



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월11일

(11) 등록번호 10-1583546

(24) 등록일자 2016년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0042571

(22) 출원일자 2014년04월09일

심사청구일자 2014년04월09일

(65) 공개번호 10-2015-0117362

(43) 공개일자 2015년10월20일

(56) 선행기술조사문헌

대한간학회 2012년 학술대회, 0-033, pp. 28-29, 2012

(73) 특허권자

국립암센터

경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)

(72) 발명자

박중원

경기 고양시 일산동구 위시티4로 80, 107동 204호 (식사동, 위시티일산자이1단지아파트)

김보현

서울 강남구 압구정로 201, 80동 1404호 (압구정동, 현대아파트)

이연수

경기 고양시 일산서구 대산로212번길 26, 1507동 204호 (대화동, 성저마을15단지건영빌라)

(74) 대리인

특허법인리온

전체 청구항 수 : 총 7 항

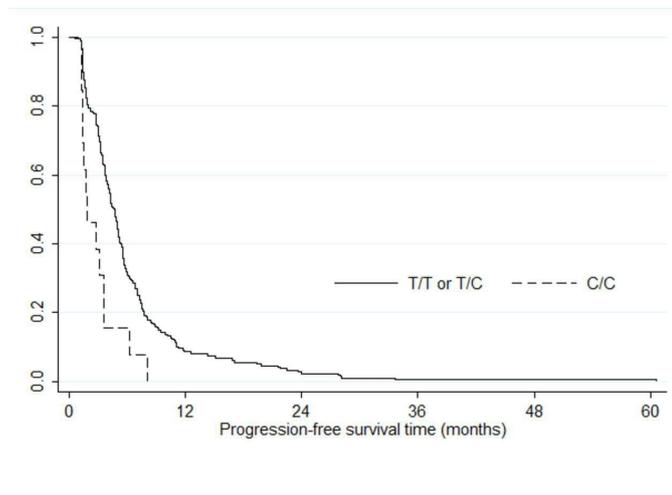
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 유전자 다형성을 이용한 소라페닙 치료에 대한 반응성 예측방법

(57) 요약

본 발명은 유전자 다형성을 이용한 소라페닙 치료에 대한 반응성 예측방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성에 대하여 간암 환자의 생물학적 시료에서 발현되는 항암제 타겟 유전자를 바이오 마커로 이용함으로써, 소라페닙 치료에 대한 시험대상의 반응성을 예측할 수 있고, 이를 통해 간암 환자에게 적합한 약물을 투여하여 최적의 치료효과를 달성하여 환자의 불편을 줄이고, 치료비용을 절감할 수 있으며, 환자 맞춤형 항암제 투여에 의한 보다 효과적으로 개인별 맞춤형 화학요법을 실시할 수 있다.

대표도 - 도3



**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

간세포암 환자의 혈액 시료로부터 SLC15A2 유전자(NCBI ACESSION NO: NM\_021082)의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째에 위치하는 C가 T로 변형되었는지 확인하여, 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

간세포암 환자의 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성을 예측하기 위한 진단키트로서, 기관의 표면에 구비되며 시료 내에 포함된 SLC15A2 유전자(NCBI ACESSION NO : NM\_021082)의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째에 상보적으로 결합하는 프라이머 및 프로브를 적어도 하나 이상 포함하는 DNA 칩과 시료의 혼성화 반응(hybridization)을 탐지하는 표지수단을 포함하는 진단키트.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 프라이머 및 프로브는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 군 중 1종 이상을 포함하는 진단키트.

**청구항 6**

제4항에 있어서, 상기 기관의 표면에는 시료 내 모든 염기서열과 혼성화 반응하는 양성 대조구 및 어떠한 염기서열과도 혼성화되지 않는 음성 대조구를 포함하는 프로브가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 진단키트.

**청구항 7**

간세포암환자의 혈액 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;

간세포암환자의 SLC15A2 유전자가 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째의 C/T 또는 T/T 유전자형을 갖는지를 결정하는 단계; 및

이에 의해 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하는 단계;를 포함하고,

상기 C/T 또는 T/T 유전자형의 존재는 시험대상이 C/C 유전자형을 갖는 대상보다 소라페닙 치료에 대해 반응성이 우수한 것으로 평가하는 것임을 나타내는 것인, 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 유전자형을 결정하는 단계는 핵산 기반 검출 분석법인 것을 특징으로 하는 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 핵산 기반 검출 분석법은 서열분석법 및 혼성화 분석법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 유전자 다형성을 이용한 소라페닙 치료에 대한 반응성 예측방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 간암 환자의 생물학적 시료에서 발현되는 항암제 타겟 유전자를 바이오 마커로 이용함으로써, 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하여 보다 효과적으로 개인별 맞춤형 화학요법을 실시할 수 있는 유전자 다형성을 이용한 소라페닙 치료에 대한 반응성 예측방법을 제공하는 것이다.

**배경 기술**

[0002] 암은 인간 건강에 가장 치명적인 위협 중의 하나이다. 미국에서만 매년 1백 30 만명 정도의 새로운 암 환자가 발생하고, 이는 심혈관계 질환 다음으로 두 번째로 높은 사망 원인이며, 사망자 4명 중의 대략 1명이 암 환자인 것으로 추정된다. 이러한 사망의 대부분은 고형 암으로 인한 것이다. 특정 암의 의학적 치료에는 상당한 진보가 있어 왔지만, 모든 암에 대한 전반적인 5년 생존율은 과거 20년간 약 10% 정도만 개선되었다. 암, 또는 악성 종양은 제어되지 않는 방식으로 신속하게 전이 및 성장하기 때문에, 제시간에 이를 검출하고 치료하는 것이 극도로 어렵다.

[0003] 현재, 암의 치료를 위해서는 수술 요법, 방사선 치료 요법 및 화학요법 등이 사용되고 있다. 오늘날에는 약 60여 종의 다양한 항암제가 사용되고 있으며, 최근 암 발생 및 암 세포의 특성에 관한 지식이 많이 알려짐에 따라, 새로운 항암제 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나, 항암제들은 반복적으로 장기간 투여되거나 암이 재발된 경우에는 암세포가 항암제에 대한 내성을 획득함으로써 치료 효과를 상실하는 단점이 있다. 또한, 대부분의 항암제는 세포 내 핵산의 합성을 억제하거나 핵산에 직접 결합하여 그 기능을 손상시킴으로써 효과를 나타내는데, 이들 항암제는 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포, 특히 세포분열이 활발한 조직 세포에도 손상을 입히기 때문에 골수 기능 저하, 위장관 점막 손상, 탈모 등 여러 부작용이 나타나는 단점이 있다.

[0004] 따라서 상기와 같은 항암제는 내성이 발생하는 특성 때문에 시장에서는 다양한 종류의 약품 개발이 지속적으로 요구되고 있으며, 특히 수요자(환자)들의 부작용을 최소화할 수 있는 항암제의 선별적 치료가 필요로 한다.

[0005] 종래의 항암 화학요법(cancer chemotherapy)에 따르면, 암 환자 개인이 아니라 암의 종류 및 암의 심각도에 따라 적합한 항암제를 선별하고 투여를 하고 있다. 그러나, 대체적인 임상 결과는 환자에 따라 이러한 항암 화학요법의 치료 효과가 크게 차이가 있으며, 이를 극복하기 위하여 다양한 방법들이 제시되어 있다.

[0006] 상술한 화학요법의 단점을 극복하기 위하여 개인별 SNP(single nucleotide polymorphism)를 분석하여 이에 따라 적합한 항암제를 선별 투여하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 또한, 새로운 항암제 개발 트렌드는 표적항암제, 바이오 의약품, 예방백신 및 진단제 개발 비중이 높아지는 양상이며, 암환자의 복약 순응도를 높이기 위해 경구제 형태의 항암제 개발 비중이 높아지는 추세이다.

[0007] 표적항암제는 암세포를 죽이지는 못한다. 대신 암세포가 자라는데 필요한 요소를 억눌러서 암세포의 증식과 성장을 방해하는 약물이다. 때문에 암을 완전히 뿌리 뽑기 어려운 환자라 할지라도 표적항암제를 통해 암의 진행을 늦추면서 생존기간을 늘릴 수 있다. 이론적으로는 정상세포에 작용하는 독성이 없기 때문에 고통스러운 부작용도 적다. 그렇기 때문에 삶의 질 면에서도 기존 항암제보다 우수한 효과가 기대된다.

[0008] 상기 표적항암제에 대한 종래 기술로 공개특허 10-2013-0058631(공개일자: 2013년06월04일)에는 인테그린 β3 중화항체, 인테그린 β3 siRNA, Src 억제제 및 Src siRNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 표적 항암제 내성 억제용 약학적 조성물, 항암 보조제 등에 관해 기재하고 있다.

[0009] 한편, 간실질세포암(Hepatocellular carcinoma, HCC)는 전세계적으로, 특히 아시아 지역에 많이 발생하는 암 유형의 하나이며, 암으로 인한 사망의 3번째 원인이다. 이러한 간암에 대하여 소라페닙(Sorafenib)은 실질적으로 유일한 간암의 표준치료제로 알려져 있다.

[0010] 소라페닙(sorafenib)은 종양세포나 종양혈관에 과발현할 것으로 예상되는 수용체 tyrosine kinase인 VEGFR-2, platelet-derived growth factor receptor(PDGFR)-β, c-kit와 더불어 신호전달 경로의 serine/threonine kinase인 Raf kinase를 동시에 저해하여 정상세포는 그대로 두고 암세포와 암세포에 영양을 공급하는 혈관내피 세포만을 공격해 치료하는 경구용 표적항암제(Oral Multikinase Inhibitor)로 알려져 있다.

[0011] 소라페닙은 다양한 고형 종양에 대해 임상연구가 진행되고 있는데, 신세포암종에서 이미 표적항암제로 사용 중이며, 진행 간세포암종에 대한 임상연구가 진행되어 최근 미국 식약청은 절제수술이 불가능한 간세포암종의 치

료제로 승인하기도 하였다. 또한, Sorafenib(Nexavar)은 2013년 상반기 3억 7,300만 유로의 매출을 올렸으며, 현재 간암과 신장암 치료제로서 승인을 획득한 바 있고, 최근 미국 FDA에서 넥사바의 갑상선암 치료제의 승인을 한 바 있다.

