



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월21일
 (11) 등록번호 10-1950717
 (24) 등록일자 2019년02월15일

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
C12Q 2600/106 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0156824
(22) 출원일자 2016년11월23일
심사청구일자 2016년11월23일
(65) 공개번호 10-2018-0058118
(43) 공개일자 2018년05월31일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130023312 A*
KR1020140125239 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌 | (73) 특허권자
주식회사 젠큐릭스
서울특별시 구로구 디지털로 242,
402,403,404,908,910,911호 (구로동, 한화비즈메
트로1차)
(72) 발명자
조상래
서울특별시 종로구 자하문로24길 41-26 (효자동)
문영호
서울특별시 서대문구 서소문로 27, 1616호 (충정
로3가, 충정리시온)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이희숙, 김석만 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 이준혁

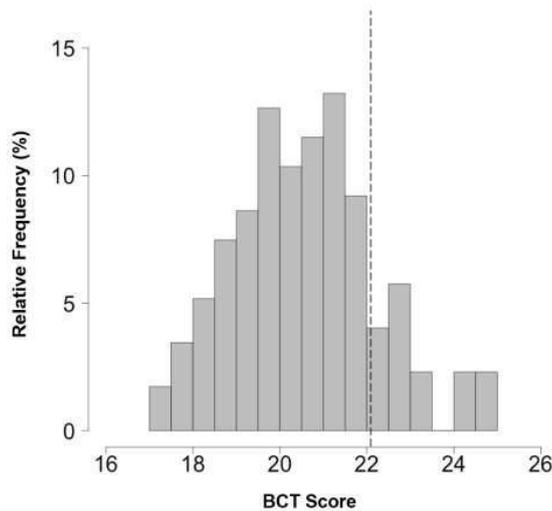
(54) 발명의 명칭 **유방암 환자의 화학치료 유용성 예측 방법**

(57) 요약

본 발명은 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 유방암 환자로부터 수득한 생물학적 시료에서 유방암의 예후 예측 유전자와 표준화 유전의 발현 정도를 측정하고, 이를 표준화함으로써 화학치료의 유용성이 큰 환자군과 유용성이 작은 환자군으로 구분하여 예측하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 방법을 통해 유방암 환자에 대한 화학치료 요법의 유용성을 정확하게 예측할 수 있는 효과가 있어, 향후 유방암 치료의 방향에 대한 단서를 제시하는 목적으로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

한진일

서울특별시 금천구 벚꽃로18길 52 (독산동), 디지
털빌딩A 402호

신영기

서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 114동 1301호
(대치동, 삼성아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 유방암 환자의 화학치료(chemotherapy) 유용성 예측 방법:

(a) 유방암 환자로부터 취득된 생물학적 시료로부터 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisoemrase 2 alpha), RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1), MKI67(Marker of proliferation Ki-67) 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2)의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 표준화하는 단계;

(c) 상기 유방암 환자의 종양의 크기 및 pN-단계를 평가하는 단계;

(d) 상기 (b) 단계에서의 표준화값 및 상기 (c) 단계에서의 종양의 크기 및 pN-단계를 하기 i) 식 1 또는 ii) 식 1 및 2에 대입하여 수치를 계산하는 단계

[식 1]

$$\text{Unscaled BCT score (U-BS)} = a * \Delta \text{Ct_UBE2C} + b * \Delta \text{Ct_TOP2A} + c * \Delta \text{Ct_RRM2} + d * \Delta \text{Ct_FOXM1} + e * \Delta \text{Ct_MKI67} + f * \Delta \text{Ct_BTN3A2} + g * \text{Tumor_size(cm)} + h * \text{pN}(0 \text{ or } 1)$$

[식 2]

$$\text{BCT score} = 0 \text{ if } 0.8 * \text{Unscaled BCT score(U-BS)} - 13.71 < 0$$

$$\text{BCT score} = 0.8 * \text{U-BS} - 13.71$$

$$\text{BCT score} = 10 \text{ if } 0.8 * \text{U-BS} - 13.71 > 10$$

(예후 유전자의 값은 표준 유전자를 사용하여 계산된 표준화 된 mRNA 발현값이며, tumor size는 종양의 장축 길이, pN은 림프절 전이의 병리학적 판단에 따라 판정되는 값을 나타냄.

상기 a는 0.16 내지 1.09, b는 0 내지 0.71, c는 0 내지 0.53, d는 0 내지 0.57, e는 0 내지 0.35, f는 -1.02 내지 0, g는 0.25 내지 1.52 및 h는 0.19 내지 2.25임);

및 (e) 상기 (d) 단계에서 계산된 수치가 민감도와 특이도의 합이 최대가 되는 Unscaled BCT score 또는 BCT score 보다 클수록 화학치료의 유용성이 큰 것으로 예측하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학치료의 유용성 예측은 화학치료 후 재발, 전이 및 전이성 재발로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상이 발생할 것인지 여부를 예측하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유방암은 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 또는 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체 양성인면서 HER2 음성인 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유방암은 암전이분류(Tumor Node Metastasis:TNM) 시스템에 따라 0기 또는 1기로 분류되는 초기 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 표준화는 CTBP1 (C-terminal-binding protein 1), CUL1 (cullin 1) 및 UBQLN1 (Ubiquilin-1)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 표준유전자의 평균 발현량에 대한 비를 산출하는 것에 의해서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 시료는 환자의 암세포를 포함하는 조직의 포르말린 고정 파라핀 포매(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 시료, 신선한 조직(fresh tissue) 및 동결 조직으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 유전자의 발현수준을 측정하기 위한 방법은 마이크로어레이, PCR(polymerase chain reaction), RT-PCR, 정량적 RT-PCR(qRT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR), 노던 블롯(northern blot), DNA 칩 및 RNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 방법인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 (e) 단계에서의 수치가 4 이상인 경우 화학치료의 유용성이 큰 것으로, 4 미만인 경우 화학치료의 유용성이 작은 것으로 예측하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (a) 유방암 환자로부터 생물학적 시료를 획득하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 시료로부터 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisomerase 2 alpha), RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1) 및 MKI67(Marker of proliferation Ki-67)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 증식 관련 유전자 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2) 면역관련 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 mRNA의 발현수준을 표준화 하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 표준화된 하나 이상의 증식 관련 유전자 및 면역관련 유전자의 조합에 의해 유방암 환자의 화학치료 유용성을 예측하는 단계로서, 상기 증식관련 유전자가 과발현 된 경우 화학치료의 유용성이 큰 것으로 및 상기 면역관련 유전자가 과발현 된 경우 화학치료의 유용성이 작은 것으로 예측하는 단계를 포함하는 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유방암은 여성에 있어 가장 흔한 암이며, 두 번째로 사망률이 높은 암이다. 2001년 유방암의 유병률은 미국에서 100,000 명당 90-100이었으며, 유럽에서는 100,000 명당 50-70이었다. 이 질환의 발병은 세계적으로 점점 증가하는 추세에 있다. 유방암의 위험 인자는 인종, 나이, 암 억제 유전자 BRCA-1, BRCA-2 및 p53에서의 돌연변이 등을 포함한다. 알코올 섭취, 고지방 식이, 운동 부족, 외인성 폐경 후 호르몬 및 이온화 방사선 또한 유방암의 발병 위험을 증가시킨다. 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체 음성 유방암(각각 "ER-" 및 "PR-"), 큰 종양 크기, 높은 등급의 세포진단결과, 및 35세 이하인 경우 그 예후가 나쁘다(Goldhirsch et al. (2001). J. Clin. Oncol. 19: 3817-27). 2005년 약 212,000건의 새로운 침습성 유방암 증례 및 58,000건의 새로운 비침습성 유방암증례가 진단될 것으로 추산되며, 40,000명의 여성이 유방암으로 사망할 것으로 예상된다.

[0003] 현재의 유방암에 대한 치료 방법은 수술 이후, 항암 치료, 항호르몬 치료, 표적 치료 혹은 방사선 치료 등 항후 재발을 줄이기 위한 추가 보조적인 치료가 필요한 경우가 많다. 이 중 화학치료(chemotherapy)는 항암 치료 요법 중의 하나이다. 유방암 환자의 병리학적 상태는 암의 상태, 종양의 크기, 종양의 병리학적 단계 또는 다른 인자들에 따라서 환자마다 다르기 마련이다. 이처럼 다양한 병리학적 상태와 유방암 환자들에서의 서로 다른 반응으로 인해, 일부 환자들은 항암제를 이용한 화학치료가 효과가 있을 수도 있지만, 다른 환자에게는 효과가 없을 수도 있다. 화학치료의 효과가 크지 않을 환자에게 지속적으로 항암제를 투여하는 것은 부작용만을 증가시켜 환자에게 원치 않는 고통을 줄 수 있다.

[0004] 이러한 관점에서, 유방암 환자에게 항암제를 투여하기에 앞서, 해당 환자에서 화학치료의 유용성을 정확하게 예측할 수 있는 방법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에, 본 발명자들은 환자의 암세포를 포함하는 조직의 FFPE 시료를 이용하여 유방암 환자의 예후를 예측할 수 있는 알고리즘을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 유방암 조직으로부터 얻은 유전자 정보 및 임상정보를 수집, 분석하여 예후 예측과 관련된 유전자 세트를 발굴하고, 발굴된 유전자 중 FFPE 시료에 적용시키기 적합한 유전자 및 이의 세트를 선별 및 조합하여 유방암 환자의 예후를 예측할 수 있는 알고리즘을 개발하였고, 상기 알고리즘에 따라 환자를 구분함으로써 유방암 환자에서 화학치료의 유용성을 예측할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 하기 단계를 포함하는 유방암 환자의 화학치료(chemotherapy) 유용성 예측 방법을 제공하는 것이다:

[0007] (a) 유방암 환자로부터 생물학적 시료를 획득하는 단계;

[0008] (b) 상기 (a) 단계의 시료로부터 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisomerase 2 alpha),

RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1) 및 MKI67(Marker of proliferation Ki-67)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 증식 관련 유전자 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2) 면역관련 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

