

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2024/035082 A1

2024 년 2 월 15 일 (15.02.2024) WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6886 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/011690

(22) 국제출원일:

2023 년 8 월 8 일 (08.08.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0101447 2022 년 8 월 12 일 (12.08.2022) KR

(71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산광역시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).

(72) 발명자: 노진경 (RHO, Jin Kyung); 01727 서울특별시 노원구 중계로8길 29, 102동 1203호, Seoul (KR). 이재철 (LEE, Jae Cheol); 06337 서울특별시 강남구 개포로 110길 15, 104동 203호, Seoul (KR). 최창민 (CHOI,

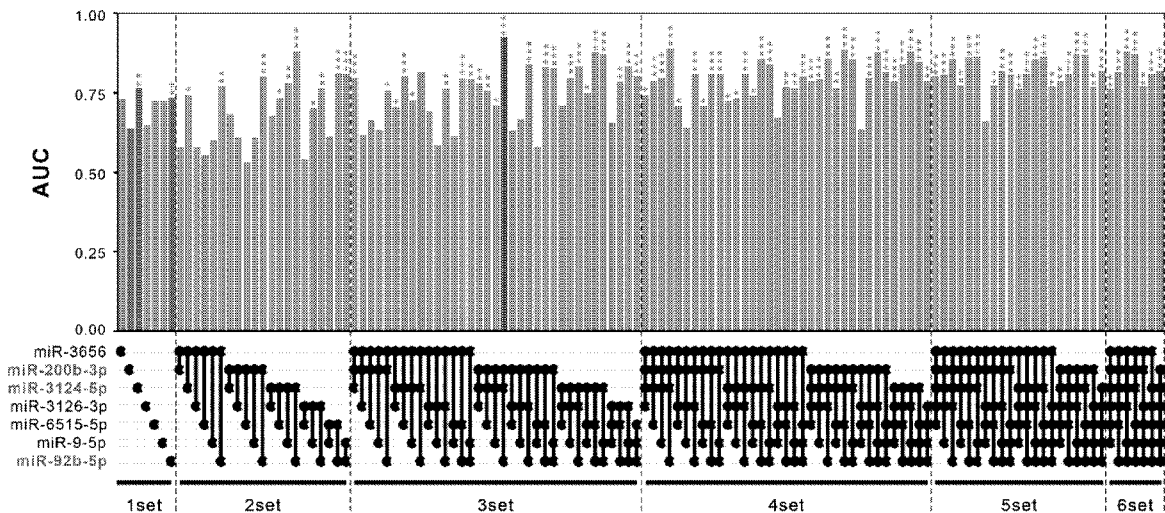
Chang-Min); 16000 경기도 의왕시 청계로 223-6, 101동 402호, Gyeonggi-do (KR). 김동하 (KIM, Dong Ha); 08616 서울특별시 금천구 시흥대로106길 4-3, Seoul (KR). 지원준 (JI, Wonjun); 05507 서울특별시 송파구 올림픽로 435, 201동 703호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울특별시 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: BIOMARKER COMPOSITION FOR DIAGNOSING SMALL CELL LUNG CANCER, CONTAINING EXOSOME-DERIVED MIRNAS AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 엑소솜 유래 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 바이오마커 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a biomarker composition for diagnosing small cell lung cancer, containing exosome-derived miRNAs as an active ingredient. Small cell lung cancer diagnosis and prognosis prediction accuracy has been analyzed using, individually or in combination, 7 miRNAs, which have been identified through analysis of miRNAs in exosomes separated from a normal group and a small cell lung cancer patient group and of which expression is specifically increased or decreased in the small cell lung cancer patient group, such that it has been identified that an miRNA combination consisting of miR-200b-3P, miR-3124-5p and miR-92b-5p exhibits an excellent small cell lung cancer diagnosis and prognosis prediction effect, and thus the composition can be effectively used as a biomarker composition for small cell lung cancer diagnosis or prognosis prediction.

[다음 쪽 계속]

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 엑소좀 유래 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 정상군 및 소세포폐암 환자군에서 분리한 엑소좀 내 miRNA 분석을 통해 확인한 소세포폐암 환자군에서 특이적으로 발현이 증가 또는 감소하는 7 개의 miRNA 를 개별 또는 조합하여 소세포폐암 진단 및 예후예측 정확도를 분석한 결과, miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA 조합이 우수한 소세포폐암 진단 및 예후예측 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 소세포폐암 진단 또는 예후예측용 바이오마커 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 엑소좀 유래 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 바이오마커 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 엑소좀 유래 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 전 세계적으로 높은 발병률과 사망률을 나타내는 질환이고, 그 중 폐암은 암 중에서도 높은 발병률과 사망률을 보인다. 폐암은 세포의 크기에 따라 비소세포폐암(non-small cell lung cancer; NSCLC)과 소세포폐암 (small cell lung cancer; SCLC)로 구분할 수 있는데, 그 중 소세포폐암은 폐암의 전체 약 10~20% 비율을 차지하고, 신경내분비(neuroendocrine) 유래의 암세포로서, 빠른 종양 형성 및 전이; 및 높은 재발률이 특징이다. 소세포폐암 진단 시 제한 병기(limited disease; LD) 및 확장 병기(extensive disease; ED)로 구분할 수 있는데, LD는 암이 종격동을 포함해서 폐의 한쪽에만 국한된 경우이고, ED는 암이 반대편 폐나 다른 장기로 전이된 경우이다. 소세포폐암은 종양 형성 및 전이 속도가 매우 빨라서 예후예측이 쉽지 않아, 소세포폐암 환자 대부분이 진단 시 이미 말기 환자(ED)로 판명받고, 5년 생존율이 10% 이내라고 보고되고 있다. 진단 후 최초 복합화학 요법(EP chemotherapy) 치료를 진행하지만 대부분의 환자에서 내성이 발생되고 ED 환자의 생존율이 LD 환자에 비해 현저하게 낮다고 보고되고 있다.
- [3] 이처럼 소세포폐암을 진단 후 치료를 진행한다 할지라도, 이미 말기 환자로 판명받는 경우가 많아 치료 효과를 기대하기 어렵고, 내성, 부작용 등의 문제도 존재하여 소세포폐암은 특히 조기 진단이 무엇보다 중요하다. 따라서, 소세포폐암을 진단 및 예후예측을 위한 바이오마커 개발이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명의 목적은 엑소좀 유래 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [5] 본 발명의 다른 목적은 엑소좀 유래 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 또다른 목적은 상기 소세포폐암 진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또다른 목적은 엑소좀 유래 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 예후예측용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또다른 목적은 소세포폐암 진단 또는 예후예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 소세포폐암 진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 키트를 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 예후예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 생물학적 시료에서 miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 소세포폐암 진단 또는 예후예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명에 따르면, 정상군 및 소세포폐암 환자군에서 분리한 엑소솜 내 miRNA 분석을 통해 확인한 소세포폐암 환자군에서 특이적으로 발현이 증가 또는 감소하는 7개의 miRNA를 개별 또는 조합하여 소세포폐암 진단 및 예후예측 정확도를 분석한 결과, miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA 조합이 우수한 소세포폐암 진단 및 예후예측 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 소세포폐암 진단 또는 예후예측용 바이오마커 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1a는 정상군 및 소세포폐암 초기 환자군에서 분리한 엑소솜의 형태학적 특성을 전자현미경으로 관찰한 결과이다. 도 1b 내지 1e는 상기 엑소솜의 사이즈별 분포도를 나노입자 추적 분석 방법을 통해 분석한 결과이다. 도 1f는 상기 엑소솜의 마커(TSG1, HSP90, CD63 및 CD81)를 웨스턴블롯(western blot)을 통해 분석한 결과이다.
- [16] 도 2는 정상군 및 소세포폐암 환자군에서 분리한 엑소솜 내부 구성요소를 Bioanalyzer를 통해 분석한 결과이다.
- [17] 도 3a는 정상군 및 소세포폐암 환자군에서 분리한 엑소솜 내 miRNA를 마이크로어레이(microarray) 방법으로 분석한 데이터를 주성분분석(PCA plot)을 통해 도식화한 결과이다. 도 3b는 정상군 및 소세포폐암 환자군에 따른 엑소솜 내 miRNA의 수 및 공통으로 가지는 miRNA 수를 분석한 결과이다. 도 3c는 정상군 및 소세포폐암 환자군에 따른 엑소솜 내 총합 및 평균 miRNA 수를 비교 및 분석

