



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0058465

(43) 공개일자 2015년05월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12Q 1/6886 (2013.01)  
G01N 33/57438 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7010267
- (22) 출원일자(국제) 2013년09월23일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년04월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/SG2013/000414
- (87) 국제공개번호 WO 2014/046623  
국제공개일자 2014년03월27일
- (30) 우선권주장  
61/704,425 2012년09월21일 미국(US)

- (71) 출원인  
싱가포르 헬스 서비스즈 퍼티이. 엘티디.  
싱가포르 싱가포르 168753 바우이어 블록 씨  
#03-03 서어드 하스피톨 에비뉴 31
- (72) 발명자  
후이, 캄 만  
싱가포르 싱가포르 168753 바우이어 블록 씨  
#03-03 서어드 하스피톨 에비뉴 31, 싱가포르 헬스 서비스즈 퍼티이 엘티디
- (74) 대리인  
윤동열

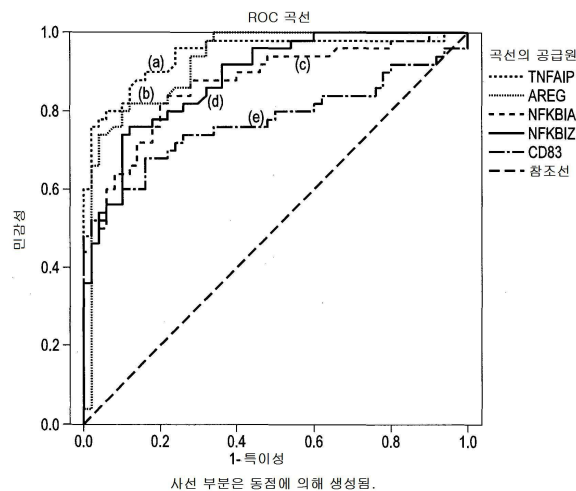
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **피험체에서 간암을 진단하는 방법 및 간암을 진단하기 위한 키트**

(57) 요약

피험체에서 간암을 진단하는 방법뿐만 아니라, 간암으로 진행할 간경변증 및 만성 간염을 가지는 피험체의 위험을 평가하는 방법이 개시된다. 또한, 간암을 진단하기 위한 키트가 개시된다.

대표도 - 도3b



(52) CPC특허분류  
C12Q 2600/158 (2013.01)  
G01N 2800/50 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

피험체로부터 얻은 샘플 중에서 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3; TNFAIP3) 유전자, 암피레굴린(amphiregulin; AREG) 유전자 및 GTPase IMAF 패밀리 구성원 5(GTPase IMAF family member 5; GIMAF5) 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 유전자의 유전자 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 피험체에서 간암을 진단하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, TNFAIP3 유전자, AREG 유전자 및 GIMAF5 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 마커 유전자의 적어도 2개의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, TNFAIP3 유전자, AREG 유전자 및 GIMAF5 유전자 3개 모두의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 간암은 간세포 암종(hepatocellular carcinoma; HCC)인, 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체는 인간인, 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 인간은 HCC의 징후를 나타내지 않는, 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결정된 발현 수준은 대조군 샘플과 비교되는, 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 대조군 샘플에 대하여 피험체의 샘플 중 발현 수준의 증가는 HCC로 진행할 위험을 나타내는, 방법.

#### 청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, HCC를 겪고 있는 피험체를 만성 B형 간염을 겪고 있는 피험체와 구별하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 HCC는 바르셀로나 임상 간암(Barcelona Clinic Liver Cancer; BCLC) 단계 A HCC인, 방법.

#### 청구항 11

제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간은 간경변증을 가지는, 방법.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 혈액 세포 또는 간 조직을 포함하는, 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 혈액 세포는 백혈구인, 방법.

#### 청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 발현 수준을 결정하는 단계는 핵산 증폭 분석을 사용하여 수행되는, 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 증폭 분석은 정량적 PCR 분석 또는 실시간 PCR 분석인, 방법.

#### 청구항 16

피험체로부터 얻은 샘플 중에서 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3) 유전자, 앰피레굴린(AREG) 유전자 및 GTPase IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5) 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 유전자의 유전자 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 간암으로 진행할 간경변증을 가지는 피험체의 위험을 평가하는 방법.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 상기 간암은 간세포 암종(HCC)인, 방법.

#### 청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 피험체는 인간인, 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 인간은 HCC의 징후를 나타내지 않는, 방법.

#### 청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군 샘플에 대하여 피험체의 샘플 중 발현 수준의 증가는 HCC로 진행할 위험을 나타내는, 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 발현 수준의 증가의 경우에 HCC로의 진행에 대하여 피험체를 모니터링하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 22

피험체로부터 얻은 샘플 중에서 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3, SwissProt 기탁 번호: P21580), 앰피레굴린(AREG, SwissProt 기탁 번호 P15514) 및 GTPase IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5, SwissProt 기탁 번호 Q96F15)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 단백질의 존재 또는 양을 결정하는 단계를 포함하는, 피험체에서 간암을 진단하는 방법.

#### 청구항 23

종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3) 유전자, 앰피레굴린(AREG) 유전자 및 GTPase, IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5) 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 유전자의 발현 수준을 결정함으로써 간암을 진단하기 위한 키트로서, 상기 키트는 마커 유전자 핵산 분자의 적어도 1개와 상보적인 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 키트.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 중 2가지 종류를 포함하며, 여기서 올리고뉴클레오타이드의 각

각의 종류는 마커 유전자 핵산 분자 중 적어도 2개 중 하나와 상보적인, 키트.

#### 청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 중 3가지 종류를 포함하며, 여기서 올리고뉴클레오타이드의 각각의 종류는 3개 마커 유전자 핵산 분자 중 하나와 상보적인, 키트.

#### 청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드 프로브인, 키트.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 증폭 프라이머인, 키트.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 상기 증폭 프라이머는 증폭 단계에서 마커 핵산 분자를 증폭시키는데 적당한, 키트.

#### 청구항 29

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 길이가 최대 약 30개, 약 60개, 또는 약 100개의 뉴클레오타이드인, 키트.

#### 청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 표지화된, 키트.

#### 청구항 31

제30항에 있어서, 상기 표지는 방사성 표지, 형광 표지, 화학 발광 표지, 친화성 표지, 또는 효소 표지인, 키트.

### 발명의 설명

### 기술 분야

관련 출원에 대한 상호 참조

본 발명은 2012년 9월 21일에 출원한 발명의 명칭이 '피험체에서 간암을 진단하는 방법 및 간암을 진단하기 위한 키트(METHODS OF DIAGNOSING LIVER CANCER IN A SUBJECT AND A KIT FOR DIAGNOSING LIVER CANCER)'인 미국 가 특허출원 제61/704,425호의 우선권의 이익을 주장하며, 이의 전체 개시 내용은 모든 목적을 위하여 전체가 참조로 본원에 포함되어 있다.

본 발명의 분야

본 발명은 피험체에서 간암을 진단하는 방법뿐만 아니라, 간암으로 진행할 간경변증을 가지는 피험체의 위험을 평가하는 방법을 청구한다. 본 발명은 또한 간암을 진단하기 위한 키트에 관한 것이다.

### 배경 기술

간세포 암종(hepatocellular carcinoma; HCC)은 전세계적으로 가장 일반적인 암 중 하나로서, 암 사망의 3번째로 가장 빈번한 원인이며, 연간 발병률이 전세계적으로 50만건을 초과한다(Kamangar et al (2006). J Clin Oncol, 24, 2137-50; Boyle P. (2008). Annals of Oncology, 19:605-606). 늦은 진단의 결과로서 HCC 환자는 아직 결과가 좋지 않다. 현재, 혈청  $\alpha$ -태아단백질(serum  $\alpha$ -fetoprotein; AFP) 수준 및 초음파 검사는 HCC 스크리닝 및 진단에 일반적으로 사용된다. 그러나, 이러한 접근법의 임상학적 유용성은 여러 가지 이유로 제한된다. 첫째, AFP는 모든 HCC 환자에서 증가되지 않고, 아마도 만성 간질환에 의해서 상승될 수도 있어, 민감성 및 특이성이 만족스럽지 않게 된다. 컷오프 값이 20ng/ml일 때, 상이한 연구에서 기록된 민감성은 41% 내지 64%의

범위이고, 특이성은 80% 내지 91%이었다(Daniele et al, (2004) Gastroenterology. 2004 Nov;127 (5 Suppl 1):S108-12). 2005년에 발행된 미국 간학회(American Association for the Study of Liver Diseases; AASLD) 치료 지침에 따르면, 200ng/ml가 진단학적 절사점인 것으로 권고되며, 이때 민감성은 22%이고, 특이성은 99% 초과이다(Trevisani et al, J Hepatol. (2001) Apr; 34(4):570-5, Lok et al., Gastroenterology (2010) Feb;138(2):493-502). 2010년에, 최근 연구로부터의 결과에 기초한, HCC 관리를 위한 2010 AASLD 가이드라인은 감시에 있어서 초음파만을 권고하며, 감시와 진단 둘 다에 있어서 더 이상 AFP를 포함하지 않는다(Bruix & Sherman, Hepatology (2011) Mar;53(3): 1020-22). 다른 한편으로, 초음파는 그 자체의 제한점을 가진다. 이상이 많이 있는 간경변증에서 암을 검출하는 것은 어렵다. 추가적으로, 초음파의 성능은 조작자의 경험과 장비의 정교함에 크게 좌우되며, 초음파는 저개발 지역에 사는 사람이 이용할 수 없다. 이러한 이유로, HCC 스크리닝 및 진단을 위한 더 신뢰할 만한 마커를 찾기 위하여 많은 노력이 있어 왔다.

[0006]

HCC에 대한 이상적인 마커는 특이적이면서 민감하여야 하고, 용이한 접근성을 가지는 시편에서 유래한다. 고밀도의 마이크로어레이 및 프로테오믹스의 개발과 함께, 최근 몇 년 동안 다수의 새로운 마커가 확인되었다. 초기의 한 가지 탐색적 접근법은 HCC 암 조직, 예를 들어 글리피칸 3(GPC3) 및 골지 단백질 73(GP73)에서 지표를 찾고(Liu et al., World J Gastroenterol. (2010) Sep 21; 16(35):4410-5, Capurro et al, Gastroenterology. (2003) Jul;125(1):89-97) ELISA 또는 웨스턴 블롯에 의해 말초 혈액에서 이의 존재를 검증하는 것이다. 일부 연구는 질량분석법을 사용하여 혈장 중 단백질의 프로필을 나타내며, 이에 의하여 단백질 마커, 예를 들어 오스테오펙틴(osteopontin; OPN)을 확인한다(Shang et al, Hepatology. (2012) Feb;55(2):483-90). 다른 연구는 마이크로어레이를 이용하여 혈장 또는 혈청 유래의 핵산의 프로필을 나타내며, 이에 의하여 유전자 마커 또는 마이크로RNA 마커를 확인한다(Zhou et al, J Clin Oncol. 2011 Dec 20;29(36):4781-8.). HCC에 대한 신규 마커 중에서, 가장 광범위하게 연구된 마커는 데스-감마-카르복시프로트롬빈(DCP) 및 AFP의 글리코형태(AFP-L3)이다. DCP의 민감성은 상대적으로 양호한 것으로 보고되었지만(74%), 특이성은 만족스럽지 않다(70%~86%)(Marerro et al, Gastroenterology. (2009) Jul;137(1):110-8, 상기 Lok et al). AFP도 DCP도 초기 HCC의 검출에 있어서 초음파를 보완하는데 최적이지 않은 것으로 결론이 내려졌다(상기 Lok et al).

[0007]

따라서, HCC의 조기 검출에 적합한 새로운 마커를 찾을 필요성이 있다.

## 발명의 내용

### 과제의 해결 수단

[0008]

본 발명은 피험체에서 간암을 진단하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 피험체로부터 얻은 샘플 중에서 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3; TNFAIP3) 유전자, 앰피레굴린(amphiregulin; AREG) 유전자 및 GTPase, IMAP 패밀리 구성원 5(GTPase, IMAP family member 5; GIMAP5) 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 유전자의 유전자 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

[0009]

본 발명은 또한 간암으로 진행할 간경변증을 가지는 피험체의 위험을 평가하는 방법을 제공한다. 본 방법은 피험체로부터 얻은 샘플 중에서 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3) 유전자, 앰피레굴린(AREG) 유전자 및 GTPase, IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5) 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 유전자의 유전자 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

[0010]

본 발명은 피험체에서 간암을 진단하는 방법을 추가로 제공한다. 본 방법은 피험체로부터 얻은 샘플 중에서 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3, SwissProt 수탁 번호: P21580), 앰피레굴린(AREG, SwissProt 수탁 번호 P15514) 및 GTPase, IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5, SwissProt 수탁 번호 Q96F15)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 단백질의 존재 또는 양을 결정하는 단계를 포함한다.

