



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월26일
 (11) 등록번호 10-1651796
 (24) 등록일자 2016년08월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
G01N 33/15 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7016712(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2008년11월26일
 심사청구일자 2015년06월23일
- (85) 번역문제출일자 2015년06월23일
- (65) 공개번호 10-2015-0080020
- (43) 공개일자 2015년07월08일
- (62) 원출원 특허 10-2010-7011781
 원출원일자(국제) 2008년11월26일
 심사청구일자 2013년11월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2008/084933
- (87) 국제공개번호 WO 2009/073540
 국제공개일자 2009년06월11일
- (30) 우선권주장
 60/991,616 2007년11월30일 미국(US)
 61/038,699 2008년03월21일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 Clin. Cancer. Res., Vol. 11, No. 10, pp.
 3647-3653 (2005.05.15.)*
 JP2007020563 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
제넨테크, 인크.
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
 스샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
슈나이더, 브라이언 피.
 미국 46123 인디애나주 아본 폭스보로 드라이브
 790
라도비치, 밀란
 미국 46241 인디애나주 인디애나폴리스 문 코트
 7116
슬레지, 조지 더블유.
 미국 46220 인디애나주 인디애나폴리스 다우슨 레
 이크 드라이브 6342
- (74) 대리인
양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 윤준호

(54) 발명의 명칭 **VEGF 다형성 및 항-혈관신생 요법**

(57) 요약

본 발명은 환자로부터 단리한 샘플을 특이적 유전자 다형성에 대해 스크리닝하여, 환자가 항-VEGF 치료와 관련하여 특히 고혈압의 위험이 있는지 또는 항-VEGF 요법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 더 큰지를 판단하는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/574 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 2600/106 (2013.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/142 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

G01N 2800/321 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

유방암에 걸린 환자로부터 단리한 샘플을 VEGF (-2578C/A)에서의 유전자 다형성에 대해 스크리닝하는 것을 포함하고, 해당 유전자형이 VEGF (-2578AA)를 포함하는 경우 상기 환자는 VEGF (-2578AA) 이외의 유전자형을 갖는 환자에 비해 항-VEGF 항체에 의한 치료로부터 유익함을 얻을 가능성이 높은 것인, 항-VEGF 항체에 의한 치료로부터 유방암에 걸린 환자가 유익함을 얻을 가능성을 예측하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항-VEGF 항체가 베바시주맙인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 환자가 항-VEGF 항체로 유방암 치료를 받는 환자인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 유방암이 전이성 유방암인 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 항-VEGF 항체가 베바시주맙인 방법.

청구항 8

VEGF (-2578C/A)에서의 유전자 다형성에 대해 특이적인 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 키트를 사용하는 환자에게 해당 유전자형이 VEGF (-2578AA)를 포함하는 경우 VEGF (-2578AA) 이외의 유전자형을 갖는 환자에 비해 항-VEGF 항체에 의한 치료로부터 유익함을 얻을 가능성이 높다는 것을 알려주는 패키지 인서트(package insert)를 추가로 포함하는, 유방암에 걸린 환자가 항-VEGF 항체에 의한 치료로부터 유익함을 얻을 가능성을 예측하기 위한 키트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 및 상기 제2 올리고뉴클레오티드가 VEGF (-2578C/A)에서의 유전자 다형성을 포함하는 VEGF 유전자의 일부를 증폭시키기 위해 사용될 수 있는 것인 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원의 교차 참조**

[0002] 본 출원은 2007년 11월 30일자로 출원된 미국 가출원 제60/991,616호 및 2008년 3월 21일자로 출원된 미국 가출원 제61/038,699호의 이익을 주장하며, 이들 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명은 일반적으로 항-혈관신생 요법과 관련된 인간의 질환 및 질병을 치료하는 것에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 독자적이거나 다른 항-암 요법과 조합된, 암의 항-혈관신생 요법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 암은 인간의 건강에 가장 치명적으로 위협이 되는 것 중 하나로, 미국에서 매년 1 백만명이 넘는 새로운 환자들에서 발병되고 있다. 고형 종양은 대부분의 사망의 원인이 된다. 특정 암의 의학적 치료에 있어서 유의한 진전이 있어 왔지만, 현재의 치료 방법은 비교적 비-선택적이다: 수술은 질환 조직을 제거하며; 방사선요법은 고형 종양을 축소시키고; 화학요법은 급속도로 분열하는 세포를 사멸시킨다. 이들 치료는 수많은 부작용을 야기할 수 있고, 일부 경우에는서는 제시될 수 있는 투여량을 제한할 만큼 심각하여 잠재적으로 효과가 있는 약물의 이용이 금지된다.
- [0005] 혈관신생은, 혈관 내피 세포가 증식되고, 전정(prune) 및 재조직화되어 이전에 존재하던 혈관망으로부터 새로운 혈관을 형성하는 중요한 세포적 사건이다. 혈관신생은 대부분의 1차 종양이 성장하고 후속 전이되는데 본질적이다. VEGF-A 또는 혈관 투과성 인자 (VPF)로도 불리는 혈관 내피 세포 성장 인자 (VEGF)는 정상 및 비정상 혈관신생 모두에 있어서의 중심 조절자로 보고되어 있다 (문헌 [Ferrara and Davis-Smyth (1997) Endocrine Rev. 18:4-25; Ferrara (1999) J. Mol. Med. 77:527-543]).
- [0006] "BV", "rhUMAb VEGF", 또는 "아바스틴 (Avastin)[®]"으로도 알려져 있는 항-VEGF 항체 "베바시주맵"은 문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]에 따라 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 단클론성 항체로, 현재 미국에서 전이성 결장직장암, 비-소세포 폐암, 및 전이성 유방암의 치료에 대해 승인받았다. 다른 암 치료에서와 같이, 아바스틴[®] 요법은 높은 고혈압 위험을 포함하여 특정 부작용과 관련이 있다.
- [0007] 유전자 다형성 (Genetic polymorphism)은 개체군 중에서 특정 유전자에서의 상이한 대립 유전자가 상이한 표현형을 야기할 경우에 생긴다. 그러한 다형성은 치료적 약물의 효능 및 안전성을 판단하는데 소정의 역할을 할 수 있다. 예를 들어, VEGF에서의 특이적 다형성은 유방암 발생과 관련이 있음을 나타내왔다 (문헌 [Schneider et al. (2008) Breast Cancer Research and Treatment 111:157-63]).
- [0008] 특정 요법의 효능 또는 안전성을 예측하게 하는 부가적인 다형성 식별법은 그로부터 최상의 유익함을 얻고자 하는 환자들에게 더 나은 맞춤 요법을 제공하는데 이용될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 부분적으로, VEGF 길항제에 의한 치료로부터 유익함을 얻을 가능성이 높은지 및/또는 아바스틴[®]을 비롯한 항-VEGF 요법을 겪은 환자에서 고혈압의 위험이 높은지를 예측하는, VEGF에서의 다형성을 식별하는 것을 기초로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 한 측면에서, 본 발명은 환자로부터 단리한 샘플을 VEGF (-1498C/T) 및 VEGF (-634G/C)로부터 선택된 유전자 다형성에 대해 스크리닝 하는 것을 포함하는, VEGF 길항제에 의한 치료와 관련하여 환자가 고혈압의 위험이 높은지를 예측하는 방법을 제공하고, 이때 해당 유전자형이 VEGF (-1498C) 또는 VEGF (-634G)를 포함하는 경우 상기 환자는 VEGF 길항제에 의한 치료와 관련하여 고혈압의 위험이 높다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체, 예를 들어 베바시주맵이다. 일부 실시양태에서, 치료는 항-신생물 조성물을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 환자는 암, 예를 들어 유방암의 치료를 받고 있는 환자이다.
- [0011] 다른 측면에서, 본 발명은 VEGF (-1498C/T) 및 VEGF (-634G/C)로 이루어진 군으로부터 선택된 VEGF에서의 다형성에 대해 특이적인 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 환자가 VEGF 길항제에 의한 치료와 관련하여 고혈압의 위험이 높은지를 예측하기 위한 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트의 올리고뉴클레오티드는 이들 다형성 중 하나를 포함하는 VEGF 영역을 증폭시키는데 유용하다.
- [0012] 다른 측면에서, 본 발명은 환자로부터 단리한 샘플을 VEGF (-2578C/A) 또는 VEGF (-1154G/A)에서의 유전자 다형성에 대해 스크리닝하는 것을 포함하는, VEGF 길항제에 의한 치료로부터 환자가 유익함을 얻을 가능성이 높은지를 예측하는 방법을 제공하며, 이때 해당 유전자형이 VEGF (-2578AA) 또는 VEGF (1154AA)를 포함하는 경우 상기 환자는 VEGF 길항제에 의한 치료로부터 유익함을 얻을 가능성이 높다. 일부 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체, 예를 들어 베바시주맵이다. 일부 실시양태에서, 치료는 항-신생물 조성물을 투여하는 것을 추가로

