

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국(43) 국제공개일
2014 년 10 월 9 일 (09.10.2014)(10) 국제공개번호
WO 2014/163445 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/574 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/002959
- (22) 국제출원일: 2014 년 4 월 7 일 (07.04.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0037336 2013 년 4 월 5 일 (05.04.2013) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 120-743 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 허용민 (HUH, Yong-min); 137-930 서울시 서초구 신반포로 270 140 동 902 호, Seoul (KR). 노성훈 (NOH, Sung Hoon); 158-755 서울시 양천구 목동동로 350 518-306, Seoul (KR). 서진석 (SUH, Jin Suck); 137-910 서울시 서초구 효령로 68 길 81 102 동 1002 호, Seoul (KR). 정재호 (CHEONG, Jae-Ho); 135-280 서울시 강남구 삼성로 150 미도아파트 103-808, Seoul (KR).

박은성 (PARK, Eun Sung); 138-891 서울시 송파구 잠실로 62 333 동 2302 호, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 135-936 서울시 강남구 역삼로 3 길 11 광성빌딩 신관 5 층, 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, LT, 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, 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: METHOD FOR MANUFACTURING GASTRIC CANCER PROGNOSIS PREDICTION MODEL

(54) 발명의 명칭 : 위암에 대한 예후 예측 모형의 제조방법

<GROUP2 * KRAS>

AA 교차분석			KRAS		Total
			0	1	
GROUP2	CL1	Count	97	3	100
		GROUP2 %	97.0%	3.0%	100.0%
		KRAS %	29.9%	11.5%	28.6%
	CL2	Count	227	23	250
		GROUP2 %	90.8%	9.2%	100.0%
		KRAS %	70.1%	86.5%	71.4%
Total		Count	324	26	350
		GROUP2 %	92.6%	7.4%	100.0%
		KRAS %	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3.993 ^a	1	.046		
Continuity correction ^b	3.142	1	.076		
Likelihood Ratio	4.692	1	.030		
Fisher's Exact Test				.068	.031
N of Valid Cases	350				

a. 0 cells(.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7.43

b. Computed only for a 2x2 table

AA ... Cross tabulation

(57) Abstract: The present invention relates to a novel model for predicting a prognosis capable of predicting the prognosis of gastric cancer, and more specifically, to manufacturing a prediction model for predicting a clinical result after a resection during gastric cancer surgery through genetic mutation comparative analysis.

(57) 요약서: 본 발명은 위암의 예후 예측이 가능한 신규한 예후 예측 모형의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 유전자 돌연변이 비교 분석법을 통해 위암의 수술에 의한 절제 후 임상 결과를 예측하는 예측 모형을 제조할 수 있다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, **공개:**
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 위암에 대한 예후 예측 모형의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 유전자 돌연변이 비교 분석법을 통해 위암의 예후 예측이 가능한 신규한 예후 예측 모형의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 위선암(Gastric adeno-carcinoma)은 2000년 700,349명의 사망에서 두 번째 원인으로, 세계에서 가장 일반적으로 진단된 네 번째 암이다. 몇 가지 역학적 및 조직병리학적 특징들을 갖는 단일 이질적 질환으로 간주하고 있다. 위암 치료는 주로 환자를 수술 만으로 또는 수술과 화학요법으로 치료하여야 하는지를 결정하는 TNM(tumor, node, metastasis) 병기결정 같은 임상적 파라미터에 근거한다. 위암은 유방암과 대장암 등과 달리 TNM 병기 시스템에 따라서 1기에서 4기까지 명확하게 차이가 난다. 즉, 1기의 경우에는 5년 생존율이 90% 이상이며, 4기의 경우에는 20% 이하로 큰 차이를 보인다. 그러므로 TNM 병기 시스템의 예후 예측력이 매우 뛰어남을 알 수 있다[참고문헌, 7th edition of the AJCC cancer staging Manual: stomach. *Ann Surg Oncol* 2010;17:3077-3079]. 상기 병기 시스템에 기반을 두어 위암은 흔히 조기 위암(Early Gastric Cancer), 국소진행형(Locally Advanced Gastric Cancer), 국소 침윤형(Locally Advanced Invasive Gastric Cancer) 및 전이 위암(Metastatic Gastric Cancer) 등으로 나눌 수 있다.
- [3] 비록 수술이 실시 가능한 위암의 주요 치료이긴 하나, 진행성인 경우 재발률이 높다. 재발을 예방하고, 위암 환자들의 예후를 개선하기 위해 화학요법과 화학-방사선요법을 포함한 집합적 치료가 도입되었다. 그러나, 이들 치료 방법이 환자들에서 일반적인 임상 결과를 개선하기는 하나 종양의 임상병리학적 이질성과, 같은 병기에 있는 환자들의 다른 결과는 어췌버트 화학요법의 임무를 예측하는데 한계가 있어 개별 환자들에 대한 최적 접근이 부족한 상태이다.
- [4] 최근의 진전에도 불구하고 발병적으로 별개의 종양 유형에 대해 특이적 치료 섭생을 표적화하고, 궁극적으로 성과를 최대화시키기 위하여 종양 치료를 개인화하기 위한 암 치료의 도전과제들이 남아있다. 따라서, 각종 치료 선택사항들에 대한 환자 반응에 관한 예측적 정보를 동시에 제공하는 시험을 필요로 하고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 위암 환자들의 유전자 돌연변이에 기초한 새로운 예후 예측 모형의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 대상으로부터 얻은 암세포를 포함하는 생물학적 샘플에서 KRAS, MET 및 PIK3CA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에서 단일 염기 다형성의 발현 여부를 측정하는 단계; 및 상기 단일 염기 다형성의 발현 빈도에 따라 통계적으로 유의한 설정치 범위를 결정하고, 상기 설정치 범위에 따라 전체 생존율(Overall Survival, OS) 측면에서 좋은 예후 군과 나쁜 예후 군으로 분류하는 단계를 포함하는, 위암으로 진단된 대상에서 예후 예측 모형을 제조하는 방법을 제공한다.
- [7] 상기 예후 예측 모형은 TNM 병기와 상관없는 전체 위암의 수술에 의한 절제 후 임상 결과를 예측하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [8] 본 발명은 TNM 병기와 상관없는 전체 위암 환자 군을 대상으로 분자적 특성에 의한 유전자 돌연변이의 발현 빈도에 따른 통계적 유의 값을 설정치로 정하여 전체 생존율 측면에서 예후가 좋은 군과 나쁜 군으로 분류할 수 있는 예후 예측 모형을 제공함으로써, 위암 수술에 의한 절제 후 임상 결과를 예측할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

- [9] 도 1은 종양조직의 mRNA 마이크로어레이 결과와 이에 따른 그룹 분류를 나타낸 것이다.
- [10] 도 2는 각 그룹의 Kaplan-Meier Plot를 나타낸 것이다.
- [11] 도 3 내지 5는 그룹 2와 돌연변이 관계를 교차분석 및 chi-square 분석 결과로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [12] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [13] 본 발명은 대상으로부터 얻은 암세포를 포함하는 생물학적 샘플에서 KRAS, MET 및 PIK3CA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에서 단일 염기 다형성의 발현 여부를 측정하는 단계; 및 상기 단일 염기 다형성의 발현 빈도에 따라 통계적으로 유의한 설정치 범위를 결정하고, 상기 설정치 범위에 따라 전체 생존율(Overall Survival, OS) 측면에서 좋은 예후 군과 나쁜 예후 군으로 분류하는 단계를 포함하는, 위암으로 진단된 대상에서 예후 예측 모형을 제조하는 방법을 제공한다.
- [14] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 위암과 관련된 차등적인 mRNA 발현을 나타내는 예후 관련 유전자 군을 선정하고, mRNA 고 발현 군과 저 발현 군으로 분류하고, 상기 분류 군에서 돌연변이 확률이 현저히 높은 유전자로 KRAS, MET 및/또는 PIK3CA를 선정하고, 상기 유전자를 대상으로 하나 이상의 단일 염기 다형성의 발현 여부를 측정한 결과, 상기 유전자들의 단일 염기 다형성의 발현 빈도는 mRNA 고 발현 군과 저 발현 군에서 통계적으로 유의한 정도로 다르게 나타나 전체 생존율 측면에서 예후가 좋은 군과 나쁜 군으로 분류할 수 있는

분류 기준으로 적용될 수 있음을 확인하였다.

