



등록특허 10-2384244



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월07일

(11) 등록번호 10-2384244

(24) 등록일자 2022년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0104135

(22) 출원일자 2020년08월19일

심사청구일자 2020년08월19일

(65) 공개번호 10-2022-0022772

(43) 공개일자 2022년02월28일

(56) 선행기술조사문헌

MEOLA, JULIANA et al., 'Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis', Fertility and Sterility, 2010, Vol. 93, pp 1750-1773. 1부.*

NCBI Reference Sequence: NM_005727.4, TSPAN1, mRNA, 2019. 1부.*

US20160251718 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김재훈

서울특별시 강남구 언주로 110, 9동 1107호(개포동, 강남아파트)

신하연

서울특별시 은평구 은평로21길 36-3, 102동 203호(대도예코빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 이재영

전체 청구항 수 : 총 9 항

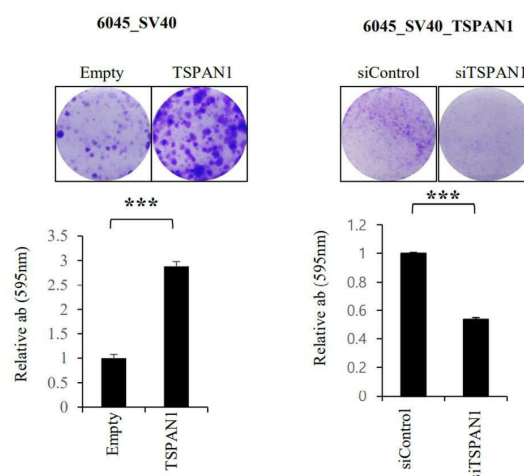
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 고위험군 자궁내막증 진단용 조성물

(57) 요약

본 발명은 TSPAN1의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 고위험군 자궁내막증의 진단용 조성물로서, 난소 투명세포암으로 진행될 수 있는 고위험군에 속하는 자궁내막증 환자를 조기에 선별할 수 있으며, 더 나아가 자궁내막증의 악성 신생물로의 형질 전환을 억제시킴으로써 치료에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도8a



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12Q 1/6883 (2022.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2500/04 (2013.01)

G01N 2800/364 (2013.01)

(72) 발명자

양우경

서울특별시 은평구 은평로21길 36-3, 102동 203호
(대도예코빌)

이은주

경기도 부천시 오정구 오정로 253, 208동 1103호
오정생활휴먼시아2단지아파트

남상희

서울특별시 송파구 바람드리5길 14-14(풍납동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345305677
과제번호	2019R1A6A3A13092928
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	고위험 자궁 내막증 유래 난소암 환자의 맞춤 치료제 개발을 위한 전임상 연구
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.09.01 ~ 2021.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345314303
과제번호	2017R1D1A1A09000576
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	Cdk1 pathway의 억제제를 통한 정상 p53을 가진 고위험 난소암의 항암제 내성 및 재발
억제를 위한 전임상 연구	
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2020.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113995
과제번호	2017R1A2B2008505
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	유전체 통합 분석에 의한 고위험 난소암의 재발 및 예후 예측 연구
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

SPAN1 (Tetraspanin 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 고위험군 자궁내막증의 진단용 조성물로서,

상기 고위험군 자궁내막증은 난소 투명세포 암종으로의 진행이 예견되는 자궁내막증인, 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 SPAN1 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 고위험군 자궁내막증의 진단용 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 SPAN1 유전자는 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 것인, 고위험군 자궁내막증의 진단용 조성물.

청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고핵타이드, 리간드, PNA (peptide nucleic acid) 및 앵타머 (aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함하는, 고위험군 자궁내막증의 진단용 조성물.

청구항 8

제 4항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함하는, 고위험군 자궁내막증의 진단용 조성물.

청구항 9

제 4항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 고위험군 자궁내막증의 진단용 키트로서,

상기 고위험군 자궁내막증은 난소 투명세포 암종으로의 진행이 예견되는 자궁내막증인, 키트.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드 (rapid) 키트 또는 MRM (Multiple reaction monitoring) 키트인, 고위험군 자궁내막증의 진단용 키트.

청구항 11

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, TSPAN1 (Tetraspanin 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 고위험군 자궁내막증의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법으로,

상기 고위험군 자궁내막증은 난소 투명세포 암종으로의 진행이 예견되는 자궁내막증인, 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 생물학적 시료에서 측정된 TSPAN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 높은 경우, 상기 목적하는 개체가 고위험군 자궁내막증일 것으로 예측하는 것인, 고위험군 자궁내막증의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 TSPAN1 (Tetraspanin 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현을 측정하는 제제를 포함하는 고위험군 자궁내막증의 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 자궁내막증 (endometriosis; Em)은 자궁 내막 조직이 자궁 이외의 조직에 부착하여 증식하는 질환으로 가임기 여성의 약 10 내지 15 %에서 발생하는 흔한 양성 부인과 질환에 해당한다. 자궁내막증은 모든 연령대에서 생길 수 있으며, 관련된 주요 증상으로는 심한 월경통과 하복부 통증, 불임 등이 있다. 원인은 명확하게 알려지지 않았지만 유전학, 환경, 면역학, 신생 혈관 생성 및 내분비 장애와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 악성 종양과 유사하게, 자궁내막증 또한 이질성, 접착력, 침윤 및 전이의 특성을 가지며, 악성 종양으로 변형되기도 한다. 자궁내막증 중 일부는 난소암으로 진행될 수 있으며, 난소암의 위험 증가와도 밀접한 관련이 있다고 보고된 바 있으나, 난소 투명세포암과의 연관성 및 난소 투명세포암과 같은 악성 형질 전환을 일으키는 매커니즘에 대하여는 아직 명확한 연구가 이루어지지 않고 있다.
- [0003] 난소의 투명세포암은 여성의 흔한 양성 질환인 자궁내막증에서 발생할 수 있으며, 비전형 자궁내막증 (atypical endometriosis; AtyEm)이 난소 투명세포암으로 진행하기 전 단계의 질환으로 보고된 바 있다. 난소암 중에서도 난소의 투명세포 암종 (Ovarian clear cell carcinoma; OCCC)은 상피성 난소암 중 약 10 % 내외의 적은 빈도를 차지하지만, 항암제 내성이 높으며, 치료의 예후가 매우 좋지 않은 암으로 알려져 있다. 특징적인 종양 표지자 검사도 없으며, 현재까지의 치료는 상피성 난소암에 준하는 치료로 진행되고 있는 실정이다.
- [0004] 이처럼, 자궁 내막증에서 난소 투명세포암으로 악성 전환되어 질환이 악화되는 경우 예후가 좋지 아니한 만큼, 고위험 자궁내막증 환자를 조기에 선별하고, 이를 억제할 수 있는 악성 형질 전환의 기초가 되는 분자적 매커니즘에 대한 연구가 절실하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 일 목적은 고위험군 자궁내막증의 진단용 바이오마커를 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 TSPAN1 (Tetraspanin 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 고위험군 자궁내막증의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 고위험군 자궁내막증의 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 고위험군 자궁내막증의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 TSPAN1 (Tetraspanin 1) 단백질의 활성 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 포함하는 자궁내막증의 암으로의 진행 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 자궁내막증의 암으로의 진행 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0013] 명세서 내에 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0015] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 고위험군 자궁내막증의 진단용 바이오마커에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에서 상기 바이오마커는 TSPAN1 (Tetraspanin 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다.

- [0017] 본 발명의 상기 TSPAN1 (Tetraspanin 1) 단백질은 TSPAN1 유전자에 의해 인코딩된 단백질로서 테트라스판닌 패밀리 (tetraspanin family)로도 알려진 막관통 4 슈퍼패밀리 (transmembrane 4 superfamily)의 구성원이다. 이들 구성원의 대부분은 4 개의 소수성 도메인의 존재를 특징으로 하는 세포 표면 단백질에 해당한다. 상기 단백질은 세포 발달, 활성화, 성장 및 운동성의 조절에 관여하는 신호 전달을 매개하는 것으로 알려져 있다. 상기 TSPAN1의 아미노산 서열 및 이를 암호화하는 핵산 염기 서열은 각각 서열번호 1과 서열번호 2로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명에서 상기 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 보다 상세하게는 고위험군 자궁내막증을 판정하는 것으로서, 자궁내막증에서 암으로의 진행 가능성을 판정하는 것 또는 악성 암으로의 형질 전환될 위험성을 가지고 있는지 여부를 판정하는 것을 말한다. 상기 암은 부인과 암의 일 유형으로서 난소암 또는 자궁암일 수 있으며, 바람직하게는 난소암, 보다 바람직하게는 난소 투명세포암일 수 있다. 상기한 진단은 진단에 대한 정보를 제공하는 것을 포함하는 넓은 개념으로 정의한다.
- [0019] 본 발명에서 상기 "자궁내막증 (endometriosis)"은 자궁내막 조직이 자궁 내강 표면 이외의 장소에서 증식하는 질환으로 이소 자궁내막증으로도 명명한다. 병변의 위치와 침범된 장기, 병변의 정도에 따라 여러 가지 다양한 증상을 보이므로 진단이 어려운 질환에 속한다. 현재 자궁내막증의 진단에 사용되는 임상적 검사로는 질식 초음파 검사, 자기공명영상 검사 (MRI), 혈액검사, 복강경 수술 검사 등이 있으며, 최근 환자 개개인들의 유전적 특성을 이용하는 방법으로 자궁내막증의 여부를 진단하거나 치료 후 재발을 예측할 수 있는 유전적 지표를 활용하는 등 다양한 진단 방법이 개발되고 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 "위험군"의 기준은 자궁내막증 환자의 악성 암으로의 형질 전환 가능 여부로 분류할 수 있다. 구체적으로, 고위험군은 자궁내막증에서 악성 신생물로의 변환 또는 악성 형질 전환이 진행될 가능성이 있거나 암으로의 진행 가능성이 있는 경우를 말하며, 저위험군은 자궁내막증에서 암으로 진행할 가능성이 없거나 악성 신생물로의 변환 또는 악성 형질 전환이 진행될 가능성이 없거나 낮은 경우에 해당하는 경우를 말한다. 본 발명의 목적상 상기 "고위험군"은 자궁내막증에서 암, 바람직하게는 부인과 암으로 난소암 또는 자궁암, 보다 바람직하게는 난소암, 가장 바람직하게는 난소 투명세포암으로 진행될 가능성이 있는 환자를 의미할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 "난소암 (ovarian cancer)"은 자궁의 양 옆에 위치한 생식샘인 난소에 발생하는 암으로, 암이 발생하는 조직에 따라 크게 상피세포암, 배세포종양 또는 성삭 기질 종양으로 구분된다. 이 중 난소 표면의 상피세포에서 발생하는 난소 상피세포암이 전체 난소암의 90 % 이상 대부분을 차지하며, 난소 상피세포암의 세포 형태에 따른 분류에 따르면 장액성 난소암 (Serous carcinoma), 점액성 난소암 (Mucinous carcinoma), 자궁내막양 난소암 (Endometrioid carcinoma), 투명세포암 (Clear cell carcinoma), 브레너 종양 (Malignant brenner tumor), 미분화세포암 (Undifferentiated carcinoma) 또는 미분류 난소암 (Unclassified Carcinoma)으로 나뉜다.
- [0022] 본 발명에서 상기 "난소 투명세포암 (ovarian clear cell carcinoma; OCCC)"은 자궁 내막증 관련 난소 암 (endometriosis-associated ovarian cancer; EAOC)의 유형의 40 내지 50 %를 차지하는 흔한 암에 해당한다. 난소 투명세포암의 조직학적 전암성 병변은 비정형 자궁내막증 (atypical endometriosis; AtyEm)으로 알려져 있다. AtyEm은 자궁내막증의 12 내지 35 %에서 관찰되며, 호르몬 수치, 산화적 스트레스, 유전적 변이, 면역조절 이상에 의하여 영향을 받는다. 자궁내막증의 악성 신생물로의 변환 진행은 종양 발암 KRAS (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog) 및 PI3K (Phosphoinositide 3-kinases) 경로의 활성화와 종양 억제 유전자 PTEN (Phosphatase and tensin homolog) 및 ARID1A (AT-Rich Interaction Domain 1A)의 불활성화와 관련이 있다는 연구 결과가 있다. 또한, 난소암 중에서도 난소의 투명세포 암종은 상피성 난소암 중 약 10 % 내외의 적은 빈도를 차지하지만, 항암제 내성이 높고, 치료의 예후가 매우 좋지 않은 암에 해당한다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 고위험군 자궁내막증의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 상기 진단용 조성물은 TSPAN1 (Tetraspanin 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함한다.
- [0026] 본 발명의 상기 TSPAN1 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 제제는 TSPAN1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA (peptide nucleic acid) 및 앵타머 (aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 상기 "항체"는 TSPAN1 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 분자를 의미하며, 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않지만 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이라면, 항체의 일

부인 경우라도 포함될 수 있고, 모든 종류의 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 또한, 인간화 항체 등의 특수 항체가 포함될 수 있고, 상기 항체는 2 개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 해당될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 상기 "올리고펩타이드"는 펩타이드로 2 내지 20 개의 아미노산으로 구성되며 디 펩티드, 트리 펩티드, 테트라 펩티드 및 펜타 펩티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에 상기 "PNA (Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991 년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254 (5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.

[0030] 본 발명의 상기 "엡타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, TSPAN1 단백질에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 엡타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3 차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 엡타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 상기 엡타머는 RNA, DNA, 변형된 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상일 수 있다.

[0031] 본 발명의 상기 TSPAN1 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 TSPAN1 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[0033] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당 업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA (peptide nucleic acid), LNA (locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명에서 상기 "LNA (Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall Gene Therapy (2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오사이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.

[0035] 본 발명에서 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적 서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA: 올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0036] 본 발명에 따른 TSPAN1 단백질이나, 이들을 암호화하는 유전자의 정보는 공지되어 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.

- [0037] 본 발명의 상기 진단용 조성물은, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 TSPAN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 대조군과 비교하여 그 발현 수준이 증가된 경우인지를 확인함으로써, 고위험군 자궁내막증을 진단할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 상기 "대조군"은 자궁내막증을 앓고 있으며 조직학으로 비정형 자궁내막증을 갖고 있지 않은 개체 그룹, 또는 자궁내막증을 앓고 있으며 생존 결과가 양호한 것으로 알려진 개체 그룹, 자궁내막증을 앓고 있으며 암으로 진행되지 않은 것으로 알려진 개체 그룹, 또는 자궁내막증을 앓고 있으며 악성 신생물 생성되지 않은 것으로 알려진 개체 그룹, 또는 자궁내막증을 앓고 있으며 악성 형질 전환이 미진행한 것으로 알려진 개체 그룹으로부터 유래된 시료로부터 취득될 수 있다. 상기에서의 자궁내막증을 앓고 있으며 생존 결과가 양호한 것으로 알려진 개체 그룹, 자궁내막증을 앓고 있으며 암으로 진행되지 않은 것으로 알려진 개체 그룹, 또는 자궁내막증을 앓고 있으며 악성 신생물 생성되지 않은 것으로 알려진 개체 그룹 또는 자궁내막증을 앓고 있으며 악성 형질 전환이 미진행한 것으로 알려진 개체 그룹은 저위험군 자궁내막증 환자 그룹일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 상기 조성물을 포함하는 고위험군 자궁내막증의 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0041] 본 발명의 상기 키트는 본 발명의 상기 조성물을 사용하여 목적하는 개체에서 자궁내막증이 대조군에 비하여 TSPAN1의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 높은 수준으로 존재하는 경우 고위험군 자궁내막증에 해당하는 것으로 예측할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 상기 진단용 키트에서, TSPAN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 자궁내막증 등에 관한 기재는 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0043] 본 발명의 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드 (Rapid) 키트 또는 MRM (Multiple reaction monitoring) 키트 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에서 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산 서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로써, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 진단용 키트에서 항원-항체 결합반응을 위한 고정체로는 니트로셀룰로오즈 막, PVDF 막, 폴리비닐 (polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트(Well plate), 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 또한, 본 발명의 진단용 키트에서 2차 항체의 표지체는 발색 반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), FITC(폴리 L-라이신-플루오르세인 아이소티오시아네이트), RITC(로다민-B-아이소티오시아네이트) 등의 형광물질 (fluorescein) 및 색소(dye) 등의 표지체가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 또한, 본 발명의 진단용 키트에서 발색을 유도하기 위한 발색 기질은 발색 반응을 하는 표지체에 따라 사용하는

것이 바람직하며, TMB(3,3',5,5'-테트라메틸 베지딘), ABTS[2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)], OPD(o-페닐렌다이아민) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색 기질은 완충 용액(0.1 M NaAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. TMB와 같은 발색기질은 이차 항체 접합체의 표지체로 사용된 HRP에 의해 분해되어 발색 침적체를 생성하고, 이 발색 침적체의 침적 정도를 육안으로 확인함으로써 상기 마커 단백질들의 존재 유무를 검출한다.

