(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 9 월 28 일 (28.09.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/164436 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002896

(22) 국제출원일: 2016 년 3 월 23 일 (23.03.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0033813 2016 년 3 월 22 일 (22.03.2016) KR

(71) 출원인: **주식회사 대웅제약 (DAEWOONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.)** [KR/KR]; 13211 경기도 성남시 중원구 갈마치로 244, Gyeonggi-do (KR). **연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY)** [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).

(72) 발명자: **김재영 (KIM, Jaeyoung)**; 06170 서울시 강남구 봉은사로 640, 5 층, Seoul (KR). **차경민 (CHE, Jingmin)**; 06170 서울시 강남구 봉은사로 640, 5 층, Seoul (KR). **정현철 (CHUNG, Hyun Cheol)**; 06544 서울시 서초구 신반포로 270, 111-2401, Seoul (KR). **라선영 (RHA, Sun Young)**; 03001 서울시 종로구 비봉 2 길 73, Seoul (KR). **권우선 (KWON, Woo Sun)**; 10306 경기도 고양시 일산동구 숲속마을로 68, 602-1002, Gyeonggi-do (KR). **김태수 (KIM, Tae Soo)**; 10294 경기도 고양시 덕양구 호국로 859, 110-1101, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **이처영 (LEE, Cheo Young)** 등; 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11 층, Seoul (KR).

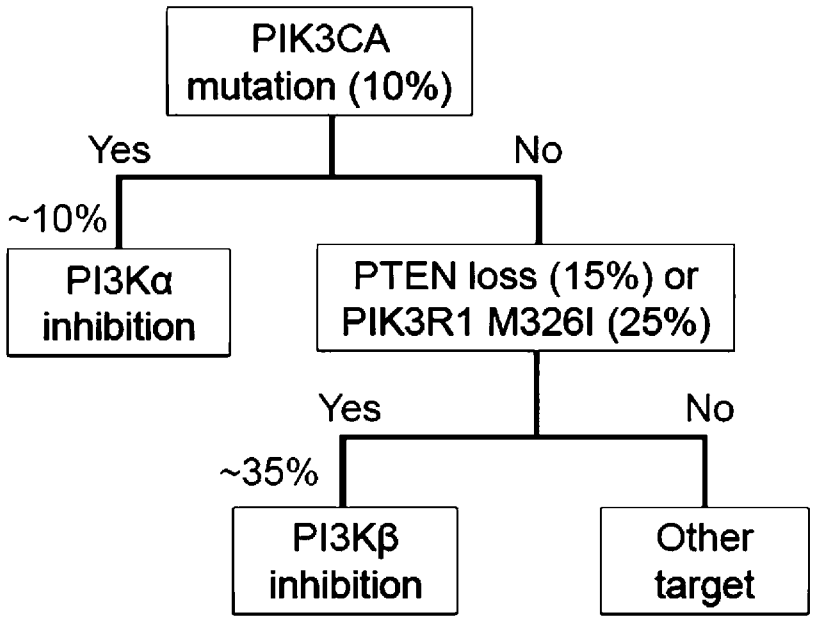
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 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,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: MARKER FOR PREDICTING TREATMENT RESPONSE TO ANTI-CANCER AGENT IN SOLID CANCER PATIENTS

(54) **발명의 명칭** : 고형암 환자의 항암제 치료 반응성 예측용 마커



(57) **Abstract**: The present invention relates to a marker for predicting treatment response to an anti-cancer agent in solid cancer patients. The marker according to the present invention can be useful in the selection of a small group, among solid cancer patients, on which chemotherapy with a particular anticancer agent is effective, or in the determination of treatment for solid cancer patients.

(57) **요약서**: 본 발명은 고형암 환자의 항암제에 대한 치료 반응성을 예측하기 위한 마커에 관한 것으로, 본 발명에 따른 마커는 고형암 환자 중에서 특정 항암제의 항암 화학요법에 효과가 있는 소그룹을 선별하거나, 고형암 환자의 치료요법을 결정하는 데 유용하게 활용할 수 있다.

WO 2017/164436 A1

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 4.17 에 의한 선언서:

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 고형암 환자의 항암제 치료 반응성 예측용 마커

기술분야

[1] 본 발명은 고형암 환자의 항암제에 대한 치료 반응성을 예측하기 위한 마커에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 PIK3R1 유전자의 SNP를 확인하여 PI3Kβ 억제제의 처리 유무를 결정하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 위암은 특히 아시아에서 높은 발생빈도를 보이며 암 관련 사망의 주된 원인이 되고 있다(Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010; 127: 2893917). 우리나라에서는 암 환자의 16.2% (남성 암 환자의 20.3% 및 여성 암 환자의 11.2%)가 위암 환자인 것으로 추정된다. 위암의 연간 연령표준화(age-standardized) 발병률은 남성의 경우 61.2/100,000이며 여성의 경우 23.9/100,000이다(Jung, KW, Park S, Kong HJ, Won YJ, Boo YK, Shin HR, et al. Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality and Survival in 2006-2007. J Korean Med Sci 2010; 25: 1113-21).

[4] 포스파티딜이노시톨-4,5-바이포스페이트 3- 인산화 효소(Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PI3K)에 의한 신호전달 경로는 위암에서 가장 자주 변이가 발생하는 신호전달 경로 중의 하나이다.

[5] PI3K는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 활성 신호전달 중간체인 phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P3)로 변환시키는 효소이다. PI(3,4,5)P3는 pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1 (PDK1)를 활성화시키고, 이어서 Akt를 활성화시킨다. PI3K는 p110과 p85의 두 가지 서브유닛으로 구성되어 있으며, 이것들은 각각 복수의 아형을 가지고 있다. 하나의 서브유닛인 p110에 초점을 맞추어 보면, 이것은 PIK3CA와 PIK3CB의 두 가지 아형을 가지고 있으며, 특이하게 중복된 기능을 보여준다. PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)은 PI(3,4,5)P3을 탈인산화시키고 PI3K 신호전달경로를 저해하는 PI3K의 음성 조절자이다. PI3K 신호전달경로의 활성화는 PI3KCA (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide)의 변이 또는 PTEN의 결핍과 같은 상위의 수용체 타이로신 카이네이즈(RTK) 신호가 상승함으로써 발생한다고 알려져 있다. PI3K의 RTK 활성화는 세포를 변형시키고, PIK3CA에 대한 의존을 야기하며, PTEN의 결손 또한 하부의 Akt 활성과 PI3K 활성을 증가시킨다고 알려져 있으나, 이것은 PI3KCB를 통하여 주로 작용한다고 알려져 있다. PI3K 신호전달의 환원적인 관점에서는 PI3K가 PDK1과 Akt를 활성화시키고 세포를 변형시키는 것이다.

[6] 한편, PI3K beta-isoform에 특이적으로 작용하는 억제제는 PTEN 단백질 발현되지 않는 암 환자에게서 적당한 세포독성을 가지면서 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 최근에는 PTEN이 발현되지 않는 동물모델에서 PI3K beta-isoform의 활성을 억제할 경우, 효과적으로 암 발생을 억제할 수 있다는 것이 보고되었다(Jia S et al., Nature. Vol. 454, pp776-9, 2008; Wee S et al., PNAS. Vl. 105, pp13057-62. 2008; Torbett NE et al., Biochem J. Vol. 415. pp97-110. 2008; Jing Ni et al., Cancer Discovery. Vol. 5. pp425-33. 2012).

[7] PI3K beta-isoform에 특이적으로 작용하는 억제제 중의 하나인 GSK2636771은 TGX-221 화합물을 기반으로 구조-활성 관계의 최적화를 진행한 결과, 매우 빠르게 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform (PI3Kβ)에 선택적으로 강력하게 저해하는 화합물을 찾아낼 수 있는데, 이 화합물의 Benzimidazole의 치환은 강력한 PI3Kβ 저해를 이끌었으며, 이 화합물 그룹에서 선도물질로 밝혀졌다.(Rivero, R.A. et al. 103rd Annu Meet Am Assoc Cancer Res (AACR) (March 31-April 4, Chicago) 2012, Abst 2913).

[8] 이전의 연구에서 PI3Kβ 저해는 phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase와 dual-specificity protein phosphatase PTEN (PTEN)-결핍 종양에서 종양 형성을 저해하는 효과를 보였는데, GSK-2636771은 RAC serine/threonine-protein kinase (Akt)의 인산화를 저해하고, 이것은 인간의 PTEN-결핍 종양세포를 이종이식한 마우스 모델에서 용량 의존적인 결과를 보이는 것으로 알려졌다(Hardwicke, M.A. et al. 243rd ACS Natl Meet (March 25-29, San Diego) 2012, Abst MEDI 21).

[9] 또한, GSK-2636771은 PTEN-결핍 세포인 PC-3 (인간의 전립선 암세포)과 HCC70 (인간의 유방 유관암) 세포에 대하여 EC50 유효활성 농도는 각각 36과 72 nM인 것으로 보고되었고, 마우스에서 GSK-2636771 100 mg/kg으로 시험했을 때, PI3Kβ 억제제는 포도당과 인슐린 수치를 올리지 않았으며, PC-3세포를 이종이식한 마우스 모델에서 GSK-2636771의 1회 투여는 Akt 인산화(Ser473)를 감소시키는 것으로 알려져 있으며(Wooster, R. 103rd Annu Meet Am Assoc Cancer Res (AACR) (March 31-April 4, Chicago) 2012, Abst), 현재 임상 시험이 진행 중이다.

[10] 하지만, 현재까지 PI3K beta-isoform에 특이적으로 작용하는 억제제에 대한 반응성을 확인할 수 있는 유전자 바이오마커는 알려진 바가 없다.

