사용될 수 있다.

[0034]

본 발명의 miRNA들은 하기 표 1에 기재된 서열로 구성된다.

표 1

[0035]

microRNA	서열
miR-92b	AGGGACGGGACGCGGUGCAGUG
miR-197	CGGGUAGAGAGGGCAGUGGAGG
miR-342-3p	UCUCACACAGAAUUCGACCCGU
miR-296-5p	AGGGCCCCCUCUAAUCCUGU
miR-26b	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU
miR-25	AGGCGGAGACUUGGGCAAUUG
miR-296-3p	GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC
miR-26a	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGCU
miR-198	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC
miR-202	UUCCUAGCAUAUACUUCUUG
miR-191	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG

miR-95	UCAAUAAAUGUCUGUUGAAU
miR-204	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR-223	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU

- [0036] 본 발명은 종종 자간전증 환자의 태반에서 정상혈압의 대조군과 비교하여 상기 miRNA의 발현 수준이 유의적으로 증가하거나 감소한다는 점을 확인한 것에 기초한다. 즉, 본 발명에 따른 miRNA는 자간전증 여부에 대한 진단 마커로 사용된다.
- [0037] 이에 따라, 본 발명은 상기 miRNA들로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자간전증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 진단용 조성물에서, 상기 miRNA의 발현 수준은 자간전증이 의심되는 환자의 태반 또는 모체 혈액에서 측정할 수 있다. 최근의 보고에 따르면, 태반의 miRNA가 모체 혈액(maternal circulation)으로 분비되기 때문에 임신-관련 질환들의 진단 및 예측에 유용할 것으로 알려져 있으므로 (Prieto DM, et al., *J Reprod Immunol* 2011;88(2):106-11), 태반에서의 miRNA 발현 수준의 변화를 모체 혈액을 통해 측정할 수 있음은 당업계에 자명한 것이다.
- [0039] 본 발명의 진단용 조성물에 있어서, 상기 제제는 miRNA에 특이적으로 결합하여 miRNA의 수준을 측정할 수 있는 물질이라면 특별히 한정되지는 않으며 바이오 키트 분야에서 통상 사용되는 것을 널리 사용할 수 있으나, 상기 miRNA 서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 또는 그 단편일 수 있으며, 바람직하게는 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이다.
- [0040] 상기 프라이머는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 갖는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다. 본 발명에서는 상기 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 자간전증의 여부를 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0041] 상기 프로브는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수십 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 상기 하나 이상의 miRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 자간전증의 여부를 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0042] 이러한 프라이머 또는 프로브는 본 발명의 공지된 miRNA들의 서열을 바탕으로 당업자가 적절히 디자인할 수 있다.
- [0043] 예컨대, 프라이머 또는 프로브는 포스포로아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0044] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 진단용 조성물을 포함하는 자간전증 진단용 키트를 제공한다.
- [0045] 본 발명의 자간전증 진단용 조성물은 상기 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제 이외에 자간전증 진단 키트로 사용되기에 적합하도록 하기 위한 다른 성분들이 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 진단용을 포함하는 자간전증 진단용 키트는 상기 조성물 이외에 진단 키트에 통상적으로 사용되는 구성을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0046] 예컨대 본 발명의 진단 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR

키트는 마커 miRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 테옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명의 진단 키트는 유전자 칩 키트일 수 있다. 유전자 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기관은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 진단 대상 환자의 생물학적 시료로부터 miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95, miR-204, miR-21 및 miR-223로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현을 측정하는 것을 포함하는 자간전증 진단에 필요한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0049] 본 발명의 정보 제공 방법에 있어서, 상기 생물학적 시료는 자간전증의 여부에 따라 상기 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 차이가 발생하는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 또는 뇨 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 다만, 신속한 진단을 위해 태반 또는 모체 혈액인 것이 바람직할 수 있다.

[0050] 본 발명의 정보 제공 방법에 있어서, 상기 miRNA의 발현은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 유전자 칩을 이용하여 측정할 수 있다.

[0051] 본 발명에서, 정상혈압 대조군 태반의 상기 miRNA의 발현 수준에 비해 자간전증 환자의 태반에서 상기 miRNA의 발현 수준이 유의적으로 낮거나 높게 측정되면 자간전증으로 진단될 수 있다는 정보를 제공할 수 있게 된다.

