(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0086898
(43) 공개일자 2013년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0008011
(22) 출원일자 2012년01월26일
심사청구일자 2012년01월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
노동영
서울특별시 영등포구 여의도동 서울아파트 1 동 1206 호
이상원
서울 성북구 안암동1가 안암래미안아파트 106동 503호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

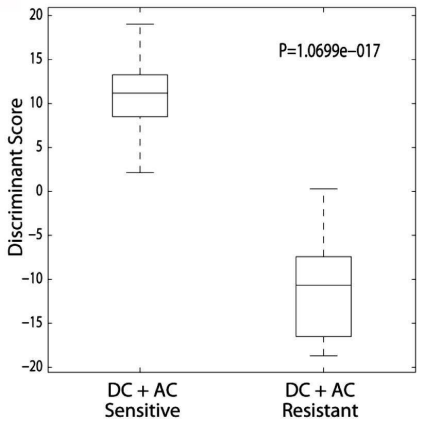
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **유방암 환자의 화학요법제 저항성 예측을 위한 혈청 바이오마커**

(57) 요 약

본 발명은 혈청 단백질로부터 분리한 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 바이오마커에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자 사이에서 차별화되게 발현되는 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물 및 상기 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 바이오마커는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단하여 개별 환자에게 치료 방향의 선택권을 부여하고, 더 나아가 유방암 환자의 무재발 생존율을 높일 수 있다.

대 표 도 - 도7



(71) 출원인

포항공과대학교 산학협력단

경상북도 포항시 남구 효자동 산31 포항공과대학교 내

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

(72) 발명자

황대희

경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아파트 6동 703호

유명희

서울특별시 성북구 하월곡동 39-1 KIST 프로테오믹스이용기술개발사업단

형석원

경남 함양군 함양읍 신천리 304-2

이민영

경상북도 포항시 남구 효자동 산31번지 지곡연구동 104호

정희정

서울특별시 성북구 안암동3가 대광아파트나동 253호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	M105KM01000207K130100210
부처명	한국과학재단
연구사업명	21C뉴프론티어연구개발사업
연구과제명	고효율, 고정보력 프로테오믹스 핵심 신기술의 개발 및 적용
주관기관	한국과학재단
연구기간	2007.04.01 ~ 2008.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9) 및 세룰로플라스민(ceruloplasmin)에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함하는 것을 특징으로 하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)에 특이적으로 결합하는 항체들을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물.

청구항 4

알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 키트.

청구항 5

알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 부착된 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 마이크로어레이.

청구항 6

알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9) 및 세룰로플라스민(ceruloplasmin)을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프

로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물.

청구항 9

알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 키트.

청구항 10

알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 마이크로어레이.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈청 단백질로부터 분리한 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물, 진단용 키트 및 진단용 마이크로어레이에 관한 것이다.

[0002]

배 경 기 술

[0003] 유방암은 여성에게 가장 흔한 암사망 원인이다. 선행화학요법(neoadjuvant chemotherapy, NACT)은 IIb-III 단계의 국소 진행 유방암 환자의 치료에 많이 시도되고 있다. 선행화학요법은 원발성 종양의 크기를 감소시키기 위해서 또한 수술 전에 특이하고 조직적인 미소-전이를 방지하기 위하여 일반적으로 사용되고 있다. 또한 선행화학요법을 평가한 많은 임상 논문들에서, 대다수는 선행화학요법이 유방 존치율을 높이고, 환자의 생존과 상관관계를 있는 것으로 나타나고 있다. 그러나 불행히도 사용된 화학요법의 처방에 따라 40% 정도까지 상당수의 환자들에게 임상적으로 또는 병인학적으로 선행화학요법의 이점이 나타나지 않고 있다. 그러한 유방암 환자들은 사용된 화학요법제에 대하여 저항성을 보유하고 있거나 저항성이 생성되는 것일 수 있다.

[0004] 현재 선행화학요법의 시도 전에 이에 대한 반응을 예측할 수 있는 방법은 알려져 있지 않다. 따라서 선행화학요법에 대한 저항성을 예측하여, 개별 환자에게 치료 방향의 선택권을 부여할 수 있는 분자 바이오마커의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 새로운 바이오마커의 탐색은 마이크로어레이와 프로테옴 기술에 의해 촉진되어 왔다. 유방암 세포주, 조직 및 혈청 시료에 대한 전체 프로파일 스펙트럼을 제공하기 위한 몇몇 유전자 발현과 프로테옴 연구가 수행되어 왔다. 이러한 프로파일은 유방암에서 질환의 서브타입, 예후 및 치료 결과를 예측하기 위한 mRNA/단백질 지표를 탐색하기 위해 사용된 것이었다. 특히 화학요법제 내성과 관련된 분자 지표(molecular signature)를 조사하기 위해, 유방암 세포주, 및 조직에 대한 몇몇 유전자 발현 연구가 수행되었다. 유방암 세포주 또는 조직에서 화학요법제 내성과 관련이 있는 것으로 보고된 유전자는 i) MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, ABCG2 등의 ABC 수송체(ATP-binding cassette transporter) 및 외인성화합물(xenobiotics)의 에너지 의존성 방출 펌프로 작용하는 다른 수송체와, ii) 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(GSTpi), 및 iii) 티오레독신(thioredoxin)을 포함한다. 그

러나, 지금까지는 타목시펜 저항성과 관련된 100개의 잠재적인 조직 바이오마커에 관한 싱글 LC-MS/MS에 기반한 Pasa-Tolic 등에 의한 샷건 프로테옴 연구(shotgun proteomic study)가 유일하다(Pasa-Tolic, L. Mol Cell Proteomics 8, 1278-1294, 2009). 그러나 Pasa-Tolic 등의 연구는 조직 바이오마커로서, 비침습적인 혈청 바이오마커가 임상에서 적용될 때 훨씬 용이하게 응용될 수 있다는 점에서 한계가 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 유방암 환자의 화학요법제 저항성 예측을 위한 혈청 바이오마커를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명의 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물은, 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9) 및 세룰로플라스민(ceruloplasmin)에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0009] 본 발명의 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물은, 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 또한 본 발명은 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 키트를 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 부착된 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물은, 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9) 및 세룰로플라스민(ceruloplasmin)을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물은, 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한 본 발명은 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적인

프라이머 또는 프로브를 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 키트를 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 아포프로테인 B(apolipoprotein B), 보체 3성분(complement component 3), 보체 9성분(complement component 9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 유방암 환자의 화학요법제 저항성 예측을 위한 혈청 바이오마커는 유방암 환자에게서 선행화학요법에 대한 저항성을 예측하여, 개별 환자에게 치료 방향의 선택권을 부여하고, 더 나아가 환자의 무재발 생존율을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 선행화학요법에 대한 저항성을 예측할 수 있는 혈청 단백질 프로파일의 확인을 위한 본 발명의 통합적인 접근 방법의 전체 순서도이다.

도 2a는 화학요법제 민감군의 최대 피크 강도를 나타내는 용출시간에서 서열 K.SKPTVSSSM#EFKYDFN@SSM#LYSTAK.G를 포함하는 아포리포프로테인B(APOB) 유래 발현 정도에 차이가 있는 펩타이드(DEPs)의 이소트로픽 클러스터의 매스 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2b는 화학요법제 내성군의 최대 피크 강도를 나타내는 용출시간에서 서열 K.SKPTVSSSM#EFKYDFN@SSM#LYSTAK.G를 포함하는 APOB 유래 DEPs의 이소트로픽 클러스터의 매스 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2c는 화학요법제 민감군 및 내성군에서 APOB 유래 4개의 DEPs의 상대 어번던스를 나타낸 그래프이다.

도 2d는 화학요법제 민감군에서 내성군에 비하여 4개 모두의 DEPs에서 더 높은 어번던스를 나타낸다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 3은 선행화학요법에 대한 저항성과 관련된 혈청 단백질의 프로파일에 대한 클러스터링 분석 결과를 나타낸 히트맵(heatmap)이다. 상기 히트맵의 가로줄은 시료를, 세로줄은 DEPs를 나타낸다. 각각의 펩타이드에서 모든 시료의 중앙값에 해당하는 발현 강도를 백색으로 나타내고, 적색은 단백질 발현이 증가된 것을, 청색은 감소되었음을 나타낸다. 가로줄 아래쪽의 컬러막대는 각각 CR 1-5, CS 1-4 및 CS 5-10의 시료 클러스터를 의미하고, 세로줄 왼쪽의 컬러막대는 C1 부터 C5까지의 펩타이드 클러스터를 의미한다. 각각의 클러스터 사이의 연관성은 계통도(dendrogram)으로 나타내었다. 세로줄 오른쪽의 막대들은 본 발명에서 확인한 DEPs와 4 개의 조직 및 세포주 데이터세트에서 얻은 발현 정도에 차이가 있는 유전자(DEGs) 사이에서 공통되는 유전자 또는 단백질을 나타낸 것으로, 하나의 단백질에 복수의 DEPs가 있는 경우에는 하나만 나타내었다.

도 4a는 파셜 리스트 스퀘어-디스크리미넌트 분석(partial least square-discriminant analysis, PLS-DA)를 통해서 50 개의 DEPs의 발현 프로파일을 확인한 것으로, 청색선은 상기 50개의 DEPs의 발현 차이에 의해 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자의 구분하는 결정 함수이다.

도 4b는 50개의 DEPs의 VIP(variable importance in projection) 값을 내림차순으로 정렬한 것으로, VIP값이 크다는 것은 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자의 구분에 기여도가 높다는 것을 의미한다.

도 5는 AHSG, APOB, C3, C9, CP 및 ORM1 각각에 의한 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자 사이의 발현 차이를 웨스턴 블랏을 이용하여 확인한 그래프이다.

도 6은 6종의 선택된 바이오마커 조합을 이용한 PLS-DA 결과를 나타낸 것으로, 적색 역삼각형은 화학요법제 내성 환자, 청색 정삼각형은 화학요법제 민감성 환자를 나타내며, 청색선은 결정 함수이다.

