

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022 년 12 월 22 일 (22.12.2022) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2022/265409 A1

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6886 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/008504

(22) 국제출원일:

2022 년 6 월 15 일 (15.06.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0077448 2021 년 6 월 15 일 (15.06.2021) KR

(71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울특별시 종로구 대학로 101, Seoul (KR). 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교, Seoul (KR). 국민대학교산학협력단 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 02707 서울특별시 성북구 정릉로 77, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김희승 (KIM, Hye Seung); 06603 서울특별시 서초구 서초중앙로 24길 57, Seoul (KR). 박수진 (PARK, Soo Jin); 04315 서울특별시 용산구 백범로 90길 74 103 동 1207호, Seoul (KR). 이은지 (LEE, Eun Ji); 06917 서

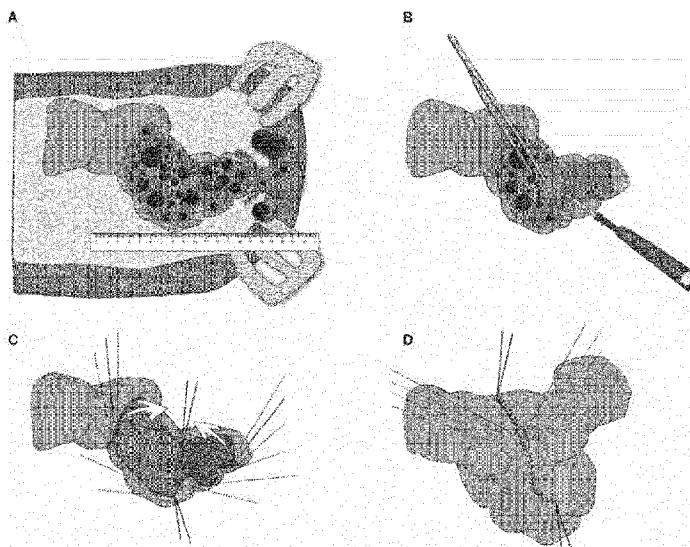
울특별시 동작구 노량진동 만양로 8길 50 106동 1706호, Seoul (KR). 김준환 (KIM, Jun Hwan); 05553 서울특별시 송파구 올림픽로 212 A동 3307호, Seoul (KR). 임현지 (LIM, Hyun Ji); 03127 서울특별시 종로구 창경궁로 146 804호, Seoul (KR). 백해린 (PAIK, Hae Rin); 03127 서울특별시 종로구 창경궁로 146 804호, Seoul (KR). 문재희 (MUN, Jae Hee); 05236 서울특별시 강동구 고덕로 131 116동 2301호, Seoul (KR). 송권화 (SONG, Gwon Hwa); 31175 충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호, Chungcheongnam-do (KR). 임화선 (LIM, Wha Sun); 07344 서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호, Seoul (KR). 박선우 (PARK, Sun Woo); 05354 서울특별시 강동구 천호대로 173길, 50, 702호, Seoul (KR). 홍태연 (HONG, Tae Yeon); 25471 강원도 강릉시 강릉대로 469번길 14, 405호, Gangwon-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 천지 (IPCJ PATENT & LAW FIRM); 06224 서울특별시 강남구 논현로76길 24, 2층(역삼동, 신한빌딩), 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, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,

(54) Title: TUMOR PHENOTYPE AND BIOMARKER FOR PREDICTING PROGNOSIS OF ADVANCED OVARIAN CANER

(54) 발명의 명칭: 진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 종양 표현형 및 바이오마커



(57) Abstract: The present invention provides a composition and method for selecting a tumor removal method and predicting a prognosis of advanced ovarian cancer, by confirming the clinical phenotype of a tumor metastasized to the rectosigmoid colon in patients with advanced ovarian cancer, or confirming the gene expression pattern that varies according to each clinical phenotype.

(57) 요약서: 본 발명은 진행성 난소암 환자에서 직장구불결장에 전이된 종양의 임상 표현형을 확인하거나, 또는 각 임상 표현형에 따라 달라지는 유전자 발현양상을 확인함으로써 종양 제거 방법의 선택 및 진행성 난소암의 예후를 예측할 수 있는 조성물 및 방법을 제공한다.

[다음 쪽 계속]



WO 2022/265409 A1

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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

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: 진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 종양 표현형 및 바이오마커

기술분야

- [1] 본 발명은 진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 종양 표현형 및 바이오마커에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 진행성 난소암(advanced ovarian cancer)은 난소에서 발생한 암이 난소 외부로 전이된 것을 의미한다. 진행성 난소암의 치료를 위해서는 최대 종양감축(Maximal cytoreduction)이 중요하지만, 진행성 난소암의 종양감축술(debulking surgery)을 하는 동안 직장구불결장(rectosigmoid colon)에 위치한 종양을 함께 제거하는 것은 부인과 종양전문의에게 부담이 된다. 부인과 종양전문의 중 일부는 임상에서 직장구불결장에 위치한 종양을 제거할 수 있으나, 일반적으로 80-90%의 사례에서는 대장 외과 의사에게 의존한다.
- [3] 그러나 직장구불결장 부위의 종양은 난소암에서 종양감축술을 받는 환자의 약 24 내지 64%에서 빈번하게 나타난다. 따라서 종양의 완전한 제거를 통한 생존율 향상을 위해서는 난소암 종양감축술과 직장구불결장의 종양 절제를 통합하는 것이 중요하다.
- [4] 저위전방절제술(Low Anterior Resection, LAR)은 직장구불결장과 관련된 종양을 제거하기 위한 일반적인 방법으로, 미세 잔류 종양(microscopic residual tumor)을 남길 위험이 없는 장점이 있다. 그러나 LAR을 받은 환자의 2.3 내지 6.8%는 문합 부위 누출(anastomosis site leakage)이 발생하고, 17 내지 18%는 장루형성(bowel diversion)이 필요하다. 또한 LAR을 시행한 환자의 40%가 저전방 절제 증후군(low anterior resection syndrome)으로 발전하여 삶의 질(Quality of life)이 저하되는 것으로 보고되었다.
- [5] LAR로 직장구불결장 전부를 제거하는 대신 직장구불결장 표면의 종양을 박리(stripping)하여 제거하는 것은 직장구불결장을 보존할 수 있고 부인과 종양전문의도 수행하기 용이하기 때문에 LAR의 대안이 될 수 있다. 그러나 종래 연구에서는 직장구불결장을 절제하지 않고 표면의 종양만을 제거하면 미세종양이 잔존하여 생존율 감소의 위험이 있다고 여겨졌다. 그러나, 최근 연구에 따르면 진행성 난소암 환자 중 일부는 직장구불결장의 종양을 박리(stripping)하여도 LAR와 비슷한 예후를 기대할 수 있다.
- [6]
- [7] [선행기술문헌]
- [8] (비특허문헌 0001) Surgical technique of visceral segmental serosectomy for advanced ovarian cancer, HS Kim et al., Gland Surg 2021;10(3):1276-1278

(2021.03.10)

- [9] (비특허문헌 0002) Clinical Phenotypes of Tumors Invading the Rectosigmoid Colon Affecting the Extent of Debulking Surgery and Survival in Advanced Ovarian Cancer, Park SJ, Mun J, Lee EJ, et al., Front Oncol. 2021;11:673631. (2021.04.22)

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 직장구불결장으로 전이가 진행된 진행성 난소암 환자의 효율적인 수술방법 선택 및 삶의 질 향상을 위하여, 임상 표현형 및 분자적 방법에 기초하여 LAR 대신 종양 박리를 수행할 수 있는 환자를 구별할 수 있는 기술이 요구된다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명자는 진행성 난소암에 의해 전이된 직장구불결장 종양의 임상 표현형에 따라 LAR 대신 보존적 수술을 실시하여도 진행성 난소암의 예후가 양호할 수 있음을 발견하였다. 그리고 직장구불결장 종양의 임상 표현형 별로 특징적인 바이오마커가 존재하며, 이를 통해 진행성 난소암의 예후 예측 및 종양 제거방법 선택에 이용할 수 있음을 확인하였다.

발명의 효과

- [12] 일 실시예에 따르면 진행성 난소암 환자에서 직장구불결장에 전이된 종양의 임상 표현형을 확인하거나, 또는 각 임상 표현형에 따라 달라지는 유전자 발현양상을 확인함으로써 종양 제거 방법의 선택 및 진행성 난소암의 예후를 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 장측구획장막절제술(VSS)의 단계별 절차를 나타낸 것이다. A는 종양이 위치한 직장구불결장의 길이를 평가하는 단계; B는 전기소작(electrocauterization)으로 종양을 박리(stripping)하는 단계; C는 좌우의 앞가쪽 가장자리(anterolateral edge)를 태그하고(tagged), 박리된 장의 표면을 접는 단계; D는 박리된 영역의 가장자리를 3-0 바이크릴 봉합사(3-0 vicryl sutures)로 봉합하는 단계를 나타낸 것이다.
- [14] 도 2는 직장구불결장에 전이된 종양의 종양 분리성 및 확산 정도에 따른 임상 표현형을 구별한 것으로, A는 FI형, B는 FI형, C는 D형을 나타낸 것이다.
- [15] 도 3 및 도 4는 FS, FI, 및 D 그룹의 무진행 생존(progression-free survival) 및 전체 생존(overall survival) 결과를 Kaplan-Meier 방법을 사용한 로그 순위(log-rank) 및 Breslow 테스트를 사용하여 비교한 것이다.
- [16] 도 5 및 도 6은 FS, FI, 및 D 그룹의 무진행 생존(progression-free survival) 및 전체 생존(overall survival) 결과를 Cox 비례 위험 회귀 분석(Cox proportional hazards regression analysis)으로 나타낸 것이다.
- [17] 도 7은 FS, FI, 및 D 그룹의 난소 종괴에서 RPKM 값을 기준으로 클러스터 1로 분류한 유전자 RPL36, IGFBP6, ANKRD1, ATOH8, RPS28 및 ADAMTS4의

mRNA 발현양상을 qPCR로 확인한 결과이다.

- [18] 도 8은 FS, FI, 및 D 그룹의 난소 종괴에서 RPKM 값을 기준으로 클러스터 2로 분류한 유전자 DPEP3, AMY1A, RELN, 및 REG1A의 mRNA 발현양상을 qPCR로 확인한 결과이다.
- [19] 도 9는 FS, FI, 및 D 그룹의 난소 종괴에서 RPKM 값을 기준으로 클러스터 3으로 분류한 유전자 BRCA2 및 SIDT1의 mRNA 발현양상을 qPCR로 확인한 결과이다.
- [20] 상기 도 7 내지 9의 그래프에서 세로축 단위는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 이다.
- [21] 도 10 내지 도 13는 FS, FI, 및 D 그룹의 난소 종괴에서 RPKM 값을 기준으로 클러스터 1로 분류한 유전자 RPL36, IGFBP6, ANKRD1, 및 ATOH8의 단백질 발현양상을 면역조직화학염색법(immunohistochemistry)으로 관찰하고 발현 정도를 점수화하여 그래프로 나타낸 것이다.
- [22] 도 14 내지 도 15는 FS, FI, 및 D 그룹의 난소 종괴에서 RPKM 값을 기준으로 클러스터 1로 분류한 유전자 RPS28 및 ADAMTS4의 단백질 발현양상을 면역조직화학염색법으로 관찰하고 발현 정도를 점수화하여 그래프로 나타낸 것이다.
- [23] 도 16 내지 도 19는 FS, FI, 및 D 그룹의 난소 종괴에서 RPKM 값을 기준으로 클러스터 2로 분류한 유전자 DPEP3, AMY1A, RELN, 및 REG1A의 단백질 발현양상을 면역조직화학염색법으로 관찰하고 발현 정도를 점수화하여 그래프로 나타낸 것이다.
- [24] 도 20 내지 도 21는 FS, FI, 및 D 그룹의 난소 종괴에서 RPKM 값을 기준으로 클러스터 3으로 분류한 유전자 BRCA2 및 SIDT1의 단백질 발현양상을 면역조직화학염색법으로 관찰하고 발현 정도를 점수화하여 그래프로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 일 양상은 직장구불결장에 종양이 있는 진행성 난소암 환자의 직장구불결장 종양 제거 방법 선택을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 종양이 있는 직장구불결장의 길이를 측정하는 단계; 점막층 및 점막하층에 종양 침투 여부를 확인하는 단계; 및 종양이 발생한 직장구불결장의 길이가 18cm 이하이고, 점막층 및 점막하층에 종양이 침투하지 않으면 보존수술을 선택하고, 그 외에는 절제수술을 선택하는 단계를 포함하는, 진행성 난소암 환자의 직장구불결장 종양 제거 방법 선택을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [26] 본 발명자는 진행성 난소암 환자의 직장구불결장에 전이된 종양의 표현형에 따라 장측구획장막절제술(VSS, visceral segmental serosectomy) 또는 LAR를 실시하고 수술결과 및 예후 등을 비교하였다. 그 결과 종양이 발생한 직장구불결장의 길이가 18cm 이하이고, 종양 박리시 점막층 및 점막하층에 종양이 침투하지 않은 경우에는 LAR를 실시하지 않고 종양을 박리하고 VSS를

실시하여도 예후가 양호함을 확인하였다. 일 실시예에 따르면, 종양을 박리(exfoliating)함으로써 직장구불결장을 보존할 수 있는 가능성은 종양 분리성(tumor separability)을 기초로 한 임상 표현형에 의존할 수 있다. 종양 분리성은 종양 침습성 및 범위에 따라 결정될 수 있다.

- [27] 상기 진행성 난소암 환자는 세계산부인과연맹(FIGO)의 암병기결정 시스템에 따라 3기 내지 4기로 분류된 환자일 수 있다.
- [28] 상기 진행성 난소암 환자는 아시아계, 또는 한국인일 수 있다.
- [29] 상기 보존수술은 장측구획장막절제술(Visceral Segmental Serosectomy, VSS)일 수 있다.
- [30] 상기 절제수술은 저위전방절제술(Low Anterior Resection, LAR)일 수 있다.
- [31] 점막층 및 점막하층에 종양이 침투하지 않은 경우는 종양이 장막(serosal layer)에만 존재하는 경우, 또는 종양이 장막 및 근육층(muscular layer)에만 존재하는 경우일 수 있다. 종양이 점막층(mucosal layer) 및 점막하층(submucosal layer)에 침투하지 않은 경우 보존수술을 선택할 수 있다. 난소암으로부터 직장구불결장으로 전이된 종양은 직장구불결장의 장막, 근육층, 점막하층, 및 점막층의 순서로 침입한다. 종양이 점막층 및 점막하층까지 침투하지 않았는지 여부는 직장구불결장의 장막에 위치한 종양을 박리할 때, 점막층 및 점막하층이 열리지 않거나 또는 이들이 손상되지 않고 종양이 박리되는지 여부로 확인할 수 있다. 이는 특별한 숙련이 필요 없으며, 대장 외과전문의가 아니어도 일반적인 의료업 종사자라면 쉽게 실시할 수 있다.
- [32] 상기 종양이 발생한 직장구불결장의 길이의 기준을 18cm 로 한 것은 임상적 경험상 18cm가 VSS를 시행할 수 있는 최대치이기 때문이다.
- [33]
- [34] 다른 양상은 직장구불결장에 종양이 있는 진행성 난소암 환자의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 종양이 발생한 직장구불결장의 길이를 측정하는 단계; 점막층 및 점막하층에 종양 침투 여부를 확인하는 단계; 및 종양이 발생한 직장구불결장의 길이가 18cm 이하이고 점막층 및 점막하층에 종양이 침투하지 않으면 국소 분리형, 종양이 발생한 직장구불결장의 길이가 18cm 이하이고 점막층 및 점막하층에 종양이 침투하면 국소 분리불가형, 종양이 발생한 직장구불결장의 길이가 18cm 이상이면 확산형으로 분류하는 종양의 표현형 결정 단계를 포함하는, 진행성 난소암 환자의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [35] 상기 예후(prognosis)는 질병을 진단 또는 분석한 시점 이후의 증세 또는 경과에 대한 전망을 포괄하는 의미이다. 진행성 난소암 환자에 있어서 예후는 통상적으로 암 발병 또는 수술 이후 일정기간 내의 전이 여부 또는 생존기간을 의미할 수 있다. 상기 예후는 재발률, 전체 생존기간(OS), 무진행 생존기간(PFS), 및 수술결과(operative outcome)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 수술 결과는 예를 들면 수술 시간, 출혈량, 수혈, 입원기간, 수술 복잡성

- 점수(SCS), 수술적 합병증, 종양 절제 부위의 누출 및 출혈 정도일 수 있다.
- [36] 일 구체예에 따르면, 상기 종양의 표현형이 국소 분리형으로 분류되면 예후가 긍정적인 것(긍정적 예후 또는 양성적 예후)으로 결정할 수 있다.
- [37] 일 구체예에 따르면, 상기 종양의 표현형이 국소 분리불가형 또는 확산형으로 분류되면 예후가 부정적인 것(부정적 예후 또는 음성적 예후)으로 결정할 수 있다.
- [38] 또 다른 양상은, 환자의 생물학적 시료로부터 RPL36, ANKRD1, IGFBP6, 및 ATOH8 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 각각 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 진행성 난소암의 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [39] 본 발명자는 국소 분리형(FS), 국소 분리불가형(FI) 및 확산형(D)종양의 유전자 발현양상을 비교한 결과, 상기 RPL36, ANKRD1, IGFBP6, 및 ATOH8 유전자들은 국소 분리형(FS) 종양에서 상대적으로 발현이 높고, 국소 분리불가형(FI) 및 확산형(D)종양에서 상대적으로 발현이 낮음을 확인하였다.
- [40] 상기 mRNA 또는 단백질 발현수준을 검출하는 제제란 본 발명의 바이오마커 유전자 또는 이들 유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현수준을 확인하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미하며, 예를 들면 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드이거나, 또는 상기 바이오마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적인 항체일 수 있다.
- [41] 일 구체예에 따르면, 상기 진행성 난소암의 예후 예측용 조성물은 상기 REG1A, AMY1A, RELN, 및 DPEP3 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 각각 검출할 수 있는 제제를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [42] 본 발명자는 국소 분리형(FS), 국소 분리불가형(FI) 및 확산형(D)종양의 유전자 발현양상을 비교한 결과, 상기 REG1A, AMY1A, RELN, 및 DPEP3 유전자들은 확산형(D) 종양에서 상대적으로 발현이 높고, 국소 분리형(FS) 및 국소 분리불가형(FI) 종양에서 상대적으로 발현이 낮음을 확인하였다.
- [43] 일 구체예에 따르면, 상기 진행성 난소암의 예후 예측용 조성물은 상기 BRCA2 및 SIDT1 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 각각 검출할 수 있는 제제를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [44] 상기 BRCA2 및 SIDT1 유전자들은 국소 분리불가형(FI) 종양 및 확산형(D) 종양에서 상대적으로 발현이 높고, 국소 분리형(FS) 종양에서 상대적으로 발현이 낮음을 확인하였다.
- [45] 일 구체예에 따르면, 상기 진행성 난소암의 예후 예측용 조성물은 상기 RPS28 및 ADAMTS4 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 각각 검출할 수 있는 제제를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [46] 상기 RPS28 및 ADAMTS4 유전자들은 DEG 분석에 의한 RPKM 값에 의할 때

국소 분리형(FS) 종양에서 상대적으로 발현이 높고, 국소 분리불가형(FI) 종양 및 확산형(D) 종양에서 상대적으로 발현이 낮았으나, qPCR에 의할 때는 국소 분리형(FS) 종양 뿐만 아니라 확산형(D) 종양에서도 발현이 높았다.

