(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월16일
(11) 등록번호 10-1416475
(24) 등록일자 2014년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0018924
(22) 출원일자 2006년02월27일
심사청구일자 2011년02월23일
(65) 공개번호 10-2007-0088979
(43) 공개일자 2007년08월30일
(56) 선행기술조사문헌
Gynecologic Oncology. 2005.10.20.(available online), Volume 100, Issue 2, Pages 294-299.*
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2001, Volume 276, Number 22, Pages 18657-18664.*
Cancer. 1985, Volume 56, Pages 562-566.
Cancer. 1988, Volume 56, Number 1, Pages 125-134.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
사회복지법인 삼성생명공익재단
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
(72) 발명자
박근칠
서울특별시 강남구 언주로30길 56, 타워펠리스 3차 G동 1503호 (도곡동)
김학성
대전광역시 유성구 어은로 57, 107동 1202호 (어은동, 한빛아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

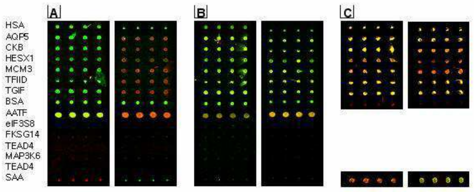
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **암진단용 마커 단백질, 그리고 이를 이용한 암진단방법 및암 진단키트**

(57) 요 약

본 발명은 암 환자에서 정상인과 차별적으로 발현되는 혈청 단백질을 포함하는 암 마커 폴리펩티드, 상기 암 마커 폴리펩티드를 항원으로 하여 제조되는 항체, 이를 이용하는 암 진단방법 및 암 진단 키트에 관한 것으로서, 본 발명을 이용하여 암조직 또는 혈액 내 암 마커 폴리펩티드의 분석으로 조기에 신속하고 정확하고, 효율적으로 암을 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 혈청만으로 진단이 가능하므로 암 진단에 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도5



Cy3와 Cy5로 각각 표지된 표준 샘플과 테스트 샘플

각 슬라이드는 왼쪽은 Cy3-표준 샘플/ Cy5-테스트 샘플로 오른쪽은 Cy5-표준 샘플/ Cy3-테스트 샘플로 실험한 결과.

(A) : 폐암환자의 혈청을 테스트 샘플로 사용.

(B) : 정상인의 혈청을 테스트 샘플로 사용.

(C) : 양성 폐질환 환자의 혈청을 테스트 샘플로 사용.

(72) 발명자

김진국

경기 성남시 분당구 정자일로 100, C동 1303호 (정자동, 미켈란쉘쉐르빌)

서수원

서울특별시 송파구 백제고분로18길 30, 우성4차아파트 107동 905호 (잠실동)

김원석

경기도 성남시 분당구 정자로 144, 407동 1102호 (정자동, 정든마을)

안진석

서울특별시 강남구 광평로31길 27, 수서 삼성아파트 111동 503호 (수서동)

강지민

서울특별시 강남구 개포로 516, 주공아파트 701동 1201호 (개포동)

한민규

대전광역시 유성구 구성동 373-1

특허청구의 범위

청구항 1

AQP5(aquaporin 5) 단백질을 포함하는, 비소세포폐암 마커 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 AQP5 단백질은 Genebank Accession: NM_001651의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 비소세포폐암 마커 폴리펩티드.

청구항 3

제1항의 비소세포폐암 마커 폴리펩티드를 항원으로 하여 제조되며, 상기 비소세포폐암 마커 폴리펩티드에 대한 특이성을 갖는 항체.

청구항 4

제1항의 비소세포폐암 마커 폴리펩티드를 항원으로 하여 제조되며 상기 비소세포폐암 마커 폴리펩티드에 대한 특이성을 갖는 항체를 함유하는 비소세포폐암 진단용 키트.

청구항 5

AQP5 단백질을 코딩하는 Genebank Accession: NM_01651로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 서열과, 상기 선택된 폴리뉴클레오티드 서열에 대한 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 비소세포폐암 진단용 핵산 프로브.

청구항 6

제5항의 비소세포폐암 진단용 핵산 프로브를 포함하는 비소세포폐암 진단용 DNA 마이크로 어레이.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 비소세포폐암 진단용 키트는 CKB(creatine kinase brain), HESX1(homeobox protein), MCM3(minichromosome maintenance protein 3), TFIID(TATA-binding protein) 및 TGIF(5'-TG-3' interacting protein)로 이루어지는 군에서 선택되는 단백질인 비소세포폐암 마커 폴리펩티드를 항원으로 하여 제조되며 상기 비소세포폐암 마커 폴리펩티드에 대한 특이성을 갖는 항체들로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 항체를 추가로 포함하는, 비소세포폐암 진단용 키트.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 비소세포폐암 진단용 DNA 마이크로 어레이는 CKB(creatine kinase brain), HESX1(homeobox protein), MCM3(minichromosome maintenance protein 3), TFIID(TATA-binding protein) 및 TGIF(5'-TG-3' interacting protein)로 이루어지는 군에서 선택되는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과, 상기 폴리뉴클레오티드 서열에 대한 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열을 비소세포폐암 진단용 핵산 프로브로 더 포함하는 것인 비소세포폐암 진단용 DNA 마이크로 어레이.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[0007] 본 발명은 폐암 환자에서 정상인과 차별적으로 발현되는 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 이의 용도에 관한 것으로서, 혈액 내 함유량으로 폐암을 조기 진단할 수 있으며, 마이크로 어레이를 이용할 경우 폐암의 조기진단에 있어 결과의 판독이 신속 정확하여 효율적이며, 혈청만으로 진단이 가능하므로 진단이 용이하고 편리한 장점이 있다.

[0008] 여러 가지 암 환자의 체액중에는 다수의 세포성 단백질이 증가하거나, 감소하는 것으로 나타난다. 암 환자에 있어서, 암세포 특이적인 발현양상을 나타내는 단백질의 유무 또는 발현양 분석함으로써, 암에 대한 진단 및 예후 판정에 이용할 수 있다. 예를 들면, 전립선 특이 항원(PSA)가 혈청 수준에서 증가한 것은 사람 전립선 암 존재의 지료로서 사용되어 왔다.

[0009] 혈액, 조직 시료등에서 분석가능한 몇몇 진단 마커가 알려져 있으며, 그 예로는 Carcinoembryonicc antigen(CEA), alpha Fetoprotein(AFP),전립선 특이적 항원(Prostate Specific Antien PSA)이 있다. 그러나 이러한 마커들은 암의 존재 유무에 대한 민감도 및 특이도가 낮다. 따라서 상기 진단방법은 시간과 노동력이 많이 소요되는 임상적 분석방법으로 검증할 필요가 있다(예, X-ray, mammograms, biopsies등).

[0010] 폐암은 최근 수십년간 그 빈도가 급속히 증가하여, 오늘날에는 서양에서는 남자와 여자 모두에게서 가장 많이 발생하는 악성종양이 되었으며, 우리나라에서도 남자에서는 위암 다음으로 많은 악성종양이다. 여자에게서도 놀랄 만큼 그 빈도가 증가하고 있다. 폐암환자들의 증상은 그 증상이 없이 신체검사나 다른 질환으로 병원에서 검사도중 우연히 발견되는 경우에서부터 폐암의 양상에 따라 다양하게 나타날 수 있다. 비소세포 폐암은 소세포 폐암을 제외한 편평상피암, 선암, 대세포암이 포함되는데, 이 세 조직형의 진행 양상이 비슷하고 치료방법도 동일하여 하나로 분류하여 치료하고 있다. T3N0는 어떤 크기의 암종이든 흉벽, 횡경막, 종경동흉막, 벽측 심낭을 침습한 경우 또는 기관분지로부터 2cm 이내이 주 기관지가 침습된 경우 또는 전폐에 확산된 무기폐 혹은 폐쇄성 폐암이 있는 경우(T3)를 말하며 국소림프절 전이가 없는 경우(N0)이다. 폐암의 병기로는 1병기는 암이 폐실질에 국한되어 있고 3cm 이하인 경우를 말하고, 2병기는 암이 주위의 림프절에 퍼져 있고 늑막까지 퍼져있는 경우, 3병기는 암이 흉벽과 횡경막까지 퍼져 있거나 종격동림프절에 퍼져 있는 경우를 3A 병기라고 하며 3A기 까지 수술이 가능하고, 3B 병기는 종격동의 혈관, 식도, 기관등에 침범한 경우로 수술불가능 경우이다. 4병기는 암이 타장기(간, 뼈, 뇌, 골수)까지 퍼진 경우을 말한다.

[0011] 폐암의 진단에 가장 중요하고 간편한 검사방법인 흉부X선 촬영으로 폐의 종괴를 발견할 수 있으며 그밖에 폐렴에 의한 침윤, 기관지폐쇄에 의한 폐허탈, 늑막삼출액유무, 횡격막신경으로의 침범에 의한 횡격막의 상승과 같은 소견을 볼 수 있으며 늑골 등 흉곽골격으로의 전이소견을 볼 수 다. 또한 원발종양의 종격동이나 주위조직으로의 침범 범위를 확인하고 원격전이 등의 발견에 전산화 단층촬영이나 자기공명촬영이 유용하게 이용된다. 그리고 객담내 세포검사, 기관지 내시경 및 기관지 생검에 의해 조직학적으로 폐암을 확진할 수 있다.

