

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2021/167280 A1

2021년 8월 26일 (26.08.2021) WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6886 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2021/001605

(22) 국제출원일:

2021년 2월 8일 (08.02.2021)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0021586 2020년 2월 21일 (21.02.2020) KR

(71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). 씨비에스바이오사이언스 주식회사 (CBSBIOSCIENCE CO., LTD) [KR/KR]; 34036 대전시 유성구 테크노11로 24, 3층, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 유창식 (YU, Chang-Sik); 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 박인자 (PARK, In-Ja); 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 홍승모 (HONG, Seung-Mo); 06217 서울시 강남구 역삼로 314, 304-601, Seoul (KR). 안성민 (AHN, Sung-

Min); 06581 서울시 서초구 사평대로20길 79, 203, Seoul (KR). 안사리아드난 아흐마드 (ANSARI, Adnan Ahmad); 21536 인천시 남동구 구월말로3번길 82-5, 101, Incheon (KR). 무스타파비랄 (MUSTAFA, Bilal); 21990 인천시 연수구 송도미래로 30, C-1509, Incheon (KR). 박진영 (PARK, Jin-Young); 04154 서울시 마포구 독막로 42길 2, 103-502, Seoul (KR).

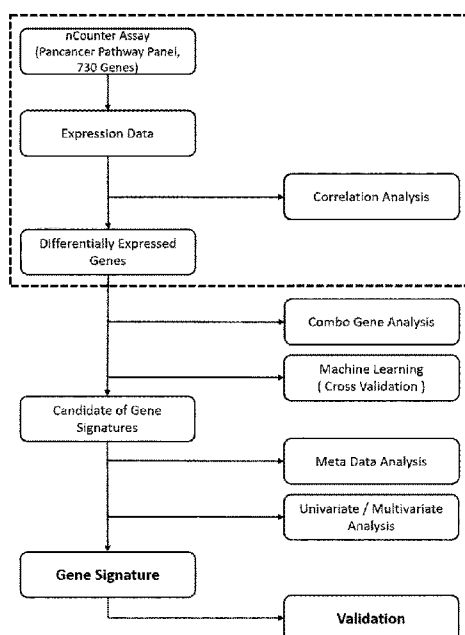
(74) 대리인: 오국진 (OH, Kook-Jin); 06595 서울시 서초구 법원로3길 24 두연빌딩 302호, Seoul (KR).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: ANALYSIS METHOD FOR PREDICTION OF RESPONSE TO PREOPERATIVE CHEMORADIOTHERAPY IN RECTAL CANCER PATIENT

(54) 발명의 명칭: 직장암 환자에서 수술-전 화학방사선치료의 반응을 예측하기 위한 분석방법



(57) Abstract: The present invention provides an analysis method for providing information necessary for diagnosis of a patient who exhibits a response to preoperative chemoradiotherapy among rectal cancer patients. It is revealed in the present invention that when nine genes, that is, FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, and SPRY2 genes in tumor tissues of rectal cancer patients are analyzed for expression levels in combination, a response (sensitivity) to preoperative chemoradiotherapy can be predicted with high accuracy. Therefore, a combination of the genes can be advantageously used as a biomarker capable of selecting a rectal cancer patient who exhibits a response to preoperative chemoradiotherapy.

(57) 요약서: 본 발명은 직장암 환자에서 수술-전 화학방사선치료에 대한 반응을 나타내는 환자의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 분석방법을 제공한다. 직장암 환자의 종양조직에서 9개의 유전자 즉, FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2 유전자의 발현량을 조합하여 분석할 경우 높은 정확도로 수술-전 화학방사선치료에 대한 반응(감수성)을 예측할 수 있다는 것이 본 발명에 의해 밝혀졌다. 따라서, 상기 유전자들의 조합은 수술-전 화학방사선치료에 대한 반응을 나타내는 직장암 환자를 선별할 수 있는 바이오마커로서 유용하게 사용될 수 있다.

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 직장암 환자에서 수술-전 화학방사선치료의 반응을 예측하기 위한 분석방법

기술분야

- [1] 본 발명은 직장암 환자에서 수술-전 화학방사선치료의 반응을 예측하기 위한 분석방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 직장암 환자에서 수술-전 화학방사선치료에 대한 반응을 나타내는 환자의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 분석방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 국소진행성 직장암(locally advanced rectal cancer, LARC)은, 직장간막근막(mesorectal fascia)을 포함한 절제할 수 없는 부위(unresectable margins) 및 임상적으로 의심되는 림프절(측방 골반 림프절)을 갖는, 침습성 직장암으로 기술된다(de Wilt JH, et al., Management of locally advanced primary and recurrent rectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg* 2007;20:255-63; Glynne-Jones R, et al., Locally advanced rectal cancer: what is the evidence for induction chemoradiation? *Oncologist* 2007;12:1309-18). 수술-전 화학방사선치료(preoperative chemoradiotherapy, PCRT) 및 이후의 수술적 절제(surgical resection)가 LARC에 대한 표준 다학제적 치료(standard multimodal treatment)이다(Kapiteijn E, et al., Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001;345:638-46; Rodel C., et al., Radiotherapy: Preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:129-30). PCRT는 국소 재발의 위험을 줄이고, 괄약근 보존의 가능성을 증가시킨다. PCRT에 대하여 좋은 반응을 보이는 환자는 바람직한 종양학적 결과를 나타낸다(Fokas E, et al., Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol* 2014;32:1554-62; Park JJ, et al., Neoadjuvant treatment response as an early response indicator for patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:1770-6).
- [3] PCRT에 대하여 완전하거나 혹은 거의 완전한 반응을 나타내는 환자에 있어서, 이러한 치료법은 종양의 직장-보존적인(rectal-sparing) 수술적 치료를 가능하게 한다. PCRT 및 이에 따른 수술적 절제가 LARC에 대한 표준적인 치료법이지만, 약 2/3의 환자는 PCRT에 대하여 부분적인 반응 혹은 비-반응을 보이며; 이러한 환자에서 PCRT는 임상적 결과를 개선하지 못한다(Lee YC et al., Prognostic significance of partial tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer: a meta-analysis. *Dis Colon Rectum* 2013;56:1093-101). 더욱이, PCRT는 비-반응자(non-responders)에서 두가지의 부작용과 관련된다: 1) 방사선 치료는

환자의 삶의 질에 영향을 주는 장기간의 합병증(long-term complications)과 관련되며, 2) PCRT로 인하여 수술적 절제가 지연됨으로써 종양이 국소적 및 원위적으로 전이될 수 있다(Conde-Muino R, et al. Predictive Biomarkers to Chemoradiation in Locally Advanced Rectal Cancer. *Biomed Res Int* 2015;2015:921435; Millino C, et al. Gene and MicroRNA Expression Are Predictive of Tumor Response in Rectal Adenocarcinoma Patients Treated With Preoperative Chemoradiotherapy. *J Cell Physiol* 2017;232:426-435). 따라서, PCRT로부터 이익을 얻을 수 있는 반응자(responders)의 선택을 가능하게 하는 바이오마커, 즉 LARC 환자에서 PCRT에 대한 반응을 예측하기 위한 바이오마커를 개발하기 위한 다양한 노력이 진행되고 있다.

- [4] 몇몇의 연구가 PCRT에 대한 반응 및 결과를 정확히 예측하기 위한 유전적 바이오마커의 잠재성을 입증한 바 있다(Watanabe T, et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res* 2006;66:3370-4; Agostini M, et al. An integrative approach for the identification of prognostic and predictive biomarkers in rectal cancer. *Oncotarget* 2015;6:32561-74; Gim J, et al. Predicting multi-class responses to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *Radiat Oncol* 2016;11:50). Ghadimi 등은 반응자 및 비-반응자에서 54개의 상이하게 발현되는 유전자를 보고한 바 있으며, 발현 프로파일링은 LARC 환자의 83%에서 종양 거동을 예측할 수 있다($p=0.02$)(Ghadimi BM, et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23:1826-38). Gantt 등은 33개의 직장암 생검 샘플(biopsy samples)로부터, 반응자로부터 비-반응자를 분류하는, 2개의 유전자 발현 프로파일을 밝힌 바 있다(Gantt GA, et al. Gene expression profile is associated with chemoradiation resistance in rectal cancer. *Colorectal Dis* 2014;16:57-66). 최근, Guo 등은 LARC 환자에서 27개 유전자를 동정함으로써, REO(relative expression orderings) 패턴에 근거하여 PCRT에 대한 반응을 예측한 바 있다(Guo Y, et al. A qualitative signature for predicting pathological response to neoadjuvant chemoradiation in locally advanced rectal cancers. *Radiother Oncol* 2018;129:149-153). 또한, Chauvin 등은 LARC 환자에서 PCRT에 대한 반응을 예측하기 위한 프로테오믹 프로파일링(proteomic profiling)의 잠재성을 보고한 바 있다(Chauvin A, et al. The response to neoadjuvant chemoradiotherapy with 5-fluorouracil in locally advanced rectal cancer patients: a predictive proteomic signature. *Clin. Proteomics* 2018;15:16; Repetto O, et al. Identification of protein clusters predictive of tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemo-radiotherapy. *Oncotarget* 2017;8:28328-28341). 그러나, LARC와 관련된 유전자 발현 프로파일의 동정에도 불구하고, 현재까지 임상적 사용을 위한 바이오마커는 아직 동정되지 못하였다.

