(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 9 월 13 일 (13.09.2012)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/121429 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/001558

(22) 국제출원일: 2011 년 3 월 7 일 (07.03.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교, 120-749 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김호근 (KIM, Ho Keun)** [KR/KR]; 서울특별시 강남구 도곡동 467 타워팰리스 D-2503, 135-270 Seoul (KR). **유권태 (YOU, Kwon Tae)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세의료원 의과대학 신관 512 호, 120-140 Seoul (KR). **김원규 (KIM, Won Kyu)** [KR/KR]; 서울특별시 송파구 석촌동 224-7 호 석촌빌라 B 동 402 호, 138-190 Seoul (KR). **이한나 (LEE, Han Na)** [KR/KR]; 서울특별시 양천구 목 1 동 목동아파트 7 단지 733 동 1306 호, 158-051 Seoul (KR). **신나라 (SHIN, Na Ra)** [KR/KR]; 경기도 고양시 일산동구 장항동 한솔프레미낭 1505 호, 410-314 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 서울특별시 관악구 인헌동 1659-2 청동빌딩 301 호, 151-832 Seoul (KR).

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

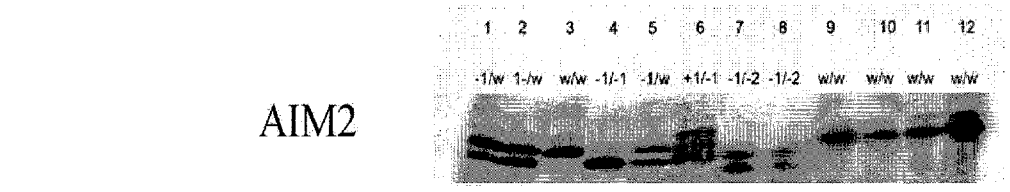
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,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

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title**: METHOD FOR CANCER CELL BIOMARKER IDENTIFICATION, AND AN NMD-IRRELEVANT CANCER CELL BIOMARKER IDENTIFIED BY MEANS OF THE METHOD

(54) **발명의 명칭** : 암 세포 바이오 마커를 동정하는 방법 및 상기 방법으로 동정한 NMD-무관 암 세포 바이오 마커

도 1



(57) **Abstract**: Provided are: a biomarker identification method for cancer cells; a biomarker for cancer cells identified by means of the method; a cancer diagnostic kit comprising the biomarker; a screening method for anticancer agents; and a pharmaceutical composition for preventing or treating cancer, comprising a pharmaceutically effective dose of an antibody or a peptide aptamer that binds specifically to a cancer specific protein. The biomarker identification method for cancer cells of the present invention does not involve examining individual genes one by one in order to test their potential as biomarkers, but rather uses a method involving twice screening genes wherein mutation frequently occurs by means of a bioinformatics technique, and thus the method of the present invention allows a plurality of biomarkers to be identified in a fashion which is very straightforward but nevertheless accurate.

(57) **요약서**: 본 발명은 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법, 상기 방법으로 동정된 암 세포에 대한 바이오 마커, 상기 바이오 마커를 포함하는 암 진단용 키트, 암 치료제의 스크리닝 방법 및 암특이적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드 앱타머의 약제학적 유효량을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법은 유전자 개개를 일일이 검사하여 바이오 마커로서의 가능성을 시험하는 것이 아니라, 생물정보학 기술을 통해 돌연변이가 잘 발생하는 유전자들을 2 차에 걸쳐 스크리닝 하는 방법을 사용하므로, 매우 간편하면서도 정확하게 다수의 바이오 마커를 동정할 수 있다.

WO 2012/121429 A1

【명세서】

【발명의 명칭】

암 세포 바이오 마커를 동정하는 방법 및 상기 방법으로 동정한 NMD-무관 암 세포 바이오 마커

【기술분야】

본 발명은 암 세포 바이오 마커를 동정하는 방법 및 상기 방법으로 동정한 NMD-무관 암 세포 바이오 마커에 관한 것이다.

【배경기술】

마이크로세틀리트란 특정 염기가 반복된 DNA의 서열을 말하며 개인마다 그 길이는 다르지만 누구나 마이크로세틀리트를 가지고 있다. 이와 같이 특정 염기 서열이 여러 번 반복되는 것은 흔하고 정상적인 것이다. 그러나, DNA 리페어 시스템에 문제가 생기는 경우 마이크로세틀리트의 길이가 비정상적으로 짧아지거나 길어질 수 있으며, 이로 인해 다양한 문제들이 발생할 수 있다. 예를 들어, 이와 같은 마이크로세틀리트의 불안정한 상태는 대장암, 자궁암, 난소암 및 위암 등 암에 있어서 중요한 요소로 알려져 있다.

대장암종의 한 세트는 고-마이크로세틀리트 불안정성(high microsatellite instability: MSI-H)을 나타낸다[1]. 구체적으로 MSI 경로는 DNA 뉴클레오타이드 미스매치 리페어(MMR)에 관여하는 유전자들의 한 유전자가 불활성됨으로써 촉발되며, 이는 반복성 및 비-반복성 DNA 서열에서 과도한 돌연변이를 유발한다[2-4]. MSI-H 종양에서 종양발생의 기전에는, 영향을 받은 유전자들의 코딩 부위 내에서 있는 마이크로세틀리트 반복 서열의 프레임쉬프트 변이가 관여하는 것으로 판단되며, 상기 유전자들의 불활성화는 종양 발생 및 진행에 직접적으로 관여하는 것으로 판단된다[5, 6]. 상기 프레임쉬프트 돌연변이는 비정상적인 mRNAs 및 단백질을 생성시킬 수 있고, 따라서 종양 특이적 항원이 생성될 수 있다. MSI-H 종양에서 높은 암주변 림프구 침윤 및 우수한 예후가 있다는 사실이 발표되었다[7, 8].

프레임쉬프트 돌연변이의 중요한 결과 중 하나는 미성숙 종결 코돈(premature termination codons: PTCs)이 형성되는 것이다. 포유동물 세포에서, 넌센스 돌연변이 또는 프레임쉬프트 돌연변이에 의한 PTC를 포함하는 mRNAs는 넌센스-중재 mRNA 파괴(nonsense-mediated mRNA decay: NMD)에 의해 잘 분해되며, 이는 절단 단백질의 생성과 관련된 나쁜 영향을 피할 수 있도록 한다[9, 10]. PTCs가 있는 mRNAs의 NMD는 마지막 엑손-엑손 연결부에 대한 PTC의 위치에 의해 PTC가 인지되는 기전에 의해 중재된다. 일반적으로, 마지막 엑손-엑손 연결부의 업스트림으로부터 55 뉴클레오타이드 이상 이격된 PTC를 포함하는 포유동물 전사체는 NMD 작용을 받는다(NMD-민감성)[11-13].

프레임쉬프트 돌연변이-유래 mRNA에서의 PTC 형성 및 NMD에 의한 이들의 파쇄는 널리 수용되고 있지만, 마지막 엑손-엑손 연결부에서 55 뉴클레오타이드 이내에 위치해 있거나 또는 다운스트림에 위치해 있는 PTCs는 NMD에 의해 인식되지 않으며(NMD-무관성), 어떠한 NMD-작용성 mRNAs는 NMD로부터 벗어날 수 있다(NMD-탈출)[14, 15]. MSI-H 종양에서, 몇 개의 NMD-민감성 및 NMD-탈출 PTC-포함 mRNA가 보고된 바 있다. 앞선 연구는, 돌연변이 상태에 따라 다양한 세포주의 영향 받은 유전자들의 총 mRNAs를 비교 하였다[16]. 그러나, 이 연구는 야생형 및 변이형 mRNAs 사이에서의 차이에 대한 결과는 보고하고 있지 않으며, 영향을 받은 유전자들의 mRNA 양이 세포주에 따라 변화가 있을 수 있다는 것을 언급하고 있지 않다. 또한, NMD-탈출 PTC-포함 mRNAs의 발현 상태 및 생물학적 영향은 아직도 규명되어 있지 않다.

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.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명자들은 간단하고도 정확하게 암 세포에 대한 신규한 바이오

마커를 동정하는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였고 그 결과 암세포 내 프레임 쉬프트 돌연변이 상태로 존재하는 유전자를 한 번에 다량으로 동정해 냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 동정된 암 세포에 대한 바이오 마커를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오 마커를 포함하는 암 진단용 키트를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 암특이적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드 앱타머의 약제학적 유효량을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 약제학적 조성물을 필요로 하는 대상(Subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【기술적 해결방법】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법을 제공한다:

(a) 9개 이상의 모노뉴클레오타이드 반복을 갖는 유전자를 선별하는 제1차 스크리닝 단계; 및

(b) 상기 제1차 스크리닝된 유전자 중 모노뉴클레오다이드의 반복이 코딩지역에 있고, 미성숙 종결코돈이 마지막 엑손에 있거나 또는 마지막 엑손 결합부에서 업스트림 쪽으로 55 bp 이내에 있는 유전자를 선별하는 제2차

스크리닝 단계.

본 발명자들은 간단하고도 정확하게 암 세포에 대한 신규한 바이오 마커를 동정하는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였고 그 결과 암세포 내 프레임 쉬프트 돌연변이 상태로 존재하는 유전자를 한 번에 다량으로 동정해 냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명의 제1차 스크리닝 단계에서는, 인간의 유전자에서 일정 개수이상의 모노뉴클레오타이드 반복을 갖는 유전자를 선별하여 바이오 마커를 동정하기 위한 범위를 설정하는데, 9개 이상의 모노뉴클레오타이드 반복을 갖는 유전자를 선별하는 것이 바람직하다. 모노뉴클레오타이드 반복이 9개 이상인 경우 프레임 쉬프트 돌연변이가 용이하게 일어날 수 있다.

상기 범위 설정을 위하여 인간의 유전자 목록을 제공하는 데이터베이스를 이용할 수 있으며, 이러한 데이터베이스의 예로는 SelTarbase(www.seltarbase.org)가 있다. SelTarbase는 인간의 모든 유전자에 대한 정보를 제공하며, 이를 이용하면 9개 이상의 모노뉴클레오타이드 반복을 갖는 유전자를 간편하고도 정확하게 선별할 수 있다.

본 발명의 제2차 스크리닝 단계에서는 제1차 스크리닝된 유전자 중 모노뉴클레오다이드의 반복이 코딩지역에 있고, 미성숙 종결코돈이 마지막 엑손에 있거나 또는 마지막 엑손 결합부에서 업스트림 쪽으로 55 bp 이내에 있는 유전자를 선별한다.

