

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0136724 (43) 공개일자 2010년12월29일
(51) Int. Cl. <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>G01N 33/15</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0054971 (22) 출원일자 2009년06월19일 심사청구일자 없음	(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천 남구 용현동 253 인하대학교 (72) 발명자 류정선 인천광역시 중구 신흥동 인하대학병원 내과 이중은 서울특별시 마포구 성산동 591-4 대명비첸시티 3층 (74) 대리인 양부현	

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 비소세포 폐암 환자의 생존기간 연관된 B R C A1 유전자 하플로타입 마커 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 단일뉴클레오타이드 다형성(SNP)들로 이루어진 일배체형을 포함하는 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 예측하기 위한 키트 및 비소세포 폐암 환자의 생존기간 마커를 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 키트를 이용한 예측 방법은 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 간편하고 효율적으로 예측할 수 있으며, 상기 방법에 의하여 예측된 생존기간을 이용하여 상기 환자에 대한 약물의 용량 조절 또는 다른 약물의 병용 등 치료방법의 개선에 효과적으로 이용하여 최적화된 치료를 제공할 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)들로 이루어진 일배체형(haplotype)을 포함하는 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 예측하기 위한 키트:

(a) 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)을 포함하는 8-100개의 연속된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열;

(b) 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)을 포함하는 8-100개의 연속된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열;

(c) 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)을 포함하는 8-100개의 연속된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열; 및

(d) 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)을 포함하는 8-100개의 연속된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드 r이 A 또는 G, 상기 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드 m이 A 또는 C, 상기 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드 y가 C 또는 T, 및 상기 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드 m이 C 또는 A인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 일배체형은 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 A, 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 A, 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 C, 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 C인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 8-100개의 연속된 뉴클레오타이드는 핵산 증폭을 위한 프라이머 또는 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 검출하기 위한 프로브인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 5

백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여 폐암 환자의 생물학적 시료에 있는 (a) 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP); (b) 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP); (c) 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP); 및 (d) 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)으로 일배체형(haplotype)을 검출하는 방법을 통해 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐

암 환자의 생존기간 마커를 검출하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드 r이 A 또는 G, 상기 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드 m이 A 또는 C, 상기 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드 y가 C 또는 T, 및 상기 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드 m이 C 또는 A인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 일배체형은 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 A, 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 A, 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 C, 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 C인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 방법은 서열목록 제 1 서열 내지 제 4 서열의 SNP 위치의 뉴클레오타이드가 각각 A, A, C 및 C인 일배체형이 상기 환자 시료에 2 카피 존재하는 경우 상기 일배체형이 0 또는 1 카피인 환자 에 비하여 생존기간이 짧은 것으로 결정하거나, 또는 상기 일배체형이 상기 환자에 0 또는 1 카피 존재하는 경우 상기 일배체형이 2 카피인 환자에 비하여 생존기간이 긴 것으로 결정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 5 항에 있어서, 상기 비소세포 폐암은 편평세포암, 선암 또는 큰세포암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 5 항에 있어서, 상기 환자는 백금 함유 항암제, 또는 백금 함유 항암제와 백금 비함유 항암제의 조합으로 처치 받은 횟수가 2 회 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 5 항에 있어서, 상기 백금 함유 항암제는 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴 및 네다플라틴으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 2 이상의 항암제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 백금 비함유 항암제는 젬시타빈, 탁산 및 빈카 알칼로이드로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 2 이상의 항암제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 5 항에 있어서, 상기 폐암 환자는 IIIA, IIIB 또는 IV 단계의 폐암 환자인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단일뉴클레오타이드 다형성(SNP)들로 이루어진 일배체형을 포함하는 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 예측하기 위한 키트 및 비소세포 폐암 환자의 생존기간 마커를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폐암은 모든 나라에서 암 관련 사망 중 가장 흔한 원인이다. 그러나, 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer: NSCLC) 환자의 생존기간은 천천히 개선되고 있다. 현재, 비소세포 폐암 환자의 15%는 5년 동안 생존한다.

[0003] 특정 분자를 표적으로 하는 새로운 약물이 도입되었음에도 불구하고, 세포독성 화학 요법(cytotoxic chemotherapy)은 여전히 진행된 비소세포 폐암에 주요 치료 방법이다. 세포독성 화학 요법에서, 백금 함유 항암제(platinum)는 더블렛(doublet) 중 하나로서 필수적 역할을 하고 있다.

[0004] 폐암에 대한 효과적인 약물유전체학(pharmacogenomics)은 백금과 같은, DNA 손상 작용제로부터 이익을 얻을 수 있는 비소세포 폐암 환자를 확인하는데 의존하고 있다. DNA 복구 능력에 있어서 개인적 변이는 DNA 손상 작용제의 효과에 영향을 미칠 수 있기 때문에, DNA 복구 경로 유전자는 잠재적 바이오마커로서 관심을 끌고 있다. DNA 복구에 관련된 ERCC1, RRM1, ERCC2 및 XRCC1과 같은 유전자가 비소세포 폐암에서 백금 함유 화학 요법의 효과를 예측하기 위한 잠재적 바이오마커로서 집중되었다.

[0005] BRCA1은 전사 연결된 뉴클레오타이드 절제 복구(excision repair)를 통하여 DNA 복구에 중요한 역할을 한다. BRCA1은 원래 분열 방추 조립(mitotic spindle assembly)의 조절뿐만 아니라, 상도 재조합 복구, 비상동 말단 연결(end joining) 및 미스매치 복구와 같은 다른 복구 과정에 관련되는 것으로 알려져 있다.

[0006] 그러나, BRCA1의 게놈 변이(germ-line variation)가 폐암 환자의 생존기간과 연관되어 있다는 것에 대하여는 알려진 바 없다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명자들은 백금-함유 항암제가 처치된(treated) 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 용이하게 판별할 수 있는 유전자 마커를 개발하고자 비소세포 폐암 환자의 SNP를 심도 있게 비교 연구한 결과, 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자에서만 특이적으로 높은 빈도로 나타나는 SNP를 발굴하였고, 이들 SNP들의 특정 조합으로 이루어진 일배체형이 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 매우 높은 정확도로 판별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 단일뉴클레오타이드 다형성(SNP)들로 이루어진 일배체형을 포함하는 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 예측하기 위한 키트를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 비소세포 폐암 환자의 생존기간 마커를 검출하는 방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)들로 이루어진 일배체형(haplotype)을 포함하는 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 예측하기 위한 키트를 제공한다:

[0013] (a) 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)을 포함하는 8-100개의 연속된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열;

[0014] (b) 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)을 포함하는 8-100개의 연속된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열;

[0015] (c) 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)을 포함하는 8-100개의 연속된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열; 및

[0016] (d) 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)을 포함하는 8-100개의 연속된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열.