- [0009] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 mRNA의 발현수준을 표준화 하는 단계; 및
- [0010] (d) 상기 (c) 단계에서 표준화된 하나 이상의 증식 관련 유전자 및 면역관련 유전자의 조합에 의해 유방암 환자의 화학치료 유용성을 예측하는 단계로서, 상기 증식관련 유전자가 과발현 된 경우 화학치료의 유용성이 큰 것으로 및 상기 면역관련 유전자가 과발현 된 경우 화학치료의 유용성이 작은 것으로 예측하는 단계.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 하기 단계를 포함하는 유방암 환자의 화학치료(chemotherapy) 유용성 예측 방법을 제공하는 것이다:
- [0012] (a) 유방암 환자로부터 생물학적 시료를 획득하는 단계;
- [0013] (b) 상기 (a) 단계의 시료로부터 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisomerase 2 alpha), RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1), MKI67(Marker of proliferation Ki-67) 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2)로 이루어진 예후 예측용 유전자 및 CTBP1 (C-terminal binding protein 1), CUL1 (cullin 1) 및 UBQLN1 (ubiquilin 1)로 이루어진 표준화용 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0014] (c) 상기 표준 유전자를 이용하여 상기 예후 예측용 유전자의 mRNA 발현 수준을 표준화하는 단계;
- [0015] (d) 상기 유방암 환자의 종양의 크기 및 pN-단계를 평가하는 단계;
- [0016] (e) 상기 (c) 단계에서의 표준화값 및 상기 (d) 단계에서의 종양의 크기 및 pN-단계를 하기 식 1에 대입하여 수치를 계산하는 단계
- [0017] [식 1]
- [0018]
$$\text{Unscaled BCT score (U-BS)} = a * \Delta \text{Ct}_{\text{UBE2C}} + b * \Delta \text{Ct}_{\text{TOP2A}} + c * \Delta \text{Ct}_{\text{RRM2}} + d * \Delta \text{Ct}_{\text{FOXM1}} + e * \Delta \text{Ct}_{\text{MKI67}} + f * \Delta \text{Ct}_{\text{BTN3A2}} + g * \text{Tumor_size(cm)} + h * pN(0 \text{ or } 1)$$
- [0019] (예후 유전자의 값은 표준 유전자를 사용하여 계산된 표준화 된 mRNA 발현값이며, tumor size는 종양의 장축 길이, pN은 림프절 전이의 병리학적 판단에 따라 판정되는 값을 나타냄.
- [0020] 상기 a는 0.16 내지 1.09, b는 0 내지 0.71, c는 0 내지 0.53, d는 0 내지 0.57, e는 0 내지 0.35, f는 -1.02 내지 0, g는 0.25 내지 1.52 및 h는 0.19 내지 2.25임); 및
- [0021] (f) 상기 (e) 단계에서 계산된 수치가 클수록 화학치료의 유용성이 큰 것으로 예측하는 단계.
- [0022] 본 발명의 다른 목적은 UBE2C, TOP2A, RRM2, FOXM1, MKI67 및 BTN3A2 유전자의 발현량을 측정하는 체계를 포함하는 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명의 다른 목적은 UBE2C, TOP2A, RRM2, FOXM1, MKI67 및 BTN3A2 유전자의 발현량을 측정하는 체계를 포함하는 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0024] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 유방암 환자의 화학치료(chemotherapy) 유용성 예측 방법을 제공한다:
- [0025] (a) 유방암 환자로부터 생물학적 시료를 획득하는 단계;
- [0026] (b) 상기 (a) 단계의 시료로부터 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisomerase 2 alpha), RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1) 및 MKI67(Marker of proliferation Ki-67)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 증식 관련 유전자 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2) 면역관련 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0027] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 mRNA의 발현수준을 표준화 하는 단계; 및
- [0028] (d) 상기 (c) 단계에서 표준화된 하나 이상의 증식 관련 유전자 및 면역관련 유전자의 조합에 의해 유방암 환자의 화학치료 유용성을 예측하는 단계로서, 상기 증식관련 유전자가 과발현 된 경우 화학치료의 유용성이 큰 것

으로 및 상기 면역관련 유전자가 과발현 된 경우 화학치료의 유용성이 작은 것으로 예측하는 단계.

- [0029] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 단계를 포함하는 유방암 환자의 화학치료 (chemotherapy) 유용성 예측 방법을 제공한다:(
- [0030] a) 유방암 환자로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계;
- [0031] (b) 상기 (a) 단계의 시료로부터 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisomerase 2 alpha), RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1), MKI67(Marker of proliferation Ki-67) 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2)로 이루어진 예후 예측용 유전자 및 CTBP1 (C-terminal binding protein 1), CUL1 (cullin 1) 및 UBQLN1 (ubiquilin 1)로 이루어진 표준화용 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0032] (c) 상기 표준 유전자를 이용하여 상기 예후 예측용 유전자의 mRNA 발현 수준을 표준화하는 단계;
- [0033] (d) 상기 유방암 환자의 종양의 크기 및 pN-단계를 평가하는 단계;
- [0034] (e) 상기 (c) 단계에서의 표준화값 및 상기 (d) 단계에서의 종양의 크기 및 pN-단계를 하기 식 1에 대입하여 수치를 계산하는 단계.
- [0035] [식 1]
- [0036]
$$\text{Unscaled BCT score (U-BS)} = a * \Delta \text{Ct}_{\text{UBE2C}} + b * \Delta \text{Ct}_{\text{TOP2A}} + c * \Delta \text{Ct}_{\text{RRM2}} + d * \Delta \text{Ct}_{\text{FOXM1}} + e * \Delta \text{Ct}_{\text{MKI67}} + f * \Delta \text{Ct}_{\text{BTN3A2}} + g * \text{Tumor_size(cm)} + h * \text{pN}(0 \text{ or } 1)$$
- [0037] (예후 유전자의 값은 표준 유전자를 사용하여 계산된 표준화 된 mRNA 발현값이며, tumor size는 종양의 장축 길이, pN은 림프절 전이의 병리학적 판단에 따라 판정되는 값을 나타냄.
- [0038] 상기 a는 0.16 내지 1.09, b는 0 내지 0.71, c는 0 내지 0.53, d는 0 내지 0.57, e는 0 내지 0.35, f는 -1.02 내지 0, g는 0.25 내지 1.52 및 h는 0.19 내지 2.25임); 및
- [0039] (f) 상기 (e) 단계에서 계산된 수치가 클수록 화학치료의 유용성이 큰 것으로 예측하는 단계.
- [0040] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 UBE2C, TOP2A, RRM2, FOXM1, MKI67 및 BTN3A2 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 UBE2C, TOP2A, RRM2, FOXM1, MKI67 및 BTN3A2 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측용 키트를 제공한다.
- [0042] 이하 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0043] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 유방암 환자의 화학치료(chemotherapy) 유용성 예측 방법을 제공한다:
- [0044] (a) 유방암 환자로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계;
- [0045] (b) 상기 (a) 단계의 시료로부터 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisomerase 2 alpha), RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1) 및 MKI67(Marker of proliferation Ki-67)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 증식 관련 유전자 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2) 면역관련 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계'
- [0046] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 mRNA의 발현수준을 표준화 하는 단계; 및
- [0047] (d) 상기 (c) 단계에서 표준화된 하나 이상의 증식 관련 유전자 및 면역관련 유전자의 조합에 의해 유방암 환자의 화학치료 유용성을 예측하는 단계로서, 상기 증식관련 유전자가 과발현 된 경우 화학치료의 유용성이 큰 것으로 및 상기 면역관련 유전자가 과발현 된 경우 화학치료의 유용성이 작은 것으로 예측하는 단계.
- [0048] 본 발명에서 “화학치료(chemotherapy)의 유용성”이란 유방암 환자에게 화학물질과 같은 항암제를 투여하는 치료요법을 진행했을 때 유효한 치료효과가 나타날 것인지를 의미하는 것이다. 또한, 상기 “유효한 치료효과”란 암의 완치, 재발, 전이 또는 전이성 재발을 포함하는 개념이며, 가장 바람직하게는 전이성 재발여부를 의미하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서의 상기 “전이성 재발”은 치료 전 유방암의 발생 부위 및/또는 동측 유방 및/또는 반대 측 유방 내의 부위에 전이된 국소 전이성 재발과 폐, 간, 뼈, 림프절, 피부, 뇌와 같은 원격 부위에 전이되어 발생하는

원격 전이성 재발을 포함하는 개념이다. 바람직하게는, 본 발명에서 상기 전이성 재발은 원격 전이성 재발일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에서 상기 “전이성 재발”이란 초기 치료 후, 최소한 하나의 유방 종양에서 유래된 변형된, 즉 암세포가 그 종양에서 분리되어 종양과 떨어진 위치(이하 "원격 부위"라 한다)에서 암으로 계속 성장하는 것을 말한다. 상기 원격 부위는 예를 들면 하나 이상의 림프절 내일 수 있으며, 이들은 이동성이거나 고정되어 있을 수 있고, 상기 종양에 대해 동측이거나 반대 측일 수 있으며, 쇄골위이거나 겨드랑이 등에 있는 것일 수 있다.

[0051] 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측은 주로 종양의 크기(T), 림프절 주변부로의 전이 상태(N) 및 다른 기관으로의 원격 전이(distant metastasis)(M)를 평가하는 수술 후의 질병의 병기(stage)(TNM 병기)에 의해 결정된다. TNM 병기에 따라 분류된 환자의 화학치료 유용성 예측은 동일한 병기에서도 서로 다르다. 즉, 동일한 병기의 유방암에서도 화학치료의 유용성은 에스트로겐 또는 프로게스테론 수용체(ER 또는 PR)의 발현여부 및 HER2(human epidermal growth factor receptor 2)의 과발현 여부 또는 유전자의 증폭에 의해 결정될 수 있다. 동일한 병기의 유방암이라 할지라도 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 또는 HER2의 발현여부에 따라 병태 및 예후가 현저히 달라지기 때문에, 이를 명확히 구분한 후 치료방법을 구체적으로 설정하는 것이 필요하다.

[0052] 따라서, 최근에는 유전자 및 분자생물학적으로 유방암의 특성을 분류하며(표 1), 아형에 따라 치료에 따른 결과 및 예후도 다르다고 보고하여, 수술적 방법이나 항암화학요법의 선택에 지표로 사용된다.

표 1

유방암의 분자생물학적 아형(subtype) 분류

Subtype	특성	발생빈도(%)
루미날 A형	* ER 양성 및/또는 PR 양성 * HER2 음성 * 낮은 Ki67 발현	30~70
루미날 B형	* ER 양성 및/또는 PR 양성 * HER2 양성 (또는 높은 Ki67 발현을 나타내면서 HER2 음성)	10~20
삼중음성(Triple negative)형	* ER 음성 * PR 음성 * HER2 음성	15~20
HER2형	* ER 음성 * PR 음성 * HER2 양성	5~15

[0053]

[0054] 본 발명에서의 유방암은 바람직하게는 에스트로겐 수용체 및/또는 프로게스테론 수용체 양성인 유방암일 수 있으며, 가장 바람직하게는 루미날 A형 유방암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 한편, 유방암의 경우 병기가 높을수록 암이 더 진행된 것이며 예후 역시 좋지 않다. 유방암은 0~4기로 구분한다. 유방암은 TNM 병기를 사용하는데 TNM 병기를 결정하기 위해서는 3가지 요소가 필요하다. 암 자체의 크기와 특성에 따라 결정되는 T 병기, 림프절의 침범 정도에 의해 결정되는 N 병기, 그리고 유방 이외의 다른 부위로 전이가 있는지 여부에 의해 결정되는 M 병기가 있다. 각각의 병기에 있어서의 병리학적 특성을 요약하면

하기 표 2와 같다.

표 2

TNM 병기에 따른 유방암의 병리학적 구분

분류	세부적 구분
T 병기	T0: 종양의 증거가 없는 경우
	Tis: 상피내암의 경우
	T1: 종양의 최대 직경이 2센티미터 이하인 경우
	T2: 종양의 최대 직경이 2센티미터보다 크지만 5센티미터 이하인 경우
	T3: 종양의 최대 직경이 5센티미터보다 큰 경우
N 병기	N0: 림프절 전이가 없는 경우
	N1: 전이된 림프절의 개수가 1개 이상 3개 이하인 경우
	N2: 전이된 림프절의 개수가 4개 이상 9개 이하인 경우
	N3: 전이된 림프절의 개수가 10개 이상인 경우
M 병기	M0: 원격 전이가 없는 경우
	M1: 원격 전이가 있는 경우

[0056]

[0057]

본 발명에서 상기 유방암은 바람직하게는 조기 유방암이며, 보다 바람직하게는 pN0 또는 pN1기에 해당하는 유방암이며, 가장 바람직하게는 TNM 병기에 따른 0기 또는 1기로 분류되는 유방암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058]

이하에서는 본 발명에서 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측 방법의 각 단계를 보다 상세히 설명한다.

