

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2009년 10월 29일 (29.10.2009)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2009/131365 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/12 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/002084
- (22) 국제출원일: 2009년 4월 21일 (21.04.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2008-0036867 2008년 4월 21일 (21.04.2008) KR
10-2008-0036868 2008년 4월 21일 (21.04.2008) KR
10-2008-0036869 2008년 4월 21일 (21.04.2008) KR
10-2008-0036870 2008년 4월 21일 (21.04.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전 유성구 어은동 52번지, 305-333 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 이희구 (LEE, Hee Gu) [KR/KR]; 대전 동구 용전동 신동아아파트 14동 405호, 300-766 Daejeon (KR). 송은영 (SONG, Eun Young) [KR/KR]; 대전 서구 둔산동 아너스빌 1010

호, 302-120 Daejeon (KR). 강민아 (KANG, Min Ah) [KR/KR]; 경북 구미시 황상동 화진금봉타운 103동 403호, 730-783 Gyeongsangbuk-do (KR). 김종태 (KIM, Jong Tae) [KR/KR]; 대전 서구 괴정동 15-36 성철오피스텔 408호, 302-814 Daejeon (KR). 최은화 (CHOI, Eun Hwa) [KR/KR]; 서울 양천구 신정 4동 916-15 심미 에셋빌 아파트 601호, 158-074 Seoul (KR). 윤효란 (YOON, Hyo Ran) [KR/KR]; 경기 광명시 하안 2동 하안주공 3단지아파트 310동 310호, 423-752 Gyeonggi-do (KR). 김재화 (KIM, Jae Wha) [KR/KR]; 대전 유성구 어은동 한빛아파트 132동 403호, 305-755 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9번지 도심공향타워 6층, 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: C ST1, D CC1, IFITM1 OR M ELK AS MARKERS FOR DIAGNOSING STOMACH CANCER

(54) 발명의 명칭: 위암 진단 마커로서의 C ST1, D CC1, IFITM1 또는 M ELK

[Fig. 7]

A.

TargetID	colon cancer	stomach cancer	Breast cancer	Pancreatic cancer	Liver cancer
CST1					

B.

TargetID	colon cancer	stomach cancer	Breast cancer	Pancreatic cancer	Liver cancer
CST1					

C.

TargetID	colon cancer	stomach cancer	Breast cancer	Pancreatic cancer	Liver cancer
CST1					

D.

TargetID	colon cancer	stomach cancer	Breast cancer	Pancreatic cancer	Liver cancer
CST1					

(57) Abstract: The present invention is related to stomach cancer-specific biomarkers CST1 (cysteine proteinase inhibitor, type 2 family), DCC1 (defective in sister chromatid cohesion homolog 1), IFITM1 (interferon induced transmembrane protein 1) or MELK (maternal embryonic leucine zipper kinase), and more specifically, is related to a composite for diagnosis of stomach cancer containing a preparation to measure the level of expression of CST1, DCC1, IFITM1 or MELK, a kit containing said composites, a method of detecting said marker and a screening method for treatment of stomach cancer using said marker.

(57) 요약서: 본 발명은 위암에 특이적인 바이오 마커 CST1(cysteine proteinase inhibitor, type 2 family), DCC1(Defective in sister chromatid cohesion homolog 1), IFITM1(interferon induced transmembrane protein 1) 또는 MELK(maternal embryonic leucine zipper kinase)에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 상기 마커의 검출 방법 및 상기 마커를 이용한 위암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ,

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

위암 진단 마커로서의 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK

기술분야

- [1] 본 발명은 위암에 특이적인 바이오 마커 CST1(cysteine proteinase inhibitor, type 2 family), DCC1(Defective in sister chromatid cohesion homolog 1), IFITM1(interferon induced transmembrane protein 1) 또는 MELK(maternal embryonic leucine zipper kinase)에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 상기 마커의 검출 방법 및 상기 마커를 이용한 위암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 2005년에 암으로 사망한 사람은 총 65,479명으로 전체 사망자의 26.7%가 암으로 사망하였다. 사망이 가장 많은 암종은 폐암으로 인구 10만명당 28.4명(21.1%)이었으며, 다음으로는 위암 22.6명(16.8%), 간암 22.5명(16.7%), 대장암 12.5명(9.3%)의 순이었다. 1996년에서 2006년 위암 사망률의 추이를 분석한 결과, 지난 10년간 위암이 차지하는 암 사망률은 24%에서 16%로 점점 줄어들고 있으나 여전히 위암은 한국인의 대표적인 3대 암의 하나로서 이는 간과할 수는 없는 수치이다 (표 1 참고).

[3]

[4] 표 1

2005년 사망자 중 10대 암의 사망률 및 사망분율 (출처;2005 통계청 자료)

	사망자 (명)	조사망률 (10만명당)
폐암	13,805	(28.4)
위암	10,990	(22.6)
간암	10,962	(22.5)
대장암	6,071	(12.5)
췌장암	3,389	(7.0)
담낭암	3,336	(6.9)
유방암	1,598	(3.3)
백혈병	1,442	(3.0)
식도암	1,434	(2.9)
비호지킨림프종	1,217	(2.5)

[5]

