



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월09일

(11) 등록번호 10-2176703

(24) 등록일자 2020년11월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) C12Q 1/6869 (2018.01)(52) CPC특허분류
G01N 33/5005 (2013.01)
C12Q 1/6869 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2019-0054964(분할)

(22) 출원일자 2019년05월10일

심사청구일자 2020년06월16일

(65) 공개번호 10-2019-0053166

(43) 공개일자 2019년05월17일

(62) 원출원 특허 10-2017-0085561

원출원일자 2017년07월05일

심사청구일자 2017년07월05일

(30) 우선권주장
1020160092132 2016년07월20일 대한민국(KR)(56) 선행기술조사문헌
JP2000224987 A*
Cristescu et al., NATURE MEDICINE, 2015, Vol. 21, No. 5, 2015, pp. 449-456.*
M.J.Strong et al., Journal of Virology, Vol. 89, 2015, pp. 10110-10114.*
Yoon et al., Genome Research, Vol. 23, 2013, pp. 1109-1117.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김현석

경기도 고양시 일산서구 강선로 116, 209동 104호 (주엽동, 강선마을2단지아파트)

(74) 대리인

이재영, 하지나

전체 청구항 수 : 총 3 항

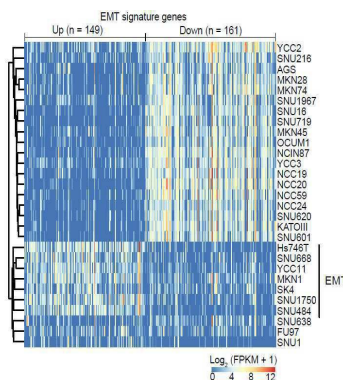
심사관 : 이민영

(54) 발명의 명칭 암 치료용 약물 스크리닝을 위한 암 세포주 패널

(57) 요약

본 발명은 암 세포주를 분류하여 암 세포주 패널을 구축 및 상기 암 세포주 패널을 이용한 암 치료용 약물 스크리닝 방법에 관한 것으로, 상기 패널 제조방법에 따른 분자 아형별 암 세포주는 임상 환자 암 세포의 특성을 나타낼 수 있으므로, 이를 이용한 암 치료용 약물 스크리닝 방법을 통해 환자별 특징에 맞는 암 치료용 약물을 선별하는데 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 33/5047 (2013.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
G01N 2333/70585 (2013.01)
G01N 2500/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	H14C1324
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	보건사업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성R&D
연구과제명	글로벌 의료수요 해결을 위한 전략적 기술통합의 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 세브란스병원
연구기간	2014.10.01 ~ 2023.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 위암 세포주 패널의 5가지 분자 아형에 포함되는 위암 세포주를 배양하는 단계;

(b) 상기 배양된 각 분자 아형 별 위암 세포주에 후보물질을 처리하는 단계; 및

(c) 상기 후보물질의 처리 후 각 분자 아형 별 위암 세포주의 생존율을 측정하는 단계를 포함하며,

상기 위암 세포주 패널의 5가지 분자 아형은 미세부수체 불안정성(Microsatellite instability) 아형; 상피 중간엽 전이 유전자 발현 특성을 보이는 아형; 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53(Tumor protein P53)의 활성을 갖는 아형; 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53의 활성이 없는 아형; 및 엡스테인 바 바이러스(Epstein-Barr virus) 감염 아형의 분자 아형을 포함하고,

상기 위암 세포주 패널의 상기 미세부수체 불안정성 아형은 SNU638, NCC59 및 SNU1의 세포주를 포함하고, 상기 상피 중간엽 전이 유전자 발현 특성을 보이는 아형은 Hs746T, SNU484, SNU1750, SK4, SNU668, MKN1 및 YCC11의 세포주를 포함하며, 상기 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53의 활성을 갖는 아형은 SNU601, AGS, KATOIII, NCC19, OCUM-1, YCC2, MKN28, MKN74, NCC20 및 FU97의 세포주를 포함하고, 상기 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53의 활성이 없는 아형은 NCI-N87, MKN45, SNU1967, SNU16, SNU216, YCC3 및 SNU620의 세포주를 포함하며, 상기 엡스테인 바 바이러스 감염 아형은 NCC24 및 SNU719의 세포주를 포함하는, 위암 치료용 약물 스크리닝 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 생존율을 측정하는 단계에 후속적으로, 상기 후보물질이 처리된 위암 세포주의 생존율이 처리되지 않은 위암 세포주의 생존율 보다 낮은 경우에 특정 분자 아형에 특이적인 위암 치료제로 판단하는 단계를 더 포함하는, 위암 치료용 약물 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 위암 치료용 약물은 항암제인 것인, 위암 치료용 약물 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 세포주를 분류하여 암 세포주 패널을 구축 및 상기 암 세포주 패널을 이용한 암 치료용 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 위암은 전세계적으로 발생 빈도가 높은 암 중 하나로 한국 및 일본 등의 아시아에서 발생하는 가장 흔한 암으로서 사망률 1위를 나타내는 암에 해당한다.

[0003] 현재 암을 치료하는 주요 치료법으로는 수술적 치료법, 약물 치료법 및 방사선 요법이 존재한다. 현실적으로는, 이들의 조합 요법이 널리 행해지고 있지만 특히 진행암 및 전이암의 경우 약물 치료법의 비중이 크다. 이에 따라 다양한 기전의 항암제가 개발되어 사용되고 있는 실정이다.

[0004] 암은 원인이 되는 유전적 변이의 종류에 따라 매우 다양한 특징을 가지며 이는 환자의 예후와 치료 반응에 있어서의 다양성을 야기하는 요인이다. 그러나, 이러한 매우 다양한 암 돌연변이들의 영향은 분자 수준에서 몇몇 중요한 발암에 관련된 신호전달체계로 수렴하는 특징을 보이며, 이에 따라 복잡한 암종을 몇 개의 대표적인 분자 아형으로 나눌 수 있는 근거가 된다. 상기 암의 분자 아형은 예후나 약물반응성과 같은 임상적 특징을 공유하는 경향을 보인다. 따라서, 암 환자의 시료를 활용하여 분자 아형을 결정하는 것은 환자의 진단과 치료 지침을 정하는데 큰 도움을 줄 수 있다. 현재 환자 맞춤형 치료제를 발굴하기 위해서는 환자 시료의 유전체 분석을 통해 약물화가 가능한 돌연변이를 탐색하거나 환자 시료에서 유래된 전임상 세포 모델이나 이종이식 모델을 사용하여 직접 약을 스크리닝하여 찾는 방법이 대표적이다. 전자의 경우는 돌연변이의 존재 자체가 약물 반응성을 예측하는데 충분하지 않은 경우가 많다는 한계점을 지닌다. 후자의 경우도 일반적으로 약물 스크리닝이 이루어지기 위해서는 많은 수의 암 세포나 이종이식 종양이 필요하므로 샘플이 제한적인 경우 불가능하거나, 긴 시간이 소요된다는 단점이 있다. 한편, 새로운 항암 신약 후보 물질을 HTS(High Throughput screening) 방법으로 탐색하는 목적으로도 유전적 분자적 특징이 분석된 세포주 모델이 유용하게 활용될 수 있다. 여러 HTS 기술 중에서도 세포 기반 분석(cell-based assay)은 기존의 생화학적 분석법에 비하여 세포 내 총체적인 기능이 정상적으로 작동하는 조건하에서 스크리닝을 할 수 있다는 장점이 존재하며 유전체, 전사체적인 변이와 더불어 분자 아형에 대한 특징을 동반하는 경우 약물 반응을 예측할 수 있는 동반 진단 바이오마커와 약물을 동시에 발굴할 수 있는 장점을 갖는다.

[0005] 따라서, 상기 세포주 모델은 환자 맞춤형 치료제의 탐색과 더불어 신규 항암 약물 후보물질을 스크리닝하기 위한 도구로서 큰 중요성을 갖음에도 불구하고, 위암 세포주에 대해 유전체, 전사체 정보에 기반한 분자 아형 분석 결과는 극히 소수의 세포주에 대해 제한적으로만 밝혀져 있다는 문제점이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 분자 아형별로 분류한 암세포주 패널을 제공함으로써, 상기 분자 아형별 특징에 적합한 암 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 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

[0008] 본 발명의 발명자들은 TCGA 및 ACRG 그룹의 분석을 통해 분류된 일부 분자 아형에서 더 나아가 위암 세포주의 유전체, 전사체 분석 및 실험적 검증을 통해 위암 세포주의 분자 아형을 크게 5가지의 군으로 분류할 수 있었다. 보다 상세하게, 상기 위암 세포주의 분자 아형은 1) 미세부수체 불안정성(Microsatellite instability)(이하 'MSI'이라 함.) 아형, 2) 상피 중간엽 전이(Epithelial to mesenchymal transition; EMT) 유전자 발현 특성을 보이는 (이하 'EMT' 이라 함.) 아형, 3) 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53(Tumor protein P53)의 활성을 갖는(이하 'MSS/TP53+'이라 함.) 아형, 4) 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53의 활성이 없는(이하 'MSS/TP53-'이라 함.) 아형 및 5) 엡스테인 바 바이러스(Epstein-Barr virus) 감염(이하 'EBV'이라 함.) 아형에 해당한다.

[0009] 본 발명자들은 상기 5개의 분자 아형의 세포주 패널을 구축하고, 더 나아가 상기 위암 세포주 패널을 활용하여 임상 환자에 적용 가능한 암 치료용 약물을 스크리닝할 수 있음을 확인해 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 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, 암 세포의 성장, 약물 저항성, 침윤 및 전이 등과 관련되어 있다.

