

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 2월 25일 (25.02.2021) WIPO | PCT



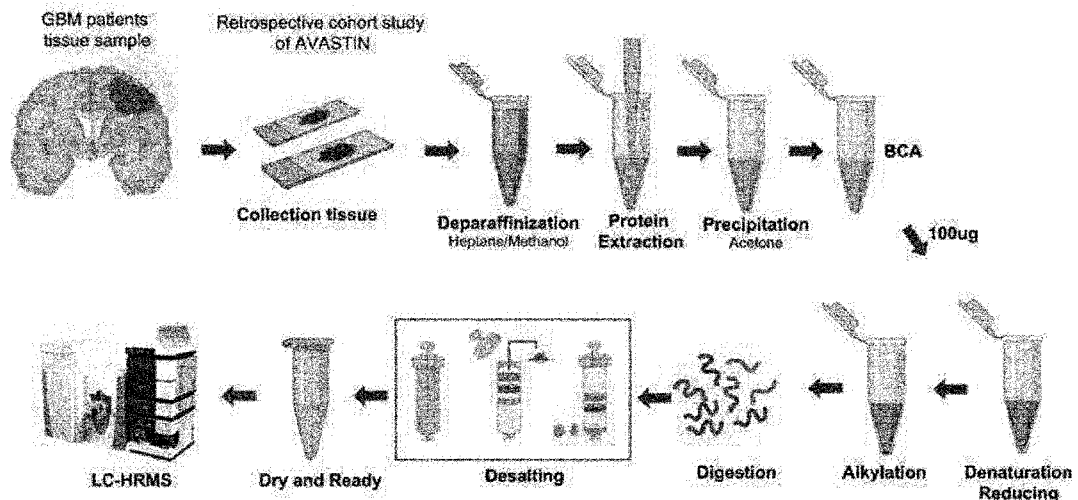
(10) 국제공개번호
WO 2021/034091 A1

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/68* (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/011011
- (22) 국제출원일: 2020년 8월 19일 (19.08.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0101010 2019년 8월 19일 (19.08.2019) 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).
- (72) 발명자: 이승주 (LEE, Seungjoo); 05535 서울시 송파구 강동대로 13, Seoul (KR). 김경곤 (KIM, Kyung Gon); 05507 서울시 송파구 올림픽로 435, 113동 3401호, Seoul (KR). 김정훈 (KIM, Jeong-Hoon); 05119 서울시 광진구 광나루로56길 29, 5동 2901호, Seoul (KR). 이은엽 (LEE, Eun Yeup); 61170 광주광역시 북구 동문대로191번길 8, 3층, Gwangju (KR). 전한울 (JEON, Hanwool); 61107 광주광역시 북구 비엔날레로 112-5, 103동 1602호, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층, 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, KR,

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING GLIOBLASTOMA

(54) 발명의 명칭: 교모세포종의 진단 방법

Sample preparation for proteomics by LC-HRMS



(57) Abstract: The present invention relates to a method for diagnosing or predicting the prognosis of glioblastoma. The present inventors have confirmed that there is a close correlation between the expression of a large number of specific proteins in the tissue of patients with glioblastoma, which is a malignant glioma, and predictions of the onset and prognosis of glioblastoma, and it is expected that confirming the expression level of said proteins or mRNA thereof can provide useful information for treating and predicting the prognosis of glioblastoma.

(57) 요약서: 본 발명은 교모세포종의 진단 또는 예후 예측 방법 등에 관한 것으로, 본 발명자들은 악성신경교종인 교모세포종 환자의 조직에서 다수의 특정 단백질의 발현과 교모세포종의 발병 및 예후 예측 사이에 밀접한 상관관계가 있음을 확인하였는 바, 해당 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 확인함으로써 교모세포종의 치료와 예후 예측에 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/034091 A1

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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 교모세포종의 진단 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 교모세포종의 진단 또는 예후 예측 방법 등에 관한 것이다.
- [2] 본 출원은 2019년 8월 19일에 출원된 한국특허출원 제10-2019-0101010호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

[3]

배경기술

- [4] 신경교종(glioma)은 원발성 뇌종양(primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서, 발생빈도가 높고 치료가 어려워서, 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 악성 종양이다. 그중에서도 가장 악성으로 분류되고 있는 교모세포종(glioblastoma, GBM)의 경우, 다른 암과 비교하였을 때 방사선 및 항암제 치료에 대한 저항성이 매우 높아 일단 진단되면 기대 생존기간이 단 1년에 불과하다. 또한 이와 같은 뇌종양의 경우, 뇌혈관장벽이 있어 치료를 위한 약물의 전달이 쉽지 않다. 특히 상대적으로 뇌신경 생물학에 대한 이해가 부족하여 그에 대한 치료제 개발이 더디게 진행되고 있다. 더욱이, 교모세포종은 다른 뇌종양과 비교해볼 때 공격적 변이(aggressive variant)를 나타내어, 이를 빠른 시일 내에 치료하지 않으면 몇 주 이내에 치명적인 결과를 초래할 수 있다.
- [5] 기존의 뇌종양 환자들의 예후를 판별하는 방법으로는 임상치료의 경과, 방사선 요법 및 화학요법의 경과들을 종합하고, 뇌종양의 악성도와 위치, 연령 등을 고려하여 재발 가능성을 비롯한 생존 예후를 결정하는 것이 일반적인 방법이었으나, 이는 환자의 유형마다 다양한 차이가 존재하며, 임상적 치료에 대한 결과도 달라지므로 정확한 예후 예측방법이라고 할 수 없다. 따라서 악성 뇌종양을 진단하고, 예후를 예측할 수 있는 새로운 진단 및 치료 표적으로서의 바이오 마커 개발의 필요성이 대두되고 있다.
- [6] 한편, 교모세포종은 치료가 어려운 대표적 난치암으로, 교모세포종에 대한 일차치료는 수술 이후에 항암-방사선 치료를 동시에 진행한다. 수술, 항암-방사선 치료 이후에 재발한 경우에는 치료 옵션이 거의 없고 항혈관 치료(anti-angiogenic therapy, 베바시주맵 이용)를 한다. 앞서 언급한 재발성 교모세포종 이외에도 수술적 치료가 어려운 경우에는 베바시주맵 치료를 이용하고 있다.
- [7] 베바시주맵 치료의 문제는 어떤 환자에게는 효과가 있을 수 있으나 특정 환자에게는 전혀 효과가 없어, 치료의 반응이 일관성이 없다는 것이다. 이를 사전에 알 수 없기 때문에 고가(800~1000만원/월)의 약제를 임의로 사용하고 있는 실정이나, 항혈관치료의 효과가 있는 환자에서는 항-종양 효과는 탁월하다.

따라서, 효율적인 항혈관치료를 위해서는 항혈관치료 반응을 예측할 수 있는 바이오마커 개발이 필요한 실정이다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 목적은 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.

[10] 생물학적 시료를 수득하는 단계; 및

[11] 상기 수득된 시료에서 STING(Stimulator of interferon genes), CALU(Calumenin), SEPT5(Septin5), CD99, CIT(Citron Rho-interacting kinase), PXMP4(Peroxisomal membrane protein 4), Nectin-2, ALG3(Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase), DLL3(Delta-like protein 3), Noelin-2, TNS1(Tensin-1), CAV1(Caveolin-1), FCN2(Ficolin-2), KIFC1(Kinesin Family Member C1), HIDE1(Highly expressed in immature dendritic cell transcript 1), CLEC2B(C-type lectin domain family 2 member B), CD207(C-type Lectin Domain Family 4 Member K) 및 CLEC12A(C-type lectin domain family 12 member A)으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계.

[12] 본 발명의 다른 목적은 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 환자의 예후 예측을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.

[13] 교모세포종 환자의 생물학적 시료를 수득하는 단계; 및

[14] 상기 수득된 시료에서 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는, 교모세포종 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물 및 지시서를 포함하는 교모세포종 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[18] 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;

[19] STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진

균으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계; 및

[20] 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 상기 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량에 차이가 있는 시험물질을 선별하는 단계.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 STING(Stimulator of interferon genes) 유전자가 결손된 교모세포종 동물 모델을 제공하는 것이다.

[22]

[23] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[24]

과제 해결 수단

[25] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[26] 생물학적 시료를 획득하는 단계;

[27] 상기 획득된 시료에서 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 균으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계; 및

[28] A) STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4 및 Nectin-2로 이루어진 균으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 낮은 경우 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정하는 단계; 또는

[29] B) ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 균으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 높은 경우 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정하는 단계.

[30] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 단백질 발현량 측정은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS 및 단백질칩으로 이루어진 균으로부터 하나 이상 선택된 방법으로 측정될 수 있다.

[31] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 mRNA 발현량 측정은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 사우던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법 및 DNA 칩으로 이루어진 균으로부터 하나 이상 선택된 방법으로 측정될 수 있다.

- [32] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 관절낭액, 양수, 복수, 자궁경부 분비물, 질 분비물, 소변 및 뇌척수액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 조직일 수 있다.
- [33] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 조직은 포르말린 고정 파라핀 포매(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 시료일 수 있다.
- [34] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 대조군은 교모세포종에 걸리지 않은 정상인일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [35] 또한, 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 진단방법을 제공한다.
- [36] 생물학적 시료를 수득하는 단계;
- [37] 상기 수득된 시료에서 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계; 및
- [38] A) STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4 및 Nectin-2로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 낮은 경우 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정하는 단계; 또는
- [39] B) ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 높은 경우 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정하는 단계.
- [40] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 환자의 예후 예측을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [41] 교모세포종 환자의 생물학적 시료를 수득하는 단계; 및
- [42] 생물학적 시료에서 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계.
- [43] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 예후 예측은 혈관신생억제제 치료에 대한 예후 예측일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [44] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 혈관신생억제제는 베바시주맙일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [45] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 방법은 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4 및 Nectin-2로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 제1 대조군과 비교하여 높은 경우, 예후가 좋을 것으로 판정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서, 상기 제1 대조군은 정상인 또는 치료 비반응군일 수 있다.

- [46] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 방법은 ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 제2 대조군과 비교하여 높은 경우, 예후가 나쁠 것으로 판정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서, 상기 제2 대조군은 정상인 또는 치료 반응군일 수 있다.
- [47] 또한, 본 발명은 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는, 교모세포종 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [48] 또한, 본 발명은 상기 조성물 및 지시서를 포함하는, 교모세포종 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [49] 또한, 본 발명은 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 제제의 교모세포종 진단 또는 예후 예측을 위한 용도를 제공한다.
- [50] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [51] 세포 또는 동물 모델에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- [52] STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계; 및
- [53] 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 상기 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량에 차이가 있는 시험물질을 선별하는 단계.
- [54] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 시험물질을 선별하는 단계는 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4 및 Nectin-2로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 높은 경우, 치료 후보물질로 판정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [55] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 시험물질을 선별하는 단계는 ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 낮은 경우, 치료 후보물질로 판정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [56] 또한, 본 발명은 STING(Stimulator of interferon genes) 유전자가 결손된 교모세포종 동물 모델을 제공한다.

[57] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 동물 모델은 교모세포종 치료제 스크리닝용일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[58]

발명의 효과

[59] 본 발명자들은 악성신경교종인 교모세포종 환자의 조직에서 다수의 특정 단백질의 발현과 교모세포종의 발병 및 예후 예측 사이에 밀접한 상관관계가 있음을 확인하였는 바, 해당 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 확인함으로써 교모세포종의 치료와 예후 예측에 유용한 정보를 제공할 수 있다.

[60]

도면의 간단한 설명

[61] 도 1은 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자에서 발현되는 증가된 단백질 및 감소된 단백질을 나타낸 결과이다.

[62] 도 2는 파라핀 절편에서 단백질을 추출하는 과정을 나타낸 것이다.

[63] 도 3은 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 반응군에서 STING의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[64] 도 4는 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 반응군에서 Calumenin(CALU)의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[65] 도 5는 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 반응군에서 Septin-5(SEPT5)의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[66] 도 6은 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 반응군에서 CD99의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[67] 도 7은 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 반응군에서 Citron Rho-interacting kinase(CIT)의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[68] 도 8은 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 반응군에서 Peroxisomal membrane protein 4(PXMP4)의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[69] 도 9는 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 반응군에서 Nectin-2의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[70] 도 10은 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 비반응군에서 ALG3(Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase)의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[71] 도 11은 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 비반응군에서 Delta-like protein 3(DLL3)의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[72] 도 12는 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 비반응군에서 Noelin-2의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[73] 도 13은 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 비반응군에서 Tensin-1(TNS1)의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[74] 도 14는 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 비반응군에서

Caveolin-1(CAV1)의 발현량을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

- [75] 도 15는 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 비반응군에서 Ficolin-2(FCN2)의 발현량을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- [76] 도 16은 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 비반응군에서 KIFC1의 발현량을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- [77] 도 17은 혈관신생억제제를 투여한 교모세포종 환자 비반응군에서 HIDE1의 발현량을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- [78] 도 18은 교모세포종 환자의 예후에 따른 CLEC2B(C-type lectin domain family 2 member B)의 발현량을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- [79] 도 19는 교모세포종 환자의 예후에 따른 CD207(C-type lectin domain family)의 발현량을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- [80] 도 20은 교모세포종 환자의 예후에 따른 CLEC12A(C-type lectin domain family 12 member A)의 발현량을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- [81] 도 21은 교모세포종 환자의 FFPE 조직을 면역염색하여, STING 단백질의 발현 위치 및 발현 양상을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [82] 도 22는 교모세포종 환자의 FFPE 조직을 면역염색하여, ALG3 단백질의 발현 위치 및 발현 양상을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [83] 도 23은 교모세포종 환자의 STING 및 ALG3 발현 정도에 따른 생존율(overall survival rate) 및 무증상 생존율(progression free survival)을 나타낸 것이다.
- [84] 도 24는 STING 유전자를 결손시킨 마우스에서 종양 성장속도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[85]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [86] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[87]

- [88] 본 명세서에서, 'mRNA(messenger RNA 또는 전령 RNA)'는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자의 염기서열의 유전 정보를 리보솜(ribosome)으로 전달하여 폴리펩티드 합성(단백질 번역, translation)의 청사진 역할을 하는 RNA이다. 유전자를 주형(template)으로 하여 단일 가닥의 mRNA가 전사(transcription) 과정을 통하여 합성된다.

- [89] 본 명세서에서, '단백질'은 '폴리펩타이드(polypeptide)' 또는 '펩타이드(peptide)'와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.

- [90] 본 명세서에 사용된 아미노산의 일문자(삼문자)는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다: A(Ala): 알라닌; C(Cys): 시스테인; D(Asp): 아스파르트산; E(Glu): 글루탐산; F(Phe): 페닐알라닌; G(Gly): 글라이신; H(His): 히스티딘; I(Ile): 이소류신; K(Lys): 라이신; L(Leu): 류신;

M(Met): 메티오닌; N(Asn): 아스파라진; O(Ply): 피롤라이신; P(Pro): 프롤린;
Q(Gln): 글루타민; R(Arg): 아르지닌; S(Ser): 세린; T(Thr): 쓰레오닌;
U(Sec): 셀레노시스테인; V(Val): 발린; W(Trp): 트립토판; Y(Tyr): 타이로신.

- [91] 본 명세서에서, "상보적(complementary)"은 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건, 구체적으로는 생리학적 조건 하(세포 내)에서 핵산 분자 내 타겟팅 모이어티가 타겟(예컨대, 본 발명의 SNP)에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하는 것으로 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있으며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 보다 구체적으로는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [92] 본 명세서에서, 용어 "검출"은 목적하는 물질의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 같은 맥락에서, 본 발명에서 상기 단백질 또는 이의 mRNA의 발현수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것(즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 단백질 또는 이의 mRNA의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 상기 단백질 또는 이의 mRNA 존재 여부 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [93] 본 명세서에서, 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 모두 포함하는 개념이다. 본 명세서에서, 상기 진단은 바람직하게는 진단, 발병 예측 또는 예후 예측을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [94] 본 명세서에서, "발현(expression)"은 세포에서 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다.
- [95]
- [96] 먼저, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 진단을 위한 정보제공 방법 또는 교모세포종 환자의 예후 예측을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.
- [97] 생물학적 시료를 수득하는 단계; 및
- [98] 상기 수득된 시료에서 STING(Stimulator of interferon genes), CALU(Calumenin), SEPT5(Septin5), CD99, CIT(Citron Rho-interacting kinase), PXMP4(Peroxisomal membrane protein 4), Nectin-2, Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase, DLL3(Delta-like protein 3), Noelin-2, TNS1(Tensin-1), CAV1(Caveolin-1), FCN2(Ficolin-2), KIFC1(Kinesin Family

Member C1), HIDE1(Highly expressed in immature dendritic cell transcript 1), CLEC2B(C-type lectin domain family 2 member B), CD207(C-type Lectin Domain Family 4 Member K) 및 CLEC12A(C-type lectin domain family 12 member A)으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계.

