



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월28일

(11) 등록번호 10-1540052

(24) 등록일자 2015년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0024663

(22) 출원일자 2014년02월28일

심사청구일자 2014년02월28일

(56) 선행기술조사문헌

JP04873510 B

Cell, Vol. 154, pp. 541-555 (2013.08.01.)

(73) 특허권자

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 8 항

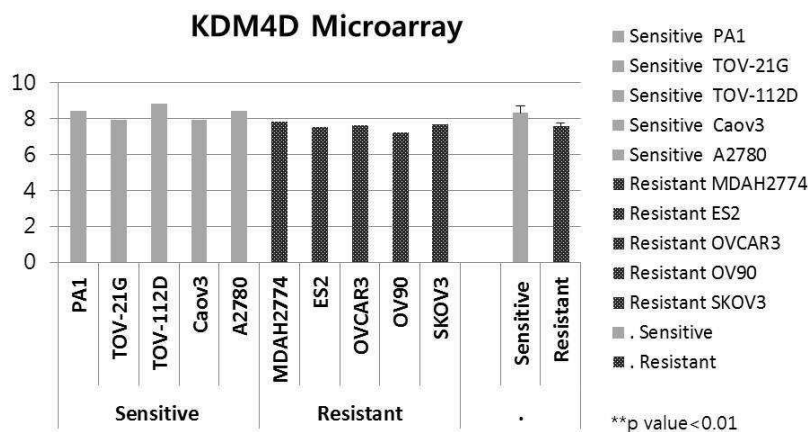
심사관 : 윤준호

(54) 발명의 명칭 난소암 환자의 항암제 치료 반응성 예측을 위한 마커 KDM4D

(57) 요약

본 발명은 KDM4D (Lysine-Specific Demethylase 4D) 의 발현 수준을 검출함으로써, 난소암 환자의 항암제 치료 반응성을 예측하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(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

명세서

청구범위

청구항 1

KDM4D (Lysine-Specific Demethylase 4D) 의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 KDM4D 의 발현 수준을 측정하는 제제는 KDM4D 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 KDM4D 의 발현 수준을 측정하는 제제는 KDM4D 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는,
난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 키트.

청구항 5

KDM4D 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는,
난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 마이크로어레이.

청구항 6

난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 KDM4D 를 검출하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 KDM4D 의 검출은,

역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 및 DNA 칩으로 구성된 군에서 선택되는 KDM4D mRNA 측정 수단에 의하여 수행되는 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 KDM4D 의 검출은,

웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조

직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 및 단백질 칩으로 구성된 군에서 선택되는 KDM4D 단백질 측정 수단에 의하여 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 난소암 환자의 치료로부터 KDM4D (Lysine-Specific Demethylase 4D) 의 발현 수준을 검출함으로써, 난소암 환자의 항암제 치료 반응성을 예측하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[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] 그러나 유전자와 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) 미국특허등록 US 8,323,941

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 측정함으로써 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 하나의 목적은 KDM1B 및 KDM4D 중 하나 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 KDM1B 및 KDM4D 중 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 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 치료로부터 KDM1B 및 KDM4D 중 하나 이상을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 항암제 민감성 세포에 비하여, 항암제 내성 세포에서 KDM1B (Lysine-Specific Demethylase 1B)의 발현이 특이적으로 증가하며, KDM4D (Lysine-Specific Demethylase 4D)의 발현이 특이적으로 감소한다는 발견에 기초한 것으로, 상기 유전자의 발현 정도를 바이오마커로서 이용하여 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하는 기술을 제공한다.
- [0013] 상기 유전자 각각은 항암제에 대한 환자 반응성을 예측하기 위한 단독의 바이오 마커로 사용하거나, 이들 2종을 복합 바이오마커로 사용할 수도 있다.
- [0014] 본 발명에서, KDM1B 및 KDM4D 유전자의 mRNA 는 공지된 유전자 데이터베이스에서 그 서열 정보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 인간 KDM1B 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_153042.3 에서 확인할 수 있고, 인간 KDM4D 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_018039.2에서 확인할 수 있다.
- [0015] 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 선별된 유전자의 발현 정도를 측정함으로써 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0016] 따라서, 환자의 시료로부터 KDM1B 및 KDM4D 의 특이적인 발현의 증가/감소 여부는 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있는 바이오 마커로 활용될 수 있다.
- [0017] 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.
- [0018] 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.
- [0019] 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.
- [0020] 보다 상세하게, 하나의 양태로서, 본 발명은 KDM1B 및 KDM4D 중 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0021] 일례로, 본 발명은 KDM1B 의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0022] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 KDM4D 의 발현 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 일례로, 본 발명은 KDM4D 의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0024] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 KDM1B 의 발현 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0025] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 KDM1B 및 KDM4D 중 1종 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 마이크로어레이에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명의 용어, "KDM1B 및 KDM4D 중 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 KDM1B 및 KDM4D 중 1종 이상의 유

전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 제제는 KDM1B 및 KDM4D 중 1종 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.

