



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월12일

(11) 등록번호 10-2487727

(24) 등록일자 2023년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2022.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0109052(분할)

(22) 출원일자 2022년08월30일

심사청구일자 2022년08월30일

(65) 공개번호 10-2022-0127182

(43) 공개일자 2022년09월19일

(62) 원출원 특허 10-2020-0063708

원출원일자 2020년05월27일

심사청구일자 2020년05월27일

(56) 선행기술조사문헌

Cancer Immunol Res (2019) 7 (5): 737-750.

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 23 항

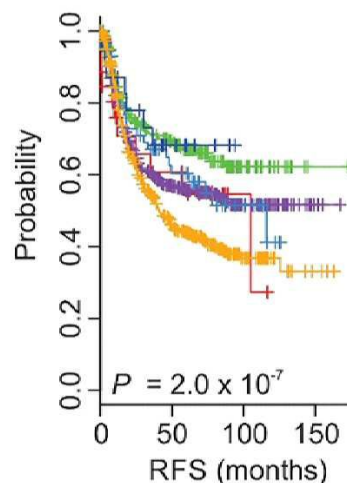
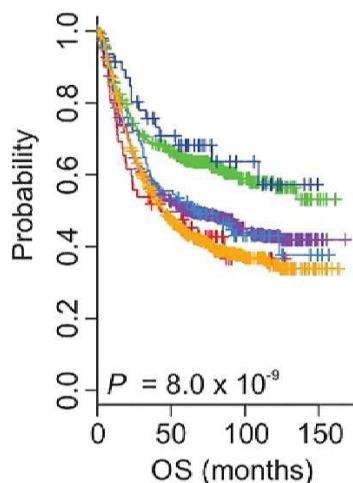
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 암 예후 예측을 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트

(57) 요약

본 발명은 암 예후 예측을 위한 조성물, 이를 포함하는 키트 및 암 예후 예측 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2c



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

CN107488740 A*

W02019157345 A1

Archives of Medical Science, 2019, 제15권, 제6호, 페이지 1539-1546

Molecular Medicine Reports, 2019, 제19권, 페이지 2263-2270

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1)을 포함하는, 위암의 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 2

ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 재제를 포함하는 위암의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 발현 수준을 측정할 수 있는 재제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 4

제2항 및 제3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 위암의 예후 예측용 조성물을 포함하는 위암의 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 5

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 위암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)인, 위암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

측정된 ACTA2-AS1 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우 위암이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는, 위암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 위암의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)인, 위암의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

측정된 ACTA2-AS1 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우 예후가 나쁠 것으로 예측하는, 위암의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1)을 포함하는, 위암의 항암제에 대한 치료 반응성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 12

ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 위암의 항암제에 대한 치료 반응성 예측용 조성물.

청구항 13

제12항의 조성물을 포함하는 위암의 항암제에 대한 치료 반응성 예측용 키트.

청구항 14

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 위암의 항암제에 대한 치료 반응성 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 항암제는 면역 항암제인, 위암의 항암제에 대한 치료 반응성 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

측정된 ACTA2-AS1 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가한 경우, 치료 반응성이 낮을 것으로 예측하는, 위암의 항암제에 대한 치료 반응성 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 17

ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1)을 포함하는, 위암의 상피-중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT) 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 18

ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 위암의 상피-중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT) 진단용 조성물.

청구항 19

제18항의 조성물을 포함하는 위암의 상피-중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT) 진단용 키트.

청구항 20

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 위암의 상피-중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT) 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

측정된 ACTA2-AS1 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가한 경우, 위암 세포가 상피-중간엽 전이 아형을 포함할 가능성이 높을 것으로 예측하는, 위암의 상피-중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT) 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 22

위암 개체로부터 분리한 생물학적 시료 또는 위암 질환 동물 모델에 후보 약제를 처리하는 단계; 및 상기 후보 약제가 처리된 생물학적 시료 또는 위암 질환 동물 모델에서 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 위암의 예방 또는 치료용 약물을 스크리닝하는 방법.

청구항 23

위암 개체로부터 분리한 생물학적 시료 또는 위암 질환 동물 모델에 후보 약제를 처리하는 단계; 및 상기 후보 약제가 처리된 생물학적 시료 또는 위암 질환 동물 모델에서 ACTA2-AS1(ACTA2 Antisense RNA 1) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 위암의 상피-중간엽 세포전이(EMT) 억제 물질을 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 예후 예측을 위한 조성물, 이를 포함하는 키트 및 암 예후 예측 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 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.

[0003] 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.

[0004] 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.

[0005] 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 단백질을 코딩하지 않고 200개 이상의 뉴클레오타이드로 이루어진 전사체이다. 이들은 단백질을 코딩하는 유전자보다 구성 뉴클레오타이드의 수가 많으며, mRNA 보다 큰 정도로 특정 세포/조직 유형으로 제한되며, 암-

유형 특이적 치료 타겟으로 전망되고 있다.

[0006] 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 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 목적은 암의 진단, 예후 또는 치료 반응성을 예측하기 위한 바이오마커 조성물을 제공하고자 한다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 암의 진단, 예후 또는 치료 반응성을 예측하기 위한 조성물, 이를 포함하는 키트를 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 진단, 예후 또는 치료 반응성을 예측하기 위한 정보 제공 방법을 제공하고자 한다.

[0010] 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.

과제의 해결 수단

[0011] 본 명세서에서, 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 nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종 일 수 있으나, 바람직하게는 위암일 수 있다.

[0012] 본 명세서에서 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) 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.

[0014] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 암의 진단용 바이오마커 조성물을 제공하고자 한다.

[0015] 본 발명의 일 구체 예에서는 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 있어서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우, 암의 발병하였거나 발병 가능성이 높을 것으로 예측할 수 있다.

[0016] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란, 상기 암의 발병 여부가 불확실한 개체로, 발병 가능성이 높은 개체를 의미한다.

[0017] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에서 상기 "대조군"이란 암이 발병하지 않은 정상 대조군일 수 있다.

- [0019] 본 발명에서 상기 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 상기한 암의 발병 여부 또는 발병 가능성(위험성)을 확인하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 암의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구체 예에서는 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 있어서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우, 암이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 암의 예후 예측용 조성물을 포함하는 암의 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 키트에는 암의 예후 예측을 위하여 선택적으로 마커를 인지하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 암의 진단용 키트는 마이크로어레이 칩 키트, 유전자 증폭 키트 또는 나노스트링 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암의 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에서 상기 생물학적 시료는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에서는 상기와 같이 분리된 생물학적 시료에서 RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1으로 이루어진 군에

서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0034] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 유전자의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 일 구체 예에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가한 경우, 암이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 암의 예후 예측을 위한 바이오마커 조성물을 제공하고자 한다.
- [0039] 본 발명의 일 구체 예에서는 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 있어서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우, 예후가 나쁠 것으로 예측할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 상기 "대조군"은 암이 발병하지 않은 정상 대조군이거나, 암이 발병된 환자 모집단의 중앙값(또는 해당 환자의 평균값)이거나, 암이 발병된 환자 중 치료 반응성이 높은 환자 모집단의 중앙값(또는 해당 환자의 평균값)일 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 "예후 예측"이란, 병리 상태의 진행 상황 및 치료 과정의 데이터를 취합하여, 병리 상태의 치료 결과를 예측하는 과정을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 예후 예측은 암의 치료 후 사망 가능성, 또는 치료 후 재발 또는 전이로 인한 사망 가능성을 판단하는 것으로 해석될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 암의 예후 예측용 조성물에 관한 것이다.
- [0044] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1의 유전자의 존재 여부와 발현 수준을 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 일 구체 예에서는 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 있어서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우, 예후가 나쁠 것으로 예측할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 암의 예후 예측용 조성물을 포함하는 암의 예후 예측용 키트에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명의 키트에는 암의 예후 예측을 위하여 선택적으로 마커를 인지하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 암의 예후 예측용 키트는 마이크로어레이 칩 키트, 유전자 증폭 키트 또는 나노스트링 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명에서 상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물

(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0054] 본 발명에서는 상기와 같이 분리된 생물학적 시료에서 RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 상기 RP11-572C15.6, FENDRR 또는 ACTA2-AS1 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 유전자의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 일 구체 예에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 RP11-572C15.6, FENDRR 및 ACTA2-AS1으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가한 경우, 예후가 나쁠 것으로 예측할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 암의 항암제에 대한 치료 반응성 예측용 바이오마커 조성물을 제공하고자 한다.
- [0060] 본 발명의 일 구체 예에서는 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 있어서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우, 예후가 나쁠 것으로 예측할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 상기 "대조군"이란 암이 발병하지 않은 정상 대조군이거나, 암이 발병된 환자 모집단의 중앙값(또는 해당 환자의 평균값)이거나, 암이 발병된 환자 중 치료 반응성이 높은 환자 모집단의 중앙값(또는 해당 환자의 평균값)일 수 있다.
- [0062] 본 발명에서 상기 항암제는 면역 항암제 또는 면역 치료제일 수 있다. 본 발명에서 상기 면역 항암제 또는 면역 치료제로는 단클론성 항체, 키메라 항원 수용체(CAR) T-세포, NK-세포, 수지상 세포(DC), 입양 세포 전이(ACT), 면역 체크포인트 조정제, 사이토카인, 암 백신, 애즈버트, 암살상 바이러스, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있고, 여기서 상기 단클론성 항체는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, IDO, TIM-3, LAG-3, 4-1BB, OX40, MERTK, CD27, GITR, B7.1, TGF- β , BTLA, VISTA, 아르기나아제, MICA, MICB, B7-H4, CD28, CD137, 및 HVEM으로 구성되는 군으로부터 선택된 신호화 분자를 조절하는 것일 수 있으며, 바람직한 예시로는 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체일 수 있고, 구체적인 예를 들면, 이필리무맙, 트레멜리무맙, 니볼루맙, 렘브롤리주맙, 피딜리주맙(CT-011), AMP-224, AMP-514(MEDI0680-Medimmune), MPDL3280A(Genentech Roche), MEDI4736, MSB0010718C(Merck Serono), YW243.55.S70 및 MDX-1105로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명에서 사용되는 용어, "면역 치료"란, 면역시스템을 자극하여 질환을 치료하는 방법으로, 본원발명에서는 소화기암을 치료하는 것을 의미한다. 수동적 면역치료는 체외에서 다량으로 만들어진 면역반응 성분 예컨대, 면역세포, 항체, 사이토카인 등을 암 환자에게 주입하여 암 세포를 공격하는 치료방법이고, 능동적 면역치료는 개인의 항체와 면역세포들을 능동적으로 활성화 또는 생산시키게 하여 암 세포를 공격하는 치료 방법이다.
- [0064] 본 발명에서 있어서 "치료 반응성 예측"이란, 환자가 면역 항암제에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응할지 여부를 예측하는 것, 또는 항암제에 대한 내성의 위험성을 예측하는 것, 면역치료 후 환자의 예후 즉, 재발, 전이, 생존, 또는 무병생존 등을 예측하는 것을 의미한다.
- [0066] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 암의 항암제에 대한 치료 반응성 예측용 조성물에 관한 것이다.
- [0067] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종

이상을 포함할 수 있다.

