



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0019646
(43) 공개일자 2017년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2013.01)

C12Q 1/6837 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0113720

(22) 출원일자 2015년08월12일

심사청구일자 2015년08월12일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

주봉건

서울특별시 용산구 보광로7길 58

곽정숙

서울특별시 용산구 청파동1가 효창원로94다길 13
1층 (청파동)

(74) 대리인

윤대웅, 공병욱

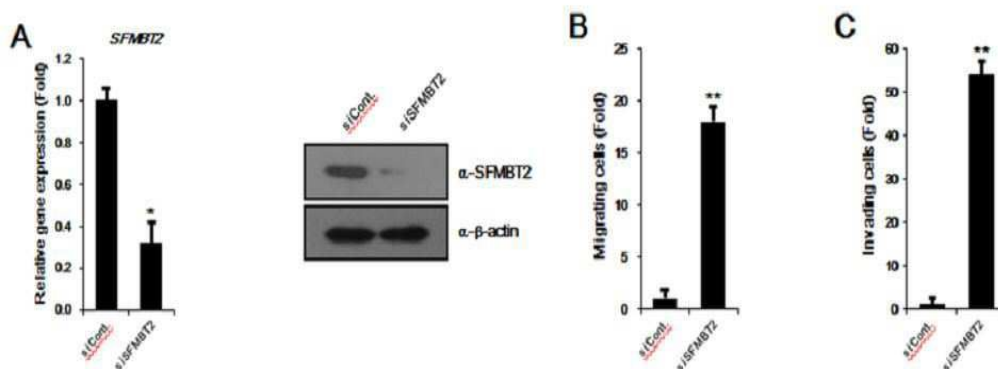
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 전립선암 전이에 대한 바이오마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 전립선암 전이에 대한 신규한 분자 마커를 제공한다. 본 발명의 전립선암 전이 마커는 전립선암 세포주 가운데 전이가 잘 일어나는 세포주에서 발현이 현저히 낮게 나타나는 것을 확인함으로써 발굴한 것으로 상기 마커 유전자를 녹다운 시킬 경우, 전립선 암세포의 침윤과 이동이 증가되는 것을 확인하였다. 본 발명의 마커는 전립선암 전이를 예측할 수 있는 신규한 바이오마커로서 전립선암 전이 기전 연구 및 항암제 개발에 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/5011 (2013.01)

G01N 33/57434 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201421038

부처명 교육부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 기초연구기반구축사업

연구과제명 세포 손상 제어 소재 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

SFMBT2(Scm-like with four mbt domains 2) 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오타이드의 단편에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 전립선암 전이의 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 키트는 마이크로어레이인 것을 특징으로 하는 전립선암 전이의 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 키트는 유전자 증폭 키트인 것을 특징으로 하는 전립선암 전이의 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트인 것을 특징으로 하는 전립선암 전이의 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 5

전립선암 전이의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 SFMBT2(Scm-like with four mbt domains 2) 유전자의 발현 수준을 측정하여 전립선암 전이 마커를 검출하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 방법은 마이크로어레이 방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 방법은 유전자 증폭 방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 방법은 항원-항체 반응 방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 전립선암 전이 억제제의 스크리닝 방법:

- (a) SFMBT2(Scm-like with four mbt domains 2) 단백질을 발현하는 세포에 분석하고자 하는 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 단백질의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계로서 상기 단백질의 발현량 또는 활성이 증가되는 경우에는 상기 시험물질은 전립선암 전이 억제제로 판정된다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전립선암 전이에 대한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 전립선암은 서구에서 발병률이 높은 암이었으나 최근에는 국내에서도 발생 빈도가 급격히 증가하고 있다. 미국에서는 남성의 암으로 인한 사망 원인 중 2위이며 매년 200,000명 이상이 새롭게 진단받고 있다. 전립선암의 조기 진단에 주로 사용되는 PSA(Prostate-specific antigen, 혈중 전립선 특이 항원)는 전립선암을 진단하는 가장 대표적인 종양지표이다. 혈액 검사만으로 간단히 진단이 가능하여 많이 사용되는 검사법이다. 하지만, PSA는 전립선 상피세포에서 만들어지는 단백분해 효소로 개인차가 크고 전립선의 염증이나 전립선 비대증, 외상 등에 의해서도 증가될 수 있기 때문에 PSA의 증가가 반드시 암의 발생을 의미하지 않는다. 따라서 새로운 전립선암의 종양 지표의 발굴이 필요하다.

