(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 3 월 28 일 (28.03.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/063523 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/6886 (2018.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/014217

(22) 국제출원일: 2023 년 9 월 20 일 (20.09.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0120790 2022 년 9 월 23 일 (23.09.2022) KR

(71) 출원인: 동아대학교 산학협력단 **(DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION)** [KR/KR]; 49315 부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, Busan (KR).

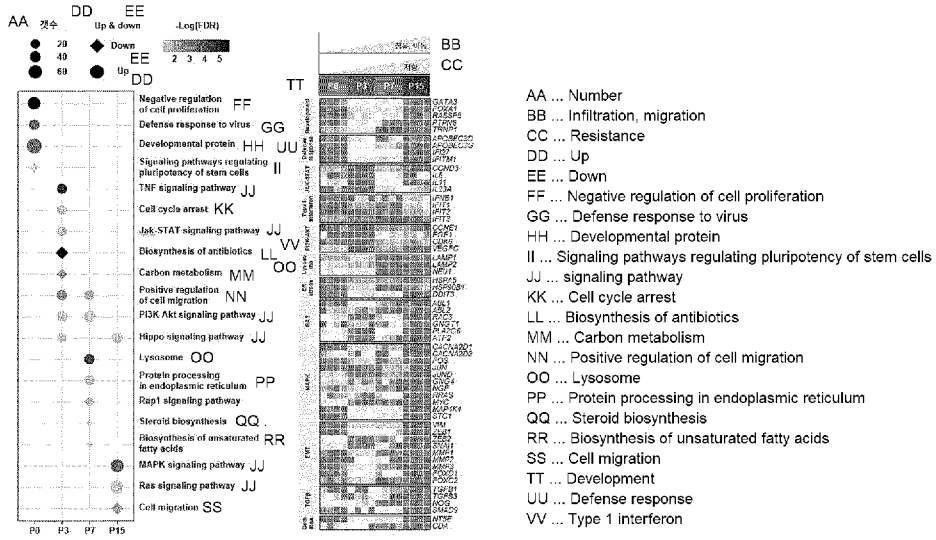
(72) 발명자: 임선희 **(LEEM, Sun-Hee)**; 46772 부산광역시 강서구 명지국제7로 110, 115동 1602호, Busan (KR). 문정연 **(MUN, Jeong-Yeon)**; 47798 부산광역시 동래구 충렬대로 487, 113동 402호, Busan (KR). 정미소 **(JEONG, Mi-So)**; 47045 부산광역시 사상구 엄궁로 40, 209동 103호, Busan (KR). 양기은 **(YANG, Gi-Eun)**; 49370 부산광역시 사하구 감천로21번길 46, 가-503, Busan (KR).

(74) 대리인: 위병갑 **(WIE, Byoung-Gap)**; 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) **Title:** BIOMARKER FOR DIAGNOSING RESISTANCE TO ANTICANCER DRUG IN BLADDER CANCER, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 방광암의 항암제 내성 진단용 바이오마커 및 이의 용도



(57) **Abstract:** In the present invention, differential expression of 23 genes has been identified, which are GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9, and NT5E, and it has been confirmed that expression of the 23 genes correlates with the prognosis and survival of bladder cancer patients and thus can be used as biomarkers for diagnosing anticancer drug-resistant bladder cancer, or predicting metastasis or making a prognosis thereof. In addition, it has been confirmed that, as a bladder cancer cell line acquires resistance, the ability for tumor infiltration and migration increases and the resistance to an anticancer drug also increases, and that the 23 genes are differentially expressed as a bladder cancer cell line acquires resistance to an anticancer drug. Further, it has been confirmed that, upon administration of an anticancer drug-resistant bladder cancer cell line to mice, the ability for tumor proliferation and metastasis increases, and that the expression of the 23 genes also increases in a mouse tumor. As such, the present invention is effective in making a diagnosis, prognosis, or metastasis prediction of cancer and also exhibits an excellent effect in diagnosing anticancer drug-resistant cancer, and thus would be useful in related industries.

WO 2024/063523 A1

[다음 쪽 계속]

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 23개의 유전자인 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E 의 차별 발현을 확인하였으며, 상기 23개의 유전자의 발현이 방광암 환자의 예후 및 생존율과 관련성이 있는 것을 확인하여, 상기의 유전자를 이용한 항암제 내성 방광암 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커로 이용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 방광암 세포주가 내성을 획득하면서 종양 침윤 및 이동 능이 증가하고, 항암제 저항성이 증가하는 것을 확인하였으며, 방광암 세포주가 항암제 내성을 획득함에 따라, 상기 23 개의 유전자가 차별 발현되는 것을 확인하였다. 또한, 항암제 내성 방광암 세포주를 마우스에 투여하면, 종양 증식 및 전이능이 증가하는 것을 확인하였으며, 마우스 종양에서도 상기 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였는 바, 암의 진단, 전이 또는 예후 예측에 효과적이고 항암제 내성암을 진단하는 효과도 우수한 바, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 방광암의 항암제 내성 진단용 바이오마커 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 방광암의 항암제 내성 진단용 바이오마커와 그 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 방광암은 전 세계적으로 가장 널리 퍼진 비뇨생식기 종양 중 하나로 약 573,000건의 새로운 사례가 보고되었다. 방광암 환자의 약 80%는 5년 생존율이 높은 표재성 방광암 진단을 받고 나머지 20%는 침윤성 방광암으로 진단받는다. 방광암에서는 외과적 수술이 활용되었지만 표재성 방광암 환자는 흔히 재발을 경험하며 이 중 약 20%가 침윤성 방광암으로 진행하게 된다. 화학 요법은 방광암 환자의 생존율을 향상시키는 유망한 치료법 중 하나이다. 젬시타빈은 활성 세포막 수송을 필요로 하는 데옥시시티딘 유사체로서 방광암과 같은 다양한 유형의 고형암에 대한 항암 효과를 나타낸다. 일단 세포 내부에 들어가면, 이불소화된 전구약물은 DNA에 결합되기 전에 모노, 디, 트리 인산화를 거쳐 차폐된 사슬 종결을 일으킨다. 그러나 젬시타빈 치료에 대한 침윤성 방광암 환자의 반응률은 40% 미만의 효능으로 제한되는 것으로 나타났으며 소수의 환자만이 잠재적인 이점을 가지고 있다.

[3] 많은 보고서에서 다양한 암에서 젬시타빈 내성과 관련된 마커를 발견하였다. 암의 이질성을 고려할 때, 약물 유출 경로 및 DNA 손상 반응과 관련된 유전자의 높은 발현은 단백질의 이차 돌연변이 또는 후성 유전적 변화로 인해 보고되고 있다. 상피-중간엽 전이 과정은 약물을 피하기 위한 전략으로도 해석될 수 있다. 그럼에도 불구하고 방광암에서 젬시타빈 내성 관련 마커를 찾는 것은 여전히 필요하다.

[4] 따라서 본 발명의 목적은 방광암 환자의 항암제 내성 및 예후를 예측할 수 제제를 포함하는 항암제 내성 진단용 조성물 및 항암제 내성 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명의 목적은, GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 바이오마커를 제공하는 것이다.

[6] 본 발명의 다른 목적은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4,

STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[7] 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 조성물을 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 또 다른 목적은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[9] 상기 분리된 생물학적 시료에서 상기의 키트를 이용하여, GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[10] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[12] 상기 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

[13] 상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료에서 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[14] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자를 포함하는 항암제 약물내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 바이오마커를 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 항암제 약물내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 조성물을 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[19] 상기 분리된 생물학적 시료에서 상기의 키트를 이용하여, GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG,

SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[20] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[22] 상기 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

[23] 상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료에서 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[24] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[25] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 바이오마커를 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[27] 또한, 본 발명은 상기의 조성물을 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[28] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[29] 상기 분리된 생물학적 시료에서 상기의 키트를 이용하여, GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[30] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[31] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[32] 상기 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

[33] 상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료에서 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[34] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[35] 또한, 본 발명은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자를 포함하는 항암제 약물내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 바이오마커를 제공한다.

[36] 또한, 본 발명은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[37] 또한, 본 발명은 상기의 조성물을 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[38] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[39] 상기 분리된 생물학적 시료에서 상기의 키트를 이용하여, GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[40] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[41] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[42] 상기 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

[43] 상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료에서 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[44] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[45] 본 발명은 23개의 유전자인 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E의 차별 발현을 확인하였으며, 상기 23개의 유전자의 발현이 방광암 환자의 예후 및 생존율과 관련성이 있는 것을 확인하여, 상기의 유전자를 이용한 항암제 내성 방광암 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커로 이용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 방광암 세포주가 내성을 획득하면서 종양 침윤 및 이동 능이 증가하고, 항암제 저항성이 증가하는 것을 확인하였으며, 방광암 세포주가 항암제 내성을 획득함에 따라, 상기 23개의 유전자가 차별 발현되는 것을 확인하였다. 또한, 항암제 내성 방광암 세포주를 마우스에 투여하면, 종양 증식 및 전이능이 증가하는 것을 확인하였으며, 마우스 종양에서도 상기 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였는 바, 암의 진단, 전이 또는 예후 예측에 효과적이고 항암제 내성암을 진단하는 효과도 우수한 바, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[46] 도 1은 T24 방광암 세포로부터의 분자 진화 세포주의 수립 및 항암제 내성을 검증한 도이다.

[47] a: 분자 진화 세포주의 수립 공정을 나타낸 도이다.

[48] b: T24-P0 세포로부터의 분자 진화 세포주의 4가지 그룹(#1~4)을 나타낸 도이며, GRC1-P3, GRC1-P7, 및 GRC1-P15 세포는 젬시타빈을 통한 분자 진화 검정이 3, 7 및 15 회 처리된 세포를 나타낸다.

[49] c: 단계적인 약물 처리를 통해 GRC1-P2 세포에서 약물 처리된 GRC1-P3 세포로, GRC1-P6 세포에서 약물 처리된 GRC1-P7 세포로, 및 GRC1-P14 세포에서 약물 처리된 GRC1-P15 세포로 수립하는 단계에서 세포 콜로니 형태를 나타낸 도이다.

[50] d: 젬시타빈 약물 처리에 대한 투여량-반응 곡선을 나타낸 것이다.

[51] e: T24 GRC #1 세포주에 젬시타빈을 24시간 처리 후 콜로니 형성 개수를 확인한 도이다.

[52] f: T24 GRC #1 세포주에 젬시타빈을 처리하지 않은 세포주에서 콜로니 형성 개수를 확인한 도이다.

[53] g: T24 세포주들의 비부착성 콜로니 형성 능력을 확인한 도이다.

[54] h: GRC 세포 및 T24-P0 세포에서 검출된 트랜스웰 침습 검정 및 이동 검정 능력을 확인하여 (×400) 필드 당 세포 수를 계수하여 계산한 세포 침입 및 이동 능력을 나타낸 도이다.

[55] 도 2는 GRC 세포가 organ-on-chip에서 전이 능력이 항암제 내성이 증가함에 따라 촉진됨을 나타낸 것이다.

[56] a: 마이크로유체 디바이스에서 HUVEC 세포로 겔 침습한 GRC 세포 및 GRC 세포의 최대 침투 거리, 침투 영역 및 침투 수를 정량화한 도이다.

[57] b: T24-P0 및 GRC1-P15 세포에서의 EMT-관련 유전자 (MMP-1, MMP-2, MMP-9, VIM, SNAIL, SLUG, ZEB1, ZEB2, TWIST, NCAD, SDC1, SDC2, 및 ECAD)의 mRNA 수준과 MMP-1, MMP-2, MMP-9, NCAD, VIM, SNAIL, ECAD, GAPDH의 단백질 수준을 나타낸 것이다.

[58] 도 3은 RNA-시퀀싱 프로파일링에 의해 약물 내성의 유전자 발현을 발견하고 확인한 결과이다.

[59] a: RNA-시퀀싱 프로파일링 전체 과정을 나타낸 공정도이다(DEGs; Differentially Expressed Genes, TCGA; The Cancer Genome Atlas).

[60] b: GRC1 세포주(n=16)의 주성분 분석(PCA)을 통해 분자 메커니즘(CPM > 1 및 S.D > 1)과 관련된 1,869개의 유전자를 기반으로 한 결과이다.

[61] c: GRC 세포의 분자 진화의 경로에서의 변화를 보이는 Gene Ontology (GO) 분석 결과로서, 모든 differentially expressed genes (DEGs)-관련 경로를 보이는 RNA-시퀀싱 데이터의 계층 클러스터링 및 히트맵을 나타낸 것이다.

[62] 도 4는 GRC 세포의 분자 진화의 경로에서 변화를 보이는 GO 분석 결과에 따라 DEG 관련 경로를 나타낸 결과이다.

[63] a: RNA-시퀀싱 데이터 변화 경로에 대표 경로와 관련 유전자들의 발현 수준을 히트맵으로 나타낸 도이다.

[64] b: 젬시타빈 내성의 분자 변화에 대한 개략도를 나타낸 도이다.

[65] c: 왼쪽 패널은 GRC1 세포주에서 젬시타빈 내성과 관련된 23개의 유전자 특징의 히트맵을 나타낸 도이며, 중간 패널은 TCGA에서 젬시타빈 치료에 대한 반응을 예측하기 위한 23개의 유전자 특징의 민감도 및 특이성을 나타낸 ROC 곡선이다.

[66] d: 내화학성 점수에 따라 분류된 TCGA 코호트의 히트맵 및 임상정보를 나타낸 도이다.

[67] e: 왼쪽 패널은 젬시타빈 치료에 대한 객관적인 반응률을 두 그룹으로 계층화한 것이고, 중간 패널은 TCGA 코호트에서 두 그룹의 카플란-마이어 곡선을 통해 내화학성 점수로 계층화하였으며, 오른쪽 패널은 내화학성 점수에 의해 계층화된 TCGA 하위 유형의 분포를 나타낸 도이다.

[68] f: TCGA 아형에 따른 내화학성 점수을 나타낸다.

[69] 도 5는 GRC1 세포주에 시스플라틴 및 독소루비신 내성에 대한 코호트를 분석한 도이다.

[70] a: 왼쪽 패널은 GRC1 세포주에 시스플라틴과 독소루비신을 농도별로 72시간 처리한 후 MTT 분석으로 약물 민감도 곡선을 나타낸 도이며, 오른쪽 패널은 내화학성 점수에 따라 분류된 TCGA 코호트의 히트맵, 약물 반응 및 전체 생존을 나타낸 도이다.

[71] b: 시스플라틴, 카보플라틴 및 독소루비신에 대한 완전한 반응을 예측하기 위한 내화학성 점수의 민감도 및 특이도를 ROC 곡선으로 나타낸 도이다.

[72] c: 시스플라틴, 카보플라틴 및 독소루비신에 대한 객관적 반응률을 두 군으로 계층화한 도이다.

[73] d: 카플란-마이어 곡선으로 TCGA 코호트에서 내화학성 점수로 계층화한 도이다.

[74] 도 6은 내화학성 점수를 기반으로 한 UROMOL 코호트의 NMIBC 환자에 대한 유전자 발현 패턴 및 생존 분석을 나타낸 도이다.

[75] a: UROMOL 코호트에서 NMIBC 환자의 진행을 예측하기 위한 23개 유전자 특징의 민감도 및 특이성의 ROC 곡선을 나타낸 도이다.

[76] b: 내화학성 점수에 따라 그룹화된 UROMOL 코호트의 히트맵을 나타낸 도이다.

[77] c: UROMOL 코호트에서 두 그룹의 카플란-마이어 곡선은 내화학성 점수로 계층화한 도이다.

[78] 도 7은 GRC 세포가 in vivo에서 종양 성장 및 전이가 촉진되는 것을 나타낸 도이다.

[79] a: 왼쪽 패널은 실험 스케줄을 나타낸 것으로, 실험 기간 동안 실시된 실험을 나타낸 것이며, 오른쪽 패널은 GRC1-P3, GRC1-P7 및 GRC1-P15 세포가 주입된 마우스 그룹의 체중 및 수술로 제거된 종양 조직 크기 이미지이다.

[80] b: 종양 부피와 GRC 세포 이종이식 종양 샘플에서 면역화학에 의한 Ki67 발현을 나타낸 H&E 염색 결과이다.

[81] c: 왼쪽 패널은 T24-P0, GRC1-P3, GRC1-P7, 및 GRC1-P15로부터 수득한 폐 조직 섹션의 H&E 조직학 이미지이며, 오른쪽 패널은 T24-P0, GRC1-P3, GRC1-P7, 및 GRC1-P15 세포의 꼬리 정맥 주입 후 형성된 전이 폐 결절의 수를 정량화한 도이다.

[82] d: P0와 P15 세포주에서 23개유전자들 중 10개의 mRNA 수준을 정량화한 것이다.

[83] e: mouse tumor에서 23개 유전자들 중 10개의 mRNA 수준을 정량화한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[84] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[85] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할

때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[86] 본 발명은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 바이오마커를 제공한다.

[87] 본 발명에서, 사용된 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

[88] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 바이오마커는, 암(cancer)의 항암제 내성을 조절하는 것일 수 있다.

[89] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 항암제는 항암치료를 위해 사용되는 항암제일 수 있으며, 예를 들어, 젬시타빈(gemcitabine), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 독소루비신(doxorubicin), 마이토마이신 C(mitomycin C) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[90] 상기 항암제는 방광암 치료를 위해 사용된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[91] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 암은 방광암, 유방암, 교모세포종, 전립선암, 뇌척수종양, 두경부암, 폐암, 흉선종, 중피종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 담도암, 신장암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있고, 바람직하게는 방광암이나, 이에 제한되지 않는다.

[92] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 바이오마커의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 증가하면, 암의 항암제 내성이 증가하는 것일 수 있다.

[93] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 바이오마커의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 증가하면, 암세포의 성장, 침습(invasion) 또는 이동(migration)이 증가하는 것일 수 있다.

[94] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 바이오마커의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 증가되면, 암의 임상적 예후(prognosis)가 불량한 것일 수 있으며, 상기 예후가 불량한 것은, 암의 반응률(response rate)이 감소하는 것일 수 있고, 암세포의 항암제 내성이 증가된 것일 수 있다.

[95] 또한, 본 발명은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4,

STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[96] 상기 miRNA 또는 이의 단편의 발현 수준을 확인하는 방법에 사용되는 제제는 시료에 포함된 해당 miRNA 또는 이의 단편의 발현 여부를 확인하는 방법에 사용되는 제제를 의미하는데, 예를 들어, RT-PCR, 경쟁적 RTPCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블럿팅(Northern blotting), 유전자 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[97] 본 발명에서 사용되는 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxylgroup)를 가지는 핵산서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.

[98] 본 발명에서 사용되는 용어 "프로브"란, 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하는데, 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이하게 검출하기 위하여 라벨링될 수 있다.

[99] 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 항체, 앱타머, 올리고펩타이드 또는 PNA(Peptide nucleic acid), 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머 또는 프로브 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[100] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 유전자의 발현항을 측정하는 제제는, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍; 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍; 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍; 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍; 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍; 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍; 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머 쌍; 서열번호 19 및 서열번호 20의 프라이머 쌍; 서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머 쌍; 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머 쌍; 서열번호 25 및 서열번호 26의 프라이머 쌍; 서열번호 27 및 서열번호 28의 프라이머 쌍; 서열번호 29 및 서열번호 30의 프라이머 쌍; 서열번호 31 및 서열번호 32의 프라이머 쌍; 서열번호 33 및 서열번호 34의 프라이머 쌍; 서열번호 35 및 서열번호 36의 프라이머 쌍; 서열번호 37 및 서열번호 38의 프라이머 쌍; 서열번호 39 및 서열번호 40의 프라이머 쌍; 서열번호 41

및 서열번호 42의 프라이머 쌍; 서열번호 43 및 서열번호 44의 프라이머 쌍; 및 서열번호 45 및 서열번호 46의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 쌍인 것일 수 있다.

[101] 또한, 본 발명은 상기의 조성물을 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[102] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[103] 상기 분리된 생물학적 시료에서 상기의 키트를 이용하여, GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[104] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[105] 구체적으로, 대상으로부터 분리된 시료에서 상기 유전자의 발현수준이 정상 대조군에 비해 상향발현될 경우 항암제에 대해 내성이 있는 것으로 판단할 수 있다. 상기 정상 대조군은 정상 환자 대조군일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[106] 상기 유전자의 발현수준은 유전자의 miRNA 또는 유전자가 코딩하고 있는 단백질 발현수준을 측정하는 것일 수 있으며, 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(real time quantitative RTPCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 유전자 칩에 의해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[107] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 유전자의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 증가되면, 암의 반응률(response rate)이 감소하는 것으로 판단하는 것일 수 있고, 암의 항암제 내성이 증가한 것으로 판단하는 것일 수 있으며, 암세포의 성장, 침습(invasion) 또는 이동(migration)이 증가하는 것으로 판단하는 것일 수 있다.