[0012] 그러나 폐암환자의 대략 절반은 발견 당시 이미 수술이 불가능하며 수술이 가능하다고 판단되어 수술을 시행하여도 그중 많은 수에서는 완전절제가 불가능한데, 그 이유는 증상이 있어 병원을 찾는 많은 환자는 이미 병이 진행되어 완치가 불가능한 상태이기 때문이다. 그러므로 폐암의 완치율을 높이기 위해서있는 폐암의 조기진단 치료가 가장 중요하다.

[0013] 폐암은 세부적인 진단이 어렵다는 문제를 갖는다. 경험이 많은 병리학자들 사이에서도 폐암의 세부 유형에 대한 의견이 엇갈린다는 사실을 봐도 그 어려움을 짐작할 수 있다. 이 같이 폐암의 세부적인 진단이 어려운 이유는 진단에 유용한 표지(marker)가 제한적이기 때문이다. 예를 들어, 백혈병(leukemia)이나 임파종(lymphoma) 같은 혈액암의 경우에는 표지가 여럿 동정돼 있어 세부적인 진단이 용이한데 반해 폐암의 경우는 그렇지가 못하다. 대부분의 충실성 종양(solid tumors)의 경우에도 폐암과 유사한 문제가 발견된다.

[0014] 따라서, 혈액등 포함하는 생물학적 시료에 존재하며 암 특이적인 마커 및 이들 마커를 이용한 높은 정확도와 정밀도로 암을 진단할 수 있는 방법에 대한 개발이 절실하다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

[0015] 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자, 본 발명은 폐암 환자의 혈청의 단백질 발현 패턴을 이용한 폐암 조기진단을 위한 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0016] 본 발명이 또다른 목적은 폐암 조기진단 결과의 판독에 있어 신속성과 정확성을 높일 수 있는, 폐암 환자의 혈청에 특이적으로 발현되는 단백질을 코딩하는 유전자를 프로브로 사용한 DNA 마이크로어레이를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또다른 목적은 혈청에 존재하는 단백질을 폐암 진단용 마커를 제공하여, 혈청만으로도 폐암진단을 정확하고 용이하게 하는 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또다른 목적은 폐암 환자의 혈청에 특이적으로 발현되는 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자

를 폐암진단용 마커로 사용하여 암을 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또다른 목적은 상기 단백질에 대한 항체, 및 이를 이용하여 폐암진단을 정확하고 용이하게 하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

[0020] 본 발명은 폐암 마커 폴리펩티드(marker polypeptide), 및 이를 이용한 폐암 진단방법, 상기 폴리펩티드(polypeptide)에 대한 항체, 및 상기 항체를 제조하는 방법, 및 상기 폐암 마커 폴리펩티드에 대응하는 염기서열을 포함하는 폐암 진단용 핵산 프로브(probe)에 관한 것이다.

[0021] 또한, 하기 표 1a 및 표 1b에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질로 이루어지는 폐암 마커 폴리펩티드(marker polypeptide), 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

[0022] 마커 폴리펩티드에 특이성을 가지는 항체를 1종 이상 포함하는 폐암 진단용 키트(kit)를 제공한다.

[0023] [표 1a]

[0024]

No	GB Accession	Gene Symbol	Gene Name	Regulation(positive_negative)
1	NM_000668	ADH1B	alcohol dehydrogenase IB (class I), beta polypeptide	DOWN
2	NM_020533	MCOLN1	mucolipin 1	DOWN
3	NM_022145	null	null	UP
4	NM_001823	CKB	creatine kinase, brain	DOWN
5	NM_057090	ARTN	artemin	DOWN
6	NM_004510	SP110	SP110 nuclear body protein	DOWN
7	NM_012138	AATF	apoptosis antagonizing transcription factor	UP
8	NM_002262	KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	DOWN
9	NM_021727	FADS3	fatty acid desaturase 3	DOWN
10	NM_003975	SH2D2A	SH2 domain protein 2A	DOWN
11	NM_000080	CHRNE	cholinergic receptor, nicotinic, epsilon polypeptide	DOWN
12	NM_000992	RPL29	ribosomal protein L29	UP
13	NM_021809	TGIF2	TGFB-induced factor 2 (TALE family homeobox)	DOWN
14	NM_001246	ENTPD2	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	DOWN
15	NM_016153	null	null	DOWN
16	NM_007063	TBC1D8	TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)	DOWN
17	NM_000191	HMGCL	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria)	DOWN
18	AC022003	null	null	DOWN
19	NM_014621	HOXD4	homeo box D4	DOWN
20	NM_015909	null	null	DOWN
21	NM_003752	EIF3S8	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa	UP
22	NM_001651	AQP5	aquaporin 5	DOWN
23	NM_014629	ARHGEF10	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10	DOWN

[0025] [표 1b]

[0026]

No	GB Accession	Gene Symbol	Gene Name	Regulation(positive_negative)
24	NM_001915	CYB561	cytochrome b-561	DOWN
25	NM_016283	TAF9	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 32kDa	DOWN

26	NM_001448	GPC4	glypican 4	DOWN
27	NM_023000	ARID4A	AT rich interactive domain 4A (RBP1-like)	DOWN
28	NM_003213	TEAD4	TEA domain family member 4	UP
29	NM_004224	GPR50	G protein-coupled receptor 50	DOWN
30	NM_005798	RFP2	ret finger protein 2	DOWN
31	NM_022338	C11orf24	chromosome 11 open reading frame 24	UP
32	ENSG00000100365	null	null	DOWN
33	AF123073	null	null	DOWN
34	AF151019	null	null	UP
35	NM_015939	null	null	DOWN
36	NM_002388	MCM3	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	UP
37	ENSG00000084774	null	null	UP
38	AF216972	null	null	DOWN
39	XM_041585	null	null	DOWN
40	AL022312	null	null	DOWN
41	M98331	DEFA6	defensin, alpha 6, Paneth cell-specific	DOWN
42	AC005754	null	null	DOWN
43	NM_003093	SNRPC	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	UP
44	AC026487	null	null	DOWN
45	NM_004639	BAT3	HLA-B associated transcript 3	UP
46	AF100318	MAP3K6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	UP
47	AF348074	null	null	DOWN

[0027] 본 발명은 또한 상기 표 1a 및 표 1b에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질로 이루어진 군에서 1종 이상 선택된 암 마커 폴리펩티드로 시료내 포함된 암마커 폴리펩티드를 분석하는 것을 특징으로 하는 암 진단방법에 관한 것이다.

[0028] 본 발명은 상기 표 1a 및 표 1b에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질로 이루어지는 군에서 선택된 암 마커 폴리펩티드를 항원으로 하여 제조되며, 상기 암 마커 폴리펩티드에 대한 특이성을 갖는 항체에 관한 것이다.

[0029] 본 발명은 상기 표 1a 및 표 1b에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질로 이루어지는 군에서 선택된 암 마커 폴리펩티드를 항원으로 하여 제조되며 상기 암 마커 폴리펩티드에 대한 특이성을 갖는 항체를 1종 이상 함유하는 암 진단용 키트에 관한 것이다.

[0030] 본 발명은 상기 표 1a 및 표 1b에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열과, 상기 폴리뉴클레오티드 서열에 대한 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 암 진단용 폴리뉴클레오티드 프로브에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드 프로브를 DNA 마이크로어레이에 관한 것이다.

[0031] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0032] 본 발명자들은 폐암 환자에서 정상인과 차별적으로 발현되는 혈청 단백질 47개의 혈액 내 함유량으로 폐암을 조기 진단에 사용되는 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 이용한 항체 및 진단용 키트를 찾아낼 수 있었다. 따라서, 본 발명은 표 1a 및 표 1b에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질을 코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 폐암 마커 폴리펩티드(marker polypeptide)를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 폐암 마커 폴리펩티드에 대한 항체 생산을 유도하는 폴리펩티드 단편을 제공한다.

[0033] 본 발명은 표 1a 및 표 1b에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질을 포함하는 폐암 마커 폴리펩티드에 특이성을 가지는 항체를, 적어도 1종 이상 함유하는 폐암 진단키트를 제공한다.

[0034] 본 명세서에서 암 마커 폴리펩티드는 보다 상세하게는 폐암 환자로부터 획득한 세포 또는 폐암 환자의 혈액내에서 특이적으로 발현량이 변화하는 것이다. 또한, 본 명세서의 항체는 표 1a 및 표 1b에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질을 포함하는 폴리펩티드를 항원으로 하여 제조되며 상기 마커 폴리펩티드에 특이적인 폴리클로날 항체 또는 단일 클로날 항체이다.

[0035] 본 발명의 표 1a 및 표 1b에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질로 이루어지는 군에서 1종 이상 선택된 암 마커 폴리펩티드는 각각 특정의 기능, 또는 발현하는 장기 등이 알려져 있었지만, 본 발명자들이 찾아낼 때까지 폐암과의 관계는 완전히 알려져 있지 않았다. 따라서, 본 발명자들이 이러한 폴리펩티드를 폐암 마커로서 이용할 수 있다는 사실을 발견하였다.

