



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0078671
(43) 공개일자 2011년07월07일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0135536

(22) 출원일자 2009년12월31일

심사청구일자 2009년12월31일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전 유성구 궁동 220 충남대학교

(72) 발명자

김제

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 405동 101호

김지연

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 405동 101호

(74) 대리인

특허법인이름

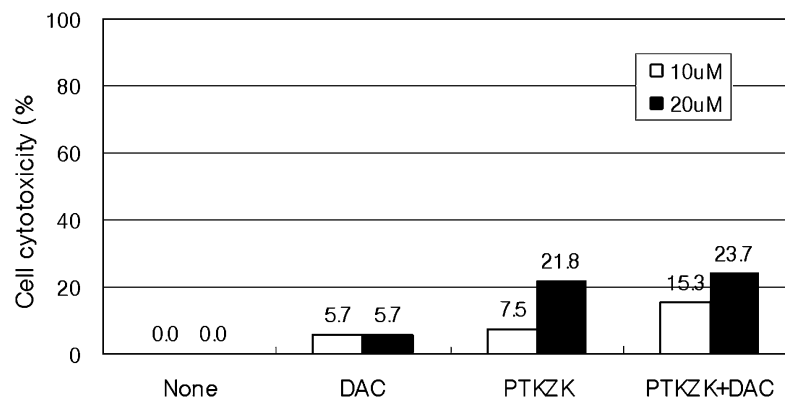
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제의 치료 반응성 예측방법 및 키트

(57) 요약

본 발명은 환자에 따라 선별적인 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료요법을 적용할 수 있도록 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 반응성 예측방법 및 키트를 제공하는 것에 대한 것이다. 본 발명에 따른 혈관내피세포성장인자수용체 유전자 프로모터(VEGFR promoter) 부분의 메틸화(Methylation) 여부 확인 및 평가에 의한 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 반응성 예측방법 및 키트를 이용할 경우, 단기간에 효과적으로 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료요법 적용대상 환자를 선별할 수 있어, 무분별한 치료요법 적용에 따른 환자의 경제적, 심리적 및 육체적 고통의 경감을 기대할 수 있다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는, 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측방법.

- a) 생물학적 샘플에서, 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter) 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하는 단계; 및
- b) 상기 a) 단계의 결과를 평가하여, 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 반응성을 예측하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 a 단계는 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing), 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis), 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 및 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)으로 구성되는 군의 방법 중 어느 하나의 방법을 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 암조직인 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter)는 FLT-1 또는 KDR 유전자의 프로모터인 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 방법 중 FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하기 위한 방법은 서열번호 1의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 2의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer) 및 서열번호 3의 염기서열을 지니는 프로브(probe)를 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 방법 중 KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하기 위한 방법은 서열번호 4의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 5의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer) 및 서열번호 6의 염기서열을 지니는 프로브(probe)를 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법 중 FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하기 위한 방법은 하기의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측방법.

- a) FLT-1 유전자에 중아황산염(Bisulfite)을 처리하는 단계;
- b) 상기 중아황산염이 처리된 FLT-1 유전자를 서열번호 7의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 8의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer)를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR) 방법으로 증폭시킴으로써 중합효소연쇄반응 생산물을 얻는 단계;
- c) 상기 중합효소연쇄반응 생산물을 서열번호 9의 염기서열을 지니는 시퀀싱프라이머(Sequencing Primer)를 이용하여 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)을 수행하는 단계.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법 중 KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하기 위한 방법은 하기의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측방법.

- a) KDR 유전자에 중아황산염(Bisulfite)을 처리하는 단계;
- b) 상기 중아황산염이 처리된 KDR 유전자를 서열번호 10의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 11의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer)를 이용하여 nested 중합효소연쇄반응 방법으로 증폭시킴으로써 중합효소연쇄반응 생산물을 얻는 단계;
- c) 상기 nested 중합효소연쇄반응 생산물을 서열번호 12의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(forward Primer), 서열번호 13의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer)를 이용하여 inside 중합효소연쇄반응 방법으로 증폭시킴으로써 중합효소연쇄반응 생산물을 얻는 단계;
- d) 상기 중합효소연쇄반응 생산물을 서열번호 14의 염기서열을 지니는 시퀀싱프라이머(Sequencing Primer)를 이용하여 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)을 수행하는 단계.

청구항 9

혈관내피세포성장인자 수용체 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하는 수단을 포함하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료 반응성 예측용 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter)는 FLT-1 또는 KDR 유전자의 프로모터인 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료 반응성 예측용 키트.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 메틸화(Methylation) 여부를 확인하는 수단은 프라이머, 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료 반응성 예측용 키트.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료 반응성 예측용 키트는 FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 실시간 중합효소연쇄반응 방법으로 확인하기 위한, 서열번호 1의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 2의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Rreverse Primer) 및 서열번호 3의 염기서열을 지니는 프로브(probe)를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료 반응성 예측용 키트.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료 반응성 예측용 키트는 KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 실시간 중합효소연쇄반응 방법으로 확인하기 위한, 서열번호 4의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 5의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Rreverse Primer) 및 서열번호 6의 염기서열을 지니는 프로브(probe)를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측용 키트.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료 반응성 예측용 키트는 FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법으로 확인하기 위한, 서열번호 7의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 8의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Rreverse Primer) 및 서열번호 9의 염기서열을 지니는 시퀀싱 프라이머(Sequencing Primer)를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측용 키트.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료 반응성 예측용 키트는 KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법으로 확인하기 위한, 서열번호 10의 염기서열을 지니는 nested 중합효소연쇄반응용 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 11의 염기서열을 지니는 nested 중합효소연쇄반응용 역방향 프라이머(Rreverse Primer), 서열번호 12의 염기서열을 지니는 inside 중합효소연쇄반응용 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 13의 염기서열을 지니는 inside 중합효소연쇄반응용 역방향 프라이머(Rreverse Primer) 및 서열번호 14의 염기서열을 지니는 시퀀싱프라이머(Sequencing Primer)를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측용 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing), 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis), 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 및 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)으로 구성되는 군의 방법 중 어느 하나의 방법을 이용하여, 생물학적 샘플에서 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter) 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하고, 이러한 확인결과를 평가하여 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제의 치료 반응성을 예측방법 및 예측용 키트에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 인간유전체에는 'CpG' 라는 이중 염기서열이 다량으로 존재하고 있고 이중 약 70%에 이르는 CpG의 시토신 염기에는 메틸기(-CH₃)가 결합되어 있는데, 이를 'DNA 메틸화' (DNA methylation)라고 부른다. 이러한 DNA 메틸화 현상은 유전체의 각종 반복서열 등에서 흔히 관찰되며, 이는 유전체안정성 유지 등에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고 있다. 한편 각종 유전자의 5' 상단 조절부위에 CpG가 밀집된 독특한 영역이 존재하는데 이를 'CpG섬' 이라 부르며, 이 경우 CpG의 시토신은 대부분 메틸기가 결합되어 있지 않다. 그러나 경우에 따라서 시토신 메틸화가 발생하며 이 부위 뉴클레오솜 히스톤 분자들과의 교감을 통해 크로마틴의 구조에 변화를 이끌어 결국 유전자발현에 영향을 주게 된다.

[0003] 즉, CpG섬에서 시토신 염기들의 비메틸화 상태는 이 부위의 뉴클레오솜 히스톤 아미노산 잔기들의 아세틸화와 연관되어 '크로마틴의 열린 구조' (Opened chromatin)를 형성하며, 이러한 구조에서 프로모터 영역에 전사인자의 자유로운 결합을 허용함으로써 활발한 mRNA의 합성이 유도된다. 그러나 CpG섬에서 시토신의 메틸화는 주변의 뉴클레오솜 히스톤 아미노산 잔기에서의 탈아세틸화 및 메틸화 등의 연속적인 화학적 변형과 연관되어 결국 '크로마틴의 닫힌 구조' (Closed chromatin)를 형성하며 이때 전사인자들의 프로모터 영역에의 결합을 방해함으로써 유전자 발현이 억제된다. 따라서 유전자의 발현은 DNA 메틸화 및 히스톤 변형 등과 같은 화학적 가역반응에 의해 조절된다고 할 수 있는데, 이와 같이 DNA 염기서열의 변화 없이 크로마틴의 구조적 변화, 즉 '크로마틴 리모델링' 에 영향을 주어 유전자 발현이 조절되는 기전에 관한 연구분야를 '후성유전학' (Epigenetics)이라고 한다.

