



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0022012
(43) 공개일자 2024년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57419 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0099804
(22) 출원일자 2022년08월10일
심사청구일자 2022년08월10일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
명승재
서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 24동 803호
(압구정동, 현대아파트)
정덕범
서울특별시 영등포구 선유서로24길 6, 101동 702호
(양평동1가, 영등포 중흥 S-CLASS)
(74) 대리인
이명진

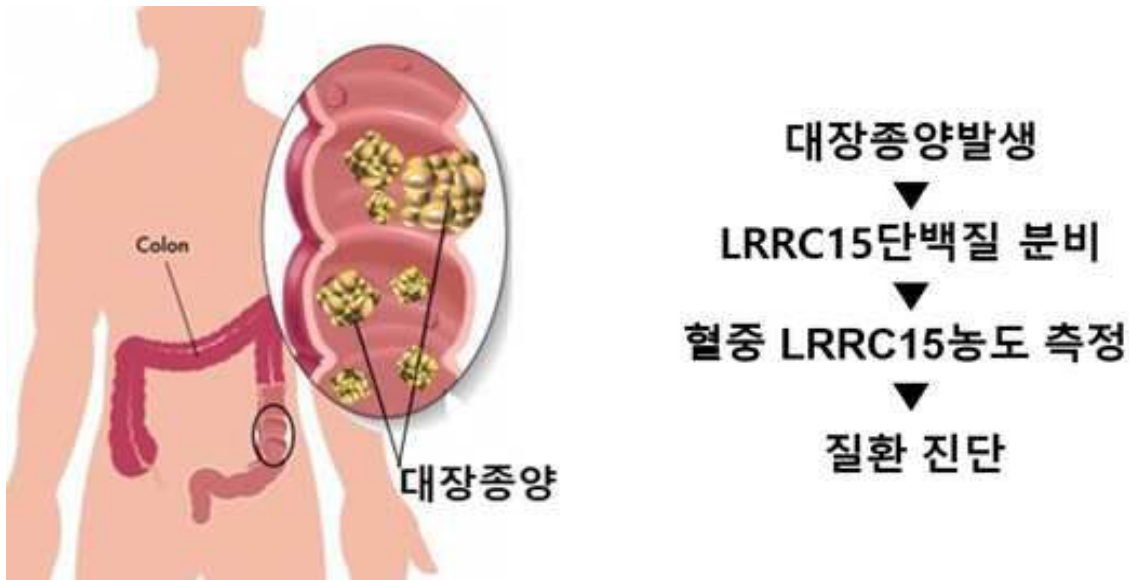
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 대장선종에 대한 진단용 바이오 마커로서 LRRC15의 용도

(57) 요약

본 발명은 대장선종 및 대장암에 대한 진단용 바이오 마커로서 LRRC15의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 대장선종 또는 대장암의 진단용 조성물 및 키트, 피검체 유래의 생물학적 시료에서 LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 측정(비교)하는 단계를 포함하는 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다. LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15)를 이용하면, 대장암 뿐만 아니라 전암(premalignant) 단계인 대장 선종에 대해서도 진단이 가능하여, 조기에 대장암 또는 대장선종이 진단 가능할 뿐만 아니라, 혈액을 통해서도 진단이 가능하여 진단적 유용성이 매우 우수하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/705 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711147781
과제번호	2019R1C1C1008341
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	대장암 진단을 위한 바이오마커 LRRC15의 기능연구 및 임상검증
기 여 율	50/100
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345347257
과제번호	2021R1A6A1A03040260
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	울산대학교(의대) 소화기병연구소
기 여 율	50/100
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2030.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 대장선종 또는 대장암의 진단용 마커 조성물.

청구항 2

LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 대장선종 또는 대장암의 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 LRRC15 단백질에 특이적인 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는

LRRC15의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 대장선종 또는 대장암의 진단용 키트.

청구항 6

피검체 유래의 생물학적 시료에서 LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 방법은

LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 정상 대조구 시료와 비교하여 발현 수준이 증가한 피검체를 대장선종 또는 대장암에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 대장조직, 대장세포, 분변, 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 단백질 발현수준은

웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunoassay), 방사선면역분석법, 방사면역확산법, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, 유세포 분석법(FACS) 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 mRNA의 발현수준은

역전사중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real-time RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 RT-PCR(Quantitative or semiQuantitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 실시간 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative real-time RT-PCR), 인 시투 하이브리드화(in situ hybridization), 형광 인 시투 하이브리드화(FISH), RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA), 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(Southern blotting), RNA 염기서열분석(RNA sequencing) DNA 칩(chip) 및 RNA 칩으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제5항에 있어서, 상기 키트는

제6항의 방법을 포함하는 내용이 교시된 설명서를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대장선종 및 대장암에 대한 진단용 바이오 마커로서 LRRC15의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 대장선종 또는 대장암의 진단용 조성물 및 키트, 피검체 유래의 생물학적 시료에서 LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 측정(비교)하는 단계를 포함하는 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 대장암은 초기에 발견할 경우 완치할 확률이 매우 높으나(90% 이상), 초기에는 별다른 증상이 없어서, 다른 암과 달리 후기 진행함으로 발견되는 비율이 월등하게 높다(위암의 2.7배). 대장암 진단을 받은 환자의 51.6%가 3~4기에 진단을 받는 것으로 알려졌다. 따라서 대장암의 조기 진단에 대한 중요성이 시간이 지날수록 크게 부각되고 있으며 아울러 암 질환 진단에 대한 제약/연구 업계의 연구비중이 커지고 있다.

[0004] 환자의 혈액, 분변, 체액 등에 존재하는, 특유의 단백질, DNA, RNA 등의 바이오 마커를 검출하는 분자진단검사(molecular diagnostics)는, 바이오 마커의 발현 유무 또는 발현량의 차이 등의 검사를 통하여 암의 발병 유무와 진행 정도를 판단할 수 있는 기법으로, 암의 진단에 필수적이다. 대장암 진단의 경우 현재 분변 잠혈 검사나 대장내시경 등을 이용하여 진단이 이루어지고 있으나, 초기에 검출해내기가 매우 어렵고 의사의 피로도 증가 및 환자의 부담이 큰 실정이다. 따라서 치료의 수집 방법이 용이하고 단시간 내에 환자의 상태를 정확히 판단할 수 있는 진단법과 진단법에 적합한 바이오 마커의 개발은 필수적이다. 수집이 용이한 대표적인 시료가 혈액이지만 혈액에서 진단이 가능한 바이오 마커는 거의 없는 실정이다. 현재 임상검사에서 대장암 관련 바이오 마커는 대표적으로 CEA(Carcinoembryonic Antigen)가 상용화 되고 있으나, 최초 진단 및 재발 진단에 있어서 낮은 진단율이 문제되고 있다(비특허문헌 1). 이에 따라, 새로운 대장암 진단 바이오 마커 발굴과 이의 기능연구 개발이 요