[0012] 그러나, 다수의 환자가 소라페닙 투여 및 치료에 있어 무반응자로 확인되어 치료를 시작하기 전에 치료 반응을 예측할 수 있는 방법 및 이를 확인할 수 있는 방법이 없었고, 신뢰성 있는 유전자마커(biomarker)에 대한 연구가 부족하여 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하여 적합한 약물투여를 하기가 매우 어려운 문제점이 있었다.

[0013] 나아가, 아직까지 실질적으로 다수의 간암 환자에 대하여 적절한 소라페닙을 투여하여 최적의 치료효과를 달성하여 환자의 불편을 줄이고, 치료비용을 절감할 수 있도록, 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측할 수 있는 방법에 대한 연구가 부족하다는 문제점이 있었다.

[0014] 이에 본 발명자들은 소라페닙 치료에 대한 반응성을 나타내는 바이오마커로써 SLC15A2 유전자 다형성의 유용성을 최초로 확인하고 본 발명을 완성하였다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 첫 번째 해결하려는 과제는 반응성을 예측하여 보다 효과적으로 개인별 맞춤형 화학요법을 실시할 수 있는 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 두 번째 해결하려는 과제는 반응성을 예측하여 항암치료 부작용 감소 및 비용절감 효과가 우수한 피시험자의 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성을 예측하기 위한 진단 키트를 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 상기 첫번째 과제를 달성하기 위하여, 피시험자로부터 시료를 채취하여 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성에 영향을 끼치는 SLC15A2 유전자의 다형성의 준부를 측정함으로써, 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 SLC15A2 유전자 다형성은 SLC15A2 유전자(NCBI ACESSION NO : NM\_021082, 서열번호 4)의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째에 위치한 C가 T로 변형된 것 일 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 피시험자는 간암 환자이며, 상기 시료는 혈액일 수 있다.

[0020] 본 발명은 상기 두번째 과제를 달성하기 위하여, 피시험자의 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성을 예측하기 위한 진단키트로서, 기관의 표면에 구비되며 시료 내에 포함된 SLC15A2 유전자(NCBI ACESSION NO : NM\_021082, 서열번호 4)의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째에 상보적으로 결합하는 프라이머 및 프로브를 적어도 하나 이상 포함하는 DNA 칩과 시료의 혼성화 반응(hybridization)을 탐지하는 표지수단을 포함하는 진단키트를 제공한다.

[0021] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 프라이머 및 프로브는 서열번호 1 및 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 군 중 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 기관의 표면에는 시료 내 모든 염기서열과 혼성화 반응하는 양성 대조구 및 어떠한 염기서열과도 혼성화 되지 않는 음성 대조구를 포함하는 프로브가 결합되어 있는 것일 수 있다.

[0023]

[0024] 본 발명은 상기 세번째 과제를 달성하기 위하여, 피시험자로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계;

- [0025] 시험대상의 SLC15A2 유전자(NCBI ACESSION NO : NM\_021082, 서열번호 4)의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째의 C/T 또는 T/T 유전자형을 갖는지를 결정하는 단계; 및
- [0026] 이에 의해 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하는 단계를 포함하고,
- [0027] 여기서 C/T 또는 T/T 유전자형의 존재는 시험대상이 C/C 유전자형을 갖는 대상보다 소라페닙 치료에 대해 반응성이 우수한 것으로 평가하는 것임을 나타내는 것인, 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 유전자형을 결정하는 단계는 핵산 기반 검출 분석법일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 핵산 기반 검출 분석법은 서열분석법 또는 혼성화 분석법일 수 있다.

**발명의 효과**

- [0030] 본 발명은 유전자 다형성을 이용하여 암 치료의 부작용을 최소화 할 수 있는 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성에 대하여 SLC15A2 유전자를 바이오마커(biomarker)로 이용함으로써, 간암 환자에 대하여 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측할 수 있고, 이를 통하여 간암 환자에게 적합한 약물을 투여하여 최적의 치료효과를 달성하고 환자의 불편을 줄이고, 치료비용을 절감할 수 있어 항암치료 효과 및 그 예후가 우수하다.

**도면의 간단한 설명**

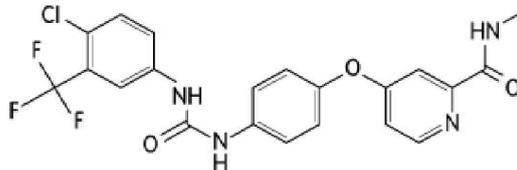
- [0031] 도 1은 실시예 1에서 수행한 PCR의 프라이머 시퀀스이다.
- 도 2는 MUSK, ABCB1, FMO3 및 SLC15A2 4개의 유전자에 위치하는 6개의 비동의 SNVs를 나타내는 도식도이다. (화살표는 변형의 위치; 숫자는 아미노산의 위치를 나타낸다.)
- 도 3은 간암 환자에 있어서 SLC15A2 유전자형에 따른 소라페닙 치료에 대한 무진행 생존율(Progression-free survival time)을 확인한 결과이다.
- 도 4는 간암 세포주에서의 SLC15A2 유전자 다형성의 기능적 분석을 위해 Sanger 시퀀싱을 통해 3가지 유전자형을 가지는 Hep3B, SNU182 및 PLC/PRF5 세포주를 선별한 시퀀싱 분석 결과이다.
- 도 5는 간암 세포주 Hep3B, SNU182 및 PLC/PRF5에 대하여 MTT 분석을 통해 소라페닙 처리에 의한 세포 생존율을 나타낸 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 간암 세포주 Hep3B, SNU182 및 PLC/PRF5에 대하여 웨스턴블랏을 통해 소라페닙 처리에 의한 단백질 발현을 나타낸 결과이다. (레인 1: PLC/PRF5 세포주에서의 SLC15A2 유전자의 발현, 레인 2: Hep3B 세포주에서의 SLC15A2 유전자의 발현, 레인 3: SNU182 세포주에서의 SLC15A2 유전자의 발현)
- 도 7은 SLC15A2 유전자(NCBI ACESSION NO : NM\_021082, 서열번호 4)의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째 염기서열을 노란색으로 채워 표시한 것이다.
- 도 8은 SLC15A2 유전자(NCBI ACESSION NO : NM\_021082, 서열번호 4)의 501번째 염기서열을 형광 녹색으로 채워 표시한 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0032] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0033] 상술한 바와 같이 다수의 간암 환자가 소라페닙 투여 및 치료에 있어 무반응자로 확인되어 치료를 시작하기 전에 치료 반응을 예측할 수 있는 방법 및 이를 확인할 수 있는 방법이 없었고, 신뢰성 있는 유전자마커(biomarker)에 대한 연구가 부족하여 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하여 적합한 약물투여를 하기가 매우 어려운 문제점이 있었다.
- [0034] 나아가, 아직까지 실질적으로 다수의 간암 환자에 대하여 적절한 소라페닙을 투여하여 최적의 치료효과를 달성하여 환자의 불편을 줄이고, 치료비용을 절감할 수 있도록, 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측할 수 있는 방법에 대한 연구가 부족하다는 문제점이 있었다.

- [0035] 이에 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 피시험자로부터 시료를 채취하여 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성에 영향을 끼치는 SLC15A2 유전자의 다형성의 존재를 측정함으로써, 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법을 제공하여 상술한 문제의 해결을 모색하였다.
- [0036] 이를 통해 다수의 환자가 소라페닙 투여 및 치료에 있어 무반응자로 확인되어 치료를 시작하기 전에 치료 반응을 예측 및 이를 확인할 수 없었던 종래의 간암 환자에 대한 소라페닙(sorafenib) 치료에 있어서 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하여 적합한 약물투여가 가능해졌다. 또한, 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성에 대하여 간암 환자의 생물학적 시료에서 발현 되는 항암제 타겟 유전자를 바이오마커로 이용함으로써, 간암 환자에 대하여 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측할 수 있고, 이로써 간암 환자에게 적합한 약물을 투여하여 최적의 치료효과를 달성하고 환자의 불편을 줄이고, 치료비용을 절감할 수 있으며, 환자 맞춤형 항암제 투여에 의한 보다 효과적으로 개인별 맞춤형 화학요법을 실시할 수 있다.
- [0037] 따라서 암 환자 개인이 아니라 암의 종류 및 암의 심각도에 따라 적합한 항암제를 선별하고 투여했던 종래의 항암 화학요법(cancer chemotherapy)에 의한 항암치료의 부작용들의 문제점을 해결할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서는 간암 환자에서 소라페닙 약물 반응을 예측하기 위한 바이오마커(biomarker)로 사용가능한, 소라페닙 반응성(sorafenib response)에 관련된 다수의 SNV(single-nucleotide variation) 및 유전자를 확인하였고, 그 중 간암 환자에서 소라페닙 치료에 대한 반응성에 있어서 SLC15A2 유전자형이 중요한 역할을 나타냄을 확인하였다.

**화학식 1**



- [0039] 일반적으로 상기 화학식 1로 나타나는 소라페닙(sorafenib)은 종양세포나 종양혈관에 과발현할 것으로 예상되는 수용체 tyrosine kinase인 VEGFR-2, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- $\beta$ , c-kit와 더불어 신호전달경로의 serine/threonine kinase인 Raf kinase를 동시에 저해하는 경구용 표적항암제로 알려져 있다.
- [0040] 삭제
- [0041] 소라페닙은 다양한 고형종양에 대해 임상연구가 진행되고 있는데, 신세포암종에서 이미 표적항암제로 사용 중이며, 진행 간세포암종에 대한 임상연구가 진행되어 최근 미국 식약청은 절제수술이 불가능한 간세포암종의 치료제로 승인하기도 하였다.
- [0042] 그러나 상술한 바와 같이, 아직까지는 다수의 환자가 소라페닙 투여 및 치료에 있어 무반응자로 확인되어 치료를 시작하기 전에 치료 반응을 예측 및 이를 확인할 수 없었던 문제점이 있었다. 본 발명의 SLC15A2 유전자 다형성을 이용한 소라페닙 치료에 대한 반응성 예측방법을 통해 종래의 간암 환자에 대한 소라페닙(sorafenib) 치료에 있어서 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하여 적합한 약물투여가 가능하고, 간암 치료에 있어서 부작용을 최소화할 수 있는 항암제의 선별적 치료가 가능하다. 나아가 간암은 예시일 뿐, 소라페닙 치료를 적용할 수 있는 질병에 적용 가능한 것도 당업자에게 자명한 것이다.
- [0043] 구체적으로, 실시예 1의 표 2에서 나타난 바와 같이, 간암 환자에서 소라페닙 반응성과 관련된 다수의 후보 유

전자 및 후보 유전자의 변이코돈(coding variants)을 확인하였다. 708개의 단일염기변이(SNV) 중에서 36개 변이가 게놈 영역(genomic region)에 위치하고, 15개 단일염기변이는 9개 유전자의 암호화 영역(coding region)에 위치함을 확인하였다. 이를 통해 소라페닙 반응성 관련 유전자의 다형성 존재 여부를 확인하였다.

