



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월07일

(11) 등록번호 10-2612020

(24) 등록일자 2023년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/57442 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0137561

(22) 출원일자 2022년10월24일

심사청구일자 2022년10월24일

(56) 선행기술조사문헌

W02017008165 A1

US11179473 B2

W02006014999 A2

International Journal of Gynecologic Cancer
32: A151-A152 (2022.10.20.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김재훈

서울특별시 강남구 언주로 211, 산부인과(도곡동)

최정아

경기도 화성시 동탄숲속로 36, 883동 1803호(능동, 동탄숲속마을모아미래도2단지아파트)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인인벤싱크

전체 청구항 수 : 총 16 항

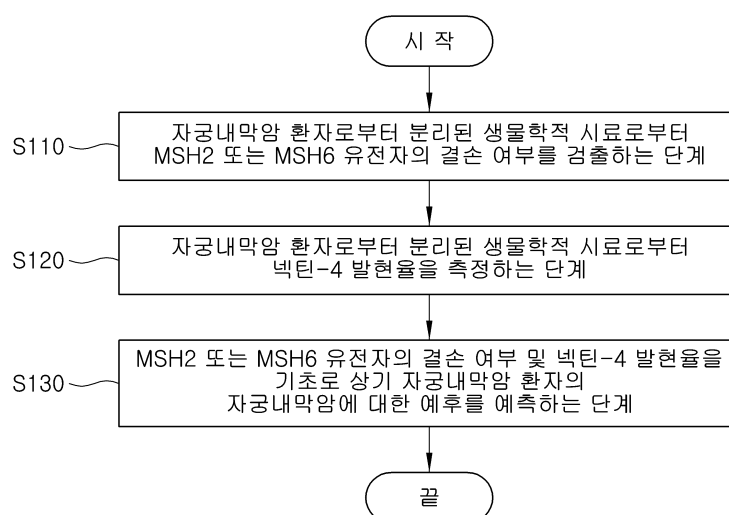
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 자궁내막암의 예후 예측 방법

(57) 요약

본 명세서에서는 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 단계; 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 넥틴-4 발현율을 측정하는 단계; 및 측정된 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 측정된 넥틴-4 발현율을 기초로 자궁내막암 환자의 자궁내막암에 대한 예후를 예측하는 단계를 포함하는, 자궁내막암의 예후 예측 방법 및 이를 이용한 키트가 제공된다. 본 발명에 따르면, MSH2 또는 MSH6가 결손된 환자군에게서 넥틴-4 발현율이 3% 이상일 때, 자궁내막암의 예후가 좋지 않은 것으로 예측되는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2474/20 (2021.08)
G01N 2800/52 (2021.08)

(72) 발명자

정준용

미국, 20850 메릴랜드, 록빌, 밸리 오크 서클
13616

김효선

서울특별시 은평구 갈현로29길 11, 101동 1208호(
갈현동, 미미아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711165178
과제번호	2021R1A2C1008631
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	Autotaxin을 기반한 BRCA 변이성 난소암 진단기술 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132134
과제번호	2017M3A9B8069610
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	한국부인암은행
기 여 율	50/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2017.07.01 ~ 2022.06.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 단계;

자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 넥틴-4 발현율을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 상기 측정된 넥틴-4 발현율을 기초로 상기 자궁내막암 환자의 자궁내막암에 대한 예후를 예측하는 단계를 포함하는, 자궁내막암의 예후 예측 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서,

MSH2 또는 MSH6가 결손된 것으로 검출되는 경우에 한하여,

자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 넥틴-4 발현율을 측정하는 단계가 수행되는 것인, 자궁내막암의 예후 예측 방법.

청구항 3

제1 항에 있어서,

상기 측정된 넥틴-4 발현율은,

상기 분리된 생물학적 시료 중에서 수집된 세포수 대비 넥틴-4 단백질이 발현된 세포수의 비율인 것인, 자궁내막암의 예후 예측 방법.

청구항 4

제2 항에 있어서,

상기 MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자는,

상기 분리된 생물학적 시료 중에서 수집된 세포수 대비 넥틴-4 단백질이 발현된 세포수의 백분율로 정의되는, 상기 측정된 넥틴-4 발현율이 3% 이상이면, 예후가 나쁜 것으로 예측되고,

상기 측정된 넥틴-4 발현율이 3% 미만이면, 예후가 좋은 것으로 예측되는, 자궁내막암의 예후 예측 방법.

청구항 5

제1 항에 있어서,

상기 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 방법은,

면역조직화학염색(immunohistochemistry), PCR, 역전사-PCR(reverse transcription-PCR), 실시간 PCR, DNA 마이크로어레이, 형광 제자리 부합법(fluorescence in situ hybridization, FISH), 염색체 마이크로어레이(chromosome microarray, CMA), 복합 결찰 의존 탐침 증폭(multiplex ligation dependent probe amplification, MLPA), 유전자 패널(targeted sequencing), 엑솜 시퀀싱(exome sequencing) 및 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 자궁내막암의 예후 예측 방법.

청구항 6

제1 항에 있어서,

상기 넥틴-4 발현율의 측정법은,

면역조직화학염색법, RT-PCR, 노던 블로팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이(microarray), NPA

(nuclease protection assay, NPA) 또는 인 시투 하이브리다이제이션(in situ hybridization), ELISA, 웨스턴 블로팅(western blotting), 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 및 단백질 칩 키트로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 자궁내막암의 예후 예측 방법.