[0036] 또한, 본 발명에서는 상기 폴리펩티드를 이용하여 일반적으로 공지된 방법에 의하여 항체를 제조할 수 있다. 본 발명의 항체는 표 1a 및 표 1b에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질을 포함하는, 폐암 마커 폴리펩티드에 특이성을 가지는 항체로 폴리클로로날 항체 또는 모노클로로날 항체 어느쪽이라도 무방하다. 본 발명의 항체를 이용하여 시료, 예를 들면 폐암조직, 폐암환자의 혈액 또는 혈청에 포함된 상기 암마커 폴리펩티드를 분석하는 방법으로는 통상의 항원-항체반응의 분석법을 사용할 수 있다. 예컨대, 면역 검정(측정)법으로는 효소 면역 측정법(ELISA), 형광면역 측정법(FIA), 방사선 면역 측정법(RIA), 발광 면역 측정법, 면역블롯(immunoblot)법, 웨스턴 블롯(western blot)법, 면역 염색법 등이 있다.

[0037] 웨스턴 블롯(western blot)법은, 생체 시료 중에 존재하는 해당 단백질의 분자량을 알기 위하여 유효한 방법이다. 예를 들어, 장기 조직 유래의 추출액 등의 생체 시료액을 아크릴아미드 겔(gel)전기 영동 시킨 뒤, 멤브레인에에 전사하고, 해당 단백질 또는 해당 펩타이드를 인식하는 항체와 반응시키고, 생성하는 면역 복합체를 표지 제2항체를 이용하고 검출하는 것이다.

[0038] 면역 염색법은 조직 및 세포에 있어서 대상 폴리펩티드(polypeptide)의 발현 부위를 해석하기 위하여 유효한 방법으로, 예를 들어, 슬라이드 글라스상에 고정되는 조직 절편, 세포 등을 본 발명의 항체와 반응시키고, 생성하는 면역 복합체를 표지 제2항체를 이용하고 검출하는 것에 따라 실시한다.

[0039] 상기 폐암 마커 폴리펩티드를 인식하는 항체를 이용하는 면역 검정의 바람직한 예로서, ELISA법을 들 수 있다. 상기 ELISA 법은 일반적인 경합법, 샌드위치법 등의 수법에 따라 실시할 수 있고, 액상계 또는 고체상태계에서도 실시할 수 있다.

[0040] 본 발명의 암진단용 키트(kit)는 상기의 폴리클로로날 또는 모노클로로날 항체를 포함하는 것으로, 보다 상세하게는 표 1a 및 표 1b에 나타낸 단백질을 코딩하는 아미노산 서열을 1종 이상 포함하는 것으로 암 마커 폴리펩티드에 특이성을 가지는 항체를, 적어도 1종 이상 이용하는 것으로, 폐암의 진단에 사용할 수 있다.

[0041] 또한, 상기 진단용 키트는 필요에 따라 면역 반응을 이용하고, 웰, 염색제, 검출용의 효소 표지 항체, 세척액, 항체 희석액, 검체 희석액, 효소 기질, 효소 기질액 희석액, 그밖의 시약을 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명은 하기 예시적인 실시예를 들어 더욱 자세히 설명할 것이나, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0043] [실시예]

[0044] **실시예 1: 핵산 마이크로 어레이를 이용한 mRNA 양상 분석**

[0045] **A.시료준비**

[0046] <u>A-1: 폐암조직 채취</u>

[0047] 120명의 폐암조직 sample을 1995년부터 2001년 12월 까지 삼성서울병원에서 폐절제술을 받은 비소세포폐암(NSCLC)환자들로 부터 모아 냉동 보관하였다. 하기 표 2에 112 비소세포폐암 환자의 임상 정보를 요약하였다.

[0048] T3N0 단계의 환자로부터 개흉술을 수행한 후 조직을 얻었다. 112명의 폐암 조직 중 70명은 LN(-), 42명은 LN(+)이다. 샘플조직의 조직학적 형태는 45개는 선암, 58개는 편평상피암 , 6개는 대세포암이다. 46명의 환자는 재발 하였다. (불완전 절제 되거나 종격동의 절제가 없는 경우의 환자는 제외한다.)

[0049] [표 2]

[0050] 비소세포폐암 환자 112명의 임상정보

	Total	TNM Stage I		TNM Stage II and III	
		N0	N+	N+	N0
Histology	112				
Adenocarcinoma	48	34	0	14	0
Squamous cell carcinoma	58	32	0	26	0
Large cell carcinoma	6	4	0	2	0
Smoking history	112				
Non-smoker	33	22	0	11	0
Smoker	77	46	0	31	0
unknown	2	2	0	0	0
Sex	112				
Female	29	20	0	9	0
Male	83	50	0	33	0
Differentiation	112				
Well	19	15	0	4	0
Moderate	57	34	0	23	0
Poor	32	17	0	15	0
unknown	4	4	0	0	0
Recurrence	112				
Recurred	46	24	0	22	0
Non-Recured	66	46	0	20	0
Current Status	112				
Alive	73	54	0	19	0
Expired	39	16	0	23	0

[0051]

[0052] 전체 112 샘플 : LN (+) 42 샘플, LN(-) 70 샘플

[0053] (전체 127 샘플중 T3N0, T4N0 15 샘플 제외)

[0054] Stage : I 기 70 샘플, II 기 14 샘플, III 기 28 샘플

[0055] 성별 : 남자 82 샘플, 여자 30 샘플

[0056] 나이 : 13~80세 (중간값=62세)

[0057] Cell Type : ADC 46 샘플, BAC 2 샘플, SQC 58 샘플, LAC 6 샘플

[0058] Size : 1.2 ~ 19 cm (median = 4 cm)

[0059] OP date : 1995.04.21 ~ 2002.06.03 (median : 1999.05.30)

[0060] 흡연력 : 흡연자 77 샘플, 비흡연자 33 샘플, 모름 2 샘플

[0061] <u>A-2: 조직샘플의 준비 및 RNA 추출</u>

[0062] 일상적인 종격동경술 검사 후에 모든 림프절의 절개는 체계적으로 개흉술에 의해 수행되었다. 모든 림프절은 American Thoracic Society LN map 의 오른쪽 폐암조직 11, 10, 9, 8, 7, 4, 3, 2 부분과 왼쪽 폐암조직 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 부분을 제거하였다. 종격동의 평균적으로 6(범위: 5~8)부분을 잘라낸다. 외과적으로 제거된 모든 조직들은 즉시 병리학적으로 검사하였다. 그리고 암 덩어리의 괴사된 부분을 피해서 주위의 암조직을 한 두 조각 (5mm× 5mm)정도 떼어내서 -80 ° C에서 보관하였다. 의학적인 자료들을 살펴 볼 때, 림프절 조직의 hematoxylin과 eosin 슬라이드를 확증된 병리학자에 의해서 재검토하였다. 모든 환자로부터 2188의 림프절을 (the number of LNs per patient: 21.3 ± 10.6, range: 8?54) 절제하고, 152개의 림프절은 전이에 양성이었다.

[0063] 112개의 폐암조직은 112명의 환자로부터 112개의 암 조직을 미세해부하였다. 그리고 모든 암 조직은 RNA를 추출하기 전에 잘 보이도록 hematoxylin으로 가볍게 염색하였다. 각각의 미세 절개된 조직들은 90% 이상이 암세포로

구성되어 있다.

[0064] 현미 해부된 암조직들에 1mL의 Trizol reagent (Life Technologies, Rockville, MD)를 넣고 즉시 vortexing하여 균질화시켰다. 전체 RNA는 Trizol reagent protocol에 따라 분리하고 전체 RNA를 정량하여 0.6 M 포름알데히드와 에티듐 브로마이드를 포함하는 1% 아가로스 젤에서 전기영동하여 분석하였다. 전체 RNA의 정량은 Nanodrop spectrometer(Nanodrop Technologies, Rockland, DE)를 이용하여 분석하였다.

[0065] B. 비소세포폐암에서 림프절 전의의 위치와 범위

[0066] 1997 TNM 분류(폐암 절제 후 예후를 수술 후 병리학적으로 분료한 표, 종양학(oncology), 종양학 = Oncology,박재갑 ; 박찬일 ; 김노경 [공]편저 ,일조각 , 2003.) 에 따르면, 112명의 환자 중에서 10명의 환자(63%)는 pN0 단계이고, 42 명의 환자(38%)는 림프관으로 전이 되었으며, 19명의 환자(17%)는 pN1 단계, 23명의 환자(21%)는 pN2단계를 나타내었다. 평균 21개의 림프절(8~54정도)를 가지는 2000개 이상의 절(n = 2349)는 임상병리학적으로 전이가 이루어진 것으로 분석된다. 148개의 림프절(6.3%)은 전이적인 관련성이 있는 것으로 나타났고, 반면 2201 LNs (93.7%) 는 암의 전이가 없는 것으로 나타났다. LN involvement는 편평세포암을 가진 환자의 44%정도에서 나타나고, 대세포암을 가진 33%의 환자에서 나타났다. 선암을 가진 환자들의 경우 LN involvement 비율이 29%정도로 나타난다.