[0011] 본 발명에서 상기 "미세부수체 (Microsatellites)"란 진핵세포 (eukaryotes) 유전자 전역에 걸쳐 분포하는 모노-, 디-, 트리- 및 테트라뉴클레오타이드 형태의 짧은 반복 염기서열을 의미한다. 일반적으로 이러한 반복 서열은 염색체 내에서 10 내지 40 번 정도 단순반복 (tandem repeat)된 형태로 존재한다. 또한, 본 발명에서 상기 "미세부수체 불안정성 (Microsatellites instability; MSI)"이란 상기 미세부수체 유전자에 짧은 염기 결손 또는 삽입에 의한 돌연변이가 일어난 것으로, 주로 DNA 부정합 수선 시스템의 결함에 의해 유발되는 미세부수체

의 유전적 불안정성을 의미한다. "유전적 불안정성(genomic instability)" 이란 DNA의 손상, 변화 및 변이가 축적되어 정상 세포가 종양 세포로 형질변환 되는 것을 의미한다. 미국 국립 암연구소에서 권장하는 다섯 개의 미세부수체 표지자(microsatellite marker)로 BAT26, D5S346, BAT25, D17S250 및 D2S123를 제시하였는데, 환자의 종양에서 상기 표지자들이 정상조직에 비하여 불안정성이 있을 때 그 표지자가 불안정하다고 정의 하며, 이 표지자들 중 두 개 이상의 표지자에서 불안정성을 보이는 경우, "미세부수체 불안정성이 높은(high degree of microsatellite instability, MSI-H)" 경우로 정의하고, 한 개의 표지자에서만 불안정성을 보이면 "미세부수체 불안정성이 낮은(low degree of microsatellite instability, MSI-L)" 경우로 정의하며, 다섯 개의 표지자 모두에서 불안정성을 보이지 않으면 "미세부수체가 안정한(microsatellite stable, MSS)" 경우로 정의한다. 다만, 경우에 따라서 짝지어진 종양 및 정상 조직을 얻을 수 없는 경우, 종양 조직에서 다섯 개의 모노뉴클레오타이드 마커인 BAT25, BAT26, NR21, NR22 (혹은 NR27) 및 NR24를 미세부수체 표지자로 사용할 수 있는데, 이 경우 불안정성을 보이는 표지자가 세 개 이상인 경우 미세부수체 불안정성이 높은 MSI-H로 정의하고, 한 개 또는 두 개의 표지자에서 불안정성이 있는 경우 미세부수체 불안정성이 낮은 MSI-L로 정의하며, 다섯 개의 표지자 모두에서 불안정성이 없는 경우 미세부수체가 안정한 MSS로 정의 하였다.

[0012] 본 발명에서 상기 미세부수체 불안정성의 분석 방법을 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 상기 미국 국립 암 연구소에서 권장한 다섯 개의 미세부수체 표지자(microsatellite marker; BAT26, D5S346, BAT25, D17S250, D2S123) 혹은 BAT25, BAT26, NR21, NR22(또는 NR27) 및 NR24의 미세부수체 표지자를 형광표지 시발체를 이용한 중합효소 연쇄반응을 통하여 측정한 뒤, 초기변성 과정은 95℃에서 15분간 시행하고, 94℃에서 1분, 58℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 총 30주기 시행한 후, 최종 증폭 과정을 72℃에서 5분간 시행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 측정 온도 및 시간은 적절히 조절할 수 있다. 이후, 반응이 끝난 시료에 GeneScan 500 ROX size standard (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)와 Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) 10 L을 섞은 후 95℃에서 5분간 반응시키고 얼음에 넣어 차갑게 한 뒤 위 시료를 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)에서 fragment analysis를 시행하며 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 단, 상기 실험 시 사용되는 프라이머의 서열은 특별히 제한하지 않으며, 당해 기술분야에서 일반적으로 사용되는 상기 미세부수체에 대한 프라이머를 사용할 수 있으며, 비제한적 예시로 original Bethesda panel을 사용할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명에서 상기 "TP53"이란, 인간에서 종양 억제 단백질을 코딩하는 유전자로 알려져 있고, 세포 내 DNA를 손상시키는 신호에 반응하여 다양한 하위 유전자의 발현을 조절함으로써 세포 주기를 조절하고, 세포사멸을 유도함으로써 세포가 악성 형질로 전환되지 않도록 보호하는 역할을 한다.

[0014] 또한, 본 발명에서 상기 "EBV"이란, 전 세계에 널리 분포하는 헤르페스(herpes)과, 감마헤르페스(gammaparvovirus) 아과, 림포크립토타바이러스(lymphocryptovirus) 속에 속하는 바이러스로, 신생물성 이상(neoplastic disorders)을 일으키는 중요한 발암물질이고, 용해성 감염 세포는 EBV-관련 악성 종양의 성장을 촉진한다.

[0015] 또한, 본 발명에서 상기 "스크리닝"이란, 여러 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적하는 특정한 성질을 갖는 물질을 특정한 조작 또는 평가 방법으로 선별하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 스크리닝은 본 발명에 따른 방법으로 제작된 세포주 패널을 이용하여 임상 환자에 적용할 수 있는 암 치료용 약물을 확인하기 위한 일련의 과정을 지칭할 수 있다.

[0016] 여기서, 상기 "암 치료용 약물"이란, 암 치료용 약물, 즉 항암제 또는 암 치료용 소분자 물질로, 그 종류를 특별히 한정하지는 않으나, 위암의 치료용 약물일 수 있다. 구체적인 예를 들면, 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 약시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미브, 수니티닙, 카보플라틴, 소라페닙, 베바시주맙, 시스플라틴, 세록시맙, 비스쑼알부, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미도레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산훈퐁 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다기빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 카페시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모페, 팔티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로데칸, 토포데칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타

목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 올라파립, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴, 보리노스텍, 엔티노스텍, 5FU 및 카르무스틴 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 또한, 본 발명에서 상기 "분자 아형"이란, 세포주의 유전체, 전사체, 후성유전체, 단백질 분석을 통해 획득된 대량의 정보를 통하여 동일 또는 유사한 유전자 변이, mRNA 및/또는 단백질 분자 등의 발현 패턴을 보이는 세포주군을 의미하며, 본 발명의 목적상 MSI, EMT, MSS/TP53+, MSS/TP53- 및 EBV군에 해당하는 분자적 특성을 보이는 아형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히, 본 발명에 따른 상기 EMT 아형은 암 세포주 중 환자의 예후가 가장 좋지 않은 아형으로, 상피 중간엽 전이 과정을 통해 전이 및/또는 재발이 일어난 암이거나, 암 치료용 약물에 대한 내성을 가져와 치료가 어려우며, 일반적인 암 세포와는 상이한 분자 유전학적 특징을 갖는 암 세포의 아형에 해당한다.

[0018] 본 발명의 일 구현 예에서, 미세부수체 불안정성(Microsatellite instability, MSI) 아형; 상피 중간엽 전이(Epithelial to mesenchymal transition, EMT) 유전자 발현 특성을 보이는 아형; 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53(Tumor protein P53)의 활성을 갖는(MSS/TP53+) 아형; 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53의 활성이 없는(MSS/TP53-) 아형; 및 엡스테인 바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV) 아형; 중 적어도 하나의 분자 아형을 포함하는 암 세포주 패널을 제공한다. 여기서, 상기 암 세포주 패널 내에 포함되는 5가지 아형들은 암 환자에서 나타날 수 있는 특징적인 분자 아형을 대표할 수 있으므로, 특정 분자 아형을 갖는 암 환자의 표적 암 치료용 약물을 발굴하는데 유용하다. 본 발명에 따른 암 세포주 패널을 이용하여 약물 스크리닝을 하는 경우 기존의 동물 모델 등을 이용한 문제점을 극복하고, 이를 통해 단기간에 환자 맞춤형 약물의 탐색이 가능할 수 있다는 장점이 있다.

[0019] 본 발명에서 상기 암 세포주는 유방암, 담도암, 담낭암, 췌장암, 대장암, 자궁암, 식도암, 위암, 뇌암, 직장암, 폐암, 방광암, 신장암, 난소암, 전립선암, 자궁암, 두경부암, 피부암, 혈액암 및 간암 중에서 선택된 어느 하나의 암의 세포주일 수 있으나, 바람직하게는 위암 세포주일 수 있다.

[0020] 단, 본 발명에서 상기 "암 세포주 패널"이란, 암 세포주의 군락 또는 암 세포주 군으로써, 상기 분자 아형 특성을 갖는 각각의 여러 암 세포주들이 모여 있는 세포주들의 총 집합체를 의미한다.

[0021] 여기서, 상기 암 세포주는 연세 암전이연구센터에서 확립된 YCC3, YCC2 및 YCC11로 이루어진 군 및 Hs746T (KCLB Number: 30135), SNU484 (KCLB Number:00484), SNU1750 (KCLB Number:01750), SK4 (DSMZ Number: ACC-712), MKN1 (KCLB Number:80101), SNU668 (KCLB Number:00668), NCC59 (KCLB Number:50059), SNU638 (KCLB Number:00638), SNU1 (KCLB Number:00001), SNU601 (KCLB Number:00601), AGS (KCLB Number:21739), KATOIII (KCLB Number:30103), NCC19 (KCLB Number:50019), NCC20 (KCLB Number:50020), NCI-N87 (KCLB Number:60113), MKN74 (KCLB Number:80104), MKN45 (KCLB Number:80103), MKN28 (KCLB Number:80102), SNU1967 (KCLB Number:01967), SNU16 (KCLB Number:00016), SNU620 (KCLB Number:00620), NCC24 (KCLB Number:50024), SNU216 (KCLB Number:00216), FU97 (JCRB Number:1074), OCUM-1 (JCRB Number:0192) 및 SNU719 (KCLB Number:00719)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 위암 세포주가 포함될 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 않고, 상기 위암 세포주에 인위적인 유전적 조작을 통해 일부 변형된 세포주도 포함될 수 있다.

[0022] 바람직하게는, 본 발명에서 상기 MSI 아형은 SNU638, NCC59 및 SNU1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포주를 포함할 수 있고, 상기 EMT 아형은 Hs746T, SNU484, YCC11, SNU1750, SK4, SNU668 및 MKN1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포주를 포함할 수 있으며, 상기 MSS/TP53+ 아형은 SNU601, AGS, FU97, KATOIII, NCC19, YCC2, NCC20, MKN28, MKN74 및 OCUM-1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포주를 포함할 수 있고, 상기 MSS/TP53- 아형은 MKN45, NCI-N87, SNU1967, SNU216, YCC3, SNU16 및 SNU620로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포주를 포함할 수 있으며, 상기 EBV 아형은 NCC24 및 SNU719 중 1종 이상의 세포주를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 다른 구현 예에서, (a) 배양된 암 세포주로부터 시료를 준비하는 단계; (b) 상기 시료에 대하여 엑솜-서열분석(exome-sequencing), RNA-서열분석(RNA-sequencing) 및 상피 중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT)의 분석을 수행하는 단계; 및 (c) 상기 분석에 의해 확보된 데이터를 통해 암 세포주를 미세부수체 불안정성(Microsatellite instability 아형), 상피 중간엽 전이(EMT) 유전자 발현 특성을 보이는 아형, 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53(Tumor protein P53)의 활성을 갖는 아형, 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53의 활성이 없는 아형 및 엡스테인 바 바이러스(Epstein-Barr virus) 감염 아형 중 적어도 하나의 분자 아형으로 분류하는 단계를 포함하는, 암 치료용 약물 스크리닝을 위한 암 세포주 패널 제조방법을 제공할 수 있다. 여기서, 상기 방법에 의해 제조된 패널에 있어서, 5가지 분자 아형은 실제 암 환자에서 나타날 수 있는 특징적

인 분자 아형을 대표할 수 있으므로, 특정 분자 아형을 갖는 암 환자의 표적 암 치료용 약물을 발굴하는데 유용하다.

