



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0113412
(43) 공개일자 2019년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
A61K 48/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0036064
(22) 출원일자 2018년03월28일
심사청구일자 2018년03월28일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박종선
대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호(둔산동, 국화아파트)
박지수
대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호(둔산동, 국화아파트)
(74) 대리인
김순웅

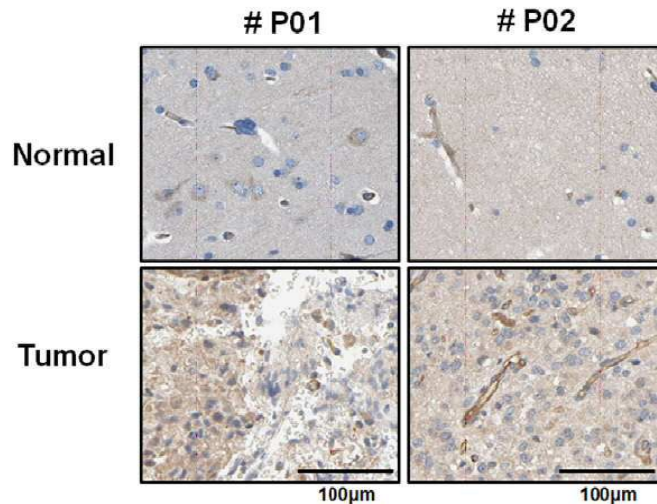
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 TrioBP를 포함하는 신경교종 진단용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 TrioBP를 포함하는 신경교종 진단용 바이오 마커 조성물 및 이를 이용한 진단용 조성물, 진단 키트, 신경교종 진단에 대한 정보 제공 방법, 신경교종 치료제의 스크리닝 방법 및 신경교종 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 TrioBP는 신경교종 세포에서 과발현되며, 상기 TrioBP의 억제제를 통해 세포 증식 및 이동을 억제하는 효과가 현저히 우수하므로, TrioBP를 타겟하여 신경교종을 진단할 수 있을 뿐만 아니라 이의 억제제를 이용하여 신경교종의 치료제 스크리닝, 예방 또는 치료 용도로도 이용 가능하여, 관련된 제약 및 의료 사업에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

김선환

대전광역시 서구 둔산남로 127, 105동 1306호(둔산동, 목련아파트)

이현지

대전광역시 서구 정림서로 162-18, 104동 104호(정림동, 강변들보람아파트)

김민희

대전광역시 중구 계룡로918번길 24, 207호(문화동, 파크빌리지)

박성진

대전광역시 서구 도안동로 177, 109동 1001호(도안동, 도안신도시 수목토 APT)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9B6055302

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

한 핵심단백질 발굴 및 기반 연구
연구과제명 폐암에서 멀티모달 오믹스 기법을 이용한 미토콘드리아 혹은 골지체 특이적 자가포식에 대

기 여 율 40/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.12.01 ~ 2017.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1A2A2A01003597

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심개인연구사업

연구과제명 두경부암에서 Warburg effect의 새로운 조절자로서 CTMP와 LETM1의 분자적 제어 기술 발굴

기 여 율 30/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016K1A3A1A08953546

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 한-몽골 협력기반조성사업

연구과제명 지방세포와 지방조직에서 신규 지방합성 매개 단백질 PHF20의 기능 연구

기 여 율 30/100

주관기관 충남대학교(의대)

연구기간 2018.04.01 ~ 2019.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

TrioBP(TRIO and F-actin-binding protein)를 포함하는 신경교종(glioma) 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신경교종은 교모세포종(glioblastoma), 다형성신경교종(glioblastoma multiforme, GBM), 성상세포 종양, 희돌기 아교세포 종양(oligodendrocytic tumor), 및 상의세포 종양으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상인, 신경교종 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 교모세포종은 고전(Classical), 중간엽(Mesenchymal), 신경 (Neural) 및 전신경(Proneural)으로 이루어진 군으로 선택되는 1종 이상의 아형인, 신경교종 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 TrioBP는 신경교종 세포에서 과발현되는 것인, 신경교종 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제를 포함하는, 신경교종 진단용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제는 상기 TrioBP에 특이적으로 결합하는 올리고 펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 애포타머(apptamer)인, 신경교종 진단용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제는 상기 TrioBP를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍 또는 프로브인, 신경교종 진단용 조성물.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 신경교종 진단 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 신경교종 진단 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인, 신경교종 진단 키트.

청구항 10

생물학적 시료에서 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 신경교종 진단에 대한 정보 제공 방법.

청구항 11

(a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 실험군과 대상 물질을 처리하지 않은 대조군에서 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 신경교종 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 12

TrioBP 억제제를 포함하는 신경교종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 TrioBP 억제제는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 siRNA(small interference RNA)인, 신경교종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 TrioBP를 포함하는 신경교종 진단용 바이오 마커 조성물 및 이를 이용한 진단용 조성물, 진단 키트, 신경교종 진단에 대한 정보 제공 방법, 신경교종 치료제의 스크리닝 방법 및 신경교종 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] TrioBP(TRIO and F-actin-binding protein)는 신경 조직 발달 및 액틴 세포의 골격 형성, 세포 운동성 및 세포 성장을 조절하는 Trio와 상호작용을 하는 단백질이다. 상기 TrioBP는 F-액틴과 결합하여, 그 구조를 안정화시킨다. TrioBP 유전자의 돌연변이는 상 염색체 열성 비증후군 난청(autosomal-recessive nonsyndromic deafness)의 한 형태와 관련이 있다고 알려져 있었다.

[0003] 한편, 뇌종양은 두개하 조직에서 발생하는 종양에 대한 일반명칭이며, 뇌 세포에서 뿐만 아니라, 경뇌막, 거미막, 두개하 혈관, 및 말초 신경 등과 같은 모든 두개하 조직에서 발생한다. 뇌종양은 다양한 조직에서

발생하며, 세계 보건 기구(WHO)에 의한 분류가 세계적으로 사용된다. WHO의 분류에서 신경상피 조직 종양으로 분류되는 신경교종(glioma)은 신경교종 세포에서 발생하는 종양의 일반 명칭이다. 신경교종 세포는 뇌와 척수 내의 신경 세포와 신경 섬유 사이에 박힌 세포이며, 신경교종은 뇌에서 발생하는 종양의 대략 1/4을 차지한다. 신경교종은 교모세포종(glioblastoma), 다형성 신경교아종(glioblastoma multiforme, GBM), 성상세포 종양, 희 돌기 아교세포 종양(oligodendrocytic tumor), 및 상의세포 종양을 포함한다. 또한 상기 교모세포종은 유전자 발현을 기반으로 아형이 분류되며, 구체적으로 DNA 메틸화 양상, 신호 전달 과정 활성화 정도를 포함하는 임상적 수치를 기반으로 하여 고전(Classical), 중간엽(Mesenchymal), 신경(Neural) 및 전신경(Proneural)으로 분류된다.