- [6] 또한, 한국이나 일본 남성의 16% 이상이 위암으로 사망하고 있는 것으로 나타나고 있다. 한국, 일본 등 아시아에 위암이 많은 것은 민족이나 인종의 차이로 보기는 어렵고, 암 발생에 제일 중요한 생활환경의 차이, 특히 식생활의 차이에서 오는 것으로 보고되고 있다. 한국인의 경우 하루 소금 섭취량은 약 20 g으로 서양인보다 두 배 가까이 많이 섭취하고 있으며, 특히 소금에 절인 생선을 먹는 습관이 있는 한국, 일본, 핀란드, 아이슬란드 등에서 위암의 발생률이 높은 것으로 보고되고 있다. 또한 위암의 발병원인으로 식습관만큼이나 유전적인 원인도 중요시 대두되고 있다. 위암환자의 1세대 자손들에게 위암의 발생률이 높고 A형 혈액형을 가진 사람이 위암의 발생률이 높은 것으로 보고되고 있다. 세 번째 원인으로는 위암의 발생에 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter Pylori*, H.P)의 감염 여부이다. 아직까지 헬리코박터 파일로리의 감염과 위암의 인과관계가 결정적인 것이라고 생각하기는 선부른 판단일 수 있으나, 한국인의 소화기계 질환 및 위암 환자의 40~60 %에서 헬리코박터 파일로리가 검출되는 것으로 볼 때, 감염자는 비감염자와 비교할 때 상대적으로 위암에 걸릴 가능성이 높은 것만은 분명하다. 따라서 헬리코박터 파일로리의 제거는 위염 및 위암 예방의 한 방법으로 대두되고 있다.
- [7] 암세포가 어떠한 경로로 어떻게 생기게 되는가 하는 것은 아직 확실히 밝혀지지는 않고 있으나, 정상세포의 증식조절의 기능을 가진 유전자의 변형에 의해 증식조절이 되지 않는 세포가 생겨남으로써 암이 발생하는 것으로 보는 것이 일반적인 견해다. 따라서 위암의 경우 초기에는 암세포가 점막 내에 국한되어있는 상태를 조기위암으로 분류하고 있는데, 조기위암 상태에서 발견된 환자의 치료의 예후는 비교적 좋은 것으로 나타났다. 따라서 위암의 조기 진단 및 치료는 위암의 사망률을 낮추고, 암의 치료비용을 낮추는데 기여할 것으로 평가되고 있다.
- [8] 위암의 증상은 전혀 증상이 없는 경우에서부터 격심한 통증에 이르기까지 다양한 양상을 나타내고 있다. 또한 위암의 증상이, 어떤 특성을 가지는 것이 아니라 일반적인 소화기 증상을 나타낸다는 것이다. 일반적으로 위암의 초기에는 증상이 없는 경우가 대부분이며 있다고 하더라도 경미하여 약간의 소화불량이나 상복부 불편감을 느끼는 정도이므로 대부분의 사람들이 이를 간과하기 쉬어 위암의 사망률을 높이는 원인이 되기도 한다.
- [9] 현재까지의 위암의 검사수단은 물리적인 것이 대부분이다. 그 첫번째로는 위장 X-선 촬영으로 이중조영법, 압박촬영법, 점막촬영법 등이 있으며, 두번째로는 위내시경으로 위속을 직접 눈으로 들여다 볼 수 있게 하여, X선 검사에서 나타나지 않는 아주 작은 병변도 발견할 수 있을 뿐 아니라 위암이 의심스러운 장소에서 직접 조직검사를 시행할 수도 있어, 그 진단률을 높이고 있다. 하지만 이 방법은 위생상의 문제와 검사가 진행되는 동안 환자로 하여금 고통을 감수해야 하는 단점이 있다.
- [10] 또한, 현재까지의 진행되고 있는 위암의 최선의 치료는 수술로써 병소를

절제해 내는 것이며, 따라서 완치를 목표로 하는 치료로써는 외과적인 절제방법 밖에는 없다. 외과적인 절제방법에는 여러 가지 방법이 있겠으나 일단 완치를 목표로 하는 수술에서는 가능한 한 넓은 범위를 포함하여 절제하는 것이 원칙이나 수술 후 광범위한 절제로 인한 후유증을 고려하여 그 절제 범위를 정하기도 한다. 이때는 위뿐만 아니라 주위 임파선을 포함한 여러 장기도 포함하게 되므로 상당히 큰 수술이 되기 때문에 환자의 예후를 장담하기 어려울 수도 있다. 또한 위암이 다른 장기에 전이되었을 경우에는 근치수술이 불가능하며, 따라서 이때에는 항암제투여 등 다른 방법을 택하게 되는데 현재까지 시판되고 있는 항암제는 일시적인 증상의 완하나 절제술 후 재발의 억제와 생존기간을 연장하는데 일시적 효과는 있지만, 항암제 투여에 따른 부작용 및 경제적 부담으로 환자에게 이중적 고통을 주기도 한다.

- [11] 위암의 발병여부 및 진행단계의 정확한 판별이 가능하게 하는 위암의 진단제 및 외과적 절제술이나 항암제의 단점을 보완한 치료제의 개발을 위한 바이오 마커의 선별 및 진단 마커를 측정하는 제제의 개발은 난치병중의 하나인 위암을 정복하는 선두 과제라 할 수 있으며 본 연구의 수행 목적이라 하겠다.

[12]

- [13] 한편, 인체의 종양은 일종의 암표지 항원이라 일컬어지는 다양한 분자들을 발현시켜 분비한다. 현재 다양한 종류의 암환자들의 혈청을 분석하여 암의 발병과 전이의 진단 및 치료에 사용될 수 있는 항원들이 제시되고 있다. 지금까지 발견된 종양 마커는 약 60여종에 이르는데, 현재 상용화되고 있는 종양 마커로는 AFP(간 암), CEA(대장암, 위암, 췌장암, 유방암), HCG(융모상피암), PAP(전립선암), NSE(폐암), C15-3(유방암), CA19-9(대장암, 췌암)등을 들 수 있다. 그러나, 안타깝게도 위암에 진단 및 치료에 대한 탁월한 효과가 있는 진단마커나 항암제는 개발되어 있지 않은 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 발명자들은 위암과 관련이 있다고 예상되는 유전자들을 대상으로 DNA 칩을 제작하여 위암은 물론 대장암, 유방암, 췌장암 등에서의 발현 정도를 비교하였다. 그 결과, 위암 조직에서만 특이적으로 과발현되는 유전자들을 선별할 수 있었고, 이러한 위암 진단마커로서의 가능성 있는 CST1, DCC1, IFITM1 및 MELK 유전자를 최종 선별하고, 이들을 통하여 위암을 조기에 정확하게 진단할 수 있음은 물론 상기 유전자의 생성이나 분비를 억제하는 물질이 위암의 치료에 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

기술적 해결방법

- [15] 본 발명의 하나의 목적은 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

- [16] 본 발명의 다른 목적은 상기 위암 진단용 조성물을 포함하는 위암 진단 키트를 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 위암 마커 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 다른 목적은 위암 마커 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK를 이용하여 위암 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

유리한 효과

- [19] 본 발명은 위암의 전이 및 예후를 판단할 수 있는 진단 마커를 발굴하고 제공함으로써, 위암의 치료 및 예후관리에 유용한 자료의 지표로 사용될 수 있는 효과를 기대한다. 본 발명에 따른 위암 마커 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK를 사용하면 위암의 유무를 정확하고 손쉽게 측정할 수 있으며, 위암 특이적 항암제 개발연구에 있어 특정 타겟으로 활용할 수 있고, 나아가 위암의 종양 형성의 연구에 활용될 수 있고, 위암의 조기 진단에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 48K 인간 마이크로 어레이 칩(Illumina사)을 사용하여 정상 위 조직과 위암 조직에서의 유전자 발현을 비교한 결과이다.
- [21]
- [22] 도 2는 48K 인간 마이크로 어레이 칩(Illumina사) 분석 결과를 토대로 위암 세포에서 특이적으로 과발현되는 유전자를 도표화한 것이다.
- [23]
- [24] 도 3은 CST1 유전자의 데이터 마이닝(data mining) 결과이다.
- [25]
- [26] 도 4는 DCC1 유전자의 데이터 마이닝(data mining) 결과이다.
- [27]
- [28] 도 5는 IFITM1 유전자의 데이터 마이닝(data mining) 결과이다.
- [29]
- [30] 도 6은 MELK 유전자의 데이터 마이닝(data mining) 결과이다.
- [31]
- [32] 도 7은 위암, 대장암, 유방암, 전립선암 및 간암에서 동일한 유전자를 대상으로 DNA 칩 결과를 가지고, 데이터 마이닝을 하여 그 발현을 비교한 결과이다 (A, CST1; B, DCC1; C, IFITM1; D, MELK).
- [33]
- [34] 도 8은 CST1, DCC1, IFITM1 및 MELK 유전자의 역전사 중합효소반응을 이용한 정상조직과 위암 조직에서의 진단 마커의 발현 정도를 확인한 전기영동 사진으로서, 홀수 레인은 정상조직에서의 각 유전자의 발현 수준을, 짝수 레인에서는 암 조직에서의 각 유전자의 발현 수준을 나타낸다(A, CST1; B,

DCC1; C, IFITM1; D, MELK).