[0044] 상기 15개의 단일염기변이 중 13개 변이는 약물반응과 관련된 유전자 내에 위치한 반면, 2개의 변이는 소라페닙 타겟 후보 유전자 중의 하나임을 알 수 있었다. 약물반응과 관련된 유전자는 약물의 흡수, 분포, 대사, 배출(ADME : absorption, distribution, metabolism, excretion)과 관련된 유전자로써, 이들 중 보다 정확한 소라페닙 효능 평가 및 동등성 평가 등을 위해서 소라페닙 반응성 관련 유전자를 선별하는데 있어 약물의 흡수, 분포, 대사, 배출(ADME : absorption, distribution, metabolism, excretion)과 관련된 유전 정보를 확인하였다.

[0045] 도 2에 나타난 바와 같이, 6개 암호화 단일염기변이는 단백질을 암호화하는 기능에 손상을 받을 가능성이 있는 비동의(non-synonymous) 변이이고, 이들은 모두 소라페닙 타겟 후보 유전자인 MUSK 및 ADME 관련 유전자인 ABCB1, FMO3, SLC15A2의 4개의 유전자에 위치함을 알 수 있었다.

[0046] 본 발명의 SLC15A2 유전자의 다형성은 SLC15A2 유전자(NCBI ACESSION NO : NM\_021082, 서열번호 4)의 단일염기 다형성(서열번호 3) 26번째에 위치하는 C가 T로 변형된 것일 수 있다.

[0047] 암 환자 개인이 아니라 암의 종류 및 암의 심각도에 따라 적합한 항암제를 선별하고 투여하는 종래의 항암 화학요법(cancer chemotherapy)에 따른 대체적인 임상 결과는 환자에 따라 이러한 항암 화학요법의 치료 효과가 크게 차이가 있으며, 이를 극복하기 위하여 다양한 방법들이 제시되었다.

[0048] 상기 화학요법의 단점을 극복하기 위하여 개인별 SNP(single nucleotide polymorphism)을 분석하여 이에 따라 적합한 항암제를 선별 투여하려는 시도가 있었으며, 본 발명의 간암 환자에서 소라페닙 치료에 대한 반응성에 SLC15A2 유전자의 다형성 준부를 확인함으로써 소라페닙 치료에 대한 환자의 반응성을 예측할 수 있었다. 이를 통해 간암 환자에 대하여 소라페닙 치료를 시행하기 전에 치료 반응을 예측할 수 있는 신뢰성 있는 바이오 마커로써 이용 가능하다.

[0049] 구체적으로, 실시예 3에서 알 수 있듯이 SLC15A2 유전자의 유전적 변이 유효성을 확인하였다.

[0050] NGS 분석을 통해 SLC15A2 유전자 내에 5개의 변이 코딩을 확인하였고, 이 중 3유전자 생성에 있어서 기능적 변이를 일으킬 수 있는 3개의 비동의성 단일염기변이(nonsynonymous SNV) L350F, P409S, R509K를 선택하여 6주 이상 소라페닙 치료를 받은 233명의 간암 환자의 유전자형을 분석하였다.

[0051] 이를 통해 3가지 단일염기다형성(SNP) 유전자형(C/C, C/T 및 T/T)을 확보하였으며, 도 2에 나타난 바와 같이, 소라페닙 치료 반응성에 대하여 SLC15A2 유전자(NCBI ACESSION NO : NM\_021082, 서열번호 4)의 염기서열 501번에 위치하는 C(도면 8의 형광 채우기한 C)가 T로 치환되었을 때 C/T 또는 T/T 유전자형의 존재는 시험대상이 C/C 유전자형을 갖는 대상보다 소라페닙 치료에 대해 반응성이 우수하여 무진행 생존기간이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0052] 본 발명의 상기 피시험자는 간암뿐만 아니라, SLC15A2 유전자를 포함하는 질병의 환자일 수 있으며, 바람직하게는 간암 환자이며, 상기시료는 SLC15A2 유전자를 포함하는 조직 샘플, 생검, 혈액, 타액, 대변, 뇌척수액, 정액, 눈물, 및 소변으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 혈액일 수 있다.

[0053] 본 발명의 바람직한 다른 구현예에 따르면, 피시험자의 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성을 예측하기 위한 진단 키트를 제공하여 상술한 문제의 해결을 모색하였다. 이를 통해 암 치료에 있어서 부작용을 최소화할 수 있는 항암제의 선별적 치료가 가능하고, 환자 맞춤형 항암제 투여에 의한 간암 치료가 보다 효과적으로 될 수 있으며, 이를 통해 암 환자의 생물학적 시료에서 발견되는 항암제 타겟 유전자를 바이오 마커로 이용함으로써, 암 환자 개인별 맞춤형 화학요법을 매우 효과적으로 실시할 수 있다.

[0054] 본 발명은 피시험자의 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성을 예측하기 위한 진단키트로서, 기관의 표면에 구비되며 시료 내에 포함된 SLC15A2 유전자(NCBI ACESSION NO : NM\_021082, 서열번호 4)의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째에 상보적으로 결합하는 프라이머 및 프로브를 적어도 하나 이상 포함하는 DNA 칩과 시료의 혼성화

반응(hybridization)을 탐지하는 표지수단을 포함하는 진단키트를 제공한다.

- [0055] 이러한 진단키트는 시료에 존재하는 RNA 또는 DNA와 혼성화 반응을 통해 각각 SLC15A2 유전자형의 존재 여부를 파악할 수 있다.
- [0056] 상기 DNA 칩에서 혼성화 반응이 유효하게 발생하였는지 여부를 파악하기 위해, 상기 기관상에는 양성 대조구 및 /또는 음성 대조구가 추가적으로 포함될 수 있다.
- [0057] 상기 표지 수단은 바이오틴-결합 단백질(biotin-binding protein)을 포함하는 형광물질일 수 있고, 그러한 형광 물질의 예로는 스트렙타비딘-R-피코에리스린(streptavidin-R-phycoerythrin) 또는 스트렙타비딘-시아닌3 등을 들 수 있으나, 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 상기 진단키트는 또한, 시료의 DNA를 증폭시킬 수 있는 증폭수단을 더 포함할 수 있고, 또한 선택적으로 검체로부터 유전자를 추출하는 수단을 포함할 수도 있다. 상기 PCR을 이용하여 시료의 DNA를 증폭시키는 방법 및 검체로부터 유전자를 추출하는 방법은 당업계에 공지되어 있으므로, 본 명세서에서는 그에 관한 자세한 설명은 생략한다.
- [0059] 한편, 바람직하게는 본 발명의 키트는 간암 진단 마커인 SLC15A2 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 마커를 검출할 수 있다. 본 발명의 마커 검출용 키트에는 간암 진단 마커의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0060] 구체적인 일례로서, 본 발명에서 SLC15A2 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 마커 유전자에 대하여 당업자가 디자인한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수 (DEPC-water), 및 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조구로는 18s rRNA를 사용하였는데, 이에 대한 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 진단 마커 검출용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관을 포함하고 기관은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.
- [0061] 상기 프라이머 및 프로브는 서열번호 1 및 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 군 중 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0062] 또한 상기 기관의 표면에는 시료 내 모든 염기서열과 혼성화 반응하는 양성 대조구 및 어떠한 염기서열과도 혼성화 되지 않는 음성 대조구를 포함하는 프로브가 결합될 수 있다. 이는 상기 DNA 칩에서 혼성화 반응이 유효하게 발생하였는지 여부를 파악하기 위함이며, 상기 기관 상에는 양성 대조구 및/또는 음성 대조구가 추가적으로 포함될 수 있다.
- [0063] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3'말단 수산화기 (free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트 (template)와 염기쌍 (base pair)를 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 본 발명에서는 UQCRH 폴리뉴클레오타이드이 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 간암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다.
- [0065] 프로브는 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 UQCRH 폴리뉴클레오타이드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 간암을 진단할 수 있다. 적당한 프

