



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0003708
(43) 공개일자 2013년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0065194
(22) 출원일자 2011년06월30일
심사청구일자 2011년06월30일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
주식회사에이앤알씨라퓨틱스
대전광역시 유성구 테크노1로 11-3 배재대학교 대
덕산학협력관 306호 (관평동)

(72) 발명자
맹필재
대전광역시 유성구 가정로 65, 102동 606호 (신성
동, 대림두레아파트)
송영자
대전광역시 유성구 배울1로 119, 테크노밸리 12단
지 1204동 1502호 (용산동)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인이름

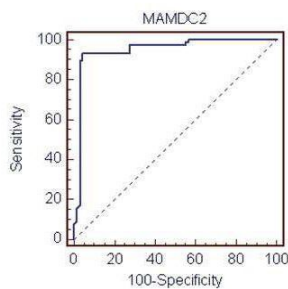
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 유방암 진단용 바이오마커

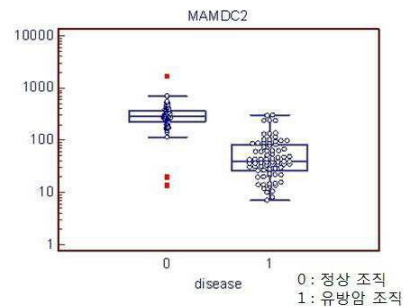
(57) 요약

본 발명은 유방암 진단용 바이오마커에 관한 것으로서, 구체적으로는 MAMDC2의 특정 DNA 단편 또는 전장 DNA로 이루어진 유방암 진단용 바이오마커를 제공한다. 검체의 조직으로부터 본 발명의 유방암 진단용 바이오마커를 구성하는 유전자인 MAMDC2의 DNA 단편 또는 전장 DNA의 발현 수준을 측정하고 이를 정상 조직에서의 발현 수준과 비교하는 경우 유방암을 효과적으로 진단할 수 있고, 이를 통해 유방암을 조기에 치료할 수 있다.

대표도



Specificity:95.7
Sensitivity:93.4
Criterion values: <=137
P:0.0001



(72) 발명자

박영우

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 506동 104호 (전민동, 엑스포아파트)

송규상

대전광역시 유성구 지족로 343, 반석마을아파트 210동 2101호 (지족동)

서광선

대전광역시 유성구 지족동 반석베르디움 311-1604

이진선

대전광역시 중구 서문로 96, 209동 1803호 (문화동, 센트럴파크)

성경미

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 506동 104호 (전민동, 엑스포아파트)

유석호

대전광역시 서구 둔산남로 15, 은하수아파트 104동 510호 (둔산동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B0009735

부처명 지식경제부

연구사업명 지역R and D클러스터구축사업

연구과제명 시장선도형분자세포진단제개발및상용화클러스터구축사업

주관기관 배재대학교

연구기간 2010.07.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 MAMDC2 유전자의 DNA 단편 또는 전장 DNA로 이루어지고, 유방암 조직에서 특이적으로 발현되는 것을 특징으로 하는 유방암 진단용 바이오마커.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 유방암 진단용 바이오마커에 관한 것으로서, 구체적으로는 MAMDC2의 특정 DNA 단편 또는 전장 DNA를 포함하는 유방암 진단용 바이오마커를 제공한다.

배경기술

[0002] 전 세계에서 유방암은 폐암에 이어 두 번째로 흔히 발생하는 암이며, 사망률은 5위에 해당하는 위험한 암이다. 유방암의 경우 일단 암세포가 주변 조직에 침범하거나 림프절로 전이가 시작되면 완치가 어렵기 때문에 조기 발견이 다른 암보다 더 중요하다고 할 수 있다.

