

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 5월 7일 (07.05.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/091387 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/6886 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/014383
- (22) 국제출원일: 2019년 10월 29일 (29.10.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0131298 2018년 10월 30일 (30.10.2018) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222 (반포동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 장정원 (JANG, Jeong Won); 06574 서울시 서초구 방배로 270, 가동 1305호 (방배동, 방배삼호아파트), Seoul (KR). 허원희 (HUH, Won Hee); 06732 서울시 서초구 효령로 72길 57, O동 314호 (서초동, 서초트라펠리스), Seoul (KR). 김진섭 (KIM, Jin Seoung); 08706 서울시 관악구 관천로 18길 39, s하우스 103호 (신림동), Seoul (KR). 김혜선 (KIM, Hye Seon); 08778 서울시 관악구 신림로 50길 17-5, 102호 (신림동), Seoul (KR). 차정훈 (CHA, Jung Hoon); 18424 경기도 화성시 동탄원천

로 315-18, 757동 404호 (능동, 동탄능동마을상록예가아파트), Gyeonggi-do (KR). 박나리 (PARK, Na Ri); 14216 경기도 광명시 시청로 29번길 12, 102동 102호 (철산동, 영풍아파트), Gyeonggi-do (KR).

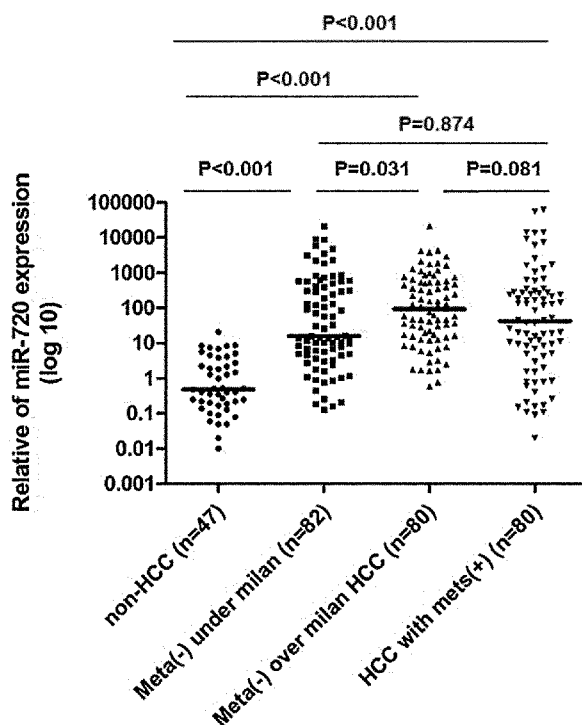
(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) Title: BIOMARKER FOR DIAGNOSIS OR PROGNOSIS PREDICTION OF LIVER CANCER METASTASIS, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a biomarker for the diagnosis or prognosis prediction of liver cancer metastasis, and a use thereof, and, more specifically, to: a biomarker for the diagnosis or prognosis prediction of liver cancer metastasis, comprising miR-720 in exosomes; and a use thereof. MiRNA according to the present invention exhibits a specific expression pattern in patients with liver cancer metastasis, and thus can be used as a biomarker for the diagnosis of liver cancer metastasis. In addition, the biomarker can be used as a factor for the prognosis prediction of liver cancer metastasis, and thus can be used in personalized medicine for liver cancer according to the determination of treatment method and the prognosis prediction for a patient.

(57) 요약서: 본 발명은 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 엑소솜 내의 miR-720을 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 miRNA는 간암 전이 환자에서 특이적인 발현 양상을 나타내는 바, 간암 전이 진단용 바이오마커로서 사용될 수 있다. 또한, 간암 전이 예후 예측 인자로 사용이 가능하므로 환자의 치료방법의 결정과 예후 예측에 따른 간암의 개인별 맞춤형 치료법(Personalized medicine)에 사용될 수 있다.

MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 2018년 10월 30일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2018-0131298호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.
- [2] 본 발명은 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 엑소좀 내 miR-720을 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

[3]

배경기술

- [4] 간세포암 (Hepatocellular carcinoma, HCC)은 해마다 50만명이 사망하는, 세계에서 5번째로 흔한 종양이다. 그 동안 다양한 기법의 치료기술이 임상에 도입되었으나 HCC 환자의 생존률은 여전히 불량하며, 우리나라에서 HCC 발생률은 20년에 걸쳐 개선되지 않았고, 사망율과 거의 동일한 발병률을 지니고 있다. B형 간염 바이러스 또는 C형 간염 바이러스에 감염되어 발병하는 만성 간염, 알코올 및 아플라톡신 B1 (aflatoxin B1)과 같은 발암물질에의 노출은 HCC에 대한 주요 위험 인자로 알려져 있다.
- [5] 한편, 간세포암의 진단을 위해 초음파 검사, CT검사, MRI 검사 등의 영상 진단 검사, 혈청 검사(AFP, PIVKA-II), 및 생검 재료의 병리 조직 검사가 이용되고 있다. 혈청 AFP 검사는 환자의 대략 7할 미만에서 높은 값을 나타내지만, 만성간질환 환자에 있어도 정도의 높은 값을 나타내는 것이 자주 인정되어 그 감별이 중요하다. 한편, 조기 간세포암에서는 낮은 값을 나타내는 일도 많다. 또, PIVKA-II(protein induced by vitamin K antagonist-II)의 양성율은 5할 미만으로 낮지만, 간세포암에의 특이성은 높고, 양자의 병용에 의해 진단 정밀도가 상승하는 것이 알려져 있다. 생검 재료의 병리 조직 검사는 간질환의 확정 진단에 있어 중요한 검사이다. 그러나, 병리학적 특징만으로 암 특히 초기의 간세포암과 비암부 조직을 식별하는 일도 때때로 곤란하다. 즉, 미소병변은 재생 결절, 혹은 초기의 고분화형의 간세포암인 경우를 볼 수 있다. 특히 경피적 침생검에 의해 종양성 조직을 채취했을 경우에는, 채취량이 한정되는 일도 있어 보다 확실한 진단 기술이 필요하다.