[0017] 본 발명자들은 백금-함유 항암제가 처치된(treated) 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 용이하게 판별할 수 있는 유전자 마커를 개발하고자 비소세포 폐암 환자의 SNP를 심도 있게 비교 연구한 결과, 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자에서만 특이적으로 높은 빈도로 나타나는 SNP를 발굴하였고, 이들 SNP들의 특정 조합으로 이루어진 일배체형이 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 매우 높은 정확도로 판별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0018] 본 발명의 SNP 마커는 비소세포 폐암 환자에게 적용되며, 가장 바람직하게는 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자에게 적용된다.

[0019] 본 명세서에서 용어, “비소세포 폐암(non-small cell lung cancer: NSCLC)”은 폐암에 종사하는 당업자에게 알려진 의미대로 사용된다. 예를 들면, 비소세포 폐암은 폐의 상피 세포(epithelial cells)로부터 발생하는 악성 종양 (malignant cell)으로서, 현미경 하에서 관찰자, 예를 들면, 조직병리학자(histopathologist)에 의하여 관찰된 종양 세포의 크기 및 모양에 따라 분류된 것이다. 비소세포 폐암에는 3가지 주요 서브타입 즉, 편평 세포 폐암(squamous cell lung carcinoma), 선암(adenocarcinoma) 및 큰세포 폐암(large cell lung carcinoma)이 포함된다.

[0020] 본 명세서에서 용어, “뉴클레오타이드”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).

[0021] 본 명세서에서 용어, “일배체형(haplotype)”은 생식세포의 감수분열시 하나의 염색체에 위치하는 일련의 SNP들은 함께 유전되는 연관성에 따라 여러 묶음으로 나눌 수 있는데, 이 때 각각의 묶음을 일배체형이라 하며, 이러한 일배체형은 동일 염색체상에 존재하는 여러 SNP의 조합으로서 일정한 SNP의 패턴을 보이게 된다.

[0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드 r이 A 또는 G, 상기 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드 m이 A 또는 C, 상기 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드 y가 C 또는 T, 및 상기 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드 m이 C 또는 A인 것이다.

[0023] 본 명세서에서 서열목록 제 1 서열의 101 번째 단일염기다형성을 나타내는 뉴클레오타이드를 포함하는

폴리뉴클레오타이드에서 SNP 변이는 "S1613G(A>G)"로도 표시하여 기재한다. 또한, 서열목록 제 2 서열의 101 번째 단일염기다형성을 나타내는 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에서 SNP 변이는 "IVS13-1893(A>C)"로도 표시하여 기재하고, 서열목록 제 3 서열의 101 번째 단일염기다형성을 나타내는 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에서 SNP 변이는 "IVS12-1207(C>T)"로도 표시하여 기재한다. 또한, 서열목록 제 4 서열의 101 번째 단일염기다형성을 나타내는 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에서 SNP 변이는 "IVS12+112(C>A)"로도 표시하여 기재한다.

[0024] 상기 4개의 단일염기다형성(SNP)에서 S1613G(A>G)는 인간의 BRCA1 유전자에서 엑손 16에 위치하며, IVS13-1893(A>C)은 인트론 13에, IVS12-1207(C>T) 및 IVS12+112(C>A)는 인트론 12에 위치하고, 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간과 강한 연관관계를 보인다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명이 포함하는 상기 일배체형은 서열목록 제 1 서열의 101 번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 A, 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 A, 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일 뉴클레오타이드 다형성이 C, 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 C인 것이다.

[0026] 즉, 서열번호 1 내지 4의 폴리뉴클레오타이드의 SNP 위치에 대하여 결정된 SNP 위치의 뉴클레오타이드가 각각 A,A,C 및 C인 일배체형이 상기 개체에 2 카피 존재하는 경우, 상기 일배체형이 0 또는 1인 개체에 비하여 생존기간이 짧은 것으로 결정하거나 또는 상기 일배체형이 상기 개체에 0 또는 1 카피 존재하는 경우, 상기 일배체형이 2 카피인 개체에 비하여 생존기간이 긴 것으로 결정하는 단계를 포함한다. 상기 생존 기간은 예를 들면, AACC 일배체형을 2카피 가지고 있는 개체는, 0 또는 1 카피 가지고 있는 개체에 비하여, 6-7 개월 더 짧게 생존하는 것으로 결정할 수 있다.

[0027] 따라서, AACC 일배체형을 2 카피 가지고 있는 개체에 대하여는, 생존기간이 짧은 것으로 예측되므로, 백금 약물에 의한 화학요법(chemotherapy)에 더하여, 2차적인 다른 약물 또는 치료 방법을 사용하는 것을 고려할 수 있다. 또한, AACC 일배체형을 2 카피 가지고 있는 개체에 대하여는, 0 또는 1 카피 가지고 있는 개체에 비하여, 약물의 효능을 늘리기 위하여 투여 계획, 예를 들면, 약물의 용량을 조절하여 사용하는 것을 고려할 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 "연관비평형(Linkage Disequilibrium)"이란 집단유전학에서 반드시 동일 염색체상에 존재하지는 않는 둘 이상의 유전자좌(loci)에서의 대립유전자의 비-무작위적 연관(non-random association)을 의미한다. 즉, 연관비평형은 서로 다른 위치의 대립형질들간의 결합의 척도로서, 만약 각 유전자가 완전히 독립적으로 배합된다면, 유전자 집합은 아마도 연관 평형(linkage equilibrium)을 유지할 것이나, 어떤 대립유전자들은 서로 같이 발견되는 예가 많으며 즉, 무작위적으로 뒤섞이지 않으며, 이런 대립유전자는 연관 비평형상태에 있다. 이러한 연관 비평형 상태는 대립유전자들이 서로 근접하여 위치하거나, 대립형질들이 서로 모여 있으면 더 유리한 경우에 자연선택의 결과로 나타나는 것으로 해석되고 있다.

[0029] 본 발명은 상기 서열목록 제 1 서열 내지 제 4 서열에서 각 SNP 위치의 염기 변이체에 관한 것이나, 이러한 SNP 염기 변이가 이중가닥의 gDNA(genomic DNA)에서 발견되는 경우, 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 따라서 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열에서 SNP 위치의 염기도 상보적인 염기가 된다.

[0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 8-100개의 연속된 뉴클레오타이드는 핵산 증폭을 위한 프라이머 또는 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 검출하기 위한 프로브인 것이다.

[0031] 본 명세서에서 용어 "핵산"은 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다 (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, ChemicalReviews, 90:543-584(1990)).

