(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0044510
(43) 공개일자 2011년04월29일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0101226
(22) 출원일자 2009년10월23일
심사청구일자 2009년10월23일

(71) 출원인
(주)지노믹트리
대전광역시 유성구 탑립동 829
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
문영호
대전시 유성구 전민동 엑스포아파트 304동 107호
오태정
대전 유성구 신성동 153 하나아파트 109동 1101호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영

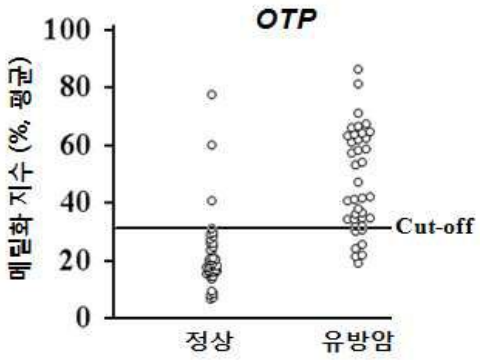
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 유방암 진단을 위한 유방암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화 검출방법

(57) 요 약

본 발명은 유방암 진단을 위한 유방암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화 검출방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 유방암 세포에서 특이적으로 메틸화되는 유방암 특이적 마커 유전자의 메틸화를 검출하여 유방암 또는 그 진행단계 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 메틸화 검출방법과 진단용 조성물, 키트 및 핵산 칩을 이용하면, 통상적인 방법보다 정확하고 빠르게 유방암의 조기 진단이 가능하고 또한 유방암 진행단계의 확인이 가능할 뿐만 아니라, 비침습적 시료인 혈청을 샘플로 이용할 수 있어 보다 간편하고 정확하게 유방암을 진단할 수 있어 유용하다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

김명순

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 406동 607호

이증훈

대전 유성구 원촌동 싸이언스빌 10-402

장일성

대전광역시 중구 대사동 충남대학교병원 외과

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 유방암 진단을 위한, 유방암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화 검출방법:

(a) DNA를 함유한 임상샘플을 준비하는 단계; 및

(b) 상기 임상샘플의 DNA로부터 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG 섬의 메틸화를 검출하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계는 *OTP* 유전자의 인트론 부위의 CpG섬의 메틸화를 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 *OTP* 유전자의 인트론은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b)단계는 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 임상 샘플은 암 의심 환자 또는 진단 대상 유래의 조직, 세포, 혈액, 유즙, 혈장 및 소변으로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

OTP (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG섬을 함유하는 유방암 진단용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 CpG섬은 상기 *OTP* 유전자의 인트론 부위에 위치하는 것을 특징으로 하는 유방암 진단용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 *OTP* 유전자의 인트론은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 유방암 진단용 조성물.

청구항 9

OTP (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG섬을 포함하는 단편을 증폭하기 위한 PCR 프라이머쌍과 상기 프라이머쌍에 의하여 증폭된 PCR 산물을 파이로시퀀싱하기 위한 시퀀싱 프라이머를 함유하는 유방암 진단용 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 PCR 프라이머쌍은 서열번호 2 및 3으로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 시퀀싱 프라이머는 서열번호 4의 서열로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

청구항 12

OTP (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG섬을 포함하는 단편과 엄격한 조건하에서 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브가 고정되어 있는 유방암 진단용 핵산 칩.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 CpG섬은 상기 *OTP* 유전자의 인트론 부위에 위치하는 것을 특징으로 하는 진단용 핵산 칩.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 *OTP* 유전자의 인트론은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 핵산 칩.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 프로브는 서열번호 5 내지 9로 표시되는 염기서열로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 진단용 핵산 칩.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유방암 진단을 위한 유방암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화 검출방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 유방암 세포에서 특이적으로 메틸화되는 유방암 특이적 마커 유전자의 메틸화를 검출하여 유방암 또는 그 진행단계 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 유방암은 유방에 생기는 악성 종양을 말하며, 대부분 유즙(모유)를 만드는 조직이나 유즙이 밖으로 나오는 관에서 가장 바깥쪽 세포인 상피세포에서 암세포로의 변이가 생겨 발생하는 것으로 알려져 있다. 유방암은 선진국 여성들에게 가장 많이 발생하는 것으로 알려져 있으며, 우리나라의 경우 위암 다음으로 많은 암이다. 또한, 위암, 간암, 자궁암, 폐암에 이어 다섯 번째로 사망률이 높은 암으로 서양에서와 마찬가지로 빈도가 매년 증가하는 추세이다.

[0003] 이러한 유방암의 증가추세는 식생활의 변화나, 서구식 생활, 첫월경이 어려지는 추세라든지 아이를 적게 낳고, 수유를 피하며 피임약을 사용하는 등 생활패턴의 변화에 기인할 가능성이 높다. 이와 같은 현상은 이웃 일본에도 현저하여 일본여성에게서 가장 흔한 암은 유방암이 되었으며, 우리나라도 머지않아 유방암이 자궁암을 추월하여 여성암에서 수위를 차지하리라는 추측은 그리 어렵지 않다.

[0004] 특히, 우리나라 유방암의 특징은 서구에서는 주로 50대에 발병하는 것과는 달리 40대에 빈도가 높아 비교적 젊은 연령층에서 유방암이 많이 발생한다는 점이다. 따라서 서구의 유방암 관리 지침과는 다른 우리나라에 맞는 유방암 관리 지침서가 필요하다.

[0005] 유방암은 조기에 진단하여 조기에 치료하면 타 암종에 비하여 좋은 결과를 기대할 수 있는 암으로 무엇보다 조기진단이 중요하다. 유방암을 조기에 발견할 경우 10년 생존율이 약 85% 이상이라고 알려져 있으며, 또한 일부만 절제하기 때문에 유방을 보존할 수도 있다. 암이라고 하면 흔히 몸이 피곤해지거나 식욕이 없고 빈혈이 일어나는 등의 증세가 나타나는 것으로 생각하기 쉬우나, 유방암의 초기에는 이런 증세가 전혀 없으며, 유방이나 응어리가 아픈 경우도 없다. 때문에 깨닫지 못하는 수도 많고, 어지간히 커진 응어리로 발견되는 경우도 많다. 따라서, 환자의 생존 기간을 늘이려면 병변 범위가 작을 때 조기 진단하는 것이 가장 좋은 방법이므로, 기존의 각종 유방암 진단 방법보다 효율적인 진단 방법, 즉 조기 진단이 가능하고, 대용량으로 검체를 처리할 수 있으며, 민감도 및 특이도가 높은 유방암 특이적 바이오마커의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 이에, 최근에는 DNA 메틸화 측정을 통하여 암을 진단하는 방법들이 제시되고 있는데, DNA 메틸화는 주로 특정 유전자의 프로모터 부위의 CpG 섬(CpG island)의 시토신(cytosine)에서 일어나고, 그로 인하여 전사 인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 차단되는 것으로서, 종양 억제 유전자의 프로모터 CpG 섬의 메틸화를 검색하는 것이 암 연구에 큰 도움이 되며, 이를 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR, 이하, "MSP"라고 함)이나 자동 염기 분석 등의 방법으로 검사하여 암의 진단과 스크리닝 등에 이용하려는 시도가 활발하게 이루어지고 있다.

[0007] 프로모터 CpG 섬의 메틸화가 발암을 직접 유발하는지, 또는 발암의 2차적인 변화를 일으키는지에 대해 논란이 있으나, 여러 암에서 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene), DNA 수선 유전자(DNA repair gene), 세포 주기 조절 유전자 등이 과메틸화(hyper-methylation)되어 있어 이들 유전자의 발현이 차단되어 있다는 것이 확인되었으며, 특히 암 발생의 초기 단계에서 특정 유전자의 프로모터 부위에 과메틸화가 일어난다는 것이 알려져 있다.