- [0068] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1의 유전자의 존재 여부와 발현 수준을 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명의 일 구체 예에서는 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 있어서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우, 치료 반응성이 낮을 것으로 예측할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 암의 예후 예측용 조성물을 포함하는 암의 항암제에 대한 치료 반응성 예측용 키트에 관한 것이다.
- [0072] 본 발명의 키트에는 암의 예후 예측을 위하여 선택적으로 마커를 인지하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 암의 예후 예측용 키트는 마이크로어레이 칩 키트, 유전자 증폭 키트 또는 나노스트링 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암의 항암제에 대한 치료 반응성 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0076] 본 발명에서 상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명에서는 상기과 같이 분리된 생물학적 시료에서 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0078] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0079] 본 발명에 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 유전자의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명의 일 구체 예에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가한 경우, 치료 반응성이 낮을 것으로 예측할 수 있다.
- [0082] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 암의 상피-중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT) 진단용 바이오마커 조성물을 제공하고자 한다.
- [0083] 본 발명의 일 구체 예에서는 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 있어서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우, 상피 중간엽 전이 아형의 가능성이 높을 것으로 예측할 수 있다.
- [0084] 본 발명에서 상기 "대조군"이란 암이 발병하지 않은 정상 대조군이거나, 암이 발병된 환자 모집단의 중앙값(또

는 해당 환자의 평균값)이거나, 암이 발병된 환자 중 치료 반응성이 높은 환자 모집단의 중앙값(또는 해당 환자의 평균값)일 수 있다.

- [0085] 단, 본 발명에서 상기 “상피 중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT)”란, 상피세포가 중간엽 세포로 변하는 과정을 말한다. 즉 상피세포의 모습을 잃어버리고 중간엽 세포의 특징을 가지게 되는 변이과정으로 개체 형성 발달에 중요한 과정으로 알려져 있으며, 암세포의 성장, 약물 저항성, 침윤 및 전이 등과 관련되어 있다.
- [0087] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 암의 상피-중간엽 전이(EMT) 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0088] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0089] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1의 유전자의 존재 여부와 발현 수준을 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0090] 본 발명의 일 구체 예에서는 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 있어서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우, 상피 중간엽 전이 아형의 가능성이 높을 것으로 예측할 수 있다.
- [0092] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 암의 상피-중간엽 전이(EMT) 진단용 조성물을 포함하는 암의 상피-중간엽 전이(EMT) 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0093] 본 발명의 키트에는 암의 예후 예측을 위하여 선택적으로 마커를 인지하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0094] 본 발명의 암의 예후 예측용 키트는 마이크로어레이 칩 키트, 유전자 증폭 키트 또는 나노스트링 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0096] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암의 상피-중간엽 전이(EMT) 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0097] 본 발명에서 상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0098] 본 발명에서는 상기와 같이 분리된 생물학적 시료에서 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0099] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0100] 본 발명에 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 유전자의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase

protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0101] 본 발명의 일 구체 예에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가한 경우, 암 세포가 상피-중간엽 전이 아형을 포함할 가능성이 높을 것으로 예측할 수 있다.
- [0103] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 암 개체로부터 분리한 생물학적 시료 또는 암 질환 동물 모델에 후보 약제를 처리하는 단계; 및 상기 후보 약제가 처리된 생물학적 시료 또는 암 질환 동물 모델에서 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [0104] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0105] 본 발명에 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 유전자의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0106] 본 발명에서 측정된 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준이 후보 약제가 처리되기 전에 비하여 감소한 경우 상기 후보 약제를 암의 예방 또는 치료용 약제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0108] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 암 개체로부터 분리한 생물학적 시료 또는 암 질환 동물 모델에 후보 약제를 처리하는 단계; 및 상기 후보 약제가 처리된 생물학적 시료 또는 암 질환 동물 모델에서 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암의 상피-중간엽 세포전이(EMT) 억제 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [0109] 본 발명에서 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0110] 본 발명에 상기 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 또는 ZNF667-AS1 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 유전자의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RTR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0111] 본 발명에서 측정된 RP11-572C15.6, FENDRR, ACTA2-AS1 및 ZNF667-AS1 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자의 발현 수준이 후보 약제가 처리되기 전에 비하여 감소한 경우 상기 후보 약제를 암의 상피-중간엽 세포 전이 억제 물질로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0112] 본 발명에서는 암 중에서도 특히 위암을 조기에 정확하면서도 간편하게 진단할 수 있고, 더 나아가서는 암의 예후, 또는 항암제에 대한 치료 반응성을 예측할 수 있어, 암 환자에 대한 가장 적절한 치료 방식을 선택할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

- [0113] 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(\log_2 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(\log_2 전환 스케일)로 나타내어지는 상대적 높고 낮은 발현 수준을 나타낸다.

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.

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.

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.

도 5는 면역 요법에 대한 치료 반응성과 LNC6 아형(n=45) 사이의 상호 관계를 나타낸 것으로, 도 5a는 LNC6 아형에 따른 램브롤리주맵에 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.

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 패밀리를 구성요소를 나타낸 것이고, 도 6b는 각 LNC6 아형에서 64개의 세포 유형의 구성요소를 나타낸 것이다.

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 억다운 효율을 분석한 결과이며, 도 7c 내지 7e는 세포 이동 및 침윤 어췌이로부터 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 어췌이로부터 반 최고치 억제 농도(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)를 나타낸 것이다.

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.

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.

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.

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 계층의 부분을 나타낸 것이며, 특이적으로 복제 수가 변화된 유전자는 q 값에 의해 필터링되고, 빈도에 의해 순위를 매겼다.

다(왼쪽). 카이 자승 검증으로 아형 특이적 복제수 변화를 확인하였다.

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.

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.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0114] 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.

[0116] 실시예

[0118] TCGA 위암 코호트의 게놈 및 임상적 데이터

[0119] 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.

[0121] 아형-특이적 lncRNA의 아형 분류 및 동정

[0122] 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.

[0124] LNC6 아형의 예측 모델

[0125] 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 베이지 확률(Bayesian probability)을 측정하였다. 실험 코호트에서 시료를 베이지 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.

[0127] 실험 코호트의 게놈 및 임상적 데이터

[0128] 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.

[0130] 면역치료 코호트 및 GC 세포주에서의 lncRNA 발현 분석

[0131] 로우 RNA 시퀀싱 데이터로부터 lncRNA 발현을 분석하였다. 켈브롤리주맵 및 29 DNA-핑거프린트 GC 세포주의 임상 2기에 참여한 전이성 GC 환자로부터 얻어진 45개의 시료에 대하여 수행하였다. STAR 2.6.0c를 이용하여 국제 암유전체 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.

[0133] 다른 분자 아형의 예측

[0134] 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.

[0136] 통계적 분석

[0137] 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(EP-L6C 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.

[0139] 생물 정보학 분석

[0140] 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).

[0141] 표준 경로(canonical pathways)와 각 아형의 상류 조절자(upstream regulators)를 규명하기 위하여 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)를 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.

[0143] 다른 생물학적 특성 분석

[0144] 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 725 개의 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.

[0146] 다른 게놈 분석

[0147] 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 >0.15로 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.

[0149] 세포 배양 및 형질 전환

[0150] 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℃의 온도 조건 하에서 수행되었다. 표 1에 나타낸 siRNA (Thermofisher Scientific)에 의한 ZNF667-AS1 녹다운은 mirus 형질 전환 시약(Mirus bio)을 사용하여 수행되었다.

표 1

[0152]		서열(5'→3')
센스 가닥(Sense)		GCUCCUAGCAACCAACAUTT
안티센스 가닥(Antisense)		AAUGUUGGUUGCUAGGAGCTG

[0154] 정량적 실시간 RT-PCR

[0155] 암 세포에 대하여 TRI 시약을 이용해 총 RNA를 추출하였다. M-MLV 역전사효소(Enzymomics)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.

표 2

유전자	정방향 프라이머(Forward Primer)	역방향 프라이머(Reverse Primer)
FENDRR	AGAGTGCTTCCACTGCCCTA	CCCATTGCAAAGGCTACAT
MAGI2-AS3	TGGGTCTGTGCAGAGTTGAG	GCTGGTTATGGCCAATGAGT
ACTA2-AS1	GTGGTTCTGGTTTGCTGAT	CTGGCCCTGTAACACCAGAT

ZNF667-AS1	GGACACTGTGCAGGATGATG	GGCAAGAATGCTGTGTCTCA
RP11-572C15.6	TCATCCCTCTTCCTTGATGG	ATTGGCAACTTTGGGCTATG

[0159] 세포 생존율 어쎬이

[0160] 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.

[0162] 세포 이동능 및 침윤능 어쎬이

[0163] 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.

[0165] 면역 블롯

[0166] 프로테아제 억제제 콕테일 및 포스파타제 억제제(Roche)로 보충된 RIPA 버퍼에서 세포를 용혈시켰다. BCA 단백질 어쎬이 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 거자무과산화수소-컨쥬게이트된 2차 항체로 배양한 뒤 향상된 케미-루미네센스(chemi-luminescence) 검출(ECL plus kit, Pierce)로 시각화 하였다.

[0168] 위암에서 lncRNA의 영향을 확인하기 위한 시스템적 접근

[0169] 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).

표 3

[0171]

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-307407.12	L6B	0.66
ENSG00000240731.1	RP5-89003.9	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	ASHIL-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-233602.1	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-PMS2P11	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	RP11-31207.2	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	FENRR	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	RP11-181I14.10	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	RP11-48020.4	L6F	-1.05
ENSG00000203499.6	FAM83H-AS1	L6F	-1.26
ENSG00000259187.1	CTD-2008A1.1	L6F	-1.55

[0173] LNC6의 인구학적 및 임상학적 연관성

[0174] 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.

표 4

[0176]

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

[0178] LNC6 아형의 진단적 중요성

[0179] 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 베이저안 확률의 ROC 분석 결과 AUC는 0.9143 내지 0.9845에 해당

하였다. 이러한 로버스트 예측 모델(robust prediction model)을 일반 GC 코호트 데이터세트에 적용하였다. 이때 상기 데이터세트에서 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.

[0181] LNC6 아형 및 보조 항암 화학 요법

[0182] 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 화학요법의 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.

[0184] LNC6 아형 및 면역 치료

[0185] 켈브롤리주맵으로 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 대하여, 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 세포주, 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).

[0187] 위암 세포주에서 lncRNA에 의해 중재되는 줄기세포 유사 특징들

[0188] 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 있는 지 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-카드린(E-cadherin)의 발현이 증가되고, N-카드린(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).

표 5

[0190]

아형	세포주	RP11-572C1 5.6	ZNF667-AS1	MAGI2-AS3	FENDRR	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-EMT	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
	P value (Student's t-test)	0.12	0.04	0.79	0.68	0.17

[0192]

LNC6 아형의 생물학적 영향

[0193]

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.

[0194]

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.

