

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0090404

(43) 공개일자 2020년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2018.05)

G01N 33/574 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0007386

(22) 출원일자 2019년01월21일

심사청구일자 2019년01월21일

(71) 출원인

에스디지노믹스 주식회사

서울특별시 강남구 개포로 619, 11층(개포동, 서울강남우체국)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

박인호

경기도 하남시 미사강변서로 127, 1807동 1903호 (망월동, 미사강변도시18단지)

이경아

서울특별시 강동구 고덕로 130, 110동 2401호(암사동, 프라이어팰리스)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

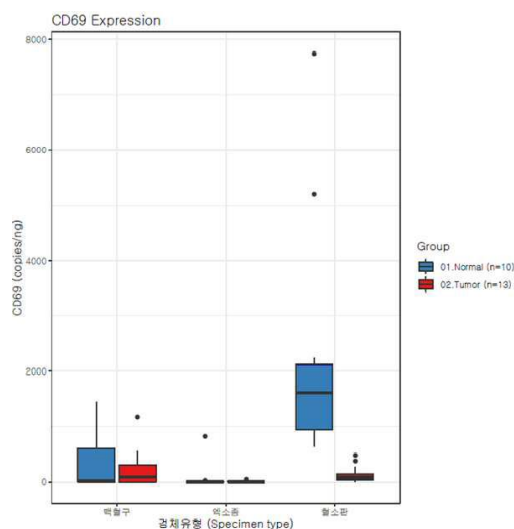
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 암 진단용 바이오 마커 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 암 진단용 바이오 마커 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 혈소판에서 발현되는 PMAIP1을 포함하는 암 진단용 바이오 마커 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 PMAIP1은 암 환자의 혈소판에서 정상인에 비해 발현량이 현저하게 감소하는바, 이를 이용한 암 진단은 혈소판을 포함하는 혈액 샘플을 이용할 수 있어 간편하고, 정확하게 암의 발병 여부를 판단할 수 있다. 따라서 본 발명은 암의 예방, 치료 및 진단 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/4706 (2013.01)
G01N 2333/70596 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)

(72) 발명자

박정선

서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 105동 1801호(도곡동, 삼성래미안아파트)

박정욱

경기도 양평군 양평읍 조숙길 3-1

권영희

서울특별시 관악구 인현1가길 18, 101호(봉천동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711070009
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	암 조기 발견을 위한 혈소판 기반 액체생검검사의 수학적 진단 모델 개발
기 여 율	1/1
주관기관	에스디지노믹스 주식회사
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

PMAIP1(Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)을 포함하는, 암 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 CD69(Cluster of differentiation 69)를 더 포함하는, 암 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암은 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer), 담관암(Common bile duct cancer), 신경내분비종양(neuroendocrine tumor) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인, 암 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 PMAIP1은 암을 가진 개체에서 발현이 억제되는 것인, 암 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 CD69는 암을 가진 개체에서 발현이 억제되는 것인, 암 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 PMAIP1은 혈소판에 존재하는 것인, 암 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 7

PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 조성물은 CD69 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제를 더 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 발현을 측정하는 제제는 PMAIP1에 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)인, 암 진단용 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 발현을 측정하는 제제는 PMAIP1를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브인, 암 진단용 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 암 진단은 혈소판에서 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 것인, 암 진단용 조성물.

청구항 12

제7항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암 진단 키트.

청구항 13

제12항에 있어서,

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

청구항 14

생물학적 시료에서 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 암 진단에 대한 정보 제공 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 방법은 CD69 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 단계를 더 포함하는, 암 진단에 대한 정보 제공 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈소판인, 암 진단에 대한 정보 제공방법.

청구항 17

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

(b) 상기 (a) 단계의 실험군과 대상 물질을 처리하지 않은 대조군에서 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈소판인, 암 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 진단용 바이오 마커 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 PMAIP1을 포함하는 암 진단용 바이오 마커 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 인간의 건강 및 삶에 위협을 주는 질병으로서, 전체 사망자 중 암으로 인한 사망자가 약 13%에 달한다. 2007년, 전세계에서 760만 명이 암으로 사망하였다. 미국에서는 지난 몇 년간 매년 140 만 건의 새로운 암이 보고 되었으며, 암은 주요 사망원인 2위에 해당한다. SEER 보고서의 통계에 따르면, 미국의 모든 암 유형에 대한 사망률은 1950년에 100,000건당 195.4건에서 1978년까지 204.4건으로 증가한 후 2005년에는 184.0건으로 꾸준히 감소했다. 이 감소 추세는 향상된 진단 기술로 인한 암의 조기 발견에 의한 것으로 보인다. 모든 암 유형에서 조기 발견과 치료는 암의 예후 및 생존에 중요한 역할을 한다.