[35]

[36] 도 9는 7종의 위암 세포주(Lane 1, SNU1; Lane 2, SNU16; Lane 3, SNU216; Lane 4, SNU484; Lane 5, SNU620; Lane 6, SNU638; Lane 7, AGS) 및 정상세포(Lane 8, Hs.683)에서 본 발명의 위암 진단 마커의 발현정도를 역전사 중합효소반응을 통하여 나타낸 그림이다(A, CST1; B, DCC1; C, IFITM1; D, MELK).

[37]

[38] 도 10은 각각 CST1 및 MELK 단일클론항체를 이용하여 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)한 것으로 전이 가능성을 지닌 위암조직에서 특이적으로 많이 발현하고 있음을 증명한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[39] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 CST1(cysteine proteinase inhibitor, type 2 family), DCC1(Defective in sister chromatid cohesion homolog 1), IFITM1(interferon induced transmembrane protein 1) 또는 MELK(maternal embryonic leucine zipper kinase)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 진단용 조성물에 관한 것이다.

[40]

[41] 본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 간암 발병 여부를 확인하는 것이다.

[42] 본 발명에서 용어, "진단용 마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)"란 위암 세포를 정상 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포에 비하여 위암을 가진 세포에서 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. 본 발명의 목적상, 본 발명의 위암진단 마커는 정상 위 조직의 세포에 비하여, 위암 세포에서 특이적으로 높은 수준의 발현을 보이는 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK유전자 및 이에 의해 코딩되는 단백질이다.

[43]

[44] CST1(cysteine proteinase inhibitor, type 2 family)는 세포 밖으로 발현되는 형태의 시스타틴(cystatin)으로서, 그 유전자 및 단백질 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있다(NM_001898, NP_001889). 그러나, CST1의 기능 및 위암과의 연관성은 전혀 알려지지 않았다.

[45]

DCC1(Defective in sister chromatid cohesion homolog 1)는 사이클린(Cyclin)에 의존하는 키나아제(kinases)의 촉매의 서브유닛에 붙어 있는 단백질이고, 이것은 생물학적 기능에 필수적으로 알려져 있으며, 그 유전자 및 단백질 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있다(NM_024094, NP_076999). 그러나, DCC1의 기능 및 위암과의 연관성은

전혀 알려지지 않았다.

- [46] IFITM1(interferon induced transmembrane protein 1)는 세포의 증식 및 분화 조절에 관여하는 인자이며, 다중결합성 복합체로 항증식성과 부착 신호 전달의 전달(transduction)에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 그 유전자 및 단백질 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있다(NM_003641, NP_003632). 그러나, IFITM1의 기능 및 위암과의 연관성은 전혀 알려지지 않았다.
- [47] MELK(maternal embryonic leucine zipper kinase)는 줄기세포 재생, 세포주기 및 pre-mRNA 스플라이싱 등에 관여하는 단백질 세린/트레오닌 키나아제로서, 그 유전자 및 단백질 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있다(NM_014791, NP_055606). 그러나, MELK의 기능 및 위암과의 연관성은 전혀 알려지지 않았다.
- [48]
- [49] 본 발명자는 다음과 같은 입증을 통하여 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK이 위암 진단을 위한 마커로 이용될 수 있음을 규명하였다.
- [50] 구체적으로, DNA 칩을 이용하여 2,230개의 유전자의 발현도를 조사하여 정상 위 상피세포에 비하여 위암 세포에만 특이적으로 과발현하는 유전자 1,601 개를 1차적으로 추출하였고, 군집화 분석을 이용하여 두 개의 군집으로 나눈 후(도 1) 60% 이상의 환자에 2배 이상의 발현 차이를 나타내는 유전자를 선별하고(도 2), 이 중 대장암, 유방암 및 췌장암과 비교했을 때 위암에서만 특이적으로 발현되는 유전자인 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK을 최종 선별하였다(도 3 내지 도 6 및 도 7).
- [51] 이와 같이 선별한 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK 유전자를 본 발명자들이 고안한 프라이머를 사용하여 역전사 중합효소반응을 실시한 결과, 정상 위 조직과 위암 조직 간의 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK 발현의 차이를 확연히 구별할 수 있었고(도 8), 또한 정상 세포와 위암 세포주 간에도 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현이 뚜렷하게 구별됨을 확인할 수 있었다(도 9).
- [52]
- [53] 본 발명에서 용어, "CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현수준을 측정하는 제제"란 상기와 같이 위암 세포에서 발현이 증가하는 마커인 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 바람직하게는 마커에 특이적인 항체, 프라이머 또는 프로브를 말한다.
- [54] CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현 수준은 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK 유전자의 mRNA 또는 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 알 수 있고, 상기 발현 수준은 하나의 유전자 단독으로 또는 어느 하나 이상의 수준을 측정함으로써 알 수 있다. 본 발명에서 "mRNA 발현수준 측정"이란 위암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 위암 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) 및 DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

- [55] 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 프라이머 쌍 또는 프로브이며, CST1, DCC1, IFITM1 및 MELK 유전자의 핵산 서열은 각각 NM_001898, NM_024094, NM_003641 및 NM_014791에 밝혀져 있으므로, 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.

- [56] 본 발명에서 용어, "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 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 본 발명에서는 CST1 폴리뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 위암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

- [57] 본 발명에서 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK 폴리뉴클레오티드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 위암을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

- [58] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포로아미다이트 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.

- [59] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 상기 위암 진단 마커 검출용 조성물은

CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK 유전자에 대하여 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다.

[60]

[61] 본 발명에서 "단백질 발현수준 측정"이란 위암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 위암 마커 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인한다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[62] 단백질 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 항체이다.

[63] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK에 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 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 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.

[64] 본 발명의 위암 진단 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.

[65]

[66] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 위암 진단용 조성물을 포함하는 위암 진단용 키트에 관한 것이다.

[67]

[68] 본 발명의 키트는 위암 진단 마커인 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 마커를 검출할 수 있다. 본 발명의 마커 검출용 키트에는 위암 진단 마커의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석

방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

- [69] 구체적 일례로서, 본 발명에서 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 RT-PCR 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 또한 바람직하게는, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 진단용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기관은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.

- [70] 또 다른 구체적 일례로서, 본 발명에서 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.

