

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2020 년 5 월 22 일 (22.05.2020) **WIPO | PCT**

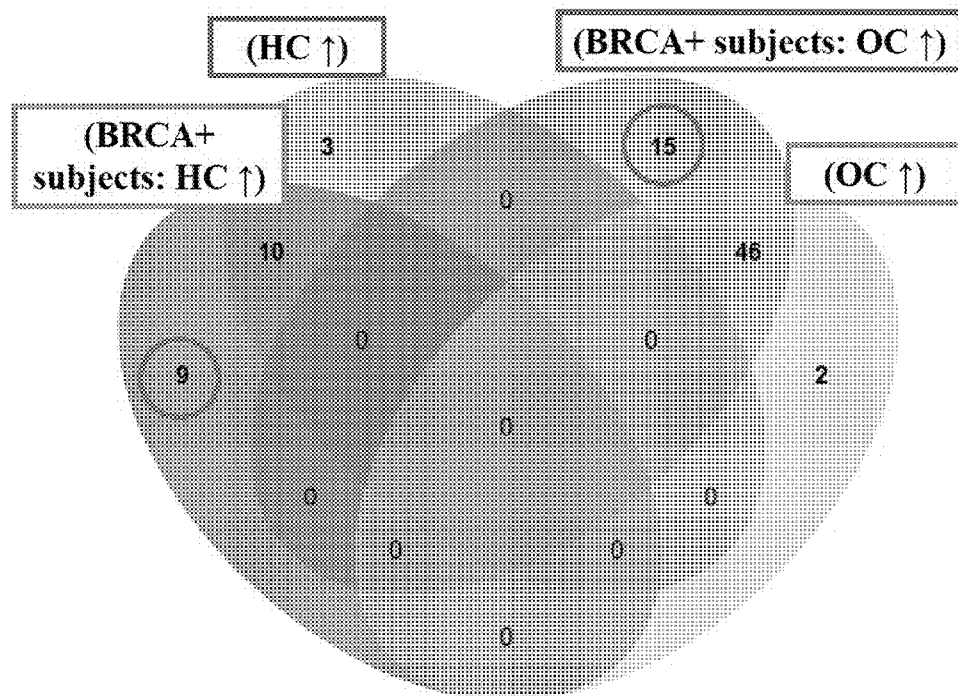


(10) 국제공개번호  
**WO 2020/101432 A1**

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/6886* (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/015660
- (22) 국제출원일: 2019 년 11 월 15 일 (15.11.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2018-0141712 2018 년 11 월 16 일 (16.11.2018) KR  
10-2019-0146229 2019 년 11 월 14 일 (14.11.2019) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (**THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정내, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최윤진 (**CHOI, Youn Jin**); 06285 서울시 강남구 영동대로 230, 5동 1305호, Seoul (KR). 호정윤 (**HO, Jung Yoon**); 12134 경기도 남양주시 진건읍 진건오남로86번길 38, 402동 501호, Gyeonggi-do (KR). 김경곤 (**KIM, Kyung Gon**); 05507 서울시 송파구 올림픽로 435, 108동 2302호, Seoul (KR). 허수영 (**HUR, Soo Young**); 17084 경기도 용인시 기흥구 탑실로 116, 206동 202호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 아이시스 (**ISIS IP LAW LLC**); 06160 서울시 강남구 테헤란로63길 14, 8층, 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,

(54) Title: BIOMARKER FOR PREDICTING ONSET OF HEREDITARY OVARIAN CANCER AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 유전성 난소암 발병 예측용 바이오마커 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a biomarker for predicting the onset of hereditary ovarian cancer and a use thereof and, more particularly, to a marker composition for predicting the onset of hereditary ovarian cancer, a composition and kit for predicting the onset of hereditary ovarian cancer, and a method for providing information for predicting the onset of hereditary ovarian cancer. By measuring the mRNA or protein level of a biomarker gene according to the present invention, the onset of hereditary ovarian cancer accompanied by BRCA mutations can be predicted early, and the biomarker can be effectively used as a target for developing a therapeutic agent for hereditary ovarian cancer.



WO 2020/101432 A1

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

---

(57) 요약서: 본 발명은 유전성 난소암 발병 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 유전성 난소암의 발병 예측용 마커 조성물, 유전성 난소암의 발병 예측용 조성물 및 발병 예측용 키트, 및 유전성 난소암의 발병 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바이오마커 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정함으로써 BRCA 돌연변이를 동반하는 유전성 난소암의 발병여부를 조기에 예측할 수 있으며, 상기 바이오마커를 표적으로 하여 유전성 난소암 치료제를 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 유전성 난소암 발병 예측용 바이오마커 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 유전성 난소암 발병 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 유전성 난소암의 발병 예측용 마커 조성물, 유전성 난소암의 발병 예측용 조성물 및 발병 예측용 키트, 및 유전성 난소암의 발병 예측방법에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 난소암은 국내여성 10대 발생 및 사망 원인인 암으로, 난소암 환자의 60% 이상이 암이 전이된 후 진단되며 이때의 5년 생존률은 30% 미만이다. 난소암은 그 증상이 뚜렷하지 않고, 복부팽만, 소화불량, 설사, 변비 등을 난소암의 증상으로 인식하기에는 애매하다. 또한 가장 중요한 것은 난소암을 조기에 발견할 수 있는 효과적인 검사법이 없다는 것이다. 이에, 난소암의 예방 및 조기 발견에 대한 효과적인 수단은 아직 충족되지 않은 중요한 의학적 요구이다.
- [3] 난소암 중 가장 흔한 유형인 고도장액성난소암(high grade serous ovarian cancer)의 경우 약 25%가 BRCA1 유전자와 연관되어 있다고 알려져 있다. BRCA1 유전자는 염색체 17번에 위치하며 최초로 유방암 및 난소암의 발병 위험성을 증가시키는 유전자로 검증되었으며, BRCA2 역시 BRCA1에 이어 상기 암종들의 발병 위험성을 증가시킨다고 보고되어 있다. BRCA1 돌연변이를 가진 사람의 난소암 발병 확률은 70세 이전에 44%에 이르며, 돌연변이가 일어난 BRCA 유전자는 모계뿐만 아니라 부계로부터 유전될 수도 있다. 대략 난소암의 10%가 BRCA1 및 BRCA2 유전자의 돌연변이와 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 이 두 유전자 중에 돌연변이가 있을 경우, 난소암 발병률이 정상인에 비해 10배 이상 증가되며, 난소암의 재발률도 증가된다. 또한, 한국 난소암 환자 중 BRCA1(23.8%) 과 BRCA2(25.7%) 에서 가족력과 상관없이 BRCA 돌연변이가 동반된다고 보고되어 있다(Choi et al. JGO. 2016).
- [4] 그러나 BRCA 돌연변이에 의한 이러한 영향에도 불구하고, 이에 의해 발병하는 난소암을 예방하기 위한 방법은 현재까지 예방적 양측 난소 절제술(risk-reducing salpingo-oophorectomy; RRSO)만이 있으며, 이외의 방법은 아직까지 확립되어 있지 않다. 가임기 여성에게서 “예방적 양측난소 절제술”은 조기폐경을 야기하여 삶의 질 저하를 유발하며, 또한 국내 고령산모(출산 > 35세) 비율이 1999년 11%에서 2009년 28.6%으로 10년 사이 17.6%가 증가하여 BRCA1 보유자 중 적절한 시기에 RRSO가 시행 가능한 대상이 줄어들고 있다. 이에, 예방적 난소 절제술(RRSO) 이외의 난소암의 발병을 미리 예측하여 예방할 수 있는 방법의 개발이 절실한 상황이다.
- [5] 최근 유방암과 BRCA 유전자 관련 연구에서 BRCA 양성 대상자에게

RANKL/RANK 저해제(e.g. denosumab)가 유방암의 예방적 약물로서 역할을 할 수 있을 것으로 제시된바 있다. 이를 바탕으로 하여, 유전성 난소암에서도 이를 미리 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴하고 더 나아가 예방적 난소 절제술 이외의 치료법으로써 선별적 바이오마커의 표적 저해제를 이용한 유전성 난소암 치료제 개발이 필요하다고 판단된다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [6] 전술한 바와 같이 본 발명자들은 BRCA 유전자 돌연변이가 동반된 유전성 난소암의 발병여부를 미리 예측하고 더 나아가 상기 질환의 치료제 개발을 위한 표적을 제시하기 위해 연구 노력한 결과, BRCA 돌연변이를 갖는 정상인에 비해 BRCA 돌연변이를 갖는 난소암 환자에서 발현이 유의하게 변화한 11종의 마커를 발굴하고 이의 유효성을 검증함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [7] 이에, 본 발명은 유전성 난소암의 발병 예측용 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [8] 또한, 본 발명은 유전성 난소암의 발병 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 유전성 난소암의 발병 예측용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [9] 또한, 본 발명은 유전성 난소암의 발병 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [10]
- [11] 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.

### 과제 해결 수단

- [12] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ALDOA(aldolase, fructose-bisphosphate A; GenBank 접근(accession) 번호: NM\_001243177), CDH2(Cadherin 2; NM\_001792, NM\_001308176), LTBP1(Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1; NM\_000627, NM\_001166264, NM\_001166265, NM\_001166266, NM\_206943), MRC1(mannose receptor C-type 1; NM\_002438), PPBP(pro-platelet basic protein; NM\_002704), RBP4(Retinol-binding protein 4; NM\_001323517, NM\_001323518, NM\_006744), SPARC(secreted protein acidic and cysteine rich; NM\_003118, NM\_001309443, NM\_001309444), SERPINA5(serpin family A member 5; NM\_000624), SERPINC1(serpin family C member 1; NM\_000488, NM\_001365052), SERPINF2(serpin family F member 2; NM\_000934, NM\_001165920, NM\_001165921), 및 THBS1(Thrombospondin 1; NM\_003246)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 유전성 난소암의 발병 예측용 마커 조성물을 제공한다.

- [13] 또한, 본 발명은 ALDOA(aldolase, fructose-bisphosphate A; GenBank 접근(accession) 번호: NM\_001243177), CDH2(Cadherin 2; NM\_001792, NM\_001308176), LTBP1(Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1; NM\_000627, NM\_001166264, NM\_001166265, NM\_001166266, NM\_206943), MRC1(mannose receptor C-type 1; NM\_002438), PPBP(pro-platelet basic protein; NM\_002704), RBP4(Retinol-binding protein 4; NM\_001323517, NM\_001323518, NM\_006744), SPARC(secreted protein acidic and cysteine rich; NM\_003118, NM\_001309443, NM\_001309444), SERPINA5(serpin family A member 5; NM\_000624), SERPINC1(serpin family C member 1; NM\_000488, NM\_001365052), SERPINF2(serpin family F member 2; NM\_000934, NM\_001165920, NM\_001165921), 및 THBS1(Thrombospondin 1; NM\_003246)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 유전성 난소암의 발병 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 유전성 난소암의 발병 예측용 키트를 제공한다.
- [14] 본 발명의 일구현예로, 상기 유전성 난소암은 BRCA1 또는 BRCA2 유전자의 돌연변이를 동반하는 것일 수 있다.
- [15] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.
- [17] 또한, 본 발명은 피검자 유래의 생물학적 시료에서 ALDOA(aldolase, fructose-bisphosphate A; GenBank 접근(accession) 번호: NM\_001243177), CDH2(Cadherin 2; NM\_001792, NM\_001308176), LTBP1(Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1; NM\_000627, NM\_001166264, NM\_001166265, NM\_001166266, NM\_206943), MRC1(mannose receptor C-type 1; NM\_002438), PPBP(pro-platelet basic protein; NM\_002704), RBP4(Retinol-binding protein 4; NM\_001323517, NM\_001323518, NM\_006744), SPARC(secreted protein acidic and cysteine rich; NM\_003118, NM\_001309443, NM\_001309444), SERPINA5(serpin family A member 5; NM\_000624), SERPINC1(serpin family C member 1; NM\_000488, NM\_001365052), SERPINF2(serpin family F member 2; NM\_000934, NM\_001165920, NM\_001165921), 및 THBS1(Thrombospondin 1; NM\_003246)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유전성 난소암의 발병 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [18] 본 발명의 일구현예로, 상기 피검자는 BRCA1 또는 BRCA2 유전자의 돌연변이를 보유할 수 있다.
- [19] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 RBP4, SERPINA5, SERPINC1 및 SERPINF2로

이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준이 건강한 정상대조군에 비하여 감소되어 있는 경우 유전성 난소암이 발병할 것으로 예측할 수 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 ALDOA, CDH2, LTBP1, MRC1, PPBP, SPARC 및 THBS1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준이 건강한 정상대조군에 비하여 증가되어 있는 경우 유전성 난소암이 발병할 것으로 예측할 수 있다.

[21] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 mRNA의 발현수준은 in situ 교잡법(in situ hybridization), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray) 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.

[22] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질의 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.

### 발명의 효과

[23] 본 발명에서는 BRCA 유전자 돌연변이를 가지고 있는 대상자에서 유전성 난소암의 발병여부를 조기에 예측할 수 있는 11종의 바이오마커를 발굴하였는바, 본 발명에 따른 바이오마커 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정함으로써 BRCA 돌연변이를 동반하는 유전성 난소암의 발병여부를 조기에 예측할 수 있으며, 상기 바이오마커를 표적으로 하여 유전성 난소암 치료제를 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[24] 도 1a는 BRCA 유전자의 돌연변이를 동반하는 유전성 난소암의 발병 예측용 후보 마커 단백질을 도출하기 위해, BRCA 유전자 돌연변이 양성(BRCA+) 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 변화된 단백질들을 발굴하기 위한 실험 시나리오를 그림으로 도시한 것이다.

[25] 도 1b는 BRCA 돌연변이 양성인 정상군 및 난소암 환자들로부터 얻은 혈장 시료를 이용하여 차등적으로 발현되는 단백질을 volcano plot으로 분석한 결과이다.

[26] 도 1c는 도 1b의 분석결과 상기 난소암 환자에서 발현이 감소한 단백질 19종 및 발현이 증가한 단백질 61종에 대하여 네트워크 분석을 통해 해당 단백질들의 기능을 분석하여 나타낸 것이다.

- [27] 도 1d는 BRCA 돌연변이 양성 정상군(BRCA+ subjects: HC), 정상군(HC), BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자(BRCA+ subjects: OC), 난소암 환자(OC) 각 군에서 발현이 유의하게 증가한 단백질 수를 비교하여 나타낸 결과이다.
- [28] 도 1e는 도 1d의 상기 4개 군에서 확인된 단백질들을 비교분석한 후 결과를 벤다이어그램으로 나타내고, 이로부터 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자군에서만 특이적으로 발현이 감소 또는 증가한 24종의 단백질을 도출한 결과이다.
- [29] 도 2a는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 감소된 9종의 단백질 중에서 SERPINA5 및 IGFBP5 각각에 대하여 4개 군(BRCA 돌연변이 음성인 정상군(HN), BRCA 돌연변이 양성인 정상군(HP), BRCA 돌연변이 음성인 난소암 환자군(ON), 및 BRCA 돌연변이 양성인 난소암 환자군(OP)) 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [30] 도 2b는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 감소된 9종의 단백질 중에서 F2 및 TFRC 각각에 대하여 상기 도 2a에서와 동일한 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [31] 도 2c는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 감소된 9종의 단백질 중에서 SELL 및 APOC3 각각에 대하여 상기 도 2a에서와 동일한 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [32] 도 2d는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 감소된 9종의 단백질 중에서 SERPINF2 및 SERPINC1 각각에 대하여 상기 도 2a에서와 동일한 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [33] 도 2e는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 감소된 9종의 단백질 중에서 RBP4에 대하여 상기 도 2a에서와 동일한 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [34] 도 3a는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 VNN1 및 PPBP 각각에 대하여 4개 군(BRCA 돌연변이 음성인 정상군(HN), BRCA 돌연변이 양성인 정상군(HP), BRCA 돌연변이 음성인 난소암 환자군(ON), 및 BRCA 돌연변이 양성인 난소암 환자군(OP)) 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [35] 도 3b는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 ALDOA 및 VWF 각각에 대하여 상기 도 3a에서와 동일한 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [36] 도 3c는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 SERPINE1 및 GPI 각각에 대하여 상기 도 3a에서와 동일한

- 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [37] 도 3d는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 PSAP 및 HEXB 각각에 대하여 상기 도 3a에서와 동일한 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [38] 도 3e는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 THBS1 및 SPARC 각각에 대하여 상기 도 3a에서와 동일한 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [39] 도 3f는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 CDH2 및 MRC1 각각에 대하여 상기 도 3a에서와 동일한 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [40] 도 3g는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 HSPA4 및 RELN 각각에 대하여 상기 도 3a에서와 동일한 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [41] 도 3h는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 LTBP1에 대하여 상기 도 3a에서와 동일한 4개 군 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석한 결과이다.
- [42] 도 4a는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 감소된 9종의 단백질 중에서 SERPINA5(Uniprot ID: P5154) 및 IGFBP5(P24593) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하고 AUC 값을 도출하여 나타낸 결과이다.
- [43] 도 4b는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 감소된 9종의 단백질 중에서 F2(P00734) 및 TFRC(P02786) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하고 AUC 값을 도출하여 나타낸 결과이다.
- [44] 도 4c는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 감소된 9종의 단백질 중에서 SELL(P14151.2) 및 APOC3(P02656) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하고 AUC 값을 도출하여 나타낸 결과이다.
- [45] 도 4d는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 감소된 9종의 단백질 중에서 SELL(P08697) 및 APOC3(P01008) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하고 AUC 값을 도출하여 나타낸 결과이다.
- [46] 도 4e는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 감소된 9종의 단백질 중에서 RBP4(P02753)의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하고 AUC 값을 도출하여 나타낸 결과이다.
- [47] 도 5a는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된

- 15종의 단백질 중에서 VNN1(Uniprot ID: O95497) 및 PPBP(P02775) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하여 AUC 값을 도출한 결과이다.
- [48] 도 5b는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 ALDOA(P04075.2) 및 VWF(P04275) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하여 AUC 값을 도출한 결과이다.
- [49] 도 5c는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 SERPINE1(P05121) 및 GPI(P06744.2) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하여 AUC 값을 도출한 결과이다.
- [50] 도 5d는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 PSAP(P07602.3) 및 HEXB(P07686) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하여 AUC 값을 도출한 결과이다.
- [51] 도 5e는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 THBS1(P07996) 및 SPARC(P09486) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하여 AUC 값을 도출한 결과이다.
- [52] 도 5f는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 CDH2(P19022) 및 MRC1(P22897) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하여 AUC 값을 도출한 결과이다.
- [53] 도 5g는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 HSPA4(P34932) 및 RELN(P78509) 각각의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하여 AUC 값을 도출한 결과이다.
- [54] 도 5h는 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 증가된 15종의 단백질 중에서 LTBP1(Q14766.4)의 정확도를 조사하기 위해 ROC 곡선 분석을 실시하여 AUC 값을 도출한 결과이다.
- [55] 도 6은 상기 24종 마커 후보군의 유효성을 검증하기 위한 2 fold cross validation에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [56] 본 발명자들은 BRCA 유전자 돌연변이를 동반하는 유전성 난소암을 미리 예측하고 더 나아가 상기 질환의 치료제 개발을 위한 표적을 제시하기 위해 연구 노력한 결과, BRCA 돌연변이를 갖는 정상인에 비해 BRCA 돌연변이를 갖는 난소암 환자에서 발현이 유의하게 변화한 11종의 마커를 발굴하고 이의 유효성을 검증함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [57] 이에, 본 발명은 ALDOA(aldehyde, fructose-bisphosphate A; GenBank 접근(accession) 번호: NM\_001243177), CDH2(Cadherin 2; NM\_001792, NM\_001308176), LTBP1(Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1; NM\_000627, NM\_001166264, NM\_001166265, NM\_001166266, NM\_206943), MRC1(mannose receptor C-type 1; NM\_002438), PPBP(pro-platelet basic protein; NM\_002704), RBP4(Retinol-binding protein 4; NM\_001323517, NM\_001323518,

NM\_006744), SPARC(secreted protein acidic and cysteine rich; NM\_003118, NM\_001309443, NM\_001309444), SERPINA5(serpin family A member 5; NM\_000624), SERPINC1(serpin family C member 1; NM\_000488, NM\_001365052), SERPINF2(serpin family F member 2; NM\_000934, NM\_001165920, NM\_001165921), 및 THBS1(Thrombospondin 1; NM\_003246)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 유전성 난소암의 발병 예측용 마커 조성물을 제공한다.

- [58] 또한, 본 발명은 ALDOA(aldolase, fructose-bisphosphate A; GenBank 접근(accession) 번호: NM\_001243177), CDH2(Cadherin 2; NM\_001792, NM\_001308176), LTBP1(Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1; NM\_000627, NM\_001166264, NM\_001166265, NM\_001166266, NM\_206943), MRC1(mannose receptor C-type 1; NM\_002438), PPBP(pro-platelet basic protein; NM\_002704), RBP4(Retinol-binding protein 4; NM\_001323517, NM\_001323518, NM\_006744), SPARC(secreted protein acidic and cysteine rich; NM\_003118, NM\_001309443, NM\_001309444), SERPINA5(serpin family A member 5; NM\_000624), SERPINC1(serpin family C member 1; NM\_000488, NM\_001365052), SERPINF2(serpin family F member 2; NM\_000934, NM\_001165920, NM\_001165921), 및 THBS1(Thrombospondin 1; NM\_003246)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 유전성 난소암의 발병 예측용 조성물을 제공한다.

- [59] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 유전성 난소암의 발병 예측용 키트를 제공한다.

- [60] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 유전성 난소암의 발병 여부를 예측할 수 있는 11종의 바이오마커를 발굴하고 그 유효성을 검증하였다.

- [61] 본 발명의 일실시예에서는, BRCA 돌연변이 양성 정상군과 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자군의 혈장 시료를 이용해 상기 정상군에 비해 난소암 환자군에서 유의하게 발현이 감소된 19종 및 발현이 증가된 61종의 단백질을 확인하였고, 상기 단백질 중에서 각각 BRCA 변이에 관계없는 전체 정상군 및 난소암 환자군에서 발현이 증가된 단백질과 중복되는 것들을 제외하여, BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자군에서 특이적으로 발현이 유의하게 변화된 24종의 마커 후보군 단백질을 도출하였다(실시예 2 참조).