- [5] PCRT 바이오마커의 개발을 제한하는 요소 중 하나는 PCRT 및 수술적 절제 전에 얻어지는 포르말린-고정된 파라핀-포매된(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 생검 샘플의 사용이다. 종양세포충실도(tumor cellularity), 괴사(necrosis)와 같은 요인 때문에 냉동 샘플(Fresh-frozen samples)은 사용될 수 없으며, 면역 침윤(immune infiltrates)은 하위 발현 분석(downstream expression analyses)을 제한한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 PCRT에 대한 반응을 예측할 수 있는, 임상적으로 적용가능한 바이오마커("유전자 시그니처(gene signature)"로도 지칭됨)를 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행하였다. 특히, 본 발명자들은 FFPE 조직 샘플을 사용하여 RNA를 추출하였으며 FDA-승인된 하드웨어 및 키트를 사용하여 유전자 발현 분석을 수행하였다. 그 결과, 직장암 환자의 종양조직에서 특정 유전자들, 즉 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2 유전자의 발현량을 조합하여 분석할 경우 높은 정확도로 수술-전 화학방사선치료에 대한 반응("감수성(susceptibility)"로도 지칭됨)을 예측할 수 있다는 것을 발견하였다.
- [7] 따라서, 본 발명은 바이오마커로서 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2 유전자를 사용하는 것을 포함하는, 직장암 환자에서 수술-전 화학방사선치료의 반응을 예측하기 위한 분석방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

기술적 해결방법

- [8] 본 발명의 일 태양에 따라, 직장암 환자에서 수술-전 화학방사선치료에 대한 반응을 나타내는 환자의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 직장암 환자로부터 채외로 분리된 종양조직 샘플 중에서 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2 유전자의 발현량을 각각 측정하는 단계를 포함하는 분석방법이 제공된다.
- [9] 본 발명의 분석방법에 있어서, 상기 직장암 환자는 바람직하게는 국소진행성 직장암 환자이다.
- [10] 또한, 본 발명의 분석방법에 있어서, 상기 직장암 환자로부터 채외로 분리된 종양조직 샘플은 포르말린-고정된 파라핀-포매된 종양조직-유래의 생검 샘플일 수 있다.

발명의 효과

- [11] 직장암 환자의 종양조직에서 특정 유전자들, 즉 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2 유전자의 발현량을 조합하여 분석할 경우 높은 정확도로 수술-전 화학방사선치료에 대한 반응(감수성)을 예측할 수 있다는 것이 본 발명에 의해 밝혀졌다. 따라서, 상기 유전자들의 조합은 수술-전 화학방사선치료에 대한 반응을 나타내는 직장암 환자를 선별할

수 있는 바이오마커로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 유전자 시그니처 개발의 플로우차트를 나타낸다.
- [13] 도 2는 메타-데이터 분석(Meta-data analysis)의 플로우차트를 나타낸다.
- [14] 도 3은 PCRT 반응자 유전자 시그니처 관련 경로: PI3K-Akt 신호전달경로에 근거한 메타데이터 분석결과를 나타낸다.
- [15] 도 4는 메타데이터 분석에 기초한 PCRT 반응자에 대한 PI3K-Akt 신호전달경로의 3차원 게놈 발현 지도를 나타낸다.
- [16] 도 5는 nCounter(Nanostring Technologies, Seattle, WA)에 제공되는 nSolver Analysis Software v 3.0(Nanostring Technologies)에서 Background subtraction 체크를 해제한 것을 나타내는 일 예이다.
- [17] 도 6은 표준화 파라미터 설정을 나타내는 일 예이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [18] PCRT 및 이에 따른 수술적 절제가 LARC에 대한 표준적인 치료법이다. 그러나, 약 2/3의 환자는 PCRT에 대하여 부분적인 반응 혹은 비-반응을 보이며, 바람직한 임상적 결과 없이 PCRT-관련 부작용을 야기하게 된다. 본 발명자들은 PCRT 후에 수술적 절제를 받은 156명의 LARC 환자(트레이닝 코호트 n=60; 검증 코호트 n=96)를 대상으로 PCRT에 대한 종양의 병리학적 반응을 평가하고, 반응자(완전 혹은 거의-완전한 회복을 갖는 환자; n=72) 및 비-반응자(다른 모든 환자; n=84)로 분류하였다. FFPE 샘플로부터 얻은 RNA에 대한 유전자 발현 분석을 nCounter(Nanostring Technologies, Seattle, WA)을 사용하여 수행하였다. 단변량 및 다변량 로지스틱 회귀분석을 사용하여, 반응자 및 비-반응자간에 상이한 발현을 나타내는 9개의 유전자(FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2 유전자)를 동정하였다. 60개의 LARC 샘플의 트레이닝 코호트에서 9개의 유전자 시그니처의 발현이 반응자(n=27) 및 비-반응자(n=33)에서 명확히 상이하였다[정확도(accuracy) = 86.9%, 특이도(pecificity) = 84.8%, 민감도(sensitivity) = 81.5%]. 상기 결과는 96명의 LARC 환자의 독립적인 코호트에서 검증되었으며, 비-반응자로부터 PCRT 반응자를 성공적으로 분리하였다(정확도 = 81.0%, 특이도 = 79.4%, 민감도 = 82.3%). 상기 시그니처는 모든 병리학적 및 임상적 특징에 대하여 독립적이었다. 따라서, 상기 9개의 유전자 시그니처는 LARC 환자에서 PCRT에 대한 반응을 예측할 수 있는 바이오마커로서 사용될 수 있으며, 상기 유전자 시그니처는 FFPE 샘플 및 FDA-승인된 하드웨어 및 시약을 사용하여 임상적 세팅에 쉽게 적용될 수 있다. PCRT에 대한 반응자 및 비-반응자에 있어서의 맞춤형 치료 접근은 LARC 환자의 암 치료 효율을 개선할 수 있다.
- [19] 따라서, 본 발명은 직장암 환자에서 수술-전 화학방사선치료에 대한 반응을 나타내는 환자의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 직장암 환자로부터

체외로 분리된 종양조직 샘플 중에서 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2 유전자의 발현량을 각각 측정하는 단계를 포함하는 분석방법을 제공한다.

- [20] 본 발명의 분석방법에 있어서, 상기 직장암 환자는 바람직하게는 국소진행성 직장암 환자일 수 있다. 또한, 본 발명의 분석방법에 있어서, 상기 직장암 환자로부터 체외로 분리된 종양조직 샘플은 포르말린-고정된 파라핀-포매된 종양조직-유래의 생검 샘플일 수 있다.
- [21] 본 발명의 분석방법에서 바이오마커로 사용되는 상기 9개의 유전자 즉, FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2 유전자는 공지의 유전자로서, 그 서열은 진뱅크(GenBank) 등에 공지되어 있다. 예를 들어, FGFR3(Fibroblast Growth Factor Receptor 3) 단백질의 NCBI 역세션 번호(NCBI accession number)는 NP_000133, NP_001156685, NP_075254, NP_001341738, NP_001341739 등이며, 이를 코딩하는 유전자 mRNA의 NCBI 역세션 번호는 NM_000142, NM_001163213, NM_022965, NM_001354809, NM_001354810 등이다. GNA11(Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11) 단백질의 NCBI 역세션 번호는 NP_002058 이며, 이를 코딩하는 유전자 mRNA의 NCBI 역세션 번호는 NM_002067 이다. H3F3A(Histone H3.3) 단백질의 NCBI 역세션 번호는 NP_005315 이며, 이를 코딩하는 유전자 mRNA의 NCBI 역세션 번호는 NM_002107 이다. IL12A(Interleukin-12 subunit alpha) 단백질의 NCBI 역세션 번호는 NP_000873, NP_001341511, NP_001341512 등이며, 이를 코딩하는 유전자 mRNA의 NCBI 역세션 번호는 NM_000882, NM_001354582, NM_001354583 등이다. IL1R1(Interleukin 1 receptor, type I) 단백질의 NCBI 역세션 번호는 NP_000868, NP_001275635, NP_001307907, NP_001307909, NP_001307910 등이며, 이를 코딩하는 유전자 mRNA의 NCBI 역세션 번호는 NM_000877, NM_001288706, NM_001320978, NM_001320980, NM_001320981 등이다. IL2RB(Interleukin-2 receptor subunit beta) 단백질의 NCBI 역세션 번호는 NP_000869, NP_001333151, NP_001333152 등이며, 이를 코딩하는 유전자 mRNA의 NCBI 역세션 번호는 NM_000878, NM_001346222, NM_001346223 등이다. NKD1(Naked cuticle 1) 단백질의 NCBI 역세션 번호는 NP_149110.1 이며, 이를 코딩하는 유전자 mRNA의 NCBI 역세션 번호는 NM_033119.5 이다. SGK2(Serine/threonine-protein kinase Sgk2) 단백질의 NCBI 역세션 번호는 NP_001186193, NP_057360, NP_733794 등이며, 이를 코딩하는 유전자 mRNA의 NCBI 역세션 번호는 NM_170693, NM_001199264, NM_016276 등이다. SPRY2(Sprouty homolog 2) 단백질의 NCBI 역세션 번호는 NP_001305465, NP_001305466, NP_001305467, NP_005833 등이며, 이를 코딩하는 유전자 mRNA의 NCBI 역세션 번호는 NM_005842, NM_001318536, NM_001318537, NM_001318538 등이다.
- [22] 본 발명에 따른 분석방법의 일 구현예에서, 직장암 환자로부터 체외로 분리된