한 결과이다. 도 3d는 도 3c의 개별 환자의 결과물의 그룹별 평균치이다. 도 3e 및 3f는 각각 마이크로어레이 분석 결과, 정상군 및 소세포폐암 환자군 사이 통계적 유의확률(p -value <0.05) 차이를 보이는 31개의 miRNA; 및 가장 큰 발현을 변화를 나타내는 상위 또는 하위 10개의 miRNA를 분석한 결과이다.

- [18] 도 4a 및 도 4b는 상기 도 3e 및 3f에서 확인한 총 51개의 miRNA를 실시한 중합 효소연쇄반응(Real-Time PCR; RT-PCR)을 통해 검증한 후, 이를 바탕으로 25개의 miRNA를 선별한 결과이다.
- [19] 도 5a 내지 도 5g는 정상군 및 소세포폐암 환자군(제한병기; LD + 확장병기; ED)에 따른 상기 도 4에서 선별한 25개의 miRNA 중 특정 7개의 miRNA의 발현 변화를 RT-PCR을 통해 비교 및 분석한 결과이다.
- [20] 도 6은 수신자 조작 특성(AUC-ROC) 분류 모델을 이용하여 상기 도 5에서 확인한 특정 7개의 miRNA가 정상군 및 소세포폐암 환자군을 구분 및 환자군을 검출할 수 있는지 분석한 결과이다. 도 6a는 상기 7개의 miRNA의 개별 또는 가능한 모든 조합을 분류모델에 적용한 결과이다. 도 6b 내지 6j는 상기 도 6a의 적용 결과를 나타낸 그래프이다.
- [21] 도 7a 및 7b는 소세포폐암 환자군을 저위험군(Low risk) 및 고위험군(High risk)으로 구분하고, 위험비(hazard ratio: HR) 분석을 통해 두 그룹별 생존률을 비교 및 분석한 결과이다. 도 7c는 3개의 miRNA의 예상 타겟(target)을 생물정보학 기술을 통해 분석한 결과이다. 도 7d 및 7e는 상기 도 7c에서 확인한 예상 타겟 유전자를 대상으로 각각 KEGG pathway 및 Gene Ontology 분석을 통해 엑소솜을 통한 세포의 기능적변화 가능성을 분석한 결과이다.
- [22] 도 8은 상기 확보한 3개의 miRNAs(miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p) 개별 또는 혼합물 (miR3124 mimic, miR200b mimic, miR92b inhibitor)을 정상 폐 세포주 (BEAS2B cell)에 형질도입후 control 대비 변화하는 유전자의 양상을 mRNA-sequencing을 통해 확인한 결과이다. 도 8a는 BEAS2B 세포에 형질도입된 샘플들의 주성분 분석 (Principal Component Analysis, PCA) 결과이다. 도 8b는 BEAS2B 세포내 형질도입된 miRNAs를 통한 mRNAs의 변화양상을 control 그룹과 비교한 volcano plot이다. 도 8c는 그룹간 변화된 mRNA 개별 및 비교조합을 분류 모델에 적용한 것을 나타낸다. 도 8d 및 도 8e는 그룹별 유의미한 변화를 보인 mRNA의 유전자 기능분석 (Gene Ontology, GO) 결과를 도식하고 나열한 결과이다. 도 8f는 그룹별 유의미성을 가지는 mRNA를 이용한 질병분석 (Disease ontology, GO) 결과이다. 도 8g는 질병분석을 통해 도출한 Lung cancer 관련 유전자들의 발현정도를 그룹별로 분석한 유전자 세트 농축분석 (Gene set enrichment analysis, GSEA) 결과이다.
- [23] 도 9는 정상군 및 비소세포폐암(NSCLC) 환자군에 따른 특정 3개의 miRNAs 발현 변화를 나타낸 것이다. 도 9a는 miR-200b-3P, 도 9b는 miR-3124-5p, 도 9c는 miR-92b-5p의 miRNA 발현 변화를 RT-PCR을 통해 비교 및 분석한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

[24] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[25]

[26] 본 발명은 miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA를 유효 성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[27] 상기 miRNA는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생물학적 시료에서 분리된 엑소좀(exosome)에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[28] 또한, 상기 miRNA는 하기와 같은 서열을 가진다.

[29] 1) miR-200b-3P (MIMAT0000318, 서열번호 1):

UAAUACUGCCUGGUAAGAUGA

[30] 2) miR-3124-5p (MIMAT0014986, 서열번호 2):

UUCGCGGGCGAAGGCAAAGUC

[31] 3) miR-92b-5p (MIMAT0004792, 서열번호 3):

AGGGACGGGACGCGGUGCAGUG

[32] 본 발명의 용어 “진단(diagnosis)”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것으로, 본 발명의 목적상 소세포폐암의 발병 여부 또는 발병 가능성을 확인하는 것을 의미하며, 소세포폐암 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상에 대한 대상의 감수성을 판정하는 것, 테라메트릭스(therametrics)(예를 들어, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것) 등을 포함한다. 또한, 임상 상태의 일차 진단 또는 재발한 질병의 진단을 포함한다.

[33] 본 발명의 용어 “바이오마커(biomarker)”는 몸 안의 변화를 알아낼 수 있는 지표로서, 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 이의 변화 여부 등을 확인할 수 있는 물질로, 폴리펩타이드, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있다.

[34] 또한, 본 발명은 miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 조성물을 제공한다.

[35] 상기 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[36] 본 발명의 용어 “프라이머(primer)”는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로, 상보적인 주형과 염기쌍을 형성할 수 있고, 주형가닥 복사를 위한 시작 시점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA polymerase 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트(nucleotide triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티

센스 프라이머의 길이는 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

- [37] 본 발명의 용어 “프로브(probe)”는 miRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 수 개 내지 수백 개의 염기서열의 단편을 의미하며, 라벨링 되어있어서 상기 miRNA의 존재 유무 및 발현량을 확인할 수 있다. 적절한 프로브 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [38] 또한, 본 발명은 상기 소세포폐암 진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 키트를 제공한다.
- [39] 상기 키트는 소세포폐암이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 상기 miRNA의 발현수준을 측정하여 소세포폐암 발병 여부를 진단하는 데 사용될 수 있다.
- [40] 상기 키트는 상기 miRNA 발현수준을 측정하는 제제뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 키트는 PCR을 수행하기 위해 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함할 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 MgCl₂를 포함할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.
- [41] 또한, 본 발명에 따른 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [42] 또한, 본 발명은 miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 예후예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [43] 본 발명의 용어 “예후예측”은 “예후”와 동일한 의미로 사용되고, 질환의 경과 및 결과를 미리 예측하는 행위를 의미한다. 보다 구체적으로, 예후예측이란 질환의 치료 후 경과와 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있고, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 후 병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [44] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 생물학적 시료에서 miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 소세포폐암 진단 또는 예후예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[45] 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 분리된 엑소좀(exosome)에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[46] 상기 miRNA의 발현수준은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 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 군에서 선택된 하나 이상의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[47]

[48] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[49]

[50] **[실시예 1] 엑소좀(exosome) 분리**

[51]

[52] 폐의 결절이 확인된 정상군과 소세포폐암 초기(limited stage) 환자군 각 5명의 혈청 1ml을 수집하고, 초고속 원심분리기를 사용하여 엑소좀을 분리하였다. 수집된 혈청을 10,000 x g 속도에서 30분간 원심분리 하여 혈청 내 세포 및 잔해 물질을 제거한 후, 상등액을 100,000 x g 속도에서 70분간 원심분리 하여 엑소좀을 수집하였다. 수집된 엑소좀은 PBS로 세척과정을 거친 후 100,000 x g 속도에서 70분간 엑소좀 분리 동일조건으로 원심분리하여 수집 후 분석 과정을 거쳤다.

