



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0098155
(43) 공개일자 2018년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/6837 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57423 (2013.01)
C12Q 1/6837 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-0021206
(22) 출원일자 2018년02월22일
심사청구일자 2018년02월22일
(30) 우선권주장
1020170025043 2017년02월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
사회복지법인 삼성생명공익재단
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
(72) 발명자
박웅양
서울특별시 강남구 일원로 81, 삼성서울병원 (일원동)
김진호
서울특별시 강남구 일원로 81, 삼성서울병원 (일원동)
(74) 대리인
리앤목특허법인

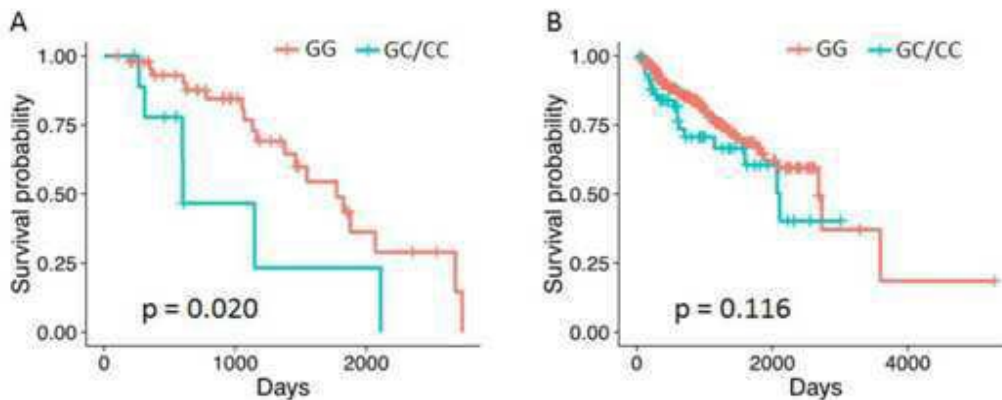
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 폐암 환자의 생존 예후 예측용 마커

(57) 요약

폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 마커, 조성물, 키트 및 이를 이용한 진단방법을 제공한다. 상기 마커를 이용한 진단은 폐암에 대한 유전자 검사를 통하여 화학 요법의 치료 방향을 제시하며, 치료 효과를 예측 및 극대화할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2018.05)

G01N 33/57484 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C2096

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발

연구과제명 선도형 암맞춤의료 프로그램의 임상적용

기 여 율 1/1

주관기관 삼성서울병원

연구기간 2016.12.01 ~ 2017.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질, 또는

서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를 특이적으로 검출할 수 있는 제제를 포함하는,

폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 p.D185H 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제인 것인 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 항체인 것인 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드를 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 c.553G>C 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제인 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드를 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산인 것인 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 안티센스 핵산은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 단편, 또는 이들에 상보적인 것인 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드를 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 10개 이상의 뉴클레오타이드를 갖는 것인 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 항암 화학 요법은 택센 (taxane)계 화합물을 투여하는 것인 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 키트.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 마이크로어레이 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것인 키트.

청구항 11

폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위하여,

개체로부터 분리된 생물학적 시료에서,

서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질, 또는

서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 단백질을 검출한 결과, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아미노산이 히스티딘, 또는

상기 폴리뉴클레오타이드를 검출한 결과, 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 뉴클레오타이드가 시토신인 경우,

상기 개체를 항암 화학 요법에 따른 생존 예후가 나쁜 위험군으로 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 제제를 사용하여 검출하는 것인 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 p.D185H 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제인 것인 방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 항체인 것인 방법.

청구항 16

청구항 11에 있어서, 상기 단백질을 검출하는 방법은 웨스턴 블랏팅, ELISA, 방사선 면역분석법, 방사선 면역확산법, 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS 또는 단백질 칩인 것인 방법.

청구항 17

청구항 11에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드의 c.553G>C 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제를 사용하여 검출하는 것인 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드의 c.553G>C 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산인 것인 방법.

청구항 19

청구항 11에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드를 검출하는 방법은 역전사 중합효소반응, 경쟁적 역전사 중합효소반응, 실시간 역전사 중합효소반응, RNase 보호 분석법(RPA), 노던 블랏팅 또는 DNA 칩인 것인 방법.

청구항 20

청구항 11에 있어서, 상기 항암 화학 요법은 탁센 (taxane)계 화합물을 투여하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 조성물, 키트, 및 이를 이용한 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하는 방법의 발명에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 개인의 다양한 유전체적 차이는 대부분 단일 뉴클레오티드 다형성 (single nucleotide polymorphism: SNP, 이하 SNP라고 함)으로 구성되는데 일부의 유전자형에서는 해당 단백질과 그 대사에서 기능적인 차이를 보이며 이는 약리 유전체적 대인적 감수성에 민감하게 작용하는 것으로 알려져 있다 (Huang and Ratain, CA Cancer J Clin 2009;59:42-55). 한편, 많은 항암제들이 효과적인 치료제로 사용되고 있지만 새롭게 대두되고 있는 문제점은 항암제에 대한 암세포의 내성 (resistance)이다 (Tsuruo et al., 1984). 항암제에 대한 내성은 장기적인 항암제 사용으로 약물내 노출된 세포들이 약물의 세포 내 축적을 감소시키거나 (Shen et al., 1986; Shen et al., 2000; Gottesman et al., 2002), 해독 작용 또는 배출을 활성화하거나 (Schuetz et al., 1996; Goto et al., 2002), 표적이 되는 단백질을 변형 (Urasaki et al., 2001) 시키는 등의 여러 가지 기전을 통하여 일어나게 된다. 이러한 과정은 암치료를 가장 큰 장애 요소일 뿐만 아니라 치료의 실패와도 깊은 관련이 있다. 약물에 대한 내성에 관여하는 다양한 기전 중에서도 다약물 내성 (MDR; Multi-Drug Resistance)이 중요한 부분을 차지하고 있다 (Brooks et al., 2003). 다약물 내성은 사용 중인 항암제뿐만 아니라 구조나 기능이 전혀 다른 다양한 항암제에도 내성을 보이는 현상을 말한다 (Biedler et al., 1975; Gottesman, 2002). 실제 암 환자에 화학 요법을 시도할 때 어떤 항암제가 효력을 발휘하지 못하는 경우에 이후 다른 항암제에 대해서도 내성을 보이는 사례가 빈번하며, 초기 치료 시 작용기전이 다른 여러 종류의 항암제를 동시에 투여하는 복합 화학 요법을 시도했음에도 불구하고 치료 효과가 없는 현상을 자주 관찰할 수 있다. 이로 인하여 사용 가능한 항암제의 범위가 매우 제한되는 것은 암의 화학 요법에 있어서 중요한 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 적합한 치료 반응성 표식자를 이용한 선별은 항암제 치료의 획기적인 진보를 초래할 수 있다. 이에, SNP 유전자형에 따른 개별 항암제의 치료 반응성에 관한 연구가 최근 지속적으로 활발하게 전개되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 일 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질, 또는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오티드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 검출할 수 있는 체제를 포함하는, 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 조성물을 제공한다.

[0004] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 키트를 제공한다.

[0005] 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질, 또는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오티드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드를 검출하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0006] 일 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0007] 상기 EZH2 단백질 변이체는 분리된 EZH2 단백질 변이체일 수 있다.

[0008] 상기 EZH2 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오티드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드인 것일 수 있다. 따라서, EZH2 단백질 변이체는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오티드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되어 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 EZH2 단백질 변이체인 것일 수 있다.