- [15] 따라서, 본 발명에 따른 방법에서, 예후 예측 모형은 위암으로 진단된 대상에서 KRAS, MET 및/또는 PIK3CA 유전자의 단일 염기 다형성의 발현 빈도를 분류 기준으로 하여 좋은 예후 군과 나쁜 예후 군으로 분류하고 이러한 분류는 통계적 유의 값을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [16] 상기 차등적인 mRNA 발현을 나타내는 예후 관련 유전자 군은 PCR 또는 어레이 기반 방법에 따라 실시될 수 있다.
- [17] 상기 차등적인 mRNA 발현을 나타내는 예후 관련 유전자 군의 분류는 공지된 다양한 통계적 수단을 사용하여 결정할 수 있다. mRNA 고 발현 군과 저 발현 군은 통계적으로 유의한 값, 즉, 약 1.5배 이상, 약 2배 이상, 약 4배 이상, 약 6배 이상, 약 10배 이상의 차이가 있는 군을 대상으로 나눌 수 있다.
- [18] 암은 게놈 내 유전적 및 후성적 돌연변이의 축적에 의해 유발된다. 하나 또는 두 개의 염기의 변화는 아미노산 치환을 유발하여 단백질의 활성을 바꿀 수 있다. 이들 단일 염기 다형성의 존재는 암의 진단 및 예후와 상관관계가 있다. 따라서, 본 발명은 KRAS, MET 및/또는 PIK3CA 유전자의 하나 이상의 단일 염기 다형성의 발현 빈도를 예후 예측 모형 제조에 적용하였다.
- [19] 상기 KRAS의 단일 염기 다형성은 A146PT_g436ca, G10R_g28a, G12DAV_g35act, G12SRC_g34act, G13DAV_g38act, G13SRC_g37act, Q61EKX_c181gat, Q61HHE_a183ctg 및 Q61LPR_a182tct로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 설정치 결정에는 이러한 돌연변이를 하나로 계수하여 설정치에 적용한다.
- [20] 여기서, 알파벳 대문자는 아미노산 1문자 코드이고, 알파벳 소문자는 염기를 나타내며, 숫자는 염기 또는 아미노산 잔기 위치를 나타낸다. 예컨대, A146PT_g436ca의 경우 유전자 436 위치에서 g는 c 또는 a로 치환될 수 있고, 이로 인해 아미노산 146번째 위치에서 아미노산 알라닌(A)은 프롤린(P) 또는 트레오닌(T)로 치환될 수 있다는 의미이다. 이하 MET 및 PIK3CA의 돌연변이의 예시 역시 이러한 의미를 나타낸다.
- [21] 상기 MET의 돌연변이는 H1112_a3335gt, H1112Y_c3334t, M1268T_t3803c, N375S_a1124g, R988C_c2962t, T1010I_c3029t, Y1248HD_t3742cg 및 Y1253D_t3757g로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 설정치 결정에는 이러한 돌연변이를 하나로 계수하여 설정치에 적용한다.
- [22] 상기 PIK3CA의 돌연변이는 A1046V_c3137t, C420R_t1258c, E110K_g328a, E418K_g1252a, E453K_g1357a, E542KQ_g1624ac, E542VG_a1625tg, E545AGV_a1634cgt, E545D_g1635ct, E545KQ_g1633ac, F909L_c2727g, G1049R_g3145c, H1047RL_a3140gt, H1047RL_a3140gt, H1047RL_a3140gt, H1047Y_c3139t, H701P_a2102c, K111N_g333c, M1043I_g3129atc, M1043V_a3127g, N345K_t1035a, P539R_c1616g, Q060K_c178a, Q546EK_c1636ga, Q546LPR_a1637Tcg, R088Q_g263a, S405F_c1214t, T1025SA_a3073tg,

Y1021C_a3062g 및 Y1021HN_t3061ca로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 설정치 결정에는 이러한 돌연변이를 하나로 계수하여 설정치에 적용한다.

- [23] 상기 단일 염기 다형성을 측정하는 방법은 특별히 제한하지는 않으나, MALDI-TOF MS(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)를 이용할 수 있다.
- [24] 본 발명의 예후 예측 모형을 제조하는 방법에서, 단일 염기 다형성의 발현 빈도를 예후가 좋은 군과 나쁜 군으로 분류 기준으로 사용함에 있어서, 단일 염기 다형성의 발현 빈도에 따라 통계적으로 유의한 설정치 범위를 결정하고 상기 설정치 범위를 기준으로 전체 생존율 측면에서 예후가 좋은 군과 나쁜 군으로 분류할 수 있다.
- [25] 상기 설정치 범위는 전체 대상에 대한 단일 염기 다형성의 발현 여부를 백분율로 계산하여 약 7%, 약 5%, 약 3%로 정할 수 있으나, 이에 특별히 제한하지는 않는다.
- [26] 예컨대, 본 발명의 일 구체예에 따르면, KRAS 또는 PIK3CA 유전자의 단일 염기 다형성의 발현 빈도가 각각 3% 이하인 경우 예후가 나쁜 군으로, 3%를 초과한 경우 예후가 좋은 군으로 분류할 수 있다.
- [27] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, MET 유전자의 단일 염기 다형성의 발현 빈도가 7% 이하인 경우 예후가 좋은 군으로, 7%를 초과한 경우 예후가 나쁜 군으로 분류할 수 있다.
- [28] 본 발명의 예후 예측 모형을 제조하는 방법에서, 예후가 좋은 군은 3년 이상, 6년 이상, 10년 이상의 기간 동안 전체 생존율이 높음을 의미하고, 예후가 나쁜 군은 상기 기간 동안 전체 생존율이 낮음을 의미한다. 상기 용어, 좋은 예후는 임상 결과의 긍정적 임상 결과 가능성의 증가로 표현될 수 있고, 나쁜 예후는 임상 결과의 긍정적 임상 결과 가능성의 감소로 표현될 수 있다.
- [29] 본 발명의 방법에 따른 예후 예측 모형은 TNM 병기와 상관없는 전체 위암의 수술에 의한 절제 후 임상 결과를 예측하는데 유용할 수 있다.
- [30] 달리 정의되지 않는다면, 본원에 사용된 기술 및 과학 용어들은 당업자 수준에서 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미가 있다. 본 발명은 어떤 방식으로든 설명된 방법 및 재료로 제한되지 않는다. 본 발명의 목적상, 하기 용어들이 아래에서 정의된다.
- [31] 용어, "폴리뉴클레오티드"는 일반적으로 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 말하고, 예컨대 변형 또는 비-변형 RNA 또는 DNA일 수 있다. 본 명세서에서, "폴리뉴클레오티드"는 구체적으로 cDNA를 포함한다.
- [32] 용어, "올리고뉴클레오티드"는 비제한적으로 한-가닥 데옥시리보뉴클레오티드, 한- 또는 두-가닥 리보뉴클레오티드, RNA:DNA 하이브리드 및 두-가닥 DNA를 포함하는, 비교적 짧은 폴리뉴클레오티드를

