

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 2월 4일 (04.02.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/018115 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12M 1/38* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/008025
- (22) 국제출원일: 2015년 7월 31일 (31.07.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0099187 2014년 8월 1일 (01.08.2014) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-015 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동), Seoul (KR). 주식회사 제큐릭스 (GENCURIX INC.) [KR/KR]; 152-733 서울특별시 구로구 디지털로 242 (구로동, 한화비즈메트로 1차) 909호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 신영기 (SHIN, Young Kee); 135-968 서울특별시 강남구 도곡로 78길 22 (대치동, 삼성아파트) 114동 1301호, Seoul (KR). 오명철 (OH, Myung Ryul); 152-733 서울특별시 구로구 디지털로 242 (구로동) 9층, Seoul (KR). 최준석 (CHOI, Joon-Seok); 151-015 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동) 서울대학교 약학대학 20동 415호, Seoul (KR). 조상래 (CHO, Sang Rea); 476-831 경기도 양평군 옥천면 중미산로 1229, Gyeonggi-do (KR). 정경숙 (CHUNG, Kyung Sook); 151-

015 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동) 서울대학교 약학대학 20동 415호, Seoul (KR). 변보현 (BYUN, Bo Hyun); 151-015 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동) 서울대학교 약학대학 20동 415호, Seoul (KR). 김진주 (KIM, Jinju); 151-015 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동) 서울대학교 약학대학 20동 415호, Seoul (KR). 김성수 (KIM, Sung Su); 151-015 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동) 서울대학교 약학대학 20동 415호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook) 등; 135-915 서울특별시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS빌딩) 시원국제특허법률사무소, Seoul (KR).

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

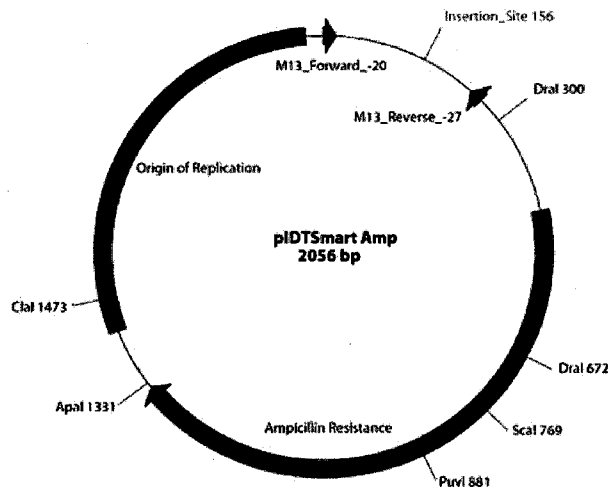
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING RESPONSIVENESS OF THERAPEUTIC AGENT FOR SECOND LINE TREATMENT OF CANCER PATIENT USING CIRCULATING TUMOR CELLS

(54) 발명의 명칭 : 순환 종양 세포를 이용한 암 환자의 2차 치료용 치료제 반응성 진단 방법

[도 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for diagnosing the responsiveness of a therapeutic agent for a second line treatment of a cancer patient using circulating tumor cells. More specifically, the present invention relates to a method for calculating a predicted value of treatment responsiveness which comprises several steps of separating and detecting CTC from a blood sample of a patient to provide information for determination of the second line treatment through detection of gene mutation information in the cancer patient, the method being suitable for automation. The method of the present invention can be useful for the purpose of guiding future treatment, including determination of the need for administering an anti-cancer therapeutic agent, since it is possible to predict and diagnose the responsiveness of a patient to the therapeutic agent by calculating the predicted value of treatment responsiveness using the blood of a patient who is subject to the second line treatment and from whom obtaining an FFPE tissue sample is difficult.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, **공개:**

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).

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 순환 종양 세포를 이용한 암 환자의 2차 치료용 치료제 반응성 진단 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 암 환자의 유전자 변이 정보 검출을 통한 2차 치료 (second line treatment) 판단을 위한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 혈액 시료로부터 CTC를 분리하여 검출하는 여러 단계를 포함하는 치료 반응성 예측치를 산출하는 방법으로 자동화에 적합한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 FFPE 조직 시료를 얻기 어려운 2차 치료 대상의 환자의 혈액을 이용하여 치료 반응성 예측치를 산출하여, 환자의 치료제에 대한 반응성 예측, 진단이 가능하므로 항암치료제의 투여 필요성 판단을 비롯하여 향후 치료의 방향에 대한 단서를 제시하는 목적으로 유용하게 사용할 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

순환 종양 세포를 이용한 암 환자의 2차 치료용 치료제 반응성 진단 방법

【기술분야】

<1> 본 출원은 2014년 8월 1일에 출원된 대한민국 특허출원 제 10-2014-0099187 호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

<2>

<3> 본 발명은 순환 종양 세포를 이용한 암 환자의 2차 치료용 치료제 반응성 진단 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 암 환자의 유전자 변이 정보 검출을 통한 2차 치료 (second line treatment) 판단을 위한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 혈액 시료로부터 CTC를 분리하여 검출하는 여러 단계를 포함하는 치료 반응성 예측치를 산출하는 방법으로 자동화에 적합한 방법에 관한 것이다.

<4>

【배경기술】

<5> 암이란 다양한 원인에 의해 세포의 분열과 사멸 간의 균형이 파괴됨으로써 계속적인 분열과 증식에 의해 발생한 비정상적인 세포의 집단을 의미하며, 종양 또는 신생물이라고도 한다. 일반적으로 장기, 백혈구, 뼈, 림프절 등을 포함한 100 가지 이상의 신체의 여러 부분에 발병하며, 주변조직으로 침윤하는 현상 및 다른 기관으로 이동하는 전이를 통해 심각한 증상으로 발전한다.

<6>

<7> 암의 치료제는 지속적으로 개발되고 있어, 현재 임상에서 사용되는 각종 암에 대한 치료제는 수십 가지에 이르고 있다. 하지만 현재까지도 임상 의들은 두 가지의 어려움을 겪고 있는데, 첫째는 치료제가 치료 효과를 나타내기까지는 몇 주 정도의 시간이 소요되고 개개 환자들에게 효과가 있는 치료제를 미리 알 수가 없다는 것이다. 즉, 항암제의 치료 효과는 며칠 내에 판정할 수 있는 것이 아니라 수주에 걸쳐서 서서히 나타나기 때문에 처방된 약물이 효과가 없다고 판단하기까지는 오랜 시간이 걸린다는 것이다. 그 후 치료 효과가 부적절하다면 다른 종류의 치료제로 변경을 고려하는데, 결국 치료 개시 시기에 임상 의가 환자에게 적절한 치료제를 선택하지 못하였다면, 그만큼 효과적인 치료에 이르는데, 시간이 그만큼 지체하게 되며, 병의 진행, 재발 및 예후에 치명적인 영향을 미치게 된다.

<8>

<9> 두 번째 어려움은 치료제에 치료 반응을 보이지 않는 환자가 다수 존재하는 점이다. 예를 들어, 유방암 치료제인 라파티닙(lapatinib)은 HER2 단백질의 수치가 높고 (HER2 양성) EGRF 단백질의 수치가 낮은 경우에 치료효과가 있는 것으로 밝혀진 바 있다. 그러나 전이성의 HER2 음성 유방암은 라파티닙에 반응을 하지 않아 라파티닙이 효과가 없는 것으로 드러났다. 이러한 연구결과를 참고하면, 일단 유방암 환자들은 치료를 받기 전에 정확한 검사를 통하여 HER2 음성인지 혹은 양성인지를 확실히 밝혀야 적절한 치료를 선택할 수 있음을 알 수 있다.

<10>

<11> 따라서, 치료제에 대한 치료반응과 그 부작용을 미리 예측할 수 있다면, 환자에게 맞는 약물을 미리 선별하여 약물을 잘못 선택함으로 인하여 생기는 치료 탈락(dropout)률을 낮추고 약물의 순응도를 높일 수 있을 것이다. 또한 약물의 효과가 나타나기까지 걸리는 시간과 환자가 겪을지도 모르는 부작용의 위험을 피해 갈 수 있을 것이다.