[0052] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95, miR-204, miR-21 및 miR-223로 이루어진 군에서 선택되는 miRNA의 발현 억제제를 유효성분으로 함유하는 자간전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0053] 본 발명의 실험결과에 따르면, 상기 miRNA들은 태반에서 miRNA의 조절장애로 인하여 정상혈압 대조군과 비교하여 자간전증 환자에서 과발현되기 때문에 (표 2 참조), 과발현된 miRNA의 발현 수준을 정상 수준으로 억제시킴으로서 자간전증의 증상을 완화시키거나 치료할 수 있다.

[0054] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 miRNA의 발현 억제제는 상기 miRNA 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열로 이루어진 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[0055] 상기 ‘안티센스 올리고뉴클레오타이드’는 타겟으로 하는 miRNA 서열에 대한 상보적인 서열을 가지고 있어 miRNA와 이합체(duplex)를 형성할 수 있는 핵산-기반 분자를 포괄한다.

[0056] 본 발명에 사용될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 다양한 분자를 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA 분자이며, 보다 바람직하게는 RNA 분자이다. 예를 들어, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드(RNA), 디옥시리보뉴클레오타이드(DNA), 2 ‘-O-변형 올리고뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트-백본 디옥시리보뉴클레오타이드, PNA(peptide nucleic acid) 또는 LNA(locked nucleic acid)이다.

[0057] 상기 miRNA의 발현 억제는 전형적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 투여하여 달성될 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 7-50 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20-25 뉴클레오타이드이다.

[0058] 본 발명에서, 상기 miRNA의 발현을 억제하는 다른 접근 방식은 억제 RNA 분자를 투여하는 것이며, 상기 억제 RNA 분자는 상기 miRNA의 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 이러한 억제 RNA 분자는 이중가닥 siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA) 및 라이보자임을 포함한다. 상기 ‘siRNA’는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자이다 (참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다.

[0059] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 miR-21 또는 miR-223을 유효성분으로 함유하는 자간전증 예방 또는

는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0060] 본 발명의 실험결과에 따르면, 상기 miRNA들은 태반에서 miRNA의 조절장애로 인하여 정상혈압 대조군과 비교하여 자간전증 환자에서 저발현되기 때문에 (표 2 참조), 저발현된 miRNA의 발현 수준을 정상 수준으로 회복시킴으로서 자간전증의 증상을 완화시키거나 치료할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 miR-21 또는 miR-223의 뉴클레오타이드 서열을 코딩하는 유전자를 발현벡터에 삽입할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 miRNA가 세포 내에서 일시적, 또는 영구적으로 발현될 수 있도록 miRNA 발현벡터를 세포 내로 형질전환 또는 감염(infection)시킬 수 있다. 본 발명의 발현벡터는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 구성될 수 있다.
- [0063] 상기 발현벡터는 포유류 세포 또는 그 밖의 표적 세포 유형의 복제 및 발현에 이용되는, 당해 분야에 공지된 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택하여 사용할 수 있다. 본 발명에서는 특히 바이러스벡터들이 바람직하다. 그 이유는, 바이러스벡터들이 생체 내에서 핵산 전달의 효율이 높기 때문에 그 효과가 높을 것이라고 생각되기 때문이다.
- [0064] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0065] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 국소 주입, 뇌실내 주입, 척수강 주입, 피하 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-100 mg/kg이다.
- [0067] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 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.
- [0068] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 a) miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95, miR-204, miR-21 및 miR-223로 이루어진 군에서 선택되는 miRNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및 b) 비처리 대조군과 비교하여, 상기 세포에서 miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95 또는 miR-204의 발현이 감소하거나, miR-21 또는 miR-223의 발현이 증가되면 상기 시험물질을 자간전증 치료제로 판단하는 단계를 포함하는 자간전증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0069] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 우선 상기 miRNA의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킨다. 본 발명의 miRNA 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포는 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 상기에서 언급한 miRNA의 뉴클레오타이드 서열을 발현벡터에 삽입시킨 후 형질전환시킨 세포이다.
- [0070] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 상기 miRNA의 발현 수준의 측정은 상기에서 언급한 바와 같이, 역전사효소 증합효소반응, 경쟁적 역전사효소 증합효소반응, 실시간 역전사효소 증합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 유전자 칩 등의 방법을 이용하여 용이하게 수행될 수 있다.