- [0025] 본 발명에서 상기 암 세포주는 유방암, 담도암, 담낭암, 췌장암, 대장암, 자궁암, 식도암, 위암, 뇌암, 직장암, 폐암, 방광암, 신장암, 난소암, 전립선암, 자궁암, 두경부암, 피부암, 혈액암 및 간암 중에서 선택된 어느 하나의 암의 세포주일 수 있으나, 바람직하게는 위암 세포주일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 시료는 암 세포주로부터 분리된 유전적 정보로, 예를 들면, DNA, RNA 및 단백질 중 1종 이상을 포함할 수 있다. 여기서, 상기 시료를 준비하는 단계는 암 세포주를 배양한 뒤, 통상적인 과정에 의하여 상기한 암 세포주로부터 DNA, RNA 또는 단백질 등을 추출하여 수행될 수 있다.
- [0027] 여기서, 상기 암 세포주는 연세 암전이연구센터에서 확립된 YCC3, YCC2 및 YCC11로 이루어진 군 및 Hs746T (KCLB Number: 30135), SNU484 (KCLB Number:00484), SNU1750 (KCLB Number:01750), SK4 (DSMZ Number: ACC-712), MKN1 (KCLB Number:80101), SNU668 (KCLB Number:00668), NCC59 (KCLB Number:50059), SNU638 (KCLB Number:00638), SNU1 (KCLB Number:00001), SNU601 (KCLB Number:00601), AGS (KCLB Number:21739), KATOIII (KCLB Number:30103), NCC19 (KCLB Number:50019), NCC20 (KCLB Number:50020), NCI-N87 (KCLB Number:60113), MKN74 (KCLB Number:80104), MKN45 (KCLB Number:80103), MKN28 (KCLB Number:80102), SNU1967 (KCLB Number:01967), SNU16 (KCLB Number:00016), SNU620 (KCLB Number:00620), NCC24 (KCLB Number:50024), SNU216 (KCLB Number:00216), FU97 (JCRB Number:1074), OCUM-1 (JCRB Number:0192) 및 SNU719 (KCLB Number:00719) 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 암 세포주를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 단, 본 발명에서 상기 "엑솜(Exome)"이란, DNA 염기서열 중 단백질의 구성 정보를 담고 있는 모든 부분을 체계적으로 지칭하는 말을 의미한다. 엑솜은 엑손(Exon)의 총합이지만, 인트론을 제외한 5'UTR, 3'UTR 등 기능성이 있는 게놈상의 지역을 포함해서 실험적으로 해독이 된다.
- [0029] 또한, 본 발명에서 상기 "서열 분석"이란, 분석대상이 되는 시료에 대해 대량의 염기서열의 판독을 하고, 대량의 염기서열 데이터를 생성할 수 있는 분석 방법을 의미한다.
- [0030] 본 발명의 일 구체 예에서, 상기 엑솜-서열분석은 세포주로부터 추출된 엑솜을 이용한 서열 분석으로 암에 수반된 DNA상의 변이를 찾는 방법을 일컫는다. 상기 엑솜 영역만을 서열 분석하는 경우, 전장유전체(Whole-genome)를 분석하는 것에 비해 비용이나 효율성 측면에서 유리하다는 장점이 존재할 뿐만 아니라, 유전자 변화가 암과 같은 직접적인 질병으로 나타나기 때문에 엑솜 영역에서의 염기서열의 변화를 보는 것이 효율성 측면에서 유리하다. 바람직하게는, 상기 엑솜은 Agilent Technologies사의 SureSelect Human All Exon V4 51Mb Kit를 통하여 시료로부터 포획될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 또한, 본 발명의 다른 구체 예에서, 상기 RNA-서열분석은 상기 세포주로부터 추출된 RNA를 이용한 서열 분석으로 DNA에서 전사 과정을 통해 발현된 구조유전자의 발현양을 정량적으로 제시할 수 있다. 기존의 probe hybridization에 기반한 microarray 방법에 비해 큰 dynamic range를 가지며 보다 정확한 전사량을 제공하기 때문에, 질병과 관련된 원인 유전자를 찾기 위한 분석의 효율성을 높일 수 있다는 장점이 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기한 엑솜-서열분석 및 RNA-서열분석은 일루미나(Illumina)사의 Illumina Genome Analyzer에 의해 수행될 수 있다. 여기서 상기한 분석 방법은 합성에 의한 서열 확인(sequencing by synthesis)이라는 개념을 도입한 것으로, 유리판 위에 한 가닥만으로 이루어진 DNA 또는 RNA 조각을 부착한 후에, 이 조각들을 중합 반응을 거쳐서 군집(cluster)을 이루게 한다. 이 과정을 거칠 때 검사하려는 DNA 또는 RNA 조각에 붙은 염기의 종류를 확인하면서 서열확인법을 수행한다. 상기 엑솜 또는 RNA 서열을 확인하는 과정을 거친 뒤, 레퍼런스 염기서열(reference Genome)과 상기 엑솜 또는 RNA 서열에 해당하는 염기서열 데이터(sequence reads)를 비교하는 과정을 통해 염기서열 데이터 분석인 매핑(mapping)을 할 수 있다.
- [0033] 단, 본 발명에서 상기 "매핑(mapping)"이란, 염기서열 데이터와 레퍼런스 염기서열을 비교하는 과정을 통해 상호간의 차이를 알아낸 뒤, 이를 적당한 선택 기준을 정해 신뢰할 수 있는 염기서열 변이 정보만을 추출(Variant Calling)하게 되는 과정을 의미한다. 상기 변이 정보는 이에 제한되지 않으나, 단일염기서열변이(SNV: Single Nucleotide Variation)이거나 짧은 삽입/결실(Short Indel)일 수 있다. 바람직하게는 상기 SNV는 Mutect [Lawrence et al. 2013 PMID 23770567]의 기본 파라미터와 tumor-only 옵션을 통해 탐지할 수 있고, 상기 INDEL은 Best Practices quality control filters [McKenna et al. 2010 PMID 20644199]을 토대로 GATK의 variant 발굴 tool들 중 HaplotypeCaller package를 통해 탐지할 수 있으며, RNA는 TopHat-Cufflinks

[Trapnell et al. 2012 PMID 22383036] 파이프라인을 활용하여 발현양을 도출할 수 있으며 엡스테인 바 바이러스의 경우 UCSC EBV (Epstein-Barr virus) reference genome에 BWA tool의 기본 파라미터를 활용하여 엑솔-서열분석과 RNA-서열분석을 통해 탐지할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 또한, 본 발명의 또 다른 구체 예에서, 상피 상피 중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT) 아형은 세포에서 상피 중간엽 전이가 일어날 때 특징적으로 발현되는 유전자 및/또는 단백질을 확인하는 방법일 수 있다. 구체적으로, 상피 상피 중간엽 전이가 일어날 때 특징적으로 발현되는 유전자 및/또는 단백질은 SNAIL, E-cadherin, Vimentin 및 CD44로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상피 상피 중간엽 전이 분석 단계는 암 줄기세포 유전자 발현 확인 및 침윤(invasion) 능력을 확인하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 또한, 본 발명에서 상피 "암 줄기세포(cancer stem cell)"란, 일반적인 줄기세포 특유의 능력인 자가재생이나 분화능력을 가진 줄기세포성(stemness)을 가지고 있는 포괄적인 의미의 암세포를 의미한다. 상피 암 줄기세포는 정상적인 종양의 성장 조건(상피 "정상적인 종양의 성장 조건"이란, 세포 성장에 필요한 영양분(당(glucose))이 충분하고 종양미세환경의 성장 여건이 풍족하여 세포 스트레스가 없는 상태를 지칭함)에서 일반적인 암세포와 상이하게 느린 속도로 증식하거나 휴지기(dormant state) 상태를 유지하여 항암제에 대한 저항성을 가지고 있을 수 있으며, 예를 들어, PGC-1 α 등의 전사조절인자의 발현이 정상적인 종양세포와 달리 통제되어 주요 대사조절물질의 기능이 일반 암세포와 비교하여 상이할 수 있다. 상이한 바와 같이, 상이한 대사조절 능력과 이에 기전적으로 연계된 세포신호 전달기작의 조절을 통해 영양 결핍 상태에서 세포 사멸(apoptosis)에 대한 저항성을 획득하고 침윤 및/또는 전이능력이 있는 세포를 포괄적으로 지칭하나, 일반적인 암 세포로 분화할 수 있는 세포라면 이에 제한되지 않는다.

[0036] 여기서, 본 발명에 따른 암 줄기세포 유전자 발현을 확인하는 단계는 본 발명에 따른 세포로부터 암 줄기세포의 마커라고 알려져 있는 ALDH1, CD24, CD44, CD133, CD166, SSEA-1, SSEA-4, EpCAM, CD90, CD54 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질 및/또는 상피 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하거나, 상피 암 세포를 구 형성 배지(sphere formation medium)에서 배양한 뒤, 예를 들면 포름알데히드와 같은 고정화 용액을 이용하여 세포를 고정한 뒤 현미경으로 관찰하여 구 형성(sphere formation) 여부를 확인함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 단, 본 발명에서 상피 "구 형성(sphere formation)"이란, 배양 용기의 하단에 부착되지 않고 부유된 상태로 세포가 배양되면서 구상체(Sphere)의 형태를 형성하게 되는 것을 의미한다. 일반적으로 상피와 같은 배양에서는 줄기세포가 아닌 일반 세포는 사멸하는 것으로 알려져 있어, 본 발명에 의한 목적하는 개체로부터 분리된 시료의 암 세포가 줄기세포성(stemness)을 갖는지 여부를 확인하는 방법으로 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에서 상피 "유전자 발현 수준 측정"이란, 상피 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브 또는 프라이머를 이용한 중합효소반응(PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 중합효소반응(real time quantitative PCR), 서던 블롯 분석(Southern blot assay) 또는 유전자 칩에 의하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 또한, 본 발명에서 상피 "단백질을 발현 수준 측정"이란, 상피 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay), 엘라자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Flow Cytometry, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되지 아니하고 상피 항체를 이용하여 본 발명에 따른 상피 단백질의 발현양을 분석할 수 있는 방법을 포함한다.

