



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0082109
(43) 공개일자 2008년09월11일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0022490

(22) 출원일자 2007년03월07일

심사청구일자 2007년03월07일

(71) 출원인

한국과학기술연구원

서울 성북구 하월곡2동 39-1

(72) 발명자

이철주

서울 광진구 자양3동 현대2차아파트 201-513

유명희

서울 서초구 잠원동 52 신반포18차아파트 335-702

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 장수길, 주성민, 김성완

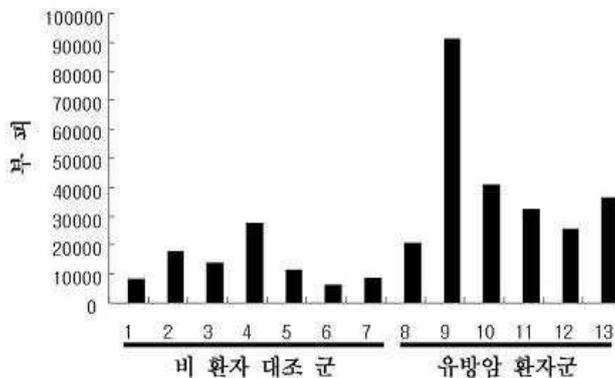
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 유방암 진단용 단백질 마커 플라빈 환원효소 및 이에 대한항체를 포함하는 유방암 진단키트

(57) 요약

본 발명은 유방암을 진단할 수 있는 단백질 마커 플라빈 환원효소(flavin reductase) 및 이의 항체를 포함하는 유방암 진단키트에 관한 것으로, 구체적으로 정상인에 비하여 유방암 환자의 혈액 내에서 그 양이 특이적으로 증가하여 유방암을 진단할 수 있는 단백질 마커로 선별된 플라빈 환원효소, 이를 선택적으로 인식하는 항체를 포함하는 유방암 진단키트, 및 항원-항체 결합반응을 이용하여 혈액 내에서 플라빈 환원효소를 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 유방암 진단용 단백질 마커인 플라빈 환원효소 및 이의 항체를 포함하는 유방암 진단키트는 진단의 민감도 및 정확도가 높을 뿐만 아니라 환자의 혈액을 이용하여 매우 간편하게 유방암을 진단할 수 있어 유방암의 조기 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

강운범

경기 의왕시 오전동 동남아파트 라-103

안영희

서울 강남구 개포4동 시영아파트 18-108

노동영

서울 영등포구 여의도동 서울아파트 1-1206

신혁재

경기 고양시 일산서구 가좌동 가좌마을2단지아파트
203-1906

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 플라빈 환원효소 단백질 마커에 특이적인 항체를 포함하는 유방암 진단키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항체가 다클론 항체 또는 단클론 항체인 것을 특징으로 하는 유방암 진단키트.

청구항 3

제1항에 있어서,

기질과의 반응에 의하여 발색하는 표지체가 접합된 이차항체 접합체; 상기 표지체와 발색 반응할 발색기질 용액; 세척액; 및 효소반응 정지액을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 유방암 진단키트.

청구항 4

제3항에 있어서,

이차항체 접합체의 표지체가 HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 5

제3항에 있어서,

발색기질이 TMB(3,3',5,5'-tetramethyl bezidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 및 OPD(o-phenylenediamine)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 6

검체로부터 항원-항체 결합반응을 이용하여 플라빈 환원효소 단백질 마커를 검출하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

- 1) 검체 및 대조군의 단백질을 고정체에 코팅시키는 단계;
- 2) 상기 고정체에 플라빈 환원효소에 특이적인 항체를 첨가하여 항원-항체 결합반응을 수행하는 단계;
- 3) 상기 항원-항체 결합반응을 통해 생성된 항원-항체 결합반응물을 이차항체 접합체(conjugate) 및 발색기질 용액을 이용하여 검출하는 단계; 및
- 4) 검체와 대조군에 대한 검출 결과를 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

단계 1)의 검체가 혈청 또는 혈장인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

단계 1)의 고정체가 나이트로셀룰로오즈 막, PVDF 막, 폴리비닐(polyvinyl) 또는 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글래스로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

단계 2)의 상기 항원-항체 결합반응이 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 형광면역법, 효소기질발색법, 항원-항체 응집법으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

단계 3)의 이차항체 접합체의 표지체가 HRP, 염기성 탈인산화효소, 콜로이드 골드, 형광물질 및 색소로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

