

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 2월 26일 (26.02.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/026171 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/007760
- (22) 국제출원일: 2014년 8월 21일 (21.08.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0098855 2013년 8월 21일 (21.08.2013) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWHY UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김승철 (KIM, Seung Cheol); 137-949 서울시 서초구 잠원로 37-48, 201동 903호, Seoul (KR). 유병철 (YOO, Byong Chul); 410-716 경기도 고양시 일산동구 강석로 110, 523동 1203호, Gyeonggi-do (KR). 김경희 (KIM, Kyung-Hee); 137-830 서울시 서초구 동광로 11길 21, 301호, Seoul (KR). 김윤환 (KIM, Yun

Hwan); 448-980 경기도 용인시 수지구 성복2로 174, 108동 1302호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 안소영 (AHN, So-Young); 137-881 서울시 서초구 서초대로 344, 4층 안소영 국제특허법률사무소, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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.

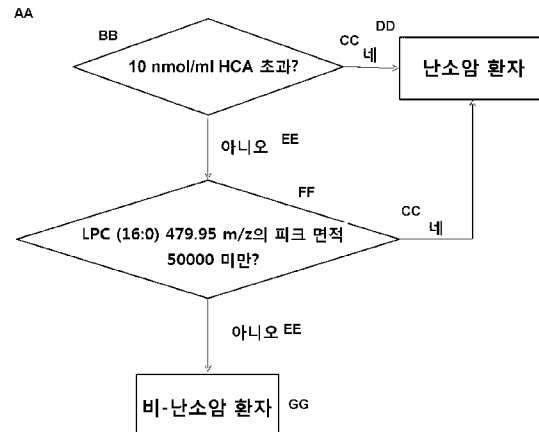
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR DIAGNOSING OVARIAN CANCER, CONTAINING LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE AND HOMOCYSTEIC ACID, AND METHOD FOR DIAGNOZING OVARIAN CANCER BY USING SAME

(54) 발명의 명칭: 리소포스파티딜콜린 및 호모시스테인산을 포함하는 난소암 진단용 조성물 및 이를 사용하여 난소암을 진단하는 방법

AA ... L-호모시스테인산 및 LPC (16:0)을 이용한 난소암 환자의 층화 스크리닝



AA ... Stratified screening of patient with ovarian cancer by using homocysteic acid and LPC (16:0)
BB ... Does it exceed 10 nmol/ml HCA?
CC ... Yes
DD ... Patient with ovarian cancer
EE ... No
FF ... Is peak area of LPC (16:0) 479.95 m/z less than 50,000?
GG ... Patient with non-ovarian cancer

(57) Abstract: The present invention relates to diagnosis of ovarian cancer by using lysophosphatidylcholine (16:0) and homocysteic acid, which are low-mass ions present in a biological sample. The present invention allows ovarian cancer to be diagnosed with accuracy and rapidity at low cost, and thus is expected to be applied to early diagnosis and treatment of ovarian cancer so as to give importance thereto.

(57) 요약서: 본 발명은 생물학적 시료 내에 존재하는 저질량 이온인 리소포스파티딜콜린(16:0) 및 L-호모시스테인산을 이용한 난소암 진단에 관한 것이다. 본 발명을 이용하면 저렴한 비용으로 신속하고 정확하게 난소암을 진단할 수 있으므로, 난소암을 조기에 진단하여 치료하는 데 중요하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, **공개:**

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).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 리소포스파티딜콜린 및 호모시스테인산을 포함하는 난소암 진단용 조성물 및 이를 사용하여 난소암을 진단하는 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 생물학적 시료 내에 존재하는 저질량 이온인 리소포스파티딜콜린(16:0) 및 L-호모시스테인산을 이용한 난소암 진단에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 난소암은 난소에 발생하는 악성 종양으로 50~70세 사이에 제일 많이 발생한다. 2002년 우리나라 통계에 의하면 매년 약 1,000~1,200명 정도가 새로 발병하고 있으며, 자궁 경부암에 이어 두번째로 흔한 부인과 암이다. 난소암의 약 90%를 차지하는 상피성 난소암은 대부분 3기 이상의 진행된 상태에서 발견되기 때문에 5년 생존율이 매우 나빠 40%가 채 되지 않는다.
- [3] 난소암은 증상이 미미하여 약 60%정도가 이미 상당히 진행된 상태에서 병원을 찾게 되므로, 증상이 없더라도 1년에 한 번 정도는 정기적인 검진을 받는 것이 권장되고 있다. 현재 사용되고 있는 진단 방법으로는 병력 및 가족력의 문진, 난소의 촉진, 초음파 검사 및 혈액검사를 통해 CA125 바이오마커의 발현이 증가했는지 여부를 확인하는 방법 등이 있으며, 암이 의심되는 경우 CT 또는 MRI를 이용하여 확진하고 있다. 그러나 상기 방법들은 난소암이 이미 어느 정도 진행된 이후에야 난소암을 진단할 수 있고, 진단이 부정확하며 진단시 환자에게 불편을 야기한다는 단점이 있다.
- [4] 한편, MALDI-TOF 질량분석기를 이용하면 혈액 내 이온의 스펙트럼을 추출할 수 있다. 기존 단백질체 연구들에 이용된 질량 분석은 주로 800 내지 2500 m/z 질량값 범위를 분석 대상으로 하였는데, 그 범위가 단백질이 트립신으로 잘려졌을 경우 펩타이드의 질량값 영역이기 때문이다. 또한, MALDI-TOF 질량분석기를 이용하면 저질량 이온의 질량 스펙트럼도 추출할 수 있다. 그러나 약 800 m/z 이하의 저질량 대역은 분석 대상이 아닌 매트릭스(matrix)의 피크(peak)들이 혼재하는 영역이기 때문에 그동안 이 영역에 대한 연구가 활발하지는 않았다.
- [5] MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 추출된 질량 스펙트럼은 현재 상용되고 있는 MarkerView™ 소프트웨어의 주성분 분석 기반 선형 판별 분석(principal component analysisbased linear discriminant analysis, PCA-DA)을 이용하여 진단에 이용할 수 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 저질량 이온인 리소포스파티딜콜린(16:0) 및

- L-호모시스테인산을 포함하는 난소암 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 대상의 생물학적 시료에서 리소포스파티딜콜린(16:0) 및 L-호모시스테인산을 검출하여 난소암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [8] 또한 본 발명의 목적은 리소포스파티딜콜린(16:0) 및 L-호모시스테인산을 이용한 난소암 진단용 키트를 제공하는 데 있다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 리소포스파티딜콜린(16:0) 및 L-호모시스테인산의 양을 변화시키는지 여부를 측정하여 난소암 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 과제를 달성하기 위하여, 본 발명자들은 난소암 환자의 생물학적 시료의 질량 스펙트럼에서 일관되게 비-난소암 환자와 유의성 있는 차이를 나타내는 2개의 피크를 선별하고 상기 피크가 각각 저질량 이온인 리소포스파티딜콜린(16:0) 및 L-호모시스테인산임을 규명하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [11] 이에 본 발명은 리소포스파티딜콜린(16:0)(Lysophosphatidylcholine (16:0), LPC (16:0)) 및 L-호모시스테인산(L-Homocysteic acid, HCA)을 포함하는 난소암 진단용 조성물을 제공한다.
- [12] 리소포스파티딜콜린(16:0)은 리소인지질(lysophospholipid)의 일종인 리소포스파티딜콜린 중에서 16개의 탄소가 연결되어 이중결합 없이 단일 결합으로만 연결된 것을 의미한다.
- [13] L-호모시스테인산은 천연 아미노산으로서, 치매 및 심장 질환에서 그 수치가 높아지는 것으로 알려져 있다.
- [14] 본 발명자들은 리소포스파티딜콜린(16:0)과 L-호모시스테인산을 함께 진단에 이용하면 난소암 진단 효과가 매우 우수함을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다. 일 예로, 본 명세서의 도 11에 모식도로 나타낸 방법을 이용할 경우 난소암 진단의 민감도는 88.0%, 특이도는 73.68%로 고루 우수하게 나타났다.
- [15] 또한 본 발명은 1) 대상에서 추출한 생물학적 시료에서 L-호모시스테인산의 양을 측정하는 단계; 및 2) 대상에서 추출한 생물학적 시료에서 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양을 측정하는 단계를 포함하는, 난소암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [16] L-호모시스테인산 또는 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양의 많고 적음은 상대적인 것으로, 측정 조건, 측정 키트 또는 기기 및 시료의 양 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 동일한 여건하에서 음성대조군인 비-난소암 환자의 생물학적 시료 및/또는 양성대조군인 난소암 환자의 생물학적 시료와 대상의 생물학적 시료 내의 L-호모시스테인산 또는 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양을 비교하여 대상이 난소암 환자인지 여부를 진단할 수 있다. 또는 표준 여건 하에서 얻은

비-난소암 환자 및 난소암 환자의 표준적인 수치 데이터를 이용하여 대상의 진단에 이용할 수도 있다.

- [17] 상기 방법에 있어서, 상기 1)단계 또는 상기 2)단계는 A) 대상에서 추출한 생물학적 시료의 질량 스펙트럼을 획득하는 단계; 및 B) 상기 질량 스펙트럼과 비-난소암 환자의 질량 스펙트럼 또는 난소암 환자의 질량 스펙트럼을 비교하여 L-호모시스테인산의 양 또는 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양의 차이를 확인하는 단계를 포함하는 단계로 수행될 수 있다.
- [18] 상기 방법에 있어서, 상기 1) 단계 또는 상기 2)단계는 항원-항체 결합반응을 이용할 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 1)단계는 대상에서 추출한 생물학적 시료에서 L-호모시스테인산의 양이 10 nmol/ml을 초과하여 검출되는지 측정하여 수행될 수 있다. L-호모시스테인산의 양이 10 nmol/ml을 초과하여 검출되는 경우 바로 난소암 환자로 진단하고 2)단계를 수행하지 않을 수 있다. 그러나 L-호모시스테인산의 양이 10 nmol/ml 이하 검출되는 경우 2)단계를 수행하여 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양을 비-난소암 환자 또는 난소암 환자와 비교하는 단계를 거쳐 난소암 환자로 진단할 수 있다.
- [20] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 1)단계는 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)로 수행되고, 상기 2)단계는 LC-MS/MS로 수행될 수 있다. 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 방법은 1)단계를 수행한 후에 2)단계를 수행할 수 있다.
- [21] 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 복수, 낭액 및 소변으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [22] 본 발명은 리소포스파티딜콜린(16:0) 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 및 L-호모시스테인산 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 난소암 진단용 키트를 제공한다. 본 발명의 일 구현예로, 본 발명의 난소암 진단용 키트는 리소포스파티딜콜린(16:0)의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 및 L-호모시스테인산의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.
- [23] 또한 본 발명은 1) 동물 모델에 시험 물질을 투여하는 단계; 및 2) 상기 동물 모델의 생물학적 시료에서 리소포스파티딜콜린(16:0)의 및 L-호모시스테인산의 양을 측정하는 단계를 포함하는, 난소암 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 상기 동물 모델은 난소암 동물 모델일 수 있다.