[71]

- [72] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 위암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 환자의 시료로부터 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현 수준을 정상 세포의 발현 수준과 비교하여 위암 마커 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[73]

- [74] 보다 구체적으로는, 유전자의 발현 수준을 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 검출할 수 있고, 생물학적 시료에서 mRNA 또는 단백질의 분리는 공지된 공정을 이용하여 수행할 수 있다.

- [75] 본 발명에서 용어 환자의 시료란 위암 마커 유전자인 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현 수준이 차이나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [76] 상기 검출 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 유전자 발현 수준을 위암

의심환자에서의 유전자 발현 수준과 비교함으로써 위암 의심 환자의 실제 암 환자 여부를 진단할 수 있다. 즉, 위암으로 추정되는 세포로부터 본 발명의 마커의 발현 수준을 측정하고, 정상 세포로부터 본 발명의 마커의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 본 발명의 마커의 발현 수준이 정상 세포의 것보다 위암으로 추정되는 세포 유래에서 더 많이 발현되면 위암으로 추정되는 세포를 위암으로 예측할 수 있는 것이다.

[77]

[78] mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 검출 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 mRNA 발현량과 위암 의심환자에서의 mRNA 발현량을 비교할 수 있고, 위암 마커 유전자에서 mRNA로의 유의한 발현량의 증가여부를 판단하여 위암 의심 환자의 실제 위암 발병 여부를 진단할 수 있다.

[79] mRNA 발현수준 측정은 바람직하게는, 위암 마커로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하는 역전사효소 중합효소반응법 또는 DNA 칩을 이용하는 것이다.

[80] 상기의 역전사효소 중합효소반응은 반응 후 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인함으로써 위암 진단 마커로 사용되는 유전자의 mRNA 발현 여부와 정도를 확인 가능하고 이를 대조군과 비교함으로써, 위암 발생 여부를 간편하게 진단할 수 있다.

[81] 한편, DNA 칩은 상기 위암 마커 유전자 또는 그 단편에 해당하는 핵산이 유리 같은 기판에 고밀도로 부착되어 있는 DNA 칩을 이용하는 것으로서, 시료에서 mRNA를 분리하고, 그 말단 또는 내부를 형광 물질로 표지된 cDNA 프로브를 조제하여, DNA 칩에 혼성화시킨 다음 위암의 발병 여부를 판독할 수 있다.

[82]

[83] 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 분석 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 위암 의심환자에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 위암 마커 유전자에서 단백질로의 유의한 발현량의 증가여부를 판단하여, 위암 의심 환자의 실제 위암 발병 여부를 진단할 수 있다.

[84] 본 발명에서 용어 항원-항체 복합체란 위암 마커 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.

[85] 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle),

레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 펄록시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, α -프탈테히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4 W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다.

- [86] 단백질 발현수준 측정은 바람직하게는, ELISA법을 이용하는 것이다. ELISA는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 보다 바람직하게는, 고체 지지체에 항체를 부착시키고 시료를 반응시킨 후 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 표지된 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키거나 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 항체에 대해 표지된 2차 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키는 샌드위치 ELISA 방법에 의해서 검출한다. 위암 마커 단백질과 항체의 복합체 형성 정도를 확인하여, 위암 발병 여부를 확인할 수 있다.

- [87] 또한, 바람직하게는, 상기 위암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 이용하는 것이다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 위암 발병 여부를 확인할 수 있다. 상기 검출 방법은 대조군에서의 마커 유전자의 발현량과

위암이 발병한 세포에서의 마커 유전자의 발현량을 조사하는 방법으로 이루어진다. mRNA 또는 단백질 수준은 상기한 마커 단백질의 절대적(예: $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 상대적(예: 시그널의 상대 강도) 차이로 나타낼 수 있다.

[88] 또한, 바람직하게는, 상기 위암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직 염색을 실시하는 것이다. 정상 대장 상피 조직 및 위암으로 의심되는 조직을 채취 및 고정한 후, 당업계에서 널리 공지된 방법으로 파라핀 포매 블록을 제조한다. 이들을 수 μm 두께의 절편으로 만들어 유리 슬라이드에 붙인 후, 이와 상기의 항체 중 선택된 1개와 공지의 방법에 의하여 반응시킨다. 이후, 반응하지 못한 항체는 세척하고, 상기에 언급한 검출라벨 중의 하나로 표지하여 현미경 상에서 항체의 표지 여부를 판독한다.

[89] 또한, 바람직하게는, 상기 위암 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 단백질 칩을 이용하는 것이다. 단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 판독하여, 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인하여, 위암 발병 여부를 확인할 수 있다.

[90]

[91] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 위암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질의 투여 후 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 측정하는 것을 포함하는, 위암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[92]

[93] 구체적으로, 위암 치료 후보 물질의 존재 및 부재 하에서 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현의 증가 또는 감소를 비교하는 방법으로 위암 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다. CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 농도를 간접적으로 또는 직접적으로 감소시키는 물질은 위암의 치료제로서 선택할 수 있다. 즉, 위암 치료 후보 물질의 부재 하에 위암 세포에서의 본 발명의 마커 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현 수준을 측정하고, 또한 위암 치료 후보 물질의 존재 하에서 본 발명의 마커 CST1, DCC1, IFITM1 또는 MELK의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 위암 치료 후보 물질이 존재할 때의 본 발명의 마커의 발현 수준이 위암 치료 후보 물질의 부재 하에서의 마커 발현 수준보다 감소시키는 물질을 위암의 치료제로 예측할 수 있는 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[94] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[95]

[96] **실시예 1. DNA 칩을 이용한 위암 과발현 유전자 발굴**

[97] 정상 위 상피세포에 비하여 위암 세포에서만 특이적으로 과발현하는 유전자를 1차적으로 추출하고자 DNA 칩(일루미나에서 판매하는 48K 사람 마이크로어레이)을 이용하여 2,230개의 유전자에 대하여 그 발현도를 조사하였다.

[98] 우선, 정상 위 상피세포 및 위암 세포에서 total RNA를 추출하였다. total RNA의 추출은 RNeasy Mini Kit (QIAGEN사)를 이용하였고, Experion RNA StdSens(Bio-Rad사) 칩을 이용하여 정량하였다. 하이브리드화를 위해 상기 추출된 total RNA를 Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion사)을 이용하였다. T7 올리고(dT) 프라이머를 이용하여 cDNA를 합성하고, 비오틴-UTP를 이용하여 인비트로 전사(*in vitro* transcription)를 실시하여 비오틴-표지된 cRNA를 제조하였다. 제조된 cRNA는 나노드롭을 이용하여 정량하였다. 정상 위 상피세포 및 위암 세포에서 제조된 cRNA를 Human-6 V2 (Illumina사) 칩에 하이브리드화 하였다. 하이브리드화 후 비특이적 하이브리드화를 제거하기 위하여 Illumina Gene Expression System Wash Buffer (Illumina사)를 이용하여 DNA 칩을 세척하였고 세척된 DNA 칩은 스트렙타비딘-Cy3(Amersham사) 형광 염색약으로 표지하였다. 형광 표지된 DNA 칩은 공초점(confocal) 레이저 스캐너 (Illumina사)를 이용하여 스캐닝하여 각 스팟에 존재하는 형광의 데이터를 얻어서 TIFF 형태의 이미지 파일로 저장하였다. TIFF 이미지 파일을 BeadStudio version 3(Illumina사)으로 정량하여 각 스팟의 형광값을 정량하였다. 정량된 결과는 Avadis Prophetic version 3.3(Strand Genomics사) 프로그램으로 quantile 기능을 이용하여 보정하였다.

