

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024 년 4 월 18 일 (18.04.2024)



(10) 국제공개번호

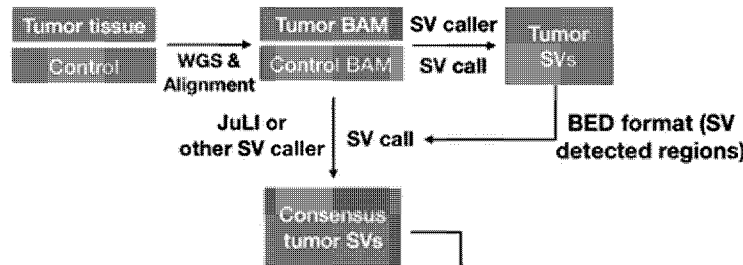
WO 2024/080481 A1

- (51) 국제특허분류: *G16B 30/00* (2019.01) *G16B 20/20* (2019.01)
G16B 50/00 (2019.01) *G16B 40/00* (2019.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/008217
- (22) 국제출원일: 2023 년 6 월 14 일 (14.06.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2022-0131806 2022 년 10 월 13 일 (13.10.2022) KR
- (71) 출원인: 인하대학교 산학협력단 (INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 22212 인천광역시 미추홀구 인하로 100, Incheon (KR).
- (72) 발명자: 신현태 (SHIN, Hyun Tae); 22332 인천광역시 중구 서해대로 366, A-771, Incheon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 정진 (JUNGJIN IP LAW FIRM); 08381 서울특별시 구로구 디지털로 29길 38, 505, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

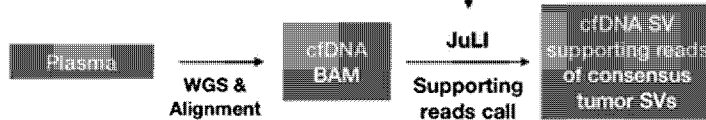
(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING MINIMAL RESIDUAL DISEASE BY DETECTING SEQUENCE OF STRUCTURAL VARIANT IN CFDNA

(54) 발명의 명칭: CFDNA의 구조 변이 서열 검출을 통한 미세잔존질환 진단 방법

1. Consensus tumor SVs detection by two algorithms



2. cfDNA SV supporting reads detection



(57) Abstract: The present invention relates to a novel system and method for whole genome sequencing (WGS), which detects the sequence of a structural variant with high sensitivity by using cfDNA samples derived from cancer patients and uses data on the structural variant that has been detected, to diagnose minimal residual disease in cancer patients. The present invention enables detecting the sequence of a structural variant, even when a cancer cell line and NA12878 were mixed at a ratio of 1:12,800, and sensitively identifying the sequence of a structural variant in cfDNA of metastatic lung cancer patients. Therefore, the method for detecting the sequence of a structural variant in cfDNA samples derived from cancer patients, according to the present invention, can be used to detect the sequence of a patient-specific structural variant with high sensitivity, even when a cancer-derived cfDNA is present at a low concentration in blood, etc., and to detect cancer cells remaining in a patient after cancer treatment, even when the sample size is small, and thus can be universally applied in the diagnosis of minimal residual disease regardless of the type of cancer.



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, ME, 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))

(57) 요약서: 본 발명은 암 환자 유래 cfDNA 시료를 이용하여 높은 민감도로 구조 변이 서열을 검출하고, 검출된 구조 변이 데이터를 이용하여 암 환자의 미세잔존질환 진단에 사용하기 위한 새로운 WGS (whole genome sequence) 분석 시스템 및 방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 암 세포주와 NA12878을 1:12,800 비율로 섞은 경우에도 구조 변이 서열을 검출하였으며, 전이성 폐암환자의 cfDNA 에서도 구조 변이 서열을 민감하게 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법을 이용하면, 암 유래 cfDNA 가 낮은 순도로 혈액 등의 존재하더라도, 높은 민감도로 환자 특이적 구조 변이 서열을 검출할 수 있고, 암 치료 후 환자에 남아있는 암 세포를 적은 시료로도 검출할 수 있어, 암 종과 상관없이 범용적으로 미세 잔존 질환 진단에 활용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: CFDNA의 구조 변이 서열 검출을 통한 미세잔존질환 진단 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 암 환자 유래 cfDNA (Cell-free DNA) 시료에서 높은 민감도로 구조 변이 서열을 검출하고, 이를 이용하여 암 환자의 미세잔존질환(Minimal Residual Disease; MRD)을 진단하기 위한 새로운 전장 유전체 서열 분석 (Whole-Genome Sequencing, WGS) 시스템 및 방법에 관한 것이다.
- [2] 본 출원은 2022년 10월 13일에 출원된 한국특허출원 제10-2022-0131806호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

[3]

배경기술

- [4] 차세대 염기서열 분석(Next Generation Sequencing)은 유전체를 무수히 많은 조각으로 나눠서 읽고, 얻어진 염기서열 조각을 정렬하여 유전체의 서열을 분석하는 유전체 고속 분석 방법이다. 차세대 염기서열 분석 기술을 통한 전장 유전체 서열 분석(Whole-Genome Sequencing, WGS)은 거의 모든 유형의 체세포 돌연변이(somatic variant) 검출에 유용하고, 이러한 유용성 덕분에 여러분야에서 광범위하게 사용되고 있으며, 특히 암 유전체학에서 매우 중요한 역할을 하고 있다.
- [5] 전 세계적으로는 유전체 분석 사업은 빠르게 발전하고 있으며, 이러한 차세대 염기서열 분석 기법은 임상유전체(clinical genomics), 약물유전체학(pharmacogenomics) 및 중개 임상(translational medicine) 분야에서도 활발히 활용되고 있다.
- [6] 구조 변이(Structural Variants, SV)는 암 발생 과정에 중요한 역할을 하므로, 암 유전체에서 체세포 구조변이를 검출하기 위해 많은 생물 정보학 알고리즘과 툴이 개발되었다. 유전체의 특정 위치가 잘려서 서로 결합하여 발생하는 구조 변이는 결합 부위에 융합(fusion) DNA 서열을 생성하게 되고 이는 정상 조직에서는 확인되지 않는 특이적인 고유 서열이다. 암 세포에서는 apoptosis로 인해 혈중으로 cfDNA가 유입되는 것으로 알려져 있고, cfDNA에서 원발암의 특이적인 구조 변이에 의한 융합 DNA 서열이 검출된다면, 이를 이용하여 암 치료 후 체내에 남아있는 미세잔존질환(Minimal Residual Disease; MRD)을 진단하는데 사용할 수 있을 것으로 기대된다.
- [7] cfDNA에서 돌연변이를 찾기 위한 방법으로 targeted high-depth 시퀀싱이 널리 이용되고 있다. 상기 방법은 돌연변이를 민감하게 찾을 수 있다는 장점이 있으나, high-depth를 구현하기 위해 개별 암 종에 적합한 표적화된 패널을 준비해야 하고, 노이즈를 줄이기 위한 실험적인 전처리 공정이 필요하다.

- [8] 따라서 암 미세잔존질환을 진단하기 위해 범용적으로 활용할 수 있는, cfDNA 시료의 WGS를 이용하여 개별 암 특이적인 구조 변이 서열을 효과적으로 검출할 수 있는 새로운 방법에 대한 필요성이 있다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명자들은 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 민감하게 검출하기 위해서, 원발암의 WGS를 활용하여 구조 변이를 찾고, 이 구조 변이의 서열을 cfDNA의 WGS에서 매칭하는 방법을 통해 적은 수의 구조 변이 서열 정보를 가지고 있는 리드들을 cfDNA에서 검출할 수 있고, 이를 환자의 미세잔존질환 진단에 활용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 환자 유래 암 조직의 WGS (whole genome sequence)를 2가지 이상의 구조 변이 분석 소프트웨어로 분석하여 공통적으로 확인되는 원발암 시료의 공통 (consensus) 구조 변이 위치 데이터를 얻는 단계; 및 2) 상기 1) 단계에서 획득한 구조 변이 위치의 참조 서열(reference sequence)과 해당 환자의 cfDNA WGS를 매칭하여, 공통 구조 변이 위치에 존재하는 구조 변이 서열 지지 리드 (supporting read)를 획득함으로써, cfDNA 시료 내 존재하는 구조 변이에 의해 발생한 특이 서열을 매칭하는 단계; 를 포함하는, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법을 제공한다.
- [13] 또한 본 발명은 1) 환자 유래 암 조직의 WGS (whole genome sequence)를 2가지 이상의 구조 변이 분석 소프트웨어로 분석하여 공통적으로 확인되는 원발암 시료의 공통 (consensus) 구조 변이 위치 데이터를 얻는 단계; 및 2) 상기 1) 단계에서 획득한 구조 변이 위치의 참조 서열(reference sequence)과 해당 환자에서 암 치료 후 수득된 cfDNA WGS를 매칭하여, 공통 구조 변이 위치에 존재하는 구조 변이 서열 지지 리드 (supporting read)를 획득함으로써, cfDNA 시료 내 존재하는 구조 변이에 의해 발생한 특이 서열을 매칭하는 단계; 를 포함하는, 미세잔존질환 (Minimal Residual Disease; MRD)에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[14]

발명의 효과

- [15] 본 발명에서는 암 세포주와 NA12878을 1:12,800 비율로 섞은 경우에도 구조 변이 서열을 검출하였으며, 전이성 폐암환자의 cfDNA 에서도 구조 변이 서열을 민감하게 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법을 이용하면, 암 유래 cfDNA 가 낮은 순도로 혈액 등의 존재하더라도, 높은 민감도로 환자 특이적 구조 변이 서열을 검출할 수 있고,

암 치료 후 환자에 남아있는 암 세포를 적은 시료로도 검출할 수 있어, 암 종과 상관없이 범용적으로 미세 잔존 질환 진단에 활용할 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 본 발명의 cfDNA 내 구조 변이 서열 검출 방법의 흐름도를 나타낸 도이다.

[18] 도 2는 본 발명 검출 방법 중 2단계에서 수행되는 대응 참조 서열과 각 지지 리드를 비교하는 구조 변이 서열 확인 공정의 모식도이다.

[19] 도 3은 세포주 혼합 실험을 이용한 분석 검증 결과를 요약하여 나타낸 도이다.

[20] 도 4 및 도 5는 임상 검증 실험 중 case 1 환자 유래 원발암 조직에서 확인된 구조 변이가 cfDNA-1 및 cfDNA-2 시료상에서 동일하게 확인되고 normal control에서는 관찰되지 않음을 보여주는 결과이다.

[21] 도 6은 case 1 환자의 원발암 조직에서 KRAS 변이가 검출 (36%)되고, cfDNA-1, cfDNA-2 시료에서도 같은 변이가 19%, 6% 검출되는 결과를 확인한 도이다.

[22] 도 7 및 도 8은 임상 검증 실험 중 case 2 환자 유래 원발암 조직에서 확인된 구조 변이가 cfDNA-1 및 cfDNA-2 시료상에서도 동일하게 확인되고 normal control에서는 관찰되지 않음을 보여주는 결과이다.

[23] 도 9은 case 2 환자의 원발암 조직에서 TP53 변이가 검출 (45%)되고, cfDNA-1, cfDNA-2 시료에서도 같은 변이가 2%, 0% 검출되는 결과를 확인한 도이다.

[24] 도 10은 case 2 환자의 원발암 조직에서 SMARCA4 변이가 검출 (27%)되고, cfDNA-1, cfDNA-2 시료에서도 같은 변이가 5%, 2% 검출되는 결과를 확인한 도이다.

[25]

발명의 실시를 위한 형태

[26] 본 발명은 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법 및 이를 이용한 미세잔존질환(Minimal Residual Disease; MRD)에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[27] 본 발명에 따르면, 암 환자의 원발암 조직에서 미리 확인된 구조 변이를 이용하여 치료 후 암 환자의 cfDNA에 존재하는 구조 변이 서열을 높은 민감도로 빠르게 비교 분석할 수 있어, 치료 후 환자에 잔존하는 암 세포를 모니터링하고 암 치료 경과 및 예후, 재발 가능성 등에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[28]

[29] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[30]

[31] 본 발명은 1) 환자 유래 암 조직의 WGS를 2가지 이상의 구조 변이 분석 소프트웨어로 분석하여 공통적으로 확인되는 원발암 시료의 공통 (consensus) 구조 변이 데이터를 얻는 단계; 및 2) 상기 1) 단계에서 획득한 구조 변이 위치의 참조

서열(reference sequence)과 해당 환자의 cfDNA WGS를 매칭하여, 공통 구조 변이 위치에 존재하는 구조 변이 서열 지지 리드 (supporting read)를 획득함으로써, cfDNA 시료 내 존재하는 구조 변이에 의해 발생한 특이 서열을 매칭하는 단계; 를 포함하는, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법에 관한 것이다.

