



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월12일
(11) 등록번호 10-1559101
(24) 등록일자 2015년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) GOIN 33/48 (2006.01)
GOIN 33/574 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0145999
(22) 출원일자 2013년11월28일
심사청구일자 2013년11월28일
(65) 공개번호 10-2015-0061816
(43) 공개일자 2015년06월05일
(56) 선행기술조사문헌
KR101219516 B1*
KR1020130002322 A
KR1020110076382 A
US20090208926 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국기초과학지원연구원
대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)
(72) 발명자
안영희
충북 청주시 상당구 울봉로209번길 40, 2동 1308호 (울량동, 럭키아파트)
유종신
서울 강남구 남부순환로 2740, 1동 701호 (도곡동, 개포럭키아파트)
(74) 대리인
이원희
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 15 항

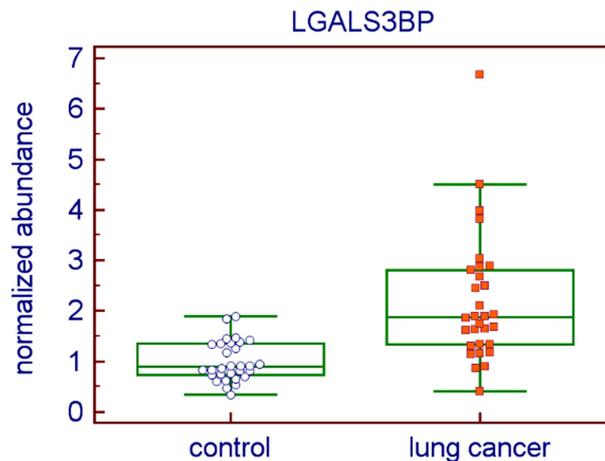
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 혈액유래 암 진단용 펩티드 마커 및 이를 이용한 암 진단방법

(57) 요약

본 발명은 혈액유래 암 진단용 펩티드 마커 및 이를 이용한 암 진단방법에 관한 것으로, 구체적으로 폐암환자의 혈액에서 암 발생 및 진행에 따른 비정상적으로 당쇄화된 당단백질을 렉틴(lectin)을 이용하여 분리하고, 렉틴에 의하여 분리된 당단백질의 가수분해로부터 생성된 펩티드를 선별하여 서열 및 정량 분석을 통해 마커 단백질 및 마커 펩티드를 선별함으로써, 상기 마커 펩티드를 암 진단용 마커 및 진단 방법으로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

지은선

대전 대덕구 우암로 394, 5동 1103호 (비래동, 현대아파트)

신박민

충북 청원군 문의면 회남문의로 1188-9,

오나리

충남 공주시 신금2길 48, 402동 604호 (신관동, 주공4단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013K000426

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 첨단의료기기사업본부

연구사업명 신기술융합형 성장동력 사업

연구과제명 질량분석기반 신기술 융합형 진단기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국기초과학지원연구원

연구기간 2013.07.01 ~ 2014.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 피검체로부터 분리된 시료에 렉틴(lectin)을 처리하여 당단백질을 분리 및 농축하는 단계;
- 2) 단계 1)의 당단백질을 가수분해하여 폴리펩티드를 제조하는 단계;
- 3) 단계 2)의 폴리펩티드를 서열분석하는 단계; 및
- 4) 단계 3)의 서열분석 결과, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드가 존재하는 경우, 상기 피검체가 폐암에 걸릴 위험이 높거나 폐암에 걸린 개체로 판정하는 단계를 포함하는, 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 단계 1)의 시료는 세포, 세포배양액, 혈액, 혈청 및 혈장으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 단계 1)의 렉틴은 ConA, WGA, Jacalin, SNA, AAL, L-PHA, PNA, LCA, ABA, DBA, DSA, ECA, SBA, SSA, UEA, VVL 및 BPL로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 조합인 것을 특징으로 하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 단계 2)의 가수분해는 아르기닌 C(Arg-C), 아스파르트산 N(Asp-N), 글루탐산 C(Glu-C), 라이신 C(Lys-C), 키모트립신(chymotrypsin) 및 트립신(trypsin)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 효소를 사용하는 것을 특징으로 하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 단계 3)에서 정량분석을 하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 단계 4)에서 서열번호 2 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드가 존재하는지를 분석하여 존재하는 경우, 폐암에 걸릴 위험이 높거나 폐암에 걸린 개체로 판정하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 서열분석은 당단백질 갈락틴-3-결합 단백질의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 알파-1-안티키모트립신의 가수분해로부터 유리되는 폴

리펩티드는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 알파-1-안티트립신의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 알파-2-HS-당단백질의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 셀룰로플라스민의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 보체 C3의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 피브로넥틴의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 헤모백신의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 칼리스타틴의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 키니노젠-1의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 루미칸의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 11로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 혈장 프로테아제 C1 억제제의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 12로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 플라스미노겐의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 13으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 셀레노프로테인(SEPP1)의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 14로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이며, 혈액 파라옥소나제/아릴에스테라제 1의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 15로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 단계 3)의 서열분석은 시퀀싱(sequencing), 파이로시퀀싱(pyrosequencing), 실시간 PCR(real-time PCR), NGS(next generation sequencing)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 분석하는 것을 특징으로 하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.

청구항 9

제 5항에 있어서, 정량분석은 크로마토그래피(chromatography) 또는 질량 분석기(Mass Spectrometry)를 이용하여 분석하는 것을 특징으로 하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.

청구항 10

제 6항에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1354.8이고, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1093.7이며, 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1014.6이고, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1195.6이며, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1370.8이고, 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1369.7이며, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1291.7이고, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1140.6이며, 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1026.5이고, 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1250.6이며, 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1296.7이고, 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1115.6이며, 서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1139.6이고,

서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1097.6이며, 및

서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 분자량은 1183.6인 것을 특징으로 하는 폐암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.

청구항 11

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 폐암 진단용 키트.

청구항 12

제 11항에 있어서, 서열번호 2 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 키트.

청구항 13

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 생물분자(biomolecule)가 고정기질에 집적된 폐암 진단용 바이오칩.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 생물분자는 항체 또는 앵타머(Aptamer)인 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 바이오칩.

청구항 15

제 13항에 있어서, 서열번호 2 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 생물분자가 더 포함되는 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 바이오칩.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 발생에 따른 비정상적 당쇄화(glycosylation)를 수반하는 혈액에 존재하는 당단백질을 렉틴(lectin)을 이용하여 분리 및 농축한 후, 당단백질 유래의 폴리펩티드를 선별한 다음, 마커 펩티드를 정량분석함으로써 암을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질의 당쇄화(glycosylation)는 단백질의 수식화 중에서 가장 대표적인 것들 중의 하나이다. 암세포로부터 분비되거나 세포막 표면에 존재하는 많은 당단백질들의 경우, 암의 발생과 진행에 따라서 당단백질의 당쇄화가 비정상적으로 일어난다. 많은 질병의 경우 암유전자의 비정상적인 신호전달로 인해 당전이효소와 당분해효소의 비정상적인 작용과 관련이 있음이 알려져 있다(Orntoft, T.F.; Vestergaard, E.M. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis* 1999,20:362-71).