청구항 7

제1 항에 있어서,

상기 생물학적 시료는,

조직액, 골수액, 림프액, 눈물, 콧물, 침, 땀, 젖, 혈액, 혈청, 혈장 및 조직으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 자궁내막암의 예후 예측 방법.

청구항 8

제7 항에 있어서,

상기 조직은,

자궁내막 조직이고,

면역조직 화학염색에 이용될 수 있는 생물학적 시료이며,

냉동 조직절편, 파라핀 절편, 세포도말 표본으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 자궁내막암의 예후 예측 방법.

청구항 9

자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여 MSH2 또는 MSH6 결손 여부를 검출하도록 구성된 제제 및 넥틴-4 발현율을 측정하도록 구성된 제제를 포함하고,

검출된 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 측정된 넥틴-4 발현율에 기초하여 상기 자궁내막암 환자의 자궁내막암에 대한 예후 정보를 제공하기 위한 수단을 포함하는, 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트.

청구항 10

제9 항에 있어서,

상기 넥틴-4 발현율을 측정하도록 구성된 제제는,

넥틴-4 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드(oligopeptide), 리간드(ligand), PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer) 중 적어도 하나인, 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트.

청구항 11

제10 항에 있어서,

상기 넥틴-4 유전자의 mRNA 발현율을 측정하는 제제를 더 포함하는, MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 넥틴-4 발현율을 이용한 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트.

청구항 12

제11 항에 있어서,

상기 넥틴-4 유전자의 mRNA 발현율을 측정하는 제제는,

상기 넥틴-4 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer), 프로브(probe) 및 뉴클레오티드(nucleotide) 중 적어도 하나인, 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트.

청구항 13

제9 항에 있어서,

상기 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 제제는,

MSH2 또는 MSH6 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드(oligopeptide), 리간드(ligand), PNA(peptide nucleic acid) 및 애포타머(aptamer) 중 적어도 하나 또는,

MSH2 또는 MSH6의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer), 프로브(probe) 및 뉴클레오티드(nucleotide) 중 적어도 하나인, 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트.

청구항 14

제9 항에 있어서,

상기 수단은,

상기 자궁내막암에 대한 정보를 디스플레이 하도록 구성된 장치이고,

상기 자궁내막암에 대한 정보를 제공하기 위하여 분리된 컴퓨팅 장치에 상기 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 상기 넥틴-4의 발현율을 전달하기 위한 통신부를 포함하는, 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트.

청구항 15

제14 항에 있어서,

상기 컴퓨팅 장치는,

측정된 MSH2 또는 MSH6 결손 여부 및 넥틴-4의 발현율에 기초하여 상기 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 상기 넥틴-4의 발현율을 포함하는 자궁내막암으로 결정된 정보를 제공하는, 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트.

청구항 16

제9 항에 있어서,

상기 생물학적 시료는,

자궁내막 조직이고,

면역조직 화학염색에 이용될 수 있는 생물학적 시료이며,

냉동 조직절편, 파라핀 절편, 세포도말 표본으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자궁내막암의 예후 예측 방법 및 이를 이용한 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자궁내막암이란 자궁 내 공간을 덮고 있는 자궁내막에 발생하는 암이다. 조기 진단 시 예후가 긍정적인 것으로 알려져 있으나, 전이 및 재발 위험성이 높기 때문에 지속적인 관리가 필수적이다.

[0003] 자궁내막암의 가장 대표적인 증상으로는 비정상적인 질출혈, 생리량 과다 등이 있으며 대부분 50 ~ 60대 폐경 여성에게 발생한다. 최근에는 스트레스, 출산을 저하, 서구식 식습관 등으로 인하여 폐경 전인 젊은 여성의 발병을 또한 증가하고 있는 추세이다.

[0004] 자궁내막암은 자궁경부암 및 난소암과는 구별되는 다른 암으로서, 자궁 입구 쪽에서 발생하면 자궁경부암, 자궁 윗부분에 속하는 체부에 생긴 암은 자궁내막암, 자궁 좌우측에 있는 난소에 생긴 암을 난소암이라고 한다.

[0005] 특히, 난소암 중 가장 큰 비중을 차지하는 상피성난소암 중 자궁내막양 선암(endometrioid carcinoma)은 자궁내막암(endometrial cancer)과 유사한 이름을 가졌으나, 자궁내막양 선암(endometrioid carcinoma)는 자궁내막암(endometrial cancer)와는 구별되는 다른 암이다.

[0006] 한편, 자궁내막암에 있어서 DNA 불일치 복구 결함 (DNA mismatch repair deficient, dMMR)에 의한 자궁내막암

은 전체 자궁내막암 발병 원인 중 20 내지 30%를 차지한다고 보고되어 있다. DNA 불일치 복구 결함은 DNA 불일치 복구 (DNA mismatch repair, MMR) 유전자의 결실, 치환 등의 변이가 일어나 그 기능을 하지 못하는 상태를 의미한다.

[0007] 그러나, DNA 불일치 복구 결함에 의한 자궁내막암의 예후 예측에 대한 보고는 부족한 실정이다 (Richman., Int J Oncol. 2015 Oct; 47(4): 1189-1202 참조).

[0008] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 자궁내막암의 예후 예측에 있어서, MSH2 또는 MSH6가 결손된 환자군에 있어서 넥틴-4 발현율에 따라 자궁내막암 환자의 무진행 생존율에 차이가 있음을 인지할 수 있었다.

[0010] 나아가, 본 발명자들은 MSH2 또는 MSH6 결손과 함께한 넥틴-4의 과발현 환자군은 림프-혈관 침윤 (Lymphovascular space invasion, LVSI)이 더 많이 발생함에 주목하였다.