[108] 상기 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 소변과 같은 시료 등을 포함할 수 있으며, 예를 들어 혈액 또는 조직일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[109] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[110] 상기 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

[111] 상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료에서 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[112] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[113] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 유전자의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 저발현 되면, 항암효과가 있는 것으로 판단하는 것일 수 있다.

[114] 본 발명의 일실시예에 따르면, 항암 효과는 암의 반응률(response rate)이 증가하는 것일 수 있고, 암세포의 성장, 침습(invasion) 또는 이동(migration)이 감소하는 것일 수 있으며, 암세포의 항암제 내성이 감소하는 것일 수 있다.

[115] 또한, 본 발명은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자를 포함하는 항암제 약물내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 바이오마커를 제공한다.

[116] 또한, 본 발명은 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[117] 또한, 본 발명은 상기의 조성물을 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[118] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[119] 상기 분리된 생물학적 시료에서 상기의 키트를 이용하여, GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[120] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[121] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[122] 상기 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

[123] 상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료에서 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[124] 상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

[125] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시

예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[126] **<실험예>**

[127] **1. 세포 배양**

[128] 인간 방광암 세포주인 T24, 5637, UC3, UC5 및 UC14는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하고 RT4 세포주는 Korean Cell Line Bank (KCLB)에서 구입하였다. T24, UC3, UC5, UC14 및 RT4 세포주는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 배양하고, 5637 세포주는 10% FBS (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) 및 1% penicillin/streptomycin (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)이 보충된 RPMI 1640에 배양하였다. 모든 세포주는 37℃, 5% CO_2조건으로 배양하였다.

[129] **2. 분자 진화 검정(Molecular Evolution Assay)**

[130] 도 1a에 나타낸 공정을 통해 분자 진화 검정을 실시하였다. 분자 진화 검정에서 세포사멸에 대한 젬시타빈의 적절한 비율을 확인하기 위해, 사전 배양에서 다양한 젬시타빈 농도를 확인하였으며, 1,500 nM이 가장 적당한 농도임을 확인하였다. 그 후 인간 방광암 세포주 T24의 세포 포화도가 70%에 이르렀을 때 에 1,500 nM 젬시타빈 (GEM, Lilly, Eli 및 company)을 72시간 동안 처리하였다. 그 후, 젬시타빈을 포함하는 DMEM을 신선한 배지로 교체하여 세포를 90%의 포화도에 도달할 때까지 회복시켰다. 회복된 세포를 회수하고, RNA 분리, 단백질 침전, 세포독성 검정하고, 이를 계대 배양 하였다. 동일한 방법으로 15 회 계대한 후, 분자 진화 검정을 실시하였다. 각각의 계대에서, P0 (Phase 0)는 비처리 대조 T24 세포주(T24-P0, 부모 세포)이며, P1 및 P1+n은 각각 1회 계대 및 (1+n)회 계대된 세포를 나타낸다.

[131] **3. RNA 시퀀싱 샘플 준비**

[132] 세포를 수확하고 RNeasy Mini Kit (#74316, Qiagen, CA, USA)를 사용하여 총 RNA 추출을 시행하였다. 구체적으로 RNA의 정량 및 RNA 정량 비교를 위하여, 추출된 RNA를 6% 포름알데하이드 겔에서 전기영동 한 후 ethidium bromide (EtBr) 염색으로 확인하였다. 전체 전사체 시퀀싱을 위한 라이브러리 구축은 키트를 사용해 실시하였으며, 분리된 총 RNA를 PrimeScript™ (TakaraBio, Otsu, Japan)를 사용하여 poly (dT) 프라이머를 이용한 역전사 반응에 사용하였다.

[133] **4. 세포 생존율 및 콜로니 형성 확인**

[134] 세포를 1 x 10^3 세포농도로 96-웰 플레이트의 각 접종하여 배양하였다. 그 후 DMEM를 제거하고 세포 시간 위치를 기록하고 이동 비율을 0, 24, 48 및 72 시간에 각각 측정하였다. 그 후 세포 생존율을 확인하기 위하여, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; #298-93-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 각 웰에 첨가한 후 1시간 동안 배양하고 Dimethyl Sulfoxide (DMSO; Duchefa Biochemie, BH Haarlem, Netherlands)를 첨가하였다. 그

후 540 nm에서spectrophotometer microplate reader (Victor3)를 이용하여 흡광도를 측정하고 세포 생존률을 대조군과 비교하여, 대조군에 대한 생존비를 계산하였다.

[135] 또한, 세포를 6-웰 플레이트에 1 x 10^3 세포 농도로 접종하고, 각 웰에 콜로니가 형성될 때까지 7일간 배양하였다. 그 후 콜로니를 4% 포름알데히드로 10분간 고정하고 0.1% 크리스탈 바이올렛 용액을 이용하여, 1시간 동안 콜로니를 염색하였다. 염색된 콜로니 수는 Image J software (NIH; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 계수하였다.

[136] **5. 세포 침입 및 이동 검정**

[137] 세포 침윤 및 이동을 확인하기 위하여, 트렌스웰 검정을 사용하여 Boyden chamber에서 세포 침윤 및 이동을 확인하였다. 구체적으로 매트리겔(matrigel; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) 코팅된 챔버에 4×10^4 세포농도로 세포를 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 그 후 세포의 조정 배지(CM)에 대한 세포 침윤 및 이동 분석을 위하여, 세포를 1:1 비율의 CM 및 새로운 배지에서 24시간 동안 접종하고, 침윤 또는 이동 능력을 확인하였다.

[138] **6. 상처 회복 분석(Wound Healing Assay)**

[139] 세포를 6-웰 플레이트에 접종하고 90% 포화도에 이를 때 까지, 24시간 동안 배양하였다. 그 후 P200 피펫의 옐로우 팁으로 배양된 세포 표면에 상처를 만든 후, 세포를 PBS(phosphate buffered solution)로 세척하고, 5% CO_2, 37℃ 조건으로 추가 배양하였다. 배양 24시간 후, 세포를 광현미경으로 확인하였으며, 상처 부근의 사진을 시간 간격을 두고 촬영하였다. 그 후 3개의 무작위 필드를 표시하여 상처 회복 정도를 확인하였으며, 상처 회복에 대한 정량 분석을 위하여, 대조군 세포의 이동 거리에 대한 비율로 상처 회복 정도를 정량화 하였다.

[140] **7. 마이크로유체 디바이스(마이크로유체 디바이스) 제작**

[141] 3D 세포 배양을 위한 마이크로유체 디바이스를 AutoCAD software (Autodesk, USA)를 사용하여 설계하였다. 설계된 디바이스를 이용하여, Si 마스터 몰드를 포토리소그래피 기법을 이용하여 제작하였다. 구체적으로 경화제와 혼합한 Poly-dimethylsiloxane (PDMS) (Sylgard 184, Dow Corning, USA) pre-polymer를 약 5-6 mm 두께로 Si 마스터에 붓고 80℃에서 2시간 동안 경화시켰다. 그 후 경화된 PDMS층을 분리하고 개별 디바이스로 절단하였으며, 주입구 및 유출구 구멍을 마이크로채널의 시작부에 뚫었다. 그 후 PDMS층을 오토클레이브로 멸균하였으며, PDMS층의 채널을 멸균된 커버 글라스(24 mm × 24 mm) 상에 플라즈마-활성 본딩으로 밀폐하였다. 본딩 후에, 친수성 채널 표면을 1 mg/㎖의 poly-D-lysinehydrobromide(PDL)(Sigma-Aldrich, MO, USA)로 4시간 동안 코팅하여 채널 표면에 대한 콜라겐 부착을 향상시키고 증류수로 3회 세척하였다. 제작된 마이크로유체 디바이스는 80℃ 오븐에서 완전히 건조시켰다.

[142] **8. 마이크로유체 디바이스에서 방광암 세포 및 HUVEC 세포 공동-배양**

[143] 스캐폴드 물질로서, 타입 I 콜라겐 (Corning, USA) 용액(2 mg/㎖)을 종래 문헌에 기재된 바와 같이 제조하였다[Chung S. et al., *Adv. Mater.* 21(47):4863-4867; Jeong K. et al., *Lab Chip* 2020;(20):548-557]. 그 후, 마이크로유체 디바이스의 중앙 채널에 콜라겐 용액을 채우고, 디바이스를 37℃ 인큐베이터에서 30분간 반응시켰다. 겔화된 디바이스 표면의 세포 부착을 증가시키기 위하여, 희석된 콜라겐 용액(PBS 중 35 μg/㎖)을 배지 채널 내로 도입하였다. 그 후 5% CO_2 인큐베이터에서 30분간 반응 시킨 후, 채널을 신선한 배지로 세척하였다. 각 조건(T24-P0, GRC1-P3, GRC1-P7, 및 GRC1-P15)에서의 방광암 세포의 현탁액(1×10^6 cells/㎖)을 배지 채널에 도입시킨 후 세포 부착을 위하여 배양하였다. 배양 4시간 이 후, HUVECs의 현탁액(1×10^6 cells/㎖) 또한 배지 채널의 반대쪽으로 도입하였다. 방광암 및 HUVECs를 위한 배지를 각 채널에 공급하였으며, 매일 배지를 교체하면서 마이크로유체 디바이스에서 공동 배양하였다.

[144] **9. 면역염색 및 종양 이동 확인**

[145] 공동-배양하는 5일 동안 마이크로유체 디바이스에서 HUVEC 세포 쪽의 겔에 침입하는 방광암 세포의 이동을 확인하였다. 세포를 실온에서 20분간 4% 파라포름알데히드로 고정시키고 0.1% Triton X-100으로 20분간 반응 시켰다. 그 후 액틴 필라멘트 및 핵을 phalloidin-594 (1:400, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 Hoechst 33342 (1:2000, Thermo Fisher Scientific, USA)로 각각 염색하였다. 그 후 전체 디바이스를 스캐닝하고 high contents screening microscope (CELENA X, Logos Biosystems, Republic of Korea)를 이용하여 시각화 하였으며, 3개의 다른 디바이스에서 8 내지 9 영역의 ROI(region of interest) 이미지를 촬영하고(total n=25), 모든 바이너리(binary) 및 트레스홀드(thresholded) 이미지를 분석하였다. 그 후 시각화 된 방광암의 침습 이미지를 Image J software를 사용하여 최대 침습 거리, 침습 영역 및 침습한 암세포의 수를 정량적으로 분석하였다. 암의 침습 영역을 확인하기 위하여, 형광 픽셀의 비율을 ROI 이미지에서 계산하였으며, 겔로 침습한 세포의 총 수를 각 ROI에서 3개의 다른 디바이스에서 계수하였다. 세포의 최대 이동 거리 또한 Image J software를 사용하여 ROI 이미지를 이용하여 확인하였다.

[146] **10. 소프트 아가 검정**

[147] 세포의 앵커리지-독립 성장(Anchorage Independent Growth)을 소프트 아가에서 콜로니의 생존률로 확인하였으며, 플레이트를 10일간 인큐베이션하고 콜로니를 현미경으로 계수하였다.

[148] **11. 세포독성 검정**

[149] 세포독성을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 사용하여 실시하였다. T24-P0, GRC1-P3, GRC1-P7, 및 GRC1-P15 세포(1,000 cells/well)를 96-웰 플레이트에 접종하고 실험 처리 시작 전에 약 60 내지 70% 포화도에 이를 때 까지 배양하였다. 그 후, 젬시타빈의 투여량-반응 곡선을 그리

고 IC_{50}을 non-linear (curve fit) regression algorithms와 GraphPad Prism9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 사용해 계산하였다.

[150] **12. qRT-PCR(Quantitative real-time polymerase chain reaction)**

[151] 총 RNA를 RNAiso reagent (Takara, Otsu, Japan)를 사용하여 분리하였다. RNA 정량 체크를 spectrophotometer (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 확인하였으며, cDNA PrimeScript™ RT reagent Kit (#RR037A, Takara, Otsu, Japan)를 이용하여 합성하고, 1 μg 총 RNA를 이용하여 RNA의 정량 분석을 수행하였다. qRT-PCR은 TB Green Premix Ex Taq (#RR420A, Takara, Otsu, Japan) 및 CFX 96 real-time PCR Detection system (#185-5096, BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 수행하였으며, 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다. 정량 분석은 총 3회의 독립적인 cDNA 합성 및 RNA 분석을 수행하여, 재연성을 평가하였다. 그 후 mRNA 분석 데이터를 GAPDH에 대해 정량화하고, 폴드 체인지(fold change)를 상대적 정량($2^{-\Delta\Delta Ct}$)을 이용하여 계산하였다. 각 프라이머 서열이 표적하는 유전자의 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

[152] [표 1]

[153]

유전자	서열번호	프라이머	프라이머 서열
GATA3	서열번호 1	*GATA3* qPCR-F	CACAAAATGAACGGACAGAAC
	서열번호 2	*GATA3* qPCR-R	AGCTTGTAGTAGAGCCCAC
FOXA1	서열번호 3	FOXA1 qPCR-F	TGGAACAGCTACTACGCAG
	서열번호 4	FOXA1 qPCR-R	GTAGTCATGGTGTTCATGGTC
RASSF5	서열번호 5	RASSF5 qPCR-F	GATACACAAGGACGGACAAG
	서열번호 6	RASSF5 qPCR-R	GAGAAGGCATCCCACTCTAC
PTPN6	서열번호 7	PTPN6 qPCR-F	ATGCCAACTACATCAAGAACC
	서열번호 8	PTPN6 qPCR-R	CTGCCAGAAGTCATTGACC
TRNP1	서열번호 9	TRNP1 qPCR-F	TCCTTCCAACTCCTCAGAAC
	서열번호 10	TRNP1 qPCR-R	TGTGTAAGGTCAATTCTCAACG
APOBEC3D	서열번호 11	*APOBEC3D* qPCR-F	TGCAGAAAGGTGCTTCCTCT
	서열번호 12	*APOBEC3D* qPCR-R	GCGGTGAAGATGGTGAGATT
APOBEC3G	서열번호 13	*APOBEC3G* qPCR-F	TTCAGCACTGTTGGAGCAAG
	서열번호 14	*APOBEC3G* qPCR-R	TGAAAGTGAATGTGGGTGGA
ABL1	서열번호 15	ABL1 qPCR-F	CATCACCACGCTCCATTATC
	서열번호 16	ABL1 qPCR-R	GTATTTCTTCCACACGCCC
ABL2	서열번호 17	ABL2 qPCR-F	CCCTAATCTCTTCGTTGCAC
	서열번호 18	ABL2 qPCR-R	CTTCACTCCACTCACCATTC
CACNA2D1	서열번호 19	CACNA2D1 qPCR-F	CTGGCCTAGCTCGATATTATCC
	서열번호 20	CACNA2D1 qPCR-R	ACACTTCCACTCACATCCAC
JUN	서열번호 21	JUN qPCR-F	CCAAGTGCCGAAAAAGGAAG
	서열번호 22	JUN qPCR-R	TAAGCTGTGCCACCTGTTC
GNG4	서열번호 23	*GNG4* qPCR-F	ACCACTAGCATCTCCCAAGC
	서열번호 24	*GNG4* qPCR-R	CAGGCACTGGAATGATGAGA
NGF	서열번호 25	*NGF* qPCR-F	GGGGCATTGACTCAAAGCAC
	서열번호 26	*NGF* qPCR-R	TTCCTGCTGAGCACACACAC
MYC	서열번호 27	MYC qPCR-F	CTCCACACATCAGCACAAC
	서열번호 28	MYC qPCR-R	TCGCCTCTTGACATTCTCC
MAP4K4	서열번호 29	MAP4K4 qPCR-F	TCTACAGAGCAGCTTTTGAAAC
	서열번호 30	MAP4K4 qPCR-R	CTCCTCTTCTTCCTCACTCC
STC1	서열번호 31	*STC1* qPCR-F	AGCGCTGCTAAATTTGACACT
	서열번호 32	*STC1* qPCR-R	CTTTGGAAAGTGGAGCACCTCCG
FOXD1	서열번호 33	*FOXD1* qPCR-F	CTCGTATATCGCGCTCATCA
	서열번호 34	*FOXD1* qPCR-R	TCTTGACGAAGCAGTCGTTG
FOXC2	서열번호 35	*FOXC2* qPCR-F	ATGTTCGAGAACGGCAGCTT
	서열번호 36	*FOXC2* qPCR-R	CTTCTTCTCGGCCTCCTTGG
TGFB1	서열번호 37	*TGFB1* qPCR-F	TTCCTGGCGATACCTCAGCAAC
	서열번호 38	*TGFB1* qPCR-R	AATTTCCCCTCCACGGCTCAAC
TGFB3	서열번호 39	*TGFB3* qPCR-F	GACACTGTGCGTGAGTGGCT
	서열번호 40	*TGFB3* qPCR-R	CCACGGCCATGGTCATCCTC
NOG	서열번호 41	*NOG* qPCR-F	CCAGCACTATCTCCACATCC
	서열번호 42	*NOG* qPCR-R	GTCTCGTTCAGATCCTTTTCC
SMAD9	서열번호 43	*SMAD9* qPCR-F	CCACAGAAGCCTCTGAGACC
	서열번호 44	*SMAD9* qPCR-R	CCCAACTCGGTTGTTCAGTT
NT5E	서열번호 45	*NT5E* qPCR-F	CCCATTCTTCTAAACAGCAGCATTC
	서열번호 46	*NT5E* qPCR-R	CTAAAGCGGCATGATTGAGAGG

[154] [표 2]

[155]

유전자	타겟서열	타겟크기
GATA3 (서열번호 47)	CACAAAATGAACGGACAGAACCGGCCCCTCATTAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCAGGGACGTCCTGTGCGAACTGTCAGACCACCACAACCACACTCTGGAGGAGGAATGCCAATGGGGACCCTGTCTGCAATGCCTGTGGGCTCTACTACAAGCT	170bp
FOXA1 (서열번호 48)	TGGAACAGCTACTACGCAGACACGCAGGAGGCCTACTCCTCCGTCCCGGTCAGCAACATGAACTCAGGCCTGGGCTCCATGAACTCCATGAACACCTACATGACCATGAACACCATGACTAC	122bp
RASSF5 (서열번호 49)	GATACACAAGGACGGACAAGTGCTCTTCCAGAAACTCTCCATTGCTGACCGCCCCCTCTACCTGCGCCTGCTTGCTGGGCCTGACACGGAGGTCCTCAGCTTTGTGCTAAAGGAGAATGAAACTGGAGAGGTAGAGTGGGATGCCTTCTC	150bp
PTPN6 (서열번호 50)	ATGCCAACTACATCAAGAACCAGCTGCTAGGCCCTGATGAGAACGCTAAGACCTACATCGCCAGCCAGGGTTGTCTGGAGGCCACGGTCAATGACTTCTGGCAG	104bp
TRNP1 (서열번호 51)	TCCTTCCAACTCCTCAGAACCTCCACTCTATGGATCTGGACCTCTGGATTCGGCTTTCTCCCTGGGCACTGCCTTCAGGAAGACGTTGAGAATTGACCTTACACA	105bp
APOBEC3D (서열번호 52)	TGCAGAAAGGTGCTTCCTCTCTTGGTTCTGTGACGACATACTGTCTCCTAACACAAACTACGAGGTCACCTGGTACACATCTTGGAGCCCTTGCCCAGAGTGTGCAGGGGAGGTGGCCGAGTTCCTGGCCAGGCACAGCAACGTGAATCTCACCATCTTCACCGC	165 bp
APOBEC3G (서열번호 53)	TTCAGCACTGTTGGAGCAAGTTCGTGTACAGCCAAAGAGAGCTATTTGAGCCTTGGAATAATCTGCCTAAATATTATATATTACTGCACATCATGCTGGGGGAGATTCTCAGACACTCGATGGATCCACCCACATTCACTTTCA	144 bp
ABL1 (서열번호 54)	CATCACCACGCTCCATTATCCAGCCCCAAAGCGCAACAAGCCCACTGTCTATGGTGTGTCCCCCAACTACGACAAGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGCGTGTGGAAGAAATAC	166 bp
ABL2 (서열번호 55)	CCCTAATCTCTTCGTTGCACTTTATGATTTTGTAGCAAGTGGTGATAACACACTCAGCATCACTAAAGGTGAAAAGCTACGAGTCCTTGGTTACAACCAGAATGGTGAGTGGAGTGAAG	119 bp
CACNA2D1 (서열번호 56)	CTGGCCTAGCTCGATATTATCCAGCTTCACCATGGGTTGATAATAGTAGAACTCCAAATAAGATTGACCTTTATGATGTACGCAGAAGACCATGGTACATCCAAGGAGCTGCATCTCCTAAAGACATGCTTATTCTGGTGGATGTGAGTGGAAGTGT	157 bp
JUN (서열번호 57)	CCAAGTGCCGAAAAAGGAAGCTGGAGAGAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAAGTGAAAACCTTGAAAGCTCAGAACTCGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAACAGGTGGCACAGCTTA	126 bp
GNG4 (서열번호 58)	ACCACTAGCATCTCCCAAGCCAGGAAAGCTGTGGAGCAGCTAAAGATGGAAGCCTGTATGGACAGGGTCAAGGTCTCCCAGGCAGCTGCGGACCTCCTGGCCTACTGTGAAGCTCACGTGCGGGAAGATCCTCTCATCATTCCAGTGCCTG	151 bp
NGF (서열번호 59)	GGGGCATTGACTCAAAGCACTGGAACTCATATTGTACCACGACTCACACCTTTGTCAAGGCGCTGACCATGGATGGCAAGCAGGCTGCCTGGCGGTTTATCCGGATAGATACGGCCTGTGTGTGTGTGCTCAGCAGGAA	139 bp
MYC (서열번호 60)	CTCCACACATCAGCACAACTACGCAGCGCCTCCCTCCACTCGGAAGGACTATCCTGCTGCCAAGAGGGTCAAGTTGGACAGTGTCAGAGTCCTGAGACAGATCAGCAACAACCGAAAATGCACCAGCCCCAGGTCCTCGGACACCGAGGAGAATGTCAAGAGGCGA	166 bp
MAP4K4 (서열번호 61)	TCTACAGAGCAGCTTTTGAAACATCCTTTTATAAGGGATCAGCCAAATGAAAGGCAAGTTAGAATCCAGCTTAAGGATCATATAGATCGTACCAGGAAGAAGAGAGGCGAGAAAGATGAAACTGAGTATGAGTACAGTGGGAGTGAGGAAGAAGAGGAG	159 bp

