



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0127507
(43) 공개일자 2010년12월06일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0045980

(22) 출원일자 2009년05월26일

심사청구일자 2009년05월26일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

정현철

서울특별시 서초구 잠원동 반포한양아파트 2-801

노재경

서울특별시 서대문구 창천동 132번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 13 항

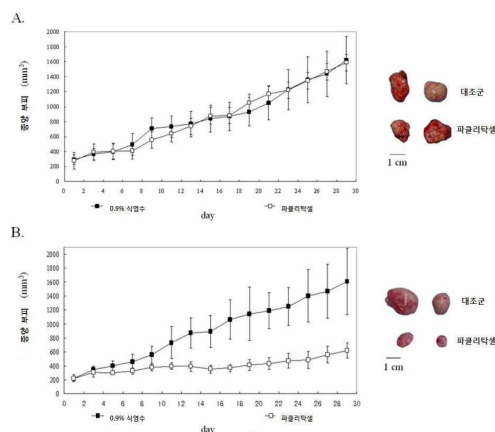
(54) 위암 세포주에서의 파클리탁셀 감수성과 관련된 유전자 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 암환자의 파클리탁셀(paclitaxel)에 대한 민감도 예측용 키트, 예측 방법 및 암세포의 파클리탁셀에 대한 저항성을 감소시키는 파클리탁셀 보조제의 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명자들은 다양한 암세포주들을 이용하여 파클리탁셀의 감수성과 관련된 유전자군을 선별하였고, 이에 선별된 유전자군의 발현이 높거나 낮은 위암세포주를 이용하여 인 비트로 및 인 비트로 검증 후, 선별된 유전자군이 위암에서 파클리탁셀의 반응을 예측할 수 있는 인자, 혹은 파클리탁셀의 저항성을 환원시킬 수 있는 인자가 될 수 있는지를 입증함으로써 본 발명을 완성하였다. 따라서 본 발명은 파클리탁셀의 사용 전에 그 반응성을 예측할 수 있게 함으로써 암환자의 치료 방향을 제시해주며, 파클리탁셀의 치료 효율을 높이는 보조제의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

노성훈

서울특별시 양천구 목동 신시가지아파트 518-306

라선영

서울특별시 양천구 목1동 대원칸타빌 101동 1309호

정희철

서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 암센터

정재준

서울특별시 용산구 한강로2가 벽산메가트리움 103-1908

특허청구의 범위

청구항 1

진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393, NM_007337, NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 또는 상기 뉴클레오타이드 서열의 단편을 포함하는 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_002924 또는 NM_004585인 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 키트는 마이크로어레이인 것을 특징으로 하는 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 키트는 유전자 증폭 키트인 것을 특징으로 하는 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 암은 위암인 것을 특징으로 하는 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393 및 NM_007337로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열은 파클리탁셀 저항성 환자로부터 고발현 되고, 상기 진뱅크 접근번호 NM_005275,

NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179 로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열은 파클리탁셀 저항성 환자로부터 저발현 되는 것을 특징으로 하는 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트.

청구항 7

인간의 생물학적 시료에 있는 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM_173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393, NM_007337, NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 검출하는 단계를 포함하는 인간의 파클리탁셀에 대한 민감도를 예측하는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_002924 또는 NM_004585인 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 방법은 마이크로어레이 방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 방법은 유전자 증폭 방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 7 항에 있어서, 상기 암은 위암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 7 항에 있어서, 상기 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441,

NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393 및 NM_007337로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열은 파클리탁셀 저항성 환자로부터 고발현 되고, 상기 진뱅크 접근번호 NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179 로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열은 파클리탁셀 저항성 환자로부터 저발현 되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

다음의 단계를 포함하는 암세포의 파클리탁셀에 대한 저항성을 감소시키는 파클리탁셀 보조제의 스크리닝 방법:

(a) 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393, NM_007337, NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현량을 측정하는 단계, 상기 진뱅크 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393 및 NM_007337로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 고발현이 억제되거나 상기 진뱅크 접근번호 NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759,

NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179 로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 저발현이 억제되는 경우에는 상기 시료는 암세포의 파클리탁셀에 대한 저항성을 감소시키는 파클리탁셀 보조제로 판정된다.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 위암에서 사용되는 주요 항암제인 파클리탁셀(paclitaxel)의 감수성을 예측하는 유전자군을 발굴함으로써 파클리탁셀의 사용 전에 그 반응성을 예측할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항암 약물치료(chemotherapy)는 수술과 더불어 종양 치료에 가장 중요한 역할을 하는 치료방법 중 하나이다. 그 동안 새로운 항암제들이 많이 개발되어 과거보다 치료 반응률은 향상 되고 부작용은 감소되고 있다. 특히, 세포의 유사분열 시에 미세소관의 해중합화를 억제함으로써 세포를 죽게 하는 항암제인 파클리탁셀(paclitaxel)의 경우, 그 개발 이전의 항암제보다 뛰어난 항암효과를 나타낼 뿐만 아니라 폐암, 유방암, 난소암 및 위암을 포함한 넓은 범위에서 항암효과를 나타내고 있다. 하지만, 파클리탁셀의 임상적인 성공은 암세포가 가지고 있는 항암제에 대한 저항성에 의해 그 효율성의 측면에서 문제가 되어 왔다. 이를 극복하기 위해서, 파클리탁셀 저항성에 대한 연구는 지난 20여 년 전부터 꾸준히 진행되어 왔다. 하지만 현재까지도 파클리탁셀 저항성에 대한 기작은 다약제 내성(multi-drug resistant) 유전자인 MDR1의 활동력, 파클리탁셀의 임상적 목표 구조인 튜불린의 구조변화와 발현 정도, 그리고 튜불린 아이소타이프 비율의 변화 정도에 국한되어 왔다. 따라서 최근에는 파클리탁셀의 임상적인 반응을 예측할 수 있는 새로운 예측인자를 찾고자 하는 연구들이 진행되었다. 하지만 이 역시 파클리탁셀의 표적인 튜불린과 관련된 것들에 국한되는 상황이고, 그렇지 않은 경우는 자료들이 모순되는 경우가 많았다.

[0003] 특히, 항암요법의 효율이 좋지 않은 위암의 경우 파클리탁셀을 비롯한 타산(taxane) 계열의 항암제의 중요성이 높아지고 있다. 위암은 전 세계적으로 가장 빈도가 높은 암종의 하나이며, 미국과 유럽에서는 발병률이 낮은 반면 우리나라를 포함한 극동에서의 발생률이 유의하게 높은 종양이다. 위암의 항암요법에 있어서 현재 표준화된 치료 약제는 없으며 개개인에 따라서 치료에 대한 감수성과 저항성의 정도 차이가 크기 때문에 항암제의 반응을 예측할 수 있는 인자, 그리고 항암효과를 높여줄 수 있는 인자의 필요성이 중요하다.

[0004] 마이크로어레이 기법은 대규모의 유전자의 발현 양상을 동시에 조사할 수 있는 방법으로써, 최근 유전체 범위의 유전정보의 중요성이 부각되는 여러 연구에서 그 중요성이 입증되고 있는 기법이다. 이 방법을 통하여, 여러 암세포주에서 항암제의 감수성 혹은 저항성과 관련된 유전자 군을 선별하는 연구들도 많이 진행되고 있다.

[0005] 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.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명자들은 다양한 암세포주들을 이용하여 파클리탁셀의 감수성과 관련된 유전자군을 선별하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 선별된 유전자군의 발현이 높거나 낮은 위암세포주를 이용하여 인 비보(*in vitro*) 및 인 비보(*in vivo*) 검증을 거친 후, 선별된 유전자 군이 위암에서 파클리탁셀의 반응을 예측할 수 있는 인자, 혹은 파클리탁셀의 저항성을 환원시킬 수 있는 인자를 규명함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393, NM_007337, NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 또는 상기 뉴클레오타이드 서열의 단편을 포함하는 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 인간의 생물학적 시료에 있는 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393, NM_007337, NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 검출하는 단계를 포함하는 인간의 파클리탁셀에 대한 민감도를 예측하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 다음의 단계를 포함하는 암세포의 파클리탁셀에 대한 저항성을 감소시키는 파클리탁셀 보조제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] (a) 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393, NM_007337, NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

[0011] (b) 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현량을 측정하는 단계, 상기 진뱅크 접근번호 NM_000584, NM_000064,

NM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393 및 NM_007337로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 고발현이 억제되거나 상기 진뱅크 접근번호 NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179 로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 저발현이 억제되는 경우에는 상기 시료는 암세포의 파클리탁셀에 대한 저항성을 감소시키는 파클리탁셀 보조제로 판정된다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393, NM_007337, NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179(이하, “나열한 115개의 서열”이라 부른다)로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 또는 상기 뉴클레오타이드 서열의 단편을 포함하는 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트를 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 다양한 암세포주들을 이용하여 파클리탁셀의 감수성과 관련된 유전자군을 선별함으로써 파클리탁셀에 의한 암 환자의 치료가능성을 예측하는 방법에 대해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 선별된 유전자군의 발현이 높거나 낮은 위암세포주를 이용하여 인 비보(*in vitro*) 및 인 비보(*in vivo*) 검증을 거친 후, 선별된 유전자 군이 위암에서 파클리탁셀의 반응을 예측할 수 있는 인자, 혹은 파클리탁셀의 저항성을 환원시킬 수 있는 인자를 동정하였다.

[0015] 암 치료의 방법은 크게 외과적 수술 치료(surgical resection), 화학적 치료(chemotherapy) 및 방사능치료(radioactivetherapy)로 구분된다. 항암 약물치료로 대표되는 화학적 치료(chemotherapy)는 수술과 더불어 종양 치료에 가장 중요한 역할을 하는 치료방법 중 하나로써, 그 동안 다양한 항암제들이 개발되어 치료 반응물은 향상 되고 부작용은 감소하고 있다. 특히, 암세포의 유사분열시 미세소관의 해중중화를 억제하는 파클리탁셀의 경우, 광범위한 암에 대해 뛰어난 항암효과를 보이지만, 암세포의 파클리탁셀에 대한 내성의 증가 및 이로 인한 효율성의 감소가 문제되고 있다. 특히, 항암요법의 효율이 낮은 위암의 경우 파클리탁셀을 비롯한 탁산 계열의 항암제의 항암효과를 높여줄 수 있는 인자의 동정이 중요한 과제로 대두되었다. 따라서, 본 발명자들

은 이러한 과제해결을 위해 파클리탁셀에 대한 민감도를 예측할 수 있는 유전자를 동정하였다.

