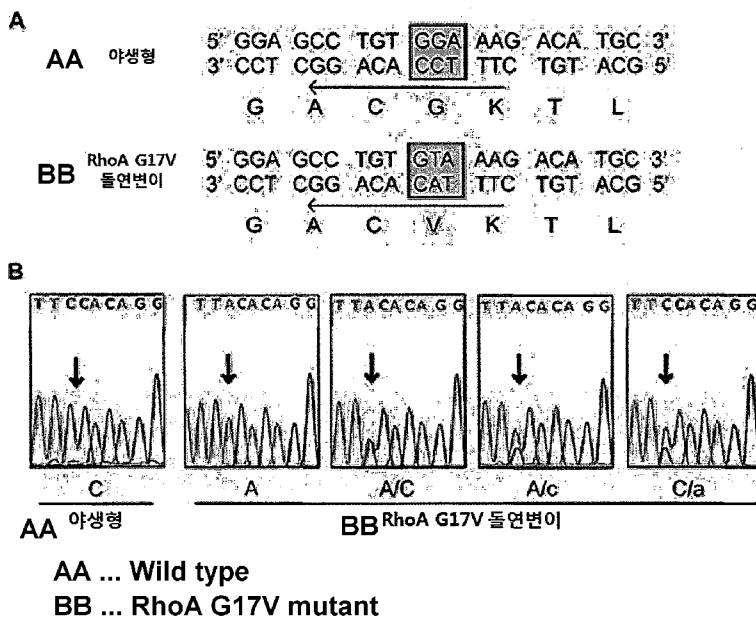




- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/68* (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/007491
- (22) 국제출원일: 2014 년 8 월 12 일 (12.08.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2013-0095368 2013 년 8 월 12 일 (12.08.2013) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 140-893 서울시 용산구 이태원로 55 길 48, Seoul (KR).
- (72) 발명자: **고영혜 (KO, Young Hye)**; 463-921 경기도 성남시 분당구 내정로 185 양지마을 202-1602, Gyeonggi-do (KR). **김원석 (KIM, Won Seog)**; 463-752 경기도 성남시 분당구 정자로 144 정든마을우성 4 단지아파트 407-1102, Gyeonggi-do (KR). **유해용 (YOO, Hae Yong)**; 138-798 서울시 송파구 올림픽로 4 길 42 우성아파트 8-905, Seoul (KR). **김석진 (KIM, Seok Jin)**; 135-828 서울시 강남구 선릉로 120 개포우성아파트 10-802, Seoul (KR). **이상혁 (LEE, Sang Hyuk)**; 134-070 서울시 강동구 상암로 51 길 54 명일엘지아파트 102-204, Seoul (KR).
- (74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301 호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:
- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
 - 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: BIOMARKER FOR DIAGNOSING TUMOR DISEASE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 종양 질환 진단용 바이오마커 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a biomarker for diagnosing a human tumor disease and a use thereof. According to the present invention, when a biological sample includes single nucleotide polymorphism (SNP) nucleotide (e.g., 'A/A', 'A/C', 'A/c', or 'C/a') in the 50th nucleotide of the Ras homolog gene family, member A (RhoA) gene of SEQ ID NO: 1, the biological sample is at a very high risk of having a tumor disease (specifically, lymphoma or leukemia). Therefore, a kit and method of the present invention can be very effectively and easily used to detect/diagnose a human tumor disease (e.g., lymphoma or leukemia).

(57) 요약서: 본 발명은 인간 종양 질환 진단용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 생물학적 시료가 서열목록 제 1 서열의 RhoA(Ras homolog gene family, member A) 유전자의 50 번째 뉴클레오타이드에서 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 뉴클레오타이드(예컨대, 'A/A', 'A/C', 'A/c' 또는 'C/a')를 포함하는 경우, 상기 생물학적 시료는 종양 질환(구체적으로는, 림프종 또는 백혈병)의 위험도가 매우 높다. 따라서, 본

발명의 키트 및 방법은 매우 효과적이고 용이하게 인간 종양 질환(예를 들어, 림프종 또는 백혈병)을 검출/진단하는 데 이용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

종양 질환 진단용 바이오마커 및 이의 용도

5 【기술 분야】

본 발명은 종양 질환 진단용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

【배경 기술】

종양발생(oncogenesis)은 염색체 불안정성(chromosomal instability),
 10 이수성(aneuploidy) 및 세포 성장 및 생존에 중요한 유전자들의 다양한
 유전적 변이(genetic aberrations)를 포함한다. 예를 들어, 균형성 전좌
 및 유전자 융합체는 육종, 백혈병 및 림프종을 포함하는 혈액 및 중간엽
 종양에서 종종 관찰되었으며(Rabbits, T. H., Nature 372(6502): 143-
 149(1994)), 암종과 같은 상피 종양에서는 덜 관찰되었었다. 최근 들어,
 15 종양발생 유전자 융합체가 전립선(Tomlins, S. A., *et al.*, Science
 310(5748): 644-648(2005)), 갑상선(Bongarzone, I., *et al.*, Cancer Res.
 54(11): 2979-2985(1994); Kroll, T. G., *et al.*, Science 289(5483):
 1357-1360(2000)), 및 폐(Soda, M., *et al.*, Nature 448(7153): 561-
 566(2007))의 암종에서 확인되었는데, 이는 상기 종양발생 유전자 융합체가
 20 암종에서 매우 빈번하게 발생한다는 것을 보여준다. 예를 들어, 재발성
 염색체 전좌는 많은 백혈병, 림프종 및 육종(예컨대, 간엽성 종양들)에서
 특징적으로 발견된다. 또한, 단일-유전자 변이가 전체 병인발생 과정에
 영향을 미치는 경우 상기 단일-유전자는 종양 바이오마커로서 이용될 수
 있다.

25 한편, NHL(non-Hodgkin's lymphomas) 및 HL(Hodgkin's lymphomas)로
 분류할 수 있는 림프종은 감염 및 질병으로부터 몸을 보호하고
 정상세포보다 더 빠르게 분열할 뿐 아니라, 더 오랫동안 생존하도록
 도와주는 면역 시스템의 일부인 백혈구 세포인 B 또는 T 림프구에서
 발생하는 혈액 종양의 일종으로 전체 종양의 약 4% 정도를 차지한다.
 30 림프종은 림프관, 비장, 골수, 혈액 또는 다른 기관들에서 발생할 수
 있으며 여성보다는 남성한테 더 많이 발생한다. 전형적으로, 림프종은

림프양세포(lymphoid cells)의 고형 종양을 나타낸다. 치료방법은 대부분 화학치료법을 이용하나 몇몇 케이스에서는 방사선 치료법 및/또는 골수 이식법을 이용한다. 일반적으로, 림프종은 병력(history), 타입 및 단계에 따라 치료가능하다. 상기 악성 세포들은 종종 림프관에서
 5 기원하고, 다른 기관들에도 영향을 미칠 수 있다. 다른 기관에서 발생한 림프종은 림프절의 림프종(extranodal lymphomas)으로 언급된다. 림프절의 위치들은 피부, 뇌, 장 및 뼈를 포함한다. 림프종은 전형적으로 림프구에서 발생할 뿐 아니라 순환 혈액 및 골수에서도 발생할 수 있는 림프구성 백혈병(lymphoid leukemias)과 밀접하게 연관되어 있다. 따라서,
 10 림프종은 많은 종류들이 존재하고 혈액 종양(hematological neoplasms)이라 불리는 폭넓은 그룹의 질환들 중 한 부분을 차지한다.

림프종은 후기 단계로 진행될수록 재발하는 경향을 가지기 때문에, 림프종의 치료는 초기 단계에 진단하는 것이 매우 중요하다. 일반적으로, 림프종의 진단은 림프관으로부터 얻어진 생검(biopsy) 시료에 대한
 15 조직병리학적 분석을 통해 실시한다. 림프종의 종류는 현미경을 이용한 암세포에 대한 형태 분석 또는 림프종에 특이적인 분자(바이오마커)의 검출을 통해 동정될 수 있다. 현미경을 이용한 조직 검사보다 바이오마커를 이용하여 림프종을 진단하는 방법이 보다 효과적이고 신속하기 때문에 신규한 바이오마커를 동정하는 것이 당업계에서 시급히
 20 요구되는 실정이다.

