



- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006006
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 7일 (07.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0083534 2015년 6월 12일 (12.06.2015) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로 55길 48, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 남도현 (NAM, Do Hyun); 06334 서울시 강남구 개포로 109번길 69, LG 자이아파트 102동 203호, Seoul (KR). 이진구 (LEE, Jin Ku); 06284 서울시 강남구 삼성로 212 은마아파트 3동 113호, Seoul (KR). 유규하 (RYU, Gyu Ha); 06677 서울시 서초구 방배천로 18길 11, Seoul (KR). 신상 (SHIN, Sang); 06710 서울시 서초구 반포대로 1길 53-3 서초생활관 나동 212호, Seoul (KR). 조희진 (CHO, Hee Jin); 06647 서울시 서초

구 반포대로 122 현대 ESA2 아파트 A동 2003호, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 윤대웅 (YOON, Dae Woong); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

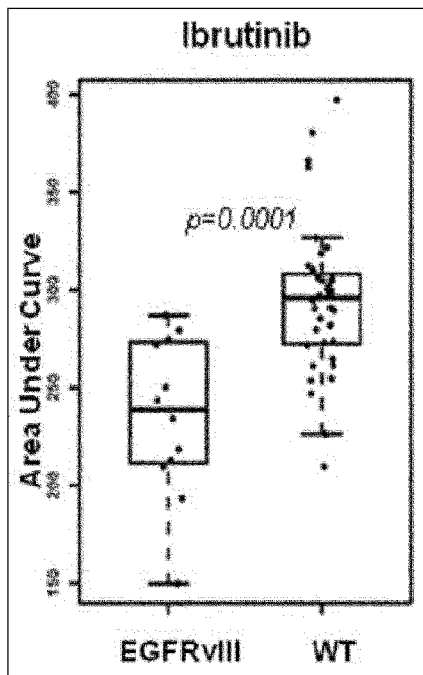
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,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

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

- (54) Title: GENE ASSOCIATED WITH IBRUTINIB SUSCEPTIBILITY IN GLIOBLASTOMA PATIENTS, AND USE THEREFOR

- (54) 발명의 명칭 : 교모세포종 환자에서 이브루티닙 감수성과 관련된 유전자 및 그 용도



(57) Abstract: The present invention provides: a method of assessing susceptibility or prognosis of glioblastoma patients with respect to ibrutinib, by testing for the presence of EGFRvIII mutation; and a kit for predicting the susceptibility of glioblastoma patients to ibrutinib. Use of the present invention makes it possible to predict reactivity to ibrutinib, which is a BTK/BMX/BLK specific inhibitor, in glioblastoma patients. The present invention can advantageously be used as evidence for allowing the administration of ibrutinib to EGFRvIII mutation patients.

(57) 요약서: 본 발명은 EGFRvIII 변이의 존재 여부를 검사하여 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성 또는 예후를 판단하는 방법 및 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성 예측용 키트를 제공한다. 본 발명을 이용하면 교모세포종 환자에서 BTK/BMX/BLK 특이적 억제제인 이브루티닙의 반응성을 예측할 수 있다. 본 발명은 EGFRvIII 변이 환자에게 이브루티닙을 투약할 수 있는 근거로 유용하게 이용될 수 있다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 교모세포종 환자에서 이브루티닙 감수성과 관련된 유전자 및 그 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 대한민국 보건복지부의 지원 하에서 과제번호 HI14C3418에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국보건산업진흥원, 연구사업명은 “보건의료연구개발사업”, 연구과제명은 “선도형 난치암연구사업단”, 주관기관은 삼성서울병원, 연구기간은 2014.12.01 ~ 2015.11.30이다.
- [2] 본 특허출원은 2015년 6월 12일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2015-0083534호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [3] 본 발명은 교모세포종 환자에서 이브루티닙 감수성과 관련된 유전자 및 그 용도에 관한 것이다.

[4]

배경기술

- [5] 교모세포종은 가장 흔하고 치명적인 뇌암으로 원발성 뇌종양의 60%를 차지하며 현재까지 방사선 치료 및 테모졸로마이드 기반 치료에도 평균 생존률이 15개월 내외인 매우 예후가 나쁜 종양이다(1-3). 따라서, 혁신적인 교모세포종 치료 전략이 필요하다. 최근 TCGA 등의 대규모 종양 유전체 분석을 통해 교모세포종의 바이오마커가 발굴되었다. 그 중, 전체 교모세포종의 15% 내외에서 발견되는 EGFRvIII 변이는 대표적인 종양유발 유전자 변이로 알려져 있고 이 변이를 타겟으로 하는 치료법에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.
- [6] 이브루티닙(Ibrutinib)은 만성 림프구성 백혈병에 허가가 되어있는 BTK(Bruton's tyrosine kinase)에 특이적 표적항암제로 최근, 이레사 치료 저항성 비소세포성폐암에 EGFR T790M 변이 특이적인 효능이 발굴되어 치료 표적 암종 및 유전자 바이오마커가 다양화되고 있다.
- [7]
- [8] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.
- [9]
- [10] 선행기술문헌
- [11] 1. Wen, P.Y. & Kesari, S. *The New England journal of medicine* 359, 492-507 (2008).