[53]

[54] **[실시예 2] 엑소좀 특성 분석**

[55]

[56] 상기 실시예 1에서 분리한 엑소좀의 특성을 확인하기 위해, 하기와 같은 분석방법을 사용하였다.

[57]

[58] 2-1. 전자현미경 분석

[59] 엑소좀의 형태학적 특성을 확인하기 위해, 엑소좀 펠렛을 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)에 1시간 동안 고정한 후 세척과정을 거쳤다. 이후 1% 사산화오스mium(OsO_4)에서 고정하고 탈수 과정을 거친 후, 1% 아세트산 우라닐(uranyl-acetate)을 처리하고 염색 및 고정 과정을 거쳤다. 초박절편(ultrathin sections)은 Hitachi 7100 전자현미경을 사용하였다.

[60]

[61] 2-2. 나노입자 추적 분석

[62] 엑소좀의 사이즈별 분포도를 확인하기 위해, NanoSight NS300 장비를 이용하여 엑소좀의 사이즈 및 조밀도를 분석하였다. NTA 2.1 analytical software를 사용하여 데이터를 해석하고, 엑소좀의 사이즈 분포도를 도식화하였다.

[63]

[64] 2-3. 웨스턴블롯(western blot)

[65] 엑소좀의 특이적인 마커를 확인하기 위해, 엑소좀에 RIPA buffer를 넣고 단백질을 추출 후 정량하였다. 추출된 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 분리하고, 이모빌론 막(immobilon membrane)으로 electrotransfer한 후 엑소좀 마커를 확인하였다.

[66]

[67] 2-4. Bioanalyzer 분석

[68] 엑소좀 내부의 구성요소를 확인하기 위해, 엑소좀 내 RNA를 추출하고 agilent 2100 bioanalyzer를 사용하여 엑소좀 내 RNA integrity를 확인하였다.

[69]

[70] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 엑소좀의 존재 여부와 두 실험군 간 엑소좀의 형태, 크기 및 양적인 차이가 없는 것을 확인하였고, 도 2에 나타난 바와 같이, 엑소좀 구성요소 중 miRNA가 주요 인자인 것을 확인하였다.

[71]

[72] **[실시예 3] 마이크로어레이(microarray) 분석**

[73]

[74] 정상군과 소세포폐암 환자군 사이의 엑소좀 miRNA 발현 차이를 확인하기 위해, 마이크로어레이를 통한 miRNA 프로파일링 분석을 수행하였다. 상기 분석을 통해 확인한 miRNA들을 온라인 데이터베이스인 VESICLEPEDIA(2929개, <http://www.microvesicles.org/>) 및 EXCARTA(2766개, <http://www.exocarta.org/>)에 등록된 miRNA들과 비교하였고, 상기 분석한 마이크로어레이 데이터를 주성분분석(PCA plot)을 통하여 도식화하여 정상군 및 소세포폐암 환자군을 비교하였다.

[75] 그 결과, 정상군과 소세포폐암 환자군에서 총 1635개의 엑소좀 miRNA의 존재를 확인하였고, 상기 온라인 데이터베이스에 등록된 miRNA들과 비교한 결과, 상기 1635개의 miRNA 중 온라인 데이터베이스 상에 등록되지 않은 135개의 새로운 엑소좀 miRNA가 존재하는 것을 확인하였다.

[76] 또한, 상기 분석한 마이크로어레이 데이터를 주성분분석(PCA plot)을 통하여 도식화한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 정상군의 경우 응집된 분포를 나타낸 반면, 소세포폐암 환자군의 경우 산발적인 분포를 나타내는 것을 확인하였다. 이는 정상군과 구별되는 특징으로, 암세포의 이질성이 엑소좀에도 반영되는 것을 의미한다.

[77] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 마이크로어레이 분석 결과, 두 실험군에서 통계적 유의확률 ($p\text{-value} < 0.05$) 차이를 보이는 31개의 miRNA와 가장 큰 발현을 변화가 관찰된 상위 또는 하위 각각 10개의 miRNA를 확인하였다.

[78]

[79] [실시예 4] 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time PCR) 분석

[80]

[81] 상기 실시예 3에서 확인한 총 51개(통계적 유의확률 차이를 보이는 31개 + 가장 큰 발현율 변화의 상위/하위 각각 10개) miRNA들을 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time PCR; 이하 RT-PCR이라 함) 방법을 통해 검증하였다. poly A 꼬리 연결 miRNA와 혼성화할 수 있는 어댑터를 올리고 뉴클레오티드를 사용하여 miRNA를 역전사시킨 후, 1) miRNA로부터 역전사된 cDNA, 2) 특이적으로 혼성화 가능한 올리고뉴클레오티드 및 3) 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 연장을 프라이머를 사용하여 miRNA를 증폭시키고 증폭 정도를 Cybergreen을 사용하여 분석하였다. 이를 바탕으로 25개의 miRNA들을 선별하였고, 상기 선별한 25개의 miRNA는 도 4에 나타난 바와 같다.

[82] 또한, 상기 선별한 25개의 miRNA를 대규모 집단에서 재검증하기 위해, 50명의 정상군과 76명의 소세포폐암 환자군(제한병기_LD: 28명, 확장병기_ED: 48명)의 혈액을 수집하여 혈청 내 엑소솜을 분리하고, 상기 25개의 miRNA를 RT-PCR 방법을 통해 분석하였다.

[83] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 25개 중 7개(miR-3565, miR3124-5p, miR-200b-3p, miR-6515, miR-3126-3p, miR-9-5p 및 miR-92b-5p)가 유의성이 있음을 확인하였고, 구체적으로, 상기 7개의 miRNA 중 6개(miR-3565, miR3124-5p, miR-200b-3p, miR-6515, miR-3126-3p 및 miR-9-5p)는 소세포폐암 환자군에서 특이적인 증가를, 나머지 1개(miR-92b-5p)는 소세포폐암 환자군에서 특이적인 감소를 나타내는 것을 확인하였다.

[84] 또한, 정상군 및 소세포폐암 환자군의 구분 및 환자군 검출 가능성 여부를 확인하기 위해, 민감도 및 특이도를 반영하는 수신자 조작 특성(AUC-ROC) 분류 모델에 상기 7개의 엑소솜 miRNA의 개별 또는 가능한 모든 조합을 적용하여 분석하였고, 정확도(accuracy; 이하 ACC라 함) 수치를 도식화하였다.

[85] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, miR-200b-3P, miR3124-5p 및 miR-92b-5p의 miRNA 조합이 AUC=0.93 및 $P<0.0001$ 의 수치를 나타내어, 소세포폐암을 구분하고 진단할 수 있는 가장 이상적인 분류 모델인 것을 확인하였다. 상기 3개의 miRNA는 표 1과 같은 서열을 가진다.