[6]

[7] 선행기술문헌

[8] 대한민국 공개특허 제10-2018-0029936호

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은, 엑소좀 내의 miR-720을 포함하는, 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커를 제공한다.
- [11] 또한 본 발명은, 엑소좀 내 miR-720을 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [12] 또한 본 발명은, 상기 조성물을 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [13] 또한 본 발명은, 간암 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [14] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[15]

과제 해결 수단

- [16] 본 발명은, 엑소좀 내 miR-720을 포함하는, 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커(또는 바이오마커 조성물)를 제공한다.
- [17] 상기 바이오마커는 간암의 간외 전이를 진단하거나 예후를 예측하는 것일 수 있다.
- [18] 본 발명의 바이오 마커는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 마커로서의 정확성 및 신뢰도도 탁월하므로 간암의 전이를 진단하거나 예후를 예측하는 용도로 이용될 수 있다.
- [19]
- [20] 또한 본 발명은, 엑소좀 내 miR-720을 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [21] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 본 명세서에서 사용되는 표현 "엑소좀 miRNA의 발현 수준 측정"은 해당 시료 내에서 검출하고자 하는 대상을 검출하는 것을 의미한다.
- [22] 본 발명에서는, 그 검출하고자 하는 대상은 시료 내에 존재하는 엑소좀 내 miR-720이다. 즉, 엑소좀 내 miR-720을 검출함으로써 상기 간암 전이 여부를 확인 할 수 있다.
- [23] 엑소좀 miRNA의 검출은 통상적으로는 시료로부터 엑소좀을 추출하여, 추출된 엑소좀내의 miRNA를 검출하는 방법으로 수행할 수 있다. 이러한 엑소좀 miRNA의 검출은 하이브리드화 반응 및 증폭반응에 의해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 다양한 기술을 이용하여 용이하게 실시될 수 있다.
- [24] 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 엑소좀 miRNA의 발현 수준은

- 간암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 측정할 수 있다.
- [25] 상기 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다.
- [26] 프라이머를 이용한 엑소좀 miRNA의 검출은 PCR과 같은 증폭 방법을 사용하여 유전자 서열을 증폭한 다음 당 분야에 공지된 방법으로 유전자의 증폭 여부를 확인함으로써 수행될 수 있다.
- [27] 프라이머는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 갖는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다. 본 발명에서는 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 간암 발병 여부를 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [28] 프로브는 짧게는 수개의 염기 내지 길게는 수십 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 상기 miRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 간암 전이 여부를 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [29] 이러한 프라이머 또는 프로브는 공지된 서열을 바탕으로 당업자가 적절히 디자인할 수 있다.
- [30] 예컨대, 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [31] 상기 miRNA의 발현 수준은 바이오 키트 분야에서 통상 사용되는 방법에 따라 측정될 수 있는데, 예컨대 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection

assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 유전자 칩 등이 포함되며 이들로 제한되는 것은 아니다.

[32]

[33] 또한 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[34] 상기 키트에는 상기 엑소좀 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제뿐만 아니라, 간암의 전이 진단 또는 예후 예측용 키트로 사용되기에 적합하도록 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.

[35] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.

[36] 예컨대 본 발명의 진단 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 miRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[37]

[38] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은, 다음 단계를 포함하는, 간암 전이 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법을 제공한다: 대상의 생물학적 시료로부터 엑소좀을 분리하는 단계(단계 a); 및 상기 엑소좀 내의 miR-720의 발현 수준을 비교대조군 시료의 해당 엑소좀 miRNA의 발현 수준과 비교하는 단계(단계 b).

[39] 상기 단계 b에서 엑소좀 내 miR-720의 발현 수준이 비교대조군에 비하여 저발현인 경우, 상기 대상은 간암 전이인 것으로 판정할 수 있다.

[40] 본 명세서에서 상기 엑소좀 miRNA의 발현 수준을 언급하면서 사용되는 용어 "저발현"은 바이오 마커가 비정상 프로세스, 질환 혹은 개체 내 기타 병태를 나타내거나 이의 징후인 경우, 건강하거나 정상인 개체 또는 비교 대상인 개체로부터 획득된 생물학적 시료에서 검출되는 바이오 마커의 값 혹은 수준 범위 보다 낮은 생물학적 시료 내의 바이오 마커의 값 혹은 수준을 지칭한다.

[41]

[42] 본 명세서에서 사용되는 용어 "생물학적 시료"란 본 발명의 바이오 마커의

발현이 검출될 수 있는 개체로부터 얻어지는 모든 시료를 의미한다.

- [43] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈청, 타액(saliva), 생검(biopsy), 혈액, 피부 조직, 액체 배양물, 분변 및 소변으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않으나 바람직하게는 혈청일 수 있고, 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법으로 처리하여 준비될 수 있다.