- [47] 일 구체예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 세포, 종양 또는 혈액일 수 있다. 상기 종양은 난소암 종양이거나, 또는 난소암으로부터 위장, 췌장, 소장, 대장, 또는 결장 등 다른 기관으로 전이된 종양일 수도 있다.
- [48] 또 다른 양상은, 상기 진행성 난소암의 예후 예측용 조성물; 및 상기 측정된 발현수준과 비교하기 위한 진행성 난소암 환자의 참조값;을 포함하는 진행성 난소암의 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [49] 상기 참조값은 유전자 발현량, 발현 양상 또는 발현 패턴으로써, 예후가 알려진 진행성 난소암 환자에 대해 직장구불결장 종양의 임상 표현형을 조사하여 국소 분리형, 국소 분리불가형, 확산형으로 환자를 분류하고, 이들의 종양 또는 혈액의 유전자 발현량을 조사하여 얻을 수 있다.
- [50] 상기 키트가 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 조성물을 포함하는 경우, 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [51] 상기 키트가 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 조성물을 포함하는 경우, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있으며, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다.
- [52]
- [53] 또 다른 양상은 환자의 생물학적 시료를 준비하는 단계; 상기 시료로부터 RPL36, ANKRD1, IGFBP6, 및 ATOH8 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준 또는 발현패턴 데이터를 확인하는 단계; 및 상기 발현수준 또는 발현패턴을 예후가 알려진 진행성 난소암 환자의 참조 데이터와 비교하는 단계를 포함하는, 진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [54] 상기 mRNA의 발현수준 또는 발현패턴 데이터를 확인하는 단계는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RTPCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(northern blotting) 또는 DNA 칩(DNA chip technology) 등의 방법이 이용될 수 있으나 특별히 한정되는 것은 아니다. 상기 mRNA의 발현수준 또는 발현패턴 데이터 확인은 RNA 시퀀싱으로

매핑된 리드의 수를 기준으로 할 수도 있다. 예를 들면 RNA 시퀀싱, 차등발현 유전자 발현값 계산(RPKM, FPKM, 또는 TPM 등), 및 클러스터링으로 RNA의 발현수준 또는 발현패턴을 확인할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [55] 상기 단백질의 발현수준 또는 발현패턴 데이터를 확인하는 단계는 웨스턴 블랏 (western blotting), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 (radial immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법 (Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동 (rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법 (immunohistochemical staining), 면역침전분석법 (immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법 (complement Fixation Assay), 면역형광법 (immunofluorescence), 면역크로마토그래피법 (immunochromatography), FACS 분석법 (fluorescenceactivated cell sorter analysis) 또는 단백질 칩 방법 (protein chip technology) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [56] 상기 예후가 알려진 진행성 난소암 환자는 진행성 난소암으로 진단받은 환자 중에서 병의 진행 경과가 밝혀진 환자를 의미하며, 예를 들면 진행성 난소암으로 인한 수술을 받은 후 36개월 안으로 재발하여 불량한 예후를 가진 것으로 확정된 환자, 또는 36개월 이후 재발하지 않고 생존하거나 완치되어 양호한 예후를 가진 것으로 확정된 환자일 수 있다. 이들 환자로부터 채취한 시료로부터 유전자의 발현수준 또는 발현패턴을 획득하고, 이를 참조값으로서 비교함으로써 예후를 알고자 하는 환자의 예후를 예측할 수 있다. 예후가 알려진 환자의 유전자 발현수준 또는 발현패턴은 환자의 예후와 함께 데이터베이스화하고, 추후 예후를 알고자 하는 환자의 발현수준 또는 발현패턴을 상기 데이터베이스에 입력하여 예후를 예측할 수 있다. 발현수준 또는 발현패턴을 비교하기 위한 알고리즘, 통계분석 프로그램은 공지된 것을 사용할 수 있다.
- [57] 상기 방법에 의해 긍정적인 예후가 예측되는 환자에 대해서는 직장구불결장 종양의 제거방법으로 덜 침습적인 수술, 또는 VSS를 실시할 것을 결정할 수 있고, 부정적인 예후가 예측되는 환자에 대해서는 LAR 또는 더 공격적이고 실험적인 치료를 실시할 것을 결정할 수 있다.
- [58] 일 구체예에 따르면, 상기 진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법은 상기 시료로부터 REG1A, AMY1A, RELN, 및 DPEP3 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준 또는 발현패턴 데이터를 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [59] 일 구체예에 따르면, 상기 진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법은 상기 시료로부터 BRCA2 및 SIDT1 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준 또는 발현패턴 데이터를 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [60] 일 구체예에 따르면, 상기 진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법은 상기 시료로부터 RPS28 및 ADAMTS4 유전자로 이루어진

군에서 선택된 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준 또는 발현패턴 데이터를 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [61] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [62]
- [63] **실시예 1: 직장구불결장에 전이된 종양의 표현형 구별 및 예후 분석**
- [64] **(1) 실험방법**
- [65] 1-1. 환자의 선별(Patient Selection)
- [66] 본 연구는 2014년 8월부터 2020년 6월까지 서울대학교 병원에서 상피 난소암(epithelial ovarian cancer) 진단을 받은 환자를 중에서 (1) 국제 산부인과 연맹 (FIGO) 기준으로 3B기 내지 4B기이고, (2) 데이터의 품질을 제어하기 위해서 숙련된 부인과 종양전문의(HSK)에 의해 1차 질환(primary disease)인 난소암에 대한 최대 종양감축술(maximal debulking surgery)을 받았고, (3) 종양감축술 중 직장구불결장(rectosigmoid colon)에서 종양 분리성(tumor separability)을 평가한 환자를 대상으로 하였다.
- [67] 서울대학교 병원기관심의위원회(IRB, Seoul National University Hospital Institutional Review Board)는 본 연구(H-1707-079-869)를 승인했으며 후향적 실험디자인(retrospective design)이므로 환자 동의는 면제되었다.
- [68]
- [69] 1-2. 수술 절차(Surgical Procedure)
- [70] 모든 환자는 이전 연구(Kim HS, Bristow RE, Chang S-J. Total Parietal Peritonectomy With En Bloc Pelvic Resection for Advanced Ovarian Cancer With Peritoneal Carcinomatosis. Gynecol Oncol (2016) 143(3):688-9)에서 설명한 절차에 따라 난소암의 최적의 종양감축을 위해 종양감축술을 받았다.
- [71] 종양감축술 중에 종양이 위치한 직장구불결장의 길이를 평가했다. 종양이 형성된 조직의 길이가 18cm 미만일 때는 직장구불결장을 손상시키지 않기 위해 이전에 보고된 수술 절차(Park SJ, Kim HS. Surgical Technique of Visceral Segmental Serosectomy for Advanced Ovarian Cancer. Gland Surg (2021) 10(3):1276-8)에 따라 장측구획장막절제술(visceral segmental seroectomy, 이하 VSS로 지칭)을 시도하였다. (도 1 참고)
- [72] VSS을 시도하여 점막결손(mucosal defect) 없이 종양을 쉽게 분리할 수 있는 경우에는 해당 표현형을 국소 분리가능 유형(focal and separable type, FS type)으로 정의하였다. 반면, VSS 시술 중에 점막 결손이 발생하면 해당 표현형을 국소 분리불가 유형(focal and inseparable type, FI type)으로 정의하고 VSS 대신 LAR을 실시하였다. 마지막으로, 종양이 포함된 조직의 길이가 18cm를 초과했을

때는 과도한 장력(excessive tension)에 의한 장막 수선 부위의 누출 위험을 방지하기 위해 LAR를 수행하였으며, 해당 표현형은 확산(D) 유형으로 정의했다. (도 2 참고)

[73] 종양 침습성(invasiveness) 및 확장성(extensiveness)에 따른 종양 분리성(tumor separability)은 두 명의 부인과 종양학자(SJP 및 EJJ)에 의해 검증되었으며, 세 번째 부인과 종양학자(JM)는 두 검증자의 검증결과를 조율했다. 최종적으로 3 명의 부인과 종양전문의는 수술 기록, 병리 보고서, 전자 의료 기록에 업로드된 수술 분야의 비디오와 사진을 사용하여 검증을 수행했다.

[74]

[75] 1-3. 데이터 선별

[76] 직장구불결장에 위치한 종양의 절제 유형에 따라 환자를 FS, FI 및 D 그룹으로 나누었다.

[77] 세 그룹에 대해서 다음 데이터를 수집했다: 연령, FIGO 병기(FIGO stage), 조직학적 유형(histologic type), 치료 유형(treatment type), 베바시주맵(bevacizumab) 사용, 추적 기간(duration of follow-up), 수술 범위(surgical extent), 종양 침윤(tumor infiltration), 수술 결과(operative outcome), 무진행 생존(PFS, progression-free survival) 및 전체 생존(OS, overall survival). 또한 수술 복잡성 점수(SCS, surgical complexity score)를 계산하여 수술의 복잡성과 정도를 평가하고, 메모리얼 슬론 케터링 암센터(MSKCC) 외과 2차 사건 등급 분류를 사용하여 수술 합병증을 평가했다. 종양 반응(Tumor response)은 RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) 기준 (버전 1.1)에 의해 평가되었다. 무진행 생존(PFS)은 치료 시작일부터 질병 재발 또는 마지막 추적일까지의 시간 간격으로 정의되었으며, 전체 생존(OS)은 치료 시작일부터 암 관련 사망 또는 마지막 추적일까지의 시간 간격으로 정의되었다. 재발 패턴은 직장구불결장(rectosigmoid colon)의 절제부위, 골반강(pelvic cavity), 복강(abdominal cavity), 원거리 전이(distant metastasis)로 분류되었다.

[78]

[79] 1-4. 통계분석

[80] 카이 제곱 검정(Chi-squared test)은 범주형 변수(categorical variables)에 대해 수행하였고, Kruskal-Wallis 검정은 연속 변수(continuous variables)에 대해 수행하였다. 생존 결과는 로그 순위 및 Breslow 검정을 사용하여 Kaplan-Meier 방법으로 추정되었으며, 생존과 관련된 요인은 위험 비율(HR)과 95% 신뢰 구간(CI)을 사용하는 Cox 비례 위험 회귀 방법으로 식별되었다. 모든 통계 분석은 SPSS 소프트웨어 버전 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

[81]

[82] (2) 임상 표현형에 따른 특성 분석

[83] 2-1. 기준특성 (Baseline characteristics)

[84] 총 83명의 환자가 진행성 난소암에 대해 직장구불결장의 종양의 절제를 포함한

최대 종양감축술을 받았다. 이 중 44명(53%)은 FS군, 18명(21.7%)은 FI군, 24명(25.3%)은 D군으로 분류되었다.

- [85] 세 그룹은 연령, FIGO 병기, 조직학, 치료 유형, 베바시주맙 사용, 및 추적 기간에서 유의한 차이가 없었다. (표 1 참고)

[86] [표 1]

	FS group (n=44, %)	FI group (n=18, %)	D group (n=21, %)	P value
Age (median, range, years)	57 (32, 76)	61 (31, 89)	60 (42, 79)	0.821
FIGO stage				0.126
III	17 (38.6)	12 (66.7)	9 (42.9)	
IV	27 (61.4)	6 (33.3)	12 (57.1)	
Histology(조직 학)				0.289
Serous(장액)	39 (88.6)	14 (77.8)	21 (100)	
Endometrioid(자궁내막)	0	1 (5.6)	0	
Clear cell(투명 세포)	3 (6.8)	3 (16.7)	0	
mixed	2 (4.6)	0	0	
Treatment				0.239
Neoadjuvant	25 (56.8)	13 (72.2)	16 (76.2)	
chemotherapy				
Primary debulking surgery	19 (43.2)	5 (27.8)	5 (23.8)	
Use of bevacizumab				0.674
Yes	5 (11.4)	1 (5.6)	3 (14.3)	
No	39 (88.6)	17 (94.4)	18 (85.7)	
Duration of follow-up(medi an, range, mons)	45.1 (8.3-70.3)	64.0 (6.7-128.7)	38.7 (9.4-80.4)	0.139
D, diffuse; FI, focal and inseparable; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; FS, focal and separable.				

[87] 2-2. 수술 범위 및 종양 침윤 표 2 및 표 3은 절제된 부위의 수술 범위 및 종양

침윤을 나타낸 것이다.

[88] [표2]

Surgical extent (수술 범위)	FS group (n=44, %)	FI group (n=18, %)	D group (n=21, %)	P value
Hysterectomy(자궁적출)	44 (100)	18 (100)	21 (100)	-
BSO(양측난소 적출)	44 (100)	18 (100)	21 (100)	-
Lymphadenect omy(림프절절 제)	44 (100)	18 (100)	21 (100)	-
Omentectomy(대망절제)	44 (100)	18 (100)	21 (100)	-
Hepatobiliary resection(간쓸 개절제)				
Splenectomy(비장절제)	27 (61.4)a,b	7 (38.9)a	17 (81.0)b	0.027
Distal pancreatectom y(원위부췌절 제)	12 (27.3)	1 (5.6)	6 (28.6)	0.14
Hepatectomy(간절제)	1 (2.3)	1 (5.6)	0	0.527
Wedge resection of liver(간 췌기절제)	11 (25.0)	2 (11.1)	7 (33.3)	0.265
Cholecystecto my(담낭절제)	14 (31.8)c,d	2 (11.1)c	10 (47.6)d	0.049
Portal triad stripping(간세 동이박리)	11 (25)e,f	1 (5.6)e	9 (42.9)f	0.028
Adrenalectomy (부신절제)	5 (11.4)	1 (5.6)	4 (19.0)	0.426

Cardiophrenic LND(심장가 로막 림프절 절제)	15 (34.1)	3 (16.7)	6 (28.6)	0.389
Peritonectomy(복막절제)				
Rt diaphragm Peritonectomy(우측 가로막 복강라이닝 절 제)	30 (68.2)	10 (55.6)	16 (76.2)	0.386
Lt diaphragmPerit onectomy (좌측 가로막 복강라이닝 절 제)	20 (45.5)g,h	4 (22.2)g	13 (61.9)h	0.045
Rt paracolicPerito nectomy (우측 잘록창자 복강라이닝 절 제)	30 (68.2)i	5 (27.8)	14 (66.7)i	0.01
Lt paracolicPerito nectomy (좌측 잘록창자 복강라이닝 절 제)	26 (59.1)j	4 (22.2)	13 (61.9)j	0.017
Rt pelvicPeritonec tomy (우측 골반 복강라이닝 절	30 (68.2)	9 (50)	13 (61.9)	0.404

제)				
Lt pelvic Peritonectomy (좌측 골반 복강라이닝 절제)	28 (63.6)	8 (44.4)	12 (57.1)	0.38
Bladder Peritonectomy (방광 복강라이닝 절제)	30 (68.2)	14 (77.8)	17 (81.0)	0.495
Bowel surgery (장수술)				
Small bowel R&A(소장 절제 및 문합)	4 (9.1)k	4 (22.2)k,l	7 (33.3)l	0.052
Large bowel R&A(대장 절제 및 문합)	10 (22.7)	4 (22.2)	8 (38.1)	0.379
Appendectomy (충수절제)	27 (61.4)	9 (50)	16 (76.2)	0.234
Prophylactic ileostomy(예방적 회장루조설술)	1 (2.3)m	2 (11.1)m,n	4 (19.0)n	0.067
BSO, bilateral salpingo-oophorectomy; D, diffuse; FI, focal and inseparable; FS, focal and separable; LND, lymph node dissection; LN, lymph node; R&A, resection and anastomosis. There is no significant difference between the two groups with the same symbols				