[86]

[87] [표1]

유전자	염기서열	서열번호
miR-200b-3P	UAAUACUGCCU GGUAAUGAUGA	1
miR3124-5p	UUCGCGGGCGA AGGCAAAGUC	2

miR-92b-5p	AGGGACGGGAC GCGGUGCAGUG	3
------------	----------------------------	---

[88]

[89] **[실시예 5] 소세포폐암 예후예측인자로서의 활용 가능성 분석**

[90]

[91] 엑소솜 miRNA를 이용한 소세포폐암 환자의 예후예측 가능성 여부를 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[92]

[93] 5-1. miRNA 발현에 따른 환자 생존률 분석

[94] 상기 실시예 3에서 확인한 7개의 miRNA에 따른 소세포폐암 환자의 예후예측 가능성을 확인하기 위해, 상기 miRNA 발현에 따른 환자 생존률을 분석하였다. miRNA 발현은 PCR을 통하여 검출된 수치를 기준으로 발현률 상위환자군과 하위환자군으로 구분하고, 이들 간 생존률 분석에는 Kaplan-Meier 생존곡선을 이용하였다. 유의성 검증에는 GraphPad Prism version 8.0 프로그램을 사용하였다.

[95] 그 결과, 상기 7개의 개별 miRNA 모두에서 생존률의 유의성을 확인할 수 없었다.

[96]

[97] 5-2. 위험비(hazard ratio) 분석

[98] 상기 실시예 3에서 확인한 3개의 miRNA(miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p) 조합에 따른 환자 예후예측 가능성을 확인하기 위해, 상기 miRNA 조합의 위험비(hazard ratio: HR) 분석을 수행하였다. 76명의 소세포폐암 환자를 저위험군(Low risk) 및 고위험군(High risk)으로 구분하였고, 두 실험군 사이 생존률을 비교 및 분석하였다.

[99] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 저위험군에 비해 고위험군의 생존율이 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다(p-value=0.0029). 이는 상기 miRNA 조합을 통한 소세포폐암의 예후예측이 가능함을 의미한다.

[100]

[101] 5-3. 엑소솜을 통한 세포의 기능적변화 가능성 분석

[102] 엑소솜을 통한 세포의 기능적변화 가능성을 확인하기 위해, 생물정보학 기술을 사용하여 상기 3개의 miRNA(miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p)의 예상 타겟(target)을 확인하고, 상기 예상 타겟 유전자를 대상으로 KEGG pathway 및 Gene Ontology 분석을 수행하였다.

[103] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p의 조합이 소세포폐암의 진단 및 예후예측인자로서 활용 가능하다는 것을 확인하였다.

[104]

[105] **[실시예 6] miRNAs의 개별 또는 조합에 따른 효과 분석**

[106]

[107] 3개의 miRNAs(miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p)의 개별 또는 조합에 따른 소세포폐암의 진단 및 예후예측인자로서 효과를 비교하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[108] 정상 폐암세포주 (BEAS2B cell)에 상기 확보한 3개의 miRNAs(miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p) 개별 또는 혼합물 (miR3124 mimic, miR200b mimic, miR92b inhibitor)을 세포내 형질도입후 이들의 기능적인 부분을 확인해본 결과, 도 8에 나타난 결과와 같이 ERBB, EGF, JACK-stat 경로의 활성화와 더불어 폐 관련, 특히 폐암 관련 유전자의 변화 양상이 혼합물이 처리된 세포 그룹에서 가장 크게 증가하는 것을 확인하였다.

[109] 이러한 결과를 통하여 miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p의 조합이 소세포폐암의 진단 및 예후예측인자로서 활용 가능하다는 것을 확인하였다.

[110]

[111] **[실시예 7] miRNAs에 의한 비소세포폐암(NSCLC)에서의 발현 양상 분석**

[112]

[113] 3개의 miRNAs(miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p)이 소세포폐암(SCLC) 특이적으로 발현하는지를 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[114] 도 9를 통해 확인한 비소세포폐암(NSCLC) 환자 그룹에서 3개의 miRNAs(miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p)의 발현양상은 정상비교군과 비교하여 유의미한 증감양상이 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 3개의 miRNA는 소세포폐암 특이적인 바이오마커로 활용 가능하다는 것을 확인하였다.

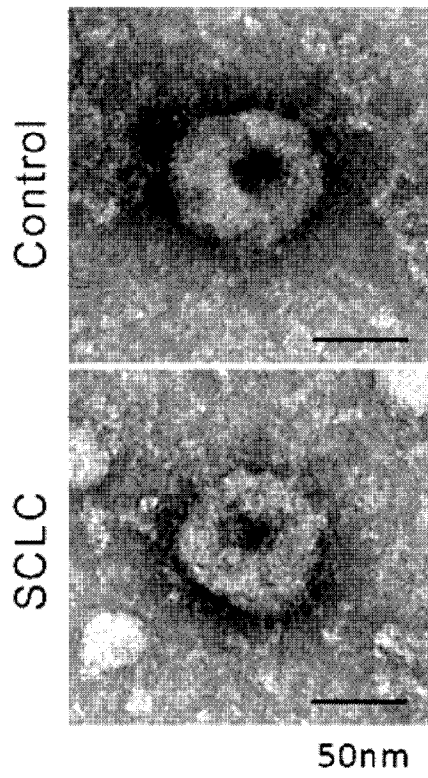
[115]

[116] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

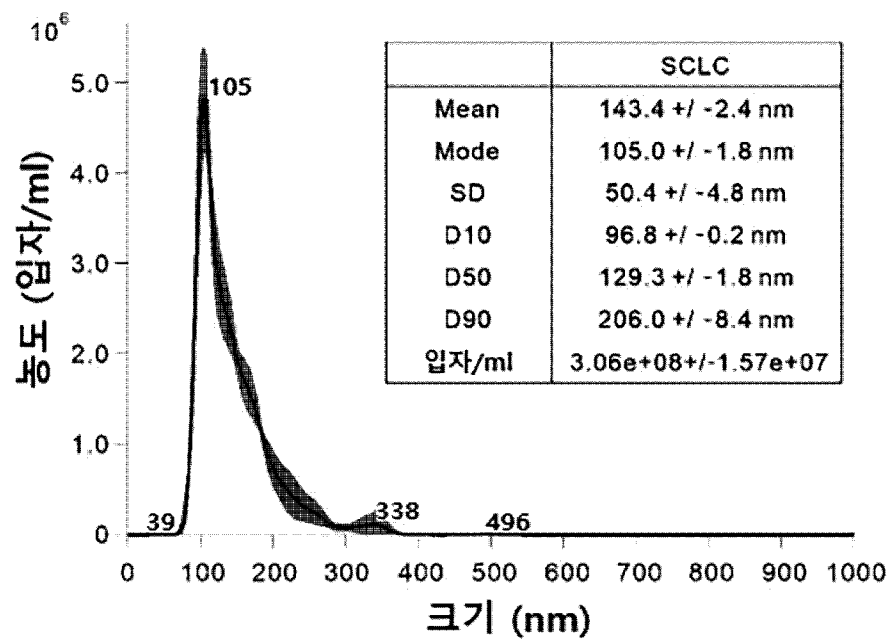
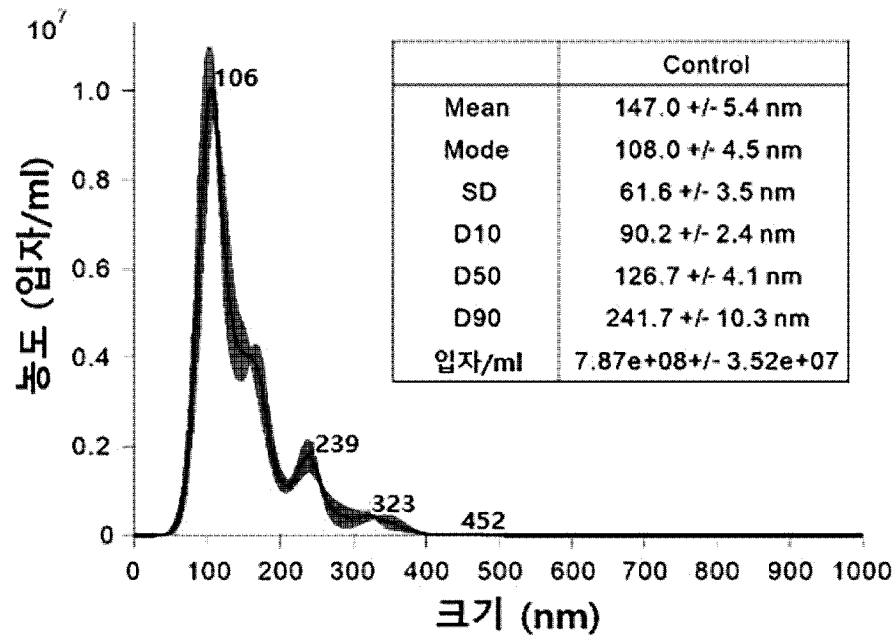
청구범위