- [0016] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 뉴클레오타이드 서열은 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_002924 또는 NM_004585인 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트는 마이크로어레이일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 진단용 키트에서 이용되는 프로브 또는 프라이머는 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 본 명세서에서 용어 “상보적(complementary)”은 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건 하에서 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 용어 “상보적”은 용어 완전 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.
- [0019] 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 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0020] 본 명세서에서 사용된 용어 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보 뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일체이며, 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명의 프로브는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산(PNA)(M. Egholm et al., *Nature*, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포아미데이트 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-알카이닐DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리달- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리달-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate)상에 고정화된다.
- [0022] 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.

- [0023] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 파클리락셀 민감도 예측용 키트는 혼성화(hybridization)에 기초하여 실시할 수 있다. 이 경우, 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브가 이용된다. 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열에 혼성화 되는 프로브를 이용하여 혼성화-기초 분석을 하여 파클리락셀에 대한 민감도 여부를 판단할 수 있다. 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P32 및 S35), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스레디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션(nick translation)방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [0025] 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 상기 생시료는, 바람직하게는 위암 세포이다. 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.
- [0026] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다.
- [0027] 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65°C 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다.
- [0028] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스레디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다. 따라서 본 발명의 암환자의 파클리락셀에 대한 민감도를 예측하는 방법을 혼성화에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브를 핵산 시료에 혼성화시키는 단계; (ii) 상기 혼성화 반응 발생 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 암환자의 파클리락셀에 대한 민감도 여부를 판단할 수 있다. 즉, 시료에서 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420,

NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM_173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393 및 NM_007337로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 대한 혼성화 시그널이 정상 시료(정상 세포)보다 강하게 나오거나 진뱅크 접근번호 NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179 로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 대한 혼성화 시그널이 정상 시료(정상 세포)보다 약하게 나오는 경우에는 파클리탁셀에 대한 저항성이 있는 것으로 판단된다.

[0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측 키트는 유전자 증폭 키트일 수 있다.

[0030] 본 명세서에 기재된 용어 “증폭”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19)(WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CPPCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)(21, 22) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)(23)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다. PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(realtime)PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다. 본 발명의 진단용 키트를 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도를 조사한다. 본 발명은 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도를 분석하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 위암 세포)에서 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 mRNA 양을 조사하여 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도를 결정한다. 따라서 본 발명은 원칙적으로 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다. mRNA를 얻기 위하여, 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 예컨대, Trizol을 이용하여 용이

하게 세포내의 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: *PNAS USA*, 85:8998(1988); Libert F, et al. *Science*, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다.

[0031] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B.D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.

[0032] 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, E. coli DNA 중합효소 I의 “클레나우” 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litalis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다.

[0033] 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 원하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 요구된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서 어닐링은 타겟 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격 조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.

[0035] 이렇게 증폭된 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 cDNA를 적합한 방법으로 분석하여 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도를 조사한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도를 조사한다.

이러한 증폭 반응을 통하여, 생시료(biosamples)에서 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393 및 NM_007337로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현이 정상 시료(정상 세포)보다 높게 나오거나 진뱅크 접근번호 NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현이 정상 시료(정상 세포)보다 낮게 나오는 경우에는 파클리탁셀에 대한 저항성을 가지는 것으로 진단된다. 따라서 본 발명의 파클리탁셀에 대한 민감도 마커의 검출 방법을 cDNA를 이용하는 증폭반응에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 어닐링되는 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계; 및 (ii) 상기 증폭 반응의 산물을 분석하여 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현정도를 결정하

는 단계를 포함한다.

- [0036] 본 발명의 키트는 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가적으로 포함할수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트는 위암 세포를 시료로 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트에서 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393, NM_007337로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열은 파클리탁셀 저항성 환자로부터 고발현 되고, 진뱅크 접근번호 NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179 로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열은 파클리탁셀 저항성 환자로부터 저발현 된다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 “고발현”은 조사 대상의 시료(예컨대, 위암세포)에서의 대상이 되는 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도가 정상 시료(예컨대, 정상세포)와 비교하여 높은 경우(바람직하게는, 4배 이상)를 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “저발현”은 조사 대상의 시료(예컨대, 위암세포)에서의 대상이 되는 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도가 정상 시료(예컨대, 정상세포)와 비교하여 낮은 경우(바람직하게는, 4배 이상)를 의미한다. 본 발명의 암 환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트는 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 고발현 또는 저발현 여부를 분석함으로써, 파클리탁셀에 대한 민감도를 예측할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인간의 생물학적 시료에 있는 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393, NM_007337, NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 검출하는 단계를 포함하는 인간의 파클리탁셀에 대한 민감도를 예측하는 방법을 제공한다.

- [0041] 본 발명의 인간의 파클리탁셀에 대한 민감도를 예측하는 방법은 상술한 본 발명의 인간의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트를 이용하기 때문에, 그 발명들 사이의 공통 사항은 본 명세서의 복잡성을 야기하는 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재 생략한다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 암세포의 파클리탁셀에 대한 저항성을 감소시키는 파클리탁셀 보조제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0043] (a) 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM_173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393, NM_007337, NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및
- [0044] (b) 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현량을 측정하는 단계, 상기 진뱅크 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354, XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM_173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393 및 NM_007337로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 고발현이 억제되거나 상기 진뱅크 접근번호 NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 저발현이 억제되는 경우에는 상기 시료는 암세포의 파클리탁셀에 대한 저항성을 감소시키는 파클리탁셀 보조제로 판단된다.
- [0045] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킨다. 바람직하게는, 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포는 인간의 위암 세포이다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시료”는 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현량에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학 물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이어, 시료가 처리된 세포에서 상기 나열한 115개의 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 발현량을 측정한다. 발현량의 측정은 상기 기재한 바와 같으며, 측정 결과, 상기 뉴클레오타이드 서열 중에서 진뱅크(GenBank) 접근번호 NM_000584, NM_000064, XM_062329, NM_024013, NM_018441, NM_000624, NM_002970, XM_166109, XM_087199, NM_000060, NM_005506, NM_022748, NM_033515, NM_012466, XM_088420, NM_024940, NM_002612, NM_144697, XM_099859, XM_070600, XM_11399, M_002294, NM_014423, NM_145055, NM_032119, NM_000833, NM_004585, NM_014314, NM_014905, NM_022354,

XM_094310, NM_002031, XM_106387, NM_003633, XM_087377, NM_012387, XM_098530, NM_021257, XM173641, NM_006274, NM_016831, NM_003019, NM_145038, XM_063719, XM_087143, NM_005192, NM_004393 및 NM_007337로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 고발현이 억제되거나 또는 진뱅크 접근번호 NM_005275, NM_032937, NM_006963, XM_166153, NM_023008, XM_047600, NM_002139, NM_021178, XM_030864, NM_014675, XM_096753, XM_172723, NM_080632, NM_019610, NM_018195, NM_052825, NM_00307, NM_004618, NM_003137, NM_004526, NM_024839, NM_005035, NM_021078, NM_018246, NM_001000, NM_031968, NM_016264, NM_007149, XM_098892, NM_144987, NM_016947, NM_144982, XM_033361, NM_015003, M_024871, NM_000386, NM_024989, NM_000222, NM_006823, XM_045076, NM_003107, NM_024830, NM_00560, XM_171053, NM_014450, NM_001778, NM_024570, NM_002561, NM_015129, NM_006914, NM_032147, NM_032268, NM_033625, NM_014067, NM_017805, NM_002661, XM_090092, NM_005521, NM_005885, NM_00261, NM_007257, NM_006474, NM_001759, NM_006891, NM_133430, NM_133431 및 NM_133179로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열의 저발현이 억제되는 경우에는 상기 시료는 암세포의 파클리탁셀에 대한 저항성을 감소시키는 파클리탁셀 보조제로 판정될 수 있다.

효 과

- [0046] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0047] (a) 본 발명은 암환자의 파클리탁셀에 대한 민감도 예측용 키트, 예측 방법 및 암세포의 파클리탁셀에 대한 저항성을 감소시키는 파클리탁셀 보조제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0048] (b) 본 발명은 위암에서 사용되는 주요 항암제인 파클리탁셀(paclitaxel)의 감수성을 예측하는 유전자군을 발굴하여 파클리탁셀의 사용 전에 그 반응성을 예측할 수 있게 함으로써 암환자의 치료 방향을 제시해주며, 파클리탁셀의 치료 효율을 높이는 보조제의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0049] 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.

[0050] 실시예

[0051] 실시예 1 : 암세포주의 배양

- [0052] 78 인간 암세포 주 (23 위암, 10 유방암, 7 간암, 6 폐암, 5 대장암, 4 혈액암, 4 뇌암, 4 자궁암, 3 두경부암, 3 피부암, 2 방광암, 2 췌장암, 2 전립선암, 1 섬유육종, 1 신장암 및 1 난소암)(63 암세포 주는 미국 ATCC와 일본의 JCRB, 한국의 KCLB에서 구입하였고, 15개 암세포 주는 암전이연구센터에서 직접 확보하였다.)를 실험에 사용하였고, 제조자의 프로토콜에 따라서 37℃ 5% CO₂ 하에서 배양하였다 (표 1).