[0003] 암세포에서 진행되는 이러한 비정상적인 당질화의 패턴에는 N-연결형 당쇄의 크기 및 결사슬 수의 증가, 시알릴화(sialylation) 및 푸코실화(fucosylation)의 증가, 그리고 폴리락토사민(polylactosamine)의 형성과 같은 당사슬 크기의 변화 등 매우 다양하며, 당단백질에서 진행되는 이러한 현상을 이용하면 암의 존재와 진행을 확인할 수 있는 암마커로서 이 당단백질을 활용할 수 있다. 특히 암세포 등에서 비정상적으로 증가되는 푸코실화는 암세포에 존재하는 단백질들이 정상세포의 그것들과 구별할 수 있는 가능성을 제공하며, 따라서 비정상적으로

당질화된 당단백질은 암을 진단할 수 있는 암마커로서 개발될 수 있다. 즉, 당단백질 자체가 아닌 해당 단백질의 비정상적으로 푸코실화된 당단백질 이형체(fucosylated protein glycoforms)들에 대한 효과적인 분석기술 개발이 요구되어 진다. 이러한 암에 관한 정보를 포함하는 당단백질들은 필요한 역할이 끝나면 세포 밖 배지(media)로 분비되기도 하고 세포막으로부터 배지로 떨어져 방출(shed)되기도 하므로, 다양한 암세포의 배양 배지, 암세포 조직의 용해물(lysis), 그리고 특히 환자의 혈액 등은 이러한 암 정보를 포함하는 당단백질, 즉 암마커들을 검출하기 위한 적절한 재료가 된다.

[0004]

정상군과 환자군 각각으로부터 얻은 단백질 시료에 있어서, 단백질 당쇄화의 차이는 환자군을 정상군으로부터 구별할 수 있는 중요한 단서가 될 수 있으며, 따라서 이들 차이를 구별하기 위한 많은 분석 방법들이 개발되어 왔다. 당쇄화의 차이를 구별하기 위하여, 당단백질의 당쇄구조에 대한 렉틴의 선택성을 이용하여 당단백질 또는 당펩티드만을 분리 농축하는 방법이 있다. 당쇄의 다양한 구조에 따라, ConA(Concanavalin A), WGA(Wheat germ agglutinin), Jacalin, SNA(Sambucus nigra agglutinin), AAL(Aleuria aurantia lectin), L-PHA(Phytohemagglutinin-L), PNA(Peanut agglutinin), LCA(Lens culinaris agglutinin-A), ABA(Agaricus biflorus agglutinin), DBA(Dolichos biflorus agglutinin), DSA(Datura stramonium agglutinin), ECA(Erythrina cristagalli agglutinin), SBA(Soybean agglutinin), SSA(Sambucus sieboldiana agglutinin), UEA(Ulex europaeus agglutinin), VVL(Vicia villosa lectin), BPL(Bauhinia purpurea lectin), 또는 이러한 렉틴(lectin) 몇 가지를 혼합하여 사용하는 다중 렉틴(multilectin)을 사용하기도 한다(Yang, Z. et al., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1053, 79-88., Wang, Y. et al., *Glycobiology*, 2006, 16, 514-523). 이 방법은 당단백질의 당쇄구조에 대한 렉틴의 선택성을 이용하는 방법이므로 특히 당쇄구조를 갖는 당단백질들에 대한 선택적인 분리, 농축이 가능하다는 장점이 있다. 특히, 렉틴에 선택적인 당단백질들에 대한 분리과정을 통하여 렉틴에 대하여 친화도를 보여주지 않는 많은 단백질을 제거함으로써, 분석시료의 복잡성(complexity)을 크게 낮출 수 있는 장점도 있다. 분리, 농축된 당단백질은 다양한 전기화학적 방법, 분광화학적 방법, 및 특히 질량분석학적 분석 방법을 이용하여 정성 및 정량 분석이 수행될 수 있다.

[0005]

많이 이용되고 있는 방법으로는, 렉틴의 당단백질의 당쇄구조에 대한 선택성을 이용하여 당단백질을 분석하는 lectin-blotting 방법이 많이 이용되고 있다. 또한, 이 방법은 특정 단백질에 대하여 높은 선택성을 보여주는 immunoblotting 방법과 함께 사용되는 것이 일반적이다. 따라서, 항원 당단백질에 대한 항체의 준비가 꼭 필요하며, 항체를 구할 수 없는 단백질의 경우 이 방법을 이용하는 것이 불가능한 단점이 있다. 또한, 기본적으로 겔-분리 기술을 사용하는 이 lectin-blotting 방법은 분석 속도 및 정량의 신뢰도 등에서 많은 한계를 보여준다. 최근에는, 항체와 렉틴을 사용하는 sandwich array 방법을 사용하여 기존의 렉틴-blotting 방법에 비하여 분석 속도 및 분석 감도를 크게 향상시킬 수 있다 (Forrester, S. et al., *Low-volume, high-throughput sandwich immunoassays for profiling plasma proteins in mice: identification of early-stage systemic inflammation in a mouse model of intestinal cancer. Mol Oncol* 2007, 1(2): 216-225). 그러나 이 경우도 신뢰할만한 항체의 확보가 필수적이며, 대규모로 새로이 발굴되고 있는 모든 당단백질들에 대한 항체를 신속히 확보하는 것은 어려운 일이다.

[0006]

한편, 질량분석법은 매우 복잡한 프로테옴 시료에 대한 초고속 고감도 정성 및 정량 분석에 매우 유용한 분석법으로 활용되고 있다. 특히 다중 반응 모니터링 질량 분석(multiple reaction monitoring mass spectrometry; MRM MS) 방법은 단백질의 가수분해로부터 생성되는 상대적으로 작은 질량을 갖는 폴리펩티드를 신속히 그리고 높은 신뢰도로 정량할 수 있는 방법을 제공하며, 특히 분석하고자 하는 단백질에 대한 항체를 확보할 수 없는 경우 특히 유용한 정량분석 방법이라고 할 수 있다. MRM 방법은 분석하고자 하는 타겟 단백질들로부터 가수분해 등에 의하여 생성되는 타겟 펩티드에 대하여 한번 이상의 액체 크로마토그래피(liquid chromatography)에 의한 펩티드들의 분리 및 두 번의 질량선택(precursor mass selection and fragment ion selection)에 의한 분리를 통하여 매우 복잡한 시료로부터도 타겟 펩티드를 매우 선택적으로 분석할 수 있는 고감도 정량 분석법이다 (Anderson L, et al., *Mol. Cell Proteomics*. 2006, 5, 573-588). 혈장 등의 검체에서와 같이 고농도의 단백질들이 함께 존재하는 검체로부터 저농도의 미량 혈장 바이오마커 단백질을 검출 및 정량 분석하는 것은 매우 어렵다. 따라서 혈장 내 질병 바이오마커를 찾아내기 위해서는 검체의 복잡성(complexity)을 최소화하기 위해 혈장의 대부분을 차지하는 알부민(albumin), 이뮤노글로블린 G(IgG), 이뮤노글로블린 A(IgA), 트랜스페린(transferrin), 합토글로빈(haptoglobin)등의 고농도의 단백질을 제거하고, 남은 단백체만을 사용하여 분석을 진행하는 것이 바람직할 수 있다. 그러나 이러한 과정이 반드시 필요한 것은 아니다. 혈장 내 고농도의 단백질들의 제거에 의한 시료의 복잡성의 최소화 및 LC-MRM 분석에 의한 타겟 펩티드에 대한 높은 선택성에도 불구하고, 검체 내 타겟 마커단백질의 농도가 극히 낮을 경우에는 항체의 immunoaffinity에 의한 마커 단백질에 대한 농축 또는 가수분해된 마커 펩티드에 대한 농축과정을 수행함으로써 암마커에 대한 검출한계(LOD, Limit of

Detection)와 정량한계(LOQ, Limit of Qualification)를 개선시킬 수도 있다. 그러나, 이 경우에도 해당 마커 단백질 또는 마커 펩티드에 선택적인 항체의 개발이 필요하다.