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 핵산은 비소세포암 환자의 다양한 소스로부터 얻을 수 있으며, 예컨대, 근육, 표피, 혈액, 뼈, 장기로부터 얻을 수 있고, 가장 바람직하게는 근육 또는 혈액으로부터 얻는다.

[0033] 본 발명에서 출발물질이 gDNA인 경우, gDNA의 분리는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Rogers & Bendich (1994)). 출발물질이 mRNA인 경우에는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 총 RNA를 분리하여 실시된다(참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold

Spring Harbor Press(2001); Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162:156(1987)). 분리된 총 RNA는 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성된다. 상기 총 RNA는 인간세포로부터 분리된 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: PNAS USA, 85:8998(1988); Libert F, et al., Science, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)).

[0034] 본 발명에 있어서, 단일뉴클레오타이드다형성(SNP)의 염기타입을 분리된 핵산분자에서 확인하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 응용될 수 있는 기술은, 단일 염기 프라이머 연장 분석(single base primer extension assay), 형광 인 시투 혼성화(FISH), 직접적 DNA 서열 결정, PFGE 분석, 서던 블롯 분석, 단일-가닥 컨퍼메이션 분석(SSCA, Orita et al., PNAS, USA 86:2776(1989)), RNase 보호 분석(Finkelstein et al., Genomics, 7:167(1990)), 닷트 블롯 분석, 변성 구배 젤 전기영동(DGGE, Wartell et al., Nucl.Acids Res., 18:2699(1990)), 뉴클레오타이드 미스매치를 인식하는 단백질(예: E. coli의 mutS 단백질)을 이용하는 방법(Modrich, Ann. Rev. Genet., 25:229-253(1991)), 및 대립형-특이 PCR을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 서열변화가 단일-가닥 분자내 염기 결합의 차이를 초래하여, 이동성이 다른 밴드를 출현하게 하는 데, SSCA는 이 밴드를 검출한다. DGGE 분석은 변성 구배 젤을 이용하여, 야생형 서열과 다른 이동성을 나타내는 서열을 검출한다. 다른 기술들은 일반적으로 본 발명의 SNP를 포함하는 서열에 상보적인 프로브 또는 프라이머를 이용한다. 예를 들어, RNase 보호 분석에서, 본 발명의 SNP를 포함하는 서열에 상보적인 리보프로브가 이용된다. 상기 리보프로브와 식물체로부터 분리한 DNA 또는 mRNA를 혼성화시키고, 이어 미스매치를 검출할 수 있는 RNase A 효소로 절단한다. 만일, 미스매치가 있어 RNase A가 인식을 한 경우에는, 보다 작은 밴드가 관찰된다.

[0036] 혼성화 시그널(hybridization signal)을 이용하는 분석에서, 본 발명의 SNP를 포함하는 서열에 상보적인 프로브가 이용된다. 이러한 기술에서, 프로브와 타겟 서열의 혼성화 시그널을 검출하여 직접적으로 SNP 변이체 여부를 결정한다.

[0037] 본 명세서에서, 용어 "프로브"는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 바람직하게는, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이다. 프로브는 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오타이드이다.

[0038] 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 프로브는 SNP 뉴클레오타이드인 서열목록 제 1 서열, 제 2 서열, 제 3 서열 및 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드를 포함하는 8-100 개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 프로브의 3'-말단 또는 5'-말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3'-말단 또는 5'-말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다. 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건(stringent condition)은 온도, 이온세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.

[0039] SNP가 유전자 증폭 방법에 적용되는 경우, 특히 SNAP(single nucleotide amplified polymorphism)라 통칭된다.

[0040] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 이러한 유전자 증폭은 SNP 뉴클레오타이드인 서열목록 제 1 서열, 제 2 서열, 제 3 서열 및 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 프라이머쌍(primer pair)을 기본적으로 이용한다.

- [0041] 본 발명의 명세서에서 “프라이머(primer)”는 단일가닥의 올리고뉴클레오타이드로서, 적합한 조건(4가지의 상이한 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 DNA 또는 RNA 폴리머라아제와 같은 중합효소의 존재), 적합한 온도 및 적합한 버퍼하에서 주형-지시적 DNA 합성을 개시할 수 있는 개시점으로서 작용하는 것을 의미한다.
- [0042] 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자하는 프라이머의 특성에 의해 결정하지만, 통상적으로 15 내지 30bp의 길이로서 사용한다. 프라이머는 주형의 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만 주형과 혼성복합체(hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적이어야만 한다.
- [0043] 본 발명의 방법에 이용될 수 있는 증폭 기술은 PCR 증폭(참조: Miller, H. I. (WO 89/06700) 및 Davey, C. et al.(EP 329,822)), 리가아제 체인 반응(LCR, Wu, D.Y. et al., Genomics 4:560 (1989)), 중합효소 리가아제 체인 반응(Barany, PCR Methods and Applic., 1:5-16(1991)), Gap-LCR (WO 90/01069), 리페어 체인 반응(EP 439,182), 3SR(Kwoh et al., PNAS, USA, 86:1173(1989)) 및 NASBA(U.S. Pat. No. 5,130,238)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 PCR 증폭 단계에 따라 증폭한다.
- [0044] 증폭기술이 적용되는 경우에, 본 발명의 SNP 염기를 확인하기 위해 적합한 프라이머를 디자인하는 것이 중요하다.
- [0045] PCR에 의한 증폭 반응의 조건 및 사용되는 시약과 효소는 당업계에서 통상적으로 공지된 것을 사용할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여 폐암 환자의 생물학적 시료에 있는 (a) 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP); (b) 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP); (c) 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP); 및 (d) 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)으로 일배체형(haplotype)을 검출하는 방법을 통해 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간 마커를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 방법은 상기 SNP를 포함하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0048] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드 r이 A 또는 G, 상기 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드 m이 A 또는 C, 상기 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드 y가 C 또는 T, 및 상기 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드 m이 C 또는 A인 것이며, 가장 바람직하게는 서열목록 제 1 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 A, 서열목록 제 2 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 A, 서열목록 제 3 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 C 및 서열목록 제 4 서열의 101번째 뉴클레오타이드에 위치하는 단일뉴클레오타이드 다형성이 C인 것이다.
- [0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 방법은 서열목록 제 1 서열 내지 제 4 서열의 SNP 위치의 뉴클레오타이드가 각각 A, A, C 및 C인 일배체형이 상기 환자 시료에 2 카피 존재하는 경우 상기 일배체형이 0 또는 1 카피인 환자에 비하여 생존기간이 짧은 것으로 결정하거나, 또는 상기 일배체형이 상기 환자에 0 또는 1 카피 존재하는 경우 상기 일배체형이 2 카피인 환자에 비하여 생존기간이 긴 것으로 결정하는 것이다.
- [0050] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 비소세포 폐암은 편평세포암, 선암 또는 큰세포암인 것이다.
- [0051] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 환자는 백금 함유 항암제, 또는 백금 함유 항암제와 백금 비함유 항암제의 조합으로 처치 받은 횟수가 2 회 이상인 것이다.
- [0052] 백금 함유 항암제는 화학구조 내에 백금분자가 들어가 있는 약물로, 암세포의 DNA에 결합하여 복제를 억제함으로써 암세포독성을 유발한다. 본 명세서에서 백금 함유 항암제는 당업계에 공지된 다양한 백금을 포함하는 항암제를 포함하며, 바람직하게는 시스플라틴(cis-platin), 카보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 파라플라틴(paraplatin) 및 네다플라틴(nedaplatin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 2

이상의 항암제인 것이다.

