



(19) 대한민국 지식재산처(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2026년09월07일

(11) 등록번호 10-3015674

(24) 등록일자 2026년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6851 (2018.01) C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/6827 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6851 (2018.05)

C12Q 1/6806 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2025-0185316

(22) 출원일자 2025년11월28일

심사청구일자 2025년11월28일

(56) 선행기술조사문헌

등록특허공보 제10-2637929호 (2024. 02. 20.)*

Molecular Cell. 67(1): 148-161(e1-5). (2017. 06. 29.)*

등록특허공보 제10-2836533호 (2025. 07. 21.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김기광

충청남도 청양군 장평면 묵은논길 67

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 5 항

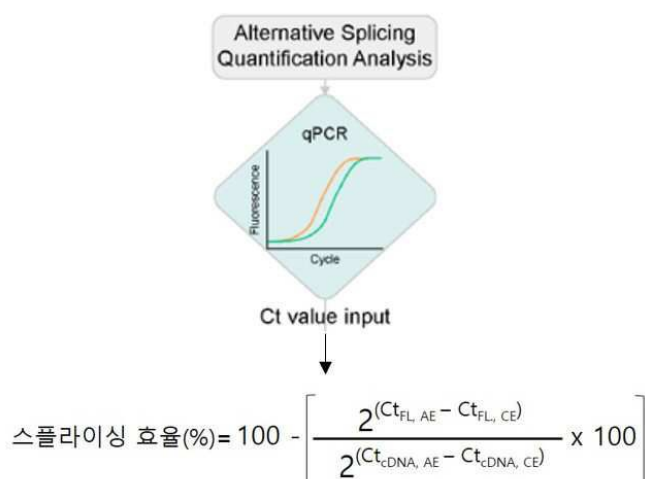
심사관 : 김윤지

(54) 발명의 명칭 다중 실시간 PCR을 이용한 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법

(57) 요약

본 발명은 다중 실시간 PCR을 이용한 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법에 관한 것으로, 본 발명의 스플라이싱 효율의 평가 방법은 표적 mRNA의 스플라이싱 효율 및 엑손 포함 비율을 정확하고 민감하게 정량화할 수 있는 기술로서, 기존 전기영동 기반 방법으로는 평가하기 어려운 복잡한 스플라이싱 패턴까지 분석할 수 있다. 또한, 대체 엑손(alternative exon) 및 구성적 엑손(constitutive exon) 특이적 형광 프로브를 이용하여 PCR 효율 및 프로브 간 증폭 효율 차이를 보정함으로써, 스플라이싱 효율을 보다 정밀하고 재현성 있게 평가할 수 있으므로, 다양한 유전자의 스플라이싱 변이체 진단 및 스플라이싱 기반 치료제의 개발과 모니터링에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6827 (2018.05)

C12Q 2527/146 (2019.08)

C12Q 2561/113 (2019.08)

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2710085871

과제번호 RS-2025-02310811

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 과학기술사업화진흥원

연구사업명 산학협력활성화지원(R&D)

연구과제명 선택적 스플라이싱 분석 기술의 항암제 반응성 예측용 진단키트 사업화 추진을 위한

IP 고도화 및 상용화

과제수행기관명 충남대학교산학협력단

연구기간 2025.04.01 ~ 2025.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 타겟 유전자의 스플라이싱 여부 또는 스플라이싱 효율을 확인하고자 하는 시료로부터 스플라이싱 변이체를 획득한 후, cDNA를 합성하는 단계;
- (2) 상기 단계 (1)에서 획득한 cDNA를 주형으로 하고, 상기 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 서로 다른 형광물질로 표지된 대체 엑손(alternative exon, AE) 특이적 프로브 및 구성적 엑손(constitutive exon, CE) 특이적 프로브를 이용하여 대체 엑손 및 구성적 엑손을 동일 반응 내에서 동시에 검출하는 다중 실시간 PCR을 수행한 후, Ct(threshold cycle) 값을 측정하는 단계; 및
- (3) 상기 단계 (2)에서 측정한 구성적 엑손의 Ct 값을 기준으로 대체 엑손의 Ct 값을 보정하는 식 1에 적용하여 스플라이싱 효율을 계산하는 단계;를 포함하는 스플라이싱 효율의 평가 방법.

[식 1]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, AE} - Ct_{FL, CE})}}{2^{(Ct_{cDNA, AE} - Ct_{cDNA, CE})}} \times 100 \right]$$

상기 식 1에서, Ct_{FL, AE}는 대체 엑손(alternative exon, AE)이 포함된 전장(full-length, FL) cDNA에서 대체 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, Ct_{FL, CE}는 전장 cDNA에서 구성적 엑손(constitutive exon, CE) 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, Ct_{cDNA, AE}는 스플라이싱 변이체에서 대체 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, Ct_{cDNA, CE}는 스플라이싱 변이체에서 구성적 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)의 시료는 플라스미드, 세포 또는 조직인 것을 특징으로 하는 스플라이싱 효율의 평가 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 형광물질은 FAM, HEX, VIC, TET, JOE, MAX, Texas Red, Cy3, TAMRA, Rox 및 Cy5 중에서 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 스플라이싱 효율의 평가 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

(1) PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27)의 스플라이싱 변이체를 획득한 후, cDNA를 합성하는 단계;

(2) 상기 단계 (1)에서 획득한 cDNA를 주형으로 하고, 상기 cDNA에 특이적으로 결합하는 서열번호 1 및 2로 이루어진 한 쌍의 프라이머, 서로 다른 형광물질로 표지된 서열번호 3으로 이루어진 엑손27(E27; 대체 엑손) 특이적 프로브 및 서열번호 4로 이루어진 엑손25(E25; 구성적 엑손) 특이적 프로브를 이용하여 대체 엑손 및 구성적 엑손을 동일 반응 내에서 동시에 검출하는 다중 실시간 PCR을 수행한 후, Ct(threshold cycle) 값을 측정하는 단계; 및

(3) 상기 단계 (2)에서 측정한 구성적 엑손의 Ct 값을 기준으로 대체 엑손의 Ct 값을 보정하는 식 2에 적용하여 스플라이싱 효율을 계산하는 단계;를 포함하는 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27) 스플라이싱 효율의 평가 방법.

[식 2]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, E27} - Ct_{FL, E25})}}{2^{(Ct_{cDNA, E27} - Ct_{cDNA, E25})}} \times 100 \right]$$

상기 식 2에서, $Ct_{FL, E27}$ 은 엑손27이 포함된 전장(full-length, FL) cDNA에서 엑손27 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{FL, E25}$ 는 전장 cDNA에서 엑손25 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{cDNA, E27}$ 은 스플라이싱 변이체에서 엑손27 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, $Ct_{cDNA, E25}$ 는 스플라이싱 변이체에서 엑손25 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

(1) HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7)의 스플라이싱 변이체를 획득한 후, cDNA를 합성하는 단계;

(2) 상기 단계 (1)에서 획득한 cDNA를 주형으로 하고, 상기 cDNA에 특이적으로 결합하는 서열번호 7 및 8로 이

루어진 한 쌍의 프라이머, 서로 다른 형광물질로 표지된 서열번호 9로 이루어진 엑손7(E7; 대체 엑손) 특이적 프로브 및 서열번호 10으로 이루어진 엑손6(E6; 구성적 엑손) 특이적 프로브를 이용하여 대체 엑손 및 구성적 엑손을 동일 반응 내에서 동시에 검출하는 다중 실시간 PCR을 수행한 후, Ct(threshold cycle) 값을 측정하는 단계; 및

(3) 상기 단계 (2)에서 측정한 구성적 엑손의 Ct 값을 기준으로 대체 엑손의 Ct 값을 보정하는 식 3에 적용하여 스플라이싱 효율을 계산하는 단계;를 포함하는 HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7) 스플라이싱 효율의 평가 방법.

