



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0136713
(43) 공개일자 2024년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/57415 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2023-0030015
(22) 출원일자 2023년03월07일
심사청구일자 2023년03월07일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김성수
서울 송파구 잠실로 88 102동 301호
최태규
서울특별시 동대문구 경희대로 26 의과대학 419호
분자생물학교실 (회기동)
(뒀면에 계속)
(74) 대리인
특허법인지담

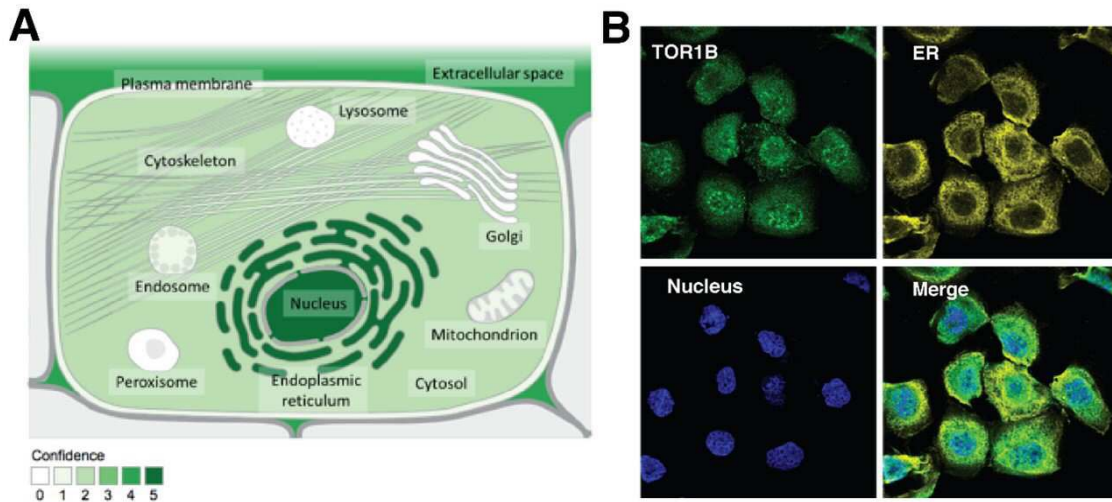
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 유방암의 골전이 예측 또는 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트

(57) 요약

본 발명의 조성물 및 키트는 유방암 환자의 골전이 예측 또는 진단용 조성물 및 키트에 관한 것으로, 본 발명의 조성물, 키트 및 방법은 유방암 환자의 골전이 단계에서 TOR1B mRNA 발현 수준을 분석하여 골전이암을 효과적으로 예측하고, 진단할 수 있다. 또한, 본 발명의 유방암 환자의 골전이를 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법을 통해 유방암 골전이 환자 등의 생존율을 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/112 (2013.01)
 C12Q 2600/118 (2013.01)
 C12Q 2600/158 (2013.01)
 G01N 2800/56 (2013.01)

살리마 악테르

서울 동대문구 이문로 88 민족통일고시텔 801호

(72) 발명자

강인숙

서울특별시 강남구 삼성로 212 3동 607호 (대치동, 은마아파트)

민 남 응옌

베트남 빈증 디안 빈안 노이호아1 빈응옌 D2길, 16

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345331688
과제번호	2018R1A6A1A03025124
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	경희대학교 의과학 연구소
기 여 율	70/100
과제수행기관명	경희대학
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345347996
과제번호	2020R111A1A01069013
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	암 바이오마커를 이용한 항체 기반 항암치료 연구
기 여 율	30/100
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

Torsin Family 1 Member B(TOR1B) mRNA 또는 그 단백질에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 유방암의 골전이 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 물질은 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인, 유방암의 골전이 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 2의 조성물을 포함하는 유방암의 골전이 예측 또는 진단용 키트.

청구항 4

진단 대상으로부터 분리된 시료 내의 TOR1B mRNA 또는 그 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 유방암의 골전이 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 발현 수준이 대조군의 발현 수준보다 높으면 상기 진단 대상은 대조군 대비 골전이 가능성이 더 높다고 판단하는 단계를 더 포함하는, 유방암의 골전이 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 또는 뇨로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 유방암의 골전이 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유방암의 골전이 예측 또는 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 유방암은 폐암에 이어 두번째로 흔히 발생하는 암이며, 사망률은 5위에 해당하는 악성 종양이다. 전세계에서 유방암의 발병 원인은 다양하지만, 알려진 원인은 약 20%에 불과한 실정이다. 나머지 약 80%는 원인이 알려지지 않았지만, 외부적인 환경에 의한 원인일 가능성이 높다는 의견이 중론이다. 외부 환경에 의한 질병은 발병 원인이 너무 다양하여 한가지 원인으로 설명하기 어렵다. 따라서 복합적인 외부 환경이 유방암의 주된 원인일 것으로 받아들여지고 있다. 외부 환경적 원인으로 발병된 질병은 미리 예측하여 예방할 수 없고 질병 진단이 이뤄진

다음에야 치료 과정이 이뤄지기 때문에, 비용, 기간 및 회복에 상당한 시간이 소요되는 문제가 있다 유방암의 경우 일단 암세포가 주변 조직에 침범하거나 림프절로 전이가 시작되면 완치가 어렵기 때문에 조기 발견이 다른 암보다 더 중요하다고 할 수 있으며, 이에 대한 연구가 활발히 진행중이다(대한민국 등록특허 10-1966493).

