(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0102596
(43) 공개일자 2015년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0024665
(22) 출원일자 2014년02월28일
심사청구일자 2014년02월28일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박윤정
경기도 성남시 분당구 내정로 185, 207동 502호 (수내동, 양지마을청구아파트
박애경
서울특별시 서초구 명달로1길 51 방배어울림아파트 102동 1202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

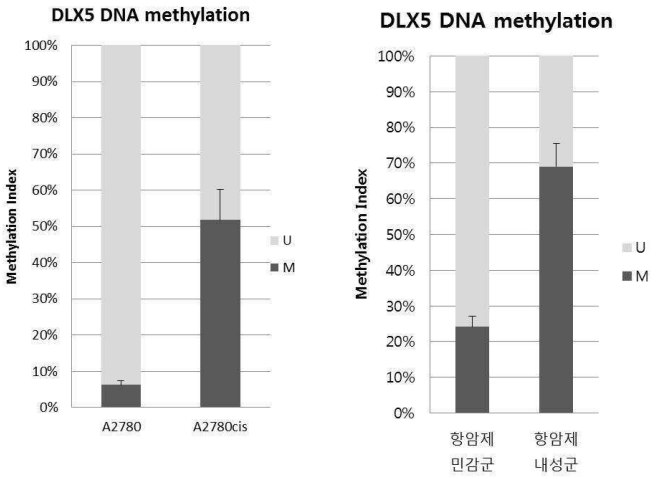
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **난소암 환자의 항암제 치료 반응성 예측을 위한 마커 DLX5**

(57) 요 약

본 발명은 DLX5 (Distal-Less Homeobox 5) 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준 또는 DLX5 의 발현 수준을 검출함으로써, 난소암 환자의 항암제 치료 반응성을 예측하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

안정혁

서울특별시 성동구 독서당로 175, 101동 605호 (옥수동, 극동그린아파트)

주웅

서울특별시 서초구 서초중앙로29길 28, 307동 602호 (반포동, 미도아파트)

임진영

경기도 성남시 수정구 모란로 65, 108동 903호 (수진동, 삼부아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465012711
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술연구개발사업-병원특성화연구센터
연구과제명	재발 조기 예측을 위한 후성유전학적 진단법 개발(2세부)
기 여 율	1/1
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2012.05.01 ~ 2017.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

DLX5 (Distal-Less Homeobox 5) 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제, 또는 DLX5 의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는,

난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는

비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소;

상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머; 및

비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염인 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI 또는 *Not*I인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 DLX5 의 발현 수준을 측정하는 제제는 DLX5 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 DLX5 의 발현 수준을 측정하는 제제는 DLX5 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 유전자의 CpG 부위는 서열번호 2의 염기서열 중에 나타나는 CpG 를 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는,

난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 키트.

청구항 9

난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 DLX5 유전자의 CpG 부위의 메틸화를 검출하는 방법.

청구항 10

난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 환자의 시료로부터 DLX5 를 검출하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 DLX5 (Distal-Less Homeobox 5) 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준 또는 DLX5 의 발현 수준을 검출함으로써, 난소암 환자의 항암제 치료 반응성을 예측하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 국가암등록사업 연례보고서(2010년 암등록통계)에 따르면 난소암은 우리나라 여성에서 10번째로 많이 발생하는 암으로서 연간 1.6%의 증가율로 발생자의 수가 증가되고 있다. 또한, 국가 암 관리사업이 확대 시행된 최근 10년 동안 암 환자의 5년 상대생존율이 63.9%에서 73.3% 증가했음에 반하여, 난소암 환자의 5년 생존율은 61.3%에서 60.4%로 오히려 감소한 것으로 나타나, 난소암의 치료에 난항을 겪고 있다.

[0003] 난소암은 초기에 발견되는 확률이 환자 전체의 15% 에 불과하며, 환자 전체의 65% 이상이 다른 조직에 전이가 발생된 채로 발견된다. 현재 난소암의 치료는 자궁, 난소, 림프절 등의 전이 병소 및 전이 의심 병소를 절제하는 외과적 수술과 시스플라틴 등의 백금 기반의 항암 화학요법을 병행하는 경우가 많다. 그러나, 1차 수술 시에 양측의 난소를 모두 제거하기 때문에 그 이후에 재발 할 경우에는 전이성 재발로서 예후가 매우 좋지 않다. 또한, 치료 이후에 재발된 환자는 화학요법에 내성을 가지는 경우가 많아, 후속적인 치료가 매우 어렵다.

[0004] 더욱이, 비슷한 임상적 특징을 가지는 환자들 중에서도 항암 화학요법에 대한 반응이 다양하게 나타나고, 같은 병기의 환자라 할지라도 환자의 생존에 상당한 차이를 보인다. 따라서 환자의 임상적 결과를 보다 잘 예측하고 특정 치료법에 효과적인 환자군을 선별할 수 있는 분자 바이오마커를 찾으려는 연구가 수없이 행해지고 있다.

[0005] 항암제에 내성을 가진 환자의 경우에는 염기서열의 변화가 아닌, 다른 환경적인 이유에 의해서 유전자의 발현에 영향을 받아 내성을 획득하게 됨으로 후생유전학 요인들이 주요하게 작용할 가능성이 있다. 후성 유전체학의 대표적인 연구분야는 DNA 염기 서열 중 사이토신에 메틸레이션이 붙는 DNA 메틸화와 히스톤의 화학적 변형, small RNA에 의한 발현조절 등이 있다. 그러나, 후생 유전학적 요인들과 항암제 반응의 연관성을 분석하여 항암 화학요법에 대한 반응과 생존을 예측할 수 있는 바이오마커를 제공하는 기술은 거의 개발되지 않고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국특허공개 KR 2010-0075857

(특허문헌 0002) 미국특허공개 US 2013-0177912

(특허문헌 0003) 미국특허공개 US 2012-0302572

(특허문헌 0004) 미국특허등록 US 8323941

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명에서는 항암제에 민감성을 나타내는 세포와 항암제 내성을 나타내는 세포 간의 유전자 발현 양상을 비교하였으며, 항암제 내성을 나타내는 세포에서 특이적으로 발현의 변화를 나타내는 유전자들을 선별하였다. 나아가, 상기 유전자 발현의 변화를 나타낸 유전자들 중 CpG 부위의 메틸레이션 변화가 유전자 발현에 영향을 준 것으로 확인된 유전자들을 최종 선별하여, 이와 같이 유전자의 발현에 영향을 준 특정 CpG 부위를 확인하였으며, 해당 유전자의 특정 CpG 위치에서 일어나는 메틸화 정도를 측정함으로써 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 하나의 목적은 MTA3 (Metastasis Associated Family, Member 3), DLX5 (Distal-Less Homeobox 5), TET1 (Tet Methylcytosine Dioxygenase 1) 및 UCHL1 (Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제, 또는 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 마이크로어레이를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 하나의 목적은 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1 유전자의 특정 CpG 부위가 항암제 내성 세포에서 특이적으로 과메틸화되며, 이에 의하여 상기 유전자의 발현이 특이적으로 감소한다는 발견에 기초한 것으로, 상기 유전자들의 CpG 부위의 메틸화 정도 또는 상기 유전자의 발현 정도를 바이오 마커로서 이용하여 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하는 기술을 제공한다.

[0014] 상기 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1 유전자의 CpG 는 각각 항암제 내성 세포에서 특이적으로 과메틸화되며, 이에 의하여 상기 유전자의 발현이 특이적으로 감소하므로, 이들 유전자 각각을 항암제에 대한 환자 반응성을 예측하기 위한 단독의 바이오 마커로 사용하거나, 이들 중 2종 이상을 복합 바이오 마커로 사용할 수도 있다.

[0015] 따라서, 하나의 양태로서, 본 발명은 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0016] 바람직한 하나의 양태로서, 본 발명은 MTA3 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0017] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0018] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 DLX5 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0019] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 MTA3, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 TET1 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0021] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 MTA3, DLX5 및 UCHL1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 UCHL1 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0023] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 MTA3, DLX5 및 TET1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에서, MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1 유전자의 mRNA 는 공지된 유전자 데이터베이스에서 그 서열 정보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 인간 MTA3 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_001282756.1 에서 확인할 수 있고, 인간 DLX5 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_005221.5 에서 확인할 수 있고, 인간 TET1 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_030625.2 에서 확인할 수 있으며, 인간 UCHL1 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_004181.4 에서 확인할 수 있다.

[0025] 본 발명에서 용어, "메틸화"는 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 바람직하게, 본 발명에서 메틸화 여부는 특정 유전자의 특정 CpG 부위의 사이토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미한다. 메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제되며, 반대로, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가하게 된다.

[0026] 포유동물 세포의 게놈 DNA 에는 A, C, G 및 T 에 더하여, 사이토신 링의 다섯번째 탄소에 메틸 그룹이 부착된 5-메틸사이토신(5-methylcytosine, 5-mC)이라는 5번째 염기가 존재한다. 5-메틸사이토신의 메틸화는 CpG라고 불리는 CG 디뉴클레오티드(5'-mCG-3')의 C에서만 일어나고, CpG의 메틸화는 alu 또는 트랜스포존과 게놈의 반복서열이 발현되는 것을 억제한다. 또한, 상기 CpG의 5-mC가 자연적으로 탈아미노화하여 티민(T)이 되기 쉽기 때문에, CpG는 포유동물 세포에서 대부분의 후생유전학적 변화가 자주 일어나는 부위이다.

