

명세서

발명의 명칭: 난소암의 진단용 신규 바이오마커

기술분야

- [1] 본 발명은 난소암에서 특이적으로 조절되는 인자의 발현량을 측정하여 발병 여부를 예측하거나, 해당 인자의 발현을 조절함으로써 난소암을 예방 또는 치료하는 법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 난소암(ovarian cancer, OC)은 가장 치명적인 부인과 암이며 전 세계 여성의 전체 암 관련 사망의 5%를 차지한다. 난소암은 난소암에 특이적인 증상이 없고, 효과적인 선별 도구(screening tools)가 부재하기 때문에, 대부분의 OC환자들은 5년 생존율이 30% 미만에 불과한 상당히 병기가 진행된 단계에서 진단된다. 하지만, 초기 단계에서 난소암을 진단할 수 있다면, 이러한 5년 생존율은 최대 90%까지 향상시킬 수 있다.
- [4] 고등급 장액성 난소암(High-grade Serous Ovarian Cancer, HGSOC)은 모든 OC 케이스들 중에서 70%를 차지하는 가장 흔한 조직학적 유형이다. 이러한 HGSOC는 난소암의 유형 중 가장 공격적인 유형이며, 빠르게 종양이 자라나는 특성 상 흔히 상당히 병기가 진행된 상태에서 진단된다. 특히, HGSOC 환자의 전체 생존율은 수십 년 동안 거의 개선되지 않았으며, 이에 따라 HGSOC를 조기에 높은 정확도로 진단하는 것에 대한 임상학적 요구가 매우 큰 상황이다. 그러나, 현재 높은 감도 및 특이도로 HGSOC를 정확하게 진단하는데 사용될 수 있는 신뢰도가 높은 바이오 마커는 발굴되지 않고 있는 실정이다.
- [5] 한편, 혈액은 액체 생검(Liquid Biopsy)의 최소 침습적 특성으로 인해 광범위한 암 바이오마커 연구의 초점이 되어 왔다. 이전 연구들에서는 microRNA에서 엑소좀, 단백질에 이르는 OC에 대한 잠재적인 혈액 바이오마커들이 확인된 바 있다. 혈액 내 암 항원(Cancer Antigen)인 CA-125 및 인간 부고환 단백질(Human Epididymis Protein-4, HE4)의 측정은 현재 OC 검출(진단) 및 모니터링의 골드 스탠다드로써 활용되고 있다. 그러나, 이러한 바이오마커들은 현재 임상환경에서 널리 사용되고 있음에도 불구하고, 낮은 민감도 및 낮은 특이성으로 인하여 OC환자의 사망률을 줄이는 데 제한적인 면이 존재한다. 이러한 점으로 인하여 OC환자에게 있어서 진단 방법의 옵션이 상당히 제한되어 있으므로, 새로운 OC 진단용 바이오마커에 대한 추가적인 발굴이 절실한 상황이다.
- [6] 프로테오믹스 전체 분석(Proteome-wide Analysis)은 이전에 식별된 바가 없는 새로운 바이오마커를 발견하고 우선 순위를 지정하는데 유용하게 사용 가능한 방법이다. 질량 분석법(Mass Spectrometry, MS)은 인간 단백질체의 비-편향적인

프로파일링을 제공할 수 있기 때문에 단백질체학에서 포괄적인 연구에 효율적으로 사용된다. 최근에는 데이터 비의존성 획득 분석법(Data Independent Acquisition, DIA)을 기반으로 한 MS 분석법이 차세대 단백질체학의 분석 방법론으로 부상하고 있다. DIA는 질량 대 전하 값(m/z)의 전체 범위에 걸쳐 있는 큰 격리 창(large isolation window)의 모든 전구체 이온의 단편화를 기반으로 하는데, 이는 종래 기술인 데이터 의존성 획득 분석법(Data-dependent Acquisition, DDA)보다 향상된 감도, 재현성 및 분획 요구의 최소화 등의 장점을 가진다.

[7] 이에, 본 발명자들은 난소암에 대한 효율적인 진단용 바이오마커를 발굴하기 위하여 DIA 기반 질량 분석을 이용하여 혈청 단백질을 분석하였으며, 이를 통하여 난소암을 조기에 높은 정확도로 진단할 수 있는 혈액 내의 난소암-특이적인 바이오마커를 발굴하고, 그 효과를 확인하고자 하였다.

[8] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명자들은 부인과 암 중 예후가 가장 불량하면서도 조기진단 방법이 부재하여 환자의 생존율이 낮은 난소암에 대한 효율적인 진단용 바이오마커를 발굴하여, 궁극적으로는 난소암, 특히 고등급 장액성 난소암으로 인한 사망률을 현저히 낮출 수 있는 새로운 진단 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 난소암 환자에서 특이적으로 상향 또는 하향 조절되는 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자들을 발굴하였고, 이들 마커의 발현 수준을 측정함으로써 난소암을 조기에 높은 정확도로 진단할 수 있을 뿐만 아니라 혈액을 이용한 질량분석 진단방법에도 적용될 수 있는 신뢰도 높은 마커임을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[11] 따라서 본 발명의 목적은 난소암의 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 난소암의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데 있다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 난소암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 난소암의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[15] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[16]

과제 해결 수단

- [17] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 *FGA*, *VWF*, *ARHGDIB* 및 *SERPINF2*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 난소암(Ovarian Cancer)의 진단용 조성물을 제공한다.
- [18] 본 발명자들은 부인과 암 중 예후가 가장 불량하면서도 조기진단 방법이 부재하여 환자의 생존율이 낮은 난소암에 대한 효율적인 진단용 바이오마커를 발굴하여, 궁극적으로는 난소암, 특히 고등급 장액성 난소암으로 인한 사망률을 현저히 낮출 수 있는 새로운 진단 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 난소암 환자에서 특이적으로 상향 또는 하향 조절되는 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자들을 발굴하였고, 이들 마커의 발현 수준을 측정함으로써 난소암을 조기에 높은 정확도로 진단할 수 있을 뿐만 아니라 혈액을 이용한 질량분석 진단방법에도 적용될 수 있는 신뢰도 높은 마커임을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [19] 본 명세서에서 용어“*FGA*”는 인간에서 피브리노겐 알파 체인(Fibrinogen alpha chain) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 피브리노겐 알파 체인 단백질은 FIBA라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(Synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [20] 본 명세서에서 용어“*VWF*”는 인간에서 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand Factor) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 폰 빌레브란트 인자 단백질은 VWF라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(Synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [21] 본 명세서에서 용어“*ARHGDIB*”는 인간에서 로 GDP-해리 억제 인자 2(Rho GDP-dissociation inhibitor 2) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 로 GDP-해리 억제 인자 2 단백질은 RhoGD12라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(Synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [22] 본 명세서에서 용어“*SERPINF2*”는 인간에서 알파 2-안티플라스민(Alpha 2-antiplasmin) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 알파 2-안티플라스민 단백질은 A2AP라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [23] 본 명세서에서 사용되는 모든 유전자들은 각각 독립적으로 또는 2개 이상의 조합으로써 난소암의 진단을 위한 바이오마커로 사용될 수 있으며, 조합으로써 사용되는 경우 해당 유전자들의 세트는“바이오마커 패널”일 수 있다.

- [24] 본 명세서에서 용어“바이오마커 패널”은 “바이오마커 검출 패널”이라고도 지칭될 수 있으며, 검출; 진단; 예후의 판단; 병기의 진단; 또는 질환 또는 상태의 모니터링에 사용될 수 있는 2개 이상의 바이오마커 세트를 의미한다. 이러한 바이오마커 세트의 바이오마커 구성들은 함께 패키징되거나 가역적 또는 비가역적으로 고체 서포트(solid support)에 결합함으로써 물리적으로 연관되어 있을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 바이오마커 패널은 키트(kit)의 일부로 함께 판매 또는 배송되는 별도의 튜브를 통하여 제공될 수 있거나; 칩(chip), 막(membrane), 스트립(strip), 필터(filter), 비드(bead), 입자(particle), 필라먼트(filament), 섬유(fiber), 겔(gel) 또는 매트릭스의 표면 또는 내부, 멀티 웰 플레이트(multi-well plates)의 웰 또는 기타 지지체에 결합되어 제공될 수 있으나, 위의 예시에 제한되지 않고 바이오마커의 조합으로서 질환의 진단에 사용될 수 있는 모든 종류의 바이오마커 패널을 포함한다.
- [25] 본 명세서에서 용어“진단”은 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는 지 여부의 판정, 및 특정 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다.
- [26] 본 명세서에서 용어“진단용 조성물”은 대상체 내 난소암의 발병 여부를 판단 하거나 발병 가능성을 예측하기 위해 *FGA*, *VWF*, *ARHGDI*B 및 *SERPINF2*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량 측정 수단을 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에“진단용 키트”로 표현될 수도 있다.
- [27] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 마커로 사용되는 유전자의 발현량을 측정하는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이다.
- [28] 본 명세서에서, 용어“핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [29] 본 명세서에서 사용되는 용어“프라이머”는 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [30] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일

수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.

- [31] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산, 예를 들어 본 발명에서 마커로 사용되는 유전자들의 특정 염기서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어“상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우를 모두 포괄하는 의미이며, 구체적으로는 완전히 상보적인 경우를 의미한다. 본 명세서에서 용어“실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [32] 프라이머는, 중합체의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, pH 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 이러한 프라이머의 설계는 타겟 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [33] 본 명세서에서 용어“프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 더욱 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 본 발명에서 마커로 사용되는 유전자들의 특정 염기서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 타겟 서열의 3'-말단 또는 5'-말단에 상보적인 프로브를 사용하는 것이 바람직하다.
- [34] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다.
- [35] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 마커로 사용되는 유전자들이 인코딩하는 단백질을 측정하는 제제는 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 해당 단백질에 특이적으로

결합하는 앵타머이다.