[0011]

본 발명은 또한 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3) 유전자, 앰피레굴린(AREG) 유전자 및 GTPase, IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5) 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 유전자의 발현 수준을 결정함으로써 간암을 진단하기 위한 키트를 제공한다. 상기 키트는 마커 유전자 핵산 분자의 적어도 1개와 상보적인 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

## 도면의 간단한 설명

[0012]

본 발명은 비제한적인 실시예 및 첨부된 도면과 함께 고려될 때 상세한 설명에 관하여 더 잘 이해될 것이며, 여기서

**도 1**은 본 발명에서 사용되는 연구 설계를 나타낸다. 중산대학 암 센터, 광저우 제8 인민 병원(중국 소재)에서 모집한 개인 28명으로 이루어진 그룹을 초기 발견된 세트에 활용하였다. 이들 환자 28명은 HCC로 진단받은 환자 10명, 만성 간염으로 진단받은 환자 12명, 건강한 환자 6명으로 구성되었다. 고밀도 유전자 마이크로어레이를 HCC 환자 및 만성 간염 환자, 및 건강한 개인으로부터 분리한 백혈구(white blood cell; WBC)에서의 유전자 발현의 프로파일을 나타내는 데 사용하였다. 초기 유전자 스크리닝 후, 또한 중산대학 암 센터, 광저우 제8 인민 병원에서 모집한 HCC로 진단받은 환자 50명, 만성 간염으로 진단받은 환자 50명으로 이루어진 그룹을 훈련 세트에 정하고 3-유전자 로지스틱 모델을 개발하는 데 활용하였다. 이러한 모델은 싱가포르 종합 병원 및 싱가포르 국립 암 센터, 및 중산대학 암 센터에서 모집한 HBV 및 HCC 둘 다 진단받은 환자 60명 및 만성 간염으로 진단받은 환자(CHB 환자) 90명의 독립적인 코호트로 검증하였다. 256명의 개인 전부(HCC 또는 CHB를 겪고 있는 환자 250명, 건강한 개인 6명)가 본 연구에 포함되었다. 건강한 대조군을 제외하고, 모든 환자는 B형 간염 바이러스의 표면 항원에 양성이었다(HBsAg 양성).

**도 2**는 표 1에서 중산대학 암 센터(광저우)에서 모집한 환자의 임상학적 특징을 나타내는 **도 2a**, 및 표 2b에서 싱가포르 종합 병원 및 싱가포르 국립 암 센터에서 모집한 환자의 임상학적 특징을 나타내는 **도 2a**와 함께 연구 참가자의 임상학적 특징을 나타낸다. 광저우 출신 환자 75명은 HCC로 진단받았고, 128명은 만성 간염 환자였지만, 싱가포르 출신 환자 35명은 HCC로 진단받고, 12명은 만성 간염 환자이었다.

**도 3**은 표 3에서(**도 3a**) 본 발명의 훈련 그룹에서 확인된 9개의 중요한 유전자의 차별화된 발현 및 진단학적 성능을 나타낸다. 훈련 그룹(훈련 세트)은 HCC로 진단받은 환자 50명, 및 만성 간염으로 진단받은 환자 50명을 포함하였다. **도 3b**는 마커 TNFAIP3(곡선 (a)), 애포레굴린(AREG) 유전자(곡선 (b)), NFKB1A(곡선 (c)), NFKB1Z(곡선 (d)) 및 CD83(곡선 (e))에 대한 곡선 하 면적(Area Under Curve)(ROC)을 나타낸다. **도 3c**는 마커 GTPase, IMAP 패밀리 구성원 6(GTPase IMAP family member 6; GIMAP6)(곡선 (a)), GTPase IMAP 패밀리 구성원 4(GTPase IMAP family member 4; GIMAP4)(곡선 (b)), GTPase IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5) 유전자(곡선 (d)) 및 GTPase IMAP 패밀리 구성원 8(GTPase IMAP family member 8; GIMAP8)(곡선 (e))에 대한 ROC를 나타낸다. 도 3a 및 도 3b에서 곡선 하 면적(AUC)은 95%의 신뢰구간으로 나타내어져 있다.

**도 4**는 훈련 그룹(**도 4a**) 및 테스트 그룹(**도 4b**)에서 상이한 마커 모델의 ROC(receiver operating characteristic; 수신자 조작 특성) 곡선 분석 결과를 나타낸다. 더 상세하게, 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3) 유전자 단독(곡선 (a)) 또는 애포레굴린(AREG) 유전자 및 GTPase IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5) 유전자와 함께 TNFAIP3의 조합(곡선 (b)) 중 어느 하나에 대한 ROC 곡선 분석 결과가 나타내어져 있다. 도 4의 곡선 하 면적(AUC)은 95%의 신뢰 구간으로 나타내어져 있다. 상기 모델은 단계식 로지스틱 회귀 분석(전진 방법)에 의해 개발하였다. HCC일 확률은 오즈비(odds ratio)로부터 계산하였으며 0 내지 1 범위의 점수로 주어졌다.

**도 5**는 TNFAIP3 유전자 단독 또는 55% 내지 92%의 상이한 절사점에서 AREG 유전자 및 GIMAP5 유전자와 함께 TNFAIP3 유전자의 조합에 대한 훈련 그룹 및 테스트 그룹의 ROC 분석 결과로부터의 민감성(True Positive Rate (진양성률); TPR) 및 특이성(1-False Positive Rate(1-위양성율); FPR)을 나타낸다.

**도 6**은 HCC 환자 104명 및 CHB 환자 108명에서 TNFAIP3 유전자 단독(곡선 (a)) 또는 TNFAIP3 유전자, AREG 유전자 및 GIMAP5 유전자의 조합(곡선 (b)) 및 혈청 AFP(곡선 (c))의 ROC 곡선 분석 결과를 나타낸다.

**도 7**은 바르셀로나 임상 간암(Barcelona Clinic Liver Cancer; BCLC) 단계 A HCC 환자로 진단받은 환자 14명 및 CHB 환자 140명에서 TNFAIP3 유전자 단독(곡선 (a)) 또는 TNFAIP3 유전자, AREG 유전자 및 GIMAP5 유전자의 조합(곡선 (b))을 혈청 AFP(곡선 (c))와 비교한 ROC 곡선 분석 결과를 나타낸다.

**도 8**은 3쌍의 쌍별 비교를 위한 벤 다이어그램을 나타낸다. 후보 유전자 마커는 CHB 및 건강한 피험체(음영 영역)와 비교하여 HCC에서 차별적으로 발현된 유전자로부터 선택하였다.

**도 9**는 유전자 마이크로어레이 분석 결과로부터 확인된 바와 같이 HCC 및 CHB에서 상당히 발현된 9개 유전자의 차별 유전자 발현을 나타낸다. 이들 유전자는 TNFAIP3, AREG, GIMAP5, B-세포 억제제 알파 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인핸서의 핵인자(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha; NFKB1A), B-세포 억제제 제타 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인핸서의 핵인자(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor zeta; NFKB1Z), CD83, GTPase IMAP 패밀리 구성원 4(GIMAP4), GTPase IMAP 패밀리 구성원 6(GIMAP6) 및 GTPase IMAP 패밀리 구성원



8(GIMAP8)이다.

**도 10**은 q-PCR에 의해 검증된 훈련 세트에서 9개의 WBC 유전자 마커(TNFAIP3, AREG, GIMAP6, NFKBIA, NFKBIZ, CD83, GIMAP4, GIMAP5 및 GIMAP8)의 차별 발현을 나타낸다(HCC 환자 수 n=50; CHB 환자 수 n=50; 건강한 환자 수 n=6). 유전자 발현 수준은 CD45(참조 유전자)의 유전자 발현 수준에 대하여 정규화하고 CD45 발현 수준의 백분율로서 제시하였다. 박스는 25번째 및 75번째 백분위수를 말하며, 이 때 선은 중앙값을 나타낸다. 위스키는 최소 및 최대 값을 나타낸다. 만-위트니 검증(Mann-Whitney test)을 실행하여 유의성을 결정하였다.

**도 11**은 정량적 PCR에 의해 확인된 9개의 유전자 마커(TNFAIP3, AREG, GIMAP6, NFKBIA, NFKBIZ, CD83, GIMAP4, GIMAP5 및 GIMAP8)의 검증에 사용된 프라이머를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

본 발명은, 환자가 HCC의 임의의 증상을 나타내지 않는 시점에서, 간암, 예를 들어 간세포 암종(HCC)의 조기 진단에 민감하면서 또한 특이적인 방법을 제공한다. 따라서, 본 출원은 또한 간암, 예를 들어 HCC의 질환 발생 또는 재발의 상이한 위험을 가지는 환자를 더 정확하게 평가하고 계층화할 수 있는 방법을 제공한다. 추가적으로, 본 발명은 간암, 예를 들어 HCC로 진행할 간경변증을 가지는 피험체의 위험을 평가하는 방법을 제공하며, 이렇게 하여 혈청  $\alpha$ -태아단백질(AFP) 수준의 결정 또는 초음파와 같은 현재 사용되는 방법과 비교하여 상당한 임상적 이점을 제공한다. 따라서 본 발명의 방법은 HCC의 임상 관리, 예를 들어 HCC의 진행으로 발전할 소인을 가지거나 그렇게 될 위험이 있는 환자의 모니터링 및 위험 관리에 매우 유익하다.

[0014]

본 발명은 면역계가 종양 발생의 상이한 단계에서 중요한 역할을 한다는 결과와 종양의 출현이 백혈구(leukocyte/white blood cell(WBC))에서 검출가능한 유전자 발현 패턴 변화를 초래할 수 있다는 결과를 기반으로 한다. 면역 반응 관련 유전자 특징은 전이를 예측하기 위하여 HCC 환자에서 비종양 간 조직에서 확인된 바 있다(Budhu et al, Cancer Cell (2006) Aug; 10(2):99-111). 본 발명에서, 본 발명자들은, B형 간염에 감염되고 HCC를 가지는 환자(HBV + HCC 환자), 만성 B형 간염을 가지는 환자(CHB 환자) 및 건강한 개인으로부터 분리한 WBC에서의 유전자 발현의 프로필을 나타내는 데 고밀도 유전자 마이크로어레이를 사용하였다.

[0015]

제1 양태에서, 본 발명은 피험체에서 간암을 진단하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 피험체로부터 얻은 샘플 중에서 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3) 유전자, 앰피레굴린(AREG) 유전자 및 GTPase, IMAP 패밀리를 구성원 5(GIMAP5) 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 유전자의 유전자 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

[0016]

종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3 유전자, 앰피레굴린 유전자 및 GTPase, IMAP 패밀리를 구성원 5에 대한 약어 TNFAIP3, AREG 및 GIMAP5는 영국 유전자명명 위원회(HUGO Gene Nomenclature Committee; HGNC) 데이터베이스로부터 승인된 부호이며, 따라서 본원에서는 당업계에서 허용되고 이해되는 바와 같은 의미 내에서 사용된다.

[0017]

본 발명에서 사용되는 바와 같은 TNFAIP3 유전자에 대한 HGNC 데이터베이스 식별자는 11896이고, 엔트레즈 유전자(Entrez Gene) 데이터베이스 식별자는 7128이다. 본원에서 언급된 바와 같은 TNFAIP3 유전자는 종양괴사인자(TNF)에 의해 발현이 급속하게 유도되는 유전자로서 확인되었다. 이 유전자에 의해 암호화되는 단백질은 길이가 790개의 아미노산인 징크 핑거 단백질(UniProtKB 수탁 번호: TNAP3\_HUMAN, Swiss-Prot 수탁 번호: P21580, 서열번호 19)이며, NF- $\kappa$ B와 B 활성화뿐만 아니라 TNF-매개 아포토시스를 억제하는 것으로 나타났다. 마우스에서 유사한 유전자의 녹아웃 연구는 이러한 유전자가 TNF-유도 NF- $\kappa$ B 반응을 종결시킴으로써 염증을 제한하는 데 중요하다는 것을 시사하였다.

[0018]

본 발명에서 사용된 바와 같은 AREG 유전자에 대한 HGNC 데이터베이스 식별자는 651이고, 엔트레즈 유전자 데이터베이스 식별자는 7128이다. AREG 유전자에 의해 암호화되는 단백질은 또한 표피성장인자 패밀리의 구성원으로서 알려져 있다. 길이가 252개의 아미노산인 상기 단백질(UniProtKB: AREG\_HUMAN, Swiss Prot 수탁 번호 P15514, 서열번호 20)은 자가분비성장인자뿐만 아니라 정상교세포, 시반세포, 및 섬유아세포에 대한 미토겐이다. 표피성장인자(epidermal growth factor; EGF) 및 변형성장인자알파(transforming growth factor alpha; TGF- $\alpha$ )와 관련되어 있다. 이 단백질은 EGF/TGF- $\alpha$ 와 수용체와 상호작용하여 정상적인 상피세포의 성장을 촉진시키고, 특정한 공격적인 암종 세포주의 성장을 억제한다. 이러한 암호화된 단백질은 건선 유사 피부 표현형과 연관되어 있다.

[0019]

본 발명에서 사용된 바와 같이 GIMAP5 유전자에 대한 HGNC 데이터베이스 식별자는 18005이고, 엔트레즈 유전자 데이터베이스 식별자는 55340이다. GIMAP5 유전자는, GTP-결합 슈퍼패밀리 및 뉴클레오티드-결합 단백질의 면역



-연관 뉴클레오티드(immuno-associated nucleotide; IAN) 서브패밀리에 속하는 길이가 408개의 아미노산인 단백질(UniProtKB: Q96F15, Swiss Prot 수탁 번호: Q96F15, 서열번호 21)을 암호화한다. 인간에서, IAN 서브패밀리 유전자는 7q36.1에서 클러스터에 위치한다. 이 유전자에 있어서 하나는 단백질을 암호화하는 것(Q96F15-1)이고 다른 하나는 아마도 단백질을 암호화하는 것이 아닌(Q96F15-2) 2가지의 전사물 변이체가 발견되었다. 전사물(유전자 변이체) 둘 다의 사용은 본 발명의 범주에 속한다.