[0004] 최근 DNA 메틸화의 정보를 활용하여 암의 발생진단, 항암제 효과 예측 등 다양한 의료연구가 진행되고 있다. 특히 암환자에게 투여하는 항암제 치료 효과의 예측은 항암화학요법이 일반적으로 인체에 독성 부작용을 유발하고 경제적인 면에서도 비용이 많이 드는 고가의 치료라는 점에서 그 필요성이 증가하고 있다. 항암제 중에서도 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)는 혈관신생 (Angiogenesis)을 억제하여 암을 치료하는 기작을 지니는 대표적인 항암제이다.

[0005] 혈관 내피세포 성장인자는 포유동물에서는 현재 5종류의 VEGF(VEGF-A, B, C, D, PLGF)가 알려져 있다. 최근에 혈관 내피세포 성장인자에 관련된 신호전달경로는 새롭고 신속하게 작용하고 더 효과적인 치료제를 제공하는 표적으로 여겨지고 있다. 이러한 혈관 내피세포 성장인자는 혈관 내피세포 성장인자 수용체(VEGF Receptor)를 통하여 세포 생존 및 증식에 중요한 역할을 하게 된다. 이러한 혈관내피세포성장인자를 표적으로 하는 항암제인 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제는 다양한 암환자의 치료에 있어서 효과를 나타내고 있다. 이미 FDA 승인절차를 완료하고 판매되고 있는 치료제로는 모노클로날항체 타입의 베바시주맙(Bevacizumab; 제넨테크), 라니비주맙(Ranibizumab; 제넨테크), 작은분자(Small molecule) 타입의 페가타니브(Pegaptanib; 화이자)가 있다. 또한, 임상시험과정에서 환자에 대해 일관된 치료효과를 나타내지 못하여 난관을 겪고 있으며, 공개되지 못한 신약도 많이 있는 상황이다.

[0006] 앞서 간단히 언급한 바와 같이, 항암치료요법은 일반적으로 인체에 독성 부작용을 유발하고 경제적인 면에서도 비용이 많이 드는 고가의 치료라는 점에서 치료반응성 예측은 매우 중요하며, 이는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제에 있어서도 마찬가지이다. 선행기술로서 미국공개특허 제2007-0254295호는 EGFR Copy number, EGFR expression, Erk(MAPK) activation, Akt activation, TGF- α expression, HER2 copy number, PTEN expression 등의 지표를 활용하여 타이로신 카이네이즈 억제제 치료효과가 예측이 가능함을 개시하고 있으나 이는 여러가지 생물학적 지표를 복합적으로 측정해야 하는 번거로움이 있고 치료반응성 예측감도 또한 만족스럽지 않아 개선이 요구되어 왔다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명은 환자에 따라 선별적인 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료요법을 적용할 수 있도록 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 반응성 예측방법

및 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명에 따른 혈관내피세포성장인자수용체 유전자 프로모터(VEGFR promoter) 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인 및 평가에 의한 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 반응성 예측방법을 이용할 경우, 단기간에 효과적으로 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료요법 적용대상 환자를 선별할 수 있어, 무분별한 치료요법 적용에 따른 환자의 경제적, 심리적 및 육체적 고통의 경감을 기대할 수 있다.

과제 해결수단

[0008] 본 발명자들은 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter) 부분의 메틸화 여부와 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 반응성 연관관계를 연구한 결과, 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter) 부분에 메틸화가 많이 이루어져 있는 경우일수록 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 감도(sensitivity)는 감소되며, 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter) 부분에 메틸화가 적게 이루어져 있는 경우일수록 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 감도(sensitivity)는 증가한다는 사실을 발견할 수 있었다. 이러한 결과에 기초하여 본 발명자들은 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter) 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 평가에 기초한 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측방법 및 키트를 개발하게 되었다. 이하 본 발명의 내용을 더욱 구체적으로 설명한다.

[0009] 본 발명은 a) 생물학적 샘플에서, 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter) 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하는 단계; 및 b) 상기 a) 단계의 결과를 평가하여, 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 반응성을 예측하는 단계를 포함하는, 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측방법에 대한 것이다.

[0010]

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 a 단계는 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing) 방법, 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis) 방법, 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 방법 및 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법을 이용하여 수행될 수 있으며, 바람직하게는 비용 및 시간을 절감할 수 있는 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 방법 및 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법을 이용할 수 있고, 더욱 바람직하게는 비용, 시간의 절감은 물론 높은 민감도(Sensitivity)를 기대할 수 있는 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법을 활용하여 수행할 수 있다.

[0012] 상기 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing) 방법은 DNA에 중아황산염(Bisulfite)을 처리할 때, 메틸화되지 않은 시토신(cytocine) 잔기는 티민(thymine)로 전환되고, 메틸화된 시토신(cytocine) 잔기는 변화되지 않는 점에 기초하여 DNA 메틸화 여부를 판별하는 대표적인 방법이다. 그러나, 상기 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing) 방법은 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA를 사이트를 모두 증폭시키는 방법으로 메틸화 정도를 정확하게 판별할 수 있는 장점이 있으나, 반면 선택적 분석이 불가한 것으로 비용적인 측면에서 경제적이지 아니하며, 시간이 오래 걸리는 단점이 있다.

[0013] 상기 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis) 방법은 상기 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing) 방법에 제한효소(Restriction Enzyme)를 처리하여, 특정 사이트의 메틸화 여부를 관찰하는 방법으로 메틸화된 사이트를 용이하게 확인할 수 있는 장점이 있으나, 중합효소연쇄반응 결과물에 있는 CpG 사이트 중 한 곳만의 메틸화 상태를 확인할 수 있는 한계가 있으며, 중합효소연쇄반응, 제한효소 처리, 전기영동과정을 거쳐야 하므로 시간이 많이 소요되는 단점이 있다.

[0014] 상기 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 방법은 중아황산염을 처리한 DNA 샘플을 실시간 중합효소연쇄반응 기기를 이용하여, CpG 섬이 있는 특정 유전자의 프로모터 부위를 증폭하고, CpG 메틸화의 유무를 알고자 하는 부위에 반응하는 프로브를 이용하여 메틸화 상태를 측정하는 방법으로서, 정량화된 메틸화 정보를 손쉽게 얻을 수 있고, 단시간에 결과를 확인할 수 있는 장점이 있으나, 중합효소연쇄반응

결과물에 프로브가 결합하여 반응하기 위해서는 모든 CpG 사이트가 메틸화되어야 하여 민감도(Sensitivity)가 다소 떨어지는 단점이 있다.

[0015] 상기 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법은 중아황산염을 처리한 DNA 샘플을 중합효소연쇄반응 기기를 이용하여 증폭하고, 파이로시퀀싱 기기를 이용하여 CpG 메틸화 유무를 확인하고자 하는 사이트에 반응하는 시퀀싱 프라이머를 이용하여 메틸화 상태를 측정하는 방법으로 단시간 내에 메틸화 여부를 손쉽게 확인할 수 있는 장점이 있다.