[0004] 신경교종을 포함한 뇌 내의 종양은 주변 정상 조직을 가능한 손상시키지 않는 치료를 요구한다. 그럼에도 불구하고, 많은 뇌 종양은 주변 뇌 조직과 척수 조직을 침윤하여 종양 세포와 정상 뇌 조직이 혼합되는 영역을 생성하여, 외과적 절제가 곤란해진다. 방사선요법도 주변 정상 조직을 쉽게 손상시킨다. 또한, 혈액-뇌 장벽이 혈액과 뇌 사이에 존재하므로, 점적 투여가 적용된다 하더라도, 뇌에 도달하지 못하는 치료제가 있으며, 화학요법이 효과적이지 않을 수 있다. 이들 사실을 고려할 때, 뇌종양에 대해 특이적이며 효과적인 새로운 치료가 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 신경교종 진단을 위한 바이오 마커를 연구하던 중, 신경교종에서 TrioBP의 발현을 분석한 결과 TrioBP가 신경교종 조직에서 특이적으로 과발현되는 것을 관찰하고, TrioBP의 신경교종 진단을 위한 바이오 마커로서의 이용 가능성을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은, TrioBP를 포함하는 신경교종 진단용 바이오 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한 본 발명의 목적은, TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제를 포함하는, 신경교종 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 목적은, 상기 신경교종 진단용 조성물을 포함하는 신경교종 진단 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 또한 본 발명의 목적은, 생물학적 시료에서 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 신경교종 진단에 대한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 또한 본 발명의 목적은, (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 대상 물질을 처리하지 않은 대조군에서 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 신경교종 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 또한 본 발명의 목적은, TrioBP 억제제를 포함하는 신경교종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TrioBP를 포함하는 신경교종 진단용 바이오 마커 조성물을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은, TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제를 포함하는, 신경교종 진단용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은, 상기 신경교종 진단용 조성물을 포함하는 신경교종 진단 키트를 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은, 생물학적 시료에서 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 신경교종 진단에 대한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은, (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계; (b) 상기

(a) 단계의 실험군과 대상 물질을 처리하지 않은 대조군에서 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 신경교종 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은, TrioBP 억제제를 포함하는 신경교종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 TrioBP는 신경교종 세포에서 과발현되며, 상기 TrioBP의 억제를 통해 세포 증식 및 이동을 억제하는 효과가 현저히 우수하므로, TrioBP를 타겟하여 신경교종을 진단할 수 있을 뿐만 아니라 이의 억제제를 이용하여 신경교종의 치료제 스크리닝, 예방 또는 치료 용도로도 이용 가능하여, 관련된 제약 및 의료 사업에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 신경교종 조직의 면역조직화학 분석 결과를 나타내는 도이다.

도 2는 신경교종 조직의 웨스턴 블롯팅 결과를 나타내는 도이다.

도 3은 웨스턴 블롯팅을 이용한 신경교종 세포주의 TrioBP 발현을 측정한 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)을 이용한 TrioBP의 mRNA를 발현을 측정한 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 교모세포종 세포의 총 RNA 추출 및 시퀀싱 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명에 따른 인간 TrioBP에 대한 siRNA이 형질주입된 교모세포종 세포의 증식 및 이동능을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 7은 본 발명에 따른 인간 TrioBP에 대한 siRNA가 형질주입된 교모세포종 세포주의 공초점 현미경을 이용한 이미지 분석 결과를 나타내는 도이다.

도 8은 생물정보학적 분석을 이용한 교모세포종의 아형에서 TrioBP의 mRNA 발현을 분석한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 TrioBP를 포함하는 신경교종 진단용 바이오 마커 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명에 있어서, "TrioBP(TRIO and F-actin-binding protein)"는 신경 조직 발달 및 액틴 세포의 골격 형성, 세포 운동성 및 세포 성장을 조절하는 Trio와 상호작용을 하는 단백질이다. TrioBP는 총 길이와 발현 양상에 따라 다양한 동형(isoform)이 있으며, 인간 및 마우스의 TrioBP 동형은 장형(long type)인 TRIOBP-3, TRIOBP-5 및 TRIOBP-6과 단형(short type)인 TRIOBP-1, TRIOBP-2 및 TRIOBP-4로 분류된다. 본 발명에 있어서, TrioBP는 TrioBP-1, TrioBP-4 및 TrioBP-5로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명에 있어서, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 상기 진단은 발병 여부뿐만 아니라 예후, 암의 경과, 병기 등을 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 본 발명의 목적상, 진단은 신경교종의 발병, 예후, 경과, 병기 상태 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다.

[0028] 본 발명에 있어서, "바이오 마커"는 진단용 마커 또는 진단 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 시료에서 신경교종 발생 여부를 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 시료에 비하여 신경교종 환자에서 채취한 시료에서 TrioBP의 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.

- [0029] 상기 신경교종은 뇌와 척수 내의 신경 세포와 신경 섬유 사이에 박힌 세포인 신경교종 세포에서 발생하는 종양의 일반 명칭으로, 교모세포종(glioblastoma), 다형성신경교종(glioblastoma multiforme, GBM), 성상세포종양, 회돌기 아교세포 종양(oligodendrocytic tumor), 또는 상의세포 종양일 수 있다. 또한 상기 교모세포종은 고전(Classical), 중간엽(Mesenchymal), 신경(Neural) 및 전신경(Proneural)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 아형일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, TrioBP가 신경교종 세포주에서 과발현됨을 확인하였는바, TrioBP는 신경교종 진단용 바이오마커로 활용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제를 포함하는, 신경교종 진단용 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명에 있어서, "TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제"는 상기와 같이 신경교종 환자의 생물학적 시료에서 발현이 증가하는 마커인 TrioBP의 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA에 특이적으로 결합하여, 이의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0034] 상기 TrioBP의 발현을 측정하는 제제는 상기 TrioBP에 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 TrioBP에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서만 들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0036] 본 발명의 신경교종 진단용 바이오 마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0037] 상기 TrioBP를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브일 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 구체적으로, TrioBP 폴리뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용한 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 신경교종을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 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.