[89] [표3]

Tumor infiltration (종양 침윤)	FS group (n=44, %)	FI group (n=18, %)	D group (n=21, %)	P value
Uterus(자궁)	29 (65.9)	13 (72.2)	18 (85.7)	0.249
Adnexa (자궁부속기관)	43 (97.7)	18 (100)	20 (95.2)	0.624
Lymph node(림프절)	28 (63.6)	10 (55.6)	13 (61.9)	0.838
Omentum(대창)	26 (59.1)	10 (55.6)	17 (81)	0.163
Hepatobiliary resection(간췌관절제)				
Spleen(지라)	18 (40.9)	5 (27.8)	12 (57.1)	0.175
Distal pancreas(원위부 췌장)	5 (11.4)	0	2 (9.5)	0.336
Liver (hepatectomy)	1 (2.3)	1 (5.6)	0	0.527
Liver (wedge resection)(간췌관절제)	9 (20.5)o,p	1 (5.6)o	7 (33.3)p	0.101
Gall bladder(담낭)	8 (18.2)	0	4 (19)	0.143
Portal triad (간세동맥)	9 (20.5)q	0r	4 (19)q,r	0.117
Adrenal gland(부신)	2 (4.5)	1 (5.6)	1 (4.8)	0.986
Cardiophrenic LN(심장가로막 림프절)	12 (27.3)	2 (11.1)	2 (9.5)	0.145
Peritonectomy(				

복강라이닝 절제)				
Rt diaphragm peritoneum(우측 가로막 복막)	27 (61.4)	10 (55.6)	16 (76.2)	0.361
Lt diaphragm peritoneum(좌측 가로막 복막)	19 (43.2)s,t	4 (22.2)s	13 (61.9)t	0.045
Rt paracolic peritoneum(우측 잘록창자 복막)	26 (59.1)u	4 (22.2)v	10 (47.6)u,v	0.031
Lt paracolic peritoneum(좌측 잘록창자 복막)	23 (52.3)w	4 (22.2)	12 (57.1)w	0.055
Rt pelvic peritoneum(우측 골반 복막)	26 (59.1)	7 (38.9)	11 (52.4)	0.35
Lt pelvic peritoneum(좌측 골반 복막)	23 (52.3)	7 (38.9)	11 (52.4)	0.602
Bladder peritoneum(방광 복막)	28 (63.6)	12 (66.7)	16 (76.2)	0.598
Bowel surgery				
Small bowel segment(소장 분절)	4 (9.1)x	2 (11.1)x,y	6 (28.6)y	0.102
Large bowel segment(대장 분절)	6 (13.6)z	3 (16.7)z,aa	8 (38.1)aa	0.066
Appendix(충수)	17 (38.6)bb,cc	4 (22.2)bb	13 (61.9)cc	0.038

)				
BSO, bilateral salpingo-oophorectomy; D, diffuse; FI, focal and inseparable; FS, focal and separable; LND, lymph node dissection; LN, lymph node; R&A, resection and anastomosis. There is no significant difference between the two groups with the same symbols				

- [90] 비장절제술(Splenectomy), 담낭절제술(cholecystectomy), 간세동이 박피(portal triad stripping), 좌측 횡격막 복막절제술(left diaphragm peritonectomy), 좌우 잘록창자 복막제거술(right and left paracolic peritonectomy) 은 FI 그룹보다 D 그룹에서 더 많이 수행되었다. 그러나 FI 그룹과 D 그룹 간에 소장 및 대장 절제술(small and large bowel resection)의 수행 정도는 차이가 없었다. 반면, FS 그룹은 FI 그룹보다 좌우 잘록창자 복막절제술(right and left paracolic peritonectomy)을 더 많이 수행하였고, D 그룹보다 소장 절제술(small bowel resection) 및 예방 회장조루술(prophylactic ileostomy)을 더 많이 수행하였다.
- [91] 병리학적 검사에서, D 그룹은 FI 그룹보다 좌측 횡격막(left diaphragm), 좌측 잘록창자 복막(left paracolic peritoneum), 충수(appendix)에서 종양 침윤이 더 흔하게 나타났다. 그러나 두 군 간에 소장 및 대장의 종양 침윤에는 차이가 없었다.
- [92] 반면, FS 그룹은 FI 그룹보다 좌우 잘록창자 복막에서 종양 침윤이 더 빈번하게 나타났으며, D 그룹보다 소장 및 대장에서의 종양 침윤은 더 적게 나타났다.
- [93]
- [94] 2-3. 수술 결과(operative outcome)
- [95] 표 4는 FS, FI, 및 D 그룹 간의 수술 결과를 비교한 것이다.

[96] [표4]

Outcomes	FS group (n=44, %)	FI group (n=18, %)	D group (n=21, %)	p-value
Operation time (median, range, minutes)	300 (170, 761)a	343 (215, 630)a,b	440 (200, 785)b	0.008
Estimated blood loss (median, range, ml)	1450 (300, 5000)c	1615 (350, 6900)c	2800 (350, 9000)	0.008
Transfusion (median, range)	3 (0, 11)d	4 (0, 15)d,e	6 (1, 16)e	0.007
Hospitalization (median, range, days)	13 (8, 36)f	13.5 (9, 46)f,g	17 (11, 38)g	0.019
Surgical Complexity Score (median, range)	10 (4, 14)	10.5 (7, 17)	14 (7, 18)	<0.001
Size of residual tumor				
No gross residual tumor	35 (79.5)	15 (83.3)	14 (66.7)	0.398
<0.5cm	42 (95.5)	16 (88.9)	17 (81.0)	0.175
<1cm	44 (100)	17 (94.4)	19 (90.5)	0.139
Time interval from surgery to adjuvant chemotherapy (median, range, days)	27 (10, 56)	25 (11, 70)	27 (12, 51)	0.429
Surgical complication				
Gastrointestinal				0.298
Grade 1-2	2 (4.5)	1 (5.6)	0 (0)	
Grade 3-4	0 (0)	1 (5.6)	2 (9.5)	
Infection				0.023
Grade 1-2	4 (9.1)	1 (5.6)	2 (9.6)	
Grade 3-4	0 (0)	3 (16.7)	0 (0)	
Thromboembolic(혈전 색전성)				0.599
Grade 1-2	2 (4.5)	0 (0)	0 (0)	
Grade 3-4	1 (2.3)	0 (0)	0 (0)	

Complication at the tumor resection site of the rectosigmoid colon (n, %)				
Leakage	0 (0)	1 (5.6)	2 (9.5)	0.139
Bleeding	0 (0) ^h	2 (11.1) ⁱ	1 (4.8) ^{h,i}	0.099
D, diffuse; FI, focal and inseparable; FS, focal and separable. There is no significant difference between the two groups with the same symbols.				

[97] 첫째, FI 그룹 및 D 그룹은 FS 그룹보다 수술 시간이 길고 출혈량 및 수혈이 많았고 입원기간이 더 긴 경향을 보였다. 수술 복잡성 점수(surgical complexity score, SCS)는 D 그룹이 가장 높았고 FS 그룹이 가장 낮았다. 그러나 잔여 종양의 크기와 수술부터 보조 화학 요법까지의 시간 간격은 세 그룹 간에 차이가 없었다.

[98] 수술적 합병증은 3-4 등급 감염이 FS 그룹 및 D 그룹보다 FI 그룹에서 더 흔하였으나, 위장관 합병증 (gastrointestinal complication) 및 혈전색전성 합병증(thromboembolic complication)은 세 그룹 간에 차이가 없었다.

[99] 또한 직장구불결장의 종양 절제 부위의 누출 및 출혈의 정도는 세 그룹 간에 차이가 없었다.

[100] 2-4. 생존(survival)

[101] 도 3 및 표 5 내지 표 6에 따르면, PFS의 중앙값(Mean)은 23.9, 52.6, 17.8 개월이었다. 표 5에 따르면, PFS에 대한 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 곡선은 FS와 D 그룹 사이($p = 0.048$), FI와 D 그룹 ($p = 0.013$) 사이에 유의한 차이를 나타냈다.

[102] [표5]

	FS	FI	D
Events, n(%)	26(59.1%)	6(33.3%)	16(76.2%)
Mean (95% CI)	23.9(16.9-30.9)	52.6(14.3-90.8)	17.8(12.2-23.5)
FS와 D 사이	Log-rank: $p=0.048$ Breslow: $p=0.201$		
FS와 FI 사이	Log-rank: $p=0.403$ Breslow: $p=0.459$		
FI와 D 사이	Log-rank: $p=0.013$ Breslow: $p=0.081$		

[103] [표6]

Time (months)	0	12	24	36	48	60	72	84	96
FS	44	33(3)	18(5)	12(2)	8(2)	5(1)	0(5)	-	-
FI	18	10(6)	5(3)	5(0)	4(0)	2(1)	1(1)	1(0)	0(1)
D	21	15(2)	6(0)	0(3)	-	-	-	-	-

[104] 도 4 및 표 7 내지 표 8에 따르면 OS의 평균값은 FS, FI, D 그룹에서 각각 56.6, 81.1, 49.6 개월이었다. 표 7에 따르면, 세 그룹의 OS에 대한 Kaplan-Meier 곡선은 큰 차이를 보이지 않았지만, FS 군과 D 군 간에는 유의한 차이를 보였고 ($p = 0.046$), FS 군과 FI 군 간에는 유의한 한계 차이(marginal difference)를 보였다 ($p = 0.074$).

[105] [표7]

	FS	FI	D
Events, n(%)	7(15.9%)	6(33.3%)	8(38.1%)
Mean (95% CI)	56.6 (50.3-62.8)	81.1 (51.2-110.9)	49.6(36.3-62.9)
FS와 D 사이	Log-rank: $p=0.046$ Breslow: $p=0.205$		
FS와 FI 사이	Log-rank: $p=0.118$ Breslow: $p=0.074$		
FI와 D 사이	Log-rank: $p=0.773$ Breslow: $p=0.574$		

[106] [표8]

Number at risk (number censored)													
Time (months)	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
FS	44	39 (3)	25 (12)	19 (5)	13 (4)	8 (5)	0 (8)	-	-	-	-	-	-
FI	18	11 (3)	8 (3)	7 (0)	5 (1)	4 (1)	2 (2)	2 (0)	1 (1)	1 (0)	1 (0)	0 (1)	-
D	21	18 (2)	14 (2)	8 (5)	4 (1)	2 (1)	1 (1)	0 (1)	-	-	-	-	-

[107] 질병 진행 위험과 암 관련 사망을 평가한 결과, D 그룹은 FS 및 FI 그룹보다 질병 진행 위험이 더 높았으며 FI 및 D 그룹은 FS 그룹보다 암 관련 사망 위험이 더 높은 것으로 나타났다. 표 9는 PFS 및 OS에 영향을 미치는 요인을 나타낸다. 1차 종양감축술, 육안상 잔존 종양 없음, 및 D 유형은 PFS에 영향을 미쳤다.

(조정된 HRs, 0.44, 0.52 및 2.06; 95% CIs, 0.23-0.85, 0.25-1.08 및 1.01-4.20). 또한 3(III)기 질환, 육안상 잔류 종양 없음, FI 및 D 유형은 OS에 영향을 미쳤다. (조정된 HRs, 0.25, 0.24, 4.59 및 3.34; 95 % CIs, 0.08-0.81, 0.08-0.70, 1.31-16.08 및 1.06-10.54)

[108] [표9]

	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	p-value	Adjusted HR (95% CI)	p-value
Progression-free survival				
Stage III disease	0.53 (0.30-0.95)	0.03	0.75 (0.39-1.43)	0.38
Primary debulking surgery	0.43 (0.23-0.78)	0.01	0.44 (0.23-0.85)	0.01
Serous type	0.64 (0.23-1.811)	0.40	1.00 (0.34-2.93)	0.99
Age ≤57 years	0.83 (0.47-1.48)	0.54	0.89 (0.49-1.64)	0.71
No gross residual tumor	0.34 (0.18-0.65)	<0.001	0.52 (0.25-1.08)	0.08
Surgery on the rectosigmoid colon				
FI type	0.67 (0.28-1.63)	0.38	0.89 (0.34-2.36)	0.82
D type	1.96 (1.02-3.76)	0.04	2.06 (1.01-4.20)	0.04
Overall survival				
Stage III disease	0.31 (0.12-0.80)	0.02	0.25 (0.08-0.81)	0.02
Primary debulking surgery	0.52 (0.21-1.28)	0.16	0.65 (0.22-1.89)	0.43
Serous type	0.53 (0.18-1.59)	0.26	0.29 (0.08-1.04)	0.06
Age ≤57 years	0.59	0.23	0.47	0.12

	(0.25-1.41)		(0.18-1.23)	
No gross residual tumor	0.18 (0.08-0.44)	<0.001	0.24 (0.08-0.70)	0.01
Surgery on the rectosigmoid colon				
FI type	2.32 (0.78-6.92)	0.13	4.59 (1.31-16.08)	0.02
D type	2.65 (0.96-7.33)	0.06	3.34 (1.06-10.54)	0.04
HR, hazard ratio; CI, confidence interval.				

[109] 2-5. 재발 패턴(Recurrence Pattern) 재발 환자 48명 (57.8 %) 중 26 명 (59.1 %), 6 명 (33.3 %), 16 명 (76.2 %)이 FS, FI, D 군에 포함되었다. 표 10에 따르면, 세 군 간 재발 패턴의 차이가 없었고 직장구불결장의 종양 절제 부위에서의 질병 재발은 관찰되지 않았다.

[110] [표10]

Recurrent sites	FS group (n=26, %)	FI group (n=6, %)	D group (n=16, %)	P value
Tumor resection site of the rectosigmoid colon (n, %)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.088
Pelvis other than the rectosigmoid colon (n, %)	2 (7.7)	1 (16.7)	1 (6.3)	
Intra-abdominal above the pelvis (n, %)	7 (26.9)	4 (66.7)	10 (62.5)	
Distant metastasis (n, %)	17 (65.4)	1 (16.7)	5 (31.3)	

[111] (3) 소결직장구불결장에 위치한 종양의 절제 유형에 기초한 3가지 임상 표현형의 주요 결과를 표 11에 요약하였다. 연구 결과를 종합하면, 3가지 임상 표현형은 수술 범위, 종양 침윤, 수술 결과, 및 진행성 난소암의 예후와 관련이 있다.

[112] [표11]

Characteristics	FS group	FI group	D group
Clinical phenotypes	Less invasive but more extensive	More invasive but less extensive	More invasive and more extensive
Surgical extent			
Bowels	+	++	++
Others	++	+	++
Tumor Infiltration			
Bowels	+	++	++
Others	++	+	++
Operative Outcomes			
Operation time	+	+ or ++	++
Estimated blood loss	+	+	++
Transfusion	+	+ or ++	++
Hospitalization	+	+ or ++	++
Surgical complexity	+	++	+++
Risk of disease progression	Lower	Lower	Higher
Risk of cancer related death	Lower	Higher	Higher

[113] 실시예 2: 임상 표현형과 관련된 바이오마커 선별

[114] (1) DEG 분석에 의한 바이오마커 선별 및 클러스터 분류

[115] 상기 실시예 1의 FS, FI, 및 D 그룹에서 이들의 난소암 종괴를 시료로 Total RNA-sequencing을 진행하고 mRNA에 대한 DEG(differentially expressed genes, 차별발현 유전자) 분석을 시행하였다.

[116] DEG 분석의 비교군은 1) FS / FI 및 D; 2) FS 및 FI / D; 3) FI / FS 및 D 으로 설정하였다. (이하에서, 상기 FS는 VSS를 실시한 그룹으로 VSS 그룹으로 지칭할 수 있고, FI는 LAR를 실시한 그룹으로 LAR1으로 지칭할 수 있고, D는 LAR를 실시한 그룹으로 LAR2로 지칭할 수 있다.)

[117] 이 중에서 각 항목에서 $p < 0.001$ 의 유의성을 가지는 유전자를 1차적으로 선별하였다. 그리고 선별된 유전자를 RPKM에 의한 차등발현 유전자 발현량을

time series(세 개 이상 비교군의 차이를 동시에 비교)로 분석하여 발현양상에 따라 3개의 클러스터로 분류하였다. 구체적으로, FS 그룹 환자의 난소암 조직에서 발현이 높고 FI 및 D 그룹에서는 발현량이 낮은 유전자들을 클러스터 1, D 그룹 환자의 난소암 조직에서 발현이 높고 FS 및 FI에서는 발현량이 낮은 유전자를 클러스터 2, FI 그룹 및 D 그룹 환자의 난소암 조직에서 발현이 높고 FI에서는 발현량이 낮은 유전자를 클러스터 3으로 분류하였다.

[118] 표 12는 선정된 바이오마커 후보를 나타낸 것이다.