종양조직 샘플 중 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2 유전자의 발현량을 측정하고; 하기 식에 따라 측정된 TBPS(Treatment Benefit Prediction Score) 값이 -7.269813 보다 클 경우에는 PCRT에 대한 반응을 나타내는 환자(즉, PCRT에 대하여 감수성을 나타내는 환자)로 분류할 수 있으며, -7.269813 이하일 경우에는 PCRT에 대한 반응을 나타내지 않는 환자(즉, PCRT에 대하여 감수성을 나타내지 않는 환자)로 분류할 수 있다.

$$[23] \quad TBPS = (-0.006697) * G_{FGFR3} + (-0.001805) * G_{GNA11} + (-0.000373) * G_{H3F3A} + (0.063996) * G_{IL12A} + (0.015269) * G_{IL1R1} + (0.017445) * G_{IL2RB} + (-0.003099) * G_{NKD1} + (-0.004739) * G_{SGK2} + (-0.002763) * G_{SPRY2}$$

[24] 상기 식에서 G_{FGFR3} , G_{GNA11} , G_{H3F3A} , G_{IL12A} , G_{IL1R1} , G_{IL2RB} , G_{NKD1} , G_{SGK2} , 및 G_{SPRY2} 는 각각 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2의 유전자 발현량을 나타낸다. 즉, 상기 각각의 유전자 발현량은 유전자 발현량 측정 기기인 nCounter(Nanostring Technologies, Seattle, WA)를 사용하여 얻어진 표준화된 발현량(normalized expression level)을 나타낸다. 상기 표준화(normalization)는 nCounter(Nanostring Technologies, Seattle, WA)에 제공되는 nSolver Analysis Software v 3.0(Nanostring Technologies)을 사용하여 제조사 권장사항에 따라 수행된다.

[25] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[26] 1. 시험방법

[27] (1) RNA 추출

[28] RNeasy FFPE 키트(Qiagen, Hilden, Germany), 탈파라핀화 용액(Deeparaffinization Solution)(Qiagen, Hilden, Germany) 및 DNase I treatment(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여, FFPE 조직(n=156)으로부터 총 RNA를 추출하였다. 시험 참여 전에 환자로 부터 서면 동의를 받았으며, 연구 프로토콜(2017-0333)은 서울아산병원(Asan Medical Center)의 임상시험심사위원회(institutional review board)의 승인을 받았다.

[29] (2) 환자 및 반응 평가

[30] 무작위로 선택된 직장암 환자(n=156)를 트레이닝 코호트(training cohort)(n=60) 및 검증 코호트(validation cohort)(n=96)로 나누었다. 모든 환자는 2014년 1월부터 2017년 12월 사이에 서울아산병원에서 PCRT 후 수절적 절제를 받았다. 수술 치료를 받지 않거나, 수술전 생검(pretreatment biopsy specimen)이 가능하지 않거나, 또는 수술후 병리학적 반응을 평가할 수 없는 환자는 본 연구에 포함시키지 않았다.

[31] PCRT는 25 또는 28 프랙션(fractions)으로 45-50.4 Gy의 선량으로 실시하였다. 화학요법(Chemotherapy)은 2 사이클로 시행하였으며, 방사선 치료의 첫째 주 및 다섯번째 주 중에 3일에 걸쳐 5-플루오로유라실(5-fluorouracil)(375 mg/m² daily)

및 류코보린(leucovorin)(20 mg/m² daily)을 정맥 주사(intravenous bolus injection)하였고, 방사선 치료 동안 카페시타빈(capecitabine)(1,650 mg/m² daily)을 매일 2회 경구투여하였다. 수술적 절제는 PCRT 종료후 6-8주에 실시하였다. 수술적 절제는 국소 절제(local excision) 및 방사선 절제(radical resection)를 포함하였으며, 이는 전직장간막절제술(total mesorectal excision, TME)의 원칙에 따라 실시하였다(Heald RJ, et al., The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982;69:613-6).

- [32] 종양 반응 정도(tumor regression grading, TRG)에 대한 5가지 분류(five-tier classification)를 사용하여, PCRT에 대한 원발성 종양의 병리학적 반응을 평가하였다(Mandard AM, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994;73:2680-6). 잔류 종양 및 섬유화에 따라 선택되는 TRG 카테고리는 다음과 같다: 1) 완전 회복[잔류 종양 세포가 없고 단지 섬유성 덩어리만 관찰됨(no residual tumor cells and only a fibrotic mass)], 2) 거의 완전 회복[섬유성 조직 중에 잔류 종양 세포가 현미경 하에서 관찰되기 어려움(difficult to microscopically find residual tumor cells in the fibrotic tissue)], 3) 중간 회복[잔류 종양과 함께, 명백한 방사선조사-관련 변화가 쉽게 관찰될 수 있음(easily identifiable dominant irradiation-related changes with residual tumor)], 4) 최소 회복[명백한 방사선 조사-관련 변화와 함께 명백한 종양 덩어리가 관찰됨(a dominant tumor mass with obvious irradiation-related changes), 및 5) 회복 없음[방사선 조사-관련 섬유화, 괴사 또는 혈관 변화가 없음(no evidence of irradiation-related fibrosis, necrosis, or vascular changes)]. 환자들은 2개의 큰 분류로 분류하였다: 반응자(완전 혹은 거의 완전한 회복을 보인 환자: n=72) 및 비-반응자(다른 모든 환자, n=84).

- [33] (3) 유전자 발현 분석

- [34] 유전자(총 770개 유전자: Endogenous 유전자 730개, Housekeeping 유전자 40개) 발현 분석은 nCounter(Nanostring Technologies, Seattle, WA)을 사용하여 수행하였다. 각각의 패널(panel)에서의 반응은 15 µl 앨리콧(aliquot)을 포함하였으며, 상기 앨리콧은 총 RNA 200 ng 및 리포터와 캡처 프로브를 포함하였다. 유전자 발현 데이터(raw data)의 표준화(normalization)는 nCounter(Nanostring Technologies, Seattle, WA)에 제공되는 nSolver Analysis Software v 3.0(Nanostring Technologies)을 사용하여 제조사 권장사항에 따라 수행하였다. 구체적으로, 실험된 검체중 분석할 검체들을 선택한 후 Background subtraction 체크를 해제하였다. 도 5는 nSolver Analysis Software v 3.0에서 Background subtraction 체크를 해제한 것을 나타내는 일 예이다. 표준화 파라미터(Normalization Parameters)에 있어서, Positive Control Normalization에서 POS_F를 체크 해제하고, Geometric mean을 선택하고, Range 는 0.3-3 으로 설정하였다. CodeSet Content (Reference or Housekeeping) 표준화는 Standard 로

설정하고, Codeset Content는 Endogenous 유전자들, Normalization Codes 는 Housekeeping 유전자들을 각각 선택하고, Geometric mean을 선택하였으며, Range 는 0.1-10 으로 설정하였다. 도 6은 표준화 파라미터 설정을 나타내는 일 예이다.

[35] (4) 통계분석

[36] 트레이닝 코호트 및 검증 코호트의 임상병리학적 변수는 카이제곱 검정(χ^2 -test) 및 피셔의 정확성 검정(Fisher's exact test)을 사용하여 평가하였으며, $p < 0.05$ 를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[37] (5) 통계적 조합 유전자 분석(Statistical Combination Gene Analysis)

[38] 본 연구에서의 모든 통계분석은 오픈 소스 통계 프로그램 환경 R 언어(open source statistical programming environment R language)(Version 3.4.3)을 사용하여 수행하였다. 트레이닝 코호트에서, 스튜던트 t-테스트를 통하여 상이하게 발현되는 유전자(DEGs)를 과발현 혹은 저발현된 것으로 분류하여($p < 0.05$ 및 |폴드-변화(fold-change)| > 1.5), PCRT 처리 반응자를 비-반응자와 비교하였다. DEGs를 추가로 단변량 로지스틱 회귀분석(univariate logistic regression)을 사용하여 선발(shortlist)하였다. 선발된 DEGs의 수를 조합하여 분석하였고, 유전자 조합(gene combinations)의 총 수는 다음 식을 사용하여 계산하였다:

$$[39] \sum_{k=1}^n \frac{n!}{K! (n-k)!}$$

[40] 상기 식에서, n은 선발된 DEGs 총 수이고, k는 조합하여 포함시킨 유전자의 수이다.

