

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0009333

(43) 공개일자 2022년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0087675

(22) 출원일자 2021년07월05일

심사청구일자 2021년07월05일

(30) 우선권주장

1020200087486 2020년07월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인

국민대학교산학협력단

서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

임화선

서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 61호(여의도동, 여의도시범아파트)

송권화

충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호(쌍용동, 현대아이파크홈타운)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

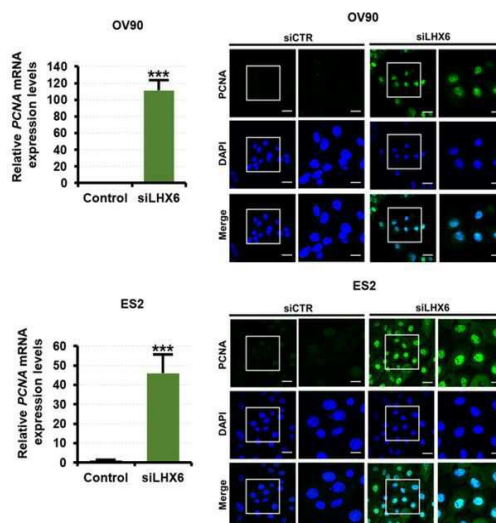
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 LHX6를 포함하는 난소암에 대한 화학요법제의 저항성 예측용 조성물

(57) 요약

본 발명은 LHX6를 포함하는 난소암에 대한 화학요법제의 저항성 예측용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상피성 난소암 환자의 조직에서 LHX6의 발현이 감소될수록 항암제 저항성이 증가되는 것이 확인됨에 따라, 상기 LHX6의 발현 수준 변화는 상피성 난소암 환자의 항암제 저항성에 대한 예후 예측용 조성물로 제공될 수 있으며, LHX6 발현촉진제 또는 활성화제가 처리된 상피성 난소암 세포의 세포 증식이 증가하고, 항암제 저항성이 증가되는 것이 확인됨에 따라, 상기 LHX6, 이의 발현촉진제 또는 활성화제는 상피성 난소암 세포의 항암 치료제 또는 항암제 민감화제로 제공될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12Q 1/6886 (2022.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

(72) 발명자

양창원

서울특별시 성북구 한천로 713, 501동 1202호(장위동, 래미안장위퍼스트하이)

김희승

서울특별시 서초구 서초중앙로24길 57, 101동 1001호(서초동, 서초롯데캐슬프레지던트)

박수진

서울특별시 용산구 백범로90길 74, 103동 1207호(문배동, 이안용산)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465028677

과제번호 HI17C0929

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 액체생체검사 기반 난소암 조기 진단, 재발 예측 및 항암제 내성 관련 엑소좀 바이

오마커 발굴 및 검증

기 여 율 1/1

과제수행기관명 국민대학교 산학협력단

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

LHX6를 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 조성물.

청구항 2

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

청구항 3

혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료로부터 LHX6를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 제제는 LHX6에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 키트는 LHX6의 발현 수준을 측정하여 정상 대조군에 비해 발현이 감소되었을 경우 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성인 것으로 결정하는 것을 지시하는 설명서를 포함하는 것을 특징으로 하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트.

청구항 6

청구항 3항 있어서, 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것을 특징으로 하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트.

청구항 7

(a) 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료에서 LHX6의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 시료 내 LHX6의 발현 수준을 정상 대조군의 발현 수준과 비교하여 정상 대조군의 발현 수준보다 낮은 경우에 난소암 환자가 화학요법제(chemotherapy)의 저항성인 것으로 결정하는 단계;를 포함하는, 난소암 환자에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것을 특징으로 하는, 난소암 환자에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

LHX6, 이의 활성화제 또는 발현촉진제를 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물.

청구항 10

LHX6, 이의 활성화제 또는 발현촉진제와 화학요법제(chemotherapy)를 포함하며, 상기 LHX6, 이의 활성화제 또는 발현촉진제가 화학요법제(chemotherapy)의 치료효과를 증진시키는, 난소암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 11

청구항 9 또는 청구항 10에 있어서, 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 12

- (a) 난소암 환자로부터 분리된 시료에서 얻은 LHX6의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (b) 상기 난소암 환자로부터 분리된 시료에 후보물질을 처리한 후 LHX6의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계의 LHX6의 발현 수준이 (a) 단계의 LHX6의 발현 수준보다 높은 경우에 상기 후보물질이 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제인 것으로 결정하는 단계; 를 포함하는, 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 LHX6를 포함하는 난소암에 대한 화학요법제의 저항성 예측용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

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

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

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1275266호 (2013.06.17. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 LHX6의 발현 수준 확인을 통하여 난소암의 화학요법제 저항성을 예측하고, LHX6의 발현 촉진제 또는 활성화제를 난소암 치료제 및 화학요법제 민감제로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 LHX6를 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명은 혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료로부터 LHX6를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트를 제공한다.