[식 3]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, E7} - Ct_{FL, E6})}}{2^{(Ct_{cDNA, E7} - Ct_{cDNA, E6})}} \times 100 \right]$$

상기 식 3에서, Ct_{FL, E7}은 엑손7이 포함된 전장(full-length) cDNA에서 엑손7 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, Ct_{FL, E6}는 전장 cDNA에서 엑손6 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, Ct_{cDNA, E7}은 스플라이싱 변이체에서 엑손7 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, Ct_{cDNA, E6}는 스플라이싱 변이체에서 엑손6 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다중 실시간 PCR을 이용한 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 스플라이싱(splicing)은 전구체-mRNA(Precursor-mRNA, Pre-mRNA)로부터 유전 정보를 가지고 있지 않은 인트론(intron)을 제거하고, 유전 정보를 가지는 엑손(exon) 부분만을 이어 단일 폴리펩티드 사슬로 번역하기 위한

mRNA의 개조 과정으로, 진핵생물의 유전자 발현조절에 있어서 필수적인 과정이며, 대체 스플라이싱(alternative splicing)은 mRNA의 다양한 엑손의 조합으로부터 특이적으로 선택된 엑손의 조합으로 이루어진 mRNA 생성 과정으로, 하나의 유전자로부터 다양한 mRNA의 생성을 가능하게 한다. 따라서 유전체의 확장 없이 다양한 단백질을 생산할 수 있어 세포의 다양성을 제공하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 하지만, 대체 스플라이싱은 비생산적 mRNA 전사체의 생성을 초래할 수 있고, 이는 단백질 발현에 영향을 미칠 수 있다.

[0003] 유전자에 의해 암호화된 pre-mRNA의 대체 스플라이싱을 표적화할 수 있는 치료제는 환자에서 기능성 단백질의 발현 수준을 증가시키거나 비정상 단백질 발현을 저해할 수 있다. 이러한 치료제는 단백질 발현량의 증가로부터 유익을 얻는 병태를 치료하거나 또는 단백질의 변경된 발현 수준에 의해 초래된 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0004] 스플라이싱 과정에서, 스플라이싱 변이체(splicing variant)의 상대적 발현 수준을 정밀하게 측정하는 것은 다양한 생물학적 과정과 질환 기전을 이해하는 데 매우 중요하다. 그동안 스플라이싱 변이체를 정량하기 위해 Northern blot, RNase protection assay, PCR, microarray 및 RNA-sequencing과 같은 다양한 방법이 사용되어 왔다. 그러나 이러한 방법들은 높은 시료 요구량, 낮은 민감도, 복잡한 실험 과정 또는 isoform 간 교차 신호로 인한 정량 오류 등 여러 한계를 지니고 있다. 특히 PCR은 정량이 제한적이며, RNA-sequencing 역시 짧은 리드의 매핑 모호성이나 특정 스플라이싱 이벤트의 낮은 커버리지 문제로 인해 변이체 간의 정확한 비율을 산출하는 데 어려움이 있다. 따라서, 스플라이싱 변이체를 보다 정확하게 재현성 있게 정량 평가할 수 있는 새로운 방법의 개발이 요구되고 있다. 특히 서로 다른 isoform을 단일 반응 내에서 동시에 측정할 수 있으며, 복잡한 표준곡선을 필요로 하지 않는 정량 평가 방법은 실험적 효율성을 높이는 동시에 정량 정확도를 향상시킬 수 있다.

[0005] 한편, 스플라이싱 평가 관련 기술로는 한국등록특허 제2312547호에 '분산 특징 표현에 기반한 딥러닝 모델을 통한 선택적 스플라이싱 예측 시스템'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제2555447호에 'RNA 전사물 변이체의 정량 분석을 위한 방법 및 생성물'이 개시되어 있지만, 본 발명의 '다중 실시간 PCR을 이용한 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법'에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 다중 실시간 PCR을 이용한 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법을 제공하고, 본 발명의 스플라이싱 효율의 평가 방법은 표적 mRNA의 스플라이싱 효율 및 엑손 포함 비율을 정확하고 민감하게 정량화할 수 있는 기술로서, 기존 전기영동 기반 방법으로는 평가하기 어려운 복잡한 스플라이싱 패턴까지 분석할 수 있는 방법이고, 대체 엑손(alternative exon) 및 구성적 엑손(constitutive exon) 특이적 형광 프로브를 이용하여 PCR 효율 및 프로브 간 증폭 효율 차이를 보정함으로써, 스플라이싱 효율을 보다 정밀하고 재현성 있게 평가할 수 있는 방법이라는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은
- [0008] (1) 타겟 유전자의 스플라이싱 여부 또는 스플라이싱 효율을 확인하고자 하는 시료로부터 스플라이싱 변이체를 획득한 후, cDNA를 합성하는 단계;
- [0009] (2) 상기 단계 (1)에서 획득한 cDNA를 주형으로 하고, 상기 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 프로브를 이용하여 다중 실시간 PCR을 수행한 후, Ct(threshold cycle) 값을 측정하는 단계; 및
- [0010] (3) 상기 단계 (2)에서 측정한 Ct 값을 식 1에 적용하여 스플라이싱 효율을 계산하는 단계;를 포함하는 스플라이싱 효율의 평가 방법을 제공한다.
- [0011] [식 1]

[0012]
$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, AE} - Ct_{FL, CE})}}{2^{(Ct_{cDNA, AE} - Ct_{cDNA, CE})}} \times 100 \right]$$

[0013] 상기 식 1에서, $Ct_{FL, AE}$ 는 대체 엑손(alternative exon, AE)이 포함된 전장(full-length, FL) cDNA에서 대체 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{FL, CE}$ 는 전장 cDNA에서 구성적 엑손(constitutive exon, CE) 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{cDNA, AE}$ 는 스플라이싱 변이체에서 대체 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, $Ct_{cDNA, CE}$ 는 스플라이싱 변이체에서 구성적 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

[0014] 또한, 본 발명은 타겟 유전자의 스플라이싱 여부 또는 스플라이싱 효율을 확인하고자 하는 시료에서 스플라이싱 효율을 평가할 수 있는 체제를 유효성분으로 포함하는 스플라이싱 효율의 평가용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 스플라이싱 효율의 평가용 키트를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은

[0017] (1) PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27)의 스플라이싱 변이체를 획득한 후, cDNA를 합성하는 단계;

[0018] (2) 상기 단계 (1)에서 획득한 cDNA를 주형으로 하고, 상기 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 프로브를 이용하여 다중 실시간 PCR을 수행한 후, Ct(threshold cycle) 값을 측정하는 단계; 및

[0019] (3) 상기 단계 (2)에서 측정한 Ct 값을 식 2에 적용하여 스플라이싱 효율을 계산하는 단계;를 포함하는 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27) 스플라이싱 효율의 평가 방법을 제공한다.

[0020] [식 2]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, E27} - Ct_{FL, E25})}}{2^{(Ct_{cDNA, E27} - Ct_{cDNA, E25})}} \times 100 \right]$$

[0021]

[0022] 상기 식 2에서, $Ct_{FL, E27}$ 은 엑손27이 포함된 전장(full-length, FL) cDNA에서 엑손27 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{FL, E25}$ 는 전장 cDNA에서 엑손25 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{cDNA, E27}$ 은 스플라이싱 변이체에서 엑손27 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, $Ct_{cDNA, E25}$ 는 스플라이싱 변이체에서 엑손25 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

[0023] 또한, 본 발명은 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27)의 스플라이싱 효율을 평가할 수 있는 체제를 유효성분으로 포함하는 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27) 스플라이싱 효율의 평가용 조성물을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27) 스플라이싱 효율의 평가용 키트를 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은

[0026] (1) HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7)의 스플라이싱 변이체를 획득한 후, cDNA를 합성 하는 단계;

[0027] (2) 상기 단계 (1)에서 획득한 cDNA를 주형으로 하고, 상기 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 프로브를 이용하여 다중 실시간 PCR을 수행한 후, Ct(threshold cycle) 값을 측정하는 단계; 및

[0028] (3) 상기 단계 (2)에서 측정한 Ct 값을 식 3에 적용하여 스플라이싱 효율을 계산하는 단계;를 포함하는 HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7) 스플라이싱 효율의 평가 방법을 제공한다.

[0029] [식 3]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, E7} - Ct_{FL, E6})}}{2^{(Ct_{cDNA, E7} - Ct_{cDNA, E6})}} \times 100 \right]$$

[0030]

[0031] 상기 식 3에서, $Ct_{FL, E7}$ 은 엑손7이 포함된 전장(full-length) cDNA에서 엑손7 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{FL, E6}$ 는 전장 cDNA에서 엑손6 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{cDNA, E7}$ 은 스플라이싱

변이체에서 엑손7 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, Ct_{cDNA, E6}는 스플라이싱 변이체에서 엑손6 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

[0032] 또한, 본 발명은 HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7)의 스플라이싱 효율을 평가할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7) 스플라이싱 효율의 평가용 조성물을 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7) 스플라이싱 효율의 평가용 키트를 제공한다.

