



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0119661
(43) 공개일자 2010년11월10일

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0038713

(22) 출원일자 2009년05월01일

심사청구일자 2009년05월01일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교

한국생명공학연구원

대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자

맹필재

대전광역시 유성구 신성동 대림두레아파트
102-606

김리라

대전광역시 유성구 송강동 한마을아파트 115-206

박영우

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 506-104

(74) 대리인

권혁성, 특허법인이름, 정승훈

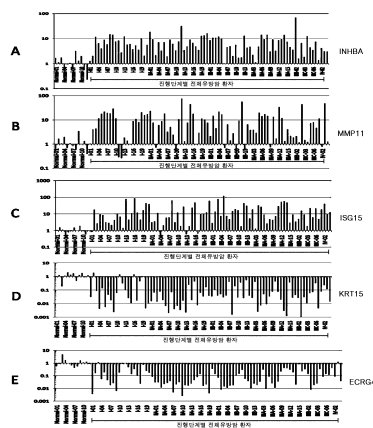
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 유방암 진단용 바이오마커 및 유방암 진단제

(57) 요약

본 발명은 유방암 진단용 바이오마커 및 이에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함하는 유방암 진단제에 관한 것으로서, KRT15의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독 또는 ECGR4의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독으로 이루어진 유방암 진단용 바이오마커와, 프로브로서 유방암 진단용 바이오 마커를 구성하는 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 상보적으로 결합하여 증폭할 수 있는 프라이머를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제를 제공한다. 검체의 조직으로부터 본 발명의 유방암 진단용 바이오마커를 구성하는 유전자인 KRT15의 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독 또는 ECGR4의 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독의 발현 수준을 측정하고 이를 정상 조직에서의 발현 수준과 비교하는 경우 유방암, 특히 초기단계로서 진행단계가 1기인 유방암을 효과적으로 진단할 수 있고, 이를 통해 유방암을 조기에 치료할 수 있다. 아울러, 본 발명의 유방암 바이오마커 조성물을 구성하는 유전자자의 DNA 단편 내지 전장 DNA의 발현 수준을 이를 정상 조직에서의 발현 수준과 비교하는 경우 유방암의 진단에 대한 특이도와 민감도를 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA로 이루어지고, 유방암 조직에서 특이적으로 저발현되는 것을 특징으로 하는 유방암 진단용 바이오마커.

청구항 2

제 1항의 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 프로브는 서열번호 3의 센스 프라이머 및 서열번호 4의 안티센스 프라이머로 구성되는 것을 특징으로 하는 유방암 진단제.

청구항 4

제 2항 또는 제 3항에 있어서, 상기 유방암은 진행단계가 1기인 것을 특징으로 하는 유방암 진단제.

청구항 5

서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA로 이루어지고, 유방암 조직에서 특이적으로 저발현되는 것을 특징으로 하는 유방암 진단용 바이오마커.

청구항 6

제 5항의 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 프로브는 서열번호 7의 센스 프라이머 및 서열번호 8의 안티센스 프라이머로 구성되는 것을 특징으로 하는 유방암 진단제.

청구항 8

제 6항 또는 제 7항에 있어서, 상기 유방암은 진행단계가 1기인 것을 특징으로 하는 유방암 진단제.

청구항 9

서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA; 및
서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA로 이루어지고,
유방암 조직에서 특이적으로 저발현되는 것을 특징으로 하는 유방암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 10

제 9항의 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 및 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브는 서열번호 3의 센스 프라이머 및 서열번호 4의 안티센스 프라이머로 구성되고,

상기 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브는 서열번호 7의 센스 프라이머 및 서열번호 8의 안티센스 프라이머로 구성되는 것을 특징으로 하는 유방암 진단제 조성물.

청구항 12

제 10항 또는 제11항에 있어서, 상기 유방암은 진행단계가 1기인 것을 특징으로 하는 유방암 진단제.

청구항 13

서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA 및 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA로 구성되는 그룹으로부터 하나 이상 선택되고, 유방암 조직에서 특이적으로 저발현되는 것을 특징으로 하는 바이오마커; 및

서열번호 9의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 INHBA 유전자의 DNA 내지 또는 전장 DNA, 서열번호 13의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ISG15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA, 및 서열번호 17의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 MMP11 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA로 구성되는 그룹으로부터 하나 이상 선택되고, 유방암 조직에서 특이적으로 고발현되는 것을 특징으로 하는 바이오마커로 이루어진 유방암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 14

제 13항의 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 및 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 프로브; 및

INHBA 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브, ISG15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브, 및 MMP11 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브는 서열번호 3의 센스 프라이머 및 서열번호 4의 안티센스 프라이머로 구성되고,

상기 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브는 서열번호 7의 센스 프라이머 및 서열번호 8의 안티센스 프라이머로 구성되고,

상기 INHBA 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브는 서열번호 11의 센스 프라이머 및 서열번호 12의 안티센스 프라이머로 구성되고,

상기 ISG15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브는 서열번호 15의 센스 프라이머 및 서열번호 16의 안티센스 프라이머로 구성되고,

상기 MMP11 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브는 서열번호 19의 센스 프라이머 및 서열번호 20의 안티센스 프라이머로 구성되는 것을 특징으로 하는 유방암 진단제 조성물.

청구항 16

제 14항 또는 제15항에 있어서, 상기 유방암은 진행단계가 1기인 것을 특징으로 하는 유방암 진단제 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유방암 진단용 바이오마커 및 이에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함하는 유방암 진단제에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 유방암 진단용 바이오마커 조성물 및 이에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함하는 유방암 진단제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전 세계에서 유방암은 폐암에 이어 두번째로 흔히 발생하는 암이며, 사망률은 5위에 해당하는 위험한 암이다. 유방암의 경우 일단 암세포가 주변 조직에 침범하거나 림프절로 전이가 시작되면 완치가 어렵기 때문에 조기 발견

이 다른 암보다 더 중요하다고 할 수 있다.

[0003] 유방암에 인한 사망률을 줄이기 위해서는 첫째, 유방암을 초기에 조기 진단하고 둘째, 일차 수술에 의한 치료 이후 예후를 진단하여 적절한 부가 치료 (Adjuvant therapy)를 하는 것이 중요하다. 현재 유방암 진단에는 1차 촉진에 의한 자가 진단 외에, 유방 X-선 조영술, 초음파검사법 등이 예방차원에서의 검진방법으로 사용되고 있으며 이 방법은 초기의 유방암을 진단하는 데에도 가장 널리 사용되는 방법이다. 그러나, 유방 X-선 조영술은 우리나라 여성들에서 흔히 발견되는 조밀유방일 경우 섬유질이 많아서, 진단율이 떨어지는 단점이 있으며, 특히 젊은 여성같이 유선이 많이 발달되어 있어도 진단율이 떨어진다. 또한, X-선을 사용하기 때문에 진단 과정에서 오히려 유방암이 생길 가능성도 배제 할 수 없다. 그래서 대안으로 초음파검사법이 사용되고 있지만 이 역시 악성종양(cancer)과 양성종양(non-cancer)을 구별하기는 쉽지 않다. 실제 임상에서는 이상 소견이 있으면 세침흡입세포검사법, 자기공명촬영법 등을 부가적으로 사용하여 진단율을 높이고 있다. 그러나, 이 방법들을 사용하더라도 정상조직과 비 정상조직을 형태상으로 구분할 뿐 악성종양(cancer) 과 양성종양(non-cancer)을 구분하기가 쉽지 않기 때문에 확진을 위해서는 더욱 정밀한 조직검사를 하게 된다. 이와 같은 이유들로 인해 유방암은 다른 암에 비해 비교적 분자 유전학적인 방법으로 유방암을 진단하는 방법이 발달되어 있다. 조직검사에서 조직을 잘라서 병변을 확인한 다음 적출을 위한 1차 수술이 시행된다. 이후의 부가치료를 어떻게 할지 결정하기 위하여 에스트로겐 수용체(Estrogen receptor, ER)의 유무와 유방암 특이 종양표지자인 HER2/neu(Human Epidermal growth factor Receptor 2, ErbB-2 또는 ERBB2라고도 알려져 있다) 유전자의 수를 조직내 교잡법(in situ hybridization)을 통해 확인하는 방법을 사용한다. 만약, 발견된 암 조직이 에스트겐 수용체를 가지고 있으면, 타목시펜(Tamoxifen)과 같은 에스트로겐 유사체를 사용하여 치료를 하게 되고, HER2/neu 유전자가 과발현되어 있으면, HER2/neu 단클론항체인 trastuzumab을 제형화한 허셉틴(Herceptin)을 유방암의 치료에 사용하게 된다. 유방암의 진단 및 치료에 가장 유용하게 사용되는 유방암 특이 진단 마커인 HER2/neu 유전자의 증폭 및 과발현은 침습성 유방암의 20 ~ 35%에서 발견된다. 따라서, HER2/neu 검사는 에스트로겐 수용체 검사와 더불어 유방암 환자의 치료에 결정적인 역할을 한다.