[0007]

[0008]

이에, 본 발명자들은 암 진단을 위한 마커를 찾기 위해 노력한 결과, 폐암 환자의 혈액에서 암 발생에 따른 비정상적으로 당쇄화된 당단백질들을 렉틴을 이용하여 분리 및 농축한 후, 상기 당단백질을 가수분해하여 폴리펩티드를 획득한 다음, 서열 및 정량을 분석하여 암 특이적 당쇄화를 일으키는 마커 당단백질 유래의 가수분해된 마커 펩티드들을 선별함으로써, 상기 마커 펩티드들을 암 진단용 마커 및 암 진단 방법에 유용하게 이용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009]

본 발명의 목적은 암 발생 및 진행에 따라 타겟 당단백질의 특이적 당쇄화를 정량적 변화를 추적할 수 있는 마커 펩티드를 이용하여 암을 진단하는 방법을 제공한다.

[0010]

본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 마커 펩티드를 이용한 암 진단용 키트 및 바이오칩을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0012]

1) 피검체로부터 분리된 시료에 렉틴(lectin)을 처리하여 당단백질을 분리 및 농축하는 단계;

[0013]

2) 단계 1)의 당단백질을 가수분해하여 폴리펩티드를 제조하는 단계;

[0014]

3) 단계 2)의 폴리펩티드를 서열분석 또는 정량분석하는 단계; 및

[0015]

4) 단계 3)의 서열분석 결과, 서열번호 1 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드가 존재하는 경우, 또는 정량분석 결과, 분자량이 1354.8, 1093.7, 1014.6, 1195.6, 1370.8, 1369.7, 1291.7, 1140.6, 1026.5, 1250.6, 1296.7, 1115.6, 1139.6, 1097.6 및 1183.6으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 갖는 폴리펩티드가 존재하는 경우, 상기 피검체가 암에 걸릴 위험이 높거나 암에 걸린 개체로 판정하는 단계를 포함하는, 암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법을 제공한다.

[0016]

또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체들의 조합을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

[0017]

아울러, 본 발명은 서열번호 1 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드들 중 어느 하나 이상에 특이적으로 결합하는 생물분자(biomolecule)가 고정기질에 집적된 암 진단용 바이오칩을 제공한다.

발명의 효과

[0018]

본 발명은 많은 종류의 암세포에서 양적 변화를 일으키는 암 특이구조의 당쇄를 갖는 마커 당단백질 아형(isoform)에 대한 서열분석 또는 정량분석을 수행하여 효과적으로 정상군과 암환자군을 구별하는 방법을 제공한다. 본 발명은 가수분해하여 생성된 마커 펩티드에 대한 정량분석을 통해 암 특이 구조의 당쇄를 갖는 마커 당단백질 아형의 양에 대한 정보를 얻음으로써 피검체의 시료로부터 암을 간단하고 신속하게 진단할 수 있으므로, 상기 선별된 펩티드는 암 진단을 위한 마커로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019]

도 1은 폐암 환자의 혈액시료 및 대조 혈액시료에서 갈렉틴-3-결합 단백질(galectin-3-binding protein) 유래

폴리펩티드들 중 트립신 가수분해로부터 생성된 마커 펩티드 SDLAVPSELALLK에 대한 MRM 정량 분석을 나타낸 도이다.

도 2는 폐암 환자의 혈액시료 및 대조 혈액시료의 차별성을 타겟 펩티드 SDLAVPSELALLK에 대한 분석 결과를 이용하여 ROC(Receiver Operating Characteristic) 커브(curve)를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0021] 본 발명은 당단백질의 특이적 당쇄화(glycosylation)에 대한 정보를 이용하여 암을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0022] 구체적으로, 본 발명은 단백질을 포함하는 피검체로부터 렉틴을 사용하여 암 발생과 관계있는 특이적 당쇄를 포함하는 당단백질들을 분리한 후, 이들 분리된 당단백질들을 가수분해하여 펩티드를 획득한 다음, 가수분해하여 얻은 펩티드 시료로부터 암 발생에 따른 특이적으로 당쇄화된 당단백질의 정량적 변화를 추적할 수 있는 마커 펩티드들을 선별한 다음, 선별된 하나 이상의 펩티드들을 마커로 이용하여 암을 진단하는 방법을 제공한다.

- [0023] 본 발명의 바람직한 실시방법으로는 하기와 같은 단계를 포함하는 방법으로 암 진단을 위한 정보를 제공하는 하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [0024] 1) 피검체로부터 분리된 시료에 렉틴(lectin)을 처리하여 당단백질을 분리 및 농축하는 단계;
- [0025] 2) 단계 1)의 당단백질을 가수분해하여 폴리펩티드를 제조하는 단계;
- [0026] 3) 단계 2)의 폴리펩티드를 서열분석 또는 정량분석하는 단계; 및
- [0027] 4) 단계 3)의 서열분석 결과, 서열번호 1 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드가 존재하는 경우, 또는 정량분석 결과, 분자량이 1354.8, 1093.7, 1014.6, 1195.6, 1370.8, 1369.7, 1291.7, 1140.6, 1026.5, 1250.6, 1296.7, 1115.6, 1139.6, 1097.6 및 1183.6으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 갖는 폴리펩티드가 존재하는 경우, 상기 피검체가 암에 걸릴 위험이 높거나 암에 걸린 개체로 판정하는 단계를 포함하는, 암 진단의 정보를 제공하기 위한 폴리펩티드의 서열 또는 정량 분석 방법.
- [0028] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 피검체는 암의 존재 및 진행 상태와 관련된 정보를 포함할 수 있는 단백질들이 존재하는 생물체로부터 얻을 수 있는 시료로서, 생체조직, 생체조직의 배양으로부터 설정된 세포주 또는 배양액, 타액, 혈액 등을 포함할 수 있다. 특히, 암에 관한 정보를 포함하는 당단백질들은 필요한 역할이 끝나면 세포 밖 배지(media)로 분비(secreted)되기도 하고 세포막으로부터 배지(media)로 떨어져 방출(shed)되기도 하므로, 특히 다양한 암 세포주의 배양 배지(culturing media), 및 환자의 혈액 등은 이러한 암 정보를 포함하는 당단백질, 즉 암마커들을 검출하기 위한 좋은 검체가 된다. 혈액 검체의 경우는, 혈액에 존재하는 구성 성분 단백질들 사이의 농도변화가 매우 크기 때문에, 고농도 단백질 제거용 컬럼[예를 들어, MARS(Multiple Affinity Removal System)] 등을 사용하여 시료의 복잡성(complexity)을 최소화하는 전처리를 수행할 수 있다. 그러나 이러한 고농도의 단백질들을 제거하는 시료 전처리 과정은, 분석하고자 하는 타겟 마커들의 감도 및 재현성에 문제가 없다면, 생략되는 것이 더욱 바람직하다.
- [0029] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 폴리펩티드에 대한 정량분석은 당단백질 갈렉틴-3-결합 단백질(Galectin-3-binding protein, LGALS3BP), 알파-1-안티키모트립신(alpha-1-antichymotrypsin, SERPINA3), 알파-1-안티트립신(Alpha-1-antitrypsin, SERPINA1), 알파-2-HS-당단백질(Alpha-2-HS-glycoprotein, AHSG), 셀룰로플라스민(Ceruloplasmin, CP), 보체 C3(Complement C3, C3), 피브로넥틴(Fibronectin, FN1), 헤모펙신(Hemopexin, HPX), 칼리스타틴(Kallistatin, SERPINA4), 키니노젠-1(Kininogen-1, KNG1), 루미칸(Lumican, LUM), 혈장 프로테아제 C1 억제제(Plasma protease C1 inhibitor, SERPING1), 플라스미노젠(Plasminogen, LPA), 셀레노프로테인(Selenoprotein P, SEPP1), 및 혈액 파라옥소나제/아릴에스테라제 1(Serum paraoxonase/arylesterase 1, PON1)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 마커 당단백질의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드에 대한 정량분석이 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 폴리펩티드에 대한 서열분석은 당단백질 갈렉틴-3-결합 단백질의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 알파-1-안티키모트립