구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Caspar G Sorensen et al., The diagnostic accuracy of carcinoembryonic antigen to detect colorectal cancer recurrence - A systematic review, Int J Surg. 2016 Jan;25:134-44.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 대장선종 및 대장암에 대한 연구를 진행하던 중, LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15)가 상기 질환에 대한 진단용 바이오 마커로서 기능함을 최초로 규명하였으며, 특히 대장암 뿐만 아니라 전암(premalignant) 단계인 대장선종에 대해서도 진단이 가능하고 혈액을 통해서도 진단이 가능하여 진단적 유용성이 매우 우수함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 이에, 본 발명의 목적은, LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 대장선종 또는 대장암의 진단용 마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은, LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 대장선종 또는 대장암의 진단용 조성물, 또는 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 피검체 유래의 생물학적 시료에서 LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 대장선종 또는 대장암의 진단용 마커 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, LRRC15 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 대장선종 또는 대장암의 진단용 조성물, 또는 키트를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 본 발명의 대장선종 또는 대장암의 진단용 키트는, 후술하는 본 발명의 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법을 포함하는 내용이 교시된 설명서를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 또한 본 발명은, LRRC15 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 대장선종 또는 대장암의 진단 용도를 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은, LRRC15 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제의 대장선종 또는 대장암의 진단용 제제를 제조(생산)하기 위한 용도를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 방법들 중, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는, LRRC15 단백질에 특이적인 항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 다른 일 구현예에서, 상기 방법들 중, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는, LRRC15의 mRNA에 특

이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머 세트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0021] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 피검체 유래의 생물학적 시료에서 LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법은, LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 정상 대조구(대조군) 시료와 비교하여 발현 수준이 증가한 피검체를 대장선종 또는 대장암에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 일 구현예에서, 상기 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법 중, 상기 생물학적 시료는 대장조직, 대장세포, 분변, 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 일 구현예에서, 상기 본 발명에서 제공하는 방법들 중, 상기 단백질 발현수준은, 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunoassay), 방사선면역분석법, 방사면역확산법, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, 유세포 분석법(FACS) 및 단백질을 침으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 일 구현예에서, 상기 본 발명에서 제공하는 방법들 중, 상기 mRNA의 발현수준은, 역전사중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real-time RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 RT-PCR(Quantitative or semiQuantitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 실시간 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative real-time RT-PCR), 인 situ 하이브리드화(in situ hybridization), 형광 인 situ 하이브리드화(FISH), RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA), 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(Southern blotting), RNA 염기서열분석(RNA sequencing), DNA 칩(chip) 및 RNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0027] LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15)를 이용하면, 대장암 뿐만 아니라 전암 단계인 대장 선종에 대해서도 진단이 가능하여, 초기에 대장암 또는 대장선종이 진단 가능할 뿐만 아니라, 혈액을 통해서도 진단이 가능하여 진단적 유용성이 매우 우수하다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 대장선종 및 대장암에 대한 진단용 바이오 마커로서 LRRC15의 작용원리 및 용도를 개략적으로 나타낸 이미지이다.
- 도 2는 정상 대장(normal), 대장 선종(Adenoma) 및 대장암(Carcinoma) 환자에서, 병변 부위의 대장 조직에서 LRRC15 단백질의 발현 수준을 정량적으로 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 정상 대장(normal), 대장 선종(Adenoma) 및 대장암(Cancer) 환자에서, 병변 부위의 대장 조직을 면역화학염색법으로 염색하고 광학현미경으로 분석하여, LRRC15 단백질의 발현 양상(수준)을 비교적으로 나타낸 이미지이다.
- 도 4는 대장암 환자에서, 병변 부위의 암조직 및 이와 인접한 정상 대장 조직에서의 LRRC15 단백질의 발현 양상(수준)을, 웨스턴 블롯 방법으로 분석하여, 비교적으로 나타낸 이미지이다.
- 도 5는 LRRC15를 과발현하고 있는 대장암 세포주 HCT116-OE2를 이용하여, LRRC15 단백질이 세포 외(extracellular)로도 분비되는 것을 확인한 결과를 나타낸 이미지이다(Lysate: 세포 용해물, S/F Sub : 농축정제된 세포배양액).

도 6은 정상 대장(normal)의 대조군 인간, 대장 선종(Adenoma) 및 대장암(Tumor) 환자에서 채취한 혈액(혈청)에서, LRRC15 단백질의 발현 수준을 ELISA 방법으로 측정하여 정량적으로 비교하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 정의

[0031] 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자들에 의해 통상적으로 이해되는 동일한 의미를 가진다.

[0033] 본 명세서에서 용어 "대장선종(adenoma)"은 대장의 내막 상에서 성장하고 암의 위험을 증가시키는 폴립(polyp)을 지칭한다. 선종 폴립(adenomatous polyp)은 전악성(premalignant)으로 간주되지만, 대장암으로 발전할 가능성이 있다. 따라서 대장선종의 존재를 미리 진단하는 것은 추후 대장암이 발병될 가능성을 사전에 예측하는데 상당한 도움이 되기 때문에, 임상적으로 매우 중요하게 여겨진다. 본원발명에서 상기 선종 폴립은 과형성 또는 염증성 폴립과 같은 비종양성의 양성 병변과는 구별된다. 본원발명에서 상기 대장선종은 적어도 하나 이상의 선종 폴립을 가지는 개체에 대해 진단되는 것일 수 있다. 바람직하게, 본 발명에서 상기 대장선종은, 진행(성) 대장선종일 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 용어 "대장암(colorectal cancer)"은 결장 또는 직장에서 발생하는 암으로 신체의 다른 부위로 침투하거나 전이될 수 있는 비정상적으로 증식하는 세포를 말한다. 본 발명에서 상기 대장암은, 결장, 직장, 대변에 대한 암 및 선암(adenocarcinomas)을 포함하며, 또한 상피성암(carcinomas)을 포함할 수 있다. 표피양(epidermoid: 비각질 편평세포 또는 기저세포양(basaloid)) 암종 또한 포함될 수 있다. 암은 특정 유형의 폴립(polyp) 또는 기타 병변, 예를 들어 관상 선종, 관상융모성 선종(예를 들어, 융모샘 폴립), 융모성 선종(선암과 함께 또는 선암없이), 과용종 폴립(hyperplastic polyps), 과오종(hamartomas), 유년성(juvenile) 폴립, 가족성 용종증, 폴리포이드 암종(polypoid carcinomas) 또는 슈도폴립(pseudopolyp) 등과 연관될 수도 있다.

[0037] 본 발명에서 용어 '발현(expression)'은 세포에서 단백질 또는 핵산(ex. mRNA)의 생성을 의미한다. 본 명세서에서 용어 '발현 수준(expression level)'은 시료 내 목적 단백질 또는 핵산(ex. mRNA)의 존재 수준의 의미를 모두 포함한다.

[0039] 본 발명에서 용어 '숙주세포(host cell)'는, 임의의 수단(예: 전기충격법, 칼슘 포스파타제 침전법, 미세주입법, 형질전환법, 바이러스 감염 등)에 의해 세포 내로 도입된 이종성 DNA를 포함하는 원핵 또는 진핵 세포를 의미한다.

[0040]

[0041] 본 발명에서 용어 '단백질'은 '폴리펩티드(polypeptide)'와 호환성 있게 사용될 수 있으며, 예컨대, 자연상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.

[0042] 본 발명에서 'LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15)' 단백질은 당업계에 공지된 LRRC15 단백질 또는 폴리펩타이드로 알려진 것이라면 그 구체적 기원과 서열(아미노산 서열 구성)이 특별히 제한되지 않으나, 일례로 본 발명에서 인간(*homo sapiens*) 유래의 LRRC15로서 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드(NCBI(Genbank) Accession No. NP_001128529, 주요하게 NCBI Gene ID: 131578 참조)일 수 있다. 본 발명에서 상기 LRRC15는 이의 기능적 동등물을 포함한다.