포함한다. 일부 실시양태에서, 환자는 암, 예를 들어 유방암의 치료를 받고 있는 환자이다.

[0013] 다른 측면에서, 본 발명은 VEGF (-2578C/A) 및 VEGF (-1154G/A)로 이루어진 군으로부터 선택된 VEGF에서의 다형성에 대해 특이적인 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 환자가 VEGF 길항제에 의한 치료로부터 유익함을 얻을 가능성이 높은지를 예측하기 위한 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트의 올리고뉴클레오티드는 이들 다형성 중 하나를 포함하는 VEGF 영역을 증폭시키는데 유용하다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 환자로부터 단리한 샘플을 특이적 유전자 다형성에 대해 스크리닝하여, 환자가 항-VEGF 치료와 관련하여 특히 고혈압의 위험이 있는지 또는 항-VEGF 요법으로부터 유익함을 얻을 가능성이 더 큰지를 판단하는 방법을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 실시예 있어서, 달리 언급이 없으면, 당업계 범위 내의 통상적인 분자 생물학 (재조합 기술을 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학 기술을 채용할 것이다. 그러한 기술들은, 예컨대 문헌 ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989)]; ["Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984)]; ["Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987)]; ["Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.)]; ["Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates)]; ["PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis et al., eds., 1994)]에 충분히 설명되어 있다.

[0016] 달리 언급이 없으면, 본원에서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 업계의 통상적인 기술자들에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994)] 및 [March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992)]은 당업자에게 본 출원에서 사용된 많은 용어들에 대한 일반적인 지침을 제공한다.

[0017] 특허출원 및 공개문헌을 비롯한, 본원에 인용된 모든 참조문헌은 그 전문이 참고로 포함된다.

정의

[0019] 본원에 사용된 단수 형태의 "부정관사 (a, an)" 및 "정관사 (the)"는 문맥에서 달리 명확히 기술되지 않는 한 복수를 포함한다. 예를 들어, "하나의" 세포는 또한 "세포들"을 포함할 것이다.

[0020] 용어 "포함하는"은 조성물 및 방법이 언급된 요소들을 포함하지만 다른 요소들을 배제하지는 않음을 의미하는 것으로 의도된다.

[0021] 용어 "VEGF" 및 "VEGF-A"는 165-아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자 및 관련 121-, 189- 및 206-아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자 (문헌 [Leung et al. Science, 246:1306 (1989)] 및 [Houck et al. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991)]에 기재된 바와 같음)와 함께 천연 발생 대립유전자 및 그의 가공 형태를 지칭하는데 상호교환적으로 사용된다. 용어 "VEGF"는 또한 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 1 내지 109를 포함하는 절단된 형태의 폴리펩티드를 지칭하는데 사용된다. 이러한 임의의 형태의 VEGF에 대한 지칭은 본원에서 예를 들어 "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" 또는 "VEGF₁₆₅"로 확인될 수 있다. "절단된" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에서 나타난 바와 같이 넘버링된다. 예를 들어, 절단된 천연 VEGF에서의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 또한 천연 VEGF에서의 위치 17 (메티오닌)이다. 절단된 천연 VEGF는 천연 VEGF에 필적하는 KDR 및 Flt-1 수용체에 대한 결합 친화도를 갖는다.

[0022] "항-VEGF 항체"는 충분한 친화도 및 특이성으로 VEGF에 결합하는 항체이다. 바람직하게, 본 발명의 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 관여하는 질환 또는 상태를 표적화하고 간섭하는 치료제로서 사용될 수 있다. 항-VEGF 항체는 통상 다른 VEGF 상동체, 예컨대 VEGF-B 또는 VEGF-C, 또는 다른 성장 인자, 예컨대 PlGF, PDGF 또는 bFGF에 결합하지 않을 것이다. 바람직한 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생성된 단클론성 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합하는 단클론성 항체이다. 보다 바람직하게, 항-VEGF 항체는 문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]에 따라 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 단클론성 항체이며, 베바시주맵 (BV; 아바스틴[®])으로서 알려진 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0023] "VEGF 길항제"는 하나 이상의 VEGF 수용체에 대한 결합을 포함하는, VEGF 활성을 중화, 차단, 억제, 방해, 감소 또는 간섭할 수 있는 분자를 지칭한다. VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 및 그의 항원-결합 단편, VEGF에 특이적으로 결합하여 VEGF가 하나 이상의 수용체에 결합하는 것을 막는 수용체 분자 및 유도체, 항-VEGF 수용체 항체 및 VEGF 수용체 길항제, 예컨대 VEGFR 티로신 키나제의 소분자 억제제를 포함한다.
- [0024] 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되며, 단클론성 항체 (전장 또는 무손상 단클론성 항체 포함), 다클론성 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다.
- [0025] 본원에 사용된 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 상동성인 항체의 집단, 즉 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 집단을 구성하는 개별 항체들이 동일한 경우에서 얻은 항체를 지칭한다. 단클론성 항체는 매우 특이적이며, 단일 항원에 대해 지시된다. 또한, 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 다클론성 항체 제제와 반대로, 각각의 단클론성 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지시된다. 수식어 "단클론성"은 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생성을 필요로 하는 것으로 해석되지 않을 것이다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 단클론성 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다. "단클론성 항체"는 또한, 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)] 또는 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.
- [0026] "질병"은 항체를 이용한 치료로부터 유익함을 얻게 될 임의의 상태이다. 이는 포유동물에게 해당 질병의 소인을 만드는 병리학적 상태를 포함하는, 만성 및 급성 질병 또는 질환을 포함한다. 본원에서 치료될 질병의 비제한적인 예에는 양성 및 악성 종양; 백혈병 및 악성 림프종; 신경, 신경교, 성상교세포, 시상하부 및 다른 샘, 대식세포, 상피, 기질 및 활강 질병; 및 염증성, 혈관신생성 및 면역성 질병이 포함된다.
- [0027] 용어 "치료 유효량"은 포유동물에서 질환 또는 질병을 치료하는데 유효한 약물의 양을 지칭한다. 암의 경우, 약물의 치료 유효량은 암 세포의 수를 감소시킬 수 있고; 종양 크기를 감소시킬 수 있고; 말초 기관으로의 암 세포 침투를 억제 (즉, 어느 정도 지연 및 바람직하게는 중단)시킬 수 있고; 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 지연 및 바람직하게는 중단)시킬 수 있고; 종양 성장을 어느 정도 억제시킬 수 있고/거나; 질병과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. 약물이 존재하는 암 세포의 성장을 방지하고/거나 상기 세포를 사멸시킬 수 있는 정도라면, 약물은 세포증식억제제 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 요법에서, 생체내 효능은 예를 들어 전체 생존률 (OS), 진행 없는 생존률 (PFS), 시간 대 질환 진행률 (TTP), 반응률 (RR), 반응의 지속 기간, 및/또는 생명의 질을 평가함으로써 측정할 수 있다.
- [0028] "치료"는 요법적 치료 및 예방적 또는 방지적 처치 모두를 지칭한다. 치료가 필요한 대상체는 이미 질병에 걸린 대상체 및 질병이 방지되어야 할 대상체 모두를 포함한다.
- [0029] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 비조절 세포 성장을 특징으로 하는, 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예에는 암종, 림프종, 아세포종, 육종 및 백혈병이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 상기 암의 보다 구체적인 예에는 편평상피세포암, 폐암 (소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 샘암종 및 폐의 편평상피 암종 포함), 복막암, 간세포암, 위 (gastric/stomach)암 (위장암 포함), 췌장암, 신경교아세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 대장암, 결장직장암, 자궁내막 (endometrial/uterine)암종, 타액선암, 신장 (kidney/renal)암, 간암, 전립선암, 외음암, 갑상선암, 간암종 및 다양한 유형의 두경부암, 뿐만 아니라 B-세포 림프종 (저등급/여포성 비-호지킨 림프종 (NHL); 소 림프구성 (SL) NHL; 중등급/여포성 NHL; 중등급 미만성 NHL; 고등급 면역아세포성 NHL; 고등급 림프아구성 NHL; 고등급 소 비-절단 세포 NHL; 거대 질환 NHL; 덩개 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 왈덴스트롬 마크로글로불린혈증 (Waldenstrom's Macroglobulinemia) 포함); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프아구성 백혈병 (ALL); 모발상 세포 백혈병; 만성 골수아세포성 백혈병; 및 이식후 림프증식성 질병 (PTLD), 뿐만 아니라 모반증과 관련된 비정상적 혈관 증식, 부종 (예컨대 뇌종양과 관련된 것), 및 메이그스(Meigs) 증후군이 포함된다.
- [0030] 용어 "항-신생물 조성물"은 종양 성장 또는 기능을 억제 또는 방지하고/거나 종양 세포의 파괴를 야기할 수 있는 하나 이상의 활성 치료제를 포함하는, 암 치료에 유용한 조성물을 지칭한다. 암 치료를 위한 항-신생물 조성물에 적합한 치료제에는 화학치료제, 방사성 동위원소, 독소, 사이토카인, 예컨대 인터페론, 및 종양 세포와 관련된 사이토카인, 사이토카인 수용체 또는 항원을 표적으로 하는 길항제가 포함되지만, 이에 제한되지