- [32] 본 발명의 1) 단계는 원발암 시료의 공통 (consensus) 구조 변이 데이터를 얻는 단계이며, 환자 유래 암 조직의 WGS 및 정상 대조군의 WGS를 2가지 이상의 구조 변이 분석 데이터로 분석한다.
- [33] 상기 단계에서는 보다 정확한 환자의 구조 변이 데이터를 얻기 위하여 2가지 이상의 구조 변이 분석 소프트웨어를 이용하는 것을 특징으로 한다. 해당 단계에서는 암 환자에서 획득된 암 조직, 즉 원발암 시료 및 정상 대조군을 이용하여 WGS 및 정렬 (alignment)을 수행하고, 이를 통해 시퀀싱 리드들이 어떤 염색체의 어느 위치에 있는 DNA 인지 표준 유전체 (reference genome) 상에서 위치를 확인하는 매핑 (Mapping) 이 수행된다. 매핑을 완료하면 각 시퀀싱 리드에 대하여 표준 유전체 상의 염색체 번호 및 위치 정보가 제공되며, 이를 포함하는 정렬된 염기 조각인 BAM(binary alignment map) 포맷을 얻을 수 있다. 제1 구조 변이 분석 소프트웨어를 이용하여, 획득된 종양 조직 유래 '종양 BAM' 파일과 '대조군 BAM' 파일에서 각 시퀀싱 리드를 비교 분석하여 특정 위치에 표준 유전체 서열과 다른 구조 변이가 일어난 변이체의 존재를 확인하기 위한 '구조 변이 호출 (Structural variant call, SV call)' 이 수행되며, 이를 통해 '제 1 구조 변이 위치 데이터'를 획득할 수 있다.
- [34] 이어서 본 발명의 '공통 (consensus) 구조 변이 위치 데이터'를 획득하기 위하여, 제 2 구조변이 분석 소프트웨어를 이용하여 구조 변이 호출을 수행한다. 이때 공통 구조변이를 빠르게 확인하기 위해, 제1 구조 변이 분석 소프트웨어를 이용하여 획득된 '제1 구조 변이 위치 데이터'를 제2 구조 변이 분석 소프트웨어에 입력하여 구조 변이 호출을 수행할 수 있다.
- [35] 즉, 본 발명에 있어서, '공통(consensus) 구조 변이 위치 데이터'란 복수 개의 구조 변이 분석 소프트웨어를 통한 SV call 에서 공통적으로 존재하는 것으로 확인된 구조 변이 위치에 대한 정보를 의미한다.
- [36] 상기 1) 단계는 암환자의 원발암 시료에 존재하는 구조 변이에 대한 DB 를 구축하기 위한 목적으로 이용되는 것일 수 있으며, 이와 같이 한번 획득된 공통 구조 변이 위치 데이터는 향후 다양한 시점에서 획득한 동일 암 환자의 cfDNA 구조 변이와의 비교 분석에 모니터링 목적으로 반복 활용될 수 있다.
- [37] 본 발명에 사용되는 구조 변이 분석 소프트웨어는 당 분야에서 전장 유전체 분석을 통해 체세포 구조 변이를 검출할 수 있는 것으로 알려진 다양한 종류의 소프트웨어를 제한없이 사용할 수 있으며, 예컨대 DELLY, BRASS, SvABA, dRanger, Pindell, BreakDancer, GASV, Hydra, CNVnator 및 JuLI 로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상을 사용할 수 있다. 상기 2종 이상의 분석 소프트웨어는

순차적으로 사용될 수 있고, 제1 WGS 분석 소프트웨어는 SV call 을 통해 각 시퀀싱 리드를 분석하여 특정 위치에 표준 유전체 서열과 다른 구조 변이가 일어난 변이체의 존재를 확인하고, '제1 구조 변이 위치 데이터'를 제공한다. 이후 제2 WGS 분석 소프트웨어에 제1 WGS 분석 소프트웨어에서 수득된 제1 구조 변이 위치 데이터를 VCF, BED format 등 으로 입력하고, 분석 대상인 종양 BAM 파일을 입력하면, 미리 확인된 제1 구조 변이 위치 데이터를 기반으로 신속하게 2종의 WGS 분석 소프트웨어에서 공통적으로 존재하는 '공통 구조 변이 위치 데이터'를 수득할 수 있다. WGS 분석 소프트웨어의 선택은 이에 제한되는 것은 아니나, 제1 WGS 분석 소프트웨어는 많은 정보량을 신속하게 처리할 수 있는 소프트웨어를 선택하는 것이 바람직하고, 본 발명에서는 바람직한 일 예로 DELLY (Version: 0.8.7, <https://github.com/dellytools/delly>)를 이용하였다. 또한 DELLY 에서 제공된 제 1 구조 변이 위치 데이터를 기반으로 신속하게 공통 구조 변이를 탐색하는 제2 WGS 분석 소프트웨어로 공개 소프트웨어인 JuLI(<https://github.com/sgilab/JuLI>, J Mol Diagn. 2020 Mar;22(3):304-318) 를 이용하였다.

- [38] 따라서 본 발명의 상기 1) 단계는 1-1) DELLY, BRASS, SvABA, dRanger, Pindell, BreakDancer, GASV, Hydra 및 CNVnator 로 이루어진 군에서 선택된 1종의 분석 소프트웨어로 원발암 시료의 제 1 구조 변이 위치 데이터를 얻는 단계; 및 1-2) 상기 1-1) 단계에서 수득된 제 1 구조 변이 위치 데이터를 JuLI 에 입력하여 공통적으로 확인되는 원발암 시료의 공통(consensus) 구조 변이 위치 데이터를 얻는 단계; 를 순차적으로 수행하는 것을 포함하는, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이를 검출하는 방법일 수 있다.
- [39] 또한 본 발명은 2) 상기 1) 단계에서 획득한 구조 변이 위치의 참조 서열(reference sequence)과 해당 환자의 cfDNA WGS를 매칭하여, 공통 구조 변이 위치에 존재하는 구조 변이 서열 지지 리드(supporting read)를 획득함으로써, cfDNA 시료 내 존재하는 구조 변이에 의해 발생한 특이 서열을 매칭하는 단계;를 포함한다.
- [40] 본 발명은 암종에 상관없이 범용적으로 cfDNA 시료에 존재하는 적은 수의 구조 변이를 높은 민감도로 검출할 수 있음을 특징으로 한다. 본 발명에서 상기 cfDNA는 암 환자의 뇌척수액, 흉수, 심낭액, 복수, 소변, 전혈, 혈장 또는 혈청 유래의 cfDNA 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [41] 본 발명은 통상적인 변이 검출 방법들과 마찬가지로, 검출 민감도는 sequencing depth에 따라 조절할 수 있다.
- [42] 한편 상기 2) 단계의 분석 대상이 되는 암 환자의 cfDNA 는 암 치료 중 또는 암 치료 후의 환자에서 수득되는 것일 수 있다. 본 발명에서는 상기 1) 단계에서 암 환자의 원발암 조직 내 존재하는 공통 구조 변이 위치에 대한 DB를 구축하고, 이후 환자가 암 치료를 받는 중 또는 받은 후, 환자의 cfDNA 내 구조 변이 위치 서열과 비교함으로써, 치료 후 환자에 남아있는 미세한 수준의 잔존 암 세포에 대한 정보를 제공할 수 있다.

- [43] 보다 구체적으로 상기 2) 단계는 다음과 같다: 먼저 암 환자의 cfDNA (Cell-free DNA) 를 WGS 및 정렬하여 수득된 각 시퀀싱 리드에 대하여 표준 유전체 상의 염색체 번호 및 위치 정보가 기록된 cfDNA BAM(binary alignment map) 포맷, 즉 cfDNA 매핑(mapping) 데이터를 얻는다. 이후 수득된 cfDNA 매핑 데이터인 cfDNA BAM 파일을 1) 단계에서 수득된 공통 구조 변이 위치 데이터와 함께 구조 변이 분석 소프트웨어에 입력하고, 지지 리드 콜(supporting read call) 을 수행하여, 1) 단계에서 확인된 공통 구조 변이 위치에서 대응 참조 서열(counter reference sequence) 과 함께 상기 지지 리드들을 정렬함으로써, cfDNA 시료 내 존재하는 구조 변이에 의해 발생한 특이 서열을 매칭하는 단계이다.
- [44] 상기 대응 참조 서열은 표준 유전체 데이터와 동일한 의미로 사용될 수 있으며, hg19 또는 hg38 등 일 수 있다.
- [45] 본 발명의 방법은 암 종과 상관없이 모든 암에 범용적으로 사용할 수 있으며, 기존 영상이나 혈액 검사, 표적화 고속 시퀀싱(targeted high-depth sequencing) 방법과 달리, 암 종류에 따라 검사 항목이나 사전 디자인을 해야 하는 별도의 공정을 수반하지 않는다. 따라서 본 발명의 대상이 되는 암은 당 분야에 공지된 암 종을 제한없이 포함할 수 있고, 예컨대 위암, 폐암, 비소세포성 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 골암, 비소세포성 골암, 혈액암, 피부암(흑색종 등), 두부 또는 경부 암, 자궁암, 직장암, 항문 부근암, 결장암, 나팔관암, 자궁내막암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 배수성암(polyploid carcinoma), 침샘암, 육종암, 가성점액종, 간모세포종, 고환암, 교모세포종, 구순암, 난소생식세포종양, 기저세포암, 다발성골수종, 담낭암, 맥락막흑색종, 바터팽대부암, 복막암, 부신암, 설암, 소세포암, 소아림프종, 신경모세포종, 십이지장암, 요관암, 성상세포종, 수막종, 신우암, 외음부암, 흉선암, 중추신경계(central nervous system, CNS) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있다.
- [46]
- [47] 본 발명에 있어서, 검출 대상이 되는 구조 변이는 체세포 구조 변이일 수 있고, 유전자의 복제, 결실, 전좌 및 삽입으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 비교 대상인 대응 참조 서열과 비교하여 서열상 특이적인 차이를 보이는 것을 말한다. 대부분의 암은 암 발생 초기에 수십개에서 수백개의 구조 변이가 발생하며, 암이 진행되는 동안 이러한 구조 변이가 유지된다. 암 세포에서는 세포자멸사에 의하여 혈중에 cfDNA 가 흘러나오게 되며, 혈중에 존재하는 cfDNA 에서 암 세포에서 발견된 구조 변이 서열이 확인된다면, 환자의 몸 속에 암이 잔존하고 있고, 미세잔존질환을 유발할 가능성이 있음을 진단할 수 있다. 따라서,

본 발명의 검출 대상이 되는 구조 변이 서열은, 환자의 암세포에 존재하는 것으로 확인된 구조 변이 중 cfDNA에 존재하는 구조 변이의 서열이다.

[48]

[49] 본 발명의 또다른 양태로, 본 발명은 1) 환자 유래 암 조직의 WGS (whole genome sequence)를 2가지 이상의 구조 변이 분석 소프트웨어로 분석하여 공통적으로 확인되는 원발암 시료의 공통 (consensus) 구조 변이 위치 데이터를 얻는 단계; 및 2) 상기 1) 단계에서 획득한 구조 변이 위치의 참조 서열(reference sequence)과 해당 환자에서 암 치료 후 수득된 cfDNA WGS를 매칭하여, 공통 구조 변이 위치에 존재하는 구조 변이 서열 지지 리드 (supporting read)를 획득함으로써, cfDNA 시료 내 존재하는 구조 변이에 의해 발생한 특이 서열을 매칭하는 단계; 를 포함하는, 미세잔존질환(Minimal Residual Disease; MRD)에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[50]

[51] 본 발명에 있어, 미세잔존질환이란, 최소 잔류 질병이라고도 하며 치료 중이나 치료를 완료한 환자에 남아있는 소수의 악성 세포가 분자적으로 검출되는 상태를 의미한다. 미세잔존질환은 다양한 혈액암과 고형암의 추적 관찰 대상이 되며, 미세잔존질환을 확인하여 환자의 치료에 대한 반응성을 확인하고 재발의 위험을 예측할 수 있다. 따라서 본 발명의 미세잔존질환에 대한 정보는 치료 중 또는 치료 후에 잔존하는 암세포 유무, 암 재발 가능성 또는 암 치료 예후에 대한 정보일 수 있다. 만약 본 발명의 방법을 수행하여, 환자의 cfDNA 시료에서 원발암 시료에서 확인된 구조 변이 서열이 확인되는 경우, 이 환자는 암 세포가 잔존하거나, 치료에 대한 반응성이 낮거나, 재발의 위험이 높거나, 또는 암 치료 후 예후가 나쁠 것으로 예측할 수 있다.