발명의 효과

- [24] 본 발명을 이용하면 저렴한 비용으로 신속하고 정확하게 난소암을 진단할 수 있다. 따라서 난소암을 조기에 진단하여 치료하는 데 중요하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1 내지 도 3은 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 추출한 전체 저질량 이온 질량 스펙트럼을 MarkerView™로 импорт하고 PCA-DA를 통해 난소암 환자(음수) 및 비-난소암 환자(양수)에서 얻은 판별 점수를 나타낸 도이다. 총 6회 반복 실험을 하였으므로 각각의 그래프는 1회 실험한 결과를 나타내며, 각 도에 2개의 그래프를 표시하였다.
- [26] 도 4 내지 6은 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 추출한 전체 저질량 이온 질량 스펙트럼을 MarkerView™로 импорт하고 PCA-DA를 통해 난소암 환자(음수) 및 비-난소암 환자(양수)에서 얻은 전체 저질량 이온의 피크들을 나타낸 도이다. 총 6회 반복 실험을 하였으므로 각각의 그래프는 1회 실험한 결과를 나타내며, 각 도에 2개의 그래프를 표시하였다.
- [27] 도 7은 MALDI-TOF를 이용하여 선발된 난소암 진단용 저질량 이온이 L-호모시스테인산임을 확인한 도이다.
- [28] 도 8은 MALDI-TOF를 이용하여 선발된 난소암 진단용 저질량 이온이 리소포스파티딜콜린(16:0)임을 확인한 도이다.
- [29] 도 9는 L-호모시스테인산의 농도가 난소암 환자의 혈청에서 비-난소암 환자의 혈청에서보다 더 높게 나타남을 나타내는 도이다.
- [30] 도 10은 리소포스파티딜콜린(16:0)의 농도가 난소암 환자의 혈청에서 비-난소암 환자의 혈청에서보다 더 낮게 나타남을 나타내는 도이다.
- [31] 도 11은 L-호모시스테인산과 리소포스파티딜콜린(16:0)의 농도를 이용하여 난소암을 판별하는 방법을 간략하게 나타낸 모식도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [32] 본 발명에서, "생물학적 시료"는 전혈, 혈청, 혈장, 요, 분변, 객담, 타액, 조직, 세포, 세포 추출물, 체외 세포 배양물 등과 같은 시료들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 아래에 기술되는 실시 예에서는 환자 또는 비환자의 혈청을 생물학적 시료로 사용하였다.
- [33] 본 발명에서, "강도(intensity)"는 MALDI-TOF 질량분석기로부터 얻어지는 값을 말하며, 피크에 해당하는 질량 이온의 양과 상관 관계를 가진다.
- [34] 본 발명에서, "정규화(normalization)"는 데이터의 범위를 일치시키거나 분포를 유사하게 만들어 주는 것을 말하며, 평균값, 중간값 등을 이용하여 정규화할 수 있으나 이에 제한되지 않고, 경우에 따라 다양한 공지의 방법들이 적용될 수 있다. 본 실시예에서는 각 시료별 강도의 소계를 구하고, 시료별 소계들의 평균을 구한 후, 각 시료별 강도의 소계가 이 평균과 일치하도록 각 피크 강도에 시료별 배율 인자를 곱하는 방식으로 정규화하였다. 즉, 이와 같이 정규화한 후에는 각 시료별 강도의 소계가 동일해진다.
- [35] 본 발명에서, "파레토 스케일링"은 정규화한 각 피크 강도에서 질량값별 평균값을 뺀 후 표준편차의 제곱근으로 나누는 것을 말한다. 보다 일반적인 스케일링 방법인 오토스케일링(autoscaling)에서는 표준편차로 나누는 것을 통해

데이터의 크기 정보를 완전히 상쇄시키는 것에 비해, 파레토 스케일링에서는 데이터의 크기 정보를 부분적으로 유지하는 것을 통해 노이즈(noise)의 증폭을 피할 수 있다는 장점이 있다.

- [36] 본 발명에서, "가중치(weighting factor)"는 가중치를 곱한 후의 데이터의 수치적 크기가 통계적 관점에서의 중요성에 비례하도록 조정하는 인자를 말하는데, 아래에 기술되는 실시 예에서 주성분 분석 기반 선형 판별 분석 결과 획득한 피크별 인자적재값을 가중치의 일례라 할 수 있다.
- [37] 본 발명에서, "저질량 이온(low mass ion)"은 MALDI-TOF 질량분석기 등을 이용하여 획득한 질량값이 1500 m/z보다 작은 이온을 의미한다.
- [38] 본 발명에서, MALDI-TOF 질량분석기에 의해 측정된 질량값은 " ± 0.1 m/z"의 오차 범위를 포함한다. 다양한 실험 환경에 따라 질량값 측정치에 다소의 오차가 발생할 수 있기 때문이다. 실험 환경에 따라 오차 범위는 " ± 0.5 m/z"일 수 있다.
- [39] 본 발명에서, MALDI-TOF 질량분석기에 의해 측정된 질량값은 MALDI-TOF 질량분석기의 포지티브 모드(positive mode)에서 획득된 질량값임에 유의한다.
- [40] 본 발명에서, 가중치 벡터(vector)의 부호는 판별 점수가 양수인 경우 양성으로 판정되고 음수인 경우 음성으로 판정되도록 조정한다. 주성분 분석에서의 인자적재값 벡터는 수학적으로 고유 벡터(eigenvector)에 해당하는데, 이 벡터의 부호는 임의로 정할 수 있다. 즉, 계산된 피크별 인자적재값에 전체적으로 -1을 곱하여 부호를 변경한다고 하여도 수학적으로는 동일한 고유치 문제(eigenvalue problem)에 대한 동등한 해라고 할 수 있으나, 판별 점수가 음수인 경우를 양성으로 양수인 경우를 음성으로 판별하게 된다. 본 발명에서는 판별 점수가 양수인 경우 양성으로 판정되고 음수인 경우 음성으로 판정되도록 고유 벡터의 부호를 조정하였으나, 본 발명의 범위가 이에 제한되지 않음에 유의한다.
- [41] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 또한, 이하에서 언급된 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한 Honeywell Burdick & Jackson로부터 구입한 것이다.
- [43]
- [44] 시료 준비-혈청 수집 대상
- [45] 142명의 난소암 환자 및 100명의 비-난소암 환자로부터 혈청을 수집하였다. 난소암 환자들의 난소암 진행 상태에 대한 정보는 상기와 같다.
- [46] [표 1]

[47]

		난소암(n=142)	대조군(n=100)
연령, 평균Mean±SD		52±13	51±13
기(stage)(n) (%)	IA	37 (26.1)	
	IB	2 (1.4)	
	IC	12 (8.5)	
	IIA	0 (0)	
	IIB	1 (0.7)	
	IIIA	0 (0)	
	IIIB	1 (0.7)	
	IIIC	77 (54.2)	
	IV	12 (8.5)	
조직학(histology)(n) (%)	장액성(serous)	90 (63.4)	
	점액성(mucinous)	23 (16.2)	
	자궁내막양 (Endometrioid)	8 (5.6)	
	투명세포(Clear cell)	11 (7.7)	
	이행세포 (Transitional cell)	7 (4.9)	
	혼합(Mixed)	3 (2.1)	
정도(Grade)(n) (%)	경도(Mild)	24 (16.9)	
	중등도(Moderate)	35 (24.6)	
	중증(Severe)	83 (58.5)	

[48] 진단 및 질병의 단계와 범위의 판정을 위하여, 모든 난소암 환자들은 자궁 및 부속기 절제술, 골반림프절절제술, 대동맥주위림프절절제술, 대망절제술, 복강내 세포검사 등을 포함하는 병기설정수술을 시행 받으며 병리검사 결과에 의해서 난소암의 진단과 병기가 최종 확정되었다.

[49]

[50] [실시예]

[51] <실시예 1> 난소암 진단용 저질량 이온 피크의 결정

[52] 1-1. 혈청 준비 및 질량 스펙트럼 측정

[53] 혈청에서 80% 이상의 단백질을 배제하기 위하여 지방산을 선택적으로 추출하는 방법인 Bligh와 Dyer의 방법(Bligh, E. G and Dyer, W. J (1959)--Canadian journal of Biochemistry and Physiology, vol 37, page 911)을 적용하였다.

[54] 혈청의 4배 부피의 메탄올/클로로포름(2:1, V/V)을 25 μ l의 혈청과 함께 격렬하게 교반한 후에 10분 동안 실온에서 배양하였다. 혼합물은 4°C에서 10분 동안 6000 xg로 원심 분리하였다. 수득한 상청액을 1시간 동안 농축기(concentrator)에서 완전히 건조시켰으며, 30분 동안 교반기(vortexer)에서 30 μ l의 50% 아세토니트릴(acetonitrile)/0.1% 트라이플루오린화 아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)으로 용해시켰다. 상기 용액을 알파-시아노-4-하이드록시 시남산(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 용액과 혼합하였으며(1:12, v/v), 1 μ l의 혼합물을 MALDI-타겟에 위치시켰다. 환자의

혈청 추출물의 개별 질량 스펙트럼을 4700 프로테오믹스 분석기(Proteomics Analyzer, AB SCIEX, Foster City, CA)를 사용하여 측정하였다. 한 개의 시료에 대해 질량 스펙트럼 데이터는 20번 반복 측정된 스펙트럼의 평균으로 추출된다. 모든 개별 시료의 질량값 구간은 최대 질량값이 약 2500 m/z이 되도록 조정하였다. 실험적 오류를 최소화하기 위하여, 초점 질량(focus mass), 레이저 강도(laser intensity), 타겟 플레이트(target plate), 데이터 수집 시각(data acquisition time)을 포함하는 다양한 요소를 점검하였다. 바람직한 초점 질량 및 레이저 강도로 500 m/z 및 5000이 각각 고정되어 사용되었다. 재현성을 확인하기 위하여, 검증 집합의 시료들은 고정된 초점 질량 및 레이저 강도와 함께, 다른 타겟 및 다른 데이터 수집 시각 하에서 6회 반복 측정하였다.

[55] 각 그래프는 1회 측정한 결과를 나타내며, 각 도에 2개의 그래프를 표시하였다.

[56]

[57] **1-2. 난소암 진단용 저질량 이온의 선발**

[58] MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 추출한 T2D 파일 형식의 저질량 이온 질량 스펙트럼을 MarkerView™ 소프트웨어 버전 1.2 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canada)로 импорт(import)하였다.

[59] импорт 조건으로 하기 표 2의 조건들을 사용하였다.

[60] **[표 2]**

[61]

질량 부하(Mass tolerance)	100 ppm
최소 요구 반응(Minimum required response)	100
최대 피크 수 (Maximum number of peaks)	5000

[62] MarkerView™에는 다수의 정규화 방법이 존재하는데, "총 면적 합계를 이용한 정규화(Normalization Using Total Area Sums)" 방법을 사용하여 정규화를 수행하였다. 이 방법에서는 각 시료별 강도의 소계를 구하고, 시료별 소계들의 평균을 구한 후, 각 시료별 강도의 소계가 이 평균과 일치하도록 각 피크 강도에 시료별 배율 인자(scaling factor)를 곱한다. 즉, 이와 같이 정규화한 후에는 각 시료별 강도의 소계가 동일해진다.

[63] 다음, 정규화한 피크 강도들을 파레토 스케일링(Pareto scaling)하였다. 즉, 정규화한 각 피크 강도에서 질량값별 평균값을 뺀 후 표준편차의 제곱근으로 나누어 피크 강도들을 파레토 스케일링하였다.

[64] 다음, 파레토 스케일링한 피크 강도들에 대해 주성분 분석 기반 선형 판별 분석(principal component analysisbased linear discriminant analysis, PCA-DA)을 수행하여 판별 점수(discriminant score, DS)를 계산하였다. 즉, 두 단계로 주성분 분석을 수행하여 각 피크별 가중치(weighting factor)인 인자적재값(factor loading)을 구하고, 파레토 스케일링된 강도에 이 인자적재값을 곱한 후 더하여 각 시료별 판별 점수를 계산하였다. 표 2의 импорт 조건에서 피크의 최대 개수를 5000개로 하였고, 충분히 많은 시료들을 함께 импорт하였으므로, 본 계산에서

인자적재값은 5000개가 계산되었으며, 따라서 5000개의 항을 더하여 한 개의 판별 점수가 계산되었다. 결과는 t-test로 검정하였다.

- [65] 도 1 내지 도 3은 PCA-DA를 통해 난소암 환자 및 비-난소암 환자에서 얻은 판별 점수를 나타낸 도이다. 총 6회 반복 실험을 하였으므로 각각의 실험을 하였으므로 각각의 그래프는 1회 실험한 결과를 나타내며, 각 도에 2개의 그래프를 표시하였다. PCA-DA 결과에서 난소암 환자의 판별 점수(스코어)는 음수로(그래프상에서 빨간색 점), 비-난소암 환자의 판별 점수는 양수로(그래프상에서 파란색 점) 나타난다.
- [66] 도 4 내지 6은 PCA-DA를 통해 난소암 환자(음수) 및 비-난소암 환자(양수)에서 얻은 전체 저질량 이온의 피크들을 나타낸 도이다. 총 6회 반복 실험을 하였으므로 각각의 그래프는 1회 실험한 결과를 나타내며, 각 도에 2개의 그래프를 표시하였다. 6번의 실험 결과에서 184 m/z의 피크와 496 m/z의 피크가 난소암 환자와 비-난소암 환자 간에 일관되게 유의성 있는 차이를 보이는 것으로 확인되었다. 따라서 이 피크들을 난소암 진단용 저질량 이온 피크로 선발하였다.
- [67]
- [68] <실시예 2> 난소암 진단용 저질량 이온 피크에 해당하는 저질량 이온의 규명
- [69] 실시예 1에서 선발한 184 m/z의 피크와 496 m/z의 피크를 나타내는 물질들을 규명하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.
- [70] **2-1. 184 m/z의 피크를 나타내는 물질의 규명**
- [71] 인간 대사체 데이터베이스에서 184 m/z의 피크를 나타내는 물질을 스크리닝하였다. 에피네프린과 L-호모시스테인산이 가장 강력한 후보 물질로 확인되었다. 따라서 에피네프린과 L-호모시스테인산 표준 물질을 각각 사용하여 MS/MS 패턴을 분석하여 L-호모시스테인산에 의해 나타난 것이 맞는지 확인하고자 하였다.
- [72] 도 7의 A는 MALDI-TOF 방법으로 확인한 난소암 환자의 MS 패턴을 나타낸 것이며, 도 7의 B는 난소암 환자에서 나타난 184 m/z의 피크를 MS/MS하여 L-호모시스테인산의 MS/MS 패턴과 동일하게 나타남을 확인한 것이다. 따라서 184 m/z의 피크를 나타내는 물질은 L-호모시스테인산임을 알 수 있었다.
- [73]
- [74] **2-2. 496 m/z의 피크를 나타내는 물질의 규명**
- [75] 인간 대사체 데이터베이스에서 496 m/z의 피크를 나타내는 물질을 스크리닝하였다. 이 피크를 나타내는 후보 물질은 리소포스파티딜콜린(16:0) 1종뿐인 것으로 확인되었다. 도 8의 A는 MALDI-TOF 방법으로 확인한 난소암 환자의 MS 패턴을 나타낸 것이며, 도 8의 B는 난소암 환자에서 나타난 496 m/z의 피크를 MS/MS하여 리소포스파티딜콜린(16:0)의 MS/MS 패턴과 동일하게 나타남을 확인한 것이다. 따라서 496 m/z의 피크를 나타내는 물질은 리소포스파티딜콜린(16:0)임을 알 수 있었다.