- [36] 본 발명에 따르면, 본 발명에서 마커로 사용되는 유전자들이 인코딩하는 단백질을 항원-항체 반응을 이용한 면역분석(immunoassay) 방법에 따라 검출하여 난소암의 발병 여부를 분석하는 데 이용할 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석 또는 면역염색 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.
- [37] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 표지된 항체가 이용될 수 있다. 본 발명에서 마커로 사용되는 단백질들을 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [38] 본 발명의 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; 및 Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984에 상세하게 기재되어 있다.
- [39] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 강도를 분석함으로써, 난소암의 발병 여부 또는 발병 가능성을 예측할 수 있다. 즉, 개체의 시료에서 상술한 단백질에 대한 시그널이 정상 시료보다 강하게 나오는 경우에는 개체에서 난소암이 발병하였거나 향후 발병할 가능성이 높은 것으로 판단된다.
- [40] 본 명세서에서 용어“항원 결합 단편(antigen binding fragment)”은 면역글로불린 전체 구조 중 항원이 결합할 수 있는 폴리펩티드의 일부를 의미하며, 예를 들어 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [41] 본 명세서에서 용어“특이적으로 결합(specifically binding)”은 “특이적으로 인식(specifically recognizing)”과 동일한 의미로서, 항원과 항체(또는 이의 단편)가 면역학적 반응을 통해 특이적으로 상호작용하는 것을 의미한다.
- [42] 본 발명은 항체 대신 상술한 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용할 수도 있다. 본 명세서에서 용어“앵타머”는 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자를 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [43] 본 발명에서 난소암의 진단에 사용되는 마커들은 전체 서열을 가지는 단백질로서 난소암 진단의 타겟이 될 수 있을 뿐만 아니라, 본 명세서의 표 2 또는 서열 번호 1 내지 21에 기재된 각 단백질들의 일부 절편만으로도 난소암

진단의 타겟이 될 수 있으며, 이 경우 질량 분석 외에도 상술한 단백질의 측정 방법을 포함한 모든 종류의 단백질 또는 펩타이드 절편의 검출방법이 이용될 수 있다.

[44]

[45] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 전술한 진단용 조성물은 *S100A9*, *VCL*, *THBS1*, *MPO*, *IGFBP2*, *SRGN*, *PF4*, *GP1BA*, *LRG1*, *PRG4*, *LBP*, *PPBP*, *C3*, *FCGBP*, *CD14*, *APOA1* 및 *APOA4*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 추가적으로 포함한다.

[46]

본 명세서에서 용어“*S100A9*”는 인간에서 칼슘-결합 단백질 A9 (Calcium-binding protein A9) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 칼슘-결합 단백질 A9 단백질은 *S100A9*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.

[47]

본 명세서에서 용어“*VCL*”은 인간에서 빈쿨린(Vinculin) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 빈쿨린 단백질은 *VCL*이라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.

[48]

본 명세서에서 용어“*THBS1*”은 인간에서 트롬보스폰딘 1(Thrombospondin 1) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 트롬보스폰딘 1 단백질은 *TSP1*이라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.

[49]

본 명세서에서 용어“*MPO*”는 인간에서 골수세포형과산화효소(Myeloperoxidase) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 골수세포형과산화효소 단백질은 *MPO*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.

[50]

본 명세서에서 용어“*IGFBP2*”는 인간에서 인슐린유사성장인자-결합 단백질2(Insulin-like growth factor-binding protein 2)을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 인슐린유사성장인자-결합 단백질 2은 *IBP2*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.

[51]

본 명세서에서 용어“*SRGN*”은 인간에서 세르글리신(Serglycin) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 세르글리신 단백질은 *SRGN*이라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.

[52]

본 명세서에서 용어“*PF4*”은 인간에서 혈소판 인자 4(Platelet factor 4) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 혈소판 인자 4 단백질은 *PF4*라고 지칭될

수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.

- [53] 본 명세서에서 용어“*GP1BA*”는 인간에서 혈소판 당단백 Ib 알파 사슬(Platelet glycoprotein Ib alpha chain) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 혈소판 당단백 Ib 알파 사슬 단백질은 *GP1BA*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [54] 본 명세서에서 용어“*LRG1*”은 인간에서 류신-풍부 알파-2-당단백질 1(Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 류신-풍부 알파-2-당단백질 1 단백질은 *LRG1*이라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [55] 본 명세서에서 용어“*PRG4*”는 인간에서 프로테오글리칸 4(Proteoglycan 4) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 프로테오글리칸 4 단백질은 *PRG4*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [56] 본 명세서에서 용어“*LBP*”는 인간에서 지질다당류결합단백질 (Lipopolysaccharide binding protein) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 지질다당류결합단백질은 *LBP*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [57] 본 명세서에서 용어“*PPBP*”는 인간에서 전-혈소판 염기성 단백질(Pro-Platelet basic protein)을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 전-혈소판 염기성 단백질은 *PPBP*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [58] 본 명세서에서 용어“*C3*”는 인간에서 보체 성분 3(Complement component 3) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 보체 성분 3 단백질은 *C3*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [59] 본 명세서에서 용어“*FCGBP*”는 인간에서 IgGFc-결합 단백질(IgGFc-binding protein)을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 IgGFc-결합 단백질은 *FCGBP*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [60] 본 명세서에서 용어“*CD14*”는 인간에서 분화 클러스터 14(Cluster of differentiation 14) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 분화 클러스터 14 단백질은 *CD14*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로

지칭될 수 있다.

- [61] 본 명세서에서 용어“*APOA1*”는 인간에서 아포지질단백질 A1(Apolipoprotein A1) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 아포지질단백질 A1 단백질은 *APOA1*이라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [62] 본 명세서에서 용어“*APOA4*”는 인간에서 아포지질단백질 A4(Apolipoprotein A4) 단백질을 인코딩하는 유전자의 명칭이다. 전술한 아포지질단백질 A4 단백질은 *APOA4*라고 지칭될 수도 있으나, 이에 제한되지 않고 해당 단백질의 호칭으로서 통용되는 모든 가명(alises) 또는 동의어(synonyms)로 지칭될 수 있다.
- [63]
- [64] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 난소암을 가진 개체에서 상기 *FGA*, *VWF* 또는 *ARHGDIB* 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량은 증가되고, 상기 *SERPINF2* 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량은 감소된다.
- [65] 본 발명의 구성 중“난소암의 진단용 조성물”을 언급하면서 사용되는 용어“발현량은 증가”는 대조군 또는 정상군에 비해 해당 유전자 또는 해당 유전자에 의하여 인코딩되는 단백질의 발현량이 유의하게 높은 경우를 의미하며, 구체적으로는 발현량이 상기 대조군 또는 정상군과 비교하여 약 10% 이상 증가, 약 20% 이상 증가, 약 30% 이상 증가, 약 40% 이상 증가, 약 50% 이상 증가, 또는 약 60% 이상 증가한 경우를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [66] 본 발명의 구성 중“난소암의 진단용 조성물”을 언급하면서 사용되는 용어“발현량은 감소”는 대조군 또는 정상군에 비해 해당 유전자 또는 해당 유전자에 의하여 인코딩되는 단백질의 발현량이 유의하게 낮은 경우를 의미하며, 구체적으로는 발현량이 상기 대조군 또는 정상군과 비교하여 약 10% 이상 감소, 약 20% 이상 감소, 약 30% 이상 감소, 약 40% 이상 감소, 약 50% 이상 감소, 또는 약 60% 이상 감소한 경우를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [67]
- [68] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 난소암을 가진 개체에서 상기 *SI00A9*, *VCL*, *THBS1*, *MPO*, *IGFBP2*, *SRGN*, *PF4*, *GP1BA*, *LRG1*, *PRG4*, *LBP*, *PPBP*, *C3*, *FCGBP* 또는 *CD14* 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량은 증가되고, 상기 *APOA1* 또는 *APOA4* 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량은 감소된다.
- [69] 본 발명에서 사용된 유전자, 이들이 인코딩하는 단백질 및 본 발명의 용어 “발현량은 증가”와 “발현량은 감소”에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 방지하기 위해 그 기재를 생략한다.

[70]

[71] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 진단될 수 있는 난소암은 고등급 장액성 난소암(High-grade serous ovarian cancer, HGSOC)이다.

[72] 본 명세서에서 용어“고등급 장액성 난소암(High-grade serous ovarian cancer, HGSOC)”은 난소암의 여러 아형(subtype) 중 하나로써, 투명세포(clear cell) 및 자궁내막양(endometrioid) 아형과 함께 3개의 주요 난소암의 아형을 구성한다. HGSOC는 난소암의 가장 악성 형태이며 모든 난소암 사례의 최대 70%를 차지하는 아형으로, 나팔관에서 기원하기 때문에 질병 경과 초기에 복부를 통해 퍼지며, 증상이 나타나는 시기에는 보통 심각한 병기의 중양인 경우가 많아서 예후가 좋지 않은 것으로 알려져 있다.

[73]

[74] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료 내의 *FGA*, *VWF*, *ARHGDIB* 및 *SERPINF2* 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 난소암의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[75] 본 발명자들은 난소암, 특히 고등급 장액성 난소암 환자에게서 *FGA*, *VWF*, *S100A9*, *VCL*, *THBS1*, *MPO*, *IGFBP2*, *SRGN*, *PF4*, *GP1BA*, *LRG1*, *ARHGDIB*, *PRG4*, *LBP*, *PPBP*, *C3*, *FCGBP* 및 *CD14* 단백질 또는 이들을 인코딩하는 유전자의 발현량과 난소암의 발병 가능성이 양의 상관관계를 가지고, *APOA1*, *APOA4* 및 *SERPINF2* 단백질 또는 이들을 인코딩하는 유전자의 발현량과 난소암의 발병 가능성이 음의 상관관계를 가짐을 최초로 규명하였다. 이에, 개체 내 또는 개체로부터 분리된 생물학적 시료내의 전술한 양의 상관관계를 가지는 단백질 또는 이들을 인코딩하는 유전자가 고발현되거나; 전술한 음의 상관관계를 가지는 단백질 또는 이들을 인코딩하는 유전자가 저발현되는 경우 상기 개체는 난소암이 발병한 개체거나 향후 발병할 가능성이 높은 개체로 판단한다.

