

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2012년 2월 16일 (16.02.2012)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/020965 A2

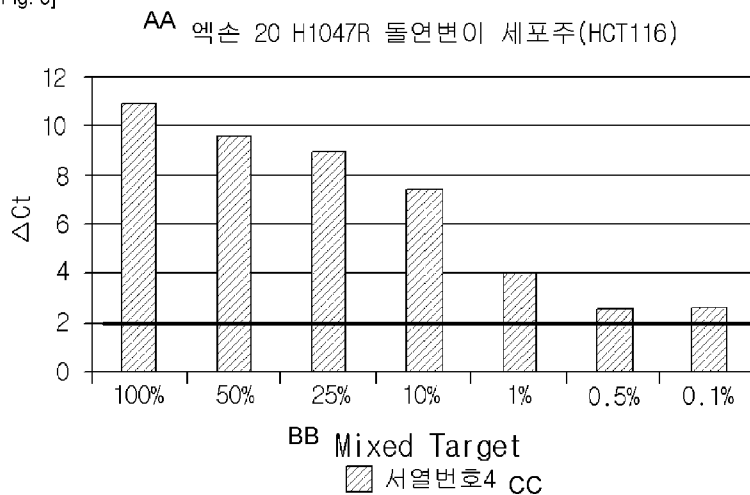
- (51) 국제특허분류: C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/005787
- (22) 국제출원일: 2011년 8월 9일 (09.08.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0078144 2010년 8월 13일 (13.08.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 파나진 (PANAGENE INC.) [KR/KR]; 경상북도 영천시 도남동 200, 770-130 Gyeongsangbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 박희경 (PARK, Hee Kyung) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 용산동 테크노밸리 1106 동 301 호, 305-500 Daejeon (KR). 최재진 (CHOI, Jae Jin) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 봉산동 휴먼시아 아파트 111-206, 305-763 Daejeon (KR). 김현선 (KIM, Hyun Sun) [KR/KR]; 충청남도 천안시 동남구 원성동 545-3 번지 삼우연립 B 동 206 호, 306-060 Chungcheongnam-do (KR).
- (74) 대리인: 권오식 (KWON, Oh-Sig) 등; 대전광역시 서구 둔산동 921 주은리더스텔 4층, 302-120 Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PIK3CA MUTATION DETECTION METHOD AND KIT USING REAL-TIME PCR CLAMPING OF PNA

(54) 발명의 명칭 : PNA의 실시간 PCR 클램핑을 이용한 PIK3CA 돌연변이 검출 방법 및 키트

[Fig. 6]



AA ... Exon 20 H1047R Mutant Cell Line (HCT116)
 BB ... Mixed Target
 CC ... Sequence Number 4

(57) Abstract: The present invention relates to a method for selectively detecting only mutation, by using a PNA (peptide nucleic acid) probe that binds specifically to the wild types of PIK3CA gene exon 9 or 20 such that wild-type amplification is inhibited, and the present invention also relates to a kit for use with the method.

(57) 요약서: 본 발명은 PIK3CA 유전자 엑손 9 또는 20의 야생형과 특이적으로 결합하는 PNA(Peptide Nucleic Acid) 프로브를 이용하여 야생형의 증폭을 억제함으로써 돌연변이만을 선택적으로 검출하는 방법 및 상기 방법에 사용하기 위한 키트에 관한 것이다.



WO 2012/020965 A2

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: PNA의 실시간 PCR 클램핑을 이용한 PIK3CA 돌연변이 검출 방법 및 키트

기술분야

- [1] 본 발명은 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid, 이하 'PNA'라 함) 프로브를 이용한 PIK3CA(Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide) 유전자의 돌연변이 검출에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, PIK3CA 유전자의 엑손 9 또는 20의 돌연변이 검출을 위하여 야생형에 특이적으로 결합하는 PNA 프로브가 야생형의 증폭을 억제함으로써 소량의 돌연변이형만을 높은 민감도로 검출하는 방법 및 상기 방법에 사용하기 위한 키트에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암의 발생에 암유전자(oncogene) 및 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 돌연변이가 관여한다는 사실이 알려지면서 여러 암유전자 및 종양억제유전자의 돌연변이를 검출하는 연구가 다양하게 진행되고 있다. 이에 따라, 암의 발생 및 약물의 예후판단에 관여하는 많은 돌연변이가 발견되고 있다. 이 중 PIK3CA 유전자의 돌연변이는 PI3K(Phosphatidylinositol 3-kinase) 단백질의 활성화를 가져오고 PI3K는 타이로신 키나제 수용체의 신호전달 체계를 활성화한다. 활성화된 타이로신 키나제는 세포의 생존과 분열을 억제하는 단백질의 기능과 대사촉진을 방해하며 세포 성장을 돕는 단백질의 기능을 활성화시킴으로써 발암과정에 관여한다(Serena Di et al., Clin Cancer Res. 2009 August 15;15(16), 5017-5019). PIK3CA 유전자변이의 75%가 PI3K 단백질의 헬리컬(helical) 부위로 번역되는 엑손 9번과 키나제 부위로 번역되는 엑손 20번 위치에서 점 돌연변이(point mutation)로 발견되며, 그 외 매우 다양한 위치에서 산발적으로 나타난다(Ligresti G et al., Cell cycle 2009 May 1;8:9, 1352-1358). 이러한 PIK3CA 유전자 변이는 매우 다양한 암에서 발견되며, 특히 대장암, 위암, 폐암, 췌장암, 두부 편평상피세포암, 교모세포종, 자궁내막암, 난소암, 유방암 등에서 25 내지 40% 비율로 나타난다고 보고되어 있다(Ligresti G et al., Cell cycle 2009 May 1;8:9, 1352-1358, Barbi S et al., J Exp Clin Cancer Res. 2010 Apr 16;29, 32, Kalinsky K et al., Clin Cancer Res. 2009 August 15;15(16), 5049-5059, Gallia GL et al., Mol Cancer Res. 2006 Oct;4(10):709-14, Ogino S et al., J Clin Oncol. 2009 Mar 20;27(9):1477-84, Oda K et al. Cancer Res. 2005 Dec 1;65(23):10669-73). PIK3CA 유전자 돌연변이는 암 진행 속도를 빠르게 하고 전이 빈도를 증가시켜 환자의 예후를 악화시킨다. 또한 인간 표피성장인자류(Human Epidermal Growth Factor, HER family)의 하류부분(downstream)의 신호전달 체계에 속하여 HER 패밀리의 표적 치료제들의 내성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Wee S et al., Cancer Res. 2009 May 15;69(10):4286-93, Guo XN et al., Cancer Res. 2007 Jun 15;67(12):5851-8,

Ogino S et al., J Clin Oncol. 2009 Mar 20;27(9):1477-84). 최근 보고된 논문에 의하면, HER2 유전자가 증폭된 유방암에 티로신 키나제 일종인 허셉틴(Herceptin)이라는 약제의 처방이 치료예후를 좋게 하는 것으로 알려져 있지만, HER2 유전자의 증폭과 더불어 PIK3CA 유전자의 돌연변이를 가질 경우 허셉틴에 대한 내성을 가진다고 보고되어 있다(O'Brien NA et al., Mol Cancer Ther. 2010 Jun;9(6):1489-502). PI3K는 이를 표적으로 하는 치료제의 개발에 중요한 요소로 그 중요성이 증가되고 있다. 따라서 PIK3CA 돌연변이 검출은 인간 표피성장인자를 표적으로 치료하는 방법에 있어 치료효과를 예측할 수 있는 중요한 지표이며 좋은 예후에 결정적인 역할을 할 수 있다.