[0043] 상기 기능적 동등물이란, LRRC15 단백질을 구성하는 아미노산 서열(바람직한 일례로, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열)과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 폴리펩티드를 말한다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 것으로, 모태가 된 상기 LRRC15 단

백질(바람직한 일례로, 서열번호 1로 표시되는 표시되는 폴리펩티드)과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다. 여기서 '실질적으로 동질의 생리활성'이란, 대장선종 또는 대장암의 진단 마커로서 기능하는 것을 의미한다. 바람직하게, 본 발명에서 LRRC15의 기능적 동등물은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 일부가 부가, 치환 또는 결실의 결과 생성된 것일 수 있다. 상기에서 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 또한 상기 LRRC15의 기능적 동등물에는, LRRC15 단백질의 아미노산 서열상에서 아미노산의 일부가 결실된 변형체도 포함된다. 상기 아미노산의 결실 또는 치환은 바람직하게는 LRRC15의 생리활성에 직접적으로 관련되지 않은 영역에 위치해 있다. 아울러 상기 LRRC15의 아미노산 서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다. 또한 본 발명의 기능적 동등물의 범위에는 LRRC15의 기본 골격 및 이의 생리활성을 유지하면서 폴리펩티드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 단백질의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경이 이에 포함된다.

[0044] 본 명세서에서 서열 상동성 및 동질성은, 원본 서열(아미노산 서열의 경우 바람직한 일례로서 서열번호 1, 또는 핵산 서열의 경우 바람직한 일례로서 서열번호 2)과 후보 서열을 정렬하고 갭(gaps)을 도입한 후, 원본 서열에 대한 후보 서열의 동일 매칭 잔기(아미노산 잔기 또는 염기)의 백분율로서 정의된다. 필요한 경우, 최대 백분율 서열 동질성을 수득하기 위하여 서열 동질성의 부분으로서 보존적 치환은 고려하지 않는다. 또한 단백질 서열상 동성 또는 동질성 판단의 경우에 있어서, LRRC15 아미노산 서열의 N-말단, C-말단 또는 내부 신장, 결손 또는 삽입은 서열 동질성 또는 상동성에 영향을 주는 서열로서 해석되지 않는다. 또한, 상기 서열 동질성은 두 개의 폴리펩티드의 아미노산 서열의 유사한 부분을 비교하기 위해 사용되는 일반적인 표준 방법에 의해 결정할 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램은 두 개의 폴리펩티드를 각각의 아미노산이 최적으로 매칭되도록 정렬한다(하나 또는 두 서열의 전장서열을 따라 또는 하나 또는 두 서열의 예측된 부분을 따라). 상기 프로그램은 디폴트 오픈링 페널티(default opening penalty) 및 디폴트 갭 페널티(default gap penalty)를 제공하며 컴퓨터 프로그램과 함께 연계되어 사용될 수 있는 PAM250(표준 스코어링 매트릭스; Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp 3, 1978)와 같은 스코어링 매트릭스를 제공한다. 예를 들어, 백분율 동질성은 다음과 같이 계산할 수 있다. 일치하는 서열(identical matches)의 총 수에 100을 곱한 다음 대응되는 스패(matched span) 내의 보다 긴 서열의 길이와 두 서열을 정렬하기 위해 보다 긴 서열 내로 도입된 갭(gaps)의 수의 합으로 나눈다.

[0046] 본 발명에서 용어 '핵산', 'DNA 서열', 'RNA 서열' 또는 '폴리뉴클레오타이드'는 단일-또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오타이드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오타이드의 공지된 아날로그도 포함된다.

[0048] 본 발명에서 용어 '코딩' 또는 '암호화'는 천연 상태에서 또는 당업자에게 잘 알려진 방법에 의해 조작될 때, 폴리펩티드 및/또는 그의 단편에 대한 mRNA를 제조하기 위해 전사 및/또는 번역될 수 있는 경우, 폴리펩티드를 '코딩' 또는 '암호화'한다고 언급되는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0050] 본 발명에서 'LRRC15를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드' 또는 'LRRC15 mRNA'는 일례로 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 적어도 70% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 염기(핵산) 서열을 가질 수 있다. 상기 핵산은 DNA, cDNA 및 RNA 서열을 모두 포함한다. 즉, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 70% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 갖거나, 이에 상보적인 염기 서열을 가질 수 있다. 일례로, 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어지는 것(NCBI(Genbank) Accession No. NM_001135057, 주요하게 NCBI Gene ID: 131578 참조)일 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 발현 목적 단백질들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 코돈(codon)의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩 영역으로부터 발현되

는 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩 영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다.

[0054] 본 발명에서 '상동체(homologues)'라 함은 단백질 및/또는 단백질 서열을 언급하는 경우에는 공통의 조상 단백질(common ancestral protein) 또는 단백질 서열에서 자연적으로 또는 인위적으로 유래된 것을 나타낸다. 유사하게 핵산 및/또는 핵산 서열은 그들이 공통의 조상 핵산 또는 핵산 서열로부터 자연적으로 또는 인위적으로 유래되었을 때 상동하다.

[0056] 본 발명에서 '(항) LRRC15 항체' 또는 'LRRC15에 대한 항체'는 LRRC15의 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 항체는 LRRC15 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 본 발명의 목적상 항체의 중쇄와 경쇄의 아미노산 서열이 실질적으로 동일한 항체의 집단인 단일클론 항체인 것이 바람직할 수 있다.

[0057] 상기한 바와 같은 LRRC15에 대한 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 다클론 항체는 상기 LRRC15 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조 가능하다.

[0058] 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method), 또는 파지 항체 라이브러리 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

[0059] 또한 본 발명에서 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태 뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 바람직하게 상기 단편은 모(母)항체의 LRRC15 결합 친화도의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 또는 그 이상을 보유한다. 구체적으로는 Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, Fv, 디아바디(diabody), scFv 등의 형태일 수 있다. Fab(fragment antigen-binding)는 항체의 항원 결합 단편으로, 중쇄와 경쇄 각각의 하나의 가변 도메인과 불변 도메인으로 구성되어 있다. F(ab')₂는 항체를 펩신으로 가수분해시켜서 생성되는 단편으로, 두 개의 Fab가 중쇄 경첩(hinge)에서 이황결합(disulfide bond)으로 연결된 형태를 하고 있다. F(ab')는 F(ab')₂ 단편의 이황결합을 환원하여 분리시킨 Fab에 중쇄 경첩이 부가된 형태의 단량체 항체 단편이다. Fv(variable fragment)는 중쇄와 경쇄 각각의 가변영역으로만 구성된 항체 단편이다. scFv(single chain variable fragment)는 중쇄가변영역(VH)과 경쇄가변영역(VL)이 유연한 펩티드 링커로 연결되어 있는 재조합 항체 단편이다. 디아바디(diabody)는 scFv의 VH와 VL가 매우 짧은 링커로 연결되어 서로 결합하지 못하고, 동일한 형태의 다른 scFv의 VL 및 VH와 각각 결합하여 이량체를 형성하고 있는 형태의 단편을 의미한다.

[0060] 본 발명에 적용되는 항체는 이에 제한되지 않으나 일례로 IgG, IgA, IgM, IgE 및 IgD로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 IgG 항체일 수 있다.