[0009] 용어, "EZH2 단백질 변이체"란 서열번호 1로 표시되는 EZH2 단백질의 아미노산 서열 일부에 변이가 일어난 것을 의미한다. 구체적으로, 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 EZH2 유전자 변이체에 의해 코딩되는 단백질인 것일 수 있고, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 변이체인 것일 수 있다.

[0010] 아미노산 치환은 하나 이상의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 변경되는 것에 의하여 아미노산 서열이 변경된 것을 의미한다. 아미노산 변이는, 미스센스 변이 (missense mutation,과오 변이), 잠재성 변이 (silent mutation), 넌센스 변이 (nonsense mutation), 중립 변이 (neutral mutation), 인트론에서 일어나는 변이, 격자이동 변이 (Frame shift mutation, 프레임 쉬프트) 등을 야기할 수 있다. 미스센스 변이는 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 변경되는 것에 의하여 다른 아미노산이 코딩되는 변경을 의미한다. 상기 EZH2 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 것으로, 미스센스 변이를 갖는 것일 수 있다.

[0011] EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) 단백질은 EZH2 유전자에 의해 코딩되는 히스톤-라이신 N-메틸트랜스퍼라제 (histone-lysine N-methyltransferase)이다. 상기 EZH2는 EC 2.1.1.43에 속하는 단백질인 것일 수 있다. EZH2는 DNA 메틸화에 관여하여 전사를 억제하는 기능을 한다. EZH2는 인간의 경우, (GRCh38/hg38) chr7:148,807,383-148,884,321의 핵산 서열, NCBI Accession number NM_004456의 핵산 서열, 또는 서열번호 2의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드인 것일 수 있다.

[0012] 상기 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오티드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드는 EZH2 유전자 변이체인 것일 수 있다.

[0013] 용어, "EZH2 유전자 변이체"란 서열번호 2로 표시되는 EZH2 유전자의 뉴클레오티드 서열 일부에 변이가 일어난 것을 의미한다. 구체적으로, 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 EZH2 유전자 변이체인 것일 수 있다.

[0014] 상기 EZH2 유전자 변이체는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에서 SNP를 포함하는 것일 수 있다. 상기 EZH2 유전자 변이체는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 SNP를 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 단일 염기 다형성 (single nucleotide polymorphism : SNP)는, 당업계에 통상적으로 알려진 의미로 사용된다.

SNP는 집단 내의 게놈에 존재하는 단일 뉴클레오타이드 다형성을 나타내는 것일 수 있다. 상기 SNP는 집단 내의 SNP의 소수 대립인자의 빈도가 7% 이상인 것일 수 있다.

- [0016] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 EZH2 단백질 변이체, 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 EZH2 유전자 변이체는 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 마커인 것일 수 있다.
- [0017] 용어 "마커"는 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측할 수 있는 표지를 의미한다. 상기 생존 예후는 항암 화학 요법에 따른 반응성 및 이에 따른 생존 예후인 것일 수 있다.
- [0018] 환자는 폐암이 발병한 환자를 의미한다. 상기 폐암은 폐에서 기원한 악성 종양을 의미하며, 편평상피암, 선암, 대세포암, 및 소세포암을 포함하는 것일 수 있다. 상기 마커는 편평상피암, 선암, 대세포암, 또는 소세포암 환자에 있어서, 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 마커인 것일 수 있다.
- [0019] 용어, "예후"는 폐암과 같은 질환의 발병, 재발, 전이성 확산, 및 약물 내성 또는 감수성을 비롯한 폐암-기인성 사망 또는 진행의 가능성 등의 병의 경과 및 완치 여부를 의미한다.
- [0020] 예후는 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 의미하는 것일 수 있고, 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 대한 반응성 및 이에 따른 생존 예후를 의미하는 것일 수 있다. 항암 화학 요법은 항암제를 이용하는 치료 요법을 의미하는 것일 수 있다. 예후는 예를 들면, 탁센 (taxane)계 화합물을 포함하는 항암제를 투여한 폐암 환자에서, 항암제에 대한 반응성 및 이에 따른 생존 예후를 의미하는 것일 수 있고, 도세탁셀을 포함하는 항암제를 투여한 폐암 환자에서 항암제에 대한 반응성 및 이에 따른 생존 예후를 의미하는 것일 수 있다. 상기 항암 화학 요법은 1차로 치료, 2차로 치료, 또는 3차로 치료된 것일 수 있다. 일반적으로 폐암이 진행성인 경우에는 항암 화학 요법으로 치료를 시행하고 있고, 도세탁셀, 파클리탁셀과 같은 탁센계 화합물을 투여하여 치료를 시행하고 있지만, 비슷한 임상적 특징 또는 비슷한 병기를 가지는 환자들 중에서도 항암 화학 요법에 대한 반응이 다양하고 생존 예후에 상당한 차이를 보인다. 상기 마커를 이용하는 경우 항암 화학 요법에 대한 반응성을 정확하게 예측할 수 있으며, 이에 따른 생존 예후를 용이하게 판단할 수 있어, 추가 필요한 치료 방법의 진행 방향을 손쉽게 결정할 수 있다. 이로써 폐암 발병 후의 생존율을 현저히 높일 수 있다.
- [0021] 용어, "예측"이란 환자가 항암 화학 요법 등 치료법에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응하여 생존할 가능성을 미리 판단하는 것을 의미한다. 생존 예후를 예측하는 것은 환자의 치료, 예를 들면 특정 항암제, 및/또는 원발성 종양의 수술로 제거, 및/또는 암 재발 없이 특정 시기 동안 항암 화학 요법으로 치료된 후 생존 여부 및/또는 가능성과 관련된다. 상기 마커를 이용하는 경우 폐암 환자에게 가장 적절한 치료 방법을 선택하도록 도움을 줄 수 있고, 특정 항암 화학 요법에 선호적으로 반응하는지 확인하거나, 항암 화학 요법을 투여한 후 환자의 장기 생존 여부를 예측할 수 있다.
- [0022] 유의성 있는 마커의 선택과 적용은 예측의 신뢰도를 결정할 수 있다. 유의성 있는 마커란 예측 결과가 정확하여 타당도 (validity)가 높고, 반복 측정 시에도 일관된 결과를 나타내도록 신뢰도 (reliability)가 높은 마커를 의미할 수 있다. 상기 마커로서, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질, 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드는, 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 정확하게 예측할 수 있는 신뢰도가 높은 마커이다.
- [0023] 다른 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질, 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를 특이적으로 검출할 수 있는 체제를 포함하는, 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0024] 용어, "단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 체제"란 개체의 시료 내에서 상기 단백질을 특이적으로 확인하거나 검출하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미한다. 상기 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 체제는 p.D185H 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 체제인 것일 수 있다.
- [0025] 용어, "단백질의 p.D185H 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 체제"란 개체의 시료 내에서 상기 단백질의 p.D185H 변이 부위를 특이적으로 확인하거나 검출하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미한다.
- [0026] 상기 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 체제는 EZH2 단백질 변이체, 예를 들어 EZH2 변이체의 p.D185H 변이

부위를 타겟(target)으로 하는 특정 화합물 또는 합성 물질일 수 있고, EZH2 단백질 변이체에 특이적인 항체일 수 있고, 서열번호 1의 단백질의 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 EZH2 단백질 변이체에 특이적인 항체일 수 있다.