- [0042] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 신경교종 진단용 조성물을 포함하는 신경교종 진단 키트를 제공한다.
- [0043] 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, 웨스턴 블롯팅 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 상기 키트에는 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제뿐만 아니라, 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.
- [0045] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 키트는 상술한 바이오 마커 조성물 및 진단용 조성물을 구성으로 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 생물학적 시료에서 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 신경교종 진단에 대한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0049] 상기 진단에 대한 정보는 신경교종 환자의 TrioBP 발현에 대한 측정 정보이고, 본 발명의 목적상, TrioBP의 발현이 증가된 것으로 측정되는 경우, 신경교종 세포의 세포 성장 및 세포 이동을 증가시켜 신경교종이 야기된다는 것을 제시하며, 이를 기반으로 본 발명은 대상의 신경교종의 발병 여부에 대한 정보를 제공한다.
- [0050] 본 발명에 있어서 "TrioBP 발현을 측정"이란 신경교종을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 신경교종 마커 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것이다.
- [0051] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯팅, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에 있어서, "TrioBP를 코딩하는 유전자의 발현을 측정"이란 신경교종을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 신경교종 진단용 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다.
- [0053] 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액 또는 조직일 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 대상물질을 처리하지 않은 대조군에서 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 신경교종 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0057] 상기 (c) 단계에서, 대상 물질이 실험군의 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 경우 이는 신경교종 세포주의 세포 성장 및 이동을 억제시킬 수 있으므로 신경교종 치료제로서 선별될 수 있다.

- [0059] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, TrioBP 억제제를 포함하는 신경교종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0060] 상기 약학적 조성물에서 TrioBP 억제제는 TrioBP가 증가된 신경교종을 갖는 개체에서 TrioBP의 발현을 억제시킬 수 있는 목적을 달성하기 위한 물질이다.
- [0061] 본 발명의 일실시예에 있어서, TrioBP 발현 억제를 통해 신경교종 세포주의 세포 성장 및 이동이 억제되는 등 항암 효과가 우수함을 확인하였는바, TrioBP 억제제는 신경교종 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물의 유효성분으로 이용될 수 있다.
- [0062] 상기 TrioBP 억제제는 TrioBP에 특이적인 항체 또는 그 항원 결합 단편을 포함하며, 이러한 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함하며, 신규 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함될 수 있다.
- [0063] 상기 항체는 TrioBP를 특이적으로 인식하는 결합의 특성을 갖는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다.
- [0064] 상기 TrioBP 억제제는 TrioBP의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA) 또는 miRNA(microRNA)일 수 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서, "siRNA"는 이중가닥의 RNA가 다이스에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제하는 것을 말한다. 본 발명의 목적상, mRNA에 특이적으로 결합하여 상기 유전자의 발현을 억제하는 것을 의미한다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.
- [0066] 본 발명에서 사용되는 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예를 들어 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트를 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태일 수 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다.
- [0067] 본 발명의 일 실시예에서, TrioBP 억제제로서 siRNA인 5'-TCCCAGCAGAACCATCCAACAAGAGAA-3'(서열번호 1)을 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 본 발명에 있어서, "shRNA"는, 45 내지 70 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 단일가닥의 RNA로서 타겟유전자 siRNA 염기서열의 sense와 상보적인 nonsense 사이에 3-10 개의 염기 링커를 연결하는 올리고 DNA를 합성한 후 플라스미드 벡터에 클로닝하거나 또는 shRNA를 레트로바이러스인 렌티바이러스(lentivirus) 및 아데노바이러스(adenovirus)에 삽입하여 발현시키면 루프(loop)가 있는 헤어핀(hairpin) 구조의 shRNA (short hairpin RNA)가 만들어지고 세포 내의 Dicer에 의해 siRNA로 전환되어 RNAi 효과를 나타내는 것을 의미한다. shRNA(small hairpin RNA)를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터는 당분야에서 공지된 방법으로 제조할 수 있다.
- [0069] 본 발명에 있어서 "miRNA(microRNA)"는, mRNA의 3' 비번역 영역(UTR) 부위와의 염기결합을 통해 전사 후 억제 역할을 하는 대략 22 nt의 비번역 RNA를 의미한다. miRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.
- [0070] 본 발명에 있어서, "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 개체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0071] 본 발명에 있어서, "치료"는 질환 또는 질병의 발전의 억제; 질환 또는 질병의 경감; 및 질환 또는 질병의 제거를 의미한다.
- [0072] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0073] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0074] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [0076] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분인 TrioBP 또는 이를 코딩하는 유전자 발현 억제제의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요 기간, 질환의 위중도 등을 고려하여 결정하며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [0077] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0079] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0081] **실시예 1. 신경교종 조직의 면역조직화학 분석**
- [0082] 면역조직화학 분석을 통해 신경교종 조직에서 TrioBP의 발현을 확인하였다. 면역조직화학 분석에는 Bio MAX 사의 파라핀을 포함하는 인간 암 조직이 배열된 슬라이드(human cancer tissue array slide with paraffin)를 시료로 사용하였다. 상기 시료의 면역조직화학 분석은 히스톤-플러스 키트(Histostain-Plus kits, Zymed Laboratories Inc.)를 이용하였다.
- [0083] 구체적으로, 시료를 자일렌(xylene)으로 탈파라핀화한 후 에탄올을 이용하여 재수화시켰다. 재수화된 시료를 퍼옥시다아제 퀀칭 용액(quenching solution)에 담귀 10분 동안 반응시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 세척된 시료를 블로킹하기 위하여, 세척된 시료에 히스톤-플러스 키트의 용액 A를 2방울 첨가한 후 30분 동안 배양하였다. 배양된 시료를 PBS로 2회 세척한 후 1차 항체를 4℃에서 밤새도록 배양하였다. 상기 1차 항체는 Novus biologicals(Littleton, USA) 사로부터 구매한 Anti-TrioBP(NBP2-20726) 항체를 사용하였으며, 상기 항체는 TrioBP-1, TrioBP-5 및 6을 검출할 수 있다. 배양된 시료를 PBS로 2회 세척하였다. 세척된 시료에 비오틴이 부착된 2차 항체(biotinylated secondary antibody)인 용액 B를 첨가한 후 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 배양된 시료를 PBS로 2회 세척하였으며, HRP 효소가 포함된 용액 C를 한 방울 가하였다. 시료를 PBS로 세척한 후 용액 D의 혼합물 및 DAB 발색체를 혼합 용액을 한 방울 떨어뜨린 후 형광 현미경으로 염색된 TrioBP을 관찰하였다. TrioBP의 발현을 확인한 결과는 도 1에 나타내었다.
- [0084] 도 1에 나타난 바와 같이, TrioBP의 발현은 정상 세포보다 신경교종 조직에서 더 높은 것을 확인하였다.
- [0087] **실시예 2. 웨스턴 블롯팅을 이용한 신경교종 조직의 TrioBP 발현 측정**
- [0088] 보다 정확하게 TrioBP 발현을 측정하기 위하여, 신경교종 환자의 정상 조직(normal) 및 신경교종 조직(종양 1 및

2)의 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 대조군으로는 신경교종 환자의 종양관련 정상 조직(Tumor asso.)을 사용하였다.