[0011] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 자궁내막암 환자의 MSH2 또는 MSH6 결손 여부 확인이 자궁내막암 예후 예측에 주요 변수임을 인지할 수 있었으며, MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자군의 예후를 넥틴-4 발현율을 통해 예측할 수 있었다.

[0012] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 단계, 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 넥틴-4 발현율을 측정하는 단계 및 측정된 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부와 넥틴-4 발현율을 기초로 자궁내막암의 예후를 예측하는 단계를 포함하는 자궁내막암의 예후 예측 방법 및 이를 이용한 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 단계, 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 넥틴-4 발현율을 측정하는 단계 및 측정된 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부와 넥틴-4 발현율을 기초로 자궁내막암 환자의 자궁내막암에 대한 예후를 예측하는 단계를 포함하는 자궁내막암의 예후 예측 방법을 제공한다.

[0015] 본 명세서에 사용되는 용어 "자궁내막암 환자"는, MSH2 또는 MSH6 결손에 의해 발병한 자궁내막암 환자를 포함한 자궁내막암 질환을 가진 인간을 포함하는 동물을 의미할 수 있으며, 숙주, 대상체, 환자와 같은 용어로 혼용되어 사용될 수 있다.

[0016] 본 명세서에 사용되는 용어 "자궁내막암 (Endometrial carcinoma, EC)"은, 자궁 윗부분에 속하는 체부에 생긴 전이성을 가진 악성 암 또는 악성 종양을 의미할 수 있다.

[0017] 본 명세서에서 사용된 용어 "MSH2" 및 "MSH6"는 DNA 복제 시 오류를 복구하는 단백질을 코딩하는 유전자인 MMR (DNA mismatch repair) 유전자 집단에 속한 유전자를 의미한다. MSH2 및 MSH6를 포함하는 MMR 단백질은 DNA 복제 과정에서 상보적으로 결합하는 DNA 가닥(strand) 간에 염기 짝이 안 맞는 것을 인식하고 떼어내는 역할을 한다. 이러한 역할을 하는 현재까지 밝혀진 MMR 유전자의 종류에는 MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 등이 있다.

[0018] 본 명세서에서 사용된 용어 "DNA 불일치 복구결함 (DNA mismatch repair deficient, dMMR)"은 MMR 유전자의 결실, 치환 등의 변이가 일어나 그 기능(DNA 복제 시 오류 복구)을 하지 못하는 상태를 의미한다.

[0019] 본 명세서에서 사용된 용어 "MSH2 또는 MSH6의 결손"은, MSH2 또는 MSH6 단백질 결손 또는 결핍을 의미할 수 있으며, 나아가 MSH2 또는 MSH6 단백질을 코딩하는 유전자의 결손 또는 결핍을 의미할 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 용어 "넥틴-4 (Nectin-4)"는 넥틴-4 단백질 또는 넥틴-4 단백질을 코딩하는 유전자를 의미할 수 있다. 넥틴-4 (Nectin-4) 단백질은 폴리오바이러스 수용체 관련 단백질 4 (Poliovirus receptor-

related-4, PVRL4)로도 알려졌으며, 약 52 kDa 크기의 막관통 단백질이다.

- [0021] 본 명세서에서 사용되는 용어 "넥틴-4 발현율"은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 있는 세포, 바람직하게는 자궁내막조직 샘플의 수집된 세포들 중에서 넥틴-4를 발현하는 세포의 수를 비율로 표현한 것일 수 있다. 이때, 비율은 퍼센트(%)로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "넥틴-4 발현율 측정"은 넥틴-4 (nectin-4)의 단백질 또는 이의 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 사용된 용어 "예후"는 의학적 귀추 (예컨대, 장기 생존 가능성, 무진행 생존율 등)에 대한 예상 을 의미하며, 양성적 예후(긍정적 예후) 또는 음성적 예후(부정적 예후)를 포함하며, 상기 음성적 예후는 재발, 종양성장, 전이, 약 저항성 등의 병의 진행 또는 치명성(mortality)을 포함하고, 양성적 예후는 질병이 없는 상 태 등의 질병의 차도, 종양 퇴행 등의 질병의 개선 또는 안정화(stabilization)를 포함한다. 바람직하게는 자궁 내막암 환자의 자궁내막암의 전이 여부 및 케플란-마이어 그래프를 통해 예측된 자궁내막암의 무진행 생존율을 의미할 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 사용된 용어 "예측"은 병세의 진행, 회복에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 본 발명의 목적상, 예후란 자궁내막암의 치료 후 해당 개체에서 치료 성공 여부, 생존, 재발, 전이, 약물반응성, 내성 등과 같은 여부를 판단하는 것을 의미한다. 보다 구체적으로는 넥틴-4 발현율에 기초 하여 자궁내막암 예후를 조기에 예측하는 것을 의미 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 "바이오마커"는 자궁내막암이 발생한 대상체의 조직 또는 세포를 정상 대조군의 조직 또는 세포와 구 분하여 예측할 수 있는 물질로, 정상 대조군에 비하여 질환이 발생한 대상체의 조직 또는 세포에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 단백질 또는 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 특징에 따르면, 자궁내막암의 예후 예측 방법은 자궁내막암 환자로 부터 분리된 생물학적 시료로부터 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 단계에서 MSH2 또는 MSH6가 결손된 것으로 검출되는 경우에 한하여, 자 궁내막암 환자로 부터 분리된 생물학적 시료로부터 넥틴-4 발현율을 측정하는 단계가 수행될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 넥틴-4 발현율은, 분리된 생물학적 시료 중에서 수집된 세포수 대비 넥틴-4 단백질이 발현된 세포수의 비율일 수 있다.
- [0027] 이때, 전술한 MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자는, 측정된 넥틴-4 발현율이 3% 이상 또는 3.411% 이상 또는 4% 이상 이면, 예후가 나쁜 것으로 예측되고, 상기 측정된 넥틴-4 발현율이 3% 미만, 3.411% 미만 또는 4% 미만이면, 예후가 좋은 것으로 예측될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 방법은, 면역조직화학염색 (immunohistochemistry), PCR, 역전사-PCR(reverse transcription-PCR), 실시간 PCR, DNA 마이크로어레이, 형 광 제자리 부합법 (fluorescence in situ hybridization, FISH), 염색체 마이크로어레이(chromosome microarray, CMA), 복합 결찰 의존 탐침 증폭(multiplex ligation dependent probe amplification, MLPA), 유 전자 패널 (tageted sequencing), 엑솜 시퀀싱 (exome sequencing) 및 차세대 염기서열분석 (Next generation sequencing, NGS)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 넥틴-4 발현율의 측정법은, 면역조직화학염색법, RT-PCR, 노던 블로 팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이(microarray), NPA (nuclease protection assay, NPA) 또는 인 시 투 하이브리다이제이션(in situ hybridization), ELISA, 웨스턴 블로팅(western blotting), 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 및 단백질 칩 키트로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 생물학적 시료는, 조직액, 정액, 골수액, 림프액, 눈물, 콧물, 침, 땀, 젖, 혈액, 혈청, 혈장 및 조직으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0031] 이때, 전술한 조직은, 자궁내막 조직이고, 면역조직 화학염색에 이용될 수 있는 생물학적 시료이며, 냉동 조직 절편, 파라핀 절편, 세포도말 표본으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0032] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 자궁내막암 환자로 부터 분리된 생물학적 시료에 대하여 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하도록 구성된 제1 및 넥틴-4 발현율을 측정하도록 구성된 제2를 포함하고, 검출된 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 측정된 넥틴-4 발현율에 기초하여 개체의 자궁내막암에 대한