- [0004] 유방암 환자는 치료중에 골 손실이 생길 수 있고, 암세포의 골 전이 위험도가 높다. 전이성 유방암 환자의 65~75%가 골전이를 경험한다.
- [0005] 현재까지 골전이는 X선 촬영, 컴퓨터 단층촬영, 자기공명영상촬영 등으로 진단하고 있다. 다양한 암종에서 암 환자의 진단 및 예후 예측을 하기 위하여 바이오마커를 임상에 활용하고 있지만, 아직 유방암의 골전이와 관련된 바이오마커는 임상에 활용되지 못하고 있다.
- [0006] 골전이암은 악성 종양이 골 조직을 파괴시키면서 암 종에 상관없이 일단 진단된 이후 급격히 예후가 나빠지는 경우가 많다. 이렇게 되는 가장 큰 이유는 영상 검사를 활용한 현재의 골전이암의 진단이 시기적으로 매우 늦기 때문이다. 실제, 골전이가 잘 일어나는 유방암에서는 이의 예방 및 조기 진단을 위해 초기 치료 종료 후에도 통상 5년간 호르몬 억제요법을 시행하면서 “골스캔”을 6-12개월 간격으로 반복 촬영한다. 그러나, 통증이나, 골절, 신경 압박 등의 증상 없이 골스캔으로 진단되는 경우에도 이미 골파괴가 진행된 상태인 경우가 대부분이며, 결국 치료 반응이 좋지 않다. 일반적으로, 골전이암은 휴면기 단계, 미세 골전이 단계, 임상적 골전이 단계로 진행된다.
- [0007] 휴면기 단계에서는 암세포가 골세포에만 존재하며, 암세포와 골세포간에 상호작용이 일어나지 않는다. 그러나, 미세 골전이 단계에서는 암세포가 파골세포와 상호작용을 하며, 세포의 증식이 일어나는 단계이다. 임상적 골전이 단계에서는 암세포와 파골세포에 의해 골조직이 파괴되어 통증, 골절 등의 증상이 발견되는 단계이다. 종래 영상 검사를 활용한 암의 골전이 진단은 이러한 임상적 골전이 단계에서만 가능하였으며, 이 경우 이미 종양이 진행되어 효과적인 치료가 어려웠으며, 골조직의 형태학적 변화가 발생된 이후에 진단이 가능하다는 한계가 있었다. 이에 따라 미세 골전이 단계에서 골조직이 파괴되기 전에 조기 진단을 통해 효과적으로 치료할 수 있는 진단용 조성물, 키트 또는 진단을 위한 정보제공 방법의 필요성이 증대되고 있는 실정이다.
- [0008] 한편, 이질성을 갖는 유방암 세포들은 다양한 바이오마커의 발현양상에 따라 다른 서브 타입을 가지며 그에 따른 약물치료뿐만 아니라 방사선 치료를 진행하고 있다.
- [0009] 유방암 세포 발현 양상에 따른 서브 타입은 에스트로젠 수용체(ER), 프로게스테론 수용체(PR) 및 인간 상피 성장인자 수용체(HER2)의 발현 유무에 따라 나누어진다고 알려져 있다. 3가지 호르몬 수용체를 모두 갖는 유형(ER+, PR+, HER2+)을 내강형(luminal type)이라고 하며 그 수용체를 타겟으로 하는 약물치료가 효과적으로 진행되고 있지만, 3가지 수용체에 대해 음성을 보이는 조직(ER-, PR-, HER2-)인 기저형(basal type) 유방암 조직은 약물치료가 쉽지 않을 뿐만 아니라 내강형과 비교하였을 때 침투능이 높고 전이가 잘 일어남으로써 좋지 않은 예후를 나타낸다. 이에, 상기와 같은 유방암 세포 발현양상에 따른 전이성 유방암을 치료할 수 있는 새로운 표적이 필요한 실정이다.
- [0010] 이에, 본 발명자들은, TOR1B가 유방암 환자에서 골전이를 판단하는 바이오마커임을 발견했으며, 특히 TOR1B가 골전이에 걸리기 쉬운 ER+/PR+ 유방암 환자에서 골전이를 진단할 수 있다는 것을 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1966493호 (2019.04.01)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 유방암 환자의 골전이를 예측 또는 진단할 수 있는 진단용 조성물 및 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [0014] 또한, 본 발명은 유방암 환자의 골전이를 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것을 목적으로