[0034] 또한, 본 발명은

[0035] (1) 암 환자로부터 분리된 암 조직 시료로부터 타겟 유전자의 스플라이싱 여부 또는 스플라이싱 효율을 평가하는 단계; 및

[0036] (2) 상기 단계 (1)에서 평가한 타겟 유전자의 스플라이싱 효율을 기반으로, 치료 방향성을 제시하거나, 적합한 치료법 또는 약물을 선택하기 위한 정보를 도출 하는 단계;를 포함하는 환자의 치료 방향 결정을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0037] 본 발명은 다중 실시간 PCR을 이용한 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법에 관한 것으로, 본 발명의 스플라이싱 효율의 평가 방법은 표적 mRNA의 스플라이싱 효율 및 엑손 포함 비율을 정확하고 민감하게 정량화할 수 있는 기술로서, 기존 전기영동 기반 방법으로는 평가하기 어려운 복잡한 스플라이싱 패턴까지 분석할 수 있는 방법이고, 대체 엑손(alternative exon) 및 구성적 엑손(constitutive exon) 특이적 형광 프로브를 이용하여 PCR 효율 및 프로브 간 증폭 효율 차이를 보정함으로써, 스플라이싱 효율을 보다 정밀하고 재현성 있게 평가할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 PBRM1 엑손27(E27)의 대체 스플라이싱 변이체에 관한 것으로, (A)는 PBRM1 E27 대체 스플라이싱 및 PBRM1 E27 스플라이싱과 PD-L1 차단요법과의 연관성을 나타낸 모식도이고, (B)는 다양한 암 세포주에서 PBRM1 E27 스플라이싱 변이체의 RT-PCR 분석 결과이다. M은 사이즈 마커이다. (C)는 본 발명의 다중 실시간 PCR 기반 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법을 나타낸 모식도로서, 단일 튜브에서 이중 프로브를 사용하여 대체 엑손 포함 비율을 정량할 수 있다는 것을 나타낸 것이다.

도 2는 다중 실시간 PCR 기반 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법 구축에 관한 것으로, (A)는 PBRM1 pre-mRNA로부터 E27 스플라이싱 변이체를 유도하는 과정, 대체 엑손(alternative exon) 및 구성적 엑손(constitutive exon) 특이적 프로브 설계를 나타낸 모식도이다. F는 FAM 형광물질이 표지된 대체 엑손(E27) 특이적 프로브이고, H는 HEX 형광물질이 표지된 구성적 엑손(E25) 특이적 프로브이며, Q는 각 프로브의 3' 말단에 표지된 Quencher(BHQ)를 나타낸다. (B)는 E27 포함(full-length, FL) 또는 배제(Δ E27)된 스플라이싱 변이체를 포함하는 플라스미드를 이용한 다중 실시간 PCR 분석 결과이고, (C)는 E27이 포함된 전장 플라스미드(FL) DNA를 사용하여 다중 실시간 PCR의 민감도 및 검출 범위를 검증한 결과이다.

도 3은 스플라이싱 효율을 평가하기 위한 수식을 나타낸 것으로, 대체 엑손 및 구성적 엑손 특이적 프로브 형광 신호의 Ct 값 차이(Δ Ct)를 이용하여, 스플라이싱 효율을 평가하는 것이다.

도 4는 다중 실시간 PCR 기반 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법을 이용한 PBRM1 E27의 스플라이싱 효율 평가에 관한 것으로, (A)는 CRISPR-Cas9을 이용하여 제작한 PBRM1 Δ E27 HeLa 세포주의 모식도이고, (B)는 상기 세포를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과이다. M은 사이즈 마커이고, WT는 100% 엑손을 포함하는 정상 HeLa 세포이며, Δ E27은 PBRM1 엑손27(E27)이 배제된 HeLa 세포이다. (C)는 상기 세포를 이용하여 다중 실시간 PCR 분석을 수행한 결과이고, (D)는 (C)의 다중 실시간 PCR 분석으로 측정한 Ct 값을 이용하여 PBRM1 E27 엑손 포함 비율을 정량한 결과이다.

도 5는 암 조직 검체에서 본 발명의 스플라이싱 효율 평가 방법을 검증한 결과로, (A)는 정상 자궁내막 조직 검체(N1~N3) 및 자궁내막암 환자의 조직 검체(C1~C5)를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과이다. M은 사이즈 마커이다. (B)는 상기 자궁내막 조직 검체를 이용하여 다중 실시간 PCR 분석을 수행한 결과로, 구성적 엑손

(E25)의 증폭곡선(좌) 및 대체 엑손(E27)의 증폭곡선(우)을 나타낸다. (C)는 (B)의 다중 실시간 PCR 분석으로 측정된 Ct 값을 이용하여 PBRM1 E27 엑손 포함 비율을 정량한 결과이다.

도 6은 다중 실시간 PCR 기반 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법을 이용한 HTRA2 E7의 스플라이싱 효율 평가에 관한 것으로, (A)는 HTRA2 pre-mRNA로부터 E7 스플라이싱 변이체를 제조하는 과정을 나타낸 모식도이다. 대체 엑손(E7) 특이적 프로브(FAM) 및 구성적 엑손(E5) 특이적 프로브(HEX)를 사용하였다. (B)는 HTRA2 플라스미드 DNA(전장, FL) 및 E7이 배제된 플라스미드(Δ E7)를 이용하여 다중 실시간 PCR 분석을 수행한 결과이다. (C)는 HTRA2 pre-mRNA에 SSO(splicing-switch oligonucleotide) 처리를 위한 모식도이다. Control SSO는 아무 유전자에도 결합하지 않는 스크램블 서열의 SSO이며, Target SSO는 E7의 스플라이싱 부위를 표적으로 한 SSO이다. (D)는 상기 Control SSO(Con) 및 Target SSO(T)를 각각 HeLa 세포에 형질도입하고 24시간 후, RT-PCR을 실시한 결과이다. M은 사이즈 마커이다. (E)는 상기 세포를 이용하여 다중 실시간 PCR 분석을 수행한 후, 측정된 Ct 값을 이용하여 HTRA2 E7 엑손 포함 비율을 정량한 결과이다. ****은 대조군 SSO(Con) 대비 Target SSO(T)의 HTRA2 E7 엑손 포함 비율이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.0001$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0040] (1) 타겟 유전자의 스플라이싱 여부 또는 스플라이싱 효율을 확인하고자 하는 시료로부터 스플라이싱 변이체를 획득한 후, cDNA를 합성하는 단계;
- [0041] (2) 상기 단계 (1)에서 획득한 cDNA를 주형으로 하고, 상기 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 프로브를 이용하여 다중 실시간 PCR을 수행한 후, Ct(threshold cycle) 값을 측정하는 단계; 및
- [0042] (3) 상기 단계 (2)에서 측정된 Ct 값을 식 1에 적용하여 스플라이싱 효율을 계산하는 단계;를 포함하는 스플라이싱 효율의 평가 방법을 제공한다.
- [0043] [식 1]
- $$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, AE} - Ct_{FL, CE})}}{2^{(Ct_{cDNA, AE} - Ct_{cDNA, CE})}} \times 100 \right]$$
- [0044]
- [0045] 상기 식 1에서, $Ct_{FL, AE}$ 는 대체 엑손(alternative exon, AE)이 포함된 전장(full-length, FL) cDNA에서 대체 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값 이고, $Ct_{FL, CE}$ 는 전장 cDNA에서 구성적 엑손(constitutive exon, CE) 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{cDNA, AE}$ 는 스플라이싱 변이체에서 대체 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, $Ct_{cDNA, CE}$ 는 스플라이싱 변이체에서 구성적 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.
- [0046] 상기 대체 엑손(alternative exon, AE)은 스플라이싱 과정에서 선택적으로 포함되거나 제외될 수 있는 엑손을 의미하며, 구성적 엑손(constitutive exon, CE)은 항상 포함되어 전사체를 형성하는 엑손을 의미한다.
- [0047] 상기 단계 (1)의 시료는 플라스미드, 세포 또는 조직인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다.
- [0048] 상기 단계 (2)의 프라이머는 스플라이싱을 유도하고자 하는 유전자에 특이적으로 결합하는 한 쌍의 프라이머를 의미하며, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 구성된다.
- [0049] 상기 단계 (2)의 프로브는 대체 엑손(alternative exon, AE) 특이적 프로브 및 구성적 엑손(constitutive exon, CE) 특이적 프로브로 구성된다.
- [0050] 상기 대체 엑손 특이적 프로브 및 구성적 엑손 특이적 프로브는 바람직하게는 서로 다른 형광물질로 표지될 수 있으며, 상기 형광물질은 FAM, HEX, VIC, TET, JOE, MAX, Texas Red, Cy3, TAMRA, Rox 및 Cy5 중에서 선택된 하나인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다.
- [0051] 또한, 본 발명은 타겟 유전자의 스플라이싱 여부 또는 스플라이싱 효율을 확인하고자 하는 시료에서 스플라이싱 효율을 평가할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 스플라이싱 효율의 평가용 조성물을 제공한다.
- [0052] 상기 스플라이싱 효율을 평가할 수 있는 제제는 타겟 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 프로브이다.