[0071] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 실시예 1. 샘플 준비

[0073] 충남대학교병원 병리과에서 1998년에서 2009년까지 PE로 진단된 증례들에 대하여 검색하였다. 총 95개 PE 증례들을 찾아내어, 그 중 21개 중증 PE 증례들이 쌍태임신, 임신성 당뇨병, 탈락막 결핍(no decidual portion) 및 불완전 임상 정보의 배제기준(exclusive criteria)에 따라 선택되었다. 미국 산부인과전문의 단체(American College of Obstetricians and Gynecologists)에 따르면, 중증 자간전증은 다음의 기준이 하나 이상 존재하는 경우로 정의된다: 중증 임신성 고혈압 (임신 20주 후 2번 이상 특정 시기에서 최대혈압 >160 mmHg 또는 최소혈압 >110 mmHg) 또는 24시간 뇨 시료에서 단백질 $\geq 5g$ (Choudhury M, et al., *Clin Exp Hypertens* 2012;34(5):334-41). 단백뇨에 의한 합병증이 없는(uncomplicated) 정상혈압의 임신부로부터 얻은 20개의 태반 샘플은 대조군으로 선택되었다. 통상적인 조직학적 시험을 위해 탯줄삽입(umbilical cord insertion)에서 대략 2 cm 태반 디스크(placental disc)의 중심으로부터 전층 섹션(full thickness sections)을 샘플로 하였다. 태반 조직은 4% 완충포르말린(buffered formalin)에서 밤새 고정한 후 파라핀에 포매(embed)하였다. 연구 개체군의 데모그래픽 및 임상병리학적 특성은 하기 표 2에 나타내었다. 본 발명자들은 샘플을 하기 표 2와 같이 모집단(training set) 및 검증집단(validation set), 두 그룹으로 나누었다.

표 2

Study population characteristics.				
Characteristic	Training set		Validation set	
	Severe preeclampsia (n = 10)	Normotensive control (n = 10)	Severe preeclampsia (n = 11)	Normotensive control (n = 10)
Maternal age (years $\pm$ SD)	29.3 $\pm$ 4.0	31.5 $\pm$ 4.3	31.0 $\pm$ 5.3	30.7 $\pm$ 3.9
Gestational age (weeks $\pm$ SD)	37.8 $\pm$ 1.6	38.8 $\pm$ 2.0	34.9 $\pm$ 3.1	38.8 $\pm$ 1.8
Systolic blood pressure (mmHg $\pm$ SD)	173.0 $\pm$ 15.7	107.5 $\pm$ 7.1	170.9 $\pm$ 18.7	112.0 $\pm$ 7.9
Diastolic blood pressure (mmHg $\pm$ SD)	116.0 $\pm$ 14.3	68.8 $\pm$ 6.4	105.5 $\pm$ 10.4	69.0 $\pm$ 7.4
Nulliparous	6	3	7	4
Birth weight (mmHg $\pm$ SD)	2607.0 $\pm$ 520.3	3161.0 $\pm$ 412.5	1602.7 $\pm$ 378.4	3020.0 $\pm$ 275.1
SGA	10	0	10	0
Female fetus	8	4	9	4
Decidual vasculopathy	6	0	6	0
Infarct	0	0	5	0
Placenta abruption	2	0	1	0
Villous maldevelopment	8	0	6	0

SGA: small for gestational age.

[0075] 실시예 2. 임상병리학적 특성

[0076] 본 발명자들은 산모연령(maternal age), 재태기간(gestational age), 출산력(parity), 혈압, 태반무게, 태아 성별 및 신생아 체중을 확인하였다. 저체중아(Small for gestational age, SGA)는 상기 재태기간에 대해 10% 이상 적게 나가는 신생아로 정의된다. 본 발명자들은 탈락막 혈관병증(decidual vasculopathy: lack of physiologic conversion, atherosclerosis, thrombosis, fibrinoid necrosis), 경색증(infarct), 태반조기박리(placenta abruption) 및 융모 발육불량(villous maldevelopment)의 4개 카테고리에서 병리조직학적 특징들을 조사하였다. 면역조직화학적(Immunohistochemical, IHC) 연구를 수행하여 병리조직학적 결과를 뒷받침하였다. 알파-평활근 액틴(smooth muscle actin, SMA)에 대한 IHC 염색을 수행하여 보유하고 있는 근육층으로 생리적 전환(physiologic conversion)의 결핍을 확인하였다. 알파-SMA 및 CD68에 대한 IHC 염색을 수행하여 탈락막 혈관(decidual vessels)의 동맥경화(atherosclerosis)를 확인하였다. 모든 연구 과정들은 충남대학교병원의 감사위원회에 의해 승인되었다.