[0050] 본 발명의 진단용 키트에서 세척액은 인산염 완충 용액, NaCl 및 트윈 20(Tween 20)을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02 M 인산염 완충용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05 % 트윈 20으로 구성된 완충 용액(PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합 반응 후 항원-항체 결합체에 2차 항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 첨가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지 용액은 황산 용액(H₂SO₄)이 바람직하게 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 고위험군 자궁내막증의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0053] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, TSPAN1 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 단계를 포함한다.

[0054] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 인간을 포함하는 포유 동물로, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에서 상기 "인간"은 자궁내막증이 발병하였거나 그 발병이 의심되는 환자로, 자궁내막증의 적절한 치료가 필요하거나 예상되는 환자를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 본 발명의 상기 "생물학적 시료"는 자궁내막증 환자이거나, 고위험군 자궁내막증 질환이 의심되는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는 혈액, 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명의 상기 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에서, TSPAN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 자궁내막증, 고위험군, 발현 수준을 측정하는 제제 등에 대한 기제는 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0058] 본 발명의 상기 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 단계는 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 단백질 칩 분석, 면역 측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 또는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)에 의해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명의 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계는 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩에 의해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 TSPAN1 단백질이 존재하는 수준이 대조군에 비하여 높은 경우, 상기 목적하는 개체가 고위험군 자궁내막증 질환일 것으로 예측할 수 있다.

[0062] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 자궁내막증의 암으로의 진행 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

- [0063] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 TSPAN1 단백질의 활성을 억제시키는 제제 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 포함하는 것일 수 있다.
- [0064] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 암으로의 진행을 억제하여 암을 예방하는 기능이 있으며, 상기 암은 부인과 암의 일 유형으로서 자궁암 또는 난소암일 수 있으며, 바람직하게는 난소암, 보다 바람직하게는 난소 투명세포암일 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물은 자궁내막증이 악성 암으로의 형질 전환되는 것을 억제할 수 있고, 보다 바람직하게는 난소암, 가장 바람직하게는 난소 투명세포암으로의 형질전환을 억제할 수 있다. 이를 통해 자궁내막증의 악화를 지연 또는 억제함으로써 궁극적으로 자궁내막 세포의 암 세포화가 예견되는 자궁내막증 질환, 예를 들면 고위험군 자궁내막증 등의 예방 또는 치료에 적용할 수 있다.
- [0065] 본 발명에서 상기 "예방"이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 자궁내막증 질환에 의해 기인된 증상을 차단하거나, 자궁내막증의 암으로의 진행을 억제 또는 지연시킬 수 있는 모든 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0066] 본 발명에서 상기 "치료"란, 목적하는 질병의 완화 또는/및 개선을 위해 수행되는 일련의 활동을 의미한다. 본 발명의 목적상 치료는 자궁내막증의 암으로의 진행을 억제 또는 지연시키는 활동을 포함한다.
- [0067] 본 발명의 상기 악성 형질전환 억제용 조성물에서 TSPAN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 자궁내막증, 투명세포암, 위험군 등에 대한 기재는 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0068] 본 발명의 상기 TSPAN1 단백질의 활성을 억제시키는 제제는 TSPAN1에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 TSPAN1 유전자의 발현을 억제시키는 제제는 TSPAN1 유전자, 바람직하게는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 표적 단백질 또는 유전자인 TSPAN1에 직간접적으로 작용하여 그의 활성 또는 발현이 저해되는 효과를 도출하는 수단에 해당하는 것으로 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법으로 공지된 기술에 의하여 용이하게 도출 가능한 것이라면 이에 제한되지 아니하고 모두 포함할 수 있다.
- [0069] 본 발명에서 상기 "펩티드 미메틱스(Peptide Minetics)"는 TSPAN1의 활성 억제를 이끄는 TSPAN1 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드이다. 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는 β -턴 디펩티드 코어(Nagai et al. Tetrahedron Lett 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류(Ewenson et al. J Med chem 29:295, 1986; 및 Ewenson et al. in Peptides: Structure and Function(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce chemical co. Rockland, IL, 1985), 아제핀(Huffman et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 벤조디아제핀(Freidinger et al. in Peptides; chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), β -아미노알콜(Gordon et al. Biochem Biophys Res commun 126:419 1985) 및 치환 감마 락탐환(Garvey et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)을 사용하여 생성할 수 있다.
- [0070] 본 발명에서 상기 "앵타머(Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앵타머는 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 앵타머 발굴 기술이 처음 개발된 이후(Ellington, AD and Szostak, JW., Nature 346:818-822, 1990), 저분자 유기물, 펩타이드, 막 단백질까지 다양한 표적분자에 결합할 수 있는 많은 앵타머들이 계속해서 발굴되었다. 앵타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 단일 항체와 비교가 되고, 특히 "화학 항체"라고 할 만큼 대체 항체로서의 높은 가능성이 있다.
- [0071] 본 발명에서 상기 "항체"는 TSPAN1 단백질을 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다.
- [0072] 여기서, 상기 다클론 항체는 상기 TSPAN1 단백질을 동물에 주사하고, 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 속주로부터 만들어질 수 있다.

- [0073] 또한, 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포주 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다.
- [0074] 또한, 상기 TSPAN1 단백질에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')₂ 단편은 항체 분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로서, Fab 발현 라이브러리를 작게 하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다.
- [0075] 본 발명에서 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리 섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.
- [0076] 본 발명에서 상기 활성을 억제시키는 제제는 TSPAN1 단백질의 서열번호 1로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 것일 수 있고, 바람직하게는 본 발명의 약학적 조성물은 상기 TSPAN1 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있으며, 여기서, 상기 항체는 서열번호 1로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명에서 상기 "안티센스 뉴클레오티드"는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다. 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포주흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.
- [0078] 본 발명에서 상기 "siRNA" 및 "shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱 (silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 (knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀 (hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이스 (dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 TSPAN1를 암호화하는 유전자에 특이적으로 작용하여 TSPAN1의 유전자(예; mRNA 분자)를 절단하여 RNA 간섭 (RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 TSPAN1의 발현을 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내 (in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내 (in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR (polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트 (cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 본 발명에서 상기 "리보자임(ribozyme)"은 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 말한다. 다양한 활성을 갖는 리보자임이 공지되어 있으며, TSPAN1 유전자의 리보자임은 공지된 또는 인공적으로 생성된 리보자임을 포함하며, 선택적으로 표적 특이적 RNA 절단 활성을 갖는 리보자임이 공지된 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 일 예시로, 상기 발현을 감소시키는 제제는 TSPAN1 유전자를 녹다운시킨 siRNA일 수 있으며, 상기 siRNA는 서열번호 3으로 표시되는 정방향 siRNA 및 서열번호 4로 표시되는 역방향 siRNA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0081] 본 발명에서 제공하는 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물의 형태로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있

으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0083] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(Elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0084] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0086] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 상기 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0087] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정직, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1 일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0088] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0089] 본 발명의 상기 유효성분이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50 %의 비율로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0090] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 포함하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 구체적으로, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등일 수 있다.
- [0091] 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등이 더 포함될 수 있다.
- [0092] 본 발명의 상기 식품 조성물에 포함되는 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0094] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 자궁내막증의 암으로의 진행 억제제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0095] 본 발명의 상기 스크리닝하는 방법은 고위험군 자궁내막증 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 생물학적 시료에서 TSPAN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.

[0096] 본 발명의 상기 스크리닝하는 방법에서, TSPAN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 자궁내막증 및 난소 투명세포암 등에 대한 기제는 상기 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0097] 본 발명의 상기 후보물질은 고위험군 자궁내막증을 극복하기 위한 억제 활성, 즉 TSPAN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 저위험군 자궁내막증 또는 자궁내막증이 존재하지 않는 정상인에서의 발현 수준과 동등, 또는 유사한 정도의 수준으로 감소시킬 수 있는 활성이 존재하는지 여부에 대해 테스트하기 위한 약제를 의미하며, 단백질, 올리고 펩타이드, 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 및 광범위한 화합물 등의 임의의 분자를 포함한다. 이러한 후보물질은 천연물질뿐만 아니라, 합성 물질도 모두 포함하는 것일 수 있다.

[0098] 본 발명의 상기 스크리닝하는 방법은 상기 후보물질의 처리 후에 측정된 TSPAN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이, 상기 후보물질의 처리 전에 측정된 TSPAN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준에 비하여 감소된 경우, 상기 후보물질을 자궁내막증의 암의로의 진행 억제제로 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0099] 본 발명에서는 TSPAN1의 발현 수준을 측정함으로써, 악성 암으로의 형질전환이 예견되는 고위험군 자궁내막증 환자를 선별할 수 있다. 또한, TSPAN1의 발현 억제를 통해 자궁내막 세포의 증식을 억제하고, 더 나아가 고위험군에서 나타나는 난소 투명세포암으로의 악성 형질전환을 억제함으로써, 고위험군 자궁내막증의 악성화의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0100] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 조직 샘플의 임상 정보에 관한 구체적인 사항을 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 FFPE 조직 블록으로부터 DESeq2 및 edgeR 방법을 통해 차별적으로 발현되는 유전자 (differentially expressed genes; DEG)를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 각 조직 비교군 별 공통된 DEG를 선택하여 벤 다이어그램을 작성한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 최종 14 개의 공통 유전자 히트맵을 Cluster3.0 및 Java Treeview를 사용하여 나타낸 도이다.
- 도 3c 및 도 3d는 본 발명의 일 실시예에 따른 14 개 유전자의 발현 수준을 조직 별로 비교 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른 불멸화 자궁내막 세포주 (Immortalized endometrial cell; 6595 및 6866_SV40), 불멸화 자궁내막증 세포 (Immortalized endometriosis cell; EM cell; 6045_SV40 및 9585_SV40) 및 난소 투명세포암 세포 (ovarian clear cell carcinoma cell; OCCC cell; ES-2, TOV-21G, OVTOKO 및 OWISE)에서의 TSPAN1 mRNA 및 단백질 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 정상 세포와 난소 투명세포암 세포 (OCCC)에서의 TSPAN1의 mRNA 발현 정도를 비교 확인한 도이다.
- 도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른 환자 조직 샘플 유형 별 TSPAN1 발현 정도를 확인하기 위하여 면역 조직 화학 (immunohistochemistry; IHC) 스코어링한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5a 및 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 TSPAN1 단백질 수준을 난소암 아형 별로 IHC 스코어링에 의해 비교 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6a 및 도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 TSPAN1 과발현 또는 TSPAN1 녹다운하여 제작한 각 세포주 별 형질감염 결과를 웨스턴 블롯 (Western blotting) 및 면역 형광 염색 (Immunofluorescence staining) 분석을 통해 확인한 도이다.

도 7a 및 도 7b는 본 발명의 일 실시예에 따른 각 세포주 별 TSPAN1의 발현에 따른 세포 증식에 대한 단기 및 장기 효과를 위하여 WST-1 세포 증식 분석기 (WST-1 Cell Proliferation Assay System)를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 도이다.

도 8a 및 도 8b는 본 발명의 일 실시예에 따른 각 세포주 별 TSPAN1의 발현에 따른 세포 증식 활성 조사를 위하여 크리스탈 바이올렛으로 염색한 결과 및 WST-1 세포 증식 분석기 (WST-1 Cell Proliferation Assay System)를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 도이다.

도 9a 및 도 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 각 세포주 별 TSPAN1의 발현에 따른 세포 침습의 정도를 비교 분석한 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 각 세포주 별 TSPAN1의 발현에 따른 세포 성장 및 생존과 관련된 주요 키나아제의 인산화 정도를 측정하여 나타낸 도이다.

도 11a는 본 발명의 일 실시예에 따른 AKT 상류 키나아제 PI3K 억제제 (Wortmannin), AMPK 억제제 (화합물 C; Dorsomorphin) 및 ERK 억제제 (U0126) 처리시 각 키나아제의 인산화 수준 및 AMPK, ERK 및 AKT 활성의 정도를 확인한 도이다.

도 11b는 본 발명의 일 실시예에 따른 AKT 상류 키나아제 PI3K 억제제 (Wortmannin), AMPK 억제제 (화합물 C) 및 ERK 억제제 (U0126) 처리시 세포의 성장 및 침입에 대한 효과를 확인한 도이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 AKT 상류 키나아제 PI3K 억제제 (Wortmannin), AMPK 억제제 (화합물 C) 및 ERK 억제제 (U0126) 처리시 세포 침윤 정도를 나타낸 도이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 AMPK 억제제 (화합물 C) 작용 효과를 확인하기 위해 크리스탈 바이올렛 분석 및 WST-1 세포 증식 분석의 결과를 나타낸 도이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 AMPK α 1 녹다운과 siControl 대조군에서의 세포 성장 정도를 비교한 도이다.

도 15a는 본 발명의 일 실시예에 따른 TOV-21G 및 OVTOKO에서 TSPAN1 발현 수준을 나타낸 도이다.

도 15b 및 도 15c는 본 발명의 일 실시예에 따른 TOV-21G 및 OVTOKO 세포주에서의 세포 성장 정도를 크리스탈 바이올렛으로 염색 및 WST-1 세포 증식 분석기 (WST-1 Cell Proliferation Assay System)를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 TOV-21G 및 OVTOKO 세포주에서의 siTSPAN1 처리에 따른 인산화 변화 정도를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0101] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0103] 준비예 1: 환자 모집 및 종양 조직 샘플 획득

[0104] 모든 포르말린 고정 파라핀 포매 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE) 조직 샘플은 한국 교육과학기술부 생명의료기술 개발 프로그램을 통해 한국 부인과 암 은행이 제공하였다. RNA 서열 분석을 위한 FFPE 조직 블록은 자궁내막증 (endometriosis; Em) (n = 9), 비정형 자궁내막증 (atypical endometriosis; AtyEm) (n = 18), 난소 투명세포암에 근접한 자궁내막증 (adjacent endometriosis to OCCC: AdjEm) (n = 7), 난소 투명세포암 (ovarian clear cell carcinoma; OCCC) (n = 17) 및 난소 자궁 내막 암 (ovarian endometrioid carcinoma; OEC) (n = 12)이 포함되었다. 조직 마이크로어레이 (tissue microarray; TMA)의 경우, FFPE 조직 블록은 Em (n = 83), AtyEm (n = 13), AdjEm (n = 4), OCCC (n = 51) 및 OEC (n = 53)가 포함되었다. 국제 산부인과 학회 (International Federation of Gynecology and Obstetrics; FIGO) 분류에 따라 종양 병기를 결정하였다. 국가 종합 암 네트워크 (NCCN) 임상 실습 지침에 따라 모든 FIGO Stage I / II 난소 암 환자의 골반 및 대동맥 림프절 절제술을 시행하였고, 나이, 수술 절차, 생존 기간 및 생존 상태를 포함한 데이터를 수집하기 위해 의료 기록을 검토하였다. 병리학 보고서를 검토하여 종양 등급 및 세포 유형에 대한 데이터를 얻었다. 본 발명의 발명자들은 연세대학교 의과대학 평가위원회 (Institutional Review Board, IRB)의 승인을 얻어 모든 실험을 수행하

였으며, 샘플 수집 전 각 환자로부터 사전 동의를 받아 진행하였다.