상기 프라이머는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 한 쌍으로 구성되고, 상기 프로브는 대체 엑손(alternative exon, AE) 특이적 프로브 및 구성적 엑손(constitutive exon, CE) 특이적 프로브로 구성된다. 상기 대체 엑손 특이적 프로브 및 구성적 엑손 특이적 프로브는 바람직하게는 서로 다른 형광물질로 표지될 수 있으며, 상기 형광물질은 FAM, HEX, VIC, TET, JOE, MAX, Texas Red, Cy3, TAMRA, Rox 및 Cy5 중에서 선택된 하나인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다.

[0053] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 스플라이싱 효율의 평가용 키트를 제공한다.

[0054] 또한, 본 발명은

[0055] (1) PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27)의 스플라이싱 변이체를 획득한 후, cDNA를 합성하는 단계;

[0056] (2) 상기 단계 (1)에서 획득한 cDNA를 주형으로 하고, 상기 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 프로브를 이용하여 다중 실시간 PCR을 수행한 후, Ct(threshold cycle) 값을 측정하는 단계; 및

[0057] (3) 상기 단계 (2)에서 측정한 Ct 값을 식 2에 적용하여 스플라이싱 효율을 계산하는 단계;를 포함하는 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27) 스플라이싱 효율의 평가 방법을 제공한다.

[0058] [식 2]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, E27} - Ct_{FL, E25})}}{2^{(Ct_{cDNA, E27} - Ct_{cDNA, E25})}} \times 100 \right]$$

[0059]

[0060] 상기 식 2에서, $Ct_{FL, E27}$ 은 엑손27이 포함된 전장(full-length, FL) cDNA에서 엑손27 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{FL, E25}$ 는 전장 cDNA에서 엑손25 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{cDNA, E27}$ 은 스플라이싱 변이체에서 엑손27 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, $Ct_{cDNA, E25}$ 는 스플라이싱 변이체에서 엑손25 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

[0061] 상기 단계 (2)의 프라이머는 바람직하게는 서열번호 1 및 2로 이루어진 한 쌍의 프라이머이며, 상기 서열번호 1은 정방향 프라이머이고, 서열번호 2는 역방향 프라이머이다.

[0062] 상기 단계 (2)의 프로브는 바람직하게는 서열번호 3으로 이루어진 엑손 27(E27) 특이적 프로브 및 서열번호 4로 이루어진 엑손25(E25) 특이적 프로브이다. 상기 서열번호 3으로 이루어진 엑손27(E27) 특이적 프로브 및 서열번호 4로 이루어진 엑손25(E25) 특이적 프로브는 바람직하게는 서로 다른 형광물질로 표지될 수 있으며, 상기 형광물질은 FAM, HEX, VIC, TET, JOE, MAX, Texas Red, Cy3, TAMRA, Rox 및 Cy5 중에서 선택된 하나인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다.

[0063] 또한, 본 발명은 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27)의 스플라이싱 효율을 평가할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27) 스플라이싱 효율의 평가용 조성물을 제공한다.

[0064] 상기 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27)의 스플라이싱 효율을 평가할 수 있는 제제는 바람직하게는 PBRM1(Polybromo 1) 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 프로브로서, 상기 프라이머는 바람직하게는 서열번호 1 및 2로 이루어진 한 쌍의 프라이머이며, 상기 서열번호 1은 정방향 프라이머이고, 서열번호 2는 역방향 프라이머이다. 또한, 상기 프로브는 바람직하게는 서열번호 3으로 이루어진 엑손27(E27) 특이적 프로브 및 서열번호 4로 이루어진 엑손25(E25) 특이적 프로브이며, 상기 프로브는 서로 다른 형광물질로 표지될 수 있고, 상기 형광물질은 FAM, HEX, VIC, TET, JOE, MAX, Texas Red, Cy3, TAMRA, Rox 및 Cy5 중에서 선택된 하나인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다.

[0065] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27) 스플라이싱 효율의 평가용 키트를 제공한다.

[0066] 또한, 본 발명은

[0067] (1) HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7)의 스플라이싱 변이체를 획득한 후, cDNA를 합성하는 단계;

[0068] (2) 상기 단계 (1)에서 획득한 cDNA를 주형으로 하고, 상기 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 프로브를

이용하여 다중 실시간 PCR을 수행한 후, Ct(threshold cycle) 값을 측정하는 단계; 및

(3) 상기 단계 (2)에서 측정한 Ct 값을 식 3에 적용하여 스플라이싱 효율을 계산하는 단계;를 포함하는 HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7) 스플라이싱 효율의 평가 방법을 제공한다.

[식 3]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, E7} - Ct_{FL, E6})}}{2^{(Ct_{cDNA, E7} - Ct_{cDNA, E6})}} \times 100 \right]$$

상기 식 3에서, Ct_{FL, E7}은 엑손7이 포함된 전장(full-length) cDNA에서 엑손7 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, Ct_{FL, E6}는 전장 cDNA에서 엑손6 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, Ct_{cDNA, E7}는 스플라이싱 변이체에서 엑손7 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, Ct_{cDNA, E6}는 스플라이싱 변이체에서 엑손6 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

상기 단계 (2)의 프라이머는 바람직하게는 서열번호 7 및 8로 이루어진 한 쌍의 프라이머이며, 상기 서열번호 7은 정방향 프라이머이고, 서열번호 8은 역방향 프라이머이다.

상기 단계 (2)의 프로브는 바람직하게는 서열번호 9로 이루어진 엑손7(E7) 특이적 프로브 및 서열번호 10으로 이루어진 엑손6(E6) 특이적 프로브이다. 상기 서열번호 9로 이루어진 엑손7(E7) 특이적 프로브 및 서열번호 10으로 이루어진 엑손6(E6) 특이적 프로브는 바람직하게는 서로 다른 형광물질로 표지될 수 있으며, 상기 형광물질은 FAM, HEX, VIC, TET, JOE, MAX, Texas Red, Cy3, TAMRA, Rox 및 Cy5 중에서 선택된 하나인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다.

또한, 본 발명은 HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7)의 스플라이싱 효율을 평가할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7) 스플라이싱 효율의 평가용 조성물을 제공한다.

상기 HTRA2 엑손7(E7)의 스플라이싱 효율을 평가할 수 있는 제제는 바람직하게는 HTRA2 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 프로브로서, 상기 프라이머는 바람직하게는 서열번호 7 및 8로 이루어진 한 쌍의 프라이머이며, 상기 서열번호 7은 정방향 프라이머이고, 서열번호 8은 역방향 프라이머이다. 또한, 상기 프로브는 바람직하게는 서열번호 9로 이루어진 엑손7(E7) 특이적 프로브 및 서열번호 10으로 이루어진 엑손6(E6) 특이적 프로브이며, 상기 프로브는 서로 다른 형광물질로 표지될 수 있고, 상기 형광물질은 FAM, HEX, VIC, TET, JOE, MAX, Texas Red, Cy3, TAMRA, Rox 및 Cy5 중에서 선택된 하나인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다.

또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 HTRA2(high temperature requirement protein A 2) 엑손7(E7) 스플라이싱 효율의 평가용 키트를 제공한다.

