

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 8월 18일 (18.08.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/099776 A2

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/000876
- (22) 국제출원일: 2011년 2월 9일 (09.02.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0012112 2010년 2월 9일 (09.02.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 국
립 암 센터 (NATIONAL CANCER CENTER)
[KR/KR]; 경기도 고양시 일산동구 마두 1 동 809 번
지, 410-769 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 홍경만 (HONG,
Kyeong Man) [KR/KR]; 경기도 고양시 일산서구 탄현
동 130 쌍용아파트 101 동 501 호, 411-320 Gyeonggi-
do (KR). 김현경 (KIM, Hyun Kyung) [KR/KR]; 경기
도 고양시 일산동구 마두 1 동 809 국립암센터 분자중
양학연구과, 410-769 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9
도심공향타워 6층 한일국제특허사무소, 135-973
Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

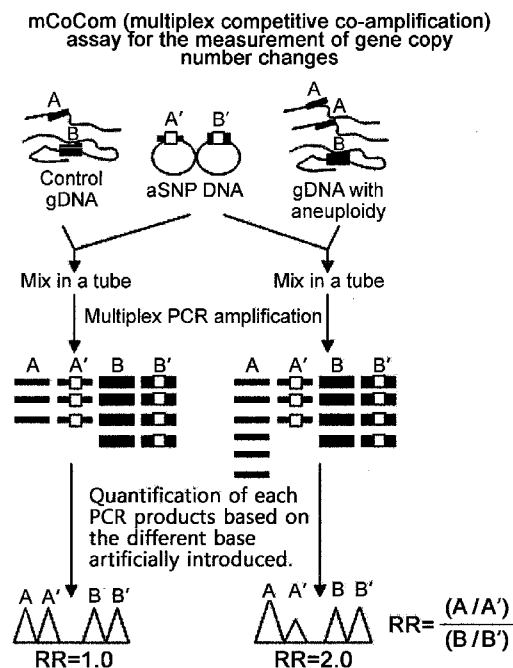
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: HER2-POSITIVE SUBJECT DIAGNOSIS METHOD AND HER2-POSITIVE SUBJECT DIAGNOSIS KIT

(54) 발명의 명칭 : H E R 2 양성 개체 진단 방법 및 H E R 2 양성 개체 진단용 키트

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to an HER2-positive di-
agnosis kit, an HER2-positive diagnosis composition, an HER2-posi-
tive subject detecting method and an HER2 copy number measure-
ment method, in which the HER2-positive diagnosis kit comprises: an
HER2 gene fragment (HER2 competitor) including at least one SNP
with an artificial base change; a standard gene fragment (standard
gene competitor) including at least one SNP with an artificial base
change; a first primer composed of a sequence that exists in the HER2
competitor sequence and in a corresponding wild-type HER2 se-
quence in common; and a second primer composed of a sequence that
exists in the standard gene competitor sequence and a corresponding
wild-type standard gene sequence in common.

(57) 요약서: 본 발명은 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP
를 하나 이상 포함하는 HER2 유전자의 단편 (HER2 경쟁자); 인
위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는
표준유전자의 단편 (표준유전자 경쟁자); 상기 HER2 경쟁자 서
열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는
서열로 이루어진 제 1 프라이머; 및 상기 표준유전자 경쟁자 서
열과 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존
재하는 서열로 이루어진 제 2 프라이머를 포함하는 HER2 양성
진단용 키트, HER2 양성 진단용 조성물, HER 양성 개체 검출 방
법 및 HER2 카피수 측정 방법에 관한 것이다.



공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: H E R 2 양성 개체 진단 방법 및 H E R 2 양성 개체 진단용 키트

기술분야

- [1] 본 발명은 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 HER2 유전자의 단편 (HER2 경쟁자); 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 표준유전자의 단편 (표준유전자 경쟁자); 상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머; 및 상기 표준유전자 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 포함하는 HER2 양성 진단용 키트, HER2 양성 진단용 조성물, HER 양성 개체 검출 방법 및 HER2 카피수 측정 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 유방암은 전 세계적으로 2000년에 150만 건의 신규 발생이 추정되는 두 번째로 많은 암이며 여성에게는 가장 흔한 암으로 신규 암 환자의 22%에 해당된다. 해마다 370,000명의 여성이 유방암으로 사망하는데 이는 여성 암의 13.9%를 차지한다(Parkin, D. N. Lancet Oncol 2. 533-543. 2001). 유방암의 원인은 정확히 규명되지 않았으나, 나이, 가족력, 음식, 알콜, 호르몬의 영향, 유방질환 병력, 몸무게, 담배, 방사선 및 유전적인 요소들이 있는 것으로 알려져 있다. 나이가 많아지면 그만큼 유방암 발생 위험도가 높아진다고 보고되고 있는데, 우리나라의 경우 40대 여성에게서 유방암 발생 빈도가 제일 높다고 발표된 바 있다.
- [4] 유방암의 다른 요인으로 여성호르몬이 있는데, 이는 세포증식을 유도하고 DNA 손상을 일으켜 유방암 위험도를 증가시키며 유방암이 커지도록 촉진하기도 한다. 따라서 초경이 12세 이전에 시작했다거나, 폐경 나이가 55세 이후인 경우, 임신을 하지 않은 경우, 30세 이후에 첫 출산을 한 경우, 수유를 하지 않은 경우, 여성 호르몬 대체 요법을 받은 경우 및 피임약을 복용한 경우에는 그만큼 여성호르몬의 영향이 많았기 때문에 유방암 발생 위험도가 높아진다. 최근 미국에서는 폐경 후 여성 호르몬 대체 요법으로 에스트로젠과 프로게스테론을 같이 사용하는 경우에는 유방암 위험도가 24% 증가한다고 발표한 바 있다.
- [5] 또한, 방사선은 염색체 혹은 유전자의 변이를 유발하여 유방암을 일으킬 수 있는데, 어릴 때 호지킨 병 등으로 방사선 치료를 받은 경우에는 유방암 발생 빈도가 더 높아질 수 있다.
- [6] 또 다른 요인으로 유전적 영향에 의한 요인이 있다. 특히, 어린 나이에 유방암에

걸렸다거나 양측 유방이 다 암에 걸린 경우 유전적 요인에 기한 것일 확률이 높다. 유방암 환자의 약 5~10%는 이러한 가족력과 관계있는 유전자인 BRCA1, BRCA2 유전자의 변이에 의해 생긴다. BRCA1, BRCA2 변이가 있는 경우에는 유방암 뿐만 아니라 자궁암 발생 위험도도 높아진다. 또한 인간 상피세포 성장인자 수용체 2(human epidermal factor receptor 2)의 과발현이 양호하지 않은 유방암 예후와 관련이 있다고 알려져 있는데(Ross et al. (2003), The oncologist: 307-325), 유방암의 발병 여부 뿐만 아니라 유방암 치료 후의 환자에 대한 예후를 진단하는 것은 환자의 고통 및 불편을 최소화하고 적절한 치료시기에 가장 최적화된 치료제 및 치료방법을 선택할 수 있다는 점에서 중요한 과제로 대두되고 있다.

- [7] 한편, 난소암(ovarian cancer)은 난소에 발생하는 악성 종양으로 50세 내지 70세 사이에 제일 많이 발생하며, 우리나라의 경우, 자궁 경부암에 이어 두 번째로 흔한 부인과 암으로 알려져 있다. 난소암 역시 그 발병원인에 대해 명확하게 알려져 있지는 않으나 가족력, 배란 횟수, 식습관, 비만등에 의한 것으로 추정하고 있다. 난소암 역시 유방암과 마찬가지로 그 진단방법 중 하나로서 특정 단백질의 과발현 또는 유전자의 카피수 증가 등을 측정하는 방법이 수행되고 있으며, 그 중 하나로 HER2 유전자가 알려져 있다.
- [8] 상기 유방암 또는 난소암 외에도 많은 암 또는 다른 여러 질환에 있어서 염색체 변이 또는 특정 유전자 서열의 변화가 알려져 있는데, 이와 같은 변화로는 다운증후군처럼 염색체 하나 전부가 더 있는 것 혹은 적은 것도 있으며, 디조지(DiGeorge) 증후군처럼 수백만 염기쌍이 결실되어 있거나, 베커(Becker) 또는 뒤시엔느(Duchenne) 근이영양증(muscular dystrophy)과 같이, 조그만 염색체 조각의 결실 혹은 중복 등이 있을 수 있다. 정신지체 환자들에서는 아말단(subtelomeric) 결실도 보고되고 있다. 암 질환과 관련하여서는, 상기 서술한 바와 같이 BRCA1, MLH1/MLH2, ERBB2 또는 HER2 등의 유전자의 변이 또는 카피수 증가에 대해 일부 알려져 있다.
- [9] 따라서, 특정 질환의 진단을 위하여 염색체 카피 수의 변화를 결정하기 위한 여러 가지 방법이 연구되고 있다. 염색체의 수와 구조적 변화를 측정하는 가장 표준적인 방법은 핵형분석(karyotyping) 방법으로, 핵형이란 한 생물이 갖고 있는 고유한 염색체의 수, 모양, 크기를 비교하는 방법이다. 사람의 경우 46개의 유전자를 그 크기 및 센트로미어(centromere)의 위치에 따라 7군(A-G)군으로 분류하고 그것들을 크기에 따라 나란히 배열하여, 대조군과 실험군의 차이를 확인함으로써 염색체의 수와 구조적 변화를 탐지할 수 있다. 그러나, 이러한 방법은 B군(2종), C군(7종), D군(3종)처럼 형태가 아주 유사한 염색체군에서는 통상적인 염색에 의한 식별이 곤란하다는 한계가 존재한다.
- [10] 상기의 핵형분석을 극복하기 위하여 1970년대 이후 각종 염색체 분열법이 개발되었다. 이들 중에 현재에도 이용되는 것에는 Quinaquiline에 의한 Q band법(Q banding), Giemsa 염색에 의한 G band법(G banding) 등이 있다. Q

band법은 퀴나크린(quinacrine)과 같은 형광물질로 염색하여 밴드 양상을 관찰할 수 있으나, 형광이 유지되는 시간이 짧고 시료를 관찰하기 위해서는 염색한 후 특별한 처리가 필요하다는 단점이 있다. G band법은 감자(Giemsa)시약으로 염색한 후 특별한 처리가 필요하지 않으며, band 양상의 안정성과 재현성 때문에 가장 유용하고 일반적인 방법으로 이용된다. 이들 분열법의 염색기전에는 미지의 부분이 많지만 어느 조직에서 염색체 표본을 만들어도 일정한 염색체 패턴을 나타내기 때문에 실용으로 유용한 방법으로 사용되고 있다. 그러나 상기와 같은 분석 방법은 환자의 혈액, 섬유아세포 혹은 양수세포를 배양해야 하고, 결과를 해석하는데 많은 시간과 인력이 필요하다. 또한 상기 분석법으로는 보통 1 메가베이스 이상의 염색체 변화만을 관찰 할 수 있다는 단점이 여전히 존재한다.

- [11] 이러한 민감도를 보완한 기술로 FISH(fluorescent in situ hybridization) 방법이 있다. FISH 방법은 형광염료를 사용하여 염색체나 유전자를 선명하게 색상으로 나타내는 기술이다. 이 기술은 유전자 맵핑(gene mapping)과 염색체 이상(chromosomal abnormality)을 관찰하는데 사용된다. 기존의 염색체를 관찰하는 다른 기술은 대개 활발하게 분열하고 있는 세포만을 이용하는 반면, 이 기술은 분열하지 않는 세포를 이용할 수 있다. 단백질이 표적인 면역화학염색법에 비해 FISH 방법은 DNA가 표적이므로 변화에 더 안정적이며, 여러가지 실험적인 변수에 대해 결과가 안정적이다. 그러나 FISH 또한 많은 시간과 인력을 필요로 할 뿐 아니라 보통 한번에 4가지 이상의 목표 유전자의 변화를 측정하지 못한다(Klinger 등, 1992).
- [12] 한편, 최근 개발된 CISH(chromogenic in situ hybridization)는 FISH의 비용적인 부분과 기술적인 어려움, 그리고 결과 보관의 문제점을 해결하고자 개발된 새로운 방법이다. CISH는 파라핀을 제거한 시료조직 슬라이드에 퍼옥시다아제를 이용한 색소 침전 반응을 이용하여 시료 유전자를 증폭하는 방법이다. FISH와 같이 DNA를 표적으로 하고 있으면서 색소가 침전되므로 일반 현미경 관찰이 가능하고 결과를 오래 보관할 수 있다는 장점이 있다. 그러나, FISH는 17번 염색체를 증폭의 판정기준으로 삼는데 비해 CISH는 이러한 방법이 부재하여, 여전히 중등도의 염색체 증폭결과에 대해서는 만족스러운 효과를 얻고 있지 못하고 있다.
- [13] 또한, 최근 분자적 방법을 이용하여 염색체 변화를 탐지하는 방법으로서 어레이를 기초로 한 CGH(comparative genomic hybridization)가 있다. 이 방법은 BAC 클론을 기관(substrate)표면에 고착시켜 어레이를 형성하고, 미리 표지한 표준 DNA와 샘플 DNA를 상기 어레이에 하이브리드 형성시켜 표준시료와 샘플시료에서 오는 신호의 상대적인 양을 비교함으로써 결실과 중복과 같은 염색체 변화를 알아낼 수 있는 방법이다.
- [14] 또한, 다중 PCR 방법으로 상대적인 증폭정도를 측정함으로써 카피 수를 결정하는 방법이 있으며 (Rahil H, et al., Rapid detection of common autosomal

aneuploidies by quantitative fluorescent PCR on uncultured amniocytes. *Eur J Hum Genet.* 2002 Aug;10(8):462-6.), 이를 변형한 방법으로 MLPA(multiplex ligation-dependent probe amplification)가 최근 소개되었다(Schouten JP et al., Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jun 15;30(12):e57.). MLPA 방법으로 유전자를 증폭하는 동안 상대적인 증폭 정도가 비교적 안정되었다고는 하나, 여전히 그 변이도가 비교적 커서(standard deviation=0.13-0.3), 염색체 이상 환자의 진단에 응용하기에는 만족할 만한 수준으로 발전하지는 못했다. 또한, 짧은 프로브들을 지놈 DNA와 혼성화 시킨 후, 이들을 회수하여 양적으로 증폭시켜 카피 수를 결정하는 MAPH(multiplex amplifiable probe hybridization) 방법이 있다(Armour JA et al., Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 15;28(2):605-9). 그러나, 여전히 측정편차가 크기 때문에, 염색체 이상 환자의 진단에 응용하기에는 어려움이 있었다.

- [15] LOH(loss of heterozygosity)는 현재 염색체의 결실이나 중복을 발견하는데 가장 많이 사용되는 방법이다. LOH 방법은 결실 혹은 중복된 부위를 제외한 나머지 부위의 대립인자(allele) 구성이 시료와 같은 표준시료가 있어야 한다. 따라서, 주로 비암조직을 표준시료로 사용하여 암조직에서의 염색체 이상을 진단하는데 주로 사용하고 있다. LOH 연구를 위해서는 현미부수체 마커(microsatellite marker)를 사용할 수도 있고, SNP를 이용할 수도 있다. 그러나, LOH 방법은 동형접합 결실(homozygous deletion)이 아니라면, 염색체의 변화가 결실인지 중복인지 구별하지 못하는 단점이 있다.

- [16] 또한, SNP 어레이를 사용하여 염색체의 결실과 중복을 알아내는 방법(Lindblad-Toh K et al., Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol.* 2000 Sep;18(9):1001-5) 소개되었는데, 이 방법은 SNP 어레이에 무수히 많은 SNP를 측정할 수 있도록 확장이 가능하다는 면에서 무한한 가능성을 가지고 있으나, 어레이를 이용한 방법은 측정장비가 필요할 뿐 아니라 측정시간이 많이 소요된다. 뿐만 아니라 어레이 방법으로 측정할 수 있는 HER2의 증폭 정도도 제한되어 있는데, 보통 FISH에서 HER2가 증폭되었다는 기준이 17번 염색체의 센트로미어(centromere)에 비해서 2배 이상의 HER2 신호가 있을 때를 기준으로 하는데, 이러한 미세한 변화를 현재의 어레이 방식에 의해서는 측정하기가 어려워 임상에 응용할 수 없다는 단점이 있다. 따라서, 특정 유전자에 대한 카피수 증폭 여부를 정확하게 측정하기 위해서는 이 분야의 개선이 절실히 필요한 상황이다.