- [99] 본 발명에서, STING은 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 STING은 서열번호 1로 표시되는 인간의 STING(UniProtKB/Swiss-Prot: Q86WV6.1) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [100] 본 발명에서, CALU는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 CALU는 서열번호 2로 표시되는 인간의 CALU(UniProtKB/Swiss-Prot: O43852.2) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [101] 본 발명에서, SEPT5는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 SEPT5는 서열번호 3으로 표시되는 인간의 SEPT5(UniProtKB/Swiss-Prot: Q99719.1) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [102] 본 발명에서, CD99는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 CD99는 서열번호 4로 표시되는 인간의 CD99(UniProtKB/Swiss-Prot: P14209.1) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [103] 본 발명에서, CIT는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 CIT는 서열번호 5로 표시되는 인간의 CIT(UniProtKB/Swiss-Prot: O14578.2) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [104] 본 발명에서, PXMP4는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 PXMP4는 서열번호 6으로 표시되는 인간의 PXMP4(UniProtKB/Swiss-Prot: Q9Y6I8.3) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [105] 본 발명에서, Nectin-2는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 Nectin-2는 서열번호 7로 표시되는 인간의 Nectin-2(UniProtKB/Swiss-Prot: Q92692.1) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [106] 본 발명에서, ALG3는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 ALG3는 서열번호 8로 표시되는 인간의 ALG3(UniProtKB/Swiss-Prot: Q92685.1) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 본 발명에서, DLL3는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는

인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 DLL3은 서열번호 9로 표시되는 인간의 DLL3(UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NYJ7.1) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [108] 본 발명에서, Noelin-2는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 Noelin-2은 서열번호 10으로 표시되는 인간의 Noelin-2(UniProtKB/Swiss-Prot: O95897.2) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [109] 본 발명에서, TNS1는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 TNS1은 서열번호 11로 표시되는 인간의 TNS1(UniProtKB/Swiss-Prot: Q9HBL0.2) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [110] 본 발명에서, CAV1는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 CAV1은 서열번호 12로 표시되는 인간의 CAV1(UniProtKB/Swiss-Prot: Q03135.4) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [111] 본 발명에서, FCN2는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 FCN2은 서열번호 13으로 표시되는 인간의 FCN2(UniProtKB/Swiss-Prot: Q15485.2) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [112] 본 발명에서, KIFC1는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 KIFC1은 서열번호 14로 표시되는 인간의 KIFC1(UniProtKB/Swiss-Prot: Q9BW19.2) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [113] 본 발명에서, HIDE1는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 HIDE1은 서열번호 15로 표시되는 인간의 HIDE1(UniProtKB/Swiss-Prot: A8MVS5.2) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [114] 본 발명에서, CLEC2B는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 CLEC2B는 서열번호 16로 표시되는 인간의 CLEC2B(UniProtKB/Swiss-Prot: Q92478.2) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [115] 본 발명에서, CD207는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 CD207은 서열번호 17로 표시되는 인간의 CD207(UniProtKB/Swiss-Prot: Q9UJ71.2) 아미노산 서열을 포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [116] 본 발명에서, CLEC12A는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 또한, 본 발명에서의 CLEC12A은 서열번호 18로 표시되는 인간의 CLEC12A(UniProtKB/Swiss-Prot: Q5QGZ9.3) 아미노산 서열을

포함하거나 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [117] 상기 생물학적 시료는 피검체에서 채취된 것이면 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 생검 등으로 얻어진 세포나 조직, 혈액, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 각종 분비물, 소변, 대변 등일 수 있다. 바람직하게는 생물학적 액체 시료(체액 시료)를 사용하는 것일 수 있으며, 일례로 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 관절낭액, 양수, 복수, 자궁경부 분비물, 질 분비물, 소변 및 뇌척수액을 사용하는 것일 수 있다. 본 발명은 교모세포종이 발생된 직접적 뇌 병변조직 외의 체액시료(일례로, 혈장)를 통해 진단이 가능하며, 진단의 효용성, 신속성, 편이성 및 안전성 등이 증가된다는 점에서 기술적 의의가 크다. 본 발명에서 상기 시료는 가장 바람직하게는 조직, 특히 뇌 조직일 수 있으며, 상기 조직은 포르말린 고정 파라핀 포매(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 시료일 수 있다. 상기 생물학적 시료는 유전자 시료일 수 있으며, 그 유전자 시료는 DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA를 포함한다.
- [118] 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데 예를 들어 환자로부터 수득한 혈청 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.
- [119] 상기 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다.
- [120] 상기 단백질 발현 수준 측정은 당업계에 공지된 단백질 발현 측정 방법에 의한 것이라면 측정 방법이 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [121] 상기 유전자 발현 수준 측정은 당업계에 공지된 유전자 발현 측정 방법에 의한 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 사우던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [122] 본 명세서에서, 상기 방법은 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4 및 Nectin-2로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 낮은 경우 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정하는 단계;를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서, 상기 대조군은 교모세포종에 걸리지 않은 정상인일 수 있다.
- [123] 본 명세서에서, 상기 방법은 ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A으로 이루어진 군으로부터 하나

이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 높은 경우 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정하는 단계;를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서, 상기 대조군은 교모세포종에 걸리지 않은 정상인일 수 있다.

- [124] 본 발명의 일 실시예에서는 STING 녹아웃 마우스 모델에서 교모세포종의 성장 속도가 증가함을 확인하였으며, High STING/Low ALG3 군의 생존율이 더 높음을 확인하였는 바, STING 단백질 또는 유전자 발현이 감소된 경우 및/또는 ALG3 단백질 또는 유전자 발현이 증가된 경우, 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정할 수 있을 것이다.
- [125] 본 명세서에서, “예후”는 질병을 진단하여 판단된 장래의 증세 또는 경과에 대한 전망을 말한다. 암 환자에 있어서 예후는 통상적으로 암 재발 또는 외과적 시술 후 일정기간 내의 전이 여부 또는 생존기간을 뜻한다. 예후의 예측(또는 예후의 진단)은 특히 교모세포종 환자의 화학치료 여부를 비롯하여 향후 교모세포종 치료의 방향에 대한 단서를 제시하므로 매우 중요한 임상적 과제이다. 예후 예측은 질환 치료제에 대한 환자의 반응, 치료 경과에 대한 예측도 포함된다.
- [126] 본 명세서에서, 상기 예후 예측은 혈관신생억제제 치료에 대한 예후 예측 또는 치료반응성 예측일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [127] 본 발명에서, “혈관신생억제제 치료에 대한 예후 예측”이란 교모세포종 환자가 혈관신생억제제 치료에 대한 반응성을 예측하는 것, 즉 혈관신생억제제 치료에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응할지 여부를 예측하는 것, 또는 혈관신생억제제 내성의 여부 또는 내성의 위험성을 예측하는 것을 의미한다. 본 발명의 예측 방법은 교모세포종 발병 환자에 대한 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다. 상기 적절한 치료 방식이란 방사선 치료 및/또는 면역치료를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [128] 본 발명에서, 상기 혈관신생억제제는 교모세포종 환자의 치료에 사용되는 혈관신생억제제라면 제한되지 않으나, 예를 들어, 베바시주맙, 2’3’-cGAMP, 푸마길린, Shikonin, Tranilast, 우르솔산; 수라민; 탈리도마이드, 레날리도마이드; 프탈라진, 비제한적인 예로서, 1-(4-클로로아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진, 1-(4-메틸아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진, 1-(3-클로로아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진, 1-아닐리노-4-(4-피리딜메틸)프탈라진, 1-벤질아미노-4-(4-피리딜메틸)프탈라진, 1-(4-메톡시아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진, 1-(3-벤질옥시아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진, 1-(3-메톡시아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진, 1-(2-메톡시아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진, 1-(4-트리플루오로메틸아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진,

1-(4-플루오로아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진,
 1-(3-히드록시아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진,
 1-(4-히드록시아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진,
 1-(3-아미노아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진,
 1-(3,4-디클로로아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진,
 1-(4-브로모아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진,
 1-(3-클로로-4-메톡시아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진,
 1-(4-시아노아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진,
 1-(3-클로로-4-플루오로아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진,
 1-(3-메틸아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진 및 PCT 특허출원 공개 No. WO 98/035958 (Bold 등, 본 발명에 내용 전체가 참조 병합됨)에 설명된 기타 프탈라진, 1-(3,5-디메틸아닐리노)-4-(피리딘-4-일메틸)-이소퀴놀린을 비롯하여 PCT 특허출원 공개 No. WO 00/09495 (Altmann 등, 본 발명에 내용 전체가 참조 병합됨)에 개시된 이소퀴놀린; PCT 특허출원 공개 No. WO 00/59509 (Bold 등, 본 발명에 내용 전체가 참조 병합됨)에 개시된 프탈라진으로서, 여기에는 E-1-(3-메틸아닐리노)-4-[(2-(피리딘-3-일)비닐]프탈라진, Z-1-(3-메틸아닐리노)-4-[(2-(피리딘-3-일)비닐]프탈라진, 1-(3-메틸아닐리노)-4-[(2-(피리딘-3-일)에틸]프탈라진, 1-(3-메틸아닐리노)-4-[(2-(피리딘-4-일)비닐]프탈라진, 1-(4-클로로-3-트리플루오로메틸아닐리노)-4-[(2-(피리딘-3-일)에틸]프탈라진, 1-(4-클로로아닐리노)-4-[(2-(피리딘-3-일)에틸]프탈라진, 1-(3-클로로벤질아미노)-4-[(2-(피리딘-3-일)에틸]프탈라진, 1-(4-클로로-3-트리플루오로메틸아닐리노)-4-[3-(피리딘-3-일)프로필]프탈라진, 1-(4-클로로아닐리노)-4-[3-(피리딘-3-일)프로필]프탈라진, 1-(3-클로로-5-트리플루오로메틸아닐리노)-4-[3-(피리딘-3-일)프로필]프탈라진 및 1-(4-3차-부틸아닐리노)-4-[3-(피리딘-3-일)프로필]프탈라진이 포함됨; 및 모노클로날 항체;일 수 있다.

[129] 본 발명에서, 상기 방법은 STING, Calumenin, SEPT5, CD99, CIT, Peroxisomal membrane protein 4 및 Nectin-2로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 제1 대조군과 비교하여 높은 경우, 예후가 좋을 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 여기서, 상기 제1 대조군은 정상인 또는 치료 비반응군일 수 있다. 상기 치료 비반응군은 교모세포종 환자 중 교모세포종 치료에 대해 비선호적으로 반응하거나, 반응 또는 치료 효과를 나타내지 않는 환자를 의미한다.

[130] 본 발명에서, 상기 방법은 STING, Calumenin, SEPT5, CD99, CIT, Peroxisomal membrane protein 4 및 Nectin-2로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 제1 대조군과 비교하여 높은 경우, 혈관신생억제제의 치료 반응성이 높을 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수

있다. 여기서, 상기 제1 대조군은 정상인 또는 혈관신생억제제 비반응군일 수 있다. 상기 혈관신생억제제 비반응군은 교모세포종 환자 중 혈관신생억제제 치료에 대해 비선호적으로 반응하거나, 반응 또는 치료 효과를 나타내지 않는 환자를 의미한다.

[131] 본 발명에서, 상기 방법은 ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 제2 대조군과 비교하여 높은 경우, 예후가 나쁠 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 여기서, 상기 제2 대조군은 정상인 또는 치료 반응군일 수 있다. 상기 치료 반응군은 교모세포종 환자 중 교모세포종 치료에 대해 선호적으로 반응하거나, 치료 효과를 나타내는 환자를 의미한다.

[132] 본 발명에서, 상기 방법은 ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 제2 대조군과 비교하여 높은 경우, 혈관신생억제제의 치료 반응성이 높을 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 여기서, 상기 제2 대조군은 혈관신생억제제 비반응군일 수 있다. 상기 혈관신생억제제 비반응군은 교모세포종 환자 중 혈관신생억제제 치료에 대해 비선호적으로 반응하거나, 반응 또는 치료 효과를 나타내지 않는 환자를 의미한다.

[133]

[134] 또한, 본 발명은 STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는, 교모세포종 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[135] 본 발명의 조성물이 mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 것일 때에는 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머 세트일 수 있다.

[136] 상기 단백질의 mRNA 특이적인 프로브 또는 프라이머 세트를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 RNA를 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가로 포함할 수 있다. 본 조성물을 이용하여 공지된 RNA를 감지하는 방법을 제한없이 사용하여 피검체에서 상기 마커들의 mRNA의 수준을 측정할 수 있다.

[137] 본 발명에서 "프라이머"는 짧은 자유 3'말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형 (template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응 (즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.

- [138] 본 발명에서 "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지 (Labelling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA (single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA (double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [139] 본 발명에서 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.
- [140] 한편, 본 발명에서 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다.
- [141] 본 발명에서, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 항원-항체 결합성을 갖는 것이면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, 본 발명 단백질에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 나아가 본 발명의 항체에는 본 발명 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메라 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다.
- [142] 본 발명에서 용어 "앵타머"는 시료 내의 검출하고자 하는 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 앵타머의 제조는 일반적인 앵타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이나 3' 말단을 앵타머 칩의 관능기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 NH₂로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [143] 상기 단백질 특이적인 항체를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 단백질을

감지하는 방법에 필요한 제제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 본 조성물을 이용하여 공지된 단백질을 감지하는 방법을 제한없이 사용하여 피검체(본 발명에서는 교모세포종 환자 또는 환자로부터 수득한 생물학적 시료)에서 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있다.

- [144] 본 발명의 유전자는 핵산 서열이 유전자 은행에 등록되어 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [145] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 또는 프로브는 포스포르 아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미 데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [146] 본 발명의 상기 조성물은 부형제, 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제 등을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 함께 포함할 수 있다. 상기 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS; 불용성 담체, 예를 들어 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [147]
- [148] 또한, 본 발명은 상기 조성물 및 지시서를 포함하는 교모세포종 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [149] 본 발명의 키트에는 표적 단백질을 마커로 인식하는 항체 또는 mRNA를 마커로 인식하는 프라이머, 프로브뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [150] 본 발명의 키트에는 키트 사용법 설명, 교모세포종 진단 지표 및 교포세포종 치료법으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 지시서가 포함될 수 있다.
- [151] 구체적인 양태로서 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 각 마커 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7bp 내지 50bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10bp 내지

30bp의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[152] 또 다른 양태로는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[153] 또한, 본 발명의 키트는 효소와 발색 반응할 기질 및 결합되지 않은 단백질을 제거하고 결합된 단백질 마커만을 보유할 수 있는 세척액 또는 용리액을 포함할 수 있다.

[154]

[155] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[156] 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;

[157] STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4, Nectin-2, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계; 및

[158] 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 상기 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량에 차이가 있는 시험물질을 선별하는 단계.

[159] 본 발명 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 본 발명의 단백질 또는 유전자의 발현에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNzyme, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 앵타머, 천연추출물 또는 화학물질을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[160] 또한, 상기 스크리닝 방법에 사용되는 세포는 실험동물의 형태로 제공될 수 있으며, 이 경우 본 발명의 스크리닝 방법은 상기 실험동물에게 교모세포종을 유도하는 단계를 추가로 포함하며, 시험물질과의 접촉은 비경구 또는 경구투여, 정위주사를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니며, 당업자라면 시험물질을 동물에게 테스트하기 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.

[161] 시험물질을 처리하는 것은 시험물질을 세포 또는 조직 배양 배지에 추가한 후 세포를 일정 시간 배양하는 것을 의미한다. 상기 세포가 실험동물 형태로 제공될

때, 시험물질과의 접촉은 비경구 또는 경구 투여, 정위주사를 포함하는 이로 제한되는 것은 아니며, 당업자라면 시험물질을 동물에게 테스트하기 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.

[162] 상기 스크리닝 방법에서, STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4 및 Nectin-2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA 수준을 증가시킨 물질을 교모세포종 치료제로 선별하는 단계;를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[163] 상기 스크리닝 방법에서, ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA 수준을 감소시킨 물질을 교모세포종 치료제로 선별하는 단계;를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[164] 상기 스크리닝 방법에서, 상기 세포는 상기 단백질 또는 이의 mRNA를 내재적으로 발현하는 세포일 수도 있고, 상기 단백질 또는 이의 mRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환되어 상기 단백질 또는 이의 mRNA를 과발현하는 세포일 수도 있다.

[165]

[166] 또한, 본 발명은 STING(Stimulator of interferon genes) 유전자가 결손된 교모세포종 동물 모델을 제공한다.

[167] 본 발명에서, "결손(knock-out)"은 유전자의 부분적, 실질적, 완전한 결손, 또는 비활성화를 의미한다.

[168] 본 발명에서, 동물 모델은 인간을 제외하고 케이지 안에서 사육할 수 있는 동물이라면 제한되지 아니하며, 설치류, 토끼 및 원숭이 등을 포함하나, 바람직하게는 실험용 쥐(mouse 및 rat)일 수 있다.

[169] 설치류에 속하는 쥐는 동물실험에 가장 많이 이용되는 것으로서, 특히 실험용 쥐는 마우스(*mus musculus*: mouse) 및 래트(*rattus norvegicus*: rat) 등이 있으며, 기르기 쉽고, 번식이 빠르며, 가격이 저렴하다는 점에서 실험동물로서 유리하고, 환자의 다양한 증상과 대응되는 행동 양상에 대한 연구가 숙성되어, 동물 모델로써 보다 적합하다.

[170]

[171] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[172] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이

아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.

[173] 본 발명의 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.

[174]

[175] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[176]

[177] **실시예 1. 실험 방법**

[178] 항혈관 치료 전 수득한 교모세포종 환자의 조직(FFPE, formalin fixed paraffin embedding) (항혈관치료 반응군 7명, 비반응군 7명)에서 단백질 발현의 차이를 분석하였다, 단백질 분석은 LC-MS를 이용하여 5,000여 개의 암 관련 단백질 중에서 통계적으로 유의미한 차이가 나는 단백질을 추출하였다.

[179] 또한, 치료 방법과 무관하게 STING과 ALG3 발현에 따른 교모세포종 환자의 예후 자체에 차이가 있는지를 확인하기 위하여, 예후가 좋은 교모세포종 환자 7명과 불량한 예후를 보이는 7명의 교모세포종 환자의 STING, ALG3의 발현양을 FFPE 조직에서 면역염색법을 통해 확인해 보았다.

[180] 구체적으로, 도 2의 실험과정을 실시하기 위한 파라핀 절편에서 단백질을 추출하는 방법은 다음과 같다.