- [3] PIK3CA 돌연변이의 검출 방법으로는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 후 염기서열분석을 통한 변이 검출 방법, 야생형과 돌연변이 유전자의 3차원적인 구조(conformation) 차이에 따른 전기영동상 이동 거리의 변화를 통해 검출하는 방법인 중합효소연쇄반응-단일쇄 형태구조 다형성(Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism; PCR-SSCP) 방법(EI-Habr EA et al., Clin Neuropathol. 2010 Jul-Aug;29(4):239-45) 등이 사용되어 왔다. 그러나 상기 방법들은 PCR 이후 제한효소로 절단하는 과정 및 전기영동의 과정, 염기서열분석의 단계를 거쳐 돌연변이를 검출하는 방법이므로 반응시간이 오래 소요되고 번거로우며 많은 비용이 소요된다. 또한 임상 시료는 돌연변이가 야생형에 비해 아주 극소량 존재하는 경우가 많기 때문에, 소량의 돌연변이를 검출하는 것이 매우 중요함에도 불구하고, 상기의 방법은 낮은 검출 민감도를 가지므로 극소량의 돌연변이의 검출이 어렵다.
- [4] 민감도를 증가시키기 위해 야생형과 돌연변이간의 용융온도 차이를 이용하여 돌연변이만을 선택적으로 검출하는 고감도 용융온도분석(high-resolution melting curve analysis, HRMA) 방법, 스코피언(scorpion) 프로브를 이용하여 돌연변이를 선택적으로 검출하는 스코피언 실시간 대립형질 특이적 PCR(scorpion Real-time allele specific PCR)(DxS' scorpions and ARMS) 방법 등이 사용되고 있다(Simi L et al., Am J Clin Pathol. 2008 Aug;130(2):247-53, Board RE et al., Clin Chem. 2008 Apr;54(4):757-60). 이러한 기술은 쉽고 빠르게 다양한 진단에 적용이 가능하며, 암 관련 유전자의 변이 진단 및 분석을 위해 좋은 기술이 되고 있다(Bernard et al., Clin Chem. 2002 Aug;48(8):1178-85). 그러나 상기한 방법은 돌연변이를 검출하기 위하여 돌연변이가 발생하는 부위에 각각 프로브나 프라이머를 모두 사용해야 하기 때문에 하나의 돌연변이를 검출하기 위하여 여러 반응이 요구되는 번거로움이 있다(Simi L et al., Am J Clin Pathol. 2008 Aug;130(2):247-53, Board RE et al., Clin Chem. 2008 Apr;54(4):757-60).
- [5] 최근에는 돌연변이형을 선택적으로 검출하는 기술로 상기한 방법과는 달리 야생형에 특이적으로 결합하는 PNA 프로브를 이용하여 다량 존재하는 야생형의 증폭을 억제하는 방법으로 돌연변이를 선택적으로 검출하는 PNA 클램핑(clamping) 기술이 개발되었다. PNA는 핵산염기가 인산 결합이 아니라

펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1991년에 처음 보고되었다(Nielsen PE et al., Science 1991 Dec 6;254(5037):1497-500). PNA는 화학적인 방법으로 합성되고 자연계에서는 발견되지 않는다. PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 겹가닥을 형성한다. 핵산 염기의 수가 같은 경우 PNA/DNA 겹가닥은 DNA/DNA 겹가닥보다, PNA/RNA 겹가닥은 DNA/RNA 겹가닥보다 안정하다. PNA의 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이고, 이 경우 펩티드 핵산의 기본 골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본 골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산 염기(nucleobase)는 DNA의 핵산 염기와 비슷한 공간을 차지하고 핵산 염기 사이의 거리도 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(Nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다. PNA는 또한 전기적으로 중성이기 때문에 PNA/DNA, PNA/RNA 겹가닥의 안정성은 염 농도에 영향을 받지 않는다. 이러한 성질 때문에 PNA는 상보적인 핵산 염기 서열을 천연 핵산보다 더 잘 인식할 수 있어서 진단 또는 다른 생물학적, 의학적 목적으로 응용된다. PNA 클램핑 기술은 상기한 PNA의 장점을 이용하여 PNA 프로브가 완벽하게 결합되면 효소 등이 인지하지 못하여 증폭반응이 일어나지 않고, 점 돌연변이가 있는 경우에는 PNA 프로브가 완벽하게 결합하지 못하기 때문에 증폭반응이 일어나게 되는 원리를 이용하는 방법으로, 야생형에 비해 극소량 존재하는 돌연변이를 빠르고 정확하게 검출할 수 있어 많이 이용되고 있다.

- [6] 미국공개특허 제2008/0176226호는 표적핵산의 선택된 부위를 증폭하는 프라이머 세트와 야생형의 상기 선택된 부위와 완벽하게 결합하는 PNA 프로브 존재 하에 PCR을 수행하고, 얻어진 PCR 산물에 대해 용융곡선 분석을 수행하여 표적핵산의 돌연변이를 검출하는 방법 및 키트를 개시하고 있다. 그러나 상기 방법은 증폭반응의 사이클 수가 아닌 용융곡선의 차이로 돌연변이형을 구별하게 되는데, PNA 클램핑 프로브 이외에 용융곡선을 측정하기 위한 형광을 검출할 수 있는 공여체 형광물질(donor fluorophore)과 수용체(acceptor)가 부착되어 있는 프로브를 필요로 한다. 이와 같이 형광이 표지된 프로브를 다량 포함하여 검출을 하게 되므로 분석을 위한 비용이 높아지는 문제점이 발생한다. 또한, 상기 미국공개특허는 K-ras 돌연변이를 검출하기 위하여 N-말단에 플루오레세인으로 표지된 17mer PNA(센서 프로브)와 3'-말단에 LC-Red 640으로 표지된 44mer DNA(앵커 프로브)를 이용한 예만을 구체적으로 개시하고 있을 뿐, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출에 대해서는 어떠한 교시나 암시도 하지 않았다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 PIK3A 유전자에 대하여, 비교적 길이가 긴(예: 15mer 이상) PNA 클램핑 프로브를 이용하여 야생형과의 증폭 사이클 차이만으로 변이형을 검출함으로써 용융곡선의 차이를 이용한 변이형 검출 기술보다 간편할 뿐만 아니라, 다량의 야생형의 증폭을 완벽하게 저해하여 변이형의 검출 민감도를 향상시킴으로써 극소량 섞여있는 돌연변이를 높은 민감도로 신속 정확하게 검출할 수 있는, PNA 기반의 실시간 PCR 클램핑을 이용한 PIK3CA 돌연변이 검출 기술을 완성하였다.
- [8] 본 발명의 목적은 PNA 기반의 실시간 PCR 클램핑을 이용한 PIK3CA 돌연변이 검출 방법을 제공하기 위한 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 PNA 기반의 실시간 PCR 클램핑을 이용한 PIK3CA 돌연변이 검출 키트를 제공하기 위한 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명의 일 면은
- [11] PIK3CA 유전자의 엑손 9 또는 엑손 20 부위를 증폭시키는 PIK3CA 유전자 클램핑 프라이머 세트와, PIK3CA 유전자의 엑손 9 또는 엑손 20의 야생형과 완전하게 결합하는 PNA(Peptide Nucleic Acid) 클램핑 프로브의 존재 하에, PIK3CA 유전자에 대해 실시간 PCR(real-time Polymerase Chain Reaction)을 수행하고;
- [12] 상기 실시간 PCR에 의한 유전자 증폭을 분석하여 PIK3CA 유전자의 돌연변이 유무 또는 농도를 결정하는;
- [13] 단계를 포함하는, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법에 관한 것이다.
- [14] 본 발명의 바람직한 태양에서는, 실시간 PCR의 C_t (cycle threshold)값을 측정하여 PIK3CA 유전자의 돌연변이 유무 또는 농도를 결정한다.
- [15] 본 발명에 사용되는 PNA 클램핑 프로브는 바람직하게는 15 내지 30mer, 보다 바람직하게는 17 내지 24mer 길이의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1 내지 31의 염기서열 중 어느 하나로 이루어지는 것일 수 있다.
- [16] 본 발명에 사용되는 PIK3CA 유전자 클램핑 프라이머 세트는 PIK3CA 유전자 엑손 9 야생형 코돈 542, 545 또는 546, 또는 엑손 20 야생형 코돈 1047의 상류부분에 특이적으로 결합하는 정방향 프라이머와, 그의 하류부분에 특이적으로 결합하는 역방향 프라이머를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 정방향 프라이머는 서열번호 36, 37, 41 및 42 중 어느 하나로 이루어지는 것이고, 역방향 프라이머는 서열번호 33, 35, 및 38 내지 40 중 어느 하나로 이루어지는 것일 수 있다.
- [17] 본 발명에서는, DNA 인터칼레이팅(intercalating) 형광물질을 사용하여 유전자 증폭을 분석하는바, 예를 들어 SYBR 그린 I, 에버그린, 에티디움브로마이드(EtBr), BEBO, YO-PRO-1, TO-PRO-3, LC 그린, SYTO-9,

SYTO-13, SYTO-16, SYTO-60, SYTO-62, SYTO-64, SYTO-82, POPO-3, TOTO-3, BOBO-3 및 SYTOX 오렌지로 구성된 그룹으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다. DNA 인터칼레이션(intercalation)이 가능한 형광물질은 어느 것이라도 사용가능하며 특별한 제한은 없다.

- [18] 본 발명에 따른 방법은 대장암, 위암, 폐암, 췌장암, 두부 편평상피세포암, 교모세포종, 자궁내막암, 난소암 또는 유방암의 치료를 결정하거나 진단하는데 사용할 수 있다.
- [19] 본 발명의 다른 면은
- [20] 서열번호 1 내지 31 중 어느 하나의 PNA 클램핑 프로브;
- [21] 를 포함하는, 본 발명에 따른 PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출방법에 사용하기 위한 키트에 관한 것이다.