[11]

[12] 이에, 본 발명자들은 상기 PI3K beta-isoform에 특이적으로 작용하는 억제제에 대한 반응성을 확인할 수 있는 방법을 개발하기 위해, 예의 노력한 결과, PIK3R1 유전자의 SNP(rs3730089)가 존재할 경우, PI3K beta-isoform에 특이적으로 작용하는 억제제의 효과가 뛰어나다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[13]

[14] **발명의 요약**

[15] 본 발명의 목적은 고형암 환자의 항암제에 대한 치료 반응성을 예측하기 위한 정보 제공방법을 제공하는데 있다.

[16] 본 발명의 다른 목적은 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 프라이머 및/또는 프로브 조성물과 이를 포함하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 키트를 제공하는데 있다.

[17] 본 발명의 또다른 목적은 환자 맞춤형 고형암 치료제 선별방법을 제공하는데 있다.

[18]

[19] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 시료에서 PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1로 표시되는 서열의 21번째의 염기에 위치하는 SNP(NCBI refSNP ID: rs3730089)를 확인하는 단계를 포함하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[20] 본 발명은 또한, PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1(NCBI refSNP ID: rs3730089)로 표시되는 서열의 21번째의 염기를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드를 확인할 수 있는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 프라이머 조성물을 제공한다.

[21] 본 발명은 또한, PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1(NCBI refSNP ID: rs3730089)로 표시되는 서열의 21번째의 염기를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드와 특이적으로 혼성화하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 프로브 조성물을 제공한다.

[22] 본 발명은 또한, (a) 시료에서 PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1로 표시되는 서열의 21번째의 염기에 위치하는 SNP(NCBI refSNP ID: rs3730089)를 확인하는 단계; 및 (b) SNP가 존재할 경우, 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 베타(phosphoinositide 3-kinase β, PI3Kβ) 억제제를 환자 맞춤형 고형암 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 환자 맞춤형 고형암 치료제 선별방법을 제공한다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 본 발명에서 발굴한 SNP와 항암제 반응성을 예측하기 위한 실험의 전체적인 흐름을 나타내는 개략도이다.

[25] 도 2는 본 발명에서 사용한 51개 위암 세포주에 대하여, PI3K 관련 유전자들의 변이 정도를 검출한 전장 엑솜 시퀀싱(whole exome sequencing) 결과를 요약한 것이다.

[26] 도 3은 본 발명에서 사용한 51개 위암 세포주에 대하여 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성과 유전자 변이의 연관성을 정리한 그래프이다.

[27] 도 4의 (A)는 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성과 PI3K 관련 유전자 변이의

연관성을 통계적으로 분석한 결과이고, (B)는 유전자 중, PIK3R1의 M326I 변이와 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성을 통계적으로 분석한 결과이다.

[28] 도 5는 PI3K 관련 유전자 변이 유무에 따른 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성과 통계적 의미를 볼케이노 그래프로 분석한 결과이다. 또한 PIK3R1의 야생형과 M326I 변이형 내에서 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성 결과를 빈도로 분석한 결과이다.

[29] 도 6은 PIK3R1의 M326I 변이의 이형접합성(heterozygosity)과 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성 사이의 관계를 분석한 결과이다.

[30] 도 7은 PIK3R1의 M326I 변이가 어떻게 PIK3R1의 구조를 변화시켜 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성을 높이는 지를 단백질 3차원 구조분석을 통해 밝혀낸 결과이다.

[31] 7A: 야생형과 돌연변이 PIK3R1의 3차원 구조를 분석하고, 각각의 결합에너지를 계산한 결과이다.

[32] 7B: 야생형 및 돌연변이 PIK3R1에 GSK2636771이 결합하는 부위가 어떻게 구조변화가 생기는지를 분석한 3차원 모델이다.

[33] 도 8은 본 발명의 SNP를 이용할 경우, 높은 정확도로 PI3Kβ 억제제에 대한반응성을 예측할 수 있다는 것을 나타내는 결과이다.

[34] 도 9는 본 발명의 환자 맞춤형 고형암 치료제 선별방법에 대한 개념도이다.

[35] 도 10은 본 발명의 SNP를 이용하여 위암 뿐만 아니라, 다양한 고형암에서 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성을 측정할 수 있다는 것을 나타내는 결과이다.

[36]

[37] **발명의 상세한 설명 및 바람직한** 구현예

[38] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[39]

[40] 본 발명에서는 고형암 환자에서 항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있는 방법을 개발하고 그 정확도를 확인하고자 하였다.

[41] 본 발명에서는, 다양한 위암 세포주에서 전장 엑솜 시퀀싱(whole exome sequencing)을 통해 PI3K 관련 유전자의 변이 정보를 파악하고, 각 세포주의 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성을 세포 생사 판별시험(cell viability assay)를 통해 확인한 다음, 통계분석을 통하여 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성과 연관되어 있는 PI3K 관련 유전자의 변이를 선별하였다.

[42] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 51개의 위암 세포주에 대하여 whole exome sequencing을 통해 PI3K 관련 유전자의 변이 정보를 확보한 다음, PI3Kβ 억제제를 이용한 세포 생사 판별 시험을 수행하고, 기존에 PI3Kβ 억제제의 반응성과 관련이 있는 PTEN 단백질의 발현 레벨도 분석하여(도 1 내지 도 3),

최종적으로 PIK3R1의 M326I 변이(NCBI refSNP ID:rs3730089)가 PI3Kβ 억제제의 반응성을 예측할 수 있다는 사실을 확인하였다(도 4 내지 도 6).

[43] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 시료에서 PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1로 표시되는 서열의 21번째의 염기에 위치하는 SNP(NCBI refSNP ID: rs3730089)를 확인하는 단계를 포함하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[44] 이 서열은 이하의 서열번호 1에 나타낸다. 서열번호 1에서 SNP에 대한 NCBI의 refSNP ID는 상기 SNP의 서열 및 그 위치를 나타내는 것이다. 당업자라면 상기 번호를 이용하여 SNP의 위치 및 서열을 용이하게 확인할 수 있다. NCBI에 등록되어 있는 SNP의 refSNP ID에 해당하는 구체적인 서열은 계속되는 유전자에 대한 연구 결과에 따라 약간씩 변경될 수 있으며, 이러한 변경된 서열 또한 본 발명의 범위 내에 포함됨은 당업자에게 자명할 것이다.

[45]

[46] 서열번호 1: rs3730089

[47] AACGGTATGA ATAACAATAT[G/A]TCCTTACAAG ATGCTGAATG

[48]

[49] 본 발명의 SNP의 유전자형의 확인은 시퀀싱 분석, 자동 염기서열 분석기를 사용한 시퀀싱 분석, 파이로시퀀싱(pyrosequencing), 마이크로어레이에 의한 혼성화, PCR-RELP법 (restriction fragment length polymorphism), PCR-SSCP법 (single strand conformation polymorphism), PCR-SSO법 (specific sequence oligonucleotide), PCR-SSO법과 도트 하이브리드화법을 조합한 ASO (allele specific oligonucleotide) 하이브리드화법, TaqMan-PCR법, MALDI-TOF/MS법, RCA법 (rolling circle amplification), HRM (high resolution melting)법, 프라이머 신장법, 서던 블롯 하이브리드화법, 도트 하이브리드화법 등의 공지의 방법에 의하여 수행될 수 있다. 나아가, 상기 SNP 다형성의 결과들은 당업계에서 일반적으로 사용되는 통계학적 분석 방법을 이용하여 통계처리 할 수 있으며, 예를 들면, 스튜던트 t-검정(Student's t-test), 카이-스퀘어 테스트 (Chi-square test), 선형 회귀선 분석(linear regression line analysis), 다변량 로지스틱 회귀분석 (multiple logistic regression analysis) 등을 통해 얻은 연속 변수 (continuous variables), 절대 변수 (categorical variables), 대응비 (odds ratio) 및 95% 신뢰구간 (confidence interval) 등의 변수를 이용하여 분석할 수 있다.

[50]

[51] 본 발명에서 용어, "예측"이란 환자가 화학요법 등 치료법에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응하여 환자의 치료, 예를 들어 특정 치료제, 및/또는 원발성 종양의 수술로 제거, 및/또는 암 재발 없이 특정 시기 동안 화학요법으로 치료된 후 생존할 여부 및/또는 가능성과 관련된다.

[52] 본 발명의 예측 방법은 고형암 발병 환자에 대한 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 위해 임상적으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의

예측 방법은 환자가 예를 들어 소정 치료제 또는 조합물, 외과적 개입, 화학요법 등의 투여를 비롯한 소정 치료 처방과 같은 치료 처방에 선호적으로 반응하는지를 확인하거나, 치료 처방 후 환자의 장기 생존이 가능한지 여부를 예측할 수 있다.

[53]

[54] 본 발명은 다른 관점에서, PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1(NCBI refSNP ID: rs3730089)로 표시되는 서열의 21번째의 염기를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드를 확인할 수 있는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 프라이머 조성물에 관한 것이다.

[55] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 15 내지 30개의 염기로 구성될 수 있다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다. 상기 프라이머는 다형성 부위를 포함하는 DNA 서열에 혼성화하여 다형성 부위를 포함하는 DNA 단편을 증폭시킬 수 있다. 본 발명의 프라이머는 대립형질을 검출하여 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 진단 키트나 예측 방법 등에 사용될 수 있다.

[56]

[57] 본 발명은 또다른 관점에서, PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1(NCBI refSNP ID: rs3730089)로 표시되는 서열의 21번째의 염기를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드와 특이적으로 혼성화하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 프로브 조성물에 관한 것이다.

[58] 본 발명에 있어서, 상기 프로브는 대립형질 특이적(allele-specific)일 수 있으며, 이는 각 대립형질에 특이적으로 혼성화하는 것을 의미한다. 즉, 다형성 서열 중에 존재하는 다형성 부위의 염기를 특이적으로 구별할 수 있도록 혼성화하는 것을 말한다. 여기에서, 혼성화란 보통 엄격한 조건, 예를 들어 1M 이하의 염 농도 및 25℃ 이상의 온도 하에서 보통 수행된다. 예를 들어, 5XSSPE (750mM NaCl, 50mM Na Phosphate, 5mM EDTA, pH 7.4) 및 25 ~ 30℃의 조건이 대립형질 특이적 프로브 혼성화에 적합할 수 있다.