않는다. 바람직한 치료제는 화학치료제이다.

- [0031] "화학치료제"는 암 치료에 유용한 화학 화합물이다.
- [0032] "단리된" 핵산 분자는 폴리펩티드 핵산의 천연 공급원에 통상적으로 관련되어 있는 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인 및 분리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 천연에서 발견된 형태 또는 셋팅 이외의 것이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는 폴리펩티드를 통상적으로 발현하는 세포에 함유된 핵산 분자 (여기서 예를 들어 핵산 분자는 천연 세포의 염색체 배치와 상이한 배치에 있음)를 포함한다.
- [0033] 용어 "다형성"은 집단 내에서 변하는 유전자의 서열에서의 배치를 지칭한다. 다형성은 상이한 "대립유전자"로 구성된다. 이러한 다형성의 배치는 유전자에서의 그의 위치 및 그에서 발견되는 상이한 염기에 의해 확인된다. 예를 들어, VEGF -1498C/T는 VEGF 유전자에서의 위치 -1498이 C와 T 사이에서 변화됨을 나타낸다. 2개의 가능한 변이체 C 및 T는 2개의 상이한 대립유전자이다. 유전자형은 2개의 별개 대립유전자로 구성되기 때문에, 여러 가능한 변이체 중 임의의 변이체가 어느 한 개체에서 관찰될 수 있다 (예를 들어, 이 예에서, CC, CT 또는 TT).
- [0034] 용어 "유전자형"은 세포 또는 조직 샘플에서 특정 유전자의 특이적 대립유전자를 지칭한다. 상기 예에서, CC, CT 또는 TT가 VEGF -1498C/T 다형성에서의 가능한 유전자형이다.
- [0035] 용어 "샘플"은 환자로부터 취한 세포 또는 조직 샘플을 포함한다. 예를 들어, 샘플은 종양 샘플, 종양 유형에 상응하는 정상 조직의 샘플, 종양 주위의 영역으로부터 취한 조직의 샘플, 또는 혈액 세포를 포함할 수 있다.
- [0036] 샘플에서 특정 유전자형의 확인은 당업자에게 널리 공지된 수많은 방법 중 임의의 방법에 의해 수행할 수 있다. 예를 들어, 다형성의 확인은 당업계에 널리 공지된 기술을 사용하여 대립유전자를 클로닝하고 그를 서열분석함으로써 수행할 수 있다. 별법으로, 유전자 서열은 예를 들어 PCR 및 서열분석된 생성물을 사용하여 게놈 DNA로부터 증폭시킬 수 있다. 소정의 유전자좌에서의 돌연변이에 대한 환자의 DNA를 분석하는 여러 비제한적인 방법은 하기에 기재한다.
- [0037] DNA 마이크로어레이 기술, 예를 들어 DNA 칩 장치 및 고처리량 스크리닝 적용을 위한 고밀도 마이크로어레이 및 저밀도 마이크로어레이가 사용될 수 있다. 마이크로어레이 제작 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 다양한 잉크젯 및 마이크로젯 칩작 또는 스팟팅 기술 및 공정, 계내 또는 칩상 포토리소그라피 올리고뉴클레오티드 합성 공정, 및 전자 DNA 프로브 어드레싱 공정을 포함한다. DNA 마이크로어레이 혼성화 적용은 점 돌연변이, 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP) 및 단연쇄 반복 (STR)에 대한 유전자 발현 분석 및 유전자형 분석의 분야에 성공적으로 적용되어 왔다. 추가의 방법에는 간접 RNA 마이크로어레이 및 마이크로어레이와 다른 방법, 예컨대 레이저 포획 미세절단 (LCM), 비교 게놈 혼성화 (CGH) 및 크로마틴 면역침전 (ChIP)의 조합이 포함된다. 예를 들어, 문헌 [He et al. (2007) Adv. Exp. Med. Biol. 593:117-133] 및 [Heller (2002) Annu. Rev. Biomed. Eng. 4:129-153]을 참조한다. 다른 방법에는 PCR, xMAP, 침략자 검정, 질량 분광법 및 실시간서열분석이 포함된다 (문헌 [Wang et al. (2007) 593:105-106]).
- [0038] 또다른 검출 방법은 다형성 부위와 중복되며 다형성 영역 주위에 약 5개, 또는 다르게는 10개, 또는 다르게는 20개, 또는 다르게는 25개, 또는 다르게는 30개의 뉴클레오티드를 갖는 프로브를 사용한 대립유전자 특이적 혼성화이다. 예를 들어, 대립유전자 변이체에 특이적으로 혼성화될 수 있는 여러 프로브는 고체상 지지체, 예를 들어 "칩"에 부착한다. 올리고뉴클레오티드는 리소그라피를 비롯한 다양한 공정에 의해 고체 지지체에 결합할 수 있다. "DNA 프로브 어레이"라고도 칭해지는, 올리고뉴클레오티드를 포함하는 칩을 사용한 돌연변이 검출 분석은 예를 들어 문헌 [Cronin et al. (1996) Human Mutation 7:244]에 기재되어 있다.
- [0039] 다른 검출 방법에서는, 대립유전자 변이체를 확인하기 전에 먼저 유전자의 적어도 일부분을 증폭시키는 것이 필요하다. 증폭은 예를 들어 PCR 및/또는 LCR 또는 당업계에 널리 공지된 다른 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0040] 일부 경우, 대상체로부터의 DNA에 특이적 대립유전자의 존재는 제한 효소 분석에 의해 나타낼 수 있다. 예를 들어, 특이적 뉴클레오티드 다형성은 다른 대립유전자 변이체의 뉴클레오티드 서열이 존재하지 않는 제한 부위를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 생성할 수 있다.
- [0041] 추가의 실시양태에서, 절단제 (예컨대 뉴클레아제, 히드록실아민 또는 오스뮴 테트록시드, 및 피페리딘 함유)로부터의 보호를 사용하여 RNA/RNA, DNA/DNA, 또는 RNA/DNA 헤테로듀플렉스 (heteroduplex)에서의 오류매치 (mismatch)된 염기를 검출할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Myers et al. (1985) Science 230:1242] 참조). 일반