[181] 먼저, 악성신경교종의 혈관신생억제제(베바시주맵, Avastin®) 투여 환자 그룹을 반응군과 비반응군으로 나눈 이후 각각 환자의 파라핀 조직을 10 μ m의 두께로 잘라 쿼아젠의 Qproteome FFPE 조직 키트를 사용하여 실험을 진행하였다. 잘라진 조직을 1.5ml 튜브에 모은 뒤 0.5ml 헵테인을 첨가하고, 10초 동안 볼텍싱한 후 1시간동안 상온에 인큐베이션하여 파라핀을 용해하였다. 이후 25 μ l의 메탄올을 첨가한 뒤 10초동안 볼텍싱한 후 9000g에서 2분 동안 원심분리하여 튜브 바닥에 생긴 펠렛을 얻어서 5분간 건조시켰다. 그 후, 100 μ l의 추출 버퍼(beta-mercaptoethanol이 첨가됨)를 혼합하고, 얼음에서 5분동안 인큐베이션한 후 볼텍싱해준 후, 100°C에서 20분동안, 80°C에서 2시간동안 750rpm으로 인큐베이션하였다. 이 과정이 끝나면 얼음에 1분 동안 넣어둔 후 수집 튜브의 밀봉 클립(sealing clip)을 제거하고, 15분 동안 14000g, 4°C에서 원심분리하였다. 그리고 나서 단백질이 추출된 상층액을 새로운 1.5ml 튜브에 옮긴 후 BCA를 통한 정량을 하여 단백질의 농도를 측정하였다. 또한, 튜브에

1ml의 에탄올을 넣고 9000g에서 2분동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 펠렛에 25mM NH_4HCO_3 중 1% RapiGest SF 10 μl 와 25mM NH_4HCO_3 중 50mM DTT 10 μl 를 혼합하여 reduction을 수행하였다. 이후 37°C의 온도를 유지하는 상태로 1시간동안 950rpm으로 인큐베이션한 후 25mM NH_4HCO_3 중 100mM iodoacetamide 10 μl 를 혼합하여 알킬레이션을 수행하였다. 이후 37°C의 온도에서 1시간동안 950rpm으로 인큐베이션하고, 10분 간격으로 볼텍싱해주었다. 이후 25mM NH_4HCO_3 를 90 μl 넣은 뒤, 25mM NH_4HCO_3 중 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 트립신 20 μl 를 넣어주었다. 이 때, 효소와 단백질의 비율은 1:5가 되게 하였다. 이후 37°C의 온도에서 16시간 이상 인큐베이션하고, 소화를 멈추기 위해 20 μl 의 5% TFA를 넣은 뒤 37°C에서 1시간동안 950rpm으로 인큐베이션하였다. 그리고, 13000rpm으로 30분동안 25°C의 온도로 원심분리한 뒤, 상층액을 0.5ml tube로 옮겨 speedvac evaporator vacuum을 사용하여 건조한 이후 0.1% 포름산에 녹여 아래의 LC-MS 분석을 진행하였다.

[182]

[183] Thermo Ultimate 3000 system을 이용한 액체 크로마토그래피 진행 조건은 다음과 같다.

[184] - Column: 50cm length, 75 μm I.D, 360 μm O.D fused silica C18

[185] LC run time: 200 min

[186] Flow rate: 350 nl/min

[187] Gradient: 5% SolB to 50% SolB during 150 min gradient

[188] SolA: 0.1% formic acid with 5% DMSO

[189] SolB: 80% acetonitrile, 0.1% formic acid with 5% DMSO

[190]

[191] Thermo Q Exactive Plus Mass spectrometry를 이용한 질량분석기 진행 조건은 다음과 같다.

[192] MS1 resolution: 70000

[193] MS1 maximum fill time: 20 msec

[194] Data dependent acquisition (DDA) methods (Top 20)

[195] MS2 resolution: 17500

[196] MS2 maximum fill time: 100 msec

[197] Auto gain control (AGC): 1e6

[198]

[199] 질량분석을 통해 얻어진 펩타이드 및 fragment ion에 대한 스펙트럼 파일은 Sequest HT 알고리즘 기반의 프로테옴 Discoverer (version 2.2, Thermo)으로 SwissProt 인간 프로테옴 서열을 이용하여 단백질을 동정하였다. 또한 각 그룹 내에서의 단백질들의 레이저 펩타이드와 유니크 펩타이드의 강도를 이용한 라벨-프리 정량화(label-free quantitation)를 이용하여 단백질 상대 정량을 수행하였다. 각 그룹의 단백질 정량값을 이용하여 Principal component analysis 및

Hierarchical cluster 분석을 수행하였다. 또한 단백질 수준에서의 P value와 비율을 이용하여 volcano plot 분석을 수행하였다. 벤 다이어그램 분석은 jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/index.html>)을 이용하여 차별적으로 발현되는 단백질들을 분석하였다.

[200]

[201] 실시예 2. 교모세포종 환자의 항혈관 치료 반응성에 대한 단백질 발현 확인

[202] 상기 결과에 따라, 통계적으로 의미가 있는 차이를 보인 단백질은 총 200 여개였으며 그 중 특정 그룹에서만 발현하는 단백질을 추출하였다. 일부는 항혈관 치료 반응이 좋았던 그룹에서만 발현하였고, 일부는 반응이 좋지 않았던 그룹에서만 발현하였다.

[203] 단백질 발현을 비교한 결과는, 표 1 및 도 3 내지 도 17에 나타내었다. 도 3 내지 도 17의 푸른색 bar는 단백질 발현량의 평균값을 나타낸 것이다.

[204]

[205] [표1]

그룹	발현량이 높은 단백질
항혈관 치료 반응이 좋았던 그룹 (good-responder group)	1. STING (Stimulator of interferon gene protein) 2. Calumenin (isoform 4) (CALU) 3. Septin-5 (isoform 2) (SEPT5) 4. CD99 antigen (CD99) 5. Citron Rho-interacting kinase (isoform 4) (CIT) 6. Peroxisomal membrane protein 4 (PXMP4) 7. Nectin-2 (NECTIN2)
항혈관 치료 반응이 없었던 그룹 (bad-responder group)	1. Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase (ALG3) 2. Delta-like protein 3 (DLL3) 3. Noelin-2 4. Tensin-1 (TNS1) 5. Caveolin-1 (CAV1) 6. Ficolin-2 (FCN2) 7. Kinesin-like protein KIFC1(Kinesin Family Member C1, KIFC1) 8. Protein HIDE1(Highly expressed in immature dendritic cell transcript 1, HIDE1)

[206]

[207] 실시예 3. 교모세포종 환자의 예후 예측을 위한 단백질 발현 확인

[208] 실시예 1과 동일한 방법으로 시료를 수득하고, 치료 방법에 관계없이 교모세포종 환자의 예후에 따른 단백질 발현량을 측정하였다.

[209] 그 결과, 도 18 내지 도 20에 나타난 바와 같이, 교모세포종 환자중 예후가 좋지 않은 환자에서 C-type lectin domain family 2 member B(CLEC2B), C-type Lectin Domain Family 4 Member K(CD207), C-type lectin domain family 12 member A(CLEC12A)가 높게 발현함을 확인하였다.

[210]

[211] 실시예 4. 교모세포종 환자의 FFPE 조직에서 STING 단백질의 발현 확인

- [212] 실시예 1에서 분석을 진행한 FFPE 조직을 면역 염색하여, STING 단백질의 발현 위치 및 발현 양상을 치료 예후가 좋은 환자 및 좋지 않은 환자에서 확인하였다.
- [213] 먼저, 4 μ m로 자른 파라핀 조직 절편 슬라이드를 60°C dry oven에 넣어 파라핀을 녹인 뒤 100% 자일렌(Xylene)에 10분간 담궈 탈파라핀화(deparaffination)을 3회 진행하였다. 100% 에탄올부터 95%-90%-80%-70%-증류수까지 각 5분씩 순차적으로 담궈 수화시켰다. 이후 증류수로 10분 동안 Rinse하였다. 이후 pH 6의 항원성 복원(antigen retrieval) 용액을 이용하여 30분 동안 조직을 Jar에 넣고 가열하여 Antigen unmasking 과정을 수행하였다. 이후 PBS-T(0.3% Triton x 100이 포함된) 버퍼를 사용하여 투과 과정을 수행하였다. 이후 1%의 BSA를 PBS-T에 녹인 후 30분 동안 상온에서 블로킹 과정을 거친 후 1차 항체를 1:100으로 희석하여 4°C에서 밤새 배양하였다. 다음날 1차 항체를 세척하고 형광이 달린 2차 항체를 2시간동안 배양하였다. 세척 과정 후 DAPI 염색을 하고 마운팅 후 공초점 현미경으로 조직을 관찰하였다.
- [214] 그 결과, 도 21에 나타난 바와 같이, 치료 예후가 좋은 환자에서 STING 단백질의 발현량이 좋지 않은 군과 비교하여 현저히 높게 나타남을 확인하였다.
- [215]
- [216] **실시예 5. 교모세포종 환자의 FFPE 조직에서 ALG3 단백질의 발현 확인**
- [217] 분석을 진행한 FFPE 조직을 면역 염색하여, ALG3 단백질의 발현 위치 및 발현 양상을 치료 예후가 좋은 환자 및 좋지 않은 환자에서 확인하였다.
- [218] 구체적으로, 면역 염색은 4 μ m로 자른 파라핀 조직 절편 슬라이드를 60°C dry oven에 넣어 파라핀을 녹인 뒤 100% 자일렌(Xylene)에 10분간 담궈 탈파라핀화(deparaffination)을 3회 진행하였다. 100% 에탄올부터 95%-90%-80%-70%-50%-증류수까지 각 5분씩 순차적으로 담궈 수화시켰다. 항원성 복원(antigen retrieval) 용액에 슬라이드를 담궈 스팀기에서 15분간 열을 가해주어 수용체 단백질을 복구시켰다. PBS로 세척한 후 내인성 퍼옥시데이즈(oxidase)를 제거하기 위해 3% H₂O₂/Methanol에 20분간 처리하였다. PBS로 세척한 후 2.5% 정상 말 혈청으로 블로킹을 1시간 진행한 후 토끼 항-ALG3 항체를 1:100으로 희석하여 4°C 밤새 반응시켰다. PBS로 세척한 후 비오틴화된 항-토끼 2차 항체를 30분 동안 실온에서 반응시켰다. PBS로 세척한 후 퍼옥시데이즈-스트렙타비딘 복합체를 15분간 실온에서 반응시킨 뒤 PBS로 세척하였다. DAB Substrate 키트를 사용하여 10분간 반응시키며 발색을 확인한 뒤 증류수로 세척하였다. 수화의 반대 순서로 탈수시킨 뒤 마운팅 용액으로 커버 슬라이드를 닫고 현미경으로 관찰하였다.
- [219] 그 결과, 도 22에 나타난 바와 같이, 치료 예후가 좋지 않은 환자에서만 ALG3 단백질의 발현량이 현저히 높게 나타남을 확인하였다.
- [220]
- [221] **실시예 6. 교모세포종 환자의 생존율 확인**

- [222] 상기 실시예 4 및 5에서 확인한 바와 같이, 예후가 좋은 환자들은 STING의 발현이 높은 반면에 불량한 예후의 환자들은 STING의 발현이 거의 없는 것으로 나타났다. 반대로 ALG3의 발현량은 좋은 예후의 환자에서는 거의 검출되지 않았고, 불량한 예후의 환자들에서 높게 검출되는 것으로 나타났다.
- [223] 이에 더하여, STING과 ALG3의 발현량에 따른 환자의 생존율을 분석하였다.
- [224] 그 결과, 도 23에 나타난 바와 같이, high STING/Low ALG3인 교모세포종 환자들의 생존율(overall survival rate) 및 무증상 생존율(progression free survival)이 Low STING/High ALG3 환자와 비교하여 모두 더 나음을 확인할 수 있었다.
- [225] 따라서, STING 및 ALG3는 항혈관 치료의 예측 뿐만 아니라 교모세포종의 전반적인 예후 마커로도 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [226]
- [227] 실시예 7. STING 유전자가 결손된 마우스 동물모델 제작
- [228] STING 유전자를 결손시켜 교모세포종 동물 모델을 제작하였다.
- [229] 구체적으로, STING 유전자가 몸 전체에 Knock-out 된 마우스를 제작하기 위하여, EGFR viii/viii mouse를 교배하여 전신 STING 결손 마우스를 수득하였다. 태어나고 1-2일 이내 뇌의 부뇌실 구역(subventricular zone, SVZ)에 CRISPR cas9 TP53/PTEN 타겟팅 cre 플라스미드를 주입하여 자발성 교모세포종 동물 모델을 제작하였다. 종양의 형성은 플라스미드 주입 후 6-8주정도가 지나고 확인할 수 있었으며 소동물 MRI를 통해 마우스 뇌 T2 영상을 관상면(coronal)으로 촬영하여 종양의 형성 유무를 확인하였다. 종양이 형성된 마우스만 선택한 이후 3주가 지나고 추적조사(follow-up)하여 종양의 크기 변화를 확인 하였다.
- [230] 그 결과, 도 24에 나타난 바와 같이, STING 유전자가 결손된 마우스에서 종양의 성장속도가 증가함을 확인하였다.
- [231] 이는 STING KO 마우스가 교모세포종 동물 모델로서 활용될 수 있음을 보여주는 결과이다.
- [232]
- [233] 상기에서 살펴본 바와 같이, 교모세포종 진단, 환자의 예후 예측, 특히 환자에 대한 항혈관신생제의 치료반응성 예측을 위하여 상기 단백질의 발현량을 측정할 수 있다. 아울러 본 발명자가 제공하는 키트로 제작되어 환자 샘플로부터 교모세포종을 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 항혈관신생제의 반응성을 포함한 예후를 빠르게 검토함에 이용될 수 있다.
- [234]
- [235] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

[236]

산업상 이용가능성

[237]

본 발명자들은 악성신경교종인 교모세포종 환자의 조직에서 다수의 특정 단백질의 발현과 교모세포종의 발병 및 예후 예측 사이에 밀접한 상관관계가 있음을 확인하였는 바, 해당 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 확인함으로써 교모세포종의 치료와 예후 예측에 유용한 정보를 제공할 수 있어 산업상 이용가능성이 있다.

청구범위

- [청구항 1] 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 진단을 위한 정보제공 방법:
 생물학적 시료를 수득하는 단계;
 상기 수득된 시료에서 STING(Stimulator of interferon genes), CALU(Calumenin), SEPT5(Septin5), CD99, CIT(Citron Rho-interacting kinase), PXMP4(Peroxisomal membrane protein 4), Nectin-2, ALG3(Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase), DLL3(Delta-like protein 3), Noelin-2, TNS1(Tensin-1), CAV1(Caveolin-1), FCN2(Ficolin-2), KIFC1(Kinesin Family Member C1), HIDE1(Highly expressed in immature dendritic cell transcript 1), CLEC2B(C-type lectin domain family 2 member B), CD207(C-type Lectin Domain Family 4 Member K) 및 CLEC12A(C-type lectin domain family 12 member A)으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계; 및
 A) STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4 및 Nectin-2로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 낮은 경우 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정하는 단계; 또는
 B) ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 높은 경우 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 관절낭액, 양수, 복수, 자궁경부 분비물, 질 분비물, 소변 및 뇌척수액으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 3] 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 진단방법:
 생물학적 시료를 수득하는 단계;
 상기 수득된 시료에서 STING(Stimulator of interferon genes), CALU(Calumenin), SEPT5(Septin5), CD99, CIT(Citron Rho-interacting kinase), PXMP4(Peroxisomal membrane protein 4), Nectin-2, ALG3(Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase), DLL3(Delta-like protein 3), Noelin-2, TNS1(Tensin-1), CAV1(Caveolin-1), FCN2(Ficolin-2), KIFC1(Kinesin Family Member C1), HIDE1(Highly expressed in immature dendritic cell transcript 1), CLEC2B(C-type lectin domain family 2 member B), CD207(C-type Lectin Domain Family 4 Member K) 및 CLEC12A(C-type lectin domain family 12 member A)으로 이루어진

군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계; 및

A) STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4 및 Nectin-2로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 낮은 경우 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정하는 단계; 또는

B) ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 높은 경우 교모세포종에 걸린 것 또는 걸릴 것으로 판정하는 단계.

[청구항 4] 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 환자의 예후 예측을 위한 정보제공 방법:

교모세포종 환자의 생물학적 시료를 수득하는 단계;

생물학적 시료에서 STING(Stimulator of interferon genes),

CALU(Calumenin), SEPT5(Septin5), CD99, CIT(Citron Rho-interacting kinase), PXMP4(Peroxisomal membrane protein 4), Nectin-2,

ALG3(Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase),

DLL3(Delta-like protein 3), Noelin-2, TNS1(Tensin-1), CAV1(Caveolin-1),

FCN2(Ficolin-2), KIFC1(Kinesin Family Member C1), HIDE1(Highly

expressed in immature dendritic cell transcript 1), CLEC2B(C-type lectin

domatin family 2 member B), CD207(C-type Lectin Domain Family 4 Member

K) 및 CLEC12A(C-type lectin domain family 12 member A)으로 이루어진

군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계; 및

i) STING, CALU, SEPT5, CD99, CIT, PXMP4 및 Nectin-2로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 제1 대조군과 비교하여 높은 경우, 예후가 좋을 것으로 예측하는 단계; 또는

ii) ALG3, DLL3, Noelin-2, TNS1, CAV1, FCN2, KIFC1, HIDE1, CLEC2B, CD207 및 CLEC12A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량이 제2 대조군과 비교하여 높은 경우, 예후가 나쁠 것으로 예측하는 단계.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 예후 예측은 혈관신생억제제 치료에 대한 예후 예측인 것을 특징으로 하는, 방법.

[청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 혈관신생억제제는 베바시주맙인 것을 특징으로 하는, 방법.

[청구항 7] STING(Stimulator of interferon genes), CALU(Calumenin), SEPT5(Septin5), CD99, CIT(Citron Rho-interacting kinase), PXMP4(Peroxisomal membrane

protein 4), Nectin-2, ALG3(Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase), DLL3(Delta-like protein 3), Noelin-2, TNS1(Tensin-1), CAV1(Caveolin-1), FCN2(Ficolin-2), KIFC1(Kinesin Family Member C1), HIDE1(Highly expressed in immature dendritic cell transcript 1), CLEC2B(C-type lectin domain family 2 member B), CD207(C-type Lectin Domain Family 4 Member K) 및 CLEC12A(C-type lectin domain family 12 member A)으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는, 교모세포종 진단 또는 예후 예측용 조성물.

[청구항 8] 제7항의 조성물 및 지시서를 포함하는, 교모세포종 진단 또는 예후 예측용 키트.

[청구항 9] STING(Stimulator of interferon genes), CALU(Calumenin), SEPT5(Septin5), CD99, CIT(Citron Rho-interacting kinase), PXMP4(Peroxisomal membrane protein 4), Nectin-2, ALG3(Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase), DLL3(Delta-like protein 3), Noelin-2, TNS1(Tensin-1), CAV1(Caveolin-1), FCN2(Ficolin-2), KIFC1(Kinesin Family Member C1), HIDE1(Highly expressed in immature dendritic cell transcript 1), CLEC2B(C-type lectin domain family 2 member B), CD207(C-type Lectin Domain Family 4 Member K) 및 CLEC12A(C-type lectin domain family 12 member A)으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 제제의 교모세포종 진단 또는 예후 예측을 위한 용도.