[119] [표12]

cluster	gene	Seq ID	Gene bank
1	RPL36	1	NM_015414.4
	ANKRD1	2	NM_014391.3
	ADAMTS4	3	NM_005099.6
	IGFBP6	4	NM_002178.3
	ATOH8	5	NM_032827.7
	RPS28	6	NM_001031.5
2	REG1A	7	NM_002909.5
	AMY1A	8	NM_001008221.1
	RELN	9	NM_005045.4
	DPEP3	10	NM_001129758.2
3	BRCA2	11	NM_000059.4
	SIDT1	12	NM_001308350.2

[120] (2) qRT-PCR (quantative reverse transcription real-time PCR)에 의한 발현량 검증동결된 난소암 조직을 각각 0.05g씩 잘라 Trizol 500 μ l에 넣어 분쇄하였다. 이후 Trizol 500 μ l 및 chloroform 200 μ l를 추가하고 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액에 isopropanol 500 μ l를 혼합하고 원심분리하여 RNA가 포함된 pellet을 분리한 후 RNase free water로 재현탁하였다. AccuPower premix를 이용하여 total RNA 1 μ g을 cDNA로 합성하였다. 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma-Aldrich) 및 StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, CA)으로 측정하였다. 타겟 유전자의 발현은 CT값으로 계산하였으며, GAPDH 발현을 기준으로 표준화하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C로 3분 진행한 후, 95 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초 조건으로 40회 증폭하였다. 실험에 사용된 프라이머는 하기 표 13에 개시되어 있다.

[121] [표 13]

	qRT primer_F	qRT primer_R	qRT_size	Gene bank
RPL36	CGCCATGGAGTTAC TGAAGG	TCTTGGCAGCAGCT TTCC	143	NM_015414.4
ANKRD1	AACGCCAAAGACA GAGAAGG	GTGTAGCACCAGA TCCATCG	147	NM_014391.3
ADAMTS4	CTGGGTATGGCTGA TGTGG	TCATGAGCAGCAG TGAAGG	98	NM_005099.6
IGFBP6	GGAATCCAGGCAC CTCTACC	CCAGATGTCTACG GCATGG	87	NM_002178.3
ATOX1	GAGATCAAAGCCC TGCAGC	CATATGAGTAGCA CGGCACC	121	NM_032827.7
RPS28	TCTCTTCGGCCAGT GTTAGC	AACCCCCAGGTTC AGTAAGC	138	NM_001031.5
REG1A	ATGCCTATCGCTCC TACTGC	AATCAGTGAGGCC ACAAAGG	143	NM_002909.5
AMY1A	TCGTCTGTCTGGTC TTCTCG	ATTCTGAACCCTGC AACACC	108	NM_001008221.1
RELN	ATTCGCTGGAGACA AACAGG	AAATCCAGGGTCA CACTTGC	138	NM_005045.4
DPEP3	CACTGTGGCAGATC ACTTTG	CCAGTCCCGTCATA ATTTCC	84	NM_001129758.2
BRCA2	TCTTCATGGAGCAG AACTGG	GGCCGAGTACTGT TAGCAGA	99	NM_000059.4
SIRT1	CAAGGACATCTTTG CTGTGG	GGTGTCTGAATTGG AAGTTGG	142	NM_001308350.2

[122] 도 7에 따르면, 앞서 클러스터 1로 분류된 RPL36, IGFBP6, ANKRD1, ATOX1의 mRNA 발현량은 FI 및 D 그룹보다 FS 그룹에서 유의하게 높게 나타났으며, 이들은 DEG 분석에 의한 발현양상과 일치하였다. 다만, RPS28 및 ADAMTS4의 mRNA 발현량은 FS 그룹 뿐만 아니라 D그룹에서도 높았다. 도 8에 따르면, 클러스터 2에 속하는 DPEP3, AMY1A, RELN, REG1A의 mRNA 발현량은 FS 및 FI그룹보다 D그룹에서 유의하게 높았으며, 이는 DEG 분석에 의한 발현양상과 일치하였다.

- [123] 도 9에 따르면, 클러스터 3에 속하는 BRCA2 및 SIDT1의 mRNA 발현량은 FS 그룹보다 FI 및 D 그룹에서 유의하게 높았으며, 이는 DEG 분석 결과와 일치하였다.
- [124]
- [125] (3) 면역조직화학염색(immunohistochemistry)에 의한 발현량 검증
- [126] RNA sequencing으로 분석된 15명의 환자들 (FS 타입 5명, FI 타입 5명, D 타입 5명)을 대상으로 각 환자의 종양 조직 시료로부터 ADAMTS4, ANKRD1, AMY1A, ATOH8, BRCA2, DPEP3, IGFBP6, REG1A, RELN, RPL36, RPS28, SIDT1의 12개 유전자에 대해 면역조직화학염색 검사를 실시하였다.
- [127] 우선 각 환자들의 종양조직을 이용하여 파라핀 블록을 제작하였고, 5 um의 두께로 절제 후 탈파라핀화(deparaffinized)하고, xylene 및 alcohol을 이용하여 재수화(rehydrate)하였다. Endogenous peroxidase 활성도는 상온에서 15분간 methanol과 1% 과산화수소에 배양하여 차단하였고, 비특이적 결합부위는 상온에서 PBS (phosphate buffered saline)과 말의 혈청에 배양하여 차단하였다. 이후 가습 챔버 내 4°C에서 16시간 동안 1:50으로 희석한 anti-human monoclonal antibody와 배양을 하였고, 이후 5분동안 PBS로 세척 후 37°C에서 1시간동안 biotinylated secondary antibody와 배양하였다. 이후 상온에서 30분동안 Avidin-Biotin 혼합물과 배양 후 5분 동안 PBS로 세척하였다. 이후 항원 발현을 가시화하기 위해 3,3'-Diaminobenzidine 용액에 배양 후 각 조직 슬라이드는 xylene과 alcohol을 이용하여 탈수화하였고, 이후 영구적으로 장착하여 발현 정도를 평가하였다.
- [128] 발현 정도를 객관적으로 평가하기 위해 다음과 같이 점수화된 지수 1 (Index 1) 및 지수 2 (Index 2)를 계산하였으며 그 결과를 도 10 내지 21 에서 그래프로 비교하였다:
- [129] * Index 1 = 종양 염색 퍼센트 x 강도
- [130] * Index 2 = 종양 염색 그룹 x 강도
- [131] 여기서, 종양 염색 그룹은 0-24%일때 1점, 25-49%일때 2점, 50-74%일때 3점, 75-100%일때 4점이고, (염색) 강도는 약한 경우(weak) 1점, 중간일 경우(moderate) 2점, 강한 경우(strong) 3점이다.
- [132]
- [133] 도 10 내지 13 및 14 및 15 에 따르면, 앞서 클러스터 1로 분류된 RPL36, IGFBP6, ATOH8, 및 RPS28 은 FI 및 D 그룹보다 FS 그룹에서 발현 정도가 강했으며 이는 DEG 분석에 의한 발현양상과 일치하였다. 다만, ANKRD1 및 ADAMTS4 는 DEG 분석 결과와 달리, FS 그룹보다 D 그룹에서 오히려 발현량이 더 높았으며 이에 따라 이들의 경우 면역조직화학염색에서는 FS 그룹의 판별에 이용가능하지 않을 것으로 보인다.
- [134] 도 16 내지 도 19 에 따르면, 앞서 클러스터 2에 속하는 DPEP3, AMY1A, RELN 은 FS 및 FI 그룹보다 D 그룹에서 발현 정도가 강했으며 이는 DEG 분석에 의한

발현양상과 일치하였다. 다만, REG1A는 DEG 분석 결과와 달리, FS 그룹에서 오히려 발현량이 더 높았으며 이에 따라 이의 경우 면역조직화학염색에서는 D 그룹의 판별에 이용가능하지 않을 것으로 보인다.

- [135] 도 20 내지 도 21에 따르면, 앞서 클러스터 3에 속하는 BRCA2은 FS 그룹보다 FI 및 D 그룹에서 발현 정도가 강했으며 이는 DEG 분석 결과와 일치하였다. 다만, SIDT1은 DEG 분석 결과와 달리 FI가 아니라 FS 및 D 그룹에서 발현 정도가 강했으며 이에 따라 이의 경우 면역조직화학염색에서는 FI 그룹의 판별에 이용가능하지 않을 것으로 보인다.

[136]

- [137] 실험결과를 종합하면 상기 유전자의 발현양상을 확인하고 진행성 난소암 환자의 유전자 발현양상에 대한 참조값과 비교함으로써 전이된 종양의 표현형 또는 수술방법을 결정하거나, 진행성 난소암의 예후를 판단하는데 도움을 줄 수 있다.

- [138] 예를 들면 표현형이 확인되지 않은 진행성 난소암 환자로부터 생물학적 시료를 얻고, 시료부터 상기 표 12의 클러스터 1 내지 3에 속하는 유전자들의 발현양상을 측정한다. 측정 결과를 표현형이 확인된 진행성 난소암 환자들로부터 얻은 참조값과 비교하여 (1) 클러스터 1에 속하는 유전자들의 발현량이 높고 다른 클러스터에 속하는 유전자들의 발현량이 낮다면 FS형으로 결정할 수 있고, (2) 클러스터 2에 속하는 유전자들의 발현량이 높고 다른 유전자의 발현량이 낮다면 D형으로 결정할 수 있고, (3) 클러스터 3에 속하는 유전자들의 발현량이 높고 다른 유전자의 발현량이 낮다면 FI형으로 결정할 수 있다. 다만, 면역조직화학염색에 의한 검사를 실시할 경우에는 클러스터 1에서 ADAMTS4 및 ANKRD1 유전자를, 클러스터 2에서 REG1A를, 클러스터 3에서 SIDT1을 제외하여 발현 강도를 비교한다.

[139]

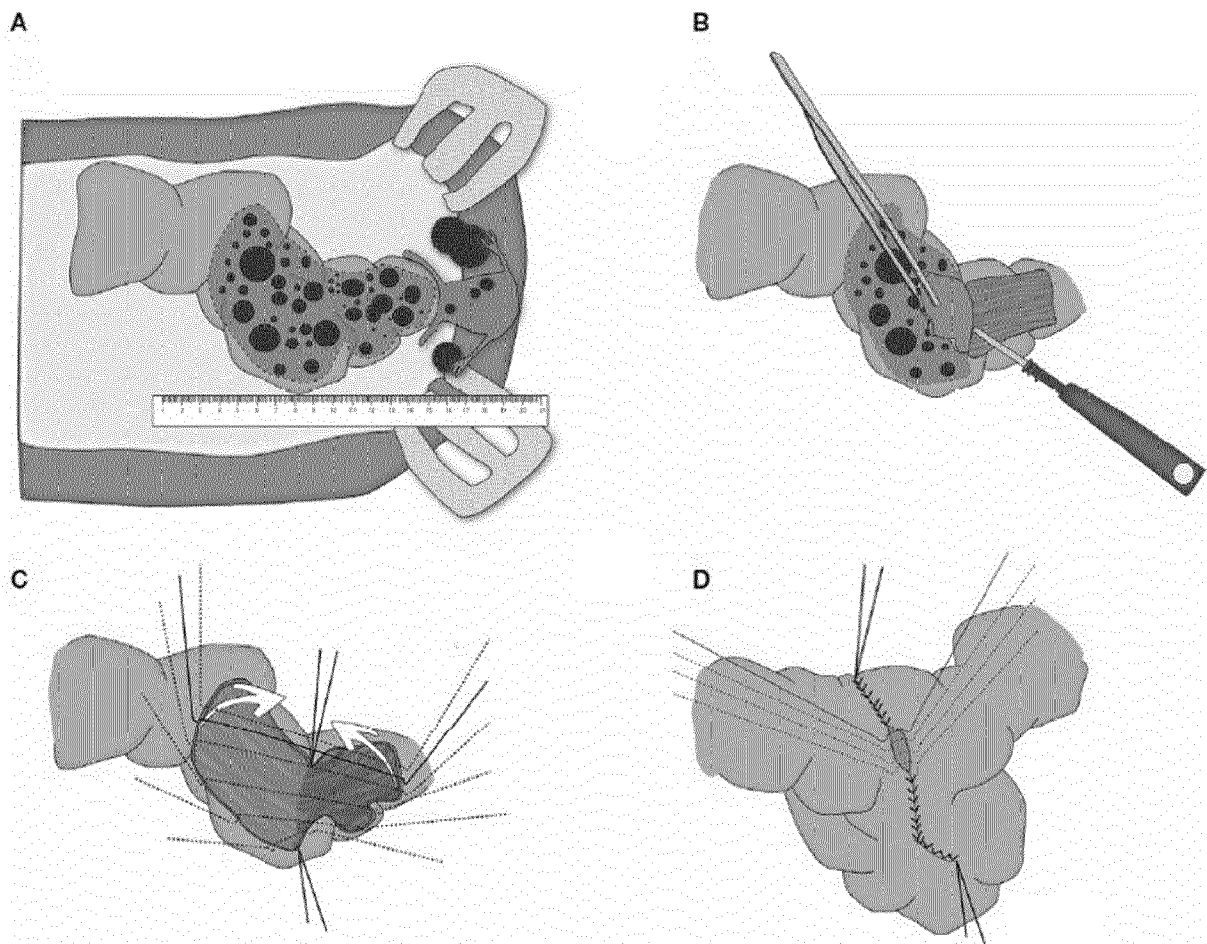
- [140] 진행성 난소암의 유전자 발현양상을 통해 FS, FI, 또는 D형인지를 결정하면, 이를 기초로 직장구불결장에 전이된 종양의 제거방법을 선택하거나, 진행성 난소암의 예후, 예를 들면 재발 및 사망 위험을 예측하는데 도움을 줄 수 있다.

청구범위

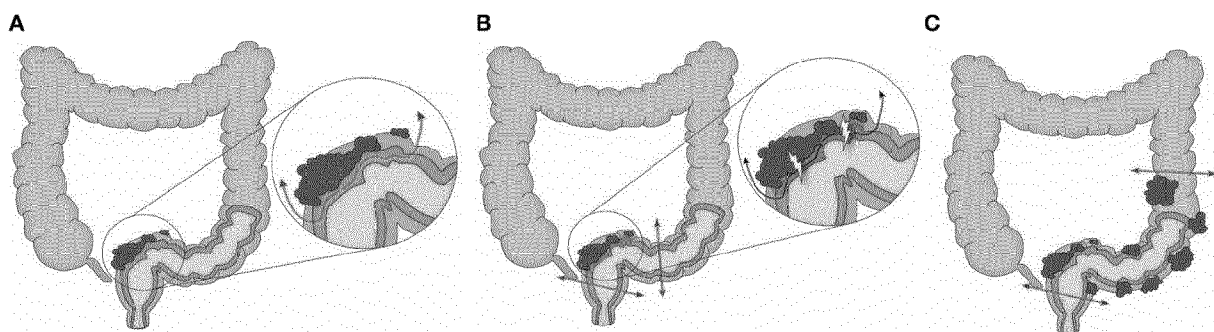
- [청구항 1] 직장구불결장에 종양이 있는 진행성 난소암 환자의 직장구불결장 종양 제거 방법 선택을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 종양이 있는 직장구불결장의 길이를 측정하는 단계; 점막층 및 점막하층에 종양 침투 여부를 확인하는 단계; 및 종양이 발생한 직장구불결장의 길이가 18cm 이하이고, 점막층 및 점막하층에 종양이 침투하지 않으면 보존수술을 선택하고, 그 외에는 절제수술을 선택하는 단계를 포함하는, 진행성 난소암 환자의 직장구불결장 종양 제거 방법 선택을 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 2] 직장구불결장에 종양이 있는 진행성 난소암 환자의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 종양이 발생한 직장구불결장의 길이를 측정하는 단계; 점막층 및 점막하층에 종양 침투 여부를 확인하는 단계; 및 종양이 발생한 직장구불결장의 길이가 18cm 이하이고 점막층 및 점막하층에 종양이 침투하지 않으면 국소 분리형, 종양이 발생한 직장구불결장의 길이가 18cm 이하이고 점막층 및 점막하층에 종양이 침투하면 국소 분리불가형, 종양이 발생한 직장구불결장의 길이가 18cm 이상이면 확산형으로 분류하는 종양의 표현형 결정 단계를 포함하는, 진행성 난소암 환자의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 종양의 표현형이 국소 분리형으로 분류되면 예후가 긍정적인 것으로 결정하는, 진행성 난소암 환자의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 4] 환자의 생물학적 시료로부터 RPL36, ANKRD1, IGFBP6, 및 ATOH8 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 각각 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 진행성 난소암의 예후 예측용 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, REG1A, AMY1A, RELN, 및 DPEP3 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 각각 검출할 수 있는 제제를 더 포함하는, 진행성 난소암의 예후 예측용 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, BRCA2 및 SIDT1 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 각각 검출할 수 있는 제제를 더 포함하는,

- 진행성 난소암의 예후 예측용 조성물.
- [청구항 7] 제4항에 있어서,
RPS28 및 ADAMTS4 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준을 각각 검출할 수 있는 제제를 더 포함하는,
진행성 난소암의 예후 예측용 조성물.
- [청구항 8] 제4항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 종양 또는 혈액인,
진행성 난소암의 예후 예측용 조성물.
- [청구항 9] 제4항의 조성물; 및
상기 측정된 발현수준과 비교하기 위한 진행성 난소암 환자의 참조값을 포함하는
진행성 난소암의 예후 예측용 키트.
- [청구항 10] 환자의 생물학적 시료를 준비하는 단계;
상기 시료로부터 RPL36, ANKRD1, IGFBP6, 및 ATOH8 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준 또는 발현패턴 데이터를 확인하는 단계; 및
상기 발현수준 또는 발현패턴을 예후가 알려진 진행성 난소암 환자의 참조값과 비교하는 단계를 포함하는,
진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 시료로부터 REG1A, AMY1A, RELN, 및 DPEP3 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준 또는 발현패턴 데이터를 확인하는 단계를 더 포함하는,
진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 시료로부터 BRCA2 및 SIDT1 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준 또는 발현패턴 데이터를 확인하는 단계를 더 포함하는,
진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 13] 제10항에 있어서,
상기 시료로부터 RPS28 및 ADAMTS4 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현수준 또는 발현패턴 데이터를 확인하는 단계를 더 포함하는,
진행성 난소암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