[76]

- [77] <실시예 3> L-호모시스테인산의 측정
- [78] L-호모시스테인산 ELISA 키트 (Cusabio Biotech)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 기재된 방법대로 L-호모시스테인산의 수치를 측정하였다. 난소암 환자 25명의 시료를 사용하였고, 비-난소암 환자 64명의 시료를 대조군으로 사용하였다.
- [79] L-호모시스테인산의 농도는 난소암 환자의 혈청에서 더 높게 나타났다(도 9).
- [80]
- [81] <실시예 4> 혈액 내 리소포스파티딜콜린(16:0)의 측정
- [82] 리소포스파티딜콜린(16:0)은 표준물질 또는 ELISA 키트 구입이 쉽지 않아 난소암 환자와 비-난소암 환자의 리소포스파티딜콜린(16:0) 농도를 LC-MS/MS 분석을 통하여 상대적으로 정량하였다. 난소암 환자 25명의 시료를 사용하였고, 비-난소암 환자의 시료를 대조군으로 사용하였다.
- [83] LC-MS/MS 분석은 하기의 방법으로 수행하였다.
- [84] 나노플로우 HPLC 기기(Easy nLC, Thermo Fisher Scientific)를 LTQ 질량 스펙트로미터(Thermo Scientific)에 온라인으로 연결하였다. 분석 칼럼(50cm, 내부 지름 75 μ m)은 PepMap RSLC, C18, 2 μ m, 100을 사용하였다. 역상 크로마토그래피가 0.1% 포름산(완충액 A) 및 0.1% 포름산 내의 아세트나이트릴(완충액 B)을 포함하는 이원 완충액 시스템을 사용하여 수행되었다. 시료는 유속 300 nL/min으로 3-50% 완충액 B의 선형 경사로 분리되었다. 경사 시간은 90분이고, LC MS/MS에 대한 총 가동 시간은 120분이었다. 추출된 리소포스파티딜콜린(16:0)은 SRM (Selected reaction monitoring) 모드에 의해 분석되었다. 리소포스파티딜콜린(16:0) 지질에 대한 SRM 전이는 m/z 496.4 $\rightarrow$ 183.96 및 m/z 496.4 $\rightarrow$ 478.33으로 설정되었다. SRM 데이터는 단편 이온 질량 ± 2 m/z 내에서 획득되었고, 각 SRM 전이 및 개별적인 체류 시간은 특이적 LPC에 의해 확립되었다. 리소포스파티딜콜린(16:0)에 대한 적절한 피크를 통합함으로써 데이터를 가공하였고, 그 후 이원 t-검정에 의해 계산된 피크 면적을 계산하여 비교하였다.
- [85] 리소포스파티딜콜린(16:0)의 농도를 의미하는 183.96 m/z 와 478.33 m/z 는 각각 난소암 환자의 혈청에서 비-난소암 환자의 혈청에서보다 더 낮게 나타났다(도 10).
- [86]
- [87] <실시예 5> 진단방법의 구성
- [88] 진단의 정확도를 결정하기 위한 척도로서 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)가 사용된다. 진단 검사 결과에서 양성(positive)은 질병에 걸렸다는 것을 의미하고 음성(negative)은 질병에 걸리지 않았다는 것을 의미할 때, 민감도(sensitivity)는 환자가 질병에 걸렸을 경우, 진단 검사의 결과가 양성으로 나올 확률을 의미하고, 특이도(specificity)는 환자가 질병에 걸리지 않았을 경우, 진단 검사의 결과가 음성으로 나올 확률을 의미한다. 즉, 민감도와

특이도가 높을수록 진단의 정확도가 높다는 것을 의미한다.

- [89] 실시예 3에서 측정된 L-호모시스테인산의 농도를 이용한 난소암 진단의 정확도를 계산하였다.
- [90] ELISA 분석에서 L-호모시스테인산의 농도가 10 nmol/ml 이상이 검출될 경우 난소암으로, 10 nmol/ml 미만인 경우 비-난소암으로 진단하는 것으로 진단방법을 구성하였을 때, 민감도는 64.0%, 특이도는 100%로 계산되었다.
- [91] 실시예 4에서 측정된 리소포스파티딜콜린(16:0)의 피크 면적을 이용한 난소암 진단의 정확도를 계산하였다.
- [92] LC-MS/MS 분석에서 리소포스파티딜콜린(16:0)의 피크 면적이 50,000 미만일 경우 난소암으로, 그 이상일 경우 비-난소암으로 진단하는 것으로 진단방법을 구성하였을 때, 민감도는 76.0%, 특이도는 47.4%로 계산되었다.
- [93] 상기 결과로부터 난소암의 정확한 진단을 위해서는 리소포스파티딜콜린(16:0)과 L-호모시스테인산 각각을 이용하는 것만으로는 부족하다고 판단되어, 도 11과 같은 진단방법을 구성하였다. 이 방법에 따르면, 먼저 시판되는 ELISA 키트를 이용하여 대상의 생물학적 시료 내의 L-호모시스테인산의 양을 측정하였다. 비-난소암 환자의 생물학적 시료 내에서 L-호모시스테인산은 일반적으로 검출되지 않았으며, 검출되는 경우에도 난소암 환자의 경우보다 극히 적은 양에 해당하는 5 nmol/ml 이하, 많은 양이 검출되는 경우에도 10 nmol/ml 이하의 양으로 검출되었다. L-호모시스테인산이 10 nmol/ml 보다 많이 검출된 경우 대상이 난소암 환자인 것으로 진단할 수 있다. L-호모시스테인산이 10 nmol/ml 이하의 양으로 검출된 경우, LC-MS/MS 방법을 이용하여 대상의 생물학적 시료 내에 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양을 측정하였다. 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양이 비-난소암 환자의 생물학적 시료 내의 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양보다 상대적으로 적거나, 난소암 환자의 생물학적 시료 내의 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양 수준으로 적게 나타난 경우, 대상이 난소암 환자인 것으로 진단할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 리소포스파티딜콜린(16:0)의 피크 면적이 50,000 미만으로 나타난 경우 대상을 난소암 환자로 진단하였으나, 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양의 많고 적음은 상대적인 것으로, 측정 조건, 측정 기기 및 시료의 양 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 동일한 여건하에서 얻은, 음성대조군인 비-난소암 환자의 생물학적 시료 및/또는 양성대조군인 난소암 환자의 생물학적 시료와 대상의 생물학적 시료 내의 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양을 비교하여 대상이 난소암 환자인지 여부를 진단할 수 있다. 또는 표준 여건 하에서 비-난소암 환자 및 난소암 환자의 표준적인 수치 데이터를 이용하여 대상의 진단에 이용할 수도 있다.
- [94] 도 11은 L-호모시스테인산과 리소포스파티딜콜린(16:0)의 농도를 이용하여 난소암을 판별하는 진단방법을 간략하게 나타낸 모식도이다.
- [95] 난소암 환자 25명과 비-난소암 환자 19명의 시료를 사용하여 도 11의 진단방법에 적용했을 때, 민감도는 88.0%, 특이도는 73.68%로 계산되었다.