로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

- [0066] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포로아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0067] 상기 진단키트에 포함되는 샘플의 양은 환자로부터 얻은 최소한의 혈액일 수 있으며, 바람직하게는 SLC15A2 유전자의 존부를 확인할 수 있는 최소한의 DNA를 수득할 수 있는 최소한의 혈액량이며, 더욱 바람직하게는 3 내지 6 ml 일 수 있다.
- [0068] 본 발명의 바람직한 또 다른 구현예에 따르면, 피시험자로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계; 시험대상의 SLC15A2 유전자의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째의 C/T 또는 T/T 유전자형을 갖는지를 결정하는 단계; 및 이에 의해 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하는 단계;를 포함하고, 여기서 C/T 또는 T/T 유전자형의 존재는 시험대상이 C/C 유전자형을 갖는 대상보다 소라페닙 치료에 대해 반응성이 우수한 것으로 평가하는 것임을 나타내는 것인, 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측하는 방법을 제공하여 상술한 문제의 해결을 모색하였다. 이를 통해 소라페닙(sorafenib) 치료의 반응성에 대하여 간암 환자의 생물학적 시료에서 발현 되는 항암제 타겟 유전자를 바이오마커로 이용함으로써, 소라페닙 치료에 대한 시험대상의 반응성을 예측할 수 있고, 이를 통해 간암 환자에게 적합한 약물을 투여하여 최적의 치료효과를 달성하고 환자의 불편을 줄이고, 치료비용을 절감할 수 있으며, 환자 맞춤형 항암제 투여에 의한 보다 효과적으로 개인별 맞춤형 화학요법을 실시 할 수 있다.
- [0069] 구체적으로, 유전자 변형된 형태가 존재하는지 여부를 측정하기 위해, 대상으로부터 채취한 샘플에서 게놈 DNA를 분리한 후 PCR 방법에 의해 증폭시킨 후 개인별 SNP(single nucleotide polymorphism)을 분석을 통하여 시험대상의 SLC15A2 유전자(NCBI ACCESSION NO : NM\_021082, 서열번호 4)의 501번째(도면 8의 형광 녹색 채우기)가 C/T 또는 T/T 유전자형을 갖는지의 여부를 측정하여 이를 분석함으로써 SLC15A2 유전자 다형성의 존부를 측정할 수 있다.
- [0070] 먼저, 피시험자로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계를 포함한다.
- [0071] 상기 "생물학적 샘플"이란 환자의 시료를 의미하는 것이며, 이는 간암 마커 유전자인 SLC15A2 유전자의 발현 수준이 차이 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 보다 바람직하게는 혈액일 수 있다.
- [0072] 상기 단계에서 피시험자로부터 샘플을 추출하고 게놈 DNA를 획득할 수 있으며, 그 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당업계에 공지된 방법에 의해 가능하다. 시판 중인 DNA 분리 키트는 예를 들어, 퓨어진(Puregene) DNA분리 키트(Gentra Systems, Inc.), 혈액용 DNA 분리 키트(2-032-805, Roche Diagnostics Corp.), 게노믹프렙(GenomicPrep) 혈액 DNA 분리 키트(27-5236-01, Amersham Biosciences Corp.), 팩스진(PAXgene) 혈액 DNA 키트(761133, QIAGEN Inc.), 지놈(GNOME) 전혈 DNA 분리 키트(2011-600, Qbiogene Inc.), 및 위자드(Wizard) 게놈 DNA 정제 키트(A1120, Promega U.S.) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0073] 상기 분리한 게놈 DNA에서 SLC15A2를 포함하는 부위를 하기 나타난 프라이머 1(서열번호1 및 서열번호2)을 이용하여 PCR 방법에 의해 증폭시킬 수 있다.
- [0074] 또한, PCR 방법에 의한 증폭 또는 Southern blotting 이외에도, 리가아제 연쇄 반응(문헌 [Abravaya, K. et al., Nucleic Acids Research, 23, 675-682, 1995] 참조), 분기된 DNA 신호 증폭(문헌 [Jrdea, MS et al., AIDS, 7(supp. 2), S11-514, 1993] 참조), 등온성 핵산 서열 기초 증폭(NASBA)(문헌 [Kievits, T. et al., J. Virological., Methods 35, 273-286, 1991] 참조), 및 다른 자가-지속 서열 복제 분석법을 포함하여, 다른 핵산 증폭 방법도 또한 이용할 수 있다.
- [0075] 다음, 시험대상의 SLC15A2 유전자의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째의 C/T 또는 T/T 유전자형을 갖는지를

결정하는 단계를 포함한다.

- [0076] 상기 유전자형을 결정하는 단계는 핵산 기반 검출 분석법일 수 있다.
- [0077] 본 발명의 바람직한 실시시에 따르면, SLC15A2 유전자 다형성 서열은 직접 서열분석법을 사용하여 검출할 수 있다. 이러한 분석법에서, 우선 임의의 적절한 방법을 사용하여 피검체로부터 DNA 샘플들을 분리하고, 관심영역을 벡터에 클로닝하여 숙주세포(예를 들어, 박테리아)내에서 성장시켜 증폭시킨다. 증폭시킨 후, 관심영역의 DNA(예를 들어, 상기영역은 관심 대상이 되는 SNP 또는 돌연변이를 포함함)를 예컨대 이에 제한되는 것은 아니나 방사선 마커 뉴클레오티드를 사용하는 수동서열분석법, 및 자동서열분석법 등을 포함하는 임의의 적절한 방법을 사용하여 서열분석한다. 서열분석 결과는 임의의 적절한 방법을 사용하여 표시한다. 상기서열을 분석하고 소정의 SNP 또는 돌연변이의 존재 유무를 확인한다.
- [0078] 또한, 본 발명의 실시시에 따르면, PCR-기반분석법을 사용하여 변형서열을 검출한다. 일구체에에서, PCR분석법은 변형 또는 야생대립유전자에만(예를 들어, 다형성 또는 돌연변이의 영역에) 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프라이머의 사용을 포함한다. 프라이머의 양쪽세트를 사용하여 DNA 샘플을 증폭하여 분석한다.
- [0079] 또한, 상기 핵산 기반 검출 분석법은 서열분석법 및 혼성화 분석법일 수 있다.
- [0080] 상기 '혼성화 반응'은 특정 서열이 복합 혼합물 DNA 또는 RNA 내에 존재하는 경우 엄격한 조건 하에 해당 뉴클레오티드 서열에만 분자가 결합, 이중가다형성 또는 하이브리드화 하는 것을 의미한다. 상기 '엄격한 조건'이란 프로브가 표적 부분 서열에는 하이브리드화 하지만 다른 부분서열에는 하이브리드화 하지 않는 조건을 의미한다. 즉, 엄격한 조건은 서열 의존성이며, 환경에 따라 달라질 수 있으며, 서열이 길수록 고온에서 특이적으로 하이브리드화 할 수 있다. 일반적으로, 엄격한 조건은 소정의 이온 강도 및 pH에서 특정 서열에 대한 용점(T<sub>m</sub>)보다 약 5°C 낮도록 선택한다. T<sub>m</sub>은, 소정의 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하에 표적 서열에 상보적인 프로브의 50%가 평형시 표적 서열에 하이브리드화하는 온도이다. 이는, 표적서열이 일반적으로 T<sub>m</sub>에서 과량으로 존재하기 때문에, 평형 상태에서 프로브의 50%를 점유하기 때문이다. 통상, 엄격한 조건은 염 농도가 pH 7.0~8.3에서 적어도 약 0.01~1.0 M Na 이온 농도(또는 기타 염)이고 온도가 짧은 프로브(예, 10~50 뉴클레오티드)에 대해 약 30°C 이상인 조건이다. 엄격한 조건은 포름아미드와 같은 탈안정화제를 첨가하여 실현할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 실시시에 따르면, 변형서열은 혼성화 분석법을 사용하여 검출할 수 있다. 혼성화 분석에서, 소정의 SNP 또는 돌연변이의 존재 유무는 상보적인 DNA분자(예를 들어, 올리고뉴클레오티드 프로브)와 혼성화할 수 있는, 샘플 내 DNA의능력을 기초로 결정한다. 혼성화 및 이의 검출을 위한 다양한 기술을 사용하는 여러 혼성화 분석법을 이용할 수 있다.
- [0082] 먼저, 혼성화의 직접검출법으로 대상서열(예를 들어, SNP 또는 돌연변이)과 프로브가 혼성화된 것은 결합한 프로프를 시각화하여 직접 검출할 수 있다(예를 들어, 노던 또는 서던분석; 예를 들어, [Ausable 등(eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, NY(1991)]참조). 이러한 분석법들에서, 게놈DNA(서던) 또는 RNA(노던)는 피검체로부터 분리한다. 상기 DNA 또는 RNA는 이후 게놈을 드물게 절단하는 일련의 제한 효소로 절단하고 임의의 마커를 분석한다. 이후 DNA 또는 RNA를 분리하고(예를 들어, 아가로스겔 상에서) 멤브레인에 이동시킨다. 검출할 SNP 또는 돌연변이에 특이적인 표지화(예를 들어, 방사선 표지된 뉴클레오티드의 도입 등)한 프로브 또는 프로브들을 통해서 조건 또는 저, 중, 고도 엄격한 조건 하에서 멤브레인에 접촉시킬 수 있다. 결합하지 않은 프로브를 제거하고 결합 존재는 표지화한 프로브로 시각화하여 검출한다.
- [0083] 또한, "DNA칩"분석을 사용한 혼성화 검출법을 이용할 수 있다. DNA칩 혼성화 분석법을 사용하여 변형 서열을 검출한다. 이 분석법에서, 일련의 올리고뉴클레오티드 프로브를 고체상 지지체에 고정시킨다. 상기 올리고뉴클레오티드 프로브는 소정의 SNP 또는 돌연변이에 고유하도록 제작한다. 관심 DNA샘플을 "DNA칩"과 접촉 시켜서 혼성화 되는 것을 검출한다.
- [0084] 상기 GeneChip기술은 "칩"에 고정화하고 소형화시킨, 고밀도의 올리고뉴클레오티드 프로브의 배열(array)을 사용한다. 프로브 분석법은 Affymetrix의 광-디렉트 화학분석 프로세스를 통해 제조하는데, 이는 반도체 산업에서 사용하는 포토리소그라피 제조 기술과 고상화학 분석법을 결합한 것이다. 일련의 포토리소그라피마스크를 사용하여 칩 노출 부위를 한정하고, 이후 특정화학분석 단계를 수행하게 되며, 그러한 프로세스로 배열상에 미리 정

해진 위치에 각 프로브를 보유하고 있는, 고밀도의 올리고뉴클레오티드 배열을 제작하게 된다. 다수의 프로브 배열들을 다량의 유리웨이퍼 상에 동시에 합성한다. 상기 웨이퍼를 이후 다이싱하고, 각 프로브 배열들을 사출 성형 플라스틱 카트리지로 포장하여 프로브들을 주위로부터 보호하고 혼성화용 챔버로 제공한다.

[0085] 분석하고자 하는 핵산을 분리하고, PCR로 증폭시키며, 형광 리포터군으로 표지화한다. 표지화된 DNA를 이후 유체공학적 상태(fluidic station)를 사용하여 상기 배열과 향온반응시킨다. 이후 상기 배열을 스캐너에 삽입시켜서 혼성화 패턴을 검출한다. 혼성화 결과는 프로브배열에 결합되는, 미리 표적에 도입시킨 형광리포터군에서 방출되는 광으로 수집하여 얻는다. 표적과 완벽하게 매치하는 프로브는 일반적으로 미스매치된 것보다 강한 신호를 낸다. 배열상의 각 프로브의 위치 및 서열은 이미 알고 있으므로, 상보성을 통해서, 프로브 배열에 적용시킨 표적 핵산의 정체를 확인할 수 있다.