[59] 본 발명에 있어서, 상기 프로브는 혼성화 프로브를 의미하는 것으로, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 본 발명의 대립형질 특이적 프로브는 같은 종의 두 개체로부터 유래한 핵산 단편 중에서 다형성 부위가 존재하여, 한 개체로부터 유래한 DNA 단편에는 혼성화 하나, 다른 개체로부터 유래한 단편에는 혼성화하지 않을 수 있다. 이 경우 혼성화 조건은 대립형질간의 혼성화 강도에 있어서 유의한 차이를 보여 대립형질 중 하나에만 혼성화되도록 충분히 엄격해야 한다. 이러한 본 발명의 프로브는 중앙 부위가 다형성 서열의 다형성 부위와 정렬하는 것이 바람직하다.

이에 따라 서로 다른 대립형질성 형태 간에 좋은 혼성화 차이를 유발할 수 있다. 본 발명의 프로브는 대립형질을 검출하여 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 진단 키트나 예측 방법 등에 사용될 수 있다.

[60] 본 발명은 또한, PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1(NCBI refSNP ID: rs3730089)로 표시되는 서열의 21번째의 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 포함하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물에 관한 것이다.

[61]

[62] 본 발명은 또다른 관점에서, 본 발명의 상기 조성물 중 어느 하나를 포함하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 키트에 관한 것이다.

[63] 본 발명에서 상기 키트는 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 항체 및 압타머 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다. 일 양태로서, 본 발명의 키트는 PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수 (DEPC-water) 및 멸균수 등을 추가로 포함할 수 있다. 다른 일 양태로서, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 폐암 생존 예후 예측용 키트일 수 있으며, DNA 칩 키트는 상기 SNP 에 대한 특이적인 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브가 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 핵산을 포함할 수 있다.

[64]

[65] 본 발명에 있어서, 상기 항암제는 고형암을 억제할 수 있는 약제이면 제한없이 이용가능하나, 바람직하게는 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 베타(phosphoinositide 3-kinase β, PI3Kβ) 억제제일 수 있고, 더욱 바람직하게는 GSK2636771, SAR260301, TGX-221, AZD5482 및 KIN-193으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[66] 본 발명에 있어서, 상기 고형암은 위암, 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 유방암, 전이암, 전립선암, 췌장암, 흑색종 및 폐암으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[67]

[68] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 시료에서 PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1로 표시되는 서열의 21번째의 염기에 위치하는 SNP(NCBI refSNP ID: rs3730089)를 확인하는 단계; 및 (b) SNP가 존재할 경우, 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 베타(phosphoinositide 3-kinase β, PI3Kβ) 억제제를 환자 맞춤형 고형암 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 환자 맞춤형 고형암 치료제 선별방법에 관한 것이다.

[69] 본 발명에 있어서, 상기 (a)단계 이후에 PTEN 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[70] 본 발명의 PTEN 단백질의 발현 수준은 상기 유전자의 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 항체를 이용하여 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 웨스턴 블랏, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산(Radioimmunodiffusion), 로케트 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS, 단백질 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[71] 본 발명에서, PTEN의 유전자 발현량을 mRNA의 양을 측정하여 분석할 수 있으며, mRNA의 발현 수준은 DNA 칩, 역전사 PCR(Reverse transcription-PCR, RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 PCR(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RPA: RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[72] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계 이전에 (a) 시료에서 포스파티딜이노시톨 4,5-바이포스페이트 3-카이네이즈 촉매 서브유닛 알파(Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)의 변이를 확인하는 단계; 및 (b) 변이가 존재하면, 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 알파(phosphoinositide 3-kinase α, PI3Kα) 억제제를 환자 맞춤형 고형암 치료제로 선별하는 단계를 추가로 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[73] 본 발명에서, 상기 PIK3CA의 변이는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 PIK3CA에서, P140R, I381M, E453K, E542K, E545K 및 H1047R로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명에서 PIK3CA의 변이는 각 변이에 특이적인 항체를 이용한 방법 또는 시퀀싱, PCR 등을 통하여 확인할 수 있다.

[74] 본 발명에 있어서, 상기 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 알파(phosphoinositide 3-kinase α, PI3Kα) 억제제는 HS-173, Alpelisib(BYL719), CH5132799, Gedatolisib (PF-05212384, PKI-587), PIK-75, A66 및 YM201636 으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[75] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 환자로부터 유래한 유전자 시료이면 모두 이용가능하고, 유전자 시료는 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 환자로부터 유래한다는 의미는 환자의 혈액, 조직샘플, 대변, 소변 및 객담 등에서 분리한 유전자 시료를 의미한다.

[76] 본 발명의 유전자 시료를 얻기 위해 환자로부터 게놈DNA를 분리하는 방법은 당업계에 알려진 방법을 통하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 조직, 혈액 또는 세포로부터 DNA를 직접적으로 정제하거나 PCR과 같은 증폭 방법을 사용하여 특정한 영역을 특이적으로 증폭하고 이를 분리함으로써 이루어질 수 있다.

DNA란 DNA 뿐만 아니라 mRNA로부터 합성되는 cDNA도 포함하는 의미이다. 피검체로부터 핵산을 얻는 단계는 예를 들면, PCR 증폭법, 리가제 연쇄 반응 (LCR), 전사증폭 (transcription amplification), 자가유지 서열 복제 및 핵산에 근거한 서열증폭 (NASBA)이 사용될 수 있다.

[77]

[78] 실시예

[79] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[80]

[81] 실시예 1: 위암 세포주 전장 엑솜 시퀀싱 분석

[82] 시퀀싱 분석은 생명체가 가지고 있는 전체 DNA를 해독하는 방법이다. 대량염기서열 분석(high throughput sequencing)은 단백질을 암호화하고 있는 영역을 비롯한 유전체의 90%이상을 차지하는 DNA 염기서열들을 모두 해독하는 방법이다. 대량으로 생산된 유전체 염기서열은 A-T-G-C의 4개 염기로 구성된 순서정보와 염기의 퀄리티를 나타내는 정보들만 제공한다. 염기서열의 순서 정보로부터 유전자의 위치와 유전자의 구조를 파악할 수 있다. 유전자의 위치를 파악하기 위해서 대량염기서열은 매우 긴 DNA 분자를 단편(read)으로 만든 후, 짧은 단편 서열들의 염기서열들을 중첩되는 부위를 연결시킨 다음 생물정보학적인 기법을 적용하여 유전자 위치를 파악한다. 본 발명에서는 특정 생물체의 대량의 단편 서열들을 확립되어 있는 인간 유전체 레퍼런스 염기서열와 비교하여 유전자의 구조와 변이들을 검출하는 염기서열 재분석(resequencing) 방법을 적용하였다. Whole exome sequnecing은 특정 유전체의 일부분을 분석하기 위한 target sequencing 방법의 하나로 단백질을 암호화 하고 있는 엑손 영역을 시퀀싱하는 방법이다. 인간 유전체에는 약 180,000개의 엑손이 있으며 이들의 총 길이는 30 MB정도로 인간 유전체의 1% 정도에 해당한다.

[83] 51개 위암 세포주의 WES를 분석하기 위해 gDNA를 추출하였고, gDNA에 대한 QC는 Agilent, 2200 TapeStation System를 사용했다. 샘플 정제는 Agencourt AMPure XP kit를 사용했다. WES 수행을 위한 라이브러리는 Agilent사의 SureSelect Library Prep Kit를 사용했다. 인간 유전체의 whole exome의 capture를 위해서 Agilent사의 SureSelect Automated Hybridization Kit를 사용했으며, sequencing은 Illumina사의 HiSeq 2500을 이용해서 150bp paired end running으로 수행했다. 각 변이에 대한 분석은 Varscan2.3.5로 분석했다.

[84] PIK3R1 M326I 변이를 검출하기 위해 PI3Kβ 억제제의 약물 감수성에 대한 표현형과의 PIK3R1 M326I 유전자형 간에 상관관계를 분석하기 위해 연관성 연구 (association study)를 적용하였다. 이 방법은 전체 집단에서 PI3Kβ 억제제에

반응하지 않는 집단보다 반응하는 집단 내에 높은 빈도로 존재하는 유전자에 의해 결정하는 방법이다.

[85] 그 결과 51개 위암 세포주에서 표 1 및 도 2에 개시된 바와 같이 유전자들의 변이가 발생한 것을 확인하였다.

[86]

[87] [표1]

위암 세포주에서 발생한 PI3K 유전자 관련 변이 정리

gene	No. of altered cell lines (N, %)	Somatic mutation	Polymorphism	CNV
PIK3CA	8 (15.7%)	P140R (1), I391M (2), E453K (1), E542K (2), E545K (3), H1047R (1)	None	None
PIK3CB	1 (2.0%)	None	None	Copy loss in YCC-30
PIK3C2B	6 (11.8%)	R1366L (1), T1360I (1), T879N (1), P717L (1), P311L (1), R250Q (1)	None	None
PIK3CD	6 (11.8%)	T456A (5), T465M (1)		None
PIK3CG	16 (31.4%)	R90W (2), G436S (1), A621S (2), T857A (2)	S442Y (13)	None

[88]

PIK3R1	14 (27.5%)	None	M326I (14)	None
PIK3R2	19 (37.3%)	P4S (4)	S234R (15)	None
mTOR	2 (3.9%)	T421A (1), I392V (1)	None	None
AKT2	1 (2.0%)	T310M (1)	None	None
Myc	11 (21.6%)	None	None	Amplified in 11 cell lines
ARID1A	6 (11.8%)	G444S (1), R693X (1), Q1458X (1), P1771S (1), D1912N (1), K1907X (1)	None	None
PTEN	2 (3.9%)	None	None	Deleted in 2 cell lines

[89]

[90] 실시예 2: PI3Kβ억제제와 관련된 유전자 변이 발굴

[91] PI3Kβ억제제에 대한 반응성을 위암 세포주를 대상으로 수행했다. 51개 위암 세포주를 대상으로 PI3Kβ 억제제를 0.001 ~ 100 uM까지 다양한 농도로 처리하여 72시간동안 노출시킨 후에 MTT assay를 통해 cell viability를 측정했다. 측정된 cell viability는 CalcuSyn Version 2.0 (Biosoft) 프로그램을 이용해서 IC50 (inhibitory concentration 50)를 계산했다. 계산된 IC50의 값을 낮은 순서 (sensitive)로 정렬하여 PI3K 관련 유전자들의 변이와 비교 분석했다 (도 3). PI3K 관련 유전자의 변이 유무에 따라서 두 그룹간의 PI3Kβ억제제에 대한 IC50값의 평균을 비교했다 (도 4). 두 그룹간의 평균 비교는 Independent samples T test 방법 (IBM SPSS Statistics 20)으로 평가했다. 그 결과 PI3K 관련 유전자들 중에서 PIK3R1의 M326I변이가 있는 경우, 야생형에 비해 PI3Kβ억제제에 대한 IC50값이 낮음을 확인했다 (p=0.003).