[22]

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 PNA 기반의 PCR 클램핑 원리를 나타내는 모식도이고;
- [24] 도 2는 본 발명에서 고안된 서열번호 7 내지 11의 PNA 프로브를 이용하여 PIK3CA 엑손 9 코돈 542 돌연변이를 검출하는 프로브를 선별하기 위하여 프로브에 따른 검출 민감도(C_t)를 비교한 그래프이며;
- [25] 도 3은 본 발명에서 고안된 서열번호 12, 13, 14, 16 및 17의 PNA 프로브를 이용하여 PIK3CA 엑손 9 코돈 545 돌연변이를 검출하는 프로브를 선별하기 위하여 프로브에 따른 검출 민감도(C_t)를 비교한 그래프이고;
- [26] 도 4는 본 발명에서 고안된 서열번호 1 내지 6의 PNA 프로브를 이용하여 PIK3CA 엑손 20 코돈 1047 돌연변이를 검출하는 프로브를 선별하기 위하여 프로브에 따른 검출 민감도(C_t)를 비교한 그래프이며;
- [27] 도 5는 PIK3CA 엑손 9 코돈 545 돌연변이를 가진 세포주를 대상으로 본 발명에서 고안된 서열번호 12 및 13의 PNA 프로브를 이용하여 샘플적용 양에 따른 검출 민감도(C_t)를 비교한 그래프이고;
- [28] 도 6은 PIK3CA 엑손 20 코돈 1047 돌연변이를 가진 세포주를 대상으로 본 발명에서 고안된 서열번호 4의 PNA 프로브를 이용하여 돌연변이 포함 농도에 따른 검출 민감도(C_t)를 비교한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [29] 본 발명은 PIK3CA 유전자의 엑손 9 또는 20의 돌연변이 검출을 위하여 야생형에 특이적으로 결합하는 PNA 프로브가 야생형의 증폭을 억제함으로써 소량의 돌연변이형만을 높은 민감도로 검출하는 방법 및 상기 방법에 사용하기 위한 키트에 관한 것이다. 도 1에 본 발명에 따른 방법의 원리를 모식적으로 나타내었다. 구체적으로, 본 발명은 아래 표 1에 열거된 PIK3CA 유전자의 엑손 9 또는 20의 돌연변이 검출을 위한 것이다.

[30]

[31] 표 1

[Table 1]

엑손	단백질	아미노산	염기서열
Exon9	Helical	Gly542Lys	1624
Exon9	Helical	Gly545Lys	1633
Exon9	Helical	Gly545Gly	1634
Exon9	Helical	Gly545Asp	1635
Exon9	Helical	Gln546Gly, Gln546Lys	1636
Exon9	Helical	Gln546Pro, Gln546Arg	1637
Exon20	Kinase	His1047Tyr	3139
Exon20	Kinase	His1047Leu, His1047Arg	3140

[32]

[33] **1. PNA 클램핑 프로브의 설계 및 제작**

[34] 본 발명의 PNA 프로브는 PIK3CA 엑손 9 및 20의 돌연변이(치환 포함)가 발생하는 부분의 야생형 유전자 서열에 완벽하게 결합할 수 있는(perfectly matched) 것으로서, 15개 이상, 바람직하게는 15~30개, 보다 바람직하게는 17~27개, 가장 바람직하게는 17~24개의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 PNA 프로브는 PIK3CA 엑손 9 및 20의 돌연변이(치환 포함)가 발생하는 부분의 야생형 유전자 부위가 프로브의 가운데에 위치하도록 고안된 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 PNA 프로브는 아래 표 2에 기재한 서열번호 1 내지 31 중 어느 하나의 염기서열로 구성될 수 있다. 상기 염기서열로부터 당업자가 통상의 지식을 이용하여 용이하게 변형할 수 있는 범위 내의 PNA 프로브 서열들은 모두 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 보아야 할 것인바, 본 발명에 따른 PNA 기반의 실시간 PCR 클램핑을 이용하여 증폭 사이클 차이만으로 PIK3CA 유전자 엑손 9 및 20의 돌연변이를 효과적으로 검출할 수 있는 것인 한, 본 발명의 범위 내에 포함되는 것이다.

[35] 구체적으로는, 서열번호 7 내지 11은 PIK3CA 엑손 9의 코돈 542의 야생형과 완벽하게 결합하여 야생형의 증폭을 저해하고 돌연변이를 검출하기 위한 프로브이다. 코돈 542에서의 치환은, 뉴클레오티드 1624의 구아닌이 아데닌으로 치환되어 코돈 542의 야생형 글루탐산이 라이신으로 치환되어 PI3K 단백질의 헬리컬(helical) 구조 부분에 변이를 준다. 서열번호 7 내지 11은 PIK3CA 엑손 9의 코돈 542를 포함하는 1624번째 염기에 특이적으로 혼성화되도록 고안되었다. 서열번호 9 내지 31은 PIK3CA 엑손 9의 코돈 545 부분의 야생형과 완벽하게 결합하여 야생형의 증폭을 저해하고 돌연변이를 검출하기 위한 프로브이다. 코돈 545에서의 치환은, 뉴클레오티드 1633의 구아닌이 아데닌으로 치환되어

코돈 545의 야생형 글루탐산이 라이신으로 치환되는 것, 뉴클레오티드 1634의 아데닌이 구아닌으로 치환되어 코돈 545의 야생형 글루탐산이 글리신으로 치환되는 것, 뉴클레오티드 1635의 구아닌이 티민으로 치환되어 코돈 545의 야생형 글루탐산이 아스파라긴산으로 치환되는 것을 포함한다. 서열번호 1 내지 6은 엑손 20의 코돈 1047를 포함하는 3140번째 염기에 특이적으로 혼성화 되도록 고안되었다. 서열번호 1 내지 6은 PIK3CA 엑손 20의 코돈 1047의 야생형과 완벽하게 결합하여 야생형의 증폭을 저해하고 돌연변이를 검출하기 위한 프로브이다. 코돈 1047에서의 치환은, 뉴클레오티드 3140의 아데닌이 구아닌 또는 티민으로 치환되어 코돈 1047의 야생형 히스티딘이 아르기닌 또는 류신으로 치환되어 PI3K 단백질의 키나제 부분에 변이를 준다.

[36]

[37] 표 2

[Table 2]

서열번호	이름	서열(5'→3')	길이
1	H1047-1	AATTATGCACATCATGGTGGC	21
2	H1047-2	AATTATGCACATCATGGTGGCT	22
3	H1047-3	GATTCACATCATGGTGGC	18
4	H1047-4	ATTATGCACATCATGGTGGC	20
5	H1047-5	TTATGCACATCATGGTG	17
6	H1047-6	ATTCACATCATGGTGGC	17
7	E542-1	ATCCTCTCTCTGAAATCACTGA	22
8	E542-2	TCTCTGAAATCACTGAGCAG	20
9	E542_E545-1	CCTCTCTCTGAAATCACT	18
10	E542_E545-2	GATCCTCTCTCTGAAATCACT	21
11	E542_E545-3	ATCCTCTCTCTGAAATCACTG	21
12	E545-546-1-as	TCTTTCTCCTGCTCAGTSATTT	22
13	E545-546-2-as	TCTTTCTCCTGCTCAGTSATTTAG	24
14	E545-546-3-as	TTTCTCCTGCTCAGTSATTT	20
15	E545-546-4-s	CTTAAATCACTGAGCAGGA	19
16	E545-546-5-s	AATCACTGAGCASSAGA	17
17	E545-546-6-s	TCTTAAATCACTGAGCAGG	19
18	E545-546-7-s	AAATCACTGAGCAGGAGAAA	20
19	E545-546-8-s	AAATCATTGAGCAGGAGAAA	20
20	E545-546-9-s	AAATCACTGASCAGGAGAAA	20
21	E545-546-10-s	AAATCACTGASCAGSAGAAA	20
22	E545-546-11-as	TTCTCCTGCTCAGTGATTT	19
23	E545-546-12-as	TTTCTCCTGCTCAGTGATTTTAG	23
24	E545-546-13-as	CTTTCTCCTGCTCAGTGATTT	21
25	E545-546-14-as	TCTTTCTCCTGCTCATTGATTT	22
26	E545-546-15-as	AATCTTTCTCCTGCTCATTGATTT	24
27	E545-546-16-as	TCTTTCTCCTGCTCAGTGATTT	22
28	E545-546-17-s	AAATCACTGAGCAGGAGAAAGA	22
29	E545-1-as	TTCTCCTGCGCAGTGATTT	19

30	E545-2-as	TTTCTCCTGCGCAGTGATTTTAG	23
31	E545-3-as	CTTTCTCCTGCGCAGTGATTT	21

[38]

[39]

본 발명의 PNA 프로브는 반응효율 및 용해도를 증가시키기 위하여 N-말단(N-terminal) 또는 C-말단(C-terminal)에 친수성 기능을 포함할 수 있으며, 예를 들어 N-말단 또는 C-말단에 친수성 링커나 아미노산, 또는 아민기를 1개 내지 여러 개 포함할 수 있다[Shakeel et al., J. Chem. Technol. Biotechnol., 2006, 81, 892-899; Gildea et al., Tetrahedron Lett., 1998, 39, 7255-7258; Demidov et al., PNAS, 2002, 99, 5953-5958; Wang et al., Anal. Chem., 1997, 69, 5200-5202]. 구체적으로, 본 발명에서는 N-말단에 라이신(lysine)이 1개 부착되거나, N-말단과 C-말단에 라이신(lysine)이 1개씩 부착된 프로브를 사용하였다.