한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본발명의 일 측면에 따라, Torsin Family 1 Member B(TOR1B) mRNA 또는 그 단백질에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 유방암의 골전이 예측 또는 진단용 조성물이 제공된다.
- [0017] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 조성물을 포함하는 유방암의 골전이 예측 또는 진단용 키트가 제공된다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 진단 대상으로부터 분리된 시료 내의 TOR1B mRNA 또는 그 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 유방암의 골전이 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 유방암 환자의 골전이를 예측 또는 진단용 조성물 및 키트에 관한 것으로, 본 발명의 조성물, 키트 및 방법은 유방암 환자의 골전이 상태를 효과적으로 예측하고, 진단할 수 있고, 유방암 환자의 골전이암의 진단 시기를 획기적으로 앞당겨 환자의 생존율을 크게 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 세포수준에서 TOR1B의 국소화를 확인한 결과이다((A) COMPARTMENTS (B) 단백질 Atlas).
- 도 2는 TOR1B의 mRNA 발현이 (A) E-MTAB-356 및 (B) GSE2034 데이터세트에서 골전이 환자에게서 상향 조절된 것을 확인한 결과이다.
- 도 3은 (A) E-MTAB-356 및 (B) GSE2034의 데이터세트에서 골전이를 예측하기 위한 ROC 곡선분석을 통해 유방암 환자의 골전이 및 비골전이 상태를 판별하는 TOR1B 유전자 발현의 유효성을 테스트하기 위한 ROC 곡선 분석을 나타낸 도이다.
- 도 4는 (A) E-MTAB-356 및 (B) GSE2034 데이터세트의 유방암 환자에서 TOR1B의 발현을 기반으로 한 TOR1B 발현의 골전이에 대한 Kaplan-Meier 플롯을 나타낸 그래프이다. (p 값은 로그 순위 테스트로 계산되었다.)
- 도 5는 TOR1B 발현 분자 마커와 임상 정보의 유의한 연관성을 확인한 그래프로써, Kaplan-Meier 곡선은 (A) E-MTAB-356 및 (B) GSE2034 데이터 세트의 ER 양성 유방암 환자, (C) PR 양성 유방암 환자 및 (D) E-MTAB-356 데이터 세트의 55세 이상 환자에게서 TOR1B의 발현을 기반으로 한다. (p 값은 로그 순위 테스트로 계산되었다.)
- 도 6은 TOR1B 및 기타 임상 정보의 다변량 Cox 비례 위험 회귀 분석을 나타낸 도이다.
- 도 7은 TOR1B와 다른 유전자 및 단백질의 상호작용 네트워크를 나타낸 도이다. (A) GeneMANIA를 사용하여 TOR1B와 다른 유전자의 상호작용 네트워크를 생성, (B) 다른 유전자와 TOR1B의 상호작용 네트워크는 STRING을 사용하여 생성되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본원에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본원의 목적상, 진단은 암의 골전이의 존재 여부를 확인하거나, 나아가 암의 골전이의 진행 여부 또는 심화 여부를 확인하는 것을 의미할 수 있다.
- [0026] 본원에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therapeutics) (예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함할 수 있다.

- [0028] 본 발명은 Torsin Family 1 Member B(TOR1B) mRNA 또는 그 단백질에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 유방암의 골전이 예측 또는 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0029] TOR1B는 주로 응급실 및 핵 외피에서 발견되는 ATPase이며, 유전자의 단백질 생성물은 분비 또는 막 단백질의 적절한 접합과 막 무결성 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136816-TOR1B>)을 유지하는 데 도움이 되는 분자 샤페론으로 작용할 수 있다.
- [0030] TOR1B는 진단 대상 유래 시료에 존재하는 것으로서, 그 mRNA 또는 단백질 서열은 NCBI genbank 등에 공지된 서열을 활용할 수 있다. 예를 들어, 진단 대상이 되는 개체 종의 서열을 사용할 수 있다.
- [0031] 상기 진단 대상은 현재 유방암을 보유하고 있거나, 유방암을 보유한 경험이 있는 동물, 그 외 유방암의 골전이를 예측 또는 진단하기 위한 정보를 제공받으려 하는 동물 등으로서, 상기 동물은 인간을 포함한 포유류일 수 있다.
- [0032] 시료는 진단 대상으로부터 분리된 것으로서, 그 예로는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 또는 뇨 일수 있고, 구체적으로는 진단 대상으로부터 분리된 암 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 상기 물질은 TOR1B mRNA 또는 그 단백질을 검출할 수 있다면 제한되지 않으나, 예를 들면 항체, 압타머, DNA, 단백질, 폴리펩티드로 이루어진 군에서 하나일 수 있다.
- [0035] 본원에서, "항체"란 항원성 부위에 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본원의 목적상, 항체는 상기 마커 단백질인 TOR1B에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 및 재조합 항체를 모두 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 모노클로날 항체는 당해 분야에 널리 공지된 하이브리도마 방법, 또는 파지 항체 라이브러리기술을 이용하여 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0037] 상기 폴리클로날 항체는 상기한 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 것을 포함하는, 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 폴리클로날 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0038] 또한, 본원의 항체에는 키메라 항체, 인간화 항체 등의 특수항체도 포함될 수 있다.
- [0039] 상기 "펩티드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙어서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.
- [0040] 상기 "압타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 압타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0041] 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 물질은 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에서 "프라이머"란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 "프로브"란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소나 효소 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.