예후 정보를 제공하기 위한 수단을 포함하는 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트를 제공한다.

- [0033] 본 발명의 특징에 따르면, 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트는 전술한 넥틴-4 발현율을 측정하도록 구성된 제제는 넥틴-4 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드(oligopeptide), 리간드(ligand), PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer) 중 적어도 하나일 수 있다. 나아가, 전술한 넥틴-4 발현율을 측정하도록 구성된 제제는 넥틴-4 유전자의 mRNA 발현율을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있으며, 이때, 넥틴-4 유전자의 mRNA 발현율을 측정하는 제제는, 넥틴-4 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer), 프로브(probe) 및 뉴클레오티드(nucleotide) 중 적어도 하나일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트의 자궁내막암에 대한 예후 정보를 제공하기 위한 수단은 자궁내막암에 대한 정보를 디스플레이 하도록 구성된 장치이며, 전술한 장치는 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 상기 넥틴-4의 발현율을 전달하기 위한 통신부를 포함할 수 있다.
- [0035] 나아가, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 자궁내막암에 대한 정보를 디스플레이 하도록 구성된 컴퓨팅 장치는, 측정된 MSH2 또는 MSH6 결손 여부 및 넥틴-4의 발현율에 기초하여 상기 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 넥틴-4의 발현율을 포함하는 자궁내막암으로 결정된 정보를 제공할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트의 생물학적 시료는, 자궁내막 조직이고, 면역조직 화학염색에 이용될 수 있는 생물학적 시료이며, 냉동 조직절편, 파라핀 절편, 세포도말 표본으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명은 자궁내막암 환자를 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하고, MSH2 또는 MSH6가 결손된 환자의 넥틴-4 발현율을 이용하여 자궁내막암의 예후를 예측할 수 있는 효과가 있다.
- [0039] 보다 상세하게는, 본 발명에서 제공하는 바이오마커를 사용하면, MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 생존 예후를 넥틴-4 발현율을 이용하여 보다 용이하게 예측할 수 있어서, MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자를 고위험군 환자로 분류하거나, 추가적인 치료 방법의 사용 여부를 결정하는데 사용할 수 있다. 이로써 자궁내막암 발병 후의 생존율을 높이는데 기여할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 본 발명의 다양한 실시예에 따른 자궁내막암의 예후 예측 방법의 절차를 예시적으로 도시한 것이다.
- 도 2a 내지 2b는 본 발명의 다양한 실시예에 따른 MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 무진행 생존(progression-free survival) 그래프를 도시한 것이다.
- 도 3a 내지 3d는 본 발명의 다양한 실시예에 따른 MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 림프-혈관 침윤(Lymph-vascular space invasion, LVSI) 유무와 넥틴-4 발현율과의 관계를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0043] 본 문서에서 사용된 표현 "~하도록 구성된(또는 설정된)(configured to)"은 상황에 따라, 예를 들면, "~에 적합한(suitable for)," "~하는 능력을 가지는(having the capacity to)," "~하도록 설계된(designed to)," "~하도록 변경된(adapted to)," "~하도록 만들어진(made to)," 또는 "~를 할 수 있는(capable of)"과 바꾸어 사용될 수 있다.