[0077] 실시예 3. miRNA 어레이

[0078] miRNA 프로파일링은 모집단(training set: 중증 PE로부터 얻은 10개 및 대조군으로부터 얻은 10개 태반)을 이용하여 수행하였다. 총 RNA는 트리졸시약(Trizol reagent; Invitrogen, CA)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라

FFPE(formalin-fixed and paraffin-embedded) 블록의 10 mm 섹션으로부터 얻었다. 고순도의 총 RNA는 나노드롭 분광광도계(NanoDrop Spectrophotometer)를 이용하여 확인하였다. 각 샘플로부터 총 400 ng의 RNA를 사용하였다. miRNA는 프로파일링 키트(PANArrayTM miRNA expression profiling kit; PNANGENE Inc., Daejeon, South Korea)를 이용하여 설명서 매뉴얼에 따라 라벨링하였다. 상기 프로파일링 키트는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid, PNA)-기반 마이크로어레이이다. 각 마이크로어레이는 158개의 인간 miRNA를 포함하였다. 혼성화 이미지는 스캐너(GenePix 4000B scanner; Axon Instruments, Foster City, California)를 이용하여 얻었다. 과발현된 miRNA는 대조군에 대한 PE에서의 miRNA 발현 수준의 비율이 2 이상일 경우에 확인되었고 저발현(underexpression)은 상기 비율이 0.5 이하인 경우에 확인되었다.

[0079] 실시예 4. 실시간 정량적 RT-PCR을 이용한 마이크로 RNA 발현 검증

[0080] 실시간 RT-PCR은 모집단 및 검증집단을 포함한 총 샘플을 이용하여 miRNA 마이크로어레이 결과의 검증을 위해 수행하였다. 총 RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 역전사 키트(TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit; ABI, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 cDNA로 역전사시켰다. 특이적 miRNA 프라이머는 해당 miRNA의 서열에 기초하여 상업적인 Taqman 프로브를 사용하여 디자인되어 마이크로 RNA 분석키트(TaqMan MicroRNA Assay Kit; Applied Biosystems)에 제공되었다. 내인성 대조군으로 사용되는 유니버설하게 발현되는 소형 핵 RNA(small nuclear RNA) U6을 이용한, 비교 C_T 방법(comparative C_T method)이 miRNA 발현을 계산하는데 사용되었다.

[0081] 실시예 5. 마이크로 RNA의 표적 유전자 및 기능 분석

[0082] 연산 알고리즘 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), miRanda (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets/>), PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>) and mirTarget2 (<http://www.mirdb.org/miRDB>)을 사용하였다. 위양성(false positives)의 수를 줄이기 위해, 상기 4개의 프로그램 중 적어도 3개에 의해 예상되는 mRNA 타겟만 선택하였다. 예상된 표적 유전자는 DAVID (the database for annotation, visualization and integrated discovery) 생물정보학 리소스에 입력하여 큰 유전자 목록과 관련된 생물학적 특징 및 기능(meanings)을 추출하였다. 경로들의 통계적 유의성은 p -value < 0.05에 근거하여 결정하였다.

[0083] 통계적 분석

[0084] miRNA 발현 수준은 SPSS 16.0의 ManneWhitney U -test를 이용하여 PE 및 대조군 사이에서 비교하였다.

[0085] 실험결과 1. 임상병리학적 특성

[0086] 본 발명에서는 21명의 중증 PE 임신부 및 20명의 정상혈압 대조군을 시험하였다. 두 그룹의 재태기간은 재태기간 효과 배제를 위한 선택 때문에 모집단에서 비교되었다. 그러나 PE 그룹의 재태기간은 검증집단에서의 대조군보다 짧았다. PE 그룹은 더 많은 사례의 비출산(nulliparous) 임신을 포함하였고 여아(female fetus)는 모집단 및 검증집단 모두에서 대조군과 비교하였다. 모든 PE 임신은 SGA를 동반하였다. 병리조직학적 결과에 따르면, 대부분의 PE 태반은 대조군에서 나타나지 않은, 탈락막 혈관병증(decidual vasculopathy)이거나 융모 발육불량(villous maldevelopment)으로 나타났다 (도 1).