표 6

[0196]

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%
	Type I Diabetes Mellitus Signaling	4.07	-1.63	8.1%
L6B	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%
	G ai Signaling	7.44	2.83	27.9%

표 7

[0197]

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

[0199] LNC6 아형의 게놈 배경

[0200] 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 특징지어 지며, 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 특징지어 진다. 또한, 아형-특이적 lncRNA의 후생적 배경 및 규명된 후생적 조절된 lncRNAs에 대하여 확인하였다(도 13).

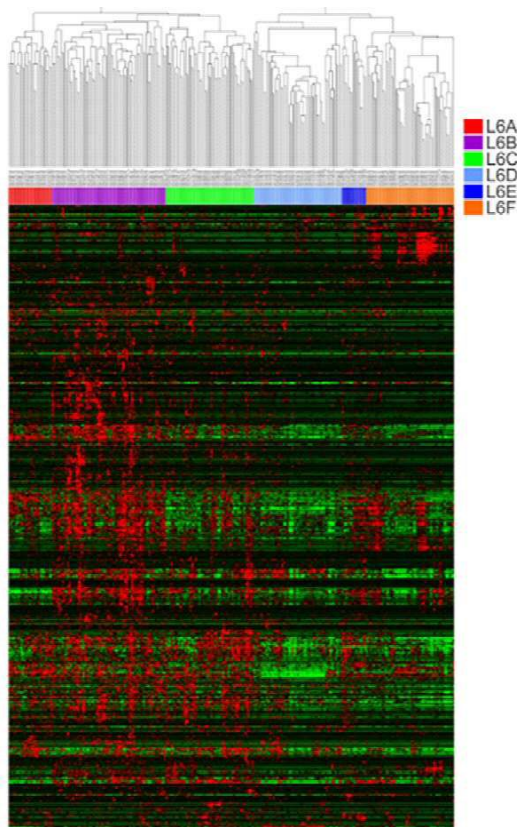
[0202] 다른 분자적 아형의 유사도

[0203] 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% 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus; EBV) 아형에 해당하였고, L6F 아형은 유전적으로 안정(genomically stable; GS)한 아형, MP 아형 및 EMT 아형에서 풍부하였다.

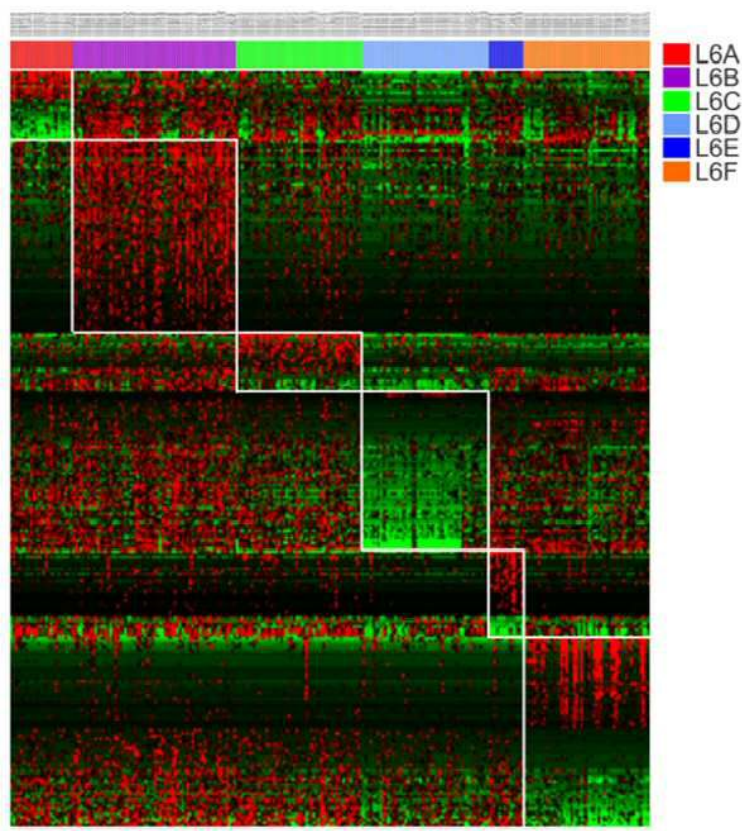
[0205] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