[92]

[93] 실시예 3: PIK3R1 M326I 변이와 PI3Kβ 억제제의 관련성 규명

[94] PI3K 관련 유전자들의 변이와 PI3Kβ 억제제 IC50의 관계를 효과적으로

시각화하기 위해서 Sanger Institute에서 발표한 자료를 참고하여 volcano plot으로 확인했다 (도 5). PI3K 관련 유전자들 중 PIK3R1 M326I 변이가 있는 경우, 통계적으로 유의하게 PI3Kβ 억제제에 대해 반응성이 좋은 것을 확인했다.

[95] 또한, PIK3R1 유전자의 대립형질 (allele)의 변이 빈도 (variant allele frequency, VAF)에 따른 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성을 분석한 결과, 두 요인간의 상관관계는 확인할 수 없었다 (도 6).

[96]

[97] 실시예 4: PIK3R1 M326I 변이의 PI3Kβ 억제제 반응성에 대한 작용 메카니즘 분석

[98] PIK3R1 M326I의 변이가 PIK3R1 단백질 구조에 미치는 영향을 in silico 상에서 분석했다. PIK3R1의 326번째 아미노산은 p110단백질의 활성을 조절할 수 있는 nSH2 domain에 가까이 위치하고 있다. 그 결과 M326I에 변이가 있는 경우, PIK3R1(p85)와 p110이 결합했을 때 p110의 활성 구조에 변화가 생기게 되는 것을 in slico 상에서 확인했다 (도 7). PIK3R1 야생형에 비해 변이가 있는 경우, p110의 억제 기능이 약해질 것이라고 예상된다. 또한 PIK3R1 M326I변이와 PI3Kβ (p110β) 의 결합에서 ATP 결합 부위에 결합하는 PI3Kβ 억제제의 결합력이 높아졌다 (도 7, 표 2). 이러한 현상으로 PIK3R1 M326I변이가 있는 경우, PI3Kβ 억제제에 반응성이 좋을 것이라고 분석했다.

[99]

[100] [표2]

야생형 및 변이형 PI3K와 억제제의 결합 에너지 계산 결과

Binding free energies	Wild p110β/p85α/GSK	Variant p110β/p85α/GSK
van der Waal energy	-172.298 +/- 16.638	-173.943 +/- 8.257
Electrostatic energy	-97.561 +/- 14.082	127.492 +/- 14.275
Polar solvation energy	194.650 +/- 33.346	127.492 +/- 14.275
SASA energy	-18.962 +/- 0.731	-18.962 +/- 0.731
Average binding energy	-94.172 +/- 18.270 (-22.50765 kcal/mol)	-100.988 +/- 13.009 (-24.13 kcal/mol)

[101]

[102] 실시예 5: 바이오마커에 따른 PI3Kβ 억제제 반응성 예측율

[103] 전체 군을 대상으로 PI3Kβ 억제제에 대한 반응성을 확인한 결과, ~37%의 낮은

빈도로 반응성을 예측하였다. 기존에 알려진 PI3Kβ 억제제 반응성 예측마커인 PTEN 단백질의 결손 혹은 낮은 발현은 전체 군에서 15% 내외로 나타났으며, 이들군에 대한 PI3Kβ 억제제 반응성 예측 정확도는 ~60%로 전체군을 대상으로 분석했을때보다 증가했다. 그러나 본 연구결과에서 확인된 PIK3R1 M326I 유전자 변이를 기존의 PTEN 결손과 함께 추가해서 PI3Kβ 억제제 반응성을 분석하면 대상군이 최대 35%로 증가되고, 이들 군에 대한 PI3Kβ 억제제 반응성 예측 정확도는 ~75%로 전체군 또는 PTEN 결손군을 대상으로 분석했을 때보다 증가함을 확인했다 (도 8).

[104] 따라서 본 연구 결과, 전체 암 환자들 대상으로 PIK3CA 변이가 있는 10% 환자군은 PI3Kα 억제제를 통한 치료를 시행하고, 나머지 PIK3CA 변이가 없는 90%의 환자들 중에서 PTEN 결손 (~15%)이나 PIK3R1 M326I 변이 (~25%)가 있는 환자들의 경우에는 PI3Kβ 억제제를 통한 치료의 수행을 제시한다 (도 9)

[105]

[106] 실시예 6: 다양한 종류의 암 환자에서 PIK3R1 M326I 변이와 PI3Kβ 억제제의 관련성 규명

[107] 51개의 위암 세포주뿐만 아니라 10개의 대장암 세포주와 10개의 유방암 세포주를 대상으로 위암 세포주와 동일하게 PIK3R1 M326I 변이와 PI3Kβ 억제제의 관련성을 분석했다. 그 결과, 위암 세포주만을 분석했을 때와 동일하게 대장암과 유방암에서도 PIK3R1 M326I 변이가 있는 경우, 야생형에 비해 PI3Kβ 억제제에 대해 반응성이 좋은 것을 확인했다 (도 10)

[108]

[109] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[110]

산업상 이용가능성

[111] 본 발명에 따른 PIK3R1 유전자의 SNP를 확인하는 방법은 고형암 환자에 대하여, 특정 항암제가 효과적으로 작용할지 작용하지 않을 지를 높은 정확도로 예측할 수 있어, 특정 항암제의 항암 화학요법에 효과가 있는 소그룹을 선별하거나, 고형암 환자의 치료요법을 결정하는 데 유용하게 활용할 수 있다.

[112]

서열목록 Free Text

[113] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

[청구항 1] 시료에서 PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1로 표시되는 서열의 21번째의 염기에 위치하는 SNP(NCBI refSNP ID: rs3730089)를 확인하는 단계를 포함하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항암제는 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 베타(phosphoinositide 3-kinase β, PI3Kβ) 억제제인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 베타(phosphoinositide 3-kinase β, PI3Kβ) 억제제는 GSK2636771, SAR260301, TGX-221, AZD5482 및 KIN-193으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 고형암은 위암, 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 유방암, 전이암, 전립선암, 췌장암, 흑색종 및 폐암으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 5] PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1로 표시되는 서열의 21번째의 염기를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드를 확인할 수 있는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 프라이머 조성물.

[청구항 6] PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1로 표시되는 서열의 21번째의 염기를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드와 특이적으로 혼성화하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 프로브 조성물.

[청구항 7] 제1항의 SNP(NCBI refSNP ID: rs3730089)를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 포함하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물.

[청구항 8] 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항암제는 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 베타(phosphoinositide 3-kinase β, PI3Kβ) 억제제인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 베타(phosphoinositide 3-kinase β, PI3Kβ) 억제제는 GSK2636771, TGX-221, AZD5482 및 KIN-193으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 10] 제5항의 프라이머, 제6항의 프로브, 또는 제7항의 항체 또는 압타머를 포함하는 고형암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 키트.

[청구항 11] 다음의 단계를 포함하는 환자 맞춤형 고형암 치료제 선별방법:

(a) 시료에서 PIK3R1 유전자 중의 서열번호 1로 표시되는 서열의 21번째의 염기에 위치하는 SNP(NCBI refSNP ID: rs3730089)를 확인하는 단계; 및

(b) SNP가 존재할 경우, 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 베타(phosphoinositide 3-kinase β, PI3Kβ) 억제제를 환자 맞춤형 고형암 치료제로 선별하는 단계.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 베타(phosphoinositide 3-kinase β, PI3Kβ) 억제제는 GSK2636771, TGX-221, AZD5482 및 KIN-193으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 (a) 단계 이후에 PTEN 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 (a) 단계 이전에 하기의 단계를 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 시료에서 포스파티딜이노시톨 4,5-바이포스페이트 3-카이네이즈 촉매 서브유닛 알파(Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)의 변이를 확인하는 단계; 및

(b) 변이가 존재하면, 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 알파(phosphoinositide 3-kinase α, PI3Kα) 억제제를 환자 맞춤형 고형암 치료제로 선별하는 단계.