[0027] 본 발명에서 용어, "메틸화 수준의 측정"은 MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것으로서, 메틸화 특이적인 PCR, 예를 들어 메틸화 특이적 PCR (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP), 실시간 메틸화 특이적 PCR (real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 또는 정량 PCR 등을 통해 측정할 수 있다. 또는, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱과 같은 자동염기분석 등의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 바람직하게, MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1 유전자의 CpG 부위란, 상기 유전자의 DNA 상에 존재하는 CpG 부위를 말한다. 상기 유전자의 DNA 는, 상기 유전자가 발현하는데 필요하며 서로 작동가능하게 연결되어 있는 일련의 구성 단위를 모두 포함하는 개념으로, 예를 들어, 프로모터 영역, 인핸서(Enhancer) 영역, 단백질 코딩 영역 (open reading frame, ORF) 및 터미네이터 영역을 포함한다. 따라서, MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1 유전자의 CpG 부위는 해당 유전자의 프로모터 영역, 인핸서 영역, 단백질 코딩 영역 (open reading frame, ORF) 또는 터미네이터 영역 등에 존재할 수 있다.

[0029] 바람직하게, 본 발명에서 MTA3 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, MTA3 유전자의 인핸서 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있고, 2번 염색체 (Chr2)의 42794620 내지 42795547 (928bp) 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 2번 염색체의 42794620 내지 42795547 번째 염기를 서열번호 1로 나타내었다.

[0030] 또한 바람직하게, 본 발명에서 DLX5 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, DLX5 유전자의 인핸서 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있고, 7번 염색체 (Chr7)의 96651477 내지 96652214 (738bp) 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 7번 염색체의 96651477 내지 96652214 번째 염기를 서열번호 2로 나타내었다.

[0031] 또한 바람직하게, 본 발명에서 TET1 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, TET1 유전자의 프로모터 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있고, 10번 염색체 (Chr10)의 70321183 내지 70322935 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 10번 염색체의 70321183 내지 70322935 번째 염기를 서열번호 3으로 나타내었다.

[0032] 또한 바람직하게, 본 발명에서 UCHL1 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, UCHL1 유전자의 프로모터 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있고, 4번 염색체 (Chr4)의 41258314 내지 41259927 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 4번 염색체의 41258314 내지 41259927 번째 염기를 서열번호 4로 나타내었다.

[0033] 본 발명에서는 상기 인간 게놈 염색체 부위의 염기서열은 최신 버전인 The February 2009 Human reference sequence (GRCh 37)에 따라 표현하였지만, 상기 인간 게놈 염색체 부위의 구체적 서열은 게놈 서열 연구 결과가 업데이트됨에 따라서 그 표현이 다소 변경될 수 있으며, 이러한 변경에 따라 본 발명의 상기 인간 게놈 염색체 부위의 표현이 상이해질 수 있다. 따라서, 본 발명의 The February 2009 Human reference sequence (GRCh 37)에 따라 표현된 인간 게놈 염색체 부위는 본 발명의 출원일 이후 인간 표준 염기서열(human reference sequence)이 업데이트되어 상기 인간 게놈 염색체 부위의 표현이 지금과 다르게 변경된다고 하여도, 본 발명의 범위가 상기 변경된 인간 게놈 염색체 부위에 미치게 됨은 자명하다고 할 것이다. 이러한 변경 내용은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자라면 누구라도 용이하게 알 수 있는 사항이다.

[0034] 본 발명자들은 항암제에 민감성을 나타내는 세포와 항암제 내성을 나타내는 세포 간의 유전자 발현 양상을 비교하였으며, 항암제 내성을 나타내는 세포에서 특이적으로 발현의 변화를 나타내는 유전자들을 선별하였다. 또한, 상기 유전자 발현의 변화를 나타낸 유전자들 중 CpG 부위의 메틸레이션 변화가 유전자 발현에 영향을 준 것으로 확인된 유전자들을 최종 선별하여, 이와 같이 유전자의 발현에 영향을 준 특정 CpG 부위를 확인하였으며, 해당 유전자의 특정 CpG 위치에서 일어나는 메틸화 정도를 측정함으로써 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0035] 따라서, MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1의 CpG 위치에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 과메틸화는 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있는 바이오 마커로 활용될 수 있다.

[0036] 본 발명에서, 환자는 난소암이 발병한 환자를 의미한다. 이들 난소암 환자로부터 획득한 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨 등으로부터 유전자 시료를 얻는데, 그 유전자 시료는 DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA를 포함한다.

[0037] 본 발명에서 용어, "항암제에 대한 반응성 예측"이란 환자가 항암제 치료에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응할지 여부를 예측하는 것, 또는 항암제 내성의 위험성을 예측하는 것을 의미한다. 본 발명의 예측 방법은 난소암 발병 환자에 대한 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다. 바람직하게, 상기 항암제는 백금 기반의 항암제, 일예로 시스플라틴일 수 있다.

[0038] 일반적으로 난소암의 경우에는 항암 화학요법으로 치료를 시행하고 있고, 특히 시스플라틴 등의 백금 기반의 항암제 병합요법을 가장 많이 사용하고 있지만, 비슷한 임상적 특징 또는 비슷한 병기를 가지는 환자들 중에서도 항암 화학요법에 대한 반응이 다양하고 생존에 상당한 차이를 보인다. 본 발명의 상기 방법을 이용하면 항암 화학요법에 대한 반응성을 쉽게 예측할 수 있으며, 이에 따른 생존 예후를 판단할 수 있어, 추가 필요한 치료 방법의 사용 여부를 결정할 수 있다. 이로써 난소암 발병 후의 생존율을 높일 수 있다.

[0039] 또한, 항암제 내성 암 세포의 비정상적인 메틸레이션의 변화는 조직, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 생물학적 시료에서 얻은 게놈 DNA의 메틸레이션 변화와 상당한 유사성을 보이므로, 본 발명의 마커를 이용할 경우 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 대하여, 혈액이나 체액 등을 통한 손쉬운 진단이 가능하다는 장점이 있다.

[0040] 본 발명에서, CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다.

[0041] 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 CpG 부위의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다(WO01/26536; US2003/0148326A1).

[0042] 또한, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있다. 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 상기 제한효소 인식부위의 C에서의 메틸화 또는 비메틸화에 따

라 제한효소에 의한 절단 여부가 달라지고 이를 PCR 또는 서던블롯(Southern Blot) 분석을 통해 검출할 수 있게 된다. 상기 제한효소 이외의 다른 메틸화 민감성 제한효소는 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0043] 환자의 MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1 유전자의 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 대표적인 방법으로, 환자의 생물학적 시료에서 게놈 DNA를 수득하고, 수득한 DNA에 메틸화되지 않은 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소를 처리한 후, 상기 처리된 DNA를 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭시키고 그 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 것을 통해 측정할 수 있다.

[0044] 따라서, 본 발명의 제제는 MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 또한, 프라이머는, 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 프라이머의 서열은 반드시 주형의 서열과 정확히 같을 필요는 없으며, 충분히 상보적이어서 주형과 혼성화될 수 있으면 된다. 프라이머의 위치 혹은 프라이머 결합부위는 프라이머가 혼성화하는 표적 DNA 절편을 말한다.

[0045] 본 발명의 프라이머는 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍일 수 있다.

[0046] 상기 조성물 및 키트에는 상기 제제 이외에도, 중합효소 아가로스, 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0047] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0048] 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 MTA3 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0049] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 DLX5, TET1 및 UCHL1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0050] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 DLX5 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0051] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 MTA3, TET1 및 UCHL1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0052] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 TET1 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0053] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 MTA3, DLX5 및 UCHL1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0054] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 UCHL1 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함

하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0055] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 MTA3, DLX5 및 TET1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명에서 용어 "환자의 시료"란 항암제 내성에 의해 MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1 유전자의 메틸화 수준이 차이 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 먼저, 환자로부터 게놈 DNA를 수득하여 메틸화 수준을 측정하기 위하여, 게놈 DNA의 수득은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법(Tai et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 8: 297-303, 1990), CTAB 분리법(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; Murray et al., Nuc. Res., 4321-4325, 1980) 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.

[0058] 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는, 보다 상세하게는, (a) 수득된 시료 내 게놈 DNA를 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및 (b) 상기 처리된 DNA를 해당 유전자의 특정 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함할 수 있다.

[0059] 상기 (a) 단계에서 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트일 수 있으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 특정 CpG 부위의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다.

[0060] 또한, 상기 (a) 단계에서 메틸화 민감성 제한효소는 상기에서 설명한 바와 같이, 특정 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있으며, 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 상기 (b) 단계에서 증폭은 통상적인 PCR 방법에 의해 수행될 수 있다. 이때 사용되는 프라이머는 상기에서 설명한 바와 같이, 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 쌍일 수 있다.