[0008] 본 발명은 (a) 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료에서 LHX6의 발현 수준을 측

정하는 단계; 및

- [0009] (b) 상기 (a) 단계의 시료 내 LHX6의 발현 수준을 정상 대조군의 발현 수준과 비교하여 정상 대조군의 발현 수준보다 감소된 경우에 난소암 환자가 화학요법제(chemotherapy)의 저항성인 것으로 결정하는 단계;를 포함하는, 난소암 환자에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 LHX6, 이의 활성화제 또는 발현촉진제를 포함하는, 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명은 LHX6, 이의 활성화제 또는 발현촉진제와 화학요법제(chemotherapy)를 포함하며, 상기 LHX6, 이의 활성화제 또는 발현촉진제가 화학요법제(chemotherapy)의 치료효과를 증진시키는, 난소암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 (a) 난소암 환자로부터 분리된 시료에서 얻은 LHX6의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0013] (b) 상기 난소암 환자로부터 분리된 시료에 후보물질을 처리한 후 LHX6의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0014] (c) 상기 (b) 단계의 LHX6의 발현 수준이 (a) 단계의 LHX6의 발현 수준보다 높은 경우에 상기 후보물질이 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제인 것으로 결정하는 단계; 를 포함하는, 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따르면, 상피성 난소암 환자의 조직에서 LHX6의 발현이 감소될수록 항암제 저항성이 증가되는 것이 확인됨에 따라, 상기 LHX6의 발현 수준 변화는 상피성 난소암 환자의 항암제 저항성에 대한 예후 예측용 조성물로 제공될 수 있으며, LHX6 발현촉진제 또는 활성화제가 처리된 상피성 난소암 세포의 세포 증식이 증가하고, 항암제 저항성이 증가되는 것이 확인됨에 따라, 상기 LHX6, 이의 발현촉진제 또는 활성화제는 상피성 난소암 세포의 항암 치료제 또는 항암제 민감화제로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 양성 장액낭샘종 (benign tumor, n=5), 경계성 장액성 종양 (borderline serous tumor, n=4), 저등급 장액성 난소암 (LGSO, n=5), 플라티늄 민감성 고등급 장액성 난소암 (HGSO, PFI > 12; n=5), 부분적 플라티늄 민감성 고등급 장액성 난소암 (HGSO, PFI 6-12; n=5) 및 플라티늄 저항성 고등급 장액성 난소암 (HGSO, PFI < 6; n=5) 환자군으로 구분된 상피성 난소암 환자 조직 내 악성화에 따른 LHX6 발현 변화를 확인한 결과이다.
- 도 2는 상피성 난소암 세포주에 siLHX6 형질주입 후 PCNA mRNA 및 단백질 발현을 확인한 결과이다.
- 도 3은 siLHX6 형질주입된 상피성 난소암 세포주에서 LHX6 억제에 따른 PCNA 단백질 발현 및 증식력 변화를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0019] 본 발명의 발명자들은 상피성 난소암 환자의 조직에서 확인된 LHX6의 발현 변화에 의해 상피성 난소암 세포주의 항암제 저항성이 조절되는 것을 확인하였으며, LHX6 억제제에 의해 난소암 세포의 증식 및 항암제 저항성이 조절되는 효과를 확인함에 따라, 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 본 발명은 LHX6를 포함하는 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0022] 상기 LHX6은 NCBI No. NM_001242333일 수 있다.
- [0023] 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것일 수 있다.

- [0024] 본 발명은 혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료로부터 LHX6를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측용 키트를 제공할 수 있다.
- [0025] 상기 제제는 LHX6에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브 중 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0026] 상기 키트는 LHX6의 발현 수준을 측정하여 정상 대조군에 비해 발현이 감소되었을 경우 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성인 것으로 결정하는 것을 지시하는 설명서를 포함하는 하는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명은 (a) 난소암 환자로부터 분리된 혈액 또는 혈청의 비침습적 생물학적 시료에서 LHX6의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0030] (b) 상기 (a) 단계의 시료 내 LHX6의 발현 수준을 정상 대조군의 발현 수준과 비교하여 정상 대조군의 발현 수준보다 낮은 경우에 난소암 환자가 화학요법제(chemotherapy)의 저항성인 것으로 결정하는 단계;를 포함하는 난소암 환자에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 저항성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0031] 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것일 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 "예후"는 병세의 진행, 회복에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 본 발명의 목적상, 예후란 상피성 난소암의 치료 후 해당 개체에서 치료 성공 여부, 생존, 재발, 전이, 약물반응성, 내성 등과 같은 여부를 판단하는 것을 의미한다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현량을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0037] 본 발명은 LHX6, 이의 활성화제 또는 발현촉진제를 포함하는 난소암에 대한 화학요법제(chemotherapy)의 민감성 증진용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0038] 본 발명은 LHX6, 이의 활성화제 또는 발현촉진제와 화학요법제(chemotherapy)를 포함하며, 상기 LHX6, 이의 활성화제 또는 발현촉진제가 화학요법제(chemotherapy)의 치료효과를 증진시키는 난소암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0039] 상기 화학요법제(chemotherapy)는 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수

