

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 12월 2일 (02.12.2021) **WIPO | PCT**

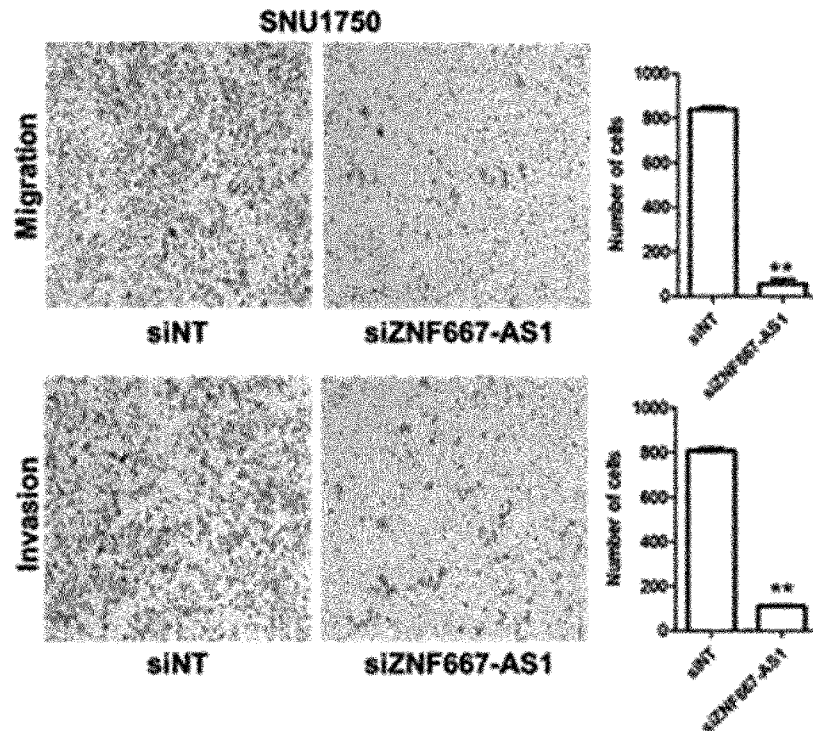


(10) 국제공개번호
WO 2021/241981 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/006493
- (22) 국제출원일: 2021년 5월 25일 (25.05.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0063802 2020년 5월 27일 (27.05.2020) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY**) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 정재호 (**CHEONG, Jae-Ho**); 06647 서울시 서초구 반포대로 122, 1302호(서초동, 현대ESA2아파트), Seoul (KR). 신민규 (**SHIN, Min-Kyue**); 07295 서울시 영등포구 문래로 94-7, 문래건영아파트 101-908, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 파도특허법인(유) (**PADO IP LAW PLLC**); 06194 서울시 강남구 테헤란로78길 16, 노벨빌딩 9층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CANCER

(54) 발명의 명칭: 암의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition capable of preventing or treating cancer, particularly, gastric cancer, inhibiting the invasion or metastasis of gastric cancer cells, and enhancing anticancer drug sensitivity.

(57) 요약서: 본 발명은 암 중에서도 특히 위암을 예방 또는 치료하거나, 위암 세포의 침윤성 또는 전이성을 억제할 수 있으며, 항암제에 대한 감수성을 증진시킬 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/241981 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 암의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 암 중에서도 특히 위암을 예방 또는 치료하거나, 위암 세포의 침윤성 또는 전이성을 억제할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

배경기술

- [2] 암이란 개체의 필요에 따라 규칙적이고 절제 있는 증식과 억제를 할 수 있는 정상세포와 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성된 세포덩어리로서 종양이라고도 한다. 이러한 무제한의 증식을 하는 암 세포는 주위의 조직으로 침투하고 더 심각한 경우는 신체의 다른 기관으로 전이가 되어 심각한 고통을 수반하고 결국 죽음을 초래하는 난치병이다.
- [3] 암은 혈액암과 고형암으로 크게 분류되며, 위암, 췌장암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생하며, 이들의 치료방법으로 최근 글리벡 또는 허셉틴과 같은 소수의 표적치료제가 특정 암의 치료에 이용되고 있으나 현재까지는 수술이나 방사선 요법 및 세포증식을 억제하는 화학요법제를 이용한 항암제 치료가 주된 방법이다. 그러나 표적치료제가 아니기 때문에 기존 화학요법제의 가장 큰 문제는 세포독성으로 인한 부작용과 약제 내성으로써, 항암제에 의한 초기의 성공적인 반응에도 불구하고 결국에는 치료가 실패하게 되는 주요 요인이다. 따라서, 이러한 화학요법제의 한계를 극복하기 위해서는 항암작용 기전이 명확한 표적 치료제 개발이 지속적으로 필요하다.
- [4] 위암은 암-관련 죽음의 3번째 원인에 해당하고, 가장 흔한 암 중에서도 4번째 순위를 차지한다. 개인 맞춤형 약제의 개발을 위하여 임상적으로 그리고 생물학적으로 면밀한 분자적 분석이 요구되고 있다. 지난 몇 년 동안, 전장 유전체 수준에서 위암에 대한 오믹스(omics) 연구를 통해 생물학적 복잡성에 대한 이해도를 높였고, 특히 mRNA 유전자 발현 데이터의 분석을 통해 바이오마커를 이용한 예후 및 보조 항암 화학 요법에 대한 반응성 예측에 큰 발전을 가져왔다. 위암에 있어서 다른 수준에서의 분자적 프로파일링은 개별 맞춤형 치료 전략의 발전을 가져올 것으로 예측된다.
- [5] 최근에는 긴 비암호화 RNA(long non-coding RNA; lncRNA)를 암의 예후 예측 및 치료를 위한 타겟으로 연구가 진행되고 있다. 상기 lncRNA는 암의 경로에 중요한 물질로 작용하며, 암으로의 발전 및 진행에 관련이 있다. 상기 lncRNA는 단백질-코딩 잠재력 없이 200개 이상의 뉴클레오티드로 이루어진 전사체이다. 이들은 단백질을 코딩하는 유전자보다 구성 뉴클레오티드의 수가 많으며, mRNA 보다 큰 정도로 특정 세포/조직 유형으로 제한되며, 암-유형 특이적 치료

타겟으로 전망되고 있다.

- [6] 핵산 기반 (RNA-타겟팅) 치료제는 몇몇 질환에서 임상적 성공을 보였고, lncRNA를 타겟으로 하여 몇몇의 암에서도 임상 전 성공을 보였다. 하지만 위암에서는 lncRNA 타겟에 대하여 보고된 바가 없고, 이들의 임상적 연관성 및 생물학적 기능에 대하여 충분한 연구가 이루어지고 있지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 일 목적은 암을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 암의 침윤성 또는 전이성을 억제할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제에 대한 내성을 극복할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.
- [10] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

기술적 해결방법

- [11] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 암의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 내성암의 내성 극복용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 내성암 또는 전이암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 항암제에 대한 감수성 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [16] 본 발명에서 상기 ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 각각은 긴-비암호화 RNA 유전자(long non-coding RNA; lncRNA)로, 상기 ZNF667-AS1는 서열번호 1로 표시될 수 있고, 상기 RP11-572C15.6는 서열번호 2로 표시될 수 있으며, 상기 FENDRR은 서열번호 3으로 표시될 수 있고, 상기

- ACTA2-AS1은 서열번호 4로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [17] 본 발명에서 상기 ZNF667-AS1, RP11-572C15, FENDRR 또는 ACTA2-AS1에 특이적인 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 바람직하다.
- [18] 본 발명에서 상기 "안티센스 뉴클레오티드"는 왓슨-크릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다(Rothenberg et al., J. Natl. Cancer Inst., 81:1539-1544, 1999). 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포주 흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.
- [19] 본 발명에서 상기 "siRNA" 및 "shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀(hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이스어(dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 ZNF667-AS1, RP11-572C15, FENDRR 또는 ACTA2-AS1에 특이적으로 작용하여 ZNF667-AS1, RP11-572C15, FENDRR 또는 ACTA2-AS1 lncRNA 분자를 절단하여 RNA 간섭(RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 ZNF667-AS1, RP11-572C15, FENDRR 또는 ACTA2-AS1을 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나

바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR (polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트 (cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [20] 본 발명에서 상기 "리보자임(ribozyme)"은 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 말한다. 다양한 활성을 갖는 리보자임이 공지되어 있으며, 상기 유전자의 리보자임은 공지된 또는 인공적으로 생성된 리보자임을 포함하며, 선택적으로 표적 특이적 RNA 절단 활성을 갖는 리보자임이 공지의 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.
- [21] 본 발명의 일 예시에서 상기 발현 억제제는 ZNF667-AS1의 유전자에 특이적인 발현 억제제로, 서열번호 5 및 6으로 표시되는 siRNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [22] 본 발명에서는 ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나의 유전자에 특이적인 발현 억제제는 암 세포의 성장 또는 증식을 효과적으로 억제할 수 있고, 더 나아가서는 암 세포의 침윤성 또는 전이성 또한 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [23] 본 발명에서 상기 "암"은 포유류에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징 지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리킨다. 본 발명에서 상기 예방 또는 치료의 대상이 되는 암은 그 발생 부위에 따라 암은 위암, 난소암, 대장암, 유방암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 향문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 바람직하게는 위암일 수 있다.
- [24] 본 발명에서 상기 "내성암"은 암 치료용 약물, 특히 항암제 치료에 대하여 극히 낮은 감수성을 나타내어, 항암요법 등의 치료법에 의하여 암의 증세가 호전, 완화, 경감 또는 치료증상을 나타내지 않는 암을 의미한다. 상기 암 치료용 약물 내성암은 특정한 항암제에 대하여 처음부터 내성을 가질 수도 있고, 최초에는 내성을 나타내지 않았으나, 긴 시간의 약물 치료로 인하여 암세포 내의 유전자 변이 등에 의하여 동일한 치료제에 대해 더 이상 감수성을 나타내지 않게 되어 발생할 수도 있다.
- [25] 본 발명에서 상기 "암 치료용 약물" 또는 "항암제"는 그 종류를 특별히 한정하지는 않으나, 바람직하게는 위암의 치료용 약물일 수 있다. 구체적인 예를 들면, 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조밐,

수니티닙, 카보플라틴, 소라페닙, 베바시주맙, 시스플라틴, 세툽시맙, 비스쿰알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀뮴 키토산, 쟈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 카페시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴, 보리노스텍, 엔티노스텍, 5FU 및 카르무스틴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 옥살리플라틴 또는 5FU일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [26] 본 발명에서 상기 "내성 극복"이란, 특정 약물로 암 치료용 약물, 특히 항암제에 대한 내성을 획득한 암 세포의 치료용 약물에 대한 감수성을 증가시키는 작용을 의미한다. 상기 감수성의 증가는 내성이 없는 암 세포에 대해 성장 억제 등의 효과를 보이는 농도와 비교하여, 내성을 획득한 암세포의 성장 억제 및 세포 사멸 등의 효과를 보이는 농도가 동등하거나 그 이상으로 상승시키는 정도에 이르는 것을 의미한다. 상기 내성 극복과 동의어로서 "내성 억제", "내성 해제", "저항성 해제" 및 "감수성 증강" 등이 있다.
- [27] 본 발명에서 상기 "전이암"이란, 암 세포가 원발 장기를 떠나 다른 장기로 이동하여 증식되어 발생한 암을 의미한다. 암이 신체 다른 부분으로 퍼지는 것은 크게 원발암에서 암 조직이 성장하여 직접적으로 주위 장기를 침습하는 것과 멀리 있는 다른 장기로 혈관이나 림프관을 따라 원격 전이를 하는 것으로 구분할 수 있다. 바람직하게는 다른 원발암에서 암이 위의 장기로 전이된 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [28] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 암 증상을 차단하거나, 암 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [29] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 조사하여 암 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [30] 본 발명의 약학적 조성물은 항암제 형태뿐만 아니라 상기 항암제의 보조제의

형태로도 사용될 수도 있다.

[31] 본 발명의 약학적 조성물은 다른 항암제와도 추가로 병용 투여할 수 있으며, 이를 통해서 암 세포에 대한 성장 억제 효과를 더욱 증강시킬 수 있다.

[32] 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 5FU, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미브, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스큐알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[33] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[34] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의

형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

- [35] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [36] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다.
- [37] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [38] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [39]
- [40] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 투여가 필요한 개체에게, ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.
- [41] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 투여가 필요한 개체에게, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 암의 침윤성 또는 전이성 억제 방법에 관한 것이다.
- [42] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 투여가 필요한 개체에게, ZNF667-AS1,

RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 내성암의 내성 극복 방법에 관한 것이다.

[43] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 투여가 필요한 개체에게, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 내성암 또는 전이암의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[44] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 투여가 필요한 개체에게, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 항암제에 대한 감수성 증진 방법에 관한 것이다.

[45] 본 발명에서 상기 "개체"는 암이 발병하였거나 발병이 의심되는 개체로서, 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물을 의미하나, 본 발명에서 제공하는 유효 물질로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다.

[46] 본 발명의 각 방법에서, 상기 발현 억제제 및 암의 정의, 투여 경로, 방법 및 용량 등에 관한 내용은 앞선 조성물에서 기재된 바와 중복되어 이하 명세서의 과도한 복잡을 피하고자 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[47] 본 발명에 따른 조성물을 이용하는 경우, 암 중에서도 특히 위암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 암 세포, 특히는 위암 세포의 침윤성 및 전이성을 또한 억제할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물을 이용하는 경우 항암제에 대한 감수성을 증진시켜 내성암의 내성 극복, 더 나아가서는 내성암을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[48] 도 1은 TCGA 코호트(n = 258)에서 STAD 조직으로부터 얻어진 lncRNA 데이터의 계층적 클러스터링 및 구분되는 발현 분석한 결과를 나타낸 것으로, 도 1a는 계층적 클러스터링 분석을 위하여, 적어도 7개의 조직에서 조직 별 중앙 값에 대하여 적어도 0.5 차이(log2 값)를 보이는 유전자(1,001 lncRNAs)가 선별된 결과를 보이는 것이고, 도 1b는 TCGA 코호트에서 LNC6 아형에 대하여 특이적인 lncRNA 발현 시그니처를 나타낸 것이다. 각 데이터는 매트릭스 형태로 나타내었으며, 행은 개별 유전자를 나타내고, 열은 각 조직을 나타낸다. 각 매트릭스 데이터에서 각각의 셀은 개별 조직에서 유전자의 발현 수준을 나타내며, 적색과 녹색은 스케일 바(log2 전환 스케일)로 나타내어지는 상대적 높고 낮은 발현 수준을 나타낸다.

[49] 도 2는 LNC6 아형의 예후 관련도를 나타낸 것으로, 도 2a는 TCGA 코호트(n = 258)에서 LNC6 아형에 특이적인 mRNA 발현 시그니처로, TCGA 데이터 세트에서 아형 특이적인 mRNA를 규명하기 위하여 다중 2-시료 t-테스트를

수행하였다. 도 2b는 예측 모델에서 계통도를 나타낸 것으로, 환자를 큰 예측 가능성이 있는 아형으로 분류하였다. 도 2c는 실험 코호트(n = 1,933)에서 환자의 총 생존 기간(overall survival; OS)과 무재발 생존 기간(recurrence-free survival; RFS)의 카플란-마이어 플롯(Kaplan-Meier plots)을 나타낸 것이다.

[50] 도 3은 한국 코호트(n=180)에서 LNC6 아형과 보조 항암 화학 요법 사이 상관 관계를 나타낸 것으로, 각 LNC6 아형 별 보조 항암 화학 요법(CTX)를 받은 환자와 받지 않은 환자 사이 무재발 생존 기간(RFS)의 카플란-마이어 플롯을 나타낸 것이며, 이때 대상 환자로는 한국인 코호트에서 원발 전이가 없는 AJCC 암기 II, III 또는 IV 환자를 대상으로 하였다.

[51] 도 4는 L6C의 항암제 내성과 상피 표현형의 서브세트에 관한 것으로, 도 4a는 한국인 코호트(n = 180)에서 LNC6 아형과 중간엽/상피 아형(MP/EP) 사이 코드표를 나타낸 것이다. 본 분석에는 원발 전이가 없는 AJCC 암기 II, III 또는 IV 환자를 대상으로 하였다. 도 4b는 보조 항암 화학 요법(CTX)를 받은 EP 아형 환자와 받지 않은 EP 아형 환자(n = 122) 사이 무재발 생존 기간(RFS)의 카플란-마이어 플롯을 나타낸 것으로, EP 아형 환자에 있어서 보조 항암 화학 요법과 L6C 아형 사이 상호 관계를 분석하였다.

[52] 도 5는 면역 요법에 대한 치료 반응성과 LNC6 아형(n=45) 사이의 상호 관계를 나타낸 것으로, 도 5a는 LNC6 아형에 따른 펙트롤리주맵에 대한 반응성을 나타낸 것이고, 도 5b 및 5c는 치료 반응성을 보이는 자와 비-반응성을 보이는 자에서 L6C 아형과 L6F 아형의 예측 가능성을 나타낸 것이다. 도 5d는 치료 반응성을 보이는 자와 비-반응성을 보이는 자에서 L6E 아형에서 상향 조절된 lncRNA의 정규화된 풍부도(Normalized enrichment score; NES)를 나타낸 것이다. 여기서, CR은 완전 관해(complete response), PR은 부분적 반응성(partial response), SD는 안정한 질환(stable disease), PD는 진행중인 질환(progressive disease)를 의미한다.

[53] 도 6은 각 LNC6 아형에서 세포 유형 구성요소를 나타낸 것으로, 도 6a 및 6b는 각 LNC6 아형에서 TCGA 코호트 시료의 xCell 스코어를 평균화한 것으로, 도 6a는 각 LNC6 아형에서 5개의 세포 유형 패밀리 구성요소를 나타낸 것이고, 도 6b는 각 LNC6 아형에서 64개의 세포 유형의 구성요소를 나타낸 것이다.

[54] 도 7은 lncRNA 및 줄기 유사 특징 사이 관계의 생체 외 입증을 나타낸 것으로, 도 7a는 위암 세포주(n=29) 사이의 상피 중간엽 전이 아형(epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) subtype)과 관련된 L6F 아형의 예측된 가능성을 나타낸 것이고, 도 7b는 EMT 아형 위암 세포주에서 siRNA 형질 전환 후 qRT-PCR로 ZNF667-AS1 녹다운 효율을 분석한 결과이며, 도 7c 내지 7e는 세포 이동 및 침윤 어썰이로부터 이동된 및 침윤된 세포의 대표 이미지를 나타낸 것으로, 통계적 바 그래프는 3번의 독립된 실험에서 평균화 결과를 나타낸다(t-test, **P < 0.05; n = 3). 도 7f는 siRNA 형질 전환된 EMT 아형의 위암 세포주에서 나타낸 EMT 마커 단백질을 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행한

결과를 나타낸 것이고, 도 7g는 siRNA 형질 전환된 EMT 아형의 위암 세포주에서 옥살리플라틴 또는 5FU의 MTS 어썬이로부터 반 최고치 억제 농도(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)를 나타낸 것이다.

- [55] 도 8은 TCGA 코호트(n=258)에서 특징(hallmark) 유전자 세트의 유전자 세트 풍부 분석을 나타낸 것으로, 분석 전 Z 스코어에 의해 시료에서 유전자 발현 값을 정규화하였고, 순위 정규화 방법에 의해 ssGSEAProjection를 적용하였으며, X 축은 LNC6 아형, Y 축은 계층적 클러스터링으로 배열하였다.
- [56] 도 9는 TCGA 코호트(n=258)에서 위 발달 전사 인자의 발현 패턴을 나타낸 것으로, mRNA 풍부한 수준에서 규명된 725개의 위 발달 TF에 있어서, TCGA 코호트에서 발현 수준이 이용 가능한 723개의 TF를 본 분석에 포함시켰다. 초기 배아 단계에서 높게 발현된 TF를 그룹 1, 후기 배아 단계 또는 성숙 단계에서 높게 발현되는 TF를 그룹 2로 구분하였고, Y 축은 TF 그룹 및 시료에서 표준 편차에 따라 상부에서 하부로 정렬하였다.
- [57] 도 10은 TCGA 코호트(n=258)에서 S-기의 lncRNA의 발현 패턴을 나타낸 것으로, 일시적으로 발현된 S-기 풍부 lncRNA에서, TCGA 코호트 시료에서 표준 편차가 0.3 보다 큰 85개의 lncRNA를 나타내었다.
- [58] 도 11은 LNC6 아형과 관련된 특이적 유전자 돌연변이 및 복제 수 변화를 나타낸 것으로, 도 11a는 TCGA 코호트(n = 256)에서 특이적으로 돌연변이된 유전자를 나타낸 것이며, 바는 돌연변이의 수를 나타낸 것으로, MutSigCV에 의해 확인된 특이적으로 돌연변이된 유전자는 q 값으로 필터링되고, 빈도에 의해 순위를 매겼다(왼쪽). 돌연변이 색은 돌연변이의 부류를 나타내고, 카이 제곱 검증(chi-square)으로 아형 특이적 유전자 돌연변이를 확인하였다. 도 11b는 TCGA 코호트(n=257)에서 복제 수 돌연변이를 나타낸 것으로, 바는 복제수가 변화된 게놈의 부분을 나타낸 것이며, 특이적으로 복제 수가 변화된 유전자는 q 값에 의해 필터링되고, 빈도에 의해 순위를 매겼다(왼쪽). 카이 제곱 검증으로 아형 특이적 복제수 변화를 확인하였다.
- [59] 도 12는 TCGA STAD 코호트에서 miRNA 및 단백질의 발현과 DNA의 구분되는 메틸화에 관한 것으로, 도 12a 내지 12c는 TCGA 데이터 세트에서 miRNA 및 단백질의 발현과 DNA의 아형-특이적 메틸화를 확인하기 위하여 다중 2-시료 t-테스트를 수행하였다. 데이터는 매트릭스 형식으로 나타내었고, 행은 각 유전자를 나타내며, 열은 각 조직을 나타낸다. 보다 상세하게, 도 12a는 TCGA 코호트(n=217)에서 LNC6 아형에 특이적인 DNA 메틸화 시그니처를 나타낸 것으로, 표준 편차가 0.15 미만인 경우 무시하였다. 도 12b는 TCGA 코호트(n=218)에서 LNC6 아형 특이적인 miRNA 발현 시그니처를 나타낸 것으로, miRNA의 결측 값이 코호트의 20% 보다 큰 경우 이를 무시하였다. TCGA 코호트(n=224)에서 LNC6 아형에 특이적인 단백질 발현(RPPA) 시그니처를 나타낸 것이다.
- [60] 도 13은 TCGA 코호트(n=228)에서 LNC6 아형-특이적 lncRNA 유전자의 메틸화

패턴을 나타낸 것으로, 262개의 LNC6 아형 특이적 lncRNA 유전자에서, HM450 프로브에 주석을 단 184개의 유전자를 나타내었다. 각 lncRNA와 프로브 쌍에서 메틸화 변화 및 유전자 발현 사이의 스피어만 상관 계수(Spearman correlation coefficients; Rho)를 왼쪽에 나타내었다. 동일한 유전자 프로모터에 다중 프로브를 주석을 달았다면, lncRNA를 위해 가장 큰 절대적인 계수의 프로브를 선별하였다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [61] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [62] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 암의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [63] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 내성암의 내성 극복용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [64] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 내성암 또는 전이암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [65] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 항암제에 대한 감수성 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [66] 본 발명에서 상기 ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1 각각은 긴-비암호화 RNA 유전자(long non-coding RNA; lncRNA)로, 상기 ZNF667-AS1는 서열번호 1로 표시될 수 있고, 상기 RP11-572C15.6는 서열번호 2로 표시될 수 있으며, 상기 FENDRR은 서열번호 3으로 표시될 수 있고, 상기 ACTA2-AS1은 서열번호 4로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [67] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [68]
- [69] 실시예
- [70]

[71] TCGA 위암 코호트의 게놈 및 임상적 데이터

[72] 258개의 종양으로 이루어진 TCGA 위선암(stomach adenocarcinoma; STAD) 코호트로부터 총 12,727 lncRNA의 발현 프로파일과 mRNA 발현 프로파일을 다운받은 뒤, log2 베이스로 전환시켰다. TCGA STAD의 체세포 돌연변이, 복제 수 변화(copy-number alteration; CNA) 및 임상적 데이터는 cBioPortal for Cancer Genomics로부터 다운받았다. 역상 단백질 어레이(reverse phase protein array; RPPA)로부터 DNA 메틸화, miRNA 발현 및 단백질 발현 데이터는 UCSC Xena 플랫폼으로부터 다운받았다.