[76] 본 명세서에서 용어“고발현”은 대조군 또는 정상군에 비해 해당 유전자 또는 해당 유전자에 의하여 인코딩되는 단백질의 발현량이 유의하게 높은 경우를 의미하며, 구체적으로는 발현량이 상기 대조군 또는 정상군과 비교하여 약 10% 이상 증가, 약 20% 이상 증가, 약 30% 이상 증가, 약 40% 이상 증가, 약 50% 이상 증가, 또는 약 60% 이상 증가한 경우를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

[77] 본 명세서에서 용어“저발현”은 대조군 또는 정상군에 비해 해당 유전자 또는 해당 유전자에 의하여 인코딩되는 단백질의 발현량이 유의하게 낮은 경우를 의미하며, 구체적으로는 발현량이 상기 대조군 또는 정상군과 비교하여 약 10% 이상 감소, 약 20% 이상 감소, 약 30% 이상 감소, 약 40% 이상 감소, 약 50% 이상 감소, 또는 약 60% 이상 감소한 경우를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

- [78] 본 명세서에서 용어“개체”는 본 발명의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하기 위한 시료를 제공하고, 궁극적으로 난소암의 발병 여부의 분석 대상이 되는 개체를 의미한다. 개체는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함하며, 구체적으로는 인간이다. 본 발명의 조성물은 현재 난소암의 발병 여부뿐 아니라 향후 난소암이 발병할 유전적 위험성을 예측하기 위한 정보도 제공하기 때문에, 본 발명의 개체는 난소암 환자일 수도 있고, 아직 난소암이 발병하지 않은 건강한 개체일 수도 있다.
- [79]
- [80] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 발현량을 측정하는 단계는 질량 분석(Mass Spectrometry, MS)에 의해 수행된다.
- [81] 본 명세서에서 용어“질량 분석”은“질량 분석법”으로도 호칭될 수 있으며, 미지의 화합물을 그들의 질량으로 분석하는 방법을 의미한다. 질량 분석은 질량 대 전하비(mass-to-charge ratio)인 m/z 값을 이용하여 이온을 필터링, 탐지 및 측정하는 방식을 통하여 수행되며, 일반적으로 질량분석은 (1) 화합물을 이온화하여 하전 시키는 단계 (2) 하전된 화합물의 분자량을 측정하고 m/z 값을 계산하는 단계를 포함한다. 계산된 m/z 값은 기준으로 복잡한 혼합물에서 목표표 하는 화합물을 식별하고 정량하는 데 사용된다. 본 명세서의 질량 분석은 상기와 같은 원리를 이용하는 모든 종류의 질량 분석법을 통하여 실행될 수 있다.
- [82]
- [83] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 분석은 서열 번호 1, 2, 12 및 21로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 펩티드의 발현 수준을 측정한다.
- [84] 본 발명에서 난소암의 바이오마커로 사용된 단백질들에 대한 질량 분석은 구체적으로 하기의 서열번호 1 내지 21로 표시된 펩타이드 절편을 통한 다중 반응 모니터링(Multiple reaction monitoring, MRM) 또는 병렬 반응 모니터링(Parallel reaction monitoring, PRM)을 통하여 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [85] 서열번호 1 (FGA) : HPDEAAFFDTASTGK
- [86] 서열번호 2 (VWF) : HIVTFDGQNFK
- [87] 서열번호 3 (S100A9) : NIETIINTFHQYSVK
- [88] 서열번호 4 (VCL) : LLAVAATAPPDAPNR
- [89] 서열번호 5 (THBS1) : TIVTTLQDSIR
- [90] 서열번호 6 (MPO) : VVLEGGIDPILR
- [91] 서열번호 7 (IGFBP2) : LIQGAPTIR
- [92] 서열번호 8 (SRGN) : IQDLNR
- [93] 서열번호 9 (PF4) : TTSQVRPR
- [94] 서열번호 10 (GP1BA) : LLSLPLGALR
- [95] 서열번호 11 (LRG1) : DLLLPQPDLR

- [96] 서열번호 12 (ARHGDIB) : TLLGDGPVVTDPK
- [97] 서열번호 13 (PRG4) : DQYYNIDVPSR
- [98] 서열번호 14 (LBP) : ITLPDFTGDLR
- [99] 서열번호 15 (PPBP) : NIQSLEVIGK
- [100] 서열번호 16 (C3) : TGLQEVEVK
- [101] 서열번호 17 (FCGBP) : GNPAVSYYVR
- [102] 서열번호 18 (CD14) : FPAIQNLALR
- [103] 서열번호 19 (APOA1) : VQPYLDDFQK
- [104] 서열번호 20 (APOA4) : QLTPYAQR
- [105] 서열번호 21 (SERPINF2) : EDFLEQSEQLFGAK.
- [106]
- [107] 본 명세서에서 용어“다중 반응 모니터링”은 특정 분석물질을 선택적으로 분리하여 검출하고 정량하여 그 농도변화를 모니터링할 수 있는 분석기술로써, **MRM**은 생체 시료 중에 존재하는 미량의 바이오마커와 같은 물질을 정량적으로 정확하게 다중 측정할 수 있는 방법으로 제1 질량필터 (Q1)를 이용하여 이온화원에서 생성된 이온 단편들 중 어미이온을 선택적으로 충돌관으로 전달한다. 이어 충돌관에 도달한 어미이온은 내부 충돌기체와 충돌하여, 쪼개져 딸이온을 생성하여 제2질량 필터 (Q2)로 보내지고, 여기서 특징적인 이온만이 검출부로 전달된다. 이런 방식으로 목적하는 성분의 정보만을 검출할 수 있는 선택성 및 민감도가 높은 분석 방법이다. **MRM**은 작은 분자의 정량분석에 활용되어 특정 유전병을 진단하는데 쓰이고 있다. **MRM** 방법은 다수의 펩티드를 동시에 측정하기에 용이하며, 항체가 없이 정상인과 암환자 사이에서 단백질 진단 마커 후보들의 상대적 농도차를 확인할 수 있다는 장점이 있다. 또한 민감도와 선택성이 탁월하여 특히, 질량분석기를 이용한 프로테옴 분석에서 혈액 내에 있는 복잡한 단백질과 펩티드의 분석을 위해 **MRM** 분석방법이 도입되고 있다(Anderson L. et al., Mol CellProteomics, 5: 375-88, 2006; DeSouza, L. V. et al., Anal. Chem., 81: 3462-70, 2009).
- [108] 본 명세서에서 용어“병렬 반응 모니터링”은 **MRM**을 병렬적으로 적용한 것으로써, 한 번에 한 쌍의 어미이온/딸이온을 분석하는 **MRM**과 달리, 선택된 하나의 어미이온에서 생성되는 모든 딸이온을 동시에 분석하는 방법이다.
- [109]
- [110] 본 발명에서 난소암의 바이오마커로 사용된 단백질들에 대한 질량 분석은 구체적으로 데이터 비의존성 획득 분석법(Data-Independent Acquisition, DIA)을 통하여 이루어질 수 있다. 본 명세서에서 용어“데이터 비의존성 획득 분석법”은 특정 어미이온을 선택하는 과정 없이 선택한 범위의 m/z값에 속하는 모든 이온을 분석하는 방법이다.
- [111]
- [112] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 전술한 난소암의 진단에 필요한 정보를

제공하는 방법은 *S100A9*, *VCL*, *THBS1*, *MPO*, *IGFBP2*, *SRGN*, *PF4*, *GP1BA*, *LRG1*, *PRG4*, *LBP*, *PPBP*, *C3*, *FCGBP*, *CD14*, *APOA1* 및 *APOA4*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.

- [113] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 발현량을 측정하는 단계는 질량 분석(Mass Spectrometry, MS)에 의해 수행된다.
- [114] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 분석은 서열 번호 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 및 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 펩티드의 발현 수준을 측정한다.
- [115]
- [116] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 혈액이다.
- [117] 본 명세서에서 용어“혈액”은 “전혈(whole blood)”를 의미하며, 이러한 혈액은 혈장 및 혈청을 포함한다.
- [118] 본 명세서에서 사용된 용어“전혈(whole blood)”은 일반적으로 응고되지 않은 혈장과 세포 성분으로 구성된 혈액을 의미한다. 혈장은 전혈 부피의 약 50 내지 60%를 차지하며, 세포 성분(예를 들어, 적혈구, 백혈구 또는 혈소판)은 약 40 내지 50%를 차지할 수 있다.
- [119] 본 명세서에서 사용된 용어“혈장(plasma)”은 혈액의 액체 성분을 의미하며, 신체의 세포 및 기관에 양분을 공급하는데 있어서 운반 매체(transport medium)으로써 기능한다.
- [120] 본 명세서에서 사용된 용어“혈청(serum)”은 혈액으로부터 채취한 담황색 액체를 의미하는 단어로, 구체적으로는 혈액을 채취한 후 방치하게 되면 혈액의 유동성이 감소하면서 적색 응고체가 생기게 되는데, 해당 적색 응고체를 제거하는 경우 남은 담황색 체액 성분을 의미한다.
- [121] 본 발명에 따르면, 본 발명의 바이오마커들을 이용하여 난소암의 진단이 가능하고, 해당 진단은 혈액 등의 환자 유래 체액을 생물학적 시료로 하여 액체 생검(Liquid Biopsy)을 통하여 이루어질 수 있으며, 이러한 액체 생검법은 종래의 조직 생검 절차에 비하여 비-침습적이어서 환자의 고통을 최소화할 수 있다는 장점과 더불어 더욱 신속하게 암에 대한 정보를 얻을 수 있는 이점을 가진다.
- [122]
- [123] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 난소암은 고등급 장액성 난소암(High-grade serous ovarian cancer, HGSOC)이다.
- [124] 본 발명에서 난소암 또는 고등급 장액성 난소암의 의미에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 방지하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [125]
- [126] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 *FGA*, *VWF*, *S100A9*, *VCL*, *THBS1*, *MPO*, *IGFBP2*, *SRGN*, *PF4*, *GP1BA*, *LRG1*, *ARHGDIB*, *PRG4*, *LBP*, *PPBP*, *C3*, *FCGBP* 및 *CD14*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 대한 억제제;

또는 APOA1, APOA4, 및 SERPINF2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 대한 활성화제를 유효성분으로 포함하는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

- [127] 본 발명에서 사용된 유전자 및 이들이 인코딩하는 단백질에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 방지하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [128] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 난소암 환자에서 FGA, VWF 및 ARHGDIB 단백질 또는 이들을 인코딩하는 유전자들을 억제하거나, SERPINF2 단백질 또는 이들을 인코딩하는 유전자를 과발현 또는 활성화하는 경우 난소암의 발병을 억제할 수 있음을 실험적으로 증명하였다.
- [129] 본 명세서에서 용어“억제제”는 타겟 유전자, 구체적으로는 FGA, VWF 및 ARHGDIB 유전자들의 활성 또는 발현의 저하를 야기시키는 물질을 의미하며, 이에 의해 타겟 유전자의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, 타겟 유전자의 생물학적 기능이 유의하게 저하될 수 있을 정도로 활성 또는 발현을 저하시키는 물질을 의미한다.
- [130] 타겟 유전자의 억제제는 예를 들어 당업계에서 이미 그 서열이 공지된 상기 유전자의 발현을 유전자 수준에서 억제하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 타겟 유전자를 인식하는 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR 시스템과, 단백질 수준에서 억제하는 항체 또는 앵타머 뿐 아니라, 이들의 활성을 억제하는 화합물, 펩타이드 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 모든 유전자 및 단백질 수준의 억제수단이 사용될 수 있다.
- [131] 본 명세서에서 용어“shRNA(small hairpin RNA)”는 인 비/보 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열을 의미한다. 통상적으로 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성하며, 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 타겟 유전자의 발현억제가 유전되도록 한다.
- [132] 본 명세서에서 용어“siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이고, 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.
- [133] 본 명세서에서 용어“miRNA(microRNA)”는 세포내에서 발현되지 않는

올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 유전자의 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA분자를 의미한다.