[0040] 본 발명에서는 상이한 분석에 의하여 암 세포주에서 상피 유전자 분석에 의해 정렬된 염기서열 정보 내 Bat-26, Bat-25, NR-21, NR-22 및 NR-24 중 3개 이상의 유전자에서 2bp 이상의 길이 변화가 존재하는 경우 미세부수체 불안정성(MSI) 아형으로 분류할 수 있다. 또한, 상피와 같은 변화가 존재하지 않는 경우를 미세부수체 안정성(MSS) 아형으로 분류한 뒤, 상피 염기서열 정보 내 TP53의 돌연변이 여부를 확인하여 돌연변이 정보가 존재하는 경우 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53의 활성(MSS/TP53+) 아형 및 미세부수체 안정성을 보이면서 TP53의 활성을 보이지 않는(MSS/TP53-) 아형으로 분류할 수 있다. 또한, 상피 염기서열 정보 내 경험적 한계(empiric cutoff)에 따라 엑솔-서열에서 300개 이상의 염기서열 데이터가 정렬되고, RNA 서열에서 3개 이상의 염기서열

데이터가 정렬되는 경우 엡스테인 바 바이러스(EBV) 아형으로 분류할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0041] 바람직하게는, 본 발명에서 상기 MSI 아형은 SNU638, NCC59 및 SNU1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포주를 포함할 수 있고, 상기 EMT 아형은 Hs746T, SNU484, YCC11, SNU1750, SK4, SNU668 및 MKN1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포주를 포함할 수 있으며, 상기 MSS/TP53+아형은 SNU601, AGS, FU97, KATOIII, NCC19, YCC2, NCC20, MKN28, MKN74 및 OCUM-1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포주를 포함할 수 있고, 상기 MSS/TP53-아형은 MKN45, NCI-N87, SNU1967, SNU216, YCC3, SNU16 및 SNU620로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포주를 포함할 수 있으며, 상기 EBV 아형은 NCC24 및 SNU719 중 1종 이상의 세포주를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 구현 예에서, 본 발명에 따른 상기 제조방법에 의해 제조된 세포주 패널을 이용한 암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. 구체적으로, (a) 본 발명에 따른 암 세포주 패널 중 1종 이상의 분자 아형의 암 세포주를 배양하는 단계; (b) 상기 배양된 암 세포주에 암 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및 (c) 상기 후보물질의 처리 후 세포 생존율을 측정하는 단계를 포함하는 암 치료제 스크리닝 방법일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 구체 예에서, 상기 후보물질의 처리 후 세포 생존율을 측정하는 단계에 후속적으로 상기 후보물질이 처리된 암 세포주의 생존율이, 처리되지 않은 암 세포주의 생존율 보다 낮은 경우에 특정 분자 아형에 맞는 암 치료제로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0045] 여기서, 상기 세포 생존율 측정 방법은 트라이판 블루 염색법(Trypan blue dye exclusion), 헤모사이토미터(Hemocytometer), MTT 분석 및 CellTiter-Glo 분석일 수 있고, 바람직하게는 CellTiter-Glo 분석일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에서 상기 암 세포주 패널을 이용한 암 치료제 스크리닝 방법은 해당 분자 아형을 갖는 암 환자의 표적 암 치료용 약물을 발굴하는데 유용하다.
- [0047] 단, 본 발명에서 상기 “후보물질”이란 암 환자에 적용하여 암에 의한 환자의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경할 수 있는 물질을 의미한다. 바람직하게는, 항암제, 항종양 항생제 등 상기 특성을 나타내는 물질을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0048] 본 발명에 따른 분자 아형별 암 세포주는 임상 환자 암 세포의 특성을 나타낼 수 있으므로, 이를 이용한 암 치료용 약물 스크리닝 방법을 통해 환자별 특징에 맞는 암 치료용 약물을 선별하는데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 STR, SNP 검증 및 상관관계 분석에 관한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 STR, SNP 검증 및 상관관계 분석에 관한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 위암 세포주의 분자 아형별 분류 분석에 관한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay) 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 마트리겔(Matrigel) 침습(invasion)분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 마트리겔(Matrigel) 침습(invasion)분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 구 형성(Sphere formation) 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 구 형성(Sphere formation) 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 위암 세포주의 분자 아형별 분류 분석 방법에 관한 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 1차 약물 스크리닝 결과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 1차 약물 스크리닝 결과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 1차 약물 스크리닝 결과를 나타낸 것이다.
- 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 2차 약물 스크리닝 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 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.
- [0052] **[실시예]**
- [0054] **[실시예 1] 위암 세포주 배양 및 시료 준비**
- [0055] 본 발명은 위암 세포주의 분자 아형에 따른 분류를 위하여, 위암 세포주 YCC2, SNU216, AGS, MKN28, MKN74, SNU1967, SNU16, SNU719, MKN45, OCUM-1, NCIN87, YCC3, NCC19, NCC20, NCC59, NCC24, SNU620, KATOIII, SNU601, Hs746T, SNU668, YCC11, MKN1, SK4, SNU1750, SNU484, SNU638, FU97, 및 SNU1를 RPMI1640과 배지 볼륨의 10%에 해당하는 우태아혈청(FBS; Gibco)과 배지 볼륨의 1%에 해당하는 항생제 (penicillin-streptomycin; Invitrogen)을 포함하도록 하는 영양 배지로 37℃, 5 %, CO₂ 배양기 내에서 배양을 실시하였다.
- [0056] 단, 상기 YCC2, YCC3 및 YCC11은 연세 암전이연구센터에서 확립하였고, 26개의 세포주는 ATCC, 일본 세포주 은행 (JCRB), 한국 세포주 은행(KCLB) 또는 독일 국제 기탁기관(Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ)에서 얻을 수 있는 세포주를 사용하였다.
- [0058] **[실시예 2] 위암 세포주 STR, SNP 검증 및 상관관계 분석**
- [0059] 상기 실시예 1의 세포주를 사용하여 하기의 검증 및 상관관계 분석을 수행하였다. 상기 STR 및 SNP 검증을 위해 QIAGEN 사의 DNA Mini Kit를 이용하여 제조사에서 제공하는 프로토콜을 통하여 지노믹(genomic) DNA를 추출하였다.
- [0060] 상기 지노믹 DNA는 Agilent Technologies사의 SureSelect Human All Exon V4 51Mb Kit를 이용하여 전체 DNA의 엑솜을 포획(capture)하였다. 상기 포획된 DNA 엑솜은 Illumina 사의 HiSeq 2500 플랫폼을 이용해 서열 분석이 되었고, 이에 따라 각각 세포주 별로 100bp의 최소 9천8백9십만의 paired-end 서열 분석 read가 생성되었다. 상기 생성된 paired-end 서열 분석 read는 Burrows-Wheeler Alignment (BWA) [Li et al. 2009 PMID 19451168]의 기본 파라미터를 이용하여 UCSC human reference genome assembly (GRCh37/hg19)에 정렬한 결과, 각 세포주에서 평균적으로 98.3%의 read가 인간 게놈(genome)에 정렬되었다. 상기 정렬된 결과로부터 YCC2, SNU216, AGS, MKN28, MKN74, SNU1967, SNU16, SNU719, MKN45, OCUM-1, NCIN87, YCC3, NCC19, NCC20, NCC59, NCC24, SNU620, KATOIII, SNU601, Hs746T, SNU668, YCC11, MKN1, SK4, SNU1750, SNU484, SNU638, FU97, 및 SNU1에서 16개의 STR 마커에 대한 분석을 수행 및 자율 계층적 클러스터링(unsupervised hierarchical clustering) 분석을 통한 SNP와 유전적 상관관계 분석을 수행하여, 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.
- [0061] 도 1 에서 보는 바와 같이, 상기 29개의 위암 세포주는 각각 특징적 STR 프로파일을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 이는 기존에 알려진 세포주 데이터베이스의 STR 정보와 일치하거나 매우 유사한 것으로 확인되었다.
- [0062] 또한, 도 2의 결과와 같이, 29개의 위암 세포주의 유전적 상관관계가 분류될 수 있음을 알 수 있었다.
- [0063] 상기 결과를 통해, 본 발명의 실험에서 사용되는 상기 29개의 세포주는 각각 환자에서 유래된 독특한 세포주 특징을 유지하고 있으므로, 하기의 분석에 사용하기 적합한 세포주에 해당한다.
- [0065] **[실시예 3] 분자 아형 분류 분석 방법**
- [0066] **3-1. 엑솜-서열(Exome-sequencing) 분석**
- [0067] 상기 실시예 2의 방법에 의해 얻은 DNA를 이용하여 전체 엑솜 염기서열 분석을 진행하였다.
- [0068] 상기 실시예 2에 의해 정렬된 서열의 삽입 및 결실(Insertion 및 Deletion; 이하 'Indel'이라 함.) 콜링(Calling) 파이프라인은 상기 정렬 결과 bam 파일로부터 Picard package (<http://broadinstitute.github.io/picard/>)을 이용하여 중복된 read들을 표지 한 뒤, GATK tool을 통해 상기 중복된 read들을 제거하였다. 또한, 상기 중복 제거된 read는 GATK tool을 사용하여 read quality score 재측정 및 지역 재배치(local realignment)를 하였고, HaplotypeCaller package를 이용하여 상기 indel을 콜링하였다. 또한, SNV 콜링의 경우는 Mutect [Lawrence et al. 2013 PMID 23770567]의 기본 파라미터와 tumor-only 옵션을 사용하였다. 상기 indel 및 SNV로 콜링된 변이체(variant)는 최소 5개의 read를 갖고, phred-scaled quality score가 최소 30이상이며 대립형질(allele) 빈도가 최소 20% 이상인 체세포 변이체(variant)만 선별하

는 과정을 거쳤다. 다음으로 TCGA에서 확인된 위암 환자의 체세포 돌연변이는 남기고 공개된 생식 계열 변형체(germ line variant)를 제거하는 과정을 거쳐 최종적인 체세포 변이체(variant)를 확정하였다.

[0070] **3-2. RNA-서열(RNA-sequencing) 분석**

[0071] QIAGEN사의 RNeasy Plus Mini Kit를 이용하여 제조사에서 제공되는 프로토콜에 따라 상기 29개의 위암 세포주 각각의 전체 RNA를 추출하여, 하기 RNA 서열 분석에 이용하였다.

[0072] RNA-서열 분석 방법은 Illumina사의 TruSeq RNA Sample Prep kit v2를 이용하여 mRNA 라이브러리를 생성하고, HiSeq 2500 플랫폼을 통해 세포주 당 100bp의 최소 4천만개의 paired-end read를 서열 분석하였다. 상기 서열 분석된 read는 TopHat-Cufflinks [Trapnell et al. 2012 PMID 22383036] 파이프라인을 이용하여 인간 레퍼런스 게놈에 정렬하고, 정규화된(normalization) 값인 FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)을 계산하여 분석하였다.

[0074] **3-3. EBV(Epstein-Barr virus) 분석**

[0075] 상기 29개 위암 세포주 각각에서 추출된 DNA 및 RNA로부터 EBV 감염여부를 최소 2%의 불일치를 허용하는 조건으로 인간 게놈 유전자에 정렬되지 않은 read를 UCSC EBV (Epstein-Barr virus) reference genome에 BWA tool의 기본 파라미터로 정렬 하여 분석하였다. 상기 분석 결과에 대해, 경험적 한계(empiric cutoff)에 따라 엑솔-서열에서 300개 이상의 read가 정렬되고, RNA-서열에서 3개 이상의 read가 정렬되는 경우를 EBV 아형 세포주로 분류하였다.

[0076] 상기 분석 결과, 위암 세포주 SNU719 및 NCC24가 EBV 양성으로 확인되어, EBV 아형에 속하는 것으로 분류하였다.