- [0044] 본 문서에서 사용된 용어들은 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 다른 실시예의 범위를 한정하려는 의도가 아닐 수 있다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함할 수 있다. 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 용어들은 본 문서에 기재된 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가질 수 있다. 본 문서에 사용된 용어들 중 일반적인 사전에 정의된 용어들은, 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 동일 또는 유사한 의미로 해석될 수 있으며, 본 문서에서 명백하게 정의되지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다. 경우에 따라서, 본 문서에서 정의된 용어일지라도 본 문서의 실시예들을 배제하도록 해석될 수 없다.
- [0045] 본 발명의 여러 실시예들의 각각 특징들이 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실시예들이 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.
- [0046] 이하에서는 도 1을 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 자궁내막암의 예후 예측 방법의 절차에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0047] 도 1은 본 발명의 다양한 실시예에 따른 자궁내막암의 예후 예측 방법의 절차를 예시적으로 도시한 것이다.
- [0048] 도 1을 참조하면, 자궁내막암의 예후 예측 방법의 절차는, 먼저 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 단계 (S110), 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 넥틴-4 발현율을 측정하는 단계 (S120), 및 측정된 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부와 측정된 넥틴-4 발현율을 기초로 상기 자궁내막암 환자의 자궁내막암에 대한 예후를 예측하는 단계 (S130)로 구성된다.
- [0049] 이때, 자궁내막암의 예후 예측 방법은 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 단계에서 MSH2 또는 MSH6가 결손된 것으로 검출되는 경우에 한하여, 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 넥틴-4 발현율을 측정하는 단계가 수행될 수 있다.
- [0050] 나아가, 도 1을 참조하면, 넥틴-4 발현율은 분리된 생물학적 시료 중에서 수집된 세포수 대비 넥틴-4 단백질이 발현된 세포수의 비율일 수 있다. 이때, 생물학적 시료는, 조직액, 정액, 골수액, 림프액, 눈물, 콧물, 침, 땀, 젖, 혈액, 혈청, 혈장 및 조직으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다. 또한, 생물학적 시료로 이용되는 조직은 면역조직 화학염색에 이용될 수 있는 자궁내막 조직이고, 냉동 조직절편, 파라핀 절편, 세포도말 표본으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0051] 한편, 도 1을 참조하면, MSH2 또는 MSH6의 결손 여부를 검출하는 방법은, 면역조직화학염색 (immunohistochemistry), PCR, 역전사-PCR(reverse transcription-PCR), 실시간 PCR, DNA 마이크로어레이, 형광 제자리 부합법(fluorescence in situ hybridization, FISH), 염색체 마이크로어레이(chromosome microarray, CMA), 복합 결찰 의존 탐침 증폭(multiplex ligation dependent probe amplification, MLPA), 유전자 패널(targeted sequencing), 엑솜 시퀀싱(exome sequencing) 및 차세대 염기서열분석(Next generation sequencing, NGS)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0052] 더 나아가, 넥틴-4 발현율의 측정법은, 면역조직화학염색법, RT-PCR, 노던 블로팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이(microarray), NPA (nuclease protection assay, NPA) 또는 인 시투 하이브리다이제이션(in situ hybridization), ELISA, 웨스턴 블로팅(western blotting), 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 및 단백질 칩 키트로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0053] 이상의 절차에 따라, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 자궁내막암의 예후 예측 방법은, MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 넥틴-4 발현율을 기초로 MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 자궁내막암에 대한 예후에 대한 정보를 제공할 수 있으며, 나아가, 상기 예후 예측 방법을 활용한 자궁내막암의 예후 정보 제공용 키트를 제공할 수 있다.
- [0054] **실시예 1. MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 예후 관찰**
- [0055] 이하에서는, 도 2a 및 2b를 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 예후 예측 마커에 대하여 설명한다.
- [0056] 도 2a는 본 발명의 다양한 실시예에 따른 MSH2가 결손된 자궁내막암 환자의 무진행 생존 (progression-free survival) 그래프를 도시한 것이다.
- [0057] 도 2b는 본 발명의 다양한 실시예에 따른 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 무진행 생존 (progression-free

survival) 그래프를 도시한 것이다.