[40]

본 발명에서 사용되는 PNA 올리고머는 한국등록특허 제464,261호의 방법에 따라 Bts(Benzothiazolesulfonyl)기로 보호된 PNA 단량체, 또는 공지의 Fmoc(9-flourenylmethoxycarbonyl) 또는 t-Boc(t-butoxycarbonyl)으로 보호된 PNA 단량체를 이용하여 합성될 수 있다(Dueholm et al., J Org chem. 59(19): 5767-5773, 1994; Christensen J peptide Sci 1(3): 175-183, 1995; Thomson et al., Tetrahedron 51(22): 6179-6194, 1995).

[41]

[42]

2. PIK3CA 유전자 클램핑 프라이머의 설계 및 제작

[43]

본 발명에서 "PIK3CA 유전자 클램핑 프라이머"라 함은 PNA 프로브와 완벽하게 결합되어 있는 야생형 유전자의 증폭은 억제하고 PNA 프로브와 완벽하게 결합되어 있지 않는(즉, 불일치 서열이 존재하는) 돌연변이 유전자를 증폭시키는 PCR 프라이머를 가리킨다. 본 발명의 클램핑 프라이머는 특별히 제한되는 것은 아니나, 보다 높은 민감도 및 특이도로 돌연변이를 검출하기 위해서는 PNA 클램핑 프로브를 기준으로 하여 한 방향으로는 PNA 프로브와 일부분이 겹쳐지도록 하며 다른 한 방향으로는 검출하고자 하는 부위를 포함하되 PCR 증폭산물의 크기를 고려하여 고안하는 것이 바람직하다. 또한 PNA 프로브와의 T_m 을 고려하고, 길이는 17mer에서 30mer 사이이며, PNA 프로브의 T_m 보다 낮게 설계하는 것이 바람직하다. 진단 민감도 및 특이도를 극대화할 수 있도록, 야생형과 상보적으로 결합하는 PNA 클램핑 프로브 서열 중 돌연변이가 일어나는 염기 바로 앞부분을 포함하도록 설계하는 것이 바람직하다. 구체적인 예에 따르면, 서열번호 1 내지 31의 PNA 프로브와 5 내지 12개의 염기서열이 중첩되도록 클램핑 프라이머를 설계하였다. 본 발명에서 예시된 서열번호 36의 정방향 프라이머는 서열번호 7 내지 11의 PIK3CA 유전자 엑손 9의 코돈 542의 상류 부분 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었다. 본 발명에서 예시된 서열번호 36의 정방향 프라이머와 조합되는 서열번호 33의

역방향 프라이머는 PIK3CA 유전자 인트론 9 부위의 61~80번째 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었다. 서열번호 39 및 40의 역방향 프라이머는 서열번호 9 내지 31의 PIK3CA 유전자 엑손 9의 코돈 545 및 546의 하류부분 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었다. 본 발명에서 예시된 서열번호 39 및 40의 역방향 프라이머와 조합되는 서열번호 37의 정방향 프라이머는 PIK3CA 유전자 엑손 9의 32~59번째 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었다. 서열번호 41 및 42의 정방향 프라이머는 서열번호 1 내지 6의 PIK3CA 유전자 엑손 20의 코돈 1047의 상류 부분 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었다. 본 발명에서 예시된 서열번호 41 및 42의 정방향 프라이머와 조합되는 서열번호 35의 역방향 프라이머는 PIK3CA 유전자 인트론 21 부위의 9~29번째 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었다. 프라이머의 길이는 20mer에서 28mer 사이로 각각 프라이머 조합의 증폭산물의 크기가 50bp 내지 500bp가 되도록 고안되었다.

- [44] 한편, PIK3CA 유전자의 엑손 9의 염기서열분석을 통한 유전자 확인을 위하여 본 발명에서 제공되는 서열번호 32의 정방향 프라이머는 PIK3CA 유전자 인트론 8 부위의 -63~-44 번째 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었고, 상기 프라이머와 조합되는 역방향 프라이머는 서열번호 33으로 PIK3CA 유전자 인트론 9 부위의 61~80번째 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었다. 이들 프라이머는 조합되어 증폭산물의 크기가 269 bp가 되도록 고안되었다. PIK3CA 유전자의 엑손 20의 염기서열분석을 통한 유전자 확인을 위하여, 본 발명에서 제공되는 서열번호 34의 정방향 프라이머는 PIK3CA 유전자 엑손 20 부위의 69~88 번째 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었고, 상기 프라이머와 조합되는 역방향 프라이머는 서열번호 35로 PIK3CA 유전자 인트론 21 부위의 9~29번째 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었다. 이들 프라이머는 조합되어 증폭산물의 크기가 202 bp가 되도록 고안되었다. 각각의 프라이머의 특성은 아래 표 3에 정리되어 있다.

- [45] 표 3

[Table 3]

서열 번호	부위	위치	이름	방향	서열(5' → 3')	길이
32	인트론 8	-63 ~ -44	E542-545-F	정방향	CTGTGAATCCAGAGGG GAAA	20
33	인트론 9	61 ~ 80	E542-545-R	역방향	ACATGCTGAGATCAGC CAAA	20
34	엑손 20	69 ~ 88	H1047-F	정방향	CTCAATGATGCTTGGC TCTG	20
35	인트론 21	9 ~ 29	H1047-R	역방향	TCAGTTCAATGCATGC TGTTT	21
36	엑손 9	59 ~ 73	E542K clamp-F	정방향	CAATTTCTACACGAGA TCCTCTCTC	25
37	엑손 9	32 ~ 59	E545F2	정방향	GGGAAAATGACAAAG AACAGCTCAAAGC	28
38	엑손 9	86 ~ 109	E542 clamp-R2	역방향	AATCTTTCTCCTGCTCA GTGATTT	24
39	엑손 9	97 ~ 120	E545 clamp-R3	역방향	ACTCCATAGAAAATCT TTCTCCTG	24
40	엑손 9	99 ~ 122	E546 clamp-R4	역방향	TGACTCCATAGAAAAT CTTTCTCC	24
41	엑손 20	240 ~ 262	H1047RL clamp-F	정방향	CATGAAACAAATGAAT GATGCAC	23
42	엑손 20	240 ~ 261	H1047YRL clamp-F	정방향	CATGAAACAAATGAAT GATGCA	22

[46]

[47]

3. PNA 기반의 실시간 PCR 클램핑을 이용한 PIK3CA 돌연변이 검출

[48]

본 발명에 따른 PIK3CA 유전자 돌연변이 검출방법은

[49]

(a) PIK3CA 유전자 클램핑 프라이머 세트와 PNA 클램핑 프로브의 존재 하에, PIK3CA 유전자에 대해 실시간 PCR을 수행하는 단계; 및

[50]

(b) 상기 실시간 PCR에 의한 유전자 증폭을 분석하여 PIK3CA 유전자의 돌연변이 유무 또는 농도를 결정하는 단계;