[0062] 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는, (c) 상기 (b) 단계에서 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 (c) 단계에서 증폭된 결과물의 존부는 당 업계에 공지된 방법, 예를 들면 전기영동을 수행하여 원하는 위치의 밴드의 검출 여부에 따라서 수행될 수 있다. 예를 들면, 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시키는 화합물을 사용한 경우 상기 (a) 단계에서 사용한 두 종류의 프라이머쌍, 즉 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍에 의해 각각 증폭된 PCR 결과물의 존부에 따라 메틸화 정도를 판단할 수 있다. 바람직하게, 샘플 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하고, 해당 유전자의 CpG 부위를 PCR로 증폭하고, 증폭된 부위의 염기서열을 분석하는 바이설파이트 게놈 시퀀싱 방법을 사용하여 메틸화 여부를 판단할 수 있다.

[0063] 또한, 제한효소를 이용한 경우에도 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어 mock DNA에서 PCR 결과물이 나타난 상태에서, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 있는 경우는 CpG 부위가 메틸화된 것으로 판단하고, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 없는 경우는 CpG 부위가 비메틸화 한 것으로 판단하는 것에 따라 그 메틸화 여부를 판단할 수 있으며, 이는 당업자에게 자명하다. 상기에서 mock DNA란 시료에서 분리되고 아무런 처리를 하지 않은 상태의 시료 DNA를 의미한다.

[0064] 이와 같은 방법에 따라, 환자 시료 내 MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1 유전자의 특정 CpG 부위가 과메틸화 상태로 측정되는 경우, 해당 환자가 항암제에 대하여 반응성을 나타낼 것으로 예측할 수 있는 것이다.

[0065] 따라서, 상기 본 발명에 따를 경우, MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1 유전자의 CpG의 메틸화 여부를 효과적으로 확인하여 난소암 환자의 항암제 반응성을 용이하게 예측할 수 있다.

[0066] 한편, 본 발명에서는 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1 유전자의 특정 CpG 부위가 항암제 내성 세포에서 특이적으로

과메틸화되며, 이에 의하여 상기 유전자의 발현이 특이적으로 감소된다는 것을 확인하였다.

[0067] 따라서, 하나의 양태로서, 본 발명은 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0068] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 마이크로어레이에 관한 것이다.

[0069] 본 발명의 용어, "MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 제제"는 난소암 환자의 항암제 반응성을 예측하기 위하여 환자의 시료에서의 상기 유전자 또는 이에 의해 코딩되는 단백질의 발현을 직접 또는 간접적으로 측정하여 발현 정도를 확인하는 제제를 의미한다. 예를 들어, 상기 제제는 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 제제는 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명에서, MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1의 발현 수준은 해당 유전자의 mRNA 의 발현수준 또는 유전자에 의해 코딩 되는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 알 수 있다. 본 발명에서 "mRNA 발현수준 측정"이란 환자의 시료에서 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA 의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응 (RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응 (Competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응 (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 "단백질 발현수준 측정"이란 환자의 시료에서 마커 유전자에 의하여 코딩되는 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent asay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion),오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 본 발명의 용어, "프라이머"는 상술한 바와 같다.

[0072] 본 발명에서 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지(Labelling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인 할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오티드 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 본 발명의 마커 폴리뉴클레오티드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 항암제 반응성을 예측할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0073] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브는 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 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0074] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수항체도 포함된다. 본 발명에 사용되는 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 결합기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

[0075] 본 발명의 키트는 MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1의 mRNA 발현수준 또는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써

마커를 검출할 수 있다. 본 발명에서 키트는 항암제 내성 세포에서 특이적으로 발현이 감소되는 MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1의 발현수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브, 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0076] 구체적인 일례로서, 본 발명에서 상기 MTA3, DLX5, TET1 및/또는 UCHL1 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필수한 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 상기 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오디트(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0077] 또한, 본 발명의 키트는 마이크로어레이를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 유전자 검출용 키트일 수 있다. 마이크로어레이, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 마이크로어레이에서 선택된 10개 이상의 유전자 또는 그 단편에 해당하는 올리고뉴클레오티드 또는 그의 상보가닥 분자가 집적된, DNA 마이크로어레이일 수 있다. 상기 올리고 뉴클레오티드 또는 이의 상보가닥 분자는 상기 유전자의 18 내지 30개의 핵산을 포함하고, 바람직하게는 20 내지 25개의 핵산을 포함할 수 있다. 본 발명의 마이크로어레이는 본 발명의 항암제 내성 특이적 유전자를 이용하여 당업계에서 통상적으로 사용되는 제조 방법에 의하여 용이하게 제조될 수 있다. 마이크로어레이 칩을 제작하기 위해서, 상기 탐색된 표지 유전자를 탐침 DNA 분자로 이용하여 DNA 칩의 기판상에 고정화시키기 위해 파이조일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting)법 또는 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 마이크로어레이 칩의 기판은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-Llysine) 및 알데히드(aldehyde)로 이루어진 군에서 선택되는 활성기가 코팅된 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 기판은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막 및 니트로셀룰로스막(nitrocellulose membrane)으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0078] 또한, 본 발명에서 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.

[0079] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 MTA3, DLX5, TET1 및 UCHL1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0080] 일예로, 본 발명은 환자의 시료로부터 MTA3의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 MTA3 의 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 MTA3 의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0081] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 DLX5, TET1 및 UCHL1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 DLX5, TET1 및 UCHL1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0082] 일예로, 본 발명은 환자의 시료로부터 DLX5의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 DLX5 의 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 DLX5 의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0083] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 MTA3, TET1 및 UCHL1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 MTA3, TET1 및 UCHL1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0084] 일예로, 본 발명은 환자의 시료로부터 TET1의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 TET1 의 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 TET1 의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0085] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 MTA3, DLX5 및 UCHL1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 MTA3, DLX5 및 UCHL1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0086] 일예로, 본 발명은 환자의 시료로부터 UCHL1의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 UCHL1의 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 UCHL1 의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0087] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 MTA3, DLX5 및 TET1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 MTA3, DLX5 및 TET1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0088] 본 발명에서 확인된 바이오마커는 항암 화학요법에 대한 환자의 반응성 및항암제 내성 위험도를 예측함으로써, 항암제에 치료 효과가 있는 환자를 선별하거나 환자의 치료요법을 결정하는데 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0089] 도 1은 기존 A2780 세포주와 항암제에 내성을 가진 A2780cis 세포주 간의 MTA3 유전자 발현 차이, 그리고 항암제 민감성 세포군과 항암제 내성 세포군 간의 MTA3 유전자 발현 차이를 각각 mRNA 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 기존 A2780 세포주와 항암제에 내성을 가진 A2780cis 세포주 간의 MTA3 유전자 DNA 메틸레이션 정도의 차이, 그리고 항암제 민감성 세포군과 항암제 내성 세포군 간의 MTA3 유전자 DNA 메틸레이션 정도의 차이를 각각 DNA 메틸레이션 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다 (U: 비메틸화, M: 메틸화).

도 3은 기존 A2780 세포주와 항암제에 내성을 가진 A2780cis 세포주 간의 DLX5 유전자 발현 차이, 그리고 항암제 민감성 세포군과 항암제 내성 세포군 간의 DLX5 유전자 발현 차이를 각각 mRNA 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 기존 A2780 세포주와 항암제에 내성을 가진 A2780cis 세포주 간의 DLX5 유전자 DNA 메틸레이션 정도의 차이, 그리고 항암제 민감성 세포군과 항암제 내성 세포군 간의 DLX5 유전자 DNA 메틸레이션 정도의 차이를 각각 DNA 메틸레이션 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다 (U: 비메틸화, M: 메틸화).

도 5는 항암제 민감성(sensitive) 세포주와 항암제 내성(resistant) 세포주 간의 TET1 유전자 발현 차이를 mRNA 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 항암제 민감성(sensitive) 세포주와 항암제 내성(resistant) 세포주 간의 TET1 유전자 발현 차이를 qRT-PCR를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 항암제 민감성 세포군과 항암제 내성 세포군 간의 TET1 유전자 DNA 메틸레이션 정도의 차이를 각각 DNA 메틸레이션 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다 (U: 비메틸화, M: 메틸화).

도 8은 TET1 의 발현 이상에 따른 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 항암제 민감성(sensitive) 세포주와 항암제 내성(resistant) 세포주 간의 UCHL1 유전자 발현 차이를 mRNA 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 기존 A2780 세포주와 항암제에 내성을 가진 A2780cis 세포주 간의 UCHL1 유전자 발현 차이를 mRNA 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 기존 A2780 세포주와 항암제에 내성을 가진 A2780cis 세포주 간의 UCHL1 유전자 DNA 메틸레이션 정도의 차이, 그리고 항암제 민감성 세포군과 항암제 내성 세포군 간의 UCHL1 유전자 DNA 메틸레이션 정도의 차이를 각각 DNA 메틸레이션 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다(U: 비메틸화, M: 메틸화).