[156]

STC1 (서열번호 62)	AGCGCTGCTAAATTTGACACTCAGGGAAAAGCATTCGTCAAAGAGA GCTTAAAATGCATCGCCAACGGGGTCACCTCCAAGGTCTTCCTCGC CATTCGGAGGTGCTCCACTTTCCAAAG	119 bp
FOXD1 (서열번호 63)	CTCGTATATCGCGCTCATCACTATGGCCATCCTGCAGAGCCCCAAG AAGCGGCTGACGCTGAGCGAGATCTGTGAGTTCATCAGCGGCCGCT TCCCCTACTACCGGGAGAAGTTCCCCGCCTGGCAGAACAGCATCCG CCACAACCTCTCGCTCAACGACTGCTTCGTCAAGA	173 bp
FOXD2 (서열번호 64)	ATGTTCGAGAACGGCAGCTTCCTGCGGCGCCGGCGGCGCTTCAAAA AGAAGGACGTGTCCAAGGAGAAGGAGGAGCGGGCCCACCTCAAGGA GCCGCCCCCGGCGGCGTCCAAGGGCGCCCCGGCCACCCCCCACCTA GCGGACGCCCCCAAGGAGGCCGAGAAGAAG	163 bp
TGFB1 (서열번호 65)	TTCCTGGCGATACCTCAGCAACCGGCTGCTGGCACCCAGCGACTCG CCAGAGTGGTTATCTTTTGATGTCACCGGAGTTGTGCGGCAGTGGTT GAGCCGTGGAGGGGAAATT	112 bp
TGFB3 (서열번호 66)	GACACTGTGCGTGAGTGGCTGTTGAGAAGAGAGTCCAACTTAGGTC TAGAAATCAGCATTCACTGTCCATGTCACACCTTTCAGCCCAATGG AGATATCCTGGAAAACATTCACGAGGTGATGGAAATCAAATTCAAA GGCGTGGACAATGAGGATGACCATGGCCGTGG	170 bp
NOG (서열번호 67)	CCAGCACTATCTCCACATCCGCCCGGCACCCAGCGACAACCTGCCC CTGGTGGACCTCATCGAACACCCAGACCCTATCTTTGACCCCAAGG AAAAGGATCTGAACGAGAC	111 bp
SMAD9 (서열번호 68)	CCACAGAAGCCTCTGAGACCCAGAGTGGCCAACCTGTAGATGCCAC AGCTGATAGACATGTAGTGCTATCGATACCAAATGGAGACTTTCGA CCAGTTTGTTACGAGGAGCCCCAGCACTGGTGCTCGGTCGCCTACT ATGAACTGAACAACCGAGTTGGG	161 bp
NT5E (서열번호 69)	CCCATTCTTCTAAACAGCAGCATTCCTGAAGATCCAAGCATAAAAG CAGACATTAACAAATGGAGGATAAAATTGGATAATTATTCTACCCA GGAATTAGGGAAAACAATTGTCTATCTGGATGGCTCCTCTCAATCA TGCCGCTTTAG	149 bp

[157] **13. 웨스턴 블롯 분석**

[158] 세포를 PBS를 사용해 세척한 후 단백질을 radio immunoprecipitation (RIPA) buffer (Ambion, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0, protease inhibitor cocktail, 및 phosphatase inhibitor)로 분리하고 12,000 g, 15 min, 4℃의 조건에서 원심분리 하여 단백질을 수득하였다. 단백질의 양은 BCA assay kit (#23225, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 확인하였으며, 10-12% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동(electrophoresis) (SDS-PAGE)를 실시하였다. 그 후 니트로셀룰로오스(NC) 맴브레인(GE healthcare, Esbjerg, Denmark)에 단백질을 옮긴 후, 5% 탈지유가 포함된 0.05% TBS-T를 이용하여 맴브레인을 차단하였다. 그 후, 1차 항체인 STC1(#sc-293435, 1:100, Santa Cruz Biotech., Dallas, TX, USA), MMP-1 (sc-137044, 1:2000, Santa Cruz Biotech., Dallas, TX, USA), MMP-2 (#4022, 1:2000, Cell signaling, Danvers, MA, USA), MMP-9 (#3852, 1:4000, Cell signaling, Danvers, MA, USA), NCAD (#4061, 1:2000, Cell signaling, Danvers, MA, USA), ECAD (#3195, 1:2000, Cell signaling, Danvers, MA, USA), VIM (#sc-6260, 1:2000, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA), SNAIL (#sc-271977, 1:5000, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA), FAK(#3285, 1:4000, Cell signaling, Danvers, MA, USA), p-FAK (#3283, 1:4000, Cell signaling, Danvers, MA, USA), ERK (#9102, 1:5000, Cell signaling, Danvers, MA, USA), 및 p-ERK (#9101, 1:5000, Cell signaling, Danvers, MA, USA)를 이용하여 반응 시켰으며, 대조군으로는 GAPDH (#2118, 1:20000,

Cell signaling, Danvers, MA, USA)를 사용하였다. 그 후, 2차 항체인, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit 또는 anti-mouse immunoglobulin G (IgG)와 반응 시켰으며, 양성 밴드를 ECL 검출 시약을 사용하여 검출하였다. 검출된 밴드는 automatic X-ray film processor (#JP-33, JPI Healthcare, Seoul, Korea)로 확인하였으며, X-ray films (#47410-15788, Fuji film, Tokyo, Japan) 상의 밴드 발현 정도를 Image J software (NIH; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)로 정량하였다.

[159] **14. 생체 내(in vivo) 종양 성장 및 전이 검정**

[160] in vivo 종양 형성 및 전이 검정을 위해, T24-P0 또는 GRC1-P3, GRC1-P7, 및 GRC1-P15 세포를 트립신으로 분리하고, PBS에 현탁하였다. 그 후, 세포 현탁액을 BALB/C 누드 마우스의 측면 및 꼬리 정맥에 피하 주사하였다. 또한, 4개 유형의 세포를 PBS 중의 세포 및 동량의 Matrigel (#354234, Corning Inc., Costar, NY, USA)과 혼합하여, 200 ㎕를 피하 주입하였다. 종양이 확인되는 시점에서, 종양 크기를 3일 간격으로 측정하고 종양 부피를 계산하였다: Tumor volume (mm^3)= $width^2$ (mm^2) x length (mm). 그 후 4 그룹의 마우스를 35일차에 희생시켰으며, 희생된 마우스에서 종양 조직을 수득하여 PBS로 2회 세척한 후 RNA 및 단백질 추출에 이용하였다.

[161] **15. 조직 마이크로어레이(Tissue Microarray; TMA) 및 면역조직화학 (Immunohistochemistry; IHC) 염색**

[162] 마우스 조직을 파라핀 블록으로 제작하였으며, 조직 마이크로어레이(Tissue Microarray; TMA)을 위하여, 파라핀 블록의 조직 코어(지름 2 mm)로 설정하였다. 그 후, 슬라이드를 H&E(hematoxylin 및 eosin)로 염색하고 종양 조직을 확인하였다. 또한, 면역조직화학(Immunohistochemistry; IHC) 분석을 위하여, 모든 조직 샘플을 완충 포르말린(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 고정하고 파라핀에 몰딩하였다. 파라핀 몰딩 조직을 자일렌 내에서 탈파라핀화시키고 알코올(100 %, 90%, 80%, 및 60%)을 이용하여 탈수시켰다. 그 후, 항원 회수(끓는 물에서 10분)를 시행하고, 시트르산나트륨 (pH7)을 회수 버퍼로서 사용하였다. 사용된 1차 STC1 및 Ki67 항체(#sc-23900, Santa Cruz Biotech., Dallas, TX, USA)는 rabbit monoclonal IgG (#ab229477, Abcam, Cambridge, MA, USA)을 이용하였으며, Rabbit IgG를 음성 아이소타입 대조군으로 사용하였다. TMA 슬라이드를 일차 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양하고 비오틴화된 이차 항체를 처리하였다. 그 후, Vectastain Elite ABC Reagent (#PK-6100, 벡터 Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 실온에서 30분간 첨가하고 3, 3`-diaminobenzidine (DAB, #D4293, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 색소원으로 사용하여 면역반응을 확인하였다. 그 후, TMA 슬라이드를 Mayer's hematoxylin (#S3309, Dako, Carpinteria, CA, USA)로 대조염색하고, 알코올(60%, 80%, 90%, 및 100%)로 탈수하였으며, 자일렌으로 3회 세척하고 자일렌 중의 봉입제로 고정하였다. Ki67 및 STC1 염색은 염색 강도

에 따라 3개 등급으로 나누었다: 약함(weak), 중간(moderate), 및 강함(strong). 강도 및 퍼센트 스코어의 합을 최종 STC1 염색 스코어로서 사용하였으며, 하기와 같이 규정하였다: 무 발현 (total score 0); 약한 발현 (total score 1); 중간 발현 (total score 2); 및 강한 발현 (total score 3).

[163] **16. 환자 및 유전자 발현 데이터**

[164] National Center for Biotechnology information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) 데이터베이스 (GSE13507, GSE32894, 및 GSE120736)로 부터 임상 및 유전자 발현 데이터를 포함하는 데이터 세트를 수득하였다. 모든 데이터는 log2 스케일로 변환하였으며, quantile normalization으로 표준화하였다. 165명의 방광암 환자 데이터를 디스커버리 코호트(n=165; Korean cohort; GSE13507)로 사용하고, 453명의 방광암 환자 데이터를 발리데이션 코호트(n=308; Lund cohort; GSE32894, n=145; Yonsei cohort; GSE120736)로 사용하였다.

[165] **17. 연관성, 유전자 발현 및 Function Enrichment 분석**

[166] 유전자 특성과 관련된 유의한 유전자 세트를 확인하기 위하여, 코리안 코호트로부터의 유전자 발현 데이터에 Pearson correlation test를 적용하고 유의한 연관성 계수($|r| > 0.4$ 및 $p < 0.001$)를 갖는 유전자를 선택하였다. 그 후, 유사성 및 완전 연결 클러스터링 방법(complete linkage clustering method)의 척도로서, 중심 상관 계수로 계층 클러스터링 분석을 실시하였다. 환자 클러스터링 결과에 따라, 환자를 2개의 서브그룹으로 나누고, 각 서브그룹에서 환자의 진행 시간 및 암 특이 생존률을 평가하였다. Kaplan-Meier 방법을 사용하여 log-rank statistics로 무진행 시간 및 암 특이 생존을 계산하였으며, Gene ontology (GO) 분석은 DAVID bioinformatic resources (http://david.ncifcrf.gov)로 실시하였다. 결과는 $p < 0.001$ 및 false discovery rate (FDR) < 0.25일 때 유의한 것으로 간주하였다.

[167] **18. 통계 분석**

[168] 데이터 결과는 3회 반복으로 획득하여, 평균 ± 표준 편차 (SD)로 나타냈다. 모든 분석은 3회 실시하였으며, 3회의 개별 실험으로부터 데이터를 나타냈다. 모든 실험은 3중 디바이스로 구성하였으며, 모든 수치 데이터는 평균 ± S.D로 나타냈다. 두 독립 그룹 사이의 차이의 유의성은 two-tailed Student's *t*-test를 사용하여 결정하였다. 차이는 $p < 0.05$에서 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). 통계 분석은 R 3.6.1 language environment (http://www.r-project.org)을 사용하여 실시하였다.

[169] **<실시예 1> 젬시타빈-내성 방광암 (GRC) 세포주의 특성화**

[170] 방광암(BC)의 분자 진화를 이해하고, 적절한 진단 및 치료 가이드라인을 설립하기 위하여, 항암제 내성 방광암 세포주를 특성화 하였다. 구체적으로, 세포가 단계적으로 항암제 젬시타빈에 대한 내성을 습득함에 따라, 달라지는 분자적 차이를 확인하기 위하여 in vitro 모델을 이용하였다. 방광암 세포주 T24(T24-P0, P0)를 4개의 군으로 분류하고, 각각 젬시타빈을 처리하였으며 동일한 조건으로 15회 계대하여, 15상(Phase)에 걸친 젬시타빈 내성 방광암 세포주(GRC)를

수득하였다(도 1a). 각 그룹에서 수득된 젬시타빈 내성 방광암 세포주는 GRC1-P15, GRC2-P15, GRC3-P15 및 GRC4-P15으로 분류하였다(도 1b). 그 후 GRC1-P3, GRC1-P7 및 GRC1-P15 세포를 이용하여, GRC1 그룹에서 단계적 내성 습득 과정을 확인하였다. 또한, GRC2, GRC3 및 GRC4 각 군의 세포를 내성 습득의 최종 비교에 이용하였다. GRC1 그룹의 세포주들은, 항암제 내성을 획득함에 따라서, 콜로니 형성 시간이 단계적으로 가속화되었으며, 젬시타빈 처리 후에도 콜로니의 크기가 증가하였다(도 1c). 모든 GRC 세포의 화학 민감성을 확인하기 위하여, 성장 저해 검정을 수행하였으며, GRC1-P3, GRC1-P7 및 GRC1-P15 세포는 T24-P0 세포와 비교하여, 젬시타빈에 대한 저항성이 상(phase) 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 1d). 또한, GRC1 세포주들은 내성이 증가됨에 따라 콜로니 형성능이 증가하는 것을 확인하였으며(도 1e 및 도 1f), 비부착성 능력 검정에서도 확인하였다(도 1g). 또한, 세포의 이동성 및 침투성과 상처 회복 능력도 GRC 세포주들에서 확인하였으며, 내성을 획득함에 따란, 단계적으로 이동성 및 침투성이 증가하는 것을 확인하였다(도 1h).

[171] **<실시예 2> HUVEC 세포와의 3D 배양 조건에서 GRC 세포 침입 및 이동 능력 확인**

[172] 최근 연구에서 약물 내성에 영향을 미치는 epithelial-mesenchymal transition(EMT)에 대하여 관심이 증가하고 있으며, EMT는 항암 약물 내성에서 중요한 역할을 하고 화학요법 치료 후 암의 전이에 기여하는 것으로 알려지게 되었다. 이에, GRC 세포를 HUVEC 세포주와함께 마이크로유체 디바이스에서 공동 배양하여, 3D 조건에서 GRC 세포의 이동성을 확인하였다. 그 결과 도 2a에 나타낸 바와 같이, GRC 세포가 마이크로유체 디바이스를 통해 콜라겐 겔을 관통하는 것을 확인하였으며, 핵 및 F-actin 면역 염색 결과, GRC1-P3, GRC1-P7 및 GRC1-P15 세포에서 침투한 세포의 수가 T24 세포와 비교하여, 단계적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 2a). 또한, 최대 침투 거리, 침투 영역 및 침투 방광암 세포 수는 T24-P0 세포와 비교하여, GRC1-P3, GRC1-P7 및 GRC1-P15 세포에서 단계적으로 증가하였으며, 상기의 결과로, 3D 조건에서 GRC 세포 침입 및 이동 능력이 T24-P0 세포와 비교하여 증가된 것을 확인하였다(도 2a). GRC 세포가 EMT에 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 상피 및 간엽 마커의 발현을 확인하였으며, GRC1-P15 세포는 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, vimentin (VIM), SNAIL, ZEB1, ZEB2, 및 NCAD의 mRNA 발현이 증가하였다(도 2b). 반대로, SDC1 및 SDC2의 mRNA 발현은 유의차가 없었으며 ECAD는 감소하였다. GRC1-P15 세포에서의 MMP-1, MMP-2, MMP-9, NCAD, 및 SNAIL의 단백질 발현은 T24-P0 세포에 비해 증가하였으며, VIM에서는 유의차가 없었다(도 2b). 따라서, T24-P0에 비해, 침습, 이동 능력 및 EMT가 GRC1-P3, GRC1-P7, 및 GRC1-P15 세포에서 단계적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[173] **<실시예 3> Gene ontology(GO) 분석을 이용한 GRC 세포의 분자 진화 경로 변화 확인**

[174] GRC1 세포주의 유전자 발현 프로파일 데이터는 RNA 시퀀싱을 이용하여, 4가지 시점의 변화를 분석하였다. 차별적으로 발현된 1,869개의 유전자가 백만분의 카운트 및 표준편차(CPM > 1 및 S.D > 1)로 선택되었으며(도 3a), GRC1 세포주에서 주성분 분석(PCA)으로 투영된 2차원 공간의 분포는 모든 시점 간에서 명확한 분리된 것을 확인하였다. 특히, P0과 P15 사이의 분포에서 73.1%의 차이가 있었고, 초기 P3과 중간기 P7 사이에 유의미한 차이가 확인되었다(도 3b). 기능 분석을 기반으로 GRC1 세포주를 대표하는 중요한 생물학적 특성 유전자를 선택하였다(도 3c 및 4a). P0에서 세포 증식 관련 유전자(GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6 및 TRNP1) 및 방어 반응 관련 유전자(APOBEC3D, APOBEC3G, IFI27 및 IFITM1)의 발달 및 음성 조절이 상향 조절되었으며, 초기 단계 P3에서 JAK-STAT 경로(CCND3, IL6, IL11 및 IL23A), I형 IFN 경로(IFNB1, IFIT1, IFIT2 및 IFIT3) 및 PI3K-AKT 경로(CCNE1, FGF1, CDK6 및 VEGFC)가 상향된 것을 확인하였다(도 4a). 또한, 중간기인 P7에서, GRC1 세포주는 리소좀(LAMP1, LAMP2, NEU1) 및 펼쳐진 단백질 반응(HSPA5, HSP90B1, DDIT3)과 같은 소포체(ER) 스트레스와 관련된 유전자가 상향되었으며(도 4a), 후기인 P15에서 RAS 신호 전달 경로(ABL1, ABL2, RAC3, GNGT1, PLA2G6 및 ATF2), MAPK 신호 경로(CACNA2D1, CACNA2D2, FOS, JUN, JUND, GNG4, NGF, RRAS, MYC, MAP4K4 및 STC1), EMT 관련 유전자(VIM, ZEB1, ZEB2, SNAI1, MMP1, MMP2, MMP3, FOXD1 및 FOXC2) 및 TGF-β 경로(TGFB1, TGFB3, NOG 및 SMAD9)가 상향 조절되었다(그림 4a). 또한 젬시타빈 작용 기전과 직접적으로 관련된 NT5E와 CDA는 P0에서 후기 P15까지 지속적으로 증가하였다(그림 4a). 다양한 생물학적 경로가 각 시점에서 관찰되었으며, 이는 분자 메커니즘이 젬시타빈 처리를 피하기 위해 GRC1 세포주에서 유도되었음을 나타낸다(그림 4b).

[175] **<실시예 4> 내화학성 점수 개발을 위한 핵심 유전자 식별**

[176] 활성화된 생물학적 경로(도 4a) 중 23개의 유전자(GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2 및 젬시타빈 내성 획득과 관련된 TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9, NT5E)를 선별하여 유전자 시그니처 셋(gene signature set)으로 명명하고, 다른 상(phase)과 유전자의 발현 수준이 차이가 있는 것을 확인하였다. 젬시타빈 치료(n=76)와 The Cancer Genome Atlas (TCGA) 코호트에 대한 23개 유전자 식별의 완전 반응 예측의 민감도와 특이성을 비교하기 위해 ROC(Receiver operating characteristics) 분석을 수행하였다. TCGA 코호트의 환자는 ROC 곡선 아래 면적(AUC = 0.755)과 최적 컷오프 값(컷오프 최적 = 3.302, 도 4c)으로 분류되었다. 내화학성 점수에 기초하여, 낮은 환자 또는 높은 환자, 두 그룹으로 분류하였으며(도 4c, 4d), 고득점 환자는 유의하게 낮은 반응률(response rate)(Fisher's exact test에 의한 P = 0.007, 도 4e)과 나쁜 예후(log-rank test에 의한 P = 0.01, 4e)를 나타내는 것을 확인하였다. TCGA 분자 아형과 내화학성 점수 사이의 연관성을 확인하기 위하여, 각 클러스터에서 5개의 분자 아형 분포를 조사하

였다(도 4e). TCGA 코호트의 기저-편평 아형에서, 고득점 환자는 더 낮은 객관적 반응률을 가지는 것을 확인하였다(도 4f).