[청구항 10] 하기의 단계를 포함하는, 교모세포종 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법: 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;

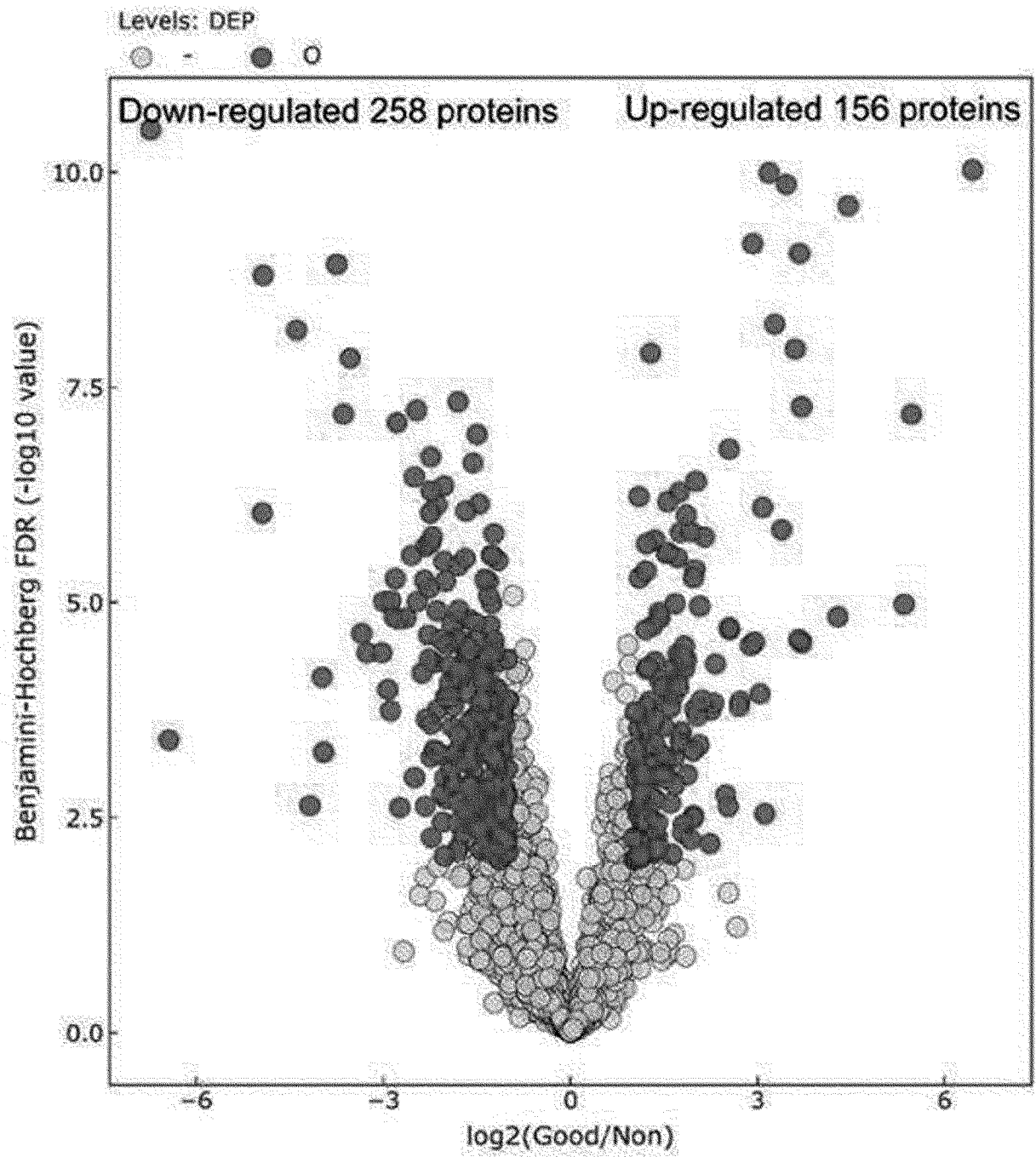
STING(Stimulator of interferon genes), CALU(Calumenin), SEPT5(Septin5), CD99, CIT(Citron Rho-interacting kinase), PXMP4(Peroxisomal membrane protein 4), Nectin-2, ALG3(Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase), DLL3(Delta-like protein 3), Noelin-2, TNS1(Tensin-1), CAV1(Caveolin-1), FCN2(Ficolin-2), KIFC1(Kinesin Family Member C1), HIDE1(Highly expressed in immature dendritic cell transcript 1), CLEC2B(C-type lectin domain family 2 member B), CD207(C-type Lectin Domain Family 4 Member K) 및 CLEC12A(C-type lectin domain family 12 member A)으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량을 측정하는 단계; 및

시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 상기 선택된 단백질 또는 이의 mRNA의 발현량에 차이가 있는 시험물질을 선별하는 단계.

[청구항 11] STING(Stimulator of interferon genes) 유전자가 결손된 교모세포종 동물 모델.

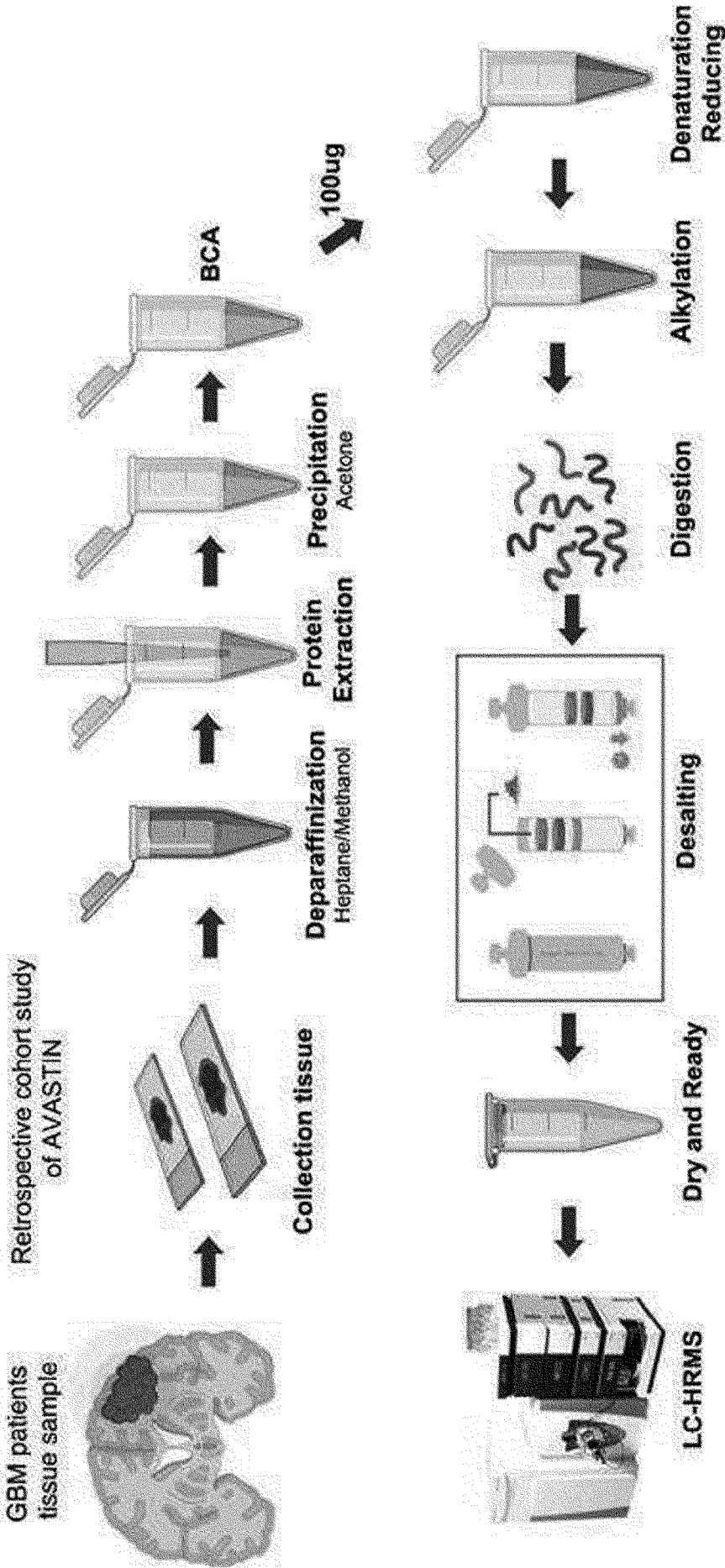
[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 동물 모델은 교모세포종 치료제 스크리닝용인 것을 특징으로 하는, 동물 모델.

[도1]

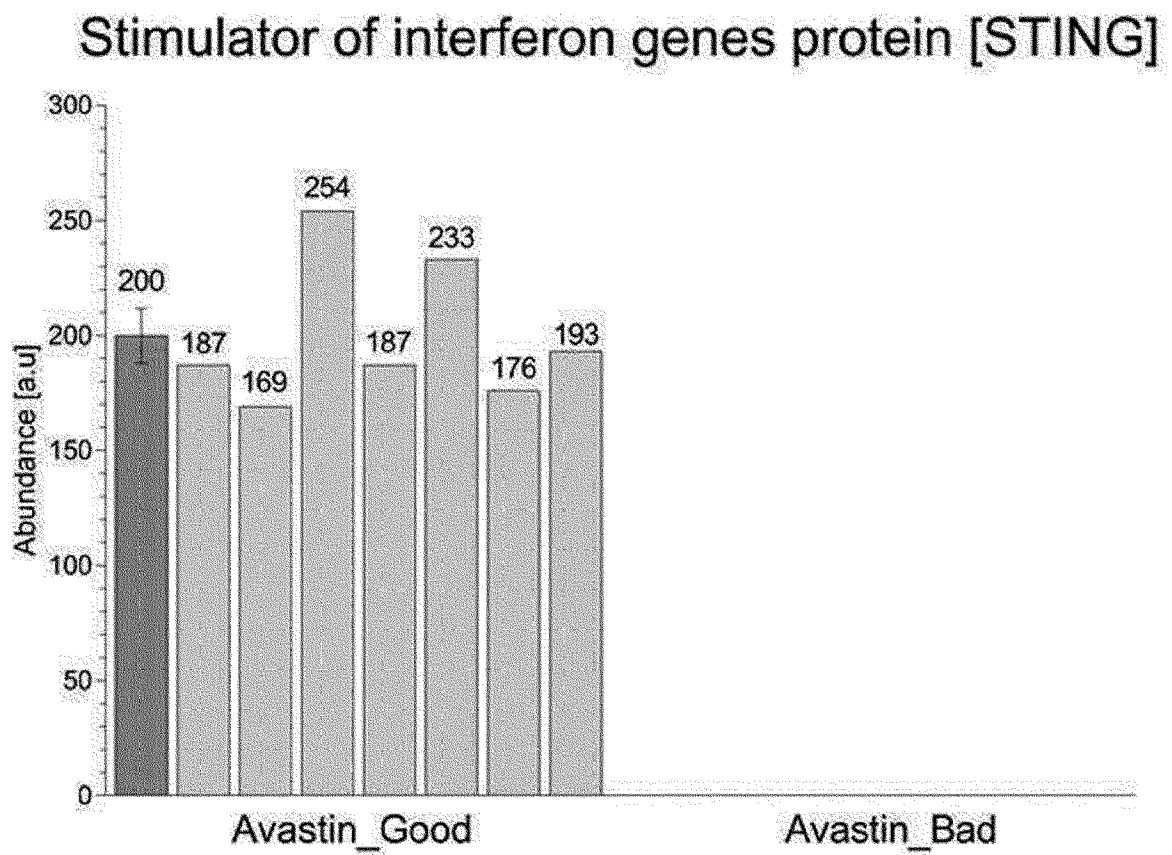


[도2]

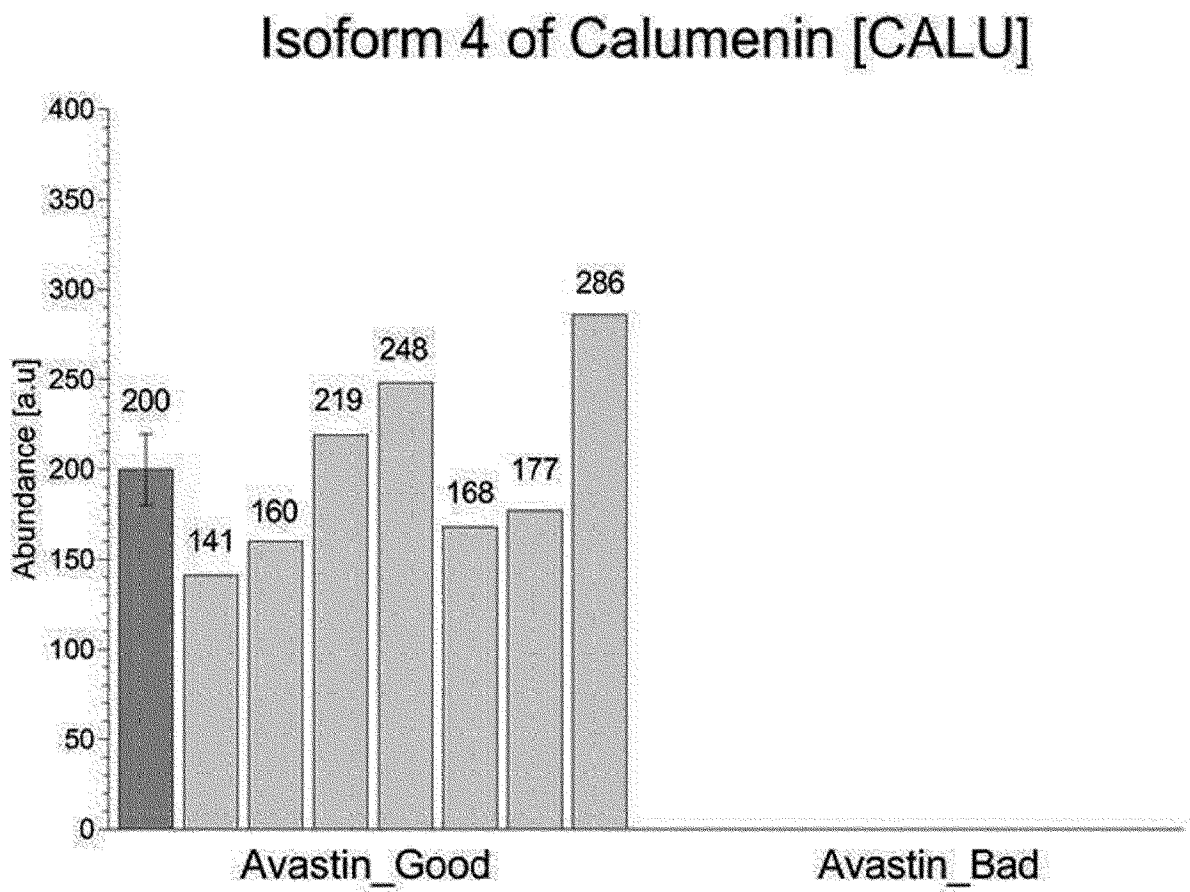
Sample preparation for proteomics by LC-HRMS



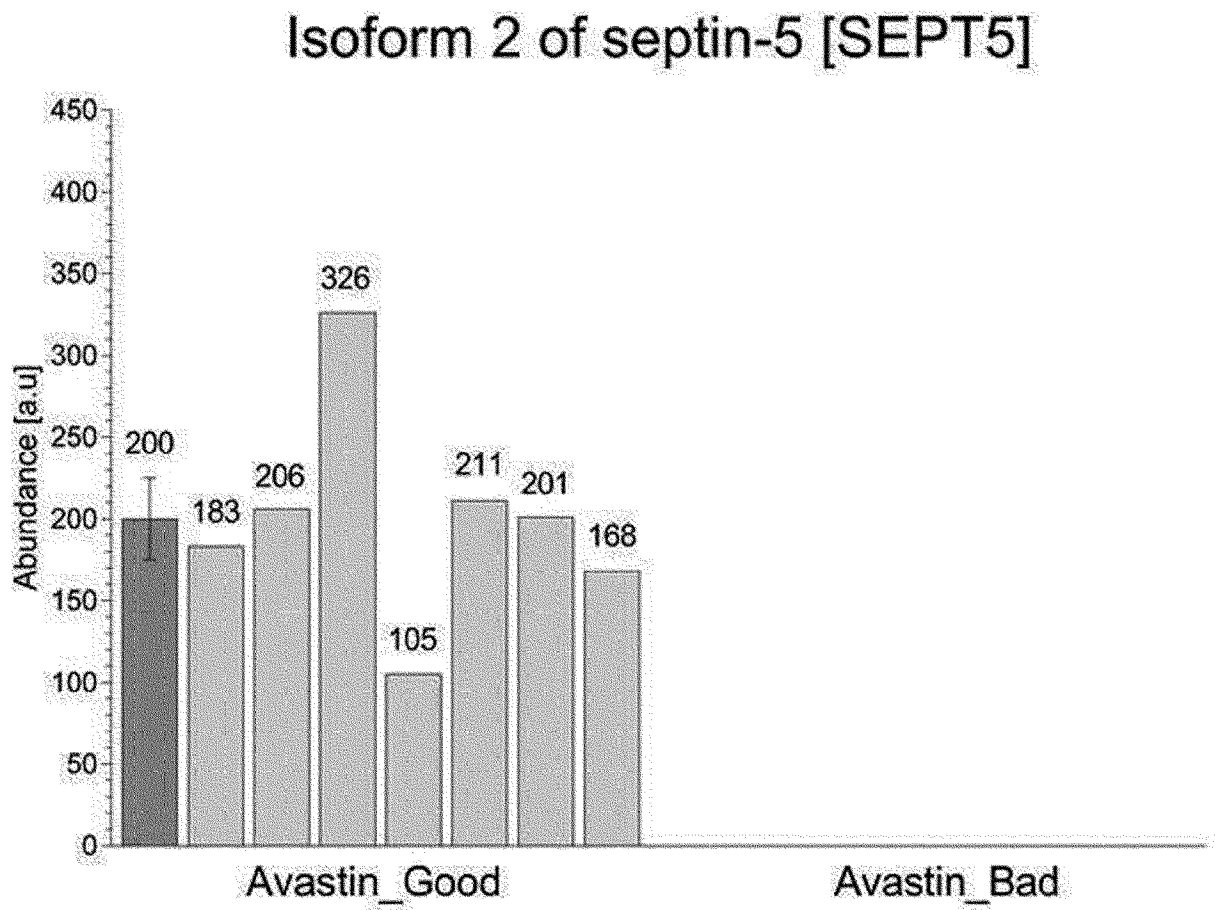
[도3]