[99] 상기의 과정으로 얻어진 1,601개의 유전자 발현 정도 분석을 통하여 정상 위 상피세포와 위암 세포의 유전자 발현 양상을 비교 분석하였다. 이 때 군집화 분석(hierarchical clustering analysis)를 이용하였으며, 그 결과, 정상 위 상피세포와 위암 세포는 크게 두 개의 군집으로 나누어지는 것을 알 수 있었다(도 1).

[100] 또한, 정상 및 위 상피세포와 비교하여 60% 이상의 환자에서 2배 이상의 발현차이를 나타내는 유전자들을 발견할 수 있었는데(도 2), 이중 과발현과 저발현이 각각 281개 및 605개였으며, 대장암, 유방암, 췌장암에서도 동일한 유전자들의 발현을 비교한 결과(도 7) 위암에서만 특이적으로 발현되는 유전자들을 최종 선별할 수 있었다(도 3 내지 6). 도 3 내지 6은 마이크로어레이 결과를 가지고 공개되어있는 여러 데이터 셋트를 비교분석(data mining)한 결과이다.

[101]

[102] **실시예 2. 조직 및 세포에서의 mRNA 분리**

[103] 역전사 중합효소 반응을 위하여 5명의 위암 환자로부터 위 정상 상피세포 조직과 위암 세포조직을 적출하여 총 10개의 조직에서 mRNA를 분리하였다.

우선, 외과적 절제술로 적출된 조직들은 적출 즉시 멸균된 인산완충 식염수에서 혈액을 제거한후, 액화질소로 동결하였다. 이후, 구아니디움 법(Guanidinium Method)에 의하여 총 RNA를 분리, 싱글-스텝 RNA 분리(Single-Step RNA Isolation)를 수행하였다. 상기와 같이 분리한 총 RNA는 스펙트로포토메터를 사용하여 정량한 후, 사용 전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

- [104] 세포주들은 총 개를 7선정하여(SNU1, SNU16, SNU216, SNU484, SNU620, SNU638, AGS) 대한민국 서울시 종로구 연건동 28번지 소재 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받았다. 각각의 최적 배양배지인 DMEM(Invitrogen 사) 또는 RPMI1640(Invitrogen 사) 배지에 10%의 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS, Hyclon사) 및 페니실린/스트렙토마이신(1mg/ml Penicillin/ Streptomycin, Sigma사)5-6 일간 배양시킨 후, 상기의 조직에서와 동일한 방법으로 구아니디움(Guanidinium Method)에 의해 총 RNA를 분리, 싱글-스텝 RNA 분리를 수행하였다. 분리된 RNA는 상기와 같이 스펙트로포토메터를 사용하여 정량하였고, 사용 전까지 -70°C 냉동고에서 보관하였다.

[105]

[106] 실시예 3. 역전사 중합효소반응을 이용한 유전자 발현 비교

- [107] 상기 실시예 1의 결과 선발된 위암 특이 과발현 유전자들 중에서 4개를 선정하여(데이터 마이닝) 중합효소 반응을 각각 실시하였다. 프라이머의 제작을 위하여 각 유전자들의 전체 DNA 염기 서열을 NCBI의 CoreNucleotide(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 얻었으며, Primer3 프로그램을 통하여 이들 유전자들의 프라이머 서열을 디자인하였다. 상기와 같이 디자인된 프라이머를 이용하여, 중합효소 반응을 실시하여 각각의 유전자들의 발현 정도를 확인하였다(도 8). 각각의 프라이머 서열은 표 2와 같다.

[108]

[109] 표 2

	올리고 명	결과물의 크기(bp)	서 열
1	CST1-〈L〉	320 bp	CCA TGG CCC AGT ATC TGA GT
	CST1-〈R〉		GAA GGC ACA GGT GTC CAA GT
2	DCC1-〈L〉	331 bp	GCA GCA CGA ATG CTA CTT CA
	DCC1-〈R〉		CAT TTT GCA TCG AAG AAC GA
3	IFITM1-〈L〉	224 bp	ATG TCG TCT GGT CCC TGT TC
	IFITM1-〈R〉		TGT CAC AGA GCC GAA TAC CA
4	MELK-〈L〉	343 bp	TGG CTC TCT CCC AGT AGC AT
	MELK-〈R〉		TAG CAC TGG CTT GTC CAC AG

[110]

- [111] 역전사 효소반응을 위하여 상기 실시예 2의 조직 및 세포주에서 추출한 mRNA로부터 역전사 반응을 통해 만든 cDNA를 제작하였다. cDNA 제작은

AccuAcript High Fidelity 1st Stand cDNA Synthesis Kit(STRATAGENE)를 이용하여 수행하였고, 상기의 반응 결과로 얻은 cDNA와 표 2의 프라이머들을 사용하여 역전사효소 반응을 사용하였다. 그 결과 도 8과 같이 정상 위 조직과 위암 조직 간의 발현의 차이를 확인할 수 있었고, 도 9에서와 같이 위암 세포주에서의 발현도 확인할 수 있었다.

[112]

[113] **실시예 4. 면역조직 화학염색법을 통한 CST1 및 MELK 단백질의 검출**

[114] 위암 조직에서의 CST1 및 MELK의 발현정도를 조사하기 위하여 각각 면역조직 화학염색법을 실시하였다. 환자로부터 얻은 위암 조직의 파라핀 절편에서 자일렌을 이용하여 파라핀을 제거하고 알코올을 이용하여 수화시킨 후 10 mM 시트르산염 완충액 (pH 6.0)에 넣어 5 분씩 3 회에 걸쳐 극초단파를 투사하였다.

[115] 다음으로 3% 과산화수소가 들어있는 메탄올을 6분 동안 처리하여 내부에서 발생하는 퍼옥시다제 활성을 억제한 후에 비특이적인 단백질의 결합을 방지하기 위하여 Vector kit (Cat No. PK 6102)에 있는 작업(working) 용액을 30 분 동안 처리하여 차단하였다. 1X PBS에 희석된 CST1 IgG 항체(Abcam, Cat No. ab26286) 및 1X PBS에 희석된 MELK IgG 항체(Abcam, Cat No. ab26286) 각각을 상온에서 2시간동안 반응시킨 후 바이오티닐화된 각각의 항-마우스 Ig Ab (Vector kit)를 상온에서 30 분 동안 반응시켰다.