[52] 본 발명에서 암 환자의 치료는 방사선 요법, 면역요법, 호르몬 요법, 화학요법 치료 또는 외과적 절제 치료 등 당 분야에 공지된 치료법을 모두 제한없이 포함한다.

[53] 또한 본 발명은 환자 자신의 원발암 공통 구조 변이와 치료 이후 cfDNA 구조 변이 서열을 비교하여 미세잔존질환에 대한 정보를 제공하므로, 환자 맞춤형 정보 제공 방법으로 활용될 수 있다.

[54] 본 발명을 이용하면, 매우 낮은 순도의 cfDNA를 포함하는 치료 후 환자의 혈액, 혈장 또는 혈청 유래 시료에서도 높은 민감도로 구조 변이 서열을 검출할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서는 1:12,800까지 희석된 시료에서도 충분한 수의 지지 리드를 확인할 수 있고 이를 통해 환자 cfDNA 시료의 구조 변이 서열을 확인하여 미세잔존질환에 대한 정보를 제공할 수 있음을 확인하였다.

[55] 본 발명의 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법 및 미세잔존질환에 대한 정보를 제공하는 방법은 모두 컴퓨터 시스템에 의해 *in silico*로 수행되는 것인 방법일 수 있다. 따라서 염기서열 변이 정보는 컴퓨터 시스템

을 통하여 접수/수득될 수 있으며, 이런 측면에서 본 발명의 방법은 유전자 변이 정보를 컴퓨터 시스템으로 접수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[56]

[57] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[58]

[59] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[60]

[61] 실시예 1. 혈장 cfDNA 내 구조 변이 특이 서열 검출 방법 구축

[62] 암환자의 혈장 cfDNA 내 구조 변이 특이 서열을 확인하기 위하여, 다음의 2 단계로 이루어진 프로세스를 구축하였다:

[63]

[64] 1. 환자의 공통 (consensus) 구조 변이 확인 단계

[65] 환자가 가진 공통 (consensus) 구조 변이를 찾기 위하여, 2가지 종류의 분석틀을 이용하였다. 환자 유래의 암 조직과 대조군 시료를 이용하여 WGS를 수행한 후 BWA의 default setting으로 정렬(alignment)을 수행하였다. 분석틀로는 DNA 체세포 변이, DNA 융합을 검출할 수 있는 구조 변이 검출 소프트웨어인 JuLI(<https://github.com/sgilab/JuLI>)와 다른 구조 변이 검출 소프트웨어인 DELLY (DELLY Version: 0.8.7, <https://github.com/dellytools/delly>)를 활용하였다. 1차적으로 DELLY를 통해 종양 BAM 및 대조군 BAM 파일을 이용한 구조 변이 호출을 수행하여 환자의 원발암 시료에 존재하는 구조 변이 위치(제1구조 변이 위치 데이터)를 확인하였다. 확인된 환자 구조 변이 위치 결과를 BED 포맷으로 JuLI에 입력하고, 종양 BAM 파일을 입력한 후 구조 변이 호출을 수행하여 DELLY와 JuLI에서 공통적으로 구조 변이가 의심되는 위치를 확인하여 공통 (consensus) 구조 변이 위치 데이터를 얻었다. 확인된 공통 구조 변이 위치 데이터를 이후 2단계의 JuLI output 포맷 형태로 활용하였다.

[66]

[67] 2. 지지 리드 검출을 통한 cfDNA 구조 변이 서열 검출 단계

[68] 암 발생 이후 환자에서 혈장 시료를 수득한 후, 해당 시료에서 DNA를 추출하여 WGS 분석을 수행한 후 BWA의 default setting으로 정렬(alignment)을 수행하여 cfDNA BAM 파일을 수득하였다. 상기 1 단계를 통해 확보한 공통 구조 변이 위치와 동일한 위치에 구조 변이 특이 서열을 의미하는 지지 리드(supporting read)가 있는지 cfDNA BAM 파일에서 확인하기 위하여 JuLI 프로그램의 'callread' 함수를 적용하였다. 'callread' 함수를 이용하면, 공통(consensus) 구조 변이 위치에서 hg19 또는 hg38과 같은 대응 참조 서열(counter reference sequence)과 각 지지 리드의 비교를 통해 구조 변이에 의해 발생한 특이 서열을 매칭할 수 있다. 이때, JuLI

파라미터 중 splitratio의 default 값을 조정하면 특이도를 조절할 수 있으며 0.95 로 설정하여 특이도를 높였다.

[69] 이러한 방법을 이용하면, 적은 수의 리드 존재만으로도 확인하고자 하는 fusion site 에서 공통 구조 변이를 서포팅하는 특이 서열을 가진 cfDNA 구조 변이 지지 리드가 있는지 높은 민감도로 검출할 수 있다.

[70]

[71] 상기 2단계로 이루어진 본 발명의 혈장 cfDNA 내 구조 변이 서열 검출 방법의 흐름도를 도 1에 나타내었고, 2 단계의 대응 참조서열과 지지 리드의 비교를 도 2에 모식화하여 나타내었다.

[72]

[73] **실험예 1. 분석 검증**

[74] 이하에서는 실제 환자의 시료와 세포주를 이용한 분석 검증 결과를 설명한다.

[75]

[76] **1.1 분석 시료의 준비**

[77] cfDNA 에 존재하는 DNA 구조 변이를 확인하기 위하여, 다음과 같은 시료를 준비하였다. 분석 검증 실험을 위하여 암세포 및 표준 물질을 시료로 이용하였다. 변이 정의를 수행함에 있어, 표준 물질로 NA12878를 지정하였고, 이를 기반으로 구조 변이를 비교 검출하였다. NA 12878는 Coriell institute에서 구매하여 사용하였다. 5개의 암세포 주 (WM2664, A375, SNU16, HCC1954, HCC95)는 한국 세포주은행에서 구입하여 사용하였다.

[78] NA12878의 DNA와 5개의 암세포 주 (WM2664, A375, SNU16, HCC1954, HCC95)에서 채취한 DNA를 일반적인 cfDNA 절편 사이즈로 알려져 있는 150 내지 170bp 로 shearing 하였다. 5종 암세포주를 각각 10ng/ul 로 희석하고 동일 부피 50 ul로 혼합하여 최종 10ng/ul, 250ul 의 혼합 시료를 준비하여 초기 시료로 준비하였다. NA 12878 의 초기 시료량은 50 ng/ul 이다. 이후 이들 5종의 암세포 혼합 시료와 NA 12878 혼합 비율을 cell line: NA12878 = 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 및 1:12800 로 달리하여 제조하고 본 발명의 민감도를 확인하기 위한 실험에 이용하였고, 모든 실험은 3회 반복 수행하였다.

[79] 환자의 임상 시료는 인하대병원에 내원한 전이성 폐암 환자로부터 각각 FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded) 암 조직, 혈액 buffy coat (control tissue) 를 얻었으며, 다른 시점에서 채취한 혈장 샘플을 준비하여 cfDNA 를 채취하였다.

[80]

[81] **1.2 세포주 혼합 실험을 이용한 분석 검증 (Analytical validation)**

[82] 실시예 1의 방법을 이용한 분석 검증을 수행하였다. 먼저 NA 12878 와 5개의 암세포 주 (WM2664, A375, SNU16, HCC1954, HCC95), 및 이들의 혼합 시료를, cell line: NA12878 = 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 및 1:12800 로 혼합 비율을 달리하여 3회 반복 분석한 결과를 표 1 내지 표 8에 나타내었다. 각 표는 5종의 암 세포주에서 구조 변이 검출을 3회 반복한 값을 나타내며, 동일

한 Sample ID 는 하나의 BAM 파일을 의미한다. CD_21_16908 내지 CD_21_16912 는 다음과 같이 각 암 세포주에 대응되는 데이터이다: CD_21_16908 (A375SM), CD_21_16909 (HCC95), CD_21_16910 (HCC1954), CD_21_16911 (SNU16), CD_21_16912 (WM2664). 암 세포주는 평균 22X 로 데이터가 생산되었고, 혼합 시료는 평균 70X로 데이터를 생산하였다. 각 세포주의 변이가 레퍼런스로만 된 WGS에서 검출되는지 확인한 데이터는 표 9에 나타내었다.

[83]

[84] [표1]

Cell-line	5MIX+NA12878 혼합비율	Sample ID	Remark	Total fusion number of each cell-line	cfDNA Fusion Number	Reads Count
CD_21_16908	1:100	CD_21_17603_C L_D SRG_1	WGS_60X - 1st	171	89	162
CD_21_16909	1:100	CD_21_17603_C L_D SRG_1	WGS_60X - 1st	292	130	239
CD_21_16910	1:100	CD_21_17603_C L_D SRG_1	WGS_60X - 1st	475	277	847
CD_21_16911	1:100	CD_21_17603_C L_D SRG_1	WGS_60X - 1st	194	115	689
CD_21_16912	1:100	CD_21_17603_C L_D SRG_1	WGS_60X - 1st	247	131	251
CD_21_16908	1:100	CD_22_06205_C L_D SRG_1	WGS_60X - 2nd	171	51	87
CD_21_16909	1:100	CD_22_06205_C L_D SRG_1	WGS_60X - 2nd	292	84	158
CD_21_16910	1:100	CD_22_06205_C L_D SRG_1	WGS_60X - 2nd	475	181	407
CD_21_16911	1:100	CD_22_06205_C L_D SRG_1	WGS_60X - 2nd	194	80	382
CD_21_16912	1:100	CD_22_06205_C L_D SRG_1	WGS_60X - 2nd	247	79	118
CD_21_16908	1:100	CD_22_10086_C L_D SRG_1	WGS_60X - 3rd	171	64	110
CD_21_16909	1:100	CD_22_10086_C L_D SRG_1	WGS_60X - 3rd	292	83	137
CD_21_16910	1:100	CD_22_10086_C L_D SRG_1	WGS_60X - 3rd	475	170	442
CD_21_16911	1:100	CD_22_10086_C L_D SRG_1	WGS_60X - 3rd	194	76	396
CD_21_16912	1:100	CD_22_10086_C L_D SRG_1	WGS_60X - 3rd	247	79	109

[85]

[86] [표2]

Cell-line	5MIX+NA12878 혼합비율	Sample ID	Remark	Total fusion number of each cell-line	cfDNA Fusion Number	Reads Count
CD_21_16908	1:200	CD_21_17605_C L_D SRG_1	WGS_60X - 1st	171	18	23
CD_21_16909	1:200	CD_21_17605_C L_D SRG_1	WGS_60X - 1st	292	49	71
CD_21_16910	1:200	CD_21_17605_C L_D SRG_1	WGS_60X - 1st	475	100	197
CD_21_16911	1:200	CD_21_17605_C L_D SRG_1	WGS_60X - 1st	194	45	194
CD_21_16912	1:200	CD_21_17605_C L_D SRG_1	WGS_60X - 1st	247	46	71
CD_21_16908	1:200	CD_22_06207_C L_D SRG_1	WGS_60X - 2nd	171	23	38
CD_21_16909	1:200	CD_22_06207_C L_D SRG_1	WGS_60X - 2nd	292	45	60
CD_21_16910	1:200	CD_22_06207_C L_D SRG_1	WGS_60X - 2nd	475	94	192
CD_21_16911	1:200	CD_22_06207_C L_D SRG_1	WGS_60X - 2nd	194	44	182
CD_21_16912	1:200	CD_22_06207_C L_D SRG_1	WGS_60X - 2nd	247	38	56
CD_21_16908	1:200	CD_22_10087_C L_D SRG_1	WGS_60X - 3rd	171	42	64
CD_21_16909	1:200	CD_22_10087_C L_D SRG_1	WGS_60X - 3rd	292	60	86
CD_21_16910	1:200	CD_22_10087_C L_D SRG_1	WGS_60X - 3rd	475	139	290
CD_21_16911	1:200	CD_22_10087_C L_D SRG_1	WGS_60X - 3rd	194	67	299
CD_21_16912	1:200	CD_22_10087_C L_D SRG_1	WGS_60X - 3rd	247	69	108

[87]

[88] [표 3]

Cell-line	5MIX+NA12878 혼합비율	Sample ID	Remark	Total fusion number of each cell-line	cfDNA Fusion Number	Reads Count
CD_21_16908	1:400	CD_21_17606_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	171	7	11
CD_21_16909	1:400	CD_21_17606_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	292	34	41
CD_21_16910	1:400	CD_21_17606_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	475	60	108
CD_21_16911	1:400	CD_21_17606_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	194	30	92
CD_21_16912	1:400	CD_21_17606_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	247	25	32
CD_21_16908	1:400	CD_22_06208_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	171	14	18
CD_21_16909	1:400	CD_22_06208_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	292	24	27
CD_21_16910	1:400	CD_22_06208_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	475	68	113
CD_21_16911	1:400	CD_22_06208_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	194	30	91
CD_21_16912	1:400	CD_22_06208_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	247	25	35
CD_21_16908	1:400	CD_22_10088_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	171	16	23
CD_21_16909	1:400	CD_22_10088_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	292	26	36
CD_21_16910	1:400	CD_22_10088_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	475	70	130
CD_21_16911	1:400	CD_22_10088_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	194	26	114
CD_21_16912	1:400	CD_22_10088_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	247	28	38

