



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0121870

(43) 공개일자 2015년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0047998

(22) 출원일자 2014년04월22일

심사청구일자 2014년04월22일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93

(72) 발명자

김송철

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 314동 803호(신천동, 파크리오아파트)

(74) 대리인

위병갑

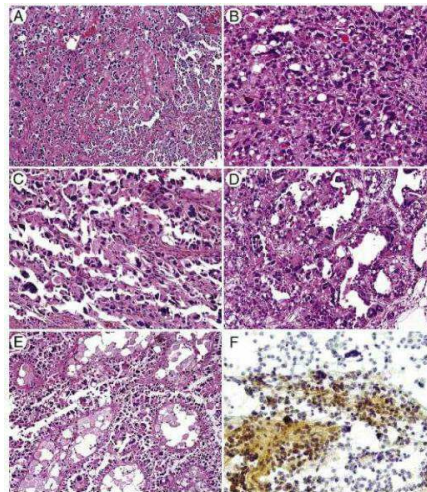
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **췌장의 다형성 고형 가유두상 종양 진단용 마커 및 이를 이용한 항암 패치 탐제용 항암제의 선별방법**

(57) 요약

본 발명은 췌장암의 구별, 특히 췌장암 중 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic solid pseudopapillary neoplasm, Pleomorphic SPN)의 구별 및 진단을 위한 신규 바이오 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 p53 유전자의 발현 특성 및 돌연변이 특성을 이용하는 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)의 진단 마커로서의 p53 유전자의 용도 및 이를 이용하여 췌장암 수술 후 재발 또는 전이를 방지하기 위한 항암 패치에 탑재되는 항암제의 선택 및/또는 투여량 결정을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

p53 유전자를 함유하는, 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단을 위한 마커용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 p53 유전자는 다형성 고형 가유두상 종양 조직에서 과발현하는 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 진단은 췌장암이 일반형 고형 가유두상 종양(Conventional SPN)인지 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 구별하는 것을 포함하는 마커용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 p53 유전자는 TP53 유전자 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 TP53 유전자 돌연변이는 p53 유전자의 엑손 6의 코돈 190에서 사이토신의 결실에 의한 프레임 시프트(frame shift) 변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 프레임 시프트 변이가 존재하는 경우 끝이 잘린(truncated) p53 단백질이 발현되는 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 TP53 유전자 변이는 p53 유전자의 엑손 7의 코돈 241에서 세린에서 알라닌으로의 대체에 의한 변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)의 진단은 진행(progression), 재발(Recurrence) 및 전이(metastasis)를 포함하는 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 9

p53 유전자의 발현 수준 또는 TP53 유전자 돌연변이 여부를 측정하는 제제를 포함하는, 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 TP53 유전자 돌연변이는 p53 유전자의 (i) 엑손 6의 코돈 190에서 사이토신의 결실에 의한 프레임 시프트 (frame shift) 변이 또는 (ii) 엑손 7의 코돈 241에서 세린에서 알라닌으로의 대체에 의한 변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 조성물.

청구항 11

제9항에 따른 조성물을 포함하는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단용 키트.

청구항 12

환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 p53 유전자의 발현 수준 또는 프레임 시프트 돌연변이를 측정하는 단계; 및

상기 p53 유전자의 발현 수준 또는 프레임 시프트 돌연변이 여부를 정상 대조구 시료의 경우와 비교하는 단계를 포함하는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

환자로부터 분리된 생물학적 시료에서의 p53 유전자의 발현이 정상 대조구 시료보다 과발현되어 나타나는 경우 또는 프레임 시프트 돌연변이가 존재하는 경우, 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 가지고 있는 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

췌장암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 p53 유전자의 과발현 또는 프레임 시프트 돌연변이를 확인하여 췌장암이 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)인지 여부를 결정하는 단계; 및

췌장암이 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)인지 여부에 따라 투여할 항암제의 종류, 양, 및 농도 중 어느 하나 이상의 투여 요소를 결정하는 단계를 포함하는, 췌장암 수술 후 재발 또는 전이 방지를 위해 필요한 항암제 투여방법 결정을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 15

다음 단계를 포함하는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 치료용 물질의 스크리닝 방법:

(a) 후보 물질의 존재하에, p53 유전자를 발현시키는 단계; 및

(b) 후보물질이 없이 p53 유전자를 발현시킨 경우에 비하여, 상기 유전자들의 발현이 억제되는 경우의 후보물질을 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 치료용 물질로 선택하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 췌장암의 구별, 특히 췌장암 중 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic solid pseudopapillary neoplasm, Pleomorphic SPN)의 구별 및 진단을 위한 신규 바이오 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 p53 유전자의 발현 특성 및 돌연변이 특성을 이용하는 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)의 진단 마커로서의 p53 유전자의 용도 및 이를 이용하여 췌장암 수술 후 재발 또는 전이를 방지하기 위한 항암 패치에 탑재되는 항암제의 선택 및/또는 투여량 결정을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

우리나라 전체 췌장암 환자의 5년 생존율은 평균 7.6%로서, 종양 의학의 지속적인 발전에 힘입어 전체 암 환자의 생존율은 꾸준히 증가추세를 보임에도 불구하고, 다른 암과 다르게 췌장암의 생존율은 지난 20여 년간 거의 향상되지 않았다. 국내 췌장암 치료 성적을 좌우하는 가장 중요한 인자는 조기 진단 여부이다. 국내 주요 병원의 자료를 통합 분석하면, 1기에서는 75% (stage IA) 또는 40% (stage IB)의 5년 생존율을 보이고 있는 바, 췌

장암의 경우에는 조기 진단이 더더욱 요구된다고 할 수 있다. 그럼에도 불구하고 조기 진단이 어려워 췌장암 진단 당시 이미 병기가 상당히 진행된 경우가 많아, 수술적 치료 요법이 가능한 환자는 20%에 불과한 실정이며, 수술 이후에도 재발과 전이가 빈번하나 뚜렷한 생존율의 향상이 보고된 치료제는 없는 상황이다.

[0003] 한편, 췌장에서 생기는 고형 가성 유두상 종양(solid pseudopapillary tumor, SPT)은 1959년 V.K Frantz가 처음 보고한 이후 췌장의 유두상 상피성 종양, 고형 낭성 종양, 유두상 낭성 종양, 고형 유두상 상피성 종양 등으로 불리다가 1996년 WHO의 정의에 의하여 췌장의 고형 가성 유두상 종양으로 불리게 되었다.

[0004] 다른 췌장에서 발생하는 종양과는 달리 주변조직의 침습이나 국소 림프절 침범, 원격전이는 매우 드물며, 느리게 성장하는 저도 악성 종양이다. 증상은 대부분 무증상의 복부 종괴나 복부 불편감으로 나타나고, 이외에 복통, 오심, 구토, 체중감소 등을 보인다. 드물게 장폐색, 빈혈, 황달, 췌장염, 담관폐쇄, 위장관출혈 등으로 나타나기도 한다.

[0005] 고형 가유두상 종양(Solid pseudopapillary neoplasms, SPNs)은 외분비성 췌장 종양의 약 1~6 %를 차지하는 흔하지 않은 종양이다. 대부분의 고형 가유두상 종양은 완벽한 수술적 절제만으로도 치료가 되지만, 5~20%는 재발하거나 떨어져있는 장기로 전이되기 때문에 고형 가유두상 종양은 저-악성 종양(low-grade malignant neoplasms)으로 간주되고 있다. 장기적으로 무 질병의 생존은 전이성 SPN을 가지는 일부 환자에서 전이의 절제에 의해 달성되어질 수 있다.

[0006] 특히, 신경내분비 췌장종양(pancreatic neuroendocrine tumors, PanNETs), 선방 세포암(acinar cell carcinomas) 또는 췌장관 선암(ductal adenocarcinomas)와 같은 다른 췌장 종양으로부터 고형 가유두상 종양(SPNS)로의 분화는, 다른 악성 췌장 종양과 비교하여 고형 가유두상 종양이 보다 나은 예후 가능성을 가지고 있기 때문에 발생한 췌장암의 유형이 췌장 고형 가유두상 종양인지 여부를 검사 및 진단하는 것은 매우 유용하면서 중요하다고 할 수 있다. 그러나, 췌장 고형 가유두상 종양은 현재까지 알려진 종양 표지자 검사가 없어, 이를 진단할 수 있는 표지자의 개발이 필요한 실정이다.