[0087] 도 1은 자간전증 태반의 병리조직학적 특징을 보여주는 도면이다. 대부분의 경우에서 탈락막 혈관병증(A-D) 및 융모 발육불량(E-F)이 나타난다. (A) 정상 탈락막 혈관은 크고 구불구불한 특징을 보여준다. (B) 생리학적 전환의 결핍; 탈락막에서 소동맥은 근육층이 있는 작은 관(small lumen)을 유지하고, (C) 알파-평활근 액틴에 대한 면역조직학적 염색은 근육층 주변에서 강조된다. (D) 탈락막 혈관에서 동맥경화; 내막은 콜레스테롤이 가득한 대식세포로 대체된다 (화살표). (E) 혈전증(화살표), (F) 탈락막 혈관에서 섬유소성괴사(fibrinoid necrosis), (G) 일부 함포체영양막을 갖는 3차 융모(tertiary villi). (H) 함포체 결절; 화살표는 증가된 함포체 결절을 나타낸다 (>30% of villi). (I) 높은 분지형 혈관신생; PE 태반의 융모는 정상 태반에 비해 증가된 분지형 및 (G) 증가된 수의 융모 간 모세혈관을 나타낸다.

실험결과 2. 태반에서 miRNA의 조절장애

본 발명자들은 상업적으로 입수가능한 혼성화-기반 마이크로어레이를 이용하여 각 프로파일에 대한 158개 miRNA의 발현 수준을 측정하였다. 15개 miRNA가 PE 태반 및 대조군 사이에서 서로 다르게 발현되었다. 13개 miRNA (miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p, miR-26a, miR-198, miR-202, miR-191, miR-95 및 miR-204)가 정상혈압 태반과 비교하여 PE 태반에서 과발현되었다. 2개 miRNA (miR-21 및 miR-223)가 정상혈압 태반과 비교하여 PE 태반에서 저발현되었다 (표 3).

표 3

Differentially expressed miRNA in preeclampsia placenta.		
Compared with normotensive placenta	MiRNA	Ratio ^a
Overexpressed	has-miR-92b	12.28
	has-miR-197	5.99
	has-miR-342-3p	5.26
	has-miR-296-5p	5.12
	has-miR-26b	3.23
	has-miR-25	3.12
	has-miR-296-3p	3.03
	has-miR-26a	2.75
	has-miR-198	2.61
	has-miR-202	2.53
	has-miR-191	2.34
	has-miR-95	2.32
	has-miR-204	2.03
	has-miR-21	0.33
Underexpressed	has-miR-223	0.40

^a This means the ratio of miRNA expression level in PE to those in control.

마이크로어레이 데이터를 검증하기 위해, 3배 이상 변화(three-fold change)를 나타낸 7개 miRNA (miR-92b, miR-197, miR-342-3p, miR-296-5p, miR-26b, miR-25, miR-296-3p)가 실시간 RT-PCR을 이용하여 시험되었다. 21개 PE 및 20개 대조군 샘플(모집단 + 검증집단)이 평가되었다. 마이크로어레이 결과에 따르면, 모든 7개 miRNA가 PE 태반에서 현저하게 증가되었다 ($p \leq 0.001$, Mann-Whitney U -test; 도 2).

도 2는 miRNA들의 발현을 실시간 RT-PCR 분석을 이용하여 확인한 도면이다. 모든 값은 U6의 수준으로 정규화하였다. 마이크로어레이 결과에서 대조군과 비교하여 3배 이상의 변화를 보여주는 7개의 miRNA들은 PE에서 현저히 과발현된다. 결과들은 마이크로어레이 결과와 일치한다.