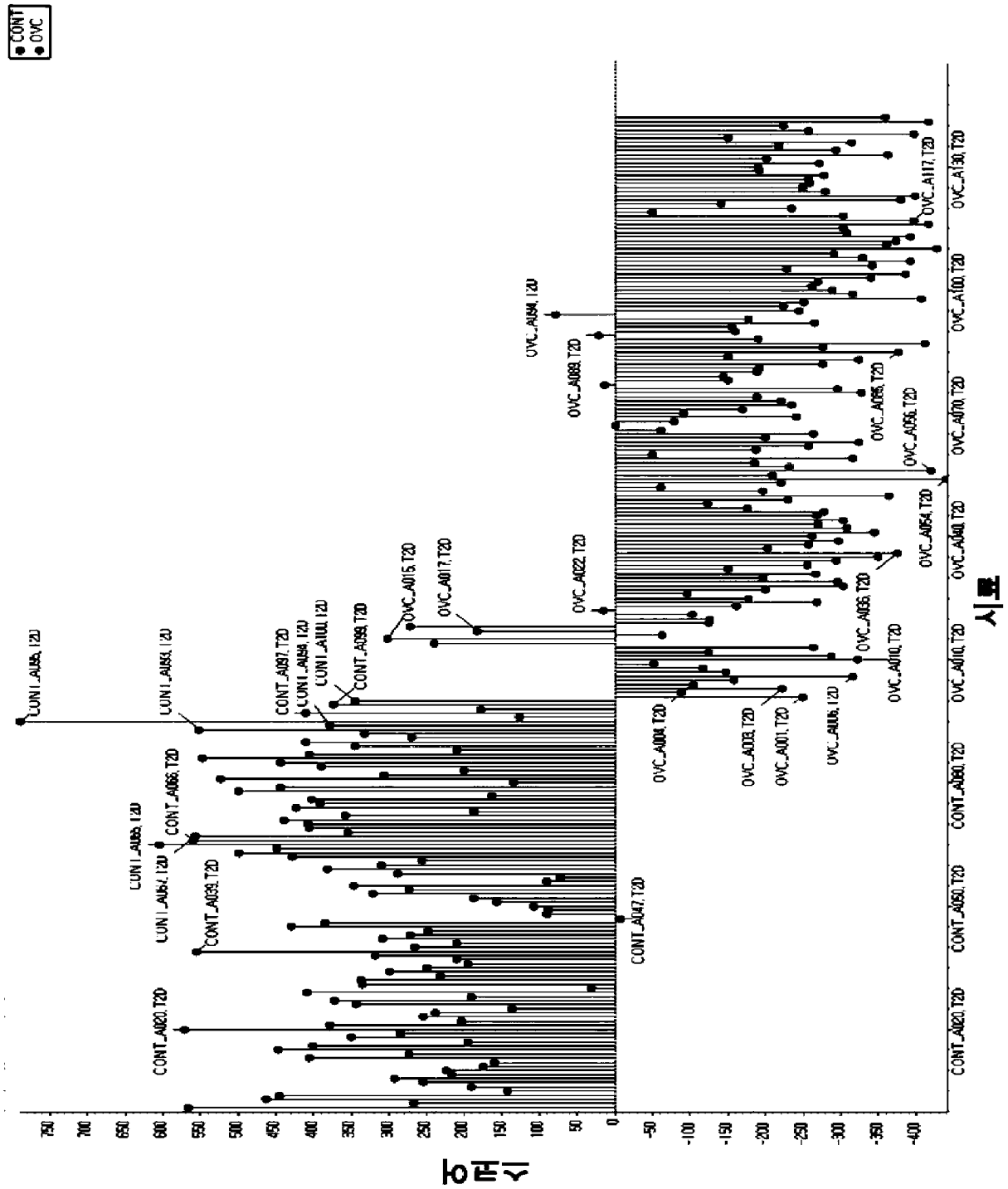
산업상 이용가능성

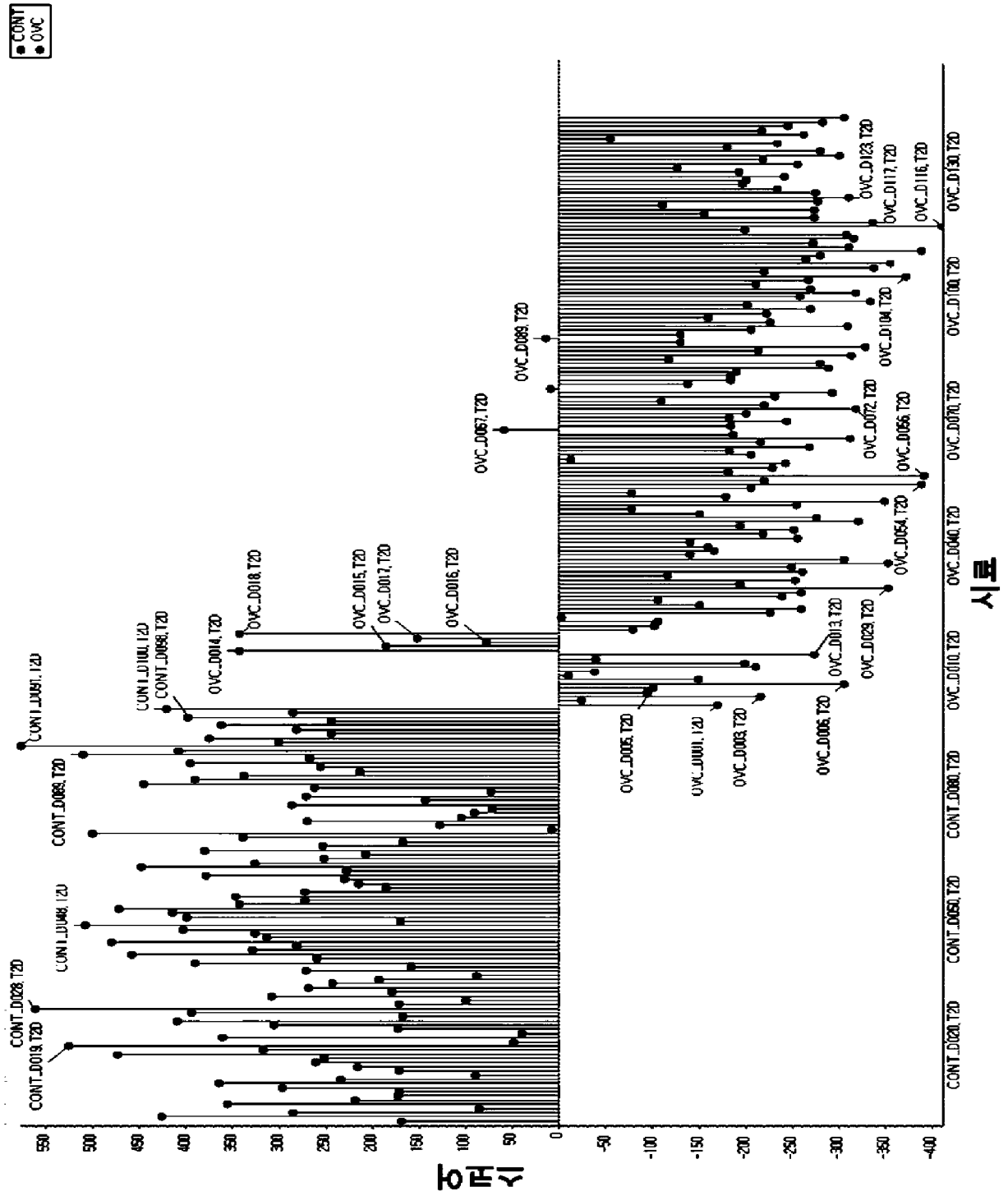
- [96] 본 발명을 이용하면 저렴한 비용으로 신속하고 정확하게 난소암을 진단할 수 있으므로, 난소암을 조기에 진단하여 치료하는 데 중요하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

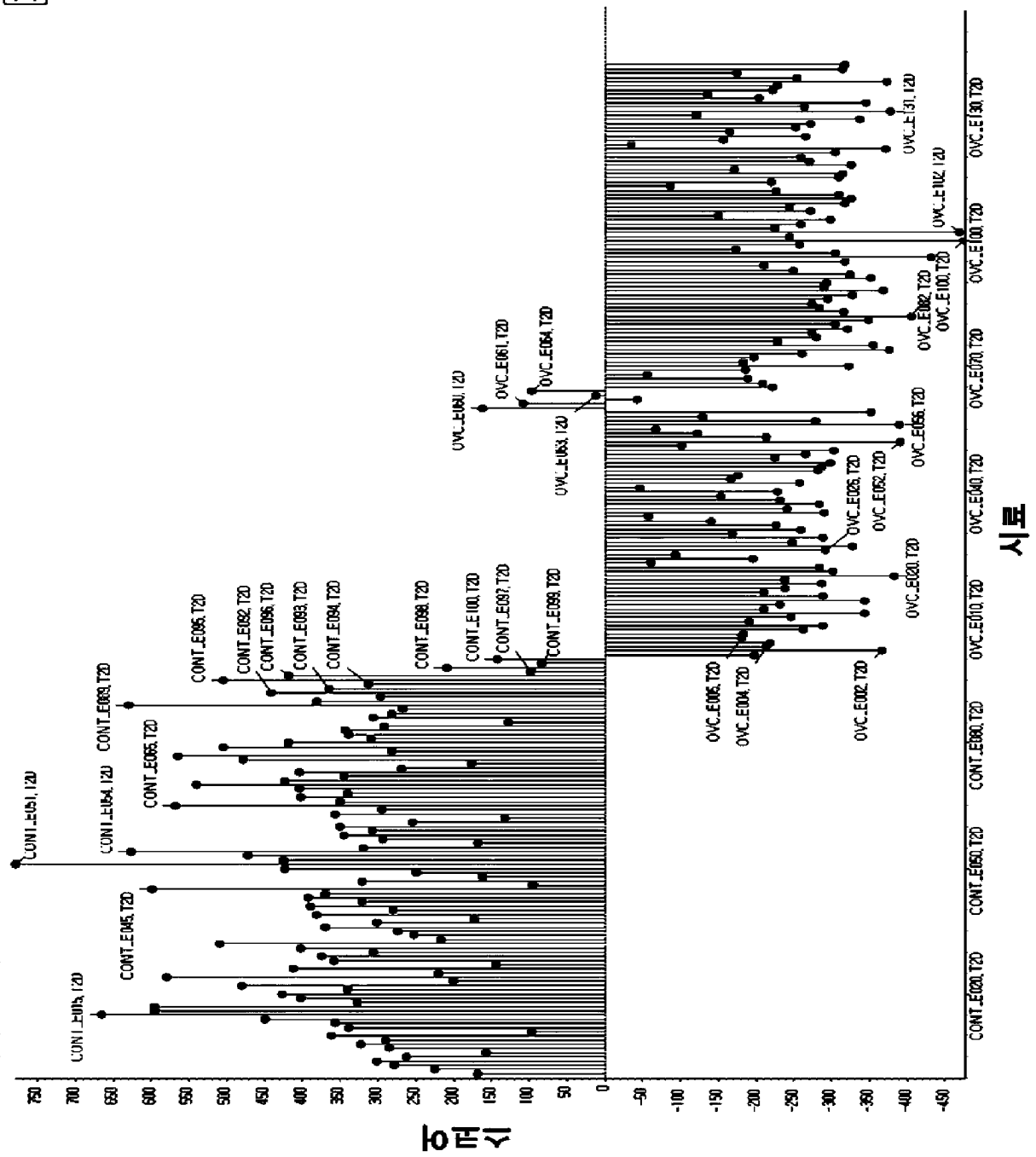
청구범위

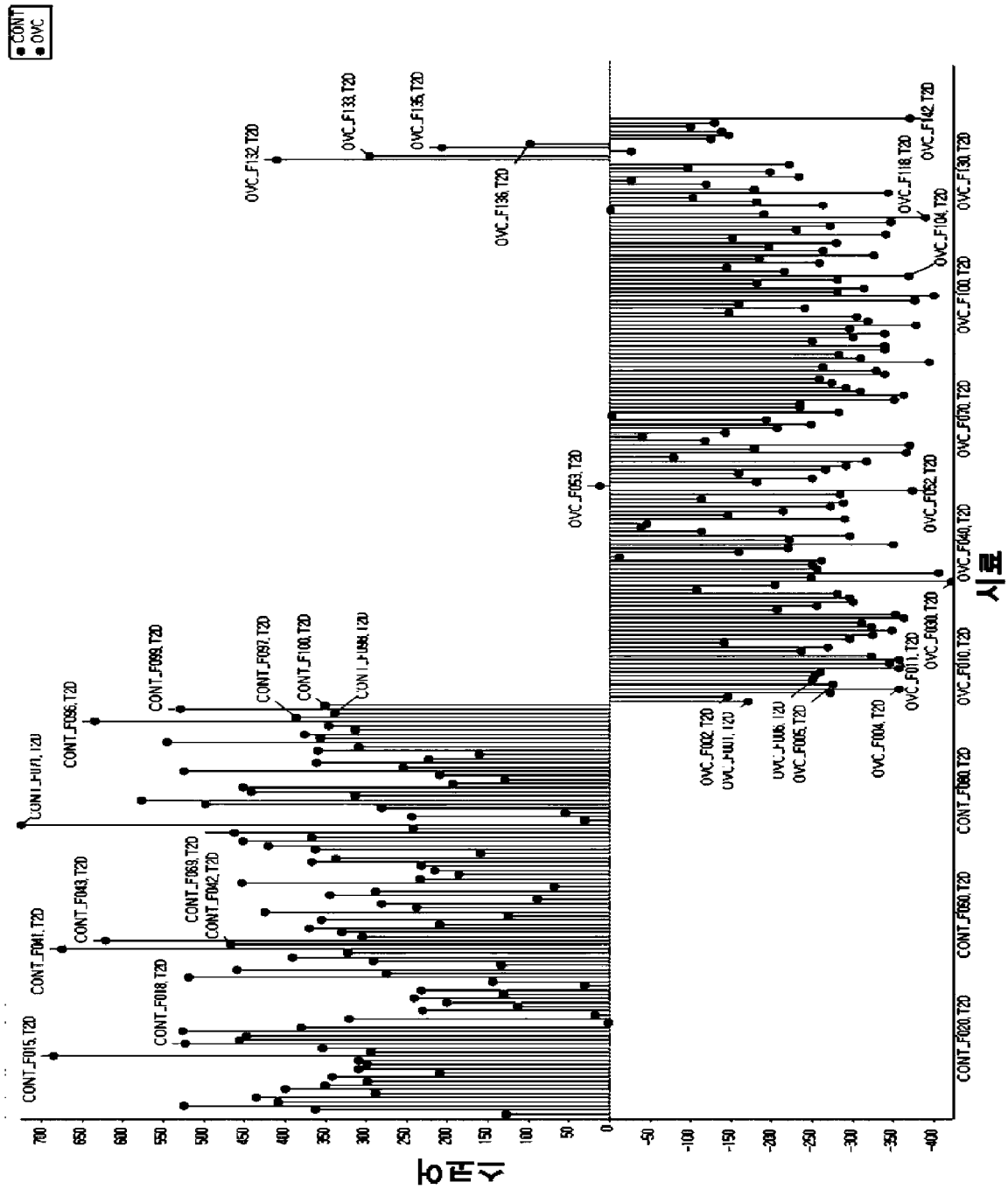
- [청구항 1] 리소포스파티딜콜린(16:0) 및 L-호모시스테인산을 포함하는 난소암 진단용 조성물.
- [청구항 2] 1) 대상에서 추출한 생물학적 시료에서 L-호모시스테인산의 양을 측정하는 단계; 및
2) 대상에서 추출한 생물학적 시료에서 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양을 측정하는 단계를 포함하는, 난소암 진단을 위한 정보 제공 방법.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 방법은 1)단계를 수행한 후에 2)단계를 수행하는 방법.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서, 상기 1)단계 또는 상기 2)단계는
A) 대상에서 추출한 생물학적 시료의 질량 스펙트럼을 획득하는 단계; 및
B) 상기 질량 스펙트럼과 비-난소암 환자의 질량 스펙트럼 또는 난소암 환자의 질량 스펙트럼을 비교하여 L-호모시스테인산의 양 또는 리소포스파티딜콜린(16:0)의 양의 차이를 확인하는 단계를 포함하는 단계로 수행되는 방법.
- [청구항 5] 제 2항에 있어서, 상기 1)단계 또는 상기 2)단계는 항원-항체 결합반응을 이용하는 방법.
- [청구항 6] 제 2항에 있어서, 상기 1)단계는 대상에서 추출한 생물학적 시료에서 L-호모시스테인산의 양이 10 nmol/ml을 초과하여 검출되는지 측정하는 단계인 방법.
- [청구항 7] 제 2항에 있어서, 상기 1)단계는 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)로 수행되고, 상기 2)단계는 LC-MS/MS로 수행되는 방법.
- [청구항 8] 제 2항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 복수, 낭액 및 소변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [청구항 9] 리소포스파티딜콜린(16:0) 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 및 L-호모시스테인산 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 난소암 진단용 키트.
- [청구항 10] 1) 동물 모델에 시험 물질을 투여하는 단계; 및
2) 상기 동물 모델의 생물학적 시료에서 리소포스파티딜콜린(16:0)의 및 L-호모시스테인산의 양을 측정하는 단계를 포함하는, 난소암 치료제를 스크리닝하는 방법.