<12>

<13> 이러한 개념하에 여러 약물 반응성과 관련된 마커의 탐색이나 이를 활용한 상용의 체외진단 또는 동반진단 키트가 개발되고 있고, 그 중 몇 가지는 이미 상용화되어 임상에서 활용되고 있다. 하지만, 이러한 방법들은 주로 1차 치료 (first line treatment)에 적용가능한 것으로 2차 치료 이후에 적용시키기는 어려운 측면이 있었다.

<14>

<15> 아울러, 치료제에 대한 반응성의 진단 방법들은 일반적으로 고도로 숙련된 실험자에 의하지 않으면 결과의 신뢰성이 떨어지는 경우가 많다. 이에 따라 일부의 경우 central lab 방식으로 환자의 시료를 정해진 과정에 따라서 서비스 제공회사에 제공하여야 비교적 의미있는 결과를 얻을 수 있는 경우도 있고, 실험실간 오차 (inter-laboratory variation), 실험자간 오차 (inter-observer variation), 실험시기간 오차(day-to-day variation)로 인해 전체적인 시스템의 신뢰성에 의문이 제기될 수 있기도 하다.

<16>

<17> 이와 같이 종래의 방법은 장소, 시간, 실험자에 따라서 진단 결과에 오류가 생길 우려가 있어 안정적인 결과를 얻기 위하여 실험자의 관여가 가급적 배제된 방법이나 자동화 과정이 필요한 실정이다.

<18>

<19> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

<20>

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<21> 이에 본 발명자들은 FFPE 조직 시료를 얻기 어려운 2차 치료 대상의 환자의 혈액을 이용하여 치료 반응성 예측치를 산출하는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 환자의 혈액 시료로부터 CTC를 분리하여 검출하는 여러 단계를 포함하는 치료 반응성 예측치를 산출하는 방법, 특히 자동화에 적합한 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

<22>

<23> 따라서, 본 발명의 목적은 폐암 환자의 유전자 변이 정보 검출을 통한 2차 치료 (second line treatment) 판단을 위한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 혈액 시료로부터 CTC를 분리하여 검출하는 여러 단계를 포함하는 치료 반응성 예측치를 산출하는 방법을 제공하는 것이다.

<24>

【기술적 해결방법】

<25> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 폐암 환자의 유전자 변이 정보 검출을 통한 2차 치료 (second line treatment) 판단을 위한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 혈액 시료로부터 하기 단계를 포함하는 치료 반응성 예측치를 산출하는 방법을 제공한다.

<26> (a) 환자의 혈액에서 CTC (circulating tumor cell)을 분리하는 단계;

<27> (b) CTC 세포에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

<28> (c) 상기 게놈 DNA, 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브를 포함하는 PCR 반응 용액을 준비하는 단계;

<29> (d) 표준 물질 벡터 (vector)를 제한효소를 처리하여 선형 DNA가 되도록 한 표준 DNA, 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브를 포함하는 표준 PCR 반응 용액을 준비하는 단계;

<30> (e) 상기 (d)단계의 PCR 반응 용액 및 (f)단계의 표준 PCR 반응 용액을 각각 다수의 작은 방울 (droplet)으로 미분화시키는 단계;

- <31> (f) 상기 다수의 작은 방울 각각에서 PCR 반응이 이루어지도록 PCR 반응을 수행하는 단계;
- <32> (g) 각 미분화된 작은 방울의 전부 또는 일부에서 PCR 반응 여부를 측정하는 단계;
- <33> (h) PCR 반응 용액과 표준 PCR 반응 용액에서의 PCR 반응 여부의 측정값에서 돌연변이율 (% mutation)을 산출하는 단계;
- <34> (i) 상기 돌연변이율이 높을수록 치료 반응성 (responsiveness)이 높을 것으로 예측하는 예측치를 산출하는 단계.
- <35>
- <36> 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자들에 의해 통상적으로 이해되는 동일한 의미를 가진다. 다음의 참고문헌은 본 발명의 명세서에 사용된 여러 용어들의 일반적인 정의를 갖는 기술(skill)의 하나를 제공한다: Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2th ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); 및 Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY.
- <37>
- <38> 이하 본 발명의 내용을 보다 상세히 설명하기로 한다.
- <39>
- <40> 본 발명은 폐암 환자의 유전자 변이 정보 검출을 통한 2차 치료 (second line treatment) 판단을 위한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 혈액 시료로부터 하기 단계를 포함하는 치료 반응성 예측치를 산출하는 방법을 제공한다.
- <41> (a) 환자의 혈액에서 CTC (circulating tumor cell)을 분리하는 단계;
- <42> (b) CTC 세포에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- <43> (c) 상기 게놈 DNA, 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브를 포함하는 PCR 반응 용액을 준비하는 단계;
- <44> (d) 표준 물질 벡터 (vector)를 제한효소를 처리하여 선형 DNA가 되도록 한 표준 DNA, 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브를 포함하는 표준 PCR 반응 용액을 준비하는 단계;
- <45> (e) 상기 (d)단계의 PCR 반응 용액 및 (f)단계의 표준 PCR 반응 용액을 각각 다수의 작은 방울 (droplet)으로 미분화시키는 단계;
- <46> (f) 상기 다수의 작은 방울 각각에서 PCR 반응이 이루어지도록 PCR 반응을

수행하는 단계;

<47> (g) 각 미분화된 작은 방울의 전부 또는 일부에서 PCR 반응 여부를 측정하는 단계;

<48> (h) PCR 반응 용액과 표준 PCR 반응 용액에서의 PCR 반응 여부의 측정값에서 돌연변이율 (% mutation)을 산출하는 단계;

<49> (i) 상기 돌연변이율이 높을수록 치료 반응성 (responsiveness)이 높을 것으로 예측하는 예측치를 산출하는 단계.

<50>

<51> 본 발명은 방법은 바람직하게는 자동화 또는 반자동화된 방법이다. 상기에서 자동화는 샘플 (시료)의 투입; 추출, 분리, 반응이 완료된 기재 (예를 들어, 튜브, 플레이트)의 재배치 또는 이동; 시약, 버퍼의 스톡 (stock)에의 투입, 보충; 장비의 유지관리를 제외한 전부 또는 대부분 과정이 인간 이외의 수단 (예를 들어, 로봇)을 통해서 이루어지는 것을 의미한다.

<52>

<53> 이하에서 각 단계에 대해서 상세히 설명한다.

<54>

<55> (a) 단계는 환자의 혈액에서 CTC (circulating tumor cell)을 분리하는 단계이다.

<56> CTC는 악성 종양 환자의 말초혈액에서 발견되는 종양세포이다. CTC가 암전이 과정에서 중요한 역할을 하기 때문에 CTC는 암의 연구, 진단 등에 있어서 매우 중요하게 여겨지고 있으나, 말초혈액 내 순환종양세포 존재 수가 매우 드물어, 수백만 개 이상의 정상 혈구세포에 섞여 있는 수십 개 이하의 종양세포를 검출할 수 있는 정도의 민감도가 요구되는 검출 시스템이 필요하다.

<57>

<58> (b) 단계는 CTC 세포에서 게놈 DNA를 분리하는 단계이다.

<59> CTC에서의 DNA의 분리는 당업계에서 공지된 통상의 방법에 따라서 수행될 수 있다. 본 발명의 CTC에서 분리되는 핵산은 바람직하게는 게놈 DNA이며, 더 바람직하게는 돌연변이를 보유하고 있을 것으로 추정되는 게놈 DNA이다.

<60>

<61> (c) 단계는 상기 DNA, 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브를 포함하는 PCR 반응 용액을 준비하는 단계이다.