[0105] 자궁 내막 조직 샘플은 조직학적으로 자궁내막증을 확인한 2 명의 환자로부터 얻은 반면, 자궁 내막 조직 샘플은 자궁 내막증이 없는 2 명의 환자로부터 얻은 것이다. 생검 물질을 멸균 식염수에 4 °C에서 보관하고 실험실로 옮겼다. 새로운 자궁 내막 생검 표본을 PBS로 세척하고, 작은 조각으로 잘게 썰고, 1000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 후, 조직을 1 mg/mL의 콜라게나제 타입 IV에서 37 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 분산 세포를 50- μ m 세포 여과기를 통해 여과하고 1000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하였다. 수집된 세포를 1 % DMEM / F12 또는 10 % FBS를 함유하는 DMEM에 현탁시켰다. 세포를 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0107] 준비예 2: 세포 배양

[0108] 실험 진행을 위하여 미국 세포주 은행 (American Type Culture Collection; ATCC)으로부터 TOV-21G, ES-2, NIH3T3 및 HS-5 세포주를 취득하였으며, 일본 세포주 은행 (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank; JCRB)으로부터 OVISe 및 OVTOKO 세포주를 취득하였고, 시스템 바이오 사이언스 (System Biosciences, SBI Inc.)로부터 HEK293T 세포주를, 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank; KCLB)으로부터 SNU-251 세포주를 취득하였다. 세포주 은행의 가이드에 따라 TOV-21G, OVISe, OVTOKO 및 SNU-251 세포주는 1 % 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지에서, ES-2 세포주는 1 % 페니실린-스트렙토마이신과 함께 10 % FBS를 함유하는 McCoy의 5A 배지에서, HEK293T, NIH3T3 및 HS-5 세포주는 1 % 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 돌베코 변형 이글스 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM) 배지에서 배양하였으며, 모든 세포주는 37 °C, 5 % CO₂ incubator(HERAcell 150i, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하여 실험에 이용하였다.

[0110] 준비예 3: 렌티 바이러스 생산 및 감염

[0111] pLenti CMV / TO SV40 small + Large T 벡터 및 인간 TERT는 Addgene (Cambridge, MA)에서 얻었다. HEK293T 세포 (1 X 10⁶)를 2 μ g 렌티 바이러스 벡터 및 2 μ g pPACKH1 렌티 벡터 패키징 키트 (System Biosciences, Palo Alto, CA)로 공동 형질 감염시켰다. 바이러스 상층액 (10 mL의 총 수거된 바이러스 매질)을 형질 감염 후 48 시간 및 72 시간에 취득하였다. 세포를 웰 당 500 μ L의 취득한 미정제 바이러스 배지로 감염시키고, 24 시간 후 배지를 신선한 것으로 바꾸주었다.

[0112] 안정적인 TSPAN1 발현 세포주의 생성을 위해, 프라이머 세트 5'-AAGCTAGCATGCAGTGTTCAGCTTC-3'(정방향) 및 5'-TTGGATCCTTATTGTAGATTGCAGTA-3'(역방향)을 사용하여 인간 TSPAN1을 암호화하는 cDNA를 증폭시켰다. 증폭된 cDNA를 GFP 서열이 없는 pCDH-프로모터-MCS-EF1 렌티벡터 (System Biosciences, Mountain View, CA)의 NheI / BamHI 제한효소 부위에 클로닝하였다. GFP 결실은 프라이머 세트 5'-CCTACGCTAGACGCCACCATGACCGAGTACAAGCCC-3'(정방향) 및 5'-GGGCTTGACTCGGTCATGGTGGCGTCTAGCGTAGG-3'(역방향)를 사용하여 PCR 산물을 증폭시켰으며 주형으로서 pCDH-프로모터 MCS-EF1-렌티벡터는 제한 효소 DpnI에 의해 선택되었고 빈 렌티벡터는 안정적인 세포주의 대조군으로 사용되었다. pCMV 텔타 및 pMDG로 구성된 바이러스 패키징 플라스미드를 사용하여 TSPAN1을 발현하는 안전한 세포주를 생성하였다. 형질 감염 후 48 시간 및 72 시간에 바이러스 입자를 취득하였으며, 양성 감염된 세포를 2 μ g / mL 퓨로마이신 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 선별하였다.

[0114] 준비예 4: siRNA의 준비

[0115] 바이오니아 (Bioneer)에서 사전 설계된 siRNA 서열을 구입하여 TSPAN1 (#1157352), AMPK (#5562-1) 및 음성 대조군 (#SN-1003)의 녹다운을 수행하였다. siTSPAN1의 형질 감염은 제조사의 지시에 따라 리포펙타민 RNAiMax (Thermo Scientific, MA, Waltham, MA)를 사용하여 수행되었다. siAMPK의 형질 감염은 제조사의 지시에 따라 G-Fectin (Genolution Pharmaceuticals Inc., Seoul, Korea)을 사용하여 수행되었다.

[0117] 실시예 1: DESeq2 및 edgeR 분석을 통한 유전자 발현 프로파일링

[0118] 1.1 차별적으로 발현된 유전자 발굴

[0119] 자궁내막증 (endometriosis; Em)에서 난소 투명세포암 (ovarian clear cell carcinoma; OCCC)으로의 발암성 전환을 설명할 수 있는 차별적으로 발현된 유전자 발굴하기 위하여, 레이저 캡처 미세 절제술 (Laser Capture Microdissection; LCM)에 의해 준비예 1에서 취득한 FFPE 조직으로부터 절제된 병변에서 추출된 mRNA를 사용하여 RNA 시퀀싱을 수행하였다. 조직 샘플의 임상 정보에 관한 구체적인 사항을 도 1에 나타내었다. DESeq2 및 edgeR 방법으로 1 차 선별 후 RNA 시퀀싱을 통해 유전자 발현 데이터 히트맵 (Heatmap)을 생성하였다. 이 때,

RNA 시퀀싱 리드를 인간 게놈 (hg19)에 맵핑하고, 각 유전자의 리드 카운트를 계산하였다. 각각의 유전자는 판독 카운트를 사용하여 정규화되었고, DESeq2 및 edgeR을 사용하여 차별적으로 발현된 유전자 (differentially expressed genes; DEG)를 분석하였다.

[0120] 6 개의 비교 군 (Em 대 AtyEm, Em 대 AdjEm, Em 대 OCCC, AtyEm 대 AdjEm, AtyEm 대 AdjEm 및 AdjEm 대 OCCC)에서의 차별적으로 발현된 유전자 (DEG)를 분석하였다. DEG 분석의 정확성을 높이기 위해 DESeq2 및 edgeR 방법이 모두 적용되었으며, DEG의 수는 모든 비교에서 DESeq2보다 edgeR에서 더 컸으며, AtyEm과 AdjEm을 비교한 결과 113 개 유전자 (DESeq2) 또는 586 개 유전자 (edgeR)로 가장 낮은 총 DEG 수를 보인 반면, Em과 OCCC 사이에서는 3,305 개 유전자 (DESeq2) 또는 5,288 개 유전자 (edgeR)로 가장 높은 것을 확인하였다(도 2 참조). 유전자의 선별은 fold change 2 배 이상 및 p-value < 0.05를 기준으로 선별하였다. AtyEm과 AdjEm을 제외한 5 가지 비교에서 공통된 DEG를 선택하여 벤 다이어그램을 작성한 결과를 도 3a에 나타내었으며, 이 때, DESeq2 분석에서 14 개의 유전자와 edgeR 분석에서 34 개의 유전자가 발견되었으며, 최종 14 개의 공통 유전자 히트맵을 Cluster3.0 및 Java Treeview를 사용하여 도 3b에 나타내었다. 상기 과정을 통하여 발굴된 14 개의 유전자는 TSPAN1, EPCAM, TMEM84A, PKP3, ERBB3, MUC20, B4GALNT3, B3GNT3, EPS8L1, KRT19, BSPRY, SYTL1, SGK2 및 CDK2P2로 확인되었다(도 3c 및 도 3d 참조). 정규화 카운트 (log2)를 통해 비교한 결과, 14 개 유전자의 발현 수준이 AtyEm 및 AdjEm에서 Em보다 높고 OCCC에서 AtyEm 및 AdjEm보다 높았다(도 3c 참조). 모든 결과는 통계적으로 유의한 값을 가지는 것으로 확인되었다(도 3d 참조). 특히, TSPAN1 유전자는 총 14 개의 유전자 중에서 Em과 비교하여 OCCC에서 가장 유의미한 증가를 가지는 것을 확인할 수 있다.

[0122] 실시예 2: TSPAN1 마커의 발굴

[0123] 2.1 세포에서의 TSPAN1 발현 평가

[0124] TSPAN1의 발현 수준 확인하고 TSPAN1의 효능을 평가하기 위해, 준비예에서 수득한 Em의 세포를 1 차 배양하고, hTERT 및 SV40 T 항원을 렌티 바이러스를 사용하여 발현시켜 불멸화된 세포주를 수득하여 실험에 이용하였다. 자궁내막 세포주 (endometrial cell; 6595 및 6866_SV40), 자궁내막증 세포 (endometriosis cell; EM cell; 6045_SV40 및 9585_SV40) 및 난소 투명세포암 세포 (ovarian clear cell carcinoma cell; OCCC cell; ES-2, TOV-21G, OVTOKO 및 OWISE)를 사용하여 TSPAN1의 mRNA 및 단백질 발현량을 확인하였다. TSPAN1의 발현이 자궁 내막 및 자궁내막증 세포보다 난소 투명세포암 세포 (ES-2를 제외하고 TOV-21G, OVTOKO 및 OWISE)에서 더 높게 나타난 것을 확인하였다(도 4a 참조). GEO (Gene Expression Omnibus) 데이터 세트 분석에 따르면, TSPAN1의 mRNA 발현은 정상 세포보다 OCCC에서 더 높은 것을 확인하였다(도 4b 참조).

[0126] 2.2 환자 조직에서의 TSPAN1 발현 평가

[0127] 또한, 환자 조직에서의 TSPAN1 발현을 평가하기 위해, 면역 조직 화학 (immunohistochemistry; IHC)을 수행하였다. 자일렌으로 파라핀 조직 섹션으로부터 파라핀을 제거하고, 에탄올로 재수화한 후, 메탄올에서 3 % H₂O₂ 용액으로 30 분 동안 처리하여 내인성 퍼옥시다제를 블로킹하였다. 30 분 동안 블로킹한 후, 섹션을 마우스 모노클로날 항-인간 TSPAN1 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Cat #sc-376551)와 RT에서 1 시간 동안 인큐베이션하여 Dako LSAB+ (Dako, Glostrup, Denmark)를 사용하여 검출하였다. 반응 생성물은 DAB (3,3'-디아미노벤지딘) 크로모젠 용액 반응으로 검출하였다. 조직 섹션을 헤마톡실린으로 염색하고, 파라마운트 수성 장착 배지 (Dako)로 고정하였다. TSPAN1에 대한 염색은 종양 또는 상피세포가 세포질 또는 막에서 면역 반응성을 나타내는 경우에 양성으로 스코어링되었다.

[0128] 그 결과, 환자의 조직 샘플 중 Em (n = 83), AtyEm (n = 13), AdjEm (n = 4) 및 OCCC (n = 51)로 TMA (tissue microarray)를 수행한 결과 TSPAN1 단백질 발현은 저위험군 자궁내막증인 Em보다 OCCC로 발전할 가능성이 높은 자궁내막증인 AtyEm 및 AdjEm과, OCCC에서 유의적으로 높게 나타나는 것으로 확인되었다(도 4c 참조).

[0129] 난소 자궁내막암의 RNA 시퀀싱 결과를 얻었으며, TSPAN1 mRNA 수준은 난소 자궁내막암이 아닌 난소 투명세포암 유형에서 보다 높게 발현되었음을 확인하였으며, IHC 스코어링에 의해 분석한 결과 조직의 TSPAN1 단백질 수준도 유사한 결과를 나타내는 것을 확인하였다(도 5a 참조). 이 결과는 GEO 데이터 세트 분석 (GSE6008, GSE655986 및 GSE29175)에 따라 도 5b에 나타내었다. 이처럼, TSPAN1은 난소암 아형에 따라 다르게 발현된다.

[0131] 실시예 3: 자궁내막증 세포주에서의 TSPAN1 작용 효과 확인

[0132] 3.1 Em에서의 TSPAN1 기능 확인을 위한 형질 감염 세포의 준비

[0133] Em에서의 TSPAN1 기능을 확인하기 위해, 상기 준비예에서 수득한 6045_SV40 및 9585_SV40 세포를 이용하여

TSPAN1 과발현 세포주를 제작하였다. 각 세포주는 TSPAN1 과발현 렌티 바이러스 (TSPAN1-overexpressing lentivirus) 및 대조군 렌티 바이러스 (empty lentivirus)로 감염시켰다. 그 후, TSPAN1 과발현 세포 라인이 대조군에 비하여 더 높은 TSPAN1 mRNA 및 단백질 수준을 가지는 것을 확인하였으며, TSPAN1 과발현 세포주의 TSPAN1 mRNA 및 단백질 발현 수준이 siRNA (small interfering RNA)를 통해 감소한 것을 확인하였다(도 6a 참조). 기존에 설계된 siRNA 서열을 바이오니어사 (Bioneer)로부터 구입하여 상기 실험을 수행하였으며, siTSPAN1의 형질 감염은 제조사의 지시에 따라 리포펙타민 RNAiMax (Thermo Scientific, MA, Waltham, MA)를 이용하였다.

[0134] 형질 감염된 6045_SV40 및 9585_SV40 세포의 TSPAN1의 발현을 확인하고자 세포질에 면역 형광 염색 (Immunofluorescence staining)을 수행하였다. 먼저 상기 6045_SV40 및 9585_SV40 세포의 컨플루언스가 적절한 30 내지 40 %에 도달할 때까지 24 웰 세포 배양 플레이트에 배양하였으며, 상기 세포를 PBS로 세척하고, 차가운 메탄올로 실온에서 1 시간 동안 고정시켜 PBS로 3 회 세척하였다. 그 후 4 °C에서 밤새 0 % 1 % 트윈 20 (TBS-T) 용액을 함유하는 트리스-버퍼 식염수에서 1 % 소 혈청 알부민과 함께 TSPAN1 (1 : 100)과 함께 배양하였다. TBS-T로 3 회 세척 후, 세포를 실온에서 2 시간 동안 Alexa Fluor 488 염료에 접합된 항-마우스 IgG (세포 신호)와 함께 배양하였다. 세포를 TBS-T로 3 회 세척하고, 핵을 실온에서 10 분 동안 1 g/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich사)로 표지 하였다. 세포를 실온에서 5 분 동안 PBS로 3 회 세척한 후 세포의 이미지를 현미경 (Life Technologies, EVOS®FL Cell Imaging System)으로 관찰한 결과를 도 6b에 나타내었다. 결과를 참조하면, 핵 내 TSPAN1의 발현 정도를 확인할 수 있다.