[0016] 상기 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)는 모노클로날 항체(Monoclonal Antibody) 계열과 작은분자(Small Molecule) 계열로 크게 구분된다. 본 발명은 모노클로날 항체(Monoclonal Antibody) 계열과 작은분자(Small Molecule) 계열의 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 모두에 있어서 적용이 가능하다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 바람직하게는 암조직을 의미하며, 인체에 발생하는 모든 종류의 암조직을 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter)는 FLT-1(Fms-related tyrosine Kinase 1, Vascular Epithelial Growth Factor Receptor 1) 또는 KDR(Vascular Epithelial Growth Factor Receptor 2, Flk-1) 유전자의 프로모터를 포함한다.

[0019] 본 발명에 있어서, 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 방법 중 FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하기 위한 방법은 서열번호 1의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 2의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer) 및 서열번호 3의 염기서열을 지니는 프로브(probe)를 이용하여 수행할 수 있다. 프로브의 경우 5' 말단과 3' 말단에 형광물질을 부착하여 사용하게 된다.(표 1)

[0020] 이는 본 발명자들이 다수의 실험에 근거하여 설계한 프라이머 및 프로브로써 이를 이용할 경우, FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 높은 민감도로서 효과적으로 확인할 수 있다.

[0021] <표 1. FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화 여부를 확인하기 위한 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 용 프라이머 및 프로브>

[0022]

정방향 프라이머(서열번호1)	5'-GGTTCGCGTCGTTAGTATTTTAC-3'
역방향 프라이머(서열번호2)	5'-CGGTTTCGTTTTTTCGTAGTC-3'
프로브(서열번호3)	5'-CGCGTTCGGTTTCGGTTATTCG-3'

[0023] 본 발명에 있어서, 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 방법 중 KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하기 위한 방법은 서열번호 4의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 5의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer) 및 서열번호 6의 염기서열을 지니는 프로브(probe)를 이용하여 수행할 수 있다. 프로브의 경우 5' 말단과 3' 말단에 형광물질을 부착하여 사용하게 된다.(표 2)

[0024] 이는 본 발명자들이 다수의 실험에 근거하여 설계한 프라이머 및 프로브로써 이를 이용할 경우, KDR 유전자 프

로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 높은 민감도로서 효과적으로 확인할 수 있다.

<표 2. KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화 여부를 확인하기 위한 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응 (Real-time Methylation Specific PCR) 용 프라이머 및 프로브>

정방향 프라이머(서열번호4)	5'-TTTGCCTCGGGTATTATTTC-3'
역방향 프라이머(서열번호5)	5'-CGGTATTCGTAGACGTTTTGTAGTC-3'
프로브(서열번호6)	5'-CGTCGTAGAAAGTTCGTTT-3'

본 발명에 있어서, 상기 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법 중 FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화 (Methylation) 여부를 확인하기 위한 방법은 a) FLT-1 유전자에 중아황산염(Bisulfite)을 처리하는 단계; b) 상기 중아황산염이 처리된 FLT-1 유전자를 서열번호 7의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 8의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer)를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR) 방법으로 증폭시킴으로써 중합효소연쇄반응 생산물을 얻는 단계; c) 상기 중합효소연쇄반응 생산물을 서열번호 9의 염기서열을 지니는 시퀀싱프라이머(Sequencing Primer)를 이용하여 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)을 수행하는 단계를 포함한다.(표 3)

<표 3. FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화 여부를 확인하기 위한 파이로시퀀싱용 프라이머>

정방향 프라이머(서열번호7)	5'-ATGGGTAGGAGGAGGGTAA-3'
역방향 프라이머(서열번호8)	*(B)5'-TCCCCACCTACCTCTTCTT-3'
시퀀싱 프라이머(서열번호9)	5'-GGAGTAAAGATTTGAATT-3'

*(B)는 바이오틴 결합 위치를 의미한다.

본 발명에 있어서, 상기 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법 중 KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화 (Methylation) 여부를 확인하기 위한 방법은 a) KDR 유전자에 중아황산염(Bisulfite)을 처리하는 단계; b) 상기 중아황산염이 처리된 KDR 유전자를 서열번호 10의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 11의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer)를 이용하여 nested 중합효소연쇄반응 방법으로 증폭시킴으로써 중합효소연쇄반응 생산물을 얻는 단계; c) 상기 nested 중합효소연쇄반응 생산물을 서열번호 12의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(forward Primer), 서열번호 13의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머 (Reverse Primer)를 이용하여 inside 중합효소연쇄반응 방법으로 증폭시킴으로써 중합효소연쇄반응 생산물을 얻는 단계; d) 상기 중합효소연쇄반응 생산물을 서열번호 14의 염기서열을 지니는 시퀀싱프라이머(Sequencing Primer)를 이용하여 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)을 수행하는 단계를 포함한다.(표 4)

<표 4. KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화 여부를 확인하기 위한 파이로시퀀싱용 프라이머>

KDR(nested) 프라이머	정방향(서열번호 10)	5'- AGTTTTATTTGTATTGAGTTT -3'
	역방향(서열번호 11)	*(B)5'- AAAATATCCAACTACCAAAC -3'
KDR(inside) 프라이머	정방향(서열번호 12)	5'- AGAGGTTAGTGTGTGGTAGTTG -3'
	역방향(서열번호 13)	5'- AATATCCAACTACCAAACCA -3'
시퀀싱 프라이머 (서열번호 14)	5'- TTGTTTGTAGTAGGGTATTAT -3'	

*(B)는 바이오틴 결합 위치를 의미한다.

본 발명은 또한 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확

인하는 수단을 포함하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료 반응성 예측용 키트에 대한 것이다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 혈관내피세포성장인자수용체 유전자의 프로모터(VEGFR promoter)는 FLT-1(Fms-related tyrosine Kinase 1, Vascular Epithelial Growth Factor Receptor 1) 또는 KDR(Vascular Epithelial Growth Factor Receptor 2, Flk-1) 유전자의 프로모터를 포함한다.

[0037] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인하는 수단은 다양한 종류의 프라이머 및 프로브를 포함한다.

[0038] 더욱 구체적으로 본 발명은, FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 실시간 중합효소연쇄반응 방법으로 확인하기 위한, 서열번호 1의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 2의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer) 및 서열번호 3의 염기서열을 지니는 프로브(probe)를 포함하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료 반응성 예측용 키트에 대한 것이다.

[0039] 본 발명은 또한, KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 실시간 중합효소연쇄반응 방법으로 확인하기 위한, 서열번호 4의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 5의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer) 및 서열번호 6의 염기서열을 지니는 프로브(probe)를 포함하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측용 키트에 대한 것이다.

[0040] 본 발명은 또한, FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법으로 확인하기 위한, 서열번호 7의 염기서열을 지니는 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 8의 염기서열을 지니는 역방향 프라이머(Reverse Primer) 및 서열번호 9의 염기서열을 지니는 시퀀싱 프라이머(Sequencing Primer)를 포함하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측용 키트에 대한 것이다.

[0041] 본 발명은 또한, KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법으로 확인하기 위한, 서열번호 10의 염기서열을 지니는 nested 중합효소연쇄반응 용 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 11의 염기서열을 지니는 nested 중합효소연쇄반응 용 역방향 프라이머(Reverse Primer), 서열번호 12의 염기서열을 지니는 inside 중합효소연쇄반응 용 정방향 프라이머(Forward Primer), 서열번호 13의 염기서열을 지니는 inside 중합효소연쇄반응 용 역방향 프라이머(Reverse Primer) 및 서열번호 14의 염기서열을 지니는 시퀀싱프라이머(Sequencing Primer)를 포함하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI)의 치료 반응성 예측용 키트에 대한 것이다.

효 과

[0042] 본 발명에 따른 혈관내피세포성장인자수용체 유전자 프로모터(VEGFR promoter) 부분의 메틸화(Methylation) 여부를 확인 및 평가에 의한 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 반응성 예측방법을 이용할 경우, 단기간에 효과적으로 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제(VEGF-Specific TKI) 치료요법 적용대상 환자를 효과적으로 선별할 수 있어, 무분별한 치료요법 적용에 따른 환자의 경제적, 심리적 및 육체적 고통의 경감을 기대할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0043] 이하 본 발명의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 1. 암세포주에서 혈관내피세포성장인자수용체 유전자 프로모터의 메틸화 정도 관찰

[0045] 다양한 암세포주(총 32종)에서 Flt-1, KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화가 어떻게 나타나고 있는지 알아보고자 다음과 같은 실험조건하에서 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis) 실험을 수행하였다.