[0027] 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 폴리펩티드 분자를 의미한다. 상기 EZH2 단백질 변이체에 특이적인 항체는, EZH2 단백질을 코딩하는 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현 벡터에 클로닝(cloning)하여 상기 유전자에 의해 코딩되는 EZH2 단백질을 얻고, 얻어진 EZH2 단백질 변이체로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 EZH2 단백질 변이체에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함하는 것일 수 있다. 상기 EZH2 단백질을 검출할 수 있는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이의 중쇄(heavy chain)를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0028] 용어, "폴리뉴클레오티드를 특이적으로 검출할 수 있는 제제"란 개체의 시료 내에서 상기 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 확인하거나 검출하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 c.553G>C 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제인 것일 수 있다.

[0029] 용어, "폴리뉴클레오티드의 c.553G>C 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제"란 개체의 시료 내에서 상기 폴리뉴클레오티드의 c.553G>C 변이 부위를 특이적으로 확인하거나 검출하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드의 c.553G>C 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드의 SNP 위치를 포함하고 상기 폴리뉴클레오티드로부터 선택된 10개 이상의 연속된 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 상기 SNP 부위는 서열번호 2에서 553번 위치의 뉴클레오티드인 것일 수 있다.

[0030] 상기 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 EZH2 유전자 변이체에 특이적으로 결합하는 물질, EZH2 유전자 변이체의 c.553G>C 변이 부위에 특이적으로 결합하는 물질, 또는 EZH2 유전자 변이체의 c.553G>C 변이 부위에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산인 것일 수 있다. 상기 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산은 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열의 553번 위치인 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오티드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고 다른 핵산 물질의 염기 서열에는 특이적 결합을 하지 않는 것일 수 있다.

[0031] 상기 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산은 통상의 기술자가 EZH2 유전자 변이체의 뉴클레오티드 서열을 바탕으로 디자인할 수 있다.

[0032] 용어, "프라이머"란 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 7 내지 50nt의 핵산 서열을 의미한다. 프라이머의 서열은 반드시 주형의 서열과 정확히 같을 필요는 없으며, 충분히 상보적이어서 주형과 혼성화될 수 있으면 된다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈(polymerase) 또는 역전사 효소(reverse transcriptase)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 3인산(nucleoside triphosphate)의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. 따라서, EZH2 유전자 변이체의 뉴클레오티드 서열 부위의 센스(sense) 및 안티센스(antisense) 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측할 수 있다.

[0033] 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(labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. 따라서, EZH2 유전자 변이체의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측할 수 있다.

[0034] 용어, "안티센스 핵산"은 타겟으로 하는 EZH2 유전자 변이체에 대한 상보적인 서열을 가지고 있어 EZH2 유전자 변이체와 이합체를 형성할 수 있는 핵산 기반의 분자를 의미하며, EZH2 유전자 변이체를 검출하는 데 사용될 수 있다.

- [0035] 상기 안티센스 핵산은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 단편, 또는 이들에 상보적인 것일 수 있다. 상기 단편은 5nt 이상, 10nt 이상, 10 내지 1000nt, 10 내지 500nt, 15 내지 500nt, 15 내지 300nt, 15 내지 200nt, 또는 15 내지 150nt의 뉴클레오타이드를 갖는 것일 수 있으나, 검출 특이성을 증가시키기 위하여 적절한 길이를 선택할 수 있다.
- [0036] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 키트를 제공한다.
- [0037] 상기 키트는 개체에서 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질, 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를 특이적으로 검출함으로써, 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측할 수 있다.
- [0038] 상기 키트에는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 특이적으로 인지하는 항체, 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산이 포함될 수 있고, 이에 추가로 분석에 적합한 1종 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0039] 구체적으로, 키트는 RT-PCR 키트, 마이크로어레이 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.
- [0040] 상기 RT-PCR 키트는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를 특이적으로 검출하기 위하여 RT-PCR을 수행하는데 요구되는 필수 요소를 포함할 수 있다. RT-PCR 키트는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드의 c.553G>C 변이 부위에 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물 (DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 상기 키트는 또한, 사용 설명서를 포함할 수 있다. 상기 사용 설명서는 예를 들면, 상기 특이적 프라이머를 사용한 증폭 반응에서 표적 서열이 증폭되고, 상기 비특이적 프라이머를 사용한 증폭 반응에서 표적 서열이 증폭되지 않는 경우, 증폭에 사용된 시료 중에서 폐암 환자의 항암제에 대한 반응성이 낮고, 이에 따른 생존 예후가 나쁜 것과 관련된 서열이 존재하는 것으로 결정하고, 그 결과로부터 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하는 것에 대한 설명을 포함한, 결과 판정에 대한 설명을 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 마이크로어레이 칩은 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 것일 수 있다. 마이크로어레이는 기관 표면의 구분된 영역에 상기 프로브가 높은 밀도로 고정화되어 있는 것을 의미한다. 상기 마이크로어레이는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드의 c.553G>C 변이 부위에 특이적인 프로브를 포함하는 것을 제외하고 통상적인 마이크로어레이의 구성을 포함할 수 있다.
- [0042] 또한, 마이크로어레이 상에서의 핵산의 혼성화 및 혼성화 결과의 검출은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 상기 검출은 핵산 시료를 형광 물질, 예를 들면, Cy3 및 Cy5와 같은 물질을 포함하는 검출 가능한 신호를 발생시킬 수 있는 표지 물질로 표지한 다음, 마이크로어레이 상에 혼성화하고 상기 표지 물질로부터 발생하는 신호를 검출함으로써 혼성화 결과를 검출할 수 있다. 상기 키트는 또한, 사용 설명서를 포함할 수 있다. 상기 사용 설명서는 예를 들면, 상기 완전 상보적인 프로브를 사용한 혼성화 반응에서 표적 서열이 검출되고, 상기 미스매치 프로브를 사용한 혼성화 반응에서 표적 서열이 검출되지 않는 경우, 시료 중에서 폐암 환자의 항암제에 대한 반응성이 낮고, 이에 따른 생존 예후가 나쁜 것과 관련된 서열이 존재하는 것으로 결정하고, 그 결과로부터 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하는 것에 대한 설명을 포함한, 결과 판정에 대한 설명을 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 단백질 칩 키트는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 발현수준을 측정할 수 있다. 단백질 칩 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광 물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 발색 효소로는 퍼옥시다아제 (peroxidase), 알칼라인 포스파타아제 (alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있다. 또한, 형광 물질로는 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질로는 ABTS (2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)), OPD (o-페닐렌디아민), TMB (테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다. 상기 키트

는 또한, 사용 설명서를 포함할 수 있다. 상기 사용 설명서는 항원-항체 반응 결과, 발색 또는 형광 수준에 기초하여 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하는 것에 대한 설명을 포함한, 결과 판정에 대한 설명을 포함할 수 있다.