[0062] 본 발명에서 용어 "프로브"는 표적 핵산의 서열을 가지고, 상보적 염기쌍에 의해 이중 구조를 형성하는, 통상적으로 표지화된 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프로브는 표적 서열의 지역에 해당하는, 바람직하게는 30개 이상의 뉴클레오티드 및 일부 경우에, 50개 이상 뉴클레오티드로 이루어진 "혼성화 지역"을 포함할 것이다. "상용하는"은 지정된 핵산과 동일하거나 상보적인 것을 의미한다. 프로브는, 바람직하게는, PCR을 준비하는데 사용된 서열(들)에 상보적인 서열을 함유하지 않을 수 있다. 일반적으로, 프로브의 3' 말단은 프라이머 신장 생성물 속으로 프로브의 일체화를 억제하도록 "차단될" 것이다. "차단"은 비-상보적 염기를 사용하거나 비오틴, 인산염기 또는 형광체와 같은 화학적 모이어티를 선택된 모이어티에 따라, 표지에 부착된 핵산의 후속 탐지 또는 포획을 위한 표지로서 작용함으로써 이중 목적을 만족시킬 수 있는 염기 뉴클레오티드의 3' 하이드록실에 첨가함으로써, 얻을 수 있다. 차단은 3'-OH를 제거하거나 다이데옥시뉴클레오티드와 같은 3'-OH가 없는 뉴클레오티드를 사용함으로써 성취될 수 있다.

- [0064] 본 발명에서 용어, "프라이머(시발체)"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 본 발명에서 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머가 한쌍(세트)으로 제공될 수 있다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부 또는/및 생성물 양의 증가 현상 여부를 통해 본 발명에서 대장선종 또는 대장암의 발생 여부(또는 위험도)를 판정(예측)할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 일 실시 양태에서, 목적 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브를 함께 사용하는 것일 수 있다. 프라이머 및 프로브는 표적의 인접 서열에 결합하도록 디자인되며, 주로 프로브는 프라이머에 의해 형성된 가닥에 상보적이다. 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 일 실시양태에서 프로브 및 프라이머는 FRET에 참여할 수 있는 한 쌍의 염료로 표지화될 수 있다. 일반적으로, 도너(donor) 염료는 프라이머의 3' 말단 근처에 부착되는 반면, 엑셉터(acceptor) 염료는 프로브의 5' 말단에 부착되어, 프라이머 신장에 의해 합성된 상보적 가닥에 어닐링된다. 이중 혼성화 프로브에 의해, DNA 증폭 동안, 여기(excitation)는 도너 염료에 특이적인 파장에서 실행되며, 반응은 엑셉터 염료의 방출 파장에서 관찰된다. 어닐링 단계에서, 프로브 및 프라이머는 헤드-투-테일 배열로 표적 서열에 혼성화된다. 이것이 도너 및 엑셉터 염료를 가깝게 하여, FRET이 발생하게 한다. 엑셉터 형광의 증가하는 양은 존재하는 PCR 생성물의 양에 비례한다.
- [0067] 본 발명의 프로브 또는 프라이머는, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0069] 본 발명에서 '피검체' 또는 '개체'란 질병(본 발명에서, 대장선종 또는 대장암)이 발생되었거나 질병 발생이 의심되는 대상으로서, 후속하여 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 포함하는 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 포유류(영장류), 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 본 발명에서 단백질 발현수준의 측정은, 당업계에 공지된 방법이라면 제한없이 사용될 수 있으며, 일례로 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunoassay), 방사선면역분석법, 방사면역확산법, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, 유세포 분석법(FACS) 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0072] 본 발명에서 유전자 발현수준의 측정은, 당업계에 공지된 방법이라면 제한없이 사용될 수 있다. 구체적인 일 실시 양태에서 유전자 발현수준의 측정은, 상기 유전자의 mRNA의 발현수준 측정을 통해 수행되는 것일 수 있다. 이때 유전자의 mRNA 발현수준 측정은 당업계에 공지된 방법이라면 제한없이 사용될 수 있으며, 일례로 역전사중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real-time RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 RT-PCR(Quantitative or semiQuantitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 실시간 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative real-time RT-PCR), 인 situ 하이브리드화(in situ hybridization), 형광 인 situ 하이브리드화(FISH), RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA), 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(Southern blotting), RNA 염기서열분석(RNA sequencing) DNA 칩(chip) 및 RNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0074] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0076] 본 발명자들은 LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15)이 대장선종 및 대장암 질환에 대한 진단용 바이오 마커로서 기능함을 최초로 규명하였으며(도 1 참조), 특히 대장암 뿐만 아니라 전암(premalignant) 단계인 대장 선종에 대해서도 진단이 가능하고 혈액을 통해서도 진단이 가능하여 진단적 유용성이 매우 우수함을 확인하였다.
- [0078] 따라서 본 발명은, LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 대장선종 또는 대장암의 진단용 마커 조성물을 제공한다.
- [0079] 또한 본 발명은, LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 대장선종 또는 대장암의 진단용 조성물, 또는 키트를 제공한다.
- [0080] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 대장선종 또는 대장암의 진단용 키트는, 후술하는 본 발명의 대장 선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법을 포함하는 내용이 교시된 설명서를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0081] 상기 본원 발명에서, 상기 LRRC15 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는, 당업계에 공지된 수단이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 일례로 LRRC15 단백질에 특이적인 항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0082] 상기 본원 발명에서, 상기 LRRC15 유전자(LRRC15 단백질을 암호화하는 유전자)의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는, 당업계에 공지된 수단이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, LRRC15의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머 세트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 상기 측정 제제들은 주어진 조건에서 이의 확인, 검출, 측정 및 정량을 용이하게 하기 위하여 검출 가능한 표지(detectable label)로 표지 될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출 가능한 표지는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시페라아제, 알파-글루루 쿠로니다제(glucuronidase), 알파-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 전이효소, β -갈락토시다아제 및 β -글루루 코시다아제), 방사능 표지(예컨대, ^{14}C , ^{125}I , ^{32}P 및 ^{35}S), 형광 표지(예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민(rhodamine) 6G, 로다민 B, TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM), 발광 표지, 화학 발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다. 유사하게, 상기 검출가능한 그룹은 기질(substrate), 보조인자(cofactor), 저해제 또는 친화 리간드일 수 있다.
- [0084] 상기 측정 제제의 확인, 검출, 측정 및 정량은 표지로부터 나오는 신호를 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레 소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl 및 pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.
- [0086] 또한 상기 본 발명의 키트는, LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하는 제제와 별도로 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 전술한 표지, 이의 검출에 사용되는 물질, 및 장치가 포함될 수 있다.
- [0087] 구체적인 일 양태로서, 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을

특징으로 하는 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 각 마커 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이일 수 있다. 또한 대조군(ex. 내부 대조군) 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 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.

[0088] 또 다른 양태로는, DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군(ex. 내부 대조군) 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0089] 또 다른 양태로는, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. ELISA 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0090] 또한, 본 발명의 키트는 효소와 발색 반응할 기질 및 결합되지 않은 단백질 등은 제거하고 결합된 단백질 마커만을 보유할 수 있는 세척액 또는 용리액을 포함할 수 있다.

[0092] 또한 본 발명은, 피검체 유래의 생물학적 시료에서 LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0093] 즉, 본 발명은 대장선종 또는 대장암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 피검체 유래의 생물학적 시료로부터 LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 검출(측정 또는/및 비교)하는 방법을 제공한다.