[청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 PIK3CA의 변이는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 PIK3CA에서, P140R, I381M, E453K, E542K, E545K 및 H1047R로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

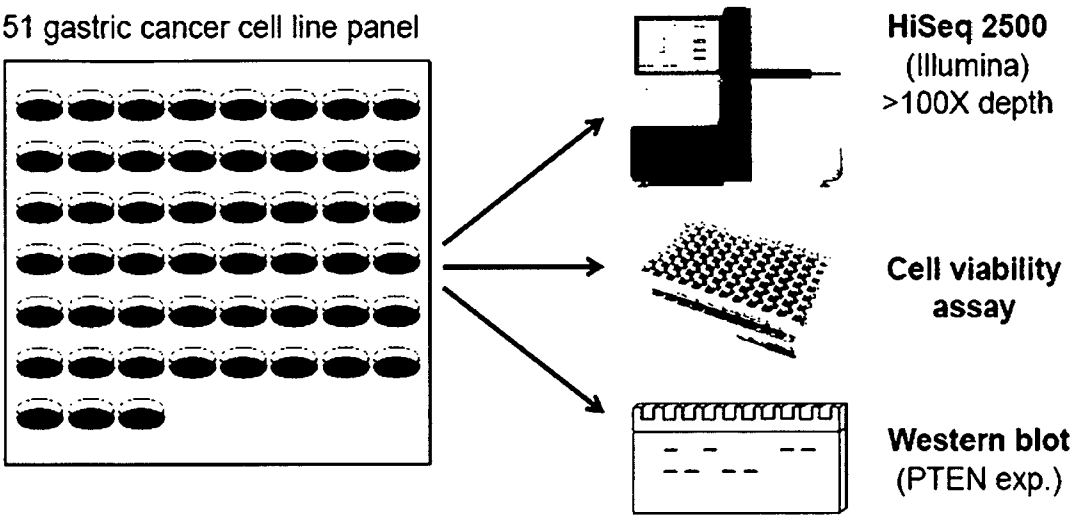
[청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 알파(phosphoinositide 3-kinase α, PI3Kα) 억제제는 HS-173, Alpelisib(BYL719), CH5132799, Gedatolisib (PF-05212384, PKI-587), PIK-75, A66 및 YM201636으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 17] 제11항에 있어서, 상기 고형암은 위암, 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 유방암, 전이암, 전립선암, 췌장암, 흑색종 및 폐암으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

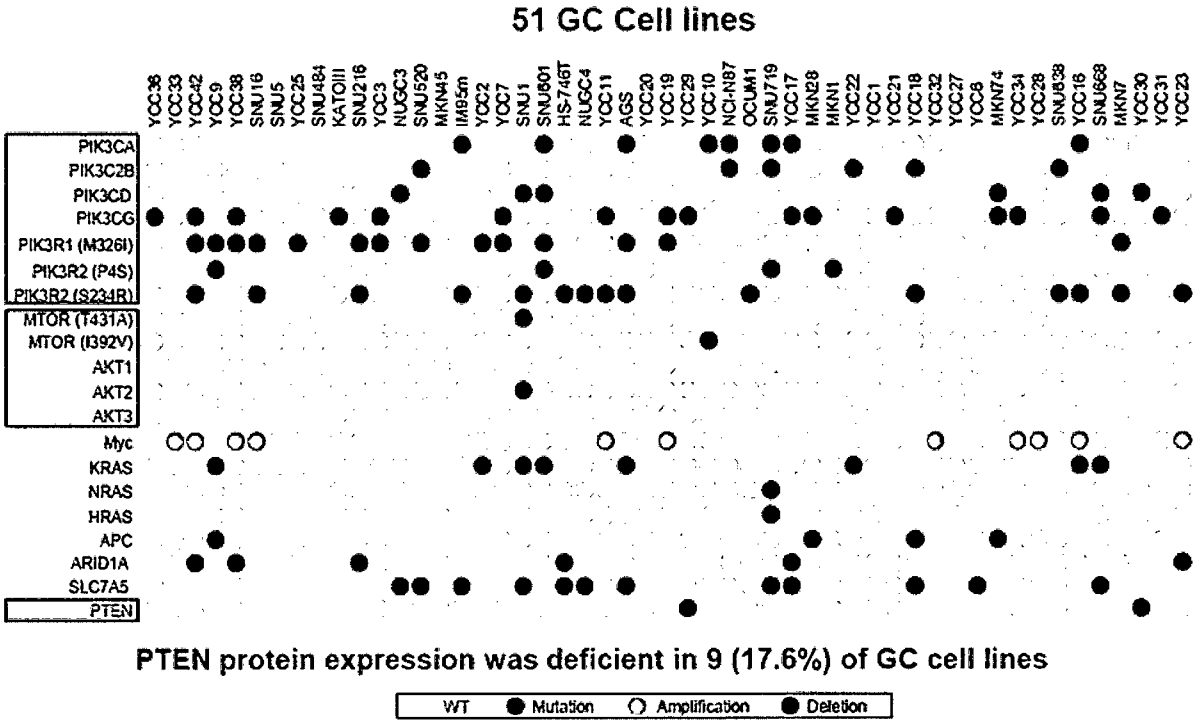
[청구항 18] 제1항에 있어서, 상기 시료는 환자로부터 유래한 유전자 시료인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 19] 제11항에 있어서, 상기 시료는 환자로부터 유래한 유전자 시료인 것을 특징으로 하는 방법.

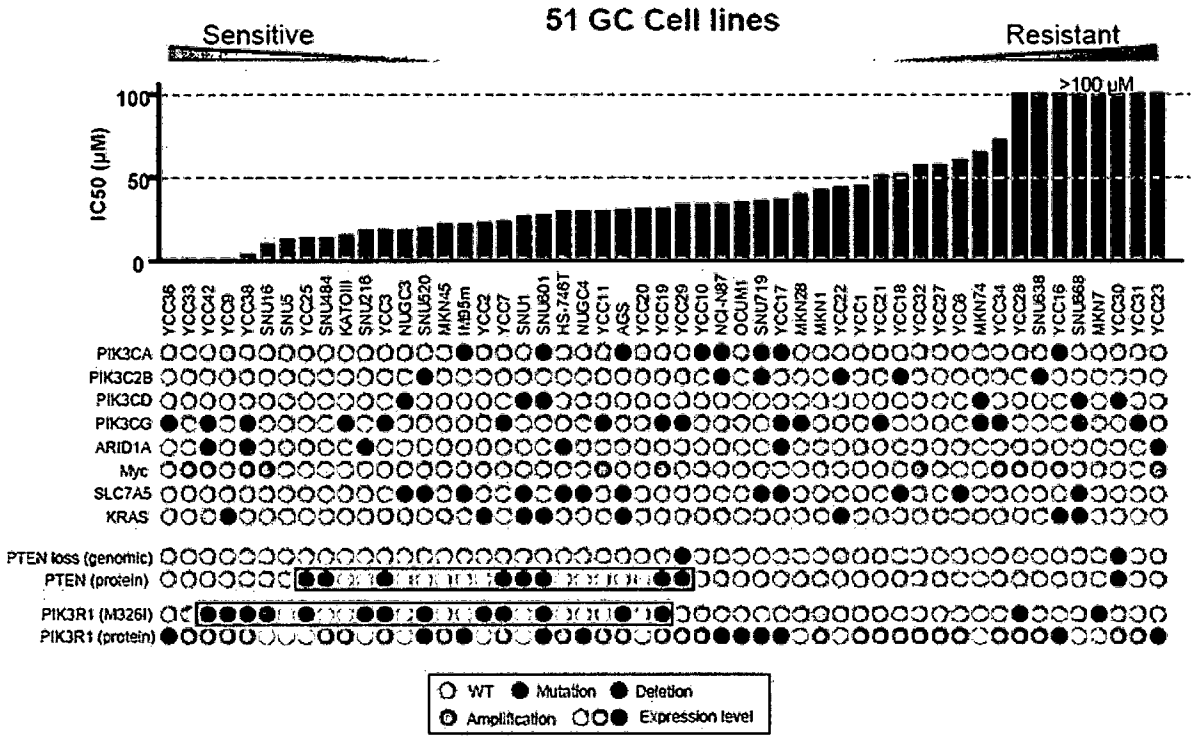
[도1]


51 gastric cancer cell line panel
HiSeq 2500
(Illumina)
>100X depth
Cell viability
assay
Western blot
(PTEN exp.)

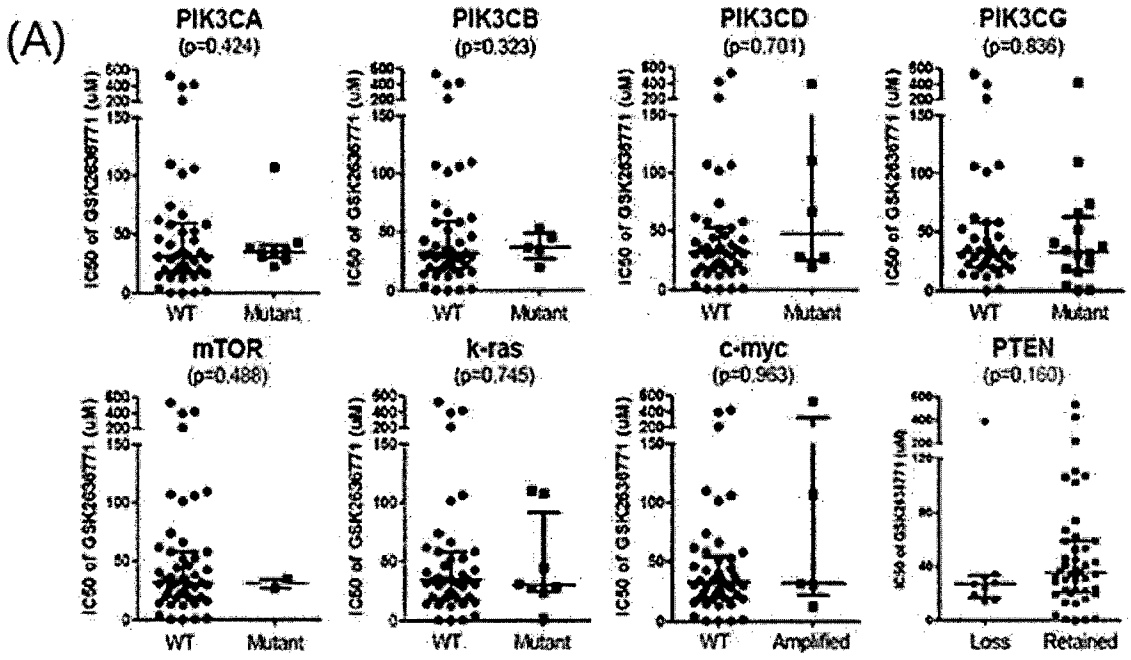
[도2]