[44]

발명의 효과

- [45] 본 발명에 따른 miRNA는 간암 전이 환자에서 특이적인 발현 양상을 나타내는 바, 간암 전이 진단용 바이오마커로서 사용될 수 있다. 또한, 간암 전이 예후 예측 인자로 사용이 가능하므로 환자의 치료방법의 결정과 예후 예측에 따른 간암의 개인별 맞춤형 치료법 (Personalized medicine)에 사용될 수 있다. 아울러, 본 발명은, 엑소좀 내의 miR-720의 발현량을 이용하여 간암의 전이를 진단하거나 예후를 예측함으로써, 동일병기의 간암 환자에서도 개개인에 개별화된 치료법 선택을 가능하게 하여 환자들의 삶의 질 향상과 전체 생존률의 증가를 통한 국민 건강보전 향상에 이바지하고, 나아가 바이오마커-기반의 간암 표준 치료 지침 개발에 기여할 수 있다.

[46]

도면의 간단한 설명

- [47] 도 1은 혈청에서 엑소좀을 분리하는 과정을 개략적으로 나타내는 것이다.
- [48] 도 2는 엑소좀 내의 RNA (exosomal RNA)를 분리하는 과정을 개략적으로 나타내는 것이다.
- [49] 도 3은 혈청(serum) 내에서 분리한 엑소좀(exosome)을 TEM으로 확인한 이미지를 나타내는 것이다.
- [50] 도 4는 혈청(serum) 내에서 분리한 엑소좀(exosome)을 NTA(Nanoparticle tracking analysis)를 통해 크기와 농도를 확인한 것이다.
- [51] 도 5는 엑소좀 내의 (exosomal) 특이적(specific) 마커들을 웨스턴 블랏(western blot)을 이용하여 확인한 것이다.
- [52] 도 6는 혈청 내에 존재하는 엑소좀 내의 miR-720(exosomal miR-720) 발현량을 분석한 결과를 나타내는 것이다.
- [53] 도 7은 같은 환자 내에서, 전이(meta) 유무에 따른 엑소좀 내의 miR-720(exosomal miR-720) 발현량을 분석한 결과를 나타내는 것이다.

[54]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [55] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예를 통하여 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명하는 실시예에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서

소개되는 실시예는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 이하의 실시예에 의해 본 발명이 제한되어서는 안 된다.

[56]

[57] <실시예>

[58] 실험내용 및 방법[59] **I. 엑소좀(exosome) 확인**

[60] 1. 혈액 분리

[61] 환자의 혈액을 2000RPM, 25°C, 20min 동안 원심분리하여 혈청(serum)을 분리하였다. 분리한 혈청(serum)을 440ul씩 전용 튜브에 포장하여 -80°C에서 보관하였다.

[62]

[63] 2. 엑소좀(exosome) 분리

[64] 분리한 혈청(serum)에서 exoquick을 이용하여 엑소좀 펠릿(exosome pellet)을 분리한 뒤(도1), 1 X PBS(phosphate buffered saline)에 재현탁(resuspension)하였다.

[65]

[66] 3. 1) TEM(Transmission electron microscope) 분석

[67] 1X PBS에 재현탁(resuspension)한 엑소좀(exosome)을 필터링(filtering) 한 후 TEM을 측정하였다.

[68] 3. 2) NTA(Nanoparticle tracking analysis)

[69] 1X PBS에 재현탁(resuspension)한 엑소좀(exosome)을 NTA로 측정하였다.

[70] 3. 3) 웨스턴 블랏(Western blot)

[71] RIPA 버퍼로 세포를 용해시킨 후, 10000RPM, 4°C, 10 분 동안 원심분리를 하여 debris를 제거한 다음, 단백질을 정량하였다. SDS-PAGE 겔(gel)에 샘플을 로딩(loading) 한 후 90V 1시간 30 분 동안 전기영동시킨 후 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(Polyvinylidene difluoride membrane, Amersham, Buckinghamshire, UK)으로 이동시켰다(110V 2h). 멤브레인을 트리스-완충의 생리식염수(tris-buffered saline)와 트윈(tween) 20 용액(TBS-T)을 이용하여 10분 동안 3회 반복하여 세척한 후 10% 스킴 밀크(skim milk)를 이용하여 1시간 동안 차단(blocking)하였다. 이후 1차 항체(1st Antibody)를 붙인 뒤, 4°C에서 오버나이트 인큐베이션(overnight incubation)하고 24시간 뒤, 세척하였다. 이후 2 시간 동안 2차 항체(2nd antibody)를 붙인 다음, 세척하고 ECL 용액(solution)으로 검출(detection)하였다.

[72]

[73] **II. 엑소좀 내의 miRNA (exosomal miRNA) 발현량 확인**

[74] 1. 혈액 분리 및 엑소좀 내의 RNA (exosomal RNA) 분리

[75] 환자의 혈액을 2000RPM, 25°C, 20분 동안 원심분리 혈청(serum)을 분리한 후 440ul씩 전용 튜브에 포장하여 -80°C에서 보관하였다. 이후 엑소좀 내의 RNA

(exosomal RNA)를 분리하였다. 분리 과정은 도 2에 나타내었다.

