



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0175267
(43) 공개일자 2024년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57407 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0075203
(22) 출원일자 2023년06월12일
심사청구일자 2023년06월12일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
최중우
서울특별시 강남구 봉은사로105길 45, 현대빌라2
차 B동 301호
정기석
서울특별시 송파구 토성로 38-6, 한강극동아파트
107동 703호
정다정
경기도 성남시 수정구 수정로 319, 산성역포레스
티아아파트 134동 303호
(74) 대리인
특허법인태평양

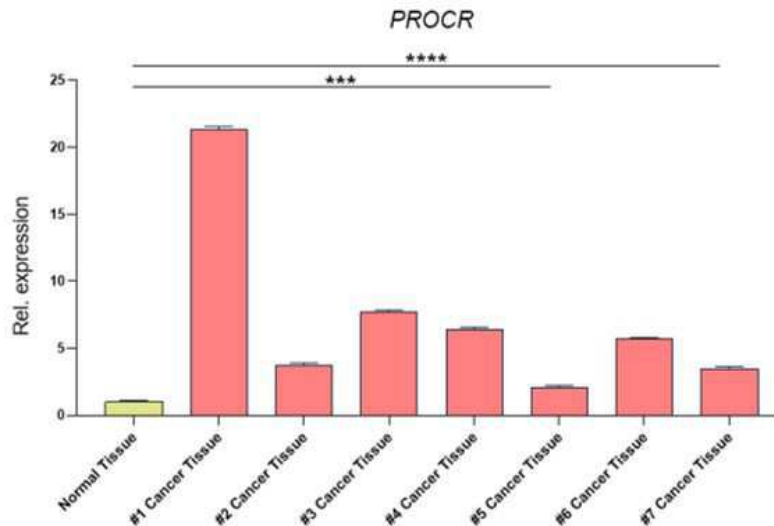
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 혈관 육종 진단용 조성물, 키트 및 혈관 육종 진단을 위한 정보제공방법

(57) 요약

본 발명은 PROCR 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 혈관 육종 진단용 조성물, 키트 및 혈관 육종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 진단 마커를 이용하는 경우, 혈관 육종에 대한 정확한 조기 진단이 가능하며, 적절한 치료를 제공하는 토대가 될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/5008 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465039079
과제번호	HR21C0198020023
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	체외환자 모델의 데이터 기반 분류를 통한 인공지능형 약물 반응 예측 기술 개발
기 여 율	80/100
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711181669
과제번호	2022R1F1A1069608
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	혈관육종 오가노이드 구축 및 약물 재창출을 위한 약리효능평가에 적용을 위한 연구
기 여 율	20/100
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

PROCR 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 혈관 육종 진단용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 올리고펩타이드, 펩타이드 핵산(peptide nucleic acid, PNA), 나노입자 및 앵타머로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인, 혈관 육종 진단용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 및 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 혈관 육종 진단용 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 하나의 조성물을 포함하는 혈관 육종 진단용 키트.

청구항 5

개체로부터 채취한 시료로부터 PROCR 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는, 혈관 육종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 시료는 혈관 조직, 혈관 육종 조직 및 혈관 세포로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인, 혈관 육종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 방법은 측정된 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA의 발현 수준을 정상 대조군의 시료로부터 측정된 수준과 비교하여, 높은 경우, 혈관 육종인 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 혈관 육종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

혈관 육종 치료 후보 물질을 혈관 육종 환자로부터 분리한 시료에 처리 후, PROCR의 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 혈관 육종 치료제 스크리닝 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 시료는 혈관 조직, 혈관 육종 조직 및 혈관 세포로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인, 혈관 육종 치료제 스크리닝 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 방법은 후보물질을 처리한 이후 PROCR의 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA 발현 수준이 낮아지는 경우, 치료제로 판단하는 단계를 추가적으로 포함하는, 혈관 육종 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 혈관 육종 진단용 조성물, 키트 및 혈관 육종 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 기술이다.

배경 기술

[0003] 고형 종양은 일반적으로 낭종 또는 액체 영역을 함유하지 않는 비정상적인 조직 덩어리이다. 다양한 유형의 고형 종양은 종양을 형성하는 세포의 유형에 대해 명명될 수 있으며, 고형 종양의 예는 암종 및 육종이다. 암은 임상에서 관찰되는 경우의 대부분을 포함하는 암종(carcinoma)과 백혈병, 림프종, 중추신경계 종양 및 육종(sarcoma)을 포함하는 조금 덜 빈번하게 발생하는 암으로 분류될 수 있다. 암종은 상피조직으로부터 발생하는 반면에 육종은 결합 조직 및 중배엽 조직으로부터 기원하는 조직으로부터 유래된다. 예를 들어, 육종은 근육 또는 뼈에 영향을 미치며, 혈관, 뼈, 방광, 신장, 간, 폐, 이하선(parotid) 또는 비장에서 발생할 수 있다. 암은 침습적(invasive)이며 새로운 위치로 전이되는 경향이 있다.