<62> 분리된 DNA는 PCR 반응을 위하여 프라이머/프로브 세트 및 PCR 반응을 위한

버퍼 등의 혼합물 (예를 들어, 상용의 PCR 프리믹스들)과 혼합된다. 프라이머 세트는 대상이 되는 게놈 DNA 유전자의 변이 (돌연변이)를 특이적으로 증폭할 수 있다. PCR 프리믹스는 PCR 반응을 위한 DNA 중합효소 (예를 들면, Tag polymerase), PCR 반응의 정량적 검출을 위한 염료 (예를 들면, 형광 염료), PCR 반응에 적합한 버퍼, dNTP 등을 포함할 수 있다.

<63>

<64> (d) 단계는 표준 물질 벡터 (vector)를 제한효소를 처리하여 선형 DNA가 되도록 한 표준 DNA, 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브를 포함하는 표준 PCR 반응 용액을 준비하는 단계이다.

<65> (d) 단계에서는 PCR 증폭을 위한 주형으로 (c) 단계에서의 게놈 DNA 대신 표준 물질 벡터를 사용하는 점을 제외하고는 상기 (c) 단계에 상응한다. 표준 물질 벡터에 처리하는 제한효소는 상기 벡터가 선형화될 수 있다면 벡터 내에 존재하는 제한효소 중 임의의 것을 선택할 수 있으며, 본 발명의 실시예의 경우 ClaI을 사용하였다.

<66>

<67> 본 발명에서의 검출 대상의 PCR 증폭 후의 수준은 대상 시료에 따라 전체적으로 차이가 있을 수 있으므로 돌연변이에 특이적인 프라이머/프로브에 의한 증폭여부의 판별을 위한 기준이 필요하다. 표준 물질 벡터는 이를 위한 것으로 게놈 DNA 유전자 변이를 포괄하는 100 내지 350 bp의 폴리뉴클레오티드가 통상의 벡터에 형질전환된 것을 이용할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 표준 물질 벡터는 EGFR의 각각 exon에서 돌연변이가 일어난 구간, 즉 probe 위치를 가운데로 하여 약 300bp를 합성하여 pIDTSmart Amp 벡터에 삽입하여 사용할 수 있다.

<68>

<69> 바람직하게는 본 발명의 표준 물질 벡터는 EGFR의 각각 exon에서 돌연변이가 일어난 구간, 즉 probe 위치를 가운데로 하여 약 300bp의 DNA 단편을 포함하는 벡터일 수 있으며, 이는 대장균 등의 숙주세포에 형질전환하여 증폭, 추출 후 사용될 수 있다. 더 바람직하게는 본 발명의 표준 물질 벡터는 엑손 18의 경우, EGFR 유전자 (genbank accession no. NG_007726) 의 159701에서 160100번째 염기에서 100 내지 350 bp의 폴리뉴클레오티드, 엑손 19의 경우, EGFR 유전자의 160501에서 160900번째 염기에서 100 내지 350 bp의 폴리뉴클레오티드, 엑손 20의 경우, EGFR 유전자의 167101에서 167500번째 염기에서 100 내지 350 bp의 폴리뉴클레오티드, 엑손 21의 경우, EGFR 유전자의 177551에서 177930번째 염기에서 100 내지 350 bp의 폴리

뉴클레오타이드 DNA 단편을 pIDTSmart Amp 벡터에 삽입한 것일 수 있다.

<70>

<71>

본 발명에서 "프라이머"는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

<72>

<73>

프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 용어 "어닐링" 또는 "프라이밍"은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.

<74>

<75>

본 발명에서 "프로브"는 정량적 PCR에 이용되는 taqman probe의 일종으로 디자인된 것이다. 바람직하게는 프로브에는 형광 물질 (HEX, VIC, FAM dye)를 부착하였으며, 모든 프로브의 3'쪽에는 퀀처 (quencher)로 TAMRA가 이용될 수 있다. TaqMan probe는 일반적으로 5'말단을 형광 물질로, 3'말단을 quencher 물질로 tagging한 oligonucleotide이며, TaqMan probe는 annealing step에서 template DNA에 특이적으로 hybridization하지만, probe의 3'말단에 quencher가 있기 때문에 빛을 주어도 형광을 발하지 못하지만, 다음 과정인 extension step에서 Taq DNA polymerase가 가지고 있는 5'→3'exonuclease 활성에 의해, 주형에 hybridization한 TaqMan probe가 분해되면 형광물질이 probe로부터 분리되어 quencher에 의한 억제가 해제되고 형광을 발하게 되는 원리에 의해서 PCR 반응에 따른 형광이 정량적으로 발하게 된다.

<76>

<77> 본 발명에서의 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브는 EGFR (epidermal growth factor receptor) 유전자의 돌연변이를 검출하기 위한 것일 수 있다. 바람직하게는 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브는 PCR 반응 용액 및 표준 PCR 반응 용액에 대해서 동일한 서열로 사용되며, 각각 독립적으로 서열번호 1의 정방향 프라이머, 서열번호 2의 역방향 프라이머 및 서열번호 9 내지 13으로 이루어진 군에서 선택된 프로브의 폴리뉴클레오티드 세트, 서열번호 3의 정방향 프라이머, 서열번호 4의 역방향 프라이머 및 서열번호 14 내지 42으로 이루어진 군에서 선택된 프로브의 폴리뉴클레오티드 세트, 서열번호 5의 정방향 프라이머, 서열번호 6의 역방향 프라이머 및 서열번호 43 내지 50으로 이루어진 군에서 선택된 프로브의 폴리뉴클레오티드 세트, 서열번호 7의 정방향 프라이머, 서열번호 8의 역방향 프라이머 및 서열번호 51 내지 54으로 이루어진 군에서 선택된 프로브의 폴리뉴클레오티드 세트로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

<78>

<79> (e) 단계는 상기 (e)단계의 PCR 반응 용액 및 (f)단계의 표준 PCR 반응 용액을 각각 다수의 작은 방울 (droplet)으로 미분화시키는 단계이다.

<80> PCR 반응 전에 각각의 PCR 반응 용액을 다수의 작은 방울로 쪼개어 나누는 과정으로, 이와 같은 미분화 과정을 통해서 각각의 작은 방울이 이후의 PCR 반응이 수행되기 때문에 각각의 작은 방울에서의 타겟 DNA의 증폭 여부에 따라 양성 또는 음성으로 구분하고, 이를 프아송 분포를 통해 타겟 DNA의 카피수를 계산할 수 있기 때문에 기존의 방법과는 달리 표준곡선이 필요없는 장점이 있게 된다. 본 발명의 미분화된 작은 방울은 약 1nl 정도의 크기일 수 있으며, PCR 반응 및 반응여부의 측정의 편의상 10,000 내지 25,000개로 미분화될 수 있다.

<81>

<82> (f) 단계는 상기 다수의 작은 방울 각각에서 PCR 반응이 이루어지도록 PCR 반응을 수행하는 단계이다.

<83> 샘플 게놈 DNA 또는 표준 물질 벡터의 DNA를 주형으로 하여 PCR 반응이 진행된다. PCR 반응은 당업계에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있으며, 일반적으로 프라이머/프로브 간 교차결합이 이루어지지 않는 조건에서 수행되어야 하나, 본 발명의 방법에 의하면 표준 물질 벡터 (vector)에 의한 기저값 설정이 가능하므로 다소 간의 교차결합은 허용되는 조건에서도 PCR 반응이 가능하다. PCR 반응 조건은 예를 들어 95° C에서 10분간 효소 활성화 반응과, 94° C에서 30초, 60° C에서 1분의 40 사이클, 98° C에서 10초 및 4° C로의 cooling 과정을 통해 PCR이 수행될 수 있다.

<84>

<85> (g) 단계는 각 미분화된 작은 방울의 전부 또는 일부에서 PCR 반응 여부를 측정하는 단계이다.