- [0044] 다른 양상은, 폐암 환자에서 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하기 위하여, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질, 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0045] 용어, "개체"는 항암 화학 요법에 따른 생존 예후를 예측하고자 하는 폐암 환자를 의미한다. 상기 개체는 척추동물일 수 있고, 포유류, 양서류, 파충류, 조류 등일 수 있고, 포유동물일 수 있으며, 예를 들면 인간 (*Homo sapiens*), 한국인일 수 있다. 상기 폐암 환자는 병리학적 병기가 IV인 폐암 환자일 수 있다.
- [0046] 용어, "생물학적 시료"는 개체로부터 분리된 조직, 종양 조직, 폐 종양 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 단백질을 검출하는 방법은 상기 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 제제를 사용하여 검출하는 것일 수 있다. 상기 단백질을 검출하는 방법은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아스파르테이트(D)가 히스티딘(H)으로 치환된, p.D185H 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제를 사용하여 검출하는 것일 수 있다. 상기 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 상기 단백질을 검출하는 방법은 웨스턴 블랏팅 (Western blotting), 효소면역흡착법 (enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역분석법 (radioimmunoassay: RIA), 방사선 면역확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트 (rocket) 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석 (Immunoprecipitation Assay), 보체고정분석 (Complement Fixation Assay), 유세포분석 (Fluorescence Activated Cell Sorter: FACS), 단백질 칩 등을 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 방법은 상기 폴리뉴클레오타이드를 특이적으로 검출할 수 있는 제제를 사용하여 검출하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 방법은 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 SNP 위치의 뉴클레오타이드를 검출하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 방법은 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 구아닌(G)이 시토신(C)으로 치환된 c.553G>C 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제를 사용하여 검출하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드의 c.553G>C 변이 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 제제는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산일 수 있다.
- [0050] 상기 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 방법은 역전사 중합효소반응 (RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응 (Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응 (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RNase protection assay: RPA), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 등일 수 있다. 또는, 알려진 핵산의 뉴클레오타이드 서열 결정 방법 (sequencing method)에 의하여 SNP 위치의 뉴클레오타이드를 직접적으로 결정할 수 있다. 뉴클레오타이드 서열 결정 방법은 생거 (또는 디데옥시) 방법 또는 막삼-길버트 (화학 절단) 방법일 수 있다.
- [0051] 상기 방법은 상기 SNP 부위의 뉴클레오타이드를 결정한 결과 위험 대립인자가 존재하는 경우, 상기 개체를 항암 화학 요법에 따른 생존 예후가 나쁜 위험군으로 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 단백질을 검출한 결과, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 185번 위치의 아미노산이 히스티딘(H)이거나, 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 검출한 결과, 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 뉴클레오타이드가 시토신(C)인 경우, 상기 개체를 항암 화학 요법에 따른 생존 예후가 나쁜 위험군으로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0052] 용어 "위험 대립인자 (risk allele)"란 기준 대립인자를 소수 대립인자 a로 하여 폐암 환자에서의 a의 빈도가 다른 폐암 환자에서의 a의 발현 빈도보다 유의하게 큰 경우에는 a를 위험 대립인자로 할 수 있다. 개체가 위험 대립인자를 많이 가질수록 항암제에 대한 반응성이 낮고, 이에 대한 생존 예후가 나쁜 위험군으로 결정할 수 있다. 예를 들면, 폐암 환자에서 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 시토신(C)의 빈도가, 다른 폐암 환자에서 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 시토신(C)의 발현 빈도보다 유의하게 큰 경우에는 시토신(C)을 위험 대립인자로 할 수 있다. 개체가 C를 많이 가질수록 항암 화학 요법에 따른 생존 예후가 나쁜 위험군으로 결정할 수 있다.
- [0053] 항암 화학 요법에 따른 생존 예후가 나쁜 위험군으로 결정하는 것은, 항암 화학 요법에 따른 생존 예후의 상대적인 정도를 예측하기 위한 것일 수 있다. 예를 들면, 참조 유전체 서열을 갖고 있는 군에 비하여 항암 화학 요

법에 따른 생존 예후가 나쁜지를 예측하기 위한 것일 수 있다. 항암 화학 요법에 따른 생존 예후가 나쁘다는 것은 항암제에 대한 반응성이 낮고, 이에 따른 생존 예후가 나쁜 것일 수 있다. 생존 예후가 나쁜 것은 생존율이 낮은 것, 생존 기간이 짧은 것, 또는 무진행 생존 기간이 짧은 것을 의미하는 것일 수 있다. 항암제에 대한 반응성이 낮은 것은 항암제에 대한 내성을 갖는 것, 또는 항암제에 대한 감수성이 낮은 것을 의미하는 것일 수 있다. 예를 들면, 폐암 환자가 CC 또는 GC의 유전자형을 갖는 경우, GG의 유전자형을 갖는 경우에 비하여, 항암제에 대한 반응성이 낮고, 생존 예후가 나쁜지를 예측하기 위한 것일 수 있다.

[0054] 상기 항암제는 예를 들어, 카보플라틴(파라플라틴)[Carboplatin(paraplatin)], 시스플라틴(Cisplatin), 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 이포스파미드(Ifosfamide), 니드란(Nidran), 질소머스타드(메클로레타민 염산염)[Nitrogen mustar(MechlorethamineHCL)], 블레오마이신(Bleomycin), 독소루비신(Doxorubicin), 미토마이신 C(Mitomycin C), 시타라빈(Cytarabine), 플루로우라실(Fluorouracil), 겐시타빈(Gemcitabine), 트리메트렉세이트(Trimetrexate), 메토크렉세이트(Methotrexate), 에토포시드(Etoposide), 빈블라스틴(Vinblastine), 비노렐빈(vinorelbine), 알림타(Alimta), 알트레타민(Altretamine), 프로카바진(Procarbazine), 탁솔(Taxol), 탁소텔(Taxotere), 토포테칸(Topotecan), 이리노테칸(Irinotecan), 베바시주맙(Bevacizumab), 게피티닙(Gefitinib), 엘로티닙(Erlotinib), 피시바닐 바이알(Picibanil Vial), 아크라루비신(Aclarubicin), 테가푸르(Tegafur), 에피루비신(Epirubicin), 베로테칸(Belotecan), 안트라사이클린(anthracycline), 이다루비신(idarubicin), 닥티노마이신(dactinomycin)일 수 있으며, 탁센(taxane)계 화합물일 수 있다. 상기 항암제는 구체적으로, 도세탁셀(Docetaxel, taxotere) 또는 파클리탁셀(Paclitaxel, Taxol)일 수 있다. 도세탁셀은 세포 분열시 염색체를 양극으로 운반하게 하는 미세소관의 생성을 방해하여 정상 세포보다 분열이 잦은 암세포를 사멸시킬 수 있다. 마찬가지로, 파클리탁셀은 세포 분열을 방해하여 암세포를 사멸시킬 수 있다.

발명의 효과

[0055] 상기 SNP는 항암 화학 요법의 반응과 생존율을 예측할 수 있는 바이오 마커로 적용이 가능하다. 상기 SNP를 분석함으로써 항암 화학 요법에 효과가 있는 환자군을 선별하고, 폐암 환자의 치료 방향을 제시하는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1a는 도세탁셀을 투여한 환자군 내에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 p.D185H 변이를 갖는 환자군 및 p.D185H 변이를 갖지 않는 환자군에서의 카플란 메이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선을 나타낸다. 도 1b는 도세탁셀을 투여하지 않은 환자군 내에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 p.D185H 변이를 갖는 환자군 및 p.D185H 변이를 갖지 않는 환자군에서의 카플란 메이어 생존 곡선을 나타낸다. 도 1에 있어서, "p-값"은 상기 SNP의 유전형의 분포가 도세탁셀을 투여한 군과 도세탁셀을 투여하지 않은 군에서 유의하게 차이가 나는지에 대한 검증의 결과인 p-값(p-value)을 의미한다.

도 2는 p.D185H 변이를 갖는 EZH2 단백질의 단백질 복합체 형성 여부를 확인한 것이다.

