(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0079602
(43) 공개일자 2019년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/57407 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0076679(분할)
(22) 출원일자 2019년06월26일
심사청구일자 2019년06월26일
(62) 원출원 특허 10-2017-0115641
원출원일자 2017년09월11일
심사청구일자 2017년09월11일

(71) 출원인
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
정양식
강원도 원주시 늘품로 38, 202동 905호 (단구동, 현진에버빌2차아파트)
김민규
강원도 원주시 일산로 20 연세대학교 원주의과대학 생화학교실
(74) 대리인
김보민

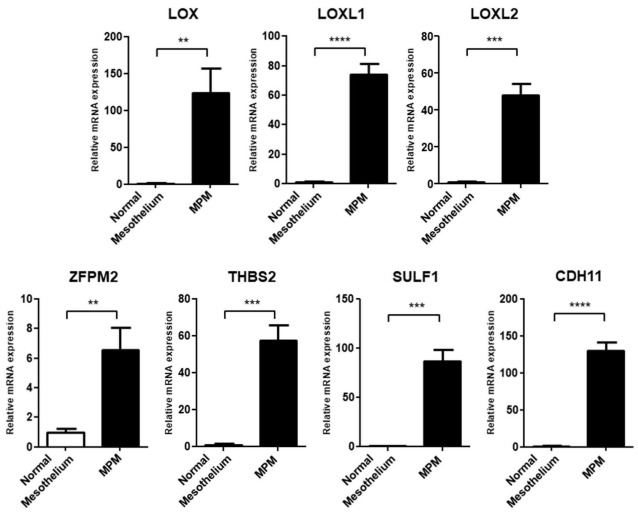
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **악성중피종 진단용 바이오마커 CDH11 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 악성중피종(malignant mesothelioma) 진단용 바이오마커 CDH11 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 생물정보학적 분석을 통해 악성중피종 진단용 유전자 CDH11을 선별하였고, 상기 유전자가 악성중피종 환자의 조직 샘플에서 높은 발현량을 나타내는 것을 확인하였으므로, 상기 유전자를 악성중피종 진단용 바이오마커로 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도12b



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/4703 (2013.01)
G01N 2333/90605 (2013.01)
G01N 2333/916 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1485012397
부처명 환경부
연구관리전문기관 한국환경산업기술원
연구사업명 생활공감환경보건기술개발사업
연구과제명 환경석면 노출에 의한 석면 관련 질환 진단기술 표준화
기 여 율 1/1
주관기관 연세대학교 원주산학협력단
연구기간 2014.07.01 ~ 2015.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

CDH11 유전자를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 흉막악성중피종(pleural malignant mesothelioma) 진단용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 제제는 CDH11 유전자의 핵산 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프라이머 또는 프로브(probe)인 것을 특징으로 하는, 흉막악성중피종 진단용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 프라이머는 유전자 증폭반응(amplication reaction)에 사용되는 것을 특징으로 하는, 흉막악성중피종 진단용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 제제는 CDH11 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 흉막악성중피종 진단용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 항체는 면역분석(immunoassay) 방법에 사용되는 것을 특징으로 하는, 흉막악성중피종 진단용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 흉막악성중피종으로 의심되는 환자의 생물학적 시료에 대해 사용되는 것을 특징으로 하는, 흉막악성중피종 진단용 조성물.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 흉막악성중피종 진단용 키트.

청구항 8

분리된 생물학적 시료에서 흉막악성중피종 진단용 바이오마커로서 CDH11 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 흉막악성중피종의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한, 흉막악성중피종 진단용 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준은 정량적 RT-PCR(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction), 실시간 RT-PCR(real-time reverse transcription polymerase chain reaction), 노던 블럿팅(Northern blotting) 및 DNA 마이크로어레이 칩 분석으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 측정하는 것을 특징으로 하는, 흉막악성중피종 진단용 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 방법.

청구항 10

CDH11 유전자의 핵산 서열 또는 그 상보 가닥 분자가 집적된, 흉막악성중피종 진단용 DNA 마이크로어레이 칩(microarray chip).

청구항 11

1) 흉막악성중피종으로 의심되는 실험군 및 정상 대조군에서 분리한 생물학적 시료에서 각각의 RNA를 분리하는 단계;

2) 단계 1)의 실험군 및 정상 대조군의 RNA를 cDNA로 합성하면서 실험군 및 대조군의 cDNA를 형광물질로 표지하는 단계;

3) 단계 2)에서 형광물질로 표지된 cDNA를 제 10항의 DNA 마이크로어레이 칩과 혼성화시키는 단계;

4) 단계 3)의 반응한 DNA 마이크로어레이 칩을 분석하는 단계; 및

5) 단계 4)의 분석한 데이터에서 제 10항의 DNA 마이크로어레이 칩에 집적된 유전자들의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는, 흉막악성중피종의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 단계 1)의 생물학적 시료는 흉막 조직인 것을 특징으로 하는, 흉막악성중피종의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 악성중피종(malignant mesothelioma) 진단용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 악성중피종 진단용 바이오마커로서 CDH11 유전자 및 이의 악성중피종 진단 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 악성중피종(malignant mesothelioma)은 장기를 보호하며 둘러싸고 있는 '중피'라는 세포에서 발생하는 종양으로, 국가통계포털(Kosis)에 따르면 악성중피종에 대한 5년 유병률이 10만 명당 0.3 명으로 다른 암종(폐암: 5년 유병률 77.6 명)보다 발생빈도가 낮은 것으로 알려져 있다. 그러나, 악성중피종은 석면 노출에 의해서 발병한다는 것이 확실하게 밝혀져 있으며, 악성도가 높고 공격적인 암으로서 예후가 좋지 않다.

[0005] 악성중피종의 원인물질로 잘 알려진 석면은 그 분진을 마시게 되면 암으로 진행될 가능성이 높다. 석면은 매우 안정한 물질로서 배출 또는 용해되지도 않는 상태로 평생 체내에 머무르면서 조직과 세포에 손상을 가한다. 따라서 체내에 석면 분진이 들어오면 10~40년 가량의 잠복기를 거쳐서 대부분 암으로 이어진다. 특히, 우리나라의 경우 1960년대부터 경제개발과 함께 산업사회에서 석면이 광범위하고 대량으로 사용되기 시작하여, 1990년대에 들어와서도 수입량이 거의 줄지 않았으며, 1990년대 후반에 이르러서야 사회문제로 수면 위에 드러나면서 석면 사용량을 줄이기 시작했다. 결국, 2000년대에 이르러서야 석면사용이 전면 금지되었다. 석면의 잠복기가 길다는 점을 미루어 보았을 때 앞으로 발병자 수는 지속적으로 늘어날 것으로 예측된다. 또한 중국, 인도, 러시아, 브