신의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 알파-1-안티트립신의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 알파-2-HS-당단백질의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 셀룰로플라스민의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 보체 C3의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 피브로넥틴의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 헤모팩신의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 칼리스타틴의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 키니노젠-1의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 루미칸의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 11로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 혈장 프로테아제 C1 억제제의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 12로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 플라스미노겐의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 13으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이고, 셀레노프로테인(SEPP1)의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 14로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이며, 혈액 파라옥소나제/아틸에스테라제 1의 가수분해로부터 유리되는 폴리펩티드는 서열번호 15로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0031] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 서열분석은 시퀀싱(sequencing), 파이로시퀀싱(pyrosequencing), 실시간 PCR(real-time PCR), NGS(next generation sequencing)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 분석하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0032] 상기 방법에 있어서, 당단백질의 암 발생과 관계있는 특이적 당쇄란, 단백질의 당쇄화가 정상과 다르게 암환자 및 암 경력자에게서 일어난 것을 의미하며, 이러한 특이적 당쇄화는 아스파라긴(asparagine), 트레오닌(threonine) 또는 세린(serine) 등의 당쇄화 자리에 연결된 당쇄에서 일어날 수 있다. 이러한 암과 관련될 수 있는 특이적 구조를 갖는 당쇄는 정상적인 구조의 당쇄들과 함께 어느 하나의 당쇄화 자리에 공유하여 당쇄의 미세이질성(glycan microheterogeneity)을 나타낸다. 따라서, 상기의 특이적 당쇄는 어느 하나의 당쇄화 자리에 존재하는 많은 당쇄 아형(glycan-isoform)들 중의 일부로서 단백질의 총 양에 대하여 비당량적으로 적은 양으로 존재하게 되며, 특이적 당쇄의 정량적 변화를 신뢰성 있게 측정하기 위해서는 이들 특이적 당쇄들을 다른 다양한 구조의 당쇄 아형(glycan-isoform)들로부터 분리 농축하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 상기 방법에 있어서, 당쇄구조에서 차이를 보이는 다양한 당쇄 아형(glycan-isoform)들로부터, 관심 있는 특이적 당쇄를 갖는 아형(isoform)만을 분리 농축하기 위하여 렉틴을 사용할 수 있다. 이 방법은 당단백질의 당쇄 구조에 대한 렉틴의 선택성을 이용하는 방법이므로 특이 당쇄구조를 갖는 마커 당단백질들에 대한 선택적인 분리, 농축이 가능하다는 장점이 있다. 분리 농축하고자 하는 당쇄의 구조에 따라, ConA, WGA, Jacalin, SNA, AAL, L-PHA, PNA, LCA, ABA, DBA, DSA, ECA, SBA, SSA, UEA, VVL, 또는 BPL 등과 같은 다양한 종류의 렉틴(lectin)을 단독으로 또는 이들의 조합으로 사용할 수 있다. 서로 다른 구조의 당쇄 아형(glycan-isoform)을 갖는 단백질들을 선택적으로 전체 피검체로부터 분리하기 위하여 다양한 종류의 렉틴을 선택하여 사용할 수 있다.

[0034] 상기 방법에 있어서, 많은 종류의 암세포 및 암환자의 혈액에서 증가하는 것으로 보고되고 있는 푸코실화(fucosylation)의 양적 변화를 추적하기 위하여 Aleuria aurantia 렉틴(AAL)을 사용하여 푸코스(fucose) 구조의 당쇄를 포함하는 당쇄 아형(glyco-isoform)을 분리 및 농축하였다. 이때, AAL에 선택적인 당단백질들에 대한 분리과정을 통하여 AAL에 대하여 친화도를 보여주지 않는 많은 단백질들이 제거됨으로써, 상기의 MARS 등을 이용한 별도의 시료 전처리 과정 없이도 분석시료의 복잡성(complexity)을 크게 낮출 수 있는 장점도 있다.

[0035] 상기 방법에 있어서, 렉틴에 의하여 분리된 고분자량 단백질들은 분석의 효율성을 높이기 위하여 보다 작은 분자량의 펩티드 조각으로 가수 분해되는 것이 바람직하다. 당단백질들을 가수분해하여 펩티드를 얻는 과정은 다양한 가수분해 효소를 사용하는 생물학적 방법 또는 특정한 아미노산 자리에서의 가수분해를 유도할 수 있는 화학 시약을 사용하는 화학적 방법 등이 이용될 수 있다. 가수분해효소는 아르기닌 C(Arg-C), 아스파르트산 N(Asp-N), 글루탐산 C(Glu-C), 라이신 C(Lys-C), 키모트립신(chymotrypsin) 및 트립신(trypsin)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 사용하는 것이 바람직하고, 트립신을 사용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서는 트립신을 사용했을 경우 렉틴에 의하여 농축된 어느 하나의 당단백질로부터 생성되는 서열번호 1에서 서열번호 15까지의 타겟 펩티드를 고려하였다. 그러나, 트립신 이외의 다른 종류의 가수분해효소(예, 아르기닌 C(Arg-C), 아스파르트산 N(Asp-N), 글루탐산 C(Glu-C), 라이신 C(Lys-C), 키모트

립신(chymotrypsin))를 사용할 경우, 서열번호 1에서 서열번호 15까지의 타겟 펩티드들의 아미노산 서열의 일부를 포함하는, 동일한 당단백질로부터 생성될 수 있는 다른 서열의 펩티드들도 당연히 타겟 펩티드로 고려될 수 있다. 또한, 가수분해의 효율 및 생성된 펩티드들에 대한 분석의 효율성을 위하여 일반적으로 알려진 변성(denaturation), 환원(reduction), 시스테인 알킬레이션(cysteine alkylation) 등과 같은 시료 전처리 과정을 가수분해반응 전에 필요에 따라 수행할 수 있다. 따라서 이러한 시료 전처리 과정을 통하여 질량 값이 변한 시스테인을 포함하는, 또는 산화과정을 통하여 질량 값이 변할 수 있는 메티오닌(methionine)을 포함하는 펩티드들도 당연히 타겟 펩티드로 고려될 수 있다.