[0067] 참고로, T 병소와 N 병소은 폐암 절제 후 생존에 영향을 미치는 요인은 림프절 전이 여부를 의미하며, 전이된 림프절 구역의 수, 전이된 림프절의 숫자가 전부 예후에 관계된다. 반면, 암종의 종류, 전이된 림프절 구역 , 전이된 림프절의 크기 N1에만 전이가 있는 지 여부 등은 생존율에 영향을 미치지 않는다.

[0068] C. cDNA 마이크로 어레이를 이용한 mRNA 발현양상 분석

[0069] 암 조직으로부터 분리한 전체 RNA의 약 5?10ug 정도를 올리고뉴크레오타이드 마이크로어레이 분석(Macrogen, Seoul, Korea)에 사용하고 나머지는 RT-PCR이나 real-time PCR을 수행하여 증폭하였다. Macrogen사의 Oligo Human 10K 마이크로어레이는 10,416개의 인간 유전자와, 알려진 8032개의 유전자, 2076개의 expressed sequence tags (ESTs) 유전자를 50-mer 올리고뉴클레오타이드 프로브로 스팟팅하였다. 각각 112개의 전체 RNA를 보편적인 human reference RNA(stratagene, La. Jolla, CA)와 혼성화시키고(oligonucleotide 마이크로어레이 hybridization) 스캐닝하여 분석, 및 확인하였다.

[0070] 마이크로어레이 혼성화 이미지는 Imagen version 5.5 software (BioDiscovery, El Segundo, CA)를 사용하여 스캔하고 분석하였다. 그리고 그 자료는 lowess method에 의해 일반화하였다. lowess method에서 Cy-5에 대한 Cy-3의 비율값은 기본적으로 log로 변환시킨 값이다.

[0071] 림프절 전이와 관련한 mRNA의 발현양상을 조사하기 위하여, Partial least square (PLS) analysis는 암조직의 유전자 발현 양상이 폐암환자의 림프절로의 전이 유무에 따라 뚜렷이 구별될 수 있는 차이가 있는 지를 조사하기 위하여 수행하였다. 그리고. 발현 양상의 차이를 보이는 유전자를 선택하기 위해 Westfall-Young method를 포함하는 multiple testing adjustment (MTA)에 의해 permutation t test를 수행하였다.

[0072] 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이 실험을 통하여 전이가 있거나 없는 폐암 환자들로부터 얻은 mRNA의 발현양상을 알았다.

[0073] Partial least square analysis방법을 사용하여 전이가 있거나 없는 폐암환자들 사이에서 나타나는 유전자의 발현양상의 차이를 확인하였다. 그 결과는 도 1에 나타냈으며, LN metastasis status가 잘 구분되고, LN metastasis와 관련있는 유전자 그룹들을 선별 가능 하다는 것을 보여준다. 또한 도 2에는 cDNA 마이크로 어레이를 이용하여, 폐암환자들 사이에서 나타나는 유전자의 발현양상의 차이를 선별하는 방법에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

[0074] D. 분류 모델의 개발과 그 예측의 정확도

[0075] 다음에 두 개의 모델 유전자세트를 사용하여 두 개의 분류 모델을 개발하였다. 그리고 각각의 두 타입을 특정화하였다. 이러한 모델링 과정을 통하여 주어진 모델에서 예측의 정확도를 증가시키기 위해 우리는 통합적이고 변

형된 알고리즘을 고안하였다.

[0076] 림프절 전이 예측의 정확도를 증가시키기 위해서, vector machine, artificial neural network, decision tree, and naive Bayes이나 같은 알고리즘에서 채택한 방법을 통합함으로써 변형된 알고리즘을 개발하였다. 이 중 세 개의 알고리즘의 경우 예측의 정확도가 80%이상으로 수용 가능한 수준을 나타내었고, 변형된 알고리즘에서 채택된 세 개의 알고리즘을 통합하였다. 그리고 그 변형된 알고리즘에서 림프절 전이 상태가 양성 또는 음성인 경우를 정하여 2~3개의 알고리즘을 조합하여 적용시켜 보았다. 이러한 변형된 알고리즘을 적용하여 47개의 유전자들을 선별하고 분류 모델을 일반화시켰다. 또한 10-fold cross validation에 의해 모델 A는 95.24%의 민감도를 보이고 90.00%의 특이도를 나타내며 이는 어떠한 다른 알고리즘 보다 더 높은 값이다(표 3).

[0077] [표 3]

[0078] 4가지 분류 알고리즘에서 모델 A 및 B의 거동

분류 알고리즘	모델 A				
		mN0	mN+	total	
Support Vector Machine	pN0	41	29	70	민감도: 71.43%
	pN+	12	30	42	특이도: 58.57%
	total	53	59	112	정확도: 63.39%
		mN0	mN+	total	
Neural Network	pN0	63	7	70	민감도: 83.33%
	pN+	7	35	42	특이도: 90.00%
	total	70	42	112	정확도: 87.50%
		mN0	mN+	total	
Decision Tree	pN0	62	8	70	민감도: 85.71%
	pN+	6	36	42	특이도: 88.57%
	total	68	44	112	정확도: 87.50%
		mN0	mN+	total	
Naive Bayes	pN0	60	10	70	민감도: 100%
	pN+	0	42	42	특이도: 85.71%
	total	60	52	112	정확도: 91.07%
		mN0	mN+	total	
Combined Model(Neural Network + Decision Tree + Naive Bayes)	pN0	63	7	70	민감도: 95.24%
	pN+	2	40	42	특이도: 90.00%
	total	65	47	112	정확도: 91.96%

[0079]

[0080] 위와 같은 방법에 따라. 10-fold cross-validation과 환자의 training set과 test set으로부터 획득한 모델을 적용하여 예측의 정확도를 시험해 보았다. 임상적 재발을 위한 분류 모델의 유용성을 뒷받침하기 위한 증거로써 우리는 림프절 전이에서 구별되는 패턴을 알아보기 위해 long-rak test를 사용하여 Kaplan-Meier survival curves를 분석하였다.

[0081] 상기 실시예 1의 B항목의 결과를 바탕으로 림프절 전이가 이루어지지 않은 70명의 환자들과 림프절 전이가 이루어진 42명의 환자들에게서 차별적으로 발현되는 유전자들을 구분하기 위한 시도를 하였다. (A) 112명 전체로부터 얻은 샘플을 대상으로 cross-validation 하여 model A로 분류 하였다. Model gene set을 선별하기 위해서 Westfall-Young method를 사용하는 다중 테스트(multiple testing)으로 *P*-값을을 조정함으로써 통계적인 변환

된 t-테스트를 수행하였다.

[0082] Model gene set A 는 47 genes (P < 0.05)으로 구성되어 있다. 39개의 알려진 유전자와 8개의 ESTs, 그리고 그 특징들을 표 4 및 표 5에서 요약하였다.

[0083] [표 4]

[0084] 비소세포폐암 환자 112명 환자의 mRNA 발현양상 분석으로부터 얻어진 발현차이 나타내는 유전자(Model gene set A)

[0085]

Gene Accession no.	Gene description	Gene Symbol
AC005754	EST	
AC022003	EST	
AC026487	EST	
AF100318	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	MAP3K6
AF123073	LOC81558	LOC81558
AF151019	Hypothetical protein HSPC111	HSPC111
AF216972	EST	
AF348074	n-acetyltransferase 2	NAT2
AL022312	EST	
ENSG00000084774	EST	
ENSG00000100365	EST	
M98331	defensin, alpha 6, Paneth cell-specific	DEFA6
NM_000080	cholinergic receptor, nicotinic, epsilon polypeptide	CHRNE
NM_000191	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria)	HMGCL
NM_000668	alcohol dehydrogenase IB (class I), beta polypeptide	ADH1B
NM_000992	ribosomal protein L29	RPL29
NM_001246	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	ENTPD2
NM_001448	glypican 4	GPC4
NM_001651	aquaporin 5	AQP5
NM_001823	creatine kinase, brain	CKB
NM_001915	cytochrome b-561	CYB561
NM_002262	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	KLRD1
NM_002388	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	MCM3
NM_003093	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	SNRPC
NM_003213	TEA domain family member 4	TEAD4
NM_003752	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa	EIF3S8
NM_003975	SH2 domain protein 2A	SH2D2A
NM_004224	G protein-coupled receptor 50	GPR50
NM_004510	SP110 nuclear body protein	SP110
NM_004639	HLA-B associated transcript 3	BAT3
NM_005798	ret finger protein 2	RFP2
NM_007063	TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)	TBC1D8
NM_012138	apoptosis antagonizing transcription factor	AATF
NM_014621	homeo box D4	HOXD4
NM_014629	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10	ARHGEF10
NM_015909	Neuroblastoma-amplified protein	NAG
NM_015939	CGI-09 protein	CGI-09
NM_016153	LW-1	LW-1
NM_016283	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 32kDa	TAF9
NM_020533	mucolipin 1	MCOLN1
NM_021727	fatty acid desaturase 3	FADS3
NM_021809	TGFB-induced factor 2 (TALE family homeobox)	TGIF2
NM_022145	Leucine zipper protein FKSG14	FKSG14