도 12는 UCHL1 유전자의 DNA methylation massARRAY 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0090] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이

하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0091] **실시예 1. 세포주 및 시스플라틴 항암제 내성 세포 모델**

[0092] 사람의 난소 세포 중 실험모델로 많이 사용되는 PA-1, TOV-21G, TOV-112D, CAOV3, A2780, MDAH2774, ES2, OVCAR3, OV-90 및 SKOV3 의 총 10개의 세포주를 10% 우태아혈청(ATLAS), 100 unit 페니실린(Gibco), 100㎍/ml 스트렙토마이신(Gibco)을 포함하는 배지에서 다음과 같은 조건에서 배양하였다. 또한, A2780 세포주에 1㎛M/ml 의 시스플라틴을 계대배양시에 넣어 의도적으로 항암제에 내성을 획득하게 된 세포모델을 만들었고, 이를 "A2780cis" 라고 명명하였다.

표 1

[0093]

Cat. (cell)	세포주	세포주 유래/관련 질환	형태학	배지	입수처
HTB-77	SKOV-3	인간/선암/전이상태에서 유래	epithelial	McCoy's 5a+10%FBS+1%P/S	(REF)16600-082(Gibco)
CRL-1978	ES-2	인간/암종	fibroblast	McCoy's 5a+10%FBS+1%P/S	(REF)16600-082(Gibco)
CRL-1572	PA-1	인간/기형암종	epithelial	MEM alpha+10%FBS+1%P/S	41061-029(Gibco)
HTB-75	Caov-3	인간/선암	epithelial	DMEM(1.5g/L sodium bicarbonate)+10%FBS+1%P/S	LM001-51(welgene)
CRL-11730	TOV-21G	인간/선암	epithelial	MCDB 105(1.5g/L sodium bicarbonate)&Medium 199(2.2g/L sodium bicarbonate) 1:1 mix	11150-059(Gibco, Medium199)
CRL-11731	TOV-112D	인간/선암	epithelial	MCDB 105(1.5g/L sodium bicarbonate)&Medium 199(2.2g/L sodium bicarbonate) 1:1 mix	11150-059(Gibco, Medium199)
CRL-11732	OV-90	인간/복수	epithelial	MCDB 105(1.5g/L sodium bicarbonate)&Medium 199(2.2g/L sodium bicarbonate) 1:1 mix	11150-059(Gibco, Medium199)
HTB-161	OVCAR-3	인간/선암	epithelial	RPMI 1640(25mM HEPES)+10%FBS+1%P/S	LM011-03(welgene)
CRL-10303	MDAH 2774	인간/선암	mucinous	RPMI 1640(25mM HEPES)+10%FBS+1%P/S	LM011-03(welgene)
93112519	A2780 (parent)	인간/암종	epithelial	RPMI 1640(25mM HEPES)+10%FBS+1%P/S	LM011-03(welgene)
93112517	A2780cis	인간/암종	epithelial	RPMI 1640(25mM HEPES)+10%FBS+1%P/S	LM011-03(welgene)

[0094] **실시예 2. Total RNA 추출**

[0095] 각 세포주에서 총 RNA는 700㎕의 Trizol(RNA-Bee)를 이용하여 추출하였고, 추출된 총 RNA는 1.5%의 아가로스 젤에서 전기영동하여 분해되는 정도를 확인 후 Nanodrop Lite(Thermo)를 이용하여 정량하였다.

[0096] **실시예 3. mRNA 마이크로어레이(Microarray) 분석**

[0097] 각 세포주에서 RNA를 추출하여 Affymetrix Human Gene 1.0 ST를 사용하여 배경을 보정하고, RMA 표준화과정과 log2 변환을 거친 발현량을 이용해 각 유전자의 발현되는 정도를 분석하였다. 10개의 세포주를 시스플라틴 항암제에 반응하는 IC_{50}(half maximal inhibitory concentration)에 따라 차례대로 나열하여 항암제에 민감한 군(Sensitive)과 내성을 갖고 있는 군(Resistant)으로 나누어서 각 군 안에서 평균 발현량의 차이가 0.3 이상인 유전자들을 분석하였다.

[0098] **실시예 4. 정량적 실시간(Quantitative real-time) PCR (qRT-PCR)**

[0099] RNA를 cDNA(complement DNA)로 합성하기 위해 역전사효소(Thermo)를 사용하였다. 1㎍의 RNA에 2㎕의 DNAseI buffer(Thermo)를 넣어주고 1㎕의 DNase I(Thermo) 효소를 넣어 DNA를 제거한 후에, 효소가 작용 할 수 있도록 37℃에서 30분간 반응 한 후에 50mM의 EDTA(fermentas)를 1㎕ 넣어준 후 65℃에서 10분간 반응시켜 효소를 변성시켰다. 그 후에 10mM의 dNTP를 2㎕, 50uM의 oligodT를 1㎕를 넣어 65℃에서 5분 동안 반응시켰다. 그 후에 5X RT buffer 4㎕, 역전사효소 0.5㎕(100U)을 포함한 반응액 20㎕을 42℃에서 60분, 70℃에서 10분 동안 반응하여 cDNA를 합성한 후 이것을 1:4로 희석하여 그 중 2㎕을 이용하여 qRT-PCR의 주형으로 사용하였다. qRT-PCR은 cDNA 2㎕, SYBER green master mix(Qiagen) 5㎕, 각 유전자의 상보적인 primer 10pmole을 포함한 10㎕을 95℃에서 5분 동안 반응한 후, 40 cycle(95℃에서 5초, 60℃에서 10초) 반복하여 증폭하였다. TBP와 GAPDH의 mRNA발현을 내부 대조군(internal control)으로 사용하였으며 각 유전자의 발현은 내부 대조군의 발현 수준으로 △Ct=2-(interesting gene ct - internal gene ct) 방법으로 보정하였다. 사용한 올리고뉴클레오티드 프라이머의 서열은 다음과 같다.

표 2

[0100]

		염기서열
Human TET1	F(forward)	5'-cagccatcagatctgtaagaaaag-3' (서열번호 5)
	R(reverse)	5'-gcctcttgttttcctttataacctc-3' (서열번호 6)
Human GAPDH	F(forward)	5'-gaaggtgaaggtcggagtca-3' (서열번호 7)
	R(reverse)	5'-catgggtggaatcatattgga-3' (서열번호 8)

[0101] **실시예 5. DNA 메틸레이션 마이크로어레이 분석**

[0102] DNA에 메틸화 정도를 측정하기 위해 Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip을 이용하여 DNA 메틸레이션 마이크로어레이를 분석하였다. 메틸레이션 되는 정도는 0부터 1의 값을 갖는 β 값으로 표시되는데, β값이 0이면 해당하는 프로브(Probe)가 있는 CpG 부위에 메틸레이션이 하나도 되지 않는 상태라는 것을 의미하고, 반대로 1인 경우에 해당하는 프로브 주위의 모든 사이토신에 메틸레이션이 일어났다는 것을 의미하게 된다. 항암제에 민감한 군과 내성을 가진 두 군 사이의 메틸레이션의 정도를 비교하기 위해 t-test 검사 방법을 사용하여 p-value가 0.05보다 작고, 메틸레이션 정도(β)가 0.2보다는 큰 CpG 부위를 선정하여 분석하였다.

[0103] **실시예 6. DNA 추출과 바이설파이트(Bisulfite) 처리**

[0104] 바이설파이트(Bisulfite) 처리는 DNA 염기서열 중 사이토신에 메틸기가 치환되어 존재 할 경우에는 그대로 유지되지만, 메틸기가 없을 경우에는 우라실로 바뀌어서 메틸화 정도를 측정할 수 있다. 각 세포주에서 DNeasy blood & tissue kit(Qiagen)을 이용하여 제조사의 매뉴얼을 따라 DNA를 추출했으며, 추출된 DNA는 바이설파이트 처리를 위한 주형으로 사용되었다. 500ng의 DNA가 Zymo EZ DNA methylation kit(zymo)의 매뉴얼을 따라 바이설파이트 처리 되었다.

[0105] **실시예 7. MassARRAY를 이용한 메틸화 정도 분석**

[0106] 바이설파이트(Bisulfite) 처리를 한 DNA는 BT 전용 프라이머를 이용하여 MassARRAY 분석 방법을 통해 메틸화된 정도를 정량적으로 분석하였다. 처리 된 DNA는 Sequenom에서 제공하는 reagent들을 사용하여 탈 인산화 과정과, RNA로 전사(transcription)된 후 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 사이토신과 티아민을 질량으로 구분함으로서 메틸레이션의 정도를 분석하였다. 제조회사인 Sequenom에서 제공하는 메뉴얼을 이용하였다.

표 3

[0107]

		염기서열
Human UCHL1_BT	F(forward)	5'- gagattgtaaggtttgggggtt-3' (서열번호 9)
	R(reverse)	5'-ccactcactttattcaacatctaaaaa-3' (서열번호 10)

[0108] **실험 결과**

[0109] **1. 항암제 내성 세포군에서 MTA3 및 DLX5 인핸서 부위의 CpG 메틸레이션의 과메틸화와 유전자 발현 감소 확인**

[0110] 시스플라틴 항암제에 내성을 가진 A2780cis 세포주에서 기존 세포주(A2780)에 비해 유전자의 발현량과 DNA 메틸레이션에서의 차이가 0.3 이상 나는 프로브가 있는 유전자들을 선별하였다. 그 중 마이크로어레이(Microarray) 결과를 참고하여 내성 세포모델 (A2780cis)과 내성 세포군에서 동일한 경향을 보이는 유전자를 탐색하였다. 그 결과 MTA3 및 DLX5 유전자에서 발현량이 감소되고, 과메틸화(hyper methylation) 되는 현상이 보였다 (도 1 내지 도 4). 또한, DNA 메틸레이션이 증가된 과메틸화 된 프로브가 있는 위치를 ENCODE 데이터에서 제공하고 있는 H3K4Me1, H3K27Ac(인핸서 마커), H3K4Me3(프로모터 마커)를 이용하여 위치를 확인해 본 결과, 프로모터 위치가 아닌 인핸서 부위에 과메틸화가 일어났다는 것을 확인 할 수 있었다. 구체적으로, MTA3 의 과메틸화된 프로브의 위치는 2번 염색체 (Chr2)의 42794620-42795547 (928bp) 부위로 나타났고, DLX5 의 과메틸화된 프로브의 위치는 7번 염색체 (Chr7)의 96651477-96652214 (738bp) 부위로 나타났다.