[89]

[90] [표4]

Cell-line	5MIX+NA12878 혼합비율	Sample ID	Remark	Total fusion number of each cell-line	cfDNA Fusion Number	Reads Count
CD_21_16908	1:800	CD_21_17607_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	171	5	11
CD_21_16909	1:800	CD_21_17607_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	292	7	9
CD_21_16910	1:800	CD_21_17607_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	475	20	35
CD_21_16911	1:800	CD_21_17607_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	194	11	33
CD_21_16912	1:800	CD_21_17607_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	247	9	10
CD_21_16908	1:800	CD_22_06209_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	171	6	8
CD_21_16909	1:800	CD_22_06209_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	292	13	18
CD_21_16910	1:800	CD_22_06209_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	475	27	49
CD_21_16911	1:800	CD_22_06209_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	194	21	68
CD_21_16912	1:800	CD_22_06209_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	247	12	15
CD_21_16908	1:800	CD_22_10089_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	171	5	9
CD_21_16909	1:800	CD_22_10089_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	292	11	17
CD_21_16910	1:800	CD_22_10089_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	475	27	49
CD_21_16911	1:800	CD_22_10089_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	194	21	65
CD_21_16912	1:800	CD_22_10089_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	247	9	9

[91]

[92] [표5]

Cell-line	5MIX+NA12878 혼합비율	Sample ID	Remark	Total fusion number of each cell-line	cfDNA Fusion Number	Reads Count
CD_21_16908	1:1600	CD_21_17604_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	171	4	4
CD_21_16909	1:1600	CD_21_17604_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	292	8	10
CD_21_16910	1:1600	CD_21_17604_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	475	11	23
CD_21_16911	1:1600	CD_21_17604_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	194	8	29
CD_21_16912	1:1600	CD_21_17604_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 1st	247	6	9
CD_21_16908	1:1600	CD_22_06206_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	171	5	5
CD_21_16909	1:1600	CD_22_06206_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	292	2	2
CD_21_16910	1:1600	CD_22_06206_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	475	15	23
CD_21_16911	1:1600	CD_22_06206_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	194	12	31
CD_21_16912	1:1600	CD_22_06206_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 2nd	247	10	11
CD_21_16908	1:1600	CD_22_10090_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	171	3	3
CD_21_16909	1:1600	CD_22_10090_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	292	5	6
CD_21_16910	1:1600	CD_22_10090_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	475	17	26
CD_21_16911	1:1600	CD_22_10090_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	194	12	27
CD_21_16912	1:1600	CD_22_10090_C L_D_SRG_1	WGS_6 OX - 3rd	247	10	11

[93]

[94] [표 6]

Cell-line	5MIX+NA12878 호환비율	Sample ID	Remark	Total fusion number of each cell-line	cfDNA Fusion Number	Reads Count
CD_21_16908	1:3200	CD_22_10091_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	171	5	5
CD_21_16909	1:3200	CD_22_10091_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	292	2	2
CD_21_16910	1:3200	CD_22_10091_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	475	9	12
CD_21_16911	1:3200	CD_22_10091_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	194	10	14
CD_21_16912	1:3200	CD_22_10091_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	247	3	5
CD_21_16908	1:3200	CD_22_10094_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	171	2	3
CD_21_16909	1:3200	CD_22_10094_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	292	7	9
CD_21_16910	1:3200	CD_22_10094_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	475	14	19
CD_21_16911	1:3200	CD_22_10094_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	194	11	19
CD_21_16912	1:3200	CD_22_10094_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	247	4	5
CD_21_16908	1:3200	CD_22_10097_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	171	1	1
CD_21_16909	1:3200	CD_22_10097_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	292	2	2
CD_21_16910	1:3200	CD_22_10097_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	475	13	17
CD_21_16911	1:3200	CD_22_10097_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	194	5	7
CD_21_16912	1:3200	CD_22_10097_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	247	1	1

Cell-line	5MIX+NA12878 혼합비율	Sample ID	Remark	Total fusion number of each cell-line	cfDNA Fusion Number	Reads Count
CD_21_16908	1:6400	CD_22_10092_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	171	2	2
CD_21_16909	1:6400	CD_22_10092_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	292	0	0
CD_21_16910	1:6400	CD_22_10092_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	475	3	4
CD_21_16911	1:6400	CD_22_10092_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	194	9	12
CD_21_16912	1:6400	CD_22_10092_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	247	1	1
CD_21_16908	1:6400	CD_22_10095_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	171	1	2
CD_21_16909	1:6400	CD_22_10095_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	292	2	2
CD_21_16910	1:6400	CD_22_10095_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	475	8	13
CD_21_16911	1:6400	CD_22_10095_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	194	2	2
CD_21_16912	1:6400	CD_22_10095_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	247	1	1
CD_21_16908	1:6400	CD_22_10098_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	171	2	3
CD_21_16909	1:6400	CD_22_10098_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	292	4	5
CD_21_16910	1:6400	CD_22_10098_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	475	4	8
CD_21_16911	1:6400	CD_22_10098_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	194	5	12
CD_21_16912	1:6400	CD_22_10098_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	247	4	4

[96]

[97] [표 8]

Cell-line	5MIX+NA12878 혼합비율	Sample ID	Remark	Total fusion number of each cell-line	cfDNA Fusion Number	Reads Count
CD_21_16908	1:12800	CD_22_10093_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	171	2	2
CD_21_16909	1:12800	CD_22_10093_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	292	0	0
CD_21_16910	1:12800	CD_22_10093_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	475	5	8
CD_21_16911	1:12800	CD_22_10093_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	194	3	3
CD_21_16912	1:12800	CD_22_10093_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 1st	247	0	0
CD_21_16908	1:12800	CD_22_10096_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	171	2	2
CD_21_16909	1:12800	CD_22_10096_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	292	1	1
CD_21_16910	1:12800	CD_22_10096_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	475	1	2
CD_21_16911	1:12800	CD_22_10096_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	194	3	4
CD_21_16912	1:12800	CD_22_10096_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 2nd	247	1	1
CD_21_16908	1:12800	CD_22_10099_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	171	0	0
CD_21_16909	1:12800	CD_22_10099_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	292	1	2
CD_21_16910	1:12800	CD_22_10099_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	475	5	5
CD_21_16911	1:12800	CD_22_10099_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	194	0	0
CD_21_16912	1:12800	CD_22_10099_C L_D_SRG_1	WGS_60 _high diluti on - 3rd	247	1	1

[98]

[99] [표 9]

Cell-line	reference	Sample ID	Total fusion number of each cell-line	cfDNA Fusion Number	Reads Count
CD_21_16908	NA12878	CD_22_06210_ET_D_SRG_1	171	0	0
CD_21_16909	NA12878	CD_22_06210_ET_D_SRG_1	292	0	0
CD_21_16910	NA12878	CD_22_06210_ET_D_SRG_1	475	0	0
CD_21_16911	NA12878	CD_22_06210_ET_D_SRG_1	194	0	0
CD_21_16912	NA12878	CD_22_06210_ET_D_SRG_1	247	0	0

[100]

[101]

암 세포주에 존재하는 구조 변이수를 의미하는 'Total fusion number of each cell-line (실시예 1의 원발암 시료 구조 변이에 대응)'은 각 암종에서 다른 세포주에 중복으로 존재하는 germline구조 변이를 제거한 후 각각 171, 292, 475, 194, 247 개였으며, 표 1 내지 표 8에 나타난 바와 같이, 각 암세포주에 존재하는 구조 변이가 cfDNA BAM파일에서도 검출(cfDNA Fusion Number)되고, 이를 서포팅하는 지지 리드가 확인되었다 (reads count). 또한, 세포주가 섞이지 않은 레퍼런스 WGS에서는 각 세포주의 구조 변이 서열이 검출되지 않음을 확인하였다 (표9).

[102]

세포주를 이용한 실험의 민감도와 특이도를 정리한 결과를 표 10 및 도 3에 나타내었다.

[103]

[104]

[표10]

	Cancer cell purity	Detected/Total	Sensitivity
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:100): 3 replicates	1.0000%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:200): 3 replicates	0.5000%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:400): 3 replicates	0.2500%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:800): 3 replicates	0.1250%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:1600): 3 replicates	0.0625%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:3200): 3 replicates	0.0313%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:6400): 3 replicates	0.0156%	14/15	93.3%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:12800): 3 replicates	0.0078%	11/15	73.3%
	Cancer cell purity	Not detected/Total	Specificity
NA12878	0.0000%	5/5	100.0%

[105]

[106]

표 10에 정리된 바와 같이, 희석 배율을 높일수록 지지 리드의 수는 점차 감소하는 경향을 나타냈지만, 1:12,800까지 희석하더라도 구조 변이 서열을 확인할 수 있는 서포트 서열이 확인되고 약 73.3%의 높은 민감도로 검출할 수 있음을 확인

하였다. 특히, 구조변이가 475개를 가지고 있는 HCC1954의 경우 1:12,800으로 희석해도 100% 검출할 수 있었다. 이는 본 발명의 방법을 이용하면 cfDNA 시료에 존재하는 구조 변이 서열을 매우 효과적으로 검출하여 암 환자의 미세잔존질환에 대한 정보를 제공할 수 있음을 의미한다.

[107]

[108] 1.3 임상 시료를 이용한 임상 검증 (Clinical validation)

[109] 본 발명의 방법을 이용하여 실제 환자의 혈액, cfDNA 에서도 변이를 효과적으로 검출가능한지 임상 검증 실험을 수행하였다.

[110] 시료를 환자의 원발암 조직, 혈액, 2가지 이상의 다른 시점에서 수득한 cfDNA1, cfDNA2 로 하여 실시예 1과 같은 분석 방법을 이용하였다.

[111] 각 암환자는 전이성 폐암환자이며, 각각 case1, case 2,로 기재하였다. 환자로부터 수득한 FFPE 암조직을 이용하여 약30X로 WGS 데이터가 생성되었고, 나머지 cfDNA 시료들로부터 평균 48X 정도의 WGS 데이터가 생성되었다.

[112] 구체적으로 환자의 FFPE 암조직을 시료로 하여 DELLY를 이용한 WGS 분석을 수행하고 BWA 의 default setting으로 alignment 하였으며, JuLI를 이용하여 2가지 분석툴에서 공통적으로 확인되는 환자의 공통 (consensus) 구조 변이를 확인하였다. 이를 JuLI output 포맷으로 활용하였다. 이후 서로 다른 시점에서 수득한 혈장 cfDNA 샘플의 WGS에 의해 수득된 BAM 파일과 상기에서 확인된 공통 (consensus) 구조 변이 데이터를 대응 참조 서열(counter reference sequence)과 비교하는 2단계 supporting read call 을 통해 cfDNA 구조 변이 서열을 확인하였다. 이를 통해 서로 다른 시점에서 수득한 환자의 혈장 내 존재하는 cfDNA 구조 변이를 보다 민감하게 검출할 수 있으므로, 환자에 남아있는 암 미세잔존질환에 대한 진단이 가능하다.

[113]

[114] 환자 Case 1

[115] 도 4 및 도 5는 Case 1의 분석결과이며, 각기 다른 시점인 2006.11.07, 2007.04.12 시점에 수득한 cfDNA를 시료로 하여 구조 변이 서열을 확인한 결과를 각각 나타낸다. 도 4 및 도 5에서는 환자 유래 원발암 조직에서 확인된 구조 변이가 cfDNA-1 및 cfDNA-2 시료상에서도 동일하게 확인되는 것을 확인하였다.

[116] 본 발명의 효과를 검증하기 위하여 환자의 원발암을 패널 시퀀싱을 수행하여 암 돌연변이를 확인하고, 이를 cfDNA에서 확인하였다. 패널 시퀀싱을 통해 case 1 환자가 KRAS 변이를 약 30% 나타내는 환자임을 확인하였고, 동일 변이가 원발암, cfDNA-1 및 cfDNA-2 의 WGS에서도 실제로 확인되었다. WGS에서 KRAS 변이 위치를 확인한 결과는 도6에 나타내었다.

[117] 도 6에서는 원발암 조직에서 패널 시퀀싱과 비슷한 정도의 KRAS 변이가 검출(36%)되는 것을 확인하였고, cfDNA-1, cfDNA-2 시료에서도 KRAS 변이가 19%, 6% 검출되어, 본 발명의 방법을 이용하면, cfDNA 시료의 구조 변이 서열 분석을

통해 미세잔존암을 확인할 수 있음을 검증하였다. 해당 환자에서 검출된 Read count 수는 하기 표 11과 같다.