[0003] 유방암으로 인한 사망률을 줄이기 위해서는 첫째, 유방암을 조기 진단하고, 둘째, 일차 수술에 의한 치료 이후 예후를 진단하여 적절한 부가 치료 (Adjuvant therapy)를 하는 것이 중요하다. 현재 유방암 진단에는 1차 촉진에 의한 자가 진단 외에, 유방 X-선 조영술, 초음파검사법 등이 예방차원에서의 검진방법으로 사용되고 있으며 이 방법은 초기의 유방암을 진단하는 데에도 가장 널리 사용되는 방법이다. 그러나 유방 X-선 조영술은 우리나라 여성들에서 흔히 발견되는 조밀유방일 경우 섬유질이 많아서, 진단율이 떨어지는 단점이 있으며, 특히 젊은 여성같이 유선이 많이 발달되어 있어도 진단율이 떨어진다. 또한, X-선을 사용하기 때문에 진단 과정에서 오히려 유방암이 생길 가능성도 배제할 수 없다. 그래서 대안으로 초음파검사법이 사용되고 있지만 이 역시 악성종양(cancer)과 양성종양(non-cancer)을 구별하기는 쉽지 않다. 실제 임상에서는 이상 소견이 있으면 세침흡입세포검사법, 자기공명촬영법 등을 부가적으로 사용하여 진단율을 높이고 있다. 그러나 이 방법들을 사용하더라도 정상조직과 비 정상조직을 형태상으로 구분할 뿐 악성종양(cancer)과 양성종양(non-cancer)을 구분하기가 쉽지 않기 때문에 확진을 위해서는 더욱 정밀한 조직검사를 하게 된다. 이와 같은 이유들로 인해 유방암은 다른 암에 비해 비교적 분자 유전학적인 방법으로 유방암을 진단하는 방법이 발달되어 있다. 조직검사에서 조직을 잘라서 병변을 확인한 다음 적출을 위한 1차 수술이 시행된다. 이후의 부가치료를 어떻게 할지 결정하기 위하여 에스트로겐 수용체(Estrogen receptor, ER)의 유무와 유방암 특이 종양표지자인 HER2/neu(Human Epidermal growth factor Receptor 2, ErbB-2 또는 ERBB2라고도 알려져 있다) 유전자의 수를 조직내 교잡법(in situ hybridization)을 통해 확인하는 방법을 사용한다. 만약, 발견된 암 조직이 에스트로겐 수용체를 가지고 있으면, 타목시펜(Tamoxifen)과 같은 에스트로겐 유사체를 사용하여 치료를 하게 되고, HER2/neu 유전자가 과발현되어 있으면, HER2/neu 단클론항체인 trastuzumab을 제품화한 허셉틴(Herceptin)을 유방암의 치료에 사용하게 된다. 유방암의 진단 및 치료에 가장 유용하게 사용되는 유방암 특이 진단 마커인 HER2/neu 유전자의 증폭 및 과발현은 침습성 유방암의 20 ~ 35%에서 발견된다. 따라서, HER2/neu 검사는 에스트로겐 수용체 검사와 더불어 유방암 환자의 치료에 결정적인 역할을 한다.

[0004] 그러나 유방암 환자 모두가 ER 유전자나 Her2/neu 유전자가 과발현되어 있는 것은 아니므로, 이러한 진단 방법들의 단점을 보완하고 좀 더 빠르고 확실하게 암을 구분하기 위하여 암 특이적 종양표지자(biomarker)를 찾기 위한 시도가 다양하게 이루어지고 있으며, 이를 이용한 새로운 진단 방법들이 최근 소개되고 있다. 최근 미국에서 Oncotype DX라고 하는 21-gene assay (Oncotype DX, Genomic Health, Redwood City, CA)와 MammaPrint라고 하는 70-gene assay (MammaPrint, Agendia, Amsterdam, the Netherlands)가 제품화되어 임상에서 실제 사용되고 있다. Oncotype DX는 실시간 정량 PCR 방법으로 16개의 유방암 관련 유전자와 5개의 대조군 유전자를 검사는 방법이고, MammaPrint는 70개의 유전자를 마이크로어레이 방법으로 검사하는 방법이다. 이들 두 방법은 1차 수술 이후, 부가 치료를 어떠한 방식으로 할지에 관한 표준을 제시하고 있으며, 이로 인해 개인 맞춤 치료가 가능하게 되었다(Am J Health-Syst Pharm Vol 65 Jan 1, 2008 23-28).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 임상조직을 이용한 NanoString's nCounter Analysis System을 이용하여 조직 내에 포함되어 있는 MAMDC2 유전자의 발현 정도, 특히 상기 유전자 전사체의 특정 부위의 발현 정도가 유방암과 유의적으로 관련이 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였고, 상기 유방암 관련 유전자의 DNA 단편 또는 전장 DNA를 유방암 진단용 바이오마커로 사용함으로써 유방암 유무를 간단하게 확인할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