[0094] 본 발명의 구체적 일 실시 양태에서, 상기 본 발명의 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법은 하기의 단계를 포함하여 수행되는 것일 수 있다:

[0095] (I) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료를 제공하는 단계;

[0096] (II) 상기 분리된 시료에서 LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계; 및

[0097] (III) 상기 LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 정상 대조군(대조군) 시료의 해당 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준과 비교하는 단계.

[0098] 본 발명의 일 실시 양태에서, 상기 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법은, LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 정상 대조군 시료와 비교하여 발현 수준이 증가한 피검체를 대장선종 또는 대장암에 걸린 것으로 판정(지시, 의미)하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0099] 본 발명에서 상기 '생물학적 시료(생물학적 샘플)'는, 이에 제한되지 않으나, 상기 피검체(환자, 개체)로부터 채취된(분리된) 세포, 조직 또는 유체를 포함하는 것일 수 있다. 이에 제한되지 않으나, 일례로 상기 세포는 대장 세포로서, 대장 기질(stroma) 세포, 대장 선상(glandular) 세포, 대장 상피 세포 또는 대장 면역세포로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 것일 수 있다. 상기 "조직"은, 상기 세포들을 포함하는 대장 조직을 의미하는 것으로, 이에 제한되지 않으나 일례로 대장 기질(stroma) 조직, 대장 선상(glandular) 조직, 또는 대장 상피 조직 등을 포함한다.

[0100] 본 발명의 일 실시 양태에서, 이에 제한되지 않으나, 본 발명에서 상기 생물학적 시료는 바람직하게 상기 피검체로부터 채취된 유체(액체) 시료 또는 분변 일 수 있다. 일례로, 상기 유체 시료는 뇌척수액, 혈액, 토사물, 타액, 림프액, 낭포액, 뇨, 기관지 세정에 의해 회수된 유체, 복막 세정에 의해 회수된 유체(복막액) 및 부인과적 유체(질액, 자궁 또는 질 세정에 의해 회수된 유체 등)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 것일

수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0101] 본 발명의 다른 일 실시 양태에서, 상기 대장선종 또는 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법 중, 상기 생물학적 시료는 가장 바람직하게 대장조직, 대장세포, 분변, 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0103] 또한 본 발명은, 대장선종 또는 대장암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 하기의 단계를 포함하는 대장선종 또는 대장암의 마커를 검출(비교)하는 방법을 제공한다:
- [0104] (I) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료를 제공하는 단계;
- [0105] (II) 상기 분리된 시료에서 LRRC15(Leucine Rich Repeat Containing 15) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계; 및
- [0106] (III) 상기 LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 정상 대조구(대조군) 시료의 해당 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준과 비교하는 단계.
- [0107] 본 발명의 일 실시 양태에서, 상기 방법은, LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 발현수준을 정상 대조구 시료와 비교하여 발현 수준이 증가한 피검체를 대장선종 또는 대장암에 걸린 것으로 판정(지시, 의미)하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0109] 또한 본 발명은,
- [0110] 생물학적 시료에서 대장선종 또는 대장암의 마커 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA의 검출을 위한 진단 분석(diagnostic assay)으로서, 다음 단계를 포함하는 분석을 제공한다:
- [0111] i) 생물학적 시료를 LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0112] ii) 결합제와의 결합을 검출하는 단계; 및
- [0113] iii) 양성으로 결합하는 양을 결정하는 단계(여기서 양성으로 결합하는 양은 대장선종 또는 대장암의 마커 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA의 존재의 지표임).
- [0114] 상기 생물학적 시료는 피검체(환자 또는 질환 의심 개체)로부터 분리된 생물학적 시료를 의미하는 것으로, 본 명세서의 다른 부분에서 구체적으로 기술한 바를 참조로 하여 이해된다. 바람직한 일 실시 양태에서, 상기 생물학적 시료는 대장조직, 대장세포, 분변, 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0116] 상기 방법은, i) 단계와 ii) 단계 사이에, 상기 i) 단계에서의 결합제와 접촉이 끝난 생물학적 시료를 대장암 특이적 항원에 특이적으로 결합하는 추가의 결합제와 접촉시키는 과정(단계)을 추가로 수행할 수 있다.
- [0117] 따라서, 본 발명의 구체적 일 실시양태에서, 본 발명은
- [0118] 생물학적 시료에서 대장선종 또는 대장암의 마커 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA의 검출을 위한 진단 분석(diagnostic assay)으로서, 다음 단계를 포함하는 분석을 제공한다:
- [0119] i) 생물학적 시료를 LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0120] ii) 상기 생물학적 시료를 대장암 특이적 항원에 특이적으로 결합하는 추가의 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0121] iii) 상이한 특이성을 갖는 결합제의 둘 이상의 결합을 검출하는 단계; 및
- [0122] iv) 2개 이상의 결합제가 양성으로 결합하는 양을 결정하는 단계(여기서 양성으로 결합하는 양은 대장선종 또는 대장암의 마커 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA의 존재의 지표임).
- [0123] 상기 대장암 특이적 항원은, 일례로 CEA(Carcinoembryonic Antigen), CA19-9(carbohydrate antigen 19-9) 및

이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 하나의 것일 수 있다.

- [0125] 상기 결합제는, 목적 단백질(항원) 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 것으로 당업계에 알려진 것이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않는다.
- [0126] 본 발명의 일 실시 양태에서, 상기 결합제는, LRRC15 단백질에 특이적으로 결합하는 항체; 또는 대장암 특이적 항원에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0127] 본 발명의 일 실시 양태에서, 상기 결합제는, LRRC15의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머 세트; 또는 대장암 특이적 항원 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머 세트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0129] 상기 본 발명의 '생물학적 시료에서 대장선종 또는 대장암의 마커 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA의 검출을 위한 진단 분석(diagnostic assay)'들은, 정상 대조군(대조군) 시료의 해당 단백질(LRRC15 또는/및 대장암 특이적 항원) 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA에 상기 결합제가(또는 상기 2개 이상의 결합제들이) 양성으로 결합하는 양과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0130] 본 발명의 일 실시 양태에서, 상기 방법은, LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 결합제가 양성으로 결합한 양을 정상 대조군(대조군) 시료와 비교하여 결합량이 증가한 피검체(상기 생물학적 시료가 유래된 피검체(환자 또는 의심개체))를 대장선종 또는 대장암에 걸린 것으로 판정(지시, 의미)하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0131] 본 발명의 일 실시 양태에서, 상기 방법은, LRRC15 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 결합제가 양성으로 결합한 양, 및 대장암 특이적 항원에 특이적으로 결합하는 추가의 결합제가 양성으로 결합한 양을 정상 대조군(대조군) 시료와 비교하여 모두 결합량이 증가한 피검체(상기 생물학적 시료가 유래된 피검체(환자 또는 의심개체))를 대장선종 또는 대장암에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0133] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0135] **실시예 1. 대장 조직 내 LRRC15 단백질 발현 차이 확인**
- [0136] **1-1. 면역조직화학 염색법을 이용한, 대장 조직 내 LRRC15 단백질 발현차이 확인**
- [0137] 정상대장, 대장선종 및 대장암 환자로부터 분리 수득한 대장조직에서, LRRC15 단백질 발현차이를 확인하였다. 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0138] 대장선종 조직은 대장내시경 및 조직검사를 통하여 진행 대장선종(advanced adenoma) 진단을 받은 환자로부터 수득한 환부 조직을 말하며, 대장암 조직은 대장내시경 및 조직검사를 통하여 대장 악성종양 진단을 받은 환자로부터 수득한 환부조직을 말한다. 정상 대장조직은 대장선종 또는 대장암에서 10cm이상 떨어진 대장에서 분리한 정상 대장 조직이다.
- [0139] 환자로부터 분리 수득한 상기 조직들을 식염수로 세척 후, 통상적인 방법으로 포르말린을 이용해 고정하고 파라핀으로 포매하여 제작한 FFPEs(paraffin-embedded tissues)를 4μm 두께로 절삭하여, 제조사의 프로토콜에 따라 벤타나 자동 면역염색기(Ventana automated immunostainer, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)를 이용하여 염색하였다. 상기 절삭된 슬라이드들을 60℃에서 1시간 동안 건조시키고, EZ 프렙(EZ Prep, Ventana Medical Systems)을 이용하여 75℃에서 4분 동안 탈파라핀화(deparaffinized)하였다. 세포 컨디셔닝(열 전처리)은 Tris/Borate/EDTA를 포함한 CC1 용매에서 20분 동안 100℃ 온도에서 이루어졌다. 면역조직화학염색법 수행을 위해 LRRC15 항체(Recombinant Anti-LRRC15 antibody [ab150376], Cambridge, UK)를 사용하였으며, 42℃에서 2시간 동안 인큐베이트(incubate)하였다. 시그널(signal)은 i-view 검출 키트(detectionkit, Ventana Medical