- [0044] 상기 TOR1B를 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열, 상기 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열 또는 상기 뉴클레오티드의 단편에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머는 TOR1B를 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열이 알려져 있으므로, 통상의 기술자는 상기 서열을 바탕으로 상기 프라이머 또는 프로브를 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 디자인할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물은 유방암 환자를 대상으로 유방암 환자의 골전이를 예측 또는 진단하는 데 사용하기 위한 물질로서, 진단 대상으로부터 분리된 시료에 처리하여 시료 내의 TOR1B mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 측정하여 유방암 환자의 골전이를 예측 또는 진단하는데 사용될 수 있다.
- [0046] 예를 들어, 유방암 골전이 환자의 시료 내의 TOR1B mRNA 또는 그 단백질의 발현 수준과 정상대조군 환자의 발현 수준을 비교하여 유방암 골전이 환자의 발현 수준이 정상대조군 환자의 발현 수준에 비해 높은 경우, 정상대조군 환자에 비해 유방암 골전이 가능성이 높다고 판단할 수 있다.
- [0047] 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 유방암 골전이 예측 또는 진단용 키트를 제공한다.
- [0048] 상기 키트는 TOR1B mRNA 또는 그 단백질에 특이적으로 결합하는 물질을 포함할 뿐만 아니라, 그 키트가 이용하는 TOR1B mRNA 또는 그 단백질 발현량을 측정하는 분석방법에 적합한 하나 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 키트는 TOR1B mRNA 또는 단백질의 발현량을 측정하기 위한 키트일 경우, RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자의 mRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 이외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시리보뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(dePC water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0050] 상기 키트는 TOR1B를 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열, 상기 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오티드의 단편 또는 상기 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 물질의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적합한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질을 포함할 수 있다. 상기 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질은 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)(ABTS) 또는 o-페닐렌디아민(OPD), 테트라메틸 벤지딘(TMB) 등이 사용될 수 있다.
- [0051] 상기 키트는 TOR1B mRNA의 발현량을 측정할 수 있는 유방암 골전이 예측 또는 진단용 마이크로어레이(microarray)일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 상기 지표인자를 이용하여 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 당업자가 용이하게 제조할 수 있으며, 일 구체예에 따르면 상기 TOR1B 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA 또는 그의 단편에 해당하는 서열의 cDNA가 프로브로서 기판에 부착되어 있는 마이크로어레이일 수 있다.
- [0052] 또한, 본원의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0053] 본원의 키트는 환자 시료 내 TOR1B mRNA 또는 그 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제뿐만 아니라, 발현 수준 분석에 적합한 한 종류 이상의 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 검출 라벨로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0054] 구체적인 일례로, 상기 키트는 ELISA 키트, 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 구현하기 위하여, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. 이러한 ELISA 키트는 상기 단백질들에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 TOR1B에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 재조합 항체일 수 있다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [0055] 이 외에도, 상기 키트는 웨스턴 블롯, 면역침전분석법, 보체 고정 분석법, 유세포분석, 또는 단백질 칩 등을 구현하기 위한 키트일 수 있으며, 각 분석 방법에 적합한 부가적인 구성을 추가로 포함할 수 있다. 이 분석 방법들을 통하여, 항원-항체 복합체 형성량을 비교함으로써 항암제 내성을 진단할 수 있다.
- [0056] 본 발명은 진단 대상으로부터 분리된 시료 내의 TOR1B mRNA 또는 그 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 유방암 골전이 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0057] 상기 측정은 TOR1B mRNA 또는 그 단백질을 검출하는 물질을 상기 시료에 처리하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0058] 상기 TOR1B mRNA 또는 그 단백질을 검출하는 물질은 앞서 예시한 범위 내의 것일 수 있다.
- [0059] 상기 시료 및 진단 대상은 전술한 바와 같다.
- [0060] 상기 TOR1B mRNA 또는 그 단백질이 발현 수준을 측정하는 방법으로서 TOR1B를 코딩하는 유전자의 전사물질인 mRNA의 시료 내 농도 또는 상기 TOR1B 단백질의 시료 내 농도를 측정하는 방법을 택할 수 있으나, 이에 제한되지 아니하고, 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법을 택하여 수행할 수 있다.
- [0061] 상기 mRNA의 시료 내 농도를 측정하는 방법으로서 역전사효소 증합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 증합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 증합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅 (Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 상기 단백질의 시료 내 농도를 측정하는 방법으로서 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 면역탁본검사, 샌드위치 측정법(sandwich assay), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색(immunohistochemistry), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS(fluorescence-activated cell sorting), 웨스턴 블롯팅, 유체 세포 측정법(flow cytometry), 효소기질발색법, 항원-항체 응집법 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명의 정보제공방법은 상기 발현 수준을 대조군의 발현 수준과 비교하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0064] 유방암 환자의 시료 내의 TOR1B mRNA 또는 그 단백질의 발현 수준과 비골전이 환자의 발현 수준을 비교하여 유방암 환자의 TOR1B 발현 수준이 비골전이 환자의 TOR1B 발현 수준에 비해 높은 경우, 유방암 환자는 골전이 가능성이 높다고 판단할 수 있다. 또한, 상기 TOR1B mRNA 또는 그 단백질의 발현 수준이 비골전이 환자의 발현 수준과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없거나(ex. $p < 0.05$) 낮게 측정되는 경우 유방암 환자의 골전이 가능성이 낮다고 판단할 수 있는 정보를 제공할 수 있다.
- [0065] 또한, 2명의 유방암 환자의 시료 내의 TOR1B mRNA 또는 그 단백질의 발현 수준을 비교하여 발현 수준이 더 높은 환자의 경우, 발현 수준이 더 낮은 환자보다 골전이 가능성이 더 높다고 판단할 수 있다.
- [0066] 또한, 유방암 환자의 시료 내의 TOR1B mRNA 또는 그 단백질의 발현 수준과 유방암 골전이 환자의 발현 수준을 비교하여 유방암 환자의 발현 수준이 유방암 골전이 환자의 발현 수준과 통계적으로 유의한 차이가 없는 경우 ($P < 0.05$) 유방암 골전이 가능성이 높다고 판단할 수 있다.
- [0068] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0070] **실시예**

[0071] **1. TOR1B의 세포하(subcellular) 국소화**

[0072] **(1) 실험 준비**

[0073] TOR1B의 세포하 국소화는 COMPARTMENTS 데이터베이스 (<http://compartments.jenselab.org>)를 사용하여 예측하고 시각화하였다. 모든 데이터는 호모 사피엔스에서 유전자 유형을 선택하여 검색 및 필터링되었으며, 유전자는 고유한 유전자 기호를 사용하여 다른 데이터베이스에서 추가로 수집되었다.