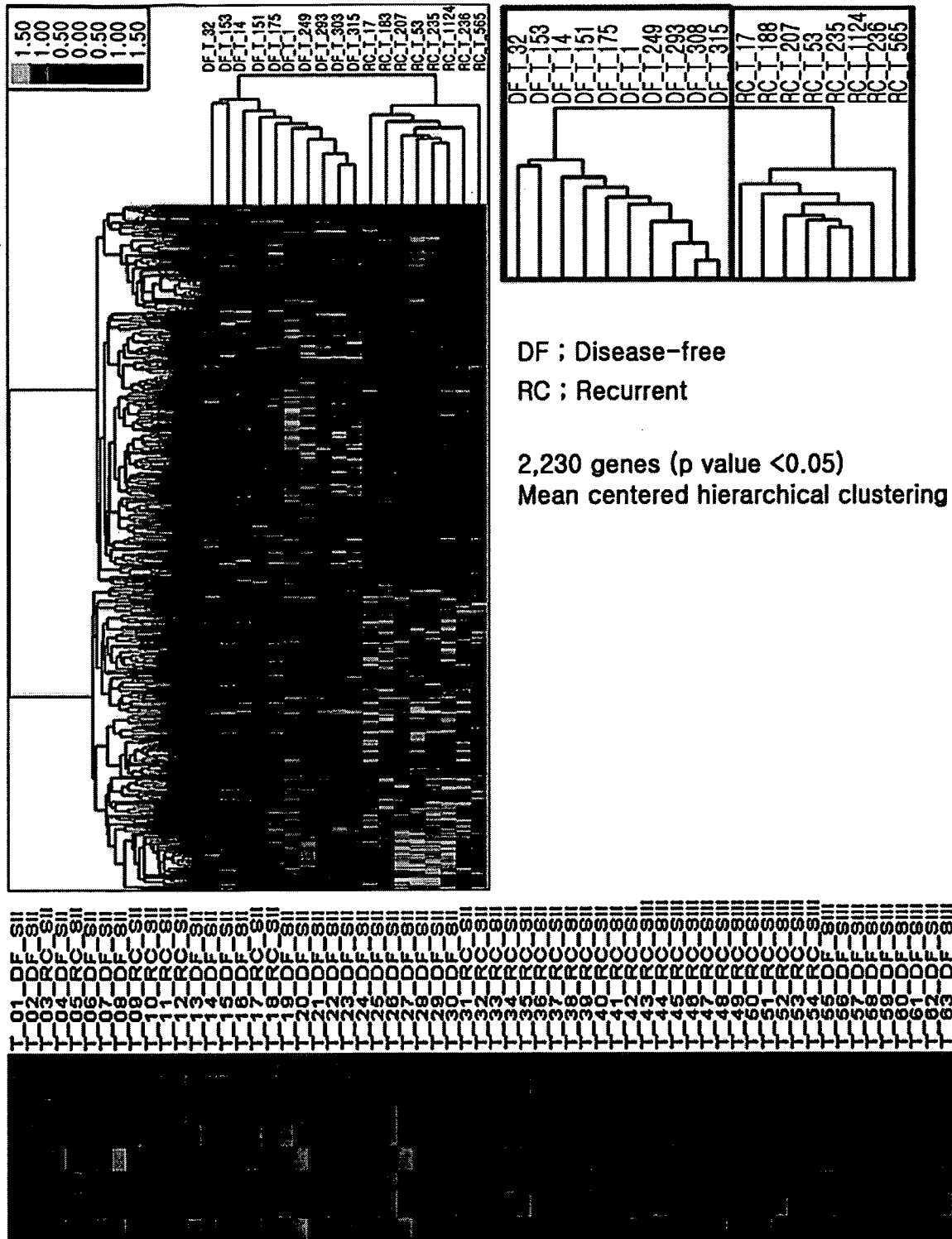
[116] 다음으로 ABC Elite kit (Vector kit)을 상온에서 30 분 동안 반응시킨 후 디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드 기질 (Vector kit)을 2분 동안 반응시켜 위암 조직에서 CST1 및 MELK의 발현정도를 각각 확인하였다(도 10).

청구범위

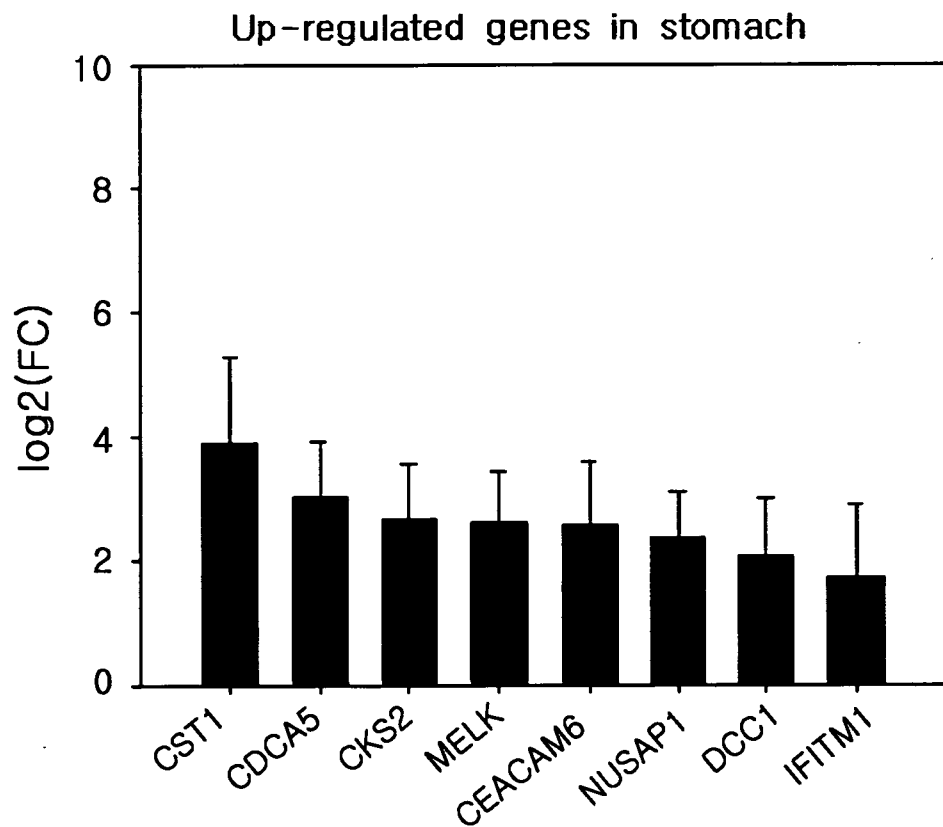
- [1] CST1, DCC1, IFITM1 및 MELK로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 진단용 조성물.
- [2] 제1항에 있어서, 상기 유전자 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 CST1, DCC1, IFITM1 및 MELK로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함하는 것인 위암 진단용 조성물.
- [3] 제1항에 있어서, 상기 유전자 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 CST1, DCC1, IFITM1 및 MELK로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함하는 것인 위암 진단용 조성물.
- [4] 제1항에서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 CST1, DCC1, IFITM1 및 MELK로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인 위암 진단용 조성물.
- [5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 위암 진단용 키트.
- [6] 제5항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 위암 진단용 키트.
- [7] 위암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 위암이 의심되는 환자의 시료로부터 CST1, DCC1, IFITM1 및 MELK로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 정상 대조구 시료의 해당 유전자의 발현 수준 또는 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 CST1, DCC1, IFITM1 및 MELK로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 위암 마커를 검출하는 방법.
- [8] 제7항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준은 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 것인 방법.
- [9] 제8항에 있어서, 상기 mRNA 수준을 측정하는 방법은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩에 의한 것인 방법.
- [10] 제9항에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 프라이머를 이용한 역전사효소 중합반응에 의한 것인 방법.
- [11] 제7항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준은 해당 단백질에 특이적인 항체를 이용하는 것인 방법.

