



종양관련유전자검사시약

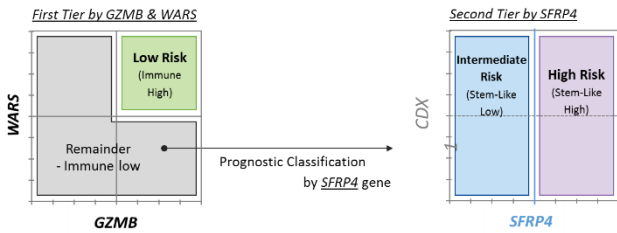
nProfiler® 1 Stomach Cancer Assay (체외 제허 17-865 호)

사용목적

nProfiler® 1 Stomach Cancer Assay (이하 nProfiler® 1) 은 수술한 진행성 위암 2기, 3기 환자의 포르말린고정 파라핀포매(FFPE)된 조직 검체에서 측정된 9 개 유전자의 발현량을 RT-qPCR 로 측정하고 그 측정값을 알고리즘에 적용하여 위암 환자의 5년 생존율에 대한 예후 정보를 제공하는 **체외진단용 의료기기**이다.

검사원리

포르말린고정 파라핀포매(FFPE)된 조직 검체에서 추출한 Total RNA 를 역전사시켜 만들어진 cDNA 로 위암 관련 9 개 유전자(4 개 표적유전자; WARS, GZMB, SFRP4, CDX1) 와 5 개 참고유전자로 구성)의 발현량을 실시간으로 측정한 후, 측정된 유전자 발현정보를 알고리즘에 대입하면 각 환자의 예후군(좋은, 중간, 나쁨)을 구분하여 준다. 예후군 구분에 따라 각 환자의 5년 생존율을 예측할 수 있어 각 예후군에 따라 치료지침을 정하는데 참고자료가 될 수 있다.



<알고리즘에 따른 예후군 구분 원리>

구성

제품구성	Cap 색상	용량		수량
		NP1T05	NP1T15	
Gene 1~9	●	65 µl	160 µl	Gene 별 튜브 각 1 개
GSP MIX	●	50 µl	108 µl	튜브 1 개
RT MIX	●	26 µl	50 µl	튜브 1 개
RT Buffer	●	100 µl	216 µl	튜브 1 개
qPCR MIX	●	800 µl	1,400 µl	튜브 1 개
Negative Control I	●	500 µl	500 µl	튜브 1 개
Positive Control I	●	30 µl	30 µl	튜브 1 개

[5 인(NP1T05) 또는 15 인(NP1T15) 테스트/KIT]

보관방법 및 사용기한

KIT 는 -20°C 이하에서 보관하도록 하며, KIT 외관에 표기된 사용기한 이내에 사용하여야 한다.

KIT 는 개봉 후 즉시 사용해야 하며, 본 제품은 "일회용 의료기기"로 "재사용을 금지"한다.

사용방법

1. 검체 대상 및 준비 방법

- 1) 검체 대상: AJCC 8 판 기준 2~3 기 진행성 위암 환자의 파라핀포매 샘플(FFPE sample)
- 2) 검체 종류 및 필요 분량: Tumor%가 20% 이상인 파라핀포매 샘플에서 ① 지름 3mm 크기로 펀칭한 core 또는 ② Unstained slide 에서 macrodissection 한 검체를 검사한다. 권장하는 수량은 다음을 따른다.

샘플링 방법	검체형태	권장하는 수량
3mm Core Punch	Core	1 (개)
3mm Macrodissection	Unstained slide	10 (장)

3) 검체 준비

- ① 위암 수술 후 추출한 조직으로 만든 파라핀포매 샘플을 슬라이드로 제작한 후, H&E 시약으로 염색한다.
- ② 임상병리 의사는 염색된 파라핀 포매 슬라이드에서 Tumor 가 20% 이상 포함되어 있는 부분을 지름 3mm 크기의 원으로 표시한다.
- ③ 위 슬라이드에 표시된 부분을 파라핀 포매 블록에 매치하여 펀칭기를 사용하여 3mm core 펀칭 또는 Unstained slide 로 제작하여 동일하게 3mm macrodissection 한다.
- 4) 저장 방법: 검체를 즉시 검사하지 않는 경우, 검체 샘플을 4°C 냉장고에 보관하며 한 달 내에 검사할 것을 권장한다.

2. 검사 전 검체 준비사항

- 1) 검체 샘플 개봉 전 준비사항: 모든 검체 샘플은 익명화해야 하므로, 샘플 개봉 전에 검사 기관의 고유번호를 부여한다.