[0003] 한편, PMAIP1(Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)은 Noxa라고도 불리우며, Bcl-2 단백질 군의 전-세포자살 구성요소(pro-apoptotic member)이다. 상기 PMAIP1의 발현은 종양 억제 인자 p53에 의해 조절되고, p53 매개 세포 사멸에 관여하는 것으로 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) KR 공개특허공보 제10-2009-0078365호

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Xu, Kun, et al. "A comparative analysis of gene-expression data of multiple cancer types." PloS one 5.10 (2010): e13696.

(비특허문헌 0002) Guo, Yongchen, et al. "Identification of key candidate genes and pathways in

colorectal cancer by integrated bioinformatical analysis." International journal of molecular sciences 18.4 (2017): 722.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에 본 발명자들은 조기 암 진단을 위한 바이오 마커를 연구하던 중 암환자 유래 혈소판에서 PMAIP1의 발현이 정상인 유래 혈소판에서의 발현량과 비교하여 현저히 낮은 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 따라서 본 발명의 목적은, PMAIP1(Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)을 포함하는 암 진단용 바이오 마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은, PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 암 진단에 대한 정보 제공 방법 및 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 PMAIP1을 포함하는 암 진단용 바이오 마커 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단 키트를 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 생물학적 시료에서 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 암 진단에 대한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은 (a) 실험군인 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 대상 물질을 처리하지 않은 대조군에서 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 PMAIP1은 암 환자의 혈소판에서 정상인에 비해 발현량이 현저하게 감소하는바, 이를 이용한 암 진단은 혈소판을 포함하는 혈액 샘플을 이용할 수 있어 간편하고, 정확하게 암의 발병 여부를 판단할 수 있다. 따라서 본 발명은 암의 예방, 치료 및 진단 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 액적 디지털 PCR을 통해 혈소판, 백혈구 연층(buffy coat) 및 엑소솜에서 CD69의 발현을 측정한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 2는 액적 디지털 PCR을 통해 혈소판, 백혈구 연층 및 엑소솜에서 PMAIP1의 발현을 측정한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 3은 RNA 시퀀싱을 통해 다양한 암종을 가진 암환자의 혈소판에서 CD69의 발현을 분석한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 4는 RNA 시퀀싱을 통해 다양한 암종을 가진 암환자의 혈소판에서 PMAIP1의 발현을 분석한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0019] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 PMAIP1을 포함하는 암 진단용 바이오 마커 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명에 있어서, “PMAIP1(Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)”은 Noxa(‘손상’이라는 의미의 라틴어)라고도 지칭되며, Bcl-2 단백질 군의 전-세포자살 구성요소(pro-apoptotic member)이다. 상기 PMAIP1의 발현은 종양 억제 인자 p53에 의해 조절되고, p53 매개 세포 사멸에 관여하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 PMAIP1을 이용한 암 진단에 대해서는 구체적으로 밝혀진바가 없고, 선행연구에서는 실질적인 바이오 마커로서의 활용 가능성에 대해 충분하게 입증하지 못하였다. 그러나 본 발명자들은 암 환자의 혈소판에서 PMAIP1의 발현이 정상인보다 감소하는 것을 최초로 확인하고, 이를 암 진단용 바이오마커로 이용하게 되었다.
- [0021] 본 발명의 구체예에서, 상기 바이오 마커 조성물은 CD69(Cluster of differentiation 69)를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명에 있어서, “CD69”는 CD69 유전자에 의해 코딩되는 인간 트랜스멤브레인 C 타입 렉틴 단백질로서, 조혈모세포, T 세포 및 면역 계통의 세포에서 발현되는 활성화 마커를 의미한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 상기 진단은 발병 여부뿐만 아니라 예후, 암의 경과, 병기 등을 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다.
- [0024] 본 발명에 있어서, “바이오 마커”는 진단용 마커 또는 진단 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 시료에서 암 발생 여부를 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 시료에 비하여 암 환자의 시료에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, “암”은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적(invasive) 특성, 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다. 본 명세서에서 상기 암은 악성 종양(malignant tumor) 또는 악성 복수(malignant ascites)와 동일한 의미로도 사용된다. 상기 암은 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer), 담관암(Common bile duct cancer), 신경내분비종양(neuroendocrine tumor) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인 것이 바람직하다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에서, 암 환자의 혈소판에서 PMAIP1의 발현이 정상인에 비해 현저히 감소되는 것을 확인한 바, 상기 PMAIP1은 암 진단용 바이오 마커로 활용될 수 있다. 추가적으로, 암 환자의 혈소판에서 CD69는 정상인에 비해 발현이 현저히 낮은바, PMAIP1을 이용한 암 진단의 정확성을 높이기 위해 함께 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 체제를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 구체예에서, 상기 조성물은 암 진단의 정확성을 높이기 위해 CD69 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 체제를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0030] 본 발명에 있어서, “단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 체제”는 상기와 같이 암 환자의 생물학적 시료에서 발현이 증가하는 마커인 PMAIP1, CD69, PMAIP1을 코딩하는 유전자 및 CD69를 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상에 특이적으로 결합하여, 이의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0031] 상기 PMAIP1 또는 CD69의 발현을 측정하는 체제는 상기 PMAIP1 또는 CD69에 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)일 수 있다.