[0086] 마지막으로, 상기 유전자형 결정을 통해 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하는 단계를 포함한다.

[0087] 본 발명의 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성의 예측은 상기 단계의 DNA의 발현을 분석하는 방법으로, 그 방법은 특별히 제한되지 않으며, 상기 분석 방법은 예를 들어, 클러스터링 알고리즘(Clustering Algorithms)을 이용하거나, SPSS 통계 프로그램을 이용하여 수행될 수 있다.

[0088] 상기 클러스터링 알고리즘은 기본적인 유전자 세트를 동정하기 위한 분석 방법으로서, 예상된 특성이 잘 한정되지 않는 큰 부류의 프로필에 대해 효과적으로 수행될 수 있다. 상기 클러스터링 알고리즘의 수행 방법에 대해서는 당업계에 공지되어 있는 바, 예를 들어, Fukunaga, 1990, Statistical Pattern Recognition, 2nd Ed., Academic Press, San Diego; Everitt, 1974, Cluster Analysis, London: Heinemann Educ. Books; Hartigan, 1975, Clustering Algorithms, New York: Wiley; Sneath 및 Sokal, 1973, Numerical Taxonomy, Freeman; Anderberg, 1973, Cluster Analysis for Applications, Academic Press: New York) 등의 문헌을 참고 할 수 있다.

[0089] 이 밖에도 SLC15A2 유전자 다형성의 검출은, 예를 들어, ABI PRISM, 7900HT 서열 검출 시스템(AM E Bioscience)과 같은 형광 기본 서열 검출 시스템을 사용하여 수행할 수도 있다.

[0090] 상기 예측 방법을 통하여, 간암 환자에서의 유전자 발현을 비교함으로써 간암 환자의 소라페닙 치료에 있어서 치료 반응성 및 효과를 예측할 수 있다. 즉, 간암 환자로부터 본 발명의 마커인 SLC15A2 유전자 다형성의 존부를 측정하여, SLC15A2 유전자의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째에 위치하는 C가 T로 변형된 C/T 또는 T/T 유전자형을 포함할 경우, C/C 유전자형을 포함하는 간암 환자와 비교 시, 소라페닙 치료에 대해 더 우수한 효과 및 반응성을 예측할 수 있는 것이다.

[0091] 결국, 종래의 항암 치료와 비교 시, 항암제 치료에 대한 반응성을 예측하여 개별 맞춤형 치료를 시행할 수 있어 암 치료의 부작용, 비용 및 시간을 줄일 수 있는 효과적인 치료방법이 될 수 있다.

[0092] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0093] **[실시예]**

[0094] **실시예 1: 소라페닙 반응성 관련 유전자의 확인**

[0095] 소라페닙의 반응성을 예측하기 위하여 소라페닙 반응성과 관련된 다수의 SNV(single-nucleotide variation) 및 유전자(gene)를 확인하였다.

[0096] 소라페닙 반응성 SNV(single-nucleotide variation)를 확인하기 위하여 소라페닙 치료를 받은 7명의 환자(4명: 강한 반응성, 3명: 약한 반응성)의 유전체(genome)를 이용하여 NGS 분석(next-generation sequencing analysis)을 통해 유전적 패턴을 확인하였다.

[0097] 구체적으로, 환자의 유전체(genomic) DNA는 환자의 백혈구(leukocyte)로부터 Mag Attract DNA blood Midi Kit(Qiagen, Inc. Valencia, CA, USA)를 이용하고, 상기 키트의 사용자 매뉴얼에 따라 추출하였다. 또한, DNA

의 질(quality)는 Nanodrop spectrometer(Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA)을 이용하여 평가하였으며, 유전체 DNA 5 µg는 Covaris S series ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA, USA)으로 나누어 사용하였다. 유전체 DNA의 나뉜 조각은 pair-end adapters (Pair End Library Preparation Kit, Illumina, CA, USA)로 말미 보수(end-repaired), 꼬리절단(A-tailed), 묶음(ligated)을 수행하였고, 이후 PCR 사용자 매뉴얼에 따라 증폭되었다. 라이브러리의 질(quality) 및 DNA 농도는 Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 측정하였고, 라이브러리의 양 및 DNA 양은 LightCycler 480 (Roche, Indianapolis, IN, USA)에서 Illumina's library quantification protocol을 통해 SYBR green qPCR protocol을 사용하여 측정하였다. Paired-end sequencing (2 × 100 bp)은 HiSeq Sequencing kits를 사용하여 Illumina HiSeq 2000에서 수행하였다.

[0098] 90-bp paired-end sequence는 hp19 인간 레퍼런스 유전체(NCBI build 37)에 BWA algorithm1 ver. 0.5.9를 이용하여 삽입된 300 bp와 함께 읽었다. 또한, 2개의 부조화(mismatch)는 45-시드 시퀀스에서 허용되었고, 라이브러리 형성 과정에서 수행된 시퀀스 읽기의 PCR 복사(duplicate)를 제거하기 위해 SAM 툴(tool)을 사용하였다. 상기 툴로 조정된 읽기는 삽입/결실(insertion/deletion; indel)로 추정되는 자리를 GATK Indel Realigner algorithm(출처: Kanehisa M (2002) The KEGG database. Novartis Foundation symposium 247: 91-101; discussion 101-103, 119-128, 244-152.)를 사용하여 향상된 맵핑 퀄리티로 재조합하였다.

[0099] 또한, NGS 분석을 확인하기 위해 수행한 SNP 유전형 검사(genotyping)는 Axiom genotyping solution을 사용하여 Axiom Genome-Wide ASI 1 Array Plate (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)으로 수행하였으며, 이때 사용한 시약 키트(reagent kit)는 사용자 매뉴얼에 기재되어 있는 것을 사용하였다. 나아가, 총 유전체 DNA 200 ng을 사용하였으며, 상기 유전형 검사 결과는 Genotyping Console 4.1(Affymetrix)을 사용하여 Axiom GT1 algorithms과 함께 상기 알고리즘의 사용자 매뉴얼에 따라 활용하였다.

[0100] 더불어, 시퀀스는 자동 시퀀서 ABI 3730(automatic sequencer ABI 3730; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 분석하였고, 목적 위치는 하기 PCR을 통해 증폭하였다. PCR에 대한 세부사항 및 프라이머 시퀀스는 하기 표 1 및 도면 1에 나타냈다.

[0101] 상기 PCR은 썬델 싸이클러(Thermalcycler(PTC-100), MJ Research, Inc, 미국)를 사용하였으며 94℃에서 3분간 사전변성(predenaturation) 시킨 후, 94℃에서 1분간 변성(denaturation), 55℃에서 1분간 결합(annealing) 및 72℃에서 4분간 연장(extension)을 30회 반복 실시하고, 마지막으로 72℃에서 10분간 추가 반응시켰다. 다음 증합효소와 비특이적 증폭산물을 제거하기 위해 아가로즈 겔에서 전기영동 후 원하는 증폭산물 밴드 부위를 조각내어 겔 추출 키트(Geneall, 한국)를 이용하여 정제하였다.

[0102] 게다가, 상술한 바와 같은 방법을 사용하여 확인한 소라페닙 반응성 관련 유전자 확인 결과는 하기 표 2에 기재하였다.

표 1

[0103]

gene	chr#	position	primer sequence 1	primer sequence 2
FM03	chr1	171076965	GATGTTACCACTGAAAGGGATGG	GAAGCGACCTTGTAATAGATGC
CYP8B1	chr3	42918296	AAGAATGACTGTATGCCCTTCCA	AAGTGATATAGGCAAGCAGTTGGG
SLC15A2	chr3	121643803	AGGGAATAGGGTCTTGGGTGTA	TCTTTTCAAACCTGGGCAAAGAC
SLC15A2	chr3	121647285	GCTGAGTCAAAAAGCATCGAGTT	ATTGTTTTCAATTTCCACCCTG
SLC15A2	chr3	121648167	TTACCAAGGATCTGCCTGATGAT	ATCTTCGAATCCACATGAGAAA
UGT2B15	chr4	69526531	ATGGCGACACGTCTTCAAAATAG	GGGAGAAAGGGAGAAAACAAAA
DDR1	chr6	30859354	AGATGGACTCCTGTCTTACACCG	GGGTGCCTTTTTCATACAGTGTC
DDR1	chr6	30865203	CTAGAGAGAACAATGGCAGAGCC	CACTGAGGAAGTGGTTGAGGTC
ABCB1	chr7	87160617	ACAATGGCCTGAAAACCTGAAAAA	CATTGCAATAGCAGGAGTTGTG
PON3	chr7	95026159	TCCTACCTCAATTCCTCAGATGG	CCGTTTCTGTCTTTTCTCTCTT
PDGFRL	chr8	17465536	AAGCAAAACGAAGATGTCAGAGG	CAAATCAGGATGAACTCCCAAAG
PDGFRL	chr8	17453555	AAACCTGGGAGTCTCAACCTTA	AGGAACTGAGGTCCAGAGAGGAC
PDGFRL	chr8	17466211	CGTGCAATGGCACAATATATCAC	GACCACACACTGTCTTCTGTTGC
PDGFRL	chr8	17455052	TGACACTCACCTACAAAAGCAGG	TCCTTGCTAAAACACCACTGTGA
PDGFRL	chr8	17457428	ATGTCCTCTTCCCTGATCTACC	TTATCAGAGAGGAAGATGGCTGC
PDGFRL	chr8	17465823	CTTTGGGAGTTTCACTGATTTG	GTGATATATTGTGCCAATGCACG
PDGFRL	chr8	17455059	TGACACTCACCTACAAAAGCAGG	TCCTTGCTAAAACACCACTGTGA
PDGFRL	chr8	17452927	TCCAAGTTCACCTTGAGTTTCC	GCTCTGTTTGTTTAGGTCAGG

PDGFRL	chr8	17466167	CGTGCATTGGCACAATATATCAC	TGTCTTCTGTTGCTCTGCTCTTG
MUSK	chr9	113538121	ACACAGAATTTAGGCTCTGCCAC	CCAAAGTCTTGGGAGAACTCTGT
ALDH3B1	chr11	67795298	TGAGGCTCAGAGGGGAGAAGTAG	ACAGCTGTCATGGTGGTCTACAG
ALDH3B1	chr11	67795352	TGAGGCTCAGAGGGGAGAAGTAG	ACAGCTGTCATGGTGGTCTACAG
FLT1	chr13	28894680	ACATGCTGTGTCAGCACCTTCTA	ACCAGTTTCTAGACCAGGGGTGT
ALDH6A1	chr14	74551517	GTGATTGGTTAGGAGCGAAAATG	CAAAGAGAAAACCTATCCCAAC
ALDH6A1	chr14	74551525	GTGATTGGTTAGGAGCGAAAATG	CAAAGAGAAAACCTATCCCAAC
ALDH6A1	chr14	74551975	CTTCTTGGGCTCTTCTCCTTC	GGTTTGTGAGAATCATTCCATCC

[0104]

상기 표 1의 chr은 chromosome의 약어이고, chr#은 염색체(chromosome)의 변이 위치를 나타낸 것이다. 또한, 표 1의 position은 인간 레퍼런스 유전체 시퀀스(Human reference genome sequence) 버전 19/빌드37에서 변종 대입유전자(variant allele)의 뉴클레오타이드 자리를 나타낸 것이다.