[0027]

본 발명에서, KDM1B 및 KDM4D의 발현 수준은 해당 유전자의 mRNA의 발현수준 또는 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 알 수 있다. 본 발명에서 "mRNA 발현수준 측정"이란 환자의 시료에서 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 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 assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028]

본 발명의 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 뉴클레오타이드 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.

[0029]

본 발명에서 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지(Labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드 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 폴리뉴클레오타이드와 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.

[0030]

본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 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 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.

[0031]

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 것 이면 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.

[0032]

본 발명의 키트는 KDM1B 및/또는 KDM4D의 mRNA 발현수준 또는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 마커를 검출할 수 있다. 본 발명에서 키트는 항암제 내성 세포에서 특이적으로 발현이 증가되는 KDM1B 및/또는 항암제 내성 세포에서 특이적으로 발현이 감소되는 KDM4D의 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.

[0033]

구체적인 일례로서, 본 발명에서 상기 KDM1B 및/또는 KDM4D 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, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0034] 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 그의 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 마이크로 피펫팅(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-L-lysine) 및 알데하이드(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.

[0035] 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 글래스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 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.

[0036] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 KDM1B 및/또는 KDM4D 중 1종 이상을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0037] 일례로, 본 발명은 환자의 시료로부터 KDM1B 의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 KDM1B 의 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 KDM1B 의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0038] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 KDM4D 의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 KDM4D 의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0039] 일례로, 본 발명은 환자의 시료로부터 KDM4D 의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 KDM4D 의 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 KDM4D 의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0040] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 KDM1B 의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 발현 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 KDM1B 의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명에서 확인된 바이오마커는 항암 화학요법에 대한 환자의 반응성 및 항암제 내성 위험도를 예측함으로써, 항암제에 치료 효과가 있는 환자를 선별하거나 환자의 치료요법을 결정하는데 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 항암제 민감성(sensitive) 세포주와 항암제 내성(resistant) 세포주 간의 KDM1B 유전자 발현 차이를 mRNA 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 항암제 민감성(sensitive) 세포주와 항암제 내성(resistant) 세포주 간의 KDM1B 유전자 발현 차이를 qRT-PCR를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 항암제 민감성(sensitive) 세포주와 항암제 내성(resistant) 세포주 간의 KDM4D 유전자 발현 차이를

mRNA 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 항암제 민감성(sensitive) 세포주와 항암제 내성(resistant) 세포주 간의 KDM4D 유전자 발현 차이를 qRT-PCR를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 세포주 및 시스플라틴 항암제 내성 세포 모델

사람의 난소 세포 중 실험모델로 많이 사용되는 PA-1, TOV-21G, TOV-112D, CAO3, A2780, MDAH2774, ES2, OVCAR3, OV-90 및 SKOV3 의 총 10개의 세포주를 10% 우태아혈청(ATLAS), 100 unit 페니실린(Gibco), 100 µg/ml 스트렙토마이신(Gibco)을 포함하는 배지에서 다음과 같은 조건에서 배양하였다. 또한, A2780 세포주에 1 µM/ml 의 시스플라틴을 계대배양시에 넣어 의도적으로 항암제에 내성을 획득하게 된 세포모델을 만들었고, 이를 "A2780cis" 라고 명명하였다.

표 1

Cat. (cell)	세포주	세포주 유래/관련 질환	형태학	배지	입수처
HTB-77	SKOV-3	인간/선암/전이상 태에서 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)

실시예 2. Total RNA 추출

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

실시예 3. mRNA 마이크로어레이(Microarray) 분석

[0050] 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 IC₅₀(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.