[0053] 백금 함유 항암제는 현재 사용되고 있는 광범위 항암제 중에서 가장 우선 순위로 사용되는 항암제로서 암의 치료에 광범위하게 이용되고 있으나, 여러 종류의 암세포에서 플라틴 항암제에 대한 내성이 나타나는 등의 문제에 따라, 백금 비함유 항암제를 병용투여하고 있다. 본 명세서에서 백금 비함유 항암제는 당업계에 공지된 다양한 백금을 포함하지 않는 항암제를 포함하며, 바람직하게는 겐씨타빈(gemcitabine), 탁산(taxne) 및 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 2 이상의 항암제인 것이다. 상기 "탁산(taxne)"은 마이크로튜브(microtubule)의 기능을 파괴하는 세포 분열 저해제(mitotic inhibitor)를 말한다. 상기 탁산에는 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 로라탁셀, 오르타탁셀(ortataxel) 및 테세탁셀(tesetaxel)이 포함된다. 상기 "빈카 알칼로이드"는 항 세포 분열(anti-mitotic) 및 항 마이크로튜브(anti-microtubule) 제제를 말한다. 상기 빈카 알칼로이드에는, 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine) 및 비노렐빈(vinoreline)이 포함된다.

[0054] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 폐암 환자는 IIIA, IIIB 또는 IV 단계의 폐암 환자인 것이다.

[0055] 단계 IIIA, IIIB 및 IV는 Clifton Mountain에 의하여 제안된 폐암 분류 체계의 일부로서 당업계에 잘 알려져 있다. Mountain 분류 체계는, 치료 및 예후 (prognosis)의 유사도에 근거하여 단계를 할당한 것이다. 단계 IIIA는 TMN 단계 체계의 T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0 또는 T3N2M0에 해당하며, 단계 IIIB는 TMN 단계 체계의 임의의 T N3M0 또는 T4 임의의 N M0에 해당하며, 단계 IV는 임의의 T 임의의 N M1에 해당한다. 상기 TMN 체계는 당업자에게 잘 알려져 있으며 상기 T, N 및 M은 TMN 체계에서 알려진 바와 같다. TMN 체계에서, T는 일차종양(primary tumour)을 나타내는 것으로, T1은 폐 또는 장측 흉막(visceral pleura)에 의하여 둘러싸이고, 주기관지(main bronchus) 내로의 기관지경적 침입(bronchoscopic invasion)이 없는, 가장 큰 차원이 3 cm 미만인 일차 종양을 갖는 것이고, T2는 가장 큰 차원이 3 cm 이상인 종양, 주기관지 내로 확장되었으나 용골(carina)에 대하여 2 cm 보다 멀리 떨어져 있는 종양, 및 폐쇄성 폐렴(obstructive pneumonitis)을 가지고 있으나, 전체 폐에 관련되는 것은 아닌 종양 중 하나를 나타내고, T3는 가슴벽(chest wall), 횡격막(diaphragm), 세로칸 가슴막(mediastinal pleura), 또는 벽쪽 심장막(parietal pericardium)의 침범을 갖는 종양, 용골의 2 cm 내에, 주기관지 내로 확장하고 있으나, 용골에 관련되는 것은 아닌 종양, 및 전체 폐의 폐쇄성 폐렴을 가지고 있는 종양 중 하나를 나타내며, T4는 세로칸(mediastinum), 심장, 큰 혈관(great vessels), 기관(trachea), 식도(esophagus), 척추뼈(vertebra), 또는 용골의 침범을 갖는 종양, 동일한 엽(lobe)에 별개의 종양 소절(nodule)을 갖는 종양, 및 악성 가슴막 삼출(pleural effusion)을 갖는 종양 중 하나를 나타낸다. N은 림프절(lymph node)을 나타내며, N1은 같은쪽 기관지 주위(ipsilateral peribronchial) 또는 같은쪽 허파(ipsilateral hilar) 림프절로의 전이, N2는 같은쪽 세로칸 또는 용골하(subcarinal) 림프절로의 전이를 나타내고, N3은 같은쪽 빗장위(supraclavicular) 림프절, 같은쪽 목갈비근(scalene) 림프절, 반대쪽 림프절 중 하나로의 전이를 나타낸다. M은 원거리 전이(distant metastasis)를 나타내는 것으로, M0는 원거리 전이가 없는 것이고, M1은 원거리 전이가 있는 것을 나타낸다.

효 과

[0056] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0057] (i) 본 발명은 단일뉴클레오타이드 다형성(SNP)들로 이루어진 일배체형을 포함하는 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 예측하기 위한 키트 및 비소세포 폐암 환자의 생존기간 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0058] (ii) 본 발명의 키트를 이용한 예측 방법은 백금-함유 항암제가 처치된 비소세포 폐암 환자의 생존기간을 간편하고 효율적으로 예측할 수 있으며, 상기 방법에 의하여 예측된 생존기간을 이용하여 상기 환자에 대한 약물의 용량 조절 또는 다른 약물의 병용 등 치료방법의 개선에 효과적으로 이용하여 최적화된 치료를 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

1. BRCA1 하플로타입이 백금 함유 항암 치료제로 치료된 비소세포 폐암 환자의 생존에 미치는 영향

본 실시예에서는 BRCA1의 게놈 차원(germ-line)의 변이가 백금 함유 항암 치료제로 치료된 비소세포 폐암(NSCLC) 환자의 생존에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 위하여, 단계 IIIA(16%), IIIB(31%) 및 IV(53%)에 있는 300 명의 한국인 NSCLC 환자에 대하여, 4개의 BRCA1 SNP와 그들의 하플로타입이 치료 결과와 연관(association)이 있는지를 평가하였다. 그 결과, BRCA1 유전자의 AACC 하플로타입이 백금 함유 항암제로 치료된 NSCLC 환자의 생존 기간과 연관이 있다는 것을 확인하였다.