- [17]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [18] 이에, 본 발명자들은 HER2 유전자의 카피수 증가와 관련된 암의 예후 및 감수성을 진단하기 위한 효과적인 수단을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 경쟁자 서열로서 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 HER2 유전자의 단편 및 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 표준유전자의 단편, 특히 17번 염색체에서 선택된 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 두개 이상의 표준유전자의 단편을 다중동시증폭 PCR 반응에 첨가함으로써 첨가한 경쟁자 서열이 시료의 지놈 DNA에 있는 야생형 서열과 경쟁적으로 증폭되도록 한 후, 증폭된 야생형 서열과 경쟁자 서열의 증폭량에 대한 상대신호비율을 측정하여 표준시료와 비교함으로써, HER2 유전자 카피수 증가 개체(HER2 양성 개체)를 효과적으로 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 증가된 카피수까지도 측정할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [19] 특히, 본 발명자들은 표준유전자로서 17번 염색체 장완에서 HER2 위치를 기준으로 센트로미어(centromere)와 텔로미어(telomere) 쪽에 각각 위치한 두개의 표준유전자를 사용하는 경우, 유방암 세포주에서 HER2의 증폭여부를 정확히 측정할 수 있으며, 본 발명의 방법을 사용하여 사람 유방암 조직에서 측정한 HER2의 증폭 결과가 조직면역화학염색과 대부분 일치한다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[20]

과제 해결 수단

- [21] 본 발명의 목적은 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 HER2 유전자의 단편 (HER2 경쟁자); 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 표준유전자의 단편 (표준유전자 경쟁자); 상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머; 및 상기 표준유전자 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 포함하는 HER2 양성 진단용 키트 및 HER2 양성 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [22] 본 발명의 다른 목적은 (a) HER2 경쟁자 및 표준유전자 경쟁자가 포함된 혼합물을 지놈 DNA 시료에 첨가하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 경쟁자가 포함된 혼합물 및 지놈 DNA 시료에 상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머 및 상기 표준유전자 경쟁자와 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 첨가하여 증폭하는 단계; (c) 경쟁자 서열들의 증폭량과 이에 대응하는 야생형 서열들의 증폭량을 측정하고, 경쟁자 서열의 증폭량과 야생형 서열의 증폭량 간의 신호비율 (SR 값) 및 표준유전자의

신호비율에 대한 HER2 유전자의 신호비율의 상대값인 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료 및 실험시료 각각에 대하여 측정하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)의 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값이 표준시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값에 비해 큰 경우, 해당 실험 개체를 HER2 양성 개체로 판정하는 단계를 포함하는, HER2 양성 개체 검출 방법을 제공하는 것이다.

- [23] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 실험시료 암조직 내 암 세포의 비율을 확인하는 단계; (b) HER2 경쟁자 및 표준유전자 경쟁자가 포함된 혼합물을 지놈 DNA 시료에 첨가하는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 경쟁자가 포함된 혼합물 및 지놈 DNA 시료에상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머 및 상기 표준유전자 경쟁자와 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 첨가하여 증폭하는 단계; (d) 경쟁자 서열들의 증폭량과 이에 대응하는 야생형 서열들의 증폭량을 측정하고, 경쟁자 서열의 증폭량과 야생형 서열의 증폭량 간의 신호비율 (SR 값) 및 표준유전자의 신호비율에 대한 HER2 유전자의 신호비율의 상대값인 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료 및 실험시료 각각에 대하여 측정하는 단계; (e) 상기 단계 (a)에 따른 암 세포의 비율을 도 10의 x축 및 y축에 대입하여 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 재조정하여 재조정된 HER2 유전자 상대신호비율 (rRR 값)을 측정하는 단계; 및 (f) 상기 단계 (e)에 실험시료의 재조정된 HER2 유전자 상대신호비율 (rRR 값) 값을 표준시료의 HER2 유전자 상대신호비율(RR 값)로 나누어 HER2의 정규화신호비율 (nRR)을 구하고 이 값을 HER2의 카피수로 결정하는 단계를 포함하는, HER2 양성 개체의 HER2 카피수 측정 방법을 제공하는 것이다.

- [24] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 실험시료 암조직 내 암 세포의 비율을 확인하여 전체세포 중 암세포가 차지하는 비율(C, 예컨대 50%인 경우 C는 0.50)을 구하는 단계; (b) HER2 경쟁자 및 표준유전자 경쟁자가 포함된 혼합물을 지놈 DNA 시료에 첨가하는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 경쟁자가 포함된 혼합물 및 지놈 DNA 시료에상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머 및 상기 표준유전자 경쟁자와 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 첨가하여 증폭하는 단계; (d) 경쟁자 서열들의 증폭량과 이에 대응하는 야생형 서열들의 증폭량을 측정하고, 경쟁자 서열의 증폭량과 야생형 서열의 증폭량 간의 신호비율 (SR 값) 및 표준유전자의 신호비율에 대한 HER2 유전자의 신호비율의 상대값인 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료 및 실험시료 각각에 대하여 측정하는 단계; 및 (e) 상기 단계 (d)에 따른 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값을 표준시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값으로 나누어 HER2 카피수를

구하고, 식 $[(\text{HER2 카피수}-1)/C+1]$ 에 대입하여 암세포에서의 표준유전자에 대한 HER2의 상대신호비율로 결정하고, 이 값이 동일한 실험과정을 거쳐 얻은 표준시료의 표준유전자에 대한 HER2의 상대신호비율에 비해 2.0 보다 큰 경우, 해당 실험 개체를 HER2 양성 개체로 판정하는 단계를 포함하는, HER2 양성 개체 검출 방법을 제공하는 것이다.

[25]

발명의 효과

[26] 본 발명에 따른 염색체, 유전자 및 특정 뉴클레오티드 카피수 분석 방법 및 측정 키트는, 특히 HER2 유전자가 과발현된 HER2 양성 유방암 조직의 염색체 변화를 분석함에 있어서, 빠른 시간 내에 저렴한 비용으로 검사결과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라, 자동화가 가능하여 특별한 기술과 숙련된 인력이 없이도 분석이 가능한 바 HER2 카피 수가 증가되어 있는 개체를 정확하게 진단하여 감수성을 판단할 수 있다.

[27]

도면의 간단한 설명

[28] 도 1은 본 발명의 A와 B에 대한 경쟁자를 첨가하여 야생형의 A와 B 유전자가 경쟁자들과 동시에 경쟁적으로 증폭하도록 한 후, 대조군 시료와 A의 유전자가 증폭되어 있는 실험군 시료에서의 RR 값을 예시한 개략도이다.

[29] 도 2는 HER2 카피수를 측정하기 위하여 12번 염색체에 위치한 IGF1과 10번 염색체에 있는 HK1을 표준유전자로 사용한 예시와 결과분석과정을 예시한 개략도이다. 이를 위해 사용한 프라이머와 경쟁자의 정보는 표 1과 같다. 정상적인 혈액과 유방암 세포주인 MDA-MB-435 세포주의 지놈 DNA를 표 1의 프라이머와 경쟁자를 사용하여 HER2 증폭상태를 분석하면 모두 6가지의 신호를 얻을 수 있다. 이러한 6가지 신호는 HER2, IGF1 및 HK1 세 가지 유전자에서 나오는 신호인데 한 가지는 지놈 DNA의 야생형 서열에서 나오고 다른 한 가지는 경쟁자 DNA(인위적인 SNP를 포함하는 유전자 서열)에서 나오게 되어 모두 6가지 신호가 나오게 된다. 도 2를 보면, 유방암 세포주인 MDA-MB-435 세포주에서 HER2 유전자와 표준 유전자 사이의 상대신호비율이 (IGF1의 RR 값=1.547 및 HK1의 RR 값=1.791) 대조군인 정상 혈액에서의 HER2 유전자와 표준 유전자 사이의 정규화신호비율 (IGF1의 RR 값=0.585 및 HK1의 RR 값=0.688)보다 높았으며, MDA-MB-435 세포주의 IGF1에 대한 정규화신호비율은 2.644 및 HK1에 대한 정규화신호비율은 2.60으로 HER2의 카피수가 증가되었음을 나타내었다.

[30] 도 3은 IGF1과 HK1을 표준유전자로 사용하고 표 1의 프라이머와 경쟁자를 사용하여 HER2 카피수를 측정한 결과를 나타내는 도면이다. SK-BR-3, JIMT 및 MDA-MB-453과 같은 세 가지 유방암 세포주의 DNA를 사용하여 실험을 시행하여 원편 그림과 같은 raw data를 얻었고, 이를 분석하여 HER2가 증폭된

결과를 얻을 수 있었다. 정규화신호비율 (nRR) 값이 2.5인 MDA-MB-435 세포의 HER2 카피수는 약 5n 이상이라는 것을 알 수 있는데, JIMT와 SK-BR-3의 경우 두 가지 표준유전자에 대한 정규화신호비율이 차이가 있어서 정확한 카피수를 결정할 수 없다. 이는 PCR 증폭에 IGF1과 HK1의 효율이 달라서 생기는 문제로 생각할 수도 있으나, 두 가지 유전자가 위치하는 염색체의 상대적인 양이 각 세포주에서 차이가 있어서 생기는 현상일 수도 있어서 표준유전자를 바르게 선택하는 것이 중요하다는 것을 알 수 있다.

[31] 도 4는 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법과 키트에서 사용한 G6PC3와 ALDOC과 같은 두 가지 표준유전자와 HER2유전자 내의 두 가지 서열 (3-HER2과 5-HER2로 표시)의 상대적인 위치를 나타내는 도면이다. ALDOC은 염색체 17q상에서 HER2에 비해 센트로미어 방향에 위치하며, G6PC3는 염색체 17q상에서 HER2에 비해 텔로미어 방향에 위치한다.

[32] 도 5는 17번 염색체상에 위치하는 두 가지 유전자 G6PC3와 ALDOC을 표준유전자로 사용하여 본 발명의 방법을 사용한 예시와 결과분석과정을 보인 개략도이다. 정상적인 혈액과 유방암 세포주인 MDA-MB-435 세포주의 지놈 DNA를 본 발명의 방법 혹은 키트를 이용하여 HER2 카피수 상태를 분석하면 모두 8가지의 신호를 얻을 수 있다. 이러한 8가지 신호는 3-HER2, 5-HER2, G6PC3 및 ALDOC와 같은 네 가지 서열에서 나오는 신호로서, 각각의 서열에 대해 한 종류는 지놈 DNA의 야생형 서열에서 나오고 다른 한 종류는 경쟁자 서열에서 나와서 모두 8가지 신호가 나오게 된다. 유방암 세포주인 MDA-MB-435 세포주에서 HER2 유전자(3-HER2, 5-HER2)와 표준 유전자 사이의 상대신호비율(3-HER2와 G6PC3의 RR 값=4.6773; 5-HER2와 ALDOC의 RR 값=4.6916)이 대조군인 정상 혈액에서의 HER2 유전자와 표준 유전자 사이의 상대신호비율(3-HER2와 G6PC3의 RR 값: 0.97 및 5-HER2와 ALDOC의 RR 값: 1.0247)보다 높음을 알 수 있으며, 이러한 결과는 본 발명의 방법으로 간편하고 정확하게 HER2의 카피수 증가 여부를 확인할 수 있음을 나타낸다. 경쟁자들의 상호간 비율과 다중동시증폭의 조건 혹은 단일 염기 연장의 조건에 따라 상대신호비율의 값이 달라질 수 있으며, 이는 같은 조건으로 표준 시료에서 얻은 상대신호비율로 교정함으로써 최종 정규화신호비율의 값에는 변화가 없도록 조정할 수 있다.

[33] 도 6은 서로 다른 유방암 세포주(JIMT, MDA-MB-453, SK-BR-3 및 T-47D)에서의 HER2 카피수 증가(HER2 양성) 여부를 두 가지 표준유전자(G6PC3 및 ALDOC)와 HER2 유전자 내 두 가지 서열(3-HER2와 5-HER2로 표시)을 사용한 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법으로 확인한 결과를 보인 도면으로서, 세로축은 정규화신호비율 (nRR) 값을 나타낸다. 도 6을 보면, JIMT, MDA-MB-453 및 SK-BR-3 세포주에서 HER2 카피수가 증가되었음을 알 수 있다. 이들 유전자 모두 G6PC3와 ALDOC의 상대적인 카피수가 달랐는데, 이는 HER2 유전자를 포함한 부위의 증폭이 이들 유전자 부위를 포함하여 일어날 수 있다는

것을 의미한다. 따라서, HER2의 유전자 증폭 여부를 측정하기 위해 이 두 표준 유전자 중 카피수가 작은 쪽 표준유전자를 기준으로 HER2의 카피수를 측정하고자 하였다. 한편, SK-BR-3 세포주에서는 5-HER2의 정규화신호비율 (nRR for 5-HER2/G6PC3:7.56)이 3-HER2의 정규화신호비율 (nRR for 3-HER2/G6PC3:2.19)보다 훨씬 높았으며, 이는 HER2 유전자 전체가 아닌 HER2 유전자의 일부분이 증폭되었음을 나타낸다.

[34] 도 7은 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트의 재현성을 보인 도면으로서, 대조군(정상 혈액 또는 정상 조직)으로 2n DNA 샘플을 사용하여 재현성 정도를 평가하였다. 도 10을 보면, HER2가 증폭되어 있는 유방암 세포주인 JIMT의 5-HER2 및 3-HER2의 정규화신호비율 (nRR)은 약 4 정도로 나타났으나, 10개의 대조군의 정규화신호비율 (nRR)은 대략 1 정도로 일정하게 나타났다(표준편차:0.03~0.06). 이러한 결과는 유방암 세포주에서는 HER2 카피수가 증가되었고, 대조군에서는 HER2 카피수가 정상이라는 것을 나타내므로, 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트로 HER2 카피수 증가 여부를 쉽게 확인할 수 있음을 나타낸다.

[35] 도 8은 서로 다른 양의 지놈 DNA 및 인위적 경쟁자를 사용한 경우에 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트 결과에 미치는 영향을 보인 도면으로서, Y축은 정규화신호비율 (nRR) 값을 나타내며, X축은 사용한 gDNA와 인위적 경쟁자 DNA의 양을 나타낸다. 5, 10 및 20 fg의 인위적 경쟁자 DNA와 각각 2.5, 5, 10, 20 및 40 ng의 gDNA를 사용한 결과, 경쟁자 DNA의 양과 지놈 DNA의 양이 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트 결과에는 거의 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다. 구체적으로, 사용한 gDNA 및 인위적 경쟁자 DNA의 양이 다르더라도 표준시료의 정규화신호비율 (nRR) 값이 모두 대략 1 정도에 분포하였고, 유방암 세포주인 MDA-MB-453에서도 3-HER2(3-HER2/ALDOC) 및 5-HER2(5-HER2/ALDOC)의 정규화신호비율 (nRR) 값이 모두 대략 2.2 ~ 2.7 정도에 분포하였으며(HER2의 카피수 증가를 의미), 표준 유전자인 G6PC3(G6PC3/ALDOC)의 정규화신호비율 (nRR) 값은 모두 대략 0.6 ~ 0.8 정도에 분포하였다. 이러한 결과는 기존의 보고된 경쟁적 PCR 방법을 사용한 HER2 카피수 측정 방법은 시료의 농도를 정확히 측정하는 것이 중요한 변수인데 반해, 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 혹은 키트에서 HER2 카피수를 측정하는데 시료 DNA의 양이 중요한 요소가 아님을 나타낸다.

[36] 도 9는 유방암 세포주 DNA를 정상적인 DNA로 연속적으로 희석하여 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 혹은 키트의 민감도를 측정한 결과를 보인 도면이다. 유방암 세포주의 DNA를 정상적인 DNA로 연속적으로 희석하여 mCoCom assay를 시행하면, 유방암 세포주인 MDA-MB-453 및 JIMT의 경우 HER2 카피수 증가가 도면과 같이 직선적인 관계라는 것을 알 수 있다.

[37] 도 10은 정상적인 세포로 희석된 암조직에서의 암세포 HER2 상태를 측정하기

위해 간편화한 도면이다. H&E 염색으로 암조직에서의 암세포 %를 알고 있는 경우 암세포의 HER2 상태를 역추적하기 위하여 x-축의 암세포 %와 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트에서의 nRR 값을 알면 암세포가 100%일 경우의 암세포의 HER2 증폭상태를 판정할 수 있다

- [38] 도 11은 동결유방암조직에서 분리한 DNA를 사용하여 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 혹은 키트를 사용하여 HER2의 카피수를 측정하여 카피수가 상대적으로 낮은 표준유전자를 1로 하여 HER2 유전자 내 서열인 5-HER2와 3-HER2 서열의 카피수를 정규화신호비율 (nRR)값으로 표시하였고 (각각 5-HER2와 3-HER2로 표시), 이 두 값의 평균을 다시 동결유방암조직의 암세포 분율을 고려한 후 최종 암세포의 HER2카피수를 결정하여 정규화신호비율 (nRR)값을 표시하였으며 (HER2 copy number로 표시), HER2 카피수를 x-축의 HER2 조직면역화학염색의 결과와 비교한 결과이다. 도에서 mismatch라고 표시한 조직을 제외한 모든 조직에서 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 혹은 키트의 결과와 HER2 조직면역화학염색의 결과가 같다는 것을 확인할 수 있다. 단 HER2 조직면역화학염색의 결과는 정도에 따라 0에서 3으로 표시하였으며, 0과 1의 경우 HER2 음성암으로 판정하였고, 3인 경우 HER 양성암으로 판정하였다. 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법과 HER2 조직면역화학염색의 결과가 대부분 일치한다는 것을 확인할 수 있었다. y-축은 mCoCom 방법에 의한 HER2의 정규화신호비율 (nRR)이다.