- [62] 본 발명의 다른 실시예에서는, 상기 24종의 각 단백질에 대하여 4개 군(BRCA 음성인 정상군(HN), BRCA 양성인 정상군(HP), BRCA 음성인 난소암 환자군(ON), 및 BRCA 양성인 난소암 환자군(OP)) 간의 단백질 발현 수준 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석하였고, 24종 단백질 모두 BRCA 양성인 정상군(HP)과 난소암 환자군(OP) 사이에 통계적 유의성이 있는 것을 확인하였다(실시예 3 참조).

- [63] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 24종의 각 단백질에 대하여 정확도를 조사하기 위해 ROC 커브 분석을 실시하고 AUC 값을 도출하여 민감도 및 특이도를 확인하였다(실시예 4 참조).
- [64] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 2 fold cross validation을 50회 반복하여 상기 24종의 단백질에 대한 마커로써의 유효성을 검증하였으며, 다양한 결과를 종합하여 최종 11종의 바이오마커를 도출하였다(실시예 5 참조).
- [65] 본 발명에서 사용되는 용어, “유전성 난소암”은 부모중 적어도 한쪽으로부터 물려받은 돌연변이 유전자 또는 유전자의 결합으로 인해 발병하는 난소암을 의미하며, 본 발명에 있어서 유전성 난소암은 BRCA1 또는 BRCA2 유전자의 돌연변이를 동반하는 것일 수 있으며, 반드시 상기 유전자의 돌연변이에 의해 난소암이 유발되는 것을 의미하지는 않는다.
- [66] 본 발명에서 사용되는 용어, “예측”이란 특정 개인에 대하여 유전성 난소암이 발병할 가능성이 있는지, 유전성 난소암이 발병할 가능성이 상대적으로 높은지, 또는 유전성 난소암이 이미 발병하였는지 여부를 판별하는 것을 말한다. 본 발명의 방법은 BRCA 유전자 돌연변이를 가지고 있는 개인을 대상으로 유전성 난소암 발병 위험도가 높은 개인으로 예측하고 이들에 대하여 특별하고 적절한 관리를 통하여 발병 시기를 늦추거나 발병하지 않도록 하는데 사용할 수 있다.
- [67] 본 발명에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [68] 본 발명에서 사용되는 용어, “프라이머(primer)”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [69] 본 발명에서 사용되는 용어, “프로브(probe)”란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소, 효소, 또는 형광체 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [70] 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [71] 본 발명에서 사용되는 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 뮤린 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.
- [72] 본 발명의 항암제 반응성 예측용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그

이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있다.

- [73] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 피검자 유래의 생물학적 시료에서 ALDOA(aldolase, fructose-bisphosphate A; GenBank 접근(accession) 번호: NM\_001243177), CDH2(Cadherin 2; NM\_001792, NM\_001308176), LTBP1(Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1; NM\_000627, NM\_001166264, NM\_001166265, NM\_001166266, NM\_206943), MRC1(mannose receptor C-type 1; NM\_002438), PPBP(pro-platelet basic protein; NM\_002704), RBP4(Retinol-binding protein 4; NM\_001323517, NM\_001323518, NM\_006744), SPARC(secreted protein acidic and cysteine rich; NM\_003118, NM\_001309443, NM\_001309444), SERPINA5(serpin family A member 5; NM\_000624), SERPINC1(serpin family C member 1; NM\_000488, NM\_001365052), SERPINF2(serpin family F member 2; NM\_000934, NM\_001165920, NM\_001165921), 및 THBS1(Thrombospondin 1; NM\_003246)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유전성 난소암의 발병 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [74] 본 발명에서 사용되는 용어 “유전성 난소암 발병 예측을 위한 정보제공방법”은 발병 예측을 위한 예비적 단계로써 유전성 난소암의 발병 여부를 예측하기 위하여 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것이며 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다.
- [75] 본 발명의 일구현예로, 상기 피검자는 BRCA1 또는 BRCA2 유전자 돌연변이 보유할 수 있다.
- [76] 본 발명에 있어서, 상기 RBP4, SERPINA5, SERPINC1 및 SERPINF2로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준이 건강한 정상대조군에 비하여 감소되어 있는 경우 유전성 난소암이 발병할 것으로 예측할 수 있다.
- [77] 본 발명에 있어서, 상기 ALDOA, CDH2, LTBP1, MRC1, PPBP, SPARC 및 THBS1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준이 건강한 정상대조군에 비하여 증가되어 있는 경우 유전성 난소암이 발병할 것으로 예측할 수 있다.
- [78] 상기 환자 유래의 생물학적 시료는 전혈, 혈액, 타액, 조직, 세포, 객담, 뇌척수액 및 뇨 등을 포함할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [79] 상기 mRNA의 발현수준은 당업계에서 알려진 통상적인 방법으로 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray) 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[80] 상기 단백질 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[81]

[82] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[83]

[84] **[실시예]**

[85] **실시예 1. 실험방법**

[86] **1-1. 피험자 모집 및 시료 확보**

[87] 본 실시예의 모든 표본은 가톨릭대학교 의과대학 서울성모병원 임상시험 심사위원회의 적절한 동의와 승인을 받은 후 진행하였다. 혈장 시료는 수술 전인 20명의 난소암 환자 및 20명의 건강한 정상군으로부터 확보하였다. 난소암 환자유래 혈장 시료는 서울성모병원과 KGCB(Korean Gynecologic Cancer Bank)에서 제공받았고, 건강한 정상대조군유래 혈장 시료는 BRCA 돌연변이 음성 대상자의 경우 서울성모병원에서 건강검진을 받은 대상자들로부터 얻었고, BRCA 돌연변이 양성 대상자의 경우에는 서울성모병원을 방문하여 혈액 채취에 동의한 대상자들로부터 얻었다. 모든 시료는 액체 질소로 동결시키고 사용 전까지 -80°C에서 보관하였다.

[88]

[89] **1-2. 혈장 시료의 전처리**

[90] 정상군 20명(BRCA1/2 유전자 돌연변이 10명, 비변이 10명) 및 난소암 환자 20명(BRCA1/2 유전자 돌연변이 10명, 비변이 10명)으로부터 얻은 혈장 시료를 하기와 같은 과정에 따라 전처리하였다. 보다 구체적으로, 상기 혈장 시료 40  $\mu$ l를 이용하여 고농도로 존재하는 14개의 단백질(알부민, 면역글로불린A(IgA), 면역글로불린G(IgG), 면역글로불린M(IgM), 알파1-항트립신( $\alpha$ 1-antitrypsin), 알파1-산 당단백질( $\alpha$ 1-acid glycoprotein), 아포지단백 A1(apolipoprotein A1), 아포지단백 A2(apolipoprotein A2), 보체 C3(complement C3), 트랜스페린(transferrin), 알파2-마크로글로불린( $\alpha$ 2-marcoglobulin), 합토글로빈(haptoglobin), 피브리노겐(fibrinogen), 트랜스타이레틴(transthyretin))이 제거된 HPLC MARS14(Multiple Affinity Removal System 14, agilent 사) 컬럼 내로 주입하였다. 다음으로, 저농도 혈장

단백질을 동결건조시킨 후 5% SDS, 50 mM의 1M 트라이에틸암모늄 바이카보네이트 (Triethylammonium bicarbonate)로 재흡수하고 20 mM이 되도록 디티오프레itol (Dithiothreitol)을 첨가하고 95°C에서 10분 동안 반응시켜 이황화결합을 환원시켰다. 이후, 알킬화를 위해 40 mM이 되도록 아이오도아세트아미드(iodoacetamide)를 가하여 암 조건하에 실온에서 30분 동안 반응시키고, 이를 S-trap filter(S-TRAPTM, Protifi사)를 이용하여 용해 완충액(lysis buffer) 및 용액을 필터(filter) 밖으로 내보내고 단백질만 필터 안에 가둔 후 원심분리하여 세척하였다. 이어서 분해 완충액(digestion buffer)으로 채우고 혈장 단백질과 Lys-C/트립신 혼합 효소(promega)가 질량 비율이 25:1이 되도록 넣은 후 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 다음으로, 건조된 시료에 100  $\mu$ l의 0.1% 포름산(Formic acid)을 녹인 후 5  $\mu$ l를 취하여 LC-MS/MS 분석에 사용하였다.

[91]

[92] **1-3. LC-MS/MS 분석**

[93] 상기 실시예 1-2에서 수행한 Nano LC-Q-Exactive plus 질량 분석(mass spectrometry)은 하기 방법에 따라 진행되었다.

[94] i) 먼저 50 cm C18 capillary column(OD 360 $\mu$ m, ID 75 $\mu$ m)으로 200분 동안 분획하고; ii) 150분 동안 구배(gradient)(5~45% 아세토니트릴(acetonitrile) 및 0.1% 포름산 용액)로 분획하고; iii) 상위 20 intensity precursor에 대해 DDA(data dependent acquisition) 모드로 데이터를 수집한 후; iv) 수집된 데이터는 Proteome discoverer 2.2 프로그램을 이용해 인간 SWISSPROT 서열 데이터베이스와 비교하며 펩타이드 및 단백질을 동정하였고, 동정된 펩타이드의 MS1 피크 강도를 이용하여 단백질의 LFQ(Lable-Free Quantification)값을 간결성(parsimony: 최소 데이터를 이용한 최대 정보) 방법으로 정량한 결과를 통해 바이오마커를 발굴하는 분석을 하였다.

[95]

[96] **1-4. 데이터 분석**

[97] 혈장 시료 중 표적 단백질의 양을 비교하기 위하여, 내인성(endogenous)의 혈장 단백질 중 군 간의 차이를 보이지 않고 보정 가능한 정규화 인자(normalization factor)로 새로운 6개의 혈장 단백질을 찾았다. 상기 6개 단백질은 티록신결합글로불린(Thyroxine-binding globulin; TBG), 보체 요소 I(Complement factor I; CFI), 보체 C6(Complement component C6; C6), 플라스틴-2(Plastin-2; PLS2), 보체 C2(Complement C2; C2), 보체 요소 H(Complement factor H; CFH)이다. 상기 6개 단백질의 대표 펩타이드에 대한 LFQ값을 총 40명의 피험자 유래 혈장 중 raw 값에서 각 펩타이드의 LFQ 값의 중앙값으로 나눈 후, 각 시료 당 6개의 펩타이드에서 중앙값을 구한 것을 최종 정규화 인자로 정의하고 다른 단백질의 LFQ 값을 최종 정규화 인자로 나누어 주었다.

[98] 통계분석 시 정규화된 값을 이용하여 Mann-whitney test를 통해서 P값을 구했고, 여기에 사후 검정으로 본페로니(Bonferonni) 보정을 통해서 0.05/374 보다 작은 P값을 가지면서 두 그룹간의 정량 차이가 2배 이상 나는 단백질을 발굴하였다.

[99]

[100] **실시예 2. 유전성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 변화된 후보 단백질 발굴**

[101] 본 발명자들은 유전성 난소암의 발병여부를 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴하기 위하여, 도 1a에 도시한 바와 같이 두 가지 시나리오에 따라 각각 혈장 시료에서 차등적으로 발현되는 단백질을 발굴하고 이를 종합적으로 분석하여 BRCA 유전자의 돌연변이가 동반된 유전성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 변화하는 마커를 도출하고자 하였다.

[102]

[103] **2-1. BRCA 돌연변이 양성 피험자 간에 차등적으로 발현된 단백질 확인 (Scenario I)**

[104] 먼저, BRCA 돌연변이 양성(BRCA+)인 정상군 및 난소암 환자들로부터 얻은 혈장 시료를 이용하여 상기 실시예 1-2 및 1-3에 기재된 방법을 통해 분석하고, 실시예 1-4의 통계분석 기준에 따라 차등적으로 발현되는 단백질을 volcano plot으로 분석하였다. 그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 유의적으로 발현이 감소한 단백질 19종이 발견되었고, 발현이 증가한 단백질 61종이 발견되었다.

[105] 나아가 각각 발현이 감소된 단백질 및 발현이 증가된 단백질에 대한 네트워크 분석을 통해 단백질의 기능을 기준으로 분류하였다. 그 결과, 도 1c에 나타난 바와 같이 BRCA 양성 난소암 환자에서 발현이 감소된 19종의 단백질들은 중성지방의 이화 과정 조절, 급성-상 반응 및 혈액 응고 피브린 혈전 형성에 관련되어 있는 것을 확인하였고, BRCA 양성 난소암 환자에서 발현이 증가된 61종의 단백질들은 대표적으로 과산화수소 대사과정, NADH 대사과정, 인터루킨-8 생성 조절 및 인터루킨-12 매개 신호전달 경로, 산화적 스트레스에 의한 세포사멸의 조절, 혈소판 응집 및 바이러스 프로세스의 숙주에 의한 양성적 조절에 관련되어 있는 것을 알 수 있었다.

[106]

[107] **2-2. 정상군 및 난소암 환자에서 차등적으로 발현된 단백질 확인 (Scenario II)**

[108] 본 실시예에서는 BRCA 유전자의 돌연변이 여부에 관계없이 전체 정상군 및 난소암 환자를 대상으로 하였으며, 상기 실시예 2-1과 유사한 방법으로 전체 정상군 및 난소암 환자 유래 혈장 시료에서 차등적으로 발현되는 단백질을 도출하였다. 그 결과, 정상군에서는 13종의 단백질이 유의적으로 증가하였고, 난소암 환자군에서는 48종 단백질의 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다.

[109]

[110] **2-3. 유전성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 변화된 단백질 확인**

[111] 이후 상기 실시예 2-1 및 2-2에서 얻어진 결과를 종합적으로 분석하였다. 도 1d에 BRCA 돌연변이 양성 정상군(BRCA+ subjects: HC), 정상군(HC), BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자군(BRCA+ subjects: OC), 난소암 환자군(OC)의 각 그룹에서 발현이 증가한 단백질 수를 비교하여 나타내었으며, 도 1e에는 밴다이어그램으로 각 그룹에서 발현이 증가한 단백질 중에 공통적인 단백질 및 각 군에서만 발현이 증가한 단백질을 구분하였다. 그 결과, BRCA 돌연변이 양성 정상군 및 전체 정상군에서 각각 발현이 증가된 단백질 중에 10개의 단백질이 공통되며, BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자 및 전체 난소암 환자 각각에서 발현이 증가된 단백질 중에는 46개가 공통적인 것을 알 수 있었다.

[112] 상기 결과들로부터, 공통적으로 발현이 증가된 단백질들을 제외하고 BRCA 돌연변이 양성 정상군에서만 발현이 증가한 단백질 즉, BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자군에서만 발현이 감소한 단백질 9종 및 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자군에서만 발현이 증가한 단백질 15종을 분리하였으며, 상기 24종의 단백질을 유전성 난소암의 발병 예측용 마커 후보군으로 도출하였다. 상기 9종 및 15종의 단백질 및 이를 암호화하는 유전자에 대한 정보는 하기 표 1 및 2에 각각 나타내었다.

[113] [Table 1]

| Index | Uniprot ID | Gene     | Protein Name                                 |
|-------|------------|----------|----------------------------------------------|
| 1     | P05154     | SERPINA5 | Plasma serine protease inhibitor             |
| 2     | P24593     | IGFBP5   | Insulin-like growth factor-binding protein 5 |
| 3     | P00734     | F2       | Prothrombin                                  |
| 4     | P02786     | TFRC     | Transferrin receptor protein 1               |
| 5     | P14151-2   | SELL     | L-selectin                                   |
| 6     | P02656     | APOC3    | Apolipoprotein C-III                         |
| 7     | P08697     | SERPINF2 | Alpha-2-antiplasmin                          |
| 8     | P01008     | SERPINC1 | Antithrombin-III                             |
| 9     | P02753     | RBP4     | Retinol-binding protein 4                    |

[114] [Table 2]

| Index | UniprotID | Gene     | Protein Name                                                |
|-------|-----------|----------|-------------------------------------------------------------|
| 1     | O95497    | VNN1     | Pantetheinase                                               |
| 2     | P02775    | PPBP     | Platelet basic protein                                      |
| 3     | P04075-2  | ALDOA    | Fructose-bisphosphate aldolase A                            |
| 4     | P04275    | VWF      | von Willebrand factor                                       |
| 5     | P05121    | SERPINE1 | Plasminogen activator inhibitor 1                           |
| 6     | P06744-2  | GPI      | Glucose-6-phosphate isomerase                               |
| 7     | P07602-3  | PSAP     | Prosaposin                                                  |
| 8     | P07686    | HEXB     | Beta-hexosaminidase subunit beta                            |
| 9     | P07996    | THBS1    | Thrombospondin-1                                            |
| 10    | P09486    | SPARC    | Osteonectin                                                 |
| 11    | P19022    | CDH2     | Cadherin-2                                                  |
| 12    | P22897    | MRC1     | Macrophage mannose receptor 1                               |
| 13    | P34932    | HSPA4    | Heat shock 70 kDa protein 4                                 |
| 14    | P78509    | RELN     | Reelin                                                      |
| 15    | Q14766-4  | LTBP1    | Latent-transforming growth factor<br>beta-binding protein 1 |

[115]

[116] 실시예 3. 유전성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 변화된 단백질의 통계적 유의성 유무 분석

[117] 본 발명자들은 상기 실시예 2를 통해 도출된 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 변화된 24종 단백질 각각에 대하여 4개 군(BRCA 음성인 정상군(HN), BRCA 양성인 정상군(HP), BRCA 음성인 난소암 환자군(ON), 및 BRCA 양성인 난소암 환자군(OP)) 간의 단백질 발현량 차이에 대한 통계적 유의성 유무를 분석하였다.

[118] BRCA 돌연변이를 보유한 난소암 환자에서 발현이 감소된 9종의 단백질에 대한 결과는 도 2a 내지 도 2e에 나타내었고, 발현이 증가된 15종의 단백질에 대한 결과는 도 3a 내지 도 3h에 나타내었다. 분석 결과, 24종의 단백질 모두 BRCA 돌연변이 양성인 정상군과 BRCA 돌연변이 양성인 난소암 환자군 간의 발현수준에 유의한 차이가 있는 것을 확인하였다. 하기 표 3에는 BRCA 돌연변이 양성인 정상군과 BRCA 돌연변이 양성인 난소암 환자군에서 24종 단백질의 평균 발현량 및 표준 편차를 정리하여 나타내었다.



[119] [Table 3]

| Accession | Description                                   | HC vs OC | Healthy-BRCA+(n=20) | OC-BRCA+(n=20) | Healthy-BRCA+(n=20) | OC-BRCA+(n=20) |
|-----------|-----------------------------------------------|----------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|
| P00734    | Prothrombin                                   | HC ↑     | 38.49               | 37.11          | 0.17                | 0.40           |
| P01008    | Antithrombin-III                              | HC ↑     | 38.14               | 36.81          | 0.16                | 0.52           |
| P02656    | Apolipoprotein C-III                          | HC ↑     | 34.20               | 33.06          | 0.71                | 0.97           |
| P02753    | Retinol-binding protein 4                     | HC ↑     | 35.50               | 34.42          | 0.23                | 0.60           |
| P02786    | Transferrin receptor protein 1                | HC ↑     | 28.61               | 26.83          | 0.58                | 1.10           |
| P05154    | Plasma serine protease inhibitor              | HC ↑     | 33.17               | 32.01          | 0.22                | 0.48           |
| P08697    | Alpha-2-antiplasmin                           | HC ↑     | 36.17               | 35.04          | 0.13                | 0.32           |
| P14151-2  | Isoform 2 of L-selectin                       | HC ↑     | 30.13               | 29.11          | 0.55                | 0.65           |
| P24593    | Insulin-like growth factor-binding protein 5  | HC ↑     | 26.71               | 25.70          | 0.85                | 0.61           |
| O95497    | Pantetheinase                                 | OC ↑     | 26.38               | 27.95          | 1.17                | 1.15           |
| P02775    | Platelet basic protein                        | OC ↑     | 32.11               | 35.11          | 0.88                | 0.49           |
| P04075-2  | Isoform 2 of Fructose-bisphosphate aldolase A | OC ↑     | 27.80               | 28.92          | 0.36                | 0.87           |
| P04275    | von Willebrand factor                         | OC ↑     | 32.04               | 33.73          | 0.4                 | 0.44           |
| P05121    | Plasminogen activator inhibitor 1             | OC ↑     | 26.20               | 27.64          | 0.6                 | 0.65           |
| P06744-2  | Isoform 2 of Glucose-6-phosphate isomerase    | OC ↑     | 27.68               | 28.77          | 0.48                | 0.63           |
| P07602-3  | Isoform Sap-mu-9 of Prosaposin                | OC ↑     | 25.26               | 26.74          | 0.62                | 0.64           |
| P07686    | Beta-hexosaminidase subunit beta              | OC ↑     | 24.20               | 25.46          | 0.88                | 0.57           |

|          |                                                                       |      |       |       |      |      |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|------|-------|-------|------|------|
| P07996   | Thrombospondin-1                                                      | OC ↑ | 29.82 | 32.88 | 1.11 | 0.78 |
| P09486   | SPARC                                                                 | OC ↑ | 25.67 | 30.19 | 0.82 | 1.15 |
| P19022   | Cadherin-2                                                            | OC ↑ | 26.58 | 27.73 | 0.59 | 0.65 |
| P22897   | Macrophage mannose receptor 1                                         | OC ↑ | 26.35 | 27.36 | 0.61 | 0.56 |
| P34932   | Heat shock 70 kDa protein 4                                           | OC ↑ | 26.01 | 27.43 | 0.49 | 0.85 |
| P78509   | Reelin                                                                | OC ↑ | 25.69 | 27.36 | 1.24 | 0.60 |
| Q14766-4 | Isoform 4 of Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 | OC ↑ | 25.73 | 28.82 | 0.84 | 0.58 |

[120]

[121] 실시예 4. 24종 마커의 민감도 및 특이도 분석

[122] 본 발명자들은 상기 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자군에서 유의적으로 발현이 변화된 24종의 마커에 대하여 정확도를 알아보기 위해 민감도(Sensitivity) 및 특이도(Specificity)를 분석하고자 하였으며, 이를 위해 ROC 곡선 분석을 실시하였다. 민감도 및 특이도는 ROC 곡선 아래 면적(AUC)을 계산함으로써 평가하였다.