- [134] 본 명세서에서 용어“리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 mRNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.
- [135] 본 명세서에서 용어“PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지면서 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성되며, 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization)를 통해 이중가닥을 형성하여 타겟 유전자의 발현을 조절한다.
- [136] 본 명세서에서 용어“안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로서 타겟 mRNA 내의 상보적 서열에 결합하여 이의 단백질로의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당솔포네이 등으로 변형될 수 있다.
- [137] 본 명세서에서 용어“gRNA(guideRNA)”는 타겟 유전자를 인식하여 핵산분해효소(nuclease)를 유도함으로써 인식된 분위를 특이적으로 절단하는 유전자 편집 시스템에 사용되는 RNA 분자를 의미한다. 이러한 유전자 편집 시스템에는 대표적으로 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템이 있다.
- [138] 본 발명에 따르면, 본 발명의 발현 억제제는 상기 유전자들이 코딩하는 단백질의 활성을 저해하는 특이적 항체일 수 있다. 목적 단백질을 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [139] 본 발명에서 이용될 수 있는 항체 또는 앵타머에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 방지하기 위해 그 기제를 생략한다.
- [140]
- [141] 본 명세서에서 용어“활성화제”는 타겟 유전자, 구체적으로는 SERPINF2 단백질의 발현량 또는 활성을 증진시키는 유효성분을 의미하며, 예를 들어 당업계에 이미 그 서열 및 구조가 공지된 단백질인 SERPINF2의 발현을 유전자 또는 단백질 수준에서 증진시키거나 고유의 생물학적 활성을 증진시키는

핵산분자, 펩타이드, 단백질, 화합물 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이에, “SERPINF2 단백질의 활성화제(activator)”는 “SERPINF2 단백질 작용제(agonist)”와 동일한 의미로 사용된다.

- [142] 본 명세서에서 용어“예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [143] 본 명세서에서 용어“치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 FGA, VWF 및 ARHGDIB 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현이 억제되거나; SERPINF2 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현이 활성화되면서 난소암세포의 생성이 저해되어 난소암으로 인한 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어“치료”또는“치료제”는“치료 보조”또는“치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [144]
- [145] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 난소암은 고등급 장액성 난소암(High-grade serous ovarian cancer, HGSOC)이다.
- [146] 본 발명에서 난소암 또는 고등급 장액성 난소암의 의미에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 방지하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [147]
- [148] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [149] (a) FGA, VWF, S100A9, VCL, THBS1, MPO, IGFBP2, SRGN, PF4, GP1BA, LRG1, ARHGDIB, PRG4, LBP, PPBP, C3, FCGBP, CD14, APOA1, APOA4, 및 SERPINF2로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질, 이들을 인코딩하는 유전자 또는 이들을 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- [150] (b) 상기 생물학적 시료 내 상기 단백질 또는 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계,
- [151] 상기 생물학적 시료 내 상기 FGA, VWF, S100A9, VCL, THBS1, MPO, IGFBP2, SRGN, PF4, GP1BA, LRG1, ARHGDIB, PRG4, LBP, PPBP, C3, FCGBP 또는 CD14의 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현량이 감소하거나 또는 상기 APOA1, APOA4, 또는 SERPINF2의 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현량이 증가하는 경우 난소암의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.
- [152] 본 발명에서 마커로 사용되는 난소암 발병 관련 유전자 또는 이들이

인코딩하는 단백질; 및 이들의 발현 조절을 통해 예방 또는 치료할 수 있는 난소암에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

- [153] 본 발명에서 용어“생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, 상술한 유전자를 발현하는 세포 또는 상술한 유전자가 발현되어 생성된 단백질을 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로는, 상기 생물학적 시료는 암조직, 암세포, 이의 배양액 또는 혈액일 수 있다.
- [154] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어“시험물질”은 본 발명의 유전자를 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 이들 유전자의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 상기 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다.
- [155]
- [156] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 난소암은 고등급 장액성 난소암(High-grade serous ovarian cancer, HGSOC)이다.
- [157] 본 발명에서 난소암 또는 고등급 장액성 난소암의 의미에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 방지하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [158]
- [159] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 *FGA*, *VWF*, *ARHGDIB* 및 *SERPINF2*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 난소암(Ovarian Cancer)의 진단용 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 난소암의 진단 방법을 제공한다.
- [160] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 진단방법에서 *S100A9*, *VCL*, *THBS1*, *MPO*, *IGFBP2*, *SRGN*, *PF4*, *GP1BA*, *LRG1*, *PRG4*, *LBP*, *PPBP*, *C3*, *FCGBP*, *CD14*, *APOA1* 및 *APOA4*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 추가적으로 포함하는 난소암의 진단 방법을 제공한다.
- [161]
- [162] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 *FGA*, *VWF*, *S100A9*, *VCL*, *THBS1*, *MPO*, *IGFBP2*, *SRGN*, *PF4*, *GP1BA*, *LRG1*, *ARHGDIB*, *PRG4*, *LBP*, *PPBP*, *C3*, *FCGBP* 및 *CD14*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 대한 억제제; 또는 *APOA1*, *APOA4*, 및 *SERPINF2*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 대한 활성화제를 유효성분으로 포함하는 난소암의 예방 또는 치료용

조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 난소암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [163] 본 발명에서 난소암의 진단, 예방 또는 치료에 이용될 수 있는 유전자, 상기 유전자가 암호화하는 단백질; 상기 유전자 및 단백질의 발현 억제제 또는 활성화제에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 이를 생략한다.

[164]

발명의 효과

- [165] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- [166] (a) 본 발명은 난소암의 발병에 관여하는 유전자 또는 단백질의 발현량을 측정함으로써 난소암을 진단하는 방법 및 이들의 발현 조절을 통하여 난소암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [167] (b) 본 발명은 난소암, 특히 고등급 장액성 난소암에 대한 유효한 바이오마커를 제공함으로써, 난소암의 발병을 조기에 높은 신뢰도로 예측할 수 있는 방법을 제공함과 동시에, 해당 인자들의 발현을 억제 또는 활성화함으로써 난소암의 효율적인 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[168]

도면의 간단한 설명

- [169] 도 1a는 포괄적인 혈청 프로테옴 프로파일링 실험(comprehensive serum proteome profiling experiments)에 이은 표적 MS 분석을 위한 실험 절차를 도식적으로 나타낸 그림이다.
- [170] 도 1b는 스펙트럼 라이브러리 생성을 위한 포괄적인 혈청 프로테옴 프로파일링으로 식별된 혈청 단백질의 단백질 농도 동적 범위를 나타낸 그래프로, 단백질 농도 추정치는 Human Protein Atlas(혈액 단백질)에서 얻었다.
- [171] 도 1c는 RNF213의 펩타이드(QCYLQQVK) 주석이 달린 MS/MS 스펙트럼을 도시한 그림이다.
- [172] 도 2a는 HGSOC 및 HC에서 LC-DIA-MS/MS로 식별된 펩타이드(상단) 및 단백질(하단)의 수를 도시한 그래프로써, 확인된 펩타이드 및 단백질의 총(Total) 및 평균수(Average number)가 표시되어 있다.
- [173] 도 2b는 HGSOC 및 HC 혈청 프로테옴의 PCA 분석 결과를 도시한 그림으로, 각 주성분에 의하여 설명되는 편차가 표시되어 있다.
- [174] 도 2c는 HGSOC 및 HC에서 DEProteins의 발현 히트맵으로써, 상향 및 하향 조절된 단백질의 수가 표시되어 있다.
- [175] 도 2d는 DEProteins에 의해 강화된 경로를 도시한 그림으로, 점 플롯(dot plot)은 DEProteins에 의해 강화된 경로의 중요성을 $\log_{10}(p\text{-값})$ 으로 보여준다.
- [176] 도 2e는 도 2d의 강화된 경로에 관여하는 DEProteins 간의 상호 작용을 보여주는 네트워크 모델을 도시한 그림이다.

- [177] 도 3a는 표적 MS 실험을 사용하여 검증 코호트(validation cohort)에서 21개의 잠재적인 HGSOc 진단 바이오마커의 정규화된 피크 영역(light/heavy)을 보여주는 박스 플롯이다.
- [178] 도 3b는 LC-DIA-MS/MS를 사용하여 발견 코호트(discovery cohort)에서 21개 바이오마커 후보의 정규화된 단백질 풍부도를 보여주는 박스 플롯이다.
- [179] 도 4a는 DMSO와 함께, 대조군 siRNA(siControl) 또는 FGA, VWF 및 ARHGDIB에 대해 표시된 siRNA로 처리하거나; 또는 SERPINF2의 과발현시킨 후(조건당 n=3), 증식 분석을 통하여 SK-OV-3 세포의 생존력 값(Viability value)을 측정한 결과를 도시한 그래프이다.
- [180] 도 4b는 표시된 siRNA로 SK-OV-3 세포를 처리하거나; 또는 SERPINF2를 과발현시킨 후(조건당 n=3), 0시간 또는 12시간에 측정한 상처 부위의 대표 이미지(좌측) 및 정량화 결과(우측)를 나타낸 것이다.
- [181] 도 4c는 표시된 siRNA로 처리 시 또는 SERPINF2의 과발현 시 (조건당 n=3), SK-OV-3 세포의 콜로니 형성 결과의 대표 이미지(좌측) 및 결과 그래프(우측)를 나타낸 것이다.
- [182] 도 4d는 DMSO와 함께, 대조군 siRNA(siControl) 또는 FGA, VWF 및 ARHGDIB에 대해 표시된 siRNA로 처리하거나; 또는 SERPINF2의 과발현시킨 후(조건당 n=3), 발현량을 웨스턴 블롯팅으로 측정한 결과를 도시한 그림이다.
- [183] 도 4e는 대조군인 siControl 또는 FGA, VWF 및 ARHGDIB에 대해 표시된 siRNA로 처리한 후(조건당 n=3), 증식 분석을 통하여 SK-OV-3 세포의 생존력 값(Viability values)을 측정한 결과를 도시한 그래프이다.
- [184] 도 4f는 표시된 siRNA로 SK-OV-3 세포를 처리한 후(조건당 n=3), 0시간 또는 12시간에 측정한 상처 부위의 대표 이미지(좌측) 및 정량화 결과(우측)를 나타낸 것이다.
- [185] 도 4g는 표시된 siRNA로 처리 시(조건당 n=3), SK-OV-3 세포의 콜로니 형성 결과의 대표 이미지(좌측) 및 결과 그래프(우측)를 나타낸 것이다.

[186]

발명의 실시를 위한 형태

- [187] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [188]
- [189] 실시예
- [190] 실험방법 및 분석방법
- [191] 연구 모집단
- [192] 본 연구에서, 고등급 장액성 난소암(High-grade serous ovarian cancer, HGSOc)

환자와 대조군(HCs)의 혈청 샘플을 사용하였다. 연구대상인 모집단 그룹의 경우 다음 조건을 충족하는 환자를 식별하였다: (1) HGSOE 진단을 받은 환자; (2) 2012년 8월부터 2020년 12월 사이에 1차 외과적 치료를 받은 자 (3) 서면 동의서를 제공한 후 과학적 목적을 위해 수술 하루 전에 채취한 혈액 샘플을 기증한 사람. 한편, HGSOE 이외의 악성 종양이 있는 환자는 제외하였다.