단계 3)의 발색기질이 TMB, ABTS 및 OPD로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <5> 본 발명은 혈액에서 유방암 발병 유무를 선택적으로 진단할 수 있는 단백질 마커로서의 플라빈 환원효소 및 이를 특이적으로 인식하는 항체를 포함하는 유방암 진단키트에 관한 것이다.
- <6> 현재 유방암의 발병 원인으로 여성 호르몬, 가족력, 과거력, 출산력, 식생활 습관 등의 다양한 인자들이 거론되고 있지만 아직까지 명확하게 규명된 것은 없다. 2005년 통계청의 조사에 의하면, 한국 여성의 유방암 발생은 최근 급격히 증가하여 1998년 자궁경부암을 추월한 이래 2001년 발생한 한국 여성암 환자의 16.1%를 차지하면서 위암을 제치고 여성암 1위가 되었다. 특히, 2002년에는 2001년에 비해 유방암(11.1%)이 가장 급증한 암으로 나타나 저 출산, 짧은 수유기간, 이른 초경, 늦은 폐경 등의 요인과 함께 생리적으로 왕성한 신체적 변화를 겪는 시기에 여성호르몬의 자극을 받는 횟수의 급격한 증가로 인한 유선조직의 민감도 증가, 식생활의 서구화, 생활환경의 오염 등의 이유로 유방암 발생이 급격하게 증가하고 있다.
- <7> 이러한 유방암의 발생빈도 및 유방암으로 인한 사망률의 증가는 현재의 서구화 실태로 보아 앞으로도 상당기간 지속될 것으로 예상된다. 유방암은 암세포의 성장으로 인한 주변 조직의 침범 또는 림프절 전이 등의 증상을 초래하는 것이 보통이지만, 대부분이 아무런 증상 없이도 자가검진으로 진단될 수 있다. 따라서, 유방암으로 인한 사망률을 줄이기 위해서는 유방암을 효과적으로 조기에 진단하는 것이 매우 중요하다(Tuli R. et al., *Breast J.*, 12: 343-348, 2006).
- <8> 유방암을 진단하기 위해서 여러 가지 방법이 복합적으로 사용되고 있는데, 현재까지는 유방암 환자의 70%가 자가진단에 의해서 내원하고 있다. 그러나, 이러한 자가진단 방법은 악성종양과 양성 혹을 구분하는 것이 매우 어렵다는 단점이 있다. 그 밖에, 유방암의 진단방법으로 X-선 유방촬영법, 초음파검사법, 세침흡입세포검사법, 자기공명촬영법 등이 있는데, 최종적으로는 조직검사를 통해 확인하는 것이 중요하다. X-선 유방촬영법은 X-선으로 유방을 찍어 검사하는 방법으로 혹이 양성인지 악성인지를 감별하는데 우수할 뿐만 아니라, 숨어 있는 혹을 발견하는 방법으로서 자가진단으로 혹이 만져지기 이전에 초기의 유방암을 진단하는데 가장 효과적인 방법이다. 그러나, 유방촬영법은 젊은 여성같이 유선이 많이 발달되어 있다거나 유방이 작고 섬유질이 많은 우리나라 여성에게서는 진단율이 떨어지는 단점이 있으며, 자주 찍으면 오히려 유방암이 유발될 수도 있다는 논란이 있다. 이러한 유방촬영법의 대안으로 초음파검사법이 사용되고 있는데, 초음파검사법은 물혹과 단단한 혹을 구별하는데 효과적이긴 하지만, 악성종양과 양성 혹을 감별하는 능력은 떨어진다.

- <9> 이러한 기존 진단방법의 단점을 보완하기 위한 방법으로 환자의 혈액에서 종양 표지자(marker)의 농도를 측정하여 유방암을 진단하려는 시도가 있었다(Clinton SR. et al., *Biomed. Sci. Instrum.*, 39: 408-414, 2003; Rui Z. et al., *Proteomics*, 3: 433-439, 2003; Soletormos G. et al., *Dan. Med. Bull.*, 48: 229-255, 2001). 그러나, 이러한 종양 표지자들의 진단적 또는 예후 인자로서의 가치가 연구되고는 있지만, 아직까지 제한적으로 사용되고 있을 뿐으로 공식적으로 권장되고 있는 유방암 표지자는 없는 실정이다.
- <10> 한편, 플라빈 환원효소(flavin reductase)는 수용성 단백질로 주로 간이나 적혈구에서 생성되고, 심장, 폐, 부신이나 대뇌에 소량 존재하며, 빌리베르딘(biliverdin) 환원효소라는 이름으로도 알려져 있다. 이 효소는 NADPH를 환원제로 사용하여 플라빈 모노뉴클레오티드(flavin mononucleotide), 메틸렌블루(methylene blue), 메트헤모글로빈(methemoglobin) 등의 환원을 촉매한다(Sass MD. et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 70: 760-767, 1967; Quandt KS. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9322-9326, 1994). 또한, 플라빈 환원효소는 세포가 산화에 의해 손상을 입는 것을 방지하며 철 대사 조절에도 관여하고, 간에서는 빌리베르딘을 빌리루빈(bilirubin)으로 전환시키는 역할을 담당한다. 최근 보고에 의하면, 빌리베르딘 환원효소가 결핍될 경우 세포 손상이 증가하면서 암세포 발달과 뇌세포 손상이 증가하고 소량의 과산화수소를 처리하더라도 세포가 사멸한다는 사실이 확인되었고, 빌리루빈을 암 세포주에 처리하면 암세포의 증식이 억제된다는 사실이 보고되었다(Baranano DE. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 16093-16098, 2002; Rao P. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342: 1279-1283, 2006). 또한, 간암, 구강 편평세포암, 신장암 환자로부터 적출한 암 조직에서 플라빈 환원효소의 발현양이 주변 정상조직보다 증가되었고(Maines MD. et al., *J. Urol.*, 162: 1467-1472, 1999; Melle C. et al., *J. Proteome Res.*, 6: 306-315, 2007; Lo WY. et al., *Clin. Chim. Acta.*, 376: 101-107, 2007), 특히 신장암에서는 플라빈 환원효소의 양이 효소로서의 활성도와 직접 연관되어 있음이 보고되었다(Maines MD. et al., *J. Urol.*, 162: 1467-1472, 1999). 그러나, 혈액 내에서 암과 관련하여 플라빈 환원효소 단백질의 발현양에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.
- <11> 이에, 본 발명자들은 유방암 환자로부터 얻어진 생물학적 검체 시료 내에서 특이하게 변화하는 단백질을 발굴하고 이를 유방암의 조기 진단에 이용하는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 플라빈 환원효소 단백질이 정상인에 비하여 유방암 환자의 혈액에서 특이적으로 그 양이 증가하여 존재한다는 사실을 발견하고, 이의 항체를 이용한 면역화학적 방법으로 유방암을 간편하게 진단할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <12> 따라서, 본 발명의 목적은 혈액내 존재하는 플라빈 환원효소를 이용하여 간편하게 유방암을 진단할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <13> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 **서열번호: 1**의 아미노산 서열을 갖는 플라빈 환원효소의 유방암 진단용 단백질 마커를 제공한다.
- <14> 또한, 본 발명은 상기 플라빈 환원효소 단백질 마커를 선택적으로 인지하는 항체를 포함하는 유방암 진단키트를 제공한다.
- <15> 아울러, 본 발명은 검체에서 항원-항체 결합반응을 통해 플라빈 환원효소 단백질 마커를 검출하는 방법을 제공한다.
- <16> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <17> 본 발명의 일 측면에 의하면, 본 발명은 유방암 진단을 위한 단백질 마커로서 **서열번호: 1**의 아미노산 서열을 갖는 플라빈 환원효소 단백질 마커를 제공한다.
- <18> 본 발명은 유방암 환자의 혈액에서 특이적으로 그 양이 증가하여 유방암의 진단에 유용하게 사용될 수 있는 진단 마커를 선별하기 위하여, cICAT(cleavable isotope-coded affinity tag) 시약을 단백질에 표지하고 질량분석기로 정량분석하는 방법을 사용한다. cICAT는 티올기(thiol)에 특이적으로 반응할 수 있도록 개발된 시약으로, 9개의 탄소원소가 모두 가벼운 동위원소(¹²C) 또는 무거운 동위원소(¹³C)로 치환된 링커(linker)를 사용하여 만들어진 두 종류의 다른 동위원소 태그(tag)를 포함한다. 따라서, 화학적 성질은 동일하지만 9 Da의 질량차이가 나는 두 종류의 cICAT 시약으로 비교하고자 하는 두 시료 내에 있는 단백질의 시스테인(cysteine) 잔기를 표지하고 트립신(trypsin)으로 절단하여 표지된 펩티드만을 모아 질량분석기로 동정하고 정량하면 두 시료에서 양