[0004] 그러나, 유방암 환자 모두가 ER 유전자나 Her2/neu 유전자가 과발현되어 있는 것은 아니므로, 이러한 진단 방법들의 단점을 보완하고 좀더 빠르고 확실하게 암을 구분하기 위하여 암 특이적 종양표지자(biomarker)를 찾기 위한 시도가 다양하게 이루어지고 있으며, 이를 이용한 새로운 진단 방법들이 최근 소개되고 있다. 최근 미국에서 Oncotype DX라고 하는 21-gene assay (Oncotype DX, Genomic Health, Redwood City, CA)와 MammaPrint라고 하는 70-gene assay (MammaPrint, Agendia, Amsterdam, the Netherlands)가 제형화 되어 임상에서 실제 사용되고 있다. Oncotype DX는 실시간 정량 PCR 방법으로 16개의 유방암 관련 유전자와 5개의 대조군 유전자를 검사는 방법이고, MammaPrint는 70개의 유전자를 마이크로어레이 방법으로 검사하는 방법이다. 이들 두 방법은 1차 수술 이후, 부가 치료를 어떠한 방식으로 할 지에 관한 표준을 제시하고 있으며, 이로 인해 개인 맞춤 치료가 가능하게 되었다 (Am J Health-Syst Pharm Vol 65 Jan 1, 2008 23-28).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명자들은 유방암 진단 과정에서 수득할 수 있는 미량의 조직으로부터 전체 RNA(total RNA)를 분리하고, 이를 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성한 다음, 특이적 프라이머를 이용한 실시간 중합효소 반응을 통하여 조직 내에 포함되어 있는 KRT15 유전자, ECRG4 유전자, INHBA 유전자, ISG15 유전자, 또는 MMP11 유전자의 발현 정도, 특히 상기 유전자 전사체의 특정 부위의 발현 정도가 유방암과 유의적으로 관련이 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였고, 상기 유방암 관련 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독, 또는 이들의 조합을 유방암 진단용 바이오마커 또는 바이오마커 조성물로 사용하여 유방암 유무를 간단하게 확인할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

[0006] 본 발명은 유방암 환자 조직과 정상 조직간에서 발현 수준의 차이를 보이며, 유방암의 초기 단계를 진단하는데 이용될 수 있는 신규 바이오마커 및 이에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제를 제공하는 데 그 목적이 있다.

[0007] 또한, 유방암 진단에 대한 특이도와 민감도를 향상시킬 수 있는 바이오마커 조성물 및 이에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제 조성물을 제공하는 데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

- [0008] 본 발명의 일 목적은 유방암 조직에서 특이적으로 저발현되는 유전자인 KRT15 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독, 또는 ECRG4 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독으로 유방암 진단용 바이오마커를 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [0009] 아울러, 본 발명의 일 목적은 KRT15 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 단독 또는 ECRG4 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 단독을 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제를 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 1) KRT15 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA 및 ECRG4 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA로 이루어진 유방암 진단용 바이오마커 조성물, 2) KRT15 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA 및 ECRG4 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 바이오마커와 INHBA 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA, ISG15 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA, 및 MMP11 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 바이오마커로 이루어진 유방암 진단용 바이오마커 조성물을 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [0011] 아울러, 본 발명의 다른 목적은 3) KRT15 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 및 ECRG4 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제 조성물, 4) KRT15 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 및 ECRG4 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 프로브와 INHBA 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브, ISG15 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브, 및 MMP11 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제 조성물을 제공함으로써 달성될 수 있다.

효과

- [0012] 검체의 조직으로부터 본 발명의 유방암 진단용 바이오마커를 구성하는 유전자인 KRT15의 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독 또는 ECRG4의 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독의 발현 수준을 측정하고 이를 정상 조직에서의 발현 수준과 비교하는 경우 유방암, 특히 초기단계로서 진행단계가 1기인 유방암을 효과적으로 진단할 수 있고, 이를 통해 유방암을 조기에 치료할 수 있다. 아울러, 본 발명의 유방암 바이오마커 조성물을 구성하는 유전자자의 DNA 단편 내지 전장 DNA의 발현 수준을 측정하고 이를 정상 조직에서의 발현 수준과 비교하는 경우 유방암의 진단에 대한 특이도와 민감도를 향상시킬 수 있다. 이때, 본 발명의 유방암 진단제 또는 유방암 진단제 조성물을 이용하는 경우 유방암 진단용 바이오마커 또는 바이오마커 조성물을 구성하는 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA의 발현 수준을 쉽게 측정할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 유방암 조직에서 정상 조직보다 특이적으로 저발현되는 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA와 고발현되는 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA를 바이오마커로 이용하고, 상기 바이오마커를 구성하는 유전자의 특정 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하여 발현 수준을 측정할 수 있는 프로브를 진단제의 유효성분으로 이용한다. 본 발명의 바람직한 일 실시예에서 유방암 진단용 바이오마커로 사용되는 유전자의 정보 및 전장 DNA의 서열번호는 표 1과 같고, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는데 사용되는 프로브, 프로브의 서열번호 및 프로브가 인식할 수 있는 유전자 mRNA상의 염기서열 위치는 표 2와 같고, 상기 프로브 및 각 유전자의 cDNA를 이용한 정량 실시간 PCR(quantitative real-time PCR, QRT-PCR) 방법에 의해 측정되어지는 각 유전자의 특정 DNA 단편의 서열번호, 염기서열 길이 및 녹는점은 표 3과 같다.