[0089] 구체적으로, 조직으로부터 얻은 세포를 얼음 위에 위치시킨 후 용해 버퍼(50mM Tris-HCl, pH7.5, 1%v/v Nonidet P-40, 120mM NaCl, 25mM sodium fluoride, 40mM β -glycerol phosphate, 0.1mM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM benzamidine, 2 M microcystin-LR)와 혼합하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 12,000g에서 15분 동안 원심분리하여, 세포 펠릿을 수득하였다. 세포 펠릿을 SDS의 농도가 10 내지 15%인 겔을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였고, Immobilon-P 멤브레인(Millipore)으로 트랜스퍼하였다. 상기 멤브레인을 5%의 탈지유 및 0.2%의 Tween-20을 함유하는 1X TBS 버퍼(140mM NaCl, 2.7mM KCl, 250mM Tris-HCl, pH7.4)에서 1시간 동안 블로킹(blocking)하였다. 블로킹 후 4℃에서 1차 항체인 1000배 희석된 항-TrioBP 항체 또는 항-액틴 항체를 첨가하여 배양하였다. 2차 항체는 HRP가 결합된 항-마우스 IgG 또는 항-토끼 IgG(horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG, Komabiotec)를 사용하였다. Thermo Fisher Scientific사의 매뉴얼에 따라 TrioBP에 결합된 HRP의 화학 발광을 검출하였고, 이로부터 TrioBP의 상대적인 발현량을 계산한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0090] 도 2에 나타난 바와 같이, 신경교종 환자의 신경교종 조직(종양 1 및 2)에서 TrioBP의 발현은 종양관련 정상 조직(Tumor asso.)보다 높았다. 이는 신경교종 환자에서 TrioBP이 과발현 된다는 것을 의미한다.

[0092] 실시예 3. 웨스턴 블롯팅을 이용한 교모세포종 세포주의 TrioBP 발현 측정

[0093] 교모세포종(glioblastoma)은 신경교종 중 조직학적으로 핵의 비정형성, 유사분열상, 혈관내피세포의 증식, 괴사가 관찰되는 악성도가 가장 높은 종양이다. 교모세포종 세포인 U87-MG, U251-MG 및 U343-MG 세포주의 TrioBP 발현 측정은 실시예 2의 웨스턴 블롯팅과 같은 방법으로 측정하였다. 교모세포종 세포주의 TrioBP 발현 측정 결과는 도 3에 나타내었다.

[0094] 도 3에 나타난 바와 같이, 정상 세포인 293A 세포주보다 교모세포종 세포인 U87-MG 및 U343-MG 세포주에서 TrioBP의 발현이 유의하게 증가하였다. 또한 교모세포종 세포인 U251-MG 세포주는 다른 교모세포종 세포주보다 TrioBP의 발현이 낮았으나, 정상 세포인 293A 세포주보다는 TrioBP의 발현이 높았다.

[0096] 실시예 4. 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)을 이용한 TrioBP의 mRNA 발현 측정

[0097] 교모세포종 세포주에서 TrioBP mRNA의 발현량을 확인하기 위하여, 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 수행하였다. 구체적으로, qRT-PCR은 Nanohelix사의 퓨어헬릭스 RNA 추출 용액(PureHelix RNA Extraction Solution)을 이용하여 신경교종 세포인 U87-MG, U251-MG 및 U343-MG 세포주와 정상 세포인 293A 세포주의 RNA를 각각 추출하였다. 추출된 RNA에 대한 cDNA는 SuperScript III First-Strand Synthesis System(Invitrogen, Grand Island, USA)을 이용하여 합성하였다. 합성된 cDNA에 대한 qRT-PCR은 StepOne Plus real-time PCR system (Invitrogen) 및 SYBR green으로 이중 DNA(duplex DNA) 형성을 측정하였다. 측정 결과는 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)의 RNA 발현 측정 결과로 정규화(normalization)하였다. qRT-PCR에 사용된 프라이머는 표 1에 나타내었다.

표 1

	정방향 프라이머(5' →3')	역방향 프라이머(5' →3')
인간 TrioBP	TCCAAGGTCTCCCTTAGTACA (서열번호 2)	GTGGGACTGGACTTGCTA (서열번호 3)
인간 GAPDH	TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT(서열번호 4)	TACGACCAATCCGTGACTCCGA(서열번호 5)

[0099] qRT-PCR을 이용한 교모세포종 세포주에서 TrioBP mRNA의 발현량 분석 결과는 도 4에 나타내었다.

[0100] 도 4에 나타난 바와 같이, 정상 세포인 293A 세포주보다 교모세포종 세포인 U87-MG 및 U343-MG 세포주에서 TrioBP의 mRNA 발현이 유의하게 증가하였다. 또한 교모세포종 세포인 U251-MG 세포주는 다른 교모세포종 세포주보다 TrioBP의 mRNA 발현이 낮았으나, 정상 세포인 293A 세포주보다는 TrioBP의 mRNA 발현이 높았다.

[0102] **실시예 5. 교모세포종 세포의 총 RNA 추출 및 시퀀싱**

[0103] 교모세포종 세포인 U87-MG, U251-MG 세포주 및 대뇌 피질 세포의 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA 추출은 트리졸 시약(Trizol, Invitrogen)을 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 총 RNA의 양 및 순도는 Bioanalyzer 2100 및RNA 6000 Nano LabChip Kit(Agilent, Santa Clara, USA)를 이용하여 분석하였다. 폴리-T 올리고 부착 자성 비드(Invitrogen)를 이용하여, 총 RNA 10 µg로부터 폴리 A mRNA를 정제하였다. 높은 온도 하에서 정제된 폴리 A mRNA 및 2가 양이온을 반응시켜 폴리 A mRNA를 절단하였다. 상기 RNA 단편을 역전사시켜 mRNA 시퀀싱 시료 준비 키트(Illumina)이용하여 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 페어-엔드 라이브러리(pair-end library)의 평균 삽입 크기는 300bp(±50bp)이다. 페어-엔드 시퀀싱은 Macrogen 사의 Illumina Hiseq 2000 시스템을 이용하였으며, 실험은 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 각 샘플에 대한 시퀀싱 결과를 Tophat 패키지를 사용하여 UCDC 인간 레퍼런스 유전체에 정렬하였다. 각 시료에서 TrioBP mRNA 변이종의 발현 수준을 비교하기 위하여, mRNA의 발현 수준을 나타내는 값인 정렬된 백만 조각 당 엑손의 킬로베이스당 단편(FPKM, fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)을 정렬 결과를 바탕으로 계산하였고, 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0104] 도 5에 나타낸 바와 같이, TrioBP의 mRNA 발현 수준(FPKM)은 대뇌 피질 세포가 11.87이었으며, 상기 대뇌 피질 세포보다 교모세포종 세포인 U87-MG 및 U251-MG 세포주의 TrioBP의 mRNA 발현 수준이 더 높았다. 이는 교모세포종 세포에서 TrioBP 유전자의 전사가 증가되므로, TrioBP가 교모세포종의 바이오마커로 이용될 수 있음을 의미한다.