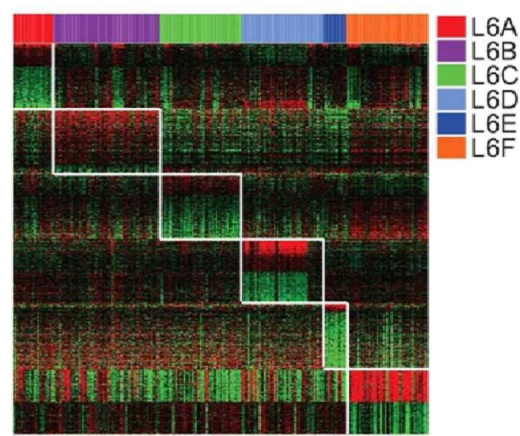
도면1a



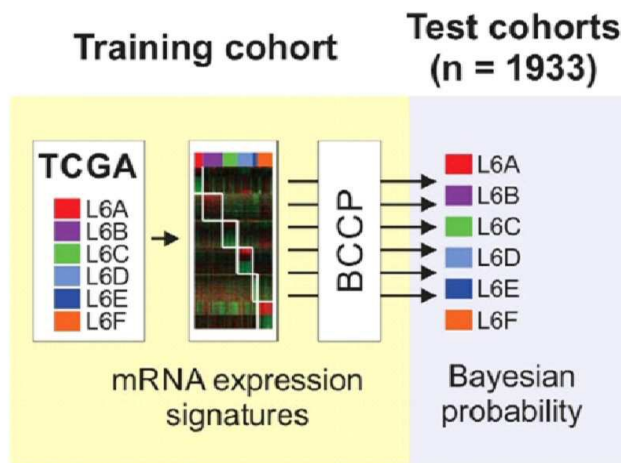
도면1b



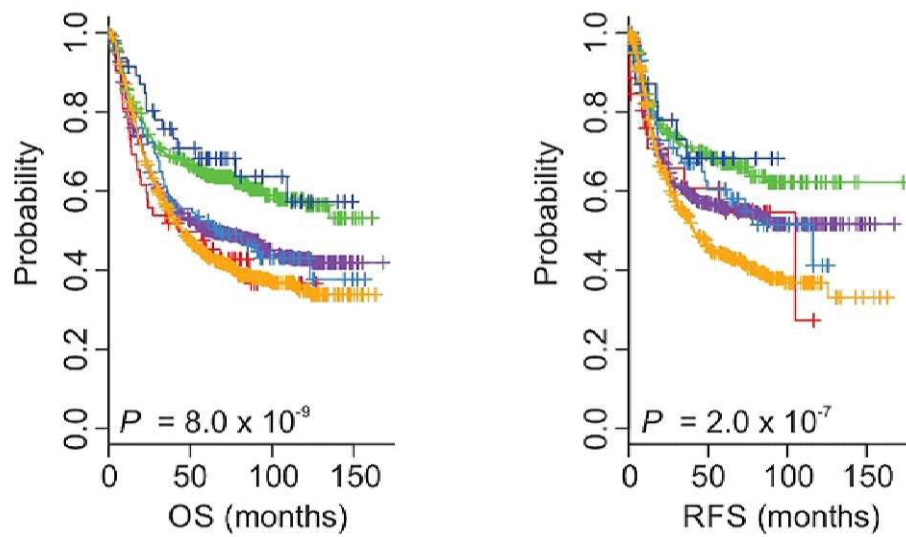
도면2a



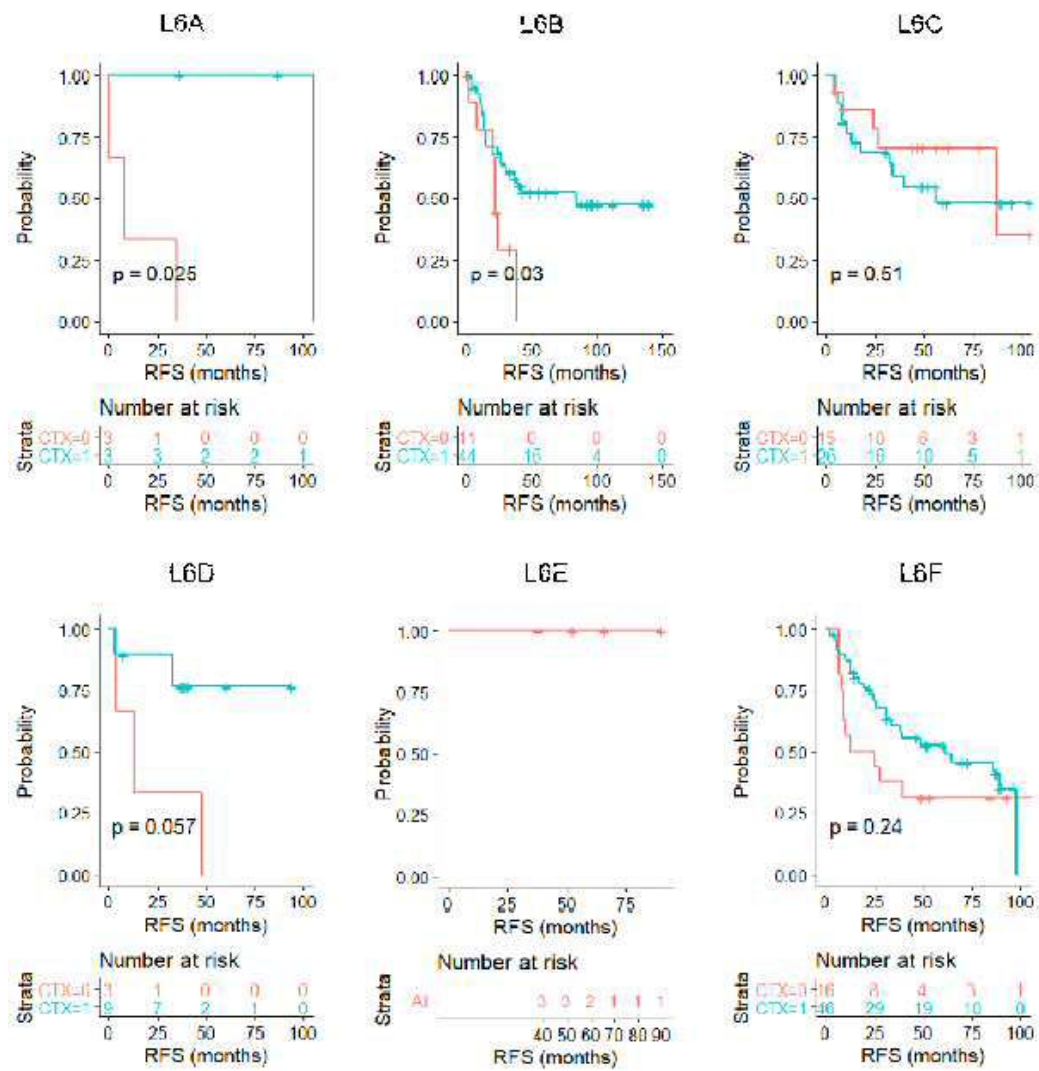
도면2b



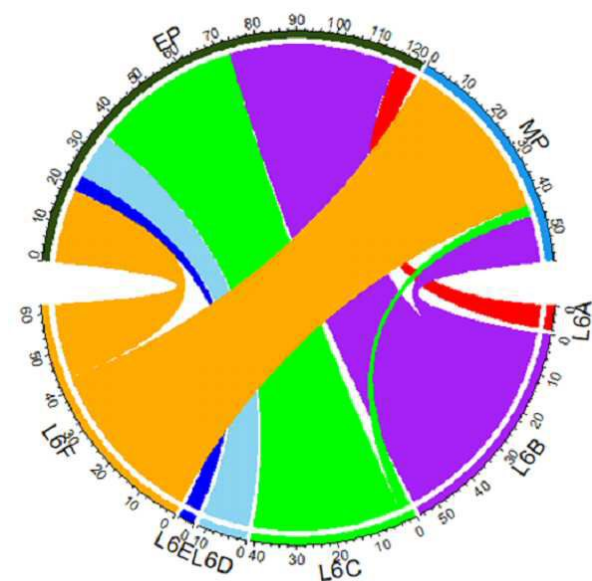
도면2c



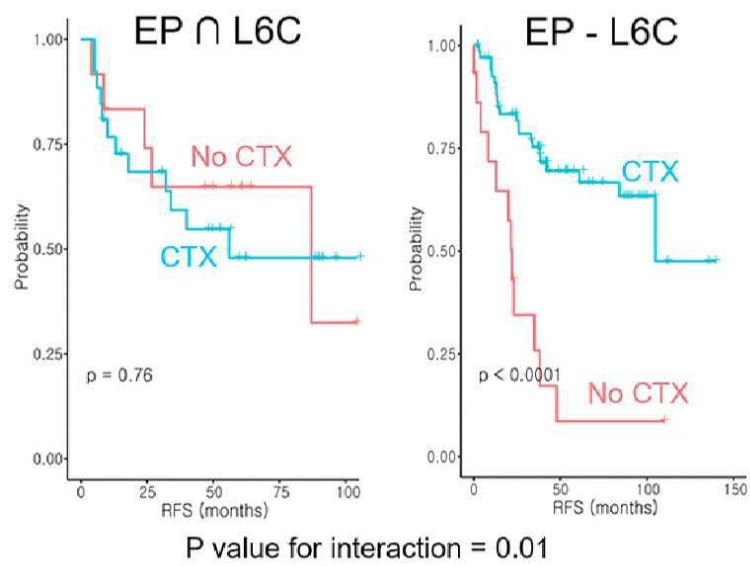
도면3



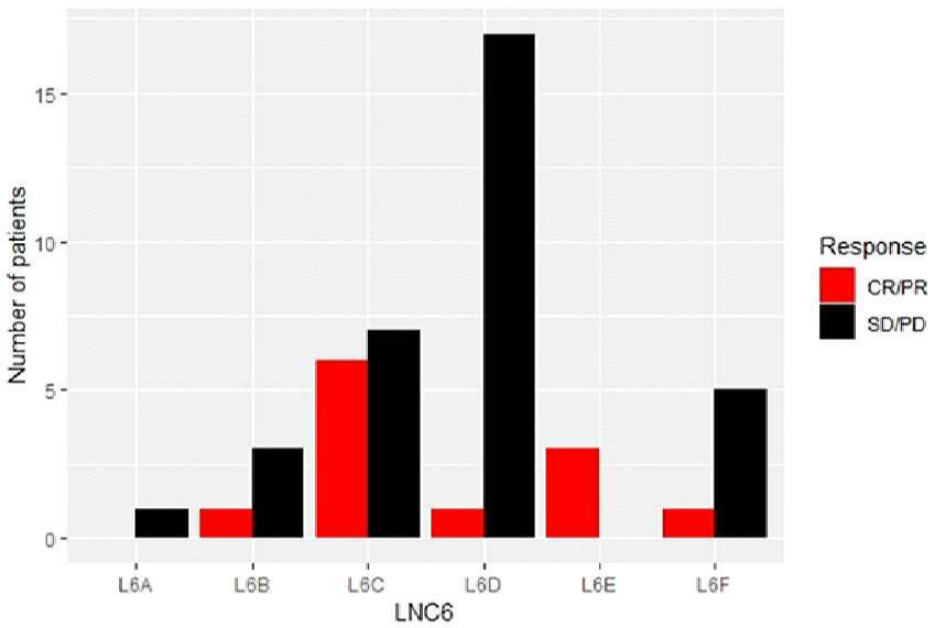
도면4a



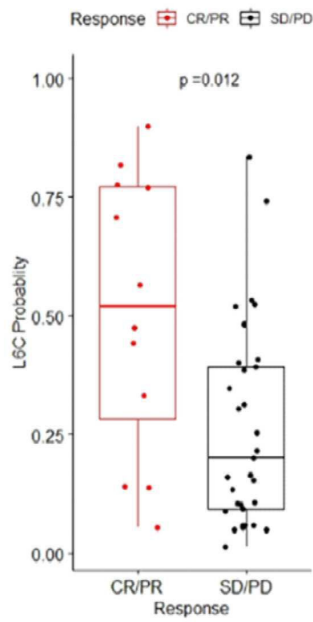
도면4b



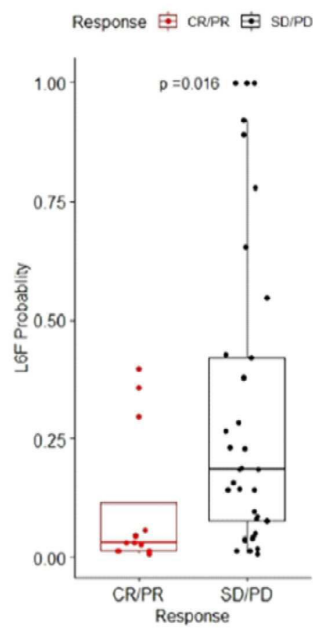
도면5a



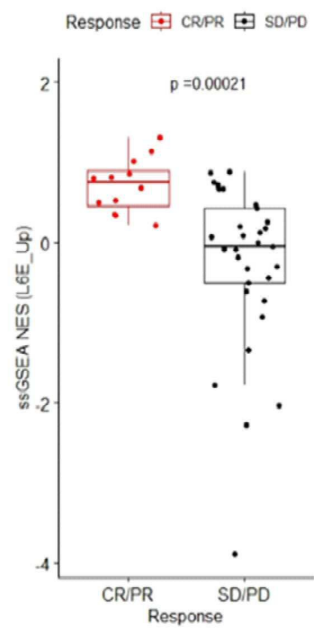
도면5b



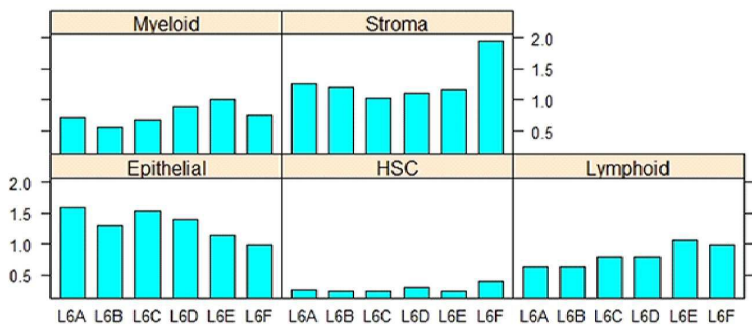
도면5c



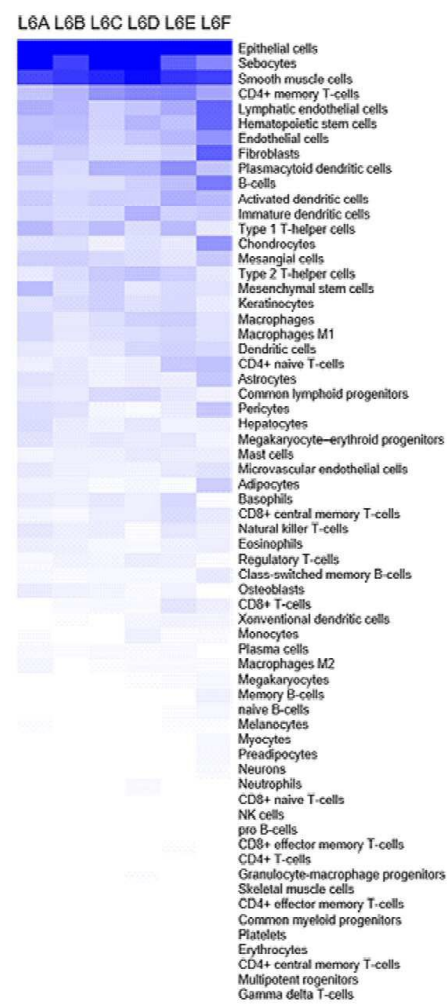
도면5d



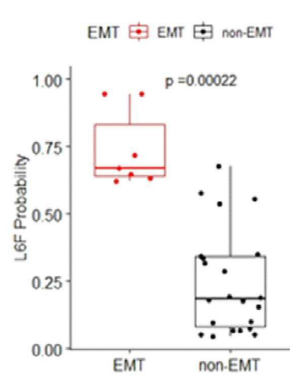
도면6a