표 1

유전자	mRNA 전방크 승인번호	mRNA 염기서열의 길이	전장 DNA 서열번호
KRT15(keratin 15)	NM_002275	1861 bp	서열번호 2
ECRG4(esophageal cancer related gene 4 protein)	NM_032411	793 bp	서열번호 6
INHBA(inhibin, beta A)	NM_002192	2175 bp	서열번호 10
ISG15(ISG15 ubiquitin-like modifier)	NM_005101	685 bp	서열번호 14

MMP11(matrix metalloproteinase 11)	NM_005940	2276 bp	서열번호 18
------------------------------------	-----------	---------	---------

표 2

[0015]

유전자	프로브	프로브 서열번호	프로브가 인식하는 유전자 mRNA상의 염기서열 위치
KRT15(keratin 15)	센스 프라이머	서열번호 3	665~744
	안티센스 프라이머	서열번호 4	
ECRG4(esophageal cancer related gene 4 protein)	센스 프라이머	서열번호 7	288~361
	안티센스 프라이머	서열번호 8	
INHBA(inhibin, beta A)	센스 프라이머	서열번호 11	1178~1262
	안티센스 프라이머	서열번호 12	
ISG15(ISG15 ubiquitin-like modifier)	센스 프라이머	서열번호 15	140~220
	안티센스 프라이머	서열번호 16	
MMP11(matrix metalloproteinase 11)	센스 프라이머	서열번호 19	1801~1894
	안티센스 프라이머	서열번호 20	

표 3

[0016]

유전자	프로브	프로브에 의해 측정되는 유전자 DNA 단편의 서열번호	유전자 DNA 단편의 염기서열 길이	유전자 DNA 단편의 녹는점(℃)
KRT15(keratin 15)	서열번호 3, 서열번호 4	서열번호 1	80	57.92~58.02
ECRG4(esophageal cancer related gene 4 protein)	서열번호 7, 서열번호 8	서열번호 5	74	57.66~57.86
INHBA(inhibin, beta A)	서열번호 11, 서열번호 12	서열번호 9	85	57.92~57.98
ISG15(ISG15 ubiquitin-like modifier)	서열번호 15, 서열번호 16	서열번호 13	81	57.90~58.20
MMP11(matrix metalloproteinase 11)	서열번호 19, 서열번호 20	서열번호 17	94	57.94~58.00

[0017]

본 발명의 일 측면은 유방암 진단용 바이오마커 및 이에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함하는 유방암 진단제에 관한 것이다.

[0018]

본 발명은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA로 이루어지는 유방암 진단용 바이오마커, 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA로 이루어지는 유방암 진단용 바이오마커를 제공한다. KRT15 유전자 또는 ECRG4 유전자는 유방암 조직에서 정상 조직보다 특이적으로 저발현되는 것을 특징으로 하기 때문에 각 유전자의 전장 DNA를 유방암 진단용 바이오마커로 사용될 수 있으며, 특히 검체 조직에서의 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 KRT15 유전자의 DNA 단편의 양, 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ECRG4 유전자의 DNA 단편의 양을 통해 각각 KRT15 유전자의 정량적인 발현 수준과 ECRG4 유전자의 정량적인 발현 수준을 간접적으로 측정할 수 있으므로 각 DNA 단편 또한 유방암 진단용 바이오마커로 사용될 수 있다.

- [0019] 본 발명은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제 또는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제를 제공한다. 이때 프로브는 각 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하여 각 유전자의 DNA 단편의 양 내지 각 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 각 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 상보적으로 결합하여 증폭할 수 있는 프라이머쌍이고, 보다 바람직하게는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 인식할 수 있는 서열번호 3의 센스 프라이머와 서열번호 4의 안티센스 프라이머, 또는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 인식할 수 있는 서열번호 7의 센스 프라이머와 서열번호 8의 안티센스 프라이머로 구성된다.
- [0020] 본 발명의 유방암 진단용 바이오마커와 유방암 진단제를 이용하여 유방암을 진단하는 방법은 정량 실시간 PCR(quantitative real-time PCR, QRT-PCR) 방법을 포함하여 본 발명의 업계에서 사용되는 방법이라면 특별히 제한되지 않으며, 바람직한 일 실시예로서 a) 검체의 유방 조직으로부터 전체 RNA(total RNA)를 분리하는 단계, b) 분리된 RNA로부터 역전사효소(Reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하는 단계, c) 합성한 cDNA를 주형으로 하고 정량 실시간 PCR(quantitative real-time PCR, QRT-PCR) 반응을 통해 특정 유전자(KRT15 유전자 또는 ECRG4 유전자)의 전장 cDNA 또는 cDNA 단편을 증폭하는 단계, d) 증폭된 전장 cDNA 또는 cDNA 단편의 양으로부터 특정 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계, e) 측정된 검체 유방 조직의 특정 유전자의 발현 수준과 정상 조직의 특정 유전자의 발현 수준을 비교하여 유방암 여부를 판정하는 단계를 포함한다.
- [0021] 상기의 유방암 진단방법 중 b) 단계는 역전사효소와 18~20 bp 길이의 올리고디티(oligo dT) 프라이머를 포함하는 하나의 키트에 의해 구현될 수 있고, c)와 d)단계는 열안정성 중합효소(hot-start Taq), KRT15 유전자(또는 ECRG4 유전자)의 전장 cDNA 또는 cDNA 단편에 상보적으로 결합하여 전장 cDNA 또는 cDNA 단편을 증폭할 수 있는 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 완충액, cDNA 또는 cDNA 단편의 양을 정량하는데 필요한 형광물질(일례로 SYBR Green I) 등으로 구성된 유방암 진단용 정량 실시간 PCR 반응 혼합물(pre-mixture)을 포함하는 하나의 키트에 의해 구현될 수 있고, 모든 단계의 유방암 진단방법은 각 단계를 구현하는 키트 내지 장치를 하나의 칩으로 구성된 랩온어칩(Lab on a chip, LOC)에 의해 구현될 수 있다.
- [0022] 아울러, 특정 유전자의 발현 수준인 mRNA의 양과 상기 mRNA에 의해 생성되는 단백질의 양은 일반적으로 비례관계에 있으므로, KRT15 단백질 또는 ECRG4 단백질을 유방암 진단용 바이오마커로 이용할 수 있고 KRT15 단백질 또는 ECRG4 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 유방암 진단제로 이용할 수 있음은 본 발명의 기술분야에서 통상의 지식을 가진자에게 자명하다.
- [0023] 본 발명의 유방암 진단용 바이오마커와 유방암 진단제를 이용하여 진단할 수 있는 유방암의 진행단계는 1기 내지 4기를 포함하고, 특히 유방암의 진행단계가 1기인 경우에도 높은 수준의 민감도와 특이도를 유지할 수 있으므로, 본 발명의 유방암 진단용 바이오마커와 유방암 진단제를 이용하는 경우 초기단계에 있는 유방암을 진단하여 조기에 치료할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 측면은 유방암 진단용 바이오마커 조성물 및 이에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함하는 유방암 진단제 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 이하, 유방암의 진단방법, 진단할 수 있는 유방암의 진행단계, 각 유전자의 단백질을 유방암 진단용 바이오마커로 이용하고 항체를 유방암 진단제로 이용하는 내용은 앞에서 기술한 것과 동일하므로 생략한다.
- [0026] 본 발명은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA; 및 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA로 이루어지는 유방암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0027] KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독 또는 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독으로 이루어진 유방암 진단용 바이오마커를 이용하여 유방암을 진단하는 경우 로지스틱 회귀분석에 의한 특이도(Specificity, 정상인을 정상으로 판정할 확률)가 대략 30~50%이나, 유방암 조직에서 특이적으로 저발현되는 두 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA를 조합한 유방암 진단용 바이오마커 조성물을 이용하여 유방암을 진단하는 경우 로지스틱 회귀분석에 의한 특이도가 거의 70%가까이 증가하여 진단하고자 하는 검체의 분류 정확도를 높일 수 있다.
- [0028] 아울러, 본 발명은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이

적으로 결합하는 프로브 및 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제 조성물을 제공한다. 이때, KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 대한 프로브는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 인식할 수 있는 서열번호 3의 센스 프라이머와 서열번호 4의 안티센스 프라이머로 구성되고, ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 대한 프로브는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 인식할 수 있는 서열번호 7의 센스 프라이머와 서열번호 8의 안티센스 프라이머로 구성되는 것이 바람직하다.