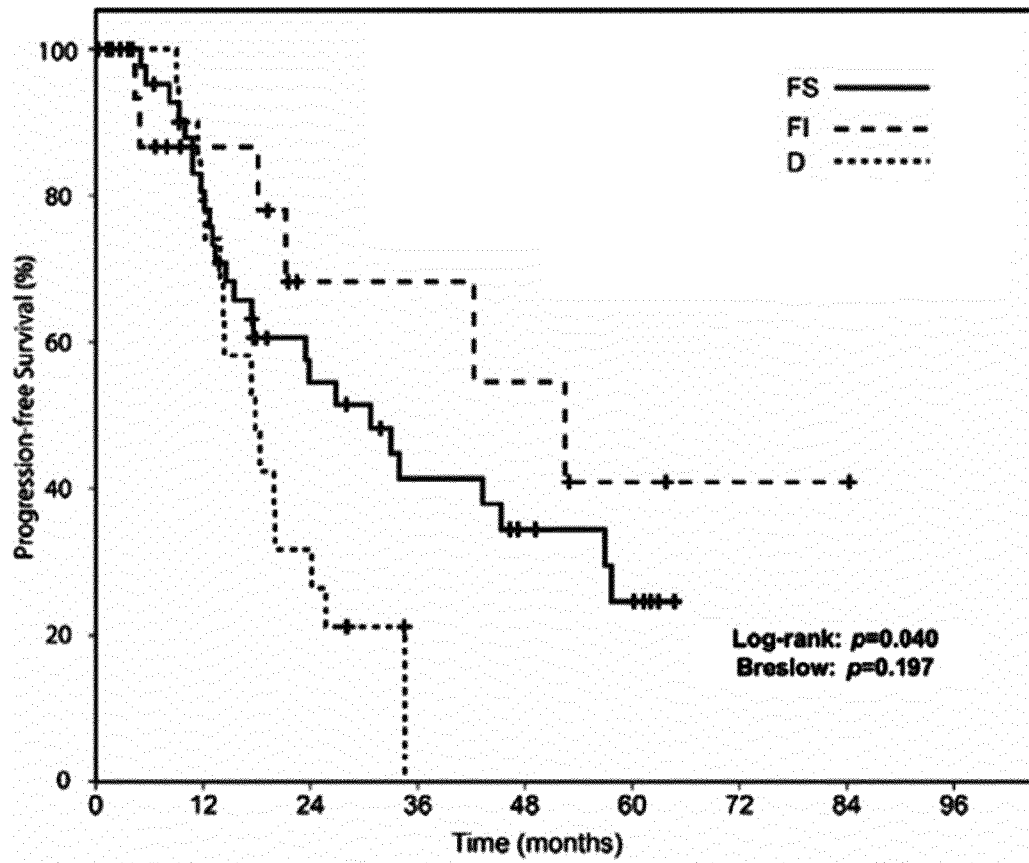
[도1]



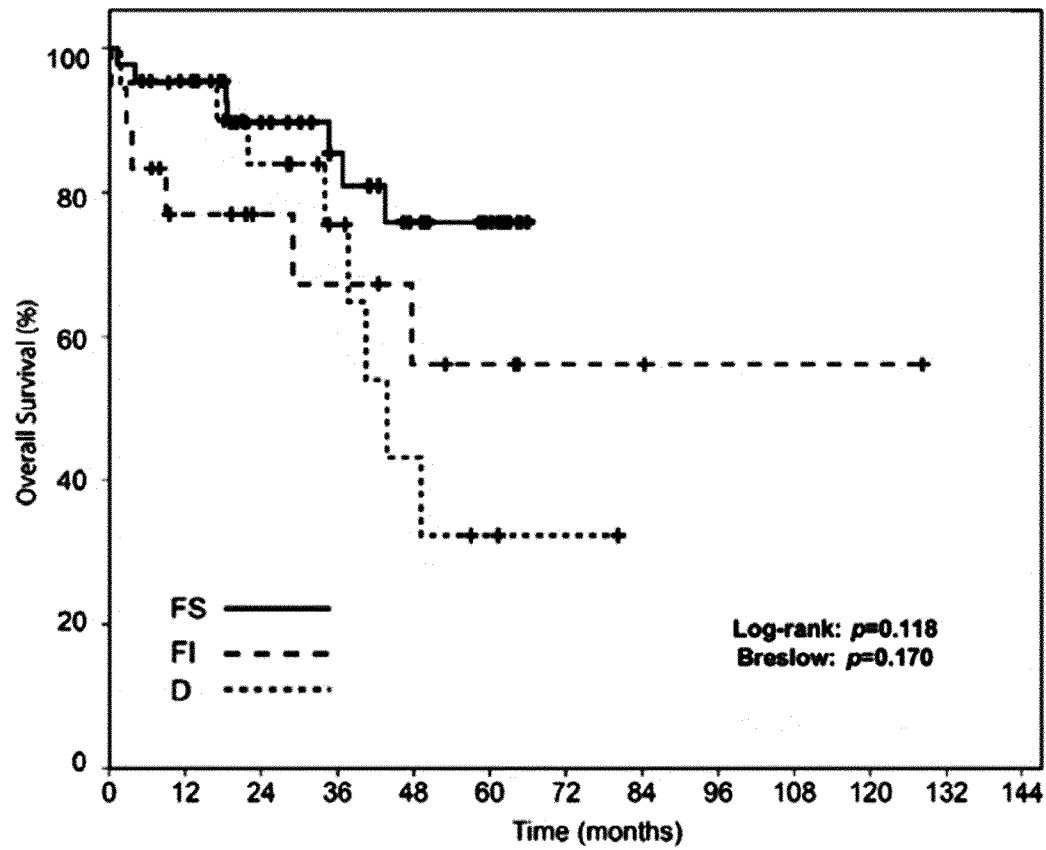
[도2]



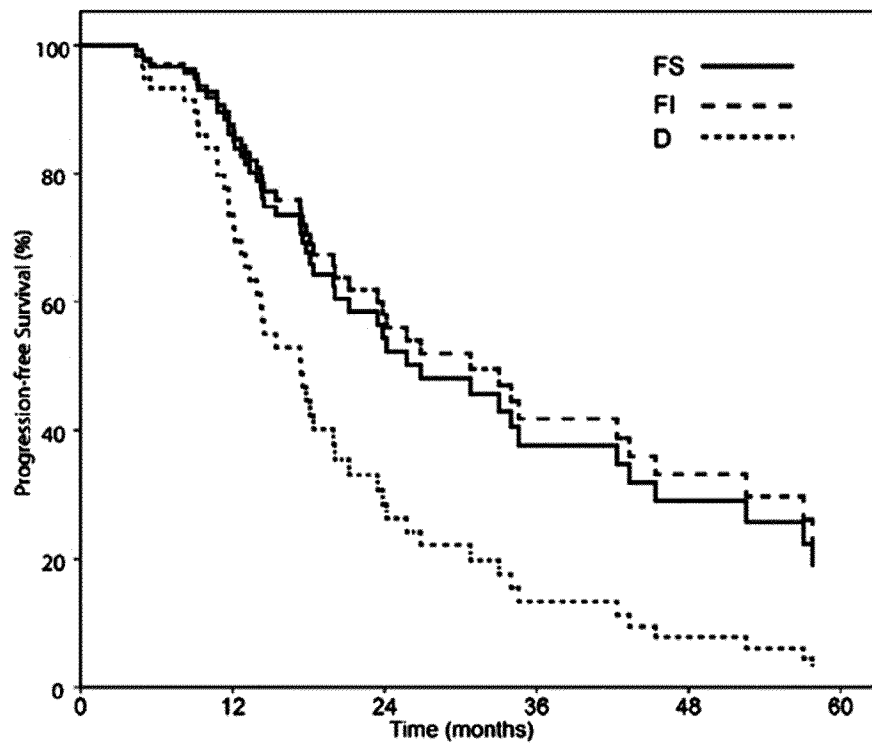
[도3]



[도4]

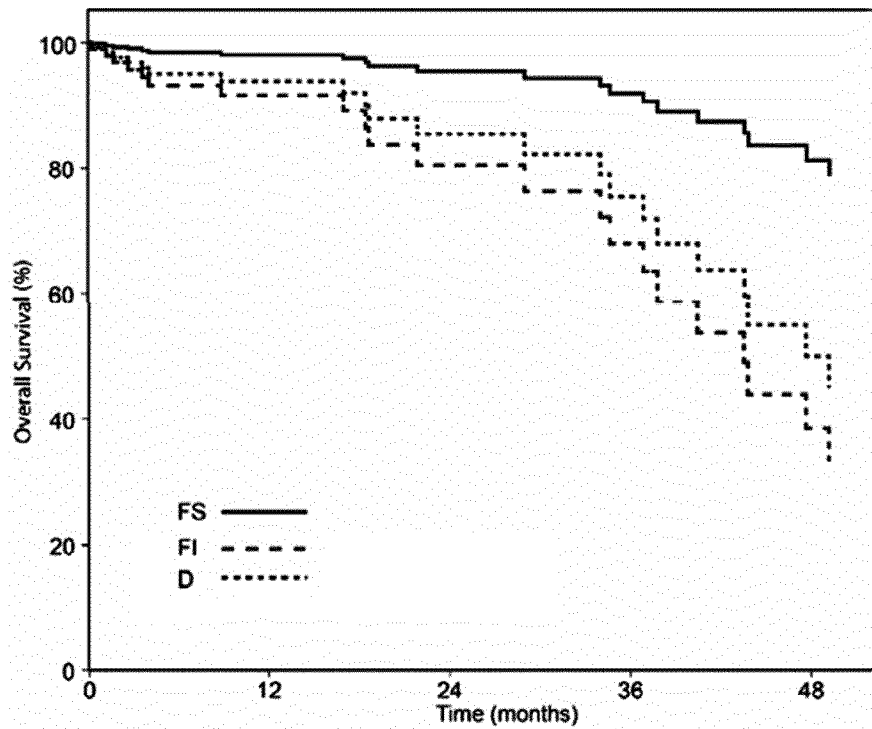


[도5]



	FS	FI	D
Adjusted HR	-	2.3	2.6
(95% CI)	-	(0.8-6.9)	(1.0-7.3)

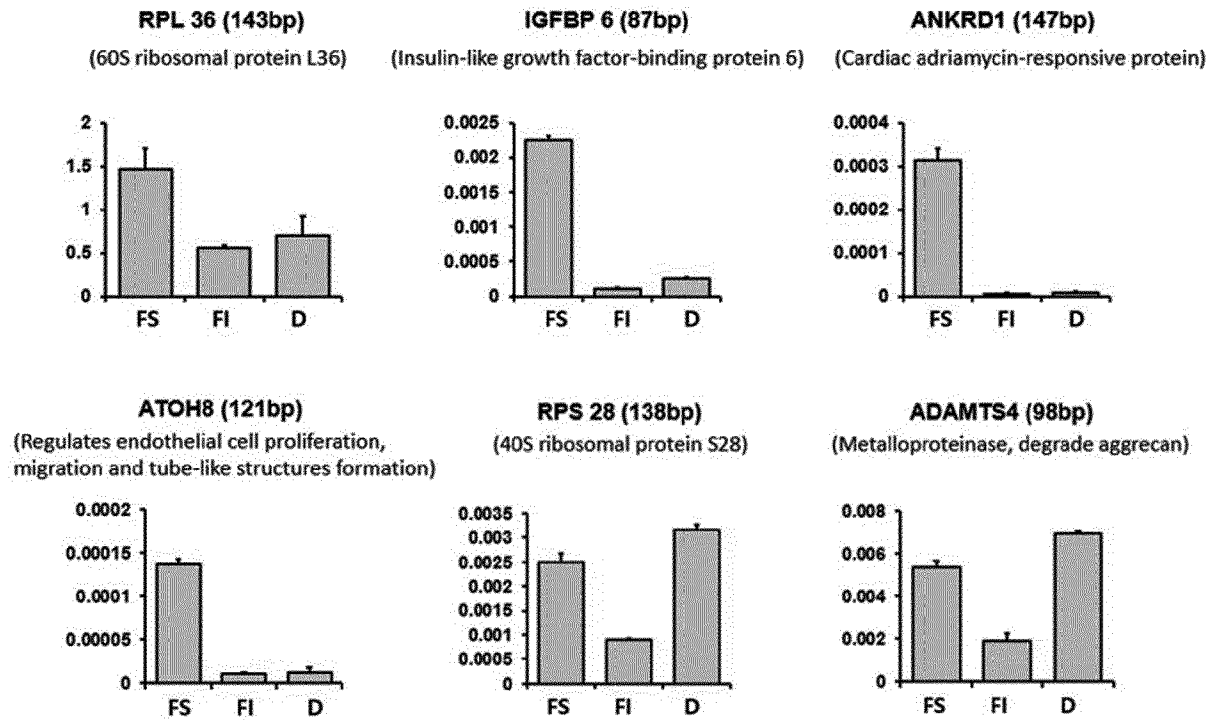
[도6]



	FS	FI	D
Adjusted HR	-	4.593	3.335
(95% CI)	-	(1.3-16.1)	(1.1-10.5)

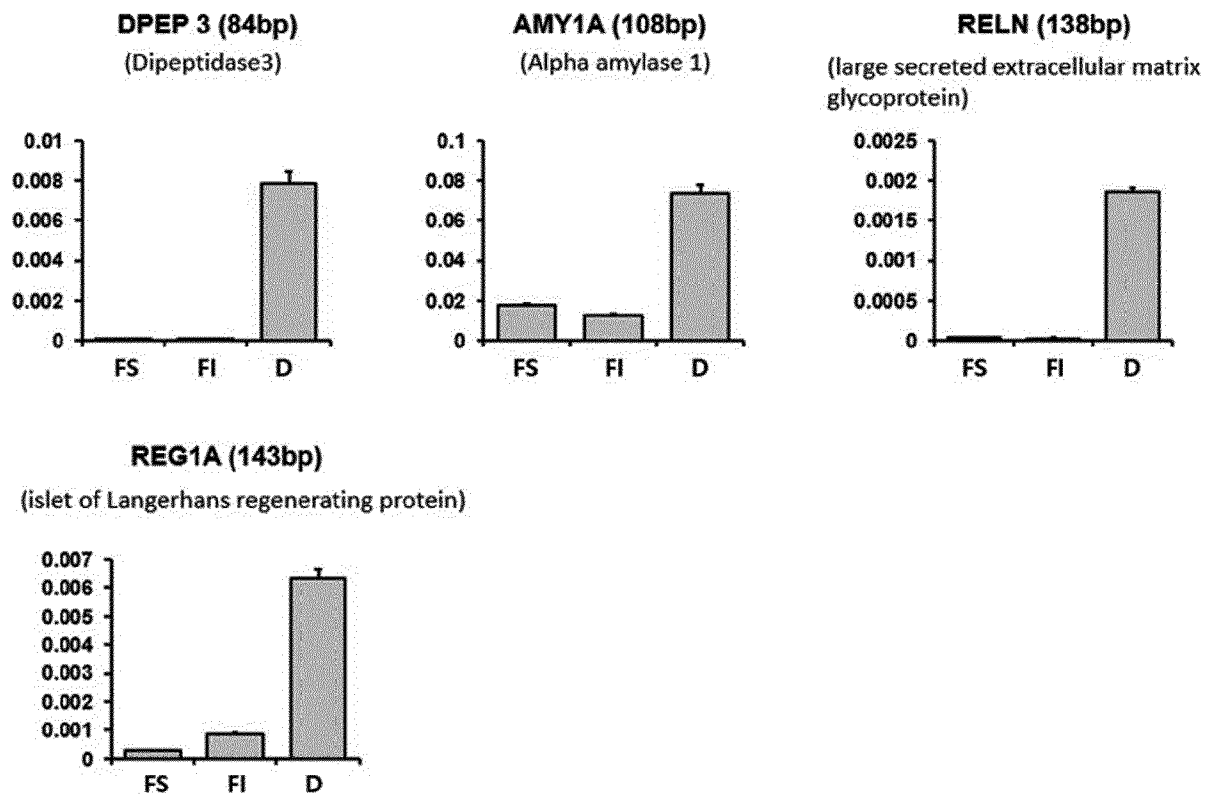
[도7]

<Cluster 1>



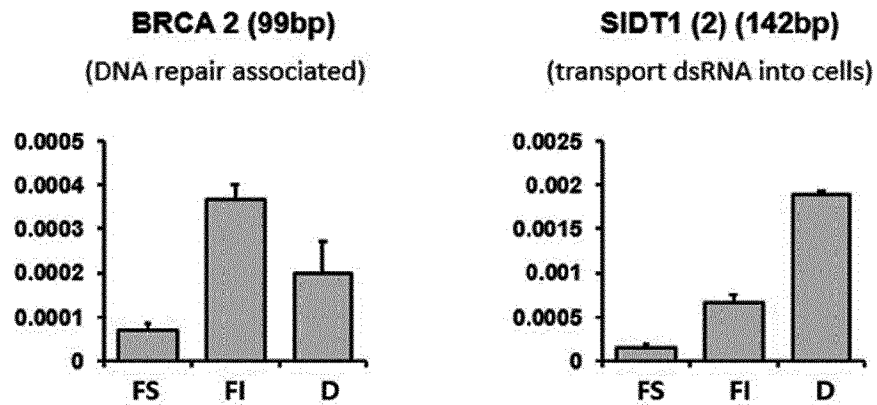
[도8]