도 3은 p.D185H 변이를 갖는 EZH2 단백질 및 p.D185H 변이를 갖지 않는 EZH2 단백질에서 항암 화학 요법의 반응성을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0058] [실시예]

[0059] 실시예 1. D185H 변이를 갖는 폐암 환자에서 항암제 투여에 따른 생존율 확인

[0060] 1. 폐암 환자의 통합 데이터 구축

[0061] 삼성 서울 병원에서 폐암으로 진단 받은 환자 총 378명, 항암 화학 요법으로 도세탁셀을 투여한 환자군 57명과 도세탁셀을 투여하지 않은 환자군 321명을 대상으로 유전체 데이터 및 상기 환자들의 임상평가, 진단 및 치료 기록을 통합하여, 통합 데이터를 구축하였다.

[0062] 상기 폐암으로 진단받은 환자 총 378명의 폐 종양 조직을 수득하였다. 이어서, QiAmp DNA 키트(Qiagen, Germany)를 이용하여, 상기 378명의 폐 종양 조직으로부터 유전체 DNA를 수득하였다. Covaris S220(Covaris,

MA, USA)를 사용하여 각 종양 조직으로부터 확보한 유전체 DNA (약 250ng)를 전단 (shearing)한 후, 말단을 평활화 시키고 (end-repair), A를 결합시키고 (A-tailing), 양 말단에 특이적인 어댑터 (adaptor)를 결합 (ligation)시키고, 이를 증폭하여 시퀀싱을 위한 라이브러리를 제작하였다. Miseq 게놈 분석기 (Illumina, US A)를 사용하여 제작된 라이브러리를 대상으로 시퀀싱을 수행하였다. 이 때, UCSC assembly hg19 (GRCh37)를 참조 게놈 (<http://genome.ucsc.edu>)으로 사용하였다. 게놈 분석기에서 획득한 시퀀싱 리드 (reads) 데이터를 버로우-휠러-정렬 (Burrows-Wheeler Aligner : BWA) 알고리즘을 사용하여 UCSC assembly hg19 (GRCh37) 참조 게놈에 정렬하였다 (<http://genome.ucsc.edu>). PCR duplication은 Picard-tools-1.8 (<http://picard.sourceforge.net/>)를 사용하여 제거하였으며, GATK-2.2.9 알고리즘을 사용하여 단일 뉴클레오타이드 변이 (Single Nucleotide Variation : SNV) 및 삽입-결실 변이 (Indel)를 검출하였다.

[0063] 상기 378명의 폐암 환자의 진단 및 치료 기록을 수득하였다. 상기 폐암으로 진단받은 환자 모두는 항암 화학 요법 전에 방사선 요법을 받지 않았다. 항암 화학 요법으로 도세탁셀을 투여한 환자군 57명에 대한 폐암 병기 시스템에 따른 분류는 다음과 같다: 단계 I 6례; 단계 II 1례; 단계 III 1례; 단계 IV 46례. 항암 화학 요법으로 도세탁셀을 투여한 환자군은, 60 내지 75mg/m²의 도세탁셀을 5%의 덱스트로스 (dextrose)를 함유하는 증류수와 혼합하여, 3주 간격으로 1시간에 걸쳐 정맥 주사하였다. 도세탁셀을 투여하지 않은 환자군은, 시스플라틴 (cisplatin) 또는 페메트렉시드 (pemetrexed)를 투여받았다. 질병 진행, 독성 여부, 또는 환자 또는 의사의 결정을 고려하여, 항암 화학 요법을 중단하였다.

[0064] 상기 폐암으로 진단 받은 환자 총 378명의 유전체 데이터 및 상기 환자들의 임상평가, 진단 및 치료 기록을 통합하였다. 통합된 데이터를 원 (raw data)로 사용하고, 상기 원 데이터로부터 항암제와 전반적인 생존에 대한 연관성을 분석한 후, 유의한 변이를 탐색하였다.

[0065] 2. 통계 분석

[0066] 유전자형과 생존율 사이의 연관성은 HR 위험도 (Hazard ratios :HR) 및 95% 신뢰도 (CIs)를 사용하여 측정하였다. 유전자형에 따른 생존율의 차이는 로그 순위 (log-rank) 검정을 이용하여 비교하였다. 유전자형에 따른 생존율을 카플란 메이어 (Kaplan-Meier) 방법을 이용하여 계산하였다. 모든 분석은 R 통계분석 시스템을 이용하였다.

[0067] 3. 폐암 환자의 SNP가 항암 화학 요법의 반응성 및 생존율에 미치는 영향 확인

[0068] 도세탁셀을 투여받은 폐암 환자의 성별, 나이, 병리학적 특성을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

임상변수	카테고리	EZH2 D185H (+)		EZH2 D185H (-)	
		환자수	%	환자수	%
성별	남성	7	70	26	55.3
	여성	3	30	21	44.7
나이	< 60	7	70	19	40.4
	60	3	30	28	59.6
병리학적 병기	IV	9	90	37	78.7
	III	0	0	1	2.1
	II	0	0	1	2.1
	I	1	10	5	10.6
	NA	0	0	3	6.4

[0070] 생존율과 SNP의 연관성을 분석하였다. 이 때, 생존기간은 진단일과 사망일 또는 최종 진료일 사이의 시간으로 기록하였다.

[0071] 도 1a은 도세탁셀을 투여한 환자군 내에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 p.D185H 변이를 갖는 환자군 및 p.D185H 변이를 갖지 않는 환자군에서의 카플란 메이어 (Kaplan-Meier) 생존 곡선을 나타낸다. 도 1a을 참조하면, 도세탁셀을 투여한 폐암 환자군에서, EZH2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 유전자형이 GC 또는 CC인 경우, GG인 경우에 비하여, HR 위험도가 약 2.9 배 높았다. 또한, EZH2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 유전자형이 GC 또는 CC인 경우, GG인 경우에 비하여, 평균 생존기간이 약 2.9배 이상 짧았다.

[0072] 이로부터, EZH2의 SNP, rs2302427는 생존율과 연관성이 높은 것을 알 수 있다. 즉 G 대립인자에 비하여 C 대립

인자를 가질 때, 항암 화학 요법에 대한 반응성 및 이에 따른 HR 위험도가 약 2.9배 높은 것을 알 수 있다. GC 또는 CC 유전자형을 가지는 환자의 경우, 도세탁셀에 대한 항암제 내성을 가지는 것으로 판단된다.

[0073] 도 1b는 도세탁셀을 투여하지 않은 환자군 내에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 p.D185H 변이를 갖는 환자군 및 p.D185H 변이를 갖지 않는 환자군에서의 카플란 메이어 생존 곡선을 나타낸다. 도 1b를 참조하면, 도세탁셀을 투여하지 않은 폐암 환자군에서, EZH2의 뉴클레오타이드 서열에서 553번 위치의 유전자형이 GC 또는 CC인 경우, GG인 경우에 비하여, HR 위험도에 유의한 차이를 보이지 않았다.

[0074] 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 SNP는 마커는, 상기 SNP를 갖는 폐암 환자군에 도세탁셀을 투여한 경우 그 대한 반응성 및 생존 예후에 유의한 차이가 있음이 확인되어, 도세탁셀에 대한 반응성 및 이에 따른 생존 예후를 예측하기 위한 마커로 작용함을 확인하였다.