표 1

- [0053] 78개 인간 암세포주의 조직별 기원과 IC₅₀

번호	세포주	기관	IC ₅₀ (uM)
1	HT-1376	방광	0.046
2	RT4	방광	0.003
3	IMR-32	뇌	0.004
4	YCC-BRN	뇌	0.002
5	T98G	뇌	22.968
6	U87MG	뇌	13.007
7	MCF/ADR	유방	0.384

8	MCF-7	유방	0.542
9	MDA-MB-231	유방	0.064
10	MDA-MB-435	유방	0.052
11	SK-BR-3	유방	0.007
12	T47D	유방	0.007
13	YCC-B1	유방	8.015
14	YCC-B2	유방	0.007
15	YCC-B3	유방	9.467
16	YCC-B5	유방	7.229
17	C33A	자궁경부	0.006
18	CaSki	자궁경부	0.006
19	HeLa	자궁경부	0.006
20	SiHa	자궁경부	0.035
21	COLO 205	직장	0.006
22	DLD-1	직장	0.051
23	HCT-116	직장	0.058
24	HCT-15	직장	0.053
25	HT 29	직장	0.081
26	HT-1080	섬유육종	0.036
27	AGS	위	0.038
28	MKN-45	위	0.019
29	NCI-N87	위	8.284
30	SNU-1	위	1.652
31	SNU-484	위	0.011
32	YCC-1	위	8.893
33	YCC-2	위	9.137
34	YCC-3	위	10.586
35	YCC-6	위	8.280
36	YCC-7	위	15.282
37	YCC-10	위	7.978
38	YCC-11	위	6.931
39	YCC-16	위	8.016
40	HS746T	위	0.081
41	KATO III	위	0.002
42	MKN-1	위	0.026
43	MKN-28	위	0.602
44	MKN-74	위	0.182
45	SNU-5	위	0.039
46	SNU-16	위	0.001
47	SNU-216	위	2.050
48	SNU-638	위	0.004
49	SNU-668	위	0.051
50	HL-60	혈액	0.048
51	Jurkat	혈액	0.004
52	Molt 4	혈액	0.054
53	Raji	혈액	1.708
54	Caki-2	신장	11.965
55	HepG2	간	2.077
56	Hep3B	간	7.166
57	SK-Hep-1	간	1.241
58	SNU-182	간	0.033
59	SNU-398	간	11.915
60	SNU-449	간	8.384
61	SNU-739	간	0.005
62	A549	폐	1.331
63	NCI-H1299	폐	0.047
64	NCI-H460	폐	0.042

65	NCI-H596	폐	0.030
66	NCI-H647	폐	0.905
67	NCI-H69	폐	14.123
68	G361	흑색종	31.122
69	SK-MEL-2	흑색종	0.715
70	SK-MEL-24	흑색종	8.607
71	YCC-01	난소	13.934
72	Capan-2	췌장	6.342
73	YCC-YJH	췌장	0.005
74	LNCap	췌장	7.216
75	PC3	췌장	0.051
76	SCC-1438	혀	7.058
77	SCC-15	혀	7.056
78	SCC-25	혀	0.333

[0054] 실시예 2 : 항암제 감수성 프로파일

[0055] 파클리탁셀(Sigma, USA)을 농도(0.6nM-6 μ M) 별로 72시간 동안 처리한 뒤, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, Saint Louis, MO, USA) 분석을 수행하였다. 실험 결과는 calcsyn 프로그램을 이용하여 IC₅₀ 값을 산출하여 분석했다. 산출된 78개 암세포주들의 IC₅₀ 값을 이용하여 파클리탁셀에 대하여 저항성을 갖는 26개 세포주와 민감한 17개 세포주를 선별하였다 (도 1).

[0056] 실시예 3 : 유전자 발현 프로파일

[0057] 트리졸 시약을 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, 22K 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이를 기준 방법으로 수행하였다. 유전자 발현 결과는 LOWESS (Locally Weighted Scatter Plot Smoothing) 기법으로 실험간 차이를 보정하고, 두 개의 표본까지의 손실을 허용하는 NMP(non missing proportion) 80%를 만족하는 유전자들을 추후 분석에 사용하였다. 78개 암세포주들에서 2만2천개 유전자의 발현 정도를 산출하였고, 계층적 군집화(hierarchical clustering)로 나타냈다. 78개 암세포주들은 같은 모기관을 같은 세포주들끼리 군집을 이루는 것을 확인하였다(도 2).

[0058] 실시예 4 : 파클리탁셀 감수성 관련 유전자의 선별

[0059] 78개 세포주 중, 파클리탁셀에 민감한 세포군과 저항성을 갖는 세포군 사이에서 유전자 발현이 1.5배 차이가 나면서 집단간 유의성이 높은 ($p < 0.01$) 유전자군을 Volcano Plot(Gene Spring)을 이용하여 선별했고, 선별된 유전자들의 내부 검정을 위해서 LOOCV(Leave-One-Out cross-validation)을 수행하였다. 위와 같은 기준으로 115개 유전자를 선별하였고(표 2), 115개 유전자와 두 집단의 세포주들을 계층적 군집화로 나타냈을 때, 선별된 유전자들은 두 집단을 잘 나누어 주는 것을 확인하였다(도 3). 이 두 집단에서 115개 유전자를 이용하여 LOOCV를 수행한 결과, 93.2%의 높은 예측율을 보였다(표 3). 115개 유전자 중, 48개는 저항성 집단에서 발현이 높았고, 67개는 민감성 집단에서 발현이 높았다. 또한 115개 유전자는 87개의 알려진 유전자와 28개의 EST(expressed sequence tag)로 구성되어 있었다. 알려진 87개 유전자 가운데 66개 유전자는 유전자 주석(gene-annotation)이 되어 있었고, 이 중 57.6이 세포대사 과정에 속해 있었다(도 6).

표 2

[0060] 선별된 115개 유전자 정보와 발현값

특성	GenBank 접근번호	유전자	발현량 (log2R/G)	
			저항성그룹의 평균	민감성그룹의 평균

저항성 집단에서 고발현	NM_000584	IL8	-0.73	-2.99
	NM_000064	C3	0.33	-1.77
	XM_062329	EST	0.58	-0.10
	NM_024013	IFNA1	0.67	0.08
	NM_018441	PECR	0.59	-0.13
	NM_000624	SERPINA5	0.87	0.07
	NM_002970	SAT	-0.19	-1.57
	XM_166109	EST	0.45	-0.24
	XM_087199	EST	0.87	0.20
	NM_000060	BTD	0.93	0.19
	NM_005506	SCARB2	0.60	-0.21
	NM_022748	TNS3	-0.35	-1.72
	NM_033515	ARHGAP18	-0.47	-1.87
	NM_012466	TSPAN16	1.34	0.62
	XM_088420	EST	0.10	-0.82
	NM_024940	DOCK5	0.47	-0.54
	NM_002612	PDK4	-1.16	-1.94
	NM_144697	C1orf51	1.49	-0.45
	XM_099859	EST	1.05	0.33
	XM_070600	EST	0.55	-0.06
	XM_113991	EST	0.41	-0.24
	NM_002294	LAMP2	0.84	-0.08
	NM_014423	AFF4	0.81	-0.01
	NM_145055	C18orf25	0.44	-0.18
	NM_032119	GPR98	1.08	0.54
	NM_000833	GRIN2A	0.76	0.05
	NM_004585	RARRES3	0.49	-0.85
	NM_014314	DDX58	0.63	-0.18
	NM_014905	GLS	0.43	-0.43
	NM_022354	SPATA1	0.85	0.40
	XM_094310	EST	0.70	0.21
	NM_002031	FRK	1.34	-0.16
	XM_106387	EST	0.76	0.18
	NM_003633	ENC1	-0.32	-1.65
	XM_087377	EST	0.64	-0.15
	NM_012387	PADI4	0.56	0.01
	XM_098530	EST	0.65	0.09
	NM_021257	NGB	0.52	0.07
	XM_173641	EST	1.19	0.59
	NM_006274	CCL19	0.89	0.40
	NM_016831	PER3	0.65	-0.32
	NM_003019	SFTPD	1.04	0.48
	NM_145038	C2orf39	0.69	0.02
	XM_063719	EST	1.34	0.67
	XM_087143	EST	1.03	0.42
	NM_005192	CDKN3	0.17	-0.46
	NM_004393	DAG1	0.80	0.18
	NM_007337	DLEC1	0.74	0.08

저항성 집단에서 저발현	NM_005275	GNL1	-0.19	0.42
	NM_032937	C9orf37	-0.17	0.43
	NM_006963	ZNF22	-1.80	-0.51
	XM_166153	EST	-1.91	-0.03
	NM_023008	FLJ12949	-0.44	0.12
	XM_047600	EST	-0.18	0.39
	NM_002139	RBMX	-1.06	-0.52
	NM_021178	CCNB1IP1	-0.79	-0.05
	XM_030864	EST	-0.56	0.53
	NM_014675	CROCC	-0.12	0.51
	XM_096753	EST	-1.06	-0.14
	XM_172723	EST	-0.37	0.16
	NM_080632	UPF3B	-0.38	0.27
	NM_019610	RP11-82K18.3	-0.58	0.18
	NM_018195	C11orf57	-0.13	0.47
	NM_052825	EST	-0.40	0.20
	NM_003074	SMARCC1	-0.75	0.12
	NM_004618	TOP3A	-0.28	0.69
	NM_003137	SRPK1	-0.65	0.06
	NM_004526	MCM2	-0.68	0.12
	NM_024839	RPP21	0.00	0.58
	NM_005035	POLRMT	-0.46	0.14
	NM_021078	GCN5L2	-0.45	0.39
	NM_018246	CCDC25	-0.18	0.45
	NM_001000	RPL39	-0.21	0.14
	NM_031968	EST	-0.55	0.21
	NM_016264	ZNF44	-0.76	-0.17
	NM_007149	ZNF184	0.12	0.82
	XM_098892	EST	-0.49	0.60
	NM_144987	U2AF1L4	-0.01	0.53
	NM_016947	EST	-0.69	-0.08
	NM_144982	PSRC2	-0.98	-0.36
	XM_033361	EST	-1.38	-0.74
	NM_015003	EST	-0.85	-0.05
	NM_024871	MAP6D1	-0.17	0.87
	NM_000386	BLMH	-0.71	-0.17
	NM_024989	PGAP1	0.06	1.02
	NM_000222	KIT	-1.08	0.00
	NM_006823	PKIA	-1.19	0.44
	XM_045076	EST	-0.23	0.40
	NM_003107	SOX4	-1.13	-0.02
	NM_024830	AYTL2	-0.69	-0.01
	NM_005608	PTPRCAP	-1.28	-0.75
	XM_171053	EST	-0.82	-0.28
	NM_014450	SIT1	-1.84	-0.84
	NM_001778	CD48	-3.24	-1.99
	NM_024570	DLEU8	-0.58	0.22
	NM_002561	P2RX5	-1.02	0.28
	NM_015129	SEPT6	-1.48	-0.63
	NM_006914	RORB	-1.67	-0.25
	NM_032147	USP44	-2.79	-1.26
	NM_032268	ZNRF1	-0.22	0.30
	NM_033625	RPL34	-0.39	0.23