[39]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [40] 상기 목적을 달성하기 위하여, 하나의 양태로서 본 발명은 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 HER2 유전자의 단편 (HER2 경쟁자); 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 표준유전자의 단편 (표준유전자 경쟁자); 상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머; 및 상기 표준유전자 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 포함하는 HER2 양성 진단용 키트 또는 HER2 양성 진단용조성물을 제공한다.
- [41] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) HER2 경쟁자 및 표준유전자 경쟁자가 포함된 혼합물을 지놈 DNA 시료에 첨가하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 경쟁자가 포함된 혼합물 및 지놈 DNA 시료에상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머 및 상기 표준유전자 경쟁자와 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 첨가하여 증폭하는 단계; (c) 경쟁자 서열들의 증폭량과 이에 대응하는 야생형 서열들의 증폭량을 측정하고, 경쟁자 서열의 증폭량과 야생형 서열의 증폭량 간의 신호비율 (SR 값)

및 표준유전자의 신호비율에 대한 HER2 유전자의 신호비율의 상대값인 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료 및 실험시료 각각에 대하여 측정하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)의 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값이 표준시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값에 비해 큰 경우, 해당 실험 개체를 HER2 양성 개체로 판정하는 단계를 포함하는, HER2 양성 개체 검출 방법을 제공한다.

[42] 또한, 본 발명은 상기 단계 (d) 이후에 표준시료에 대한 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)의 비를 HER2의 정규화신호비율 (nRR)로 정의하고, 이 값을 실험시료의 HER2 카피수로 판정하는 단계를 추가로 포함하는 HER2 양성 개체 검출 방법을 제공한다.

[43] 본 명세서에서 상기 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 유전자의 단편을 “경쟁자”, “경쟁자 서열”, “HER2 경쟁자” 또는 “표준유전자 경쟁자” 등으로 표현할 수 있다.

[44] 바람직하게 본 발명은 표준시료와 실험시료에 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 HER2 및 표준유전자 단편(경쟁자 서열)을 포함하는 비교군 시료를 첨가한 후, 각 인위적 경쟁자와 이에 대응하는 시료 내의 야생형 서열을 경쟁적으로 증폭시킬 수 있다.

[45] 본 발명의 키트는 키트에 처리되는 시료 내에서 경쟁자 서열들이 야생형 서열들과 경쟁적으로 증폭되도록 고안한 프라이머를 포함한 multiplex PCR 구성물 및 HER2 카피수가 정상인 표준시료와 비교하여 HER2 카피수를 측정할 수 있도록 고안된 키트이면 충분하다. 또한, 당업자의 필요에 따라 경쟁적 증폭반응에 필요한 수단, 경쟁자 서열의 증폭산물을 야생형 서열의 증폭산물과 구분하기 위한 추가적인 반응을 수행하기 위한 수단을 더 첨가할 수 있으며, 이에 대해서는 하기에서 설명한다.

[46] 또한, 본 발명의 키트는 HER2 양성을 측정하는 방법을 기재한 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

[47] 또한, 본 발명의 키트는 암조직에서 암세포의 각 분율과 HER2의 상대적인 카피수를 표시함으로써 암세포와 정상적인 세포가 섞인 상태에서 측정한 HER2 카피수 값을 암세포에서의 HER2 카피수로 변환할 수 있는 표 또는 그래프를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 그래프는 예컨대 도 10일 수 있다. 이에 대한 설명은 하기에서 한다.

[48] 본 발명에서 “HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 유전자”는 인간 상피 성장인자라고 명명되며, 일부 암에 있어서 과발현하는 유전자로 알려져 있다. 본 발명의 HER2 양성 개체 검출 방법은 HER2의 카피수가 증가하였다고 알려진 암이면 제한되지 않으며, 원발성 또는 전이성 암을 모두 포함한다. 상기 암의 예로 유방암, 난소암, 비소세포폐암, 대장암, 위암 또는 전립선암 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 HER2 양성 판별이 가능한 암의 종류가 제한되는 것은 아니다. 이러한 HER2는 185kDa의 막통과 성장인자 수용체로

티로신 카이네이즈(tyrosine kinase) 활성을 가지고 있으며, 세포의 성장과 관련된 신호 전달에 중요한 역할을 한다. 많은 연구에서 HER2가 과발현 되는 것이 HER2 유전자의 증폭(카피수 증가) 때문이라는 것이 밝혀졌고, HER2 유전자가 증폭된 HER2 양성 개체의 경우 수술 후 재발율이 높으며, 환자의 생존이 나쁘다는 것이 알려져 있다. 또한, HER2 양성인 종양은 화학요법과 호르몬 요법과 같은 치료에 잘 반응하지 않는다는 사실도 보고된바 있다.

- [49] 본 발명의 "표준시료"는 HER2 카피수가 증폭되어 있을 것이라 의심되는 개체의 시료와 비교하기 위한 정상개체 또는 HER2 유전자 카피수가 증가되어 있지 않다고 알려진 개체의 시료 또는 그 시료에서 분리한 DNA 시료이다. 또한, 암 개체의 경우에도 아직 암 전이가 일어나지 않은 조직과 같이 HER2 카피수 증가가 일어나지 않은 시료이면 제한되지 않으며, HER2 유전자의 카피수 증가를 진단하고자 하는 실험군의 기준이 되는 시료를 의미한다.
- [50] 본 발명에서는 표준시료를 사용하여 본 발명의 표준유전자 및 HER2 유전자의 상대신호비율을 측정하고 이들의 평균값을 이용하여 진단하고자 하는 실험시료의 절대적인 HER2 카피수를 측정하게 된다. 표준시료로는 전혈, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 뇌척수액 또는 세포간액을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 암조직 중 암세포가 포함되지 않은 정상적인 조직을 사용할 수도 있다.
- [51] 본 발명의 "실험시료"는 염색체, 유전자 혹은 특정 뉴클레오티드 서열의 증폭된 카피수를 측정하고자 하는 시료로서, 본 발명의 목적상 상기 실험시료는 암조직 혹은 암조직에서 분리한 DNA를 의미한다. 상기의 시료 또한 HER2 유전자 카피수를 포함하는 전혈, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 뇌척수액 및 세포간액과 같은 시료등을 포함할 수 있으며, 상기 예에 의해 사용될 수 있는 종류의 시료가 제한되는 것은 아니다.
- [52] 상기 대조시료 및 실험시료는 야생형 HER2 유전자 및 표준유전자를 포함하고 있다.
- [53] 본 발명의 "HER2 경쟁자 및 표준유전자 경쟁자가 포함된 혼합물"은 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP 서열을 하나 이상 포함하는 HER2 유전자의 단편 및 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 표준유전자의 단편이 포함된 혼합물을 의미한다.
- [54] 상기 혼합물은 실험시료 및 표준시료에 포함된 HER2 유전자 및 표준 유전자에 상응하는 유전자에 임의적으로 SNP를 유도함으로써 준비될 수 있다.
- [55] 본 발명에서 "HER2 유전자의 단편" 및 "표준유전자의 단편"에서 유전자의 단편이란 상기 HER2 유전자 또는 표준유전자의 특정 뉴클레오티드로 이루어진 유전자의 일부분을 의미하며, 반드시 물리적으로 분리된 유전자의 일부분을 의미하는 것은 아니다. 예컨대, HER2 유전자의 단편이란 HER2 유전자의 물리적으로 분리된 일부분 또는 물리적으로 분리되지 않은 HER2 유전자 내의 일부분을 의미한다. 본 발명에서는 HER2 카피수 증가 여부를 확인하기 위하여

유전자 전체뿐만 아니라, 각 유전자의 단편도 사용할 수 있다.

- [56] 본 발명에서 “인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP 서열(인위적 SNP 서열, 경쟁자 서열 또는 경쟁자)”은 인위적으로 도입한 SNP를 제외하고는 야생형 유전자의 DNA 서열과 동일한 서열을 의미하며, 벡터에 클로닝한 형태를 의미할 수 있다. 예를 들어 “HER2의 인위적 SNP 서열” 또는 “HER2 경쟁자 서열”은 HER2의 야생형 유전자 서열에서 인위적으로 하나 이상의 SNP를 도입한 서열 또는 벡터에 클로닝한 서열을 의미할 수 있다. 바람직하게 임의의 SNP 서열 또는 경쟁자 서열은 보통 야생형 서열의 염기 중 하나 이상이 다른 염기로 치환되어 있지만, 그 치환된 염기 이외의 나머지 염기는 야생형의 서열과 동일하게 함으로써 증폭하는 과정에서 증폭 효율이 야생형 유전자의 DNA 서열과 크게 달라지지 않도록 하여, 경쟁적 증폭이 일어나도록 해야 한다. 이때, 야생형 서열과 차이를 나타내는 인위적 SNP의 염기 변화는 일반적인 개체에서는 발견되지 않거나 매우 드문 염기의 변화를 만든 것으로, 이 서열을 포함하는 유전자가 증폭된 이후에 지놈 DNA 서열과 인위적 SNP 서열들을 구별할 수 있도록 하는 수단을 제공할 수 있다.
- [57] 본 발명의 인위적 SNP 서열은 자연계에서 1% 미만으로 나타나는 염기의 변화가 도입된 것으로, 바람직하게는 0.5% 미만, 보다 바람직하게는 아직 보고된 바 없는 0.1% 미만의 염기 변화를 도입하는 것이 좋다.
- [58] 본 발명에 있어서, 상기 혼합물 내에 상기 HER2 경쟁자를 하나 이상 포함할 수 있고, 바람직하게는 2개 이상의 HER2 경쟁자를 포함할 수 있으며, 2개 이상의 HER2 경쟁자를 포함하는 경우에, 서열번호 10(3-HER2) 및 서열번호 11(5-HER2)의 폴리뉴클레오티드로 이루어진 서열에 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 HER2 경쟁자를 하나 이상 포함할 수 있다. 이때, 상기 3-HER2는 5-HER2를 기준으로 텔로미어 방향에 위치하며, 상기 5-HER2는 3-HER2를 기준으로 센트로미어 방향에 위치함이 바람직하다.
- [59] 본 발명의 “HER2 양성”이란 암을 진단하는 척도로서, 암의 전이, 종양의 악성도 및 예후와 관련이 있는 HER2 유전자의 카피수가 정상개체의 HER2 유전자에 비해 증가되어있는 종양을 의미한다. 상기와 같이 본 발명의 검출 방법은 HER2 카피수가 증가하였음을 판정할 수 있는 암이면, 그 종류에 제한되지 않으며, 일반적으로 이들 암의 경우, 다른 암 보다 예후가 나쁘고 전이가 빠르며, 생존율이 나쁘다고 알려져 있다. 상기 유전자는 인간 유방암의 20~30%에서 발현이 증가된다고 알려져 있는데, HER2 유전자가 카피수가 증가되어 과발현된 HER2 양성 유방암의 경우 암세포가 뇌 세포로 전이될 가능성이 높으며, 조기 유방암에서 더욱 전이 빈도가 높아지고, 다른 수용체형 유방암의 경우보다 예후가 나쁜 것이 특징이다.
- [60] 또한, HER2 양성인 유방암의 경우, 라파티닙(타이커브) 치료에 효과적이거나, HER2 음성인 경우에는 이러한 치료에 반응하지 않다고 보고되었다. 한편, 유방암의 치료제 중 하나인 허셉틴(Herceptin)은 이러한 HER2 유전자에 대한

단클론 항체인데, 유방암 중 HER2 양성으로 나타난 환자에게는 효과적인 치료제로 알려져 있다. 그러나, 이러한 허셉틴이 치료비용이 많이 소요되고, 또한 그 자체의 부작용으로 인해 허셉틴 치료를 위한 대상 환자를 선별하는 것이 중요한 과제로 대두되고 있다.

[61] 현재 유방암 환자에서 HER2 증폭여부를 검출하기 위해서 조직면역화학염색과 FISH를 사용하는데, 많은 비용, 시간 및 숙련된 인력이 필요한 상황이다. 그러나, 본 발명의 키트 또는 방법을 이용하는 경우, 상기 단점들을 해결하면서 HER2 양성인 개체를 효과적으로 판별할 수 있다.

[62] 현재 HER2 과발현 여부 또는 카피수 증가 여부를 확인하기 위해 사용되는 조직면역화학 염색법은 암의 파라핀 조직을 5 μ m로 얇게 잘라서 HER2 항체를 이용하여 HER2 단백질의 발현양상을 semi-quantitative하게 검사하는 방법으로 비교적 많은 병리 실험실에서 쉽게 시행하고 있으나 시료보관조건, 고정액의 종류, 고정 시간의 변화, 항체의 종류에 따라 염색결과에 큰 차이가 존재하여 모든 경우에 동일적으로 적용 가능한 검사방법으로 한계가 있고, 중등도 염색이 되는 경우 결과 판정이 모호하여 FISH검사를 반드시 시행해야한다는 단점이 있다. 또한, HER2 유전자의 증폭을 검사하기 위한 방법으로 FISH (Fluorescence in situ hybridization) 방법은 디파라핀화한 유방암 조직에서 HER2 유전자를 측정하는 방법으로 17번 염색체와 동시에 측정하여 조직면역화학 염색법에 비하여 정량적인 방법이나, 측정에 지나치게 많은 시간이 소요되고, 특별한 기술과 장비가 필요하며, 시간이 지나면 신호가 약해져 장기간 보관이 불가능하다는 단점이 있다. 또 다른 방법으로 최근 개발된 CISH(Chromogenic in situ hybridization)는 디파라핀화(deparafinized)한 유방암 조직 슬라이드에 퍼옥시다아제(oxidase)를 이용한 색소침전 반응을 이용하여 HER2 증폭을 진단하는 방법으로 FISH의 단점을 보완하기 위해 개발되었으나, 아직까지 검증이 진행 중이며 FISH를 대체하고 있지 못하고 있다.

[63] 그러나, 본 발명의 방법을 이용하는 경우에는 HER2 카피수 증가 여부를 구체적으로 확인할 수 있을 뿐만 아니라 비용 및 시간을 절약할 수 있고, 그 결과를 오래 보관할 수 있으며, 자동화할 수 있어 숙련자의 조작 없이도 재현성을 나타낼 수 있다.

[64] 본 발명에서, "표준유전자"란 측정하고자 하는 유전자의 증폭 상태의 기준이 되는 유전자로, 보통 중복, 결실 또는 치환 등이 흔히 나타나지 않은 유전자를 선택한다. 또한, 표준유전자는 특정 염색체 부위의 유전자 뿐 아니라 그 부위의 인트론을 포함한 DNA 서열일 수 있다. 세포내에서 여러 유전자의 상대적인 카피수를 측정하는 방법 중 FISH 방법은 17번 염색체의 센트로미어를 기준으로 HER2 유전자의 상대적인 카피수 변화를 측정하는데, 17번 염색체의 센트로미어는 본 발명의 표준유전자와 비슷한 개념이라고 할 수 있다. 본 발명의 HER2 카피수 측정 방법에서는 표준유전자의 카피수 변화를 HER2 유전자 카피수 변화와 함께 측정하여 표준유전자의 카피수에 비교함으로써

특정유전자의 상대적인 카피수를 측정하게 된다.

- [65] 본 발명에 있어서, 상기 표준유전자는 17번 염색체의 장완, 단완이나 다른 염색체상의 유전자 또는 인트론 서열을 포함할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, IGF1(Insulin-like growth factor 1), HK1(Hexokinase 1), G6PC3(glucose 6 phosphatase, catalytic, 3) 및 ALDOC(aldolase C, fructose-bisphosphate)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자일 수 있으며, 바람직하게 표준유전자는 17번 염색체의 장완(q arm)에 위치하는 둘 이상의 유전자 또는 인트론으로서 HER2 유전자 위치를 기준으로 하여 각각 텔로미어쪽과 센트로미어쪽에 위치하는 유전자 또는 인트론 서열을 표준유전자로서 사용할 수 있다. 이때, HER2 위치를 기준으로 센트로미어쪽에 위치하는 표준유전자로 ALDOC와 텔로미어쪽에 위치하는 G6PC3을 사용할 수 있다. 그러나, HER2의 카피수를 측정하기 위한 표준유전자는 G6PC3와 ALDOC에만 국한하는 것은 아니며, 17번 염색체 장완에서 HER2보다 텔로미어와 센트로미어에 존재하는 유전자서열을 각각 하나 이상씩 사용할 수 있다.
- [66] 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 방법 또는 키트의 일실시에에서 HER2 유전자의 증폭에 의한 카피수 증가를 비교하기 위한 기준이 되는 표준유전자로 IGF1 및 HK1을 사용하였고, 이들 표준유전자에 대한 HER2 유전자의 증폭 비율을 SR 값, RR 값 및 nRR 값으로 계산하여 HER2 양성 개체를 판단하였다.
- [67] 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 방법 또는 키트의 다른 실시예에서는 HER2 유전자의 증폭에 의한 카피수 증가를 비교하기 위한 기준이 되는 표준유전자로 G6PC3 및 ALDOC을 사용하였고, HER2의 유전자에서도 두 가지 HER2 유전자 단편(3-HER2, 5-HER2)을 사용함으로써 정확히 HER2 카피수를 측정할 수 있도록 고안하였다. G6PC3 혹은 ALDOC을 표준유전자로 사용하여 상대적인 HER2의 증폭 비율을 SR 값, RR 값을 계산하고, 대조군시료에서의 RR 값들의 평균값으로 나눈 nRR 값을 기준으로 실험군 시료의 HER2 카피수를 측정하였다.
- [68] 본 발명의 “mCoCom”의 방법은 카피수를 알고자 하는 특정유전자와 표준유전자 각각에 대한 경쟁자 서열이 야생형의 서열과 경쟁적으로 증폭되도록 경쟁자 서열의 혼합물을 다중 PCR 반응에 첨가하고, 증폭된 산물에서 야생형 서열과 경쟁자 서열에서 증폭된 산물을 구별하여 상대적인 양을 계산하고 이들 신호의 상대량으로부터 표준유전자에 대한 특정 유전자의 카피수를 표준시료와 비교함으로써 특정유전자의 카피수를 측정하는 방법을 의미한다.
- [69] 본 발명은 하나 이상의 HER2 경쟁자와 17번 염색체 장완에서 HER2보다 각각 텔로미어와 센트로미어쪽에 위치하는 둘 이상의 표준유전자 경쟁자들로 구성된 경쟁자 혼합물을 multiplex PCR 반응에 첨가하여 수행될 수 있으며, 이때, 각 군에 첨가되는 경쟁자의 상대적인 양과 사용하는 시료의 양은 당업자의 선택에 의해 적절하게 조절될 수 있다. 그런데, 본 발명은 서로 다른 양의 경쟁자를

첨가하거나 다른 농도의 시료를 사용하는 경우에도 그 결과에는 많은 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 기존에 보고된 경쟁적 PCR 방법을 사용한 HER2 카피수 측정 방법의 경우 시료의 농도를 정확히 측정하지 않으면 결과가 크게 달라질 수 있다는 점을 크게 개선하였다고 할 수 있다.