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
 25 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

30 본 발명자들은 종양 질환(예를 들어, 혈액 종양(hematological neoplasms))의 신속한 동정 및/또는 진단을 위한 바이오마커를 개발하기

위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 림프종 환자로부터 얻어진 생물학적 시료에 대한 전체 엑솜 시퀀싱(whole exome sequencing) 및 RNA-시퀀싱(sequencing)을 통한 돌연변이 유전자 프로파일을 조사하여 RhoA 유전자의 50번째 뉴클레오타이드가 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 뉴클레오타이드로 변이된 RhoA G17V 돌연변이가 림프종 진단에 효과적으로 이용될 수 있다는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 종양 질환 진단용 키트를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 종양 질환의 검출 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

15

【기술적 해결방법】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열인 RhoA(Ras homolog gene family, member A) 유전자의 50번째 뉴클레오타이드의 G에서 T로의 치환을 포함하는 T 대립 유전자의 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 종양 질환 진단용 키트를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 종양 질환의 검출 방법을 제공한다: (a) 대상(subject)의 생물학적 시료(sample)로부터 핵산 분자를 분리하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 핵산분자에서 서열목록 제1서열의 RhoA(Ras homolog gene family, member A) 유전자의 50번째 뉴클레오타이드를 확인하는 단계로, 상기 50번째 뉴클레오타이드가 G에서 T로 치환된 경우 상기 대상은 종양 질환을 가지는 것으로 판단되는 것을 특징으로 하는 종양 질환의 검출 방법.

본 발명자들은 종양 질환(예를 들어, 혈액 종양)의 신속한 동정 및/또는 진단을 위한 바이오마커를 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 림프종 환자로부터 얻어진 생물학적 시료에 대한

전체 엑솜 시퀀싱 및 RNA-시퀀싱을 통한 돌연변이 유전자 프로파일을 조사하여 RhoA 유전자의 50번째 뉴클레오타이드가 단일 뉴클레오타이드 다형성 뉴클레오타이드로 변이된 RhoA G17V 돌연변이가 림프종 진단에 효과적으로 이용될 수 있다는 것을 발견하였다.

- 5 Rho 단백질은 작은 GTPase들의 p21 Ras 슈퍼패밀리의 잘-알려진 멤버로, 비활성 GDP-결합 상태 및 활성 GTP-결합 상태 간의 형태적 변형(conformational change)을 통해 내인성(intrinsic) GTPase 활성을 나타낸다. RhoA 단백질은 세포 표면 수용체들로부터 세포내 타겟 분자들로 시그널 전달(transduction)을 조절하고 세포 형태, 이동능(motility), 세포질 분열(cytokinesis), 평활근 수축 및 종양 성장(tumor progression)을 포함하는 다양한 생물학적 과정들에 포함되어 있다(Yoshioka, K., *et al.*, *Cancer Research*, 59: 2004-2010(1999)). 종양 조직에서 RhoA의 발현 레벨은 주위의 정상 조직과 비교하여 현저하게 높을 뿐 아니라, 대장암의 단계에 따라 양성적으로 증가한다는 것이
- 10 보고되었다(Nakamori, S., *et al.*, *Rec. Adv. Gastroenterol. Carcinogenesis*, 1: 901904(1996)). 특히, RhoA 및 RhoC 유전자는 전이 부위에서 상대적으로 훨씬 더 높은 레벨로 발현되었다(Suwa, H., *et al.*, *Br. J. Cancer*, 77: 147152(1998)). 따라서, RhoA는 종양세포의 이동(transmigration)에 양성적으로 기능한다. 또한, RhoA는 혈청 반응
- 15 인자(serum response factor, SRF)에 의한 전사 활성화를 조절하고 종양발생(oncogenesis) 및 세포내 변형(transformation)에 포함되어 있다고 보고되었다(Perona R., *et al.*, *Oncogene*, 8(5): 1285-1292(1993); Hill C. S., *et al.*, *Cell*, 81(7): 1159-1170(1995)).

- 본 발명에 따르면, 본 발명의 RhoA G17V 돌연변이는 AITL 림프종 및
- 25 T-세포-유래된 림프종에서 높은 빈도로 발견되었다(참고: 표 1). 본 발명의 키트는 서열목록 제1서열인 RhoA(Ras homolog gene family, member A) 유전자의 50번째 뉴클레오타이드의 G에서 T로의 치환을 포함하는 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하며, 상기 T 뉴클레오타이드를 상보적으로 표현하면 A
- 30 뉴클레오타이드이고 이를 이용하여 대상(subject)에서 종양 질환을 동정 및/또는 진단할 수 있다. 따라서, 본 발명의 단계 (b)의 “50번째

뉴클레오타이드가 G에서 T로 치환된 경우”는 “50번째 뉴클레오타이드가 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 뉴클레오타이드 'A/A', 'A/C', 'A/c' 또는 'C/a'인 경우”로 표현될 수도 있다.

5

본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴클레오타이드(nucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

본 발명은 서열목록 제1서열인 RhoA(Ras homolog gene family, member A) 유전자의 50번째 뉴클레오타이드가 "T"인 대립 유전자에 관한 것이나, 이러한 대립유전자 뉴클레오타이드가 이중가닥의 gDNA(genomic DNA)에서 발견되는 경우, 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 즉, 상보적인 뉴클레오타이드 서열에서 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs)인 'T'는 'A'가 된다. 이러한 측면에서, 본 명세서의 모든 서열은, 특별한 언급이 없는 한, gDNA에서 센스 가닥에 있는 서열을 기준으로 한 것이다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs)"은 게놈(genome)에서 단일염기(A, T, C 또는 G)가 종의 멤버들 간 또는 한 개체(individual)의 쌍 염색체 간에 다른 경우에 발생하는 DNA 서열의 다양성을 의미한다. 예를 들어, 서로 다른 개체의 DNA 단편들(예: TGTG[G/T]AAAG, 본 발명의 SNP에서 G/T의 상보적인 염기로 표기하였음)처럼 단일염기에서 차이를 포함하는 경우, 두 개의 대립 유전자(G 또는 T)라고 부르며, 일반적으로 거의 모든 SNPs는 두 개의 대립 유전자를 가진다. 한 집단(population)내에서, SNPs는 소수 대립인자 빈도(minor allele frequency, MAF; 특정 집단에서 발견되는 유전자위치(locus)에서 가장 낮은 대립인자 빈도)로 할당될 수 있다. 인간 집단 내에서 변이성(variations)이 존재하며, 지질학적 또는 민족적

군에서 공통적인 하나의 SNP 대립 유전자는 매우 희귀하다. 단일염기는 폴리뉴클레오타이드 서열에 변화(대체), 제거(결실) 또는 첨가(삽입)될 수 있다. SNP는 번역 프레임의 변화(in-frame shift)를 유발할 수 있다.

- 단일 뉴클레오타이드 다형성은 유전자의 코딩 서열, 유전자의 비-코딩 부위 또는 유전자 사이의 내부 지역(intergenic regions)에 포함될 수 있다. 유전자의 코딩 서열 내의 SNP는 유전암호의 중복성(codon degeneracy)으로 인해 반드시 타겟 단백질의 아미노산 서열 상에 변화를 일으키지는 않는다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고(때때로, 침묵 돌연변이라 불림), 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP의 경우 비-동의적(non-synonymous)이라고 한다. 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넌센스일 수 있으며, 미스센스 변화는 다른 아미노산을 발생시키는 반면에 넌센스 변화는 비성숙 종결코돈을 형성한다. 단백질-코딩 부위가 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발시킬 수 있다.

- 인간의 DNA 서열 상의 변이성은 병의 발병 및 인간이 어떻게 병원체, 화학물질, 약물, 백신 및 다른 시약에 반응하는가에 영향을 미칠 수 있다. 또한, SNPs는 맞춤형 의학의 개념을 실현하기 위한 중요한 도구(key enabler)로 생각되고 있다. 무엇보다도, 최근에 마커로서 활발하게 개발되고 있는 SNPs는 질병을 가지거나 또는 가지지 않는 군들 간에 게놈 부위를 비교함으로써 질병을 진단하는 생의학적 연구에서 매우 중요하다. SNPs는 인간 게놈의 가장 많은 변이이며, 1.9 kb 당 하나의 SNP 비율로 존재하는 것으로 추측되고 있다(Sachidanandam et al., 2001). SNPs는 매우 안정된 유전적 마커이고, 때때로 표현형에 직접적인 영향을 미치며, 자동화된 유전자형규명 시스템에 매우 적합하다(Landegren et al., 1998; Isaksson et al., 2000). 또한, SNPs 연구는 곡식 및 가축 육성 프로그램에서도 중요하다.

- 본 발명에 따르면, 본 발명의 키트는 서열목록 제1서열 내 50번째 뉴클레오타이드의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP) 뉴클레오타이드(예컨대, T 뉴클레오타이드)를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 프라이머쌍을 포함하는 종양 질환 진단용 키트이다. 구체적으로는,

상기 프라이머쌍 중에서 전방향 프라이머는 서열목록 제1서열에서 50번째 뉴클레오타이드에 해당하는 종양 질환(예를 들어, 림프종 또는 백혈병)-관련 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP) 뉴클레오타이드에 인접한 서열과 어닐링할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 전방향
5 프라이머의 3'-말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 키트 및 방법은 유전자 증폭 또는 마이크로어레이일 수 있다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 증폭은 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다. 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 프라이머는 유전자 증폭
10 반응(amplification reactions)에 이용될 수 있다.