- [12] 제7항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 방법은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 방법 중 어느 하나를 이용하는 것인 방법.
- [13] 위암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질의 투여 후 CST1, DCC1, IFITM1 및 MELK로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 것을 포함하는, 위암 치료제의 스크리닝 방법.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 4]

symbol	Chen				Boussioutas			Hippo			Kim			Meta	
	Diffuse	Intestinal	Lymph	Mixed	Diffuse	Intestinal	Mixed	IM	CG	Diffuse	Intestinal	Diffuse	Mixed	Diffuse	Intestinal
DCC1															
log2(FC)	0.7257	1.1478	1.1701	0.9881								0.083	0.0916	0.4044	0.6571
p-value	6.96E-05	9.16E-11	6.53E-07	1.64E-07										6.96E-05	9.16E-11
q-value	0.0013	2.10E-09	2.32E-05	4.97E-05										0.0013	2.10E-09

Differential expression between Diffuse and Intestinal Type										Download	
		DCC1	Chen		Boussioutas		Hippo		Kim		Meta
		log2(FC): DGC-IGC	-0.422						-0.0832		-0.2526
		p-value	0.004						0.3434		0.0371
		q-value	0.0456						0.7153		0.1808

Chen															
		Diffuse		Intestinal										Mixed	
DCC1															
Boussioutas															
		Diffuse		Intestinal		Mixed		Intestinal Metaplasia						Chronic Gastritis	
Hippo															
		Diffuse								Intestinal					
Kim															
				Diffuse				Intestinal						Mixed	
DCC1															

[Fig. 5]

symbol	Chen				Boussloutas				Hippo			Kim			Meta	
	Diffuse	Intestinal	Lymph	Mixed	Diffuse	Intestinal	Mixed	IM	CG	Diffuse	Intestinal	Diffuse	Intestinal	Mixed	Diffuse	Intestinal
IFITM1																
log2(FC): DGC-IGC	0.9857	1.1912	0.5716	1.0498	0.4311	0.5975	0.4891	-0.3107	-0.386	0.5608	0.4358	0.3851	0.1249	0.37	0.5907	0.5874
p-value	0.0003	3.08E-13	0.038	6.37E-05	0.1006	0.0451	0.2645	0.2174	0.1274	0.3548	0.1456				0.022	1.26E-05
q-value	0.0037	1.57E-11	0.0952	0.0022	0.1887	0.0911	0.4442	0.4175	0.4453	0.5537	0.3128				0.0728	7.65E-05

[Download](#)

Differential expression between Diffuse and Intestinal Type

	Chen			Boussloutas			Hippo			Kim			Meta	
	IFITM1			Diffuse	Intestinal	Mixed	Diffuse	Intestinal	CG	Diffuse	Intestinal	Diffuse	Intestinal	Mixed
log2(FC): DGC-IGC				-0.2056		-0.1664				0.1249		0.2602		0.0033
p-value				0.3786		0.3978				0.8256		0.1044		0.2505
q-value				0.5733		0.6126				0.9707		0.492		0.557

Chen

		Diffuse	Intestinal	Mixed
IFITM1				

Boussloutas

		Diffuse	Intestinal	Mixed	Chronic Gastritis
IFITM1					

Hippo

		Diffuse	Intestinal	Mixed
IFITM1				

Kim

		Diffuse	Intestinal	Mixed
IFITM1				

[Fig. 6]

symbol	Chen				Boussioutas			Hippo			Kim			Meta	
	Diffuse	Intestinal	Lymph	Mixed	Diffuse	Intestinal	Mixed	Diffuse	Intestinal	Mixed	Diffuse	Intestinal	Mixed	Diffuse	Intestinal
MELK															
log2(FC)	0.7985	1.433	1.496	1.0944				0.978	1.0265		0.2818	0.5111	-1.0733	0.6861	0.9902
p-value	0.0001	3.70E-13	7.17E-08	8.77E-07				0.0044	0.0029					0.0007	3.28E-06
q-value	0.0019	1.83E-11	4.85E-06	0.0001				0.1017	0.0246					0.0139	6.71E-07

Differential expression between Diffuse and Intestinal Type												Download	
Chen				Boussioutas				Hippo				Meta	
MELK													
log2(FC): DGC-IGC													
p-value													
q-value													

[Fig. 7]

A.

TargetID	colon cancer	stomach cancer	Breast cancer	Pancreatic cancer	Liver cancer
CST1					

B.

TargetID	colon cancer	stomach cancer	Breast cancer	Pancreatic cancer	Liver cancer
CST1					