[0004] 전립선암은 진행 속도가 느린 암이지만 18% 정도의 환자에서 전이(metastasis)가 발생한다. 전립선암의 전이 여부는 예후를 결정하는 중요한 요인이다. 다른 암들과 같이 전립선암도 림프 시스템이나 혈액을 통해서 주로 뼈, 림프절, 간 폐 등의 다른 장기로 전이된다. TGF와 Akt/mTOR 신호 전달 체계의 비정상적인 조절이 전립선암의 전이를 촉진한다고 알려져 있지만 전립선암의 전이를 조절하는 정확한 기전은 알려져 있지 않다.

[0005] SFMBT2는 최근에 알려진 PcG(polycomb gene) 복합체를 구성하는 단백질로 MBT(malignant brain tumor) 도메인을 갖고 있으며 이 도메인을 통해 메틸화가 된 히스톤 단백질과 결합한다고 알려졌다.

[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

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 전립선암 전이 가능성을 신속하고 정확하게 분자 진단할 수 있는 신규한 바이오마커를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 발굴된 바이오마커 SFMBT2가 전립선암 전이 가능성을 조기 진단할 수 있고, 예후를 판정할 수 있는 마커임을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 전립선암 전이의 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 전립선암 전이의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여 전립선암 전이 마커를 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 전립선암 전이 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 SFMBT2(Scm-like with four mbt domains 2) 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오타이드의 단편에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 전립선암 전이의 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 전립선암 전이의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 SFMBT2(Scm-like with four mbt domains 2) 유전자의 발현 수준을 측정하여 전립선암 전이 마커를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명자들은 전립선암 전이 가능성을 신속하고 정확하게 분자 진단할 수 있는 신규한 바이오마커를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 발굴된 바이오마커 SFMBT2가 전립선암 전이 가능성을 조기 진단할 수 있고, 예후를 판정할 수 있는 마커임을 규명하였다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 “전립선암(prostate cancer)”은 전립선의 주변부로부터 시작되는 악성종양을 의미한다.
- [0020] 본 발명의 분자 마커는 전립선암 전이에 대한 지표가 될 수 있으며, 전립선암 전이의 진단에 이용될 수 있다.
- [0021] 암 전이는 크게 림프성 전이와 혈액성 전이로 구분하고 있는데, 원발부위에서 먼 장기로의 전이는 대부분 혈액성 전이로 일어난다고 알려져 있다. 혈액성 전이가 일어나기 위해서는 여러 과정이 필요하다. 이 중에 대표적인 것이 혈관내피세포나 혈소판과의 접착(cell adhesion), 주변조직으로의 침윤(invasion), 나아가 신생혈관의 생성 유도(angiogenesis) 및 세포 이동(cell migration) 등이다.
- [0022] 즉, 전이과정은 접착, 침윤 및 혈관신생의 세 가지 주요 단계로 구성되어 있으며, 이 단계들 가운데 어느 하나를 막을 수 있다면 암의 전이를 억제할 수 있을 것으로 예상된다. 암세포가 다른 조직으로 전이되기 위해서는 세포의 이동이 선행되어야 한다. 이와 같이, 암 전이는 신생혈관의 생성 유도 및 세포의 이동을 수반하는 것으로 암 자체와는 그 현상이 상이하다. 따라서, 암의 전이를 막기 위해서는 신생혈관의 생성 유도 및 세포의 이동까지 억제하여야 하기 때문에 항전이의 효과와 항암 효과는 서로 상이하다고 할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서는, SFMBT2 유전자의 발현을 억제하면 전립선암 세포의 이동 및 침윤력이 증가하는 결과를 통해 SFMBT2 유전자가 전립선암의 전이 가능성을 진단하는 데 유용한 마커가 될 수 있음을 규명하였고 이로부터 SFMBT2 유전자의 발현을 증가시키는 물질을 전립선암 전이 억제제가 될 수 있다고 판단하였다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 마이크로어레이다.
- [0026] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 유전자 증폭 키트이다.
- [0027] 본 발명의 키트가 마이크로어레이인 경우에는, 마이크로어레이의 고상표면에 프로브가 고정화 되어 있다. 본 발명의 키트가 유전자 증폭 키트인 경우에는 프라이머를 포함한다.
- [0028] 본 발명의 진단용 키트에서 이용되는 프로브 또는 프라이머는 SFMBT2 유전자를 코딩하는 서열목록 제1서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 본 명세서에서 용어 “상보적(complementary)”은 어떤 특정한 혼성화(hybridization) 또는 어닐링 조건 하에서 상술한 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 용어 “상보적”은 용어 완전 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 상술한 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.
- [0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는

단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.