[0008] 따라서, 종양 관련 유전자의 프로모터 메틸화가 암의 중요한 지표이며, 이를 암의 진단 및 조기 진단, 발암 위험의 예측, 암의 예후 예측, 치료 후 추적 조사, 항암 요법에 대한 반응 예측 등 다방면으로 이용할 수 있다. 실제 혈액이나 객담, 침, 대변, 소변 등에서 종양 관련 유전자의 프로모터 메틸화를 조사하여 각종 암 진료에 사용하려는 시도가 최근 활발하게 이루어지고 있다 (Esteller, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 59:67, 1999; Sanchez-Cespedez, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 60:892, 2000; Ahlquist, D.A. *et al.*, *Gastroenterol.*, 119:1219, 2000).

[0009] 이에, 본 발명자들은 조기 진단, 발암 위험 또는 암의 예후 예측 등이 가능한 효과적인 유방암 특이적 메틸화 마커를 개발하고자 예의 노력한 결과, *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자가 유방암세포에서 특이적으로 메틸화되어 있으며, 이를 바이오마커로 이용하여 메틸화 정도를 측정함으로써 유방암을 진단할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명의 주된 목적은 유방암 진단에 효과적으로 사용될 수 있는 유방암에서 특이적으로 메틸화되는 유방암 특이적 메틸화 바이오마커를 제공하고, 이를 이용하여 조기에 유방암을 진단하기 위한 정보를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 유방암 특이적 메틸화 마커 유전자인 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 메틸화 검출방법 및 이를 이용한 유방암 진단용 키트 및 핵산 칩을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 유방암 진단을 위한, 유방암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화 검출방법을 제공한다:

[0013] (a) DNA를 함유한 임상샘플을 준비하는 단계; 및

[0014] (b) 상기 임상샘플의 DNA로부터 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG 섬의 메틸화를 검출하는 단계.

[0015] 본 발명은 또한, *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG섬을 함유하는 유방암 진단용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG섬을 포함하는 단편을 증폭하기 위한 PCR 프라이머쌍과 상기 프라이머쌍에 의하여 증폭된 PCR 산물을 파이로시퀀싱하기 위한 시퀀싱 프라이머를 함유하는 유방암 진단용 키트를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG섬을 포함하는 단편과 엄격한 조건하에서 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브가 고정되어 있는 유방암 진단용 핵산 칩을 제공한다.

효 과

[0018] 본 발명은 유방암 특이적 마커 유전자의 CpG 섬의 메틸화를 검출함으로써, 유방암 진단을 위한 정보를 주는 방법을 제공하는 효과가 있다.

[0019] 본 발명에 따른 메틸화 검출방법과 진단용 조성물, 키트 및 핵산 칩을 이용하면, 통상적인 방법보다 정확하고 빠르게 유방암의 조기 진단이 가능하고 또한 유방암 진행단계의 확인이 가능할 뿐만 아니라, 비침습적 시료인 혈청을 샘플로 이용할 수 있어 보다 간편하고 정확하게 유방암을 진단할 수 있어 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0021] 본 발명은 유방암에서 특이적으로 디메틸화에 의해서 발현이 증가하는 유전자인 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG섬을 바이오마커로서 사용하는 것으로서, 이에 본 발명은 일 관점에서 유방암 특이적 메틸화 마커 유전자인 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG섬을 함유하는 유방암 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 CpG섬은 상기 *OTP* 유전자의 인트론(intron) 영역은 존재하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이때, 상기 인트론 영역은 전사개시점을 기준으로볼 때, +2001nt부터 +2200nt까지의 서열로, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0023] 본 발명에서는 유방암세포조직에서 과메틸화되어 있는 유전자 및 디메틸화에 의하여 재활성화되는 유전자들 중, *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자가 유방암 진단에 유용함을 확인하였으며, 본 발명에 따른 메틸화 마커 유전자를 스크리닝하는 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) 형질전환 세포 및 비형질전환 세포로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 게놈 DNA로부터 메틸화된 DNA에 결합하는 단백질과 반응시켜 메틸화된 DNA를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 메틸화된 DNA를 증폭시킨 후, CpG 마이

크로어레이에 하이브리다이제이션한 다음, 정상 세포와 암 세포 간 메틸화 정도의 차이가 가장 큰 유전자를 메틸화 마커 유전자로 선정하는 단계; (d) 유방암 세포주에 디메틸화제를 처리하여 발현이 증가하는 유전자를 선별하는 단계; (e) (c)와 (d)의 유전자 목록을 비교하여 공통되는 유전자를 메틸화 바이오마커 후보유전자로 결정하는 단계.

[0024] 상기 메틸화 바이오 마커 유전자의 선별방법으로 유방암뿐만 아니라, 유방암으로 진행 중인 여러 이형증 단계에서 다양하게 메틸화되는 유전자를 찾아낼 수 있으며, 선별된 유전자는 유방암 스크리닝, 위험성 평가, 예측, 병명 확인, 병의 단계 진단 및 치료 타겟의 선정에도 사용될 수 있다.

[0025] 유방암 및 여러 단계의 이상에서 메틸화되는 유전자를 확인하는 것은 정확하고 효과적으로 유방암을 조기 진단할 수 있게 하며, 다중 유전자를 사용한 메틸화 목록 확립 및 치료를 위한 새로운 타겟을 확인할 수 있다. 추가로, 본 발명에 따른 메틸화 데이터는 다른 비-메틸화 연관 바이오 마커 검출 방법과 연계하면 더욱 정확한 유방암 진단 시스템을 확립할 수 있을 것이다.

[0026] 본 발명의 상기 방법으로, 검체로부터 얻어진 하나 이상의 핵산 바이오 마커의 메틸화 단계를 결정하는 것을 포함하는 여러 단계 또는 기(期)의 유방암 진행을 진단할 수 있다. 유방암의 각 단계의 검체에서 분리된 핵산의 메틸화 단계를 유방 조직의 세포 증식성 이상을 갖지 않는 검체로부터 얻어진 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계와 비교하여, 검체의 유방암의 특정 단계를 확인할 수 있으며, 상기 메틸화 단계는 하이퍼메틸화일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일례로, 핵산은 유전자의 조절 부위에서 메틸화될 수 있다. 다른 예로, 메틸화는 유전자의 조절 부위의 외곽에서부터 시작되어 내부로 진행되기 때문에, 조절 부위의 외곽에서 메틸화를 검출하는 것으로 세포 형질 전환에 관여하는 유전자를 조기 진단할 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 메틸화 유전자 마커를 이용하여 유방암을 형성할 가능성이 있는 세포의 조기 진단이 가능하다. 암세포에서 메틸화된다고 확인된 유전자가 임상적으로 또는 형태학적으로 정상으로 보이는 세포에서 메틸화되면, 상기 정상으로 보이는 세포는 암화가 진행되고 있는 것이다. 그러므로, 정상으로 보이는 세포에서의 유방암 특이적 유전자가 메틸화를 확인함으로, 유방암을 조기 진단할 수 있다.

[0029] 본 발명의 메틸화 마커 유전자를 이용하면, 검체에서 유방 조직의 세포 성장성 이상(이형증진행)을 검출할 수 있다. 상기 방법은 검체로부터 분리한 하나 이상의 핵산을 포함하는 시료를 하나 이상의 메틸화 상태를 결정할 수 있는 제제와 접촉시키는 것을 포함한다. 상기 방법은 하나 이상의 핵산에서 하나 이상의 부위의 메틸화 상태를 확인하는 것을 포함하고, 상기 핵산의 메틸화 상태는 유방 조직의 세포 성장성 이상 (이형증 진행)을 가지지 않는 검체의 핵산에서의 동일한 부위의 메틸화 상태와 차이가 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 유방암에서 특이적으로 메틸화되는 유전자의 메틸화 빈도를 검토하고, 유방암 진행 가능성을 가지는 조직의 메틸화 빈도를 정하는 것에 의하여 조직의 유방암으로의 발전 가능성을 평가할 수 있다.