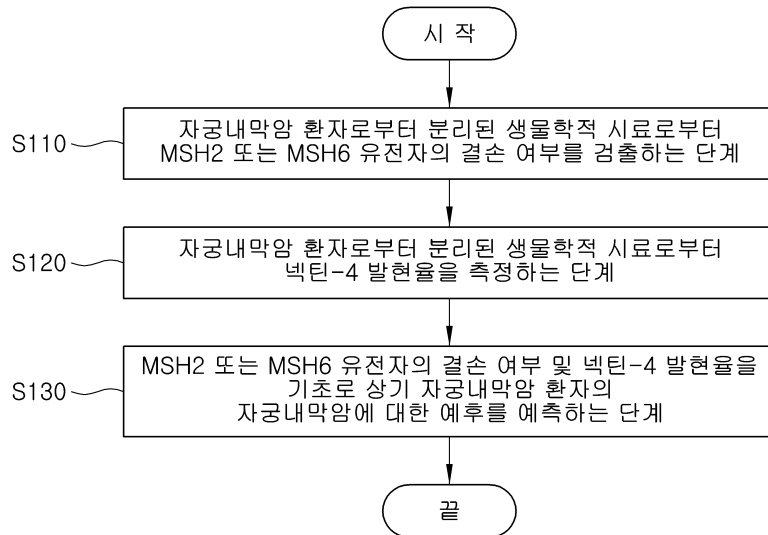
- [0058] 도 2a 및 2b를 참조하면, “Low”는 넥틴-4 발현율이 3.411% 미만임을 의미하며, 도 2a 및 2b에서 얇은 선으로 표시되었고; “high”는 넥틴-4 발현율이 3.411% 이상임을 의미하며, 굵은 선으로 표시되었다. 도 2a의 세로축은 MSH2가 결손된 자궁내막암 환자의 무진행 생존율(백분율)을 나타내고, 도 2b의 세로축은 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 무진행 생존율(백분율)을 나타낸다. 도 2a 내지 2b의 가로축은 케플란-마이어 생존곡선 그래프의 생존 관찰 시간 (월, months)을 나타낸다.
- [0059] 도 2a를 참조하면, MSH2가 결손된 자궁내막암 환자군에서 넥틴-4 발현율이 높은 환자군 (Nectin4 High)은 넥틴-4 발현율이 낮은 환자군 (Nectin4 Low)과 대비하여 위험비 (Hazard ratio, HR)에 있어서 9.025로 증가하였으며, 1.259-64.71의 95% 신뢰구간을 보여주는 것으로 관찰되었다. 즉, MSH2가 결손된 자궁내막암 환자군에 있어서, 넥틴-4의 발현율은 생존율로 관찰되는 예후 예측에 있어 바이오마커로 사용될 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0060] 도 2b를 참조하면, MSH6가 결손된 자궁내막암 환자군에서 넥틴-4 발현율이 높은 환자군 (Nectin4 High)은 넥틴-4 발현율이 낮은 환자군 (Nectin4 Low)과 대비하여 위험비 (Hazard ratio, HR)에 있어서 6.285로 증가하였으며, 1.259-64.71의 95% 신뢰구간을 보여주는 것으로 관찰되었다.
- [0061] 이는, MSH6가 결손된 자궁내막암 환자군에 있어서, 넥틴-4의 발현율은 생존율로 관찰되는 예후 예측에 있어 바이오마커로 사용될 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0062] < 넥틴-4 발현율 측정 방법 >
- [0063] 자궁내막 조직에서의 넥틴-4 발현율 확인을 위해 자궁내막조직을 면역조직화학염색 하고자 하였으며, 이를 위해 자궁내막 조직의 조직 마이크로어레이(Tissue microarray, TMA)를 먼저 박절(section)하였다. 다음으로 조직 마이크로어레이 박절을 통해 얻어진 5 μ m 두께의 조직 마이크로어레이(TMA) 절편은 자일렌(xylene)으로 탈파라핀화 되었고 일련의 등급 에탄올 시리즈로 다시 수화되었다. 본 발명에서는 위와 같은 과정을 통해 얻어진 시료를 생물학적 시료로 하였다.
- [0064] 이어서 수행된 TMA 절편의 열-매개 항원 회수(Heat-mediated antigen retrieval)는 pH 6.0의 구연산염 버퍼 처리 후 압력 챔버 (Pascal; Dako, Carpinteria, CA, USA)를 사용하여 수행되었다.
- [0065] 다음으로, 시료는 내인성 과산화효소 활성 억제제를 위해 3% 과산화수소소 용액 (Dako)으로 상온에서 20분간 침지되었고, 이어서 상기 TMA 절편 슬라이드는 실온에서 1시간 동안 mouse monoclonal anti-Nectin-4 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)로 염색되었다.
- [0066] 이후, 면역조직화학염색된 넥틴-4 단백질의 확인을 위해 슬라이드는 Envision+Ms HRP link secondary (Dako)로 염색되고 3,3'-다이아미노벤지딘(Dako)으로 시각화되었으며 헤마톡실린으로 염색되었다. 이어서, 면역 염색된 슬라이드는 Aperio AT2 디지털 스캐너(Leica Biosystems, Vista, CA)를 사용하여 스캔되었으며, Visiopharm Digital Image Analysis (DIA) software v6.9.1 (Visiopharm, Hø Tsholm, Denmark)로 이미지 분석되었다.
- [0067] 본 발명에서 넥틴-4 발현율은 생물학적 시료 중에서 수집된 세포수 대비 넥틴-4 단백질이 발현된 세포의 백분율 (0-100%)로 표현되었다.
- [0069] **실시예 2. MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 림프-혈관 침윤 (Lymph-vascular space invasion, LVSI) 유무와 넥틴-4 발현율과의 관계 확인**
- [0070] 이하에서는, 도 3a 내지 3d를 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 림프-혈관 침윤 (Lymph-vascular space invasion, LVSI) 유무와 넥틴-4 발현율과의 관계 확인 결과에 대하여 설명한다.
- [0071] 도 3a 내지 3d는 본 발명의 다양한 실시예에 따른 MSH2 또는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 림프-혈관 침윤 (Lymph-vascular space invasion, LVSI) 유무와 넥틴-4 발현율과의 관계를 도시한 것이다.
- [0072] 도 3a는 MSH2가 결손된 자궁내막암 환자의 림프-혈관 침윤 (Lymph-vascular space invasion, LVSI) 유무에 따른 넥틴-4 발현율을 도시한 것이다.
- [0073] 도 3b는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자의 림프-혈관 침윤 (Lymph-vascular space invasion, LVSI) 유무에 따른 넥틴-4 발현율을 도시한 것이다.