[0136] 3.2 TSPAN1의 발현이 세포의 성장 속도에 미치는 영향

[0137] TSPAN1이 세포의 성장 속도에 미치는 영향을 확인하기 위해, 6045_SV40 및 9585_SV40 안정성 세포주에서의 세포 증식에 대한 단기 및 장기 효과를 분석하고자 하였다. TSPAN1 과발현 또는 녹다운시킨 6045_SV40 및 9585_SV40 안정성 세포주 각각에서의 세포 증식의 정도를 WST-1 세포 증식 분석기 (WST-1 Cell Proliferation Assay System)를 이용하여 측정하였다. 보다 상세하게는 TSPAN1 과발현 6045_SV40 및 9585_SV40 안정성 세포주가 최종 부피 100 μ L/웰로 될 수 있도록 96 웰 플레이트 상에 0.1×10^4 세포/웰로 접종하였다. 세포 증식 활성 조사를 위하여 37 °C에서 2 시간 동안 premix WST-1 (대일 랩, 한국)을 첨가하여 인큐베이션하고, 450 nm 파장에서 OD (optical density) 값을 VERSA max™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 사용하여 0, 3 및 5 일마다 측정하여 기록하여 도 7a 및 도 7b에 나타내었다. 또한, TSPAN1 녹다운 6045_SV40 및 9585_SV40 안정성 세포주를 얻기 위하여 24 웰 플레이트 상에 0.5 내지 2×10^4 세포/웰로 접종하고 세포를 부착한 후, 20 내지 50 nM의 siTSPAN1 또는 siControl을 세포 내로 형질 감염시켰다. 형질 감염 후 10 % 메탄올과 함께 10 % 아세트산 용액을 사용하여 세포를 고정시키고, 1 시간 동안 0 내지 5 % 크리스탈 바이올렛으로 염색하고, 촬영한 뒤, 1 % SDS 용액을 사용하여 추출하였다. 세포로부터 VERSA max™ 595 nm 파장에서의 흡광도를 기준으로 측정하여 도 8a 및 도 8b에 나타내었으며 상기의 모든 실험은 3 회 반복하여 수행되었다.

[0138] 상기 도 7a 및 도 8a를 참조하면, 자궁내막증 세포주인 TSPAN1 과발현 6045_SV40에서 대조군에 비하여 빠르게 증식한 것을 확인하였으며, TSPAN1을 녹다운시키는 경우 TSPAN1 과발현 세포주의 성장 속도를 감소시키는 것을 확인하였다. 또한, 9585_SV40 세포주는 6045_SV40에 비하여 오랜 기간 동안 테스트했을 때만 더 빠른 성장을 보여주었으며, 이 역시 TSPAN1 녹다운시킨 경우 TSPAN1 과발현 세포주의 성장 속도를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(도 7b 및 도 8b 참조).

[0140] 3.3 TSPAN1의 발현이 세포의 침습에 미치는 영향

[0141] 세포 침습 분석을 위하여 제조사의 지시에 따라 침습 챔버 (Neuro Probe 48-well Micro Chemotaxis Chamber, Neuro Probe, Inc., Gaithersburg, MD)에서 수행되었다. 0.3×10^4 세포를 무혈청 배지 (56 μ L)에 재현탁시키고 매트릭셀 (BD Transduction Lab, San Jose, CA)로 코팅된 상부 챔버에 플레이팅하였다. 하부 챔버는 0.1 내지 10 % FBS (27 μ L)를 함유하는 배지로 채워졌으며, 24 시간 인큐베이션 후 막을 통해 이동한 세포를 Differential Quik Stain Kit (Triangle Biomedical Sciences, Inc., Durham, NC)로 염색하였다. 6 개의 무작위로 선택된 필드의 침윤 세포를 현미경 Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, Magnification x200)를 이용하여 계수하였다.

[0142] 상기와 같은 매트릭셀 침습 분석 결과, TSPAN1에 반응하여 6045_SV40 안정 세포주에서 세포 침윤의 증감을 확인한 반면, 9585_SV40 안정 세포는 변화를 보이지 않은 것을 확인하였다(도 9a 및 도 9b 참조). 이를 통해 TSPAN1

이 Em 세포의 성장 속도를 증가시키고 세포 침습에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있다.

[0144] **3.4 Em 세포에서의 TSPAN1의 세포 성장 및 침습의 매커니즘 규명**

[0145] Em 세포에서의 TSPAN1 반응에 따른 세포 성장 및 침습의 매커니즘을 결정하기 위해, 본 발명자들은 Em 안정 세포주에서 세포 성장 및 생존과 관련된 주요 키나아제의 인산화 정도를 측정하였다. 6045_SV40 및 9585_SV40 안정성 세포주에서 TSPAN1의 과발현은 AMPK-Thr172 인산화를 증가시켰으며, 이는 siTSPAN1에 반응하여 감소되었다. 그러나, TSPAN1 발현은 pAKT-Ser473 및 pERK-Thr201/Thr204의 변화를 유도하지 않았다(도 10 참조). 본 발명자들은 6045_SV40 안정 세포주를 AKT 상류 키나아제 PI3K 억제제 (Wortmannin), AMPK 억제제 (화합물 C; Dorsomorphin) 및 ERK 억제제 (U0126)로 처리하여 TSPAN1 과발현 세포의 성장 및 침습에 대한 효과를 확인하였다. 그 결과, Wortmannin 및 화합물 C를 처리한 경우 TSPAN1 과발현 세포주의 성장을 지연시키는 반면, U0126의 처리는 변화가 없는 것을 확인하였다(도 11b 참조). 침습 분석에서, Wortmannin은 TSPAN1에 관계없이 세포 침윤을 크게 감소시켰으나, U0126 및 화합물 C의 처리시, TSPAN1- 과발현 세포의 세포 침습은 감소하지 않았다(도 12 참조). 상기와 같이 각 억제제 처리 후 키나아제의 활성은 각 키나아제의 인산화 수준에 의해 확인되었다. AMPK 및 ERK 활성은 상기 억제제에 의해 약화되었지만, AKT 활성은 억제제의 처리 여부에 관계없이 유지된 것을 확인할 수 있다(도 11a 참조). Wortmannin의 처리에 의해 AKT-Ser473 인산화를 감소시키지 않았음에도 불구하고, TSPAN1 유도된 세포 성장은 이에 의해 감소된 것으로, 세포 성장에 미치는 영향이 PI3K/AKT 신호 대신 다른 PI3K 경로에 기인하는 것을 확인할 수 있었다.

[0146] 여기서, 화합물 C는 AMPK 억제제로 잘 알려진 약물로, AMPK-Thr172 인산화 및 TSPAN1 유도된 세포 성장을 감소시켰음을 주목할 만하다. 화합물 C의 효과를 다시 한 번 확인하기 위해, 크리스탈 바이올렛 분석을 수행하였다. TSPAN1에 반응하여 세포 성장은 화합물 C의 농도에 따라 감소되었다 (도 12 및 도 13 참조). 마지막으로, 세포 성장은 AMPK alpha1 녹다운을 통해 평가되었다. AMPK alpha1 및 pAMPK-Thr172의 발현은 siAMPK에 의해 약화되었다. TSPAN1에 반응하여 세포 성장이 siControl에서 가속화되는 반면, AMPK alpha1 녹다운 세포는 성장에 차이가 없음을 보여주었다(도 14 참조). 이러한 결과는 TSPAN1이 Em 세포에서 AMPK 인산화를 통해 세포 성장을 유도함을 시사한다.

[0148] **실시예 4: TSPAN1의 발현과 OCCC의 성장 조절 반응 간의 연관성 확인**

[0149] TSPAN1이 Em 세포에서 OCCC의 성장을 조절하는지를 확인하기 위하여 서열번호 3 및 4로 표시되는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 siTSPAN1을 TOV-21G 및 OVTOKO에 일시적으로 형질 감염시킨 후, 세포 성장의 정도를 측정하였다. siTSPAN1에 반응하여 TOV-21G 및 OVTOKO에서 TSPAN1 발현 수준이 감소하였고(도 15a 참조), 세포 성장 속도는 그에 따라 지연되는 것을 확인할 수 있었다(도 15b 및 도 15c 참조). Em 세포와는 달리, TOV-21G 및 OVTOKO의 siTSPAN1 처리는 siControl과 비교하여 AMPK-Thr172 인산화의 변화를 유발하지 않았다(도 16 참조). 이는 곧 세포가 OCCC와 같은 악성 유형으로 변형되었을 때, TSPAN1이 AMPK 대신에 다른 매커니즘을 통해 세포 성장을 조절하는 것을 의미한다. 이러한 매커니즘을 이용함으로써 고위험군 자궁내막증의 난소 투명세포암(OCCC)으로의 진행을 지연시키고, 더 나아가 억제시킬 수 있을 것으로 기대된다.

[0151] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

Clinical characteristics of patients.

Characteristic	Em	AtyEm	AdjEm	OCCC
Number of cases				
n (%)	9 (17.64%)	18 (35.29%)	7 (13.72%)	17 (33.33%)
Age at presentation (years)				
mean (S.D)	27.78 (5.74)	40.00 (6.63)	44.57 (11.15)	43.59 (10.60)
FIGO stage of cancer, n (%)				
I/II	N/A	N/A	N/A	9 (41.17%)
III/IV	N/A	N/A	N/A	2 (11.76%)
Recurrent	N/A	N/A	N/A	4 (23.52%)
Unknown	N/A	N/A	N/A	2 (11.76%)
Tumor grade, n (%)				
Well + Moderate	N/A	N/A	N/A	0 (0%)
Poor	N/A	N/A	N/A	11 (64.70%)
Unknown	N/A	N/A	N/A	6 (35.29%)

Abbreviation

- Em ; endometriosis
- AtyEm ; atypical endometriosis
- AdjEm ; adjacent endometriosis to OCCC
- OCCC ; ovarian clear cell carcinoma
- S.D ; Std. Deviation
- N/A ; not applicable

도면2

The number of Differentiation Expression Genes.						
Comparing group	Number of genes					
	DeSeq			edgeR		
	Up-regulated	Down-regulated	Total	Up-regulated	Down-regulated	Total
Em vs AtyEm	193	465	658	430	1,599	2,029
Em vs AdjEm	184	337	521	442	643	1,085
Em vs OCCC	1,447	1,858	3,305	1,784	3,504	5,288
AtyEm vs AdjEm	80	33	113	480	106	586
AtyEm vs OCCC	2,048	1,128	3,176	2,444	2,067	4,511
AdjEm vs OCCC	1,089	977	2,066	1,258	1,773	3,031