[0020]

이러한 간암을 진단하는 방법의 일 구현에는 TNFAIP3 유전자, AREG 유전자 및 GIMAP5 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 마커 유전자 중 적어도 2개의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하며, 이는 a) TNFAIP3 유전자 및 AREG 유전자, 또는 b) TNFAIP3 유전자 및 GIMAP5 유전자, 또는 c) AREG 유전자 및 GIMAP5 유전자를 함께 발현하는 수준을 의미한다. 추가 구현예에서, 상기 방법은 TNFAIP3 유전자, AREG 유전자 및 GIMAP5 유전자 3개 모두의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

[0021]

이들 3개 마커 유전자 중 임의의 것에 더하여, 간암을 검출하는 방법은 다음 6개 마커, 즉 B-세포 억제제 알파 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인헨서의 핵인자(NFKBIA), B-세포 억제제 제타 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인헨서의 핵인자(NFKBIZ), CD83, GTPase IMAP 패밀리 구성원 4(GIMAP4), GTPase IMAP 패밀리 구성원 6(GIMAP6) 및 GTPase IMAP 패밀리 구성원 8(GIMAP8) 중 하나 이상을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 이들 구현예에서, TNFAIP3 유전자, AREG 유전자 및 GIMAP5 유전자 중 1개, 2개 또는 3개 모두는 NFKBIA, NFKBIZ, CD83, GIMAP4, GIMAP5 및 GIMAP8의 군에서 선택되는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 이들 6개 모두의 마커 유전자와 함께 사용될 수 있다. 이 점에 있어서, 본 발명은 또한 B-세포 억제제 알파 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인헨서의 핵인자(NFKBIA), B-세포 억제제 제타 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인헨서의 핵인자(NFKBIZ), CD83, GTPase IMAP 패밀리 구성원 4(GIMAP4), GTPase IMAP 패밀리 구성원 6(GIMAP6) 및 GTPase IMAP 패밀리 구성원 8(GIMAP8)로 이루어진 군에서 선택되는, 간암, 예를 들어 HCC를 진단하기 위한 마커 유전자 중 임의의 것의 단독 사용을 포함한다.

[0022]

이 점에 있어서, 관심 유전자의 발현 수준은 하향 조절 또는 상향 조절될 수 있음이 주목된다. 예를 들어, 본 발명에서 사용되는 5개 유전자(TNFAIP3, AREG, NFKBIA, NFKBIZ, CD83)는 대조군에서의 발현 수준보다 HCC에서 더 높은 발현 수준을 가지는 반면, 본 발명에서 사용되는 GIMAP 패밀리(GIMAP4, GIMAP5, GIMAP6 및 GIMAP8) 유래의 4개 유전자는 대조군의 발현 수준보다 HCC에서 더 낮은 발현 수준을 가지는 것이 본 발명에서 발견되었다. 본원에서 사용되는 용어 "발현 수준을 결정하는 것"은 일반적으로 피험체로부터 얻은 샘플에서 관심 유전자의 각각의 mRNA의 양을 결정하는 것을 말한다. 발현 수준은 당업자에게 잘 알려지고 이용가능한 임의의 방법론을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, mRNA는 피험체의 샘플로부터 분리될 수 있고, 상업적으로 입수가능한 키트, 예를 들어 이에 한정되는 것은 아니지만 SuperScript® III First-Strand Synthesis System(Invitrogen, 미국)을 사용하여 cDNA로 역전사될 수 있다. 그러므로, 이렇게 얻은 cDNA(또는 이의 부분)는 핵산 증폭 방법, 예를 들어 이에 한정되는 것은 아니지만 단지 몇 가지만 말하자면, 실시간 PCR, 정량적 PCR, 등은 핵산 증폭, 또는 리가제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)에 의해 분석될 수 있다.

[0023]

발현 수준을 결정하는 것은 피험체의 샘플에서 이렇게 구조적으로 발현되는 참조 유전자를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 결정은 또한 관심 유전자를 발현하는 대조군 샘플과 발현 수준을 비교하는 것을 포함할 수 있다. 발현 수준의 결정은 정성적으로(이는 유전자 산물의 존재 또는 부재만이 결정될 수 있음을 의미함), 또는 정량적으로(이는 (대조군 샘플에 비하여) 발현 산물의 전체 양이 결정될 수 있음을 의미함) 수행될 수 있다.

[0024]

본 발명의 방법은 간에서 유래하는 간암(liver cancer, hepatic cancer)의 임의의 형태를 진단하는 데 사용될 수 있다. "간암"은 간의 표면 또는 내부에서 성장하는 악성 종양을 의미한다. 간암은 예를 들어 간세포 암종(HCC) 또는 HCC 및 담관암(담도암) 성분 둘 다를 이루어진 HCC의 변형 유형일 수 있다. 간암은 또한 육종, 간모세포종, 중간엽조직의 암일 수 있다.

[0025]

본원에서 개시된 진단 방법은 임의의 피험체, 통상적으로 인간을 포함한 임의의 포유동물에 적용될 수 있다. 본 발명의 방법의 한가지 중요한 이점은, 피험체/인간이 간암, 예를 들어 HCC의 징후를 나타내지 않을 때 질환 발생의 초기 단계일지라도 민감하고 특이적이라는 것이다. 따라서, 본 발명은 환자가 여전히 무증상일 때 환자의 모니터링 및 또한 잠재적 치료를 가능하게 하므로, 본 발명은 또한 환자 관리에 있어서 중요한 이점이 된다. 따라서, 본 발명은 HCC로 진행할 고위험에 있는 환자, 예를 들어 만성 B형 간염(CHB)을 겪고 있는 환자 또는 만성 B형 간염과 간경변증을 둘 다 겪고 있는 환자를 모니터링할 수 있게 한다. 오래 전부터 초기 HCC는 수술이 유일한 치료법이므로, 따라서 본 출원은 또한 매우 초기 단계에서 HCC의 발생/진행을 인식할 수 있게 하고, 따라서 HCC 환자의 생존율 및 치료율을 증가시킬 수 있게 한다. 종양괴사인자 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3) 유전자, 엠

피레굴린(AREG) 유전자 및 GTPase IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5) 유전자 중 적어도 1개의 유전자 발현 수준을 측정하는 방법 또는 이들 3개 단백질(TNFAIP3, AREG 또는 GIMAP5) 중 적어도 1개의 존재 또는 양을 측정하는 방법(하기에 상세히 설명되어 있음)은 또한 외과 치료를 받은 환자를 모니터링하여 HCC의 재발에 대하여 확인하는데 사용될 수 있다.

[0026] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 방법에서, 피험체로부터 얻은 샘플 중에서 결정된 발현 수준은 대조군 샘플과 비교될 수 있다. 따라서 대조군 샘플에 비하여 관심 피험체/환자의 샘플 중에서 증가된 발현 수준은 간암, 예를 들어 HCC로 진행할 위험을 나타낼 수 있다.

[0027] 본 발명의 방법의 추가 이점은 HCC를 겪고 있는 환자 또는 HCC로 진행할 위험을 가진 환자를 만성 B형 간염을 겪고 있는 환자와 구별하는 것을 가능하게 하는 것이다(실험 부분, 도 6 및 도 7 참조). 현재, 이러한 구별을 하는 것은 매우 어렵다. 이 때 구별되는 HCC는 바르셀로나 임상 간암(BCLC) 단계 A HCC일 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 간경변증을 겪는 환자의 위험 평가 또는 진단을 가능하게 하며, 따라서 간경변증이 간암, 예를 들어 HCC, 또는 예를 들어 B형 간염과 연관되어 있는지 여부를 결정하는 것을 가능하게 한다. 이들 2개 환자 그룹을 구별하는 능력은 본 발명은 또 다른 중요한 이점이다.

[0028] 본원에 기술된 바와 같은 진단은 환자로부터의 임의의 적당한 신체 또는 조직 샘플, 예를 들어 고체 샘플, 예를 들어 조직 또는 체액을 이용하여 수행될 수 있다. 샘플은 유리하게 혈액 세포, 예를 들어 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell; PBMC) 또는 간 조직이거나 이를 포함할 수 있다. 혈액 세포는 통상적으로 백혈구이다.

[0029] 상기한 바와 일치하여, 본 발명은 또한 간암으로 진행하는 간경변증을 가지는 피험체의 위험을 평가하는 방법을 제공한다. 본 방법은 피험체로부터 얻은 샘플 중에서 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3) 유전자, 엠펜레굴린(AREG) 유전자 및 GTPase, IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5) 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 유전자의 유전자 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 또한 이 양태에서, 간암은 간세포 암종(HCC)일 수 있고, 피험체/환자는 테스트 시에 징후를 나타내지 않을 수 있다.

[0030] 피험체에서 간암을 진단하기 위한 마커로서 본원에서 확인된 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 결정하는 것에 대한 대안으로서, 본 발명은 또한 피험체로부터 얻은 샘플 중에서 본원에서 확인된 유전자 중 하나에 의해 암호화되는 적어도 1개의 마커 단백질의 존재 또는 양을 결정하는 단계를 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한 종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3, SwissProt 수탁 번호: P21580), 엠펜레굴린(AREG, SwissProt 수탁 번호: P15514) 및 GTPase, IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5, SwissProt 수탁 번호: Q96F15)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 단백질의 존재를 결정하는 것에 관한 것이다. 본 방법의 구현예에서, 이들 3개 중 2개의 존재 또는 양, 또는 3개 단백질 모두의 존재 또는 양이 결정된다. 본 방법은 상기에서 언급된 간암 중 임의의 것의 진단에 사용될 수 있으며, 이 때 HCC는 가장 바람직한 암이다.

[0031] 간암을 진단하는 본 방법의 다른 구현예는 다음 6개 마커 단백질, 즉 B-세포 억제제 알파 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인헨서의 핵인자(NFKBIA), B-세포 억제제 제타 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인헨서의 핵인자(NFKBIZ), CD83, GTPase IMAP 패밀리 구성원 4(GIMAP4), GTPase IMAP 패밀리 구성원 6(GIMAP6) 및 GTPase IMAP 패밀리 구성원 8(GIMAP8) 중 하나 이상의 존재 또는 양의 결정을 포함할 수 있다. 이들 구현예에서, TNFAIP3 유전자, AREG 유전자 및 GIMAP5 유전자 중 1개, 2개 또는 3개 모두는 NFKBIA, (NFKBIZ), CD83, GIMAP4, GIMAP6 및 GIMAP8의 군으로부터 선택되는 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 이들 5개 마커 유전자 모두와 함께 사용될 수 있다. 이 점에 있어서, 본 발명은 또한 B-세포 억제제 알파 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인헨서의 핵인자(NFKBIA), B-세포 억제제 제타 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인헨서의 핵인자(NFKBIZ), CD83, GTPase IMAP 패밀리 구성원 4(GIMAP4), GTPase IMAP 패밀리 구성원 6(GIMAP6) 및 GTPase IMAP 패밀리 구성원 8(GIMAP8)로 이루어진 군으로부터 선택되는 간암, 예를 들어 HCC를 진단하기 위한 마커 유전자 중 임의의 것의 단독 용도를 포함한다.

[0032] 본 발명은 또한 알파-유도 단백질 3(TNFAIP3) 유전자, 엠펜레굴린(AREG) 유전자 및 GTPase, IMAP 패밀리 구성원 5(GIMAP5) 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1개의 마커 유전자의 발현 수준을 결정함으로써 간암을 진단하기 위한 키트에 관한 것이다. 상기 키트는 마커 유전자 핵산 분자의 적어도 1개와 상보적인 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 키트는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 중 2가지 종류를 포함할 수 있으며, 여기서 올리고뉴클레오타이드의 각각의 종류는 마커 유전자 핵산 분자 중 적어도 2개 중 하나와 상보적이다. 상기 키트는 또한 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 중 3가지 종류를 포함할 수 있으며, 여기서 올리고뉴클레오타이드의 각각의 종류는 3개 마커 유전자 핵산 분자 중 하나와 상보적이다. (비교: 본원에서 확인된 9개 유전자

마커의 증폭 및 정량화에 적당한 올리고뉴클레오타이드를 나타내는 실험 부분 또는 도 11). 올리고뉴클레오타이드는 보통, 예를 들어 시험될 피험체의 샘플로부터 분리된 전체 mRNA의 전사 후 각각의 마커 유전자의 증폭에 사용될 수 있는 증폭 프라이머/프로브와 같은 올리고뉴클레오타이드 프로브이다. 따라서, 이와 같은 증폭 프라이머는 증폭 단계에서 마커 핵산 분자를 증폭시키는데 적당하다. 마커 유전자는 이와 같이 알려진 바와 같이 본 발명에서 확인되었으므로, 적당한 증폭 프라이머의 설계는 당업계에서 평균 기술을 가지는 사람의 지식 범위 내에 속한다. 상기 키트에서 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 임의의 길이를 가질 수 있으며, 예를 들어 길이가 최대 약 30개, 약 60개, 또는 약 100개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 이들 올리고뉴클레오타이드(프로브)는 또한 표지화되어, 예를 들어 관심 마커 유전자의 실시간 PCR 또는 정량화를 가능하게 할 수 있다. 표지는 예를 들어 방사성 표지, 형광 표지, 화학 발광 표지, 친화성 표지(예를 들어, 이질성 분석 형식에서 고상에 올리고뉴클레오타이드를 고정화시키기 위함) 또는 효소 표지일 수 있다. 친화성 표지는 핵산의 검출에서 일반적으로 사용되는 시약일 수 있다. 이와 같은 시약의 예는 이에 한정되는 것은 아니지만, 비오틴 또는 디곡시게닌을 포함한다. 유전자 발현(수준)은 이용가능한 임의의 적당한 방법론에 의해 결정될 수 있으며, 예를 들어 질병 바이오마커의 테스트, 검증 및 정량화에 일반적으로 사용되는 상업적으로 입수가능한 시스템, 예를 들어 Affymetrix QuantiGene Plex 2.0(Affymetrix, 미국 캘리포니아주 산타클라라 소재)을 사용하여 수행될 수 있다. 이와 같은 분석을 이용하여, 현재 멀티플렉싱에 의해 동시에 3개 내지 80개 마커 유전자의 유전자 발현을 분석하는 것이 가능하다. 간단히 말해서, 이와 같은 분석에서, 조직 또는 신체 샘플(예를 들어, PBMC)은 용해되어 RNA를 방출하고 관심 유전자에 특이적인 프로브 패널이 고정화되어 있는 자성 비드와 같은 고체 지지체와 접촉된다. 적당한 시간, 예를 들어 24시간에 걸쳐서 각각의 프로브와 관심 마커 유전자 RNA의 혼성화를 위하여 정제된 RNA 샘플은 인큐베이션된다. 표적 혼성화 후, 분지 DNA(branch DNA; bDNA) 기술을 사용하여 신호 증폭이 달성된다(예를 들어, 상세한 내용에 대해서는 QuantiGene Plex 2.0의 제품 설명서를 참조). 마지막으로, 샘플에 존재하는 표적 RNA의 양과 비례하는 신호를 생성하는 검출 화합물이 첨가되고, 각각의 판독기, 예를 들어 발광 또는 형광 판독기를 사용하여 광학 신호가 판독된다.