[0059]

(a) 유방암 환자로부터 생물학적 시료를 획득하는 단계;

[0060]

본 발명에서 상기 생물학적 시료는 유방암 환자의 유방암 조직일 수 있다. 상기 유방암 조직에는 일부 정상 세포도 포함되어 있을 수 있으며, 바람직하게는 암세포를 포함하는 유방암 조직의 포르말린 고정 파라핀 포매 (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 시료, 신선한 조직(fresh tissue) 및 동결 조직으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061]

(b) 상기 (a) 단계의 시료로부터 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisomerase 2 alpha), RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1) 및 MKI67(Marker of proliferation Ki-67)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 증식 관련 유전자 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2) 면역관련 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

[0062]

본 발명에서 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측 마커로 기능하는 것은 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisomerase 2 alpha), RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1) 및 MKI67(Marker of proliferation Ki-67)로 이루어진 증식 관련 유전자군 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2) 면역관련 유전자이다. 이들은 각각 독립적으로 선택될 수 있으나, 바람직하게는 2개 이상의 유전자의 조합에 의해서 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측에 이용될 수 있다.

- [0063] 상기 각 유전자는 당업계에 공지된 각 유전자의 서열 또는 각 유전자의 동의어(synonym)의 서열, 바람직하게는 인간에서 유래된 각 유전자의 서열일 수 있으며, 더 바람직하게는 UBE2C (Gene ID: 11065), TOP2A (Gene ID: 7153), RRM2 (Gene ID: 6241), FOXM1 (Gene ID: 2305), MKI67 (Gene ID: 4288), BTN3A2 (Gene ID: 11118)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 각 유전자에 대한 동의어 및 그 서열은 GenBank에서 검색할 수 있다.
- [0065] 본 발명에서 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에서 유전자의 발현 수준을 측정하기 위해 수행되는 모든 방법을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 마이크로어레이, PCR(polymerase chain reaction), RT-PCR, 정량적 RT-PCR(qRT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR), 노던 블롯(northern blot), DNA 칩 및 RNA 칩으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 본 발명의 대상 유전자의 발현 수준의 측정은 바람직하게는 대상 유전자의 발현량의 검출, 더 바람직하게는 대상 유전자의 발현량의 정량적인 검출이다. 발현량의 검출을 위해서 시료 조직 내에서의 mRNA 분리 및 mRNA에서의 cDNA 합성과정이 필요할 수 있다. mRNA의 분리를 위해서는 당업계에 공지된 시료에서의 RNA 분리 방법이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 시료는 FFPE 시료이므로 FFPE 샘플에 적합한 mRNA의 분리방법일 수 있다. cDNA 합성과정은 mRNA를 주형으로 하여 이루어지는 당업계에 공지된 cDNA 합성 방법이 이용될 수 있다. 바람직하게 본 발명의 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측 마커의 발현 수준 측정은 FFPE 시료에서의 mRNA 발현의 정량적 검출이므로 FFPE 시료에 대한 mRNA 분리방법 및 실시간 RT-qPCR (real time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) 방법에 의한 측정일 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명에서 대상 유전자의 발현 수준의 측정은 당업계에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있으나, 리포터 형광 염료 및/또는 퀸처 (quencher) 형광 염료로 표지된 프로브를 사용한 광학적 정량 분석 시스템에 의해서 측정될 수 있다. 상기 측정은 상업적으로 판매되는 장비, 예를 들어, ABIPRISM 7700™ Sequence Detection System™, Roche Molecular Biochemicals Lightcycler 및 이에 부속되는 소프트웨어 등의 시스템에 의해서 이루어질 수 있다. 이와 같은 측정 데이터는 측정값 또는 역치 사이클 (Ct 또는 Cp)로서 표현될 수 있다. 측정된 형광값이 처음으로 통계학적으로 유의한 것으로 기록될 때의 지점이 역치 사이클이며, 이는 검출 대상이 PCR 반응의 주형으로써 존재하는 초기값에 반비례하여 나타나므로 역치 사이클 값이 작은 경우 정량적으로 더 많은 검출 대상이 존재하는 것을 나타낸다.
- [0068] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 mRNA의 발현수준을 표준화 하는 단계;
- [0069] 본 발명에서의 검출 대상 유전자의 발현 수준은 대상 환자 또는 시료에 따라 전체적인 유전자 발현량 또는 발현 수준에 차이가 있을 수 있으므로 표준화가 필요하다. 표준화는 기본 발현량 또는 발현 수준의 차이를 나타낼 수 있는 유전자의 발현량 또는 발현 수준과의 차이를 통해 이루어지며, 바람직하게는 CTBP1 (C-terminal-binding protein 1), CUL1 (cullin 1) 및 UBQLN1(Ubiquilin-1)에서 하나 내지 세 개의 유전자의 발현량 (또는 복수의 유전자가 선별된 경우 이들 발현량의 평균)을 측정하여 이에 대한 비를 산출하는 것에 의해서 수행될 수 있다.
- [0070] (d) 상기 (c) 단계에서 표준화된 하나 이상의 증식 관련 유전자 및 면역관련 유전자의 조합에 의해 유방암 환자의 화학치료 유용성을 예측하는 단계로서, 상기 증식관련 유전자가 과발현 된 경우 화학치료의 유용성이 큰 것으로 및 상기 면역관련 유전자가 과발현 된 경우 화학치료의 유용성이 작은 것으로 유방암 예후를 예측하는 단계;
- [0071] 본 발명에서 상기 “화학치료의 유용성이 큰 것” 이란 화학치료를 받지 않았을 때와 비교해 화학치료를 받은 후 암의 전이, 재발 또는 전이성 재발의 확률이 낮아지는 것을 의미하는 것이다. 즉, 화학치료의 부작용보다 그 효과가 크기 때문에 화학치료를 진행하는 것이 더 바람직한 경우를 의미한다고 할 수 있다.
- [0072] 한편, 상기 “화학치료의 유용성이 작은 것” 이란 화학치료를 받지 않았을 때와 비교해 화학치료를 받은 후 전이, 재발 또는 전이성 재발의 확률이 큰 변화가 없거나 오히려 더 나쁜 예후를 나타내는 경우를 의미한다. 즉, 화학치료의 효과는 기대할 수 없고 부작용이 존재하기에, 화학치료를 진행하지 않는 것이 더 바람직한 경우를 의미한다고 할 수 있다.
- [0073] 바람직하게는 “화학치료의 유용성이 큰 것” 이란 화학치료를 받지 않았을 때와 비교해 10년 이내에 암의 전이, 재발 또는 전이성 재발의 확률이 더 낮아지는 것을 의미하며, “화학치료의 유용성이 작은 것” 화학치료를 받지 않았을 때와 비교해 10년 이내에 전이, 재발 또는 전이성 재발의 확률에 별다른 변화가 없거나, 오히려 더 높아진 경우를 의미한다.

- [0074] 상기 “10년”이란 원발성 유방암(primary breast cancer) 환자의 수술로 암을 제거한 시점(즉, 수술일 기점)으로부터 10년을 의미한다.
- [0075] 본 발명에서 상기 증식관련 유전자의 과발현은 유방암 환자의 나쁜 예후 및 화학치료의 유용성이 큰 것과 밀접한 상관성이 있으며, 상기 면역관련 유전자의 과발현은 유방암 환자의 좋은 예후 및 화학치료의 유용성이 작은 것과 밀접한 상관성이 있다. 따라서, 상기 증식관련 유전자와 면역관련 유전자의 발현 양상을 조합함으로써 화학치료의 유용성을 보다 정확하게 예측할 수 있다.
- [0076] 즉, 본 발명의 상기 유전자 조합은 원발성 유방암(primary breast cancer) 수술 후 추가적인 화학치료가 필요 없는 환자를 선별하는데 이용될 수 있다. 본 발명의 상기 유전자 조합의 대상 환자군은 바람직하게는 수술 전과 후에도 어떠한 화학치료를 받지 않은 환자군으로, 향후 화학치료를 받는 것이 병의 진행경과에 유리할지 또는 받지 않는 것이 유리할지 결정하고자 하는 환자군이라 할 수 있다.
- [0077] 본 발명에서 상기 화학치료의 유용성이 작은 환자군은 유방암의 예후가 나쁘지 않을 것으로 예상되는 환자군으로(즉, 향후 “좋은 예후”를 나타낼 것으로 예상되는 환자군) 10년 내 전이, 재발 또는 전이성 재발의 발생 확률이 낮기에 수술 후 추가적으로 화학치료가 필요하지 않지만, 화학치료의 유용성이 큰 집단은 유방암의 예후가 좋지 않을 것으로 예상되는 환자군으로(즉, 향후 “나쁜 예후”를 나타낼 것으로 예상되는 환자군) 수술 후 10년 내 전이, 재발 또는 전이성 재발의 발생 확률이 높아 수술 후 추가적인 화학치료가 권장되는 것이다. 즉, 유방암의 예후가 나쁘지 않을 것으로 예상되는 환자는 화학치료에 따른 부작용이 치료효과보다 더 크기 때문에 화학치료를 받지 않는 것이 향후 유방암의 진행경과에 더 유리할 것으로 판단할 수 있으며, 반대로, 유방암의 예후가 나쁜 것으로 예상되는 환자는 화학치료에 따른 효과가 부작용보다 월등하기 때문에 화학치료를 받는 것이 향후 유방암의 진행경과에 더 유리할 것으로 판단할 수 있는 것이다.
- [0078] 본 발명은 또한 상기 (b) 단계 이후에 종양의 크기 및 pN-단계를 평가하는 단계를 추가적으로 포함하며, 상기 (d) 단계에서 종양의 크기가 클수록 및 pN 단계가 높을수록 화학치료의 유용성이 큰 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측 방법을 제공한다.
- [0079] 즉, 증식관련 유전자의 발현, 면역관련 유전자의 발현, 종양의 크기 및 pN-단계를 조합함으로써 화학치료의 유용성을 보다 정확하게 예측할 수 있으며, 이러한 조합을 통해 유방암 환자의 화학치료 유용성을 예측하는 방법은 종래에 보고된 바가 없다.
- [0080] 본 발명에서 상기 종양의 크기란 암의 장축의 길이를 뜻하며, 바람직하게는 병리학자의 판단에 의해 측정된 암의 장축의 길이를 말한다. 종양의 크기는 센티미터(centimeter) 단위로 표기된다.
- [0081] 본 발명에서 상기 pN은 유방암의 단계를 구분하는 방법 중 병리학적 구분방법(pathological classification)에 의해 림프절로의 전이 여부로 판단하는 방법을 의미한다. 병리학적 구분방법은 수술 후 병리조직학적 구분방법(postsurgical histopathological classification)이라고도 불리며, 유방암 환자에서 치료를 시작하기 전에 얻었던 정보들과 함께 수술 또는 병리학적 검사들로부터 얻은 정보들을 취합하여 병리 단계를 구분하는 방법이다.
- [0082] pN은 병리학적 구분방법 중 림프절로의 전이정도를 기준으로 판단하는 구분방법으로 겨드랑이 림프절을 절제하여 종양의 전이 여부를 판단한다. pN 단계가 상승할수록 림프절로의 종양세포 전이가 많이 이루어진 것으로 유방암 예후가 나쁘기 때문에 화학치료의 유용성이 큰 것으로 판단할 수 있다.
- [0083] 본 발명에서 상기 pN 단계는 바람직하게는 pN0 단계 또는 pN1 단계일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. pN0 단계란 국부 림프절로의 전이가 전혀 관찰되지 않는 단계를 의미하며, pN1 단계란 1~3개의 동측(同側) 겨드랑이 림프절 미세전이 발견된 단계를 의미한다.
- [0084] 즉, 상기 방법에 따르면 (b) 단계에서 측정된 유전자들의 발현수준과 함께 종양의 크기 및 pN 단계를 예후 예측인자 또는 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측인자로 판단함으로써, 보다 정확하게 유방암 환자의 예후 및 화학치료의 유용성을 예측할 수 있다.
- [0085] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측 방법을 제공한다:
- [0086] (a) 유방암 환자로부터 생물학적 시료를 획득하는 단계;
- [0087] (b) 상기 (a) 단계의 시료로부터 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisomerase 2 alpha), RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1), MKI67(Marker of proliferation Ki-67) 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2)로 이루어진 예후 예측용 유전자 및 CTBP1 (C-terminal binding

protein 1), CUL1 (cullin 1) 및 UBQLN1 (ubiquilin 1)로 이루어진 표준 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