[73]

[74] 아형-특이적 lncRNA의 아형 분류 및 동정

[75] Gene Cluster 3.0 및 Java TreeView를 통하여 클러스터 분석 및 lncRNA 데이터의 시각화를 수행하였다. 계층적 클러스터링 결과, 258 TCGA STAD 환자를 6개의 클러스터로 분류하였다: 25명은 L6A로, 66명은 L6B로, 51명은 L6C로, 51명은 L6D로, 14명은 L6E로, 그리고 51명은 L6F로 분류하였다. 그 후, 아형-특이적 lncRNA를 확인하기 위하여, 6개 아형의 가능한 모든 조합에 대해 다중 2-클래스 t 테스트(multiple two-class t tests)를 수행하였다. 아형 L6A의 선별을 위하여 5번의 2-시료 t-테스트(2-sample t-tests)를 수행하였다(L6A vs. L6B, L6A vs. L6C, L6A vs. L6D, L6A vs. L6E, and L6A vs. L6F 비교) ($P < 0.05$). 5개의 가능한 비교에 있어서 발현에 유의적 차이가 있는 lncRNA는 다음의 262개의 아형-특이적 lncRNA에 해당한다: 24개는 L6A로, 67개는 L6B로, 20개는 L6C로, 55개는 L6D로, 30개는 L6E로, 그리고 66개는 L6F로 분류되었다.

[76]

[77] LNC6 아형의 예측 모델

[78] lncRNA 발현 데이터는 대규모 코호트 데이터세트 중 TCGA 코호트에서만 이용 가능하므로, 그 발현이 LNC6 아형에 특이적인 mRNA를 규명함으로써 lncRNA 아형 시그니처를 mRNA 아형 시그니처로 전환하였고, mRNA 발현 데이터를 이용하여 mRNA 시그니처를 독립 검증 코호트에 적용하였다. 아형-특이적 mRNA 발현 시그니처를 다중 2-클래스 t 테스트에 의해 확인하였다. 아형 L6A 선별을 위하여, 5개의 2-시료 t-테스트를 수행하였다(L6A vs. L6B, L6A vs. L6C, L6A vs. L6D, L6A vs. L6E, and L6A vs. L6F comparisons) ($P < 0.001$). 로그 비율에 따라 각 아형에 대하여 상위 200 mRNA를 선별하였다. 5개의 가능한 비교에 있어서 유의적 차이가 있는 발현을 보이는 유전자의 수가 200개 미만인 경우, 4개의 비교에서 유의적 차이가 있는 유전자를 아형-특이적인 것으로 간주하였다. 아형 예측 모델을 제작하기 위하여, Bayesian compound covariate predictor (BCCP) 알고리즘을 사용하여 이전에 개발된 모델을 사용하였다. 간단히는 총 1,200개 유전자 시그니처(각 아형별 200개 유전자를 포함함)에 대한 유전자 발현 데이터를 사용하여 아형에 속하는 각 조직 시료의 베イズ 확률(Bayesian probability)을 측정하였다. 실험 코호트에서 시료를 베イズ 확률

스코어에 따라 6개 아형 중 하나로 분류하였다. 예측을 위해 BRB-Array Tools (National Institutes of Health)을 사용하였다. 면역 치료 코호트 및 암 세포주에서 LNC6 아형 예측을 위하여 TCGA 코호트에서 lncRNA 발현 데이터에 근거하여 BCCP 모델을 제작하였다. 데이터세트 내 레퍼런스 게놈 주석 버전(reference genome annotation version)의 차이로 인하여, 262 아형-특이적 lncRNA 중 241개만 사용하였다.

[79]

[80] 실험 코호트의 게놈 및 임상적 데이터

[81] 미국 국립생물공학 정보센터(NCBI; accession numbers GSE13861, GSE26942, GSE26253, GSE29272, GSE66229, GSE14209, GSE84437, GSE15459)의 유전자 발현 옴니버스 데이터베이스(Gene Expression Omnibus database)로부터 1,933 환자를 포함하는 7개 독립 GC 코호트에서의 mRNA 발현 및 생존데이터를 획득하였다. 한국 코호트의 267명 환자에서 155명은 표준 보조 항암 화학 요법(5-FU 또는 5-FU와 시스플라틴/옥살리플라틴, 독소루비신 또는 파클리탁셀의 조합)을 받았다. 이들 중, 미국 암연합회(American Joint Commission on Cancer (AJCC), 6th edition) II기, III기 또는 IV기 질환으로 원발 전이가 없는 환자 180명을 보조 항암 화학 요법의 이점을 평가하기 위한 분석 서브세트에 포함시켰다. 190명의 환자 중 132명의 환자가 보조 항암 화학 요법을 받았다.

[82]

[83] 면역치료 코호트 및 GC 세포주에서의 lncRNA 발현 분석

[84] 로우 RNA 시퀀싱 데이터로부터 lncRNA 발현을 분석하였다. 펨브롤리주맙 및 29 DNA-핑거프린트 GC 세포주의 임상 2기에 참여한 전이성 GC 환자로부터 얻어진 45개의 시료에 대하여 수행하였다. STAR 2.6.0c를 이용하여 국제암유전체 협력단(International Cancer Genome Consortium)의 방법에 따라 리드를 레퍼런스 인간 게놈 GRCh38와 얼라인하였다. Gencode 주석(Release 22)과 함께 Rsubread 패키지(ver. 1.34.0)를 사용하여 각 비코딩 RNA에 대한 유니크 맵 리드(uniquely mapped read)를 계산하였다. R (<https://www.r-project.org/>)을 이용하여 그것의 정의에 따라 FPKM(Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 값을 계산하였다.

[85]

[86] 다른 분자 아형의 예측

[87] TCGA 아형 및 미세부수체 불안정성(microsatellite instability; MSI) 상태를 정의하였다. 다른 분자 아형 및 면역 치료의 이점을 예측하기 위하여 BCCP 모델을 적용하였다. 환자를 해당 분자 아형으로 분류하기 위하여 위장관 기질 종양(gastrointestinal stromal tumor; GIST) 및 아시아 암 연구 그룹(Asian Cancer Research Group; ACRG) 유전자 발현 시그니처를 적용하였다.

[88]

[89] 통계적 분석

[90] 각 아형 별 총 생존 기간(overall survival; OS) 및 무재발 생존 기간(recurrence-free survival; RFS) 사이의 상관 관계를 분석하기 위하여 카플란-마이어 플롯(Kaplan-Meier plots) 및 로그 순위법(log-rank tests)을 사용하였다. 두 아형(EPnL6C vs EP-L6C) 사이의 상호 관계 정도와, 보조 항암 화학 요법의 이점을 평가하기 위하여, 콕스 비례 위험 모델(Cox proportional hazards model)을 적용하였다. 모델은 세가지 공변량으로, 성별, 나이 및 미국 암연합회(AJCC) 암의 병기를 포함하였다. 모든 통계적 분석은 R 언어 환경(<http://www.r-project.org>)에서 수행하였다.

[91]

[92] 생물 정보학 분석

[93] TCGA 코호트 및 면역 치료 코호트에서 GenePattern과 함께 Single-sample GSEA (ssGSEA), Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)의 연장(extension)을 수행하였다. 간단히는, 시료 및 유전자 세트의 각 페어링의 분리된 풍부 점수(enrichment scores)를 계산하였고, 이는 유전자 세트에서 유전자가 시료 내에서 대등하게 상향- 또는 하향-조절되었는 지 정도를 나타낸다. 발현 값은, 시료에 걸쳐 유전자 당 Z-정규화를 수행하였고, 그 후 시료 당 Z 값에 의해 순위를 매겼다. TCGA 코호트 분석을 위하여 "hallmark" 유전자 세트를 사용하였다. 얻어진 풍부 점수는 Z 스코어에 의해 시료에 걸쳐 정규화되었다(NES - normalized enrichment score).

[94] 표준 경로(canonical pathways)와 각 아형의 상류 조절자(upstream regulators)를 규명하기 위하여 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)을 사용하였다. IPA는 적절한 수의 유전자가 요구되므로, 5개의 가능한 비교에서 발현 상 유의적 차이($P < 0.05$)를 보이는 mRNA를 분석에 사용하였다. 절대적 로그 비율이 1 초과인 mRNAs만을 L6F의 분석에 사용하였다. 유전자의 결과적 수는 다음과 같았다: L6A는 1,576개, L6B는 404개, L6C는 427개, L6D는 1,756개, L6F는 2,391개에 해당하였다. 아형별 시료와 TCGA 코호트에서 시료 나머지 사이에서의 유전자의 발현 로그 비율을 분석하였다.

[95]

[96] 다른 생물학적 특성 분석

[97] 64개의 면역 및 기질 세포 타입을 포함하는 세포 이질성(cellular heterogeneity)은 유전자 시그니처-기반 방법(xCell)에 의한 TCGA 코호트 전사체로부터 추론되었다. 64개의 세포형은 5개의 세포형 패밀리로 그룹핑하였고, 각 세포형 패밀리의 스코어는 포함하는 세포형 스코어의 총체로 계산되었다. 각 아형 별 줄기세포능은 마우스 위 발달 단계에서 다르게 발현되는 전사 인자의 발현 수준으로부터 평가되었다. mRNA 풍부 수준에서 규명된 725개의 위 발달 전사인자 중 TCGA 코호트에서 발현 수준 값이 이용 가능한 723개를 분석에 사용하였다. 각 아형 별 세포 주기의 단계는 초기 RNA 캡처 시퀀싱에 의해 규명된 S-단계 풍부 lncRNA의 발현 정도로부터 평가하였다.

1,145개의 일시적으로 발현되는 S-단계 풍부 lncRNA 중, TCGA 코호트 시료에 걸쳐 표준 편차가 0.3 초과인 경우 분석에 사용하였다. 위암에서 면역 조절에 관여하는 lncRNA를 확인하기 위하여, LncRNA Modulator Atlas in Pan-cancer (LncMAP)에서 규명된 lncRNA-중재 전사 네트워크 변화들을 평가하였다. 간단히는, 게놈-와이드 전사 조절(genome-wide transcriptional regulation)로 페어링된 lncRNA 및 유전자 발현 프로파일을 통합함으로써 각 암 유형별 변화된 lncRNA-전사 인자 유전자 트리플렛(triplets)을 확인하였다. 이후, ImmPort 프로젝트로부터 얻어진 면역-관련 유전자를 포함한 트리플렛만을 분석에 사용하였다(STAD에서 17,572 트리플렛). 면역 조절의 정도는 각 lncRNA가 구성하는 트리플렛의 수로 정의하였다.

[98]

[99] 다른 게놈 분석

[100] TCGA 코호트 데이터(395 프로파일 시료)로부터 Q-value (<0.1)에 의해 돌연변이된 유전자를 거른 뒤 상위 29 유전자를 TCGA 코호트로부터 돌연변이 빈도로 플롯팅하였다($n=258$). TCGA 코호트 데이터로부터 CNA 유전자를 Q-값 (<0.25) 및 빈도($>5\%$)로 필터링 하였다. TCGA 코호트로부터 CNA 빈도로 상위 25개 유전자를 플롯팅하였다($n=258$). DNA 메틸화 데이터는 표준 편차 >0.15 로 필터링하였고, 모든 5개의 가능한 비교에서 β -값에 유의적 차이가 있는 경우($P<0.01$), 아형 특이적인 것으로 간주하였고, 총 38,476개의 아형 특이적 프로브를 확인하였다: L6A는 451개, L6B는 773개, L6C는 84개, L6D는 10개, L6E는 28,803개, 그리고 L6F는 8,355개에 해당한다. miRNA 데이터는 결측 값(코호트의 $<20\%$)으로 필터링하였고, 모든 5개의 가능한 비교에서 유의적 차이를 보이는 경우($P<0.05$) 아형 특이적인 것으로 간주하였고, 143개의 아형 특이적 miRNA를 확인하였다: L6A는 17개, L6B는 4개, L6C는 0개, L6D는 4개, L6E는 8개, L6F는 110개에 해당하였다. 모든 5개의 가능한 비교에서 유의적 차이($P<0.05$)가 있는 단백질은 아형 특이적인 것으로 간주하였고, 총 40개의 아형 특이적 단백질을 얻었다: L6A는 3개, L6B는 1개, L6C는 0개, L6D는 1개, L6E는 10개, L6F는 25개에 해당하였다. lncRNA 유전자의 후성 조절의 분석을 위하여, HM450 프로브를 lncRNA 유전자에 주석으로 달았다. TCGA 코호트에서 유전자 융합 경우를 다운로드 하였고, 258명의 환자 중 유전자 융합이 발생한 데이터는 183명의 환자에서 이용이 가능하였다.

[101]

[102] 세포 배양 및 형질 전환

[103] 위암 세포주를 10% 소태아 혈청이 첨가되었고, 페니실린/스트렙토마이신(100ug/L each)을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 배양하였고, 이때 배양은 5% CO₂를 포함하는 가습화된 배양기 내에서 37°C의 온도 조건 하에서 수행되었다. 표 1에 나타낸 siRNA (Thermofisher Scientific)에 의한 ZNF667-AS1 녹다운은 mirus 형질 전환 시약(Mirus bio)을 사용하여

수행되었다.

[104]

[105] [표1]

	서열(5'→3')
센스 가닥(Sense)	GCUCCUAGCAACCAACAUTT(서열번호 5)
안티 센스 가닥(Antisense)	AAUGUUGGUUGCUAGGAGCTG(서열번호 6)

[106]

[107] 정량적 실시간 RT-PCR

[108] 암 세포에 대하여 TRI 시약을 이용해 총 RNA를 추출하였다. M-MLV 역전사효소(Enzynomics)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. SYBR Green PCR 마스터 믹스 (Thermofisher Scientific) 및 하기 표 2의 프라이머를 이용하여 Eco 실시간 PCR 시스템(Illumina) 상에서 실시간 qPCR에 의해 유전자 발현을 측정하였다. GAPDH에 대하여 상대적 유전자 발현량을 정규화 하였다.

[109]

[110] [표2]

유전자	정방향 프라이머(Forward Primer)	역방향 프라이머(Reverse Primer)
FENDRR	AGAGTGCTTCCACTGCCCTA (서열번호 7)	CCCATTGCAAAGGCTACAT (서열번호 8)
MAGI2-AS3	TGGGTCTGTGCAGAGTTGAG (서열번호 9)	GCTGGTTATGGCCAATGAGT (서열번호 10)
ACTA2-AS1	GTGGTTCTGGTTTGCCTGAT (서열번호 11)	CTGGCCCTGTAACACCAGAT (서열번호 12)
ZNF667-AS1	GGACACTGTGCAGGATGATG (서열번호 13)	GGCAAGAATGCTGTGTCTCA (서열번호 14)
RP11-572C15.6	TCATCCCTCTTCCTTGATGG (서열번호 15)	ATTGGCAACTTTGGGCTATG (서열번호 16)

[111]

[112] 세포 생존율 어쎐이

[113] si-비 타겟 또는 si-ZNF667-AS1로 형질 전환된 암 세포를 96-웰 플레이트에 2×10^3 세포/웰의 양으로 접종하여 약물 처리 전 밤새 배양하고, 웰당 20uL CellTiter 96 AQueous One 용액(MTS, Promega)을 첨가하기 전에 72 시간 동안

약물의 존재 하에서 유지하였다. 플레이트를 3시간 동안 배양한 뒤 ELISA 리더(Bio tek)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[114]

[115] 세포 이동능 및 침윤능 어썰이

[116] si-비 타겟 또는 si-ZNF667-AS1로 형질 전환된 암 세포의 이동능 및 침윤능을 평가하기 위하여, 8-um-기공 사이즈의 챔버 인저트(Corning Costar)를 포함하는 24-웰 플레이트를 사용하였다. 200uL FBS-프리 배양 배지 내 2×10^5 세포를 각 필터 인저트(상부 챔버)에 로딩하고, 각 하부 챔버에 10% FBS를 포함하는 배양 배지 700uL를 추가한 뒤, 37°C에서 16 시간 동안 배양하였다. 수확 후 인저트의 바닥을 고정시킨 뒤 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. EVOS M7000 이미징 시스템(Thermofisher Scientific)을 이용하여 이동 또는 침윤한 세포의 수를 측정하였다.

[117]

[118] 면역 블롯

[119] 프로테아제 억제제 콕테일 및 포스파타제 억제제(Roche)로 보충된 RIPA 버퍼에서 세포를 용혈시켰다. BCA 단백질 어썰이 키트(Thermofisher Scientific)를 이용하여 총 단백질 농도를 측정하였다. SDS-PAGE를 이용하여 단백질 10ug을 분리한 뒤 PVDF 막(Millipore) 상에서 이동시키고 1차 항체를 이용하여 4°C에서 밤새 배양하였다. 사용된 1차 항체는 다음과 같다: ZNF667 (1:2000, Abcam, ab106432), N-Cadherin (1:1000, Cell signaling, 4061S), E-Cadherin (1:1000, Cell signaling, 14472S), Vimentin (1:1000, Cell signaling, 5741) 및 GAPDH (1:1000, Sigma, G9545). TBS-T로 5회 세척하고, 블롯을 겨자무과산화수소-컨쥬게이트된 2차 항체로 배양한 뒤 향상된 케미-루미네센스(chemi-luminescence) 검출(ECL plus kit, Pierce)로 시각화 하였다.

[120]

[121] 위암에서 lncRNA의 영향을 확인하기 위한 시스템적 접근

[122] 총 게놈 수준에서 무편파적 접근으로 위암에서 lncRNA의 영향을 확인하기 위하여, 비지도 클러스터링(unsupervised clustering)을 수행하였다. TCGA 코호트에서 lncRNA 발현의 계층적 클러스터링 분석을 통해 6개의 클러스터로 구분하였고, L6A, L6B, L6C, L6D, L6E, 및 L6F로 명명하였다(도 1a). 다음으로, 각 아형 별로 발현이 독특한 lncRNA 유전자를 규명하였다: 6개의 아형에서 구분되는 발현을 보이는 lncRNA는 총 262개에 해당하였다(도 1b; 표 3).