프레임쉬프트 돌연변이의 결과 발생하는 넌센스 mRNAs는 넌센스-중재 mRNA 파괴(nonsense-mediated mRNA decay: NMD)에 의해 잘 분해되며, 이는 절단 단백질의 생성과 관련된 나쁜 영향을 피할 수 있도록 한다. 그러나, 미성숙 종결코돈이 마지막 엑손에 있거나 또는 마지막 엑손 결합부에서 업스트림 쪽으로 55 bp 이내에 있는 경우에는 NMD에 의해 인식되지 않으며, 따라서 어떠한 NMD-작용성 mRNAs는 NMD로부터 벗어날 수 있다. 이러한 넌센스 mRNA가 NMD에 의해 파괴되지 않고 단백질이 발현되는 경우 인체에 암과 같은 질병을 일으키게 된다. 따라서, 제2차 스크리닝 단계에서는 제1차 스크리닝된 유전자 중

모노뉴클레오다이드의 반복이 코딩지역에 있고, 미성숙 종결코돈이 마지막 엑손에 있거나 또는 마지막 엑손 결합부에서 업스트림 쪽으로 55 bp 이내에 있는 유전자를 선별함으로써, 암세포에 대한 바이오 마커가 될 수 있는 유전자의 범위를 더욱 좁게 설정할 수 있다.

미성숙 종결코돈의 위치를 확인하는 방법은 분자생물학 및 관련 분야에서 알려진 통상적인 방법에 의할 수 있다. 예컨대, VectorNTI 소프트웨어 또는 NCBI 데이터베이스를 이용해 오픈리딩프레임과 엑손접합부위, 시작코돈 및 종결코돈을 모두 표시하여 기준을 만족하는 유전자만을 선택하는 방법을 사용할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에서, 상기 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법은 상기 제2차 스크리닝 단계 이후에 제2차 스크리닝 단계에서 선별된 유전자가 실제로 마이크로세틀리트 불안정 암세포 내 프레임 쉬프트 돌연변이 상태로 존재하는지를 확인하는 단계를 추가적으로 포함한다. 상기 제2차 스크리닝 단계에서 선별된 유전자가 프레임 쉬프트 돌연변이 상태로 존재하는지 확인 할 수 있는 암세포는 마이크로세틀리트 불안정성을 지닌 것으로 알려진 암세포라면 아무 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 대장암세포, 자궁암세포, 난소암세포, 위암세포, 뇌종양세포, 후두암세포, 유방암세포, 폐암세포, 식도암세포, 간암세포, 췌장암세포, 담낭암세포, 전립선암세포, 방광암세포, 소아암세포 및 피부암세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나일 수 있으며, 더 바람직하게는 대장암세포, 자궁암세포, 난소암세포 및 위암세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나일 수 있다. 상기 제2차 스크리닝 단계에서 선별된 후보 유전자가 프레임 쉬프트 돌연변이 상태로 존재하는지 확인하는 방법은 분자생물학 및 관련 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 방법이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 동위원소 PCR 방법을 이용할 수 있다.

본 발명의 다른 구현예에서, 상기 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법은 상기 제2차 스크리닝된 유전자로부터 생성되는 mRNA 또는 폴리펩타이드를 동정하는 단계를 추가적으로 포함한다. 유전자가 밝혀진 경우 이를 기초로

하여 mRNA 마커 및 펩타이드 마커를 동정하는 것은 분자생물학 및 관련 기술 분야에서 통상적으로 쓰이는 방법에 의해 용이하게 수행될 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법을 사용하여 동정한, 서열목록 제1서열 내지 제49서열에 해당하는 신규한 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.

상기 뉴클레오타이드 서열은 프레임 쉬프트 돌연변이가 발생한 유전자의 뉴클레오타이드 서열이며, 상기 서열이 발현되는 경우 암세포 특이적 mRNA 및 단백질이 생성된다.

일 구현예에서, 상기 뉴클레오타이드 서열이 인코딩하고 있는 단백질의 아미노산 서열은 서열목록 제50서열 내지 제95서열에 기재된 아미노산 서열이다.

상기 서열목록 제1서열 내지 제49서열에 해당하는 신규한 뉴클레오타이드 또는 서열목록 제50서열 내지 제95서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 암세포 특이적 단백질단백질은 대장암세포 특이적 마커로서 사용될 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 암세포 특이적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드 앱타머를 포함하는 암 진단용 키트 및 상기 신규한 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

상기 암 진단용 키트에 포함되는 항체는 폴리클론 항체 또는 단일클론 항체로 제조될 수 있으며, 바람직하게는 단일클론 항체이다. 상기 암세포 특이적 단백질에 특이적으로 결합하는 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. 폴리클로날 항체는 서열목록 제50서열 내지 제82서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 암세포 특이적 단백질, 즉 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

상기 암 진단용 키트에 포함되는 본 발명의 앱타머는 서열목록 제50서열 내지 제95서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 특이적으로 결합하며, 펩타이드 구조를 갖는다. 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형 또는 환형, 바람직하게는 선형의 분자를 의미한다. 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)에 따라 제조될 수 있다(Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-54(1963); Stewart, et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).

본 발명의 암 진단용 키트에서 이용되는 프로브 또는 프라이머는 서열목록 제1서열 내지 제49서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 본 명세서에서 용어 "상보적(complementary)"은 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건 하에서 서열목록 제1서열 내지 제49서열 기재된 프레임 쉬프트 유전자의 뉴클레오타이드 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 서열목록 제1서열 내지 제49서열 기재된 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을

정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.

본 명세서에서, 용어 "프로브"는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일쇄이다. 바람직하게는, 프로브는 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-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 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.

본 명세서에서, 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 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.

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 서열목록 제1서열 내지 제49서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 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 서열목록 제1서열 내지 제49서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램인 Primer 3 프로그램(http://frodo.wi.mit.edu/primer3/), Blast 프로그램(NCBI)을 이용하여 할 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

(a) 서열목록 제50서열 내지 제95서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 암세포 특이적 단백질을 발현하는 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 시험물질이 상기 암세포 특이적 단백질에 결합하는 지 여부를 분석하는 단계로서, 상기 시험물질이 상기 암세포 특이적 단백질에 결합하는 경우에는 암 치료제로 판정된다.

또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 암세포 특이적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드 앱타머의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 약제학적 조성물을 필요로 하는 대상(Subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

상기에서 '치료(treatment)'는 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 악화되지 않는 질환의 유지, 질환진행의 지연, 질환 상태의 개선 또는 완화(palliation), 일부 또는 완전한 완화(remission)를 포함한다. 또한 치료는 치료를 받지 않은 경우 예상되는 생존율과 비교하여 증가된 생존을 의미할 수 있다. 치료는 치료적 수단 이외에 예방적 수단을 동시에 포함한다. 치료가 필요한 경우는 질환을 이미 가지고 있는 경우와 질환이 예방되어야 하는 경우를 포함한다. 질병의 완화는 치료받지 않는 상황과 비교하여 원하지 않는 질병의 임상양상의 호전이나 질병의 추이가 지연되거나 연장되는 경우이다.

본 발명의 약제학적 조성물에는 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 '약제학적으로 허용되는'이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 것을 말한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조될 수 있다. 예컨대, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 포함제 형태로 제조할 수 있다. 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나, 엑스제, 산제, 과립제, 분말제, 과립제, 정제, 또는 캅셀제 형태일 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 의약 제형의 일반적인 원리에 대해서는 여러 문헌을 참고할 수 있다(W. Sheridan 및 G. Morstyn amp, *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy,* Cambridge University Press (1996); E. D. Ball 및 J. Lister amp, *Hematopoietic Stem Cell Therapy*; P. Law, *Churchill Livingstone* (2000)).

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 대장암, 자궁암, 난소암, 위암, 뇌종양,

후두암, 유방암, 폐암, 식도암, 간암, 췌장암, 담낭암, 전립선암, 방광암, 소아암 및 피부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암의 예방 및 치료제로서 사용될 수 있다.

【유리한 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(i) 본 발명은 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법, 상기 방법으로 동정된 암 세포에 대한 바이오 마커, 상기 바이오 마커를 포함하는 암 진단용 키트, 암 치료제의 스크리닝 방법 및 암특이적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드 앱타머의 약제학적 유효량을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

(ii) 본 발명의 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법은 유전자 개개를 일일이 검사하여 바이오 마커로서의 가능성을 시험하는 것이 아니라, 생물정보학 기술을 통해 돌연변이가 잘 발생하는 유전자들을 2차에 걸쳐 스크리닝 하는 방법을 사용하므로, 매우 간편하면서도 정확하게 다수의 바이오 마커를 동정할 수 있다.

(iii) 또한 본 발명은 상기 방법을 사용하여 동정된 신규한 NMD-무관 암 세포 바이오 마커를 제공하며, 이로써 상기 신규한 마커를 이용한 암 진단용 키트, 암 치료제의 스크리닝 방법 및 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 기초적인 자료를 제공한다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 AIM2 유전자의 시퀀스 정보를 기본으로 제작한 프라이머를 사용한 PCR 수행 결과 증폭된 DNA 산물에 대한 6% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 결과이다.

도 2 내지 도 25는 각각 ASTE1, CCDC43-Iso1, CCT8L1, CYHR1, FAM111B-Iso1, EBPL, LOC100131089, RGS22, FLT3LG, ASH1L, MED8, TTK, SLAMF1, LOC100127950, SFRS12IP1, SYCP1, TCF7L2, TRIM59, GBP3, GAFA1, KCTD16, INO80E, FBXL3 및 KIAA2018 유전자의 시퀀스 정보를 기본으로 제작한 프라이머를 사용한

PCR 수행 결과 증폭된 DNA 산물에 대한 6% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 결과이다.

도 26은 AIM2 단백질에 대한 웨스턴 블롯팅 결과이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

실시예 1-31: 유전자 탐색 및 동위원소 PCR을 이용한 변이 유전자 스크리닝

SelTarbase(www.seltarbase.org)는 모노뉴클레오타이드 반복을 갖는 인간의 모든 유전자 목록을 제공해주는 데이터베이스이다. 이러한 Seltarbase에서 모노뉴클레오타이드 반복이 9개 이상(예컨대 A, C, G 및 T 관계없이 반복이 9개 이상)인 인간의 모든 유전자를 찾았다. 이렇게 찾아낸 유전자는 모두 447개였다. 447개의 유전자 중에는 비교적 많이 알려진 유전자부터 거의 알려지지 않은 유전자까지 광범위하게 다양한 유전자를 포함하고 있었다.

본 발명의 목적은 NMD-무관(irrelevant) 바이오 마커를 동정하는 것이므로 모노뉴클레오다이드의 반복이 코딩지역 즉, 오픈리딩프레임에 있으며, 프레임 쉬프트 돌연변이가 일어나는 원인인 뉴클레오타이드의 삽입이나 빠짐에 의해 생기는 미성숙 종결코돈이 마지막 엑손에 있거나 마지막 엑손 결합부에서 시작코돈 방향으로 55 bp 이내(즉, 마지막 엑손 결합부에서 업스트림쪽으로 55 bp 이내)에 있는 경우만을 찾아내었다. 구체적으로는 상기 447개의 모든 유전자를 VectorNTI 소프트웨어(Invitrogen)와 NCBI 데이터베이스를 이용해 오픈리딩프레임과 엑손접합부위, 시작코돈 및 종결코돈을 모두 표시하여 기준을 만족하는 유전자만을 선택하였으며 그 개수는 총 66개였다. 66개의 유전자들 중에는 이전에 모노뉴클레오타이드 반복이 있다고 보고된 것이 15개, 보고되지

않았던 것이 51개 있었다.