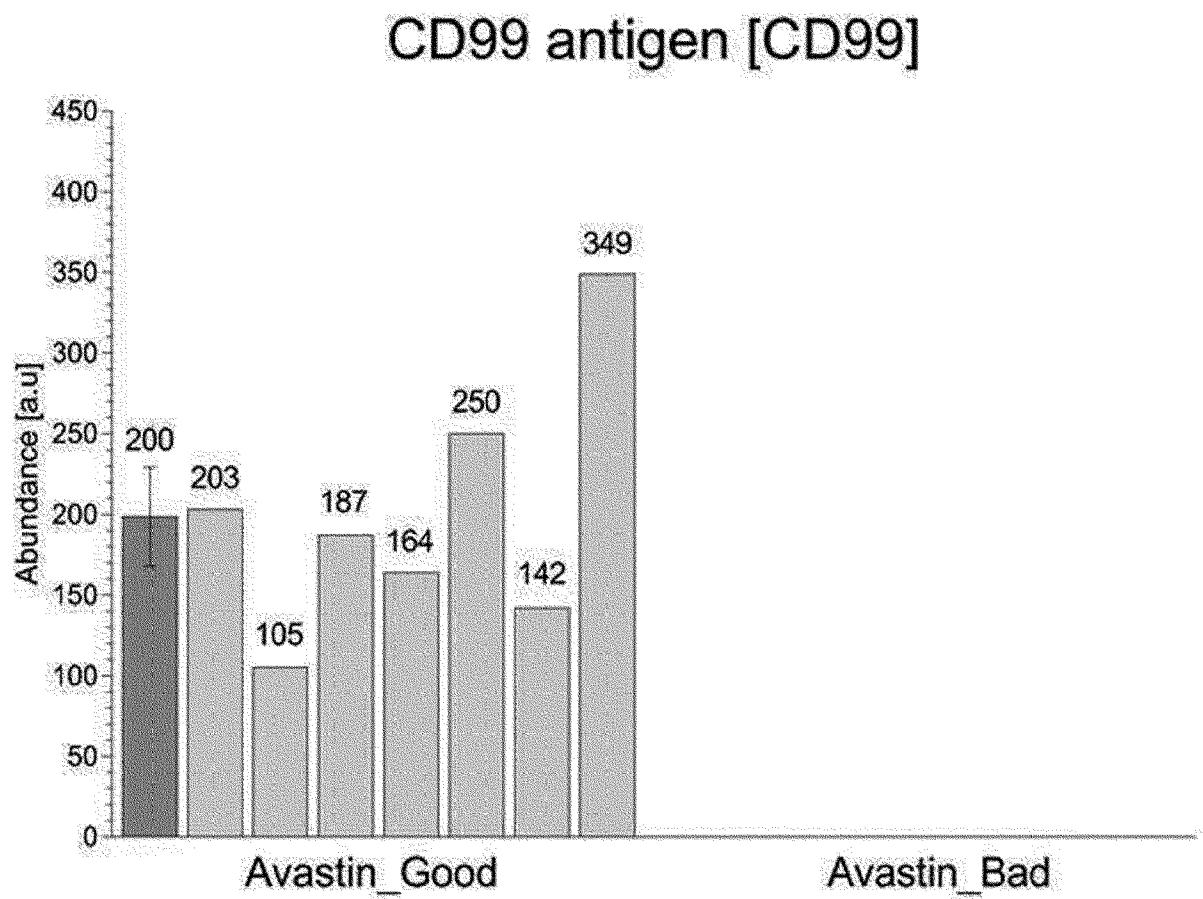
[도4]



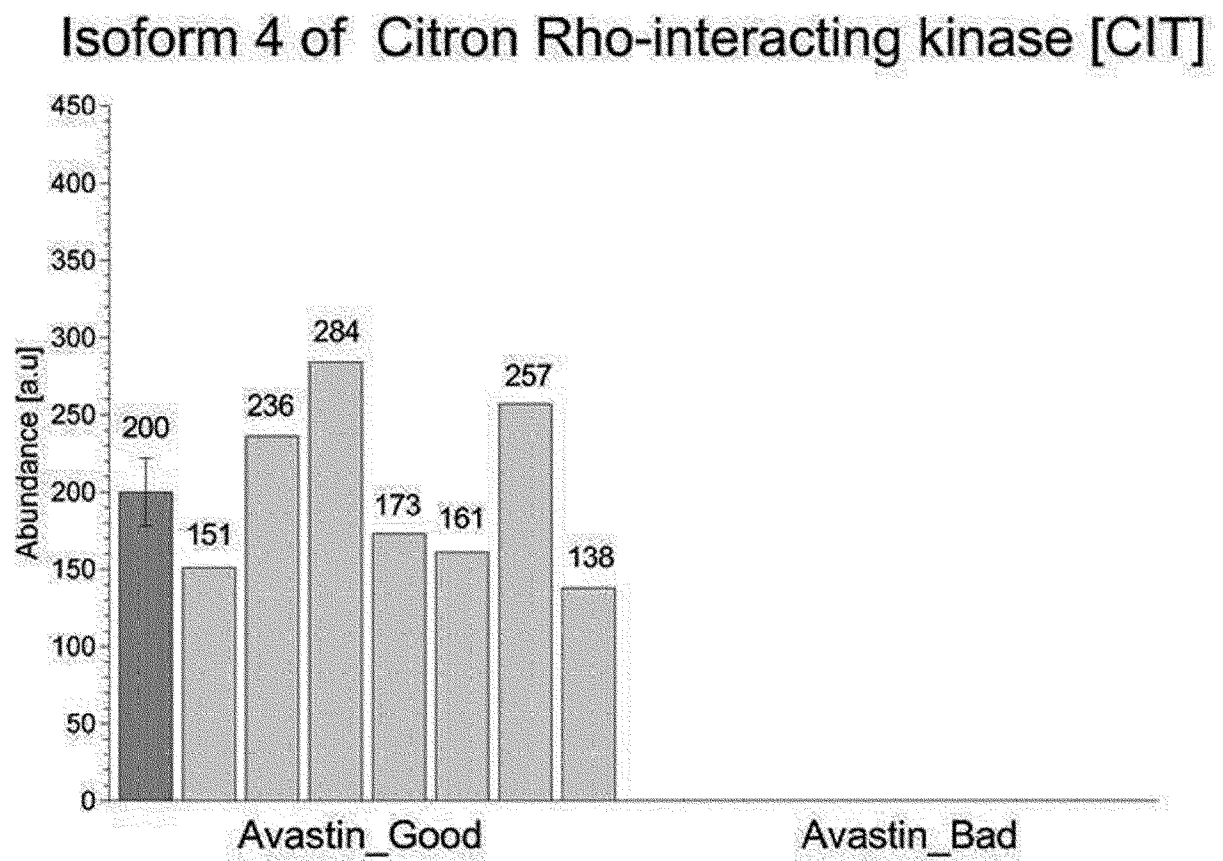
[도5]



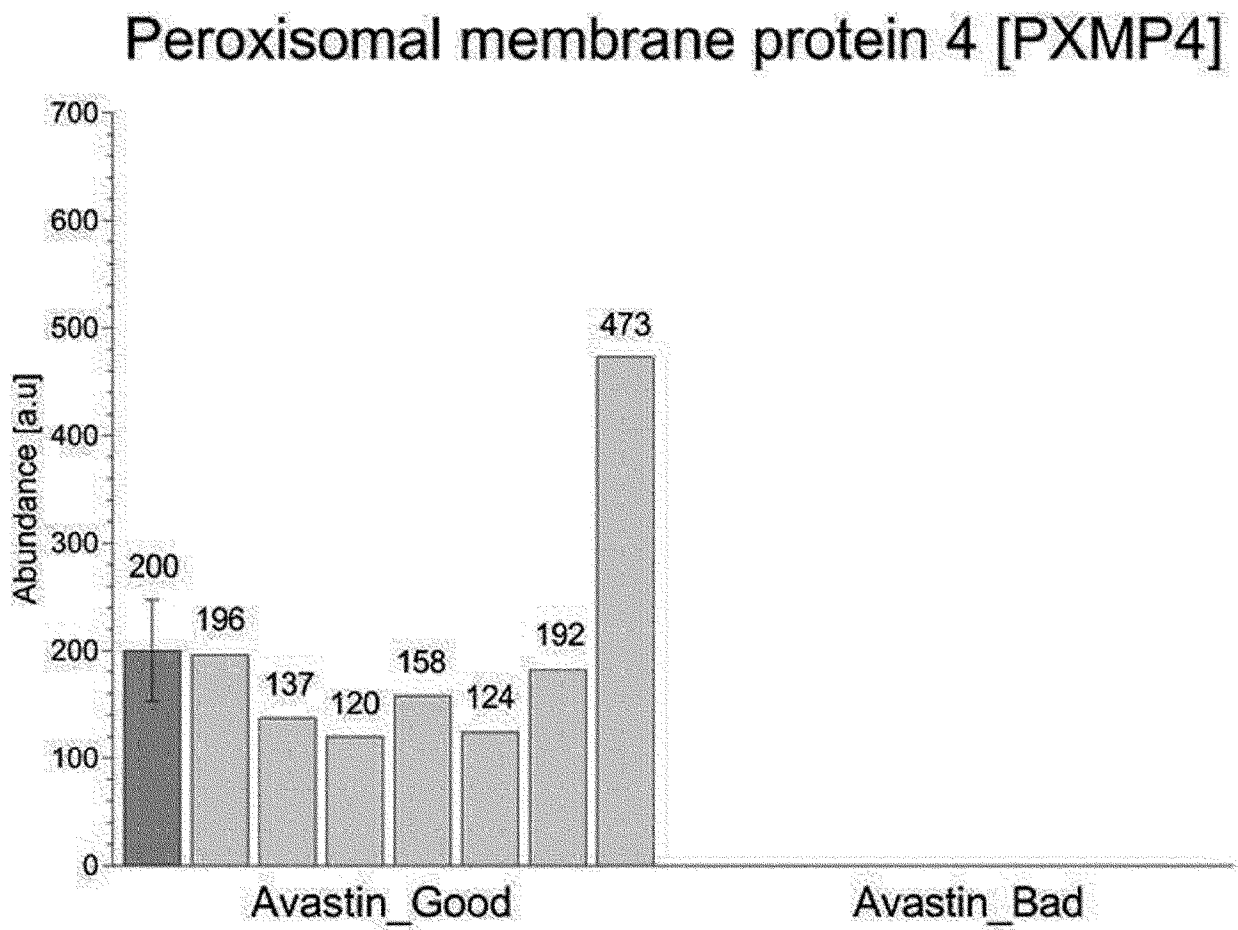
[도6]



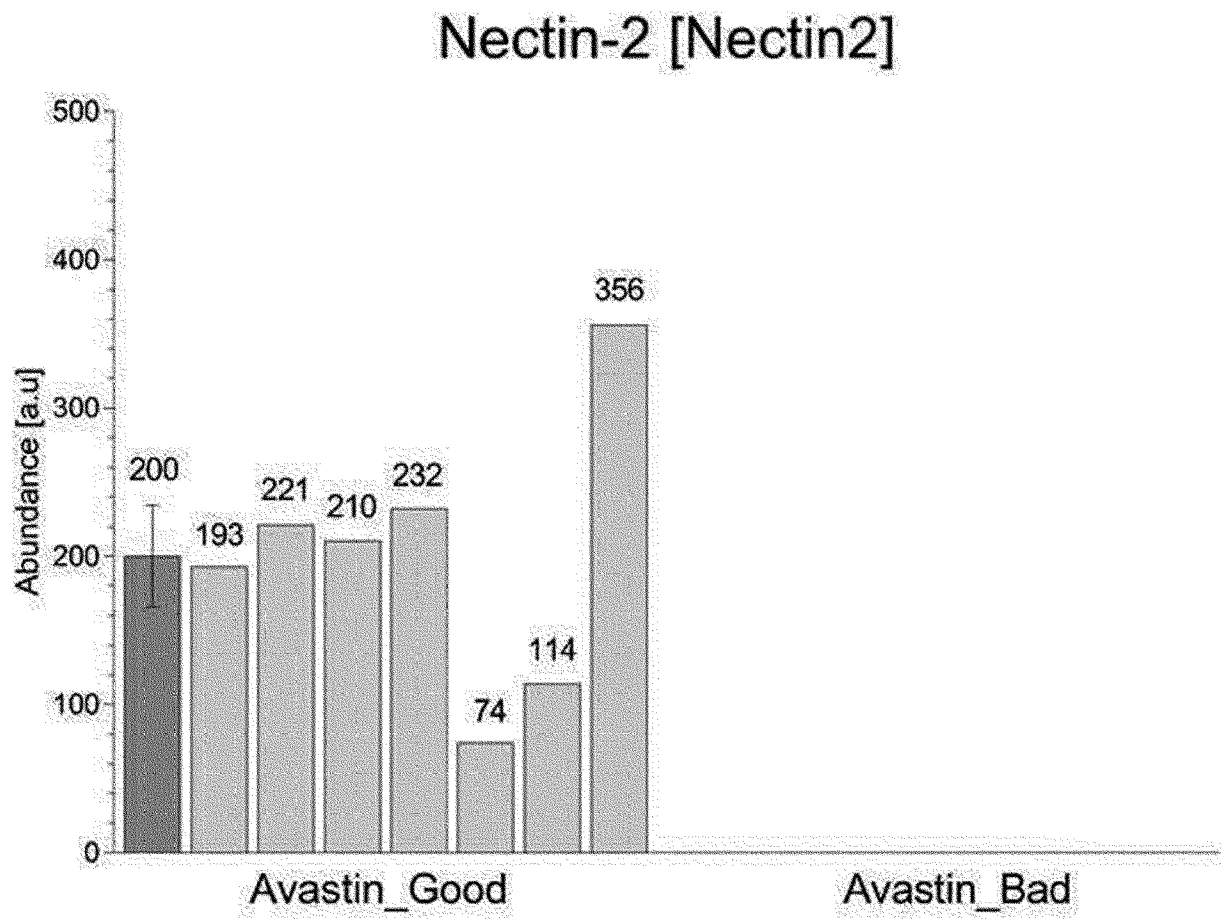
[도7]



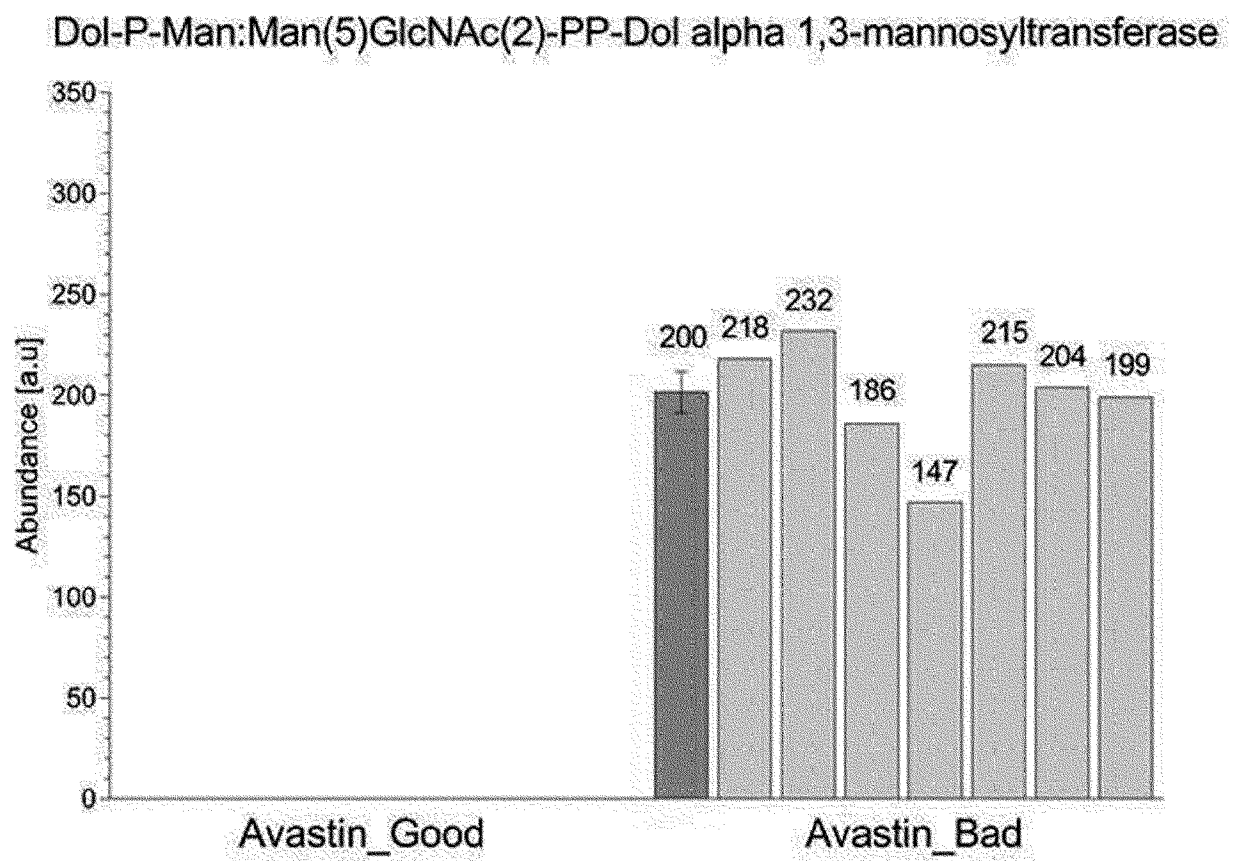
[도8]