[Fig. 1a]

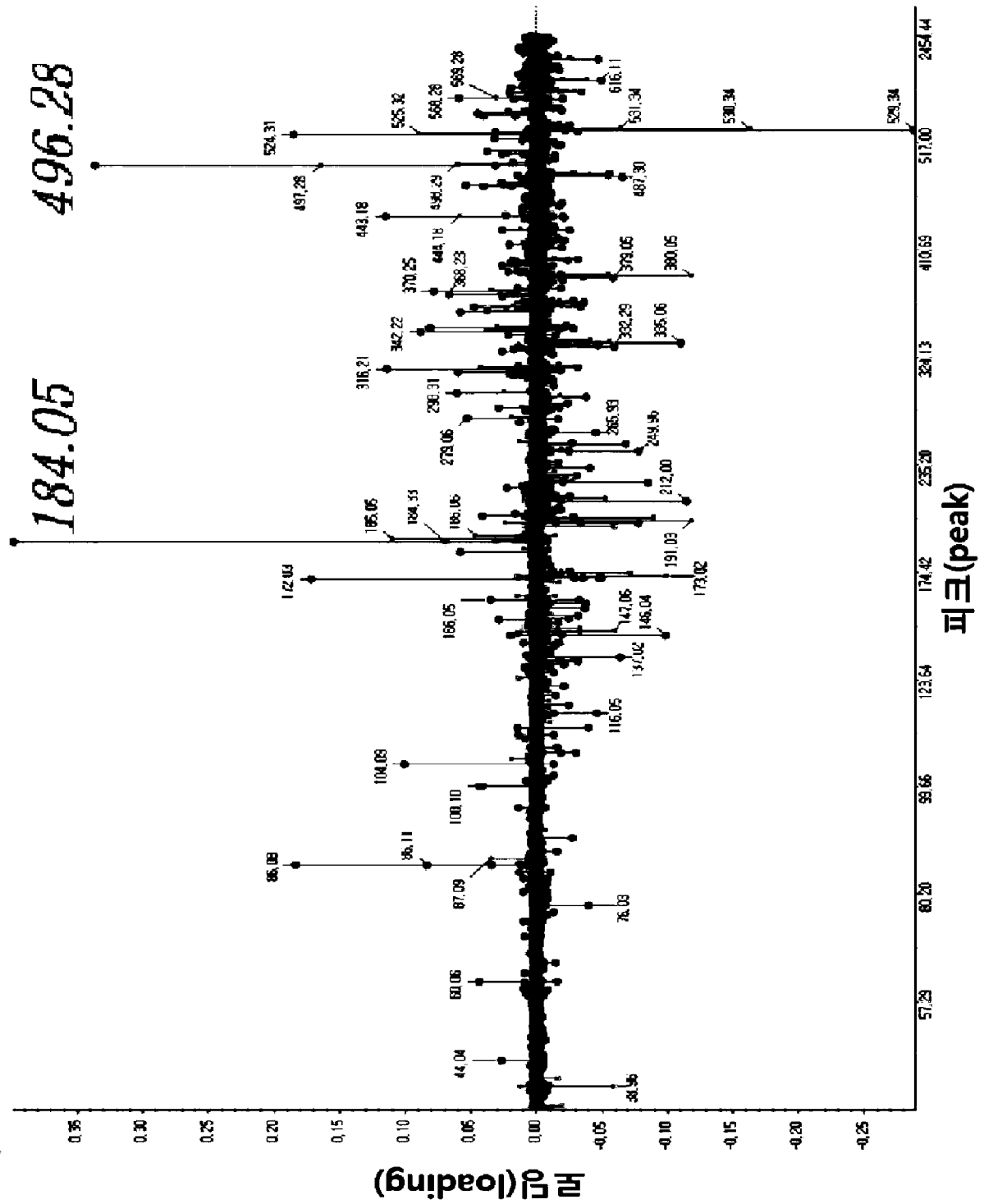




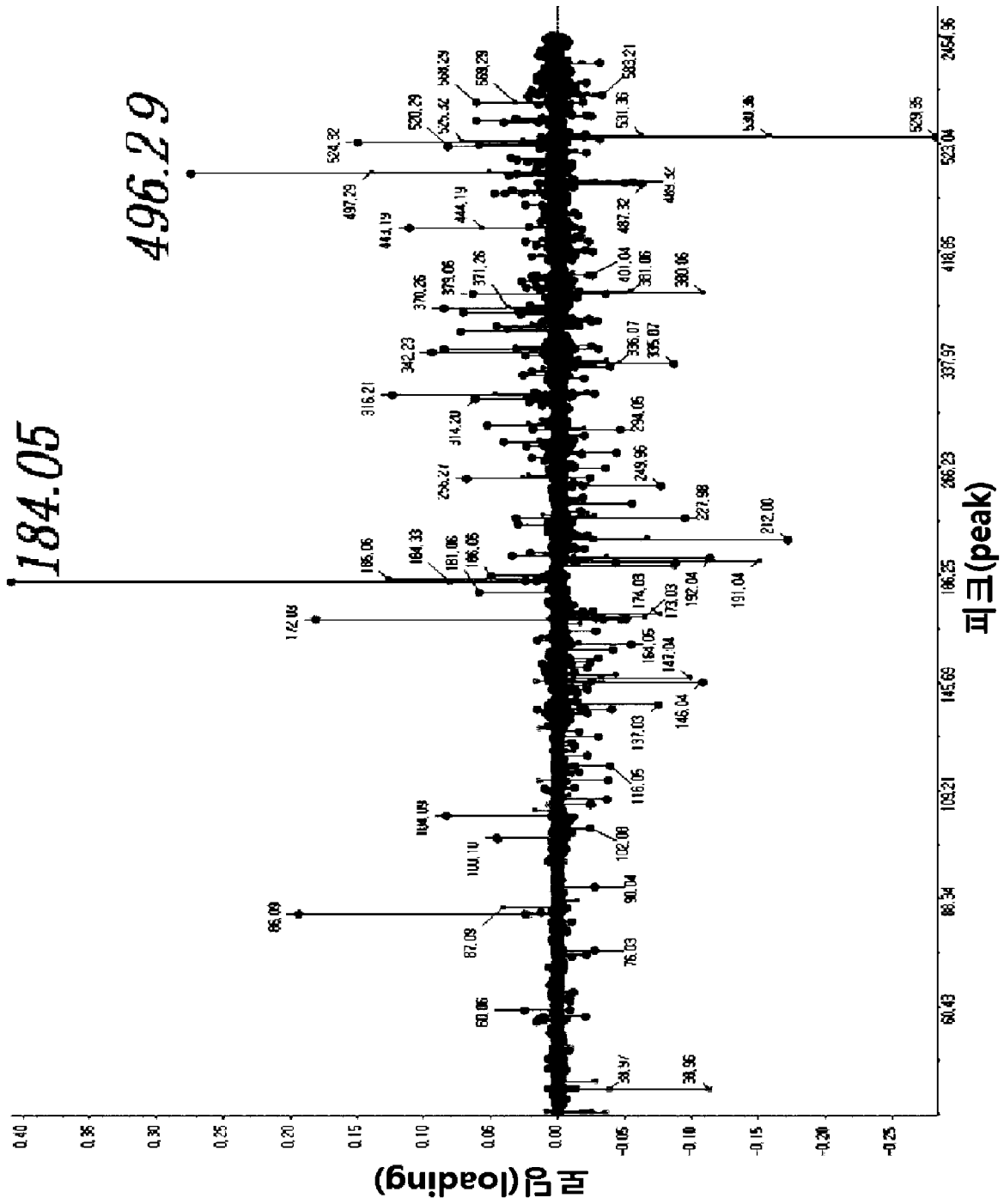




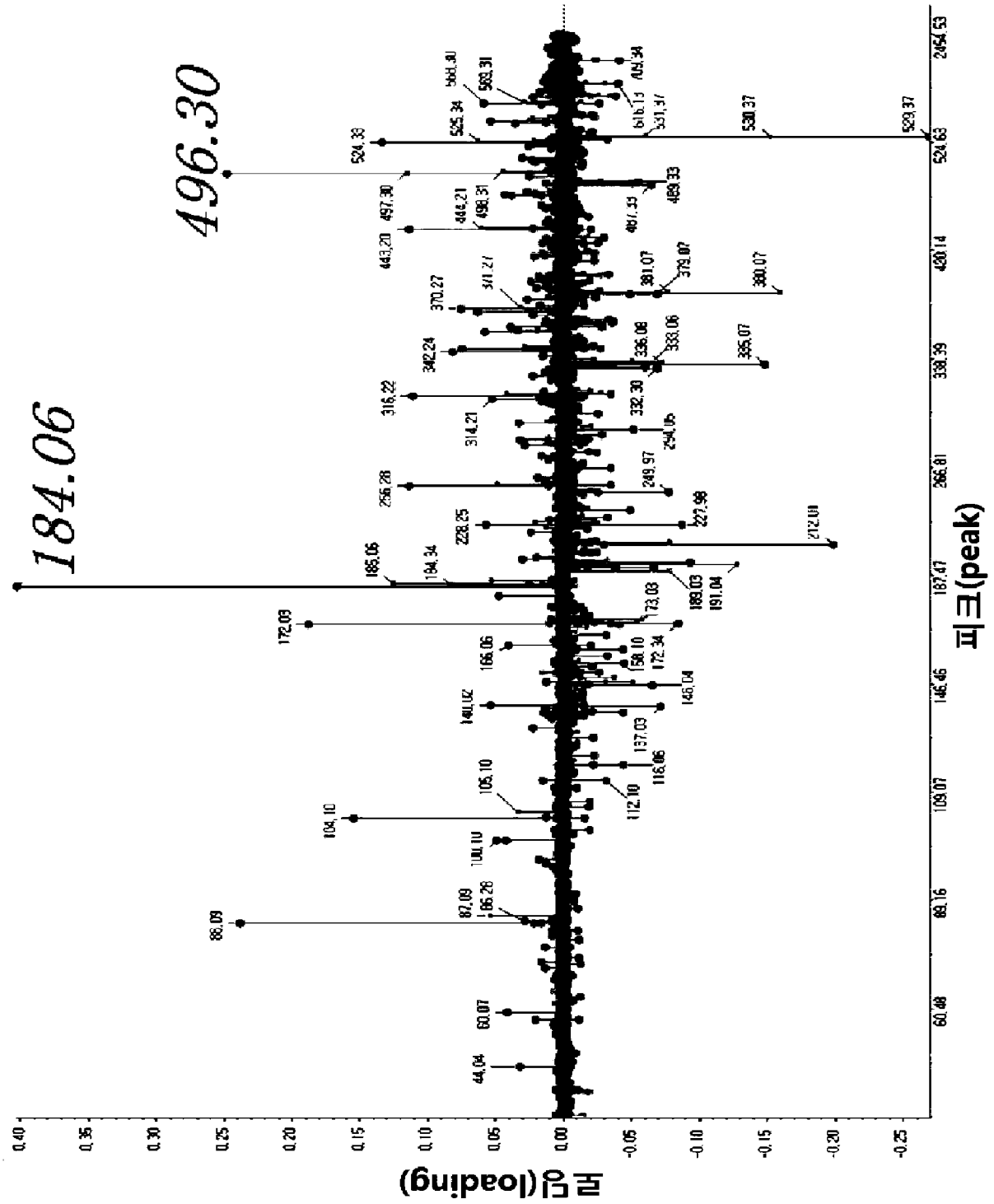
[Fig. 4a]