[123] BRCA 돌연변이를 보유한 난소암 환자에서 발현이 감소된 9종의 단백질에 대한 결과는 도 4a 내지 도 4e 및 표 4에 나타내었고, 발현이 증가된 15종의 단백질에 대한 결과는 도 5a 내지 도 5h 및 표 5에 나타내었다. Area=1인 경우 시험 데이터세트에 대한 완벽한 정확도를 갖는 것으로 판단하였고, Area=0.5인 경우에는 부정확한(worthless) 정확도를 갖는 것으로 판단하였다. AUC 값에 따른 정확도 기준은 하기와 같다: 0.9~1 = excellent, 0.8~0.9 = good, 0.7~0.8 = Fair (C), 0.6~0.7 = poor (D), 0.5~0.6 = Fail (F).

[124] [Table 4]

| Index | Uniprot ID | Gene         | Protein Name                                    | AUC value |
|-------|------------|--------------|-------------------------------------------------|-----------|
| 1     | P05154     | SERPINA<br>5 | Plasma serine protease inhibitor                | 0.951     |
| 2     | P24593     | IGFBP5       | Insulin-like growth factor-binding<br>protein 5 | 0.839     |
| 3     | P00734     | F2           | Prothrombin                                     | 0.868     |
| 4     | P02786     | TFRC         | Transferrin receptor protein 1                  | 0.753     |
| 5     | P14151-2   | SELL         | L-selectin                                      | 0.864     |
| 6     | P02656     | APOC3        | Apolipoprotein C-III                            | 0.633     |
| 7     | P08697     | SERPINF<br>2 | Alpha-2-antiplasmin                             | 0.914     |
| 8     | P01008     | SERPINC<br>1 | Antithrombin-III                                | 0.927     |
| 9     | P02753     | RBP4         | Retinol-binding protein 4                       | 0.981     |

[125] [Table 5]

| Index | Uniprot ID | Gene      | Protein Name                                             | AUC value |
|-------|------------|-----------|----------------------------------------------------------|-----------|
| 1     | O95497     | VNN1      | Pantetheinase                                            | 0.533     |
| 2     | P02775     | PPBP      | Platelet basic protein                                   | 0.534     |
| 3     | P04075.2   | ALDOA     | Fructose-bisphosphate aldolase A                         | 0.844     |
| 4     | P04275     | VWF       | von Willebrand factor                                    | 0.792     |
| 5     | P05121     | SERPINE 1 | Plasminogen activator inhibitor 1                        | 0.642     |
| 6     | P06744.2   | GPI       | Glucose-6-phosphate isomerase                            | 0.774     |
| 7     | P07602.3   | PSAP      | Prosaposin                                               | 0.771     |
| 8     | P07686     | HEXB      | Beta-hexosaminidase subunit beta                         | 0.755     |
| 9     | P07996     | THBS1     | Thrombospondin-1                                         | 0.667     |
| 10    | P09486     | SPARC     | Osteonectin                                              | 0.664     |
| 11    | P19022     | CDH2      | Cadherin-2                                               | 0.868     |
| 12    | P22897     | MRC1      | Macrophage mannose receptor 1                            | 0.816     |
| 13    | P34932     | HSPA4     | Heat shock 70 kDa protein 4                              | 0.826     |
| 14    | P78509     | RELN      | Reelin                                                   | 0.760     |
| 15    | Q14766.4   | LTBP1     | Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 | 0.674     |

[126]

[127] 실시예 5. 24종 마커의 유효성 검증

[128] 본 발명자들은 상기 24종의 BRCA 돌연변이 양성 난소암 환자군에서 유의적으로 발현이 변화된 24종의 마커에 대하여 유전성 난소암의 발병을 예측할 수 있는 특이적 바이오마커로서의 유효성을 검증하고자 하였다. 이를 위해, 상기 24종의 각 단백질에 대하여 50회 반복하여 2 fold cross validation을 진행하였으며, 도 6에 상기 검증과정에 대한 모식도를 나타내었다.

[129] 상기 분석을 통해 24종의 후보군 단백질 중에서 선별된 변수인 optimal K 값이 15이고, cross validation의 AUC 값이 0.983 이상이며, Probability(확률)가 0.70 이상(selected K=7)인 15개의 단백질을 선정하였으며, 문헌 등을 통해 7개 단백질을 선별하였다. 또한 이에 추가적으로 24종의 후보군 단백질에서 BRCA 변이 양성 정상군과 난소암 환자 간에 유의적인 발현 차이를 나타내며, BRCA 돌연변이 양성 및 음성군 사이에서도 유의적인 발현 차이를 보인 PPBP, SPARC,

THBS1, 및 LTBP1 단백질을 추가하였다.

[130] 이에, 상기 실시예를 통해 BRCA 변이 후 난소암 발병 예측용 바이오마커로써 하기 11종이 최종 발굴되었으며, 11종의 바이오마커에 대한 정보를 하기 표 6에 나타내었다.

[131] [Table 6]

| Information |                                                          |          | Significant sample group | Univariate ROC analysis |
|-------------|----------------------------------------------------------|----------|--------------------------|-------------------------|
| Accession   | Description                                              | Gene     | HC vs OC                 | AUC                     |
| P01008      | Antithrombin-III                                         | SERPINC1 | HC ↑                     | 0.927                   |
| P02753      | Retinol-binding protein 4                                | RBP4     | HC ↑                     | 0.981                   |
| P05154      | Plasma serine protease inhibitor                         | SERPINA5 | HC ↑                     | 0.951                   |
| P08697      | Alpha-2-antiplasmin                                      | SERPINF2 | HC ↑                     | 0.914                   |
| P04075-2    | Isoform 2 of Fructose-bisphosphate aldolase A            | ALDOA    | OC ↑                     | 0.844                   |
| P19022      | Cadherin-2                                               | CDH2     | OC ↑                     | 0.868                   |
| P22897      | Macrophage mannose receptor 1                            | MRC1     | OC ↑                     | 0.816                   |
| P02775      | Platelet basic protein                                   | PPBP     | OC ↑                     | 0.534                   |
| P09486      | Osteonectin, SPARC                                       | SPARC    | OC ↑                     | 0.664                   |
| P07996      | Thrombospondin-1                                         | THBS1    | OC ↑                     | 0.667                   |
| Q14766.4    | Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 | LTBP1    | OC ↑                     | 0.674                   |

[132]

### 산업상 이용가능성

[133] 본 발명에 따르면 BRCA 유전자의 돌연변이를 보유한 난소암 환자에서 특이적으로 발현이 변화하는 11종의 바이오마커를 발굴하고 이의 유효성을 검증하였는바, 임상에서 BRCA 유전자의 돌연변이를 가지고 있는 피검자로부터 상기 11종의 바이오마커 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을

측정함으로써 난소암 발병여부에 대한 정보를 조기에 제공할 수 있어 상기 질환에 대한 예방이 가능하며, 또한 상기 바이오마커는 BRCA 유전자 돌연변이가 동반된 유전성 난소암에 대한 표적 치료제를 개발하는데 표적 분자로서 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

## 청구범위

- [청구항 1] ALDOA(aldolase, fructose-bisphosphate A; GenBank 접근(accession) 번호: NM\_001243177), CDH2(Cadherin 2; NM\_001792, NM\_001308176), LTBP1(Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1; NM\_000627, NM\_001166264, NM\_001166265, NM\_001166266, NM\_206943), MRC1(mannose receptor C-type 1; NM\_002438), PPBP(pro-platelet basic protein; NM\_002704), RBP4(Retinol-binding protein 4; NM\_001323517, NM\_001323518, NM\_006744), SPARC(secreted protein acidic and cysteine rich; NM\_003118, NM\_001309443, NM\_001309444), SERPINA5(serpin family A member 5; NM\_000624), SERPINC1(serpin family C member 1; NM\_000488, NM\_001365052), SERPINF2(serpin family F member 2; NM\_000934, NM\_001165920, NM\_001165921), 및 THBS1(Thrombospondin 1; NM\_003246)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 유전성 난소암의 발병 예측용 마커 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 유전성 난소암은 BRCA1 또는 BRCA2 유전자의 돌연변이를 동반하는 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.
- [청구항 3] ALDOA(aldolase, fructose-bisphosphate A; GenBank 접근(accession) 번호: NM\_001243177), CDH2(Cadherin 2; NM\_001792, NM\_001308176), LTBP1(Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1; NM\_000627, NM\_001166264, NM\_001166265, NM\_001166266, NM\_206943), MRC1(mannose receptor C-type 1; NM\_002438), PPBP(pro-platelet basic protein; NM\_002704), RBP4(Retinol-binding protein 4; NM\_001323517, NM\_001323518, NM\_006744), SPARC(secreted protein acidic and cysteine rich; NM\_003118, NM\_001309443, NM\_001309444), SERPINA5(serpin family A member 5; NM\_000624), SERPINC1(serpin family C member 1; NM\_000488, NM\_001365052), SERPINF2(serpin family F member 2; NM\_000934, NM\_001165920, NM\_001165921), 및 THBS1(Thrombospondin 1; NM\_003246)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 유전성 난소암의 발병 예측용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,

- 상기 유전성 난소암은 BRCA1 또는 BRCA2 유전자의 돌연변이를 동반하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,  
상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서,  
상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 7]  
[청구항 8] 제3항의 조성물을 포함하는, 유전성 난소암의 발병 예측용 키트.  
피검자 유래의 생물학적 시료에서 ALDOA(aldehyde dehydrogenase, fructose-bisphosphate A; GenBank 접근(accession) 번호: NM\_001243177), CDH2(Cadherin 2; NM\_001792, NM\_001308176), LTBP1(Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1; NM\_000627, NM\_001166264, NM\_001166265, NM\_001166266, NM\_206943), MRC1(mannose receptor C-type 1; NM\_002438), PPBP(pro-platelet basic protein; NM\_002704), RBP4(Retinol-binding protein 4; NM\_001323517, NM\_001323518, NM\_006744), SPARC(secreted protein acidic and cysteine rich; NM\_003118, NM\_001309443, NM\_001309444), SERPINA5(serpin family A member 5; NM\_000624), SERPINC1(serpin family C member 1; NM\_000488, NM\_001365052), SERPINF2(serpin family F member 2; NM\_000934, NM\_001165920, NM\_001165921), 및 THBS1(Thrombospondin 1; NM\_003246)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유전성 난소암의 발병 예측방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,  
유전성 난소암은 BRCA1 또는 BRCA2 유전자의 돌연변이를 동반하는 것을 특징으로 하는, 예측방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서,  
상기 피검자는 BRCA1 또는 BRCA2 유전자의 돌연변이를 보유하는 것을 특징으로 하는, 예측방법.
- [청구항 11] 제8항에 있어서,  
상기 RBP4, SERPINA5, SERPINC1 및 SERPINF2로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준이 건강한 정상대조군에 비하여

감소되어 있는 경우 유전성 난소암이 발병할 것으로 예측하는 것을 특징으로 하는, 예측방법.

[청구항 12]

제8항에 있어서,

상기 ALDOA, CDH2, LTBP1, MRC1, PPBP, SPARC 및 THBS1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준이 건강한 정상대조군에 비하여 증가되어 있는 경우 유전성 난소암이 발병할 것으로 예측하는 것을 특징으로 하는, 예측방법.

[청구항 13]

제8항에 있어서,

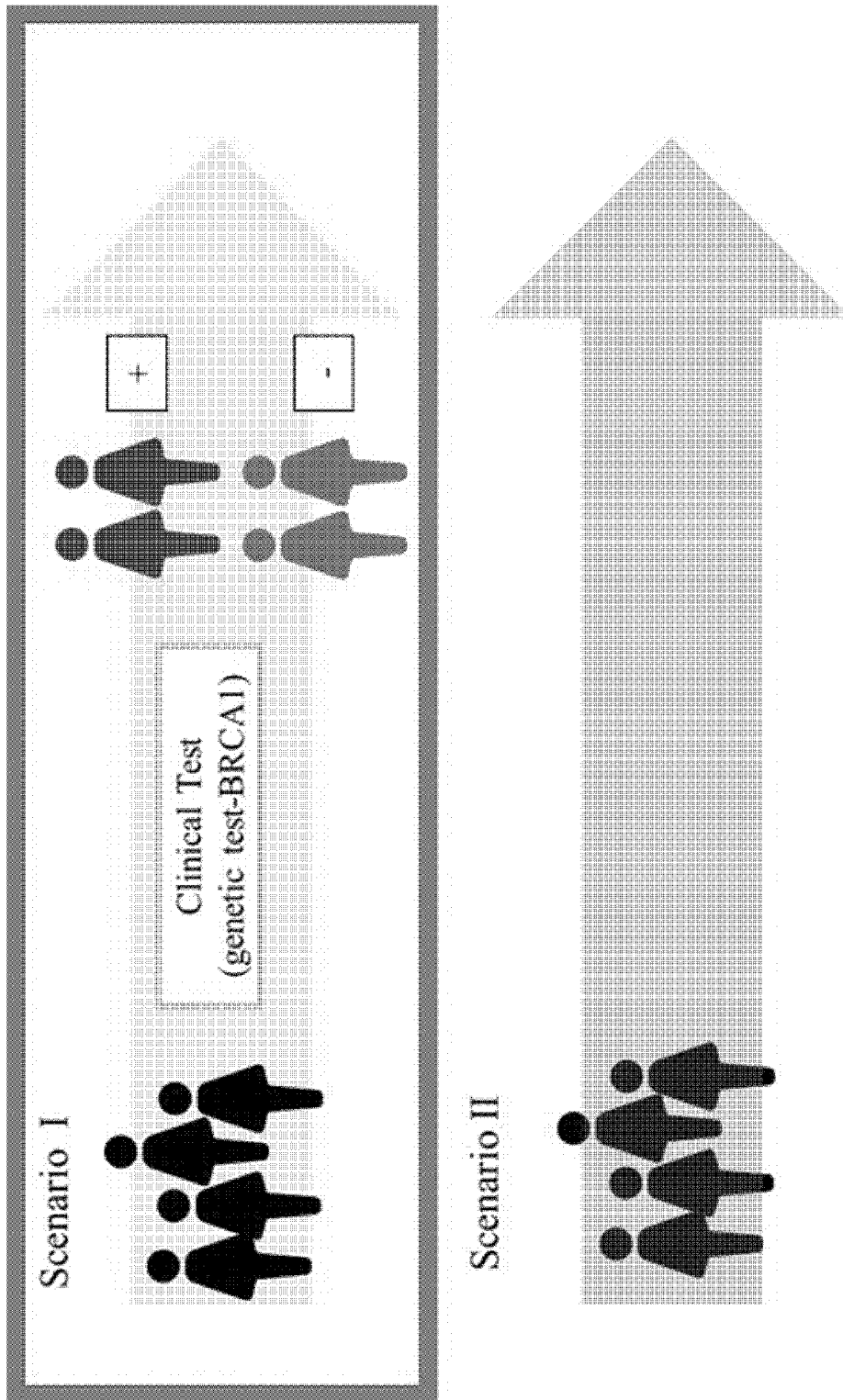
상기 mRNA의 발현수준은 in situ 교잡법 (in situ hybridization), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray) 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 예측방법.

[청구항 14]

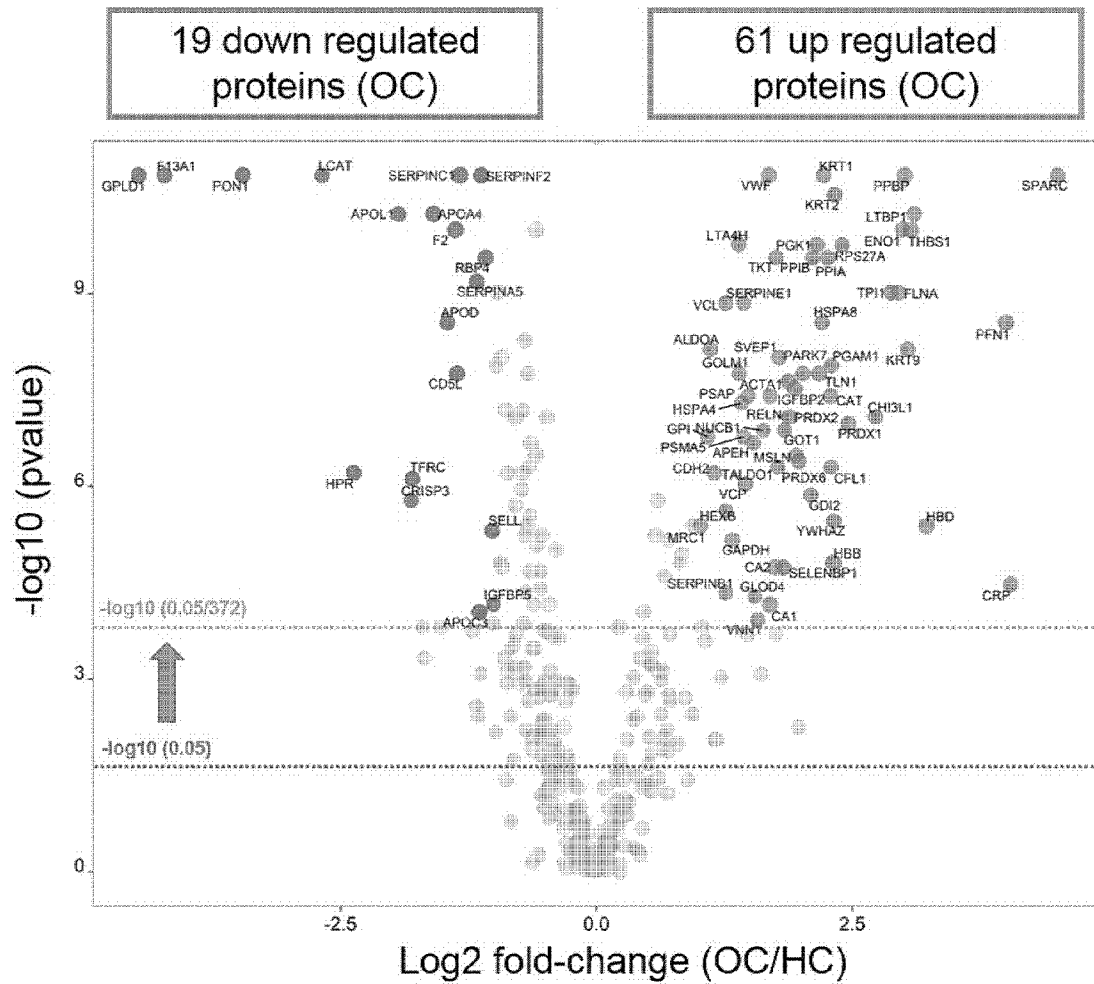
제8항에 있어서,

상기 단백질의 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법 (ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 예측방법.

[Fig. 1a]

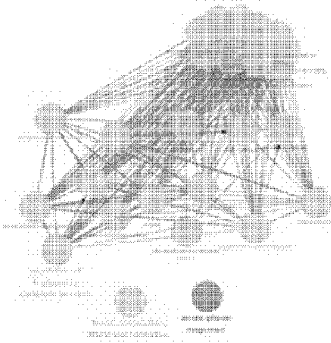


[Fig. 1b]



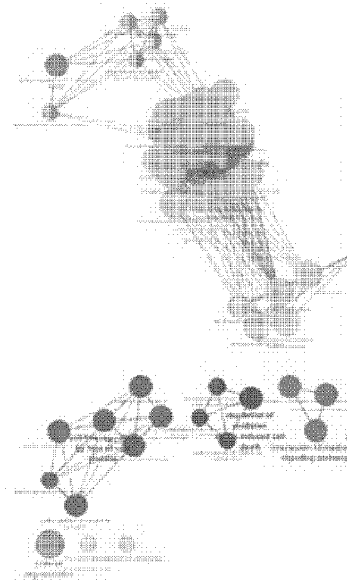
[Fig. 1c]

## 19 down regulated proteins (OC)



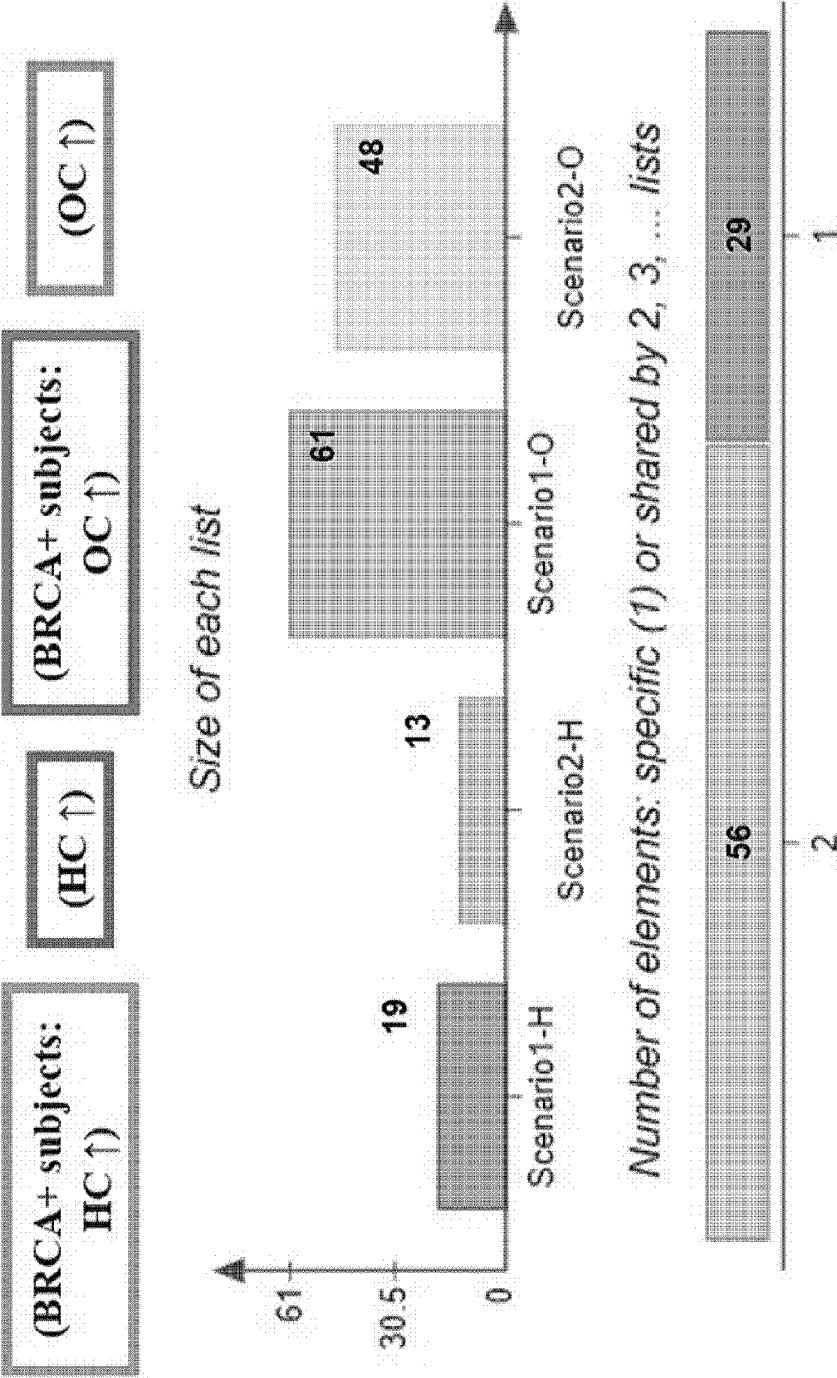
- Regulation of triglyceride catabolic process
- Acute-phase response
- Blood coagulation fibrin clot formation