[0029] 본 발명은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA 및 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA로 구성되는 그룹으로부터 하나 이상 선택되고, 유방암 조직에서 특이적으로 저발현되는 것을 특징으로 하는 바이오마커; 및 서열번호 9의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 INHBA 유전자의 DNA 내지 또는 전장 DNA, 서열번호 13의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ISG15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA, 및 서열번호 17의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 MMP11 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA로 구성되는 그룹으로부터 하나 이상 선택되고, 유방암 조직에서 특이적으로 고발현되는 것을 특징으로 하는 바이오마커로 이루어진 유방암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0030] 유방암 조직에서 특이적으로 저발현되는 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA와 유방암 조직에서 특이적으로 고발현되는 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA를 조합하고, 이를 유방암 진단용 바이오마커 조성물로 이용하는 경우 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독 또는 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA 단독으로 이루어진 유방암 진단용 바이오마커를 이용하여 유방암을 진단하는 경우보다 로지스틱 회귀분석에 의한 민감도(암환자를 암으로 판정할 확률, Sensitivity) 또는 특이도가 증가하여 검체의 분류 정확도를 높일수 있다.

[0031] 아울러, 본 발명은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 및 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 프로브; 및 서열번호 9의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 INHBA 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브, 서열번호 13의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 ISG15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브, 및 서열번호 17의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 MMP11 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단제 조성물을 제공한다. 이때, KRT15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 대한 프로브는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 인식할 수 있는 서열번호 3의 센스 프라이머와 서열번호 4의 안티센스 프라이머로 구성되고, ECRG4 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 대한 프로브는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 인식할 수 있는 서열번호 7의 센스 프라이머와 서열번호 8의 안티센스 프라이머로 구성되고, INHBA 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 대한 프로브는 서열번호 9의 폴리뉴클레오티드를 인식할 수 있는 서열번호 11의 센스 프라이머 및 서열번호 12의 안티센스 프라이머로 구성되고, ISG15 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 대한 프로브는 서열번호 13의 폴리뉴클레오티드를 인식할 수 있는 서열번호 15의 센스 프라이머 및 서열번호 16의 안티센스 프라이머로 구성되고, MMP11 유전자의 DNA 단편 내지 전장 DNA에 대한 프로브는 서열번호 17의 폴리뉴클레오티드를 인식할 수 있는 서열번호 19의 센스 프라이머 및 서열번호 20의 안티센스 프라이머로 구성되는 것이 바람직하다.

[0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 명확하게 설명하기 위한 것일뿐, 본 발명의 권리범위가 실시예에 의해 제한되지 않는다.

[0033] 실시예 1. 유방암 진단용 후보 바이오마커의 선별

[0034] 정상조직 27개 및 유방암 조직 78개로부터 전체 RNA를 분리한 후 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하고, Affymetrix 사의 GeneChip 시스템인 U133 GeneChip(45000 probe sets, 39,000 transcripts)에 혼성화(hybridization)시켜 유전자 발현 양상, 즉 mRNA의 양을 분석하였다. 이때 적절한 조직 시료는 PCR 통계 분석법(Principal Component Analysis: 각 시료의 발현 유사성을 조사하는 통계적 분석법)을 이용하여 구하였고, 분석된 mRNA의 양을 기초로 발현도가 통계적 유의성을 가지고 변하는 유전자들을 확보하였다($p\text{-value} \leq 0.05$, fold change ≥ 3.0). 본 실험을 통하여 9개의 유전자를 확보하였고, 구체적으로 유방암 고발현 유전자인 INHBA, HIST2H2AA, FNDC1, MMP11, CXCL9, CXCL10, ISG15 와 유방암 저발현 유전자인 ECRG4, KRT15 이었다. 이중 KRT15, ECRG4, INHBA, ISG15, MMP11을 유방암 진단용 후보 바이오마커로 선별하였다.

[0035] 실시예 2. 선별된 유방암 진단용 후보 바이오마커의 유방암 진행 단계에 따른 발현수준 분석

[0036] (1) 선별된 유방암 진단용 후보 바이오마커의 발현수준 측정

[0037] 16명의 암이 아니라고 판정된 환자 조직으로부터 분리한 유방 조직과 실제 암으로 판정된 128명의 유방암 환자로부터 분리한 유방암 조직을 가지고, 정량 실시간 PCR (quantitative real-time PCR, QRT-PCR) 방법을 이용하여 선별된 유방암 진단용 후보 바이오마커인 KRT15, ECRG4, INHBA, ISG15, MMP11의 발현량을 분석하였다. 이때 정상인의 정보와 유방암 환자의 진행단계 별 정보는 표 4에 나타나는 바와 같다.

표 4

[0038]

환자 구분	유방암 진행단계	환자수	나이 평균값
정상인		16	45.9
유방암 환자	1기	23	60.3
	2A기	36	56.4
	2B기	23	55.3
	3A기	22	54.6
	3B기	6	66.2
	3C기	13	52.4
	4기	5	46.6

[0039] 먼저 검체의 조직으로부터 전체 RNA를 분리하고, 역전사효소 및 올리고디티(oligo dT) 프라이머를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 열안정성 중합효소(hot-start Taq), 프라이머, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 완충액, SYBR Green I 형광물질로 구성된 정량 실시간 PCR 반응 전혼합물(pre-mixture)을 이용한 정량 실시간 PCR 반응법으로 유방암 진단용 후보 바이오마커 유전자의 발현수준을 측정하였다. 이때 유방암 진단용 후보 바이오마커 유전자의 발현수준은 대조군으로 사용된 베타액틴(actin, beta; ACTB)의 발현량을 기준으로 하여 상대적인 발현량으로 계산하였다.

[0040] 정량 실시간 PCR 반응법에서 각 유전자의 cDNA를 증폭하는 데 사용된 프라이머는 표 2의 센스 프라이머 및 안티 센스 프라이머이고, 증폭된 cDNA 단편은 각각 표 3에 나타난 서열번호 1, 서열번호 5, 서열번호 9, 서열번호 13, 서열번호 17의 폴리뉴클레오티드이었다. 또한, 베타액틴 유전자의 cDNA를 증폭하는 데 사용된 프라이머는 서열번호 21의 센스 프라이머와 서열번호 22의 안티센스 프라이머이고, 그에 의해 증폭된 cDNA 단편은 베타액틴 유전자의 제넨코 승인번호 NM_001101에 나타나는 염기서열의 876~963 위치에 해당하는 88개 염기의 폴리뉴클레오티드이고 녹는점은 57.88~57.98℃의 범위를 가진다.