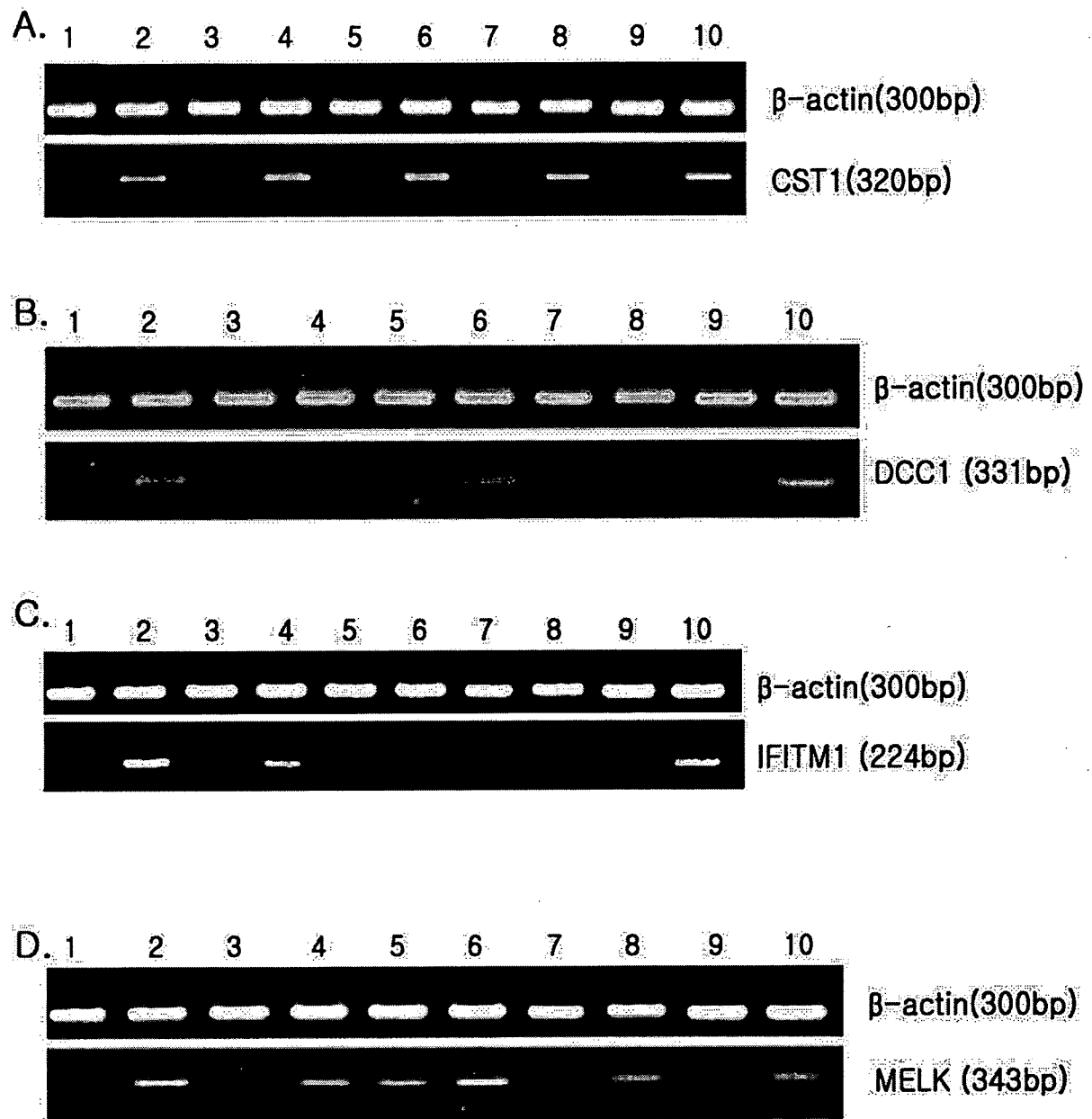
C.

TargetID	colon cancer	stomach cancer	Breast cancer	Pancreatic cancer	Liver cancer
CST1					

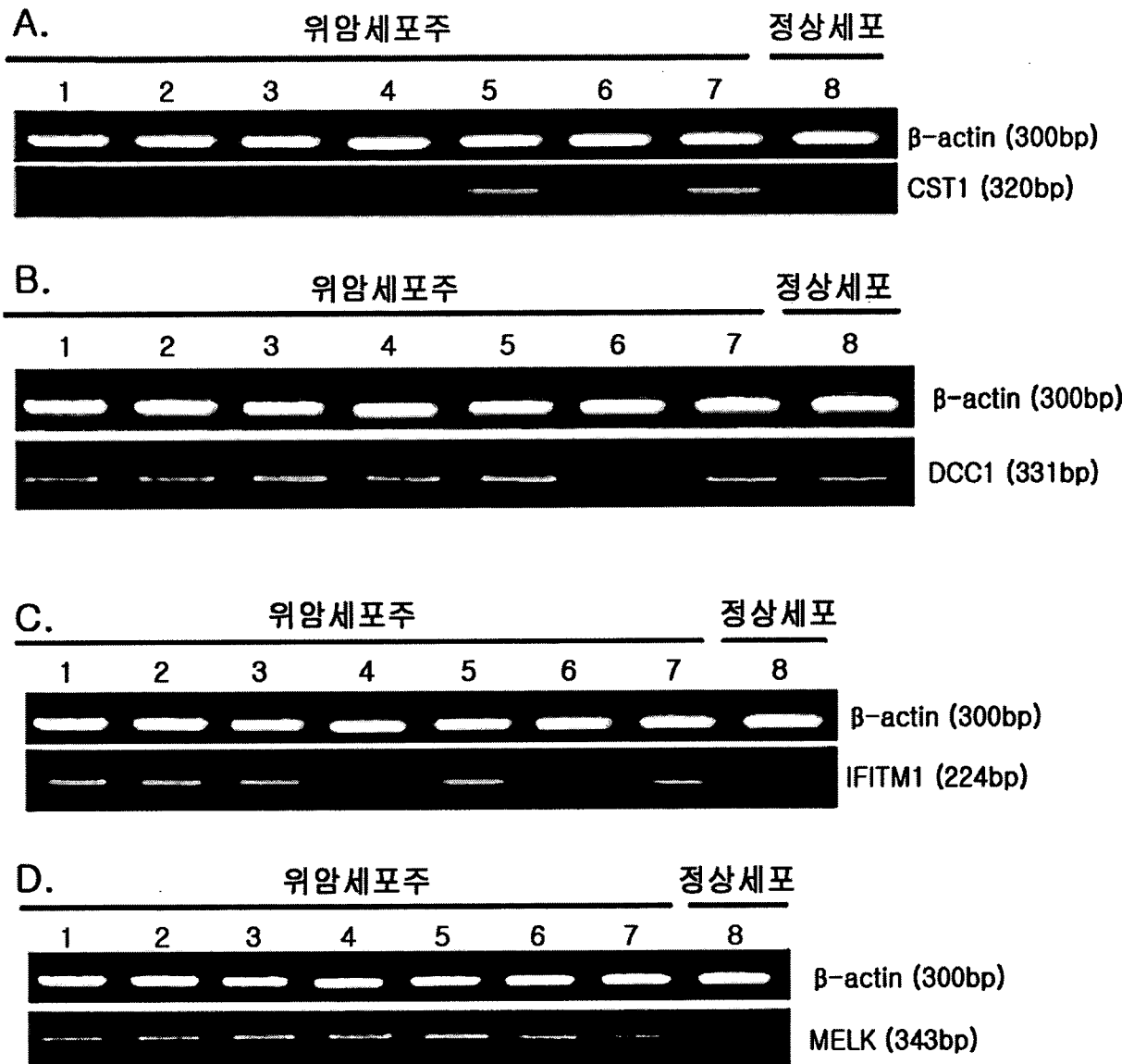
D.

TargetID	colon cancer	stomach cancer	Breast cancer	Pancreatic cancer	Liver cancer
CST1					

[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

A. CST1



B. MELK