## 61 up regulated proteins (OC)

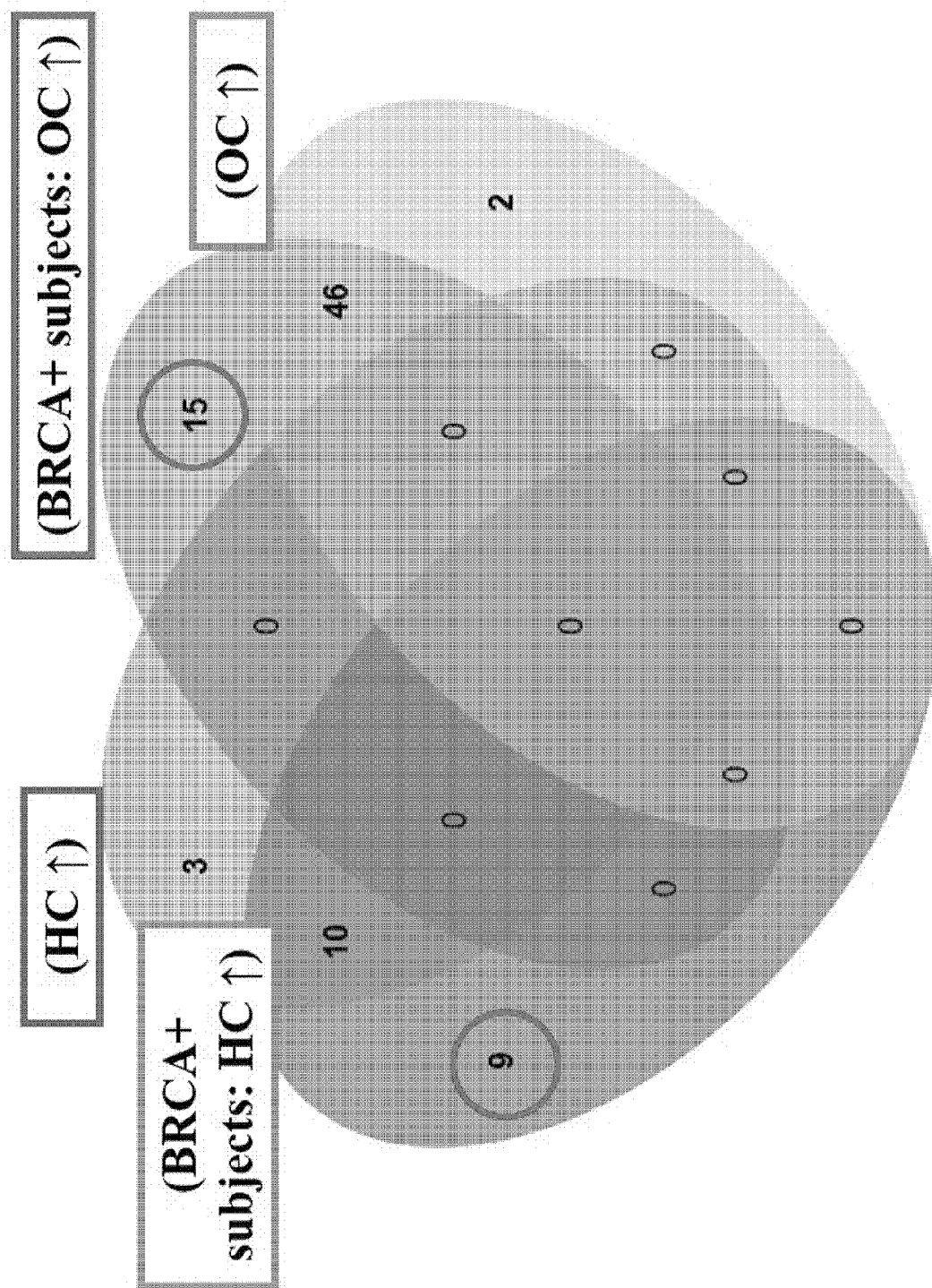


- Hydrogen peroxide metabolic process
- NADH metabolic process
- Regulation of Interleukin-8 production
- Interleukin-12-mediated signaling pathway
- Regulation of oxidative-stress induced cell death
- Platelet aggregation
- Positive regulation by host of viral process

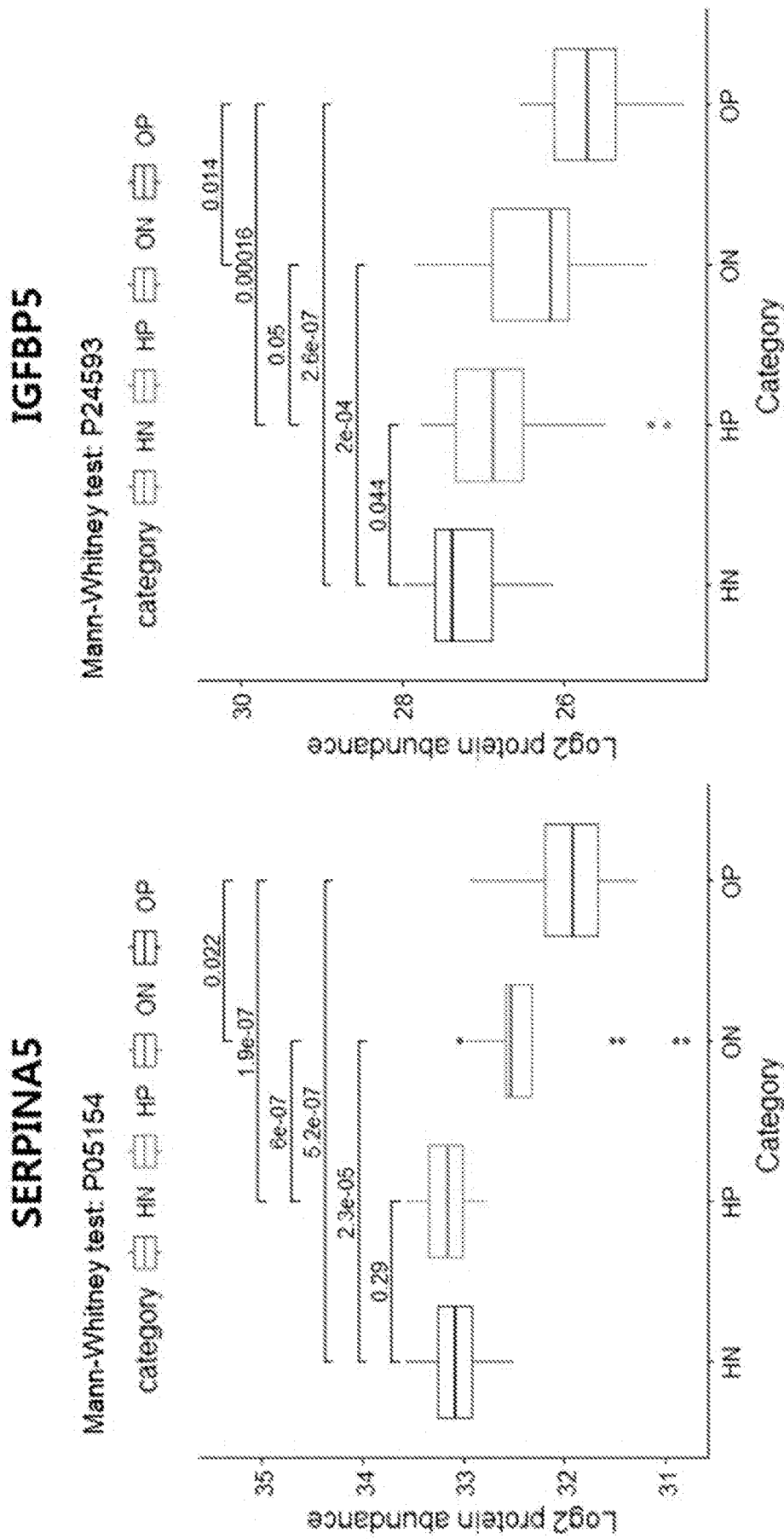
[Fig. 1d]



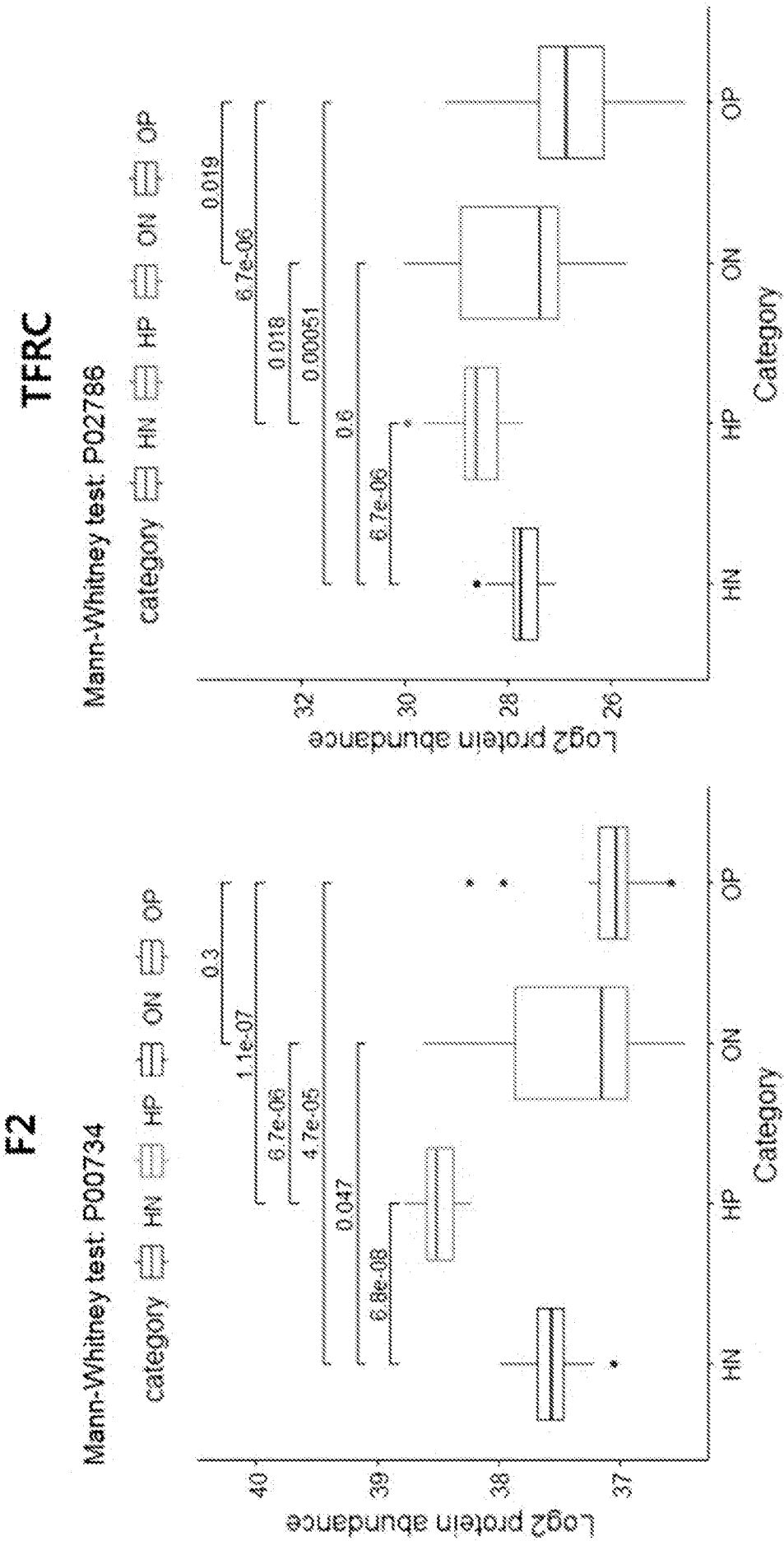
[Fig. 1e]



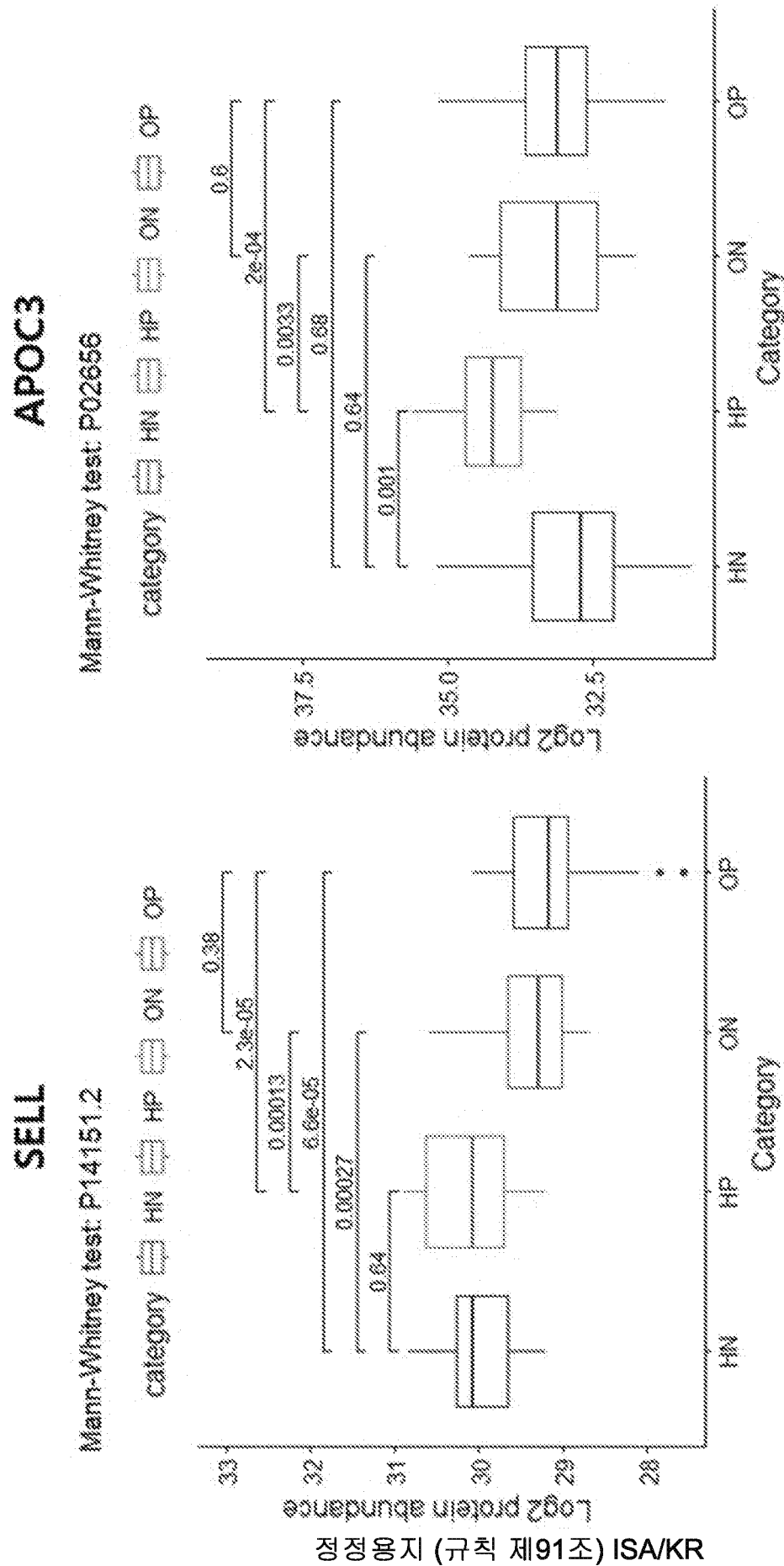
[Fig. 2a]



[Fig. 2b]



[Fig. 2c]

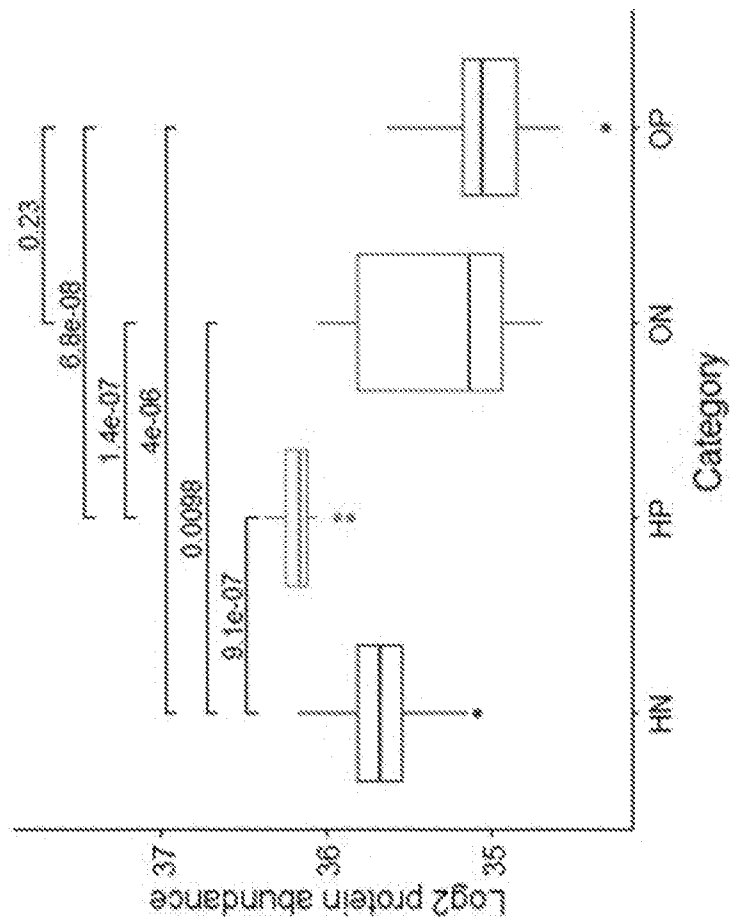


[Fig. 2d]