[0004] 혈관 육종은 혈관 내피세포에서 비롯된 악성 종양으로, 혈관 내피세포종양이라고도 불리우며, 3년 생존율이 50% 이하로 매우 예후가 좋지 않은 악성 종양이다. 혈관 육종은 일반적으로 다른 육종종양과 마찬가지로 피부나 소프트 티슈 부위에서 생길 수 있지만, 희귀하게는 내장기관에서도 생길 수 있으며, 종양이 성장하면서 출혈, 부종 등의 증상을 유발할 수 있다.

[0005] 혈관 육종은 종양의 크기, 위치, 환자의 건강 상태 등 다양한 요인에 따라 치료 전략이 달라지며, 종양 크기가 작을 경우 완전 절제 수술이 가능하며, 이 경우 수술로만 완치할 수 있다. 그러나 종양이 크거나 전이된 경우 화학요법, 방사선요법 또는 협진 치료가 필요할 수 있으며, 최근 연구에서는 면역항암제와 조합한 치료가 효과적인 것으로 나타나고 있다.

[0006] 따라서, 종양의 특성과 환자의 상황을 고려하여 맞춤형 치료 전략을 수립하기 위하여, 혈관 육종의 정확하고 신속한 진단이 매우 중요한 실정이다.

발명의 내용**해결하려는 과제**

- [0008] 본 발명의 목적은 혈관 육종의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 혈관 육종의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 측면은 단백질 C 수용체 (protein c receptor, 이하 PROCR) 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 혈관 육종 진단용 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 혈관 육종 진단용 키트를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 환자로부터 채취한 시료로부터 PROCR 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 혈관 육종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명은 혈관 육종에 대한 새롭고 효과적인 진단마커로서 PROCR을 제공하는바, 본 발명에 따르면 혈관 육종에 대한 정확한 조기진단이 가능하며, 적절한 치료를 제공하는 토대가 될 수 있어 개인별 맞춤의학에 효과적으로 이용될 수 있다.
- [0017] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 인체 정상 두피조직과 7명의 혈관 육종 환자에서 분리한 조직에서 PROCR의 발현 차이를 비교한 결과, 정상 조직에 비해 혈관 육종에서 PROCR 발현이 증가함을 확인한 결과이다.
- 도 2는 혈관 육종 조직에서 PROCR의 발현을 면역조직화학분석(Immunohistochemistry; IHC)을 통해 나타낸 결과이다. 정상 조직에 비해 암조직에서 염색된 세포의 수가 현저하게 많음을 확인하였으며, 정상 조직 대부분의 세포에서는 PROCR이 발현되더라도 염색강도가 약한 것을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 먼저, 본 발명에서 이용된 용어를 정의한다.
- [0021] 본 발명에서 일컫는 용어 '육종(sarcoma)'이란 뼈, 연골, 근육, 지방, 신경, 혈관 등의 비상피성 결합조직에서 발생한 종양을 의미한다. 결합조직은 태생기의 중배엽에서 기원하며, 크게 악성 골종양과 연부조직 육종으로 구분할 수 있다. 악성 골종양은 뼈에서 발생한 종양이며, 연부조직 육종은 피부, 지방, 신경, 혈관, 근육 등의 연부조직에서 발생한 종양이다.
- [0022] 본 발명에서 일컫는 '진단'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 혈관 육종의 병리 존재 또는 발생 여부를 확인하는 것이다.
- [0023] 본 발명에서 일컫는 '바이오마커'는 생물학적 현상의 존재와 정량적 또는 정성적으로 연관된 분자를 의미하며, 본 발명의 바이오마커는 혈관 육종이 있는지 확인할 수 있는 물질로, 대조군에 비하여 발현량의 변화가 있는 분자를 의미한다.
- [0025] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0027] **1. 신규 바이오마커**

[0028] 본 발명은 PROCR를 혈관 육종에 특이적인 신규 바이오마커로 제공한다.