- [70] 본 발명은 실험군 시료에서 HER2 유전자의 카피수 증가 여부를 검증하기 위하여 유전자 증폭단계가 수행되는데, 통상적으로 알려진 유전자 증폭방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명의 증폭방법은 경쟁자와 이에 대응하는 야생형 유전자 서열이 동시에 증폭되는 것이 바람직하며, 따라서 HER2 경쟁자 및 표준유전자의 경쟁자들이 야생형 HER2 유전자 서열 및 표준유전자 서열에 공통적인 프라이머를 사용한다. 또한, 사용하는 프라이머 서열이 기존에 알려진 SNP들과 겹치지 않도록 고안하여 사용한다.
- [71] 상기 목적을 달성하기 위하여 바람직하게는 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 사용하여 경쟁자 서열과 지놈 DNA의 야생형 서열이 동시에 경쟁적으로 증폭될 수 있게 한다. 또한, 본 발명의 실시예에서는 2개의 HER2 유전자 서열과 2개의 표준유전자의 4가지 서열을 사용하여 다중동시증폭 PCR(Multiplex Polymerase Chain Reaction)을 수행하였는데, 다중증폭으로 형성되는 서열은 경쟁자에서 증폭되는 4가지 서열과 지놈 DNA에서 증폭되는 4가지 서열 등 모두 8가지 서열이 증폭된다.
- [72] 본 발명의 용어 "프라이머(primer)"는 일반적으로 15개에서 30개의 염기로 구성된 단일 사슬의 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)이다. 프라이머는 보통 합성하지만 자연적으로 생성된 폴리뉴클레오티드(polynucleotide)에서 이용할 수도 있다. 프라이머의 서열은 반드시 주형의 서열과 정확히 같을 필요는 없으며, 충분히 상보적이어서 주형과 혼성화될 수 있으면 된다. 프라이머의 위치 혹은 프라이머 결합부위는 프라이머가 혼성화하는 표적 DNA 절편을 말한다. 바람직하게 본 발명의 증폭단계에서 사용되는 프라이머는 HER2 유전자 또는 이의 단편 및 표준 유전자에 대한 프라이머로서 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 공지된 방법에 의해 당업자가 용이하게 디자인할 수 있다.
- [73] 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트의 일실시예에서는 다중 PCR을 위한 프라이머 서열로서 서열번호 1 내지 6을 사용하였다.
- [74] 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트의 다른 실시예에서는 다중 PCR을 위한 프라이머 서열로서 서열번호 12 내지 19를 사용하였다.
- [75] 또한, 증폭된 서열들 중 경쟁자 서열을 야생형 서열과 구분하기 위하여, 당업계에서 사용되는 다양한 방법이 추가적으로 적용될 수 있으며, 이를 위한 수단이 본 발명의 키트에 포함될 수 있다. 바람직하게 이러한 방법으로 단일 염기 연장법이 수행될 수 있는데, 본 발명의 "단일 염기 연장법(single base extension)"이란 경쟁자 서열의 산물과 지놈 DNA로부터 증폭된 야생형 서열의

산물을 구별하여 각 유전자의 양을 상대적으로 측정하는 방법 중 하나로서, 바람직하게 상기 방법은 Applied Biosystem사에서 공급되는 SNaPshot 키트를 사용하여 수행될 수 있다. 연장 프라이머는 상기 인위적인 SNP 서열의 도입을 위해 야생형 지놈 DNA 서열과 다른 염기가 인위적으로 도입되는 위치의 염기가 상기 프라이머에 의해 첫 번째 중합될 염기가 되도록 고안한다.

- [76] 상기 연장 프라이머는 각각 다르게 표지된 네 가지의 다이디옥시 뉴클레오티드(dideoxy nucleotide)와 DNA 중합효소(보통 Taq polymerase)를 이용하여 상기 증폭된 산물과의 하이브리드 형성 후 연장 프라이머의 3'-말단에 단일염기가 연장된다. 연장된 프라이머는 모세관 전기영동법(capillary electrophoresis)으로 전기 영동하여, 상기 표지된 신호를 통해 상대적인 양을 측정할 수 있다. 이 반응에 표지된 네 가지 다이디옥시 뉴클레오티드(dideoxy nucleotide)와 중합효소(polymerase)로 연장 프라이머(extension primer)를 연장시키면 두 가지 산물이 생성되는데, 이들은 각각 경쟁자 서열에서 증폭된 산물과 지놈 DNA의 야생형 서열에서 증폭된 산물과 염기간의 수소결합에 의한 하이브리드를 형성한 후 단일 염기가 연장되어 생성된다. 두 가지 연장된 산물은 서로 다른 형광 표지 물질에 의해 표지된 다이디옥시뉴클레오티드(dideoxynucleotide)로 구별된다.
- [77] 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트의 일실시예에서는 상기 단일 염기 연장법에 사용되는 프라이머로서 서열번호 7 내지 9의 서열을 사용하였다.
- [78] 본 발명의 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트의 다른 실시예에서는 상기 단일 염기 연장법에 사용되는 프라이머로서 서열번호 20 내지 23의 서열을 사용하였다.
- [79] 상기와 같은 방법에 의해 증폭된 유전자들은 실험군의 HER2 유전자 카피수 증가여부(HER2 양성 여부)를 측정하기 위해 비율로서 계산될 수 있다. 즉, 본 발명은 경쟁자 서열들의 증폭량과 이에 대응하는 야생형 서열들의 증폭량을 측정하고, 경쟁자 서열의 증폭량과 야생형 서열의 증폭량 간의 신호비율 (SR 값) 및 표준유전자의 신호비율에 대한 HER2 유전자의 신호비율의 상대값인 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료 및 실험시료 각각에 대하여 측정함으로써 HER2 양성을 판단할 수 있다.
- [80] 구체적으로, 이러한 비율은 HER2 야생형 유전자 서열에서 증폭된 산물 (A)과 경쟁자 서열에서 증폭된 산물(A')의 HER2의 신호비율 ($SR_A=A/A'$) 및 표준유전자의 야생형 유전자 서열에서 증폭된 산물 (B)과 경쟁자 서열에서 증폭된 산물(B')로부터 표준유전자의 신호비율 ($SR_B=B/B'$)을 각각 구한다. 그리고, 이들 HER2와 표준유전자의 신호비율의 비 (SR_A/SR_B)를 구하면 표준유전자에 비교한 상대적인 HER2의 상대신호비율 [$RR=SR_A/SR_B=(A/A')/(B/B')$]을 얻을 수 있다. 이렇게 얻은 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료에서 얻은 상대신호비율의 평균 값(aveRR)으로 나누어 정규화신호비율

($nRR=RR/aveRR$)을 구하고, 이 정규화신호비율 (nRR) 값을 기준으로 HER2의 카피수를 결정할 수 있다(실시예 5 참조).

- [81] 이에 대하여 좀 더 구체적으로 설명하면, (a) HER2 유전자의 증폭이 없는 표준시료에서 각각 서열에 대한 야생서열 (N) 과 경쟁자 서열 (C)에서 오는 신호의 비율 ($SR=N/C$)을 구한 후, HER2 (cSR_{HER2})와 표준유전자 (cSR_{ALDOC} 또는 cSR_{G6PC3})에서의 상대신호비율 [$cRR_{ALDOC}(=cSR_{HER2}/cSR_{ALDOC})$ 또는 $cRR_{G6PC3}(=cSR_{HER2}/cSR_{G6PC3})$] 또는 상대신호비율의 평균값을 (mRR_{ALDOC} 혹은 mRR_{G6PC3}) 얻고, (b) HER2 상태를 알고자 하는 실험시료(암조직)에서 얻은 HER2 (sSR_{HER2})와 표준유전자 (sSR_{ALDOC} 또는 sSR_{G6PC3})에서의 상대신호비율 [$sRR_{ALDOC}(=sSR_{HER2}/sSR_{ALDOC})$ 또는 $sRR_{G6PC3}(=sSR_{HER2}/sSR_{G6PC3})$]을 (a)에서 얻은 상대신호비율의 평균값 ($aveRR_{ALDOC}$ 또는 $aveRR_{G6PC3}$)으로 나누어 HER2 정규화신호비율 [$(nRR_{ALDOC}=sRR_{ALDOC}/aveRR_{ALDOC})$ 또는 $nRR_{G6PC3}(=sRR_{G6PC3}/aveRR_{G6PC3})$]를 구함으로써 HER2 양성을 판단할 수 있다. (c) 이때, ALDOC을 기준으로 한 HER2 정규화신호비율 (nRR_{ALDOC})와 G6PC3를 기준으로 한 HER2 정규화신호비율 (nRR_{G6PC3})이 상이한 경우 큰 값을 이용한다.
- [82] 본 발명의 인위적 SNP 서열은 정상 지놈의 유전자 서열과 유사하나 특정 염기에 인위적으로(일반인에게는 보고되지 않은) 돌연변이를 도입하여, 지놈 DNA(정상 유전자 서열)와 경쟁자(인위적 SNP 서열)를 경쟁적으로 증폭되도록 한 다음, 경쟁자와 지놈 DNA의 염기서열의 차이를 이용한 상대적인 증폭량에서 HER2 카피수를 결정하게 된다. 이때, 사용하는 경쟁자 서열은 적어도 PCR에 사용할 시발체 부위를 포함하고 있는 유전자 서열을 벡터에 클로닝한 후 여러 경쟁자들을 일정 비율로 섞은 후 사용한다.
- [83] 실제로 HER2가 증폭되어 있다고 알려진 여러 유방암 세포주(SK-BR3, JIMT, MDA-MB-453)의 DNA를 사용하여 본 발명에 따라 HER2 유전자의 카피수를 측정하여 정상 혈액 DNA의 결과와 비교한 결과, 정상인에게서 분리한 혈액인 대조군에서는 RR 값의 평균 비율(normalized ratio)이 모두 1.0 부근인 반면, 암 세포주에서의 RR 값은 모두 1.0을 훨씬 초과하였다(도 2, 3 및 5). 이러한 결과는 본 발명의 측정방법으로 HER2 유전자가 증폭되어 있다는 것을 쉽게 확인할 수 있음을 나타낸다.
- [84] 이전의 모든 HER2에 대한 판정기준은 FISH결과를 기준으로 하였는데, FISH의 경우 HER2유전자 프로브와 17번 염색체 센트로미어 프로브를 사용하여 그 상대적인 양을 주요 판정기준으로 사용하며, 동시에 하나의 세포당 HER2의 카피수가 크게 증가되어 있는 경우도 부수적으로 판정에 참조하고 있다. 그리고, FISH에서 HER2의 카피수가 증가되어 있는 경우에도 17번 염색체의 센트로미어가 동시에 증가되어 있는 heteroplasmy인 유방암은 허셉틴 치료에 좋은 반응을 보이지 않는다는 것이 알려져 있다. 따라서, 다른 염색체상에 있는 유전자에 비해 17번 염색체를 기준으로 HER2의 카피수를 결정하는 것이 기존의 결과와의 일치성이 클 것으로 판단할 수 있다.

- [85] 그런데, 실시간 PCR을 포함한 HER2 카피수 측정을 위한 분자적 방법에서 17번 염색체의 어느 부분을 표준유전자로 사용하는 것이 좋은가 혹은 몇 개의 표준유전자를 사용해야 하는가에 대해서 연구된 바가 없다. 본 발명에서는 이를 위해 HER2가 위치하고 있는 17번 염색체의 장완에 있으면서 HER2보다 센트로미어에 가까운 유전자 중 하나인 ALDOC과 텔로미어쪽에 위치하고 있는 G6PC3를 표준유전자로 사용하여 이미 HER2가 증폭되어 있다고 알려져 있는 유방암 세포주들을 사용하여 표준유전자의 사용기준에 대해 실험해 보았다. 또한, HER2 유전자 내에서도 두 가지 서로 다른 서열에 대한 경쟁자를 고안하고 HER2 유전자 내 두 부위의 카피수가 어떻게 다른 지에 대해서도 알 수 있도록 표 2와 같은 프라이머들과 인위적인 SNP 위치를 사용하여 HER2 증폭의 측정방법을 고안하였다.
- [86] G6PC3와 ALDOC 등 두 가지 표준유전자를 사용한 HER2 카피수 측정 결과, 각각의 두 가지 표준유전자들의 카피수가 JIMT, MDA-MB-453, 및 SK-BR-3 등 세가지 유방암 세포주에서 모두 변화되어 있다는 것을 알 수 있었다. 또한, MDA-MB-453 및 SK-BR-3세포에서는 ALDOC 유전자의 카피수가 G6PC3에 비해 증가되어 있고, JIMT에서는 G6PC3유전자의 카피수가 ALDOC에 비해 증가되어 있다는 것을 알 수 있었다(도 6).
- [87] 그런데, 17번 염색체 장완에서도 HER2의 위치에 비해 텔로미어쪽에 있는 G6PC3와 센트로미어쪽에 있는 ALDOC을 사용하여 HER2의 카피수를 측정하여 보면 여기에서도 어떤 표준유전자를 기준으로 사용하는가에 따라 HER2의 카피수가 달라진다는 것을 도 6과 같이 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 같은 17번 염색체 장완에서도 HER2를 포함하여 증폭되는 부위가 어디까지 인가에 따라 ALDOC 혹은 G6PC3가 같이 증폭되든지 증폭되어 있지 않은 상태로 존재하게 되는 것으로 여겨진다. 따라서, 본 발명의 방법으로 두 표준 유전자 중 카피수가 작은 것으로 결정된 표준유전자의 카피수를 기준으로 HER2의 카피수를 도 6과 같이 계산하였다.
- [88]
- [89] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 실험시료 암조직 내 암 세포의 비율을 확인하는 단계; (b) HER2 경쟁자 및 표준유전자 경쟁자가 포함된 혼합물을 지놈 DNA 시료에 첨가하는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 경쟁자가 포함된 혼합물 및 지놈 DNA 시료에상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머 및 상기 표준유전자 경쟁자와 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 첨가하여 증폭하는 단계; (d) 경쟁자 서열들의 증폭량과 이에 대응하는 야생형 서열들의 증폭량을 측정하고, 경쟁자 서열의 증폭량과 야생형 서열의 증폭량 간의 신호비율 (SR 값) 및 표준유전자의 신호비율에 대한 HER2 유전자의 신호비율의 상대값인 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료 및 실험시료 각각에 대하여 측정하는 단계; (e)

상기 단계 (a)에 따른 암 세포의 비율을 도 10의 x축 및 y축에 대입하여 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 재조정하여 재조정된 HER2 유전자 상대신호비율 (rRR 값)을 측정하는 단계; 및 (f) 상기 단계 (e)에 실험시료의 재조정된 HER2 유전자 상대신호비율 (rRR 값) 값을 표준시료의 HER2 유전자 상대신호비율(RR 값)로 나누어 HER2의 정규화신호비율 (nRR)을 구하고 이 값을 HER2의 카피수로 결정하는 단계를 포함하는, HER2 양성 개체의 HER2 카피수 측정 방법을 제공한다.

[90] 실질적으로 암세포의 HER2 양성 개체 판단에 있어서, 암조직 시료를 채취하면 암과 관련된 세포뿐만 아니라 주변의 정상 조직도 함께 섞여 분리될 수 있다. 따라서, 이들 시료에 대한 유전자 카피수를 측정하는 경우, 정상 유전자 또는 세포의 혼입에 기인하여 정확한 유전자 카피수의 증폭 여부를 판정하는데 한계가 있으며 HER2가 증폭되어 있음에도 불구하고 HER2의 카피수에 변화가 없는 것처럼 위음성으로 판정할 위험이 있다.