- [0074] 도 3c는 MSH2가 결손된 자궁내막암 환자를 넥틴-4 발현율이 3.411% 미만인 환자군 (가로축 Nectin4 group-Low)과 넥틴-4 발현율이 3.411% 이상인 환자군 (가로축 Nectin4 group-High)으로 나누었을 때, 각 군 내에서 림프-혈관 침윤 (Lymph-vascular space invasion, LVSI)이 있는 환자의 비율(백분율 0-100%)을 나타낸다.
- [0075] 도 3d는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자를 넥틴-4 발현율이 3.411% 미만인 환자군 (가로축 Nectin4 group-Low)과 넥틴-4 발현율이 3.411% 이상인 환자군 (가로축 Nectin4 group-High)으로 나누었을 때, 각 군 내에서 림프-혈관 침윤 (Lymph-vascular space invasion, LVSI)이 있는 환자의 비율(백분율 0-100%)을 나타낸다.
- [0076] 도 3a 및 3b를 참조하면, 가로축의 “LVSI-0”는 림프-혈관 침윤이 없는 환자, 즉 암 전이가 일어나지 않은 환자군을 나타내며, “LVSI-1”은 림프-혈관 침윤이 있는 환자, 즉 암 전이가 일어난 환자군을 나타낸다. 세로축은 각 군의 자궁내막암의 넥틴-4 발현율을 나타낸다. 가로축의 “n=17”, “n=13”, “n=16”, “n=14”는 각 군의 환자 수(number)를 의미한다. “MSH2-0”는 MSH2가 결손된 자궁내막암 환자군을 의미하고, “MSH6-0”는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자군을 의미한다.
- [0077] 한편, 도 3a 및 3b에서, 넥틴-4 발현은 미국 R&D사의 Nectin-4 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다.
- [0078] 도 3a를 참조하면, MSH2가 결손된 자궁내막암 환자군 중, 림프-혈관 침윤이 있는 경우(LVSI-1)에서 넥틴-4 발현율이 높은 것으로 나타났다.
- [0079] 도 3b에서도, MSH6가 결손된 자궁내막암 환자군 중, 림프-혈관 침윤이 있는 경우(LVSI-1)에서 넥틴-4 발현율이 높은 것으로 나타났다.
- [0080] 다음으로, 도 3c 및 3d를 참조하면, 가로축의 “Nectin4 group-Low”는 넥틴-4 발현율이 3.411% 미만임을 의미하며, “Nectin4 group-high”는 넥틴-4 발현율이 3.411% 이상임을 의미한다. 세로축은 각 군 내에서 림프-혈관 침윤 (Lymph-vascular space invasion, LVSI)이 있는 환자의 비율(백분율 0-100%)을 나타낸다. MSH2-0는 MSH2가 결손된 자궁내막암 환자군을 의미하고, MSH6-0는 MSH6가 결손된 자궁내막암 환자군을 의미한다.
- [0081] 도 3c를 참조하면, MSH2가 결손된 자궁내막암 환자군에서 넥틴-4 발현율이 높을 때, 림프-혈관 침윤 (Lymph-vascular space invasion, LVSI)이 있는 환자의 비율이 높은 것으로 나타난다.
- [0082] 도 3d에서도, MSH6가 결손된 자궁내막암 환자군에서 넥틴-4 발현율이 높을 때, 림프-혈관 침윤 (Lymph-vascular space invasion, LVSI)이 있는 환자의 비율이 높은 것으로 나타난다.
- [0083] 요약하면, 도 3a 내지 3d는, 도 2a 내지 2b에서 언급된 넥틴-4 발현율 3.411% 이상일 때, 무진행 생존율이 낮은 이유를 설명해주는 결과로서, MSH-2 또는 MSH-6 결손 자궁내막암 환자 군에서 넥틴-4 발현율이 높으면 림프-혈관 침윤 경향이 더 높을 수 있음을 보여주고 있다.
- [0084] 이에, 자궁내막암 환자에게 있어서, MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 검출 및 넥틴-4 발현율은, MSH2 또는 MSH6가 결손된 환자군에게서 자궁내막암의 예후를 예측하는 바이오마커로서 이용될 수 있으며, MSH2 또는 MSH6가 결손된 환자군에게서 넥틴-4 발현율이 3.411% 이상일 때, 자궁내막암의 예후가 좋지 않은 것으로 예측되는 효과가 있다.
- [0086] 이상의 실시예의 결과로, MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 검출 및 넥틴-4 발현율을 확인하고 이를 이용하여 자궁내막암의 예후 예측용 바이오마커로 유용하게 이용할 수 있음을 확인하였다.
- [0087] 이때, 자궁내막암의 예후 예측을 위한 생물학적 시료는 자궁내막 조직일 수 있다. 즉, 자궁내막 조직에서 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 검출 및 넥틴-4 발현율을 측정함으로써 자궁내막암의 예후를 보다 높은 정확도로 예측할 수 있는 효과가 있다.
- [0088] 또한, 본 발명은 자궁내막암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여, MSH2 또는 MSH6 결손 여부를 검출하도록 구성된 제제 및 넥틴-4 발현율을 측정하도록 구성된 제제를 포함하고, 검출된 MSH2 또는 MSH6의 결손 여부 및 측정된 넥틴-4 발현율에 기초하여 상기 자궁내막암 환자의 자궁내막암에 대한 예후 정보를 제공하기 위한 수단을 포함 키트를 더 제공할 수 있다.
- [0089] 본 발명의 여러 실시예들의 각각 특징들은 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실시예들이 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.
- [0090] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실