[0036]

상기 방법에 있어서, 정상군 및 환자군으로부터 얻은 각각의 가수분해된 펩티드 시료를 정량적으로 분석함으로써, 암 발생에 따른 특이적으로 당쇄화된 마커 당단백질의 정량적 변화를 추적할 수 있다. 특히 다양한 암 세포주의 배양배지(culturing media), 및 환자의 혈액 등은 이러한 암 정보를 포함하는 당단백질, 즉 암 마커들을 검출하기 위한 좋은 검체가 된다. 이때 암은 단백질의 암 특이적 당쇄화를 유도할 수 모든 종류의 암을 포함할 수 있으며, 간암, 대장암, 위암, 폐암, 자궁암, 유방암, 전립선암, 갑상선암 및 췌장암 등을 포함하는 것이 바람직하고, 폐암인 것이 가장 바람직하다.

[0037]

상기 방법에 있어서, 폐암 환자의 혈액에서 증가하는 fucosylated 당단백질들의 정량적 변화를 이 당단백질의 대리자로서의 후보 마커 폴리펩티드들에 대한 정량적 분석을 수행하고 검증함으로써, 본 발명의 펩티드 마커로 암을 진단하는 방법을 완성하였다(표 1).

[0038]

상기 방법에 있어서, 락틴으로 농축 후 가수분해하여 얻은 펩티드 시료로부터 선별되는 마커 펩티드들은, 하나의 당단백질로부터 유래 되는 하나 이상의 펩티드들로 구성될 수 있고, 또는 서로 다른 당단백질로부터 유래 되는 펩티드들을 포함할 수 있다(표 1). 따라서, 선별된 마커펩티드들은 필요에 따라서 둘 이상의 펩티드들을 함께 검체 분석에 이용할 수 있다.

[0039]

본 발명에 있어서, 마커 펩티드들을 포함하는 가수분해된 펩티드들을 정량적으로 분석하는 방법으로는 분석하고자 하는 펩티드에 선택적인 항체를 사용하는 면역침강 또는 면역블랏팅(immuno-precipitation/-blotting) 방법과 질량분석 방법을 바탕으로 하는 분석방법들이 사용될 수 있다. 특히, 질량분석 방법은 분석하고자 하는 펩티드에 대한 항체의 확보 문제에서 자유롭기 때문에 분석할 수 있는 타겟 펩티드에 있어서 제한이 거의 없으며, 초고속 및 고감도 분석능력도 질량분석 방법의 장점이 될 수 있다. 동위원소로 표지된 표지물질을 이용하여 펩티드를 표지하여 정량 분석하는 방법(iTRAQ, ICAT etc.) 또는 동위원소로 표지된 표준물질(stable isotope standard)을 시료에 내부표준물질로 첨가하여 정량 분석하는 방법(multiple reaction monitoring, MRM) 등이 사용될 수 있다.

[0040]

본 발명의 실시예에서는 실제 폐암환자의 혈액시료를 및 암조건이 없는 사람들의 혈액시료들을 대상으로 하여 본 발명의 방법에 따라 표 1의 펩티드 마커들에 대한 정량분석을 진행하였다. 도 1은 본 발명의 방법에 따라서, 임상적으로 확인된 폐암(lung cancer) 환자의 혈액시료 30 개 및 임상적으로 암과 관련된 소견이 없는 것으로 확인된 대조(control) 혈액시료 30개씩을 사용하여, 표1의 Galectin-3-binding protein (LGALS3BP) 유래의 마커 펩티드 SDLAVPSELALLK에 대하여 3 회 반복된 MRM 정량 질량분석으로부터 얻은 각 혈액시료들에서의 마커 펩티드SDLAVPSELALLK의 정량분석 결과이다. 분석된 총 60개의 시료들에 대한 분석값들을 대조 혈액시료들(30개)로부터 얻은 평균값으로 normalization하여 box-and-whisker plot에서 나타내었다. 30명의 폐암 환자에서의 마커 펩티드의 평균 수준이 30명의 대조 혈액시료들의 평균에 비하여 2.2배 높음을 확인할 수 있다.

[0041]

도 2는 상기 도 1에서 사용된 폐암 혈액시료 30 개와 대조 혈액시료 30개 사이의 차별성을 ROC(Receiver Operating Characteristic) curve로 분석한 예이다. AUROC(area under ROC)=0.856의 값으로, 70%의 감도(sensitivity)에서 93.3%의 마커 특이성(specificity)을 보여주고 있다. 이러한 결과로부터, 본 발명의 Galectin-3-binding protein 유래의 마커 펩티드 SDLAVPSELALLK를 이용하면 혈액검체에 대한 분석으로부터 정상인과 폐암 환자를 구별해낼 수 있음을 확인하였다(도 2 참조).

[0042]

또한, 펩티드 마커를 이용하는 본 발명의 방법에 있어서, 개발된 마커 당단백질에 대한 신뢰도는 동일한 마커 당단백질로부터 가수분해 과정을 통하여 함께 생성될 수 있는 하나 이상의 다른 마커 펩티드들을 조합하여 함께 정량질량 분석에 사용한다면, 그 신뢰도는 더욱 높아질 수 있음은 당연하다. 나아가, 상기 Galectin-3-binding protein 유래의 마커 펩티드 제조과정을 통하여, 혈액시료내의 다른 당단백질 alpha-1-antichymotrypsin (SERPINA3), Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1), Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG), Ceruloplasmin (CP), Complement C3 (C3), Fibronectin (FN1), Hemopexin (HPX), Kallistatin (SERPINA4), Kininogen-1 (KNG1), Lumican (LUM), Plasma protease C1 inhibitor (SERPING1), Plasminogen (LPA), Selenoprotein P (SEPP1), 및

Serum paraoxonase/arylesterase 1(PON1) 으로부터 함께 생성되는 폴리펩티드들에 대한 MRM 정량분석도 함께 수행하였다(표1). 그 결과 표2에서 보는 바와 같이, 함께 분석이 수행된 이들 당단백질로부터 유래된 폴리펩티드들도 control 검체들로부터 폐암 검체들을 구별할 수 있는 마커 펩티드가 될 수 있음을 확인하였다(표 2 참조).