[177] 또한, GRC1 세포주에 대한 in vitro 실험을 통해 cisplatin과 doxorubicin에 내성을 나타내는 것을 확인하였다(도 5a). 다른 약물(시스플라틴, 독소루비신 및 카보플라틴)으로 치료받은 환자를 23개 유전자 시그니처(gene signature set)에 따라 분석하여 내화학성 점수와 반응률 사이의 연관성을 확인하였으며(도 5a), 내화학성 점수의 성능을 추정하였다(도 5b). 시스플라틴 치료의 경우 내화학성 점수가 높은 환자는 반응률이 유의하게 낮았고 예후가 좋지 않게 나타났으며 (Fisher's exact test에서 $P = 0.004$, log-rank test에서 각각 $P = 0.01$, 도 5c), carboplatin과 doxorubicin 치료에서도 유사한 경향을 확인되었다(도 5d). UROMOL 코호트의 NMIBC 환자를 23개 유전자 시그니처에 따라 분석하여 내화학성 점수와 질병 진행 사이의 연관성을 확인하여 본 결과(도 6a), 내화학성 점수가 높은 환자는 불량한 예후를 가지는 것을 확인하였다(로그 순위 테스트에 의한 $P < 0.001$, 도 6b, 6c). 상기의 결과로 내화학성 점수가 방광암 환자의 다양한 화학요법에 대하여, 예후 잠재력 및 예측 가치를 가지는 것을 시사한다.

[178] **<실시예 5> GRC 세포의 생체 내(in vivo) 종양 성장 및 전이 확인**

[179] 생체 내에서 방광암의 종양 성장 및 전이에 약물내성 세포주의 효과를 확인하기 위하여, GRC 세포주를 이용하여, in vivo에서 종양 성장 및 전이를 확인하였다. 종양 발생 실험의 과정은 도 7a 나타내었다. 구체적으로 GRC 및 T24-P0 세포를 5-6주령 BALB/C 누드에게 피하 주입하고 체중 및 종양 부피를 매주 확인하였으며, 초기에는 마우스의 체중은 유의미한 차이가 없었으나, 처리 후 28일째부터 체중이 유의적으로 차이가 나는 것을 확인하였다(도 7a). 또한, 마우스의 종양 부피는 21일째부터 증가하였으며(도 7b), 도 7a에 나타낸 바와 같이, T24-P0 세포에 비해 GRC1-P3, GRC1-P7, 및 GRC1-P15 세포가 마우스의 종양 크기를 단계적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 또한, 증식 마커를 Ki67 및 H&E 염색으로 확인한 결과, GRC1 세포가 T24 GRC 세포에 비해 더 많은 증식 및 종양 성장을 유도하는 것을 확인 하였다(도 7b). 상기의 결과로, GRC 세포가 방광암 종양 성장을 촉진함을 확인하였다. 또한, GRC 세포의 in vivo에서 전이 능력을 평가하기 위하여, T24-P0, GRC1-P3, GRC1-P7, 및 GRC1-P15 세포를 5-6주령 BALB/C 누드 마우스의 꼬리 정맥에 주입하였으며(도 7a), 체중은 매주 확인하였다. 정맥내 주입된 GRC 세포는 T24-P0 세포보다 단계적으로 더 많은 폐 결절을 하는 것을 확인하였으며(도 7c), 폐 조직의 H&E 염색 결과로 확인된 폐 결절의 크기는 T24-P0 세포에 비해 GRC 세포 그룹에서 유의적으로 증가한 것을 확인하였다(도 7c). 상기의 결과로 GRC 세포가 T24-P0보다 침습성이 증가하고, 전이 능력 또한 증가하는 것을 확인하였다. GRC 세포주와 mice tumor에서의 23개 유전자군 중 10개의 유전자의 mRNA 수준을 확인하여 본 결과, GRC 세포주 및 마우스 종양에서 10개 유전자 중 다수의 유전자가 현저히 상향 발현된 것을 확인하였다(도 7d). 상기의 결

과로 GRC 세포가 in vitro 및 in vivo 모두에서 종양형성 및 전이 능력을 촉진시키는 것을 확인하였다.

[180] 따라서, 본 발명은 23개의 유전자인 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E의 차별 발현을 확인하였으며, 상기 23개의 유전자의 발현이 방광암 환자의 예후 및 생존율과 관련성이 있는 것을 확인하여, 상기의 유전자를 이용한 항암제 내성 방광암 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커로 이용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 방광암 세포주가 내성을 획득하면서 종양 침윤 및 이동 능이 증가하고, 항암제 저항성이 증가하는 것을 확인하였으며, 방광암 세포주가 항암제 내성을 획득함에 따라, 상기 23개의 유전자가 차별 발현되는 것을 확인하였다. 또한, 항암제 내성 방광암 세포주를 마우스에 투여하면, 종양 증식 및 전이능이 증가하는 것을 확인하였으며, 마우스 종양에서도 상기 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였는 바, 암의 진단, 전이 또는 예후 예측에 효과적이고 항암제 내성암을 진단하는 효과가 우수한 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 바이오마커.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 바이오마커는, 암(cancer)의 항암제 내성을 조절하는 것인, 바이오마커.

[청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 항암제는 젬시타빈(gemcitabine), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 독소루비신(doxorubicin), 마이토마이신 C(mitomycin C) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 바이오마커.

[청구항 4] 제 2항에 있어서,
상기 암은 방광암, 유방암, 교모세포종, 전립선암, 뇌척수종양, 두경부암, 폐암, 흉선종, 중피종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 담도암, 신장암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 바이오마커.

[청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 바이오마커의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 증가하면, 암의 항암제 내성이 증가하는 것인, 바이오마커.

[청구항 6] 제 1항에 있어서,
상기 바이오마커의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 증가하면, 암세포의 성장, 침습(invasion) 또는 이동(migration)이 증가하는 것인, 바이오마커.

[청구항 7] 제 1항에 있어서,
상기 바이오마커의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 증가되면, 암의 임상적 예후(prognosis)가 불량한 것인, 바이오마커.

[청구항 8] 제 7항에 있어서,
상기 예후가 불량한 것은, 암의 반응률(response rate)이 감소하는 것인, 바이오마커.

[청구항 9] 제 7항에 있어서,
상기 예후가 불량한 것은, 암세포의 항암제 내성이 증가된 것인, 바이오마커.

[청구항 10] GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1,

FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물.

[청구항 11] 제 10항에 있어서,
상기 유전자의 발현항을 측정하는 제제는, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍; 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍; 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍; 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍; 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍; 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍; 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머 쌍; 서열번호 19 및 서열번호 20의 프라이머 쌍; 서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머 쌍; 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머 쌍; 서열번호 25 및 서열번호 26의 프라이머 쌍; 서열번호 27 및 서열번호 28의 프라이머 쌍; 서열번호 29 및 서열번호 30의 프라이머 쌍; 서열번호 31 및 서열번호 32의 프라이머 쌍; 서열번호 33 및 서열번호 34의 프라이머 쌍; 서열번호 35 및 서열번호 36의 프라이머 쌍; 서열번호 37 및 서열번호 38의 프라이머 쌍; 서열번호 39 및 서열번호 40의 프라이머 쌍; 서열번호 41 및 서열번호 42의 프라이머 쌍; 서열번호 43 및 서열번호 44의 프라이머 쌍; 및 서열번호 45 및 서열번호 46의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 쌍인 것인, 조성물.

[청구항 12] 제 10항에 있어서,
상기 암은 방광암, 유방암, 교모세포종, 전립선암, 뇌척수종양, 두경부암, 폐암, 흉선종, 중피종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 담도암, 신장암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 조성물.

[청구항 13] 제 10항의 조성물을 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 키트.

[청구항 14] 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;
상기 분리된 생물학적 시료에서 13항의 키트를 이용하여, GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및
상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

[청구항 15] 제 14항에 있어서,
상기 유전자의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 증가되면, 암의 반응률(response rate)이 감소하는 것으로 판단하는 것인, 방법.

[청구항 16] 제 14항에 있어서,
상기 유전자의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 증가되면, 암의 항암제 내성이 증가한 것으로 판단하는 것인, 방법.

[청구항 17] 제 14항에 있어서,
상기 유전자의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 증가되면, 암세포의 성장, 침습(invasion) 또는 이동(migration)이 증가하는 것으로 판단하는 것인, 방법.

[청구항 18] 제 14항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 및 소변으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 방법.

[청구항 19] 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;
상기 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;
상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료에서 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제의 스크리닝 방법.

[청구항 20] 제 19항에 있어서,
상기 유전자의 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 저발현 되면, 항암효과가 있는 것으로 판단하는 것인, 방법.

[청구항 21] 제 20항에 있어서,
상기 항암 효과는, 암의 반응률(response rate)이 증가하는 것인, 방법.

[청구항 22] 제 20항에 있어서,
상기 항암 효과는, 암세포의 성장, 침습(invasion) 또는 이동(migration)이 감소하는 것인, 방법.

[청구항 23] 제 20항에 있어서,
상기 항암 효과는, 암세포의 항암제 내성이 감소하는 것인, 방법.

[청구항 24] GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자를 포함하는 항암제 약물내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 바이오마커.

[청구항 25] GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군

에서 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물.

[청구항 26] GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물.

[청구항 27] 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

상기 분리된 생물학적 시료에서 26항의 키트를 이용하여, GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 진단, 전이 또는 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

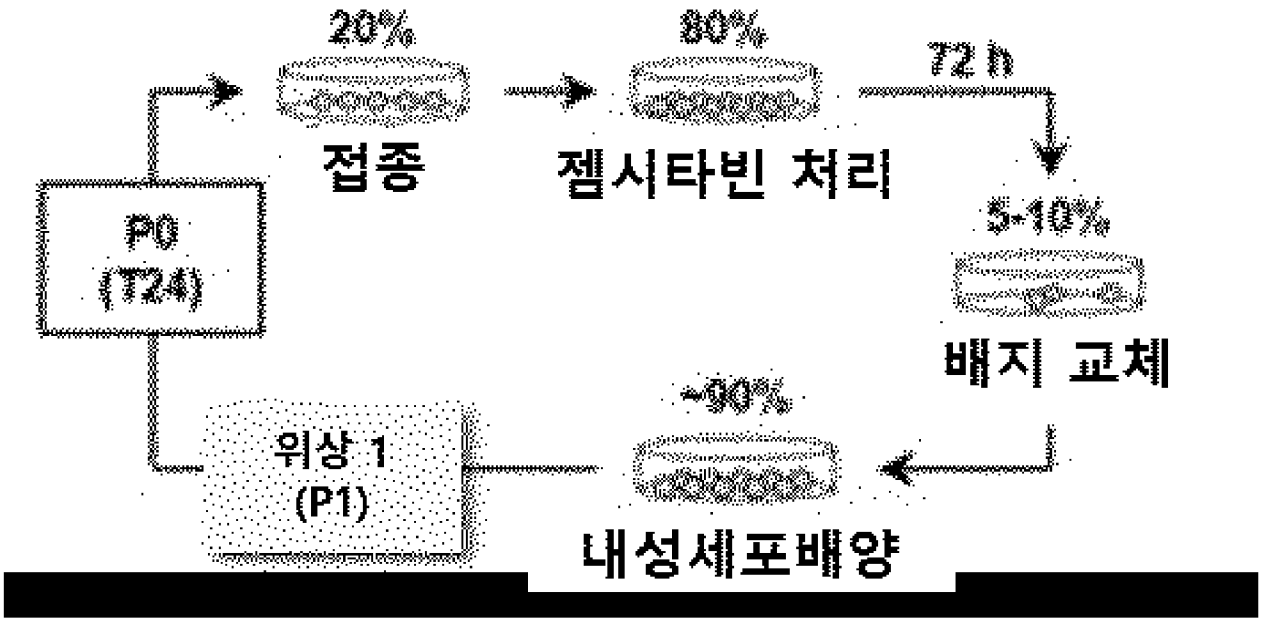
[청구항 28] 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

상기 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

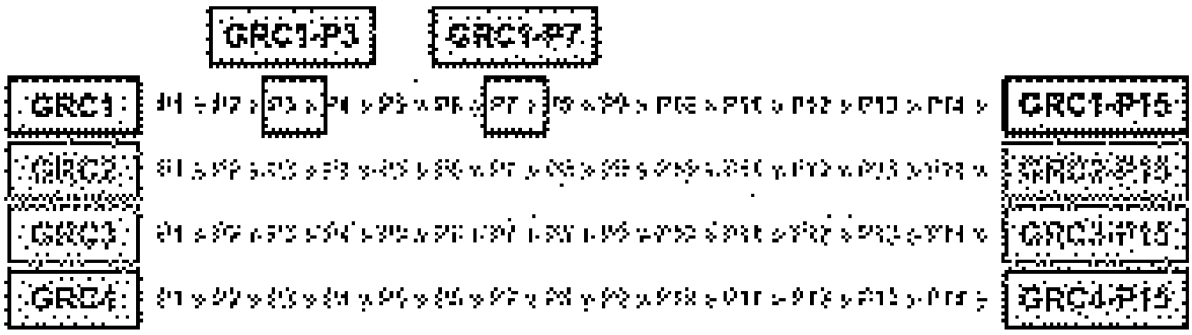
상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료에서 GATA3, FOXA1, RASSF5, PTPN6, TRNP1, APOBEC3D, APOBEC3G, ABL1, ABL2, CACNA2D1, JUN, GNG4, NGF, MYC, MAP4K4, STC1, FOXD1, FOXC2, TGFB1, TGFB3, NOG, SMAD9 및 NT5E로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 발현수준을 측정하는 단계; 및

상기 유전자의 발현 수준을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 항암제 약물 내성을 가지는 암의 치료제 스크리닝 방법.

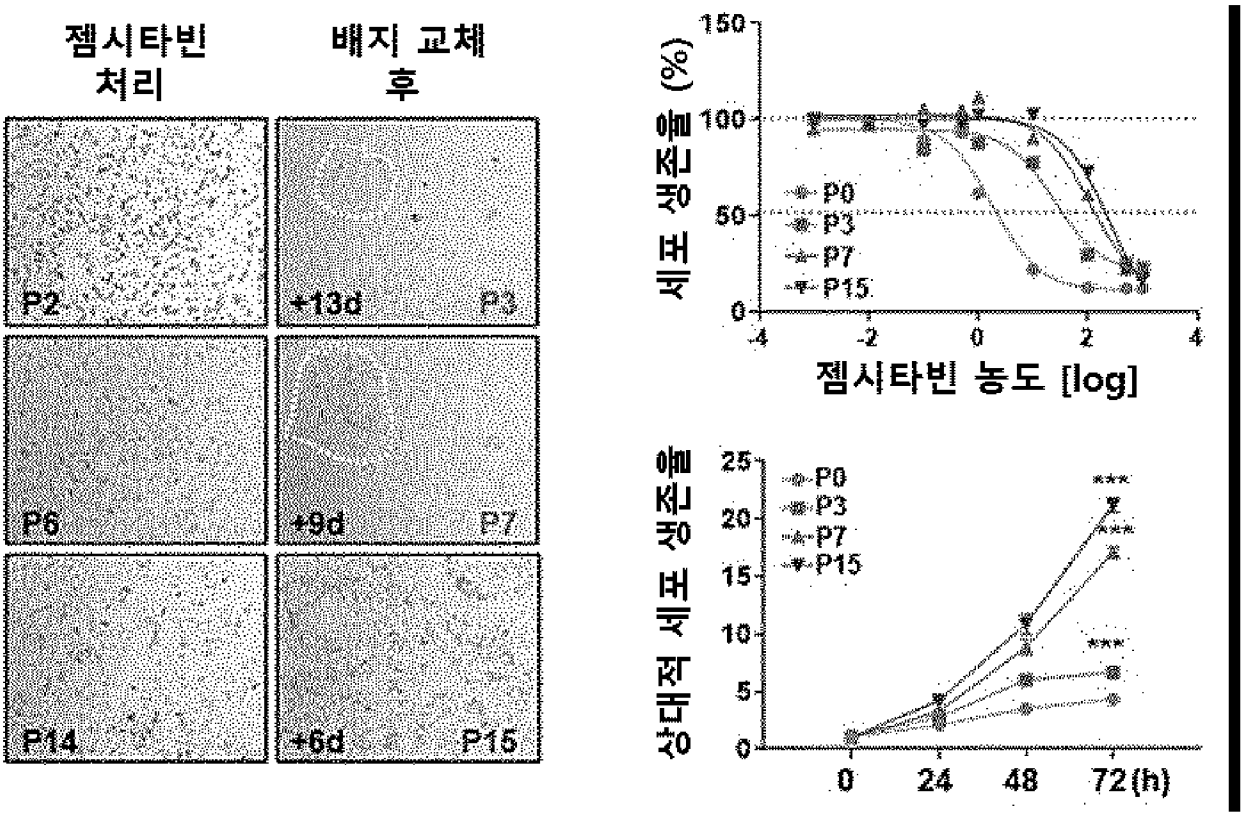
[도1a]


20%
80%
72 h
접종
젬시타빈 처리
P0
(T24)
5-10%
배지 교체
~90%
위상 1
(P1)
내성세포배양

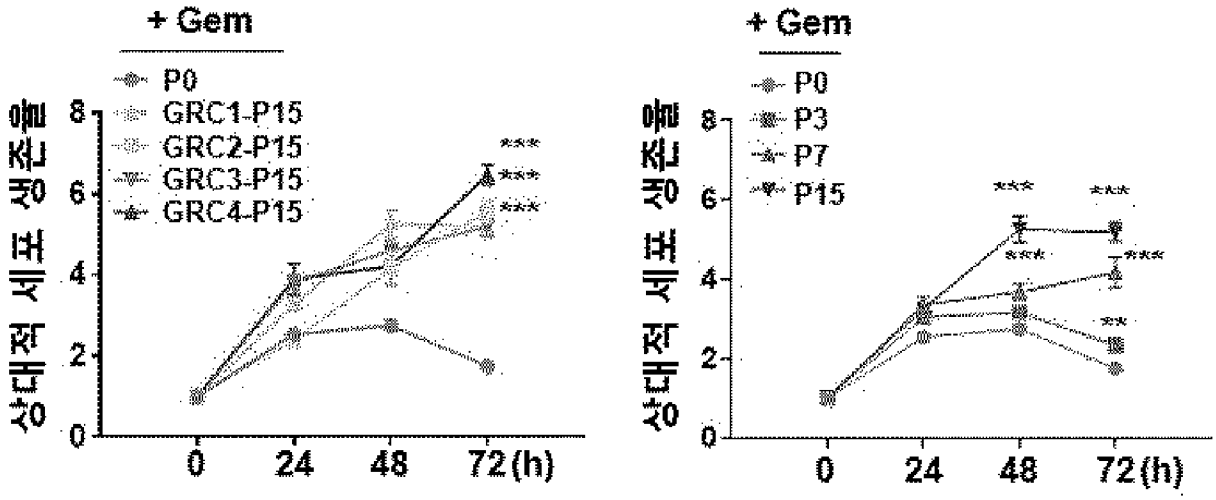
[도1b]