[0029] 상기 PROCR은 단백질 C 수용체(Protein C receptor)와 동일한 의미를 갖는 유전자로, PROCR 단백질은 혈액 응고 경로에 의해 활성화되고 관여하는 세린 프로테아제인 활성화된 단백질 C에 대한 수용체이다. 인코딩된 단백질은 단백질 C의 활성화를 향상시키는 N-글리코실화된 타입 I 막 단백질이다.

[0030] 상기 혈관 육종은 혈관이나 림프관의 내피세포에서 유래한 악성종을 의미하며, 전체 연조직 종양의 1% 미만을 차지한다. 혈관육종은 내피세포 기원이기 때문에, 신체의 모든 부위에서 발생할 수 있으나 약 60%는 두경부의 피부와 연부조직에서 생기며, 그 외에 유방, 간, 폐, 비장 등에서도 생길 수 있다.

[0031] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 혈관 육종 환자의 조직 샘플에서 특정 바이오마커의 발견을 위해 총 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였으며, 정상 대조군과 비교할 때 혈관 육종 환자에서 PROCR의 발현 수준이 증가됨을 확인하였다. 또한, 면역조직화학을 이용하여 단백질 수준에 대한 유전자 발현의 분포를 조사한 결과 정상 조직에 비해 암조직에서 염색된 세포의 수가 현저하게 많음을 확인하여, 혈관 육종에서 PROCR의 발현이 증가함 또한 확인하였다.

[0032] 이에, 본 발명에서는 PROCR을 혈관 육종의 진단에 이용할 수 있음을 확인하였고, 이를 이용하여 혈관 육종의 조기 진단을 수행하고, 적절한 시기에 치료방향을 결정할 수 있어 환자 맞춤형 치료 방법의 제공이 가능함을 새롭게 규명하였다.

[0033] 여기서, PROCR(Protein C receptor) 발현 전구 세포는 혈관 내피 줄기 세포로, PROCR이 정상 세포에 비해 혈관 육종 환자에서 유래한 세포에서 유의하게 더 높게 발현될 수 있다. PROCR 발현 세포는 혈관 육종의 진행에서 비정상적인 혈관 신생에 기여할 수 있으므로 혈관 육종에 대한 새로운 진단 지표로서 활용 가능하다. 구체적으로, PROCR의 발현이 정상 세포에 비해 환자에서 더 높게 발현되는 것을 확인하였으므로, PROCR의 발현이 정상 대조군보다 높은 경우, 혈관 육종인 것으로 진단할 수 있다.

[0035] **2. 신규 바이오마커의 활용**

[0036] **2-1. 혈관 육종 진단용 조성물**

[0037] 본 발명은 PROCR 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 혈관 육종 진단용 조성물을 제공한다.

[0038] 상기 '제제(agent)' 또는 '시험 제제(test agent)'는 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실체물(entity) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예컨대, 단백질, 폴리펩티드, 소 유기 물질(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함할 수 있으며, 자연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 화학 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 상기 제제, 물질 및 화합물은 상호 교환적(interchangeably)으로 사용할 수 있다.

[0039] 일실시예에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 올리고펩타이드, 펩타이드 핵산(peptide nucleic acid, PNA), 나노입자 및 앵타머 등 일 수 있다.

[0040] 일실시예에 있어서, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 및 프로브 등 일 수 있다.

[0041] 본 발명의 '안티센스'는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서, 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오티드염기의 서열 및 서브 유닛간 백본을 갖는 올리고머를 지칭한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다. 이 안티센스 올리고머는 mRNA의 번역을 차단 또는 저해하고 mRNA의 스플라이스 변이체를 생산하는 mRNA의 프로세싱 과정을 변화시킬 수 있다.

[0042] 본 발명에서 '프라이머'는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)을 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형의 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 본 발명에서는 PROCR을 코딩하는 mRNA의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증

폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 혈관 육종을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 용어, '프로브(probe)'란 핵산과 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 특정 핵산의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드 프로브, 단일 사슬 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중 사슬 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 본 발명의 바이오마커 PROCR을 코딩하는 mRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 혈관 육종을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0044] 본 발명의 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 뉴클레오타이드간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0045] 본 발명의 '항체'는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 PROCR 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개의 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 이러한 본 발명의 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 대한 항체는 당업계의 공지된 방법으로 제조될 수 있는 모든 항체가 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 혈관 육종 진단용 마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0046] 일 실시예에 있어서 '측정'이란, 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 측정 및 발현량 측정을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.