표 2

Gene	Chromosome <sup>a</sup>	Position <sup>b</sup>	Ref <sup>c</sup>	Variant <sup>d</sup>	Ref amino acid <sup>e</sup>	Variant amino acid <sup>f</sup>
ABCB1	chr7	87160618	A	C	S	A
ALDH3B1	chr11	67795299	G	A	P	P
ALDH3B1	chr11	67795353	G	A	L	L
CYP21A2	chr6	32006317	C	T	L	L
DDR1	chr6	30865204	A	C	P	P
FMO3	chr1	171076966	G	A	E	K
MUSK	chr9	113538122	G	A	M	I
SLC15A2	chr3	121646641	A	G	A	A
SLC15A2	chr3	121643804	C	T	L	F
SLC15A2	chr3	121641693	G	A	A	A
SLC15A2	chr3	121647286	C	T	P	S
SLC15A2	chr3	121648168	G	A	R	K
SLC22A15	chr1	116534852	C	T	S	S
SLC7A7	chr14	23282449	C	T	S	S
SLC7A7	chr14	23282110	A	G	I	I

<sup>a</sup>Chromosome on which the variation was located

<sup>b</sup>Nucleotide position of the variant allele in the human reference genome sequence version 19/build 36

<sup>c</sup>Nucleotide at the same position in human reference genome sequence version 19/build 36

<sup>d</sup>Nucleotide at the variation site

<sup>e</sup>Amino acid encoded by the corresponding codon in the reference sequence

<sup>f</sup>Amino acid encoded by the corresponding codon in the variant sequence

<sup>g</sup>Genotypes of good responders

<sup>h</sup>Genotypes of poor responders

[0105]

[0106]

상기 표 2에서 확인되는 바와 같이, 간암 환자에서 소라페닙 반응성(sorafenib response)과 관련된 다수의 후보 유전자 및 후보 유전자의 변이코돈(coding variants)을 확인하였다. 구체적으로, 708개의 단일염기변이(SNV) 중에서 36개 변이가 게놈영역(genomic region)에 위치하고, 15개 단일염기변이는 9개 유전자의 암호화 영역(coding region)에 위치함을 확인하였다. 이를 통해 소라페닙 반응성 관련 유전자의 다형성 존재 여부를 확인하였다.

[0107]

**실시예 2. SLC15A2 유전자의 다형성 확인**

[0108]

상기 실시예 1을 통해 소라페닙 반응성 관련 유전자의 다형성 존재 여부를 확인하였고, 상기 표 1에 나타난 15개의 단일염기변이 중 13개는 약물반응과 관련된 유전자 내에 위치한 반면, 2개의 변이는 소라페닙 타겟 후보

유전자 중의 하나임을 알 수 있었다.

- [0109] 상기 약물반응과 관련된 유전자는 약물의 흡수, 분포, 대사, 배출(ADME : absorption, distribution, metabolism, excretion)과 관련된 유전자로써, 이들 중 보다 정확한 소라페닙 효능 평가 및 동등성 평가 등을 위해서 소라페닙 반응성 관련 유전자를 선별하는데 있어 약물의 흡수, 분포, 대사, 배출(ADME : absorption, distribution, metabolism, excretion)과 관련된 유전 정보를 확인하였다.
- [0110] 구체적으로, 실시예 1에서 확인한 소라페닙 반응성 관련 유전자의 다형성이 존재하는 각 SNV는 UCSC 유전자 테이블에서 코딩 부위(coding region), 비해석 부위(untranslated region; UTR) 및 비발현 부위(intron)와 같은 유전체 특성을 통해 발견되었다. 비동의(non-synonymous) SNV 정보는 UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) 레퍼런스 유전자 정보와 비교하여 추출되었다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0111] 도 2에 나타난 바와 같이, 6개 암호화 단일염기변이는 단백질을 암호화하는 기능에 손상을 받을 가능성이 있는 비동의(non-synonymous) 변이이고, 이들은 모두 소라페닙 타겟 후보 유전자인 MUSK 및 ADME 관련 유전자인 ABCB1, FMO3, SLC15A2의 4개의 유전자에 위치하였다.
- [0112] **실시예 3. SLC15A2 유전자 다형성을 이용한 소라페닙 치료에 대한 반응성 예측**
- [0113] SLC15A2는 막수송 단백질 그룹의 하나로써 약물전달에 관여한다. SLC15A2 유전자의 유전적 변이 유효성을 확인하였다.
- [0114] NGS 분석을 통해 SLC15A2 유전자 내에 5개의 변이 코딩을 확인하였고, 이 중 3유전자 생성에 있어서 기능적 변이를 일으킬 수 있는 3개의 비동의성 단일염기변이(nonsynonymous SNV) L350F, P409S, R509K를 선택하여 6주 이상 소라페닙 치료를 받은 233명의 간암 환자의 유전자형을 분석하였다.
- [0115] 구체적으로, SLC15A2에서의 변형(variation)에 대한 구조 분석(structural analysis)은 NCBI ACESSION NO가 NM\_001145998인 것을 사용하여 수행하였다. 또한, 3차원 구조는 Phyre 2.0(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)을 이용하여 구축하였고, 단백질 번역 보정(post-translational modification)은 KinasePhos (kinasephos.mbc.nctu.edu.tw)을 이용하여 분석하였다. 나아가, 주요 돌연변이 분석을 위해 주식단 유전자에 대하여 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG; 32, <http://www.genome.jp/kegg/>) 및 Biocarta (<http://www.biocarta.com/>)을 이용하여 경로분석(pathway analysis)을 수행하였다. 더불어, SLC15A2에 대한 상술한 바와 같은 공개 데이터 및 경로분석과 함께 통합 분석(integrative analysis)은 cBioPortal website ([www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org))을 통해 수행하였다.
- [0116] 또한, 분석 대상 SNP들의 확인을 위해, 소라페닙(sorafenib)으로 치료한 249명의 환자들은 MassARRAY system (Sequenom, San Diego, CA, USA)을 이용하여 유전형 검사(genotyping)를 수행하였다. 이를 통해 3가지 단일염기다형성(SNP) 유전자형(C/C, C/T 및 T/T)을 확보하였으며, 무진행 생존율(progression-free survival; PFS)은 Kaplan-Meier method으로 평가하였고 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0117] 도 3에 나타난 바와 같이, 소라페닙 치료 반응성에 대하여 SLC15A2 유전자의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째(L350F)에 위치하는 C가 T로 치환되었을 때 C/T 또는 T/T 유전자형의 존재는 시험대상이 C/C 유전자형을 갖는 대상보다 소라페닙 치료에 대해 반응성이 우수하여 무진행 생존기간이 증가함을 확인할 수 있었다(누적 위험 비율(hazard ratio): 2.46; 95% 신뢰구간(confidence interval): 1.36 ~ 4.44; P = 0.003).
- [0118] 따라서 간암 환자에서 소라페닙 치료에 대한 반응성과 관련하여 SLC15A2 유전자가 중요한 역할을 나타냄을 확인하였으며, 이를 통해 소라페닙 치료에 대한 반응성을 예측할 수 있는 신뢰성 있는 바이오마커(biomarker)로써 이용할 수 있다.
- [0119] **실시예 4. SLC15A2 유전자 다형성에 의한 기능적 효과(functional effect)**
- [0120] 사람 간암 세포주를 통해 SLC15A2 유전자의 단일염기다형성(서열번호 3) 26번째(L350F) 위치(도면 7의 형광 채우기 부분)의 변이 유전자형을 확인하고, in vitro 기능적 분석을 수행하였다. 결과는 도 4에 나타났다.
- [0121] 구체적으로, 유전적 다형성(generic polymorphism)과 진행(progression)에 대한 위험 사이의 연관

(association)은 간세포암종(hepatocellular carcinoma; HCC)의 상태에 대한 적응과 함께 Cox proportional hazard model을 이용하여 평가하였다. 또한, 측정된 데이터 분석은 STATA version 10.1 (Stata Corp, College Station, TX, USA)을 사용하였다.