[0007] 또한, 췌장 고형 가유두상 종양은 일반형과 다형성으로 구분지어 지는데, 일반형의 췌장 고형 가유두상 종양(conventional SPNs)은 다른 췌장 종양들과 구별할 수 있는 특징들이 잘 연구되어 있다. 그러나 다형성의 췌장 고형 가유두상 종양(pleomorphic SPNs)은 드물게 관찰되고 진단 또한 명확하게 할 수 없는 문제점이 있는데, 이는 다형성 종양의 경우 천자 생검 물질, 내시경 초음파로 유도된 세포 시료 또는 동결 절편 검사 등에 있어서 분석의 어려움이 있기 때문이다. 따라서 다형성의 췌장 고형 가유두상 종양에 대한 특징을 분석하고 이를 검사 및 진단하는 연구는 거의 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 췌장 고형 가유두상 종양 환자의 조직으로부터 다양한 면역조직화학적 검사 등을 통해 다형성의 특징 및 이에 따른 p53 단백질의 특이적 발현 특성, 프레임 시프트 돌연변이 등의 유전자 변이 등을 포함하는, 췌장 고형 가유두상 종양의 진단에 유용한 정보들을 확인하였고, 나아가 췌장암이 일반형 고형 가유두상 종양인지 다형성 고형 가유두상 종양인지를 구별할 수 있는 방법을 고안함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 1.Bosman FT, Carneiro F, Hurlan RH, Theise ND, editors. WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.

(비특허문헌 0002) 2.Papavramidis T, Papavramidis S. Solid pseudopapillary tumors of the pancreas: review of 718 patients reported in English literature. J Am Coll Surg 2005;200:965-72.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 특정 유전자 p53의 췌장암 구별화 기능에 대한 신규 용도에 관한 것으로, 본 발명의 목적은 p53 유전자를 함유하는, 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단을 위한 마커용 조성물을 제공하는 데

있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 p53 유전자의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 구별 진단에 필요한 다양한 용도를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 p53 유전자를 이용하여 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 치료기능을 가지는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 p53 유전자를 함유하는, 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단을 위한 마커용 조성물을 제공한다. 상기 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)의 진단은 진행(progression), 재발(Recurrence) 및 전이(metastasis)를 포함한다.

[0014] 특히, 상기 진단은 췌장암이 일반형 고형 가유두상 종양(Conventional SPN)인지 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 구별하는 것을 포함하는데, 다형성 고형 가유두상 종양 조직에서 상기 p53 유전자는 과발현하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 이 때, 상기 p53 유전자는 TP53 유전자 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0016] TP53 유전자 돌연변이는 p53 유전자의 (i) 엑손 6의 코돈 190에서 사이토신의 결실에 의한 프레임 시프트(frame shift) 변이 또는 엑손 7의 코돈 241에서 세린에서 알라닌으로의 대체에 의한 변이를 포함할 수 있는데, 특히, (i) 엑손 6의 코돈 190에서 사이토신의 결실에 의한 프레임 시프트(frame shift) 변이를 포함하는 경우, 끝이 잘린(truncated) p53 단백질이 생성된다.

[0017] 즉, 본 발명에서는 p53 유전자의 상향조절 및/또는 TP53 유전자 돌연변이 확인을 통해 췌장암의 종류를 구별할 수 있다. 바람직하게는 일반형 고형 가유두상 종양(Conventional SPN)인지 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 구별하여 진단할 수 있다.

[0018] 한편, 본 발명은 p53 유전자의 발현 수준 또는 TP53 유전자 돌연변이 여부를 측정하는 제제를 포함하는, 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단용 조성물을 제공한다.

[0019] 이 때, 상기 유전자의 발현 수준 측정은 mRNA 또는 단백질의 수준의 측정이나 돌연변이 여부를 확인은 공지된 다양한 방법 중, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자가 임의로 적절히 선택하여 사용할 수 있다.

[0020] 유사한 관점에서 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단용 키트를 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 p53 유전자의 발현 수준 또는 프레임 시프트 돌연변이를 측정하는 단계; 및 상기 p53 유전자의 발현 수준 또는 프레임 시프트 돌연변이 여부를 정상 대조구 시료의 경우와 비교하는 단계를 포함하는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

[0022] 이 때, 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서의 p53 유전자의 발현이 정상 대조구 시료보다 과발현되어 나타나는 경우 또는 프레임 시프트 돌연변이가 존재하는 경우, 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 가지고 있는 것으로 판단한다.

[0023] 또한, 본 발명은 유사한 관점에서,

[0024] 췌장암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 p53 유전자의 과발현 또는 프레임 시프트 돌연변이를 확인하여 췌장암이 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)인지 여부를 결정하는 단계; 및

[0025] 췌장암이 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)인지 여부에 따라 투여할 항암제의 종류, 양, 및 농도 중 어느 하나 이상의 투여 요소를 결정하는 단계를 포함하는, 췌장암 수술 후 재발 또는 전이 방지를 위해 필요한 항암제 투여방법 결정을 위한 정보의 제공 방법을 제공할 수도 있다.

- [0026] 또한, 본 발명은
- [0027] (a) 후보 물질의 존재하에, p53 유전자를 발현시키는 단계; 및
- [0028] (b) 후보물질이 없이 p53 유전자를 발현시킨 경우에 비하여, 상기 유전자들의 발현이 억제되는 경우의 후보물질을 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 치료용 물질로 선택하는 단계를 포함하는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 치료용 물질의 스크리닝 방법도 제공할 수 있다.
- [0029] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명은 췌장암 중 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic solid pseudopapillary neoplasm, Pleomorphic SPN)을 구별해 내는 p53 유전자의 신규 용도에 관한 것으로, 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단 마커로서의 p53 유전자의 기능을 기반으로 하는 다양한 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0030] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명은 특정 p53 유전자의 신규 기능에 관한 것으로, 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic solid pseudopapillary neoplasm)을 다른 일반적인 췌장암의 경우와 구별하여 진단할 수 있고, 나아가, 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 치료에 특별히 유용한 물질을 스크리닝할 수 있는 등, 다형성 고형 가유두상 종양의 조기 진단, 연구 및 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)에 대한 여러가지 조직학적 특징의 대표적인 이미지들이다 (A-E: 헤마토실린-에오신 염색; F: 파파니콜로 염색).
- 도 2는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 및 일반형 고형 가유두상 종양(Conventional SPN) 사이의 면역조직화학적 염색 결과의 비교이다.
- 도 3은 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 가지는 경우 나타나는 TP53 돌연변이 서열분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.
- [0033] "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 그 중에서도 본 발명은 특히 췌장의 고형 가유두상 종양 진단에 유용하다. 본 발명에서는 췌장 고형 가유두상 종양의 재발(Recurrence) 진행(progression), 전이(metastasis)를 예측하는 것을 포함한다. 이에, 췌장 고형 가유두상 종양의 재발 및 진행을 정확히 예측할 수 있는 지표가 매우 중요하며 조직의 분화도와 병기와 같은 임상적 지표를 보완하면서 치료의 반응을 예측할 수 있는 인자가 필요한데, 본 발명의 p53이 이러한 지표 기능을 하므로 췌장 고형 가유두상 종양 진단 인자로 이용할 수 있다. 즉, 이러한 유전자들의 발현 특성 측정은 췌장 고형 가유두상 종양의 분화도 및 병기, 진행을 예측하는데 유용한 지표(진단 마커)로 사용될 수 있다.
- [0034] "진단용 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)"란 췌장의 고형 가유두상 종양 세포를 정상 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포에 비하여 췌장 고형 가유두상 종양을 가진 세포에서 증가양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 다당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.
- [0035] "암", "종양" 또는 "악성"은 일반적으로 비조절된 세포 성장의 특징을 갖는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다.
- [0036] "대상" 또는 "환자"는 인간, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.
- [0037] "조직 또는 세포 샘플"은 대상 또는 환자의 조직으로부터 얻은 유사한 세포의 집합체를 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형

조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다. 조직 샘플은 또한 1차 또는 배양 세포 또는 세포주일 수 있다.