[118]

[119] [표11]

cfDNA samples	Tumor Fusion Number	cfDNA Fusion Number	ReadsCount
cfDNA-1	131	115	4122
cfDNA-2	131	112	1926

[120]

[121] 표 11에 따르면, case1 환자는 원발암 시료에서 분석한 결과 총 131개의 구조 변이 서열인 융합(fusion) 서열을 가지고 있는 환자로, 본 발명의 방법을 통해 cfDNA 에서도 구조 변이가 115 또는 112개 확인되며, 19% *KRAS* 변이를 나타낸 cfDNA-1 시료에서 4122 개의 지지 리드, 6% *KRAS* 변이를 나타낸 cfDNA-2 시료에서 1926 개의 지지 리드가 확인되었다.

[122] 이는 혈장 cfDNA를 WGS 로 분석하는 종래 방법이 5% 이하의 변이는 검출하기 어려운 낮은 민감도를 나타내는 것과 비교하여, 본 발명은 6% 정도의 변이에서도 1900 개 이상의 리드를 나타내므로, 훨씬 우수한 검출능이 있음을 보여주는 결과이다.

[123]

[124] 환자 Case 2

[125] 도 7 및 도 8 는 Case 2의 분석결과이며, 각기 다른 시점인 2010.10.29, 2011.01.04 시점에 수득한cfDNA 를 시료로 하여 구조 변이 서열을 확인한 결과를 나타낸다. 도 7 및 도 8에서는 환자 유래 원발암 조직에서 확인된 구조 변이가 cfDNA-1 및 cfDNA-2 시료상에서도 확인됨을 나타낸다.

[126] 패널 시퀀싱을 통해 case 2 환자가 가지고 있는 돌연변이들을 원발암, cfDNA-1 및cfDNA-2 의 WGS에서도 실제로 확인하였고 이는 도9 및 도10에 나타내었다.

[127] 도 9에서 cfDNA-1, cfDNA-2에서 *TP53*변이가 각각2%, 0%, 도 10에는 *SMARCA4* 변이가 각각 5%, 2% 변이가 확인되었으나, 표 12에 나타낸 바와 같이, 2-5% 변이를 나타낸 cfDNA-1에서 128 개의 리드, 0-2% 변이에서 118 개의 리드가 확인되어, 2 내지 5% 이하의 낮은 대립유전자 빈도를 나타내는 시료에서도 구조 변이 존재를 나타내는 지지 리드가 충분히 검출됨을 확인하였다.

[128]

[129] [표12]

cfDNA samples	Tumor Fusion Number	cfDNA Fusion Number	Reads Count
cfDNA-1	62	23	128
cfDNA-2	62	22	118

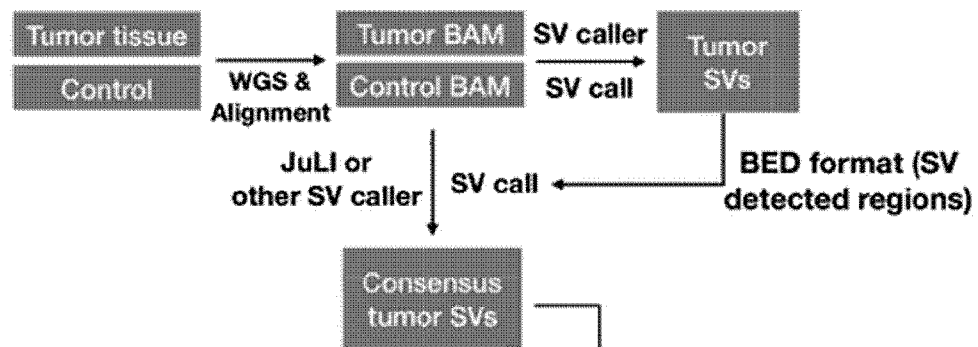
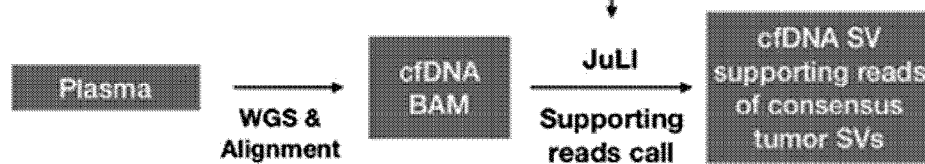
청구범위

- [청구항 1] 1) 환자 유래 암 조직의 WGS (whole genome sequence)를 2가지 이상의 구조 변이 분석 소프트웨어로 분석하여 공통적으로 확인되는 원발암 시료의 공통 (consensus) 구조 변이 위치 데이터를 얻는 단계; 및
2) 상기 1) 단계에서 획득한 구조 변이 위치의 참조 서열(reference sequence)과 해당 환자의 cfDNA WGS를 매칭하여, 공통 구조 변이 위치에 존재하는 구조 변이 서열 지지 리드 (supporting read)를 획득함으로써, cfDNA 시료 내 존재하는 구조 변이에 의해 발생한 특이 서열을 매칭하는 단계; 를 포함하는, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 방법은 WGS의 시퀀싱 심도(depth)를 조절하여 검출 민감도를 조절하는 것을 특징으로 하는, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 WGS 분석 소프트웨어는 DELLY, BRASS, SvABA, dRanger, Pindell, BreakDancer, GASV, Hydra, CNVnator 및 JuLI 로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상인, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 1) 단계는
1-1) DELLY, BRASS, SvABA, dRanger, Pindell, BreakDancer, GASV, Hydra 및 CNVnator 로 이루어진 군에서 선택된 1종의 구조 변이 분석 소프트웨어로 원발암 시료의 제 1 구조 변이 위치 데이터를 얻는 단계; 및
1-2) 상기 1-1) 단계에서 획득된 제 1 구조 변이 위치 데이터를 JuLI 에 입력하여 공통적으로 확인되는 원발암 시료의 공통 (consensus) 구조 변이 위치 데이터를 얻는 단계; 를 순차적으로 수행하는 것을 포함하는, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 cfDNA는 암 환자의 뇌척수액, 흉수, 심낭액, 복수, 소변, 전혈, 혈장 또는 혈청 유래인, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 2) 단계의 암 환자의 cfDNA 는 암 치료 중 또는 암 치료 후의 환자에서 획득되는 것인, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 구조 변이는 유전자의 복제, 결실, 전좌 및 삽입으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 암은 위암, 폐암, 비소세포성 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁

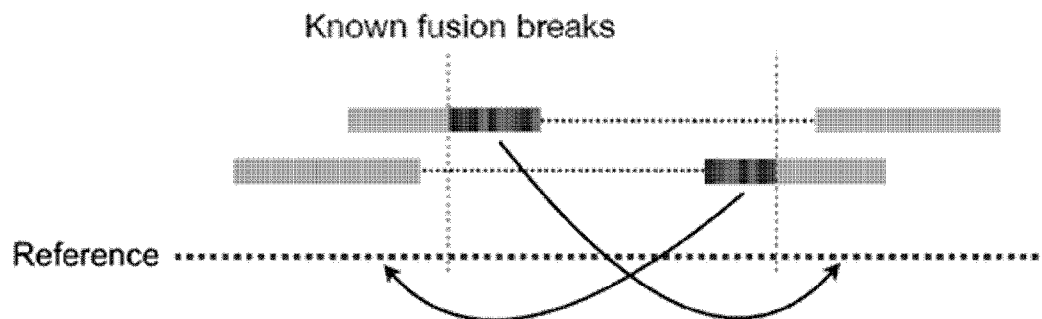
경부암, 골암, 비소세포성 골암, 혈액암, 피부암(흑색종 등), 두부 또는 경부암, 자궁암, 직장암, 항문 부근암, 결장암, 나팔관암, 자궁내막암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장 골반암종, 배수성암(polyploid carcinoma), 침샘암, 육종암, 가성점액종, 간모세포종, 고환암, 교모세포종, 구순암, 난소생식세포종양, 기저세포암, 다발성골수종, 담낭암, 맥락막흑색종, 바터팽대부암, 복막암, 부신암, 설암, 소세포암, 소아림프종, 신경모세포종, 십이지장암, 요관암, 성상세포종, 수막종, 신우암, 외음부암, 흉선암, 중추신경계(central nervous system, CNS) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인, 암 환자 유래 cfDNA 시료에서 구조 변이 서열을 검출하는 방법.

- [청구항 9] 1) 환자 유래 암 조직의 WGS (whole genome sequence)를 2가지 이상의 구조 변이 분석 소프트웨어로 분석하여 공통적으로 확인되는 원발암 시료의 공통 (consensus) 구조 변이 위치 데이터를 얻는 단계; 및
2) 상기 1) 단계에서 획득한 구조 변이 위치의 참조 서열(reference sequence)과 해당 환자에서 암 치료 후 수득된 cfDNA WGS를 매칭하여, 공통 구조 변이 위치에 존재하는 구조 변이 서열 지지 리드 (supporting read)를 획득함으로써, cfDNA 시료 내 존재하는 구조 변이에 의해 발생한 특이 서열을 매칭하는 단계; 를 포함하는, 미세잔존질환(Minimal Residual Disease; MRD)에 대한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 미세잔존질환에 대한 정보는 치료 중 또는 치료 후에 잔존하는 암세포 유무, 암 재발 가능성 또는 암 치료 예후에 대한 정보인, 방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 2) 단계의 치료는 방사선 요법, 면역요법, 호르몬 요법, 화학요법 치료 또는 외과적 절제 치료인, 방법.

[도1]

1. Consensus tumor SVs detection by two algorithms**2. cfDNA SV supporting reads detection**

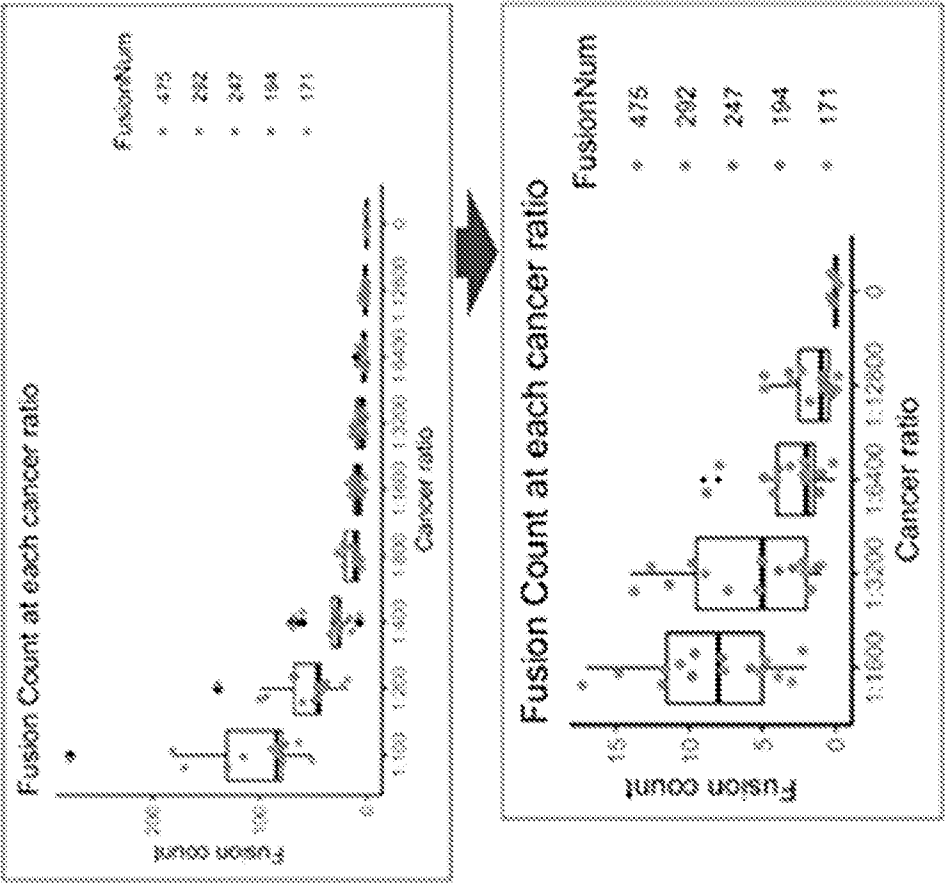
[도2]