Number of genes was selected by 2fold and p-value< 0.05

Abbreviation

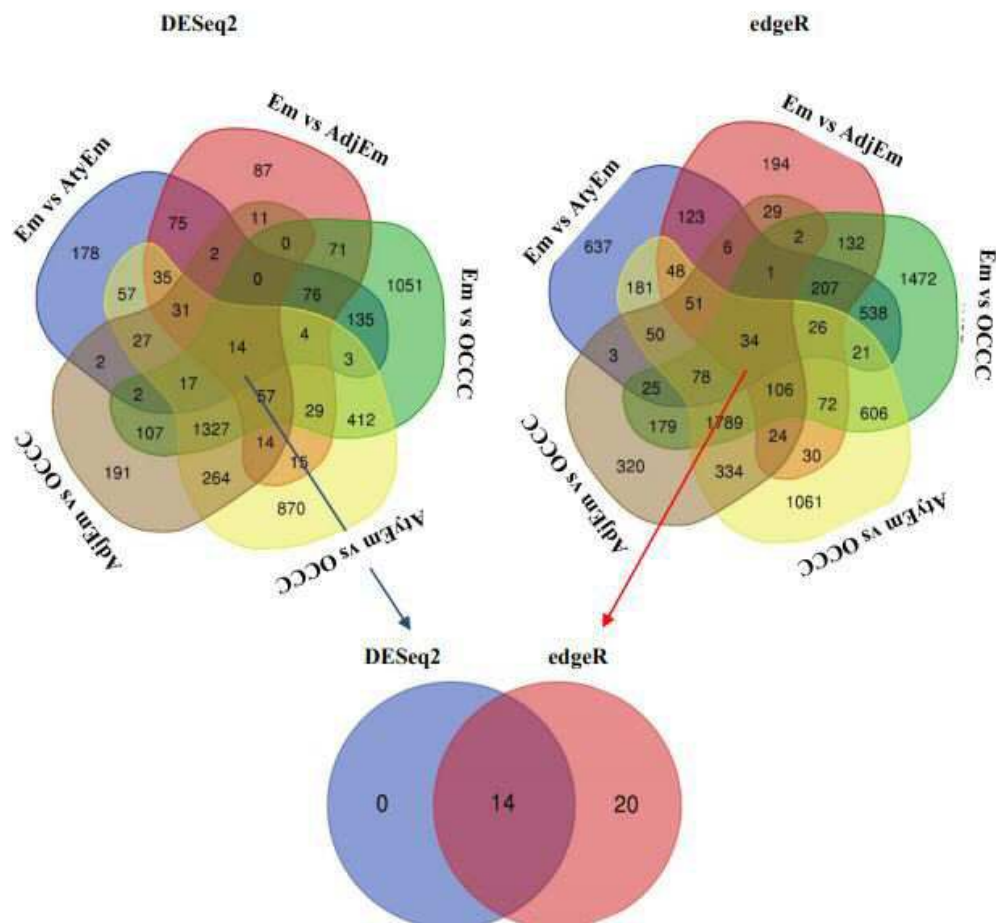
Em ; endometriosis

AtyEm ; atypical endometriosis

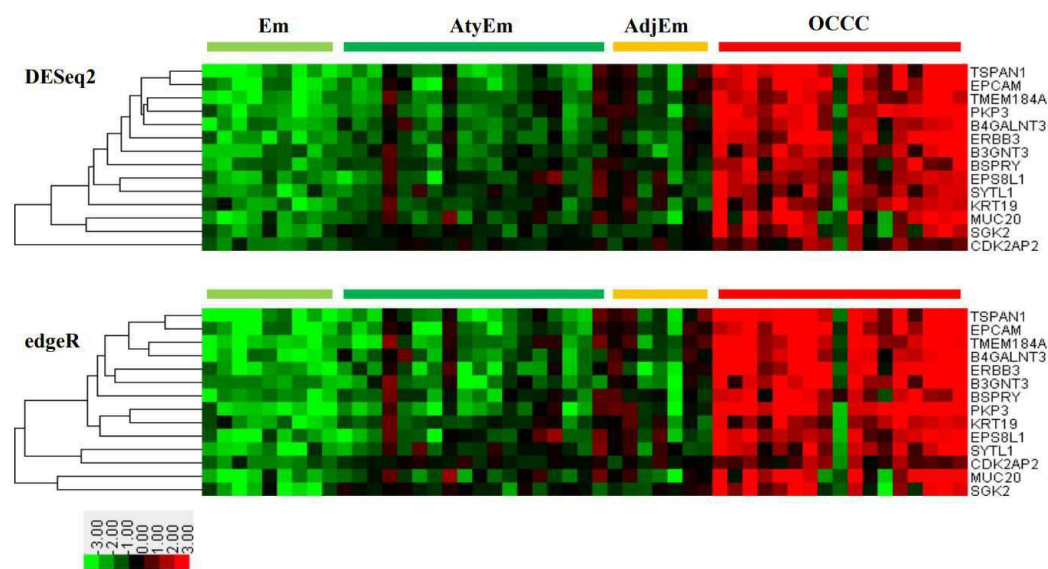
AdjEm ; adjacent endometriosis to OCCC

OCCC ; ovarian clear cell carcinoma

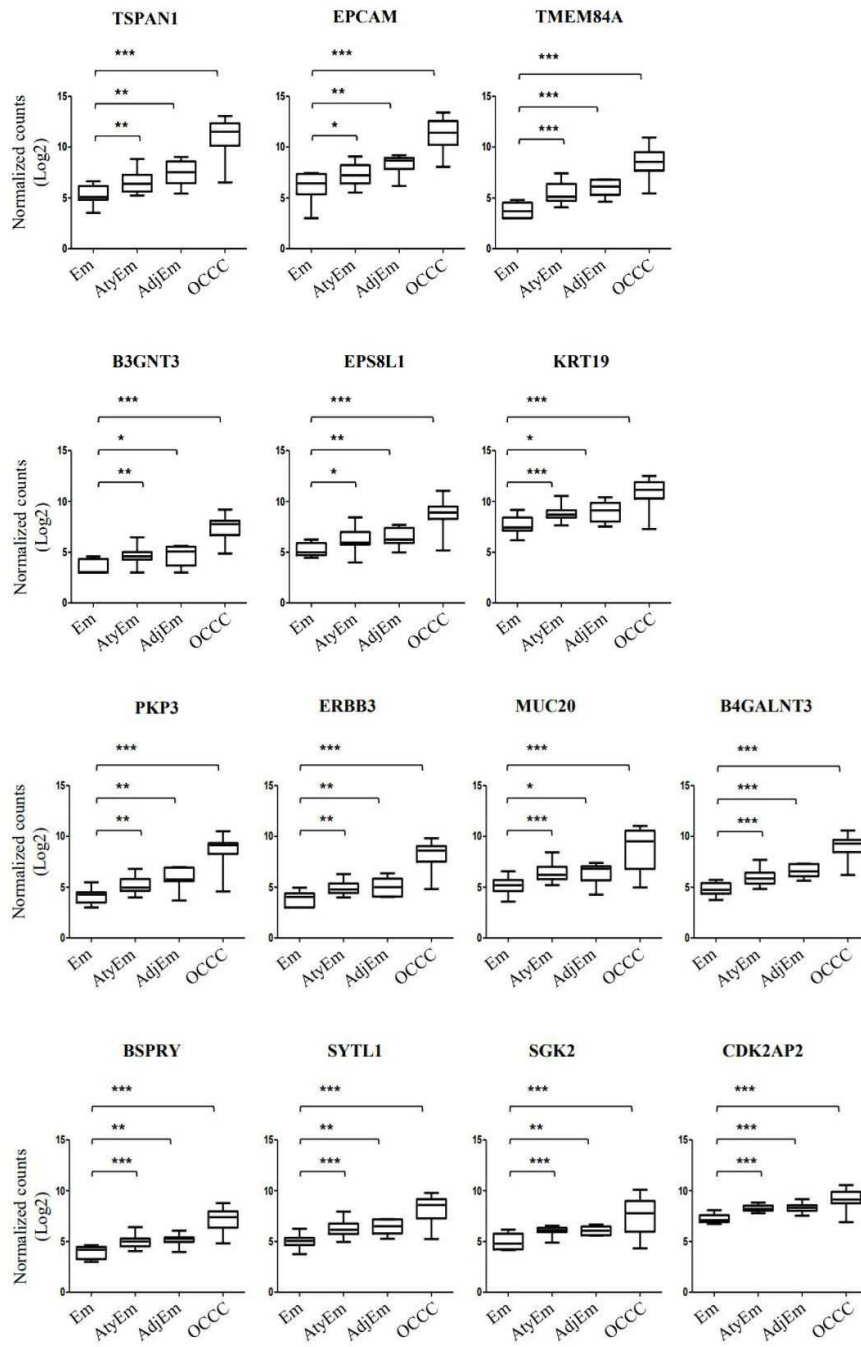
도면3a



도면3b



도면3c

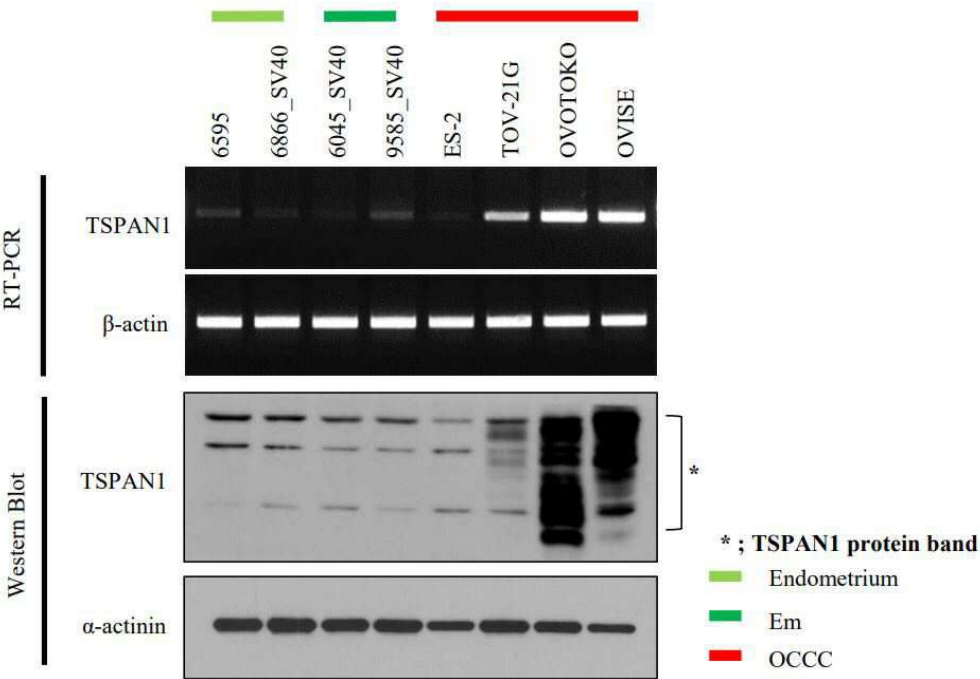


도면3d

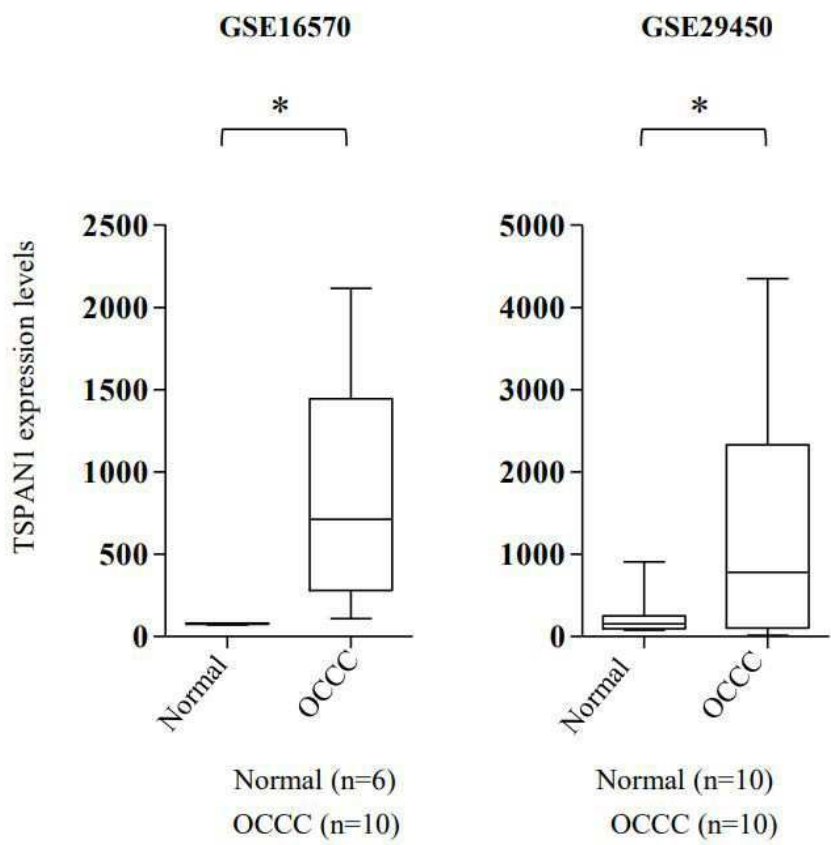
Tabular data shows the fold change of 14 gene in 5 different two-group comparisons.

Gene Symbol	DeSeq					edgeR				
	Em vs AtyEm	Em vs AdjEm	Em vs OCCC	AtyEm vs OCCC	AdjEm vs OCCC	Em vs AtyEm	Em vs AdjEm	Em vs OCCC	AtyEm vs OCCC	AdjEm vs OCCC
	Fold change (P)	Fold change (P)	Fold change (P)	Fold change (P)	Fold change (P)	Fold change (P)	Fold change (P)	Fold change (P)	Fold change (P)	Fold change (P)
TSPAN1	2.4 (0.048)	4.646 (0.005)	80.747 (0.001)	33.532 (1.E-05)	17.381 (0.006)	3.412 (0.045)	7.065 (0.005)	101.098 (0.001)	2.608 (4.E-05)	4.494 (0.008)
EPCAM	2.352 (0.048)	4.431 (0.001)	54.089 (0.001)	22.994 (1.E-05)	12.206 (0.006)	2.534 (0.044)	4.411 (0.001)	47.906 (0.001)	18.906 (1.E-05)	10.859 (0.006)
TMEM184A	3.152 (0.015)	4.520 (4.E-04)	37.653 (0.004)	11.945 (2.E-04)	8.331 (0.021)	9.457 (0.02)	12.896 (0.001)	116.595 (0.003)	12.329 (1.E-04)	9.041 (0.016)
PKP3	2.061 (0.029)	3.133 (0.004)	30.603 (9.E-05)	14.849 (1.E-07)	9.768 (0.001)	3.735 (0.034)	6.723 (0.005)	66.888 (1.E-05)	17.910 (4.E-08)	9.949 (4.E-04)
ERBB3	2.020 (0.011)	2.375 (0.014)	26.721 (3.E-04)	13.228 (1.E-06)	11.250 (0.002)	3.874 (0.019)	5.502 (0.018)	76.145 (2.E-04)	19.655 (1.E-06)	13.838 (0.002)
MUC20	2.577 (0.021)	2.215 (0.016)	22.674 (0.004)	8.799 (2.E-06)	10.236 (0.013)	3.683 (0.022)	3.011 (0.015)	29.987 (0.003)	8.143 (2.E-04)	9.958 (0.013)
B4GALNT3	2.101 (0.016)	3.179 (0.001)	22.119 (1.E-04)	10.527 (2.E-07)	6.958 (0.001)	3.166 (0.019)	4.853 (0.001)	36.086 (4.E-05)	11.398 (1.E-07)	4.433 (0.003)
B3GNT3	2.044 (0.023)	2.119 (0.014)	18.426 (0.001)	9.015 (1.E-05)	8.695 (0.004)	4.695 (0.041)	5.452 (0.012)	63.170 (0.001)	13.456 (9.E-06)	11.587 (0.004)
EPS8L1	2.035 (0.046)	2.292 (0.014)	15.016 (0.003)	7.378 (2.E-04)	6.552 (0.014)	3.456 (0.043)	3.262 (0.013)	20.725 (0.001)	5.996 (8.E-05)	6.354 (0.009)
KRT19	2.181 (0.022)	2.521 (0.021)	13.117 (4.E-04)	6.014 (4.E-04)	5.204 (0.004)	2.179 (0.019)	2.705 (0.019)	11.992 (2.E-04)	5.503 (3.E-06)	4.433 (0.003)
BSPRY	2.051 (0.007)	2.306 (0.002)	11.844 (0.001)	5.774 (2.E-05)	5.136 (0.007)	4.150 (0.01)	4.758 (0.002)	33.224 (0.001)	8.007 (3.E-05)	6.983 (0.024)
SYTL1	2.442 (0.007)	2.543 (0.004)	11.776 (4.E-04)	4.821 (1.E-05)	4.631 (0.004)	3.586 (0.006)	3.594 (0.003)	17.433 (2.E-04)	4.861 (1.E-05)	4.851 (0.004)
SGK2	2.122 (2.E-04)	2.216 (0.003)	10.996 (0.011)	5.181 (0.001)	4.961 (0.038)	2.550 (2.E-04)	2.669 (0.003)	15.488 (0.008)	6.074 (0.001)	5.803 (0.035)
CDK2AP2	2.011 (5.E-06)	2.061 (0.002)	4.597 (0.001)	2.286 (2.E-04)	2.231 (0.023)	2.145 (4.E-06)	2.241 (0.001)	4.945 (4.E-04)	2.306 (2.E-04)	2.206 (0.022)