	NM_014067	LRP16	-0.39	0.33
	NM_017805	RASIP1	-1.01	0.24
	NM_002661	PLCG2	-0.65	-0.07
	XM_090092	EST	-3.20	-1.90
	NM_005521	TLX1	0.03	0.75
	NM_005885	MARCH6	-0.48	0.11
	NM_002615	SERPINF1	-0.06	1.07
	NM_007257	PNMA2	-1.12	-0.17
	NM_006474	PDPN	-0.89	-0.04
	NM_001759	CCND2	-3.79	-2.07
	NM_006891	CRYGD	-1.88	-0.58
	NM_133430	XAGE1	-0.72	0.28
	NM_133431	XAGE1	0.01	1.00
	NM_133179	XAGE3	-2.61	0.11

표 3

LOOCV(Leave-One-Out cross-validation) 결과

세포주	실제값	예측값	한계 저항도값	한계 민감도값
Caki-2	저항성	저항성	1.572	-1.572
Capan-2	저항성	저항성	1.232	-1.232
G361	저항성	저항성	1.064	-1.064
Hep3B	저항성	저항성	1.131	-1.131
LNCap	저항성	민감성	-0.0496	0.0496
NCI-H69	저항성	저항성	0.242	-0.242
NCI-N87	저항성	저항성	0.734	-0.734
SCC-1438	저항성	저항성	1.576	-1.576
SCC-15	저항성	저항성	1.509	-1.509
SK-MEL-24	저항성	저항성	1.68	-1.68
SNU-398	저항성	저항성	1.416	-1.416
SNU-449	저항성	저항성	1.564	-1.564
T98G	저항성	저항성	1.291	-1.291
U87MG	저항성	저항성	1.247	-1.247
YCC-1	저항성	저항성	0.929	-0.929
YCC-10	저항성	저항성	1.036	-1.036
YCC-11	저항성	저항성	0.886	-0.886
YCC-16	저항성	저항성	0.34	-0.34
YCC-2	저항성	저항성	0.507	-0.507
YCC-3	저항성	저항성	1.464	-1.464
YCC-6	저항성	저항성	1.11	-1.11
YCC-7	저항성	저항성	1.776	-1.776
YCC-B1	저항성	저항성	0.376	-0.376
YCC-B3	저항성	저항성	0.739	-0.739
YCC-B5	저항성	저항성	1.436	-1.436
YCC-O1	저항성	저항성	0.342	-0.342
C33A	민감성	민감성	-0.918	0.918
Caski	민감성	저항성	0.238	-0.238
COLO-205	민감성	저항성	0.733	-0.733
HeLa	민감성	민감성	-1.078	1.078
IMR-32	민감성	민감성	-1.63	1.63
Jurkat	민감성	민감성	-2.37	2.37
KATO III	민감성	민감성	-1.34	1.34
RT4	민감성	민감성	-0.756	0.756
SK-BR-3	민감성	민감성	-0.323	0.323

SNU-16	민감성	민감성	-1.344	1.344
SNU-484	민감성	민감성	-1.483	1.483
SNU-638	민감성	민감성	-0.972	0.972
SNU-739	민감성	민감성	-1.162	1.162
T47D	민감성	민감성	-0.662	0.662
YCC-B2	민감성	민감성	-0.805	0.805
YCC-BRN	민감성	민감성	-0.0128	0.0128
YCC-YJH	민감성	민감성	-0.647	0.647

[0062] 실시예 5 : 마우스에서 인간 위암 세포주의 이중이식 암조직

[0063] 1×10^7 개 세포 (NCI-N87 in ATCC 및 MKN-45 in JCRB)(ATCC in USA and JCRB in Japan)를 6주령 된 Balb/c athymic nu/nu 마우스(SLC, Japan) 피하에 주사하여 암조직을 형성시켰다. 15 mg/kg 파클리탁셀과 0.9% 식염을 복강 내로 총 3회 주사 (1일, 4일 및 7일)하면서 암조직의 부피를 측정하였다. 인비보(*In vivo*) 암조직의 항암효과 예측을 위해서 대조군의 암조직에서 전체 RNA를 추출하여 마이크로어레이를 수행하였다. NCI-N87로 만든 암조직의 경우는 파클리탁셀 처리 후에도 대조군과 차이 없이 부피가 증가함을 관찰하였고, MKN-45로 만든 암조직의 경우는 파클리탁셀을 처리한 실험군이 대조군에 비하여 부피의 증가가 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(도 4). 이 결과를 선별된 115개 유전자로 예측이 가능한지를 알아보기 위하여 대조군의 암조직에서 전체 RNA를 추출하여 앞과 동일한 방법으로 마이크로어레이를 진행하였다. 43개 세포주들과 암조직을 섞어서 수행한 계층적 군집화에서 저항성 암조직과 민감성 암조직은 각각 저항성 세포주와 민감성 세포주 군집에 포함되는 것을 확인하였고(도 5), SVM(Support vector machine) 법으로 파클리탁셀의 감수성 정도를 예측해본 결과 100% 예측율을 나타냈다(표 4).

표 4

[0064] SVM(support vector machine) 결과

시료	실제치	예측치	저항성 오차	민감성 오차
MKN-45 (1)	저항성	저항성	1.464	-1.464
MKN-45 (2)	저항성	저항성	1.572	-1.572
MKN-45 (3)	민감성	민감성	-1.078	1.078
NCI-N87 (1)	저항성	저항성	1.291	-1.291
NCI-N87 (2)	저항성	저항성	1.776	-1.776
NCI-N87 (3)	저항성	저항성	0.507	-0.507

[0065] 실시예 6 : 유전자 발현의 검증

[0066] 앞에서 선별한 115개 파클리탁셀 관련 유전자 중에서, 유전자의 기능(도 6) 과 이전 연구들로 미루어 볼 때 파클리탁셀의 감수성을 설명할 수 있고 그렇지 않더라도 두 집단에서 유전자 발현차이가 큰 11개 유전자를 선정하여 4개의 위암세포주와 2개의 이중이식 위암조직에서 반정량적 RT-PCR을 수행하였다. 유전자들의 발현은 마이크로어레이 결과에서와 같이 두 집단에서 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 그 중 4개의 유전자를 2개의 위암세포주와 2개의 이중이식 위암조직에서 정량적 RT-PCR 수행한 결과에서도 4개의 유전자는 두 집단에서 발현차이를 보였으며, 마이크로어레이 결과와의 상관성도 $r > 0.9$ 이상으로 높음을 확인하였다(도 7 및 도 8). 사용된 프라이머의 염기서열은 표 5에 나열하였다.

표 5

[0067] RT-PCR에 사용된 프라이머 세트

번호	유전자	방향	서열 (5'-3')
1	IL8	좌	CTGTGTCATTGCCAGCTGTGT
		우	GCCTTGTATTTAAAAATGCAGTCA
2	C3	좌	GACAAGGTCACCCTGGAAGA
		우	ACTTGATGGGCTGATGAAC
3	LAMP2	좌	TGCCTTGGCAGGAGTACTTA
		우	TCTCAAAATGCTGGGATTGAT
4	ENC1	좌	TATTTTGTGGGCTGGTTGCT
		우	TGAACATGAACATTTTCCTTCAA
5	RARRES3	좌	TGAAGCAGCCACAAAATCCT
		우	GGGCAGATGGCTGTTTATTG
6	ARHGAP18	좌	TGTGACAAGAGATGAGCCTCTG
		우	ATCATGAACACCGTTTGTGC
7	DDX58	좌	GCCATTACACTGTGCTTGGA
		우	CCTCCACCACAAAATTTCAA
8	SERPINA5	좌	TGGGGCTACTGTTTCAGTCC
		우	AAAGGATGAATGGCACTTGA
9	P2RX5	좌	GGAGTCCTTGAGCACCTCAG
		우	GGCAGGAAGGTGGTGTCTT
10	SRPK1	좌	GGAAATGCTTCTCCACCAAA
		우	GTGAGATCGTGGCAATTTGA
11	SOX4	좌	CACGGTCAAAC TGAAATGGA
		우	ACTGACTGCCCTGTACCAC
12	GAPDH	좌	CCATGGAGAAGGCTGGGG
		우	CAAAGTTGTCATGGATGACC
13	ACTB	좌	GGGAATTCAAACTGGAACGGTGA
		우	GGAAGCTTATCAAAGTCCTCGGCC

[0068] 실시예 7 : siRNA(small interfering RNA)를 이용한 유전자 발현의 억제

[0069] 리포펙타민(lipofectamine) RNAiMAX 트랜스펙션 시약(Invitrogen, USA)을 이용하여 2 nM, 10 nM 및 50 nM 의 siRNA (LAMP2 또는 RARRES3)를 NCI-N87 세포주에 48시간 동안 주입하였다. 세 가지 siRNA 모두에서 농도와 상관없이 mRNA의 발현이 억제되는 것을 확인하였고, 이뮤노블롯팅으로 단백질의 발현 억제 정도를 확인한 결과 첫번째 siRNA의 최소 농도인 2 nM 에서도 발현이 억제되는 것을 확인하였다(도 9). siRNA의 염기서열은 표 6 에 나열하였다.