도 7은 6종의 선택된 바이오마커 조합을 이용한 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자 사이의 판별 점수 차이를 확인한 그래프이다.

도 8은 판별 점수가 높은 그룹과 낮은 그룹 사이의 무재발 생존 분석을 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 명세서에서 사용되는 "유방암"은 유방에서 발생하는 악성종양을 의미하는 것이다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 "바이오마커"란 화학요법제 민감성 환자의 시료와 화학요법제 내성 환자의 시료를 구분하여 진단할 수 있는 물질로 유기 생체 분자를 말한다.

[0021] 본 명세서에 사용되는 "시료"는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 시료를

[0022] 말한다. 바람직하게는, 상기 생물학적 시료 또는 시료는 전혈, 혈장, 혈청일 수 있다. 상기 시료는 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간으로부터 수득될 수 있다. 상기 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한 상기 시료로부터 핵산 및 단백질을 분리하여 검출에 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명에서는 유방암 환자의 선행화학요법에 대한 저항성 예측을 위한 혈청 바이오마커를 확인하기 위해 혈청 내 N-글라이코실화 단백질을 프로파일링하였다.

[0024] 선행화학요법 전에 환자를 화학요법제 민감군(CS)과 내성군(CR)으로 나누고 각각의 혈청 시료를 수집하였다. 화학요법제 민감군과 내성군의 혈청 단백질의 발현 차이를 확인하기 위해 N-글라이코실화 펩타이드의 분리 기술과 조합한 LC-MS/MS에 기반한 라벨-프리 정량분석 기술을 적용하였다.

[0025] 본 발명에서 혈청 바이오마커의 선정을 위해 N-글라이코펩타이드를 선택한 이유는 혈청 시료에서 복잡성을 효율적으로 감소시켜 측정가능한 단백질 농도의 범위를 넓히고, 또한 N-글라이코실화가 혈청 단백질에서 흔히 일어나는 변화이기 때문이다.

[0026] 본 발명에서 화학요법제 민감군과 내성군 사이에서 발현 정도에 차이가 있는 펩타이드(differentially expressed peptides, DEPs)와 종래 알려진 4 개의 조직 및 세포주 데이터세트에서 얻은 발현 정도에 차이가 있는 유전자(DEGs) 사이에서 부분 최소자승-분별 분석(partial least square-discriminant analysis, PLS-DA)를 통해서 공통되는 유전자 또는 단백질을 확인하고, 화학요법제 민감군과 내성군 사이의 판별에 대한 기여도를 평가하여 바이오마커 후보로서 13 종의 단백질을 선정하였다.

[0027] 상기 선정된 13 종의 단백질을 대상으로 화학요법제 민감군과 내성군 사이의 발현 차이가 웨스턴 블랏을 통해 각각 독립적인 혈청 시료에서 확인한 결과, 위 후보 중에서, 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein, AHSG), 아포프로테인 B(apolipoprotein B, APOB), 보체 3성분(complement component 3, C3), 보체 9성분(complement component 9, C9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin, CP) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1, ORM1) 총 6 종의 단백질을 혈청 바이오마커로 최종 선택하였다.

[0028] 상기 6 종의 혈청 바이오마커 단백질을 사용해서, 본 발명자들은 도세탁셀과 독소루비신 선행화학요법 처방에 대한 저항성을 예측할 수 있는 PLS-DA 모델을 설정하고, 더 나아가 환자의 무재발 생존을 예측하였다.

[0029] 본 발명에서 시료 중에서 특정 단백질의 존재여부는 시료를 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시켜 항원-항체 복합체의 형성여부를 측정함으로써 확인할 수 있다. 상기 항원-항체 복합체란 시료 중의 특정 단백질과 이를 특이적으로 인지하는 항체의 결합물을 의미한다. 또한 항체란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다.

[0030] 본 발명에 사용되는 항체는 단클론 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성인 단편(예를 들어, Fab 또는 (Fab)2 단편), 항체 중쇄, 인간화 항체, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 Fv 분자, 키메릭 항체 등일 수 있다.

[0031] 본 발명의 상기 6 종의 단백질들은 공지된 단백질이므로 본 발명에 사용되는 항체는 상기 공지된 단백질을 항원으로 하여 면역학 분야에서 널리 알려져 있는 통상의 방법으로 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 항체의 항원으로서 사용되는 단백질은 천연에서 추출하거나 합성될 수 있으며 DNA 서열을 기초로 하여 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우 단백질을 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체에서 목적으로 하는 단백질이 발현되도록 숙주 세포를 배양한 후 형질전환체로부터 목적으로 하는 단백질을 회수함으로써 수득될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 항체는 말, 소, 염소, 양, 개, 닭, 칠면조, 토끼, 마우스 또는 래트와 같은 여러 온혈 동물을 이용하여 제

조할 수 있다. 단클론 항체도 공지된 융합방법(fusion method)(Kohler and Milstein, European J. Immnunol. 6:511-519 1976), 재조합 DNA 방법(미국특허 제4816567호) 및 파지 항체 라이브러리(Clackson et al., Nature, 352, 624-628, 1991; Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 58:1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다.

[0032] 본 발명의 진단용 조성물은 단백질에 특이적인 항체 이외에 면역학적 분석에 사용되는 당 업계에 공지된 시약을 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 면역학적 분석은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 면역세포화학 및 면역조직화학, 방사선 면역 분석법(radioimmunoassays), 효소결합면역법(ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent assay), 면역블롯(immunoblotting), 파아르 분석법(Farr assay), 면역침강, 라텍스 응집, 적혈구 응집, 비탁계법, 면역확산법, 카운터-전류 전기영동법, 단일 라디칼 면역확산법, 면역크로마토그래피법, 단백질 칩 및 면역형광법이 있다.

[0033] 면역학적 분석에 사용되는 시약으로는 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 또한, 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.

[0034] 상기에서 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지는 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하며, 이의 예로는 효소, 형광물질, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사성 동위원소 등을 사용할 수 있다. 효소로는 β-글루쿠로니데이즈, β-D-글루코시데이즈, 우레아제, 퍼옥시데이즈, 알칼라인 포스파테이즈, 아세틸콜린에스테레이즈, 글루코스 옥시데이즈, 헥소키네이즈, 말레이트 디하이드로게네이즈, 글루코스-6-인산디하이드로게네이즈, 인버테이즈 등을 사용할 수 있다. 형광물로는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 플루오르신이소티옥시아네이트 등을 사용할 수 있다. 리간드로는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시퍼레이즈 등이 있다. 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있고 레독스 분자로는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논 등이 있다. 방사성 동위원소로는 ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re 등이 있다. 그러나 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있은 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명의 진단용 조성물은 진단의 신속도 및 편리성을 높이기 위해, 적합한 담체 또는 지지체상에 공지된 다양한 방법을 이용하여 고정화된 상태로 제공될 수 있다(Antibodies: A Labotory Manual, Harlow& Lane; Cold SpringHarbor, 1988). 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 덱스트란, 세파덱스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 유리, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 컵, 플랫 팩(flat packs) 등이 포함된다. 그 외의 다른 고체 기질로는 세포배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막이 있다. 상기 지지체는 임의의 가능한 형태, 예를 들어 구형(비드), 원통형(시험관 또는 웰 내면), 평면형(시트, 시험 스트립)을 가질 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물은 진단용 키트 또는 마이크로어레이 형태로 제공될 수 있다.

[0036] 상기 진단용 키트로는 예를 들면, 시료 중의 특정 단백질을 검출하기 위해 면역크로마토그래피법을 기초로 하는 측방 유동 검정 키트(lateral flow assay kit)의 형태로 제공될 수 있다. 측방 유동 검정 키트는 시료가 적용되는 샘플패드(sample pad), 탐지용 항체가 코팅되어 있는 방출패드(releasing pad), 시료가 이동하여 분리되고 항원-항체 반응이 일어나는 전개용 막(예를 들어 니트로셀룰로스) 또는 스트립, 그리고 흡수패드(absorption pad)로 이루어져 있다. 상기 마이크로어레이는 일반적으로 특정 시약으로 처리된 슬라이드 글라스 표면 위에 항체를 부착하여 항원-항체 반응에 의해 상기 항체에 특이적으로 부착하는 단백질을 검출할 수 있도록 하는 것이다.

[0037] 한편 본 발명은 바이오마커 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함하는 유방암 환자의 화학요법제 저항성 진단용 조성물을 제공한다.

[0038] 프라이머를 이용한 특정 핵산의 검출은 PCR과 같은 증폭 방법을 사용하여 목적 유전자의 서열을 증폭한 다음 당 분야에 공지된 방법으로 유전자의 증폭여부를 확인함으로써 수행될 수 있다. 또한, 프로브를 이용한 특정 핵산의 검출은 적합한 조건하에서 시료 핵산을 프로브와 접촉시킨 후 하이브리드화되는 핵산의 존재여부를 확인함으로써 수행될 수 있다.

[0039] 상기 프라이머란 짧은 자유 수산화기를 가지는 핵산서열로서 상보적인 템플레이트와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산서열을 말한다. 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0040] 상기 프로브는 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백 개의 염기로 이루어진 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어 특정 mRNA의 존재유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA 프로브, 이중쇄 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고 비오틴, FITC, 로다민, DIG 등으로 표지되거나 방사선 동위 원소 등으로 표지될 수 있다.

[0041] 또한, 상기 프로브는 검출 가능한 물질 예를 들면, 적합한 신호를 제공하고 충분한 반감기를 갖는 방사성 표지로 표지할 수 있다. 표지된 프로브는 문헌(Sambook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Mannual, 1989)에 공지된 바와 같은 고체 지지체 상의 핵산에 하이브리드화시킬 수 있다.