2. 연구 집단의 선발 및 임상 정보의 획득

인하대학교 병원의 폐암 그룹(Lung Cancer Cohort of Inha University Hospital: Incheon, Korea)은 임상 정보 및 그에 대응되는 말초혈액 DNA (peripheral-blood DNA) 서열 정보를 포함하는 데이터베이스를 구축하였다. 상기 임상 정보는 잘 훈련된 연구 간호사(research nurse)가 폐암 진단을 받은 때에, 모든 폐암 환자를 인터뷰한 후 얻어졌다. 치료, 중앙 반응(tumor response), 추적(follow-up) 및 생존(survival), 흡연 습관, ECOG 거동 상태(Eastern Cooperative Oncology Group performance status) 및 체중손실(weight loss)에 관한 정보가 통일된 데이터 시트를 사용하여 상기 그룹으로부터 수집되었다. 상기 정보의 품질을 증가시키기 위하여, 의사(physician: J.S.R.) 및 연구 간호사(research nurse: H.J.K.)는 각 환자에 대한 전자 차트 및 방사선 검사(radiologic examination) 또는 실험실 연구(laboratory studies)의 결과를 2주마다 리뷰하였다. 환자가 일차 또는 2차 병원으로 옮겨가거나, 환자가 보존적 또는 말기 간호(conservative or terminal care)를 위해 가정에서 머물기 위해 병원을 떠나는 경우, 환자의 상태를 확인하기 위하여 환자 또는 그 친척에게 전화 또는 메일을 통하여 접촉하였다.

2000년 3월과 2006년 5월 사이에 진단된 1,000 명이 넘는 NSCLC 환자로부터, 일차 치료(first-line treatment)로서 백금 함유 항암제(platinum-based anticancer drug)로 2회 이상 치료되고, 상기 인하대 병원에서 완전한 추적(follow-up)이 이루어지고, 환자의 말초 혈액 림프구가 분석을 위하여 이용가능하고, 진행된 단계의 질병을 가진, 300명의 환자를 선택하였다.

선택된 300명의 환자는 연구 목적에 대하여 설명을 받았으며, 그에 대하여 서면 동의를 하였다. 상기 연구는 인하대학병원의 기관연구위원회 (Institutional Review Board)에 의하여 승인되었다.

3. 태그 다형(tagging polymorphism)의 선발

BRCA1 유전자는 약 81.2kb에 걸쳐 있으며 24 엑손을 포함한다. 개시 코돈(ATG)로부터 상류의 -1,100 뉴클레오타이드와 BRCA1 유전자의 3' 비번역 영역(untranslated region) 사이의 모든 다형에 대하여 다음의 2개의 데이터 시스템을 사용하여 조사하였다: 국제적 HapMap Project 및 Japanese Single-Nucleotide Polymorphisms.

아시아 인종 집단(Asian ethnic populations)에서 10% 보다 큰 소수 대립인자 빈도(minor allele frequency)를 갖는 35개의 다형을 선택하였다. 이들 다형 중, 4개의 tSNP(tagging SNP)를 상관계수(correlation coefficient) r^2 의 값이 0.9 보다 큰 것이라는 기준을 사용하여 선택하였다. 4개의 tSNP는 다음의 우선순위(priority)로 선택되었다. (1) 비동의적 코딩 다형(nonsynonymous coding polymorphism); (2) 동의적 코딩 다형(synonymous coding polymorphism); (3) 개시 코돈 근처의 다형(polymorphism near the start codon); (4) 엑손 근처의 인트론 다형(intronic polymorphism near an exon); 및 (5) 하류(downstream).

최종적으로, IVS12+112(C>A; *rs2070833*), IVS12-1207(C>T; *rs8067269*), IVS13-1893A/C(*rs8176199*), 및 S1613G(*rs1799966*)에 대하여 이 본 실시예에서 tSNP로서 확인하였다. 표 1은 4개의 tSNP에 대한 정보를 나

타낸다. 표 1은 tSNP의 증폭에 사용된 프라이머 및 대립인자 빈도를 포함한다.

표 1

SNP 명칭	rs 번호	위치	프라이머 서열	가닥	방법	대립인자 빈도	HWE P
S1613G(A>G)	rs1799966	엑손16		포워드	UHT	A:G= 0.692:0.308	0.9043
포워드			서열번호5				
리버스			서열번호6				
확장			서열번호7				
IVS13-1893(A>C)	rs8176199	인트론 13		리버스	UHT	A:C= 0.828:0.172	0.1697
포워드			서열번호8				
리버스			서열번호9				
확장			서열번호10				
IVS12-1207(C>T)	rs8067269	인트론 12		포워드	UHT	C:T= 0.599:0.401	0.7241
포워드			서열번호11				
리버스			서열번호12				
확장			서열번호13				
IVS12+112(C>A)	rs2070833	인트론 12		리버스	SNaPshot	C:A= 0.724:0.276	0.7525
포워드			서열번호14				
리버스			서열번호15				
확장			서열번호16				

표 1에서, SNP는 single-nucleotide polymorphism; HWE는 하디-와인버그 평형(Hardy-Weinberg equilibrium)을 나타낸다.

4. 유전적 분석

표 1에 나타난 4개 SNP에 대한 유전형 분석(genotyping analysis)은 제조자의 프로토콜에 따라, GenomeLab SNPstream Genotyping System(ultra-high throughput [UHT]; Beckman Coulter, Fullerton, CA)을 사용하여 수행하였다.

중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR) 증폭은 Taq Gold DNA 폴리머라아제를 사용하여, PTC-225 Peltier Thermal Cycler(MJ Research, Waltham, MA) 중에서 수행하였다. PCR 및 확장(extension) 프라이머의 서열은 표 1에 나타난 바와 같다. S1613G 유전자형은 제조자의 프로토콜에 따라, SNaPshot assay kit(Applied Biosystems [ABI], Foster City, CA)를 사용한 단일 염기 프라이머 확장 분석(single-base primer extension assay)을 사용하여 분석하였다. PCR 산물 서열은 ABI Prism 3730 DNA analyzer에서 전기영동을 사용하여 분석하였다. 그 결과는 Gene Mapper software(ABI)를 사용하여 분석하였다.