[0043] 따라서, 본 발명에 따라 발굴된 마커 펩티드들을 이용하면 혈액검체에 대한 분석으로부터 정상인과 폐암 환자를 구별해낼 수 있음을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 마커 당단백질에 대한 신뢰도는, 동일한 마커 당단백질로부터 가수분해되어 생성될 수 있는 본 발명에 따른 마커 펩티드들 중 하나 이상, 또는 암진행에 따른 비정상적인 당질화를 일으킨 다른 당단백질로부터 가수분해되어 생성될 수 있는 본 발명에 따른 마커 펩티드들 중 하나 이상을 조합하여 함께 정량질량 분석에 사용함으로써, 그 신뢰도를 더욱 높일 수 있음을 알 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체들의 조합을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

[0045] 상기 암은 간암, 대장암, 위암, 폐암, 자궁암, 유방암, 전립선암, 갑상선암 및 췌장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0046] 상기 키트는 피검체의 시료로부터 가수분해효소 처리 결과 생성된 마커 펩티드에 대한 정량적 변화를 검출함으로써, 피검체가 암에 걸린지를 구별하여 암을 모니터링, 진단 또는 스크리닝하는 것을 가능하게 한다.

[0047] 상기 폴리펩티드들, 또는 이들 각각의 동위원소로 표지된 펩티드들은 표준물질로 상기 키트에 추가로 포함될 수 있다.

[0048] 상기 키트에 사용될 수 있는 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다. 상기 다클론 항체는 상기 펩티드 마커 중 어느 하나를 동물에 주사하고 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 만들어질 수 있다. 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다(Kohler G *et al.*, *Nature* 256:495-497, 1975; Kozbor D *et al.*, *J Immunol Methods* 81:31-42, 1985; Cote RJ *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 80:2026-2030, 1983; 및 Cole SP *et al.*, *Mol Cell Biol* 62:109-120, 1984). 또한, 상기 펩티드 마커 중 어느 하나에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다(Huse WD *et al.*, *Science* 254: 1275-1281, 1989). 상기 와 같이 특정 서열을 갖는 펩티드에 대한 항체를 제조하는 방법은 당업자에게 자명한 일이다.

[0049] 상기 키트에 사용될 수 있는 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고정기질 (solid substrate)에 결합될 수 있다. 상기 고정기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0050] 상기 키트는 피검체로부터 수득 된 시료를 고정 기질에 결합된 상기 펩티드 마커 중 어느 하나에 특이적으로 결합할 수 있는 항체와 접촉시키는 경우, 시료는 항체와 접촉 전에 알맞은 정도로 희석될 수 있다.

[0051] 상기 키트는 피검체로부터 수득 된 시료를 고정 기질에 결합된 상기 펩티드 마커 중 어느 하나에 특이적으로 결합할 수 있는 항체와 접촉시킨 후, 추가적으로 항체에 결합되지 않은 단백질 등은 세척하여 제거하고 마커 펩티드를 검출할 수 있다.

[0052] 상기 키트는 추가적으로 상기 펩티드 마커에 특이적으로 결합하는 검출용 항체를 포함할 수 있다. 상기 검출용 항체는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표지한 접합체(conjugate)일 수 있고, 상기 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 2차 항체인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 발색효소는 퍼옥시다제(peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 또는 산성 포스파타제(acid phosphatase)(예: 양고추냉이 퍼옥시다제(horseradish peroxidase))일 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 형광물질은 플루오레신카복실산(FCA), 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), 플루오레신 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루

오레신-6-일, 디하이드로테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 추가적으로 효소와 발색 반응할 기질 및 결합되지 않은 단백질 등은 제거하고 결합된 펩티드 마커만을 보유할 수 있는 세척액 또는 용리액을 추가로 포함할 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 생물분자(biomolecule)가 고정기질에 집적된 암 진단용 바이오칩을 제공한다.

[0055] 상기 서열번호 1 내지 15 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 안전동위원소(stable isotope)로 표지된 폴리펩티드인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0056] 상기 암은 간암, 대장암, 위암, 폐암, 자궁암, 유방암, 전립선암, 갑상선암 및 췌장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 폐암인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0057] 상기 바이오칩은 피검체의 시료로부터 가수분해효소 처리 후, 얻은 마커 펩티드들의 정량적 변화를 검출함으로써, 피검체가 암에 걸린지를 구별하여 암을 모니터링, 진단 및 스크리닝하는 것을 가능하게 한다.

[0058] 상기 생물분자는 항체 또는 앵타머(Aptamer)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 생물분자는 1차 대사물질, 2차 대사물질 및 천연 물질 등의 작은 분자뿐만 아니라 단백질, 다당류 및 핵산과 같은 거대 중합 분자를 포함하는 살아있는 유기체에 의해 생산되는 유기 분자를 의미한다. 상기 앵타머는 특이적 표적 분자에 결합하는 올리뉴클레오티드 또는 펩티드를 의미한다.

[0059] 상기 고정기질은 플라스틱, 유리, 금속 및 실리콘으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0060] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0061] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] **<실시예 1> 시료의 제조**

[0063] 임상적으로 확인된 폐암(lung cancer) 환자의 혈액시료 (human plasma) 30개 및 임상적으로 암과 관련된 소견이 없는 것으로 확인된 대조 (control) 혈액시료 (human plasma) 30개씩을 준비하였다. 푸코스(Fucose) 당쇄를 갖는 당단백질에 대하여 특이적 친화도를 보여주는 AAL(aleuria aurantia lectin) 렉틴을 사용하여 동일량의 혈액으로부터 AAL-렉틴 특이적 단백질 시료를 분리하고, 분리된 시료들을 가수분해하여 각 혈액검체에 대한 폴리펩티드 시료물질을 확보하였다. 이때, 렉틴을 고정하기 위한 지지체로서, 아가로스 비드 및 자성 비드(magnetic bead) 등을 포함하여 다양한 종류의 지지체를 활용할 수 있다. 본 임상 혈액시료의 분석에서는 렉틴을 고정하기 위하여 스트렙타비딘-자성 비드(strepavidine-magnetic beads)를 사용하였다. 즉, 인산 완충용액(phosphate-buffered saline; PBS) 하에서, 폐암군과 정상 대조군의 혈액시료 각각을 AAL-바이오틴-스트렙타비딘-자성 비드(AAL-biotin-strepavidine-magnetic beads)에 가하고 4℃에서 12 시간 동안 방치하였다. 렉틴과 결합된 단백질을 PBS 완충용액을 사용하여 3차례 세척한 후, 2 M 우레아(urea)/디티오쓰레이톨(DTT) 용액을 사용하여 렉틴에 결합되었던 단백질을 떼어내었다. 획득한 단백질을 요오드아세트아미드(iodoacetamide; IAA)로 처리하고 50 mM 탄화수소 암모늄(ammonium bicarbonate)을 사용하여 물린 다음, 트립신을 사용하여 37℃, 밤새(overnight) 가수분해시켰다. 상기 가수분해된 펩티드는 감압 건조시켰다.

[0064] **<실시예 2> 펩티드 분석을 통한 마커 폴리펩티드들의 서열분석**

[0065] 상기 <실시예 1>의 시료 제조과정에서 제조된 시료들을 분석하기 위하여, 질량분석 및 서열분석을 수행하였다.