[123]

[124] [표3]

ENSEMBL ID	유전자 명 (Gencode v19)	아형	비율 (subtype/others)
ENSG00000269900.2	RMRP	L6A	2.01
ENSG00000242125.2	SNHG3	L6A	1.37
ENSG00000271824.1	AC009014.3	L6A	1.16
ENSG00000126005.11	MMP24-AS1	L6A	0.97
ENSG00000233621.1	RP11-422J8.1	L6A	0.89
ENSG00000229953.1	RP11-284F21.7	L6A	0.88
ENSG00000260704.1	LINC00543	L6A	0.79
ENSG00000175701.6	LINC00116	L6A	0.77
ENSG00000258940.2	RP11-407N17.5	L6A	0.64
ENSG00000226330.1	RP11-739N20.2	L6A	0.61
ENSG00000268516.1	CTD-3138B18.5	L6A	-0.26
ENSG00000272645.1	RP11-504P24.8	L6A	-0.31
ENSG00000269958.1	RP11-73M18.8	L6A	-0.49
ENSG00000267449.1	RP11-264B14.2	L6A	-0.54
ENSG00000188206.5	HNRNPU-AS1	L6A	-0.58
ENSG00000257621.3	RP11-349A22.5	L6A	-0.61
ENSG00000273014.1	RP11-225B17.2	L6A	-0.77
ENSG00000229152.1	ANKRD10-IT1	L6A	-0.91
ENSG00000259865.1	RP11-488L18.10	L6A	-0.96
ENSG00000268205.1	CTC-444N24.11	L6A	-0.99
ENSG00000245532.4	NEAT1	L6A	-1.14
ENSG00000267207.1	RP11-264B14.1	L6A	-1.30
ENSG00000251562.3	MALAT1	L6A	-1.39
ENSG00000264940.2	SNORD3C	L6A	-1.50
ENSG00000130600.11	H19	L6B	2.24
ENSG00000260032.1	LINC00657	L6B	1.58
ENSG00000269972.1	RP3-430N8.10	L6B	1.27
ENSG00000234678.1	RP11-465N4.4	L6B	1.24

ENSG00000269987.1	RP3-430N8.11	L6B	1.19
ENSG00000253352.4	TUG1	L6B	1.15
ENSG00000232803.1	RP11-93B14.5	L6B	1.07
ENSG00000254635.1	WAC-AS1	L6B	1.00
ENSG00000234771.2	RP11-395P17.3	L6B	0.97
ENSG00000270580.1	RP11-1186N24.5	L6B	0.86
ENSG00000234072.1	AC074117.10	L6B	0.84
ENSG00000260766.1	RP11-226L15.5	L6B	0.81
ENSG00000228989.1	AC133528.2	L6B	0.77
ENSG00000206195.6	AP000525.9	L6B	0.74
ENSG00000238035.4	AC138035.2	L6B	0.74
ENSG00000247228.2	RP11-296I10.3	L6B	0.73
ENSG00000267100.1	ILF3-AS1	L6B	0.73
ENSG00000253738.1	GS1-251I9.4	L6B	0.73
ENSG00000226696.1	LENG8-AS1	L6B	0.73
ENSG00000225484.2	RP11-773D16.1	L6B	0.69
ENSG00000188185.7	LINC00265	L6B	0.69
ENSG00000272993.1	RP11-196G18.24	L6B	0.69
ENSG00000231826.1	AC016735.2	L6B	0.66
ENSG00000269990.1	CTD-3074O7.12	L6B	0.66
ENSG00000240731.1	RP5-890O3.9	L6B	0.65
ENSG00000231074.4	HCG18	L6B	0.65
ENSG00000273071.1	RP11-337C18.10	L6B	0.65
ENSG00000177337.3	DLGAP1-AS1	L6B	0.63
ENSG00000261455.1	LINC01003	L6B	0.61
ENSG00000226752.3	PSMD5-AS1	L6B	0.59
ENSG00000259943.1	RP1-39G22.7	L6B	0.58
ENSG00000255503.1	RP11-113K21.4	L6B	0.58
ENSG00000228315.7	GUSBP11	L6B	0.58
ENSG00000240618.1	RP11-206L10.5	L6B	0.57
ENSG00000273000.1	KB-1572G7.2	L6B	0.56

ENSG00000270346.1	RP1-90J20.12	L6B	0.53
ENSG00000225210.5	AL589743.1	L6B	0.52
ENSG00000244306.5	CTD-2314B22.3	L6B	0.51
ENSG00000230724.5	LINC01001	L6B	0.50
ENSG00000261716.1	RP11-196G18.22	L6B	0.43
ENSG00000270157.1	RP5-894A10.6	L6B	0.43
ENSG00000229539.1	RP11-119B16.2	L6B	0.42
ENSG00000232640.1	RP1-266L20.2	L6B	0.42
ENSG00000246067.3	RAB30-AS1	L6B	0.41
ENSG00000273179.1	RP11-20I20.4	L6B	0.41
ENSG00000229043.2	AC091729.9	L6B	0.39
ENSG00000235477.2	RP11-122G18.5	L6B	0.37
ENSG00000225791.2	TRAM2-AS1	L6B	0.34
ENSG00000260233.2	SSSCA1-AS1	L6B	0.32
ENSG00000237094.7	RP4-669L17.10	L6B	0.32
ENSG00000272872.1	LL22NC03-N14H11.1	L6B	0.31
ENSG00000233013.4	FAM157B	L6B	0.31
ENSG00000245849.2	RAD51-AS1	L6B	0.31
ENSG00000270015.1	RP11-540B6.6	L6B	0.29
ENSG00000235919.3	ASH1L-AS1	L6B	0.28
ENSG00000227719.1	AC006042.6	L6B	0.27
ENSG00000247400.3	DNAJC3-AS1	L6B	0.27
ENSG00000215394.4	BMS1P18	L6B	0.25
ENSG00000230177.1	RP5-1112D6.4	L6B	0.25
ENSG00000249592.1	RP11-440L14.1	L6B	0.24
ENSG00000179523.4	EIF3J-AS1	L6B	0.23
ENSG00000271975.1	RP11-383J24.6	L6B	0.21
ENSG00000261172.1	RP11-356C4.5	L6B	0.19
ENSG00000247137.4	RP11-727A23.5	L6B	0.18
ENSG00000236859.2	AC018737.1	L6B	0.16
ENSG00000260276.1	RP11-77H9.2	L6B	0.16

ENSG00000206573.4	SETD5-AS1	L6B	0.15
ENSG00000263934.2	SNORD3A	L6C	1.59
ENSG00000236081.1	AC074389.9	L6C	1.30
ENSG00000250920.1	RP11-297P16.4	L6C	1.25
ENSG00000260552.1	RP11-49I11.1	L6C	0.82
ENSG00000257084.1	U47924.27	L6C	0.81
ENSG00000240990.5	HOXA11-AS	L6C	0.67
ENSG00000256940.1	RP11-783K16.5	L6C	0.63
ENSG00000243766.3	HOTTIP	L6C	0.48
ENSG00000245694.4	CRNDE	L6C	0.47
ENSG00000204528.3	PSORS1C3	L6C	0.39
ENSG00000228630.1	HOTAIR	L6C	0.36
ENSG00000247095.2	MIR210HG	L6C	0.26
ENSG00000269867.1	CTD-2583A14.8	L6C	0.11
ENSG00000273142.1	RP11-458F8.4	L6C	-0.01
ENSG00000267394.1	CTB-175E5.7	L6C	-0.19
ENSG00000267776.1	AC006116.24	L6C	-0.31
ENSG00000236933.1	RP11-439A17.7	L6C	-0.36
ENSG00000245060.2	LINC00847	L6C	-0.44
ENSG00000249456.1	RP11-298J20.4	L6C	-0.47
ENSG00000238039.1	AF011889.2	L6C	-0.49
ENSG00000232593.2	RP11-258C19.5	L6D	0.45
ENSG00000237250.3	RP11-193H5.1	L6D	0.24
ENSG00000230555.2	RP11-517P14.2	L6D	-0.12
ENSG00000214719.7	AC005562.1	L6D	-0.12
ENSG00000261801.1	LOXL1-AS1	L6D	-0.15
ENSG00000233903.2	Z83851.4	L6D	-0.16
ENSG00000230513.1	THAP7-AS1	L6D	-0.18
ENSG00000235314.1	LINC00957	L6D	-0.18
ENSG00000223813.2	AC007255.8	L6D	-0.20
ENSG00000273145.1	CITF22-92A6.1	L6D	-0.21

ENSG00000268087.1	CTC-429P9.2	L6D	-0.22
ENSG00000267322.1	SCARNA17	L6D	-0.26
ENSG00000224914.2	LINC00863	L6D	-0.26
ENSG00000267904.1	CTC-429P9.5	L6D	-0.27
ENSG00000196810.4	CTBP1-AS2	L6D	-0.27
ENSG00000259806.2	CTD-2196E14.4	L6D	-0.28
ENSG00000270017.1	CTD-2576F9.2	L6D	-0.29
ENSG00000263327.2	TAPT1-AS1	L6D	-0.35
ENSG00000245937.3	CTC-228N24.3	L6D	-0.36
ENSG00000175772.10	AC112229.7	L6D	-0.37
ENSG00000271359.1	RP11-84C13.1	L6D	-0.41
ENSG00000269481.1	CTD-2521M24.6	L6D	-0.47
ENSG00000273015.1	LINC00938	L6D	-0.49
ENSG00000272667.1	RP11-395A13.2	L6D	-0.50
ENSG00000272447.1	RP11-182L21.6	L6D	-0.53
ENSG00000267080.1	ASB16-AS1	L6D	-0.57
ENSG00000253982.1	CTD-2336O2.1	L6D	-0.57
ENSG00000239569.2	KMT2E-AS1	L6D	-0.59
ENSG00000236618.2	PITPNA-AS1	L6D	-0.60
ENSG00000163597.10	SNHG16	L6D	-0.60
ENSG00000254911.2	SCARNA9	L6D	-0.61
ENSG00000270081.1	RP5-935K16.1	L6D	-0.64
ENSG00000226137.3	BAIAP2-AS1	L6D	-0.66
ENSG00000233368.2	RP11-277L2.3	L6D	-0.68
ENSG00000264575.1	LINC00526	L6D	-0.68
ENSG00000265479.1	DTX2P1-UPK3BP1-PMS 2P11	L6D	-0.69
ENSG00000265091.1	RP11-835E18.5	L6D	-0.69
ENSG00000257167.2	TMPO-AS1	L6D	-0.72
ENSG00000204054.7	LINC00963	L6D	-0.72
ENSG00000236537.1	RP11-732M18.3	L6D	-0.73

ENSG00000270103.2	RNU11	L6D	-0.73
ENSG00000270170.1	NCBP2-AS2	L6D	-0.73
ENSG00000232533.1	AC093673.5	L6D	-0.74
ENSG00000262477.1	AC021224.1	L6D	-0.75
ENSG00000233223.2	AC113189.5	L6D	-0.75
ENSG00000255198.3	SNHG9	L6D	-0.77
ENSG00000214783.5	POLR2J4	L6D	-0.79
ENSG00000270726.1	AJ271736.10	L6D	-0.81
ENSG00000229874.2	RP11-312O7.2	L6D	-0.88
ENSG00000273432.1	RP5-1165K10.2	L6D	-0.95
ENSG00000261512.2	RP11-46D6.1	L6D	-1.01
ENSG00000270066.2	SCARNA2	L6D	-1.39
ENSG00000272933.1	RP11-47A8.5	L6D	-1.62
ENSG00000258486.2	RN7SL1	L6D	-2.31
ENSG00000259001.2	RPPH1	L6D	-2.48
ENSG00000250742.1	RP11-834C11.4	L6E	2.93
ENSG00000256039.1	RP11-291B21.2	L6E	1.04
ENSG00000235576.1	AC092580.4	L6E	0.96
ENSG00000253838.1	RP11-44K6.2	L6E	0.90
ENSG00000261520.1	DLGAP1-AS5	L6E	0.82
ENSG00000132832.5	RP11-445H22.3	L6E	0.74
ENSG00000261971.2	RP11-473M20.7	L6E	0.64
ENSG00000227619.1	RP11-492E3.2	L6E	0.57
ENSG00000273290.1	CTC-297N7.8	L6E	0.56
ENSG00000258521.1	RP11-638I2.9	L6E	0.55
ENSG00000239213.1	RP11-85F14.5	L6E	0.52
ENSG00000259834.1	RP11-284N8.3	L6E	0.46
ENSG00000229950.1	TFAP2A-AS1	L6E	0.46
ENSG00000267745.1	RP11-686D22.8	L6E	0.44
ENSG00000262222.1	RP11-876N24.4	L6E	0.32
ENSG00000206028.1	CTA-373H7.7	L6E	0.29

ENSG00000254287.1	RP11-44K6.4	L6E	0.27
ENSG00000225783.2	MIAT	L6E	0.26
ENSG00000263013.1	RP11-876N24.5	L6E	0.25
ENSG00000203362.2	RP3-337H4.8	L6E	0.22
ENSG00000267074.1	RP11-1094M14.5	L6E	0.21
ENSG00000249746.1	RP11-254I22.3	L6E	0.16
ENSG00000261270.1	RP11-325K4.3	L6E	0.07
ENSG00000235437.3	RP11-357C3.3	L6E	-0.79
ENSG00000272620.1	AFAP1-AS1	L6E	-0.86
ENSG00000268913.1	AC026806.2	L6E	-0.95
ENSG00000238142.1	RP11-108M9.4	L6E	-1.02
ENSG00000261123.1	RP11-304L19.3	L6E	-1.29
ENSG00000259933.2	RP11-304L19.1	L6E	-1.37
ENSG00000272763.1	RP11-357H14.17	L6E	-1.43
ENSG00000272761.1	RP11-572C15.6	L6F	2.02
ENSG00000269936.2	MIR145	L6F	1.72
ENSG00000203706.4	SERTAD4-AS1	L6F	1.17
ENSG00000268388.1	FENDRR	L6F	1.07
ENSG00000255248.2	RP11-166D19.1	L6F	1.04
ENSG00000249669.3	MIR143HG	L6F	0.92
ENSG00000237125.4	HAND2-AS1	L6F	0.77
ENSG00000224958.1	PGM5-AS1	L6F	0.76
ENSG00000267047.1	RP11-589P10.7	L6F	0.74
ENSG00000166770.6	ZNF667-AS1	L6F	0.66
ENSG00000261625.1	RP11-554A11.4	L6F	0.60
ENSG00000253864.1	AC131025.8	L6F	0.59
ENSG00000250734.2	RP11-404E16.1	L6F	0.58
ENSG00000234638.1	AC053503.6	L6F	0.47
ENSG00000180139.10	ACTA2-AS1	L6F	0.46
ENSG00000235501.1	RP4-639F20.1	L6F	0.44
ENSG00000269186.1	LINC01082	L6F	0.43

ENSG00000230148.4	HOXB-AS1	L6F	0.42
ENSG00000230630.1	DNM3OS	L6F	0.39
ENSG00000272755.1	RP11-326G21.1	L6F	0.37
ENSG00000228221.1	LINC00578	L6F	0.37
ENSG00000225986.1	RP3-340N1.5	L6F	0.33
ENSG00000262879.1	RP11-156P1.3	L6F	0.32
ENSG00000259248.1	USP3-AS1	L6F	0.27
ENSG00000234456.3	MAGI2-AS3	L6F	0.27
ENSG00000258441.1	LINC00641	L6F	0.26
ENSG00000261534.1	RP11-244O19.1	L6F	0.26
ENSG00000269044.1	CTC-429P9.3	L6F	0.24
ENSG00000255455.2	RP11-890B15.3	L6F	0.23
ENSG00000267532.2	MIR497HG	L6F	0.21
ENSG00000250360.1	CTD-2089N3.1	L6F	0.21
ENSG00000267082.1	CTC-510F12.2	L6F	0.18
ENSG00000224739.2	AC016735.1	L6F	-0.18
ENSG00000260711.1	RP11-747H7.3	L6F	-0.18
ENSG00000234286.1	AC006026.13	L6F	-0.20
ENSG00000238164.2	RP3-395M20.8	L6F	-0.21
ENSG00000267751.1	AC009005.2	L6F	-0.22
ENSG00000269609.1	RP11-18I14.10	L6F	-0.22
ENSG00000260196.1	RP1-239B22.5	L6F	-0.22
ENSG00000235823.1	LINC00263	L6F	-0.23
ENSG00000253716.1	RP13-582O9.5	L6F	-0.26
ENSG00000231770.1	TMEM44-AS1	L6F	-0.27
ENSG00000214293.4	RSBN1L-AS1	L6F	-0.29
ENSG00000225138.3	CTD-2228K2.7	L6F	-0.32
ENSG00000234155.1	RP11-30P6.6	L6F	-0.34
ENSG00000251603.1	RP11-164P12.4	L6F	-0.34
ENSG00000254837.1	AP001372.2	L6F	-0.40
ENSG00000227036.2	LINC00511	L6F	-0.43

ENSG00000234608.3	MAPKAPK5-AS1	L6F	-0.44
ENSG00000175061.13	C17orf76-AS1	L6F	-0.45
ENSG00000177410.8	ZFAS1	L6F	-0.51
ENSG00000233834.2	AC005083.1	L6F	-0.52
ENSG00000268006.1	PTOV1-AS1	L6F	-0.52
ENSG00000247271.2	ZBED5-AS1	L6F	-0.55
ENSG00000232677.2	LINC00665	L6F	-0.61
ENSG00000196696.8	PDXDC2P	L6F	-0.64
ENSG00000232445.1	RP11-132A1.4	L6F	-0.67
ENSG00000232956.4	SNHG15	L6F	-0.71
ENSG00000261183.1	RP11-532F12.5	L6F	-0.77
ENSG00000272141.1	RP11-465B22.8	L6F	-0.78
ENSG00000196756.7	SNHG17	L6F	-0.82
ENSG00000226950.2	DANCR	L6F	-0.82
ENSG00000261373.1	VPS9D1-AS1	L6F	-0.91
ENSG00000224259.1	RP11-48O20.4	L6F	-1.05
ENSG00000203499.6	FAM83H-AS1	L6F	-1.26
ENSG00000259187.1	CTD-2008A1.1	L6F	-1.55

[125]

[126] LNC6의 인구학적 및 임상학적 연관성

[127] TCGA 코호트에서 LNC6 아형은 성별, 민족, 종양 위치 및 암의 병기, 조직학적 등급 및 로렌 아형을 나타낸다(표 4). L6A 및 L6E 환자 대부분이 남성이었다(84% 및 100%). L6A 및 L6D 환자의 대부분은 서양 국가 환자이었다(96% and 92%). 민족에서의 그러한 차이는 위암의 분자적 아형에서는 발견할 수 없었다. L6A 환자가 종양의 근위부의 가장 높은 비율을 보였고 (36%), 반면 L6F 환자가 가장 낮은 비율을 보였다(10%). 흥미롭게도, 일반적으로 위암은 서양 국가에서 병기가 진행된 후 진단이 되지만, L6A 아형 종양은 상대적으로 낮은 암의 병기를 보였다. L6C 종양 또한 상대적으로 낮은 암의 병기를 보였으나, L6E 및 L6F 종양은 높은 병기와 조직학적 등급을 보였다. 마지막으로, L6F 아형은 로렌 분류에서 미만성 아형이 풍부하였다.

[128]

[129] [표4]

LNC6	L6A	L6B	L6C	L6D	L6E	L6F	n
나이, 평균 (SD)	66.2 (10.3)	66.2 (9.7)	68.5 (10.0)	68.9 (9.9)	62.6 (12.3)	60.2 (10.5)	258
남성	21/25 (84%)	45/66 (68%)	24/51 (47%)	26/51 (51%)	14/14 (100%)	29/51 (57%)	258
서양 기원(Western origin)	24/25 (96%)	47/66 (71%)	29/51 (57%)	47/51 (92%)	9/14 (64%)	37/51 (73%)	258
근위부(Proximal location)	9/25 (36%)	14/66 (21%)	9/51 (18%)	8/43 (19%)	3/14 (21%)	5/51 (10%)	250
T3/4	7/25 (28%)	48/66 (73%)	38/50 (76%)	24/44 (55%)	13/14 (93%)	44/51 (86%)	250
N1-3	18/25 (72%)	42/66 (64%)	26/50 (52%)	31/41 (76%)	10/14 (71%)	35/50 (70%)	246
M1	0/25 (0%)	4/62 (6%)	1/48 (2%)	7/48 (15%)	1/12 (8%)	3/51 (6%)	246
AJCC 암기 III/IV	8/25 (32%)	30/66 (45%)	16/51 (31%)	21/51 (41%)	8/14 (57%)	31/51 (61%)	240
조직학적 등급 3	12/25 (48%)	34/64 (53%)	32/51 (63%)	31/51 (61%)	14/14 (100%)	43/48 (90%)	253
로렌 미만형(Lauren Diffuse type)	5/25 (20%)	7/66 (11%)	3/51 (6%)	11/51 (23%)	3/13 (23%)	34/49 (69%)	247

[130]

[131] LNC6 아형의 진단적 중요성

[132] TCGA 코호트에서 후속 조치 기간의 단축으로, 독립적 일반 GC 코호트(Total n = 1,933)에서 LNC6 아형의 진단적 관계를 평가하였다. 먼저, TCGA 코호트로부터 LNC6 아형 특이적 mRNA 유전자 발현 시그니처를 추출하였다(도 2a). 이후 예측 모델을 설계하기 위하여 BCCP 알고리즘을 시행하였고(도 2b), 각 시그니처의 강도를 평가하였다. TCGA 코호트에서 각 시그니처의 베이직한 확률의 ROC 분석 결과 AUC는 0.9143 내지 0.9845에 해당하였다. 이러한 로버스트 예측 모델(robust prediction model)을 일반 GC 코호트 데이터셋에 적용하였다. 이때 상기 데이터셋에서 mRNA 유전자 발현 및 생존 데이터는 이용 가능하다. 상기한 예측 모델로 환자를 계층화 하였을 때, OS와 RFS에서

비슷한 생존 패턴을 보였다(도 2c). L6A 및 L6F 아형은 나쁜 예후와 상관 관계가 있고, 다음으로 L6B 및 L6D 아형이 상관 관계가 있었다. L6C 및 L6E 아형은 좋은 예후와 상관 관계가 있었다. 이를 통해 위암의 임상적 결과는 lncRNA 발현 패턴을 반영한 전사적 특징에 기인한 것을 알 수 있었다.

[133]

[134] LNC6 아형 및 보조 항암 화학 요법

[135] 반 이상의 환자가 표준 보조 항암 화학 요법을 받은 코호트에서 LNC6 아형과 보조 항암 화학 요법으로 인한 임상적 이점 사이 상관 관계를 조사하였다(도 3). L6A ($P=0.025$), L6B ($P=0.03$), 및 L6D ($P=0.057$) 아형이 보조 항암 화학 요법에 대하여 이점을 보이는 반면, L6C 아형($P=0.51$)의 경우 보조 항암 화학 요법에 대하여 이점이 없는 것을 볼 수 있었다. 상피 및 중간엽 표현형의 두가지 구분되는 분자적 아형은 보조 항암 화학과의 상호 작용을 입증하므로, 이러한 두가지 분자적 아형과 LNC6 아형 사이 관련성을 분석하였다. 상피 표현형(epithelial phenotype; EP)은 L6B 및 L6C에서 풍부한 반면, 중간엽 표현형(mesenchymal phenotype; MP)은 L6F에서 풍부하였다(도 4a). EP 아형 종양을 가진 환자는 보조 항암 화학 요법에서 이점을 가지는 주된 아형이므로, EP 아형의 서브세트 분석을 수행하였다. L6C 아형 환자의 경우 보조 항암 화학 요법에 어떠한 이점도 보이지 않은 반면($P=0.76$), L6C 아형에 속하지 않는 환자는 보조 항암 화학 요법에 우수한 이점을 보였다($P<0.0001$) (도 4b). 콕스 회귀 모델에 적용하는 상호 작용 실험을 수행하여 두 군 사이에서 보조 항암 화학 요법의 영향의 차이점을 평가하였고, 상호 작용은 유의성을 보였다($P=0.01$ by likelihood ratio test). 화학 반응에 민감한 것으로 알려진 EP 아형 종양의 서브세트인 L6C 아형 종양은 보조 항암 화학 요법에 이점을 보이지 않았으나, lncRNA 발현 패턴은 EP 아형을 임상적 관련된 아형으로 추가로 세분할 수 있음을 알 수 있었다.