[0051] **실시예 4. 정량적 실시간(Quantitative real-time) PCR (qRT-PCR)**

[0052] RNA를 cDNA(complement DNA)로 합성하기 위해 역전사효소(Thermo)를 사용하였다. 1μg의 RNA에 2μl의 DNaseI buffer(Thermo)를 넣어주고 1μl의 DNase I(Thermo) 효소를 넣어 DNA를 제거한 후에, 효소가 작용 할 수 있도록 37℃에서 30분간 반응 한 후에 50mM의 EDTA(fermentas)를 1μl 넣어준 후 65℃에서 10분간 반응시켜 효소를 변성시켰다. 그 후에 10mM의 dNTP를 2μl, 50uM의 oligodT를 1μl를 넣어 65℃에서 5분 동안 반응시켰다. 그 후에 5X RT buffer 4μl, 역전사효소 0.5μl(100U)을 포함한 반응액 20μl을 42℃에서 60분, 70℃에서 10분 동안 반응하여 cDNA를 합성한 후 이것을 1:4로 희석하여 그 중 2μl을 이용하여 qRT-PCR의 주형으로 사용하였다. qRT-PCR은 cDNA 2μl, SYBER green master mix(Qiagen) 5μl, 각 유전자의 상보적인 primer 10pmole을 포함한 10μl을 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 $\Delta Ct = 2^{-(interesting\ gene\ ct - internal\ gene\ ct)}$ 방법으로 보정하였다. 사용한 올리고뉴클레오티드 프라이머의 서열은 다음과 같다.

표 2

		염기서열
Human KDM1B	F(forward)	5'-gcgtgctgatgtctgtgatt-3' (서열번호 1)
	R(reverse)	5'-ttgtgggatctgggacctc-3' (서열번호 2)
Human KDM4D	F(forward)	5'-gcgtgctgatgtctgtgatt-3' (서열번호 3)
	R(reverse)	5'-ttgtgggatctgggacctc-3' (서열번호 4)
Human GAPDH	F(forward)	5'-gaaggtgaaggtcggagtca-3' (서열번호 5)
	R(reverse)	5'-catgggtggaatcatattgga-3' (서열번호 6)

[0054] **실험 결과**

[0055] **1. 항암제 내성 세포군에서 KDM1B 유전자의 발현 증가 확인**

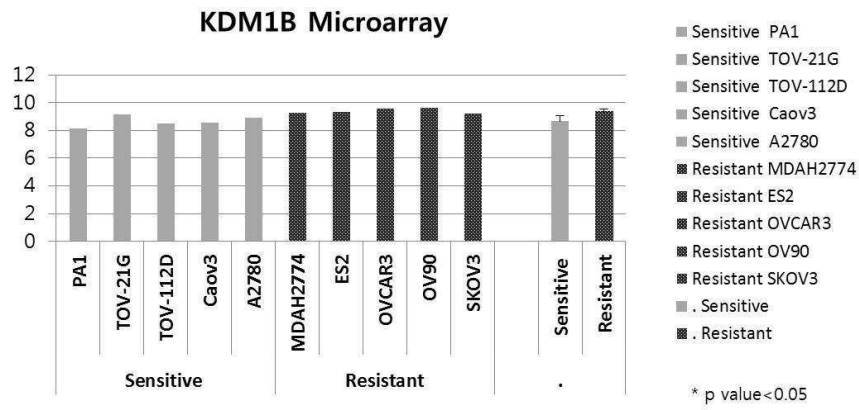
[0056] mRNA의 발현량을 이용한 마이크로어레이(Microarray) 데이터를 기반으로 항암제에 민감성을 가진 세포주와 비교하여 내성을 가지는 세포주에서 발현량의 차이(fold change)가 0.3 이상인 유전자들을 분석하였다. 그 중 후생유전학적 변이를 규명할 수 있는 후생유전학적 조절자(Epigenetic Modulator, EM) 중에 t-test 검사를 이용해 유의적으로 발현에 차이가 있는 유전자들을 선별해 낸 결과, KDM1B가 유의적(p-value가 0.012)으로, 항암제 내성 세포군에서 발현량이 1.7 배 증가한 것을 알 수 있었다 (도 1). 또한, qRT-PCR로 확인 한 결과 마이크로어레이 데이터와 유사하게 항암제 내성 세포군에서 증가하는 발현 패턴을 보였다 (p-value가 0.0015) (도 2).