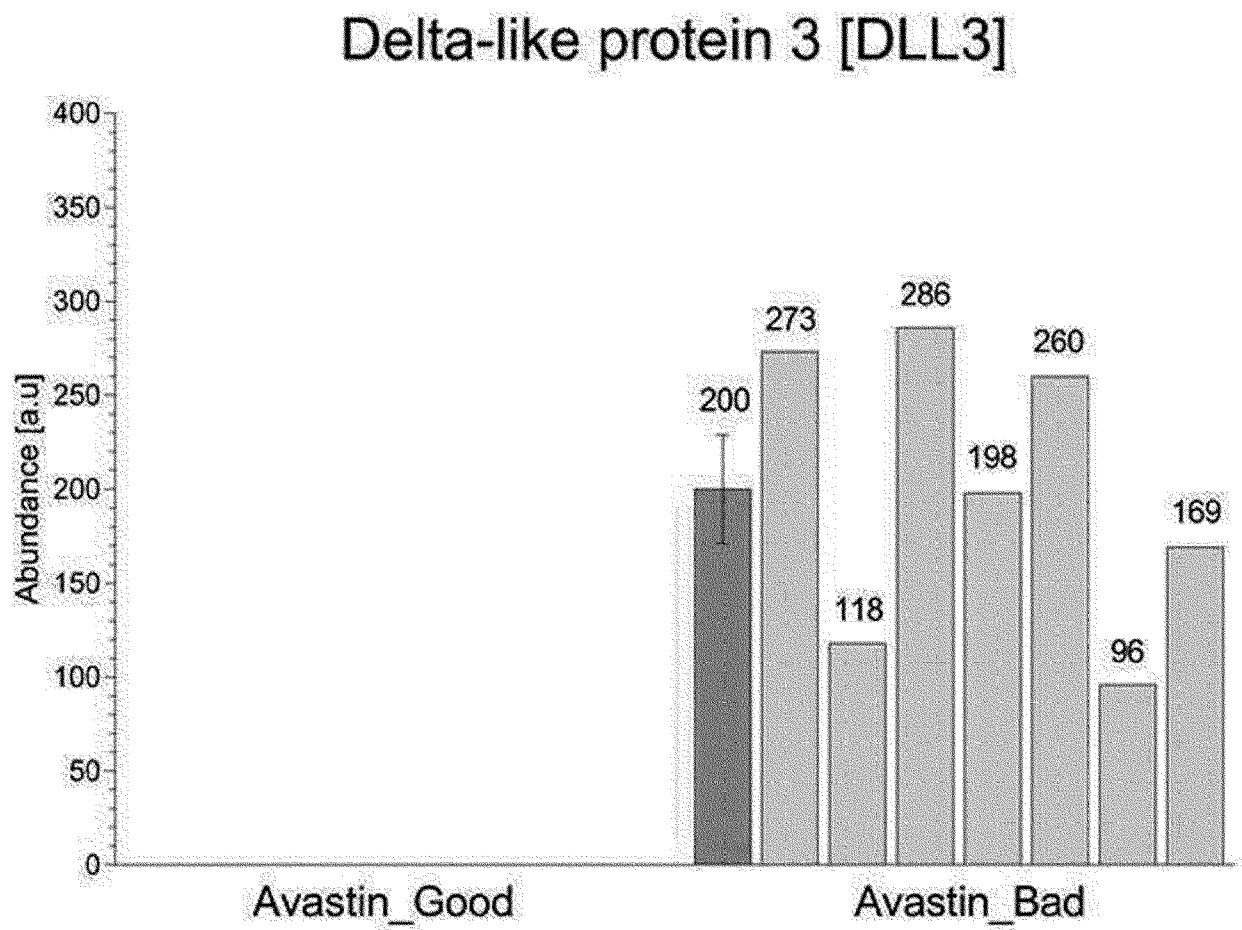
[도9]



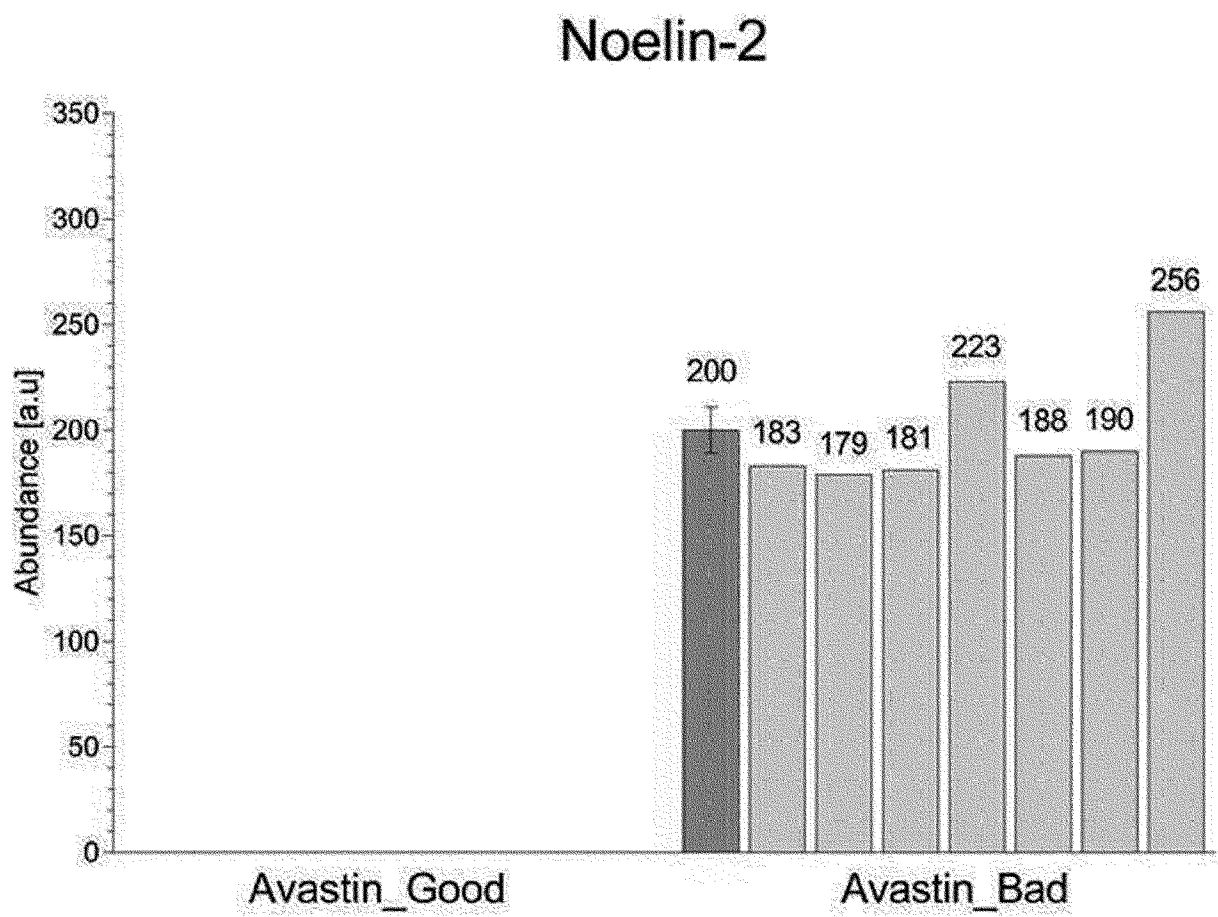
[도10]



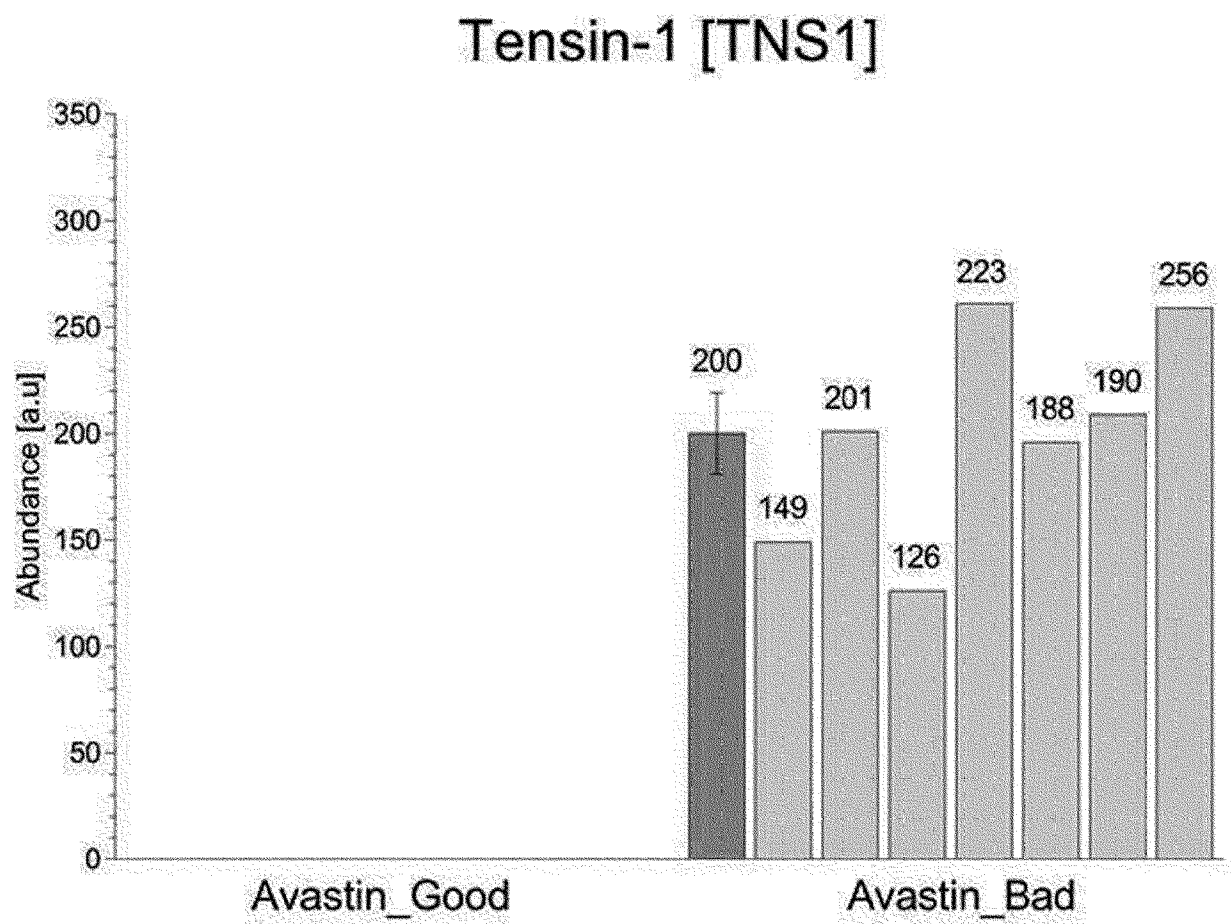
[도11]



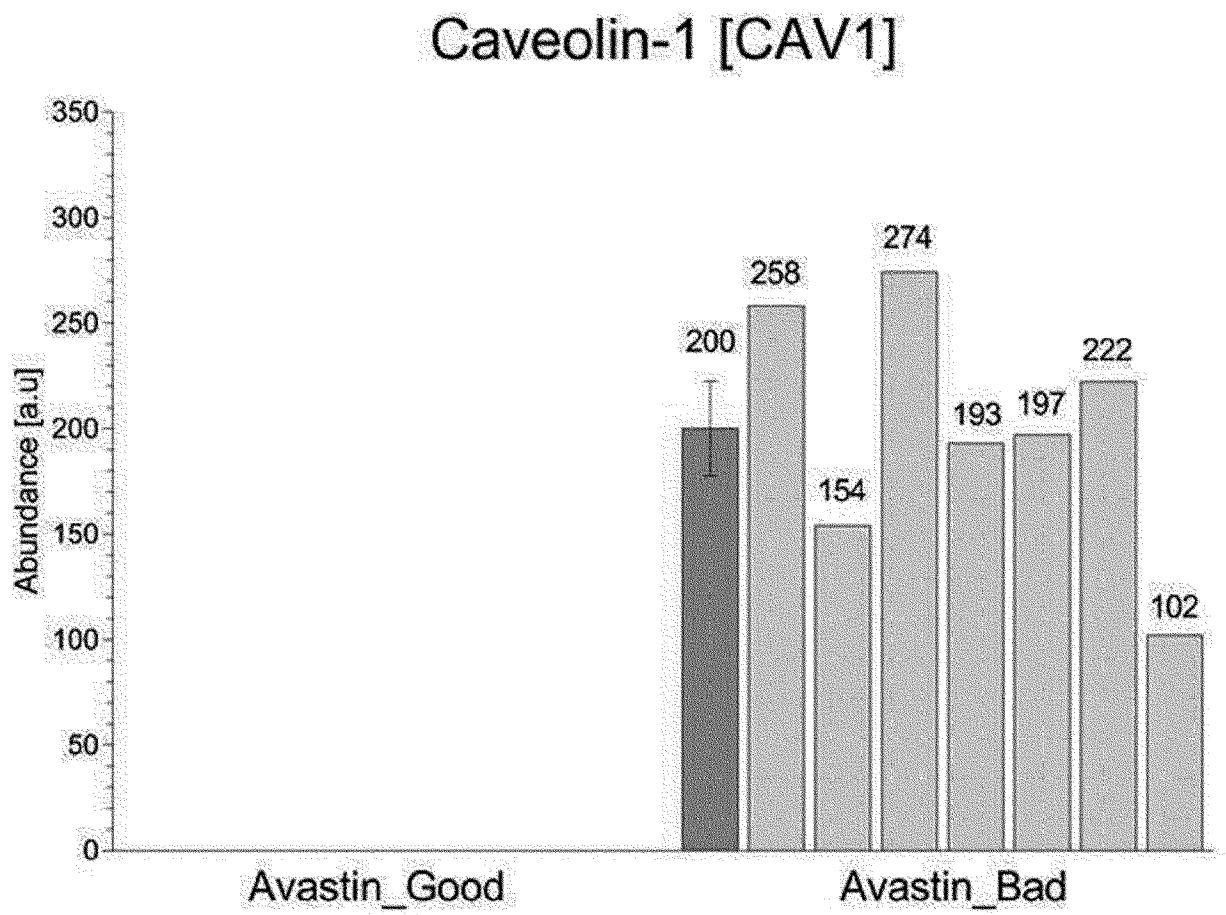
[도12]



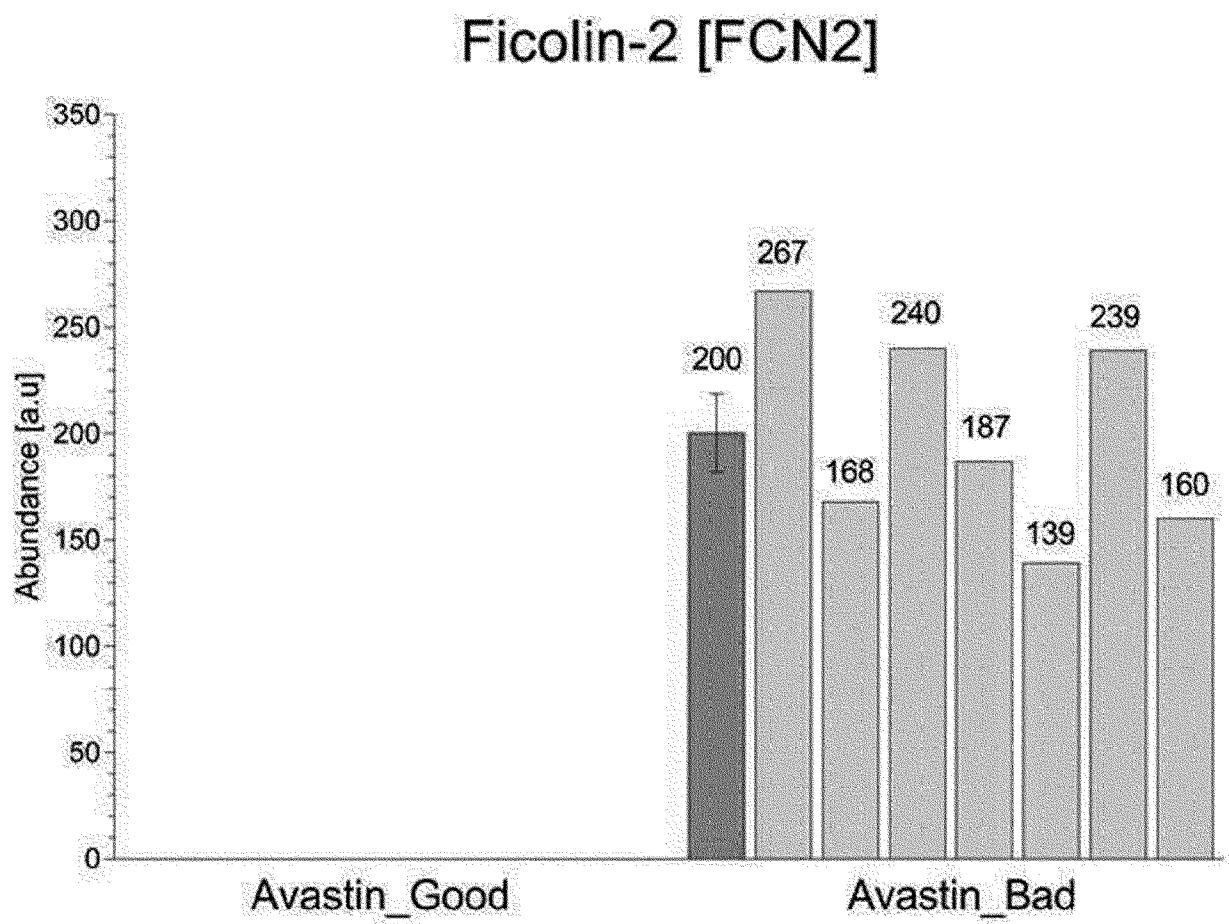
[도13]