[0047] 일 실시예에 있어서 '단백질 발현량 측정'이란 혈관 육종의 가능성 여부를 확인하기 위하여 혈관 육종 조직 세포에서 본 발명의 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 단백질의 양을 측정하여 이루어진다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA:Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 면역조직화학 분석법(Immunohistochemistry; IHC), 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Flow Cytometry, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 '유전자 발현 수준 측정'이란 혈관 육종의 가능성 여부를 확인하기 위하여 혈관 육종 조직 세포에서 상기 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정하여 이루어진다. 이를 위한 분석 방법으로는 예를 들어, 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 본원에 따른 바이오마커 검출하기 위한 프로브 및/또는 프라이머는 공지된 다양한 방법에 사용될 수 있으며, 구체적으로 사용되는 방법에 맞추어 다양한 시약이 본원에 따른 조성물에 또한 포함될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들면 핵산 혼성화, 중합, 증폭 방법 및 혼성화 기반 라이게이션 등을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0050] 핵산 혼성화는 핵산이 고상의 지지체, 예를 들면 비드, 나노입자 또는 바이오칩 어레이(마이크로에레이)에 결합

된 형태로 또는 인시츄 혼성화를 이용하여 수행될 수 있다. mRNA 마이크로어레이 기술은 동시에 다수의 mRNA의 분석을 가능하게 한다. 본원에 따른 mRNA에 상보적인 뉴클레오타이드는 코팅된 고상지지체에 스폿팅되거나 또는 인시츄 합성 방법으로 고상지지체에 스폿팅될 수 있다. 실시예에서 생물학적 시료로부터 분리된 mRNA는 상기 고상지지체 상의 상보적인 서열, 예를 들면 프로브와의 혼성화 효소반응에 의해 검출되는 표지(예를 들면 바이오 틴, 형광염료)의 혼입에 의해 검출될 수 있다. 다른 실시예에서, 생물학적 시료에서 분리된 mRNA는 형광물질로 표지되어, 상응하는 서열과 결합하고, 그 결과 방출된 형광신호는 특정 mRNA의 존재를 나타낸다. 마이크로어레이 제조 기술은 예를 들면 Schena et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA.93(20):10614-9; Schena et al., 1995, Science 270(5235):467-70; 및 U.S. Pat. Nos. 5,599,695, 5,556,752 또는 5,631,734를 참조할 수 있다. 이런 경우, 검출용 물질 또는 시약은 고상의 지지체에 결합된 형태로 제공될 수 있다. 검출시약은 검출을 위해 직접적 또는 샌드위치 형태로 간접적으로 표지 될 수 있으며, 후술하는 바를 참조할 수 있다.

[0051] 상기 PROCR 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준의 측정에는 핵산 증합 또는 증폭 방법이 또한 사용될 수 있다. 공지된 다양한 핵산 증폭 또는 합성 방법이 사용될 수 있으며, 예를 들면 역전사 반응, 역전사 증합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 RT-PCR, PCR, 실시간 PCR, 정량 RT-PCR, 정량 PCR, NASBA(Nucleic Acid Sequence-Base Amplification), LCR(Ligase Chain Reaction), 다중 연결 프로브 증폭(Multiple ligatable probe amplification), Invader 기술(Third Wave) 및 SDA(Strand Displacement Amplification), TMA(Transcription Mediated Amplification)등을 포함할 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0052] 전형적인 PCR 방법은 특정 표적 서열의 증폭을 위해, 주형의 변성, 포워드 및 리버스 프라이머가 표적 서열에 결합하는 어닐링 및 열안정 증합효소에 의한 신장의 단계로 구성되는 3 단계가 여러 주기 예를 들면 통상 20회 이상이 수행된다. 대안적으로 어닐링 및 신장은 동일한 단계에서 수행되기도 한다.

[0053] PCR 및 정량 PCR에서는 포워드 및 리버스의 한 세트의 프라이머 또는 상기 프라이머와 함께 프로브가 사용될 수 있다. 프로브 및 프라이머의 길이는 혼성화온도, 표적 서열의 구성, 표적 서열의 복잡성 등과 같은 다양한 요소에 따라 결정된다. 예를 들면 프로브는 7 뉴클레오타이드 이상, 프라이머의 길이는 약 10 내지 35 뉴클레오타이드, 예를 들면 15, 20, 25, 30 또는 35 뉴클레오타이드이다. 포워드 프라이머는 바이오마커 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 서열을 포함하며, 5'쪽에 비상보적 서열을 추가로 포함할 수 있다. 리버스 프라이머의 서열은 바이오마커의 서열과는 독립적일 수 있으며, 다수의 mRNA 바이오마커가 한 종류의 리버스 프라이머로 증폭될 수 있거나, 또는 바이오마커에 특이적인 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.