- [51] 를 포함한다.
- [52] 단계 (a)에서 사용되는 PIK3CA 유전자는 대상 검체로부터 추출하여 준비된다. 본 발명에서는 핵산추출에 특별한 제한이 없으며, 일반적으로 사용하는 모든 핵산 추출방법을 사용할 수 있으며, 시판중인 핵산 추출키트 등을 사용하여 환자의 혈액 또는 종양 표본으로부터 DNA를 추출하여 준비된다.
- [53] 단계 (a)에서는, 실시간 PCR 방법을 이용하여 PIK3CA 유전자의 돌연변이를 검출한다. 실시간 PCR 방법은 지수적인 증폭이 일어나는 초기 시료의 양을 형광물질의 지수적 증가가 탐지되기 시작하는 사이클의 수(Cycle threshold, 이하 'C_t'라고 칭한다)로 나타내므로 보다 정확한 정량분석이 가능하며 반응을 실시간으로 분석할 수 있다. 이 방법은 전기영동하여 영상분석기로 강도를 측정하는 단계가 생략되고 증폭산물의 증폭정도를 자동화, 수치화시켜 빠르고 간편하게 진단할 수 있는 방법이다.
- [54] 본 발명에서 실시간 PCR 클램핑의 반응물 중 PNA 클램핑 프로브는 1 내지 1000nM의 최종농도를 갖는 것이 바람직하다.
- [55] 본 발명에서는 인터칼레이팅(intercalating)법을 이용하여 형광을 검출하는데, 이 방법은 증폭된 이중가닥 DNA에 형광표지가 인터칼레이션(intercalation)되어 형광을 발하게 되는데 이 때의 형광 강도를 측정함으로써 증폭산물의 생성량을 측정하게 된다. 이로써 어느 PCR 기기에나 적용할 수 있고 프라이머를 따로 제작하지 않아도 높은 민감도 및 특이도로 PIK3CA 유전자의 돌연변이를 검출할 수 있다.
- [56] 본 발명에서는 유전자 증폭산물을 확인하기 위한 형광물질로서 실시간 유전자 검출방법에 사용되는 DNA-결합 형광물질(DNA-binding fluorophore)을 사용하며 그 종류에 특별한 제한은 없다. 예를 들어, SYBR 그린 I 외에 에버그린, 에티디움브로마이드(EtBr), BEBO, YO-PRO-1, TO-PRO-3, LC 그린, SYTO-9, SYTO-13, SYTO-16, SYTO-60, SYTO-62, SYTO-64, SYTO-82, POPO-3, TOTO-3, BOBO-3, SYTOX 오렌지 등을 사용할 수 있다(Gudnason et al., *Nucleic Acids Res.* 2007;35(19):e127, Bengtsson et al., *Nucleic Acids Res.* 2003;31(8):e45; Wittwer et al., *Clinical Chemistry* 49(6):853-860).
- [57] 단계 (b)에서는, 단계 (a)의 실시간 PCR에 의한 유전자 증폭을 분석하여 PIK3CA 유전자의 돌연변이 유무 또는 농도를 결정하는바, 증폭된 C_t값을 비교하여 PIK3CA 유전자의 돌연변이 유무를 확인할 수 있다. 야생형 유전자와 혼성화되도록 고안된 PNA 프로브가 PIK3CA 돌연변이 코돈 유전자 부위에 혼성화되어 증폭을 저해하게 되면 증폭이 저해되어 C_t값이 높게 나타난다. 반면 PIK3CA 돌연변이 코돈 부위에 돌연변이가 발생한 경우 PNA 프로브와 혼성화되지 못하고 증폭되어 C_t값이 낮게 나타나게 된다. 양성 대조 시료로부터 얻어진 C_t값에서 미지의 시료로부터 얻어진 C_t값을 빼어 얻어진 C_t의 값을 확인하여 각 코돈의 돌연변이 유무를 확인한다(하기 수학적 1 참조).
- [58] [수학적 1]

- [59] C_i = 양성대조 시료로부터 얻어진 C_i 값 - 미지의 시료로부터 얻어진 C_i 값
- [60] [양성대조 시료: 야생형 유전자 시료]
- [61] 돌연변이형 유전자가 다량 포함되어 있을수록 C_i 값이 낮게 나타나게 되므로 C_i 차이가 클수록 돌연변이가 다량 포함되어 있음을 판단할 수 있다.
- [62] 본 발명의 PNA 기반의 실시간 PCR 클램핑을 이용한 PIK3CA 돌연변이 검출 방법은 대장암을 비롯하여 위암, 폐암, 췌장암, 두부 편평상피세포암, 교모세포종, 자궁내막암, 난소암, 유방암 등의 종양을 검사하는데 이용할 수 있으며, 종양 연구뿐만 아니라 PIK3CA 신호 전달 체계에 관여하는 기작을 연구하는 데에도 매우 유용하게 사용될 수 있다. 또한 개체군-기초 연구와 같이 다량의 시료 분석을 요구하는 연구에도 효과적으로 적용될 수 있다.
- [63]
- [64] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명하나, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [65]
- [66] **실시예 1: PIK3CA 엑손 9 및 20에 존재하는 코돈 542, 545 및 1047 야생형의 증폭을 억제하기 위한 PNA 프로브 합성**
- [67] PIK3CA 유전자의 엑손 9 코돈 542, 545 및 엑손 20 코돈 1047의 야생형과 완벽하게 결합하는 28개의 PNA 프로브를 상기 표 2에 나타낸 바와 같이 제작하였다. 각 코돈의 야생형과 완벽하게 결합하는 프로브는 돌연변이와의 효과적인 분리를 위하여 돌연변이가 일어나는 염기서열이 프로브의 중간에 위치하도록 고안하였다. 한국등록특허 제464,261호에 기재된 방법에 따라, PNA 프로브를 합성하였다(Lee H et al., Org Lett. 2007 Aug 16;9(17):3291-3.).
- [68]
- [69] **실시예 2: PIK3CA 엑손 9 및 20의 표적핵산 증폭 및 클램핑 PCR을 위한 프라이머 합성**
- [70] PIK3CA 엑손 9 및 20의 표적핵산의 증폭 및 클램핑 PCR을 위하여 PIK3CA 유전자의 엑손 9 및 20 부위를 분석하여 프라이머를 제작하였다. PIK3CA 엑손 9의 야생형 및 돌연변이 유전자를 확인하기 위한 서열번호 32 및 33으로 이루어진 프라이머 세트와 PIK3CA 엑손 9 코돈 542의 클램핑 프라이머로 서열번호 36의 프라이머를 합성하였다. 엑손 9 코돈 542의 클램핑에 사용된 역방향 프라이머는 PIK3CA 엑손 9의 유전자를 확인하기 위하여 고안된 서열번호 33의 역방향 프라이머를 동일하게 사용하였다. PIK3CA 엑손 9 코돈 545의 클램핑 프라이머로 서열번호 39 및 40을 합성하였으며, 엑손 9 코돈 545의 클램핑에 사용된 정방향 프라이머로는 서열번호 37의 프라이머를 사용하였다. PIK3CA 엑손 20의 야생형 및 돌연변이 유전자를 확인하기 위한 서열번호 34 및 35로 이루어진 프라이머 세트와 엑손 20 코돈 1047의 클램핑 프라이머로 서열번호 41 및 42의 프라이머를 합성하였다. 엑손 20 코돈 1047의 클램핑에

사용된 역방향 프라이머는 PIK3CA 엑손 20의 유전자를 확인하기 위하여 고안된 서열번호 35의 역방향 프라이머를 동일하게 사용하였다. 사용한 프라이머의 서열은 상기 표 3에 나타낸 바와 같다. 프라이머는 바이오니아(한국)에 의뢰하여 합성하였다.

[71]

[72] 실시예 3: PIK3CA 엑손 9 및 20의 표적핵산을 제조하기 위한 돌연변이유발 및 클론제조

[73] 인간의 전체 DNA를 이용하여 서열번호 32 및 33의 프라이머 세트와 서열번호 34 및 35의 프라이머 세트를 사용하여 PIK3CA 엑손 9 및 20 부분의 유전자를 증폭하였다. 증폭된 핵산을 pGEM-T 이지 벡터(Promega, USA)에 절찰하고 *E. coli* JM 109 세포에 형질전환하여 DNA를 대량 확보하였다. 변이 유전자를 가진 클론을 확보하기 위해 상기한 방법으로 제조된 정상 클론을 이용하여 돌연변이용 프라이머를 제작하고 부위특이적 돌연변이유발 키트 (Stratagene, USA)를 사용하여 변이 유전자를 가진 클론을 확보하였다. 확보된 클론은 염기서열 분석으로 그 변이 여부를 확인하였다.

[74]

[75] 실시예 4: PIK3CA 엑손 9 및 20의 야생형 및 돌연변이 세포주(cell line)로부터의 핵산 추출

[76] PIK3CA 엑손 9 및 20의 야생형 및 돌연변이의 표적핵산을 확보하기 위하여, 한국세포주은행으로부터 세포주를 분양받았다. 야생형 세포주로 HT29(genomic DNA) 인간 대장암 세포주[KCLB30038, 한국세포주은행(KCLB), 서울, 한국]를 분양 받았다. 하기 표 4에 나타낸 돌연변이 세포주들도 한국세포주은행으로부터 분양 받았다.