[0106] **실시예 6. 인간 TrioBP에 대한 siRNA 합성 및 교모세포종 세포의 증식 및 이동능 확인**

[0107] **6-1. 인간 TrioBP에 대한 siRNA 합성 및 형질주입**

[0108] 인간 TrioBP에 대한 siRNA는 인테그레이티드 DNA(Integrated DNA)법으로 합성하였다. 합성된 인간 TrioBP에 대한 siRNA의 서열은 다음과 같다; 5'-TCCCAGCAGAACCATCCAACAAGAGAA-3'(서열번호 1).

[0109] 인간 TrioBP에 대한 siRNA를 형질주입하기 위하여, 신경교종(glioblastoma)세포인 U87-MG 및 U251-MG 세포주를 RPMI 배지(10 % FBS, 25 mM HEPES, 1 % Antibiotics-Antimycotics)에서 배양하였다. 배양된 U87-MG 및 U251-MG 세포주에 네온™ 형질주입 시스템(Neon™ Transfection System, Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 30 nM의 대조 siRNA 및 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 TrioBP에 대한 siRNA를 각각 일시적으로 형질주입시켰다. 상기 대조 siRNA의 서열은 다음과 같다; 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTTACGUGACACGUCGAGAATT-3'.

[0111] **6-2. 형질주입된 교모세포종 세포의 증식 및 이동능 확인**

[0112] 인간 TrioBP에 대한 siRNA가 형질주입된 U87-MG 및 U251-MG 세포주의 TrioBP 발현 측정은 실시예 2의 웨스턴 블롯팅과 같은 방법으로 측정하였으며, 그 결과는 도 6A에 나타내었다.

[0113] 도 6A에 나타낸 바와 같이, 신경교종 세포에 인간 TrioBP에 대한 siRNA를 형질주입한 결과, TrioBP가 녹다운된 것을 알 수 있다.

[0115] 세포 증식 및 이동에 대한 분석은 라벨 부착없이 실시간으로 세포를 모니터링하는 xCELLigence RTCA DP 시스템(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)을 사용하여 측정하였다.

[0116] xCELLigence 시스템을 이용하여, 인간 TrioBP에 대한 siRNA가 형질주입된 U87-MG 및 U251-MG 세포주의 세포 증식을 150 시간 동안 측정하였다. 세포 증식을 측정한 결과는 도 6B에 나타내었다.

[0117] 도 6B에 나타낸 바와 같이, 인간 TrioBP에 대한 siRNA가 형질주입된 U87-MG 및 U251-MG 세포주는 모두 세포 증식이 억제된 것을 확인하였다. 특히 U87-MG 세포주의 세포 증식이 U251-MG 세포주보다 큰 폭으로 감소하였다.

[0119] xCELLigence 시스템을 이용하여, 인간 TrioBP에 대한 siRNA가 형질주입된 U87-MG 및 U251-MG 세포주의 72시간

동안 세포 이동능을 확인하였다. 세포 이동능을 확인한 결과는 도 6C에 나타내었다.

[0120] 도 6C에 나타낸 바와 같이, 인간 TrioBP에 대한 siRNA가 형질주입된 U87-MG 및 U251-MG 세포주는 모두 세포 이동이 억제된 것을 확인하였다.

[0122] 결과적으로, 인간 TrioBP에 대한 siRNA는 교모세포종 세포인 U87-MG 및 U251-MG 세포주에서 TrioBP를 녹다운 시키며, 세포 증식 및 이동능을 억제한다는 것을 확인하였다.

[0124] **실시예 7. 인간 TrioBP에 대한 siRNA가 형질주입된 교모세포종 세포주의 공초점 현미경을 이용한 이미지 분석**

[0125] 공초점 현미경 이미지 분석 및 면역형광법으로 인간 TrioBP에 대한 siRNA가 형질주입된 교모세포종 세포주에서 TrioBP의 세포 내 위치를 확인하였다. 구체적으로, U87-MG 세포가 유리 커버슬립의 50 내지 70%만큼 차치할 정도로 배양하였다. 배양된 세포를 실온의 4% 파라포름알데하이드에서 10분 동안 고정시킨 후 실온의 0.2% 트리톤 X100에서 5분 동안 투과(permeabilization) 처리하였다. 1X TBS 버퍼 및 5%의 소 혈청 알부민을 포함하는 블로킹 용액을 투과 처리된 세포에 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 세척한 후 1차 항체인 토끼 폴리클로날 항-TrioBP 항체(rabbit polyclonal anti-TrioBP antibody)를 200배 희석하였으며, 희석된 1차 항체를 세포와 함께 밤새 배양하였다. 1차 항체를 세척한 후 2차 항체인 FITC-접합 항-토끼 항체 (FITC-conjugated anti-rabbit antibody)를 세포에 처리하여 배양하였다. 배양 후 2차 항체를 세척한 커버슬립을 Vectashield(Vector Laboratories)에 장착하고, Zeiss 공초점 현미경을 사용하여 시각화 하였다. 시각화 결과는 도 7에 나타내었다.

[0126] 도 7에 나타낸 바와 같이, TrioBP는 세포 내에서 뾰족한 패턴으로 분포되어 있으며, 이는 세포 골격 및 세포질과 관련이 있는 것으로 보인다.

[0128] **실시예 8. 생물정보학적 분석을 이용한 교모세포종의 아형에서 TrioBP의 mRNA 발현 분석**

[0129] 다양한 교모세포종의 아형에서 TrioBP의 mRNA 발현을 생물정보학적 분석을 통해 확인하였다. 보다 상세하게는 공개 데이터베이스로부터 213 세트의 TCGA 신경아교종 데이터 세트를 다운로드하였다 (http://www.betastasis.com/glioma/tcga_gbm/). 다운로드한 데이터 세트의 구성은 정상(Normal) 11세트, 고전(Classical) 54세트, 중간엽(Mesenchymal) 58세트, 신경(Neural) 33세트 및 전신경(Proneural) 57세트이다. 신경교종의 아형에서 TrioBP의 mRNA 발현을 생물정보학적으로 분석한 결과는 도 8에 나타내었으며, 각 실험군의 중간 값은 라인으로 표시하였다.

[0130] 도 8에 나타낸 바와 같이, 교모세포종의 아형인 고정, 중간엽, 신경 및 전신경에서 TrioBP의 mRNA 발현은 유사한 수준이었다. 이는 인간 TrioBP에 대한 siRNA가 다양한 신경교종의 진단 및 치료에 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

[0132] 종합적으로 본 발명자들은 교모세포종 세포주에서 TrioBP가 과발현되며 TrioBP의 억제를 통해 세포 증식 및 이동을 억제시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 인간 TrioBP에 대한 siRNA가 교모세포종의 진단뿐만 아니라, 교모세포종의 예방 또는 치료 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

[0134] 이하, 제제예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 제제예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 제제예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.