본 명세서에 기재된 용어 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)),
15 Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19) (WO 88/10315),
20 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement
30 amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한

다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794호, 제5,494,810호, 제4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 PCR(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

본 발명의 진단용 키트를 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 본 발명의 바이오마커의 뉴클레오티드 서열을 분석하여 진단한다. 본 발명은 본 발명의 바이오마커의 뉴클레오티드 서열을 검출하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 게놈 DNA)에서 본 발명의 바이오마커의 뉴클레오티드 서열을 결정함으로써 조사하여 종양 질환의 유무를 결정할 수 있다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 키트 또는 방법에서 이용될 수 있는 생물학적 시료는 인간으로부터 분리된 생물학적 시료로, 혈액, 혈장, 혈청, 조직, 세포, 림프액, 골수액, 타액, 안구액, 정액, 뇌 추출물, 척수액, 관절액, 흉선액, 복수액, 양막액, 세포 조직액 및 세포 배양액을 포함하고, 보다 구체적으로는 혈액, 혈장, 혈청, 조직, 세포, 림프액, 골수액, 세포 조직액 및 세포 배양액을 포함하며, 보다 더 구체적으로는 혈액, 혈장, 혈청, 조직, 세포, 림프액 및 세포 배양액을 포함하고, 보다 더욱 더 구체적으로는 혈액, 혈장, 혈청, 조직 및 림프액을 포함하며, 가장 구체적으로는 혈액 및 조직을 포함한다.

본 발명의 어떤 구현예에서, 본 발명의 증폭 과정은 미국특허

제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시될 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "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. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드, 비-자연 뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 명세서에서 언급되는 용어 "연장 프라이머(extension primer)"는 타겟 핵산(바이오마커)에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 프라이머를 의미한다. 이 연장 프라이머는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.

본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산의 제1위치에 상보적으로 혼성화될 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 명세서에서 언급되는 용어 "상보적"은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, '실질적으로 상보적(substantially complementary)' 및 '완전히 상보적(perfectly complementary)'인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 구체적으로는 '완전히 상보적'인 것을 의미한다. 본 명세서에서, 프라이머 서열과 관련하여 사용되는 용어, "실질적으로 상보적인 서열"은 완전히 일치되는 서열 뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.

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 bp의 폴리뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여

일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 본 명세서에서 사용되는 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.

프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상술한 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.

프라이머 제작 시 참조하여야 하는 본 발명 타겟의 뉴클레오타이드 서열은 GenBank에서 확인할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 바이오마커인 서열목록 제1서열인 RhoA 유전자의 GenBank 접근번호는 AF498970.1이고, 상기 서열 및 본 발명의 단일 뉴클레오타이드 다형성 뉴클레오타이드를 참조하여 프라이머를 디자인할 수 있다. 구체적으로는, 프라이머쌍 중에서 전방향 프라이머는 서열목록 제1서열에서 50번째 뉴클레오타이드에 해당하는 인간 림프종-관련 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP) 염기에 인접한 서열과 어닐링할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 전방향 프라이머의 3'-말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다.

본 명세서에서 언급되는 용어 "핵산 분자"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

본 발명의 키트에서 출발물질이 gDNA인 경우, gDNA의 분리는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Rogers &

Bendich (1994)).

출발물질이 mRNA인 경우에는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 총 RNA를 분리하여 실시된다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 분리된 총 RNA는 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성된다. 상기 총 RNA는 인간(예컨대, 림프종 환자)로부터 분리된 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: *PNAS USA*, 85:8998(1988); Libert F, et al., *Science*, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)).

본 발명의 키트에 있어서, 상기 특정 서열의 규명/확인용 당업계 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 응용될 수 있는 기술은, 형광 인 situ 혼성화(fluorescence *in situ* hybridization, FISH), 직접적 DNA 서열결정, PFGE 분석, 서던 블롯 분석, 단일-가닥 컨퍼메이션 분석(SSCA, Orita et al., *PNAS, USA* 86:2776(1989)), RNase 보호 분석(Finkelstein et al., *Genomics*, 7:167(1990)), 닷트 블롯(dot blot) 분석, 변성 구배 젤 전기영동(DGGE, Wartell et al., *Nucl. Acids Res.*, 18:2699(1990)), 뉴클레오타이드 미스매치를 인식하는 단백질(예: *E. coli*의 mutS 단백질)을 이용하는 방법(Modrich, *Ann. Rev. Genet.*, 25:229-253(1991)) 및 대립형-특이 PCR을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

서열변화가 단일-가닥 분자 내 염기 결합의 차이를 초래하여, 이동성이 다른 밴드를 출현하게 하는 데, SSCA는 이 밴드를 검출한다. DGGE 분석은 변성 구배 젤을 이용하여, 야생형 서열과 다른 이동성을 나타내는 서열을 검출한다.

다른 기술들은 일반적으로 본 발명의 SNP를 포함하는 서열에 상보적인 프로브 또는 프라이머를 이용한다. 예를 들어, RNase 보호

분석에서, 본 발명의 SNP를 포함하는 서열에 상보적인 리보프로브가 이용된다. 상기 리보프로브와 인간으로부터 분리한 DNA 또는 mRNA를 혼성화시키고, 이어 미스매치를 검출할 수 있는 RNase A 효소로 절단한다. 만일, 미스매치가 있어 RNase A가 인식을 한 경우에는, 보다 작은 밴드가 관찰된다.

혼성화 시그널을 이용하는 분석에서, 본 발명의 SNP를 포함하는 서열에 상보적인 프로브가 이용된다. 이러한 기술에서, 프로브와 타겟 서열의 혼성화 시그널을 검출하여 직접적으로 종양 질환의 유무를 결정한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "프로브"는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로는, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 보다 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다.

본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 구체적으로는, 본 발명에 이용되는 프로브는 서열목록 제1서열에서 50 뉴클레오타이드를 포함하는 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 잔기(보다 구체적으로는, 10-30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기)를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 구체적으로는, 상기 프로브의 3'-말단 또는 5'-말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3'-말단 또는 5'-말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다.

혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., *et al.*, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.

(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건(stringent condition)은 온도, 이온세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.

5 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 T 대립 유전자를 가진 인간은 종양 질환의 위험도가 매우 높다.

 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 T 대립 유전자는 TT 동형접합체(homozygote) 또는 TG 유전자형(genotype)을 포함한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 키트에 의해 검출된 시료 내 단일
10 뉴클레오타이드 다형성이 T 뉴클레오타이드를 포함하는 경우(예컨대, 'A/A', 'A/C', 'A/c' 또는 'C/a')가 37% 이상이었다 (참고: 도 2 및 표 1).

 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 T 대립 유전자를 가진 대상(subject)은 혈액 종양에서 37% 이상이다.

 본 명세서에서 사용되는 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한
15 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것(예컨대, 종양 질환의 동정), 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 및 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함하고, 보다
20 구체적으로는 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것이다.

 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 키트 또는 방법을 통해 진단/검출될 수 있는 종양 질환은 림프종, 백혈병, 골수종, 혈관육종, 내피세포육종(endotheliosarcoma), 림프관 육종, 림프관
25 혈관내피세포육종(lymphangi endotheliosarcoma), EMC(extraskelatal myxoid chondrosarcoma), 자궁경부암, 고환 종양, 폐암종, 소세포 폐암종, 방광암종, 상피 암종, 신경교종, 대장선암, 전립선암종, 대장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평상피세포암, 기저세포암, 선암종(adenocarcinoma), 신세포암종, 간세포암, 담도암, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 윤활막종, 중피종, 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 횡문근종, 땀샘암종, 피지샘 암종, 유두상암종, 유두상 선암,
30

낭선암종, 연수갑상선암종, 기관지암종, 용모상피암, 고환종, 배아성암종(embryonal carcinoma), 월름 종양, 성상세포종, 카포시육종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 회돌기세포교종, 수막종, 신경모세포종 및 망막모세포종이고, 보다
 5 구체적으로는 혈액 종양(hematological tumors)이며, 보다 더 구체적으로는 T-세포 유래된 림프종 및 백혈병이다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 키트 또는 방법을 통해 진단/검출될 수 있는 T-세포 유래된 림프종 또는 백혈병은 AITL(angioimmunoblastic T-cell lymphoma), PTCL(panniculitis-like T-
 10 cell lymphoma), NK/T(NK-T cell lymphoma), 림프아세포 림프종(lymphoblastic lymphomas), 말초(peripheral) T-세포 림프종, 피부 T-세포 림프종(cutaneous T cell lymphoma), T-세포 타입 역형성 대세포 림프종(anaplastic large cell lymphoma, T-cell type; ALCL), 장변변 T-세포 림프종(enteropathy-type T cell lymphoma), HTLV-1(Human T-
 15 lymphotropic virus-1)-연관된 ATL(Adult T-cell leukemia/lymphoma), T-세포 전림프구성 백혈병(T-cell prolymphocytic leukemia), T-세포 전림프구성 백혈병(T-cell granular lymphocytic leukemia) 및 공격성 NK-세포 백혈병(aggressive NK-cell leukemia)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

20 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열인 RhoA(Ras homolog gene family, member A)의 아미노산 서열의 17번째 아미노산이 Gly에서 Val로 치환된 변이형 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 종양 질환 진단용 키트를 제공한다.