또한, 본 발명은

(1) 암 환자로부터 분리된 암 조직 시료로부터 타겟 유전자의 스플라이싱 여부 또는 스플라이싱 효율을 평가하는 단계; 및

(2) 상기 단계 (1)에서 평가한 타겟 유전자의 스플라이싱 효율을 기반으로, 치료 방향성을 제시하거나, 적합한 치료법 또는 약물을 선택하기 위한 정보를 도출 하는 단계;를 포함하는 환자의 치료 방향 결정을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 세포 배양

HeLa, U2OS, HCT116, HT29, 293A, HepG2, SH-SY5Y, SK-N-SH 세포를 10%의 소 태아 혈청(FBS) 및 1%의 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배양액으로 배양하였다. BEWO 세포는 10%의 소 태아 혈청(FBS) 및 1%의 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 F-12K 배양액으로 배양하였으며, A549, K562 및 Jurkat 세포는 10%의 소 태아 혈청(FBS) 및 1%의 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 RPMI-1640 배양액으로 배양하였다. NK-92 세포는 12.5%의 소 태아 혈청(FBS), 12.5%의 말 혈청(HS), 100 μM의 β-머캅토에탄올,

200 μ M의 이노시톨, 20 μ M의 엽산, 100U/ml의 IL-2 및 1%의 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 α -MEM 배양액으로 배양하였다. 모든 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건의 습윤 배양기에서 배양하였다.

[0087] 실시예 2. PBRM1 E27의 대체 스플라이싱 변화 및 정확한 스플라이싱 효율 평가의 필요성

[0088] 인간 PBRM1 유전자는 엑손26(E26)과 엑손27(E27)을 포함한 30개의 엑손으로 구성되어 있다. 이전 연구에서, TCGA 암 데이터 베이스를 기반으로 PBRM1의 스플라이싱 변화를 분석한 결과, 다양한 암 유형에서 PBRM1의 대체 스플라이싱 패턴이 인접한 정상 조직에 비해 유의미하게 변형되어 있는 것을 확인하였다. 특히, 엑손27이 포함된 PBRM1 아이소폼(isoform)은 PBAF 복합체를 PD-L1 프로모터로 동원하여 암세포에서 면역 체크포인트 분자인 PD-L1의 발현을 상향 조절하는 것으로 나타났다(도 1A).

[0089] 다양한 세포주에서 PBRM1 E27의 대체 스플라이싱 패턴을 분석하기 위해, RT-PCR을 실시하였다. 세포주로는 인간 신경모세포종 세포(SK-N-SH), 인간 신경모세포종 유래 세포(SH-SY5Y), 폐선암 세포(A549), 간암 세포(HepG2), 결장암 세포(HCT116), 대장암 세포(HT29), 신장유래 세포(293A), 골육종세포(U2OS), 인간 T 림프구 백혈병세포(Jurkat), 만성골수성 백혈병세포(K562), 자연살해세포(NK92) 및 인간용모막암세포(BEWO)를 이용하였다.

[0090] 먼저, Hybrid-RTM RNA 추출 키트(GeneA11)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출한 총 RNA를 랜덤 헥사머, M-MLV 역전사효소(Promega), RNase 억제제(Enzynomics)를 이용하여 역전사하였다. 이후, PBRM1에 항상 포함되어 전사체를 형성하는 구성적 엑손(constitutive exon)인 E25와 E28을 표적으로 한 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR은 핫 스타트 PCR 마스터 믹스(Bioneer)를 사용하여 수행한 후, 아가로스 겔 전기영동을 실시하였다.

[0091] 12종의 다양한 세포주에서 PBRM1 E27의 대체 스플라이싱 패턴을 분석한 결과, 여러 세포주에서 PBRM1 유전자의 대체 스플라이싱 패턴이 다르게 나타나며, 이를 통해 PBRM1의 대체 스플라이싱이 다양한 암에서 광범위하게 나타나는 것을 확인하였다(도 1B).

[0092] 그러나, 상기 RT-PCR 방법을 이용한 PBRM1 E27의 대체 스플라이싱 패턴 분석법에는 한계가 있는 것을 확인하였다. 스플라이싱 과정에서 선택적으로 포함되거나 제외될 수 있는 대체 엑손(alternative exon)인 E26(165개 뉴클레오티드) 및 E27(156개 뉴클레오티드)의 뉴클레오티드 길이가 유사하여, 스플라이싱 변이체인 E25-E26-E28 및 E25-E27-E28의 정확한 정량 분석이 어려운 것으로 나타났다. 따라서, 스플라이싱 효율을 보다 정확하고 재현성 있게 평가할 수 있는 정량 분석 방법이 필요하였다(도 1C).

[0094] 실시예 3. 다중 실시간 PCR 기반 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법 구축

[0095] (1) PBRM1 스플라이싱 변이체를 포함하는 플라스미드 제작

[0096] HeLa 세포의 cDNA로부터 PBRM1 스플라이싱 변이체(E25-E27-E28 또는 E25-E28)를 증폭한 후, pCRTM2.1-TOPO® 벡터(Invitrogen)에 클로닝하여 PBRM1 엑손27(E27) 포함(전장, FL) 또는 배제(Δ E27)된 스플라이싱 변이체를 포함하는 PBRM1 발현 플라스미드를 제작하였다. 상기 플라스미드는 Sanger 시퀀싱(Macrogen)을 통해 검증하였다.

[0097] PBRM1 E27 스플라이싱의 효율을 평가하기 위해, 상기 플라스미드를 이용하여 cDNA를 제작한 후, 다중 실시간 PCR(Multiplex Real-time PCR)을 실시하였다. E27 포함 비율을 특이적으로 정량화하기 위해, PBRM1 특이적 프라이머, 대체 엑손인 E27 특이적 프로브(FAM) 및 구성적 엑손인 E25(HEX)를 표적으로 하는 프로브를 이용하였다. 두 프로브 모두 배경 형광을 최소화하기 위해 3' 말단에 블랙홀 퀀처(BHQ)를 표지하였다(도 2A).

표 1

PBRM1 다중 실시간 PCR용 프라이머 및 프로브 서열

서열번호	명칭	방향	서열(5'→3')
1	PBRM1-F	정방향	GATTAAGGCCCAACACCCAGAC
2	PBRM1-R	역방향	GCTGGAGTCCCTACCATAGG
3	PBRM1-E27	프로브	FAM-TGGCCTTGTTAGCATGGGCAGCATGC-BHQ
4	PBRM1-E25	프로브	HEX-TCAGCCGCCTCCTCCCCACAGAATGG-BHQ

[0099] 상기 이중 프로브를 이용하여 다중 실시간 PCR을 수행한 결과, 도 2B에 개시한 바와 같이 E27을 포함하는 E25-E27-E28(FL)의 경우, FAM(E27) 및 HEX(E25) 형광신호가 모두 검출되어 E27 및 E25의 증폭이 확인되었다. 반면,

E27이 배제된 E25-E28(ΔE27)에서는 HEX(E25) 형광신호만 검출되어, E25만이 증폭됨을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 다중 실시간 PCR 방법의 특이도를 확인하였다.

[0101] (2) 다중 실시간 PCR의 민감도 및 검출 범위 검증

[0102] 상기 E25 및 E27 특이적 프로브를 이용한 다중 실시간 PCR 방법의 민감도 및 검출 범위를 검증하기 위해, E27이 포함된 전장 플라스미드(FL) DNA를 사용하여 다중 실시간 PCR을 실시하였다. 전장 플라스미드 DNA를 400pg~195fg 범위로 2배씩 연속 희석한 후, 다중 실시간 PCR의 주형으로 사용하였다. 그 후, Ct 값과 희석배율 간의 피어슨 상관관계(Pearson correlation)를 log2 스케일로 분석하였다.

[0103] 그 결과, 10배 이상에 달하는 넓은 농도 범위에서 HEX(E25) 및 FAM(E27) 신호 모두 강한 선형 상관성을 나타내었다(HEX $R^2 = 0.9804$, FAM $R^2 = 0.9969$). 이와 같은 결과를 통해 본 분석법의 높은 민감도와 넓은 검출 범위를 확인하였다(도 2C).

[0105] (3) 다중 실시간 PCR 기반 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법 구축

[0106] 다중 실시간 PCR 분석법의 특이도와 민감도를 확인한 후, 대체 엑손 포함 비율 및 스플라이싱 효율을 평가하기 위한 계산 방법을 확립하였다(도 3). 대체 엑손 포함 비율 계산은 FAM(E27)과 HEX(E25) 형광신호의 Ct 값 차이(ΔCt)를 이용하여 수행하였다. ΔCt는 E27을 포함한 전사체의 상대적 양을 전체 PBRM1 발현에 대해 정규화한 값이며, 이를 100% 엑손이 포함된 전장(FL) 플라스미드 DNA를 기준으로 한 ΔCt와 비교하여 ΔΔCt를 산출하였다. 엑손 포함 비율은 $2^{(-\Delta\Delta Ct)} \times 100$ 으로 계산되어, 대체 엑손 포함 비율을 정량화할 수 있으며, 최종적으로 스플라이싱 효율은 하기 식 1의 방법으로 평가할 수 있다. 이와 같은 정량 방법은 대체 엑손 및 구성적 엑손 특이적 프로브 사이의 증폭 효율 차이를 보정하고, 전장 플라스미드 DNA를 기준으로 한 절대 정량을 가능하게 한다.