NM_022338	chromosome 11 open reading frame 24	C11orf24
NM_023000	AT rich interactive domain 4A (RBP1-like)	ARID4A
NM_057090	artemin	ARTN
XM_041585	EST	

[0086] [표 5]

[0087] 비소세포폐암 환자 112명 환자의 mRNA 발현양상 분석으로부터 얻어진 발현차이 나타내는 유전자(Model gene set A)

[0088] 비소세포폐암 79명 환자의 mRNA 발현양상 분석으로부터 얻어진 발현차이를 나타내는 유전자(Model gene set B)

[0089]

Gene Accession no.	Gene description	Gene Symbol
AC005754	EST	
AF216972	EST	
AF309034	SRY (sex determining region Y)-box 6	SOX6
ENSG00000084774	EST	
NM_000486	aquaporin 2 (collecting duct)	AQP2
NM_000992	ribosomal protein L29	RPL29
NM_001246	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	ENTPD2
NM_001448	glypican 4	GPC4
NM_001915	cytochrome b-561	CYB561
NM_002262	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	KLRD1
NM_002280	keratin, hair, acidic, 5	KRTHA5
NM_002388	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	MCM3
NM_003093	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	SNRPC
NM_003365	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	UQCRC1
NM_003481	ubiquitin specific protease 5 (isopeptidase T)	USP5
NM_003975	SH2 domain protein 2A	SH2D2A
NM_004639	HLA-B associated transcript 3	BAT3
NM_004711	synaptogyrin 1	SYNGR1
NM_012138	apoptosis antagonizing transcription factor	AATF
NM_014621	homeo box D4	HOXD4
NM_014629	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10	ARHGEF10
NM_015909	Neuroblastoma-amplified protein	NAG
NM_016153	LW-1	LW-1
NM_018695	erbb2 interacting protein	ERBB2IP
NM_020533	mucolipin 1	MCOLN1
NM_021809	TGFB-induced factor 2 (TALE family homeobox)	TGIF2
NM_022338	chromosome 11 open reading frame 24	C11orf24
NM_030673	SEC13-like 1 (S. cerevisiae)	SEC13L1
NM_057090	artemin	ARTN
XM_039877	mucin 5, subtype B, tracheobronchial	MUC5B
XM_041585	EST	

[0090] **실시예 2: 항체 마이크로 어레이를 이용한 분석**

[0091] 2-1: 항체와 혈청의 준비

[0092] DNA 마이크로어레이의 결과(표 4 및 5)를 바탕으로 13개의 항체를 선택하고, 혈청 아밀로이드 A (SAA)는 reference search를 통해 선택하였다. Anti-aquaporin 5 (AQP5), anti-creatine kinase brain (CKB), anti-homeobox protein (HESX1), anti-minochromosome maintenance protein (MCM3), anti-TATA-binding protein (TFIID) and anti-5'-TG-3' interacting protein (TGIF)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로 부터, Anti-apoptosis antagonizing transcription factor (AATF) and anti-SoxLZ/Sox6-binding

protein (FKSG14)는 Abnova Corporation (Taipei, Taiwan)로 부터, Anti-eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8 (eIF3S8)는 Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA)로부터, Anti-small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C (SNRPC)는 GeneTex (San Antonio, TX, USA)로부터, Anti-mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6 (MAP3K6)는 Abgent (San Diego, CA, USA)로 부터 Anti-TEA domain family member (TEAD4) 는Abcam (Cambridge, UK)로부터, Anti-SAA 는 Antigenix America (Huntington Station, NY, USA)로 부터 각각 구입하여 사용하였다(표 6).

[0093] [표 6]

[0094] 항체 마이크로어레이(1~13) 및 웨스턴 블랏팅(1~6)에서 사용된 표적 항체

ID #	Gene	Protein name
1	AQP5	Aquaporin 5
2	CKB	Creantine kinase, brain
3	HESX1	Homeobox protein
4	MCM3	Minichromosome maintenance protein
5	TFIID	TATA-binding protein
6	TGIF	5'-TG-3' interacting factor
7	MAP3K6	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
8	SNRPC	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C
9	TEAD4	TEA domain family member 4
10	eIF3S8	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8
11	AATF	Apoptosis antagonizing transcription factor
12	FKSG14	SoxLZ/Sox6-binding protein
13	SAA	Serum amyloid A

[0095] 혈청은 정상인군, 삼성서울병원의 폐암 악성종양 환자군, 양성종양 환자군의 혈액을 7~10ml 정도 모은 후, 4 ° C 에서 3000rpm으로 10분간 원심분리 하여 같은 방법으로 분리하고, 1.5 ml 튜브에 나누어 -80° C에서 보관하였다.

[0096] 현재 실험에서 사용한 혈청 샘플은 총 25개로 8개는 정상인으로부터 13개 삼성서울병원의 폐암환자로부터 4개는 양성종양환자로부터 확보한 것으로 모든 혈청은 분석 전까지 냉동 보관하였다.

[0097] <u>2-2: 혈청의 형광표지</u>

[0098] 마이크로어레이에서 두 가지 환자군 단백질의 발현양상을 비교분석 하기 위하여 Cy3와 Cy5로 혈청을 표지하였다. 도 3a에 나타낸 바와 같이, N-hydroxysuccinimide ester (NHS)-linked Cy3 와 Cy5 dye (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)와 혈청과 반응시켜 붙임으로써 혈청을 형광으로 표지하였다. 우선, 혈청을 dye-conjugation buffer(50 mM sodium carbonate buffer, pH 9.0)와 1/15로 희석하고 dye-conjugation buffer에 포함된 Cy 염료를 희석된 혈청과 잘 섞이도록 어두운 곳에서 10분마다 가볍게 흔들어 주면서 40분간 상온에서 반응시켰다. 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 첨가하고 어두운 곳에서 10분마다 흔들어 주면서 20분 동안 혈청과 Cy 염료의 반응을 중지시킨다. Microcon YM-10 (Millipore Corporate, Billerica, MA, USA)을 사용하여 10,000X g 에서 30분간 원심 분리하여 형광으로 표지된 혈청만을 분리했다. 형광 표지된 혈청을 안정화시키기 위해 그 부피의 50배 정도의 skim milk를 포함하는 PBS를 첨가하고 다시 원심 분리하여 형광으로 안정하게 표지된 혈청만을 얻었다.(결국 형광 표지된 혈청은 PBS에 15배 정도 희석된다.)

[0099] <u>2-3. 항체 마이크로 어레이 제작</u>

[0100] 항체 마이크로 어레이는 robotic arrayer (Microsys, Cartesian Technologies, Irvine, CA, USA)를 사용하여CMP 3 spotting pins (Telechem International, Sunnyvale, CA, USA)으로 하이드로겔이 코팅된 유리 슬라이드(슬라이드 H Schott Nexterion, Jena, Germany)위에 스팟팅하여 제조하였으며 제조방법의 예를 도 3b

에 도시하였다.

[0101] 하나의 항체 마이크로어레이는 표 6의 13개의 항체 세트로 구성되어 있으며, 이중 양성 대조구는 항-사람 혈청 알부민 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로, 음성 대조구(negative control)는 항-소혈청 알부민(anti-BSA, Sigma-Aldrich)로 하였다. 스팟에 필요한 모든 단백질 용액은 0.5% 트레할로스를 섞어서 준비하고, 스팟기계의 상대습도는 70%로 유지하였다. 각각의 Ab 샘플들은 하나의 어레이당 4줄씩 스팟하였다. 항체들이 슬라이드의 반응기와 공유결합 할 수 있도록 어레이안에서 상온으로 1시간 가량 둔 다음, 슬라이드를 어레이밖으로 꺼내고 1M 에탄올아민 (Sigma-Aldrich)을 포함하는 인산염 완충액(PBS)으로 4° C에서 하룻밤동안 반응하고 중지하였다. PBS로 씻어 낸 다음, 제작된 항체 마이크로어레이를 형광 표지된 혈청샘플과 함께 어두운 곳에서 1시간 가량 반응시켰다. 형광강도를 확인하기 전에, 형광표지된 혈청 샘플과 반응시킨 항체 마이크로어레이를 연속적으로 세 번 정도 PBST(PBS 함유 0.1% Tween-20)로 씻어 내고 증류수로 씻어 낸 다음 N2 가스로 건조하였다.