## SERPINF2

Mann-Whitney test: P08697

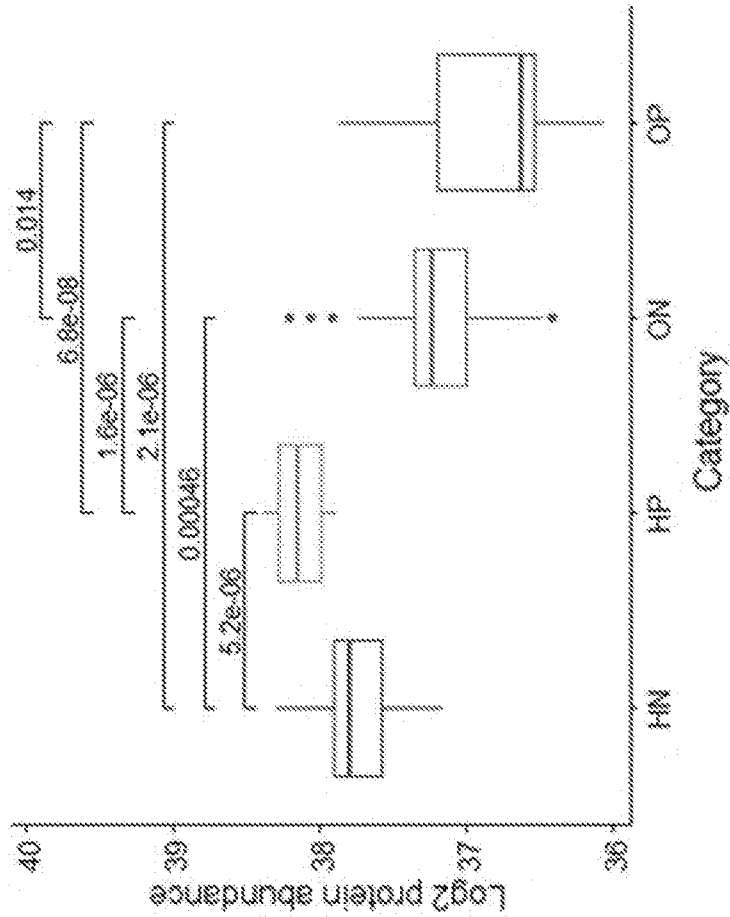
category HN HP ON OP



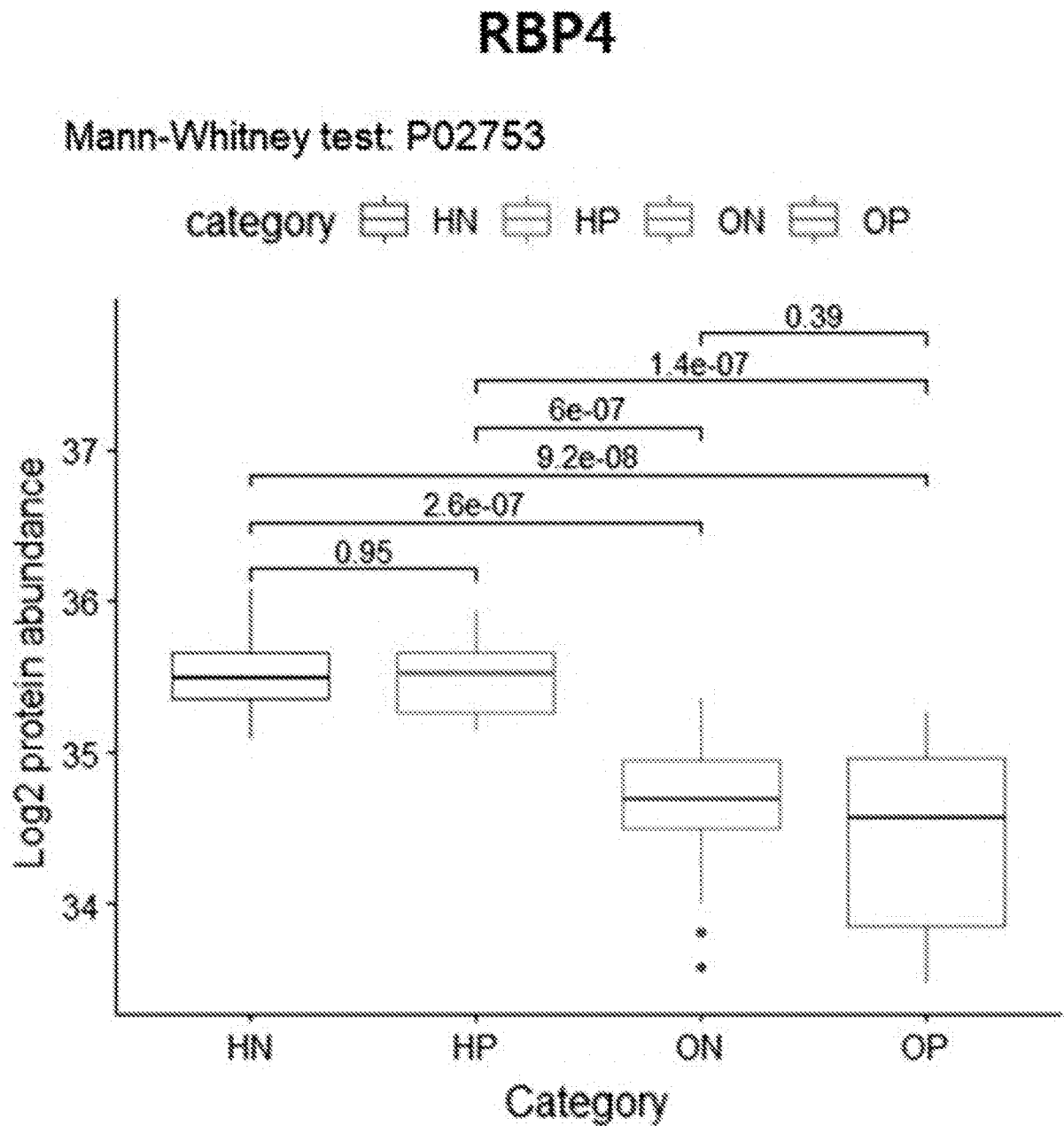
## SERPINC1

Mann-Whitney test: P01008

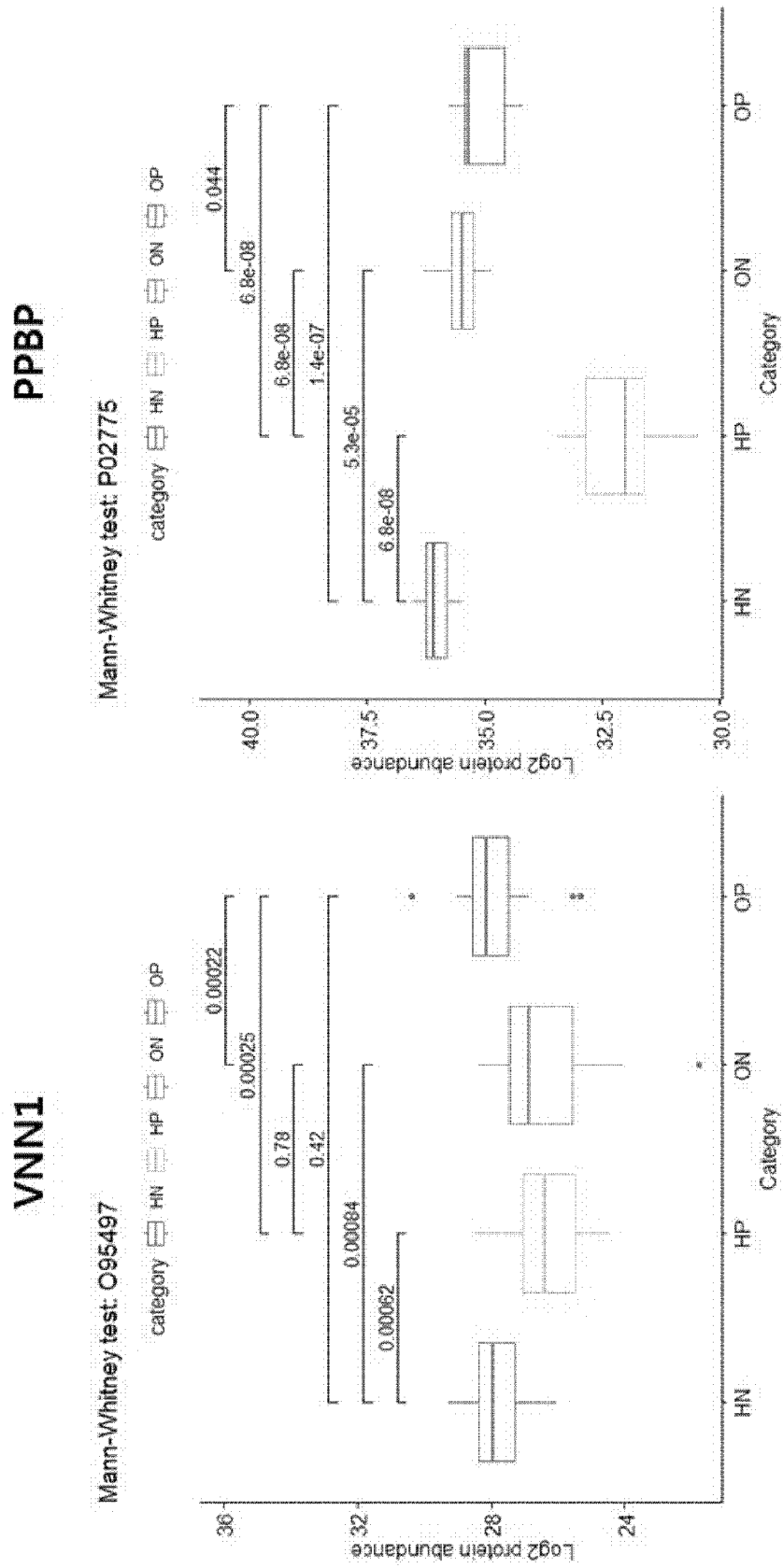
category HN HP ON OP



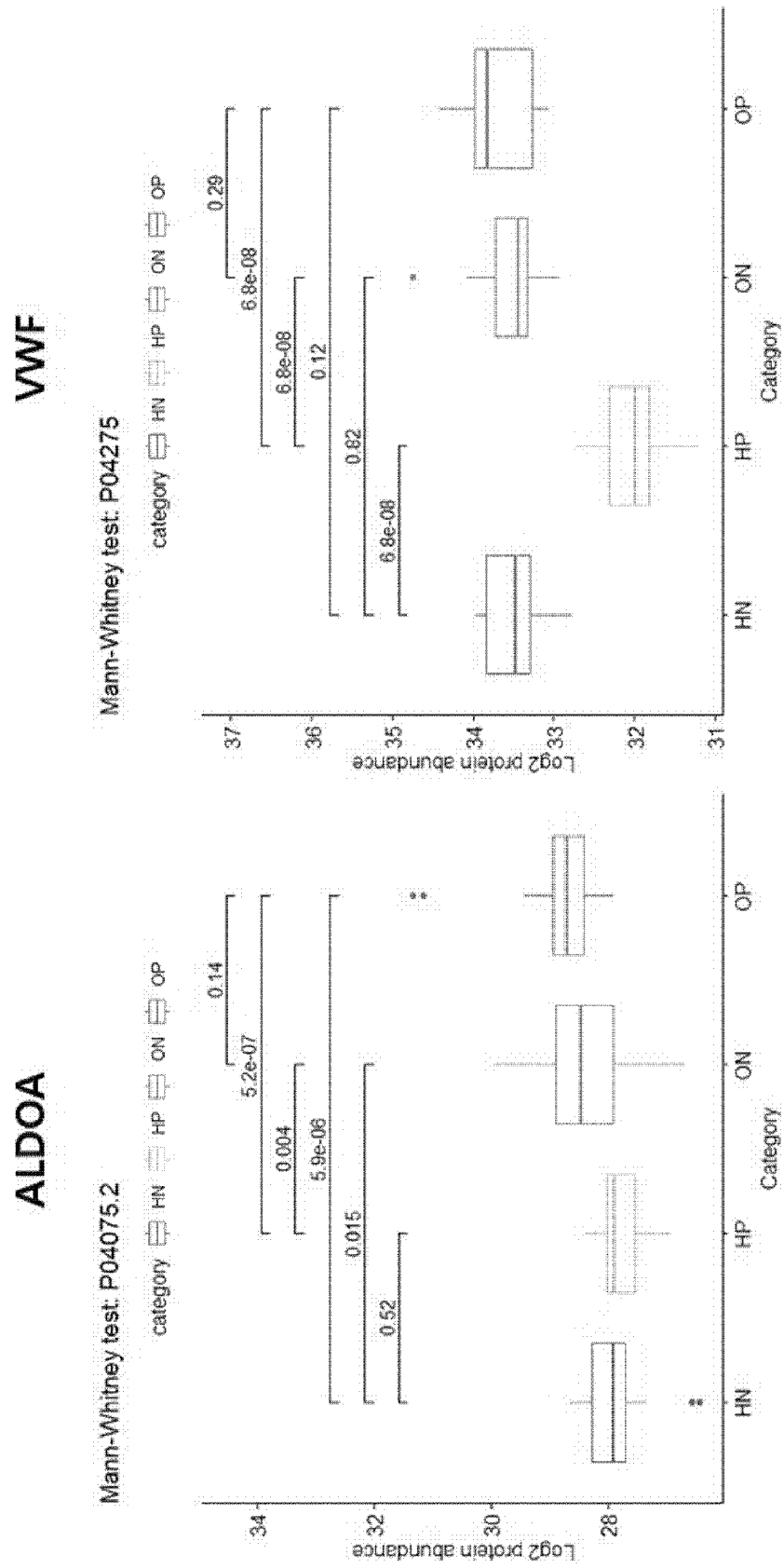
[Fig. 2e]



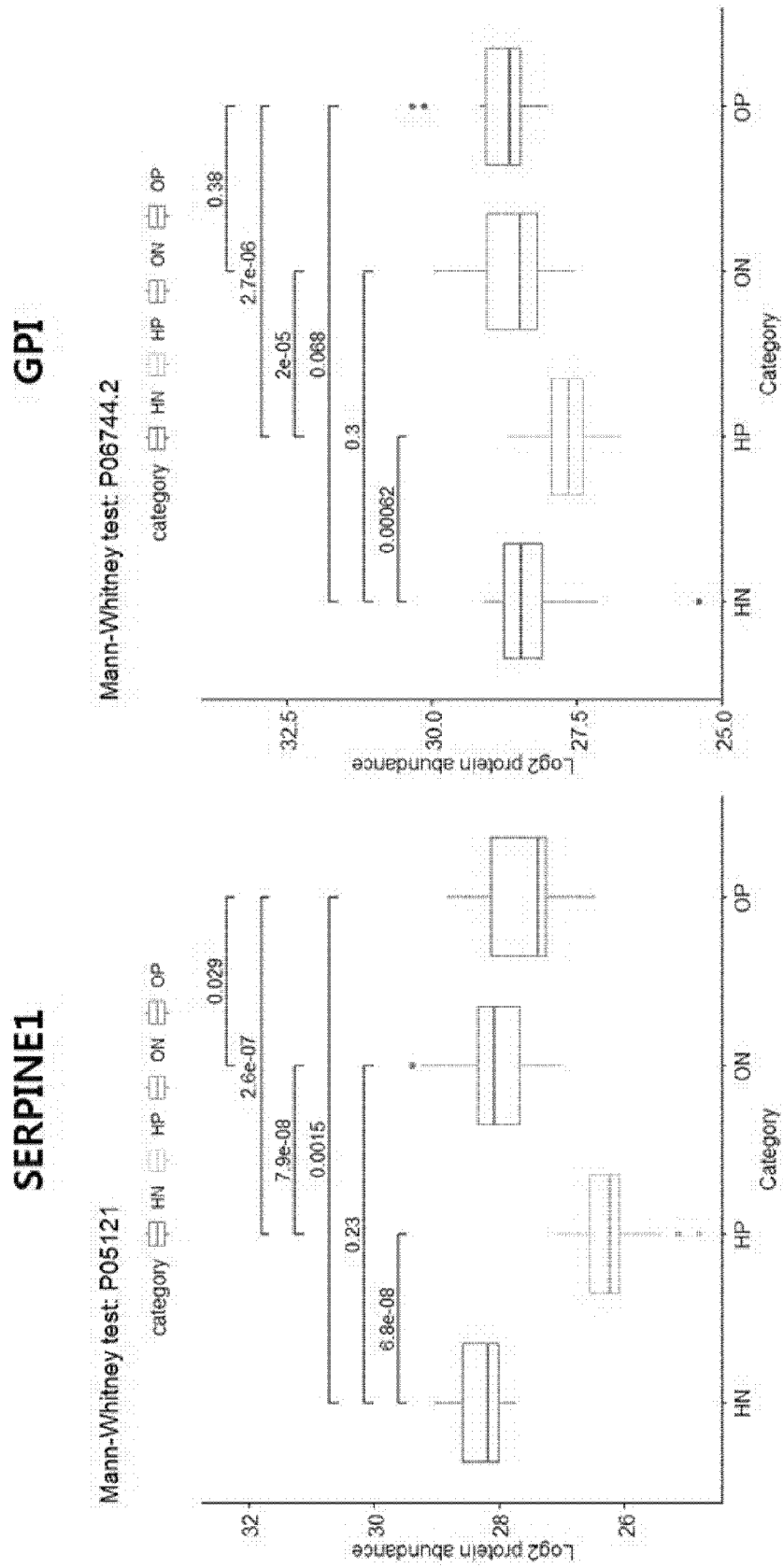
[Fig. 3a]



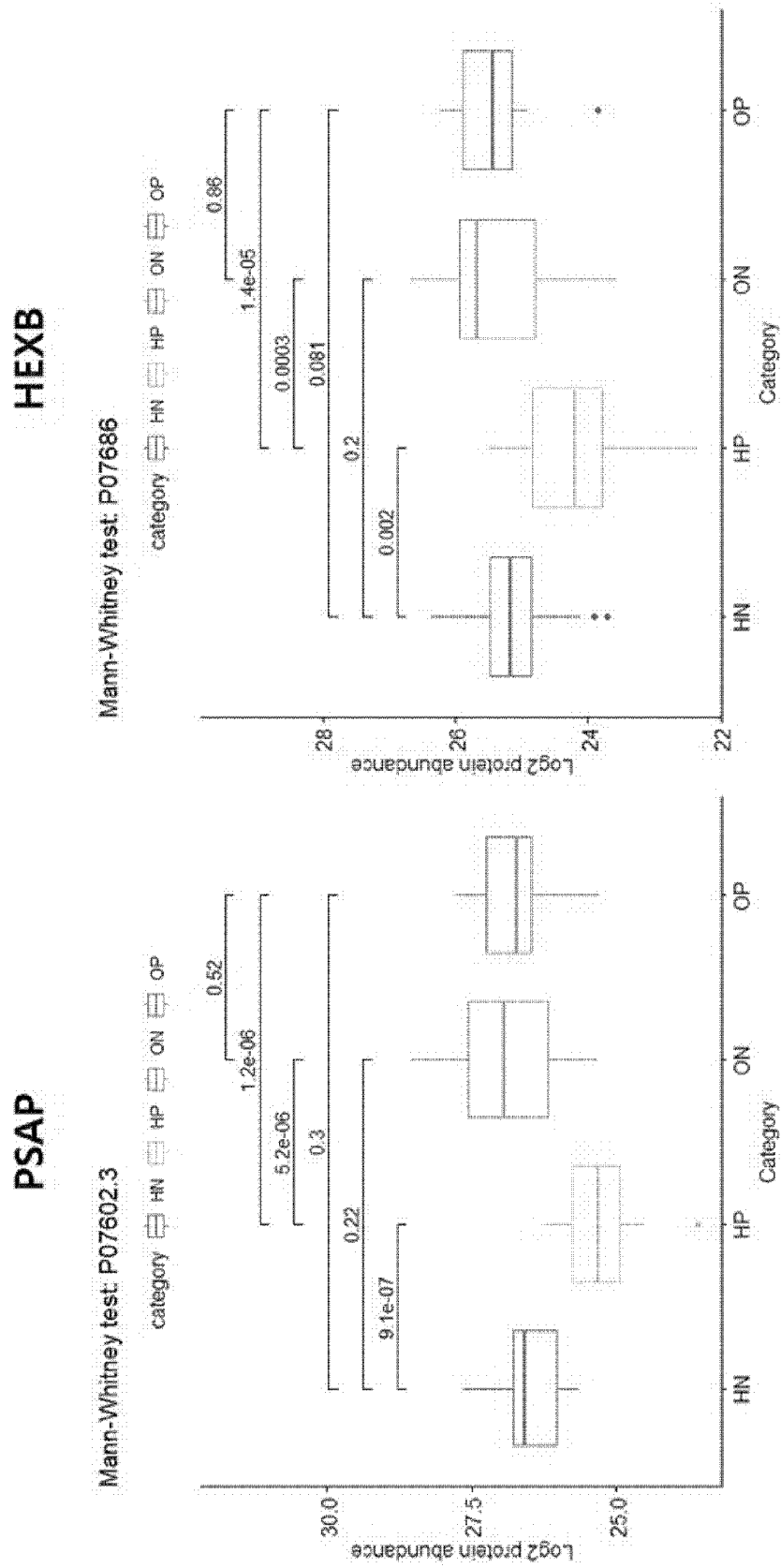
[Fig. 3b]



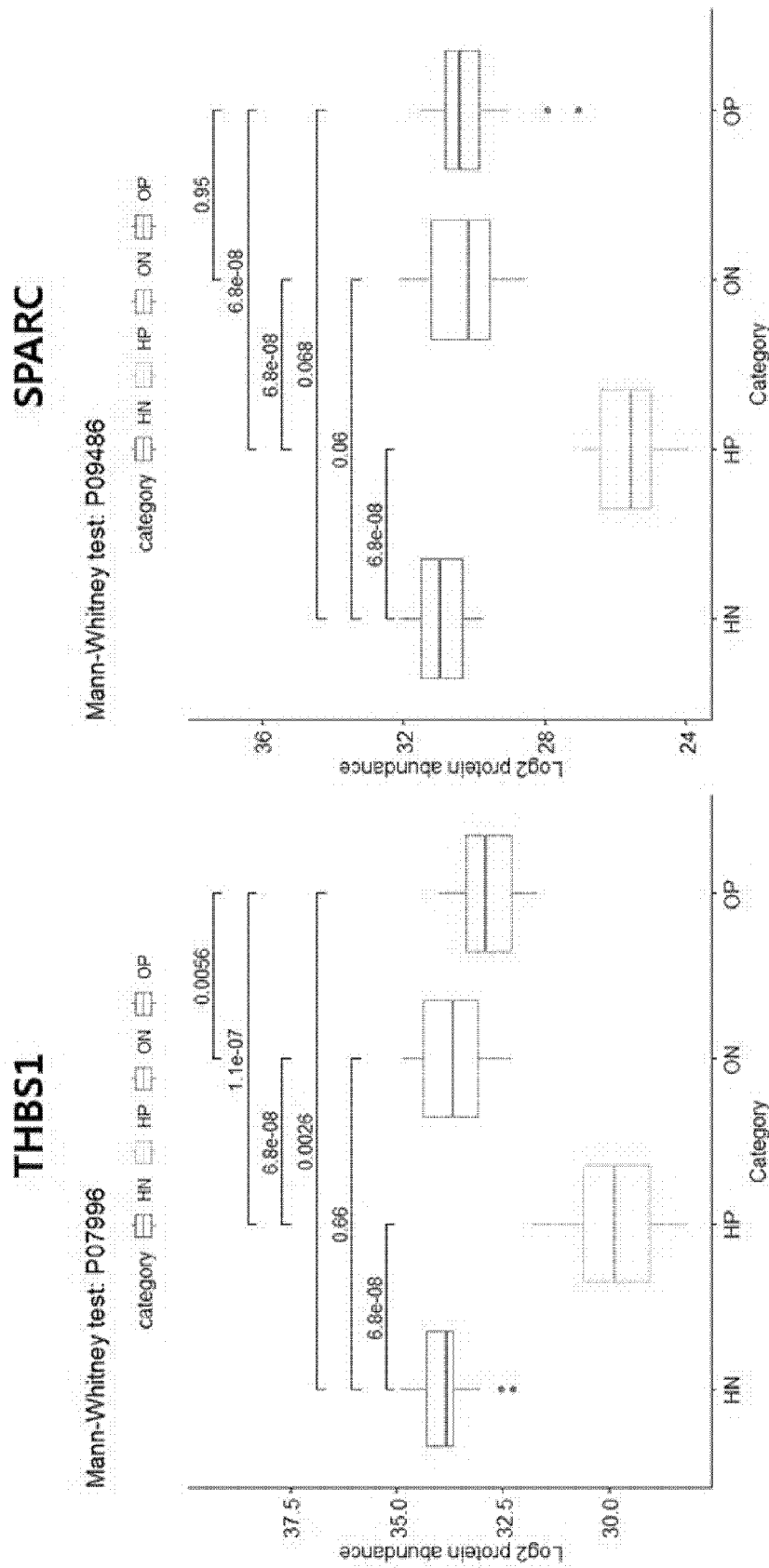
[Fig. 3c]