[0066] 구체적으로, HPLC(high-performance liquid chromatography)를 사용(trap column, C18, 5 μm, 300 X 5 mm과 analytical column, C18, 5 μm, 75 μm X 10 cm)하고, 이를 바로 전자 스프레이 이온화(electrospray

ionization; ESI) 질량분석기에 연결하여 LC/ESI-MS/MS를 수행하였다. 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 획득한, 락틴에 의하여 농축된 시료 단백체를 트립신 가수분해하여 준비된 펩티드 시료 일부를 10배 희석하여 질량분석기가 연결된 액체크로마토그래피에 10 µl씩 주입하여 분석을 수행하였다. 그 다음, 질량분석 결과를 바탕으로 MASCOT, SEQUEST 등의 검색엔진을 통하여 사용한 AAL-락틴에 의하여 농축되는 타켓 당단백질들의 가수분해 폴리펩티드들을 확인하였다. 타켓 당단백질 유래의 가수분해된 폴리펩티드를 대리자로 하고 이들에 대한 MRM MS 방법에 의한 정량분석을 통하여, 이들 타켓 당단백질들이 암마커로서 활용될 수 있는지 검증하였다.

[0067]

하기 [표 1]은 본 발명에서 선별된 타켓 당단백질의 트립신 가수분해를 통하여 생성되는 펩티드들 중에서 대표적으로 선택한 타켓 폴리펩티드들이다. 이론적으로 트립신 이외의 다른 가수분해효소들 (예를 들면, 아르기닌 C(Arg-C), 아스파르트산 N(Asp-N), 글루탐산 C(Glu-C), 라이신 C(Lys-C), 키모트립신(chymotrypsin) 등의 가수분해효소들)에 의하여 상기의 동일 당단백질로부터 생성되는 펩티드들을 사용하여 타켓 마커 폴리펩티드 패널을 구성하는 것도 당연히 가능하다.

표 1

[0068]

서열번호	마커 단백질	마커 펩티드	펩티드질량(Da)
1	Galectin-3-binding protein	SDLAVPSELALLK	1354.8
2	Alpha-1-antichymotrypsin	NLAVSQVVHK	1093.7
3	Alpha-1-antitrypsin	SVLGQLGITK	1014.6
4	Alpha-2-HS-glycoprotein	HTLNQIDEVK	1195.6
5	Ceruloplasmin	GAYPLSIEPIGVR	1370.8
6	Complement C3	TIYTPGSTVLYR	1369.7
7	Fibronectin	DLQFVEVTDVK	1291.7
8	Hemopexin	GGYTLVSGYPK	1140.6
9	Kallistatin	LGFTDLFSK	1026.5
10	Kininogen-1	TVGSDTFYSFK	1250.6
11	Lumican	SLEDLQLTHNK	1296.7
12	Plasma protease C1 inhibitor	LLDSLPSDTR	1115.6
13	Plasminogen	EAQLPVIENK	1139.6
14	Selenoprotein P	LPTDSELAPR	1097.6
15	Serum paraoxonase/arylesterase 1	IQNILTEEPK	1183.6

[0069]

상기 [표 1]에 포함되어 있는 Galectin-3-binding protein 유래의 마커 펩티드 SDLAVPSELALLK 이외에도 이 동일한 당단백질로부터 가수분해에 의하여 생성될 수 있는 다른 펩티드들도 둘 이상의 조합으로 함께 사용하여 마커 당단백질 Galectin-3-binding protein의 대리자로서 사용될 수 있음은 자명하다. 또한, Galectin-3-binding protein 유래의 마커 펩티드는 동일 검체내에 존재하는 서로 다른 타켓 당단백질 유래의 폴리펩티드들과도 함께 조합하여 암 진단을 위하여 사용할 수 있다.

[0070]

<실시예 3> 질량분석을 이용한 마커 폴리펩티드들에 대한 정량분석

[0071]

상기 <실시예 1>의 시료 제조과정에서 제조된 시료들을 분석하기 위하여, 상기 [표 1]의 마커 폴리펩티드들의 서열을 갖는 동위원소로 표지된 표준물질들을 제조하였다. 이 제조된 표준물질들을 상기 <실시예 1>의 시료 제조과정에서 제조된 각각의 펩티드 시료에 동일량 첨가하여 정량분석을 위한 내부표준물질로 삼고, 각각의 시료에 대한 LC/MRM 정량 질량분석을 3회 반복 수행하였다.

[0072]

이때, 혈액 내에서 표적 폴리펩티드가 매우 낮은 농도로 존재하는 경우 또는 표적 폴리펩티드의 분석이 시료 내에 공존하는 다른 펩티드에 의하여 간섭받을 경우, 제조된 펩티드 시료로부터 표적 마커 펩티드를 상기의 MRM 정량분석 방법에 따라서 바로 검출할 수 없을 수 있다. 따라서 이 경우에는 표적 마커 펩티드에 선택적인 펩티드 항체(anti-peptide antibody)를 제작하고 이를 사용하여, 각 제조된 펩티드 시료로부터 표적 마커 펩티드를 농축하여 정량분석을 수행하였다. 이때 사용하고자 하는 폴리 또는 단일클론 펩티드 항체는 실험상의 편리성을 위하여 폴리머성 고형체 또는 자기성(magnetic) 고형체 등에 직접 고정화시켜서 사용하거나, 아비딘-바이오틴(avidine-biotin) 링커(linker) 등을 사용하여 고정시켜서 사용하였다.

[0073]

총 60개의 혈액 검체들에 대한 분석으로부터 얻은 Galectin-3-binding protein 유래의 마커 펩티드 SDLAVPSELALLK에 대한 정량분석 값들을, 대조 검체들 (30개)로부터 얻은 평균값으로 정량화(normalization)하여

box-and-whisker plot을 사용하여 나타내었다. 30명의 폐암 환자에서의 마커 펩티드의 평균 수준이 30명의 대조 혈액시료들의 평균에 비하여 2.2배 높음을 확인하였다(도 1).

[0074]

도 2는 폐암 혈액시료 30개와 대조 혈액시료 30개 사이의 차별성을 타겟 펩티드 SDLAVPSELALLK에 대한 분석 결과를 이용하여 ROC(Receiver Operating Characteristic) 커브(curve)로 나타낸 도이다. 이때 AUROC 값은 0.856, P-value 는 <0.0001의 값을 보였다.

[0075]

또한, Galectin-3-binding protein 유래의 폴리펩티드 시료를 제조하는 과정에서, 혈액시료내의 다른 당단백질 alpha-1-antichymotrypsin (SERPINA3), Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1), Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG), Ceruloplasmin (CP), Complement C3 (C3), Fibronectin (FN1), Hemopexin (HPX), Kallistatin (SERPINA4), Kininogen-1 (KNG1), Lumican (LUM), Plasma protease C1 inhibitor (SERPING1), Plasminogen (LPA), Selenoprotein P (SEPP1), 및 Serum paraoxonase/arylesterase 1(PON1) 으로부터 함께 생성되는 표1의 마커 폴리펩티드들에 대하여 추가적으로 함께 MRM 정량분석을 수행한 결과를 하기 [표 2]에 요약하였다.