말한다. 올리고뉴클레오타이드, 예를 들면 한-가닥 DNA 프로브
 올리고뉴클레오타이드는 종종 예를 들면 상업적으로 입수가 가능한 자동화
 올리고뉴클레오타이드 합성기를 사용하는 화학적 방법에 의해 합성된다. 그러나,
 올리고뉴클레오타이드는 시험관내 제조합 DNA-매개 기술을 포함하는 각종 다른
 방법들에 의해 및 세포 및 유기체 중에서의 DNA 발현에 의해 제조될 수 있다.

- [33] 용어, "차등적으로 발현된 유전자" 또는 "차등적인 유전자 발현"은 정상 또는
 대조용 대상체의 발현에 비하여 위암과 같은 암을 앓는 대상체 중에서 더 높거나
 낮은 수준으로 활성화되는 유전자를 말한다. 또한, 동일한 질병의 다른 병기에서
 더 높거나 낮은 수준으로 활성화되는 유전자를 포함한다. 차등적으로 발현되는
 유전자는 핵산 수준 또는 단백질 수준에서 활성화 또는 억제되거나, 다른
 스플라이싱을 받아 상이한 폴리펩타이드 산물을 야기하는 경우일 수 있다.
 이러한 차이는 예를 들면 폴리펩타이드의 mRNA 수준, 표면 발현, 분비 또는
 다른 분배에 있어서의 변화에 의해 입증될 수 있다. 본 발명의 목적상, "차등적인
 유전자 발현"은 정상 및 질병에 걸린 대상체에서 또는 질병에 걸린 대상체의
 다양한 병기에서 주어진 유전자의 발현 사이에 약 1.5배 이상, 약 4배 이상, 약
 6배 이상, 약 10배 이상의 차이가 있을 때 존재하는 것으로 간주 된다.

- [34] 유전자 전사체 또는 유전자 발현 생성물에 관한 용어 "표준화된"은 기준
 유전자 세트의 전사체/생성물의 평균 수준에 대한 전사체 또는 유전자 발현
 생성물의 수준을 말하는데, 여기서 레퍼런스 유전자들은 환자, 조직 또는 치료에
 걸쳐 이들의 최소한의 변동에 기준하여 선택되거나 ("하우스키핑
 유전자(housekeeping genes)"), 또는 레퍼런스 유전자는 시험된 유전자들 전체를
 말한다. 후자의 경우, 일반적으로 "전체 표준화(global normalization)"로
 언급되는데, 시험된 유전자들의 총 수가 비교적 큰, 바람직하게는 50 초과인
 것이 중요하다. 구체적으로, RNA 전사체에 관한 용어 '표준화된'은 기준 유전자
 세트의 전사 수준의 평균에 대한 전사 수준을 말한다.

- [35] 용어, "발현 역치" 및 "정의된 발현 역치"는 혼용하여 사용하며, 이 수준
 이상에서는 유전자 또는 유전자 생성물이 환자 반응에 대한 예측 마커로서
 사용되는 해당 유전자 또는 유전자 생성물의 수준을 말한다. 역치는 대표적으로
 임상적 연구로부터 실험적으로 정의된다. 발현 역치는 최대 민감성, 또는 최대
 선택성(예를 들면 한 약물에 대한 반응자들만을 선택하도록), 또는 최소 오차로
 선택될 수 있다.

- [36] 용어, "유전자 증폭"은 특정 세포 또는 세포주에서 유전자 또는 유전자 단편의
 다수개의 복사물이 형성되는 과정을 말한다. 복제된 영역 (증폭된 DNA의
 신장)은 종종 "암플리콘"으로 언급된다. 종종, 생산된 mRNA의 양, 즉 유전자
 발현도는 또한 특정 유전자의 만들어진 복제 수에 비례하여 증가한다.

- [37] 본 명세서에서, "예후"는 본원에서 암에 의한 사망 또는 위암과 같은 신생물성
 질환의 진행(재발, 전이성 확산 및 내약물성 포함)의 가능성의 예측을 말하는데
 사용된다. 용어 "예측"은 본원에서 환자가 주요 종양의 수술 제거 후에 암 재발

없이 특정 기간 동안 살아남게 될 가능성을 말하는데 사용된다. 이러한 예측은 임의의 특정 환자에 대하여 가장 적절한 치료 기법을 선택함으로써 치료를 결정하는데 임상적으로 사용될 수 있다. 이러한 예측은 환자가 치료 섭생, 예를 들면 수술 시술에 대하여 유리하게 반응하기 쉬운지, 또는 수술 종료 후에 환자의 장기간 생존이 가능한지를 예측하는데 있어서 귀중한 수단이 된다.

[38] 달리 지시하지 않는 한, 분자 생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학 및 생화학의 종래 기술을 사용하여 본 발명을 수행할 수 있다.

[39]

[40] 1. 유전자 발현 프로파일 작성(Profiling)

[41] 유전자 발현 프로파일 작성 방법은 폴리뉴클레오티드의 혼성화 분석에 기초한 방법, 폴리뉴클레오티드의 서열화에 기초한 방법, 및 프로테오믹스 기제 방법을 포함한다. 예를 들어 mRNA 발현의 정량화를 위한 방법은 노던 블랏팅(northern blotting) 및 인 시츄 혼성화(in situ hybridization); RNase 보호 검정시험; 및 PCR-기제 방법, 예를 들면 역 전사 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR) 등을 포함한다. 또는, DNA 두 가닥, RNA 두 가닥, 및 DNA-RNA 하이브리드 두 가닥 또는 DNA-단백질 두 가닥을 포함하는 특정 두 가닥을 인식할 수 있는 항체들이 사용될 수 있다. 서열화-기제 유전자 발현 분석에서 대표적인 방법은 유전자 발현의 연속 분석(Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) 및 대량적으로 평행한 시그너처 서열화(massively parallel signature sequencing, MPSS)에 의한 유전자 발현 분석을 포함한다.

[42]

[43] 2. PCR-기반 유전자 발현 프로파일 작성 방법

[44] a. 역 전사효소 PCR(RT-PCR)

[45] 가장 민감하고 가장 유연한 정량적 PCR-기제 유전자 발현 프로파일작성 방법들 중 하나는 RT-PCR이고, 이것은 약물 치료와 함께 또는 약물 치료 없이 정상 조직 및 종양 조직에서의 상이한 샘플 집단에 있어서의 mRNA 수준을 비교하여 유전자 발현 패턴을 특성화하고, 밀접하게 관련된 mRNA들을 판별하고, RNA 구조를 분석하는데 사용될 수 있다.