[41] 다변량 로지스틱 회귀분석(multivariate logistic regression analysis)을 수행하여 유전자 시그니처(gene signatures) 및 임상병리학적 특징의 관련성을 측정하였다($p < 0.05$, 표 5).

[42] 후보 유전자 시그니처($p < 0.05$, AUC > 0.08 , 민감도(sensitivity) $> 75\%$ 및 특이도(specificity) $> 75\%$)를 k-fold 교차 검증에 의해 계층화하여 최적의 유전자 조합(gene combination)을 동정하였다. 트레이닝 코호트는 2개의 폴드(트레이닝 세트 및 시험 세트)로 나누어 트레이닝 세트에서의 기준 값을 테스트 세트에 적용하여 결과를 확인하였으며, 트레이닝 세트와 시험 세트의 환자군은 무작위로 나누었고 이를 300회 반복하여 테스트하였다. 정확도는 시험 세트에 대하여 $p < 0.05$ 를 근거하여 계산하였다.

[43] (6) 메타분석(meta-analysis)

[44] 트레이닝 코호트(n=60)에 대한 메타분석을 수행하여 PCRT 반응자에서 활성화된 신호변환경로(signal transduction pathways)를 동정하였다. 메타분석은 CBS Probe PINGS™(Protein Interaction Network Generation System, 대한민국 특허등록 제10-0957386호)을 사용하여 수행하였다. 상기 프로그램은, 상호작용하는 유전자 및 유전자 조합(gene combination)의 유전자 상호작용 정보[상호작용 거리(interaction distance) 및 상호작용 빈도(interaction frequency)]

등]를 동정하기 위한 5개의 모듈을 사용한다: 단백질-단백질 상호작용(protein-protein interactions) 모듈(PPI module), Path-Finder 모듈(Path-Finder module), Path-Linker 모듈(Path-Linker module), Path-maker 모듈(Path-maker module) 및 Path-Lister 모듈(Path-Lister module). 동정된 유전자들을 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) 데이터베이스로부터 얻어진 신호변환경로로 맵핑(mapping)하였다(Kanehisa M, et al. The KEGG databases at GenomeNet. Nucleic Acids Res. 2002;30:42-6). 상호작용 및 상호작용하는 유전자의 수에 따라 가장 높은 10개의 신호변환경로를 선택하였다.

- [45] 신호변환경로와 관련되는 조합 유전자들(combination genes)의 수를 계산함으로써 PCRT 반응자에서 가장 유의한 변환경로를 동정하기 위하여, 트레이닝 코호트의 메타분석을 수행하였다.
- [46] 각각의 신호변환경로에 대하여, 시그니처 유전자와 상호작용하는 유전자들의 유전자 상호작용 빈도를 계산하였다. 각각의 신호변환경로 내에서 가장 높은 유전자 상호작용 수를 100%로 하여 이에 대비해서 상호작용 수가 75% 이상을 기준으로 하여 상호작용 유전자를 선정하였다(도 2). 높은 상호작용 빈도 유전자를 갖는 가장 높은 10개의 신호변환경로를 트레이닝 코호트의 환자로부터 동정하였으며, 유전자 시그니처를 관련된 신호변환경로에 매치시켰다.
- [47] **2. 시험결과**
- [48] (1) 임상병리학적 특징
- [49] 표 1은 본 연구 코호트의 임상병리학적 특징을 요약한 것이다. 트레이닝 코호트 및 검증 코호트 사이에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

[50] [표1]

트레이닝 코호트 및 검증 코호트의 임상병리학적 특징

		트레이닝 코호트 (n = 60)	검증 코호트 (n = 96)	p-값
성	남성	27 (45.0%)	53 (55.2%)	0.282
	여성	33 (55.0%)	43 (44.8%)	
분화도	고분화도	9 (15%)	18 (18.9%)	0.596
	중증도 분화도	51 (85.0%)	76 (79.1%)	
	저분화도	0 (0.0%)	2 (2.0%)	
임상적 T-단계	T1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.810
	T2	4 (6.7%)	9 (9.4%)	
	T3	53 (88.3%)	78 (81.3%)	
	T4	3 (5.0%)	4 (9.0%)	
임상적 N-단계	N0	2 (3.3%)	10 (10.4%)	0.225
	N1	24 (40.0%)	40 (41.7%)	
	N2	34 (56.7%)	46 (47.9%)	
임상적 M-단계	M0	58 (96.7%)	94 (97.9%)	0.639
	M1	2 (3.3%)	2 (2.1%)	
병리학적 T-단계	Tis	1 (1.7%)	2(2.0%)	0.908
	T0	9 (15.0%)	16 (16.7%)	
	T1	3 (5.0%)	4 (4.2%)	
	T2	17 (28.3%)	25 (26.0%)	
	T3	30 (50.0%)	46 (47.9%)	
	T4	0(0.0%)	3 (3.1%)	
병리학적 N-단계	N0	41 (68.3%)	66 (68.8%)	0.762
	N1	10 (16.7%)	22 (22.9%)	
	N2	5 (8.3%)	8 (8.3%)	
병리학적 M-단계	M0	59 (98.3%)	95 (99.0%)	1.000
	M1	1 (1.7%)	1 (1.0%)	

[51] 약어: 병리학적; T, 종양; N, 절(node); M, 전이

[52] (2) 반응자 및 비-반응자 간의 상이한 유전자 발현의 분석

[53] 트레이닝 코호트에서 반응자(n=27) 및 비-반응자(n=33) 간의 상이한 유전자 발현의 분석 결과, 47/730 유전자들이 통계적으로 유의하게 상이하게 발현되었다($p < 0.05$). 다변량 로지스틱 회귀분석을 통하여, 이들 47개 유전자들 중 42개 유전자들을 선별하였다($p < 0.05$). 반응자에서, 28개 유전자가 저발현(down-regulated)되었으며, 14개 유전자가 과발현(up-regulated)되었다(표 2).

[54] [표2]

트레이닝 코호트에서 반응자 및 비-반응자 간에 상이하게 발현되는 유전자

Sr. No.	유전자	p-값	Fold-변화
1	ID1	2.17E-02	-2.78
2	WNT11	1.99E-02	-2.32
3	NKD1	1.90E-03	-2.27
4	SFN	2.45E-03	-2.24
5	LAMA5	8.51E-03	-1.96
6	CACNA1D	5.06E-04	-1.96
7	IKBKB	9.91E-03	-1.88
8	PLA2G4F	5.89E-03	-1.83
9	CDK6	3.63E-03	-1.79
10	CIC	1.21E-02	-1.76
11	SMARCB1	5.80E-04	-1.75
12	SRSF2	3.07E-03	-1.73
13	IKBKG	1.51E-02	-1.68
14	BAP1	9.01E-03	-1.68
15	SPRY2	1.52E-03	-1.65
16	AXIN2	5.01E-03	-1.65
17	GNA11	6.73E-03	-1.64
18	FGFR4	1.69E-03	-1.64
19	FGFR3	1.05E-03	-1.62
20	HDAC10	1.08E-03	-1.62
21	SGK2	5.64E-03	-1.6
22	H3F3A	2.42E-03	-1.58
23	EPHA2	1.74E-02	-1.57
24	U2AF1	4.56E-03	-1.56
25	ITGB4	3.14E-03	-1.56
26	TRAF7	6.07E-03	-1.54
27	CBL	5.56E-03	-1.53
28	MAP2K2	1.99E-03	-1.51

29	BMP2	3.06E-02	1.5
30	CDC14B	5.16E-03	1.51
31	CACNA2D1	1.13E-02	1.52
32	ETV7	1.37E-02	1.55
33	STAT1	1.89E-02	1.56
34	ITGB3	2.98E-02	1.57
35	FAS	2.59E-02	1.58
36	IL1R1	2.31E-02	1.61
37	RASGRP1	3.42E-02	1.69
38	IRS1	1.17E-02	1.7
39	BMP8A	1.77E-02	1.75
40	IL12A	3.73E-02	1.99
41	CD40	1.51E-03	2.18
42	IL2RB	1.27E-02	2.33

- [55] 폴드-변화(Fold change)는 반응자의 평균 발현 수준을 비-반응자의 평균 발현 수준으로 나누어 계산하였다.
- [56] (3) 유전자 시그니처의 선별 및 로지스틱 회귀 분석
- [57] 42개의 상이하게 발현되는 유전자의 k-폴드 교차검증에 의해, 9개의 유전자 시그니처가 최적의 유전자 조합(gene combination)임을 확인하였다. 상기 9개의 유전자는 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2이다. 모든 후보 유전자 시그니처들의 2-폴드 교차검증 결과, 상기 9개의 유전자 시그니처는 반응자 및 비-반응자를 구분하는데 있어서 일관된 정확도(86.9%)를 나타내었다(트레이닝 코호트에서 민감도(sensitivity) = 81.5% 및 특이도(pecificity) = 84.8%)(표 3).