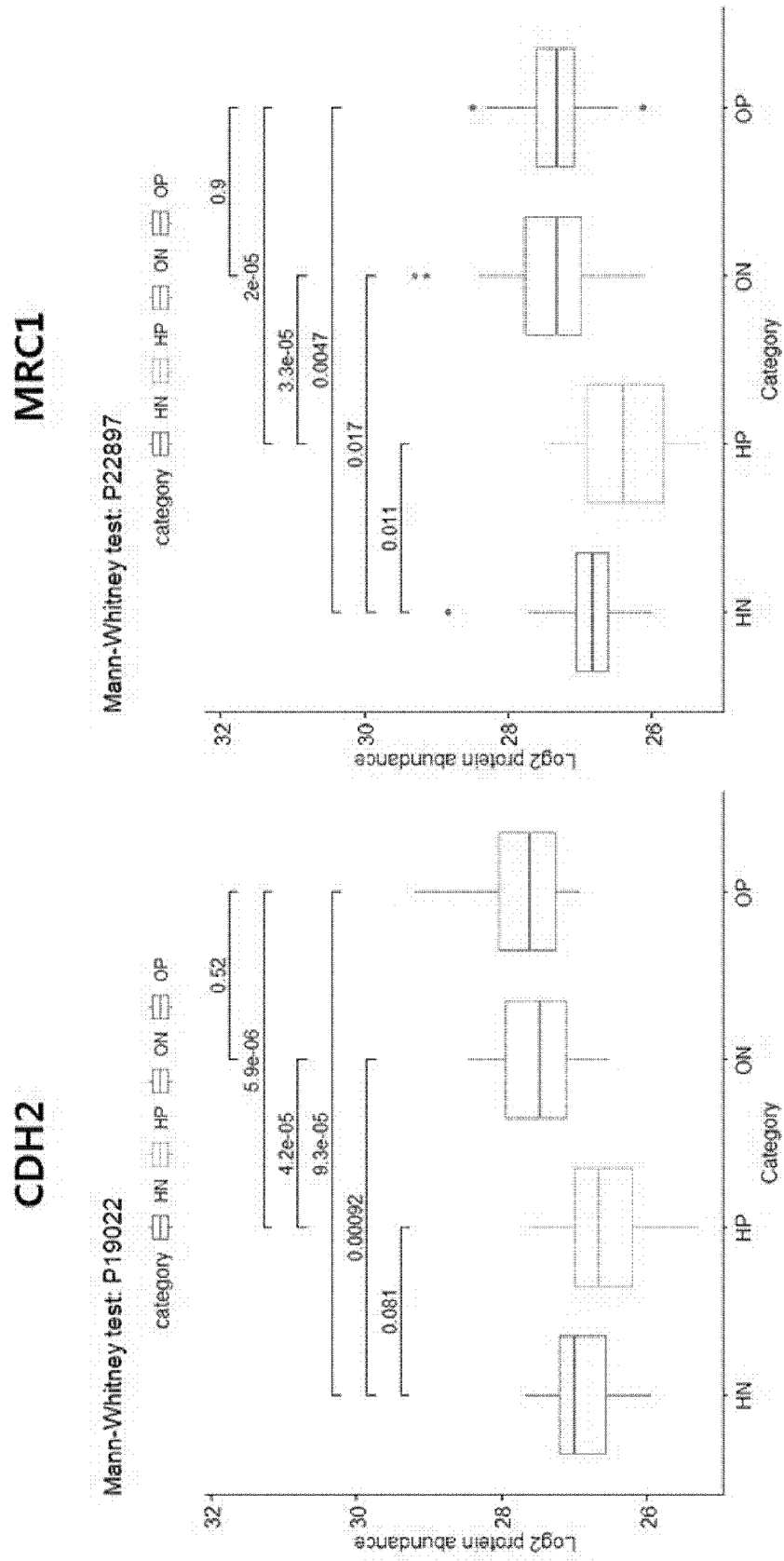
[Fig. 3d]



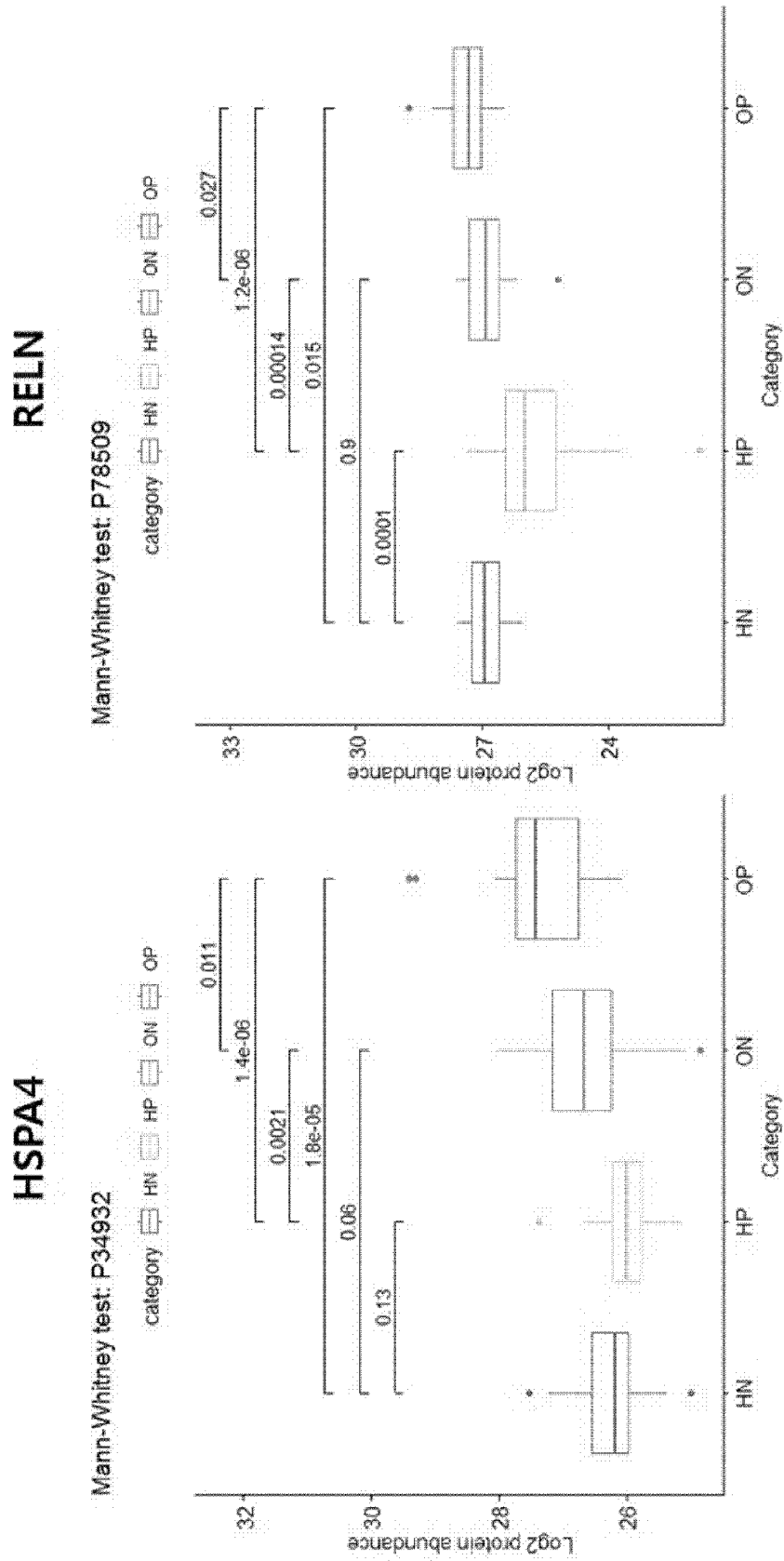
[Fig. 3e]



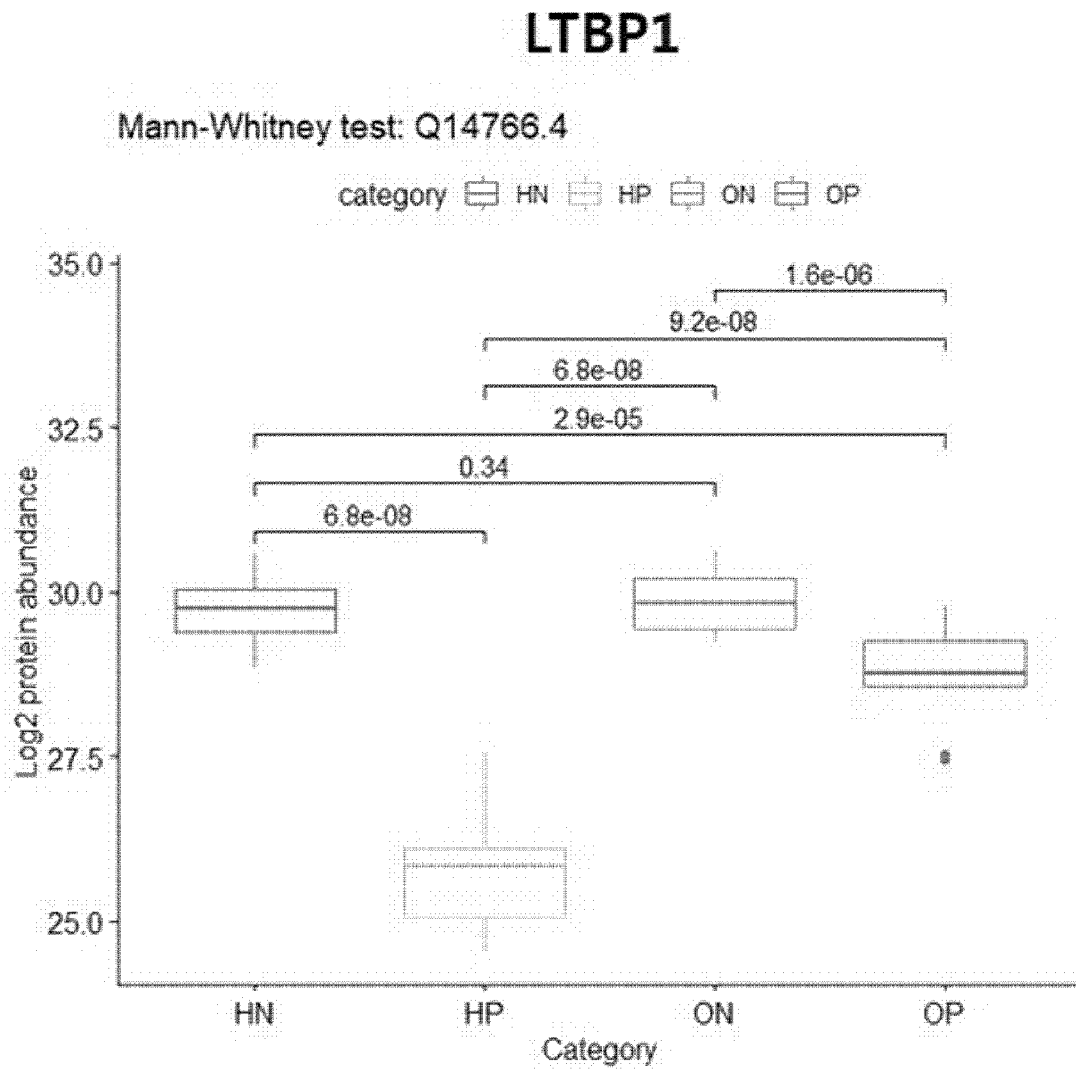
[Fig. 3f]



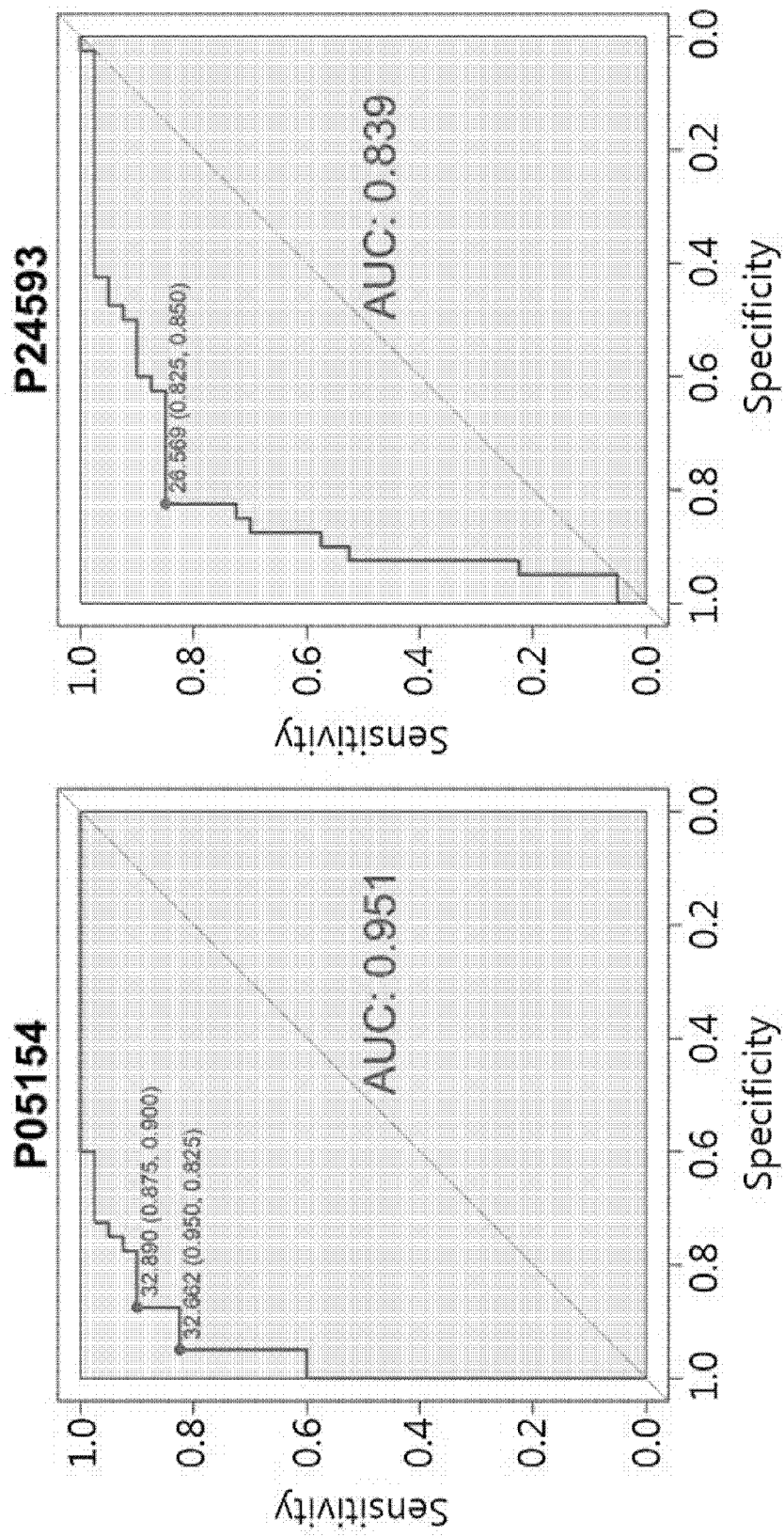
[Fig. 3g]



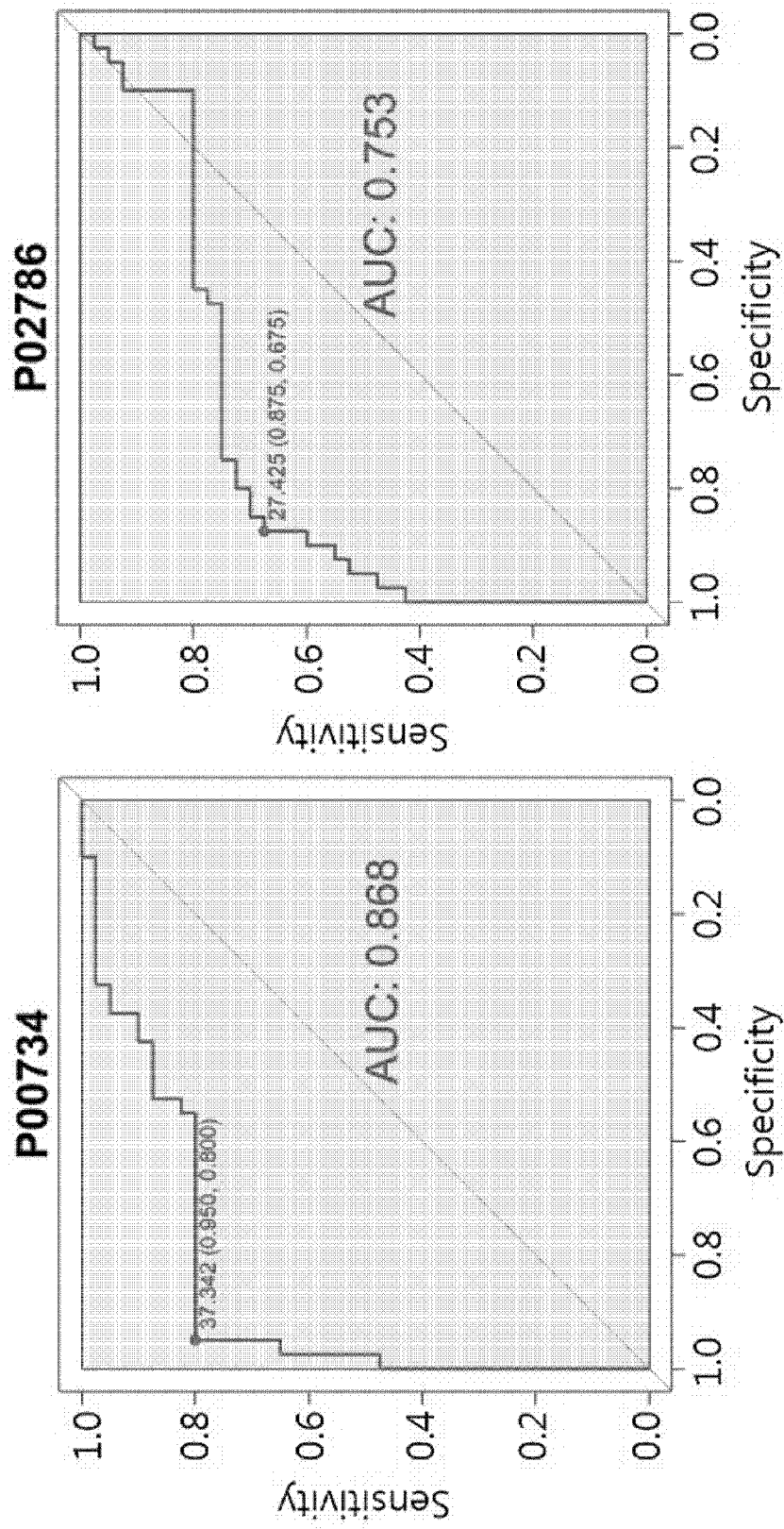
[Fig. 3h]



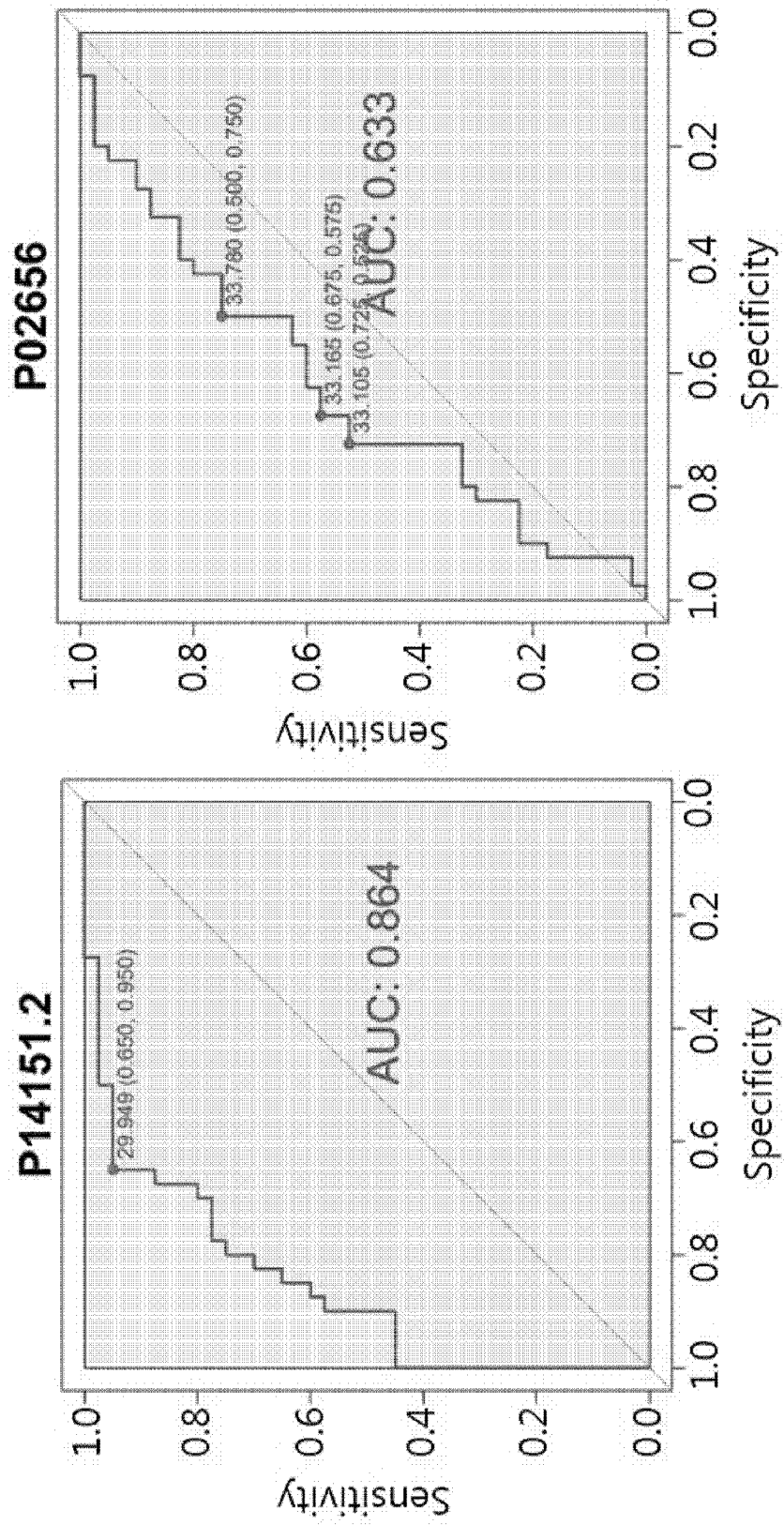
[Fig. 4a]