- [12] 2. Stupp, R. et al. *The New England journal of medicine* 352, 987-996 (2005).
- [13] 3. Ostrom, Q.T. et al. *Neuro-oncology* 16 Suppl 4, iv1-63 (2014).
- [14] 4. Verhaak, R.G. et al. *Cancer cell* 17, 98-110 (2010).
- [15] 5. Brennan, C.W. et al. *Cell* 155, 462-477 (2013).
- [16] 6. Cancer Genome Atlas Research, N. *Nature* 455, 1061-1068 (2008).
- [17] 7. Lee, J. et al. *Cancer cell* 9, 391-403 (2006).
- [18] 8. Pollard, S.M. et al. *Cell stem cell* 4, 568-580 (2009).
- [19] 9. Rosen, J.M. & Jordan, C.T. *Science* 324, 1670-1673 (2009).
- [20] 10. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. *Nature* 414, 105-111 (2001).
- [21] 11. Singh, S.K. et al. *Nature* 432, 396-401 (2004).
- [22] 12. Gan, H.K., Kaye, A.H. & Luwor, R.B. *official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 16, 748-754 (2009).
- [23] 13. Fan, Q.W. et al. *Cancer cell* 24, 438-449 (2013).
- [24] 14. Nathanson, D.A. et al. *Science* 343, 72-76 (2014).
- [25] 15. Fenstermaker, R.A. & Ciesielski, M.J. *Oncogene* 19, 4542-4548 (2000).
- [26] 16. Huang, P.H., Xu, A.M. & White, F.M. *Science signaling* 2, re6 (2009).
- [27] 17. Ivanescu, A.M., Oprea, M., Turbatu, A., Colita, A. & Lupu, A.R. *Maedica* 9, 217-218 (2014).
- [28] 18. Rushworth, S.A., MacEwan, D.J. & Bowles, K.M. *The New England journal of medicine* 369, 1277-1278 (2013).
- [29] 19. Byrd, J.C. et al. *The New England journal of medicine* 369, 32-42 (2013).
- [30] 20. Wang, M.L. et al. *The New England journal of medicine* 369, 507-516 (2013).
- [31] 21. Gao, W. et al. *Journal of the National Cancer Institute* 106 (2014).
- [32] 22. Baras, A., Yu, Y., Filtz, M., Kim, B. & Moskaluk, C.A. *Oncogene* 28, 2919-2924 (2009).
- [33] 23. DePristo, M.A. et al. *Nature genetics* 43, 491-498 (2011).
- [34] 24. Cibulskis, K. et al. *Nature biotechnology* 31, 213-219 (2013).
- [35] 25. Banerji, S. et al. *Nature* 486, 405-409 (2012).
- [36]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [37] 본 발명자들은 교모세포종 환자에서 이브루티닙의 감수성과 관련된 유전자군을 선별하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 선별된 EGFRvIII(epidermal growth factor receptor variant 3) 변이가 교모세포종 환자에서 이브루티닙의 반응을 예측할 수 있는 인자인 것을 규명함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[38] 따라서, 본 발명의 목적은 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성 또는 예후의 판단에 유용한 정보를 제공하기 위해 EGFRvIII 변이의 존재 여부를 검사하는 방법을 제공하는데 있다.

[39] 본 발명의 다른 목적은 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성 예측용 키트를 제공하는데 있다.

[40]

[41] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

[42]

과제 해결 수단

[43] 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 교모세포종(glioblastoma multiforme) 환자의 이브루티닙(ibrutinib)에 대한 감수성 또는 예후의 판단에 유용한 정보를 제공하기 위해 EGFRvIII 변이의 존재 여부를 검사하는 방법을 제공한다:

[44] (a) 대상자로부터 분리한 생물학적 시료로부터 핵산 분자 또는 단백질을 분리하는 단계; 및

[45] (b) (i) 상기 분리된 핵산 분자로부터 서열목록 제1서열의 폴리뉴클레오타이드 또는 (ii) 상기 분리된 단백질로부터 서열목록 제2서열의 단백질을 검출하는 단계로 상기 서열목록 제1서열의 폴리뉴클레오타이드 또는 서열목록 제2서열의 아미노산이 검출되는 경우, 상기 대상자는 증가된 이브루티닙 감수성을 갖는다.

[46]

[47] 본 발명자들은 교모세포종 환자에서 이브루티닙의 감수성과 관련된 유전자군을 선별하기 위해 예의 연구 노력하였고, 그 결과, 선별된 EGFRvIII 변이가 교모세포종 환자에서 이브루티닙의 반응을 예측할 수 있는 인자인 것을 규명하였다.

[48] 하기 실시예에서 확인하는 바와 같이, 환자유래 교모세포종 표적항암제 스크리닝을 통하여 교모세포종 EGFRvIII 변이에서 이브루티닙의 특이적 감수성을 확인하였고, 이를 통하여 이브루티닙에 대한 민감도를 예측할 수 있다.

[49] 본 명세서에서 사용되는 용어 “이브루티닙 감수성”은 이브루티닙에 대한 반응성을 나타내며, EGFRvIII 변이를 갖는 교모세포종 환자는 이브루티닙에 대하여 증가된 감수성을 나타내어 EGFRvIII 변이를 갖지 않는 교모세포종 환자와 비교하여 이브루티닙에 의한 치료 효과가 우수하게 나타난다.

[50] 본 명세서에서 용어 “생물학적 시료”는 체외로 분리된 교모세포종 환자의 생체 시료로서, 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 세포, 모발 또는 조직 시료를 의미한다.

[51] 본 명세서에서 용어 “핵산분자”는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다 (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New