- [193] 본 발명자들은 진단 당시 연령, 국제 산부인과 연맹(FIGO) 병기, 초기 혈청 CA-125 수치와 같은 환자의 기준 임상 병리학적 특성(baseline clinicopathologic characteristics)을 수집하였다. 생존 결과 측면에서, 무진행 생존(progression-free survival, PFS)은 진단일로부터 질환 진행일까지의 시간 간격으로 정의하였다. 해당 실험 대상의 혈청 샘플은 냉동되어 신선하게 유지되었고, 서울대학교 병원 인간 바이오뱅크에서 회수하였다. 대조군은 서울대학교병원 헬스케어시스템 강남센터에 정기건강검진을 받은 건강한 사람을 대상으로 하였다.

[194]

[195] 시약

- [196] 다중 친화성 제거 컬럼(Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA); S-Trap(Protifi, Huntington, NY, USA); 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액(TEAB; Sigma); 아세토니트릴(ACN; Macron, Avantor Performance Materials, Center Valley, PA); DL-디티오프레이톨(DTT; Sigma); 요오도아세트아미드(IAA; Sigma); 트리플루오로아세트산(TFA; Pierce, Rockford, IL); 포름산(FA; 시그마); 디메틸 설펍사이드(DMSO; Sigma)를 사용하였다.

[197]

[198] 혈청 샘플 준비

- [199] 다중 친화성 제거 컬럼(MARS14)을 사용하여 혈장에서 가장 풍부한 14개의 단백질(알부민, IgA, IgG, IgM, α 1-항트립신, α 1-산 당단백질, 아포지단백질 A1, 아포지단백질 A2, 보체 C3, 트랜스페린, α 2-마크로글로불린, 트랜스티레틴, 합토글로빈 및 피브리노겐)를 제거하였다. 전용(proprietary) "Buffer A"로 4배 희석된 혈청의 40 μ L의 부분 샘플을 바이너리 HPLC 시스템(20A Prominence, Shimadzu, Tokyo, Japan)의 MARS14 고갈 컬럼에 주입하였다. 결합되지 않은 분획을 100mM TEAB 용액에 100 μ L의 5% SDS가 포함된 수집 튜브에 수집한 다음, speed-vac 농축기(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 완전히 건조하였다. 건조된 샘플을 100 μ L의 50mM TEAB 용액에 재현탁하고 10분 동안 초음파 처리하였다. 단백질 100 μ g을 환원시키고(DTT, 10mM, 56°C, 30분) 알킬화시켰다(IAA, 20mM, 암실 상온, 30분). 그런 다음 약간 변형한 제조업체의 지침에 따라 현탁액 트래핑(suspension trapping, S-Trap) 기반 트립신 소화(trypsin digestion)로 샘플을 준비하였다. 요약하면, 로딩 후 샘플을 90:10% 메탄올/50mM 중탄산암모늄으로 세척하였다. 그런 다음 샘플을 50mM 중탄산 암모늄으로 소화시켰고 트립신(1:25 트립신/단백질)을 이 분획에 첨가한 후 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 소화된 펩티드를 1,000g에서 60초 동안 원심분리기로

용리하였다. 0.2% 포름산 및 50% 아세토니트릴에 포함된 0.2% 포름산을 사용하여 2번의 추가 용리를 수행하였다. 3개의 용리액을 함께 모으고, 진공 원심 분리하여 건조하고 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

[200]

[201] *혈청 스펙트럼 라이브러리 생성을 위한 포괄적인 혈청 프로테옴 프로파일링 실험*

[202] 혈청 프로테옴 프로파일링 실험을 위해 총 157개의 혈청 펩타이드 샘플을 조합하여 6개의 합동 샘플 그룹(pooled sample groups)(Benign, Clear Cell, Endometriod, High-Grade Serous, Mucinous 및 Healthy)을 만들었다.

[203]

[204] 이전에 개발된 이중 온라인 비연속 분획화(dual online noncontiguous fractionating) 및 연결 역상/역상 액체 크로마토그래피(concatenating reverse phase/reverse phase liquid chromatography)(DO-NCFC-RP/RPLC) 시스템을 24개의 NCFC 분획을 생성하도록 수정하였다. 요약하면, 온라인 NCFC 장치는 중간-pH RP 컬럼(150 μ m $\times$ 50cm)과 24개의 분수 루프(200 μ m)로 상호 연결된 2개의 NCFC 밸브(25포트, 1채널, C5M-66024D, VICI)로 구성하였다. 이중 온라인 액체 크로마토그래피 시스템의 경우 2개의 SPE 컬럼(150 μ m $\times$ 3cm)과 2개의 분석 컬럼(75 μ m $\times$ 150cm)을 사용하였다. 모든 컬럼은 Jupiter C18 재료(3 μ m, 300 Å, Phenomenex)로 채워서 자체 제작하였으며, 60°C에서 가열하였다.

[205]

[206] 각 합동 샘플 그룹의 혈청 펩타이드(25 μ g, 40 μ g 또는 50 μ g)를 온라인 1차원 분리(online 1st dimensional separation)를 위해 중간-pH 컬럼에 주입하고 분리하였다. 중간-pH 용매 A(물 용매에서 10mM TEAB, pH 7.5) 및 중간-pH 용매 B(99% ACN 용매에서 10mM TEAB, pH 7.5)를 사용하여 구배(유속 1 μ L/min에서 1-50% 용매B로 120분)를 생성하였다. mRP 기울기 용출 동안 2개의 NCFC 밸브를 5주기 동안 1분 간격으로 동시에 회전하여 24개의 분획 루프 각각에 비연속적으로 연결된 5개의 1분 용출액이 포함되도록 하였다. 2차원 분리를 위해 24개의 온라인 NCFC 분획 각각을 산성화 및 희석 완충액(0.2% TFA in water)으로 10배 희석하면서 SPE 컬럼으로 옮겼다. 저-pH 용매 A(물 용매, 0.1% 포름산) 및 저-pH 용매 B(ACN 용매, 0.1% 포름산)를 사용하여 구배(0.3 μ L/min의 유속에서 160분 동안 10-37.5% Sol B, 37.5-80% Sol 5분 동안 B, 13분 동안 80% Sol B, 2분 동안 10% Sol B)하였다.

[207]

[208] DO-NCFC-RP/RPLC는 고자기장 비대칭 파형 이온 이동성 분광계(high field asymmetric waveform ion mobility spectrometry)(FAIMS Pro™, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)가 있는 Orbitrap Exploris™ 480 질량 분석기(Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)에 온라인으로 연결하였다. 펩타이드는 본사의 3kV 분무전압(spray voltage)를 가지는 나노전기분무

소스(nanoelectrospray source)를 이용하여 이온화하였고, 탈용매화 모세관의 온도는 250°C로 설정하였다. -35V, -50V 및 -60V의 세 가지 보상 전압(CV)을 1초 주기 시간으로 사용하였다. 내부 및 외부 전극의 온도는 모두 100°C로 설정하였다. 각 CV에 대해 전체 MS 스캔(300-1400 Th)은 60,000의 분해능에서 얻었고 전체 MS AGC 타겟값은 20ms의 IT로 500이었다. 1.2 Th의 격리 창(isolation window)과 28의 정규화된 충돌 에너지(normalized collision energy, NCE)는 고에너지 충돌 해리(HCD)에 사용하였다. MS/MS 스펙트럼은 15,000의 분해능과 1000의 AGC 타겟 및 32ms의 IT에서 획득하였다. MS/MS 데이터는 mPE-MMR(Post-Experiment Monoisotopic Mass Refinement)을 거치게 하였고, 결과 MS/MS 데이터(예: mgf 파일)는 UniProt 인간 참조 데이터베이스(2020년 8월 출시, 97,093개 항목 포함) 및 일반적인 오염 물질(179개 항목)로 구성된 단백질 데이터베이스에서 MS-GF+ 검색 엔진(v9949, <http://proteomics.ucsd.edu/software-tools/ms-gf/>)를 이용하여 검색하였다. 검색 매개변수(search parameters)는 반-트립신 절단(semi-tryptic cleavage) 및 10ppm의 전구체 질량 허용 오차로 하였다. 시스테인의 카르바미도메틸화(Carbamidomethylation)는 정적 변형(static modification)에 사용하였고, 메티오닌의 산화와 아스파라긴과 글루타민의 탈아미드화는 가변 변형(variable modifications)에 사용하였다. 검색결과는 PSM(Peptide Spectrum Match) 수준에서 1%의 FDR(False Discovery Rate)의 표적-유인체 분석(target-decoy analysis)으로 필터링하였다. 단백질 추론(protein inference)을 위해 이분 그래프 분석(bipartite graph analysis)을 사용하였다. 형제 펩타이드(sibling peptides)가 가장 많은 단백질을 각 단백질 군에서 대표 단백질로 선정하였다. 하나 이상의 단백질이 같은 수의 형제 펩타이드를 가진 경우에는 서열 커버리지가 가장 높은 단백질을 대표 단백질로 선택하였다. 또한, 독특한 펩타이드를 갖는 단백질을 별도의 대표 단백질로 간주하였다.

[209]

[210] 최종 펩타이드의 대표적인 MS/MS 스펙트럼을 사용하여 스펙트럼 라이브러리 데이터베이스를 구축하였다. 요약하면, 각 펩타이드 이온에서 가장 높은 검색 점수(즉, $-\log(\text{SpecE-value})$)를 갖는 MS2 스펙트럼을 대표적인 MS/MS 스펙트럼으로 선택하였다. 각 펩타이드에 대해 대표적인 MS/MS 스펙트럼의 단편 피크는 0.01 Da 내에서 이론적인 단편(b 및 y 타입)과 일치하였다. 주석이 달린 절편(annotated fragments)은 수집하고, 주석이 없는 다른 조각은 제거하였다. 최종적으로, 5개 이상의 주석이 달린 단편이 있는 대표적인 MS/MS 스펙트럼이 실험 질량 정보 및 머무름 시간 정보와 함께 스펙트럼 라이브러리에 포함되었다. 각 NCFC 분획에 스파이킹된 iRT 펩타이드(Ki-3002-2, Biognosys)를 사용하여 실험적 머무름 시간을 정규화된 용출 시간으로 변환하였다.