[76]

[77] 2. cDNA 합성

[78] Exoquick을 이용하여 엑소좀(exosome) RNA를 추출하고 Taqman reverse transcription kit을 사용하여, cDNA를 얻는다. 증폭하고자 하는 서열 (hsa-miR-720; 5'-UCUCGCGUGGGGCCUCCA-3')에 상보적인 서열을 가진 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 이 때 필요한 프라이머(primer)는 Applied Biosystems에서 구입하여 사용하였다. master mix(100mM dNTP, Multiscribe Reverse Transcriptase(50U/ul), 10X Reverse transcription buffer, RNase inhibitor(20U/ul)를 7ul을 넣고, 혼합물에 5X RT primer 3ul와 RNA sample 5ul을 넣고, PCR을 진행하였다(표 1). PCR의 조건은 16°C 30분, 42°C 30분, 85°C 5분으로 설정하였다(표 2).

[79] [표 1]

[80]

Component	Master Mix Volume/ 15-μL Reaction ^a
100mM dNTPs (with dTTP)	0.15
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/μL	1.00
10X Reverse Transcription Buffer	1.50
RNase Inhibitor, 20U/μL	0.19
Nuclease-free water	4.16
Total	7.00

[81]

[82] [표 2]

[83]

Step Type	Time (min)	Temperature (°C)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	5	85
HOLD	∞	4

[84]

[85] 3. 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응(Quantitative Reverse-Transcription polymerase chain reaction)

[86] 역전사를 통해 얻은 cDNA를 주형으로 Taqman universal PCR Master mix(2X) 5ul에 Taqman gene expression assay(20X)인 hsa-miR-720 프로브(probe) 0.5ul, 반응시킨 cDNA 반응물, 뉴클레아제 프리 워터(Nuclease free water)로 총 10ul 용량을 맞추는 뒤, 384 well에 분주하여 qRT-PCR을 시행하였다(표3). qRT-PCR 조건은 50°C 2분, 95°C 10분, 40 사이클 (95°C 15초, 60°C 1분)로 설정하였다(표 4).

[87]

[88] [표 3]

[89]

Component	Volume (μL) per reaction		Final conc.
	50-μL rxns.	20-μL rxns.	
TaqMan® Universal PCR Master Mix [2X]	25.0	10.0	1X
TaqMan® Gene Expression Assay [20X] [†]	2.5	1.0	1X
cDNA template + H ₂ O [‡]	22.5	9.0	1-100 ng
Total Volume	50.0	20.0	—

[90]

[91] [표 4]

[92]

Thermal cycling conditions		
Stage	Temp (°C)	Time(mm:ss)
Hold[§]	50	2:00
Hold	95	10:00
Cycle(40 Cycles)	95	0:15
	60	1:00

[93] 실험결과

[94] 1. TEM 이미지 분석

[95] 혈청(serum) 내에 존재하는 엑소좀(exosome)을 확인하기 위하여, exoquick을 이용하여 엑소좀을 분리한 뒤, TEM을 이용하여, 엑소좀이 맞는지 육안으로 확인하였다(도 3).

[96]

[97] 2. NTA 분석 결과

[98] NTA를 이용하여 엑소좀의 크기가 73.1±3.1nm(mean), 47±2nm(mode) 인 것을

확인함으로써 엑소솜임을 증명하였다(도 4).

[99]

[100] 3. 웨스턴 블랏 분석 결과

[101] 웨스턴 블랏(western blot)을 이용하여 엑소솜 내에 있는 다양한 특이적(specific) 마커들을 확인함으로써 엑소솜임을 증명하였다(도 5).

[102]

[103] 4. 혈청(serum) 내에 존재하는 엑소솜 내의 miR-720(exosomal miR-720 발현량) 분석 결과

[104] 전이(metastasis) 여부에 따른, 엑소솜 내의 miR-720(exosomal miR-720)의 발현량을 확인하였다. 전이(metastasis)가 있는 그룹(HCC with mets(+))에서 전이(metastasis)가 없는 그룹(HCC without mets)에 비해 엑소솜 내의 miR-720(exosomal miR-720)의 발현량이 감소되는 것으로 확인되었는 바, 엑소솜 내의 miR-720(exosomal miR-720)이 간암의 전이(metastasis)와 관련성이 있는 것을 알 수 있다(도 6).

[105]

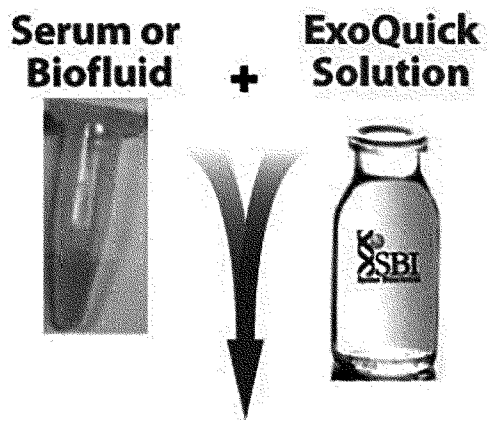
[106] 5. 같은 환자 내에서 전이(meta) 유무에 따른 엑소솜 내의 miR-720(exosomal miR-720)의 발현량 분석

[107] 엑소솜 내의 miR-720(exosomal miR-720)과 전이(metastasis)와의 관련성을 좀 더 확인하고자 같은 환자 내에서 전이(metastasis) 유무에 따른 엑소솜 내의 miR-720(exosomal miR-720)의 발현량을 확인하였다. 그 결과 전이(metastasis)가 있는 그룹에서 엑소솜 내의 miR-720(exosomal miR-720)의 발현량이 감소되는 것을 확인하였다(도 7).