[0054] 증폭 산물은 증폭 과정에서 또는 증폭 후에 당업계에 공지된 다양한 방법으로 분석될 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 공지된 것으로서 예를 들면 젤 전기영동, 실시간 PCR 분석, SSCP(single strand conformational polymorphism), RFLP(restriction fragment length polymorphism), CZE(capillary zone electrophoresis), WAVE(HPLC-based nucleic acid analyzing technology), 마이크로칩을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0055] 또한 혼성화에 기반한 라이게이션 기술이 mRNA의 정량 분석에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면 OLA(oligonucleotide ligation) 및 예를 들면 미국공개공보 2006-0078894에 기재된 HARP-유사 프로브를 사용한 방법과 같은 표적 핵산 서열에 결합한 검출가능한 프로브를 결합하지 않은 프로브로부터 분리해내는 방법 등을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 라이게이션을 이용한 다른 기술은 MLPA(Multiplex Ligationdependent Probe Amplification)(Schouten et al., Nucleic Acids Research 30:e57 (2002))을 들 수 있다. 상기 기술은 한 쌍의 프로브가 표적서열에 나란히 결합한 경우에만 라이게이션이 일어나는 방식으로 결합하며, 라이게이션된 프로브는 PCR에 의해 증폭될 수 있도록 프라이머 결합부위를 포함한다.

[0056] 상술한 바와 같은 혼성화, 증폭 및/또는 혼성화 기반 라이게이션 반응에서 표적의 염색 또는 표지, 프라이머 또는 프로브의 염색 또는 표지를 통해 혼성화 또는 증폭된 mRNA 산물을 검출할 수 있다. 검출에는 당업계의 공지된 기술이 사용될 있으며, 당업자라면 검출의 민감도 및/또는 표적의 양을 고려하여 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다. 검출 방법의 민감도 및/또는 표적의 양에 따라 검출 전에 증폭이 필요하지 않을 수도 있다.

[0057] 검출을 위한 표지자(label)는 이로 제한하는 것은 아니나, 광방출, 광산란, 광흡수 물질과 같은 검출가능한 형광, 화학발광 또는 생발광 신호를 생성 또는 소거할 수 있는 화합물을 포함하며, 예를 들면 Garman A., Non_Radioactive Labeling, Academic Press 1997을 참조할 수 있다. 형광 물질은 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나, 플루오레신(예를 들면 미국특허 6,020,481), 로다민(예를 들면 미국 특허 6,191,278), 벤조페녹사진(예를 들면 미국특허 6,140,500), 공여체와 수용체를 포함하는 에너지 전이 형광 염료(예를 들면 미국특허 공개특허 10-2016- 0022017 5,945,526) 및 사이아나인(예를 들면 WO1997-45539), 리사민, 파이크에리스핀, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX (Amersham), Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY

650/665, BODIPY-FL, BODIPYR6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, 6-FAM, Fluorescein Isothiocyanate, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, Renographin, ROX, SYPRO, TAMRA, Tetramethylrhodamine, 및/또는 Texas Red는 물론 기타 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 임의의 형광 모이어티를 포함한다.

[0058] 또한 표지자는 핵산의 결합을 향상, 안정화 또는 핵산의 결합에 영향을 미칠 수 있는 화합물 예를 들면 에씨디움 브로마이드 및 SYBR-Green을 포함하는 인터칼레이터, 마이너그루브 결합체 및 가교가능한 작용기가 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니며, Blackburn et al., eds. 'DNA and RNA Structure' in Nucleic Acids in Chemistry and Biology (1996)을 참조할 수 있다. 따라서 본원에 따른 조성물은 상술한 방법 중 적어도 하나의 방법에 사용되는 시약을 포함할 수 있다.

[0059] 중복되는 기재는 '1. 신규 바이오마커'에서 진술한 바와 동일한바, 그 기재는 생략한다. 진술한 본원에 따른 바이오마커는 정량적 및/또는 정성적 분석을 통해 PROCR 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 존재 여부의 검출 및/또는 이의 발현량 자체, 발현량의 변화, 발현량 차이의 수준에서 검출되어 혈관 육종의 진단에 사용될 수 있다.