[0042] 상기 프로브나 프라이머를 이용하여 특정 핵산을 검출할 수 있는 방법으로는 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 중합효소 연쇄반응(PCR), DNA 시퀀싱, RT-PCR, 프라이머 연장법(Nikiforeov et al., Nucl Acids Res 22, 4167-4175, 1994), 올리고뉴클레오타이드 연장 분석(Nickerson et al., Pro Nat Acad Sci USA, 87, 8923-8927, 1990), 대립형질 특이적 PCR법(Rust et al., Nucl Acids Res, 6, 3623-3629, 1993), RNase 불일치 절단(RNase mismatch cleavage, Myers et al., Science, 230, 1242-1246, 1985), 단일가닥 입체 다형화(single strand conformation lymorphism, Orita et al., Pro Nat Acad Sci USA, 86, 2766-2770, 1989), SSCP 및 헤테로듀플렉스 동시 분석법(Lee et al., Mol Cells, 5:668-672, 1995), 변성 구배 젤 전기영동(DGGE, Cariello et al., Am J Hum Genet, 42, 726-734, 1988), 변성 고압 액체 크로마토그래피(Underhill et al., Genome Res, 7, 996-1005, 1997), 혼성화 반응, DNA 칩 등이 있다. 상기 혼성화 반응의 예로는 노던 하이브리다이제이션(Maniatis T. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Habor Laboratory, NY, 1982), 인시츄 하이브리다이제이션(Jacquemier et al., Bull Cancer, 90:31-8, 2003) 및 마이크로어레이(Macgregor, Expert Rev Mol Diagn 3:185-200, 2003) 방법 등이 있다.

[0043] 상기 본 발명의 유방암 환자의 화학요법제 진단용 조성물은 상술한 핵산을 검출하는 방법에 일반적으로 사용되는 시약을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, PCR 반응에 요구되는 dNTP(deoxynulceotide triphosphate), 내열성 중합효소(polymerase), 염화마그네슘 등의 금속이온염이 포함할 수 있으며, 시퀀싱에 요구되는 dNTP, 시쿼나제(sequenase) 등을 포함할 수 있다.

[0044] 바람직하게는, 본 발명의 유방암 환자의 화학요법제 진단용 조성물은 키트 또는 마이크로어레이의 형태로 제공될 수 있다.

[0045] 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 본 발명의 마커 유전자에 대하여 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함하는 RT-PCR 키트, 본 발명의 마커 유전자의 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드가 부착된 기판을 포함하는 DNA 칩 등이 있다.

[0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0047] **실시예 1**

[0048] **1-1. 혈청시료의 수집**

[0049] 도세탁셀(DC) 및 독소루비신(AC)을 조합한 선행화학요법 처방으로 치료받는 15 명의 암 크기 2 cm 이상인 국소 진행 유방암 환자로부터 혈청 시료를 수집하였다. 선택된 환자의 특징은 표 1에 나타내었다.

표 1

Patient		cStage*	pStage*	RECIST Evaluation	Tumor Size Reduction Rate (%)
Chemoresistant Group (CR)	CR1	IIB	I	SD	0
	CR2	IIIA	IIIC	PD	-30
	CR3	IIIA	IIB	SD	0
	CR4	IIIB	IIIA	SD	10
	CR5	IIIC	IIIC	PD	-50
Chemoresponsive Group (CS)	CS1	IIIA	IIB	PR	30
	CS2	IIB	IIA	PR	46
	CS3	IIIA	I	PR	50
	CS4	IIIA	IIA	PR	88
	CS5	IIIB	IIIA	PR	80
	CS6	IIB	IIA	PR	90
	CS7	IIB	IIIA	PR	30
	CS8	IIIA	IIA	PR	50
	CS9	IIIA	IIB	PR	50
	CS10	IIB	IIIA	PR	27.7

CR = chemoresistant ; CS = chemosensitive ; cStage = clinical stage ; pStage = pathologic stage ; NG= nuclear grade ; ER = estrogen receptor ; PgR = progesterone receptor ; Her2 = Her2 receptor. SD=stable disease; PD=progressive disease; PR=partial response.

[0050]

[0051] 상기 환자들로부터 선행화합요법 전에 혈청 시료를 채취하였다. 각각의 환자에 대하여 선행화합요법 시행 전과 매 3주 동안 3주기의 선행화학요법을 시행한 후의 암의 크기를 자기공명 이미징을 이용하여 측정하였다. 암 크기의 변화를 계산하여 고형 종양에서 반응 평가 기준(Responxe Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST)에 따른 선행화학요법에 대한 반응을 평가하였다[Therasse et al. (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92, 205-216]. 평가 결과는 상기 표 1에 함께 나타내었고, 그 결과를 바탕으로 15명의 환자를 10명의 화학요법제 민감군과 5명의 화학요법제 내성군으로 구분하였다.

[0052] **1-2. 혈청 N-글라이코프로테옴 분석**

[0053] 선행화학요법 시행 전에 유방암 환자의 혈청 시료로부터 N-연결 글라이코펩타이드를 선택적으로 분리하였다[Zhang et al. (2003) Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 21, 660-666].

[0054] 각각의 시료에 대하여 3번씩 총 45개의 데이터세트(dataset)에 대하여 N-글라이코실화 혈청 프로테옴을 분석하였다. 도 1에 선행화학요법에 대한 반응을 예측하기 위한 혈청 단백질 프로파일의 분석을 위한 통합적인 접근법의 전체적인 방법을 나타낸 순서도를 나타내었다.

[0055] 첫번째로 7-테슬라 퓨리에 트랜스폼 이온 사이클로트론 레조넌스 매스 스펙트로메터(FTICR, LTQ-FT, Thermo Electorn, San Jose, CA)를 이용한 N-글라이코실화 펩타이드들의 라벨-프리 LC-MS/MS 분석을 통해 펩타이드의 특성을 확인하였다[Min et al. (2007) Ultrahigh-pressure dual online solid phase extraction/capillary reverse-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry (DO-SPE/cRPLC/MS/MS): a versatile separation platform for high-throughput and highly sensitive proteomic analyses. *Electrophoresis* 28, 1012-1021].

[0056] 두번째로 각각의 데이터세트에서 펩타이드의 특성으로부터 유니크 매스 클래스(unique mass classes, UMCs)을 확인하였다. 모든 이중 질량 스펙트럼 결과(즉 DTA 화일)은 Bioworks™ 소프트웨어(v. 3.2EF2, Thermo Electron)의 ExtractMSn(v. 3; creation date: 2006. 7. 18)을 이용하여 추출하였고, MS/MS 프리커서 질량 데이터는 SEQUEST를 사용하여 검색하기 전에 PE-MMR 방법으로 보정하였다[Shin et al. (2008) Postexperiment monoisotopic mass filtering and refinement (PE-MMR) of tandem mass spectrometric data increases accuracy of peptide identification in LC/MS/MS. *Mol Cell Proteomics* 7, 1124-1134]. PE-MMR 소프트웨어를 사용하여 각각의 데이터세트에서 평균 7893 UMCs가 확인되었다.

[0057] 세번째로 리눅스 14-노드 클러스터 시스템의 SEQUEST(v. 3.14) 데이터베이스 검색을 통해 펩타이드들의 서열을 확인하고, 그 검색 결과는 타겟-디코이 방법(target-decoy method)으로 평가하였다[Elias et al. (2007) Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 4, 207-214]. 각 데이터세트에서 평균 81.4%의 펩타이드가 N-글라이코실화 펩타이드로 확인되었다.

[0058] 네번째로 펩타이드 서열 검색결과와 UMCs 정보를 통합하여 UMCs 어번던스(abundance)를 계산하였다.

[0059] 다섯번째로 45개의 모든 데이터세트에서 확인된 2699개의 펩타이드(930개의 단백질에 해당)를 포함하는 정렬표에 결합하고, 퀀틸 노말리제이션(quantile normalization)을 이용하여 정렬표에서 강도를 일반화시켰다[Bolstad et al. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19, 185-193].

[0060] 마지막으로 뮬러 등의 방법으로, LC/MS 유사성 점수를 계산하여, 펩타이드 특성(UMCs)의 확인, 정량 및 정렬을 포함하는 전반적인 라벨-프리 정량 과정에 의해 평가하였다[Mueller et al. (2007) SuperHirn - a novel tool for high resolution LC-MS-based peptide/protein profiling. *Proteomics* 7, 3470-3480].

[0061] **1-3. 혈청 N-글라이코프로테옴에서 발현 정도에 차이가 있는 펩타이드의 선별**

[0062] 상기 1-2에서 정렬하고 강도를 일반화시킨 2699개의 펩타이드들을 화학요법제 민감군과 내성군 사이에서 발현 정도에 차이가 있는 펩타이드(differentially expressed peptides, DEPs)를 확인하기 위해, 정렬된 펩타이드의 강도에 대하여 양방 t 검증(two-tailed t-test)와 윌콕슨 랭크 섬 검증(Wilcoxon rank sum test)를 모두 실시하였다[Proschan, M. P. F. a. M. A. (2010) Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. *Statistics Surveys* 4, 1-39].

[0063] 통계 가설 검증의 신뢰성을 높이기 위하여, 정렬된 펩타이드 중에서 먼저 1398개의 글라이코실화 되지 않은 펩타이드들과 각 실험군의 환자들의 반복 시료에서 어번던스의 30% 이상이 손실된 742개의 펩타이드를 제외하고, 558개의 N-글라이코실화 펩타이드(116개의 독자적인 단백질(unique protein))로 검증을 실시하였다.

[0064] 먼저 상기 2가지 검증에서 모두 오류 발견율(False Discovery Rates, FDRs) ≤ 0.05를 충족하는 79개의 DEPs를 선택하였다[Storey et al. (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9440-9445].

[0065] 다음으로 상기 79개의 DEPs 중에서, 다른 서열을 가진 2 이상의 불필요하지 않은 DEPs(non-redundunt DEPs)를 가진 단백질에 대응하거나, 또는 하나의 서열이 불필요하지 않은 DEPs를 가진 단백질에 대응하는 경우에도 도세탁셀 또는 독소루비신 내성 치료 후의 예후와 관련된 것으로 보고되는 mRNA에 대응하는 것으로 50개의 DEPs(24개의 독자적인 단백질)을 엄격히 선정하여 표 2 및 표 3에 나타내었다.