[0136] **제제예 1. 약학적 조성물의 제조**

[0137] **1-1. 산제의 제조**

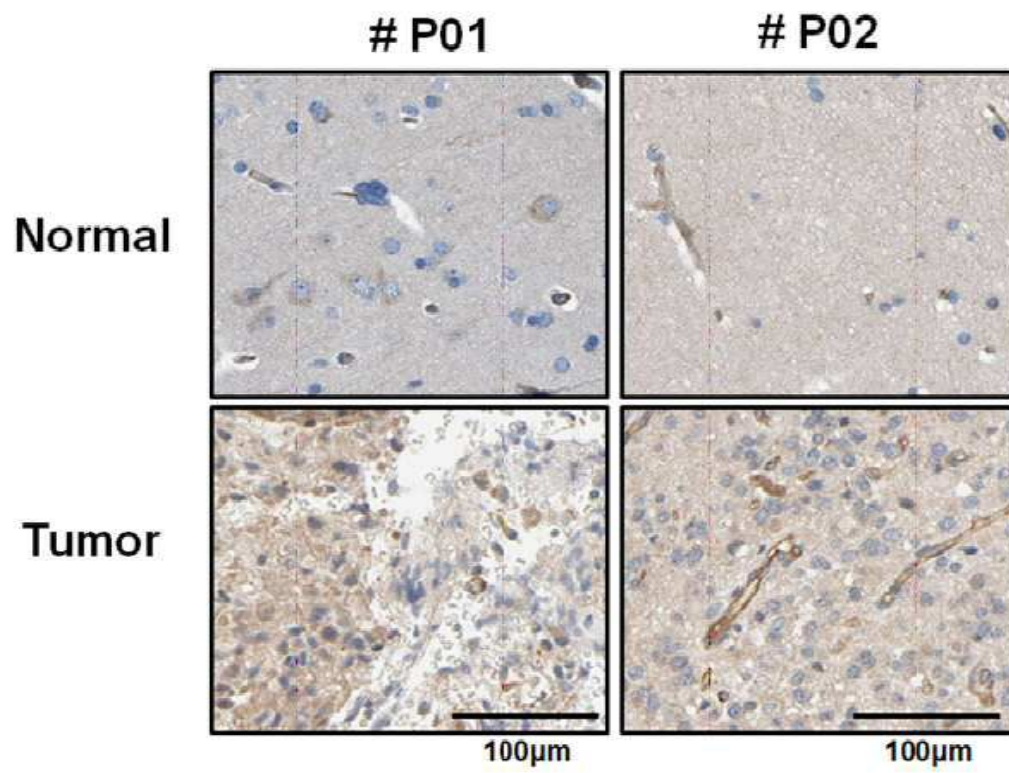
[0138] TrioBP 억제제 20 mg

- [0139] 유당 100 mg
- [0140] 탈크 10 mg
- [0141] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0143] 1-2. 정제의 제조
- [0144] TrioBP 억제제 10 mg
- [0145] 옥수수전분 100 mg
- [0146] 유당 100 mg
- [0147] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0148] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0150] 1-3. 캡슐제의 제조
- [0151] TrioBP 억제제 10 mg
- [0152] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [0153] 락토오스 14.8 mg
- [0154] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg
- [0155] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [0157] 1-4. 주사제의 제조
- [0158] TrioBP 억제제 10 mg
- [0159] 만니톨 180 mg
- [0160] 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- [0161] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg
- [0162] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- [0164] 1-5. 액제의 제조
- [0165] TrioBP 억제제 20 mg
- [0166] 이성화당 10 g
- [0167] 만니톨 5 g
- [0168] 정제수 적량
- [0169] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.
- [0171] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 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 의해 정의된다고 할 것이

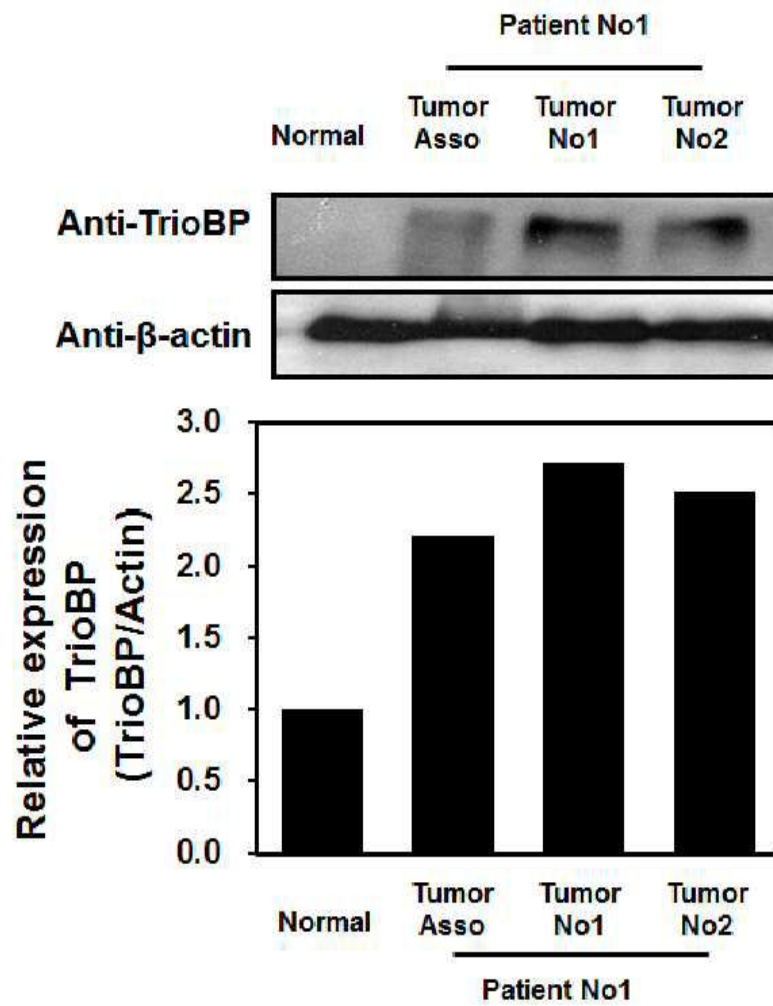
다.