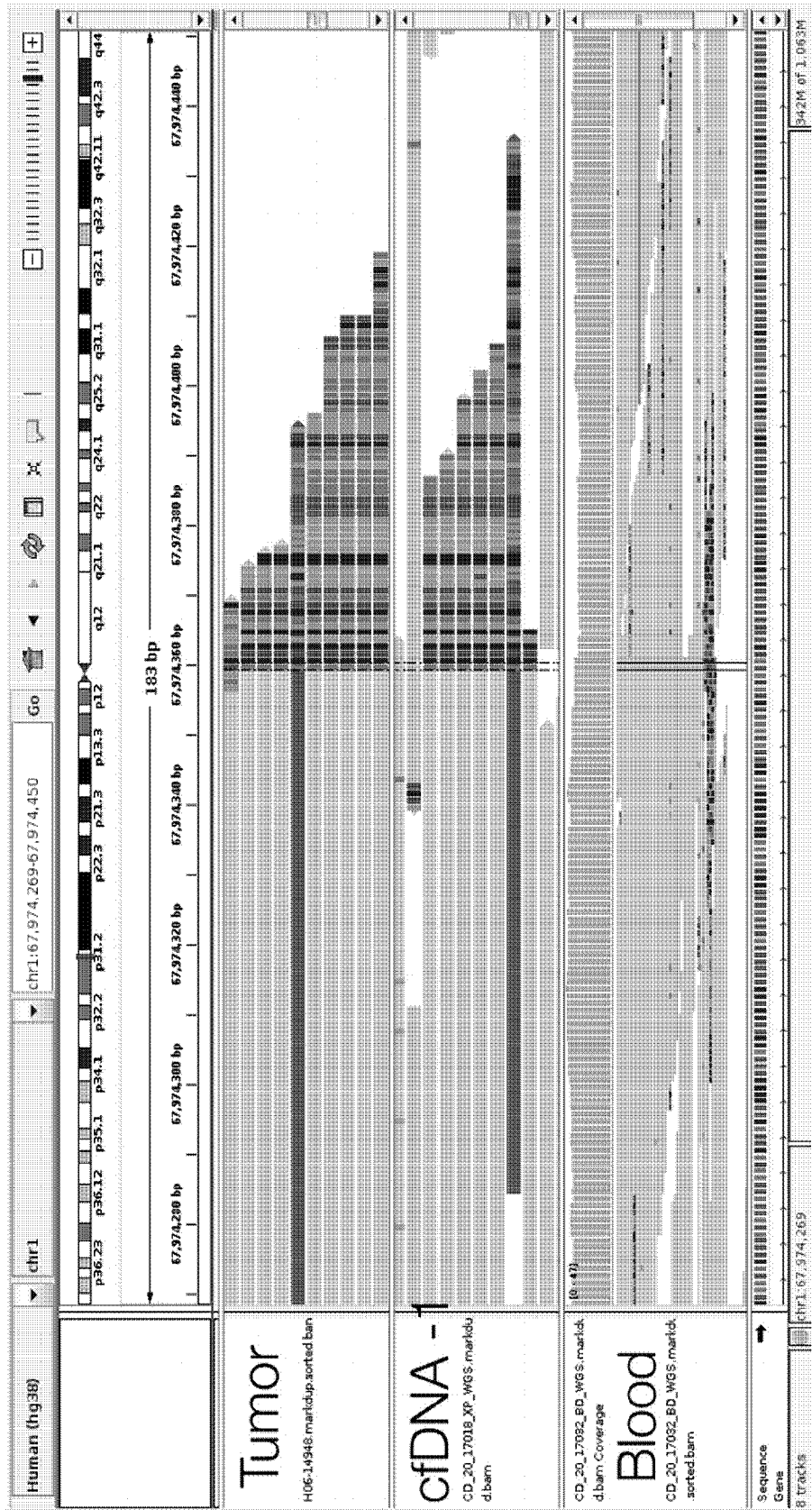
**Comparison of each supporting reads
with counter reference sequence**

[도 3]

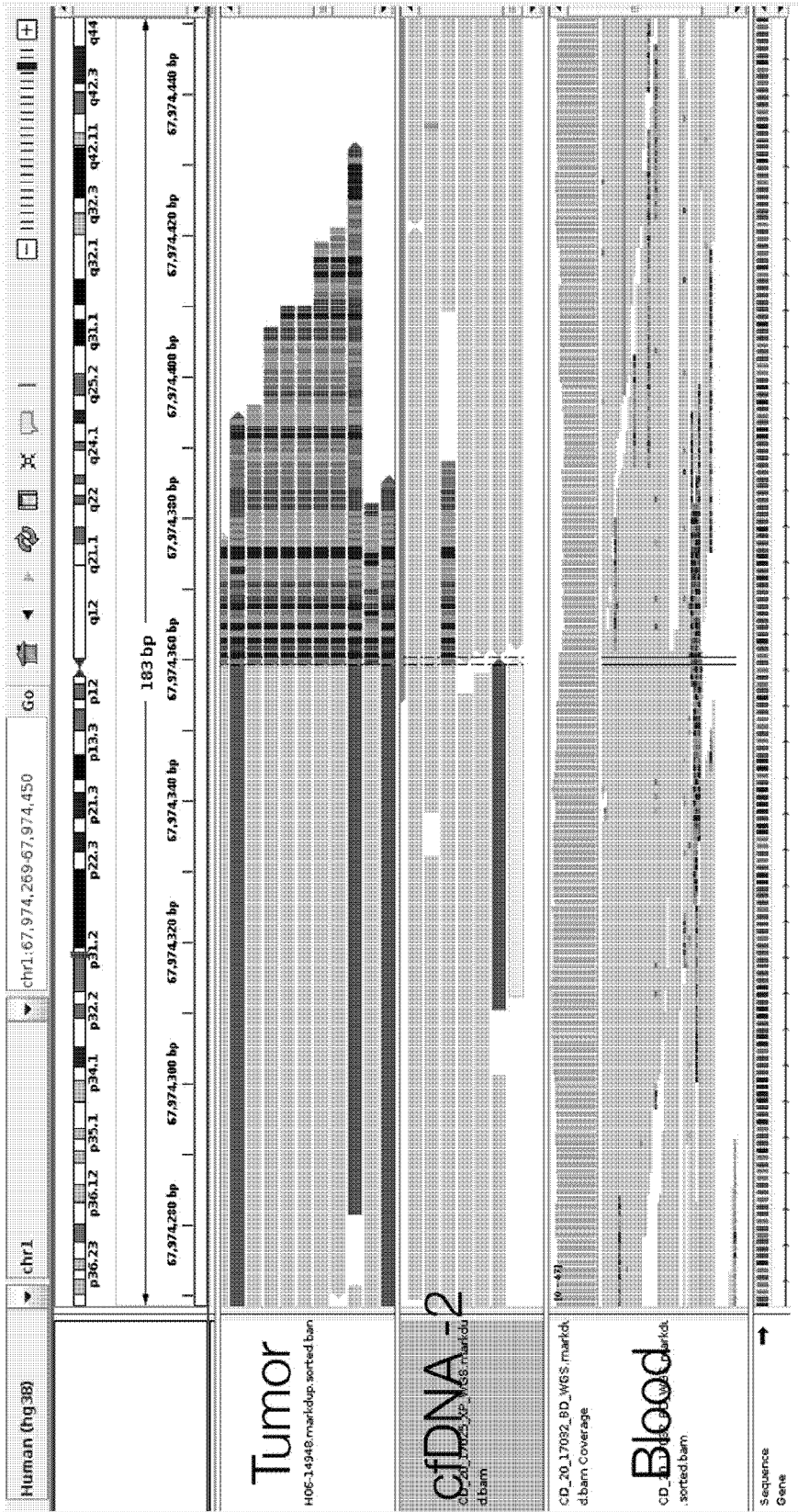
	Cancer cell purity	Detected/ Total	Sensitivity y
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:100): 3 replicates	1.0000%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:200): 3 replicates	0.5000%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:400): 3 replicates	0.2500%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:800): 3 replicates	0.1250%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:1600): 3 replicates	0.0625%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:3200): 3 replicates	0.0312%	15/15	100.0%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:6400): 3 replicates	0.0156%	14/15	93.3%
NA12878 + 5 cancer cell lines (1:12800): 3 replicates	0.0078%	11/15	73.3%
	Cancer cell purity	Not detected/ Total	Specificity y
NA12878	0.0000%	0/5	100.0%



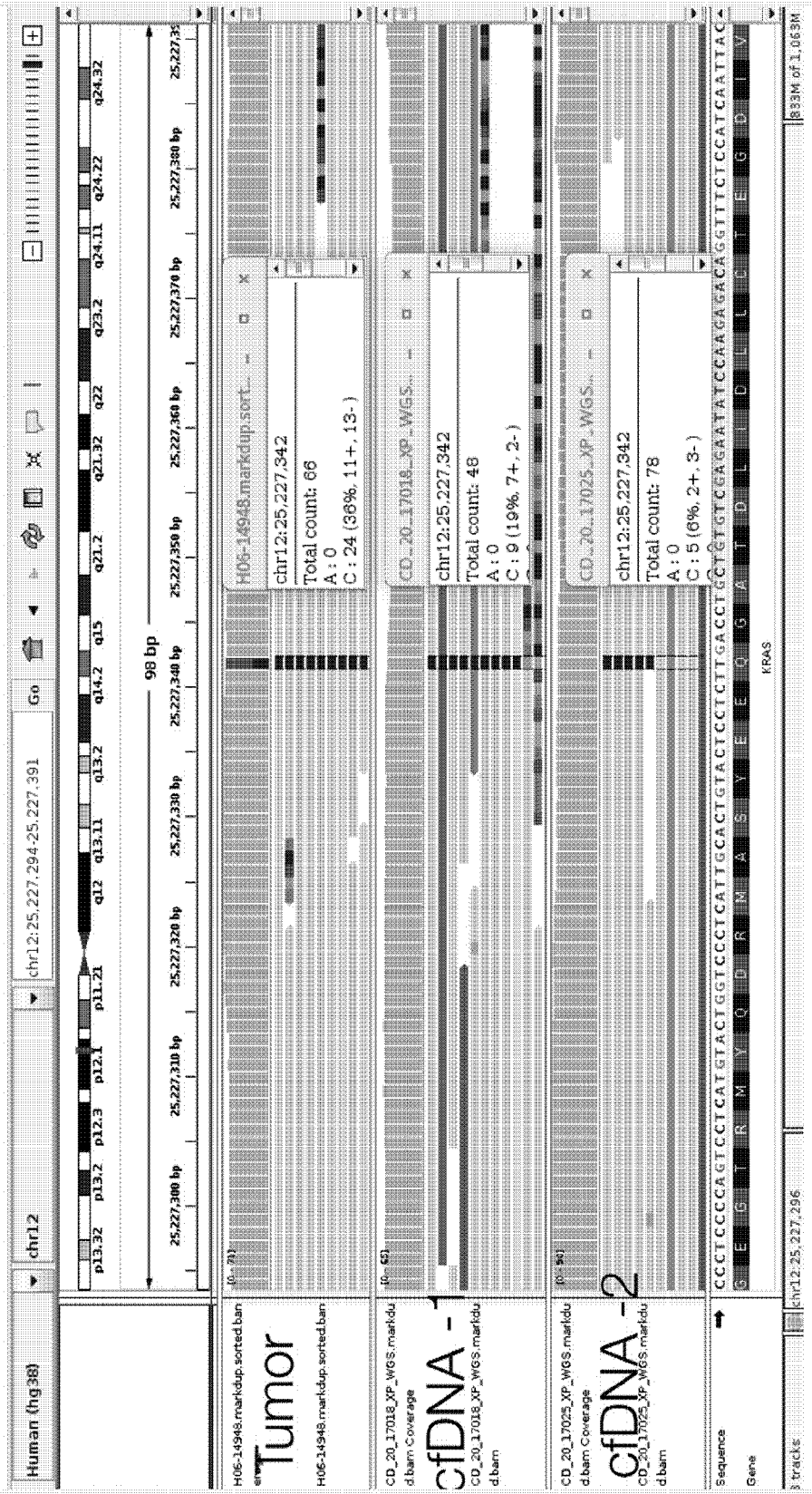
[도4]