[46] 제1단계는 표적 샘플로부터 mRNA의 단리이다. mRNA는 예를 들면 냉동되거나 보관된 파라핀-매립 및 고정된 (예를 들면, 포르말린-고정된) 조직 샘플로부터 추출될 수 있다.

[47] mRNA 추출을 위한 일반적인 방법은 당업계에서 공지되어 있으며, 파라핀에 매립된 조직으로부터의 RNA 추출 방법은 문헌 ([Rupp and Locker, *Lab Invest.* 56: A67 (1987)] 및 [De Andres *et al.*, *BioTechniques* 18: 42044 (1995)]) 등에 개시되어 있다. 특히, RNA 단리는 상업적 제조업체, 예를 들면 퀴아겐(Qiagen)으로부터의 정제 키트, 완충제 세트 및 프로테아제를 사용하여 제조업체의 설명서에 따라 수행할 수 있다. 다른 상업적으로 입수가 가능한 RNA 단리 키트는 마스터퓨어(MasterPure)TM 완전 DNA 및 RNA 정제

키트(에피센트레(EPICENTRE)®, 위스콘신주 매디슨) 및 파라핀 블록(Paraffin Block) RNA 단리 키트(앰비온, 인크.(Ambion, Inc.))를 포함한다. 조직 샘플로부터의 전제 RNA는 RNA Stat-60 (Tel-Test)를 사용하여 단리할 수 있다. 종양으로부터 제조된 RNA는 예를 들면 염화세슘 밀도 구배 원심분리에 의해 단리될 수 있다.

- [48] RNA는 PCR을 위한 주형으로 사용될 수 없기 때문에, RT-PCR에 의한 유전자 발현 프로파일 작성의 제1단계는 RNA 주형의 cDNA로의 역 전사이고, 이후 그의 PCR 반응으로의 지수적 증폭이 이어진다. 역 전사효소는 주로 조류 골수아세포종 바이러스 역 전사효소(AMV-RT) 및 몰로니(Moloney) 쥐 백혈병 바이러스 역 전사효소(MMLV-RT)를 사용할 수 있다. 역 전사 단계는 대표적으로 발현 프로파일작성의 환경 및 목표에 따라, 특정 프라이머, 무작위 헥사머, 또는 올리고-dT 프라이머를 사용하여 초회항원자극된다. 예를 들면, 추출된 RNA는 진앰프(GeneAmp) RNA PCR 키트(퍼킨 엘머(Perkin Elmer), 미국 캘리포니아주)를 사용하여 제조업체의 설명서에 따라 역-전사될 수 있다. 유도된 cDNA는 이어서 후속되는 PCR 반응에서 주형으로서 사용될 수 있다.
- [49] 비록 PCR 단계가 각종 열안정성 DNA-의존성 DNA 폴리머라제를 사용할 수 있지만, 이것은 전형적으로는 Taq DNA 폴리머라제를 사용하는데, Taq DNA 폴리머라제는 5'-3' 뉴클레아제 활성을 갖지만, 3'-5' 판독방지(proofreading) 엔도뉴클레아제 활성은 부족하다. 따라서, 타크맨® PCR은 전형적으로는 Taq 또는 Tth 폴리머라제의 그의 표적 암플리콘에 결합된 혼성화 프로브를 혼성화시키는 5'-뉴클레아제 활성을 이용하지만, 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 임의의 효소가 사용될 수 있다. 2개의 올리고뉴클레오티드 프라이머들을 사용하여 PCR 반응의 대표적인 암플리콘을 생성시킨다. 제3 올리고뉴클레오티드 또는 프로브는 2개의 PCR 프라이머들 사이에 위치한 뉴클레오티드 서열을 검출하도록 설계된다. 프로브는 Taq DNA 폴리머라제 효소에 의해 비-연신성이고, 리포터 형광 염료 및 소광제(quencher) 형광 염료로 표시된다. 리포터 염료로부터 임의의 레이저-유도 방출은 2개의 염료가 이들이 프로브 상에 있을 때와 같이 함께 가깝게 위치할 때 소광제 염료에 의해 소거된다. 증폭 반응 동안, Taq DNA 폴리머라제 효소는 주형-의존적 방식으로 프로브를 절단한다. 생성되는 프로브 단편들은 용액 중에서 해리되고, 방출된 리포터 염료로부터의 신호에는 제2 형광단의 소거 효과가 없다. 리포터 염료의 한 분자가 합성된 새로운 분자 각각으로부터 방출되고, 소거되지 않은 리포터 염료의 검출은 데이터의 정량적 해석에 대한 기준을 제공한다.
- [50] 타크맨® RT-PCR은 상업적으로 입수 가능한 장비, 예를 들면 ABI 프리즘(PRISM) 7700™ 시퀀스 검출 시스템(Sequence Detection System)™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems), 또는 라이트사이클러(Lightcycler)(Roche Molecular Biochemicals)를 사용하여 수행될 수 있다.
- [51] 5'-뉴클레아제 검정시험 데이터는 초기에 Ct, 또는 역치 사이클로서 표현된다.

형광 값은 매 사이클 동안 기록되고, 증폭 반응으로 그 지점으로까지 증폭된 생성물의 양을 나타낸다. 형광 신호가 처음 통계학적으로 유의한 것으로 기록될 때의 지점이 역치 사이클(Ct)이다.

[52] 샘플 간의 변동 효과 및 오차를 최소화시키기 위하여, RT-PCR은 일반적으로 기준 RNA(이것은 이상적으로는 상이한 조직들 사이에서 일정 수준으로 발현됨)를 사용하여 수행되고, 실험 치료에 의해 영향을 받지 않는다. 유전자 발현 패턴을 표준화하는데 가장 자주 사용되는 RNA는 하우스키핑 유전자 글리세르알데히드-3-포스페이트-데히드로게나제 (GAPD) 및 β -액틴(ACTB)의 mRNA이다.

[53] 또한, 새로운 실시간 정량적 PCR은 이중-표지된 형광원성 프로브(즉, 타크맨® 프로브)를 통한 PCR 생성물 축적을 측정하는 기술로, 정량적 경쟁적 PCR(여기서는, 각 표적 서열에 대한 내부 경쟁자가 표준화에 사용됨) 및 샘플 내에 포함된 표준화 유전자 또는 RT-PCR에 대한 하우스키핑 유전자를 사용하는 정량적 비교용 PCR 모두와 상용 가능하다.

[54]

[55] b. 매스어레이(MassARRAY) 시스템

[56] 시커놈, 인크.(Sequenom, Inc.)가 개발한 매스어레이-기반 유전자 발현 프로파일 작성 방법에서는 RNA의 단리 및 역 전사 후에 얻은 cDNA를 합성 DNA 분자(경쟁자)(이것은 단일 염기를 제외한 모든 위치에서 표적화 cDNA 구역과 일치함)로 스파이크하고(spiked), 내부 표준으로 사용한다. cDNA/경쟁자 혼합물을 PCR 증폭시키고, 후-PCR 새우 알칼리성 포스파타제(SAP) 효소 처리를 가하여 남아있는 뉴클레오티드의 데포스포릴화를 야기한다. 알칼리성 포스파타제의 불활성화 후에, 경쟁자 및 cDNA로부터의 PCR 생성물을 프라이머 신장시키고, 이것은 경쟁자- 및 cDNA-유래 PCR 생성물에 대한 별도의 질량 신호들을 생성시킨다. 정제 후, 이들 생성물들을 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 흐름 시간 질량 분광측정법(MALDI-TOF MS) 분석을 이용한 분석에 필요한 성분들이 이미-부하 되어 있는 칩 어레이 상에 계량분배한다. 반응에 존재하는 cDNA를 이어서 생성된 질량 스펙트럼 내의 피크 면적 비를 분석하여 정량화한다.