[0078] **3-4. 유전자 복제 수 분석**

[0079] 유전자 복제 수(copy number)의 분석을 위하여 상기 엑솔-염기서열의 bam 파일로부터 UCSC hg19 refgene 테이블 [Karolchik et al. 2004 PMID 14681465]을 기반으로 Bedtools를 이용하여 유전자-기초 염기서열 데이터 숫자의 매트릭스를 생성하였다. 상기 데이터 수치에 1을 더하여 Log2 수치로 변환하는 단계에서 발생할 수 있는 마이너스 무한 수 생성을 방지하였다. 상기 염기서열 데이터의 중앙값(median)이 20 미만에 해당하는 경우 분석에서 제외하였다. 또한, 1사분위(first-quantile)/중앙값 미만의 것과 3사분위(third-quantile)/중앙값을 초과하는 유전자 역시 분석에서 제외하였다. 제외된 나머지 염기서열 데이터 값은 edgeR[Robinson et al. 2010 PMID 19910308] R package을 이용해 TMM (trimmed mean of M-values normalization) 방법을 통해 정규화된 염기서열 데이터 숫자로 계산하고, log2-ratio 값을 계산하기 위해 상기 정규화된 염기서열 데이터 수를 각각 세포주 유전자의 중앙값으로 나눈 뒤, 상기 값을 log2-전환하였다. Circular binary segmentation (CBS) algorithm에 적용하기 위하여 DNACopy[Seshan et al. 2016 DNACopy: DNA copy number data analysis. R package version 1.46.0.] R package를 이용하여 유전자 복제 수를 계 하였다. 또한, Genomic Identification of Significant Targets in Cancer (GISTIC) 2.0[Mermel et al. 2011 PMID 21527027] tool의 기본 파라미터로 하여 유의성 있게 변형된 복제 부위를 분석하였다.

[0081] **3-5. 미세부수체 불안정성(Microsatellite instability) 분석**

[0082] 상기 29개의 위암 세포주에서 상기 실시예 2의 방법에 의해 추출된 지노믹 DNA의 미세부수체 불안정성(Microsatellite instability)을 하기 방식에 의해 분석 하였다.

[0083] 상기 지노믹 DNA를 3730 DNA 분석기(ABI 시스템)를 이용한 모세관 전기영동 방법으로 하기 표 1에 표기된 5개의 단일염기서열 마커에 대해 genemarker v2.2.0 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 상기 5개의 마커 중 3개 이상에서 3bp이상 마커 사이즈의 변화를 보이는 경우를 미세부수체 불안정성(MSI) 아형 세포주로 분류하였다.

[0084] 상기 분석결과, SNU638, NCC59 및 SNU1가 MSI 아형 세포주에 속하는 것으로 분류하였다. 상기 세포주 중 SNU1 및 NCC59는 모든 마커에서 불안정성이 확인되었고, SNU638은 세개의 마커에서 불안정성이 확인되었다. 상기 SNU638, NCC59 및 SNU1을 제외한 26개의 세포주는 두개 이하의 마커에서만 불안정성이 관찰되어, 미세부수체 안정성(MSS) 아형에 속하도록 분류하였다.

표 1

Name	Gene	Genbank number	Length and location of the repeat	Fluorescent marker	Primer sequence 5' to 3'	Average PCR product size (bp)
BAT-26	hMSH2	U41210	26 (A) intron 5	FAM	tgactacttttgacttcagoc aaccattcaacatttttaaccc ^a	120
BAT-25	c-kit	L04143	25 (T) intron 16	NED	tcgctccaagaatgtaagt ^a tctgcattttaactatggctc	124
NR-21	SLC7A8	XM_033393	21 (T) 5' UTR	HEX	taaagtgtatgtctccctgg attctactcgcattcaca ^a	103
NR-22	Transmembrane precursor protein B5	L38961	22 (T) 3' UTR	FAM	gaggctgtcaaggacataa aattcggatgccatccagt ^a	142
NR-24	Zinc finger 2 (ZNF-2)	X60152	24 (T) 3' UTR	HEX	ccattgctgaatttaactc atttgccattgcattccaa ^a	132

[0086]

[실시예 4] 상피 중간엽 전이(Epithelial mesenchymal transition; EMT) 아형

4-1. 상피 중간엽 전이(EMT) 유전자 특징(signature) 분석

본 발명에서 상피 중간엽 전이 유전자 특징으로 분류하기 위하여 ACRG의 위암 코호트 상피 중간엽 전이 아형 분류에 사용된 유전자 특징으로서 과발현되는(up-regulated) 149개 유전자와 저발현되는(down-regulated) 161개 유전자를 이용한 자율 계층 클러스터링(unsupervised hierarchical clustering)을 수행하였다.

상기 상피 중간엽 전이 유전자 특징 자율 계층 클러스터링 분석 방식은 다음과 같다. 상기 실시예 3-2에서와 같이, RNA-서열 분석을 통해 29종의 세포주의 전사체에 대한 정규화된 발현량을 계산하였다. 결과적으로 얻은 FPKM값에 1을 더한 뒤 log2 수준으로 변환하여 분석에 사용하였다. 자율 계층 클러스터링을 수행하기 위해 R 패키지인 hclust를 사용하였다. 거리계산에는 유클리디안 방법으로 최대 링크지(maximum linkage)를 이용하여 계산하였다.

상피 중간엽 전이 유전자 특징 분석은 상기 과발현되는(up-regulated) 149개 유전자 평균 값에서 저발현되는(down-regulated) 161개 유전자의 평균값의 차이를 계산한 뒤, 상기 차이값을 통하여 분위수-분위수 그림(qqplot)에 나타내었다. 이때, 1사분위수(first quantile) 및 3사분위수(third quantile)를 잇는 대각선의 분포 경향에서 높은 스코어 방향으로 벗어나기 시작하는 지점을 한계점으로 결정하여, 상기 한계점보다 상피 중간엽 전이 유전자 특징 스코어 값이 큰 경우에 EMT 아형 샘플로 분류하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

도 3에서 보는 바와 같이, Hs746T, SNU484, YCC11, SNU1750, SK4, SNU668 및 MKN1 세포주가 EMT 아형에 속하는 것을 확인할 수 있었다.

4-2. 상피 중간엽 전이 단백질 발현 확인

상기 상피 중간엽 전이 아형 세포주의 상피 중간엽 전이 특성에 대하여 검증하기 위하여 상피 중간엽 전이 마커 단백질 발현을 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay)으로 확인 하였다.

상기 웨스턴 블롯 분석에 사용된 단백질의 준비 방법은 하기와 같다. 상기 담도암 세포주에 PBS를 처리하여 수득(harvest)하고, PBS로 세척 후 단백질 분해 억제제가 포함되어 있는 세포 용해 버퍼(cell lysis buffer)인 RIPA버퍼를 이용하여 용해시켰다. 상기 용해된 용액을 원심분리기를 이용하여 전체 용액을 분획한 뒤, 단백질이 포함된 용액만을 추출하였다. 상기 추출된 단백질은 브래드포드(Bradford) 방법에 의해 정량화 하였다. 정량화를 통해 얻은 동일 농도의 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 겔 전기영동을 수행하여 분리한 뒤, PVDF 막에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막은 비 특이적 결합을 줄이기 위하여 5% 탈지유(non-fat milk)가 포함된 TBS-T(Tris-buffered saline/0.1% Tween-20)용액으로 상온에서 1시간 동안 차단(blocking)한 후, 5% BSA 용액에 희석된 1차 항체를 4℃ 조건에서 12시간 이상 동안 반응시킨 뒤, 2차 항체(1:5000 희석)를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 시각화를 위해서는 강화된 화학 발광 시스템(Enhanced chemiluminescence system)을 이용하였다.

웨스턴 블롯 분석은 상피 중간엽 전이 마커로 보고되어 있는 E-cadherin, Vimentin 및 Snail 마커를 이용하여 수행하였고, 발현의 정량적 비교를 위하여 항존(house-keeping) 단백질인 β -actin을 이용하였으며, 그 결과는

도 4에 나타내었다.

[0099] 도 4에서 보는 바와 같이, 상피 중간엽 전이(EMT) 세포주에서는 E-cadherin의 발현이 낮으며, 발현 정도의 차이가 존재하긴 하지만 Vimentin 및 snail의 발현이 상피 중간엽 전이가 일어나지 않는 비-상피 중간엽 전이(Non-EMT) 세포주와 비교하여 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, 비-상피 중간엽 전이 세포주의 경우에는 상피 중간엽 전이 세포주와 발현 패턴이 정 반대로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0101] **4-3. 상피 중간엽 전이 아형 세포주 침습(invasion) 확인**

[0102] 본 발명에 따른 상피 중간엽 전이 아형 세포주의 침습(invasion) 여부를 확인하기 위하여 매트릭셀(matrigel) 침습 분석을 수행하였다.

[0103] 매트릭셀 침습 분석 방법은 매트릭셀이 300 µg/ml의 농도로 코팅되어 있는 트랜스웰(transwell)에 상피 중간엽 전이 세포주 및 대조군을 무혈청 배지에서 배양하였다. 트랜스웰 아래쪽은 우태아혈청(FBS)이 포함되어 있는 영양배지로 하여 37℃, 5 %, CO₂ 조건으로 배양기 내에서 배양하였다. 상기 대조군 세포는 상피 중간엽 전이가 일어나지 않는 세포주인 MKN45 및 NCC59 세포를 사용하였다. 상기 각각의 분주된 세포주를 48시간 배양한 뒤, 매트릭셀 막 위쪽의 세포를 면섬유를 이용하여 닦아내고, 상기 매트릭셀을 메탄올로 고정시킨 후 0.2% 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 사진 촬영하였다. 또한, 상기 막에 포함되어 있는 세포의 수를 집계하여, 그 결과는 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0104] 도 5 및 도 6의 결과에서 알 수 있듯이, 상피 중간엽 전이(EMT) 아형 세포주의 막 침습은 세포주 마다 차이가 존재하였지만, SNU1750을 제외한 모든 세포주에서 대조군인 비-상피 중간엽 전이(Non-EMT) 세포주에 비하여 높은 비율로 막 침습이 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

[0106] **4-4. 상피 중간엽 전이 아형 세포주 구 형성(sphere formation) 확인**

[0107] 상기 상피 중간엽 전이 아형 세포주의 줄기세포성(stemness)을 확인하기 위하여 구 형성(sphere formation) 실험을 수행하였다.

[0108] 상기 구 형성 실험 방법은 혈청이 포함되지 않은 DMEM-F12 배지(20ng/ml EGF, 20ng/ml 기초 FGF, 2% B27 보충물)에서 상피 중간엽 전이 아형 세포주 및 대조군인 MKN45를 배양하여 구 형성 여부에 대하여 현미경으로 관찰하였다. 또한, 구를 형성한 세포의 수를 집계하여, 그 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0109] 도 7 및 도 8에서 보는 바와 같이, SK4, Hs746T, SNU484, SNU1750, YCC11 및 SNU668 세포주의 경우 대조군인 MKN45와 NCC59에 비하여 구 형성 능력이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0110] 상기 결과를 통하여, 본 발명에 따른 상피 중간엽 전이 아형 세포주 SK4, Hs746T, SNU484, SNU1750, YCC11 및 SNU668은 암 줄기세포성을 갖는다는 것을 알 수 있다.