- [0030] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상술한 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 용어 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화 할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일쇄이며, 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다.
- [0032] 프라이머 또는 프로브 제작 시 참조하여야 하는 본 발명 마커의 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열에서 확인할 수 있으며, 이 서열을 참조하여 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이션 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.
- [0034] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 전립선암 전이 진단용 키트는 혼성화에 기초하여 실시할 수 있다. 이 경우, 상술한 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브가 이용된다.
- [0036] 상술한 본 발명의 마커들의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화 되는 프로브를 이용하여 혼성화-기초 분석을 하여 전립선암 전이를 예측할 수 있다.
- [0037] 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신 (fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민 (lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5 (Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P^{32} 및 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 증금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션(nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, *Methods in Enzymology*, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [0038] 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 상기 생시료는, 바람직하게는 전립선암 세포이다. 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.
- [0039] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위

하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65℃ 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다.

[0040] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-BI-포스페이트(naphthol-AS-BI-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다. 따라서 본 발명의 전립선암 전이 마커를 검출하는 방법을 혼성화에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브를 핵산 시료에 혼성화시키는 단계; (ii) 상기 혼성화 반응 발생 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 전립선암 전이를 예측할 수 있다. 즉, 시료에서 본 발명의 마커에 대한 시그널이 정상 시료(예컨대, 정상 전립선 세포) 또는 전이 능력이 낮은 전립선암 세포주 보다 약하게 나오는 경우에는 전립선암의 전이 가능성이 높은 것으로 판단된다.

[0041] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 인간의 전립선암 전이의 진단 또는 예후 분석용 키트는 유전자 증폭 키트일 수 있다.

[0042] 본 명세서에 기재된 용어 “증폭”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-매개 증폭(transcription-mediated amplification; TMA, WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication, WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences, 미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction(CP-PCR), 미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP-PCR), 미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification(NASBA), 미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.

[0043] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다.

PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

- [0044] 본 발명의 진단용 키트를 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 발현 정도를 조사한다. 본 발명은 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 발현 정도를 분석하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 전립선암 세포)에서 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 mRNA 양을 조사하여 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 발현 정도를 결정한다.
- [0045] 따라서 본 발명은 원칙적으로 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다.
- [0046] mRNA를 얻기 위하여, 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 예컨대, TRIzol을 이용하여 용이하게 세포내의 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 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)). 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다.
- [0047] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- [0048] 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중합효소 I의 “클레나우” 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다.
- [0049] 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 원하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 요구된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서 어닐링은 타겟 뉴클레오티드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.
- [0051] 이렇게 증폭된 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 cDNA를 적합한 방법으로 분석하여 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 발현 정도를 조사한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 발현 정도를 조사한다. 이러한 증폭 반응을 통하여, 생시료에서 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 발현이 정상 시료(예컨대, 정상 전립선 세포) 또는 전이 능력이 낮은 전립선암 세포주 보다 낮게 나오는 경우에는 전립선암의 전이 가능성이 높은 것으로 판단된다.
- [0052] 따라서 본 발명의 전립선암 전이 마커의 검출 방법을 cDNA를 이용하는 증폭반응에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열에 어닐링되는 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계; 및 (ii) 상기 증폭 반응의 산물을 분석하여 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 발현정도를 결정하는

단계를 포함한다.

- [0053] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 면역분석(immunoassay) 방식, 즉 항원-항체 반응 방식으로 실시될 수 있다. 이 경우, 상술한 본 발명의 전립선암 전이 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 이용하여 실시된다.
- [0054] 본 발명에서 이용되는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.
- [0055] 본 발명의 방법을 항체를 이용하여 실시하는 경우, 본 발명은 통상적인 면역분석 방법에 따라 실시하여 전립선암 전이를 진단하는 데 이용될 수 있다.
- [0056] 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경계 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0057] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 이차항체로서의 마커에 대한 항체와 상기 세포 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0059] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.
- [0060] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P₄₅₀을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)와 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing

antibody)로서 본 발명의 마커에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, SFMBT2 단백질에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.