[0102] 2-4. 형광 강도의 분석

[0103] 형광 스캐너(GenePix Personal 4100A; Axon instruments, Union City, CA, USA)을 사용하여 Cy5-와 Cy3-의 특정 파장이 방출하는 형광강도를 읽고, 제작사에서 제공하는 GenePix Pro 4.1 software를 사용하여 스캔된 자료를 분석하였다. 두 채널의 Photomultiplier tube (PMT) 수치는 마이크로어레이의 Cy5/Cy3 비율이 1이 되도록 조절한다. 모든 스팟으로부터 나오는 Cy5와 Cy3의 강도는 배경 강도(background intensity)의 중간값을 뺀 값으로 계산하였다. 각 항체당 네 개의 보정된 자료를 이용하여 평균값을 구하여 향후분석에 이용하였다. 명확한 결함이 있거나, 배경 강도보다 2배 이상 높은 신호를 보이지 않는 스팟들은 분석에서 제외하였다. 두 샘플간에 단백질의 발현 비율은 internally normalized ratio (INR)로 표현한다. 이 비율은 두 종류의 샘플을 2개의 염료로 각각 다르게 표지하여 얻은 값을 이용하여 계산하였다. 첫 번째 슬라이드는 Cy3-labeled reference와 Cy5-샘플로 표지하여 항체 마이크로어레이에 결합시키고, 다른 두 번째 슬라이드는 Cy5-표준 샘플와 Cy3-테스트 샘플로 표지하여 각각 동일한 양을 항체 마이크로어레이에 결합시켰다. Cy5-와 Cy-3 표지된 항체는 도 3c에 나타냈다.

[0104] Cy5와 Cy3의 비율은 두개의 슬라이드위에서 각각 얻은 뒤, internally normalized ratio (INR)를 다음과 같이 계산한다.

[0105] [수학식 1]

X : the Cy5/Cy3 ratio obtained slide #1
Y : the Cy5/Cy3 ratio obtained slide #2

[0106]
$$X/Y = \frac{sample^{cy5}}{reference^{cy3}} \Big/ \frac{reference^{cy5}}{sample^{cy3}} = \frac{sample^{cy5}}{reference^{cy3}} \times \frac{sample^{cy3}}{reference^{cy5}} = R_1 \times R_2$$

[0107] 이상적인 경우, R1 과 R2 는 동일하게 된다. 그러므로 INR은 (X / Y)의 제곱근으로 정의된다. INR은 염료-표지 효율에 영향을 받지 않고, 외부의 정상화 요건들이 없는 모든 단백질을 위한 일반적인 조건으로써 사용될 수 있다. 여기서는 모든 비율을 관례대로 log2로 변환하여 표시한다.

[0108] **2-4: 실험결과**

[0109] 도 4에서 보여주는 폐암 환자들의 혈청과, 건강한 사람, 양성종양 환자들의 혈청을 항체 마이크로어레이를 사용하여 분석하였다. 정상인 4명의 혈청으로 구성된 혈청을 표준물질로(reference)로 사용하였다.

[0110] 폐암 환자와 양성반응의 환자의 혈청을 분석 시, AQP5, CKB, HESX1, MCM3, TFIID, TGIF, AATF, SAA의 단8개 단백질의 항체로 이루어진 스팟은 두 슬라이드에서 모두 높은 형광강도를 나타낸다.(도 4A, 도 4C). 정상인의 혈청에서도 항체 SAA를 제외하고 같은 강도를 나타낸다.(도 4B). 그러나 eIF3S8, FKSG14, TEAD4, MAP3K6, TEAD4 5개의 단백질의 항체 스팟에서는 모든 경우 신호가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 항체 마이크로어레이가 DNA 마이크로어레이의 결과와는 달리 폐 조직에의 mRNA를 대상으로 수행되는 것이 아니라 단백질이 다량 존재하는 혈청에서 수행되었기 때문이라 생각된다. 비록 mRNA에서 전사된 단백질이 폐 조직에서는 매우 높은 수준으로 발현 된다고 하더라도, 실제 혈청에서는 폐 조직에서와 같은 수준으로 동종의 단백질이 존재하지 않을 수

있다. 이러한 조직에서의 차이뿐만 아니라 실제 단백질의 발현량은 mRNA의 발현량과는 상관관계가 적기 때문에 나타난 결과라 생각된다.

[0111] 슬라이드의 배경 강도는 스팟의 형광 강도 보다 충분히 낮게 나타난다. 그리고, 그 스팟의 형태는 정상적인 원의 형태를 벗어나지 않는다. 항원과 항체의 농도와 완충액의 조건에 따라 스팟의 직경은 다양하게 나타난다. 그러나 만약 이러한 스팟들이 주변의 다른 스팟들과 겹쳐진다거나 균등하게 나타나지 않는다면, 형광 신호는 스팟의 직경에 영향을 받지 않는다. 이러한 모든 사실로부터, 현재 구입하여 사용한 항체들을 이용한 단백질 마이크로어레이가 혈청을 두 가지 종류의 염료로 형광표지함으로써 인간혈청 단백질의 발현 양상 분석에 사용될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0112] 단백질의 발현 양상 분석은, 세 종류의 테스트 샘플군의 상대적인 단백질은 INR과 log2 값으로 전환하여 계산하였다.(도 4A). 특정 단백질의 log2(INR)값은 1.0보다 높거나 1.0보다 크게 나오는데 이는 각각 up-regulation과 down-regulation된다는 것을 의미한다. 예상했던 대로 정상인의 혈청 샘플과 표준 샘플의 발현율과는 차이가 없게 나타났다. 표준 샘플은 네 개의 정상인의 혈청을 모은 것이기 때문에 이러한 결과는 표준 샘플이 항체 마이크로어레이에서 profiling하기 위해 적절하게 작용하였음을 의미한다. 반면, 폐암환자의 혈청은 HAS와 AATF 제외하고, 표준 샘플과 비교하였을 경우 발현을에서 큰 차이를 나타낸다. 정상인의 발현 양상 결과와는 달리 폐암 환자의 양상 결과, AQP5, CKB, HESX1, MCM3, TFIID, TGIF은 6개의 단백질의 경우, 정상인의 혈청에서보다 폐암환자의 혈청에서 더 낮은 수준의 발현량을 나타낸다. 선별된 다른 항체와는 달리 표 오른쪽의 HAS(human serum albumin)의 경우, biomarker의 후보 단백질이 아니라 양성 대조구로써 사용하였기 때문에 마이크로어레이 결과 발현 수준에서 차이가 없음을 확인 할 수 있었다. SAA는 다른 논문의 결과에서와 같이 폐암환자에게서 up-regulation 됨을 확인하였고, 양성 환자군의 경우에도 같은 결과가 예상된다. 만약 두 개의 환자군 사이에서 단백질 발현량이 통계적 유의성을 갖는다면, 비록 두 환자군에서 모두 up-regulation된다고 하더라도 여전히 그 단백질은 biomarker로써 의미를 갖는다. 그러므로 SAA의 경우에도 통계분석에 의한 biomarker로써의 이용가능성을 확증시키기 위한 실험에 필요하다. 폐암(악성종양)환자와 양성종양 환자들 사이에서도 단백질 발현량에 차이가 있을 수 있으므로 양성종양 환자의 혈청도 함께 발현양상을 분석할 필요가 있다. 위에서 언급했던 SAA를 제외하고, 정상인 혈청 단백질 발현량 양상의 경우에는 모두 유사하게 나타났다. 이러한 점으로 볼 때, 항체 마이크로어레이를 통하여 정상인뿐만 아니라 양성종양 환자로부터 폐암(악성종양) 환자를 구별해 낼 수 있다는 것을 확인하였다. 더 나아가 이러한 단백질들을 발현률의 차이를 분석함으로써 폐암진단이 가능함을 알 수 있었다.

[0113] 상기 항체 마이크로 어레이로 분석한 폐암 조직과 정상 폐 조직사이의 mRNA 발현량 양상을 하기 표에 나타냈으며, 표에서 다운-레귤레이션되는 mRNA는 검정색 역삼각형(▼)으로 표시하고, up-regulation되는 단백질은 빈 삼격형(Δ)으로 표시한다.

[0114] [표 7]

[0115] 항체 마이크로 어레이로 분석한 폐암 조직과 정상 폐 조직사이의 mRNA 정량

Gene Name	Regulation
cytochrome b-561	▼
TATA box binding protein (TBP)-associated factor	▼
glypican 4	▼
AT rich interactive domain 4A (RBP1-like)	▼
TEA domain family member 4	△
G protein-coupled receptor 50	▼
ret finger protein 2	▼
chromosome 11 open reading frame 24	△
minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	△
defensin, alpha 6, Paneth cell-specific	▼
small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	△
HLA-B associated transcript 3	△
alcohol dehydrogenase IB (class I), beta polypeptide	▼
mucolipin 1	▼
creatine kinase, brain	▼
artemin	▼
SP110 nuclear body protein	▼
apoptosis antagonizing transcription factor	△
killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	▼
fatty acid desaturase 3	▼
SH2 domain protein 2A	▼
cholinergic receptor, nicotinic, epsilon polypeptide	▼
ribosomal protein L29	△
TGFB-induced factor 2 (TALE family homeobox)	▼
ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	▼
TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)	▼
3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria)	▼
homeo box D4	▼
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa	△
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10	▼
aquaporin 5	▼
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	△

[0116] **실시예 3: 웨스턴 블랏팅**

[0117] 웨스턴 블랏팅은 항원성 에피토프(antigenic epitope)과 반응하는 항체를 이용하여 단백질 혼합물 중에서 원하는 단백질(antigen)만을 찾아내는 방법으로 cDNA 마이크로어레이 분석 결과 폐암환자와 정상인 사이에서 차별적으로 발현되리라 생각 되는 단백질의 발현 양상에 대한 마이크로어레이의 결과를 확증하기 위해 수행하였다.