- [0032] 본 발명에 있어서, "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 PMAIP1 또는 CD69에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0033] 본 발명의 암 진단용 바이오 마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0034] 상기 PMAIP1 또는 CD69를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 구체적으로, PMAIP1 또는 CD69 폴리뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용한 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0038] 본 발명의 구체예에서, 상기 암 진단은 혈소판에서 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 것이 바람직하다. 또한, 암 진단의 정확성을 향상시키기 위해 혈소판에서 CD69의 발현을 함께 측정하는 것이 바람직하다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단 키트를 제공한다.
- [0041] 상기 키트는 RT-PCR 키트, 디지털 PCR 키트, DNA 칩 키트, 웨스턴 블롯팅 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 상기 키트에는 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제뿐만 아니라, 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 구체예에서, 상기 키트는 암 진단의 정확성을 향상시키기 위하여, CD69 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지,

가교 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.

- [0045] 본 발명의 키트는 상술한 바이오 마커 조성물 및 진단용 조성물을 구성으로 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 생물학적 시료에서 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 암 진단에 대한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0048] 상기 진단에 대한 정보는 암 환자의 PMAIP1의 발현에 대한 측정 정보이고, 본 발명의 목적상, 혈소판에서 PMAIP1의 발현이 정상 시료보다 감소된 것으로 측정되는 경우 암 세포의 세포 성장 및 세포 이동을 증가시켜 암이 야기된다는 것을 제시하며, 이를 기반으로 본 발명은 대상의 암 발병 여부에 대한 정보를 제공한다.
- [0049] 본 발명의 구체예에서, 암 진단에 대한 정보 제공의 정확성을 높이기 위하여 혈소판에서 CD69 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 추가적으로 측정할 수 있다. 혈소판에서 CD69 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 정상 시료보다 감소된 것으로 측정되는 경우 암이 야기된다는 것을 제시한다.
- [0050] 본 발명에 있어서 "단백질의 발현을 측정"이란 암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 마커 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것이다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯팅, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명에 있어서, "단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 측정"이란 암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 암 진단용 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명의 구체예에서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액 또는 조직일 수 있고, 바람직하게는 혈액, 보다 바람직하게는 혈소판일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 실험군인 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 대상 물질을 처리하지 않은 대조군에서 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0055] 본 발명의 구체예에서, 암 치료제의 스크리닝 방법은 스크리닝의 정확성을 높이기 위하여 혈소판에서 CD69 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하고, 대조군과 비교하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0056] 상기 (c) 단계에서, 대상 물질이 실험군의 PMAIP1 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 경우 이는 암 세포의 세포 성장 및 이동을 억제시킬 수 있으므로 암 치료제로서 선별될 수 있다.
- [0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0060] **실시예 1. 시료 준비**
- [0061] 시료는 정상인과, 암환자의 혈액에서 혈소판, 백혈구 연층(buffy coat) 및 엑소좀을 각각 분리하였으며, 이로부

터 RNA를 추출하였다. 상기 암환자는 위암, 자궁경부암, 대장암, 폐암, 유방암, 췌장암, 전립선암, 담관암, 신경내분비종양, 간세포암종 및 난소암 환자이다.