[0006] 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

[0007] 본 발명의 목적은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 MAMDC2 유전자의 DNA 단편 또는 전장 DNA로 이루어지고, 유방암 조직에서 특이적으로 발현되는 것을 특징으로 하는 유방암 진단용 바이오마커를 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0008] 검체의 조직으로부터 본 발명의 유방암 진단용 바이오마커를 구성하는 유전자인 MAMDC2의 DNA 단편 또는 전장 DNA의 발현 수준을 측정하고 이를 정상 조직에서의 발현 수준과 비교하는 경우 유방암을 효과적으로 진단할 수 있고, 이를 통해 유방암을 조기에 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 MAMDC2에 대하여 유방암 진단 성능을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 유방암 조직에서 정상 조직보다 특이적으로 발현되는 유전자의 특정 DNA 단편 또는 전장 DNA를 이용하는 유방암 진단용 바이오마커에 관한 것으로서, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 MAMDC2 유전자의 DNA 단편 또는 전장 DNA를 이용한다. MAMDC2 유전자는 유방암 조직에서 정상 조직보다 특이적으로 발현되는 것을 특징으로 하기 때문에 유전자의 전장 DNA를 유방암 진단용 바이오마커로 사용될 수 있으며, 특히 검체 조직에서의 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 MAMDC2 유전자의 DNA 단편의 양을 통해 MAMDC2 유전자의 정량적인 발현 수준을 간접적으로 측정할 수 있으므로 DNA 단편 또한 유방암 진단용 바이오마커로 사용될 수 있다.

[0011] 본 발명의 유방암 진단용 바이오마커를 이용하여 유방암을 진단하는 방법은 당업계에서 사용되는 방법이라면 특별히 제한되지 않는다.

[0012] 예를 들면, NanoString's nCounter를 사용할 수 있다. NanoString's nCounter Analysis system은 Digital mRNA profiling이 가능한 분석 장비로, cDNA의 합성 과정이나 측정하고자 하는 목표물의 증폭과정이 필요 없다는 장점이 있고, 따라서 mRNA 수준에서의 발현량을 측정하는데 total RNA, cell lysates, blood lysates, FFPE 시료처럼 보다 간편한 시료만 준비되면 분석이 가능하다는 장점이 있다.

[0013] 본 발명의 유방암 진단용 바이오마커와 유방암 진단제를 이용하여 유방암을 진단하는 방법의 바람직한 일실시예로서 a) 검체의 유방 조직으로부터 전체 RNA(total RNA)를 reporter probe와 capture probe로 구성된 nCounter probe에 직접 혼합시키는 단계; b) hybridization 반응을 수행하는 단계; c) 결합하지 않은 과량의 probe들은 affinity-purification을 통해 제거하는 단계; d) 정제된 reporter probe, capture probe, RNA의 3중 complex를 imaging surface에 부착시키고 전압을 걸어주어 molecule들을 잡아 늘여 일렬로 정렬하고 고정화 시키는 단계; e) Digital Analyzer로 옮겨서 imaging processing을 수행하여 reporter probe들을 해독함으로써 MAMDC2 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및 f) 측정된 검체 유방 조직의 MAMDC2 유전자의 발현 수준과 정상 조직의 MAMDC2 유전자의 발현 수준을 비교하여 유방암 여부를 판정하는 단계를 포함한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에서 유방암 진단용 바이오 마커로 사용되는 MAMDC2 유전자의 정보 및 상기 프로브에 대한 정보는 표 1과 같다.

표 1

[0015]

Gene	Accession	Targeted Region	Tm_CP	Tm_RP	PN(CP;RP)	NSID
MAMDC2	MM_153267.3	1525-1625	78	82	326439;226439	NM_153267.3:1525
Target Sequence (서열번호 1)						
AGGGAGGTTATGTTGCCCTGGATGATATTTTCATTCTCTCTGTTCACTGCCAGAATCAGACAGAACTTCTGTTCACTGCCGTGGAAGCCAGCTGCAATTT						

[0016]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 명확하게 설명하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 권리범위가 실시예에 의해 제한되지 않는다.