- York(1980); Uhlman 및 Peyman, ChemicalReviews, 90:543-584(1990)).
- [52] 본 발명의 방법에서 출발물질이 gDNA인 경우, gDNA의 분리는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Rogers & Bendich (1994)).
- [53] 출발물질이 mRNA인 경우에는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 총 RNA를 분리하여 실시된다(참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162:156(1987)). 분리된 총 RNA는 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성된다. 상기 총 RNA는 동물세포로부터 분리된 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라본 발명의 방법에 있어서, 상기 단계 (b)에서 서열목록 제1서열의 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수 있다.
- [54] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 서열목록 제1서열의 폴리뉴클레오타이드의 검출은 PCR(Polymerase Chain Reaction), 혼성화(hybridization), 시퀀싱(sequencing), 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 또는 NGS(next generation sequencing) 방식을 이용하여 실시할 수 있다.
- [55] 또한, 본 발명에서 서열목록 제1서열의 폴리뉴클레오타이드의 검출에 응용될 수 있는 기술은, 형광 인 situ 혼성화(FISH), 직접적 DNA 서열결정, PFGE 분석, 서던 블롯 분석, 단일-가닥 컨퍼메이션 분석 (SSCA, Orita et al., PNAS, USA 86:2776(1989)), RNase 보호 분석 (Finkelstein et al., Genomics, 7:167(1990)), 닛트 블롯 분석, 변성 구배 젤 전기영동 (DGGE, Wartell et al., Nucl.Acids Res., 18:2699(1990)), 뉴클레오타이드 미스매치를 인식하는 단백질(예: *E. coli*의 mutS 단백질)을 이용하는 방법 (Modrich, Ann. Rev. Genet., 25:229-253(1991)) 및 유전자 증폭 방법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [56] 상기 단계 (b)에서 서열목록 제2서열의 단백질 검출은 생물학적 시료에서 상기 EGFRvIII 변이 단백질의 존재 여부를 확인하는 과정으로, 바람직하게는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 항원-항체 반응 방식으로 실시할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA:Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 상기 예에 의해 본 발명의 분석방법이 제한되는 것은 아니다.
- [57]
- [58] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 (i) 서열목록 제2서열의 단백질에

특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer), 또는 (ii) 서열목록 제1서열의 폴리뉴클레오타이드에 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 교모세포종(glioblastoma multiforme) 환자의 이브루티닙(ibrutinib)에 대한 감수성 예측용 키트를 제공한다.

- [59] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성 예측용 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트일 수 있다.
- [60] 상기 면역분석용 키트는 면역분석 방식, 즉 항원-항체 반응 방식으로 실시될 수 있다. 이 경우, 상술한 본 발명의 EGFRvIII 변이 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 이용하여 실시된다.
- [61] 본 발명에서 “항체”란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.
- [62] 본 발명에서 이용되는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다.
- [63] 폴리클로날 항체는 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.
- [64] 본 발명의 방법을 항체 또는 앵타머를 이용하여 실시하는 경우, 본 발명은 통상적인 면역분석 방법에 따라 실시하여 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성을 예측하는데 이용될 수 있다.
- [65] 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에

한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzymelinked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

- [66] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커로서 EGFRvIII 변이 단백질을 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [67] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 마커에 대한 항체와 상기 세포 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다.
- [68] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.
- [69] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfat e)과 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [70] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 본 발명의 마커에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, 마커 단백질에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계;

- 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.
- [71] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450), 방사능물질((예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.
- [72] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.
- [73] 본 발명의 다른 변형 예에 따르면, 항체 대신에 본 발명의 마커에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용할 수 있다. 앵타머는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., *Nature* 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [74] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널을 분석함으로써, 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성을 예측할 수 있다. 즉, 치료에서 본 발명의 마커에 대한 시그널이 나오는 경우에는 이브루티닙에 대하여 증가된 감수성을 갖는 것으로 판단된다.
- [75] 본 발명에서 키트의 종류의 예로는 면역크로마토그래피 스트립 키트, 루미넥스 어세이 키트, 단백질 마이크로어레이 키트, 엘라이자 키트, 또는 면역학적 도트 키트등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명에서 사용 가능한 키트의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [76] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성 예측용 키트는 마이크로어레이용 키트일 수 있다.
- [77] 본 발명의 감수성 예측용 키트에서 이용되는 프로브 또는 프라이머는 서열목록 제1서열의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 본 명세서에서 용어 “상보적(complementary)”은 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건 하에서 상기 서열목록 제1서열의 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 용어 “상보적”은 용어 완전 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 상기 서열목록 제1서열의 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화 할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch)

염기서열을 가질 수 있다.

- [78] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.
- [79] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상기 서열목록 제1서열의 뉴클레오티드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상기 서열목록 제1서열의 뉴클레오티드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [80] 본 명세서에서 사용된 용어 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함하고 타깃 뉴클레오티드 서열에 특이적으로 혼성화 할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일쇄이며, 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명의 프로브는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산(PNA)(M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.
- [81] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이

- 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate)상에 고정화된다.
- [82] 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 젤, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.
- [83] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [84] 본 발명의 이브루티닙에 대한 감수성 예측용 키트는 혼성화(hybridization)에 기초하여 실시할 수 있다. 이 경우, 상기 서열목록 제1서열의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브가 이용된다. 상기 서열목록 제1서열의 뉴클레오티드 서열에 혼성화 되는 프로브를 이용하여 혼성화-기초 분석을 하여 이브루티닙에 대한 민감도 여부를 판단할 수 있다. 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P32 및 S35), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, Nick 트랜스레이션(nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labellingsystems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [85] 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생물학적 시료에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다.
- [86] 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.

- [87] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다.
- [88] 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65°C 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다.
- [89] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다. 따라서 본 발명의 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성을 예측하는 방법을 혼성화에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브를 핵산 시료에 혼성화시키는 단계; (ii) 상기 혼성화 반응 발생 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성을 판단할 수 있다. 즉, 서열목록 제1서열에 대한 혼성화 시그널이 나오는 경우, 이브루티닙에 대하여 증가된 감수성을 나타내는 것으로 판단된다.

- [90] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성 예측용 키트는 유전자 증폭 키트일 수 있다.
- [91] 본 명세서에 기재된 용어“증폭”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에서 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등 (EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19) (WO 88/10315), 자가유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CPPCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)(21, 22) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)(23)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다. PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(realtime)PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다. 본 발명의 진단용 키트를 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드의 존재 여부를 조사한다. 본 발명은 원칙적으로 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다.