라질, 짐바브웨, 카자흐스탄, 인도네시아 등의 개발도상국이나 후진국에서는 여전히 석면을 사용하고 있다. 이러한 점에서 새로운 진단 바이오마커(Diagnostic Biomarker)는 악성중피종의 진단이나 치료 방향을 결정하는 데에 있어서 긍정적인 영향을 발휘할 수 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 기존에 알려진 악성종피종 진단 바이오마커보다 우수한 진단력을 갖는 새로운 진단 바이오마커를 개발하기 위해 노력한 결과, 생물정보학적인 분석을 통해 후보 유전자 CDH11을 선별하였고, 상기 유전자가 악성중피종 환자의 조직 샘플에서 높은 발현량을 나타내는 것을 확인하여, 상기 유전자를 정확한 악성중피종 진단 용도로 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Harvey I. Pass, M.D., Stephen M. Levin, M.D., Michael R. Harbut, M.D., Jonathan Melamed, M.D., Luis Chiriboga, Ph.D., Jessica Donington, M.D., Margaret Huflejt, Ph.D., Michele Carbone, M.D., Ph.D., David Chia, Ph.D., Lee Goodglick, Ph.D., Gary E. Goodman, M.D., Mark D. Thornquist, Ph.D., Geoffrey Liu, M.D., Marc de Perrot, M.D., Ming-Sound Tsao, M.D., and Chandra Goparaju, Ph.D. Fibulin-3 as a Blood and Effusion Biomarker for Pleural Mesothelioma. N Engl J Med 2012; 367:1417-1427.

(비특허문헌 0002) Haynes RC. Where there is asbestos, there is mesothelioma: filling in the data blanks. Environ Health Perspect. 2011 Apr;119(4):A177.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 악성중피종(malignant mesothelioma) 진단용 바이오마커 CDH11 및 상기 바이오마커를 이용하여 악성중피종의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 악성중피종(malignant mesothelioma) 진단용 바이오마커 CDH11을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 CDH11 유전자를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 악성중피종 진단용 조성물 및 이를 포함하는 악성중피종 진단용 키트를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 분리된 생물학적 시료에서 악성중피종 진단용 바이오마커로서 CDH11 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 악성중피종의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한, 악성중피종 진단용 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 CDH11 유전자의 핵산 서열 또는 그 상보 가닥 분자가 집적된, 악성중피종 진단용 DNA 마이크로어레이 칩(microarray chip)을 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명은

[0017] 1) 악성중피종으로 의심되는 실험군 및 정상 대조군에서 분리한 생물학적 시료에서 각각의 RNA를 분리하는 단계;

[0018] 2) 단계 1)의 실험군 및 정상 대조군의 RNA를 cDNA로 합성하면서 실험군 및 대조군의 cDNA를 형광물질로 표지하는 단계;

[0019] 3) 단계 2)에서 형광물질로 표지된 cDNA를 상기 DNA 마이크로어레이 칩과 혼성화시키는 단계;

[0020] 4) 단계 3)의 반응한 DNA 마이크로어레이 칩을 분석하는 단계; 및

[0021] 5) 단계 4)의 분석한 데이터에서 DNA 마이크로어레이 칩에 집적된 유전자들의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는, 악성중피종의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 생물정보학적 분석을 통해 악성중피종 진단용 후보 유전자 CDH11을 선별하였고, 상기 유전자가 악성중피종 환자의 조직 샘플에서 높은 발현량을 나타내는 것을 확인하였으므로, 상기 유전자를 정확한 악성중피종 진단을 위한 바이오마커로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종(pleural malignant mesothelioma) 샘플에서 이미 알려진 중피종 바이오마커(biomarker)인 MSLN의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 2는 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종 샘플에서 이미 알려진 중피종 바이오마커인 Fibulin-3의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 3은 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종 샘플에서 이미 알려진 중피종 바이오마커인 CALB2의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 4는 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종 샘플에서 이미 알려진 중피종 바이오마커인 WT-1의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 5는 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종 샘플에서 중피종 바이오마커 후보유전자로 LOX의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 6은 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종 샘플에서 중피종 바이오마커 후보유전자로 LOXL1의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 7은 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종 샘플에서 중피종 바이오마커 후보유전자로 LOXL2의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 8은 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종 샘플에서 중피종 바이오마커 후보유전자로 THBS2의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 9는 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종 샘플에서 중피종 바이오마커 후보유전자로 ZFPM2의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 10은 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종 샘플에서 중피종 바이오마커 후보유전자로 CDH11의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 11은 정상 폐 또는 흉막 샘플과 흉막악성중피종 샘플에서 중피종 바이오마커 후보유전자로 SULF1의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 12a는 정상 폐 조직 샘플 및 흉막악성중피종 환자의 조직 샘플에서 이미 알려진 중피종 바이오마커 MSLN, Fibulin-3 및 CALB2의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

도 12b는 정상 폐 조직 샘플 및 흉막악성중피종 환자의 조직 샘플에서 중피종 바이오마커 후보유전자 LOX, LOXL1, LOXL2, ZFPM2, THBS2, SULF1 및 CDH11의 유전자 발현량을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명은 악성중피종(malignant mesothelioma) 진단용 바이오마커를 제공한다.

[0029] 상기 바이오마커는 CDH11 유전자로 이루어져 있다.

[0030] 상기 악성중피종은 장기를 보호하며 둘러싸고 있는 '중피'라는 세포에서 발생하는 종양을 의미하며, 상기 중피는 폐를 보호하는 흉막, 위장이나 간을 보호나는 복막, 심장을 둘러싸고 있는 심박 등의 표면을 구성하고 있다. 보다 구체적으로, 흉막악성중피종(pleural malignant mesothelioma)은 폐를 덮고 있는 흉막 표면을 구성하고 있는 중피에서 발생하는 종양을 말한다.

[0032] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 NCBI의 GEO 데이터베이스에 공개된 "Malignant pleural mesothelioma(GSE2549)" microarray(Affymetrix Human Genome U133A array) 데이터로부터 총 9개의 정상 폐 또는 흉막 샘플 및 40개의 흉막악성중피종 샘플의 유전자 발현량 데이터를 획득하고, 이를 생물정보학적 분석을 통해 악성중피종 진단을 위한 후보 유전자 CDH11을 선별하였고, 상기 유전자가 흉막악성중피종 환자의 조직 샘플에서 우수한 진단력을 나타냄을 확인하였으므로, 상기 유전자를 악성중피종 진단용 바이오마커로 이용할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 CDH11 유전자를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 악성중피종 진단용 조성물을 제공한다.

[0035] 상기 제제는 CDH11 유전자의 핵산 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프라이머 또는 프로브(probe)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 상기 프라이머는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 상기 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서, 상기 프라이머는 주형인 CDH11 유전자의 핵산 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분한다.