[0075] (2) 실험 방법

[0076] TOR1B의 단백질 발현 수준은 인간 단백질 아틀라스 데이터베이스 (<https://www.proteinatlas.org/>)의 세포하 아틀라스(subcellular Atlas)를 사용하여 확인하였다. 유전자 기호는 데이터베이스에서 정보를 검색하는데 사용되었으며, 소포체 및 핵에서 TOR1B의 면역조직화학(IHC) 염색을 세포하 아틀라스(subcellular Atlas)에서 평가하였다.

[0078] (3) 실험 결과

[0079] TOR1B의 세포하 국소하는 여러 정보 소스, 즉 데이터베이스 주석인 생물학 문헌의 자동 텍스트 마이닝 및 다양한 세포 유형에 대한 서열기반 예측을 고려하여 COMPARTMENTS 데이터베이스를 사용하여 예측되었다. TOR1B 단백질 생성물은 소포체 및 핵에서 가장 높은 신뢰도(신뢰수준 5)와 세포의 공간(p 값)에서 중간 정도의 신뢰도(신뢰수준 4)로 확인되었다.

[0080] 가장 낮은 신뢰도(신뢰수준 1)는 세포질, 세포골격, 미토콘드리아, 피옥시좀, 엔도솜, 리소솜 및 골지체에서 나타났다(도 1A). TOR1B 단백질 발현은 인간 단백질 아틀라스 데이터베이스로부터의 세포하 아틀라스(subcellular Atlas)를 사용하여 투영되었고, 소포체 및 핵에서 높게 발현되었다(도 1B).

[0082] 2. 유전자 발현 프로파일, 임상 데이터 및 분석

[0083] (1) 실험 방법

[0084] 유방암(BC) 환자의 유전자 발현 프로파일 및 임상정보는 국립 생명공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 유전자 발현 옴니버스(GEO) 데이터베이스 (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) 및 ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>)에서 다운로드하였다.

[0085] 강력한 다중 배열 평균 알고리즘(robust multiarray average algorithm, RMA)을 사용하여 클러스터 3.0을 통해 원시 데이터를 중앙값으로 정규화했다. GSE2034 및 EMTAB-365 데이터 세트는 각각 286 및 425 명의 환자로 구성되었으며 훈련 및 검증 코호트로 사용되었다. 프로브 세트 식별자를 유전자 기호로 변환하였다. 유전자 발현 수준을 중앙값 중심으로 정규화하고 2개의 발현군으로 분류하였다. TOR1B 발현 수준이 중앙값보다 높은 환자는 높은 발현 그룹으로 간주되었고, TOR1B 발현 수준이 중앙값 이하인 환자는 낮은 발현 그룹으로 간주되었다. 이 그룹은 추가 분석에 사용되었다.

[0087] (2) 실험 결과

[0088] TOR1B의 mRNA 발현은 E-MTAB-365 및 GSE2034 데이터 세트에서 전이성 및 비전이성 유방암(BC) 환자 사이에서 평가되었다. TOR1B의 상향 조절은 골전이(BM) 환자에서 매우 유의했다 ($p = 8e-04$ 및 $p = 4.5e-05$, 전이성 대 비전이성 유방암(BC), E-MTAB-365 및 GSE2034 데이터 세트, 각각)(도 2). 이러한 결과는 전사 수준에서 더 높은 TOR1B 발현이 유방암(BC) 환자에서 골전이(BM)와 관련될 수 있음을 나타내었다.

[0090] 3. TOR1B 발현 및 임상 정보와의 상관 관계

[0091] (1) 실험 방법

[0092] 유방암 환자의 골전이 환자들 사이에서 TOR1B의 mRNA 발현 수준을 관찰하기 위해 GSE2034 및 E-MTAB-365 데이터 세트로부터 총 711명의 환자를 선택하였다. mRNA 발현 수준에 기초하여, Kaplan-Meier 방법은 골전이(BM)가 발병한 유방암(BC) 환자와 골전이(BM)이 발병하지 않은 환자, 그리고 ER 및 PR 양성 유방암(BC) 환자 간의 생존을 비교하는 데 사용되었다. 카이제곱(Chi-square) 및 로그 순위 테스트(log-rank test)를 사용하여 환자 생존 및 전이를 평가했다.

[0094] (2) 실험 결과

[0095] 이 연구에는 E-MTAB-365 데이터 세트의 유방암(BC) 환자 425 명과 GSE2034 데이터 세트의 유방암(BC) 환자 286 명이 포함되었다. TOR1B 발현과 임상적 특징의 연관성은 표 1에 나타내었다. TOR1B의 중앙값 발현을 기반으로 E-MTAB-365 데이터 세트의 환자는 높은 발현(n=212)과 낮은 발현(n=213)의 그룹으로 분류되었다.

[0096] 유방암(BC) 환자의 임상 병리학적 특징과 TOR1B 발현 (높고 낮음)의 연관성을 연구하기 위해 카이제곱검정(chi-square test)을 수행했다. 결과는 유방암(BC) 환자의 연령 및 종양 등급이 TOR1B 발현과 유의하게 상관관계가 없음을 보여주었다($p > 0.05$). 호르몬 수용체 상태와 관련하여, HER2의 존재 또는 부재는 TOR1B 발현과 유의하게 연관되었다 ($p = 0.008$). 또한, TP53 돌연변이는 TOR1B 상향조절과 높은 상관관계가 있었고($p=0.007$), 유방암(BC) 환자의 CIT 분류, TNM 단계 및 골전이(BM)는 TOR1B 발현과 유의하게 연관되었다 (각각 $p=5.00E-04$, $p=0.023$ 및 $p=0.001$).