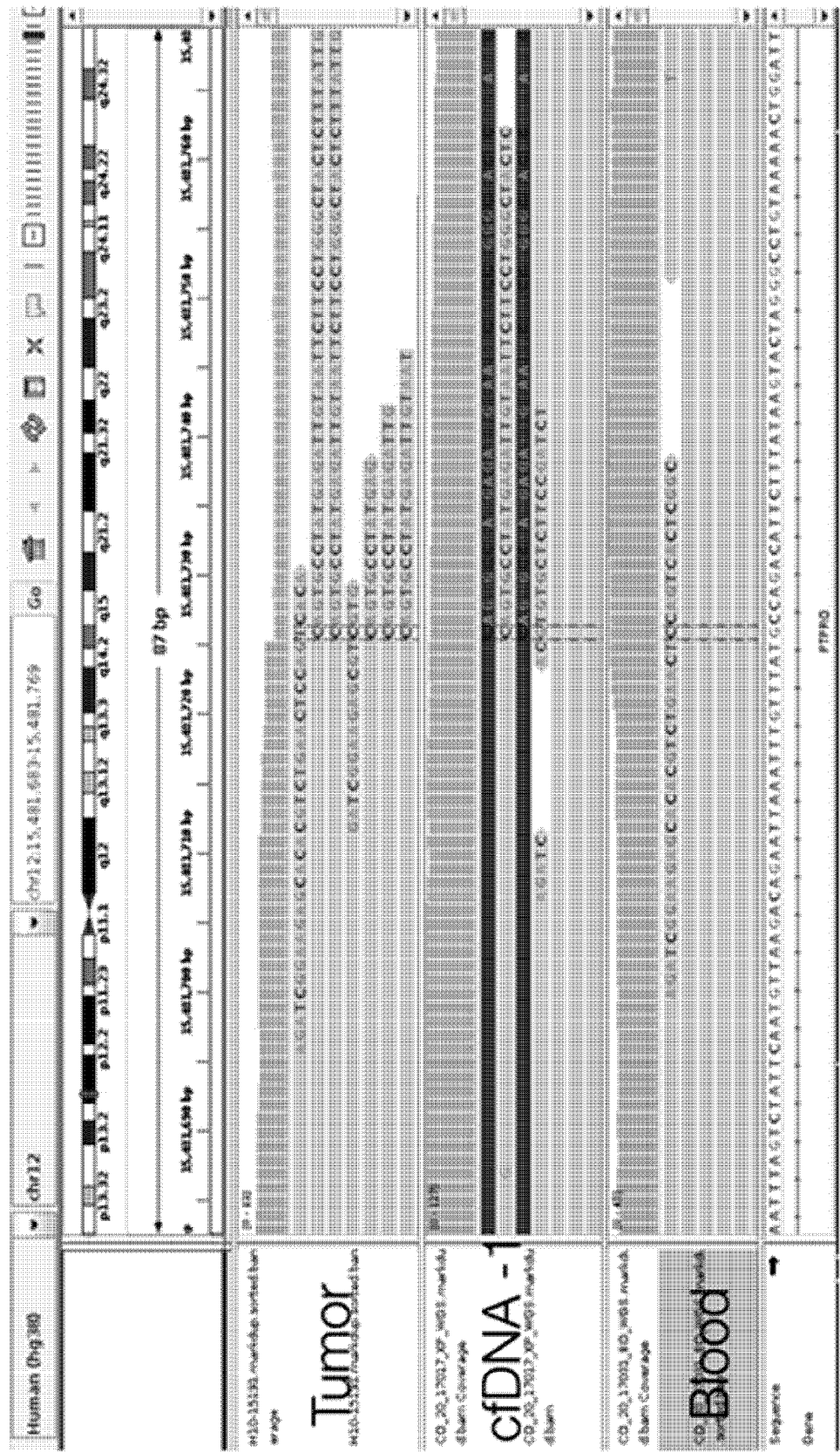
[도5]



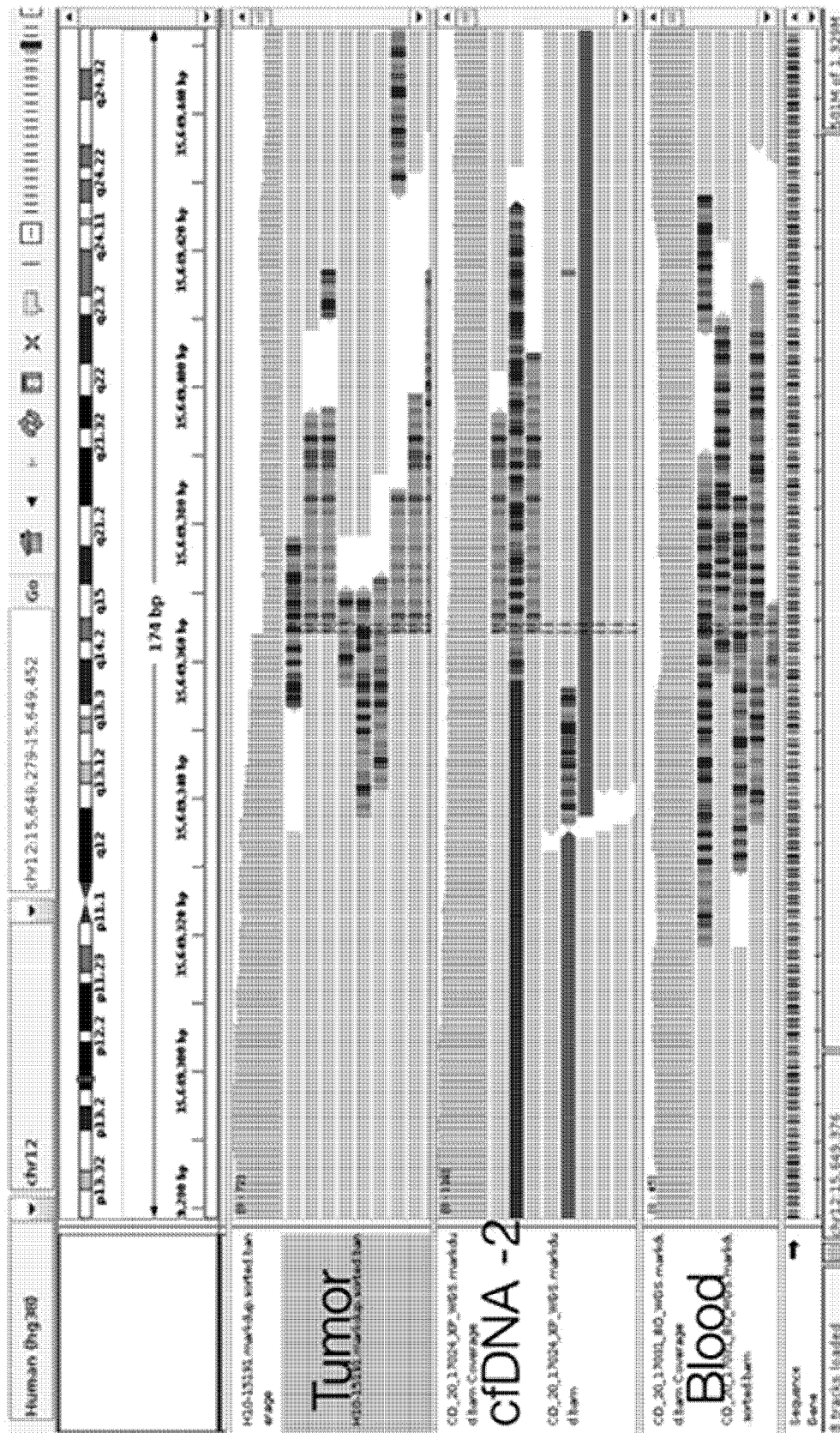
[도6]



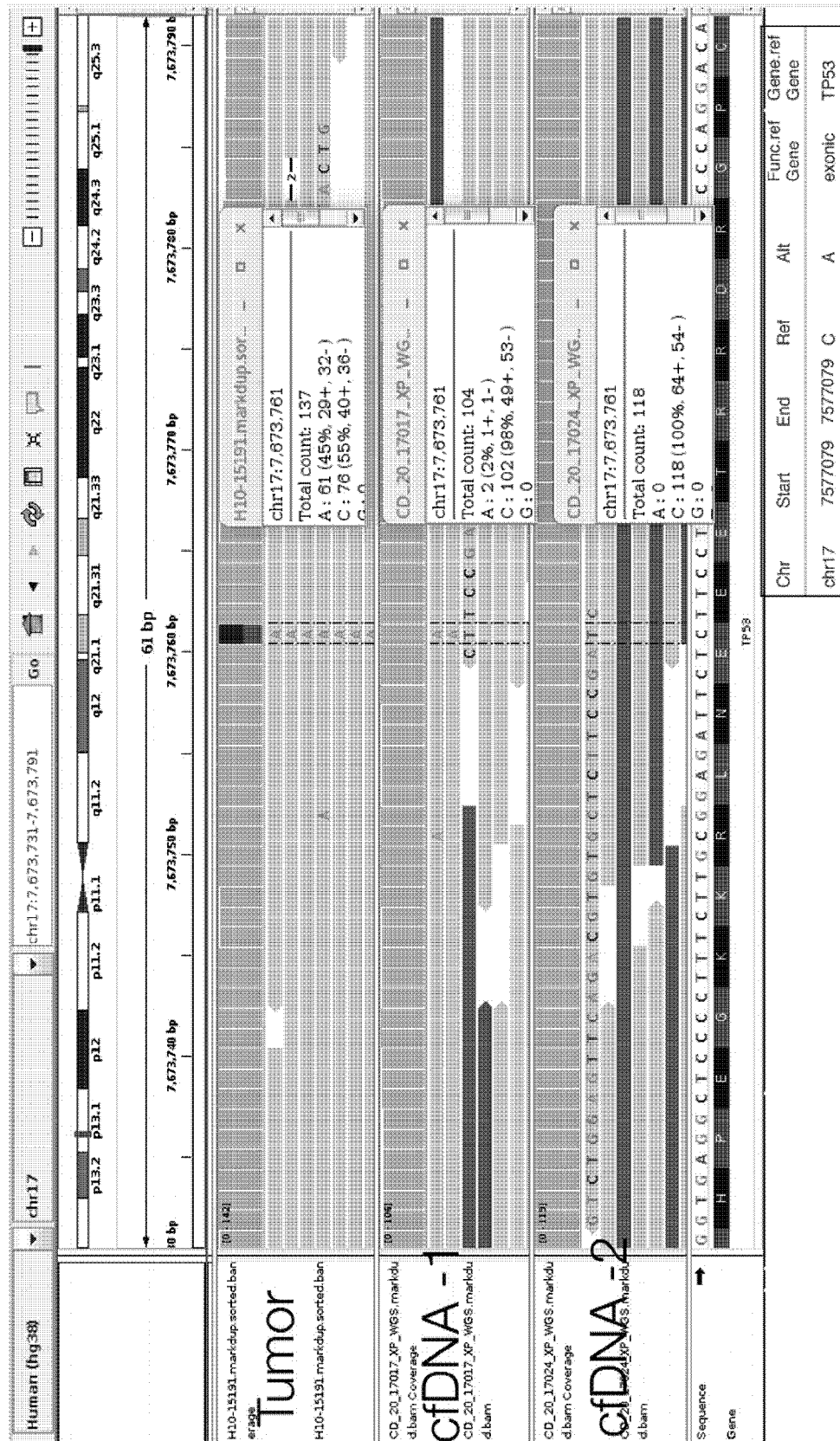
[도7]



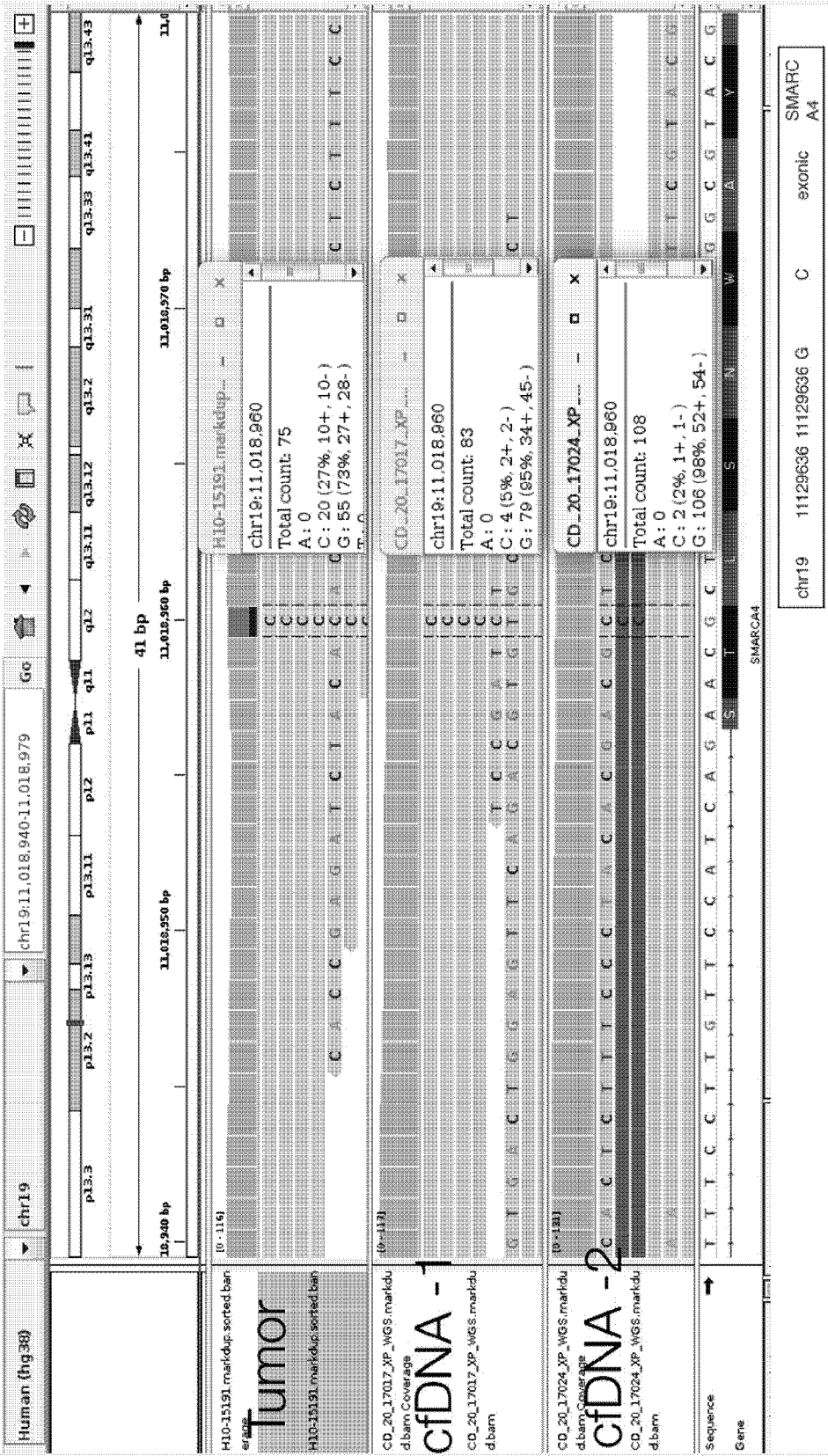
[도8]