표 2

EZH2 rs2302427	도세탁셀을 투여한 군					도세탁셀을 투여하지 않은 군				
	발생수	평균 생존 기간 (일) (95%CI)	로그 순위 p	HR (95%CI)	P	발생수	평균 생존 기간 (일) (95%CI)	로그 순위 p	HR (95%CI)	P
GG	47	1773 (1376, NA)	0.020	1.00	0.026	262	2681 (2069, NA)	0.12	1.00	0.12
GC/CC	10	602 (597, NA)		2.933 (1.134, 7.584)		59	2110 (1596,NA)		1.53 (0.90, 2.61)	

[0076] 표 2는 폐암 환자 378명에 대하여, SNP 위치에서 GG 또는 GC/CC 유전자형을 가지는 환자수, 평균 생존 기간 등을 나타내는 표이다. 표 2에 나타난 SNP는 rs 번호 rs2302427를 갖고, p.D185H 및 c.553G>C의 변이를 갖는다. 표 2에 있어서, rs 번호는 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, national center for biotechnology information) 진뱅크 (GENEBANK)에 등록된 SNP의 번호로서, 상기 서열번호에 나타난 서열은 SNP를 포함하는 이들 서열의 일부를 나타낸 것이다. 당업자라면, rs 번호를 참조하여 SNP의 위치 및 서열을 용이하게 확인할 수 있다. 서열번호로 표시되는 서열은 NCBI 진뱅크 등록번호 (rs 번호)에 의하여 나타내어지는 서열의 일부로서 SNP 부위를 포함하는 서열이다. 표 2에 있어서, "p-값"은 상기 SNP의 유전형의 분포가 도세탁셀을 투여한 군과 도세탁셀을 투여하지 않은 군에서 유의하게 차이가 나는지에 대한 검증의 결과인 p-값 (p-value)을 의미한다.

[0077] 이러한 결과는 확인된 SNP가 항암 화학 요법의 반응과 생존율을 예측할 수 있는 조직학적 특이성을 가진 바이오 마커로 적용이 가능하다는 것을 보여준다. 특히, 상기 SNP는 도세탁셀 항암 화학 요법으로 치료한 폐암 환자에 있어서, 항암 화학 요법 반응과 생존을 예측하는 생체 지표로 사용될 수 있다. 따라서, 상기 SNP의 분석은 도세탁셀 항암 화학 요법에 효과가 있는 소그룹의 선별에 유용할 것이며, 말기 폐암 환자의 치료 요법을 결정하는 데에도 도움이 될 수 있다.

[0078] 4. 폐암 환자의 SNP가 단백질 복합체 형성에 미치는 영향 확인

[0079] EZH2는 대부분의 히스톤 메틸화 효소가 가지고 있는 SET domain을 가진 효소로, Suz12, EED, RbAp48/46 등과 함께 복합체를 이루어 히스톤 H3의 27번째 라이신(K) 잔기를 메틸화 시키며, 히스톤 공유변형을 유발할 뿐만 아니라, DNA 메틸화 효소인 DNMT와 결합으로 인한 DNA 메틸화를 유도하여 유전자 발현을 억제한다. 따라서, EZH2의 SNP가 단백질 복합체 형성, 즉 Suz12, EED, RbAp48/46 등과의 결합력 여부에 영향을 미치는지 확인하기 위해 면역침강법을 수행하였다.

[0080] 4-1. EZH2 클로닝

[0081] 전장 인간 EZH2를 코딩하는 cDNA 클론을 Origene社로부터 구매하여 준비하였다. EZH2 돌연변이체(mutants), 특히 D185H(GAC→CAG)는 QuikChangeSite-Directed Mutagenesis kit(Stratagene)를 사용하여 생성하였으며, 돌연변이 여부를 시퀀싱을 통해 확인하였다.

[0082] 4-2. 세포배양 및 형질도입(transfection)

[0083] 폐선암종 세포주인 NCI-H23와 293T 세포주를 각각 10% FBS, 100 U/ml 페니실린, 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 함유된 RPMI-1640 및 DMEM에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂로 유지시켰다. 이후, EZH2를 과발현 시키기 위해, GFP-표지된 wild type EZH2 및 EZH2 돌연변이체(D185H)를 발현하는 플라스미드를 제조사의 지시에 따라 Nucleofector 용액(Amaxa) 또는 리포펙타민(Liopofectamine) 3000(Invitrogen)를 사용하여 세포 내로 형질도입 시켰다.

[0084] **4-3. 상호면역침전(Co-immunoprecipitation)**

[0085] 형질도입 후, 48시간에 293T 세포를 용해 완충액에서 20분 동안 용해시킨 후, 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 원심분리 하였다. 세포 용해물을 단백질 G 마그네틱 비드(magnetic beads)(Thermo Fisher Scientific) 및 GFP 항체(Abcam) 2 μ g과 혼합하여 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양하였다. magnetic을 이용하여 면역 복합체를 수집하고 세척 완충제로 2 회 세척하였다. 전체 세포 용해물 및 단백질 복합체와 관련된 비드를 SDS-PAGE로 분리하고 적절한 항체를 이용하여 면역 블로팅하였다.

[0086] **4-4. 면역블롯 방법(Immunoblotting assay)**

[0087] GFP, EED, EZH2 (Abcam), 및 SUZ12 (Cell signaling)을 사용하여 단백질 블로팅을 수행하였다. Horseradish peroxidase (HRP)-컨쥬게이트 2차 항체(Bio-Rad)를 사용하여 1차 항체를 검출하고, 면역염색된(Immunostained) 단백질은 ECL 검출 시스템 (Thermo Fisher Scientific)으로 시각화 하였다.

[0088] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 단백질 복합체의 구성 요소인 Suz12 및 EED의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있다. 즉, EZH2의 SNP, rs2302427는 단백질 복합체의 형성력을 감소시킬 수 있다.

[0089] **5. 폐암 환자의 SNP가 항암 화학 요법의 저항성에 미치는 영향 확인**

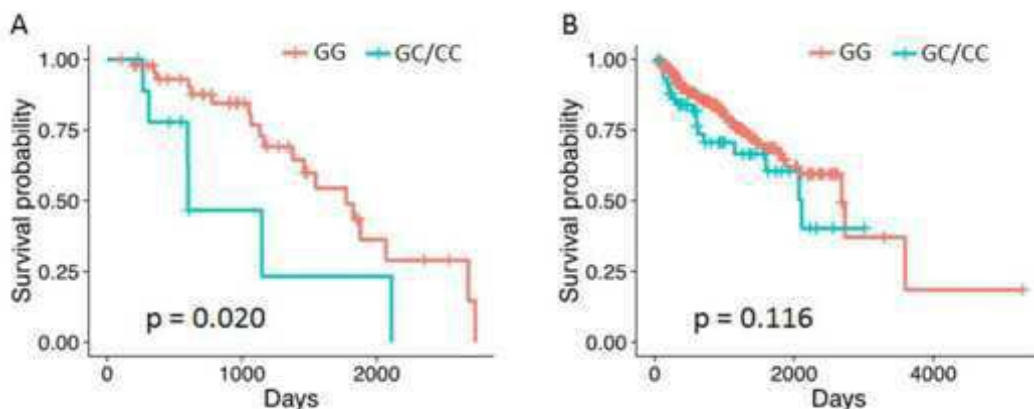
[0090] EZH2의 SNP, rs2302427가 항암제에 대하여 저항성을 갖는지 여부를 확인하기 위하여, p.D185H 변이를 갖는 EZH2가 형질도입된 NCI-H23 세포 및 p.D185H 변이를 갖지 않는 EZH2가 형질도입된 NCI-H23 세포를 96-well plate에 5x10³ cell/well의 밀도로 3중 분주(seeding)하였다. 이후, 세포에 GSK126(10 μ M), GSK343(10 μ M), 도세탁셀(5 μ M), 및 파클리탁셀(10 μ M)을 48시간 동안 처리하였다. 세포 성장을 Cell Counting Kit-8 (Dojindo)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 분석하였다.