[91] 따라서, 본 발명자들은 증가된 HER2 카피수의 값을 정확하게 측정하기 위하여 암조직에 대한 H&E 염색을 시행함으로써 대상 시료 내의 암세포 비율을 측정하고, 이를 기준으로 HER2 양성 개체에서의 증가된 카피수의 값 까지도 측정이 가능할 것으로 추론 하였다. 이와 같은 암 세포의 희석 비율과 HER2 카피수의 관계를 도 10의 그래프로 나타내면, 암세포 희석 비율을 함께 측정하여 이를 도 10의 그래프에 대입함으로써 암 세포에 내재된 HER2 카피수를 추론할 수 있다.

[92] 예를 들면, H&E 염색을 통하여, 분석 대상 시료의 암 세포가 시료 내에서 50%에 해당함을 확인한 후, 본 발명의 HER2 양성 개체 판정 방법을 통해 대조군에 대한 실험군의 비율(nRR) 값이 2.5로 도출되었다면, 도 10에 도시된 그래프에 따라 암 세포 내 HER2 카피수는 4가 된다. 반면 H&E 염색 결과, 시료 내 암 세포의 비율이 30%인 경우에 nRR 값이 2.5인 경우, 도 10의 그래프에 따라 추론하면 암 세포의 HER2 카피수는 6임을 확인할 수 있다. 이와 같은 결과로부터 본 발명의 카피 수 측정방법을 이용하는 경우, 희석되어 있는 암세포의 HER2의 카피수 증가 자체에 대한 정보뿐만 아니라, 검출하고자 하는 시료 내에 암 세포의 대략적인 비율을 추가적으로 분석함으로써 원래 암 세포 내의 HER2 카피수에 대한 정보를 역으로 추론할 수 있는 장점이 있다.

[93] 한편, 도 10과 같은 그래프를 이용하려면 HER2가 증폭된 조직에서 암세포의 비율이 낮다가 점점 증가하는 경우, 그에 따라 본 발명의 방법으로 측정된 HER2의 카피수 측정값도 정비례 관계가 있을 것이라는 가정이 사실이어야 한다. 따라서, 이러한 비례관계를 실험하기 위하여 도 9와 같이 HER2 카피수가 증가되어 있는 세포주의 DNA를 정상적인 HER2 카피수의 DNA와 일정한 비율로 희석한 후 본 발명의 방법으로 HER2의 카피수를 결정하여 보았는데, HER2의 카피수가 증가되어 있는 세포주의 DNA를 희석함에 따라 정비례 관계로 HER2 카피수가 감소한다는 것을 알 수 있었다(도 9). 이러한 결과는 정상세포가

50% 이상 포함된 암조직의 경우에도 비교적 정확히 암세포의 HER2 카피수를 추론 할 수 있다는 것을 의미하며, 본 발명의 방법이 임상에 적용할 가능성이 크다는 것을 의미하는 것이다.

- [94] 그러나, 도 9의 SK-BR-3 유방암 세포주에서 보는 바와 같이 암세포의 HER2 카피수가 크게 증가되어 있는 경우 (4 혹은 $8n$ 이상으로 증폭되어 있는 경우), 본 발명에 의한 HER2 카피수 측정값이 예상보다 더 크게 나올 수 있다는 것을 알 수 있었는데, 이러한 조직의 경우 대개 HER2가 4배 이상으로 증폭되어 있다고 판정함으로써 임상적용에 문제가 되지 않을 것으로 여겨진다. 이때, 더 정확한 카피수의 측정이 필요한 경우는 실험군 시료의 DNA를 정상적인 HER2 카피수를 가진 정상세포 DNA로 희석한 후 그래프에 plot하면 HER2 카피수가 4배 이상 증폭된 경우에도 정확히 카피수를 측정할 수 있게 된다.
- [95] 본 발명의 HER2 카피수 측정 방법에 사용될 수 있는 암세포의 염색 방법은 정상 세포에 대한 암 세포의 염색 비율을 나타낼 수 있는 방법이면 제한되지 않는다. 이러한 방법은 현재 통상적으로 이용되는 H&E 염색 방법이 사용될 수 있으며, 당업자의 선택에 따라 다른 염색 방법이 사용되거나, 추가적인 방법이 부가될 수 있고, 비율을 알 수 있는 다른 통상의 방법을 사용할 수 있음은 자명하다. 본 발명의 바람직한 일실시예에서는 암 세포의 비율을 측정하기 위하여 H&E 염색 방법을 사용하였다.
- [96] 또한, 암 세포주가 정상 세포와 섞여 희석되어 있는 경우에 희석 정도와 측정되는 nRR의 값은 비례적인 관계에 있음을 확인하였는바, 비례 관계를 나타낼 수 있는 한 HER2 카피수의 증가된 값을 추론하기 위하여 적절하게 해당 그래프를 변경하거나 대체할 수 있음은 자명하다. 본 발명자들은 암 세포의 희석 비율과 HER2 카피수의 관계를 도 10의 그래프로 나타내고, 암세포 희석 비율을 측정하여 이를 도 10의 그래프에 대입함으로써 암 세포에 내제된 HER2 카피수를 역으로 추론할 수 있음을 도 9에 나타낸 바와 같이 증명하였다.
- [97] 또한, 본 발명의 검사방법이 기존의 검사방법과 같은 결과를 보이는지 여부에 대하여 사람의 동결유방암조직에서 분리한 DNA를 사용하여 본 발명의 방법으로 HER2의 카피수를 결정하고, H&E 염색으로 결정한 암세포의 비율을 기준으로 유방암조직의 암세포에서의 HER2 카피수를 결정한 후, 2.0 이상으로 증폭된 경우를 HER2가 증폭되었다고 판정한 결과와 조직면역염색의 결과를 비교하였다. 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 하나의 시료를 제외하고 모든 결과가 일치한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 본 발명의 HER2 카피수 측정방법과 분석방법이 진료를 위한 암조직에서의 HER2 카피수 측정에 쉽게 적용될 수 있음을 의미하며, 나아가 암세포가 30-40%로 이루어지고 나머지가 정상적인 세포로 이루어진 암조직에서도 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.
- [98] 따라서, 본 발명의 HER2 카피수 측정방법을 암조직 검사의 일반적인 조직검사 방법인 H&E 염색과 동시에 실시하는 경우, 이러한 방법이 실제 임상적으로도 유용하게 이용될 것임을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 검사비용이 FISH 방법에

비해 저렴하고, 빠른 시간 내(3-4시간) 검사결과를 얻을 수 있으며, 자동화가 가능하여 숙달된 인력이 없어도 검사가 가능한 이점을 가진다.

[99]

[100] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 실험시료 암조직 내 암 세포의 비율을 확인하여 전체세포 중 암세포가 차지하는 비율(C, 예컨대 50%인 경우 C는 0.50)을 구하는 단계; (b) HER2 경쟁자 및 표준유전자 경쟁자가 포함된 혼합물을 지놈 DNA 시료에 첨가하는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 경쟁자가 포함된 혼합물 및 지놈 DNA 시료에상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머 및 상기 표준유전자 경쟁자와 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 첨가하여 증폭하는 단계; (d) 경쟁자 서열들의 증폭량과 이에 대응하는 야생형 서열들의 증폭량을 측정하고, 경쟁자 서열의 증폭량과 야생형 서열의 증폭량 간의 신호비율 (SR 값) 및 표준유전자의 신호비율에 대한 HER2 유전자의 신호비율의 상대값인 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료 및 실험시료 각각에 대하여 측정하는 단계; 및 (e) 상기 단계 (d)에 따른 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값을 표준시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값으로 나누어 HER2 카피수를 구하고, 식 $[(\text{HER2 카피수}-1)/C+1]$ 에 대입하여 암세포에서의 표준유전자에 대한HER2의 상대신호비율로 결정하고, 이 값이 동일한 실험과정을 거쳐 얻은 표준시료의 표준유전자에 대한 HER2의 상대신호비율에 비해 2.0 보다 큰 경우, 해당 실험 개체를 HER2 양성 개체로 판정하는 단계를 포함하는 HER2 양성 개체 검출 방법을 제공한다.

[101] 상기 방법을 본 발명의 일양태에 따라 구체적으로 설명하면, 상기 (a) 단계는 실험군 시료 내 암 세포의 비율을 확인하는 단계로서 전체세포 중 암세포가 차지하는 비율(C라 한다)을 예컨대 암세포의 비율이 50%인 경우 C는 0.50로 나타낸다.

[102] 또한, HER2 유전자의 증폭이 없는 표준시료에서 각각 서열에 대한 야생서열 (N) 과 경쟁자 서열 (C)에서 오는 신호의 비율 ($SR=N/C$)을 구한 후, HER2 (cSR_{HER2})와 표준유전자 (cSR_{ALDOC} 또는 cSR_{G6PC3})에서의 상대신호비율 [$cRR_{ALDOC}(=cSR_{HER2}/cSR_{ALDOC})$ 또는 $cRR_{G6PC3}(=cSR_{HER2}/cSR_{G6PC3})$] 또는 상대신호비율의 평균값을 (mRR_{ALDOC} 혹은 mRR_{G6PC3}) 얻고, HER2 상태를 알고자 하는 실험군 시료(암조직)에서 얻은 HER2 (sSR_{HER2})와 표준유전자 (sSR_{ALDOC} 또는 sSR_{G6PC3})에서의 상대신호비율 [$sRR_{ALDOC}(=sSR_{HER2}/sSR_{ALDOC})$ 또는 $sRR_{G6PC3}(=sSR_{HER2}/sSR_{G6PC3})$]을 표준시료에서 얻은 상대신호비율의 평균값 ($aveRR_{ALDOC}$ 또는 $aveRR_{G6PC3}$)으로 나누어 HER2 정규화신호비율 [$nRR_{ALDOC}(=sRR_{ALDOC}/aveRR_{ALDOC})$ 또는 $nRR_{G6PC3}(=sRR_{G6PC3}/aveRR_{G6PC3})$]을 구한다. 이때, ALDOC을 기준으로 한 HER2 정규화신호비율 (nRR_{ALDOC})와 G6PC3를 기준으로 한 HER2 정규화신호비율 (nRR_{G6PC3})이 상이한 경우 큰 값을 이용한다.

[103] 이후, 상기에 따른 HER2 정규화신호비율을 HER2 카피수로 하고, 식 $[(HER2 \text{ 카피수}-1)/C+1]$ 에 대입하여 암세포에서의 표준유전자에 대한 HER2의 상대신호비율로 결정하고, 이 값이 동일한 실험과정을 거쳐 얻은 표준시료의 표준유전자에 대한 HER2의 상대신호비율에 비해 2.0 보다 큰 경우, 해당 실험 개체를 HER2 양성 개체로 판정한다.

[104]

발명의 실시를 위한 형태

[105] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[106]

[107] 실시예 1. 세포주(Cell lines) 및 종양 시료(Tumor specimens)

[108] 유방암 세포주 (SK-BR-3, JIMT, MDA-MB-453 및 T-47D)들은 한국세포주은행과 ATCC (American Tissue Culture Collection)에서 구입하였으며, 10% 소태아혈청을 함유한 RPMI 배지에서 배양하였다. 40개의 동결유방암조직은 외과절 절제술로 얻었다.

[109]

[110] 실시예 2. DNA 분리

[111] 사람의 지놈 DNA는 EDTA를 처리한 전체 혈액에서 분리하였고, 이를 위하여 QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN)를 사용하였다. 사람의 유방암 세포주들 (SK-BR-3, JIMT, MDA-MB-453, T-47D)의 DNA를 분리하기 위해서 세포 펠렛(pellet)을 얻은 후 전체 혈액에서와 같은 키트를 사용하여 분리하였다. 동결유방암조직의 DNA는 하기의 조건에 따라 분리정제하였다; 100 mM Tris, 1% SDS를 포함하는 pH 8.0 버퍼, 5 mM EDTA, 10 mM NaCl, 및 500 mg/ml 프로테아제K (proteinase K)를 포함하는 배지에 55°C의 온도로 12시간 동안 배양한 후, 페놀-클로로폼(phenol-chloroform)을 처리한 뒤, 에탄올 및 암모늄 아세테이트로 DNA를 침전시켰다.

[112]

[113] 실시예 3. 임의의 SNP를 포함하는 서열의 클로닝

[114] 인위적인 SNP를 포함하는 서열(이하 '인위적 경쟁자 DNA' 또는 '경쟁자 DNA'와 혼용)는 인위적으로 바꾼 한 개의 염기를 포함하는 서열이다. 이 인위적 경쟁자 DNA는 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트의 각 서열에 대한 내재적 기준(internal standard)으로 사용하였다.

[115]

[116] 3-1. IGF1과 HK1을 표준유전자로 사용하기 위한 인위적 SNP를 포함하는 HER2, IGF1과 HK1 각각의 인위적 경쟁자 서열의 클로닝

[117] HER2, IGF1과 HK1 유전자의 일부 서열을 표 1의 프라이머를 사용하여 사람의 혈액 DNA에서 PCR 증폭하였다. 이때 사용한 PCR 조건은 95°C 10초, 55°C 30초,

72°C 30초의 조건으로 30 주기 반복하였다. 증폭된 각 유전자 일부 서열은 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝하고 염기서열을 확인하였다.

- [118] 원하는 위치의 염기를 치환하기 위하여 site-directed mutagenesis kit (Stratagene)을 사용하였다. HER2와 HK1의 인위적 경쟁자 DNA 서열에는 81번째와 90번째 염기인 G를 각각 T로 치환하였으며, IGF1의 경우는 증폭서열의 71번째 염기인 C대신 A로 치환하였고, 이러한 치환을 확인하기 위하여 염기서열을 결정하였다.

[119]

[120] 표 1

프라이머	서열	서열번호
ERBB2 forward primer	tgtccccaggaagcatcgtgat	1
ERBB2 reverse primer	cccaggtgcataccttggaat	2
IGF1 forward primer	ttctctaaatccctcttctgttgctaaatc	3
IGF1 reverse primer	gagagatgggagatgttgagagcaatgt	4
HK1 forward primer	ccaacatcgtagctgtggtgaatgac	5
HK1 reverse primer	gagggtgcagagccacctggaaga	6
ERBB2 single base extension primer	gggcatctgcctgacatccac	7
IGF1 single base extension primer	attgcgaggctctatctgctct	8
HK1 single base extension primer	cactgtgaagtcggcctgatcatc	9

[121]

[122] **3-2. G6PC3와 ALDOC을 표준유전자로 사용하기 위한 인위적인 SNP를 포함하는 3-HER2, 5-HER2, ALDOC과 G6PC3에 대한 각각의 인위적 경쟁자 서열의 클로닝**

- [123] HER2 유전자 중 센트로미어(centromere) 근처에 위치하는 서열번호 10의 HER2 유전자 단편(5-HER2), 텔로미어(telomere) 근처에 위치하는 서열번호 11의 HER2 유전자 단편(3-HER2, 5-HER2와 약 16000 염기만큼 떨어져 있으며(3-HER2는 실시예 3-1의 HER2와 같은 정방향 및 연장 프라이머와 경쟁자 DNA를 사용), ALDOC(염색체 17q 상의 센트로미어 근처에 위치) 및 G6PC3(염색체 17q 상의 텔로미어 근처에 위치) 유전자를 표 2의 프라이머를 사용하여 사람의 혈액 DNA에서 PCR 증폭하였다. 이때 사용한 PCR 조건은 95°C 10초, 55°C 30초, 72°C 30초의 조건으로 30 주기 반복하였다. 증폭된 각 유전자 서열은 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝하였다. 원하는 위치의 염기를 치환하기 위하여 site-directed mutagenesis kit (Stratagene)을 사용하였다. 치환된 염기 서열을 표 2에 나타내었다. 구체적으로, 3-HER2와 G6PC3의 인위적 경쟁자 DNA 서열에는 G를 T로 치환하였으며, 5-HER2와 ALDOC의 인위적 경쟁자 DNA 서열에는 C를 A로 치환하였다. 염기 치환을 확인하고, 4개의 클론된 서열을 혼합하고, 혼합물을 희석하여 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트에 사용하였다.

[124]

[125] 표 2

유전자		시열	시열번호
3HER2	Forward primer	TGTCCCCAGGAAGCATACGTGAT	12
	Reverse primer	GCAGCCATAGGGCATAAGCTGTG	13
	Extension primer	GGGCATCTGCCTGACATCCAC	20
	Modified sequence	#CTTCTGGGCATCTGCCTGACATCCAC <u>G</u> GTG	26
5HER2	Forward primer	GGGCTACGTGCTCATCGCTCAC	14
	Reverse primer	GCCAGGGCATAGTTGTCCTCAAAG	15
	Extension primer	CAAAGAGCTGGGTGCCTCGCACAATCC	21
	Modified sequence	#AGGC <u>TG</u> C <u>G</u> GATGTGTCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGG	27
G6PC3	Forward primer	CTCCAGCCCAGGTTACACAGTTC	16
	Reverse primer	CCTAACCACATTGGGAAAGGGAGAAT	17
	Extension primer	##GTTACAGAGTTCCTCTCTTGTGAGACTG (g: modified)	22
	Modified sequence	#CCCAGCTTACCAGTTCCCTCTCTTGTGAGACTG <u>G</u> TCC	28
ALDOC	Forward primer	GGGCAGAGTAATGAGGTTGGCACT	18
	Reverse primer	GTGCAGAGGGGTACGCTCACTGAT	19
	Extension primer	##CACACTCTAGCACACAGCGCCACTTGGCAAAAGTCA	23
	Modified sequence	#TGGTGCTGACTTTGCCAAGTGGCGCTGTGTGCTGAA A	29

* and ** is the HER2 sequence marked by 3-HER2 and 5-HER2, respectively in the text.