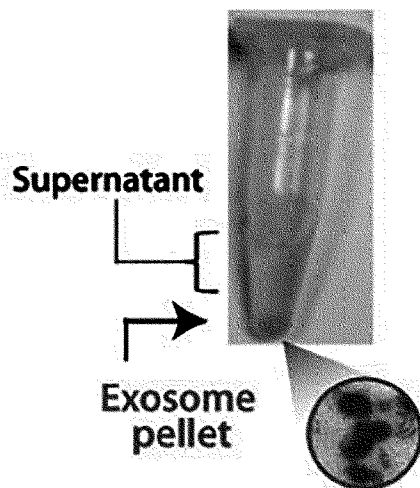
청구범위

- [청구항 1] 엑소좀 내 miR-720을 포함하는, 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 바이오마커는 간암의 간외 전이를 진단하거나 예후를 예측하는 것을 특징으로 하는 바이오마커.
- [청구항 3] 엑소좀 내 miR-720을 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 조성물.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서,
상기 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 조성물.
- [청구항 5] 청구항 3 또는 청구항 4의 조성물을 포함하는 간암 전이 진단 또는 예후 예측용 키트.
- [청구항 6] 다음 단계를 포함하는, 간암 전이 진단 및 예후 예측을 위한 정보제공 방법:
대상의 생물학적 시료로부터 엑소좀을 분리하는 단계(단계 a); 및
상기 엑소좀 내의 miR-720의 발현 수준을 비교대조군 시료의 해당 엑소좀 miRNA의 발현 수준과 비교하는 단계(단계 b).
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서,
상기 단계 b에서 엑소좀 내 miR-720의 발현 수준이 비교대조군에 비하여 저발현인 경우, 상기 대상은 간암 전이인 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 청구항 6에 있어서,
상기 생물학적 시료는 혈액, 혈청, 타액(saliva), 생검(biopsy), 피부 조직, 액체 배양물, 분변 및 소변으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

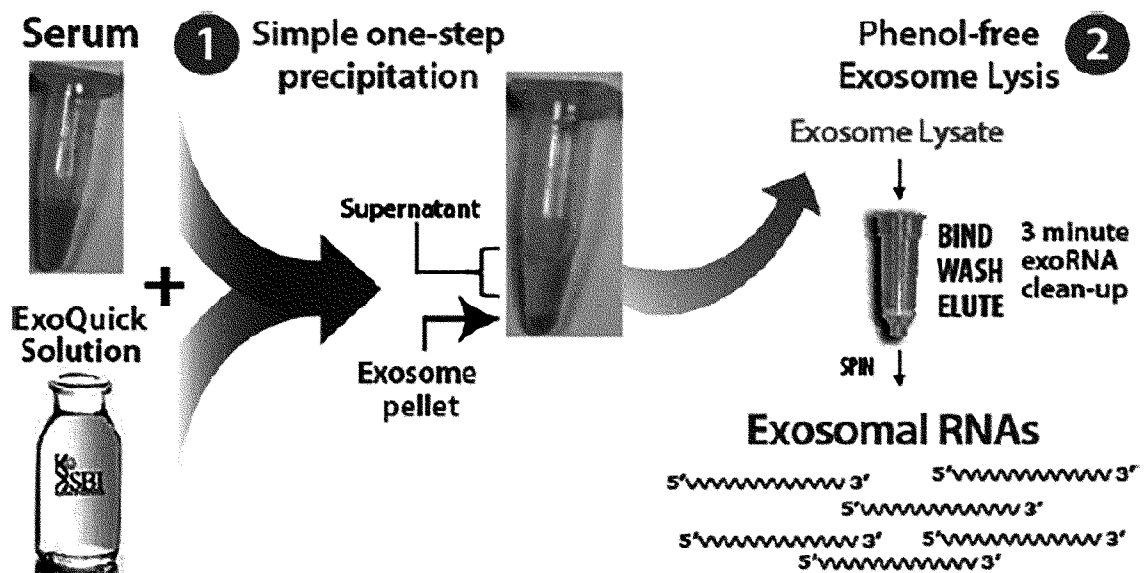
[도1]