본 발명에서 진단하고자 하는 종양 질환에 대해서는 이미
 25 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 RhoA 유전자 상의 단일염기다형성은 코딩 아미노산의 치환을 야기한다. G17V는 본 발명자들에 의해 발견된 상술한 변이 뉴클레오타이드가 인코딩하는 변이 단백질의 아미노산 서열이다. 따라서, 본 발명의 키트는 본 발명의 돌연변이
 30 뉴클레오타이드가 인코딩하는 변이 단백질을 항원-항체 반응을 이용한 면역분석(immunoassay) 방법에 따라 검출하여 종양 질환을 진단하는 데

이용될 수 있다.

이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석(immunoassay) 또는 면역염색(immunostaining) 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 변이 Lp-PLA₂ 단백질을 검출하는 데 이용될 수 있다.

본 발명에서 이용되는 변이 단백질에 대한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.

변이 단백질에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 상술한 변이 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 산화 스트레스 관련 질환을 진단할 수 있다. 즉, 인간의 시료에서 변이 단백질에 대한 시그널이 정상 시료 보다 강하게 나오는 경우에는 산화 스트레스 관련 질환의 위험도가 높은 것으로 진단된다.

본 발명의 키트는 항체 대신에 변이 상술한 변이 RhoA 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용할 수 있다. 본 명세서에서 용어 “앵타머”는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자

또는 펩타이드 분자로서 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하여 작용을 나타내는 것을 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., *Nature* 355(6360):564-6(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 아시아인에게 적용된다.

본 명세서에서 용어 “아시아”는 한국, 중국 및 일본 등을 비롯한 몽골계 인종이 거주하는 극동 지역을 의미한다. “아시아인”이란 조상이 아시아인인 개체군을 의미하며, 바람직하게는 적어도 10대 이상의 조상이 아시아인인 개체군을 의미한다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 아시아인은 한국인이다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열인 RhoA(Ras homolog gene family, member A) 유전자의 50번째 뉴클레오타이드가 G에서 T로 치환된 변이형 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열인 RhoA(Ras homolog gene family, member A) 단백질의 아미노산 서열의 17번째 아미노산이 Gly에서 Val로 치환된 변이형 아미노산 서열을 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 인간 종양 질환 진단용 바이오마커 및 의 용도에 관한 것이다.

(b) 본 발명에 따르면, 생물학적 시료가 서열목록 제1서열의 RhoA(Ras homolog gene family, member A) 유전자의 50번째

뉴클레오타이드에서 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 뉴클레오타이드(예컨대, 'A/A', 'A/C', 'A/c' 또는 'C/a')를 포함하는 경우, 상기 생물학적 시료는 종양 질환(구체적으로는 림프종 또는 백혈병)의 위험도가 매우 높다.

- 5 (c) 따라서, 본 발명의 키트 및 방법은 매우 효과적이고 용이하게 인간 종양 질환(예를 들어, 림프종 또는 백혈병)을 검출/진단하는 데 이용될 수 있다.

10 【도면의 간단한 설명】

도 1은 AITL 환자 시료의 전체 엑솜 시퀀싱 및 RNA-시퀀스 분석을 통해 동정된 돌연변이 유전자 프로파일을 보여주는 결과이다. 상단의 넘버는 병원에 기탁된 환자 조직의 시료번호를 의미한다.

- 15 도 2는 AITL 환자 시료에서 Sanger 시퀀싱을 통해 동정된 RhoA 돌연변이(G17V)를 보여주는 결과이다.

- 20 도 3은 RhoA 돌연변이 위치에 따른 GTPase 활성 측정한 결과(도 3a) 및 상기 결과를 정량적으로 나타낸 그래프(도 3b)이다. 야생형 RhoA 및 RhoA G14V 돌연변이는 GTPase 활성을 유지하지만, RhoA G17V 돌연변이는 활성을 나타내지 않았다. RhoA T19N 돌연변이는 GTPase 활성이 없는 양성 대조군으로 사용되었다.

도 4는 G17V 돌연변이 RhoA의 세포 증식에 대한 영향을 보여주는 도면이다. RhoA 활성이 없는 G17V 및 T19N 돌연변이체가 야생형 및 G14V 돌연변이체보다 증가된 세포 증식률을 나타냈다.

- 25 도 5는 G17V 돌연변이 RhoA와 세포 침윤(invasion) 간의 연관성을 나타내는 결과이다. RhoA 활성이 없는 G17V 및 T19N 돌연변이체가 야생형 및 G14V 돌연변이체보다 현저하게 증가된 세포 침윤성(invasiveness)을 나타냈다.

30 【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

5

실시예

실험방법

엑솜 시퀀싱(exome sequencing) 데이터 프로세싱

- 10 양-말단(paired-end) 101-bp 판독 정보들(reads)이 각각 동일한 조건 하의 림프종과 정상 시료들에서 Illumina HiSeq 2000 플랫폼(platform)을 이용하여 얻어졌다. 엑솜 데이터 분석은 다음과 같은 파이프라인으로 프로세싱되었다. 먼저, 기본적인 QC(quality control) 프로세스를 실시하여 상기 판독 정보들로부터 어댑터 서열들을 정리하고
- 15 fastx(http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)을 이용하여 나쁜 판독 결과들 및 서열 오류들(artifacts)을 제거하였다. 이후, FastQC(<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>)을 이용하여 상술한 데이터의 질 체크 과정(quality check procedures)을 실시하여 이후 단계에서 발생할 수 있는 문제들을 배제시켰다. 다음으로,
- 20 Burrows-Wheel Aligner v0.5.9(Li and Durbin 2010)을 이용하여 인간 레퍼런스 게놈 hg19와 정렬(alignment)을 실시하였다. Genome Analysis ToolKit v1.6-5 (McKenna, Hanna et al. 2010)을 이용한 보다 정확한 변이체 검출을 위해 Picard(<http://picard.sourceforge.net>), 국소적 재정렬(local realignment) and base quality recalibration을 이용하여
- 25 듀블리케이트(duplicates)를 제거하는 과정을 포함하는 다양한 '클린업(clean up)' 과정을 실시하였다. 상술한 과정들을 통해 완벽하게 분류되고 정돈된 bam 파일들(bam files)을 얻었다.

- 상기 bam 파일들을 이용하여 체세포 변이체들(somatic variants)의 동정을 실시하였다. 체세포 SNV(single-nucleotide variations), 그리고
- 30 소규모(small) 삽입 및 결실들이 VarScan v2.3.3(Koboldt, Zhang et al. 2012)을 이용하여 검출되었다. 상기 변이체들은 VarScan(최소

범위(minimum coverage), >10; 및 최소 정상 변이 수(variant depth), >2)에 의해 제공되는 p-값(>0.05)를 이용하여 여과되었다. 마지막으로, 코딩 부위에서 ns 돌연변이들(non-synonymous mutations)의 리스트를 이용하여 여러 가지 예측된 생물학적 효과들에 주석을 달았는데, 상기

5 효과들은 기능 평가(functional impact), COSMIC 내 암 타입 및 Mutation assessor(Reva, Antipin et al. 2007)를 이용한 암에서 유전자의 알려진 기능을 포함한다. 상술한 아웃풋(outputs)은 절편 이중 스코어(segmental duplication score; <0.5) 및 ANNOVAR를 이용한 1000 게놈 프로젝트 대립형질 빈도 값(genomes project allele frequency value = 0)으로

10 추가적으로 여과되었다.

RNA 시퀀싱 데이터 프로세싱

양-말단(paired-end) 101-bp 판독 정보들(reads)이 각 림프종 시료에서 Illumina HiSeq 2000 시퀀서를 이용하여 얻어졌다. 엑솜 시퀀싱

15 데이터 프로세싱에 기재된 바와 같이, RNA-Seq 데이터에 대한 기본적인 QC 프로세스가 실시되었다. tophat2(Trapnell, Pachter et al. 2009)을 이용하여 인간 레퍼런스 게놈 hg19와 정렬(alignment)을 실시한 후, Picard(<http://picard.sourceforge.net>)을 이용하여 듀플리케이트 제거를 실시하였다. 완벽하게 분류되고 정돈된 bam 파일(bam files)을 이용하여 본

20 발명자들은 체세포 돌연변이들이 발현되었는지 여부를 확인하였다.

게놈(genomic) DNA 시퀀싱

엑솜 시퀀싱 후, 후보 돌연변이들이 Sanger 시퀀싱으로 확인되었다. 삼성서울병원에 예치된 림프종 환자들 시료에서 RhoA 유전자의 게놈

25 돌연변이를 검출하기 위해, I-StarTaq-Maxime PCR PreMix kit(iNtRON) 및 적합한 프라이머쌍을 이용하여 FFPE(formalin fixed paraffin embedded) 시료로부터 얻어진 게놈 DNA에 대한 PCR 분석을 실시하였다. PCR 산물이 아가로오스 겔에 전기영동되고 네스티드(nested) 프라이머를 이용하여 시퀀싱되었다.