[0037] 또한, 상기 프라이머는 유전자 증폭반응(amplication reaction)에 사용되는 것이 바람직하며, 상기 유전자 증폭반응은 예를 들어 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction), 역전사-중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR), 실시간-중합효소연쇄반응(real-time polymerase chain reaction), 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction), 복구연쇄반응(repair chain reaction), 전사-중재증폭(transcription-mediated amplification), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication), 타깃 폴리뉴클레오티드 염기 서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소연쇄반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction), 임의적 프라이밍 중합효소연쇄반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction), 핵산염기서열 기반증폭(nucleic acid sequence basedamplification), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 고리-중재 항온성 증폭(loopmediated isothermal amplification)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 상기 프로브는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 상기 프로브는 자연발생(naturally occurring)의 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드핵산(PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-,

비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0039] 또한, 상기 제제는 CDH11 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 상기 항체는 다클론항체 또는 단일클론 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 또한, 상기 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 제4,816,56호) 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.

[0041] 또한, 상기 항체는 면역분석 방법에 사용되는 것이 바람직하며, 상기 면역분석 방법은 예를 들어 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 유세포 분석(flow cytometry) 또는 면역 형광염색을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 상기 조성물은 악성중피종으로 의심되는 환자의 생물학적 시료에 대해 사용된다. 또한, 상기 생물학적 시료는 악성중피종으로 의심되는 환자에서 분리한 생물학적 시료로서 예를 들어 요액, 혈액, 혈청, 타액, 눈물, 흉강액, 복강액, 조직 또는 세포일 수 있고, 보다 구체적으로 조직일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 상기 조직은 흉막, 복막 또는 심막 조직일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 또한, 본 발명은 상기 악성중피종 진단용 조성물을 포함하는 악성중피종 진단용 키트를 제공한다.

[0045] 상기 악성중피종 진단용 키트는 DNA 마이크로어레 키트 또는 유전자 증폭 키트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 키트가 마이크로어레이 칩인 경우 마이크로어레이의 고상표면에 프로브가 고정화 되어 있고, 상기 키트가 유전자 증폭 키트인 경우 프라이머를 포함한다.

[0046] 또한, 상기 악성중피종 진단용 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 키트가 면역분석용 키트인 경우 다클론 항체 또는 단일클론 항체, 그리고 표지물질이 결합된 상기 다클론 항체와 단일클론 항체에 대한 2차 항체를 포함한다.

[0047] 상기 악성중피종 진단용 키트는 추가적으로 생물학적 시료를 포함할 수 있고, 구체적으로 악성중피종으로 의심되는 환자에서 분리한 생물학적 시료로서 예를 들어 요액, 혈액, 혈청, 타액, 눈물, 흉강액, 복강액, 조직 또는 세포를 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로 조직일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 상기 조직은 흉막, 복막 또는 심막 조직일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 상기 악성중피종 진단용 키트는 추가적으로 형광물질을 포함할 수 있으며, 예를 들어 스트렙아비딘-알칼리 탈인화효소 접합물질(strepavidin-like phosphatease conjugate), 화학형광물질(chemiflurorensce) 또는 화학발광물질(chemiluminescent)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 상기 악성중피종 진단용 키트는 추가적으로 반응 시약을 포함시킬 수 있으며, 상기 반응 시약은 혼성화에 사용되는 완충용액, 형광염색제의 화학적 유도제와 같은 표식시약, 세척 완충용액 등으로 구성될 수 있으나 이에 한정된 것은 아니며, 당업자에게 알려진 DNA 마이크로어레이 칩의 혼성화 반응에 필요한 반응 시약은 모두 포함시킬 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명은 분리된 생물학적 시료에서 악성중피종 진단용 바이오마커로서 CDH11 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 악성중피종의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한, 악성중피종 진단용 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 방법을 제공한다.

[0052] 상기 유전자의 발현 수준은 정량적 RT-PCR(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction), 실시간 RT-PCR, 노던 블럿팅(Northern blotting) 및 DNA 마이크로어레이 칩 분석으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 측정하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 상기 분리된 생물학적 시료는 악성중피종으로 의심되는 환자에서 분리한 생물학적 시료로서 예를 들어 요액, 혈

액, 혈청, 타액, 눈물, 흉강액, 복강액, 조직 또는 세포일 수 있고, 보다 구체적으로 조직일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 상기 조직은 흉막, 복막 또는 심막 조직일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 또한, 본 발명은 CDH11 유전자의 핵산 서열 또는 그 상보 가닥 분자가 집적된, 악성중피종 진단용 DNA 마이크로어레이 칩을 제공한다.

[0056] 상기 악성중피종은 흉막, 복막 또는 심박 표면을 구성하는 중피에서 발생하는 종양일 수 있고, 보다 구체적으로 흉막악성중피종일 수 있다.

[0057] 상기 상보 가닥 분자는 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건하에서 CDH11 유전자의 핵산 서열에 대하여 선택적으로 혼성화할 수 있는 정도의 상보성을 갖는 분자를 의미한다. 따라서 상기 상보 가닥 분자는 CDH11 유전자의 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있는 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 핵산 서열을 가질 수 있다.

[0059] 본 발명의 악성중피종 진단용 DNA 마이크로어레이 칩은 당업자에게 알려진 방법으로 제작할 수 있다. 상기 마이크로어레이 칩을 제작하는 방법은 하기와 같다. 상기 탐색된 바이오마커를 탐침 DNA 분자로 이용하여 칩의 기판상에 고정화시키기 위해 inkjet 방식 등을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 상기 DNA 마이크로어레이 칩의 기판은 에폭시(epoxy), 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-L-lysine) 및 알데히드(aldehyde)로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 활성기가 코팅된 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 상기 기판은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막, 및 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 아울러, 본 발명은

[0064] 1) 악성중피종으로 의심되는 실험군 및 정상 대조군에서 분리한 생물학적 시료에서 각각의 RNA를 분리하는 단계;

[0065] 2) 단계 1)의 실험군 및 정상 대조군의 RNA를 cDNA로 합성하면서 실험군 및 대조군의 cDNA를 형광물질로 표지하는 단계;

[0066] 3) 단계 2)에서 형광물질로 표지된 cDNA를 CDH11 유전자의 핵산 서열 또는 그 상보 가닥 분자가 집적된, 악성중피종 진단용 DNA 마이크로어레이 칩과 혼성화시키는 단계;

[0067] 4) 단계 3)의 반응한 DNA 마이크로어레이 칩을 분석하는 단계; 및

[0068] 5) 단계 4)의 분석한 데이터에서 상기 DNA 마이크로어레이 칩에 집적된 유전자들의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는, 악성중피종의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법을 제공한다.