[0033]

본원에서 확인된 마커 단백질 중 하나 이상의 존재 또는 양이 결정되어야 한다면, 결정은 샘플 중 하나 이상의 단백질, 예를 들어 피험체로부터 얻은 조직 또는 체액 샘플을 검출하여 분석 결과를 제공하도록 구성된 임의의 분석 방법을 이용하여 수행된다. 분석은 면역분석, 예를 들어 ELISA(이를 위하여 관심 단백질, 예를 들어 TNFAIP3, 앰피레굴린(AREG) 및 GTPase IMAP 패밀리를 구성원 5(GIMAP5)에 대한 다중클론성 또는 단일클론성 항체가 사용될 수 있음)일 수 있다. 일반적으로, 면역분석은 관심 단백질(마커)을 포함하거나 포함하는 것으로 의심되는 샘플을 단백질(마커)에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항체와 접촉시키는 단계를 수반한다. 그 다음 항체와 샘플 중 폴리펩티드의 결합에 의해 형성된 복합체의 존재 또는 양을 나타내는 신호가 생성된다. 그 다음 신호는 샘플 중 바이오마커의 존재 또는 양과 관련된다. 다수의 방법 및 장치가 바이오마커의 검출 및 분석에 대한 숙련된 기술자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,143,576호; 제6,113,855호; 제6,019,944호; 제5,985,579호; 제5,947,124호; 제5,939,272호; 제5,922,615호; 제5,885,527호; 제5,851,776호; 제5,824,799호; 제5,679,526호; 제5,525,524호; 및 제5,480,792호, 및 문헌[*The Immunoassay Handbook*, David Wild, ed. Stockton Press, New York, 1994]을 참조하며, 이들 각각은 모든 표, 도면 및 청구항을 포함하여 전체가 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0034]

당업계에 알려져 있는 분석 장치 및 방법은 다양한 샌드위치, 경쟁, 또는 비경쟁 분석 형식에서 표지화된 분자를 이용하여 관심 단백질(이는 본원에서 TNFAIP3, AREG 및 GIMAP5 중 적어도 1개를 의미함)의 존재 또는 양과 관련되어 있는 신호를 생성할 수 있다. TNFAIP3, 앰피레굴린(AREG) 및 GTPase IMAP 패밀리를 구성원 5(GIMAP5)에 대한 단일클론성 및 다중클론성 항체 둘 다는 다양한 공급원으로부터 상업적으로 입수가능하다. 순전히 예시적인 예로서, Proteintech Group, Inc.(미국 일리노이주 시카고 소재)의 다중클론성 TNFAIP3 토끼 항체 카탈로그 번호: 23456-1-AP, Pierce(Thermo Fisher Scientific, 미국 일리노이주 록랜드 소재)의 앰피레굴린 다중클론성 항체 카탈로그 번호 PA5-16616, Santa Cruz Biotechnology Inc.(미국 캘리포니아주 산타크루즈 소재)의 단일클론성 마우스 GIMAP5 항체(E-11), 카탈로그 번호 sc-377307을 참조한다. 대안적으로, 이와 같은 항체는 재조합 항체 조작 기법(친화적 방법), 예를 들어 파지 디스플레이를 사용하여 인공적인 항체 라이브러리로부터 또는 면역화에 의해 얻어질 수 있다.

[0035]

관심 단백질의 존재 또는 양은 또한 면역분석 이외의 수단, 예를 들어 단백질 측정(예를 들어, 점블롯, 웨스턴 블롯, 크로마토그래피 방법, 질량분석법 등)에 의해 결정될 수 있다.

[0036]

**실시예**

- [0037] **재료 및 방법**
- [0038] **환자**
- [0039] 싱가포르 국립 암 센터(National Cancer Centre Singapore; NCCS)에서 진단시 1차 HCC가 있는 환자를 모집하였다. 일부 HCC 혈액 샘플을 또한 중산대학 암 센터의 간담증성 종양학 부에서 수집하였다. 만성 간염 및 간경변(CHB)과 HCC를 가지는 환자의 혈액 샘플을 또한 싱가포르 종합 병원의 소화기내과 진료소에의 환자의 방문 동안 다양한 시점에서 채용하였다. 모든 샘플을 각각의 기관 감사 위원회에 의해 승인된 프로토콜에 따라서 수집하였고, 혈액 샘플을 수집하기 전에 모든 피험체로부터 사전 동의서를 얻었다. 모든 건강한 참가자는 간 질환의 병력, 바이러스 간염, 및 악성 질환이 없는 NCCS의 직원이었으며, 구두로 사전 동의한 후 혈액 샘플을 수집하였다. 전체 10ml의 혈액을 BD Vacutainer® Plus Plastic K2 EDTA 튜브(Becton-Dickinson) 내로 수집하였다.
- [0040] HCC에 대한 진단은 AASLD 가이드라인(상기 Bruix & Sherman, 2011)에 따라서 조직학적 평가 또는 2가지 동적 영상 검사에 의해 이루어졌다. 임의의 치료가 주어지기 전에 혈액 샘플을 수집하였다. 임의의 동반질환이 있는 환자는 배제하였다.
- [0041] 만성 B형 간염(CHB) 환자에 있어서, AASLD 치료 지침을 포함 기준으로서 사용하였으며, 이는 HBsAg 양성 6개월 초과; HBV DNA  $10^3$  복제수/ml 초과(HBeAg 음성의 경우에  $10^4$  내지  $10^5$  복제수/ml), 및 혈청 중 지속적 또는 간헐적 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제/알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT/AST) 상승을 포함한다. 임의의 동반질환이 있는 환자는 배제하였다.
- [0042] 경변증의 진단은 영상 증거를 기반으로 하였고, 등록 전 적어도 3개월 동안 간 질량의 증거가 없었다.
- [0043] **간 샘플**
- [0044] 암성 및 상응하는 원위 비암성 간 조직을 HCC에 대한 요법으로서 부분 간절제술을 받은 환자로부터 얻었다. 연구된 모든 암성 조직은 적어도 70%가 암이었다. 본 연구에서 이용된 모든 조직 샘플은 싱가포르 국립 암 센터(NCCS)의 윤리 위원회의 정책에 따라서 이의 조직 저장소가 승인하고 제공하였다. 사전 동의서는 모든 참가 환자로부터 얻었으며, 연구자에게 제공된 모든 임상 및 조직병리학적 데이터는 익명으로 제시하였다.
- [0045] **백혈구 분리**
- [0046] 수집하고 6시간 이내에, Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare)를 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의해 혈액을 처리하였다. Ficoll-Paque PLUS는 5.7g Ficoll 400 및 9g 소듐 디아트리조에이트를 매 100ml 중 0.0231g 칼슘 디소듐 에틸렌디아민테트라아세트산과 함께 포함하는 밀도  $1.077 \pm 0.001\text{g/ml}$ 의 수용액이다. 잔여 적혈구 세포를 5분 동안 1ml RBC 용해 버퍼(BioLegend) 중에 용해하고, 그 다음 10ml 인산완충식염수로 세척하였다. 분리된 PBMC는 테스트할 때까지  $-80^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. PBMC 샘플을 연구한 환자의 임상 특징은 표 1 및 2에 요약되어 있다.
- [0047] **RNA 추출 및 Affymetrix 유전자칩 분석**
- [0048] 전체 RNA를 TRIzol 시약(Invitrogen, 미국)을 사용하여 WBC로부터 추출하였고, ND-1000 Nano-drop Spectrophotometer(Thermo Scientific, 미국) 상에서 정량화하였다. RNA의 완전성을 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent, 미국)에 의해 평가하였다. 문헌[“Synthesis of Biotin-Labeled RNA for Gene Expression Measurements Using Oligonucleotide Arrays”. Ana E. Vazquez, Liping Nie, and Ebenezer N. Yamoah. Methods Mol. Biol. 2009; 493: 21]에 앞서 기술된 바와 같이 RNA 완전성 수(RNA Integrity Number; RIN)가 6.7을 초과하는 RNA 샘플만 유전자 마이크로어레이에 사용하였다. 얻은 최종 cRNA를 앞서 기술한 바([Wang SM, Ooi LL, Hui KM. Identification and validation of a novel gene signature associated with the recurrence of human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 2007; 13:6275-83]; [Liu BH, Goh CH, Ooi LL, Hui KM. Oncogene. 2008 Jul 3; 27(29):4128-36 “Identification of unique and common low abundance tumour-specific transcripts by suppression subtractive hybridization and oligonucleotide probe array analysis”])와 같이, GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array(Affymetrix, 미국)에 혼성화시켰다. cel 파일 형식으로 Affymetrix Microarray Suite version 5.0에 의해 생성된 모든 데이터는 Partek Genomics Suite 소프트웨어 패키지(Partek, 미국)를 사용하여 개선시켰다.
- [0049] **정량적 PCR 및 멀티플렉싱된 유전자 발현 분석**



[0050] 정량적 PCR(q-PCR)을 실행하여 유전자 마이크로어레이로부터 확인된 9개의 후보 유전자를 검증하였다. 확인된 유전자의 증폭에 사용된 프라이머는 도 11에 나타나어져 있으며, 또한 하기 표에도 제공되어 있다.

	정방향 5'-3'	역방향 5'-3'
NFKBIZ	TCCTGTTGCACATCCGAAGTC (서열번호 1)	TCCATCAGACAACGAATCGGG (서열번호 2)
GIMAP8	GGGTCGCTCTCCGGCCATTC (서열번호 3)	CAGGCTCCCGCTTGTCTGGG (서열번호 4)
GIMAP5	GTGCAGCTGAGTCATGGAGCTT (서열번호 5)	TTCTCTCCAGAAACGGTTGTGTGC (서열번호 6)
AREG	GTGGTGCTGTGCTCTTGATACTC (서열번호 7)	TCAAATCCATCAGCACTGTGGTC (서열번호 8)
CD83	TGCACTCTGCAGGACCCGGA (서열번호 9)	TGTAGCCGTGCAAACTTACAAGTGA (서열번호 10)
NFKBIA	CTCCGAGACTTTTCAGGAAATAC (서열번호 11)	GCCATTGTAGTTGGTAGCCTTCA (서열번호 12)
GIMAP6	GTCTTCGAGTCTAACTCAGCAC (서열번호 13)	TGGGTGTGTCAATCACCTCAA (서열번호 14)
TNFAIP3	TTGTCTCAGTTTCGGGAGAT (서열번호 15)	TTCTCGACACCAGTTGAGTTTC (서열번호 16)
GIMAP4	GCCCAATACGGCAGTATGAG (서열번호 17)	CCTGCTCCGGTTTACCCAC (서열번호 18)

[0051]

[0052] SuperScript® III First-Strand Synthesis System(Invitrogen, 미국)을 사용하여 500나노그램의 전체 RNA를 cDNA로 역전사시키고, 이후에 SsoFast EvaGreen Supermix(Bio-Rad, 미국)를 사용하여 cDNA의 1/40을 실시간 PCR에 의해 분석하였다. 비교 주기 역치값(cycle threshold; Ct) 방법을 사용하였으며, 후보 유전자의 발현 수준을 CD45의 발현 수준에 대하여 정규화하고,  $-\Delta\Delta C_t$ 를 이후 분석에서 사용하였다. 후보 유전자 및 참조 유전자에 대한 PRC 반응의 효율은 90% 초과인 것으로 테스트되었다.

[0053]

#### 통계학적 분석

[0054]

혈청 AFP는 HCC 스크리닝 및 진단에 대하여 가장 일반적으로 사용되는 혈청학적 마커이며, 이 때 전반적인 민감성은 52%이고, 특이성은 80%이다(상기 Daniele et al, Gastroenterology, 2004). HCC 환자 50명 및 CHB 환자 50명의 더 작은 그룹을 사용한 훈련 세트에서, 확인된 유전자 마커는 92% 초과 민감성 및 96% 초과 특이성을 나타내었다. 따라서, 훈련 세트/연구는 HCC를 CHB 환자와 구별하도록 AFP의 민감성과 확인된 유전자 마커의 민감성을 비교하도록 설계하였다. 환자 109명(HCC 50명 및 CHB 59명)의 샘플 크기가 5%의 편차 I형 오차가 있는 90%의 힘을 달성하는데 필요하였다(비교: 문헌[Sample Size Tables for Clinical Studies, 3rd Edition, David Machin, Michael J. Campbell, Say-eng Tan, Sze-Huey Tan, ISBN: 978-1-4051-4650-0]). 소프트웨어 "Sample Size Tables for Clinical Studies Software Program Version 1.0"을 분석에 사용하였다.

[0055]

정량화 중합효소 연쇄 반응에 의해 설정된 훈련 샘플로부터 얻은 데이터는 단계식 정방향 방법 로지스틱 회귀 분석을 사용한 모델을 구성하는 데 사용하였다. HCC인 확률은 로지스틱 회귀 분석 모델을 사용하여 계산하였으며, 0 내지 1 범위의 점수로 제공하였다. HCC 확률 점수를 수신자 조작 특성(ROC) 곡선을 생성하는 데 사용하였다. 곡선 하 면적(AUC)을 계산하였다. 상이한 절사점에서 민감성 및 특이성은 훈련 샘플 세트로부터의 ROC 곡선으로부터 선택하였다.