30

RhoA 활성 어세이

GTP-로딩된 RhoA의 양은 제조자의 지시에 따라 풀-다운(pull down) 기반된 RhoA 활성화 어세이 키트(Cytoskeleton, Denver, CO)로 측정하였다. Jurkat 세포는 트랜스펙션(transfection)하고 48시간 동안 유지시킨 후, 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에서 배양하였다. 이후, 상기 세포는

5 냉장(ice cold) PBS로 세척하고 용해 완충액에 재현탁시켰다. 세포 용해물을 1.5 ml의 냉장 원심분리 튜브에 옮긴 후, 4℃에서 10,000 x g로 1분 동안 원심분리시켰다. 단백질 농도는 단백질 어세이 키트(Precision Red advance protein assay; Cytoskeleton, Denver, CO)를 이용하여 결정하였으며, 약 200-300 µg의 단백질이 처방전(prescription) 당 RhoA

10 활성화 어세이에 이용되었다. 세포 용해물에서 GTP-결합 RhoA 단백질은 로테킨(rhotekin)-RBD(Rho binding domain) 글루타티온 친화성 비드와 로테이터(rotator) 상에서 4℃에서 반응시킴으로써 정제되었다. 세포 용해물 내 활성 GTP-결합된 RhoA 단백질은 비드와 결합하는 반면에, 비활성 GDP-결합된 RhoA는 세척 단계를 통해 제거되었다. 비드 펠렛(bead

15 pellets)들을 침전시켜 수득하여 램리 완충액(Laemmli buffer)에 재현탁시킨 후, SDS-PAGE하여 항-RhoA 및 항-HA 항체들을 이용하여 면역블랏팅하였다.

세포 증식 어세이

20 트랜스펙션하고 48시간 후, 세포들은 96-웰 플레이트에 5×10^3 세포/웰의 밀도로 10% FBS 및 항생제를 포함하는 100 µl RPMI 1640 배지에 세 쌍으로(triplicate) 분주하였다. 플레이트 후, 세포들은 습도-유지된 챔버에서 37℃로 배양하였다. 세포 증식은 제조자의 지시에 따라 24시간

25 마다 4일 연속으로 세포 카운팅 키트-8(cell Counting Kit-8; Dojindo)로 조사하였으며, 각 웰의 흡광도(absorbance value)는 마이크로플레이트 판독기(Spectra Max 180, Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

인 비트로 침윤(invasion) 어세이

30 세포 침윤 어세이는 제조자의 지시에 따라 재-수화 후 기저막(basement membrane) 매트릭셀로 전-코팅된 Bio-Coat cell invasion

- chambers(BectonDickinson; 8 μ m 동공 크기)를 이용하여 실시하였다. 트랜스펙션된 Jurkat 세포는 혈청-결핍 배지에 3×10^5 세포/ml의 밀도로 각 인서트(위쪽 챔버)에 로딩시켰다. 아래쪽 구획(compartments)은 10% FBS를 포함하는 750 μ l 배지로 채웠다. 24시간 배양 후, 침윤된
- 5 세포들은 혈구계산기(hemocytometer)로 카운팅하여 정량하였다. 각 실험들은 세 번에 걸쳐서 반복하였다. 침윤은 세포 카운팅으로 결정하고 다음 식을 이용하여 계산하였다: 세포 침윤(%) = 아래쪽 N/(아래쪽 N + 위쪽 N) $\times$ 100, 상기 N은 각 구획 내 세포수의 평균값을 의미한다.

10

실험결과

림프종 환자(angioimmunoblastic T-cell lymphoma, AITL) 시료를 이용한 전체 엑솜(exome) 시퀀싱 및 RNA-시퀀스 분석

- 15 림프종(AITL)의 발암 기전을 규명하고 항암제 내성 치료 타겟을 개발하기 위해, 본 발명자들은 AITL 환자들의 시료를 이용하여 전체 엑솜 시퀀싱 및 RNA-시퀀스를 실시하여 돌연변이 유전자 프로파일을 조사하였다.
- 림프종 환자와 대조군(예를 들어, 정상인)으로부터 얻어진 혈액 시료를 템플레이트로 사용하여 엑솜(Exome) + RNA-시퀀스(5명), 엑솜
- 20 시퀀싱(2명) 및 RNA-시퀀스(4명)을 통해 유전자 돌연변이를 분석하였다(도 1). 도 1에서 볼 수 있듯이, RhoA, TET2, CD28 등의 유전자에서 염기가 치환된 돌연변이가 발견되었다. 이들 중, RhoA 유전자의 돌연변이 위치는 RhoA CDS(coding sequence; 서열목록 제1서열GenBank Accession Number: AF498970.1)에서 50번째 뉴클레오타이드인 G가 T로 바뀐 돌연변이로,
- 25 서열목록 제2서열의 RhoA 아미노산 서열(GenBank Accession Number: AAM21117.1)에서 17번째 글라이신(GGA)이 발린(GTA)으로 치환되었다.

림프종 환자 시료에서 RhoA 돌연변이 검출

- 상술한 엑솜 시퀀싱 및 RNA 시퀀싱을 통해 발견된 RhoA 돌연변이는
- 30 삼성서울병원에 수집되어 있는 파라핀 블록 환자 시료를 이용하여 확인하였다. PCR 방법을 통해 게놈(genomic) DNA를 증폭시킨 후 Sanger

시퀀싱을 이용해 RhoA의 돌연변이 위치를 확인하였다.

【표 1】

27명의 AITL 환자에서 검출된 RhoA G17V 돌연변이.

5

야생형		17/27	63.0%
RhoA G17V 돌연변이	A	10/27	37.0%
	A/C		
	A/c		
	C/a		
합		27	100%

상기 표 1에서 확인할 수 있듯이, 27명의 AITL 환자 시료를
 템플레이트로 PCR을 실시한 결과 10명의 환자 시료(37.0%)에서 RhoA G17V
 돌연변이가 검출되었다. RhoA G17V 돌연변이가 검출된 10명의 환자
 10 시료들은 뉴클레오타이드가 완전히 뒤바뀐 경우 뿐 아니라, 부분적으로
 변이되어 야생형과 함께 검출되는 경우도 존재하였다(도 2).

다른 종류의 림프종 환자 시료에서 RhoA 돌연변이 검출

RhoA G17V 돌연변이가 AITL에 특이적인 것인지 여부를 조사하기 위해,
 15 본 발명자들은 다른 종류의 림프종에서도 상기 돌연변이를 확인하였다.

【표 2】

다른 종류의 림프종 환자들에서의 RhoA G17V 돌연변이 확인.

림프종		AITL		PTCL		NK/T	
야생형		17/27	63.0%	12/13	92.3%	17/20	85.0%
RhoA G17V 돌연변이	A	10/27	37.0%	1/13	7.6%	3/20	15.0%
	A/C						
	A/c						
	C/a						
합		27	100%	13	100%	20	100%

상기 표 2에 나타난 바와 같이, PCTL 시료에서 13개 중 1개(7.6%), NK/T 시료에서 20개 중 3개(15.0%)에서 동일한 위치에서의 RhoA 돌연변이가 검출되었는데, 이는 RhoA G17V 돌연변이가 T-세포-유래된 림프종에서 발견된다는 것을 의미한다.

5

RhoA G17V 돌연변이에 따른 RhoA 활성 변화

RhoA는 Ras 패밀리에 속하는 단백질로 GTPase 활성을 가지며 세포 증식과 연관되어 있다. 이에, 본 발명자들은 G17V 돌연변이된 RhoA의 GTPase 활성을 RhoA 활성 어세이(RTK 폴-다운 어세이) 방법으로
10 조사하였다(도 3). 야생형 RhoA와 지속적으로 활성화되어 있는 형태인 RhoA G14V 돌연변이는 높은 GTPase 활성을 보이지만, RhoA G17V 돌연변이는 GTPase 활성을 전혀 나타내지 않았다. 따라서, RhoA G17V 돌연변이는 GTPase 활성을 억제시키는 돌연변이이다.