[0063] 1-1. 혈소판 RNA 추출

[0064] 혈액 4ml을 채혈한 후 K2/K3 EDTA 튜브에 옮겼다. 옮겨진 혈액을 800 내지 1000rpm의 속도로 상온(20 내지 25°C)에서 10분 동안 원심분리 하였다. 원심분리된 다혈소판혈장(Platelet-Rich Plasma, PRP)을 1.5ml 튜브에 옮긴 후 2500rpm 속도로 상온에서 10분 동안 원심분리 시켜, 혈소판 펠렛을 수득하였다. RNeasy Mini Kit(Qiagen, Venlo, Netherlands)를 이용하여, 상기 혈소판 펠렛으로부터 RNA를 추출하였다.

[0066] 1-2. 백혈구 연층(buffy coat) RNA 추출

[0067] 혈액 4ml을 채혈한 후 K2/K3 EDTA 튜브에 옮겼다. 옮겨진 혈액을 800 내지 1000rpm의 속도로 상온(20 내지 25°C)에서 10분 동안 원심분리 하였다. 튜브 상층의 혈장 및 적혈구층을 제거하였다. 튜브 내에 남아있는 적혈구를 제거하기 위하여, 적혈구 용해액을 튜브에 첨가한 후 14000rpm, 4°C에서 1분 동안 원심분리하였다. 적혈구 제거 과정을 5회 반복하여 튜브 내의 적혈구를 제거하여, 백혈구 연층만을 수득하였다. RNeasy Mini Kit를 이용하여, 상기 백혈구 연층으로부터 RNA를 추출하였다.

[0069] 1-3. 엑소좀 RNA 추출

[0070] ExoQuick 용액(System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) 및 혈청 1ml을 혼합한 후 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 튜브를 1500g로 30분 동안 원심분리하여 엑소좀 펠렛을 분리하였다. SeraMir Exosome RNA Purification column Kit(System Biosciences)를 이용하여, 상기 엑소좀 펠렛으로부터 엑소좀 RNA를 추출하였다.

[0072] 실시예 2. cDNA 합성

[0073] 상기 실시예 1에서 추출된 혈소판 RNA, 백혈구 연층 RNA 및 엑소좀 RNA의 농도, 순도, 수율 및 크기를 측정 한 후 이를 기반으로 cDNA를 합성하였다.

[0074] 구체적으로, 혈소판 RNA 및 백혈구 연층 RNA의 농도와 순도는 NanoDrop 1000 분광기(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), Qubit 2.0 형광광도계(Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 및 Qubit RNA Hs 분석 키트를 사용하여 측정하였다. RNA의 수율 및 크기는 Agilent 2100 바이오애널라이저(Agilent Technologies, Foster City, CA, USA)와 RNA 6000 Pico 키트를 사용하여 측정하였다.

[0075] SuperScript™ VILO™ cDNA 합성 키트(invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여, 상기 혈소판 RNA, 백혈구 연층 RNA 및 엑소좀 RNA를 주형으로 하는 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA 합성은 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다.

[0077] 실시예 3. 액적 디지털 PCR(Droplet digital PCR)을 이용한 CD69 및 PMAIP1 발현 분석

[0078] 상기 실시예 2에서 합성된 혈소판 cDNA, 백혈구 연층 cDNA 및 엑소좀 cDNA를 주형으로 하는 액적 디지털 PCR을 수행하였다. 구체적으로, 준비된 혈소판 cDNA를 5 배 희석하여 준비하였다. 프로브를 위한 QX200 액적 디지털 PCR 수퍼믹스(No UTP, 2X) 10ul, 정방향 PMAIP1 프라이머(10pmol) 1ul, 역방향 PMAIP1 프라이머(10pmol) 1ul, 정방향 CD69 프라이머(10pmol) 1ul, 역방향 CD69 프라이머(10pmol) 1ul, PMAIP1 특이적 프로브(FAM 염료, 10uM) 0.5ul, CD69 특이적 프로브(VIC 염료, 10uM) 0.5ul, 증류수 4ul 및 희석된 혈소판 cDNA 1ul를 혼합하여, 최종 시료(20ul)를 준비하였다.

[0079] 본 실시예에 사용된 액적 디지털 PCR 프라이머 및 프로브의 염기서열은 다음과 같다.