적 차이가 나는 단백질을 알아낼 수 있다(Gygi SP. et al., *Nat. Biotechnol.*, 17: 994-999, 1999).

- <19> 본 발명에서는 cIACt 분석을 위해 먼저 유방암 환자의 혈장과 비환자의 혈장을 각각 따로 모아 유방암 환자군과 비환자 대조군 혈장 시료를 준비한다. 사람의 혈장에는 소수의 단백질이 혈장 내 단백질 농도의 대부분을 차지하기 때문에, 소량의 대다수 단백질을 동정하기 위해서는 먼저 상대적으로 양이 많은 단백질을 제거해야 한다 (Anderson NL. et al., *Mol. Cell. Proteomics*, 1: 845-867, 2002; Somiari RI. et al., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 815: 215-225, 2005). 준비된 유방암 환자군과 비환자 대조군의 혈장 시료로부터 상대적으로 양이 많은 단백질, 예컨대 알부민, 면역글로불린 A, 면역글로불린 G, 헤모글로빈 (heptoglobin), 트랜스페린(trasnferrin), 트립신 저해제(trypsin inhibitor) 등을 제거하기 위해 다중 친화 컬럼(multiple affinity column)을 이용하여 액체 크로마토그래피를 수행한다. 상기 컬럼에 결합하지 않은 단백질 구획을 자외선 흡광도 280 nm로 추적하여 모으고 컬럼에 결합한 단백질들을 제거하였다. 이와 같이 상대적으로 양이 많은 6종의 단백질들이 대부분 제거된 혈장단백질 구획을 모아 3 kDa 이상의 크기를 갖는 단백질들을 농축한 후, 비환자 대조군과 유방암 환자군의 단백질 시료를 각각 가벼운 cICAT 시약과 무거운 cICAT 시약으로 표지하고 동량으로 혼합한 뒤 트립신을 처리하여 다수의 펩티드 절편으로 절단한다. 이렇게 얻은 펩티드 절편을 강한 양이온 교환수지 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 다수의 분획으로 나누고, 각 분획으로부터 아비딘(avidin) 친화성 컬럼 크로마토그래피를 통해 cICAT 시약이 결합되어 있는 펩티드만을 분리하여 농축한다. 농축된 펩티드 절편을 역상 수지 크로마토그래피 시스템을 통해 분리하고 탠덤질량분석기(tanderm mass spectrometry)를 사용해 각 펩티드 절편의 탠덤질량분석 스펙트럼을 얻는다. 컴퓨터 분석 프로그램으로 펩티드 절편의 탠덤질량분석 정보를 공지된 단백질 데이터베이스와 비교 검색하여 단백질을 동정하고, 유방암 환자군과 비환자 대조군 시료 사이의 양적 차이를 분석한다(도 1 및 2 참조)(Keller A. et al., *Anal. Chem.*, 15: 5395-5392, 2002; Nesvizhskii AI. et al., *Anal. Chem.*, 75: 4646-4658, 2003; Li XJ. et al., *Anal. Chem.*, 75: 6648-6657, 2003). 이로부터 비환자 대조군에 비해 유방암 환자군에서 특이적으로 발현양이 증가한 단백질로서 **서열번호: 1**로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 플라빈 환원효소 단백질이 동정된다.
- <20> 본 발명에서 유방암 환자의 혈액에서 특이적으로 발현양이 증가한 것으로 확인된 플라빈 환원효소 단백질을 유방암의 진단 마커로 이용하는 것은 본 발명이 최초이다. 또한, 상기 단백질은 혈장에서 검출이 가능하기 때문에 생검(biopsy)을 통해서만 진단이 가능하던 기존의 단백질과는 달리 환자에게 불편을 초래하지 않으면서 간편한 방법으로 유방암을 진단하는데 활용될 수 있다.
- <21> 본 발명에서는 상기 플라빈 환원효소가 유방암 환자의 혈액에서만 특이적으로 그 양이 증가함을 발견하고, 이를 선택적으로 인지하는 항체를 이용하여 비환자 대조군과 유방암 환자군의 혈장 시료를 대상으로 한 면역화학 분석에서 유의한 결과를 얻어(도 3 및 4 참조), 상기 플라빈 환원효소가 유방암의 진단 마커로 유용하게 사용될 수 있음을 확인한다.
- <22> 본 발명의 일 실시예에 의하면, 피검자의 혈액 시료를 채취하고, 피검자의 혈액 시료에 함유된 상기 유방암 진단 마커인 플라빈 환원효소를 이에 대한 항체를 이용하여 검출함으로써 유방암의 발병 여부를 확인할 수 있다.
- <23> 따라서, 본 발명의 플라빈 환원효소 및 이를 선택적으로 인지하는 항체를 이용한 유방암의 발병 확인방법은 환자의 혈액을 이용하는 새로운 면역학적 진단도구로서 민감도가 우수할 뿐만 아니라 생검을 이용하지 않고 혈액을 대상으로 간편하게 분석할 수 있어, 유방암의 조기 진단에 유용하게 사용될 수 있다.
- <24> 이에, 본 발명의 다른 측면에 의하면, 본 발명은 유방암 진단 마커인 플라빈 환원효소에 선택적으로 결합하는 항체를 포함하는 유방암 진단키트를 제공한다.
- <25> 플라빈 환원효소 마커 단백질에 선택적으로 결합하는 항체를 제조하기 위해서는 플라빈 환원효소의 입수가 선행되어야 하며, 이는 **서열번호: 1**의 아미노산 서열을 이용하여 합성하거나 유전자 재조합을 이용하여 미생물에서 생산할 수 있고, 또는 혈액으로부터 직접 분리하여 준비할 수도 있다.
- <26> 본 발명의 목적상, 상기 항체는 플라빈 환원효소의 다클론 항체 및 단클론 항체를 모두 포함할 수 있으나, 항원과 보다 특이적으로 결합할 수 있는 단클론 항체가 바람직하다.
- <27> 다클론 항체는 당업자에 알려진 종래 방법에 따라 면역원(antigen)으로 플라빈 환원효소 마커 단백질 또는 그의 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 이러한 외부 숙주로는 마우스, 랫트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 예로 들 수 있으며, 면역원은 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 근육내, 복강내 또는 피하주사 등의 방법으로 투여되어 외부 숙주를 면역화시킨다. 면역화된 외부 숙주로부터 정기적으로 혈청을 채취하여 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리, 정