[211]

[212] 데이터 비의존성 획득 분석법 및 데이터 처리

- [213] 소화된 펩티드는 Dionex UltiMate 3000 RSLCnano 시스템(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 분리하였다. 트립신으로 처리된 펩티드를 0.1% TFA에서 재구성하고 C18 Pepmap 트랩 컬럼(20mm x 100 μ m i.d., 5 μ m, 100 Å; Thermo Scientific)이 장착된 Acclaim™ Pepmap RSLC C18 컬럼(150mm x 150 μ m i.d., 2 μ m, 100Å)에서 50°C 환경 및 0.1% 포름산 및 5% DMSO에서 5-40% 아세토니트릴 구배를 사용하여 60분(1 μ L/min)에 걸쳐 분리하였다. LC는 EASY-SPRAY™ 소스(Thermo Fisher Scientific)가 있는 Orbitrap Exploris™ 480 질량 분석기에 연결하였다. 질량 분석 실행은 DIA 모드에서 작동시켰다. DIA 실험의 경우 전체 MS 분해능은 60,000으로 설정되었고 전체 MS AGC 목표는 25ms의 IT로 300%이었으며, m/z 범위는 300-1,400으로 설정하였다. MS2 스펙트럼에 대한 AGC 목표 값은 1000%로 설정하였으며, 24 Da의 44개의 윈도우를 1 Da의 중첩과 함께 사용하였다. 해상도는 15,000으로, IT는 22ms로 설정하였다. NCE는 27로 설정하였다. 이중 CV(dual CV)가 -35V 및 -45V인 FAIMS에는 가스 흐름(gas flow)이 적용되지 않고 분무 전압(spray voltage)이 2.5kV로 설정되었다는 점을 제외하고는 기본 설정을 사용하였다. LC-DIA-MS/MS 데이터는 자체 혈청 스펙트럼 라이브러리와 함께 DIA-NN17(버전 1.7.10)을 사용하여 처리하였다. m/z 범위가 전구체의 경우 300-1,300이고 단편 이온의 경우 200-1,300이라는 점을 제외하고는 스펙트럼은 기본 설정으로 검색하였다. 식별 결과는 전구체 수준에서 1%의 FDR으로 필터링하였다. MaxLFQ 알고리즘을 사용하여 펩티드 및 단백질의 양(quantities)을 얻었고, 해당 양 데이터를 분위수 정규화(quantile normalization)하였다. 모든 LC-MS/MS 데이터는 데이터세트 식별자 PXD033169로 PRIDE 파트너 리포지토리(repository)를 통해 ProteomeXchange 컨소시엄에 기탁하였다.
- [214]
- [215] *차등발현 분석*
- [216] 통합 통계 방법(integrative statistical method)을 적용하여 차등적으로 발현된 펩타이드 및 단백질(각각 DEPeptides 및 DEProteins)을 정의하였다. 요약하면, 각 펩타이드 또는 단백질에 대해 각 비교에서 Students' t-test, Wilcoxon-Ranksum 테스트 및 log2-median-ratio를 사용하여 검정 통계량(test statistics)을 계산하였다. 그런 다음 모든 샘플을 10,000번 무작위로 치환하여 귀무 가설에 대한 검정 통계 및 log2-median-ratio의 경험 분포(empirical distributions)를 추정하였다. 추정된 경험 분포를 사용하여 각 펩타이드 또는 단백질에 대해 관찰된 검정 통계 및 log2-median-ratio에 대한 조정된 p-값을 계산한 다음 Stouffer의 방법(Stouffer's method)을 사용하여 이러한 p-값을 결합하여 전체 p-값을 계산하였다. 마지막으로, 각 비교에서 전체 p-값이 <0.05이고, 경험적 분포의 10번째 및 90번째 백분위수 평균보다 절대 log2-median-ratio가 더 큰 것으로 DEPeptides를 식별하였다. 본 발명자들은 t-test p-value가 <0.05이고, 절대 log2-median-ratios 값이 log2-median-ratios에 대한 경험적 분포의 10번째 및 90번째 백분위수의

평균보다 크며, 일관된 DEPeptides의 수(the number of consistent DEPeptides) ≥ 1 인 것으로 DEProteins를 정의하였다. 각 비교에서 두 테스트 그룹의 전체 샘플의 절반 이상에서 발현된 펩타이드와 단백질만을 가설 테스트에 사용하였다.

[217]

[218] *경로분석*

[219] ConsensusPathDB를 사용하여 경로 과잉 표현 분석(Pathway over-representation analysis)을 수행하였다. DEProteins가 나타내는 경로는 q-value가 0.05 미만이고 경로에 관여하는 분자의 수가 3 이상인 경로로 식별하였다. 현재 연구에서 확인된 전체 유전자 세트는 배경 유전자 목록으로 사용하였다. 확인된 경로는 기능적 관련성에 따라 '면역계', 'IGF 신호전달', 'TGF- β 신호전달', 'ECM 조직' 또는 '지단백질 조립'으로 분류하였다. 과도하게 표현된 경로와 관련된 DEProteins에 대한 네트워크 모델을 구성하였다. 네트워크는 노드를 단백질로 설정하고 단백질-단백질 상호작용 및 활성화/억제 관계를 추가하여 구성하였다. KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 데이터베이스 및 문헌 검색에서 얻은 국소화(localization) 및 활성화/억제 관계를 기반으로 노드를 정렬하였다. 네트워크는 Cytoscape를 사용하여 그렸다.

[220]

[221] *다중 및 병렬 반응 모니터링 분석*

[222] MRM-MS(Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry) 분석은 Qtrap5500 plus(Sciex)와 함께 적용하였다. 트립신으로 처리한 펩티드는 ZORBAX 300SB-C18 역상 컬럼(0.5mm $\times$ 150 μ m i.d., 3.5 μ m, 100Å; Agilent)에서 0.1% 포름산의 5-40% 아세트오니트릴 구배를 사용하여 15분(20 μ L/min)에 걸쳐 분리하였다. 각 이온화된 펩타이드에 대한 충돌 에너지(Collision energy, CE) 값은 값을 제공하는 SKYLINE을 이용하여 결정하였다. Parallel Reaction Monitoring-Mass Spectrometry(PRM-MS) 분석은 Orbitrap Exploris™ 480 질량 분석기로 적용하였다. 트립신으로 처리한 펩티드는 C18 Pepmap 트랩 컬럼(20mm $\times$ 100 μ m i.d., 5 μ m, 100Å, Thermo Scientific)이 장착된 Acclaim™ Pepmap RSLC C18 컬럼(150mm $\times$ 150 μ m i.d., 2 μ m, 100Å)에서 50°C, 0.1% 포름산 및 5% DMSO에서 5-40% 아세트오니트릴 구배를 사용하여 60분 이상(1.5 μ L/min) 동안 분리하였다. 질량 분석은 표적 질량 모드(targeted mass mode)에서 실행하였다. 전구체 표적 질량, m/z 값 및 전하 상태는 합성 펩타이드를 사용한 데이터 의존 획득 분석을 통해 나열하였다. PRM 실험의 경우 전체 MS 분해능은 60,000으로, 전체 MS AGC 목표는 25ms의 IT로 300으로 설정하였고, m/z 범위는 280-1,200으로 설정하였다. MS/MS 분해능은 15,000으로, IT는 22ms로 설정하였으며, NCE는 27로 설정하였다. 분 전압은 2.5kV로 설정하였고, PRM-MS 스펙트럼 피크를 선택하고 SKYLINE으로 계산하였다.

[223]

[224] *인-비트로 기능 분석*

[225] 세포 배양

[226] 인간 HGSOC 암 세포주 SK-OV-3은 서울대학교 의과대학(한국)에서 입수하였다. SK-OV-3 세포는 RPMI 1640(Corning; 10-041-CV), 10% 소테아혈청(FBS; Invitrogen), 및 1% Penicillin/streptomycin(WelGENE Inc.)을 함유하는 배지에서 37°C in 5% CO₂로 배양하였다. 세포는 3일 동안 신선한 영양소로 유지하였다.

[227]

[228] 플라스미드 및 siRNA 형질감염

[229] Myc-DDK 태그가 붙은 플라스미드는 OriGene Technologies, Inc.(Rockville, MD)에서 구입하였다. Myc-DDK 태그가 붙은 SERPINF2-인간 세르핀 펩티다제 억제제(RC206435) 플라스미드를 형질감염에 사용하였다. Invitrogen(#L3000008)의 제조업체 프로토콜에 따라 Lipofectamine 3000 시약을 사용하여 플라스미드를 SK-OV-3 세포에 형질감염시켰다. 녹다운 실험을 위해 다음 siRNA를 Genolution, Inc.(한국)에서 구입하였다:

[230] Negative Control 5'-CCUCGUGCCGUUCCAUCAGGUAGUU-3'(서열번호 22),

[231] siFGA-1 5'-CUCUGUAUCUGGUAGUACUUU-3' (서열번호 23),

[232] siFGA-2 5'-GGAUUUAGGCACAUUGUCUUU-3' (서열번호 24),

[233] siVWF-1 5'-CCUUCUGAGCCCACAAUAAUU-3' (서열번호 25),

[234] siVWF-2 5'-GCUGUAAGUCUGAAGUAGAUU-3' (서열번호 26),

[235] siARHGDIB-1 5'-GGAAAUGGACAAAGAUGAUUU-3' (서열번호 27) 및

[236] siARHGDIB-2 5'-AAACCAUUGUGUAAAAGGAUU-3' (서열번호 28).

[237]

[238] Invitrogen(#13778075)의 제조업체 프로토콜에 따라 Lipofectamine RNAiMAX 형질감염 시약을 사용하여 siRNA를 SK-OV-3 세포에 형질감염시켰다. SK-OV-3 세포를 siRNA 시약에 72시간 노출시키고 PBS(WelGENE Inc.)로 수확하였다. 또한, DNA 형질감염을 리포펙타민으로 희석된 Opti-MEM에서 28시간 동안 인큐베이션하고 웨스턴 블롯팅을 위해 수확하였다. 증식 분석 및 세포 이동을 위해, 세포를 48시간째에 siRNA 시약으로 형질감염시키고 24시간째에 DNA 형질감염된 시약으로 형질감염시켰다.

[239]

[240] 웨스턴 블롯팅

[241] 포스파타제 억제제(100X 카테일 GenDEPOT)를 포함하는 RIPA 용해 완충액(cell biolabs, Inc.)에서 세포를 용해시켰다. 용해물을 95°C, 5분에서 SDS 샘플 완충액(Alfa Aesar Thermo)으로 끓였다. 단백질을 4-20% 프리캐스트 SDS-PAGE 겔(BIORAD)로 분리하고 ATTO EZ Fast 프로토콜의 15분에 FL-PVDF 멤브레인(MERCK)으로 옮겼다. 막 차단은 1X TBST에서 5% 알부민 소 혈청(BSA; EcoCell)과 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하여 수행하였다. 막을 1차 환원시킨 다음 1X TBST로 3회 세척하고 실온에서 30분

동안 2차 항체로 인큐베이션하였다. 그런 다음 검출된 단백질은 웨스턴 블롯팅 시약 용액(Roche)과 ODYSSEY Fc System (Li-Cor Bioscience)의 ECL(ElectroChemiLuminescence)을 사용하였다. 웨스턴 블롯팅을 위해 다음 항체를 사용하였다: FGA(M α 1:500; ab92572, Abcam), VWF(R α 1:500; ab189500, Abcam), ARHGDIB(D4GDI 1:1000; ab181252, Abcam), α -Tubulin DM1A M α 1:1000; Cell Signaling Technology Inc.), FLAG(GT231 M α 1:1000; GTX629631, GeneTex Inc), 항-마우스 IgG 항체 HRP(1:3000; 170-6516, BIORAD) 및 항-토끼 IgG 항체 HRP(1:3000; 170-6515, BIORAD).