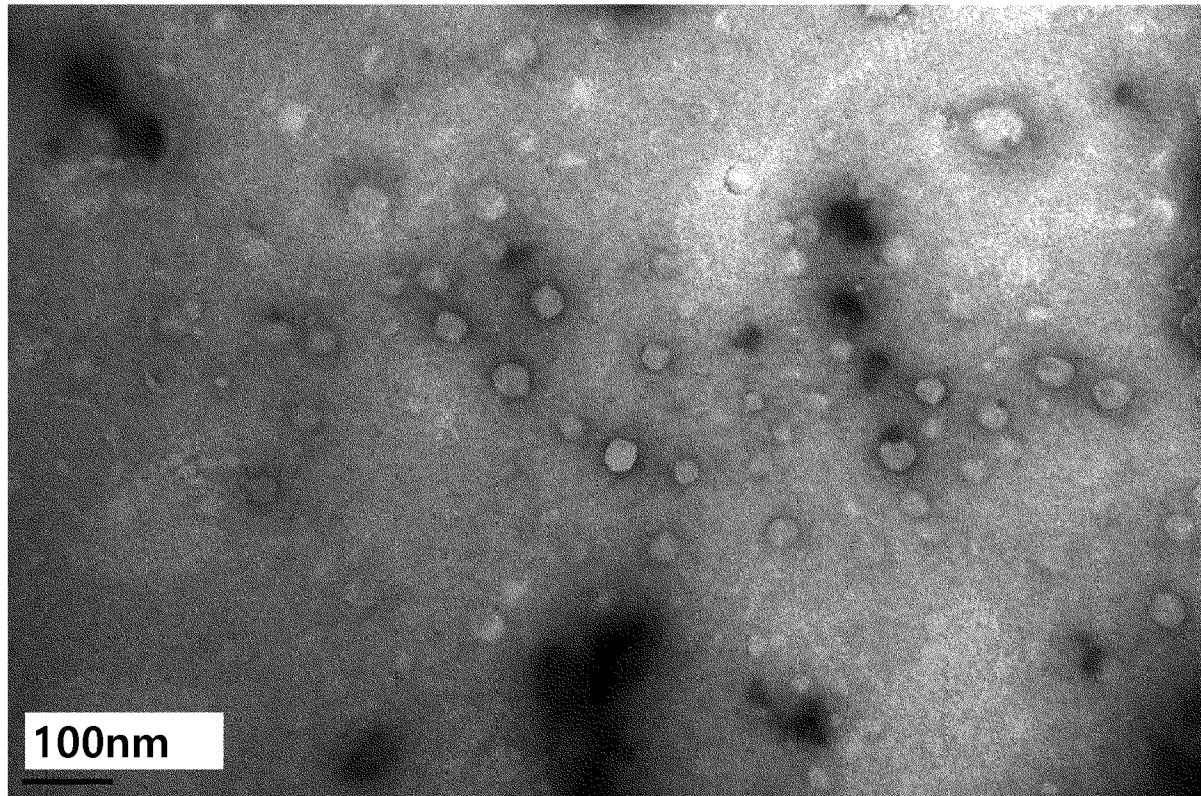
**Simple one-step
precipitation**



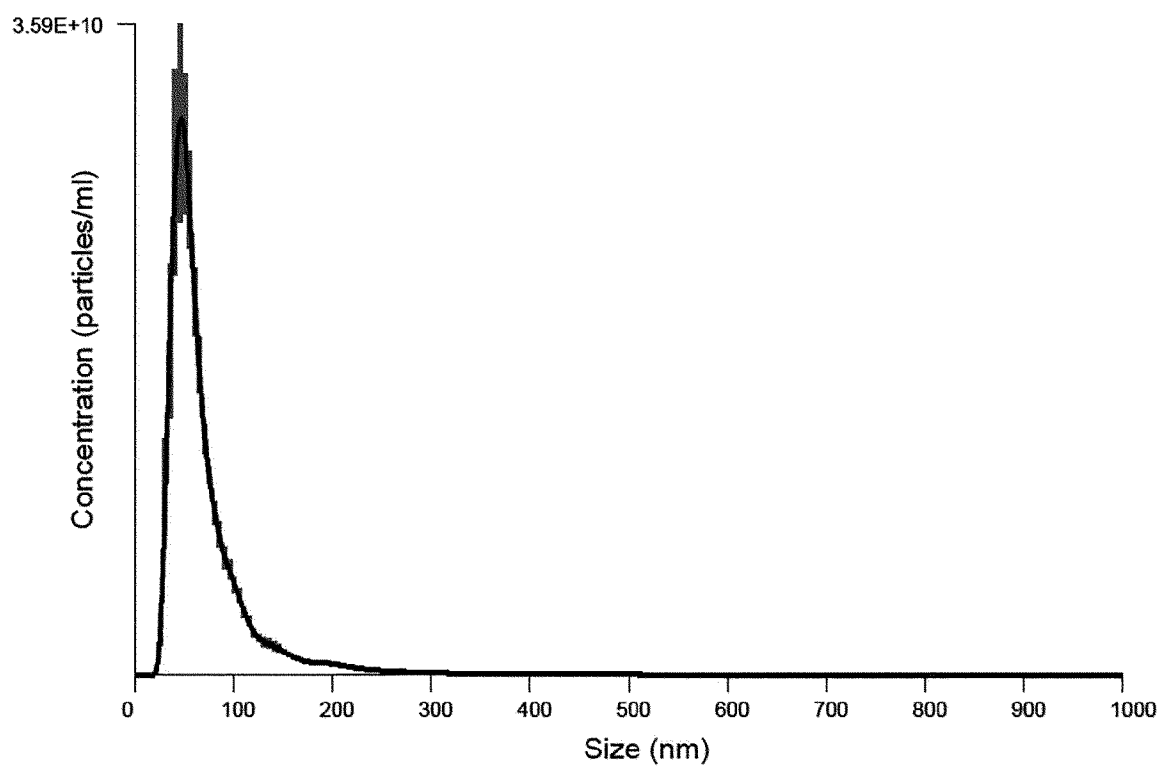
[도2]