<86>

PCR 반응 여부의 측정은 당업계에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있으나, 리포터 형광 염료 및/또는 퀀처 (quencher) 형광 염료로 표지된 프로브를 사용한 광학적 정량 분석 시스템에 의해서 측정될 수 있으며, 바람직하게는 각 미분화된 작은 방울 각각의 PCR 반응에 대한 형광값을 측정하는 것에 의해서 수행될 수 있다.

<87>

구체적으로 프로브에 FAM, HEX, VIC 형광염료 (형광물질) 또는 EvaGreen 형광염료가 결합된 형태를 사용하였으므로 이들에 대한 형광을 측정하는 것에 의해서 수행될 수 있다. 이와 같은 과정은 상용의 검출장치 (예를 들어, biorad사의 Droplet Reader)에 의해서 수행될 수 있으며, 해당 장치내에서 각각의 샘플의 droplet 형광 신호를 각각 감지 및 positive와 negative droplet의 수를 세어 자동으로 분석까지 완료될 수 있다.

<88>

이 때 검출을 위해서 PCR 반응 용액에 첨가되는 프로브 및 표준 PCR 반응 용액에 첨가되는 프로브는 각각 상이한 형광물질과 결합되어 있을 수 있다.

<89>

<90>

(h) 단계는 PCR 반응 용액과 표준 PCR 반응 용액에서의 PCR 반응 여부의 측정값에서 돌연변이율 (% mutation)을 산출하는 단계이다.

<91>

상기 돌연변이율 (% mutation)의 산출은 PCR 반응 용액과 표준 PCR 반응 용액에서의 PCR 반응 여부의 측정값을 비교하여 표준 PCR 반응 용액에서의 측정값에 상응하는 역치값 이상의 비율로 돌연변이율 (% mutation)을 산출할 수 있다.

<92>

<93>

(i) 단계는 상기 돌연변이율이 높을수록 치료 반응성 (responsiveness)이 높을 것으로 예측하는 예측치를 산출하는 단계이다.

<94>

<95>

본 발명에서 치료 반응성은 폐암 성장률이 치료제와 접촉하지 않은 그의 성장과 비교해서 치료제와 접촉한 결과로서 억제된다면 치료제에 대해서 "반응성"이라고 정의할 수 있다. 폐암의 성장은 다양한 방식으로 측정될 수 있고, 예를 들어, 종양의 크기 또는 그 종양 유형에 적합한 종양 마커의 발현이 측정될 수 있다. 아울러, 상기 "반응성"에는 유의미한 생존곡선상의 생존시기의 증가를 나타낼 수도 있다.

<96>

폐암은 성장률이 치료제와 접촉하지 않은 그의 성장과 비교해서 치료제와 접

측한 결과로서 매우 낮은 정도로 억제되거나 억제되지 않는다면 치료제에 대해서 "비반응성"이다. 위에서 언급된 바와 같이, 폐암의 성장은 다양한 방식으로 측정될 수 있고, 예를 들어, 종양의 크기 또는 그 종양 유형에 적합한 종양 마커의 발현이 측정될 수 있다. 비반응성의 척도는 환자의 삶의 질, 전이도 등을 비롯하여 종양의 성장 크기를 넘는 추가의 기준을 이용해서 평가될 수 있다.

<97>

<98> 폐암 치료제에 대한 치료 반응성으로 EGFR (epidermal growth factor receptor)의 저해제에 대한 치료 반응성일 수 있다.

<99>

<100> EGFR은, 종양유전자(oncogene)인 erbB 또는 ErbB1의 단백질 산물이다. erbB 또는 ErbB1은 수많은 암 발생에 있어 중요 인자로 알려진 원발암유전자(protooncogenes)인 ERBB 군의 하나이다.

<101>

<102> 폐암 등의 상피세포암을 치료하기 위하여 다양한 EGFR 표적 약물이 개발되었으며, 특히 제피티닙(Gefitinib)(AstraZeneca UK Ltd., 상표명 "IRESSA")와 엘로티닙(Erlotinib)(Genentech, Inc. & OSI Pharmaceuticals, Inc., 상표명 "TARCEVA")이 대표적인 약물이다. 제피티닙과 엘로티닙은 퀴나졸린계 화합물로서, EGFR의 티로신 키나제 활성을 저해하여 인산화를 억제함으로써 세포성장을 막는다.

<103>

<104> 참고로, 상기에서 언급한 뉴클레오티드 및 단백질 작업에는 다음의 문헌을 참조할 수 있다(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990); Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997); Rupp and Locker, Lab Invest. 56: A67 (1987); De Andres et al., BioTechniques 18: 42044 (1995); Held et al., Genome Research 6:986-994 (1996); T.E. Godfrey et al. J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000); K. Specht et al., Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)).

<105>

【유리한 효과】

<106> 따라서, 본 발명의 방법은 FFPE 조직 시료를 얻기 어려운 2차 치료 대상의 환자의 혈액을 이용하여 치료 반응성 예측치를 산출하여, 환자의 치료제에 대한 반응성 예측, 진단이 가능하므로 항암치료제의 투여 필요성 판단을 비롯하여 향후 치료의 방향에 대한 단서를 제시하는 목적으로 유용하게 사용할 수 있다.

<107>

【도면의 간단한 설명】

<108> 도 1은 pIDTSmart Amp 벡터의 벡터맵을 나타낸 것이다.

<109> 도 2는 본 발명의 방법 중 CTC 분리 방법의 개념도이다.

<110> 도 3은 본 발명의 방법에 따라 CTC 세포에서의 PCR 반응 결과의 일례이다.

<111>

【발명의 실시를 위한 형태】

<112> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<113> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<114>

<실시예 1>

<CTC 분리>

<117> CTC는 암 환자로부터 수득한 혈액 샘플을 자기영동 (magnetophoresis) 방법에 기반한 CTC 분리 장치에 의해서 수득하였다. 자기영동에 의한 CTC 분리방법에 대한 개념도는 도 2와 같다. CTC의 분리방법을 보다 상세히 설명하면 다음과 같다.

<118>

<119> CTC 분리를 위하여 제조한 마이크로플루이딕스 칩 (microfluidics chip)을 혈액과 버퍼가 주입가능한 CTC 분리 장치에 설치하였다. 버퍼를 가운데 채널로 흘려주면서 혈액을 양쪽 끝의 주입구를 통해 흘려주었다. 혈액에는 미리 CTC에 특이적으로 결합하도록 자성물질이 부착된 항체 (EpCam antibody)를 첨가하여 CTC에만 특이적으로 자성을 나타내도록 하였습니다. 마이크로플루이딕스 칩에 미리 설치된 강자성체는 CTC 분리 장치에 설치된 영구자석에 의해서 자화되고, 자화된 강자성체에서 형성된 자기력에 의해서 CTC 세포가 중앙부의 CTC 분리 채널쪽으로 이동하게 된다. 혈액의 흐름이 끝나면 CTC 분리 채널 쪽에 모여진 CTC를 이후의 실험을 위하여 사용하였다.

<120>

<실시예 2>

<122> 표준 물질 벡터의 제작

<123> 디자인된 프라이머와 프로브를 검증하기 위해, 그리고 ddPCR 수행에 필요한 표준물질을 만들기 위해 표준 물질 벡터 (mini-clone으로 명명)을 제작하였다. mini-clone의 제작과정은 먼저 EGFR의 각각 exon에서 돌연변이가 일어난 구간, 즉 probe 위치를 가운데로 하여 약 300bp을 합성하였다. 합성된 DNA 단편은 pIDTSmart Amp 벡터의 universal link sequence 사이에 삽입하고 (도 1 참조), 제작된 clone 은 대장균 DH5 α 세포에 형질전환 (transformation) 시켰다.

<124>

<125> circular form 또는 super-coiled form으로 존재하는 표준물질 벡터를 선형 화시켜 ddPCR (droplet digital PCR) 시 효율을 극대화시키기 위하여 표준물질 벡터에 제한효소를 처리하였다. 표준물질 벡터 (Miniclon DNA) ClaI 제한효소를 37 °C에서 30분간 반응 후, 반응산물을 정량 후 -20도씨에서 사용 전까지 보관하였다.