[58] [표3]

유전자 시그니처 후보

Sr. No.	유전자 시그니처	로지스틱 회귀 p-값	교차검증 정확도 (%)	AUC*	민감도 (%)	특이도 (%)
1	ETV7_H3F3A_HDAC10_ID1_IL1R1_SPRY2	7.60E-04	72	0.841	77.8	81.8
2	H3F3A_IL12A_IL1R1_NKD1_PLA2G4F_SGK2	1.13E-04	79.7	0.868	77.8	87.9
3	H3F3A_HDAC10_ID1_IL1R1_NKD1_SPRY2_STAT1	1.81E-04	75.7	0.878	77.8	93.9
4	H3F3A_HDAC10_IL1R1_PLA2G4F_SGK2_TRAF7_WNT11	7.47E-04	57	0.822	81.5	75.8
5	H3F3A_IL12A_IL1R1_NKD1_PLA2G4F_RASGRP1_SGK2	1.99E-04	77.3	0.871	81.5	90.9
6	FGFR3_H3F3A_HDAC10_ID1_IL1R1_IL2RB_TRAF7_WNT11	4.65E-04	81	0.851	77.8	84.8
7	FGFR3_GNA11_H3F3A_IL12A_IL1R1_IL2RB_NKD1_SGK2_SPRY2	2.56E-04	83.3	0.869	81.5	84.8
8	FGFR3_H3F3A_IL12A_IL1R1_IL2RB_NKD1_SGK2_SPRY2_TRAF7	3.56E-04	73.7	0.870	77.8	84.8

[59] * AUC: 곡선하 면적(area under the curve)

[60] 선별된 유전자 시그니처와 임상병리학적 특징과의 관련성을 검토하였다. 단변량 분석 결과, 성 및 선별된 유전자 시그니처는 PCRT 반응과 유의하게 양성으로(significantly and positively) 관련되었다. 병리학적 T-단계는 PCRT 반응과 유의하게 음성으로(significantly and negatively) 관련되었다(표 4). 다변량 분석을 수행하여 유전자 시그니처, 성, 및 병리학적 T-단계 사이의 관련성을 평가하였다. 그 결과, 유전자 시그니처, 성, 및 병리학적 T-단계는 PCRT 반응의

독립적인 예측인자(predictors)인 것으로 확인되었다(표 5).

[61] [표4]

PCRT 반응자에서 선별된 유전자 시그니처의 예측값의 단변량 로지스틱 회귀분석($p < 0.05$)

변수 ¹	N ²	Coef ³	SE ⁴ (Coef)	Z-스코어	p-값
후보 유전자					
FGFR3_GNA11_H3F3A_IL12A_IL1R1_IL2RB_NKD1_SGK2_SPR Y2 (low vs. high)	60	3.204371	0.693663	4.619491	3.85E-06
임상병리학적 특징					
GENDER (Male vs. Female)	60	1.170379	0.549265	2.130811	3.31E-02
GRADED_DESCRIPTION (Moderate vs. Well)	59	-0.787079	0.783116	-1.00506	3.15E-01
CLIN_T_TNM (T2 vs. T3-T4)	60	-1.386294	1.185853	-1.16903	2.42E-01
CLIN_N_TNM (N0-N1 vs. N2)	60	-0.633724	0.528492	-1.19912	2.30E-01
CLIN_M_TNM (M0 vs. M1)	60	16.8437	1696.73436	0.009927	9.92E-01
PATH_T_TNM (Tis-T0-T1-T2 vs. T3)	60	-2.233592	0.605857	-3.68666	2.27E-04
PATH_N_TNM (N0-N1 vs. N2)	56	-0.04879	0.956183	-0.05103	9.59E-01
PATH_M_TNM (M0 vs. M1)	60	-15.39617	1455.39756	-0.01058	9.92E-01

[62] ¹약어: CLIN; 임상적, PATH; 병리학적, T; 종양, N; 절(node), M; 전이

[63] ²Coef; 계수(Coefficient)

[64] ³SE; 표준 편차(Standard error)

[65] ⁴N; 샘플의 수

[66] [표5]

유전자 시그니처, 성, 및 병리학적 종양 단계 간의 관련성에 대한 다변량 분석

변수 ¹	Odds Ratio	95% CI ²	p-값
FGFR3_GNA11_H3F3A_IL12A_IL1R1_IL2RB_NKD1_SGK2_SPRY2 (low vs. high)	25.6	4.71 - 139.23	0.0002
GENDER (Male vs. Female)	2.26	0.48 - 10.72	0.3048
PATH_T_TNM (Tis-T0-T1-T2 vs. T3)	0.08	0.02 - 0.46	0.0042

[67] ¹약어: CLIN; 임상적, PATH; 병리학적, T; 종양, N; 절(node), M; 전이[68] ²CI; 신뢰구간(Confidence interval)

[69] (4) 선별된 유전자 시그니처 검증

[70] 선별된 유전자 시그니처는, 검증 코호트(n=96)에서, 비-반응자로부터 PCRT 반응자를 81.0%의 정확도로 구분하였다. (표 6)

[71] [표6]

환자 중 PCRT 반응을 예측하는 9개 유전자 시그니처의 임상적 실행 평가

유전자 시그니처		FGFR3_GNA11_H3F3A_IL12A_IL1R1_IL2RB_NKD1_SGK2_SPRY2
로지스틱 회귀분석 p-값		4.62 X 10 ⁻⁴
교차 검증 정확도 (%)		83.3
유전자 수		9
트레이닝 세트	정확도 (%)	86.9
	민감도 (%)	81.5
	특이도 (%)	84.8
	반응 (%)	81.5
검증 세트	정확도(%)	81.0
	민감도 (%)	82.3
	특이도 (%)	79.4
	PPV ¹ (%)	87.9
	NPV ² (%)	71.1

[72] ¹PPV; 양성 예측치(Positive Predictive Value)[73] ²NPV; 음성 예측치(Negative Predictive Value)

[74] PCRT 반응의 9개 유전자 시그니처 예측자(predictive)는, 암-관련 경로, PI3K-Akt 신호변환경로를 포함한 KEGG 신호변환경로(도 3 및 도 4), 암에서의 프로테오글리칸, 인간 사이토메갈로바이러스 감염(Human cytomegalovirus

infection) 및 인간 파필로마바이러스 감염(Human papillomavirus infection)에 높게 관련되었다. 유전자 시그니처와 관련된 높은 상호작용 빈도 유전자는 GRB2, HSP90AA1 및 HSP90AB1을 포함하였다(표 7).

[75] [표7]

PCRT 반응자와 관련된 유전자 시그니처-관련 경로 및 높은 상호작용 빈도 유전자

	경로명/높은 상호작용 빈도 유전자
경로	Pathways in cancer PI3K-Akt signaling pathway Proteoglycans in cancer Human cytomegalovirus infection Human papillomavirus infection
높은 상호작용 빈도 유전자	GRB2 HSP90AA1 HSP90AB1

[76] (4) 로지스틱 회귀 분석을 통한 치료 효과 예측 점수(TBPS, Treatment Benefit Prediction Score)의 계산

[77] 상기와 같은 방법으로 선별된 9개의 유전자, 즉 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2의 조합에 대하여 단변량 로지스틱 회귀분석(univariate logistic regression)을 통하여 얻어진 각 유전자별 회귀 계수 값은 다음 표 8과 같다.