[0091] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, p.D185H 변이를 갖는 EZH2가 형질도입된 세포는 p.D185H 변이를 갖지 않는 EZH2가 형질도입된 세포에 비하여 모든 항암제에서 세포 증식이 더 활발한 것을 확인할 수 있었다. 즉, EZH2의 SNP는 항암제에 대하여 내성을 가지는 바, 항암 화학 요법으로 치료한 폐암 환자에 있어서, 항암 화학 요법 반응과 생존을 예측하는 생체 지표로 사용될 수 있다.

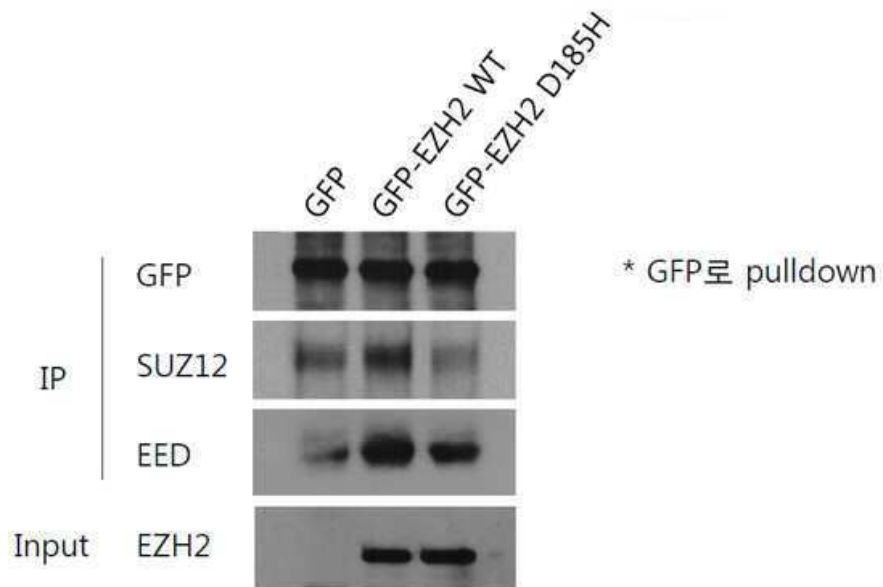
[0092] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

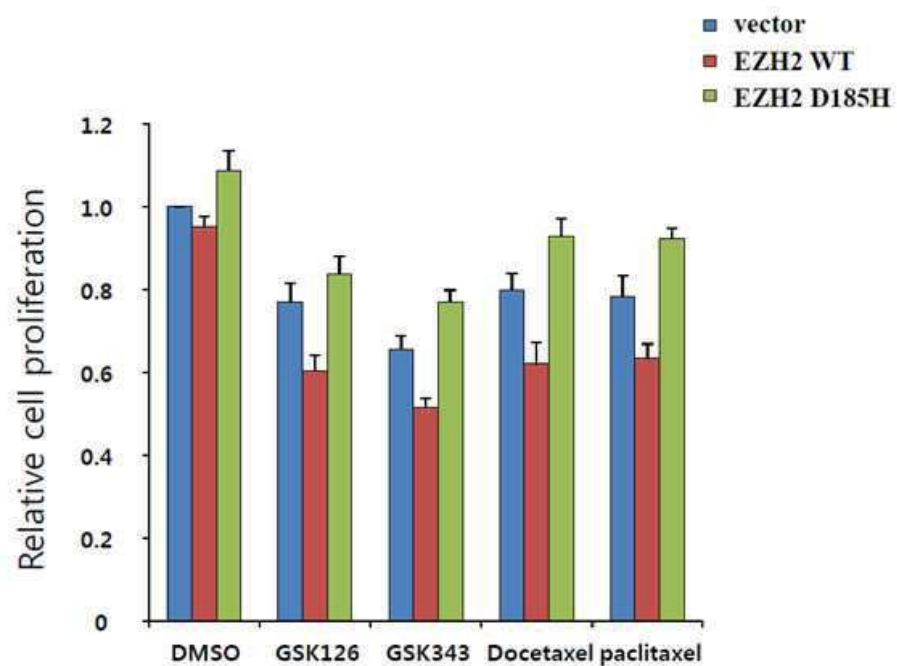
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Samsung Life Public Welfare Foundation
- <120> Markers for predicting survival in a patient with lung cancer
- <130> PN121147
- <150> KR 10-2017-0025043

<151> 2017-02-24

<160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 751

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Gln Thr Gly Lys Lys Ser Glu Lys Gly Pro Val Cys Trp Arg

1 5 10 15

Lys Arg Val Lys Ser Glu Tyr Met Arg Leu Arg Gln Leu Lys Arg Phe

20 25 30

Arg Arg Ala Asp Glu Val Lys Ser Met Phe Ser Ser Asn Arg Gln Lys

35 40 45

Ile Leu Glu Arg Thr Glu Ile Leu Asn Gln Glu Trp Lys Gln Arg Arg

50 55 60

Ile Gln Pro Val His Ile Leu Thr Ser Val Ser Ser Leu Arg Gly Thr

65 70 75 80

Arg Glu Cys Ser Val Thr Ser Asp Leu Asp Phe Pro Thr Gln Val Ile

85 90 95

Pro Leu Lys Thr Leu Asn Ala Val Ala Ser Val Pro Ile Met Tyr Ser

100 105 110

Trp Ser Pro Leu Gln Gln Asn Phe Met Val Glu Asp Glu Thr Val Leu

115 120 125

His Asn Ile Pro Tyr Met Gly Asp Glu Val Leu Asp Gln Asp Gly Thr

130 135 140

Phe Ile Glu Glu Leu Ile Lys Asn Tyr Asp Gly Lys Val His Gly Asp

145 150 155 160

Arg Glu Cys Gly Phe Ile Asn Asp Glu Ile Phe Val Glu Leu Val Asn

165 170 175

Ala Leu Gly Gln Tyr Asn Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp

180 185 190

Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys Gln Lys Asp Leu Glu Asp His Arg Asp
195 200 205

Asp Lys Glu Ser Arg Pro Pro Arg Lys Phe Pro Ser Asp Lys Ile Phe
210 215 220

Glu Ala Ile Ser Ser Met Phe Pro Asp Lys Gly Thr Ala Glu Glu Leu
225 230 235 240

Lys Glu Lys Tyr Lys Glu Leu Thr Glu Gln Gln Leu Pro Gly Ala Leu
245 250 255

Pro Pro Glu Cys Thr Pro Asn Ile Asp Gly Pro Asn Ala Lys Ser Val
260 265 270

Gln Arg Glu Gln Ser Leu His Ser Phe His Thr Leu Phe Cys Arg Arg
275 280 285

Cys Phe Lys Tyr Asp Cys Phe Leu His Arg Lys Cys Asn Tyr Ser Phe
290 295 300

His Ala Thr Pro Asn Thr Tyr Lys Arg Lys Asn Thr Glu Thr Ala Leu
305 310 315 320

Asp Asn Lys Pro Cys Gly Pro Gln Cys Tyr Gln His Leu Glu Gly Ala
325 330 335

Lys Glu Phe Ala Ala Ala Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Thr Pro Pro
340 345 350