Systems)를 사용하여 LSAB(labelled streptavidin-biotin) 방법에 기초하여 검출하였다. 키트의 각 단계는, 37℃에서 억제제의 처리(1% H₂O₂, 4분), 바이오티닐레이티드(biotinylated) IgG(8분), 스트렙타비딘-HRP(Streptavidin-Horseradish peroxidase, 8분), DAB(chromogen+substrate, 8분)와 코퍼(Copper, 4분) 처리로 구성되었다. 또한, 대조염색(Counterstaining)은 메이어의 헤마토자일린 (Mayer's hematoxylin)(ScyTek, Logan, UT)으로 상온에서 2분 동안 수행하였다.

[0141] 대장 조직을 면역화학염색 및 정량 분석한 결과 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 정상 대장(normal)과는 달리, 진행대장선종(Adenoma, 대장선종) 및 대장암(Carcinoma 또는 Cancer) 환자의 대장 조직에서 LRRC15 단백질이 특이적으로 높은 수준으로 발현함을 확인하였다. 이러한 현상은 대장의 기질(stroma) 조직 뿐만 아니라 선상(glandular)조직에서도 나타났다(도 3).

[0143] 1-2. 웨스턴 블롯을 이용한, 대장 조직 내 LRRC15 단백질 발현차이 확인

[0144] 대장암환자의 대장암 조직은 조직 병리검사를 통하여 대장암(악성종양) 판정을 받은 환자의 수술검체(암병변 부위) 일부를 수득하였으며, 정상조직은 동일 환자의 암병변 부위로부터 10cm이상 떨어진 정상 대장조직을 수득하여 웨스턴 블롯(Western-Blot)실험으로 LRRC15 단백질의 발현을 확인하였다. 먼저, 대장암환자 대장조직을 식염수로 세척 후, 액체질소에서 급속냉동(snap freezing)시켰다. 냉동되어 경화된 대장 조직을 분쇄한 뒤, 세포 용해 완충액(RIPA buffer; abcam(ab156034), Cambridge, UK)을 이용하여 용해시켰다. 정상대장 또는 대장암 각각의 조직에서 얻은 세포 용해액을 13000rpm으로 20분간 원심 분리하여, 상층액으로부터 세포 내 단백질을 수득하였다. 수득한 세포 내 단백질은 Bicinchoninic Acid 정량키트(PierceTM BCA Protein Assay Kit; #23225, Fisher Scientific, USA)를 이용하여 전체 단백질량을 동일화하였다. 동량화된 단백질 시료를 웨스턴 블롯(Western-Blot) 전기영동법을 이용하여 단백질 크기에 따라 분획하였으며, Semi-Dry Western Blotting Transfer System(Trans-Blot® TurboTM Transfer Starter System, Midi PVDF; #17001919, Bio-Rad Laboratories)을 사용하여 PVDF 막에 분획된 단백질을 옮겼다. 단백질이 옮겨진 PVDF 막에 5% Skim milk를 상온에서 2시간 처리한 뒤, LRRC15 항체(Recombinant Anti-LRRC15 antibody; #ab150376, abcam, Cambridge, UK) 또는 beta-actin(Anti-beta Actin antibody #ab8227, abcam, Cambridge, UK) 항체를 4℃에서 12시간 이상 노출시켰다. 각 항체를 처리한 PVDF 막은 TBST wash buffer를 이용하여 세척 후, HRP가 결합된 2차 항체(Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) #ab205718), abcam, Cambridge, UK)를 추가결합 시킨 다음, ECL용액(enhanced chemiluminescent; SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate #34094, Fisher Scientific, USA)을 처리하여 각 단백질의 발현정도를 확인하였다.

[0146] 웨스턴 블롯 실험결과 도 4에 나타난 바와 같이, LRRC15는 대장암 환자 유래 병변 부위의 암조직에서, 인접 정상조직 대비 과발현되고 있는 것을 확인하였다.

[0148] 실시예 2. 대장암 세포에서 LRRC15 단백질의 세포 외(extracellular) 분비 확인

[0149] 정상대장 세포주 FHC와, LRRC15 단백질 과발현 대장암 세포주 HCT116-OE2를 무혈청 DMEM 배지(DMEM Serum free medium, #11965084, Fisher Scientific, USA)에서 48시간 배양하였다. 그 후, 세포 배양액을 3000rpm으로 3분간 원심 분리하여, 세포가 배제된 세포 배양액을 수득하였다. 세포 배양액을 원심분리필터(Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit, # UFC5003, Merck)를 이용하여 농축정제 하였다.

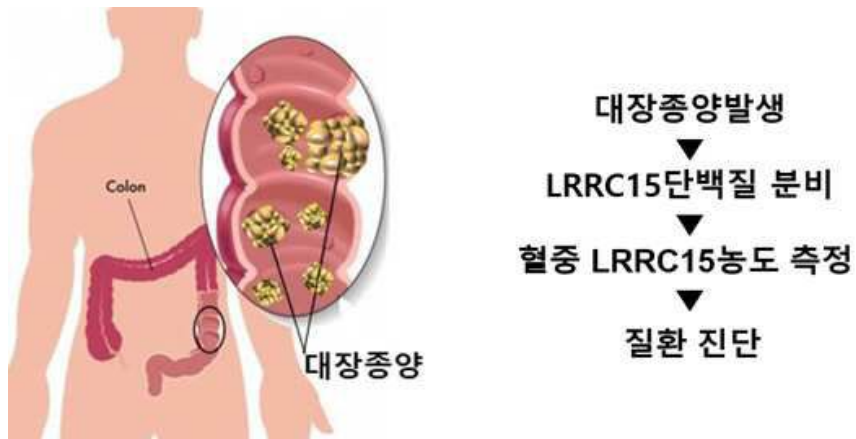
[0150] 세포 배양액이 제거된, 정상대장세포(FHC)와 LRRC15 단백질 과발현 대장암 세포(HCT116-OE2)들을, 각각 세포 용해 완충액(RIPA buffer; abcam(ab156034), Cambridge, UK)을 이용하여 용해시켰다.