[0111] 인핸서 부위는 전사인자의 결합을 용이하게 함으로서 전사 효율을 높여주는데, 이 부분이 과메틸화가 되면서 전사인자가 적절하게 결합하지 못해 발현량이 감소하는 것으로 보여진다.

[0112] **2. 항암제 내성 세포군에서 TET1 유전자의 프로모터 프로모터 CpG 의 과메틸화와 유전자 발현 감소 확인**

[0113] 통합 분석(Integration analysis)를 통하여 항암제 내성 세포군과 내성 세포 모델에서 DNA 메틸레이션에서 차이를 보이고 mRNA 발현량이 변하는 유전자들을 공통적으로 검색해 내성 특이적 분자 표적 후보 유전자로 TET1을 선정하였다. TET1의 프로모터 지역에서 항암제 내성 세포군과 민감 세포군 사이에 유의적인 차이(p-value가 0.05)를 보이는 프로브 선별하여 살펴본 결과, 항암제 내성 세포군에서 과메틸화되었고, 유전자가 저발현(down expression)되었다. 또한, TET1 유전자의 프로모터 부위인 5' UTR 의 메틸화 수준이 항암제에 내성을 가질 경우 매우 높아지는 경향을 보였다. 프로모터 부위의 과메틸화(hypermethylation)된 경우에는 TET1의 발현량이 감소되었다. 이러한 경향성은 마이크로어레이 데이터와 qRT-PCR을 통해 확인하였다 (도 5 내지 도 7).

[0114] TET1 의 과메틸화된 프로브의 위치는 10번 염색체 (Chr10)의 70321183 내지 70322935 부위로 나타났다.

[0115] **3. 난소암 환자의 혈액에서 TET1의 발현량 이상에 따른 무병생존율간의 밀접한 연관성 확인**

[0116] 316명의 난소암 환자의 혈액샘플을 분석한(Ovarian Serous Cystadenocarcinoma, TCGA, Nature 2011) 자료를 C-bioportal을 이용하여 분석(Cerami et al. Cancer Discov. 2012 & Gao et al. Sci. Signal. 2013) 한 결과, TET1 유전자의 발현에 문제가 생긴 17명의 환자에게서 무병생존율(Disease free survival) 기간이 짧아졌다 (p value가 0.039). 반면, 전체 생존율(Overall survival)에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (p value가 0.09).

[0117] 또한, TET1의 프로모터 부위에 과메틸화(hypermethylaion)에 따라 발현량이 변화된 경우 환자의 생존율보다는 무병생존율을 단축시켰는데, 이는 TET1의 발현이 감소 된 경우 항암제에 내성을 가지게 되어 재발의 위험성을 높임으로 항암제에 내성을 확인해 재발의 위험 정도를 측정할 수 있는 진단 바이오 마커로 활용될 수 있음을 뒷받침하는 것이다(도 8).

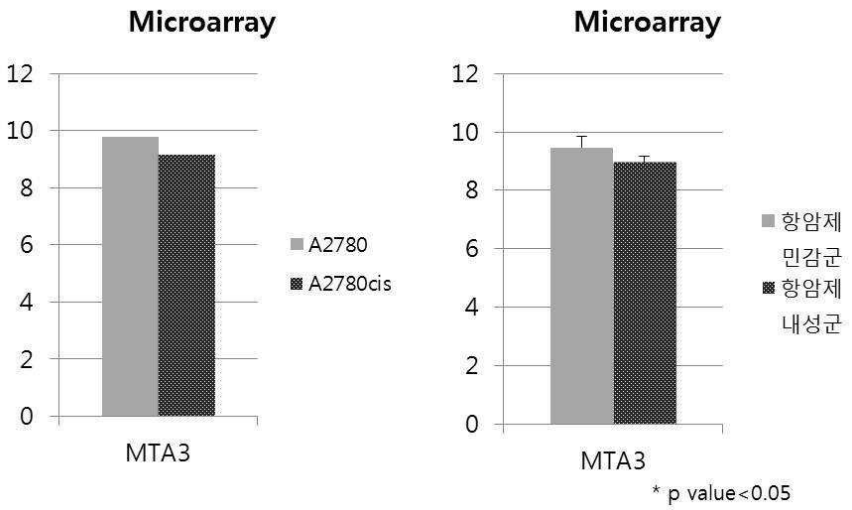
[0118] **4. 항암제 내성 세포군에서 UCHL1 유전자의 프로모터 CpG 의 과메틸화와 유전자 발현 감소 확인**

[0119] 항암제 내성 세포 모델인 A2780cis에서 DNA 메틸레이션에 차이를 보이고, mRNA 발현량이 변하는 후보 유전자 군 중 UCHL1 유전자의 메틸레이션 정도를 massARRAY로 확인 한 결과, UCHL1의 프로모터 부위에서 과메틸화되는 현상을 보였으며, 어레이데이터 결과 항암제 내성 세포 모델(A2780cis)과 내성 세포군에서 저발현되고, 프로모터 부위에 과메틸되는 현상을 보였다 (도 9 내지 도 12).

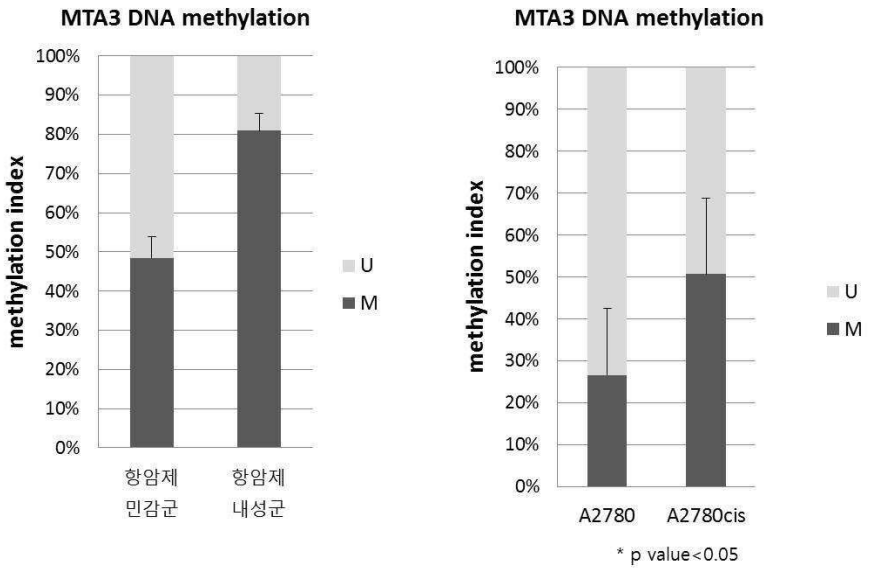
[0120] UCHL1 의 과메틸화된 프로브의 위치는 4번 염색체 (Chr4)의 41258314 내지 41259927 부위로 나타났다.

도면

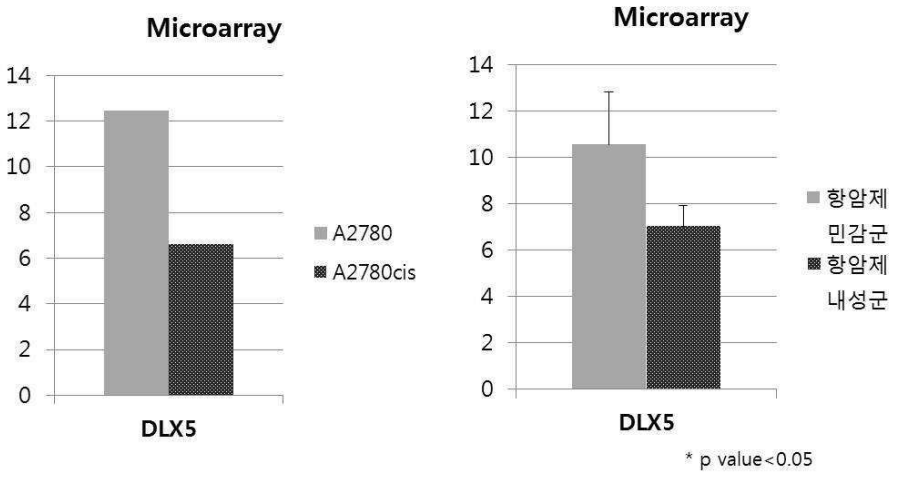
도면1


Microarray
12
10
8
6
4
2
0
MTA3
A2780
A2780cis
Microarray
12
10
8
6
4
2
0
MTA3
항암제 민감군
항암제 내성군
* p value<0.05