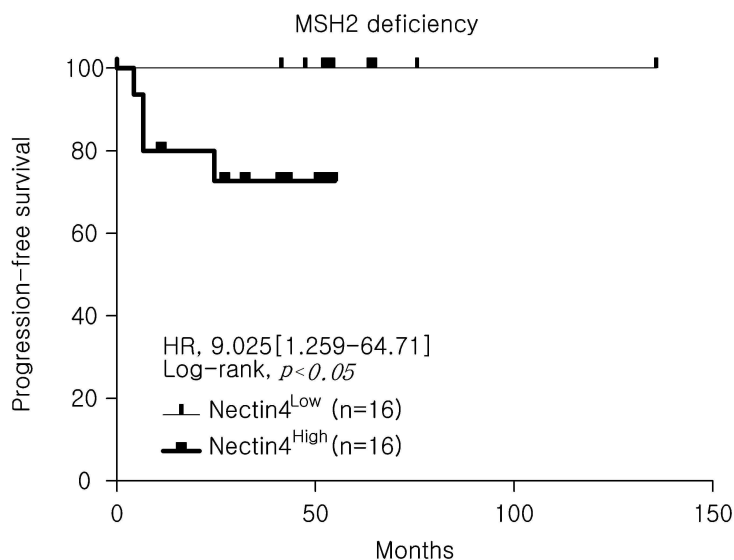
시예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

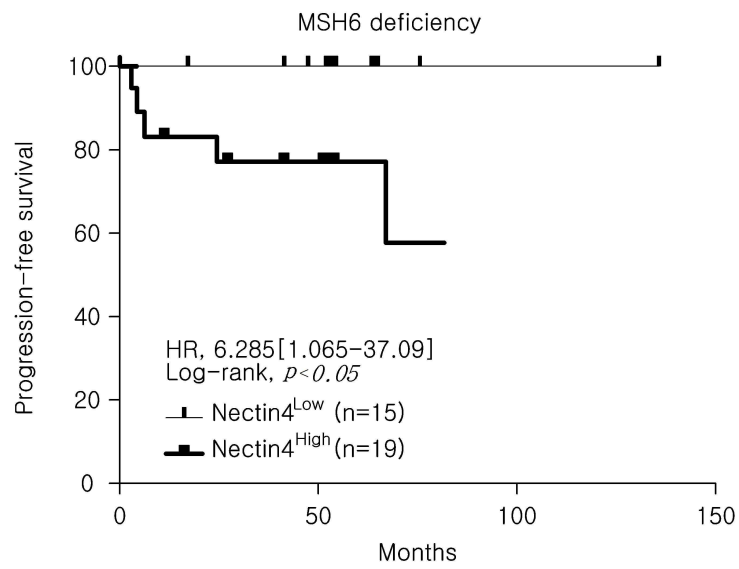
도면1



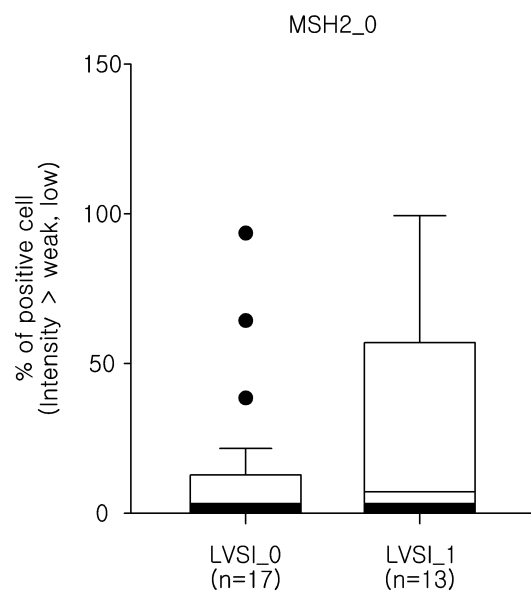
도면2a



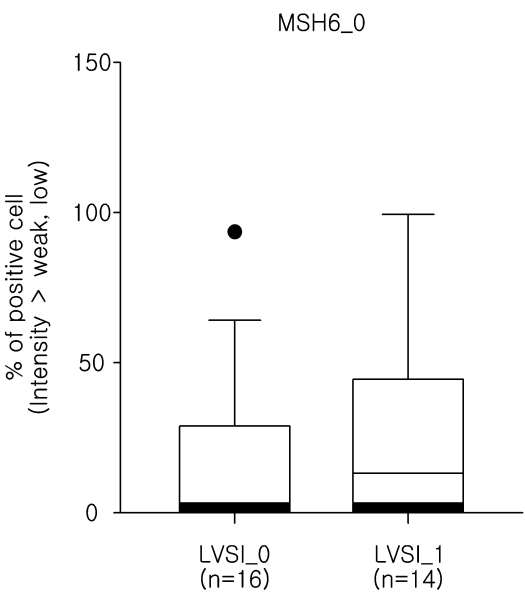
도면2b



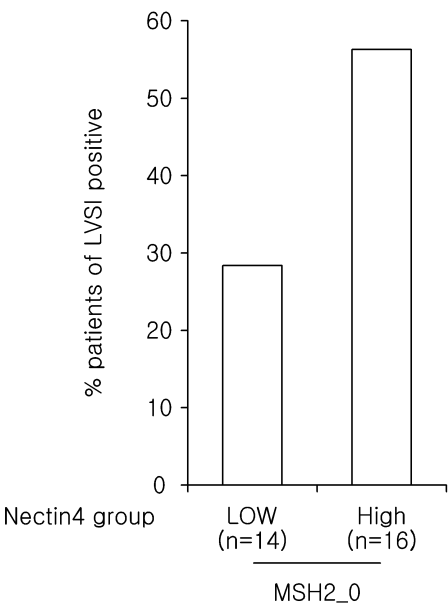
도면3a



도면3b



도면3c



도면3d