적으로, "오류매치 절단" 기술은, 유전자의 대립유전자 변이체의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 임의로 표지된 대조군 핵산, 예를 들어 RNA 또는 DNA를 조직 샘플로부터 수득한 샘플 핵산, 예를 들어 RNA 또는 DNA와 혼성화함으로써 형성된 헤테로듀플렉스를 제공함으로써 출발한다. 이중-가닥 듀플렉스는 대조군과 샘플 가닥 사이의 염기쌍 오류매치를 기초로 형성된 듀플렉스와 같은 듀플렉스의 단일-가닥 영역을 절단하는 작용제로 처리한다. 예를 들어, RNA/DNA 듀플렉스는 RNase로 처리하고, DNA/DNA 하이브리드는 S1 뉴클레아제로 처리하여, 오류매치된 영역을 효소적으로 소화시킬 수 있다. 별법으로, DNA/DNA 또는 RNA/DNA 듀플렉스는 히드록실아민 또는 오스뮴 테트록시드 및 피페리딘으로 처리하여, 오류매치된 영역을 소화시킬 수 있다. 오류매치된 영역의 소화 후, 생성된 물질을 변성 폴리아크릴아미드 겔 상에서 크기에 의해 분리하여, 대조군 및 샘플 핵산이 동일 또는 상이한 뉴클레오티드 서열을 갖는지 여부를 결정한다. 예를 들어, 미국 특허 제6,455,249호, 문헌 [Cotton et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397], [Saleeba et al. (1992) Meth. Enzymol. 217:286-295]을 참조한다.

[0042] 또한, 전기영동 운동성의 변화가 특정 대립유전자 변이체를 확인하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 단일 가닥 구조 다형성 (SSCP)을 사용하여 돌연변이체와 야생형 핵산 사이의 전기영동 운동성 차이를 검출할 수 있다 (문헌 [Orita et al. (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA 86:2766], [Cotton (1993) Mutat. Res. 285:125-144] 및 [Hayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79]). 샘플 및 대조군 핵산의 단일 가닥 DNA 단편은 변성되고, 재생된다. 단일-가닥 핵산의 2차 구조는 서열에 따라 변하며, 이에 따른 전기영동 운동성의 변화는 심지어 단일 염기 변화의 검출도 가능케 한다. DNA 단편은 표지된 프로브에 의해 표지 또는 검출될 수 있다. 검정의 민감도는 (DNA 보다는) RNA (2차 구조가 서열 변화에 더 민감함)를 사용하여 향상될 수 있다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 주 방법은 전기영동 운동성의 변화를 기초로 이중 가닥 헤테로듀플렉스 분자를 분리하는 헤테로듀플렉스 분석을 이용한다 (문헌 [Keen et al. (1991) Trends Genet. 7:5]).

[0043] 또한, 대립유전자 변이체의 확인은, 변성제의 구배를 함유하는 폴리아크릴아미드 겔에서 다형성 영역을 포함하는 핵산의 이동을 분석함으로써 (변성 구배 겔 전기영동 (DGGE)을 사용하여 검정됨) 얻어질 수 있다 (문헌 [Myers et al. (1985) Nature 313:495]). DGGE가 분석의 방법으로서 사용되는 경우, DNA는 예를 들어 PCR에 의해 대략 40 bp의 고유점 GC-풍부 DNA의 GC 클램프를 첨가함으로써 완전히 변성되지 않도록 변형될 것이다. 추가의 실시양태에서, 대조군 및 샘플 DNA의 운동성의 차이를 확인하기 위해 변성제 구배 대신에 온도 구배가 사용된다 (문헌 [Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys. Chem. 265:1275]).

[0044] 2개의 핵산 사이에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 차이를 검출하기 위한 기술의 예에는 선택적 올리고뉴클레오티드 혼성화, 선택적 증폭, 또는 선택적 프라이머 연장이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 공지된 다형성 뉴클레오티드가 중심에 놓인 올리고뉴클레오티드 프로브 (대립유전자-특이적 프로브)를 제조할 수 있으며, 이어서 완벽한 매치가 발견되는 경우에만 혼성화를 허용하는 조건 하에서 표적 DNA에 혼성화될 수 있다 (문헌 [Saiki et al. (1986) Nature 324:163]; [Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230]). 이러한 대립유전자 특이적 올리고뉴클레오티드 혼성화 기술은 유전자의 다형성 영역에서 뉴클레오티드 변화의 검출에 사용될 수 있다. 예를 들어, 특이적 대립유전자 변이체의 뉴클레오티드 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 혼성화 멤브레인에 부착시킨 다음, 이 멤브레인을 표지된 샘플 핵산에 혼성화한다. 이어서, 혼성화 신호의 분석은 샘플 핵산의 뉴클레오티드의 신원 (identity)을 나타낼 것이다.

[0045] 별법으로, 선택적 PCR 증폭에 좌우되는 대립유전자 특이적 증폭 기술이 본 발명과 함께 사용될 수 있다. 특이적 증폭을 위한 프라이머로서 사용된 올리고뉴클레오티드는 분자의 중심에서 목적 대립유전자 변이체를 가질 수 있거나 (이에 의해 증폭이 차별적인 혼성화에 좌우됨) (문헌 [Gibbs et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17:2437-2448]), 또는 적절한 조건 하에서 오류매치가 폴리머라제 연장을 방지 또는 감소시킬 수 있는 경우 한 프라이머의 최대 3' 말단에서 목적 대립유전자 변이체를 가질 수 있다 (문헌 [Prossner (1993) Tibtech 11:238] 및 [Newton et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17:2503]). 이러한 기술은 프로브 올리고 베이스 연장 (Probe Oligo Base Extension)에 대해 "PROBE"로도 칭해진다. 또한, 돌연변이 영역에 신규 제한 부위를 도입하여 절단-기초 검출을 생성하는 것이 바람직할 수 있다 (문헌 [Gasparini et al. (1992) Mol. Cell. Probes 6:1]).

[0046] 또다른 실시양태에서, 대립유전자 변이체의 확인은, 예를 들어 미국 특허 제4,998,617호 및 문헌 [Laridgren, U. et al. Science 241:1077-1080 (1988)]에 기재된 바와 같은 올리고뉴클레오티드 라이게이션 검정 (OLA)를 사용하여 수행한다. OLA 프로토콜은 표적 단일 가닥의 인접 서열에 혼성화될 수 있도록 디자인된 2개의 올리고 뉴클레오티드를 사용한다. 올리고뉴클레오티드 중 하나는 분리 마커, 예를 들어 비오틴화된 분리 마커에 연결되고, 다른 하나는 검출가능하게 표지된다. 정확한 상보성 서열이 표적 분자에서 발견되는 경우, 올리고뉴클레오티드는 그의 말단이 인접하고 라이게이션 기질을 생성하도록 혼성화될 것이다. 이어서, 라이게이션은 표지

된 올리고뉴클레오티드가 아비딘 또는 또다른 비오틴 리간드를 사용하여 회수될 수 있도록 한다. 닉커슨, 디. 에이. 등 (Nickerson, D. A. et al.)은 PCR과 OLA의 특성을 조합한 핵산 검출 검정을 기재하였다 (문헌 [Nickerson, D. A. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8923-8927]). 이 방법에서, PCR을 사용하여 표적 DNA의 기하급수적 증폭을 달성하고, 이어서 OLA를 사용하여 표적 DNA를 검출한다.