제하여 플라빈 환원효소에 특이적인 다클론 항체를 제조할 수 있다.

- <28> 단클론 항체는 당업자에 알려진 융합(fusion)에 의한 불멸화된 세포주 생성방법(Kohler G. et al., *Nature*, 256: 495-497, 1975)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법을 간략히 설명하면, 먼저 순수한 플라빈 환원효소 단백질 또는 그의 단편으로 마우스를 면역시키거나, 이의 펩티드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 마우스에 면역시킨다. 면역이 된 마우스로부터 분리한 항체-생산 B 임파구를 인간 또는 마우스의 골수종세포와 융합하여 불멸화된 하이브리도마 세포를 생성한다. 이어, 효소면역분석법(ELISA; Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)으로 하이브리도마 세포의 단클론 항체의 생성 여부를 조사하여 양성 클론을 선발하고 이를 배양한 후 항체를 분리, 정제하거나 쥐의 복강에 주입한 후 복수를 채취하여 플라빈 환원효소에 특이적인 단클론 항체를 제조할 수 있다.
- <29> 본 발명의 플라빈 환원효소 단백질의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- <30> 본 발명의 유방암 진단키트에는 플라빈 환원효소를 선택적으로 인지하는 항체뿐만 아니라 당분야에서 면역학적 분석에 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함된다.
- <31> 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 유방암 진단키트는 플라빈 환원효소 단백질에 특이적인 항체; 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 이차항체 접합체(conjugate); 상기 표지체와 발색 반응할 발색기질 용액; 세척액; 및 효소반응 정지용액을 포함할 수 있다.
- <32> 또한, 본 발명의 유방암 진단키트는 플라빈 환원효소 표준 항원을 포함하는 양성 대조군과 상기 항원이 주입되지 않은 동물의 항혈청을 포함하는 음성 대조군을 추가적으로 포함할 수 있다.
- <33> 본 발명의 유방암 진단키트는 항원-항체 결합반응을 통하여 항체 단백질에 대한 항원을 정량 또는 정성적으로 분석함으로써 유방암을 진단할 수 있으며, 상기 항원-항체 결합반응은 통상의 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 형광면역법, 효소기질발색법, 항원-항체 응집법 등의 방법을 이용하여 측정할 수 있다. 예를 들어, 검체 및 대조군을 표면에 코팅시킨 96-웰 마이크로타이더 플레이트 등을 이용하여 재조합 단클론 항체 단백질과 반응하는 ELISA를 수행하도록 상기 진단키트를 제공할 수 있다.
- <34> 항원-항체 결합반응을 위한 고정체로는 나이트로셀룰로오즈 막, PVDF 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트(well plate), 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 사용될 수 있다.
- <35> 이차항체의 표지체는 발색반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등의 표지체가 사용될 수 있다.
- <36> 발색을 유도하기 위한 발색기질은 발색반응을 하는 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB(3,3',5,5'-tetramethyl bezidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], OPD(o-phenylenediamine) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색기질은 완충용액(0.1 M NaAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. TMB와 같은 발색기질은 이차항체 접합체의 표지체로 사용된 HRP에 의해 분해되어 발색 침적체를 생성하고, 이 발색 침적체의 침적 정도를 육안으로 확인함으로써 플라빈 환원효소 단백질 항원의 존재 유무를 검출한다.
- <37> 세척액은 인산염 완충용액, NaCl 및 트윈 20(Tween 20)을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02 M 인산염 완충용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05% 트윈 20으로 구성된 완충용액(PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합반응 후 항원-항체 결합체에 이차항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 첨가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지용액은 황산용액(H₂SO₄)이 바람직하게 사용될 수 있다.
- <38> 아울러, 본 발명의 또 다른 측면은 검체에서 유방암 진단용 마커 단백질인 플라빈 환원효소를 항원-항체 결합반응을 이용하여 검출하는 방법을 제공한다.
- <39> 상기 검출방법은 혈액내 단백질을 고정화시키거나 전기영동(SDS-PAGE)으로 분리시킨 후 나이트로셀룰로오즈 막으