[0060] 2-2. 키트

[0061] 본 발명은 상기 혈관 육종의 진단용 조성물을 포함하는 혈관 육종의 진단용 키트를 제공한다.

[0062] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.

[0063] 본 발명의 키트에는 상기 PROCR의 단백질을 인식하는 항체 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA를 인식하는 프라이머, 프로브 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 하나 이상의 다른 구성 성분을 포함하는 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0064] 구체적인 양태로서 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 각 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7bp 내지 50bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10bp 내지 30bp의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0065] 또 다른 양태로는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0066] 또 다른 양태로, 본 발명에서 단백질의 발현수준을 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, 폴리 비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있으며, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다. 상기에서 2차 항체는 면역글로불린 G일 수 있다.

[0067] 상기 키트에 포함될 수 있는 시약 및 이를 이용한 검출은 앞서 언급한 바를 참조할 수 있다.

[0068] 본원에 따른 키트는 양성대조군, 음성대조군 및 사용설명서를 추가로 포함한다. 음성대조군으로는 PROCR 단백질 및 이를 코딩하는 유전자의 mRNA를 포함하지 않는 시료, 양성대조군은 PROCR 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA를 포함하는 시료일 수 있다.

[0069] 본 명세서에서 상술한 본 발명의 키트는 추가적으로, 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 효소, 다양한 버퍼 및 시약을 포함할 수 있다. 어떤 하나의 특정 반응에서 사용되는 시약의 최적량은, 본 명세서에 개시사항을 습득한 당업자에 의해서 용이하게 결정될 수 있다.