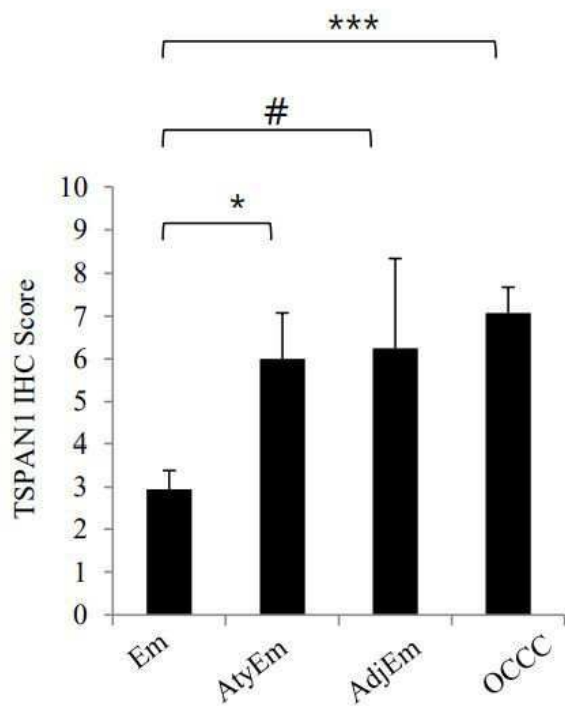
도면4a



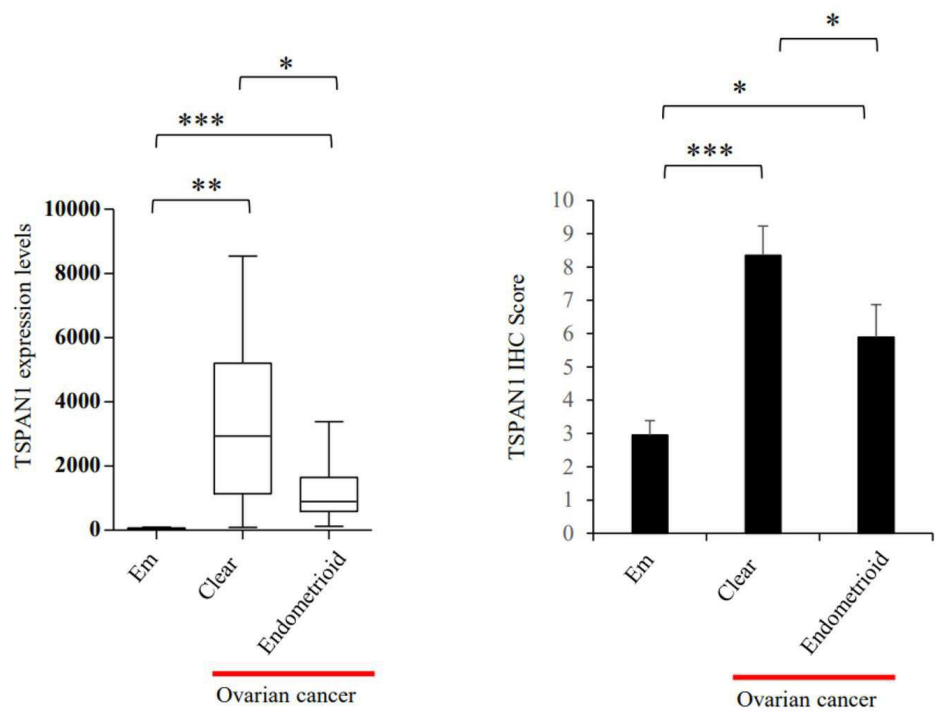
도면4b



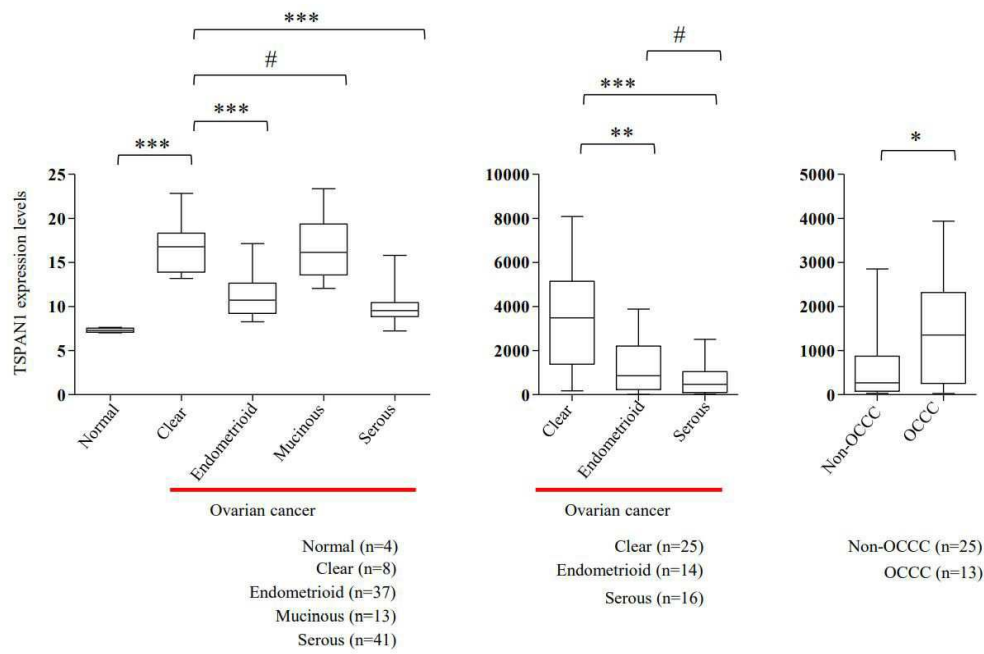
도면4c



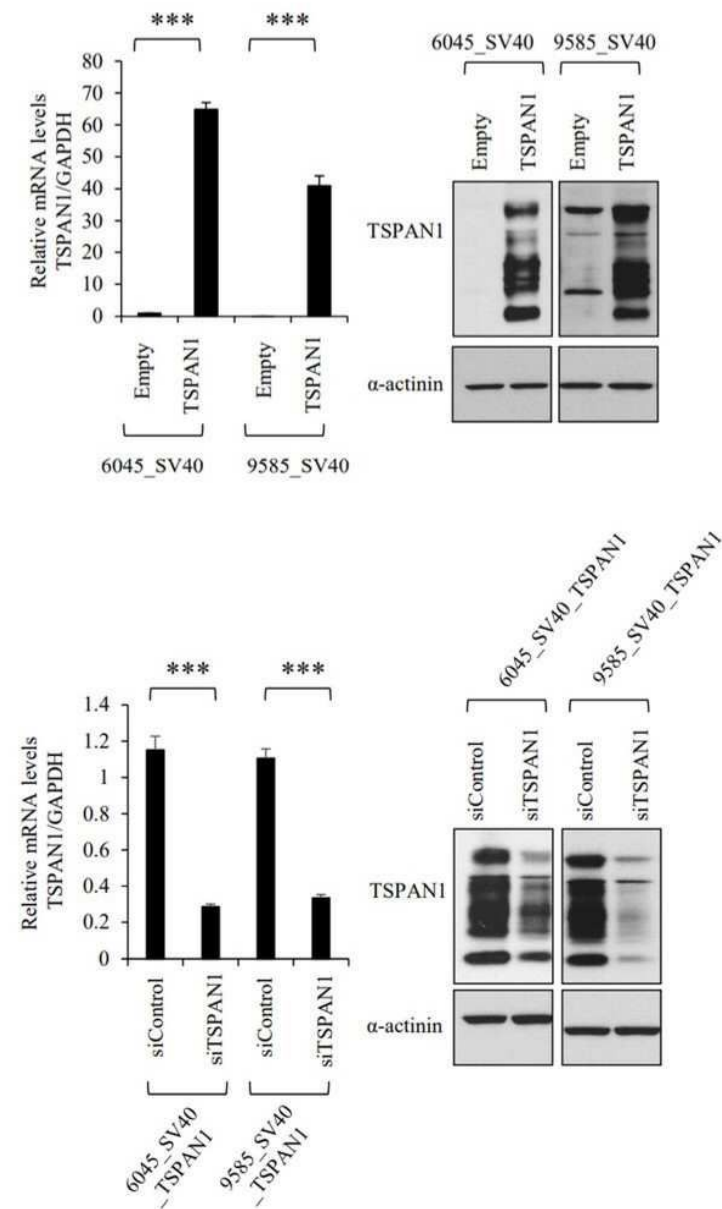
도면5a



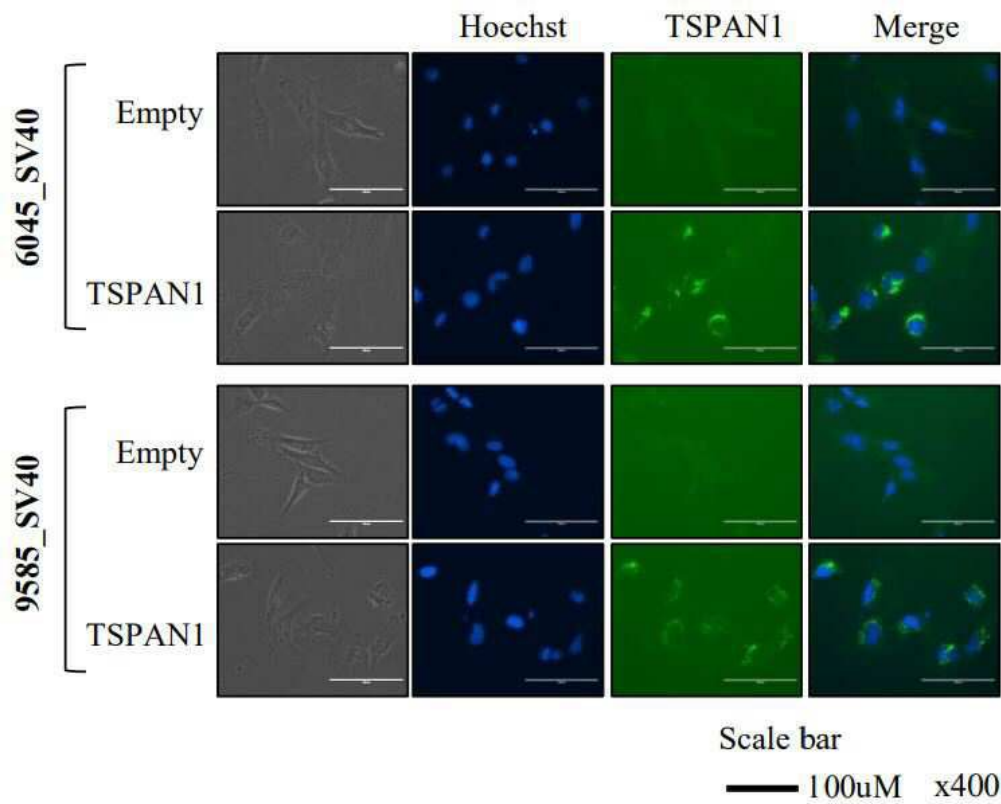
도면5b



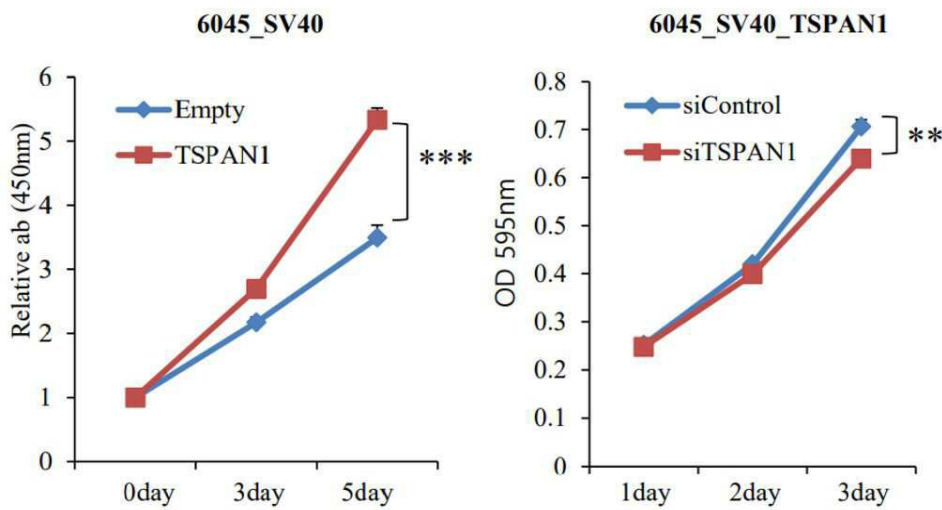
도면6a



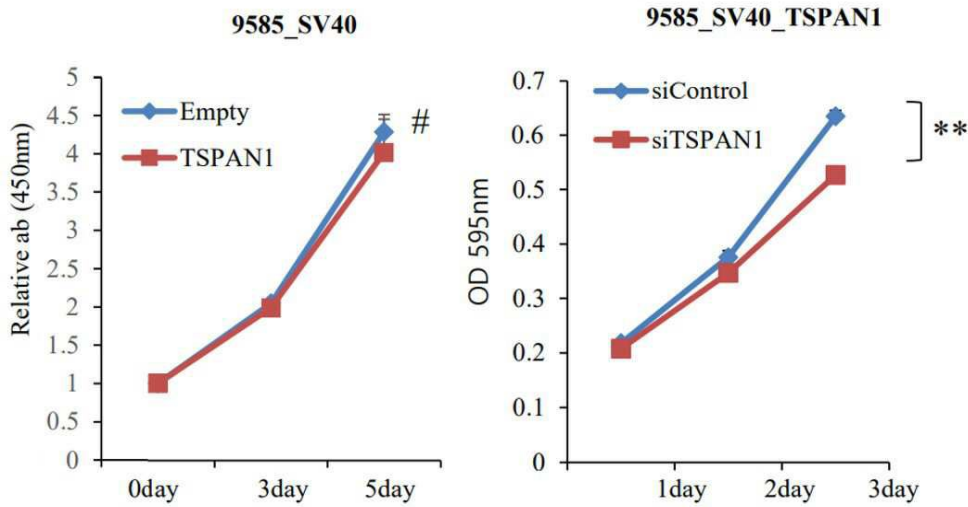
도면6b



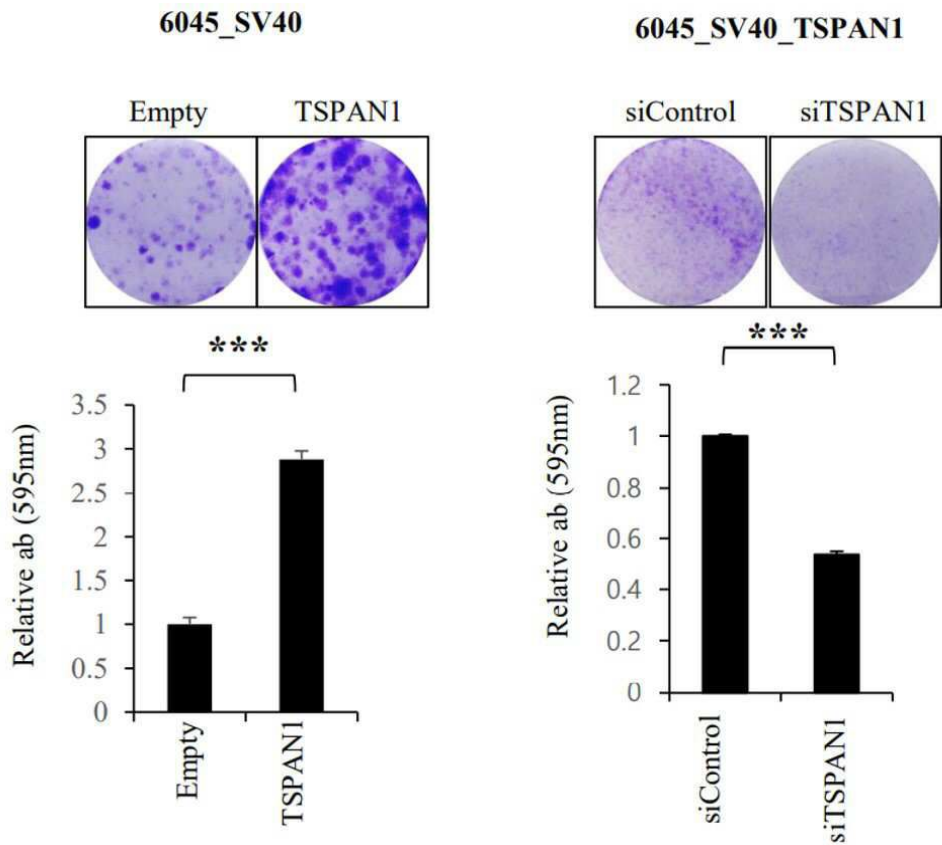
도면7a



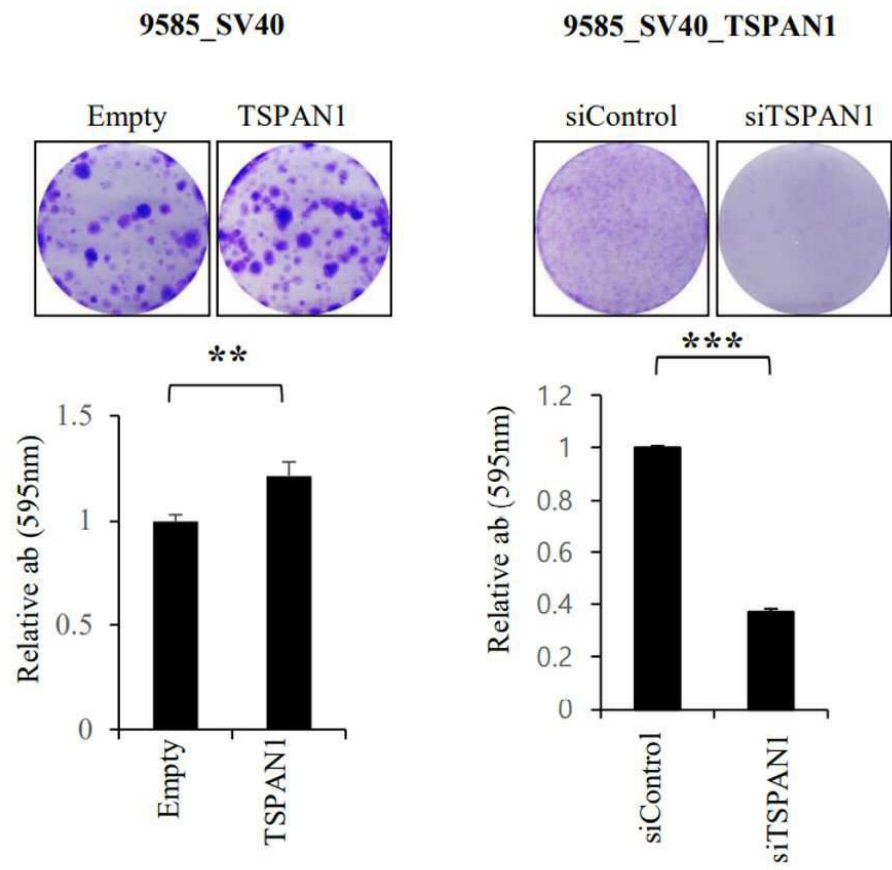
도면7b



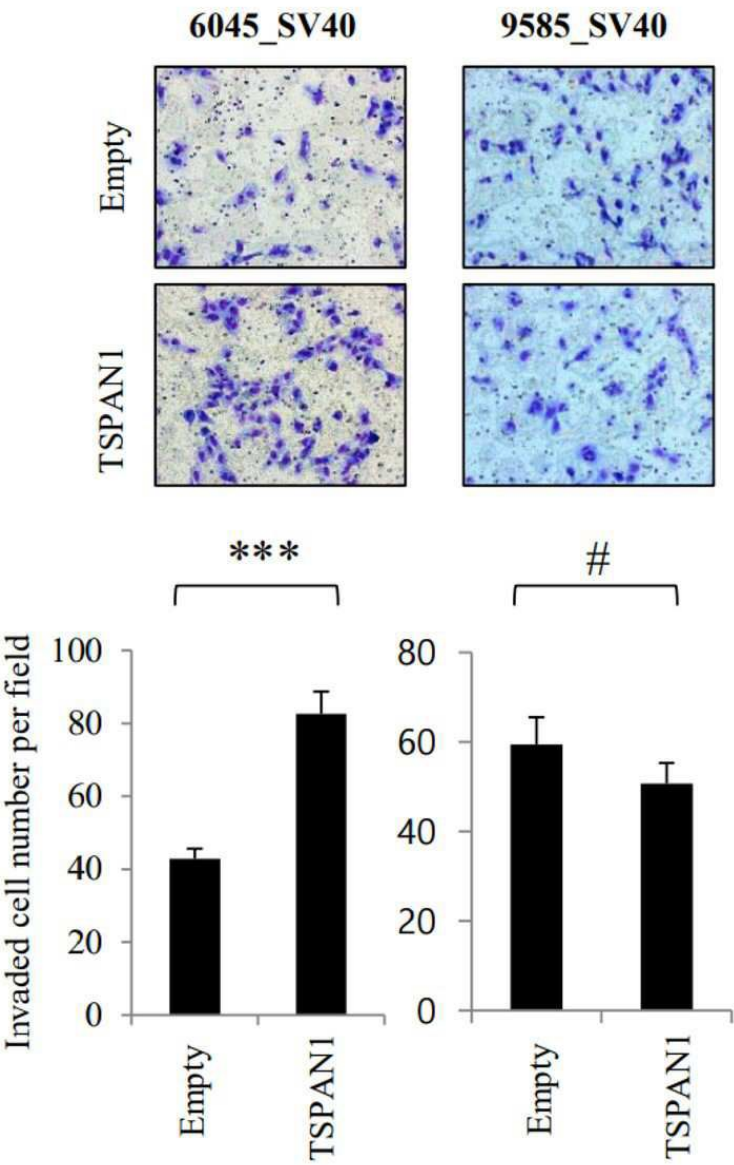
도면8a



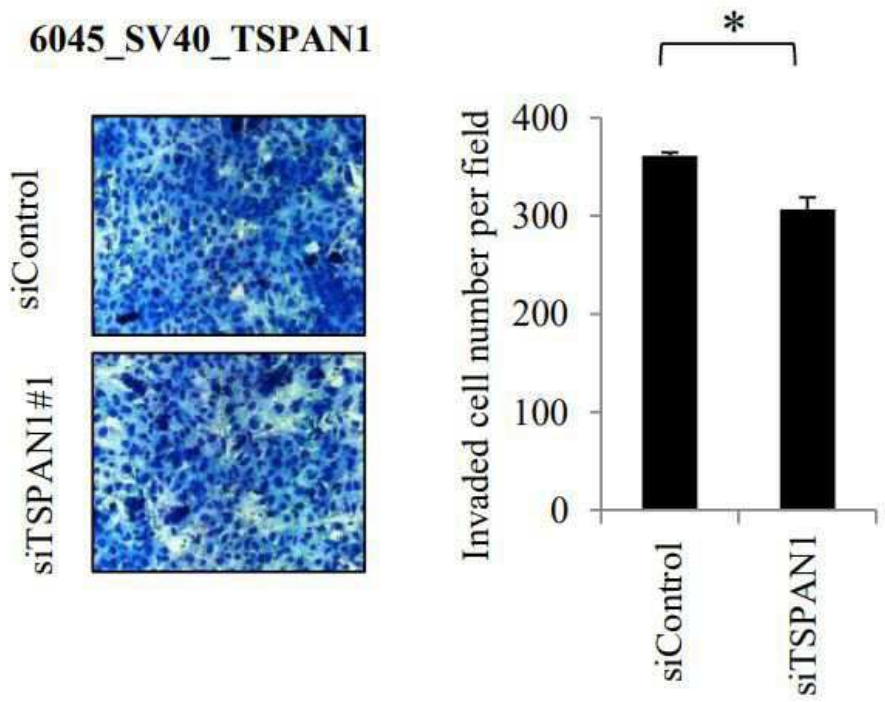
도면8b



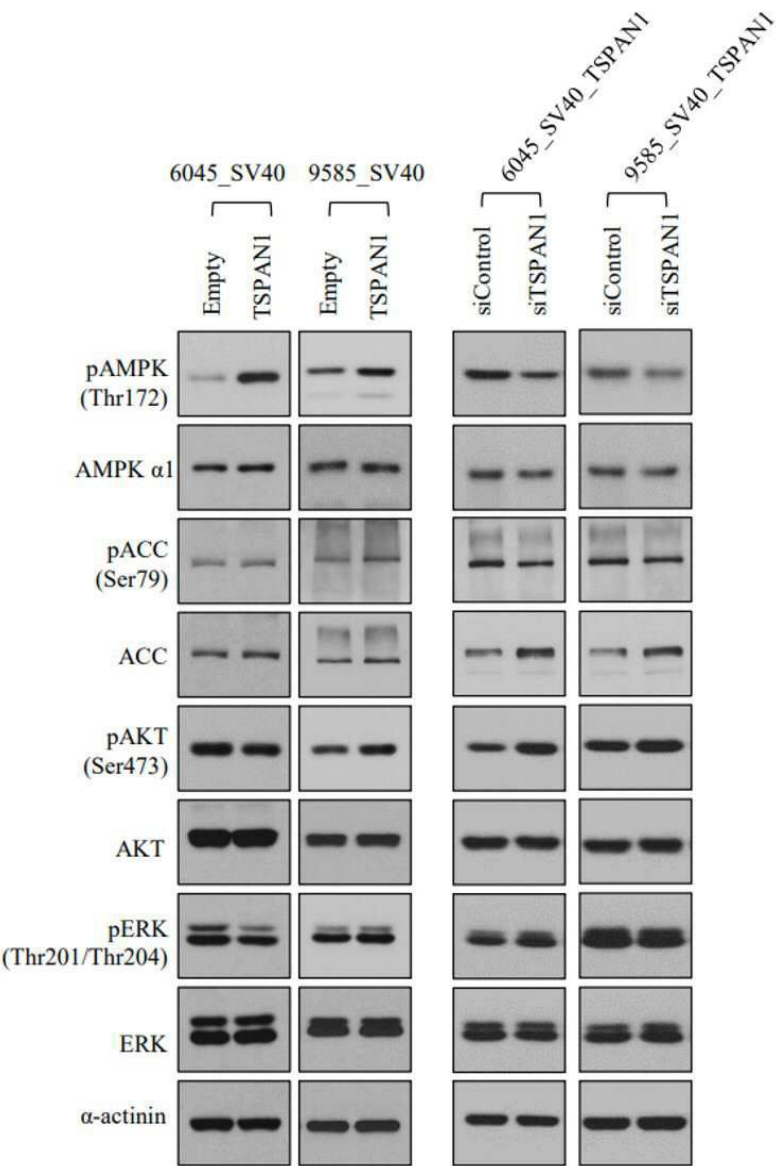
도면9a



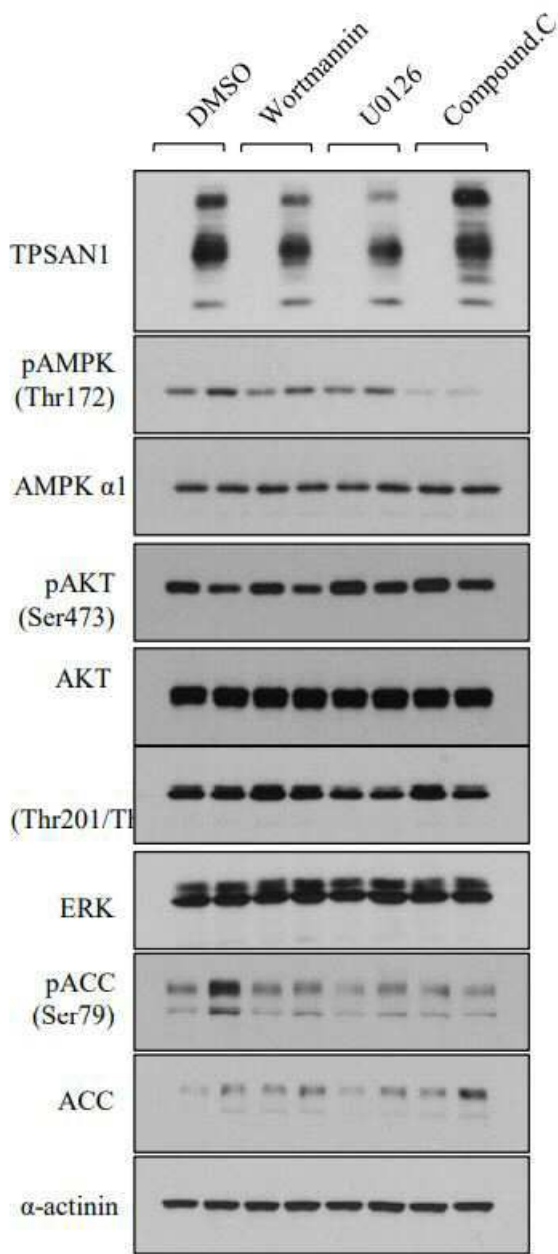
도면9b



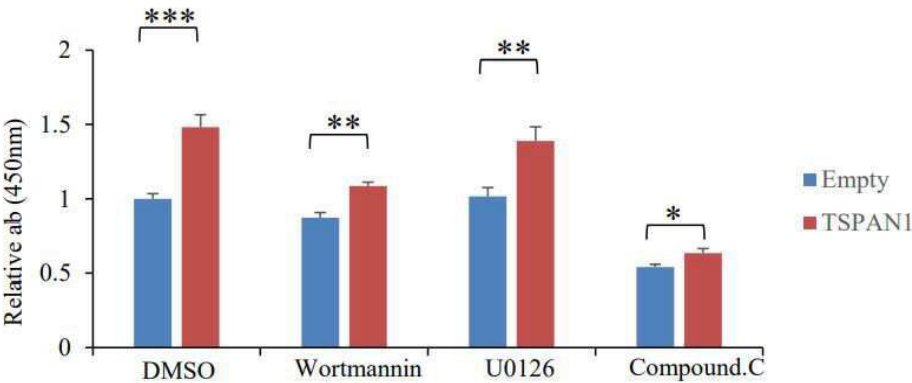
도면10



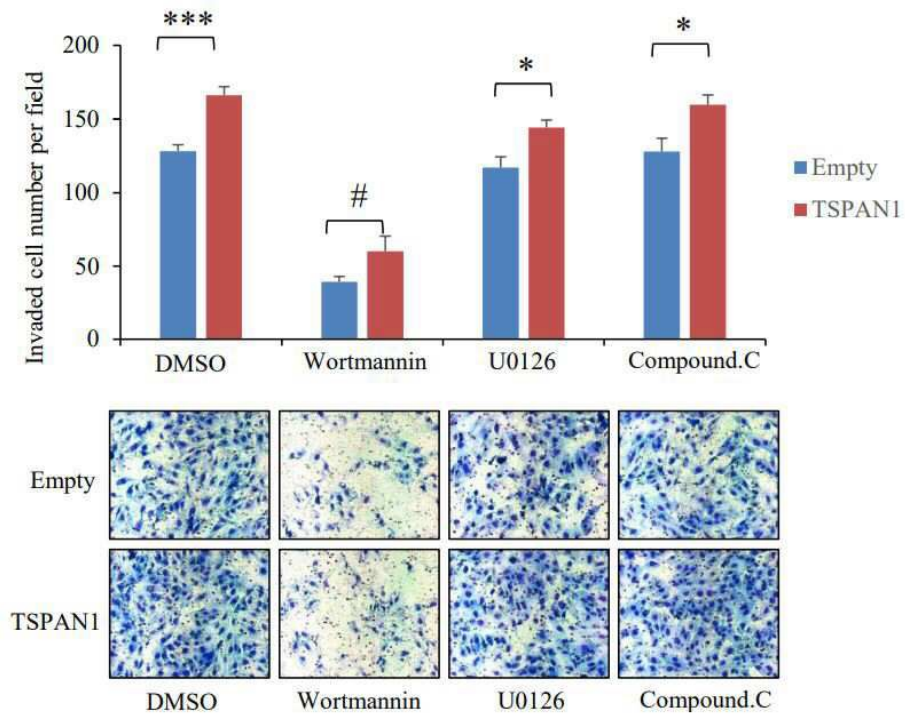
도면11a



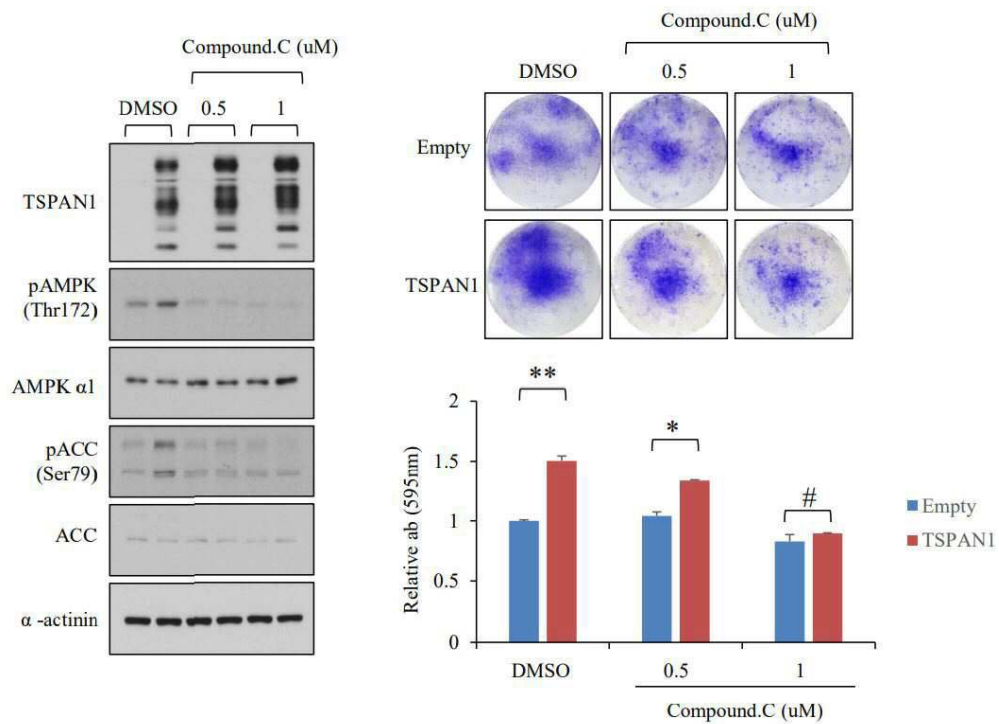
도면11b



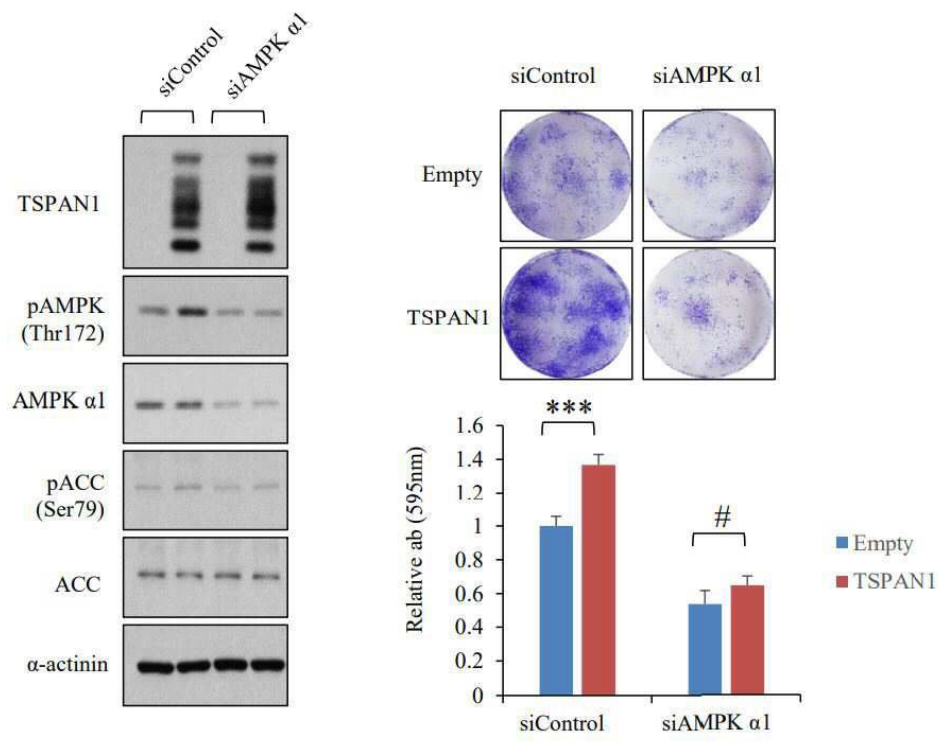
도면12



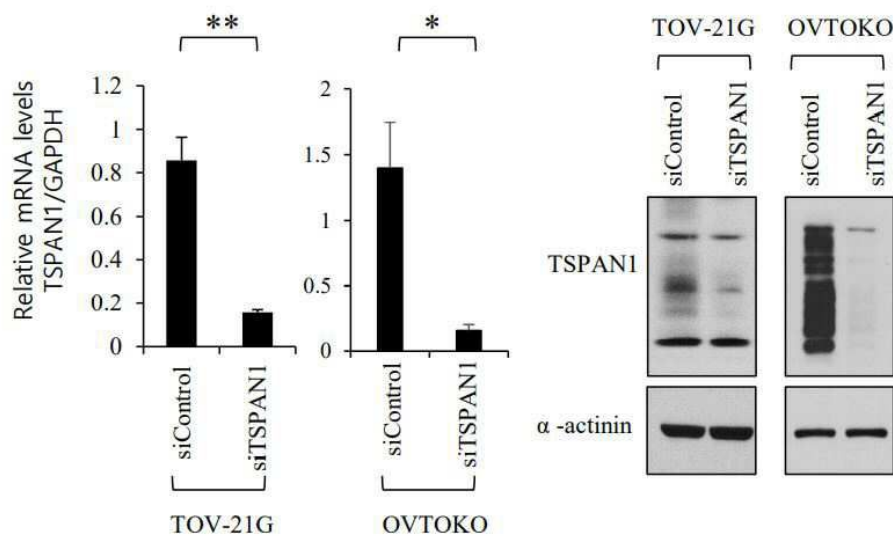
도면13



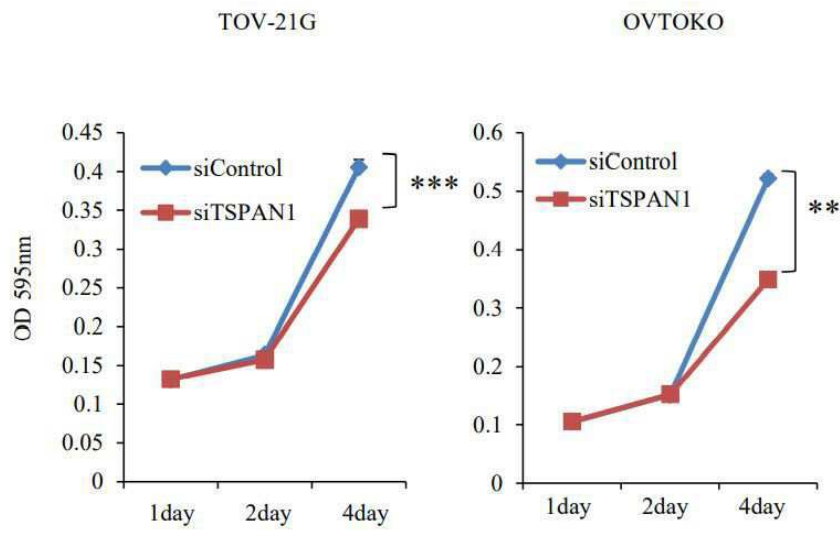
도면14



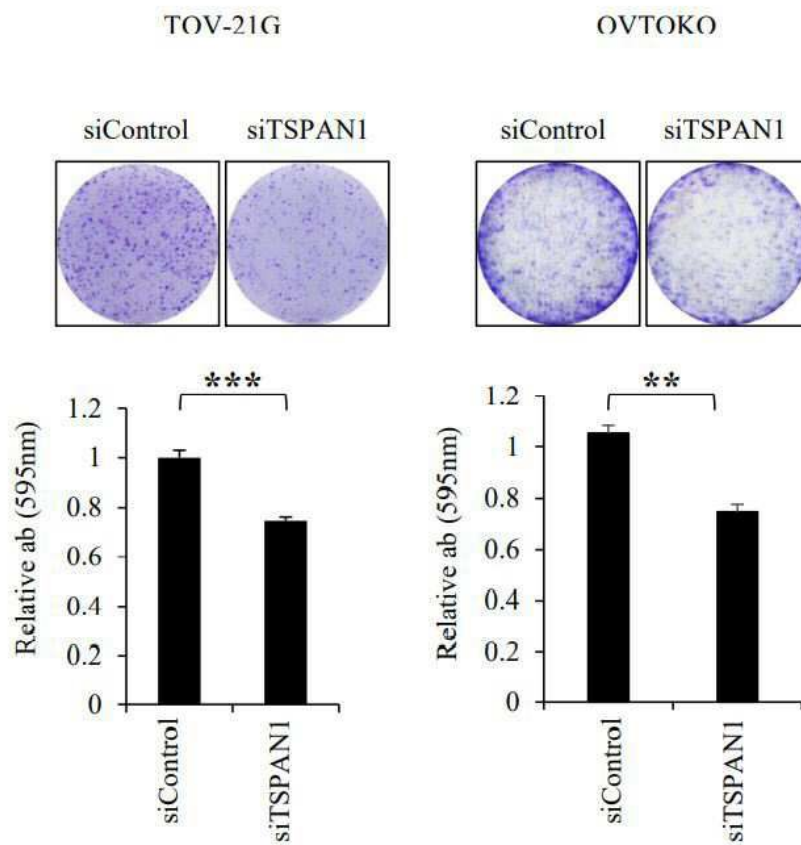
도면15a



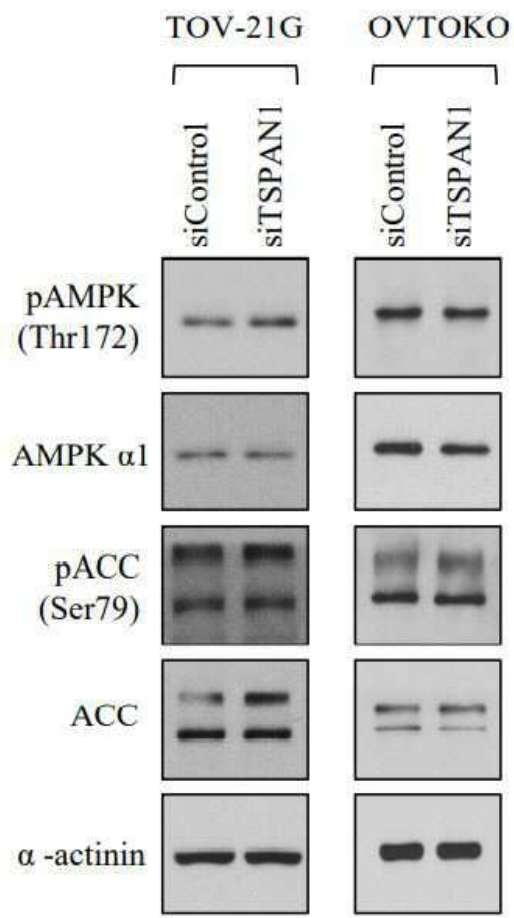
도면15b



도면15c



도면16



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A composition for diagnosing high-risk endometriosis
- <130> PDPB204064
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 241
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Gln Cys Phe Ser Phe Ile Lys Thr Met Met Ile Leu Phe Asn Leu

1 5 10 15

Leu Ile Phe Leu Cys Gly Ala Ala Leu Leu Ala Val Gly Ile Trp Val

	20				25				30						
Ser	Ile	Asp	Gly	Ala	Ser	Phe	Leu	Lys	Ile	Phe	Gly	Pro	Leu	Ser	Ser
35				40				45							
Ser	Ala	Met	Gln	Phe	Val	Asn	Val	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ile	Ala	Ala	Gly
50				55				60							
Val	Val	Val	Phe	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Cys	Tyr	Gly	Ala	Lys	Thr