- [청구항 1] miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 바이오마커 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 miRNA는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생물학적 시료에서 분리된 엑소좀(exosome)에서 유래된 것을 특징으로 하는 소세포폐암 진단용 바이오마커 조성물.
- [청구항 3] miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 조성물.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 소세포폐암 진단용 조성물.
- [청구항 5] 청구항 3 또는 청구항 4의 조성물을 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 진단용 키트.
- [청구항 6] miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA를 유효성분으로 포함하는 소세포폐암 예후예측용 바이오마커 조성물.
- [청구항 7] 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계; 및
상기 분리된 생물학적 시료에서 miR-200b-3P, miR-3124-5p 및 miR-92b-5p로 이루어진 miRNA의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 소세포폐암 진단 또는 예후예측을 위한 정보 제공 방법.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 분리된 엑소좀(exosome)에서 유래된 것을 특징으로 하는 소세포폐암 진단 또는 예후예측을 위한 정보 제공 방법.
- [청구항 9] 청구항 7에 있어서, 상기 miRNA의 발현수준은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 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 군에서 선택된 하나 이상의 방법으로 측정하는 것을 특징으로 소세포폐암 진단 또는 예후예측을 위한 정보 제공 방법.

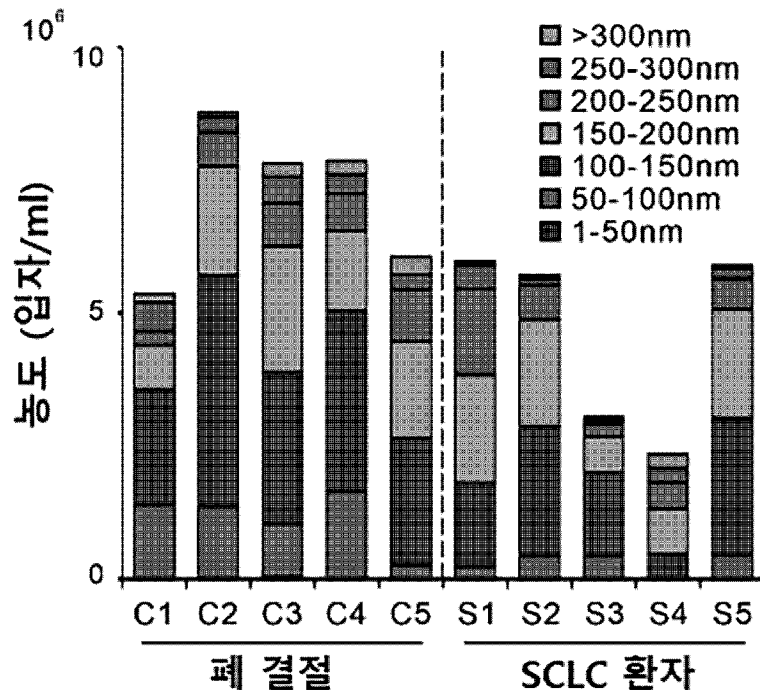
[도 1a]



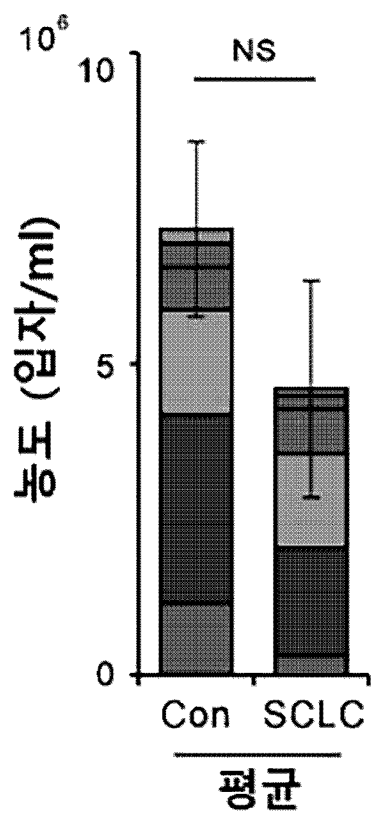
[도 1b]



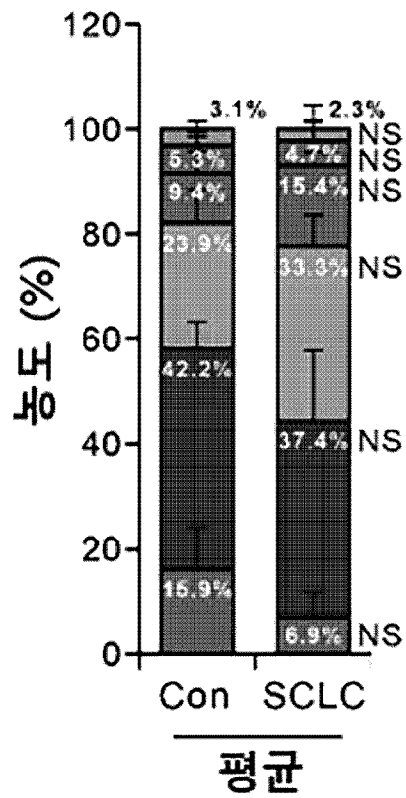
[도1c]



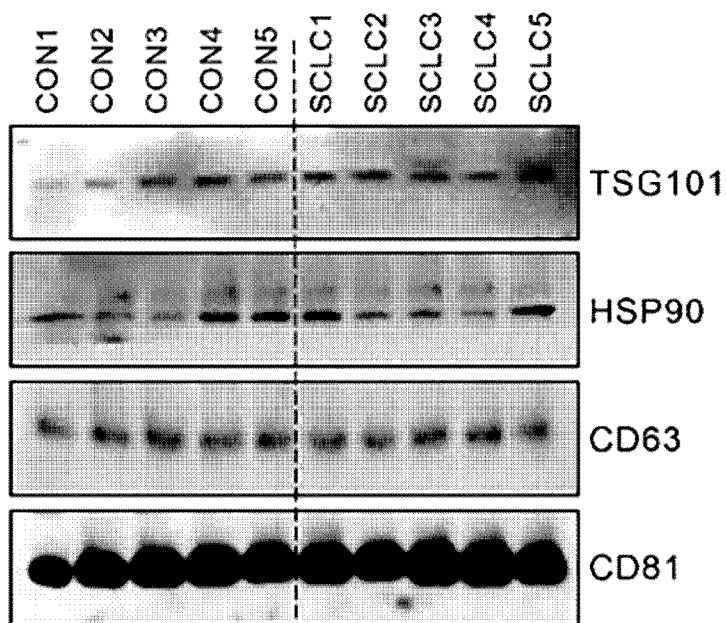
[도1d]