[0038] "핵산"은 임의의 DNA 또는 RNA, 예를 들어, 조직 샘플에 존재하는 염색체, 미토콘드리아, 바이러스 및/또는 세균 핵산을 포함하는 의미이다. 이중가닥 핵산 분자의 하나 또는 두개 모두의 가닥을 포함하고, 무손상 핵산 분자의 임의의 단편 또는 일부를 포함한다.

[0039] "유전자"는 단백질 코딩 또는 전사시에 또는 다른 유전자 발현의 조절시에 기능적 역할을 갖는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 유전자는 기능적 단백질을 코딩하는 모든 핵산 또는 단백질을 코딩 또는 발현하는 핵산의 일부만으로 이루어질 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종료 영역, 프로모터 서열, 다른 조절 서열 또는 유전자에 인접한 특유한 서열 내에 유전자 이상을 포함할 수 있다.

[0040] "유전자 발현"이란 용어는 일반적으로 생물학적 활성이 있는 폴리펩티드가 DNA 서열로부터 생성되고 세포에서 생물학적 활성을 나타내는 세포 과정을 의미한다. 그런 의미로, 유전자 발현은 전사 및 해독 과정을 포함할 뿐만 아니라, 유전자 또는 유전자 산물의 생물학적 활성에 영향을 끼칠 수 있는 전사후 및 해독후 과정을 포함한다. 상기 과정들은 RNA 합성, 가공 및 수송뿐만 아니라, 폴리펩티드 합성, 수송 및 폴리펩티드의 해독후 변형을 포함하지만, 이들에 국한되는 것은 아니다. 본 발명에서는 유전자 발현의 대상으로 유전자 프로모터의 메틸화, mRNA 발현 및 단백질 발현의 경우를 모두 포함한다.

[0041] "코딩 영역" 또는 "코딩 서열"은, 통상적인 염기쌍과 코돈 용법 관계에 따라, 발현이 요구되는 특정 유전자 생성물 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산 서열, 그의 상보체, 또는 이들의 일부분을 지칭한다. 코딩 서열은 성숙 mRNA를 제공하기 위해 세포의 생화학 기구에 의해 함께 연결되는 게놈 DNA 또는 미성숙 1차 RNA 전사체에서의 엑손을 포함한다. 안티센스(antisense) 가닥은 상기 핵산의 상보체이고, 코딩 서열은 이들로부터 추정될 수 있다. 코딩 서열은, 적절한 길이의 전사체가 생성되고 적절한 리딩 프레임에서 번역되어 목적하는 기능 생성물이 생성되도록, 전사 조절 요소 및 번역 개시 및 종결 코돈과의 관계에 놓인다.

[0042] "프라이머"는 상보성 RNA 또는 DNA 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하고 예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응에서 발생하는 뉴클레오타이드트랜스퍼라제의 작용에 의해 모노뉴클레오타이드로부터 폴리뉴클레오타이드의 단계적 합성을 위한 출발점으로 기능하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 의미한다.

[0043] "단백질"은 또한 기준 단백질과 본질적으로 동일한 생물 활성 또는 기능을 보유하는, 단백질의 단편, 유사체 및 유도체를 포함하는 것이다

[0044] "표지" 또는 "라벨"은 직접 또는 간접적으로 시약, 예를 들어 핵산 프로브 또는 항체에 컨쥬게이팅 되거나 융합되고 컨쥬게이팅 되거나 융합된 시약의 검출을 용이하게 하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 표지는 그 자체가 검출될 수 있거나 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매 할 수 있다.

[0045] "상향조절(up-regulation)"이라는 표현은, 정상조직세포에 비하여, 세포내 전사(gene transcription) 또는 번역(gene translation)에 의해서 특정 유전자의 mRNA로의 발현 또는 단백질로 발현량이 현저하게 증가된 것을 의미한다.

[0046] "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 무손상 모노클로날(단일클론) 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어 이중특이적 항체) 및 목적하는 생물학적 활성을 보이는 항체 단편을 포함한다.

[0047] "치료"는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로), 검출가능하거나 또는 검출되지 않거나의 여부를 포함한다. 또한, "치료"는 치료를 받지 않았을 때 예상되는 생존율과 비교하여 생존율을 높이는 것을 의미할 수도 있다. 치료는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방조치 방법 모두를 가리킨다. 상기 치료들은 예방되는 장애뿐만 아니라 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다. 질병을 "완화(Palliating)"하는 것은 치료를 하지 않은 경우와 비교하여, 질병상태의 범위 및/또는 바람직하지 않은 임상적 징후가 감소되거나 및/또는 진행의 시간적 추이(time course)가 늦춰지거나 길어지는 것을 의미한다.

[0048] "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20,

25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0049] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.

[0050] 이하, 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0051] 본 발명에서 진단하고자 하는 질병은 췌장암과 관련된 질병이다.

[0052] 췌장암은 악성종양인 췌관 선암종 (pancreatic ductal adenocarcinoma), 선방세포 암종(acinar cell carcinoma), 신경 내분비 종양 (neuroendocrine tumor)과 낭종성 양성종양인 장액성 낭성 종양(serous cystadenoma), 점액성 낭성 종양 (mucinous cystic neoplasm), 췌관 내 유두상 점액 종양(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN), 고형 가유두상 종양 (solid pseudopapillary tumor, SPN)을 포함하는 것이며, 또한 1기, 2기 등과 같이 분류되는 암의 진행단계에 따른 췌장암을 포함한다.

[0053] 특히, 본 발명은 췌장암 중 고형 가유두상 종양 (solid pseudopapillary neoplasm, SPN)의 구별화(classfication), 더욱 바람직하게는, 췌장의 고형 가유두상 종양이 일반형인지 다형성을 나타내는 것인지 판별하여 진단할 수 있는 방법에 관한 것이다.

[0054] 본 발명자들은 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic solid pseudopapillary neoplasm, Pleomorphic SPN) 조직에서 p53유전자가 과발현되고, TP53 유전자 변이(mutation)가 나타남을 발견하였다. 즉, 다형성 고형 가유두상 종양과 p53 유전자들의 발현 관련성에 대해 최초로 규명하였다.

[0055] 따라서, 본 발명은 p53유전자의 다형성 고형 가유두상 종양 진단 마커로서의 용도에 관한 것으로, 상기 유전자의 과발현 및 특정 돌연변이의 확인을 통해 다형성 고형 가유두상 종양을 판별하여 진단할 수 있다. 상기 다형성 고형 가유두상 종양의 진행(progression), 재발(Recurrence) 및 전이(metastasis)를 포함한다.

[0056] <p53 진단 마커 용도>

[0057] 그러므로, 본 발명은 일 관점에서 p53 유전자의 췌장암의 구별화, 특히, 다형성 고형 가유두상 종양인지 여부의 진단 마커로서의 용도에 관한 것이다.

[0058] 즉, p53의 발현 정도 및 특정 변이 여부에 따른 일반형 고형 가유두상 종양(Conventional SPN)인지 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 구별하여 진단할 수 있는, p53 유전자의 용도 및 이의 이용에 관한 것이다.

[0059] p53 단백질은 공지된 것, 예를 들면 공지된 인간 유래의 서열을 공지된 DB로부터 수득할 수 있는데, 이로 한정하는 것은 아니며, 이의 기능적 동등체를 포함하는 것이다. 바람직하게 상기 p53 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 2로 기재되어 있고, p53의 단백질을 암호화하는 염기서열은 서열번호 1에 기재되어 있다.

[0060] 유의성 있는 진단 마커의 선택과 적용은 진단 결과의 신뢰도를 결정짓는다. 유의성 있는 진단 마커란, 진단하여 얻은 결과가 정확하여 타당도(validity)가 높고 반복 측정시에도 일관된 결과를 나타내도록 신뢰도(reliability)가 높은 마커를 의미한다. 본 발명의 췌장암 구별 진단 마커는, 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)의 발병과 함께 직접적 또는 간접적 요인으로 발현이 변화하는 유전자들로 반복된 실험에도 동일한 결과를 나타내며, 발현 수준의 차이가 대조군과 비교할 때 매우 커서 잘못된 결과를 내린 확률이 거의 없는 신뢰도가 높은 마커들이다. 그러므로 본 발명의 유의성 있는 진단 마커의 발현 정도를 측정하여 얻은 결과를 토대로 진단된 결과는 타당하게 신뢰할 수 있다.