- [92] mRNA를 얻기 위하여, 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 세포내의 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: PNAS USA, 85:8998(1988); Libert F, et al. *Science*, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다.
- [93] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B.D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- [94] 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중합효소 I의 “클레나우” 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다.
- [95] 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 원하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 요구된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.
- [96] 본 발명에 있어서 어닐링은 타겟 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격 조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.
- [97] 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰

및 분석함으로써 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드에 대한 존재 여부를 조사한다. 이러한 증폭반응을 통하여 생물학적 시료에서 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드가 존재하는 것으로 나오는 경우 이브루티닙에 대하여 증가된 감수성을 나타내는 것으로 판단된다. 따라서 본 발명의 이브루티닙에 대한 감수성 마커의 검출 방법을 cDNA를 이용하는 증폭반응에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 어닐링되는 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계; 및 (ii) 상기 증폭 반응의 산물을 분석하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드의 존재 여부를 결정하는 단계를 포함한다.

- [98] 본 발명의 키트는 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[99]

발명의 효과

- [100] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [101] (i) 본 발명은 EGFRvIII 변이의 존재 여부를 검사하여 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성 또는 예후를 판단하는 방법 및 교모세포종 환자의 이브루티닙에 대한 감수성 예측용 키트를 제공한다.
- [102] (ii) 본 발명을 이용하면 교모세포종 환자에서 BTK/BMX/BLK 특이적 억제제인 이브루티닙의 반응성을 예측할 수 있다.
- [103] (iii) 본 발명은 EGFRvIII 변이 환자에게 이브루티닙을 투약할 수 있는 근거로 유용하게 이용될 수 있다.

[104]

도면의 간단한 설명

- [105] 도 1은 이브루티닙에 대한 감수성을 EGFRvIII 변이를 가진 환자유래 세포 및 무변이 세포에서 측정한 결과이다($p=0.0001$).
- [106] 도 2는 이브루티닙 처리에 의해 EGFRvIII 변이 세포의 종양구(Tumor sphere) 형성능이 감소하는 것을 확인한 결과이다.
- [107] 도 3은 이브루티닙 처리에 의해 EGFR 관련 신호계(pEGFR, pAKT, pS6K)의 활성이 감소하는 것을 확인한 결과이다.
- [108] 도 4는 EGFRvIII 유전자 주입 세포에서 대조군에 비해 이브루티닙의 감수성이 증가하는 것을 확인한 결과이다.

[109]

발명의 실시를 위한 형태

[110] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[111]

[112] **실시예**[113] **실험방법**

[114] 1. 교모세포종 세포

[115] 교모세포종 시료 및 임상 기록은 IRB(Institutional Review Boards)에 따라 삼성 메디컬 센터에서 수술을 받은 교모세포종 환자로부터 수득하였다. 유전적 분석을 위해 약 5×5×5 mm³의 외과 샘플을 액체 질소를 이용하여 동결시켰다. 외과 샘플의 일부는 종래에 알려진 면역세포 제거 방법에 따라 효소를 이용하여 단일 세포로 분리하였다(7). 종양세포는 N2 및 B27(0.5X each; Invitrogen), 인간 재조합 bFGF(basic fibroblast growth factor) 및 EGF(epidermal growth factor, 20 ng/ml each; R&D systems)를 추가적으로 포함하는 신경세포 배지에서 배양하였다. 종양구 형성 인 비트로 제한희석 어세이를 포함하는 표준 어세이 및 면역블롯은 종래에 알려진 방법에 따라 실시하였다(7).

[116]

[117] 2. 전체 엑솜 시퀀싱

[118] 얼라인먼트

[119] Burrows- Wheeler Aligner(version 0.6.2)를 이용하여 FASTQ 파일을 인간 지놈 어셈블리(hg19)에 얼라인하였다(22). SAMtools, Picard(version 1.73, <http://picard.sourceforge.net>) 및 Genome Analysis ToolKit(GATK, version 2.5.2)을 이용해 분석 이전에 초기 얼라인 BAM 파일에 대하여 분류, 중복 판독 제거, 작은 삽입/결실(INDELs) 주위 서열에 대한 부분적인 재얼라인 판독 및 베이스 퀄리티 스코어의 재보정을 실시하였다(23).

[120]

[121] 돌연변이 콜링(mutation calling)

[122] 종양 및 정상 조직으로부터 체세포 돌연변이 콜링은 MuTect (version 1.1.4) 및 Somatic Indel Detector(GATK version 2.2)를 이용하여 실시하였다(24, 25). Variant Effect Predictor(VEP, version 73)는 콜링된 체세포 돌연변이에 대하여 생물학적 정보를 추출하는데 사용되었다. 본 발명에서 비유사(nonsynonymous) 체세포 돌연변이는 MAF(minor allele frequency) >0.20 및 돌연변이 대립유전자에 대한 판독 숫자가 >2인 경우, 추후 분석을 위해 콜링되었다.

[123]

[124] 카피 수 변화

[125] ngCGH 파이썬(python) 패키지는 매치된 정상 WES 데이터와 비교하여 종양 WES 데이터의 카피 수 변화를 측정하기 위해 사용되었다. 측정한 DNA 카피 수 분할을 R 패키지 “DNACopy” (version 1.30.0)를 이용하여 실시하였고, 각 유전자의 카피 수는 유전자의 모든 엑손 세그먼트의 평균 카피 수로 계산하였다. 정상군에 대한 종양군의 로그2 비율이 0.5 이상 또는 -0.5 이하일 경우, 카피 수는 각각 “증폭” 또는 “삭제”된 것으로 추정하였다.

[126]

[127] 엑손 스킵핑 & 유전자 융합 분석

[128] 싱글-엔드 맵핑 모드에서 GSNAP은 스플라이싱을 허용하는 hg19에 절단되지 않은 서열에 대한 판독 결과를 얼라인하기 위해 사용되었다. 비정규(non-canonical) 스플라이싱 연결을 스패닝하는 “스플리트(Split)” 판독을 분리하고, 스플리트 판독 수가 2 이상일 경우 엑손-스킵핑 이벤트를 콜링하였다. 유전자 융합 분석을 위해 엑손-스킵핑 분석과 같은 방법을 이용하여 스패 융합 연결을 분리하고, 융합 이벤트를 콜링하였다.