실험결과 3. 예상 표적 유전자 및 기능 분석

본 발명자들은 4개의 연산 알고리즘 중 적어도 3개에 의해 예상되는 893개 유전자들을 얻었다(데이터 미도시). KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 및 Biocarta pathway에 기초한 타겟 유전자 기능 분석의 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

Gene ontology analysis of predicted target genes of differentially expressed miRNAs.			
Category	Term	Gene no.	p-value
KEGG_pathway	MAPK signaling pathway	33	3.38E-06
	Adherens junction	12	0.0016
	TGF-beta signaling pathway	12	0.0042
	Regulation of actin cytoskeleton	20	0.0121
	Pathways in cancer	27	0.0143
	Focal adhesion	18	0.0254
	Vascular smooth muscle contraction	12	0.0258
	Calcium signaling pathway	16	0.0326
Biocarta	PDGF signaling pathway	7	0.0064
	EGF signaling pathway	6	0.0324
	IL 6 signaling pathway	5	0.0405
	Rac 1 cell motility signaling pathway	5	0.0480

[0095]

[0096]

15개 유의한 miRNA의 타겟 유전자들은 다양한 신호전달 경로, 접착결합(adherens junction), 국소부착(focal adhesion), 액틴 세포골격의 조절(regulation of the actin cytoskeleton) 및 KEGG pathway에 따른 암에서의 경로들에 관련되어 있었다. 또한, 타겟 유전자들은 PDGF(platelet-derived growth factor), EGF(epidermal growth factor), IL-6(interleukin-6) 및 Biocarta 시스템에 따른 Rac 1 세포 이동 신호전달 경로(cell motility signaling pathways)와 관련되어 있었다. 3개 이상의 과발현된 miRNA의 공통 타겟 및 2개의 저발현된 miRNA의 공통 타겟인, 공통 타겟(common target) 유전자들은 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

Common target genes of the differentially expressed miRNAs.	
Target gene	Differentially expression miRNA
ADM	miR-25, miR-26a, miR-92b
BAZ2B	miR-25, miR-26b, miR-92b
BCL11A	miR-25, miR-26a, miR-92b
COL1A2	miR-25, miR-26a, miR-26b, miR-92b
CPEB2	miR-25, miR-205, miR-26a
DLG5	miR-204, miR-26a, miR-26b
G3BP2	miR-25, miR-26a, miR-26b, miR-92b
HGF	miR-202, miR-26a, miR-26b
KLF4	miR-25, miR-26a, miR-26b
PCDH9	miR-204, miR-26a, miR-26b
PPP3R1	miR-204, miR-26a, miR-26b, miR-342-3p
RNF44	miR-25, miR-296-5p, miR-92b
SLC38A2	miR-26a, miR-26b, miR-92b
SNN	miR-25, miR-26a, miR-26b, miR-92b
SOX4	miR-25, miR-191, miR-204
TANC2	miR-204, miR-26a, miR-342-3p
TOB1	miR-25, miR-26a, miR-26b
NFIB	miR-21, miR-223
RHOB	miR-21, miR-223

[0097]

[0098]

17개 유전자들이 3개 이상 과발현된 miRNA에 의해 공통적으로 타겟팅되었고, 2개 유전자들이 2개 저발현된 miRNA (miR-21 및 miR-223)에 의해 공통적으로 타겟팅되었다.

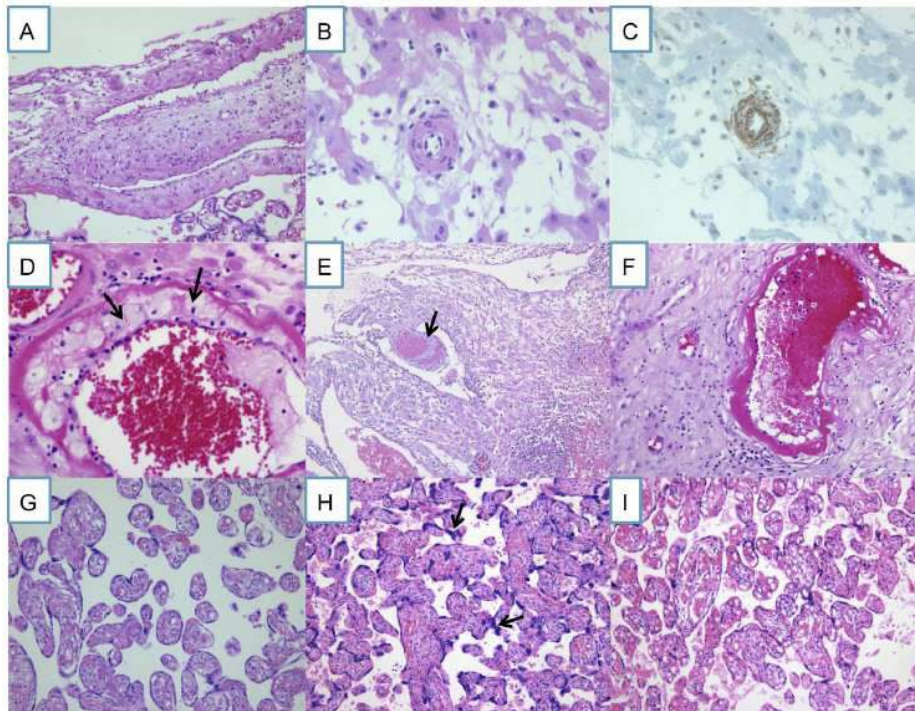
[0099]