상기와 같은 방법으로 선택된 66개의 유전자 중에서, 이전에 보고된 유전자 8개 및 보고되지 않은 유전자 23개를 임의로 선택하였다. 이들 31개의 유전자의 명칭은 각각 AIM2, ASTE1, CCDC43-Iso1, CCT8L1, CYHR1, FAM111B-Iso1, EBPL, LOC100131089, RGS22, FLT3LG, ASH1L, MED8, TTK, SLAMF1, LOC100127950, SFRS12IP1, SYCP1, TCF7L2, TRIM59, GBP3, GAFA1, KCTD16, INO80E, FBXL3, KIAA2018, CIR1, LOC643677, RXFP2, LOC100128175, HOXA11 및 ERCC5이며, 이 중 이전에 보고된 유전자는 AIM2, ASTE1, FLT3LG, TTK, SYCP1, TCF7L2, HOXA11 및 ERCC5 이다.

실시예 1: AIM2 유전자의 대장암 마커로서의 가능성 확인

우선 고-마이크로세틀리트 불안정(high microsatellite instability: MSI-H) 대장암 세포주 10종류 및 마이크로세틀리트 안정(microsatellite stability: MSS) 대장암 세포주 2종류를 취득하였다. MSI-H 대장암 세포주는 실험군으로, MSS 대장암 세포주는 대조군으로 사용하기 위한 것이다. 구체적으로 사용한 대장암 세포주 명칭은 하기 표 1과 같다:

【표 1】

MSI-H 대장암 세포주(실험군)	MSS 대장암 세포주(대조군)
1.DLD1(한국세포주은행)	11.WiDr(한국세포주은행)
2.HCT116(한국세포주은행)	12.Hela(한국세포주은행)
3.HCT8(한국세포주은행)	-
4.LOVO(한국세포주은행)	-
5.LS174T(한국세포주은행)	-
6.RKO(한국세포주은행)	-
7.SNUC2A(한국세포주은행)	-
8.SNUC2B(한국세포주은행)	-
9.SNUC4(한국세포주은행)	-
10.SNU407(한국세포주은행)	-

PCR에 사용할 프라이머는 SelTarbase에서 얻은 AIM2 유전자의 시퀀스 정보를 기본으로, Primer 3 프로그램(http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) 또는

Blast 프로그램(NCBI)을 사용하여 제작하였다. 구체적으로는 제작한 프라이머의 서열은 다음과 같다:

정방향 프라이머:CCACTCATCGACTGCATCTC

역방향 프라이머:TTGGCTTGAATTGGTCCTTT.

상기 표 1의 각각의 대장암 세포주로부터 얻은 2 ㎕ 지놈 DNA(50 ㎍/ ㎕), 2 ㎕ 10x Gold *Taq* 완충액(Applied Biosystem), 1.2 ㎕ 25 mM $MgCl_2$(Applied Biosystem), 2 ㎕ 10 mM dNTP(Applied Biosystem), 상기 제작한 2 ㎕의 20 pM 프라이머, 0.2 ㎕ Alpha P-32(BMS), 0.2 ㎕ 1000 U Gold *Taq*(Applied Biosystem) 및 10.6 ㎕의 증류수 이렇게 총 20 ㎕의 반응 부피를 가지고 동위원소 PCR 사이클을 수행하였다. 이때 PCR 생성물의 길이는 대부분 100 bp 내외로 맞추었고, 사용한 동위원소는 α-P^{32}(BMS)이었다. PCR 온도 조건은 아래와 같이 설정하였다: 95℃ 10분 이후, 95℃ 30초, 55℃ 30초 및 72℃ 30초의 30 사이클 그런 다음 72℃ 10분.

이러한 동위원소-PCR은 1 bp의 차이도 구분할 수 있다. 상기 PCR 수행 결과 증폭된 DNA 산물에 대하여 6% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법을 수행하였다. 젤의 각 라인(1-12)에 상기 표 1의 대장암 세포주의 PCR 증폭 DNA 산물을 로딩하고, 전기영동을 수행하여 그 결과를 도 1에 도시하였다.

대조군 라인(11-12)과 실험군 라인(1-10)의 밴드를 비교해본 결과, MSI-H 대장암 세포(1-2 및 4-8 라인)에 AIM2 유전자의 프레임 쉬프트 돌연변이가 발생하였음을 확인할 수 있었다. 구체적으로 모노뉴클레오타이드 반복 부분에서, 1 뉴클레오타이드가 결여된 프레임 쉬프트 돌연변이, 2 뉴클레오타이드가 결여된 프레임 쉬프트 돌연변이 및 1 뉴클레오타이드가 첨가된 프레임 쉬프트 돌연변이가 실제로 확인되었으며, 각각의 프레임 쉬프트 돌연변이 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열 내지 제3서열에 표시하였다.

<u>실시예 2-25: ASTE1 등 총 24개 유전자의 대장암 마커로서의 가능성 확인</u>

ASTE1, CCDC43-Iso1, CCT8L1, CYHR1, FAM111B-Iso1, EBPL, LOC100131089, RGS22, FLT3LG, ASH1L, MED8, TTK, SLAMF1, LOC100127950, SFRS12IP1, SYCP1,

TCF7L2, TRIM59, GBP3, GAFA1, KCTD16, INO80E, FBXL3 및 KIAA2018 유전자 각각의 시퀀스 정보를 기본으로 제작한 프라이머를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일하게 수행하였다.

구체적으로 실시예 2-25에 사용한 프라이머는 하기 표 2와 같다.

【표 2】

		정방향 프라이머	역방향 프라이머
실시예2	ASTE1	atatgcccccgctgaaata	ttggtgtgtgcagtggttct
실시예3	CCDC43-Iso1	acaagctgcagagggagaga	aggccaaggttatcgctttc
실시예4	CCT8L1	aaaagtcccacacatcagca	ttgttcccttcttggcaatc
실시예5	CYHR1	ggccaacacttatgggatgt	gtaagcccagctgcctacag
실시예6	FAM111B-Iso1	aacagtccatggtggatgaag	tttcatcagtggcactttca
실시예7	EBPL	gtatggctgctggatgacct	tctagccatgactgccacag
실시예8	LOC100131089	ccactatgccacaacctcct	ggacacaacaatggtgaagg
실시예9	RGS22	ttctggcctcagttctgtga	tgagtcttgtctcacctttcca
실시예10	FLT3LG	gatgacgtggtggtgacg	gaagttctggcgagtgatcc
실시예11	ASH1L	tagccagtcaagagcaagca	ttcctcaggggtacaggttg
실시예12	MED8	cctgggtttcattctggcta	ttggctccttagaggatgga
실시예13	TTK	ttcttcatcctccaagactttt	gatttccacagggattcaaga
실시예14	SLAMF1	ggggaccagagggagataac	ggtttctggacttgggcata
실시예15	LOC100127950	tgcacagatgtcagggaaat	caaaagcagggaacatccat
실시예16	SFRS12IP1	tcccccacaggaataaatga	tcataggcctgctttgttttt
실시예17	SYCP1	ccgttgggctgtaattgcta	tttggctctggcaaataagaa
실시예18	TCF7L2	ggcatctgtgccctctattc	gggggaggcgaatctagtaa
실시예19	TRIM59	atgatccaaggcgataagga	ttgccaacatcacagagagc
실시예20	GBP3	ggagagatgccaaggtgaaa	gccttgggttaggatgacag
실시예21	GAFA1	gcttctgccatgtcctcttc	gctgcagtgggctttatgat
실시예22	KCTD16	agggaatcgaacatgagcag	ctcaggaaaccgatctggaa
실시예23	INO80E	cctcccacccccctaagatg	atcaccaggtcatcgtctcc
실시예24	FBXL3	tgggatgctttcatcagaca	agcgaaagaaggggtcaaat
실시예25	KIAA2018	acccgacaattcactggaaa	ctgtttccaccaggctgatt

전기영동법 실시 후 실시예 2-25 각각의 실험결과를 도 2-25에 도시하였다.

도 2-25를 보면 실험군인 MSI-H 대장암 세포에서 각각의 유전자의 프레임 쉬프트 돌연변이가 발생하였음을 알 수 있다. 구체적인 각각의 프레임 쉬프트 돌연변이 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제4서열 내지 제49서열에 기재하였다.

상기 실시예 1-25의 결과를 종합하여, 하기 표 3에 정리하였다.

【표 3】

돌연변이 상태표

분류 항목		MSI-H									MSS	
		1. DLD1	2. HCT 116	3. HCT8	4. LOVO	5. LS 174T	6. RKO	7. SNUC2A	8. SNUC2B	9. SNUC4	10. SNU 407	11. WiDr	12. Hela
실시예 1	AIM2	-1/W	-1/W	W	-1/-1	-1/W	+1/-1	-1/-2	-1/-2	W	W	W	W
실시예 2	ASTE1	+1/W	-1/W	+1/W	+1/W	+1/W	-2/-2	-2/-2	-2/-3	W	-2/-3	W	W
실시예 3	CCDC43-Iso1	W	W	W	-1/W	-1/W	W	-1/W	-1/W	W	+1/W	W	W
실시예 4	CCT8L1	W	-1/-2	W	-1/-2	-1/-2	-1/-2	-2/-2	-2/-2	-1/-3	-2/W	W	W
실시예 5	CYHR1	W	W	W	W	-1/-1	-1/W	-1/W	-1/W	+1/+2	-1/W	W	W
실시예 6	FAM11	-1/W	-1/W	W	-1/-1	-1/W	-1/-1	-2/W	+1/-2	-1/-1	-1/-2	W	W
실시예 7	EBPL	W	+1/W	W	+1/-1	W	-1/W	W	-1/W	W	W	W	W
실시예 8	LOC100131089	W	-1/-1	W	W	+1/+1	-1/-1	-1/-1	-1/W	-1/W	W	W	W
실시예 9	RGS22	W	W	W	-1/W	W	-1/W	W	W	W	W	W	W
실시예 10	FLT3LG	W	W	W	W	+1/W	W	+1/W	+1/W	W	+1/W	W	W
실시예 11	ASH1L	W	W	W	W	W	W	-1/-1	-1/-1	-1/W	W	W	W
실시예 12	MED8	W	W	W	-1/W	-2/W	W	-1/W	-1/W	-1/W	W	W	W
실시예 13	TTK	W	-1/W	W	-1/W	W	-2/W	-2/W	-2/W	+1/-2	W	W	W
실시예 14	SLAMF1	W	-1/W	W	-1/W	W	W	W	W	-1/W	-1/W	W	W
실시예 15	LOC100127950	W	W	W	-1/W	-1/W	W	+1/W	-1/W	-1/W	-1/W	W	W
실시예 16	SFRS12IP1	W	W	W	W	-1/-2	W	+1/+1	M	W	+1/+1	W	W
실시예 17	SYCP1	-1/W	W	-1/W	+1/+1	W	W	-1/-1	-1/-1	-1/-1	-1/W	W	W
실시예 18	TCF7L2	W	W	W	-1/W	-1/W	W	-1/W	-1/W	-1/-1	-1/-1	W	W
실시예 19	TRIM59	W	W	W	-1/W	-1/W	-1/-1	-1/W	-1/W	W	-1/-2	W	W
실시예 20	GBP3	-1/W	-1/-1	-1/W	W	-1/W	-1/W	W	W	-1/W	-1/-1	W	W
실시예 21	GAFA1	W	-2/2	W	-2/-2	-2/-2	-2/-2	-2/-3	-2/-3	W	-1/-1	W	W
실시예 22	KCTD16	W	-1/W	W	W	-1/W	W	-1/W	-1/W	W	-1/W	W	W
실시예 23	INO80E	-1/W	W	-1/W	-1/-1	-1/-1	-1/-	-1/W	-1/W	-1/-1	-1/W	W	W