2) 검체 샘플 개봉 후 준비과정

- ① 파라핀포매 조직의 최소 면적은 지름 3mm 인 원으로, 권장하는 수량은 샘플링방법에 따라 다를 수 있다.

$$\times 3\text{mm core 의 면적(mm}^2\text{)} = \pi r^2 = \pi \times \left(\frac{3}{2}\right)^2$$

- ② 제작된 검체 샘플 슬라이드의 사진을 찍어 현미경으로 슬라이드 상에 표시된 샘플의 Tumor%를 확인하고, 해당하는 부분의 확대된 이미지를 확보한다.
- ③ 검사 진행에 적합한 경우, 새로운 1.5ml micro tube 에 생성된 고유번호를 라벨링하고, 파라핀포매 샘플 3mm core 펀칭 또는 3mm macrodissection 한 조직을 라벨링 된 tube 에 옮겨 담아 보관한다.
- ④ 파라핀포매 샘플이 검사 진행에 적합하지 않은 경우에는 새로운 검체 샘플을 준비한다.

3. 사용 장비 및 KIT 사용 조건

1) 사용 장비

- SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, 체외 승인 20-2393 호): cDNA 합성용
- ViiA™7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, 체외 승인 12-648 호): qPCR 용

2) KIT 사용 조건

- 온도: 22 ± 5°C
- 습도: 40 ± 10%

모든 KIT 의 구성품은 사용 전 ice 에서 30 분간 녹이며, Vortex 후 Spin down 하여 사용한다.

4. RNA 추출

- 1) Total RNA 추출은 RNeasy® DSP FFPE Kit(체외 승인 18-2036 호) 시약을 사용하여 추출하며 사용방법은 제조사의 사용방법에 따른다.
- 2) Total RNA 는 최소 400ng(RT 200ng/ No-RT 200ng)을 확보한다. 이 때 Total RNA 의 양은 UV Spectrophotometer 로 측정하며 A260:A280 비율이 1.8 이상인 RNA 를 시험에 사용한다.
- 3) 추출된 Total RNA 는 즉시 nProfiler® 1 의 검사 시험을 진행하길 권장한다. 즉시 진행할 수 없을 시 -70°C 냉동고에 보관하며, 적어도 3 주 내에 시험을 진행한다.

5. RT-qPCR 과정

1) 준비사항

① Control 및 Total RNA 준비 (RT, No-RT)

1개의 검체 및 Control 당 RT 와 No-RT 용으로 각 Total RNA 200 ng 을 9 µl 로 준비하며, Negative Control I 을 이용해 최종 농도를 맞춘다.

샘플	농도/최종 볼륨	비고
RT	Total RNA 200 ng/9 µl	하나의 검체 당 RT 와 No-RT 진행
No-RT	Total RNA 200 ng/9 µl	
 ... 5 or 15 (RT, No-RT) 5 인 : 총 8 strip cap tube 2 개 (10 well) 15 인 : 총 8 strip cap tube 4 개 (30 well)		

※ RT(Reverse Transcription): Reverse Transcriptase Enzyme 을 사용하여 RNA 의 상보적인 cDNA 를 만드는 반응과정

※ No-RT(Not-Reverse Transcriptase): RT 과정에서 Reverse Transcriptase Enzyme 을 사용하지 않고 진행되는 반응과정

2) cDNA 합성

① 아래 표와 같이 각 번호의 구성물을 준비하여 RT 와 No-RT 샘플에 대해 cDNA 를 합성한다. 단, No-RT 용에는 RT MIX 가 아닌 Negative Control I 을 넣어준다.

1 번 구성물	용량
샘플 RNA 및 Control	9 µl
GSP MIX	3 µl
Total	12 µl

2 번 구성물	용량
1 번 구성물	12 µl
RT Buffer	6 µl
RT MIX or N.C I	2 µl
Total	20 µl

② cDNA 합성 조건

No.	과정	온도	시간
1	1 번 구성물 분주	-	-
2	Denature	65°C	5 분
3	2 번 구성물 분주	-	-
4	Synthesis	37°C	60 분
5	Enzyme inactivation	70°C	15 분

3) qPCR 분주

- 1.5ml tube 에 합성한 cDNA 를 각각 8 µl 와 qPCR MIX 를 40 µl 씩 넣어 cDNA MIX 를 만들어준다.
- 범용 분주장비를 사용하며, 각 Gene 별로 장비의 매뉴얼에 따라 다음 표와 같이 384well 에 분주한다.