65				70				75				80			
Glu	Ser	Lys	Cys	Ala	Leu	Val	Thr	Phe	Phe	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile
85				90				95							
Phe	Ile	Ala	Glu	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Val	Tyr	Thr	Thr
100				105				110							
Met	Ala	Glu	His	Phe	Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Val	Pro	Ala	Ile	Lys	Lys
115				120				125							
Asp	Tyr	Gly	Ser	Gln	Glu	Asp	Phe	Thr	Gln	Val	Trp	Asn	Thr	Thr	Met
130				135				140							
Lys	Gly	Leu	Lys	Cys	Cys	Gly	Phe	Thr	Asn	Tyr	Thr	Asp	Phe	Glu	Asp
145				150				155				160			
Ser	Pro	Tyr	Phe	Lys	Glu	Asn	Ser	Ala	Phe	Pro	Pro	Phe	Cys	Cys	Asn
165				170				175							
Asp	Asn	Val	Thr	Asn	Thr	Ala	Asn	Glu	Thr	Cys	Thr	Lys	Gln	Lys	Ala
180				185				190							
His	Asp	Gln	Lys	Val	Glu	Gly	Cys	Phe	Asn	Gln	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ile
195				200				205							
Arg	Thr	Asn	Ala	Val	Thr	Val	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly
210				215				220							
Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Met	Ile	Val	Ser	Met	Tyr	Leu	Tyr	Cys	Asn	Leu
225				230				235				240			
Gln															

 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 1619

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

agacacacac accagcagct acacctacac gctgaccatc acaggcacac agaggcacat	60
ccacctcaca tccacctcat acttgtgtac tctcagggtt cagtctttca tcctatccct	120
ctctgatctg tgcctcccaa taccttccaa gatgtttaca gagacccttc tccctgtgca	180
gttaggagtg taaggcaaga gagcccctac ttcattggggc agatcaagag ctgagaccaa	240
agatgggtcta tgttctgtac cttgtcctgt cctcctctgt tcttaacta tgatccctgc	300
tgcggtcact gaagccttcc cctgtgagca gtgggtgtgtg agagccaggc gtcctctctg	360