<Cluster 2>



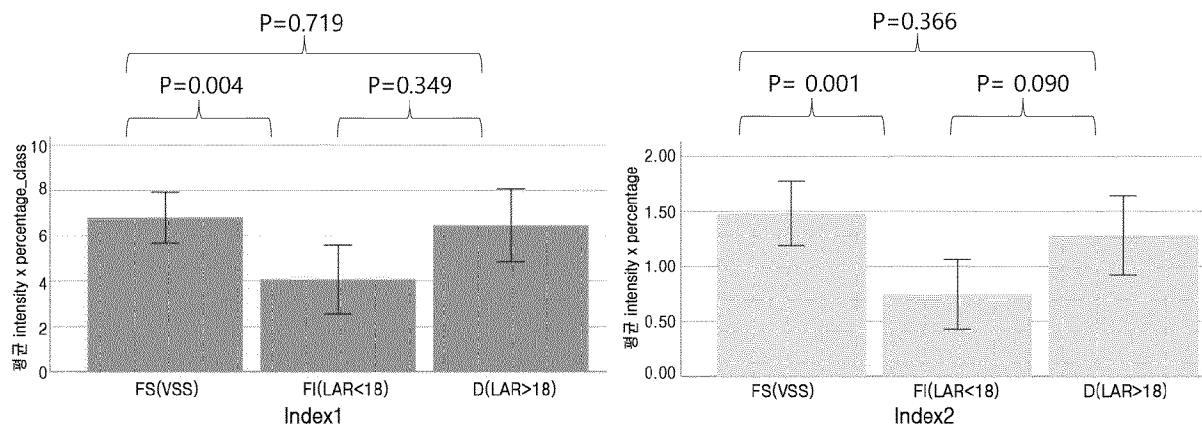
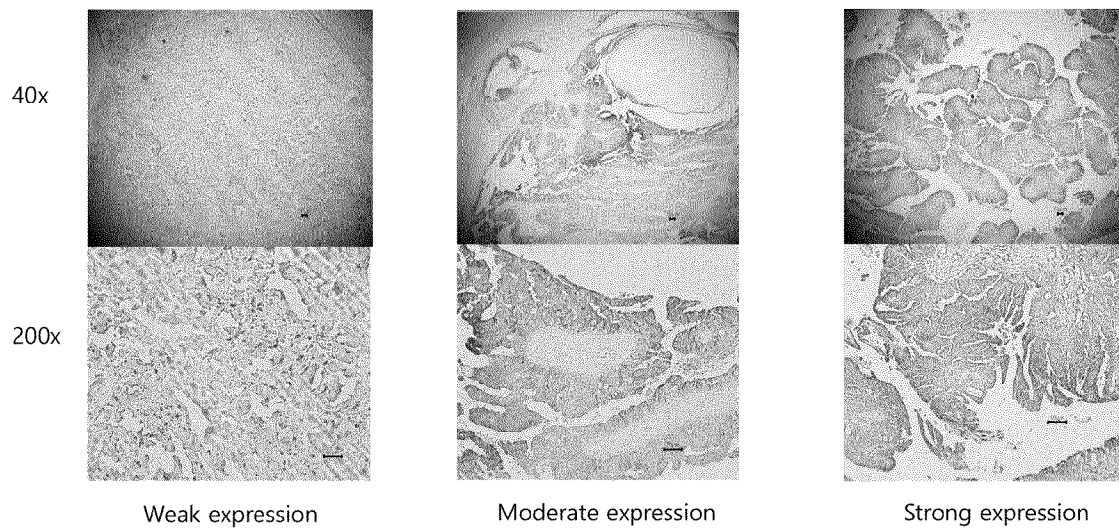
[도9]

<Cluster 3>



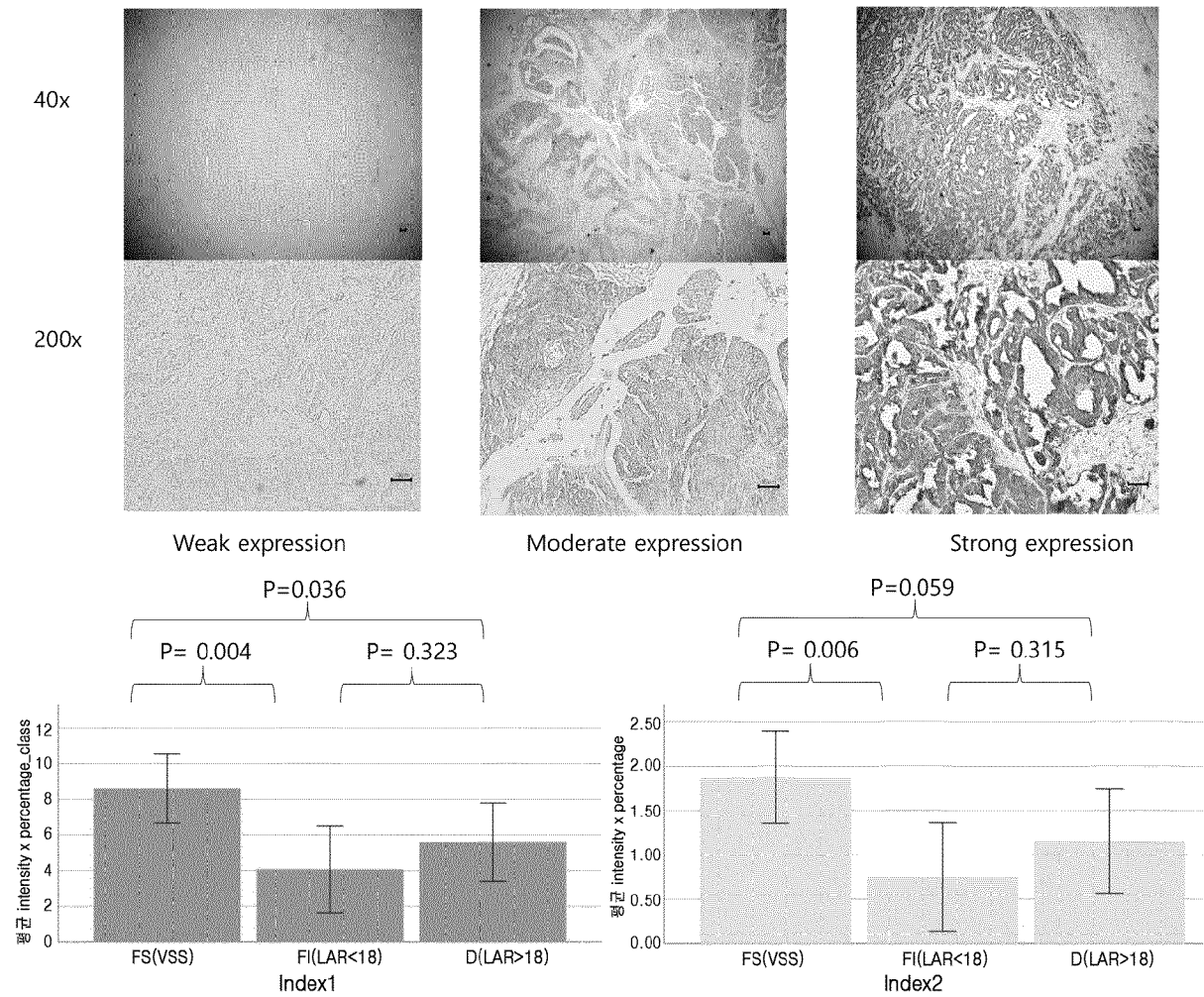
[도10]

RPL36



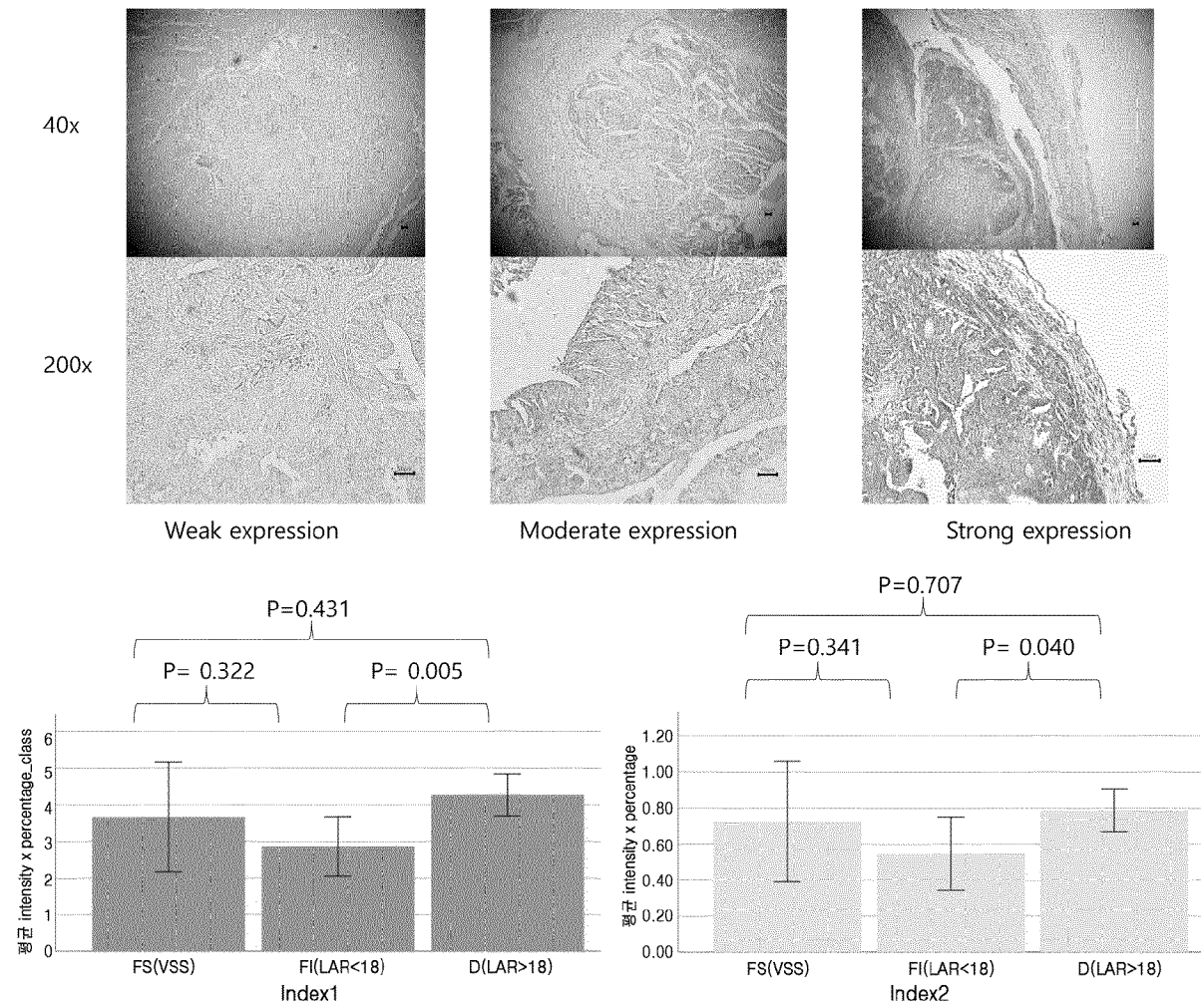
[도11]

IGFBP6



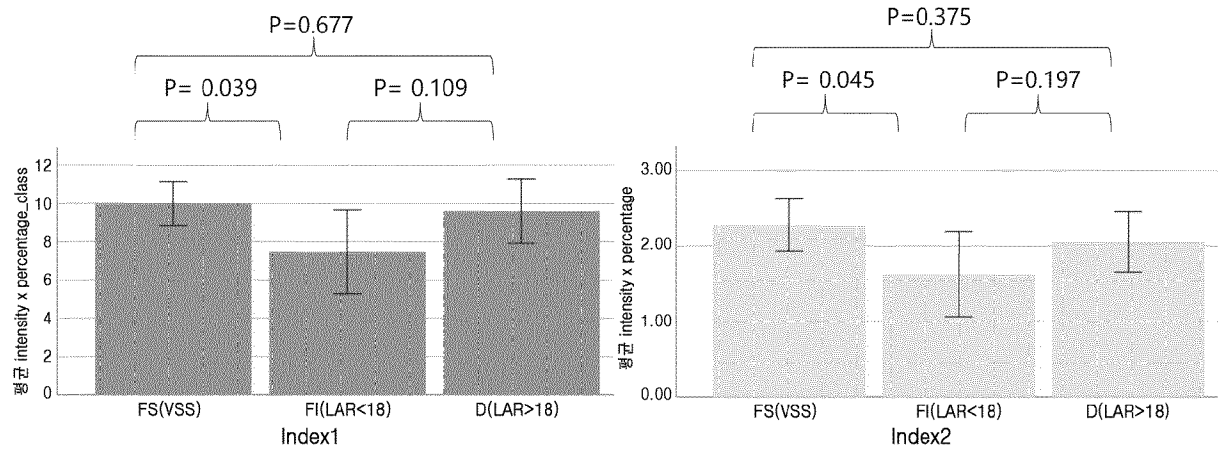
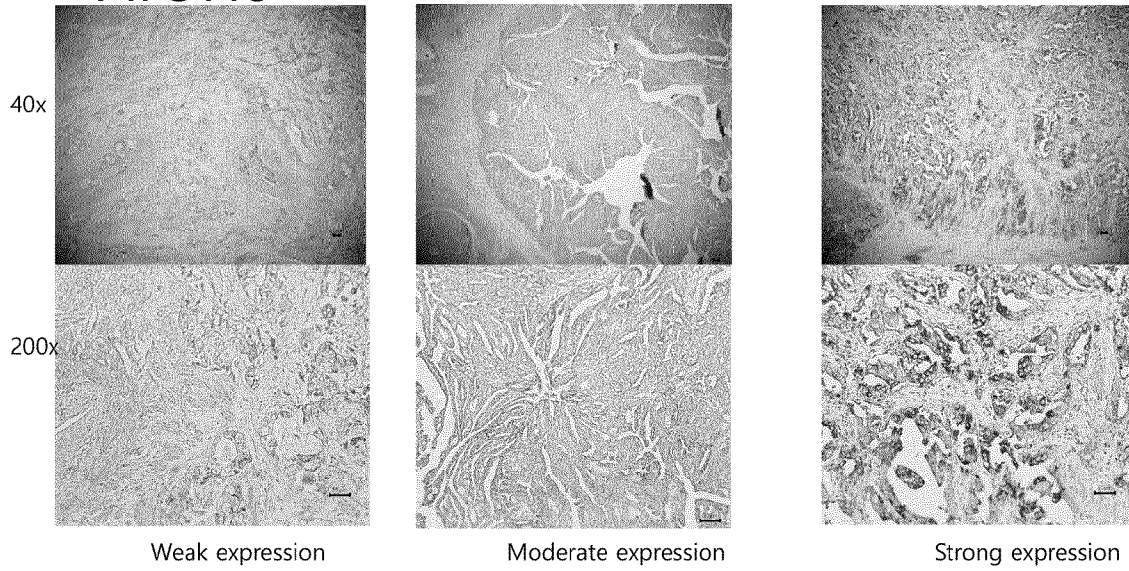
[도12]

ANKRD1



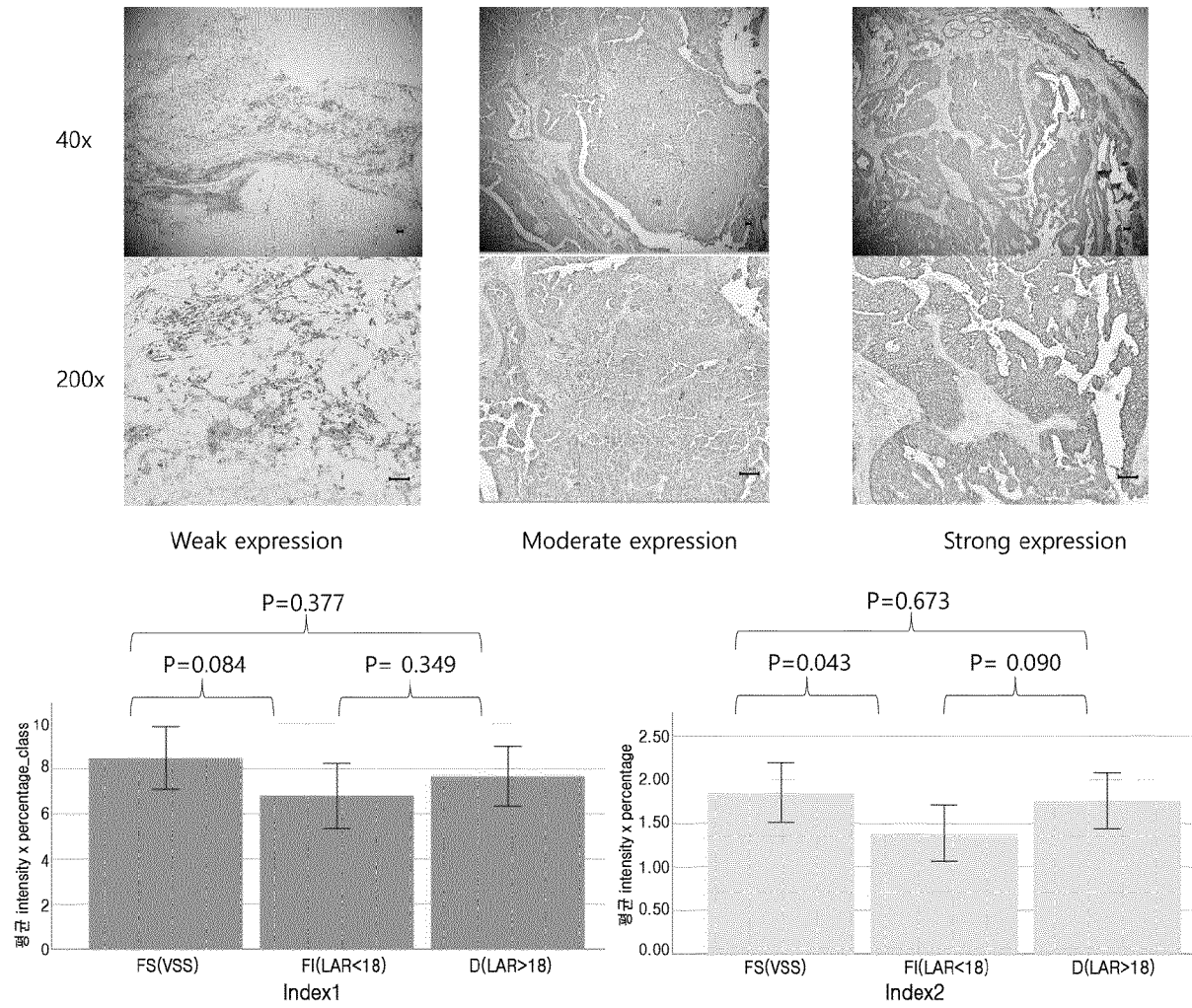
[도13]