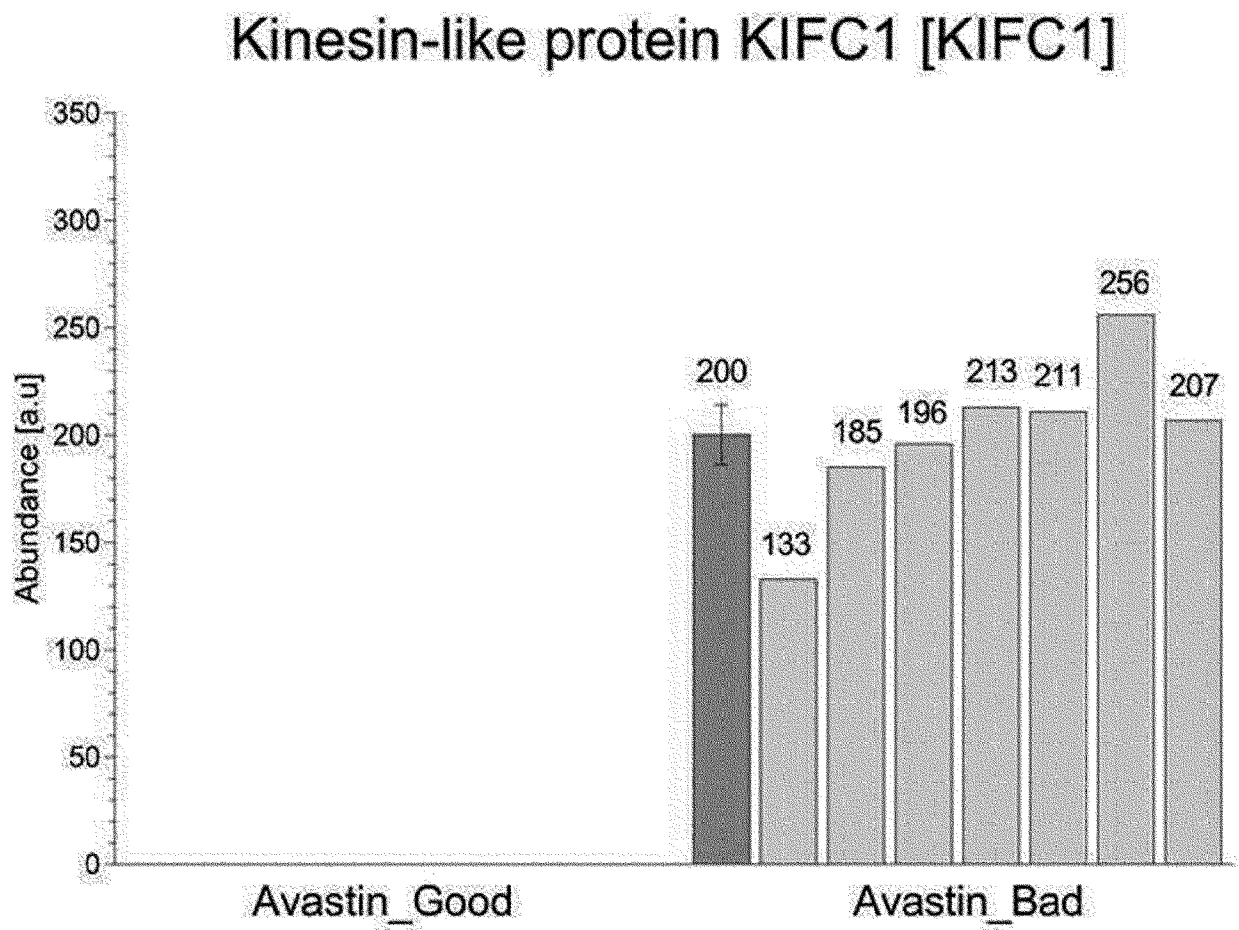
[도14]



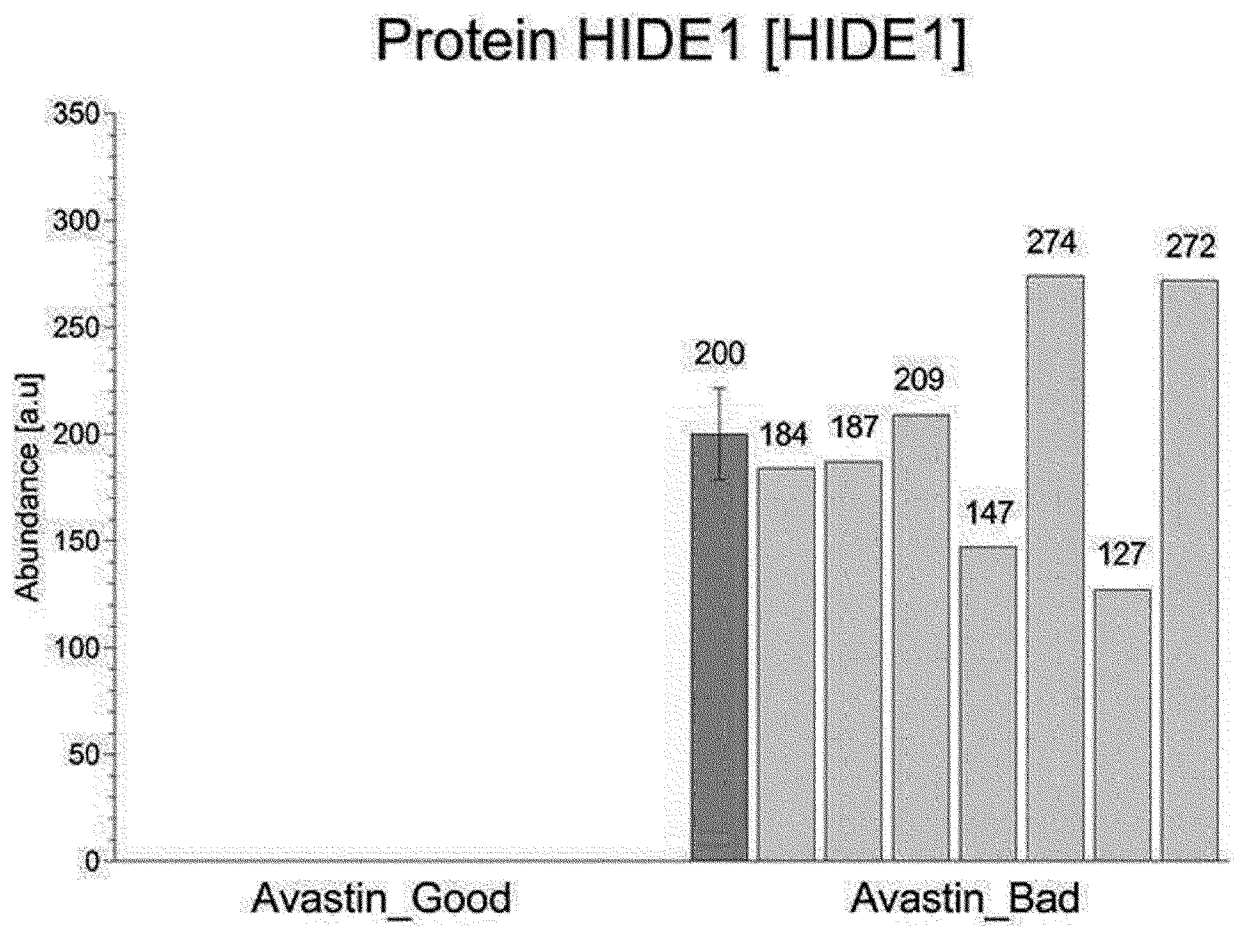
[도15]



[도16]

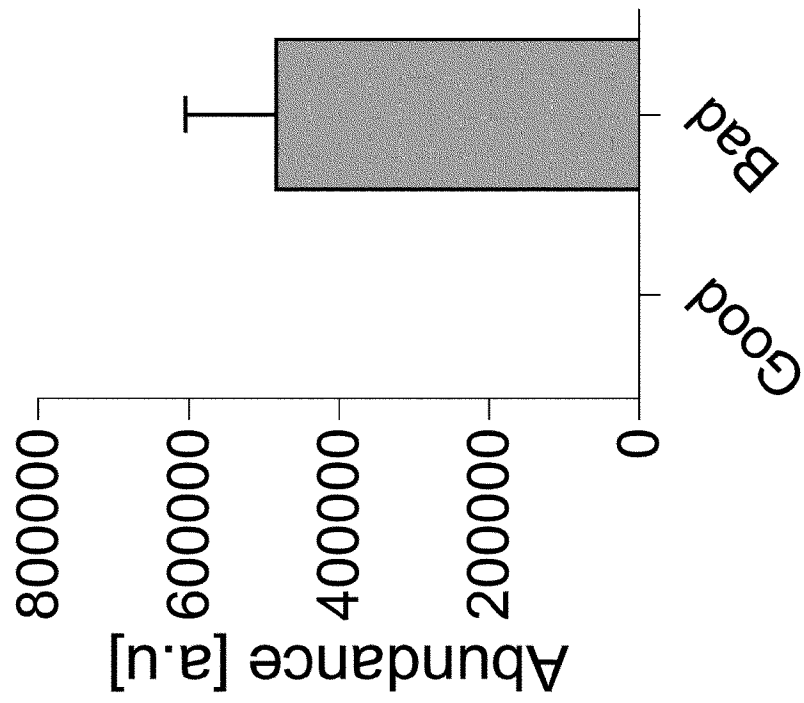


[도17]



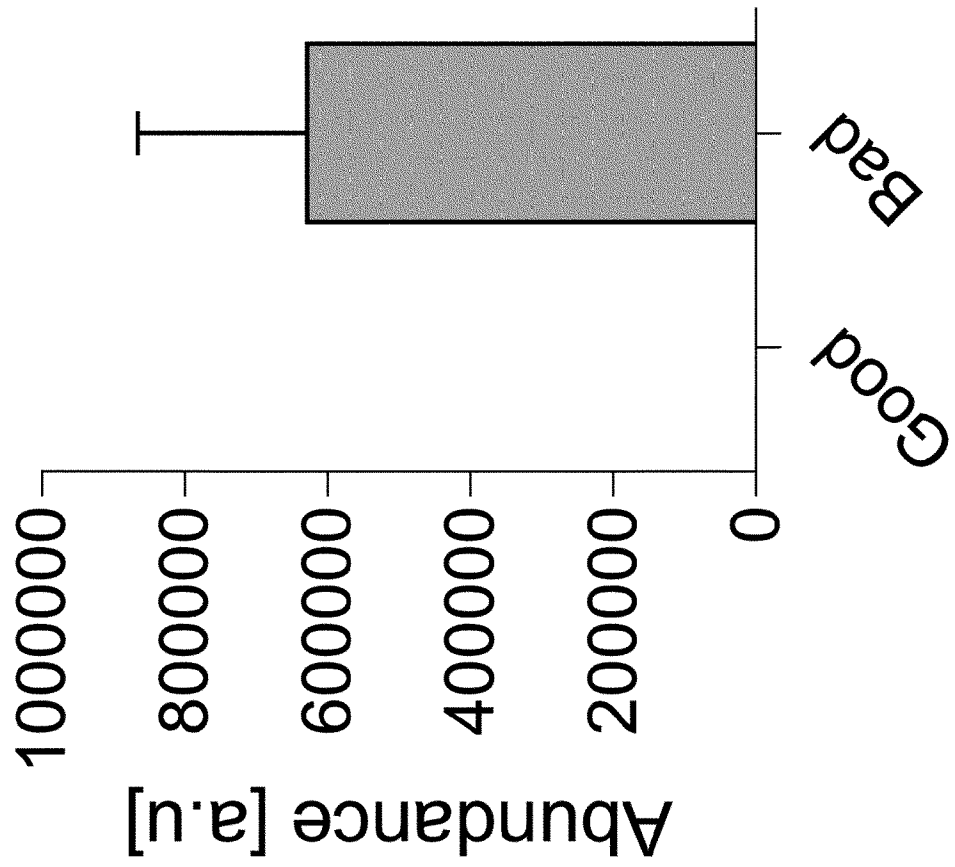
[도18]

C-type lectin domain family 2 member B (CLEC2B)



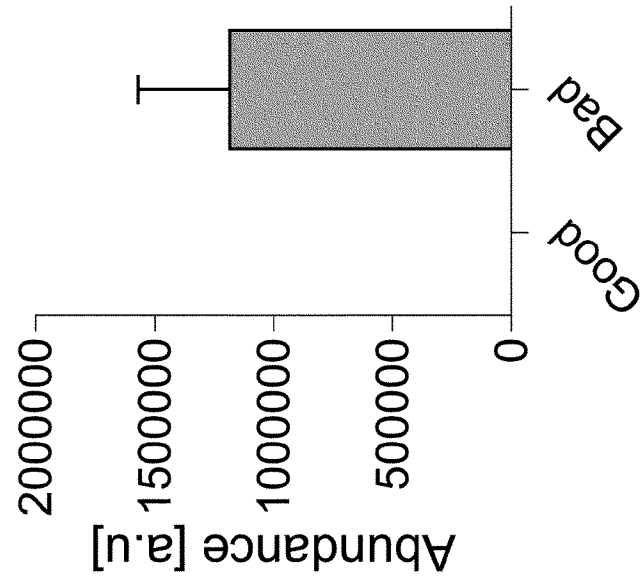
[도19]

C-type lectin domain family 4 (CD207)



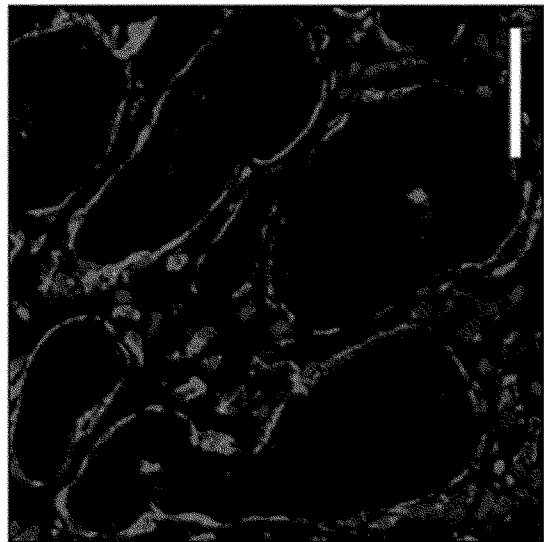
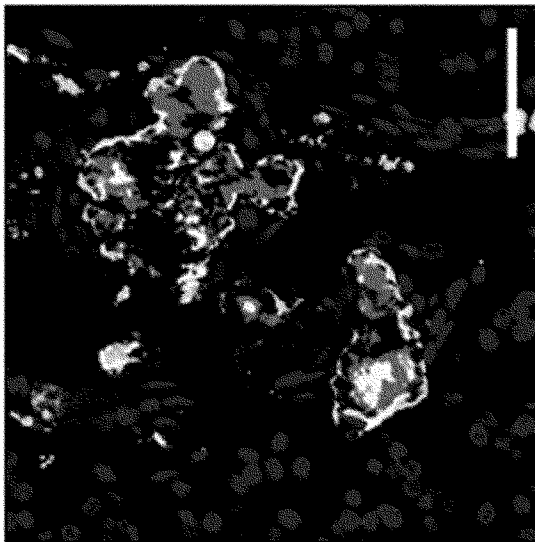
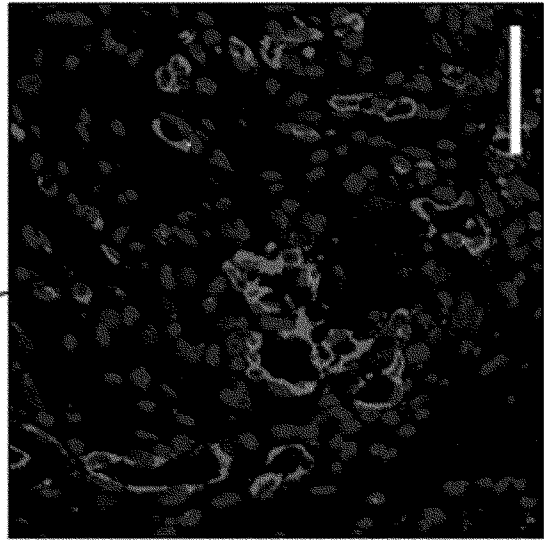
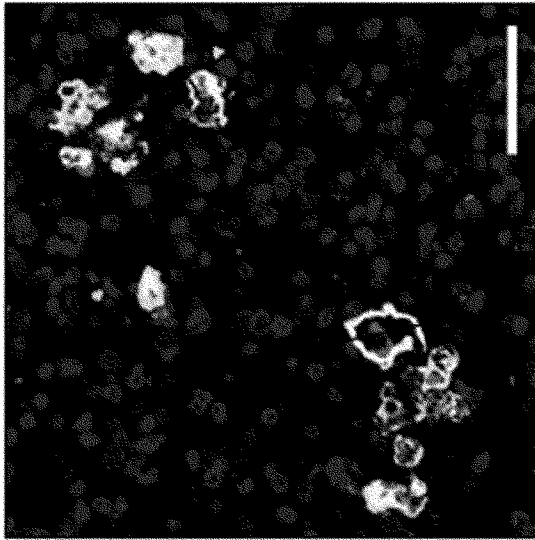
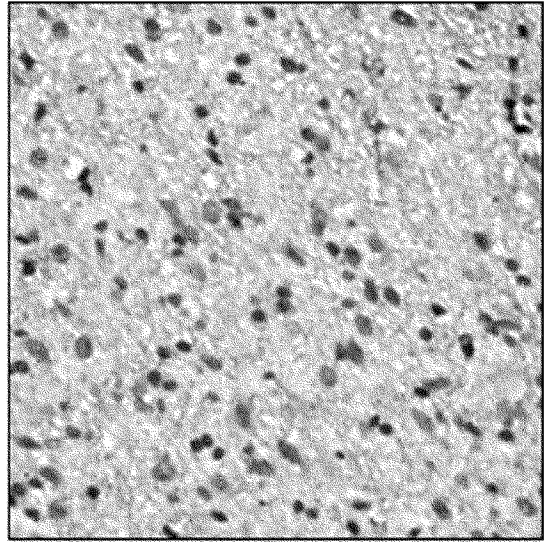
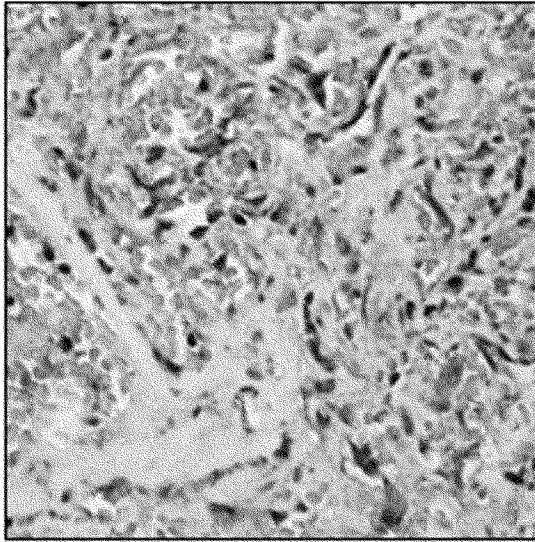
[도20]

Isoform 1 of c-type lectin domain family 12 member A(CLEC12A)



[도21]

DAPI STING VEGF-A (종양혈관)