							1						
실시예 24	FBXL3	W	W	W	W	W	W	W	W	-1/W	W	W	W
실시예 25	KIAA2018	W	W	W	W	W	W	W	W	W	-1/W	W	W

실시예 26-31: CIR1 등 총 6개 유전자의 대장암 마커로서의 가능성 확인

CIR1, HOXA11, LOC643677, RXFP2, ERCC5 및 LOC100128175 유전자 각각의 시퀀스 정보를 기본으로 제작한 프라이머를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일하게 수행하였다.

실시예 26 및 31에 사용한 프라이머는 하기 표 4와 같다.

【표 4】

		정방향 프라이머	역방향 프라이머
실시예26	CIR1	tcctcctcctcctcttcctc	tgccctgaacacttgtttttc
실시예27	HOXA11	gcatgctcaacctcactgat	cagccgctggagtcttagag
실시예28	LOC100128175	ttcccttgtacccatcattca	tcatcctttatttttcctccttca
실시예29	LOC643677	ttggtggaaacctccaaaag	tcagtgagattgctggcttc
실시예30	RXFP2	gctgcacaaacatcagagga	tcaaaaccccaagtttcagg
실시예31	ERCC5	tctcagaatggtggcatgaa	gcaacagctgggttaggaaa

대조군 라인(11-12)과 실험군 라인(1-10)의 밴드를 비교해본 결과, 밴드가 완전히 일치하여 MSI-H 대장암 세포 내에 프레임 쉬프트 돌연변이가 발생하지 않았음을 확인할 수 있었다.

실시예 1-31의 결과를 종합하면, 총 31개의 돌연변이 확인을 시도 했던 유전자 중에 총 25개의 유전자에 실제 돌연변이가 있음을 확인하였으며, 그 결과 서열목록 제1서열 내지 제49서열에 해당하는 신규한 뉴클레오타이드 서열을 동정하기에 이르렀다. 이들 뉴클레오타이드 서열은 새로운 대장암 마커로서의 용도를 갖는다.

실시예 32-33: 대장암 펩타이드 마커 동정을 위한 웨스턴 블롯팅

앞서 찾은 66개의 유전자 모두에 대해 데이터베이스(http://www.genecards.org/) 탐색을 통해 상업적으로 유통되고

있는 항체가 있는 유전자를 찾아본 결과, 그 중 토끼 생산 항-AIM2(Abcam) 및 토끼 생산 항-TTK(Abcam) 항체 두 개를 찾았고, 상기 두 항체를 구입하여 상기 유전자 AIM2 및 TTK에 대해 웨스턴 블롯을 수행하였다.

상기 구입한 항체(anti-AIM2, anti-TTK)를 이용해 웨스턴 블롯을 수행할 때 동위원소 PCR에 사용했던 10개의 MSI 대장암 세포주에서 정상 타입, 헤테로접합형(heterozygous) 돌연변이, 호모접합형(homozygous) 돌연변이를 갖는 세포주를 각각 선택하고 대조군으로 사용했던 MSS 세포주에서는 하나를 선택해 총 4가지의 대장암 세포주를 사용하였다.

실시예 32: AIM2 단백질에 대한 웨스턴 블롯팅

정상 타입으로는 SNUC4(야생형), 헤테로 돌연변이로는 DLD1(-1/w), 호모 돌연변이로는 LoVo(-1/-1)를 선택하고, 대조군 세포주로는 WiDr(야생형)을 선택하였다. 상기 4가지 세포주를 각각 25 μM의 MG132(A.G. scientific INC)로 8시간 처리한 것과 처리안한 것으로부터 수집한 세포 용해물을 각 웰 당 50 μg씩 4~12%의 Bis-Tris 젤(amresco)에 로딩하였다. MG132(proteasome inhibitor)으로 처리한 이유는 변이 단백질이 프로테아좀에 의해 분해되는 것을 방지하기 위해서이다. 이어, 5% 스킴밀크로 한 시간 동안 블록킹하고, 1 μg/ml의 농도로 4℃에서 16시간 동안 1차 항체반응 후, 0.1 μg/ml의 농도로 상온에서 1시간 동안 2차 항체(anti-rabbit antibody, santa cruz) 반응하는 방식으로 진행하였다.

상기 실험 결과를 도 27에 도시하였는데, 이를 보면 헤테로 돌연변이 DLD1(-1/w) 뿐만 아니라, 호모 돌연변이 LoVo(-1/-1)에서도 밴드가 보이는 것을 확인 할 수 있다.

또한, 호모 돌연변이가 있는 다른 MSI 세포주인 RKO, SNUC2A 및 SNUC2B에서도 동일하게 웨스턴 블롯을 수행한 결과 AIM2가 탐지되었다.

실시예 33: TTK 단백질에 대한 웨스턴 블롯팅

정상 타입으로는 DLD1(야생형), 헤테로 돌연변이로는 HCT116(-1/w), 호모

돌연변이로는 SNUC4(+1/-2)를 선택하고, 대조군 세포주로는 WiDr(야생형)을 선택하였다. 상기 4가지 세포주를 각각 25uM의 MG132로 8시간 처리한 것과 안한 것으로 모아 얻은 세포 용해물을 각 웰 당 50 ㎍씩 4~12%의 Bis-Tris 젤에 로딩하였다.

이어, 5% 스킴밀크로 한 시간 동안 블록킹하고, 1 ㎍/ml의 농도로 4℃에서 16시간 동안 1차 항체반응 후, 0.1 ㎍/ml의 농도로 상온에서 1시간 동안 2차 항체(anti-rabbit antibody, santa cruz) 반응하는 방식으로 진행하였다.

실험 결과 헤테로 돌연변이 HCT116(-1/w) 뿐만 아니라, 호모 돌연변이 SNUC4(+1/-2)에서도 밴드가 보이는 것을 확인하였다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 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.

참조 문헌

1. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. Nature 396: 643-649.

2. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 363: 558-561.

3. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 260: 816-819.

4. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. Am J Pathol 145: 148-156.

5. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, et al. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with

microsatellite instability. Science 268: 1336-1338.

6. Perucho M (2003) Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. Oncogene 22: 2223-2225.

7. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, et al. (1998) CD8(+) T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. Cancer Research 58: 3491-3494.

8. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, et al. (1999) High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. American Journal of Pathology 154: 1805-1813.

9. Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S (2002) The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. Human Molecular Genetics 11: 2805-2814.

10. Wagner E, Lykke-Andersen J (2002) mRNA surveillance: the perfect persist. Journal of Cell Science 115: 3033-3038.

11. Nagy E, Maquat LE (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. Trends in Biochemical Sciences 23: 198-199.

12. Zhang J, Sun XL, Qian YM, LaDuca JP, Maquat LE (1998) At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation. Molecular and Cellular Biology 18: 5272-5283.

13. Zhang J, Sun XL, Qian YM, Maquat LE (1998) Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: Indications that pre-mRNA splicing in the nucleuscan influence mRNA translation in the cytoplasm. Rna-a Publication of the Rna Society 4: 801-815.

14. Mendell JT, Dietz HC (2001) When the message goes awry: Disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. Cell 107:

411-414.

15. Lewis BP, Green RE, Brenner SE (2003) Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 189-192.

16. El-Bchiri J, Buhard O, Penard-Lacronique V, Thomas G, Hamelin R, et al. (2005) Differential nonsense mediated decay of mutated mRNAs in mismatch repair deficient colorectal cancers. Human Molecular Genetics 14: 2435-2442.

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음 단계를 포함하는 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법:

(a) 9개 이상의 모노뉴클레오타이드 반복을 갖는 유전자를 선별하는 제1차 스크리닝 단계; 및

(b) 상기 제1차 스크리닝된 유전자 중 모노뉴클레오다이드의 반복이 코딩지역에 있고, 미성숙 종결코돈이 마지막 엑손에 있거나 또는 마지막 엑손 결합부에서 업스트림 쪽으로 55 bp 이내에 있는 유전자를 선별하는 제2차 스크리닝 단계.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 암은 대장암, 자궁암, 난소암, 위암, 뇌종양, 후두암, 유방암, 폐암, 식도암, 간암, 췌장암, 담낭암, 전립선암, 방광암, 소아암 및 피부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 제1차 스크리닝 단계(a)는 인간 지놈 서열 정보를 제공하는 데이터베이스를 이용하는 것을 특징으로 하는 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 상기 제2차 스크리닝된 유전자가 마이크로세틀리트 불안정 암세포 내에서 프레임 쉬프트 돌연변이 상태로 존재하는지를 분석하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 분석하는 단계는 동위원소 PCR 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 상기 제2차 스크리닝된 유전자로부터 생성되는 mRNA 또는 폴리펩타이드를 동정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 암 세포에 대한 바이오 마커 동정 방법.

【청구항 7】

서열목록 제 50 서열 내지 제 95 서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 암세포 특이적 단백질.

【청구항 8】

제 7 항의 암세포 특이적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열 내지 제49서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 서열.

【청구항 10】

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 단백질 또는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 암세포 특이적 마커.

【청구항 11】

제 7 항의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드 앱타머를 포함하는 암 진단용 키트.

【청구항 12】

제 8 항 또는 제 9 항의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 암 진단용 키트.

【청구항 13】

다음 단계를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법:

(a) 상기 제6항의 암세포 특이적 단백질을 발현하는 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 시험물질이 상기 암세포 특이적 단백질에 결합하는 지 여부를 분석하는 단계로서, 상기 시험물질이 상기 암세포 특이적 단백질에 결합하는 경우에는 암 치료제로 판정된다.