[0069] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 생물학적 시료는 요액, 혈액, 혈청, 타액, 눈물, 흉강액, 복강액, 조직 또는 세포일 수 있고, 보다 구체적으로 조직일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 상기 조직은 흉막, 복막 또는 심막 조직일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 단계 2)의 형광물질은 Cy3, Cy5, 폴리-L-라이신-플로오르세인 이소티오시아네이트(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate; FITC), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 및 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에게 알려진 형광물질은 모두 사용 가능하다.

[0072] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0073] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0075] **<실시예 1> 샘플 획득**

[0076] 생물정보학적 접근을 통한 악성중피종(malignant mesothelioma)에 대한 진단용 바이오마커를 선별하기 위하여, 9개의 정상 폐 또는 흉막 샘플, 및 40개의 흉막악성중피종(Pleural malignant mesothelioma) 샘플에 대한 유전자 발현량 데이터베이스를 확보하였다.

[0077] 구체적으로, 정상 폐 또는 흉막 조직, 또는 흉막악성중피종 환자의 종양 조직을 이용하여 얻은 유전자 발현 프로파일을 공개 데이터베이스인 NCBI의 GEO(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)에서 수집하였다. GEO 데이터베이스에 공개된 "Malignant pleural mesothelioma(GSE2549)" microarray(Affymetrix Human Genome U133A array) 데이터로부터 총 9개의 정상 폐 또는 흉막 샘플, 및 40개의 흉막악성중피종 샘플의 유전자 발현량 데이터를 확보하였다.

[0079] **<실시예 2> 악성중피종 후보 유전자 선별**

[0080] 상기 <실시예 1>에서 획득한 샘플의 유전자 발현량 데이터베이스를 이용하여 생물정보학적인 분석을 통해 이미 알려진 중피종 바이오마커 4종과 유사하게 흉막악성중피종 샘플에서 높은 유전자 발현 양상을 나타내는 7종의 후보 유전자를 선별하였다.

[0081] 구체적으로, 중피종에서 높게 발현될 것으로 예상되는 유전자들을 선별하기 위하여, 종양세포주 데이터베이스인 Cancer Cell Line Enclopedia (https://portals.broadinstitute.org/ccle/home)에서 중피종 세포주들과 폐 선암(Lung Adenocarcinoma) 세포주들의 microarray 데이터베이스를 상호 비교하여 중피종에서 높은 발현량을 보이는 유전자 100종을 1차 후보 유전자군으로 선별하였다.

[0082] 그 다음, 1차 후보 유전자군 100종을 상기 <실시예 1>에서 획득한 샘플의 유전자 발현량 데이터베이스에서 확인하여 정상 폐 또는 흉막 샘플에 비하여 흉막악성중피종 샘플에서 유전자 발현이 높은 유전자를 선별하였다.

[0083] 그 결과, 도 1 내지 도 11에 나타낸 바와 같이, 이미 알려진 악성중피종 바이오마커인 MSLN(Accession No.: NM_005823.5), Fibulin-3(Accession No.: NM_001039348.2), CALB2(Accession No.: NM_001740.4) 및 WT-1(Accession No.: NM_000378.4) 유전자와 유사하게 LOX(Accession No.: NM_001178102.1), LOXL1(Accession No.: NM_005576.2), LOXL2(Accession No.: NM_002318.2), THBS2(Accession No.: NM_003247.3), ZFPM2(Accession No.: NM_012082.3), CDH11(Accession No.: NM_001797.2) 및 SULF1(Accession No.: NM_001128205.1) 유전자가 정상 샘플에 비하여 유전자 발현량이 높게 나타남을 확인하였으며, 이를 통해 상기 7종을 악성중피종 진단을 위한 유전자로 선별하였다.

[0085] **<실시예 3> 악성중피종 후보 유전자를 이용한 악성중피종 진단력 확인**

[0086] 상기 <실시예 2>에서 선별한 7종의 유전자를 악성중피종 진단을 위한 바이오마커로 이용할 수 있는지 알아보기 위하여, 흉막악성중피종 환자의 조직 샘플을 이용한 q-PCR 분석을 통해 상기 <실시예 2>에서 선별한 7종의 유전자 및 이미 알려진 3종의 악성중피종 바이오마커에 대한 유전자 발현량을 확인하였다.

[0087] 구체적으로, 일반 환자 또는 흉막악성중피종 환자로부터 추출한 흉수샘플을 기관내 대학병원의 병리학과로부터 확보한 후 상기 흉수샘플 내에 부유하는 중피조직을 원심분리기로 분리하였다. 상기 조직 샘플을 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 총 RNA를 분리하였다. 그 다음, 분리한 RNA 1 ㎍을 Revertra Ace qPCR 역전사 마스터 믹스 키트(Toyobo, Osaka, Osaka, Japan)를 사용하여 제조사의 절차에 따라 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA은 하기 [표 1]의 프라이머를 이용하여 q-PCR을 수행하였다. q-PCR은 ThermoFisher Scientific의 Fast SYBR Green PCR 마스터 믹스(Waltham, MA, USA)를 사용하여 수행하였다.

표 1

[0089]

프라이머		서열(5'→3')	서열번호
Fibulin-3	정방향	GGGAGCAGTGCGTAGACATAG	1
	역방향	GCTGCCAATTGAAACCCAGG	2

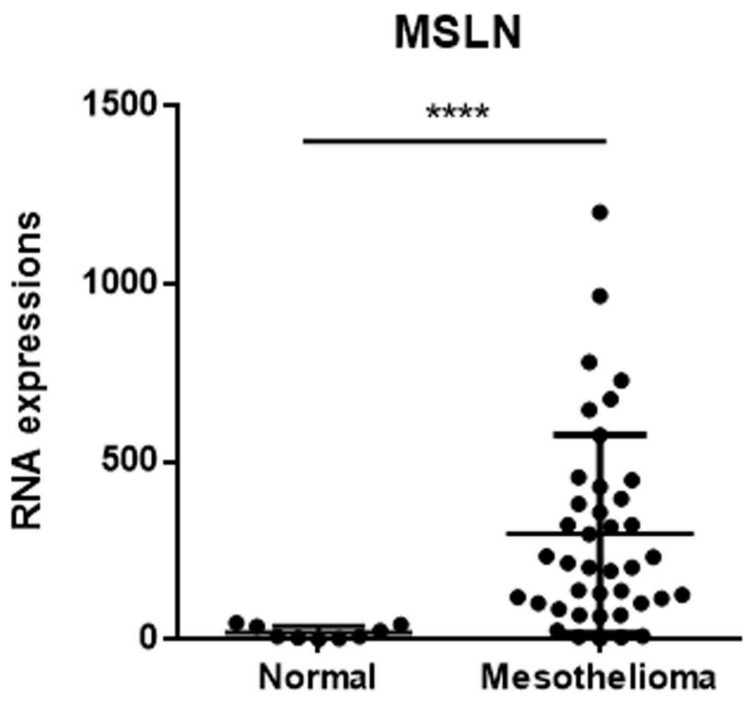
MSLN	정방향	GGATGAGCTCTACCCACAAGG	3
	역방향	ACTTGCGAATGTCCTCAGGG	4
CALB2	정방향	CTGCCTGTCCAGGAAAACTTC	5
	역방향	GTAGCCGCTTCTATCCTTGTC	6
LOX	정방향	TCTGGCCAGTACAGCATACAG	7
	역방향	CTTGGTCGGCTGGGTAAGAA	8
LOXL1	정방향	TCTGGCCAGCACAGCCTAT	9
	역방향	GTTGGGGAGGAAGTCTGCTG	10
LOXL2	정방향	ACTGCCACATAGGTGGTTCC	11
	역방향	CGGGGACAGCTGGTTGTTTA	12
ZFPM2	정방향	TGTGTACAGCAAAGGGGGTC	13
	역방향	TGGCAGCTTGTAGCCTTGAG	14
THBS2	정방향	TGAGGACCTGGACGAGTGTG	15
	역방향	GCTGGTTCCCTCTGTATCGG	16
SULF1	정방향	GCAGTGCAACCCAAGACCTA	17
	역방향	CCATCCCATAACTGTCCTCTGT	18
CDH11	정방향	ACAAGGATGACACGGCCAAT	19
	역방향	GCCTGCTGTGTTATCTCGGT	20