[57] c. 기타 PCR-기반 방법

[58] 기타 시차 디스플레이; 증폭된 단편 길이 다형성 (iAFLP);

비드어레이(BeadArray) TM 기술 (일루미나(Illumina), 캘리포니아주 샌 디에고); 유전자 발현에 대한 신속 검정시험에 상업적으로 입수 가능한 루미넥스(Luminex)100 LabMAP 시스템 및 다색-코딩된 미소구(Luminex Corp.)를 사용하는, 유전자 발현 검출용 비즈어레이(BeadsArray for Detection of Gene Expression, BADGE); 및 고 피복 발현프로파일 작성(HiCEP) 분석이 있다.

[59]

[60] 3. 마이크로어레이

[61] 신선한 또는 파라핀에 매립된 종양 조직에서 암 관련 유전자의 발현 프로파일을 측정할 수 있다. 이 방법에서는, 관심을 갖는 서열(cDNA 및 올리고뉴클레오티드 포함)을 마이크로칩 기판상에 플레이팅 또는 배열시킨다. 배열된 서열들을 이어서 관심을 갖는 세포 또는 조직으로부터의 특정 DNA 프로브와 혼성화시킨다. RT-PCR 방법에서와 마찬가지로, mRNA의 공급원은 전형적으로 사람 종양 또는 종양 세포주, 및 대응하는 정상 조직 또는 세포주로부터 단리된 총 RNA이다. 따라서 RNA는 각종 주요 종양 또는 종양 세포주로부터 단리될 수 있다. 마이크로어레이 기술은 cDNA 클론의 PCR 증폭된 삽입물을 치밀한 어레이로 기판상에 제공한다. 바람직하게는, 10,000 이상의 뉴클레오티드 서열들을 기판에 가한다. 10,000 엘레먼트 각각으로 마이크로칩 상에 고정화된 미세배열된 유전자들이 엄격한 조건 하에서의 혼성화에 적합하다. 형광적으로 표지된 cDNA 프로브들이 관심을 갖는 조직으로부터 추출된 RNA의 역 전사에 의해 형광 뉴클레오티드의 혼입을 통해 생성될 수 있다. 칩에 가해진 표지된 cDNA 프로브는 어레이 상의 DNA 각 스팟에 특이성을 갖게 혼성화된다. 비-특이적으로 결합된 프로브들을 제거하기 위한 엄격한 세척 후, 칩을 동일초점 레이저 현미경에 의해 또는 다른 검출 방법, 예를 들면 CCD 카메라에 의해 주사한다. 각 배열된 엘레먼트의 혼성화에 대한 정량화는 대응하는 mRNA 과다의 평가를 가능하게 한다. 이중 색 형광의 경우, 2개의 RNA 공급원으로부터 생성된 별도로 표지된 cDNA 프로브가 어레이에 각 쌍 별로 혼성화된다. 따라서 각 명시된 유전자에 대응하는 2개의 공급원으로부터의 전사체의 상대적 과다가 동시에 결정된다. 소형화 규모의 혼성화가 많은 수의 유전자들에 대한 발현 패턴의 편리하고 신속한 평가를 제공한다. 이러한 방법은 희귀한 전사체(이것은 세포당 소수개의 복사물로 발현됨)을 검출하는데 및 발현도에 있어서 적어도 대략 2배 차이로 재현 가능하게 검출하는데 필요한 민감성을 갖는 것으로 나타났다. 마이크로어레이 분석은 상업적으로 입수 가능한 장비에 의해 제조업체의 프로토콜에 따라, 예를 들면 아피메트릭스 겐칩(Affymetrix GenChip) 기술 또는 인사이트(Incyte's) 마이크로어레이 기술을 사용하여 수행될 수 있다.

[62]

[63] 4. mRNA 단리, 정제 및 증폭의 일반적인 설명

[64] 파라핀에 매립된 조직을 사용하여 유전자 발현 프로파일을 작성하는 기술은 상술한 바와 같다. 최종적으로 얻은 데이터를 분석하여 관찰된 종양 샘플에서 확인된 특징적인 유전자 발현 패턴에 기초하여 환자에게 이용할 수 있는 최상의 치료 선택사항(들)을 판별해낸다.

[65] 본 발명의 중요한 면은 위암 조직에 의한 특정 유전자의 측정된 발현을 사용하여 예후 정보를 제공하는 것이다. 이러한 목적을 위해, 검정 시험된 RNA의 양, 사용된 RNA 품질에 있어서의 변동, 및 다른 인자, 예를 들면 기계 및 작업자 차이에 있어서의 차이에 대해 보정하는(표준화) 것이 필수적이다.

그러므로, 검정시험은 전형적으로 GAPD 및 ACTB와 같은 공지된 하우스키핑 유전자로부터 전사된 것들을 포함하는, 기준 RNA의 사용을 측정하여 혼입시킨다. 또는, 표준화는 검정시험된 유전자들 또는 이들의 많은 서브세트 전부의 평균 또는 중간 신호(Ct)를 기준으로 할 수 있다(전체 표준화 접근법). 하기 실시예에서는 중심 표준화 전략을 사용하였는데, 이것은 표준화를 위해 임상적 성과와의 상관성 부족에 기초하여 선택된 스크리닝된 유전자의 서브세트를 이용하였다.

발명의 실시를 위한 형태

- [66] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [67]
- [68] <실시예 1> 예후 예측 대상 선정 및 실험설계
- [69] Sanger Institute가 보유하고 있는 다양한 암 중에서 동정되는 체세포 돌연변이에 대한 데이터베이스를 이용하여, 본 발명자들은 많은 다른 암에서 존재하는 보다 일반적으로 발생하는 단일 염기 다형성(SNP)의 존재를 검출하는 분석을 개발하였다.
- [70] 이를 위해, 종양 조직 샘플 537개, 정상 조직 샘플 129개, FFPE 종양 샘플 125개(1999년 내지 2006년까지 연세대학교 세브란스 병원에서 일차 치료로 위 절제술을 받은 위암 환자들) 및 FFPE 정상 조직 샘플 123개를 대상으로, AKT1, BRAF, CTNNB1, FBWX7, GNAS, IDH1, JAK2, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PDPK1, PHLPP2, PIK3CA 및 PIK3R1를 선정하고, 이들에서 나타나는 159 종류의 돌연변이를 조사하였다.
- [71] 단일 염기 다형성 검출은 시커놈 MALDI TOF MassArray system(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)을 사용하였다. 이 방법은 DNA 근처 선정된 SNP를 일차로 PCR로 증폭하고 나서 프라이머 익스텐션 반응을 진행하여 잠재적 SNP 염기를 측정한다. PCR 프라이머와 익스텐션 프라이머 둘 다 Sequenom Assay Design software를 이용하여 설계하였다. 이 프로그램은 웰 당 29개까지 다른 SNP의 다중 반응이 가능하다. 초기 PCR 반응은 제조업체 설명서에 따라 384 웰 포맷에서 수행하고 나서, Sequenom 사의 EXO-SAP를 이용하여 PCR을 마무리하였다. 프라이머 익스텐션 반응은 Sequenom s IPLEX 화학을 이용하여 그들의 프로토콜에 따라 수행하였다. 그 후, IPLEX 반응은 Sequenom s Clean Resin을 이용하여 탈염 처리되고, Samsung Nanodispenser를 이용하여 Spectrochip matrix chips 상에 스팟팅 하였다. 그 후 상기 칩을 Sequenom MassArray 시켰다. Sequenom Typer Software는 생성된 질량 스펙트럼을 해석하고 기대된 질량에 기초하여 SNP를 보고한다. 생성된 모든 스펙트럼은 2반복으로 진행하고 육안으로 점검하였다.
- [72] 결과는 표 1에 나타내었고, 각 유전자에서 발생하는 한 종류 이상의 돌연변이를