5. 생존기간 추정

생존기간은 백금 함유 항암제로서 치료를 개시한 날로부터 계산한 생존기간을 측정하였다. 사망일은 주로 전화 또는 메일로 환자의 친척과 접촉하여 또는 전자 차트를 리뷰함으로써 얻었다. 환자 중 7명은 병원에서 퇴원한 후 추적(follow-up)되지 않아 접촉할 수 없었다. 이들에 대한 정보는 통계청 또는 경찰청(서울, 한국)으로부터 수집하였다.

6. 통계 방법

비균일성(heterogeneity)에 대한 χ^2 테스트는 임상 변수(clinical variables) 또는 유전형 빈도

(genotype frequencies)의 분포를 비교하기 위하여 사용하였으며, 만-위트니 U(Mann-Whitney U) 테스트는 연속 변수(continuous variables)에 대하여 사용하였다. 상기 4개 tSNP의 대입인자 빈도(allele frequency)가 하디-와인버그 평형(Hardy-Weinberg equilibrium)에 있는지는 Haploview v. 4.0 소프트웨어 패키지(software package)를 사용하여 결정하였으며, 레원틴 계수(Lewontin's coefficient), D' 및 r^2 의 값을 추정하였다.

[0082] 유전형 또는 임상 변수와 전체 생존기간(overall survival)의 연관성은 단일변수 분석(univariate analysis)에 대한 카플란-마이어 방법(Kaplan-Meier method) 및 로그-랭크 테스트(log-rank testing)를 사용하여 추정하였다. 잠재적 교란변수(potential confounders)에 대하여 조정된 위험률(hazard ratio) 및 95% 신뢰도(confidence interval: CI)는 다중변수 분석(multivariate analysis)에 대한 콕스 비례 위험 모델(Cox proportional hazards model)을 사용하여 결정하였다.

[0083] 하플로타입 카피 수와 전체 생존 기간 사이의 연관성은 열성 모델(recessive model)을 사용하여 결정하였다. 모든 분석은 SAS 소프트웨어 패키지(version 9.1.3; SAS Institute, Cary, NC)를 사용하여 수행하였다.

[0084] 실험결과

[0085] 1. 환자 및 치료

[0086] 본 실시예에 사용된 300명 환자에 대한 인구학적(demographic) 임상적 정보는 표 2에 나타내었다. 300명 환자의 중간 값 나이는 63 세(28 세 내지 89세)이었고, 그 중 238명(79%)이 남자였다. 환자 대부분(300명 중 223명, 74%)은 ECOG 거동 상태(Eastern Cooperative Oncology Group performance status) 1 또는 그 보다 컸다. 진단 시점에서, 환자 중 16%는 IIIA 폐암 단계이었으며, 31%는 IIIB 폐암 단계였고, 53%는 IV 폐암 단계이었다.

[0087] 조직학적 세포 타입(histologic cell type)에 대하여, 환자 중 46.3%는 편평세포암(squamous cell carcinomas)이었고 45.7%는 선암(adenocarcinoma)이었다. 일차 치료(first-line chemotherapy)로서, 159명의 환자(53%)가 탁산 더블렛(taxane doublets)을 투여 받았고, 139명의 환자(46%)는 겐씨타빈 더블렛(gemcitabine doublets)을 투여 받았다. 2차 치료(second-line chemotherapy)를 받은 163명(54%) 중, 백금 더블렛(platinum doublets) 및 단일 세포독성 작용제(single cytotoxic agent)로 치료를 받은 환자는 91%이었다. 여기서, 탁산 더블렛(taxane doublets)은 탁산(파클리탁셀, 도세탁셀)과 백금 함유 항암제의 병용 치료를 나타내고, 겐씨타빈 더블렛(gemcitabine doublets)은 겐씨타빈과 백금 함유 항암제의 병용 치료를 나타낸다. 백금 더블렛(platinum doublets)은 백금 함유 항암제 사이의 병용 치료를 나타낸다.

[0088] 일차 종양(primary tumor)에 대한 방사선 치료(radiation therapy)는 89명의 환자(30%)에게 투여되었다. 300명 환자 중 290명에서 사건(사망)을 관찰하였다(90%). 표 2a-표 2b는 본 실시예에 선택된 환자의 특성 및 BRCA1의 AACC 하플로타입의 카피를 나타낸다.

표 2a

변수	전체 환자		AACC 하플로타입 카피 수				피어슨 χ^2 P
	환자수	%	환자수	%	환자수	%	
총 환자	300		265		27		
나이 (세)							
중간값	63		63		56		0.098
범위	28 내지 89		28 내지 89		41 내지 73		
성별							
남성	238	79.3	208	89.7	24	10.3	0.203
여성	62	20.7	57	95	3	5	
ECOG 거동 상태							
0-1	223	74.3	194	89.4	23	10.6	0.122
2이상	70	23.3	65	95.6	3	4.4	
누락 (missing)	7	2.3	1	50	1	50	
조직학적 세포타입							
편평세포암	139	46.3	122	89.1	15	10.9	0.548
선암	137	45.7	122	91.7	11	8.3	
혼합	24	8	21	95.5	1	4.5	
흡연 습관							
흡연경험없음	59	19.7	54	96.4	5	3.6	0.103
흡연경험있음	241	80.3	211	89.4	25	10.6	
현재	174						
과거	67						
년40 팩 미만	153	51	132	88.6	17	11.4	0.594
년40팩 이상	88	29.3	79	90.8	8	9.2	
단계							
III	141	47	126	91.3	12	8.7	0.758
IIIA	48						
IIIB	93						
IV	159	53	139	90.3	15	9.7	
종양 반응							
완전/부분 반응	112	37.3	98	91.6	9	8.4	0.72
안정/진행성 질병	168	56	149	90.3	16	9.7	
누락 (missing)	20	6.7	18		2		
일차 치료							
백금/시스플라틴	139	46.3	128	93.4	9	6.6	0.128
백금/타크산	159	53	135	88.2	18	11.8	
파클리탁셀	120						
도세탁셀	39						
백금/다른 약물	2	0.7	2	100	-	0	
전달된 회 수							0.375
평균	3.98		3.97		3.7		
표준편차	1.9		1.9		1.4		

[0089]

표 2b

변수	전체 환자		AACC 하플로타입 카피 수				피어슨 x ² P
			0-1		2		
	환자수	%	환자수	%	환자수	%	
2차 치료							
합계	300 중 163	54.3	292 중 145	49.7	292 중 14	4.8	0.438
백금 더블렛	163 중 71	43.6	61	89.7	7	10.3	
단일세포독성제	163 중 77	47.2	69	90.8	7	9.2	
EGFR TKI	163 중 15	9.2	15	100	0	0	
일차종양에 대한 방사선 치료							
합계	300 중 89	29.7	292 중 77	26.4	292 중 11	3.8	
IIIA	48 중 27	56.3	23	85.2	4	14.8	0.369
IIIB	93 중 37	39.8	34	91.9	3	8.1	0.99
IV	159 중 25	15.7	20	83.3	4	16.7	0.255
사건, 사망	270	90	239	90.5	25	9.5	0.686

[0090]

[0091] 표 2a-표 2b에서 EGOG는 Eastern Cooperative Oncology Group를 나타내며, EGFR은 epidermal growth factor receptor를 나타내고, TKI는 tyrosine kinase inhibitor를 나타낸다.