[78] [표8]

유전자	회귀 계수 값
FGFR3	-0.006697
GNA11	-0.001805
H3F3A	-0.000373
IL12A	0.063996
IL1R1	0.015269
IL2RB	0.017445
NKD1	-0.003099
SGK2	-0.004739
SPRY2	-0.002763

[79] nCounter(Nanostring Technologies, Seattle, WA)를 사용하여 얻어진 9개 유전자, 즉 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2

각각의 표준화된 발현량 및 각 유전자별 회귀 계수 값을 사용하여 다음 식에 따라, 치료 효과 예측 점수(TBPS, Treatment Benefit Prediction Score)를 계산하였다.

$$[80] \quad TBPS = C_{FGFR3} * G_{FGFR3} + C_{GNA11} * G_{GNA11} + C_{H3F3A} * G_{H3F3A} + C_{IL12A} * G_{IL12A} + C_{IL1R1} * G_{IL1R1} + C_{IL2RB} * G_{IL2RB} + C_{NKD1} * G_{NKD1} + C_{SGK2} * G_{SGK2} + C_{SPRY2} * G_{SPRY2}$$

[81] 상기 식에서 $C_{\text{유전자}}$ 는 해당 유전자의 회귀 계수 값을 나타내며, $G_{\text{유전자}}$ 는 nCounter(Nanostring Technologies, Seattle, WA)를 사용하여 얻어진 해당 유전자의 표준화된 발현량을 나타낸다. 따라서, 상기 표 8의 결과로부터, TBPS는 하기 식에 따라 또한 계산될 수 있다.

$$[82] \quad TBPS = (-0.006697) * G_{FGFR3} + (-0.001805) * G_{GNA11} + (-0.000373) * G_{H3F3A} + (0.063996) * G_{IL12A} + (0.015269) * G_{IL1R1} + (0.017445) * G_{IL2RB} + (-0.003099) * G_{NKD1} + (-0.004739) * G_{SGK2} + (-0.002763) * G_{SPRY2}$$

[83] 상기와 같이 계산된 TBPS 값은 -7.269813 로서, 이는 PCRT에 대한 반응을 예측할 수 있는 기준값(threshold)으로 사용될 수 있다. 즉, 직장암 환자에서 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2의 발현량을 각각 측정하고, 상기 식에 따라 얻어진 TBPS 값이 -7.269813 보다 클 경우에는 PCRT에 대한 반응을 나타내는 환자(즉, PCRT에 대하여 감수성을 나타내는 환자)로 판별될 수 있으며, -7.269813 이하일 경우에는 PCRT에 대한 반응을 나타내지 않는 환자(즉, PCRT에 대하여 감수성을 나타내지 않는 환자)로 판별될 수 있다.

[84] 3. 고찰

[85] 본 연구에서, LARC 환자에서 PCRT에 대한 반응을 예측할 수 있는 9개의 유전자 시그니처가 동정 및 검증되었다. 상기 9개 유전자 시그니처는 기존에 보고된 예측 시그니처에 대하여 3가지 중요한 장점을 갖는다: 1) 상기 유전자 시그니처는 기존에 보고된 시그니처에 비해 PCRT에 대한 반응을 더욱 높은 정확도로 예측할 수 있다; 2) 유전자 발현 분석은 FFPE 샘플 및 FDA-승인된 하드웨어 및 시약을 사용하여 수행될 수 있다; 및 3) 9개의 유전자 시그니처는 기존의 연구에서 사용된 것보다 더욱 큰 코호트에서 검증되었다. 따라서, 상기 방법은 임상적 세팅(clinical setting)에 쉽게 적용될 수 있다.

[86] 높은 정확도로 PCRT에 대한 반응을 예측할 수 있는 9개의 유전자 시그니처는 2가지 중요한 임상적 의미를 갖는다. 첫째, 9개의 유전자 시그니처를 사용하여 확인된 반응자를 PCRT로 처리할 수 있으며, 이는 직장-보존적인(rectal-sparing) 수술로 이어질 수 있다. 국소 절제 또는 수술의 연기는 때때로 근치적 절제(radical resection)와 관련된 수술 합병증을 회피하는데 사용될 수 있으며, 또한 삶의 질을 떨어뜨릴 수 있는 장루(stoma) 형성을 줄이는데 사용될 수 있다. 둘째, 낮은 반응자의 확인은 LARC 환자의 치료에 유리할 수 있으며, 이는 이러한 환자군에서 독성적이고 또한 비효율적인 방사선조사 치료에 대한 노출을 방지할 수 있기 때문이다. 또한, 비효율적인 PCRT로 인한 수술적 치료의 지연을

회피할 수 있다. LARC의 분자적인 특징에 근거한 이러한 맞춤형 접근은 LARC 환자의 전체적인 생존 및 삶의 질을 개선할 수 있다.

- [87] 상기 시그니처에 포함된 9개의 유전자는 암에서 이상조절(dysregulated)된다(Waaler J, et al. Novel synthetic antagonists of canonical Wnt signaling inhibit colorectal cancer cell growth. *Cancer Res.* 2011;71:197-205; Marshall KW, et al. A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 2010;126:1177-86; Chang YT, et al. Verification of gene expression profiles for colorectal cancer using 12 internet public microarray datasets. *World J. Gastroenterol.* 2014;20:17476-82; Stanilov NS, et al. Monocytes expression of IL-12 related and IL-10 genes in association with development of colorectal cancer. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39:10895-902; Fromme JE, et al. FGFR3 mRNA overexpression defines a subset of oligometastatic colorectal cancers with worse prognosis. *Oncotarget* 2018;9:32204-32218; Feng YH, et al. MicroRNA-21-mediated regulation of Sprouty2 protein expression enhances the cytotoxic effect of 5-fluorouracil and metformin in colon cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 2012;29:920-6; Ayoubi HA, Investigation of the human H3.3B (H3F3B) gene expression as a novel marker in patients with colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* 2017;8:64-69; Feng YH, et al. Deregulated expression of sprouty2 and microRNA-21 in human colon cancer: Correlation with the clinical stage of the disease. *Cancer Biol. Ther.* 2011;11:111-21). FGFR3는 직장암 환자에서 과발현되며, 세포 증식 및 이동을 촉진함으로써 암유전자(oncogene)로서 작용한다(Fromme JE, et al. FGFR3 mRNA overexpression defines a subset of oligometastatic colorectal cancers with worse prognosis. *Oncotarget* 2018;9:32204-32218). GNA11은 G 단백질 알파 서브유닛을 코딩하며, 다양한 암에서 발암(carcinogenesis)에 관여한다(Shoushtari AN, et al. GNAQ and GNA11 mutations in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 2014;24:525-34; Van Raamsdonk CD, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010;363:2191-9). SPRY2 과발현은 EMT를 촉진함으로써 직장암으로의 발전에 기여한다(Zhang Q, et al. Atypical role of sprouty in colorectal cancer: sprouty repression inhibits epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 2016;35:3151-62). SGK1는 이동 및 증식과 같은 몇몇의 생리학적 과정에 관여하며 직장암에서 과조절(upregulated)된다(Eide PW, et al. NEDD4 is overexpressed in colorectal cancer and promotes colonic cell growth independently of the PI3K/PTEN/AKT pathway. *Cell. Signal.* 2013;25:12-8). 따라서, 상기 9개 유전자 시그니처는 PCRT에 대한 반응을 예측할 수 있는 실용적인 도구일 뿐만 아니라 LARC의 생리에 대한 메카니즘적인 연결일 수 있다.

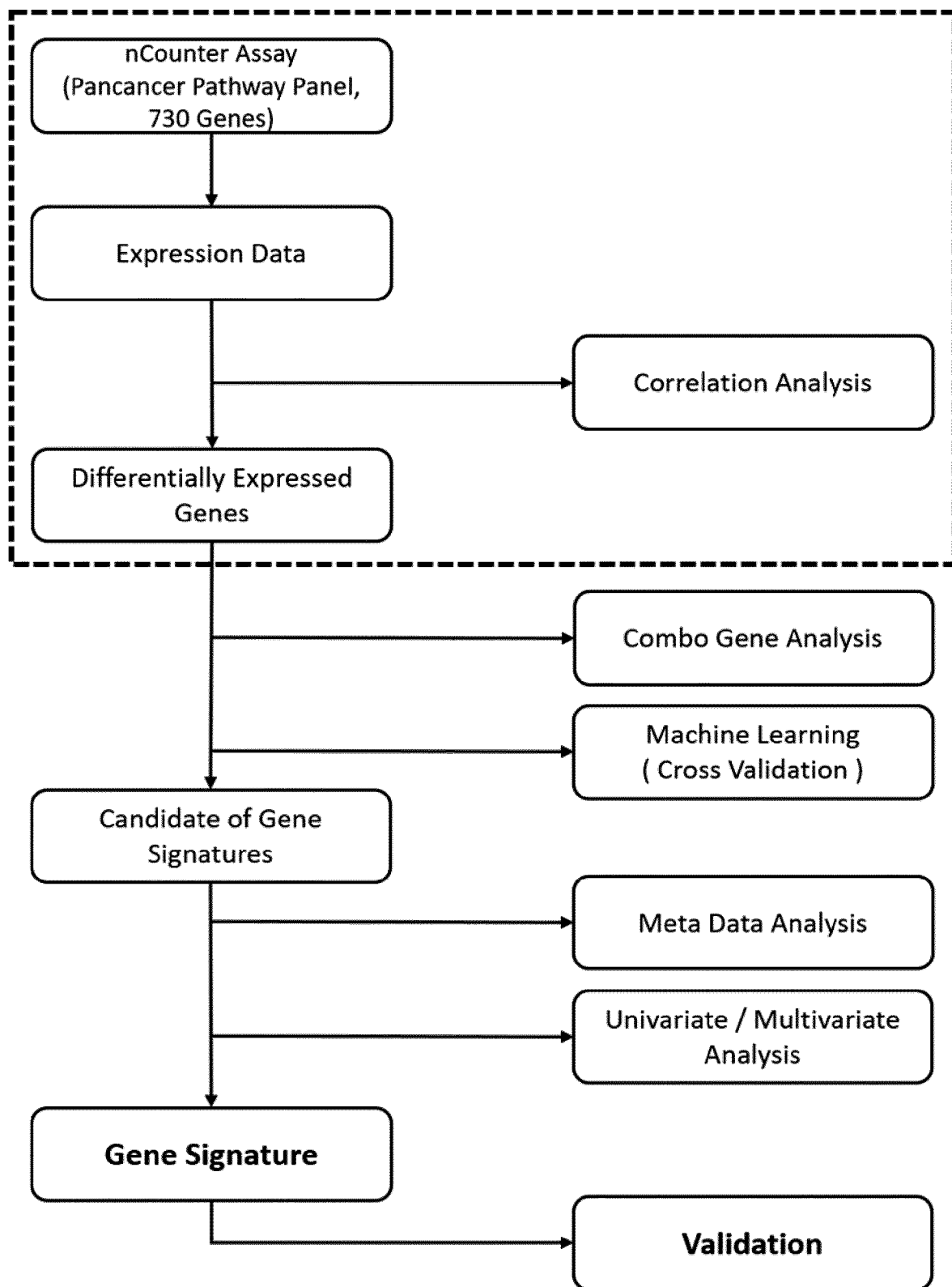
- [88] 요약하면, LARC 환자에서 PCRT에 대한 반응을 예측할 수 있는 9개 유전자 시그니처가 동정되었으며, 상기 유전자 시그니처는 FFPE 샘플 및 FDA-승인된 하드웨어 및 시약을 사용하여 임상적 세팅에 쉽게 적용될 수 있다. PCRT에 대한