로 전이시키고 플라빈 환원효소를 선택적으로 인지하는 항체와 접촉시켜 항원-항체 결합반응을 통해 플라빈 환원효소 단백질의 존재를 간접적으로 확인하는 것을 포함한다. 상기 항원-항체 결합반응으로는 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(RIA), 샌드위치 측정, 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법, 형광면역법, 효소기질발색법, 항원-항체 응집법 등을 예로 들 수 있다. 검체로서는 혈청 또는 혈장을 사용할 수 있고, 혈장이 더 바람직하다.

- <40> 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면, 상기 검출방법은,
- <41> 1) 검체 및 대조군의 단백질을 고정체에 코팅시키는 단계;
- <42> 2) 상기 고정체에 플라빈 환원효소에 특이적인 항체를 첨가하여 항원-항체 결합반응을 수행하는 단계;
- <43> 3) 상기 항원-항체 결합반응을 통해 생성된 항원-항체 결합반응물을 이차항체 접합체(conjugate) 및 발색기질 용액을 이용하여 검출하는 단계; 및
- <44> 4) 검체와 대조군에 대한 검출 결과를 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

<45> 상기 검출방법을 구체적으로 설명하면, 먼저 검체로부터 혈장단백질을 분자량에 따라 분리한다. 플라빈 환원효소는 분자량이 대략 22 kDa이므로 15% 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동을 수행하고, 이로부터 분리된 단백질들을 나이트로셀룰로즈 막과 같은 고정체로 전이시켜 고정한다. 이어, 고정된 단백질 항원에 특이적인 항체를 가하여 항원-항체 결합반응을 수행한다. 검체에 플라빈 환원효소 단백질이 존재한다면, 상기 단백질이 고정된 막에 플라빈 환원효소 특이적인 항체가 가해졌을 때 항원-항체 결합반응이 일어나게 된다. 플라빈 환원효소와 이에 대한 항체의 결합 정도를 측정하기 위해서, 플라빈 환원효소 항체에 친화성을 갖는 이차항체와 결합시키는 단계를 수행하는데, 이차항체에 접합된 HRP(horseradish peroxidase)가 기질인 ECL(enhanced chemiluminescence)과 반응하여 발색반응을 일으키는지의 여부와 그 정도를 대조군과 비교함으로써 검체 시료내 유방암 진단 마커인 플라빈 환원효소 단백질의 존재 여부를 검출하게 된다.

<46> 한편, 플라빈 환원효소에 특이적인 항체를 생물학적 마이크로칩(biological microchip) 상에 고정시킨 후 대상자로부터 분리된 검체 시료와 반응시켜 상기 항체 단백질에 대한 항원을 검출할 수 있는 생물학적 마이크로칩 및 자동화된 미세배열 시스템(microarray system)을 이용하면, 한 번의 분석으로 대량의 시료를 분석할 수 있는 장점이 있다.

<47> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

<48> **실시예 1: 유방암 특이적 진단 마커로서 플라빈 환원효소의 동정**

<49> 본 발명자들은 유방암 환자의 혈액에서 특이적으로 그 양이 증가하여 유방암의 진단에 유용하게 사용될 수 있는 진단 마커를 선별하기 위하여, cICAT(cleavable isotope-coded affinity tag) 시약을 단백질에 표지하고 질량 분석기로 정량분석하는 방법을 사용하였다(Gygi SP. et al., *Nat. Biotechnol.*, 17: 994-999, 1999). cICAT 정량분석을 위하여 9개의 탄소원소가 모두 가벼운 동위원소(¹²C) 또는 무거운 동위원소(¹³C)로 치환된 두 종류의 시약으로 구성된 cICAT 시약(Cat. No. 4339039, Applied Biosystems사)을 사용하였다. 상기 cICAT 시약은 티올기(thiol)에 특이적으로 반응하도록 개발된 것이다.