Modified bases for each aSNP sequence were marked by rectangle in modified sequence. Underlined sequences in modified sequence are the sites for extension primers. The artificial competitor for 3-HER2 and G6PC3 contains T instead of G, and the competitor for 5-HER2 and ALDOC contains A instead of C.

##The extension primers for G6PC3 and ALDOC were modified from original genomic sequence. C is modified to G (marked by g) in extension primer for G6PC3, and an extra sequence (CACACTCT, underlined) was added to 5' extension primer for ALDOC.

[126] **실시예 4. PCR 과정에서의 인위적 경쟁자의 다중 동시 증폭(multiplex co-amplification of artificial competitors)**

[127]

[128] **4-1. IGF1과 HK1을 표준유전자로 사용하기 위한 HER2, IGF1과 HK1 각각에 대한 인위적 경쟁자와 야생형 서열의 다중 동시 증폭**

[129] 전혈(대조군)과 유방암 세포주(실험군)에서 정제된 지놈 DNA 20 ng을 세 가지 유전자의 인위적 경쟁자 DNA 160 fg씩을 섞어서 증폭에 사용하였다(사용한 각각의 인위적 경쟁자의 양은 실험적으로 결정하였다). 혼합한 DNA 시료는 98°C에서 5분간 변성시켰고, 각각의 표 1의 프라이머들을 사용하여 다음과 같은 조건으로 다중 PCR(multiplex PCR)을 시행하였다: 94°C 5분 변성시킨 후 95°C 10초, 55°C 30초, 72°C 30초의 조건으로 35 주기 동안 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물들을 AxyPrep PCR Clean up 키트(Axygen)를 사용하여 정제하였고, 단일 염기 연장 프라이머(single base extension primer, 표 1)들을 사용하여 단일 염기 연장을 수행하였다. 이를 위하여 SNaPshot 키트(Applied Biosystems)를 사용하였으며, 조건은 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 30초로 30 주기를 사용하였다. 단일 염기 연장된 산물은 ABI 3100 sequencer(Applied Biosystems)를 사용하여

상대적인 신호양을 측정하였다.

[130]

[131] **4-2. G6PC3와 ALDOC을 표준유전자로 사용하기 위한 3-HER2, 5-HER2,**

ALDOC과 G6PC3 각각에 대한 인위적 경쟁자와 야생형 서열의 다중 동시 증폭

[132] 전혈(대조군)과 유방암 세포주(실험군)에서 정제된 지놈 DNA 10 ng을 세 가지 유전자의 인위적 경쟁자 DNA 10 내지 30 fg씩을 섞어서 증폭에 사용하였다(사용한 각각의 인위적 경쟁자의 양은 실험적으로 결정하였다). DNA 시료, 프라이머 혼합물 및 인위적 경쟁자 DNA의 혼합물은 98°C에서 5분간 변성시켰고, 각각의 표 2의 프라이머들을 사용하여 다음과 같은 조건으로 다중 PCR(multiplex PCR)을 시행하였다: 94°C 5분 변성시킨 후 95°C 10초, 58°C 30초, 72°C 30초의 조건으로 32 주기 동안 증폭시켰다. 이때, 각 서열에 대한 프라이머 비율을 다음과 같은 조건으로 조정하였다: 몰비(molar ratio)로 ALDOC:3-HER2:5-HER2:G6PC3 = 0.75:1:1:1.5(증폭반응에서 3-HER2 및 5-HER2 프라이머의 최종 농도는 0.2 pmole/ μ l였다).

[133] 증폭된 PCR 산물들을 AxyPrep PCR Clean up 키트(Axygen)를 사용하여 60 μ l의 최종 부피로 정제하였고, 표 2의 단일 염기 연장 프라이머(single base extension primer)들을 사용하여 SNaPshot 키트(Applied Biosystems)로 단일 염기 연장을 수행하였다. 이때, 단일 염기 연장 반응의 각 서열에 대한 프라이머 비율은 몰비로 3-HER2:5-HER2:G6PC3:ALDOC = 1:0.75:0.75:1.1이었으며(증폭반응에서 3-HER2 프라이머의 최종 농도는 0.2 pmole/ μ l였다), 단일 염기 연장 반응의 조건은 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 30초로 15 주기를 사용하였다. 단일 염기 연장된 산물은 ABI 3100 sequencer(Applied Biosystems)를 사용하여 분석하였으며, 크기 및 변형된 형광 염료의 차이에 근거하여 분리하였다.

[134]

[135] **실시예 5. 유전자 카피수 분석을 위한 피크 비율(peak ratio)의 분석**

[136]

[137] **5-1. IGF1과 HK1을 표준유전자로 사용하기 위한 HER2, IGF1과 HK1 유전자 피크 비율의 분석**

[138] 단일 염기 연장 반응이 완료되어 ABI sequencer에서 분석하면 도 2에서와 같이 모두 6가지의 신호가 나오게 된다. 각각의 피크는 HER2의 지놈 DNA에서 나온 신호 (A)와 인위적 경쟁자 DNA에서 나온 신호 (A'); IGF1의 지놈 DNA에서 나온 신호 (B)와 경쟁자에서 나온 신호 (B'); HK1의 지놈 DNA에서 나온 신호 (C)와 경쟁자에서 나온 신호 (C')가 있다. 신호비율(signal ratio, SR) 값은 지놈 DNA에서 나온 신호를 각각의 경쟁자에서 나온 신호로 나눈 값으로 모두 세가지 값이 도출된다(SR for HER2=A/A'; SR for IGF1=B/B'; SR for HK1=C/C'). 각각의 SR값을 서로 다른 유전자의 SR 값으로 나눈 값을 상대신호비율(RR)로 정의하며 이 경우, 도 2에서와 같이 다시 세 가지 RR 값이 결정될 수 있다[RRab=(A/A')/(B/B'), RRac=(A/A')/(C/C'), RRbc=(B/B')/(C/C')]. 세포주 혹은 암조직 시료(실험군)의 RR

값들을 대조군 시료의 RR 값으로 나눈 값들을 평균 RR로 정의하였으며, 평균 RR 값을 통하여 HER2의 양성 여부를 판단할 수 있다

- [139] 실제 실험에서는 10개의 대조군 gDNA에서 얻은 RR 값들의 평균값을 평균($RRa*b^*$, $RRa*c^*$, $RRb*c^*$)이라고 정의하며, 이들을 사용하여 유전자 카피수를 측정하기 위한 정규화신호비율 (nRR) 값을 구하였다. 이때, 세포주 혹은 암조직(실험군)에서 얻은 DNA의 정규화신호비율(nRR) 값들은 $nRRab=RRab/RRa*b^*$, $nRRac=RRac/RRa*c^*$, $nRRbc=RRbc/RRb*c^*$ 이 된다.

[140]

[141] **5-2. G6PC3와 ALDOC을 표준유전자로 사용하기 위한 3-HER2, 5-HER2, ALDOC과 G6PC3 유전자 피크 비율의 분석**

- [142] G6PC3와 ALDOC을 표준유전자로 사용한 HER2 카피수 측정을 위한 mCoCom 방법 또는 키트를 사용하여 단일 염기 연장 반응을 완료하고 ABI sequencer에서 분석하면 도 5에서와 같이 모두 8가지의 다른 신호가 나오게 된다. 각각의 피크는 3-HER2의 지놈 DNA에서 나온 신호 (A)와 3-HER2의 인위적 경쟁자 DNA에서 나온 신호 (A'); 5-HER2의 지놈 DNA에서 나온 신호 (B)와 5-HER2의 인위적 경쟁자에서 나온 신호 (B'); G6PC3의 지놈 DNA에서 나온 신호 (C)와 G6PC3의 인위적 경쟁자에서 나온 신호 (C'); 및 ALDOC의 지놈 DNA에서 나온 신호 (D)와 ALDOC의 인위적 경쟁자에서 나온 신호 (D')가 있다. 신호비율(signal ratio, SR) 값은 야생형 서열의 증폭신호를 각각의 인위적 경쟁자의 증폭신호로 나눈 값으로 모두 네 가지 값이 도출되며, 시료 DNA를 사용하여 얻은 신호비율을 분석하였다($SR \text{ for } 3\text{-HER2}=A/A'$; $SR \text{ for } 5\text{-HER2}=B/B'$; $SR \text{ for } G6PC3=C/C'$; $SR \text{ for } ALDOC=D/D'$).

- [143] HER2에 대한 신호비율 (SR) 값을 표준유전자의 신호비율로 나눈 값을 표준유전자에 대한 HER2의 상대신호비율(RR)로 정의하며 이 경우, 도 5에서와 같이 다시 네 가지 상대신호비율(RR)을 얻을 수 있다[G6PC3에 대한 3-HER2의 RR 값: $RRac=(A/A')/(C/C')$; ALDOC에 대한 3-HER2의 RR 값: $RRad=(A/A')/(D/D')$; G6PC3에 대한 5-HER2의 RR 값: $RRbc=(B/B')/(C/C')$; ALDOC에 대한 5-HER2의 RR 값: $RRbd=(B/B')/(D/D')$]. 또한, 세포주 혹은 암조직 시료의 상대신호비율(RR) 값들을 표준시료의 상대신호비율(RR) 값으로 나눈 값을 정규화신호비율(nRR)로 정의하였으며, 정규화신호비율 값은 HER2의 카피수와 동일하다고 할 수 있다($nRR=\text{실험시료RR}/\text{표준시료RR}$).

- [144] 실제 실험에서는 10개의 표준시료 gDNA에서 얻은 RR 값들의 평균값을 평균RR($aveRRac$, $aveRRad$, $aveRRbc$, $aveRRbd$)로 정의하며, 이들을 사용하여 유전자 카피수를 측정하기 위한 정규화신호비율(nRR) 값을 구하였다. 이때, 세포주 혹은 암조직에서 얻은 DNA의 정규화신호비율(nRR) 값들은 $nRRac=RRac/aveRRac$, $nRRad=RRad/aveRRad$, $nRRbc=RRbc/aveRRbc$, $nRRbd=aveRRbd/RRbd$ 이 된다.

[145]

청구범위

- [청구항 1] 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 HER2 유전자의 단편 (이하 ‘HER2 경쟁자’); 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 표준유전자의 단편 (이하 ‘표준유전자 경쟁자’); 상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머; 및 상기 표준유전자 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 포함하는 HER2 양성 진단용 키트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 경쟁자를 위해 인위적으로 도입한 SNP는 자연계에서 1% 미만으로 나타나는 염기변화인 것인 키트.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 표준유전자는 17번 염색체의 장완(q arm)에 위치하는 둘 이상의 유전자 또는 인트론 서열로서 HER2 유전자 위치를 기준으로 하여 적어도 하나 이상 각각 텔로미어쪽과 센트로미어쪽에 위치하는 것인 키트.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 텔로미어쪽에 위치하는 표준유전자는 ALDOC(aldolase C, fructose-bisphosphate)이며, 상기 센트로미어쪽에 위치하는 유전자는 G6PC3(glucose 6 phosphatase, catalytic, 3)인 것인 키트.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 G6PC3 표준유전자의 경쟁자는 서열번호 24의 폴리뉴클레오티드로 이루어진 서열에 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하며, 상기 ALDOC 표준유전자의 경쟁자는 서열번호 25의 폴리뉴클레오티드로 이루어진 서열에 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 것인 키트.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 제1프라이머와 제2프라이머는 각각 하나 이상의 쌍을 포함하며, 제1프라이머는 서열번호 12 및 13의 서열로 표시되는 프라이머 또는 서열번호 14 및 15의 서열로 표시되는 프라이머이고, 상기 G6PC3에 대한 제2프라이머는 서열번호 16 및 17의 서열로 표시되는 프라이머이며, 상기 ALDOC에 대한 제2프라이머는 서열번호 18 및 19의 서열로 표시되는 프라이머인 것인 키트.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 제1프라이머와 제2프라이머는 각각 하나 이상의 쌍을 포함하며, 상기 제1프라이머는 서열번호 12 및 13의 서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 14 및 15의 서열로 표시되는 프라이머이고, 상기 G6PC3에 대한 제2프라이머는 서열번호 16 및 17의 서열로 표시되는 프라이머이며, 상기

- ALDOC에 대한 제2프라이머는 서열번호 18 및 19의 서열로 표시되는 프라이머인 것인 키트.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 HER2 경쟁자는 서열번호 10 또는 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드로 이루어진 서열에 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 것인 키트.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, HER2 양성을 측정하는 방법을 기재한 설명서를 추가로 포함하는 것인 키트.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 암조직에서 암세포의 각 분율과 HER2의 상대적인 카피수를 표시함으로써 암세포와 정상적인 세포가 섞인 상태에서 측정한 HER2 카피수 값을 암세포에서의 HER2 카피수로 변환할 수 있는 표 또는 그래프를 추가로 포함하는 것인 키트.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 키트는 상기 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 유전자 서열 모두에 상보결합 하는 프라이머로서, 인위적으로 도입한 염기와 상보 결합할 염기가 상기 프라이머에 의한 단일염기연장반응에 의해 첨가되도록 하는 연장 프라이머; 서로 다르게 표지된 ddGTP, ddCTP, ddATP 및 ddTTP로 구성된 다이디옥시 뉴클레오티드 혼합물; 및 DNA 중합효소를 추가로 포함하는 것인 키트.
- [청구항 12] (a) HER2 경쟁자 및 표준유전자 경쟁자가 포함된 혼합물을 지놈 DNA 시료에 첨가하는 단계;
 (b) 상기 단계 (a)의 경쟁자가 포함된 혼합물 및 지놈 DNA 시료에 상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머 및 상기 표준유전자 경쟁자와 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 첨가하여 증폭하는 단계;
 (c) 경쟁자 서열들의 증폭량과 이에 대응하는 야생형 서열들의 증폭량을 측정하고, 경쟁자 서열의 증폭량과 야생형 서열의 증폭량 간의 신호비율 (SR 값) 및 표준유전자의 신호비율에 대한 HER2 유전자의 신호비율의 상대값인 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료 및 실험시료 각각에 대하여 측정하는 단계; 및
 (d) 상기 단계 (c)의 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값이 표준시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값에 비해 큰 경우, 해당 실험 개체를 HER2 양성 개체로 판정하는 단계를 포함하는, HER2 양성 개체 검출 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 단계 (d) 이후에 표준시료에 대한 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)의 비를 HER2의 정규화신호비율 (nRR)로 정의하고, 이 값을 실험시료의 HER2

- 카피수로 판정하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 경쟁자를 위해 인위적으로 도입한 SNP는 자연계에서 1% 미만으로 나타나는 염기변화인 방법.
- [청구항 15] 제12항에 있어서, 상기 시료는 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액 및 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 시료인 방법.
- [청구항 16] 제12항에 있어서, 상기 단계 (b)의 증폭 반응은 다중 PCR(multiplex PCR) 방법을 사용하며, 상기 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 서열을 동시에 경쟁적으로 증폭시키는 것인 방법.
- [청구항 17] 제12항에 있어서, 상기 단계 (c)의 유전자 단편의 증폭량 측정은 단일 염기 연장법(single base extension)에 의해 측정하는 것인 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 단일 염기 연장법은, 상기 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 유전자 서열 모두에 상보결합 하는 프라이머로서, 인위적으로 도입한 염기와 상보결합할 염기가 상기 프라이머에 의한 단일염기연장반응에 의해 첨가되도록 하는 연장 프라이머, 서로 다르게 표지된 ddGTP, ddCTP, ddATP 및 ddTTP로 구성된 다이드옥시 뉴클레오티드 혼합물 및 DNA 중합효소와 반응시키는 단계; 및 상기 반응을 통해 연장된 단일 염기가 상기 경쟁자와 야생형 서열에서 다른 표지를 나타내는 것을 이용하여, 상기 양 서열을 구별하여 각 유전자량을 측정하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- [청구항 19] 제12항에 있어서, 상기 표준유전자는 17번 염색체의 장완(q arm)에 위치하는 둘 이상의 유전자 또는 인트론 서열로서 HER2 유전자 위치를 기준으로 하여 적어도 하나 이상 각각 텔로미어쪽과 센트로미어쪽에 위치하는 것인 방법.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 텔로미어쪽에 위치하는 표준유전자는 G6PC3이며, 상기 센트로미어쪽에 위치하는 유전자는 ALDOC인 것인 방법.
- [청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 G6PC3 경쟁자는 서열번호 24의 폴리뉴클레오티드로 이루어진 서열에 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하며, 상기 ALDOC 경쟁자는 서열번호 25의 폴리뉴클레오티드로 이루어진 서열에 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 것인 방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 제1프라이머와 제2프라이머는 각각 하나 이상의 쌍을 포함하며, 상기 제1프라이머는 서열번호 12 및 13의 서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 14 및 15의 서열로 표시되는 프라이머이고, 상기 G6PC3에 대한 제2프라이머는

서열번호 16 및 17의 서열로 표시되는 프라이머이며, 상기 ALDOC에 대한 제2프라이머는 서열번호 18 및 19의 서열로 표시되는 프라이머인 것인 방법.