1개로 계수하고 산출하였다.
[73] 표 1

[Table 1]

구 분	AK T1	BR AF	CT NN B1	FB WX 7	GN AS	ID H1	JA K2	KIT	KR AS	ME T	NR AS	PD GF RA	PD PK 1	PH LP P2	PIK 3C A	PIK 3R1
종 양 조 직-5 37	2	1	6	7	1	1	1	1	33	54	1	7	1	0	42	0
정 상 조 직-1 29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0
FFP E- 종 양 샘 플-1 25	0	0	0	0	0	0	0	0	3	12	1	1	0	4	3	15
FFP E- 정 상 샘 플-1 23	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	0	1	0	4	0	12
G.C 세 포 주-1 08 - 4반 복	0	0	11	4	0	0	0	0	23	4	4	1	0	0	19	0
유	0	11	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0

방 암 세 포 주- 16-4 반 복																
ET C	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6	0	2	0	0	1	0
TO TA L - 108 1	2	12	17	11	1	1	1	5	72	99	6	12	1	8	65	27

[74] 표 1에 나타난 바와 같이, KRAS, MET, PIK3CA 돌연변이가 정상 조직과 비교하여 종양에서 많이 나타남을 알 수 있었다.

[75] KRAS, MET 및 PIK3CA의 단일 염기 다형성에 의한 돌연변이 종류는 표 2와 같다.

[76] 표 2

[Table 2]

유전자 종류	돌연변이 종류
KRAS	A146PT_g436ca, G10R_g28a, G12DAV_g35act, G12SRC_g34act, G13DAV_g38act, G13SRC_g37act, Q61EKX_c181gat, Q61HHE_a183ctg, Q61LPR_a182tct
MET	H1112_a3335gt, H1112Y_c3334t, M1268T_t3803c, N375S_a1124g, R988C_c2962t, T1010I_c3029t, Y1248HD_t3742cg, Y1253D_t3757g
PIK3CA	A1046V_c3137t, C420R_t1258c, E110K_g328a, E418K_g1252a, E453K_g1357a, E542KQ_g1624ac, E542VG_a1625tg, E545AGV_a1634cgt, E545D_g1635ct, E545KQ_g1633ac, F909L_c2727g, G1049R_g3145c, H1047RL_a3140gt, H1047RL_a3140gt, H1047RL_a3140gt H1047Y_c3139t, H701P_a2102c, K111N_g333c, M1043I_g3129atc, M1043V_a3127g, N345K_t1035a, P539R_c1616g, Q060K_c178a, Q546EK_c1636ga, Q546LPR_a1637Tcg, R088Q_g263a, S405F_c1214t, T1025SA_a3073tg, Y1021C_a3062g, Y1021HN_t3061ca
알파벳 대문자는 아미노산 1문자 코드이고, 대문자 사이의 숫자는 아미노산 위치로 숫자 왼쪽은 치환 전 아미노산, 숫자 오른쪽은 치환 후 아미노산을 나타냄. 알파벳 소문자는 염기를 나타내고, 소문자 사이의 숫자는 유전자 내 염기 위치로 숫자 왼쪽은 치환 전 염기, 숫자 오른쪽은 치환 후 염기를 나타냄	

- [77] 상기 결과를 기반으로, 연세대학교 세브란스 병원에서 보유 중인 종양조직 샘플 545개와 정상조직 샘플 129개를 대상으로 chi-square 분석을 한 결과, KRAS, MET 및 PIK3CA의 p-값은 0.001 이하였다. 즉, 정상조직과 종양조직 간에는 돌연변이 여부에 대한 구분이 분명히 이루어진다고 볼 수 있다.
- [78] 상기 샘플 중 종양조직 350개를 대상으로 mRNA 마이크로어레이를 실시하고, mRNA 그룹에서 해당 예후와 관련된 돌연변이가 있는지를 조사하였다. 이를 위해 350개의 mRNA의 unsupervised clustering 분석을 하여 그룹으로 나누고 Kaplan-Mei Plot 및 log rank test를 실시하여 예후 관련 그룹을 확정하였다. 즉, 350개 샘플을 원래의 로우 데이터로 추출하여 사분위수 표준화를 실시하고, 로그 베이스 2로 전환한 후 median centering를 실시하였다. 분산 여과 방법을 통해 예후 관련 유전자를 그룹화하고, 최종적으로 중간값과 비교하여 1.5배 이상의 증가 또는 감소를 보여주는 15개의 프로브를 사용하여 5432개의 유전자를 추출하고 Cluster and Treeview(<http://rana.lbl.gov/EigenSoftware.htm>)으로 클러스터 분석을 시행하였다.

- [79] 상기 그룹에서 KRAS, MET 및 PIK3CA 돌연변이가 있는 샘플을 배치하고, chi-square 분석 기법을 통해 그룹 간의 해당 돌연변이와의 연관 관계를 조사하였다. 종양조직의 mRNA 마이크로어레이 결과는 도 1에 나타내었다.
- [80] 도 1 및 표 3은 두 개의 그룹으로 구분하였을 경우(CL1, CL2), 세 개의 그룹으로 구분하였을 경우(CL1, CL2, CL3), 4개의 그룹으로 구분하였을 경우(CL1, CL2, CL3, CL4), 5개의 그룹으로 구분하였을 경우 (CL1, CL2, CL3, CL4, CL5) 의 P-값을 기재하였다. 예컨대, 그룹 2는 2개의 그룹(CL1, CL2)으로 구분되며 각 그룹에서 KRAS, MET 및 PIK3CA의 돌연변이 여부를 알 수 있다.

[81] 표 3

[Table 3]

CHI-SQUARE	KRAS	MET	PIK3CA
그룹 2	0.046	0.064	0.015
그룹 3	0.003	0.180	0.002
그룹 4	0.008	0.314	0.005
그룹 5	0.016	0.181	0.007

- [82] 도 2는 각 그룹의 Kaplan-Meir Plot를 나타낸 것이다.
- [83] 도 3 내지 5는 그룹 2와 돌연변이 관계를 교차분석 및 chi-square 분석 결과로 나타낸 것이다.
- [84] 도 3 내지 5에 나타난 바와 같이, 예후가 좋은 클래스 2에서 KRAS 및 PIK3CA 유전자의 돌연변이 빈도가 높았고, 예후가 나쁜 클래스 1에서는 KRAS 및 PIK3CA 유전자의 돌연변이 빈도가 낮게 나타났다. 또한, 예후가 좋은 클래스 2에서 MET 유전자의 돌연변이 빈도가 낮았고, 예후가 나쁜 클래스 1에서는 MET 유전자의 돌연변이 빈도가 높게 나타났다.