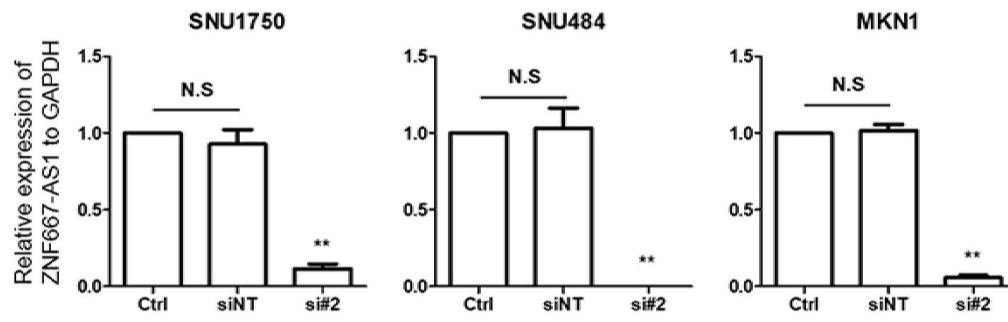
도면6b



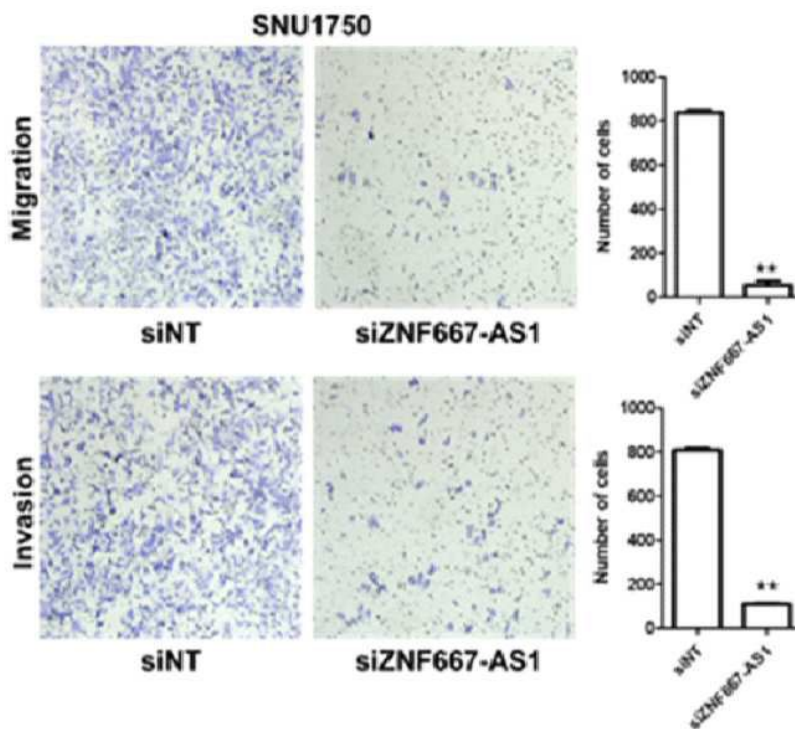
도면7a



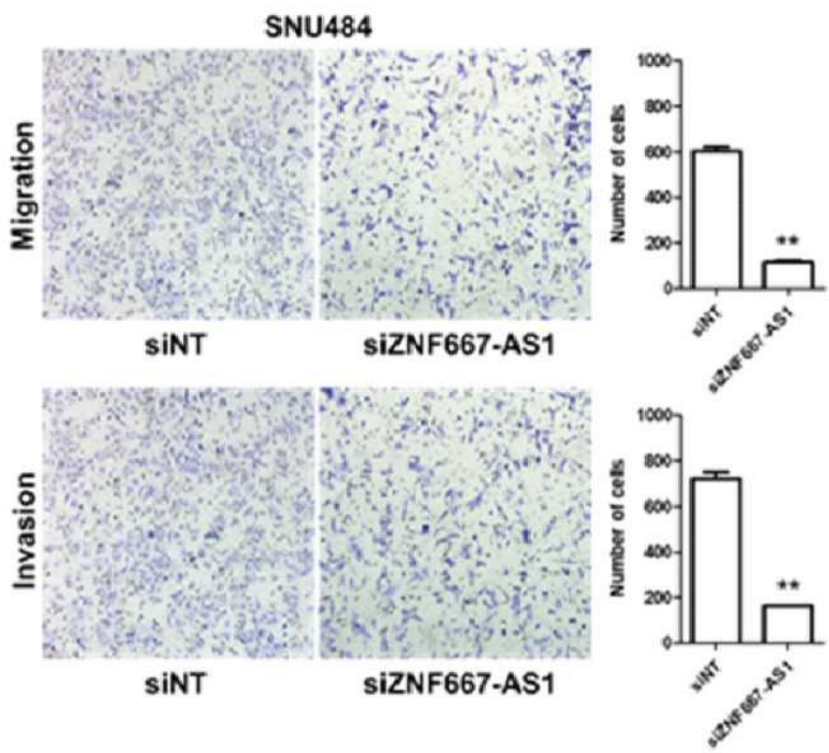
도면7b



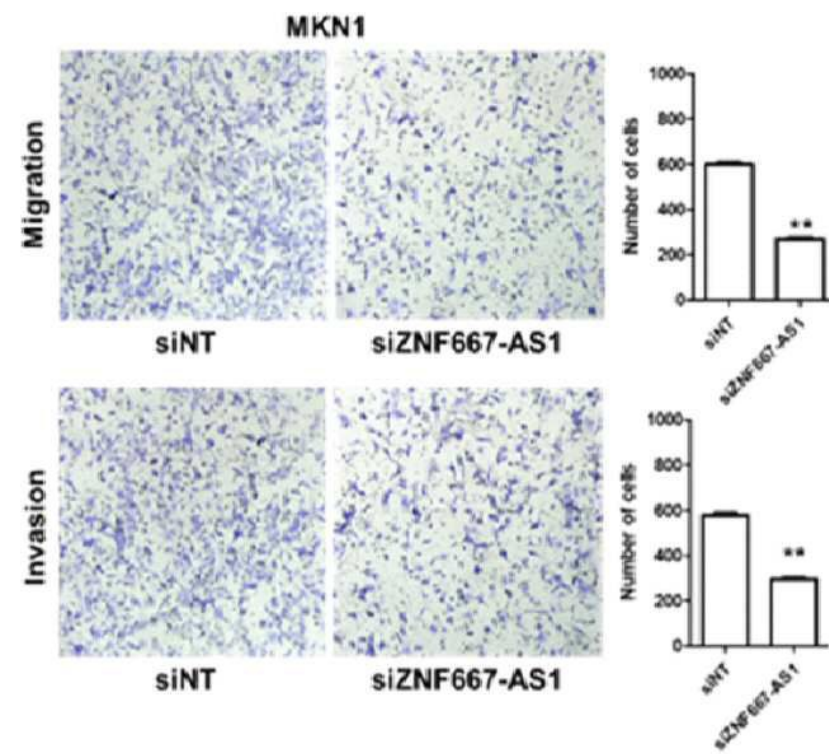
도면7c



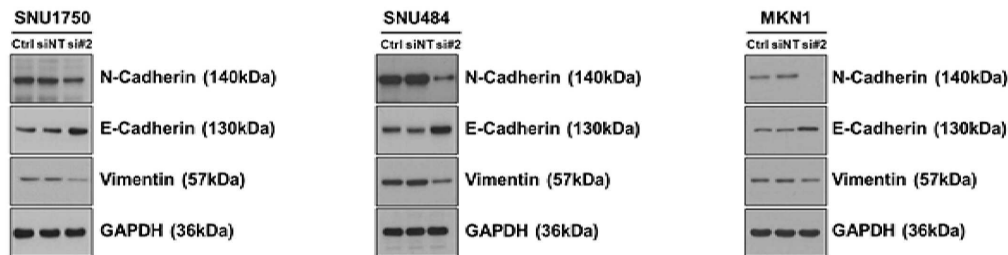
도면7d



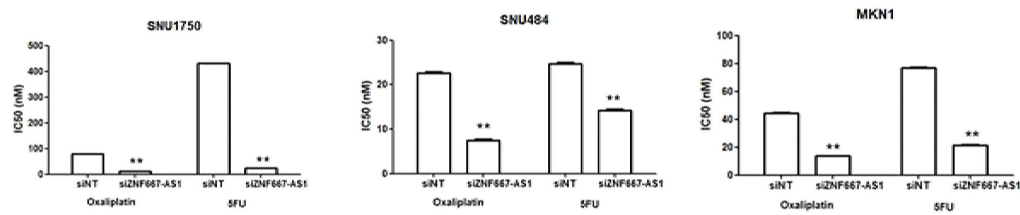
도면7e



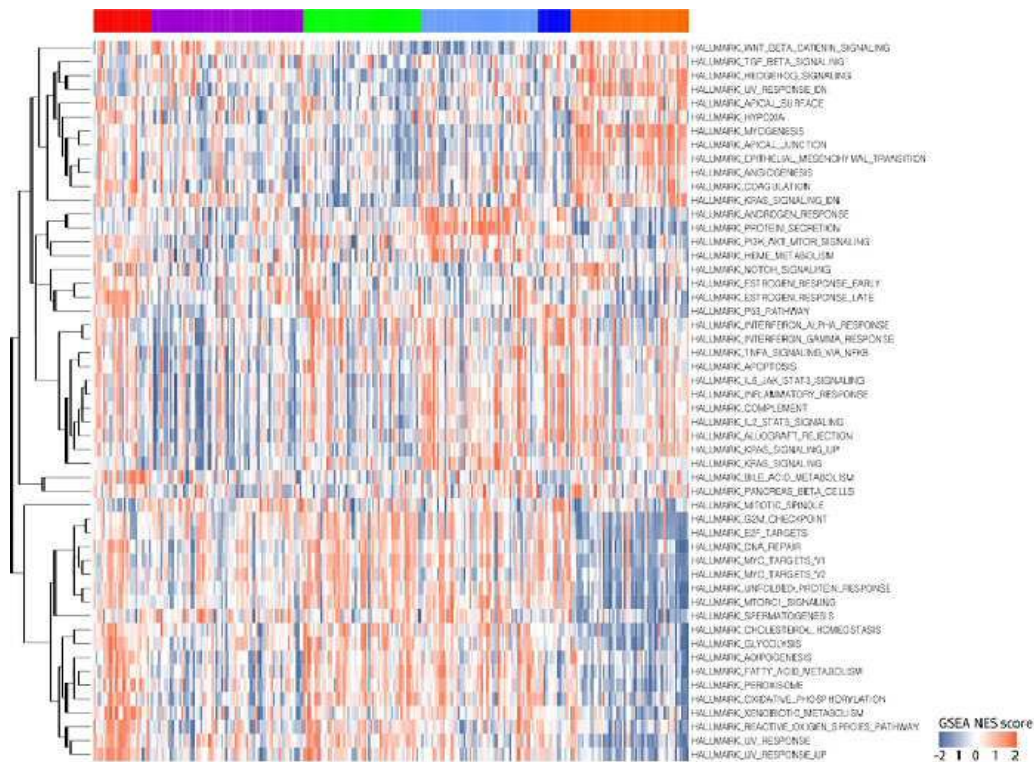
도면7f



도면7g



도면8



Gene Set Enrichment Analysis of hallmark gene sets in TCGA cohort (n=258)

Gene expression value was normalized across samples by Z score.

ssGSEAProjection was applied with rank normalization method.

Enrichment score was normalized across samples by Z score to visualize.