[77]

[78] 표 4

[Table 4]

KCLB No.	돌연변이	엑손	세포주명	기원
30038	야생형		HT29	대장암
000601	E542K	엑손 9	SNU601	위궤양성 종양
30022	E545K	엑손 9	MCF7	유방암
10247	H1047R	엑손 20	HCT116	대장암

[79]

[80] 분양 받은 세포주는 RPMI1640(Hyclone, Thermo scientific, USA) 또는 MEM(WelGENE, 한국)에 10% 열-불활성화 우태아혈청(FBS, Hyclone, Thermo scientific, USA)과 1X 페니실린-스트렙토마이신(WelGENE, 한국)이 첨가된 배지를 사용하여 37, 5% 이산화탄소(CO₂)가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

배양된 세포주는 고순도 PCR 주형 제조 키트(High Pure PCR Template Preparation Kit)(Roche, USA)를 사용하여 키트에서 제공한 매뉴얼에 의거하여 DNA를 추출하여 표적핵산을 확보하였다. 확보된 핵산은 나노드롭 스펙트로포토미터(ND 2000C, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 정량하고 -20에 보관하여 사용하였다. 인간 세포주로부터 각각 분리한 전체 DNA를 상기 표 3에 기재되어 있는 서열번호 32 및 33의 프라이머 세트와 서열번호 34 및 35의 프라이머 세트를 적용하여 PIK3CA 엑손 9 및 20 부분의 유전자를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 Labopass PCR 정제 키트(코스모진텍, 한국)를 사용하여 정제한 후 염기서열분석하여 유전자형을 확인하였다. 유전자형이 확인된 야생형 및 변이형 세포주는 본 발명의 PNA 프로브를 이용한 실시간 PCR 방법의 검체로 사용하였다.

[81]

[82] 실시예 5: PIK3CA 엑손 9 코돈 542에 대한 PNA 프로브를 이용한 실시간 PCR 클램핑 방법 확립

[83] 실시예 3에서의 클론으로부터 추출된 플라스미드 DNA와 실시예 4에서의 세포주로부터 추출된 DNA를 이용하여 하기 조건으로 RT-PCR 클램핑을 수행하여 PIK3CA 유전자의 돌연변이를 검색하는 PNA 프로브들을 만들어 차이점을 비교해 보고 분석함으로써 최적의 PNA 프로브를 찾고자 하였다. 클론에서 추출된 플라스미드 DNA 용액 1 또는 세포주에서 추출된 주형 DNA 용액(50 ng/) 1, 표 3에 나타난 1개의 클램핑 센스 프라이머(10 pmole/) 1, 안티센스 프라이머(10 pmole/) 1, 표 2에 나타난 프로브 중 1개의 클램핑 프로브(100nM) 1, 2X IQ Sybr 그린 슈퍼믹스(Bio-Rad, USA) 10, 증류수 6 를 가하고 실시간 DNA 증폭기(Real-time PCR machine, CFX96™ Real-Time PCR System, Bio-RAD사 제품)를 이용하여 95에서 3분 동안 반응시킨 후 95 30초 그리고 PNA가 혼성화될 수 있는 70에서 20초 반응을 추가하고, 63 30초, 72 30초 반응과정을 40회 반복하였다. 형광은 72 중합반응 단계에서 측정하였다.

[84] 상기 프로브들 중 서열번호 7 내지 11의 프로브를 적용하여 엑손 9의 코돈 542 야생형의 증폭을 저해하고 돌연변이를 검출하는 효과를 두 세트의 프라이머(서열번호 33과 36, 및 서열번호 37와 38)로 확인한 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 서열번호 33과 서열번호 36을 이용한 정방향 클램핑에서는 서열번호 7이 모두 매우 우수한 효과를 나타냈으며, 서열번호 37와 38를 이용한 역방향 클램핑에서는 서열번호 8 내지 10의 프로브가 우수한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[85] 서열번호 9 내지 31의 프로브 중 대표적으로 서열번호 12, 13, 14, 16 및 17을 적용하여 엑손 9의 코돈 545 야생형의 증폭을 저해하고 돌연변이를 검출하는 효과를 확인한 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 적용한 모든 프로브가 우수한 효과를 나타내며, 특히 서열번호 12 및 13의 프로브가 다양한 돌연변이를 검출하는데 보다 우수한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[86] 서열번호 1 내지 6의 프로브를 적용하여 엑손 20의 코돈 1047 야생형의 증폭을 저해하고 돌연변이를 검출하는 효과를 확인한 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 서열번호 1, 2 및 4의 프로브가 우수한 효과를 나타내며, 특히 서열번호 4의 프로브가 보다 우수한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[87]

[88] **실시예 6: PNA 프로브를 이용한 실시간 PCR 클램핑 방법을 통한 PIK3CA 유전자의 돌연변이 검색**

[89] 실시예 5에서 확립된 실시간 PCR을 이용한 방법을 사용하여 야생형 유전자에 돌연변이 유전자를 각각 10ng, 5ng, 2.5ng, 1ng, 0.1ng, 0.05ng, 0.01ng이 포함하도록 제작하여 돌연변이 유전자의 농도에 따른 C_t 값 사이의 상관관계를 분석하여, 돌연변이형의 검출한계를 확인하였다.

[90] 도 5에 PIK3CA 엑손 9 코돈 545 돌연변이를 가진 세포주를 대상으로 서열번호 12 및 13의 PNA 프로브를 이용하여 샘플적용 양에 따른 검출 민감도(C_t)를 비교한 결과를 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이, 돌연변이 유전자의 양이 증가할수록 형광이 역치값에 도달하는 반응횟수를 나타내는 C_t 값이 일정하게 감소(즉 C_t 값이 증가)하여, 돌연변이 유전자의 양과 C_t 값 사이에 상관관계가 있는 것으로 나타났다.

[91] 도 6에 PIK3CA 엑손 20 코돈 1047 돌연변이를 가진 세포주를 대상으로 서열번호 4의 PNA 프로브를 이용하여 돌연변이 포함 농도에 따른 검출 민감도(C_t)를 비교한 결과를 나타내었다. 도 6에 나타난 바와 같이, 돌연변이 유전자의 상대적 농도가 증가할수록 C_t 값이 일정하게 감소(즉 C_t 값이 증가)하여, 돌연변이 유전자의 상대적 농도와 C_t 값 사이에 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 또한, 본 발명의 방법 사용 시 0.1%로 존재하는 돌연변이의 유무도 검출할 수 있음을 확인하였다.

산업상 이용가능성

[92] 본 발명에 따르면, 암 발생, 예후 및 약제내성에 관여하는 것으로 예상되는 PIK3CA 유전자의 돌연변이를 단시간 내에 우수한 민감도 및 특이도로 극소량 포함되어 있는 돌연변이까지 검출할 수 있다. 또한 프로브로 이용된 PNA 자체가 생물학적 효소 및 물리적인 요소에 매우 안정하고 검출하는 방법이 매우 간단하며 단시간 내에 검출이 이루어지므로 대량 분석 및 임상에서 사용하기에 매우 용이할 것으로 기대된다.

서열목록 Free Text

[93] 서열목록 전자파일 첨부(C:\KipoNet\KOPATENTIN\panagene-PIK3CA.app)

청구범위

- [청구항 1] PIK3CA(Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide) 유전자의 엑손 9 또는 엑손 20 부위를 증폭시키는 PIK3CA 유전자 클램핑 프라이머 세트와, PIK3CA 유전자의 엑손 9 또는 엑손 20의 야생형과 완전하게 결합하는 PNA(Peptide Nucleic Acid) 클램핑 프로브의 존재 하에, PIK3CA 유전자에 대해 실시간 PCR(real-time Polymerase Chain Reaction)을 수행하고;
상기 실시간 PCR에 의한 유전자 증폭을 분석하여 PIK3CA 유전자의 돌연변이 유무 또는 농도를 결정하는;
단계를 포함하는, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 실시간 PCR의 C_t (cycle threshold)값을 측정하여 PIK3CA 유전자의 돌연변이 유무 또는 농도를 결정하는, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, PNA 클램핑 프로브는 15 내지 30mer 길이의 염기서열로 이루어지는 것인, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, PNA 클램핑 프로브는 17 내지 24mer 길이의 염기서열로 이루어지는 것인, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, PNA 클램핑 프로브는 서열번호 1 내지 31의 염기서열 중 어느 하나로 이루어지는 것인, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서, PIK3CA 유전자 클램핑 프라이머 세트는 PIK3CA 유전자 엑손 9 야생형 코돈 542, 545 또는 546, 또는 엑손 20 야생형 코돈 1047의 상류부분에 특이적으로 결합하는 정방향 프라이머와, 그의 하류부분에 특이적으로 결합하는 역방향 프라이머를 포함하는 것인, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 정방향 프라이머는 서열번호 36, 37, 41 및 42 중 어느 하나로 이루어지는 것이고, 역방향 프라이머는 서열번호 33, 35, 및 38 내지 40 중 어느 하나로 이루어지는 것인, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법.
- [청구항 8] 제1항 또는 제2항에 있어서, DNA 인터칼레이팅(intercalating) 형광물질을 사용하여 유전자 증폭을 분석하는, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, DNA 인터칼레이팅(intercalating) 형광물질은 SYBR 그린 I, 에버그린, 에티디움브로마이드(EtBr), BEBO, YO-PRO-1, TO-PRO-3, LC 그린, SYTO-9, SYTO-13, SYTO-16,

SYTO-60, SYTO-62, SYTO-64, SYTO-82, POPO-3, TOTO-3, BOBO-3 및 SYTOX 오렌지로 구성된 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 것인, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법.