<126>

<127> <실시에 3>

<128> 프라이머/프로브 디자인 및 선발

<129> 폐암 관련 유전자인 EGFR의 바이오 마커를 개발하기 위해 cosmic번호 (<http://cancer.sanger.ac.uk>)를 기반으로 하여 돌연변이 위치를 확인하였다. 유전자의 exon별 프라이머를 primer3 프로그램을 사용하여 EGFR-21을 제외한 나머지는 forward가 intron부분과 overlapping될 수 있도록 디자인하였다. 이 때, 프라이머의 Tm값은 58~60°C로 하였으며 GC%는 40~60%로 디자인하였다.

<130>

<131> 프로브는 조건을 충족하는 것들을 선별하여 taqman probe로 디자인하였다. 5' wild type 프로로브에는 HEX/VIC reporter fluorescence를 부착하였으며, 5' mutant probe에는 FAM dye를 부착하여 이후에 증폭 여부를 검출가능하도록 하였다. 모든 프로브의 3' 쪽에는 quencher로 TAMRA를 사용하였다. EGFR exon 18, 19, 20, 21번에 각각 4, 31, 8, 4개의 프로브들을 디자인하여 합성하였다. 본 발명자들에 의해 디자인된 프로브는 allele specific을 갖고있으며 거의 모든 프로브들이 cosmic 번호를 가지고 있었다.

<132>

<133> 디자인된 프라이머 (표 1)와 프로브 (표 2 및 표 3)의 정보는 다음과 같다.

<134>

<135> 【표 1】

프라이머 명칭	서열	서열번호	위치
C1-F1 (EGFR18F)	tgaggatcttgaaggaaactga	1	엑손 18
C1-R1 (EGFR18R)	ctgtgccaggagaccttacct	2	엑손 18
C5-F2 (EGFR19F)	tgatccagaaggtgagaa	3	엑손 19
C5-R2 (EGFR19R)	gcagaaactcacatcgagga	4	엑손 19
C36-F1 (EGFR20F)	ccctccaggaagcctacg	5	엑손 20
C36-R1 (EGFR20R)	cagccgaaggagcatga	6	엑손 20
C44-F1 (EGFR21F)	acaccgcagcatgtcaagat	7	엑손 21
C44-R1 (EGFR21R)	tgcctccttctgcatggtat	8	엑손 21

<136>

<137>

<138> 【표 2】

프라이머 명칭	서열	서열번호	위치	검출변이
P1-2	HEX-aagatcaaagtgtgggctccg	9	엑손 18	EGFR18P_WT
P1-3	HEX-caaaaagatcaaagtgtgggctc	10	엑손 18	EGFR18P_WT
P2-2	FAM-aagatcaaagtgtggCctccg	11	엑손 18	EGFR18P_2156G>C mt
P3-2	FAM-aagatcaaagtgtgAgctccgg	12	엑손 18	EGFR18P_2155G>A mt
P4-2	FAM-aagatcaaagtgtgTgctccgg	13	엑손 18	EGFR18P_2155G>T mt
P5-3	HEX-cgctcgctatcaaggaaattaagagaagc	14	엑손 19	EGFR19P_WT
P6-2	FAM-aaattcccgtcgctatcaAaacatc	15	엑손 19	EGFR19P_c.2235_2249 del 15 mt
P7	FAM-cgctcgctatcaaAATatctccgaaag	16	엑손 19	EGFR19P_c.2235_2252>AAT mt
P8	FAM-tcccgtcgctatcaaGtctccgaaa	17	엑손 19	EGFR19P_c.2236_2253 del 18 mt
P9	FAM-gtcgctatcaagGcatctccgaaag	18	엑손 19	EGFR19P_c.2237_2251 del 15 mt
P10	FAM-attcccgtcgctatcaagGctcc	19	엑손 19	EGFR19P_c.2237_2254 del 18 mt
P11-2	FAM-attcccgtcgctatcaaggTtccg	20	엑손 19	EGFR19P_c.2237_2255>T mt
P12-2	FAM-aaattcccgtcgctatcaaGacat	21	엑손 19	EGFR19P_c.2236_2250 del 15 mt
P13	FAM-gctatcaaggATccgaaagccaaca	22	엑손 19	EGFR19P_c.2238_2255 del 18 mt
P14-2	FAM-ccgctcgctatcaaggaaGCaaacat	23	엑손 19	EGFR19P_c.2238_2248 >GC mt
P15-2	FAM-ccgctcgctatcaaggaaGCAatctccg	24	엑손 19	EGFR19P_c.2238_2252 >GCA mt
P16-2	FAM-ccgctcgctatcaaggaaGcaacatc	25	엑손 19	EGFR19P_c.2239_2247del 9-1 mt
P17-5	FAM-ccgctcgctatcaaggaaTctccgaa	26	엑손 19	EGFR19P_c.2239_2253del15mt (C17=C23=C25)
P18-2	FAM-ccgctcgctatcaaggaaAccgaaag	27	엑손 19	EGFR19P_c.2239_2256 del 18 mt
P19	FAM-atcaaggaaCcaacatctccgaaag	28	엑손 19	EGFR19P_c.2239_2248 TTAAGAGAAG>C-2 mt
P20-2	FAM-ccgctcgctatcaaggaaCAgaaagcc	29	엑손 19	EGFR19P_c.2239_2258 >CA mt
P21-2	FAM-ccgctcgctatcaaggaaTcatctccga	30	엑손 19	EGFR19P_c.2240_2251 del 12 mt
P22-2	FAM-ccgctcgctatcaaggaaTcgaaag	31	엑손 19	EGFR19P_c.2240_2257 del 18 mt

* WT: wildtype; mt: mutant (이하 표 3도 같음)

<139>

【표 3】

프라이머 명칭	서열	서열 번호	위치	검출변이
P24-3	FAM_gtcgctatcaaggaaaccatctccg	32	엑손 19	EGFR19P_c.2239_2251>C mt
P26	FAM-aaaattccccgtcgctatcaaggTT	33	엑손 19	EGFR19P_2237_2253>TTGCT mt
P27	FAM-aaattccccgtcgctatcaaggaaG	34	엑손 19	EGFR19P_2239_2257>GT mt
P28	FAM_aaattccccgtcgctatcGcaacatct	35	엑손 19	EGFR19P_c.2233_2247del15 mt
P29	FAM_agaagcaacactcgatgtgagtttctgctt	36	엑손 19	EGFR19P_c.2253_2276del124 mt
P30-2	FAM-ccgtcgctatcaaaAATT Ccaacatctc	37	엑손 19	EGFR19P_c.2235_2248>AATTC mt
P31-2	FAM-ttccccgtcgctatcaagTatctccga	38	엑손 19	EGFR19P_c.2237_2252>T mt
P32-2	FAM-ccgtcgctatcaaaAATT Ccatctccga	39	엑손 19	EGFR19P_c.2235_2251>AATTC mt
P33-2	FAM-tccccgtcgctatcaaaAAT tccgaaag	40	엑손 19	EGFR19P_c.2235_2255>AAT mt
P34-2	FAM-ccgtcgctatcaaggTCTcgaaagcca	41	엑손 19	EGFR19P_c.2237_2257>TCT mt
P35	FAM_ctatcaaggaaCA Accgaaagccaaca	42	엑손 19	EGFR19P_c.2239_2256>CAA mt
P36-5	HEX-ctgggcatctgcctcacctcca	43	엑손 20	EGFR20P_WT
P37	FAM-agggcatgagctgcAtgatgagc	44	엑손 20	EGFR20P_c.2369C>T mt
P38-2	FAM-cctacgtgatggccaTcgtggac	45	엑손 20	EGFR20P_c.2303G>T mt
P39	FAM-gccagcgtgGCCAGCGTGg	46	엑손 20	EGFR20P_c.2307_2308 insGCCAGCGTG mt
P40-2	FAM-cgtggacaacccccacCACgtg	47	엑손 20	EGFR20P_c.2319_2320 insCAC mt
P41-2	FAM-ccagcgtggacGGTaacccccac	48	엑손 20	EGFR20P_c.2310_2311 insGGT mt
P42-2	FAM-tggccagcgtggacaGCGT GGA C	49	엑손 20	EGFR20P_c.2311_2312 insGCGTGGACA mt
P43	FAM_tggccagcgtggCCAGCGTGG	50	엑손 20	EGFR20P_c.2309_2310 AC>CCAGCGTGGAT mt
P44-4	HEX-agattttgggctggccaaact	51	엑손 21	EGFR21P_WT
P45-5	FAM-agatcacagattttgggcGgg	52	엑손 21	EGFR21P_c.2573T>G mt
P46-2	FAM-ctggccaaacAgctgggtgcgg	53	엑손 21	EGFR21P_c.2582T>A mt
P47-2	FAM-cacagattttgggcGTgccaaact	54	엑손 21	EGFR21Pc.2573_2574TG>GT mt