[0017]

실시예 1. 유방암 진단용 바이오마커의 선별 및 유방암 진단 성능 확인

[0018]

공공으로 이용할 수 있도록 개발된 microarray data set을 이용하여 신규 유방암 진단용 바이오마커의 검색을 실시한 결과 20종류의 후보 바이오마커를 검색하였다. 그리고, 미국의 NanoString이라는 회사에서 개발한 nCounter Analysis system을 통해 유방암 환자 76명의 정상조직과 암조직에서 동시에 추출한 total RNA를 사용하여 이들 후보 바이오마커의 mRNA의 발현 분석을 의뢰하였다. 분석은 duplicate로 수행하였고, 분석결과는 표 2에 나타내었다.

[0019]

상기 유방암 임상 조직은, 유방암 환자의 암 조직과 동일 환자의 암 조직 인접부위에서 병리학적으로 정상으로 판정된 조직 (matched normal and cancer tissue)을 IRB 승인을 거쳐 충남대병원 한국 인체자원 거점은행(National BioBank of Korea)을 통해 100명 환자의 조직을 공급받았고, 유방암 임상 조직은 -70℃에 동결 상태로 보관 중인 것을 사용하였으며, 유방암 임상 조직에서 total RNA의 추출은 TRI REAGENT(MRC)를 사용하여 권장하는 방법에 따라 total RNA를 추출하였고 DEPC(RNase inhibitor)-treated water에 녹였다.

표 2

❖ nCounter Analysis system 분석 결과 요약(1차+2차 : 76명 대상)

	Specificity(%)	Sensitivity(%)	Criterion	P value	
MS001	73.9	78.9	<=81	0.0001	
MS002	79.7	85.5	<=111.2	0.0001	
MS003	85.5	60.5	>53	0.0001	
MS004	78.3	78.9	<=93.5	0.0001	
MS005	89.9	72.4	>163	0.0001	
MS006	87	71.1	>99.8	0.0001	
MS007	81.2	60.5	<=11	0.0001	
MS008	84.1	88.2	<=429.1	0.0001	
MS009	85.5	81.6	>1335.6	0.0001	
MS010	75.4	85.8	>74.5	0.0001	
MS011	78.8	80.3	>348.2	0.0001	
MS012	91.3	75	<=102.5	0.0001	
MS013	92.8	88.2	<=168.2	0.0001	
MS014	95.7	93.4	<=137	0.0001	
MS016	89.9	78.9	<=46.8	0.0001	
MS017	95.7	89.5	<=81.7	0.0001	
MS018	84.1	39.5	<=773	0.1677	
MS019	69.6	72.4	>271.3	0.0001	
MS020	92.8	78.9	<=404.4	0.0001	

감소
증가

[0020]

상기 결과로부터, 이전에 알려지지 아니한 신규한 유방암 진단 마커 MAMDC2(MS014)를 발견하게 되었다.

[0021]

상기 신규한 MAMDC2에 대하여 유방암 진단 성능을 확인한 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이 MAMDC2는 유방암 조직에서 발현이 떨어지는 결과를 보여 유방암 진단용 바이오마커로서 가치가 있음을 검증할 수 있었다. 또한, 유방암 진단에 대한 특이성(Specificity) 및 민감도(Sensitivity)를 살펴보면, 도 1에서 알

[0022]

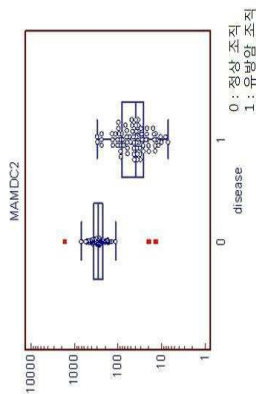
수 있는 바와 같이, 본 발명의 유방암 진단 바이오마커(MAMDC2)는 유방암 진단에 높은 특이도(95.7)와 민감도(93.4)를 나타내었다.

[0023]

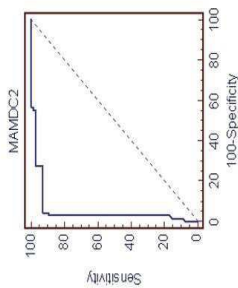
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

도면1



Specificity:95.7
Sensitivity:93.4
Criterion values: <=137
P:0.0001



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
A&R therapeutics co., ltd.
- <120> Biomarker for diagnosing breast cancer
- <130> PB11-09371
- <160> 1

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide fragment of MAMDC2 gene

<400> 1

agggagggtta tgttgccctg gatgatattt cattctctcc tggtcactgc cagaatcaga 60

cagaacttct gttcagtgcc gtggaagcca gctgcaattt 100