있다.

- [0042] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 봉해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0045] 상기 LHX6, 이의 활성화제 또는 발현촉진제의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명은 (a) 난소암 환자로부터 분리된 시료에서 얻은 LHX6의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0049] (b) 상기 난소암 환자로부터 분리된 시료에 후보물질을 처리한 후 LHX6의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0050] (c) 상기 (b) 단계의 LHX6의 발현 수준이 (a) 단계의 LHX6의 발현 수준보다 높은 경우에 상기 후보물질이 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제인 것으로 결정하는 단계; 를 포함하는 난소암 치료 시 화학요법제(chemotherapy)의 민감화제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.
- [0052] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0054] <실험예>
- [0055] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0057] 1. 환자 조직 및 혈청 동정
- [0058] 양성종양(benign), 경계성종양(borderline), 저등급 장액성 난소암(low grade serous adenocarcinoma, LGSG), 플라티늄 저항성 고등급 장액성 난소암(high grade serous adenocarcinoma, HGSG: 플라티늄 약물의 primary treatment에 의한 재발 기간에 따라 6개월 미만, 6개월~12개월, 12개월 초과로 구분) 환자의 조직과 혈액 샘플을 사용하여 실험을 수행하였다.

[0059] 난소암 환자의 조직은 29명의 환자로부터 수술 직후 동정하였으며 액체 질소에 보관하였다. 동정한 조직은 양성 장액낭샘종 (n=5), 경계성 장액성 종양 (n=4), 저등급 장액성 난소암 (LGSO, n=5), 고등급 장액성 난소암 (HGSO, n=15)로 분류된다. 또한 고등급 장액성 난소암은 플라티늄 계열의 화학적치료 이후 재발 기간 (PFI)에 기반한 분류에 따라 민감성 (PFI > 12개월; n=5), 부분적 민감성 (6개월 ≤ PFI < 12개월; n=5), 및 저항성 (PFI < 6개월; n=5)으로 분류되었다. 혈액 샘플은 수술 직후 같은 환자에서 동정하였으며 원심분리를 통해 얻어낸 혈청을 액체 질소에 보관하였다. 모든 조직과 혈액 샘플은 서울대병원 인체자원은행을 통해 얻었으며 서울대학교병원 생명윤리위원회(IRB)의 승인을 받았다 (No. 1708-053-876).

[0061] 2. mRNA 발현 분석

[0062] 1 µg의 RNA를 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma)과 StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 측정하였다. PCR 조건은 95℃에서 3분 동안 인큐베이션 후 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 3분 조건을 40회 증폭하였으며 GAPDH 발현량에 기반하여 정규화하였다.

[0064] 3. 형질주입 (Transfection)

[0065] 상피성 난소암 OV90 및 ES2 세포를 6 웰에 배양하고, 비특이적 대조군과 표적 올리고뉴클레오티드 (oligonucleotide)를 리포펙타민 (Lipofectamine) 2000 (Invitrogen)을 이용하여 형질주입하였다. 모든 올리고뉴클레오티드는 바이오니아에서 합성하였다. 올리고뉴클레오티드와 리포펙타민 2000은 Opti-MEM reduced serum media (Gibco, catalog number: 32985070)에 희석하여 세포에 처리되었다. 37℃/5% CO₂ 인큐베이터에서 6시간 배양한 후 배지는 FBS가 포함된 배지로 교체되었다.