- [0070] 본 발명의 방법을 수행하는 것에 관한 설명서를 더 포함할 수 있고, 상기 설명서에는 PROCR의 발현 수준이 정상 대조군 대비 2배 이상인 경우, 혈관 육종으로 진단하는 설명이 기재될 수 있다.
- [0071] 상기 정상 대조군에 대한 설명은 후술할 "2-3. 혈관 육종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 혈관 육종 치료제 스크리닝 방법"의 내용과 동일한바 그 기재를 생략한다.
- [0072] **2-3. 혈관 육종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 혈관 육종 치료제 스크리닝 방법**
- [0073] 본 발명은 개체로부터 채취한 시료로부터 PROCR의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 혈관 육종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0074] 본 발명에서, '개체'는 혈관 육종이 있거나, 있을 것으로 예상되는 개체로서, 인간, 침팬지를 포함한 영장류, 개, 고양이 등의 애완동물, 소, 말, 양, 염소 등의 가축 동물, 마우스, 래트 등의 설치류 등의 포유동물, 양식 어류 등을 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0075] 일 실시예에 있어서, 분석을 위해 사용되는 '시료'는 세포, 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 등 정상적인 상태와 구별될 수 있는 혈관 육종의 가능성을 확인할 수 있는 생체 시료를 포함한다. 바람직하게는 상기 시료는 생물학적 조직, 더욱 바람직하게는 혈관 조직, 혈관 육종 조직 및 혈관 세포일 수 있다.
- [0076] 여기서, PROCR의 발현 수준은 역전사 반응, 역전사 증합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 RT-PCR, PCR, 실시간 PCR, 정량 RT-PCR, 정량 PCR, NASBA(Nucleic Acid Sequence-Base Amplification), LCR(Ligase Chain Reaction), 다중 연결 프로브 증폭(Multiple ligatable probe amplification), Invader 기술(Third Wave), SDA(Strand Displacement Amplification), TMA(Transcription Mediated Amplification)으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, mRNA를 측정할 수 있는 공지의 방법은 제한없이 가능하다.
- [0077] 본원에 따른 방법이 구현되는 구체적 수단(방법) 및 검출용 시약 등은 앞서 기술한 바를 참조할 수 있다.
- [0078] 일 실시예에 있어서, 상기 측정된 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA의 발현 수준을 정상 대조군의 시료로부터 측정된 수준과 비교하여, 높은 경우, 혈관 육종인 것으로 판단하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0079] 상기 '정상 대조군'이란 혈관 육종이 발생하지 않은 정상인을 의미할 수 있고, 정상 대조군의 시료는 혈관 육종 조직이 아닌 정상 조직이 이용될 수 있다.
- [0080] '발현 수준이 정상 대조군의 시료로부터 측정된 수준보다 높다'는 것은 정상 대조군의 시료로부터 측정된 수준 대비 1.3배 이상, 1.5배 이상, 1.8배 이상, 2배 이상, 4배 이상, 8배 이상, 16배 이상, 32배 이상인 경우를 의미할 수 있으며, 특히 2배 이상일 수 있다.
- [0081] 구체적인 일 실시예에서, 혈관 육종 환자 및 정상 대조군에서 분리한 조직으로부터 PROCR의 발현량의 차이를 확인하였으며, 면역조직화학 분석을 통해서도 정상 조직에 비해 혈관 육종 조직에서 염색된 세포의 수가 현저하게 많음을 확인하였다(도 1 및 도 2).
- [0082] 혈관 육종 환자는 3년 생존율이 50% 이하로 매우 예후가 좋지 않아, 초기에 신속하고 정확한 진단이 필수적이다. 혈관 육종의 크기, 위치, 환자의 건강 상태 등 다양한 요인에 따라 적절한 치료 전략을 수립하는 것은 맞춤형 치료 전략에 필수적이므로, 본 발명의 바이오마커를 이용한 정확한 조기진단은 적절한 치료를 제공하는 토대가 될 수 있다.
- [0083] 따라서, 이들 정상 대조군으로부터 채취한 시료와, 혈관 육종의 가능성 여부를 알고자 하는 환자로부터 채취한 시료에서 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 발현 패턴을 획득하고, 비교함으로써 혈관 육종을 정확하게 진단할 수 있다.
- [0084] 구체적인 일 실시예에서는, 혈관 육종 환자에서 분리한 조직에서 PROCR의 발현량을 확인하기 위해 RT-PCR을 실시하였고, 정상 조직과 비교하였다(실시예 1 및 도 1). 또한, 면역조직화학 분석을 통해 정상 조직에 비해 암조직에서 염색된 세포의 수가 현저하게 많았으며, 염색 강도 또한 강한 것을 확인하였다(실시예 2 및 도 2).
- [0085] 본 발명의 혈관 육종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법의 결과를 바탕으로, 혈관 육종에 대한 진단이 이루어질 수 있다.
- [0086] 또 다른 측면에서 본 발명은 혈관 육종 치료 후보 물질을 혈관 육종 환자로부터 분리한 시료에 처리 후, PROCR의 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 혈관 육종 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0087] 상기 치료제 스크리닝 방법에 있어서, 상기 시료는 혈관 조직, 혈관 육종 조직 및 혈관 세포 일 수 있다.
- [0088] 본 발명의 혈관 육종 치료제 스크리닝 방법은 PROCR의 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA 발현 수준이 후보물질을 처리하기 전보다 낮아지는 경우, 상기 후보물질을 혈관 육종의 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0089] 구체적으로, 혈관 육종 치료 후보물질의 존재 및 부존재 하에서 마커의 단백질 또는 mRNA 발현의 증가 또는 감소를 비교하는 방법으로, 혈관 육종의 치료제를 스크리닝 하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0090] 즉, 혈관 육종에 대한 치료 후보물질의 부존재 하에서 혈관 육종 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 본 발명의 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하고, 또한 치료 후보물질 존재 하에서 본 발명의 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 치료 후보물질이 존재할 때의 발현 수준을 부재 하에서의 발현 수준보다 감소시키는 물질을 혈관 육종 치료제로 선택할 수 있다.
- [0091] 본 발명의 혈관 육종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 혈관 육종의 치료제 스크리닝 방법은 모두 개체로부터 분리된 시료에서 수행되는 생체 외 (in vitro) 방법이므로, 인간 (human) 또는 인체 (human body)를 대상으로 하지 않는다.
- [0092] 다만, 생체 내 (in vivo)에서 치료제 스크리닝 방법이 수행되는 경우, 인간을 제외한 포유동물을 대상으로 하며, 인간 (human) 또는 인체 (human body)를 대상으로 하지 않는다.
- [0094] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0095] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.
- [0097] **[준비예]**
- [0098] 대한 민국 서울 아산병원의 IRB(Institutional Review Board) 및 ACC(Institutional Review Board and Animal Care Committee)로부터 승인을 받아 실험을 진행하였다. 7명의 혈관 육종 환자의 수술 진행 중 절제된 조직으로부터 인간 혈관 육종 시료를 획득하였다.
- [0100] **[실시예 1]**
- [0101] **PCR 분석법에 의한 PROCR 마커 진단**
- [0102] 인체 정상 두피조직과 혈관 육종 환자에서 분리한 조직에서 PROCR 발현 차이를 확인하기 위해, RT-PCR을 실시하였다. 구체적으로는, 정상 두피조직과 혈관 육종 환자에서 분리한 암조직에서 총 RNA를 분리하여 역전사효소(reverse transcriptase)와 올리고 dT 프라이머를 이용하여 cDNA로 전환한 다음, Taq 폴리머라아제와 PROCR 프라이머 (Forward: 5'-TTGTAGCCAAGACGCCTCAG-3', Reverse: 5'-GCTGCAGCTGAATGATCGTG-3')를 이용하여 RT-PCR로 PROCR을 증폭시켰다. 이 때 이용된 PROCR 아미노산 서열은 미국 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)의 데이터베이스에서 사람의 PROCR 아미노산서열 검색을 통해 찾아냈으며, ACCESSION 번호가 NM_006404 이다. 각 환자 별 유전자 발현정도는 유전자의 발현정도를 GAPDH로 보정(Ct)한 후, 정상 조직에서의 유전자 발현정도에 대한 폴드(fold) 값을 구하여 비교하였다.
- [0103] 그 결과, 도 1에 개시된 바와 같이, 정상 조직(Normal tissue)에 비해 7개의 혈관 육종 조직(Cancer tissue) 모두에서 PROCR 발현이 증가된 것을 확인하였다.
- [0105] **[실시예 2]**
- [0106] **면역조직화학(Immunohistochemistry) 이미지에 의한 PROCR 발현량 차이 확인**
- [0107] 면역조직화학을 이용하여 단백질 수준에 대한 유전자 발현의 분포를 확인하였다. 시료를 포르말린으로 고정한