[0107] [식 1]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, AE} - Ct_{FL, CE})}}{2^{(Ct_{cDNA, AE} - Ct_{cDNA, CE})}} \times 100 \right]$$

[0109] 상기 식 1에서, $Ct_{FL, AE}$ 는 대체 엑손(alternative exon, AE)이 포함된 전장(full-length, FL) cDNA에서 대체 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{FL, CE}$ 는 전장 cDNA에서 구성적 엑손(constitutive exon, CE) 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{cDNA, AE}$ 는 스플라이싱 변이체에서 대체 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, $Ct_{cDNA, CE}$ 는 스플라이싱 변이체에서 구성적 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

[0111] 실시예 4. 다중 실시간 PCR 기반 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법을 이용한 PBRM1 E27의 스플라이싱 효율 평가

[0112] (1) PBRM1 ΔE27 HeLa 세포주 제작

[0113] 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법 기반 스플라이싱 효율 평가 방법을 이용하여 실제 세포 유래의 cDNA 샘플에서 대체 엑손 포함 비율을 정확하게 정량화할 수 있는지 확인하기 위해, PBRM1 E27이 배제된(ΔE27) HeLa 세포주를 제작하였다.

[0114] PBRM1 ΔE27 HeLa 세포주는 PBRM1 E27의 3' 스플라이스 부위를 표적으로 하는 CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 제작하였다(도 4A). 이 때, sgRNA의 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 상단(Top): 5'-CACCGTGTGCTTCAAGGCATGAT-3'(서열번호 5) 및 하단(Bottom): 5'-AAACATCATGCCTTGAAGGACACAC-3'(서열번호 6) 서열을 사용하였다. 그 후, 상기 올리고뉴클레오타이드를 어닐링하여 pX330 벡터(Addgene)에 클로닝한 후, jetPEI 시약(Polyplus)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 HeLa 세포에 형질감염시켰다. 형질감염 4일 후, 96-웰 플레이트에 웰당 0.5개의 세포 밀도로 세포를 분주하여 단일 세포 클론을 분리하였다. 개별 클론은 RT-PCR 및 면역블롯 분석을 통해 스크리닝하였고, PBRM1 단백질 수치에 변화가 없는 PBRM1 ΔE27 클론을 선별하여 후속 실험에 사용하였다.

[0115] 그 후, 기존 RT-PCR 분석을 사용하여 100% 엑손을 포함하는 정상 HeLa 세포(WT) 및 상기 방법으로 제작한 PBRM1

ΔE27 HeLa 세포(ΔE27) 사이의 스플라이싱 차이를 분석하였다.

[0116] 그 결과, 도 4B에 개시한 바와 같이 정상 HeLa 세포(WT)에서는 여러 PBRM1 스플라이싱 변이체가 검출되었으나, ΔE27 세포에서는 E27을 포함하는 전사체가 검출되지 않은 것을 확인하였다.

[0118] **(2) PBRM1 ΔE27 HeLa 세포를 이용한 스플라이싱 효율 평가**

[0119] 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법 기반 스플라이싱 효율 평가 방법을 이용하여 정상 HeLa 세포(WT) 및 PBRM1 ΔE27 HeLa 세포(ΔE27)의 스플라이싱 효율을 확인하였다. 이 때, PBRM1 E27의 스플라이싱 효율은 하기 식 2를 사용하여 평가하였고, PBRM1의 E27 포함 비율은 식 2-1을 이용하여 정량화하였다.

[0120] [식 2]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, E27} - Ct_{FL, E25})}}{2^{(Ct_{cDNA, E27} - Ct_{cDNA, E25})}} \times 100 \right]$$

[0121]

[0122] [식 2-1]

$$\text{엑손 포함률(\%)} = \frac{2^{(Ct_{FL, E27} - Ct_{FL, E25})}}{2^{(Ct_{cDNA, E27} - Ct_{cDNA, E25})}} \times 100$$

[0123]

[0124] 상기 식 2 및 식 2-1에서, $Ct_{FL, E27}$ 은 엑손27이 포함된 전장(full-length, FL) cDNA에서 엑손27 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{FL, E25}$ 는 전장 cDNA에서 엑손25 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, $Ct_{cDNA, E27}$ 은 스플라이싱 변이체에서 엑손27 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, $Ct_{cDNA, E25}$ 는 스플라이싱 변이체에서 엑손25 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

[0125] 정상 HeLa 세포(WT) 및 PBRM1 ΔE27 세포(ΔE27)의 스플라이싱 효율을 확인한 결과, 정상 HeLa 세포(WT)에서는 E27 특이적 FAM 형광신호 및 E25 특이적 HEX 형광신호가 모두 검출된 반면, ΔE27 세포에서는 E27 특이적 FAM 형광신호가 전혀 검출되지 않는 것을 확인하였다(도 4C). 이와 같은 결과를 통해, E27을 포함하는 전사체에 대한 FAM 프로브의 특이성 및 HEX 프로브가 내부 정규화 대조군으로서 유용함을 확인하였다.

[0126] 상기 식 2-1을 이용하여 PBRM1의 E27 포함 비율을 계산한 결과, 정상 HeLa 세포(WT)에서는 약 27%의 E27 포함 비율을 나타낸 반면, ΔE27 세포(ΔE27)에서는 E27이 전혀 검출되지 않았다(도 4D). 또한, 정상 HeLa 세포(WT)의 스플라이싱 효율은 약 73%이며, ΔE27 세포(ΔE27)의 스플라이싱 효율은 100%로 확인되었다.

[0128] **실시예 5. 암 조직 검체를 이용한 스플라이싱 효율 평가**

[0129] 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법의 환자 검체 분석 및 임상 적용 가능성을 평가하기 위해 자궁내막암(UCEC) 환자 조직 검체를 대상으로 분석을 수행하였다. 분석에는 3개의 정상 조직(N1~N3)과 5개의 암 조직(C1~C5)을 이용하였다.

[0130] 자궁내막 조직 검체를 이용하여 기존 RT-PCR을 수행한 결과, 정상 조직과 암 조직 사이의 뚜렷한 PBRM1 대체 스플라이싱 패턴 차이가 관찰되었으며, 특히 암 조직에서 E27을 포함한 밴드가 보다 뚜렷하게 확인되었다(도 5A).

[0131] 이러한 스플라이싱 차이가 정량적 변화로 반영되는지를 평가하기 위해, 각 조직 검체로부터 추출한 RNA를 이용하여 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석을 실시하였다. 증폭곡선 분석 결과, E25 특이적 HEX 형광신호는 모든 검체에서 유사한 증폭 양상을 보인 반면, E27 특이적 FAM 형광신호는 정상 조직 대비 암 조직에서 현저히 증가된 양상을 보였으며, 암 조직 간에도 뚜렷한 차이를 나타내었다(도 5B).

[0132] 상기 식 2-1을 이용하여 PBRM1의 E27 포함 비율을 계산한 결과, 암 조직에서의 E27 포함 비율은 평균 $56.7 \pm 10.3\%$ 로, 정상 조직($11.2 \pm 6.8\%$)에 비해 유의하게 높은 것을 확인하였다(도 5C).

[0133] 이러한 결과는 TCGA 암 데이터 베이스의 자궁내막암 RNA-sequecing 데이터에서 보고된 PBRM1 E27 포함 패턴과 일치하여, 본 발명의 분석 방법의 독립적 타당성을 뒷받침해주었다. 특히 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법은 암 조직 간 E27 포함율의 이질성(inter-tumor heterogeneity)을 약 45~80% 범위로 정밀하게 검출 가능한 것을 확인함으로써, 환자 조직 검체에서 대체 엑손 포함 비율을 민감하고 신뢰성 있게 정량할 수 있으며, 임상 적용

가능한 분석 플랫폼임을 검증하였다. 더 나아가, 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법을 이용한 스플라이싱 효율 평가 방법은 치료법 또는 약물 선택을 위한 치료 방향성 제시 및 향후 면역치료 반응 예측을 위한 환자 분류에도 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

[0135] 실시예 6. 다중 실시간 PCR 기반 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법을 이용한 HTRA2 E7의 스플라이싱 효율 평가

[0136] (1) HTRA2 변이체를 포함하는 플라스미드를 이용한 스플라이싱 효율 평가

[0137] 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법 기반 스플라이싱 효율 평가 방법이 PBRM1 유전자 외에 다른 유전자의 스플라이싱 분석에도 적용 가능한지 확인하기 위해, HTRA2 유전자를 이용하여 대체 스플라이싱 효율을 평가하였다.