ATOH8

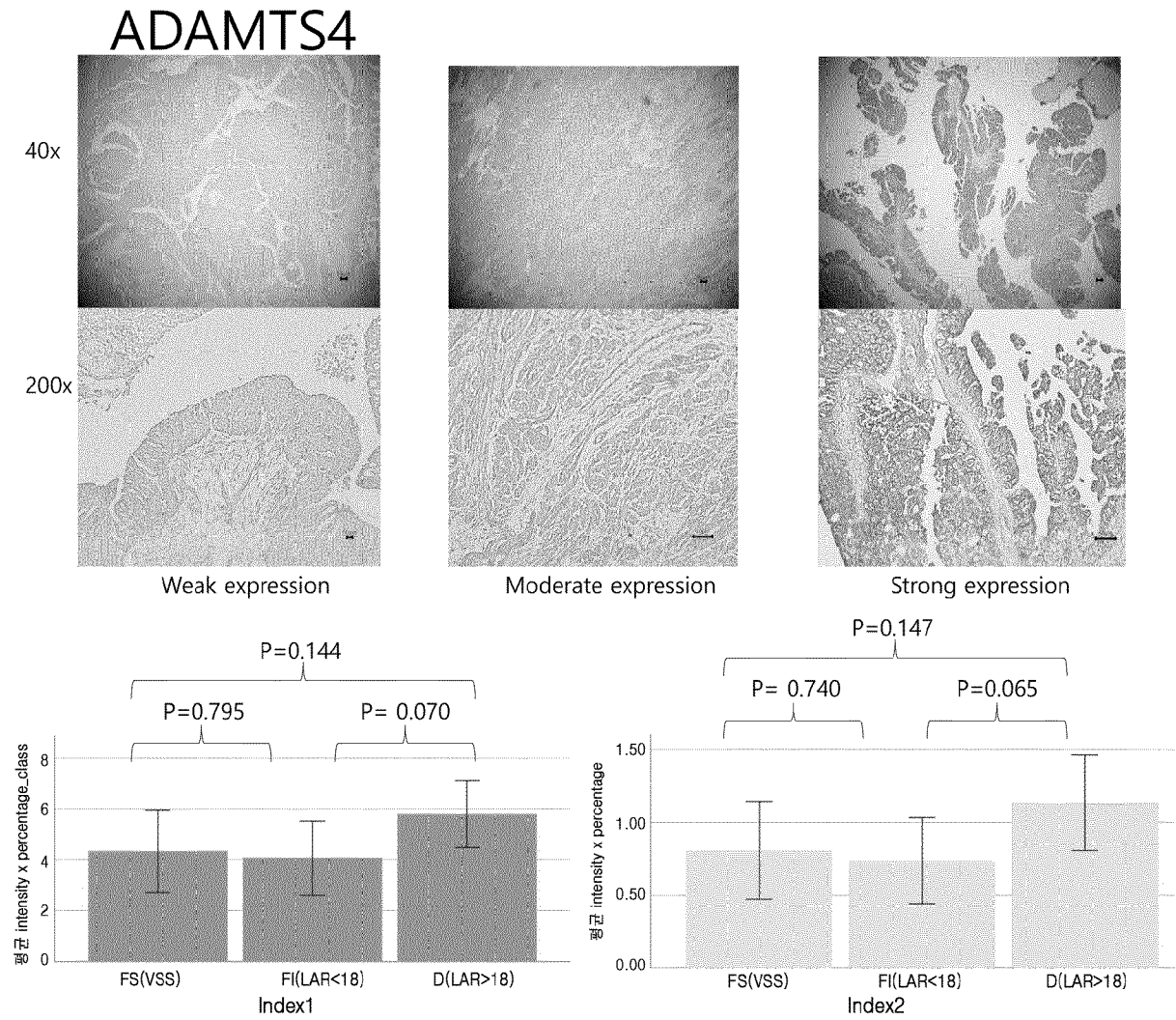


[도14]

RPS28

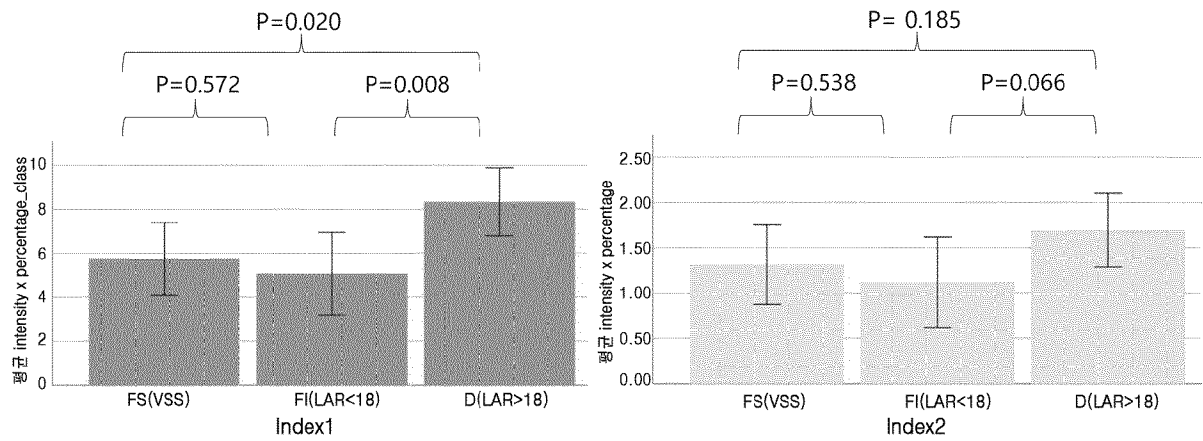
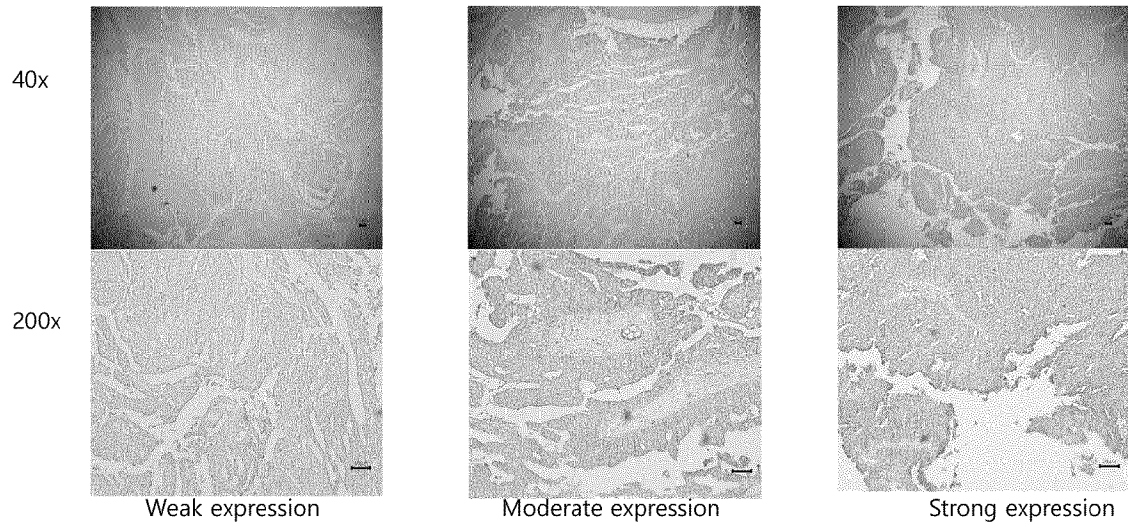


[도15]



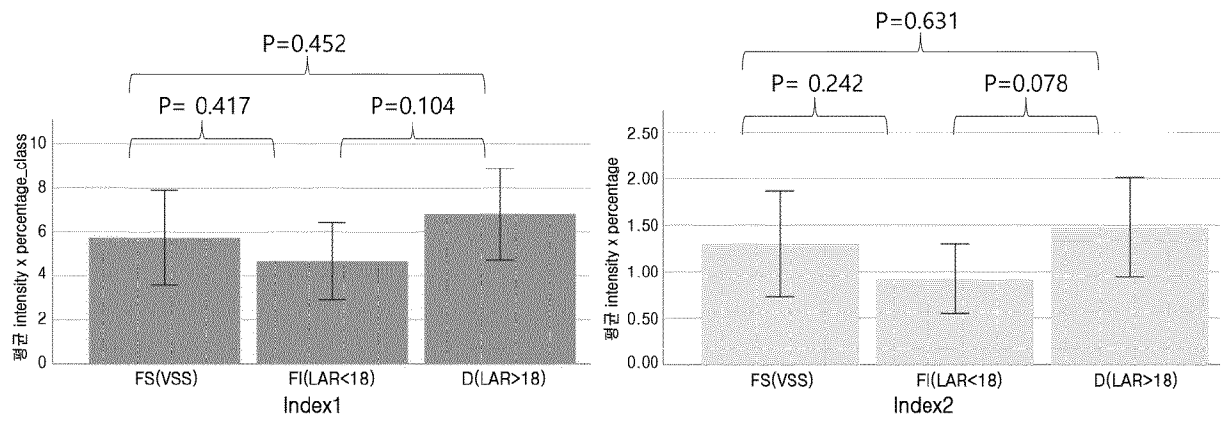
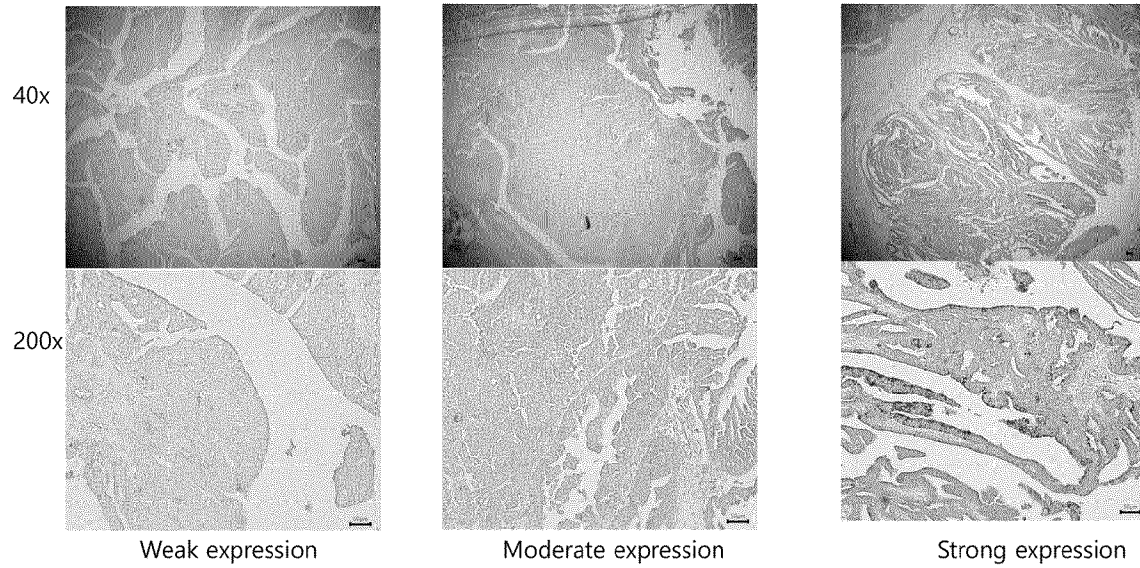
[도16]

DPEP3



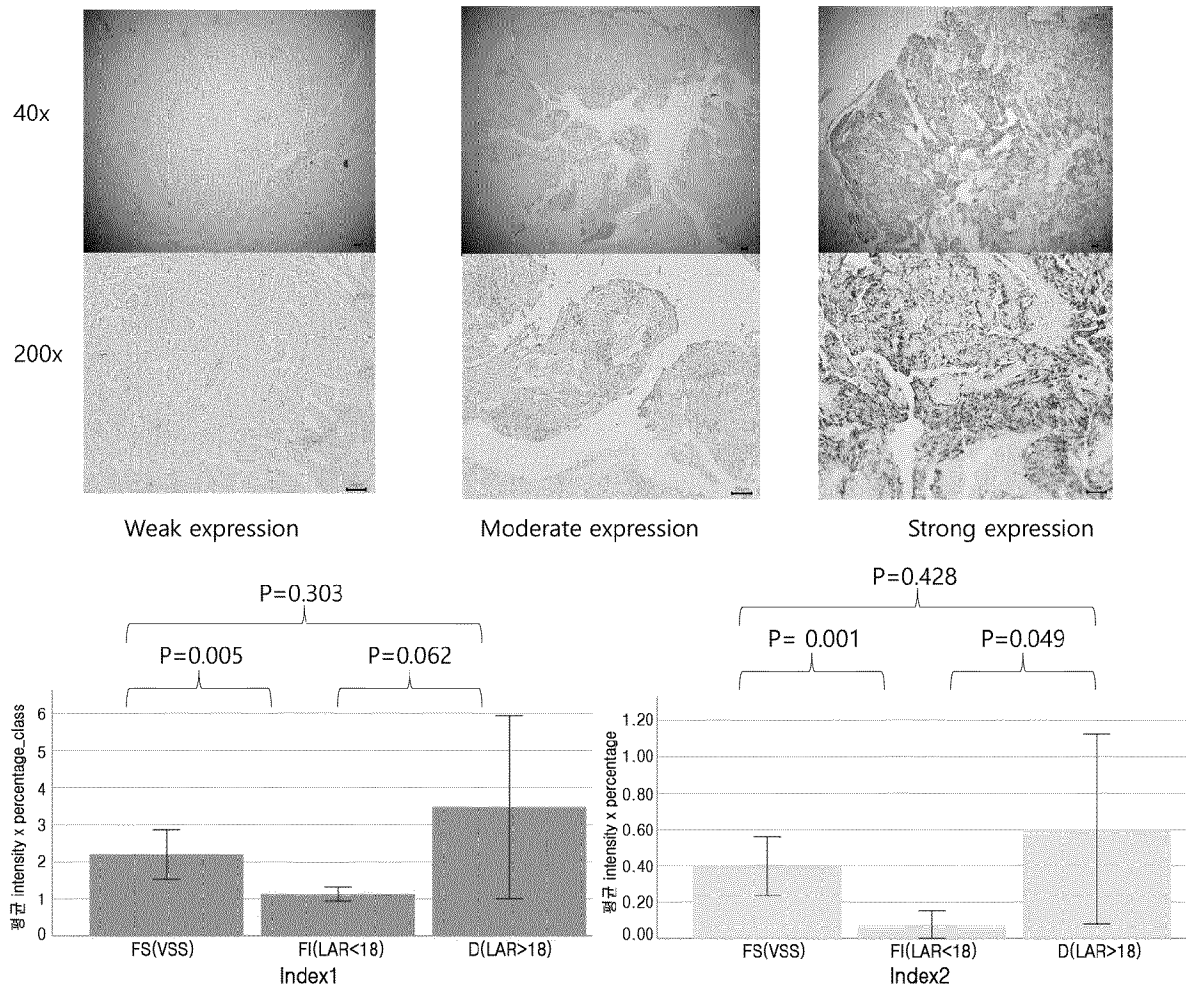
[도17]