[136]

[137] LNC6 아형 및 면역 치료

[138] 펙트롤리주맵으로 처리된 전이성 위암 환자의 코호트로부터 lncRNA 발현데이터를 이용하여 LNC6 아형과 면역 치료에 대한 임상적 이점 사이 상관 관계를 분석하였다. TCGA 코호트에서 아형 특이적 lncRNA의 발현 데이터에 기반하여 예측 모델을 설계하였다. L6C (46%) 및 L6E (100%) 아형은 면역 치료에 대한 치료 반응성이 좋았으나, 다른 아형의 경우 치료 반응성이 나빴다($\leq 25\%$) (도 5a). 임상적 반응은 L6C ($P=0.012$) 및 L6F ($P=0.016$) 아형의 예측되는 확률과 매우 높은 상관 관계를 보였다(도 5b-c). L6C 확률은 면역 치료에 대한 반응의 긍정적 예측 표지에 해당하는 반면, L6F 확률은 면역 치료에 대한 반응의 부정적 예측 표지에 해당한다. 아마도 트레이닝 시료(training samples)에서 L6E 아형의 적은 수로 인하여 편차가 0 또는 1에 해당하여, L6E 아형의 예측되는 확률이 면역 치료 반응자와 비반응자를 계층화하지

못하였더라도, L6E 아형에서 특이적으로 상향 조절된 lncRNA의 GSEA가 성공적으로 면역 치료 반응자와 비반응자를 계층화하였다($P=0.00021$) (도 5d). 따라서, lncRNA 발현 패턴을 고려함으로써 위암에서 면역 치료 반응성의 예측 값을 더할 수 있다. LNC6 아형에서 종양 미세 환경의 기본적인 면역적 특징을 보다 잘 이해하기 위하여, 유전자 시그니처-기반 방법에 의해 전사체로부터 세포 서브세트를 열거하였다. L6E 종양에서 골수성 및 림프성 면역 세포가 풍부한 것으로 예측되었는 바, 이로부터 L6E 종양에서 활동적인 면역 반응이 있음을 알 수 있었다(도 6a). 반면에, L6F 종양은 기질 세포층, 림프성 상피 세포, 섬유아세포, 연골 세포, 혈관 주위 세포 및 지방 세포로 이루어지는 것으로 예측되는 바, L6F 종양에서 면역 반응이 제한되어 있는 것을 알 수 있었다(도 6b).

[139]

[140] 위암 세포주에서 lncRNA에 의해 중재되는 줄기세포 유사 특징들

[141] L6F 아형이 나쁜 예후, 조기 재발 및 항암 화학 요법에 대한 내성과 같은 임상적 결과와 가장 유의적 연관성을 보이므로, LNC6 아형 중 특정 lncRNA가 임상적 관련된 표현형에 연관이 있는지 확인하였다. 먼저, L6F 아형에 대한 BCCP 예측자를 29개 위암 세포주로부터의 lncRNA 발현 데이터에 적용함으로써 L6F-유사 위암 세포주를 규명하였다. L6F 확률은 상피-중간엽 전이 아형(epithelial-mesenchymal transition (EMT) subtype)과 높은 상관 관계를 보였고(도 7a). qRT-PCR을 이용하여 RNA 시퀀싱 데이터로부터 얻어진 결과에 의해 선별된 L6F 아형에서 특이적으로 상향 조절된 5개의 lncRNA의 발현을 확인하였다. 하기 표 5에 나타낸 이들 lncRNA의 발현은 비-EMT 아형 세포주($n=3$)에 비하여 EMT 아형 세포주($n=3$)에서 평균 발현 수준이 높았다. 특히, ZNF667-AS1 (ENSG00000166770.6)는 시료의 소수에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다. EMT 아형 세포주에서 siRNA를 이용하여 ZNF667-AS1를 녹다운한 결과, 세포의 침윤성 및 이동능을 감소시켰다(도 7b 및 7c-7e). 더욱이, ZNF667-AS1 사일런싱(silencing)에 의해 E-카데린(E-cadherin)의 발현이 증가되고, N-카데린(N-cadherin) 및 비멘틴(vimentin)의 발현이 감소되었는 바, 상기 EMT 아형 세포들이 중간엽 특성을 잃고, 상피적 특성을 얻은 것을 알 수 있었다(도 7f). 이로써, ZNF667-AS1가 위암 세포주의 EMT 표현형에 관련성이 높은 것을 알 수 있었다. 이를 통해 ZNF667-AS1를 사일런싱함으로써 EMT 위암 세포주의 옥살리플라틴 및 5-FU에 대한 감수성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다(도 7f 및 7g).

[142]

[143] [표5]

아형	세포주	RP11-57 2C15.6	ZNF667- AS1	MAGI2- AS3	FENDR R	ACTA2- AS1
EMT	MKN1	-11.99	-8.29	-13.32	-9.90	-13.51
	SNU1750	-12.87	-6.46	-9.94	-13.52	-14.29
	SNU484	-15.06	-2.56	-11.80	-16.18	-12.94
non-EM T	YCC3	-22.26	-10.62	-7.66	-12.98	-13.92
	SNU719	-15.00	-11.07	-13.27	-13.81	-14.92
	MKN74	-16.68	-11.42	-16.44	-15.40	-14.38
	평균 배수 변화	4.67	5.27	0.77	0.86	0.83
	<i>P</i> value (Student's t-test)	0.12	0.04	0.79	0.68	0.17

[144]

[145] LNC6 아형의 생물학적 영향

[146] LNC6 아형의 생물학적 특성을 규명하기 위하여, GSEA(Gene set enrichment analysis) 및 IPA(ingenuity pathway analysis)를 수행하였다(도 8, 표 6 및 7). L6A 아형은, 당화, 산화적 인산화 및 지방산 대사와 같은 대사 경로의 활성화를 통해 나타내었다. 간 세포 핵 인자(Hepatocyte nuclear factor-4 α ; HNF4 α)가 가장 중요한 L6A의 상류 조절자인 것으로 예측되었다. L6C 아형은 G2M 체크포인트(checkpoint), E2F 타겟, DNA 수선(repair), MYC 타겟 및 MTORC1 신호의 활성화와 관련되어 있고, L6D 아형은 단백질 방출 및 KRAS 신호의 활성화와 관련되어 있다. L6E 아형은 L6E 아형의 활성화된 면역을 유지시키는 인터페론 반응의 활성화와 관련되어 있다. 가장 특징적으로, L6F 아형은 Wnt/ β -카테닌(Wnt/ β -catenin) 신호, TGF- β 신호, EMT, 및 혈관 신생의 활성화와 관련된다. 또한, EMT의 주 조절자에 해당하는 TGF- β 및 Twist1는 L6F 아형의 상류 조절자로 알려져 있다.

[147] LNC6 아형의 줄기세포능을 평가하기 위하여, 마우스에서 위 발달 과정 중 다르게 발현되는 전사 인자의 발현 패턴을 확인하였다(도 9). 초기 배아 단계에서 과발현되는 전사인자는 L6F 아형, 다음으로 L6B 아형에서 발현이 상향 조절되었는 바, 이를 통하여 이들 아형이 줄기세포능을 갖는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 L6F 아형의 활성화된 생물학적 경로와 L6F 아형의 나쁜 예후 사이의 상관 관계를 알 수 있었다. 한편, 후기 배아 단계 또는 성숙 단계에서 과발현되는 전사인자는 LNC6 아형들 사이에서 다르게 발현되지 않았다. 또한, S-기에서 풍부 lncRNA의 발현 패턴을 조사한 결과, S-기 lncRNA는 L6D 및 L6F에서 그 발현이 하향 조절되었으나, L6B에서는 상향 조절된 것을 볼 수 있었다(도 10).

이는 줄기세포의 휴지 특징(quiescent feature)과 EMT 시그니처와 증식 시그니처 사이의 음성 상관관계에 의한 것이다.

[148]

[149] [표6]

LNC6	Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	zScore	Ratio
L6A	Sumoylation Pathway	2.96	-1.94	15.6%
	DNA Double-Strand Break Repair by Non-Homologous End Joining	2.89	NaN	35.7%
	Stearate Biosynthesis I (Animals)	2.80	1.67	20.5%
	EIF2 Signaling	2.50	-2.84	11.4%
	Acyl-CoA Hydrolysis	2.27	0.00	33.3%
L6B	Type I Diabetes Mellitus Signaling	4.07	-1.63	8.1%
	Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	3.81	-2.00	15.6%
	Antigen Presentation Pathway	3.45	NaN	13.2%
	CD28 Signaling in T Helper Cells	3.45	-2.00	6.7%
	Nur77 Signaling in T Lymphocytes	3.41	NaN	10.2%
L6C	Regulation of Actin-based Motility by Rho	4.32	1.00	10.1%
	RhoGDI Signaling	3.88	0.30	6.9%
	Glucocorticoid Receptor Signaling	2.99	NaN	4.6%
	Integrin Signaling	2.96	-0.30	5.4%
	GP6 Signaling Pathway	2.96	-2.33	6.7%
L6D	Protein Ubiquitination Pathway	5.43	NaN	15.5%
	Estrogen Receptor Signaling	4.84	NaN	18.7%
	Sirtuin Signaling Pathway	4.62	-1.33	14.4%
	Cleavage and Polyadenylation of Pre-mRNA	4.00	NaN	50.0%
	mTOR Signaling	3.86	0.00	14.9%
L6E	MSP-RON Signaling Pathway	4.25	NaN	17.6%
	Calcium Transport I	4.24	0.45	50.0%
	Sperm Motility	3.76	-1.60	13.3%
	Interferon Signaling	3.54	2.12	22.2%
	Endothelin-1 Signaling	3.49	-1.09	11.1%

L6F	Axonal Guidance Signaling	10.60	NaN	20.1%
	cAMP-mediated signaling	10.50	5.53	25.6%
	Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	9.48	NaN	26.3%
	G-Protein Coupled Receptor Signaling	8.69	NaN	22.3%
	Gαi Signaling	7.44	2.83	27.9%

[150] [표7]

LNC6	상류 조절자	p-value of overlap	예측 활성 상태	Activation z-score
L6A	HNF4A	8.92E-08		1.844
	CD24	1.49E-06	억제	-4.126
	CST5	1.21E-03		1.768
	ESR1	1.41E-03	억제	-5.532
	TCOF1	2.00E-03		
L6B	SAFB	2.81E-05		1.673
	interferon beta-1a	3.47E-05		
	Sod	1.45E-04	활성화	2
	EBI3	2.28E-04		-0.685
	CIITA	4.81E-04		-0.41
L6C	ERBB2	2.91E-05		-1.327
	Rhox4b (includes others)	1.36E-04		
	Histone h3	2.59E-04		
	Ctbp	3.36E-04		
	MM-401	3.70E-04		
L6D	HNF4A	3.68E-14		-1.604
	mir-149	4.33E-04		
	miR-16-5p (and other miRNAs w/seed AGCAGCA)	7.60E-04	억제	-2.896
	tunicamycin	1.27E-03		1.467
	ONECUT1	1.44E-03		
L6E	PHF1	1.87E-08	활성화	2.219
	KAT6A	3.16E-08	억제	-3.231
	CDX2	2.13E-07	억제	-2.762
	COMMD3-BMI1	4.93E-07	활성화	2.891
	STAT5A	8.44E-07		-1.145

L6F	TGFB1	4.10E-29	활성화	7.428
	ERBB2	1.20E-22	억제	-2.928
	TGFB3	1.15E-20	활성화	4.795
	beta-estradiol	2.69E-19	활성화	3.139
	TWIST1	1.17E-18	활성화	4.508

[151]

[152] LNC6 아형의 게놈 배경

[153] TCGA 데이터로부터 게놈 및 프로테옴 데이터를 이용하여 LNC6 아형의 분자적 특성을 더욱 조사하였다. L6B 아형을 고복제수 변화로 정의하였고, 일부의 유전자만 LNC6 아형 사이에서 다르게 발현되었다(도 11a). L6C 아형은 높은 돌연변이 부하(high mutation burden)로 특징지어지며, LNC6 아형 사이에서 많은 유전자가 다르게 돌연변이 되었다(도 11b). L6E 아형은 과메틸화 패턴에 의해 특징지어지며(도 12a), L6F 아형은 miRNA 및 단백질의 가장 구분되는 발현 패턴(도 12b 및 12c)과 재발성 (15.4%) CLDN18-ARHGAP 융합으로 특징지어진다. 또한, 아형-특이적 lncRNA의 후생적 배경 및 규명된 후생적 조절된 lncRNAs에 대하여 확인하였다(도 13).

[154]

[155] 다른 분자적 아형의 유사도

[156] 위암의 다른 분자적 아형에 대한 LNC6의 유사도를 확인하였다(도 6). L6A 및 L6B 아형은 염색체 불안정성(chromosomal instability; CIN) 및 미세부수체 안정성(microsatellite stability; MSS) 아형에서 풍부하였다. L6C 아형은 미세부수체 불안정성(microsatellite instability; MSI) 아형에서 풍부하였고, L6D 아형은 다수의 다른 분자적 아형과 혼합되어 있었다. L6E 아형은 100% Epstein-Barr virus(EBV) 아형에 해당하였고, L6F 아형은 유전적으로 안정(genomically stable; GS)한 아형, MP 아형 및 EMT 아형에서 풍부하였다.

[157]

[158] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

산업상 이용가능성

[159] 본 발명은 암 중에서도 특히 위암을 예방 또는 치료하거나, 위암 세포의 침윤성 또는 전이성을 억제할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

청구범위

- [청구항 1] ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 암은 위암, 난소암, 대장암, 유방암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 발현 억제제는 서열번호 5 및 6으로 표시되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 5] ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 암의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서,
상기 암은 위암, 난소암, 대장암, 유방암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암,

연조직 육종, 요도암, 음경암, 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인, 약학적 조성물.

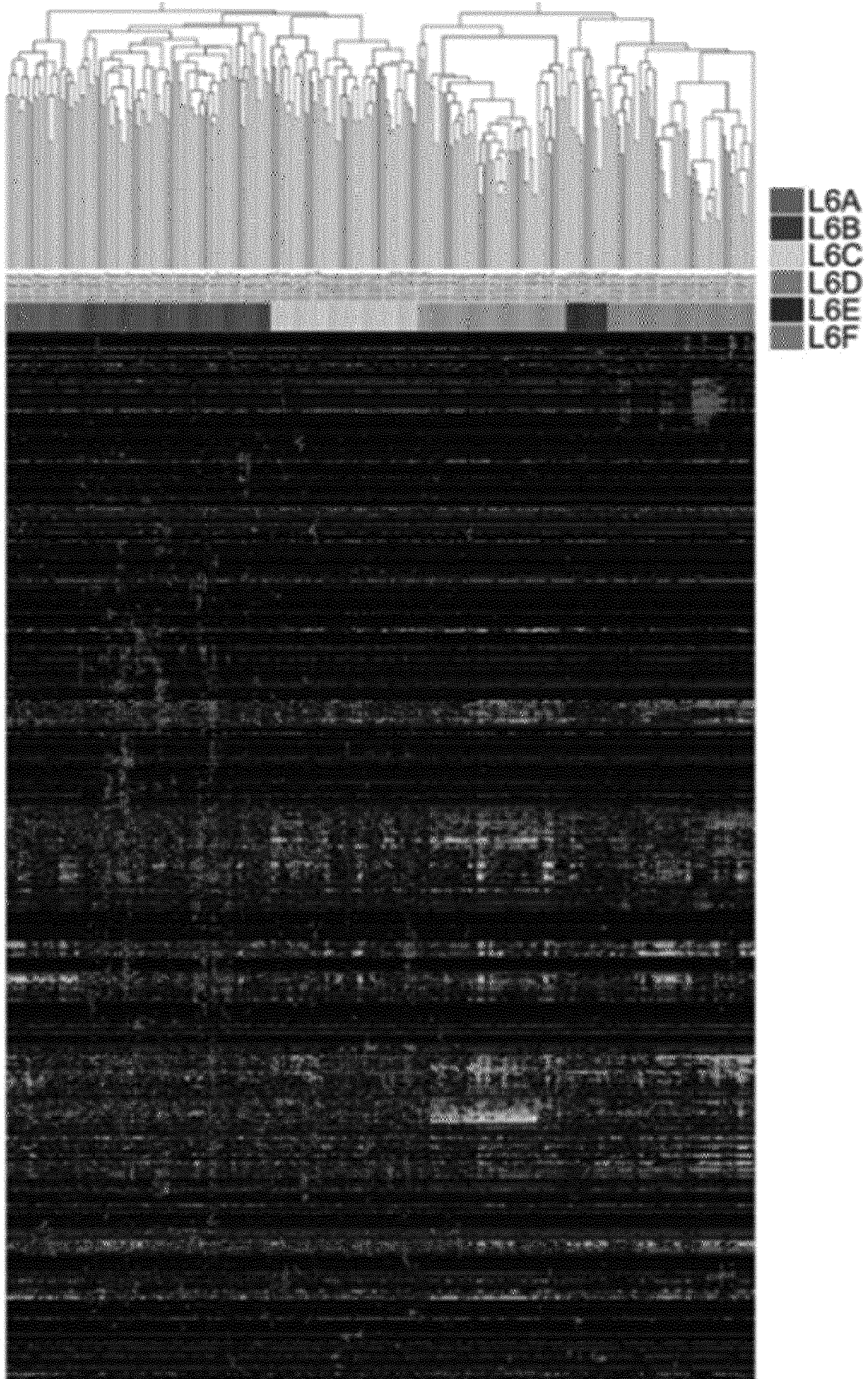
- [청구항 8] 제5항에 있어서,
상기 발현 억제제는 서열번호 5 및 6으로 표시되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 9] ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 내성암의 내성 극복용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 암은 위암, 난소암, 대장암, 유방암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인, 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 발현 억제제는 서열번호 5 및 6으로 표시되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제9항에 있어서,
상기 내성암은 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조밂, 수니티닙, 카보플라틴, 소라페닙, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스쿰알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀륨 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 카페시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼,

랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 데모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스트라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴, 보리노스텍, 엔티노스텍, 5FU 및 카르무스틴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 약물에 대한 내성을 가진 암인, 약학적 조성물.

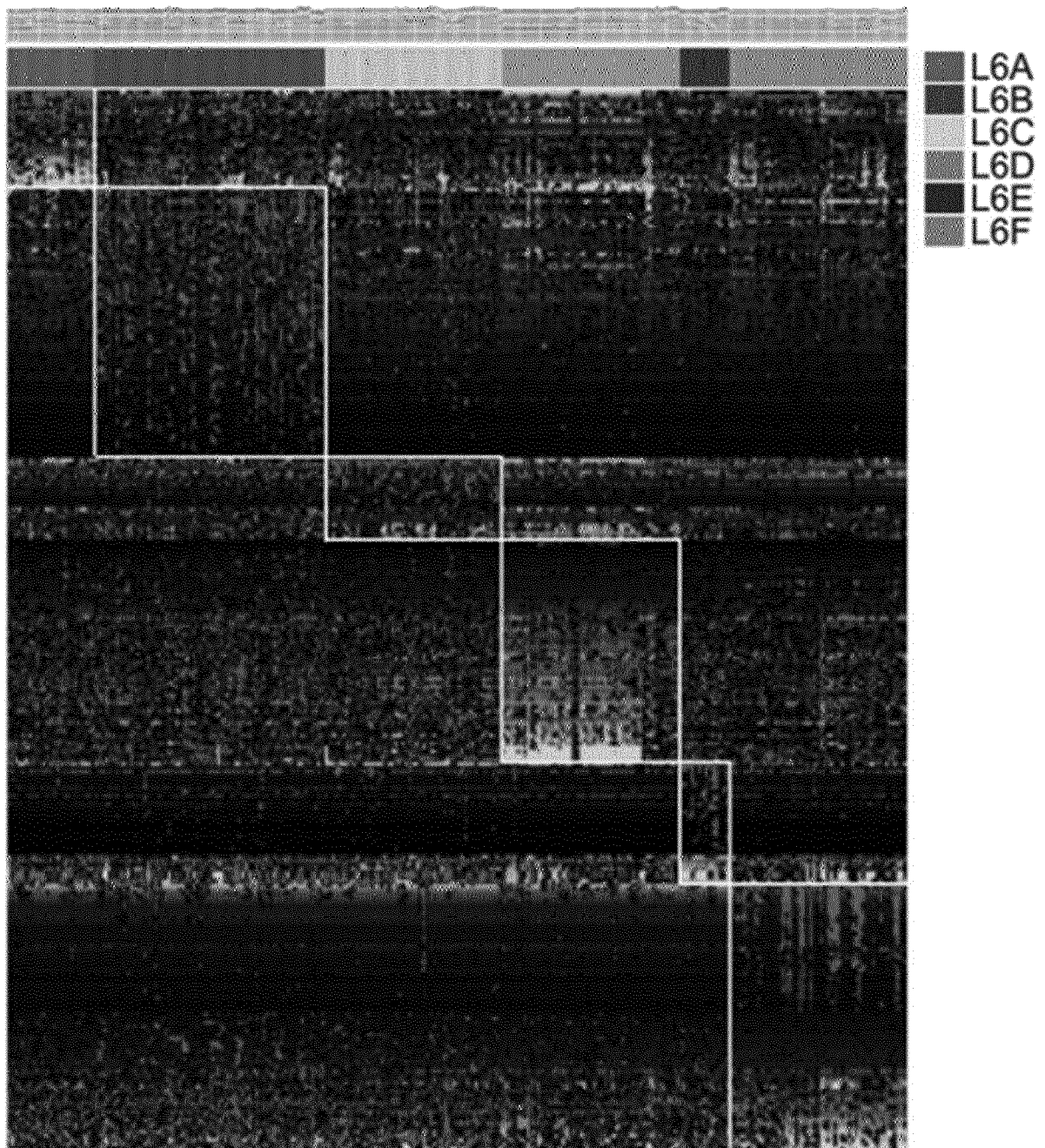
- [청구항 14] ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 내성암 또는 전이암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 15] ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 항암제에 대한 감수성 증진용 약학적 조성물.
- [청구항 16] 투여가 필요한 개체에, ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 17] 투여가 필요한 개체에, ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 암의 침윤성 또는 전이성 억제 방법.
- [청구항 18] 투여가 필요한 개체에, ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 내성암의 내성 극복 방법.
- [청구항 19] 투여가 필요한 개체에, ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding

- Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 내성암 또는 전이암의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 20] 투여가 필요한 개체에게, ZNF667-AS1(ZNF667 Antisense RNA 1 (Head To Head)), RP11-572C15.6, FENDRR(FOXF1 Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA) 및 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 중 적어도 하나에 특이적인 발현 억제제를 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 항암제에 대한 감수성 증진 방법.