[도9]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/008217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G16B 30/00(2019.01)i; G16B 50/00(2019.01)i; G16B 20/20(2019.01)i; G16B 40/00(2019.01)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)

G16B 30/00(2019.01); C12Q 1/6809(2018.01); C12Q 1/6869(2018.01); C12Q 1/6874(2018.01); C12Q 1/6881(2018.01); C12Q 1/6886(2018.01)

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

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 암(cancer), 전장 유전체 서열 분석(whole genome sequencing, WGS), 구조 변이 분석 소프트웨어(structural variation analysis software), 참조 서열(reference sequence), 세포유리 DNA(cell-free DNA, cfDNA), 미세잔존질환(minimal residual disease, MRD)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKAGAWA, H. et al. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. Cancer Science. 2018, vol. 109, no. 3, pp. 513-522. See figure 2, and page 514.	1-11
Y	WO 2021-108620 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 03 June 2021 (2021-06-03) See claims 1-24, and pages 6, 7 and 15.	1-11
A	KR 10-2021-0045953 A (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 27 April 2021 (2021-04-27) See claims 1 and 34-36.	1-11
A	KR 10-2018-0088922 A (THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG) 07 August 2018 (2018-08-07) See claim 1.	1-11
A	KR 10-2021-0119282 A (ILLUMINA, INC.) 05 October 2021 (2021-10-05) See claims 1-14.	1-11



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

08 September 2023

Date of mailing of the international search report

08 September 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/008217

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
WO	2021-108620	A1	03 June 2021	AU	2020-392127	A1	30 June 2022
				AU	2020-392127	A1	03 June 2021
				CA	3159505	A1	03 June 2021
				CN	115298326	A	04 November 2022
				EP	4065731	A1	05 October 2022
				JP	2023-505031	A	08 February 2023
				US	2023-002831	A1	05 January 2023
KR	10-2021-0045953	A	27 April 2021	AU	2019-269679	A1	17 December 2020
				AU	2019-269679	A1	21 November 2019
				BR	112020023587	A2	09 February 2021
				CA	3100345	A1	21 November 2019
				CN	112805563	A	14 May 2021
				EP	3794348	A1	24 March 2021
				IL	278716	A	31 December 2020
				JP	2021-525069	A	24 September 2021
				US	2020-131571	A1	30 April 2020
				US	2020-149118	A1	14 May 2020
				US	2021-198747	A1	01 July 2021
				US	2021-254152	A1	19 August 2021
				US	2022-325343	A1	13 October 2022
				WO	2019-222657	A1	21 November 2019
KR	10-2018-0088922	A	07 August 2018	AU	2013-278994	A1	29 January 2015
				AU	2017-204558	A1	27 July 2017
				AU	2020-200122	A1	30 January 2020
				AU	2022-209294	A1	25 August 2022
				CA	2876327	A1	27 December 2013
				CA	3080937	A1	27 December 2013
				CN	104662168	A	27 May 2015
				CN	107779506	A	09 March 2018
				CN	113151474	A	23 July 2021
				DK	2864501	T3	05 November 2018
				DK	3456843	T3	25 October 2021
				EA	201500027	A1	29 May 2015
				EA	202092900	A2	31 March 2021
				EP	2864501	A2	29 April 2015
				EP	3456843	A1	20 March 2019
				EP	3919627	A1	08 December 2021
				ES	2687847	T3	29 October 2018
				ES	2894479	T3	14 February 2022
				HK	1204013	A1	06 November 2015
				HK	1205533	A1	18 December 2015
				HK	1246830	A1	14 September 2018
				HU	E056915	T2	28 March 2022
				IL	235967	A	29 January 2015
				IL	235967	D0	29 January 2015
				IL	268645	A	31 October 2019
				IL	268645	D0	31 October 2019
				IL	278867	A	31 January 2021
				IL	278867	D0	31 January 2021
				IL	298810	A	01 February 2023

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/008217

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2015-527057 A	17 September 2015
		JP 2018-191640 A	06 December 2018
		JP 2021-191280 A	16 December 2021
		KR 10-2015-0032708 A	27 March 2015
		KR 10-2020-0035507 A	03 April 2020
		KR 10-2021-0040464 A	13 April 2021
		KR 10-2022-0038181 A	25 March 2022
		KR 10-2023-0052998 A	20 April 2023
		MX 2014016058 A	10 April 2015
		MX 2018013085 A	16 November 2021
		PT 3456843 T	26 October 2021
		SG 10201808217 A	30 October 2018
		SG 11201408113 A	29 January 2015
		TW 201403066 A	16 January 2014
		TW 201920952 A	01 June 2019
		TW 202122796 A	16 June 2021
		US 11261494 B2	01 March 2022
		US 2014-0100121 A1	10 April 2014
		US 2018-202003 A1	19 July 2018
		US 2019-264291 A1	29 August 2019
		WO 2013-190441 A2	27 December 2013
		ZA 201409281 B	30 August 2017
KR 10-2021-0119282 A	05 October 2021	AU 2020-210912 A1	30 July 2020
		AU 2020-210912 A1	21 January 2021
		BR 112020026133 A2	27 July 2021
		CA 3104153 A1	30 July 2020
		CN 112424372 A	26 February 2021
		EP 3914731 A1	01 December 2021
		IL 279433 A	31 January 2021
		IL 279433 D0	31 January 2021
		JP 2022-517456 A	09 March 2022
		MX 2020014095 A	09 March 2021
		SG 11202012518 A	28 January 2021
		US 2021-310067 A1	07 October 2021
		WO 2020-154402 A1	30 July 2020

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G16B 30/00(2019.01)i; G16B 50/00(2019.01)i; G16B 20/20(2019.01)i; G16B 40/00(2019.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G16B 30/00(2019.01); C12Q 1/6809(2018.01); C12Q 1/6869(2018.01); C12Q 1/6874(2018.01); C12Q 1/6881(2018.01); C12Q 1/6886(2018.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 암(cancer), 전장 유전체 서열 분석(whole genome sequencing, WGS), 구조 변이 분석 소프트웨어(structural variation analysis software), 참조 서열(reference sequence), 세포유리 DNA(cell-free DNA, cfDNA), 미세잔존질환(minimal residual disease, MRD)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	NAKAGAWA, H. 등, Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine, Cancer Science, 2018년, 109권, 3호, 페이지 513-522 그림 2, 페이지 514	1-11
Y	WO 2021-108620 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2021.06.03 청구항 1-24, 페이지 6, 7, 15	1-11
A	KR 10-2021-0045953 A (더 존스 홉킨스 유니버시티) 2021.04.27 청구항 1, 34-36	1-11
A	KR 10-2018-0088922 A (더 차이니스 유니버시티 오브 홍콩) 2018.08.07 청구항 1	1-11
A	KR 10-2021-0119282 A (일루미나, 인코포레이티드) 2021.10.05 청구항 1-14	1-11
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년09월08일(08.09.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년09월08일(08.09.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 장정아 전화번호 +82-41-481-5955

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2021-108620 A1	2021/06/03	AU 2020-392127 A1	2022/06/30
		AU 2020-392127 A1	2021/06/03
		CA 3159505 A1	2021/06/03
		CN 115298326 A	2022/11/04
		EP 4065731 A1	2022/10/05
		JP 2023-505031 A	2023/02/08
		US 2023-002831 A1	2023/01/05
KR 10-2021-0045953 A	2021/04/27	AU 2019-269679 A1	2020/12/17
		AU 2019-269679 A1	2019/11/21
		BR 112020023587 A2	2021/02/09
		CA 3100345 A1	2019/11/21
		CN 112805563 A	2021/05/14
		EP 3794348 A1	2021/03/24
		IL 278716 A	2020/12/31
		JP 2021-525069 A	2021/09/24
		US 2020-131571 A1	2020/04/30
		US 2020-149118 A1	2020/05/14
		US 2021-198747 A1	2021/07/01
		US 2021-254152 A1	2021/08/19
		US 2022-325343 A1	2022/10/13
		WO 2019-222657 A1	2019/11/21
KR 10-2018-0088922 A	2018/08/07	AU 2013-278994 A1	2015/01/29
		AU 2017-204558 A1	2017/07/27
		AU 2020-200122 A1	2020/01/30
		AU 2022-209294 A1	2022/08/25
		CA 2876327 A1	2013/12/27
		CA 3080937 A1	2013/12/27
		CN 104662168 A	2015/05/27
		CN 107779506 A	2018/03/09
		CN 113151474 A	2021/07/23
		DK 2864501 T3	2018/11/05
		DK 3456843 T3	2021/10/25
		EA 201500027 A1	2015/05/29
		EA 202092900 A2	2021/03/31
		EP 2864501 A2	2015/04/29
		EP 3456843 A1	2019/03/20
		EP 3919627 A1	2021/12/08
		ES 2687847 T3	2018/10/29
		ES 2894479 T3	2022/02/14
		HK 1204013 A1	2015/11/06
		HK 1205533 A1	2015/12/18
		HK 1246830 A1	2018/09/14
		HU E056915 T2	2022/03/28
		IL 235967 A	2015/01/29
		IL 235967 D0	2015/01/29
		IL 268645 A	2019/10/31
		IL 268645 D0	2019/10/31
		IL 278867 A	2021/01/31
		IL 278867 D0	2021/01/31
		IL 298810 A	2023/02/01

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2015-527057 A	2015/09/17
		JP 2018-191640 A	2018/12/06
		JP 2021-191280 A	2021/12/16
		KR 10-2015-0032708 A	2015/03/27
		KR 10-2020-0035507 A	2020/04/03
		KR 10-2021-0040464 A	2021/04/13
		KR 10-2022-0038181 A	2022/03/25
		KR 10-2023-0052998 A	2023/04/20
		MX 2014016058 A	2015/04/10
		MX 2018013085 A	2021/11/16
		PT 3456843 T	2021/10/26
		SG 10201808217 A	2018/10/30
		SG 11201408113 A	2015/01/29
		TW 201403066 A	2014/01/16
		TW 201920952 A	2019/06/01
		TW 202122796 A	2021/06/16
		US 11261494 B2	2022/03/01
		US 2014-0100121 A1	2014/04/10
		US 2018-202003 A1	2018/07/19
		US 2019-264291 A1	2019/08/29
		WO 2013-190441 A2	2013/12/27
		ZA 201409281 B	2017/08/30
KR 10-2021-0119282 A	2021/10/05	AU 2020-210912 A1	2020/07/30
		AU 2020-210912 A1	2021/01/21
		BR 112020026133 A2	2021/07/27
		CA 3104153 A1	2020/07/30
		CN 112424372 A	2021/02/26
		EP 3914731 A1	2021/12/01
		IL 279433 A	2021/01/31
		IL 279433 D0	2021/01/31
		JP 2022-517456 A	2022/03/09
		MX 2020014095 A	2021/03/09
		SG 11202012518 A	2021/01/28
		US 2021-310067 A1	2021/10/07
		WO 2020-154402 A1	2020/07/30