표 6

[0070] siRNA세트

유전자	타겟 사이트	방향	서열 (5'-3')
LAMP2	Site 1	좌	AUU AAG UUC CAA UGC AUA AGA CCG C
		우	GCG GUC UUA UGC AUU GGA ACU UAA U
	Site 2	좌	UUU GUA GUU UCA UAG GGU ACU GUG A
		우	UCA CAG UAC GUC AUG AAA CUA CAA A
	Site 3	좌	AAA GCU UGU ACA AGA ACA UCC CAG U
		우	ACU GGG AUG UUC UUG UAC AAG CUU U
RARRES3	Site 1	좌	AUA UAC AGG GCC CAG UGC UCA UAG C
		우	GCU AUG AGC ACU GGG CCC UGU AUA U
	Site 2	좌	UGA CCA ACC AUC UCC UUC GCA GAA C
		우	GUU CUG CGA AGG AGA UGG UUG GUC A
	Site 3	좌	AAA GAG CAU CCA GCA ACA ACC AGG A
		우	UCC UGG UUG UUG CUG GAU GCU CUU U

[0071] **실시예 8 : 파클리탁셀 민감성의 회복의 확인**

[0072] 1. 세포 생존능력 분석

[0073] NCI-N87 세포주에 LAMP2와 RARRES3를 목표로 하는 siRNA를 각각 2 nM 로 48시간 동안 처리한 뒤, 다양한 농도의 파클리탁셀을 72시간 동안 처리하고 MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)-분석을 수행하였다. LAMP2를 억제시킨 경우, 최소 농도인 0.6 nM 부터 최대 농도인 6 μ M 까지 모든 부분에서 파클리탁셀에 대한 감수성이 증가하는 것을 확인하였다. RARRES3를 억제시킨 경우, 60 nM 이상의 높은 농도에서는 대조군 및 NT(non-targeting) siRNA 처리군과 유의한 차이가 없었지만, 6 nM 이하의 낮은 농도에서는 파클리탁셀에 대한 반응이 미비한 대조군에 비하여 감수성이 유의하게 증가함을 확인하였다(도 10).

[0074] 2. 아포토시스 분석

[0075] NCI-N87 세포주에 LAMP2와 RARRES3를 목표로 하는 siRNA를 각각 2 nM 로 48시간 동안 처리한 뒤, 6 nM 의 파클리탁셀을 48시간 동안 처리하고 아넥신 V-FITC 및 7-AAD로 표지한 뒤 아포토시스 분석을 수행하였다. 유전자를 억제시킨 두 실험 모두에서 리포펙타민만 처리하거나 NT siRNA를 처리한 대조군의 경우 파클리탁셀은 세포사를 일으키지 않았지만, LAMP2 또는 RARRES3를 억제시킨 실험군의 경우에는 세포괴사와 늦은 아포토시스가 유의하게 증가하는 것을 확인 하였다(도 11 및 도 12).

[0076] **실시예 9 : 세포주기 분석**

[0077] 세포괴사(Necrosis) 또는 늦은 아포토시스가 진행된 세포를 제외하고, 정상적인 DNA를 가지고 있는 세포들을 이용하여 세포주기 구속(cell cycle arrest)연구를 진행하였다. 동일한 방법으로 siRNA를 처리한 뒤, 6 nM 의 파클리탁셀을 24시간 동안 처리하였다. 두 대조군에 비해서 LAMP2 유전자를 억제시킨 경우의 G2/M 기 구속만이 유의하게 증가함을 확인하였다(도 13).

[0078] Student t-검정 및 Kolmogorov-Smirnov 검정을 이용하여 통계적 유의성을 확인하였다.

[0079] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 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.

도면의 간단한 설명

[0080] 도 1은 78개 인간 암세포주의 파클리탁셀 감수성 프로필을 나타낸 그림이다. 세포주의 파클리탁셀에 대한 IC₅₀을 산출하여 평균 \pm 1표준편차를 계산한 뒤, 그 이상치의 값을 갖는 세포주를 저항성 세포주로, 그 이하치의 값을 갖는 세포주를 민감성 세포주로 결정했다.

[0081] 도 2는 78개 인간 암세포주의 유전자 발현 프로필을 나타낸 그림이다. 78개 세포주와 19,494 유전자 사이의 자율 계층 군집화(unsupervised hierarchical clustering)결과이다. 도표 아래 막대의 각 색상은 세포주의 기원이 되는 조직을 나타내고, 오른쪽의 단위 규모는 유전자 발현 정도를 나타내며, 적색은 높은 발현을, 녹색은 낮은 발현을 의미한다.

[0082] 도 3은 선별된 115개 유전자와 저항성, 민감성 세포주 사이의 자율 계층 군집화를 나타낸 그림이다. 115개 유전자는 저항성과 민감성을 갖는 세포주들을 두 집단으로 군집화 시키는 결과를 볼 수 있다. 도표 아래 막대는 저항성 혹은 민감성 집단을 나타낸다. 오늘쪽 단위 규모는 도 2와 동일하다.

[0083] 도 4는 NCI-N87 및 MKN-45 위암세포주로 만든 암조직의 성장곡선을 나타낸 그래프이다. 암조직의 부피가 200-300 mm³이 되었을 때(1일) 15 mg/kg의 파클리탁셀과 0.9% 생리식염수를 복강주사로 1일, 4일 및 7일째 투여한 뒤 암조직의 성장을 관찰했다. NCI-N87 암조직은 대조군(control)과 비교했을 때 파클리탁셀 처리군과 차이를

보이지 않았지만(도 4a), MKN-45 암조직의 경우 파클리탁셀 처리군에서 암조직의 부피가 유의하게 감소함을 확인하였다($p < 0.001$)(도 4b). 도표의 막대는 표준오차를 나타낸다.

[0084] 도 5는 선별된 115개 유전자와 저항성 또는 민감성 세포주, 암조직 사이의 교차 계층 군집화(supervised hierarchical clustering)를 나타낸 그림이다. 저항성 암조직은 저항성 세포주와 같은 군집을 이루고, 민감성 암조직은 민감성 세포주와 같은 군집에 속하는 것을 볼 수 있다. 오늘날 단위 규모는 도 2와 동일하다.

[0085] 도 6은 유전자의 기능별 분류를 나타낸 그림이다. 선별된 유전자 중, 통계적인 유의성($p < 0.05$)을 가지며 특정 기능군에 10 % 이상의 빈도수를 나타내는 유전자의 분류이다.

[0086] 도 7은 반정량적 역전사효소 연쇄반응(Semi-quantitative RT-PCR)의 결과를 나타낸 그림이다. 선별된 유전자 중, 11개 유전자에 대해서 2개의 저항성 위암세포주(NCI-N87, YCC-7), 2개의 민감성 위암세포주(MKN-45, SNU-16), 1개의 저항성 암조직(NCI-N87 암조직) 및 1개의 민감성 암조직(MKN-45 암조직)에서의 발현을 반정량적 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과, 모든 경우에서 마이크로어레이에서의 발현이 재현되는 것을 확인하였다.

[0087] 도 8은 정량적(quantitative)RT-PCR의 결과를 나타낸 그림이다. 11개 유전자 중, 4개의 유전자를 선별하여 2개의 위암세포주(NCI-N87 및 MKN-45)와 2개의 위암조직 (NCI-N87 암조직 및 MKN-45 암조직)에서 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 마이크로어레이와의 상관성이 모두 0.9이상으로 높게 나오는 결과를 보였고(도 8a), 모든 경우에서 마이크로어레이에서의 발현이 재현되는 것을 확인하였다(도 8b).

[0088] 도 9는 siRNA에 의한 LAMP2 및 RARRES3 유전자의 발현 억제를 나타낸 그림이다. NCI-N87 세포주에 2 nM, 10 nM 및 50 nM의 siRNA를 48시간 동안 처리한 뒤 발현을 확인하였다. 반정량적 RT-PCR 기법으로 mRNA의 발현억제를 확인하였으며, 세 종류의 siRNA의 모든 농도에서 발현이 억제됨을 보였다(도 9a). 첫번째 siRNA (site 1)의 2 nM 농도로 48시간 처리한 뒤 이뮤노블롯팅으로 단백질의 발현을 확인한 결과 역시 그 발현이 대조군(control)과 비표적 siRNA(NT siRNA)군에 비해서 억제됨을 확인하였다.

[0089] 도 10은 세포 생존능력 분석을 통해 파클리탁셀 민감성의 회복을 나타낸 그래프이다. 세포의 생존능력은 LAMP2의 발현이 억제된 NCI-N87 세포주가 대조군(파클리탁셀만 투여) 및 NT siRNA 처리군에 비해서 유의하게 감소됨을 확인하였다. 이 감소현상은 전체 파클리탁셀 농도에서 나타났고 ($p < 0.001$), 6nM 이하의 낮은 농도에서 극대화 되었다(도 10a). RARRES3를 억제시킨 NCI-N87 세포주에서도 마찬가지로 세포의 생존능력이 감소하는 결과를 보였다. 이 경우에는 전체 농도에서의 차이는 유의하지 않았지만 6nM 이하의 농도에서는 유의한 차이를 나타냈다($p < 0.05$)(도 10b). †, Student's t-test; ‡, Kolmogorov-Smirnov test