15 *세포 증식 상의 RhoA G17V 돌연변이의 효과*

세포 증식에 대한 RhoA G17V 돌연변이의 효과를 조사하기 위해, 본 발명자들은 RhoA siRNA를 사용하여 내인성(endogenous) RhoA를 제거시키고 야생형 RhoA 또는 RhoA G17V 돌연변이체를 각각 Jurkat 세포에 트랜스펙션시켜 세포 증식 효과를 비교하였다. RhoA 활성이 없는 G17V 및
20 T19N 돌연변이체는 야생형 및 G14V 돌연변이체와 비교하여 세포 증식률이 현저하게 증가하였다(도 4). 따라서, RhoA 활성이 낮을수록 세포 증식률이 증가하고 RhoA G17V 돌연변이가 세포 증식을 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

25 *세포 침윤에 대한 RhoA G17V 돌연변이의 효과*

RhoA G17V 돌연변이가 세포 침윤(invasion)에 미치는 영향을 조사하기 위해, 본 발명자들은 RhoA siRNA를 사용하여 내인성 RhoA를 제거시키고 야생형 RhoA 또는 RhoA G17V 돌연변이체를 각각 Jurkat 세포에 트랜스펙션시켜 세포 침윤성(invasiveness)을 비교하였다(도 5). RhoA
30 활성이 없는 G17V 및 T19N 돌연변이체는 야생형 및 G14V 돌연변이체와 비교하여 세포 침윤성이 매우 높았는데, 이는 RhoA 활성이 낮을수록 세포

침윤성이 증가하고 RhoA G17V 돌연변이가 세포 침윤성의 증대를 유발한다는 것을 의미한다.

5 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 어떤 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명 의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

10 참조문헌

1. Koboldt, D. C., et al. (2012). "VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing." Genome research 22(3): 568-576.
2. Li, H. and R. Durbin (2010). Fast and accurate long-read alignment with BurrowsWheeler transform. Bioinformatics. 26: 589-595.
3. McKenna, A., et al. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome research. 20: 1297-1303.
4. Reva, B., et al. (2007). Determinants of protein function revealed by combinatorial entropy optimization. Genome biology. 8: 1-15.
5. Trapnell, C., et al. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics. 25: 1105-1111.
6. Wang, K., et al. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. Nucleic acids research. 38: e164-e164.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열목록 제1서열인 RhoA(Ras homolog gene family, member A) 유전자의 50번째 뉴클레오타이드의 G에서 T로의 치환을 포함하는 10-
 5 100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 종양 질환 진단용 키트.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 서열목록 제1서열인 RhoA 유전자의 50번째
 10 뉴클레오타이드의 G에서 T로의 치환을 가진 대상(subject)은 혈액 종양의 위험도가 37% 이상인 것을 특징으로 하는 종양 질환 진단용 키트.

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 종양 질환은
 15 혈액종양(hematological tumors)인 것을 특징으로 하는 종양 질환 진단용 키트.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 혈액 종양은 T-세포 유래된 림프종 또는
 20 백혈병인 것을 특징으로 하는 종양 질환 진단용 키트.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 T-세포 유래된 림프종 또는 백혈병은
 AITL(angioimmunoblastic T-cell lymphoma), PTCL(panniculitis-like T-
 25 cell lymphoma), NK/T(NK-T cell lymphoma), 림프아세포
 림프종(lymphoblastic lymphomas), 말초(peripheral) T-세포 림프종, 피부
 T-세포 림프종(cutaneous T cell lymphoma), T-세포 타입 역형성 대세포
 림프종(anaplastic large cell lymphoma, T-cell type; ALCL), 장변변 T-
 세포 림프종(enteropathy-type T cell lymphoma), HTLV-1(Human T-
 30 lymphotropic virus-1)-연관된 ATL(Adult T-cell leukemia/lymphoma), T-
 세포 전림프구성 백혈병(T-cell prolymphocytic leukemia), T-세포

전림프구성 백혈병(T-cell granular lymphocytic leukemia) 또는 공격성 NK-세포 백혈병(aggressive NK-cell leukemia)인 것을 특징으로 하는 종양 질환 진단용 키트.

5 **【청구항 6】**

서열목록 제2서열인 RhoA(Ras homolog gene family, member A)의 아미노산 서열의 17번째 아미노산이 Gly에서 Val로 치환된 변이형 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 종양 질환 진단용 키트.

10

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 변이형 아미노산 서열을 가진 대상(subject)은 혈액 종양의 위험도가 37% 이상인 것을 특징으로 하는 종양 질환 진단용 키트.

15

【청구항 8】

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 종양 질환은 혈액종양(hematological tumors)인 것을 특징으로 하는 종양 질환 진단용 키트.

20

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 혈액 종양은 T-세포 유래된 림프종 또는 백혈병인 것을 특징으로 하는 종양 질환 진단용 키트.

25 **【청구항 10】**

제 9 항에 있어서, 상기 T-세포 유래된 림프종 또는 백혈병은 AITL(angioimmunoblastic T-cell lymphoma), PTCL(panniculitis-like T-cell lymphoma), NK/T(NK-T cell lymphoma), 림프아세포 림프종(lymphoblastic lymphomas), 말초(peripheral) T-세포 림프종, 피부 T-세포 림프종(cutaneous T cell lymphoma), T-세포 타입 역형성 대세포 림프종(anaplastic large cell lymphoma, T-cell type; ALCL), 장변변 T-

30

- 세포 림프종(enteropathy-type T cell lymphoma), HTLV-1(Human T-lymphotropic virus-1)-연관된 ATL(Adult T-cell leukemia/lymphoma), T-세포 전림프구성 백혈병(T-cell prolymphocytic leukemia), T-세포 전림프구성 백혈병(T-cell granular lymphocytic leukemia) 또는 공격성
- 5 NK-세포 백혈병(aggressive NK-cell leukemia)인 것을 특징으로 하는 종양 질환 진단용 키트.

【청구항 11】

다음의 단계를 포함하는 종양 질환의 검출 방법:

- 10 (a) 대상(subject)의 생물학적 시료(sample)로부터 핵산 분자를 분리하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)의 핵산분자에서 서열목록 제1서열의 RhoA(Ras homolog gene family, member A) 유전자의 50번째 뉴클레오타이드를 확인하는 단계로, 상기 50번째 뉴클레오타이드가 G에서 T로 치환된 경우
- 15 상기 대상은 종양 질환을 가지는 것으로 판단되는 것을 특징으로 하는 종양 질환의 검출 방법.

【청구항 12】

- 제 11 항에 있어서, 상기 대상의 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 조직, 세포, 림프, 골수액, 타액, 안구액, 정액, 뇌 추출물, 척수액, 관절액, 흉선액, 복수액, 양막액, 세포 조직액 또는 세포 배양액인 것을
- 20 특징으로 하는 종양 질환의 검출 방법.

【청구항 13】

- 25 제 11 항에 있어서, 상기 종양 질환은 혈액 종양인 것을 특징으로 하는 종양질환의 검출 방법.

【청구항 14】

- 제 11 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 단일 뉴클레오타이드 다형성 뉴클레오타이드의 검출 빈도는 37% 이상인 것을 특징으로 하는 종양 질환의
- 30 검출 방법.

【청구항 15】

제 11 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 유전자 증폭 또는
마이크로어레이를 통해 실시하는 것을 특징으로 하는 종양 질환의 검출
5 방법