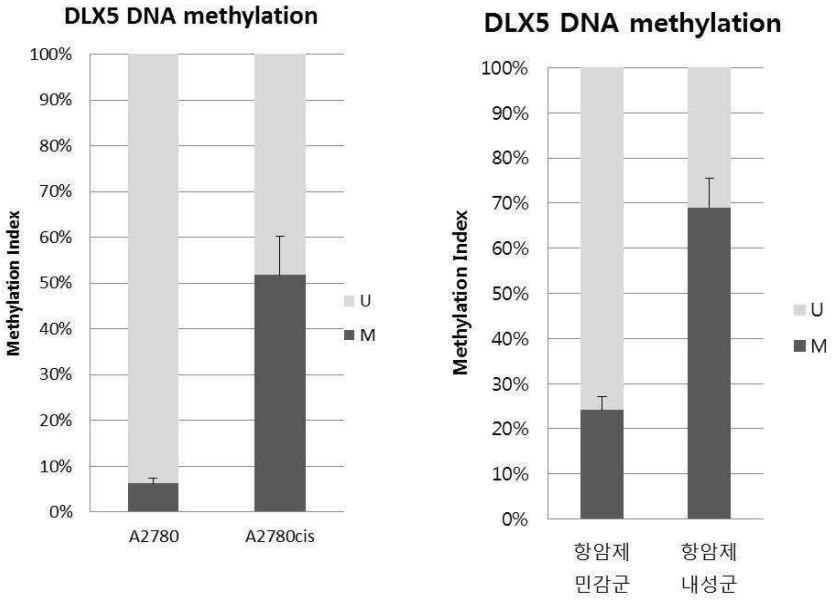
도면2


MTA3 DNA methylation
methylation index
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
항암제 민감군
항암제 내성군
U
M
MTA3 DNA methylation
methylation index
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
A2780
A2780cis
U
M
* p value<0.05

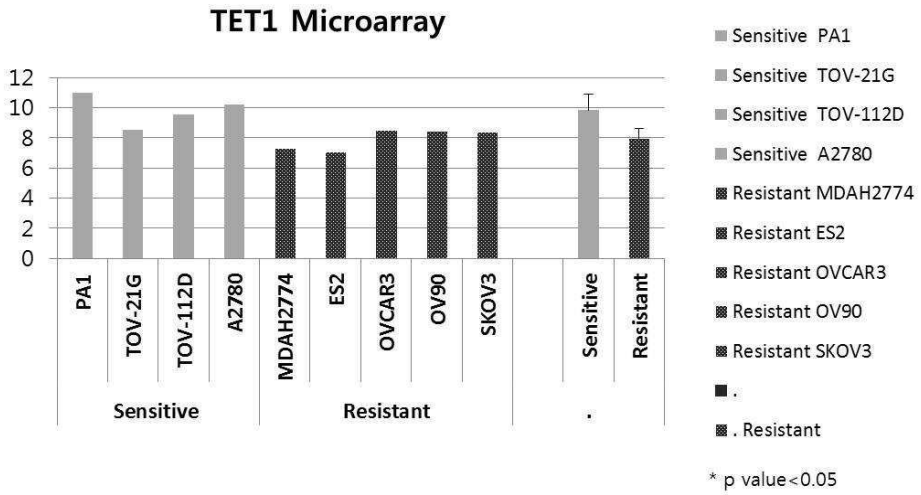
도면3


Microarray
14
12
10
8
6
4
2
0
DLX5
A2780
A2780cis
Microarray
14
12
10
8
6
4
2
0
DLX5
항암제 민감군
항암제 내성군
* p value<0.05

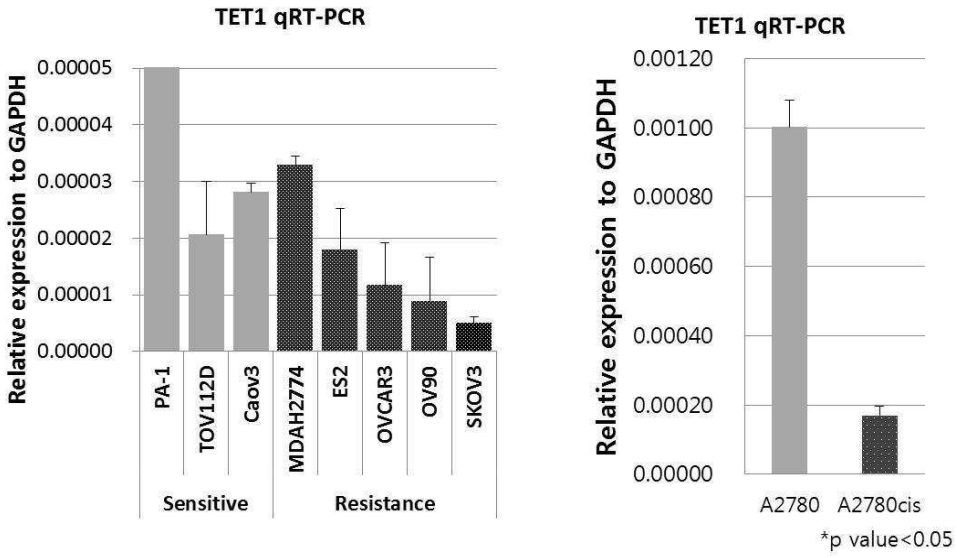
도면4


DLX5 DNA methylation
Methylation Index
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
A2780
A2780cis
U
M
DLX5 DNA methylation
Methylation Index
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
항암제 민감군
항암제 내성군
U
M

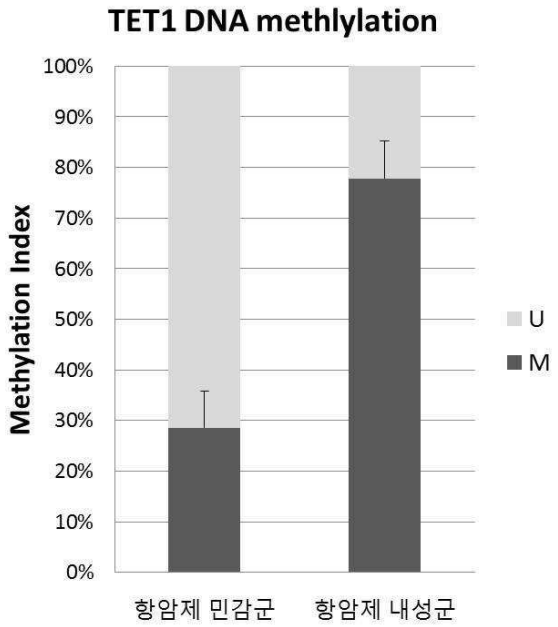
도면5


TET1 Microarray
12
10
8
6
4
2
0
PA1
TOV-21G
TOV-112D
A2780
MDAH2774
ES2
OVCAR3
OV90
SKOV3
Sensitive
Resistant
.
Sensitive
Resistant
Sensitive PA1
Sensitive TOV-21G
Sensitive TOV-112D
Sensitive A2780
Resistant MDAH2774
Resistant ES2
Resistant OVCAR3
Resistant OV90
Resistant SKOV3
.
. Resistant
* p value<0.05

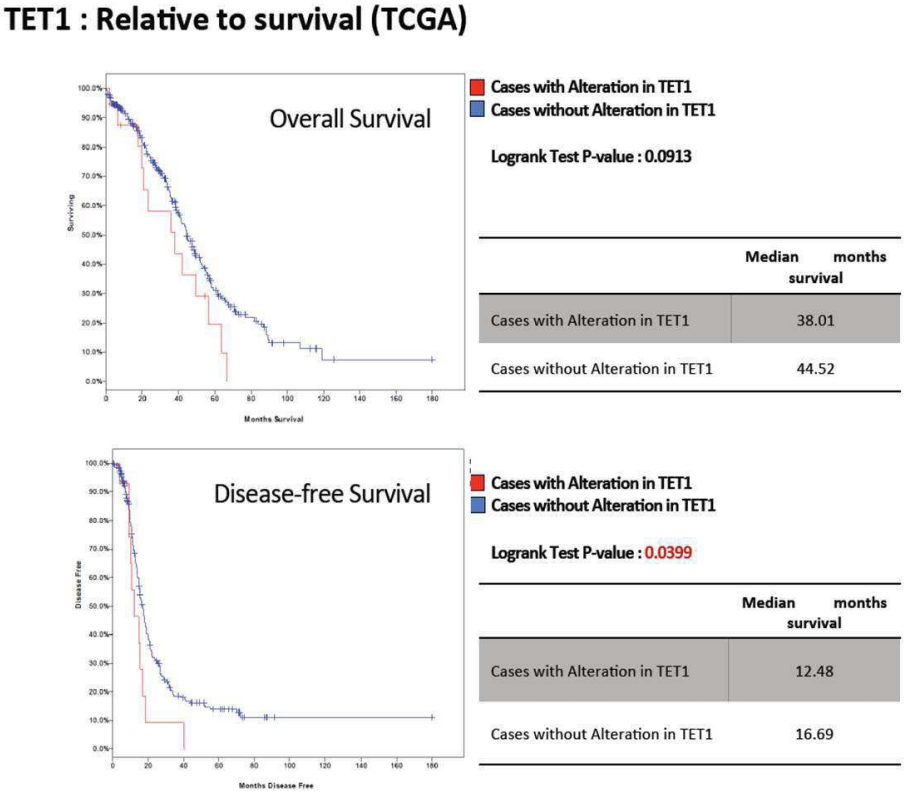
도면6


TET1 qRT-PCR
Relative expression to GAPDH
0.00005
0.00004
0.00003
0.00002
0.00001
0.00000
PA-1
TOV112D
Caov3
MDAH2774
ES2
OVCAR3
OV90
SKOV3
Sensitive
Resistance
TET1 qRT-PCR
Relative expression to GAPDH
0.00120
0.00100
0.00080
0.00060
0.00040
0.00020
0.00000
A2780
A2780cis
*p value<0.05