- [0122] 도 4에 나타난 바와 같이, 간암 세포주에서의 SLC15A2 유전자 다형성의 기능적 분석을 위해 Hep3B, SNU182 및 PLC/PRF5 세포주를 선별하여 Sanger 시퀀싱을 수행한 결과, Hep3B, PLC/PRF5 및 SNU182 세포주는 각각 C/C, C/T 및 T/T 유전자형임을 확인하였다.
- [0123] 또한, 상기 Hep3B(C/C 유전자형), PLC/PRF5(C/T 유전자형) 및 SNU182(T/T 유전자형) 세포주를 이용하여, 소라페닙 반응에 의한 세포생존율을 확인하였다. 확인 결과는 도 5에 나타났다.
- [0124] 구체적으로, 인간 간세포암종(hepatocellular carcinoma; HCC)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul, Republic of Korea) 구매하였다. 이후 상기 인간 간세포암종은 MagAttract DNA mini M48 kit (Qiagen) 및 상기 키트의 사용자 매뉴얼에 따라 상기 간세포암종으로부터 유전체 DNA(genomic DNA)를 추출하였다. 이후 추출한 유전체 DNA는 10%(v/v) 우태아혈청(FBS; Fetal Bovine Serum)와 100 U/ml 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)을 포함하는 RPMI-1640(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 37 °C 및 5 % 이산화탄소 환경 하에서 배양하였다. 이후 MTT 어세이를 위해, 배양된 유전체 DNA는 96-웰 플레이트에  $1 \times 10^4$  세포주/웰의 밀도로 분주하고, 상술한 것과 동일한 RPMI-1640에서 48 시간 동안 소라페닙 처리하였다. 이후 생존 가능한 세포주의 수는 MTT 어세이(Promega Fitchburg, WI, USA) 및 상기 MTT 어세이 사용자 매뉴얼에 기재되어 있는 방법을 통해 측정하였다.
- [0125] 도 5에서 확인되는 바와 같이, 3종류의 세포주 모두 농도 의존적(dose-dependent)으로 소라페닙에 의해 증식(Proliferation)이 억제되었다. 이 중 SNU182(T/T 유전자형)의 세포주에서 C/C 유전자형인 Hep3B 세포주보다 소라페닙에 대한 반응성이 더 우수함을 확인할 수 있었다.
- [0126] 나아가, PCR 및 웨스턴 블롯 분석을 통해 SLC15A2 유전자형(genotype)에 대한 분석을 수행하였다.
- [0127] 구체적으로, 상술한 바와 같이 추출 및 배양한 유전체 DNA를 하기 기재되어 있는 전방 및 후방 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 상기 PCR 증폭은 씨멀 싸이클러(Thermalcycler(PTC-100), MJ Research, Inc, 미국)를 사용하였으며 94°C에서 3분간 사전변성(predenaturation) 시킨 후, 94°C에서 1분간 변성(denaturation), 55°C에서 1분간 결합(annealing) 및 72°C에서 4분간 연장(extension)을 30회 반복 실시하고, 마지막으로 72°C에서 10분간 추가 반응시켰다. 다음 중합효소와 비특이적 증폭산물을 제거하기 위해 아가로즈 겔에서 전기영동 후 원하는 증폭산물 밴드 부위를 조각내어 겔 추출 키트(Geneall, 한국)를 이용하여 정제하였다.
- [0128] - 전방 프라이머(서열번호 1): 5'-GGGTCTGGGTGTAATGGA-3'
- [0129] - 후방 프라이머(서열번호 2): 5'-CACACTGGAGACCAGACGA-3'
- [0130] 이후 웨스턴 블롯(western blot) 분석을 위해, 상술한 바와 같이 PCR 증폭한 세포주 용해물(lysate) 30 µg을 12% NuPage gel (Invitrogen)에 채용해시키고, Immobilon (Millipore, Billerica, MA, USA)로 옮겼다. 이후 면역 블롯(immunoblotting)은 anti-SLC15A2 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 및 anti-β-actin (Abcam, Cambridge, MA, USA)을 이용하여 수행하였으며, 단백질 밴드는 WestZol (iNtRon, Gyeonggi, Republic of Korea)을 이용하여 분석하였다. 분석 결과는 도 6에 나타났다.
- [0131] 도 6에 나타난 바와 같이, 세포생존율 결과와는 달리, SLC15A2 유전자의 발현 비율은 단일염기다형성 유전자형과 상관없이 모두 비슷한 발현 양상을 보였으며, 이는 발현의 변화보다는 구조적 변화에 의한 기능의 변화일 수 있을 것이다.

[0132]

따라서, 본 발명의 유전자 다형성을 이용한 소라페닙 치료에 대한 반응성 예측방법을 통해 소라페닙에 반응을 높은 반응성을 보여 치료 예후가 좋은 환자군을 선별할 수 있으며, 이를 통해 간암 환자에 대하여 소라페닙 치료에 대한 대상의 반응성을 예측하여, 간암 환자에게 적합한 약물을 투여하여 최적의 치료효과를 달성하고 환자의 불편을 줄이고, 치료비용을 절감할 수 있어 우수한 항암효과 기대할 수 있다. 또한, 암 치료에 있어서 부작용을 최소화할 수 있는 항암제의 선별적 치료 및 환자 개인별 맞춤형 화학요법이 될 수 있다.

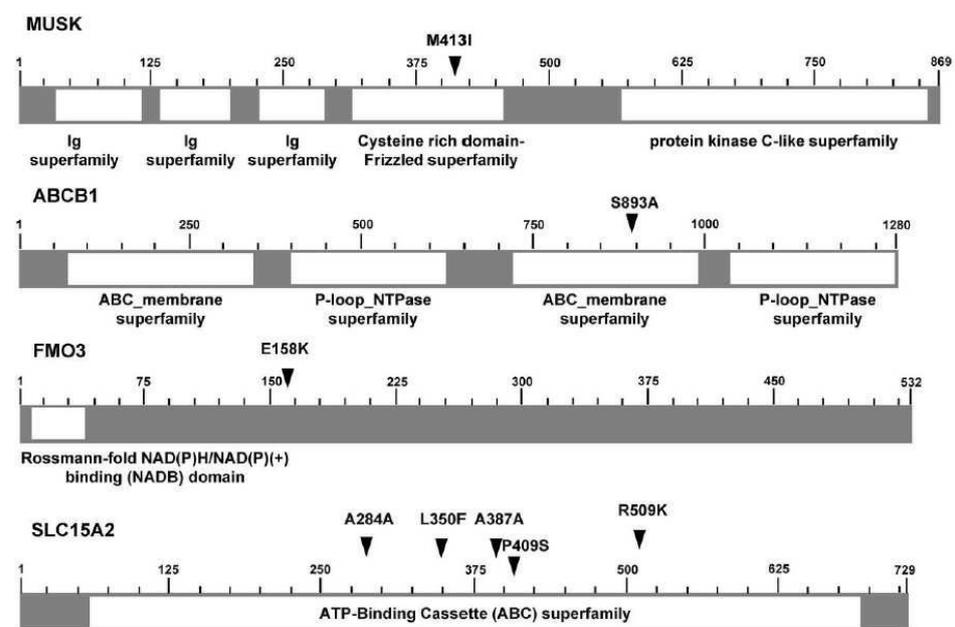
도면

도면1

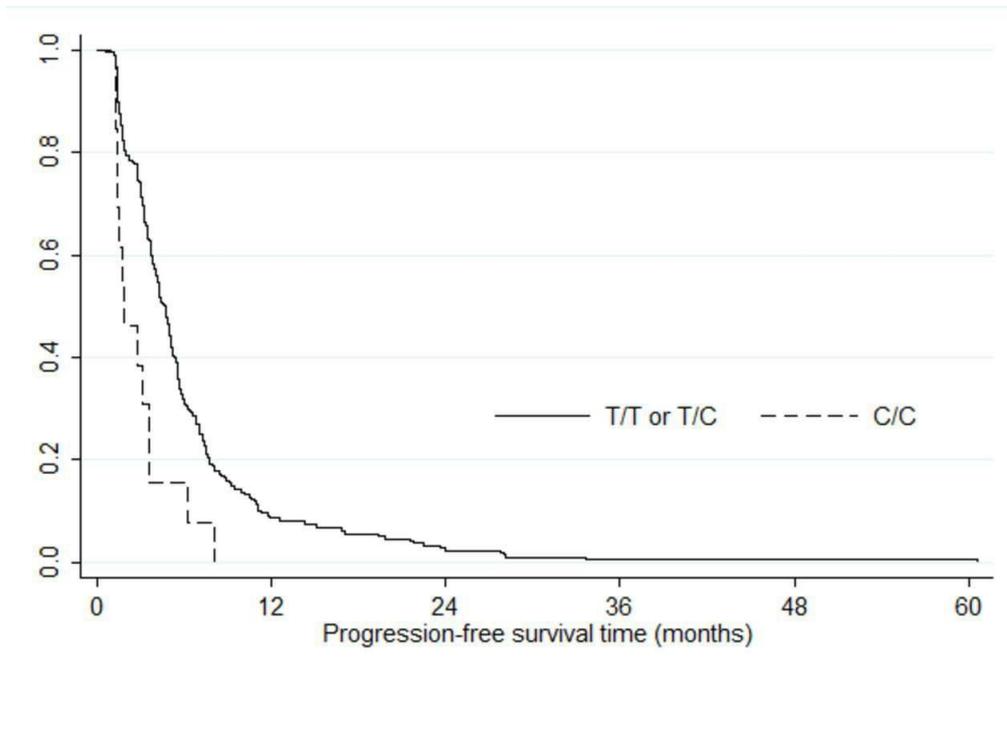
gene	chr# <sup>a</sup>	position <sup>d</sup>	primer sequence 1	primer sequence 2
FMO3	chr1	171076965	GATGTTACCACTGAAAGGGATGG	GAAGCGACCTTGTGAATAGATGC
CYP8B1	chr3	42918296	AAGAATGACTGTATGCCCTTCCA	AAGTGATATAGGCAAGCAGTTGGG
SLC15A2	chr3	121643803	AGGGAAATAGGGTCTTGGGTGTA	TCTTTTTCAAACCTGGGCAAAGAC
SLC15A2	chr3	121647285	GCTGAGTCAAAAAGCATGGAGTT	ATTGTTTTTCAATCCACCACCTG
SLC15A2	chr3	121648167	TTACCAAGGATCTGCCTGATGAT	ATCTTCGAATCCCACATGAGAAA
UGT2B15	chr4	69526531	ATGGCGACACGCTTCAAAATAG	GGGAGAAAAGGGAGAAAAACAAA
DDR1	chr6	30859354	AGATGGACTCCTGTCTACACCG	GGGTGCCTTTTTATACAGTGTG
DDR1	chr6	30865203	CTAGAGAGAACAAATGGCAGAGCC	CACTGAGGAAGTGGTTGAGGTC
ABCB1	chr7	87160617	ACAATGGCCTGAAACTGAAAAA	CATTGCAATAGCAGGAGTTGTTG
PON3	chr7	95026159	TCCTACCTCAATTCCTCAGATGG	CCGTTTTCTGTCTTTTCTTCTT
PDGFRL	chr8	17465536	AAGCAAAACGAAGATGTCAGAGG	CAAAATCAGGATGAACTCCCAAG
PDGFRL	chr8	17453555	AAACCTGGGAGTCTCAACCTTA	AGGAACTGAGGTCAGAGAGGAC
PDGFRL	chr8	17466211	CGTGCATTGGCACAATATATCAC	GACCACACACTGTCTCTGTTC
PDGFRL	chr8	17455052	TGACACTCACACAAAAGCAGG	TCCTTGCTAAAACACCACTGTGA
PDGFRL	chr8	17457428	ATGTCCTCCTTCCCTGATCTACC	TTATCAGAGAGGAAGTGGCTGC
PDGFRL	chr8	17465823	CTTTGGGAGTTCATCCTGATTTG	GTGATATATTGTGCAATGCACG
PDGFRL	chr8	17455059	TGACACTCACACAAAAGCAGG	TCCTTGCTAAAACACCACTGTGA
PDGFRL	chr8	17452927	TCCAAGTTCACCTTGAGTTTTCC	GCTCTTGTGTTTTAGGTCCAGG
PDGFRL	chr8	17466167	CGTGCATTGGCACAATATATCAC	TGCTTCTGTTGCTGTCTGCTTG
MUSK	chr9	113538121	ACACAGAATTTAGGCTCTGCCAC	CCAAAGTCTTGGGAGAACTCTGT
ALDH3B1	chr11	67795298	TGAGGCTCAGAGGGGAGAAGTAG	ACAGCTGTCATGGTGGTCTACAG
ALDH3B1	chr11	67795352	TGAGGCTCAGAGGGGAGAAGTAG	ACAGCTGTCATGGTGGTCTACAG
FLT1	chr13	28894680	ACATGCTGTGTGACACCTTCTA	ACCAATTTCTAGACACAGGGGTGT
ALDH6A1	chr14	74551517	GTGATTGGTTAGGAGCGAAAATG	CAAAGAGAAACCCATCCCCAAC
ALDH6A1	chr14	74551525	GTGATTGGTTAGGAGCGAAAATG	CAAAGAGAAACCCATCCCCAAC
ALDH6A1	chr14	74551975	CTTCTTGGGCTCTCTCCTTTC	GGTTTGTGAGAATCATTCCATCC