[0080] - 정방향 PMAIP1 프라이머 : CAAGAACGCTCAACCGAGC

- [0081] - 역방향 PMAIP1 프라이머 : CTGCCGGAAGTTCAGTTTGTGTC
- [0082] - PMAIP1 특이적 프로브 : AGCAGAGCTGGAAGTC
- [0083] - 정방향 CD69 프라이머 : GGAAGTGGTCAAATGGCAAAGA
- [0084] - 역방향 CD69 프라이머 : TTCCATGCTGCTGACCTCTGT
- [0085] - CD69 특이적 프로브 : ACAACTGGTTCAACGTT.

[0087] DG8 액적 형성기 카트리지(DG8 Droplet Generator Cartridge)에 준비된 시료 20ul 및 액적 형성 오일(Droplet generator oil) 70ul를 첨가하여, QX200 액적 형성기에서 액적(droplet)을 생성하였다. 제작된 액적을 조심스럽게 PCR 플레이트에 옮긴 후 밀봉하였다. 밀봉된 PCR 플레이트의 PCR을 수행하였다. 상기 PCR 조건은 표 1에 나타내었다.

표 1

단계	온도(℃)	시간	온도 변화 속도	사이클 수
효소활성화 (Enzyme activation)	95	10분	2℃/sec	1
변성 (Denaturation)	94	30초		40
어닐링/신장 (Annealing/extension)	60	1분		40
효소 불활화 (Enzyme deactivation)	98	10분		1
유지 (Hold)	4	-		1

[0089] PCR 종료 후, QX200 액적 리더(QX200 Droplet Reader)를 이용하여 각 액적의 형광을 측정하였다. 측정된 결과는 QuantaSoft 소프트웨어를 이용하여 확인하였다. 측정된 결과는 총 RNA ng 당 mRNA 복사 수(copies/ng)로 변환하여 나타내었다. 전술한 바와 같은 방법으로, 백혈구 연층 및 엑소솜 cDNA의 액적 디지털 PCR을 수행하였다. 혈소판 cDNA, 백혈구 연층 cDNA 및 엑소솜 cDNA의 액적 디지털 PCR 결과는 표 2와 같으며, 이를 그래프화하여 도 1 및 2에 나타내었다.

표 2

Label	Sample No.	진단명	혈소판		엑소솜		백혈구 연층	
			PMAIP1 copies/ng	CD69 copies/ng	PMAIP1 copies/ng	CD69 copies/ng	PMAIP1 copies/ng	CD69 copies/ng
1	환자	GAST	95	260	0	0	0	0
2	환자	CECA	110	485	0	0	0	0
3	환자	CORE	3.5	29.5	0	0	0	0
4	환자	CORE	20	120	0	0	0	0
5	환자	LUCA	3.5	0	0	0	0	0
6	환자	BRCA	3.5	0	7	0	10	260
7	환자	BRCA	3.5	14	0	7	43	190
8	환자	HPCA	22.5	135	7	7	109	1180
9	환자	CORE	51	125	7	0	119	300
10	환자	OVCA	61	370	0	0	0	0
11	환자	BRCA	10	80	13	47	7	90
12	환자	GAST	3.5	50	6	13	44	320
13	환자	GAST	0	45	0	7	50	560
14	정상인	HLTH	515	2250	6	26	7	7
15	정상인	HLTH	280	1605	7	0	0	34
16	정상인	HLTH	995	7750	7	0	55	710
17	정상인	HLTH	180	1450	0	0	80	300

18	정상인	HLTH	735	5200	7	0	0	0
19	정상인	HLTH	165	705	0	0	0	0
20	정상인	HLTH	180	760	0	0	0	0
21	정상인	HLTH	185	635	0	0	0	0
22	정상인	HLTH	365	1770	292	0	525.6	1430.8
23	정상인	HLTH	390	1635	546	819	0	1365
HLTH: 정상대조군 BRCA: 유방암 CORE: 대장암 GAST: 위암 PANC: 췌장암 PRCA: 전립선암 BIDU: 담관암 NRED: 신경내분비종양 CECA: 자궁경부암 LUCA: 폐암 HPCA: 간암 OVCA: 난소암								

[0091] 표 2 및 도 1에 나타난 바와 같이, CD69는 정상인의 혈소판에서 약 635 내지 2250copies/ng로 발현되는 것을 확인하였다. 그러나 암환자(유방암, 대장암, 위암, 췌장암, 전립선암, 담관암, 신경내분비종양, 자궁경부암, 폐암, 간암 및 난소암)의 혈소판에서는 CD69의 발현이 약 0 내지 125copies/ng로 크게 감소한 것을 확인하였다.