[0067] 4. BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0068] 상피성 난소암 세포의 증식 능력 변화를 확인하기 위해, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 후, 10 µM BrdU를 각 웰에 추가하여 37℃/5% CO₂ 인큐베이터에서 2시간 동안 배양하였다. 상피성 난소암 세포에 BrdU를 라벨링하고 세포를 고정하여 항-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션한 후 3회 세척하였다. 마지막으로 100 µL의 3,3',5,5' - tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응시키고 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm 및 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0070] 5. 면역형광법

[0071] 형질주입이 진행된 상피성 난소암 세포를 메탄올로 10분간 고정하고, 1:100으로 희석된 PCNA 항체를 처리하였다. 이 후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번 세척 후 2차 항체로 goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A11017, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 항체 희석 완충액 (antibody dilution buffer)에 1:200으로 희석하여 상온에서 1 시간 동안 배양하였다. 세포를 0.1% BSA-PBS로 세척한 후 DAPI 염색을 추가적으로 수행하여 타겟 단백질뿐만 아니라 핵을 동시에 관찰할 수 있도록 하였다. 실험 종료 후 LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0073] 6. 통계분석

[0074] 모든 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 수행하였으며, P < 0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0076] <실시예 1> 악성화 정도에 따른 상피성 난소암 환자 조직 내 LHX6의 발현 변화 확인

[0077] 난소암 환자 조직에서 전체 RNA를 추출하여 LHX6의 발현 변화를 확인하였다.

[0078] 그 결과, 도 1과 같이 LHX6의 발현은 양성 종양 (benign tumor) 환자군과 비교하여 경계성 장액성 종양 (borderline serous tumor), 저등급 장액성 난소암 (LGSO), 플라티늄 저항성 고등급 장액성 난소암 (HGSO) 환자의 조직에서 낮게 나타나는 것이 확인되었다. 특히, LHX6의 발현은 경계성 종양, 저등급 장액성 난소암, 고등급 장액성 난소암으로 암화의 진행이 될수록 발현이 낮게 나타났으며, 플라티늄 계열 약물의 저항성이 높을수록 그에 대한 발현은 현저히 감소하는 양상을 나타내었다.

[0080] <실시예 2> LHX6 조절에 따른 상피성 난소암 세포 증식 변화 확인

[0081] LHX6의 발현을 억제하는 siRNA(siLHX6, 서열번호 1: Sense 5' -GAG UCA UCC UUU UUC AGU A-3' , 서열번호 2: Antisense 5' -UAC UGA AAA AGG AUG ACU C-3')를 형질주입한 실험군에서 OV90 및 ES2 세포의 증식력이 유의적으로 증가하는 것이 확인되었다. 또한, 세포 증식에 필수적인 단백질인 PCNA에 대한 mRNA 및 단백질 수준 발현을 각각 qPCR과 면역형광법으로 확인한 결과, 도 2와 같이 siLHX6는 OV90 및 ES2 세포 내 PCNA의 발현을 유의적으로 증가시키는 것이 확인되었다.

[0083] <실시예 3> 항암제와 siLHX6 병용 처리에 의한 상피성 난소암 세포 증식 변화 확인

[0084] 상피성 난소암 세포주인 OV90 및 ES2 세포에 siLHX6를 형질주입한 후, 난소암에 대한 표준 항암제인 시스플라틴 (cisplatin) 또는 파클리탁셀 (paclitaxel)을 병용 처리하여 PCNA 단백질의 발현 변화를 확인하였다.

[0085] 그 결과, 도 3A 및 도 3B와 같이 OV90과 ES2 세포에서 시스플라틴에 의해 PCNA의 발현이 유의적으로 감소하였으나, siLHX6이 형질주입된 세포에서는 시스플라틴에 의해 감소한 PCNA의 발현이 다시 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

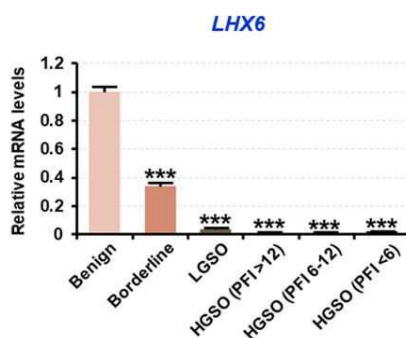
[0086] 또한, 실제로 siLHX6의 형질주입이 OV90 및 ES2 세포의 증식력을 회복시키는지 확인하기 위해 BrdU incorporation 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 3C와 같이 siLHX6 형질주입은 시스플라틴 또는 파클리탁셀 처리에 의해 감소한 OV90 및 ES2 세포의 증식력을 대조군 수준으로 회복시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0087] 상기 결과로부터 LHX6의 발현 조절은 기존 항암제에 대한 세포 저항성 문제를 해결할 수 있는 새로운 대안이 될 수 있음이 확인되었다.