[0090] 그 결과, 도 12a 및 도 12b에 나타낸 바와 같이, 정상 폐 조직 샘플에 비해 흉막악성중피종 환자의 조직 샘플에서 LOX, LOXL1, LOXL2, ZFPM2, THBS2, SULF1 및 CDH11의 유전자 발현량이 현저히 증가하므로, 상기 7종의 유전자가 악성중피종에 대한 우수한 진단력을 나타냄을 확인하였다. 또한, 정상 폐 조직 샘플과 흉막악성중피종 환자의 조직 샘플 간 LOX, LOXL1, LOXL2, THBS2, SULF1 및 CDH11 유전자의 발현량 차이가 이미 알려진 중피종 바이오마커 Fibulin-3, MSLN 및 CALB2보다 유전자 발현량 차이보다 현저하게 나타나므로, 기존 중피종 바이오마커보다 진단력이 우수함을 확인하였다.

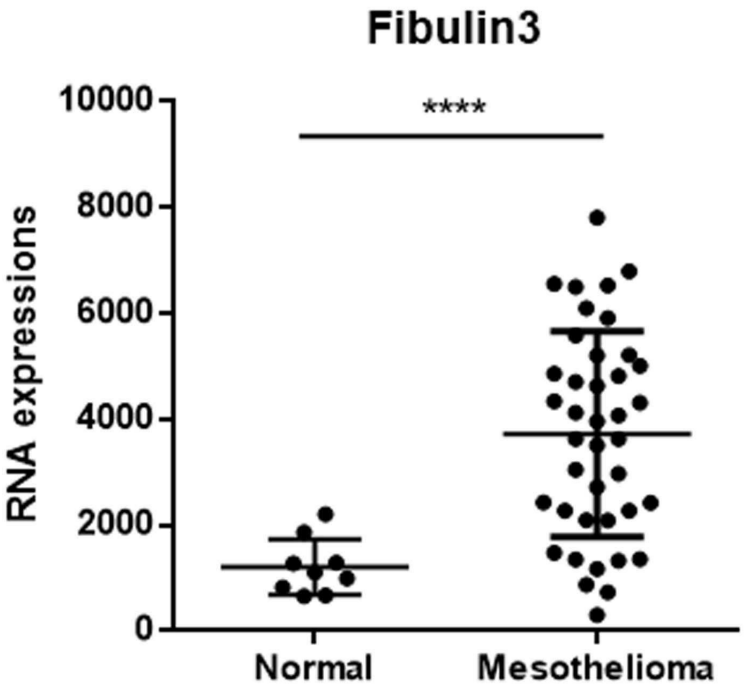
[0091] 따라서 상기 결과를 통해 LOX, LOXL1, LOXL2, ZFPM2, THBS2, SULF1 및 CDH11를 악성중피종 바이오마커로 이용할 수 있음을 확인하였다.