- [0088] (c) 상기 표준 유전자를 이용하여 상기 예후 예측용 유전자의 mRNA 발현 수준을 표준화하는 단계;
- [0089] (d) 상기 유방암 환자의 종양의 크기 및 pN-단계를 평가하는 단계;
- [0090] (e) 상기 (c) 단계에서의 표준화값 및 상기 (d) 단계에서의 종양의 크기 및 pN-단계를 하기 식 1과 2에 대입하여 수치를 계산하는 단계
- [0091] [식 1]
- [0092]
$$\text{Unscaled BCT score (U-BS)} = a * \Delta \text{Ct_UBE2C} + b * \Delta \text{Ct_TOP2A} + c * \Delta \text{Ct_RRM2} + d * \Delta \text{Ct_FOXM1} + e * \Delta \text{Ct_MKI67} + f * \Delta \text{Ct_BTN3A2} + g * \text{Tumor_size(cm)} + h * \text{pN(0 or 1)}$$
- [0093] [식 2]
- [0094]
$$\text{BCT score} = 0 \text{ if } 0.8 * \text{Unscaled BCT score(U-BS)} - 13.71 < 0$$
- [0095]
$$\text{BCT score} = 0.84 * \text{U-BS} + 26.1 \text{ if } 0 \leq 0.8 * \text{U-BS} - 13.71 \leq 10$$
- [0096]
$$\text{BCT score} = 10 \text{ if } 0.8 * \text{U-BS} - 13.71 > 10$$
- [0097] (예후 유전자의 값은 표준 유전자를 사용하여 계산된 표준화 된 mRNA 발현값이며, tumor size는 종양의 장축 길이, pN은 림프절 전이의 병리학적 판단에 따라 판정되는 값을 나타냄.
- [0098] 상기 a는 0.16 내지 1.09, b는 0 내지 0.71, c는 0 내지 0.53, d는 0 내지 0.57, e는 0 내지 0.35, f는 -1.02 내지 0, g는 0.25 내지 1.52 및 h는 0.19 내지 2.25임); 및
- [0099] (f) 상기 (e) 단계에서 계산된 수치가 클수록 화학치료의 유용성이 큰 것으로 예측하는 단계.
- [0100] 상기 (a) 내지 (d) 단계에 대해서는 전술한 바와 동일하다.
- [0101] (e) 상기 (c) 단계에서의 표준화값 및 상기 (d) 단계에서의 종양의 크기 및 pN-단계를 하기 식 1에 대입하여 수치를 계산하는 단계
- [0102] [식 1]
- [0103]
$$\text{Unscaled BCT score (U-BS)} = a * \Delta \text{Ct_UBE2C} + b * \Delta \text{Ct_TOP2A} + c * \Delta \text{Ct_RRM2} + d * \Delta \text{Ct_FOXM1} + e * \Delta \text{Ct_MKI67} + f * \Delta \text{Ct_BTN3A2} + g * \text{Tumor_size(cm)} + h * \text{pN(0 or 1)}$$
- [0104] (예후 유전자의 값은 표준 유전자를 사용하여 계산된 표준화 된 mRNA 발현값이며, tumor size는 종양의 장축 길이, pN은 림프절 전이의 병리학적 판단에 따라 판정되는 값을 나타냄.
- [0105] 상기 a는 0.16 내지 1.09, b는 0 내지 0.71, c는 0 내지 0.53, d는 0 내지 0.57, e는 0 내지 0.35, f는 -1.02 내지 0, g는 0.25 내지 1.52 및 h는 0.19 내지 2.25임)
- [0106] 상기 유전자 및 tumor size, pN 각각에 해당하는 계수와 선형 조합을 통해 예후 예측 점수를 계산. 증식 유전자 및 tumor size, pN은 양의 계수를 가지며, 면역 유전자는 음의 계수를 가진다. 각 계수는 생존분석 결과 계산된 계수값(점추정값)의 95%의 신뢰구간 범위 내에서 적용되며, 바람직하게는 각 계수의 점 추정값이 사용된다.

계수	점추정값	95% 신뢰구간
a (UBE2C)	0.63	0.16 ~ 1.09
b (TOP2A)	0.32	0.00 ~ 0.71
c (RRM2)	0.13	0.00 ~ 0.53
d (FOX1)	0.02	0.00 ~ 0.57
e (MKI67)	0.04	0.00 ~ 0.35
f (BTN3A2)	-0.42	-1.02 ~ 0.00
g (Tumor size)	0.89	0.25 ~ 1.52
h (pN)	1.22	0.19 ~ 2.25

- [0107]
- [0108] 바람직하게, 본 발명에 따른 유방암 환자의 화학치료 유용성을 예측하는 방법은 유방암 환자들의 임상 결과를

지배하는 2가지 주요 생물학적 특성인 면역 반응과 세포 증식에 관련되어 있으며 FFPE 검체 조직에서 발현이 안정적이며, 예후에 따른 발현차이가 큰 유전자를 대상으로 선별하고, Cox 분석을 통해 상기 유전자들 및 예후에 중요한 2개의 임상정보(종양의 크기, pN 단계)에 대한 계수(coefficient)를 계산하고, 표준화된 유전자의 발현값, 종양의 크기 및 pN 단계에 곱하여 하기 식 1에 따라 BCT score를 구하여 화학치료의 유용성을 예측할 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0109] [식 1]
- [0110]
$$\text{Unscaled BCT score} = 0.63 \cdot \Delta \text{Ct_UBE2C} + 0.32 \cdot \Delta \text{Ct_TOP2A} + 0.13 \cdot \Delta \text{Ct_RRM2} + 0.02 \cdot \Delta \text{Ct_FOXM1} + 0.04 \cdot \Delta \text{Ct_MKI67} - 0.42 \cdot \Delta \text{Ct_BTN3A2} + 0.89 \cdot \text{Tumor_size(cm)} + 1.22 \cdot \text{pN(0 or 1)}$$
- [0111] 상기 예후 예측 인자(유전자, 임상정보)가 생존율에 영향을 미치는 정도는 Cox 비례 위험 분석(Cox proportional hazard analysis)을 통해 정량적인 값으로 나타낼 수 있다. Cox 비례 위험 모형은 예후 인자가 없는 경우의 위험도와 예후인자가 있는 경우의 위험도의 비례값인 비례위험비(relative hazard ratio, HR)값을 통해 예후 인자가 생존율에 미치는 영향 정도를 표현한다. 비례위험비(HR)의 값이 1보다 크면 예후 인자가 있는 경우에 없는 경우보다 위험도가 올라가며, 1보다 작을 경우 예후 인자가 있을 경우 위험도가 더 감소한다. 각 예후 인자에 대한 비례위험비를 log scale로 전환한 값을 각 인자에 대한 계수(coefficient)라 하며, 이 값을 BCT score 모델의 산출식 계수로 사용한다(Cox, David R. "Regression models and life-tables." Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) (1972): 187-220.). 유전자의 계수는 교차검증(cross validation)을 통해 산출식의 결과의 타당성을 검증 판단하였다.
- [0112] 상기 식에서 각각의 “ $\Delta \text{Ct_예후예측용유전자}$ ”에는 각 유전자의 발현량을 표준화한 값이 대입된다. 상기 표준화는 기본 발현량 또는 발현 수준의 차이를 나타낼 수 있는 유전자의 발현량 또는 발현 수준과의 차이를 통해 이루어지며, 바람직하게는 CTBP1 (C-terminal-binding protein 1), CUL1 (cullin 1) 및 UBQLN1(Ubiquilin-1)에서 하나 내지 세 개의 유전자의 발현량 (또는 복수의 유전자가 선별된 경우 이들 발현량의 평균)을 측정하여 이에 대한 비를 산출하는 것에 의해서 수행될 수 있다.
- [0113] 구체적으로, CTBP1 (C-terminal-binding protein 1), CUL1 (cullin 1) 및 UBQLN1(Ubiquilin-1)로 이루어진 표준화용 유전자의 발현 평균값에 각 예후예측용 유전자의 발현값을 빼준 뒤 30을 더한 값을 “ $\Delta \text{Ct_예후예측용유전자}$ ” 값으로 하며, 이 값을 상기 예후 예측용 각 유전자의 표준화값이 된다. 즉, 각각의 예후 예측용 유전자의 표준화값은 하기 식에 대입하여 계산된다:
- [0114]
$$[\Delta \text{Ct_예후예측유전자} = (\text{Ct_CTBP1} + \text{Ct_CUL1} + \text{Ct_UBQLN1}) / 3 - \text{Ct_예후예측유전자} + 30]$$
- [0115] (상기 “예후예측유전자”란 표준화 하고자 하는 UBE2C(Ubiquitin-conjugating enzyme E2C), TOP2A(Topoisoemerase 2 alpha), RRM2(ribonucleotide reductase M2), FOXM1(Forkhead box M1), MKI67(Marker of proliferation Ki-67) 및 BTN3A2(Butyrophilin subfamily 3 member A2) 중 어느 하나를 의미한다.
- [0116] 상기 “Ct”란 PCR 증폭 산물이 일정량 증폭되었을 때의 cycle 수를 의미한다. real-time RT-PCR법을 채용하는 경우, 일반적으로 증폭 사이클수 1 내지 10까지는 형광 강도의 변화는 노이즈 수준이고 0과 같기 때문에, 이들을 증폭산물 0의 샘플 블랭크라고 간주하고, 이들의 표준편차 SD를 산출하고 10을 곱한 형광값을 임계값으로 하고, 그 임계값에 최초로 상회하는 PCR 사이클 수를 Ct(cycle threshold) 값으로 한다. 따라서 증폭 산물이 많은 경우, Ct값은 작은 값이 되고, 증폭 산물이 적을 경우, Ct값은 큰 값이 된다.
- [0117] 본 발명에서는 표준 유전자를 사용하여 각 예후 유전자의 발현값을 표준화하였으며, 3개의 표준 유전자의 평균 Ct값을 사용하여, 시험 상 발생할 수 있는 기술적인 오류를 최소화 하였다.
- [0118] 본 발명에서 상기 [식 1]의 계산값을 직관적인 수치로 표현하기 위하여 하기 [식 2]와 같은 선형변환(linear transformation)에 의해 0과 10 사이의 값으로 변환한다.
- [0119] [식 2] (BCT score 계산식)
- [0120]
$$\text{BCT score} = 0 \text{ if } 0.8 \cdot \text{Unscaled BCT score(U-BS)} - 13.71 < 0$$
- [0121]
$$\text{BCT score} = 0.84 \cdot \text{U-BS} + 26.1 \text{ if } 0 \leq 0.8 \cdot \text{U-BS} - 13.71 \leq 10$$
- [0122]
$$\text{BCT score} = 10 \text{ if } 0.8 \cdot \text{U-BS} - 13.71 > 10$$
- [0123] (f) 상기 (e) 단계에서 계산된 수치가 클수록 화학치료의 유용성이 큰 것으로 예측하는 단계:

- [0124] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측방법에서 위험군 분류의 정확도를 평가하는 변수인 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)의 합이 최대가 되는 지점을 산출한 결과, 상기 [식 1]에 따라 계산된 수치값이 22.1을 초과하는 경우에는 화학치료의 유용성이 큰 것으로(전이 고위험군), 22.1 이하인 경우 화학치료의 유용성이 작은 것으로(전이 저위험군) 판단할 수 있었다.
- [0125] 한편, 상기 식 1(Unscaled BCT score)을 선형 변환한 식 2(BCT score)의 경우 그 값이 4 이상인 경우 화학치료의 유용성이 큰 것으로(전이 고위험군)인 것으로, 4 미만인 경우 화학치료의 유용성이 작은 것으로(전이 저위험군) 판단할 수 있었다.
- [0126] 본 발명에서 상기 “민감도(sensitivity)” 란 10년 내 전이된 환자 중 검사 결과에서 고위험군인 비율을 의미하며, 상기 “특이도(specificity)” 는 10년간 무 전이 환자 중 검사 결과에서도 저위험군인 비율을 의미한다.
- [0127] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명자들은 BCT score 및 BCT score에 사용되는 유전자와 임상정보(즉, 암의 크기 및 pN 단계)의 통계적 유의성을 판단하기 위해, Cox 비례위험 모델을 사용해 분석하여 본 결과, 본 발명에 따른 BCT score가 일반적인 예후의 지표로 사용되는 임상정보 및 이들을 사용한 임상정보 기반 예후 평가 모델인 NPI Score, PREDCIT, SNAP 보다 유의성을 띄는 것으로 확인되었다.
- [0128] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면 같은 환자군을 대상으로 BCT score 및 타 임상 정보 기반 모델들의 c-index를 비교한 결과 BCT score가 가장 높은 c-index 값을 보이는 것으로 나타나, BCT score가 타 모델보다 더 높은 유방암 예후 예측력을 나타낸다는 것을 확인하였다.
- [0129] 따라서, 본 발명의 상기 알고리즘은 원발성 유방암(primary breast cancer) 수술 후 추가적인 화학치료가 필요 없는 환자를 선별하는데 이용될 수 있다. 본 발명의 상기 본 알고리즘의 대상 환자군은 바람직하게는 수술 전과 후에도 어떠한 화학치료를 받지 않은 환자군으로 ‘좋은 예후 (good prognosis)’ 를 가진 환자군은 10년 내 전이, 재발 또는 전이성 재발의 발생 확률이 낮기에 수술 후 추가적으로 화학치료가 필요하지 않지만(화학치료의 유용성이 작음), ‘나쁜 예후(poor prognosis)’ 를 가진 집단은 수술 후 10년 내 전이, 재발 또는 전이성 재발의 발생 확률이 높아 수술 후 추가적인 화학치료가 권장될 수 있다(화학치료의 유용성이 큼).
- [0130] 즉, 본 발명의 상기 식 1 또는 식 1 및 2에 의한 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측 알고리즘은 광범위한 임상시료를 대상으로 유방암의 예후와 밀접하게 관련된 증식관련 유전자, 면역관련 유전자 및 임상정보(암의 크기 및 pN 단계)를 분석하여 산출된 것으로 그 예후 예측력이 종래 임상정보 기반 예후 평가모델 등 타 모델보다 더 높은 유방암 예후 예측력을 나타내어, 이를 기초로 한 화학치료의 유용성 예측 또한 매우 정확하다.
- [0131] 본 발명은 또한 UBE2C, TOP2A, RRM2, FOXM1, MKI67 및 BTN3A2 유전자의 발현량을 측정하는 체제를 포함하는 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0132] 본 발명은 또한 상기 조성물은 CTBP1, CUL1 및 UBQLN1 유전자의 발현량을 측정하는 체제를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0133] 본 발명에서 상기 유전자의 발현량을 측정하는 체제는 UBE2C, TOP2A, RRM2, FOXM1, MKI67, BTN3A2, CTBP1, CUL1 및 UBQLN1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0134] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머” 는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0135] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [0136] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산의 제1위치에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적” 은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 본 명세서에서, 프라이머 서열과 관련하여 사용되는 용어, “실질적으로 상보적인 서열” 은 완

전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.

[0137] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 용어 “어닐링” 또는 “프라이밍”은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.

[0138] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상술한 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.

[0139] 바람직하게는, 본 발명에서 상기 프라이머쌍은 서열번호 1 내지 18로 표시되는 서열로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에서 유전자의 발현량을 측정하기 위해 선별된 유전자의 프라이머 및 프로브 서열을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

유방암 예후 예측 유전자의 프라이머 및 프로브 서열

기능적 분류	유전자	프로브	정방향 프라이머	역방향 프라이머
증식관련 유전자	UBE2C	서열번호 19 GGGAAGGC	서열번호 1 AAAAGGCTACAGCAGGAGC	서열번호 2 AGCTGCTCCATGGATGGTC
	TOP2A	서열번호 20 GCCTCTGA	서열번호 3 AAGAGTCATTCCACGAATAACCAT	서열번호 4 GAGGGCTTCCTCAGTATTT
	RRM2	서열번호 21 AAAGCCAG	서열번호 5 TGGGAATCCCTGAAACCC	서열번호 6 GAACTTCCTGGCTAAATCG
	FOXM1	서열번호 22 AGGCTGGA	서열번호 7 AAGCACATTGCCAAGCCAGGC	서열번호 8 CAGGGAAGGTTGTGGCGG
	MKI67	서열번호 23 GAGGAGAG	서열번호 9 CAGAATGAGAGCTCCAGCCT	서열번호 10 TGCATGAGAACCTTCGCACTC
면역관련 유전자	BTN3A2	서열번호 24 CAAGGTGG	서열번호 11 CTTCAAGCCTGGTGAGGA	서열번호 12 TTTTCTGCAGTCTATTTTCC
표준유전자	CTBP1	서열번호 25 GCCCCACG	서열번호 13 CCTTGGGCATCATCGGA	서열번호 14 GTGAAAGCCGAAGGCCIT
	CUL1	서열번호 26 GCAGAGGC	서열번호 15 AGTACTGAATTCTTGACGAGA	서열번호 16 TCTTCGTTGTTCCCAAGCAGAC
	UBQLN1	서열번호 27 TTGGGAGC	서열번호 17 GAAATCCTCAGCTTCAAGAACA	서열번호 18 TGACATTGCTGATAGTGTATCA

[0140]

[0141] 본 발명은 UBE2C, TOP2A, RRM2, FOXM1, MKI67 및 BTN3A2 유전자의 발현량을 측정하는 체제를 포함하는 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측용 키트를 제공한다.

[0142] 본 발명은 또한 상기 키트는 CTBP1, CUL1 및 UBQLN1 유전자의 발현량을 측정하는 체제를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트를 제공한다.

[0143] 본 발명의 키트는 UBE2C, TOP2A, RRM2, FOXM1, MKI67, BTN3A2, CTBP1, CUL1 및 UBQLN1 유전자의 PCR에 의한 증

폭이 가능한 프라이머쌍 이외에 PCR 반응, 시료에서의 RNA 분리 및 cDNA의 합성에 사용되는 당업계에 공지된 도구 및/또는 시약을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 필요에 따라 각 성분들을 혼합하는데 사용될 튜브, 웰 플레이트 및 사용방법을 기재한 지시자료 등을 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0144] 본 발명은 유방암의 예후와 유의한 상관성을 나타내는 유전자군 및 임상정보를 이용한 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법을 통해 유방암 환자에 대한 화학치료 요법의 유용성을 정확하게 예측할 수 있는 효과가 있어, 향후 유방암 치료의 방향에 대한 단서를 제시하는 목적으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0145] 도 1은 알고리즘 산출 시험군에서 unscaled BCT score의 분포를 나타낸 결과이다.
 도 2는 알고리즘 산출 시험군 및 검증 시험군에서 BCT score의 분포를 나타낸 결과이다.
 도 3은 BCT score에 따라 구분된 고위험군(화학치료의 유용성이 큰 그룹) 및 저위험군(화학치료의 유용성이 작은 그룹)의 10년 내 무원격전이 생존확률을 나타낸 도면이다.
 도 4는 C-index를 통한 유방암 예후 예측 모델들의 예측력 평가 결과를 나타낸 도면이다.
 도 5는 본 발명에 따른 알고리즘으로 저위험군 환자 및 고위험군 환자를 구분한 후, 화학치료를 받았거나 또는 받지 않은 환자집단의 10년 간 무원격전이 확률을 계산한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0146] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
 [0147] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0148] <실시예 1>

[0149] **초기 유방암 조직의 발현 프로파일의 수집**

[0150] NCBI의 Gene Expression Omnibus (GEO, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)는 연구자들이 microarray를 비롯한 유전자 발현 및 돌연변이에 대한 대규모 실험 데이터들을 저장하는 데이터베이스 사이트이다. 이 사이트의 데이터들은 자유롭게 재분석을 할 수 있으며, 본 예후 유전자의 도출 과정 역시 이 사이트의 자료를 사용하였다.

[0151] 본 연구에 사용된 microarray 데이터는 ‘Affymetrix Human Genome U133A Array’ 라는 microarray chip을 사용한 데이터로 한정되었다. 이 chip에는 약 2만 2천개의 탐침(probe)이 존재하며, 각 탐침은 하나의 유전자를 지칭한다. 이러한 chip 분석을 통해 인체 내 대부분의 유전자에 대한 mRNA 발현 정도를 측정할 수 있다.

[0152] NCBI GEO 사이트 내에서 ‘Affymetrix Human Genome U133A Array’ 기반의 림프절 음성이며, 수술 후 어떠한 화학치료를 받지 않은 환자군이 대상인 microarray 데이터셋을 조사하였으며, 그 결과 다음과 같은 3개의 데이터셋으로부터 684개의 검체 데이터를 확보하였다. 검체 데이터셋에 대한 정보를 하기 표 4 및 표 5에 나타내었다.

표 4

검체 데이터셋

GEO No.	GEO	검체 수	검체 진단	후향적 관찰 기간
	등록연도		날짜	(년도)
GSE2034	2005	286	1980-1995	7.17
GSE7390	2006	198	1980-1998	12.01
GSE11121	2008	200	1988-1998	7.54

[0153]

표 5

임상샘플의 병리학적 정보

Characteristics	Discovery data set		
	GSE2034	GSE7390	GSE11121
Total	286 (100%)	198 (100%)	200 (100%)
Age			
≤40	36 (13%)	42 (21.2%)	10 (5%)
41-55	129 (45%)	129 (65.2%)	64 (32%)
56-70	89 (31%)	27 (13.6%)	83 (42%)
≥70	32 (11%)		43 (22%)
Not available			
ER status			
ER+	209 (73.1%)	134 (67.7%)	156 (78%)
ER-	77 (26.9%)	64 (32.3%)	44 (22%)
Not available			
Grade			
G1	7(2%)	30 (15.2%)	29 (14.5%)
G2	42 (15%)	83 (41.9%)	136 (68.0%)
G3	148 (52%)	83 (41.9%)	35 (17.5%)
Not available	89 (31%)	2 (1.0%)	
T stage			
T1	146 (51%)	107 (54%)	112 (56.0%)
T2	132 (46%)	91 (46.0%)	85 (42.5%)
T3	8 (3%)		3 (1.5%)
Not available			
N stage			
N-	286 (100%)	198 (100%)	200 (100%)
N+			
Not available			

[0154]

[0155] <실시예 2>

[0156] 원격 전이성 재발이 없는 생존(Distant-Metastasis-free survival, DMFS)의 분포에 따라서, 10년 이상 원격 전이성 재발이 없는 집단을 “예후가 좋은 집단”으로 분류하였으며, 5년 이내에 원격 전이성 재발이 발생한 집단을 “예후가 나쁜 집단”으로 분류하였다. 이러한 분류기준에 따라 검체 집단을 분류한 결과 212개의 예후가 좋은 집단과 159개의 예후가 나쁜 집단으로 분류가 되었다. 예후가 좋은 집단에서 평균 DMFS는 13년 이었으며, 예후가 나쁜 집단에서 평균 DMFS는 2.2년이었다.