[청구항 10]

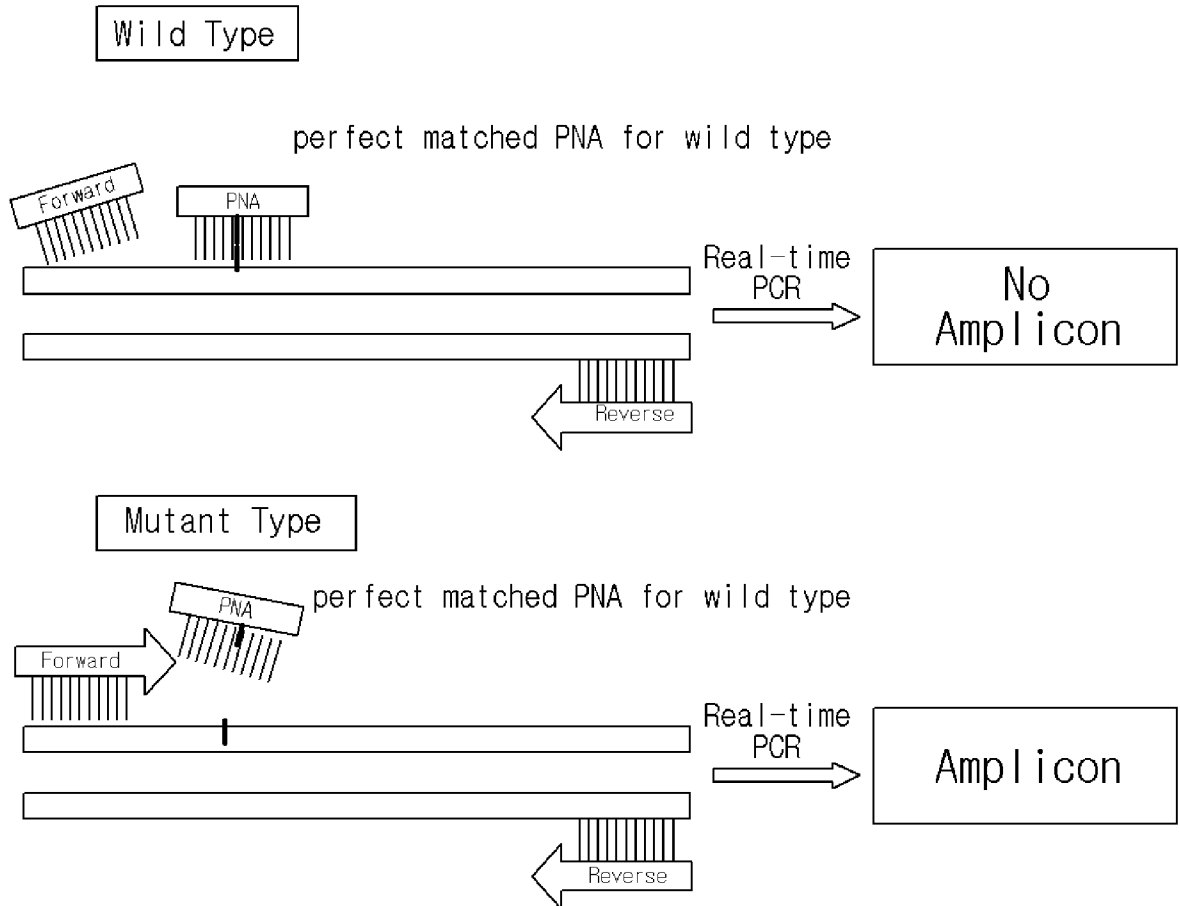
제1항 또는 제2항에 있어서, 대장암, 위암, 폐암, 췌장암, 두부 편평상피세포암, 교모세포종, 자궁내막암, 난소암 또는 유방암의 치료를 결정하거나 진단하는데 사용하기 위한, PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출 방법.

[청구항 11]

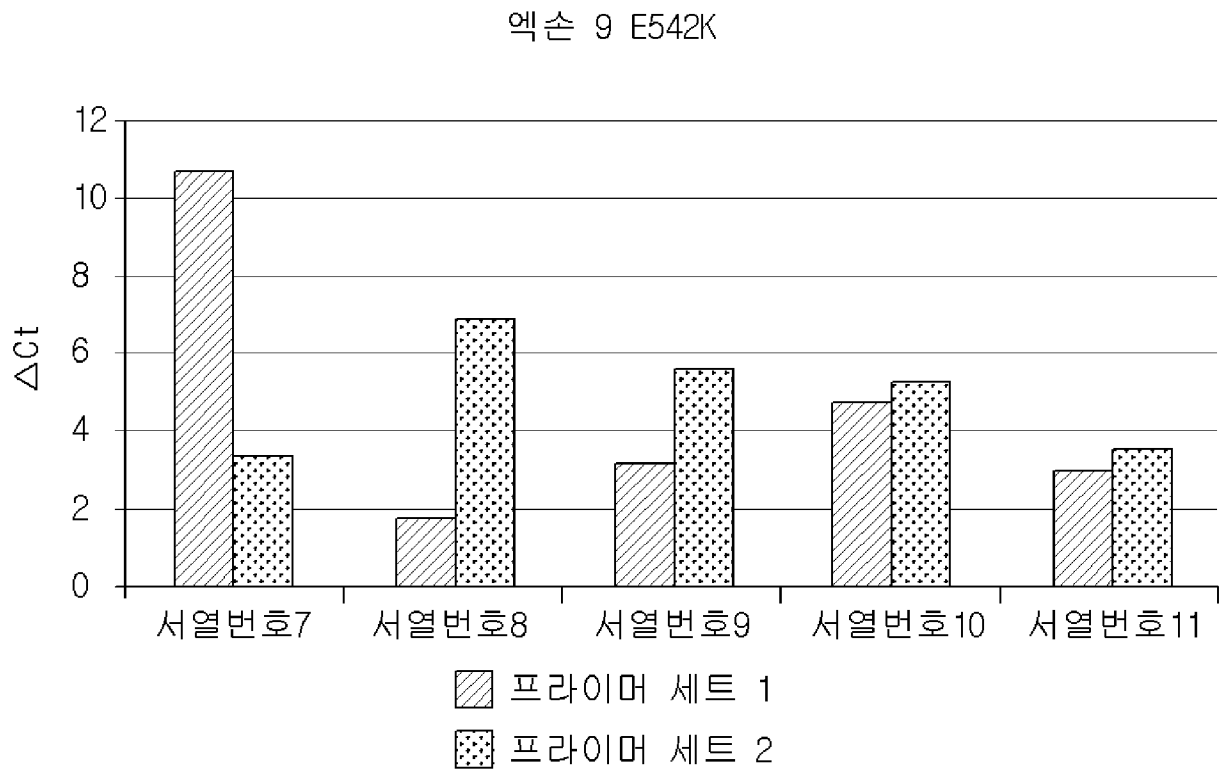
서열번호 1 내지 31 중 어느 하나의 PNA 클램핑 프로브: 를 포함하는, 제5항에 따른 PIK3CA 유전자의 돌연변이 검출방법에 사용하기 위한 키트.