도면

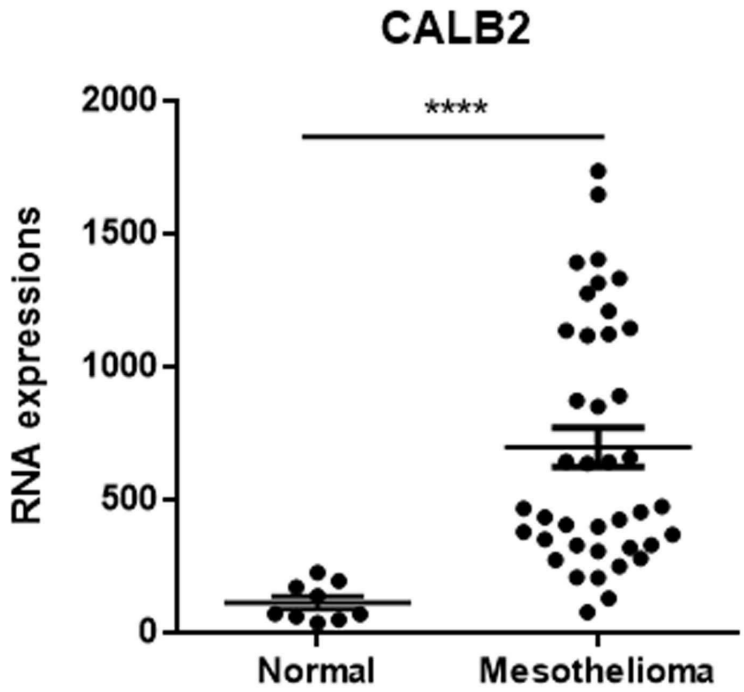
도면1


MSLN
****
1500
1000
500
0
RNA expressions
Normal
Mesothelioma

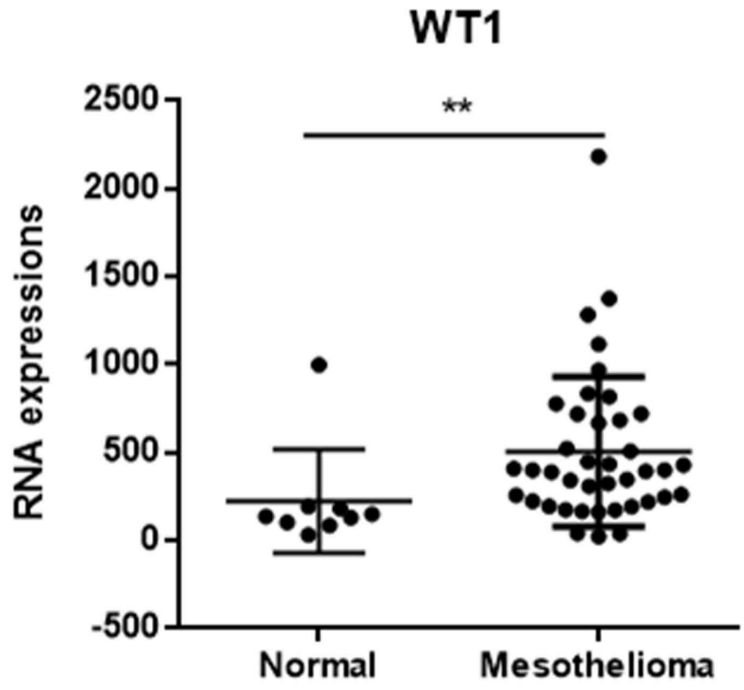
도면2


Fibulin3
****
10000
8000
6000
4000
2000
0
RNA expressions
Normal
Mesothelioma

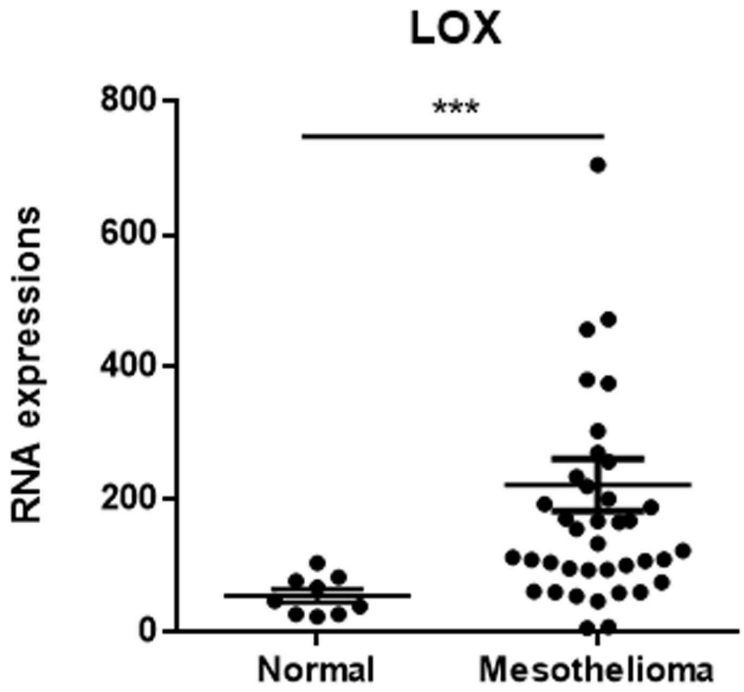
도면3


CALB2
****
RNA expressions
2000
1500
1000
500
0
Normal
Mesothelioma

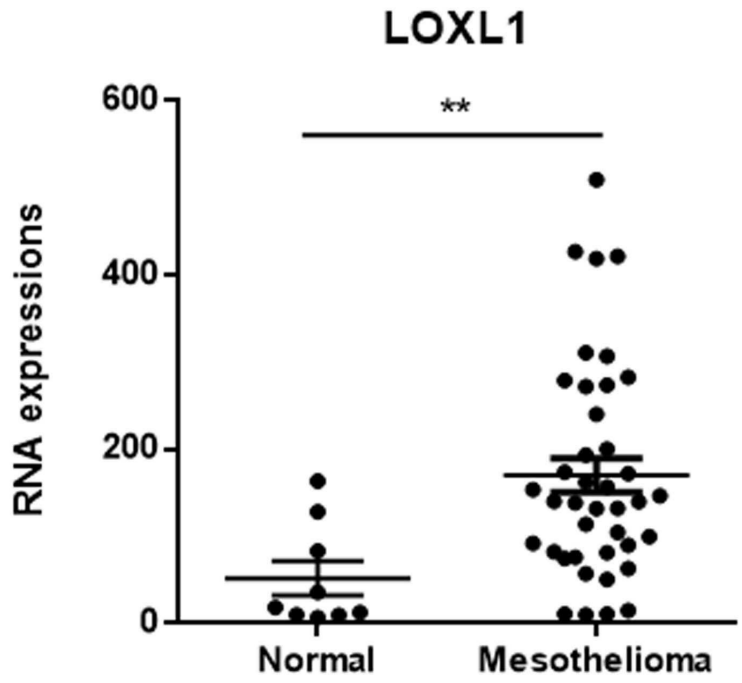
도면4


WT1
**
RNA expressions
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
Normal
Mesothelioma