[0157] <실시예 3>

[0158] 예후 예측 유전자의 선택

[0159] 상기 예후가 좋은 집단인 212개의 샘플과 예후가 나쁜 집단인 159개의 샘플에서 SAM(Significant Analysis of Microarray) 분석을 통해 예후집단 간 발현량이 차이가 나는 유전자를 알아보았다. SAM 분석결과와 q-값을 이용하여 예후가 좋은집단에서 과발현된 유전자, 예후가 나쁜 집단에서 과발현된 유전자를 선택하였다. 선택된 유전자를 하나로 합친 결과 총 302개의 중복되지 않는 유전자세트가 만들어졌고, 이 유전자들의 발현패턴을 알아보기 위한 군집분석을 주성분 분석(Principal Component Analysis, PCA) 방법을 이용하여 수행하였다. 2개의 주성분을 선택하여 각 주성분에 대해, 관련된 생물학적 기능을 알아보기 위하여, 군집별로 Gene Ontology (GO) 기

능분석을 수행하였다.

- [0160] GO 분석결과 주성분 1은 증식에 집중되어 있고 주성분 2는 면역반응에 집중되어 있는 것으로 나타났다. 증식과 면역반응에 관여하는 2개의 주성분에 속하는 유전자를 대상으로 예후 집단 간 발현량이 가장 큰 유전자를 각각 선택하였다. 각 유전자세트는 유전자는 증식의 발현패턴을 대표하는 의미에서 p-gene, 면역반응의 발현패턴을 나타내는 i-gene으로 명명하였다.
- [0161] 상기 p-gene 또는 i-gene으로 분류된 유전자군에서 하기 조건에 맞는 유전자를 유전자 예후 진단 모델의 후보 유전자로 선별하였다:
- [0162] (i) 면역 또는 면역 반응에 높은 연관성이 있음.
- [0163] (ii) 검체 간 발현의 차이가 큼.
- [0164] (iii) 평균적으로 높은 발현값을 가짐.
- [0165] (iv) qRT-PCR 실험 결과, FFPE 검체와 frozen 검체에서 발현의 높은 연관성을 보임.
- [0166] 상기 기준에 따라 선별된 유전자군은 다음과 같다.
- [0167] (1) 10종의 증식관련 유전자군(p-genes) : AURKA, CCNB2, FOXM1, MKI67, MMP11, PTTG1, RACGAP1, RRM2, TOP2A 및 UBE2C
- [0168] (2) 6종의 면역반응 관련 유전자군(i-genes) : BTN3A2, CCL19, CD2, CD52, HLA, DPA1 및 TRBC1
- [0169] **<실시예 4>**
- [0170] **유방암 예후 예측 알고리즘 구현을 위한 변수의 선별**
- [0171] **<4-1> 알고리즘 구현을 위한 샘플 수득**
- [0172] 삼성병원과 아산병원에서 화학치료를 받지 않은 유방암 환자의 샘플을 174개 입수하여 알고리즘의 구현에 사용하였으며, 227개의 샘플을 알고리즘 검증에 사용하였다.
- [0173] 수득한 환자 샘플의 임상정보는 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

삼성 및 아산병원 임상검체의 임상정보

	알고리즘 산출 시험군		알고리즘 검증 시험군	
	No. of patients	%	No. of Patients	%
Samples	174	100.00%	227	100.00%
Age (years)				
<50	66	37.93%	109	48.02%
>=50	108	62.07%	113	49.78%
NA	0	0.00%	5	2.20%
pN				
0	163	93.68%	208	91.63%
1	11	6.32%	19	8.37%
Tumor size (cm)				
≤2	141	81.03%	189	83.26%
2 - 5	33	18.97%	38	16.74%
>5	0	0.00%	0	0.00%
Pathologic Stage				
IA	136	78.16%	177	77.97%
IIA	31	17.82%	34	14.98%
IIB	7	4.02%	11	4.85%
NA	0	0.00%	5	2.20%
Histologic Grade				
1	53	30.46%	36	15.86%
2	103	59.20%	149	65.64%
3	18	10.34%	37	16.30%

[0174]

[0175] <4-2> 예후 예측에 사용될 유전자의 선별

[0176] 앞서 선별된 16유전자는 FFPE 검체에서부터 RNA를 추출하여 qRT-PCR을 수행하여 그 발현값을 계산하였다.

[0177] 각 유전자의 발현 증가에 따른 원격전이의 위험성의 변화는 Cox 비례 위험 모형을 사용해 파악할 수 있다. Cox 비례 위험 모형에서 일정 시간 간격에서 위험인자(유전자)의 유무에 따른 사건(원격전이)의 발생의 위험 정도의 비를 위험도(hazard ratio, HR)이라 정의하며, 이러한 위험도가 1보다 크면 위험인자가 사건 발생의 위험을 증가시키는 것이고, 1보다 작으면 위험이 감소됨을 의미한다.

[0178] p-genes으로 분류된 증식 관련 유전자는 위험도의 값이 1 이상으로 발현값이 커질수록 예후에 악영향을 주었으며, 반대로 i-genes로 분류된 유전자는 위험도의 값이 1 이하로 발현값이 커질수록 좋은 예후 결과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0179] 관찰된 유전자 군 중 예후 예측의 중요도가 다른 유전자보다 높으며, 타 연구와 예후의 방향성이 일치하는 유전자를 최종 알고리즘에 사용될 유전자로 선택하였다.

[0180] 선택된 유전자는 증식 관련 유전자 5개(UBE2C, TOP2A, MKI67, RRM2, FOXM1)와 면역반응 관련 유전자 1개(BTN3A2)이며, 추가적으로 발현 표준화를 위해 FFPE 조직에 적합한 표준 유전자 3개(CTBP1, CUL1, UBQLN1)를 기존 논문을 통해 선별해 그 발현값을 분석에 사용하였다("Identification of novel reference genes using multiplatform expression data and their validation for quantitative gene expression analysis." PLoS One 4(7): e6162.2009).

- [0181] <4-3> 알고리즘에 사용할 임상정보의 선별
- [0182] 단변량 Cox 비례 위험 모델을 사용하여 화학치료를 받지 않은 유방암 환자 대상으로 전이성 재발과 연관된 중요한 임상 인자가 무엇인지 확인하였다 (p-value<0.05).
- [0183] 이에 대한 결과를 하기 표 7에 나타내었다.
- [0184] 하기 표 7에 나타난 바와 같이, pN, 병리학적 병기(pathologic stage), 암의 크기(Tumor size) 및 NPI score가 원격전이에 유의한 인자로 확인되었다.

표 7

단변량 Cox 비례 위험 모델을 통한 원격전이에 유의한 임상정보 확인

		All			Chemo			Non-chemo		
		HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
pN	0	1.000			1.000			1.000		
	1	3.732	2.418 5.761	0.000	2.602	1.624 4.168	0.000	14.832	4.819 45.650	0.000
pT	1	1.000			1.000			1.000		
	2	1.888	1.217 2.928	0.005	1.302	0.806 2.102	0.281	4.668	1.568 13.900	0.006
	3	1.999	0.617 6.471	0.248	1.360	0.416 4.441	0.611	-	-	-
Pathologic Stage	IA	1.000			1.000			1.000		
	IIA	2.473	1.479 4.136	0.001	1.592	0.902 2.810	0.108	5.750	1.663 19.880	0.006
	IIIB	4.696	2.590 8.514	0.000	2.780	1.442 5.357	0.002	19.512	4.639 82.070	0.000
	IIIA	5.934	1.399 25.170	0.016	3.738	0.868 16.091	0.077	-	-	-
Histologic Grade	1	1.000			1.000			1.000		
	2	1.982	1.029 3.818	0.041	1.771	0.830 3.778	0.140	1.607	0.416 6.214	0.492
	3	2.795	1.368 5.711	0.005	2.061	0.912 4.660	0.082	3.983	0.804 19.739	0.091
Tumor Size	-	1.271	1.121 1.441	0.000	1.131	0.969 1.321	0.119	4.579	2.275 9.217	0.000
	1	1.000			1.000			1.000		
NPI	2	2.894	1.679 4.986	0.000	1.828	0.996 3.355	0.051	7.652	2.240 26.140	0.001
	3	4.257	2.415 7.507	0.000	2.650	1.436 4.893	0.002	12.233	2.236 66.930	0.004
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NPI Score	-	1.930	1.546 2.411	0.000	1.604	1.246 2.066	0.000	4.281	2.076 8.829
Pathologic Stage	1	1.000			1.000			1.000		
	2	2.963	1.837 4.777	0.000	1.868	1.099 3.174	0.021	7.809	2.552 23.900	0.000
	3	5.920	1.396 25.112	0.016	3.729	0.866 16.057	0.077	-	-	-
	Pathologic Stage	-	2.802	1.836 4.275	0.000	1.885	1.165 3.051	0.010	7.809	2.552 23.900
Histologic Grade	-	1.613	1.164 2.236	0.004	1.360	0.949 1.949	0.094	1.996	0.852 4.673	0.111

- [0185]
- [0186] 이들 중 암의 크기(Tumor size)는 화학 치료를 받지 않은 유방암 환자군에서 원격 전이성 재발에 중요한 인자이었지만 화학 치료를 받은 유방암 환자군에서는 유의하지 않았다.
- [0187] pN은 화학 치료를 받지 않은 환자군과 화학치료를 받은 환자군 모두에서 유의하지만, 화학 치료를 받지 않은 환자군에서의 위험도(hazard ratio) 값이 화학 치료를 받은 환자군에서의 위험도 값보다 7배 이상 차이가 났다. 즉, pN은 화학치료를 받은 환자군보다 화학 치료를 받지 않은 환자군에서 더 강력한 원격 전이성 재발에 대한 지표라는 것을 알 수 있었다.
- [0188] 병리학적 병기(Pathologic stage)도 유의한 인자이지만 암의 크기(tumor size), pN이 포함된 개념이며, NPI score는 암의 크기, 림프절 전이 정도 등을 바탕으로 계산되기에 이 지표 역시도 암의 크기와 pN의 정보와 중첩되는 것이어서, 최종적으로 화학 치료를 받지 않은 환자군을 대상으로 한 예후 예측 모델에서 임상 정보는 암의 크기(tumor size) 및 pN 정보를 선택하였다.
- [0189] <실시예 5>

[0190] **Cox 비례 위험 모델 기반 BCT score 계산식의 도출**

[0191] **<5-1> 계산식의 도출**

[0192] 증식관련 유전자인 p-gene 그룹(UBE2C, TOP2A, RRM2, FOXM1 및 MKI67)은 많이 발현할수록 예후에 나쁜 결과를 나타내며, 면역관련 유전자인 i-gene(BTN3A2)은 많이 발현할수록 예후에 좋은 결과를 나타낸다. 상기 유전자들을 Cox 비례 위험 분석을 통해 다음과 같은 식을 산출하였다.