[0047] 본 발명은 VEGF에서 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)을 검출하는 방법을 제공한다. 단일 뉴클레오티드 다형성은 불변 서열의 영역에 접해있기 때문에, 그의 분석은 단일 변이체 뉴클레오티드의 신원의 결정 이외에 어떤 것도 필요로 하지 않으며, 각 환자에 대한 완전한 유전자 서열을 결정하는 것은 불필요하다. SNP의 분석을 용이하게 하는 여러 방법이 개발되었다.

[0048] 단일 염기 다형성은 예를 들어 미국 특허 제4,656,127호에 개시된 바와 같은 특수화된 엑소뉴클레아제-내성 뉴클레오티드를 사용하여 검출할 수 있다. 그 방법에 따라, 다형성 부위의 3' 바로 가까이의 대립유전자 서열에 대해 상보적인 프라이머는 특정 동물 또는 인간으로부터 수득된 표적 분자에 혼성화되도록 허용된다. 표적 분자 상의 다형성 부위가, 존재하는 특정 엑소뉴클레아제-내성 뉴클레오티드 유도체에 상보적인 뉴클레오티드를 함유한다면, 그 유도체는 혼성화된 프라이머의 단부에 혼입될 것이다. 이러한 혼입은 프라이머가 엑소뉴클레아제에 대해 내성이도록 만들어 그의 검출을 가능케 한다. 샘플의 엑소뉴클레아제-내성 유도체의 신원은 공지되어 있기 때문에, 프라이머가 엑소뉴클레아제에 대해 내성을 갖는다는 발견은, 표적 분자의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오티드가 반응에 사용된 뉴클레오티드 유도체의 뉴클레오티드에 상보적이었다는 것을 나타낸다. 이러한 방법은 다량의 외부 서열 데이터의 결정을 필요로 하지 않는다는 이점을 갖는다.

[0049] 또한, 용액-기재 방법이 다형성 부위의 뉴클레오티드의 신원을 결정하는데 사용될 수 있다 (WO 91/02087). 상기와 같이, 다형성 부위의 3' 바로 가까이의 대립유전자 서열에 상보적인 프라이머가 사용된다. 그 방법은, 다형성 부위의 뉴클레오티드에 상보적이라면 프라이머의 말단에 혼입하게 될 표지된 디옥시뉴클레오티드 유도체를 사용하여 다형성 부위의 뉴클레오티드의 신원을 결정한다.

[0050] 별법은 WO 92/15712에 기재되어 있다. 이 방법은 표지된 종결자의 혼합물 및 다형성 부위의 3' 서열에 상보적인 프라이머를 사용한다. 따라서, 혼입되는 표지된 종결자는 평가될 표적 분자의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오티드에 의해 결정되고, 그에 상보적이다. 그 방법은 통상적으로 프라이머 또는 표적 분자가 고체상에 고정되는 이중 상 검정이다.

[0051] DNA에서 다형성 부위를 검정하기 위한 다수의 다른 프라이머-안내된 뉴클레오티드 혼입이 기재되었다 (문헌 [Komher, J. S. et al. (1989) Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784]; [Sokolov, B. P. (1990) Nucl. Acids Res. 18:3671]; [Syvanen, A.-C., et al. (1990) Genomics 8:684-692]; [Kuppuswamy, M. N. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1143-1147]; [Prezant, T. R. et al. (1992) Hum. Mutat. 1: 159-164]; [Ugozzoli, L. et al. (1992) GATA 9:107-112]; [Nyren, P. et al. (1993) Anal. Biochem. 208:171-175]). 이들 방법은 모두 다형성 부위에서 염기들을 구별하기 위해 표지된 디옥시뉴클레오티드의 혼입에 의존한다.

[0052] 또한, 유전자 또는 유전자 생성물 또는 다형성 변이체에서의 변화를 검출하기 위한 상기 방법 중 임의의 방법을 사용하여 치료 또는 요법의 과정을 모니터링할 수 있음을 이해할 것이다.

[0053] 본원에 기재된 방법은, 예를 들어 편리하게 사용될 수 있는 하나 이상의 프로브 또는 프라이머 핵산을 포함하는, 하기 기재된 바와 같은 사전-포장된 진단 키트를 이용하여 수행함으로써, 예를 들어 대상체가 VEGF-길항제를 이용한 치료와 관련된 고혈압을 발생시킬 위험에 있는지 여부를 결정할 수 있다.

[0054] 상기 기재된 진단 및 예후 방법에서 사용하기 위한 샘플 핵산은 대상체의 임의의 세포 유형 또는 조직으로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 대상체의 체액 (예를 들어 혈액)은 공지된 기술에 의해 수득할 수 있다. 별법으로, 핵산 시험을 건조 샘플 (예를 들어, 모발 또는 피부) 상에서 수행할 수 있다.

[0055] 본원에 기재된 발명은 VEGF 좌위에 존재하는 대립유전자를 결정하고 확인하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 이러한 정보는 VEGF-길항제를 이용한 치료와 관련된 고혈압이 발생할 위험 수준을 예상하는데 유용하다. 프로브는 샘플의 유전자형을 직접 결정하는데 사용될 수 있거나, 또는 증폭과 동시에 또는 증폭 이후에 사용될 수 있다. 용어 "프로브"는 천연 발생 또는 제조합의 단일- 또는 이중-가닥 핵산 또는 화학적으로 합성된 핵산을 포함한다. 이들은 닉 (nick) 번역, 클레노우 필-인 (Klenow fill-in) 반응, PCR 또는 당업계에 공지된 다른 방법에 의해 표지될 수 있다. 본 발명의 프로브, 그의 제조 및/또는 표지는 상기 문헌 [Sambrook et al. (1989)]에 기재되어 있다. 프로브는 본 발명의 다형성 영역을 함유하는 핵산에 대한 선택적 혼성화에 적합한 임의의 길이의 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 사용된 프로브의 길이는 부분적으로는, 사용된 검정의 성질 및 사

용된 혼성화 조건에 좌우될 것이다.