[0062] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화합물(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P₄₅₀), 방사능물질((예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.

[0063] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널이 검출은 본 발명의 마커의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

[0064] 본 발명의 다른 변형예에 따르면, 항체 대신에 본 발명의 마커에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용할 수 있다. 앵타머는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., *Nature* 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.

[0065] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 전립선암 전이를 진단할 수 있다. 즉, 시료에서 본 발명의 마커에 대한 시그널이 정상 시료(예컨대, 정상 전립선 세포) 또는 전이 능력이 낮은 전립선암 세포주 보다 약하게 나오는 경우에는 전립선암의 전이 가능성이 높은 것으로 판단된다.

[0066] 본 발명의 키트는 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소 (예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0067] 본 발명의 마커는 전이 능력이 높은 전립선암 세포에서 저발현되는 생체 분자이다. 이러한 마커의 저발현은 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “저발현”은 조사 대상의 시료에서의 대상이 되는 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도가 비교대상 시료와 비교하여 낮은 경우를 의미한다. 예컨대, 당업계에서 통상적으로 이용되는 발현 분석 방법, 예컨대 RT-PCR 방법 또는 ELISA 방법(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))에 따라 발현 분석을 한 경우, 발현이 많은 것으로 분석되는 경우를 의미한다. 예를 들어, 상술한 분석 방법에 따라 분석한 결과, 본 발명의 마커가 정상 시료(예컨대, 정상 전립선 세포) 또는 전이 능력이 낮은 전립선암 세포와 비교하여 2-10 배 정도 저발현 되는 경우, 본 발명에서의 “저발현”으로 판정하고 전립선암의 전이 가능성이 높은 것으로 판정한다.

[0069] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 전립선암 전이 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0070] (a) SFMBT2(Scm-like with four mbt domains 2) 단백질을 발현하는 세포에 분석하고자 하는 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

[0071] (b) 상기 단백질의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계로서 상기 단백질의 발현량 또는 활성이 증가되는 경우에는 상기 시험물질은 전립선암 전이 억제제로 판정된다.

[0072] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료

를 접촉시킨다. 바람직하게는, 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 세포는 인간의 전립선암 세포이다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 본 발명의 마커의 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화합물질, 뉴클레오티드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)일 수 있다. 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다.

[0074] 시험물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스able 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

[0075] 본 발명의 스크리닝 방법은 다양한 방식으로 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 다양한 결합 분석(binding assay), 발현 분석 또는 활성 분석 기술들에 따라 고속(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다.

[0076] SFMBT2의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufman et al., *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 또는 인 시투(in situ) 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.

[0077] RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시료를 처리한 세포에서 총 RNA를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 제1쇄 cDNA를 제조한다. 이어, 제1쇄 cDNA를 주형으로 이용하고, SFMBT2-특이적 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 SFMBT2의 발현량 변화를 측정한다.

[0078] SFMBT2의 양을 측정하는 방법은 다양한 분석 방법에 따라 실시할 수 있다. 예를 들어, SFMBT2에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 다양한 면역분석 포맷으로 SFMBT2의 양을 측정할 수 있다.

[0079] 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0080] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 SFMBT2를 검출하는 데 이용될 수 있다.

[0081] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서 SFMBT2-특이적 항체와 상기 세포 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상

기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다.

- [0082] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.
- [0083] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 및 사이토크롬 P₄₅₀을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), σ -페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate)와 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0084] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 SFMBT2에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, SFMBT2에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0085] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P₄₅₀), 방사능물질(예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.
- [0086] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널이 검출은 SFMBT2의 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시퍼라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.
- [0087] SFMBT2의 발현 양을 측정하여 상기 SFMBT2의 발현 양이 대조군과 비교하여 상향-조절(up-regulation)되는 것으로 측정되는 경우에는 상기 시험물질은 전립선암 전이 억제제 후보물질로 판정된다.