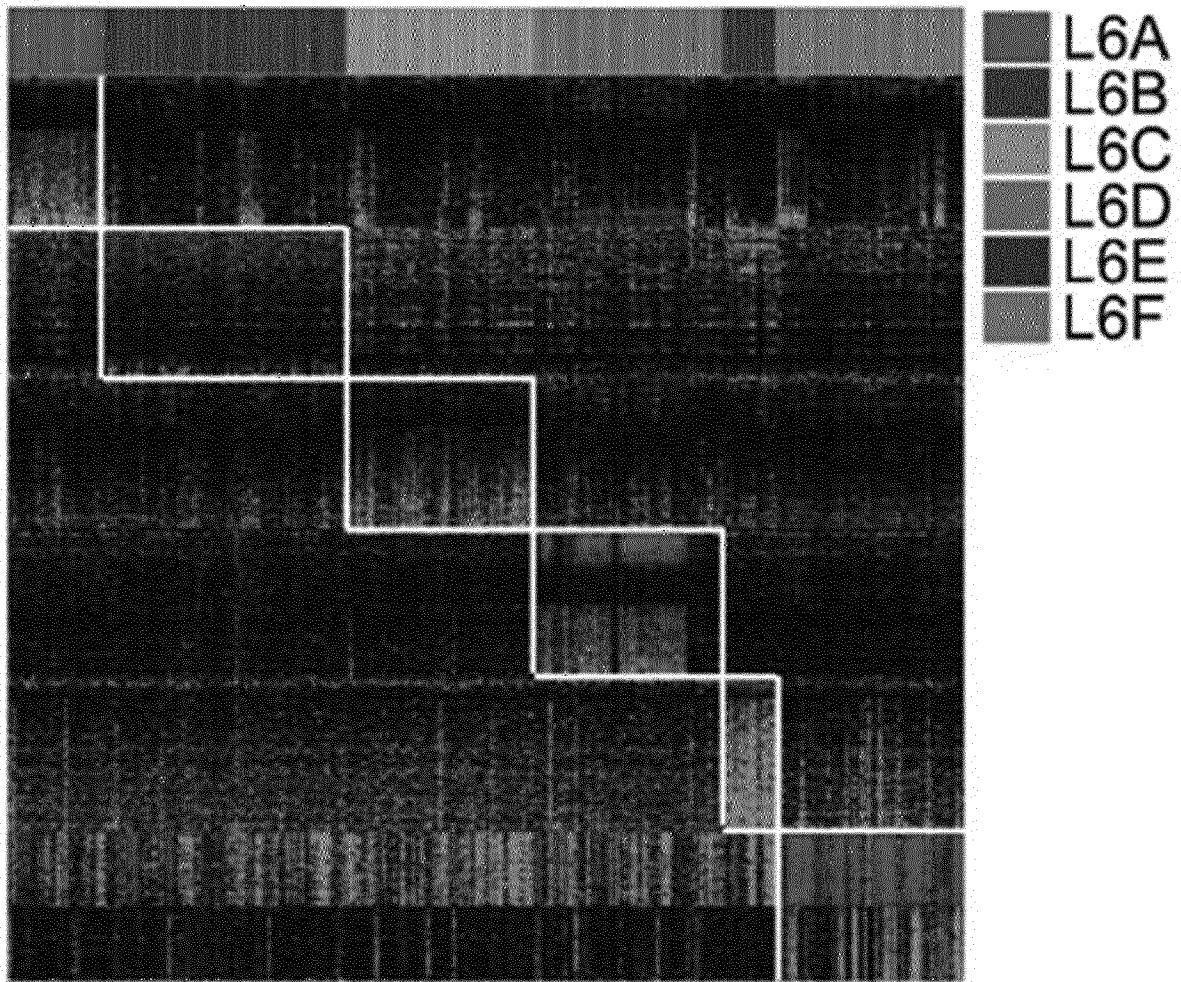
[도 1a]



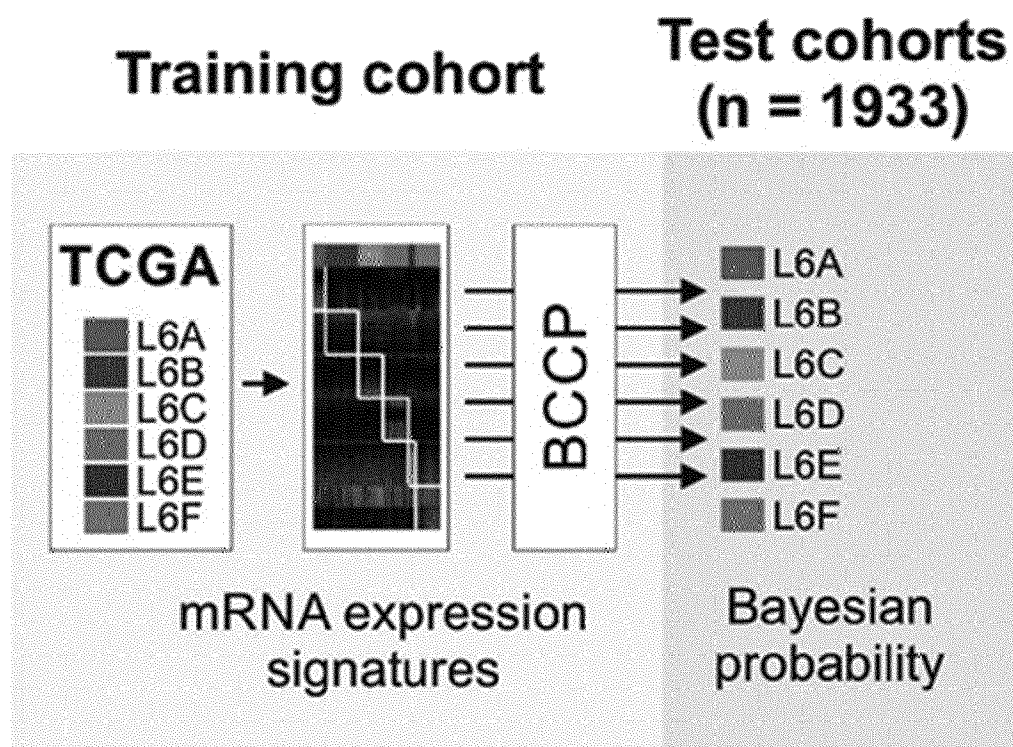
[도 1b]



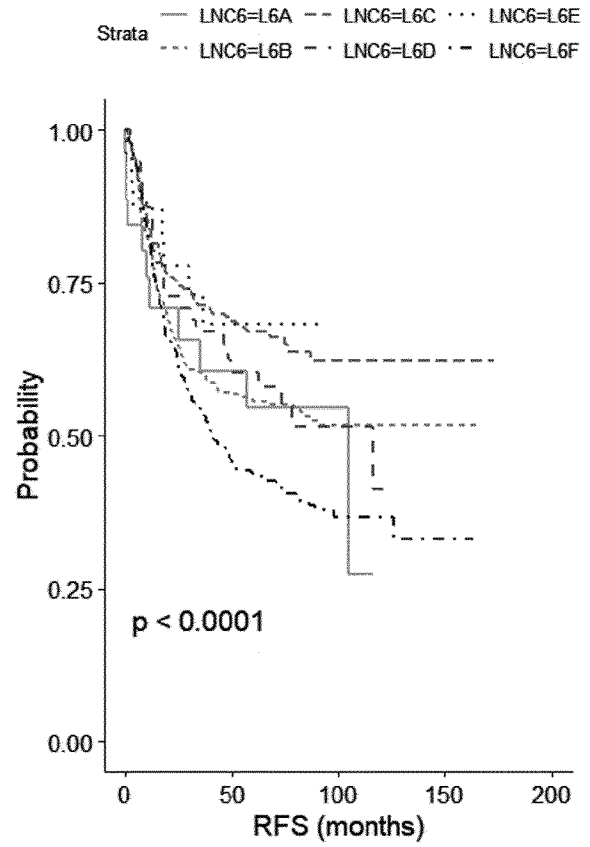
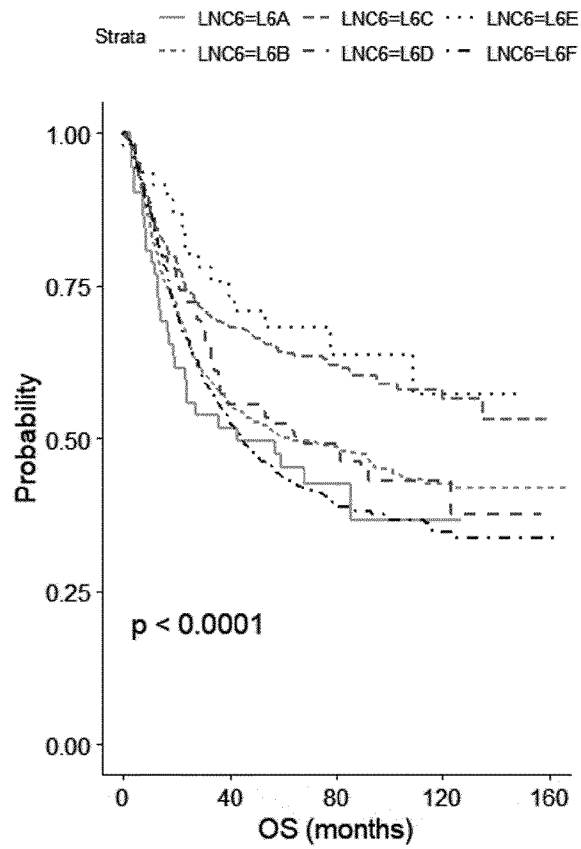
[도2a]



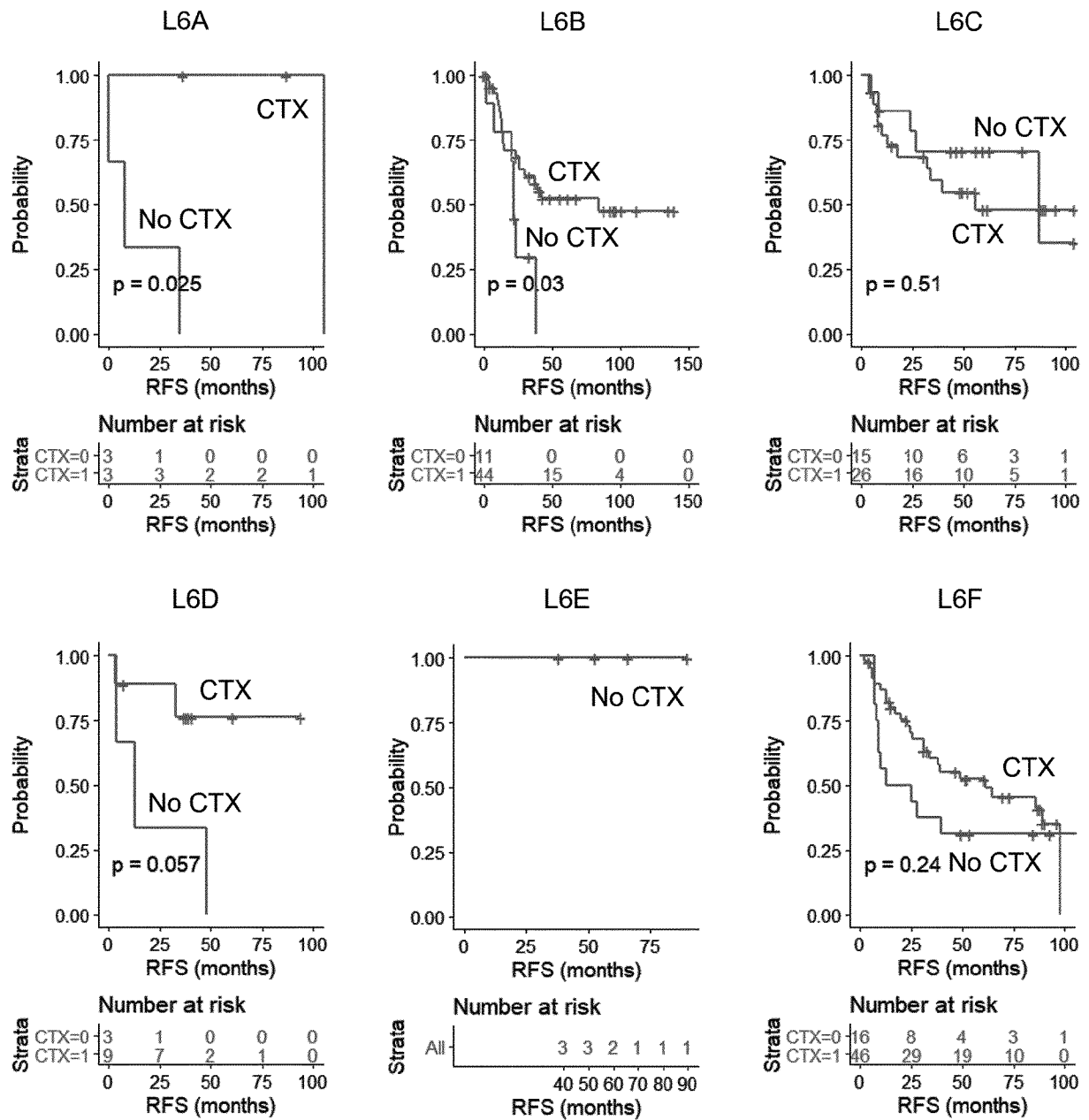
[도2b]



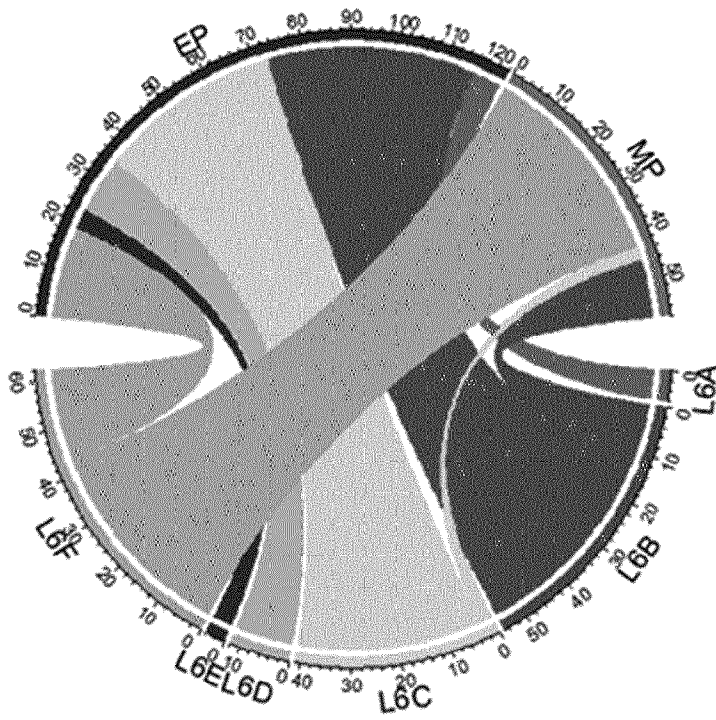
[도2c]



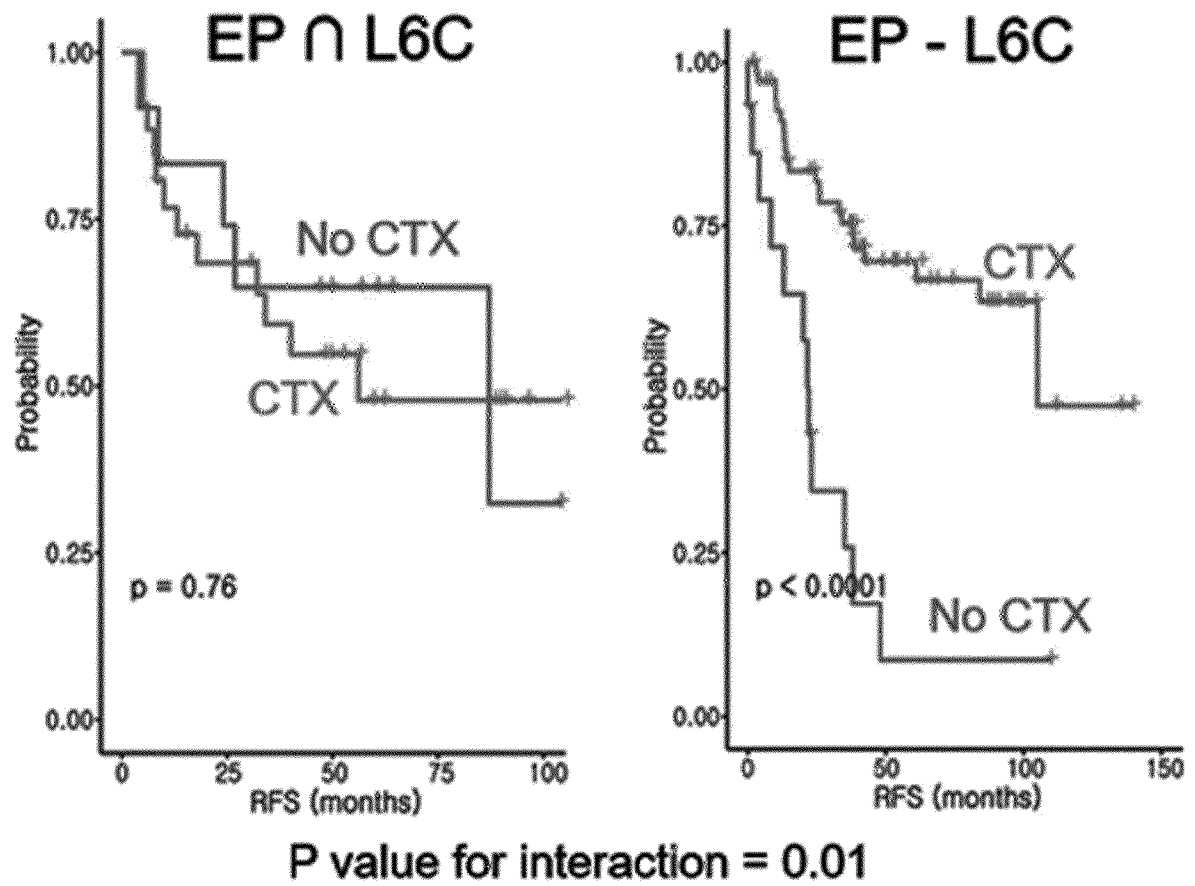
[도3]



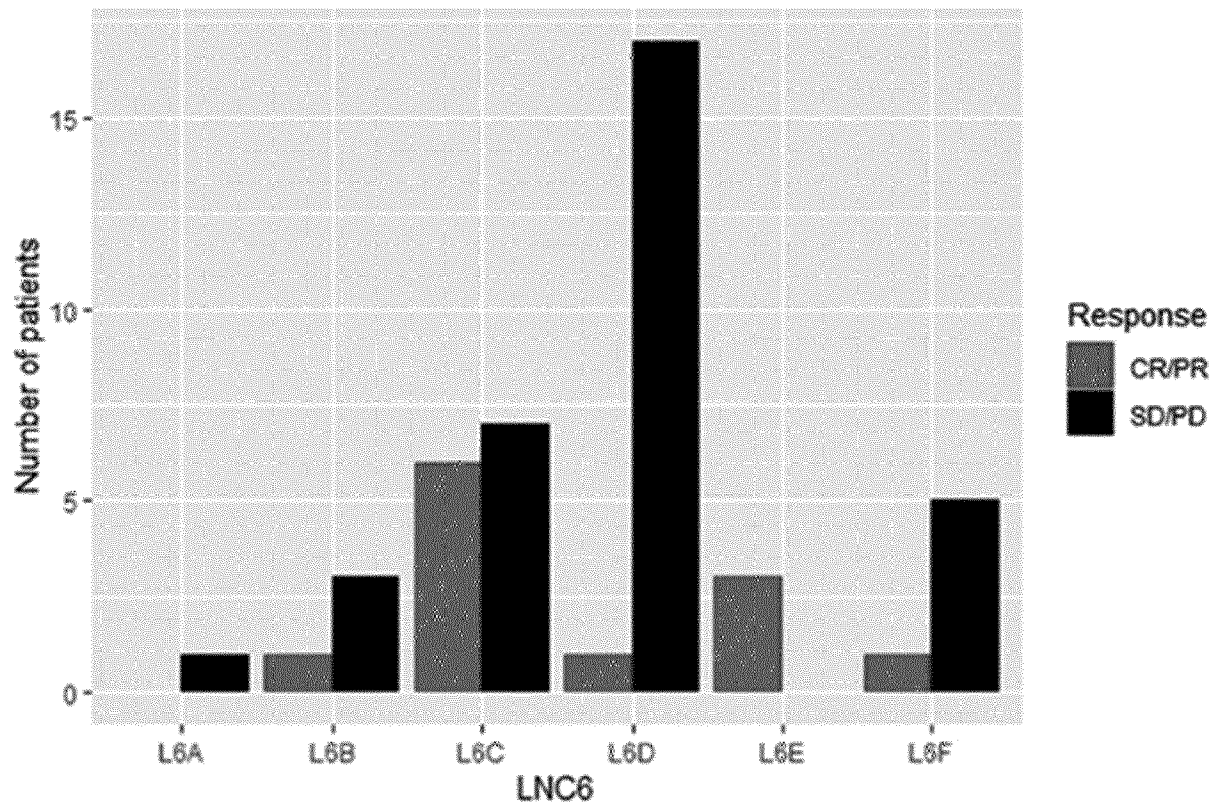
[도4a]