- [0056] 표지된 프로브는 또한 다형성의 증폭과 함께 사용될 수 있다 (문헌 [(Holland et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280)]. 미국 특허 제5,210,015호에는 PCR 동안 증폭 생성물의 실시간 측정을 제공하기 위한 형광-기재 접근법이 기재되어 있다. 이러한 접근법은 존재하는 이중-가닥 DNA의 양을 나타내기 위해 삽입 염료 (예컨대 에티뎀 브로마이드)를 사용하거나, 또는 형광-소광제 쌍을 함유하는 프로브를 사용하며 ("태크-만 (Taq-Man)" 접근법이라고도 지칭됨), 여기서 프로브는 증폭 동안 절단되어 형광 분자를 방출하고 그의 농도는 존재하는 이중-가닥 DNA의 양에 비례한다. 증폭 동안, 프로브는 표적 서열에 혼성화될 때 폴리머라제의 뉴클레아제 활성에 의해 소화되어, 형광 분자가 소광제 분자로부터 분리되도록 함으로써, 리포터 분자로부터의 형광이 나타나도록 한다. 태크-만 접근법은 다형성을 함유하는 표적 폴리뉴클레오티드의 영역에 특이적으로 어닐링하는, 리포터 분자-소광제 분자 쌍을 함유하는 프로브를 사용한다.
- [0057] 프로브는 "유전자-칩"으로서 사용하기 위해 표면에 고정될 수 있다. 이러한 유전자 칩은 당업자에게 공지된 다수의 기술에 의해 유전 변이를 검출하는데 사용될 수 있다. 한 기술에서, 올리고뉴클레오티드는 미국 특허 제 6,025,136호 및 동 제6,018,041호에 약술된 바와 같은 혼성화 접근법에 의한 서열분석에 의해 DNA 서열을 결정하고자 유전자 칩 상에 정렬된다. 또한, 본 발명의 프로브는 유전 서열의 형광 검출에 사용될 수 있다. 이러한 기술은 예를 들어 미국 특허 제5,968,740호 및 동 제5,858,659호에 기재되었다. 또한, 프로브는 미국 특허 제5,952,172호 및 문헌 [Kelley, S. O. et al. (1999) Nucl. Acids Res. 27:4830-4837]에 기재된 바와 같은 핵산 서열의 전기화학 검출을 위해 전극 표면에 고정될 수 있다.
- [0058] 추가로, 프로브 또는 프라이머로서 사용된 단리된 핵산은 보다 안정해지기 위해 변형될 수 있다. 변형된 예시적인 핵산 분자에는 DNA의 포스포아미데이트, 포스포티오에이트 및 메틸포스포네이트 유사체가 포함된다 (또한 미국 특허 제5,176,996호, 동 제5,264,564호 및 동 제5,256,775호 참조).
- [0059] 본원에 설명된 바와 같이, 본 발명은 또한 VEGF에 존재하는 다형성 영역의 대립유전자 변이체 유형을 결정하기 위한 진단 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 그 방법은 VEGF의 다형성 영역에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 프로브 또는 프라이머를 사용한다. 따라서, 본 발명은 이들 방법을 수행하기 위한 키트를 제공한다.
- [0060] 일부 실시양태에서, 본 발명은 대상체가 VEGF-길항제를 이용한 치료와 관련하여 고혈압을 발생시킬 위험이 있는지 여부를 판단하기 위한 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 대상체가 항-VEGF 요법으로부터 보다 큰 유익함을 얻을 가능성이 있는지 여부를 판단하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 상기에 기재된 하나 이상의 조성물 및 사용 지시서를 함유한다. 단지 하나의 예로서, 본 발명은 또한 환자가 VEGF의 다형성 영역, 예를 들어 VEGF (-2578C/A), VEGF (-1498C/T), VEGF (-1154G/A) 또는 VEGF (-634G/C)에 특이적인 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드를 함유하는 VEGF-길항제를 이용한 치료와 관련하여 고혈압을 발생시킬 위험이 있는지 여부를 판단하기 위한 키트를 제공한다. 또다른 예로서, 본 발명은 또한 대상체가 VEGF의 다형성 영역, 예를 들어 VEGF (-2578C/A) 또는 VEGF (-1154G/A)에 특이적인 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드를 함유하는 항-VEGF 요법으로부터 보다 큰 유익함을 얻을 수 있는지 여부를 판단하기 위한 키트를 제공한다. 유전자좌에 "특이적인" 올리고뉴클레오티드는 좌위의 다형성 영역에 결합하거나 또는 좌위의 다형성 영역의 인접부에 결합한다. 증폭을 위한 프라이머로서 사용되는 올리고뉴클레오티드의 경우, 프라이머는 다형성 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 생성하는데 사용되기 위해 충분히 근접하는 경우 인접한다. 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 다형성으로부터 약 1 내지 2 kb, 예를 들어 1 kb 미만 이내에 결합하는 경우 인접한다. 특이적 올리고뉴클레오티드는 서열에 혼성화될 수 있으며, 적합한 조건 하에서 하나의 뉴클레오티드가 상이한 서열에 결합하지 않을 것이다.
- [0061] 키트는 VEGF의 다형성 영역에 특이적으로 혼성화될 수 있는 하나 이상의 프로브 또는 프라이머 및 사용 지시서를 포함할 수 있다. 키트는 통상적으로 하나 이상의 상기 기재된 핵산을 포함한다. VEGF의 적어도 일부분을 증폭시키기 위한 키트는 일반적으로 2개의 프라이머를 포함하며, 이 중 적어도 1개는 대립유전자 변이 서열에 혼성화될 수 있다. 이러한 키트는 예를 들어 형광 검출, 전기화학 검출 또는 다른 검출에 의한 유전자형의 검출에 적합하다.
- [0062] 키트에 함유된 올리고뉴클레오티드는 프로브로서 사용되든지 또는 프라이머로서 사용되든지 간에 검출가능하게 표지될 수 있다. 표지는 예를 들어 형광 표지의 경우 직접적으로, 또는 간접적으로 검출될 수 있다. 간접적 검출은 당업자에게 공지된 임의의 검출 방법, 예를 들어 비오틴-아비딘 상호작용, 항체 결합 등을 포함할 수 있다. 형광 표지된 올리고뉴클레오티드는 또한 소광 분자를 함유할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 표면에 결합

할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표면은 실리카 또는 유리이다. 일부 실시양태에서, 표면은 금속 전극이다.

[0063] 본 발명의 또다른 키트는 검정을 수행하는데 필요한 하나 이상의 시약을 포함한다. 예를 들어, 키트는 효소를 포함할 수 있다. 다르게는, 키트는 완충제 또는 임의의 다른 필요한 시약을 포함할 수 있다.

[0064] 키트는 VEGF의 다형성 영역에서 대상체의 유전자형을 결정하기 위해 본원에 기재된 양성 대조군, 음성 대조군, 시약, 프라이머, 서열분석 마커, 프로브 및 항체 모두 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0065] 하기 실시예는 단지 본 발명의 실시를 예시하는 것으로 의도되며, 제한하고자 제공된 것이 아니다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시는 그 전문이 참고로 명백하게 포함된다.

[0066] **실시예 1. VEGF의 유전자 다형성 및 결과와의 연관성**

[0067] E2100은 사전 치료되지 않은 전이성 유방암에 걸린 여성에게 파클리탁셀에 더하여 베바시주맵을 첨가한 경우, 무진행 생존기간 (PFS) 및 반응 속도 (RR)에서 개선이 있음을 입증한 III상 그룹간 시험이었다. 베바시주맵을 투여한 여성에게서 고혈압 및 단백뇨가 유의하게 더 많이 관찰되었다.

[0068] *샘플*

[0069] 본 발명자들은 유방암에 대한 아바스틴의 E2100 시험으로부터의 데이터에 대해 소급 시험을 수행하였다. 데이터 세트는 질환 진행 사건이 623건인 673명의 적격 환자와 483명의 사망자를 포함하였다. 이들 중에서, 본 발명자들은 363명의 적격 사례로부터 파라핀-포매 중앙 블록의 유전자형을 분석하였다 (중간 추적 43 개월). 또한, 377명의 적격 사례가 VEGF IHC에 이용가능하였고, 341명이 VEGFR-2 IHC에 이용가능하였다. 모든 표본을 환자의 신원정보나 임상 결과의 정보없이 "블라인드" 분석하였다.

[0070] *다형성*

[0071] 본 발명자들이 시험한 다형성을 표 1에 나타낸다.

표 1

시험한 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)

유전자	단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)	위치	백인: 회귀 대립 유전자 빈도 ¹	아프리카계 미국인: 회귀 대립 유전자 빈도 ¹
VEGF	-2578 C/A	프로모터	A=49%	A=24%
	-1498 C/T	프로모터	C=49%	C=33%
	-1154 G/A	프로모터	A=33%	A=10%
	-634 G/C	5' UTR	C=32%	C=35%
	936 C/T	3' UTR	T=15%	T=13%
VEGFR-2	889 G/A (V297I)	엑손 7	A=9%	A=20%
	1416 A/T (Q472H)	엑손 11	T=25%	T=10%

[0072]

[0073] 이들 다형성은 이러한 유전자가 혈관신생을 조정하는 것으로 공지되어 있기 때문에, 즉 1) 이들은 혈관신생 경로에 관여하고/하거나; 2) 확립된 유전자 다형성을 가지고/가지거나; 3) 개체군 수준에서 약물 반응에 대한 그의 영향이 의미가 있을 만큼 다형성의 빈도가 충분히 높고/높거나; 4) 다형성은 생물학적으로 관련된 방식으로 유전자의 기능을 변경시킬 수 있는 것으로 공지되어 있기 때문에 선택되었다.