[242]

[243] 세포 증식 분석

[244] WST-1 분석 키트는 TaKara의 제조업체 프로토콜(MK400; Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System)에 따라 세포 증식 분석에 사용하였다. 형질감염된 세포를 100 μ l 배지에 웰당 1000개 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 플레이팅하고 5일 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포에 10 μ l WST-1 시약을 처리하고 4시간 후 450nm에서 formazan 염료의 흡광도를 측정하여 세포의 증식을 분석하였다.

[245]

[246] 상처 치유 분석

[247] 세포 이동은 웰당 500개 세포의 밀도로 배양된 12웰 플레이트에서 SK-OV-3 세포의 스크래치를 통해 평가하였다. 10 $\times$ /0.22 PH1 렌즈와 MC170 HD 카메라가 있는 LEICA DMi1 현미경 시스템을 사용하여 0시간 및 12시간 시점의 상처 치유 이미지 스냅을 획득하였다. 실험은 3개의 웰을 통하여 삼중으로 수행하였다. 각 실험에서 4가지 다른 위치에서 상처 봉합의 평균 너비를 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 촬영하였다.

[248]

[249] 콜로니 형성 분석

[250] 형질감염된 세포를 웰당 500개 세포의 밀도로 6-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 10일 후, 콜로니를 실온에서 PBS로 1회 세척하고 0.5% 크리스탈 바이올렛(V5265, Sigma)으로 1시간 동안 염색하고, 3회 세척하여 잔여 염색약을 제거하였다. 그런 다음 콜로니를 밤새 건조시키고 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[251]

[252] 인비트로 기능 분석의 통계 분석

[253] 양방향적 t-검정(Two-tailed t-test)을 모든 기능적 실험 결과의 통계적 유의성을 추정하는 데 사용하였다. 0.05 미만의 p-값은 유의미한 것으로 간주하였고, 각 실험은 3개의 생물학적 복제로 수행하였다.

[254]

[255] 실험결과

[256] 연구 모집단의 특성화

[257] HGSOC에 대한 잠재적 진단 바이오마커의 발견을 위해 54개의 HGSOC에 대한 환자 케이스와 48명의 건강한 대조군(HC) 피험자를 준비하였다: (1) 26 HGSOC 및 24 HC로 구성된 단백질체학 프로파일링을 위한 발견 세트(discovery set) 및 (2) 28개의 HGSOC 및 24개의 HC로 구성된 표적 MS(targeted MS) 실험에 대한 검증 세트(validation set)(표 1). HGSOC 환자의 평균 연령은 발견 및 검증 세트에서 각각 59.5세 및 56세였고, HC의 경우 발견 및 검증 세트에서 각각 46세 및 48.5세이었다. FIGO I기, II기, III기 HGSOC 환자의 수는 디스커버리 세트에서 각각 3, 3, 20명, 검증 세트에서 3, 10, 15명이었다. 중간 관찰 기간인 25개월 동안 HGSOC 환자 중 발견세트에서 42.3%, 검증세트에서 57.1% 1차 치료 수술 후 재발을 경험하였다.

[258] [표1]

표 1. 연구 모집단의 특성 (Characteristics of samples)

샘플 세트	발견 세트 (Discovery)		검증 세트 (Validation)	
조직(Histology)	HC ¹	HGSOC ²	HC	HGSOC
케이스 수	24	26	25	28
나이 (중간값)	25-65 (46)	42-78 (59.5)	33-70 (48.5)	33-76 (56)
FIGO ³				
병기 I	-	3	-	3
병기 II	-	3	-	10
병기 III	-	20	-	15
재발				
유	-	11	-	16
무	-	15	-	12

¹ 건강 대조군(Healthy control, HC). ² 고등급 장액성 난소암 (High-grade serous ovarian cancer, HGSOC). ³ 국제산부인과학회 (Federation of International of Gynecologists and Obstetricians, FIGO).

[259]

[260] 포괄적인 OC 혈청 스펙트럼 라이브러리

[261] FAIMS-MS/MS 기기(DO-NCFC-RP/RPLC-FAIMS-MS)와 결합된 이중 온라인

비연속 분별(dual online non-contiguous fractionating) 및 연결 역상/역상 액체 크로마토그래피(concatenating reverse-phase/reverse-phase liquid chromatography coupled to a FAIMS-MS/MS instrument)(DO-NCFC-RP/RPLC-FAIMS-MS/MS)를 사용하여 혈청 샘플의 포괄적인 글로벌 프로테오믹 프로파일링 실험을 수행하였다. 6개 그룹의 고갈된 혈청 샘플에서 총 9개 세트의 DO-NCFC-RP/RPLC-FAIMS-MS/MS 실험을 수행했으며, 각 그룹에는 온라인 NCFC 24개 분획과 3개의 CV가 포함되었다(도 1a). 총 216개의 LC-FAIMS-MS/MS 전역 프로테오믹 데이터셋을 얻었고 MS-GF+ 검색을 통해 137,086개의 펩타이드와 12,066개의 단백질 그룹을 식별하였다. 확인된 혈청 프로테오믹은 대략 8개의 동적 범위(8 orders of dynamic ranges)를 포함하는 것으로 추정하였다(440 μ g/mL의 세룰로플라스민(Ceruloplasmin)에서 3.5pg/mL의 링 핑거 단백질 213(Ring finger protein 213)까지, 도 1b 및 1c). 본 발명의 혈청 프로테오믹은 높은 범위의 혈청 프로테오믹을 제공하며, OC 혈청 스펙트럼 라이브러리를 구성하는 데 사용 가능하다. 확인된 혈청 펩타이드의 탠덤 스펙트럼 중 펩타이드에 대한 검색 점수가 가장 높은 탠덤 스펙트럼과 5개 이상의 주석이 달린 단편 이온 피크를 사용하여 스펙트럼 라이브러리를 구성하였다. 스펙트럼 라이브러리에는 8,458개의 단백질 그룹을 포함하는 94,212개의 비중복 펩티드의 127,444개의 스펙트럼이 포함되었다.

[262]

[263] *HGSOC에 대한 잠재적 진단 바이오마커의 발견*

[264] HGSOC 진단 바이오마커 발견을 위해 발견 코호트(discovery cohort)에서 24개 HC 및 26개 HGSOC에 대한 LC-DIA-MS/MS 분석을 수행하였다. OC 혈청 스펙트럼 라이브러리를 사용한 DIA-NN 검색 결과, 모든 샘플에서 29,721개의 펩타이드와 2,439개의 단백질이 식별되었으며(도 2a), 이는 현재까지 OC의 혈청 프로테오믹에서 가장 큰 정량화에 해당한다. 샘플 전체에 걸쳐 확인된 펩티드의 수는 평균 14,797로 13,818-15,987 범위에서 다양했고 단백질은 평균 1,104로 1,012-1,240 범위에서 다양하였다. 주성분 분석(principal component analysis, PCA)을 통하여 해당 혈청 프로테오믹이 HC에서 HGSOC를 명확하게 분리함을 확인할 수 있었다(도 2b). 다운스트림 분석을 위해, HGSOC 및 HC 그룹 모두에서 전체 샘플의 절반 이상에서 정량화된 14,755개의 펩타이드 및 951개의 단백질을 사용하였다. 그런 다음 HGSOC에 대한 잠재적 진단 바이오마커를 식별하기 위해 차등 발현 분석을 수행하였다. 그 결과, HC와 비교하여 HGSOC 환자의 혈청에서 100개의 상향 및 54개의 하향 조절된 단백질을 확인할 수 있었다(도 2c).

[265] 경로 분석을 통하여, 상향 조절된 단백질이 보체 및 응고 캐스케이드, 혈소판 활성화 및 응집, 톨유사 수용체 4(TLR4) 신호 전달, 호중구 세포외 트랩(NET) 형성뿐만 아니라, 인슐린 유사 성장인자(IGF) 및 변형 성장 인자 β (TGF- β) 신호 전달 및 세포외 기질(ECM) 조직을 포함한 면역 과정에 관여한다는 것을 확인하였다. 반면, Fc 감마 수용체(FC γ R) 활성화 및 혈장 지단백질 조립에

관여하는 단백질은 유의하게 하향 조절되었다(도 2d).