발명의 효과

- [0089] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0090] (a) 본 발명은 전립선암 전이에 대한 신규한 분자 마커를 제공한다.
- [0091] (b) 본 발명의 전립선암 전이 마커는 전립선암 세포주 가운데 전이가 잘 일어나는 세포주에서 발현이 현저히 낮게 나타나는 것을 확인함으로써 발굴한 것으로 상기 마커 유전자를 녹다운 시킬 경우, 전립선 암세포의 침윤과 이동이 증가되는 것을 확인하였다.
- [0092] (c) 본 발명의 마커는 전립선암 전이를 예측할 수 있는 신규한 바이오마커로서 전립선암 전이 기전 연구 및 항암제 개발에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0094] 도 1은 전립선암 세포주에서 SFMBT2 발현 정도를 비교한 결과이다.

좌측 패널: 실시간-PCR 결과, 우측 패널: SFMBT2 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 결과.

도 2는 SFMBT2 녹다운에 의한 전립선암 세포주의 침윤 및 이동 변화를 측정된 결과이다.

(A) SFMBT2 녹다운에 의해 SFMBT2 발현을 억제한 결과. 좌측 패널: 실시간-PCR, 우측 패널: SFMBT2 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 결과. (B) SFMBT2 녹다운에 의한 세포 이동 변화를 측정된 결과. (C) SFMBT2 녹다운에 의한 세포 침윤 감소.

도 3은 SFMBT2 녹다운에 의한 MMP-2, MMP-3, MMP-9의 발현 변화를 측정된 결과이다.

(A) 실시간-PCR 결과, (B) 웨스턴 블롯팅 결과.

도 4는 전립선암 환자 조직에서 SFMBT2 발현 정도를 측정된 결과이다.

좌측 패널: SFMBT2 항체를 이용하여 전립선암 환자 조직에서 SFMBT2 발현 정도를 측정된 결과, 우측 패널: 글리슨 점수가 7-8 이상인 경우 SFMBT2 발현이 낮음 (low).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0095] 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.

[0097] 실시예

[0098] 연구방법

[0099] 세포배양

[0100] RWPE-1, LNCaP, PC3 그리고 Du145 세포주는 ATCC(American Type Culture collection)로부터 구입하였다. PC3 세포주는 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액에서 유지하였고 RWPE-1, LNCaP, Du145 세포주는 FBS가 포함된 RPMI 배양액에서 유지하였다.

[0102] *siRNA(small interfering RNA) 형질감염을 통한 SFMBT2 녹다운*

[0103] LNCaP 세포주에 인간 *SFMBT2* 유전자의 siRNA(M-026395-01-0005, Dharmacon) 또는 대조군 siRNA(D-001210-02-05, Dharmacon)를 형질감염시켰다. *SFMBT2* 녹다운을 위해 4개의 siRNA를 혼합하였다(GGUGUGAAGCCAAUUCUUA, GCAAAGCGUGCUGGUUCU, AGAACAACCCGGACACGUA, CUGGAUAGUUAGUGUGAUU). 대조군 siRNA 서열은 UAAGGCUAUGAAGAGAUAC이다.

[0105] *SFMBT2의 녹다운에 의한 LNCaP 세포주의 이동과 침윤*

[0106] SFMBT2가 녹다운된 LNCaP 세포주의 이동을 조사하기 위해 트랜스웰 챔버 (Transwell chamber) (corning Costar)를 사용하였다. 먼저 챔버의 아래쪽에 10% FBS가 포함된 RPMI 배양액을 넣고 윗부분에는 LNCaP 세포주를 배양하였다. 인간 *SFMBT2* 유전자의 siRNA(M-026395-01-0005, Dharmacon) 또는 대조군 siRNA(sc-37007, Santa Cruz Biotechnology)를 형질감염시켰다. 48시간 후 폴리카르보네이트 필터를 통해 이동한 세포는 cresyl violet으로 염색하였고 이동된 세포의 수는 현미경($\times 100$)을 이용하여 정량하였다. 침윤 연구는 매트릭셀이 코팅된 매트릭셀 침윤 챔버(Invasion chamber)(BD Biosciences)를 사용하여 전이와 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[0108] *RNA 추출 및 실시간-PCR*

[0109] 세포주에 TRIZOL를 넣고 파쇄한 후 클로로포름을 넣고 4℃, 13,000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 새 튜브에 옮겨 같은 부피의 이소프로판올을 첨가한 후 다시 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. RNase free DNase I을 처리하여 지노믹 DNA를 제거하고 cDNA synthesis kit (takara)를 이용하여 RNA로부터 cDNA로 합성하였다.