[Fig. 1]

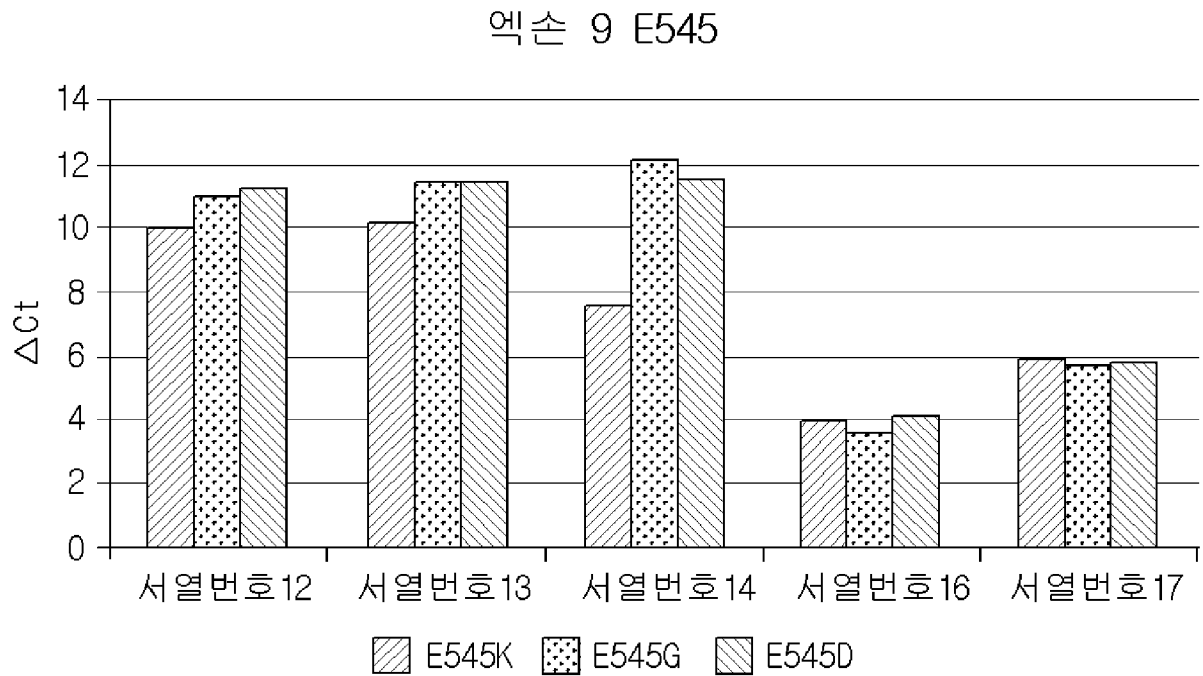
PNA기반 PCR clamping 원리 모식도



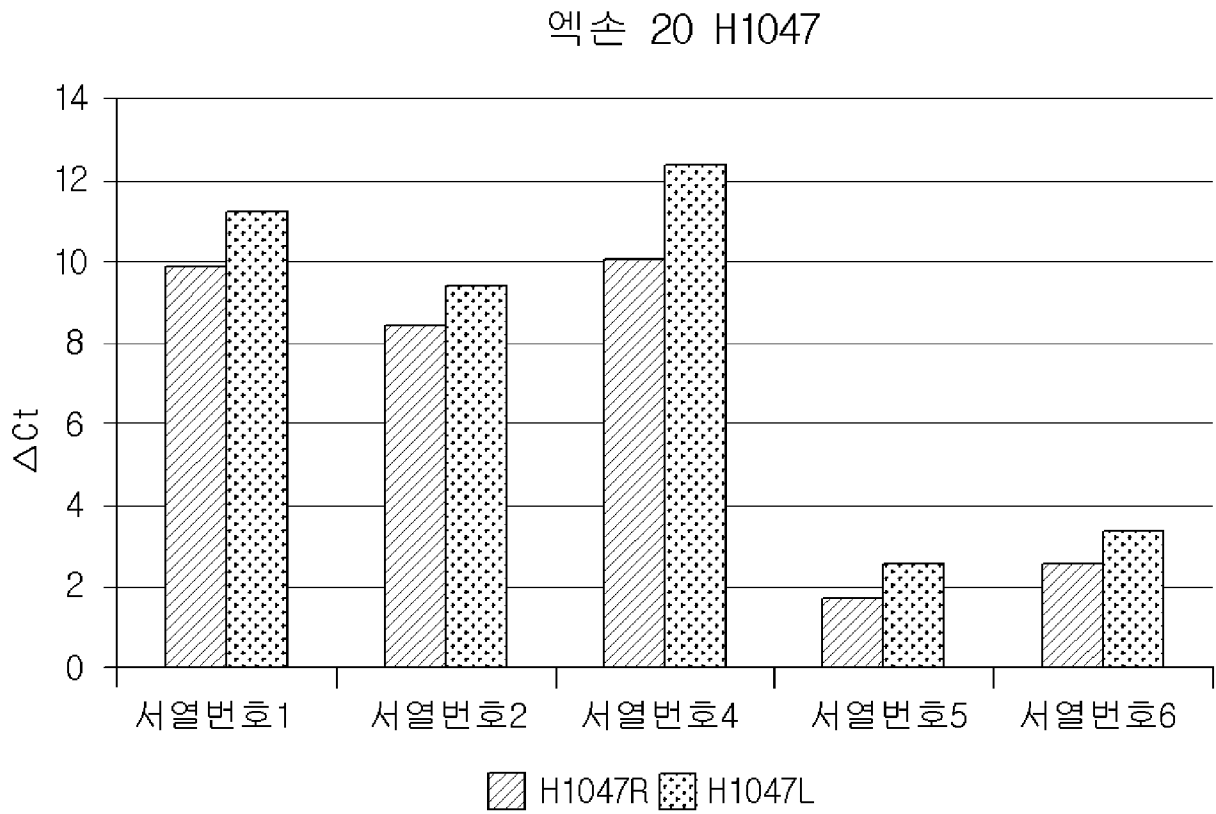
[Fig. 2]



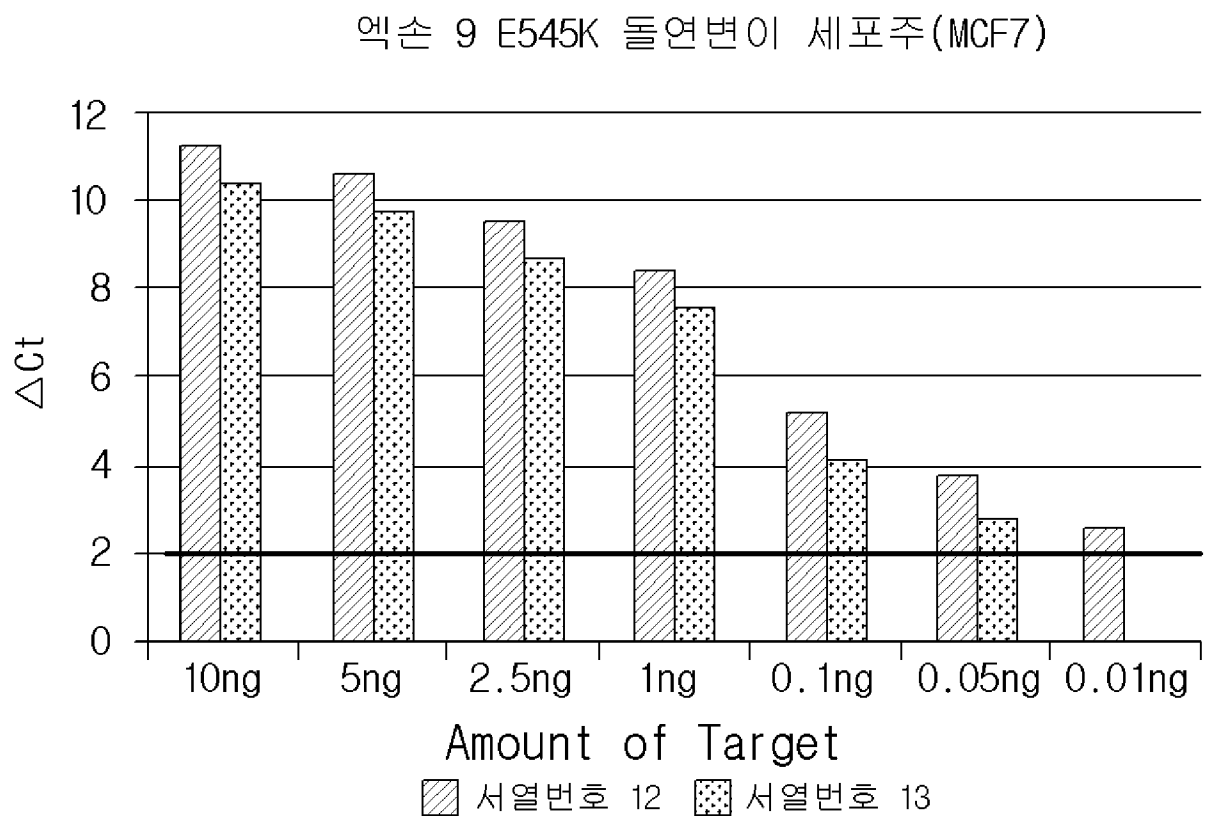
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]