<50> 한편, 유방암 환자 6명의 혈장과 비환자 7명의 혈장을 따로 섞어 유방암 환자군과 비환자 대조군의 혈장 시료를 준비하였다. 준비된 유방암 환자군과 비환자 대조군의 혈장 시료로부터 상대적으로 양이 많은 단백질인 알부민, 면역글로블린 A, 면역글로블린 G, 헵토글로빈, 트랜스페린 및 트립신 저해제를 제거하기 위해 MARS(multiple affinity removal system, Aglient사) 컬럼을 이용하여 액체 크로마토그래피를 수행하였다. 상기 컬럼에 결합하지 않은 단백질 구획을 자외선 흡광도 280 nm로 추적하여 모으고 컬럼에 결합한 혈장 단백질들을 분리하여 제거하였다. 이렇게 준비된 혈장 시료는 아세트산 침전을 통해 염류를 제거하고 유방암 환자군과 비환자 대조군의 혈장으로부터 각각 100 µg의 단백질 시료를 준비하였다. 유방암 환자군의 단백질 시료에는 무거운 cICAT 시약 3.5 mM을 첨가하고 비환자 대조군의 단백질 시료에는 가벼운 cICAT 시약 3.5 mM을 첨가하여 37°C에서 120분간 반응시켜 표지하였다. cICAT 시약으로 표지된 각각의 단백질 시료를 동일한 비율로 혼합한 후 전체 단백질 200 µg의 1/40에 해당하는 양인 5 µg의 트립신을 25 µl를 첨가하고 37°C에서 16시간 동안 처리하여 다수의 펩티드 절편으로 분리하였다. 이렇게 얻은 펩티드 절편을 강한 양이온 교환수지 컬럼에 적재하고 염화칼륨 농도 구배(0%→60%)를 통해 용리하여 여러 개의 분획으로 나누었다. 양이온 교환수지 컬럼 크로마토그래피를 통해 얻은 16개의 분획을 아비딘 친화성 컬럼에 충전하여 cICAT 시약이 결합되어 있는 펩티드만을 농축하

였다. 이로부터 얻은 농축 시료에 인산을 처리하여 cICAT 시약에 접합되어 있는 바이오틴(biotin)을 제거함으로써 질량 분석을 위한 최종 시료를 준비하였다.

<51> 상기에서 준비된 최종 시료를 역상 수지 크로마토그래피에 걸어 혈장 펩티드 절편을 분리하고 탠덤질량분석기를 사용해 각 절편의 탠덤질량분석 스펙트럼을 얻었다. 이때, 역상 수지 크로마토그래피는 내경 75 μm 의 무수규산이 입혀진 모세관(silica coated capillary)에 매직 아쿠아 수지(magic C18 aqua resin, Microchom사)를 충전한 컬럼으로 70분간 5%~40%의 아세토니트릴 농도 구배를 이용하여 실시하였다. SEQUEST 컴퓨터 분석 프로그램(ThermoFinnigan사)으로 펩티드 절편의 탠덤질량분석 정보를 SWISS-PROT 단백질 데이터베이스와 비교 검색하여 단백질을 동정하고, ISB 파이프라인(Institute for Systems Biology사)을 사용하여 동정된 단백질을 재확인하였으며, 이로부터 유방암 환자군과 비환자 대조군 시료 사이의 양적 차이를 분석하였다(Keller A. et al., *Anal. Chem.*, 15: 5395-5392, 2002; Nesvizhskii AI. et al., *Anal. Chem.*, 75: 4646-4658, 2003; Li XJ. et al., *Anal. Chem.*, 75: 6648-6657, 2003).

<52> 비환자 대조군으로부터 얻은 혈장 시료내의 단백질들은 가벼운 cICAT 시약으로 표지되고 유방암 환자군으로부터 얻은 혈장 시료내의 단백질들은 무거운 cICAT 시약으로 표지되기 때문에, 동일한 단백질로부터 얻은 동일한 아미노산 서열을 갖는 펩티드들도 질량 차이를 나타낸다. 따라서, 하나의 단백질을 동정하는데 사용된 펩티드는 가벼운 cICAT 시약으로 표지된 펩티드일 수도 있고 무거운 cICAT 시약으로 표지된 펩티드일 수도 있다. 이와 같이 특정 단백질의 동정에 사용된 가벼운 cICAT 시약과 무거운 cICAT 시약으로 표지된 펩티드 각각의 크로마토그램을 추적하여 이들의 질량 피크(mass peak) 면적을 계산하고 각 펩티드의 크로마토그램 면적비를 구하면 비환자 대조군과 유방암 환자군 사이에 단백질 발현양의 차이를 정량할 수 있다. 이러한 정량분석으로부터 비환자 대조군에 비해 유방암 환자군에서 특이적으로 발현양이 증가한 트립틱 펩티드를 선별하였고 이 펩티드가 **서열번호: 2**의 아미노산 서열을 가짐을 확인하였다.

<53> **도 1**은 상기에서 선별된 **서열번호: 2**의 펩티드의 아미노산 서열 중에서 시스테인 잔기가 가벼운 cICAT 시약으로 표지(C^+)된 비환자 대조군 유래 펩티드와 시스테인 잔기가 무거운 cICAT 시약으로 표지(C^*)된 유방암 환자군 유래 펩티드를 추적하여 도식화한 것으로, 가벼운 cICAT 시약과 무거운 cICAT 시약으로 표지된 각 펩티드의 크로마토그램의 면적을 계산한 결과, 비환자 대조군에 비하여 상기 펩티드의 발현양이 유방암 환자군에서 3.48배 증가하였음을 확인하였다. **도 2a** 및 **2b**는 상기에서 유방암 환자군의 혈액에서 특이적으로 발현양이 증가한 것으로 확인된 **서열번호: 2**의 펩티드에 대한 탠덤질량분석 스펙트럼 결과를 나타낸 것으로, 이로부터 질량분석기에 의해 동정된 단백질이 **서열번호: 1**의 아미노산 서열을 갖는 플라빈 환원효소 단백질을 확인하였다.