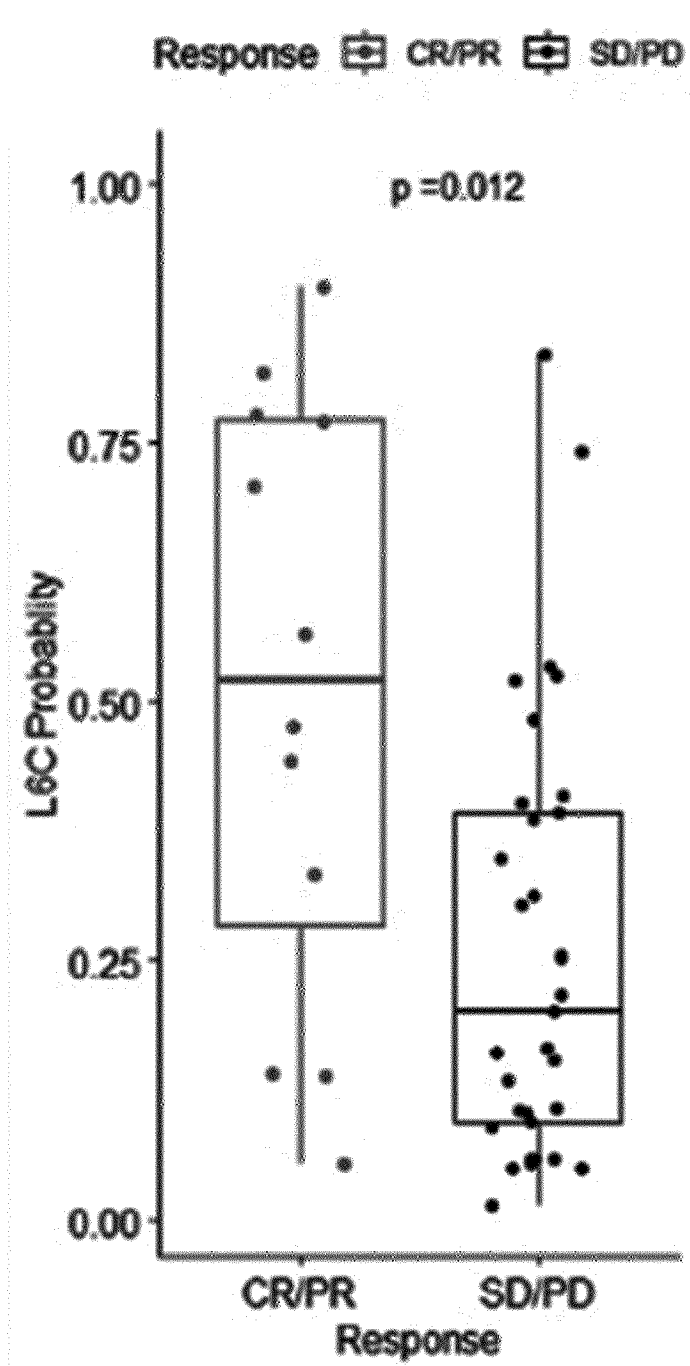
[도4b]



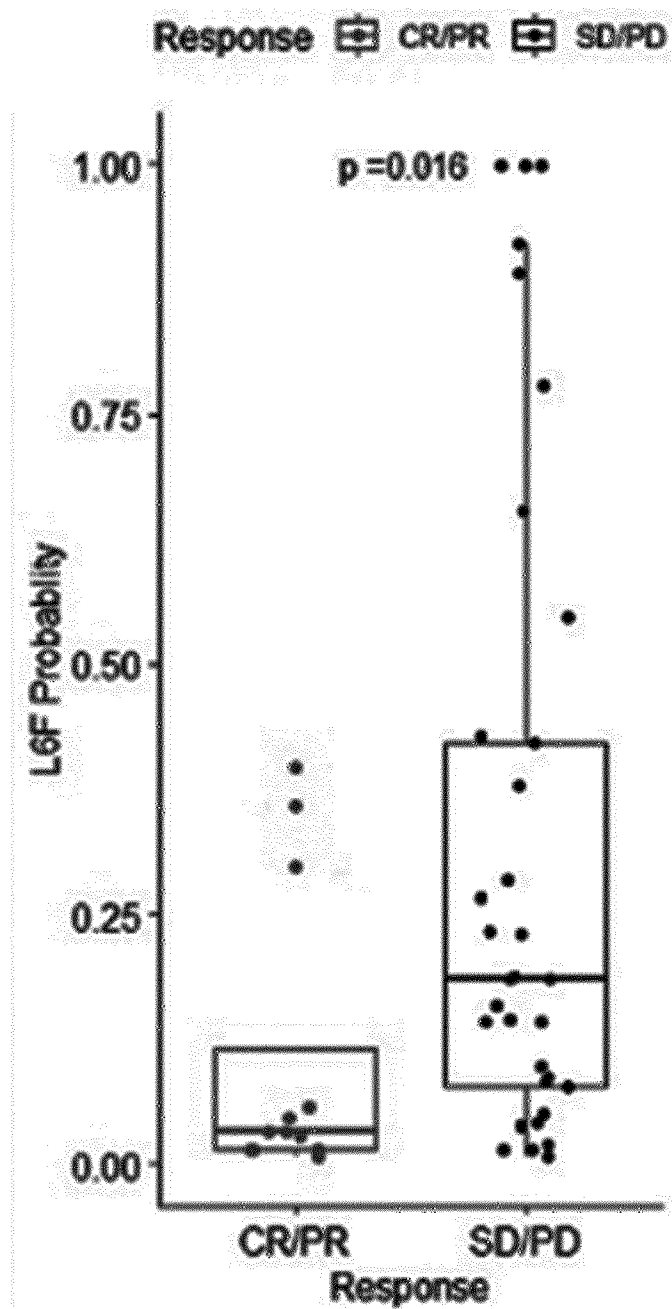
[도5a]

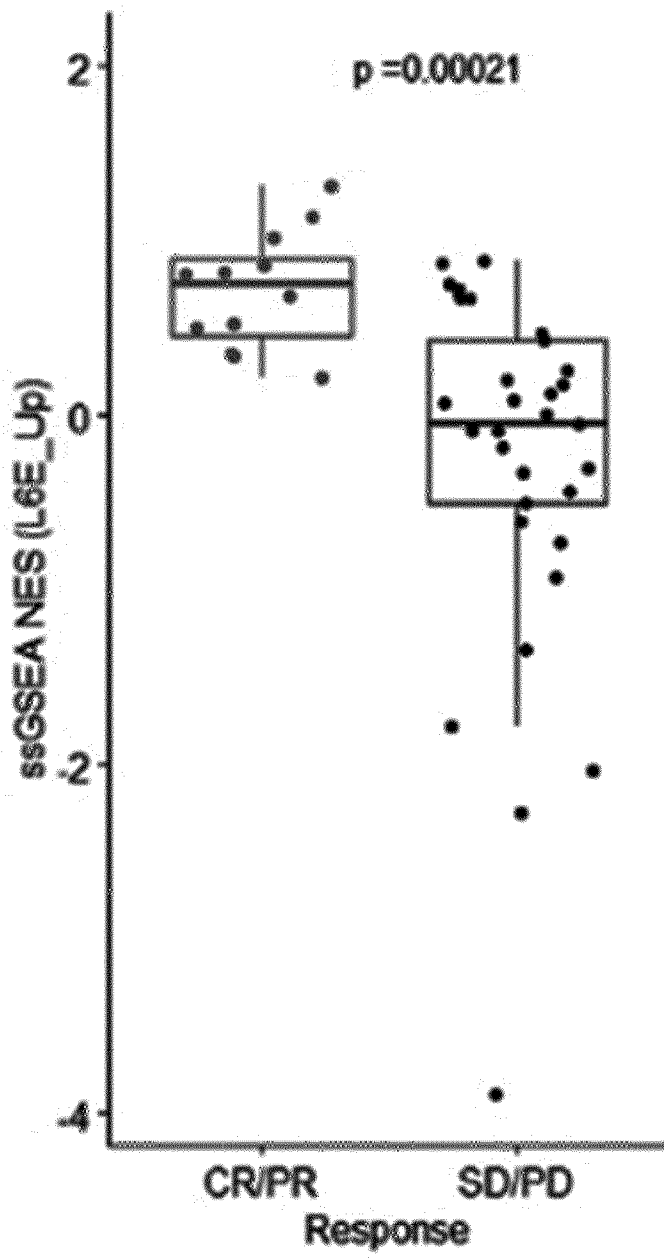


[도5b]

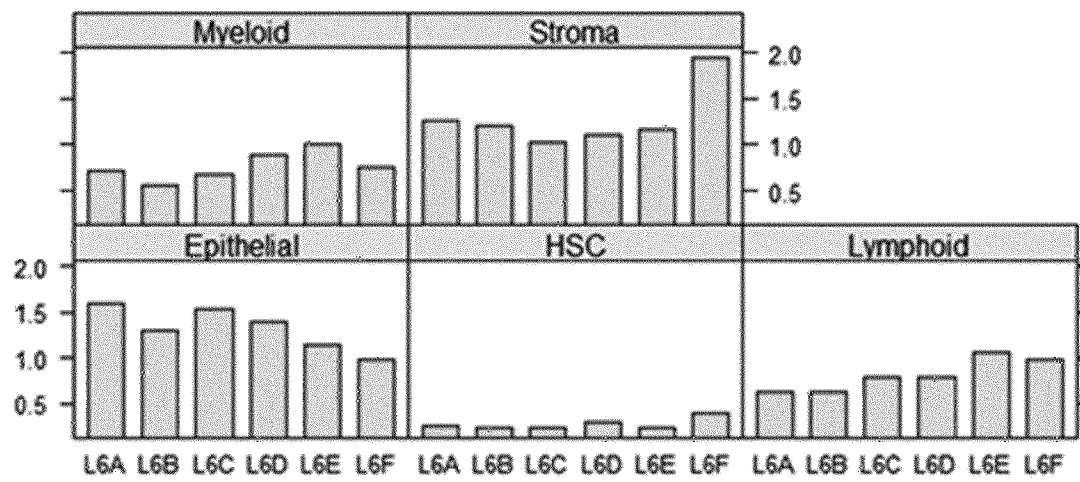


[도5c]



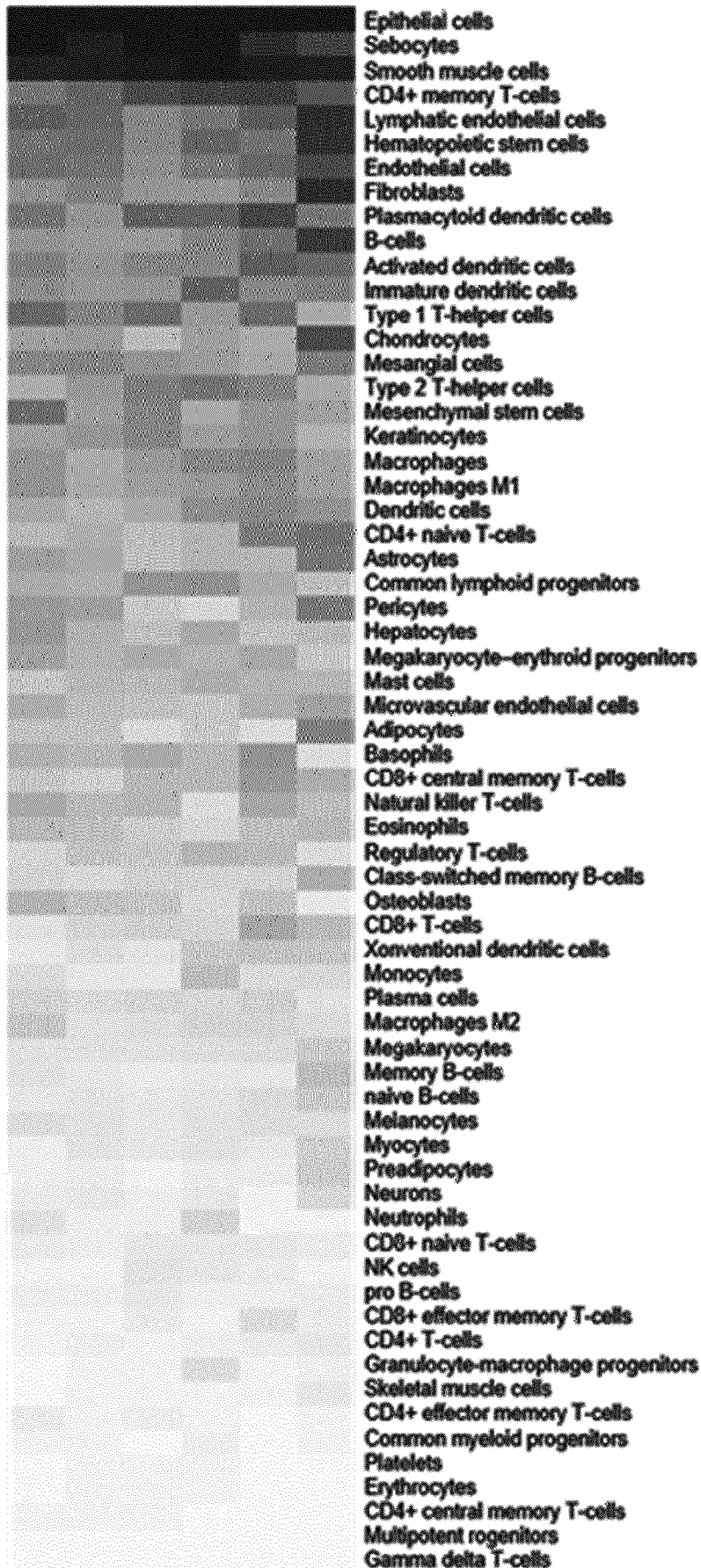
Response  CR/PR  SD/PD

[도6a]

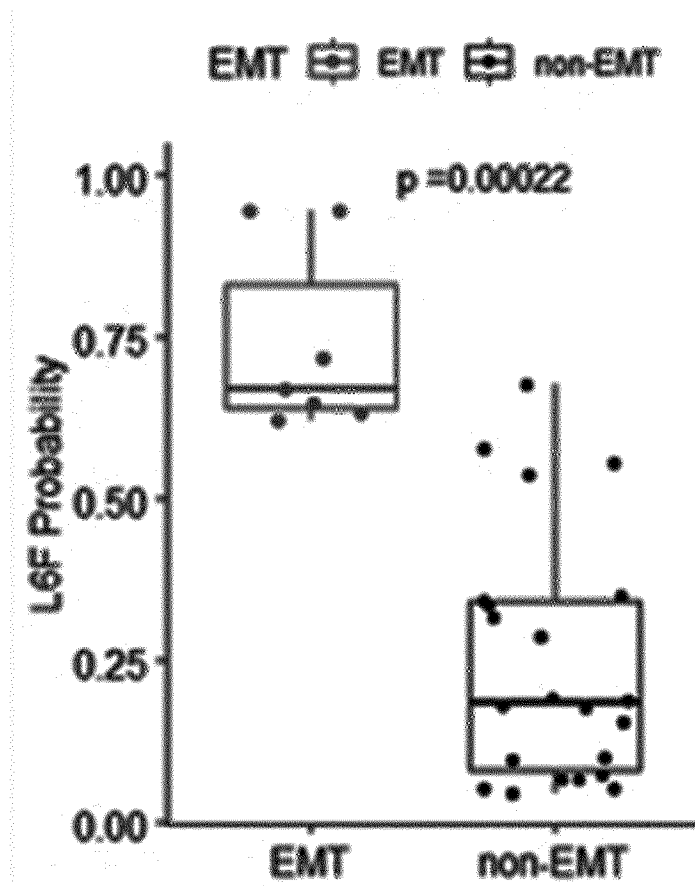


[도6b]

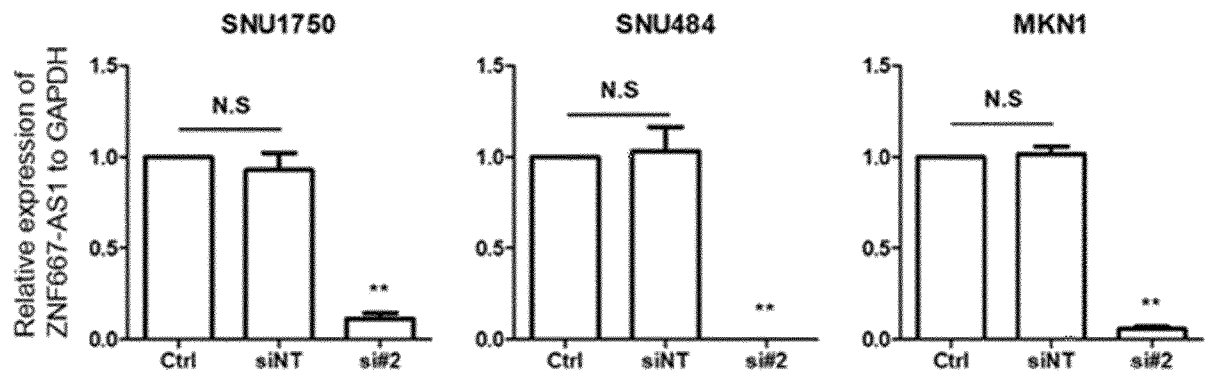
L6A L6B L6C L6D L6E L6F



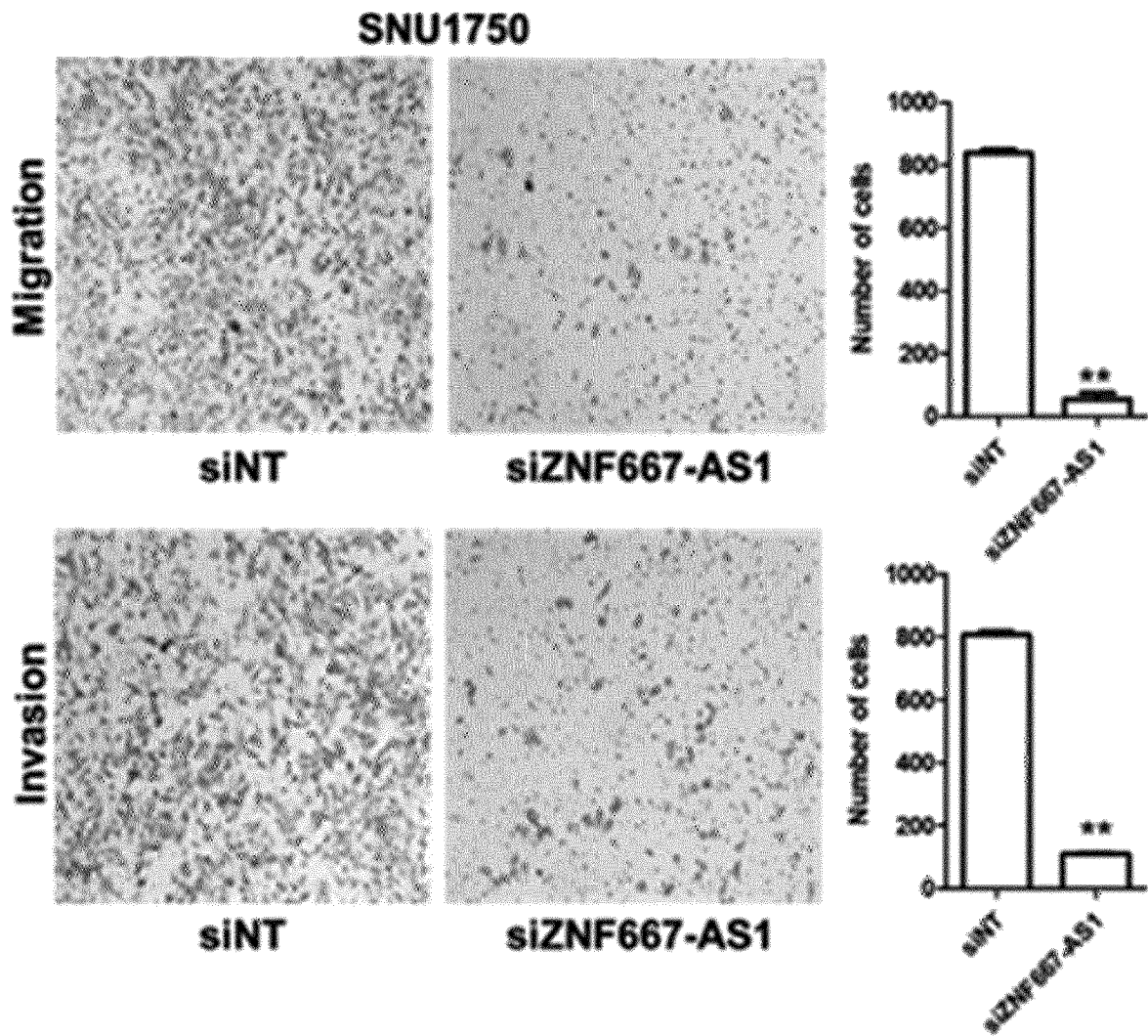
[도7a]