[0074] *SNP의 유전자형 분석*

[0075] 디엔이지 (DNeasy)[®] 조직 키트 (미국 캘리포니아주 발렌시아 소재의 키아젠 (Qiagen))를 이용하여 20 μm의 파라핀 포매된 조직 절편으로부터 DNA를 추출하였다. 택맨 (Taqman)[®]에 기초한 실시간 PCR로 SNP의 유전자형을 분석하였다. 각 SNP에 대한 상세사항은 종래의 문헌 [Schneider, et al. (2007) "Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer." Breast Cancer Res. Treat]에 기술되어 있다. 전체적으로, 88.2%의 사례에서 유전자형이 성공적으로 판단되었다. 이는 분석한 SNP에 따라 달랐고, 성공률은 82% 내지 92%의 범위였다. 조합된 모든 SNP에 대해, 50%는 대조군에서 50%는 조합군에서 정확하게 평가하였다.

[0076] 단백질 발현의 평가

[0077] IHC를 이용하여 제공된 종양 블록으로부터 VEGF 및 VEGFR-2 둘 모두에 대한 단백질 발현을 평가하였다. VEGF 평가를 위해, 슬라이드를 탈파라핀화하고, 재수화하고, pH 6.0의 시트레이트 완충액과 함께 야채 찜기 (vegetable steamer) 내에 30분간 두었다. 슬라이드를 실온으로 냉각시킨 후, 이를 증류수로 2회, 이어서 0.05% 트윈 (Tween)TM 20을 함유하는 포스페이트 완충 염수 (PBST) (미국 펜실베이니아주 피츠버그 소재의 피셔 사이언티픽 (Fisher Scientific))로 2회 세척하였다. 이어서, 슬라이드를 다코 자동염색기 (Dako Autostainer) (미국 캘리포니아주 카뮈테리아 소재의 다코 사이토메이션 (Dako Cytomation))에 놓아 두었다. 슬라이드를 퍼옥시다제 블로킹 용액 (다코, S2001)과 함께 10분 동안 인큐베이션한 후, PBST와 함께 총 최소 10분 동안 3회 인큐베이션하였다. 이어서, 슬라이드를 1:100으로 희석시킨 항-VEGF 항체 (VG1, 미국 캘리포니아주 프레몬트 소재의 랩 비전 (Lab Vision))와 함께 60분, 다코 엔비전 (Envision) + (다코, K4001)과 함께 60분, 및 DAB 기질-크로모젠 시스템 (다코, K3466)과 함께 순차 인큐베이션하면서, 각 단계 사이에 PBST와 함께 3회 인큐베이션하였다. 슬라이드를 탈수화된 해리스 헤마톡실린 (Harris hematoxylin) (피셔)으로 대조염색하고, 투명하게 하고, 커버 유리를 덮었다. 전체 슬라이드로부터 세포질 VEGF 염색된 침습성 종양 세포의 백분율을 추산하여 VEGF-inv 점수를 계산하였다.

[0078] VEGFR-2 IHC의 경우에는, 먼저 포르말린-고정 파라핀-포매된 유방 종양 절편을 탈파라핀화하고 재수화하였다. 다음으로, pH 9.0의 표적 복구 용액 (S2367, 미국 캘리포니아주 카뮈테리아 소재의 다코) 중에서 98°C에서 20분간 항원을 복구시켰다. 이어서, 실온에서 5분 동안 이중 내생 효소 블록 (K4065, 엔비전TM + 이중 연결 시스템-HRP, 다코)을 가하였다. 항-VEGFR-2 클론 55B11 토끼 단클론성 항체 (#2479, 미국 메사추세츠주 덴버스 소재의 셀 시그널링 테크. (Cell Signaling Tech.))를 실온에서 2시간 동안 1:20으로 투여하였다. 엔비전 + 키트에 대한 프로토콜을 약간 변형시켜 DAB에 의한 신호를 발생시켰다. 헤마톡실린 QS (H-3404, 미국 캘리포니아주 벨링게임 소재의 벡터 (Vector))를 이용하여 대조염색을 완료한 다음, 탈수화하고, 커버 유리를 덮었다. 인간 태반 또는 간 절편을 양성 대조군으로 이용하였다. 1차 항체를 생략하고 토끼 IgG (X0936, 다코)로 대체한 것을 음성 대조군으로 제공하였다. 점수는: $\sum(u \times a)$ (여기서, u는 염색 강도이고 (0-3+), a는 각각의 강도 (ref)로 염색된 종양 세포의 백분율 (0-100)이다)로 계산하는 H-스코어 방법으로 매겼다.

[0079] 통계

[0080] 카플란-마이어 (Kaplan-Meier) 분석법을 이용하여 사건-시간 분포를 추산하였다. 유전자형과 사건 결과 (PFS & OS)에 대한 시간의 연관성은 콕스 (Cox)의 비례 위험 방법을 이용하여 평가하였다. 유의한 수준=0.017은, 다중 비교에 대한 본페로니 교정 (Bonferroni correction)에 기초하면, 전체 유형 I 오류율이 각각의 다형성에 대해 0.05인 것에 해당하였다. 각 비교에서 가양성률이 1.7%로 주어질 경우, 21번의 비교에서 적어도 하나의 가양성이 일어날 확률이 약 0.3이고, 이는 모든 비교가 독립적임을 짐작케한다. 유전자형과 RR (완전 반응군/부분 반응군 vs. 안정형 질환/진행형 질환으로 정의됨) 및 독성 (등급 3/4 고혈압)의 연관성은 피셔의 정확 시험을 이용하여 평가하였고, 유의한 수준은 p=0.05이다. 유전자형과 발현의 연관성은 크루스칼-왈리스 (Kruskal-wallis) 시험을 이용하여 연구하였다. RR 및 독성의 경우에, 각 비교에서 가양성률이 5%로 주어질 경우, 7번의 비교에서 적어도 하나의 가양성이 일어날 확률은 약 0.3이고, 이는 모든 비교가 독립적임을 짐작케한다. 발현과 사건 결과 (PFS & OS)에 대한 시간 및 발현과 RR의 연관성은 각각 콕스의 비례 위험 방법 및 윌콕슨 (Wilcoxon) 순위합 시험을 이용하여 평가하였다. 모든 p-값은 양 측면에 대한 것이다.

[0081] 유전자형과 효능과의 관계

[0082] 모든 후보 유전자형 (표 1)을 E2100에서 평가한 것과 같이 대조군 (파클리탁셀 단독) 및 조합군 (파클리탁셀 및 베바시주맵) 둘 모두에서의 효능과 비교하였다. 효능 매개변수에는 PFS (E2100의 1차 종말점), OS, 및 RR이 포함되었다. VEGF -2578 AA 유전자형 및 VEGF -1154 AA 유전자형은 조합군의 환자에 대해 바람직한 OS를 예측케 하였다 (표 2).