【청구항 14】

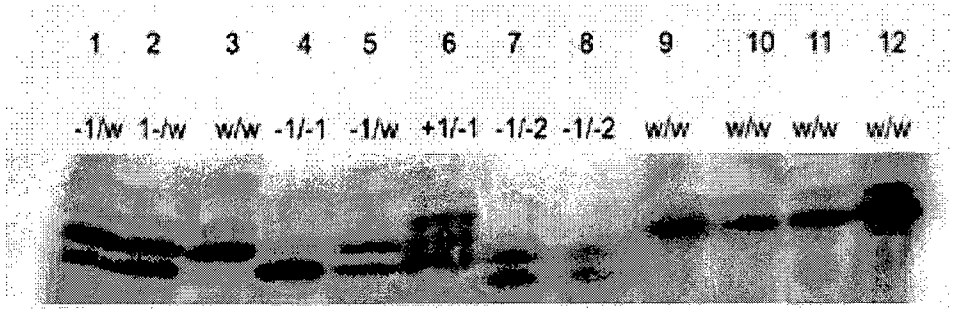
(a) 상기 제 6 항의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드 앱타머의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

【청구항 15】

상기 제 14 항의 약제학적 조성물을 필요로 하는 대상(Subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법.

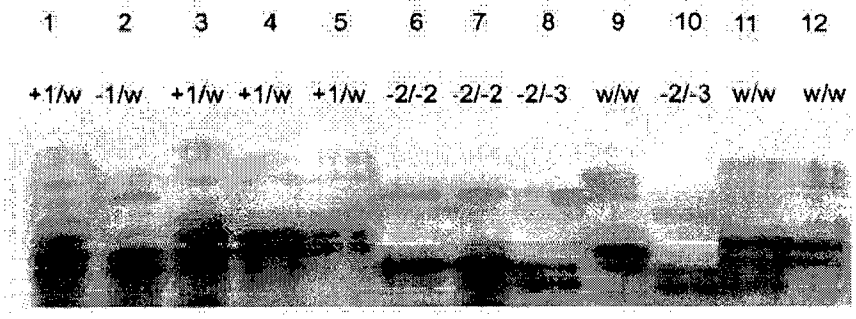
도 1

AIM2



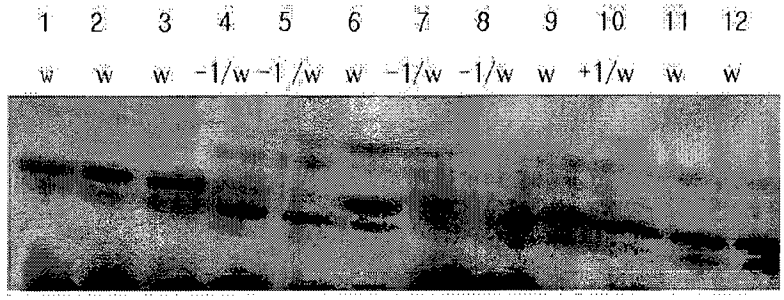
도 2

ASTE1



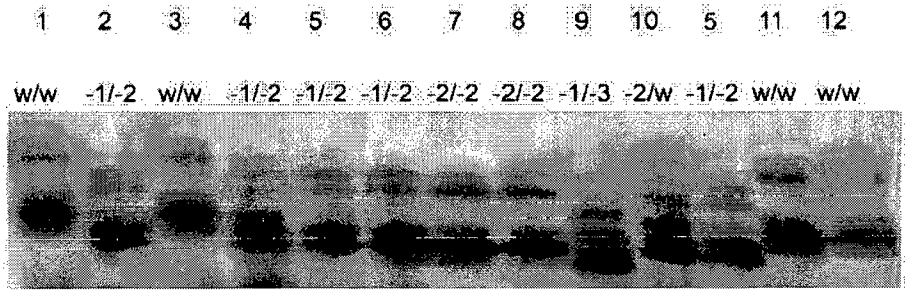
도 3

CCDC43-Iso1



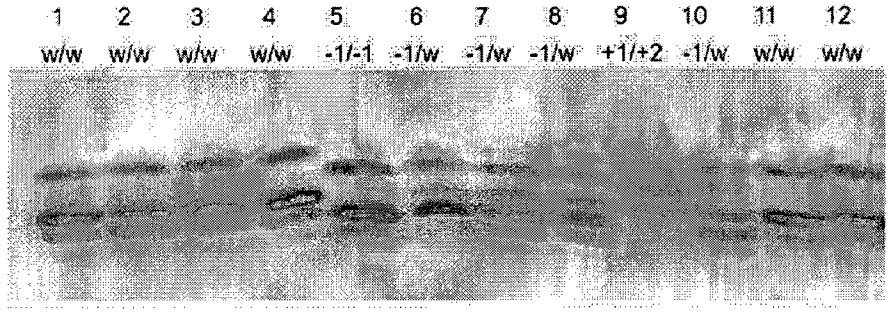
도 4

CCT8L1



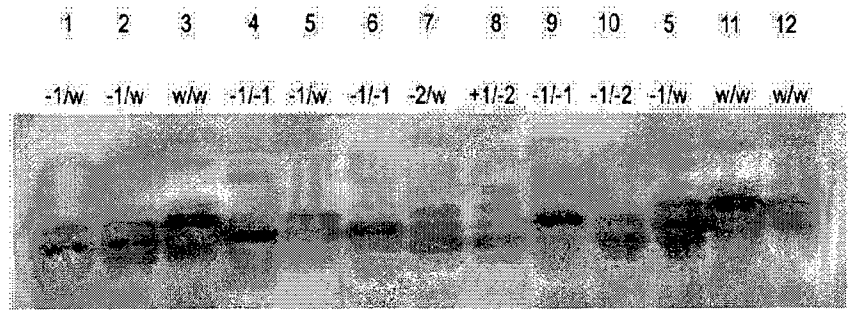
도 5

CYHR1



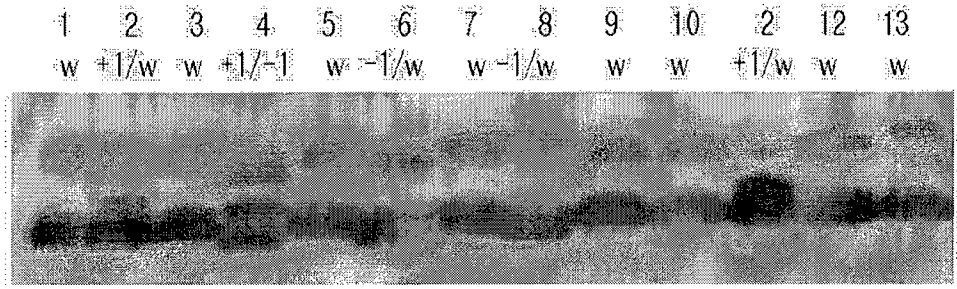
도 6

FAM111B-Iso1



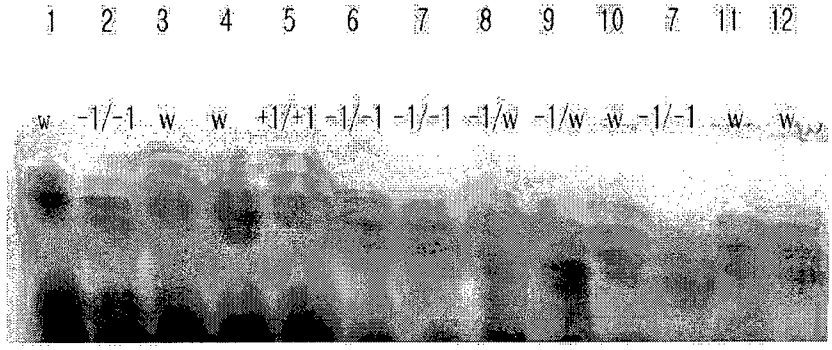
도 7

EBPL

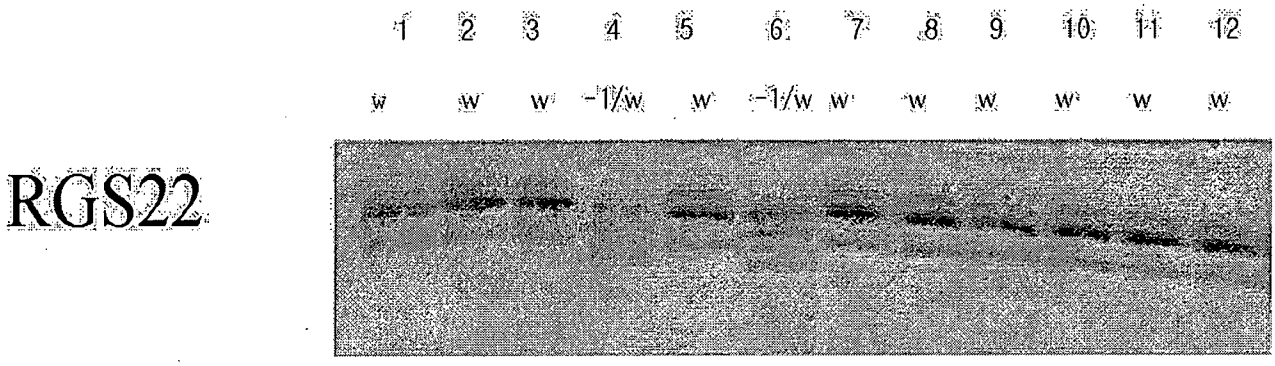


도 8

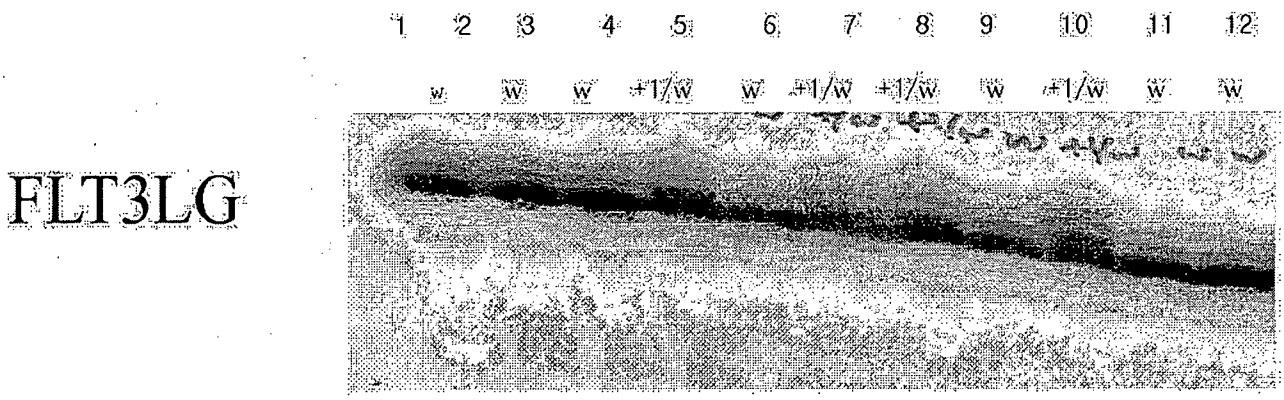
LOC100131089



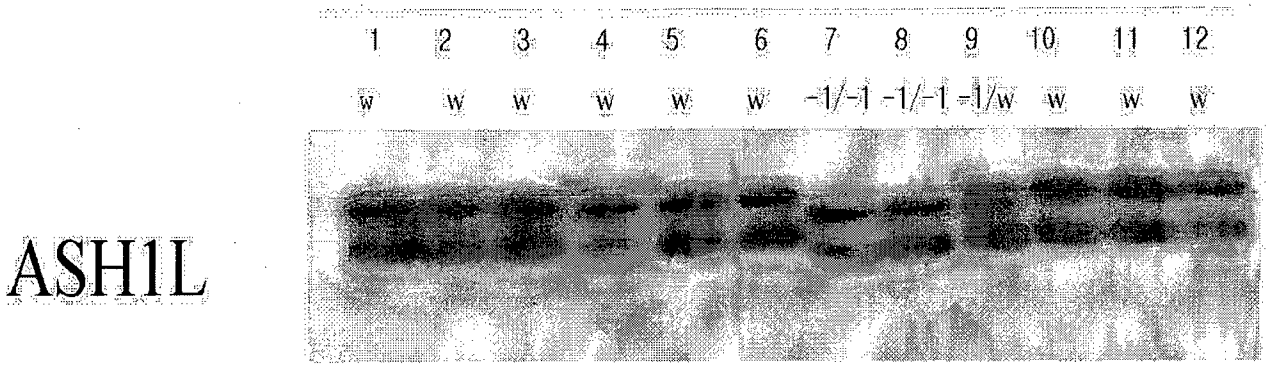