[0031] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는 유방암 진단을 위한, 유방암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화 검출방법에 관한 것이다:

[0032] (a) DNA를 함유한 임상샘플을 준비하는 단계; 및

[0033] (b) 상기 임상샘플의 DNA로부터 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG 섬의 메틸화를 검출하는 단계.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계는 *OTP* 유전자의 인트론 부위의 CpG의 메틸화를 검출하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이때 *OTP* 유전자의 인트론 영역은 전사개시점을 기준으로볼 때, +2001nt부터 +2200nt까지의 서열로, 상기 인트론은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 메틸화 검출단계는 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의하여 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 상기 임상 샘플은 암 의심 환자 또는 진단 대상 유래의 조직, 세포, 유즙, 혈액, 혈장 및 소변으로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 있어서, 일례로 상기 유전자의 인트론 부위의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 다음 단계를 포함할 수 있다: (a) DNA를 함유한 임상샘플을 준비하는 단계; (b) 상기 임상샘플로부터 DNA를 분리하는 단계; (c) 상기

분리된 DNA를 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 인트론의 CpG섬을 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 증폭된 결과물의 생성 유무를 근거로 인트론의 메틸화 여부를 결정하는 단계.

[0037] 다른 예로, 본 발명에서는 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 메틸화 상태를 키트를 이용하여 검출하는 것에 의하여, 검체에 존재하는 유방 조직의 세포 성장성 이상(이형증)을 진단할 수 있다.

[0038] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG섬을 포함하는 단편을 증폭하기 위한 PCR 프라이머쌍과 상기 프라이머쌍에 의하여 증폭된 PCR 산물을 파이로시퀀싱하기 위한 시퀀싱 프라이머를 함유하는 유방암 진단용 키트에 관한 것이다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 PCR 프라이머쌍은 서열번호 2 및 3으로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0040] 본 발명에 있어서 또한, 상기 시퀀싱 프라이머는 서열번호 4로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0041] 다른 예로, 본 발명에서는 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 메틸화 상태를 핵산 칩을 이용하여 검출하는 것에 의하여, 검체에 존재하는 유방 조직의 세포 성장성 이상(이형증)을 진단할 수 있다.

[0042] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 CpG섬을 포함하는 단편과 엄격한 조건하에서 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브가 고정되어 있는 유방암 진단용 핵산 칩에 관한 것이다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 *OTP* 유전자는 적어도 하나의 메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 또한, 상기 CpG섬은 *OTP* 유전자의 인트론 부위에 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 이때 상기 *OTP* 유전자의 인트론 영역은 전사개시점을 기준으로볼 때, +2001nt부터 +2200nt까지의 서열로, 상기 인트론은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 프로브는 서열번호 5 내지 9로 표시되는 염기서열로 구성되는 군에서 선택된 것임을 특징으로 할 수 있으며, 그 구체적인 서열은 다음과 같다.

[0045] Probe 1: 5'-ctgtatcgag ttatctcctt ctctacccgg-3' (서열번호 5)

[0046] Probe 2: 5'-acacgcaagg cccgtctccg gccag-3' (서열번호 6)

[0047] Probe 3: 5'-acacgcaagg cccgtctccg gccagtatag cgacatcccg gaagaagctc-3' (서열번호 7)

[0048] Probe 4: 5'-aagcccggcg ttgtcgggct acagggttcg cctcctccgc ctgagaaggc aacctcagcg-3' (서열번호 8)

[0049] Probe 5: 5'-ctgtatcgag ttatctcctt ctctacccgg aaactggtcc ccatcgccat cccccaatgg acacgcaagg cccgtctccg gccagtatag cgacatcccg gaagaagctc ctcaaaatcg aagcccggcg ttgtcgggct acagggttcg cctcctccgc ctgagaaggc aacctcagcg cccccccggg cggcccagcc-3' (서열번호 9)

[0050] 본 발명의 진단용 키트 또는 핵산 칩을 이용하면 검체의 유방 조직의 세포 성장성 이상 성향(이형증 진행도)을 결정할 수 있다. 상기 방법은 검체로부터 분리한 하나 이상의 핵산의 메틸화 상태를 결정하는 것을 포함하고, 상기 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계는 유방 조직의 세포 성장성 이상 성향(이형증)이 없는 검체로부터 분리한 핵산의 메틸화 단계와 비교하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0051] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 키트 또는 핵산 칩을 이용하여 마커 유전자의 메틸화를 검사하는 것에 의하여 형질전환된 유방암 세포를 확인할 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 키트 또는 핵산 칩을 이용하여 마커 유전자의 메틸화를 검사하는 것에 의하여 유방암을 진단할 수 있다.

[0053] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 정상 표현형을 나타내는 샘플을 이용하여 상기 키트 또는 핵산 칩을 이용하여 마커 유전자의 메틸화를 검사하는 것에 의하여 유방암으로 진행될 수 있는 가능성을 진단할 수 있다. 상기 샘플은 고체 또는 액체 조직, 세포, 유즙, 소변, 혈청 또는 플라즈마를 사용할 수 있다.

[0054] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0055] 본원에서 사용된 "세포 형질전환"은 정상에서 비정상으로, 비-종양성에서 종양성으로, 미분화에서 분화로, 줄기세포에서 비-줄기세포로와 같이 세포의 특징이 한 형태에서 다른 형태로 바뀌는 것을 의미한다. 추가적으로, 상기 형질전환은 세포의 형태, 표현형, 생화학적 성질 등에 의하여 인식될 수 있다.

[0056] 본원에서 암의 "조기 확인"은 전이되기 전에 암의 가능성을 발견하는 것으로, 바람직하게는 검체 조직 또는 세포에서 형태학적 변화가 관찰되기 전에 발견하는 것이다. 추가적으로, 세포 형질전환의 "조기 확인"은 세포가 형질전환되는 형태가 되기 전에 초기 단계에서 형질전환이 일어날 가능성 높은 것을 말한다.

[0057] 본원에서 "하이퍼메틸화"는 CpG 섬의 메틸화를 의미한다.

[0058] 본원에서, "샘플" 또는 "검체 샘플"은 수행되는 분석의 종류에 따라, 개개인, 체액, 세포주, 조직 배양 등에서 얻어지는 모든 생물학적 체액, 포함하는 폭넓은 범위의 체액을 의미하는 것이다. 포유동물로부터 체액 및 조직 생검을 획득하는 방법은 통상적으로 널리 알려져 있다. 바람직한 소스는 유방의 생검(biopsy)이다.

[0059] **유방암에 대한 바이오 마커-정상세포와의 비교를 위한 암세포의 용도**

[0060] 본 실시예에서, "정상" 세포는 비정상적 세포 형태 또는 세포학적 성질의 변화를 나타내지 않은 세포를 의미한다. "종양"세포는 암 세포를 의미하고, "비종양" 세포는 병증 조직의 일부이지만, 종양 부위는 아니라고 판단되는 세포를 의미한다.

[0061] 본 발명은 일 관점에서, 유방암과 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자의 하이퍼메틸화 사이의 관련성의 발견에 기반을 둔 것이다.

[0062] 본 발명의 진단용 키트 및 핵산 칩의 다른 용도로, 검체에서 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계를 결정하여 검체의 유방 조직의 세포 성장성 이상을 조기 진단할 수 있다. 상기 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계는 유방 조직의 세포 성장성 이상을 가지고 있지 않은 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화 상태와 비교하는 것을 특징으로 할 수 있다. 핵산은 CpG 섬과 같은 CpG-함유 핵산인 것이 바람직하다.

[0063] 본 발명의 진단용 키트 및 핵산 칩의 다른 용도로, 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화를 결정하는 것을 포함하는 검체의 유방 조직의 세포 성장성 이상 소양을 진단할 수 있다. 상기 핵산은 *OTP* (NM_032109, 오쏘페디아 호메오박스, Orthopedia Homeobox) 유전자인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계는 유방 조직의 세포 성장성 이상에 대한 소양을 가지고 있지 않은 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화 상태와 비교하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0064] 상기 "소양"은 상기 세포 성장성 이상에 걸리기 쉬운 성질을 의미한다. 소양을 가진 검체는 아직은 세포 성장성 이상을 가지고 있지 않지만, 세포 성장성 이상이 존재하거나 존재할 경향이 증가된 검체를 말한다.