[0151] 세포 용해액과, 농축정제된 세포배양액은 Bicinchoninic Acid 정량키트(PierceTM BCA Protein Assay Kit; #23225, Fisher Scientific, USA)를 이용하여 전체 단백질량을 동량화 하였으며, 상기 실시예 1-2에서와 같은 방법으로 웨스턴 블롯(Western-Blot)을 수행하여, LRRC15 단백질의 발현을 확인하였다.

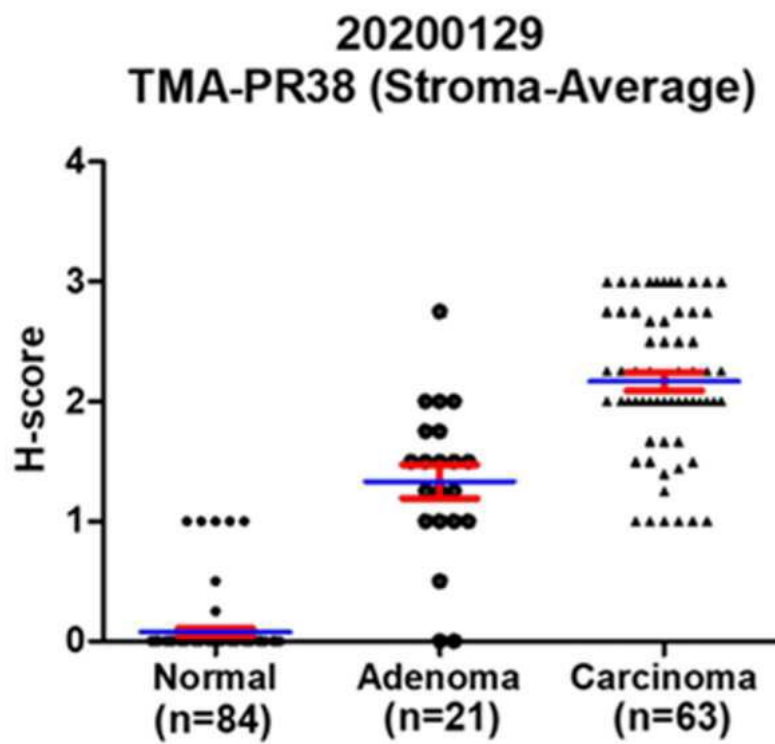
- [0153] 실험결과 도 5에 나타난 바와 같이, LRRC15 과발현 대장암 세포주 HCT116-OE2에서 LRRC15 단백질이 세포외(extracellular)로 분비됨을 확인하였다.
- [0155] **실시예 3. 혈액 내 LRRC15 단백질 발현 차이 확인**
- [0156] 정상대장, 대장선종 및 대장암 환자로부터 분리 수득한 혈액에서, LRRC15 단백질 발현차이를 확인하였다. 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0157] 정상대장, 대장선종 및 대장암 환자의 분류는 대장내시경결과 및 조직병리 검사결과를 바탕으로 분류되었다. 정상대장 12명, 대장선종환자 14명, 대장암환자 9명의 혈액을 수득 하여 혈중 LRRC15 단백질 존재량(존재 수준)을 분석하였다.
- [0158] 먼저, 원심분리기를 이용하여 상기 수득한 혈액을 3000rpm에서 7분간 원심분리하여, 상층액인 혈청을 분리하였다. 혈청 내 LRRC15의 발현정도(존재 수준)는 ELISA(효소결합면역흡착검사법)를 수행하여 확인하였다. 먼저 Polystyrene 96-well plate에 LRRC15 항체(Recombinant Anti-LRRC15 antibody; #ab150376, abcam, Cambridge, UK)를 carbonate-bicarbonate buffer를 이용하여 코팅하였다. 비특이적 결합을 막기 위하여, Blocking buffer(Pierce Protein-Free TBS Blocking Buffer, # 37570, Fisher Scientific, USA)와 상온에서 2시간 반응시킨 후 제거하였다. 상기 환자 혈액으로부터 분리한 혈청을 식염수에 1/5 농도로 희석하여, 상기 항체가 코팅된 plate에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 혈청샘플을 제거 후, LRRC15-mouse Fc IgG 항체를 반응시켰다. 이어서 Goat Anti-Mouse IgG H&L HRP(#ab6789, abcam, Cambridge, UK)를 1시간동안 상온에서 반응시켰다. 비결합 항체를 제거하기 위해 세척액(Wash Buffer PT; #ab206977, abcam, Cambridge, UK)으로 여러 번 세척 후, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) 용액(1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution; #34028, Fisher Scientific, USA)을 이용하여 항원-항체 결합체의 발색반응을 유발시켰다. 발색이 확인되면, 0.16M 황산을 처리하여 반응을 중단 시킨 뒤, 흡광도 측정기(Infinite® F50, TECAN, Switzerland)를 이용하여 450nm 파장으로 결과값을 측정하였다.
- [0160] ELISA(효소결합면역흡착검사법)를 수행하여 비교적 발현 수준을 확인한 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 정상 대조군의 혈액에서와 비교하여, 대장선종 및 대장암 환자 혈청(serum)에서 LRRC15 단백질의 발현량이 현저하게 증가되어 있는 것을 확인하였다. 이로서 LRRC15는 대장종양 세포 또는 대장선종 세포로부터 세포 외로 분비되며, 혈액에서도 대장선종 및 대장암에 대한 진단적 가치를 가지는 매우 우수한 바이오 마커임을 확인하였다.
- [0162] 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