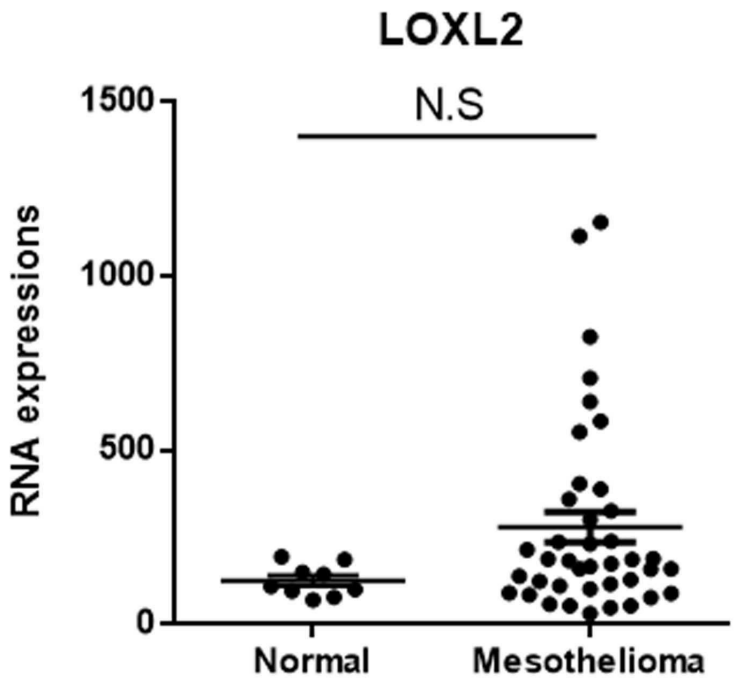
도면5


LOX
***
800
600
400
200
0
RNA expressions
Normal
Mesothelioma

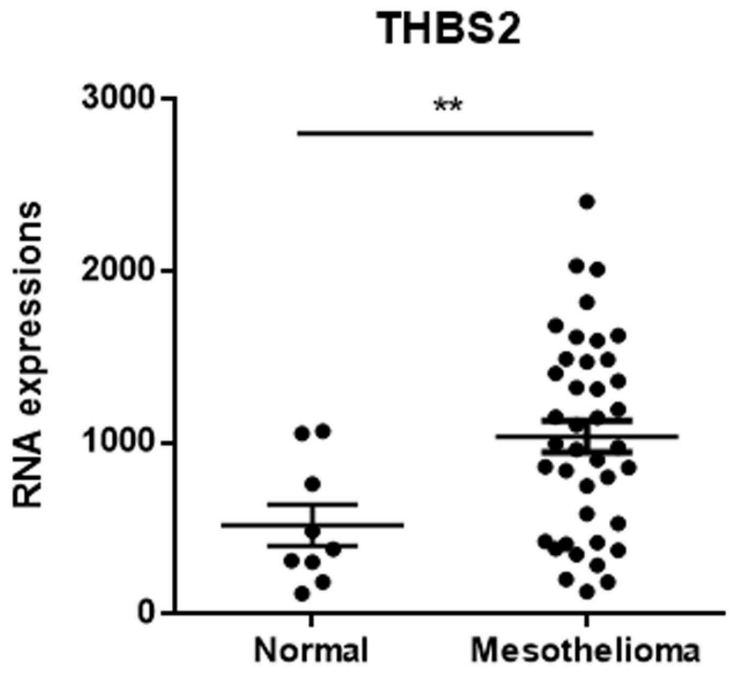
도면6


LOXL1
**
600
400
200
0
RNA expressions
Normal
Mesothelioma

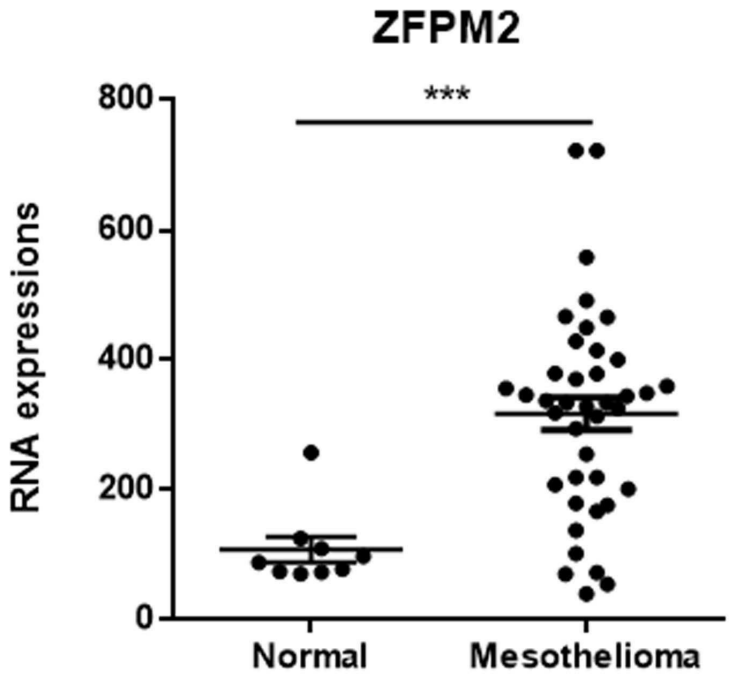
도면7


LOXL2
N.S
1500
1000
500
0
RNA expressions
Normal
Mesothelioma

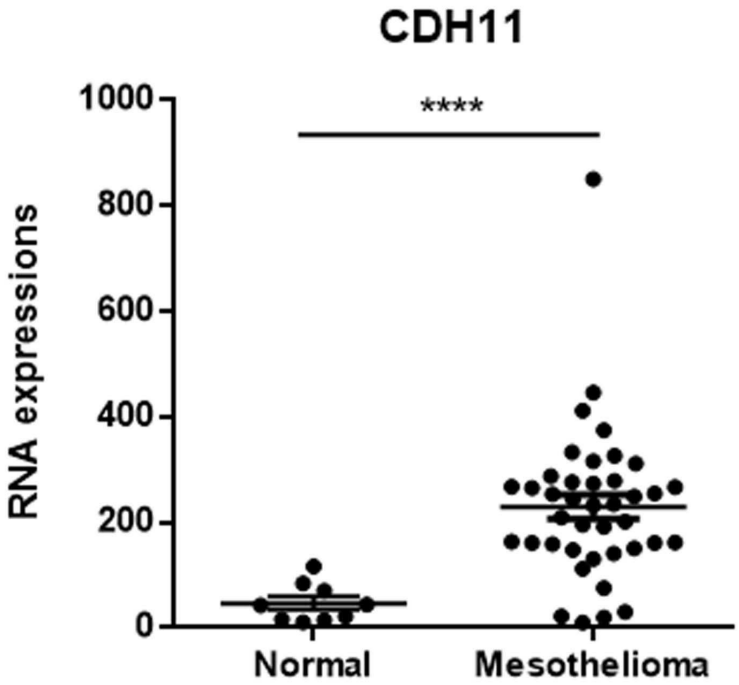
도면8


THBS2
**
3000
2000
1000
0
RNA expressions
Normal
Mesothelioma

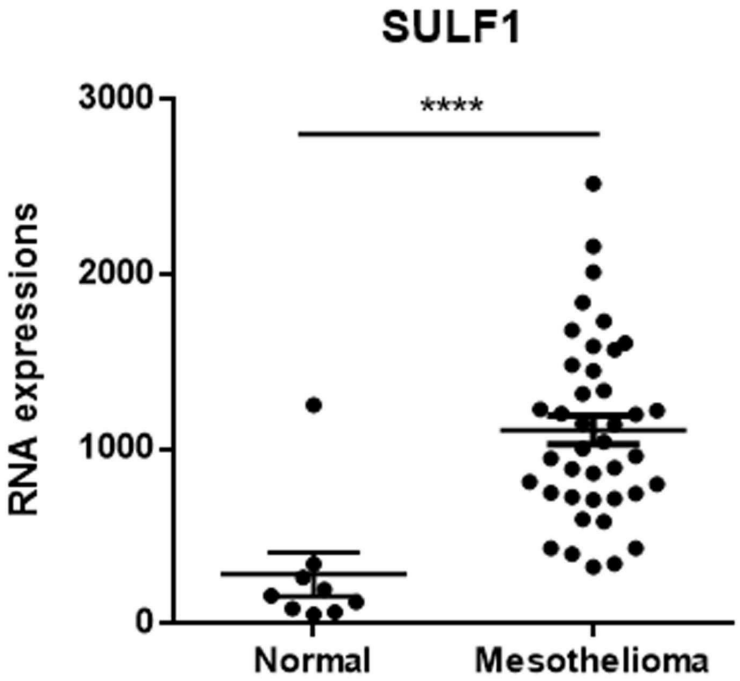
도면9


ZFPM2
***
800
600
400
200
0
RNA expressions
Normal
Mesothelioma

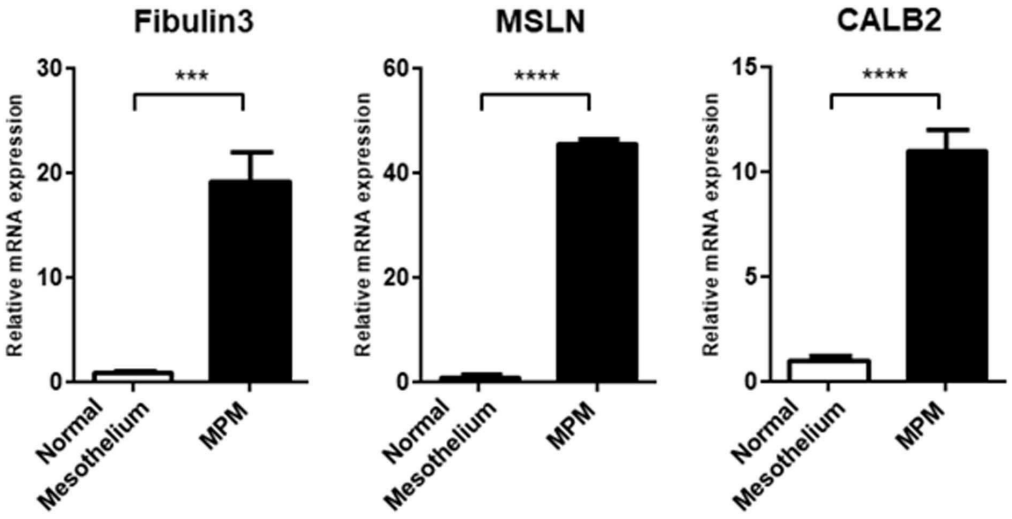
도면10


CDH11
****
1000
800
600
400
200
0
RNA expressions
Normal
Mesothelioma

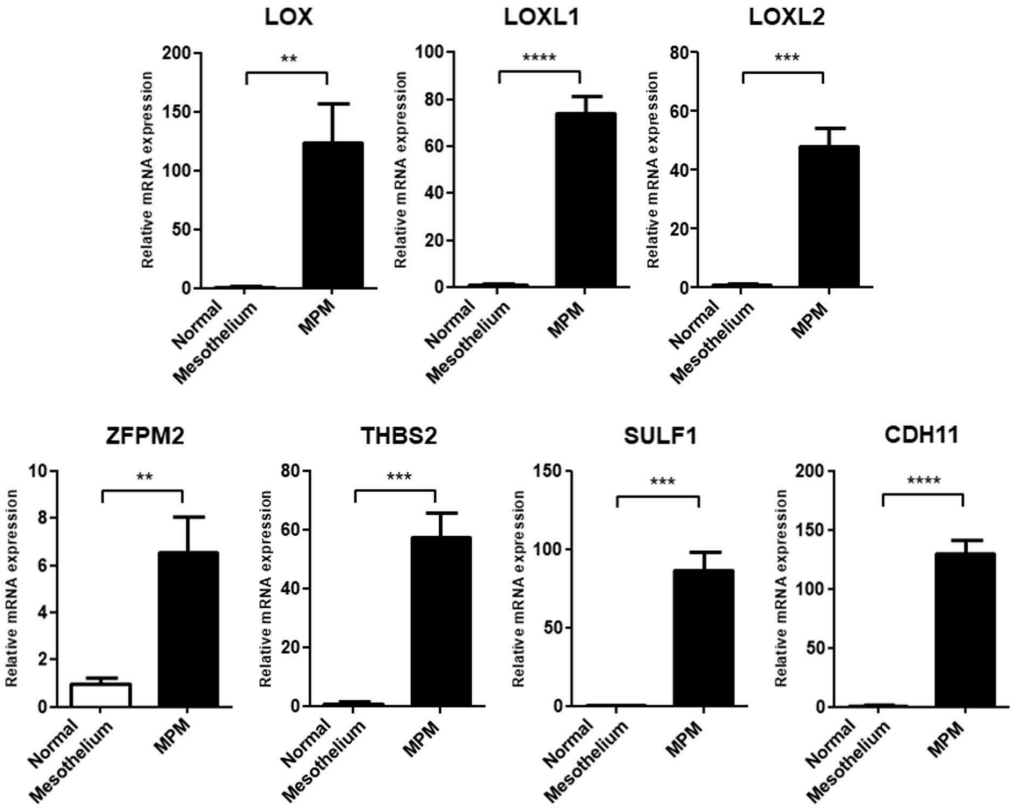
도면11


SULF1
****
3000
2000
1000
0
RNA expressions
Normal
Mesothelioma

도면12a


Fibulin3
***
30
20
10
0
Relative mRNA expression
Normal Mesothelium
MPM
MSLN
****
60
40
20
0
Relative mRNA expression
Normal Mesothelium
MPM
CALB2
****
15
10
5
0
Relative mRNA expression
Normal Mesothelium
MPM

도면12b



서 열 목 록

<110> YONSEI UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION OFFICE

<120> Biomarkers for diagnosing malignant mesothelioma CDH11 and their uses

<130> PB2019-110

<160> 20

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fibulin-3 primer forward

<400> 1

gggagcagtg cgtagacata g 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Fibulin-3 primer reverse

<400> 2

gctgccaatt gaaacccagg 20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MSLN primer forward

<400> 3

ggatgagctc tacccacaag g 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MSLN primer reverse

<400> 4

acttgcgaat gtcctcaggg 20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CALB2 primer forward