[0138] 인간 HTRA2 유전자는 8개의 엑손을 포함하고 있으며, 그 중 엑손7(E7)은 대체 스플라이싱을 통해 두 가지 다른 스플라이싱 변이체를 생성한다. HeLa 세포의 cDNA로부터 HTRA2 스플라이싱 변이체(E5-E67-E7-E8 또는 E5-E6-E8)를 증폭한 후, pCRTM2.1-TOPO[®] 벡터(Invitrogen)에 클로닝하여 HTRA2 엑손7(E7) 포함(전장, FL) 또는 배제(ΔE7)된 스플라이싱 변이체를 포함하는 HTRA2 발현 플라스미드를 제작하였다. 상기 플라스미드는 Sanger 시퀀싱(Macrogen)을 통해 검증하였다.

[0139] HTRA2 E7 스플라이싱의 효율을 평가하기 위해, 상기 플라스미드를 이용하여 cDNA를 제작한 후, 다중 실시간 PCR을 실시하였다. E7 포함 비율을 특이적으로 정량화하기 위해, HTRA2 특이적 프라이머, 대체 엑손인 E7 특이적 프로브(FAM) 및 구성적 엑손인 E6(HEX)를 표적으로 하는 프로브를 이용하였다. 두 프로브 모두 배경 형광을 최소화하기 위해 3' 말단에 블랙홀 켄처(BHQ)를 표지하였다(도 6A).

표 2

[0140] HTRA2 다중 실시간 PCR용 프라이머 및 프로브 서열

서열번호	명칭	방향	서열(5'→3')
7	HTRA2-F	정방향	ATTCCTCCTCCGGAATCAGTGG
8	HTRA2-R	역방향	GCCAAAATCACATCACCAGGC
9	HTRA2-E7	프로브	FAM-GTGTGCAGGGGAGCCCAGGATGACTT-BHQ
10	HTRA2-E6	프로브	HEX-GCGGCGCTACATTGGGGTGATGATGCT-BHQ

[0141] 상기 이중 프로브를 이용하여 다중 실시간 PCR을 수행한 결과, E7을 포함하는 E5-E67-E7-E8(FL)의 경우, FAM(E7) 및 HEX(E6) 형광신호가 모두 검출되어 E7 및 E6 모두 증폭됨을 확인하였다. 반면, E7이 배제된 E5-E6-E8(ΔE7)에서는 HEX(E6) 형광신호만 검출되어, E6만이 증폭됨을 확인하였다(도 6B).

[0143] (2) SS0(splicing-switch oligonucleotide) 처리에 따른 HTRA2 ΔE7 HeLa 세포의 스플라이싱 효율 평가

[0144] 기존 RT-PCR 방법 및 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법을 이용하여 정상 HeLa 세포(WT) 및 HTRA2 ΔE7 HeLa 세포(ΔE7)의 E7 포함 비율을 확인하였다. 이 때, HTRA2 E7의 스플라이싱 효율은 하기 식 3을 사용하여 평가하였고, HTRA2의 E7 포함 비율은 식 3-1을 이용하여 정량화하였다.

[0145] [식 3]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, E7} - Ct_{FL, E6})}}{2^{(Ct_{cDNA, E7} - Ct_{cDNA, E6})}} \times 100 \right]$$

[0147] [식 3-1]

$$\text{엑손 포함률(\%)} = \frac{2^{(Ct_{FL, E7} - Ct_{FL, E6})}}{2^{(Ct_{cDNA, E7} - Ct_{cDNA, E6})}} \times 100$$

[0149] 상기 식 3 및 3-1에서, Ct_{FL, E7}은 엑손7이 포함된 전장(full-length) cDNA에서 엑손7 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, Ct_{FL, E6}는 전장 cDNA에서 엑손6 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, Ct_{cDNA, E7}은 스플

라이싱 변이체에서 엑손7 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, Ct_{cDNA, E6}는 스플라이싱 변이체에서 엑손6 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

[0150] HTRA2 ΔE7 HeLa 세포주는 HTRA2 E7의 3' 스플라이스 부위를 표적으로 하는 스플라이스-스위칭 올리고뉴클레오타이드(SSO, Target SSO)를 합성하여 HeLa 세포에 도입하여 제작하였다. 이때, 아무 유전자에도 결합하지 않는 스크램블 서열의 SSO를 동일 조건으로 처리하여 대조군(Control SSO)으로 사용하였다(도 6C).

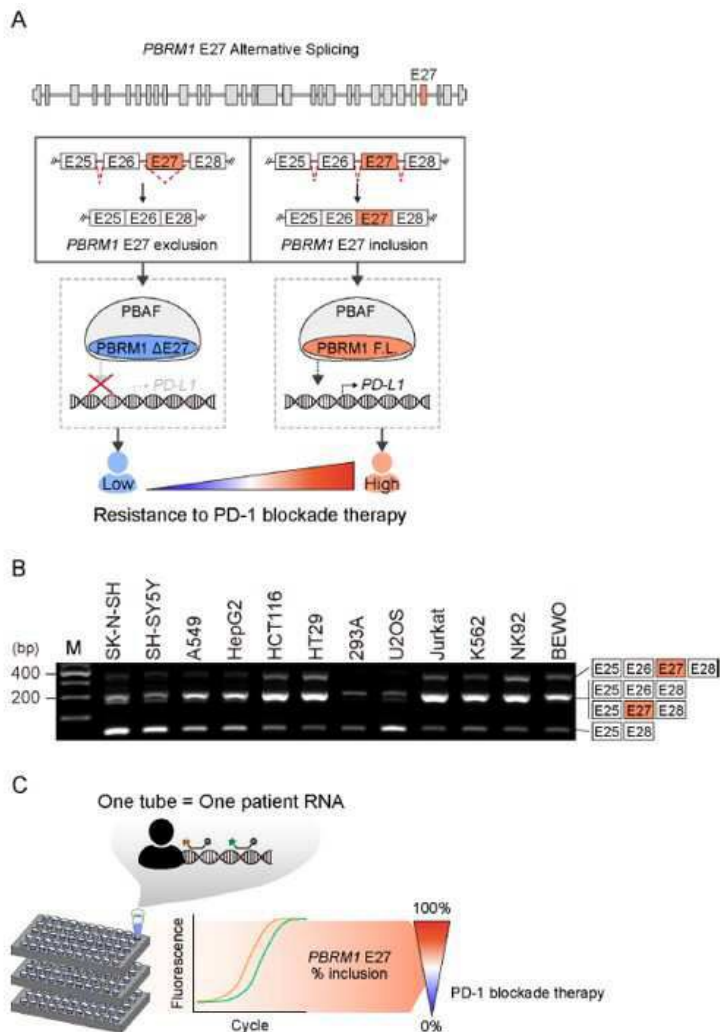
[0151] SSO를 세포에 형질도입하고 24시간 동안 배양한 후, 기존 RT-PCR 방법으로 스플라이싱 패턴을 확인하였다. 그 결과, 대조군(Con) 대비 Target SSO 처리군(T)에서 E7 포함 비율이 현저하게 감소하였다(도 6D).

[0152] 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법을 이용하여 HTRA2 E7의 스플라이싱 효율을 평가한 결과, 대조군(Con)의 E7 포함 비율은 $67.3 \pm 8.9\%$ 인 반면, Target SSO 처리군(T)의 E7 포함 비율포함 비율은 $23.8 \pm 4.2\%$ 로 나타났다(도 6E). 또한, 대조군(Con)의 스플라이싱 효율은 $32.7 \pm 8.9\%$ 이며, Target SSO 처리군(T)의 스플라이싱 효율은 $76.2 \pm 4.2\%$ 로 확인되었다.