[0057] **2. 항암제 내성 세포군에서 KDM4D 유전자의 발현 감소 확인**

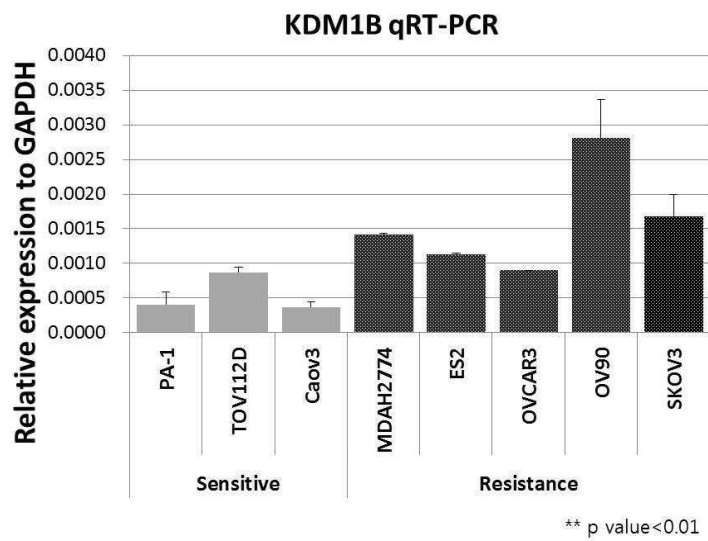
[0058] mRNA의 발현량을 이용한 마이크로어레이 데이터를 이용하여 항암제 내성 세포군들의 발현 패턴과 시스플라틴 항암제 내성 모델인 A2780cis 세포주에서 같은 패턴으로 감소한 유전자를 분석하였다. 그 중 후생유전학적 조절자(EM)인 KDM4D가, 마이크로어레이 데이터에서는 유의적(p-value가 0.007)으로 0.7배 감소한 것으로 나타났다 (도 3). 또한, qRT-PCR로 확인 한 결과에서도 내성 세포군에서 발현량이 감소하는 경향성을 보였으며, 항암제 내성 모델인 A2780cis 세포 모델에서는 A2780 비해 발현량이 크게 감소하였다 (p-value가 0.005) (도 4).

도면

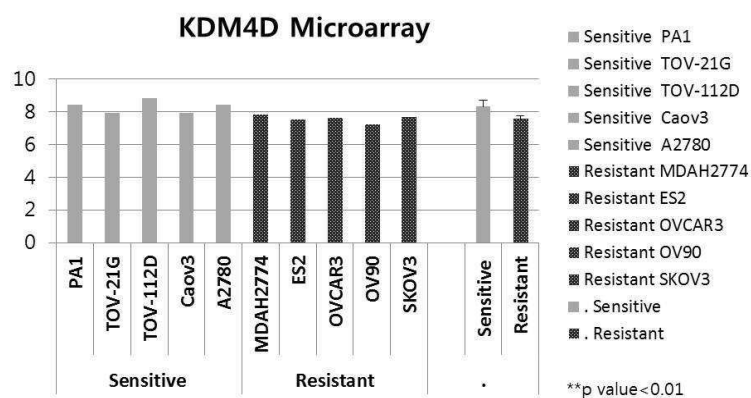
도면1



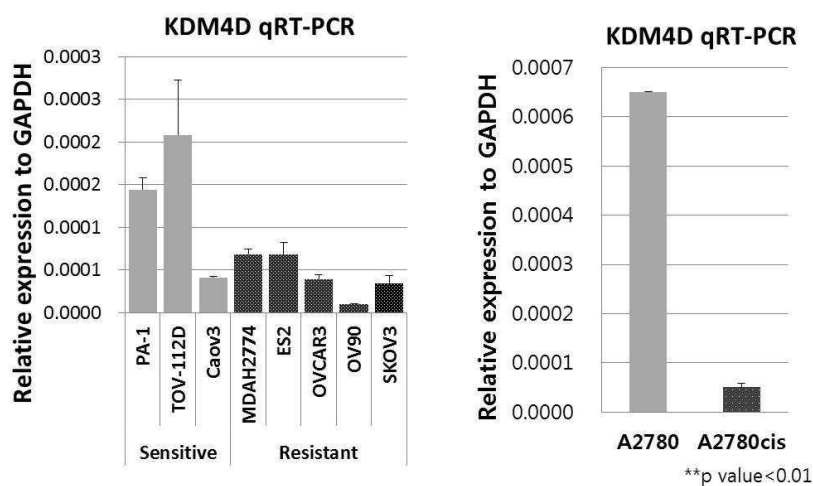
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> KDM4D, a marker for predicting the response to anti-cancer drug
in a patient with ovarian cancer
- <130> DPP20140604KR
- <160> 6
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Human KDM1B

<400> 1

gcgtgctgat gtctgtgatt

20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Human KDM1B

<400> 2

ttgtgggatc tgggacctc

19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Human KDM4D

<400> 3

gcgtgctgat gtctgtgatt

20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Human KDM4D

<400> 4

ttgtgggatc tgggacctc

19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Human GAPDH

<400> 5

gaaggtgaag gtcggagtca

20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Human GAPDH

<400> 6

catgggtgga atcatattgg a

21