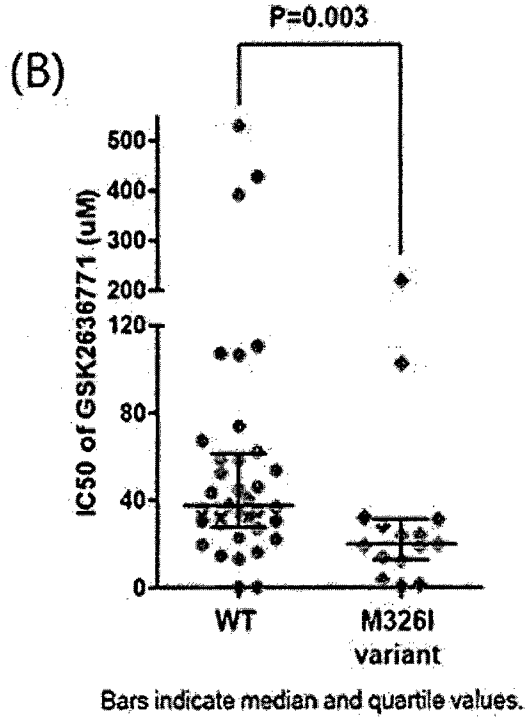

51 GC Cell lines
YCC36 YCC33 YCC42 YCC9 YCC38 SNU16 SNU5 YCC25 SNU484 KATOIII SNU216 YCC3 NUGC3 SNU520 MKN45 IM95m YCC2 YCC7 SNU1 SNU601 HS746T NUGC4 YCC11 AGS YCC20 YCC19 YCC29 YCC10 NCI-N87 OCUM1 SNU719 YCC17 MKN28 MKN1 YCC22 YCC1 YCC21 YCC18 YCC32 YCC27 YCC8 MKN74 YCC34 YCC28 SNU638 YCC16 SNU668 MKN7 YCC30 YCC31 YCC23
PIK3CA
PIK3C2B
PIK3CD
PIK3CG
PIK3R1 (M326I)
PIK3R2 (P4S)
PIK3R2 (S234R)
MTOR (T431A)
MTOR (I392V)
AKT1
AKT2
AKT3
Myc
KRAS
NRAS
HRAS
APC
ARID1A
SLC7A5
PTEN
PTEN protein expression was deficient in 9 (17.6%) of GC cell lines
WT
Mutation
Amplification
Deletion

[도3]


51 GC Cell lines
Sensitive
Resistant
>100 μM
IC50 (μM)
100
50
0
YCC36 YCC33 YCC42 YCC9 YCC38 SNU16 SNU5 YCC25 SNU484 KATOIII SNU216 YCC3 NUGC3 SNU620 MKN45 HB5m YCC2 YCC7 SNU1 SNU601 HS-746T NUGC4 YCC11 AGS YCC20 YCC19 YCC29 YCC10 NCI-N87 OCUM1 SNU719 YCC17 MKN28 MKN1 YCC22 YCC1 YCC21 YCC18 YCC32 YCC27 YCC8 MKN74 YCC34 YCC28 SNU638 YCC16 SNU668 MKN7 YCC30 YCC31 YCC23
PIK3CA
PIK3C2B
PIK3CD
PIK3CG
ARID1A
Myc
SLC7A5
KRAS
PTEN loss (genomic)
PTEN (protein)
PIK3R1 (M326I)
PIK3R1 (protein)
WT
Mutation
Deletion
Amplification
Expression level

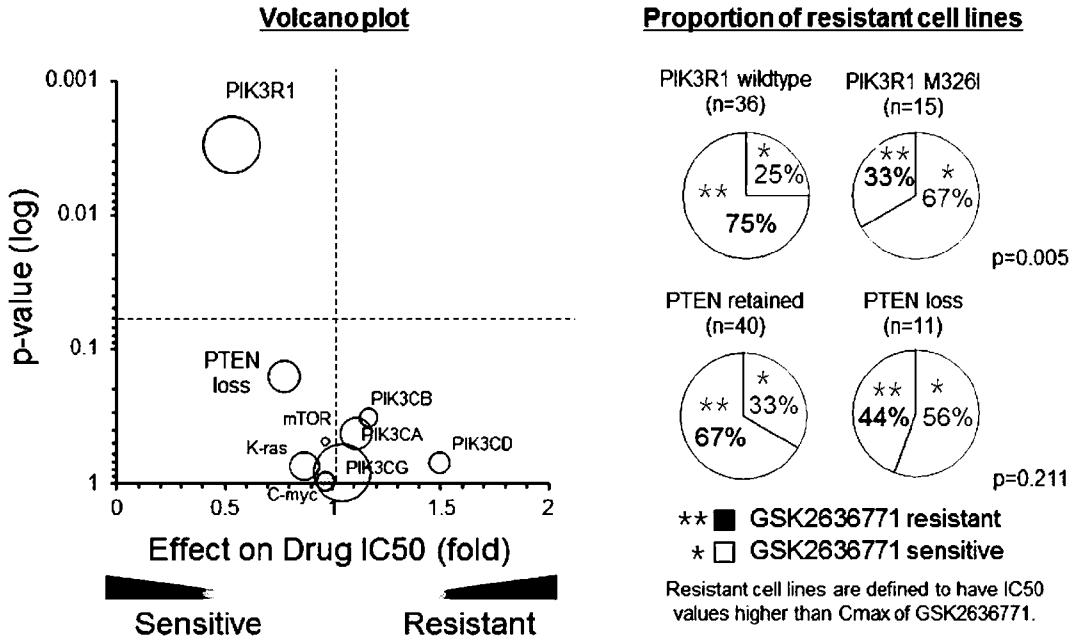
[도4]



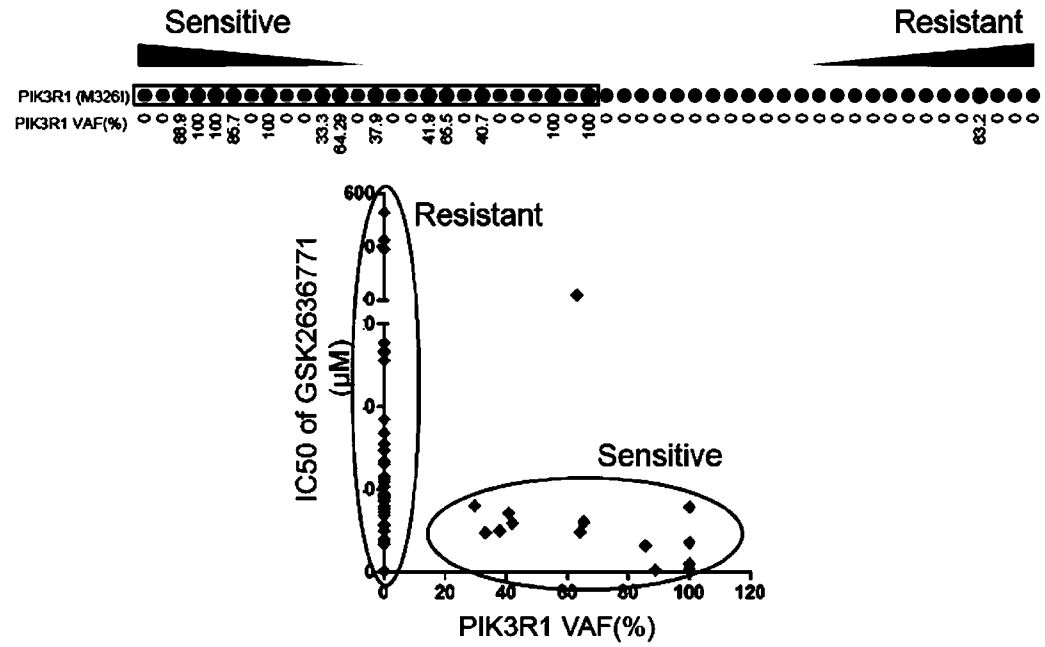


Bars indicate median and quartile values.

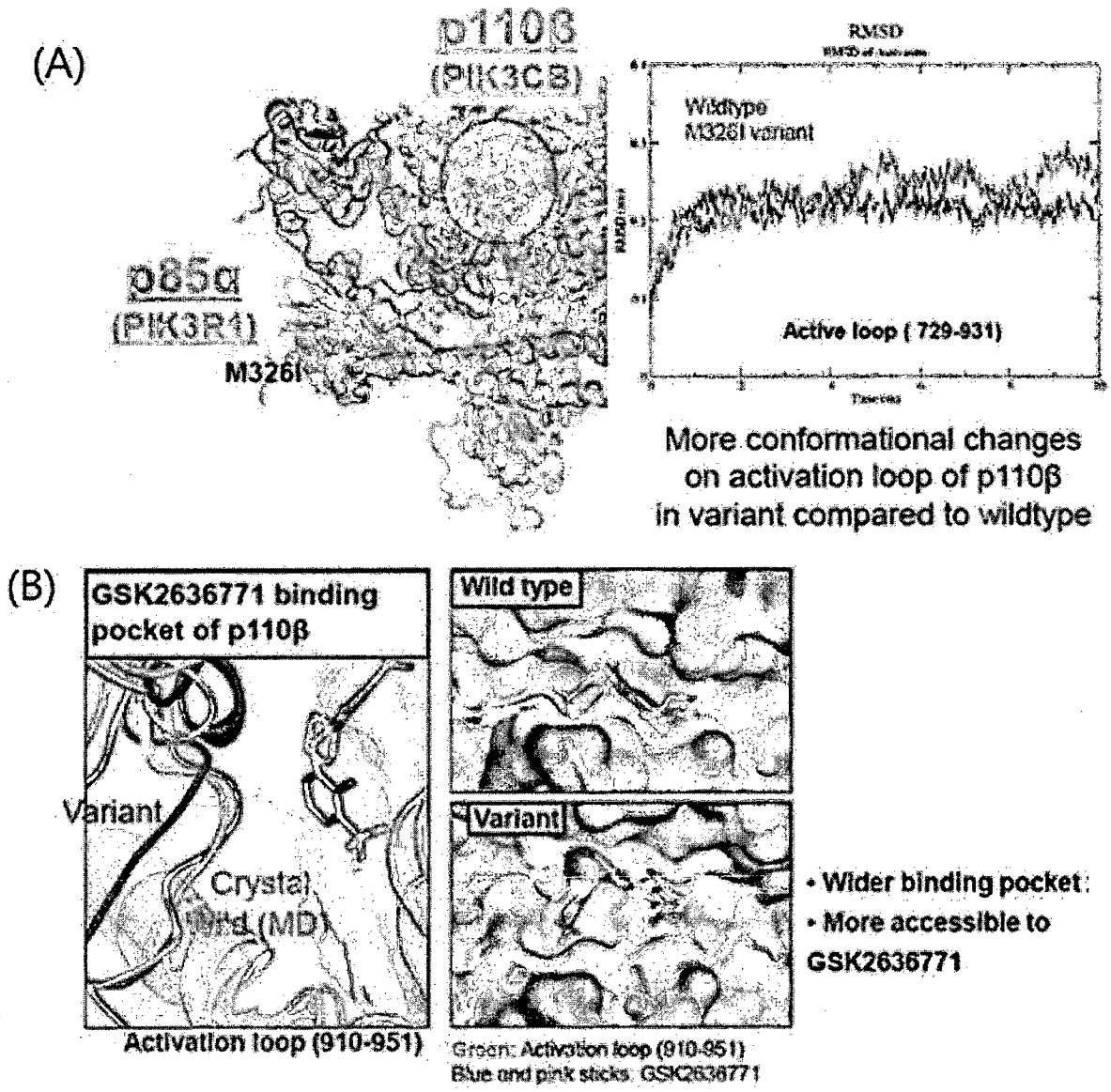
[도5]