[0092] 2. BRCA1의 4개 태그 SNP(tagging SNP)의 유전형 및 대립인자 빈도

[0093] 상기 tSNP 중 3개는 인트론에 위치하였다. 엑손 16에 위치하는 다른 하나의 tSNP는 아미노산 변화, 즉 세린을 글리신으로의 변화를 야기하는 비동의적 다형(nonsynonymous polymorphism)이었다. 4개 tSNP에 대하여 하디-와인버그 평형을 관찰하였다. 변이 대립인자(variant alleles)의 빈도는 다음과 같다: S1613G에 대하여 30%, IVS13-1893(A>C)에 대하여 17%, IVS12-1207(C>T)에 대하여 40%, 및 IVS12+112(C>A)에 대하여 27%. 각 tSNP와 성별, ECOG 거동 상태(0 내지 1 대 ≥ 2), 조직학적 세포 타입(편평세포암 대 선암), 흡연습관(무경험(never smoker) 대 유경험(ever smoker)), 단계(III 대 IV), 종양 반응(tumor response)(완전 또는 불완전 재발 대 안정 질병 또는 진행성 질병), 일차 치료(젬싸타빈 대 탁산), 이차치료(유(yes) 대 무(no)), 또는 연속적 방사선 치료(sequential radiation therapy)(유(yes) 대 무 데이터 보이지 않음).

[0094] 3. 연관 비평형(linkage disequilibrium)과 BRCA1 하플로타입

[0095] D 값 1로 4개 tSNP 모두에 대하여 높은 연관비평형(linkage disequilibrium: LD)이 관찰되었으나, r² 값은 중간 정도 값이었다(범위: 0.08 내지 0.664). Haploview v. 4.0 소프트웨어 패키지를 사용하여, 아래의 순서로 BRCA1의 하플로타입을 구성하였다: S1613G, IVS13-1893(A>C), IVS12-1207(C>T) 및 IVS12+112(C>A); 이들 중 6개 하플로타입을 확인하였다. 6개 하플로타입 중 5개의 흔한 하플로타입은 AACC, AACA, GCTC, GATC 및 AATC이었으며, 합쳐서 모든 하플로타입의 99.9%이었다. AACC 하플로타입은 빈도 32.1%로 가장 빈번하게 관찰되었다.

[0096] 4. tSNP와 전체 생존기간의 연관

[0097] 300명 환자의 중간값 생존 시간(median survival time :MST)은 13.0개월이었다. tSNP와 환자의 생존기간과는 연관이 관찰되지 않았다(데이터는 나타내지 않음).

[0098] 5. 임상적 변수 또는 BRCA1의 하플로타입과 전체 생존기간의 연관

[0099] 임상적 변수와 환자의 전체 생존기간 사이의 연관을 분석한 경우, 체중 손실($\geq 5\%$), ECOG 거동 상태(≥ 2), 단계(IV), 이차치료(no) 또는 방사선 치료(no) 로그-랭크 테스트 및 콕스 비례 위험 모델(Cox proportional hazards model)에 따르면, 짧은 생존 기간(shorter survival)과 유의하게 연관되었다(표 3).

조사된 다른 임상적 변수(성별, 흡연습관, 조직학적 세포 타입, 및 일차 치료)는 본 실시예의 관점에서 예후적 인자(prognostic factors)는 아니었다.

[0100] 292명의 환자를 각 BRCA1 하플로타입의 대립입자의 카피 수에 따라 2개 그룹으로 분류하였다. 0 또는 1 카피를 가진 한 그룹과 2카피를 가진 다른 그룹. 열성 모델(recessive model)을 사용하여 이 두 개 그룹을 통계적으로 분석하고, 5개 BRCA1 하플로타입의 카피 수와 전체 생존기간 사이의 연관을 평가하였다. 그 결과, 4개의빈도가 낮은 하플로타입(AACA, GCTC, GATC, 및 AATC) 중 어느 하나와 생존 시간 사이의 연관을 입증할 수 없었다(데이터는 보이지 않음). 그러나, AACC, 야생형 하플로타입을 2카피 가진 환자가 0 또는 1카피 가진 환자에 비하여 유의하게 더 짧은 생존기간을 보인다는 것을 입증하였다(MST, 8.5개월 대 14.6개월); 로그-랭크 $P = 0.0066$; 표 3). 단독변수 분석에 의하여 확인된 복합 변수(confounding variables)를 조정한 후, 상기 콕스 모델은 2카피를 가진 환자는 AACC 하플로타입을 0 또는 1카피 가진 환자에 비하여 2배 높은 사망 위험을 가진다는 것을 보였다(위험률(hazard ratio [HR] = 2.097; 95% CI, 1.339 내지 3.284). AACC 하플로타입의 카피 수에 따른 것을 제외하면, AACC 하플로타입 또는 임상적 변수에 의하여 구분된 두 그룹 사이에 연관관 관찰되지 않았다(표 1).

[0101]

[0102] 6. BRCA1의 AACC 하플로타입과 전체 생존기간: 서브 그룹 분석

[0103] 본 발명자들은 야생형 하플로타입(AACC)의 카피 수가 세포 타입, 흡연 습관, 및 화학요법(chemotherapy regimen)에 따라 생존기간에 미치는 영향을 분석하였다.

[0104] 편평세포암을 가진 환자에서, 2카피를 가진 환자의 MST는 6.8개월이었으며, 0 또는 1 카피를 가진 환자의 MST의 절반값보다 작았다(로그-랭크 $P = 3.6 \times 10^{-5}$). 콕스 모델에서, 2카피를 가진 환자는 증가된 사망 위험을 보였다(HR = 3.20; 95% CI, 1.74 내지 5.97). 대조적으로, 선암을 가진 환자에서는 연관이 입증되지 않았다(로그-랭크 $P = 0.6774$; HR = 0.919; 95% CI, 0.429 내지 1.968). 카피 수의 영향을 흡연 습관 또는 성별에 따라 분석한 결과, 2카피를 가진 흡연자(smoker) 또는 남성이 유의하게 짧은 생존기간을 보였다(흡연자에 대한 로그-랭크 $P = 0.0016$; HR = 2.01; 95% CI, 1.248 내지 3.240; 남성에 대한 로그-랭크 $P = 0.0070$; HR = 1.96; 95% CI, 1.217 내지 3.187). 화학요법에 대하여, 2 카피를 가진 환자는 탁산/시스플라틴 처리된 환자에서 유의하게 짧은 생존기간을 보였으나, 젬씨타빈/시스플라틴 처리된 환자에서는 이 효과는 나타나지 않았다(탁산/시스플라틴에 대한 로그-랭크 $P = 0.0082$; HR = 2.053; 95% CI, 1.123 내지 3.752; 젬씨타빈/시스플라틴에 대한 로그-랭크 로그-랭크 $P = 0.3009$; HR = 1.606; 95% CI, 0.763 내지 3.382).