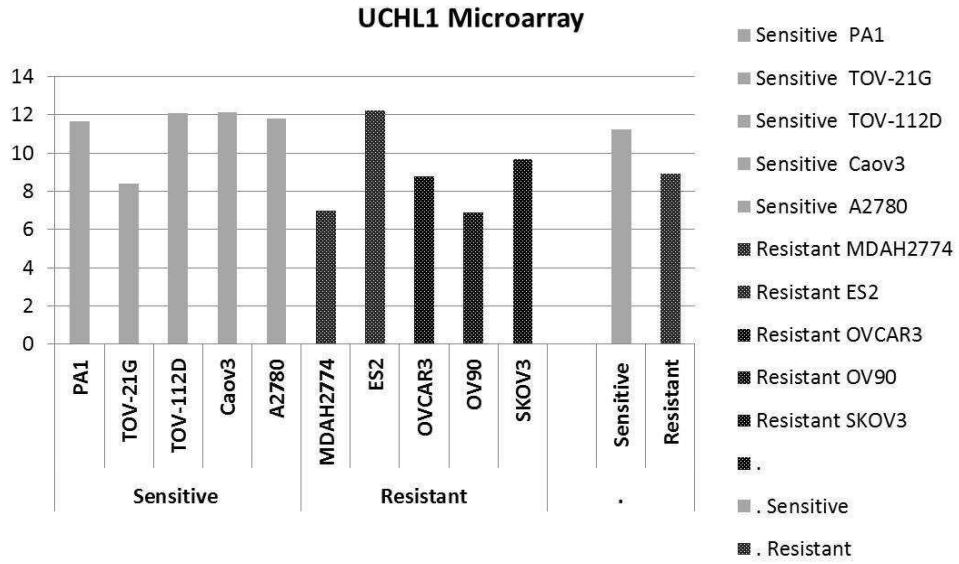
도면7


TET1 DNA methlylation
Methylation Index
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
U
M
항암제 민감군
항암제 내성군

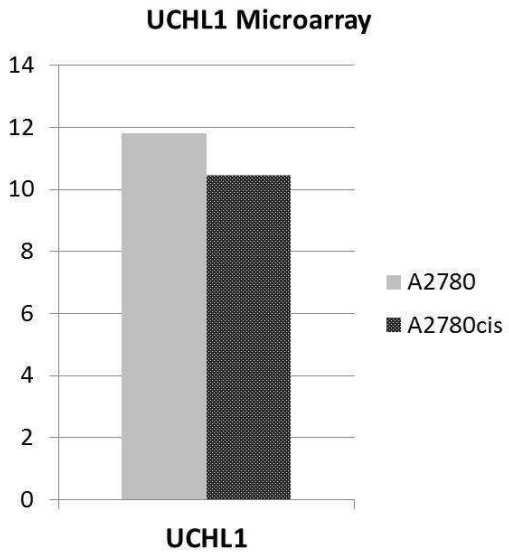
도면8


TET1 : Relative to survival (TCGA)
Overall Survival
Cases with Alteration in TET1
Cases without Alteration in TET1
Logrank Test P-value : 0.0913
Median months survival
Cases with Alteration in TET1 38.01
Cases without Alteration in TET1 44.52
Disease-free Survival
Cases with Alteration in TET1
Cases without Alteration in TET1
Logrank Test P-value : 0.0399
Median months survival
Cases with Alteration in TET1 12.48
Cases without Alteration in TET1 16.69

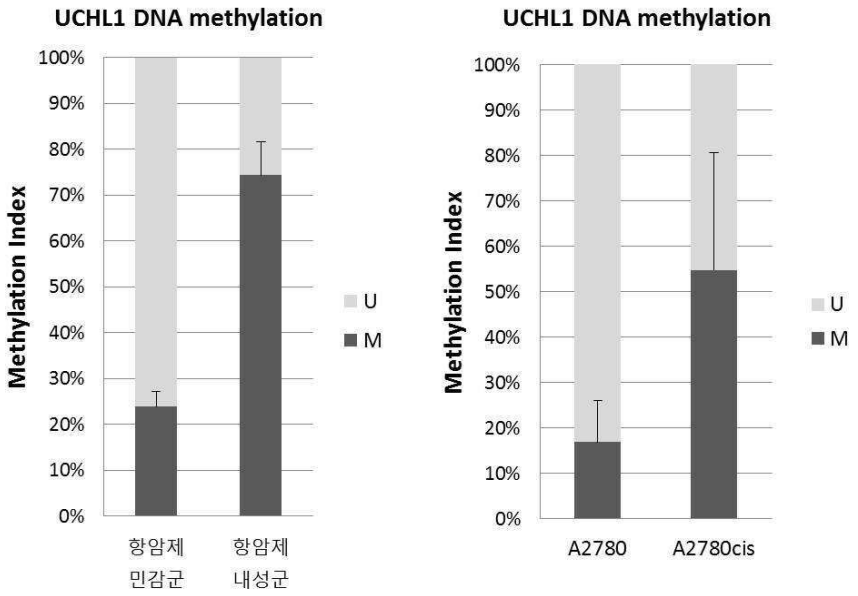
도면9


UCHL1 Microarray
14
12
10
8
6
4
2
0
PA1
TOV-21G
TOV-112D
Caov3
A2780
MDAH2774
ES2
OVCAR3
OV90
SKOV3
Sensitive
Resistant
Sensitive
Resistant
Sensitive
Resistant
Sensitive PA1
Sensitive TOV-21G
Sensitive TOV-112D
Sensitive Caov3
Sensitive A2780
Resistant MDAH2774
Resistant ES2
Resistant OVCAR3
Resistant OV90
Resistant SKOV3
.
. Sensitive
. Resistant

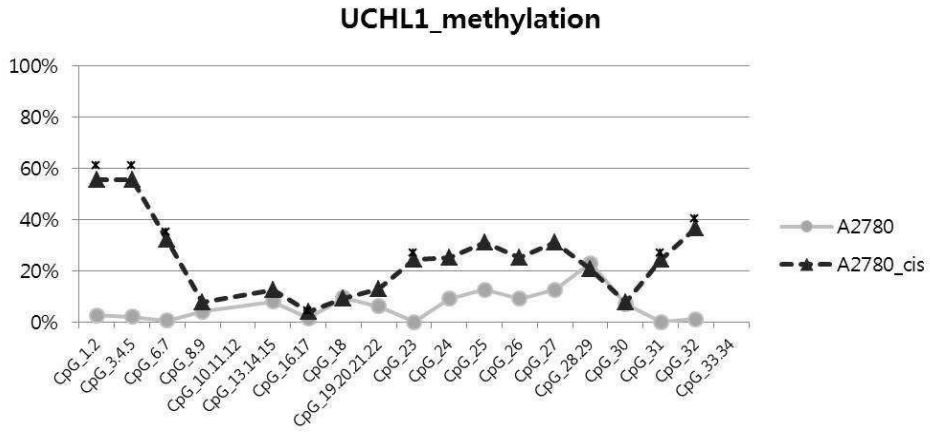
도면10


UCHL1 Microarray
14
12
10
8
6
4
2
0
UCHL1
A2780
A2780cis

도면11



도면12



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> DLX5, a marker for predicting the response to anti-cancer drug in a patient with ovarian cancer

<130> DPP20140606KR

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 928

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> enhancer

<222> (1)..(928)

<223> Chr2 : 42794620-42795547

<400> 1

agcacacagc tgtgtatcac cacacattcc aaacaagcca ccacaccaag aaatcttctt 60

cgtgtttatt atgcagcaat gtctgggagt actttggaat ggactggctt ctctaaagaa 120

agttatttgt gttcatttgg gggatcgcca gctaagattc aacgttgttt ttttttttt 180

gtatctgtga gagtaggaag gccgtgaaaa cagaggttgt ttagagaatt ggcctgggac 240

aataaccatt tagaagcttt aggcacgtaa ccagttaagt gtccatcgac atgaaactga 300

ttgaatacaa tctcctctgt ttgggggtgg tggtgattgt gaactgtagg gccctgttcc 360

cccatggaca aaggaagccc ctcactccta aaggtccctt ttcccagcag aacaggccct 420

gcatatacag tgcccgtcta gagccagggc ctccatctgg gtgttggaca gttggttctg 480

ctcagcccag ttttggggta aacgatgacg cagttagggt ggcctaggaa gggagttttt 540

ctacctctgt ccccagctgg gtctctggcg aggcgggaag cacccggaat cttcctggcc 600

ctagagcctg caggctccag gccggcccct tgaatctcac cgcgaggaag gcaccctgct 660

gcctgcactt atttgcatcc aagagtttgc attgagactg gcgcttgcct actagggcag 720

ccacaggggg gttccccagg gacagaggta gggaaggagg acctgtcttg gggtggacag 780

gtgacggggt accctgggtg ggggaagagg tgctggggag aggctaagcc ccagccccca 840

ctctaattct ctaacagccc ctggtccgca tttgagtgca ggcctctgcc tcagccagga 900

ccctgacccc agggccctcc acttccag 928

<210> 2

<211> 738

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> enhancer

<222> (1)..(738)