후, 파라핀으로 포매한 FFPEs(paraffin-embedded tissues)는 5-6 μ m 두께로 섹션하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 자동 면역염색기를 이용하여 염색하였다. 그 후, 슬라이드를 탈파라핀화 및 재수화 시킨 후, 0.01 mol/ℓ 시트르산 버퍼(pH6.0)를 이용하여 열-유도 에피토프 검색(heat-induced epitope retrieval)을 실시하였다. 내재성 퍼옥시다아제 활성은 3% 과산화수소를 이용하여 10분 동안 처리하였다. 비특이적인 결합은 1시간 동안 5% 염소 혈청을 이용하였으며, 4° C에서 12시간 동안 PROCR 항체를 이용하여 슬라이드를 배양시킨 후 EVOS FL Auto 2 microscope (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 이미지를 촬영하였다.

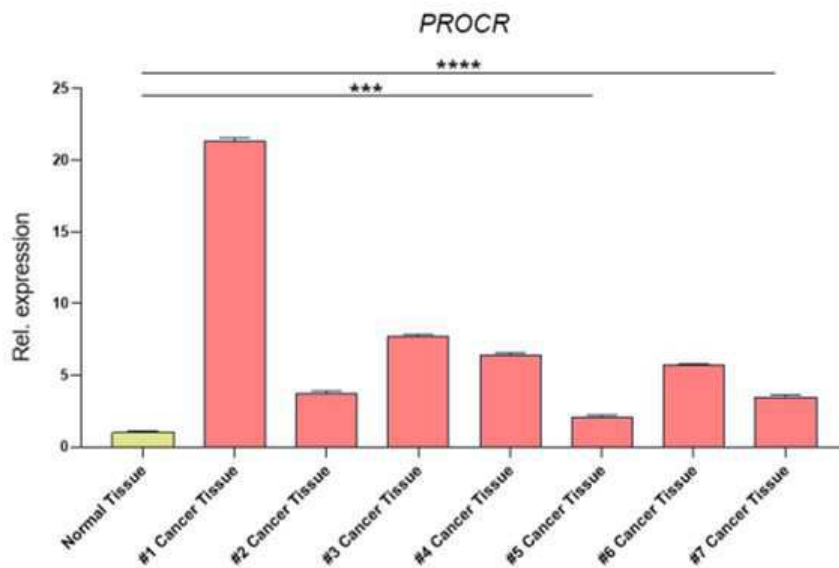
[0108] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 정상 조직에 비해 암조직에서 염색된 세포의 수가 현저하게 많음을 확인하였으며, 정상 조직 대부분의 세포에서는 PROCR이 발현되더라도 염색강도가 약한 것을 확인하였다.

[0110] 종합하면, 정상 조직에 비해 혈관 육종에서 PROCR의 발현 수준이 증가하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 PROCR이 혈관 육종의 진단 마커로서 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0112] 상기에서는 본 발명의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변형이 가능할 것이다.

도면

도면1



도면2