[0041] 도 1은 정상인의 정상 조직과 진행단계별 유방암 환자의 유방암 조직에서의 유방암 진단용 후보 바이오마커 유전자의 발현수준을 나타낸 그래프로서, 도 1A는 INHBA 유전자를, 도 1B는 MMP11 유전자를, 도 1C는 ISG15 유전자를, 도 1D는 KRT15 유전자를, 도 1E는 ECRG4 유전자를 나타낸 것이다. 도 1에서 y축은 베타액틴(Beta-Actin)의 발현량을 기준으로 한 상대적인 발현량을 의미하는 것으로서, 값 "1"은 베타액틴의 발현량과 동일한 양이 발현됨을 의미한다. 도 1에서 보이는 바와 같이 KRT15 유전자와 ECRG4 유전자는 대부분의 진행단계별 유방암 환자의 유방암 조직에서 정상인의 정상조직보다 약 10~100배 수준으로 저발현되었고, INHBA 유전자, ISG15 유전자 및 MMP11 유전자는 대부분의 진행단계별 유방암 환자의 유방암 조직에서 정상인의 정상조직보다 약 10~100배 수준으로 고발현되었다.

[0042] (2) ROC(receiver operating characteristic) 커브 분석을 통한 선별된 유방암 진단용 후보 바이오마커의 유방암 진단 성능

[0043] 유방암 진단용 후보 바이오마커의 유방암 진단에 대한 민감도 및 특이성을 알아보기 위하여 유방암 진단용 후보 바이오마커의 발현수준을 기초로 ROC 커브를 작성하였다. 이때 계산은 MedCalcversion10.1.7.0 프로그램을 사용하였다.

[0044] 도 2는 유방암 환자의 진행단계를 고려하지 않은 유방암 진단용 후보 바이오마커의 발현수준에 대한 ROC 커브를 나타낸 그래프로서, 도 2A는 도 1을 재구성한 것이고, 도 2B는 각 유전자별 ROC 커브이다. ROC 커브에서 y축은 민감도(sensitivity, 암환자를 암으로 판정할 확률)를, x축은 정상인을 암으로 판정할 확률인 FPR(False positive rate)을 의미하고, 백분율을 기준으로 "100-FPR"은 특이도(specificity, 정상인을 정상으로 판정할

확률)를 의미한다. 도 2에서 보이는 바와 같이 선별된 유방암 진단용 후보 바이오마커는 유방암 진단에 대한 높은 민감도와 특이도를 가지고 있다.

[0045] 암과 정상의 판정기준을 특정 임계값으로 설정하였을때 유방암 진단용 후보 바이오마커의 유방암 환자의 진행단계를 고려하지 않은 전체 단계의 유방암 진단에 대한 민감도와 특이도를 표 5에 나타내었다. 표 5에서 나타내는 바와 같이 후보 바이오마커는 높은 민감도와 특이도를 가지고 있고, 특히 KRT15와 ECRG4는 다른 후보 바이오마커보다 더 높은 민감도를 보였다.

표 5

구분	ECRG4	ISG15	INHBA	KRT15	MMP11
민감도(%)	89.8	74.2	78.9	91.4	71.9
특이도(%)	100	100	93.7	93.7	93.7
임계값	≤ 0.3511	> 2.395	> 1.9834	≤ 0.4577	> 2.4751
P value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

[0047] 여기서, 임계값을 살펴보면, 유방암 조직에서 저발현되는 KRT15, ECRG4의 경우 검체 조직에서의 각 유전자의 베타액틴(Beta-Actin) 발현량을 기준으로 한 상대적인 발현량이 각각 0.4577이하, 0.3511 이하이면 암으로 판정하고, 초과하면 정상으로 판정함을 의미하고, 유방암 조직에서 고발현되는 INHBA, ISG15, MMP11의 경우 반대로 해석된다.

[0048] 도 3은 진행단계가 1기인 유방암 환자만을 대상으로 하여 유방암 진단용 후보 바이오마커의 발현수준에 대한 ROC 커브를 나타낸 그래프로서, 도 3A는 도 1의 진행단계가 1기인 유방암 환자만의 값을 재구성한 것이고, 도 3B는 진행단계가 1기인 유방암 환자만을 대상으로 한 각 유전자별 ROC 커브이다. 또한, 표 6은 암과 정상의 판정기준을 특정 임계값으로 설정하였을때 유방암 진단용 후보 바이오마커의 진행단계가 1기인 유방암 진단에 대한 민감도와 특이도를 나타낸 것이다.

표 6

구분	ECRG4	ISG15	INHBA	KRT15	MMP11
민감도(%)	78.3	82.5	91.3	82.6	69.6
특이도(%)	100	100	93.7	87.5	100
임계값	≤ 0.3511	> 2.395	> 1.9834	≤ 0.4577	> 2.4751
P value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

[0050] 도 3과 표 6에서 나타나는 바와 같이 진행단계가 1기인 유방암 진단에 대한 ROC 커브의 패턴 민감도, 특이도는 도 2 및 표 5의 진행단계가 전체인 유방암 진단의 경우와 거의 유사하므로, 선별된 유방암 진단용 후보 바이오마커를 이용하여 진행단계가 1기인 유방암을 효과적으로 진단할 수 있고, 이를 통해 조기에 유방암을 치료할 수 있다.

[0051] (3) 로지스틱 회귀분석을 통한 유방암 진단용 후보 바이오마커 조합의 진단 성능 분석

[0052] 유방암 조직에서 특이적으로 저발현되는 유전자인 KRT15 또는 ECRG4 하나만을 유방암 진단용 바이오마커로 이용하는 경우와 유방암 조직에서 특이적으로 저발현 또는 고발현되는 유전자인 KRT15, ECRG4, INHBA, ISG15, MMP11의 조합을 유방암 진단용 바이오마커로 이용하는 경우의 진단 정확도를 알아보기 위하여 로지스틱 회귀분석을 실시하였고, 그 결과를 표 7에 나타내었다. 단, 하나만의 유전자를 유방암 진단용 바이오마커로 사용하는 경우 ROC 커브에 의한 진단 성능 값과 로지스틱 회귀분석에 의한 진단 성능 값은 차이가 있을 수 있다.

표 7

[0053]

바이오마커 유전자의 조합수	KRT15	ECRG4	ISG15	INHBA	MMP11	특이도(정상 구분률)(%)	민감도(암 구분률)(%)	진단 정확도(%)
1	○					31.25	96.87	89.58
		○				50	96.87	91.67
2	○	○				68.75	96.87	93.75
	○		○			75	99.22	96.53
	○			○		68.75	98.44	95.14
	○				○	50	98.44	93.06
		○	○			81.25	98.44	96.53
		○		○		68.75	97.66	94.44
		○			○	62.5	97.66	93.75
3	○	○	○			75	97.66	95.14
	○	○		○		75	99.22	96.53
	○	○			○	75	96.87	94.44
	○		○	○		81.25	99.22	97.22
	○		○		○	81.25	96.87	95.14
	○			○	○	75	97.66	95.14
		○	○	○		93.75	99.22	98.61
		○	○		○	87.5	99.22	97.92
		○		○	○	81.25	98.44	96.53
4	○	○	○	○		93.75	99.22	98.61
	○	○	○		○	87.5	99.22	97.92
	○	○		○	○	81.25	98.44	96.53
	○		○	○	○	75	97.66	95.14
		○	○	○	○	93.75	99.22	98.61
5	○	○	○	○	○	93.75	99.22	98.61

[0054]

표 7에서 나타나는 바와 같이 KRT15 유전자만을 유방암 진단용 바이오마커로 사용하는 경우 유방암 환자를 유방암으로 판정할 확률은 96.87%이고 정상인을 정상으로 판정할 확률은 31.25%인데 반해, KRT15 유전자와 ECRG4 유전자를 조합하여 유방암 진단용 바이오마커로 사용하면 정상인을 정상으로 판정할 확률이 50%로 증가하고, 결과적으로 진단 정확도가 높아진다. KRT15, ECRG4, INHBA, ISG15, MMP11의 조합수가 증가할수록 유방암 환자를 유방암으로 판정할 확률 또는 정상인을 정상으로 판정할 확률이 증가하므로 유방암 진단용 바이오마커의 조합을 통해 진단 정확도를 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0055]

도 1은 정상인의 정상 조직과 진행단계별 유방암 환자의 유방암 조직에서의 유방암 진단용 후보 바이오마커 유전자의 발현수준을 나타낸 그래프로서, 도 1A는 INHBA 유전자를, 도 1B는 MMP11 유전자를, 도 1C는 ISG15 유전자를, 도 1D는 KRT15 유전자를, 도 1E는 ECRG4 유전자를 나타낸 것이다.