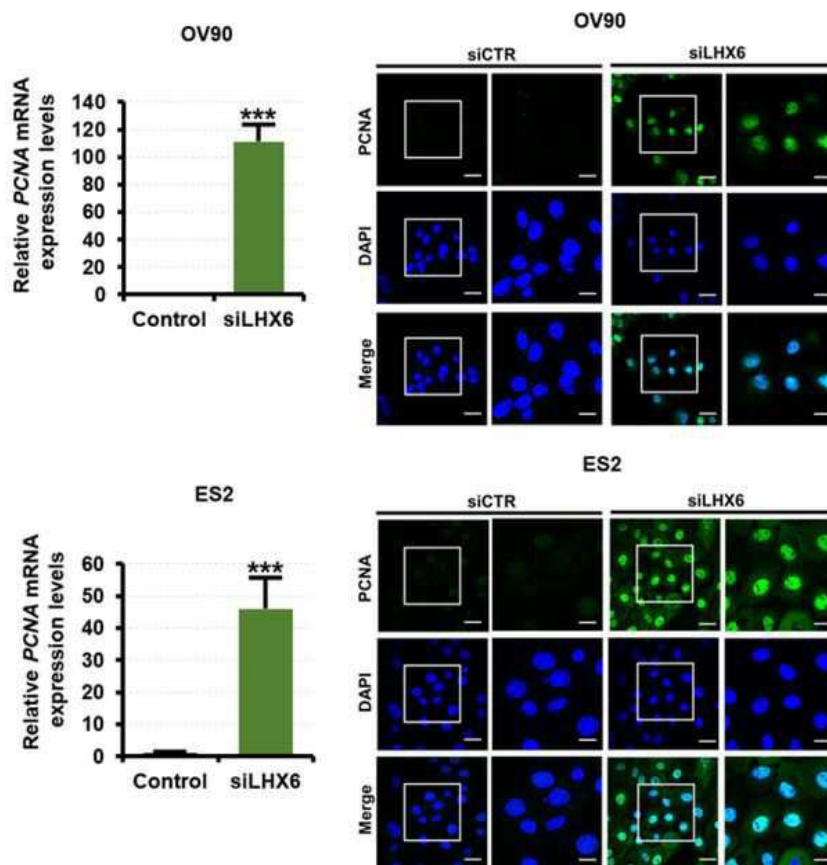
[0089] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

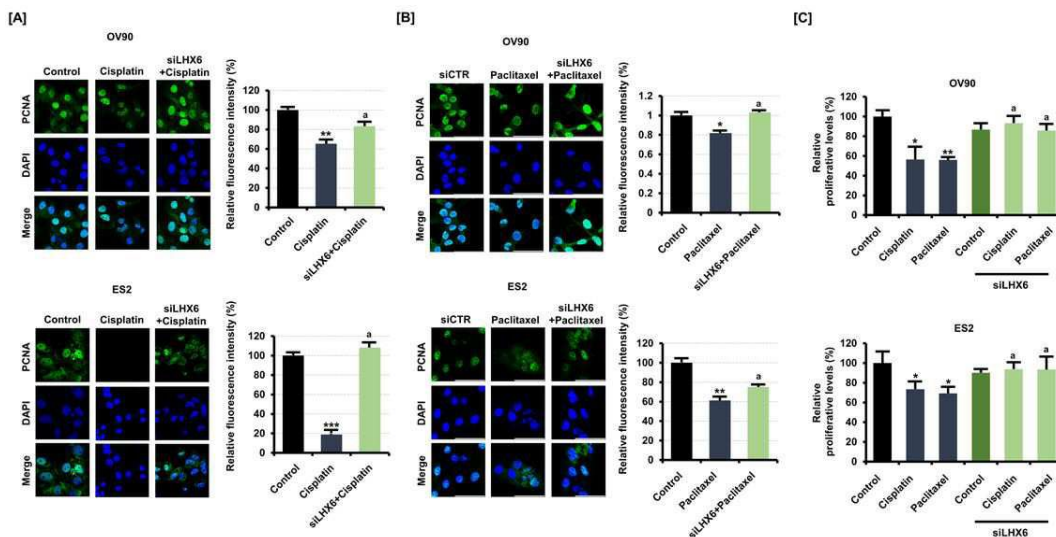
도면1



도면2



도면3



서열목록

- <110> Kookmin University Industry Academy Cooperation Foundation
- <120> Composition for predicting chemotherapy resistance to ovarian cancer comprising LHX6

<130> ADP-2021-0275
 <160> 2
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siLHX6 Sense
 <400> 1

gagucauccu uuucagua

19

<210> 2
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> siLHX6 Antisense
 <400> 2

uacugaaaaa ggaugacuc

19