반응자 및 비-반응자에 있어서의 맞춤형 치료 접근은 LARC 환자의 암 치료 효율을 개선할 수 있다.

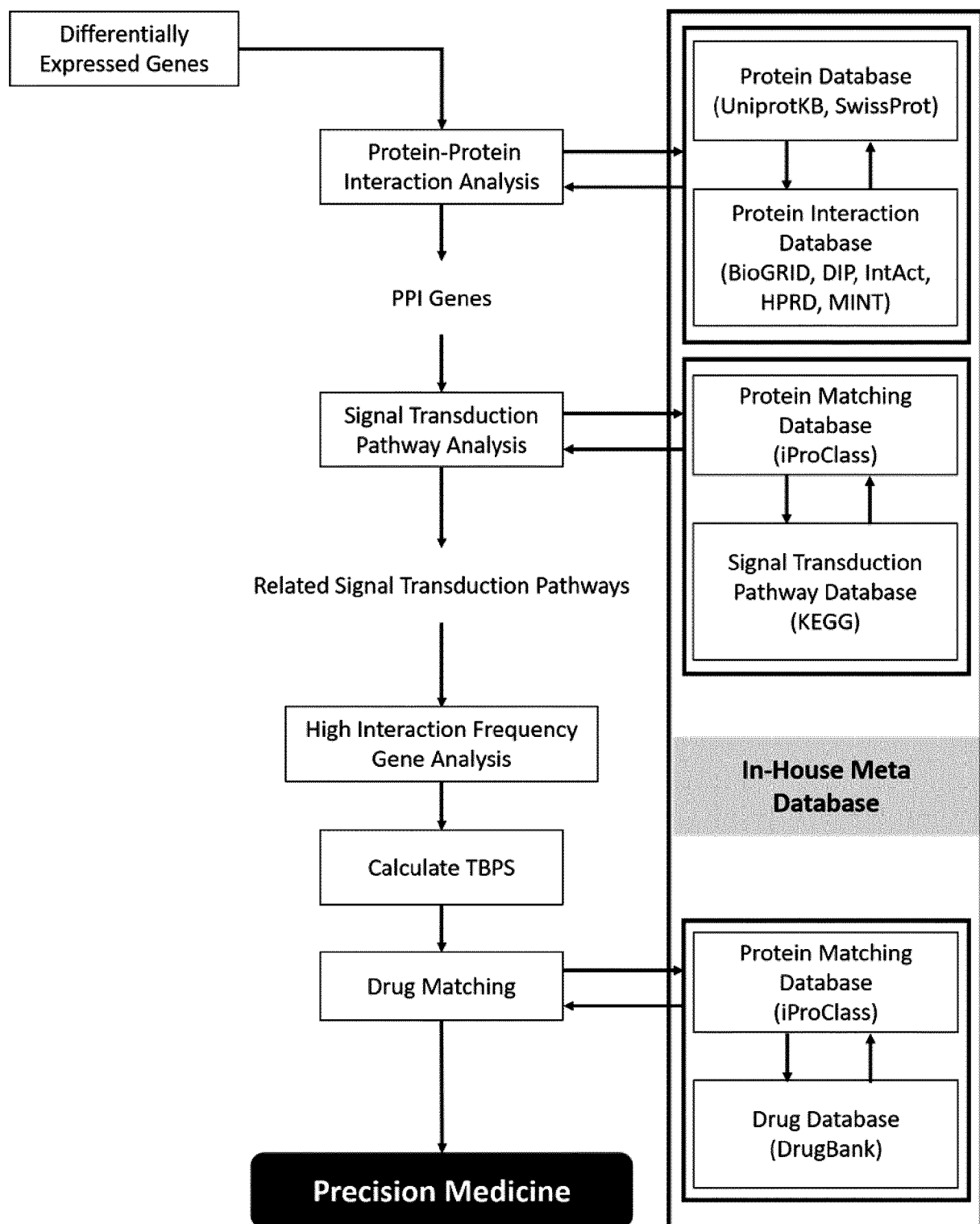
청구범위

- [청구항 1] 직장암 환자에서 수술-전 화학방사선치료에 대한 반응을 나타내는 환자의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 직장암 환자로부터 체외로 분리된 종양조직 샘플 중에서 FGFR3, GNA11, H3F3A, IL12A, IL1R1, IL2RB, NKD1, SGK2, 및 SPRY2 유전자의 발현량을 각각 측정하는 단계를 포함하는 분석방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 직장암 환자가 국소진행성 직장암 환자인 것을 특징으로 하는 분석방법.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 직장암 환자로부터 체외로 분리된 종양조직 샘플이 포르말린-고정된 파라핀-포매된 종양조직-유래의 생검 샘플인 것을 특징으로 하는 분석방법.

[도1]



[도2]



[도5]

Experiment Design Wizard

Select Background subtraction OR Background thresholding Parameters

"Background subtraction" will subtract estimated background from Raw count. Background can be estimated from blank lane, Negative control probe counts or can be a defined count value. Probe counts less than background will be floored to a value of 1.

"Background threshold" will substitute all raw count at or below estimated background to this threshold value.

Background threshold is estimated from Negative control probe counts or can be a defined count value.

Probe counts less than threshold will be floored to the threshold count value.

Background subtraction and thresholding will not apply for SNV probes

☒ Background Subtraction/ Thresholding

☐ Background Subtraction

☒ Background Thresholding

☐ Negative control count

Class	Name	Avg. Count	Selected
Negative	NEG_A	9,705	☒
Negative	NEG_B	7,407	☒
Negative	NEG_C	8,669	☒
Negative	NEG_D	8,958	☒
Negative	NEG_E	11,964	☒
Negative	NEG_F	18,619	☒
Negative	NEG_G	5.5	☒
Negative	NEG_H	8,812	☒

Threshold to

mean

+

0

standard deviations

☐ Threshold count value

Threshold count value: 20

< Back

Next

Finish

Cancel

[56]

Experiment Design Wizard

Normalization Parameters

Select Normalization type(s) and specify normalization parameters for your experiment.

1. Select positive control normalization parameters.
2. Select codeset content normalization parameters.

1. Positive Control Normalization

☒ 1. Positive Control Normalization

Class	Name	Avg. C...	Selected
Positive	POS_A	29820.628	☒
Positive	POS_B	9068.949	☒
Positive	POS_C	2264.625	☒
Positive	POS_D	562.321	☒
Positive	POS_E	101.232	☒
Positive	POS_F	49.088	☐

Use geometric mean to compute normalization factor

Flag lanes if normalization factor is outside of the range

2. CodeSet Content (Reference or Housekeeping) Normalization

☒ Standard ☐ Other

Save as default

Set normalization Genes as default for subsequent experiments.