Volcano plot
Proportion of resistant cell lines
PIK3R1
PTEN loss
mTOR
K-ras
C-myc
PIK3CB
PIK3CA
PIK3CG
PIK3CD
p-value (log)
0.001
0.01
0.1
1
0
0.5
1
1.5
2
Effect on Drug IC50 (fold)
Sensitive
Resistant
PIK3R1 wildtype
(n=36)
PIK3R1 M326I
(n=15)
25%
75%
33%
67%
p=0.005
PTEN retained
(n=40)
PTEN loss
(n=11)
33%
67%
44%
56%
p=0.211
GSK2636771 resistant
GSK2636771 sensitive
Resistant cell lines are defined to have IC50
values higher than Cmax of GSK2636771.

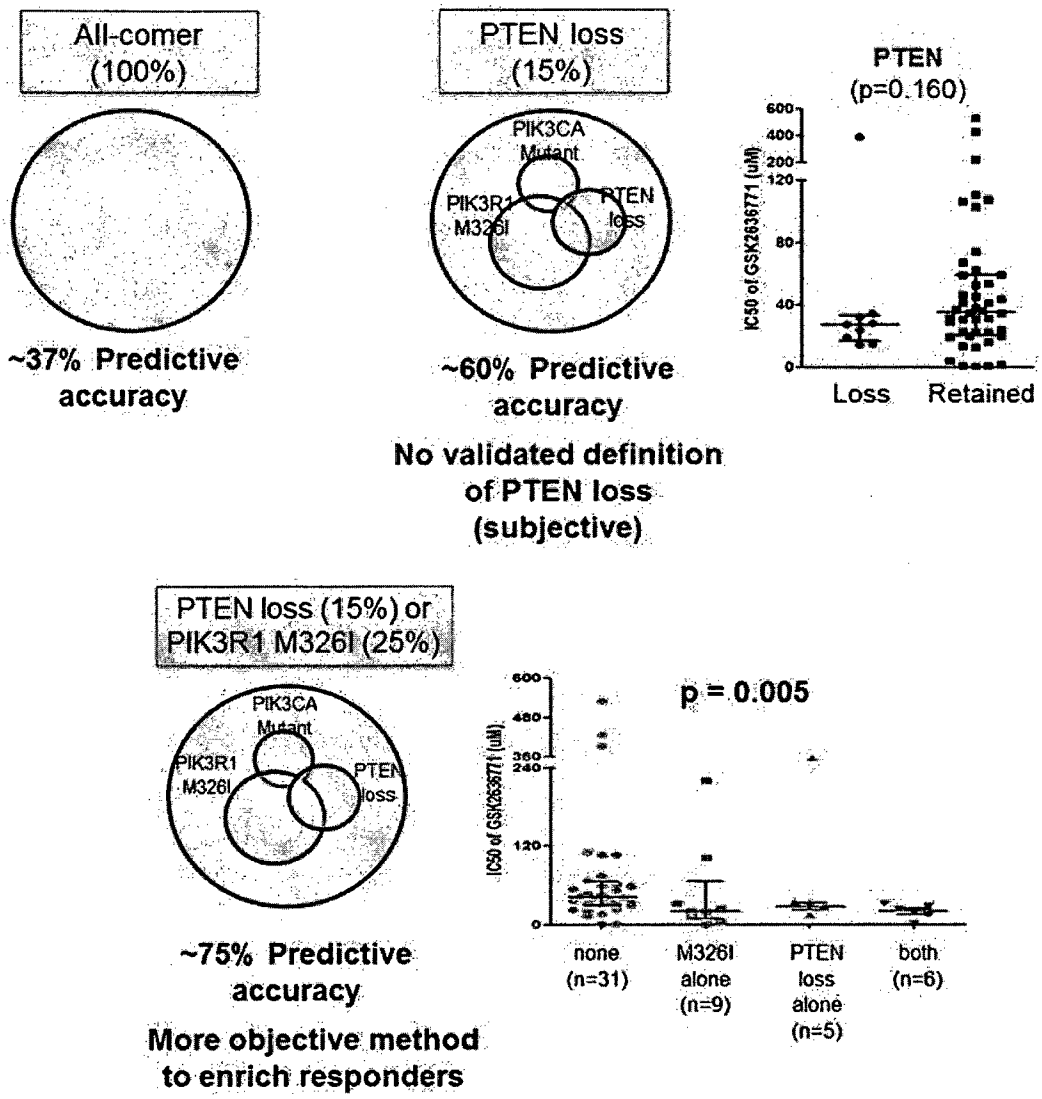
[도6]


Sensitive
Resistant
PIK3R1 (M326I)
PIK3R1 VAF(%)
IC50 of GSK2636771 (μM)
Resistant
Sensitive
0
20
40
60
80
100
120
PIK3R1 VAF(%)

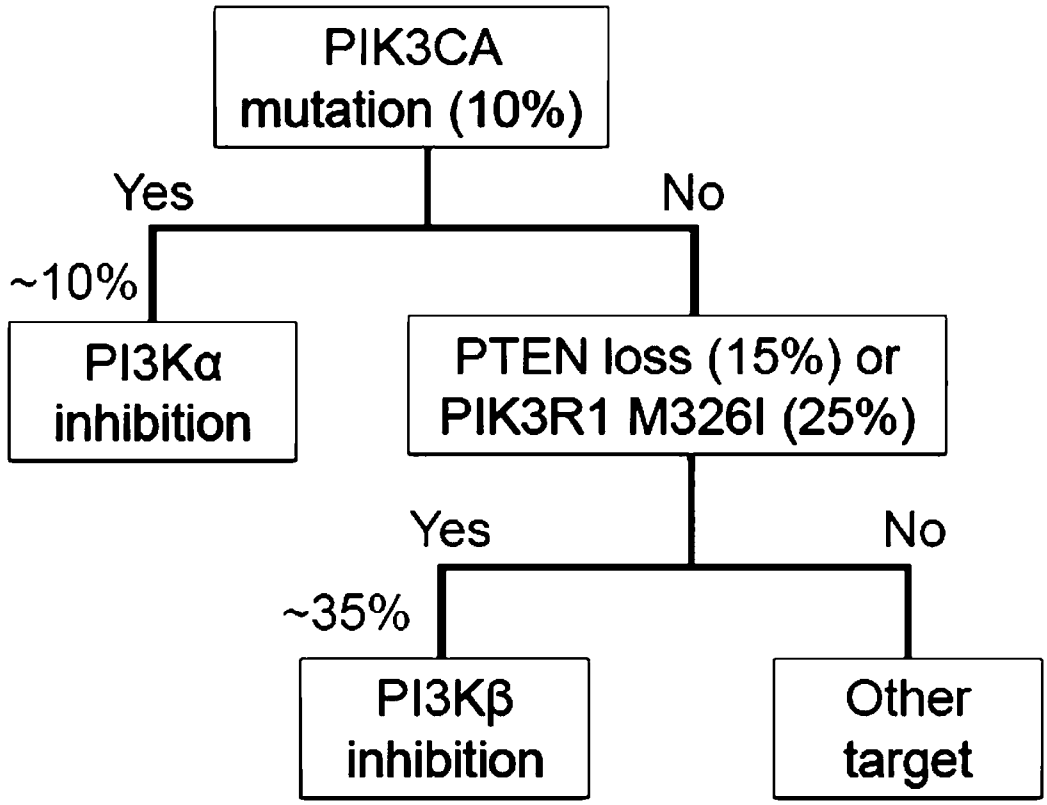
[도7]


(A)
p110β
(PIK3CB)
p85α
(PIK3R1)
M326I
RMSD
Wildtype
M326I variant
Active loop (729-931)
More conformational changes
on activation loop of p110β
in variant compared to wildtype
(B)
GSK2636771 binding
pocket of p110β
Variant
Crystal
Wild (MD)
Activation loop (910-951)
Wild type
Variant
• Wider binding pocket
• More accessible to
GSK2636771
Green: Activation loop (910-951)
Blue and pink sticks: GSK2636771