ctgcccactc agtggcaaca cccgggagct gttttgtcct ttgtggagcc tcagcagttc	420
cctctttcag aactcactgc caagagccct gaacaggagc caccatgcag tgcctcagct	480
tcattaagac catgatgac ctttcaatt tgcctatctt tctgtgtggt gcagccctgt	540
tggcagtggg catctgggtg tcaatcgatg gggcatcctt tctgaagatc ttcgggccac	600
tgtcttcag tgccatgcag ttgtcaacg tgggtactt cctcatcgca gccggcgttg	660
tggctcttgc tcttggtttc ctgggtctgt atggtgctaa gactgagagc aagtgtgccc	720
tcgtgacgtt cttcttcac ctcctcctca tcttcattgc tgaggttgca gctgctgtgg	780
tcgccttggg gtacaccaca atggctgagc acttctgac gttgctggta gtgcctgcca	840
tcaagaaaga ttatggttcc caggaagact tcaactaagt gtggaacacc accatgaaag	900
ggctcaagtg ctgtggcttc accaactata cggattttga ggactcaccc tacttcaaag	960
agaacagtgc ctttcccca ttctgttgca atgacaacgt caccaacaca gccaatgaaa	1020
cctgcaccaa gcaaaggct cagacacaaa aagtagaggg ttgcttcaat cagcttttgt	1080
atgacatccg aactaatgca gtcaccgtgg gtgggtgtggc agctggaatt gggggcctcg	1140
agctggctgc catgattgtg tccatgtatc tgtactgcaa tctacaataa gtccacttct	1200
gcctctgcca ctactgtgc cacatgggaa ctgtgaagag gcaccctggc aagcagcagt	1260
gattggggga ggggacagga tctaacaatg tcacttgggc cagaatggac ctgccttttc	1320
tgtccagac ttggggctag atagggacca ctcttttag gcgatgcctg actttccttc	1380
cattgggtggg tggatgggtg gggggcattc cagagcctct aaggtagcca gttctgttgc	1440
ccattccccc agtctattaa acccttgata tgccccctag gcctagtggg gatcccagtg	1500
ctctactggg ggatgagaga aaggcatttt atagcctggg cataagtga atcagcagag	1560
cctctgggtg gatgtgtaga aggcacttca aaatgcataa acctgttaca atgttgcca	1619

<210> 3

<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TSPAN1 siRNA sense	
<400>	3	
	gcuucaccaa cuauacgga	19
<210>	4	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TSPAN1 siRNA antisense	
<400>	4	
	uccguauacu uggugaagc	19