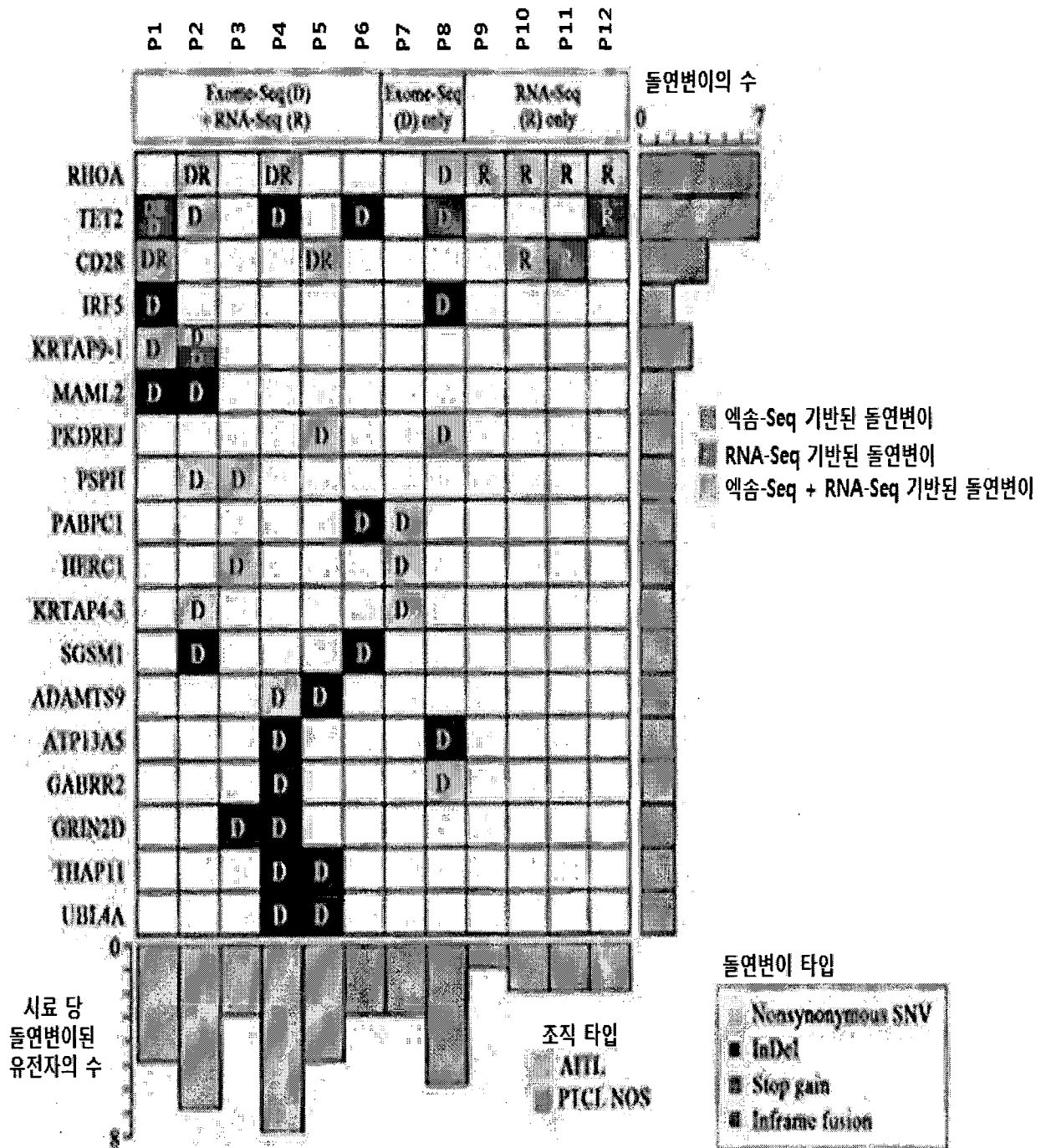
【청구항 16】

서열목록 제1서열인 RhoA(Ras homolog gene family, member A)
유전자의 50번째 뉴클레오타이드가 G에서 T로 치환된 변이형
10 뉴클레오타이드 서열.

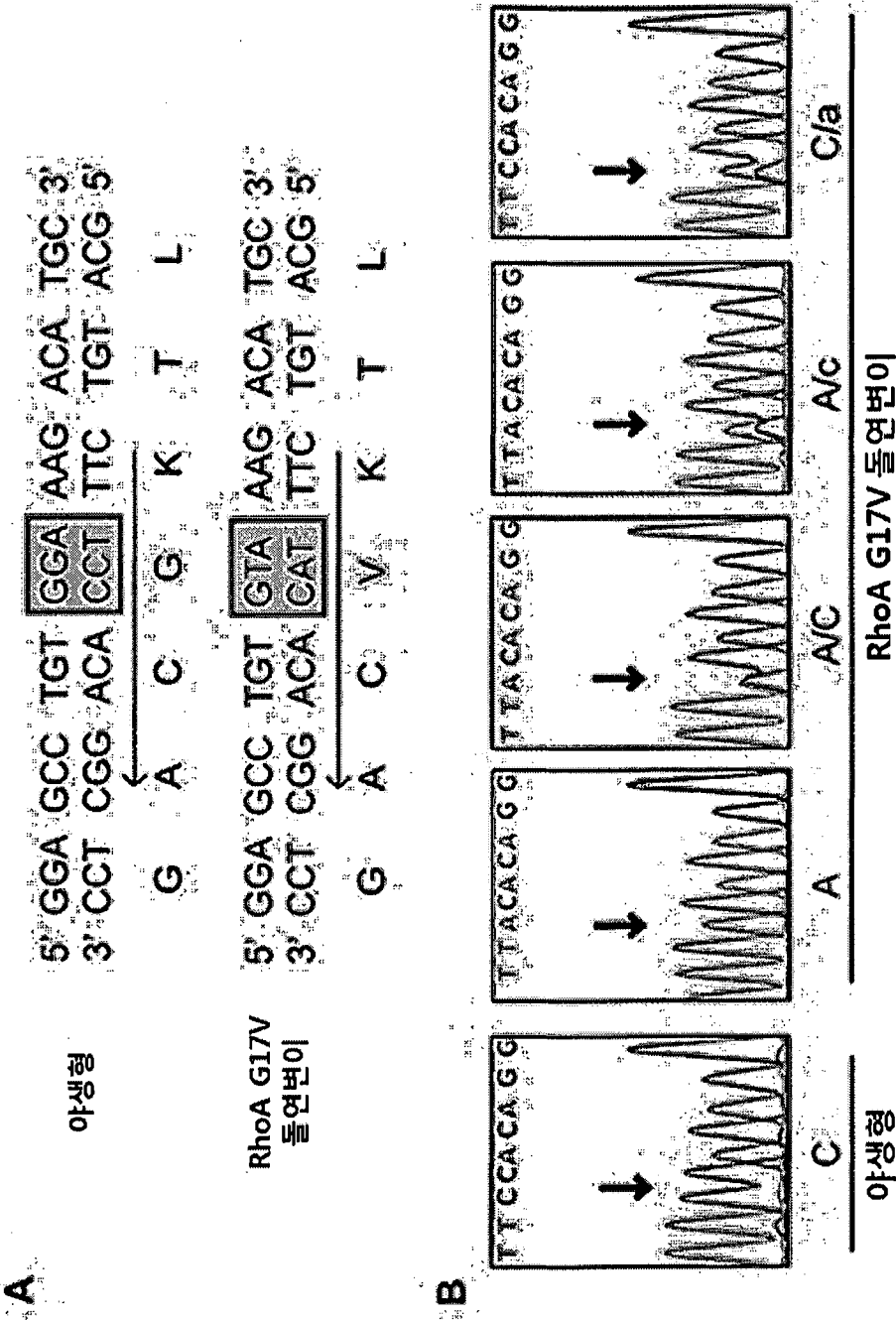
【청구항 17】

서열목록 제2서열인 RhoA(Ras homolog gene family, member A)
단백질의 아미노산 서열의 17번째 아미노산이 Gly에서 Val로 치환된 변이형
15 아미노산 서열.