[0056]

프로그램 PASW® Statistics 18(SPSS Inc., 미국 일리노이주 시카고 소재)을 ROC 곡선, 로지스틱 회귀 분석, 및 통계적 분석에 사용하였다. 스튜던트의 T-검정(Student's t-test) 또는 만-윌트니 U 검증을 연속 변수의 비교에 사용하였고, 카이-제곱 검정을 범주 변수에 사용하였다. AUC, 민감성 및 특이성에 대하여 95%의 신뢰구간을 제공하였다.

[0057]

#### 환자 특징 결과

[0058]

HCC 또는 CHB가 있는 환자를 4개의 상이한 병원에서 모집하였다. 이들의 특징적인 정보는 표 1 및 표 2에 열거되어 있다.

[0059]

#### 유전자 마이크로어레이를 사용한 후보 WBC 유전자 마커의 선택

[0060]

고밀도 Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 분석을 말초 혈액 WBC로부터 잠재적인 유전자 마커를 스크리닝하는 데 사용하였다. 28개 샘플(HCC 10개, CHB 12개 및 건강한 환자 6개)로부터의 전체 RNA 추출물을

이러한 초기 스크리닝 단계에서 사용하였다(비교: 도 1). 후보 유전자 마커는 CHB 및 건강한 피험체와 비교하여 HCC에서 차별적으로 발현되는 유전자로부터 선택하였다(도 10). 후보 유전자 마커를 선택하는데 있어서 몇몇 인자들을 고려하였다: 배수 변화(상향 조절된 유전자에 대하여 1.5 초과, 하향 조절된 유전자에 대하여 -1.5 미만), p-값(0.0003 미만). 이들 기준에 따라서, 정량적 PCR(qPCR)에 의한 추가 검증을 위하여 궁극적으로 9개의 유전자를 선택하였다.

[0061] **q-PCR에 의한 후보 WBC 유전자 발현의 검증**

[0062] 17개 후보 유전자의 발현 수준을 56개의 샘플로 이루어진 그룹에서 q-PCR에 의해 평가하였으며, 상기 그룹은 마이크로어레이 스크리닝에서 사용된 26개의 샘플 및 추가적인 30개의 샘플(HCC 15개 및 CHB 15개)을 포함한다. 17개 후보 유전자 중에서, 9개 유전자는 CHB 및 건강한 피험체와 비교하여 HCC에서 상당히 상이한 발현 수준을 나타내었다(도 10). 5개의 상향 조절된 유전자 및 4개의 하향 조절된 유전자의 ROC 곡선 분석은 표 2에 나타나고 있다. 10개 예측자 모두 AUC가 0.7을 초과하는 한편, TNFAIP3은 가장 강력한 예측자이다(AUC 0.943). 5개의 유전자(TNFAIP3, AREG, NFKBIA, NFKBIZ, CD83)는 대조군에서의 발현 수준보다 HCC에서 발현 수준이 더 높았고, 이 때 배수 변화는 2.8내지 8.2의 범위이었다. GIMAP 패밀리로부터의 4개 유전자(GIMAP4, GIMAP5, GIMAP6 및 GIMAP8)는 대조군에서의 발현 수준보다 HCC에서 발현 수준이 더 낮으며, 이 때 배수 변화의 정도는 1.9 내지 2.4의 범위로 더 낮다(도 9). 이 그룹에서 이들 9개의 중요한 유전자의 qPCR 데이터를 개별적인 유전자의 식별력을 결합하는 모델을 개발하는 데 훈련 데이터 세트로서 사용하였다.

[0063] **모델 개발 및 WBC 유전자 마커 선택**

[0064] 중요한 유전자 중 일부는 동일한 신호전달 경로, 또는 동일한 유전자 패밀리에 있으므로, 이들 유전자 발현은 서로 상관되어 있었다. 따라서, 유전자 발현 데이터가 모델 개발에 사용되기 전에 다중공선성 테스트를 적용하였다. 상기 테스트는 TNFAIP3, NFKBIA 및 NFKBIZ의 분산 팽창 요인 지수(Variance Inflation Factor index; VIF)가 5를 초과하는 것으로 나타내었으며, 이는 다중공선성이 존재함을 나타낸다. TNFAIP3이 가장 강력한 예측자이므로, NFKBIA 및 NFKBIZ는 패널로부터 제거하였다. 다중공선성 테스트를 다시 적용하였으며, VIF가 5 미만인 나머지 8개 예측자로는 어떠한 다중공선성도 검출되지 않았다. 단계식 로지스틱 회귀 분석 모델을 상기 방법을 사용하여 개발하였다:

[0065] 
$$\text{Log}(p/(1+p)) = 3.462 + 0.897 \times \text{AREG} + 1.570 \times \text{TNFAIP3} - 1.769 \times \text{GIMAP5}$$

[0066] TNFAIP3, AREG 및 GIMAP5는 독립 예측자로서 모델에 포함된 반면, 나머지 5개 유전자는 불필요한 것으로 나타났다. 이 모델에 따라서, 특정 피험체에서 HCC일 확률을 계산하였다. 유사하게, 비교로서 단일 예측자 TNFAIP3에 기반하여 로지스틱 회귀 분석을 실행하였고( $\text{Log}(p/(1+p)) = 2.812 + 2.403 \times \text{TNFAIP3}$ ), 확률 점수를 계산하였다.

[0067] 2가지 모델로부터의 확률 점수는 훈련 그룹에 대한 ROC 곡선을 생성하는 데 사용하였다(도 3a). 단일 유전자 및 3-유전자 모델 둘 다 뛰어난 예측자인 한편(AUC > 0.9), 3-유전자 모델은 AUC를 0.977로 추가로 증가시켰다.

[0068] **WBC 유전자 마커 패널의 검증**

[0069] 훈련 그룹에서 개발된 모델을 HCC 환자 60명 및 CHB 환자 90명의 독립적인 샘플 그룹에서 검증하였다. ROC 곡선은 도 4b에 나타나고 있다. 훈련 그룹에서와 비교하여, 테스트 그룹에서의 AUC는 단일 유전자에 대하여 0.891, 3-유전자 모델에 대하여 0.909로 약간 감소하였다.

[0070] 따라서, 상이한 절사점에서 훈련 그룹 및 테스트 그룹 둘 다의 민감성 및 특이성은 표 3에 열거되어 있다(도 5). 동일한 절사점에서, 훈련 그룹에서 민감성 및 특이성의 합계는 단일 유전자 및 3-유전자 모델 둘 다에 대한 테스트 그룹에서 보다 더 높다. HCC 확률 점수의 더 낮은 절사점(55 내지 70의 범위)에서, 2가지 모델은 HCC를 CHB와 구별하는 데 있어서 유사하게 실행한다. 그러나, 90 근처의 더 높은 절사점에서, 72%의 더 높은 감수성은 58%의 감수성을 제공하는 단일 유전자 모델에 의한 것보다 3-유전자 모델에 의해 달성되는 한편, 특이성은 모델 둘 다에 대하여 100%이다.

[0071] 추가적으로, 혈청 AFP는 HCC 진단 및 스크리닝에 가장 일반적으로 사용되는 혈청학적 마커이므로, CHB로부터 HCC를 검출하는 이의 능력을 본 발명의 WBC 유전자 마커, 즉 TNFAIP3, AREG 및 GIMAP5의 능력과 비교하였다. 이용가능한 AFP 데이터와 함께 전체 HCC 환자 104명 및 CHB 환자 108명을 본 비교에서 사용하였다. ROC 곡선 분석은 단일 유전자 및 3-유전자 모델이 AFP보다 상당히 더 우수하게 실행된다는 것을 나타낸다(도 6). AFP에 대한 AUC는 0.697인 반면, WBC 유전자 마커에 대한 AUC는 둘 다 0.94 초과이다. 임상 진단을 위한 200ng/ml AFP의 절사점에서(상기 Bruix & Sherman, 2011), 민감성은 43%이고 특이성은 95%이다. 반대로, 3-유전자 모델에 있어

서 민감성은 74%이고 특이성은 99%이며, 단일 유전자 모델에 있어서는 약간 더 낮다(민감성 57%, 특이성 98%).

[0072] 또한, 바르셀로나 임상 간암(BCLC) 단계 A HCC가 있는 환자(3cm 이하의 단일 결절, 혈관 침범 없음)를 CHB 환자와 구별하기 위해 AFP 및 본 발명의 유전자 마커, 즉 TNFAIP3, AREG 및 GIMAP5를 모두 적용하였다. HCC 환자 그룹 모두로부터의 결과와 유사하게, 본 발명의 유전자 마커는 AFP보다 더 양호하게 실행되며, 이 때 AUC는 0.96이다(도 7).

[0073] 논의

[0074] 현재, AFP는 불만족스러운 민감성과 특이성을 가지는, HCC에 대하여 가장 일반적으로 사용되는 혈청학적 마커이다. 불충분한 정확도로 인하여, 2010년에 발행된 미국 간학회(AASLD) 치료 지침은 HCC 스크리닝 및 진단을 위한 마커로서 AFP를 더 이상 권고하지 않는다(상기 Bruix & Sherman 2011).

[0075] 본 발명은 초기 단계에 HCC를 검출하기 위하여 말초 혈액으로부터 효과적인 새로운 마커를 발견하는 것을 목표로 하였다. 미국 국립 암협회의 조기 검출 연구 네트워크(Early Detection Research Network; EDRN)에 의해 사용되는 5-상 구조에 따르면, 이는 임상 분석 개발 및 검증을 위한 2상 연구(phase 2 study)이다. 대부분의 HCC가 아시아에서 HBV 양성 집단에서 진행하였으므로, 만성 B형 간염을 가지는 환자 및 HBV-연관 HCC를 가지는 환자를 모집하였다. 포괄적인 유전자 발현 프로파일링 마이크로어레이를 사용함으로써, 후보 유전자 마커를 HCC 환자 유래 WBC에서 확인하였다. q-PCR을 후보 유전자를 검증하고, 추후 단순성 및 재현 가능성에 대하여 임상 샘플에서 유전자 발현 수준을 측정하는 데 사용하였다.

[0076] 17개의 후보 유전자로부터의 9개 유전자를 q-PCR에 의해 본 발명에서 검증하였고, 3개 유전자를 비교한 로지스틱 모델을 개발하는 데 훈련 그룹을 사용하였다. 3-유전자 모델은 훈련 및 독립 테스트 그룹에서 뛰어난 진단 정확도를 가진다(도 7). 비록 TNFAIP3 단독은 80%의 민감성 및 88%의 특이성을 획득할 수 있을지라도, 3-유전자 모델은 정확도를 미세 조정할 수 있으며, 높은 특이성이 요구될 더 높은 민감성을 초래하였다(민감성 85%, 특이성 87%). 또한, 본 발명의 유전자 마커는 혈청 AFP보다 상당히 더 양호하게 실행되며, BCLC 단계 A HCC 환자를 CHB 환자로부터 구별할 수 있다.

[0077] 본원에 예시적으로 기술된 발명은 임의의 요소 또는 요소들, 본원에 구체적으로 개시되어 있지 않은 제한 또는 제한들의 부재 하에서 적당하게 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어 용어 "포함하는", "포괄하는", "함유하는" 등은 포괄적으로 제한없이 읽혀질 것이다. 추가적으로, 본원에서 이용되는 용어 및 표현은 설명의 관점으로서 제한 없이 사용되었으며, 이와 같은 용어 및 표현의 사용에서 나타내어지고 기술된 특징 또는 이의 일부의 임의의 균등물을 배제하는 의도는 없으나, 다양한 변형이 청구된 본 발명의 범주 내에서 가능성이 인식된다. 따라서, 비록 본 발명이 예시적인 구현에 및 선택적인 특징에 의해 구체적으로 개시되어 있더라도, 본원에 개시된 본 발명 내에서 구현화된 본 발명의 예시적인 구현에 및 선택적인 특징, 변형 및 변화는 당업자에 의해 행하여질 수 있으며, 이와 같은 변형 및 변화는 본 발명의 범주 내인 것으로 간주됨이 이해되어야 한다.

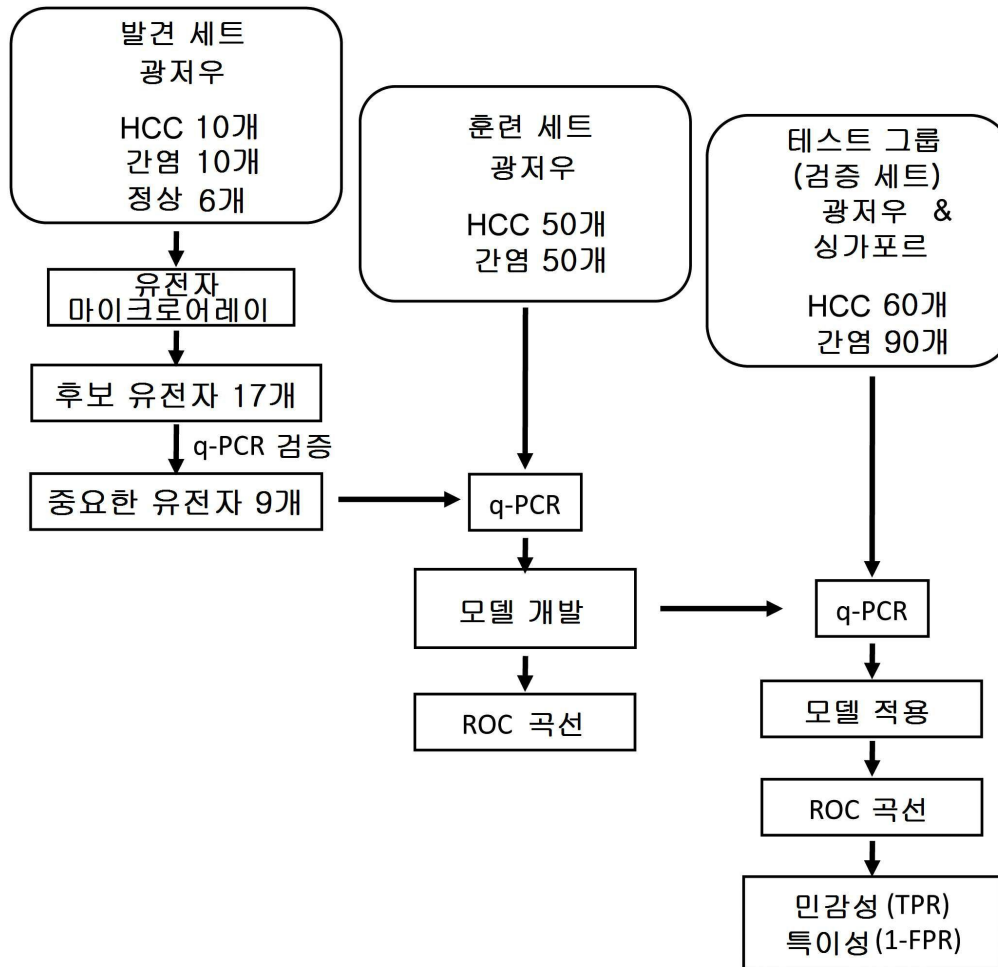
[0078] 본 발명은 본원에 광범위하면서 총괄적으로 기술되었다. 총괄적인 개시 내용에 속하는 더 좁은 종의 각각 및 아속의 그룹화는 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 이는, 삭제된 물질이 본원에서 구체적으로 언급되어 있는지 여부에 상관없이 단서 또는 속으로부터 임의의 주제를 제거하는 부정적인 제한을 가지는 본 발명의 총괄적인 기술을 포함한다.