[0061] p53 유전자는 17번 염색체의 단완에 위치하는 인단백으로서 DNA 손상에 대한 반응을 조절하고 세포사멸(apoptosis)을 유도하며 세포주기에 관여하는 등의 역할을 수행한다. p53유전자가 돌연변이에 의해 불활성화되면 DNA 복구가 일어나지 않고 세포가 G1기에 정지되지 않으며 계속 증식하여 종양이 발생하게 된다. p53 유전자는 정상 세포에서는 매우 적은 양으로 존재하고 감기가 짧아서 일반적인 면역조직화학염색에 의해 인지되기 힘들지만, 종양세포에서 점 돌연변이가 초래되는 경우 구조의 변화 및 반감기의 증가로 인해 면역조직화학염색으

로도 쉽게 증명될 수 있다.

- [0062] 본 발명은 p53(TP53)가 다형성 고형 가유두상 종양 조직에서 과발현되는 특징을 이용한다. 즉, 본 발명의 마커 p53이 과발현되는 경우 체장암 중 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 가지고 있다고 진단할 수 있다.
- [0063] 이 때, 본 발명의 p53(TP53) 유전자는 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0064] 바람직하게는, 프레임시프트 돌연변이(frameshift mutation)를 포함한다. p53 단백질을 코딩하는 서열 중 엑손 6의 코돈 190에서 사이토신의 결실이 일어남에 의해 프레임 시프트 변이가 형성되고, 이에 따라 끝이 잘린(truncated) p53 단백질을 생산한다. 또한, p53의 DNA-결합 도메인 영역에 위치하는 엑손 7의 코돈 241에서 세린에서 알라닌으로 대체하는 변이를 포함할 수도 있다.
- [0065] 상기 변이체들은 뉴클레오타이드 대체, 결손 또는 부가에 의하여 생성되는 것을 포함한다. 그 부가, 결손 또는 대체는 하나 이상의 뉴클레오타이드와 관련될 수 있다. 그 변이체들은 코딩 부위, 비-코딩 부위 또는 양자 모두에서 변경될 수 있다. 코딩 부위에서 변경은 보존적인 또는 비보존적인 아미노산 대체, 결손 또는 부가를 생성할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 돌연변이체 TP53 서열과 적어도 90% 동일한, 더욱 바람직하게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 뉴클레오타이드 서열; 또는 그러한 예시적인 서열과 상보적인 뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0067] 이처럼, 본 발명에서는 p53 유전자의 상향조절 및/또는 TP53 유전자 돌연변이 확인을 통해 체장암의 종류를 구별할 수 있다. 바람직하게는 일반형 고형 가유두상 종양(Conventional SPN)인지 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 구별하여 진단할 수 있다.
- [0068] 상기 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)의 진단 또는 예측 마커로서 p53 유전자 과발현 및 프레임 시프트 변이는 개별적으로 사용하거나 조합하여 사용할 수 있고, 전체적인 발현 패턴 또는 변이 확인을 통하여 신뢰성 및 효율성을 향상시킬 수 있다.
- [0069] 추가로, p53(TP53) 유전자 변이와 밀접한 관련을 가지는 Ki-67의 낮은 염색 라벨링 지수를 확인함으로써 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)의 진단에 활용할 수도 있다.
- [0070] 동일한 관점에서, 본 발명은 p53 유전자의 과발현 및/또는 TP53 유전자 변이를 측정하는 제제를 포함하는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0071] 이 때, 유전자 발현 수준 측정에 의해 p53 유전자의 과발현 여부를 확인한다. 상기 '유전자 발현 수준 측정'이란, mRNA 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 것을 모두 포함한다.
- [0072] mRNA 발현수준 측정
- [0073] "mRNA 발현수준 측정"이란 체장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 상기 마커 유전자들의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다.
- [0074] 이를 위한 분석 방법으로는 역전사중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 이 때, 사용되는 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는, 각 마커 유전자 특이적인 프라이머로 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산이다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 상기 프라이머는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있고, 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자,

바이오틴 등이 있다.

[0076] 이에, 본 발명의 구체적인 일 양태에서는, p53 유전자에 특이적인 프라이머 서열을 포함하는 채장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단 마커 조성물을 제공할 수 있다. 이 때, 상기 유전자들의 mRNA 발현 수준을 측정함으로써 상향조절되는 경우 채장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 가지는 것으로 진단하는 용도를 제공할 수 있다.

[0077] 단백질 발현 수준 측정

[0078] 또한, 단백질 발현수준 측정이란 채장암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 채장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다.

[0079] 항체란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.

[0080] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0081] 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 p53 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 채장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단 마커 조성물을 제공할 수 있다. 이 때, 상기 유전자들의 단백질 발현 수준을 측정함으로써 상향조절되는 경우 채장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 가지는 것으로 진단하는 용도를 제공할 수 있다.

[0082] 돌연변이 측정

[0083] 본 발명의 돌연변이 확인을 위해서 당업계에 주지되고 일반적인 어떠한 방법을 사용하는 것도 무방하다. 예를 들어, 공지된 DNA 서열분석 방법에 의해 돌연변이를 확인할 수도 있다.

[0084] 그 방법들은 DNA 중합효소 I의 Klenow 절편, SEQUENASE (US Biochemical Corp, Cleveland, Ohio), Taq 중합효소 (Perkin Elmer), 열안정 T7 중합효소(Amersham, Chicago, IL), 또는 재조합 중합효소와 Gibco BRL (Gaithersburg, Md.)에 의하여 판매되는 ELONGASE 증폭 시스템과 같은 교정 엑소뉴크리에이즈의 조합과 같은 효소를 채택할 수 있다. 바람직하게는 그 과정은 Hamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, Nev.), Peltier Thermal Cycler (PTC200; MJ Research, Watertown, Mass.) 및 ABI 377 DNA 시퀀서(Perkin Elmer)와 같은 기계로 자동화될 수 있다.

[0085] 본 발명의 돌연변이체 p53의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴크레오타이드는 프로모터와 조절 요소와 같은 업스트림 서열을 검출하는 것으로 당업계에 알려진 여러 방법들을 채택하고 부분 핵산 서열을 이용하여 확장될 수 있다. 게놈 DNA는 공지된 부위에 특이적인 프라이머와 링커 서열에 프라이머의 존재로 먼저 증폭된다. PCR 산물은 적절한 RNA 중합효소로 전사되고 역전사 효소를 사용하여 서열화한다.

[0086] <수행 방법>

[0087] 이하, 본 발명에서 사용할 수 있는 샘플로부터의 채장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단을 위한 p53 마커의 검출에 관련된 일 프로토콜을 예시로 제시한다.

[0088] 샘플 제조를 위해, 포유동물 (일반적으로 인간 환자)로부터의 조직 또는 세포 샘플을 사용할 수 있다. 샘플은 수술에 의한 절제, 흡인 또는 생검을 포함하여 이로 제한되지 않는 당업계에 공지된 다양한 과정에 의해 얻을 수 있다.

[0089] 조직 샘플은 통상적인 방법에 의해 고정 (즉 보존)될 수 있다. 당업자는 샘플이 조직학적으로 염색되거나 달리 분석되는 목적에 따라 고정액을 선택할 수 있음을 이해할 것이다. 당업자는 또한 고정 길이가 조직 샘플의 크기

및 사용되는 고정액에 따라 결정됨을 이해할 것이다.