[0046] <표 5. 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis) 프라이머 시퀀스 및 조건>

유전자		Primer Sequence	Anneal Temp. (°C)	PCR Product length(bp)	Restriction Enzyme	RFLP(bp)
FLT-1	Forward	5'-GGAGTAAAGATTTTGAATTTGT-3'	56	148	HhaI	80/60
	Reverse	5'-TCTTCTTCCTCCCAAACTC-3'				
KDR	Forward	5'-AGTTTTTATTTGTATTGAGTTT-3'	56	128	HhaI	93/35
	Reverse	5'-AAAATATCCAACTACCAAAC-3'				

[0048] <표 6. 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis) 중합효소연쇄반응 조건>

최종 중합효소 연쇄반응 부피: 50 μ l
1 x 중합효소연쇄반응 buffer
0.2mM dNTP mix
Taq 중합효소 2 unit
정방향 및 역방향 프라이머 1 μ m
중아황산염이 처리된 DNA 샘플 2 μ l

[0050] 상기와 같은 조건에서 실험을 수행한 결과를 하기 표 7에 기재하였다. 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이 혈관내피세포성장인자수용체인 FLT-1과 KDR 유전자는 프로모터 부분에서 다양한 메틸화 성향을 나타내었다.

[0051] <표 7. 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis) 분석결과>

세포주	조직타입	FLT-1	KDR
HCT116	colon	67	86
SNU-C5	colon	60	76
KM12C	colon	36	73
SNU-C4	colon	0	92
SW480	colon	0	92
HT29	colon	38	72
HM7	colon	0	60
SNU-C1	colon	61	86
SNU-638	Stomach	85	81
MKN28	Stomach	41	82
SNU-1	Stomach	99	93
MKN45	Stomach	0	81
IMR60	Lung(normal fibroblast)	0	0
H1299	Lung	0	23
A549	Lung	0	0

H322	Lung	41	38
EKVK	Lung	0	0
H460	Lung	0	0
H1973	Lung	0	0

[0053]

H157	Melanocyte(normal)	0	10
Primary tissue*	Melanocyte	0	0
SK-MEL-5	Melanocyte	0	2
TXM13	Melanocyte	84	0
G361	Melanocyte	0	0
SK-MEL-24	Melanocyte	0	15
SK-MEL-28	Melanocyte	5	17
TXM1	Melanocyte	0	0
Primary tissue*	Breast(normal)	0	0
MCF7	Breast	37	0
MDA-MB231	Breast	46	0
T47D	Breast	0	0
Primary tissue*	Thyroid(normal)	0	0
NPA	Thyroid	10	0
FRO	Thyroid	0	0
TPC1	Thyroid	37	0
ARO	Thyroid	32	79

[0054]

* 각 종류의 장기에서 취득한 normal primary tissue

[0055]

2. 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 프로모터 메틸화 및 이들 유전자 발현의 연관성 분석

[0056]

다양한 암세포주에서 증가되어 있는 FLT-1과 KDR 유전자의 프로모터 메틸화가 실제로 이들 유전자의 발현과 연관성이 있는지 다양한 암세포주를 이용하여 분석하였다.

[0057]

실시간 중합효소연쇄반응 기기(Step-one;Applied Biosystems사 제품)를 이용하여 하기 표 8과 같은 실시간 중합효소연쇄반응 mixture 및 증폭사이클을 조건으로 분석을 수행하였다.

[0058]

<표 8. 실시간 중합효소연쇄반응 mixture 및 증폭사이클 조건>

[0059]

(a) 20 x Probes
a) FLT-1: Hs01052936_m1
b) KDR : Hs00176676_m1
c) GAPDH: Hs99999905_m1
(b) Reaction Mixture
TaqMan; Universal Master Mix (Cat. No.; 4369016, Applied Biosystems사)10 μ l
20 x primer probe mix 1 μ l
Distilled Water 7 μ l
cDNA 2 μ l
(c) Amplification cycle
95°C 30 cycle / 60°C 30 cycle / 72°C 30 cycle

[0060]

상기와 같은 실험조건하에서 실험을 수행한 결과를 도 1에 나타내었다. 이를 통해 혈관내피세포성장인자 수용체인 FLT-1 및 KDR 유전자의 프로모터 메틸화가 증가함에 따라 이들 유전자의 발현이 감소하는 것(dCT가 증가함)을 확인할 수 있었다. 따라서 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 프로모터 메틸화 증가가 이들 유전자의 발

현에 영향을 미침을 알 수 있었다.

[0061] **3. 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 메틸화와 혈관내피세포성장인자-혈관내피세포성장인자수용체-PI3K-Akt 시그널링의 연관성 분석**

[0062] 혈관내피세포성장인자 수용체 프로모터 메틸화가 이들 유전자의 발현에도 영향을 미친다면, 혈관내피세포성장인자 - 혈관내피세포성장인자 수용체 시그널링에도 영향을 미칠 수 있을 것이라는 가설을 확인하고자 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 프로모터 메틸화 정도가 현저하게 다른 암세포주에 혈관내피세포성장인자를 처리한 후 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 메틸화 정도에 따라서 세포내 2차 전달자(intracellular secondary messenger)인 Akt와 Erk의 인산화 변화를 비교 분석하였다.

[0063] 이를 위해 FLT-1과 KDR 유전자 프로모터 메틸화 정도가 0%인 T47D 암세포주와 FLT-1과 KDR 유전자의 프로모터 메틸화 정도가 80%이상인 SNU-1 암세포주를 샘플로 선정하였고, 상기 세포를 1×10^6 cells로 넣고 24시간 배양한 다음 Serum free 배지로 바꾸어 다시 24시간 배양한 후 100mg/ml 혈관내피세포성장인자를 첨가하였다.

[0064] 그 후 Akt, pAkt는 10% SDS-PAGE gel에 러닝, PVDF membrane에 이동시킨 다음, 5% skim milk로 블로킹하였으며, 항체는 anti-Akt, anti-pAkt rabbit antibody(cell signaling)을 이용하였고, KDR, pKDR은 6% SDS-PAGE gel에 러닝, PVDF membrane에 이동시킨 다음, 5% skim milk로 블로킹하였으며, 항체는 anti-Akt, anti-pAkt rabbit antibody(cell signaling)을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다.

[0065] 이와 같은 실험결과를 도 2(SNU1) 및 도 3(T47D)에 나타내었다. 사진을 통해 확인할 수 있는 바와 같이 SNU1과 T47D 세포주 모두 total Akt와 Erk가 관찰되었다. 혈관내피세포성장인자 수용체(FLT-1, KDR) 유전자의 프로모터 메틸화가 증가한 SNU1 세포주는 혈관내피세포성장인자 처리 후에도 Akt와 Erk의 인산화 증가가 없었다. 그러나 혈관내피세포성장인자 프로모터 메틸화가 없는 T47D 세포주는 혈관내피세포성장인자의 자극에 따라 Akt와 Erk의 인산화가 증가하는 것이 관찰되었다. 이 결과는 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 프로모터 메틸화가 많이 되어 있는 세포주는 메틸화가 되어 있지 않은 세포주에 비하여 혈관내피세포성장인자-혈관내피세포성장인자 수용체-PI3K-Akt 시그널링 및 혈관내피세포성장인자-혈관내피세포성장인자 수용체-Raf-Mek 시그널링에 영향을 미칠 수 있음을 보여준다. 결과적으로 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 프로모터 메틸화 정도가 혈관내피세포성장인자의 세포내 시그널링에 영향을 미칠 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0066] **4. 혈관내피세포성장인자 수용체 프로모터 메틸화 상태 및 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료반응성 분석**

[0067] 상기에서 확인한 바와 같이, 혈관내피세포성장인자 프로모터 메틸화의 상태에 따라 혈관내피세포성장인자-혈관내피세포성장인자 수용체-PI3K-Akt 시그널링이 영향을 받아, 혈관내피세포성장인자 수용체의 프로모터 메틸화 상태에 따라 혈관내피세포성장인자-혈관내피세포성장인자 프로모터 시그널링을 억제하는 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제의 효과가 변화하는지 확인하고자 다음과 같은 조건하에 분석을 수행하였다.