[0065] 본 발명은 다른 관점에서, 검체의 핵산을 포함하는 시료를 시료의 메틸화 상태를 결정할 수 있는 제제와 접촉시키고, 하나 이상의 핵산의 하나 이상의 부위의 메틸화를 확인하는 것을 포함하는 검체의 유방 조직의 세포 성장성 이상을 진단하는 방법을 제공한다. 여기서, 하나 이상의 핵산의 하나 이상의 부위의 메틸화는 세포 성장성 이상을 가지지 않는 검체의 동일한 핵산의 동일한 부위의 메틸화 단계와 다른 것을 특징으로 할 수 있다.

[0066] 본 발명의 방법은 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 하나 이상의 부위의 메틸화를 결정하는 단계를 포함한다. 여기서, "핵산" 또는 "핵산 서열"이란 올리고뉴클레오티드, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드를 의미하거나 이들의 단편, 단일가닥 또는 이중가닥의 게놈 기원 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA, 센스 또는 안티센스 가닥의 게놈 기원 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA, PNA(peptide nucleic acid) 또는 자연 기원 또는 합성 기원의 DNA 양 또는 RNA 양 물질을 말한다. 핵산이 RNA이면, 데옥시뉴클레오티드 A, G, C 및 T를 대신하여, 각각 리보뉴클레오티드 A, G, C 및 U로 대체된다는 것은 당해 분야 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명하다.

[0067] 서로 다르게 메틸화된 CpG 섬의 존재를 검출할 수 있는 핵산이라면 어떤 것이든 사용할 수 있다. 상기 CpG 섬은

핵산 서열에서 CpG가 풍부한 부위이다.

[0068] **메틸화(methylation)**

[0069] 본 발명에서의 정제되거나 정제되지 않은 형태의 어떠한 핵산도 사용될 수 있으며, 타겟 부위(예를 들면, CpG-함유 핵산)를 함유하는 핵산 서열을 함유하고 있거나 함유할 것으로 의심되는 어떠한 핵산도 사용될 수 있다. 차별적으로 메틸화될 수 있는 핵산 부위가 CpG 섬이고, 이는 다른 디뉴클레오티드 CpG 핵산 부위와 비교하여 높은 CpG 밀도를 가지는 핵산 서열이다. 이중(doublet) CpG는 G*C 염기쌍의 비율로 예측하였을 때, 척추동물 DNA에서 단 20% 정도의 확률로 나타난다. 특정 부위에서, 이중 CpG의 밀도는 게놈의 다른 부위와 비교하여 10배나 더 높다. CpG 섬은 평균 G*C 비율이 약 60%로, 보통의 DNA의 G*C 비율은 평균 40%를 나타낸다. CpG 섬은 전형적으로 약 1~2kb 길이를 가지고, 인간 게놈에는 약 45,000개의 CpG 섬이 존재한다.

[0070] 여러 유전자에서, CpG 섬은 프로모터의 업스트림(upstream)에서 시작하여, 다운스트림의 전사 부위까지 확장된다. 프로모터에서 CpG 섬의 메틸화는 보통 유전자의 발현을 억제시킨다. CpG 섬은 또한 유전자 코딩 부위의 3' 부위뿐만 아니라, 유전자 코딩 부위의 5' 부위를 둘러싸고 있을 수 있다. 그러므로, CpG 섬은 프로모터 부위를 포함하는 조절 부위의 코딩 서열 업스트림, 코딩 부위(예를 들어, 엑손영역), 코딩 부위의 다운스트림, 예를 들면, 인헨서 부위 및 인트론을 포함하는 여러 부위에서 발견된다.

[0071] 통상적으로, CpG-함유 핵산은 DNA이다. 그러나, 본 발명의 방법은 예를 들면, DNA 또는 DNA와 mRNA를 포함하는 RNA를 함유하는 시료를 적용할 수 있으며, 여기서 DNA 또는 RNA는 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있으며, 또는 DNA-RNA 하이브리드를 함유한 시료인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0072] 핵산 혼합물 또한 사용할 수 있다. 검출될 특이적인 핵산 서열은 큰 분자의 분획일 수 있고, 처음부터 특이 서열이 전체 핵산 서열을 구성하는 분리된 분자 형태로 존재할 수 있다. 상기 핵산 서열은 순수한 형태로 존재하는 핵산일 필요는 없으며, 핵산은 전체 인간 DNA가 포함되어 있는 것과 같이 복잡한 혼합물 내의 적은 분획일 수도 있다. 시료에 포함된 핵산의 메틸화 정도를 측정하는 데 사용되거나, 메틸화된 CpG 섬을 검출하는 데 사용되는 시료에 포함된 핵산은 Sambrook 등(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY., 1989)에 기재된 여러 가지 방법으로 추출될 수 있다.

[0073] 검체로부터 분리된 핵산은 검체의 생물학적 시료에 의하여 얻어진다. 유방암이나 유방암의 진행 단계를 진단하고 싶다면, 스크랩이나 생검으로 유방 조직에서 핵산을 분리하여야 한다. 이러한 시료는 당해 분야에서 알려진 여러 의학적 과정에 의하여 얻어질 수 있다.

[0074] 본 발명의 한 양태에서, 검체로부터 얻어진 샘플의 핵산의 메틸화 정도는 유방 조직의 세포 성장성 이상이 없는 검체의 동일한 핵산 부분과 비교하여 측정한다. 하이퍼메틸화는 하나 이상의 핵산에서 메틸화된 대립유전자가 존재하는 것을 말한다. 유방 조직의 세포 성장성 이상이 없는 검체는 동일한 핵산을 검사했을 때, 메틸화 대립유전자가 나타나지 않는다.

[0075] **개별 유전자 및 패널**

[0076] 본 발명은 진단 또는 예측 마커로서 각 유전자를 개별적으로 사용하거나, 몇몇 마커 유전자를 조합하여 패널 디스플레이 형태로 하여 사용할 수 있고, 몇몇의 마커 유전자는 전체적인 패턴 또는 메틸화된 유전자의 목록을 통하여 신뢰성 및 효율성을 향상시키는 것을 확인할 수 있다. 본 발명에서 확인된 유전자는 개별적으로, 또는 본 실시예에서 언급된 유전자가 조합된 유전자 세트로 사용될 수 있다. 또는, 유전자들은 함께 메틸화된 유전자의 수 및 그 중요도에 따라 순위를 매길 수 있고, 가중치를 둘 수 있으며, 암으로 발전할 가능성의 수준을 선정할 수 있다. 이러한 알고리즘은 본 발명에 속한다.

[0077] **메틸화 검출 방법**

[0078] **메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR)**

[0079] 지노믹 DNA에 바이설파이트를 처리하면 5'-CpG'-3 부위의 시토신이 메틸화된 경우에는 그대로 시토신으로 남아있고, 비메틸화된 경우에는 우라실로 변하게 된다. 따라서, 바이설파이트 처리 후 변환된 염기서열을 대상으로

5'-CpG-3' 염기서열이 존재하는 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 제작하였다. 이때 메틸화된 경우에 해당되는 PCR 프라이머와 비메틸화된 경우에 해당하는 두 종류의 프라이머를 제작하였다. 지노믹 DNA를 바이설파이트로 변환시킨 다음, 상기 두 종류의 프라이머를 이용하여 PCR을 하면 메틸화된 경우에는 메틸화된 염기서열에 해당되는 프라이머를 사용한 것에서 PCR 산물이 만들어지게 되고, 반대로 비메틸화인 경우에는 비메틸화에 해당되는 프라이머를 이용한 것에서 PCR 산물이 만들어진다. 메틸화 여부는 아가로즈겔 전기영동방법으로 정성적으로 확인할 수 있다.

[0080] **실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR)**

[0081] 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화 특이 PCR 방법을 실시간 측정방법으로 전환한 것으로, 지노믹 DNA에 바이설파이트를 처리한 후, 메틸화된 경우에 해당하는 PCR 프라이머를 디자인하고, 이들 프라이머를 이용하여 실시간 PCR을 수행하는 것이다. 이때, 증폭된 염기서열과 상보적인 TanMan 프로브를 이용하여 검출하는 방법과 Sybergreen을 이용하여 검출하는 두 가지 방법이 있다. 따라서, 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화된 DNA만을 선택적으로 정량 분석할 수 있다. 이때, *in vitro* methylated DNA 샘플을 이용하여 표준곡선을 작성하고, 표준화를 위하여 염기서열내에 5'-CpG-3' 서열이 없는 유전자를 음성대조군으로 함께 증폭하여 메틸화 정도를 정량 분석하였다.