[0112] **[실시예 5] 분자 아형 분석 결과**

[0113] 상기 실시예 3 및 4의 분자 아형 분석을 통하여 본 발명에 따른 위암 세포주 29개의 분류 및 알고리즘은 도 9과 같다.

[0114] 분자 아형별 분석 결과 EMT 아형 세포주는 Hs746T, SNU484, YCC11, SNU1750, SK4, SNU668 및 MKN1이고, MSI 아형 세포주는 SNU638, NCC59 및 SNU1이며, MSS/TP53+ 아형 세포주는 SNU601, AGS, KATOIII, NCC19, OCUM-1, YCC2, MKN28, MKN74, NCC20 및 FU97이고, MSS/TP53- 아형 세포주는 NCI-N87, MKN45, SNU1967, SNU16, SNU216, YCC3 및 SNU620이며, EBV 아형 세포주는 NCC24 및 SNU719인 것으로 분류할 수 있었다.

[0116] **[실시예 6] 위암 세포주 분자 아형을 이용한 1차 약물 스크리닝**

[0117] 상기 실시예 3 및 4에 의해 분류된 7개의 EMT 아형 세포주를 이용하여 미국 FDA에서 승인 받은 1132개 소분자 약리 화합물 및 213개의 항암 소분자 화합물에 대한 약물 민감도를 측정 하였다. 상기 소분자 약리 화합물은 중앙학, 심장학, 항염증, 면역학, 신경 정신과 및 항암에 관련되고, 상기 항암 소분자 화합물은 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 전임상, 임상시험 단계에 있거나 시험이 완료된 물질을 사용하였다. 상기 약리 화합물 및 항암 화합물은 Selleckchem에서 구입하였다.

[0118] 상기 약물 스크리닝을 위하여 본 발명에 따른 7개의 EMT 아형 위암 세포주 각각을 96 웰-플레이트에 웰당 5,000 개씩 분주한 뒤, 24시간이 되는 때 세포 배양액에서의 약물 농도를 2.5 µM에 해당하게 희석하여, 바이오맥 리퀴드 핸들러 기기(베크만사)를 이용해 세포에 첨가하였다. 또한, 대조군으로 실험군과 같은 농도의 DMSO를 처리하

였다. 상기 세포는 37℃, 5 % CO₂ 배양기 내에서 72시간 동안 배양한 뒤, CellTiter-Glo 분석 키트(Promega사)를 이용하여 세포 생존율(cell viability)을 측정하였다. 그 결과를 도 10에 나타낸 뒤, 상기 세포 생존율 값으로 계층적 클러스터링 분석을 수행하여 생존율 값을 0.1 단위로 나누어 해당 생존율 값 이하에 해당되는 세포주의 개수에 따라 선택되는 약물의 수를 도 11 및 도 12에 나타내었다.

[0119] 도 10 내지 도 12에서 보는 바와 같이, 상피 중간엽 전이 아형 세포주에 생존율 한계점(threshold) 0.5 이하에 해당하는 세포주 수가 4개 이상에 해당하는 소분자 화합물은 총 63개에 해당하는 것으로 확인할 수 있었다. 상기 63개의 소분자 화합물은 DNA 합성을 타겟하는 약물인 Topoisomerase 관련한 약물 9건, 세포 주기 저해제 6건, HDAC 저해제 8건, EGFR, HER2, PIK3CA 및 src 관련 약물 3건, mTOR 및 PI3K 저해제 4건, proteasome관련 약물 4건, Autophagy관련 약물 2건, microtubule관련 5건, DNA/RNA 손상 관련 2건, ALK 관련 2건, Ubiquitine ligase 3건, 감염 관련 6건 및 기타 3건을 확인할 수 있었다(표 2).

표 2

Target	Drug	Target	Drug
Topoisomerase, DNA synthesis	Epirubicin Hydrochloride Mitoxantrone Hydrochloride Camptothecin Doxorubicin (Adriamycin) Gemcitabine Daunorubicin HCl (Daunomycin HCl) Gemcitabine HCl (Gemzar) Clofarabine Niclosamide (Niclocide) Fludarabine Phosphate (Fludara)	proteasome	Carfilzomib (PR-171) MLN9708 Bortezomib (Velcade) MLN2238
		Autophagy	Geldanamycin Nocodazole Obatoclox mesylate (GX15-070)
Cell cycle (Aurora, Cdk, plk1..)	Danusertib (PHA-739358) AT9283 Flavopiridol (Alvocidib) HCl BI 2536 GSK461364 BI6727 (Volasertib) SB 743921 Ispinesib (SB-715992)	microtubule	Paclitaxel (Taxol) Vinblastine Epothilone A
		DNA/RNA damage (chk1,chk2)	AZD7762 LY2603618 (IC-83)
HDAC	Trichostatin A (TSA) PCI-24781 CUDC-101 JNJ-26481585 Belinostat (PXD101) SB939 (Pracinostat) AR-42 (HDAC-42) Vorinostat (SAHA)	ALK	LDN193189 TAE684 (NVP-TAE684)
		Hsp90	Ganetespib (STA-9090) AUY922 (NVP-AUY922)
		Ubiquitine ligase	BAY 11-7082 (BAY 11-7821) YM155
EGFR, HER2, PIK3CA, src	Neratinib (HKI-272) CUDC-101 Ponatinib (AP24534) GSK2126458 PIK-75 KX2-391	infection	Pyrimethamine Thioniazole Bromide Fenbendazole (Panacur) Albendazole (Albenza) Cetylpyridinium Chloride Triptolide Flubendazole (Flutelmium)
mTOR, PI3K	Torin 2 BEZ235 (NVP-BEZ235) PI-103 INK 128 (MLN0128) BKM120 (NVP-BKM120)	Etc	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase inhibitor, nampt, acute lymphocytic leukemia, PTPMT1, anti-cancer, natural taxoid

[0121]

[실시예 7] 위암 세포주 분자 아형을 이용한 2차 약물 스크리닝

[0124] 상기 실시예 6을 통해 얻은 63개의 소분자 화합물을 이용하여 상기 29개의 위암 세포주를 각각 96 웰-플레이트에 웰당 5,000개씩 분주한 뒤, 24시간이 되는 때 세포 배양액에서의 약물 농도를 로그 연속 희석 방법으로 최소 0.5nM 내지 최대 50 μM에 해당하게 12개의 농도로 희석하여, 바이오맥 리퀴드 핸들러 기기(베크만사)를 이용해 세포에 첨가하였다. 상기 세포는 37℃, 5 % CO₂ 배양기 내에서 72시간 동안 배양한 뒤, CellTiter-Glo 분석 키트(Promega사)를 이용하여 세포 생존율(cell viability)을 측정하였다. 상기 측정 값은 63종의 약물과 29종의 세포주 각각에 대하여 약물당 12개의 농도에 대한 세포 생존율 값을 얻었다. 상기 생존율 값으로 trapezoidal

방법을 사용하여 63개의 약물에 대한 세포주 특이적 민감도를 나타내는 지표인 AUC(Area under the curve)값을 계산하여, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0125] 도 13에서 보는 바와 같이, AUC 값이 낮은(파란색) 약물의 경우 해당 세포주에서 약물 민감도가 높은 것으로 확인할 수 있었다.

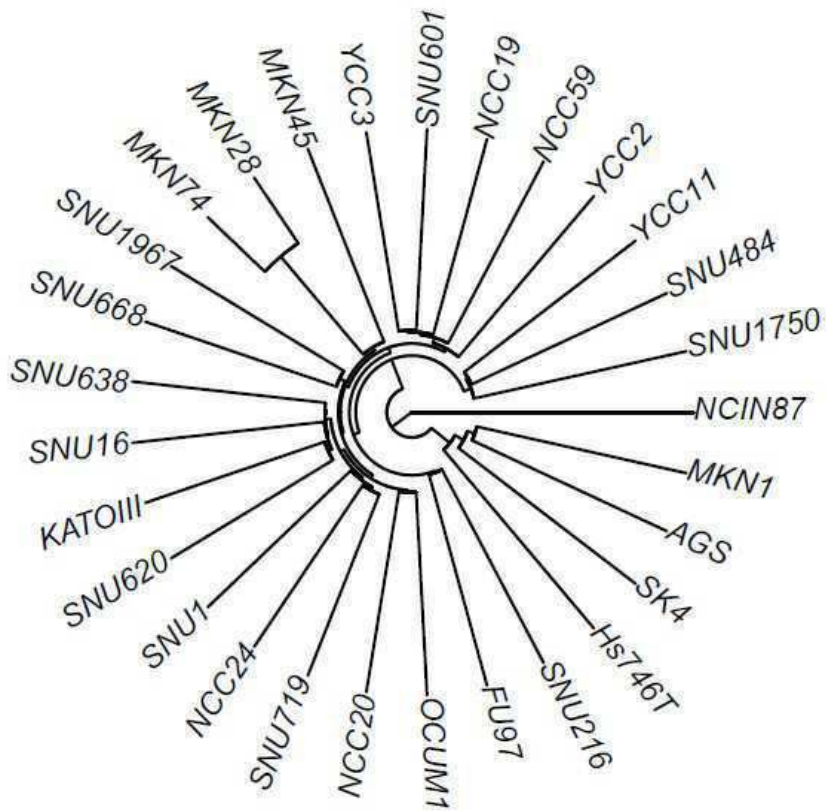
[0126] 이상에서 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