<실시예 4>

기허가 제품과의 비교실험

식약처에서 기허가된 코바스 EGFR 유전자 변이 검사 (cobas EGFR mutation test) 키트에 의한 방법과 본 발명에서의 방법과의 상관성 시험을 위해 민감도에 비해서 비교 분석 시험을 하였다.

<148>

<149> 돌연변이 빈도 (mutation frequency)를 각각 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.02%, 0.01% 까지 7단계로 희석하여 조절된 샘플을 대상으로 코바스 EGFR 유전자 변이 검사 키트에 의한 방법과 본 발명에서의 방법에 의해서 동시에 측정하였다. 코바스 EGFR 유전자 변이 검사는 제조사의 지침에 따라서 수행하였다.

<150>

<151> 대상 시료는 3가지 경우로 나누어 각각 시험하였다. 첫째로, Horizon사의 FFPE 조직에서 추출한 DNA(exon 19, delE746-A750(1))과 Horizon사의 mutant genomic DNA을 이용하였다.

<152>

<153> 첫 번째로 Miniclone에 gDNA를 spiking한 template를 이용하여 최소 돌연변이 빈도를 측정한 결과, 코바스 EGFR 유전자 변이 검사의 최소 측정 결과는 0.5%에서 5%인 반면 본 발명의 방법에 의하는 경우 0.02%에서 0.1%에서도 검사가 가능함을 확인하였으며, 특히 주목할 결과는 2239_2257>GT의 돌연변이 위치를 코바스 EGFR 유전자 변이 검사로는 측정할 수 없는 것이 본 발명의 방법에 의하는 경우 0.05%의 민감도를 보여 기허가된 코바스 EGFR 유전자 변이 검사의 방법과 대비해서 동등성 이상의 결과를 가짐을 확인하였다.

<154>

<155> 【표 4】

표. Miniclone을 이용한 ddPCR-based RUO kit과 Cobas CDx 비교 분석										
Mutant fraction	delE746-A750(1)		delE746-S752>V		delE746-A750(2)		delL747-T751		delL747-S752	
	ddPCR*	Cobas**	ddPCR	Cobas	ddPCR	Cobas	ddPCR	Cobas	ddPCR	Cobas
5%	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
0.5%	O	N/A	O	N/A	O	O	O	N/A	O	N/A
0.1%	O	N/A	O	N/A	O	N/A	O	N/A	O	N/A
0.05%	O	N/A	O	N/A	N/A	N/A	O	N/A	N/A	N/A
0.02%	N/A	x	N/A	x	N/A	x	O	x	O	x
0.01%	N/A	x	N/A	x	N/A	x	O	x	O	x
Mutant fraction	delL747-A750>P		delL747-P753>S		delE746-T751>VA		2239_2257>GT			
	ddPCR	Cobas	ddPCR	Cobas	ddPCR	Cobas	ddPCR	Cobas		
5%	O	O	O	O	O	O	O	N/A		
0.5%	O	N/A	O	N/A	O	N/A	O	N/A		
0.1%	O	N/A	O	N/A	O	N/A	O	N/A		
0.05%	O	N/A	N/A	N/A	O	N/A	O	N/A		
0.02%	O	x	N/A	x	O	x	N/A	x		
0.01%	N/A	x	N/A	x	N/A	x	N/A	x		

Red(N/A): Not Available X: No test

<156>

<157> * ddPCR은 33ng gDNA(10^4 copies)를 template 로 사용함

<158> ** Cobas EGFR mutation kit는 50ng(1.5×10^4 copies)를 template 로 사용함

<159>

<160> 두 번째로 Horizon사의 FFPE 조직에서 추출한 DNA와 Horizon사의 mutant genomic DNA로 상관성 시험을 위해 민감도를 비교 분석한 결과, 코바스 EGFR 유전자 변이 검사로 측정된 결과는 0.5%~5%값으로 측정되었으나 본 발명의 방법에 의한 경우 돌연변이 위치에 따라 최소 측정치가 0.02%~0.5%값으로 측정되었다. 이는 기허가 제품비교분석에서 최소 10배 이상의 민감도를 나타냄을 보여주는 것이다.

<161>

<162> 【표 5】

표. ddPCR-based RUO kit 과 Cobas CDx 비교 분석

Mutant fraction	Exon 18		Exon 19		Exon 20		Exon 21	
	G719S		delE746-A75		T790M		L858R	
	ddPCR*	Cobas**	ddPCR	Cobas	ddPCR	Cobas	ddPCR	Cobas
5%	O	O	O	O	O	O	O	O
0.5%	O	N/A	O	N/A	O	O	O	N/A
0.1%	O	N/A	O	N/A	O	N/A	O	N/A
0.05%	O	N/A	O	N/A	N/A	N/A	O	N/A
0.02%	O	x	O	x	N/A	x	O	x
0.01%	N/A	x	N/A	x	N/A	x	N/A	x

Red(N/A): Not Available, X : No test

<163>

<164> * ddPCR은 33ng gDNA(10^4 copies)를 template 로 사용함

<165> ** Cobas EGFR mutation kit는 50ng(1.5×10^4 copies)를 template 로 사용함

<166>

<167> 세 번째로, 인간 CTC 세포에서 분리된 DNA에서 EGFR 유전자의 돌연변이를 측정하였다. 상기 실시예 4에서 분리한 CTC에서 DNA를 분리하고, 이를 본 발명의 프라이머/프로브를 이용하여 본 발명의 방법에 따라 돌연변이를 확인하였다.

<168>

<169> 그 결과, 도 3에서와 같이 P5, P44 프로브의 경우와 같이 돌연변이가 존재하여 PCR 산물이 증폭된 작은 방울 들이 검출되었고, 이를 통해 CTC에서도 EGFR 돌연변이 검출을 통해서 치료반응성의 예측이 가능함을 알 수 있었다.