GRC1-P3
GRC1-P7
GRC1
GRC1-P15
GRC2
GRC3
GRC4

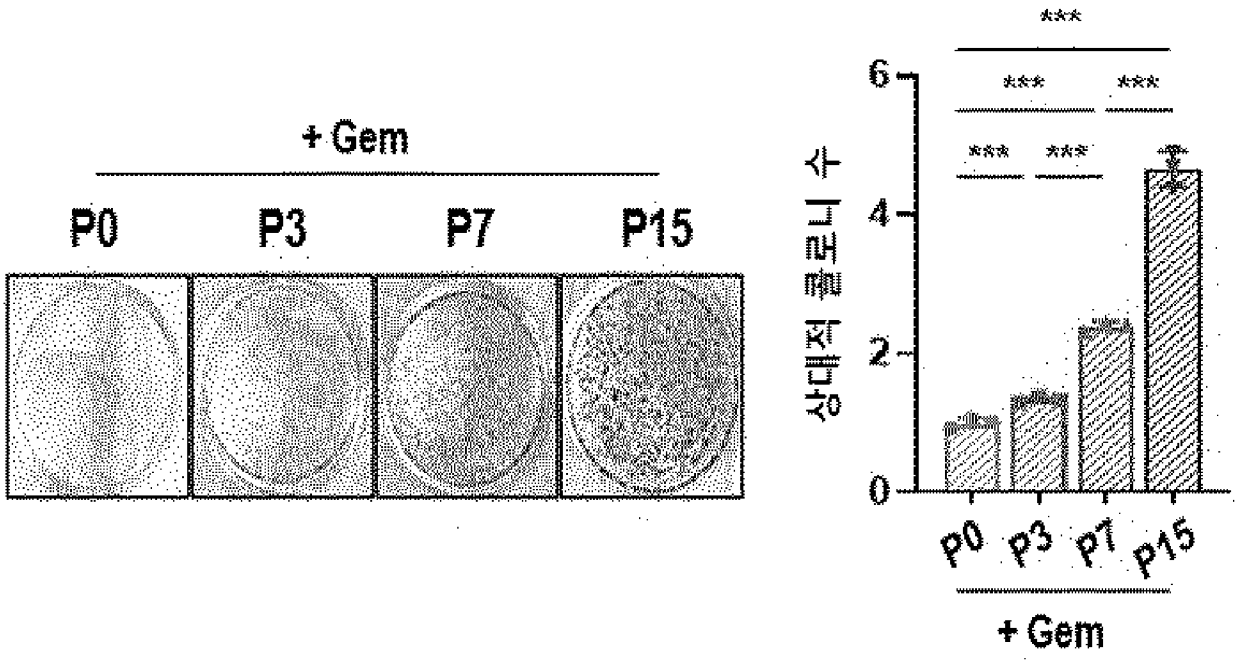
[도1c]


젬시타빈 처리
배지 교체 후
P2
+13d
P3
P6
+9d
P7
P14
+6d
P15
세포 생존율 (%)
젬시타빈 농도 [log]
P0
P3
P7
P15
상대적 세포 생존율
0
24
48
72 (h)

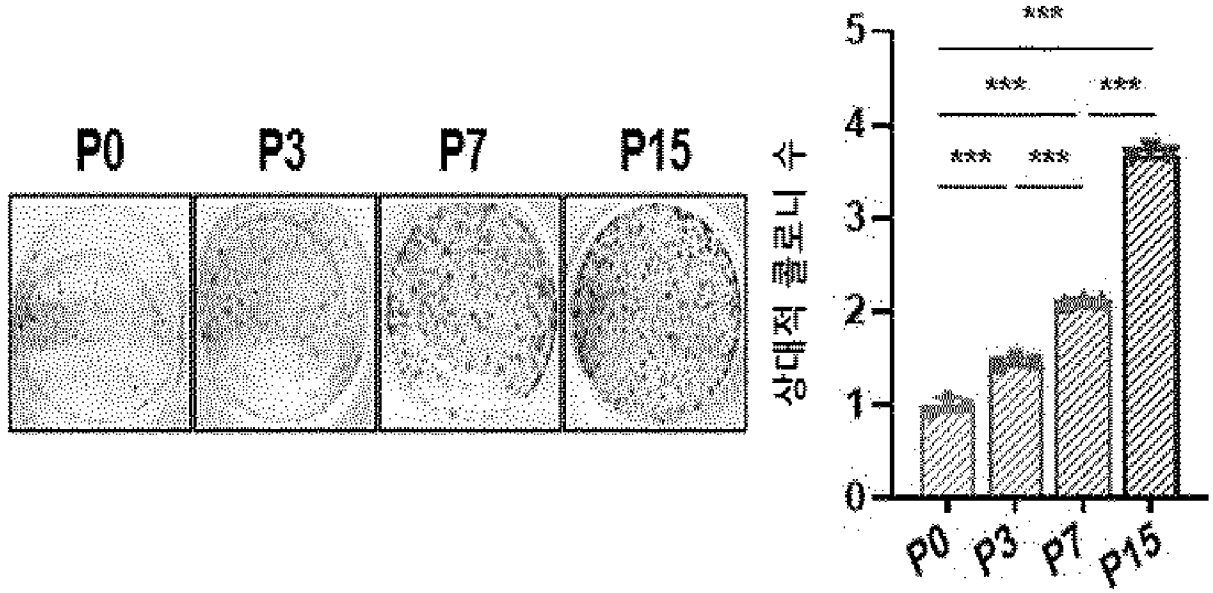
[도1d]


+ Gem
P0
GRC1-P15
GRC2-P15
GRC3-P15
GRC4-P15
상대적 세포 생존율
0
24
48
72 (h)
+ Gem
P0
P3
P7
P15
상대적 세포 생존율
0
24
48
72 (h)

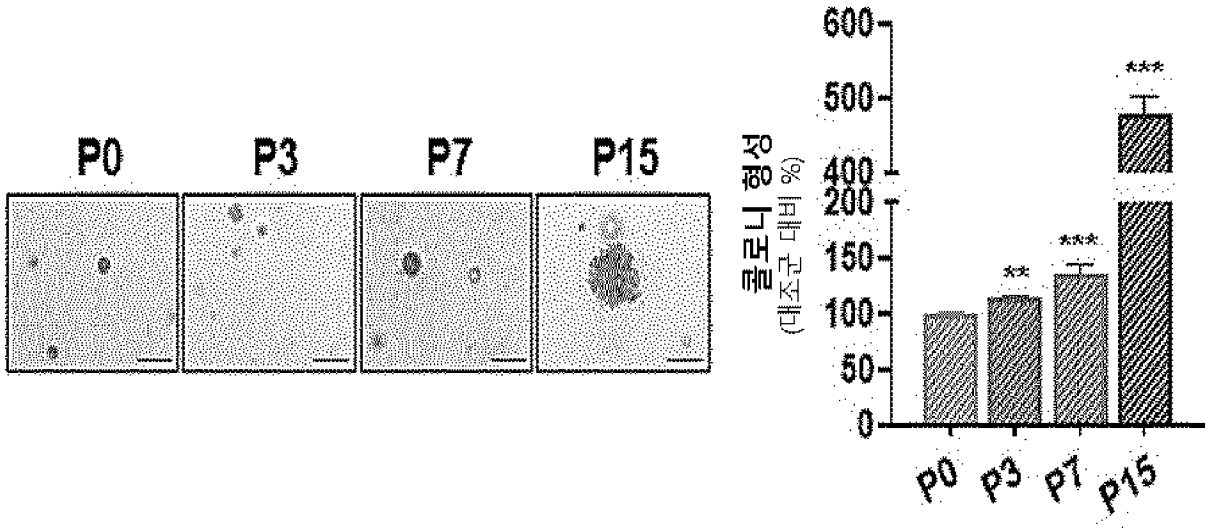
[도1e]


+ Gem
P0
P3
P7
P15
***
***
***
***
***
상대적 콜로니 수
0
2
4
6
P0
P3
P7
P15
+ Gem

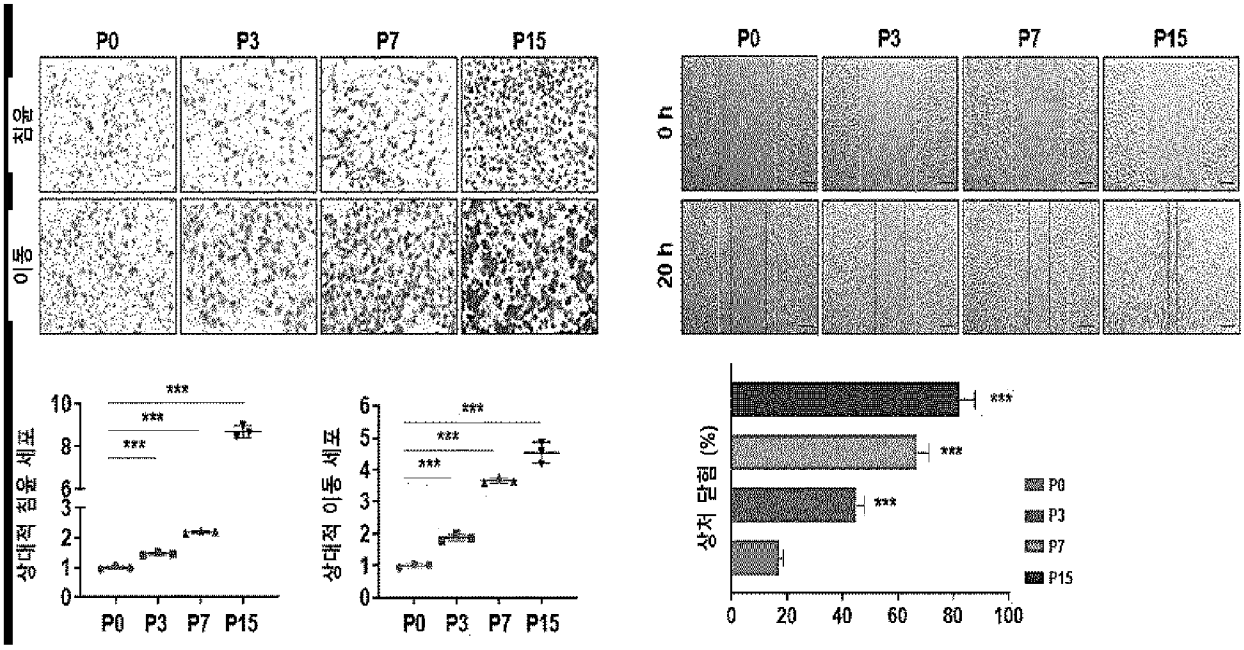
[도1f]


P0
P3
P7
P15
***
***
***
***
***
상대적 콜로니 수
0
1
2
3
4
5
P0
P3
P7
P15

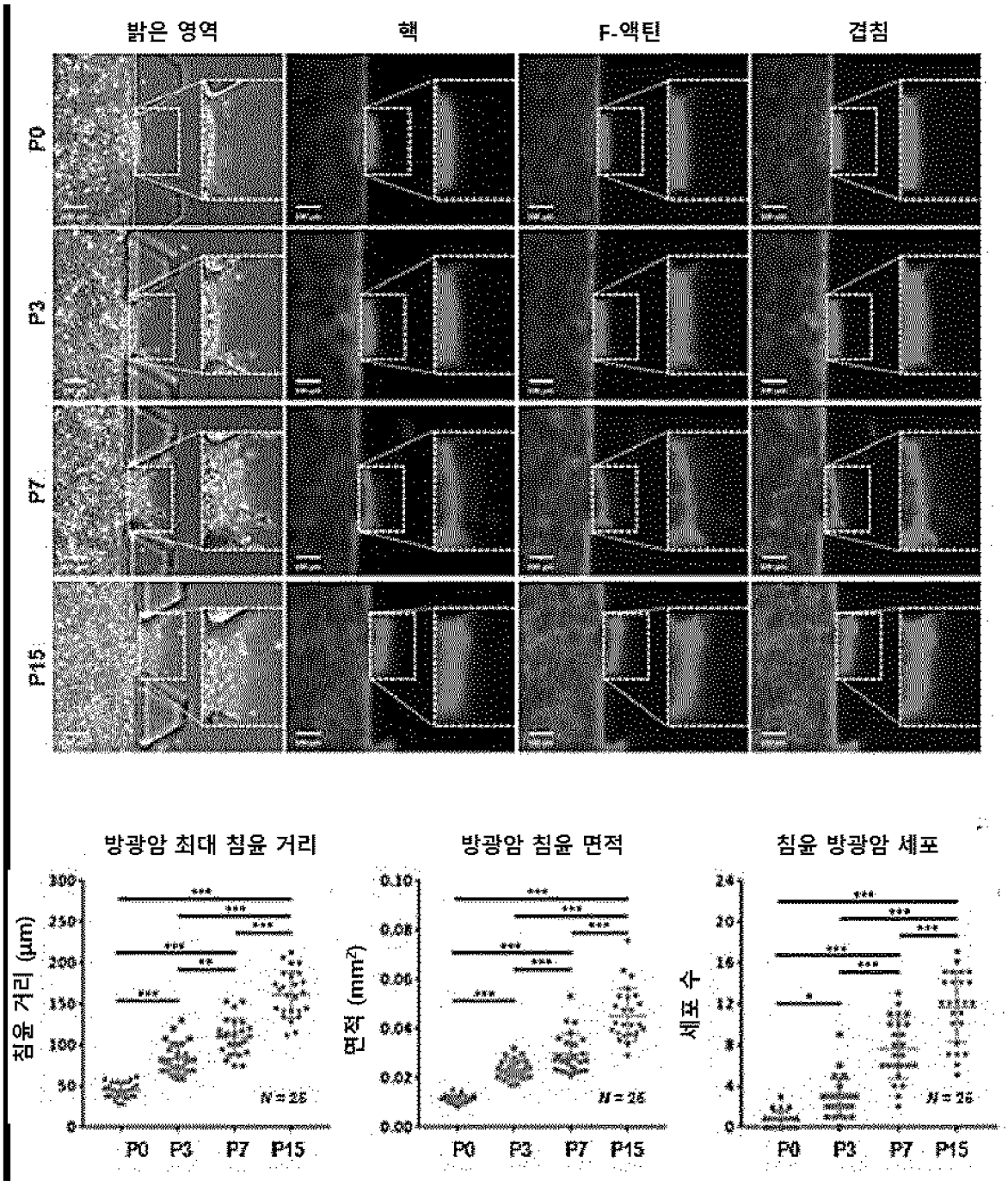
[도1g]


P0
P3
P7
P15
콜로니 형성
(대조군 대비 %)
600
500
400
200
150
100
50
0
**
***
***
***
P0
P3
P7
P15

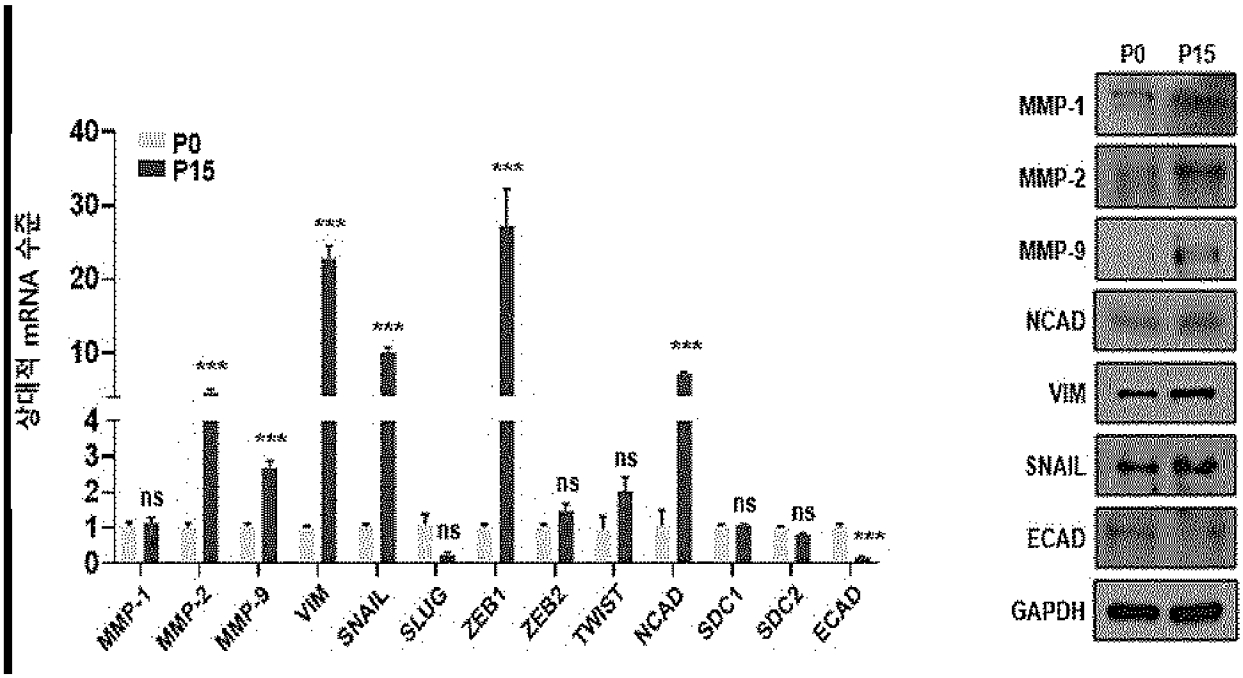
[도1h]


P0
P3
P7
P15
침윤
이동
0 h
20 h
상대적 침윤 세포
상대적 이동 세포
상처 닫힘 (%)
***
P0
P3
P7
P15
0
20
40
60
80
100

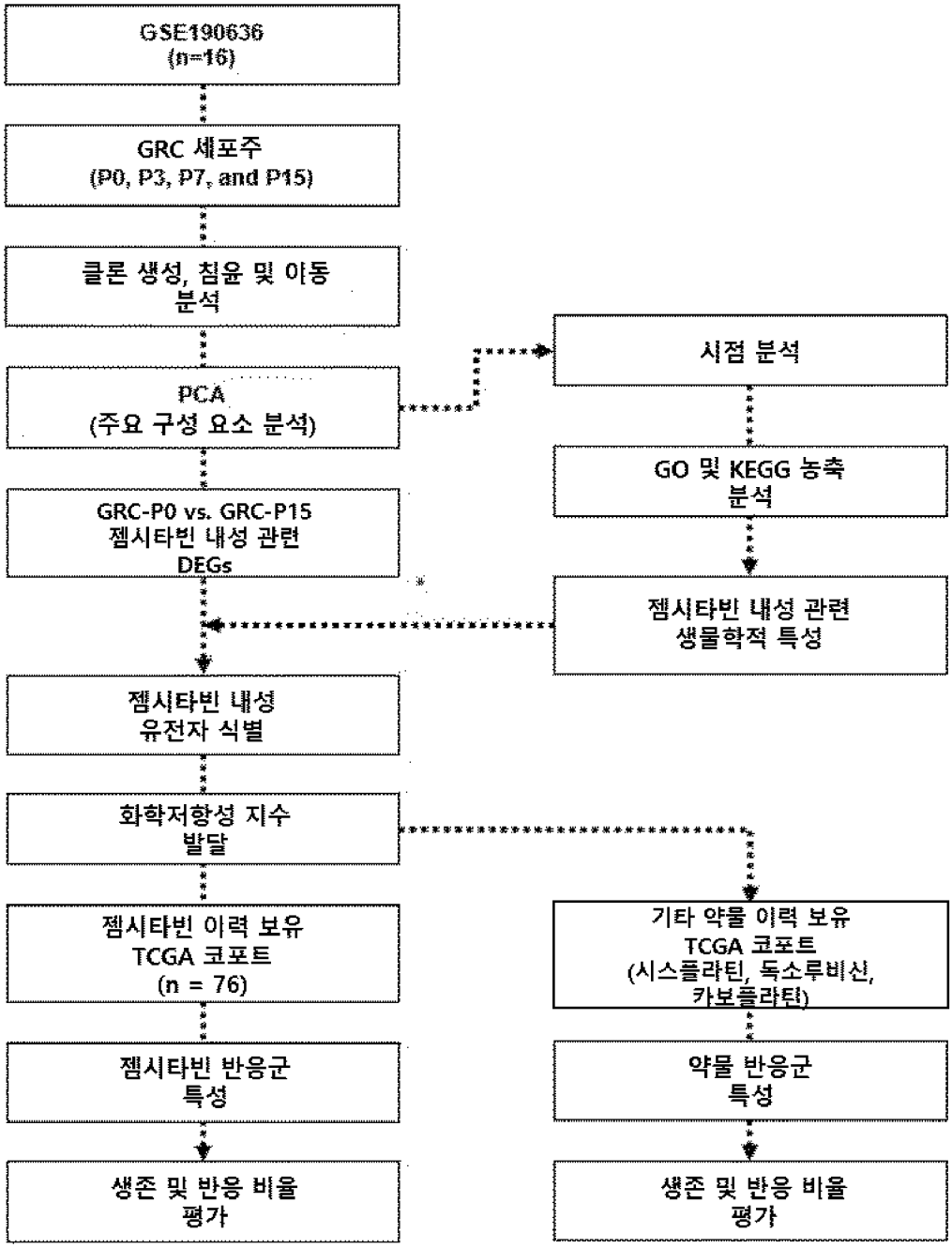
[도2a]


밝은 영역
핵
F-액틴
겹침
P0
P3
P7
P15
방광암 최대 침윤 거리
침윤 거리 (μm)
방광암 침윤 면적
면적 (mm²)
침윤 방광암 세포
세포 수
N = 25
P0
P3
P7
P15