Lys Arg Pro Gly Gly Arg Arg Arg Gly Arg Leu Pro Asn Asn Ser Ser
355 360 365

Arg Pro Ser Thr Pro Thr Ile Asn Val Leu Glu Ser Lys Asp Thr Asp
370 375 380

Ser Asp Arg Glu Ala Gly Thr Glu Thr Gly Gly Glu Asn Asn Asp Lys
385 390 395 400

Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asp Glu Thr Ser Ser Ser Ser Glu Ala Asn
405 410 415

Ser Arg Cys Gln Thr Pro Ile Lys Met Lys Pro Asn Ile Glu Pro Pro
420 425 430

Glu Asn Val Glu Trp Ser Gly Ala Glu Ala Ser Met Phe Arg Val Leu
435 440 445

Ile Gly Thr Tyr Tyr Asp Asn Phe Cys Ala Ile Ala Arg Leu Ile Gly
450 455 460

Thr Lys Thr Cys Arg Gln Val Tyr Glu Phe Arg Val Lys Glu Ser Ser
465 470 475 480

Ile Ile Ala Pro Ala Pro Ala Glu Asp Val Asp Thr Pro Pro Arg Lys
485 490 495

Lys Lys Arg Lys His Arg Leu Trp Ala Ala His Cys Arg Lys Ile Gln
500 505 510

Leu Lys Lys Asp Gly Ser Ser Asn His Val Tyr Asn Tyr Gln Pro Cys
515 520 525

Asp His Pro Arg Gln Pro Cys Asp Ser Ser Cys Pro Cys Val Ile Ala
530 535 540

Gln Asn Phe Cys Glu Lys Phe Cys Gln Cys Ser Ser Glu Cys Gln Asn
545 550 555 560

Arg Phe Pro Gly Cys Arg Cys Lys Ala Gln Cys Asn Thr Lys Gln Cys
565 570 575

Pro Cys Tyr Leu Ala Val Arg Glu Cys Asp Pro Asp Leu Cys Leu Thr
580 585 590

Cys Gly Ala Ala Asp His Trp Asp Ser Lys Asn Val Ser Cys Lys Asn
595 600 605

Cys Ser Ile Gln Arg Gly Ser Lys Lys His Leu Leu Leu Ala Pro Ser
610 615 620

Asp Val Ala Gly Trp Gly Ile Phe Ile Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn
625 630 635 640

Glu Phe Ile Ser Glu Tyr Cys Gly Glu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala
645 650 655

Asp Arg Arg Gly Lys Val Tyr Asp Lys Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe
660 665 670

Asn Leu Asn Asn Asp Phe Val Val Asp Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys
675 680 685

Ile Arg Phe Ala Asn His Ser Val Asn Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val

690 695 700
Met Met Val Asn Gly Asp His Arg Ile Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala
705 710 715 720
Ile Gln Thr Gly Glu Glu Leu Phe Phe Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Ala
725 730 735
Asp Ala Leu Lys Tyr Val Gly Ile Glu Arg Glu Met Glu Ile Pro
740 745 750

<210> 2

<211> 2256

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgggccaga ctgggaagaa atctgagaag ggaccagttt gttggcggaa gcgtgtaaaa 60
tcagagtaca tgcgactgag acagctcaag aggttcagac gagctgatga agtaaagagt 120
atgttttagtt ccaatcgta gaaaattttg gaaagaacgg aaatcttaaa ccaagaatgg 180
aaacagcgaa ggatacagcc tgtgcacatc ctgacttctg tgagctcatt gcgcgggact 240
agggagtgtt cggtgaccag tgacttggat ttccaacac aagtcatccc attaaagact 300
ctgaatgcag ttgcttcagt acccataatg tattcttggg ctcacctaca gcagaatttt 360

atggtggaag atgaaactgt ttacataac attccttata tgggagatga agtttttagat 420
caggatggta ctttcattga agaactaata aaaaattatg atgggaaagt acacggggat 480
agagaatgtg ggtttataaa tgatgaaatt ttgtggagt tggatgaatgc ccttgggtcaa 540
tataatgatg atgacgatga tgatgatgga gacgatcctg aagaaagaga agaaaagcag 600
aaagatctgg aggatcaccg agatgataaa gaaagccgcc cacctcggaa atttccttct 660
gataaaatth ttgaagccat ttctcaatg ttccagata agggcacagc agaagaacta 720
aaggaaaaat ataaagaact caccgaacag cagctccag gcgcacttcc tctgaaatgt 780

acccccaaca tagatggacc aaatgctaaa tctgttcaga gagagcaaag ctacactcc 840
tttcatacgc ttttctgtag gcgatgtttt aaatatgact gcttcctaca tcgtaagtgc 900
aattattctt ttcattgcaac acccaacact tataagcgga agaacacaga aacagctcta 960
gacaacaaac ctgttgacc acagtgttac cagcatttgg agggagcaaa ggagtgtgct 1020
gctgctctca ccgtgagcg gataaagacc ccacaaaac gtccaggagg ccgcagaaga 1080
ggacggcttc ccaataacag tagcaggccc agcaccacca ccattaatgt gctggaatca 1140

aaggatacag acagtgatag ggaagcaggg actgaaacgg ggggagagaa caatgataaa	1200
gaagaagaag agaagaaaga tgaacttcg agtcctctg aagcaaattc tcggtgtcaa	1260
acaccaataa agatgaagcc aaatatigaa cctcctgaga atgtggagtg gagtgggtgt	1320
gaagcctcaa tgtttagagt cctcattggc acttactatg acaatttctg tgccattgct	1380
aggttaattg ggaccaaacc atgtagacag gtgtatgagt ttagagtcaa agaactctagc	1440
atcatagctc cagctccgcg tgaggatgtg gatactcctc caaggaaaaa gaagaggaaa	1500
caccggttgt gggctgcaca ctgcagaaag atacagctga aaaaggacgg ctctctaac	1560
catgtttaca actatcaacc ctgtgatcat ccacggcagc cttgtgacag ttcgtgcct	1620
tggtgatag cacaaaattt ttgtgaaaag tttgtcaat gtagttcaga gtgtcaaac	1680
cgctttccgg gatgccgtg caaagcacag tgcaacacca agcagtgccg gtgctacctg	1740
gctgtccgag agtgtgacc tgacctctgt ctacttgtg gagccgtga ccattgggac	1800
agtaaaaatg tgcctgcaa gaactgcagt attcagcggg gctccaaaa gcactctattg	1860
ctggcaccat ctgacgtggc aggctggggg atttttatca aagatcctgt gcagaaaaat	1920
gaattcatct cagaatactg tggagagatt atttctcaag atgaagctga cagaagaggg	1980
aaagtgtatg ataaatacat gtgcagcttt ctgttcaact tgaacaatga ttttgtggtg	2040
gatgcaacc gcaagggtaa caaaattcgt ttgcaaacc attcggtaaa tccaaactgc	2100
tatgcaaaag ttatgatggt taacggtgat cacaggatag gtatttttgc caagagagcc	2160
atccagactg gcgaagagct gttttttgat tacagataca gccaggctga tgccctgaag	2220
tatgtcggca tcgaaagaga aatggaaacc ccttga	2256