[0097] 하기 표 1에 TOR1B의 중앙값 발현에 기초한 두 그룹의 유방암 환자의 임상 병리학적 특성을 기재하였다.

표 1

[0099]

Variable	Total	Low expression	High expression	p (χ^2 - test)
Number of patients (%)	425	213 (50.1)	212 (49.9)	
Age				
≤55	216 (51.3)	109 (25.9)	107 (25.4)	0.788
>55	205 (48.7)	100 (23.8)	105 (24.9)	
ER				
No	103 (24.8)	50 (12)	53 (12.8)	0.74
Yes	312 (75.2)	158 (38.1)	154 (37.1)	
PR				
No	167 (40.3)	87 (21)	80 (19.3)	0.538
Yes	248 (59.8)	121 (29.2)	127 (30.6)	
HER2				
No	250 (85)	113 (38.4)	137 (46.6)	0.008
Yes	44 (15)	30 (10.2)	14 (4.8)	
Grade				
I	34 (8.2)	12 (2.9)	22 (5.3)	0.209
II	215 (51.5)	111 (26.6)	104 (24.9)	
III	168 (39.6)	86 (20.6)	82 (19)	
TP53 status				
Mutation	76 (50)	43 (28.3)	33 (21.7)	0.007
Wild type	76 (50)	60 (39.5)	16 (10.5)	
CIT				
basL	47 (11)	12 (2.8)	35 (8.2)	5.00E-04
lumA	81 (19)	49 (11.5)	32 (7.5)	
lumB	86 (20.2)	62 (14.6)	24 (5.6)	
lumC	62 (14.6)	34 (8)	28 (6.6)	
mApo	36 (8.5)	22 (5.2)	14 (3.3)	
normL	113 (26.6)	34 (8)	79 (18.6)	
TNM stage				
NO	134 (32.1)	79 (18.9)	55 (13.2)	0.023
N1	284 (67.9)	133 (31.8)	151 (36.1)	
Bone metastasis				
No	355 (83.5)	165 (38.8)	190 (44.7)	0.001
Yes	70 (16.5)	48 (11.3)	22 (5.2)	

[0100] 골전이(BM) 예측에서 TOR1B의 민감도 및 특이성은 수신기 동작 특성(ROC) 곡선 분석의 곡선 아래 면적(AUC)으로 부터 평가되었다. TOR1B의 AUC는 E-MTAB-365 및 GSE2034 데이터 세트 모두에서 유방암(BC) 환자의 골전이(BM)

에 대해 유의미한 예측 능력을 보여주었다(각각 AUC=0.627, $p < 0.001$ 및 AUC=0.663, $p < 0.001$)(도 3).

[0101] TOR1B 상향 조절과 관련하여 유방암(BC) 환자의 예후를 연구하기 위해 Kaplan-Meier 플롯을 생성했으며 결과는 TOR1B 발현이 상향 조절된 환자가 TOR1B 발현이 낮은 환자보다 더 조기에 골전이(BM)를 얻은 것으로 나타났다(도 4).

[0102] 본 발명에서는 다양한 임상 병리학적 특징, 즉 연령, 호르몬 수용체의 존재 또는 부재 등을 사용하여 골전이(BM) 환자에게서 TOR1B 발현을 추가로 연구하여 조기 전이가 발생하기 가장 쉬운 환자를 확인했다. 결과는 TOR1B 상향 조절이 ER+(E-MTAB-365, $p=0.0159$ 및 GSE2034, $p=0.00182$) 및 PR+(E-MTAB-365, $p=0.00742$) 유방암(BC)에서 조기 골전이(BM)과 유의한 관련이 있음을 입증했으며, 55세 미만의 환자는 조기 전이에 더 취약했다(E-MTAB-365, $p=0.0182$). 또한 유방암(BC) 환자의 예측 인자를 확인하기 위해 다른 임상 정보와 함께 TOR1B의 다변량 Cox 비례 위험 회귀 분석을 수행했다. 결과는 TOR1B가 유방암(BC) 환자에서 골전이(BM)의 독립적인 예측 인자임을 밝혀냈다($p=0.024$)(도 5 및 도 6).

[0104] **4. TOR1B 유전자-유전자, 단백질-단백질 상호작용 네트워크 분석**

[0105] **(1) 실험 방법**

[0106] TOR1B 유전자와 다른 유전자 사이의 상호작용은 GeneMANIA 데이터베이스(<https://genemania.org/>)를 사용하여 분석하였다. 유전자 상호 작용 네트워크는 단백질 및 유전적 상호 작용, 신호 전달 경로, 공동 발현, 공동 국소화 및 단백질 도메인 유사성을 포함하여 데이터 세트에 존재하는 유전자의 기능적 연관성을 기반으로 구축되었다. 분석 매개 변수는 기본 지표에 따라 설정되었다. 단백질 상호 작용 유전자/단백질 검색 (STRING) 데이터베이스 (<http://www.stringdb.org/>)를 사용하여 단백질 상호 작용 (PPI) 네트워크 분석을 수행했다.

[0107] TOR1B의 PPI 네트워크는 STRING의 호모 사피엔스 데이터베이스에서 조사되었다. TOR1B 단백질 네트워크는 실험적 증거 및 선별된 데이터베이스, 유전자 이웃, 유전자 융합, 유전자 동시 발생, 텍스트 마이닝, 공동 발현 및 단백질 상동성의 8가지 기준에 따라 설정되었다.