도 9


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w w w -1/w w -1/w w w w w w w
RGS22

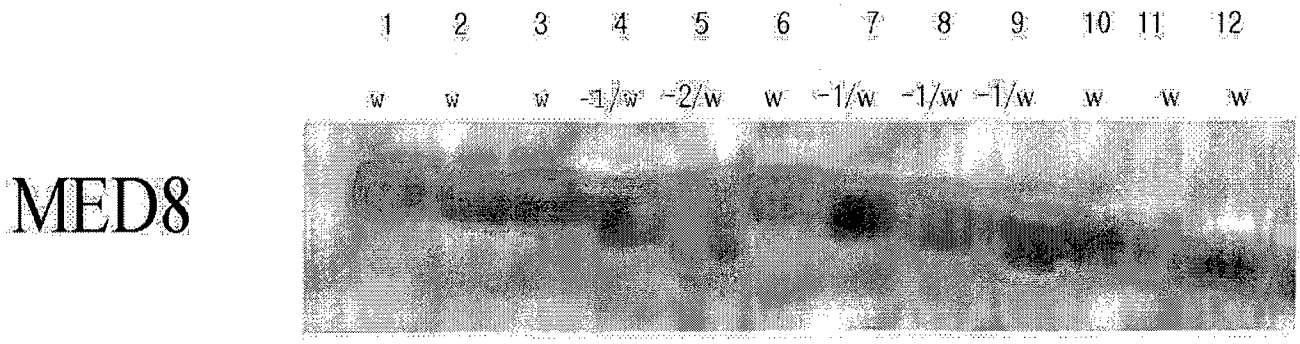
도 10


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w w w +1/w w +1/w +1/w w +1/w w w
FLT3LG

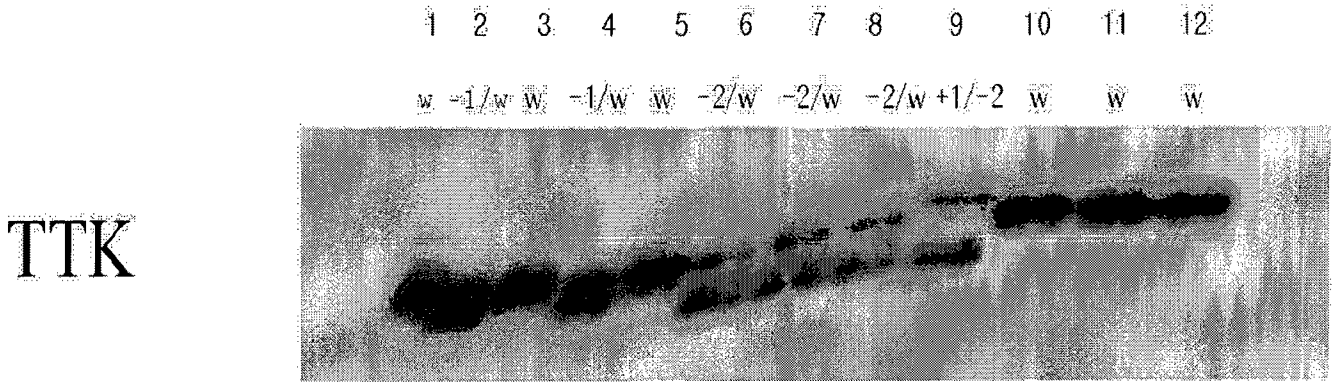
도 11


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w w w w w w -1/-1 -1/-1 -1/w w w w
ASH1L

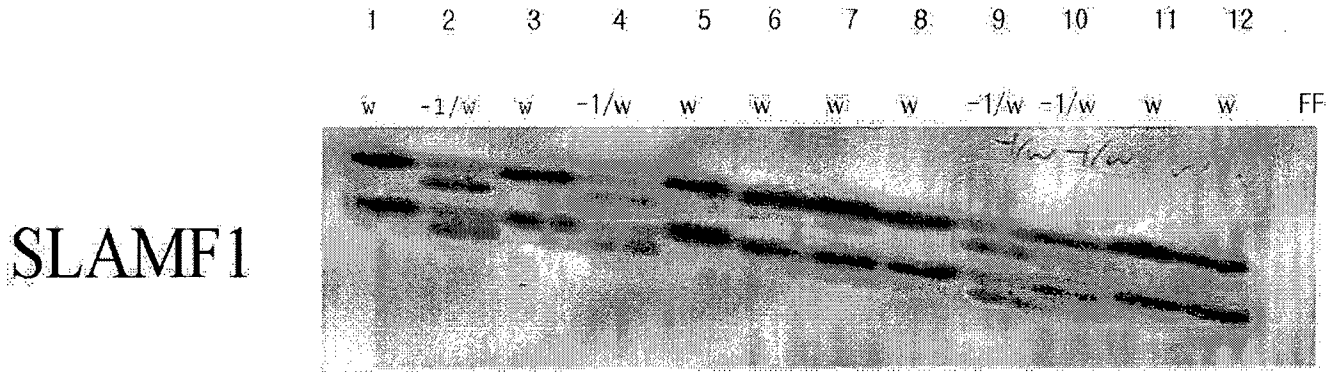
도 12


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w w w -1/w -2/w w -1/w -1/w -1/w w w w
MED8

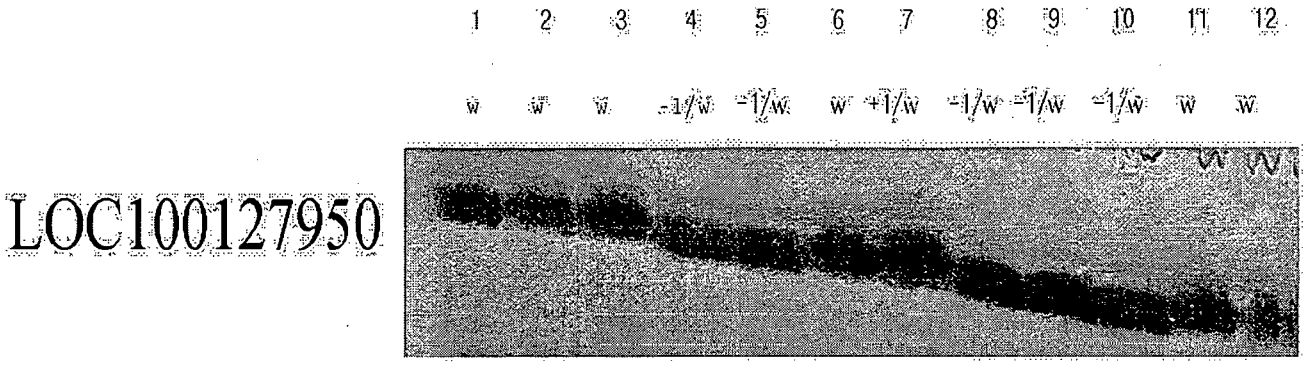
도 13


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w -1/w w -1/w w -2/w -2/w -2/w +1/-2 w w w
TTK

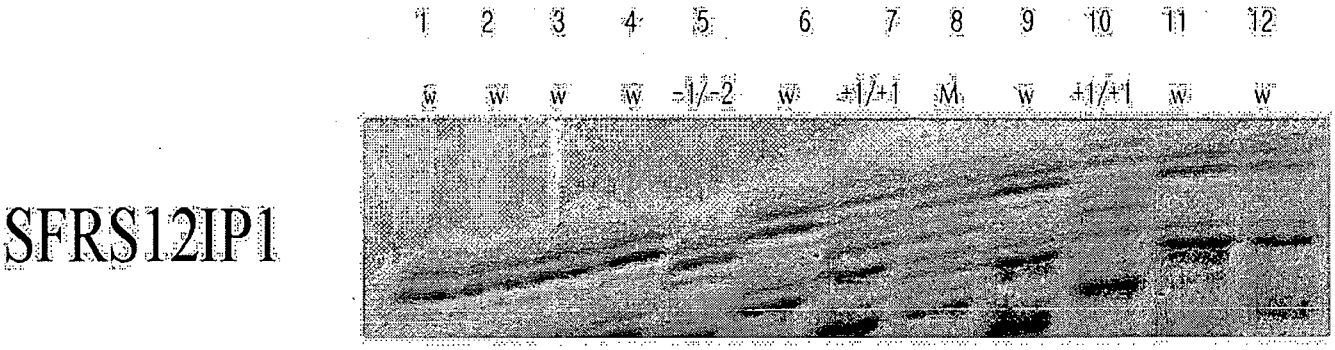
도 14


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w -1/w w -1/w w w w w -1/w -1/w w w FF
SLAMF1