[129]

[130] 3. RNA 시퀀싱

[131] 어떠한 미스매치, 삽입/결실 또는 스플라이싱을 허용하지 않고, GSNAP (version 2012-12-20)를 이용하여 hg19 상에 30 nt-절단된 서열 판독을 맵핑하였다. 얼라인먼트 SAM 파일 및 bedTools(bamToBed, version 2.16.2)로 분류된 SAMtools는 BED 파일로 정리하는데 사용되었다. RPKM 값은 R 패키지 DEGseq를 이용하여 측정하였다.

[132]

[133] 4. 세포 기반 HTS 약물 스크리닝

[134] 무혈청 배지에서 배양한 1차 교모세포종 세포를 384-웰 플레이트에 웰당 500개 세포씩 시딩하였다. 플레이팅 2시간 후, Janus Automated Workstation (PerkinElmer)를 이용하여 4배 및 7-포인트 단계 희석 방법으로 약물을 세포에 처리하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양한 다음, 파이어플라이 루시퍼라아제(ATPLite™ 1step, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 기초로 한 아데노신 3인산염 모니터링 시스템을 이용하여 세포 생존능을 분석하였다. 생존 세포는 EnVision Multilabel Reader(PerkinElmer)를 이용하여 측정하였다. 인 비트로 약물 스크리닝에서 세포 및 DMSO(vehicle) 만을 포함하는 대조군 웰이 각 어레이 플레이트에 포함되도록 하였다. 이러한 대조군은 플레이트에서 상대적인 세포 생존능을 계산하고, 플레이트 당 데이터를 정규화하기 위해 사용하였다. 데이터는 PRISM(Graphpad USA)를 이용하여 곡선화하였으며, 곡선하면적을 계산하였다.

[135]

[136] 5. 약물 반응 및 유전자 변화 연관성 분석

- [137] 점 돌연변이, 삽입/결실, 엑손 스킵핑, 유전자 융합 및 카피 수 변화(“중폭”, “결실” 및 “야생형”)와 같은 별개의 이벤트에 대한 약물 반응성 및 유전적 변화 사이의 연관성을 분석하기 위해 정규분포(Kolmogorov-Smirnov) 검정(null hypothesis: uniform distribution) 및 Wilcoxon 순위합검정을 실시하였다. 약물 반응성 및 유전자 발현 사이의 관계를 분석하기 위해 피어슨 상관 검정을 이용하였다.
- [138]
- [139] 6. 웨스턴 블롯
- [140] 환자 유래 교모세포종 세포를 차가운 PBS로 세척하고, 프로테아제 및 포스파타아제 억제제 칵테일(Thermo scientific)을 포함하는 용해 버퍼(150 mM 염화나트륨, 1% 트리톤 X-100, 1% 소듐 디옥시콜레이트, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCL 및 2mM EDTA)를 처리한 다음 수득하였다. 불용해성 물질은 4°C에서 15분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 제거하였다. 단백질을 SDS-PAGE로 분리하였다. 면역블롯팅은 pEGFR(Y1068), EGFR, pAKT(S473), AKT, pERK(T202/Y204), ERK, pSTAT3(Y705) 및 STAT3(all from Cell Signaling Technology)에 특이적인 항체를 이용하여 실시하였다.
- [141]
- [142] 7. 종양구(Tumorsphere) 형성 어세이
- [143] 교모세포종 환자 시료로부터 유래한 교모세포종 세포 및 이중 이식 종양은 단일세포 현탁으로 분리하였고, 그 다음 다양한 시딩 농도(웰당 1-500 세포)로 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 세포를 37°C에서 1-2주 동안 배양하였다. 각 웰에 대하여 신경구-유사 세포군 형성을 측정하였다. 통계학적 유의성은 Extreme Limiting Dilution Analysis(ELDA; Walter+Eliza Hall Bioinformatics)를 이용하여 계산하였다.
- [144]
- [145] 실험결과
- [146] 1. 이브루티닙에 높은 감수성을 나타낸 EGFRvIII 변이군
- [147] 교모세포종 환자유래세포 50종을 이용하여 이브루티닙의 약물 감수성을 7 용량으로 관찰 후(20 μ M - 5 nM), 약물 처리 6일째 DMSO 대조군 대비 세포 생존률(%) 값을 이용하여 DRC(Dose response curve)를 구한 후 곡선하면적(Area under curve) 값을 기준으로 측정하였다. EGFRvIII 변이를 갖는 세포와 무변이 세포군으로 분류 후 이브루티닙 반응을 비교해 보았을 때, 유의하게 EGFRvIII 변이 군에서 이브루티닙에 높은 감수성을 나타냈다(Wilcox P=0.0001)(도 1).
- [148]
- [149] 2. EGFRvIII 변이에 따른 종양구 형성능 변화
- [150] EGFR WT(GBM591) 및 EGFRvIII 변이 세포주(NS626 및 GBM352R)에 DMSO 또는 이브루티닙(100 또는 500 nM)을 처리하고 종양구 형성능을 Limiting Dilution Assay를 이용하여 관찰하였다. 24웰 플레이트에 다양한 농도(웰당 1-250

세포)로 세포를 플레이트하고 2주간 배양한 다음, 종양구의 형성 유무를 관찰하였다. 세포의 대표 이미지는 도 2에 나타냈다. EGFR WT 세포(GBM591)에서는 이브루티닙 처리에 따른 종양구 형성능에 차이가 없지만, EGFRvIII 세포(NS626, GBM352R)에서는 이브루티닙 농도 의존적으로 유의한 종양구 형성 억제 효과가 나타났다.