표 2

No.	Peptide	IPI	Symbol	Protein Description	Molecular mass	FDR (t-test)	FDR (ranksum)
1	K.AALAAFNAQNN@GSNFQLEEISR.A	IPI00022431	AHSG	alpha-2-HS-glycoprotein	2365.132718	0.0056	0.0036
2	K.VC*QDC*PLLAPLN@DTR.V	IPI00022431	AHSG	alpha-2-HS-glycoprotein	1771.8262	0.0169	0.0274
3	L.AAFNAQNN@GSNFQLEEISR.A	IPI00022431	AHSG	alpha-2-HS-glycoprotein	2109.97444	0.0000	0.0039
4	K.YDFN@SSM#LYSTAK.G	IPI00022229	APOB	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	1542.657746	0.0225	0.0241
5	K.SKPTVSSSM#EFKYDFN@SSM#LYSTAK.G	IPI00022229	APOB	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	2867.290991	0.0139	0.0278
6	K.LATALSLSNKFVEGSHN@STVSLTTK.N	IPI00022229	APOB	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	2605.362764	0.0078	0.0132
7	K.FVEGSHN@STVSLTTK.N	IPI00022229	APOB	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	1606.786771	0.0070	0.0126
8	Y.KPSAGN@NSLYR.D	IPI00298828	APOH	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	1206.602222	0.0144	0.0161
9	K.PSAGN@NSLYR.D	IPI00298828	APOH	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	1078.507267	0.0142	0.0210
10	K.WNVNAPPTFHSEMMYDN@FTLVPVWGK.E	IPI00218413	BTD	biotinidase	3080.42293	0.0086	0.0111
11	L.TPATNHM#GN@VTFTIPANR.E	IPI00164623	C3	complement component 3	1957.934502	0.0091	0.0152
12	T.PATNHM#GN@VTFTIPANR.E	IPI00164623	C3	complement component 3	1856.886829	0.0091	0.0161
13	P.ATNHM#GN@VTFTIPANR.E	IPI00164623	C3	complement component 3	1759.834069	0.0086	0.0273
14	R.GLN@VTLSSTGR.N	IPI00032258	C4A	complement component 4A (Rodgers blood group)	1104.580427	0.0399	0.0022
15	R.FSDGLESN@SSTQFEVKK.Y	IPI00032258	C4A	complement component 4A (Rodgers blood group)	1902.887595	0.0249	0.0272
16	R.RFEQLELRPVLYNYLDKN@LTVSVHVSPVEGLC*LAGGGGLAQQVLVPAGSAR.P	IPI00032258	C4A	complement component 4A (Rodgers blood group)	5490.911291	0.0464	0.0366
17	R.FEQLELRPVLYNYLDKN@LTVSVHVSPVEGLC*LAGGGGLAQQVLVPAGSAR.P	IPI00032258	C4A	complement component 4A (Rodgers blood group)	5334.810191	0.0144	0.0199
18	K.EWDN@TTTEC*R.L	IPI00025862	C4BPB	complement component 4 binding protein, beta	1311.506666	0.0141	0.0278
19	K.TLFC*N@ASK.E	IPI00025862	C4BPB	complement component 4 binding protein, beta	940.4353555	0.0334	0.0305
20	R.FSYSKN@ETYQLFLSYSSK.K	IPI00022395	C9	complement component 9	2192.03425	0.0254	0.0275
21	K.IVLDPSGSM#NTYLVLDGSDSIGASN@FTGAK.K	IPI00019591	CFB	complement factor B	3057.48809	0.0146	0.0120
22	R.KIVLDPSGSM#NTYLVLDGSDSIGASN@FTGAK.K	IPI00019591	CFB	complement factor B	3185.583045	0.0142	0.0111
23	D.GASN@VTC*INSR.W	IPI00029739	CFH	complement factor H	1178.537907	0.0251	0.0356
24	I.PC*SQPPQIEHGTIN@SSR.S	IPI00029739	CFH	complement factor H	1907.882462	0.0232	0.0370
25	Y.PDN@TTDFQR.A	IPI00017601	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	1093.470548	0.0146	0.0265

[0066]

표 3

No.	Peptide	IPI	Symbol	Protein Description	Molecular mass	FDR (t-test)	FDR (ranksum)
26	K.EN@LTAPGSDSAVFFEQGTTR.I	IPI00017601	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	2126.978524	0.0424	0.0307
27	L.IWNYAPSGIDIFTKEN@LTAPGSDSAVFFEQGTTR.I	IPI00017601	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	3732.797579	0.0045	0.0101
28	R.N@HSC*EPC*QTLAVR.S	IPI00019581	F12	coagulation factor XII (Hageman factor)	1571.684964	0.0403	0.0378
29	R.YPHKPEIN@STTHPGADLQENFC*R.N	IPI00019568	F2	coagulation factor II (thrombin)	2711.242665	0.0446	0.0349
30	P.HKPEIN@STTHPGADLQENFC*R.N	IPI00019568	F2	coagulation factor II (thrombin)	2451.126583	0.0073	0.0117
31	A.KMVSHHN@LTTGATLINEQWLLTTAK.N	IPI00431645	HP	haptoglobin	2807.466842	0.0311	0.0238
32	A.KNLFLN@HSEN@ATAK.D	IPI00431645	HP	haptoglobin	1587.795174	0.0222	0.0233
33	L.PQPQN@VTSLLGC*TH.-	IPI00022488	HPX	hemopexin	1551.738048	0.0067	0.0156
34	K.ALPQPQN@VTSLLGC*TH.-	IPI00022488	HPX	hemopexin	1735.859216	0.0118	0.0164
35	T.PLIAN@ITK.S	IPI00384948	IGHA2	immunoglobulin heavy constant alpha 2	857.4887728	0.0087	0.0139
36	K.VFPLSLDSTPQDGNVVVAC*LVQGFFPQEPLSVTWSESGQN@VTAR.N	IPI00384948	IGHA2	immunoglobulin heavy constant alpha 2	4776.34089	0.0135	0.0142
37	K.LGSFEGLVN@LTFIHLQHNR.L	IPI00020986	LUM	lumican	2195.151611	0.0331	0.0397
38	K.LHINHNN@LTESVGPLPK.S	IPI00020986	LUM	lumican	1882.992999	0.0481	0.0476
39	V.PVPITN@ATLDQITGK.W	IPI00022429	ORM1	orosomucoid 1	1567.848642	0.0098	0.0133
40	L.PLC*ANLVPVPITN@ATLDQITGK.W	IPI00022429	ORM1	orosomucoid 1	2335.248599	0.0039	0.0119
41	R.IYSN@HSALESLALIPLQAPLK.T	IPI00022733	PLTP	phospholipid transfer protein	2278.260154	0.0372	0.0379
42	R.GKEGHFYYN@ISEVK.V	IPI00022733	PLTP	phospholipid transfer protein	1670.796942	0.0060	0.0120
43	K.ADTHDEILEGLNFN@LT.E	IPI00553177	SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1	1801.839921	0.0152	0.0216
44	K.ADTHDEILEGLNFN@LTEIPEAQIH.E	IPI00553177	SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1	2719.300558	0.0420	0.0272
45	H.DEILEGLNFN@LTEIPEAQIHEGFQELLR.T	IPI00553177	SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1	3267.632764	0.0052	0.0117
46	K.LGAC*N@DTLQQLMEVFK.F	IPI00032179	SERPINC1	serpin peptidase inhibitor, clade C, member 1	1866.888464	0.0474	0.0298
47	K.GVTSVSQIFHSPDLAIRDTFVN@ASR.T	IPI00291866	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1	2717.38014	0.0086	0.0302
48	R.DTFVN@ASR.T	IPI00291866	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1	909.4221491	0.0176	0.0258
49	R.N@ISDGFDGIPDNVDAALALPAHSY.S	IPI00298971	VTN	vitronectin	2472.147366	0.0144	0.0269
50	Y.DDGEEKNN@ATVHEQVGGPSLTSDLQAQSK.G	IPI00298971	VTN	vitronectin	3054.404227	0.0311	0.0267

[0067]

[0068] 상기 표 2 및 표 3의 펩타이드 서열에서 X는 시스테인의 카바미도메틸레이션, #는 메치오닌의 산화 및 @는 아스파라긴의 가수분해를 각각 나타내었다.

[0069] 상기 50개의 선정된 DEPs의 MS 및 MS/MS 스펙트라를 조사한 결과 50개의 DEPs의 N-글라이코실화를 확인할 수 있었다.

[0070] 또한 화학요법제 내성군과 민감군 사이의 상기 50개의 DEPs의 발현 차이를 확인할 수 있었다. 예를 들어, 도 2a는 화학요법제 민감성 환자의 도 2 b는 화학요법제 내성 환자의 각각의 최대 피크 강도를 나타내는 용출시간에서 서열 K.SKPTVSSSM#EFKYDFN@SSM#LYSTAK.G를 가진 아포리포프로테인B(APOB) 유래 DEPs의 이소트로픽 클러스터의 매스 스펙트럼을 나타낸 것으로, 화학요법제 민감군이 내성군의 어번던스에 비하여 2 배 이상 증가되어 민감군과 내성군 사이에 확연히 다른 양상을 나타내었다.

[0071] 또한 도 2c는 화학요법제 민감군 및 내성군에서 APOB 유래 4개의 DEPs의 상대 어번던스를 나타낸 그래프로서, 아포리포프로테인B(APOB) 유래의 4개의 펩타이드 모두에서 화학요법제 내성군과 민감군 사이에서 어번던스에 차이가 있음을 보여주고 있다.

[0072] 또한 도 2d는 화학요법제 민감군에서 내성군에 비하여 4개 모두의 펩타이드에서 더 높은 어번던스를 나타낸다는 것을 보여주는 그래프로서, 화학요법제 민감군의 APOB 유래의 4개의 펩타이드 모두의 어번던스는 화학요법제 내성군 환자의 것에 비하여 현저히 증진되었음을 확인할 수 있다($P = 1.291 \times 10^{-4}$).