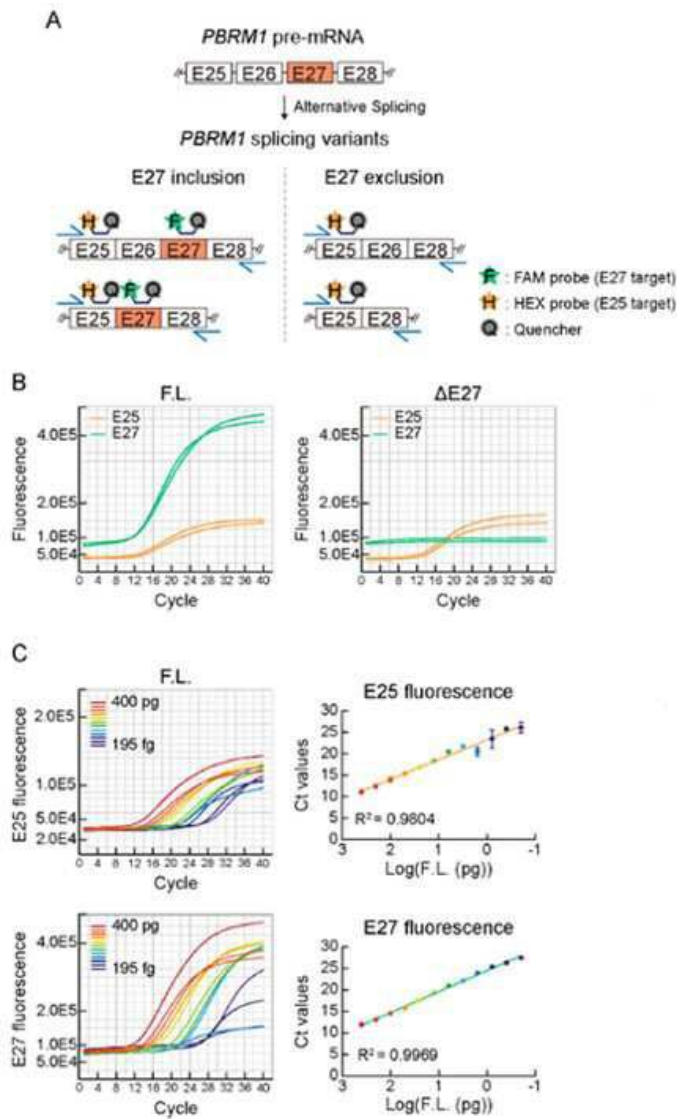
[0153] 이와 같은 결과를 통해 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법 기반 스플라이싱 효율 평가 방법이 다양한 유전자의 스플라이싱 변화를 정량적으로 평가할 수 있는 표준화된 분석 플랫폼임을 확인하였다.

도면

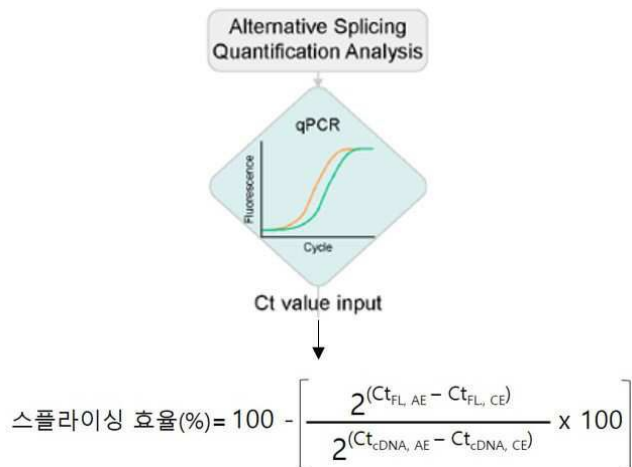
도면1



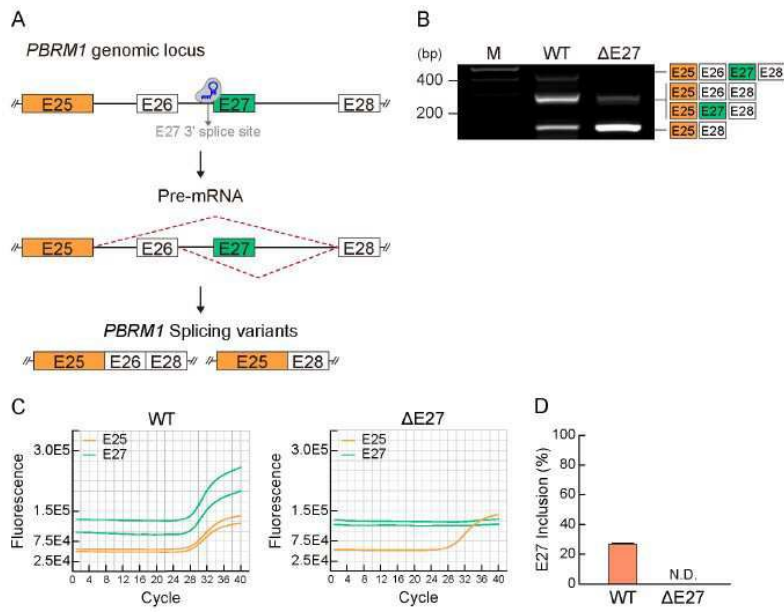
도면2



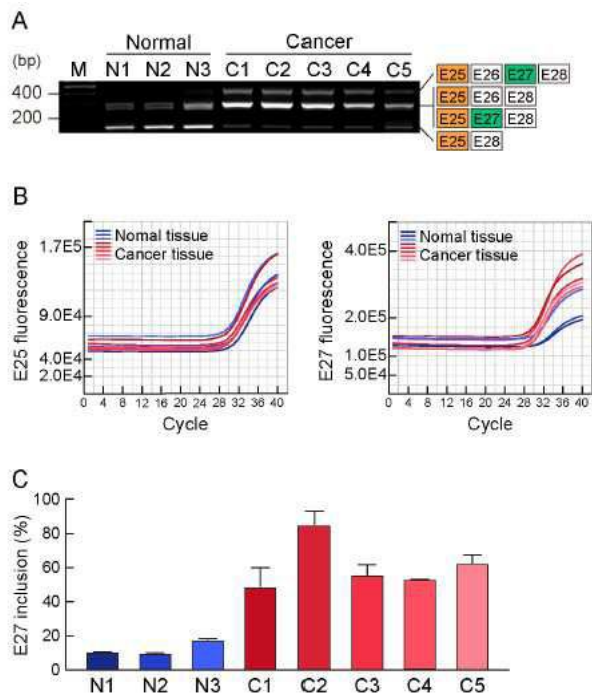
도면3



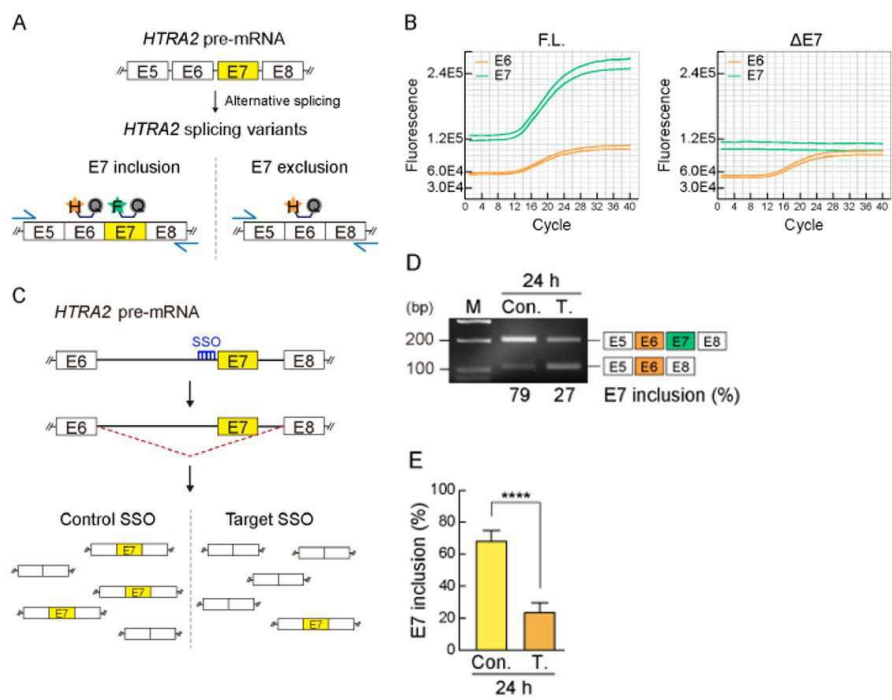
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.