[0092] 표 2 및 도 2에 나타난 바와 같이, PMAIP1은 정상인의 혈소판에서 약 160 내지 490copies/ng로 발현되는 것을 확인하였다. 그러나 암환자(유방암, 대장암, 위암, 췌장암, 전립선암, 담관암, 신경내분비종양, 자궁경부암, 폐암, 간암 및 난소암)의 혈소판에서는 PMAIP1의 발현이 약 0 내지 51copies/ng로 현저히 감소한 것을 확인하였다.

[0093] 상기 결과는 암 환자의 혈소판에서 CD69 및 PMAIP1의 발현이 정상인에 비해 현저히 감소하므로, 이를 다양한 암의 진단에 이용할 수 있음을 의미한다.

[0095] 실시예 4. RNA 시퀀싱을 이용한 암종에 따른 CD69 및 PMAIP1의 발현 분석

[0096] Cubit 시스템을 이용하여 상기 실시예 1에서 추출된 혈소판 RNA의 양을 측정 후, 검체 별 RNA 주입량을 10ng으로 균일화하였다. SuperScript™ VILO™ cDNA 합성 키트(Thermo Fisher)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Ion AmpliSeq 전사체 인간 유전자 발현 키트(Thermo Fisher)를 이용하여 전사체(Transcriptome) 라이브러리를 제조하였다. 이 때, RNA 주입량이 10ng 미만인 경우 제조사의 매뉴얼에 따라서 PCR 사이클을 증가시켰다. 제조된 라이브러리를 High Sensitivity D1000 ScreenTape를 이용하여 측정하였다. RNA 시퀀싱을 통해 암종에 따른 CD69 및 PMAIP1의 발현을 분석한 결과는 도 3 및 4에 나타내었다.

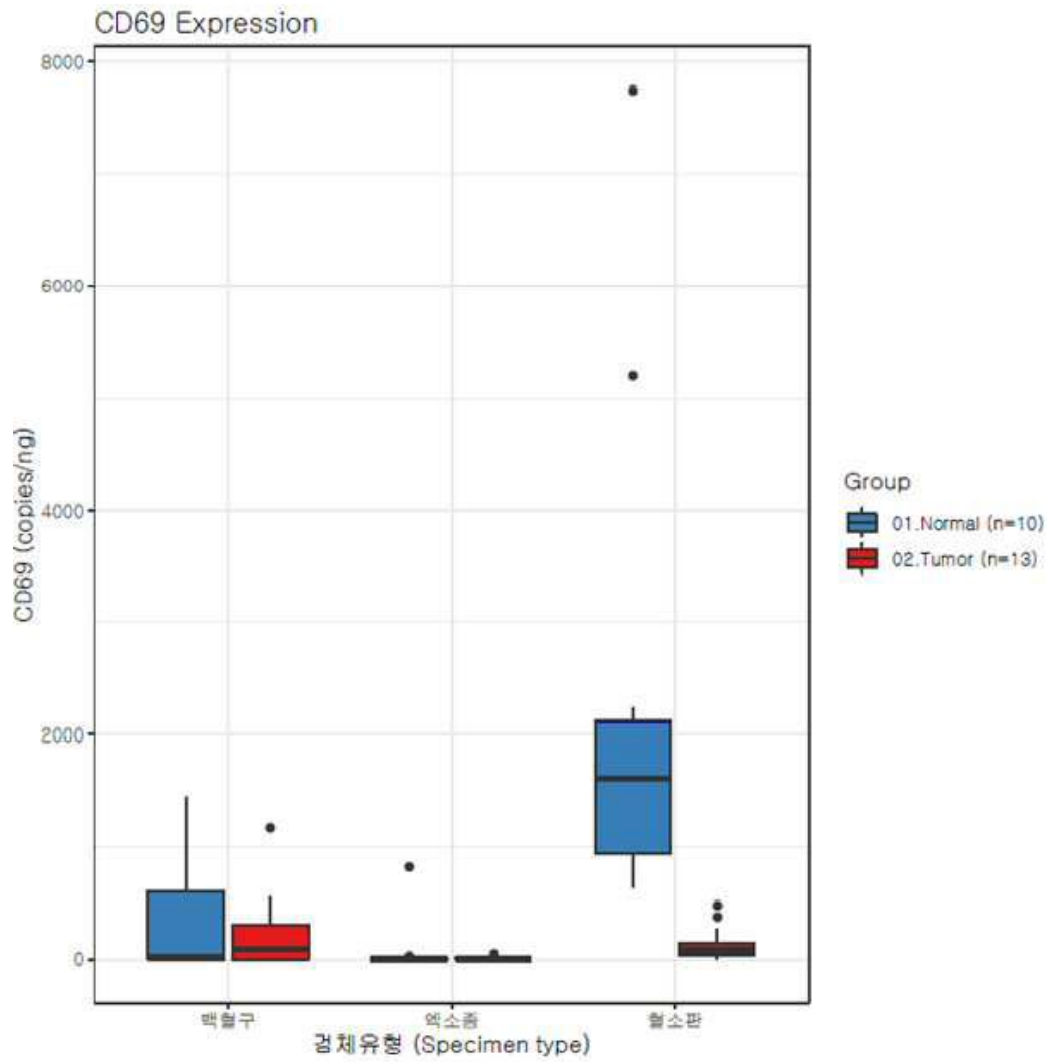
[0097] 도 3 및 4에 나타난 바와 같이, 유방암, 대장암, 위암, 췌장암, 전립선암, 담관암 및 신경내분비종양 환자의 혈소판에서도 CD69 및 PMAIP1의 발현이 정상인보다 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