[0073] **1-4. 클러스터화 및 부분 최소자승-분별 분석**

[0074] 상기 1-3에서 선별된 DEPs와 시료를 각각의 발현 패턴에 따라 그룹화를 시도하였다. 화학요법제 민감군과 내성군 사이의 차이를 시각화하고, 각각의 DEPs가 가지는 화학요법제 민감군과 내성군 판별에서의 상대적 중요성을 VIP 값(variable importance in projection)에 기반하여 계산하기 위하여 부분 최소자승-분별 분석(partial least square-discriminant analysis, PLS-DA)을 이용하였다[Geladi et al. (1986) Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta* 185, 1-17].

[0075] 먼저 부분 최소자승-분별 분석을 실시하기 전에 화학요법제 민감군과 내성군 사이에서 발현 정도에 차이가 있는 펩타이드(differentially expressed peptides, DEPs)와 종래 알려진 4 개의 조직 및 세포주 데이터세트에서 얻은 발현 정도에 차이가 있는 mRNA 및 발현 정도에 차이가 있는 단백질(differentially expressed proteins, DEPs) 결과를 통합하였다.

[0076] 첫번째 세트는 유방암 조직에서 독세탁셀(DC) 내성과 관련된 mRNA에 대응하는 발현 차이, 두번째 세트는 유방암 조직에서 독소루비신(AC) 내성과 관련된 mRNA에 대응하는 발현 차이, 세번째 세트는 유방암 조직에서 도세탁셀 및 독소루비신(DC+AC) 내성과 관련된 DEPs의 발현 차이, 그리고 네번째 세트는 유방암 조직에서 예후와 관련된 mRNA에 대응하는 발현 차이이다. 상기 네번째 세트는 선행화학요법에 대한 임상적 및 병인학적 반응이 유방암 치료의 예후 및 생존과 상관관계가 있음을 보여주기 위하여 통합하였다.

[0077] 각각의 데이터세트에서 발현 정도에 차이가 있는 유전자(differentially expressed genes, DEGs) 및 발현 정도에 차이가 있는 단백질(differentially expressed proteins, DEPs)를 양방향 t-검증에서 FDR ≤ 0.05인 것과 XPRESS 비(ratio) 〉 1.5 또는 XPRESS 비 〈 0.067인 것을 각각 확인하였다.

[0078] 도 3에는 상기 통합된 데이터세트와 함께 시료와 1-3에서 선별된 DEPs의 클러스터링 결과를 히트맵(heatmap)으로 나타내었다. 상기 도 3에서 세로줄 오른쪽의 막대들은 본 발명에서 선택한 50개의 DEPs와 4 개의 조직 및 세포주 데이터세트에서 얻은 발현 정도에 차이가 있는 유전자(DEGs) 사이에서 공통되는 유전자 또는 단백질을 나타낸 것으로, 하나의 단백질에 복수의 DEPs가 있는 경우에는 하나만 나타내었다.

[0079] 또한 도 3은 상기 50개의 DEPs의 발현 패턴의 차이 특성을 조사하기 위하여, DEPs의 강도에 대한 계층적 클러스터화(hierarchical clustering)한 것이다. 도 3의 클러스터화 결과는 DEPs에 5개의 클러스터가 존재하고, 그 중 클러스터 2, 4 및 5의 3개의 클러스터는 나머지인 클러스터 1 및 3에 비하여 화학요법제 내성군으로부터 민감군을 분리하는데에 유용함을 보여주고 있다.

[0080] 또한 도 3은 환자(또는 시료)에도 3개의 클러스터가 존재하고, 5 명의 모든 화학요법제 내성 환자[CR 1-5]를 포함하고, 4명의 화학요법제 민감성 환자[CS 1-4]와 6명의 화학요법제 민감성 환자[CS 5-10]를 포함하는 것으로 클러스터링 될 수 있다. 이때 [ ]안의 숫자는 환자의 일련번호를 나타낸다. 그런데 특이하게도 4명의 화학요법제 민감성 환자 클러스터[CS 1-4]는 나머지 화학요법제 민감성 환자 클러스터[CS 5-10]보다 오히려 화학요법제 내성 환자 클러스터[CR 1-5]와 덴드로그램(dendrogram)이 유사하였다. 이러한 유사성은 화학요법제 민감성 환자 클러스터[CS 1-4]와 화학요법제 내성 환자 클러스터[CR 1-5] 사이에서 DEPs의 클러스터 1 및 3의 발현 패턴이 유사하기 때문이다.

[0081] 따라서 상기 클러스터링 결과는 DEPs의 클러스터 2, 4 및 5는 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자의 차이를 식별하는데에 유용함을 나타낸다.

[0082] 상기 공통되는 단백질은 먼저 DEPs의 클러스터 2, 4 및 5에 포함되는 것으로, 보체 4A성분(complement component 4A, C4A), 보체 9성분(complement component 9, C9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin, CP), 세르핀 펩티데이즈 저해제, 클레이드 C, 멤버 1(serpin peptidase inhibitor, clade C, member 1, SERPINC1), 다음으로 DEPs의 클러스터 1 및 3에 포함되는 것으로 응고인자 XII(coagulation factor XII, F12), 바이오티니데이즈(biotinidase, BTD) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1, ORM1)이었다.

[0083] 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자를 구별하는 데에 있어서 상기 1-3에서 선별된 50개의 DEPs의 상대적 기여도를 평가하는 것이 필요하다. 이를 위하여, 부분 최소자승-분별 분석을 통해 선별된 DEPs의 발현 프로파일을 비교하고, VIP 값(variable importance in projection)을 계산하였다[Chong et al. (2005) Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometr Intell Lab* 78, 103-112].

[0084] 도 4a에 나타낸 PLS-DA 결과는 결정 함수(청색선)에 의해 상기 50개의 DEPs의 발현 차이에 의해 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자의 구분이 명확히 가능함을 나타내고 있다. 또한 도 3의 클러스터화 결과에서와 같이 화학요법제 민감성 환자를 CS1군과 CS2군의 서브그룹으로 구별할 수 있음을 재확인하였다.

[0085] 도 4b는 50개의 DEPs의 VIP값을 내림차순으로 정렬한 것으로, VIP값이 크다는 것은 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자의 구분에 기여도가 높다는 것을 의미한다.

[0086] 따라서 VIP 값이 1을 넘는 AHSG(alpha-2-HS-glycoprotein), APOB(apolipoprotein B), BTD(biotinidase), C3(complement component 3), C4A(complement component 4A), C9(complement component 9), CP(ceruloplasmin), HPX(hemopexin), ORM1(orosomucoid 1), PLTP(phospholipid transfer protein), SERPINA1(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1), SERPING1(serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)) 및 VTN(vitronectin) 총 13종의 단백질을 선택하였다.

[0087] **1-5. 웨스턴 블랏을 통한 발현 차이 검증**

[0088] 상기 1-4에서 선별된 13종의 단백질의 화학요법제 내성 환자와 민감성 환자 사이의 발현 차이를 검증하기 위하여, 상기 1-1의 환자와 별도로, 5 명의 화학요법제 내성 환자(CR)와 8명의 민감성 환자(CS)로부터 13개의 독립적인 혈청 시료를 수집하였다. 혈청 시료를 제공한 환자의 특성을 표 4에 나타내었다.

표 4

Patient		cStage*	pStage*	RECIST Evaluation	Tumor Size Reduction Rate (%)
Chemoresistant Group (CR)	CR1	IIIA	IIIA	PD	-29.8
	CR2	IIA	IIIA	SD	13
	CR3	IIIA	IIIC	SD	-16.7
	CR4	IIIA	IIIC	SD	17.5
	CR5	IIIA	IIIC	SD	21.1
Chemoresponsive Group (CS)	CS1	IIIB	IIB	PR	37.8
	CS2		IIB	PR	38.9
	CS3	IV	IIA	PR	43.1
	CS4	IIB	IIIA	PR	46.4
	CS5	IIB	I	PR	46.7
	CS6	IIIB	I	PR	70
	CS7	IIIA	IIIA	PR	87.5
	CS8	IIIB	PCR	PR	100

CR = chemoresistant ; CS = chemosensitive ; cStage = clinical stage ; pStage = pathologic stage ; NG= nuclear grade ; ER = estrogen receptor ; PgR = progesterone receptor ; Her2 = Her2 receptor.
SD=stable disease; PD=progressive disease; PR=partial response.

[0089]

[0090] 상기 환자들로부터 선행화합요법 전에 혈청 시료를 채취하였다. 혈청 시료에서 높은 농도로 존재하는 6종의 단백질을 제거하기 위하여 다중 친화 제거 LC 컬럼(Human 6, Agilent, Santa Clara, CA)를 이용하여 바이오마커 후보 단백질의 검출에 간섭을 줄 수 있는 단백질들을 제거하였다. 이 과정에서 SERPINA1은 제거되었다. 브래드포드 법으로 단백질을 농도를 확인한 후, SDS-PAGE로 단백질을 분리하고 PVDF 멤브레인에 겔을 옮겼다. 멤브레인을 5% 탈지유로 실온에서 1 시간 블로킹하고, 1차 항체를 결합시켰다. 다시 블랏을 세척한 후 호스래디쉬 퍼록시데이즈-중합 2차 항체로 실온에서 1시간 반응시킨 후, 신호를 검출하였다. 1차 항체로는 상기 1-5

에서 선별된 SERPINA1를 제외한 12 종의 단백질의 1차 항체를 이용하였다.

[0091] 상기 12 종의 단백질 중에서 화학요법제 내성 환자와 민감성 환자 사이에 단백질 발현의 차이를 나타낸 것은 AHSG, APOB, C3, C9, CP 및 ORM1 총 6종이었다.