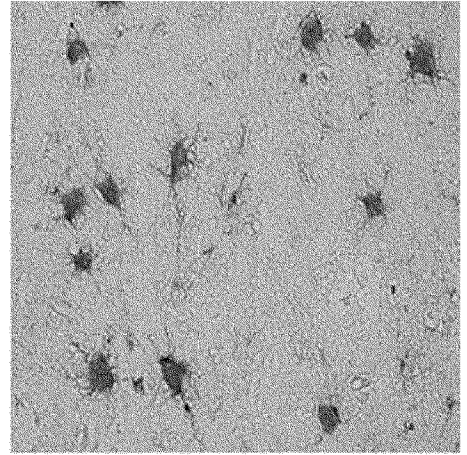
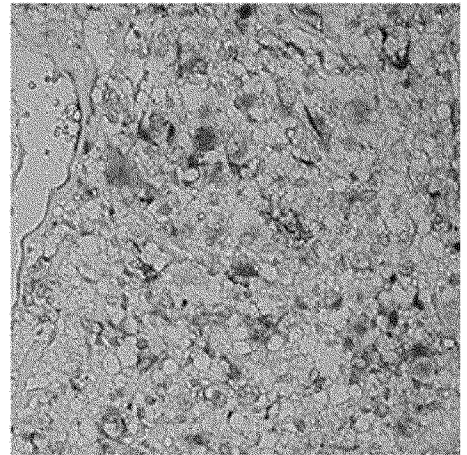
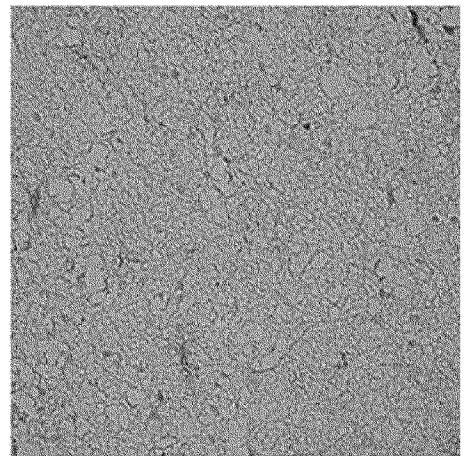
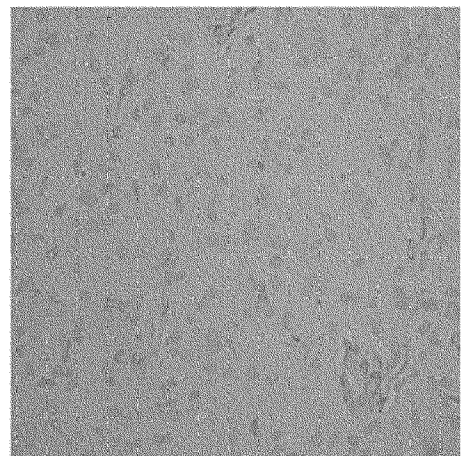
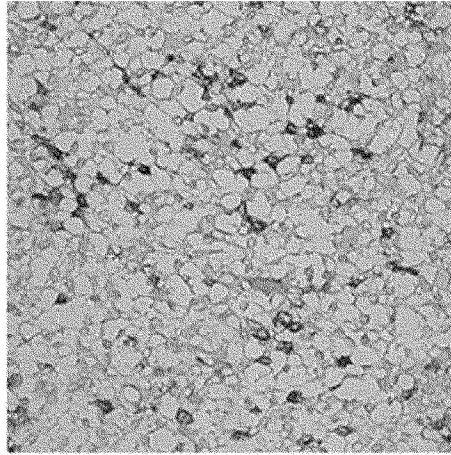
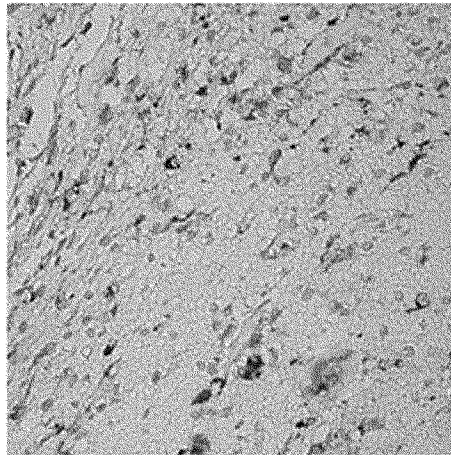
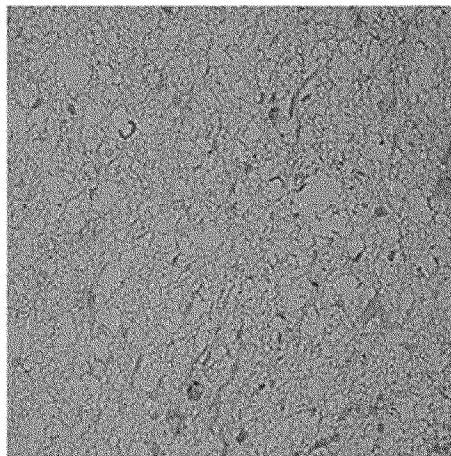
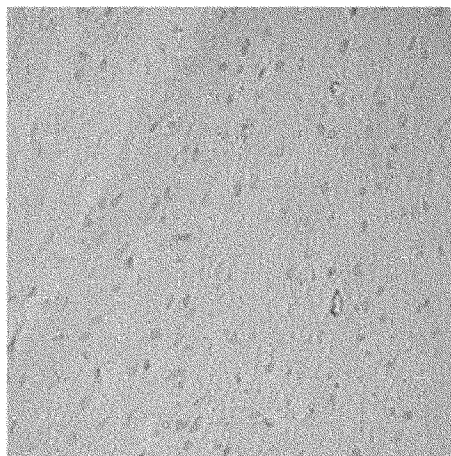


곤응구

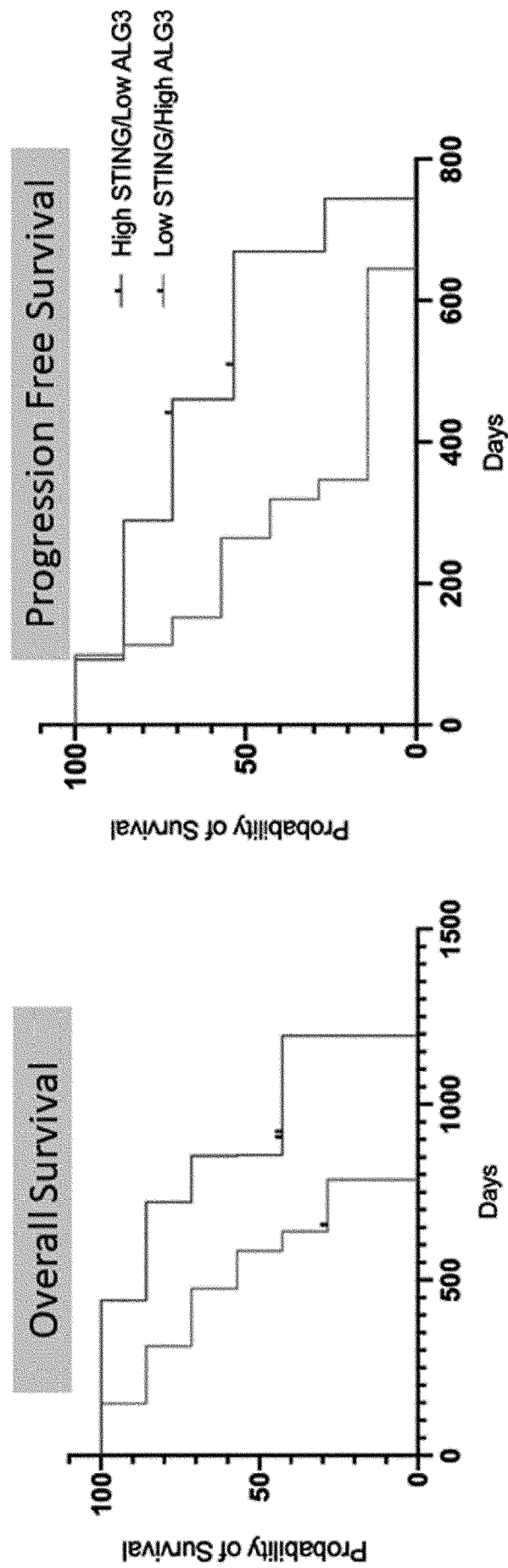
곤응구

[도22]

Expression of ALG3 in Human Glioblastoma

Good**Bad****GBM patient1****GBM patient2****GBM patient3****GBM patient4**

[도23]



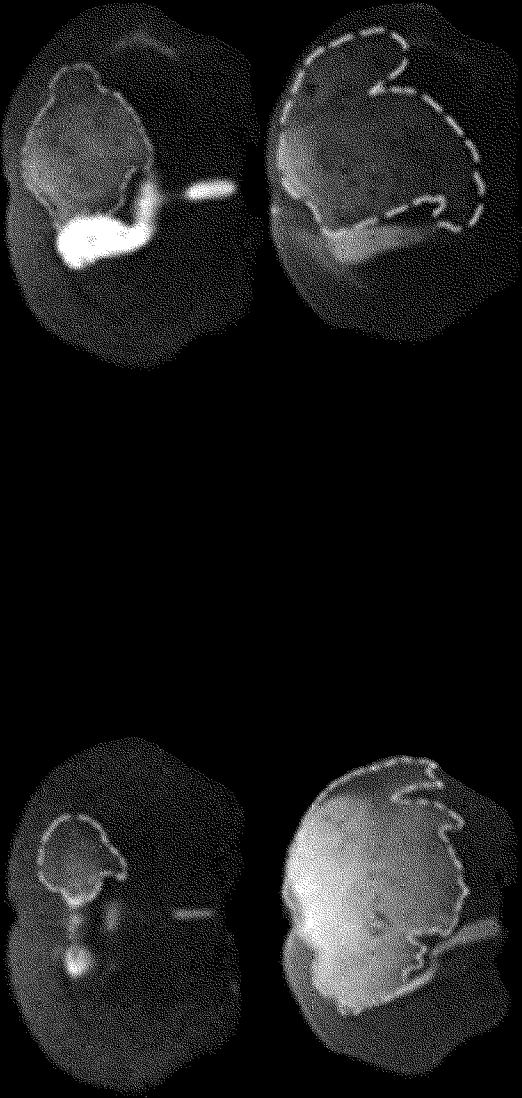
[도24]

STING 유전자
결손된 마우스

종양성장속도 증가
EGFR viii x STING KO

EGFR viii GBM mouse

CCRT only



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/011011

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/68(2006.01)i; 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) G01N 33/68; A61K 39/395; C12Q 1/68; G01N 33/574; C12Q 1/6886 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: 교모세포종(glioblastoma), STING(stimulator of interferon genes), CALU(calumenin), DDL3, CAV1, 결손(deletion), 동물모델(aminal model)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOWIE, M. et al. IMMU-31. Dysfunctional Sting Pathway Signaling Compromises Innate Immunity In Glioblastoma. NEURO-ONCOLOGY. November 2018, pp. vi127-vi128. See abstract.	7-9,11-12
X	KR 10-2016-0048196 A (GENENTECH, INC.) 03 May 2016. See claims 1 and 122; paragraphs [0175] and [0176]; and table 1.	7-9
X	KR 10-2014-0114415 A (GENENTECH, INC.) 26 September 2014. See claims 1 and 15-16; paragraphs [0148]-[0154]; and table 1.	7-9
X	WO 2015-181555 A1 (ALMAC DIAGNOSTICS LIMITED) 03 December 2015. See pages 105-106; and tables F, G, L and M.	7-9
A	KR 10-2015-0090246 A (ALMAC DIAGNOSTICS LIMITED) 05 August 2015. See entire document.	7-9,11-12
☐ 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 16 December 2020		Date of mailing of the international search report 17 December 2020
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/011011

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **1-6,10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1-6 and 10 include a method invention which includes a step for direct treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/011011

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2016-0048196	A	03 May 2016	AU	2014-312079	A1	03 March 2016
				AU	2014-312079	B2	16 January 2020
				BR	112016004305	A2	17 October 2017
				CA	2921515	A1	05 March 2015
				CN	105611940	A	25 May 2016
				EP	3038646	A2	06 July 2016
				EP	3038646	B1	04 March 2020
				HK	1221422	A1	02 June 2017
				IL	244089	A	21 April 2016
				JP	6664323	B2	13 March 2020
				JP	2016-529903	A	29 September 2016
				JP	2020-062012	A	23 April 2020
				MX	2016002423	A	19 August 2016
				RU	2016111161	A	05 October 2017
				RU	2706968	C2	21 November 2019
				SG	11201601471	A	30 March 2016
				US	10456470	B2	29 October 2019
				US	2015-0064178	A1	05 March 2015
				WO	2015-031808	A2	05 March 2015
				WO	2015-031808	A3	23 April 2015
KR	10-2014-0114415	A	26 September 2014	AU	2013-207778	A1	21 August 2014
				AU	2013-207778	B2	12 October 2017
				AU	2018-200270	A1	01 February 2018
				BR	112014017320	A2	29 May 2018
				CA	2862835	A1	18 July 2013
				CN	104203268	A	10 December 2014
				EP	2802346	A1	19 November 2014
				EP	2802346	B1	12 September 2018
				HK	1204933	A1	11 December 2015
				IL	233467	A	31 July 2018
				IL	257141	A	29 March 2018
				JP	6529261	B2	12 June 2019
				JP	2015-512612	A	30 April 2015
				JP	2018-082705	A	31 May 2018
				MX	2014008463	A	27 August 2014
				MX	356802	B	13 June 2018
				NZ	627443	A	28 October 2016
				RU	2014133164	A	10 March 2016
				RU	2659173	C2	28 June 2018
				SG	11201403927	A	28 August 2014
WO	2015-181555	A1	03 December 2015	US	10364466	B2	30 July 2019
				US	2013-0216533	A1	22 August 2013
KR	10-2015-0090246	A	05 August 2015	US	2014-0017233	A1	16 January 2014
				WO	2013-106765	A1	18 July 2013
WO	2015-181555	A1	03 December 2015	ZA	201405305	B	25 November 2015
				EP	3149196	A1	05 April 2017
				US	2017-0088902	A1	30 March 2017
KR	10-2015-0090246	A	05 August 2015	AU	2013-353839	A1	18 June 2015
				CA	2893033	A1	12 June 2014
				CN	105102631	A	25 November 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/011011

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 2925885 A1	07 October 2015
		EP 2925885 B1	05 February 2020
		HK 1214633 A1	29 July 2016
		IL 239196 A	30 July 2015
		JP 2015-536667 A	24 December 2015
		MX 2015006955 A	25 January 2016
		SG 11201504023 A	29 June 2015
		US 2016-0002732 A1	07 January 2016
		WO 2014-087156 A1	12 June 2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/6886(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/68; A61K 39/395; C12Q 1/68; G01N 33/574; C12Q 1/6886

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: 교모세포종(glioblastoma), STING(stimulator of interferon genes), CALU(calumenin), DDL3, CAV1, 결손(deletion), 동물모델(animal model)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	BOWIE, M. 등, 'IMMU-31. Dysfunctional Sting Pathway Signaling Compromises Innate Immunity In Glioblastoma', NEURO-ONCOLOGY, 2018.11, 페이지 vi127-vi128 초록	7-9, 11-12
X	KR 10-2016-0048196 A (제넨테크, 인크.) 2016.05.03 청구항 1, 122; 단락 [0175], [0176]; 표 1	7-9
X	KR 10-2014-0114415 A (제넨테크, 인크.) 2014.09.26 청구항 1, 15-16; 단락 [0148]-[0154]; 표 1	7-9
X	WO 2015-181555 A1 (ALMAC DIAGNOSTICS LIMITED) 2015.12.03 페이지 105-106; 표 F, G, L, M	7-9
A	KR 10-2015-0090246 A (알막 다이아그노스틱스 리미티드) 2015.08.05 전체 문헌	7-9, 11-12

☐ 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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 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

2020년 12월 16일 (16.12.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 12월 17일 (17.12.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



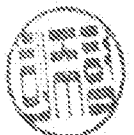
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 1-6, 10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 1-6, 10은 인체에 대한 직접적인 처치 단계를 포함하는 방법 발명을 포함하고 있으므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0048196 A	2016/05/03	AU 2014-312079 A1 AU 2014-312079 B2 BR 112016004305 A2 CA 2921515 A1 CN 105611940 A EP 3038646 A2 EP 3038646 B1 HK 1221422 A1 IL 244089 A JP 2016-529903 A JP 2020-062012 A JP 6664323 B2 MX 2016002423 A RU 2016111161 A RU 2706968 C2 SG 11201601471 A US 10456470 B2 US 2015-0064178 A1 WO 2015-031808 A2 WO 2015-031808 A3	2016/03/03 2020/01/16 2017/10/17 2015/03/05 2016/05/25 2016/07/06 2020/03/04 2017/06/02 2016/04/21 2016/09/29 2020/04/23 2020/03/13 2016/08/19 2017/10/05 2019/11/21 2016/03/30 2019/10/29 2015/03/05 2015/03/05 2015/04/23
KR 10-2014-0114415 A	2014/09/26	AU 2013-207778 A1 AU 2013-207778 B2 AU 2018-200270 A1 BR 112014017320 A2 CA 2862835 A1 CN 104203268 A EP 2802346 A1 EP 2802346 B1 HK 1204933 A1 IL 233467 A IL 257141 A JP 2015-512612 A JP 2018-082705 A JP 6529261 B2 MX 2014008463 A MX 356802 B NZ 627443 A RU 2014133164 A RU 2659173 C2 SG 11201403927 A US 10364466 B2 US 2013-0216533 A1 US 2014-0017233 A1 WO 2013-106765 A1 ZA 201405305 B	2014/08/21 2017/10/12 2018/02/01 2018/05/29 2013/07/18 2014/12/10 2014/11/19 2018/09/12 2015/12/11 2018/07/31 2018/03/29 2015/04/30 2018/05/31 2019/06/12 2014/08/27 2018/06/13 2016/10/28 2016/03/10 2018/06/28 2014/08/28 2019/07/30 2013/08/22 2014/01/16 2013/07/18 2015/11/25
WO 2015-181555 A1	2015/12/03	EP 3149196 A1 US 2017-0088902 A1	2017/04/05 2017/03/30

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0090246 A	2015/08/05	AU 2013-353839 A1	2015/06/18
		CA 2893033 A1	2014/06/12
		CN 105102631 A	2015/11/25
		EP 2925885 A1	2015/10/07
		EP 2925885 B1	2020/02/05
		HK 1214633 A1	2016/07/29
		IL 239196 A	2015/07/30
		JP 2015-536667 A	2015/12/24
		MX 2015006955 A	2016/01/25
		SG 11201504023 A	2015/06/29
		US 2016-0002732 A1	2016/01/07
		WO 2014-087156 A1	2014/06/12