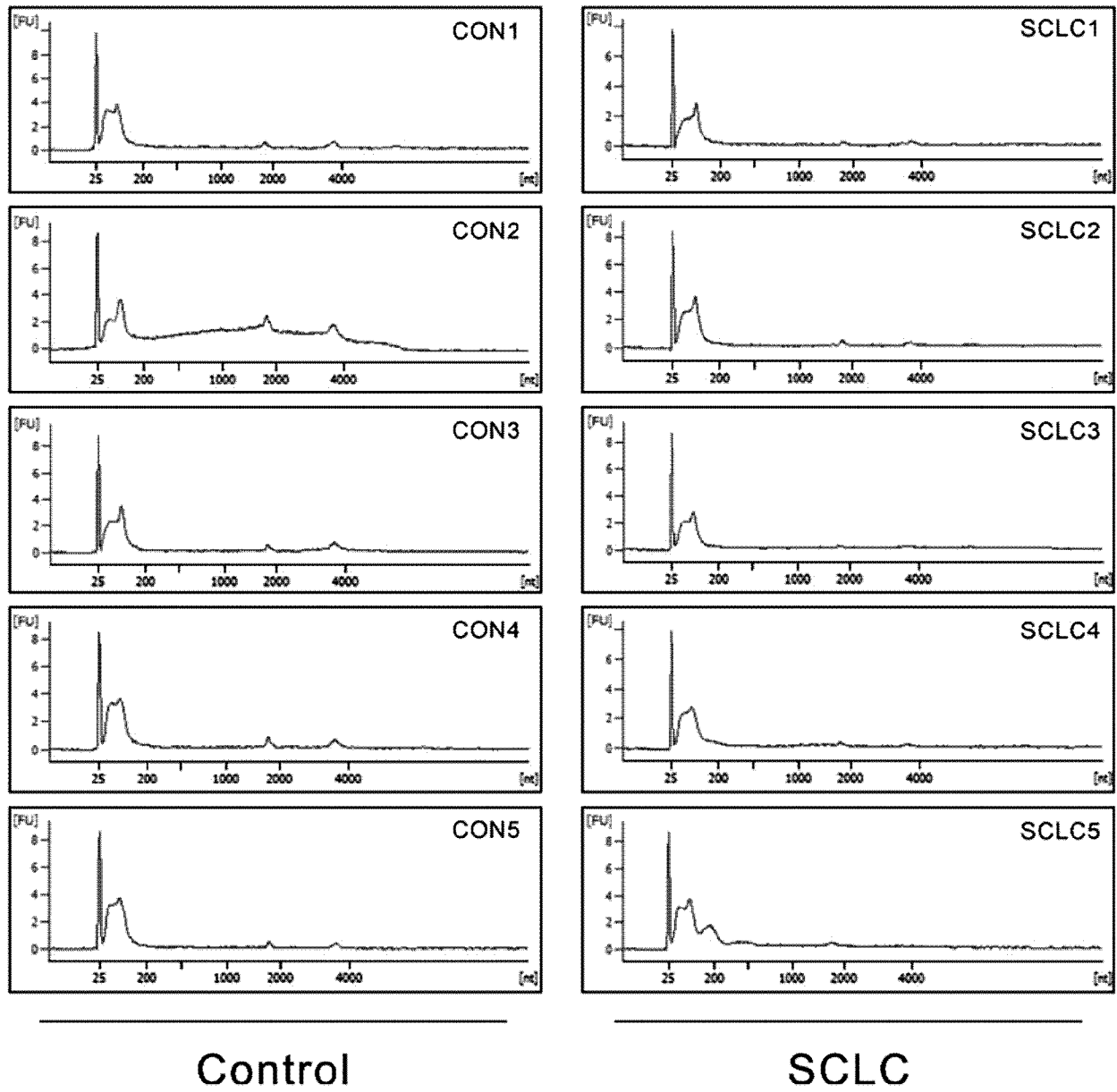
[도 1e]



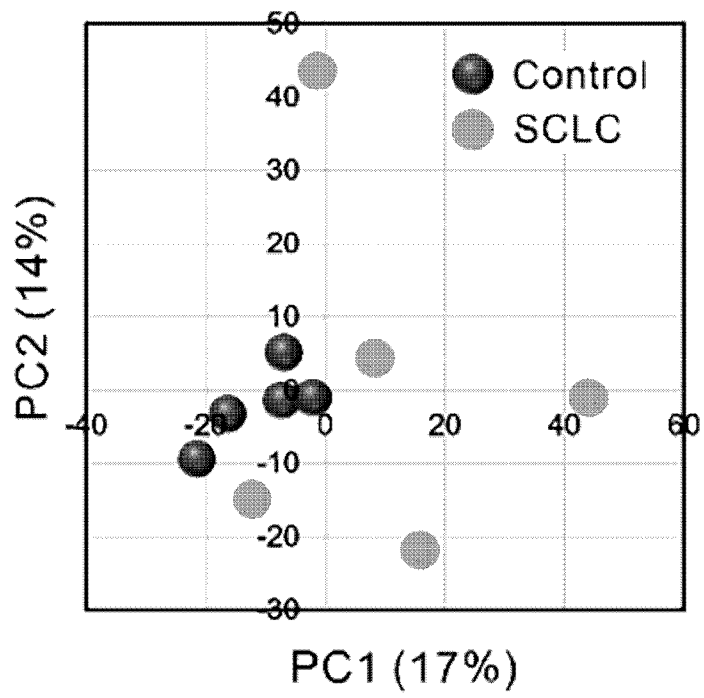
[도 1f]



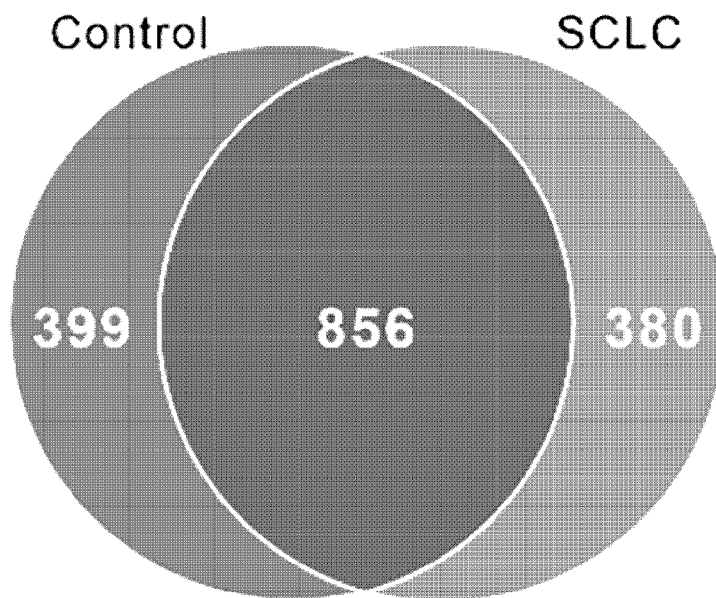
[도2]