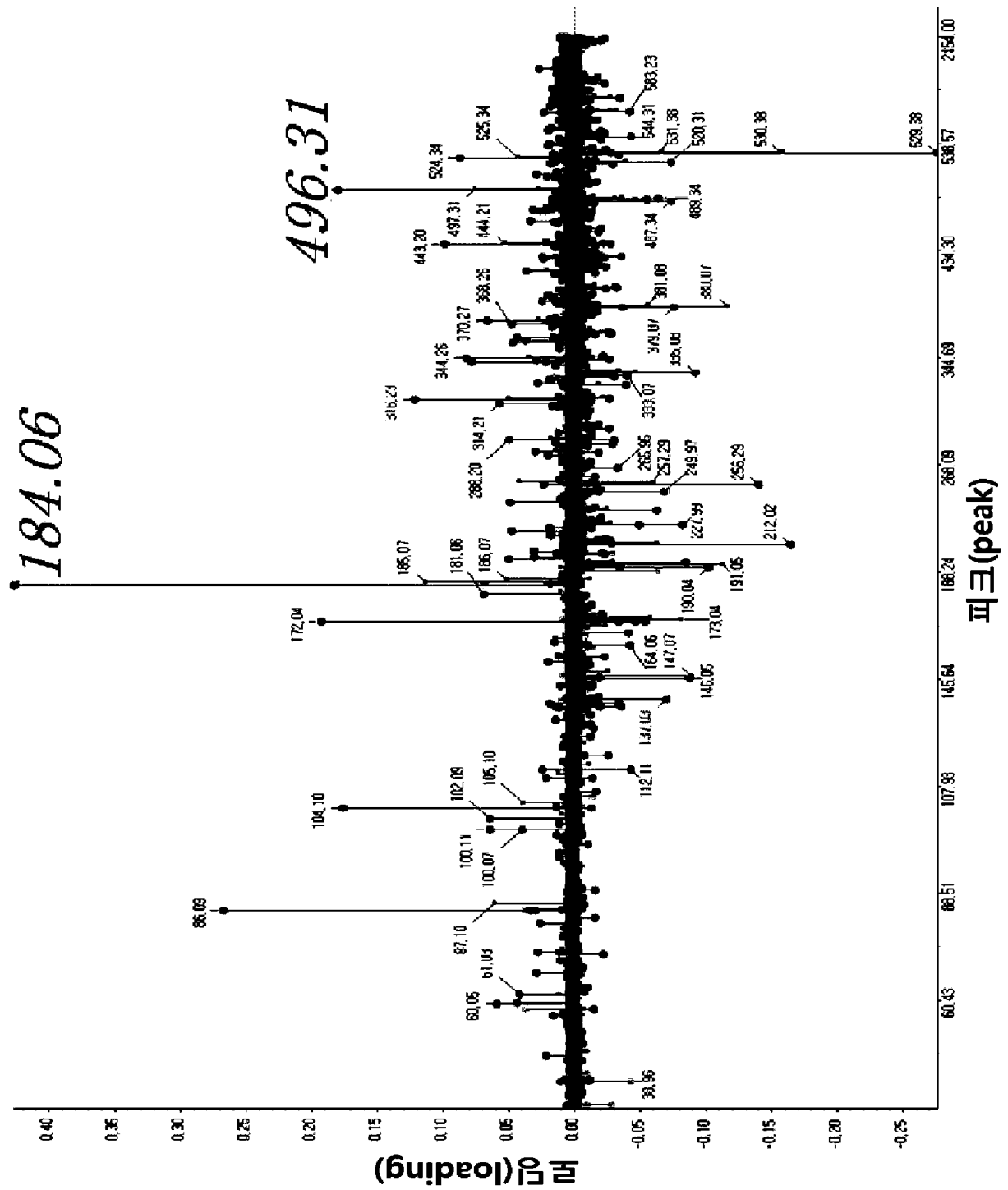
[Fig. 4b]



[Fig. 5a]

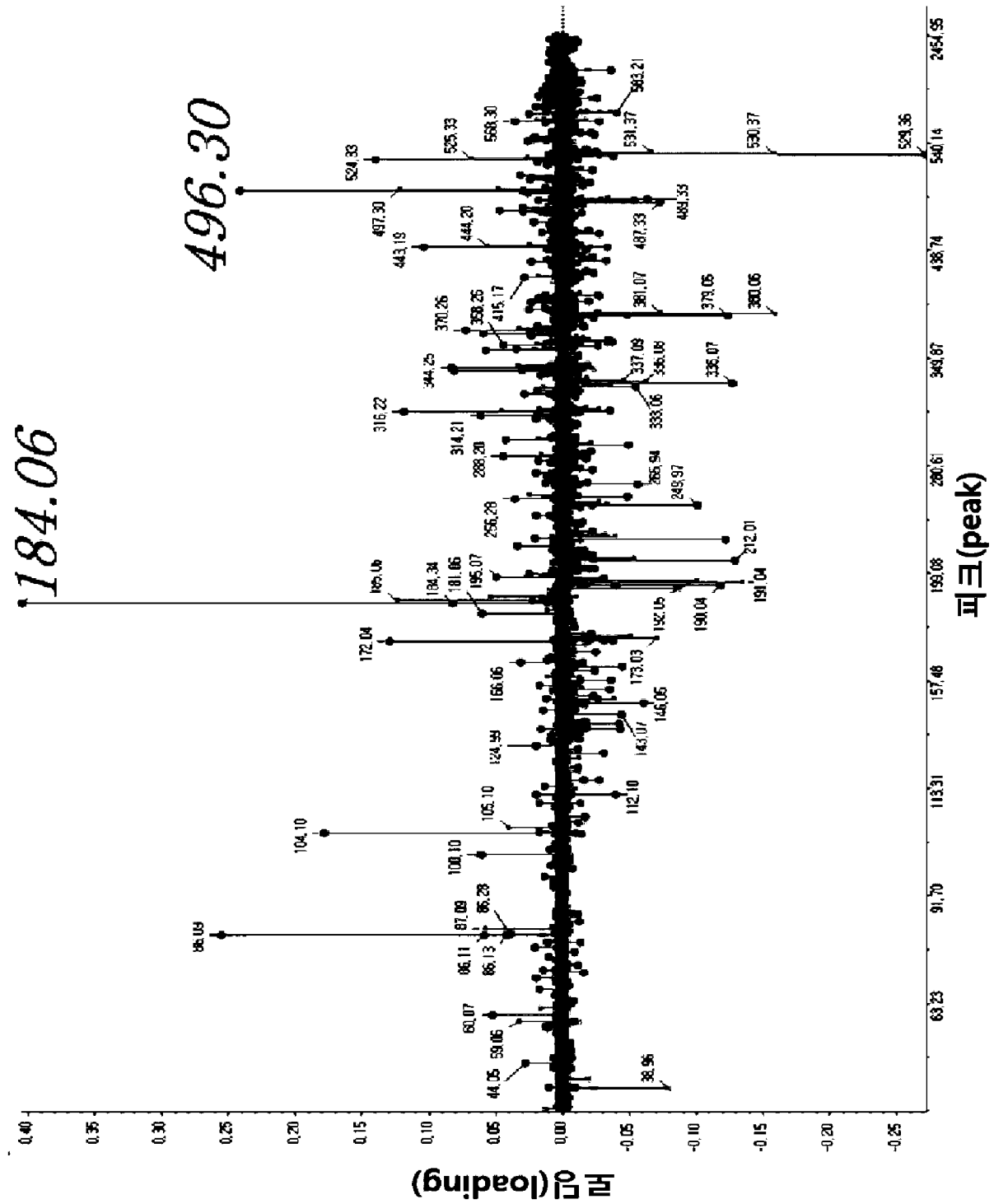


[Fig. 5b]



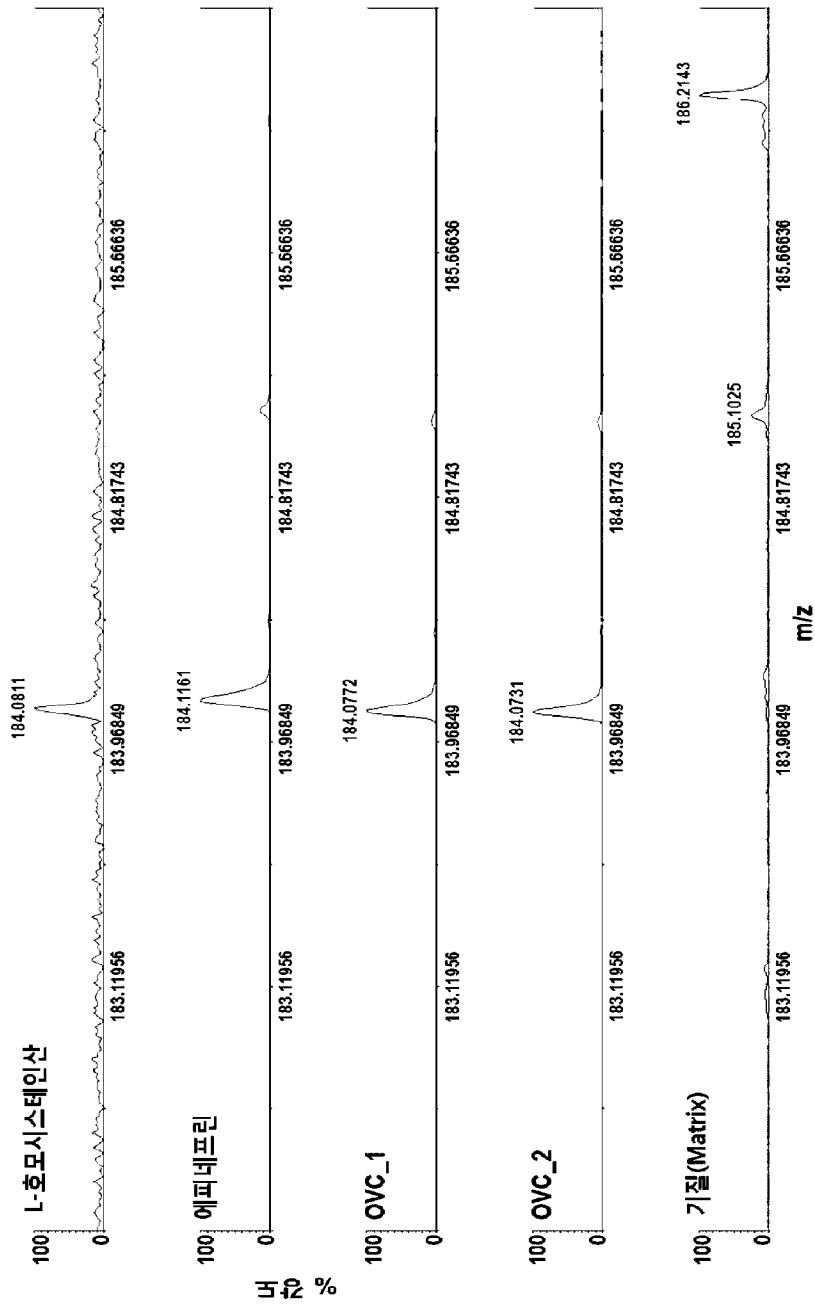
Mass spectrum plot showing relative intensity (loading) versus mass-to-charge ratio (m/z). The x-axis is labeled '피크(peaks)' and ranges from 62 to 94. The y-axis is labeled '(loading)보' and ranges from -0.24 to 0.34. The plot displays numerous peaks, with the most prominent ones labeled with their m/z values. Two major peaks are highlighted with vertical lines and labels: one at m/z 184.06 and another at m/z 496.29.