도면

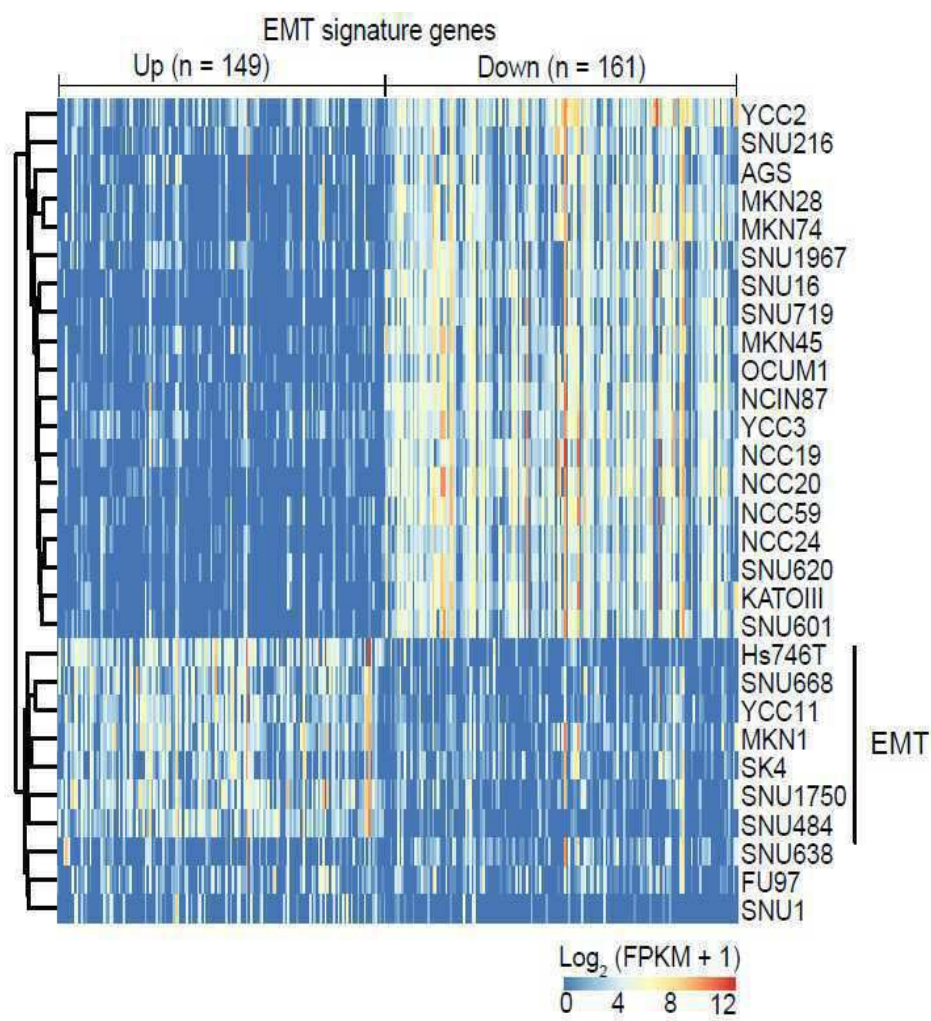
도면1

Sample	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	Vwa	TPOX	D18S51	Amelogenin	D5S818	FGA
AGS	13	29	10,11	11,12	15,2	6,7	12	11,13	20,22	14	15,17	11,12	13	X	9,12	23,24
FU97	14,15	30	11	12	16,17	9	10,12	9,11	—	—	17	12	15	X	10,12	19
Hs746T	13,14	29	8	10,12	14,15	9	10	11	23	14	15,17	8,10	15,16	XY	11,13	25
KATOIII	13,14	30,31	8,12	7,11	15,16	7,9	8,12	10,12	18,20	13,16	14,16	11	12	X	10,11	23,24
SK4	13	31,2	7	11,15	17	6,9,3	9,10	11,13	16,19	13,14	17,19	8,10	14,15	X	12	22,23
MKN1	14	29	19	9,12	15,17	9	10,12	11,12	22	13,14	16	8	13,16	X	11	20,23
MKN28	11,16	33,2	9	12	16	6	11	9,11	18,23	13,15,2	16,20	8,11	12	X	11	23
MKN45	13,17	31	10,11	12	15,16	7	8,11	10	17,18	14,16,2	19	8	16	X	10,11	19,24
MKN74	11,16	32,2	9	12	16	6	11	9,11	18,23	13,15,2	16,20	8,11	12	X	11	23
NCIN87	14	30	10,11	8,12	14	7,9	8,11	9,13	23,24	14,14,2	15,16	9,11	17	XY	12,13	20,21
NCC19	12,14	29	8,12	10,12	16	6,9	8,13	9	18,19	14	18	9	15	XY	11	20,23
NCC20	13,15	31	8,11	11	15	7,9,3	11,12	13	18,23	14	16,17	8,11	12,13	X	12,13	23
NCC24	13,15	30	10,12	10,12	15,18	7,9	8	9	19,22	13,14,2	14,16	8	19,20	XY	10,11	23
NCC59	10,13	28	11,13	10,11	14,15	9	8,14	8,9	24,27	14	16,17	8	13,14	XY	12,14	21
OCUM1	11,12	30	12	10,12	17	9	10,11	11	—	—	14,16,17	8,11	12,13	X	9,10	19,23
SNU1	13,14	29,32,2	9,12	12,14	16,17	8,9,3	12,14	9,12	23,24	13,14,2	14	8,10	14,20	XY	13	22
SNU16	14	29,33,2	12	12	15,16	6,9	8,12	11,13	18,19	13,15,2	16	11	14	X	10,13	23
SNU216	14,15	29	8,12	12	15,16	9	8,9	12,13	17,22	13,2,14,15	15,16	11	13,16	X	10,15	17,28
SNU484	12,14	30	12	12	9	18	7	11,12	13	23	13,14	18	8	X	10	19,23
SNU601	13,14	19,30	9,11	10,11	10,11	16	7,9	9,12	12	18,19	15,2	16,18	8,11	XY	10	23
SNU620	13	31,32,2	13	10,11	10,11	17,18	6,7	12	9,11	23,25	13,15,2	16,17,18	8,11	X	11	19,24
SNU638	10,12	30,2,31	9,10	10,12	15	7	10	11,13	18,22	11,14	14,19	8,11	14,16	XY	10,14	17,27
SNU668	14,15	30	9,11	9,11	12	16	8	8	11,12	17,19	13,14	17	9	X	13	23
SNU719	12,14	29,30	10,11	12	14,15	7,9	10,11	9,10	19	14,15	16,18	8,9	13,15	XY	11,12	21,23
SNU1750	15	29	11	12	15,17	6	11	11	24	14	14,18	9	7,14	XY	12	24
SNU1967	10,16	30,31	12,13	12	17	6	11	11	17,18	14,2	14,16	8,11	15,17	X	13	22
YCC2	12,13	30,31,2	8,10	12	15,16	6	9,11	9,12	19,20	13,15	14,17	8,11	16,17	XY	11,13	24
YCC3	13,14	29	11,12	10,13	15,16	9	8,11	9	19,23	13,14	16	11	13	X	9,15	23,24
YCC11	12,13	31,2	9	12	14,15	6,10	8	10	24	14,2,15,2	16,17	8	15	X	10,11	20,2,22