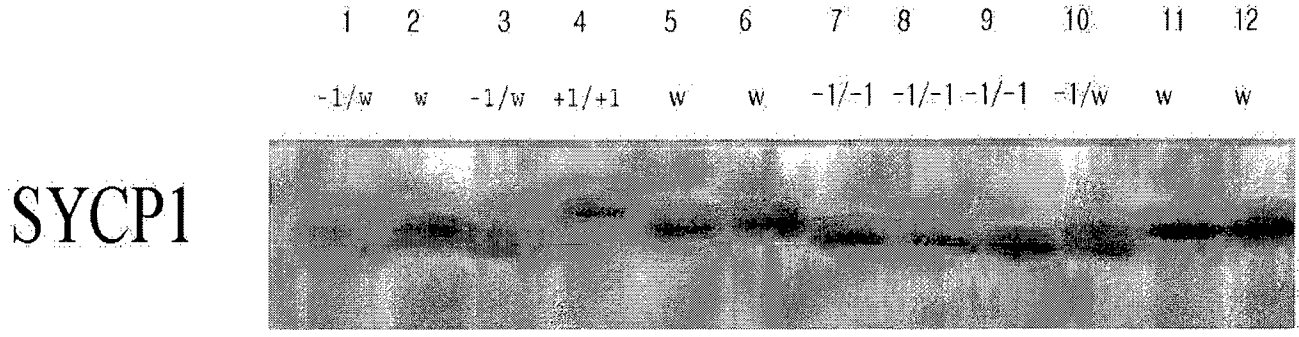
도 15


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w w w -1/w -1/w w +1/w -1/w -1/w -1/w w w
LOC100127950

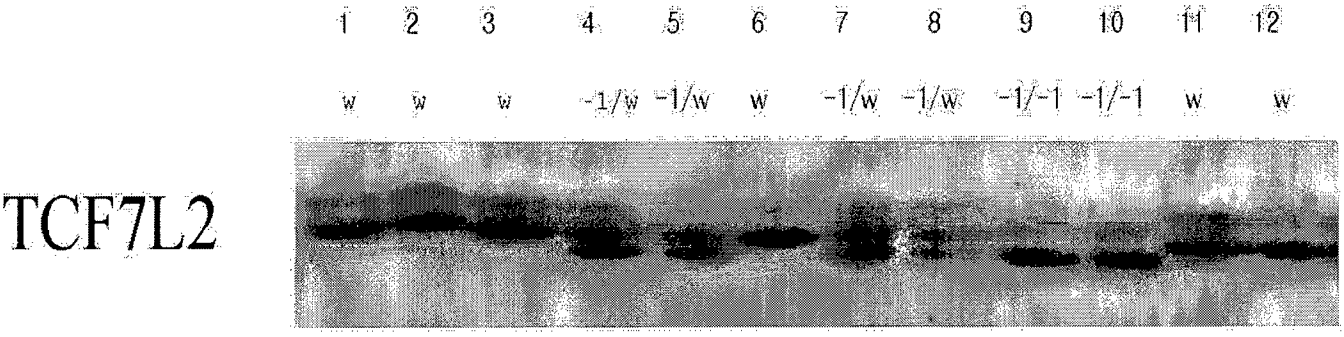
도 16


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w w w w -1/-2 w +1/+1 M w +1/+1 w w
SFRS12IP1

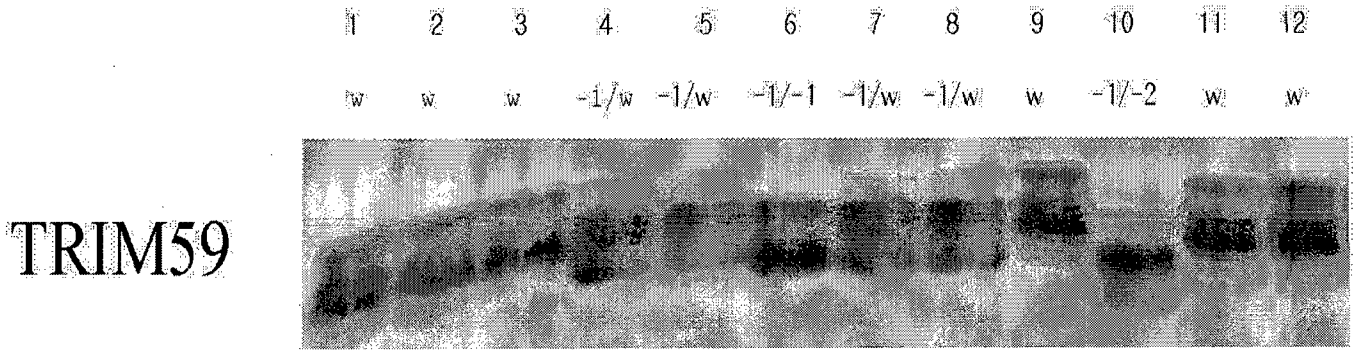
도 17


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
-1/w w -1/w +1/+1 w w -1/-1 -1/-1 -1/-1 -1/w w w
SYCP1

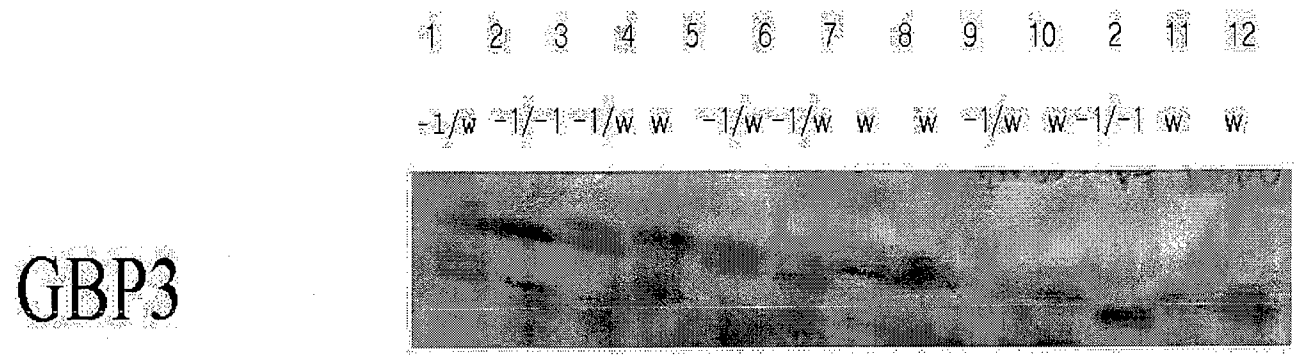
도 18


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w w w -1/w -1/w w -1/w -1/w -1/-1 -1/-1 w w
TCF7L2

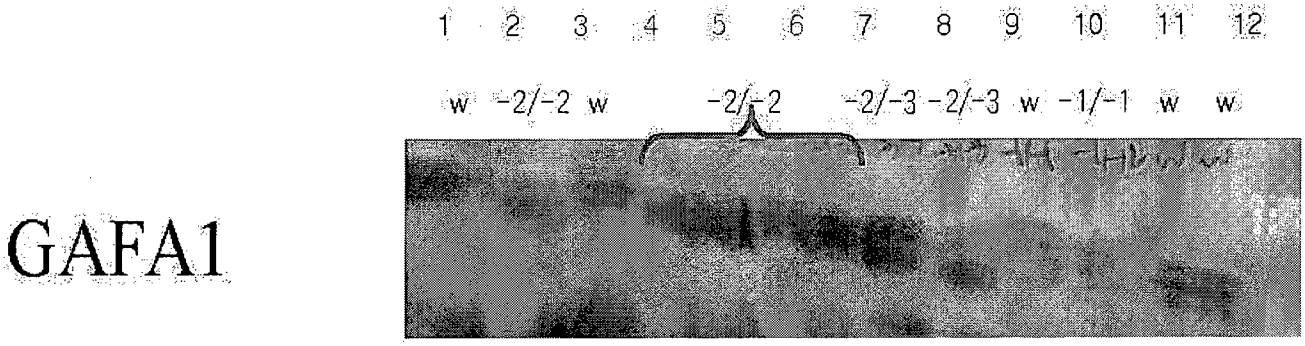
도 19


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w w w -1/w -1/w -1/-1 -1/w -1/w w -1/-2 w w
TRIM59

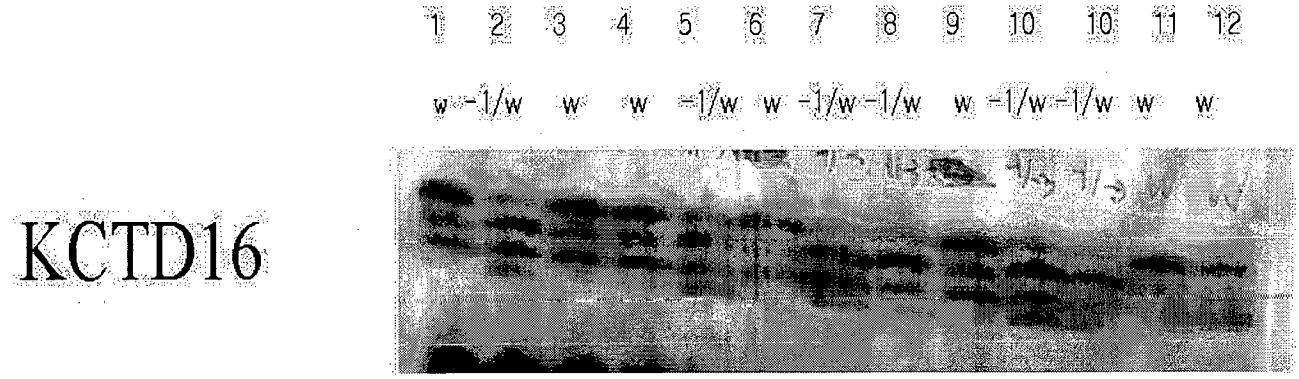
도 20


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 2 11 12
-1/w -1/-1 -1/w w -1/w -1/w w w -1/w w -1/-1 w w
GBP3

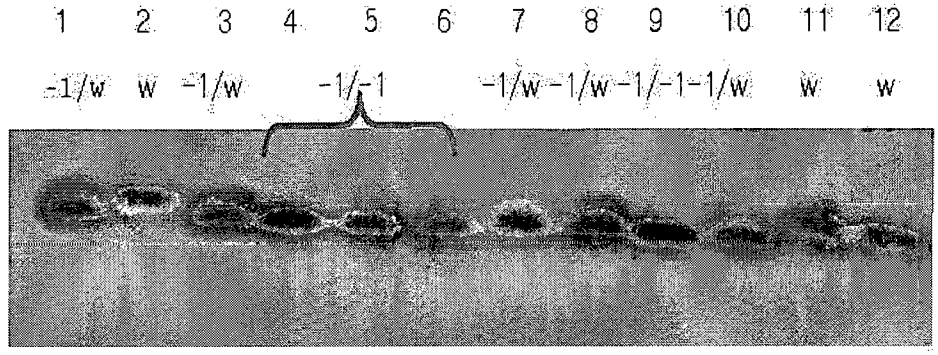
도 21


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w -2/-2 w -2/-2 -2/-3 -2/-3 w -1/-1 w w
GAFA1