구성물	용량
cDNA MIX	3 µl
Gene 1~9	2 µl
Total	5 µl

4) qPCR 과정

장비매뉴얼에 따라 ViiA™ 7 Real-Time PCR System 장비를 사용하여 qPCR 을 진행한다.

① ViiA™ 7 Real-Time PCR System 설정 조건

항목	설정값
Type of experiment	Comparative C _t (ΔΔ C _t)
Reagent	TaqMan® Reagents
Property	Fast
Reporter	FAM
Quencher	None

② qPCR 조건

No.	과정	온도	시간	Cycle
1	Enzyme activation	95°C	120 초	1
2	Denature	95°C	10 초	40
3	Extension	60°C	30 초	

6. 결과 해석

1) 시험 결과

- nProfiler® 1 의 결과는 nDx 1 software 를 이용하여 분석하며, nDx1 software 는 노보믹스 홈페이지(www.novomics.com)에서 다운받아 사용할 수 있다.
- 유효하지 않은 결과에 대한 검체의 재시험
 - nDx1 의 분석 결과 QC 검사 합격 시 의뢰정보 목록에서 녹색 이미지 (●) 가 표시되며, 불합격시 목록에서 빨간색 이미지 (●) 가 표시된다.
 - QC 검사 불합격시 경우 해당 샘플을 재시험한다.
 - 재시험 이후 동일한 QC 원인으로 불합격한 경우에는 제조사에 문의한다.

3) 위암 예후군 구분 원리 및 해석

예후군은 알고리즘에 의해 GZMB 와 WARS 가 동시에 임계치 이상인 경우 저위험군(Low Risk)으로 분류되고, 이에 속하지 못한 환자 샘플들 중 SFRP4 가 임계치 이상인 경우 고위험군(High Risk)으로 분류되고 SFRP4 가 임계치 미만인 경우 중간위험군(Intermediate Risk)으로 분류된다.

nProfiler® 1 임상시험 결과에 따라 저위험군(Low Risk)로 분류된 군은 고위험군 (High Risk)으로 분류된 군에 비하여 예후가 좋고, 고위험군 (High Risk)으로 분류된 군은 저위험군(Low Risk)으로 분류된 군에 비하여 예후가 나쁘다고 해석한다.

예후군	해석
저위험군 (Low Risk)	예후 좋음
중위험군 (Intermediate Risk)	예후 중간
고위험군 (High Risk)	예후 나쁨

사용 시 주의사항

1. 준비사항

- 본 제품은 체외진단용 의료기기이므로 체외진단용으로만 사용되어야 하며, 전문가만이 사용해야 한다.
- 본 제품은 단순히 정보를 제공하는 제품이며, 이 검사 결과만으로 치료적 결정을 내릴 수 없다.
- 본 제품은 범용 분주기와 ViiA™ 7 Real-Time PCR system (체외 수인 12-648 호), SimpliAmp Thermal Cycler (체외 수인 20-2393 호)을 사용하여 분석적 성능이 검증되었으며, 해당 기기는 기기 사용에 대한 교육을 받은 사람만 사용하는 것을 원칙으로 한다.
- 본 제품 사용 시 사용되는 기기들의 조작방법을 숙지하고 전원을 미리 켜 놓는다.

2. 오염방지

- 실험장소나 도구 및 사용 시약 등으로 인한 미생물, RNA, DNA 의 오염을 피하기 위해 RNase 전용 세제와 70% Ethanol 을 사용하여 세척한다.
- RNA 추출, 분주, 증폭과정의 공간이 구분되어 있어야 하며 작업순서는 단방향으로 이루어져야 한다. 특히, 증폭혼합물은 심각한 오염을 야기할 수 있으므로 실험실 규칙에 따라 철저히 관리해야 한다.
- 오염을 방지하기 위해 항상 장갑(일회용), 마스크(일회용), 실험복을 착용한다.

3. 사용 시 유의사항

- 사용 전 제품에 표기되어 있는 유효기간을 반드시 확인해야 하며 유효기간이 지난 제품은 사용하지 않는다.
- 다른 키트의 시약 또는 다른 LOT 의 시약과 함께 사용하지 않는다.
- 본 제품은 고온과 자외선에 노출되면 성능이 저하될 수 있으므로 사용 직전 개봉, 개봉 후 즉시 사용을 원칙으로 한다.