<170>

【산업상 이용가능성】

<171>

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명의 방법은 FFPE 조직 시료를 얻기 어려운 2차 치료 대상의 환자의 혈액을 이용하여 치료 반응성 예측치를 산출하여, 환자의 치료제에 대한 반응성 예측, 진단이 가능하므로 항암치료제의 투여 필요성 판단을 비롯하여 향후 치료의 방향에 대한 단서를 제시하는 목적으로 유용하게 사용할 수 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

폐암 환자의 유전자 변이 정보 검출을 통한 2차 치료 (second line treatment) 판단을 위한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 혈액 시료로부터 하기 단계를 포함하는 치료 반응성 예측치를 산출하는 방법:

- (a) 환자의 혈액에서 CTC (circulating tumor cell)을 분리하는 단계;
- (b) CTC 세포에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- (c) 상기 게놈 DNA, 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브를 포함하는 PCR 반응 용액을 준비하는 단계;
- (d) 표준 물질 벡터 (vector)를 제한효소를 처리하여 선형 DNA가 되도록 한 표준 DNA, 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브를 포함하는 표준 PCR 반응 용액을 준비하는 단계;
- (e) 상기 (d)단계의 PCR 반응 용액 및 (f)단계의 표준 PCR 반응 용액을 각각 다수의 작은 방울 (droplet)으로 미분화시키는 단계;
- (f) 상기 다수의 작은 방울 각각에서 PCR 반응이 이루어지도록 PCR 반응을 수행하는 단계;
- (g) 각 미분화된 작은 방울의 전부 또는 일부에서 PCR 반응 여부를 측정하는 단계;
- (h) PCR 반응 용액과 표준 PCR 반응 용액에서의 PCR 반응 여부의 측정값에서 돌연변이율 (% mutation)을 산출하는 단계;
- (i) 상기 돌연변이율이 높을수록 치료 반응성 (responsiveness)이 높을 것으로 예측하는 예측치를 산출하는 단계.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 치료 반응성은 EGFR (epidermal growth factor receptor)의 저해제에 대한 치료 반응성인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 EGFR 저해제는 엘로티닙 (erlotinib) 또는 제피티닙 (gefitinib)인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 게놈 DNA 유전자는 EGFR (epidermal growth factor receptor) 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 게놈 DNA 유전자 변이에 특이적인 프라이머 및 프로브는 PCR 반응 용액 및 표준 PCR 반응 용액에 대해서 동일한 서열로 사용되며, 각각 독립적으로 서열번호 1의 정방향 프라이머, 서열번호 2의 역방향 프라이머 및 서열번호 9 내지 13으로 이루어진 군에서 선택된 프로브의 폴리뉴클레오티드 세트, 서열번호 3의 정방향 프라이머, 서열번호 4의 역방향 프라이머 및 서열번호 14 내지 42으로 이루어진 군에서 선택된 프로브의 폴리뉴클레오티드 세트, 서열번호 5의 정방향 프라이머, 서열번호 6의 역방향 프라이머 및 서열번호 43 내지 50으로 이루어진 군에서 선택된 프로브의 폴리뉴클레오티드 세트, 서열번호 7의 정방향 프라이머, 서열번호 8의 역방향 프라이머 및 서열번호 51 내지 54으로 이루어진 군에서 선택된 프로브의 폴리뉴클레오티드 세트로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 프로브는 형광물질과 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

제5항에 있어서, 상기 PCR 반응 용액에 첨가되는 프로브 및 표준 PCR 반응 용액에 첨가되는 프로브는 각각 상이한 형광물질과 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 제한효소는 ClaI인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제1항에 있어서, 상기 작은 방울은 10,000 내지 25,000개로 미분화되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

제1항에 있어서, 상기 PCR 반응 여부의 측정은 각 미분화된 작은 방울 각각의 PCR 반응에 대한 형광값을 측정하는 것에 의해서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

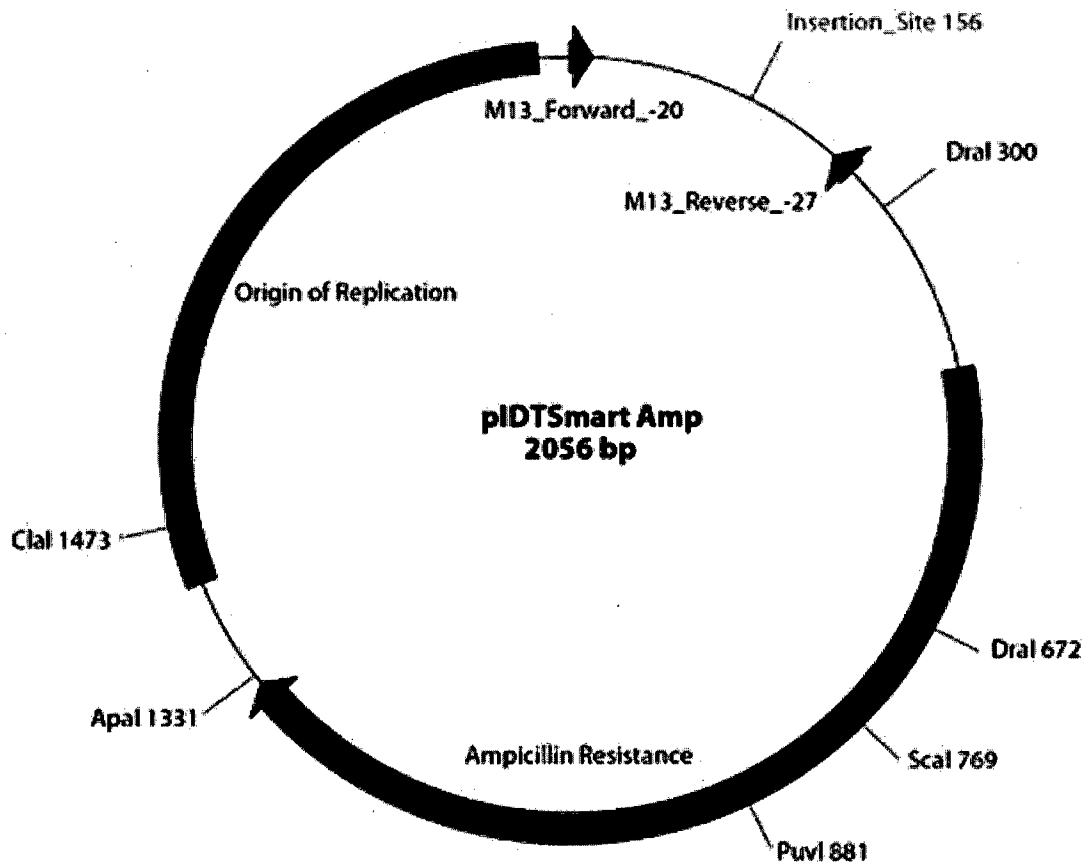
제1항에 있어서, 상기 돌연변이율 (% mutation)의 산출은 PCR 반응 용액과 표준 PCR 반응 용액에서의 PCR 반응 여부의 측정값을 비교하여 표준 PCR 반응 용액에서의 측정값에 상응하는 역치값 이상의 비율로 돌연변이율 (% mutation)을 산출하는 것임을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

제1항에 있어서, 상기 방법은 자동화 또는 반자동화에 의해서 수행되는 것임을 특징으로 하는 방법.