[0193] [Unscaled BCT score 계산식]

[0194]
$$\text{Unscaled BCT score (U-BS)} = 0.63 * \Delta \text{Ct_UBE2C} + 0.32 * \Delta \text{Ct_TOP2A} + 0.13 * \Delta \text{Ct_RRM2} + 0.02 * \Delta \text{Ct_FOXM1} + 0.04 * \Delta \text{Ct_MKI67} - 0.42 * \Delta \text{Ct_BTN3A2} + 0.89 * \text{Tumor_size(cm)} + 1.22 * \text{pN(0 or 1)}$$

[0195] 상기 계산식에 따라 Unscaled BCT score(U-BS)를 산출하여 분포를 확인하였고, 이에 대한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0196] BCT Score의 cut-off는 환자를 10년 내 원격 전이성 재발 발생에 대한 저위험군 또는 고위험군을 분류한다. 위험군 분류의 정확도(accuracy)의 평가변수가 바로 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)이며, 본 발명의 알고리즘에서는 민감도와 특이도는 다음과 같이 정의된다.

[0197] * 민감도(sensitivity): 10년 내 원격 전이성 재발된 환자 중 검사 결과에서 고위험군인 비율.

[0198] * 특이도(specificity): 10년 내 원격 전이성 재발이 없는 환자 중 검사 결과에서도 저위험군인 비율.

[0199] 상기 민감도와 특이도의 값이 클수록 분류가 잘 되었다고 할 수 있지만, 민감도를 높이면 특이도가 떨어지며, 반대로 특이도를 높이면 민감도가 떨어진다. 본 발명의 알고리즘에서는 민감도와 특이도 모두를 고려하여, 위험군 분류의 cut-off 지점을 민감도와 특이도의 합이 최대가 되도록 하는 BCT score 분류 지점을 계산을 통해 산출하였다.

[0200] 도 2에 나타난 바와 같이, 상기한 기준에 따라 민감도와 특이도의 합이 최대가 되는 지점은 22.13767로 이 지점을 원격전이의 고위험군과 저위험군을 나누는 threshold로 지정하였다. 즉, BCT score(BS)가 22.13767 이상일 경우 원격전이 고위험군, 미만일 경우 원격전이 저위험군으로 분류할 수 있는 것이다.

[0201] **<5-2> Scaled 계산식의 도출**

[0202] 상기 실시예 <5-1>의 계산식을 보다 직관적인 수치로 표현하기 위하여 선형변환(linear transformation)에 의해 BCT score로 변환하였고, 계산식은 다음과 같다.

[0203] [BCT score(BS) 계산식]

[0204]
$$\text{BCT score} = 0 \text{ if } 0.8 * \text{U-BS} - 13.71 < 0$$

[0205]
$$\text{BCT score} = 0.84 * \text{U-BS} + 26.1 \text{ if } 0 \leq 0.8 * \text{U-BS} - 13.71 \leq 10$$

[0206]
$$\text{BCT score} = 10 \text{ if } 0.8 * \text{U-BS} - 13.71 > 10$$

[0207] 상기 계산식에서 BCT score의 값이 0보다 적으면 0으로 치환되며, 10보다 클 경우 10으로 변환된다. BCT score가 커짐에 따라 10년 내 암의 재발, 전이 또는 전이성 재발의 확률은 커지게 된다.

[0208] 상기 계산식에 따라 BCT score를 산출하여 그 분포를 확인하였고, 이에 대한 결과를 도 2에 나타내었다. 도 3에 나타난 바와 같이 BCT score에서 환자를 원격전이 발생에 대한 고위험군과 저위험군을 분류하는 threshold는 4로 설정(민감도와 특이도의 합이 최대가 되는 지점) 하였다. 즉, BCT score가 4 이상인 경우에는 재발, 전이 또는 전이성 재발 고위험군으로, 미만이면 저위험군으로 분류할 수 있다.

[0209] **<실시예 6>**

[0210] **예후 예측 성능 평가**

[0211] **<6-1> 알고리즘 산출 시험군과 검증 시험군을 통한 성능평가**

[0212] 상기 실시예 5의 계산식에 따라 분류한 고위험군은 저위험군보다 높은 확률로 재발, 전이 또는 전이성 재발이 발생할 수 있음을 의미한다. 알고리즘 산출 시험군(discovery set)과 알고리즘 검증 시험군(validation set) 생존분석을 통한 원격 전이성 재발 확률을 추정된 결과를 도 3에 나타내었다.

[0213] 도 3에 나타난 바와 같이, 알고리즘 산출 시험군과 알고리즘 검출 시험군에서 BCT score 기반 저위험군의 10년 무원격전이 확률은 각각 97.82%, 96.47%이었으며, 고위험군의 10년 내 무원격전이 확률은 61.07%, 76.31%로 두 시험군 모두에서 통계적으로 유의한 10년 내 원격 전이성 재발 확률의 차이가 있음을 확인하였다(p-values<0.001, log-rank test).

[0214] <6-2> 단변량 및 다변량 Cox 비례 위험 모델을 사용한 BCT score의 예후 예측에 대한 통계적 유의성 검증

[0215] BCT score의 원격전이 예측에 대한 통계적 유의성을 검증하기 위해 Cox 비례위험 분석을 사용해 임상정보 및 임상정보 기반 예후 평가 모델보다 유의성을 가지는지 분석하였다.

[0216] 알고리즘 산출 시험군 및 검증 시험군에서 다변량 Cox 비례위험 분석 결과, BCT Score는 예후의 지표로 사용되는 일반적인 임상정보보다 원격전이의 예측에 통계적으로 유의한 지표로 확인되었다 (p-values<0.05). 이와 유사하게 BCT Score는 임상정보를 기반으로 하는 예후 모델보다 통계적으로 유의한 지표임이 다변량 Cox 비례위험 분석을 통해 확인할 수 있었다 (p-values<0.05).

표 8

임상 정보 및 예후 예측 모델들의 다변량 Cox 비례 위험 분석

	알고리즘 산출 시험군			알고리즘 검증 시험군		
	HR	95% C.I.	P value	HR	95% C.I.	P value
BCT Score	2.22	(1.08-4.58)	0.030	1.88	(1.10-3.21)	0.022
Age at surgery	1.02	(0.98-1.07)	0.364	1.04	(0.98-1.10)	0.184
Tumor Size	1.50	(0.47-4.74)	0.494	0.79	(0.33-1.89)	0.597
No. of LN metastasis	1.53	(0.77-3.04)	0.220	0.17	(0.02-1.42)	0.103
Histologic Grade	1.36	(0.50-3.69)	0.543	1.51	(0.54-4.27)	0.435

	알고리즘 산출 시험군			알고리즘 검증 시험군		
	HR	95% C.I.	P value	HR	95% C.I.	P value
BCT Score	2.54	(1.35-4.78)	0.004	2.02	(1.17-3.50)	0.012
NPI Score	1.76	(0.42-7.36)	0.437	1.43	(0.37-5.48)	0.600
PREDICT	1.05	(0.99-1.12)	0.090	0.98	(0.88-1.10)	0.763
SNAP	0.93	(0.74-1.18)	0.545	0.91	(0.71-1.16)	0.438

[0217]

[0218] <6-3> C-index를 사용한 BCT score의 예후 예측력 평가

[0219] C-index는 0.5에서 1까지의 값을 가지며 0.5에 가까울수록 예후 예측력은 떨어지며 1에 가까울수록 높은 예후 예측력을 가진다. BCT score의 예후예측력을 평가하기 위하여 임상정보 기반 모델과 C-index 비교 평가를 수행하였다.

[0220] 같은 환자군을 대상으로 BCT score 및 타 임상정보 기반 모델들의 c-index를 비교한 결과 BCT score가 가장 높은 c-index 값을 보이는 것으로 나타났다. 이는 타 예후예측 모델보다 BCT score가 더 높은 예후 예측력을 가졌다는 것을 의미한다(도 4).

[0221] <실시에 7>

[0222] 화학치료의 유용성 예측력

[0223] 상기 실시예 1 내지 6을 통해 확립한 알고리즘을 이용하여 유방암 환자의 화학치료 유용성을 예측할 수 있는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0224] 삼성의료원 및 아산병원에서 화학치료를 받은 환자 검체 515개를 취득하여 본 실시예에 사용하였다. 화학치료를 받은 검체와 화학치료를 받지 않은 상기 실시예 4의 검체를 본 발명에 따른 알고리즘으로 분석하여 고위험군과 저위험군으로 구분하고, 화학치료 유무에 따른 10년 무원격전이 확률을 비교하였다.

[0225] 상기 환자의 구체적인 임상 정보를 하기 표 9에 나타내었으며, 무원격전이 확률에 대한 결과를 도 5에 나타내었

다.

표 9

화학치료를 받지 않은 환자 검체와 화학치료를 받은 환자 검체의 임상정보

	화학치료 받지 않은 환자군			화학치료 받은 환자군		
	총 검체	고위험군	저위험군	총 검체	고위험군	저위험군
검체 수	401	72	329	515	290	225
암 크기 (cm)						
<2	289	21	268	195	60	135
≥2	112	51	61	320	230	90
조직학적 등급						
1	89	4	85	82	29	53
2	252	45	207	313	161	152
3	55	20	35	117	97	20
NA	5	3	2	3	3	0
병리학적 병기						
IA	313	20	293	153	32	121
IIA	65	34	31	258	160	98
IIB	18	15	3	101	95	6
NA	5	3	2	3	3	0

[0226]

[0227]

도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 알고리즘에 따라 구분된 저위험군에서는 화학치료를 받지 않은 환자군에서 무원격전이 확률이 97.20%인데 반해서, 화학치료를 받은 환자군에서 92.56%로 화학치료를 받은 환자군에서 무원격전이 확률이 4.64% 감소하였다. 이는 저위험군 환자군에서는 화학치료의 이익이 없다고 판단할 수 있다. 한편, 본 발명의 알고리즘에 따라 구분된 고위험군에서는 화학치료를 받은 환자군의 무원격전이 확률이 77.68%인데 반해, 화학치료를 받지 않은 환자군은 70.50%로 화학치료를 받은 환자군의 예후가 더 좋았던 것을 확인할 수 있었다.

[0228]

위험군에 따른 화학치료의 효과의 차이는 림프절 음성인 유방암에서 보다 명확하게 확인되었다. 상기 환자 중 림프절 음성인 화학치료를 받지 않은 환자의 검체는 371개이며 림프절 음성인 화학치료를 받은 환자의 검체는 323개로 본 발명에 따른 알고리즘으로 분석하여 고위험군과 저위험군으로 구분하고, 화학치료 유무에 따른 10년 무원격전이 확률을 비교하였다.

[0229]

도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 알고리즘으로 저위험군에 분류된 환자에서 화학치료에 따른 무원격전이 확률의 차이는 -2.55%로 저위험군은 화학치료로 인해 무원격전이 생존확률이 감소하는 화학치료의 유용성이 없는 환자군임을 확인하였다. 반대로 고위험군으로 분류된 환자에서 화학치료에 따른 무원격전이 확률의 차이는 14.95%로 고위험군은 화학치료로 인해 무원격전이 확률이 상승하는 화학치료의 유용성이 있는 환자군임을 확인할 수 있었다.

[0230]

즉, 유방암 진단을 받은 환자로서 본 발명의 알고리즘에 따라 저위험군으로 판단된 특정 환자의 경우에는, 화학치료를 통한 유의한 무원격전이 확률의 증가가 없을 것이라 예측해 볼 수 있으며, 고위험군으로 판단된 특정 환자의 경우에는 화학치료를 받는 것이 수술 후 10년 내 무원격전이 생존확률이 높아 예후가 더 좋을 것으로 예측해 볼 수 있는 것이다.