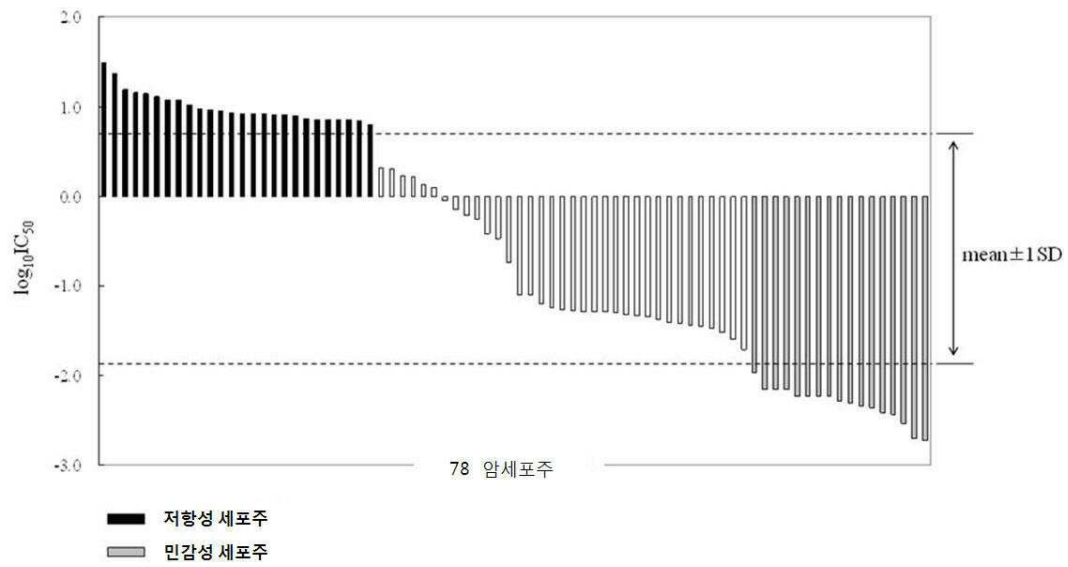
[0090] 도 11은 아포토시스(Apoptosis) 분석을 통해 파클리탁셀 민감성의 회복을 나타낸 그림이다. 6 nM의 파클리탁셀을 NCI-N87 세포주에 48시간 동안 처리한 뒤 아넥신 V-FITC, 7-AAD로 표지하고 유세포 분석을 통하여 아포토시스 분석을 수행하였다. 대조군인 A 및 B는 NT siRNA 처리군으로서 파클리탁셀의 처리 뒤에도 세포 분포의 변화가 없었지만, LAMP2가 억제된 세포인 C에서는 파클리탁셀의 처리 후 괴사(necrosis)와 늦은 아포토시스가 관찰되었다(도 11a). 도표상으로 봤을 때에도 LAMP2가 억제된 실험군에서만 세포괴사(necrosis)($p < 0.005$)와 늦은 아포토시스 ($p < 0.0005$)가 유의하게 증가함을 확인하였다(도 11b).

[0091] 도 12도 역시 아포토시스(Apoptosis) 분석을 통해 파클리탁셀 민감성의 회복을 나타낸 그림이다. 도 11에서와 동일한 방법으로 RARRES3가 억제된 NCI-N87 세포주에서 실험한 결과, LAMP2 결과와 유사하게 세포괴사와 늦은 아포토시스가 증가함을 확인하였다.

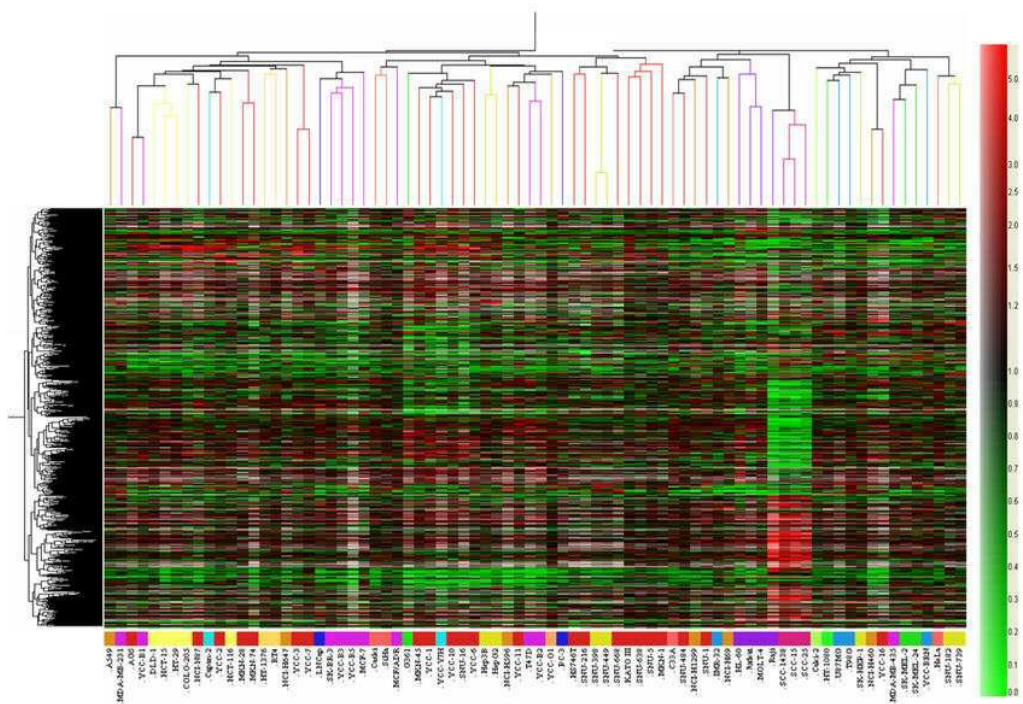
[0092] 도 13은 세포주기를 분석한 그림이다. 6 nM의 파클리탁셀을 NCI-N87 세포주에 24시간 동안 처리한 뒤 PI로 표지하고 유세포 분석을 통하여 세포주기 분석을 수행하였다. 대조군인 A 및 B는 NT siRNA 처리군으로서 파클리탁셀의 처리 뒤에도 G2/M기의 변화가 보이지 않았지만, LAMP2가 억제된 실험군인 C에서는 파클리탁셀 처리 후 G2/M기가 두 배 이상 증가함을 확인하였다.