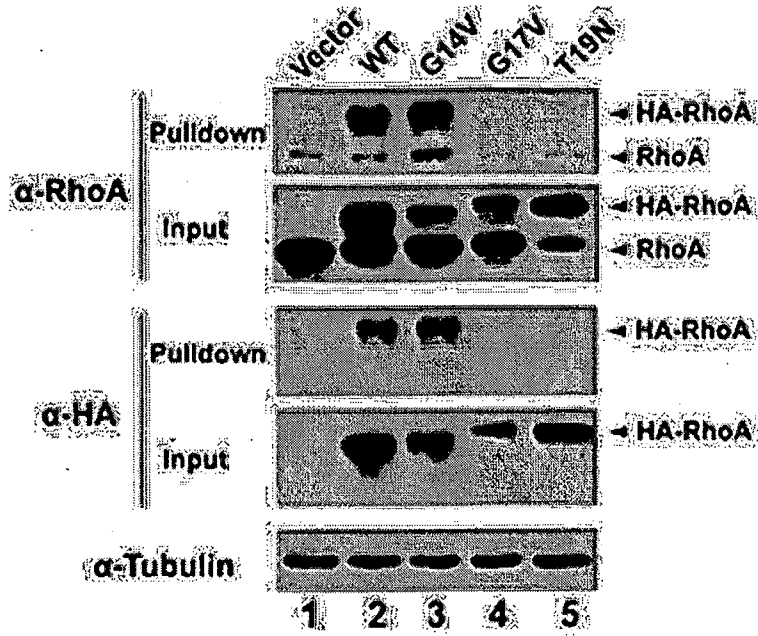
도 1



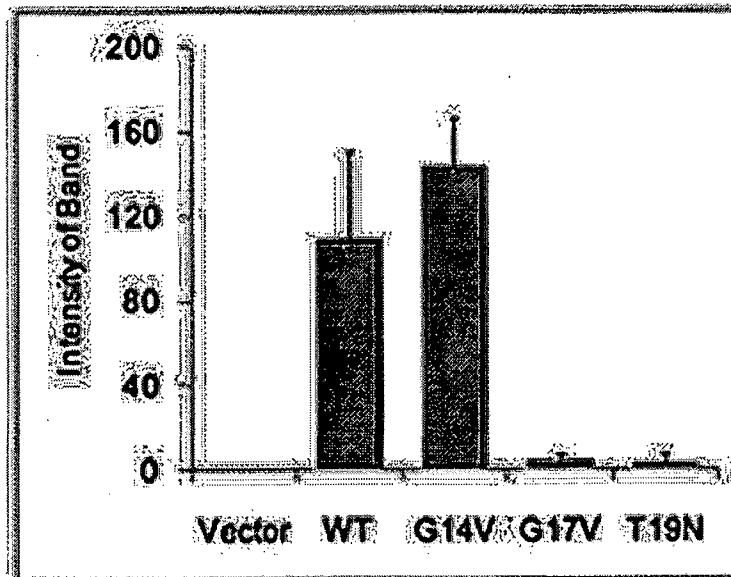
도 2



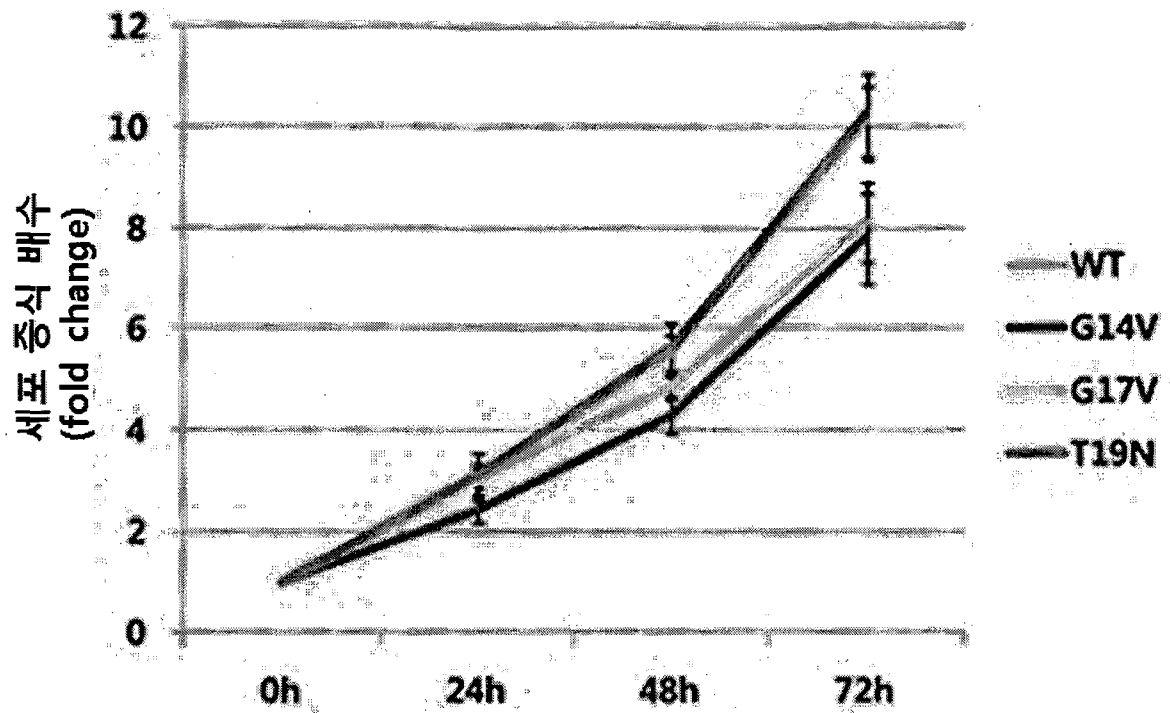
도 3a



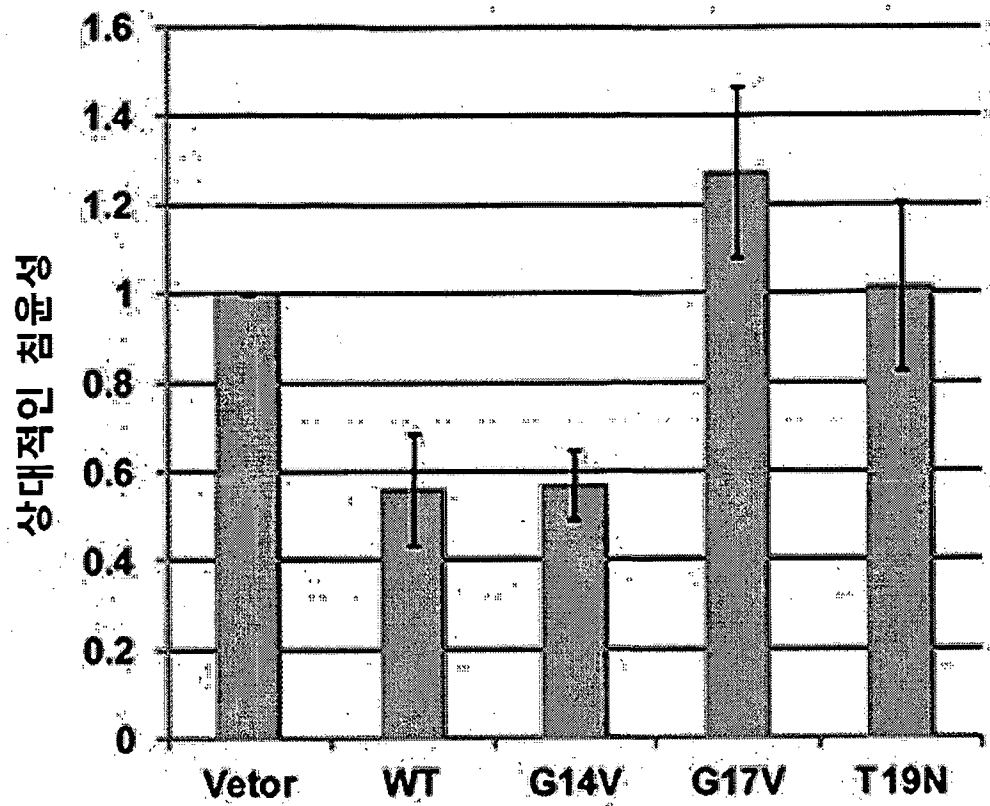
도 3b



도 4



도 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/007491**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, G01N 33/574(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; A61K 31/7105; C12N 15/113; A61K 48/00; G01N 33/574

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), Google Scholar Search, NCBI PubMed & Blast: RhoA, Single Nucleotide Polymorphism(SNP), G17V, cancer(cancer), tumor(tumor), diagnosis(diagnosis) etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Morgan, A. R. et al., "Association analysis of 3p21 with Crohn's disease in a New Zealand population" Hum. Immunol., vol. 71, no. 6, pp. 602-609 (June 2010) - See the entire main text. Especially abstract; table 2.	1-17
A	Karlsson, R. et al., "Rho GTPase function in tumorigenesis" Biochim. Biophys. Acta., vol. 1796, issue 2, pp. 91-98 (December 2009) - See the entire main text. Especially table 1; page 94.	1-17
A	KR 10-2013-0028966 A (QUARK PHARMACEUTICALS, INC.) 20 March 2013 - See the entire main text.	1-17
A	WO 2004-108142 A2 (THE VICTORIA UNIVERSITY OF MANCHESTER) 16 December 2004 - See the entire main text.	1-17
PX	Yoo, H. Y. et al., "A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma" Nat. Genet., vol. 46, no. 4, pp. 371-375 (April 2014) - See the entire main text.	1-17



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

24 NOVEMBER 2014 (24.11.2014)

Date of mailing of the international search report

25 NOVEMBER 2014 (25.11.2014)

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/007491

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0028966 A	20/03/2013	CA 2801928 A1	29/12/2011
		CN103097534 A	08/05/2013
		EP 2585594 A1	01/05/2013
		JP 2013-537404A	03/10/2013
		US 2013-0137750 A1	30/05/2013
		WO 2011-163436 A1	29/12/2011
WO 2004-108142 A2	16/12/2004	WO 2004-108142 A3	21/04/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/68; A61K 31/7105; C12N 15/113; A61K 48/00; G01N 33/574 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), 구글학술검색, NCBI PubMed & Blast: RhoA, 단일염기다형성(SNP), G17V, 암(cancer), 종양(tumor), 진단(diagnosis) 등		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	Morgan, A. R. 외, `Association analysis of 3p21 with Crohn's disease in a New Zealand population` Hum. Immunol., Vol. 71, No. 6, pp. 602-609 (2010.06.) - 본문 전체 참조. 특히 초록; 표2	1-17
A	Karlsson, R. 외, `Rho GTPase function in tumorigenesis` Biochim. Biophys. Acta., Vol. 1796, Issue 2, pp. 91-98 (2009.12.) - 본문 전체 참조. 특히 표1; 제94면	1-17
A	KR 10-2013-0028966 A (쿠아크 파마수티칼스 인코퍼레이티드) 2013.03.20 - 본문 전체 참조.	1-17
A	WO 2004-108142 A2 (THE VICTORIA UNIVERSITY OF MANCHESTER) 2004.12.16 - 본문 전체 참조.	1-17
PX	Yoo, H. Y. 외, `A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma` Nat. Genet., Vol. 46, No. 4, pp. 371-375 (2014.04.) - 본문 전체 참조.	1-17
☐ 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 "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 2014년 11월 24일 (24.11.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 11월 25일 (25.11.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 윤준호 전화번호 +82-42-481-3350 

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/007491

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0028966 A	2013/03/20	CA 2801928 A1 CN103097534 A EP 2585594 A1 JP 2013-537404A US 2013-0137750 A1 WO 2011-163436 A1	2011/12/29 2013/05/08 2013/05/01 2013/10/03 2013/05/30 2011/12/29
WO 2004-108142 A2	2004/12/16	WO 2004-108142 A3	2005/04/21