유전자에 특이적인 프라이머(표 1)를 합성하여 cDNA를 이용하여 실시간-PCR을 수행함으로써 유전자들의 발현 정도를 측정하였다.

표 1

프라이머 서열

유전자	정방향 프라이머	역방향 프라이머
SFMBT2	5' -TGACGTAGTCATCGCGGATTT-3'	5' -ACCAGTCAAGTCACGTATGAGAA-3'
MMP-2	5' -TACAGGATCATTGGCTACACACC-3'	5' -GGTCACATCGCTCCAGACT-3'
MMP-3	5' -AGTCTTCCAATCCTACTGTTGCT-3'	5' -TCCCGTCACCTCCAATCC-3'
MMP-9	5' -AGGACGGCAATGCTGATG-3'	5' -TCGTAGTTGGCGGTGGTG-3'
GAPDH	5' -AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	5' -TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

웨스턴 블롯팅

세포주로부터 RPIA 버퍼를 이용하여 단백질을 분리하였다. 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 5% 논팻 밀크(nonfat milk)로 블로킹하고 일차 항체인 항-SFMBT2 항체(Novex), 항-MMP-2 항체(Abcam), 항-MMP-3 항체(Santa Cruz Biotechnology), 항-MMP-9 항체(Abcam), 항-β-액틴 항체(Sigma-Aldrich))를 붙인 후 호스레디쉬 퍼옥시다아제(horseradish-peroxidase, HRP)가 붙어있는 2차 항체인 항-마우스 IgG-HRP 항체(Santa Cruz Biotechnology) 또는 항-토끼 IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology)를 붙인 후 ECL 시스템을 이용하여 발광시켰다.

면역조직 화학염색

조직 슬라이드는 파라핀을 제거하고 탈수과정을 거친 후 Epitomic retrieval solution(pH 9.0)을 100℃에서 20분간 처리하였다. 3% H₂O₂를 5분간 처리하여 내부의 퍼록시다아제 활성을 억제하였고 anti-SFMBT2 antibody(Novex)를 실온에서 1:150으로 처리하였다. Leica BOND-MAX를 이용하여 2차 항체인 항-토끼 HQ HRP (Roch)를 처리하고 DAB 염색을 거친 후 헤마톡실린으로 염색하였다.

실험결과

SFMBT2의 발현 양상

실시간-PCR과 웨스턴 블롯팅 방법을 통해 다양한 전립선암 세포주에서의 SFMBT2 발현 양을 조사하였다. 정상 전립선 세포주인 RWPE-1과 전이가 잘 되지 않는(poorly metastatic) LNCaP 세포주에 비해 전이가 잘된다고 알려진(highly metastatic) PC3와 Du145 세포주에서는 SFMBT2의 발현이 낮음을 확인하였다(도 1).

SFMBT2의 녹다운에 의한 LNCaP 세포주의 침윤(invasion)과 이동(migration) 증가

암세포의 전이 능력은 세포의 이동과 침윤 능력을 통해 측정할 수 있다. 전이 능력이 매우 낮은 LNCaP 전립선암 세포주의 SFMBT2 발현을 siRNA를 이용하여 녹다운(knock-down) 시켰을 때 세포의 이동과 침윤 능력이 증가함을 트랜스웰 실험을 통해 확인하였다.

LNCaP 세포주에서 SFMBT2의 녹다운에 의한 MMP-2, 3, 9 발현의 증가

분자생물학적으로 암세포의 전이 능력은 MMP(matrix metalloproteinase)의 발현 및 활성 증가와 연관이 있다. LNCaP 세포주에서 SFMBT2를 녹다운시켰을 때 암세포의 전이를 촉진한다고 알려진 MMP-2, MMP-3, MMP-9의 발현이 증가함을 확인하였다.