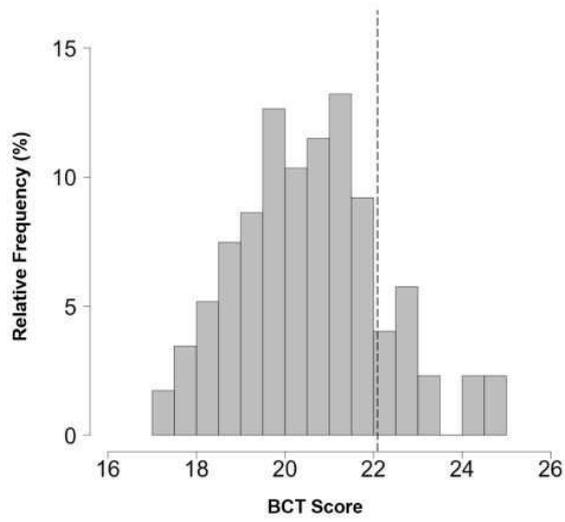
산업상 이용가능성

[0231]

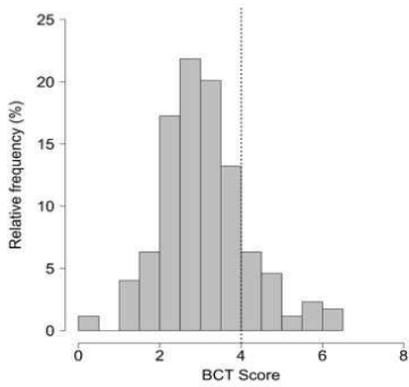
본 발명은 유방암의 예후와 유의한 상관성을 나타내는 유전자군 및 임상정보를 이용한 유방암 환자의 화학치료 유용성 예측방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법을 통해 유방암 환자에 대한 화학치료 요법의 유용성을 정확하게 예측할 수 있는 효과가 있어, 향후 유방암 치료의 방향에 대한 정보를 제시하는 목적으로 유용하게 사용할 수 있어 산업상 이용가능성이 매우 우수하다.

도면

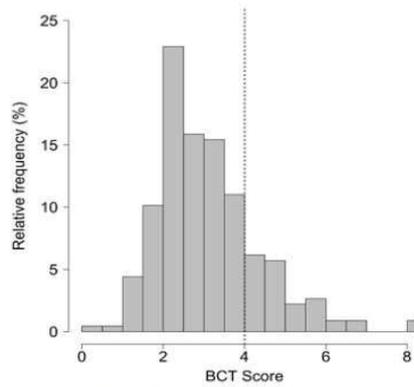
도면1



도면2

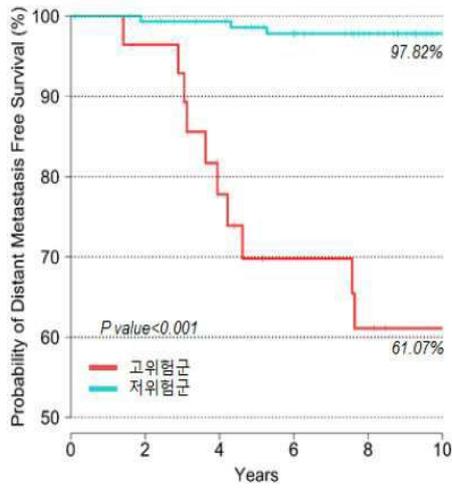


<알고리즘 산출 시험군>

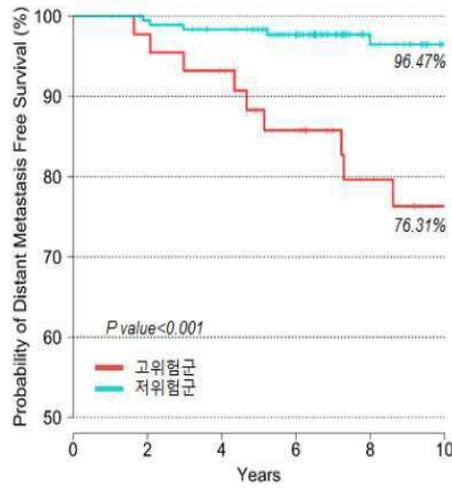


<알고리즘 검출 시험군>

도면3

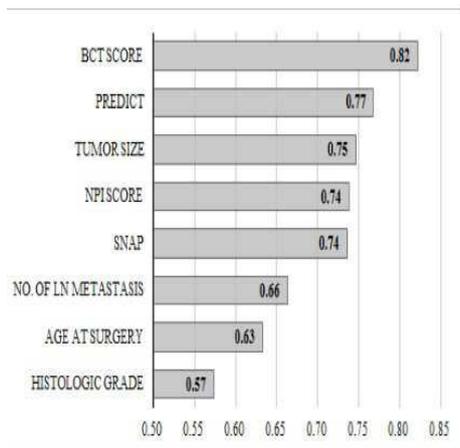


<알고리즘 산출 시험군>

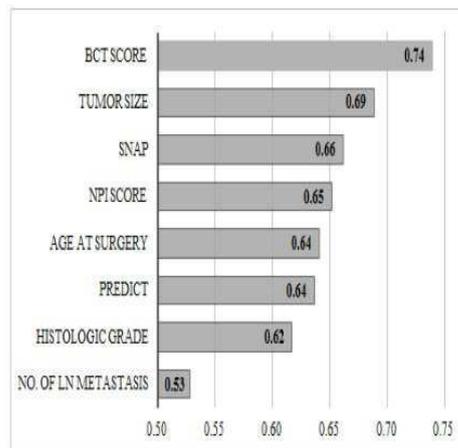


<알고리즘 검출 시험군>

도면4

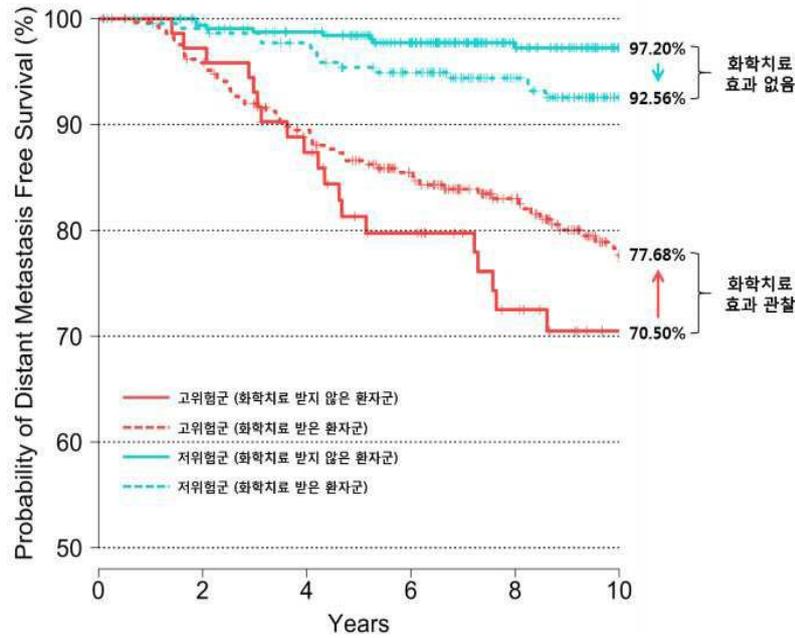


<알고리즘 산출 시험군>

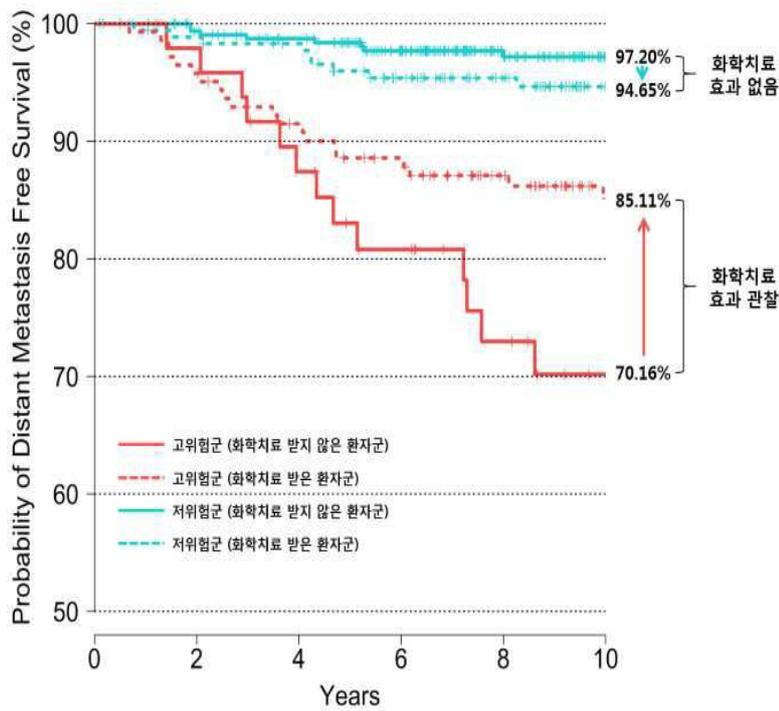


<알고리즘 검출 시험군>

도면5



도면6



서열목록

- <110> Gencurix Inc.
- <120> Methods for predicting effectiveness of chemotherapy for breast cancer patients
- <130> NP16-0113
- <160> 27

<170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> UBE2C forward primer
 <400> 1
 aaaaggctac agcaggagc 19
 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> UBE2C reverse primer
 <400> 2

 agctgctcca tggatggtc 19
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TOP2A forward primer
 <400> 3
 aagagtcatt ccacgaataa ccat 24
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TOP2A reverse primer
 <400> 4
 gagggcttcc ttcagtattt 20
 <210> 5
 <211> 18
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> RRM2 forward primer
 <400> 5
 tgggaatccc tgaaaccc 18
 <210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RRM2 reverse primer
 <400> 6
 gaacttcttg gctaaatcg 19
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FOXM1 forward primer
 <400> 7
 aagcacattg ccaagccagg c 21
 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FOXM1 reverse primer
 <400> 8
 cagggaaagg ttgtggcgg 19
 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MKI67 forward primer
 <400> 9
 cagaatgaga gctcccagcc t 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> MKI67 reverse primer

<400> 10
 tgcattgagaa ccttcgcact c 21
 <210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BTN3A2 forward primer
 <400> 11
 cttcaagcct ggtgagga 18
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BTN3A2 reverse primer
 <400> 12
 ttttctgcag tctatttttc c 21
 <210> 13
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTBP1 forward primer
 <400> 13
 ccttgggcat catcgga 17
 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTBP1 reverse primer
 <400> 14
 gttgaagccg aagcctt 18
 <210> 15

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CUL1 forward primer	
<400>	15	
agtactgaat tcttcagca ga		22
<210>	16	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CUL1 reverse primer	
<400>	16	
tcttcgttgt tcctcaagca gac		23
<210>	17	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	UBQLN1 forward primer	
<400>	17	
gaaatcctca gcttcaagaa ca		22
<210>	18	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	UBQLN1 reverse primer	
<400>	18	
tgacattgct gatagtgtat ca		22
<210>	19	
<211>	8	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	UBE2C UPL probe	
<400>	19	

gggaaggc	8
<210> 20	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TOP2A UPL probe	
<400> 20	
gcctctga	8
<210> 21	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RRM2 UPL probe	
<400> 21	
aaagccag	8
<210> 22	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FOXM1 UPL probe	
<400> 22	
aggctgga	8
<210> 23	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MKI67 UPL probe	
<400> 23	
gaggagag	8
<210> 24	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> BTN3A2 UPL probe
 <400> 24
 caaggtgg 8
 <210> 25
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTBP1 UPL probe
 <400> 25
 gccccacg 8
 <210> 26
 <211> 8
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CUL1 UPL probe
 <400> 26
 gcagaggc 8
 <210> 27
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> UBQLN1 UPL probe
 <400> 27
 ttgggagc 8