[0092] 도 5는 AHSG, APOB, C3, C9, CP 및 ORM1 각각에 의한 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자 사이의 발현 차이를 웨스턴 블랏을 이용하여 확인한 그래프로서, C3, C9, CP 및 APOB 4종의 단백질에서 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자 사이에 현저한 차이가 있었고($P \leq 0.05$), AHSG($P=0.0797$) 및 ORM1($P=0.0534$)에서는 약간의 차이만 존재하였다.

[0093] 상기 결과는 LC-MS/MS 데이터에서 확인한 발현 차이와 일치하는 것으로, 특히 6종의 단백질 중에서 AHSG, C3, C9 및 CP 4종은 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자의 구별에 유리한 DEPs의 클러스터2, 4 및 5의 3개의 클러스터에 속하는 것이었다.

[0094] **실시예 2: 진행 유방암 환자에서 선행화학요법에 대한 저항성을 예측**

[0095] 상기 실시예 1의 1-5에서 선별한 알파-2-HS-글라이코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein, AHSG), 아포프로테인 B(apolipoprotein B, APOB), 보체 3성분(complement component 3, C3), 보체 9성분(complement component 9, C9), 세룰로플라스민(ceruloplasmin, CP) 및 오로소뮤코이드 1(orosomucoid 1, ORM1) 총 6종의 혈청 바이오마커를 이용하여, PLS-DA 모델에 의해 상기 1-5의 13명의 유방암 환자들에 대하여 선행화학요법에 대한 저항성을 예측하였다.

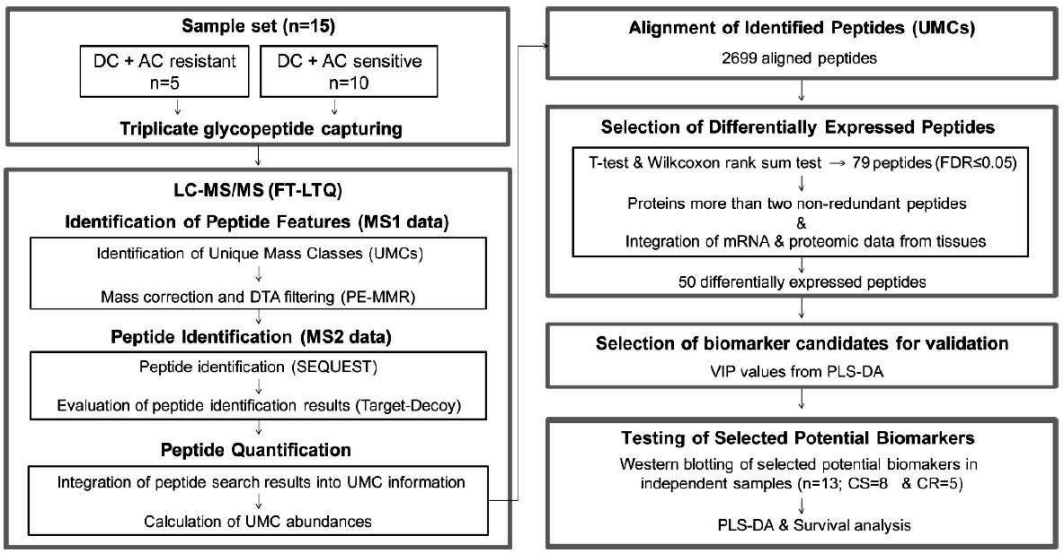
[0096] 도 6은 6종의 선택된 바이오마커 조합을 이용한 PLS-DA 결과를 나타낸 것으로, 역삼각형은 화학요법제 내성 환자, 정삼각형은 화학요법제 민감성 환자를 나타내며, 청색선은 결정 함수이다. 시료의 좌표계(LV1, LV2) 및 PLS 공간 상에서 정의된 결정 함수(decision function)를 이용하여, 결정 함수에 직교하는 축에 시료의 좌표계를 도시하여 시료의 판별 점수를 계산하였다.

[0097] 하나의 적색 정삼각형(CR5-II)이 화학요법제 민감군 영역에 포함된 것을 제외하고는, 나머지 모든 시료는 결정 함수에 의하여 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자를 정확히 예측하였고, 이는 도 7에 나타낸 것과 같이 화학요법제 민감성 환자와 내성 환자 사이에 명확한 판별 점수의 차이를 나타내었다($p=1.0699e-017$).

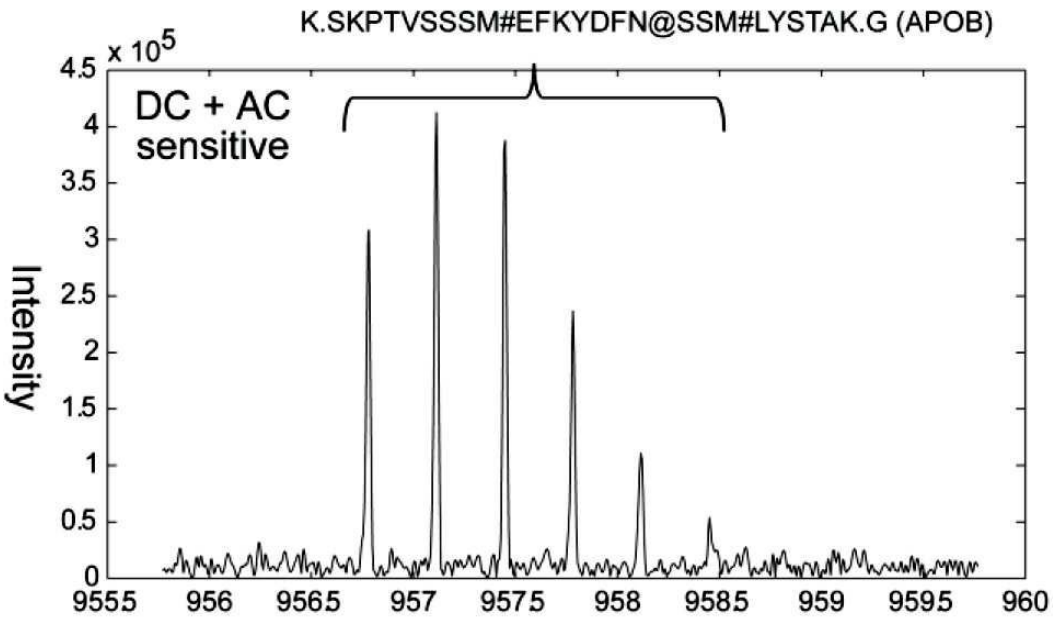
[0098] 더 나아가 도 8은 판별 점수가 높은 그룹과 낮은 그룹 사이의 무재발 생존 분석을 비교한 것으로, 선택된 바이오마커 조합은 유방암 환자의 무재발 생존을 예측할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

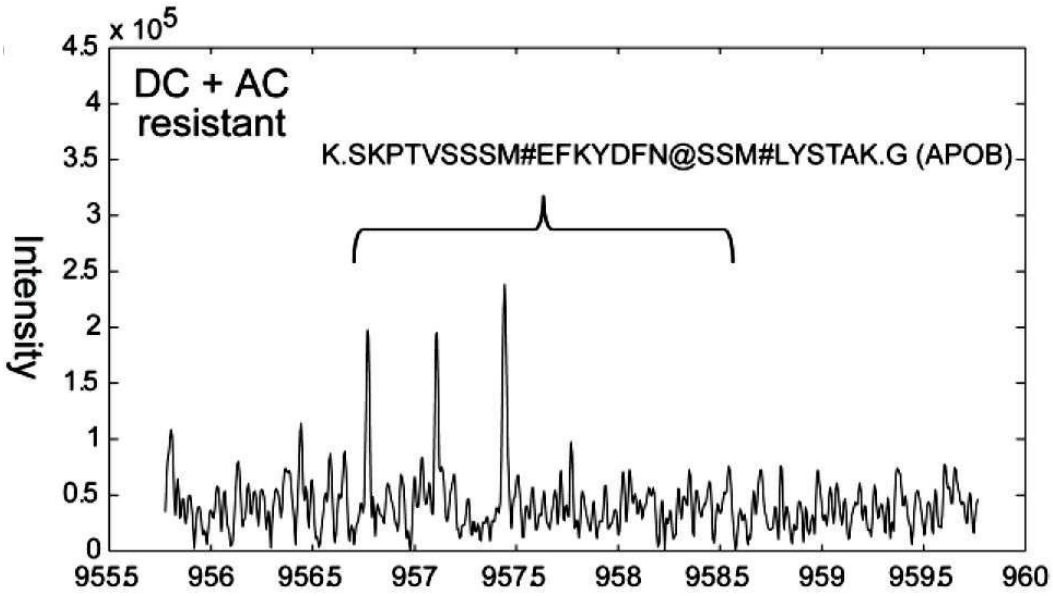
도면1



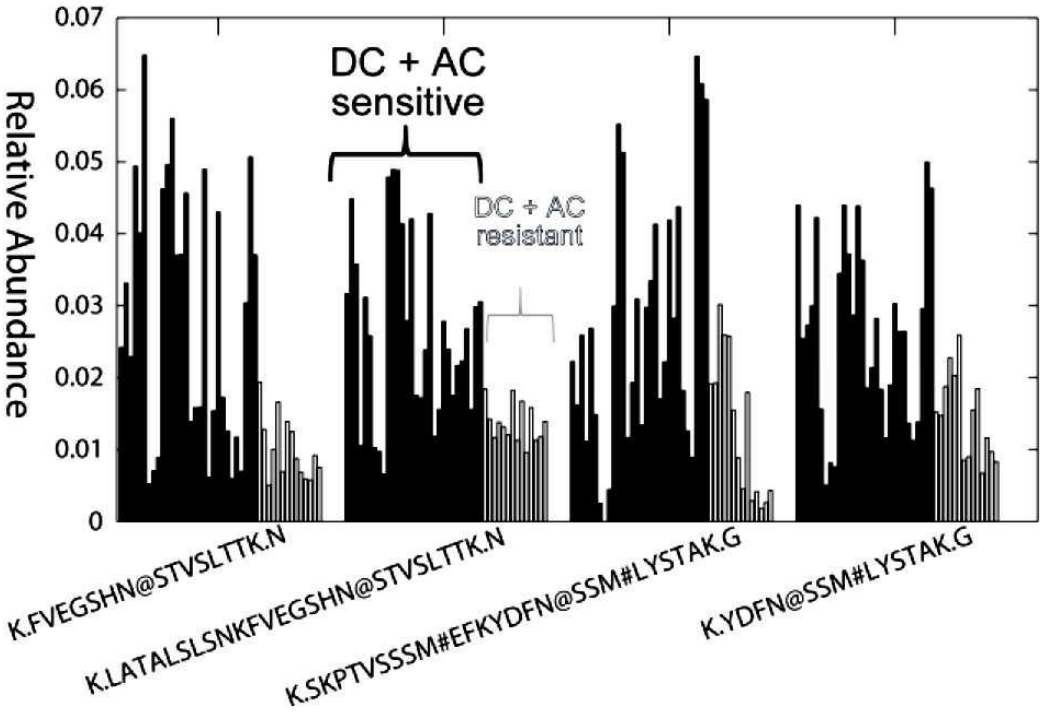
도면2a


K.SKPTVSSSM#EFKYDFN@SSM#LYSTAK.G (APOB)
x 10^5
DC + AC
sensitive
Intensity
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
9555
956
9565
957
9575
958
9585
959
9595
960