<sup>a</sup>chromosome. Chromosome on which the variation is located.  
<sup>b</sup>ref, nucleotide at the same position in the Human reference genome sequence version 19/build 36.  
<sup>c</sup>variant, nucleotide at the variation site  
<sup>d</sup>position, nucleotide position of the variant allele in the Human reference genome sequence version 19/build 3

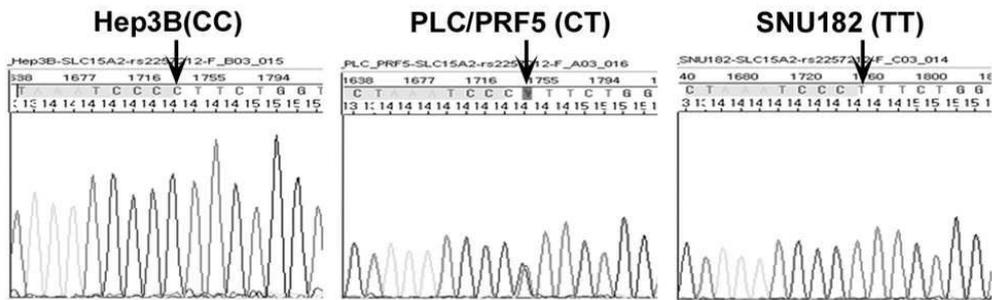
도면2



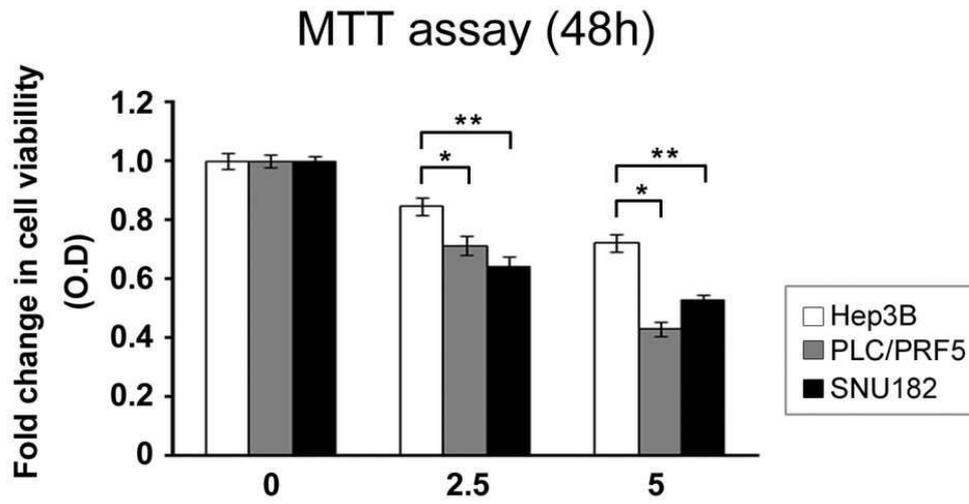
도면3



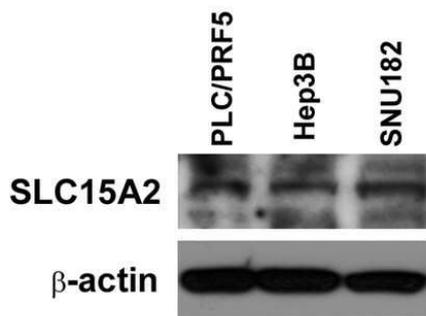
도면4



도면5



도면6



도면7

AACGGGATGAAGATAAGAACCAGAA**C**GGGATTTAGAACCTGTAACACCATG

도면8

TAATTCAGTC CCCAGTCCTA CTAGGTTCCC CATTTGTTTT GTAGGGACAA  
 CAGGAGATTT AAAGGGATTA GTAGTCATCA AAGGCCTTGA GTTTCTTTGA  
 AGAGACAACA TTCAAGAACA AAGAAGAAAG TTGGTTTAGG AGCTAAATTT  
 CACATATTTT TGGTTTGGCA TGAAACCTAG ACCTGCCCTT CCACCACCAT  
 TACACAGTTA AGTCCACAGT AATGGCTTTG ACTCTCATT AATTATATCTA  
 ATTCACATTT TTCAGGGTCA ATAGGCAGTT AGTCTAACAT GGAAAAATAG  
 AAGCAGATAG ATGATAAACT AAAACCAATC CTCACTAAGA AAAATACTGA  
 CATTGAATCT TTTTCAAACCT GGGCAAAGAC TGAGTCAATT TAGAGTAATC  
 CATAACAGACA TAGTGAACAC TTACGAGAAG TTAATTCCAC ACTTGGAGAC  
 CAGACGATAA ATGACAAAAGT CAAACAACGG GATGAAGATA AGAACCAGAA  
 GGGGATTTAGA ACCTGTAACA CCATGATAAA AAGGATTAGC TACAAATATT  
 CTCCTATCAT GAGTGTGAGC ACTGCACTCA TTTGCTTGTT TACTCTCTGT  
 CTCACATCTA CACACACTTT TGTCATTGTA AGTACAGAAT GACTCCACAT  
 TCCTCAGTCC ATTTACACCC AAGACCCTAT TTCCCTTGCA TAGCATTTTA  
 GCTTTCAAAT ATCCCAAGGG ACAAGTTTCA CTCTGAGCCT GTCTTTCTGC  
 CAGCCTTATT GTGAGCTCTT TCCTCTCATG ACTTCATTGC TCACAAAATA  
 AGCCTTACAA TTTCTTTTAC AAGATTTTGA TTATACTATC TTGACTTGGA  
 AAAAAATCCA ATGCTTACAC TTAACCCGTT GCAAGTTAAG TACTTAACAG  
 GGGATGTGAA GGAGAAGGGT GGGGCTTAAT GGGAATGTTT TCATGTGCGAA  
 GCTTGGCCCT TATCAGCGTA CAAGGAGAAA AGCATCAAAT TATGGTTGT

서열목록

- <110> NATIONAL CANCER CENTER
- <120> Method for prediction of reactivity to sorafenib treatment Using  
gene polymorphism
- <130> 1040380
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer sequence

<400> 1	
gggtcttggg tgtaaatgga	20
<210> 2	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer sequence	
<400> 2	
cacacttggg gaccagacga	20
<210> 3	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> human leukocyte	
<400> 3	
aacgggatga agataagaac cagaacggga tttagaacct gtaacacat g	51
<210> 4	
<211> 950	
<212> DNA	
<213> human leukocyte	
<400> 4	
taattcagtc cccagtccta ctaggttccc catttgtttt gtagggacaa caggagattt	60
aaagggatta gtagtcatca aaggccttga gtttctttga agagacaaca ttcaagaaca	120
aagaagaag ttggtttagg agctaaatth cacatatttt tggtttgca tgaaacctag	180
acctgccct ccaccacat tacacagtta agtccacagt aatggctttg actctcatta	240
attatateta attcacattt ttcaggttca ataggcagtt agtctaacat ggaaaaatag	300
aagcagatag atgataaact aaaaccaatc ctactaaga aaaatactga cattgaaatct	360
ttttcaaact gggcaaagac tgagtcaatt tagagtaatc catacagaca tagtgaacac	420
ttacgagaag ttaattccac acttggagac cagacgataa atgacaaaagt caaacaacgg	480
gatgaagata agaaccagaa gggattttaga acctgtaaca ccatgataaa aaggattagc	540
tacaaatatt ctctatcat gagtgtgagc actgcactca tttgcttgtt tacactctgt	600
ctcacateta cacacacttt tgtcattgta agtacagaat gactccacat tctcagttcc	660
atttacccc aagaccctat ttccttgcga tagcatttta gctttcaaat atcccaaggg	720

acaagtttca ctctgagcct gtctttctgc cagccttatt gtgagctctt tcctctcatg	780
acttcattgc tcacaaaata agcettacaa tttcttttac aagattttga ttatactatc	840
ttgacttggg aaaaaatcca atgettacac ttaaccggtt gcaagttaag tacttaacag	900
gggatgtgaa ggagaagggt ggggcttaat gggaatgttt tcatgtcgaa	950