이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고

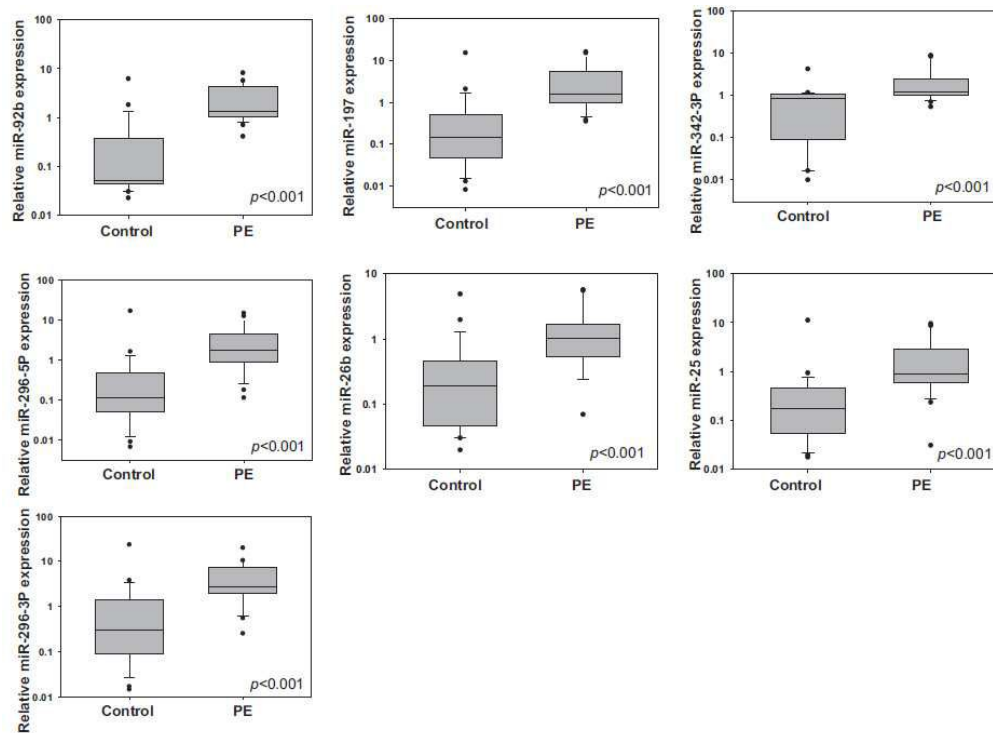
려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2



서열목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Compositions for diagnosis and treatment of preeclampsia
comprising miRNA

<130> NP13-1402

<160> 15

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

agggacggga cgcgugcag ug

22

<210> 2

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cggguagaga gggcaguggg agg	23
<210> 3	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
ucucacacag aaaucgcacc ugu	23
<210> 4	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
aggggccccc cucaauccug u	21
<210> 5	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
uucaaguaau ucaggauagg u	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 6	
aggcggagac ugggcaauu g	21
<210> 7	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 7	
gagggguuggg uggaggcucu cc	22
<210> 8	
<211> 22	

<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	8	
uucaaguaau ccaggauagg cu		22
<210>	9	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	9	
gguccagagg ggagauaggu uc		22
<210>	10	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	10	
uuccuaugca uauacuucuu ug		22
<210>	11	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	11	
caacggauc caaaagcag cug		23
<210>	12	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	12	
ucaauaaaug ucuguugaau u		21
<210>	13	
<211>	22	
<212>		
RNA		
<213>	Homo sapiens	
<400>	13	

uuccuuugu cauccaugc cu	22
<210> 14	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	
uagcuuauca gacugauguu ga	22
<210> 15	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	
cguguuuug acaagcugag uu	22