[0099] 종합적으로 본 발명자들은 암의 발병 여부에 따라 혈소판에서 CD69 및 PMAIP1의 발현이 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 이는 CD69 및 PMAIP1을 암 진단의 바이오 마커로 이용할 수 있음을 의미하는바, 암의 예방, 치료 및 진단 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

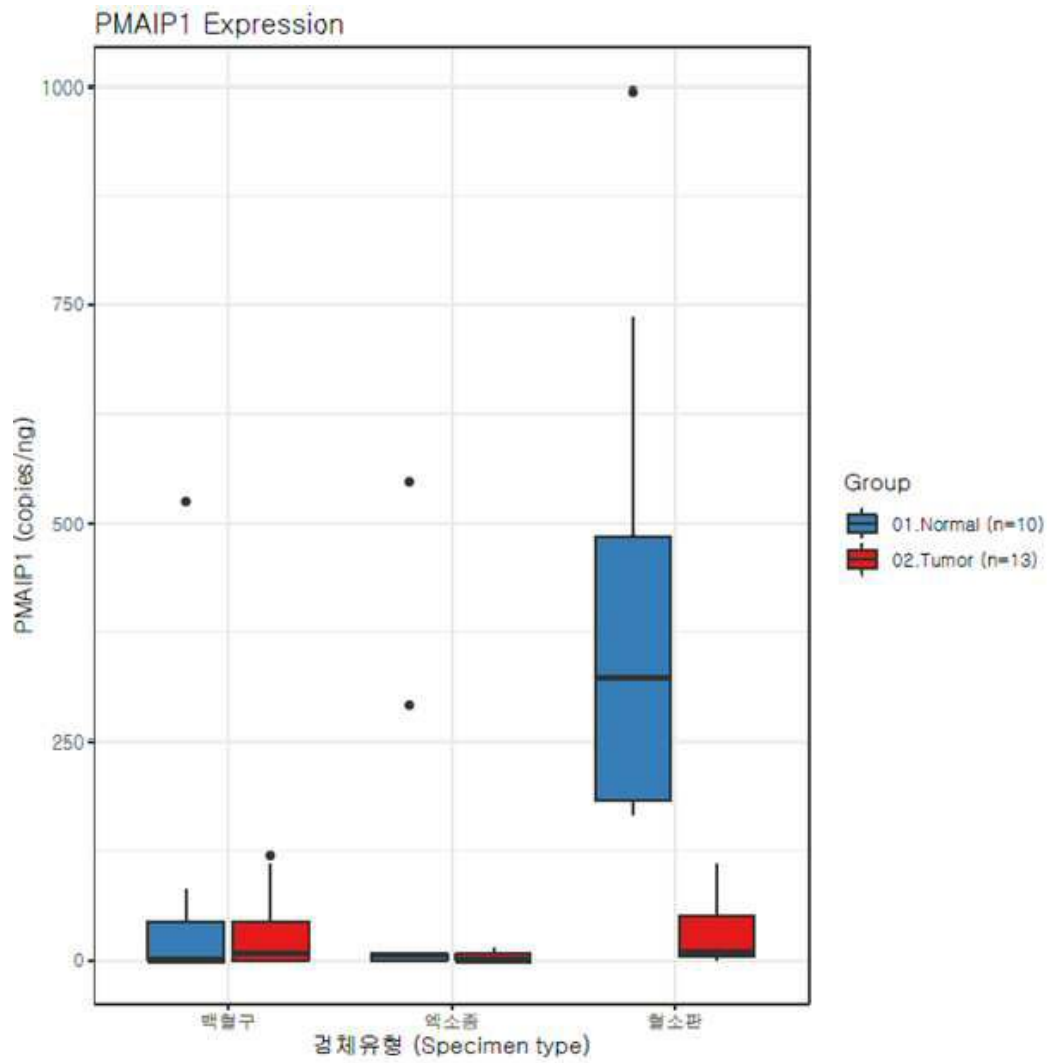
[0101] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

