



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2015년03월13일  
 (11) 등록번호 10-1501826  
 (24) 등록일자 2015년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12Q 1/68** (2006.01) **G01N 33/574** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2013-0037336  
 (22) 출원일자 2013년04월05일  
 심사청구일자 2013년04월05일  
 (65) 공개번호 10-2014-0121524  
 (43) 공개일자 2014년10월16일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 BJC,108권,1495-1501면(온라인공개:  
 2013.03.19.)\*  
 KR1020120061010 A  
 US20100055095 A1  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**연세대학교 산학협력단**  
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대  
 학교)  
 (72) 발명자  
**허용민**  
 서울 광진구 아차산로70길 61, 501동 507호 (광장  
 동, 광장현대아파트)  
**노성훈**  
 서울 양천구 목동동로 350, 518동 306호 (목동,  
 목동5단지아파트)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**특허법인다나**

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **위암에 대한 예후 예측 모형의 제조방법**

(57) 요약

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.

대표도 - 도3

<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 <sup>a</sup>	1	.046		
Continuity correction <sup>b</sup>	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

(72) 발명자

**서진석**

서울특별시 서초구 서초동 1436-14 (6/4) 서초동  
자이

**정재호**

서울 강남구 남부순환로 3032, 103동 808호 (대치  
동, 미도아파트)

**박은성**

서울 서초구 나루터로4길 70-5, 1102 (잠원동, 한  
신타운아파트)

**허용민**

서울 광진구 아차산로70길 61, 501동 507호 (광장  
동, 광장현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10041653

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 지식경제부

연구사업명 바이오 의료기기 산업융합원천기술개발

연구과제명 위암 구강암 예후 예측 및 치료 지침을 위한 mRNA-miRNA 복합진단시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.06.01 ~ 2015.05.31

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

위암과 관련된 차등적인 mRNA 발현을 나타내는 예후 관련 유전자군을 선정하여, 대상으로부터 얻은 암세포를 포함하는 생물학적 샘플에서 mRNA 발현 정도가 중간값을 기준으로 1.5배 이상 증가하는 mRNA 고발현군과 1.5배 이상 감소하는 mRNA 저발현군으로 분류한 후, 상기 mRNA 고발현군과 저발현군에서 KRAS, MET 및 PIK3CA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 단일 염기 다형성의 발현 여부를 측정하는 단계; 및

상기 유전자의 단일 염기 다형성의 발현 여부를 백분율로 계산하여 통계적으로 유의한 설정치를 3%와 7%로 정하고, KRAS 또는 PIK3CA 유전자의 단일 염기 다형성의 발현 빈도가 각각 3% 이하인 경우 예후가 나쁜 군으로, 3%를 초과하는 경우 예후가 좋은 군으로 분류하고, MET 유전자의 단일 염기 다형성의 발현 빈도가 7% 이하인 경우 예후가 좋은 군으로, 7%를 초과하는 경우 예후가 나쁜 군으로 분류하는 단계를 포함하고,

상기 예후가 좋은 군은 TNM 병기와 상관없는 전체 위암의 수술에 의한 절제 후 위암 재발없이 전체 생존율(Overall Survival, OS) 측면에서 5년 내지 10년 기간 동안 긍정적인 임상 결과 가능성이 증가하는 군을 의미하고, 예후가 나쁜 군은 상기 기간 동안 전체 생존율 측면에서 긍정적인 임상 결과 가능성이 감소하는 군을 의미하며,

상기 KRAS의 단일 염기 다형성은 A146PT\_g436ca, G10R\_g28a, G12DAV\_g35act, G12SRC\_g34act, G13DAV\_g38act, G13SRC\_g37act, Q61EKK\_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, 위암으로 진단된 대상에서 예후 예측 모형을 제조하는 방법.

**청구항 2**

삭제

**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**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 유전자 돌연변이 비교 분석법을 통해 위암의 예후 예측이 가능한 신규한 예후 예측 모형의 제조방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 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 뛰어난을 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.

[0003] 비록 수술이 실시 가능한 위암의 주요 치료이긴 하나, 진행성인 경우 재발률이 높다. 재발을 예방하고, 위암 환자의 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.

[0004] 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.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0005] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제2007-0022694호, 2007.02.27  
 (특허문헌 0002) 2. 대한민국 공개특허 제2010-0072283호, 2010.06.30

**비특허문헌**

[0006] (비특허문헌 0001) 1. *Journal of clinical oncology*, vol. 23(29), pp.7286-7295, 2005.10.10

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명의 목적은 위암 환자들의 유전자 돌연변이에 기초한 새로운 예후 예측 모형의 제조방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0008] 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.