[0082] **파이로시퀀싱**

[0083] 파이로시퀀싱 방법은 바이설파이트 시퀀싱 방법을 정량적인 실시간 시퀀싱으로 변환한 방법이다. 바이설파이트 시퀀싱과 마찬가지로 지노믹 DNA를 바이설파이트를 처리하여 전환시킨 다음, 5'-CpG-3' 염기서열이 없는 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 제작하였다. 지노믹 DNA를 바이설파이트로 처리한 후, 상기 PCR 프라이머로 증폭한 다음, 시퀀싱 프라이머를 이용하여 실시간 염기서열 분석을 수행하였다. 5'-CpG-3' 부위에서 시토신과 티민의 양을 정량적으로 분석하여 메틸화 정도를 메틸화 지수로 나타내었다.

[0084] **메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 정량 PCR 및 DNA 칩**

[0085] 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 DNA 칩 방법은 메틸화 DNA에만 특이적으로 결합하는 단백질을 DNA와 섞어주게 되면, 메틸화 DNA에만 특이적으로 단백질이 결합하기 때문에 메틸화 DNA만을 선택적으로 분리할 수 있다. 지노믹 DNA를 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질과 섞어준 후, 메틸화된 DNA만을 선택적으로 분리하였다. 이들 분리된 DNA를 인트론 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 이용하여 증폭한 후, 아가로즈 전기영동으로 메틸화 여부를 측정하였다.

[0086] 또한, 정량 PCR 방법으로도 메틸화 여부를 측정할 수 있으며, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질로 분리한 메틸화 DNA는 형광 염료로 표지하여 상보적인 프로브가 집적된 DNA칩에 하이브리디제이션시킴으로써 메틸화 여부를 측정할 수 있다. 여기서 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질은 MBD2bt에 제한되지 않는다.

[0087] **차별적 메틸화의 검출-메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제**

[0088] 차별적 메틸화의 검출은 메틸화되지 않은 CpG 부위만을 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제와 핵산 샘플을 접촉시켜 비메틸화된 핵산을 절단하는 것으로 수행할 수 있다.

[0089] 별도의 반응으로, 상기 샘플을 메틸화 및 비메틸화 CpG 부위를 모두 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머(isochizomer)와 접촉시켜, 메틸화된 핵산을 절단하였다.

[0090] 특이적 프라이머를 핵산 샘플에 첨가하고, 통상의 방법으로 핵산을 증폭시켰다. 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제를 처리한 샘플에서 증폭 산물이 존재하고, 메틸화 및 비메틸화 CpG 부위를 모두 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머를 처리한 샘플에서 증폭 산물이 존재하지 않으면, 분석된 핵산 부위에 메틸화가 일어난 것이다. 그러나, 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제를 처리한 샘플에서 증폭 산물이 존재하지 않고, 메틸화 및 비메틸화 CpG 부위를 모두 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머를 처리한 샘플에서도 증폭 산물이 존재하지 않는다는 것은 분석된 핵산 부위에 메틸화가 일어나지 않은 것이다.

[0091] 여기서, "메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제"는 인식 부위에 CG를 포함하고, C가 메틸화되지 않았을 때와 비교하여 C가 메틸화되었을 때 활성을 가지는 제한효소이다 (예를 들면, *Sma*I). 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 비제한적 예로써, *Msp*I, *Hpa*II, *Bss*HII, *Bst*UI 및 *Not*I이 포함된다. 상기 효소들은 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 다른 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레오티드로는 예를 들어, *Sac*II 및 *Eag*I를 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0092] 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머는 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레아제와 동일한 인식 부위를 갖는 제한 엔도뉴클레아제이지만, 메틸화된 CGs와 비메틸화된 CGs를 모두 절단하며, 예를 들면, *Msp*I를 들 수 있다.

[0093] 본 발명의 프라이머는 증폭될 로커스의 각 가닥과 "대체적으로" 상보성을 가지도록 제작되고, 상기에서 설명한 바와 같이, 적당한 G 또는 C 뉴클레오티드를 포함한다. 이것은 중합반응을 수행하는 조건에서 프라이머가 대응하는 핵산 가닥과 하이브리다이제이션 되기에 충분한 상보성을 가지는 것을 의미한다. 본 발명의 프라이머는 증폭 과정에 사용되며, 상기 증폭 과정은 예를 들면, PCR과 같은, 타겟 로커스가 많은 반응 단계를 거치면서 기하급수적인 숫자로 증가하는 효소 연속 반응이다. 전형적으로, 한 프라이머(안티센스 프라이머)는 로커스의 네가티브(-) 가닥에 대하여 상동성을 가지고, 나머지 하나의 프라이머(센스 프라이머)는 포지티브(+) 가닥에 대하여 상동성을 가진다. 변성된 핵산에 프라이머가 어닐링되면, DNA 폴리머라아제 I(Klenow) 및 뉴클레오티드와 같은 효소 및 반응물들에 의하여 사슬이 신장되고, 그 결과, 타겟 로커스 서열을 함유하는 + 와 - 가닥이 새롭게 합성된다. 상기 새로이 합성된 타겟 로커스가 주형으로도 사용되어 변성, 프라이머 어닐링 및 사슬 신장의 사이클이 반복되면 타겟 로커스 서열의 기하급수적인 합성이 진행된다. 상기 연속 반응의 산물은 반응에 사용된 특이 프라이머의 말단과 대응하는 말단을 가지는 독립적인 이중가닥 핵산이다.

[0094] 상기 증폭 반응은 당해 분야에서 보편적으로 사용되고 있는 PCR인 것이 바람직하다. 그러나, 리얼타임 PCR 또는 등온 효소를 사용한 선형증폭과 같은 대체적인 방법도 사용할 수 있으며, 멀티플렉스 증폭 반응 역시 사용할 수 있다.

[0095] **<u>차별적 메틸화의 검출-바이설파이트 시퀀싱 방법</u>**

[0096] 메틸화 CpG를 함유한 핵산을 검출하는 다른 방법은 핵산을 함유한 시료를 비메틸화 시토신을 변형시키는 제제와 접촉시키는 단계 및 CpG-특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 시료의 CpG-함유 핵산을 증폭시키는 단계를 포함한다. 여기서, 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머는 변형된 메틸화 및 비메틸화 핵산을 구별하여 메틸화 핵산을 검출하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 증폭 단계는 선택적이고, 바람직하지만 필수적인 것은 아니다. 상기 방법은 변형된(예를 들면, 화학적으로 변형된) 메틸화 및 비메틸화 DNA를 구별하는 PCR 반응에 의존하는 것이다. 상기와 같은 방법은 미국특허 5,786,146에 개시되어 있으며, 상기 특허에는 메틸화 핵산의 검출을 위한 바이설파이트(bisulfite) 시퀀싱과 연관하여 기재되어 있다.

[0097] **<u>키트(Kit)</u>**

[0098] 본 발명에 의하면, 검체의 세포 성장성 이상을 검출하는 데 유용한 키트를 제공하고 있다. 본 발명의 키트는 샘플을 담는 구획된 캐리어 수단, 샘플을 파이로시퀀싱하기 위한 5'-CpG-3' 염기서열 부위를 증폭할 수 있는 PCR 프라이머쌍을 함유하는 두번째 용기, 및 증폭된 PCR 산물을 파이로시퀀싱하기 위한 시퀀싱 프라이머를 함유하는 세번째 용기를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다.

[0099] 캐리어 수단은 병, 튜브와 같은 하나 이상의 용기를 함유하기에 적합하고, 각 용기는 본 발명의 방법에 사용되는 독립적 구성요소들을 함유한다. 본 발명의 명세서에서, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 용기 중의 필요한 제제를 손쉽게 분배할 수 있다.

[0100] **<u>기질</u>**

[0101] 타겟 핵산 부위가 증폭되면 핵산 서열의 존재를 검출하기 위하여, 상기 핵산 증폭 산물은 고체 지지체(기질)에 고정된 알려진 유전자 프로브와 하이브리다이제이션될 수 있다.