도면9

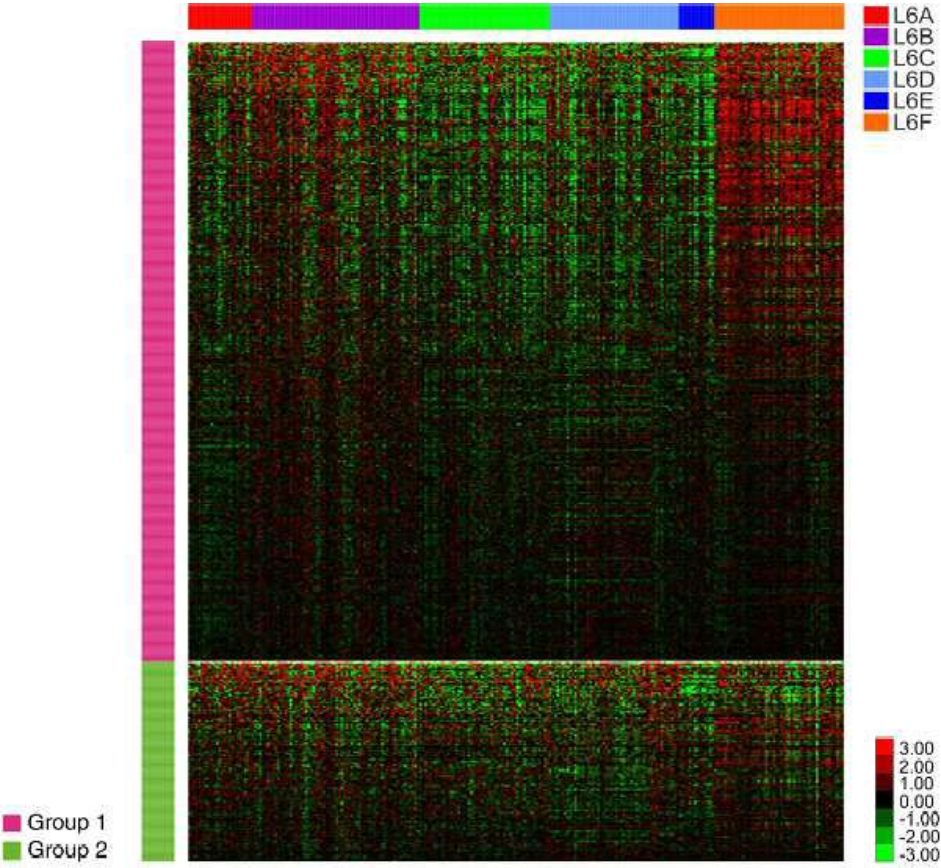
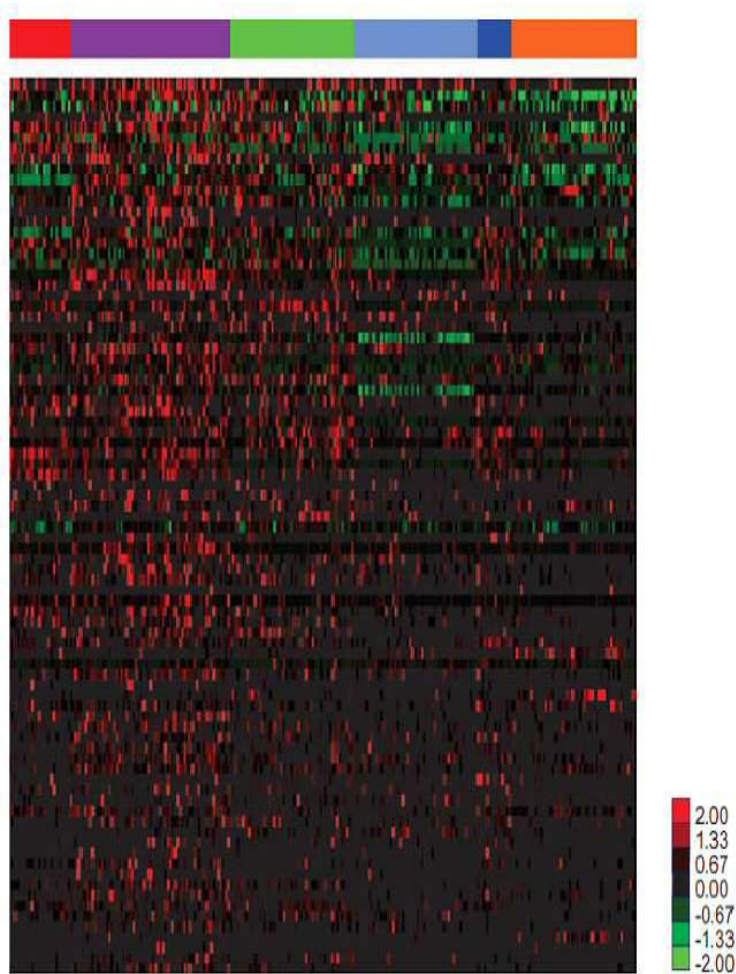


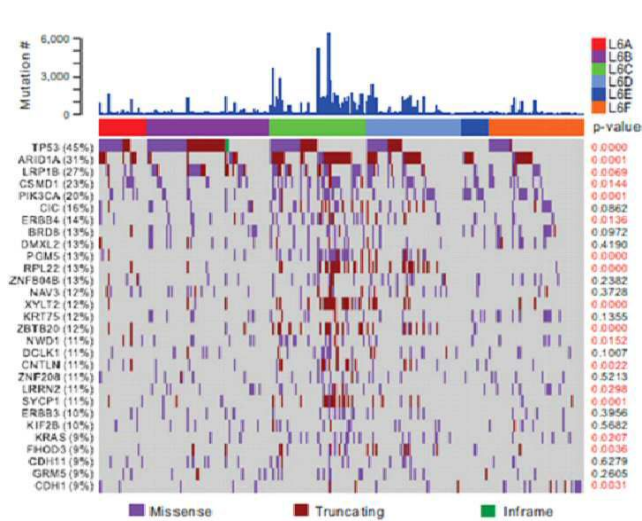
Figure XX. Expression pattern of stomach developmental transcription factors in TCGA STAD cohort (n = 258)

Among 725 transcription factors (TFs) differentially expressed in stomach development identified by Xianju et al, overlapping 723 TFs are depicted. TFs highly expressed at the early embryonic stages are grouped to Group1, and TFs highly expressed at the late embryonic stage or mature stage are grouped to Group2. y-axis is ordered from top to bottom by TF groups and standard deviation.

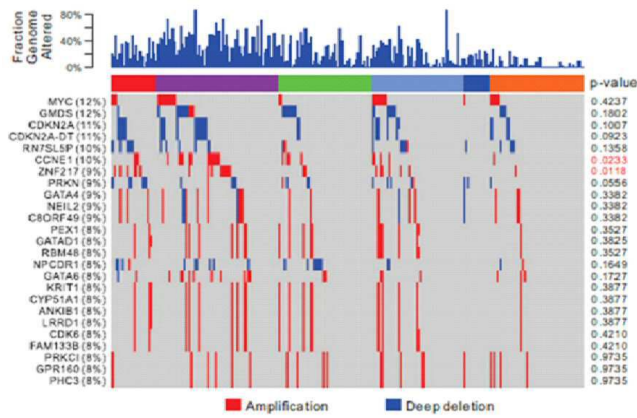
도면10



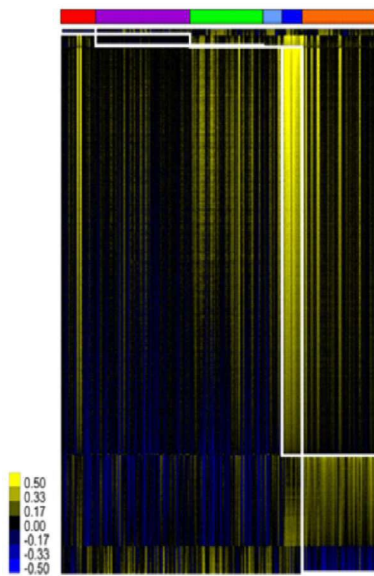
도면11a



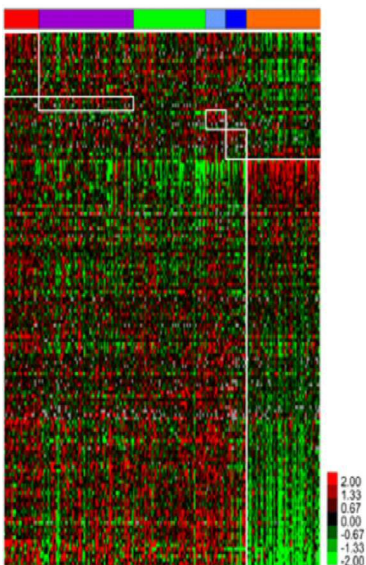
도면11b



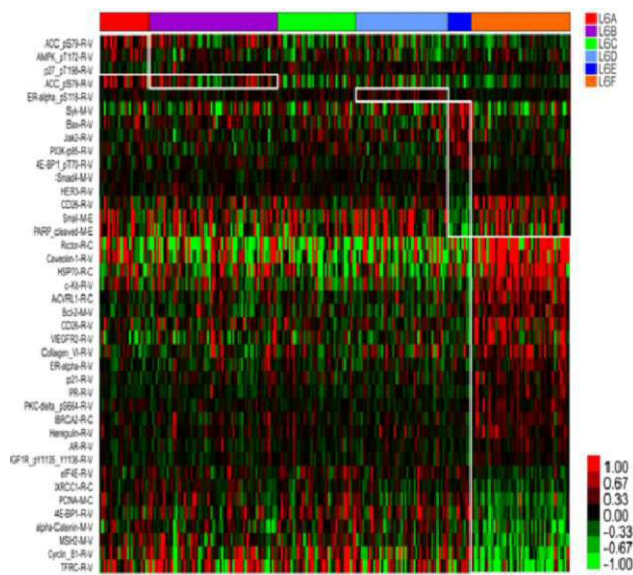
도면12a



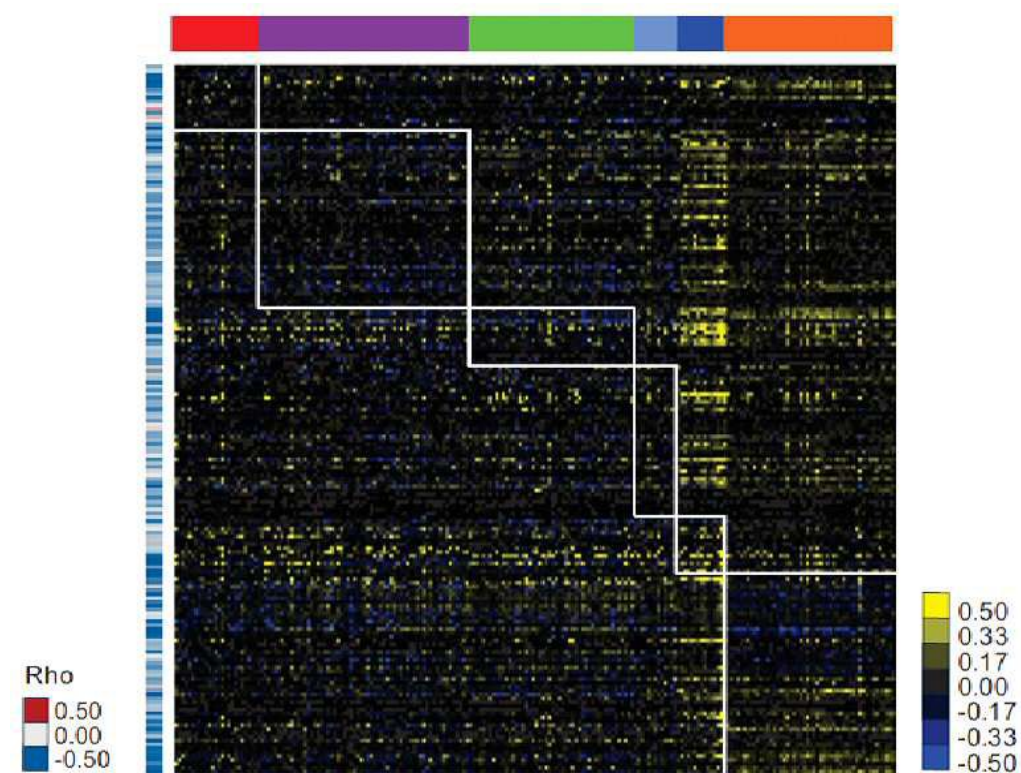
도면12b



도면12c



도면13



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Composition for prediction prognosis of cancer and kit comprising the same
- <130> PDPB201909d01
- <160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1837