도면

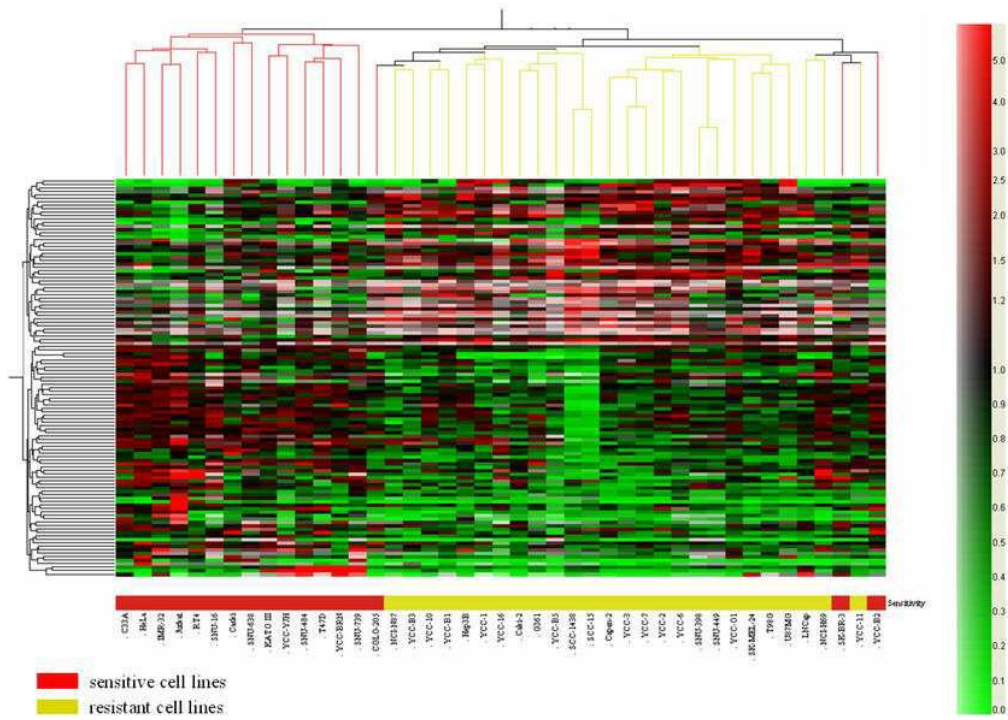
도면1



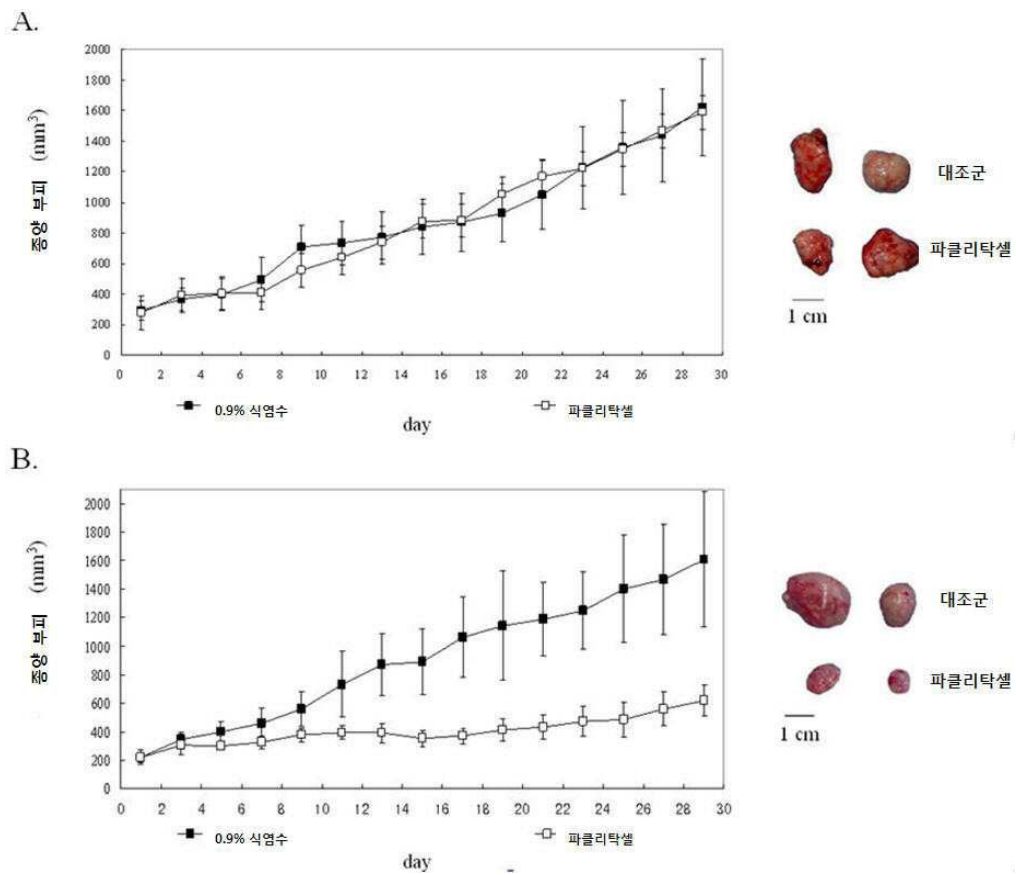
도면2



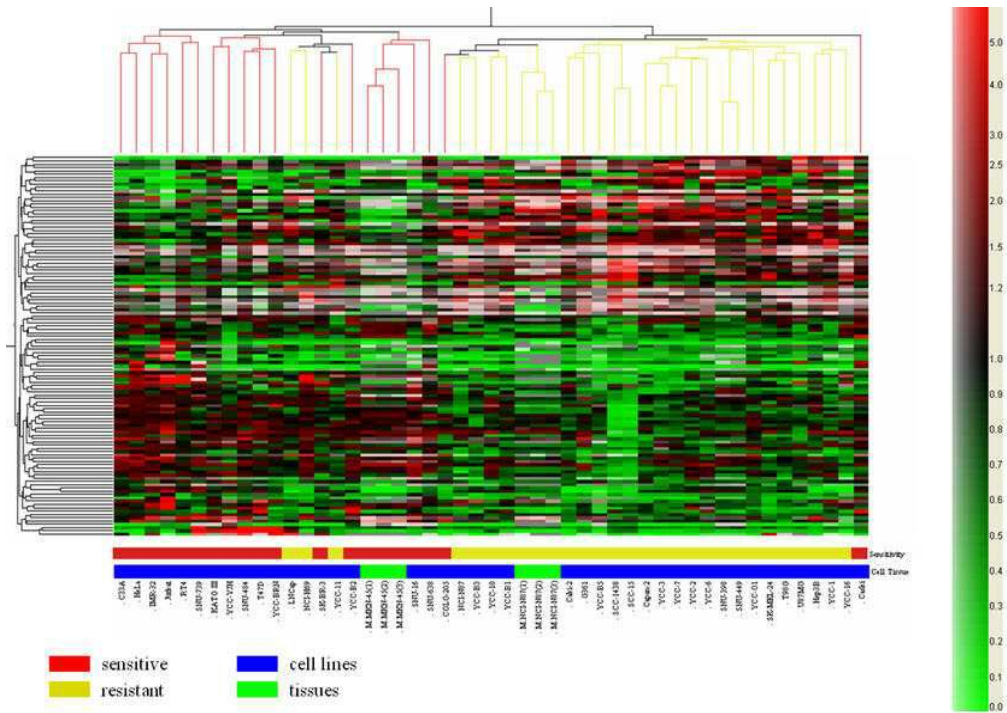
도면3



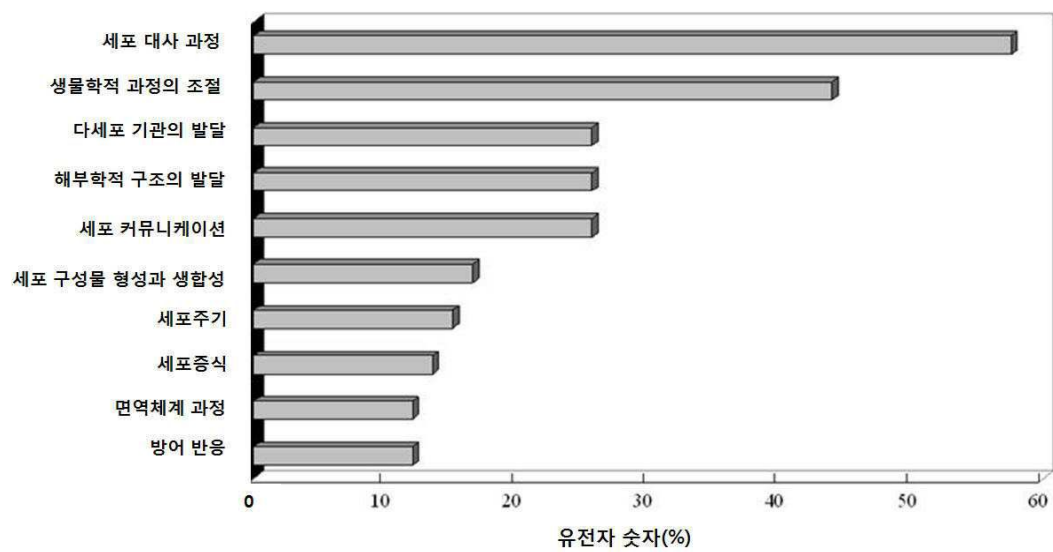
도면4



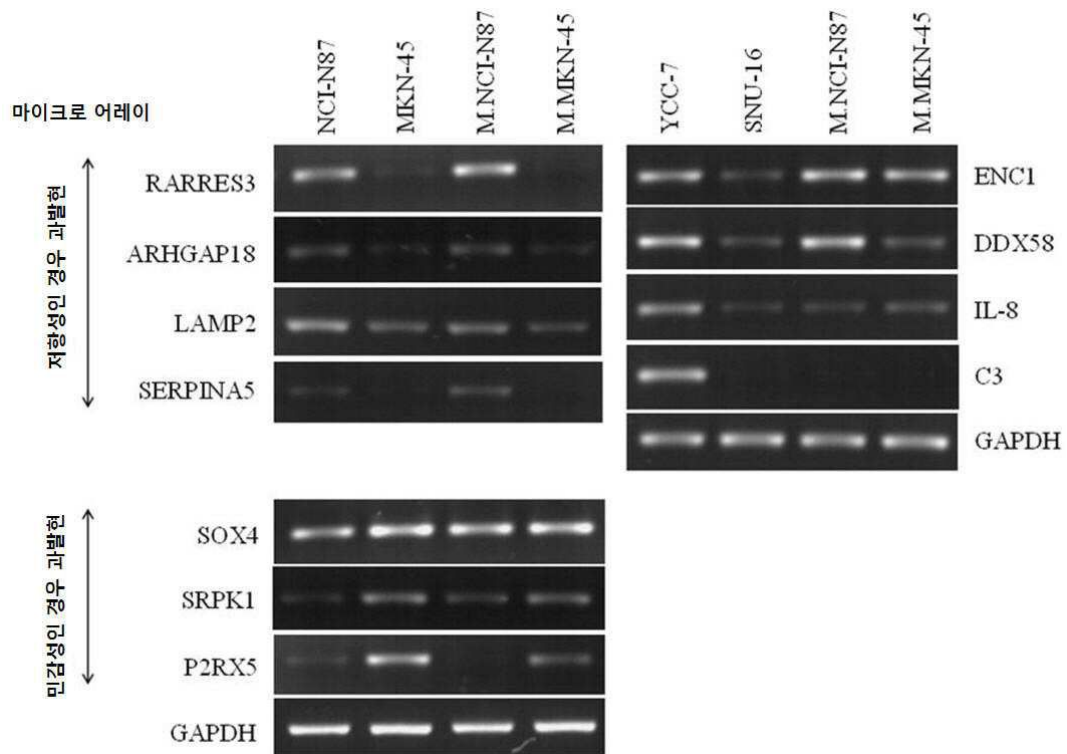
도면5



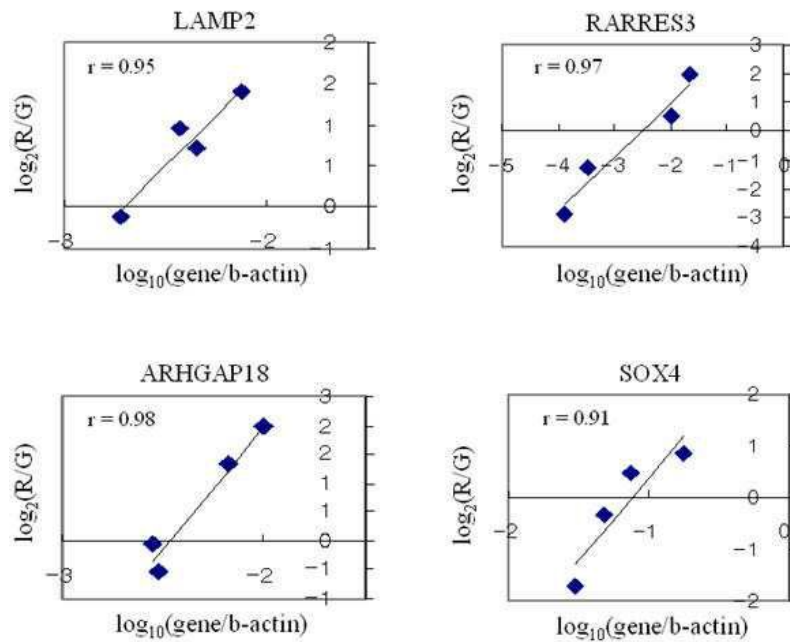
도면6



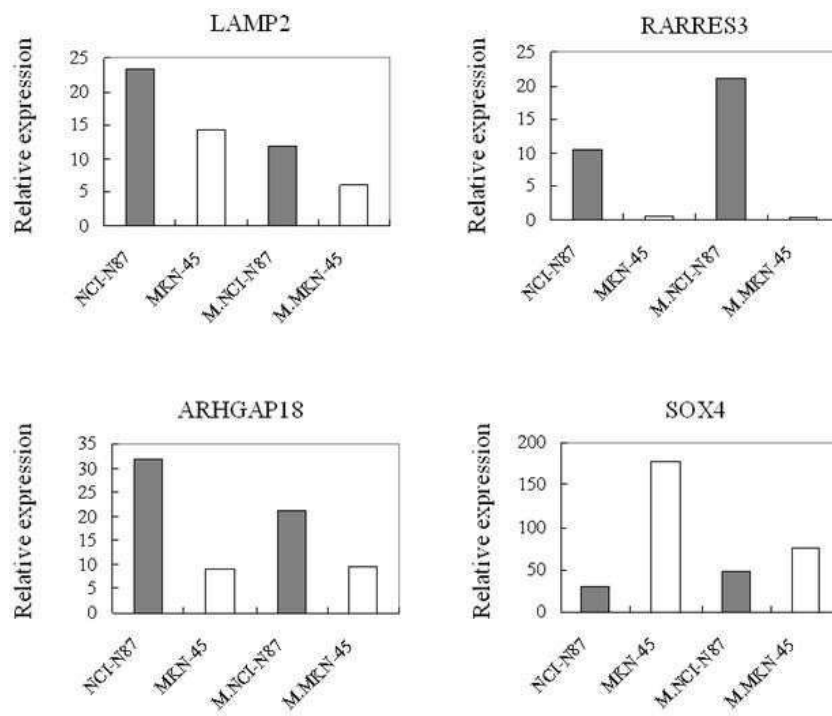
도면7



도면8a