[0129] 전립선암 환자의 조직에서 SFMBT2의 발현양상

[0130] 면역조직 화학염색 방법(Immunohistochemistry)을 이용하여 실제 전립선암 환자의 조직에서 SFMBT2의 발현 양상을 확인하였다. 즉, 전립선암의 예후 예측에 중요한 글리슨 점수(Gleason score)가 높을수록(≥ 8) SFMBT2의 발현 양이 감소함을 확인하였다. 일반적으로 글리슨 점수가 7-8 이상인 경우, 전이가 잘 일어나며 예후가 좋지 않다.

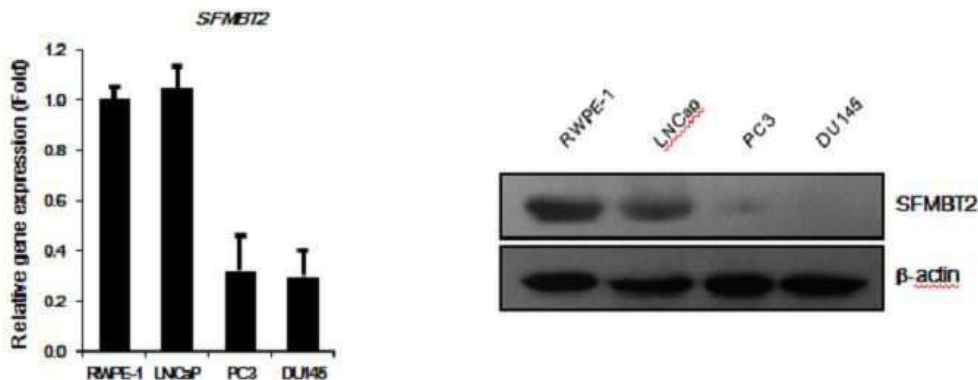
[0132] 결론

[0133] 정상 전립선 세포주와 전립선암 세포주들에서 PcG 단백질 중 하나인 SFMBT2의 발현 양을 비교해본 결과 전이가 잘 되는 세포주에서 SFMBT2의 발현이 낮은 것을 확인할 수 있었다. SFMBT2가 전립선암의 전이에 중요하게 작용하는지 확인하기 위해 전이가 거의 일어나지 않고 SFMBT2 발현이 많은 전립선암 세포주인 LNCaP 세포주의 SFMBT2를 녹다운 시켰을 때 LNCaP 세포의 침윤과 이동이 증가되었고 암 세포의 성장과 전이에 중요한 기능을 한다고 알려진 MMP-2, MMP-3, MMP-9의 발현도 증가되었다. SFMBT2의 발현과 실제 전립선암의 병기와 예후를 예측할 수 있는 글리슨 점수와 비교해보았을 때, 점수가 높을수록 즉, 전립선암의 악성도가 높을수록 SFMBT2의 발현이 낮은 것을 관찰하였다. 따라서 SFMBT2의 발현이 전립선암의 전이를 예측할 수 있는 새로운 바이오 마커가 될 수 있으며 전립선암 전이 기전 연구와 항암제 개발의 새로운 타겟이 될 수 있다.

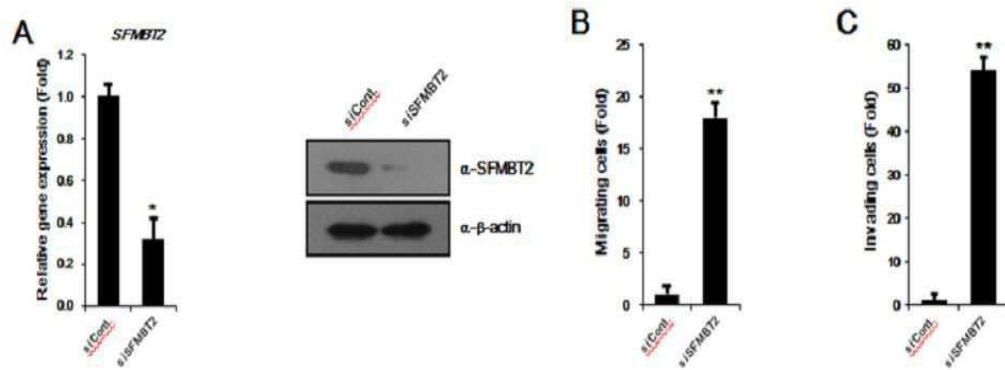
[0135] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