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

agaatccacc ggggtgcagc gaggtgtgg aaagtccac ccagaacgtg aggtgaagaa 60

ggcttgggct gcgtgtgtc tgctctgtcc gggtcggaga tgaactgacc cgggagagca 120

gcggagggat gtttcttttg gccaacagtg gggactcacc tgcacgtttt gcgaagaggc 180

ccacagtctt ttgcgtggcg ctcgactac atttcccaac ggccctgca cgcctgggg 240

gctgttccat gcggtgtgc gcctgcgtag ccggcgggct ggcagtgaga ctgactgcgt 300

cggggttag acitgggtga tgaggctcac ccggcgggg agaagggacg aggaggggcg 360

gacagcggaa ggtccgggag tgctcccat aaagtcgttt gaggtgaccg ttgcgtaatt 420

gtgagtctgt gagagaagat gtgaagtatg gcctcgtccc ggtcatctgg gcgtgcgggt 480

cccgggtttt gatcgcgct ttgtgtagt ttaacttcta gtcattggcg atgatcgag 540

gagagcacag actggaccct gctacgatct ctcttgaggt ggatcagact gatgatcacc 600

aacaaccaac tcattcccg ataaggaaga agagagtgtc acctacttca gtgtggtttc 660

aacctactt ctgcatctta aagacactgt atggtttcag cagtagtgcc cctgttcatt 720

agtcacctg atgttttcat tctcatctc atctttttct tagcagcatt caatgaatcc 780

ttcattctag aaacactcta tatctttgtt ttcatgaga ccattctcac ctgttttgt 840

cctgtgactt ttttgaaaa aacaaaaaca aaaaaccctt tttttcttt taaattctgg 900

taaaaaaac aatgaaaatt tgctatctta accatgttga aatgtgcagt tagtaaagta 960

cattcacatt gtggtgcaag ccactactac catccatcac tagaaccctt ttcactctgc 1020

agatctgaaa ctctacccat taaacgactt cccacttcc catccccaca gctcctagca 1080

accaacattc tactttctct atcagtttga ctactctagg tacctcatat gagtagaatc 1140

atacagcatt tatccttctc tgcctggctt atttcaactg tataatgtcc tcaaggttca 1200

ttcatgttgt agcatgcac agaacttct ccccttttaa aggetggata atatttcatg 1260

glatgtttag atcacattct gtttatccat tcatccatca gtgaacactt gtgtccttc 1320

caactttggg ctgttgggtg tctgccact gttgtccta gtgtcaate tcgtttatc 1380

cctcctaate aagtgtacaa cgttggacac tgtgcaggat gatgccactt catcttgat 1440

gctaactctg catgttgact tctgattaac ccaggccca ggaatgcctc aagatttcta 1500

ctttacttac tgttgcttgt gtaagccaag acaaccttga tgttatcata aacatgtact 1560
 tacctaagtc ctgtcccttg gcaaatatg ggctatgaga cacagcattc ttgcctttcc 1620
 ctgaggggtc aatttcagcg atcctacaca ttccttctga agcacttatg ctctttctat 1680
 atggtaigta agctctcggc ctggggagta acagtgcaga gatctacctg tcttgttgcc 1740
 acatgtttct aaactttcca ataatcacc ttctactgac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1837

<210> 2

<211> 5176

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ataaaataag atgtgcctgt acttacttgc taatggacct attaccatac tggcatctta 60
 taaaaaaaaat tacaaggaag gagattatat ccagggattc tttttgtttt caaggcaaag 120
 gttaccaagt tacaatggac caaagtagct ggaatgcaaa ggagtataat ccttgtcttt 180
 gaaaaaagag catttgtttc aatcatatgg catatcaaag taaactttct cccttcctcc 240
 ctctttctgt tgcgtctgct tctttttttt ctcttttttt ttttcttttt ttggagaggg 300
 tctcactctg tcaccaggc tgcagtgcag tagtgcaatc ttggctcact gcaaactcag 360

cttcctcaa acaatcctcc caccicagca tccaagtta gctgggacca cagccatgct 420
 ccaccatgcc cagccatcct tgcctcttta ctacatttct tttttcaaca aatattttatc 480
 aagtaatat gtcaagtaat atttatgagc tccccctcag ataggcattt agcatcatga 540
 tggcaccatc ctctaacaat aatgggaagg ctattttcca ctgttattaa tcattaattc 600
 tccaaatcat tttagtatta ttattaattc taataagtac agagattaat aaatgcattc 660
 aaaccacatg tgaatatttg ctatagggtt atctgtgcct actgtatgtt cagatttttc 720
 tttatatctg aactttgtta taaataaatg acagtaaaaa tggaatttat agttcaatga 780

acttgacaaa tcaattatc tgccattcat ttccataaa gaccattcat tcttcttgt 840
 ttacaggta actgagctcc agaaagctca agtgacttta gaactcagtt cttagtgtgt 900
 gaattatgct cccatctcat cctcttctct tgatggagca ctttctctct cattttttct 960
 tggatagtct gtacaagctg cctgaggtgt gcaggaaagt gagccacgtc gaagtgtact 1020
 gctttttaat ttttgccagg atgaagcata gcccaaagtt gccaataaaa atggatttct 1080
 ttacctttct gaaattgtgt gatgacaatt tctaagtaaa ggacccaaat catgtcaact 1140
 tcaggaaata taataatgag ggagccagga gcagtgaggg gctcacacct gtaatcccag 1200

cactttggga ggccaaggtg agcgggtcgc ttgagcccag gacttcgaga ccagcctggg	1260
caacacggca aaacctgtc tctacaaaa aatacaaaaa attagctggg taaggtggtg	1320
tgtgtctgtg gtcccagcta ttcaggaggc tgaagtgaga gaatcgcttg agcctaggag	1380
gtcagggtt cagtgtgcc tgatcgtgcc acagcactcc atcatcatca tcctgggtga	1440
caaagtgaga cctgtctcc ccaccaaaaa aaagaggag tttcatctcc caagaaaatg	1500
aattagatag gaataataga aaatttactc tcagaataat agggttctag ctctgcaac	1560
caaaaaaga tagttctttt ttacaacctg agattacttt ttcaagcatt tctccagttc	1620
cactggcatt gaaataatag ttagcaatgc atctgagctt ttcttctct aatgagcagg	1680
cagagaagtc atagatcatc atttggagga ctataaaata agacatagct tagcaaaagg	1740
accaaatac attcagagga ggatgctatt ggtgaatgtc ctcaaagcct ataactctga	1800
aaaatacaag gcatatctct gaaactgtga ggattagcaa actagctaac ctgaatctct	1860
gtcttctggt agtataaact aggtagtttc aaatctgagt agtttctcca taaaagcatt	1920
tcttccaaa cgtttcttac caaactcca aataaatgag aaaaaataaa tacagtttta	1980
taatttttga gaaagattat gggattatgg tatttaaaaa gaaaagcatt ctgtagagtt	2040
ggggaaatct ggaagactct tgaggacata gctttgccga aattgctggt tgtcacaaga	2100
ctttcaaaa actacttttc atcagacatc tcccagggt ctgagggtgaa tattaattca	2160
gcagaaagat cttttctgc tacataggca ggaggtccag acacagggga gtgggtgcaa	2220
cccagctggt cccattttct gtaataat taacaatgaa gctcatactt tctcaacttc	2280
tagaagcctg gaggatggaa gcagcccag agtagggtga atgatggcct cagtgggccc	2340
ttcttaatgt gtctcaglac tgaatgtgtg gagattgtag aaaaatagaa ggcccttgga	2400
aaaaacctct gtctgtttct ctgttcgttt cgctccctga tctccctgcc ggattgcttt	2460
tctttccttt ctcttcttg gctgtccttt acctcatggt gtggggtgtg cagatagcag	2520
gttgtggctt ggtgagtgtc cttcacttca ggtcaagggt aggcacagtt aacatgctaa	2580
ctactttcct cagtctcttc tgagtgtgtt aaagctcccg atgccagact tcctcttaat	2640
tttgcacatt attaaagtcc aaagagttaa gatttggtga tgaggggcaa agggccagct	2700
gtcacagaaa tcaatgaaat gatacacaga aatgggtatc atgaaaaggc cactggactt	2760
gggaaaactg ggtgcctgtc cttgccctgc catgtactta cctgtgtgac tggaggtgag	2820
atgttttacc tatgggcctc agttttctcat tacaaaatga cagagaagac tagataccta	2880
agttcctaag tttgtgacat ttgtgaattt ttcttgcccc tctgtgagta gagtgtctaa	2940
tttagaggct tcctgtggtt gaactgatgt ccaattctca gggaaccag acttctcagt	3000
tcagaacca gtccagatt tttgtgggaa tagggaaagg tattaaataa ctccattgaa	3060

ttctttcctg cataatgccc tgctgtggct gagactcaat gaggtcatca cctccaacac	3120
acagaacccc tcatcatctc cttacagcca gactggagct tccaaggaca tcaggttggc	3180
aaggattgtg agtaccctaa acatctaaag aggccctcta ataagggaca tatttgttct	3240
tcaacagttt cctaacttga gaccacaaat gcgtaatctc tctaatatcc taaagcttgg	3300
acaaactggg cagccccctga gcagaccgca cagagcttaa atgtcagtgc ttctcttcca	3360
gaaagaaaaa gaatggctct acacctccca atccatgggc tgatacatat gccaaaggag	3420
ccggatgaag aagtgggtga ttttaaatag ctaagactgc ccatgggcaa acgttctttg	3480
gcttttctcc tctgcaataa gtataccttc ctctctctg gtcttttct ctttcccag	3540
gcccccttat caataataat tctggctctc agatgactac agttgattag gtggaactga	3600
taggataaag gtgacacctt tccaaggct atctataatg caaaaagata tccaagaaaa	3660
agagaggtag ggaacacctt gggaaccat ttctggaaga cagccagtcc ctgctgtaga	3720
caagcctcat ttctcttccc ccaaatgtta aagagtaaat tctctctgta gccttagctc	3780
tcttttctat ctttggcttg ctttttatga actatcttta gagtgcctaaa ttagaacagg	3840
gtaggcagag gcaggaatat gcccaattt gggaagacct ggttgggaat agtcgaaagc	3900
cttgatatgt gcaagaaaag aaccatttga tcaaccagt tcttaataca ggatactaac	3960
ttaaaattta gactcaagtt atacgataat tcaaacattt attgtattta tactattcta	4020
tatgtacttt tcaggaacc aggaatacaa aactgacatt tctctgtaca gaggtcaga	4080
ctagtagaga acagttaggt acgccgttaa ttataaacta atatgtatca tcaattatgg	4140
gtttttatgg gggtttgcca ggtggaaggg accagggaga gatgatgagt gatgatggtt	4200
atgtagtctt taggaggatg caattataac attgctcttc ctttcacgca ccacatgatt	4260
tagcaagtac ttcatattgg ctccaccatt aacatggtca atggcttctg gatactcaca	4320
gttcaggcac agtttctct gaagattttt tacctctccc atctttaaga aattgtctgg	4380
atgtccatga aagatgctga cacttgtatt aattcattaa aaaacaccac cccctcctg	4440
aaataaacta aaaagtaatg aattcataga aaaaaatttc accaagattg aaactagaga	4500
atatacctag acttgcactt tgagctttga gaaatgtgta cctattcacc attccaacgt	4560
gaagaagctc tgcagtagga aaaataatta acacacttat agtctactgc ccatgtaagg	4620
atcagctccg gctaagagge caaagatggg tgacatcggt atgctctgcc tttatTTTTT	4680
ctttcttacc cacttagctt cctaattgga ggaaggaggc gtggtaaagg tatatgaaga	4740
ctatggttta attagaccag aaaacactgt cataatctct ggggtcatca gaatgtccag	4800
ttttgtcttt gggccaagat aagggcagtg ggatttatga tgtgttgttt atagtctgaa	4860
actactctgg tgatcaccag ggtcagtttc tttaatgatg gtttccaact ggcctaatac	4920