Codeset Content

Prob...	Class Na...	Avg Count	%CV
ABL1	Endogenous	714,015	83,663
ACVR1B	Endogenous	385,637	114,581
ACVR1C	Endogenous	57,717	90,737
ACVR2A	Endogenous	245,884	83,211
AKT1	Endogenous	3,554,197	81,957
AKT2	Endogenous	2,122,902	81,813
AKT3	Endogenous	465,229	115,45
ALK	Endogenous	14,295	53,597
ALKBH2	Endogenous	203,955	131,811
ALKBH3	Endogenous	304,298	86,15
AMER1	Endogenous	210,307	101,546
AMH	Endogenous	22,542	168,484
ANGPT1	Endogenous	146,798	197,825
APC	Endogenous	198,012	68,777

Normalization Codes

Prob...	Class Na...	Avg Count	%CV
ACAD9	Housetee...	736,81	95,626
AGK	Housetee...	429,917	106,948
ANMECRIL	Housetee...	541,503	76,743
C10orf76	Housetee...	375,661	77,184
CCND1B	Housetee...	29,342	94,819
CNOT10	Housetee...	513,738	97,284
CNOT4	Housetee...	577,658	98,088
COG7	Housetee...	488,958	71,21
D0X50	Housetee...	587,476	85,504
DHX16	Housetee...	394,429	99,492
DNAJC14	Housetee...	234,711	90,471
EDC3	Housetee...	632,027	91,476
EIF2B4	Housetee...	934,753	106,914
ERCC3	Housetee...	272,869	70,931

Use geometric mean to compute normalization factor

Flag lanes if normalization factor is outside of the range

< Back Next Finish Cancel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/001605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6886(2018.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/6886(2018.01); C12Q 1/68(2006.01) 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: 직장암(rectal cancer), 반응(response), 화학방사선(radiotherapy), 바이오마커(biomarker), 발현(expression)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0079801 A (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION et al.) 08 July 2019 (2019-07-08) See claims 1-18.	1-3
A	CHO, E. et al. A Multigene Model for Predicting Tumor Responsiveness After Preoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 15 November 2019, vol. 105, no. 4, pp. 834-842. See abstract.	1-3
A	MILLINO, C. et al. Gene and MicroRNA Expression Are Predictive of Tumor Response in Rectal Adenocarcinoma Patients Treated With Preoperative Chemoradiotherapy. J. Cell. Physiol. 2017, vol. 232, pp. 426-435. See abstract.	1-3
A	KR 10-2018-0040420 A (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION et al.) 20 April 2018 (2018-04-20) See entire document.	1-3
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 14 May 2021		Date of mailing of the international search report 14 May 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/001605

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2009-0003178 A (GENOMIC HEALTH, INC. et al.) 09 January 2009 (2009-01-09) See entire document.	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/001605

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2019-0079801	A	08 July 2019	KR	10-2061950	B1	11 February 2020
KR	10-2018-0040420	A	20 April 2018	KR	10-1859652	B1	28 June 2018
KR	10-2009-0003178	A	09 January 2009	AU	2007-204826	A1	19 July 2007
				AU	2007-204826	B2	10 January 2013
				AU	2013-200984	A1	14 March 2013
				BR	PI0706511	A2	29 March 2011
				CA	2636984	A1	19 July 2007
				CN	101400804	A	01 April 2009
				CN	101400804	B	26 March 2014
				DK	1974058	T3	01 September 2014
				EP	1974058	A2	01 October 2008
				EP	1974058	B1	11 June 2014
				EP	2377950	A1	19 October 2011
				EP	2377950	B1	17 September 2014
				EP	2400036	A1	28 December 2011
				EP	2407553	A1	18 January 2012
				EP	2412820	A1	01 February 2012
				EP	2412821	A1	01 February 2012
				EP	2412821	B1	17 September 2014
				EP	2412822	A1	01 February 2012
				EP	2412823	A1	01 February 2012
				EP	2412823	B1	03 September 2014
				EP	2412824	A1	01 February 2012
				EP	2412824	B1	08 October 2014
				ES	2491222	T3	05 September 2014
				HK	1120089	A1	20 March 2009
				IL	192794	A	31 July 2013
				JP	2009-523028	A	18 June 2009
				JP	2013-074894	A	25 April 2013
				JP	2013-176398	A	09 September 2013
				JP	5297202	B2	25 September 2013
				JP	5486664	B2	07 May 2014
				MX	2008008973	A	26 November 2008
				NO	20083461	A	10 October 2008
				NZ	569788	A	26 August 2011
				NZ	593224	A	26 October 2012
				RU	2008132876	A	20 February 2010
				US	2009-0291434	A1	26 November 2009
				US	2010-0190173	A1	29 July 2010
				US	2011-0039269	A1	17 February 2011
				US	2011-0039270	A1	17 February 2011
				US	2011-0039271	A1	17 February 2011
				US	2011-0039272	A1	17 February 2011
				US	2011-0097759	A1	28 April 2011
				US	2011-0111421	A1	12 May 2011
				US	2012-0171688	A1	05 July 2012
				US	2013-0102492	A1	25 April 2013
				US	7695913	B2	13 April 2010
				US	8026060	B2	27 September 2011
				US	8029995	B2	04 October 2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/001605

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 8153378 B2	10 April 2012
		US 8153379 B2	10 April 2012
		US 8153380 B2	10 April 2012
		US 8198024 B2	12 June 2012
		US 8273537 B2	25 September 2012
		US 8367345 B2	05 February 2013
		WO 2007-082099 A2	19 July 2007
		WO 2007-082099 A3	17 January 2008
		ZA 200806316 B	25 November 2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6886(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6886(2018.01); C12Q 1/68(2006.01) 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: 직장암(rectal cancer), 반응(response), 화학방사선(radiotherapy), 바이오마커(biomarker), 발현(expression)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2019-0079801 A (울산대학교 산학협력단 등) 2019.07.08 청구항 1-18	1-3
A	CHO, E. 등, 'A Multigene Model for Predicting Tumor Responsiveness After Preoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer', Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2019.11.15., 105권, 4호, 페이지 834-842 초록	1-3
A	MILLINO, C. 등, 'Gene and MicroRNA Expression Are Predictive of Tumor Response in Rectal Adenocarcinoma Patients Treated With Preoperative Chemoradiotherapy', J. Cell. Physiol., 2017, 232권, 페이지 426-435 초록	1-3
A	KR 10-2018-0040420 A (울산대학교 산학협력단 등) 2018.04.20 전체 문헌	1-3
A	KR 10-2009-0003178 A (게노빅 헬쓰, 인코포레이티드 등) 2009.01.09 전체 문헌	1-3
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년05월14일(14.05.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년05월14일(14.05.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0079801 A	2019/07/08	KR 10-2061950 B1	2020/02/11
KR 10-2018-0040420 A	2018/04/20	KR 10-1859652 B1	2018/06/28
KR 10-2009-0003178 A	2009/01/09	AU 2007-204826 A1	2007/07/19
		AU 2007-204826 B2	2013/01/10
		AU 2013-200984 A1	2013/03/14
		BR PI0706511 A2	2011/03/29
		CA 2636984 A1	2007/07/19
		CN 101400804 A	2009/04/01
		CN 101400804 B	2014/03/26
		DK 1974058 T3	2014/09/01
		EP 1974058 A2	2008/10/01
		EP 1974058 B1	2014/06/11
		EP 2377950 A1	2011/10/19
		EP 2377950 B1	2014/09/17
		EP 2400036 A1	2011/12/28
		EP 2407553 A1	2012/01/18
		EP 2412820 A1	2012/02/01
		EP 2412821 A1	2012/02/01
		EP 2412821 B1	2014/09/17
		EP 2412822 A1	2012/02/01
		EP 2412823 A1	2012/02/01
		EP 2412823 B1	2014/09/03
		EP 2412824 A1	2012/02/01
		EP 2412824 B1	2014/10/08
		ES 2491222 T3	2014/09/05
		HK 1120089 A1	2009/03/20
		IL 192794 A	2013/07/31
		JP 2009-523028 A	2009/06/18
		JP 2013-074894 A	2013/04/25
		JP 2013-176398 A	2013/09/09
		JP 5297202 B2	2013/09/25
		JP 5486664 B2	2014/05/07
		MX 2008008973 A	2008/11/26
		NO 20083461 A	2008/10/10
		NZ 569788 A	2011/08/26
		NZ 593224 A	2012/10/26
		RU 2008132876 A	2010/02/20
		US 2009-0291434 A1	2009/11/26
		US 2010-0190173 A1	2010/07/29
		US 2011-0039269 A1	2011/02/17
		US 2011-0039270 A1	2011/02/17
		US 2011-0039271 A1	2011/02/17
		US 2011-0039272 A1	2011/02/17
		US 2011-0097759 A1	2011/04/28
		US 2011-0111421 A1	2011/05/12
		US 2012-0171688 A1	2012/07/05
		US 2013-0102492 A1	2013/04/25
		US 7695913 B2	2010/04/13
		US 8026060 B2	2011/09/27
		US 8029995 B2	2011/10/04

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 8153378 B2	2012/04/10
		US 8153379 B2	2012/04/10
		US 8153380 B2	2012/04/10
		US 8198024 B2	2012/06/12
		US 8273537 B2	2012/09/25
		US 8367345 B2	2013/02/05
		WO 2007-082099 A2	2007/07/19
		WO 2007-082099 A3	2008/01/17
		ZA 200806316 B	2009/11/25