[0009] 상기 예후 예측 모형은 TNM 병기와 상관없는 전체 위암의 수술에 의한 절제 후 임상 결과를 예측하는 것일 수 있다.

**발명의 효과**

[0010] 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**

[0011] 도 1은 중앙조직의 mRNA 마이크로어레이 결과와 이에 따른 그룹 분류를 나타낸 것이다.

도 2는 각 그룹의 Kaplan-Meier Plot를 나타낸 것이다.

도 3 내지 5는 그룹 2와 돌연변이 관계를 교차분석 및 chi-square 분석 결과로 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0012] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0013] 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.

[0014] 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.

[0015] 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.

[0016] 상기 차등적인 mRNA 발현을 나타내는 예후 관련 유전자 군은 PCR 또는 어레이 기반 방법에 따라 실시될 수 있다.

[0017] 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.

[0018] 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 빈도

를 예후 예측 모형 제조에 적용하였다.

- [0019] 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.
- [0020] 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.
- [0021] 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.
- [0022] 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.
- [0023] 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.
- [0024] 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.
- [0025] 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.
- [0026] 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.
- [0027] 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.
- [0028] 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.
- [0029] 본 발명의 방법에 따른 예후 예측 모형은 TNM 병기와 상관없는 전체 위암의 수술에 의한 절제 후 임상 결과를 예측하는데 유용할 수 있다.
- [0030] 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.
- [0031] 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.
- [0032] 용어, "올리고뉴클레오티드"는 비제한적으로 한-가닥 데옥시리보뉴클레오티드, 한- 또는 두-가닥 리보뉴클레오티드, RNA:DNA 하이브리드 및 두-가닥 DNA를 포함하는, 비교적 짧은 폴리뉴클레오티드를 말한다. 올리고뉴클레오티드, 예를 들면 한-가닥 DNA 프로브 올리고뉴클레오티드는 종종 예를 들면 상업적으로 입수가능한 자동화 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하는 화학적 방법에 의해 합성된다. 그러나, 올리고뉴클레오티드는 시험관내 제

조합 DNA-매개 기술을 포함하는 각종 다른 방법들에 의해 및 세포 및 유기체 중에서의 DNA 발현에 의해 제조될 수 있다.

[0033] 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.

[0034] 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.

[0035] 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.

[0036] 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.

[0037] 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.

[0038] 달리 지시하지 않는 한, 분자 생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학 및 생화학의 종래 기술을 사용하여 본 발명을 수행할 수 있다.

[0039] 1. 유전자 발현 프로파일 작성(Profiling)

[0040] 유전자 발현 프로파일 작성 방법은 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 분석에 기초한 방법, 폴리뉴클레오타이드의 서열화에 기초한 방법, 및 프로테오믹스 기체 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-기체 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-기체 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.

[0041] 2. PCR-기반 유전자 발현 프로파일 작성 방법

[0042] a. 역 전사효소 PCR(RT-PCR)