attaagtaag actggctgat aacatgacca gacagacata aagaccctgt tgggaatgac	4980
attgaactct caaagtcaag atttcttaca caaatctatc agctggagaa aatgaaggca	5040
gtgtggtata tgtgtgcaaa taaggacatt atgaagctta aatatggaat gtctcttgga	5100
ccccgatgt catctgtatt ctctttttct tcttgtacta tatcctttgc ctgtaataa	5160
aaggtttatt tgatta	5176
<210> 3	
<211> 3099	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
agcagacagc gcgggctggg agcgccggca agggcgggccc tcgcgcacct ggctgccagc	60
ccgcagggggg ctgcacgca gacctgccct tgccacctca gcgctcgggt gcgggctggg	120
ggcgggtggag ccacgaaagg tgggtcccag agcggagcgc aggacagcgc aggagccccg	180
gcgcacgcgc gcgcgcacag acccaggatt acttcatgca cataaaagaa aacgcaacta	240
cagtggacc c tgaacaacct atggcctgca gccactgaag aatgcttgca taaggagctc	300
ttctctgcac ataccccgac acagtgatgg tatcttgca ctgctgcttc tgtccaaggc	360
actgcagcct actcgtcaaa agcccgaagc ccagctctgc cagcagtgca ctgtgtgctc	420
ttaggaaaca gagaagcaaa gaagttagca agcttgtttt ggcaagaaga aaaacacaaa	480
ataccaacc acagatcctc aaaaatattg ctaagcacta attttgctaa catgttagac	540
agccttcgga tctaggcaat cttgttcctc agctggaaag agttcctgcc agccatgtga	600
ttccaaatcc accctggaca tatggggata atgagaaaat cagctccggc cttccctggc	660
cttcagcca agtgaatggg ggcatccct ggtgcttcag cccggggccc acccagagga	720
tgctagctgg cctgcagagg cctcaacat gccctcctgg actcaggtaa gactgaggtt	780
tccatgccct caaaacaatt gttagacaa aaactcactg cccaggtcaa agtcacagca	840
ccagaaagcc aacctgagga tgaagacaaa gctctttgtt ggcacagtcc cctgatcatt	900
cgaggtcagc atctccatca aaatggacct aatgctgagg caagaaggag aacatcactg	960
ttaagaaggt aatgagtcac aaatgctatt tcgatggttt tctttgaaag aaatacacag	1020
aaccaaacca attttaatta aagatcttgt ctttgtaac aggcagccac aaatgaaggc	1080
aaaactgctt tcatgtggca taatatacac agagctgaac tagttttccc ataaaagggc	1140
aggttctttt cttaataaa gaaaagagtt tgttcctaac aatatggggg atgcaacaga	1200
aagctgtctt ttgcaaagta taaaattgca gatcctccc tggaagccat ttcttgatgc	1260

taaaccaatg cgaacgtttg ccaaacgcac atcgagccg ggattatcct accctttgag	1320
attagacatg tgatcctgat ttttaagtga aaaacgcagc cagaggccaa ataaacatac	1380
ctacaagtac atcgaaagct caaatggttg agaaatgatt gtaacacacc ccggtgtgta	1440
tttctgagga agaatacaac tgcacatgga aattgatgtt ttgattttta attttaaaac	1500
gacgacagaa ctgaaatacc tcccctaact aggtccactg aaaccagtga ggagataatc	1560
attttcagtt aaatatgcat gtaatttaat aatccacaga tggaaaatgc atttgaggtg	1620
gactgaacac agccaggagt ttttgcttat cgacagcact gaatcctgcc ttgactagag	1680
agactcgtca tgtgatcaac tgtggccaga gggcatcctg cagacagctc ctgtcacacc	1740
acactgacca gactcttatg agtatattaag catcttcagg gaagcgattg actgtcttat	1800
aatggtctta caagtacgga actttattac ctgctaataa tcagagcaca tgatggcaca	1860
atagaatata cgagtgaagt tctaaatgca aggttgttct tattctgtga gtggcaaac	1920
tcatgcagtg agcagataaa gctggcagga ggcatggcg ccctaattgct gggcactaac	1980
cacctgcccg gactgcgaat atctgttggg tcctttctat atctggtcta ttctcgtgtt	2040
tgattatate ctggtggcaa gaatagcaaa atcaactctc cttctatcc catgtggaga	2100
ggcatgattt gactcagaga gcattatcct ctctgcgtta tccaaccca tgtcccatga	2160
tgcactttgt agacaagcaa gtgtccctgg tggagaatcc acagccacac atcctcattg	2220
gttgcaagga tcagtgtcca atatctactg ccatgatcat tctcagtttt acatccacag	2280
agcttcatag aattctaaca ccacaggctc aagtagaggt tttggcctca gagtgggcta	2340
gattccacct ctgacagcag ctgtgggact gtttttccat ctgtaaaatg gagacaagag	2400
tatcacctac ctcatggtgt tgggtgggac gttaaacaga attccgatca tgaaacctt	2460
agcctgtcc ctgcatagc tgcatgcgct cagttagcta tggctctgtt tcatgtgac	2520
tttaccatca tgtaagcagt tttaaaaatg ctagaagctt tagtcataga attaccatat	2580
gatacagcct actgcagagt ccagaggctg aggcaggaga gttacttgaa cctgggaggc	2640
ggaggttgca gtgagccaag atcgcgccac tgcactccag cctgggcaac agagtgagat	2700
tctgtctcaa cacaaaaaag aagacatgtg tccccatcac agtatcatag agagtgcctc	2760
cactgccta aaataccctg tgctcttcct attcatcct ctcttcaacc ccagcaacca	2820
ctgatccctt taccatctcc atggttttgc ctctccaga atgtcatatt gttggaatca	2880
tacgctatgt agcctttgca aatgggcttc tttcaccgag caatgtgcat tgaagtgcc	2940
tctatgactt ttcaagggtt gatagctcat tcctttttat tgctaaataa tattccattg	3000

tctgaatgta ccacattttg tttatccatt cacctactaa aggacatctt ggttgcttcc	3060
aagtttgggc aattataaat aaaactgcta taaacattg	3099
<210> 4	
<211> 2043	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
gtgcttaggc actgcagttg agtggctcac aaggagctaa aatttcacta atgcgtattc	60
agtgggtggt tctggtttgc ctgatttttg cctctgggca tggctgtttc agcctgagag	120
gctgttccaa gaatgttgct ttactaggag ctcatgccgc ctggtggtaa atatgaagta	180
cagcagtga acagaccagt tttactccaa ggaaacctg tagagatgac agcaatggtt	240
ggtgatttct gcctcaatta tgaaagtgat ctggtgttac agggccagag aagactaggg	300
gagttcgggt tttctagacc aaacagacac tcagtcctgg gcctggaggt ctctgcagtg	360
aggtgctgcc acagacagag ccaccttaac tctcaggac aaccagtggc ttccgacaca	420
cactatgcac tggagggcaa gcagctctca gcttgggagc aactgaggat ggtgaacagc	480
ctgggcaagg agtgctctga ggctaagacc ctgaacagca ggaaccgaag tgcagctccc	540
cacttcaggt aatgtgattc taccctttgc ctgagaaaca tatccatcct aattgccatg	600
tgctcagctg gaccactaga gggagccatc ctgtaacggg tgaggtcaac ctaacaaatg	660
gtatcagtcg agtattgac ggaggccaac gcaagaagtt accagtagcc tatttcagat	720
ttattaaaaa acacataggt aacgagtcag agctttggct aggaatgatt tggaaaagaa	780
ctgaaggcat aattccacag gacattcaca gttgtgtgct agagacagag aggagcagga	840
aagtgtttta gaagcatttg cggtaggaca tggaaggccc ggcttcacgc tattcctgtt	900
tgctgatcca catctgctgg aaggtaggaca gagaggccag gatggagcca ccgatccaga	960
cagagtattt gcgctccgga ggggcaatga tctgtcagtc aagatgaaaa agaattgtca	1020
ttaatgtcat cattagtga gtcgttagtg cggtaggaca gagcctggat gttctacat	1080
ggcctagttt ctgttcagc agggacacag gcttgtctgt tagatgcaa ttgtgtccta	1140
attgtgtcat gttcttggca ggaccgccag agggagccat ggatttagaa attcttcagt	1200
ggtttcatgg atgccagcag actccatccc tggaaaagag acacaggcca tggctcttaa	1260
gtggagagta aaaccaggc tagacatgga agaccagact tgaacatctg gatgatcttg	1320
cagtggactg aggtgggaa gacataataa tctaggaacc acctgtctga gagacaaaag	1380
ggtcttgtta tgctctatgt cttctgcct gccttctaata gaggaaggcc tgctgcagca	1440

tcctgaggtg tgggctacaa cagaaatgct tttggtcttg gggcaaccgt cacttgctctc	1500
catgttcttg aggctggctt gatatggaag aagacaatga ctccccttcc caggaaaagg	1560
gcgtttgttg cctaccgatg aaggatggct ggaacagggt ctctgggcag cggaaacgtt	1620
catttccgat ggtgatcact tgcccatcag gcaactcgta actcttctca agggaggatg	1680
aggatgcggc agtggccatc tcattttcaa agtccagagc tacataacac agtttctcct	1740
tgatgtcccg gacaatctca cgctcagctg tcaaccagat acaaacattg tggcaaacat	1800
taggtgtctgc acaggtggca aagattcacc tgccctactg cagtctctcc ctcaagacat	1860
gtgccatcaa aaaatgtgtc agttcaatat tctgcaatcc aaaatccaca atgataatga	1920
cgtagtaggg ccaccaggga accacctctg ttcctaggac agtgtctcat gcatagtagg	1980
ccctcagcat gcattgtctg ggaaatgcat aacaagaata aaatgagcta gctagagaaa	2040
ggc	2043
<210> 5	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Sense siRNA	
<400> 5	
gcuccuagca accaacaaut t	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Antisense siRNA	
<400> 6	
aauguugguu gcuaggagct g	21