[0056]

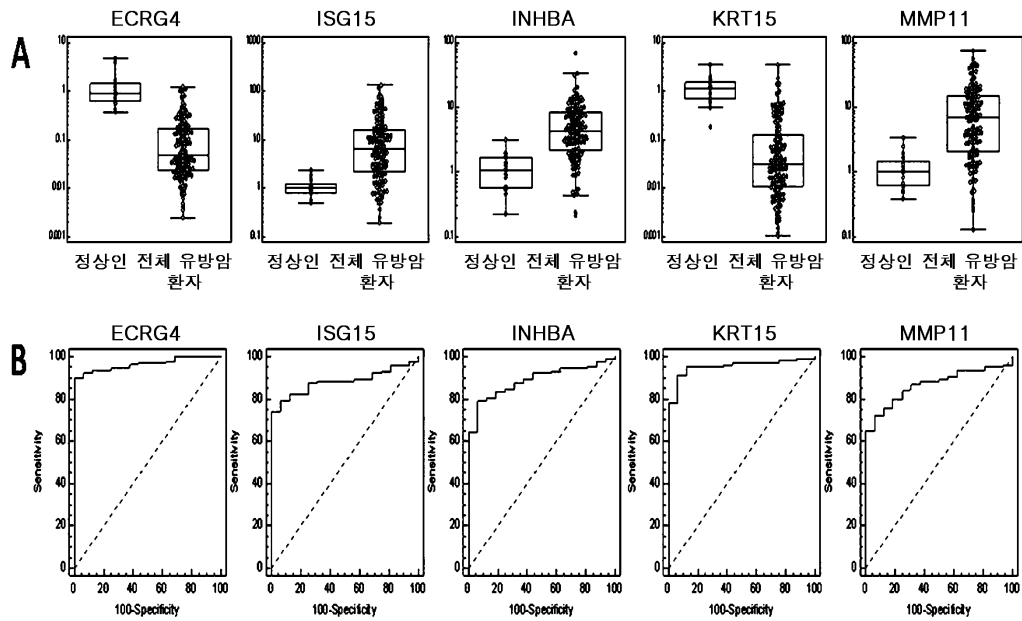
도 2는 유방암 환자의 진행단계를 고려하지 않은 유방암 진단용 후보 바이오마커의 발현수준에 대한 ROC 커브를 나타낸 그래프로서, 도 2A는 도 1을 재구성한 것이고, 도 2B는 각 유전자별 ROC 커브이다.

[0057]

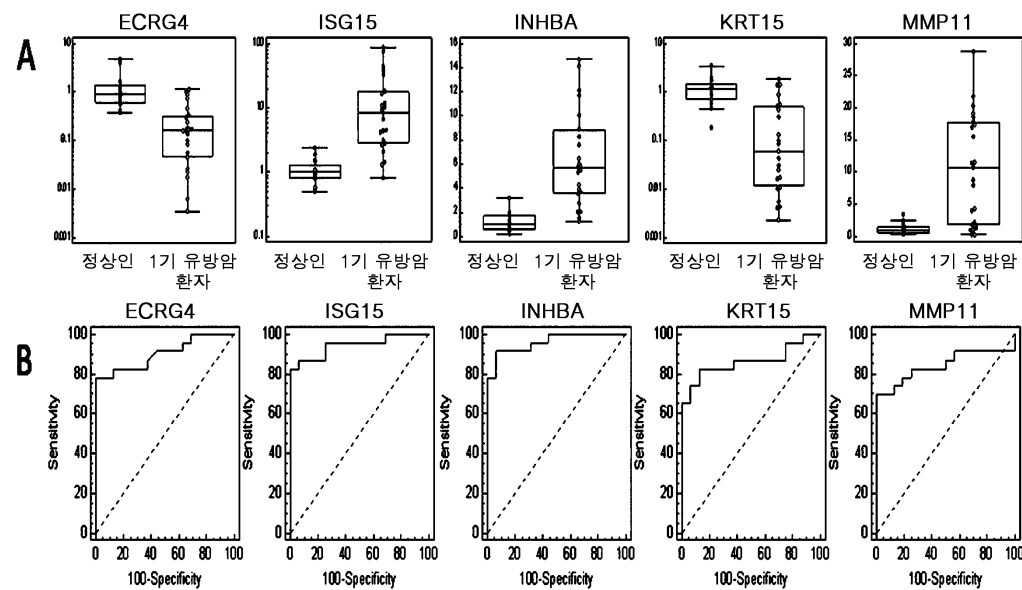
도 3은 진행단계가 1기인 유방암 환자만을 대상으로 하여 유방암 진단용 후보 바이오마커의 발현수준에 대한 ROC 커브를 나타낸 그래프로서, 도 3A는 도 1의 진행단계가 1기인 유방암 환자만의 값을 재구성한 것이고, 도 3B는 진행단계가 1기인 유방암 환자만을 대상으로 한 각 유전자별 ROC 커브이다.



도면2



도면3



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University
 <120> Biomarker for diagnosing breast cancer and diagnostic agent for breast cancer

<130> P08-06795

<160> 22

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide fragment of KRT15 gene

<400> 1

gaccattgaa gagctccggg acaagatcat ggccaccacc atcgacaact cccgggtcat 60

cctggagatc gacaatgcca 80

<210> 2

<211> 1861

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cactcaaggt gtgcaggcag ctgtgtttgt caggaaggca gaaggagtgt gctttgcttt 60