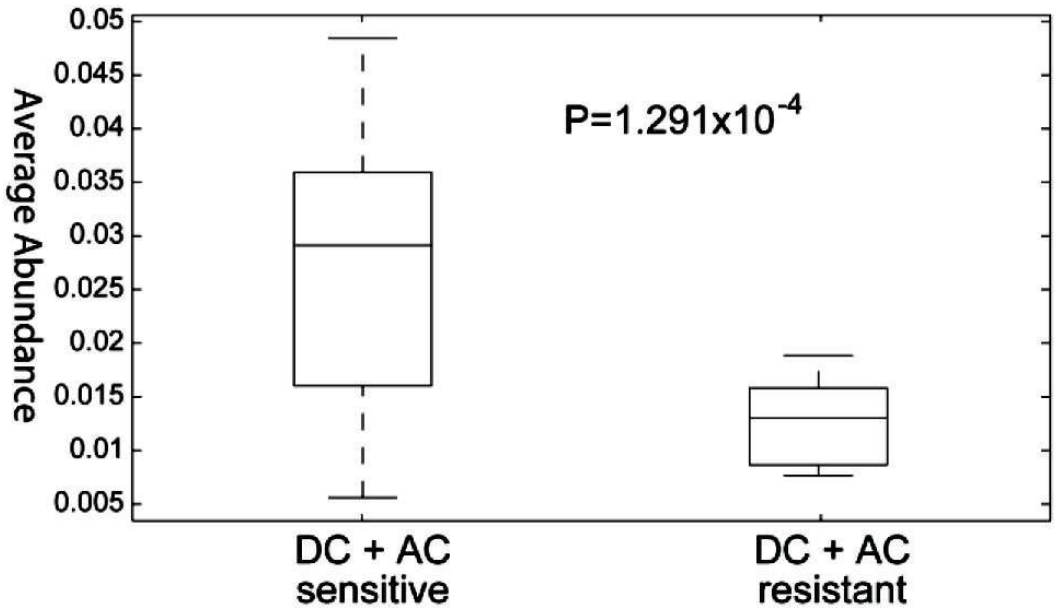
도면2b


x 10^5
DC + AC
resistant
K.SKPTVSSSM#EFKYDFN@SSM#LYSTAK.G (APOB)
Intensity
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
9555
956
9565
957
9575
958
9585
959
9595
960

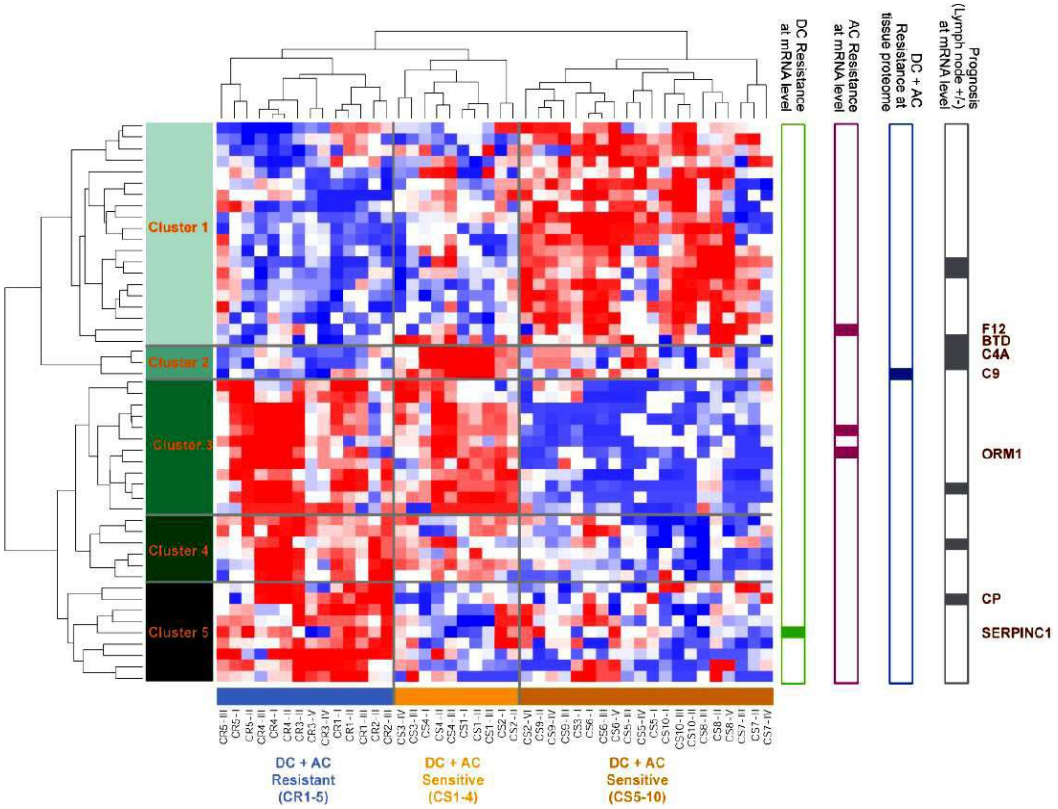
도면2c


Relative Abundance
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
DC + AC
sensitive
DC + AC
resistant
K.FVEGSHN@STVSLTTK.N
K.LATALSLSNKFVEGSHN@STVSLTTK.N
K.SKPTVSSSM#EFKYDFN@SSM#LYSTAK.G
K.YDFN@SSM#LYSTAK.G

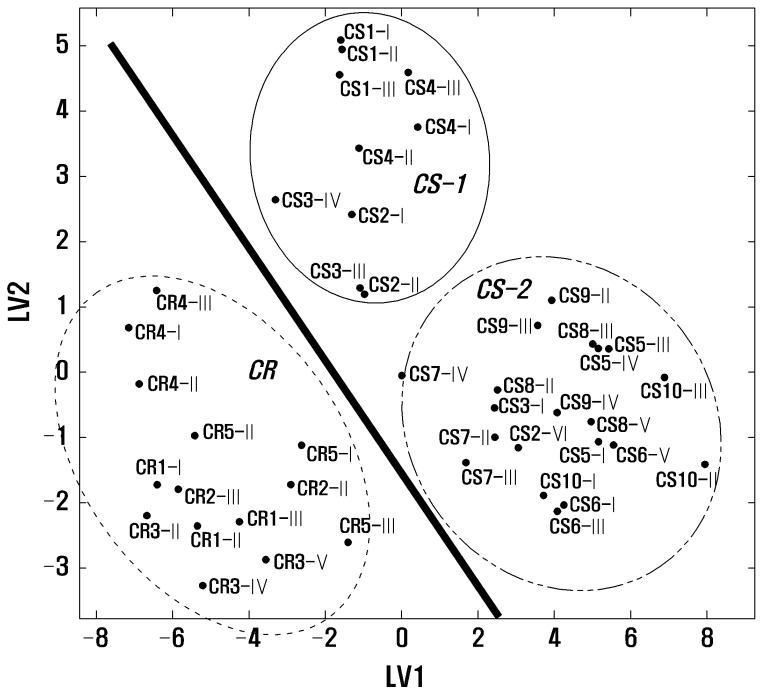
도면2d


Average Abundance
0.05
0.045
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
P=1.291x10-4
DC + AC
sensitive
DC + AC
resistant

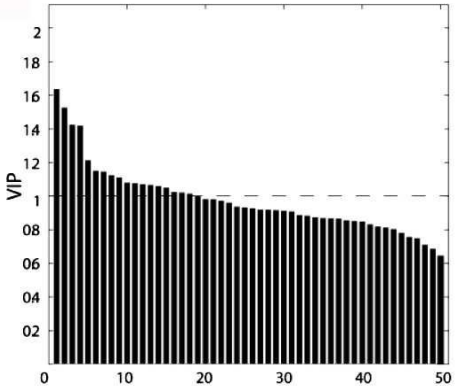
도면3


DC Resistance at mRNA level
AC Resistance at mRNA level
DC + AC Resistance at tissue proteome
Prognosis (Lymph node +/-) at mRNA level
Cluster 1
Cluster 2
Cluster 3
Cluster 4
Cluster 5
F12
BTD
C4A
C9
ORM1
CP
SERPINC1
DC + AC Resistant (CR1-5)
DC + AC Sensitive (CS1-4)
DC + AC Sensitive (CS5-10)