[0102] 여기서, "기질"은 물질, 구조, 표면 또는 재료, 비생물학적이고, 합성되고, 무생물, 평면, 구형 또는 특이적 결

합, 평편한 표면의 물질을 포함하는 혼합물 수단으로, 하이브리다이제이션 또는 효소 인식 부위 또는 대다수의 다른 인식 부위 또는 표면, 구조 또는 재료로 구성된 수많은 다른 분자 종을 넘어서는 수많은 다른 인식 부위를 포함할 수 있다. 상기 기질은 예를 들면, 반도체, (유기)합성 메탈, 합성 반도체, 인슐레이터 및 도판트; 금속, 합금, 원소, 화합물 및 미네랄; 합성되고, 분해되며, 에칭되고, 리소그라프되며, 프린트되고 마이크로패브리케이트된 슬라이드, 장치, 구조 및 표면; 산업적, 폴리머, 플라스틱, 멤브레인, 실리콘, 실리케이트, 유리, 금속 및 세라믹; 나무, 종이, 카드보드, 면, 울, 천, 직조 및 비직조 섬유, 재료 및 패브릭일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0103] 몇몇 형태의 멤브레인은 당해 분야에서 핵산 서열에 대하여 부착력을 가진다고 알려져 있다. 이러한 멤브레인의 특이적이고 비제한적인 예로 니트로셀룰로오스 또는 폴리비닐클로라이드, 디아조티즈드(diazotized) 페이퍼 및 GENESCREEN™, ZETAPROBE™(Biorad) 및 NYTRAN™ 등의 상업적으로 사용되는 멤브레인과 같이 유전자 발현 검출용 멤브레인을 들 수 있다. 비드, 글래스, 웨이퍼 및 금속 기질도 포함된다. 이러한 목적물에 핵산을 부착시키는 방법은 당해 분야에서 잘 알려져 있다. 이와 다르게, 액체 상에서도 스크리닝을 수행할 수 있다.

[0104] **하이브리다이제이션 조건**

[0105] 핵산 하이브리다이제이션 반응에서, 엄격한 특정 수준을 달성하기 위하여 사용되는 조건은 하이브리다이즈되는 핵산의 성질에 따라 다양하다. 예를 들면, 하이브리다이제이션되는 핵산 부위의 길이, 상동성 정도, 뉴클레오티드 서열 조성(예를 들면, GC/AT 조성비) 및 핵산 타입(예를 들면, RNA, DNA)등이 하이브리다이제이션 조건을 선택하는데 고려된다. 추가적인 고려 조건은 핵산이 예를 들면, 필터 등에 고정화되어 있는지의 여부이다.

[0106] 매우 엄격하게 진행되는 조건의 예를 들면 다음과 같다: 실온의 2X SSC/0.1% SDS(하이브리다이제이션 조건); 실온의 0.2X SSC/0.1% SDS(엄격성이 낮은 조건); 42℃에서의 0.2X SSC/0.1% SDS(보통의 엄격성을 가지는 조건); 68℃에서 0.1X SSC(높은 엄격성을 가지는 조건). 세척 과정은 이들 중 한가지 조건을 사용하여 수행할 수 있고, 예를 들면 높은 엄격성을 가지는 조건, 또는 상기 조건을 각각 사용할 수 있으며, 상기 기재된 순서대로 각각 10~15분씩, 상기 기재된 조건을 전부 또는 일부 반복하여 수행할 수 있다. 그러나 상기에 기술한 바와 같이, 최적 조건은 포함된 특별한 하이브리다이제이션 반응에 따라 다양하며, 실험을 통하여 결정할 수 있다. 일반적으로, 중요한 프로브의 하이브리다이제이션에는 높은 엄격성을 가지는 조건이 사용된다.

[0107] **표지(Label)**

[0108] 중요한 프로브는 검출할 수 있도록 표지되며, 예를 들면 방사선 동위원소, 형광 화합물, 바이오 발광 화합물, 화학 발광 화합물, 금속 킬레이트 또는 효소로 표지될 수 있다. 상기와 같은 프로브를 적당하게 표지하는 것은 당해 분야에서 널리 알려진 기술이며, 통상적인 방법을 통하여 수행할 수 있다.

실 시 예

[0109] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0110] **실시예 1: 유방암 특이적 메틸화 마커 유전자의 선별**

[0111] 1-1: 유방암 조직샘플에서 과메틸화되어 있는 유전자의 선별

[0112] 유방암에서 과메틸화된 유전자를 선별하기 위하여 충남대학교 병원 조직은행으로부터 유방암 조직 및 이와 인접하는 정상소견 조직시료를 제공받아 아래와 같은 방법으로 과메틸화 유전자들을 선별하였다.

[0113] 우선 각 조직 시료로부터 게놈 DNA를 분리하였다. 상기 게놈 DNA 500ng을 초음파파쇄법 (Vibra Cell, SONICS)으로 300~400bp 크기로 절편을 만들고, Methylcapture™ (Genomictree 사, 대한민국)을 이용하여 각 조직으로부터 메틸화 DNA를 선택적으로 분리하였다. 분리한 메틸화 DNA를 GenomePlexComplete Whole Genome Amplification

Kit (Sigma, 미국)를 사용하여 증폭한 후, 유방암 조직 유래 증폭 DNA는 Cy5-dUTP로 표지하고, 인접한 정상소견 조직 유래 증폭 DNA는 Cy3-dUTP로 표지하여 혼합한 다음, 인간 유전체에 존재하는 27,800 여개의 CpG 섬에 존재하는 CpG에 대한 프로브가 집적되어 있는 CpG 마이크로어레이 (Agilent 사, 미국)를 사용하여 하이브리다이제이션을 수행하였다. 상기 하이브리다이제이션 후, 일련의 세척 과정을 거친 다음, Agilent scanner를 이용하여 스캐닝하였다. 마이크로어레이 이미지로부터 시그날 값의 계산은 Feature Extraction 프로그램 v. 9.5.3.1(Agilent)을 이용하여 인접한 정상소견 조직과 유방암 조직 시료 간 시그날의 상대적인 강도 차이를 계산하고, 분석 프로그램인 GeneSpringGX (Agilent 사)를 이용하여 인접한 정상조직과 유방암조직간 메틸화 정도의 차이가 큰 유전자를 선별하였다. 통계적 기법을 통하여 유방암 조직에서 과메틸화된 후보 유전자를 3,969개 선별하였다 (도 1).

[0114] 1-2: 디메틸화에 의해 재활성화되는 유전자 선별

[0115] 실시예 1-1에서 선별된 유전자가 메틸화에 의하여 발현이 조절되는지 확인하기 위하여, 유방암 세포주 MCF-7 (KCLB (한국세포주은행) 30022) 및 MDA-MB231 (KCLB 30026)에 디메틸화제인 5-아자-2-데옥시사이티딘(DAC, Sigma, USA)을 200nM 농도로 5일간 처리하였다. 처리하지 않은 세포주와 처리한 세포주를 Tri reagent로 처리하여 전체 RNA를 분리하였다.

[0116] DAC 비처리 세포주 및 DAC 처리 세포주간의 전사 수준을 직접적으로 비교하여, DAC 처리에 의한 유전자 발현 변화를 측정하기 하였다. 그 결과, DAC를 처리하지 않은 대조군에 비하여, DAC를 처리하였을 경우, 1,085개의 유전자가 발현이 상승하는 것을 확인하였다. 실시예 1-1에서 획득한 3,969개의 유방암 특이적 과메틸화 유전자 목록과 1,085개의 디메틸화에 의하여 2배 이상 재발현된 유전자를 비교한 결과, 144개의 공통된 유전자를 선별하였다 (도 1). 이들 144개의 유전자들 중 유전자 정보가 불명확한 유전자들을 제외시키고, 나머지 유전자들 중 암과 관련성이 있는 13개의 바이오마커 후보유전자를 선별하였다. 이로부터 유의성이 높은 1개의 유전자(*OTP*)를 최종적인 유방암 진단을 위한 바이오마커 후보로 선택하였다 (표 1).