- 본 제품의 키트는 일회용이므로 원인에 관계없이 한 번 키트를 개봉하면 재사용 할 수 없다.
- 본 제품의 5 인용 키트는 최대 5 인까지 그리고 15 인용 키트는 최대 15 인까지 동시에 검사할 수 있다.
- 일회용 RNase-free pipette tip 의 사용을 권장한다.
- 사용하지 않은 시약 및 폐기물은 의료폐기를 전용 용기에 폐기한다.
- 본 제품은 Proteinase K, Dnase I, FFPE matrix / Neo-clear mix 로 부터의 간섭영향은 없는 것으로 확인되었으나, Ethanol, 2-propanol/3M Sodium acetate mix 는 간섭영향이 있을 수 있으니 취급에 주의를 요한다.

4. 안전수칙

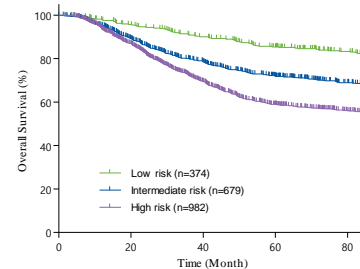
- 검체는 잠재적으로 감염성이 있는 것으로 간주하고, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 와 CLSI M29-A3 와 같은 실험실 안전 지침에 따라야 한다.
- Kit 내 시약을 쏟았을 경우 흡착제(천, 플리스, 모래, 규조토, 톱밥 등)로 수거하고 물질이 제거된 후에는 환기 시킨 후 쏟은 곳을 RNase 전용 세제로 청소한다.
- 입에 넣거나 먹지 않으며 삼켰을 경우 입안을 행구고, 피부나 눈에 접촉하면 즉시 다량의 물로 씻어낸 후 의사의 자문을 받는다.
- 흡입했을 경우 신선한 공기가 있는 곳으로 이동하고 불편감이 지속되면 의사의 자문을 받는다.
- 폭발 및 화재 시에는 호흡장비를 착용하고 상황에 따라 적절한 소화방법을 사용한다. 눈의 노출을 피하기 위해 보호 안경 혹은 고글을 착용하며 독성 가스는 반드시 배출한다.
- 검사실 내에서는 식사·음주·흡연을 금하고, 다른 검사와 마찬가지로 이 검사를 적절히 수행하기 위한 실험실 안전지침을 준수한다.

임상적 성능; SPRINT trial 결과 기반

nProfiler® 1 은 AJCC 8 판 기준 2 기와 3 기 위암 수술 후 환자로 부터 얻은 2,035 개 FFPE 검체를 대상으로 임상시험을 수행하였다.

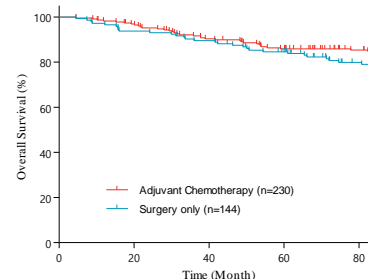
1. 예후군 구분 결과

카플란 마이어 생존분석을 통해 세 예후군의 5년 생존율(95% CI)은 각각 저위험군 85.40% (95% CI; 81.37% - 88.62%), 중위험군 71.74% (95% CI; 68.17% - 74.99%), 고위험군 58.87% (95% CI; 55.67% - 61.92%)으로 산출되었다.



2. 저위험군의 항암치료 효과 없음 검증

저위험군에서 수술군과 수술 후 보조항암요법군의 5년 생존율(5-year overall survival)과 95% 신뢰구간은 수술 후 보조항암요법군 85.91%(95% CI; 80.66% ~ 89.82%), 수술군 84.59% (95% CI; 77.54% ~ 89.57%)이었다. 따라서 저위험군에서 수술군과 수술 후 보조항암요법군 간의 5년 생존율은 통계적으로 유의미하게 차이가 없음을 확인하였다. 즉, 저위험군으로 구분된 위암 2, 3 기 환자는 수술 후 항암 치료 효과가 없음을 검증하였다.



제조번호 및 포장단위 외부포장 제조번호(LOT) 및 포장단위 참조

제조판매원

㈜노보믹스

서울특별시 영등포구 당산로 171 금강펜테리움 IT 타워 306,306-1 호
전화: 02) 2068-3700 홈페이지: http://www.novomics.com

첨부분서 작성 및 개정연월: 2023.09

※본 사용설명서는 당사(㈜노보믹스)의 홈페이지에서 다운로드하여 받아보실 수 있습니다.