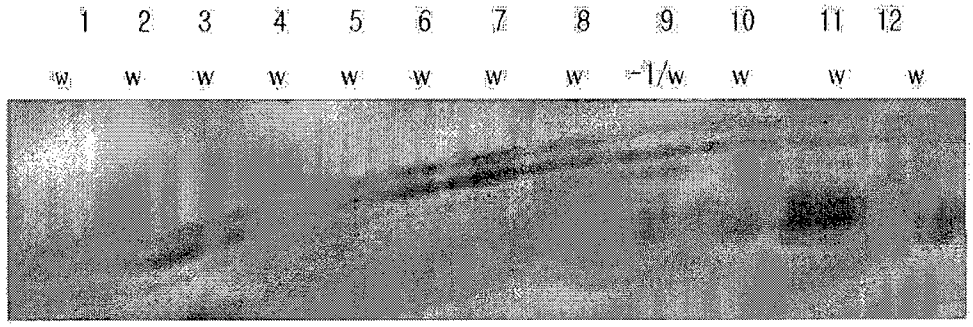
도 22


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 10 11 12
w -1/w w w -1/w w -1/w -1/w w -1/w -1/w w w
KCTD16

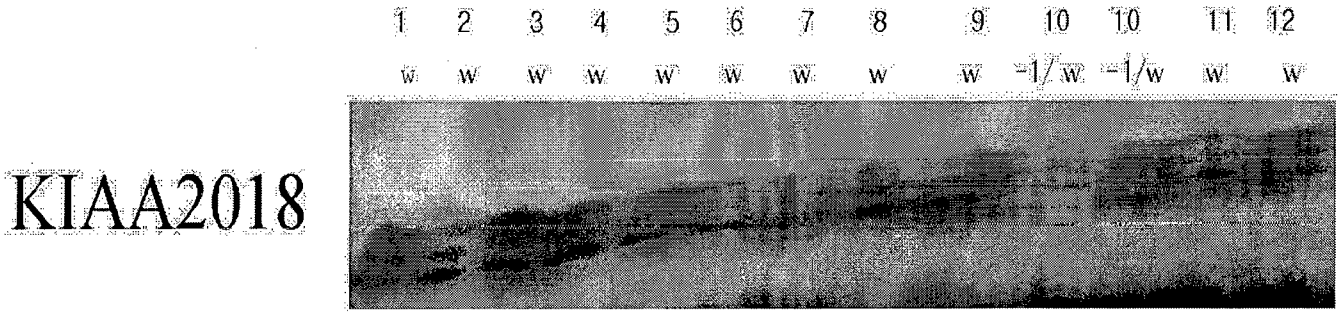
도 23


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
-1/w w -1/w -1/-1 -1/w -1/w -1/-1 -1/w w w
INO80E

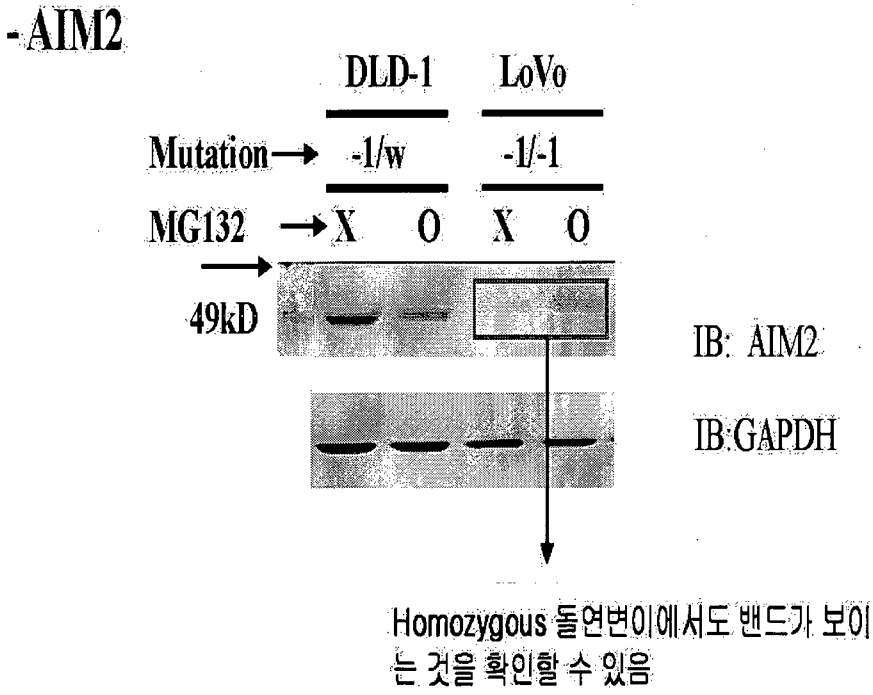
도 24


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
w w w w w w w w -1/w w w w
FBXL3

도 25


1 w
2 w
3 w
4 w
5 w
6 w
7 w
8 w
9 w
10 -1/w
10 -1/w
11 w
12 w
KIAA2018

도 26


-AIM2
DLD-1
LoVo
Mutation →
-1/w
-1/-1
MG132 →
X
0
X
0
49kD
IB: AIM2
IB:GAPDH
Homozygous 돌연변이에서도 밴드가 보이는 것을 확인할 수 있음

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2011/001558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/15(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

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)

NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), 'mononucleotide, repeat, cancer, marker, exon, upstream, downstream, etc.'

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WONG, Y. F. et al., "Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers" Carcinogenesis, May 2006, Vol. 27, No. 5, pp951-955 (Epub 20 Feb. 2006) -See the entire main text, especially abstract; p952 "Reading of mononucleotide repeat profiles"	1-6
A	SUN, X. et al., "Detection of mononucleotide repeat sequence alterations in a large background of normal DNA for screening high-frequency microsatellite instability cancers" Clin. Cancer Res., 15 Jan. 2006, Vol. 12, No. 2, pp454-459 -See the entire main text, especially abstract; figure 1.	1-6
A	FERREIRA, A. M. et al., "Mononucleotide precedes dinucleotide repeat instability during colorectal tumour development in Lynch syndrome patients" J. Pathol., Sep. 2009, Vol. 219, No. 1, pp96-102 -See the entire main text, especially abstract.	1-6

☒ 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	Date of mailing of the international search report
30 MAY 2012 (30.05.2012)	**31 MAY 2012 (31.05.2012)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MA, J. et al., "Somatic mutation and functional polymorphism of a novel regulatory element in the HGF gene promoter causes its aberrant expression in human breast cancer" J. Clin. Invest., Mar. 2009, Vol. 119, No. 3, pp478-491 (Epub 2 Feb. 2009) -See the entire main text, especially abstract.	1-6
A	XICOLA, R. M. et al., "Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors" J. Natl. Cancer Inst., 7 Feb. 2007, Vol. 99, No. 3, pp244-252 -See the entire main text, especially abstract.	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2011/001558

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The International Searching Authority found 26 groups of inventions in this application, as follows:
-The invention of group 1: claims 1-6 pertain to one invention relating to a bio marker identification method
-The invention of group 2: a part of claims 7-15 pertains to one invention relating to proteins containing the feature related to AIM2 proteins listed in the 50th to 52nd sequences, or nucleotide sequences encoding the proteins themselves, a kit for the diagnosis of cancer including the same, or a method for screening a therapeutic agent for cancer.
-The inventions of groups 3-26: the rest of claims 7-15 pertains to 24 inventions relating to proteins containing the feature respectively related to 24 proteins listed in the 53rd to 95th sequences, respectively, or nucleotide sequences encoding the proteins themselves, a kit for the diagnosis of cancer including the same, or a method for screening a therapeutic agent for cancer.
The inventions of the 26 groups include a common technical feature of "diagnosing cancer using proteins or genes". However, the technical feature has already been indicated in "Pharmacol. Ther., Vol. 128, No. 3, pp488-498 (09 September 2010)". Therefore, this application lacks unity of invention under PCT Rule 13.2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-6

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2011/001558

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2011/001558

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류**(IPC)**)

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/68

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))
NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), 'mononucleotide, repeat, cancer, marker, exon, upstream, downstream, etc.'

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WONG, Y. F. et al., 'Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers' Carcinogenesis, 2006 May, Vol. 27, No. 5, pp951-955 (Epub 2006 Feb. 20) -본문 전체 참조, 특히 초록; p952 'Reading of mononucleotide repeat profiles'	1-6
A	SUN, X. et al., 'Detection of mononucleotide repeat sequence alterations in a large background of normal DNA for screening high-frequency microsatellite instability cancers' Clin. Cancer Res., 2006 Jan. 15, Vol. 12, No. 2, pp454-459 -본문 전체 참조, 특히 초록; 도1.	1-6
A	FERREIRA, A. M. et al., 'Mononucleotide precedes dinucleotide repeat instability during colorectal tumour development in Lynch syndrome patients' J. Pathol., 2009 Sep., Vol. 219, No. 1, pp96-102 -본문 전체 참조, 특히 초록.	1-6

☒ 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

"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 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2012년 05월 30일 (30.05.2012)	**2012년 05월 31일 (31.05.2012)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
이준혁
전화번호 82-42-481-8115

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2011/001558

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MA, J. et al., 'Somatic mutation and functional polymorphism of a novel regulatory element in the HGF gene promoter causes its aberrant expression in human breast cancer' J. Clin. Invest., 2009 Mar., Vol. 119, No. 3, pp478-491 (Epub 2009 Feb. 2) -본문 전체 참조, 특히 초록.	1-6
A	XICOLA, R. M. et al., 'Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors' J. Natl. Cancer Inst., 2007 Feb. 7, Vol. 99, No. 3, pp244-252 -본문 전체 참조, 특히 초록.	1-6

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2011/001558

제**2**기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 **2**의 계속)

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

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

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.

제**3**기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 **3**의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

본 국제조사기관은 다음과 같이 26개의 발명그룹이 이 국제출원에 포함되어 있음을 발견하였습니다.
-제1군: 청구항 1 내지 청구항 6은 바이오 마커 동정 방법에 관한 1개의 발명
-제2군: 청구항 7 내지 청구항 15의 일부는 서열목록 제50서열 내지 제52서열에 기재된 AIM2 단백질과 관련된 구성을 포함하는 단백질 또는 이를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 그 자체, 이를 포함하는 암 진단용 키트 또는 암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 1개의 발명
-제3군 내지 제26군: 청구항 7 내지 청구항 15의 나머지는 서열목록 제53서열 내지 제95서열에 기재된 24종의 단백질 각각과 관련된 구성을 포함하는 단백질 또는 이를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 그 자체, 이를 포함하는 암 진단용 키트 또는 암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 24개의 발명
상기 26개의 발명군은 "단백질 또는 유전자의 발현 프로파일을 이용한 암의 진단"에 공통된 기술적 특징이 존재합니다. 그러나 상기 기술적 특징은 "Pharmacol. Ther., Vol. 128, No. 3, pp488-498 (2010.09.09)"에 이미 기재되어 있어, PCT 규칙 13.2의 규정에 기초하여 이 국제출원은 발명의 단일성이 없습니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☒ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.
1-6

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2011/001558

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음