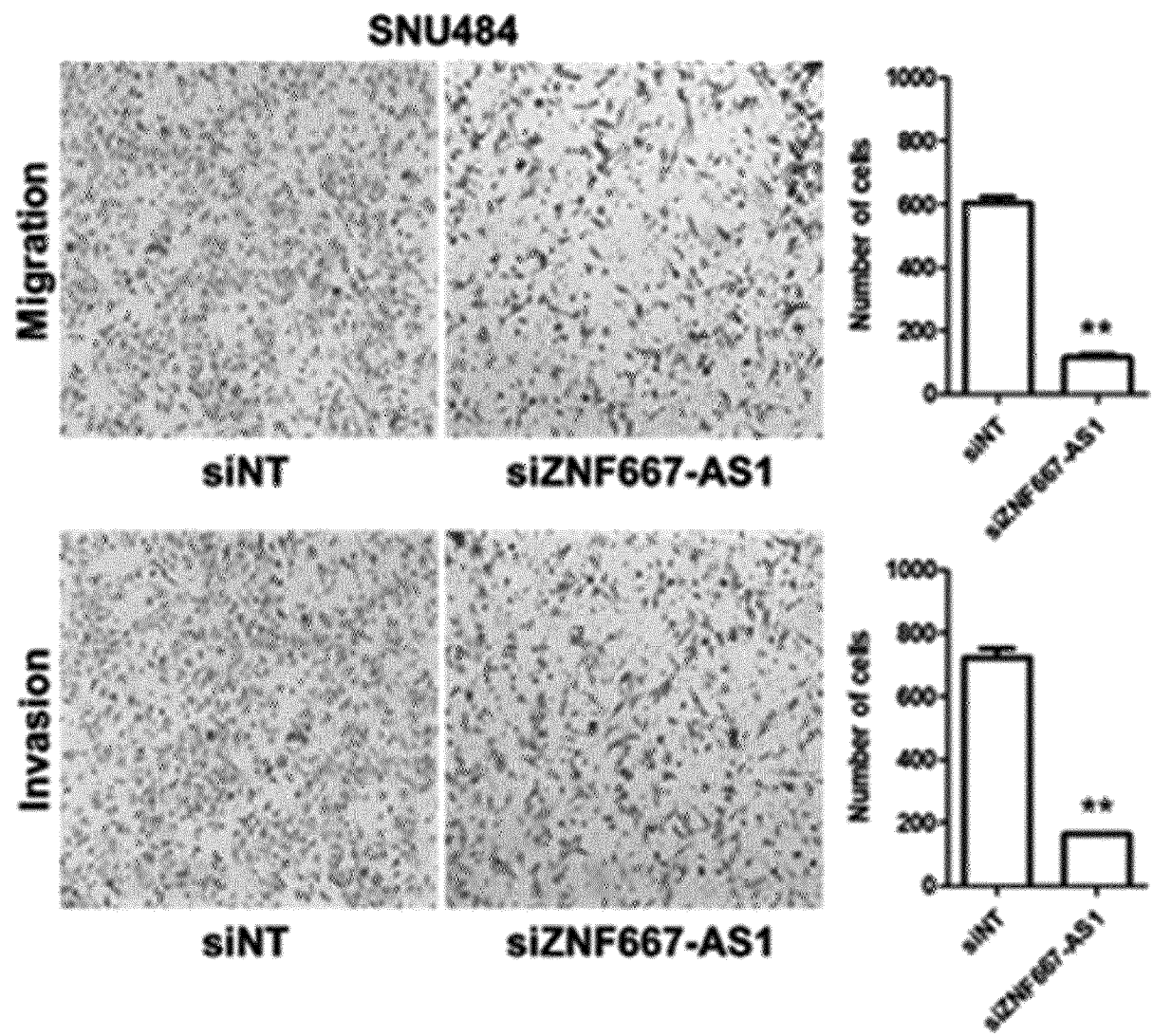
[도7b]



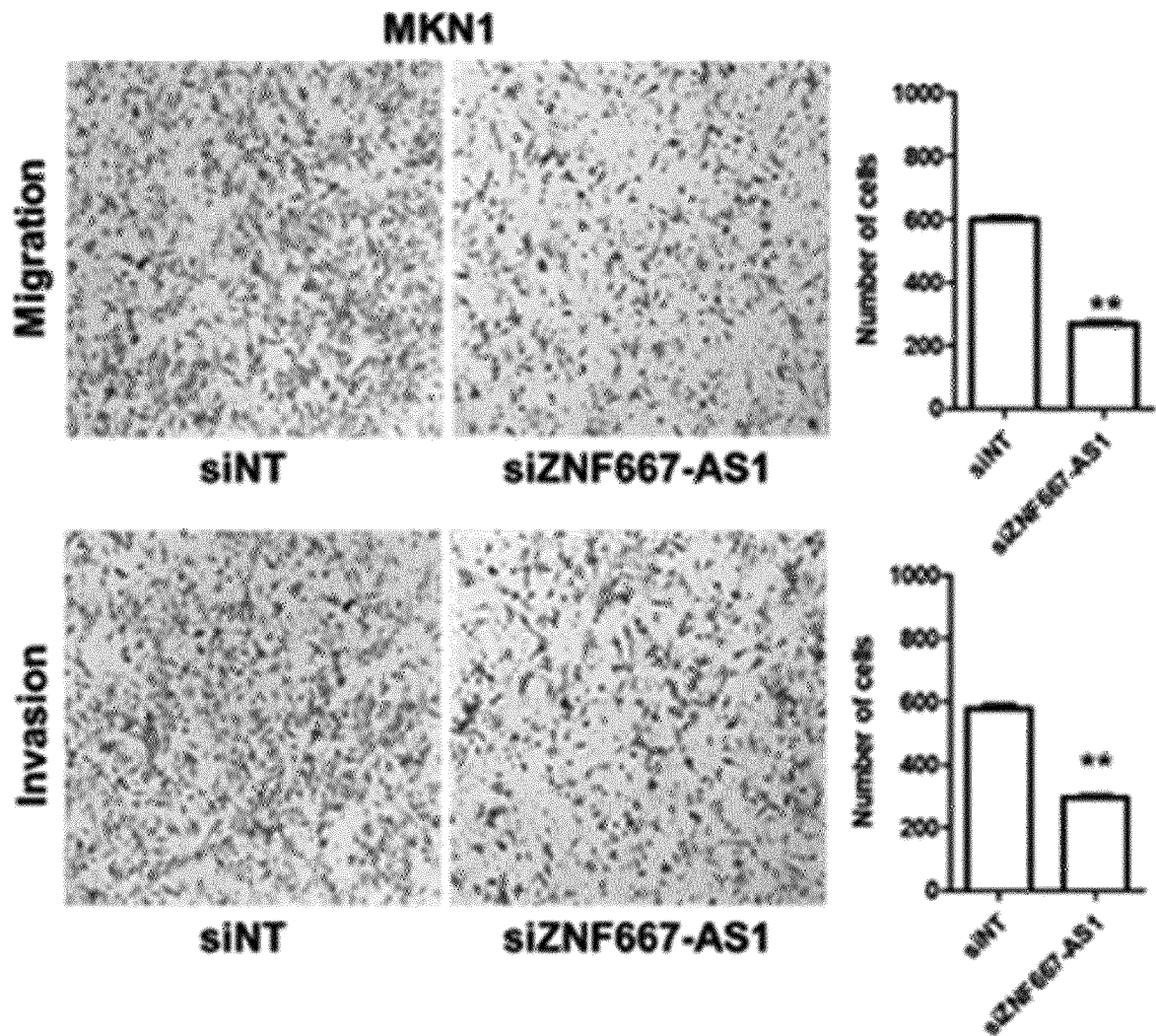
[도7c]



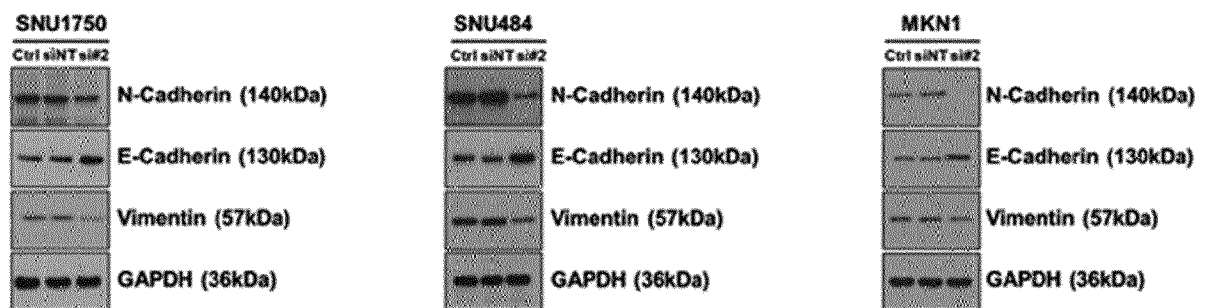
[도7d]



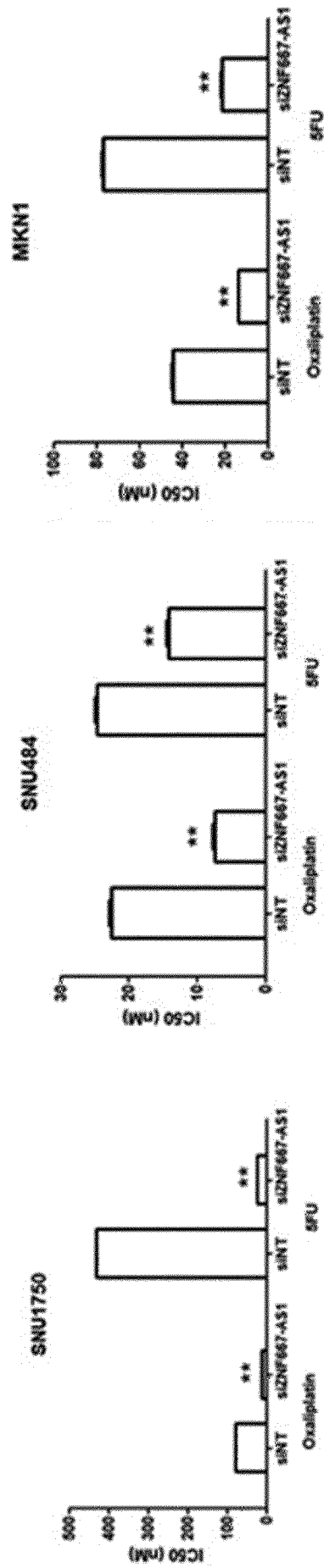
[도7e]



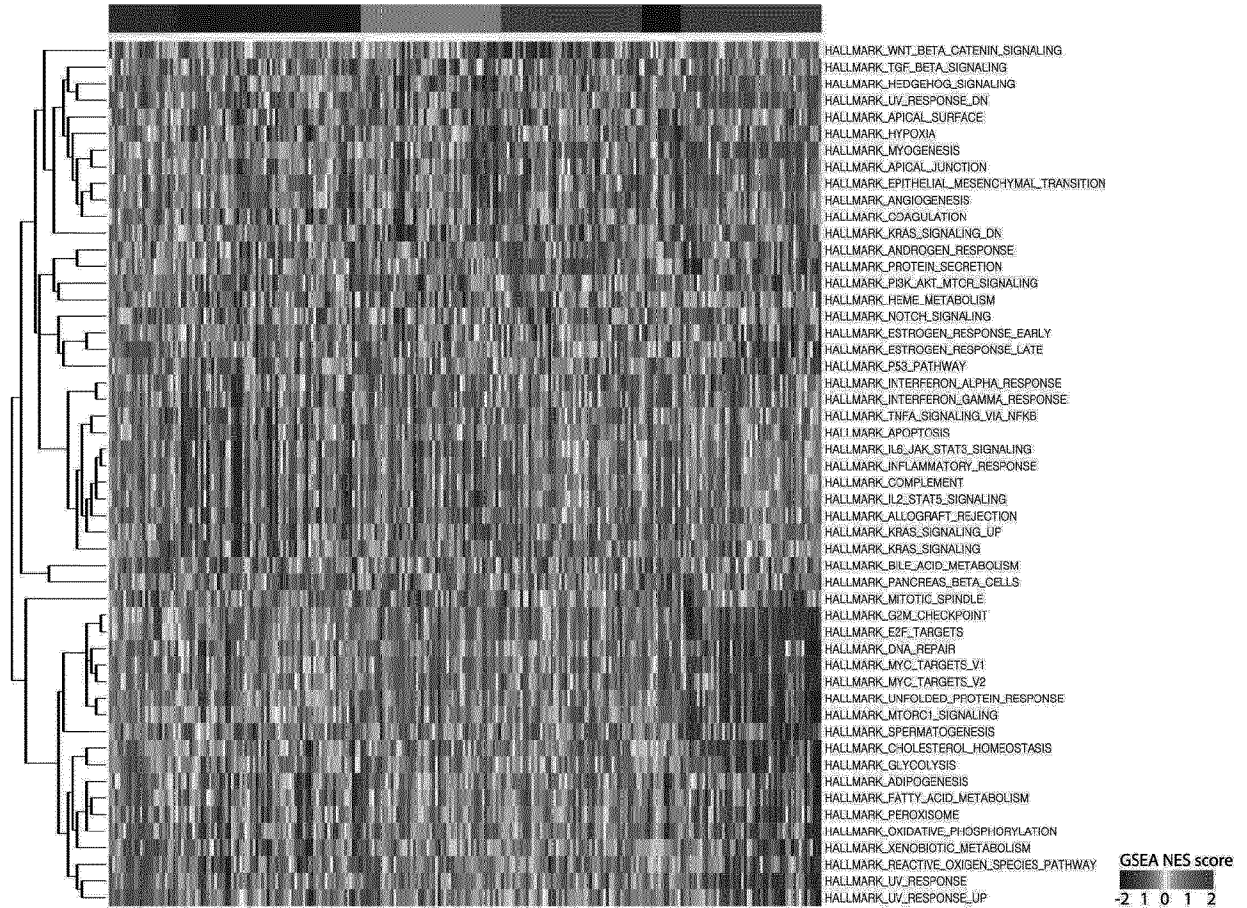
[도7f]



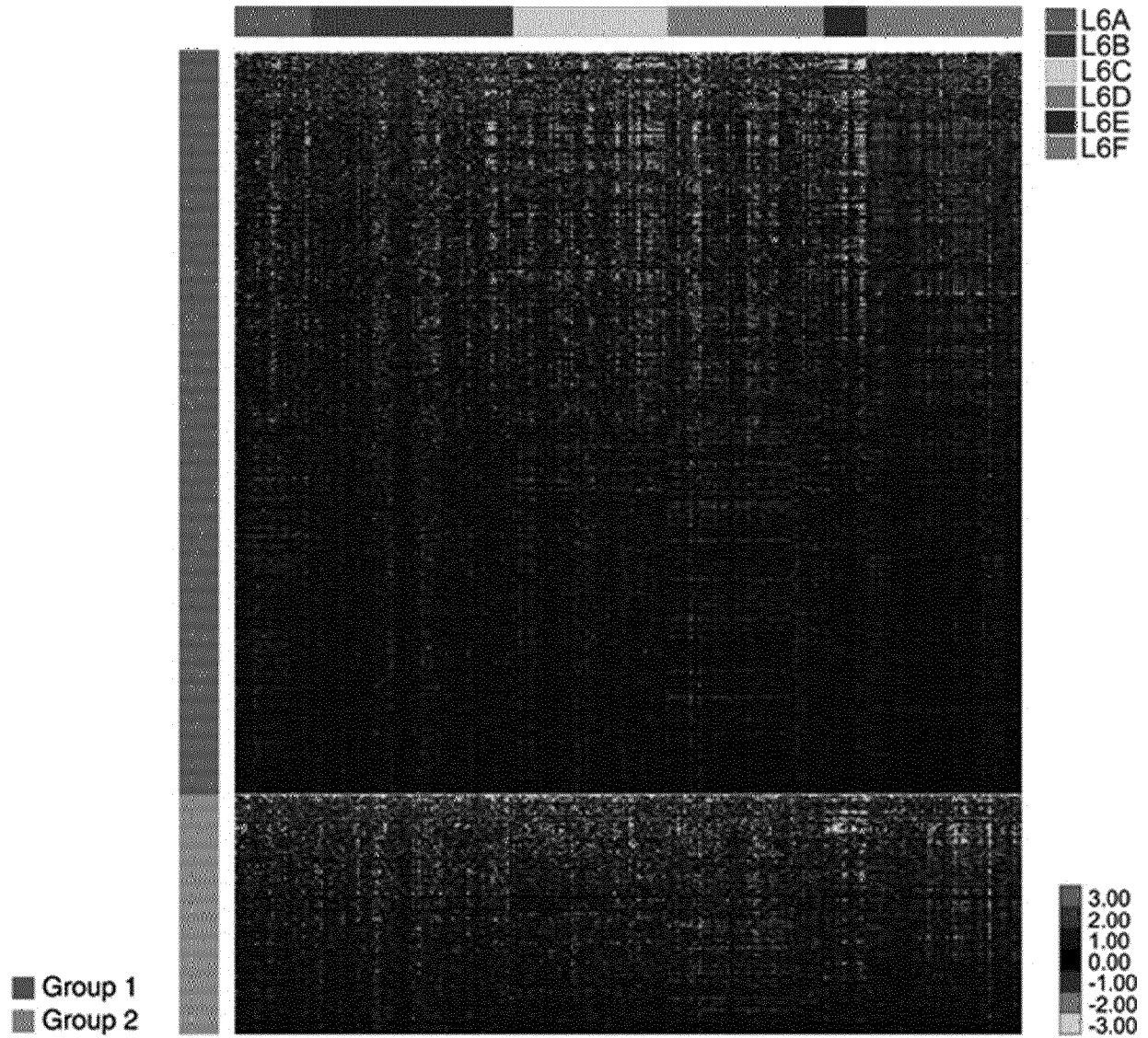
[도7g]



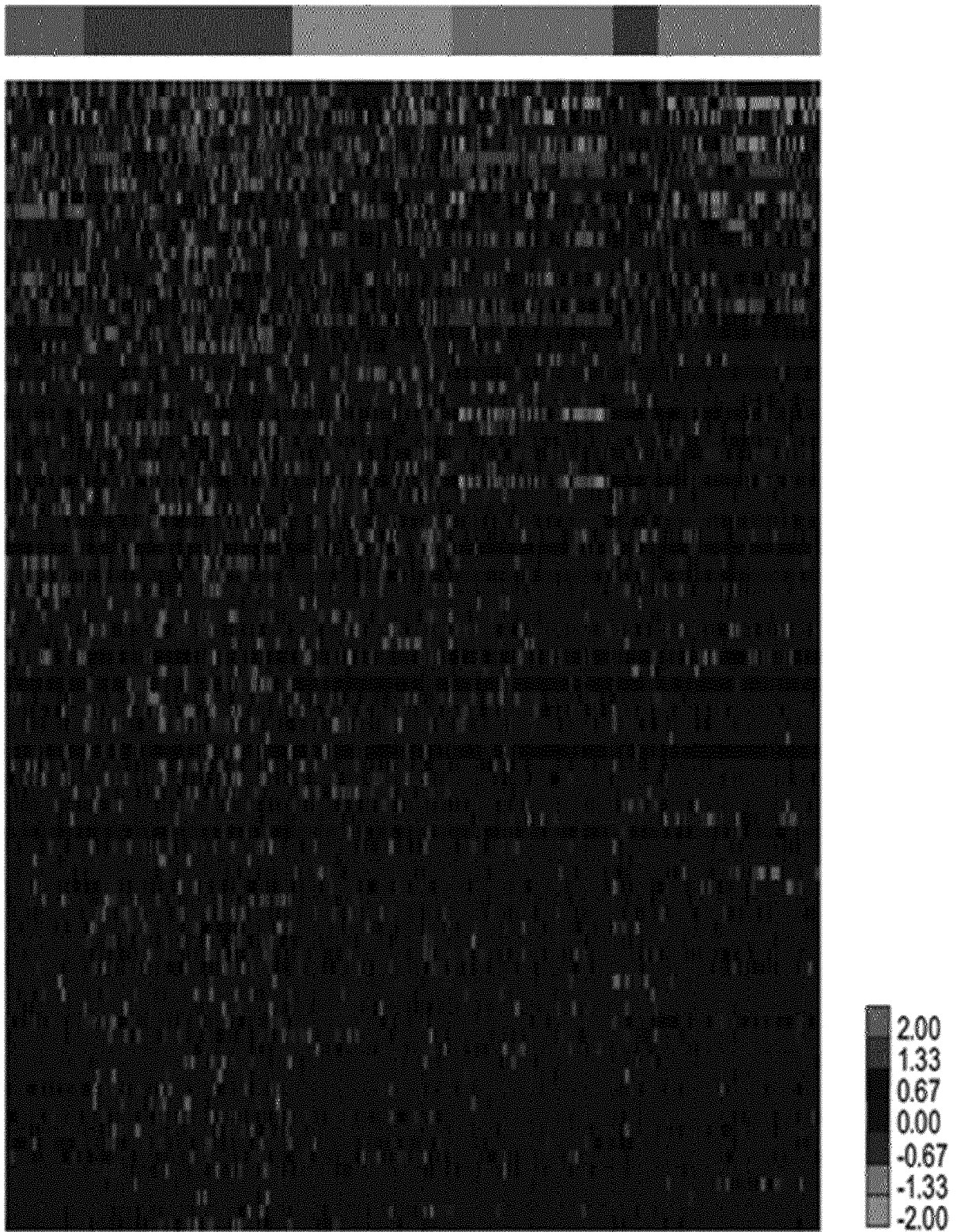
[도8]



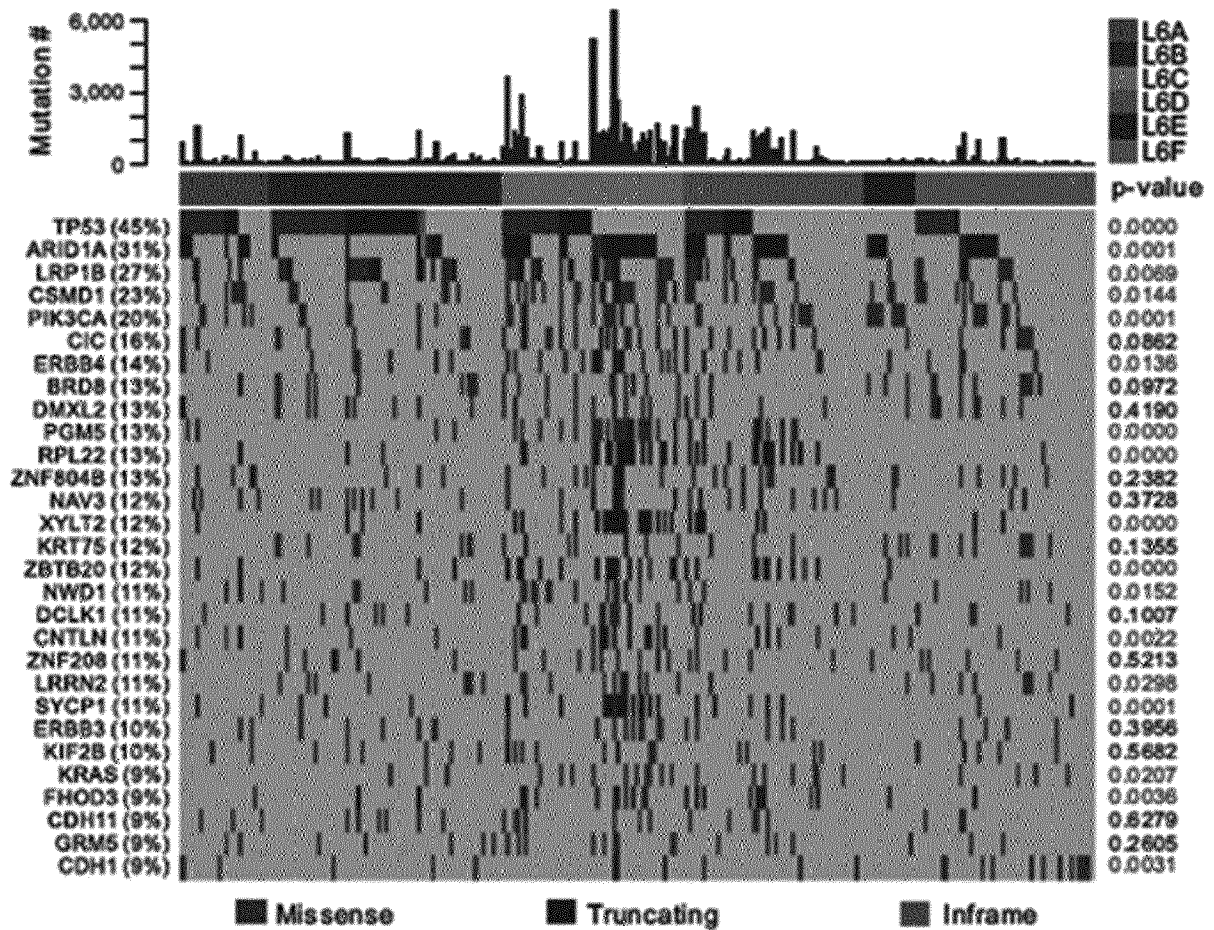
[도9]