[0068] 두 종류의 실험군에 FLT-1, KDR 유전자의 프로모터 메틸화 정도가 0%인 T47D 암세포주 및 FLT-1, KDR 유전자의 프로모터 메틸화 정도가 80%이상인 SNU1 암세포주를 샘플로 채택하였고, 여기에 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 중 하나인 PTK/ZK(노바티스사)를 처리하였다. 구체적인 처리조건은 96 well plate에 세포를 5×10^3 cell을 넣고 24시간 배양한 뒤 PTK/ZK를 최종농도가 $10\mu\text{M}$ 또는 $20\mu\text{M}$ 가 되도록 첨가하였다.

사용한 암세포주인 T47D 및 SNU1에는 매일 1 μ m 농도의 5-aza-2'-deoxycytidine(DAC)을 처리하였고, 4일 동안 PTK/ZK를 처리하며 세포독성을 조사하였다. 세포 독성은 PTK/ZK를 첨가하고 48시간 또는 72시간 동안 배양한 다음 CCK-8 solution(Dojindo Laboratories)을 10 μ l를 첨가하고 2시간 배양한 다음 540nm에서 측정하였다.

[0069] 이와 같은 조건하에서 수행한 실험결과를 도4(T47D) 및 도5(SNU1)에 나타내었다. 도4 및 도5에서 확인할 수 있는 바와 같이 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자 프로모터 메틸화 정도가 0%인 T47D의 세포가 메틸화 정도가 80% 이상인 SNU1에 비하여 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 중 하나인 PTK/ZK 약물에 대한 반응성(세포사멸 능력)이 더욱 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

[0070] 이러한 경향은 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자 프로모터 메틸화가 80%인 SNU1에 DNA 메틸화를 감소시키는 물질인 5-aza-2'-deoxycytidine(DAC)를 처리한 경우 PTK/ZK 약물에 대한 반응성이 10 μ m 처리군에 있어서 7.5 → 15.3%, 20 μ m 처리군에 있어서 21.8 → 23.7%로 각각 증가함에서도 관찰되어, 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자 프로모터 메틸화 정도가 낮을수록 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료 반응성이 높아짐을 다시 한번 확인할 수 있었다.

[0071] 이러한 실험결과를 통하여, 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자 프로모터 메틸화 여부를 확인하여 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료반응성 예측이 가능함을 확인할 수 있었다.

[0072] 5. 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 프로모터 메틸화 상태의 효과적 확인 방법 연구 및 예측용 키트 개발

[0073] 상기에서 확인한 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제의 치료반응성 예측을 위해서는 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 프로모터 메틸화 여부가 효과적으로 측정될 수 있어야 한다. 본 발명자들은 다양한 다양한 분자진단 기법을 활용하여 연구를 수행하였고, 이를 통해 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응 키트 및 파이로시퀀싱 키트를 개발하고 이의 효과를 확인하였다.

[0074] 최근까지 DNA 메틸화를 측정하기 위한 방법으로는 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing), 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis) 등이 많이 사용되고 있다. 그러나, 이와 같은 방법은 아가로스, PAGE gel을 이용한 후 정량을 해야하기 때문에 시간이 많이 소요되고, 반복성이나 정확성이 떨어지는 단점이 있었다.

[0075] 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR) 방법은 중합효소연쇄반응 결과를 정량적으로 측정할 수 있는 중합효소연쇄반응 방법으로 알려져 있다. 본 발명자들은 이러한 실시간 중합효소 연쇄반응 방법을 프로모터 메틸화 여부를 판단하기 위한 기법으로 활용하였다. 아울러, 최근 사용빈도가 늘어나고 있는 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 방법을 프로모터 메틸화 여부를 판단하기 위하여 활용하였다.

[0076] 이하에서는 본 발명자들이 개발한 프라이머, 프로브를 이용하여 수행한 상기 두 종류 프로모터 메틸화 측정방법(실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 및 파이로시퀀싱(Pyrosequencing))을 이용한 측정결과를 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing), 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis) 등 기존에 공지된 기법에 의한 실험결과와 비교하여, 유효성을 확인하기로 한다.

[0077] (1) 실험방법

1) 실시간 메틸화 특이적 중합효소 연쇄반응 프라이머 및 프로브

하기 표9, 표10에 FLT-1, KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화 여부를 확인하기 위한 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 용 프라이머 및 프로브 조건을 각각 나타내었다.

<표 9. FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화 여부를 확인하기 위한 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 용 프라이머 및 프로브>

정방향 프라이머(서열번호1)	5'-GGTTCGCGTCGTTAGTATTTTTTTAC-3'
역방향 프라이머(서열번호2)	5'-CGGTTTTCGTTTTTTTCGTAGTC-3'
프로브(서열번호3)	5'-CGCGTTCGGTTTCGGGTATTTCG-3'

<표 10. KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화 여부를 확인하기 위한 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 용 프라이머 및 프로브>

정방향 프라이머(서열번호4)	5'-TTTGCCTCGGGTATTATTTC-3'
역방향 프라이머(서열번호5)	5'-CGGTATTCGTAGACGTTTTTGTAGTC-3'
프로브(서열번호6)	5'-CGTCGTAGAAAGTTCGTTTG-3'

2) 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응 mixture

하기와 같은 조건의 중합효소연쇄반응 mixture를 이용하였다.

a. 각 유전자의 20 x probe

위에 기술된 각 유전자의 프로브 시퀀스의 5'에는 FAM을 붙이고, 3'에는 BHQ1을 붙여서 제작하였다.

b. Reaction mixture

TaqMan Universal Master Mix (Cat. No.: 4369016, Applied Biosystems) 15 μ l, 프라이머 프로브 mix 2.1ul (0.3 μ M primer each, 0.1 μ M probe, final concentration)(0.9ul 10pmole/ul primer each, 0.3 ul 10pmole/ul probe), 2.9 ul distilled water, 중아황산염 처리된 genomic DNA 10 μ l.

c. 중합효소연쇄반응 cycle

10 min at 95° C and 40 cycles(95° C, 15 s, 60° C, 60 s)

3) 파이로시퀀싱 프라이머 및 프로브 시퀀스 및 방법

하기 표 11, 12와 같은 프라이머 및 프로브를 이용하여 파이로시퀀싱을 수행하였다.

<표 11. FLT-1 유전자 프로모터 부분의 메틸화 여부를 확인하기 위한 파이로시퀀싱 프라이머 및 프로브 시퀀스>

정방향 프라이머(서열번호7)	5'-ATGGGTAGGAGGAGGGTAA-3'
역방향 프라이머(서열번호8)	*(B)5'-TCCCCACCTACCCTCTTCTT-3'
시퀀싱 프라이머(서열번호9)	5'-GGAGTAAAGATTTTGAATT-3'

<표 12. KDR 유전자 프로모터 부분의 메틸화 여부를 확인하기 위한 파이로시퀀싱 프라이머 및 프로브 시퀀스>

KDR(nested) 프라이머	정방향(서열번호 10)	5'- AGTTTTTATTTTGTATTGAGTTT -3'
	역방향(서열번호 11)	*(B)5'- AAAATATCCAACTACCAAAC -3'
KDR(inside) 프라이머	정방향(서열번호 12)	5'- AGAGGTTAGTGTGTGGTAGTTG -3'
	역방향(서열번호 13)	5'- AATATCCAACTACCAAACCA -3'

시퀀싱 프라이머 (서열번호 14)	5'- TTGTTTGAGTAGGGTATTAT -3'
-----------------------	------------------------------

a. 파이로시퀀싱 중합효소연쇄반응 방법

① 1 차 중합효소연쇄반응은 처음에 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 이용해서 중합효소연쇄반응을 시행하였다.