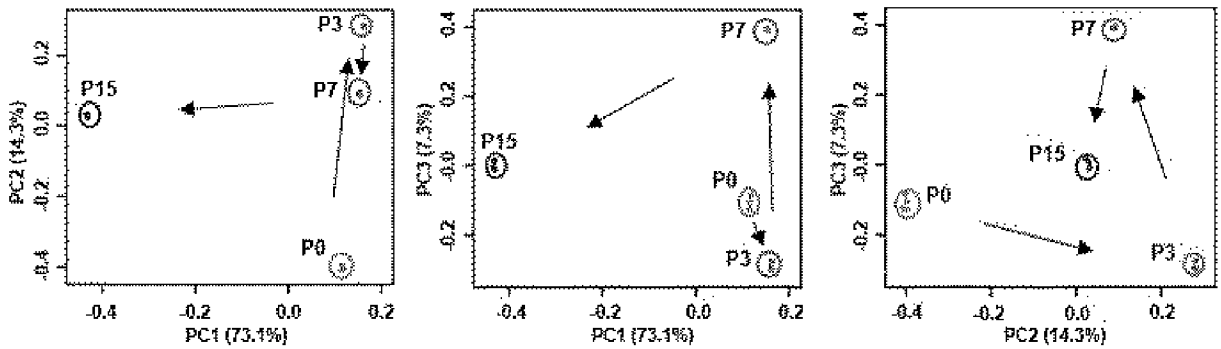
[도2b]


상대적 mRNA 수준
P0
P15
MMP-1
MMP-2
MMP-9
VIM
SNAIL
SLUG
ZEB1
ZEB2
TWIST
NCAD
SDC1
SDC2
ECAD
ns
***
P0
P15
MMP-1
MMP-2
MMP-9
NCAD
VIM
SNAIL
ECAD
GAPDH

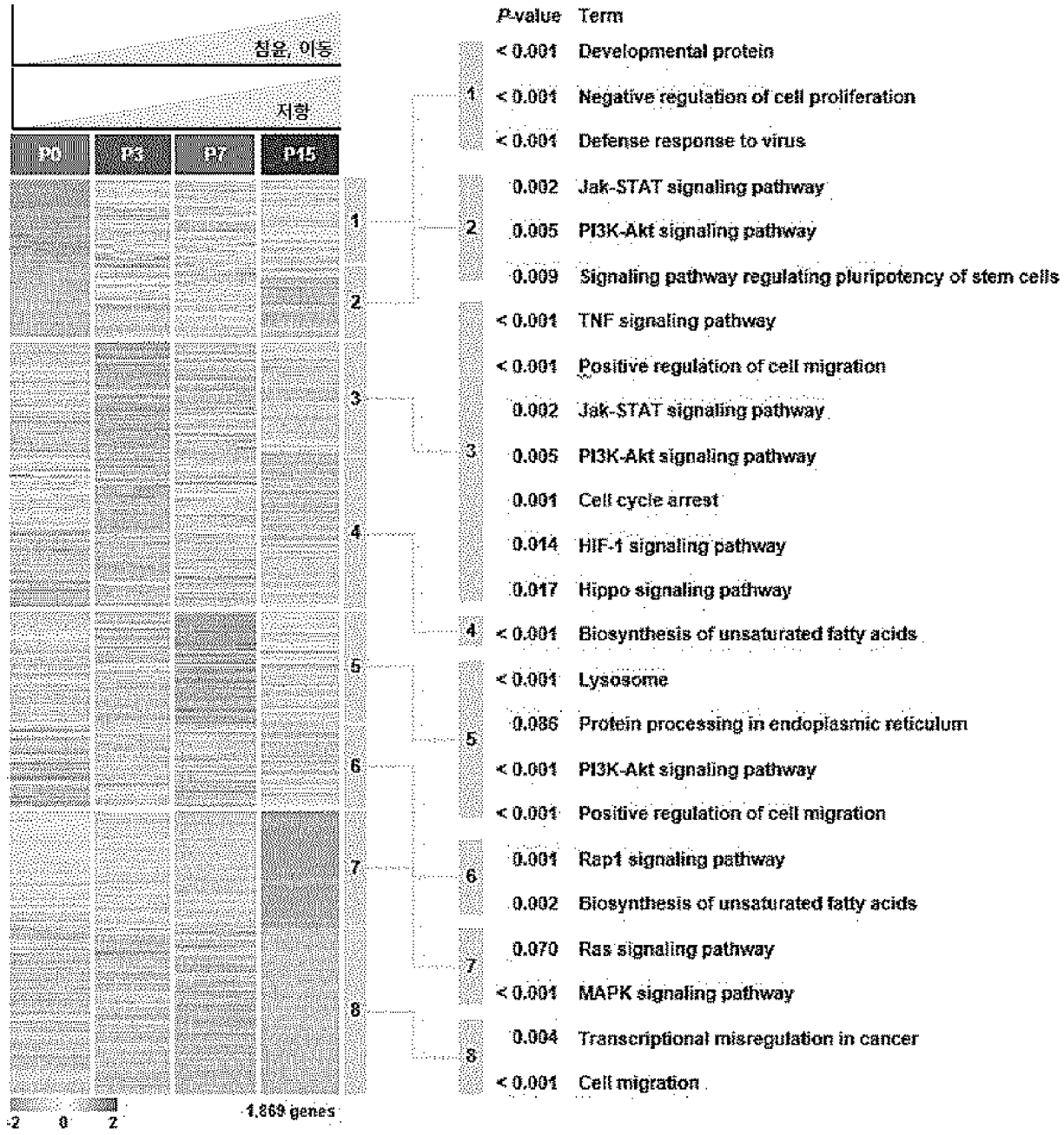
[도3a]


GSE190636
(n=16)
GRC 세포주
(P0, P3, P7, and P15)
클론 생성, 침윤 및 이동
분석
PCA
(주요 구성 요소 분석)
GRC-P0 vs. GRC-P15
젬시타빈 내성 관련
DEGs
젬시타빈 내성
유전자 식별
화학저항성 지수
발달
젬시타빈 이력 보유
TCGA 코포트
(n = 76)
젬시타빈 반응군
특성
생존 및 반응 비율
평가
시점 분석
GO 및 KEGG 농축
분석
젬시타빈 내성 관련
생물학적 특성
기타 약물 이력 보유
TCGA 코포트
(시스플라틴, 독소루비신,
카보플라틴)
약물 반응군
특성
생존 및 반응 비율
평가

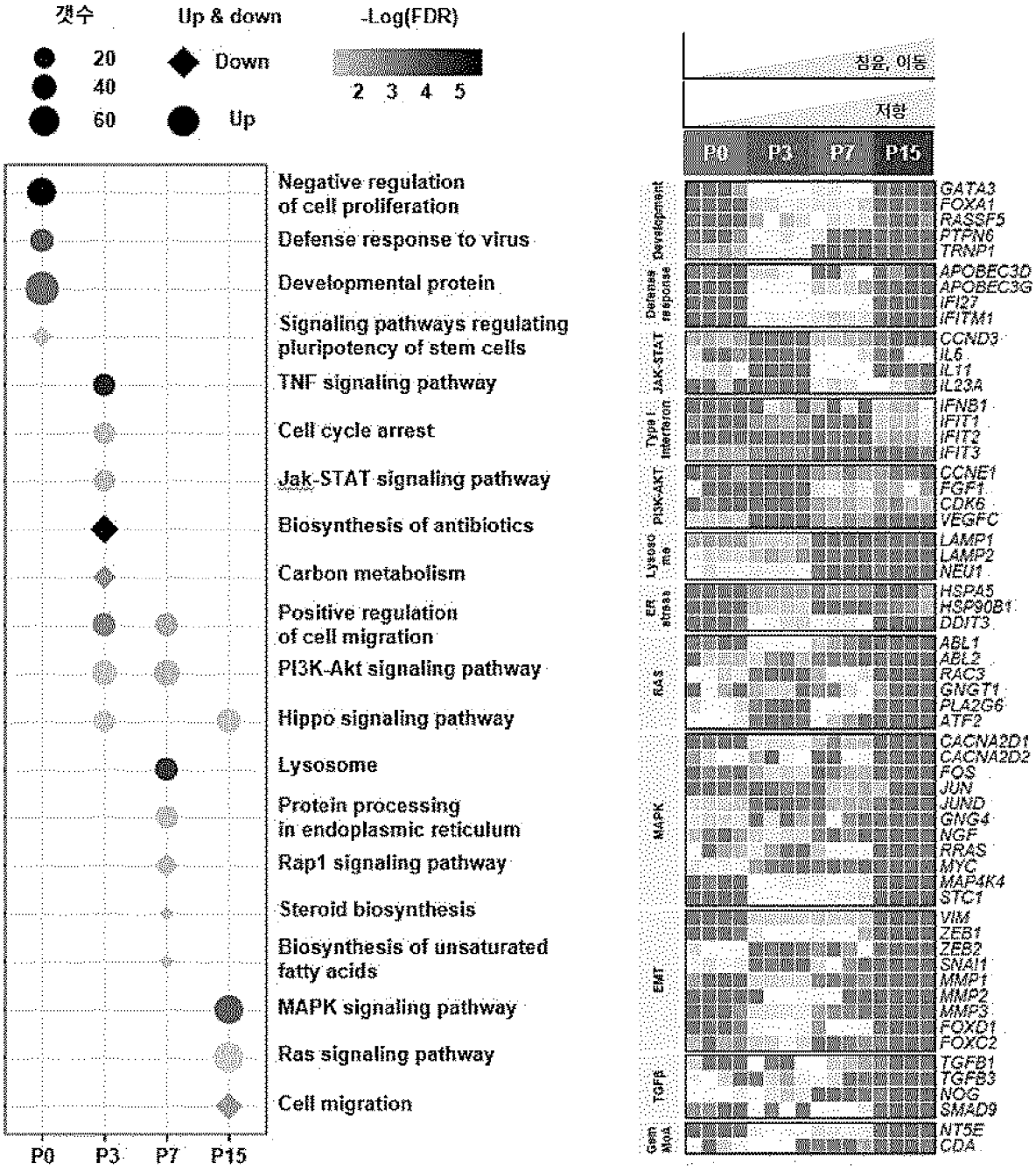
[도3b]


P3
P15
P7
P0
PC2 (14.3%)
PC1 (73.1%)
P7
P15
P0
P3
PC3 (7.3%)
PC1 (73.1%)
P7
P15
P0
P3
PC3 (7.3%)
PC2 (14.3%)

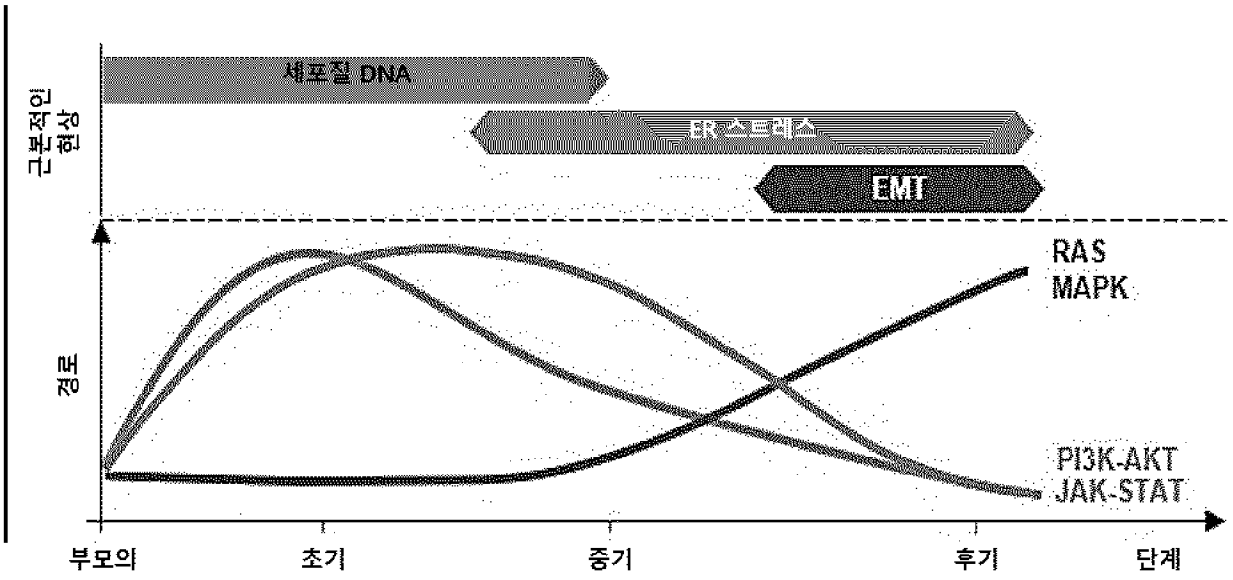
[도3c]


침윤, 이동
저항
P6
P5
P7
P15
1
2
3
4
5
6
7
8
-2
0
2
1,869 genes
P-value Term
< 0.001 Developmental protein
< 0.001 Negative regulation of cell proliferation
< 0.001 Defense response to virus
0.002 Jak-STAT signaling pathway
0.005 PI3K-Akt signaling pathway
0.009 Signaling pathway regulating pluripotency of stem cells
< 0.001 TNF signaling pathway
< 0.001 Positive regulation of cell migration
0.002 Jak-STAT signaling pathway
0.005 PI3K-Akt signaling pathway
0.001 Cell cycle arrest
0.014 HIF-1 signaling pathway
0.017 Hippo signaling pathway
< 0.001 Biosynthesis of unsaturated fatty acids
< 0.001 Lysosome
0.086 Protein processing in endoplasmic reticulum
< 0.001 PI3K-Akt signaling pathway
< 0.001 Positive regulation of cell migration
0.001 Rap1 signaling pathway
0.002 Biosynthesis of unsaturated fatty acids
0.070 Ras signaling pathway
< 0.001 MAPK signaling pathway
0.004 Transcriptional misregulation in cancer
< 0.001 Cell migration

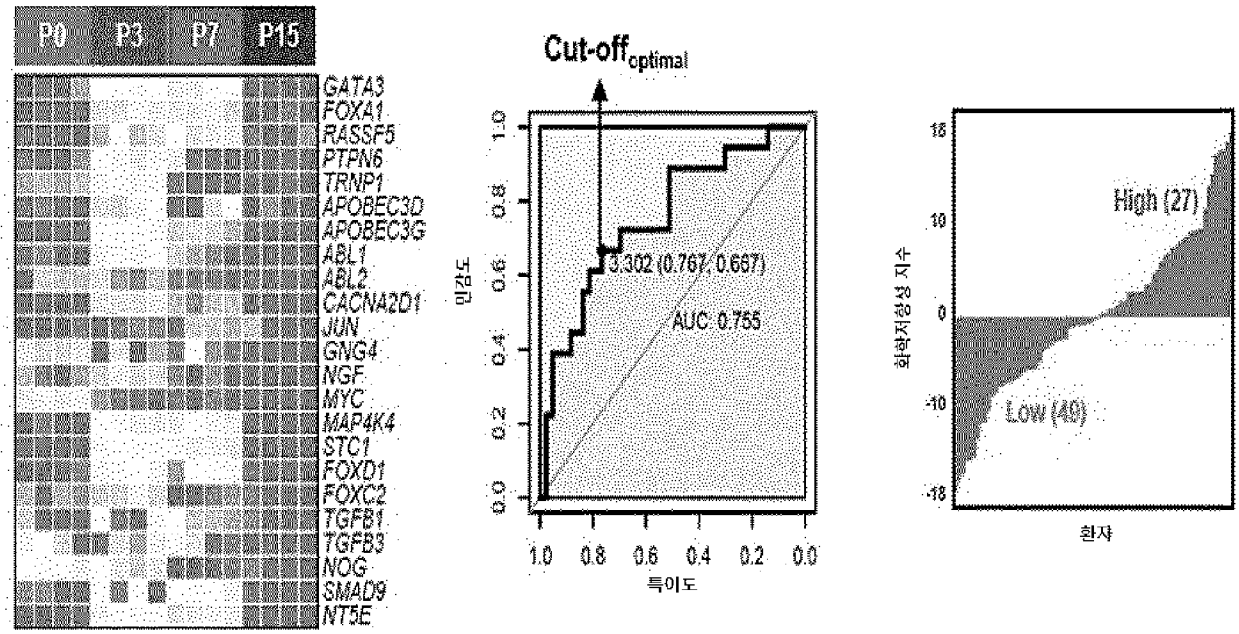
[도4a]


갯수
20
40
60
Up & down
Down
Up
-Log(FDR)
2 3 4 5
Negative regulation of cell proliferation
Defense response to virus
Developmental protein
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells
TNF signaling pathway
Cell cycle arrest
Jak-STAT signaling pathway
Biosynthesis of antibiotics
Carbon metabolism
Positive regulation of cell migration
PI3K-Akt signaling pathway
Hippo signaling pathway
Lysosome
Protein processing in endoplasmic reticulum
Rap1 signaling pathway
Steroid biosynthesis
Biosynthesis of unsaturated fatty acids
MAPK signaling pathway
Ras signaling pathway
Cell migration
P0 P3 P7 P15
침윤, 이동
저항
P0 P3 P7 P15
Development
GATA3
FOXA1
RASSF5
PTPN6
TRNP1
Defense response
APOBEC3D
APOBEC3G
IFI27
IFITM1
JAK-STAT
CCND3
IL6
IL11
IL23A
Type I interferon
IFNB1
IFIT1
IFIT2
IFIT3
PI3K-AKT
CCNE1
FGF1
CDK6
VEGFC
Lysosome
LAMP1
LAMP2
NEU1
ER stress
HSPA5
HSP90B1
DDIT3
RAS
ABL1
ABL2
RAC3
GNGT1
PLA2G6
ATF2
MAPK
CACNA2D1
CACNA2D2
FOS
JUN
JUND
GNG4
NGF
RRAS
MYC
MAP4K4
STC1
EMT
VIM
ZEB1
ZEB2
SNAI1
MMP1
MMP2
MMP3
FOXD1
FOXC2
TGFβ
TGFB1
TGFB3
NOG
SMAD9
Gem MoA
NT5E
CDA

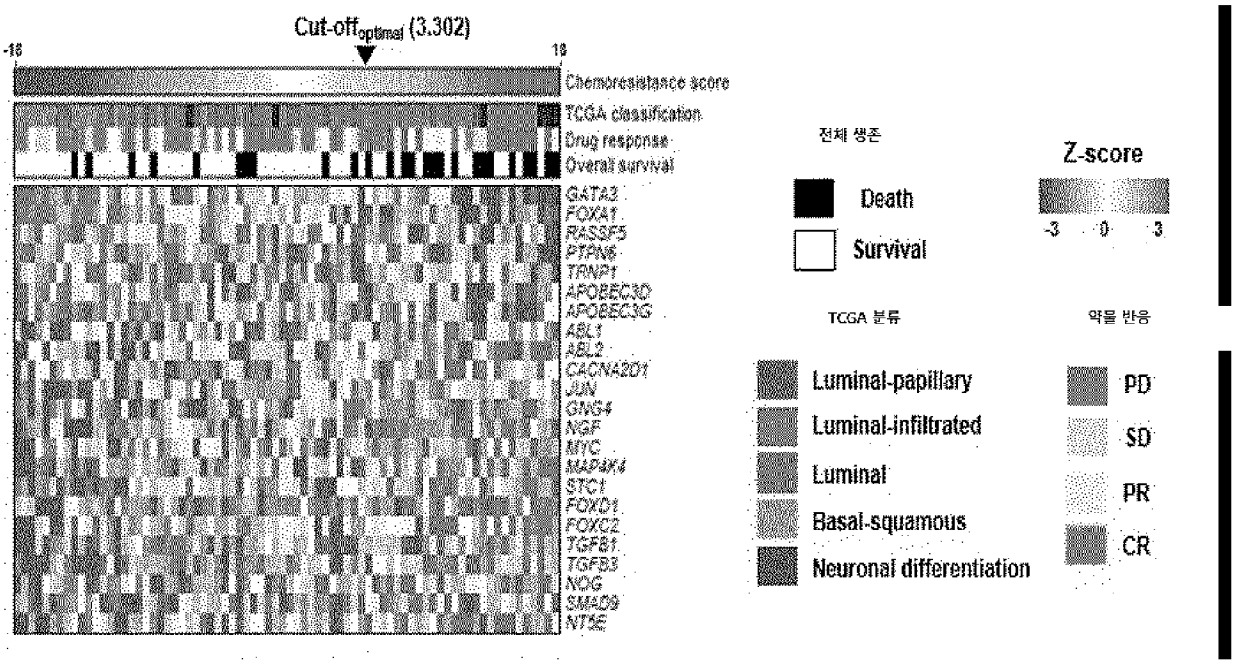
[도4b]