[청구항 23]

제12항에 있어서, 상기 HER2 경쟁자는 서열번호 10 또는 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드로 이루어진 서열에 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 것인 방법.

[청구항 24]

(a) 실험시료 암조직 내 암 세포의 비율을 확인하는 단계;
 (b) HER2 경쟁자 및 표준유전자 경쟁자가 포함된 혼합물을 지놈 DNA 시료에 첨가하는 단계;
 (c) 상기 단계 (b)의 경쟁자가 포함된 혼합물 및 지놈 DNA 시료에상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머 및 상기 표준유전자 경쟁자와 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 첨가하여 증폭하는 단계;
 (d) 경쟁자 서열들의 증폭량과 이에 대응하는 야생형 서열들의 증폭량을 측정하고, 경쟁자 서열의 증폭량과 야생형 서열의 증폭량 간의 신호비율 (SR 값) 및 표준유전자의 신호비율에 대한 HER2 유전자의 신호비율의 상대값인 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료 및 실험시료 각각에 대하여 측정하는 단계;
 (e) 상기 단계 (a)에 따른 암 세포의 비율을 도 10의 x축 및 y축에 대입하여 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 재조정하여 재조정된 HER2 유전자 상대신호비율 (rRR 값)을 측정하는 단계; 및
 (f) 상기 단계 (e)에 실험시료의 재조정된 HER2 유전자 상대신호비율 (rRR 값) 값을 표준시료의 HER2 유전자 상대신호비율(RR 값)로 나누어 HER2의 정규화신호비율 (nRR)을 구하고 이 값을 HER2의 카피수로 결정하는 단계를 포함하는, HER2 양성 개체의 HER2 카피수 측정 방법.

[청구항 25]

제24항에 있어서, 상기 단계 (a)의 암 세포 비율을 확인하는 방법은 H&E 염색에 의한 것인 방법.

[청구항 26]

(a) 실험시료 암조직 내 암 세포의 비율을 확인하여 전체세포 중 암세포가 차지하는 비율(C, 예컨대 50%인 경우 C는 0.50)을 구하는 단계;
 (b) HER2 경쟁자 및 표준유전자 경쟁자가 포함된 혼합물을 지놈 DNA 시료에 첨가하는 단계;
 (c) 상기 단계 (b)의 경쟁자가 포함된 혼합물 및 지놈 DNA 시료에상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2

서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머 및 상기 표준유전자 경쟁자와 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 첨가하여 증폭하는 단계;

(d) 경쟁자 서열들의 증폭량과 이에 대응하는 야생형 서열들의 증폭량을 측정하고, 경쟁자 서열의 증폭량과 야생형 서열의 증폭량 간의 신호비율 (SR 값) 및 표준유전자의 신호비율에 대한 HER2 유전자의 신호비율의 상대값인 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값)을 표준시료 및 실험시료 각각에 대하여 측정하는 단계;

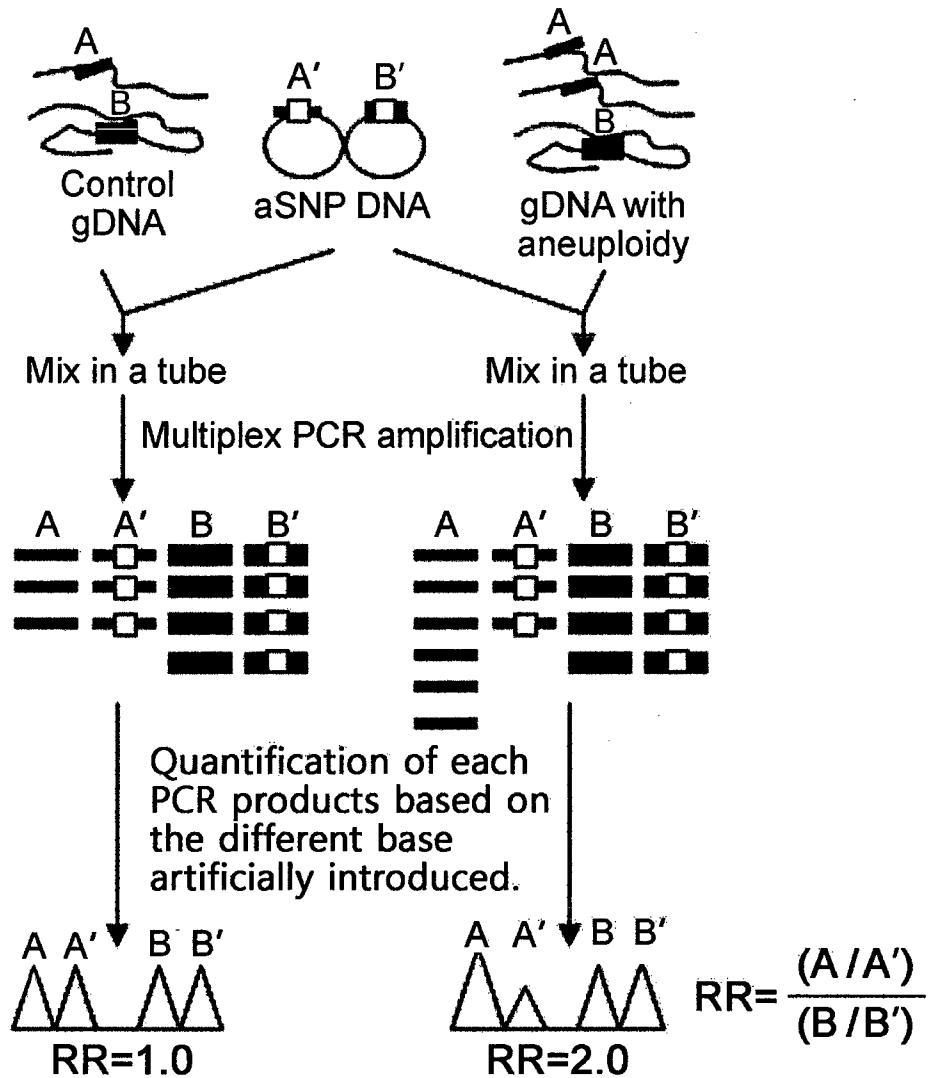
(e) 상기 단계 (d)에 따른 실험시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값을 표준시료의 HER2 유전자 상대신호비율 (RR 값) 값으로 나누어 HER2 카피수를 구하고, 식 $[(\text{HER2 카피수}-1)/C+1]$ 에 대입하여 암세포에서의 표준유전자에 대한 HER2의 상대신호비율로 결정하고, 이 값이 동일한 실험과정을 거쳐 얻은 표준시료의 표준유전자에 대한 HER2의 상대신호비율에 비해 2.0 보다 큰 경우, 해당 실험 개체를 HER2 양성 개체로 판정하는 단계를 포함하는, HER2 양성 개체 검출 방법.

[청구항 27] 제26항에 있어서, 상기 단계 (a)의 암 세포 비율을 확인하는 방법은 H&E 염색에 의한 것인 방법.

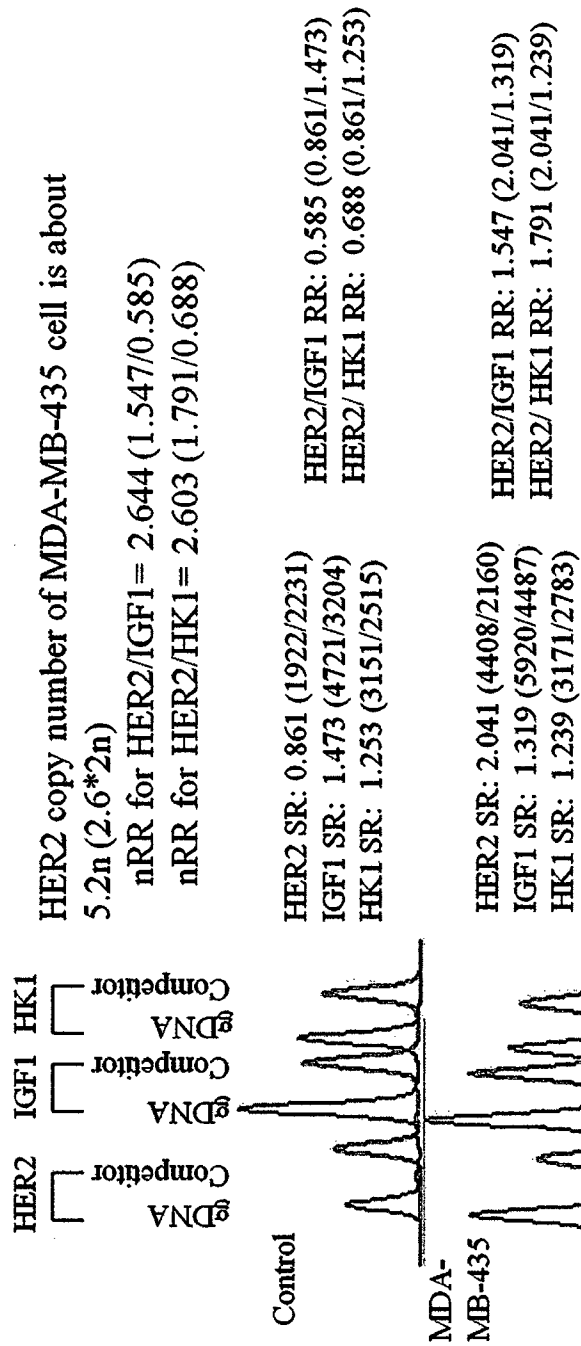
[청구항 28] 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 HER2 유전자의 단편 (이하 HER2 경쟁자); 인위적으로 염기의 변화가 이루어진 SNP를 하나 이상 포함하는 표준유전자의 단편 (이하 표준유전자 경쟁자); 상기 HER2 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 HER2 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제1프라이머; 및 상기 표준유전자 경쟁자 서열과 이에 대응하는 야생형 표준유전자 서열에 공통적으로 존재하는 서열로 이루어진 제2프라이머를 포함하는 HER2 양성 진단용 조성물.

[Fig. 1]

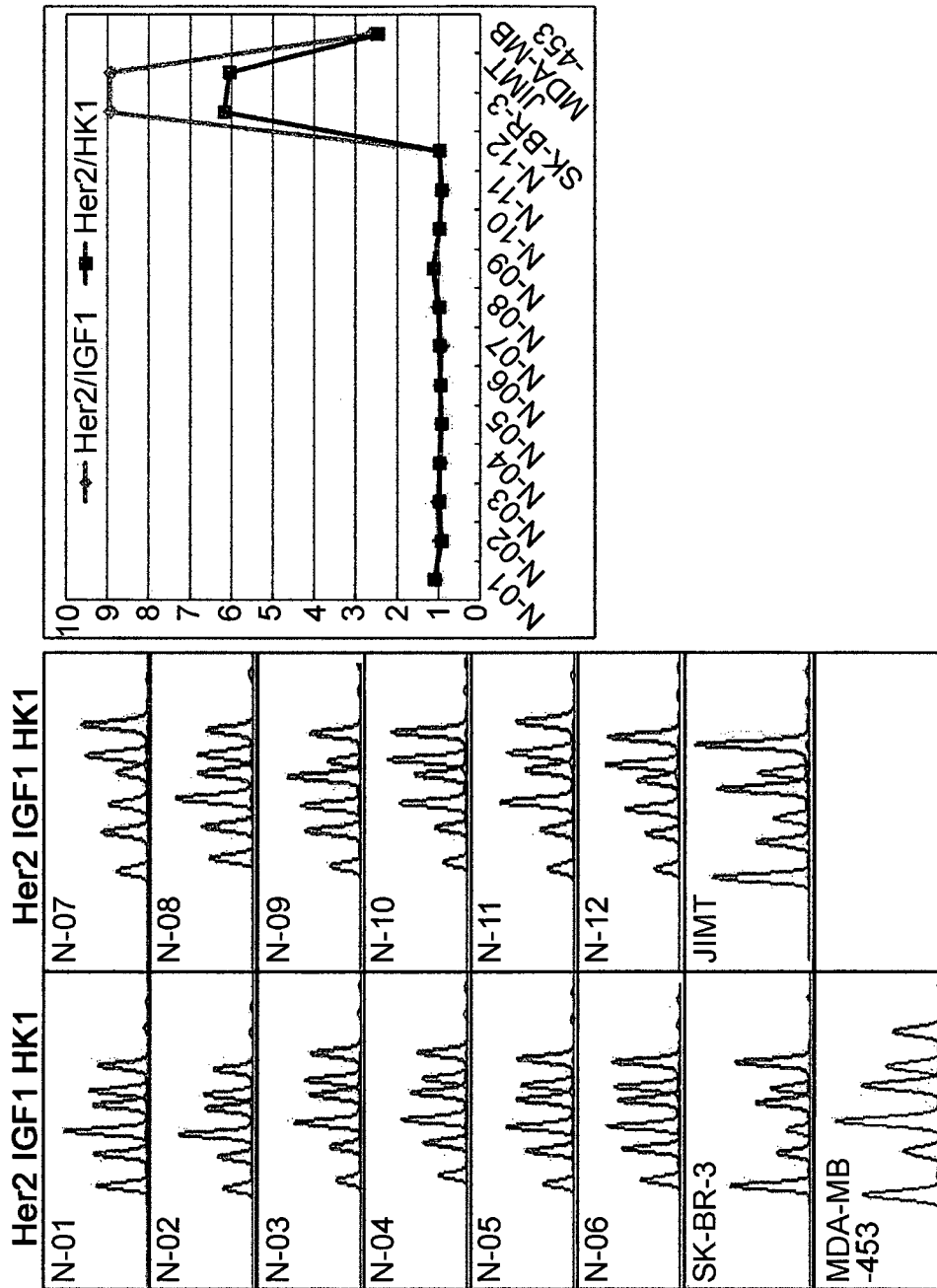
**mCoCom (multiplex competitive co-amplification)
assay for the measurement of gene copy
number changes**



[Fig. 2]

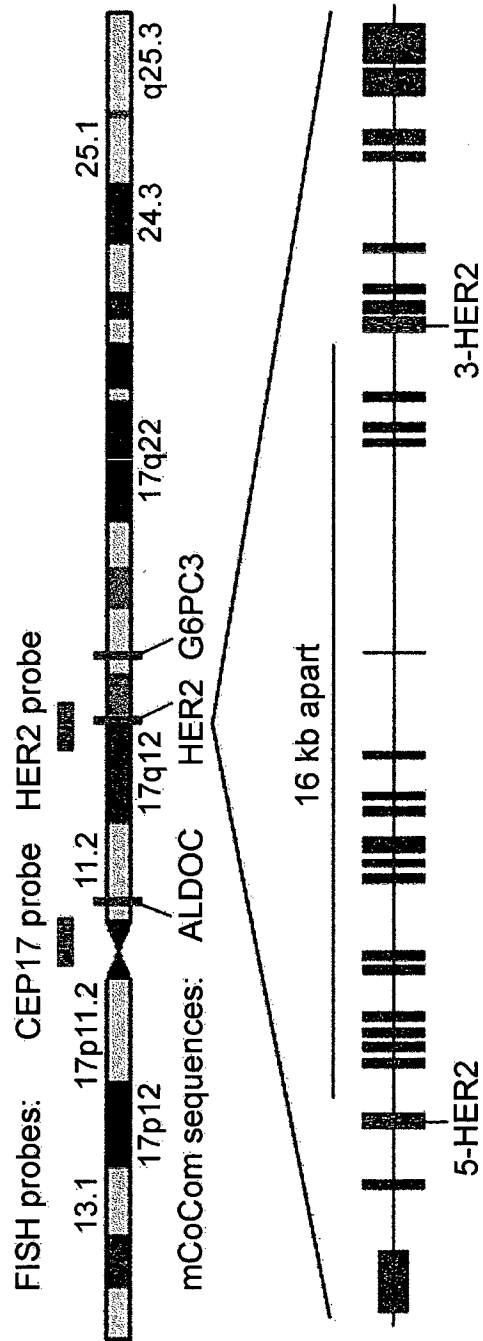


[Fig. 3]