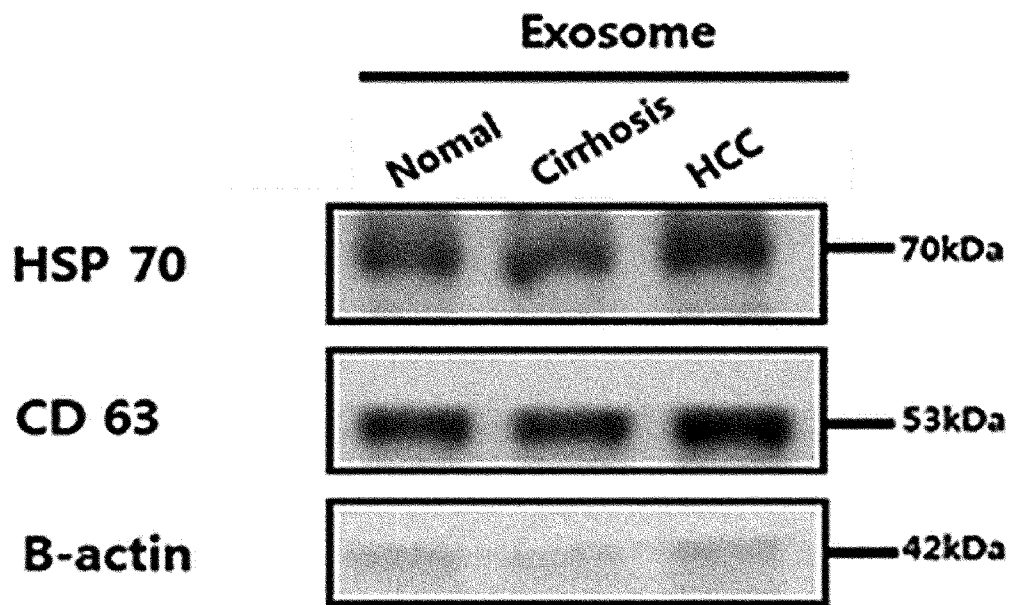
[도3]



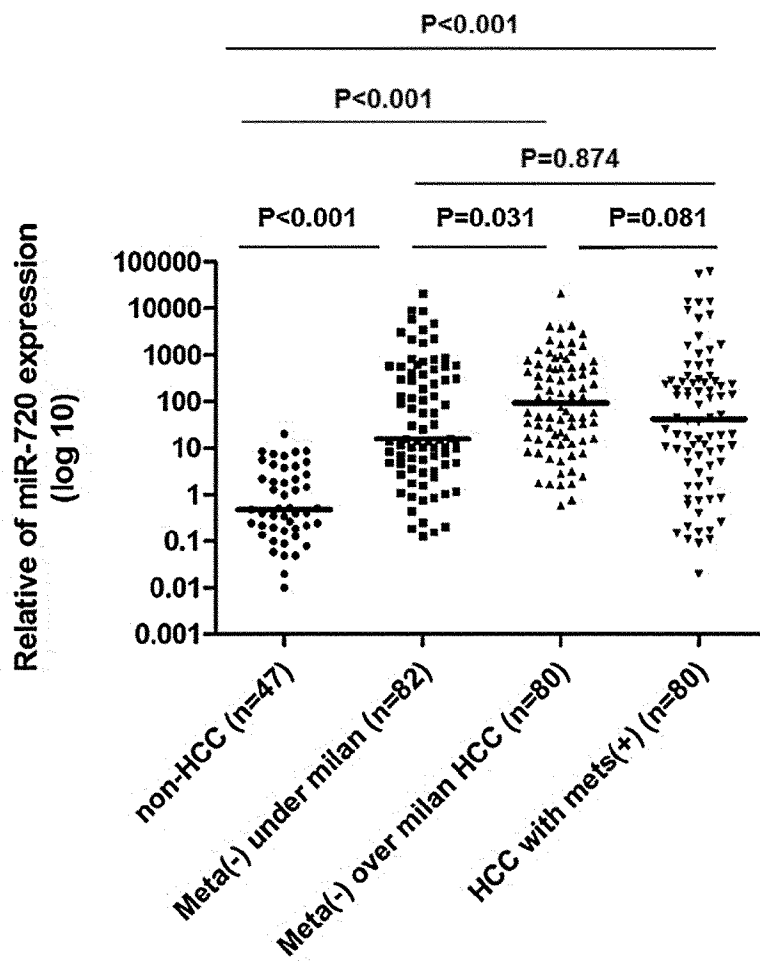
[도4]



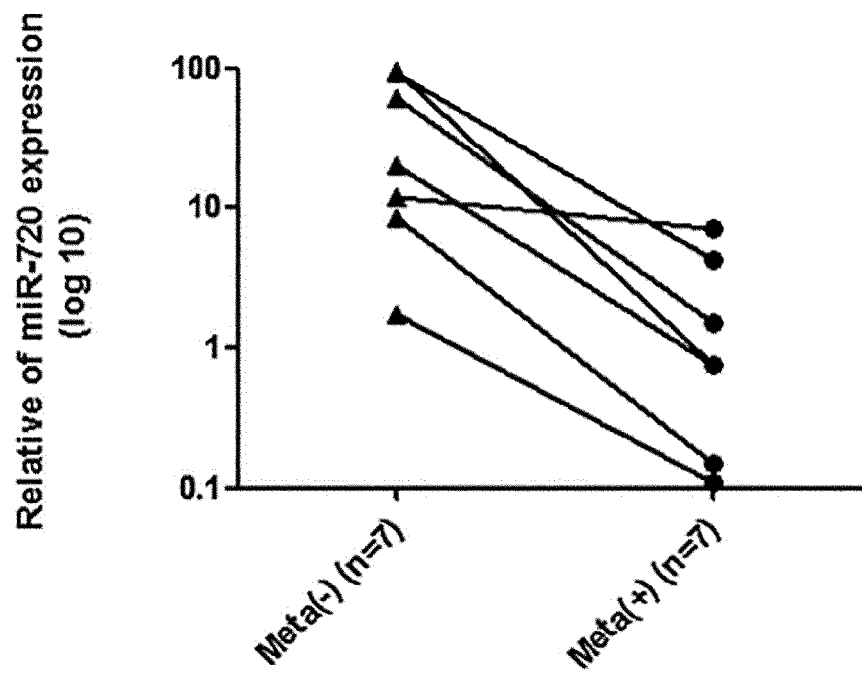
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/014383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6886(2018.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6886; C12N 15/09; C12N 15/113; C12Q 1/02; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: hepatocellular carcinoma, miR-720, exosome, biomarker, prognostic, kit