표 3

변수	단일변수			다중 변수		
	MST(월)	95% CI	로그-랭크 P	위험율*	95% CI	P
AACC						
카피수, 0-1	14.57	12.40 내지 16.73	0.0066	1.0000	기준	
카피수, 2	8.47	6.94 내지 9.99		2.0970	1.339 내지 3.284	0.001
체중 손실, %						
5미만	15.47	14.12 내지 16.81	0.0242	1.0000	기준	
5이상	10.00	9.14 내지 12.53		1.3510	1.050 내지 1.739	0.020
ECOG 거동 상태						
0-1	14.57	12.40 내지 16.73	0.0010	1.0000	기준	0.003
2이상	10.00	7.68 내지 12.32		1.5450	1.154 내지 2.068	
단계						
IIIA/IIIB	14.67	11.90 내지 17.43	0.0125	1.0000	기준	0.002
IV	11.60	9.32 내지 13.88		1.5020	0.958 내지 1.649	
2차 치료						
유(yes)	15.77	13.64 내지 17.89	0.0038	1.0000	기준	
무(no)	10.00	8.14 내지 11.86		1.7200	1.274 내지 2.321	0.000
일차 종양에 대한 방사선 치료						
유(yes)	16.63	11.42 내지 21.84	0.0005			
무(no)	11.60	10.18 내지 13.02				
성별						
여성	15.23	12.21 내지 18.26	0.4576			
남성	12.23	10.45 내지 14.02				
흡연 습관						
없음	15.23	11.86 내지 18.60	0.2287			
있음	12.33	10.53 내지 14.14				
조직학적 세포 타입						
편평세포암	14.17	11.39 내지 16.94	0.1847			
선암	13.30	11.11 내지 15.49				
일차치료						
백금/젠타빈	11.90	9.59 내지 14.21	0.1682			
백금/탁산(P,D)	13.67	11.36 내지 15.97				

[0105]

[0106]

표 3에서, MST는 median survival time을 나타내고, ECOG는 Eastern Cooperative Oncology Group이고, P,D는 파클리탁셀/도세탁셀이다. *는 체중 손실, ECOG 거동 상태, 단계, 이차 치료, 및 방사선 치료에 대하여 조정된, 콕스 비례 위험 모델(Cox proportional hazard's model)로부터 추정된 것임.

[0107]

이상의 실시예의 결과로부터, 하플로타입 AACC의 카피 수가 백금 함유 항암제로 치료 받은 환자의 생존 기간과 연관이 있다는 것이 입증되었다. 이러한 연관성에 근거하여, 2카피의 하플로타입 AACC를 가진 환자와 그렇지 않은 환자를 구분하여 최적화된 치료를 제공할 수 있다.

[0108]

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

서 열 목 록

<110> INHA Industry Partnership Institute

<120> BRCA1 Haplotype Markers Associated with Survival of Non-small
Cell Lung Cancer Patient and Used Thereof

<160> 16

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 201

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ttctgaagac agagccccag agtcagctcg tgttggcaac ataccatctt caacctctgc 60

attgaaagtt ccccaattga aagttgcaga atctgcccag rgtccagctg ctgctcatac 120

tactgatact gctgggtata atgcaatgga agaaagtgtg agcagggaga agccagaatt 180

gacagcttca acagaaaggg t 201

<210> 2

<211> 201

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ttctacctat atttatggct tttagctttt ctaataaaag ctcaaaatga attacagtca 60

tcagtgactt tttaatgaat agaagacttt tgcaattttt mactatttgt ttttacttat 120

taaatatttc cgccttggcc aggcatgggtg gctcacgcct ataatcccag cactgtgaga 180

tgccaaggca ggaggatcac t 201

<210> 3

<211> 201

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

agagccctga gaaagcctgt aaggatagtt actgttttta aaataatgag ttctttttgc 60

ttatgggctc ctgttggtta ttgggtccatt tcaaagaaga ytggtctaag tccaagtatt 120

tgataaaca agaatttagg tatgtaagga gttttccaaa ataccttct taagaattta 180

ttttatttat ttatTTTTT t 201

<210> 4
<211> 201
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
gtgtgtgtgt gcacatgcgt gtgtgtgggtg tcctttgcat tcagtagtat gtatccaca 60

ttcttaggtt tgcigacatc atctctttga attaatggca maattgtttg tggttcattg 120

tctccttaaa ttagactgta agcaccttga tggaactcat actacctttt atttcacaca 180

cacgcacacg cgcacacaca g 201

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for rs1799966 amplification

<400> 5
aacataccat cttaacctc tgc 23

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for rs1799966 amplification

<400> 6
aattctggct tctccctgc 19

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Extension primer for rs1799966 allele

<400> 7
rttgaaagtt gcagaatctg cccag 25

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for rs8176199 amplification

<400> 8
tgaattacag tcatacagta cttttt 26

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for rs8176199 amplification

<400> 9
gcctggccaa ggcggaaata t 21

<210> 10
<211> 45
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Extension primer for rs8176199 allele

<400> 10

acgcacgtcc acggtgattt tatttaataa gtaaaaacaa atagt

45

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for rs8067269 amplification

<400> 11

tttgaaaac tccttacata cctaa

25

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for rs8067269 amplification

<400> 12

ctgtaaggat agttactgtt tttaaaataa tg

32

<210> 13

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Extension primer for rs8067269 allele

<400> 13

ggatggcggtt ccgtcctatt ttatcaaata cttggactta gcaca	45
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Forward primer for rs2070833 amplification	
<400> 14	
tcctttgcat tcagtagtat gtatc	25
<210> 15	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Reverse primer for rs2070833 amplification	
<400> 15	
taaaaggtag tatgagttcc atca	24
<210> 16	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Extension primer for rs2070833 allele	
<400> 16	
ggctatgatt cgcaatgctt aggagacaat gaaccacaaa caatt	45