[0118] <u>B-1. 혈청 시료의 준비</u>

[0119] ProteoExtract Albumin/IGg Removal Kit (Calbiochem, La Jolla, CA)을 사용하여 혈청단백질의 대부분을 차지하는 알부민과 IGg를 제거하였다. (혈청이 약 1/30 정도 희석된다.) 희석된 혈청을 Bradford 정량하여 2X SDS 샘플 완충액과 섞은 후 3분간 끓인 후 12000rpm에서 4분간 원심분리 하여 샘플을 튜브 바닥에 모았다.

[0120] [표 8]

[0121] 웨스턴 블랏팅에 사용된 항체

[0122]

1차 항체	2차 항체	1차 항체 크기	1차 희석범위	2차 희석범위
AQP5	SC-2004 (goat anti-rabbit IgG-HRP)	35kDa	1:100~ 1:1000	1:2000~ 1:100000

CK-B	SC-2020 (donkey anti-goat IgG-HPR)	43kDa	1:100~ 1:1000	1:2000~ 1:100000
HESX-1	SC-2020 (donkey anti-goat IgG-HPR)	21kDa	1:100~ 1:1000	1:2000~ 1:5000
MCM3	SC-2020 (donkey anti-goat IgG-HPR)	115 kDa	1:100~ 1:1000	1:2000~ 1:100000
TFIID	SC-2004 (goat anti-rabbit IgG-HRP)	36 kDa	1:100~ 1:1000	1:2000~ 1:100000
TGIF	SC-2004 (goat anti-rabbit IgG-HRP)	35 kDa	1:100~ 1:1000	1:2000~ 1:5000

[0123] C-2. 웨스턴 블랏팅

[0124] 준비된 혈청 샘플을 12% SDS 폴리아미드겔에서 70V에서 15분 120V 1시간 가량 전기영동하고 니트로셀룰로스 멤브레인으로 단백질을 300mA에서 1시간 동안 이동시켰다. 단백질이 이동된 멤브레인을 상온에서에 1시간 동안 5% 탈지유를 포함하는 TBS-T 완충액(0.1% 트윈-20)로 차단하였다. 선택된 단백질에 대한 항체를 일차 항체로 1/2000로 TBS-T 완충액에 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 일차 항체가 붙은 멤브레인을 TBS-T 완충액(0.1% 트윈-20)로 10분마다 5회 씻어 주고, 이차 항체를 1/5000로 TBS-T 완충액에 희석하여 1시간 동안 상온에서 결합시켰다. 멤브레인을 10분마다 TBS-T 완충액으로 5회 씻어 준 뒤 멤브레인과 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)의 웨스턴 블랏팅 시약과 1분 정도 반응시키고 암실에서 Hyperfilm(Amersham Biosciences, Uk)으로 현상하였다. 웨스턴 블랏팅 수행절차를 도 5에 도시하였다.

[0125] 항체 마이크로어레이의 분석결과를 확증하기 위해 각 항체별로 웨스턴 블랏팅을 수행 하였다. 이번 실험의 경우 혈청에서 표적 단백질인 AQP5, CKB, HESX1, MCM3, TFIID, TGIF을 각각 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. AQP5의 경우에는 마이크로어레이 결과처럼 폐암환자와 정상인 사이의 단백질 발현량이 down-regulation 됨을 확인하였다.(도 6B) 도 6B에서 Δ는 Khan N, Cromer CJ, Campa M, Patz EF Jr. Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarkers for the detection of nonsmall cell lung carcinoma. Cancer. 2004 Jul 15;101(2):379-84에 기재된 ELISA 실험결과이다.

[0126] AQP5를 제외한 다른 5개의 단백질의 경우 원하는 단백질이 분명하게 탐지되지는 않았다. 항체 마이크로어레이의 경우 매우 작은 양의 샘플로도 단백질의 발현 양상을 분석하는데 높은 민감도를 가지나 웨스턴 블랏팅의 샘플에 포함된 단백질의 양이 적은 경우 탐지하기 어렵다. 또한 혈청의 경우 많은 양의 알부민과 IGg가 포함되어 전기영동에 의한 단백질 분리에 영향을 미치므로 혈청을 웨스턴 블랏팅 하기에는 많은 주의가 요구되며 웨스턴 블랏팅의 경우 단백질의 양이 매우 많고 다양한 종류의 단백질을 포함하고 있는 혈청이 적합한 시료가 되지는 못한다. 또한 혈액에 의한 희석효과에 의해 혈청의 전체 단백질에 비례한 표적 단백질의 양이 매우 적은 수준으로 존재 할 수 있으므로 웨스턴 블랏팅으로 탐지하기 어려움이 있으리라 생각된다.

발명의 효과

[0127] 본 발명은 폐암 환자에서 정상인과 차별적으로 발현되는 혈청 단백질 47개의 혈액 내 함유량으로 폐암을 조기 진단하는 용도에 관한 특허로, 본 발명에 따른 단백질 칩을 사용하는 경우, 폐암의 조기진단에 있어 결과의 판독이 신속 정확하여 효율적이며, 혈청만으로 진단이 가능하므로 진단이 용이하고 편리하다.

도면의 간단한 설명

[0001] 도 1은 Partial least square analysis방법에 따른 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이를 이용하여 림프절 전이(Lymph node(LN) metastasis)상태를 관찰한 것이다.

[0002] 도 2는 cDNA 마이크로 어레이를 이용하여, 폐암환자들 사이에서 나타나는 유전자의 발현양상의 차이를 선별하는 방법에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

[0003] 도 3a 내지 도 3c는 종래에 알려진 항체 마이크로어레이 제조과정을 나타내는 모식도이다.

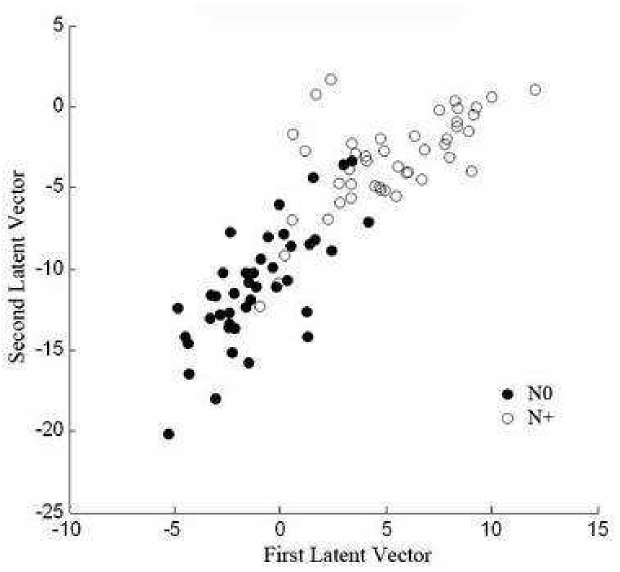
[0004] 도 4는 종래에 알려진 웨스턴 블랏팅 분석 절차를 보여주는 모식도이다. (출처: http://www.bseinquiry.gov.uk/report/volume2/fig1_8.htm)

[0005] 도 5는 본 발명의 실시예 2에 따른 항체 마이크로어레이를 이용한 폐암조직에서 특이적으로 발현되는 단백질을 분석한 결과이다.

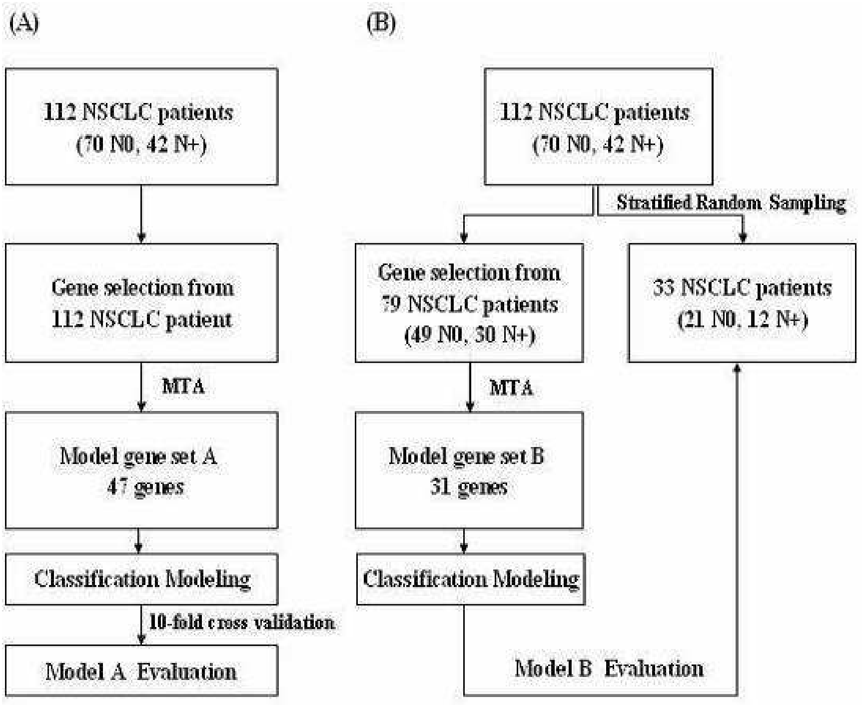
[0006] 도 6a 내지 도 6b는 본 발명이 실시예 3에 따른 웨스턴 블랏팅을 이용한 혈청내 폐암조직에서 특이적으로 발현되는 단백질을 분석한 결과이다.