<54> **실시예 2: 면역블롯팅을 이용한 혈액내 플라빈 환원효소의 검출**

<55> 상기 실시예 1에서 동정된 **서열번호: 1**의 플라빈 환원효소 단백질이 혈액에서 유방암의 선택적 진단을 위한 마커로서 사용될 수 있는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 면역블롯팅을 수행하였다.

<56> 먼저, 유방암 환자군 6명 및 비환자 대조군 7명으로부터 각각 혈장을 30 μl 씩 취하고 혈장 단백질의 대부분을 차지하는 단백질들인 알부민, 면역글로불린 A, 면역글로불린 G, 헤모글로빈, 트랜스페린, 트립신 저해제 등을 제거하기 위해서 MARS(Aigent사) 컬럼을 장착한 크로마토그래피를 수행하였다. 상기 컬럼에 결합하지 않은 단백질 구획을 자외선 흡광도 280 nm로 추적하여 모으고 컬럼에 결합한 혈액 단백질들을 분리하여 제거하였다. 이와 같이 혈액 단백질이 제거된 구획으로부터 3 kDa 이상의 크기를 갖는 단백질들만을 모아 농축하여 유방암 환자군 및 비환자 대조군의 혈장 단백질 시료를 준비하였다. 이와 같이 준비된 혈장 단백질 시료 각 5 μg 과 1% SDS가 포함된 완충용액을 혼합한 후 15% SDS 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동을 수행하였다. 분리된 혈청 단백질을 25 mM 트리스(Tris-HCl), 190 mM 글라이신(glycine) 및 10% 메탄올(methanol)이 포함된 용액 내에서 나이트로셀룰로즈 막으로 전이시키고 전이된 막을 5% 탈지분유가 함유된 TBST(Tris-buffered saline Tween 20)에서 1시간 동안 반응시켰다.

<57> 이어, 상기 나이트로셀룰로즈 막을 항-플라빈 환원효소 항체(1:1000, Abnova사)와 4°C에서 16시간 동안 반응시키고 TBST로 3회 세척한 후 마우스 면역글로불린과 결합하는 마우스 IgG-HRP(1:2000, Amersham Bioscience사)와 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 뒤, 상기 나이트로셀룰로즈 막을 ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham Bioscience사)과 반응시킨 후 X-ray 필름에 감광시켜 플라빈 환원효소 항원의 농도를 측정하였다.

<58> **도 3**은 상기와 같이 비환자 대조군의 혈장과 유방암 환자군의 혈장을 전기영동으로 분석한 후 항-플라빈 환원효소 항체로 면역블롯팅을 수행한 결과이고, **도 4**는 **도 3**의 면역블롯팅에 의해 측정된 항원의 농도를 그래프로 도시한 것이다. **도 3** 및 **4**에 나타난 바와 같이, 유방암 환자의 경우 혈액 내 플라빈 환원효소 단백질의 농도가

정상인에 비하여 평균 3.1배 높은 경향을 나타내었는데, 이러한 결과로부터 혈액 내 플라빈 환원효소를 선택적으로 인지하는 항체를 사용하여 항원의 농도를 측정하고 이를 비환자 대조군과 비교함으로써 상대적으로 증가된 플라빈 환원효소 단백질의 농도를 나타내는 피시험자를 유방암 환자로 진단할 수 있음을 확인하였다.

발명의 효과

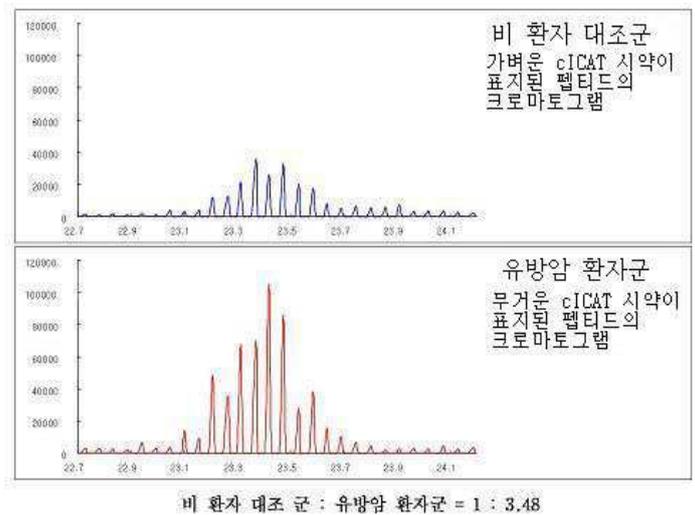
<59> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 유방암 진단용 마커 단백질 및 이의 항체를 이용한 유방암 진단키트는 비교적 채취가 용이한 혈액을 검체로 하기 때문에 생검을 대상으로 하는 기존의 유방암 진단방법과는 달리 환자에게 부담을 주지않고 매우 간편하게 유방암을 진단할 수 있을 뿐만 아니라 진단의 정확도 및 민감도가 높아 유방암의 조기 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