산업상 이용가능성

- [85] 본 발명은 위암 재발 예후 예측 분야에서 진단 키트로 사용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 대상으로부터 얻은 암세포를 포함하는 생물학적 샘플에서 KRAS, MET 및 PIK3CA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에서 단일 염기 다형성의 발현 여부를 측정하는 단계; 및
상기 단일 염기 다형성의 발현 빈도에 따라 통계적으로 유의한 설정치 범위를 결정하고, 상기 설정치 범위에 따라 전체 생존율(Overall Survival, OS) 측면에서 좋은 예후 군과 나쁜 예후 군으로 분류하는 단계를 포함하는, 위암으로 진단된 대상에서 예후 예측 모형을 제조하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
KRAS의 단일 염기 다형성은 A146PT_g436ca, G10R_g28a, G12DAV_g35act, G12SRC_g34act, G13DAV_g38act, G13SRC_g37act, Q61EKX_c181gat, Q61HHE_a183ctg 및 Q61LPR_a182tct로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이고, 여기서, 알파벳 대문자는 아미노산 1문자 코드이고, 알파벳 소문자는 염기를 나타내며, 숫자는 염기 또는 아미노산 잔기 위치를 나타내는 것인 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
MET의 돌연변이는 H1112_a3335gt, H1112Y_c3334t, M1268T_t3803c, N375S_a1124g, R988C_c2962t, T1010I_c3029t, Y1248HD_t3742cg 및 Y1253D_t3757g로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이고, 여기서, 알파벳 대문자는 아미노산 1문자 코드이고, 알파벳 소문자는 염기를 나타내며, 숫자는 염기 또는 아미노산 잔기 위치를 나타내는 것인 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
PIK3CA의 돌연변이는 A1046V_c3137t, C420R_t1258c, E110K_g328a, E418K_g1252a, E453K_g1357a, E542KQ_g1624ac, E542VG_a1625tg, E545AGV_a1634cgt, E545D_g1635ct, E545KQ_g1633ac, F909L_c2727g, G1049R_g3145c, H1047RL_a3140gt, H1047RL_a3140gt, H1047RL_a3140gt, H1047Y_c3139t, H701P_a2102c, K111N_g333c, M1043I_g3129atc, M1043V_a3127g, N345K_t1035a, P539R_c1616g, Q060K_c178a, Q546EK_c1636ga, Q546LPR_a1637Tcg, R088Q_g263a, S405F_c1214t, T1025SA_a3073tg, Y1021C_a3062g 및 Y1021HN_t3061ca로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이고, 여기서, 알파벳 대문자는 아미노산 1문자 코드이고, 알파벳

소문자는 염기를 나타내며, 숫자는 염기 또는 아미노산 잔기 위치를 나타내는 것인 방법.

[청구항 5]

제1항에 있어서,

예후 예측 모형은 TNM 병기와 상관없는 전체 위암의 수술에 의한 절제 후 임상 결과를 예측하는 것인 방법.

[Fig. 1]

2개그룹

	N	Observed	Expected	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
Class_15_15_2=CL1	100	59	44.3	4.86	6.8
Class_15_15_2=CL2	250	98	112.7	1.91	6.8
Chisq= 6.8 on 1 degrees of freedom, p= 0.00913					

3개그룹

	N	Observed	Expected	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
Class_15_15_3=CL1	100	59	44.3	4.859	6.797
Class_15_15_3=CL2	92	28	45.6	6.770	9.613
Class_15_15_3=CL3	158	70	67.1	0.124	0.217
Chisq= 11.8 on 2 degrees of freedom, p= 0.00267					

4개그룹

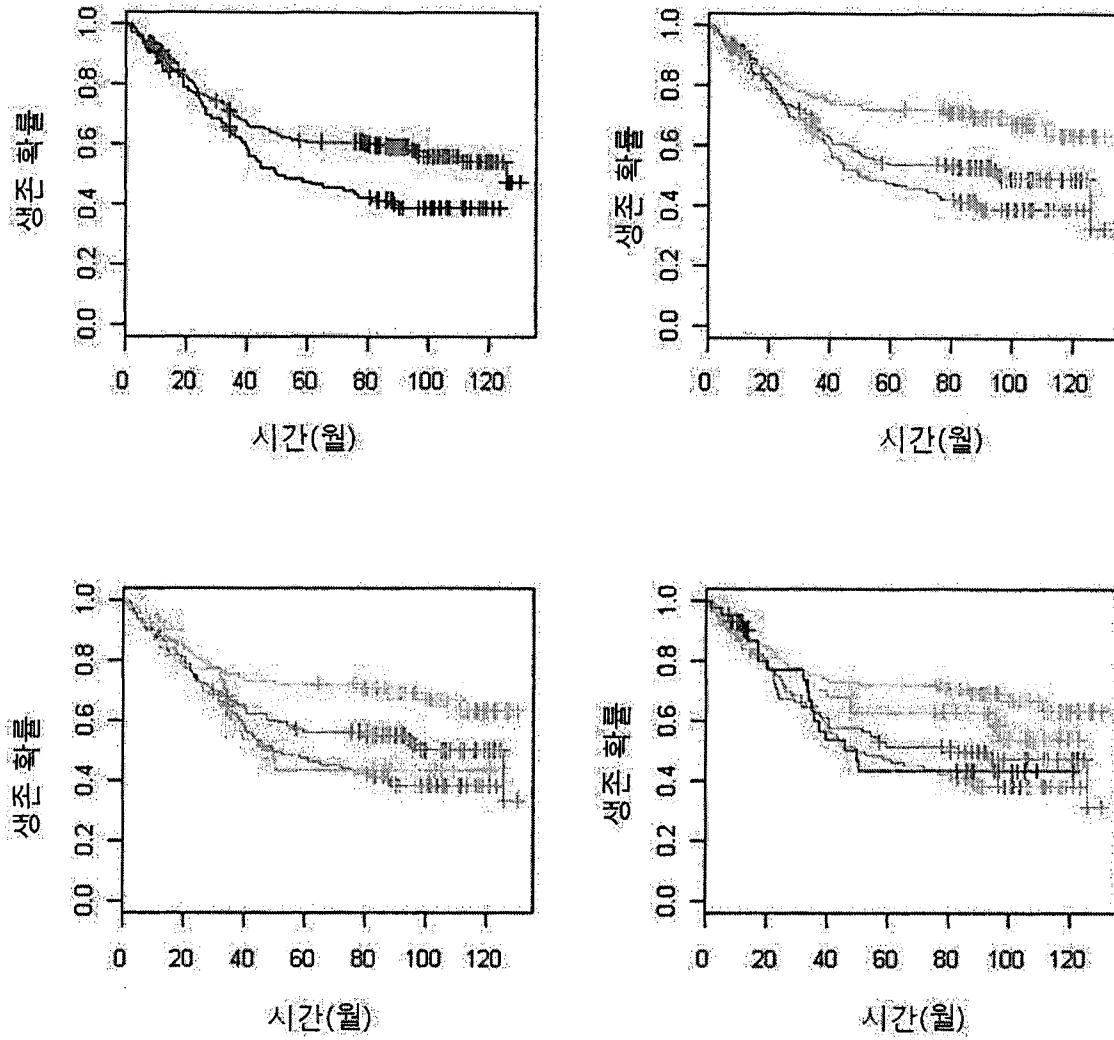
	N	Observed	Expected	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
Class_15_15_4=CL1	100	59	44.3	4.858757	6.796632
Class_15_15_4=CL2	92	28	45.6	6.770432	9.613380
Class_15_15_4=CL3	113	52	51.8	0.000494	0.000737
Class_15_15_4=CL4	45	18	15.3	0.487515	0.542952
Chisq= 12.2 on 3 degrees of freedom, p= 0.00663					