<400> 5

ctgcctgtcc aggaaaactt c 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CALB2 primer reverse

<400> 6

gtagccgctt ctatccttgt c 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOX primer forward

<

400> 7

tctggccagt acagcataca g 21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOX primer reverse

<400> 8

cttggtcggc tgggtaagaa 20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOXL1 primer forward

<400> 9

tctggccagc acagcctat 19

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOXL1 primer reverse

<400> 10

gttggggagg aagtctgctg 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOXL2 primer forward

<400> 11

actgccacat aggtggttcc 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOXL2 primer reverse

<400> 12

cggggacagc tggttgttta 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZFPM2 primer forward

<400> 13

tgtgtacagc aaaggggtc 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZFPM2 primer reverse

<400> 14

tggcagcttg tagccttgag 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> THBS2 primer forward

<400> 15

tgaggacctg gacgagtgtg 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> THBS2 primer reverse

<400> 16

gctggttccc tctgtatcgg 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SULF1 primer forward

<400> 17

gcagtgcaac ccaagaccta 20

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SULF1 primer reverse

<400> 18

ccatcccata actgtcctct gt 22

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDH11 primer forward

<400> 19

acaaggatga cacggccaat 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDH11 primer reverse

<400> 20

gcctgctgtg ttatctcggt 20