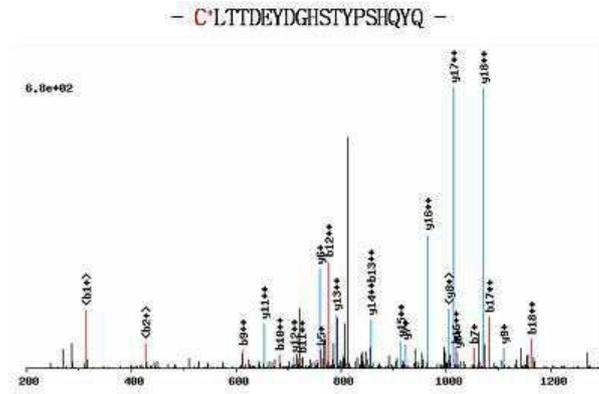
- <1> 도 1은 비환자 대조군과 유방암 환자군의 혈장을 각각 가벼운 동위원소와 무거운 동위원소로 치환된 cICAT(cleavable Isotope-Coded Affinity Tag) 시약으로 표지하고 트립신으로 절단한 후, 질량분석기로 동정 및 정량하여 유방암 환자군에서 특이적으로 발현양이 증가한 펩티드의 두 동위원소 쌍에 대한 크로마토그램을 나타낸 것이고,
- <2> 도 2a 및 2b는 상기 도 1에서 유방암 환자군에서 특이적으로 발현양이 증가한 것으로 확인된 **서열번호: 2**의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 각각 가벼운 동위원소(2a)와 무거운 동위원소(2b)의 cICAT으로 표지한 후 탠덤 질량분석기(tandem mass spectrometry)로 분석한 결과이고,
- <3> 도 3은 비환자 대조군의 혈장과 유방암 환자군의 혈장을 전기영동으로 분석한 후 항-플라빈 환원효소 항체로 면역블롯팅을 수행한 결과이고,
- <4> 도 4는 상기 도 3의 면역블롯팅에 의해 측정된 플라빈 환원효소의 항원 농도를 그래프로 나타낸 것이다.

도면

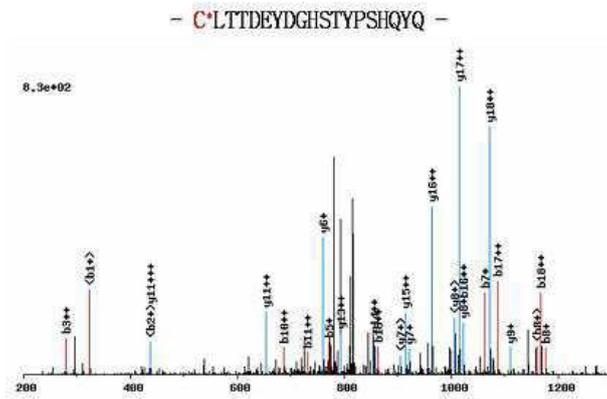
도면1



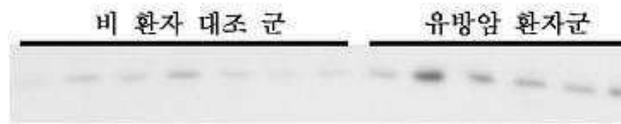
도면2a



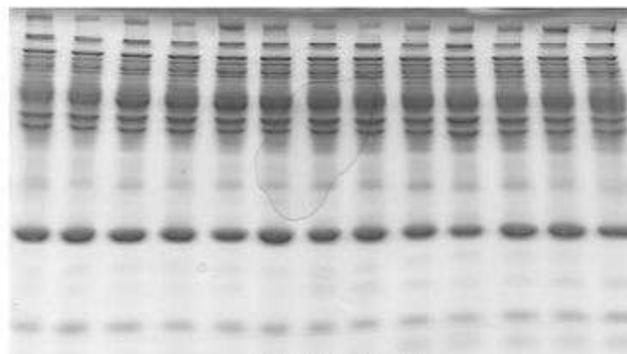
도면2b



도면3

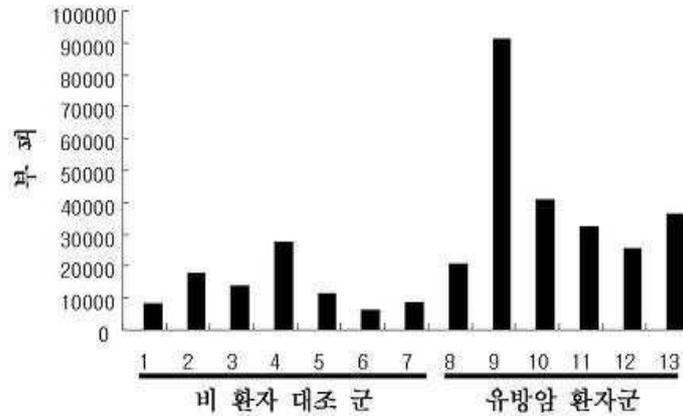


항-플라빈 환원 효소 항체



쿠마시 염색

도면4



서열 목록

<110> Korea Institute of Science and Technology
 <120> PROTEIN MARKER FLAVIN REDUCTASE FOR BREAST CANCER DIAGNOSIS AND
 DIAGNOSIS KIT FOR BREAST CANCER USING ANTIBODY AGAINST THE SAME

<130> KC071050

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> human flavin reductase protein

<400> 1

Ala Val Lys Lys Ile Ala Ile Phe Gly Ala Thr Gly Gln Thr Gly Leu
 1 5 10 15

Thr Thr Leu Ala Gln Ala Val Gln Ala Gly Tyr Glu Val Thr Val Leu
 20 25 30

Val Arg Asp Ser Ser Arg Leu Pro Ser Glu Gly Pro Arg Pro Ala His
 35 40 45

Val Val Val Gly Asp Val Leu Gln Ala Ala Asp Val Asp Lys Thr Val