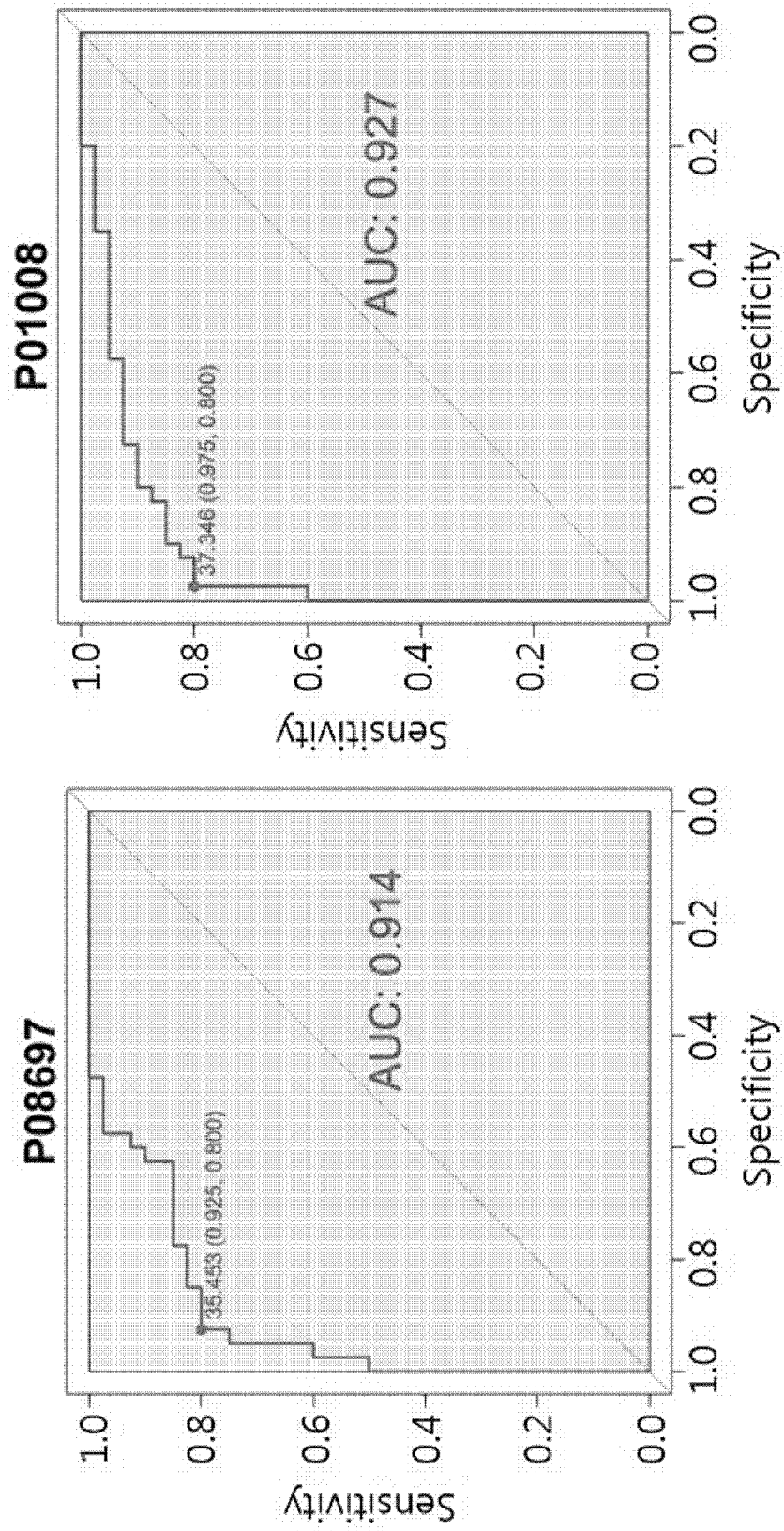
[Fig. 4b]



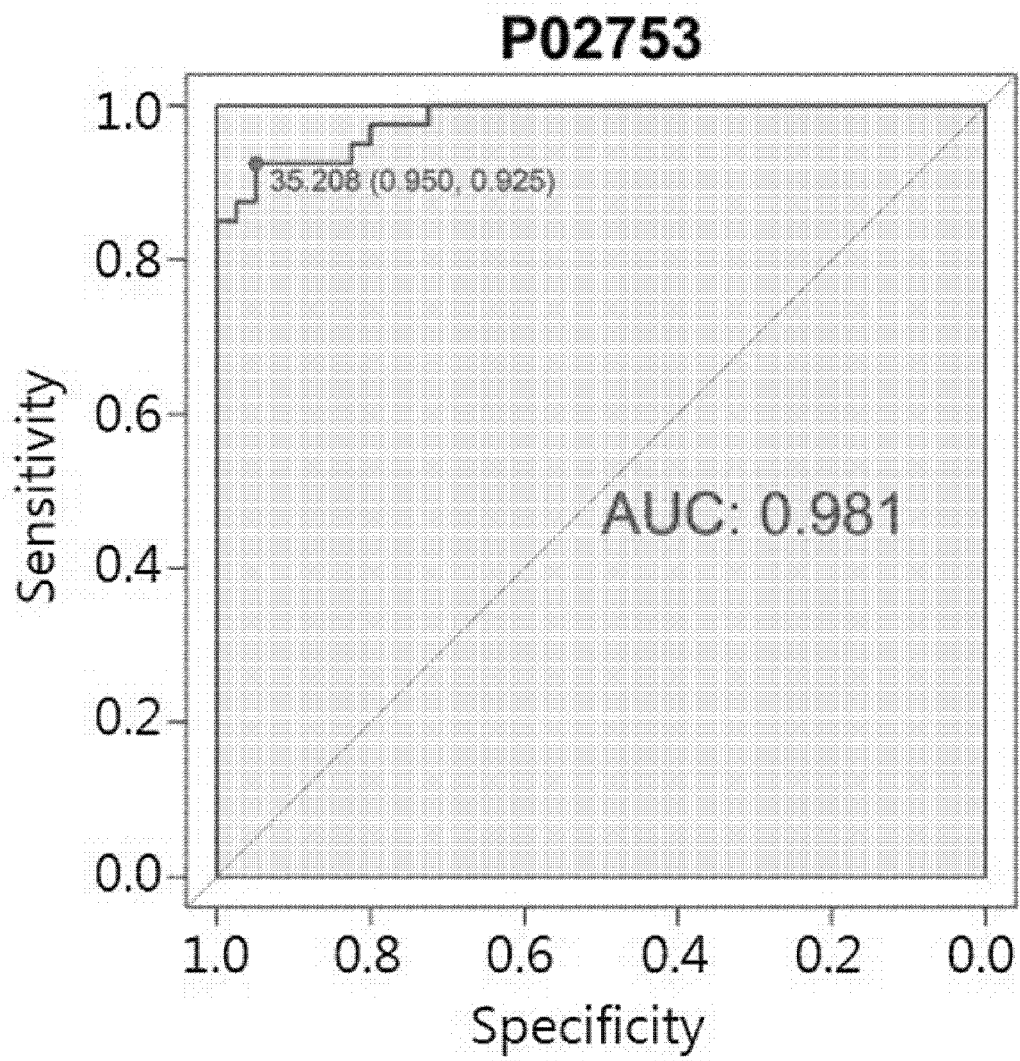
[Fig. 4c]



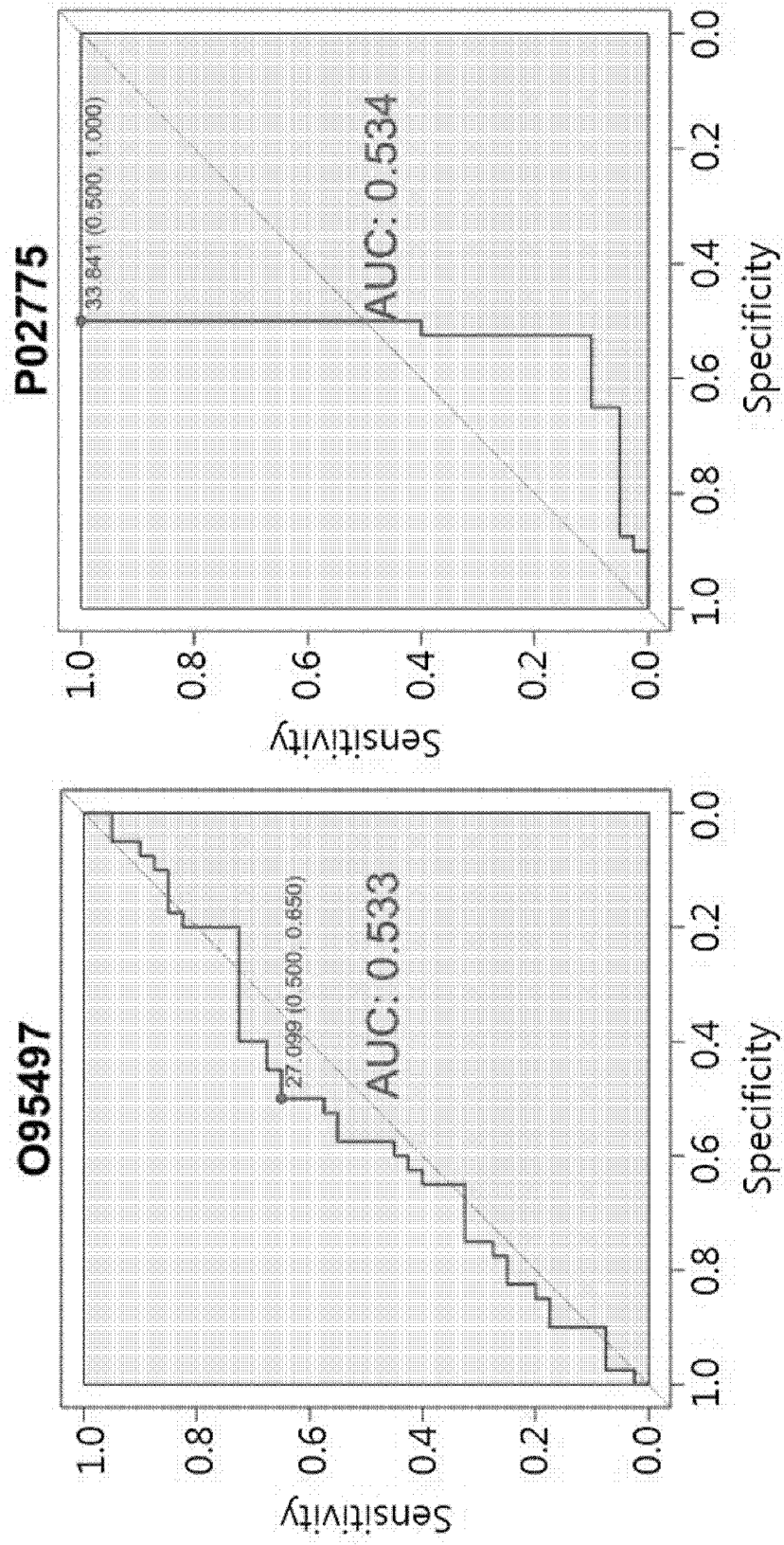
[Fig. 4d]



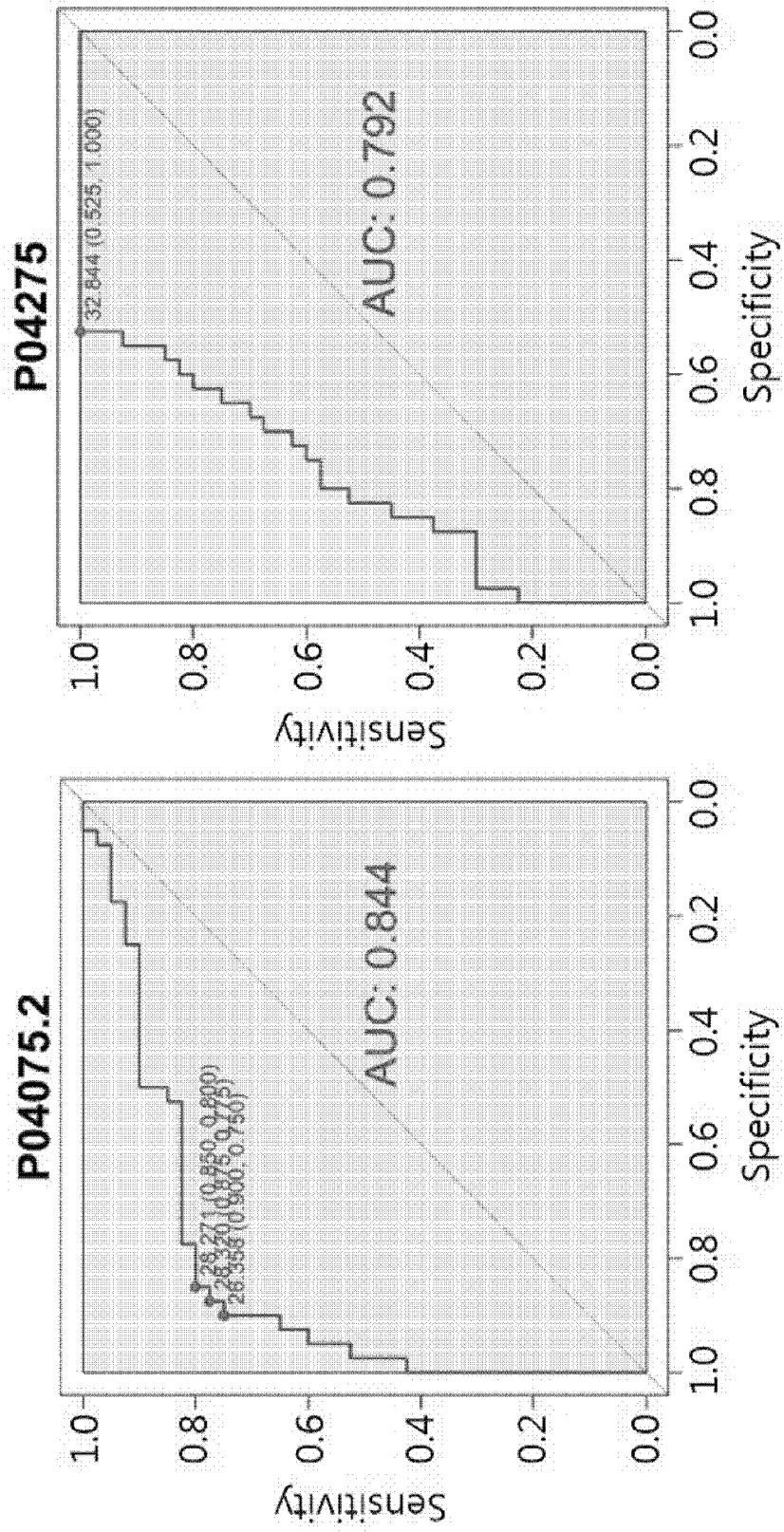
[Fig. 4e]



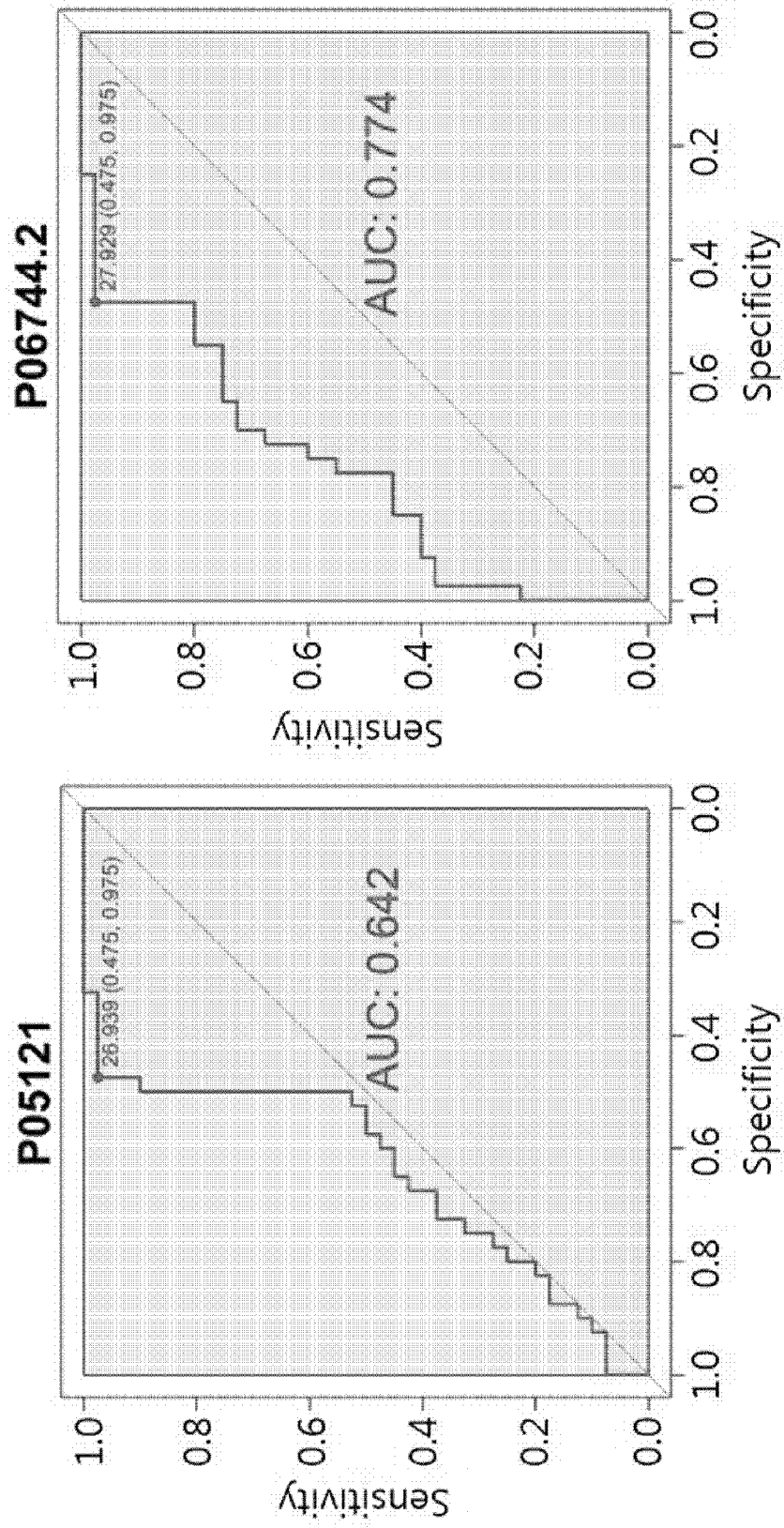
[Fig. 5a]



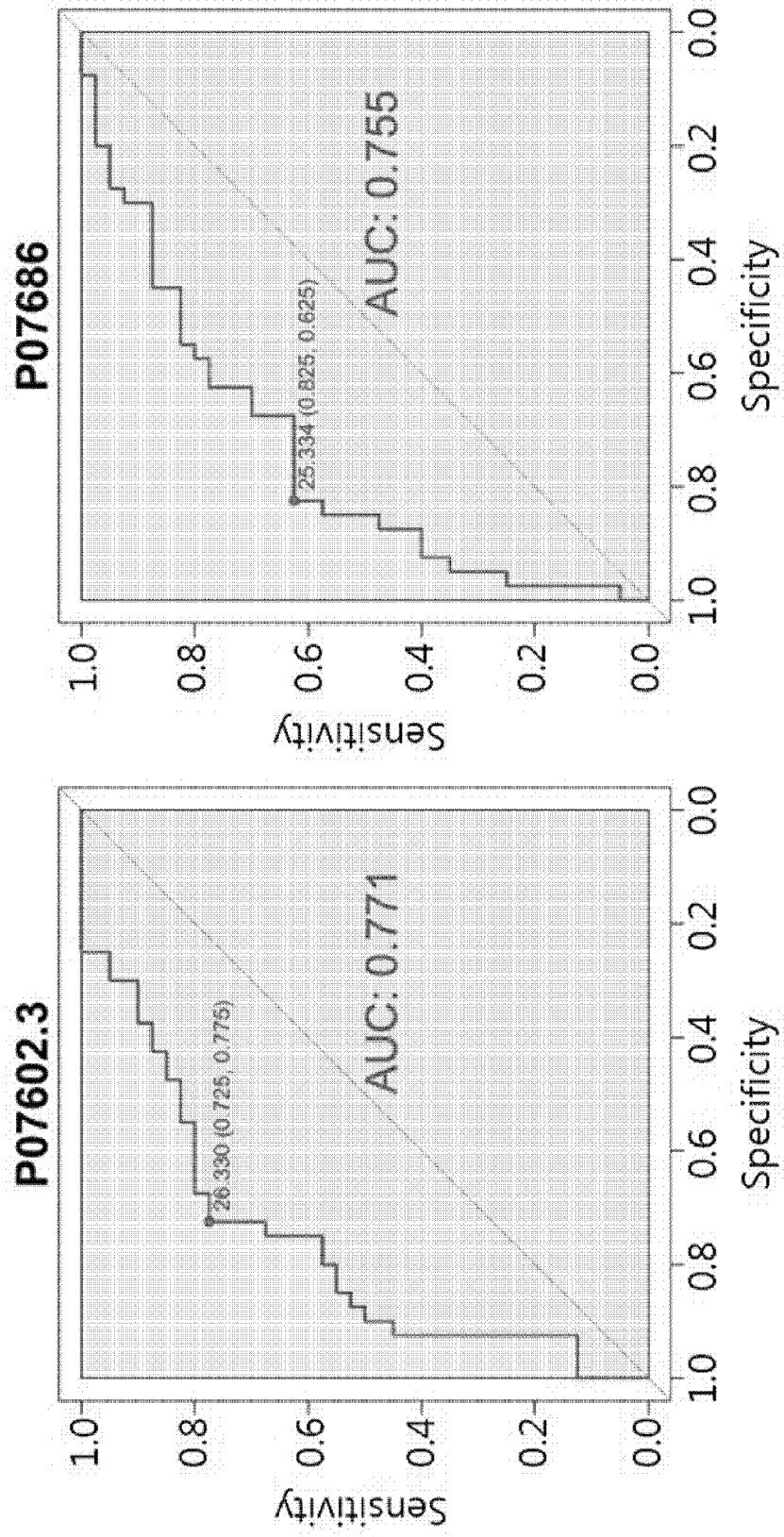
[Fig. 5b]