근본적인 현상
세포질 DNA
ER 스트레스
EMT
경로
RAS
MAPK
PI3K-AKT
JAK-STAT
부모의
초기
중기
후기
단계

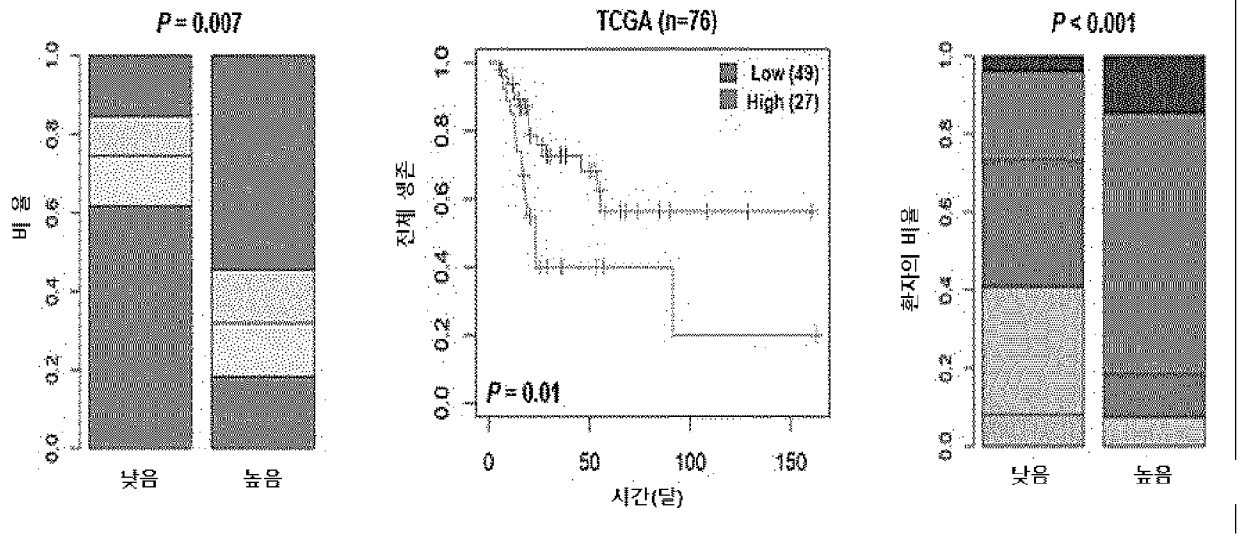
[도4c]


P0
P3
P7
P15
GATA3
FOXA1
RASSF5
PTPN6
TRNP1
APOBEC3D
APOBEC3G
ABL1
ABL2
CACNA2D1
JUN
GNG4
NGF
MYC
MAP4K4
STC1
FOXD1
FOXC2
TGFB1
TGFB3
NOG
SMAD9
NT5E
Cut-off optimal
민감도
3.302 (0.767, 0.667)
AUC: 0.755
특이도
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
High (27)
Low (40)
화학저항성 지수
환자

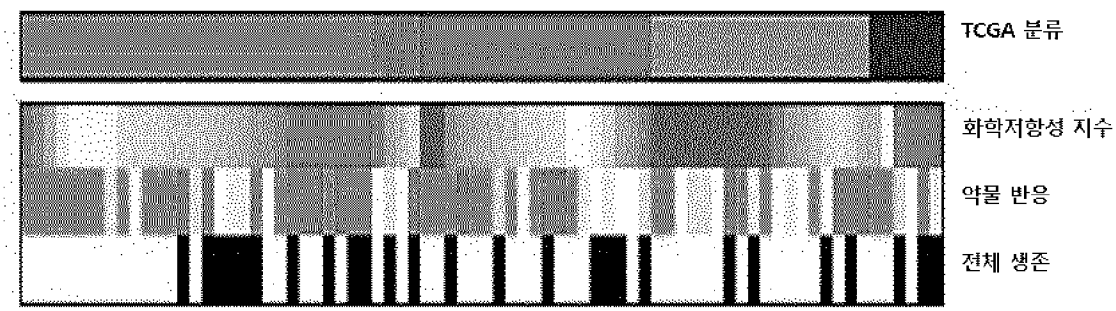
[도4d]


Cut-off$_{optimal}$ (3.302)
-18
18
Chemoresistance score
TCGA classification
Drug response
Overall survival
GATA3
FOXA1
RASSF5
PTPN6
TRNP1
APOBEC3D
APOBEC3G
ABL1
ABL2
CACNA2D1
JUN
GNG4
NGF
MYC
MAP4K4
STC1
FOXD1
FOXC2
TGFB1
TGFB3
NOG
SMAD9
NT5E
전체 생존
Death
Survival
Z-score
-3
0
3
TCGA 분류
Luminal-papillary
Luminal-infiltrated
Luminal
Basal-squamous
Neuronal differentiation
약물 반응
PD
SD
PR
CR

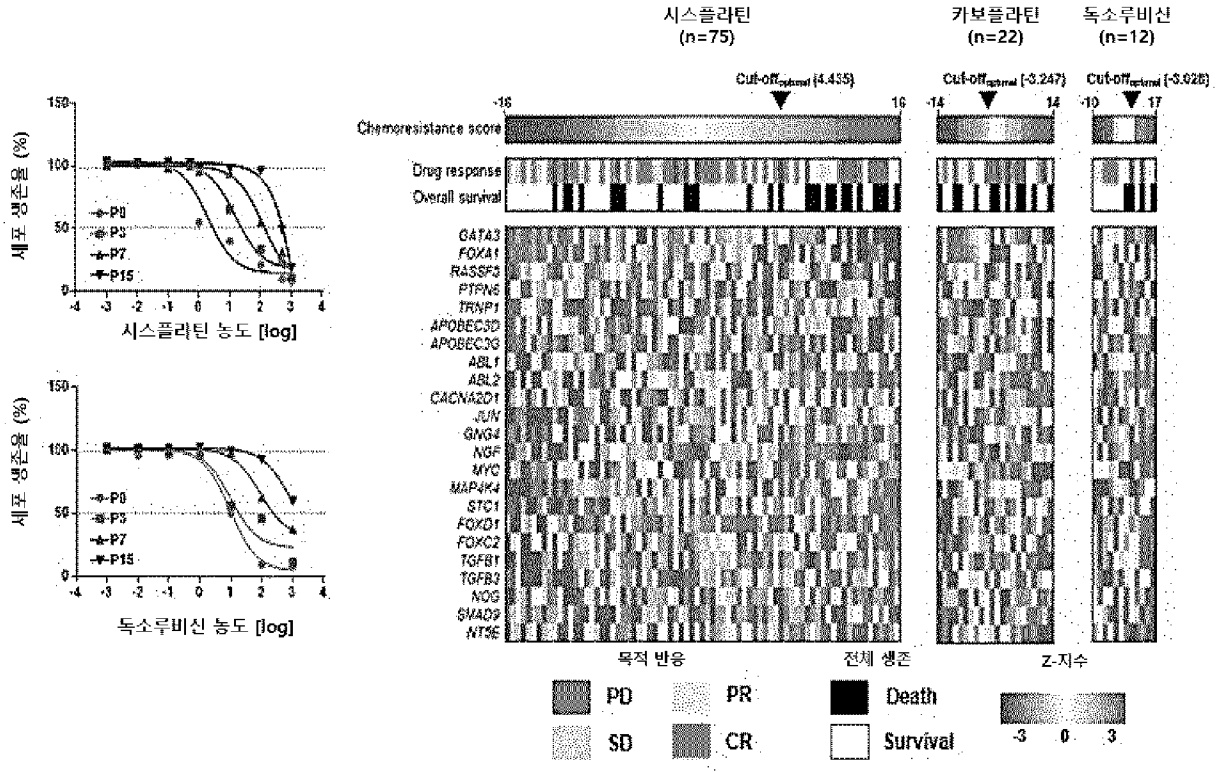
[도4e]


P = 0.007
비율
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
낮음
높음
TCGA (n=76)
Low (49)
High (27)
전체 생존
P = 0.01
0
50
100
150
시간(달)
P < 0.001
환자의 비율
낮음
높음

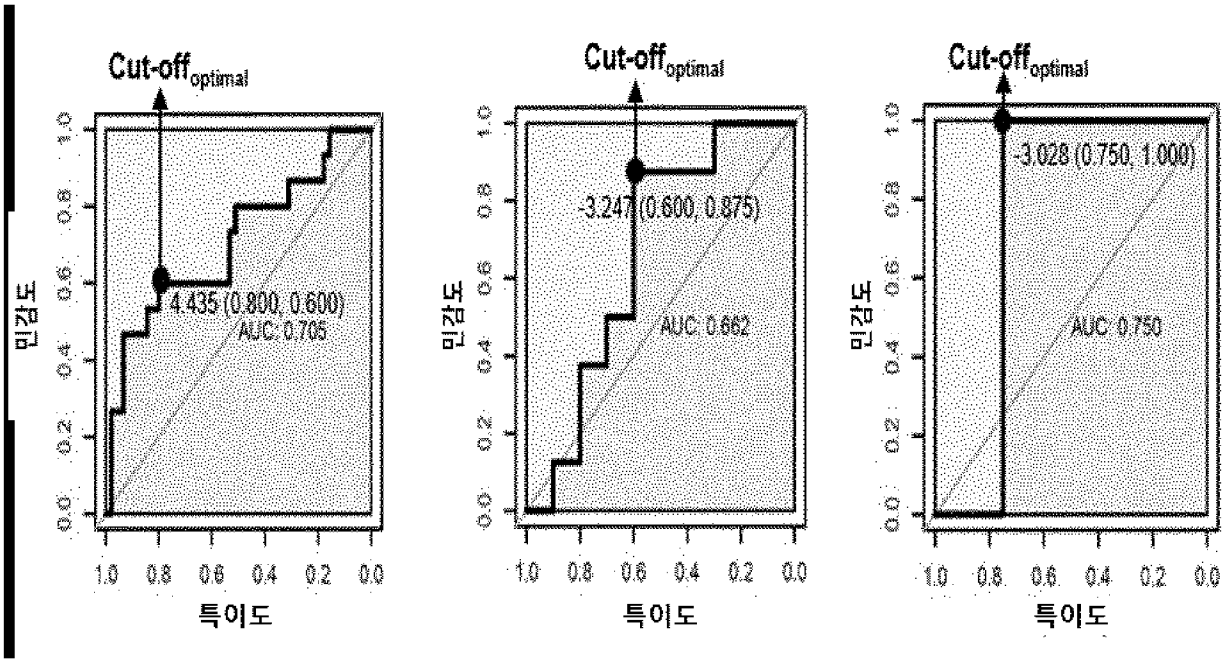
[도4f]


TCGA 분류
화학저항성 지수
약물 반응
전체 생존

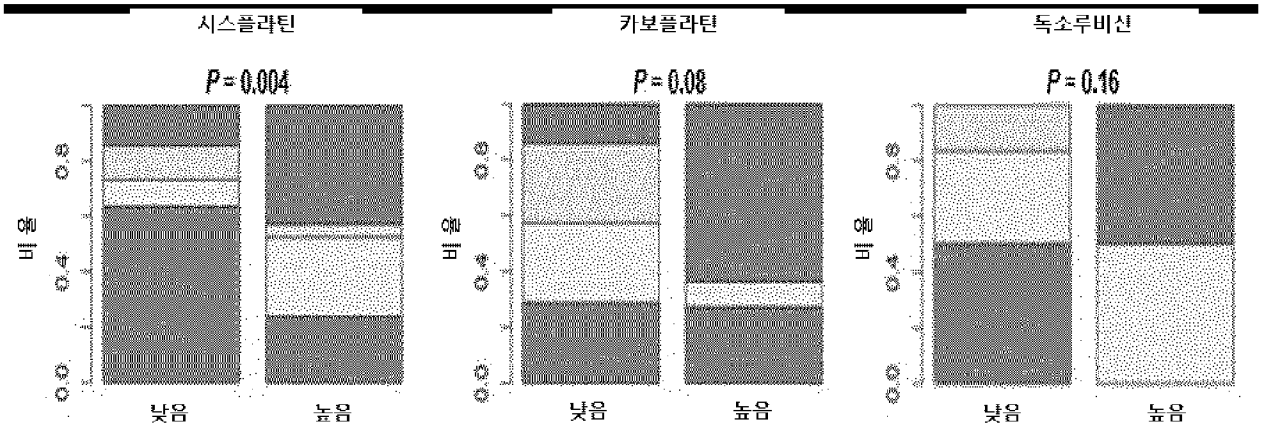
[도5a]


시스플라틴
(n=75)
카보플라틴
(n=22)
독소루비신
(n=12)
세포 생존율 (%)
시스플라틴 농도 [log]
독소루비신 농도 [log]
P0
P3
P7
P15
Chemoresistance score
Drug response
Overall survival
GATA3
FOXA1
RASSF3
PTPN6
TRNP1
APOBEC3D
APOBEC3G
ABL1
ABL2
CACNA2D1
JUN
GNG4
NGF
MYC
MAP4K4
STC1
FOXD1
FOXC2
TGFB1
TGFB3
NOG
SMAD9
NTSE
목적 반응
전체 생존
Z-지수
PD
PR
SD
CR
Death
Survival

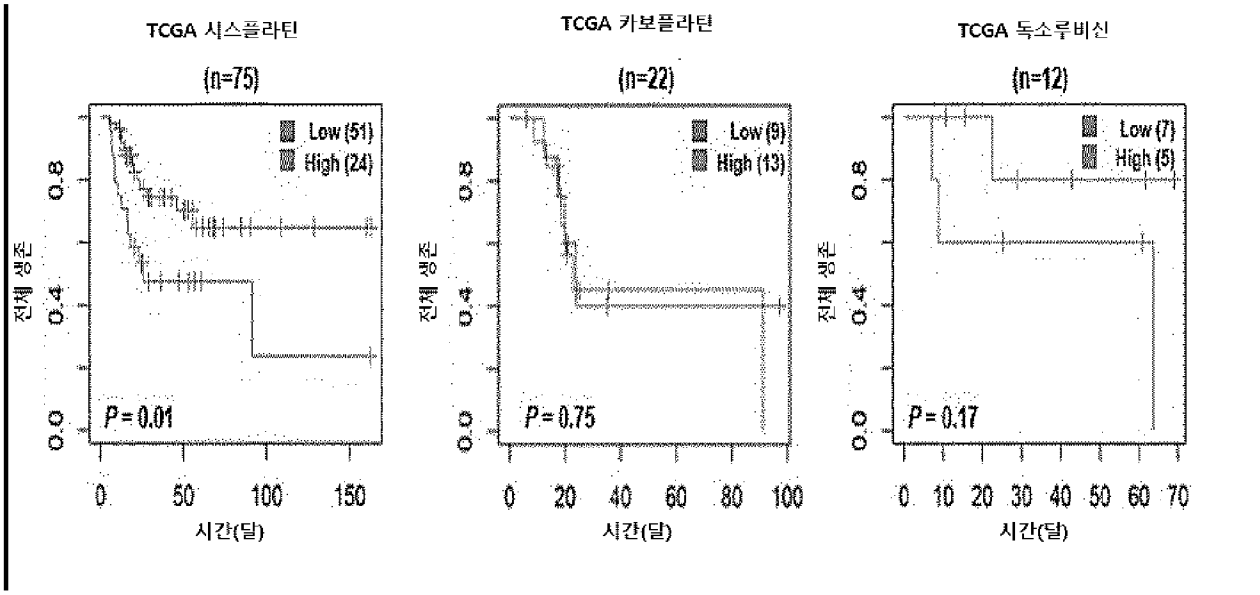
[도5b]


Cut-off optimal
4.435 (0.800, 0.600)
AUC: 0.705
-3.247 (0.600, 0.875)
AUC: 0.662
-3.028 (0.750, 1.000)
AUC: 0.750
민감도
특이도

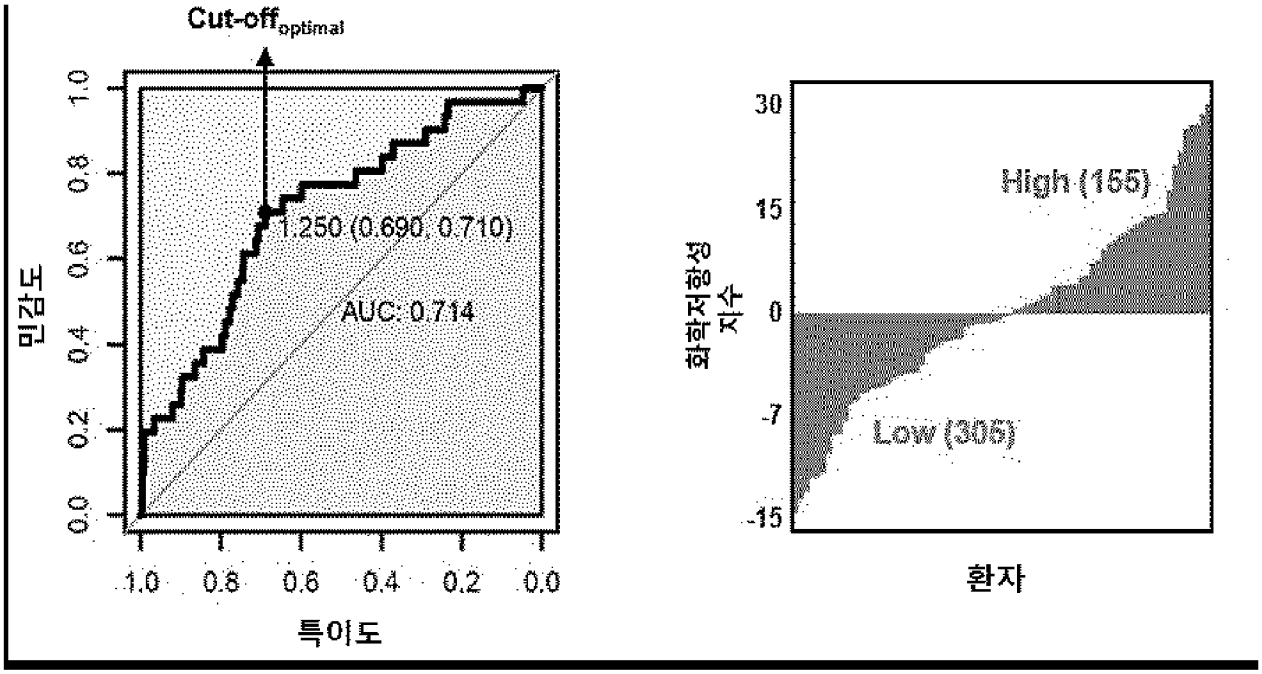
[도5c]


시스플라틴
카보플라틴
독소루비신
P = 0.004
P = 0.08
P = 0.16
비율
0.0
0.4
0.8
낮음
높음

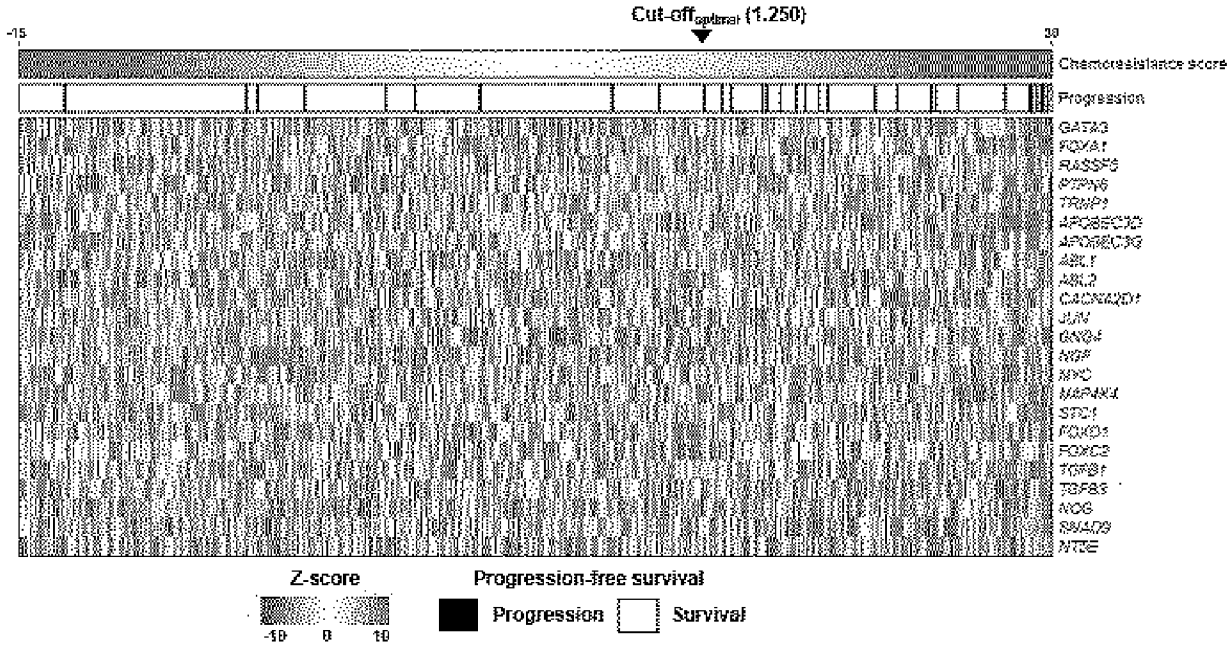
[도5d]


TCGA 시스플라틴
TCGA 카보플라틴
TCGA 독소루비신
(n=75)
(n=22)
(n=12)
Low (51)
High (24)
Low (9)
High (13)
Low (7)
High (5)
전체 생존
P = 0.01
P = 0.75
P = 0.17
0 50 100 150
0 20 40 60 80 100
0 10 20 30 40 50 60 70
시간(달)