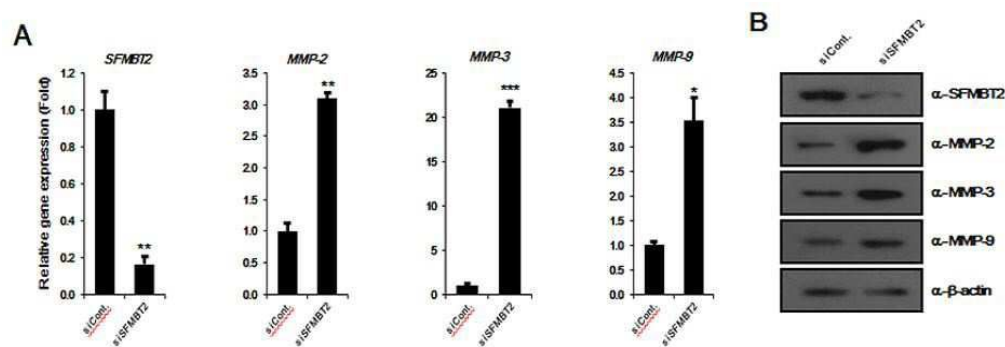
도면1



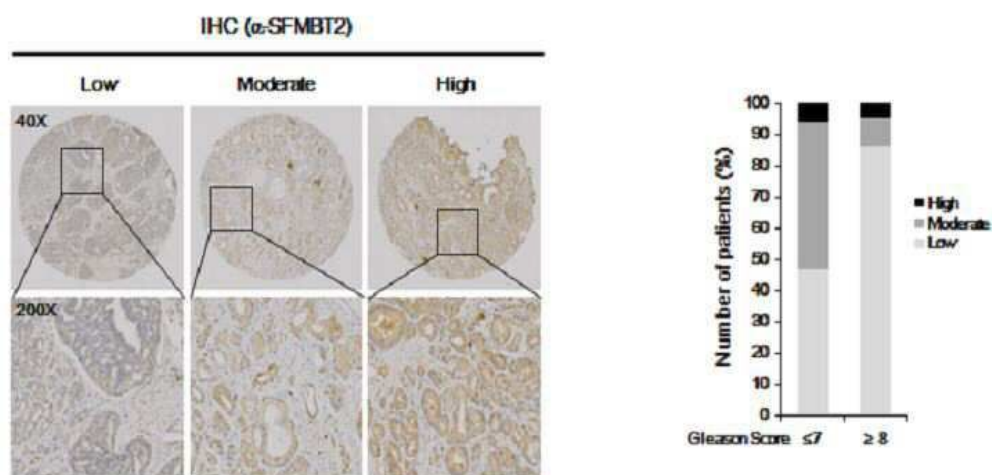
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> Biomarker Indicative of Prostate Cancer Metastasis and Uses Thereof

<130> PN150342

<160> 15
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SFMBT2 siRNA-1
 <400> 1
 ggugugaagc caauucuua 19
 <210> 2
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SFMBT2 siRNA-2
 <400> 2
 gcaaaugcgu gcugguucu 19
 <210> 3
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SFMBT2 siRNA-3
 <400> 3
 agaacaaccc ggacacgua 19
 <210> 4
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SFMBT2 siRNA-4
 <400> 4
 cuggauaguu agugugauu 19
 <210> 5
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Control siRNA

<400>	5	
uaaggcuaug aagagauac		19
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SFMBT2 Forward Primer	
<400>	6	
tgacgtagtc atcgcggtt t		21
<210>	7	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SFMBT2 Reverse Primer	
<400>	7	
accagtcaag tcacgtatga gaa		23
<210>	8	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP-2 Forward Primer	
<400>	8	
tacaggatca ttggctacac acc		23
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP-2 Reverse Primer	
<400>	9	
ggtcacatcg ctccagact		19
<210>	10	
<211>	23	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-3 Forward Primer

<400> 10

agtcttccaa tcctactgtt gct 23

<210> 11

<

211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-3 Reverse Primer

<400> 11

tccccgtcac ctccaatcc 19

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-9 Forward Primer

<400> 12

aggacggcaa tgctgatg 18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-9 Reverse Primer

<400> 13

tcgtagttgg cggtggtg 18

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH Forward Primer

<400> 14

aggtcgggtg gaacgattt g 21

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH Reverse Primer

<400> 15

tgtagaccat gtagttgagg tca

23