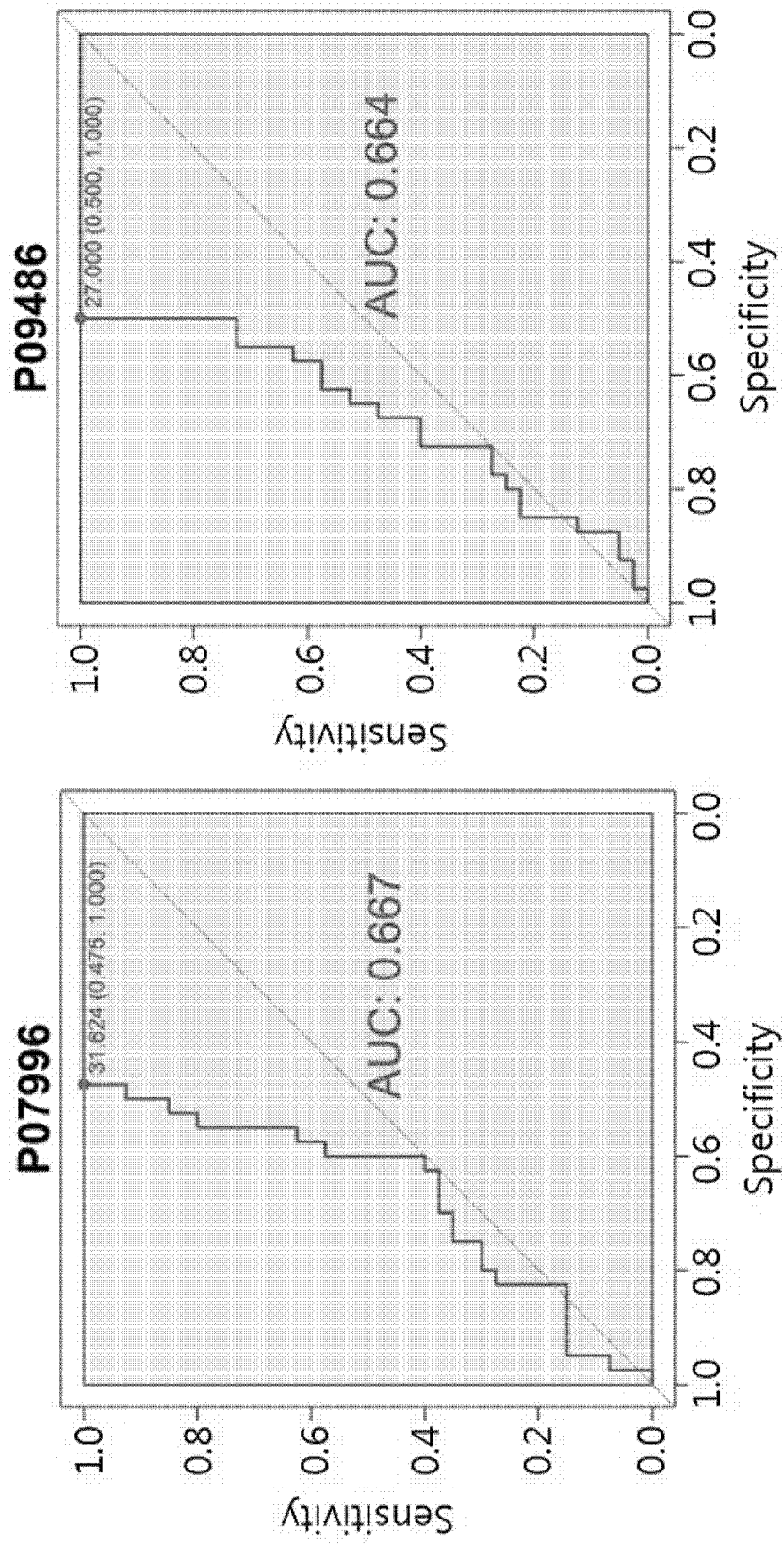
[Fig. 5c]



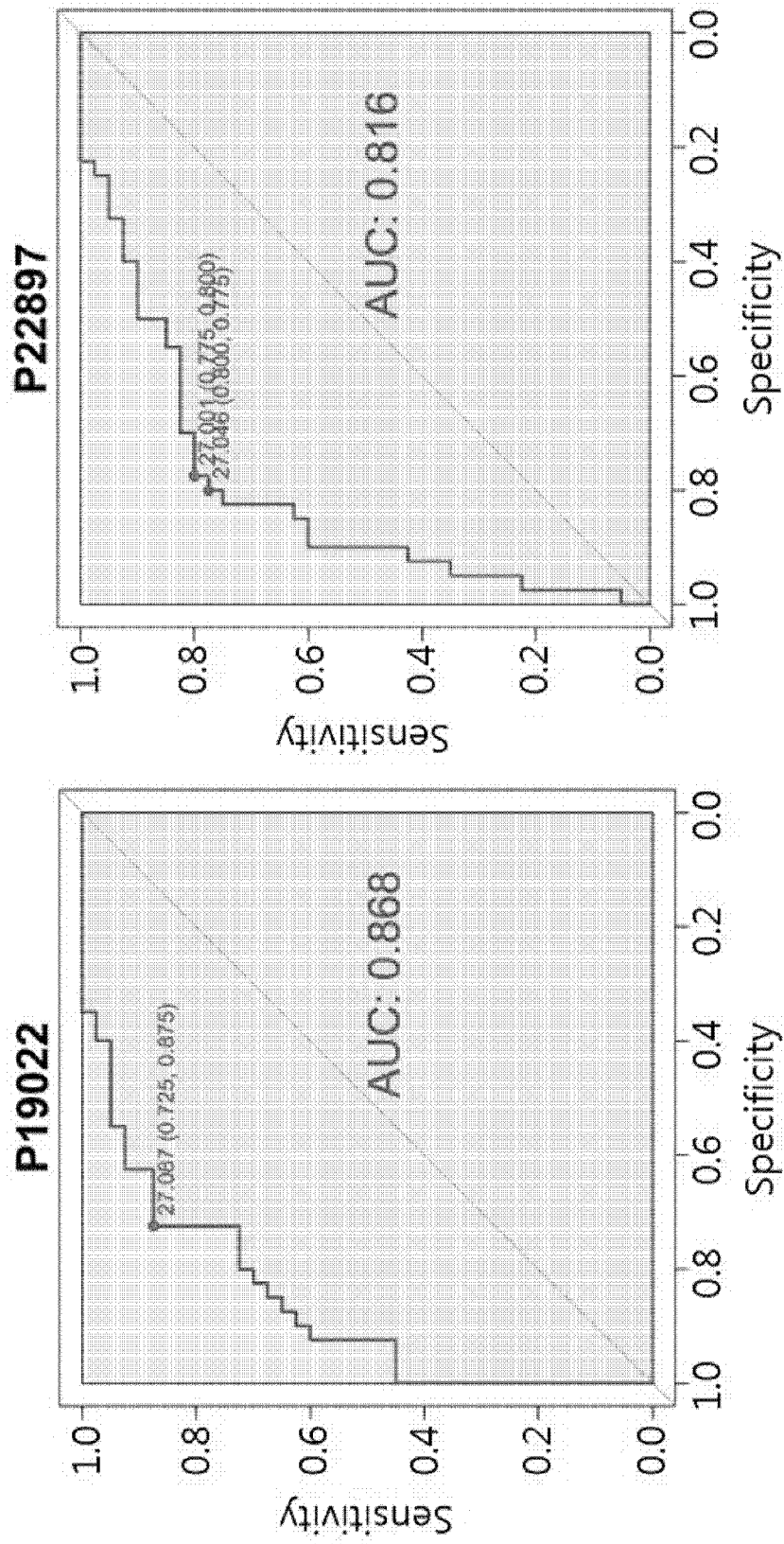
[Fig. 5d]



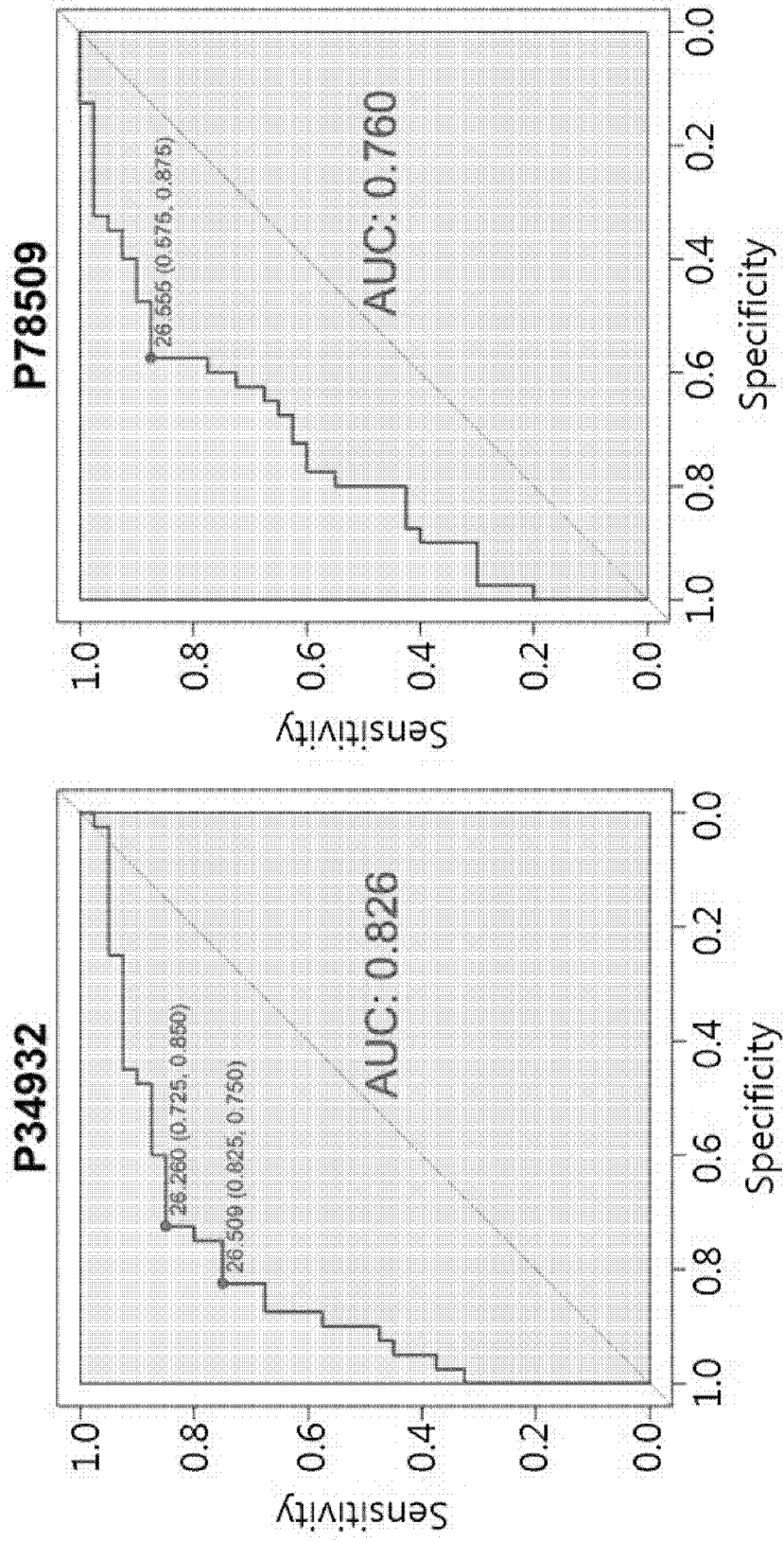
[Fig. 5e]



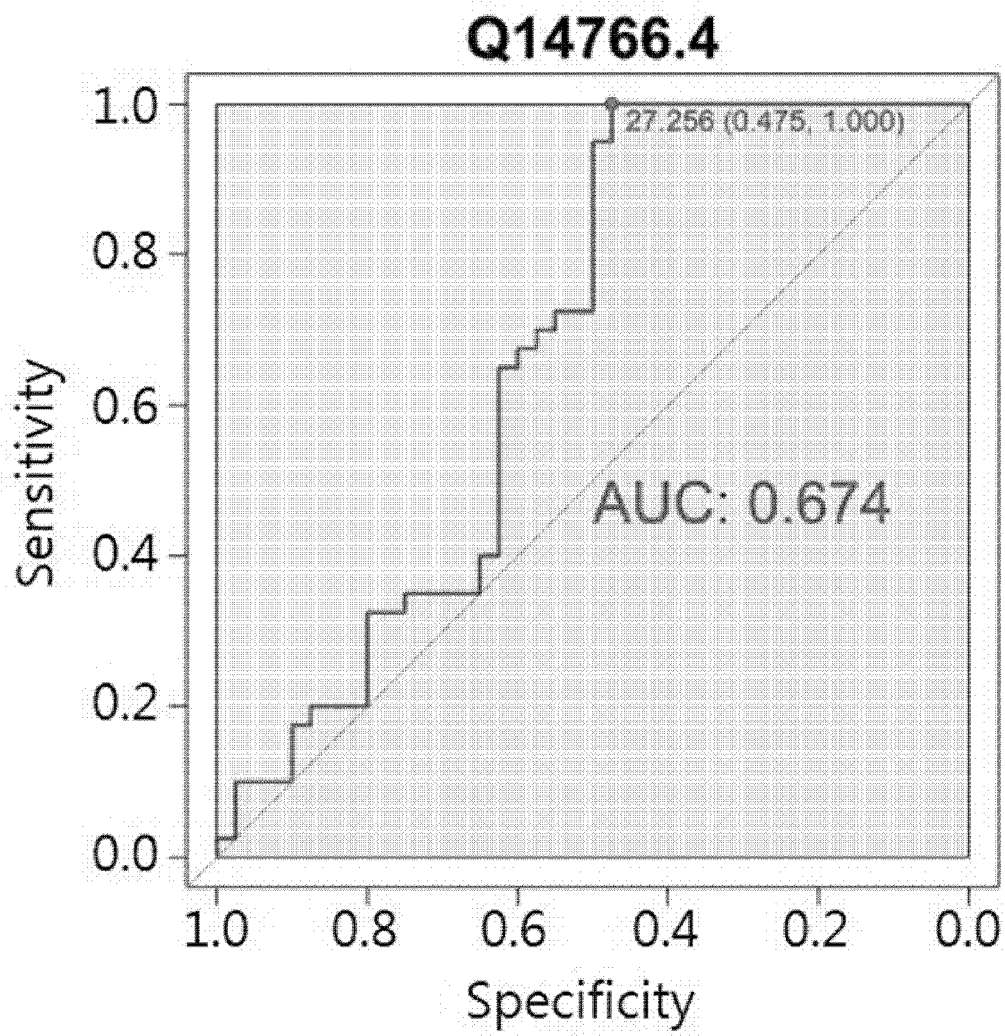
[Fig. 5f]



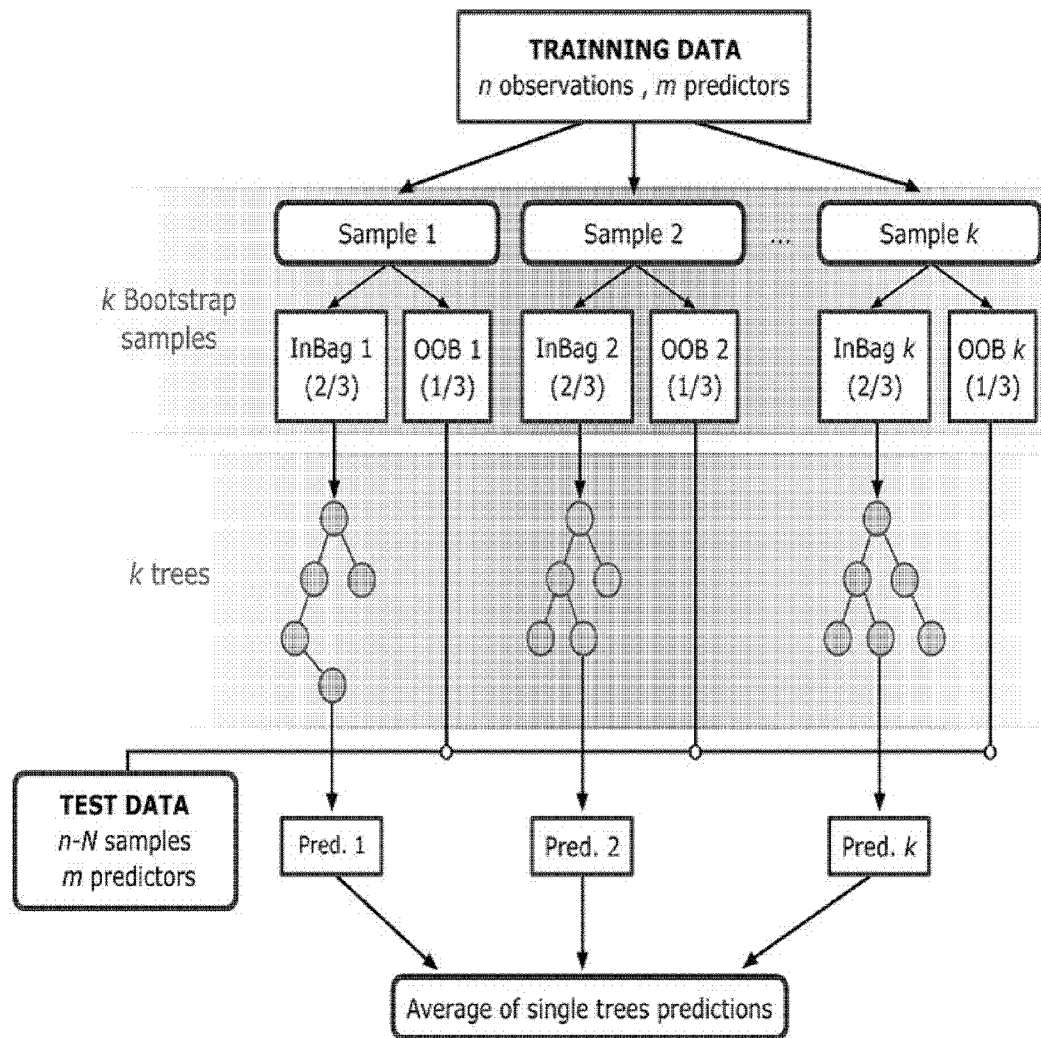
[Fig. 5g]



[Fig. 5h]



[Fig. 6]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/015660

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12Q 1/6886(2018.01)i, G01N 33/574(2006.01)i*

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6886; C12N 15/113; C12Q 001/68; C12Q 1/68; G01N 033/574; G01N 33/566; G01N 33/574

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: Hereditary ovarian cancer, biomarker, BRCA1, BRCA2, mutation

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | GB 2549763 A (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED) 01 November 2017<br>See pages 48-51, 60; claims 1, 10, 24; table A.   | 1-10,12-14            |
| Y         |                                                                                                                           | 11                    |
| Y         | US 2005-0095592 A1 (JAZAERI, Amir A et al.) 05 May 2005<br>See abstract; paragraph [0239].                                | 11                    |
| X         | US 2015-0322530 A1 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) 12 November 2015<br>See claims 1, 7.                                     | 1,3,5-8,12-14         |
| X         | US 2011-0256560 A1 (DIAMANDIS, Eleftherios P. et al.) 20 October 2011<br>See paragraph [0154]; claims 1, 34, 47; table 1. | 1,3,5-8,12-14         |
| A         | US 2007-0099209 A1 (CLARKE, Michael F. et al.) 03 May 2007<br>See the entire document.                                    | 1-14                  |



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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 MARCH 2020 (16.03.2020)

Date of mailing of the international search report

16 MARCH 2020 (16.03.2020)

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/KR2019/015660**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| GB 2549763 A                              | 01/11/2017          | None                    |                     |
| US 2005-0095592 A1                        | 05/05/2005          | WO 03-068054 A2         | 21/08/2003          |
| US 2015-0322530 A1                        | 12/11/2015          | EP 2908913 A1           | 26/08/2015          |
|                                           |                     | EP 2908913 B1           | 03/10/2018          |
|                                           |                     | US 10253368 B2          | 09/04/2019          |
|                                           |                     | WO 2014-062978 A1       | 24/04/2014          |
| US 2011-0256560 A1                        | 20/10/2011          | WO 2010-045714 A1       | 29/04/2010          |
| US 2007-0099209 A1                        | 03/05/2007          | WO 2006-135886 A2       | 21/12/2006          |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

C12Q 1/6886(2018.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6886; C12N 15/113; C12Q 001/68; C12Q 1/68; G01N 033/574; G01N 33/566; G01N 33/574

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 유전성 난소암(Hereditary ovarian cancer), 바이오마커(biomarker), BRCA1, BRCA2, 돌연변이(mutation)

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                              | 관련 청구항           |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| X     | GB 2549763 A (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED) 2017.11.01<br>페이지 48-51, 60; 청구항 1, 10, 24; 표 A 참조. | 1-10, 12-14      |
| Y     |                                                                                                         | 11               |
| Y     | US 2005-0095592 A1 (JAZAERI, AMIR A 등) 2005.05.05<br>요약; 단락 [0239] 참조.                                  | 11               |
| X     | US 2015-0322530 A1 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) 2015.11.12<br>청구항 1, 7 참조.                             | 1, 3, 5-8, 12-14 |
| X     | US 2011-0256560 A1 (DIAMANDIS, ELEFTHERIOS P. 등) 2011.10.20<br>단락 [0154]; 청구항 1, 34, 47; 표 1 참조.        | 1, 3, 5-8, 12-14 |
| A     | US 2007-0099209 A1 (CLARKE, MICHAEL F. 등) 2007.05.03<br>전체 문헌 참조.                                       | 1-14             |

☐ 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 03월 16일 (16.03.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 03월 16일 (16.03.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



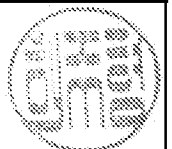
대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌            | 공개일        |
|-----------------------|------------|-------------------|------------|
| GB 2549763 A          | 2017/11/01 | 없음                |            |
| US 2005-0095592 A1    | 2005/05/05 | WO 03-068054 A2   | 2003/08/21 |
| US 2015-0322530 A1    | 2015/11/12 | EP 2908913 A1     | 2015/08/26 |
|                       |            | EP 2908913 B1     | 2018/10/03 |
|                       |            | US 10253368 B2    | 2019/04/09 |
|                       |            | WO 2014-062978 A1 | 2014/04/24 |
| US 2011-0256560 A1    | 2011/10/20 | WO 2010-045714 A1 | 2010/04/29 |
| US 2007-0099209 A1    | 2007/05/03 | WO 2006-135886 A2 | 2006/12/21 |