5개그룹

	N	Observed	Expected	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
Class_15_15_5=CL1	100	59	44.3	4.859	6.797
Class_15_15_5=CL2	92	28	45.6	6.770	9.613
Class_15_15_5=CL3	63	33	29.4	0.451	0.556
Class_15_15_5=CL4	50	19	22.5	0.538	0.629
Class_15_15_5=CL5	45	18	15.3	0.488	0.543
Chisq= 13.2 on 4 degrees of freedom, p= 0.0104					



[Fig. 2]



[Fig. 3]

<GROUP2 * KRAS>

교차분석

			KRAS		Total
			0	1	
GROUP2	CL1	Count	97	3	100
		GROUP2 %	97.0%	3.0%	100.0%
		KRAS %	29.9%	11.5%	28.6%
	CL2	Count	227	23	250
		GROUP2 %	90.8%	9.2%	100.0%
		KRAS %	70.1%	88.5%	71.4%
Total	Count	324	26	350	
	GROUP2 %	92.6%	7.4%	100.0%	
	KRAS %	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3.993 ^a	1	.046		
Continuity correction ^b	3.142	1	.076		
Likelihood Ratio	4.692	1	.030		
Fisher's Exact Test				.068	.031
N of Valid Cases	350				

a. 0 cells(.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7.43

b. Computed only for a 2x2 table

[Fig. 4]

<GROUP2 * MET>

교차분석

			MET		Total
			0	1	
GROUP2	CL1	Count	86	14	100
		GROUP2 %	86.0%	14.0%	100.0%
		MET %	27.1%	42.4%	28.6%
	CL2	Count	231	19	250
		GROUP2 %	92.4%	7.6%	100.0%
		MET %	72.9%	57.6%	71.4%
Total	Count	317	33	350	
	GROUP2 %	90.6%	9.4%	100.0%	
	MET %	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3.426 ^a	1	.064		
Continuity correction ^b	2.718	1	.099		
Likelihood Ratio	3.202	1	.074		
Fisher Exact Test				.071	.053
N of Valid Cases	350				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9.43

b. Computed only for a 2x2 table

[Fig. 5]

<GROUP2 * PIK3CA>

교차분석

			PIK3CA		Total
			0	1	
GROUP2	CL1	Count	97	3	100
		GROUP2 %	97.0%	3.0%	100.0%
		PIK3CA %	30.4%	9.7%	28.6%
	CL2	Count	222	28	250
		GROUP2 %	88.8%	11.2%	100.0%
		PIK3CA %	69.6%	90.3%	71.4%
Total	Count	319	31	350	
	GROUP2 %	91.1%	8.9%	100.0%	
	PIK3CA %	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5.950 ^a	1	.015		
Continuity Correction ^b	4.977	1	.026		
Likelihood Ratio	7.167	1	.007		
Fisher's Exact Test				.012	.009
N of Valid Cases	350				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected counted is 8.86.

b. Computed only for a 2x2 table.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/002959

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(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)

G01N 33/574; A61K 39/395; G01N 33/68; C12Q 1/68; C12N 15/11

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: gastric cancer, prediction, prognosis, KRAS, MET, PIK3CA, single nucleotide polymorphism

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	QUAYE, L. et al., "The Effects of Common Genetic Variants in Oncogenes on Ovarian Cancer Survival", <i>Clinical Cancer Research</i> , 2008, vol. 14, pp. 5833-5839 See abstract, pages 5834, 5837.	1-5
A	WINDER, T. et al., "Molecular Predictive and Prognostic Markers in Colon Cancer", <i>Cancer Treatment Reviews</i> , 2010, vol. 36, pp. 550-556 See abstract, page 552.	1-5
A	KR 10-2012-0061010 A (SNU R&DB FOUNDATION) 12 June 2012 See abstract, claims 1-10.	1-5
A	SIENA, S. et al., "Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer", <i>Journal of the National Cancer Institute</i> , 2009, vol. 101, no. 19, pp. 1308-1324 See abstract.	1-5
A	US 2010-0055095 A1 (KAN, Z. et al.) 04 March 2010 See abstract, claim 54.	1-5



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

21 JULY 2014 (21.07.2014)

Date of mailing of the international search report

22 JULY 2014 (22.07.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-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/KR2014/002959

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0061010 A	12/06/2012	WO 2012-060636 A2	10/05/2012
		WO 2012-060636 A3	02/08/2012
US 2010-0055095 A1	04/03/2010	AU 2007-329740 A1	12/06/2008
		AU 2007-329740 A2	18/06/2009
		CA 2666057 A1	12/06/2008
		EP 2089540 A2	19/08/2009
		IL 198354 D	17/02/2010
		JP 2010-508025 A	18/03/2010
		MX 2009004382 A	11/06/2009
		NZ 576852 A	24/02/2012
		US 8680041 B2	25/03/2014
		WO 2008-070325 A2	12/06/2008
		WO 2008-070325 A3	05/03/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/574(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/574; A61K 39/395; G01N 33/68; C12Q 1/68; C12N 15/11

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: 위암, 예측, 예후, KRAS, MET, PIK3CA, 단일 염기 다형성

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	QUAYE, L. 외, "The Effects of Common Genetic Variants in Oncogenes on Ovarian Cancer Survival", Clinical Cancer Research, 2008, 14권, 페이지 5833-5839 요약, 페이지 5834, 5837 참조.	1-5
A	WINDER, T. 외, "Molecular Predictive and Prognostic Markers in Colon Cancer", Cancer Treatment Reviews, 2010, 36권, 페이지 550-556 요약, 페이지 552 참조.	1-5
A	KR 10-2012-0061010 A (서울대학교산학협력단) 2012.06.12 요약, 청구항 1-10 참조.	1-5
A	SIENA, S. 외, "Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer", Journal of the National Cancer Institute, 2009, 101권, 19호, 페이지 1308-1324 요약 참조.	1-5
A	US 2010-0055095 A1 (KAN, Z. 외) 2010.03.04 요약, 청구항 54 참조.	1-5



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

2014년 07월 21일 (21.07.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 07월 22일 (22.07.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

최승희

전화번호 +82-42-481-8740



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0061010 A	2012/06/12	WO 2012-060636 A2 WO 2012-060636 A3	2012/05/10 2012/08/02
US 2010-0055095 A1	2010/03/04	AU 2007-329740 A1 AU 2007-329740 A2 CA 2666057 A1 EP 2089540 A2 IL 198354 D JP 2010-508025 A MX 2009004382 A NZ 576852 A US 8680041 B2 WO 2008-070325 A2 WO 2008-070325 A3	2008/06/12 2009/06/18 2008/06/12 2009/08/19 2010/02/17 2010/03/18 2009/06/11 2012/02/24 2014/03/25 2008/06/12 2009/03/05