- [0090] 조직 또는 세포 샘플에서 mRNA 또는 단백질 발현 및/또는 돌연변이 존재 여부를 조사한다. 앞서 설명한 것처럼, 세포 내의 mRNA, 단백질의 평가 방법 등은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0091] 상기 방법은 마이크로어레이 기술에 의해 조직 또는 세포 샘플에서 메틸화 및 mRNA를 조사 또는 검출하는 프로토콜을 포함할 수 있다. 마이크로어레이(Microarray) 방법은 종양 내의 수천 또는 심지어 수만 개의 유전자의 RNA 발현을 동시에 연구할 수 있어, 인간 질병의 분자적 기초에 대한 포괄적 통찰력을 보다 효과적으로 얻을 수 있게 해준다. 또한, 이를 이용하여 종양 분류에서의 유전자 발현 패턴, 임상학적 결과 및 화학적 치료요법에 대한 반응의 평가가 가능하다.
- [0092] 이와 같이, 샘플을 이용한 상기 프로토콜 등에 의해 p53 유전자 발현을 측정하여 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단이 가능하다.
- [0093] 중요한 프로브는 검출할 수 있도록 표지될 수 있으며, 예를 들면 방사선 동위원소, 형광 화합물, 바이오 발광 화합물, 화학 발광 화합물, 금속 킬레이트 또는 효소로 표지될 수 있다. 상기와 같은 프로브를 적당하게 표지하는 것은 당해 분야에서 널리 알려진 기술이며, 통상적인 방법을 통하여 수행할 수 있다.
- [0094] 유사한 관점에서 본 발명은 췌장암의 구별화, 특히, 다형성 고형 가유두상 종양인지 여부의 진단을 위한 키트에 관한 것이다.
- [0095] 상기 키트는 p53 유전자의 발현을 분석하여 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)을 판단하는데 쓰이는데, 이는 크게 두 가지 방법으로 실시할 수 있다: 유전적 분석(genetic analysis) 및 면역분석(immunoassay).
- [0096] 이를 위해, 상기 키트는 예를 들어, p53 유전자 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 혹은 프로브; 또는 p53 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.
- [0097] 즉, 본 발명의 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 그리고, 본 발명의 인간 췌장암 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다.
- [0098] 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0099] 이처럼, 본 발명의 또 다른 양태에서는, 본 발명에 따른 상기 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단용 조성물을 포함하는 진단 키트를 제공한다. 바람직하게, 상기 진단 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.
- [0100] <진단 및 정보제공 방법>
- [0101] 본 발명은 다른 관점에서, 이러한 발견에 기초하여 p53 유전자의 발현수준 및/또는 TP53 유전자의 변이, 바람직하게는 프레임 시프트 변이를 측정하는 것을 포함하는, 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단 방법 또는 진단을 위한 정보 제공방법을 제공한다.
- [0102] 상기 방법은 또한, 췌장암 수술 후 재발 또는 전이 방지를 위한 항암제 등을 탑재한 생분해성 고분자 패치 등의 개발에도 유용한 정보를 제공한다.
- [0103] 일 구체예로서, 본 발명의 방법은
- [0104] 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 p53 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 정상 대조군 시료의 해당 유전자의 발현과 비교하는 단계를 포함하는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

- [0105] 상기 p53 유전자의 과발현은 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)에 대한 지표임을 특징으로 한다.
- [0106] 이 때, 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서의 p53 유전자의 발현이 정상 대조구 시료보다 과발현되어 나타나는 경우, 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)인 것으로 판별하는 것을 특징으로 한다.
- [0107] 다시 말해, 상기 진단방법은, 특히 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)에 따른 특정 마커의 발현 특징을 조사하는 것에 관한 것이고, 본 명세서에 개시된 방법은 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 환자 치료를 위해 적절하거나 효과적인 요법을 평가할 때 유용한 데이터 및 정보를 얻기 위한 편리하고, 효율적이며, 비용 효과적인 수단을 제공할 수 있을 것이다.
- [0108] 다른 구체예로서, 본 발명의 방법은
- [0109] 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 TP53의 유전자 프레임 시프트 돌연변이 여부를 확인하는 단계; 및 상기 TP53 유전자 프레임 시프트 돌연변이 여부를 정상 대조구 시료의 해당 유전자의 발현과 비교하는 단계를 포함하는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [0110] 상기 TP53의 유전자 프레임 시프트 돌연변이의 존재는 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)에 대한 지표임을 특징으로 한다.
- [0111] 이 때, 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서의 TP53 유전자 내 프레임 시프트 돌연변이가 존재하는 경우, 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)인 것으로 판별하는 것을 특징으로 한다.
- [0112] 본 발명은, 또한, 췌장암 수술 후 재발 또는 전이 방지를 위해 필요한 항암제 투여량 및 투여방법 결정을 위한 정보도 제공할 수 있다.
- [0113] 또 다른 구체예로서, 본 발명은
- [0114] 췌장암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 p53 유전자의 과발현 또는 프레임 시프트 돌연변이를 확인하여 췌장암이 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)인지 여부를 결정하는 단계; 및
- [0115] 췌장암이 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)인지 여부에 따라 투여할 항암제의 종류, 양, 및 농도 중 어느 하나 이상의 투여 요소를 결정하는 단계를 포함하는, 췌장암 수술 후 재발 또는 전이 방지를 위해 필요한 항암제 투여방법 결정을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [0116] 즉, p53 과발현 및/또는 TP53 유전자 내 프레임 시프트 돌연변이 측정에 의해, 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)인지 여부를 판별하고, 나아가 상기 판별된 췌장암의 종류, 다시 말해 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN)인 경우와 그렇지 않은 경우에 따라 췌장암 수술 후 투여할 항암제의 종류, 양 및 농도 등 항암제 투여 방법을, 해당 췌장암의 종류에 따라 적합하도록 서로 상이하게 적용할 수 있다.
- [0117] <스크리닝 방법>
- [0118] 한편, 다른 관점에서 본 발명은 앞서 설명한 사실을 기반으로 하여, p53의 발현을 억제시키는 췌장의 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic SPN) 치료용 물질을 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다.
- [0119] 상기 방법은 일 구체예로,
- [0120] (a) 후보 물질의 존재하에, p53 유전자를 발현시키는 단계; 및
- [0121] (b) 후보물질이 없이 p53 유전자를 발현시킨 경우에 비하여, 상기 p53 유전자의 발현이 억제되는 경우의 후보물질을 췌장암 치료용 물질로 선택하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0122] 본 발명은 p53 발현과 유전자의 발현의 상향 조절 또는 하향 조절에 대한 유전적 접근까지 확장한다.
- [0123] 이처럼, 본 발명에서는 췌장암, 바람직하게는 다형성 고형 가유두상 종양(Pleomorphic solid pseudopapillary

neoplasm) 환자에게서 p53 유전자의 발현 증가 프로파일 특성 및 p53 유전자의 특정 돌연변이 특성을 보여 주었고, 이러한 결과는 췌장암 진단 마커로서의 상기 유전자의 용도를 활용하여, 췌장암 진단 및 치료제를 개발 또는 스크리닝하기 위한 표적유전자로서, 본 발명에 의해 특성이 규명된 상기 유전자를 이용할 수 있음을 시사한다.

[0124] <실시예>

[0125] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0126] 재료 및 방법

[0127] 1. 케이스 선별 및 SPNs의 분류

[0128] 감사위원회의 승인(2013-0618)하에, 아산 의료센터에서 2005년 10월부터 2012년 3월까지의 총 170 건의 췌장절제술 또는 적출 케이스를 병리학 데이터베이스로부터 검색하여, 그 중 139 케이스를 적용하였다. SPNs을 2개의 그룹으로 나누었다: 일반적 타입(conventional) 및 다형성 타입(pleomorphic).

[0129] 다형성 SPNs는 전체 종양의 20% 이상의 영역이 유의미한 핵 다형성을 가지는 세포를 가지는 경우로 정의하였다. 이러한 컷오프(cutoff)는 다형성 신경내분비 종양에 사용해왔기 때문에 선정되었다. 핵 다형성은 4배 이상의 핵 크기 변화(variation)로 정의하였다. 오직 단형성 세포로 구성되어 있거나 전체 종양의 20% 이하의 다형성 영역을 가지고 있는 SPNs는 일반적인 종래의 SPNs로 간주하였다.

[0130] 2. 병리조직학적 평가 및 세포학적 평가

[0131] 모든 케이스에서, 대표적인 섹션을 2 ~ 13 헤마톡실린 및 에오신-염색된 슬라이드를 검토하여 선별하였다. SPN 및 핵 다형성을 가진 5명의 환자로부터 수술 전 세포 슬라이드를 사용하였다. 이들은 췌장 절제술 전에 EUS-가이드된 미세 니들 흡인법에 의해 획득하였다. 각 케이스의 흡인물을 4 글라스 슬라이드 상에서 문지르고, 바로 100% 알코올 및 파파니콜로(Papanicolaou) 용액으로 고정시켰다.