[0117] <표 1> 선별유전자 리스트

[0118]

Gene Symbol	GenBank No.	Description	Chromosme location
OTP	NM_032109	Orthopedia homeobox	5q13.3

[0119] **실시예 2: 암 세포주에서의 바이오마커 유전자의 메틸화 측정**

[0120] 실시예 1-2에서 선별된 유전자의 메틸화 상태를 추가적으로 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-1에서 CpG 마이크로어레이 실험결과 유방암 조직에서 과메틸화된 것으로 확인된 프로브를 포함하는 부위에 대하여 바이설파이트 파이로시퀀싱을 수행하였다.

[0121] 바이설파이트(bisulfite)를 이용하여 메틸화되지 않은 시토신을 우라실로 변형하기 위하여, 유방암 세포주 MDAMB-231(KCLB 30026) 및 HCC1428 (ATCC CRL-2327)로부터 전체 게놈 DNA를 분리하고, 200ng의 게놈 DNA에 EZ DNA methylation-Gold kit(Zymo Research, USA)를 이용하여 바이설파이트를 처리하였다. DNA를 바이설파이트로 처리하면, 비메틸화된 시토신은 우라실로 변형되고, 메틸화된 시토신은 변화없이 남게 된다. 상기 바이설파이트가 처리된 DNA를 멸균 증류수 20㎕로 용출시켜 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하였다.

[0122] 상기 유전자에 대한 파이로시퀀싱을 수행하기 위한 PCR 및 시퀀싱 프라이머는 PSQ assay design 프로그램 (Biotage, USA)을 이용하여 설계하였다. 유전자의 메틸화 측정을 위한 PCR 및 시퀀싱 프라이머는 표 2 및 표 3에 나타내었다.

[0123] <표 2> PCR 프라이머 및 조건

[0124]

유전자	프라이머	서열(5'-> 3')	서열 번호	CpG 위치[a]	앰플리콘 크기 (bp)
OTP	Forward	TATTYGGAAATTGGTTTTTA	2	+2064, +2073, +2079, +2091, +2099	98
	Reverse	biotin-TCRATTTTAAAAAACTTCTT	3		

[0125] [a] 전사 개시점(+1)으로부터의 거리(nucleotide): 메틸화 측정에 사용된 CpG 부위의 게놈 DNA 상의 위치

[0126] <표 3> 메틸화 마커 유전자의 시퀀싱 프라이머 서열

[0127]

유전자	서열 (5 '3')	서열번호
OTP	TTATYGTTATTTTTTAATGG	4

[0128] 상기 바이설파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng을 PCR로 증폭하였다. PCR 반응 용액(바이설파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng, 10X PCR 버퍼(Enzynomics, Korea) 5㎕, Taq polymerase(Enzynomics, Korea) 5units, 2.5mM dNTP(Solgent, Korea) 4㎕, PCR 프라이머 2㎕(10 pmole/㎕))을 95℃에서 5분 동안 처리한 후, 95℃에서 40초, 60℃에서 45초, 72℃에서 40초로 총 45회 실시한 다음, 72℃에서 5분 동안 반응시켰다. 상기 PCR 산물의 증폭 여부는 2.0% 아가로오스젤을 사용한 전기영동으로 확인하였다.

[0129] 즉, 상기 증폭된 PCR 산물에 PyroGold 시약(Biotage, USA)을 처리한 후, PSQ96MA 시스템(Biotage, USA)을 이용하여 파이로시퀀싱을 수행하였다. 상기 파이로시퀀싱 후, 메틸화 지수(methylation index)를 계산함으로써 메틸화 정도를 측정하였다. 메틸화 지수는 각 CpG 부위에서 시토신이 결합하는 평균율을 구하여 계산하였다.

[0130] 상기 바이오마커의 유방암 세포주에서의 메틸화 정도를 파이로시퀀싱 방법을 이용하여 정량적으로 나타낸 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이, 상기 바이오마커 유전자가 2개의 세포주에서 모두 높은 수준으로 메틸화되어 있는 것을 확인하였다.

[0131] 한편 상기 유전자가 바이오마커로서 유용성을 가지려면 정상 유방조직에서는 메틸화가 되어 있지 않아야 한다. 이를 확인하기 위하여 유방암 환자가 아닌 정상인의 유방조직 지노믹 DNA (Biochain 사, 미국)를 구입하여 메틸화 여부를 상기와 동일하게 파이로시퀀싱 방법으로 측정하였다.

[0132] 그 결과, 도 2B에 나타난 바와 같이, *OTP* 유전자는 20% 이하의 낮은 메틸화 수준을 나타난바, 바이오마커로서의 유용성을 가질 가능성이 있음을 확인하였다.

[0133] **실시예 3: 유방암 조직에서의 바이오마커 유전자의 과메틸화 측정**

[0134] 실시예 1 및 2로부터, (a) 유방암 조직에서 과메틸화 되어 있으며, (b)디메틸화 조건에서 마커의 발현이 재활성화되며, (c) 인트론 부위에 CpG 섬을 함유하고 있고, 유방암 세포주에서 과메틸화 되어 있으나 유방 정상조직에서는 메틸화가 되어 있지 않음을 확인한 *OTP* 유전자를, 유방암 진단용 바이오마커로 사용할 수 있는지 검증하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다. 즉, 39명의 유방암 환자의 수술조직 임상 검체 (충남대학교 병원 조직은행)를 이용하여 상기 바이오마커에 대하여 메틸화 어세이를 수행하였다. 메틸화 어세이는 실시예 2에 기재된 파이로시퀀싱 방법으로 수행하였다.

[0135] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 정상인 및 암조직과 연접하는 정상소견 유방조직에 비해 유방암 조직에서 *OTP* 유전자는 매우 높은 정도의 메틸화 수준을 나타내었다. *OTP* 유전자의 경우 시험된 39명의 모든 유방암 조직에서 인접하는 정상소견 조직에 비해 유방암 조직에서 과메틸화를 나타내었다. 또한 병기에 따라서도 1기부터 과메틸화가 관찰되어 유방암 조기진단에 대한 유용성이 있음을 보여주고 있으며, 일부 환자의 정상소견 조직에서는 환자가 아닌 정상인의 유방조직 보다 높은 메틸화가 관찰되어 field defect 현상이 확인되었다. 통상적으로 field defect 현상은 암 조직과 연접하고 있는 정상조직에서도 이미 분자수준에서의 암화가 일어나는 것을 대변해주는 현상으로서 조기진단에 대한 유용성이 높음을 제시해 주는 증거라 할 수 있다.

[0136] **실시예 4: *OTP* 바이오마커 유전자의 유방암 진단에 대한 민감도 및 특이도 평가**

[0137] ROC(receiver operating calculation) 커브 분석을 수행하여 유방암 환자 진단을 위한 메틸화 지수 cut-off를 결정하고, 민감도와 특이도를 결정하였다.

[0138] 유방암 조직과 이와 연접하는 정상소견 조직의 메틸화 측정 결과를 비교한 결과, 표 4 및 도 4에 나타난 바와

같이, *OTP* 유전자는 민감도 82.1%, 특이도 92.3%를 나타냄으로써 우수한 유방암 진단용 바이오마커임을 확인하였다.

[0139] <표 4> 조직시료를 대상으로 한 *OTP* 유전자의 민감도 및 특이도

[0140]

마커	AUC[a]	95% C.I[b]	Cut-off (%)	민감도 (%, 95% C.I)	특이도 (%, 95% C.I)
OTP	0.914	0.828-0.965	31.11	82.1 (66.5 - 92.4)	92.3 (79.1 -98.3)

[0141] [a]: Area Under ROC Curve; [b]: 95% Confidence Interval

[0142] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0143] 도 1은 유방암 조직과 인접한 정상소견 조직의 CpG 마이크로어레이 분석과 디메틸화에 의해 재발현되는 유전자의 비교선별과정을 통하여 유방암 진단을 위한 메틸화 바이오마커를 발굴하는 과정을 나타낸 모식도이다.