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011-012074 A1 (JIANGSU MICROMEDMARK BIOTECH CO., LTD.) 03 February 2011 See claims 1-6.	1-8
A	KR 10-2013-0014840 A (BIOINFRA INC.) 12 February 2013 See the entire document.	1-8
A	JP 2010-508042 A (THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION et al.) 18 March 2010 See the entire document.	1-8
A	JP 2010-538653 A (THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 16 December 2010 See the entire document.	1-8
A	JP 2016-518124 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 23 June 2016 See the entire document.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 FEBRUARY 2020 (07.02.2020)

Date of mailing of the international search report

07 FEBRUARY 2020 (07.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/014383

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2011-012074 A1	03/02/2011	CN 101988120 A	23/03/2011
KR 10-2013-0014840 A	12/02/2013	None	
JP 2010-508042 A	18/03/2010	EP 2087135 A2	12/08/2009
		EP 2087135 B1	19/06/2013
		JP 5501766 B2	28/05/2014
		US 2010-0120898 A1	13/05/2010
		US 2012-0329672 A1	27/12/2012
		US 8252538 B2	28/08/2012
		WO 2008-054828 A2	08/05/2008
		WO 2008-054828 A3	11/12/2008
JP 2010-538653 A	16/12/2010	CN 101842484 A	22/09/2010
		CN 101842484 B	29/07/2015
		CN 104975089 A	14/10/2015
		EP 2190992 A1	02/06/2010
		EP 2190992 B1	03/04/2013
		EP 2610342 A1	03/07/2013
		EP 2610342 B1	04/05/2016
		EP 3112464 A1	04/01/2017
		JP 5624470 B2	12/11/2014
		US 2010-0279292 A1	04/11/2010
		US 2013-0316925 A1	28/11/2013
		US 2017-0009306 A1	12/01/2017
		US 8455199 B2	04/06/2013
		WO 2009-036236 A1	19/03/2009
JP 2016-518124 A	23/06/2016	CN 105308189 A	03/02/2016
		CN 105308189 B	04/09/2018
		EP 2986739 A2	24/02/2016
		EP 2986739 B1	04/04/2018
		KR 10-2015-0140728 A	16/12/2015
		US 2014-0308370 A1	16/10/2014
		US 2018-0291468 A1	11/10/2018
		WO 2014-172376 A2	23/10/2014
		WO 2014-172376 A3	29/10/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6886(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6886; C12N 15/09; C12N 15/113; C12Q 1/02; C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 간세포암(hepatocellular carcinoma), miR-720, 엑소좀(exosome), 바이오마커(biomarker), 예후(prognostic), 키트(kit)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2011-012074 A1 (JIANGSU MICROMEDMARK BIOTECH CO., LTD) 2011.02.03 청구항 1-6	1-8
A	KR 10-2013-0014840 A (주식회사 바이오인프라) 2013.02.12 전문	1-8
A	JP 2010-508042 A (THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION 등) 2010.03.18 전문	1-8
A	JP 2010-538653 A (THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 2010.12.16 전문	1-8
A	JP 2016-518124 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2016.06.23 전문	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 02월 07일 (07.02.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 02월 07일 (07.02.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



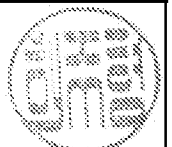
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2011-012074 A1	2011/02/03	CN 101988120 A	2011/03/23
KR 10-2013-0014840 A	2013/02/12	없음	
JP 2010-508042 A	2010/03/18	EP 2087135 A2 EP 2087135 B1 JP 5501766 B2 US 2010-0120898 A1 US 2012-0329672 A1 US 8252538 B2 WO 2008-054828 A2 WO 2008-054828 A3	2009/08/12 2013/06/19 2014/05/28 2010/05/13 2012/12/27 2012/08/28 2008/05/08 2008/12/11
JP 2010-538653 A	2010/12/16	CN 101842484 A CN 101842484 B CN 104975089 A EP 2190992 A1 EP 2190992 B1 EP 2610342 A1 EP 2610342 B1 EP 3112464 A1 JP 5624470 B2 US 2010-0279292 A1 US 2013-0316925 A1 US 2017-0009306 A1 US 8455199 B2 WO 2009-036236 A1	2010/09/22 2015/07/29 2015/10/14 2010/06/02 2013/04/03 2013/07/03 2016/05/04 2017/01/04 2014/11/12 2010/11/04 2013/11/28 2017/01/12 2013/06/04 2009/03/19
JP 2016-518124 A	2016/06/23	CN 105308189 A CN 105308189 B EP 2986739 A2 EP 2986739 B1 KR 10-2015-0140728 A US 2014-0308370 A1 US 2018-0291468 A1 WO 2014-172376 A2 WO 2014-172376 A3	2016/02/03 2018/09/04 2016/02/24 2018/04/04 2015/12/16 2014/10/16 2018/10/11 2014/10/23 2015/10/29