[0132] 3. 조직 마이크로어레이 구조물(construction)

[0133] 균질한 면역조직학적 라벨링을 획득하고 및 분석 내 변화(intra-assay variation)를 제한하기 위해, 조직 마이크로어레이를 구축하였다. 조직 마이크로어레이는 매뉴얼 조직 마이크로어레이(UniMA Co Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여, 유용한 블록을 가진 121개의 수술적으로 절개된 일반 SPN 케이스 중 112개로부터 포르말린 고정, 파라핀-매립된 조직 블록을 만들어 구축하였다

[0134] 3개의 코어(2-mm size)를, 각 일반 SPN으로부터 펀칭(punching)하였고 1개의 코어를 비종양성 췌장 조직과 매칭하여 수용체 블록에 위치시켰다. 다형성 SPNs 중 대표적인 전체 절개된 슬라이드를 면역조직화학적 라벨링에 사용하였다.

[0135] 4. 면역조직화학적 분석

[0136] 아산 메디컬 센터 병리학부의 실험실에서 면역조직화학적 라벨링을 수행하였다. 조직 마이크로어레이 섹션들을 112 일반적 SPN 케이스; 및 유용한 파라핀 블록을 가진 18 다형성 SPNs의 17개로부터 전체 대표적 조직 섹션들을 라벨링하였다. 간단히 보면, 4- μ m 조직 절편들에서 파라핀을 제거하고(deparaffinized) 자일렌에서 수화시킨 후, 이어서 각각 알코올 용액에서 희석시켰다. 3% H₂O₂ 에서 10분 동안 인큐베이션함으로써 내생성 퍼옥시다아제를 차단시키고, 열-유도된 항원 회복공정을 수행하였다.

[0137] Benchmark autostainers (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)과 함께 일차항체를 사용하였다. β -카테닌(catenin)(1:2000, CAT-5H10; Zymed, San Francisco, CA), E-카드헤린(cadherin)(1:400, 4A2C7; Zymed), 시냅

토포이신(synaptophysin)(1:200; DiNona, Seoul, Korea), p53 (1:1500, DO-7; DAKO, Glostrup, Denmark), 및 Ki-67 (1:100, 7B11; Zymed)에 대한 일차항체들을 상온에서 32분 동안 인큐베이션시키고 절편들을 I-View 검출 키트 (Benchmark XT; Ventana Medical Systems)의 자동화된 면역염색 시스템으로 라벨링하였다. 면역염색된 절편들을 헤마토실린으로 가볍게 대비염색(counterstaine)시키고 에탄올에서 탈수시킨 다음 자일렌에서 세정하였다

[0138] 5. TP53 유전자 시퀀싱

[0139] 면역조직화학적 라벨링에 의해서 p53 양성을 보이는, 다형성 SPNs 영역으로부터 종양성 세포(Neoplastic cells)를 꼼꼼한 현미해부에 의해 조심히 수집하였다. QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 샘플로부터 게놈 DNA를 추출하였다.

[0140] TP53 유전자의 5~8 엑손 및 이들 엑손 옆에 배치되어 있는 프라이머를 함유하는 10 ng의 gDNA로 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 조건은 하기와 같다: 95° C 하 5분, 이어서 95° C 하 15초, 56° C 하 40초, 및 72° C 하 45초로 40 사이클, 그리고 72° C 하 4분 동안 최종 확장 단계.

[0141] PCR-증폭 산물들을 QIAquick 칼럼 (Qiagen, Valencia, CA)으로 정제하였다. TP53 유전자 시퀀싱을 BigDye 3.1 및 ABI PRISM Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA)를 이용하여 수행하였다.

[0142] 6. 통계학적 분석

[0143] 통계학적 분석을, 윈도우용 SPSS version 17(Chicago, IL)으로 수행하였다. 범주형 변수(Categorical variables)들을 Pearson χ^2 또는 Fisher exact tests에 의해 비교하였다. 연속적 변수(Continuous variables)들을 Student t test 또는 Mann-Whitney U test에 의해 비교하였다. 0.5 이하 P value를 통계학적으로 유의미한 값으로 간주하였다.

[0144] 실시예 1 : 임상적 특징 분석

[0145] 케이스들의 임상적 특징들을 표 1에 요약하였다.

표 1

Table 1 Comparisons of clinical and histologic features between conventional and pleomorphic SPNs

Characteristics	Conventional SPN	Pleomorphic SPN	Total	P
No. of cases	121 (87.1%)	18 (12.9%)	139 (100%)	
Patient's age (y), median (range)	32 (6-73)	45 (21-64)	32 (6-73)	<.001 *
Sex				.32
Male	20 (16.5%)	5 (27.8%)	25 (18.0%)	
Female	101 (83.5%)	13 (72.2%)	114 (82.0%)	
Ratio (male to female)	0.2	0.4	0.2	
Tumor location				
Uncinate, head and neck	36 (29.8%)	8 (44.4%)	62 (44.6%)	.44
Body and tail	84 (69.4%)	10 (55.6%)	76 (54.7%)	
Head to tail	1 (0.8%)	0 (0%)	1 (0.7%)	
Aggressive behavior*	14 (11.6%)	1 (5.6%)	15 (10.8%)	.69
Follow-up (mo), median (range)	20.5 (0.5-148)	18.2 (2-73.8)	20.5 (0.5-148)	.26
Recurrence	3 (2.5%)	0 (0.0%)	3 (2.2%)	NA
Death	2 (1.6%)	0 (0.0%)	2 (1.4%)	NA
Gross morphology				.62
Solid or lobulated mass	100 (82.6%)	14 (77.8%)	114 (82.0%)	
Degenerative cyst	21 (17.4%)	4 (22.2%)	25 (18.0%)	
Tumor size (cm)	4.7 ± 3.0	3.6 ± 2.1	4.5 ± 2.9	.13
Tumor margin				.52
Expansile	43 (35.5%)	5 (27.8%)	48 (34.5%)	
Infiltrative	78 (64.5%)	13 (72.2%)	91 (65.5%)	
Tumor extension				.31
Confinement to pancreas	65 (53.7%)	7 (38.9%)	72 (51.8%)	
Extension beyond pancreas	56 (46.3%)	11 (61.1%)	67 (48.1)	
Neural encasement				.19
Absent	49 (40.5%)	4 (22.2%)	53 (38.1%)	
Present	72 (59.5%)	14 (77.8%)	86 (61.9%)	
Lymphovascular invasion	0 (0%)	0 (0%)	0	NA
Mitotic count (per 50 HPFs)	1.3 ± 1.1	1.6 ± 0.9	1.4 ± 1.2	.34

Abbreviations: NA, not applicable; HPFs, high-power fields.
 * Significant at the level of $P < .05$.
 * Aggressive behaviors include invasion to adjacent organs and/or distant metastasis.

[0146]

[0147]

SPN을 가진 139명의 환자 중에서, 114 (82.0%) 명은 여자였고 25 (18.0%)명은 남자였다(남자 대 여자 비율 0.2). 139건의 SPNs 케이스에서, 87.1% (121 케이스)는 일반형(conventional)이고 12.9% (18 케이스)는 다형성(pleomorphic)이었다. 7개의 일반형 SPNs이 다형성 종양 세포를 함유하고 있었지만 이들은 전체 종양 영역의 20% (1%-10%)미만을 포함하고 있었다.

[0148]

모든 환자들에 대한 진단 연령은 6~73세 범위였다(중간치 32세). 다형성 SPNs을 가진 환자들의 중간값(45세, 21 ~ 64세 범위)는 일반형 SPNs (32세, 6~73세 범위; $P < .001$)의 경우보다 현저히 높은값을 나타냈다. 일반형 및 다형성 SPNs을 가지는 환자들 사이에서 환자의 성별이나 종양의 위치에 대해서는 통계학적 차이는 나타나지 않았다.

[0149]

일반형 SPNs의 경우에 1 달~13.5 년의 팔로우 업 기간 동안(중양값 31달) 2개의 종양이 재발하였고 2명의 환자는 사망하였다. 팔로우업 기간 동안(중양값, 25.5 달; 3달~7년 범위), 다형성 SPNs에서는 재발이나 사망의 경우가 없었다.

[0150]

비정맥(splenic vein) 및 비장과 같은 주변 기관에 대한 침윤은, 다형성 SPNs의 경우 5.6% (1/18 cases)로 나타났고, 침윤 전방에서 두드러진 종양 세포들이 단형성(monomorphic) 종양 세포의 특징을 보였다. 그러나 일반형 SPNs의 경우 십이지장, 담관, 비정맥 또는 간으로의 전이(7 cases), 림프절, 또는 장막을 포함하는 인접 기관(7 케이스)으로의 침윤은 11.6% (14/121)로 나타났다.