aggggaggag acgaggtccc acaacacct ctgaagggtata tataaggagc cccagcgtgc 120

agcctggcct ggtacctcct gccagcatct ctgggttttg ctgagaactc acgggctcca 180

gctacctggc catgaccacc acatttctgc aaacttcttc ctccaccttt gggggtggct 240

caaccgagg ggggttcctc ctggctgggg gaggtggctt tggtaggggg agtctctctg 300

ggggaggtgg aagccgaagt atctcagctt cttctgctag gtttctctct tcagggtcag 360

gaggaggata tgggggtggc atgagggtct gtggcttttg tggaggggct ggtagtgttt 420

tcggtggagg ctttggaggg ggcgttgggt ggggttttgg tggtaggcttt ggtggtggcg 480

atggtggtct cctctctggc aatgagaaaa ttaccatgca gaacctcaat gaccgcctgg 540

cctcctacct ggacaaggta cgtgccctgg aggaggccaa tgctgacctg gagtgaaga	600
tccatgactg gtaccagaag cagaccccaa ccagcccaga atgcgactac agccaatact	660
tcaagacat tgaagagctc cgggacaaga tcatggccac caccatcgac aactcccggg	720
tcatcctgga gatcgacaat gccaggctgg ctgcggacga cttcaggctc aagtatgaga	780
atgagctggc cctgcgccag ggcgttgagg ctgacatcaa cggcttgccg cgagtctgg	840
atgagctgac cctggccagg actgacctgg agatgcagat cgagggcctg aatgaggagc	900
tagcctacct gaagaagaac cacgaagagg agatgaagga gttcagcagc cagctggccg	960
gccaggtcaa tgtggagatg gacgcagcac cgggtgtgga cctgaccctg gtgctggcag	1020
agatgaggga gcagtacgag gccatggcgg agaagaaccg ccgggatgtc gaggcctggt	1080
tcttcagcaa gactgaggag ctgaacaaag aggtggcctc caacacagaa atgatccaga	1140
ccagcaagac ggagatcaca gacctgagac gcacgatgca ggagctggag atcgagctgc	1200
agtcccagct cagcatgaaa gctgggctgg agaactcact ggccgagaca gagtgccgct	1260
atgccacgca gctgcagcag atccaggggc tcattggtgg cctggaggcc cagctgagtg	1320
agctccgatg cgagatggag gctcagaacc aggagtacaa gatgctgctt gacataaaga	1380
cacggctgga gcaggagatc gctacttacc gcagcctgct cgagggccag gatgccaaga	1440
tggctggcat tggcatcagg gaagcctctt caggaggtgg tggtagcagc agcaatttcc	1500
acatcaatgt agaagagtca gtggatggac aggtggtttc ttcccacaag agagaaatct	1560
aagtgtctat tgcaggagaa acgtcccttg ccactcccca ctctcatcag gccaaagtga	1620
ggactggcca gagggcctgc acatgcaaac tccagtcctt gccttcagag agctgaaaag	1680

ggtcctcggg tcttttatit cagggttttg catgcgtctt attccccctc tgcctctccc 1740

caccttcttt ggagcaagga gatgcagctg tattgtgtaa caagtcatt tgtacagtgt 1800

ctgttcatgt aataaagaat tacttttctt ttgcaaata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860

a 1861

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sense Primer of KRT15 gene

<400> 3
gaccattgaa gagctccggg 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense primer of KRT15 gene

<400> 4
tggcattgtc gatctccagg 20

<210> 5
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polynucleotide fragment of ECRG4 gene

<400> 5

attccttggc agcctgaagc gccagaagcg gcagctgtgg gaccggactc ggcccagagt 60

gcagcagtgg tacc 74

<210> 6
 <211> 793
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 ggataaccgc cgcccgcgcc tgcccgtcg caccctctc ccgcgcccg ttctccctcg 60

cagcacctcg aagtgcgccc ctgcacctc tgctcgcgcc ccgcgccat ggctgcctcc 120

cccgcgcggc ctgctgtcct ggccctgacc gggtggcg tgctcctgct cctgtgctgg 180

ggcccaggtg gcataagtgg aaataaactc aagctgatgc ttcaaaaacg agaagcacct 240

gttccaacta agactaaagt ggccgttgat gagaataaag ccaaagaatt ccttggcagc 300

ctgaagcgcc agaagcgcca gctgtgggac cggactcggc ccgaggtgca gcagtggtag 360

cagcagtttc tctacatggg ctttgacgaa gcgaaatttg aagatgacat cacctattgg 420

cttaacagag atcgaaatgg acatgaatac tatggcgatt actaccaacg tcactatgat 480

gaagactctg caattgggcc ccggagcccc tacggcttta ggcatggagc cagcgtaac 540

tacgatgact actaaccatg acttgccaca cgtgtacaa gaagcaaata gcgattctct 600

tcatgtatct cctaatgcct tacactactt ggtttctgat ttgctctatt tcagcagatc 660

ttttctacct actttgtgtg atcaaaaaag aagagttaaa acaacacatg taaatgcctt 720

ttgatatttc atgggaatgc ctctcattta aaaatagaaa taaagcattt tgttaaaaag 780

aaaaaaaaa aaa 793

<210> 7

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sense primer of ECRG4 gene

<400> 7
 attccttggc agcctgaagc 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense primer of ECRG4 gene

<400> 8
 ggtaccactg ctgcacctcg 20

<210> 9
 <211> 85
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Polynucleotide fragment of INHBA gene

<400> 9
 ggcttggagt gtgatggcaa ggtcaacatc tgctgtaaga aacagttctt tgtcagtttc 60

aaggacatcg gctggaatga ctgga 85

<210> 10
 <211> 2175
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10

agtacagtat aaaacttcac agtgccaata ccatgaagag gagctcagac agctcttacc	60
acatgataca agagccggct ggtggaagag tggggaccag aaagagaatt tgctgaagag	120
gagaaggaaa aaaaaaacac caaaaaaaaa aataaaaaaa tccacacaca caaaaaaacc	180
tcgcgtgag gggggaggaa aagcagggcc ttttaaaaag gcaatcaca caacttttgc	240
tgccaggatg ccttgcctt ggctgagagg atttctgttg gcaagttgct ggattatagt	300
gaggagtcc cccaccccag gatccgaggg gcacagcgcg gccccgact gtccgtcctg	360
tcgcgtggcc gccctccaa aggatgtacc caactctcag ccagagatgg tggaggccgt	420
caagaagcac attttaaca tgctgcactt gaagaagaga cccgatgtca cccagccggt	480
accaaggcg gcgttctga acgcgatcag aaagcttcat gtgggcaaag tcggggagaa	540
cgggtatgtg gagatagagg atgacattgg aaggagggca gaaatgaatg aacttatgga	600
gcagacctcg gagatcatca cgtttgccga gtcaggaaca gccaggaaga cgctgcactt	660
cgagatttcc aaggaaggca gtgacctgtc agtgggtggag cgtgcagaag tctggctctt	720
cctaaaagtc cccaaggcca acaggaccag gaccaaagtc accatccgc tcttcagca	780
gcagaagcac ccgcagggca gcttggacac aggggaagag gccaggaag tgggcttaaa	840
gggggagagg agtgaactgt tgctctctga aaaagtagta gacgctcgga agagcacctg	900
gcatgtcttc cctgtctcca gcagcatcca gcggttgctg gaccagggca agagctccct	960
ggacgttcgg attgccgtg agcagtgcca ggagagtggc gccagcttgg ttctcctggg	1020
caagaagaag aagaaagaag aggaggggga agggaaaaag aagggcggag gtgaagggtg	1080
ggcaggagca gatgaggaaa aggagcagtc gcacagacct ttcctcatgc tgcaggcccc	1140
gcagtctgaa gaccaccctc atcgccggcg tcggcggggc ttggagtgtg atggcaaggt	1200

caacatctgc tgtaagaaac agttctttgt cagtttcaag gacatcggt ggaatgactg	1260
gatcattgct ccctctggct atcatgcaa ctactgcgag ggtgagtgcc cgagccatat	1320
agcaggcacg tccgggtcct cactgtcctt ccactcaaca gtcacaaacc actaccgat	1380
gcggggccat agcccccttg ccaacctcaa atcgtgtgtg gtgcccacca agctgagacc	1440
catgtccatg ttgtactatg atgatggtca aaacatcatc aaaaaggaca ttcagaacat	1500
gatcgtggag gagtgtgggt gctcatagag ttgccagcc cagggggaaa gggagcaaga	1560
gttgtccaga gaagacagtg gcaaaatgaa gaaattttta aggtttctga gttaccaga	1620
aaaatagaaa ttaaaaacaa aacaaaaaaa aaaacaaaaa aaaacaaaag taaattaaaa	1680
acaaaacctg atgaaacaga tgaaggaaga tgtggaaaaa atccttagcc agggctcaga	1740
gatgaagcag tgaagagac aggaattggg agggaaaggg agaatggtgt accctttatt	1800
tcttctgaaa tcacactgat gacatcagtt gtttaaaccg ggtattgtcc ttccccct	1860
tgaggttccc ttgtgagcct tgaatcaacc aatctagtct gcagtagtgt ggactagaac	1920
aacccaaata gcactagaa agccatgagt ttgaaagggc ccatcacagg cactttccta	1980
cccaattacc caggtcataa ggtatgtctg tgtgacactt atctctgtgt atatcagcat	2040
acacacacac acacacacac acacacacac acacaggcat ttccacacat tacatatata	2100
cacatactgg taaaagaaca atcgtgtgca ggtggtcaca cttccttttt ctgtaccact	2160
tttgcaacaa aacaa	2175