② 상기 중합효소연쇄반응 생성물을 이용해서 파이로시퀀싱을 시퀀싱 프라이머를 이용하여 수행함.

③ KDR 유전자를 위해서는 PCR의 민감도를 높이기 위해서 KDR-nested 프라이머로 nested 중합효소연쇄반응을 먼저 수행한 후에, KDR-nested PCR product를 가지고 KDR-inside 프라이머를 이용해서 다시 중합효소연쇄반응을 수행하고, 마지막으로 KDR-sequencing 프라이머를 이용해서 파이로시퀀싱을 수행하였다.

b. 구체적인 파이로시퀀싱 조건

1 차 중합효소연쇄반응 mixture는 Final 중합효소연쇄반응 volume을 25 μ l로 하되, 1 x 중합효소연쇄반응 buffer, 0.2 mM dNTP mix, Taq polymerase 2 unit, 정방향 및 역방향 프라이머 1 μ M, 중아황산염 처리 DNA 샘플 2 μ l (100 ng)로 구성한다. KDR 중합효소연쇄반응 생성물을 얻기 위해서 1 차로 KDR-nested 중합효소연쇄반응을 수행한 후에, 여기에서 얻은 생성물 0.1 μ l를 이용하여 KDR-inside 중합효소연쇄반응을 수행하였고, 여기서 얻은 중합효소연쇄반응 생성물을 파이로시퀀싱에 이용하였다.

파이로시퀀싱의 구체적인 방법은 다음과 같다.

① 중합효소연쇄반응 생성물에 Streptavidin-Sepharose HP (Amersham Biosciences)가 붙도록 반응시킨다.

② Immobilized 중합효소연쇄반응 생성물을 포함하는 sepharose beds를 정제, 세척한 후에 0.2M NaOH 용액을 이용하여 denaturation시킨다. 그런 후에 다시 세척한다.

③ 각 유전자에 특이적인 0.3 μ M 파이로시퀀싱 프라이머를 purified single-stranded 중합효소연쇄반응 생성물에 붙도록 반응시킨다.

④ PSQ HS 96 Pyrosequencing System (Pyrosequencing, Inc.)을 이용하여 파이로시퀀싱을 한다.

⑤ 메틸화 정량을 소프트웨어를 이용하여 측정한다.

⑥ 각 유전자 마다 4-5 개의 CpG 사이트의 메틸화 정도를 계산한다.

4) Standard Curve를 그리기 위한 혈관내피세포성장인자 수용체 복제 시퀀스 개발

a. Plasmid DNA

DNA 메틸화가 되어 있지 않은 인간 정자에서 얻은 DNA를 SssI Methylase (NEB)를 3 일간 처리하여 CpG 사이트가 메틸화 된 DNA를 얻었다. 이 DNA를 중아황산염으로 처리한 후, 상기에서 기술한 FLT-1, KDR 유전자의 프라이머와 프로브를 이용하여 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응을 실시하였다.

여기서 얻은 중합효소연쇄반응 결과물을 cloning (TOPO kit, invitrogen)한 후에, plasmid sequencing을 하여 아래의 중합효소연쇄반응 sequence와 비교하였다. 각 유전자의 중합효소연쇄반응 생성물에 위치한 CpG 사이트가 모두 CG로 된 sequence를 가지고 있는 colony를 선택하여 miniprep한 후, plasmid DNA를 획득하였다. 이 plasmid DNA를 이용하여 standard curve를 그리기 위한 template DNA로 사용하였다.

<표 13. 중합효소연쇄반응 생성물 시퀀스>

유전자	중합효소연쇄반응 시퀀스	길이(bp)
FLT-1	5'-GGTTCGCGTCGTTAGTATTTTACGCGCGTTCGGTTTCGGGTATTCGTTTCGTCGGTTTCGTTT TTTTTCGTAGTC-3'	81
KDR	5'-TTTGCCTCGGGTATTATTGCGCGTCGTAGAAAGTTCGTTTGGTAGTTTGGATATTTTATTCGGT ATTCGTAGACGTTTTTGTAGTC-3'	91

b. Reference sample

DNA 메틸화가 되어 있지 않은 인간 정자에서 얻은 DNA를 SssI methylase (NEB)를 3 일간 처리하여 CpG site가 메틸화된 DNA를 얻었다. Unknown sample과 함께 이 SssI methylase 처리된 DNA도 unknown sample과 함께 중아황산염으로 처리하여 100% 메틸화된 reference sample로 사용하였다.

5) 메틸화 정도 계산방법

프로모터 메틸화의 방법은 실시간 중합효소연쇄반응의 absolute quantitation method를 이용하여 계산하였다.

① 각 유전자의 100%-메틸화된-중합효소연쇄반응 생성물을 포함하고 있는 plasmid DNA 5 pg/ul 을 1/2, 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000 순서로 희석한 후에, reference sample, unknown sample과 함께 중합효소연쇄반응 과정을 수행하였다.

② 중합효소연쇄반응이 끝난 후에 Standard line을 그린다.

③ Reference sample과 unknown sample의 CT 값을 standard line과 비교하여 이용하여 각 sample의 메틸화 농도 (copy no.)를 계산한다.

④ Reference sample 값을 분모로, unknown sample의 값을 분자로 하여 계산한 비율을 각 unknown sample의 메틸화 %로 이용한다.

(2) 실험결과

1) 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing), 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis), 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 및 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법을 이용한 메틸화 측정 결과 비교

a. 사용한 암세포주

SNU1, Hct116, Mkn28, Aro

b. 실험방법

각 유전자의 프로모터의 CpG island sequence의 같은 위치에 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing), 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis), 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(Real-time Methylation Specific PCR) 및 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 방법의 프라이머를 도6과 같이 디자인 하였다.

각 cell line의 gDNA을 이용해서 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis)를 위한 중합효소연쇄반응을 시행하였고, 여기서 얻은 중합효소연쇄반응 생성물의 절반을 이용하여 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis) 결과를 얻기 위하여 각각의 유전자에 적합한 제한효소를 처리하였고, 나머지 절반의 중합효소연쇄반응 생성물은 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing)을 하는데 이용하였다.

a) 각각의 암세포주에서 Flt-1, KDR 유전자에 대한 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing) 결과 분석 방법

각 cell line의 gDNA을 이용해서 시행한 코브라 중합효소연쇄반응 생성물을 이용하여 cloning을 하여, 이들 중 5-10 개 정도의 clone을 M13 primer를 이용해서 중합효소연쇄반응을 시행한 후에, 이 중합효소연쇄반응 결과물을 sequencing 하여 중합효소연쇄반응 생성물 sequence와 비교하였다.

각각의 암세포주에서 얻은 FLT-1, KDR 유전자의 중아황산염 시퀀싱(Bisulfite Sequencing)에서 전체 CpG site 개수를 분모로 하고, 메틸화된 CpG 사이트의 개수를 분자로 하여 계산된 값을 메틸화 % 로 정하였다.

b) 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis)

각 cell line의 gDNA을 이용해서 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis)을 시행하여 각 유전자의 메틸화 %를 얻었다.

c) 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응

각각의 세포주의 중아황산염으로 처리된 gDNA를 이용해서 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였다.

d) 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)

(a) Flt-1, KDR 유전자의 파이로시퀀싱을 위한 primer와 probe sequence를 이용하여 파이로시퀀싱을 수행하였다.

c. 각각 세포주에서 4가지 방법으로 획득한 FLT-1, KDR 유전자의 메틸화 % 비교

각각의 세포주에서 상기에서 소개한 4가지 방법으로 획득한 FLT-1, KDR 유전자의 메틸화% 결과를 하기 표 14(FLT-1), 표 15(KDR)에 나타내었다.