[0079] 다른 구현에는 하기 청구항에 속한다. 추가적으로, 본 발명의 특징 또는 양태가 마취쉬 그룹으로 기술되어 있는 경우, 당업자는 본 발명이 또한 이에 의하여 마취쉬 그룹의 임의의 개별적인 구성원 또는 구성원의 서브그룹으로 기술됨을 인식할 것이다.



도면

도면1



도면2a

표 1. 연구 참가자의 임상학적 특징(광저우 샘플)

그룹	HCC (n=75)	간염 (n=128)
성별		
남성	70 (93%)	99 (77%)
여성	5 (7%)	29 (23%)
연령 (세)	52 (29-76)	49 (18-69)
>50	38 (51%)	26 (20%)
AFP ng/ml <sup>a</sup>		a. HCC 환자 75명 중 73명은 AFP 값을 가짐; 간염 환자 128명 중 100명은 AFP 값을 가짐.
≤ 20	25 (34%)	66 (50%)
>20	48 (64%)	36 (28%)
ALB g/l <sup>b</sup>		c. 간염 환자 128명 중 123명은 ALT 값을 가짐.
≥35	59 (79%)	74 (58%)
ALT U/L <sup>c</sup>		d. 간염 환자 29명은 경변증이 있음이 확인됨.
≤ 40	34 (45%)	22 (17%)
경변증 <sup>d</sup>	54 (72%)	29 (27%)
종양 크기 <sup>e</sup>		e. HCC 환자 75명 중 72명은 종양 크기 정보를 가짐.
≤ 3cm	11 (15%)	NA
3-5 cm	22 (31%)	NA
>5 cm	39 (54%)	NA

도면2b

표 2. 연구 참가자의 임상학적 특징(NCC/SGH 샘플)

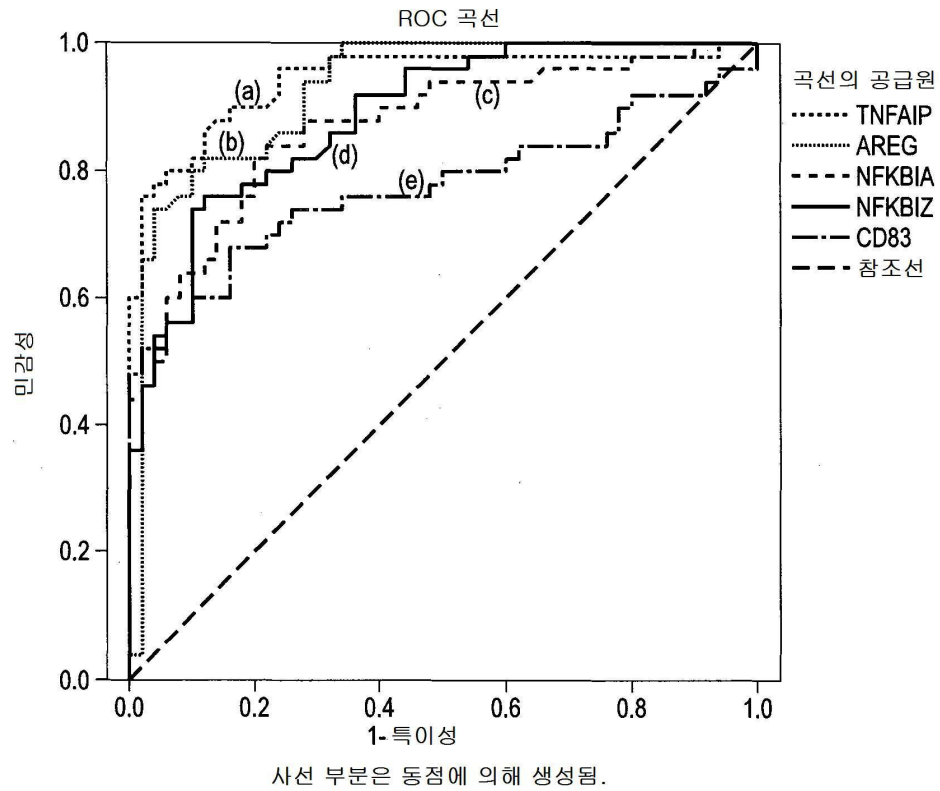
그룹	HCC (n=35)	간염 (n=12)	
성별			
남성	17 (49%)	9 (75%)	
여성	4 (11%)	2 (17%)	
연령(세)			
>50	20 (57%)	0 (0%)	
AFP ng/ml <sup>a</sup>			
≤ 20	19 (54%)	7 (58%)	
>20	11 (31%)	0 (0%)	a. HCC 환자 35명 중 31명은 AFP 값을 가짐; 간염 환자 12명 중 7명은 AFP 값을 가짐.
ALB g/l <sup>b</sup>			
≥35	17 (49%)	4 (33%)	b. 간염 환자 12명 중 5명은 ALB 값을 가짐.
ALT U/L <sup>c</sup>			
≤ 40	11 (31%)	5 (42%)	c. 간염 환자 12명 중 6명은 ALT 값을 가짐.
경변증 <sup>d</sup>	13 (37%)	6 (0.5%)	d. 간염 환자 12명 중 6명은 경변증이 있음이 확인됨.
종양 크기 <sup>e</sup>			
≤ 3cm	5 (14%)	NA	e. HCC 환자 35명 중 26명은 종양 크기 정보를 가짐.
3-5 cm	5 (14%)	NA	
>5 cm	15 (43%)	NA	

도면3a

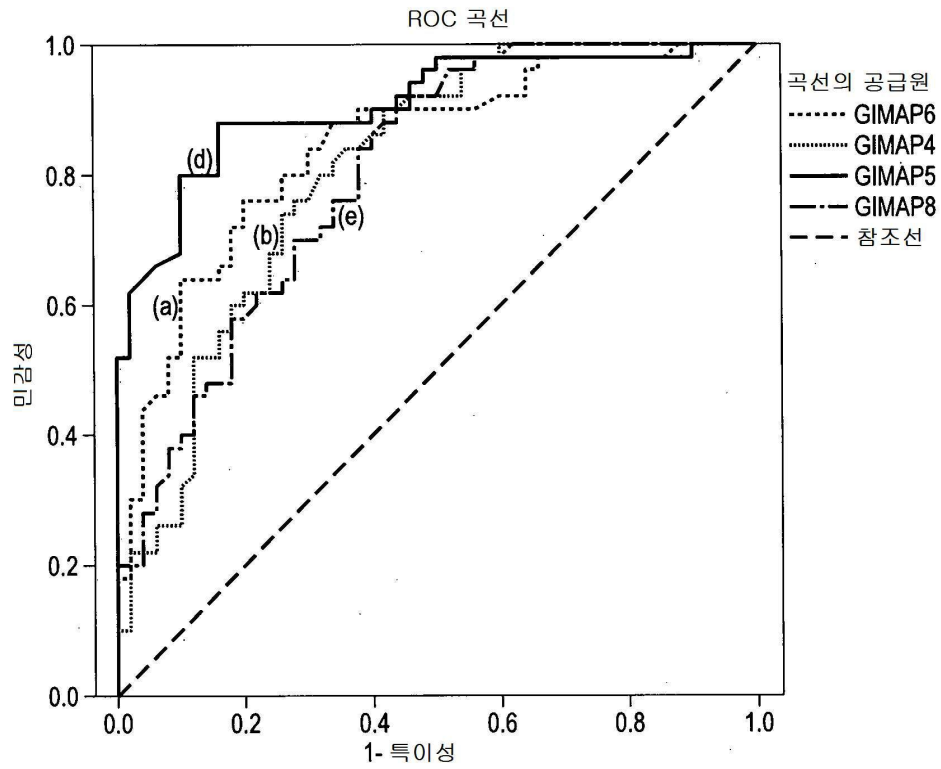
표 3. 훈련 그룹에서 9개의 중요한 유전자의 차별화된 발현 및 진단학적 성능(HCC n=50, CHB n=50)

유전자 명칭	배수 변화	AUC	표준 오차	P-값	95% 신뢰구간
GIMAP6	-1.94801	.841	.039	.000	.764 - .919
GIMAP4	-2.11316	.808	.043	.000	.723 - .892
GIMAP5	-2.70232	.906	.030	.000	.848 - .965
GIMAP8	-2.45173	.801	.043	.000	.716 - .885
TNFAIP	4.67122	.943	.024	.000	.896 - .989
AREG	8.28786	.926	.027	.000	.873 - .978
NFKBIA	4.64282	.869	.036	.000	.799 - .940
NKFBIZ	3.55833	.885	.032	.000	.823 - .947
CD83	2.82843	.776	.049	.000	.679 - .872

도면3b

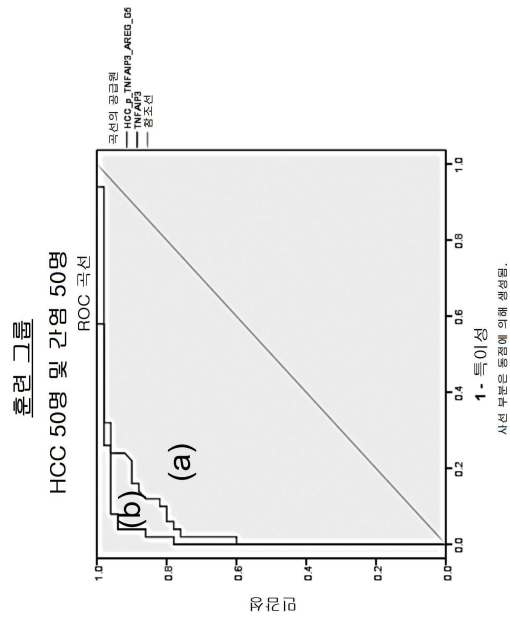


도면3c



사선 부분은 동점에 의해 생성됨.

도면4a



곡선 하 면적

테스트 결과 변수(들)	면적	표준 오차	무증상 신뢰 구간	
			하한계	상한계
HCC_p_TNFAIP3_AREG_G5	.977	.014	.940	1.000
TNFAIP3	.943	.024	.896	.989

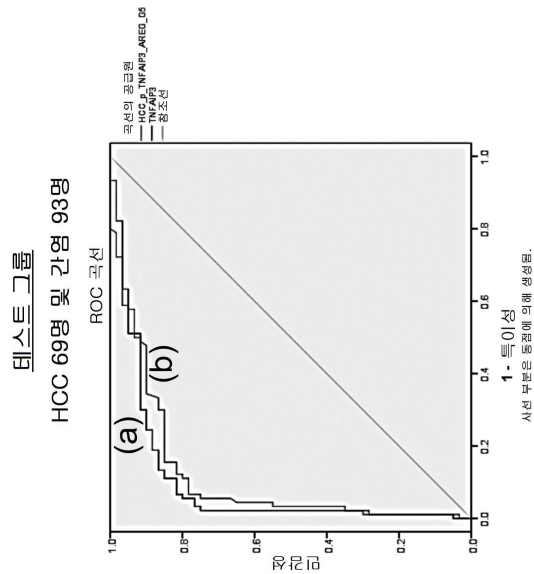
곡선 하 면적

테스트 결과 변수(들)	면적	표준 오차	무증상 신뢰 구간	
			하한계	상한계
HCC_p_TNFAIP3_AREG_G5	.909	.028	.853	.964
TNFAIP3	.891	.029	.834	.947

훈련 그림(A) 및 테스트 그림(B)에서 상이한 마커 모델의 ROC 곡선 분석 결과, 곡선 하 면적(AUC)은 95% 신뢰 구간으로 나타내져 있다. 모델은 단계식 로지스틱 회귀 분석(전진 방법)에 의해 개발하였다. HCC일 확률은 오즈비로부터 계산하였으며 0 내지 1 범위의 점수로 주어졌다.