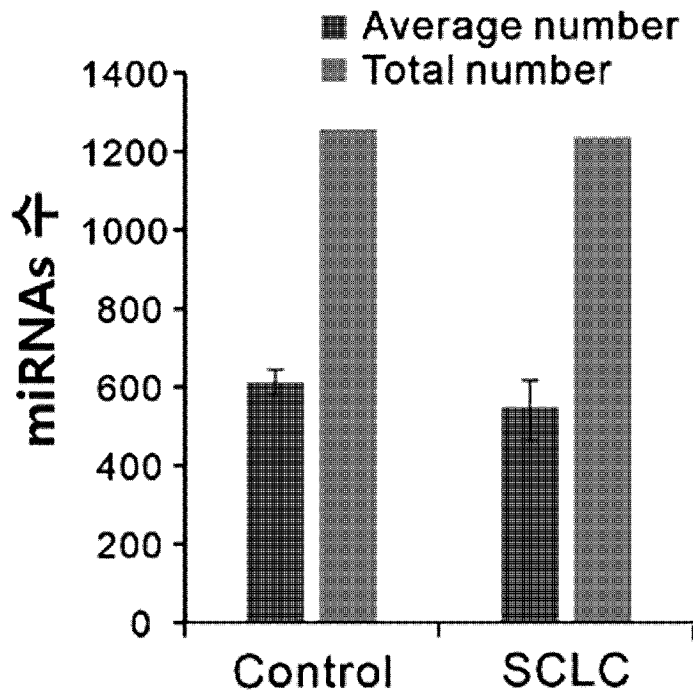
[도3a]



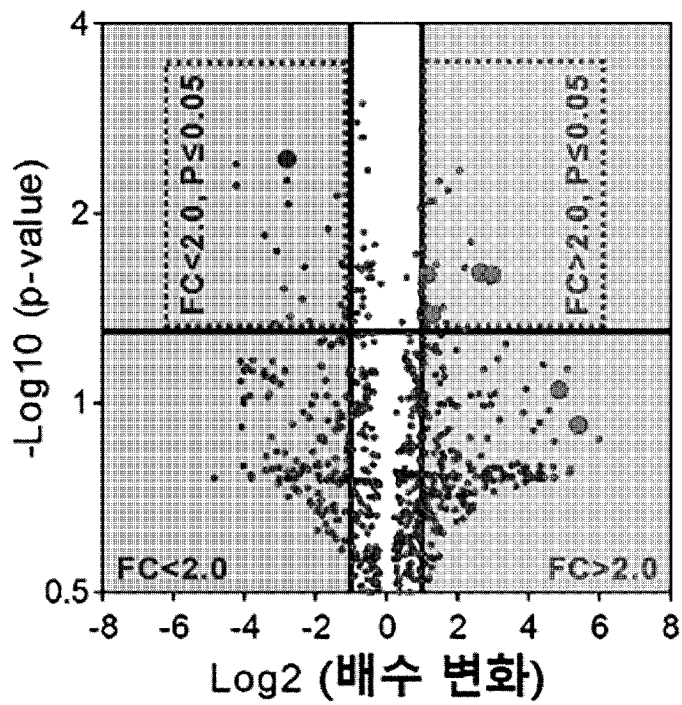
[도3b]



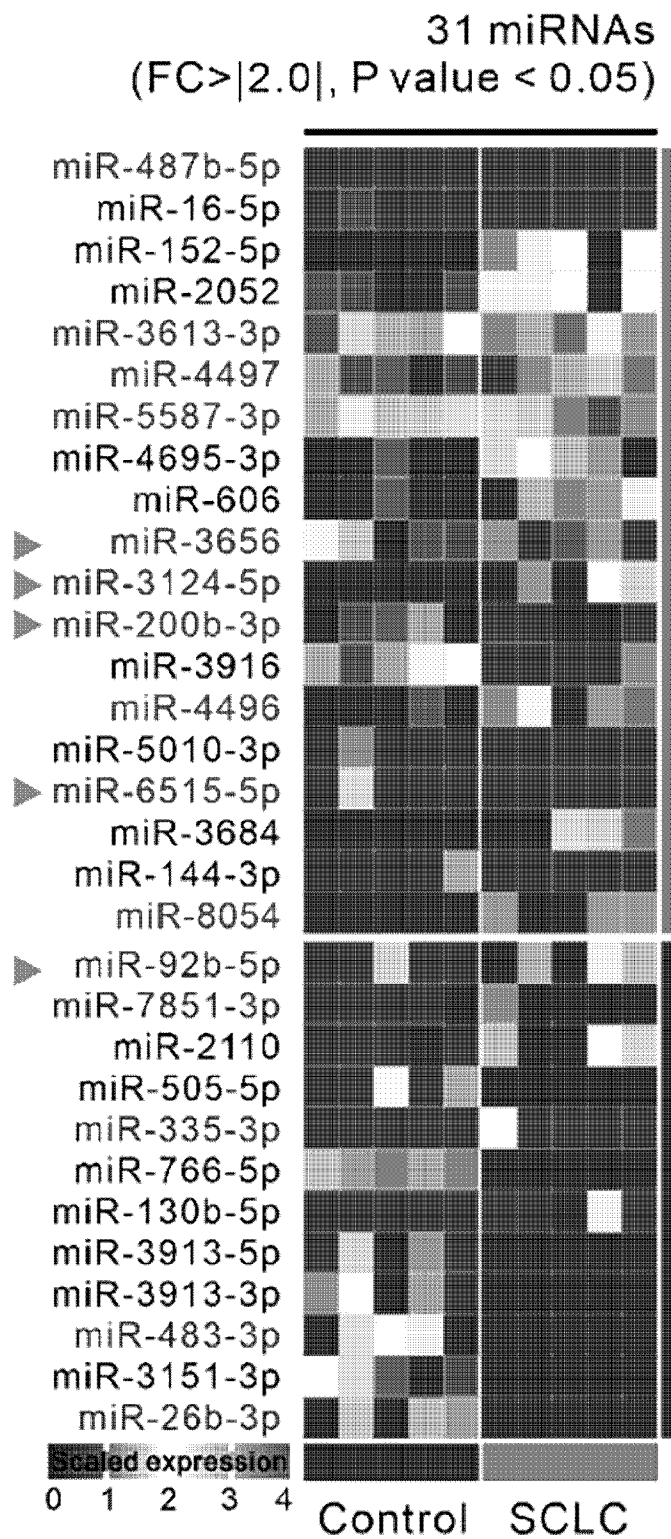
[도3c]



[도3d]