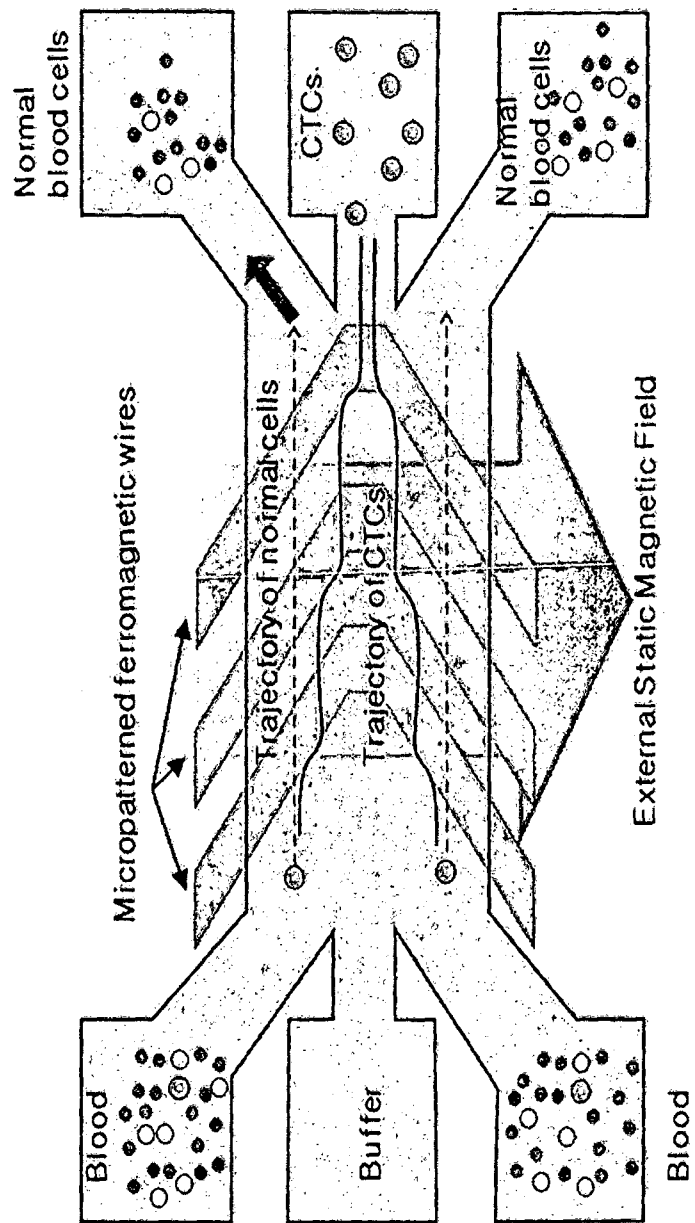
【도면】

【도 1】



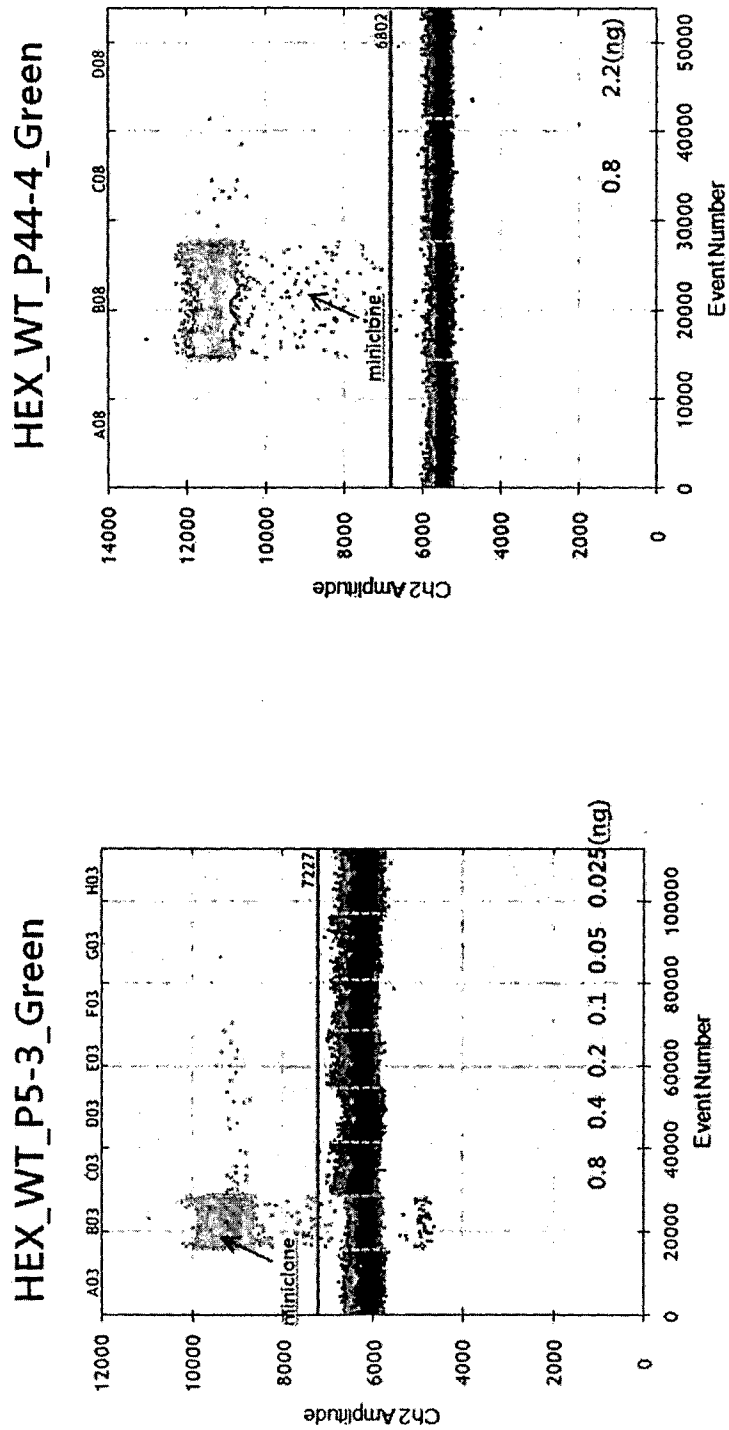
2/3

【도 2】



3/3

【도 3】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/008025

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, C12M 1/38(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), "CTC, EGFR inhibitors, droplet digital PCR, lung cancer, prediction, etc."

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PUNNOOSE, E. A. et al., "Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib", Clin. Cancer Res., Vol. 18, No. 8, pp. 2391-2401 (05 April 2012)	1-4,8-12
A	- See the entire main text. especially abstract; materials and methods; figures 2, 4, 5.	5-7
Y	OXNARD, G. R. et al., "Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA", Clin. Cancer Res., Vol. 20, No. 6, pp. 1698-705 (15 January 2014)	1-4,8-12
A	- See the entire main text. especially abstract; materials and methods; figures 1, 2, 4, 5.	5-7
A	LEWANDOWSKA, M. A. et al., "Application of PCR methods to evaluate EGFR, KRAS and BRAF mutations in a small number of tumor cells in cytological material from lung cancer patients", Oncol. Rep., Vol. 30, No. 3, pp. 1045-1052 (01 June 2013)	1-12
	- See the entire main text.	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 NOVEMBER 2015 (11.11.2015)

Date of mailing of the international search report

12 NOVEMBER 2015 (12.11.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/008025

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUBERS, A. J. et al., "EGFR mutation analysis in sputum of lung cancer patients: a multitechnique study", Lung Cancer, Vol. 82, No. 1, pp. 38-43 (05 August 2013) - See the entire main text.	1-12
A	DIDELOT, A. et al., "Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples", Clin. Chem., Vol. 59, No. 5, pp. 815-823 (12 February 2013) - See the entire main text.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/008025

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

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, C12M 1/38(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), 'CTC, EGFR inhibitors, droplet digital PCR, lung cancer, prediction, etc .'

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	PUNNOOSE, E. A. 외, 'Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib' , Clin. Cancer Res., Vol. 18, No. 8, pp. 2391-2401 (2012-04-05) - 본문 전체 참조. 특히 초록; Materials and Methods; 도 2, 4, 5.	1-4,8-12
A		5-7
Y	OXNARD, G. R. 외, 'Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA' , Clin. Cancer Res., Vol. 20, No. 6, pp. 1698-705 (2014-01-15) - 본문 전체 참조. 특히 초록; Materials and Methods; 도 1, 2, 4, 5.	1-4,8-12
A		5-7
A	LEWANDOWSKA, M. A. 외, 'Application of PCR methods to evaluate EGFR, KRAS and BRAF mutations in a small number of tumor cells in cytological material from lung cancer patients' , Oncol. Rep., Vol. 30, No. 3, pp. 1045-1052 (2013-06-01) - 본문 전체 참조.	1-12

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 11월 11일 (11.11.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 11월 12일 (12.11.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

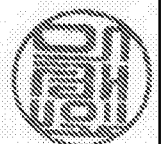
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이준혁

전화번호 +82-42-481-8115



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	HUBERS, A. J. 외, 'EGFR mutation analysis in sputum of lung cancer patients: a multitechnique study', Lung Cancer, Vol. 82, No. 1, pp. 38-43 (2013-08-05) - 본문 전체 참조.	1-12
A	DIDELOT, A. 외, 'Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples', Clin. Chem., Vol. 59, No. 5, pp. 815-823 (2013-02-12) - 본문 전체 참조.	1-12

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음