도면4b



곡선 하 면적

테스트 결과 변수(들)	면적	표준 오차	무증상 95% 신뢰 구간	
			하한계	상한계
HCC_p_TNFAIP3_AREG_G5	.977	.014	.000	.940
TNFAIP3	.943	.024	.000	.989

곡선 하 면적

테스트 결과 변수(들)	면적	표준 오차	무증상 특징	무증상 95% 신뢰 구간	
				하한계	상한계
HCC_p_TNFAIP3_AREG_G5	.908	.028	.000	.853	.964
TNFAIP3	.891	.029	.000	.834	.947

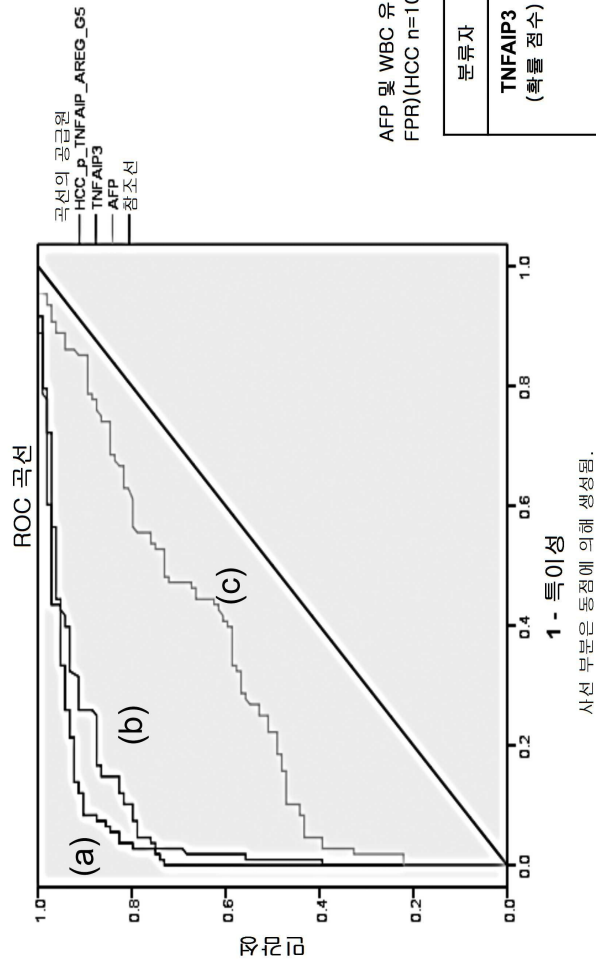
훈련 그룹(A) 및 테스트 그룹(B)에서 상이한 마커 모델의 ROC 곡선 분석 결과, 곡선 하 면적(AUC)은 95% 신뢰 구간으로 나타내어져 있다. 모델은 단계식 로지스틱 회귀 분석(전진 방법)에 의해 개발하였다. HCC일 확률은 오즈비로부터 계산하였으며 0 내지 1 범위의 점수로 주어졌다.

도면5

표 3. 상이한 절사점에서 훈련 그룹 및 테스트 그룹의 ROC 분석 결과로부터의 민감성(TPR) 및 특이성(1-FPR).

모델	컷오프	훈련		테스트	
		TPR	1-FPR	TPR	1-FPR
TNFAIP3 단독	> 0.58	80%	92%	80%	88%
	> 0.73	76%	98%	75%	94%
	> 0.90	58%	100%	55%	96%
TNFAIP3 세트 (TNFAIP, AREG, GIMAP5)	> 0.58	92%	96%	85%	87%
	> 0.73	88%	96%	82%	90%
	> 0.90	72%	100%	77%	97%

도면6



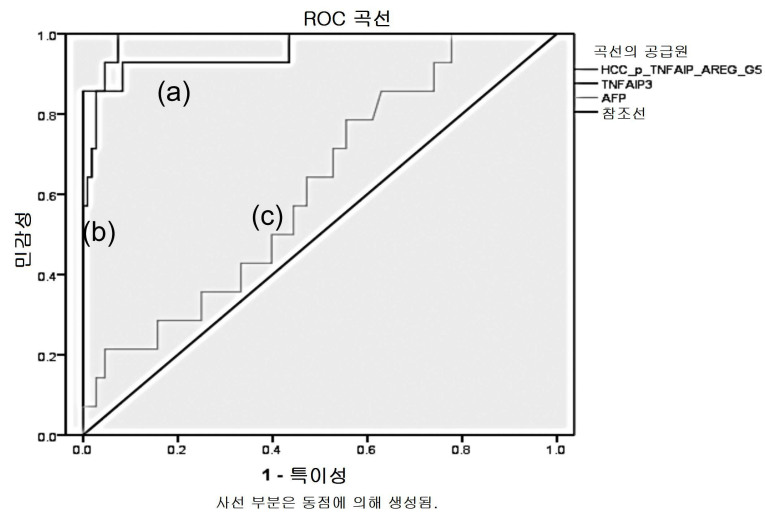
AFP 및 WBC 유전자 마커의 민감성(TPR) 및 특이성(1-FPR)(HCC n=104; CHB n=108)

분류자	컷오프	TPR	1-FPR
TNFAIP3 (확률 점수)	> 55	81%	90%
	> 69	79%	95%
	> 90	57%	98%
TNFAIP3 세트 (확률 점수)	> 57	90%	92%
	> 70	87%	93%
	> 90	74%	99%
AFP (ng/ml)	> 20	58%	67%
	> 107	47%	89%
	> 209	43%	95%

테스트 결과 변수(들)	면적	표준 오차 <sup>a</sup>	무증상 특징 <sup>b</sup>	무증상 95% 신뢰 구간	
				하한계	상한계
HCC_p_TNFAIP_AREG_G5	.951	.015	.000	.924	.981
TNFAIP	.925	.019	.000	.889	.961
AFP	.697	.036	.000	.626	.769

HCC 환자 104명 및 CHB 환자 108명에서 WBC 유전자 마커 및 혈청 AFP의 ROC 곡선 분석 결과.

도면7

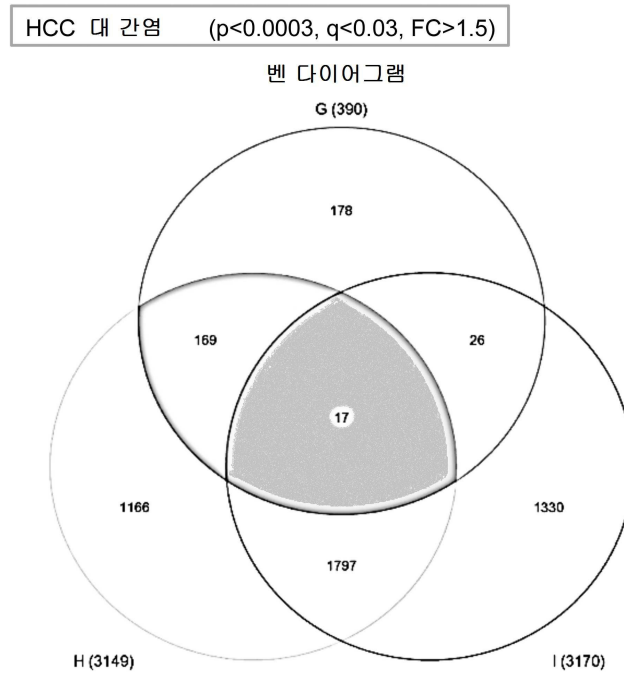


곡선 하 면적

테스트 결과 변수(들)	면적	표준 오차 <sup>a</sup>	무증상 특징 <sup>b</sup>	무증상 95% 신뢰 구간	
				하한계	상한계
HCC_p_TNFAIP_AREG_G5	.963	.031	.000	.000	1.000
TNFAIP3	.985	.009	.000	.959	1.000
AFP	.618	.073	.153	.475	.761

BCLC 단계 A HCC 환자(단일 결절 3cm, 혈관 침범 없음) 14명 및 CHB 환자 140명에서 WBC 유전자 마커 및 혈청 AFP의 ROC 곡선 분석 결과.

도면8



HCC 대 정상 (p<0.0003, q<0.001, FC>1.5)

정상 대 간염 (p<0.0003, q<0.001, FC>1.5)

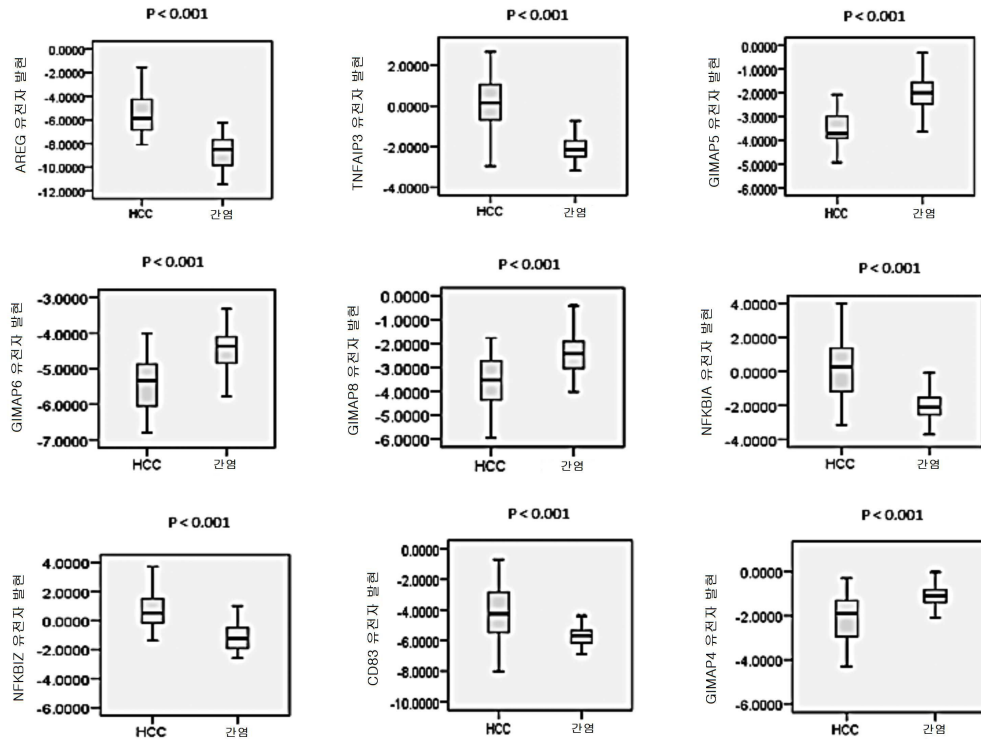
3쌍의 쌍별 비교를 위한 벤 다이어그램. 후보 유전자 마커는 CHB 및 건강한 피험체와 비교하여 HCC에서 차별적으로 발현된 유전자로부터 선택하였다.

도면9

표 4. 유전자 마이크로어레이 분석 결과로부터의 HCC 및 CHB에서 9개 중요한 유전자의 차별 유전자 발현.

유전자 부호	유전자 타이틀	p-값	q-값	HCC/CHB
TNFAIP3	종양괴사인자, 알파-유도 단백질 3	3.68E-005	0.015	3.72
NFKBIA	B-세포 억제제 알파 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인핸서의 핵인자	0.00013	0.027	3.06
NFKBIZ	B-세포 억제제 제타 중 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인핸서의 핵인자	5.05E-005	0.017	3.8
AREG	엠펙레굴린 /// 엠펙레굴린 B	5.04E-007	0.0004	8.6
CD83	CD83 분자	0.0014	0.080	4.83
GIMAP4	GTPase, IMAP 패밀리 구성원 4	2.05E-005	0.013	-2.04
GIMAP5	GTPase, IMAP 패밀리 구성원 5	1.4E-05	0.008	-2.05
GIMAP6	GTPase, IMAP 패밀리 구성원 6	5.11E-005	0.017	-1.70
GIMAP8	GTPase, IMAP 패밀리 구성원 8	0.0001	0.024	-2.34

도면10



q-PCR에 의해 검증된 혼련 그룹에서 WBC 유전자 마커의 차별 발현(HCC n=50; CHB n=50; 건강체 n=6). 유전자 발현 수준은 CD45의 유전자 발현 수준에 대하여 정규화하고 CD45 발현 수준의 백분율로서 제시된다. 박스는 25번째 및 75번째 백분위수를 말하며, 이 때 선은 중앙값을 나타낸다. 위스커는 최소 및 최대 값을 나타낸다. 만-윌트니 검증을 실행하여 유의성을 결정하였다.

도면11

	정방향 5'-3'	역방향 5'-3'
1 NFKB1Z	TCCTGTTGCACATCCGAAGTC	TCCATCAGACAACGAATCGGG
2 GIMAP8	GGGTCGCTCTCCGGCCATTC	CAGGCTCCCGCTTGTCTGCG
3 GIMAP5	GTGCAGCTGAGTCATGGAGCTT	TTCTCTCCAGAAACGGTTGTTGTC
4 AREG	GTGGTGCTGTCGCTCTTGATACTC	TCAAATCCATCAGCACTGTGGTC
5 CD83	TGCACTCTGCAGGACCCGGA	TGTAGCCGTGCAAACCTTACAAGTGA
6 NFKB1A	CTCCGAGACTTTCGAGGAAATAC	GCCATTGTAGTTGGTAGCCTTCA
7 GIMAP6	GTCTTCGAGTCTAAACTCAGCAC	TGGGTGTGTCAATCACCTCAA
8 TNFAIP3	TTGTCTCAGTTTCGGGAGAT	TTCTCGACACCAGTTGAGTTTC
9 GIMAP4	GCCCAATACGGCAGTATGAG	CCTGCTCCGGTTTTACCCAC

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Singapore Health Services Pte. Ltd.