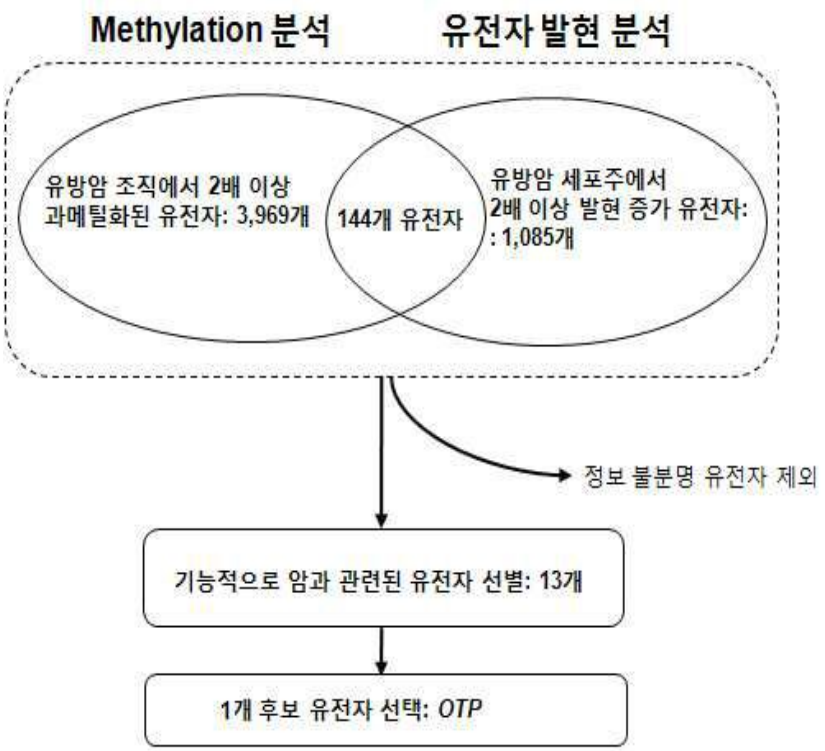
[0144] 도 2는 유방암 세포주 및 정상 유방조직에서 1개의 메틸화 유전자의 파이로시퀀싱을 통한 정량적인 메틸화 정도를 나타낸 것이다.

[0145] 도 3은 유방암 조직 및 이와 연접하는 정상소견 조직에서 *OTP* 유전자의 메틸화 정도를 측정한 것이다.

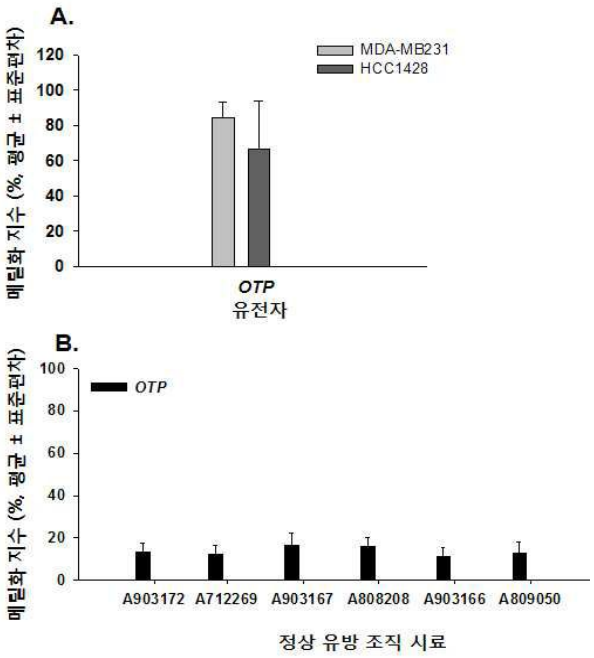
[0146] 도 4는 ROC 커브 분석을 수행하여 유방암 진단 능력을 측정한 것이다.

도면

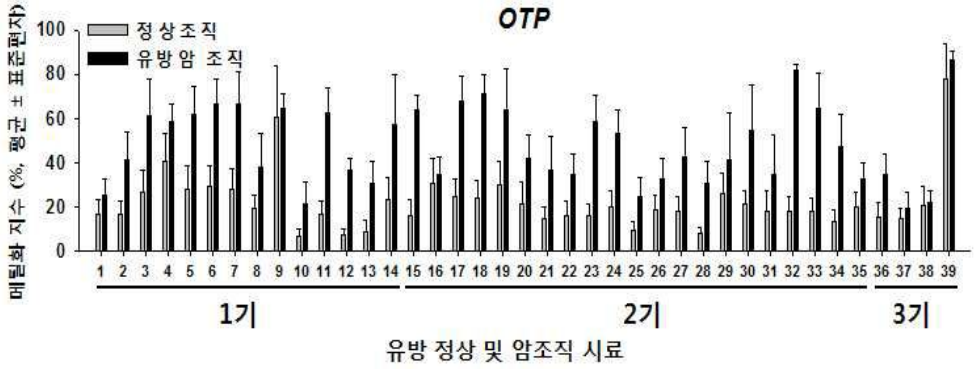
도면1



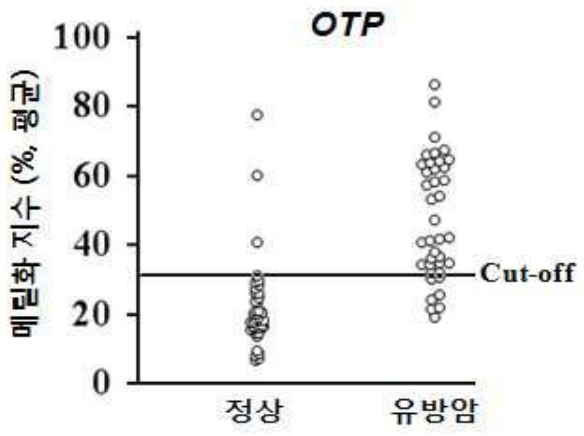
도면2


A.
MDA-MB231
HCC1428
메틸화 지수 (%, 평균 ± 표준편차)
120
100
80
60
40
20
0
OTP
유전자
B.
OTP
메틸화 지수 (%, 평균 ± 표준편차)
100
80
60
40
20
0
A903172
A712269
A903167
A808208
A903166
A809050
정상 유방 조직 시료

도면3


OTP
정상조직
유방암 조직
메틸화 지수 (%, 평균 ± 표준편차)
100
80
60
40
20
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
1기
2기
3기
유방 정상 및 암조직 시료

도면4



서 열 목 록

<110> GENOMICTREE, INC.
The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
<120> ethod for Detecting Methylation of Breast Cancer Specific
Methylation Marker Gene for Breast Cancer Diagnosis

<160> 9

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 200
<212> DNA
<213> Intron of OTP gene

<400> 1
ctgtatcgag ttatctcctt ctctacccgg aaactggtcc ccatcgccat cccccaatgg 60

acacgcaagg cccgtctccg gccagtatag cgacatcccg gaagaagctc ctcaaaatcg 120

aagcccggcg ttgtcgggct acagggttcg cctcctccgc ctgagaaggc aacctcagcg 180

ccccccgggg cggcccagcc 200

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 2
tattyggaaa ttggttttta 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 3
tcrattttaa aaaacttctt 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 4
ttatygttat tttttaatgg 20

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe for necleotide chip

<400> 5
ctgtatcgag ttatctcctt ctctacccgg 30

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe for necleotide chip

<400> 6
acacgcaagg cccgtctccg gccag 25

<210> 7
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe for necleotide chip

<400> 7
acacgcaagg cccgtctccg gccagtatag cgacatcccg gaagaagctc 50

<210> 8
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe for necleotide chip

<400> 8
aagcccggcg ttgtcgggct acagggttcg cctcctccgc ctgagaaggc aacctcagcg 60

60

<210> 9
<211> 200
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe for necleotide chip

<400> 9
ctgtatcgag ttatctcctt ctctacccgg aaactggtcc ccatcgccat cccccaatgg 60

acacgcaagg cccgtctccg gccagtatag cgacatcccg gaagaagctc ctcaaaatcg 120

aagcccggcg ttgtcgggct acagggttcg cctcctccgc ctgagaaggc aacctcagcg 180

ccccccgggg cggcccagcc 200