[151]

[152] 3. EGFRvIII 변이에 따른 EGFR 신호계 활성 변화

[153] GBM591 및 NS626 세포에 이브루티닙(0, 100 및 500 nM)을 처리하고 24시간 후 세포를 수거하여 용해시킨 다음, pEGFR(Y1068), EGFR, pAKT, AKT, pS6K 및 S6K에 특이적인 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시하였다. 베타-액틴은 로딩 대조군으로 사용하였다(도 3). EGFR 및 pAKT 및 pSTAT3와 같은 다운스트림 시그널이 이브루티닙 처리에 의해 EGFRvIII 세포(NS626)에서 농도 의존적으로 현저히 감소하였다.

[154]

[155] 4. EGFRvIII 유전자 주입 세포에서 이브루티닙의 감수성

[156] pLenti 대조군 벡터 또는 EGFRvIII(서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드)를 렌티바이러스 시스템을 이용하여 GBM352L 세포에 주입하였다. GBM352L-벡터 또는 -EGFRvIII 주입 세포에 이브루티닙(20 μ M - 5 nM에서 7가지 용량)을 6일간 처리하였다. 세포 생존율은 ATPlite cell viability 키트를 이용하여 측정하였으며, 생존율은 DMSO 대조군 생존율과 비교하여 평가하였다(도 4). 이브루티닙에 대한 감수성은 EGFR WT 세포(GBM352L)에 EGFRvIII를 주입한 경우, 현저히 증가하였다.

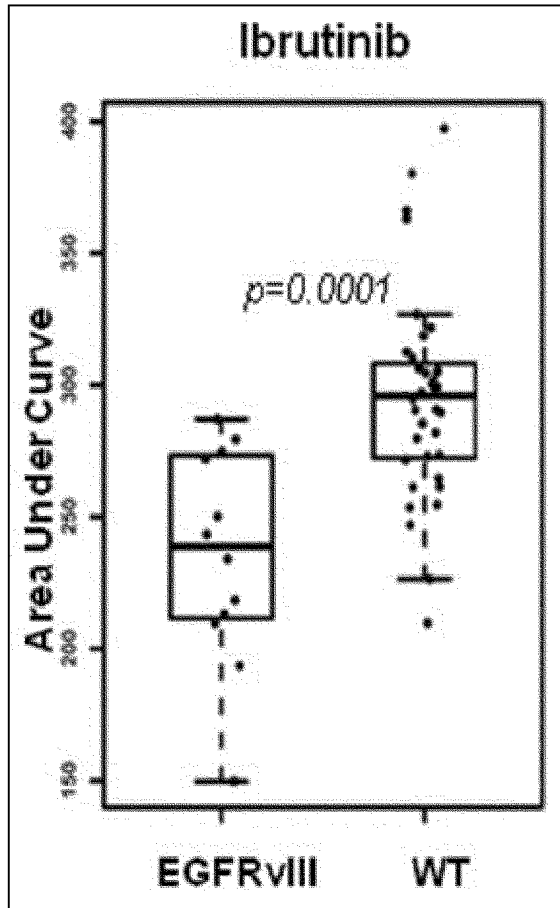
[157]