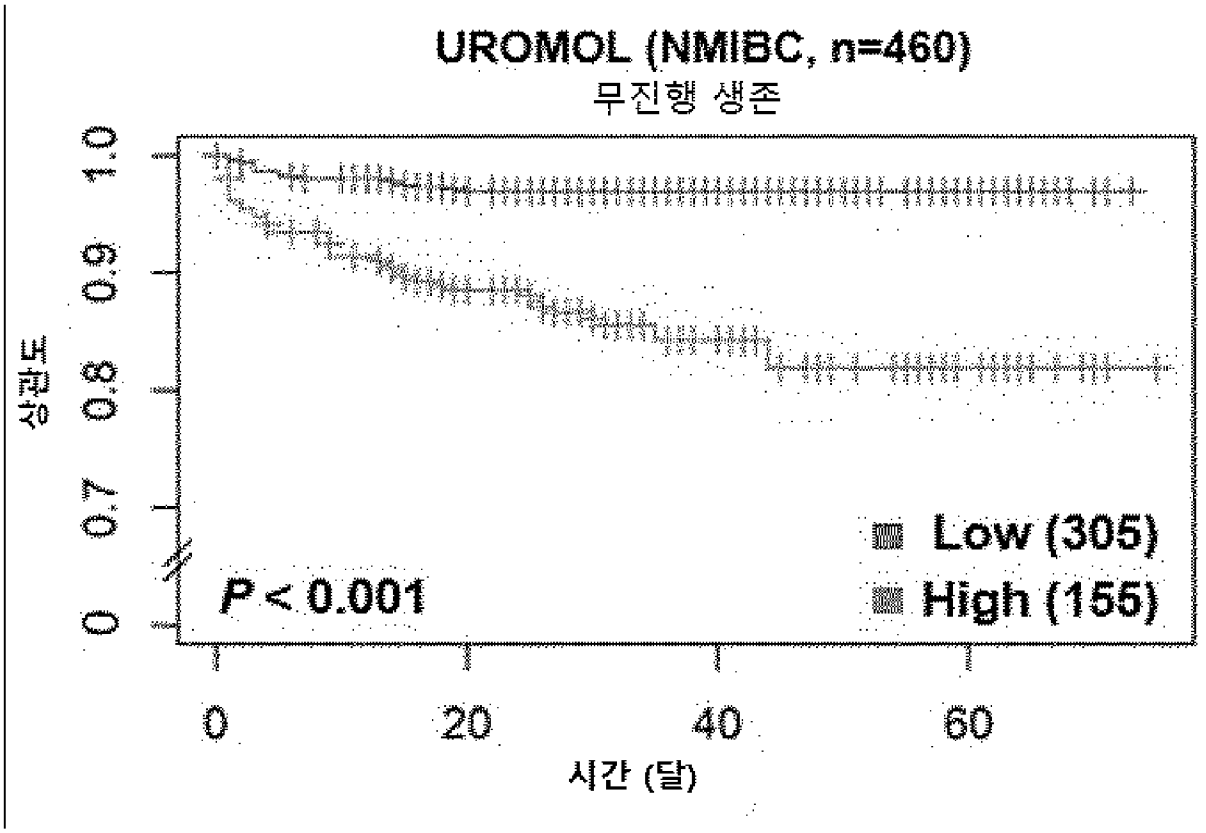
[도6a]


Cut-off optimal
1.250 (0.690, 0.710)
AUC: 0.714
민감도
특이도
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
30
15
0
-7
-15
High (155)
Low (306)
화학저항성 지수
환자

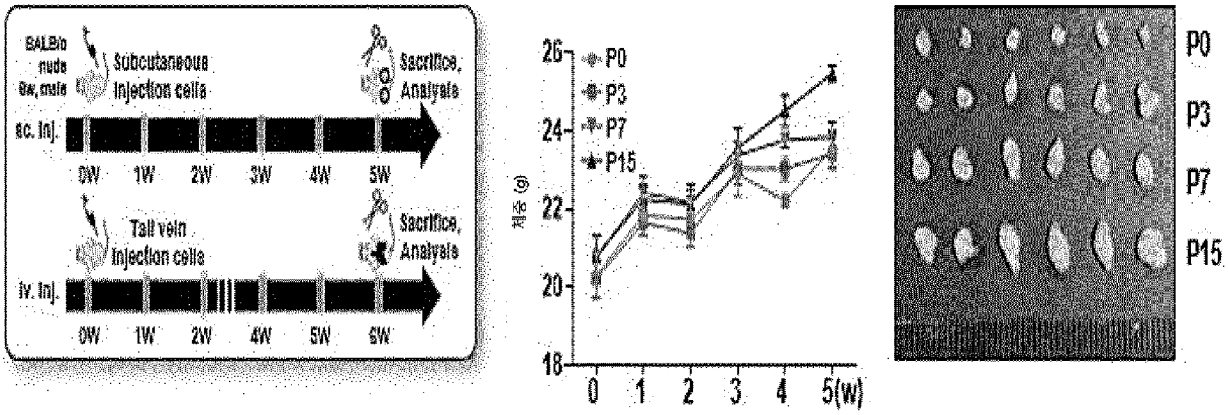
[도6b]


Cut-off optimal (1.250)
-15
38
Chemoresistance score
Progression
GATA3
FOXA1
RASSF6
PTPN6
TRIP13
APOBEC3D
APOBEC3G
ABL1
ABL2
CADM4/ZO1
JUN
GNG4
NGF
MYC
MAPMK4
STC1
FOXO1
FOXC2
TGFB1
TGFB3
NOS
SMAD9
NTE
Z-score
-10 0 10
Progression-free survival
Progression
Survival

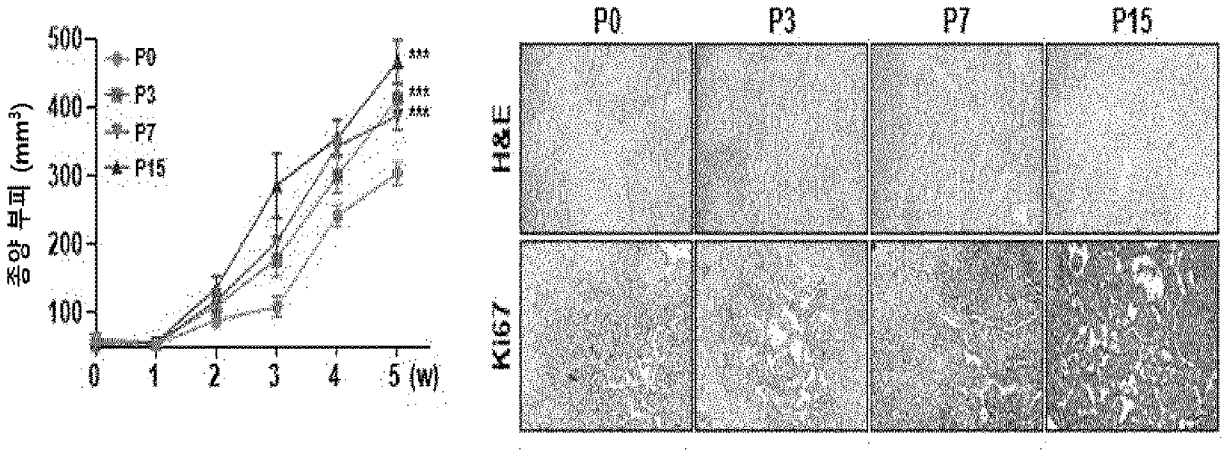
[도6c]


UROMOL (NMIBC, n=460)
무진행 생존
상관도
0 0.7 0.8 0.9 1.0
Low (305)
High (155)
P < 0.001
0 20 40 60
시간 (달)

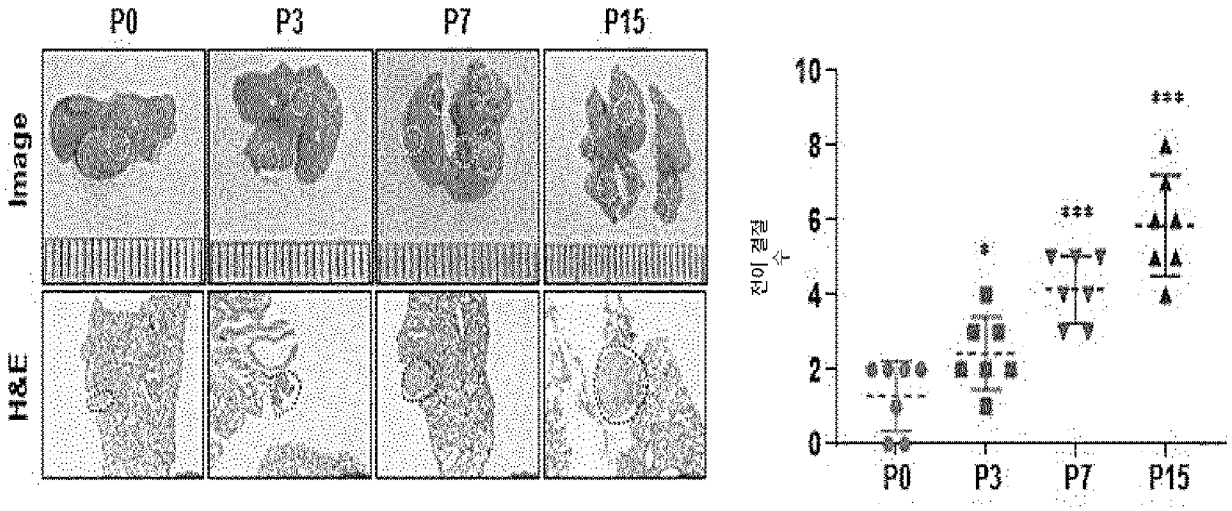
[도7a]


BALB/c nude 6w, male
Subcutaneous injection cells
Sacrifice, Analysis
sc. Inj.
0W 1W 2W 3W 4W 5W
Tail vein injection cells
Sacrifice, Analysis
iv. Inj.
0W 1W 2W 4W 5W 6W
P0
P3
P7
P15
체중 (g)
0 1 2 3 4 5(w)

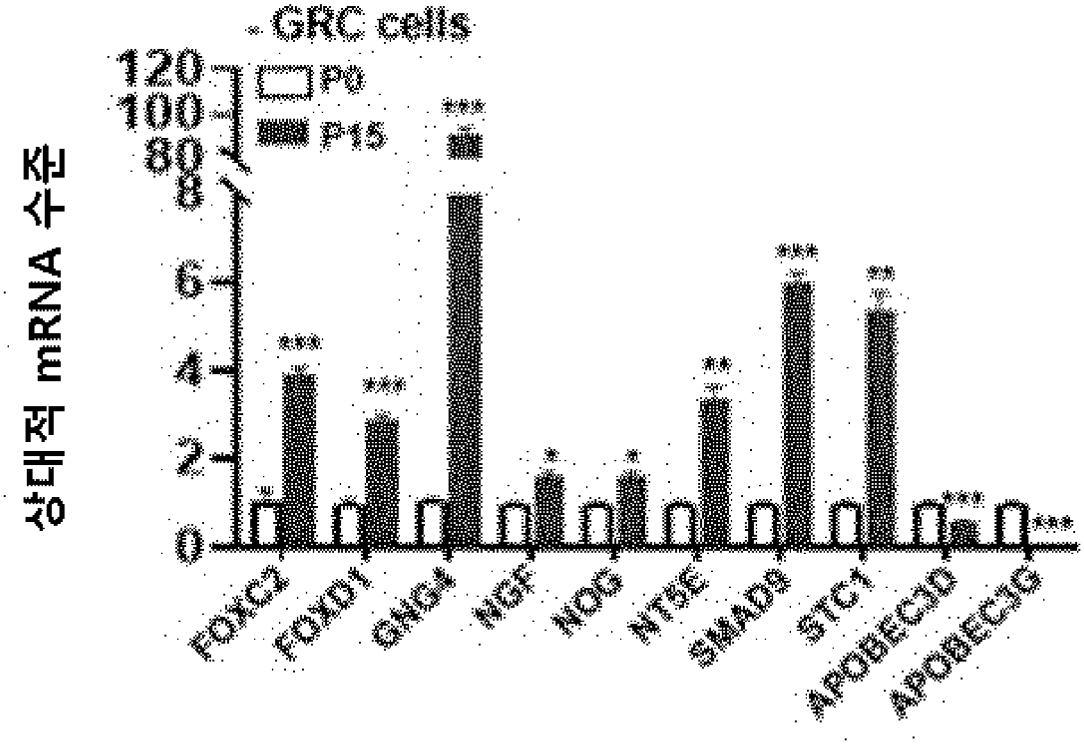
[도7b]


종양 부피 (mm³)
P0
P3
P7
P15
0 1 2 3 4 5 (w)
H&E
Ki67

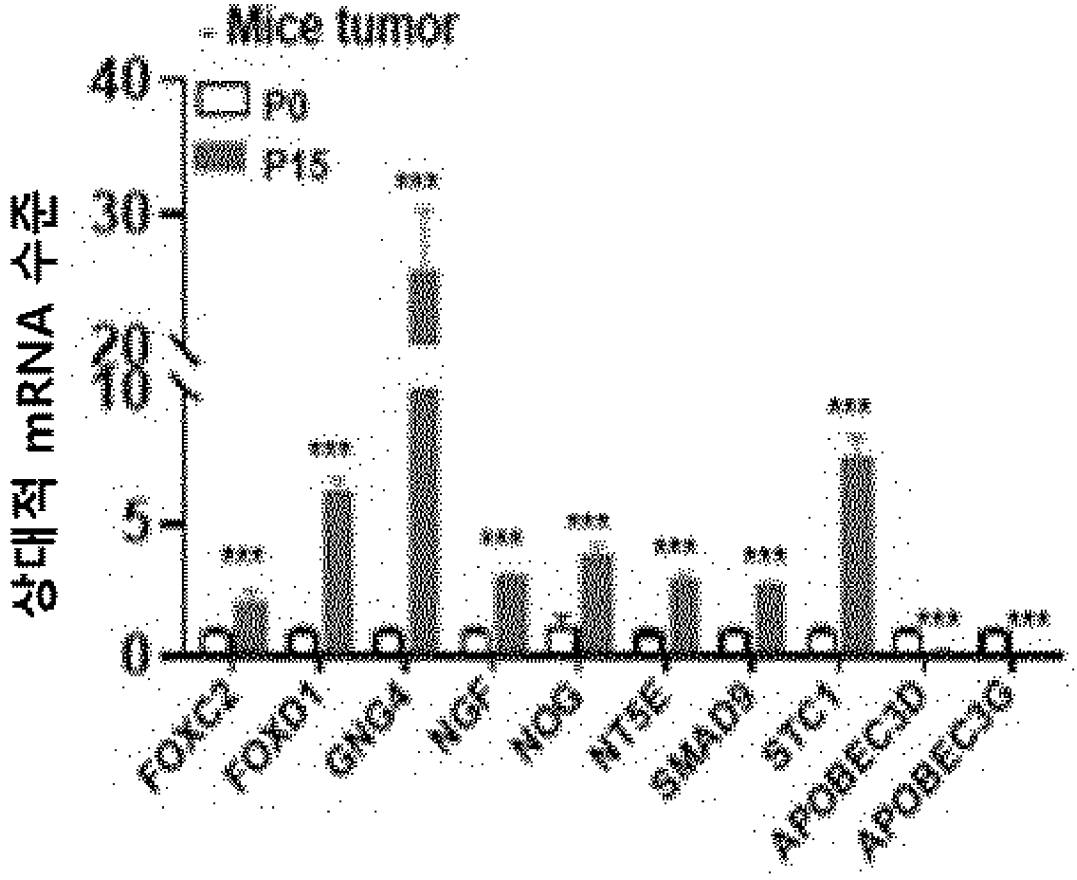
[도7c]


Image
H&E
전이 결절 수
P0 P3 P7 P15

[도7d]


GRC cells
P0
P15
상대적 mRNA 수준
120
100
80
8
6
4
2
0
FOXC2
FOXD1
GNG4
NGF
NOG
NT5E
SMAD9
STC1
APOBEC3D
APOBEC3G

[도7e]


Mice tumor
P0
P15
상대적 mRNA 수준
40
30
20
10
5
0
FOXC2
FOXD1
GNG4
NGF
NOG
NT5E
SMAD9
STC1
APOBEC3D
APOBEC3G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/014217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6886(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6886(2018.01); A23L 33/105(2016.01); C12Q 1/02(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/574(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 암(cancer), 항암제(anticancer drug), 내성(resistance), 바이오마커(biomarker)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2021-0047196 A (DONGGUK UNIVERSITY GYEONGJU CAMPUS INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 29 April 2021 (2021-04-29) See claims 1 and 4-5; paragraphs [0014], [0016], [0020], [0048], [0062] and [0070]; and examples 3-5.	1-13,24-26
X	KR 10-2016-0141218 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 08 December 2016 (2016-12-08) See claims 1-11; and paragraphs [0022]-[0023] and [0052].	1,6-7,10-13
X	EP 2682475 A1 (BEIJING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 08 January 2014 (2014-01-08) See claims 1 and 36-42; and paragraphs [0032]-[0033] and [0081].	1,6-7,10-13
A	KR 10-2021-0047429 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) 30 April 2021 (2021-04-30) See entire document.	1-13,24-26

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 January 2024	**11 January 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/014217

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2022-0061425 A (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) 13 May 2022 (2022-05-13) See entire document.	1-13,24-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/014217

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/014217

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **14-23,27-28**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 14-23 and 27-28 include a method invention, which includes a step for direct treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/014217

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2021-0047196 A	29 April 2021	KR 10-2250925 B1	17 May 2021
KR 10-2016-0141218 A	08 December 2016	KR 10-1816345 B1	09 January 2018
EP 2682475 A1	08 January 2014	BR 112013021350 A2	08 November 2016
		CN 102251013 A	23 November 2011
		CN 103562403 A	05 February 2014
		CN 103562403 B	16 November 2018
		EP 2682475 B1	13 November 2019
		JP 2014-507150 A	27 March 2014
		JP 6084170 B2	22 February 2017
		KR 10-1797090 B1	13 November 2017
		KR 10-1885705 B1	06 August 2018
		KR 10-2014-0020922 A	19 February 2014
		KR 10-2017-0126033 A	15 November 2017
		US 10174123 B2	08 January 2019
		US 2014-0044729 A1	13 February 2014
		US 2020-0040097 A1	06 February 2020
		WO 2012-113266 A1	30 August 2012
KR 10-2021-0047429 A	30 April 2021	None	
KR 10-2022-0061425 A	13 May 2022	KR 10-2524548 B1	20 April 2023

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/014217

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6886(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6886(2018.01); A23L 33/105(2016.01); C12Q 1/02(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/574(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 암(cancer), 항암제(anticancer drug), 내성(resistance), 바이오마커(biomarker)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2021-0047196 A (동국대학교 경주캠퍼스 산학협력단) 2021.04.29 청구항 1, 4-5; 단락 [0014], [0016], [0020], [0048], [0062], [0070]; 실시예 3-5	1-13,24-26
X	KR 10-2016-0141218 A (아주대학교산학협력단) 2016.12.08 청구항 1-11; 단락 [0022]-[0023], [0052]	1,6-7,10-13
X	EP 2682475 A1 (BEIJING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 2014.01.08 청구항 1, 36-42; 단락 [0032]-[0033], [0081]	1,6-7,10-13
A	KR 10-2021-0047429 A (서울대학교병원) 2021.04.30 전문	1-13,24-26
A	KR 10-2022-0061425 A (사회복지법인 삼성생명공익재단) 2022.05.13 전문	1-13,24-26

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년01월11일(11.01.2024)	**2024년01월11일(11.01.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/014217

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/014217

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **14-23,27-28**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 14-23, 27-28은 인체에 대한 직접적인 처치 단계를 포함하는 방법 발명을 포함하고 있으므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/014217

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2021-0047196 A	2021/04/29	KR 10-2250925 B1	2021/05/17
KR 10-2016-0141218 A	2016/12/08	KR 10-1816345 B1	2018/01/09
EP 2682475 A1	2014/01/08	BR 112013021350 A2	2016/11/08
		CN 102251013 A	2011/11/23
		CN 103562403 A	2014/02/05
		CN 103562403 B	2018/11/16
		EP 2682475 B1	2019/11/13
		JP 2014-507150 A	2014/03/27
		JP 6084170 B2	2017/02/22
		KR 10-1797090 B1	2017/11/13
		KR 10-1885705 B1	2018/08/06
		KR 10-2014-0020922 A	2014/02/19
		KR 10-2017-0126033 A	2017/11/15
		US 10174123 B2	2019/01/08
		US 2014-0044729 A1	2014/02/13
		US 2020-0040097 A1	2020/02/06
		WO 2012-113266 A1	2012/08/30
KR 10-2021-0047429 A	2021/04/30	없음	
KR 10-2022-0061425 A	2022/05/13	KR 10-2524548 B1	2023/04/20