<표 14. FLT-1의 메틸화 % 측정결과 비교>

세포주	메틸화						비고
	중아황산염 시퀀싱법	코브라법		실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응법		파이로시퀀싱법	
	평균	평균	SD	평균	SD	평균	
SC-SssI	100%	97.5%	0.6%	100%	0%	100%	Positive control
SNU1	100%	96.8%	0.4%	35.0%	1.5%	99%	
Hct 116	98.7%	95.5%	1.0%	63.4%	2.3%	93%	
MKN28	71.9%	37.5%	2.2%	16.7%	1.7%	83%	
Aro	59.2%	35.1%	2.3%	2.0%	0.0%	76%	

<표 15. KDR의 메틸화 % 측정결과 비교>

세포주	메틸화						비고
	중아황산염 시퀀싱법	코브라법		실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응법		파이로시퀀싱법	
	평균	평균	SD	평균	SD	평균	
SC-SssI	100%	94.9%	3.2%	100%	0%	100%	Positive control

SNU1	100%	92.7%	2.5%	50.2%	4.1%	82%	
Hct 116	99%	88.8%	1.4%	73.2%	3.9%	87%	
MKN28	94%	82.2%	2.0%	46.6%	0.8%	93%	
Aro	91%	79.9%	3.2%	28.7%	1.6%	87%	

[0147] 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis)의 프라이머는 CG 염기를 포함하지 않고, 중합효소연쇄반응 결과물 시퀀스 중에서 한곳의 제한 효소 사이트의 메틸화 상태를 확인할 수 있는 반면, 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응법은 3~4개의 CG 사이트를 포함하고, 프로브 시퀀스에도 3~4개의 CG 사이트를 포함한다. 따라서 양쪽 프라이머와 프로브의 9~12개의 CG 사이트가 메틸화되어 있어야 시그널이 관찰될 수 있다. 그래서 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응법의 결과는 중아황산염 시퀀싱법에서의 메틸화 수준보다 낮은 메틸화 정도가 관찰되었다. 이러한 결과는 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응이 각 유전자의 메틸화 정도를 관찰함에 있어 특이성(Specificity)은 높지만, 민감도(Sensitivity)는 상대적으로 낮을 수 있음을 보여준다.

[0148] 파이로 시퀀싱 결과는 FLT-1, KDR 유전자에서 중아황산염 시퀀싱 결과와 비슷한 메틸화 정도를 보여주고 있다. 이러한 결과는 파이로시퀀싱이 각 유전자의 메틸화 정도를 측정함에 있어서 특이성(Specificity)은 물론, 민감도(Sensitivity)도 높은 검사방법임을 보여준다.

[0149] 상기에서 살펴본 바와 같이, 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 치료반응성 예측을 위해 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 프로모터 메틸화 여부의 확인은 기존에 많이 이용해 왔던, 중아황산염 시퀀싱법 및 코브라(COBRA; Combined Bisulfite Restriction Analysis)법에 의해서 수행할 수 있으나, 시간과 비용 절감, 선별적 메틸화 여부 관찰을 위하여 본 발명에서 제공하는 프라이머 및 프로브를 이용하여 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응법 및 파이로시퀀싱 방법을 통하여 효과적으로 수행이 가능하다. 아울러 본 발명자가 제공하는 프라이머 및 프로브는 예측용 키트로 제작되어 환자 샘플로부터 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 메틸화 여부를 빠르게 검토함에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0150] 도 1은 다양한 암세포주에서 혈관내피세포성장인자 수용체 유전자의 프로모터 메틸화와 유전자의 발현관계를 나타낸 것이다.

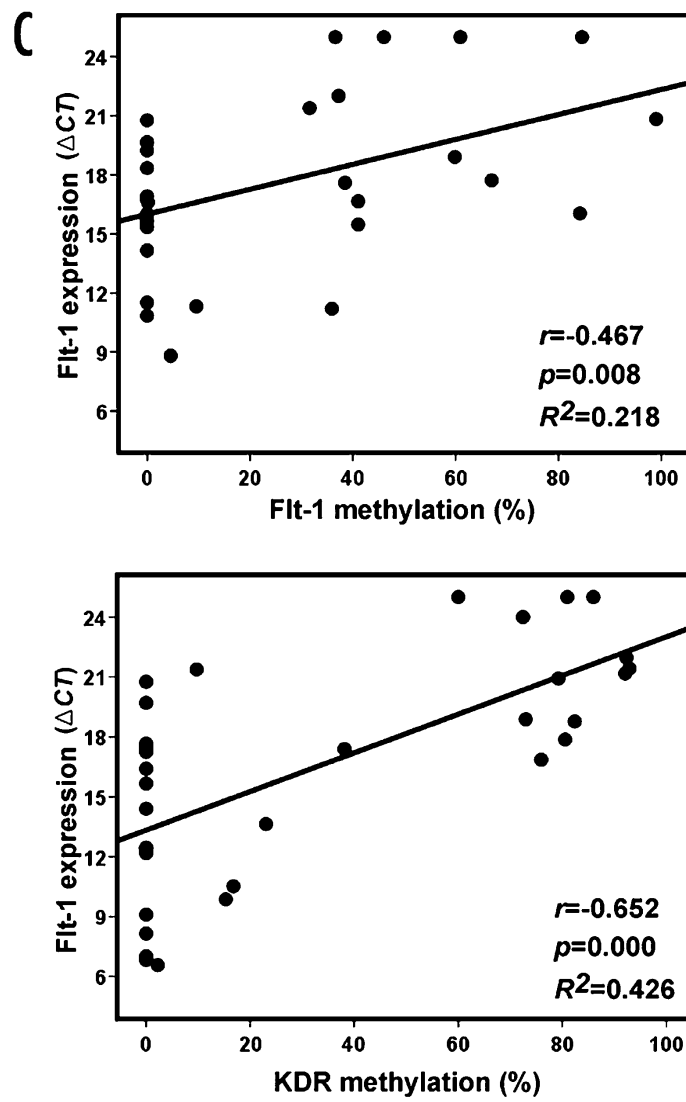
[0151] 도 2, 3은 SNU1 및 T47D 암세포주에 대하여 혈관내피세포성장인자(100ng/ml)를 처리한 후 0, 5, 10, 30, 60분 후에 Akt와 Erk의 인산화 변화에 대한 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 것이다.

[0152] 도 4, 5는 T47D 및 SNU1 암세포주에 DAC 및 혈관내피세포성장인자 특이적 타이로신 카이네이즈 억제제 처리(10 μ m, 20 μ m)에 따른 세포사멸율을 비교한 결과이다.

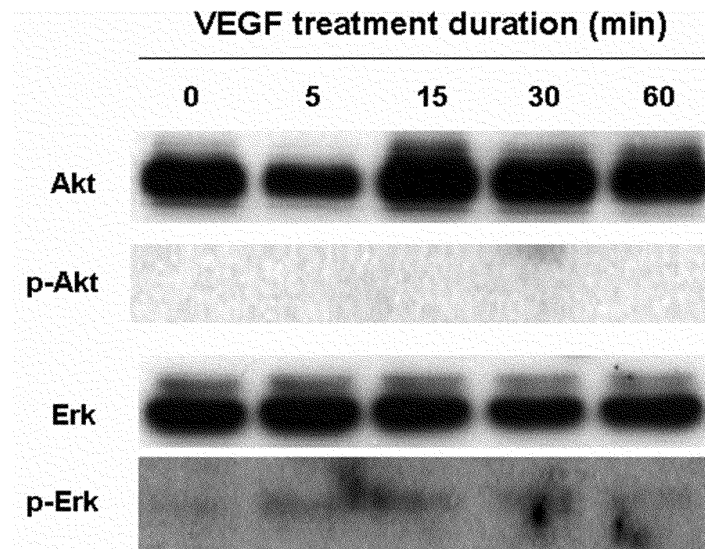
[0153] 도 6은 본 발명의 코브라법, 실시간 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응법, 파이로시퀀싱법에서 사용하는 프라이머 디자인 개요를 나타낸 것이다.