[158] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

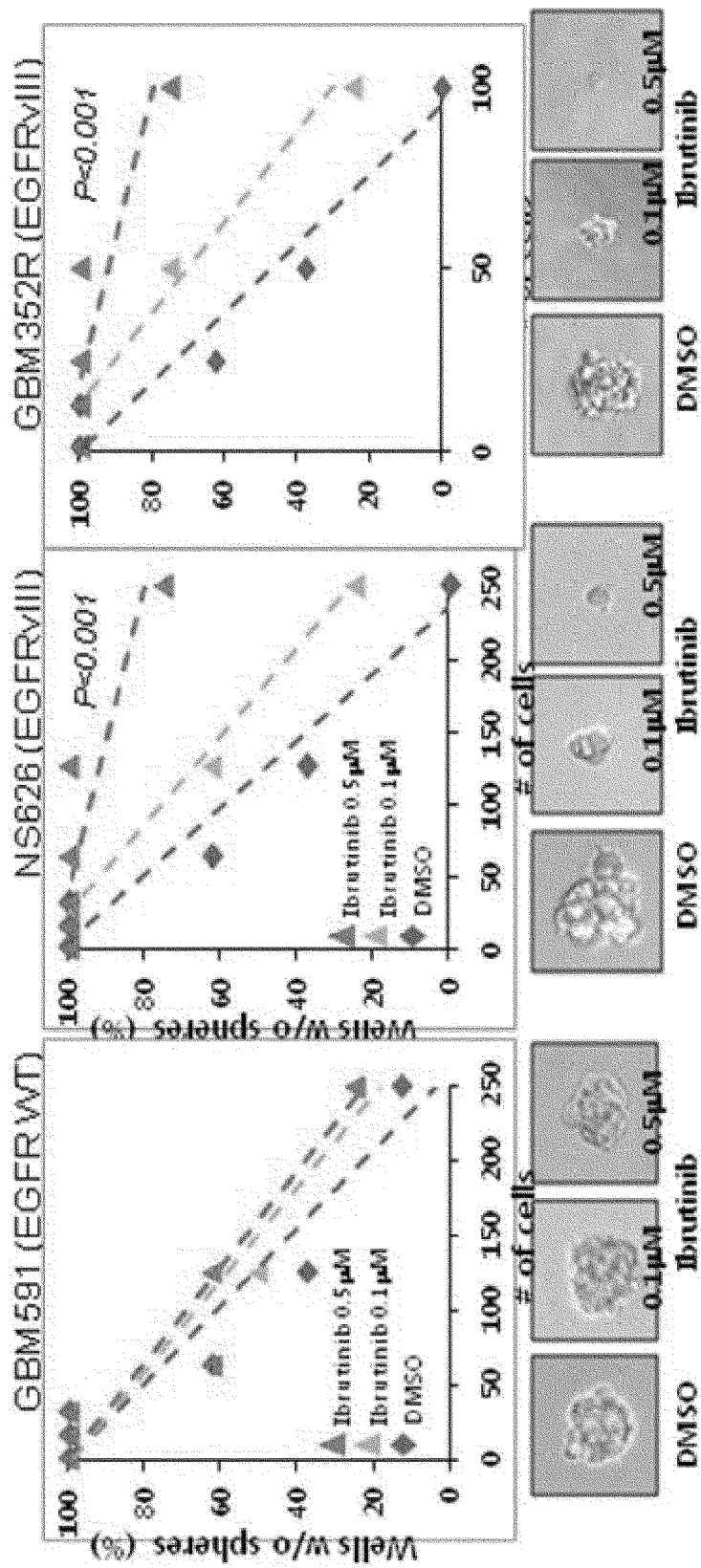
청구범위

- [청구항 1] 다음의 단계를 포함하는 교모세포종(glioblastoma multiforme) 환자의 이브루티닙(ibrutinib)에 대한 감수성 또는 예후의 판단에 유용한 정보를 제공하기 위해 EGFRvIII 변이의 존재 여부를 검사하는 방법:
 (a) 대상자로부터 분리한 생물학적 시료로부터 핵산 분자 또는 단백질을 분리하는 단계; 및
 (b) (i) 상기 분리된 핵산 분자로부터 서열목록 제1서열의 폴리뉴클레오타이드 또는 (ii) 상기 분리된 단백질로부터 서열목록 제2서열의 단백질을 검출하는 단계로 상기 서열목록 제1서열의 폴리뉴클레오타이드 또는 서열목록 제2서열의 아미노산이 검출되는 경우, 상기 대상자는 증가된 이브루티닙 감수성을 갖는다.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 서열목록 제1서열의 폴리뉴클레오타이드의 검출은 PCR(Polymerase Chain Reaction), 혼성화(hybridization), 시퀀싱(sequencing), 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 또는 NGS(next generation sequencing) 방법으로 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 서열목록 제2서열의 단백질의 검출은 항원-항체 반응 방식으로 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 세포, 모발 또는 조직 시료인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] (i) 서열목록 제2서열의 단백질에 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 애포머(aptamer), 또는 (ii) 서열목록 제1서열의 폴리뉴클레오타이드에 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 교모세포종(glioblastoma multiforme) 환자의 이브루티닙(ibrutinib)에 대한 감수성 예측용 키트.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트인 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 7] 제 5 항에 있어서, 상기 키트는 마이크로어레이용 키트인 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 8] 제 5 항에 있어서, 상기 키트는 유전자 증폭 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

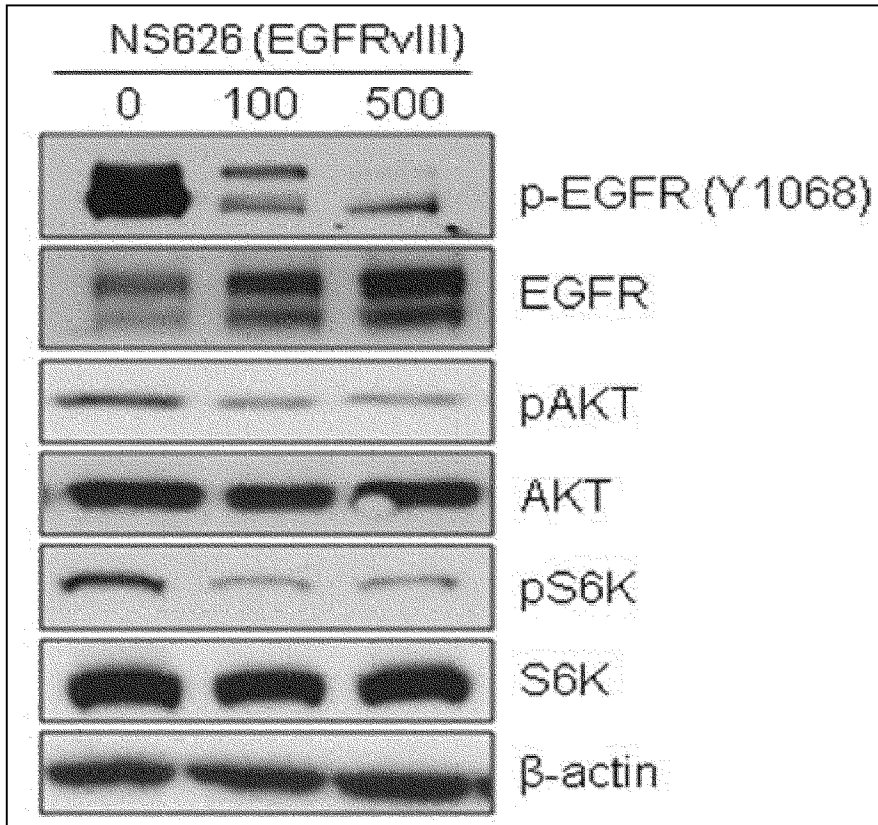
[도1]