[Fig. 6b]



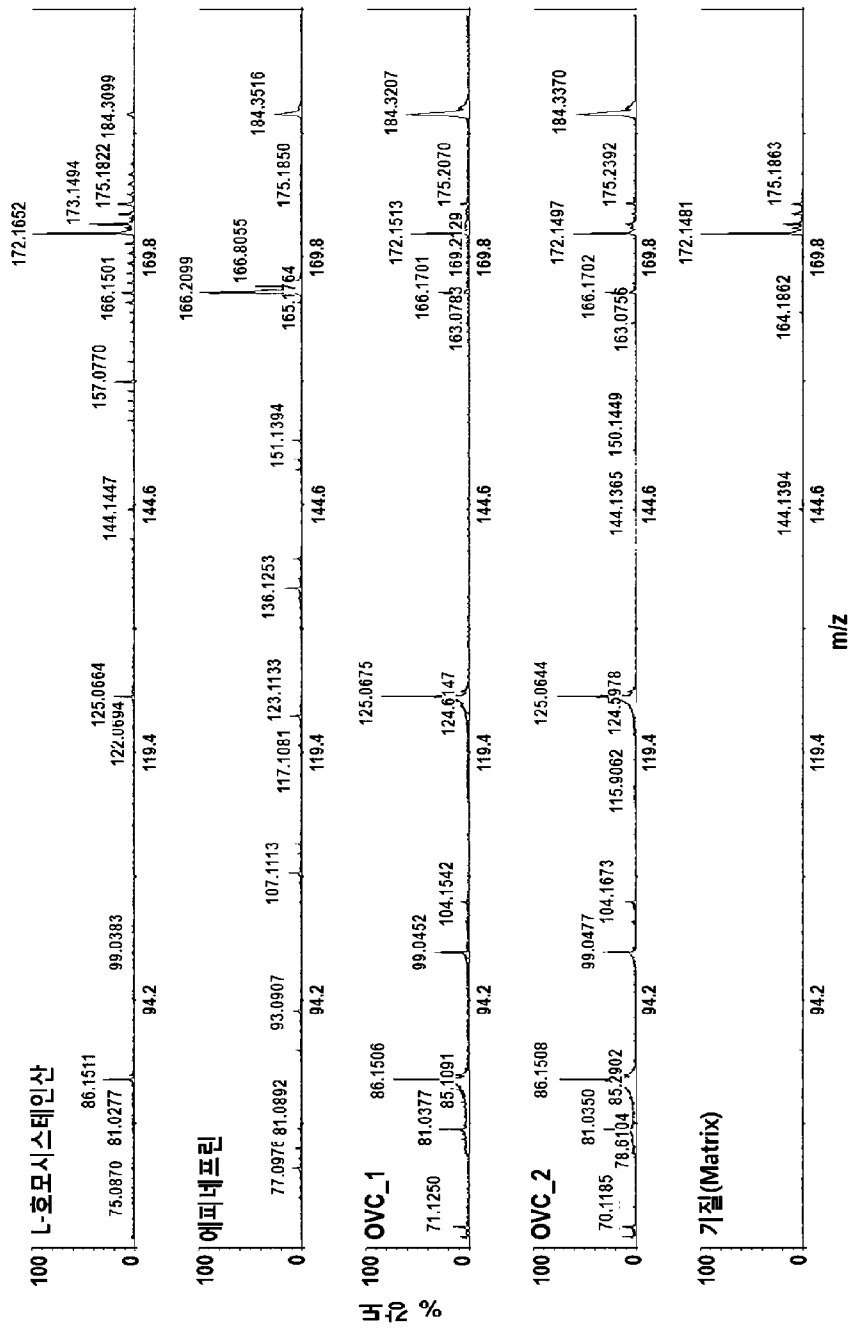
[Fig. 7a]

후보 대사체 및 난소암 환자 혈청의 메탄올/클로로포름 추출물의
MS 패턴

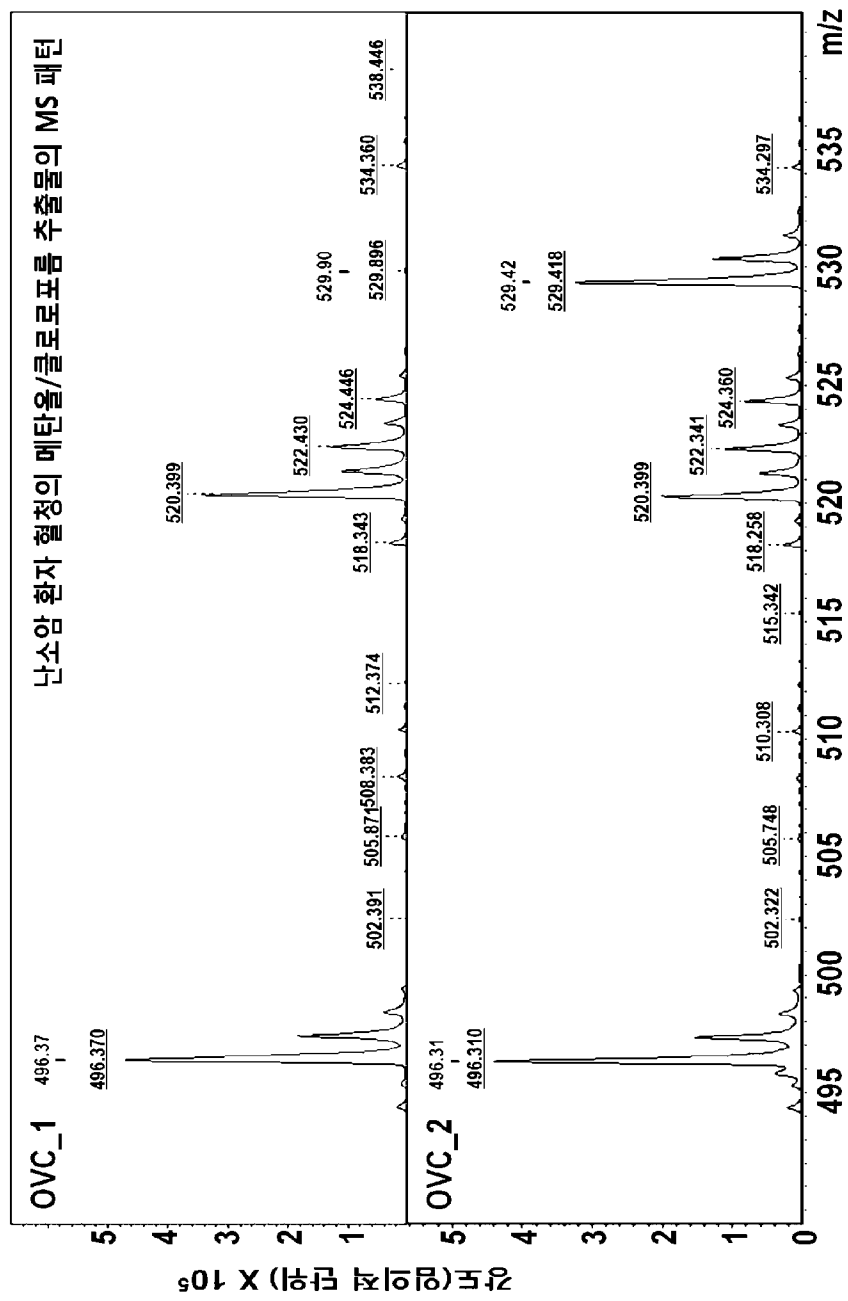


[Fig. 7b]

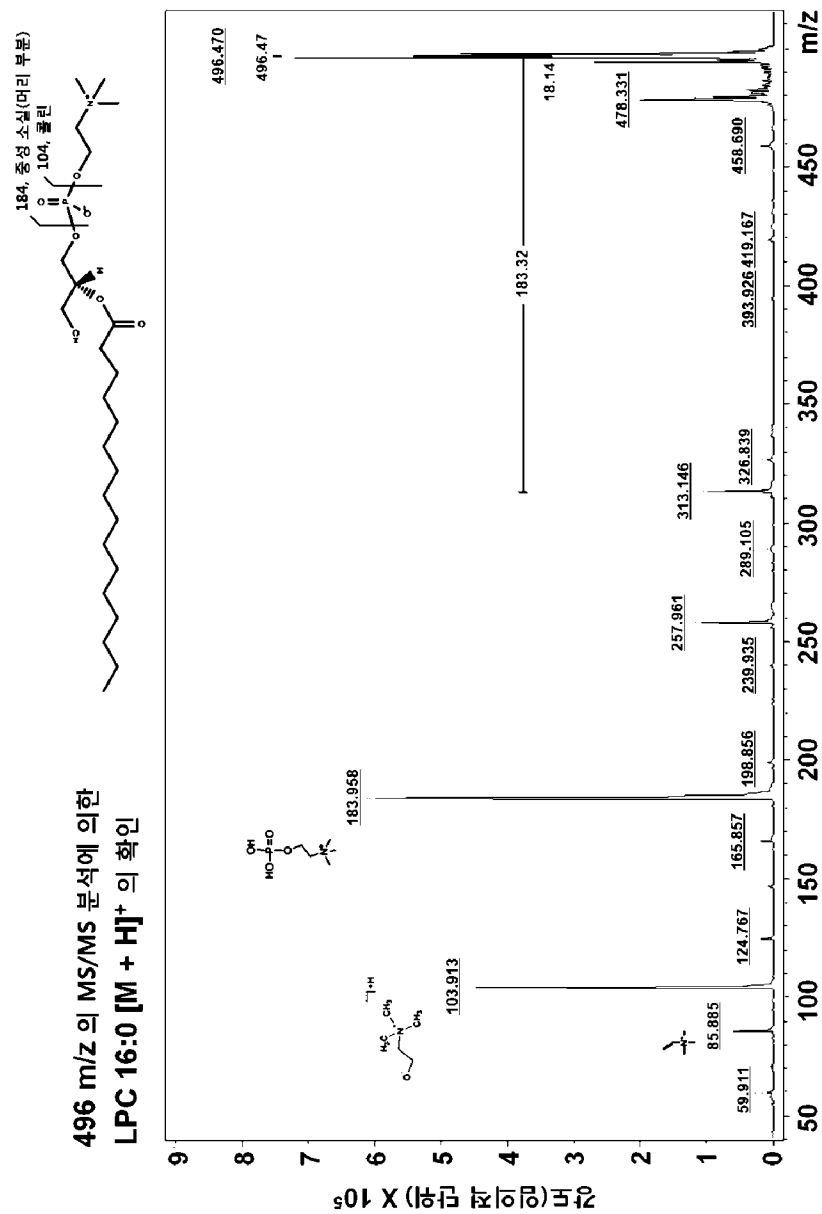
184 m/z의 MS/MS 분석



[Fig. 8a]



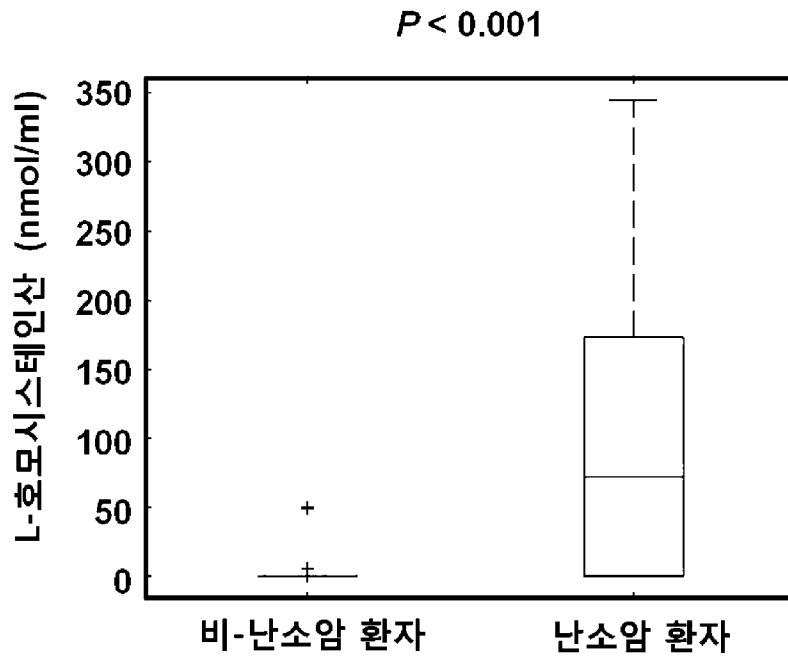
[Fig. 8b]



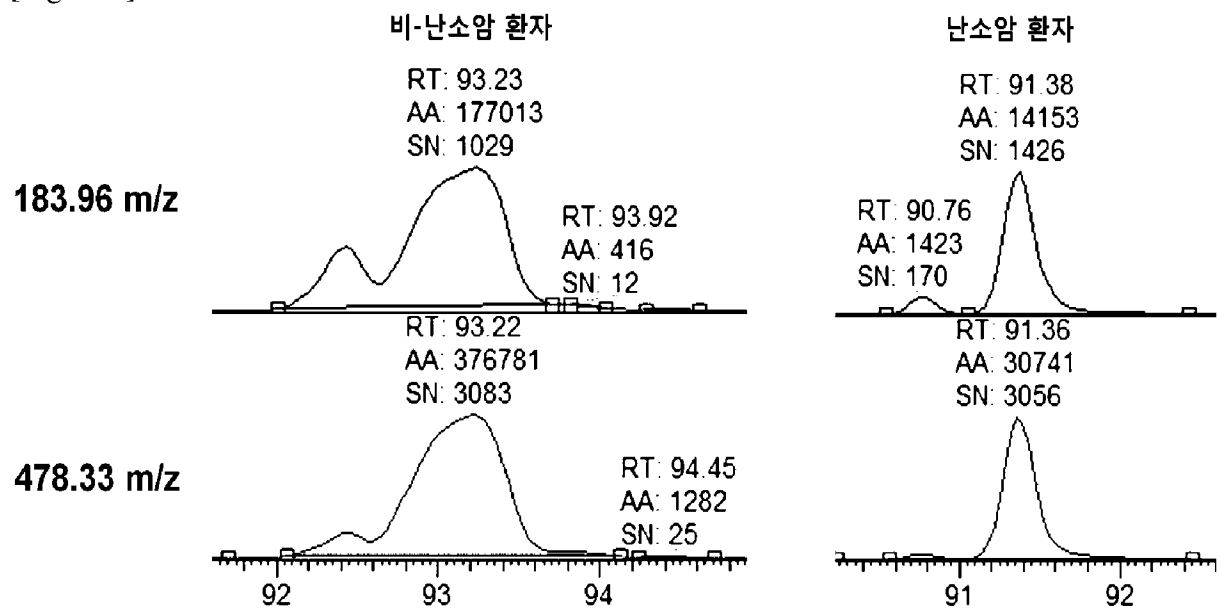
[Fig. 9a]