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sense primer of INHBA gene

<400> 11
ggcttggagt gtgatggcaa 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense primer of INHBA gene

<400> 12
tccagtcatt ccagccgatg 20

<210> 13
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polynucleotide fragment of ISG15 gene

<400> 13
gggcaacgaa ttccaggtgt ccctgagcag ctccatgtcg gtgtcagagc tgaaggcgca 60

gatcaccag aagattggcg t 81

<210> 14
<211> 685
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
ataatagggc cgtgtctgcc tgccgaagcc ggcggctgag aggcagcgaa ctcattttg 60

ccagtacagg agcttgtgcc gtggcccaca gcccacagcc cacagccatg ggctgggacc	120
tgacggtgaa gatgctggcg ggcaacgaat tccaggtgtc cctgagcagc tccatgtcgg	180
tgtcagagct gaaggcgagc atcaccagca agatcggcgt gcacgccttc cagcagcgtc	240
tggctgtcca cccgagcggg gtggcgctgc aggacagggt ccccttgcc agccagggcc	300
tgggccccgg cagcacggtc ctgctgggtg tggacaaatg cgacgaacct ctgagcatcc	360
tggtgaggaa taacaagggc cgcagcagca cctacagggt acggctgacg cagaccgtgg	420
cccacctgaa gcagcaagtg agcgggctgg aggggtgtgca ggacgacctg ttctggctga	480
ccttcgaggg gaagcccctg gaggaccagc tcccgtggg ggagtacggc ctcaagcccc	540
tgagcacctg gttcatgaat ctgcgcctgc ggggaggcgg cacagagcct ggcgggcgga	600
gctaagggcc tccaccagca tccgagcagg atcaagggcc ggaaataaag gctgttgtaa	660
agagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa	685

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sense primer of ISG15 gene

<400> 15	
gggcaacgaa ttccaggtgt	20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense primer of ISG15 gene

<400> 16

acgccaatct tctgggtgat

20

<210> 17

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide fragment of MMP11 gene

<400> 17

tagcaccatg gcaggactgg gggaactgga gtgtccttgc tgtatccctg ttgtgaggtt

60

ccttcagg gctggcactg aagcaagggt gctg

94

<210> 18

<211> 2276

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

aagcccagca gccccggggc ggatggctcc ggccgccttg ctccgcagcg cggccgcgcg

60

cgccctctg ccccgatgc tgctgctgct gctccagccg ccgcccgtgc tggcccgggc

120

tctgccgcg gacggccacc acctccatgc cgagaggagg gggccacagc cctggcatgc

180

agccctgccc agtagcccg cacttgcccc tgccacgcag gaagcccccc ggcctgccag

240

cagcctcagg cctccccgt gtggcgtgcc cgacccatct gatgggctga gtgcccga

300

ccgacagaag aggttcgtgc tttctggcgg gcgtgggag aagacggacc tcacctacag

360

gaccttcgg ttcccatggc agttgggtgca ggagcaggtg cggcagacga tggcagaggc

420

cctaaaggta tggagcgaatg tgacgccact cacctttact gaggtgcacg agggccgtgc	480
tgacatcatg atcgacttcg ccaggtactg gcatggggac gacctgccgt ttgatgggcc	540
tgggggcacg ctggcccatg cttctttccc caagactcac cgagaagggg atgtccactt	600
cgactatgat gagacctgga ctatcgggga tgaccagggc acagacctgc tgcaggtggc	660
agcccatgaa ttggccacg tgctggggct gcagcacaca acagcagcca aggccctgat	720
gtccgcttc tacaccttc gctaccact gactctcagc ccagatgact gcaggggcgt	780
tcaacaccta tatggccagc cctggccac tgcacctcc aggacccag ccctgggccc	840
ccaggctggg atagacacca atgagattgc accgtggag ccagacgcc cgccagatgc	900
ctgtgaggcc tcctttgacg cggctccac catccaggc gagctctttt tcttcaaagc	960
gggttttgtg tggcgctcc gtgggggcca gctgcagccc ggctaccag cattggcctc	1020
tcgccactgg caggactgc ccagccctgt ggacgtgcc ttcaggatg cccagggcca	1080
catttggttc ttccaaggatg ctgactactg ggtgtacgac ggtgaaaagc cagtctctgg	1140
ccccgcacc ctcaccgagc tgggcctggt gaggttccc gtccatgctg ccttggtctg	1200
gggtcccgag aagaacaaga tctacttctt ccgaggcagg gactactggc gtttcaccc	1260
cagcaccgg cggttagaca gtccgtgcc ccgagggcc actgactgga gaggggtgcc	1320
ctctgagatc gacgtgcct tccaggatgc tgatggctat gcctacttcc tgcgcggccg	1380
cctctactgg aagtttgacc ctgtgaaggt gaaggctctg gaaggcttcc cccgtctctg	1440
gggtcctgac ttctttggct gtgccgagcc tgccaacact ttctctgac catggcttgg	1500
atgccctcag ggtgtctgac cctgccagg ccacgaatat caggctagag acccatggcc	1560
atctttgtgg ctgtgggcac caggcatggg actgagccca tgtctctca ggggatggg	1620

gtgggtaca accacatga caactgccgg gagggccacg caggtcgtgg tcacctgcca	1680
gcgactgtct cagactgggc agggaggcctt tggcatgact taagaggaag ggcagtcttg	1740
ggcccgtat gcaggtcctg gcaaacctgg ctgccctgtc tccatccctg tccctcaggg	1800
tagcaccatg gcaggactgg gggaactgga gtgtccttgc tgtatccctg ttgtgaggtt	1860
ccttcaggg gctggcactg aagcaagggt gctggggccc catggccttc agccctggct	1920
gagcaactgg gctgtagggc agggccactt cctgaggtca ggtcttggtg ggtgcctgca	1980
tctgtctgcc ttctggctga caatcctgga aatctgttct ccagaatcca ggccaaaaag	2040
ttcacagtca aatggggagg ggtattcttc atgcaggaga cccagggccc tggaggctgc	2100
aacatactc aatcctgtcc caggccgat cctcctgaag cccctttcgc agcactgcta	2160
tcctccaaag ccattgtaaa tgtgtgtaca gtgtgtataa acctcttct tctttttttt	2220
tttttaaact gaggattgtc attaaacaca gttgttttct aaaaaaaaaa aaaaaa	2276

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sense primer of MMP11 gene

<400> 19	
tagcaccatg gcaggactgg	20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense primer of MMP11 gene

<400> 20
 cagcacccctt gcttcagtgc 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sense primer of ACTB gene

<400> 21
 ttccttctctg ggcatggagt 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense primer of ACTB gene

<400> 22
 caggtctttg cggatgtcca 20