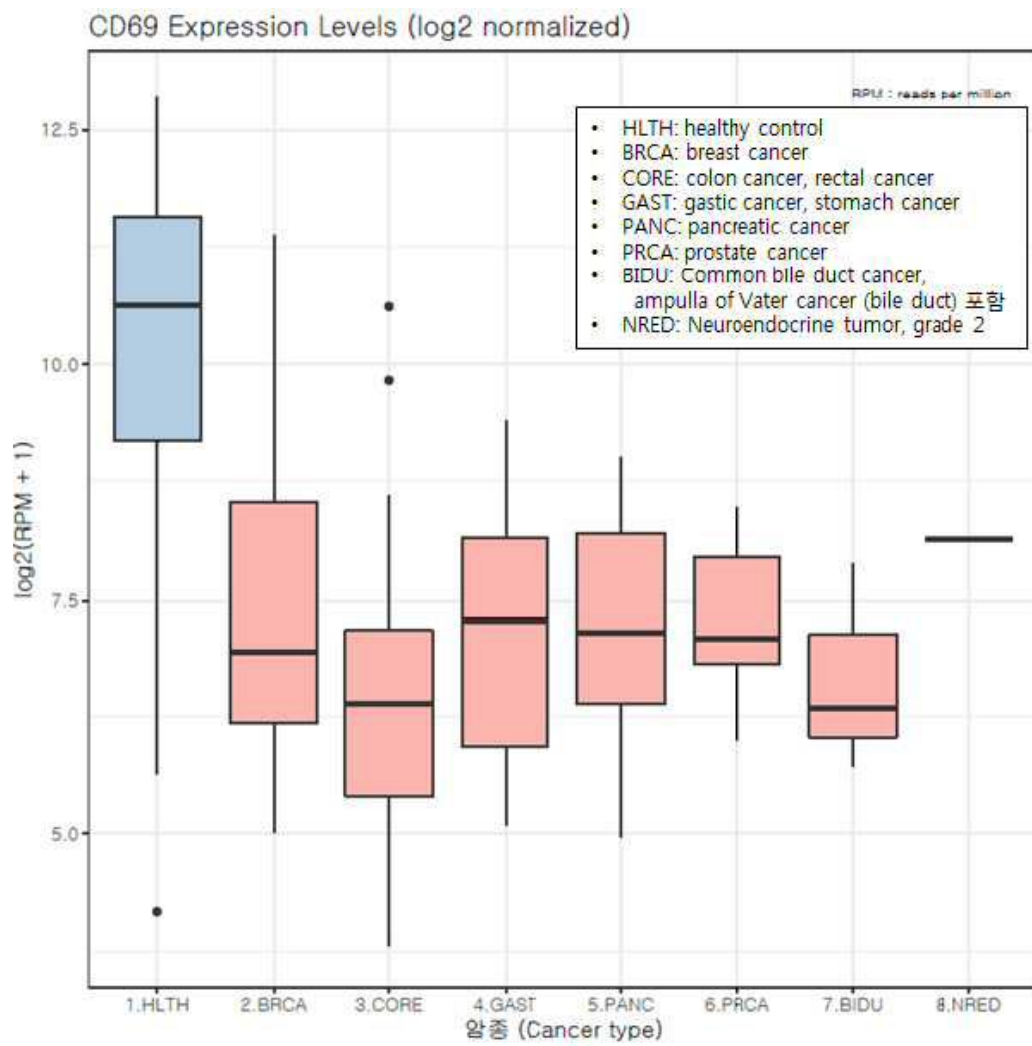
도면1



도면2



도면3



도면4