- [0043] 가장 민감하고 가장 유연한 정량적 PCR-기재 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.
- [0044] 제1단계는 표적 샘플로부터 mRNA의 단리이다. mRNA는 예를 들면 냉동되거나 보관된 파라핀-매립 및 고정된 (예를 들면, 포르말린-고정된) 조직 샘플로부터 추출될 수 있다.
- [0045] 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 퀴아젠(Qiagen)으로부터의 정제 키트, 완충제 세트 및 프로테아제를 사용하여 제조업체의 설명서에 따라 수행할 수 있다. 다른 상업적으로 입수 가능한 RNA 단리 키트는 마스터퓨어(MasterPure)<sup>TM</sup> 완전 DNA 및 RNA 정제 키트(에피센트레(EPICENTRE)<sup>®</sup>, 위스콘신주 매디슨) 및 파라핀 블록(Paraffin Block) RNA 단리 키트(엠비온, 인크.(Ambion, Inc.))를 포함한다. 조직 샘플로부터의 전체 RNA는 RNA Stat-60 (Tel-Test)를 사용하여 단리할 수 있다. 종양으로부터 제조된 RNA는 예를 들면 염화세슘 밀도 구배 원심분리에 의해 단리될 수 있다.
- [0046] 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 핵사머, 또는 올리고-dT 프라이머를 사용하여 초회항원 자극된다. 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.
- [0047] 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<sup>®</sup> 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 표지된다. 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.
- [0048] 타크맨<sup>®</sup> RT-PCR은 상업적으로 입수 가능한 장비, 예를 들면 ABI 프리즘(PRISM) 7700<sup>TM</sup> 시퀀스 검출 시스템 (Sequence Detection System)<sup>TM</sup>(Perkin-Elmer-Applied Biosystems), 또는 라이트사이클러(Lightcycler)(Roche Molecular Biochemicals)를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0049] 5'-뉴클레아제 검정시험 데이터는 초기에 Ct, 또는 역치 사이클로서 표현된다. 형광 값은 매 사이클 동안 기록되고, 증폭 반응으로 그 지점으로부터 증폭된 생성물의 양을 나타낸다. 형광 신호가 처음 통계학적으로 유의한 것으로 기록될 때의 지점이 역치 사이클(Ct)이다.
- [0050] 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 하우스킵핑 유전자 글리세르알데히드-3-포스페이트-데히드로게나제 (GAPD) 및 β-액틴(ACTB)의 mRNA이다.
- [0051] 또한, 새로운 실시간 정량적 PCR은 이중-표지된 형광원성 프로브(즉, 타크맨<sup>®</sup> 프로브)를 통한 PCR 생성물 추적

을 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.

[0052] b. 매스어레이(MassARRAY) 시스템

[0053] 시퀀싱, 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.

[0054] c. 기타 PCR-기반 방법

[0055] 기타 시차 디스플레이; 증폭된 단편 길이 다형성 (iAFLP); 비드어레이(BeadArray)™ 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.

[0056] 3. 마이크로어레이

[0057] 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 기관상에 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 기관상에 제공한다. 바람직하게는, 10,000 이상의 뉴클레오티드 서열들을 기관에 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 동일조점 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.

[0058] 4. mRNA 단리, 정제 및 증폭의 일반적인 설명

[0059] 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.

[0060] 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 혼합시킨다. 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.

[0061] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] <실시예 1> 예후 예측 대상 선정 및 실험설계

[0063] Sanger Institute가 보유하고 있는 다양한 암 종에서 동정되는 체세포 돌연변이에 대한 데이터베이스를 이용하여, 본 발명자들은 많은 다른 암에서 존재하는 보다 일반적으로 발생하는 단일 염기 다형성(SNP)의 존재를 검출하는 분석을 개발하였다.

[0064] 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.

[0065] 단일 염기 다형성 검출은 시커눔 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 Sequenom의 IPLEX 화학을 이용하여 그들의 프로토콜에 따라 수행하였다. 그 후, IPLEX 반응은 Sequenom의 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.

[0066] 결과는 표 1에 나타내었고, 각 유전자에서 발생하는 한 종류 이상의 돌연변이를 1개로 계수하고 산출하였다.

표 1

[0067]

구분	AKT1	BRAF	CTNNB1	FBWX7	GNAS	IDH1	JAK2	KIT	KRAS	MET	NRAS	PDGFRA	PDPK1	PHLPP2	PIK3CA	PIK3R1
종양 조직-537	2	1	6	7	1	1	1	1	33	54	1	7	1	0	42	0
정상 조직-129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0
FFPE-종양 샘플-125	0	0	0	0	0	0	0	0	3	12	1	1	0	4	3	15
FFPE-정상 샘플-123	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	0	1	0	4	0	12

G.C 세 포주 -108 - 4 반복	0	0	11	4	0	0	0	0	23	4	4	1	0	0	19	0
유 방 암 세 포주 - 16- 4반 복	0	11	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0
ETC	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6	0	2	0	0	1	0
TOTA L - 1081	2	12	17	11	1	1	1	5	72	99	6	12	1	8	65	27

[0068] 표 1에 나타난 바와 같이, KRAS, MET, PIK3CA 돌연변이가 정상 조직과 비교하여 종양에서 많이 나타남을 알 수 있었다.

[0069] KRAS, MET 및 PIK3CA의 단일 염기 다형성에 의한 돌연변이 종류는 표 2와 같다.

표 2

유전자 종류	돌연변이 종류
KRAS	A146PT_g436ca, G10R_g28a, G12DAV_g35act, G12SRC_g34act, G13DAV_g38act, G13SRC_g37act, Q61EKK_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	

[0071] 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.