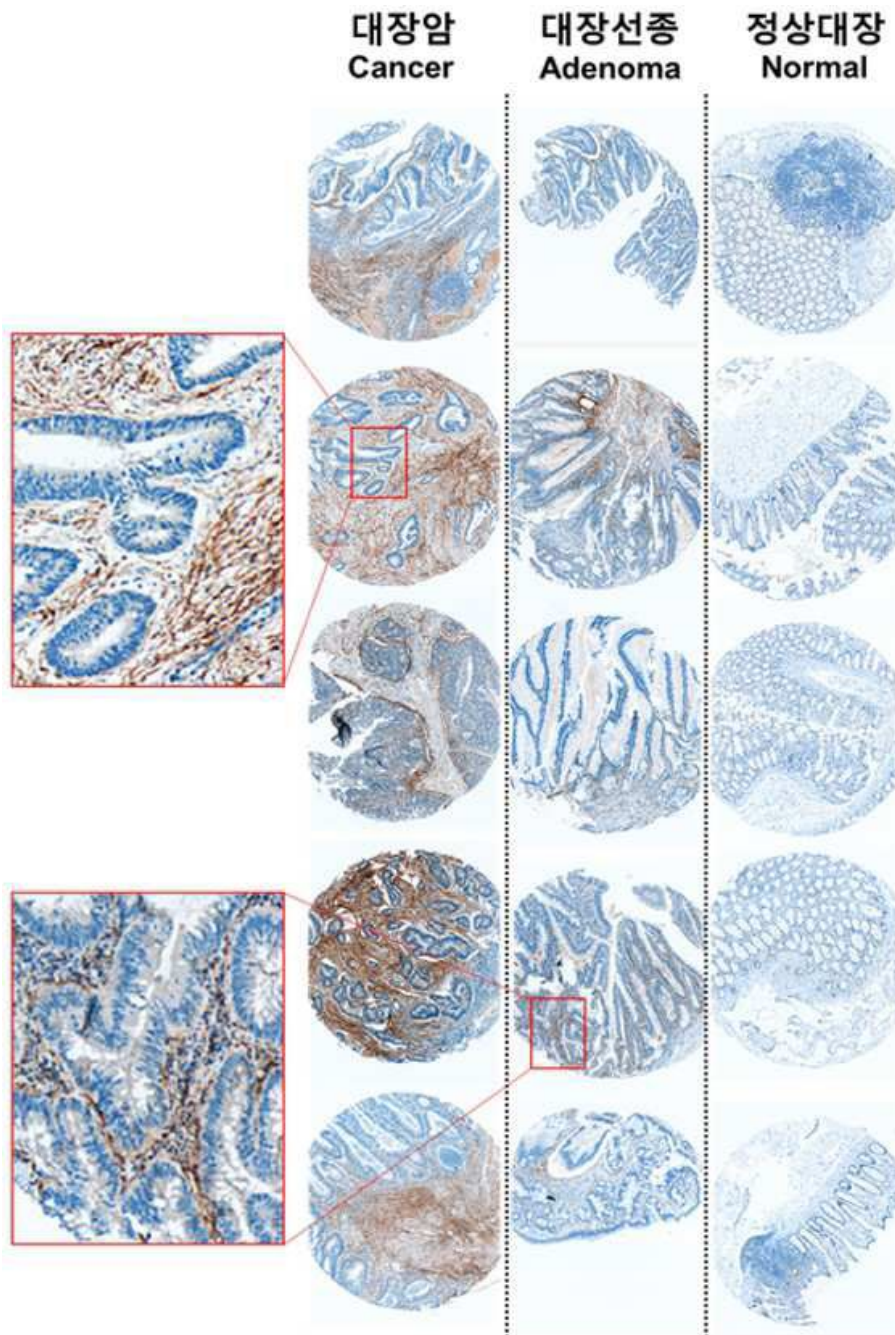
도면1



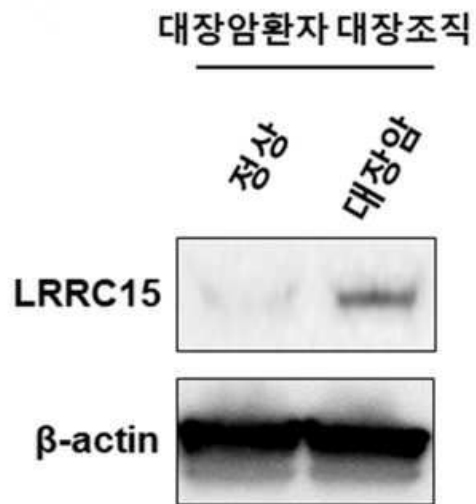
도면2



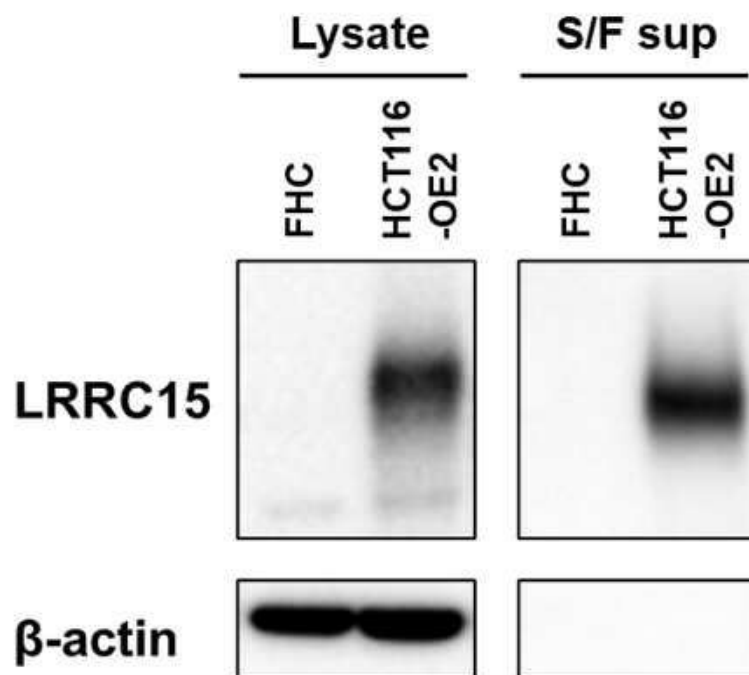
도면3



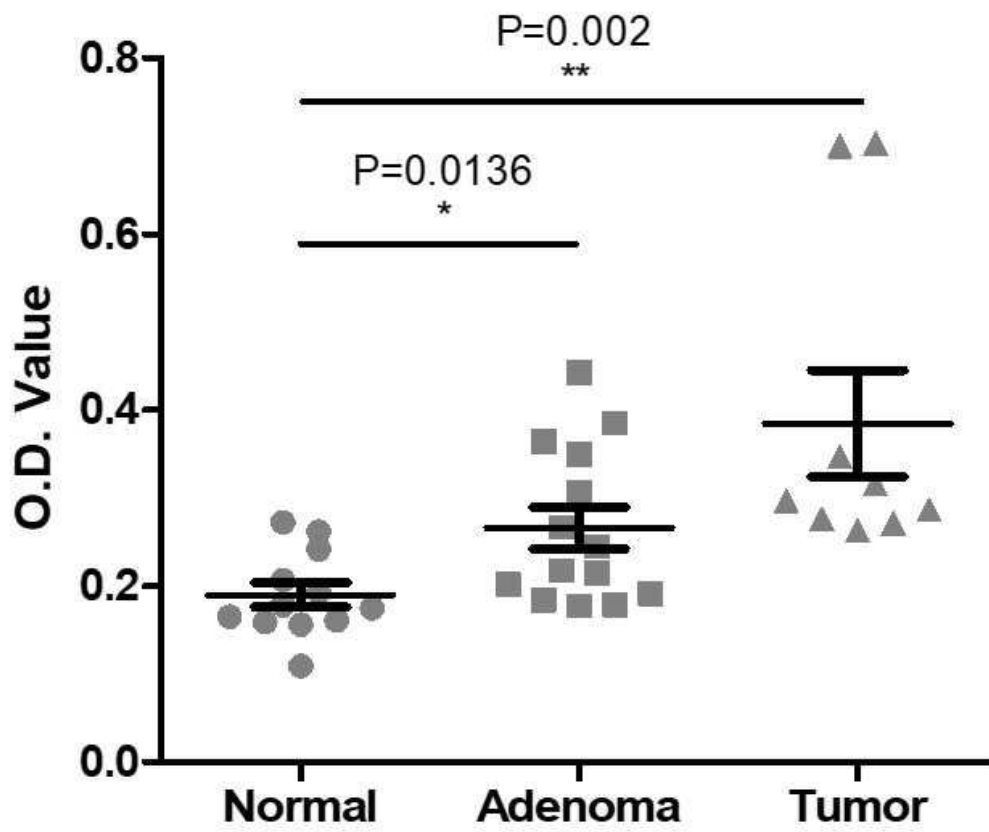
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.