[0151]

인접 기관으로의 침윤, 전이 및 재발을 포함하는 이러한 공격적인 양상에 대해서는 다형성 SPNs을 가진 환자나 일반형 SPNs을 가진 환자들 사이에 통계학적인 차이는 나타나지 않았다.

실시예 2 : 거시적(Gross) 특징 및 조직학적 특징 분석

거시적 검토(gross examination) 동안, 2~13 절편(중양값, 5 절편)을 샘플화하고 현미경 검사를 위해 선별하였다. 종양 절편들을 포함하는 슬라이드 중양 수는, 일반형 SPN에 대해서는 5 (범위, 2-10)이고 다형성 SPN에 대해서는 4 (범위, 2-13)이다($P = .542$).

다형성 SPNs의 대표적인 이미지를 도 1에 도시하였다.

이러한 종양들에서, 다형성 영역은 전체 종양 영역의 20% ~ 80%를 포함하였다 (mean $\pm$ SD, 41.1% $\pm$ 25.9%). 핵 크기에서도 4배 이상의 변이를 보였을 뿐만 아니라, 크고 과염색된(hyperchromatic) 불규칙적인 형태의 핵이 때때로 확인되었다. 염색체 패턴 또한 미세한 것부터 굵은 것까지 다양하였고, 일부 케이스에서는 얼룩진(smudged) 핵을 가졌으며, 다른 케이스에서는 핵의 가-침윤(pseudoinclusions)이 나타났다. 이형(atypical) 세포에의 세포질은 풍부하고 호산성(eosinophilic)이거나, 또는 일부 예들은 단형성 SPN에서 나타난 바와 같이 깨끗하였다.

일반형 SPN의 특유의 특징인, 단형성 종양 세포를 함유하는 영역은 또한 모든 다형성 SPNs에서 확인되었다. 이러한 영역은 결합력이 약한 단형성 종양 세포들로 구성되어 있는데, 유리질(hyalinized) 또는 점액성(myxoid) 기질 밴드(stromal bands)에 매립되어 있는 얇은 벽의 혈관과 잘 섞여 있었다.

이러한 일반적 이상의 영역에서, 종양 세포들은 정교하게 분산된 염색체를 가지는 등글거나 타원형 핵 또는 뚜렷하지 않은(indistinct) 핵을 가지고 있었다. 종양성 핵은 때로 들쭉날쭉하거나 홈이 나타나있었다. 18건의 다형성 SPNs (100%) 모두 고체 성장(solid growth) 영역을 가지고 있었고, 15 (83.3%) 케이스는 가유두상(pseudopapillary) 영역을 가졌으며, 12 (66.7%) 케이스는 소피낭체(microcysts)를 가지고 있었다.

일반형 SPN에서 통상적으로 관찰되는 석회화(Calcification), 히알린 혈구(hyaline globules) 및 거품세포(foam cell) 변화 또한 다형성 SPN에서 자주 관찰되었다(12 케이스[각각 66.7%]). 콜레스테롤 클레프트(Cholesterol clefts) 및 조직구 침윤(histiocytic infiltration)도 각각 4건(22.2%) 및 7건(38.8%)의 다형성 SPNs 케이스에서 확인되었다.

다형성 SPNs의 병리학적 특성들을 표 1에서 일반적 SPN의 경우와 비교하였다. 총 형태학적 특징(고형 vs 퇴행성 낭종), 종양 크기, 주변부 패턴(팽창성 vs 침윤성), 종양 확장(체장 이내로 구속 vs 체장주변 유조직으로의 확장), 신경 포위(neural encasement), 림프관 침윤(lymphovascular invasion) 및 유사분열을 포함하는 여러 가지 병리학적 특징들을 비교하였다.

그러나, 다형성 SPNs 및 일반형 SPNs를 비교했을 때, 이러한 조직학적 특징들에서 통계학적 차이는 나타나지 않았다.

실시예 3 : 면역조직학적 라벨링

E-카드헤린, β -카테닌, 및 p53에 대한 면역라벨링의 대표적인 결과 및 이미지를 표 2에 요약하고 도 2에 각각 나타냈다.

표 2

	Conventional SPN	Pleomorphic SPN	Total	P
No. of cases	112	17	129	
β -Catenin	112 (100%)	17 (100%)	129 (100%)	1.00
E-cadherin	0 (%)	0 (0%)	0 (0%)	1.00
Synaptophysin	92 (82.9%)	11 (64.7%)	103 (80.5%)	.10
p53	2 (1.8%)	11 (64.7%)	13 (10.1%)	<.001 ^a

^a Significant at the level of $P < .05$.

- [0164] 다형성 SPNs (64.7% [11/17 cases])는 일반형 SPNs (1.8% [2/112 cases]; $P < .001$)보다 p53 단백질의 현저히 높은 발현을 보였다. 다형성 SPNs에서 다형성 세포에 인접한 단형성 종양세포들 또한 p53 단백질을 비정상적으로 발현하였다. 그러나, 다형성 SPNs에서 다형성 세포들로부터 멀리 떨어져 있는 단형성 종양 세포들은 p53 단백질 발현을 보이지 않았다.
- [0165] 다형성 SPNs(17/17 cases) 및 일반형 SPNs(112/112 cases)에서, β -카테닌에 대한 항체들은 지속적으로 종양성 핵을 라벨링하였고, 종양성 세포의 대부분의 세포질을 가볍게 데코레이션하였다. E-카드헤린 발현의 손실이 모든 일반형(112/112 cases) 및 다형성 SPN(17/17 cases)에서 관찰되었다.
- [0166] 일반형 SPNs의 82.9% (92/112 cases) 및 다형성 SPNs의 64.7%(11/17 cases)에서 시냅토파이신(Synaptophysin)이 초점에 모여 약하게 발현되었다.
- [0167] 다형성 SPNs 및 일반형 SPNs에서 β - 카테닌, E-카드헤린 및 시냅토파이신 발현에서 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.
- [0168] 15건의 다형성 SPNs에서 Ki-67에 대한 면역조직화학적 염색을 수행하였고, 모든 케이스에서 1% 미만의 라벨링 지수를 보였다.
- [0169] p53-양성 및 p53-음성 다형성 SPNs의 면역조직화학적 특징, 임상적 특징, 조직학적 특징을 비교하였지만, p53-양성 및 p53-음성 다형성 SPNs 사이에서 현저한 차이는 나타나지 않았다.

[0170] **실시예 4 : 세포학적(Cytologic) 특징 분석**

- [0171] 18건의 다형성 SPN 케이스 중 3건에서 채장 종양의 절제 전에 EUS-가이드된 미세 니들 흡인법을 수행하고 세포학적 특징을 살펴보았다. 3건 모두에서 오리지널 세포학적 진단은 SPN이었다.
- [0172] 도말(smearing) 테스트는 높은 세포성 도말(cellular smear)에 대한 백그라운드에서 부족한 세포질을 가진, 간헐적인 과염색(hyperchromatic) 및 다형성 핵을 보였다. 가지를 치고 있는 유두상엽(papillary fronds) 및 맥관 코어(vascular cores)를 가지는 작고 성긴 클러스터(small loose clusters) 또는 수많은 산발적 단일 세포(scattered single cells)와 함께 대부분 단형성(monomorphic) 세포로 구성되어 있었다. 큰 특이한 종양의 세포의 핵 대 세포질(Nuclear-to-cytoplasmic) 비율은 낮았고, 유사분열(mitoses)은 드물었다. 과염색 및 다형성 핵을 가지는, 이러한 특이한 단일 종양성 세포가 흡인세포검사(aspiration cytology) 케이스 3건 모두에서 관찰되었다.
- [0173] 다형성 종양 세포 외에도, 다형성 SPNs에서 세포검사 샘플에서 단형성 종양세포 또한 관찰되었다 (도 1F).