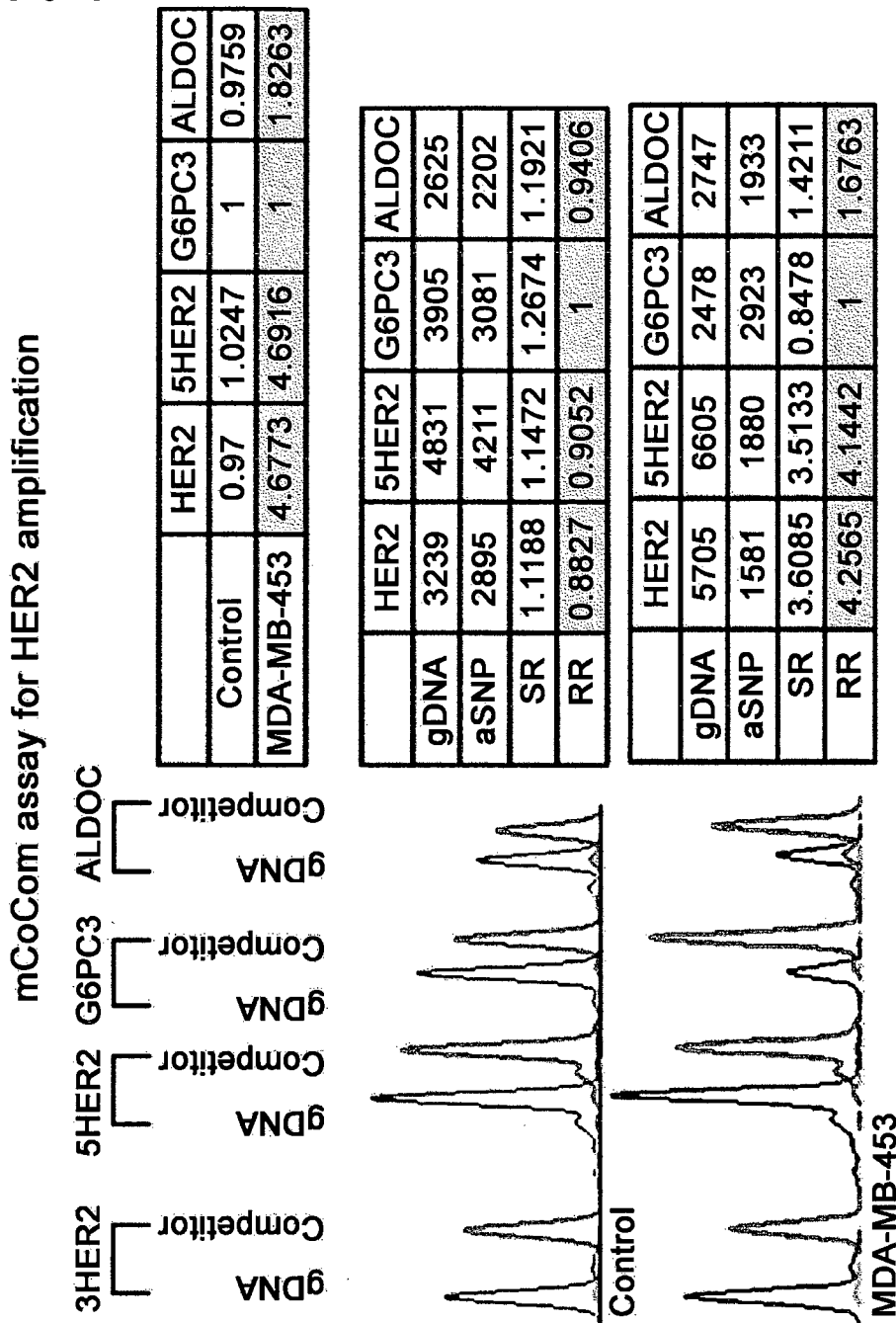


[Fig. 4]

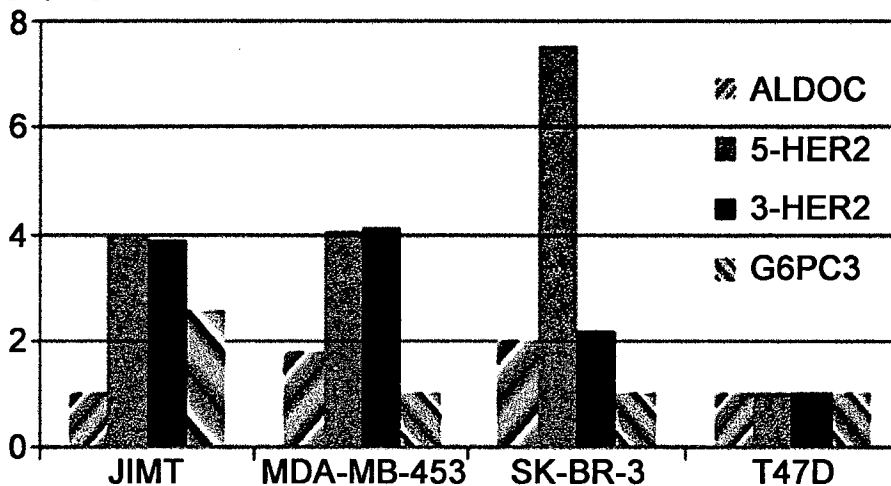
Location of mCoCom primers and FISH probes



[Fig. 5]

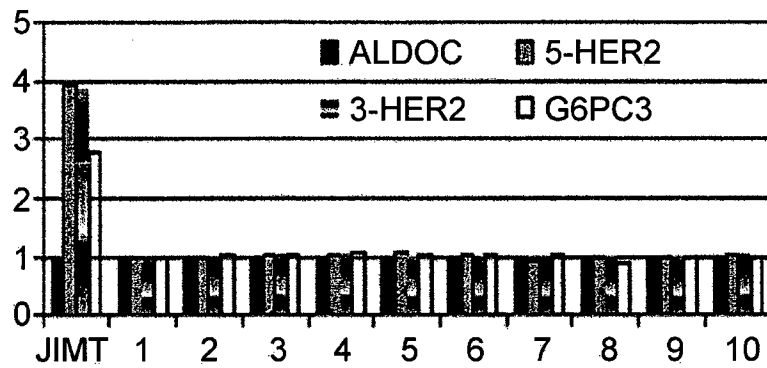


[Fig. 6]



[Fig. 7]

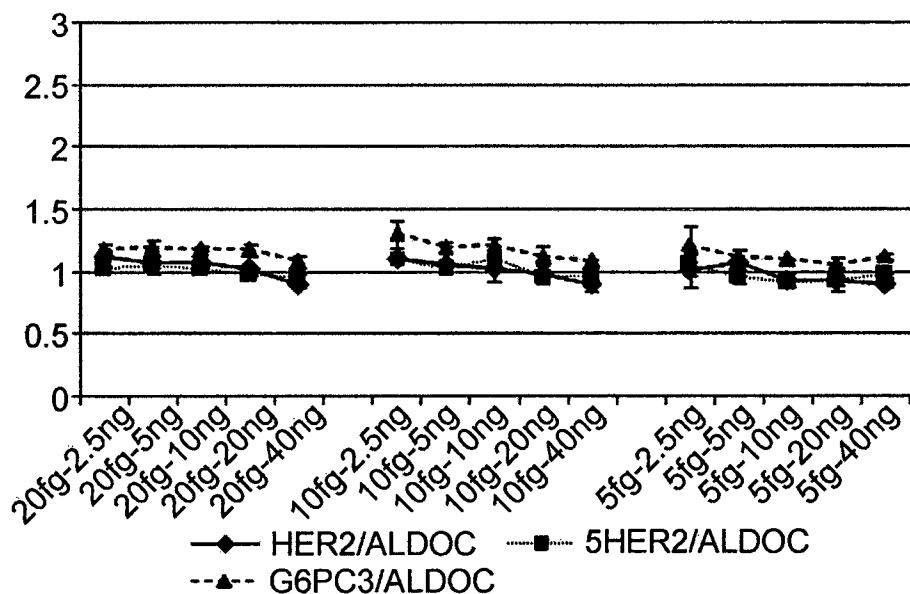
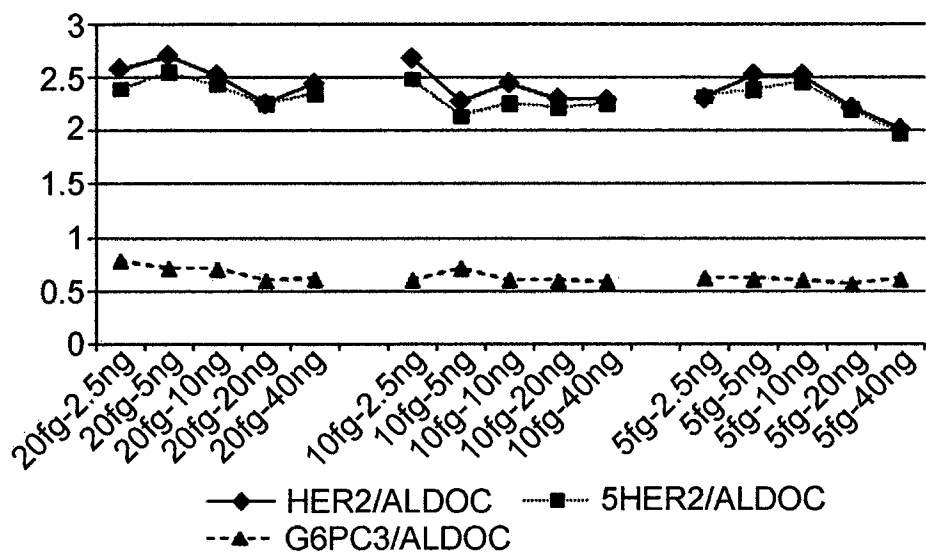
Reproducibility of mCoCom Assay with control samples



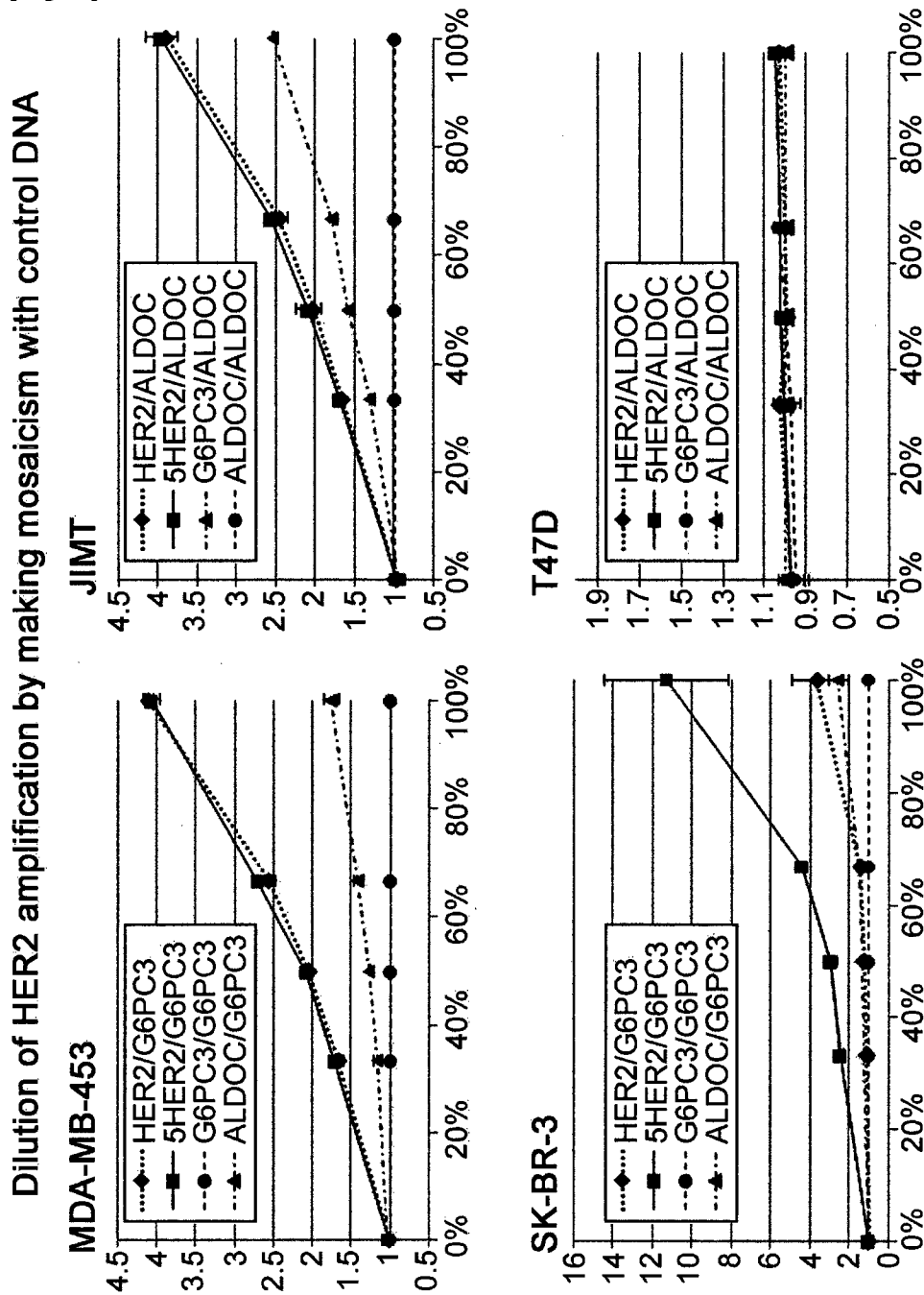
	ALDOC	5-HER2	3-HER2	G6PC3
Average	1	0.963	0.992	1.093
STDEV	1	0.030	0.031	0.059

	ALDOC	5-HER2	3-HER2	G6PC3
Average	1	1.000	1.000	1.000
STDEV	1	0.032	0.031	0.054

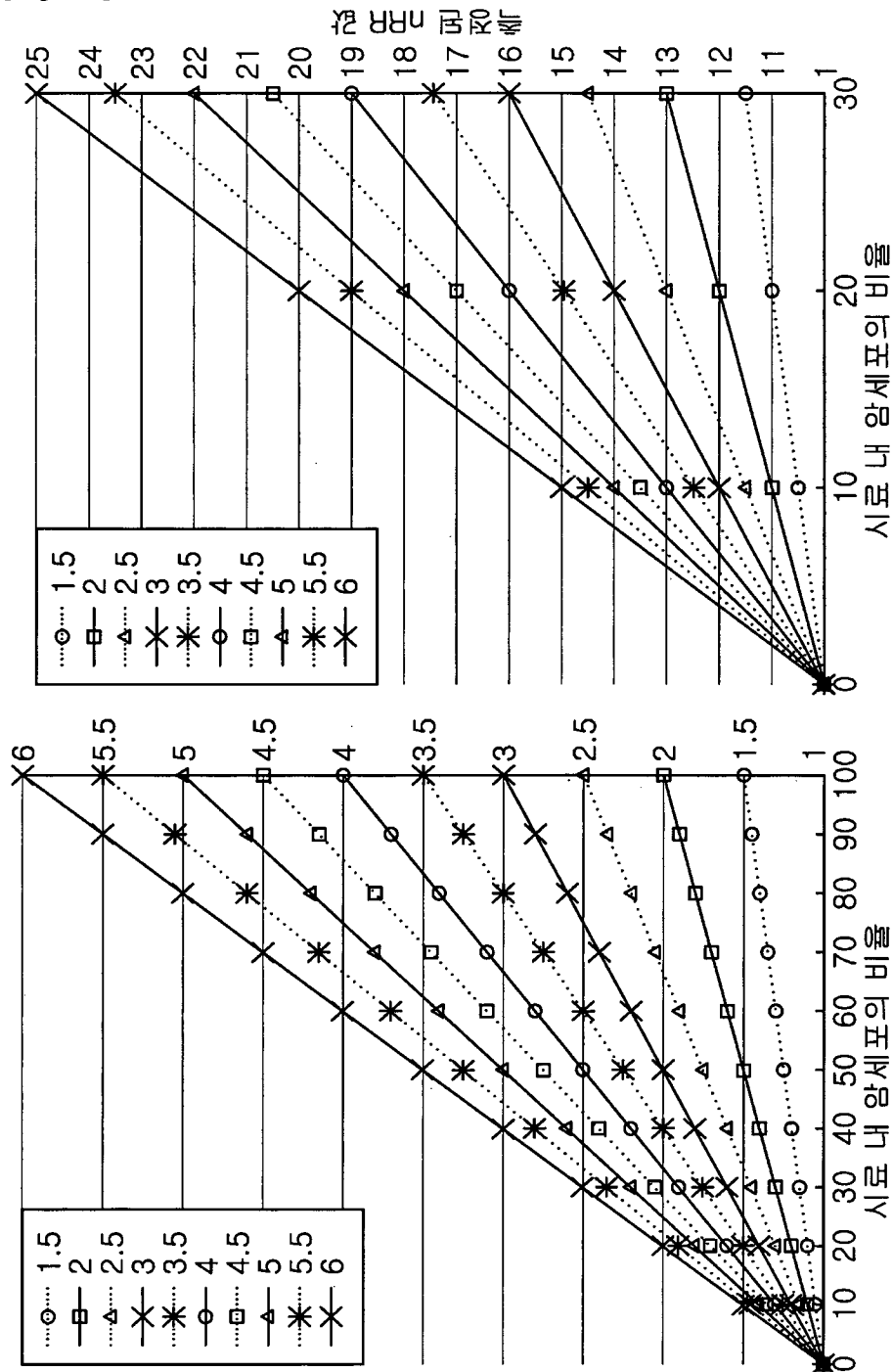
[Fig. 8]

A. Control**B. MDA-MB-453**

[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