도면

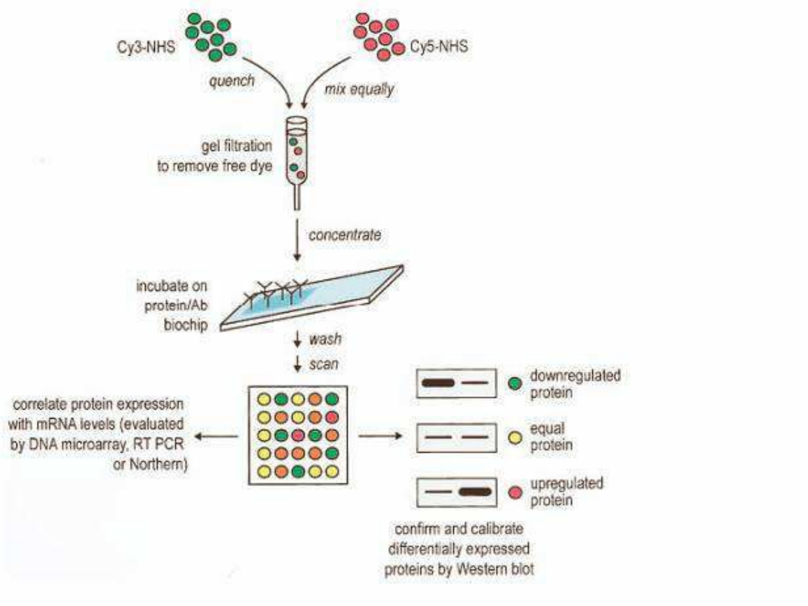
도면1



도면2

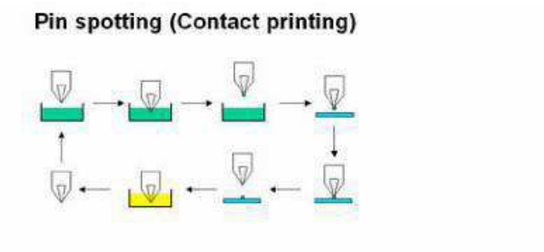


도면3a



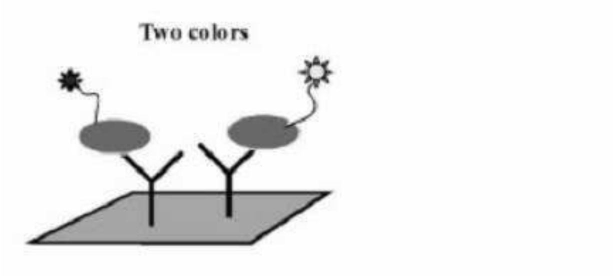
(Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S, Barrette TR, Ghosh D, Lawrence TS, Chinnaiyan AM., Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. ,Cancer Res. 2001 Oct 15;61(20):7585-93.)

도면3b



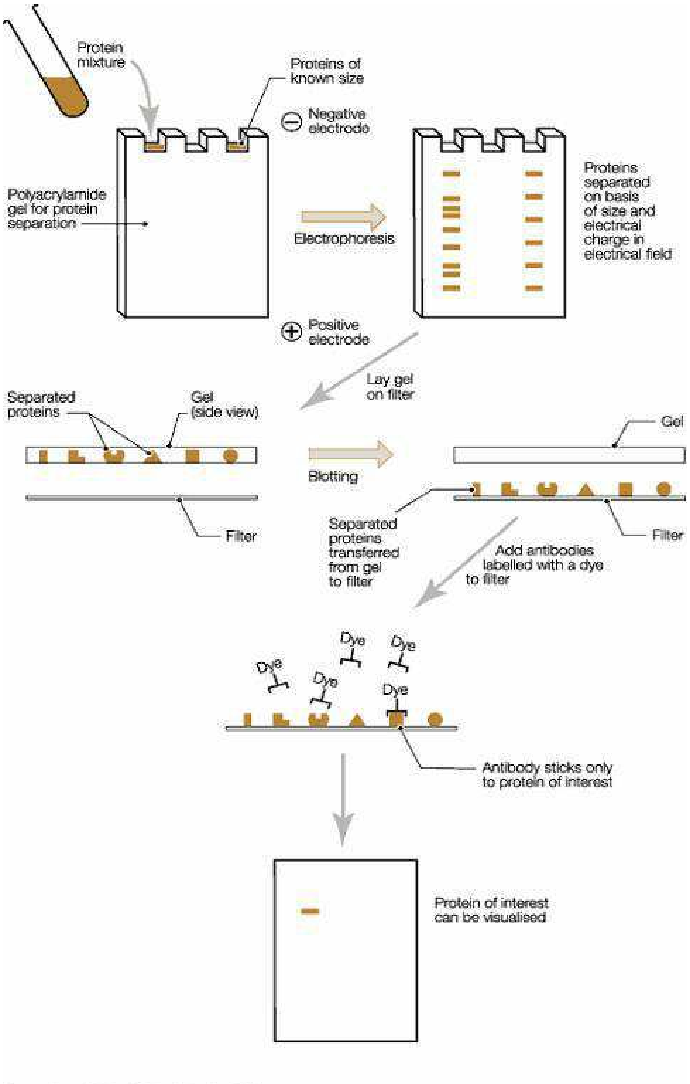
(주)디지털지노믹스
http://www.digital-genomics.co.kr/05_info/microarray02.htm

도면3c



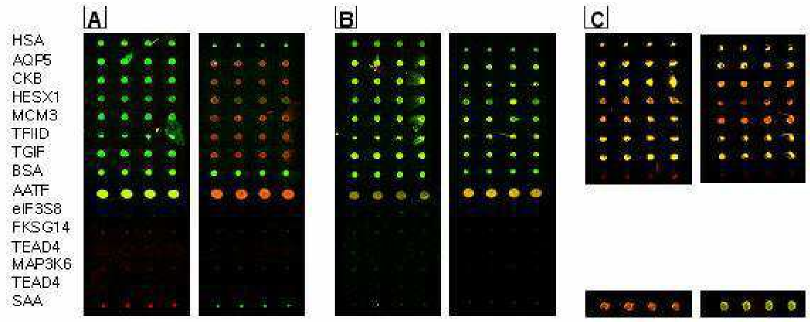
(Haab BB. Methods and applications of antibody microarrays in cancer research. Proteomics. 2003 Nov;3(11):2116-22. Review.)

도면4



Source: Konrad Bishop, BSE Inquiry, London, 2000

도면5



Cy3와 Cy5로 각각 표지된 표준 샘플과 테스트 샘플

각 슬라이드는 왼쪽은 Cy3-표준 샘플/ Cy5-테스트 샘플로 오른쪽은 Cy5-표준 샘플/ Cy3-테스트 샘플로 실험한 결과.

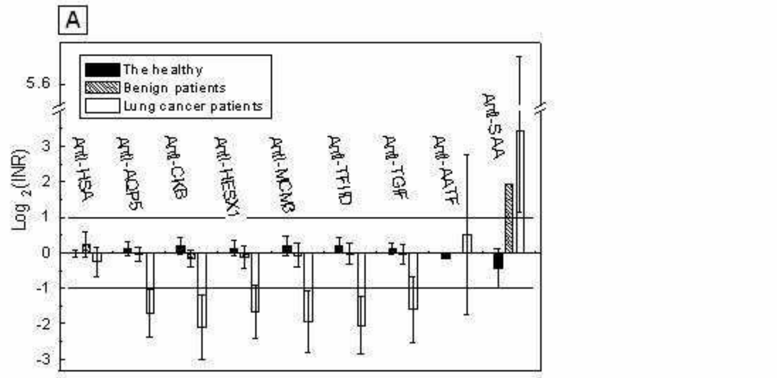
(A) : 폐암환자의 혈청을 테스트 샘플로 사용.

(B) : 정상인의 혈청을 테스트 샘플로 사용.

(C) : 양성 폐질환 환자의 혈청을 테스트 샘플로 사용.

도면6a

(A): 혈청의 단백질 발현 수준 분석 결과.
정상인 8명 폐질환 환자 4명 폐암환자 13명으로부터 획득한 혈청샘플로 부터 계산된 평균과 표준편차. 수직선은 표준편차를 표시



도면6b

B

Protein	Ab microarray	Western blotting	DNA microarray
HSA	Same	-	-
AQP5	▼		▼
CKB	▼	-	▼
HESX1	▼	-	▼
MCM3	▼		Δ
TFIID	▼		▼
TGIF	▼		▼
AATF	Same	-	Δ
SAA	Δ	Δ[a]	-

(B): Ab microarry와 웨스턴 블랏팅과 mRNA 마이크로어레이의 결과 : up-regulation(Δ). Down-regulation(▼), 과 발현량의 차이 없는 경우