도면

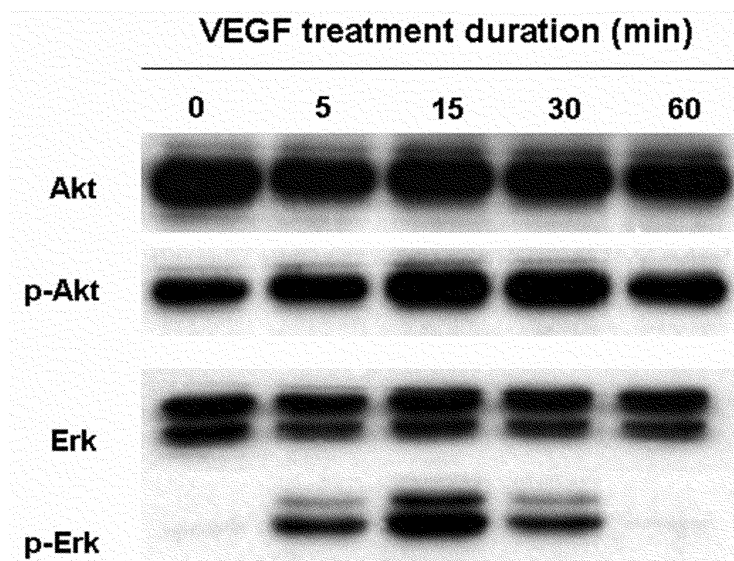
도면1



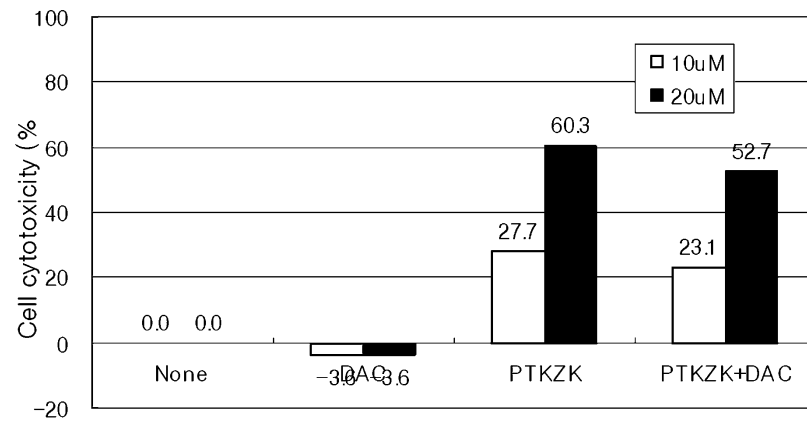
도면2



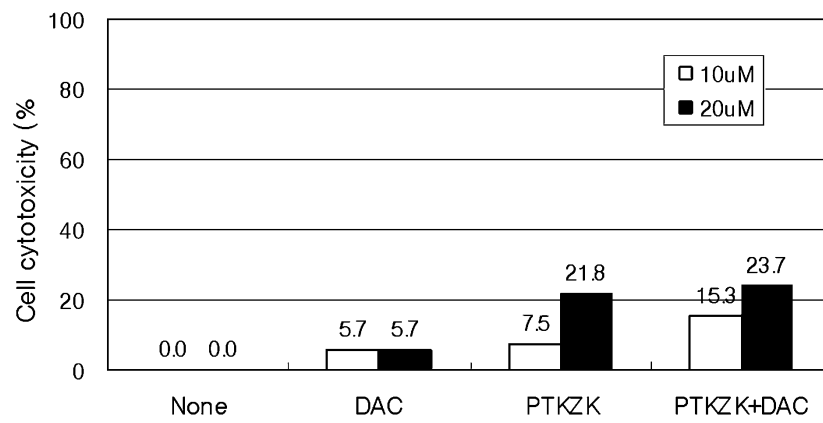
도면3



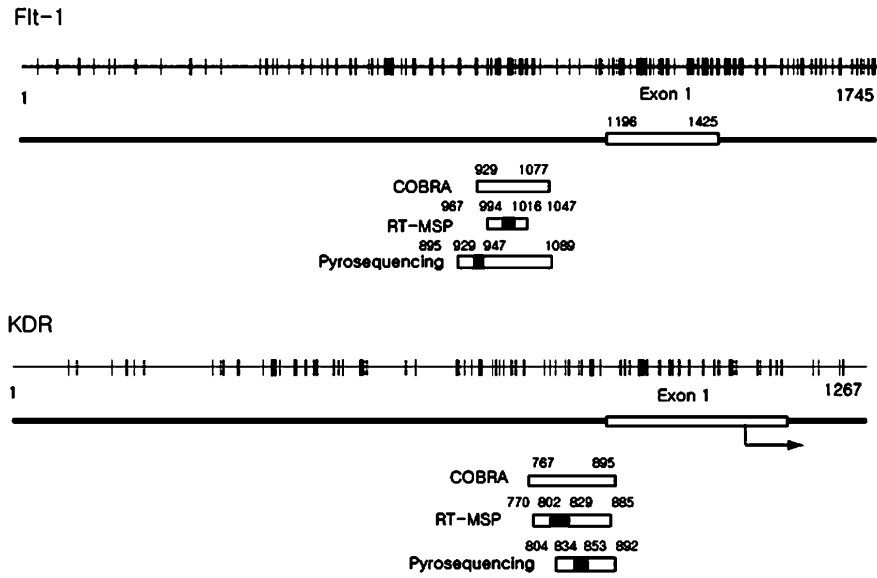
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY
 <120> Method for predicting therapeutic response to VEGF specific TKI acting on the patient and kit

<130> P09-07921

<160> 14

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for identifying methylation of FLT-1 promoter site by RT-MSP

<400> 1

ggttcgcgtc gtagtatatt ttttac

26

<210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer for identifying methylation of KDR promoter site
 by RT-MSP

<400> 2
 cggtttttcgt tttttttcgt agtc 24

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe for identifying methylation of FLT-1 promoter site by
 RT-MSP

<400> 3
 cgcgttcggt ttcgggttat tcg 23

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer for identifying methylation of KDR promoter site
 by RT-MSP

<400> 4
 tttgcgtcgg gtattatttg c 21

<210> 5
 <211> 26

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for identifying methylation of KDR promoter site
by RT-MSP

<400> 5
cggtattcgt agacgttttt gtagtc 26

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe for identifying methylation of KDR promoter site by RT-MSP

<400> 6
cgtcgtagaa agtcgtttg 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for identifying methylation of FLT-1 promoter site
by pyrosequencing

<400> 7
atgggtagga ggaggggtaa 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for identifying methylation of FLT-1 promoter site

by pyrosequencing

<400> 8
tccccaccta ccctcttctt 20

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sequencing primer for identifying methylation of FLT-1 promoter site by pyrosequencing

<400> 9
ggagtaaaga ttttgaatt 19

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for identifying methylation of KDR promoter site by pyrosequencing(which include nested PCR step)

<400> 10
agtttttatt ttgtattgag ttt 23

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for identifying methylation of KDR promoter site by pyrosequencing(which include nested PCR step)

<400> 11

aaaatatcca aactaccaa c	21
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Forward primer for identifying methylation of KDR promoter site by pyrosequencing(which include inside PCR step)	
<400> 12	
agaggttagt gtgtgtagt tg	22
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Reverse primer for identifying methylation of KDR promoter site by pyrosequencing(which include inside PCR step)	
<400> 13	
aatatccaaa ctaccaaacc a	21
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> sequencing primer for identifying methylation of KDR promoter site by pyrosequencing	
<400> 14	
ttgtttgagt aggttattat	20