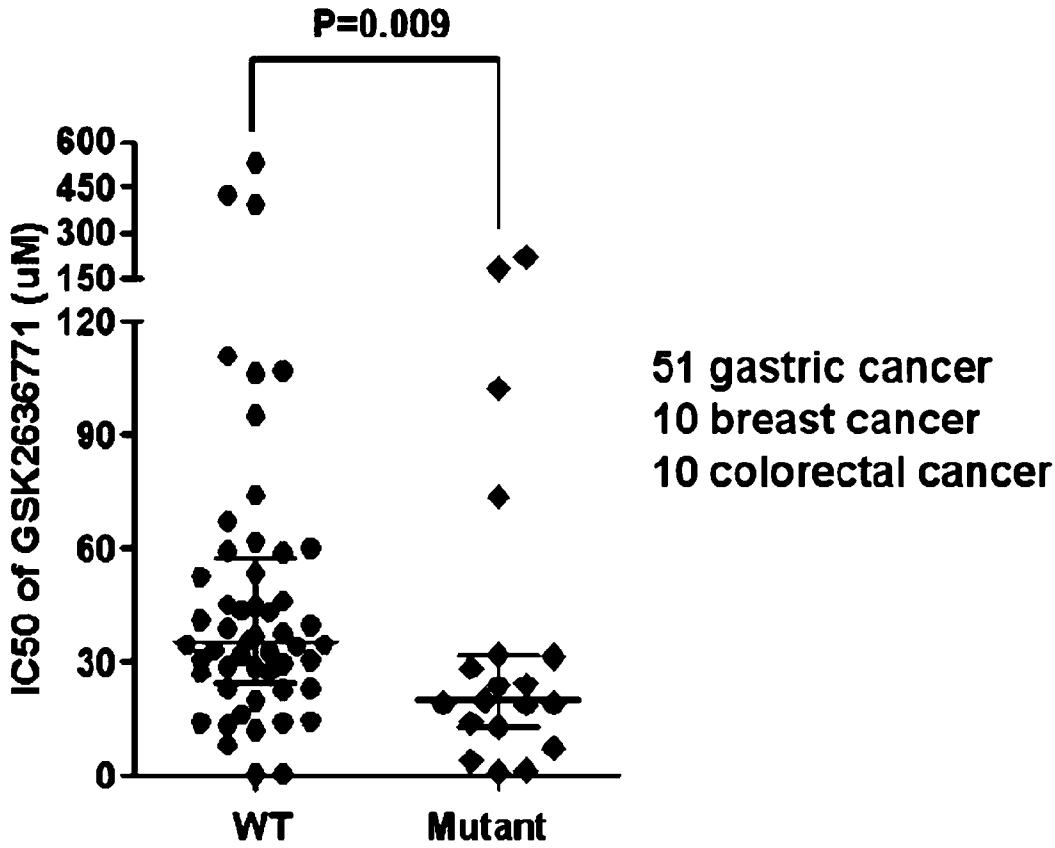
[도8]


All-comer
(100%)
~37% Predictive
accuracy
PTEN loss
(15%)
PIK3CA
Mutant
PIK3R1
M326I
PTEN
loss
~60% Predictive
accuracy
No validated definition
of PTEN loss
(subjective)
PTEN
(p=0.160)
IC50 of GSK2636771 (uM)
600
400
200
120
80
40
0
Loss
Retained
PTEN loss (15%) or
PIK3R1 M326I (25%)
PIK3CA
Mutant
PIK3R1
M326I
PTEN
loss
~75% Predictive
accuracy
More objective method
to enrich responders
p = 0.005
IC50 of GSK2636771 (uM)
600
480
360
240
120
0
none
(n=31)
M326I
alone
(n=9)
PTEN
loss
alone
(n=5)
both
(n=6)

[도9]


PIK3CA mutation (10%)
Yes
No
~10%
PI3Kα inhibition
PTEN loss (15%) or PIK3R1 M326I (25%)
Yes
No
~35%
PI3Kβ inhibition
Other target

[도10]


P=0.009
IC50 of GSK2636771 (uM)
600
450
300
150
120
90
60
30
0
WT
Mutant
51 gastric cancer
10 breast cancer
10 colorectal cancer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/002896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68; A61P 35/00; G01N 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: PIK3R1, SNP, rs3730089, solid cancer, anticancer drug, reactive, phosphoinositide-3 Kinase beta inhibitor, GSK2636771

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEIGELT et al., "Genomic Determinants of PI3K Pathway Inhibitor Response in Cancer", Frontiers in Oncology, vol. 2, document no. 109, pages 1-16 (August 2012) See abstract; page 1, left column; tables 1 and 2.	1-19
A	MAZUMDAR et al., "A Comprehensive Evaluation of Biomarkers Predictive of Response to PI3K Inhibitors and of Resistance Mechanisms in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma", Molecular Cancer Therapeutics, vol. 13, no. 11, pages 2738-2750 (November 2014) See abstract; page 2748, right column-page 2749, left column.	1-19
A	CHEUNG et al., "Naturally Occurring Neomorphic PIK3R1 Mutations Activate the MAPK Pathway, Dictating Therapeutic Response to MAPK Pathway Inhibitors", Cancer Cell, vol. 26, pages 479-494 (13 October 2014) See abstract; page 480, left column.	1-19
A	WO 2013-171777 A2 (ALBERTI) 21 November 2013 See abstract; claims 1-5.	1-19
A	KR 10-2007-0032074 A (ASTRAZENECA AB.) 20 March 2007 See abstract; claims 1-14.	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 DECEMBER 2016 (15.12.2016)	**15 DECEMBER 2016 (15.12.2016)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/002896

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM et al., "Whole-exome Sequencing of Gastric Cancer Identifies Germline PIK3R1 Variant as a Novel Genetic Biomarker for a PI3K Beta-isoform Selective Inhibitor, GSK2636771", In: American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015, Philadelphia, Pennsylvania (18 April 2015) See the entire document. ※ The above document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-19
X	KIM et al., "Abstract 4694: Whole-exome Sequencing of Gastric Cancer Identifies Germline PIK3R1 Variant as a Novel Genetic Biomarker for a PI3K Beta Isoform Selective Inhibitor, GSK2636771", Cancer Research, vol. 75, no. 15, (supplement), page 4694 (01 August 2015) See the entire document. ※ The above document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/002896

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2013-171777 A2	21/11/2013	AU 2013-261018 A1	04/12/2014
		CA 2873017 A1	21/11/2013
		CN 104395754 A	04/03/2015
		EP 2850433 A2	25/03/2015
		IN 10081DEN2014 A	21/08/2015
		IT CH20120008 A1	17/11/2013
		JP 2015-524051 A	20/08/2015
		WO 2013-171777 A3	20/03/2014
KR 10-2007-0032074 A	20/03/2007	AU 2005-263972 A1	26/01/2006
		CA 2574311 A1	26/01/2006
		CN 101027414 A	29/08/2007
		EP 1781815 A2	09/05/2007
		IL 180333 A	04/07/2007
		JP 2008-507264 A	13/03/2008
		US 2008-0286771 A1	20/11/2008
		WO 2006-008526 A2	26/01/2006
		WO 2006-008526 A3	13/07/2006

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/002896

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/68; A61P 35/00; G01N 33/574

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: PIK3R1, SNP, rs3730089, 고형암, 항암제, 반응성, 포스포이노시타이드 3-카이네이즈 베타 억제제, GSK2636771

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WEIGELT 등, 'Genomic determinants of PI3K pathway inhibitor response in cancer' Frontiers in Oncology, 2권, 문서번호 109, 페이지 1-16 (2012.08) 초록; 페이지 1, 왼쪽 칼럼; 표 1 및 2 참조.	1-19
A	MAZUMDAR 등, 'A comprehensive evaluation of biomarkers predictive of response to PI3K inhibitors and of resistance mechanisms in head and neck squamous cell carcinoma` Molecular Cancer Therapeutics, 13권, 11호, 페이지 2738-2750 (2014.11) 초록; 페이지 2748, 오른쪽 칼럼-페이지 2749, 왼쪽 칼럼 참조.	1-19
A	CHEUNG 등, 'Naturally occurring neomorphic PIK3R1 mutations activate the MAPK pathway, dictating therapeutic response to MAPK pathway inhibitors` Cancer Cell, 26권, 페이지 479-494 (2014.10.13) 초록; 페이지 480, 왼쪽 칼럼 참조.	1-19
A	WO 2013-171777 A2 (ALBERTI) 2013.11.21 요약; 청구항 1-5 참조.	1-19
A	KR 10-2007-0032074 A (아스트라제네카 아베) 2007.03.20 요약; 청구항 1-14 참조.	1-19

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 12월 15일 (15.12.2016)	2016년 12월 15일 (15.12.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/002896

C(계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM 등, 'Whole-exome sequencing of gastric cancer identifies germline PIK3R1 variant as a novel genetic biomarker for a PI3K beta-isoform selective inhibitor, GSK2636771', In: American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015, Philadelphia, Pennsylvania (2015.04.18) 전체 문헌 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-19
X	KIM 등, 'Abstract 4694: Whole-exome sequencing of gastric cancer identifies germline PIK3R1 variant as a novel genetic biomarker for a PI3K beta isoform selective inhibitor, GSK2636771`, Cancer Research, 75권, 15호(Supplement), 페이지 4694 (2015.08.01) 전체 문헌 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-19

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/002896

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2013-171777 A2	2013/11/21	AU 2013-261018 A1	2014/12/04
		CA 2873017 A1	2013/11/21
		CN 104395754 A	2015/03/04
		EP 2850433 A2	2015/03/25
		IN 10081DEN2014 A	2015/08/21
		IT CH20120008 A1	2013/11/17
		JP 2015-524051 A	2015/08/20
		WO 2013-171777 A3	2014/03/20
KR 10-2007-0032074 A	2007/03/20	AU 2005-263972 A1	2006/01/26
		CA 2574311 A1	2006/01/26
		CN 101027414 A	2007/08/29
		EP 1781815 A2	2007/05/09
		IL 180333 A	2007/07/04
		JP 2008-507264 A	2008/03/13
		US 2008-0286771 A1	2008/11/20
		WO 2006-008526 A2	2006/01/26
		WO 2006-008526 A3	2006/07/13