<120> METHODS OF DIAGNOSING LIVER CANCER IN A SUBJECT AND A KIT FOR  
DIAGNOSING LIVER CANCER

<130> P0305-W0

<150> US 61/704425

<151> 2012-09-21  
 <160> 21  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer for NFKBIZ  
 <400> 1  
 tcctgttgca catccgaagt c 21  
 <210> 2  
 <211> 21  
  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer for NFKBIZ  
 <400> 2  
 tccatcagac aacgaatcgg g 21  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer for GIMAP8  
 <400> 3  
 gggtcgctct cggccattc 20  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer for GIMAP8  
 <400> 4  
 caggctcccg cttgttctgg g 21  
  
 <210> 5  
 <211> 22



<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer for GIMAP5  
 <400> 5  
 gtgcagctga gtcattggagc tt 22  
 <210> 6  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer for GIMAP5  
 <400> 6  
 ttctctccag aaacgggtgt tgtgc 25  
 <210> 7  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer for AREG  
 <400> 7  
 gtggtgctgt cgctcttgat actc 24  
 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer for AREG  
 <400> 8  
 tcaaatccat cagcactgtg gtc 23  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer for CD83  
 <400> 9  
 tgcactctgc aggacccgga 20  
 <210> 10

<211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer for CD83  
 <400> 10  
 tgtagccgtg caaacttaca agtga 25

<210> 11  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer for NFKBIA  
 <400> 11  
 ctccgagact ttcgaggaaa tac 23

<210> 12  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer for NFKBIA  
 <400> 12  
 gccattgtag ttggtagcct tca 23

<210> 13  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer for GIMAP6  
 <400> 13  
 gtcttcgagt ctaaactcag cac 23

<210> 14  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer for GIMAP6  
 <400> 14

tgggtgtgtc aatcacctca a	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for TNFAIP3	
<400> 15	
ttgtcctcag tttcgggaga t	21
<210> 16	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for TNFAIP3	
<400> 16	
ttctcgacac cagttgagtt tc	22
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for GIMAP4	
<400> 17	
gcccaatacg gcagtatgag	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for GIMAP4	
<400> 18	
cctgctccgg ttttaccac	20
<210> 19	
<211> 790	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 19	

Met Ala Glu Gln Val Leu Pro Gln Ala Leu Tyr Leu Ser Asn Met Arg

1	5	10	15
Lys Ala Val	Lys Ile Arg	Glu Arg Thr	Pro Glu Asp
	20	25	30
Thr Asn Gly	Ile Ile His	His Phe Lys	Thr Met His
	35	40	45
Glu Met Phe	Arg Thr Cys	Gln Phe Cys	Pro Gln Phe
	50	55	60
His Lys Ala	Leu Ile Asp	Arg Asn Ile	Gln Ala Thr
			Leu Glu Ser
			Gln
65	70	75	80
Lys Lys Leu	Asn Trp Cys	Arg Glu Val	Arg Lys Leu
	85	90	95
Thr Asn Gly	Asp Gly Asn	Cys Leu Met	His Ala Thr
	100	105	110
Trp Gly Val	Gln Asp Thr	Asp Leu Val	Leu Arg Lys
	115	120	125
Thr Leu Lys	Glu Thr Asp	Thr Arg Asn	Phe Lys Phe
			Arg Trp Gln
			Leu
130	135	140	
Glu Ser Leu	Lys Ser Gln	Glu Phe Val	Glu Thr Gly
			Leu Cys Tyr
145	150	155	160
Thr Arg Asn	Trp Asn Asp	Glu Trp Asp	Asn Leu Ile
	165	170	175
Thr Asp Thr	Pro Met Ala	Arg Ser Gly	Leu Gln Tyr
	180	185	190
Glu Ile His	Ile Phe Val	Leu Cys Asn	Ile Leu Arg
			Arg Pro Ile
			Ile
195	200	205	
Val Ile Ser	Asp Lys Met	Leu Arg Ser	Leu Glu Ser
			Gly Ser Asn
210	215	220	
Ala Pro Leu	Lys Val Gly	Gly Ile Tyr	Leu Pro Leu
			His Trp Pro
225	230	235	240
Gln Glu Cys	Tyr Arg Tyr	Pro Ile Val	Leu Gly Tyr
			Asp Ser His
			His

245                      250                      255  
 Phe Val Pro Leu Val Thr Leu Lys Asp Ser Gly Pro Glu Ile Arg Ala  
  
 260                      265                      270  
 Val Pro Leu Val Asn Arg Asp Arg Gly Arg Phe Glu Asp Leu Lys Val  
 275                      280                      285  
 His Phe Leu Thr Asp Pro Glu Asn Glu Met Lys Glu Lys Leu Leu Lys  
 290                      295                      300  
 Glu Tyr Leu Met Val Ile Glu Ile Pro Val Gln Gly Trp Asp His Gly  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Thr His Leu Ile Asn Ala Ala Lys Leu Asp Glu Ala Asn Leu Pro  
  
 325                      330                      335  
 Lys Glu Ile Asn Leu Val Asp Asp Tyr Phe Glu Leu Val Gln His Glu  
 340                      345                      350  
 Tyr Lys Lys Trp Gln Glu Asn Ser Glu Gln Gly Arg Arg Glu Gly His  
 355                      360                      365  
 Ala Gln Asn Pro Met Glu Pro Ser Val Pro Gln Leu Ser Leu Met Asp  
 370                      375                      380  
 Val Lys Cys Glu Thr Pro Asn Cys Pro Phe Phe Met Ser Val Asn Thr  
  
 385                      390                      395                      400  
 Gln Pro Leu Cys His Glu Cys Ser Glu Arg Arg Gln Lys Asn Gln Asn  
 405                      410                      415  
 Lys Leu Pro Lys Leu Asn Ser Lys Pro Gly Pro Glu Gly Leu Pro Gly  
 420                      425                      430  
 Met Ala Leu Gly Ala Ser Arg Gly Glu Ala Tyr Glu Pro Leu Ala Trp  
 435                      440                      445  
 Asn Pro Glu Glu Ser Thr Gly Gly Pro His Ser Ala Pro Pro Thr Ala  
  
 450                      455                      460  
 Pro Ser Pro Phe Leu Phe Ser Glu Thr Thr Ala Met Lys Cys Arg Ser  
 465                      470                      475                      480  
 Pro Gly Cys Pro Phe Thr Leu Asn Val Gln His Asn Gly Phe Cys Glu  
 485                      490                      495

Arg Cys His Asn Ala Arg Gln Leu His Ala Ser His Ala Pro Asp His  
 500 505 510  
 Thr Arg His Leu Asp Pro Gly Lys Cys Gln Ala Cys Leu Gln Asp Val  
 515 520 525  
 Thr Arg Thr Phe Asn Gly Ile Cys Ser Thr Cys Phe Lys Arg Thr Thr  
 530 535 540  
 Ala Glu Ala Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Leu Pro Pro Ser Cys His  
 545 550 555 560  
 Gln Arg Ser Lys Ser Asp Pro Ser Arg Leu Val Arg Ser Pro Ser Pro  
 565 570 575  
 His Ser Cys His Arg Ala Gly Asn Asp Ala Pro Ala Gly Cys Leu Ser  
 580 585 590  
 Gln Ala Ala Arg Thr Pro Gly Asp Arg Thr Gly Thr Ser Lys Cys Arg  
 595 600 605  
 Lys Ala Gly Cys Val Tyr Phe Gly Thr Pro Glu Asn Lys Gly Phe Cys  
 610 615 620  
 Thr Leu Cys Phe Ile Glu Tyr Arg Glu Asn Lys His Phe Ala Ala Ala  
 625 630 635 640  
 Ser Gly Lys Val Ser Pro Thr Ala Ser Arg Phe Gln Asn Thr Ile Pro  
 645 650 655  
 Cys Leu Gly Arg Glu Cys Gly Thr Leu Gly Ser Thr Met Phe Glu Gly  
 660 665 670  
 Tyr Cys Gln Lys Cys Phe Ile Glu Ala Gln Asn Gln Arg Phe His Glu  
 675 680 685  
 Ala Lys Arg Thr Glu Glu Gln Leu Arg Ser Ser Gln Arg Arg Asp Val  
 690 695 700  
 Pro Arg Thr Thr Gln Ser Thr Ser Arg Pro Lys Cys Ala Arg Ala Ser  
 705 710 715 720  
 Cys Lys Asn Ile Leu Ala Cys Arg Ser Glu Glu Leu Cys Met Glu Cys  
 725 730 735  
 Gln His Pro Asn Gln Arg Met Gly Pro Gly Ala His Arg Gly Glu Pro

740                      745                      750  
 Ala Pro Glu Asp Pro Pro Lys Gln Arg Cys Arg Ala Pro Ala Cys Asp  
 755                      760                      765  
 His Phe Gly Asn Ala Lys Cys Asn Gly Tyr Cys Asn Glu Cys Phe Gln  
  
 770                      775                      780  
 Phe Lys Gln Met Tyr Gly  
 785                      790  
 <210> 20  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 20  
 Met Arg Ala Pro Leu Leu Pro Pro Ala Pro Val Val Leu Ser Leu Leu  
 1                      5                      10                      15  
 Ile Leu Gly Ser Gly His Tyr Ala Ala Gly Leu Asp Leu Asn Asp Thr  
 20                      25                      30  
 Tyr Ser Gly Lys Arg Glu Pro Phe Ser Gly Asp His Ser Ala Asp Gly  
  
 35                      40                      45  
 Phe Glu Val Thr Ser Arg Ser Glu Met Ser Ser Gly Ser Glu Ile Ser  
 50                      55                      60  
 Pro Val Ser Glu Met Pro Ser Ser Ser Glu Pro Ser Ser Gly Ala Asp  
 65                      70                      75                      80  
 Tyr Asp Tyr Ser Glu Glu Tyr Asp Asn Glu Pro Gln Ile Pro Gly Tyr  
 85                      90                      95  
 Ile Val Asp Asp Ser Val Arg Val Glu Gln Val Val Lys Pro Pro Gln  
  
 100                      105                      110  
 Asn Lys Thr Glu Ser Glu Asn Thr Ser Asp Lys Pro Lys Arg Lys Lys  
 115                      120                      125  
 Lys Gly Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn  
 130                      135                      140  
 Pro Cys Asn Ala Glu Phe Gln Asn Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys  
 145                      150                      155                      160



Tyr Ile Glu His Leu Glu Ala Val Thr Cys Lys Cys Gln Gln Glu Tyr

165 170 175  
Phe Gly Glu Arg Cys Gly Glu Lys Ser Met Lys Thr His Ser Met Ile

180 185 190  
Asp Ser Ser Leu Ser Lys Ile Ala Leu Ala Ala Ile Ala Ala Phe Met

195 200 205  
Ser Ala Val Ile Leu Thr Ala Val Ala Val Ile Thr Val Gln Leu Arg

210 215 220  
Arg Gln Tyr Val Arg Lys Tyr Glu Gly Glu Ala Glu Glu Arg Lys Lys

225 230 235 240  
Leu Arg Gln Glu Asn Gly Asn Val His Ala Ile Ala

245 250  
<210> 21  
<211> 408  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 21

Met Asn Asn Met Leu Asp Ile Trp Gln Ser Arg Leu Gln Glu His Ile

1 5 10 15  
Lys Glu Thr Arg Thr Tyr Met Lys Tyr Met Leu Asn Asp His Leu Val

20 25 30  
Ile Val Leu Ile Phe Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ser Trp Tyr Ser Lys

35 40 45  
Trp Ile Arg Asp Ile Pro Ala His Phe Pro Ser Phe Trp Val Met Ala

50 55 60  
Val Leu Phe Ser Leu Val Leu Thr Ser Ser Tyr Val Arg Thr Leu Leu

65 70 75 80  
Lys Glu Ala Asp Leu Val Phe Leu Leu Pro Leu Glu Ala Lys Met Glu

85 90 95  
Pro Tyr Leu Lys Gln Ala Phe Val Tyr Ser Tyr Val Ser Gln Leu Phe

100 105 110

Pro Leu Ile Ala Leu Ser Ile Val Ala Met Pro Leu Tyr Phe Ala Val  
115 120 125

Thr Pro Gly Ala Ser Leu Val Ser Tyr Ala Ala Val Phe Val Gln Leu  
130 135 140

Leu Leu Leu Lys Ala Trp Asn Gln Val Met Glu Trp Arg Thr Thr Phe  
145 150 155 160

Gln Asn Asp Arg Ser Met Lys Arg Met Asp Val Ile Ile Arg Phe Ala  
165 170 175

Ala Asn Thr Leu Val Leu Tyr Phe Val Phe Gln Ser Val Tyr Met Tyr  
180 185 190

Ala Leu Leu Val Tyr Val Ile Met Ala Val Leu Tyr Leu Tyr Met Ser  
195 200 205

Ser Ala Ala Lys Arg Lys Thr Phe Lys Trp Glu Ser His Ile Glu Ser  
210 215 220

Glu Leu Arg Arg Lys Gln Arg Phe Tyr Arg Ile Ala Asn Leu Phe Thr  
225 230 235 240

Asp Val Pro His Leu Arg Lys Gln Ala Lys Arg Arg Ala Tyr Leu Asp  
245 250 255

Phe Leu Leu Arg Leu Val Pro Phe Glu Gln Arg Lys Thr Phe Ala Tyr  
260 265 270

Met Phe Thr Arg Ala Phe Leu Arg Ser Ser Asp Tyr Leu Gly Ile Leu  
275 280 285

Val Arg Leu Thr Ile Val Phe Ala Leu Ile Ile Met Tyr Val Ser Ala  
290 295 300

Ser Pro Leu Ile Ala Ala Val Leu Thr Val Phe Ala Ile Phe Ile Thr  
305 310 315 320

Gly Ile Gln Leu Leu Pro Leu Phe Gly His Phe Asp His Leu Ala Leu  
325 330 335

Gln Glu Leu Tyr Pro Val Gln Lys Glu Thr Lys Leu Lys Ser Tyr Phe  
340 345 350

Ser Leu Leu Lys Thr Ala Leu Ser Ile Gln Ala Leu Leu Met Ser Val

355	360	365	
Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Phe Leu Tyr Ala Leu Ile			
370	375	380	
Gly Ser Ala Val Leu Ile Phe Val Val Leu Pro Ala Tyr Met Thr Thr			
385	390	395	400
Arg Leu Lys Lys His Gly Lys Leu			
405			