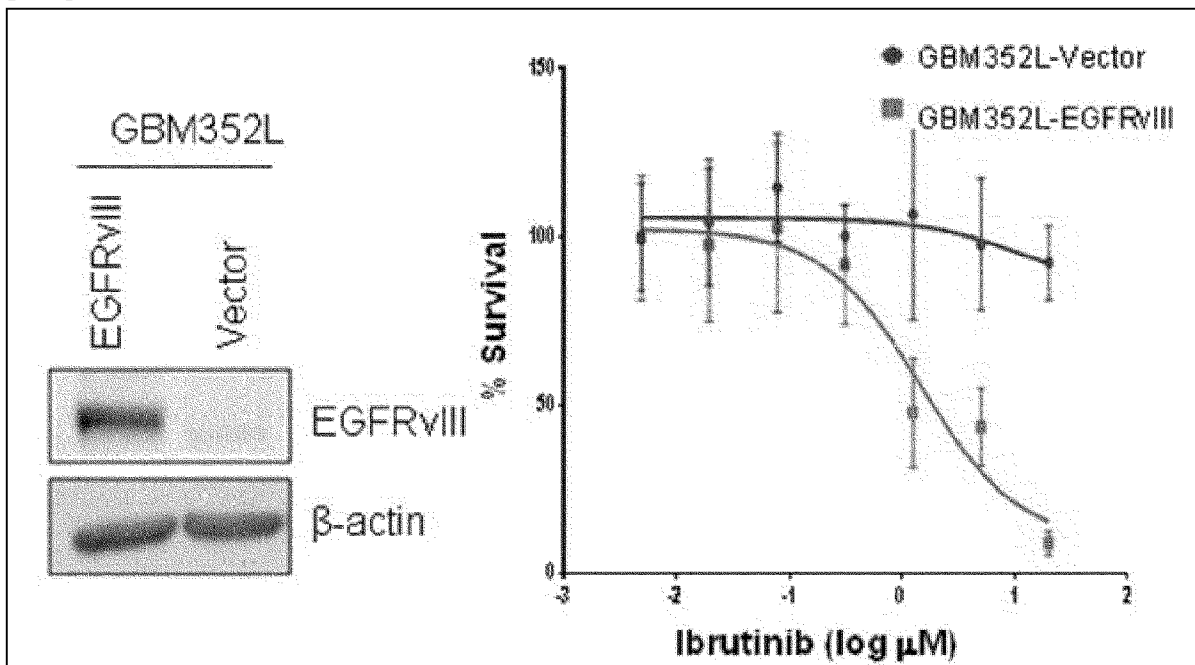
[도2]



[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/006006**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, A61K 31/519(2006.01)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 1/68; C07K 16/28; A61K 31/52; A61P 35/00; A61K 31/519; G01N 33/574

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: glioblastoma multiforme, ibrutinib, EGFRvIII, sensitivity, prognosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WIKSTRAND et al., "Cell Surface Localization and Density of the Tumor-associated Variant of the Epidermal Growth Factor Receptor, EGFRvIII", Cancer Research, vol. 57, no. 18, pages 4130-4140 (15 September 1997) See abstract.	1-8
A	OLAPADE-OLAOPA et al., "Evidence for the Differential Expression of a Variant EGF Receptor Protein in Human Prostate Cancer", British Journal of Cancer, vol. 82, no. 1, pages 186-194 (January 2000) See abstract.	1-8
A	KR 10-2014-0077208 A (PHARMACYCLICS INC.) 23 June 2014 See the entire document.	1-8
A	KR 10-2015-0032340 A (PHARMACYCLICS INC.) 25 March 2015 See abstract.	1-8
PA	WO 2015-143382 A1 (ABBVIE INC.) 24 September 2015 See claim 1.	1-8



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

"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

27 SEPTEMBER 2016 (27.09.2016)

Date of mailing of the international search report

27 SEPTEMBER 2016 (27.09.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/006006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0077208 A	23/06/2014	AU 2014-325804 A1	01/05/2014
		CA 2851808 A1	25/04/2013
		CN 104039325 A	10/09/2014
		EP 2771010 A2	03/09/2014
		EP 2771010 A4	01/04/2015
		JP 2014-530877 A	20/11/2014
		US 2014-0303191 A1	09/10/2014
		WO 2013-059738 A2	25/04/2013
KR 10-2015-0032340 A	25/03/2015	AU 2013-293087 A1	30/01/2014
		CA 2879570 A1	30/01/2014
		CN 104704129 A	10/06/2015
		EP 2877598 A1	03/06/2015
		JP 2015-530080 A	15/10/2015
		MX 2015001081 A	14/10/2015
		US 2015-0184249 A1	02/07/2015
		WO 2014-018567 A1	30/01/2014
WO 2015-143382 A1	24/09/2015	US 2015-337042 A1	26/11/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**C12Q 1/68(2006.01)I, G01N 33/574(2006.01)I, A61K 31/519(2006.01)I****B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; C07K 16/28; A61K 31/52; A61P 35/00; A61K 31/519; G01N 33/574

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: 교모세포종, 이브루티닙, EGFRvIII, 감수성, 예후

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WIKSTRAND 등, 'Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII', Cancer Research, 57권, 18호, 페이지 4130-4140 (1997.09.15) 초록 참조.	1-8
A	OLAPADE-OLAOPA 등, 'Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer', British Journal of Cancer, 82권, 1호, 페이지 186-194 (2000.01) 초록 참조.	1-8
A	KR 10-2014-0077208 A (파마시클릭스, 인코포레이티드) 2014.06.23 문서 전체 참조.	1-8
A	KR 10-2015-0032340 A (파마시클릭스, 인코포레이티드) 2015.03.25 요약 참조.	1-8
PA	WO 2015-143382 A1 (ABBVIE INC.) 2015.09.24 청구항 1 참조.	1-8

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 09월 27일 (27.09.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 09월 27일 (27.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0077208 A	2014/06/23	AU 2014-325804 A1 CA 2851808 A1 CN 104039325 A EP 2771010 A2 EP 2771010 A4 JP 2014-530877 A US 2014-0303191 A1 WO 2013-059738 A2	2014/05/01 2013/04/25 2014/09/10 2014/09/03 2015/04/01 2014/11/20 2014/10/09 2013/04/25
KR 10-2015-0032340 A	2015/03/25	AU 2013-293087 A1 CA 2879570 A1 CN 104704129 A EP 2877598 A1 JP 2015-530080 A MX 2015001081 A US 2015-0184249 A1 WO 2014-018567 A1	2014/01/30 2014/01/30 2015/06/10 2015/06/03 2015/10/15 2015/10/14 2015/07/02 2014/01/30
WO 2015-143382 A1	2015/09/24	US 2015-337042 A1	2015/11/26