[0072] 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.

[0073] 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.

[0074] 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.

표 3

[0075]

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

[0076]

도 2는 각 그룹의 Kaplan-Meier Plot를 나타낸 것이다.

[0077]

도 3 내지 5는 그룹 2와 돌연변이 관계를 교차분석 및 chi-square 분석 결과로 나타낸 것이다.

[0078]

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.

도면

도면1

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

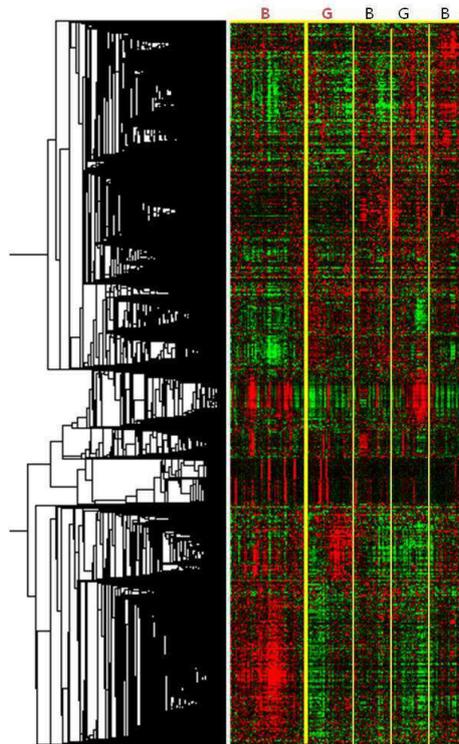
	N	Observed	Expected	(O-E)^2/E	(O-E)^2/V
Class_15_15_4=CL1	100	59	44.3	4.858757	6.796632
Class_15_15_4=CL2	92	28	45.6	6.770432	9.613380
Class_15_15_4=CL3	113	52	51.8	0.000494	0.000737
Class_15_15_4=CL4	45	18	15.3	0.487515	0.542952

Chisq= 12.2 on 3 degrees of freedom, **p= 0.00663**

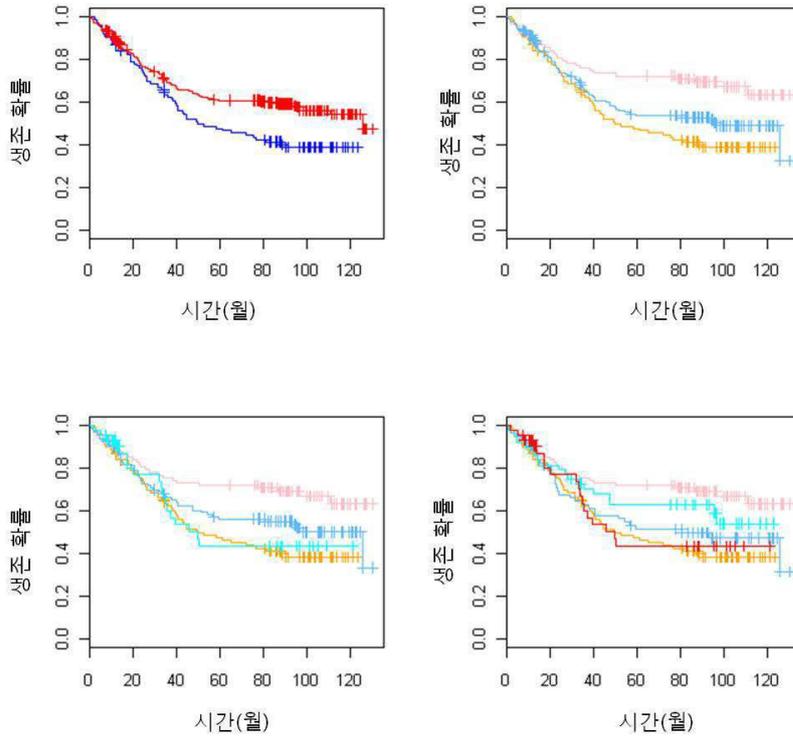
5개그룹

	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**



도면2



도면3

<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 <sup>a</sup>	1	.046		
Continuity correction <sup>b</sup>	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

도면4

<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 <sup>a</sup>	1	.064		
Continuity correction <sup>b</sup>	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

도면5

<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 <sup>a</sup>	1	.015		
Continuity Correction <sup>b</sup>	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 count is 8.86.  
 b. Computed only for a 2x2 table