AMY1A



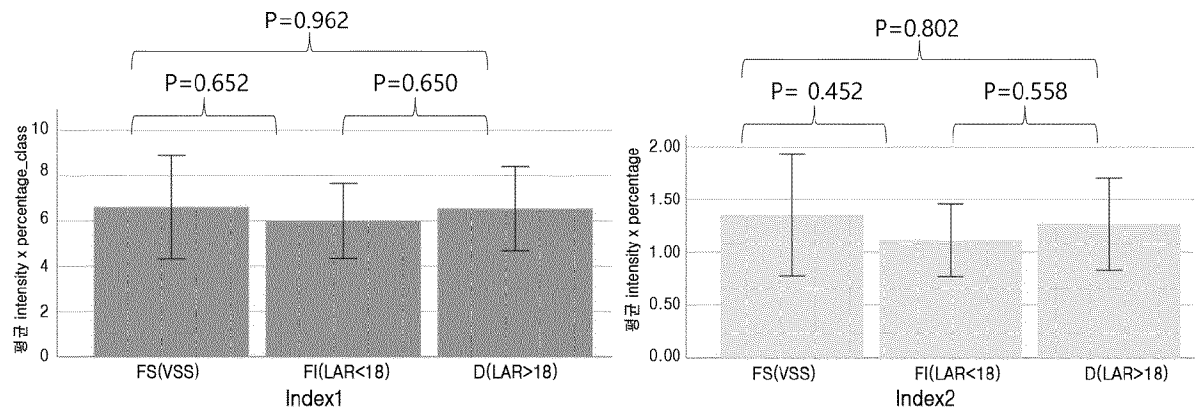
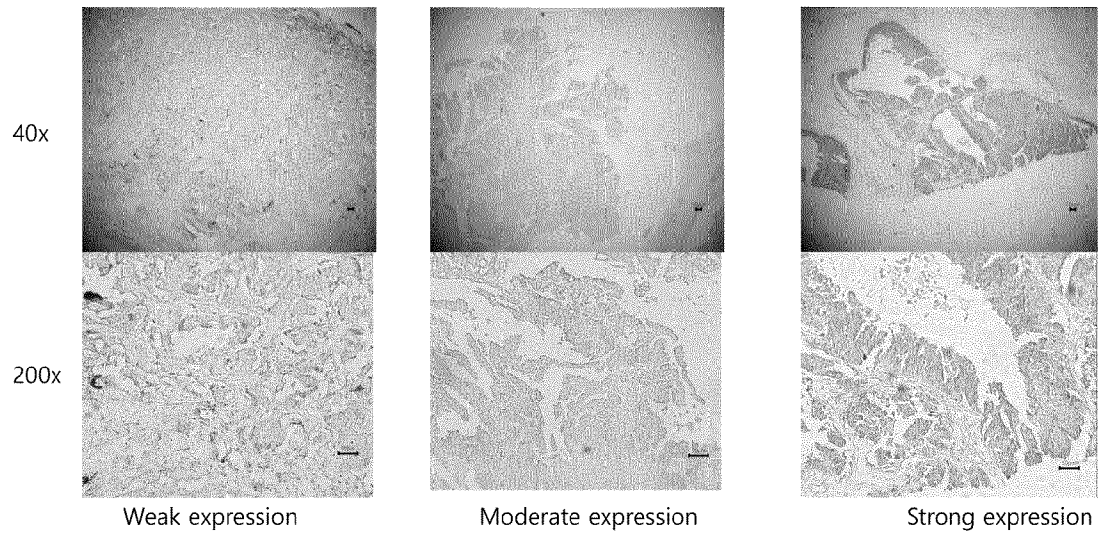
[도18]

RELN



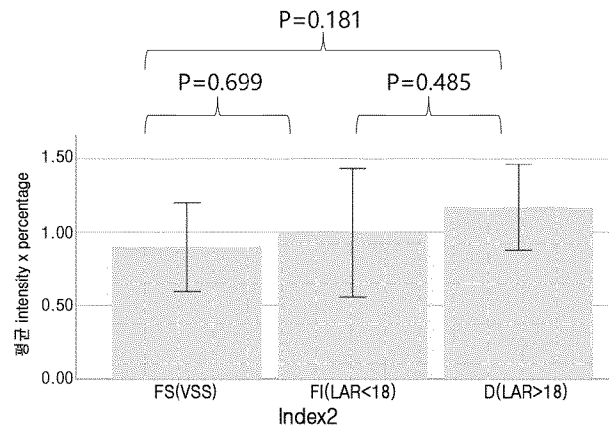
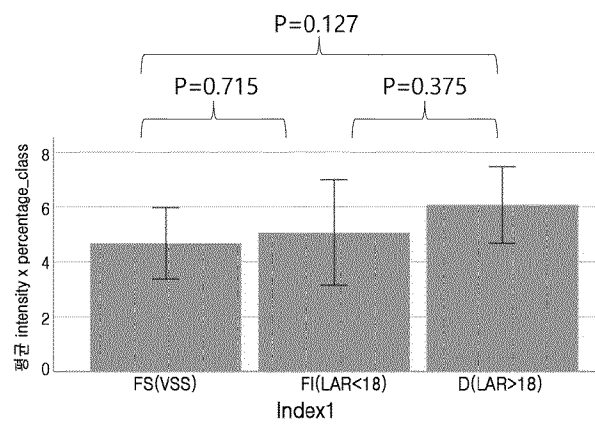
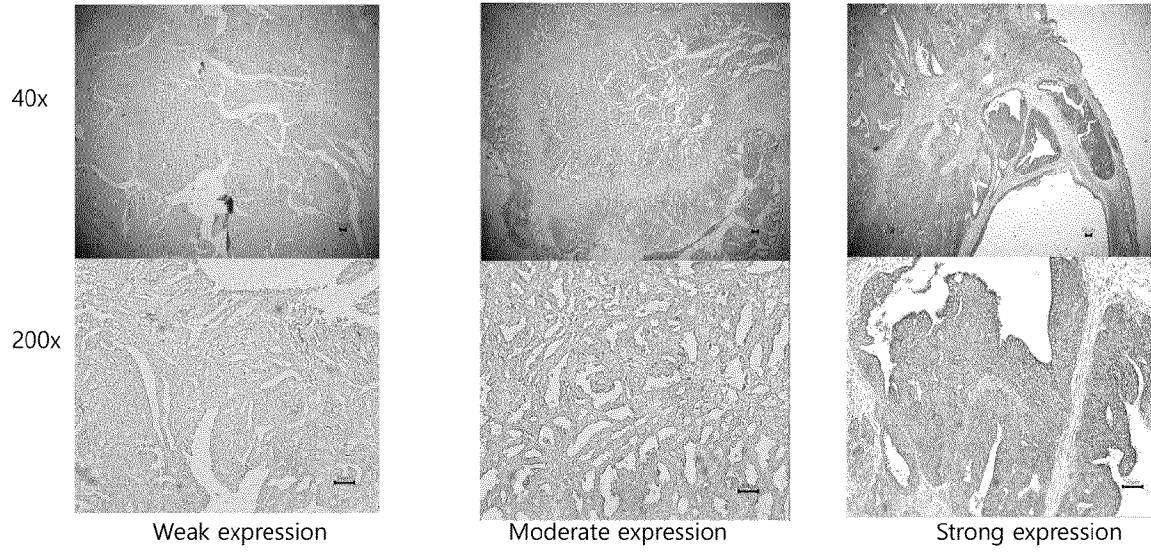
[도19]

REG1A



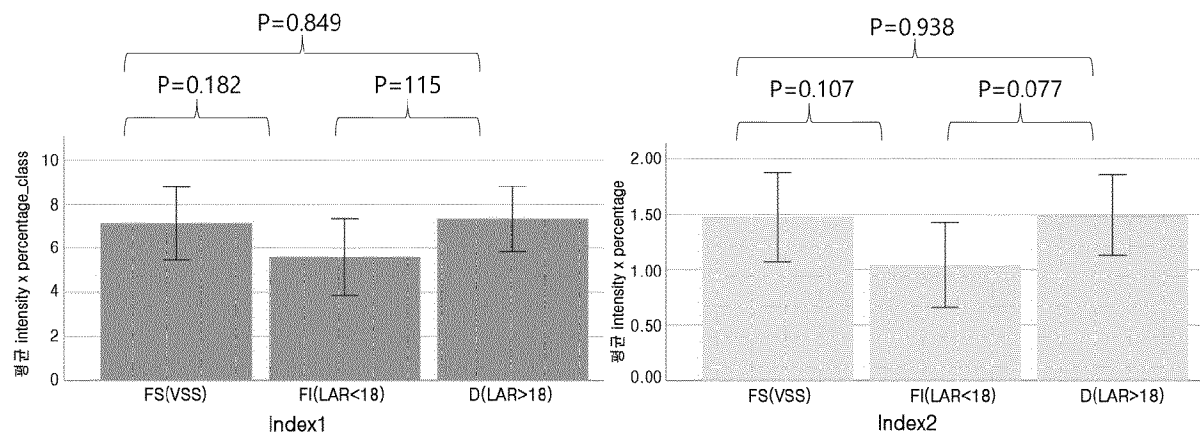
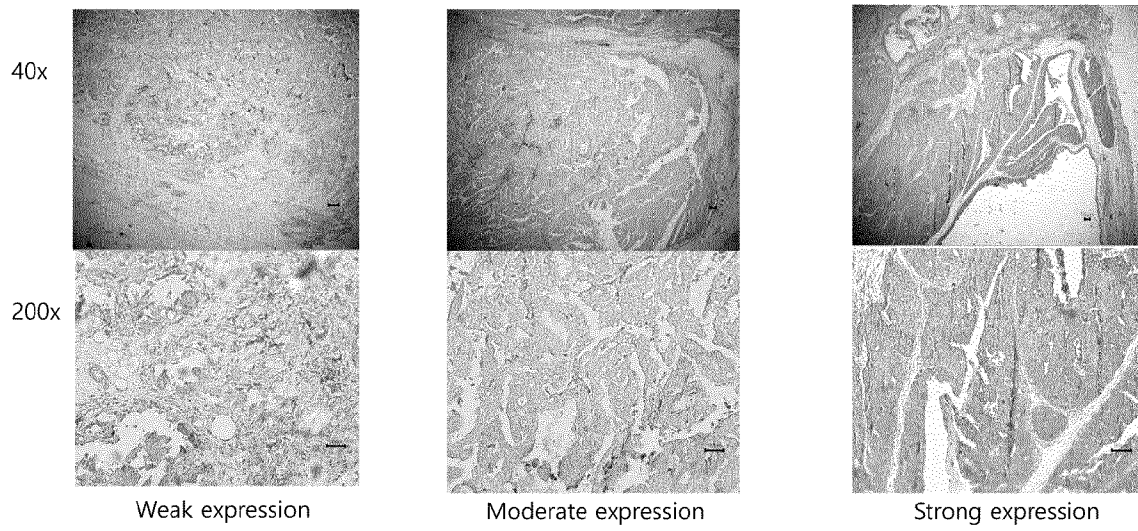
[도20]

BRCA2



[도21]

SIDT1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/008504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6886(2018.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/6886(2018.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/48(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 직장구불결장(rectosigmoid colon), 난소암(ovarian cancer), 저위전방절제술(low anterior resection; LAR), 장측구획장막절(visceral segmental serosectomy; VSS), 길이(length), 예후(prognosis), RPL36, ANKRD1, IGFBP6, ATOH8, REG1A, AMY1A, RELN, DPEP3, BRCA2, SIDT1, RPS28, ADAMTS4		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
DX DA	PARK, S. J. et al. Surgical technique of visceral segmental serosectomy for advanced ovarian cancer. Gland Surgery. March 2021, vol. 10, no. 3, pp. 1276-1278. See abstract; and page 1277, left column.	1-3 4-9
X Y	SIYAVOSHI, A. et al. Gene expression profiles and pathway enrichment analysis to identification of differentially expressed gene and signaling pathways in epithelial ovarian cancer based on high-throughput RNA-seq data. bioRxiv. 31 March 2019, pp. 1-12, figures 1-9. See page 7, second paragraph.	4,8-9 5-7
Y	WANG, X. et al. A comprehensive risk assessment model for ovarian cancer patients with Phospho-STAT 3 and IL-31 as immune infiltration relevant genes. OncoTargets and Therapy. 2020, vol. 13, pp. 5617-5628. See abstract; page 5623; and table 2.	5
☒ 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 26 October 2022		Date of mailing of the international search report 27 October 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/008504

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YANG, F. et al. AURKA and BRCA2 expression highly correlate with prognosis of endometrioid ovarian carcinoma. Modern Pathology. 2011, vol. 24, pp. 836-845. See abstract.	6
Y	CHEN, J. et al. Promotion of tumor growth by ADAMTS4 in colorectal cancer: focused on macrophages. Cellular Physiology and Biochemistry. 25 April 2018, vol. 46, pp. 1693-1703. See abstract; and page 1694.	7
X	PARK, S. J. et al. 480: Surgery for rectosigmoid peritonectomy in advanced ovarian cancer: surgical technique of visceral segmental serosectomy and 8-year experience. International Journal of Gynecological Cancer. 2020, vol. 30, Suppl. 3, p. A198. See page A198, left column.	1-3
A	WO 2016-049276 A1 (MOFFITT GENETICS CORPORATION) 31 March 2016 (2016-03-31) See entire document.	1-9
PX	PARK, S. J. et al. Visceral segmental serosectomy during debulking surgery for advanced ovarian and fallopian tubal cancer. Gynecologic Oncology. August 2021, vol. 162, Supplement 1, p. S331. See page S331.	1-3
X	PARK, S. J. et al. Clinical phenotypes of tumors invading the rectosigmoid colon affecting the extent of debulking surgery and survival in advanced ovarian Cancer. Frontiers in Oncology. 22 April 2021, vol. 11, thesis no. 673631, pp. 1-9. See entire document. * This document is a document declaring non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/008504

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/008504

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.: **10-13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 10-13 pertain to a method for treatment of the human body by surgery, 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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of group 1: claims 1-3 pertain to a method, which provides information for selecting a rectosigmoid tumor removal method in an advanced ovarian cancer patient through the length of a tumorous rectosigmoid and the tumor characteristics, or for predicting the prognosis of the ovarian cancer patient,

The invention of group 2: claims 4-9 pertain to a composition for predicting the prognosis of advanced ovarian cancer, comprising an agent for detecting the expression level of specific markers (RPL36 and the like), and to a kit comprising same.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/KR2022/008504

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016-049276	A1	31 March 2016	US	2017-0298443	A1	19 October 2017
				US	2022-0112562	A1	14 April 2022

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6886(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6886(2018.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/48(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 직장구불결장(rectosigmoid colon), 난소암(ovarian cancer), 저위전방절제술(low anterior resection; LAR), 장측구획장막절(visceral segmental serosectomy; VSS), 길이(length), 예후(prognosis), RPL36, ANKRD1, IGFBP6, ATOH8, REG1A, AMY1A, RELN, DPEP3, BRCA2, SIDT1, RPS28, ADAMTS4		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
DX DA	PARK, S. J. 등, 'Surgical technique of visceral segmental serosectomy for advanced ovarian cancer', Gland Surgery, 2021.03, 10권, 3호, 1276-1278 페이지 초록; 페이지 1277, 좌컬럼	1-3 4-9
X Y	SIYAVOSHI, A. 등, 'Gene expression profiles and pathway enrichment analysis to identification of differentially expressed gene and signaling pathways in epithelial ovarian cancer based on high-throughput RNA-seq data', bioRxiv, 2019.03.31, 페이지 1-12, 도면 1-9 페이지 7, 2번째 단락	4,8-9 5-7
Y	WANG, X. 등, 'A comprehensive risk assessment model for ovarian cancer patients with Phospho-STAT3 and IL-31 as immune infiltration relevant genes', OncoTargets and Therapy, 2020, 13권, 5617-5628 페이지 초록; 페이지 5623; 표 2	5
☒ 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 2022년10월26일(26.10.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년10월27일(27.10.2022)
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

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	YANG, F. 등, 'AURKA and BRCA2 expression highly correlate with prognosis of endometrioid ovarian carcinoma', Modern Pathology, 2011, 24권, 836-845 페이지 초록	6
Y	CHEN, J. 등, 'Promotion of tumor growth by ADAMTS4 in colorectal cancer: focused on macrophages', Cellular Physiology and Biochemistry, 2018.04.25, 46권, 1693-1703 페이지 초록; 페이지 1694	7
X	PARK, S. J. 등, '480: Surgery for rectosigmoid peritonectomy in advanced ovarian cancer: surgical technique of visceral segmental serosectomy and 8-year experience', International Journal of Gynecological Cancer, 2020, 30권, Sspl. 3, A198 페이지 페이지 A198, 좌컬럼	1-3
A	WO 2016-049276 A1 (MOFFITT GENETICS CORPORATION) 2016.03.31 전체 문헌	1-9
PX	PARK, S. J. 등, 'Visceral segmental serosectomy during debulking surgery for advanced ovarian and fallopian tubal cancer', Gynecologic Oncology, 2021.08, 162권, Supplement 1, S331 페이지 S331 페이지	1-3
X	PARK, S. J. 등, 'Clinical phenotypes of tumors invading the rectosigmoid colon affecting the extent of debulking surgery and survival in advanced ovarian Cancer', Frontiers in Oncology, 2021.04.22, 11권, 논문번호 673631, 1-9 페이지 전체 문헌 ※ 위 문헌은 출원인에 의해 '신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외'가 선언된 문헌임	1-3

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

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: **10-13**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 10-13은 수술에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 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.

제1군 발명: 청구항 1-3은 종양이 발생한 직장구불결장의 길이 및 상기 종양 특징을 통한 진행성 난소암 환자의 직장구불결장 종양 제거 방법 선택 또는 난소암 환자의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이고,

제2군 발명: 청구항 4-9는 특정 마커(RPL36 등)의 발현 수준 검출 제제를 포함하는 진행성 난소암의 예후 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것입니다.

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.