[0109] **(2) 실험 결과**

[0110] TOR1B와 다른 단백질 및 유전자의 상호 작용 네트워크를 연구하기 위해 TOR1B를 GeneMANIA 및 STRING 데이터베이스에 도입하여 분자 네트워크 분석을 수행했다. TOR1B는 다른 단백질, 예컨대 NEDD8, TOR1A1P2, DYNLT1, TOR1A, TNFRSF25, PRPF4B, WDR11, STON2, TNFRSF10A 및 COPS4와 밀접하게 연관되었다(도 7).

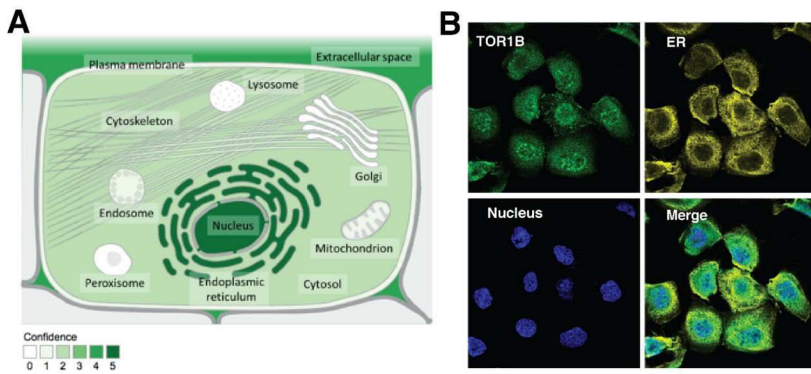
[0111] 또한, 다양한 호모 사피엔스 유전자 중 TOR1B는 TOR1A, TOR1A1P2, TOR1A1P1, TOR2A, TOR3A, TOR4A, BUB1, GIMAP2, GAPVD1, LIPC, GPR107, FBXO6, FUBP3, UBE201, LAGE3, EN2, FAM32A, SPTLO1, ERP44 및 TOPORS 유전자와 관련이 있는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0113] **5. 통계 분석**

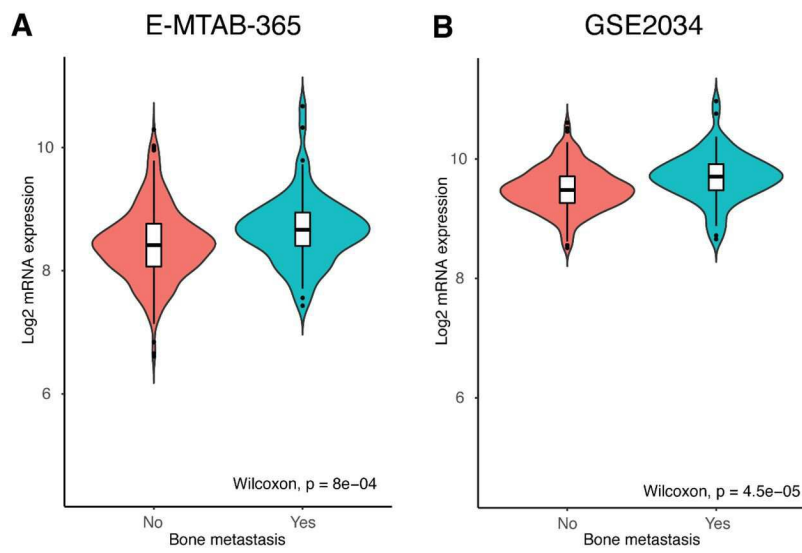
[0114] Kaplan-Meier 곡선, 카이제곱검정 및 로그순위검정은 R 프로그래밍 언어(www.r-project.org)를 사용하여 수행되었다. Wilcoxon 부호 순위 검정은 두 그룹 간의 군집을 비교하는 데 사용되었다. 바이오마커의 예측 능력은 다변량 분석에 의해 평가되었다. 예후 바이오마커의 민감도 및 특이성을 AUC에 의해 평가하였고, 0.05 미만의 양측 P값(two-sided P value)은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