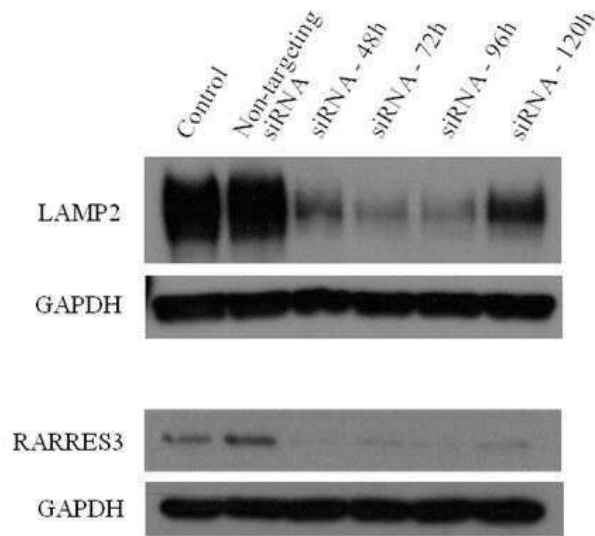
도면8b



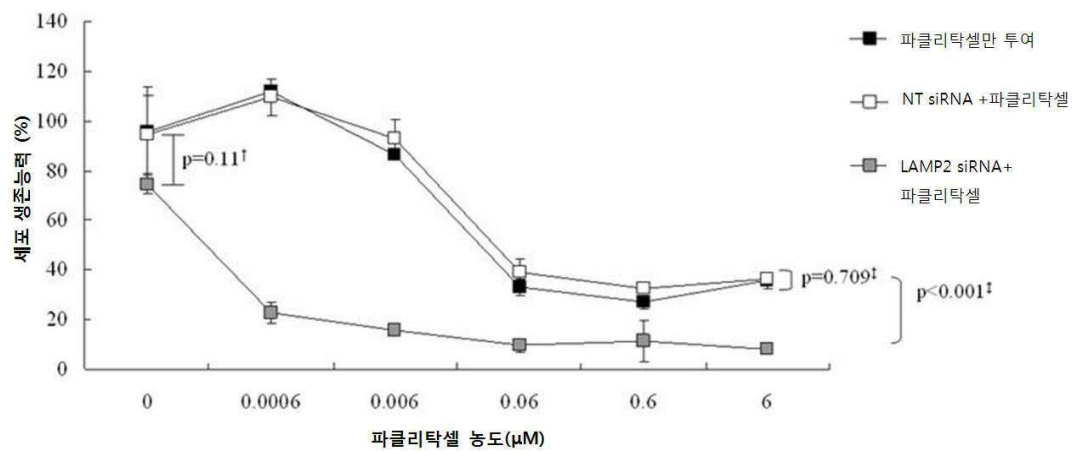
도면9a



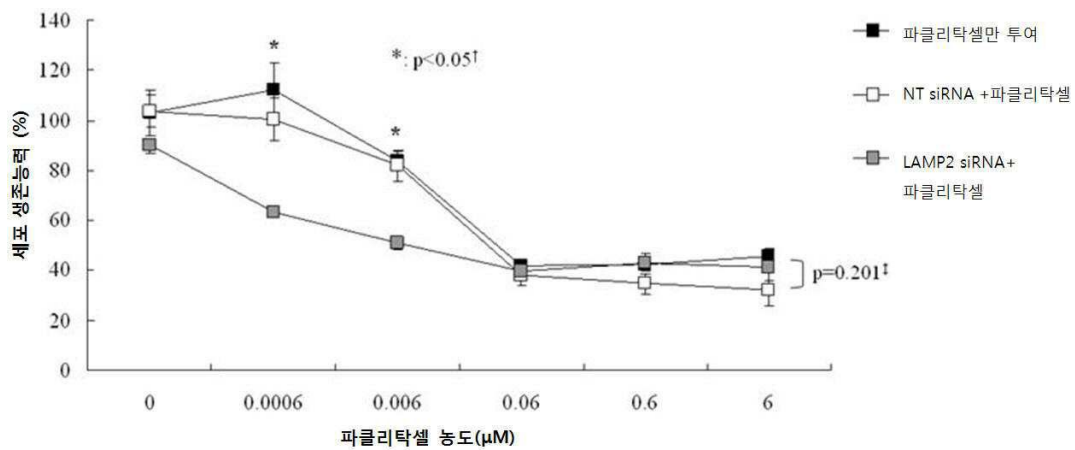
도면9b



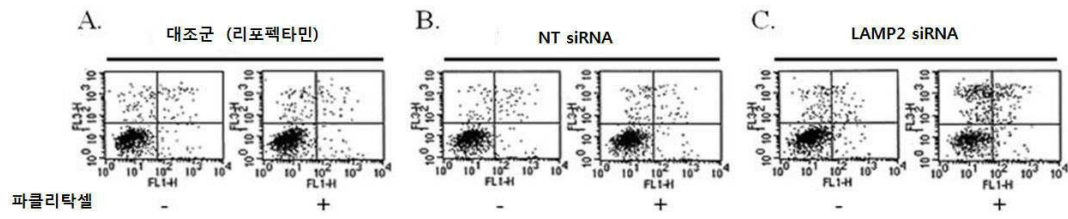
도면10a



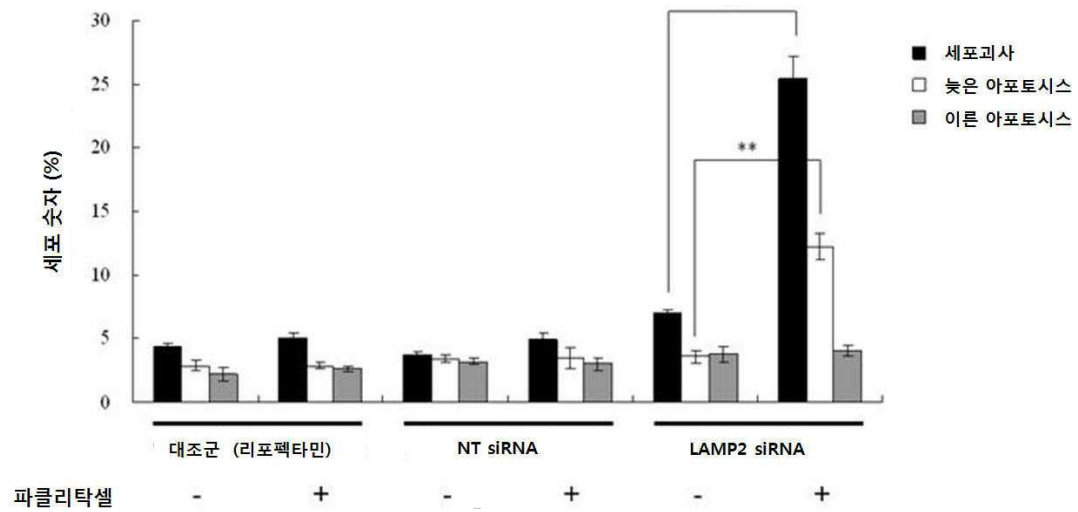
도면10b



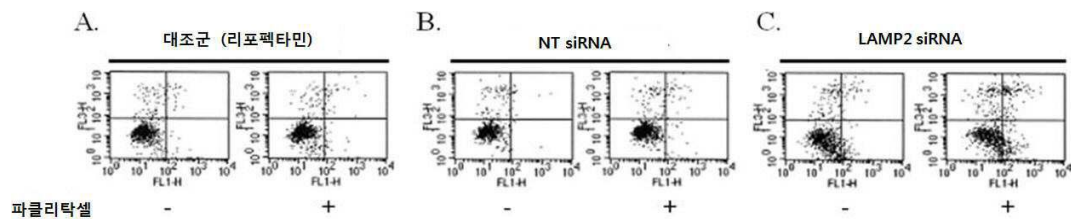
도면11a



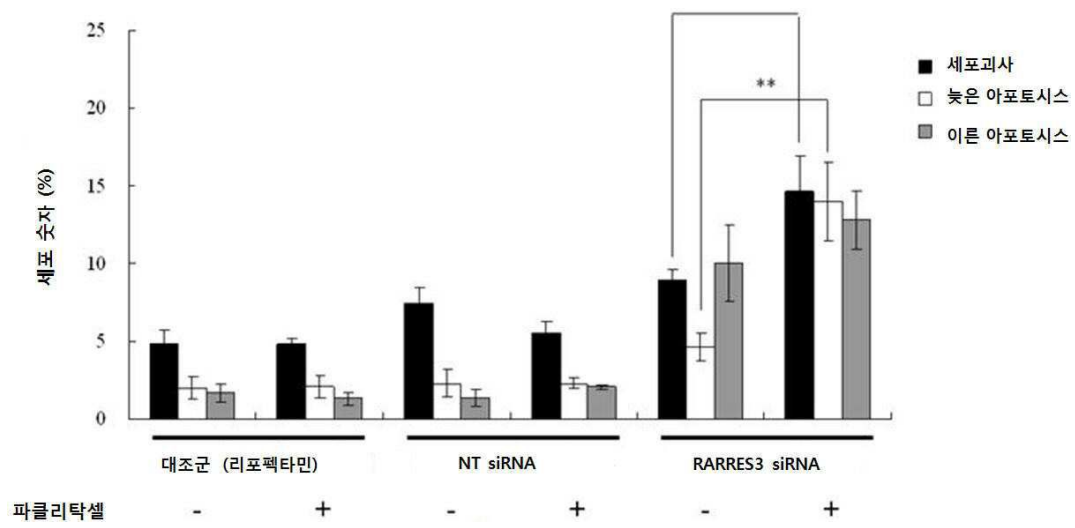
도면11b



도면12a



도면12b



도면13