[0174] **실시예 5 : TP53 유전자 시퀀싱**

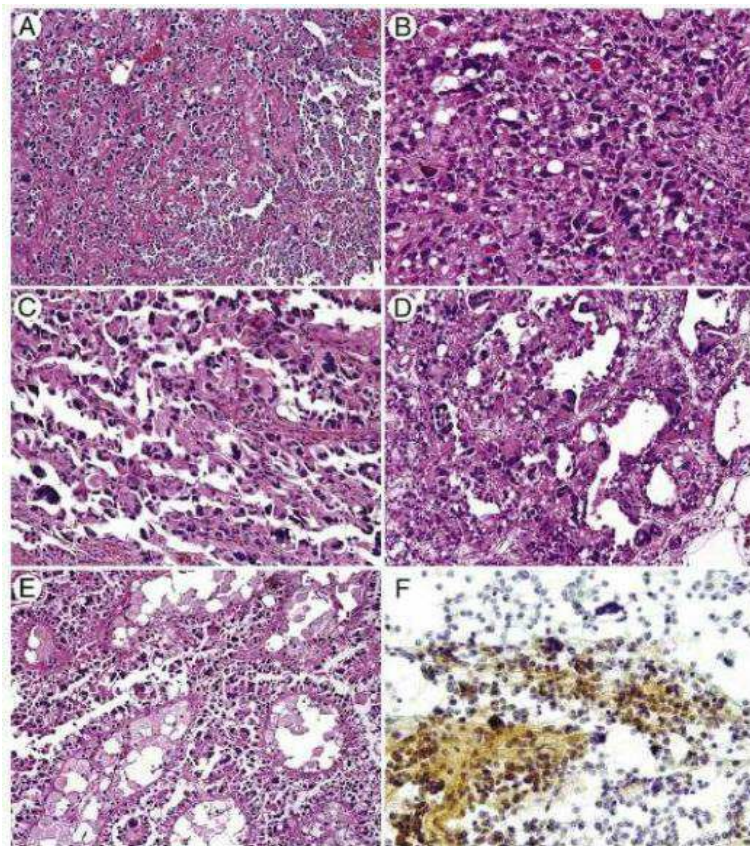
- [0175] 9개 p53 면역라벨링된 다형성SPNs 중 3개에서 TP53 유전자 시퀀싱을 수행하였다. 3개중 2개에서 TP53 유전자 변이를 포함하였다 (도 3).
- [0176] 하나의 종양은 엑손 6의 코돈 190에서 사이토신의 결실이 일어나 결과적으로 프레임 시프트 변이, p.Pro190Leufs*57 (c.569delC)에 따른 끝이 잘린(truncated) p53 단백질을 생산함을 보였다(Fig. 3A).
- [0177] 다른 종양은, p53의 DNA-결합 도메인 영역에 위치하는 엑손 7의 코돈 241에서 세린에서 알라닌으로 대체하는 변이(p.Ser241Ala, c.721TNG)를 보였다(도 3B).
- [0178] 이처럼, 핵 다형성 SPNs의 경우에는 일반형(비다형성) SPN보다 p53 면역반응성이 더 높고 TP53 유전자 변이를 포함하기도 한다. 그러나 다형성 SPN이 일반형 SPN보다 더 공격적이지는 않고, 낮은 유사분열 비율 및 Ki-67 라벨링 지수는 퇴행성 변화로서 핵 다형성을 시사한다.
- [0179] 그러므로, 본 발명에서 확인한 전형적인 악한 결합성 종양 세포 및 면역조직화학적 특징들은 다형성 SPN의 정확한 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

[0180]

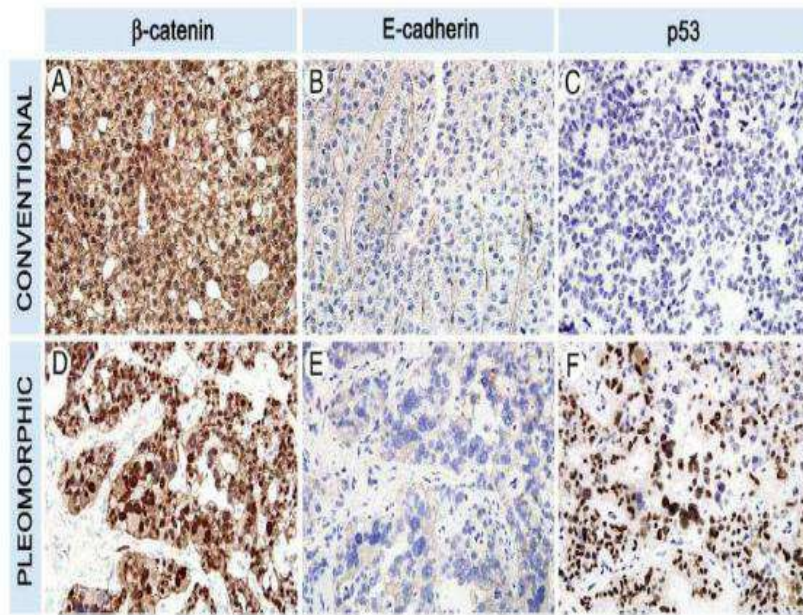
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

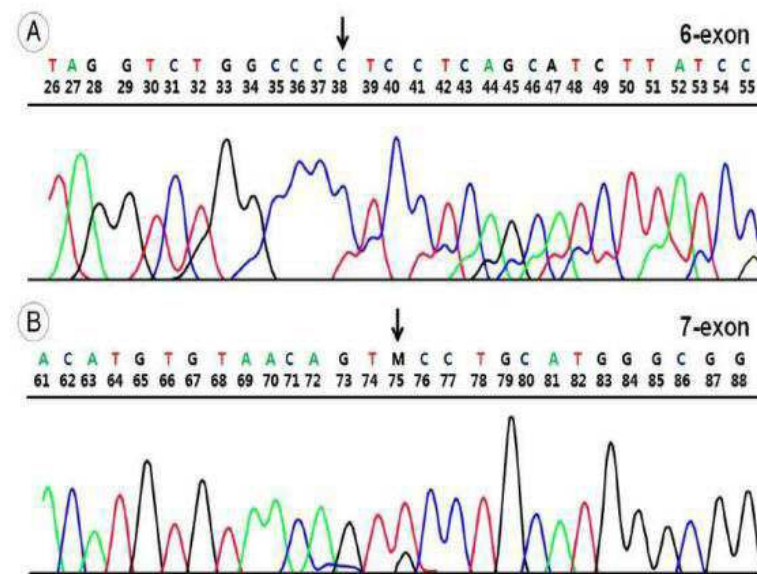
도면1



도면2



도면3



서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Ulsan University
- <120> Prognostic marker for diagnosis of pleomorphic solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas and selecting method for loading an anticancer drug on patch
- <130> pn1404-117
- <160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1182

<212> DNA

<213> P53 cDNA sequence

<400> 1

atggaggagc cgcagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca 60
gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg 120

gatgatttga tgcgtgtccc ggacgatatt gaacaatggt tcaactgaaga cccaggtcca 180
gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct cccccctgg cccctgcacc agcagctcct 240
acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggccccctgt catcttctgt ccttccag 300
aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag 360
tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt tttgccaact ggccaagacc 420
tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca cccccgccg gcacccgcgt ccgcgcatg 480
gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctgccc ccaccatgag 540

cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat 600
ttgcgtgtgg agtatgttga tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat 660
gagccgctg aggttggtc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt 720
tcttgcgtgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcatcacact ggaagactcc 780
agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgctgt tttgtgcctg tcctgggaga 840
gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc 900
ccaggagca ctaagcgagc actgccaac aacaccagct cctctcccca gccaaagaag 960

aaaccactgg atggagaata tttcacctt cagatccgtg ggcgtgagcg cttcgagatg 1020
ttccgagagc tgaatgagc cttggaactc aaggatgccc aggctgggaa ggagccaggg 1080
gggagcaggg ctactccag ccacctgaag tcaaaaaagg gtcagtctac ctccgccat 1140
aaaaaactca tgttcaagac agaagggcct gactcagact ga 1182

<210> 2

<211> 393

<212> PRT

<213> P53 aminoacid sequence(polypeptide sequence)

<400> 2

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln

1 5 10 15
 Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
 20 25 30
 Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
 35 40 45
 Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
 50 55 60
 Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
 65 70 75 80
 Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
 85 90 95
 Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
 100 105 110
 Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
 115 120 125
 Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
 130 135 140
 Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
 145 150 155 160

 Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
 165 170 175
 Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
 180 185 190
 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
 195 200 205
 Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220
 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser

 225 230 235 240
 Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270
 Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 275 280 285
 Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300

 Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320
 Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 325 330 335
 Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 340 345 350
 Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
 355 360 365
 Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met

 370 375 380
 Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 385 390