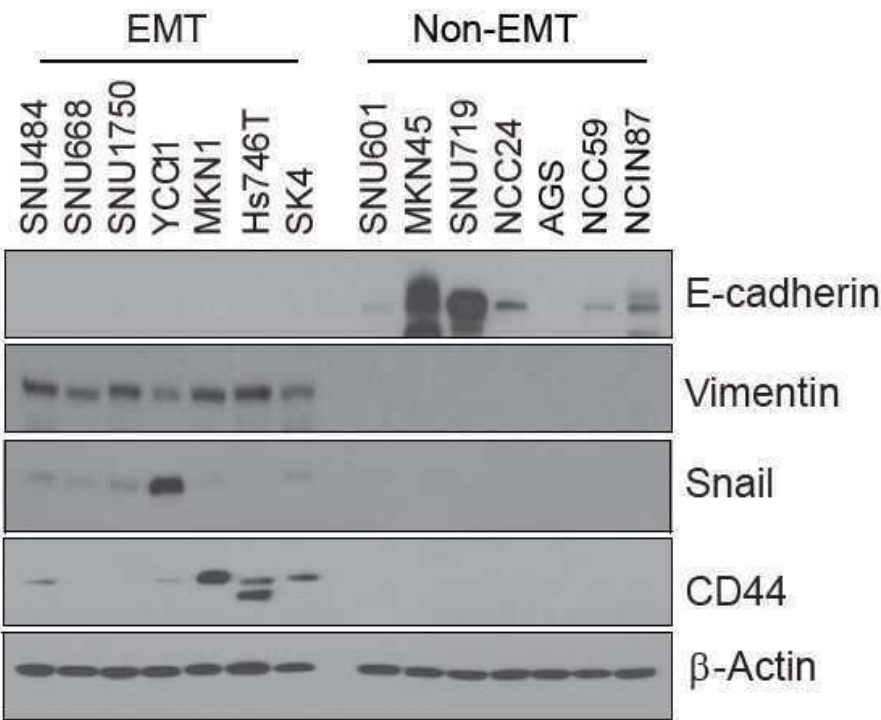
도면2



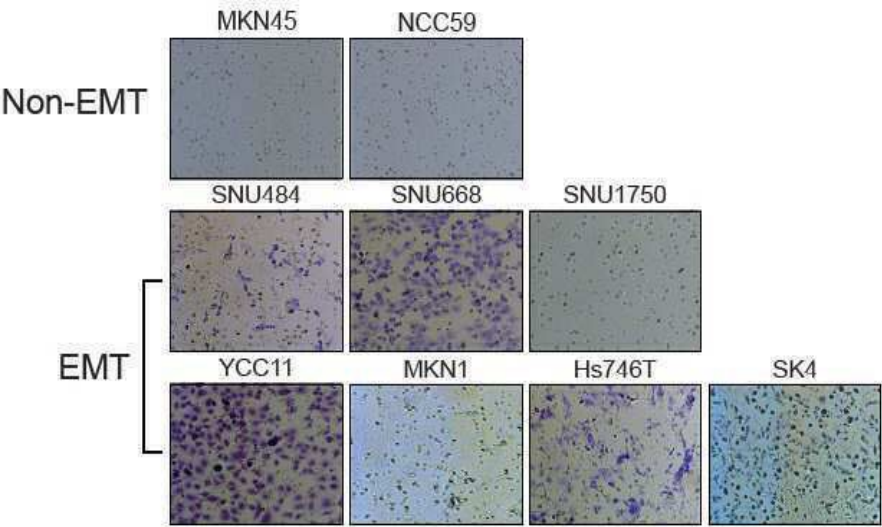
도면3



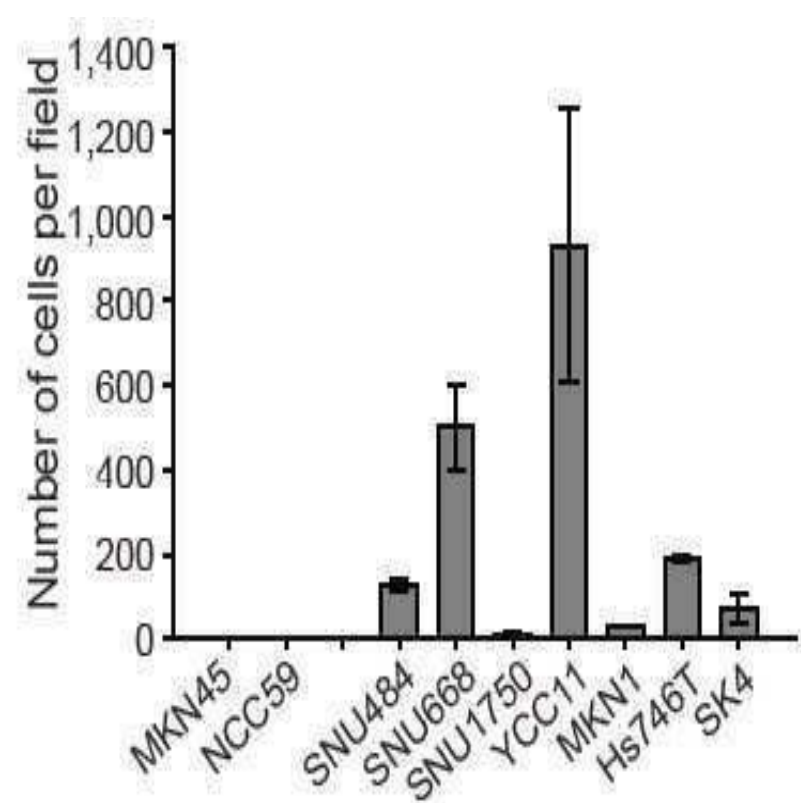
도면4



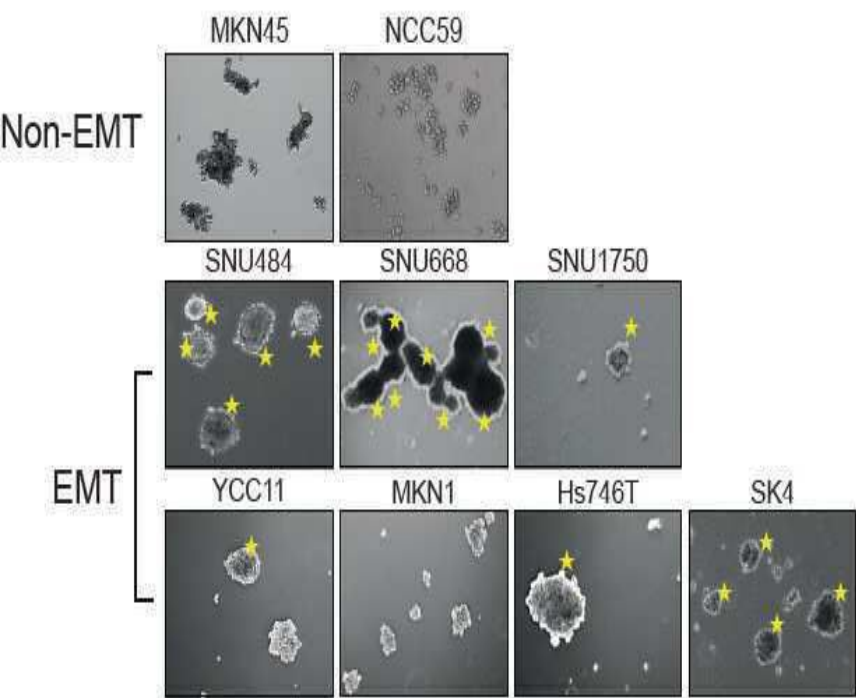
도면5



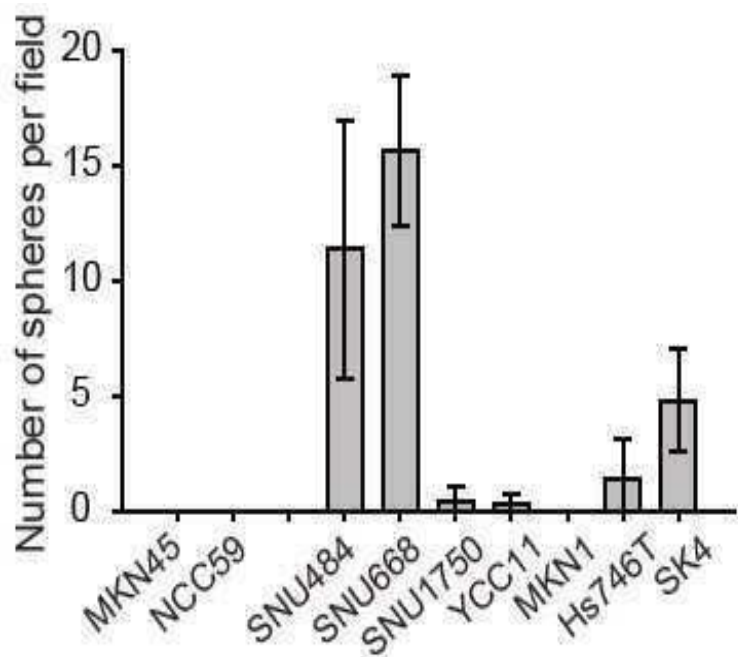
도면6



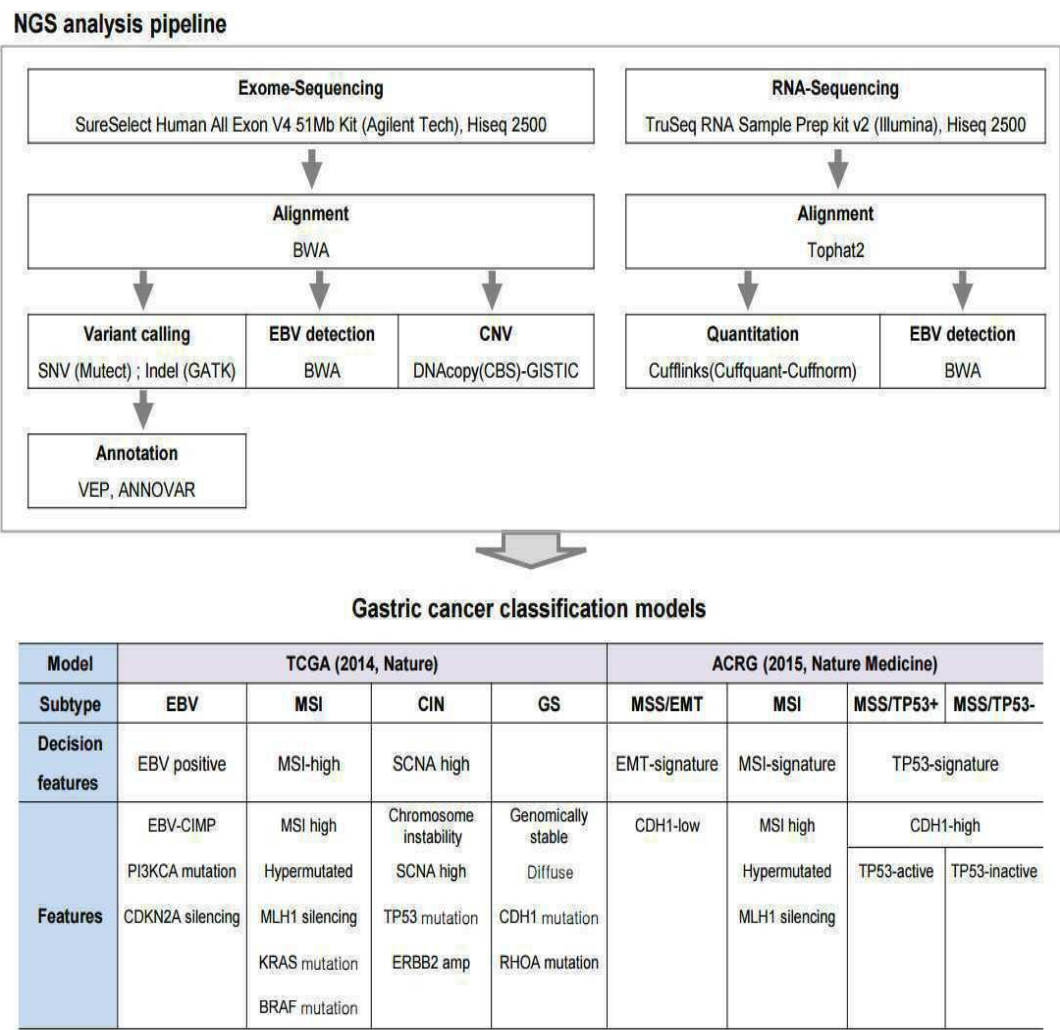
도면7



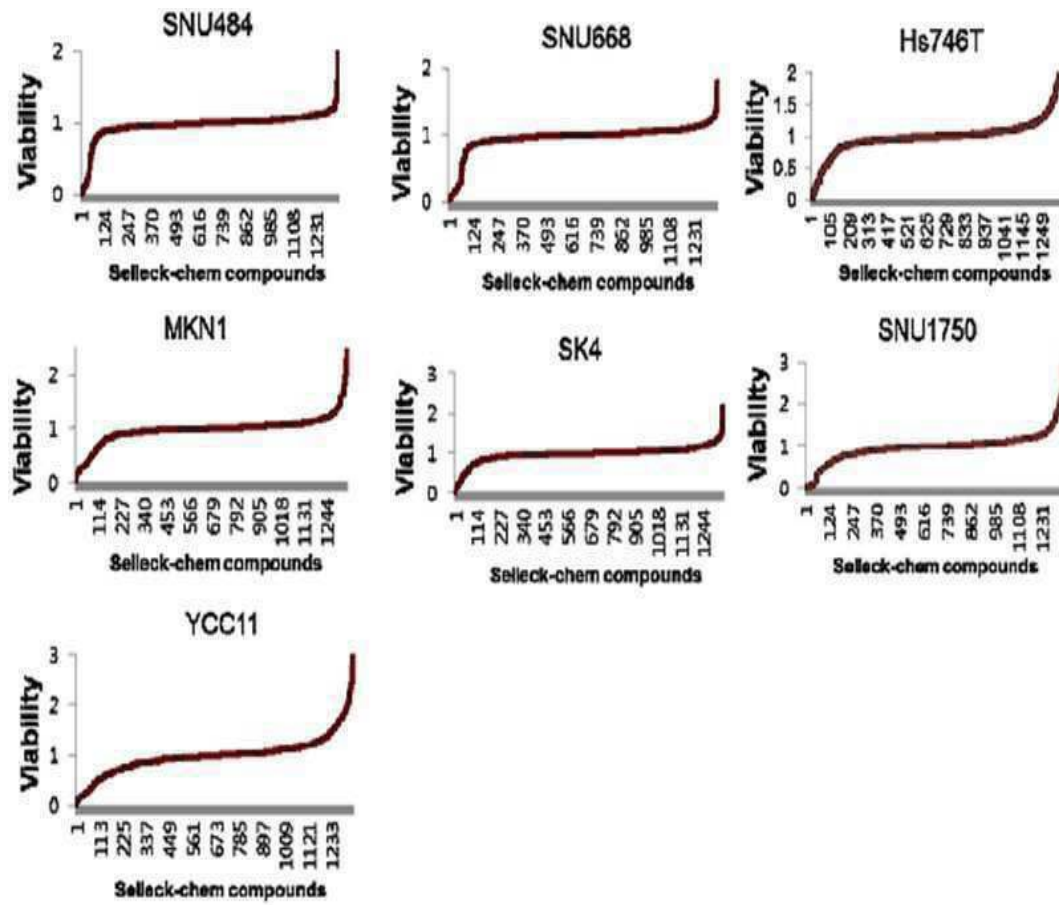
도면8



도면9



도면10



도면11