시료 번호	HCA (nmol/ml)	시료 번호	HCA (nmol/ml)	시료 번호	HCA (nmol/ml)	시료 번호	HCA (nmol/ml)
C1	0.000	C26	0.000	C51	0.000	OVC1	25.991
C2	0.000	C27	0.000	C52	0.000	OVC2	0.000
C3	0.000	C28	0.000	C53	48.750	OVC3	109.620
C4	0.000	C29	0.000	C54	0.000	OVC4	0.000
C5	0.000	C30	0.000	C56	0.000	OVC5	20.037
C6	0.000	C31	0.000	C57	0.000	OVC6	0.000
C7	0.000	C32	0.000	C58	0.000	OVC7	0.000
C8	0.000	C33	0.000	C59	0.000	OVC8	0.000
C9	0.000	C34	0.000	C60	0.000	OVC9	116.759
C10	0.000	C35	0.000	C61	0.000	OVC10	79.676
C11	0.000	C36	0.111	C62	0.000	OVC11	61.083
C12	0.000	C37	0.000	C63	0.000	OVC12	172.352
C13	0.000	C38	0.000	C64	0.000	OVC13	286.398
C14	0.000	C39	0.000			OVC14	203.306
C15	0.000	C40	0.000			OVC15	0.000
C16	0.000	C41	0.000			OVC16	175.713
C17	0.000	C42	0.000			OVC17	175.676
C18	0.000	C43	0.000			OVC18	74.824
C19	4.981	C44	0.000			OVC19	133.407
C20	0.000	C45	49.750			OVC20	344.787
C21	0.000	C46	0.000			OVC21	206.537
C22	0.000	C47	0.000			OVC22	0.000
C23	0.000	C48	0.000			OVC23	0.000
C24	0.000	C49	0.000			OVC24	72.565
C25	0.000	C50	0.000			OVC25	0.000

[Fig. 9b]



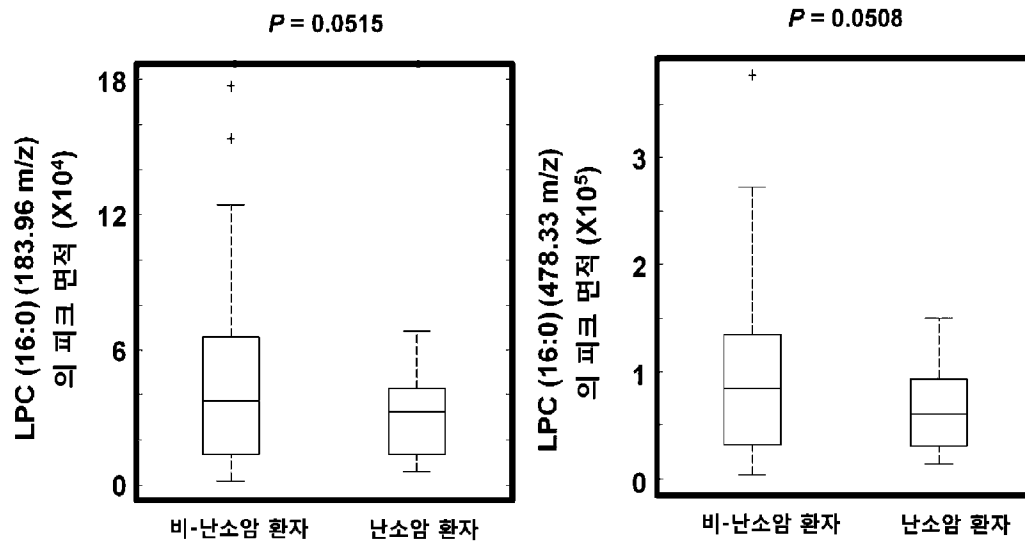
[Fig. 10a]



[Fig. 10b]

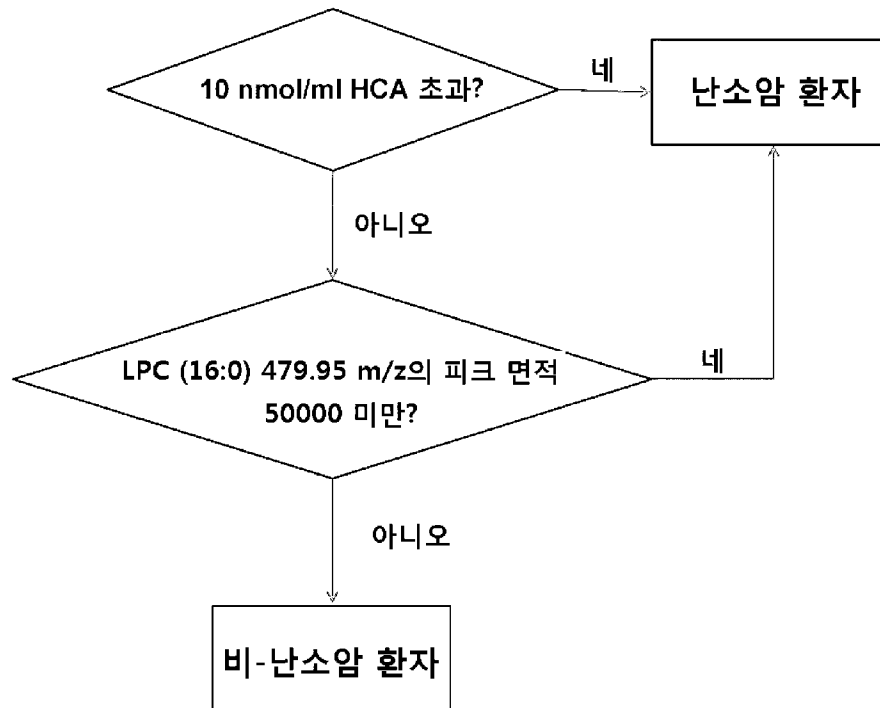
시료 번호	183.96 m/z	478.33 m/z	시료 번호	183.96 m/z	478.33 m/z
C1	177013	376781	OVC1	14153	30741
C2	69756	137502	OVC2	5859	13745
C3	124532	272566	OVC3	7971	15462
C5	25420	66997	OVC4	8396	19590
C6	54801	128622	OVC5	20228	53475
C7	37451	84449	OVC6	16271	39552
C8	83913	172936	OVC7	32559	69217
C9	24680	64998	OVC8	25213	60890
C10	24203	53327	OVC9	12003	30286
C11	154157	376840	OVC10	26121	59037
C12	22627	51433	OVC11	33905	51453
C13	48125	102808	OVC12	51453	115718
C14	52038	109721	OVC13	40846	87236
C15	45143	104486	OVC14	68258	149730
C16	10764	24637	OVC15	49476	114076
C17	4301	10910	OVC16	53280	132663
C18	6538	15969	OVC17	49151	109521
C19	5664	8595	OVC18	40636	84156
C20	1894	3979	OVC19	35516	78462
			OVC20	59084	130141
			OVC21	38533	80979
			OVC22	14389	31289
			OVC23	7779	15915
			OVC24	35065	83313
			OVC25	12879	29815

[Fig. 10c]



[Fig. 11]

L-호모시스테인산 및 LPC (16:0)을 이용한 난소암 환자의 층화 스크리닝



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/007760**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/92(2006.01)i, G01N 33/53(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)

G01N 33/574; C12Q 1/00; G01N 33/48; G01N 33/92; G01N 33/53

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: Lysophosphatidylcholine, L-Homocysteic acid, ovarian cancer, low-mass ion

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUTPHEN, R. et al., "Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer", Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2004, vol. 13, no. 7, pp. 1185-1191 See abstract.	1-10
A	LUKYANOVA, N. Y., "Characteristics of homocysteine-induced multidrug resistance of human MCF-7 breast cancer cells and human A2780 ovarian cancer cells", Experimental Oncology, 2010, vol. 32, no. 1, pp. 10-14 See abstract.	1-10
A	SCHULZ, R.-J., "Homocysteine as a biomarker for cognitive dysfunction in the elderly", Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2007, vol. 10, pp. 718-723 See abstract.	1-10
A	US 2002-0123084 A1 (MILLS, G. B. et al.) 05 September 2002 See claims 1, 9, 14-15.	1-10
A	KR 10-2004-0062819 A (OPTRON-TEC CO., LTD. et al.) 09 July 2004 See abstract.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 01 DECEMBER 2014 (01.12.2014)	Date of mailing of the international search report 01 DECEMBER 2014 (01.12.2014)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/007760

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KIM, S. C. et al., "Differential levels of L-homocysteic acid and lysophosphatidylcholine (16:0) in sera of patients with ovarian cancer", Oncology Letters, 03 June 2014 (Published online), vol. 8, pp. 566-574 See abstract.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/007760

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2002-0123084 A1	05/09/2002	AU 1998-65808 B2	07/02/2002
		AU 6580898 A	20/10/1998
		CA 2284630 A1	01/10/1998
		CN 1269014 A	04/10/2000
		EP 0985150 A1	15/03/2000
		EP 0985150 A4	21/08/2002
		IL 131985 D	19/03/2001
		JP 2002-510386 A	02/04/2002
		KR 10-2001-0005550 A	15/01/2001
		TR 9902828 T2	21/04/2000
		US 2002-0150955 A1	17/10/2002
		US 2004-0137541 A1	15/07/2004
		WO 98-43093 A1	01/10/1998
KR 10-2004-0062819 A	09/07/2004	KR 10-0487911 B1	06/05/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/92(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/574; C12Q 1/00; G01N 33/48; G01N 33/92; G01N 33/53

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: 리소포스파티딜콜린, L-호모시스테인산, 난소암, 저질량 이온

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SUTPHEN, R. 외, 'Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer', Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2004, 13 권, 7 호, 페이지 1185-1191 요약 참조.	1-10
A	LUKYANOVA, N. Y., 'Characteristics of homocysteine-induced multidrug resistance of human MCF-7 breast cancer cells and human A2780 ovarian cancer cells', Experimental Oncology, 2010, 32 권, 1 호, 페이지 10-14 요약 참조.	1-10
A	SCHULZ, R.-J., 'Homocysteine as a biomarker for cognitive dysfunction in the elderly', Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2007, 10 권, 페이지 718-723 요약 참조.	1-10
A	US 2002-0123084 A1 (MILLS, G. B. 외) 2002.09.05 청구항 1, 9, 14-15 참조.	1-10
A	KR 10-2004-0062819 A (주식회사 옵트론-텍 외) 2004.07.09 요약 참조.	1-10

☒ 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

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

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 12월 01일 (01.12.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 12월 01일 (01.12.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

최승희

전화번호 +82-42-481-8740



C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KIM, S. C. 외, `Differential levels of L-homocysteic acid and lysophosphatidylcholine (16:0) in sera of patients with ovarian cancer`, Oncology Letters, 2014.06.03.(온라인 공개), 8권, 페이지 566-574 요약 참조.	1-10

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2002-0123084 A1	2002/09/05	AU 1998-65808 B2 AU 6580898 A CA 2284630 A1 CN 1269014 A EP 0985150 A1 EP 0985150 A4 IL 131985 D JP 2002-510386 A KR 10-2001-0005550 A TR 9902828 T2 US 2002-0150955 A1 US 2004-0137541 A1 WO 98-43093 A1	2002/02/07 1998/10/20 1998/10/01 2000/10/04 2000/03/15 2002/08/21 2001/03/19 2002/04/02 2001/01/15 2000/04/21 2002/10/17 2004/07/15 1998/10/01
KR 10-2004-0062819 A	2004/07/09	KR 10-0487911 B1	2005/05/06