표 2

전체 생존기간 (OS)에 대한 VEGF 유전자형의 관계

SNP	유전자형 비교 (OS 중간값(월) & 빈도)	위험률	신뢰 구간	p-값
VEGF -2578	CA (24.4; 42.6%) vs. AA (37.0; 20.8%)	1.78	(98.3%=0.96, 3.32)	0.026
	CC (22.2; 37.6%) vs. AA (37.0; 21%)	1.70	(98.3%=0.91, 3.17)	0.043
	CC (22.2; 37.6%) vs. CA (24.4; 42.6%)	0.99	(98.3%=0.62, 1.58)	0.95
	AA vs. CA+CC	0.58	(95%=0.36, 0.93)	0.023
VEGF -1154	GG (22.3; 56.9%) vs. GA (29.8; 38.8%)	1.60	(98.3%=0.98, 2.60)	0.022
	GG (22.3; 56.95) vs. AA (46.5; 9.4%)	2.69	(98.3%=1.10, 6.59)	0.008
	GA (29.8; 38.8%) vs. AA (46.5; 9.4%)	1.68	(98.3%=0.66, 4.30)	0.19
	AA vs. GA vs. GG	0.62	(95%=0.46, 0.83)	0.001

[0083]

[0084]

이들 유전자형은 대조군의 환자에 대해서는 개선된 OS를 예측케하지 못했고, 어떤 군에서도 우수한 PFS나 RR을 예측케하지 못했다. VEGF -2578 AA 유전자형을 가진 환자에서의 유의한 개선으로 인해, 본 발명자들은 AA를 OS에 대해 CA 및 CC 조합 유전자형과 비교하여 분석하였고, 이러한 비교는 위험률이 0.58 (95% C.I.: 0.36, 0.93; p=0.023)로 AA 유전자형이 바람직함을 입증하였다. 상응하는 PFS 비교는 위험률이 0.91 (95% C.I. 0.62, 1.35; p=0.65)로 VEGF -2578 AA 유전자형이 바람직함을 나타내었다. VEGF -1154 SNP에서의 분명한 유전자-투여 효과로 인해, 본 발명자들은 유전자-투여 효과를 평가하였고, 이는 위험률이 0.62 (95% C.I.: 0.46; 0.83; p=0.001)로 VEGF -1154AA 유전자형이 바람직함을 입증하였다. PFS에 대한 동일한 유전자-투여 분석은 위험률이 0.79 (95% C.I.: 0.62, 1.02; p=0.07)로 VEGF -1154AA 유전자형이 바람직함을 나타내었다 (표 3).

표 3

무진행 생존기간(PFS)에 대한 VEGF 유전자형의 관계

SNP	유전자형 비교 (PFS 중간값(월))	위험률	신뢰 구간	p-값
VEGF -1154	AA (14.1) vs. GA (13.5) vs. GG (10.7)	0.79	(95%=0.62, 1.02)	0.07

[0085]

[0086]

대조군에 대한 전체 생존기간의 중간값은 25.2 개월이었고, 조합군에서는 26.7 개월이었다. VEGF -2578 AA 및 VEGF -1154 AA 유전자형에 대한 조합군에서의 전체 생존기간은 각각 37.0 개월 및 46.5 개월로 유의하게 더 길었다.

[0087]

본 발명자들은 또한 VEGF -2578 및 VEGF -1154에 대한 모든 유전자형을 조합하여 전체 생존기간과의 연관성을 평가하였다. 9 가지의 조합이 가능했고, 이 중 4 그룹은 3 이하의 사례를 가졌으므로 분석에서 배제하였다. 남은 5 그룹에서 생존기간과의 관계를 분석하였다 (표 4). VEGF -2578/-1154 AA/AA 유전자형을 그밖의 모든 것들과 비교할 경우, 전체 생존기간에서 통계학적으로 유의한 개선이 있었다 (p=0.041).

표 4

조합 VEGF 유전자형과 전체 생존기간과의 비교

VEGF 유전자형 -2578/-1154	전체 생존기간의 중간값(월)	사례 %	다른 조합 유전자형과의 비교
AA/AA	49.7	7.6	P=0.041
AA/GA	30.2	11.4	p=0.44
CA/GA	27.1	20.9	p=0.40
CA/GG	22.5	21.5	p=0.038
CC/GG	21.7	32.9	p=0.30
기타	---	5.7	

[0088]

[0089]

유전자형과 독성 (등급 3/4 고혈압)과의 관계

[0090]

모든 후보 유전자형 (표 1)을 가장 흔하고 유의한 독성의 등급 3/4 고혈압 (일반적 독성 기준 (Common Toxicity Criteria)에 의함)과 비교하였다. 모 시험에서 베바시주맙을 수여받은 모든 환자 중 15%를 초과하여 등급 3/4 고혈압을 겪었다. 본 발명자들은 VEGF -1498C/T 및 -634G/C 둘 모두에서의 특정 대립 유전자가 실험군의 등급 3/4 고혈압과 관련이 있음을 관찰하였다. VEGF -634 CC 및 VEGF -1498 TT 유전자형은 다른 유전자형과 비교했을 때 등급 3/4 고혈압과 덜 강하게 관련되어 있었다 (각각 8% 및 0%) (표 5). VEGF -2578 CC 유전자형에서의 고혈압은 CA (21%) 및 AA (22%) 유전자형과 비교했을 때 수치적으로 낮았지만 (12%), 통계학적으로 유의한 정도에 이르지지는 못했다 (p=0.32). VEGF -2578 CC를 다른 조합 유전자형 (CA/AA)과 비교했을 때, 연관 경향이 있었다 (p=0.16). 유사한 방식으로, VEGF -1154 GG 유전자형은 다른 조합 유전자형 GA (22%) 및 GG (27%)와 비교해서 고혈압이 덜했으나 (14%), 통계학적으로 유의한 정도에 이르지지는 못했다 (p=0.15).

표 5

등급 3/4 고혈압과 VEGF 유전자형의 관계

단일 뉴클레오티드 다형성	유전자형에 의한 등급 3/4 고혈압% & (절대수/퍼센트)	p-값
VEGF -634	CC=0% (n=27; 15.3%) vs. GC=22% (n=82; 46.3%) vs. GG=19% (n=68; 38.4%)	0.013
	CC vs. GC+GG	0.005
VEGF-1498	TT=8% (n=60; 33.9%) vs. CT=22% (n=82; 46.3%) vs. CC=23% (n=35; 19.8%)	0.056
	TT vs. CC+CT	0.022

[0091]

[0092]

유전자형과 발현 (IHC)과의 관계

[0093]

VEGF 및 VEGFR-2 둘 모두에 대해 모든 후보 유전자형 (표 1)을 1차 중앙 발현 (IHC로 평가)과 비교하였다. VEGF 발현 정도는 (세포질 VEGF 염색된 침습성 세포의 백분율을 기준으로) 그 범위가 0 내지 100인 VEGF_inv 점수로 평가하였다. VEGFR-2 발현 정도는 그 범위가 0 (발현이 검출되지 않음) 내지 300 (100%의 세포가 최대 3+의 발현을 가짐)일 수 있는 H-점수로 평가하였다. 유전자형을 전체 집단에 대하여 VEGF 발현과 비교하였고, 판단된 통계학적으로 유의한 연관성은 없었다. VEGF -2578 유전자형의 경우, 유전자형과 VEGF inv_점수 사이에 연관 경향이 있었다. AA 유전자형에 대한 평균 점수는 다른 유전자형 (CA=54 (표준 편차=37) 및 CC=61 (표준 편차=37))과 비교했을 때 더 낮았지만 (AA=48 (표준 편차=40)), 통계학적으로 유의한 정도에 이르지지는 못했다 (p=0.08). 또한, VEGF -1154 AA 유전자형도 다른 유전자형 (GA=53 (표준 편차=38) 및 GG=58 (표준 편차=37))에 비해 더 낮은 평균 발현을 나타내었지만 (AA=42 (표준 편차=40)), 이것 역시 통계학적으로 유의한 정도에 이르지지는 못했다 (p=0.13). 어떤 유전자형도 VEGFR-2의 발현과는 관련이 없었다.

[0094] VEGF 및 VEGFR-2 발현과 임상 결과와의 관계

[0095] 1차 종양 발현 (IHC에 의해 평가)을 E2100에서의 결과 (RR, PFS 및 OS)와 비교하였다. VEGF 또는 VEGFR-2 발현과 결과 사이에는 통계학적으로 유의한 어떤 연관성도 없었다. 이는 대조군, 조합군 또는 전체 집단을 평가했을 때에도 역시 그러하였다.