도면

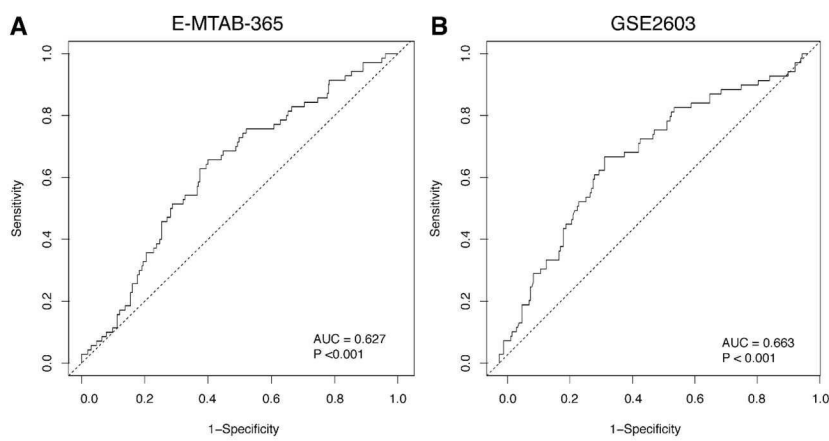
도면1



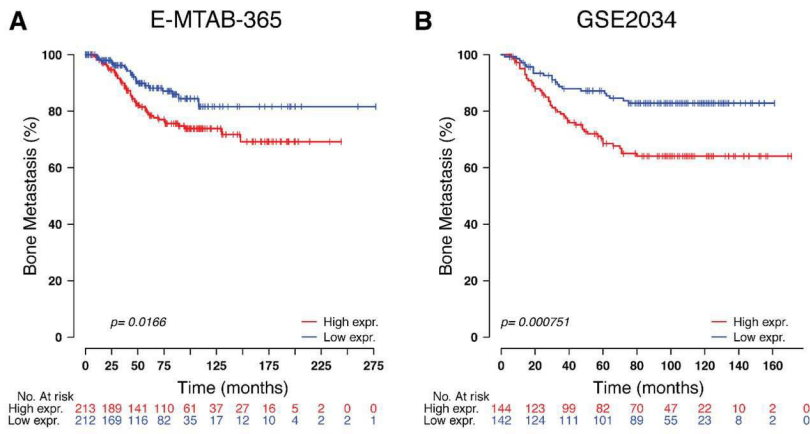
도면2



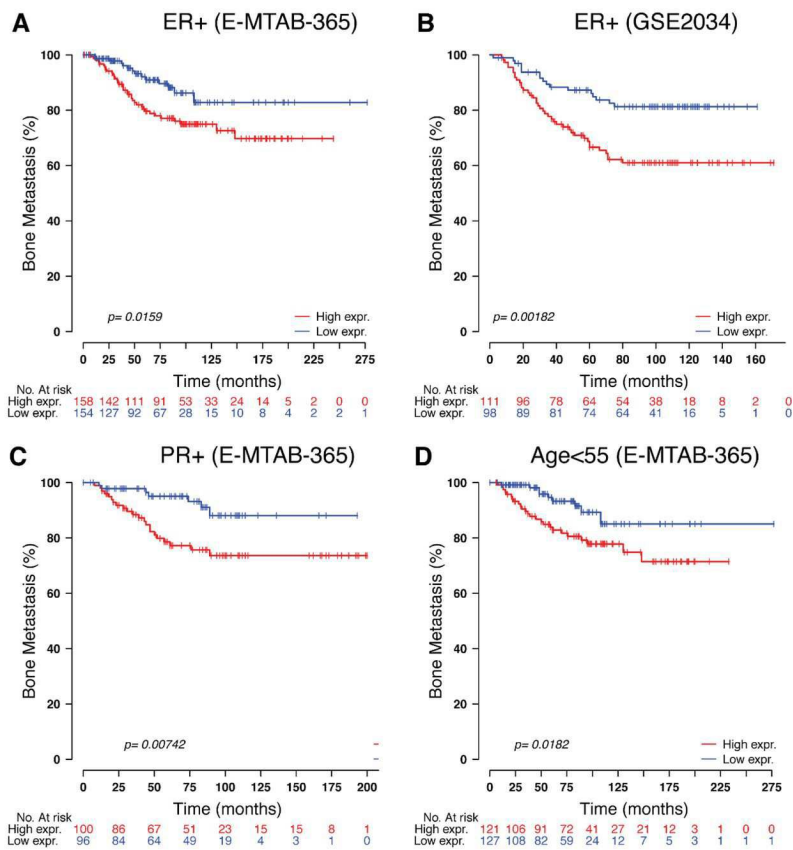
도면3



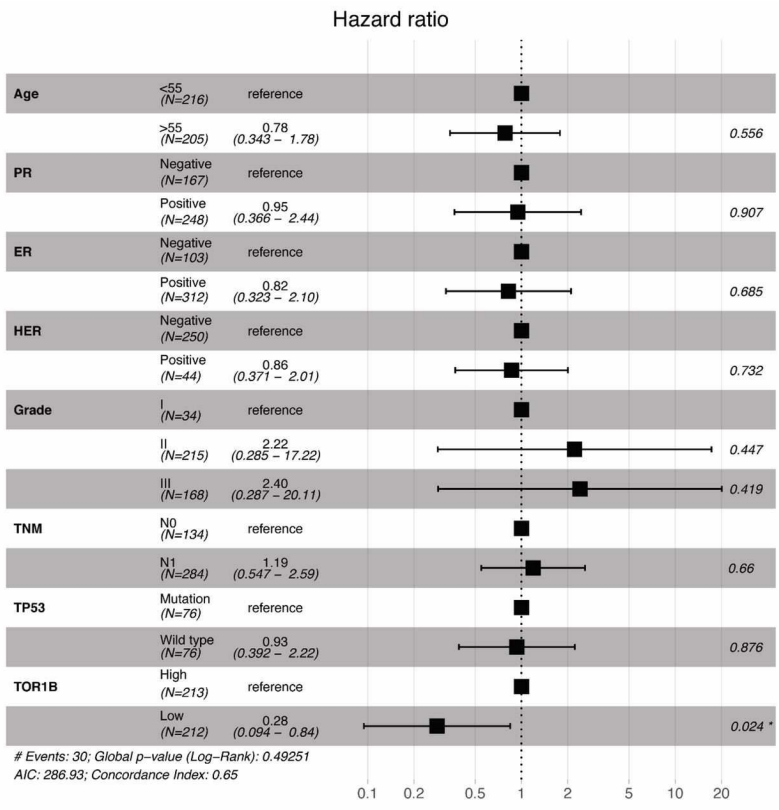
도면4



도면5



도면6



도면7