도면4a

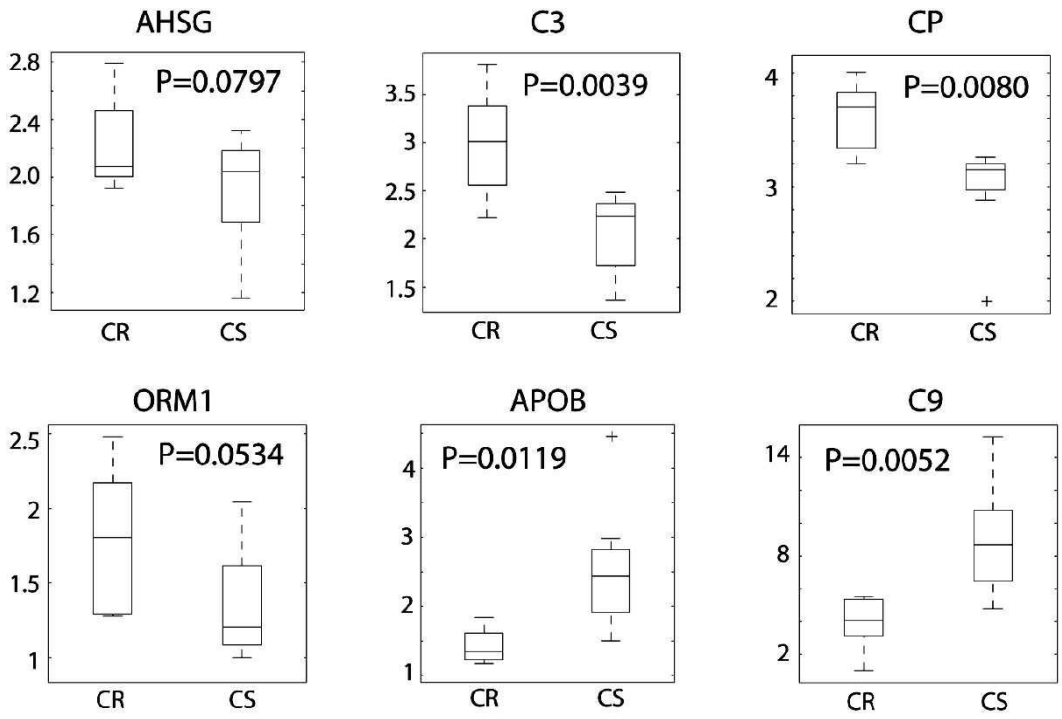

CS1-I
CS1-II
CS1-III
CS4-III
CS4-I
CS4-II
CS-1
CS3-IV
CS2-I
CS3-III
CS2-II
CS-2
CS9-II
CS9-III
CS8-III
CS5-III
CS5-IV
CS7-IV
CS8-II
CS10-III
CS3-I
CS9-IV
CS8-V
CS7-II
CS2-VI
CS5-I
CS6-V
CS7-III
CS10-I
CS10-II
CS6-I
CS6-III
CR
CR4-III
CR4-I
CR4-II
CR5-II
CR5-I
CR1-I
CR2-III
CR2-II
CR3-II
CR1-III
CR1-II
CR5-III
CR3-V
CR3-IV
LV1
LV2

도면4b

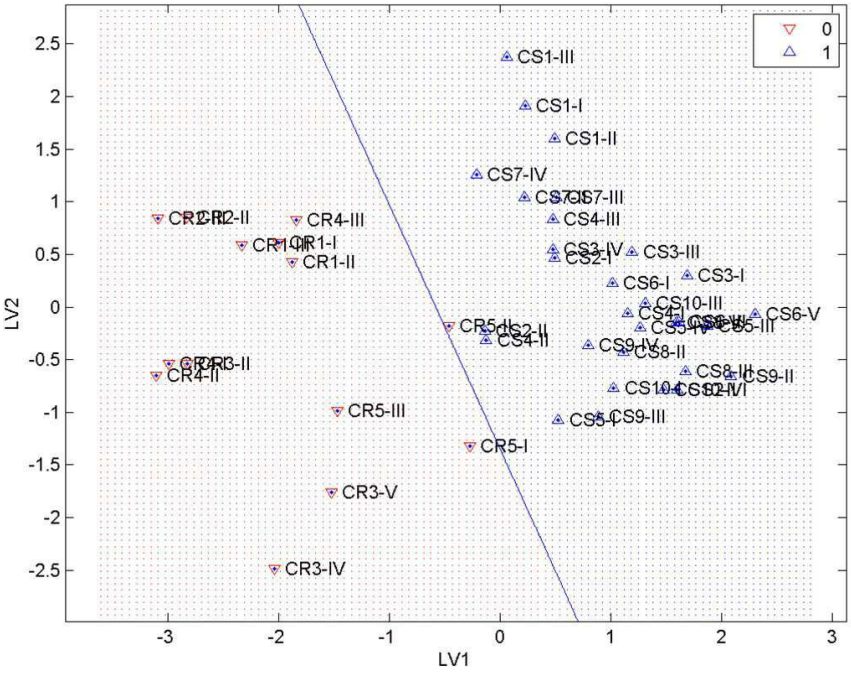


Protein	Peptides
AHSG	L.AAFNAQNN@GSNFQLEEISR.A K.AALAAFNAQNN@GSNFQLEEISR.A
APOB	K.FVEGSHN@STVSLTTK.N
BTD	K.WNVNAPPTFHSEMMYDN@FTLVPVWGK.E
C3	P.ATNHM#GN@VTFTIPANR.E T.PATNHM#GN@VTFTIPANR.E L.TPATNHM#GN@VTFTIPANR.E
C4A	R.FEQLELRPVLYNYLDKN@LTVSVHVSPVEGLC*LAGGGGLAQQVLVPAGSAR.P R.RFEQLELRPVLYNYLDKN@LTVSVHVSPVEGLC*LAGGGGLAQQVLVPAGSAR.P
C9	R.FSYSKN@ETYQLFLSYSSK.K
CP	I.IWNYAPSGIDIFTKEN@LTAPGSDSAVFFEQGTTR.I Y.PDN@TTDFQR.A
HPX	L.PQPQN@VTSLLGC*TH.-
ORM1	I.PLC*ANLVPVPITN@ATLDQITGK.W V.PVPITN@ATLDQITGK.W
PLTP	R.GKEGHFYYN@ISEVK.V
SERPINA1	H.DEILEGLNFN@LTEIPEAQIHEGFQELLR.T
SERPING1	R.DTFVN@ASR.T
VTN	Y.DDGEEKNN@ATVHEQVGGPSLTSDLQAQSK.G

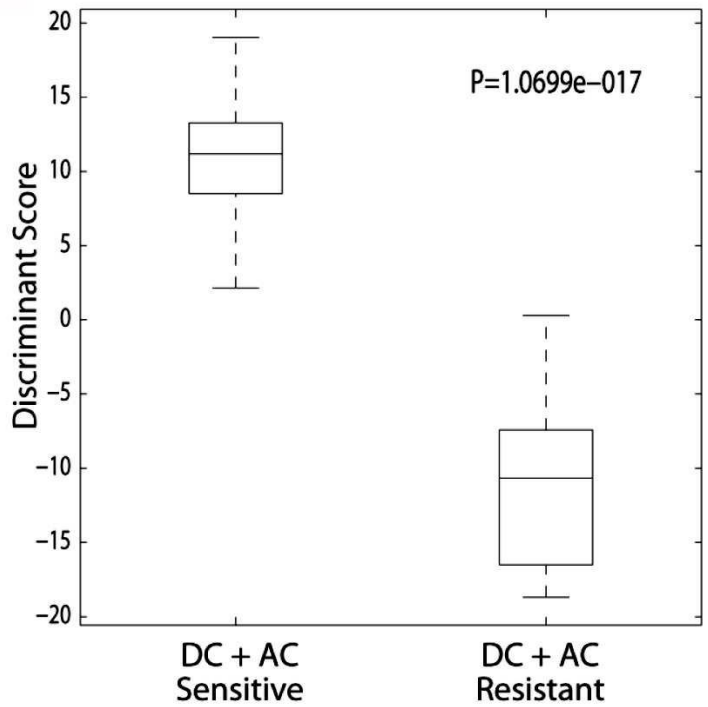
도면5



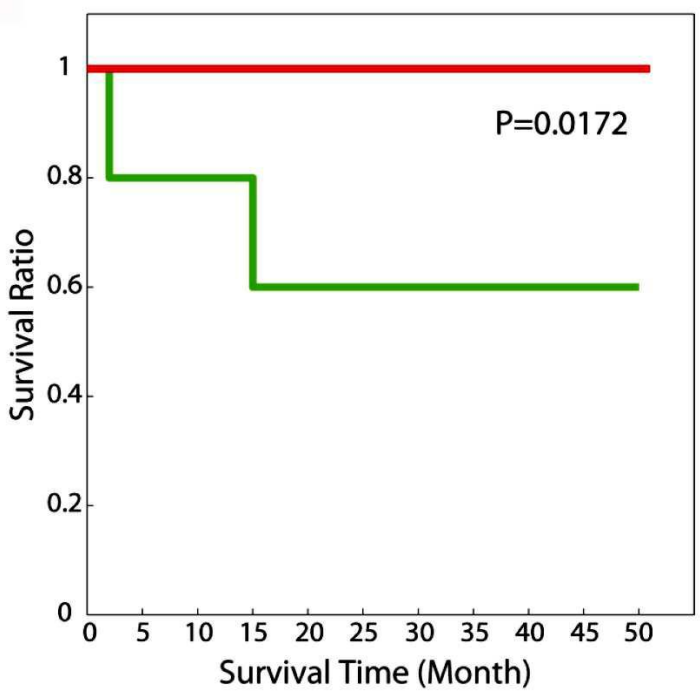
도면6


0
1
CS1-III
CS1-I
CS1-II
CS7-IV
CS4-III
CS3-III
CS3-I
CS6-I
CS10-III
CS6-V
CS8-II
CS9-II
CR4-III
CR1-II
CR5-III
CR5-I
CR3-V
CR3-IV
LV1
LV2

도면7


P=1.0699e-017
Discriminant Score
DC + AC
Sensitive
DC + AC
Resistant

도면8


P=0.0172
Survival Ratio
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
Survival Time (Month)