표 2

[0076]

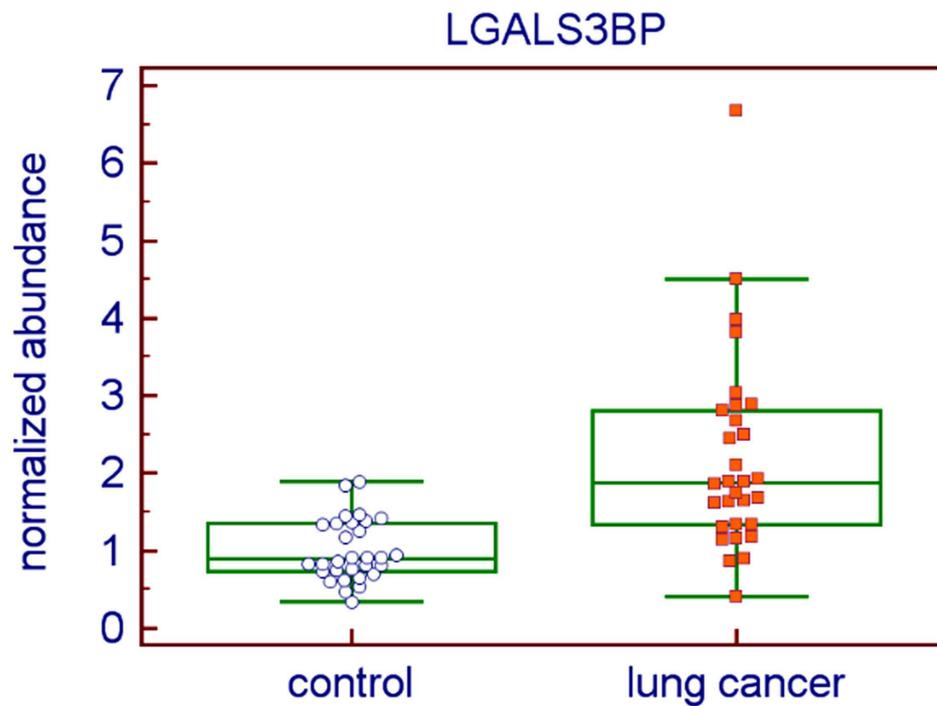
서열번호	마커 단백질	마커 펩티드	폐암 환자 펩티드 평균/대조군 평균	AUROC 값
1	Galectin-3-binding protein	SDLAVPSELALLK	2.2	0.856
2	Alpha-1-antichymotrypsin	NLAVSQVVK	2.6	0.847
3	Alpha-1-antitrypsin	SVLQGLGK	1.8	0.792
4	Alpha-2-HS-glycoprotein	HTLNQIDEVK	1.5	0.767
5	Ceruloplasmin	GAYPLSIEPIGVR	2.0	0.847
6	Complement C3	TIYTPGSTVLYR	1.7	0.821
7	Fibronectin	DLQFVEVTDVK	4.3	0.929
8	Hemopexin	GGYTLVSGYPK	2.1	0.856
9	Kallistatin	LGFTDLFSK	2.0	0.840
10	Kininogen-1	TVGSDTFYSFK	2.1	0.916
11	Lumican	SLEDLQLTHNK	1.8	0.841
12	Plasma protease C1 inhibitor	LLDSLPSDTR	2.4	0.911
13	Plasminogen	EAQLPVIENK	1.9	0.867
14	Selenoprotein P	LPTDSELAPR	1.4	0.805
15	Serum paraoxonase/arylesterase 1	IQNILTEEPK	2.4	0.890

[0077]

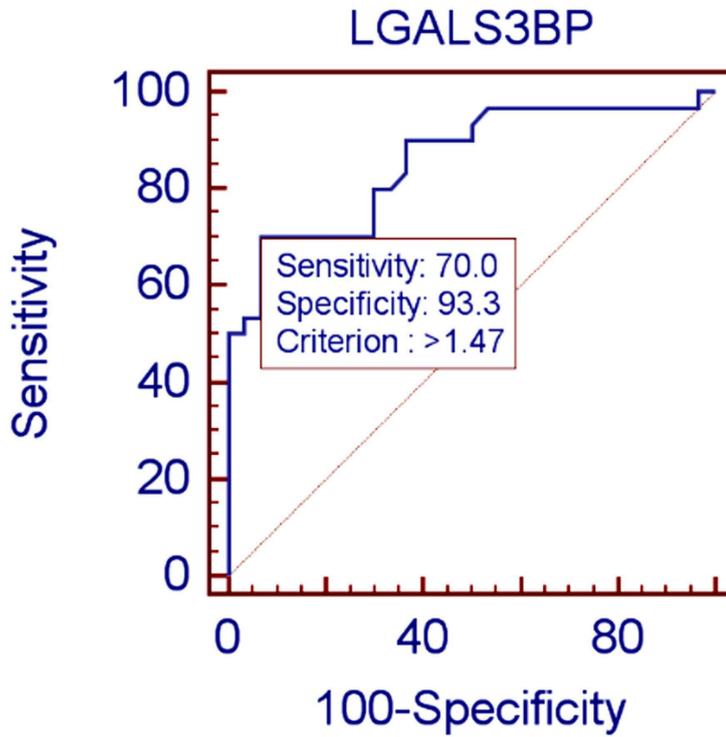
이들 타겟 펩티드들도 폐암군과 대조군 사이에 차이를 보이고 있다. 따라서, 당연히 상기의 당단백질로부터 가수분해 과정을 통하여 함께 생성된 마커 타겟펩티드들도 대표적으로 사용된 상기의 Galectin-3-binding protein 유래의 폴리펩티드들과 마찬가지로 폐암에 대한 마커 펩티드가 될 수 있음은 자명하다. 따라서 이들 마커 폴리펩티드들을 Galectin-3-binding protein 유래의 마커 폴리펩티드 SDLAVPSELALLK 와 함께 분석할 경우, 암진단을 위한 보다 신뢰도 높은 정보를 얻을 수 있다.

도면

도면1



도면2



서열목록

- <110> Korea Basic Science Institute
 - <120> Polypeptide markers for cancer diagnosis derived from blood sample and methods for the diagnosis of cancers using the same
 - <130> 13p-10-84
 - <160> 15
 - <170> KopatentIn 2.0
 - <210> 1
 - <211> 13
 - <212> PRT
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 1
- Ser Asp Leu Ala Val Pro Ser Glu Leu Ala Leu Leu Lys
- 1 5 10
- <210> 2
 - <211> 10
 - <212> PRT
 - <213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Leu Ala Val Ser Gln Val Val His Lys

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

His Thr Leu Asn Gln Ile Asp Glu Val Lys

1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Ala Tyr Pro Leu Ser Ile Glu Pro Ile Gly Val Arg

1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Thr Val Leu Tyr Arg

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Asp Leu Gln Phe Val Glu Val Thr Asp Val Lys
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Gly Gly Tyr Thr Leu Val Ser Gly Tyr Pro Lys
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Leu Gly Phe Thr Asp Leu Phe Ser Lys
 1 5
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Thr Val Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Ser Leu Glu Asp Leu Gln Leu Thr His Asn Lys
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

Leu Leu Asp Ser Leu Pro Ser Asp Thr Arg
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys
 1 5 10

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg
 1 5 10

<210> 15
 <211>
 > 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu Pro Lys
 1 5 10