도면

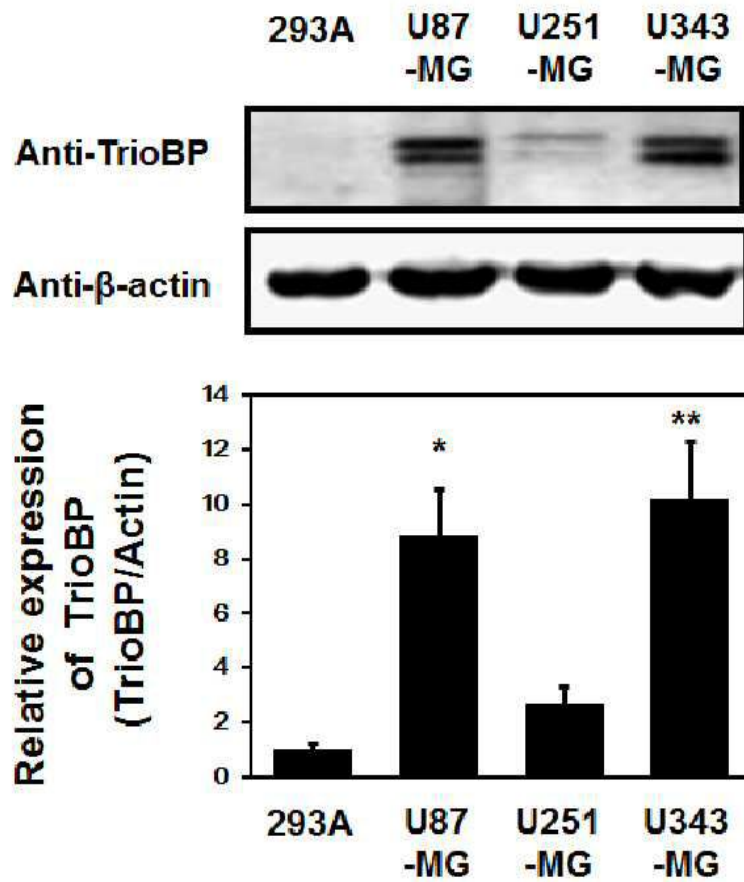
도면1



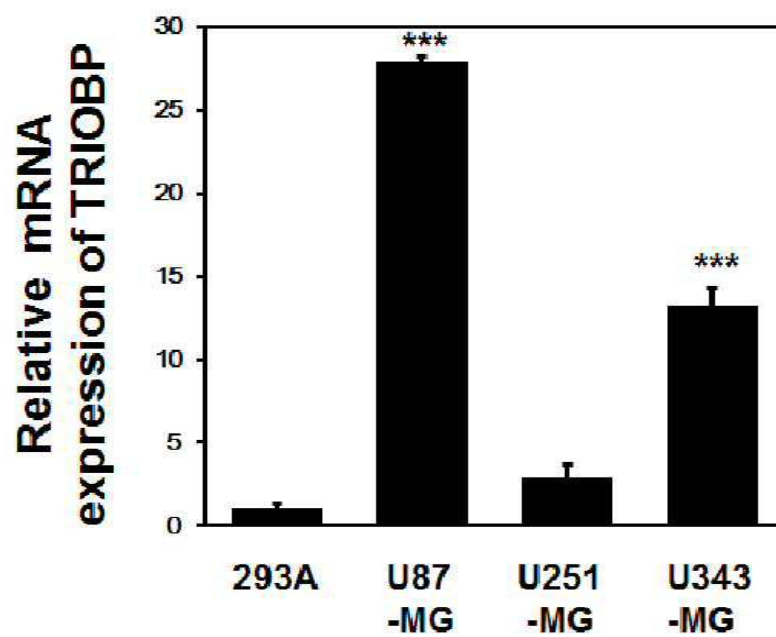
도면2



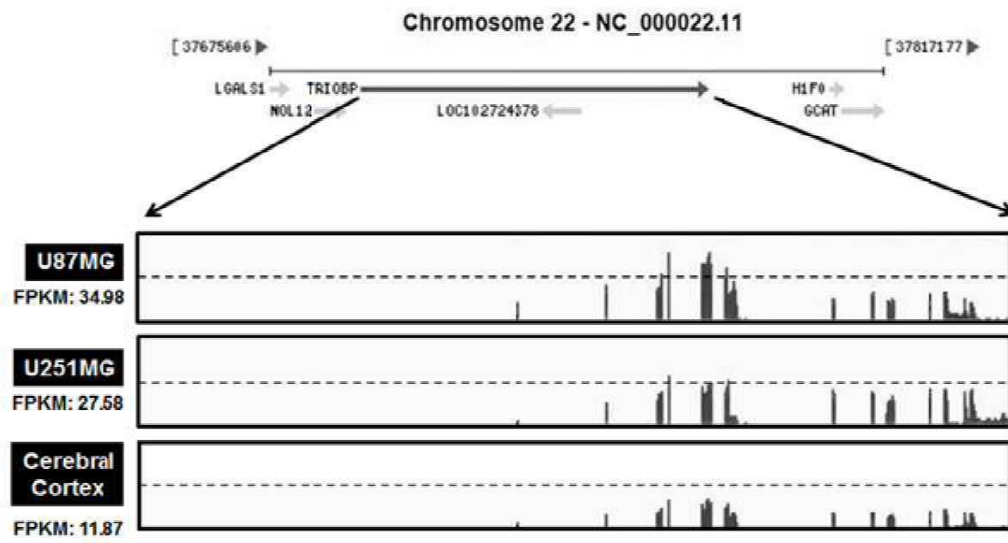
도면3



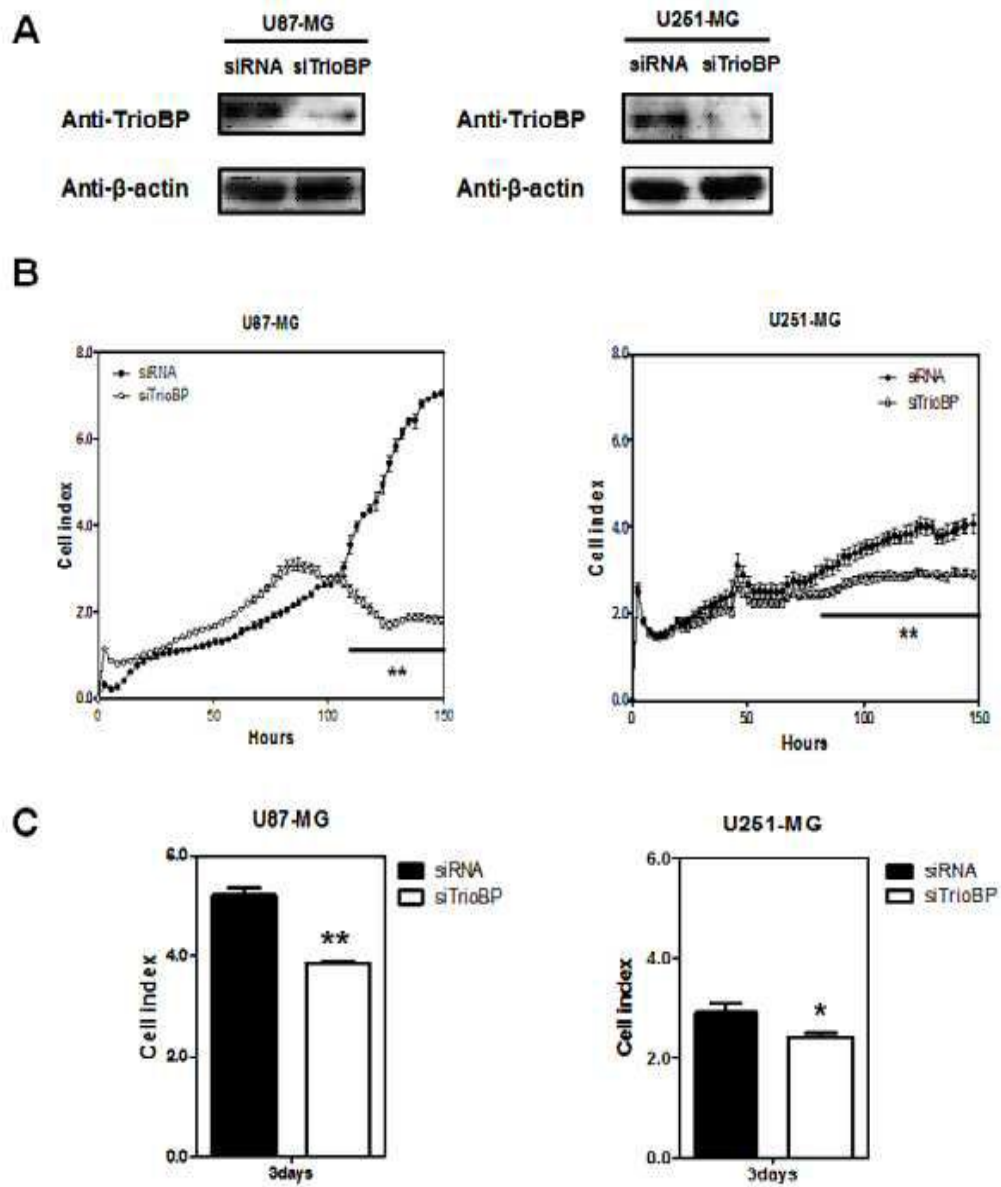
도면4



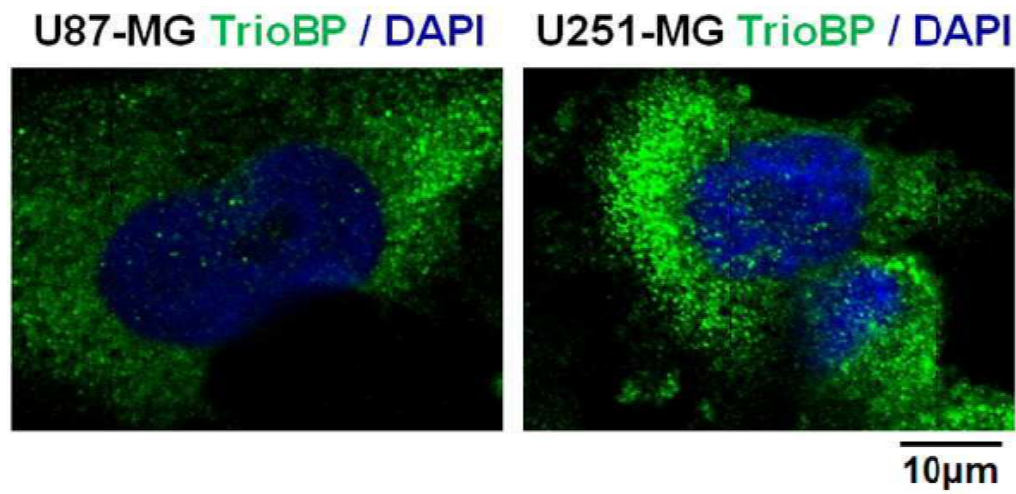
도면5



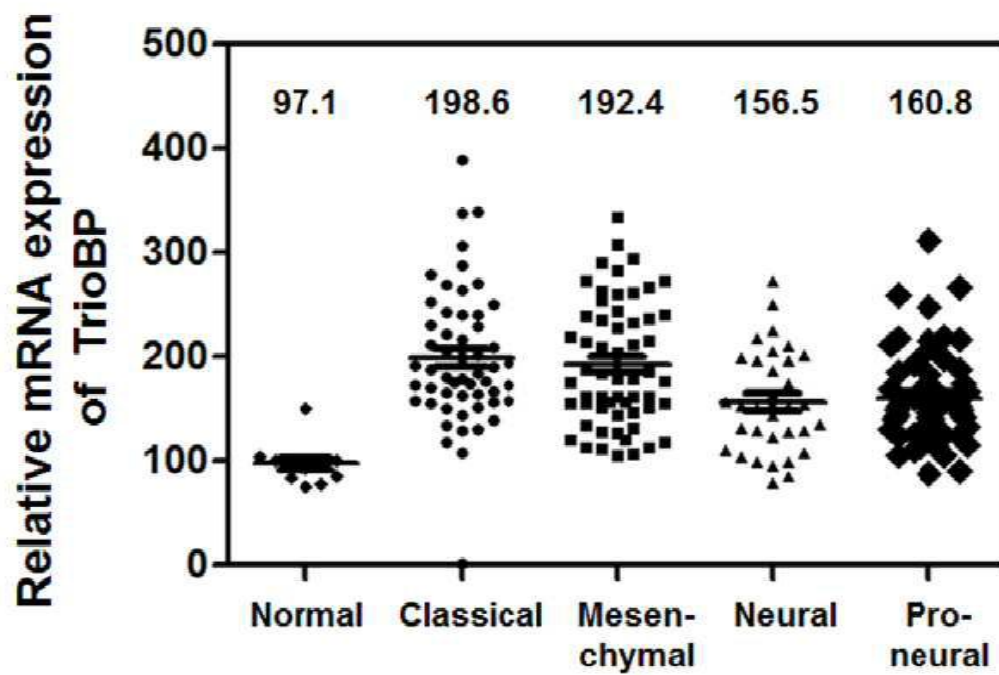
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Biomarker composition for diagnosis of glioma comprising TRIO and
F-actin-binding protein
- <130> 1-57
- <160> 5
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA for human TrioBP
 <400> 1
 tcccagcaga accatccaac aagagaa 27
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for human TrioBP
 <400> 2
 tccaaggtct cccttagtac a 21
 <210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for human TrioBP
 <400> 3
 gtgggactgg acttgcta 18
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for human GAPDH
 <400> 4
 tcgacagtca gccgcattt cttt 24
 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for human GAPDH
 <400> 5

tcgacagtca gccgcattctt cttt

24