- [266] 다음으로 HGSOC 혈청에서 과도하게 표현된 프로세스에 관련된 단백질 간의 상호 작용을 설명하는 네트워크 모델을 구성하였다(도 2e). 응고 및 보체 캐스케이드를 포함하는 네트워크 모델은 (1) 응고 촉진제 (F11, VWF 및 FGA/B)의 상향 조절, 항응고 인자(SERPINA5/F2 및 A2M)의 하향 조절을 포함하는 응고 작용; 및 (2) 응고를 촉진 또는 그 역반응을 수행하기 위해 응고 캐스케이드와 교차 작용(cross talk)하는 보체 과정(MBL2, C3/9/C4A/B/BPA/BPB 및 CFHR2/5)이 공통적으로 상향 조절됨을 나타내었다.
- [267] 호중구와 대식세포를 포함하는 네트워크는 (1) NET 형성(LBP, ACTB 및 MPO); (2) TLR4 신호전달 활성화 단백질(LBP, FGA/B, CD14, S100A8)의 상향 조절 및 TLR4 신호전달 억제 단백질(APOA1/4/C3)의 하향 조절을 포함하는 TLR4 신호전달; 및 (3) FC γ R 매개 식균 작용(IGLC2/3/HG2/HG3/KC/KV1-5)의 하향 조절 /KV1D-33/KV3-20/KV3D-20/KV4-1)이 공동 조절됨을 나타내었다. 또한, TLR4 신호의 활성화와 함께 FCGBP의 상향 조절은 종양 미세 환경(TME)에 대한 대식세포 모집을 일으킬 수 있음을 확인하였다. 또한, 혈소판을 포함하는 네트워크는 NET 형성에 의해 촉진되고 응고 과정을 유도할 수 있는 혈소판 활성화 및 응집(예: VCL, GPIBA, PF4, PPBP, SRGN, VWF 및 FGA)의 조정된 상향 조절됨을 나타내었다.
- [268] 마지막으로, IGF, TGF- β 신호 및 ECM 조직을 포함하는 네트워크 모델은 (1) ECM 조직(EFEMP1, SERPINE1, PCOLCE, SPARC, TIMP1, FN1, NID1, ENO1, LCP1, ARHGDIB 및 FGA/B)의 상향 조절; (2) IGF 신호전달(IGFBP2 및 APP); 및 (3) TGF- β 신호전달(LRG1, LTBP1, THBS1, PRG4 및 SERPINE1)은 HGSOC에서 암 세포 증식, 이동 및 침입에 집합적으로 기여함을 나타내었다.
- [269] 네트워크 모델에서, 다음의 기준에 따라 표적 MS 실험(targeted MS experiments)을 위한 잠재적인 HGSOC 관련 진단 바이오마커를 선택하였다: 배수 변화, 샘플 전반에 걸친 발현 일관성, 및 이전에 보고된 OC 병리생리와의 연관성.
- [270] 응고 및 보체 캐스케이드(VWF, SERPINF2, MBL2, C3 및 C4B); NET 형성(MPO); TLR4 신호 전달(LBP, CD14 및 S100A8/9); 지단백질 어셈블리(APOA1/4), TME로의 대식세포 모집(FCGBP); 혈소판 활성화 및 응집(VCL, PFN1, FLNA, GPIBA, VWF, FN1, FGA, PF4, PPBP, SRGN 및 CALU); ECM 조직(SPARC, TIMP1, FN1, ENO1, LCP1 및 ARHGDIB); IGF 신호 전달(IGFBP2); 및 TGF- β 신호 전달(LRG1, LTBP1, THBS1 및 PRG4)(도 2e의 빨간색으로 표시된 것)을 포함하는 앞서 언급한 생물학적 과정과 관련된 33개의 바이오마커 후보의 초기 세트를 선정하였다.
- [271]
- [272] *HGSOC에 대한 잠재적 진단 바이오마커 검증*
- [273] 33개의 바이오마커 후보의 안정 동위원소 표지(SIL) 펩타이드를 사용하여 25명의 HC 및 28명의 HGSOC 환자의 독립적인 코호트에서 표적 MS 분석(MRM

또는 PRM)을 수행하여 잠재적 진단 가치를 검증하였다. 7개의 후보(FLNA, FN1, LTBP1, PFN1, S100A8, TIMP1 및 CALU)는 MRM 또는 PRM 실험에서 감지 가능한 트랜지션(transition) 신호를 나타내지 않았으므로 최종 바이오마커 후보 세트에서 제외하였다. 26개의 진단 바이오마커 후보의 최종 세트의 발현 패턴을, 표적 MS(도 3a)와 LC-DIA-MS/MS 분석(도 3b) 결과들을 가지고 서로 비교하였다. 표적 MS 분석은 26개 후보 중 21개의 발현이 HGSOC와 HC(표 2) 사이에 통계적으로 유의한($P < 0.05$) 변화를 나타냄을 보였고, 이는 LC-DIA-MS/MS 분석과 일치하였다.

[274]

[275] [표2]

표 2. MRM 정량 결과

유전자 명칭	단백질 명칭	UniProt ID	LC-DIA- MS/MS	표적 MS (Targeted MS)			
			DEProtein ¹	방법	펩티드	log ₂ -fold- change ²	P-값 ³
FGA	FIBA	P02671	UP	PRM	HPDEAAFFDTASTGK	2.61	<0.005
VWF	VWF	P04275	UP	PRM	HIVTFDQQNFK	2.48	<0.001
S100A9	S100A9	P06702	UP	PRM	NIETIINTFHQYSVK	1.75	<0.01
VCL	VCL	P18206	UP	PRM	LLAVAATAPPDAPNR	1.70	<0.05
THBS1	TSP1	P07996	UP	MRM	TIVTTLQDSIR	1.50	<0.001
MPO	MPO	P05164	UP	PRM	VVLEGGIDPILR	1.19	<0.005
IGFBP2	IBP2	P18065	UP	MRM	LIQGAPTIR	1.13	<0.001
SRGN	SRGN	P10124	UP	MRM	IQDLNR	1.03	<0.001
PF4	PF4	P02776	UP	MRM	TTSQVRPR	0.91	<0.001
GP1BA	GP1BA	P07359	UP	MRM	LTSPLGALR	0.87	<0.001
LRG1	LRG1	P02750	UP	MRM	DLLLPQPDLR	0.85	<0.001
ARHGDIB	RhoGDI2	P52566	UP	PRM	TLLGDGPVVTDPK	0.85	<0.005
PRG4	PRG4	Q92954	UP	MRM	DQYYNIDVPSR	0.83	<0.001
LBP	LBP	P18428	UP	MRM	ITLPDFTGDLR	0.80	<0.001
PPBP	PPBP	P02775	UP	MRM	NIQSLEVIK	0.54	<0.001
C3	C3	P01024	UP	MRM	TGLQEVEVK	0.43	<0.005
FCGBP	FCGBP	Q9Y6R7	UP	MRM	GNPAVSIVR	0.42	<0.005
CD14	CD14	P08571	UP	MRM	FPAIQNLALR	0.41	<0.05
APOA1	APOA1	P02647	DOWN	MRM	VQPYLDDFQK	-0.30	<0.01
APOA4	APOA4	P06727	DOWN	MRM	QLTPYAQR	-0.74	<0.001
SERPINF2	A2AP	P08697	DOWN	PRM	EDFLEQSEQLFGAK	-1.08	<0.001

¹UP, 상향조절; DOWN, 하향조절. ²HGSOC 대 HC. ³ Benjamini-Hochberg procedure를 사용한 다중

검정 보정을 사용한 Student's t-검정 p-값.

[276]

[277] HGSOC에 대한 혈청 바이오마커의 인-비트로 기능 실험

[278] 상기 HGSOC 혈청 바이오마커는 HGSOC에서 조절되는 생물학적 과정의 단순한 결과라기보다는 기능적 역할을 수행할 수 있다는 가정하에, 3 개의

강하게 상향 조절된 바이오마커(FGA, VWF 및 ARHGDIB)와 하나의 강하게 하향 조절된 바이오마커(SERPINF2)에 대해 기능적 분석을 수행하였다. 먼저 대조군 siRNA 및 3개의 상향 조절된 바이오마커 각각에 대한 siRNA를 발현하는 SK-OV-3 인간 HGSOC 세포의 세포 생존, 이동 및 집락 형성 능력을 비교하였다(도 4d). SK-OV-3 세포에서 FGA, VWF 및 ARHGDIB의 녹다운에 의하여 세포 생존, 이동 및 콜로니 형성 능력을 현저히 감소됨을 확인하였다($P < 0.05$)(도 4a 내지 c 및 e 내지 g). 한편, SK-OV-3 세포에서 SERPINF2의 과발현(도 4d)은 상당히($P < 0.05$) 그들의 생존력, 이동 및 집락 형성 능력을 감소함을 확인하였다(도 4a 내지 c 및 e 내지 g). 상기 데이터를 통하여 FGA, VWF, ARHGDIB 및 SERPINF2와 같은 HGSOC 혈청 바이오마커가 HGSOC에서 암세포 증식 및 이동에 중요한 조절 역할을 할 수 있음을 알 수 있었다.

[279]

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

청구범위

- [청구항 1] *FGA, VWF, ARHGDIB* 및 *SERPINF2*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 난소암(Ovarian Cancer)의 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, *S100A9, VCL, THBS1, MPO, IGFBP2, SRGN, PF4, GPIBA, LRG1, PRG4, LBP, PPBP, C3, FCGBP, CD14, APOA1* 및 *APOA4*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 난소암을 가진 개체에서 상기 *FGA, VWF* 또는 *ARHGDIB* 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량은 증가되고, 상기 *SERPINF2* 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량은 감소되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 2 항에 있어서, 난소암을 가진 개체에서 상기 *S100A9, VCL, THBS1, MPO, IGFBP2, SRGN, PF4, GPIBA, LRG1, PRG4, LBP, PPBP, C3, FCGBP* 또는 *CD14* 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량은 증가되고, 상기 *APOA1* 또는 *APOA4* 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량은 감소되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 난소암은 고등급 장액성 난소암(High-grade serous ovarian cancer, HGSOC)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 개체로부터 분리된 생물학적 시료 내의 *FGA, VWF, ARHGDIB* 및 *SERPINF2* 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 난소암의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 발현량을 측정하는 단계는 질량 분석(Mass Spectrometry, MS)에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 질량 분석은 서열 번호 1, 2, 12 및 21로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 펩티드의 발현 수준을 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제 6 항에 있어서, *S100A9, VCL, THBS1, MPO, IGFBP2, SRGN, PF4, GPIBA, LRG1, PRG4, LBP, PPBP, C3, FCGBP, CD14, APOA1* 및 *APOA4*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 이들이 인코딩하는 단백질의 발현량을 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서, 상기 발현량을 측정하는 단계는 질량 분석(Mass Spectrometry, MS)에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서, 상기 질량 분석은 서열 번호 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 및 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의

- 펩티드의 발현 수준을 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제 6 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제 6 항에 있어서, 상기 난소암은 고등급 장액성 난소암(High-grade serous ovarian cancer, HGSOC)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] FGA, VWF, S100A9, VCL, THBS1, MPO, IGFBP2, SRGN, PF4, GP1BA, LRG1, ARHGDIB, PRG4, LBP, PPBP, C3, FCGBP 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 대한 억제제; 또는 APOA1, APOA4, 및 SERPINF2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 대한 활성화제를 유효성분으로 포함하는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서, 상기 난소암은 고등급 장액성 난소암(High-grade serous ovarian cancer, HGSOC)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 16] 다음의 단계를 포함하는 난소암의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법:
- (a) FGA, VWF, S100A9, VCL, THBS1, MPO, IGFBP2, SRGN, PF4, GP1BA, LRG1, ARHGDIB, PRG4, LBP, PPBP, C3, FCGBP, CD14, APOA1, APOA4, 및 SERPINF2로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질, 이들을 인코딩하는 유전자 또는 이들을 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 생물학적 시료 내 상기 단백질 또는 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계,
- 상기 생물학적 시료 내 상기 FGA, VWF, S100A9, VCL, THBS1, MPO, IGFBP2, SRGN, PF4, GP1BA, LRG1, ARHGDIB, PRG4, LBP, PPBP, C3, FCGBP 또는 CD14의 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현량이 감소하거나 또는 상기 APOA1, APOA4, 또는 SERPINF2의 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현량이 증가하는 경우 난소암의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.
- [청구항 17] 제 16 항에 있어서, 상기 난소암은 고등급 장액성 난소암(High-grade serous ovarian cancer, HGSOC)인 것을 특징으로 하는 방법.