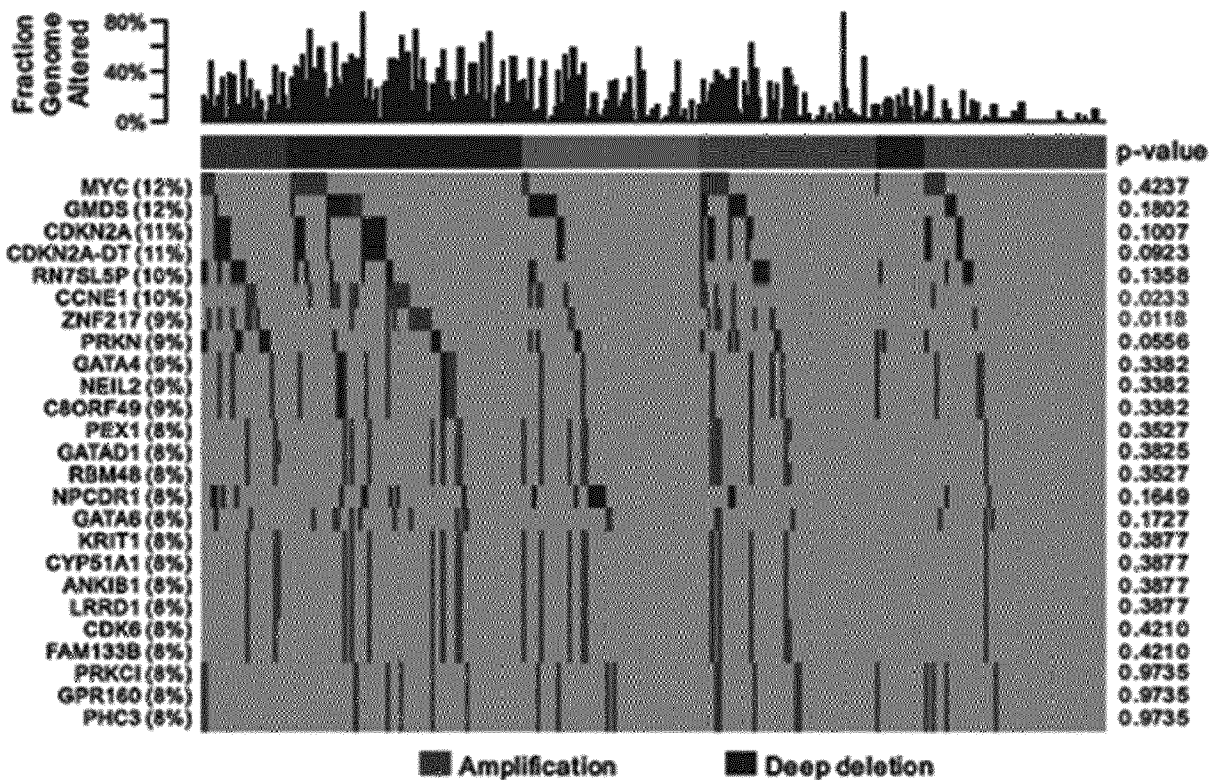
[도10]



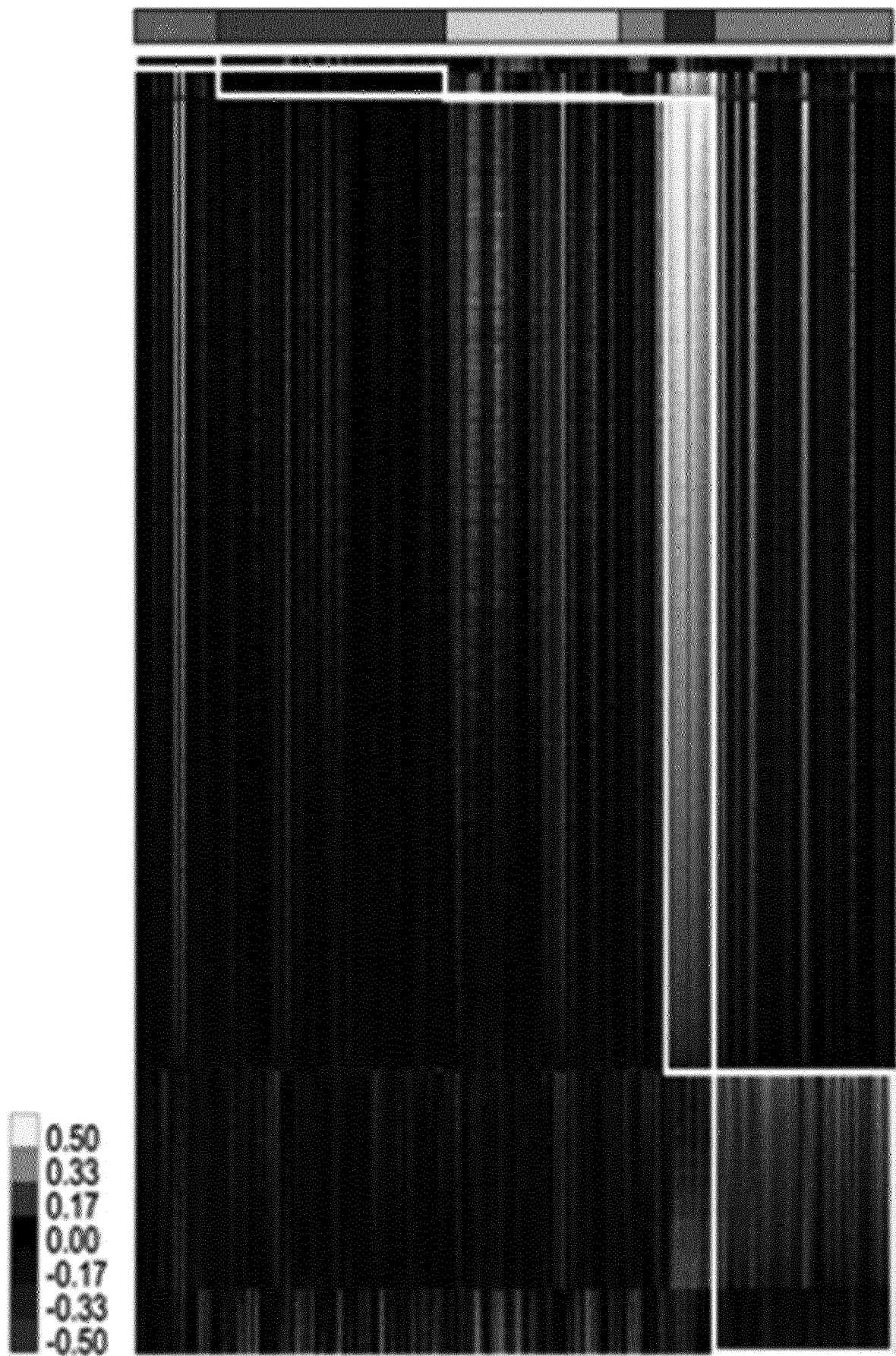
[도11a]



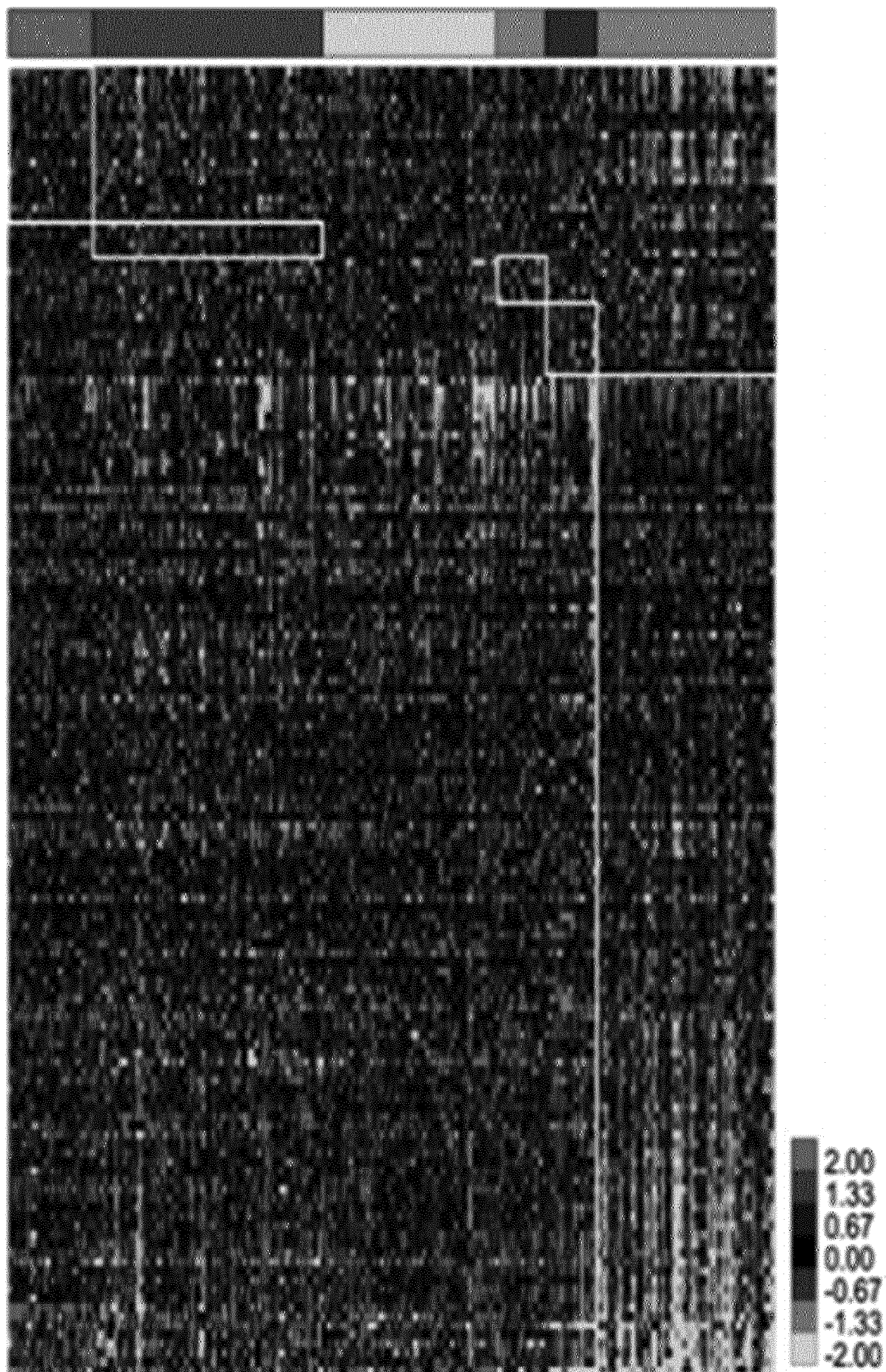
[도11b]



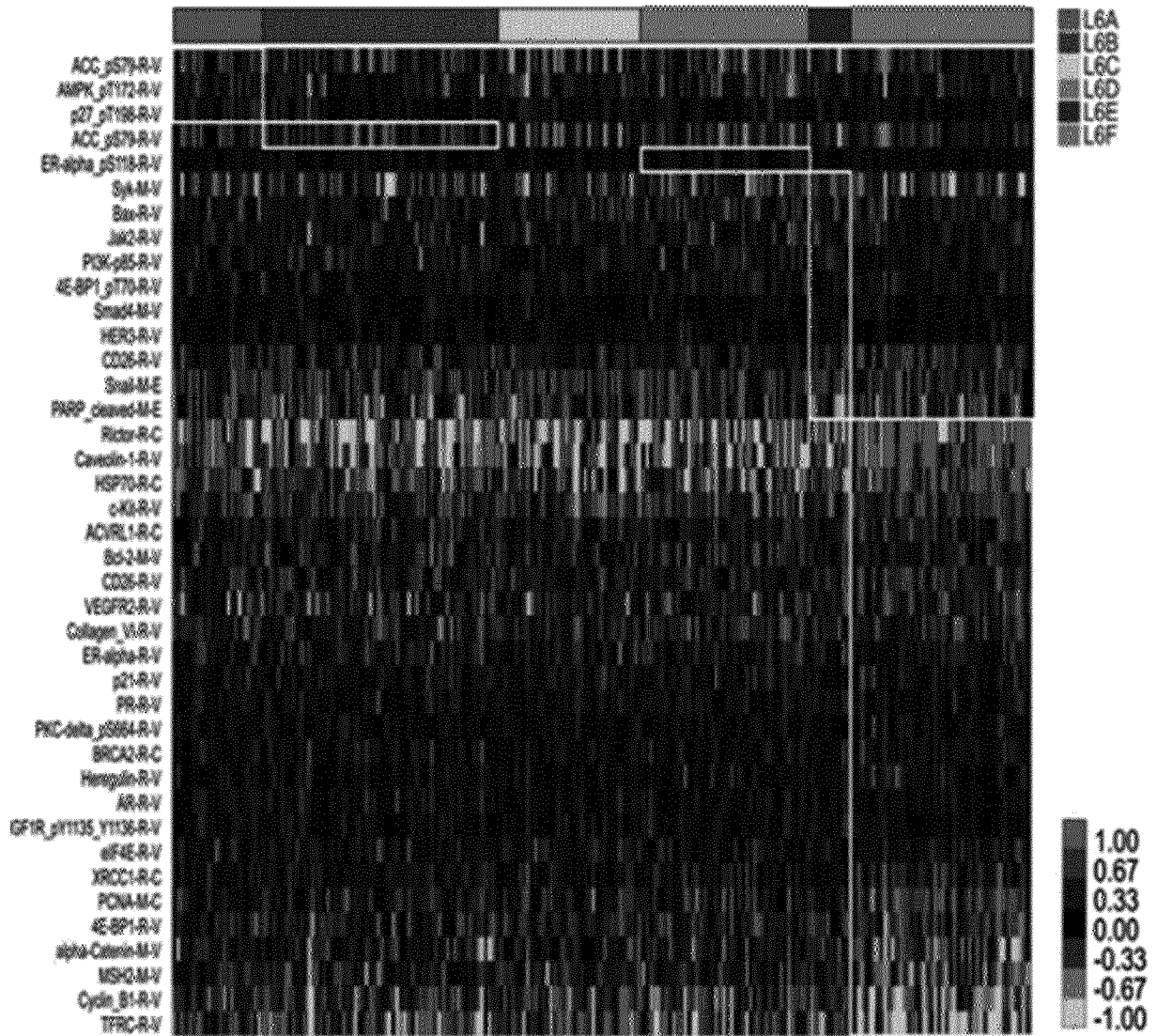
[도 12a]



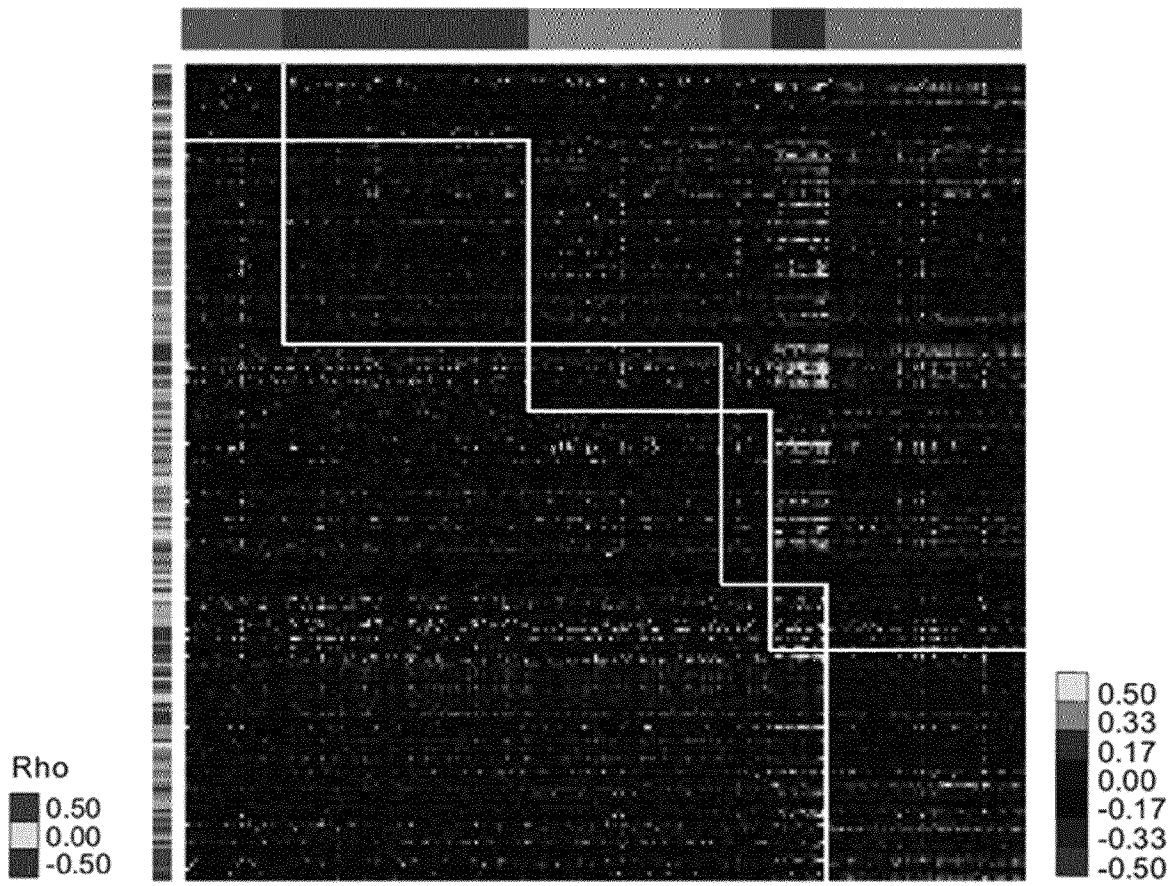
[도 12b]



[도 12c]



[도13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/006493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 48/00(2006.01); A61K 31/713(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C12N 15/113(2010.01)		
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), 위암(stomach cancer), ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1, 억제(inhibition)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 109988765 A (SHENGJING HOSPITAL OF CHINA MEDICAL UNIVERSITY) 09 July 2019 (2019-07-09) See abstract; claims 1, 2 and 7; and paragraph [0005].	1-15
A	CN 107213161 A (SOUTHWEST JIAOTONG UNIVERSITY) 29 September 2017 (2017-09-29) See entire document.	1-15
A	DONG, Z. et al. Aberrant hypermethylation-mediated downregulation of antisense lncRNA ZNF667-AS1 and its sense gene ZNF667 correlate with progression and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. Cell Death and Disease. 2019, vol. 10, document 930, pp. 1-18. See entire document.	1-15
A	ZHU, Y. et al. FENDRR suppresses cervical cancer proliferation and invasion by targeting miR-15a/b-5p and regulating TUBA1A expression. Cancer Cell International. electronic publication 06 May 2020, vol. 20, document 152, pp. 1-10. See entire document.	1-15
☒ 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 06 September 2021		Date of mailing of the international search report 06 September 2021
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/KR2021/006493**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHOU, R. J. et al. Knockdown of ACTA2-AS1 promotes liver cancer cell proliferation, migration and invasion. Molecular Medicine Reports. 2019, vol. 19, pp. 2263-2270. See entire document.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/006493

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/KR2021/006493

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.: **16-20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 16-20 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/006493

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	109988765	A	09 July 2019	None		
CN	107213161	A	29 September 2017	CN	107213161	B
						15 January 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 48/00(2006.01); A61K 31/713(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C12N 15/113(2010.01) 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), 위암(stomach cancer), ZNF667-AS1, RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1, 억제(inhibition)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CN 109988765 A (SHENGJING HOSPITAL OF CHINA MEDICAL UNIVERSITY) 2019.07.09 요약; 청구항 1, 2, 7; 및 단락 [0005]	1-15
A	CN 107213161 A (SOUTHWEST JIAOTONG UNIVERSITY) 2017.09.29 전체 문헌	1-15
A	DONG, Z. 등, `Aberrant hypermethylation-mediated downregulation of antisense lncRNA ZNF667-AS1 and its sense gene ZNF667 correlate with progression and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma`, Cell Death and Disease, 2019, 10권, 문헌 930, 페이지 1-18 전체 문헌	1-15
A	ZHU, Y. 등, `FENDRR suppresses cervical cancer proliferation and invasion by targeting miR-15a/b-5p and regulating TUBA1A expression`, Cancer Cell International, 전자공개 2020.05.06, 20권, 문헌 152, 페이지 1-10 전체 문헌	1-15
A	ZHOU, R. J. 등, `Knockdown of ACTA2-AS1 promotes liver cancer cell proliferation, migration and invasion`, Molecular Medicine Reports, 2019, 19권, 페이지 2263-2270 전체 문헌	1-15
☐ 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		
국제조사의 실제 완료일 2021년09월06일(06.09.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년09월06일(06.09.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

제1기재란 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: **16-20**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 16-20은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 109988765 A	2019/07/09	없음	
CN 107213161 A	2017/09/29	CN 107213161 B	2021/01/15