<223> Chr7 : 96651477-96652214

<400> 2

catggcagcg ccgtatttac ctgtgtttgt gtcaatccca gcgaggcggc cagctcggcg 60

cgttccggca aggcgaggta ctgagtcttc tgaaaccttc tctgtaatgc ggccagctga 120

aagctggaat aaatagtcct gggtttacga actttctttg gtttgccatt caccattctc 180

acctcgggct cggtcacttc tttctctaaa taatcaaaac agactcagtt aaagcttgtc 240

accagacaat gccccttttg cggaagggcc tcaaatagag tcctagagtt tcttaccact 300

cagtcttcat tctttgccca tatcaccacc acctttgctt ttcaggaccg cgataaatat 360

gcacctaccc caaatatgga aaagcgggat agcctctgat taattcctac tctgttcatt 420

cagatagttt gtgcaaagcg cttcctacaa cactgctttc tccttggcat ctgggattca 480

gctcttgcgg tcgttgcttc ttctcccgga cttgttttta cgcccaccct gtgctcctcc 540

gcgtttccgc ccctccccag gcttcaagaa caccagcccc tccccaggct tcaaggaggt 600

ggccctgggc cgtgacccta cttctgtcgg cgtctgttcg ggcgcccgca gaagccagac 660

tcttgggcag ggaagacgct aaccgaggtc tccaaagttc aaagacccac aagcaaactg 720

ctccttcact tcagcagc 738

<210> 3

<211> 1753

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(1753)

<223> chr10 : 70321183-70322935

<400> 3

gagtagagtg tgttctgtca aaatggcatt taagaaactc atttatgagc accactgggt 60

cgctggacgc gctggccttg cgatcccatc agtccccgtc tggcgggatc ccggagcggg 120

ccccgagggt gggaggtgcg cggagctggg tgctggggct ggtcgtgcag cacgtgaggg 180

gcctggtcct cgctctcggg cgaggaggcg gccgcacaac ctaccgcccc cagagaaaaa 240

atgctctcct ctctctctgt gcttccctcc ctccctccct ctcccccgct ccggtccccg 300

cctctctcgc cccaggctct tgaatatata tatatatata ttctacaaga agtggtctgg 360

aagggactgg ccgacgctgg taatctttcc acgtgaacga gaaacccacg ctgggcattt 420

ctgatccact aaaaactaaa gtgtttccaa aagaacactt aaagcttcag cctcggagtc 480

tttcccgcgc ccccaactcg tccctctccc aaattaacca acctttctgc atacgtctct 540

tagggtgcct cttcccctcc gtcccggttc cactcctggg cactaaacga gctgcacaat 600

atgtcctagt aatgactgct ttttgaagaa atgtttgaaa agtgctgcaa gaccttggag 660

cgagaacagg attaggtaca cagccctggg ccggcggggt gagccgcgcg cgccactgga 720

agagcggcgc tgtatagcag cagccccagg tctcccctgg acctgagtgt gctcggcgtc 780

cccacccca atataaagta aaataaaagc aatggtttaa ttaggcctca ggatacgaaa 840

aatatggaaa aggcgcttct taaccagtaa gggcaacagt tatttggagc acactaggaa 900

tttatgacta caattaaacc aggggcaggg gtacacgtag ataggtacgg aaataaggag 960

attggtgtga gttaataatc gaaagactta ggtgaatcaa accaagaatc aaaagactta 1020

ggtggctttt ggtgtgtttc cgattttatc ggtattgatc atacgggtcc ccctttccc 1080

caattaaggg atttttaatt agtttgtcag tctttaaagc taagttgtgg tttcaattaa 1140

atttcagaat caagatatac gggaaatggc agacagtgtc cttttctctt tgcaaagatg 1200

aggagtccag gcttacaact ctgggactgc cactttccat tttaataaga gttaactatc 1260

gctctccggg ctggtctccc agaatagatg ggtgggaggg ttgggtctcc actgtccctg 1320

ccctttgttt ctcttccttc tcccatctga tttgtctccc ctcccccacc ttctgagcgt 1380

ccgtatcttc cctgcacact tgatttcccc tatccccttg gtcttttagt tttcggcctt 1440

ttgatcccag ttgccttttt atgttctagc tttattacta tagatgtcga acccccttcct 1500

cagtttttac tataagtaat ttttgccctt cctcagtttt ttactataca tttcttcccc 1560

ttctttcgtt tttggccttt tttgttttct ttttgggcat tttcttcctt ctcttgcttt 1620

ttcttctact tcctcctgtt gtgtgttatg tctttcttgt cttcggaagg acagttctat 1680

gtccattcta acgtctccct tccctttttct tggccctttt ccccccctttt ttcccccttc 1740

ctctctgcag ggc 1753

<210> 4

<211> 1614

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(1614)

<223

> chr4 : 41258314-41259927

<400> 4

tgtattaccc tcacatcccc cagctttcta ctgctctccc aggaccaacc atttcttccg 60

cgggagtcac attacatcag cattcctaat gcagtatctg ttatctacca gattctgttt 120

tattctaggt agtcacttaa aaacgaacct cggtactggt ctgacttaac atggaggagg 180

aattgtctaa ggttaaacgc aaactgctga gagatttggg gcgggggggca cacatttaca 240

ttcattcgta ttaaatatat acctgttgaa tttgtgcttt ttctcaaatg cttcagagac 300

tcgagcttta gagtaattgg gatggtgaaa ggatgggttt ccagaaactt cgcccaaaat 360

taaagactcc atcaaaagga ctgctccata cactcaagga acacccacca acaaatcccg 420

tctccacaac caccagatta tctcaccggc gagtgagact gcaaggtttg ggggcccggc 480

cgtaccactc cgcgctgcgc acgggggtt cgtacccatc tggccgcgac cgtccgtttc 540

cccctcgctt ggttctgccc ctgctccccc tgcacaggcc tcacagtgcg tctggccggc 600

gctttatagc tgcagcctgg gcggctccgc tagctgtttt tcgtcttccc taggctattt 660

ctgccgggcg ctccgcgaag atgcagctca agccgatgga gatcaacccc gaggtgagcg 720

ccaggtgcac cgctacccgg agagcgcgag gccgagggag ggggagccga gtcgctgatc 780

ggttcggttt tgccttttc tttgcatttg cctttcagat gctgaacaaa gtgagtggcg 840

tctcgcgccg tctctggccc cctcccccgc gagcgccgag gcgggggcgc ccaccggttc 900

cggctgctgg cagggaccaa gccgcccgct gcgagcaccg gagacggccg ggctggggcg 960

tgggctgggc gcctttcctg ggcccctgca tttagcgggt gactctacga aaccggtcac 1020

ggggagacgg agggggctgc gccccgtggc gagcgagcgc caggcggagc tcccgagggc 1080

gtggcgcggg cagcacagac tcggctgcac gggcttcgcg ggcgccacgt gtgggccgcg 1140

ctttgtgctg tgtcattgcg ccggcccggg tgggggtggc agggcgggac tggggctcct 1200

cccaggctcg ggtgcgggcg cggagggcgc gcgcctcctg gccccgcccc ctggcaggtg 1260

cccgcgaccc gcgtgtcccc gtgcgcctgg ccgccttgtc tcctctccgc aggtgctgtc 1320

ccggctgggg gtcgccggcc agtggcgctt cgtggacgtg ctggggctgg aagaggagtc 1380

tctgggctcg gtgccagcgc ctgcctgcgc gctgctgctg ctgtttcccc tcacggccca 1440

ggtagggcgt ggggcccagg atgcgccggc cgccggcagt gcacgccgct ccccagcttg 1500

agtcctcggg ggctccccgc cccgcccccc cccctgtagg tgatgcgggg cgcgcctaca 1560

aggaagggag gagcctgcat tttcgtggta cctactccct gggctcctgt tcca 1614

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Human TET1

<400> 5

cagccatcag atctgtaaga aaag 24

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Human TET1

<400> 6

gcctcttgtt ttcctttata acctc 25

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Human GAPDH

<400> 7

gaaggtgaag gtcggagtca 20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Human GAPDH

<400> 8

catgggtgga atcatattgg a 21

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Human UCHL1_BT

<400> 9

gagattgtaa ggtttggggg tt 22

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Human UCHL1_BT

<400> 10

ccactcactt tattcaacat ctaaaaa 27