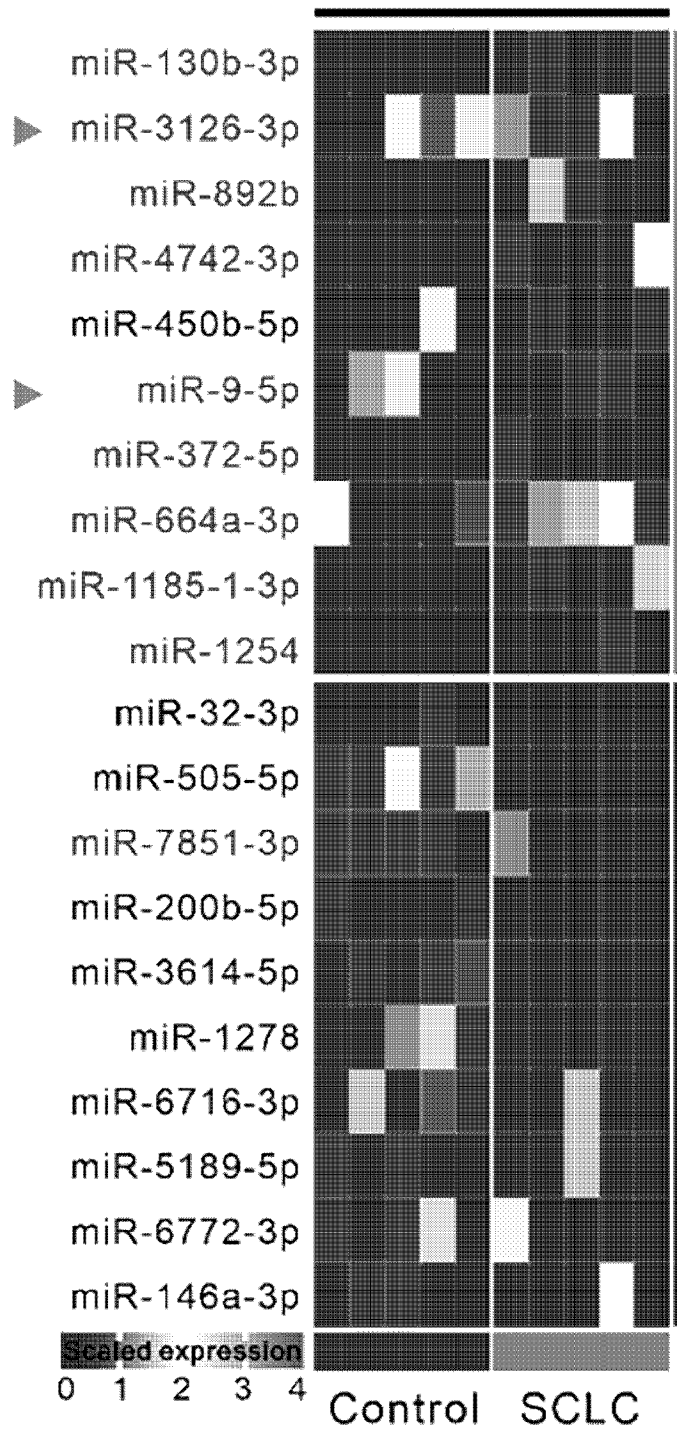


[도3e]



[도3f]

위 10개의 miRNAs (상위 또는 하위)



[도4a]

P-value Top 31	miRNA array		QRT-PCR	
SCLC UP 19	SCLC/CON		SCLC/CON	
유전자 기호	배수 변화	p-value	배수 변화	p-value
hsa-miR-487b-5p	4.16	0.005	3.32	0.013
hsa-miR-16-5p	2.80	0.006	1.45	0.181
hsa-miR-152-5p	3.32	0.007	1.86	0.078
hsa-miR-2052	2.51	0.008	ND	ND
hsa-miR-3613-3p	2.31	0.008	5.39	0.008
hsa-miR-4497	5.24	0.016	3.23	0.074
hsa-miR-5587-3p	2.04	0.018	3.65	0.009
hsa-miR-4695-3p	2.66	0.022	1.75	0.013
hsa-miR-606	4.64	0.023	ND	ND
hsa-miR-3656	6.29	0.025	4.16	0.049
hsa-miR-3124-5p	2.20	0.025	4.33	0.042
hsa-miR-200b-3p	7.88	0.025	2.85	0.040
hsa-miR-3916	7.48	0.028	1.55	0.248
hsa-miR-4496	2.17	0.037	3.78	0.017
hsa-miR-5010-3p	3.02	0.038	1.73	0.156
hsa-miR-6515-5p	2.43	0.041	2.77	0.036
hsa-miR-3684	3.23	0.046	2.15	0.132
hsa-miR-144-3p	2.23	0.047	ND	ND
hsa-miR-8054	4.60	0.049	4.55	0.035

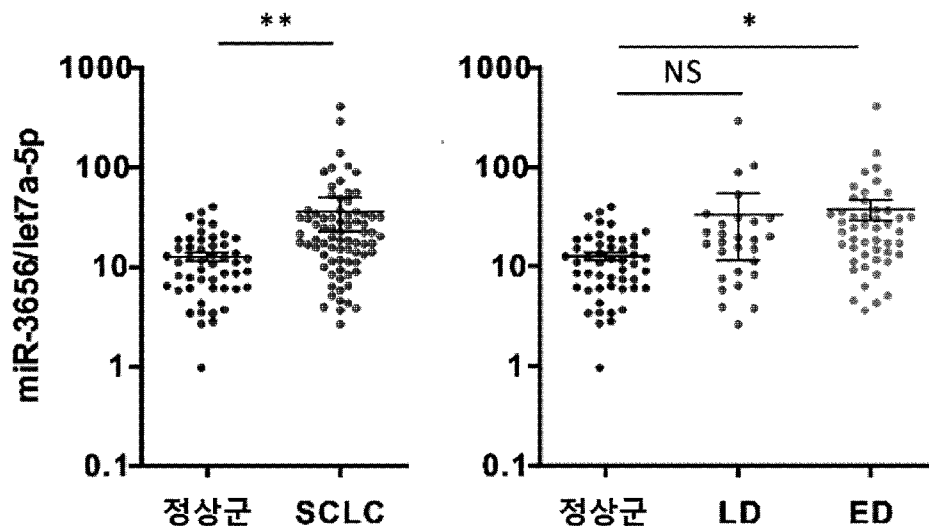
SCLC DOWN 12	CON/SCLC		CON/SCLC	
유전자 기호	배수 변화	p-value	배수 변화	p-value
hsa-miR-92b-5p	6.96	0.007	9.761	0.041
hsa-miR-7851-3p	18.64	0.008	13.938	0.023
hsa-miR-2110	6.99	0.011	6.208	0.087
hsa-miR-505-5p	18.77	0.012	9.160	0.085
hsa-miR-335-3p	2.62	0.015	2.818	0.049
hsa-miR-766-5p	6.76	0.017	10.460	0.141
hsa-miR-130b-5p	3.12	0.026	3.486	0.101
hsa-miR-3913-5p	10.77	0.028	13.502	0.099
hsa-miR-3913-3p	8.57	0.036	3.696	0.105
hsa-miR-483-3p	2.38	0.043	5.329	0.056
hsa-miR-3151-3p	2.34	0.044	5.516	0.078
hsa-miR-26b-3p	4.90	0.045	2.008	0.059

[도4b]

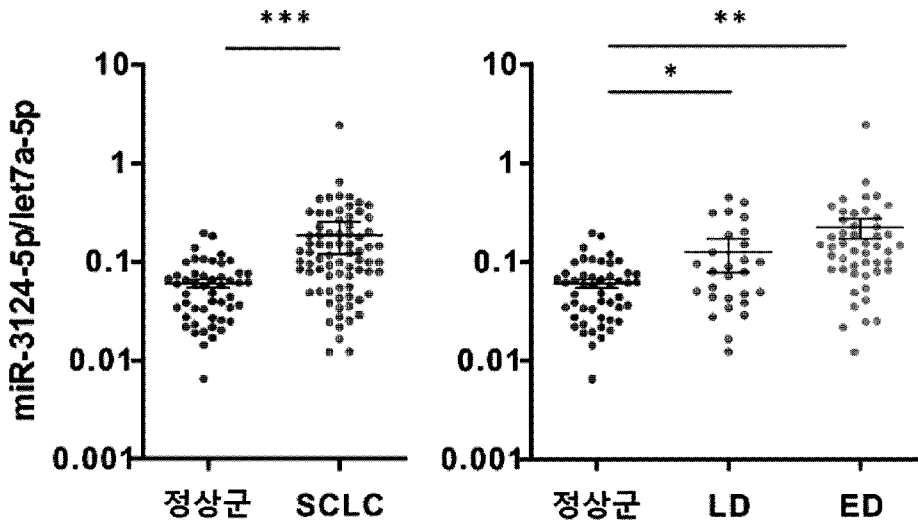
Expression Top 10	miRNA array		QRT-PCR	
SCLC UP 10	SCLC/CON		SCLC/CON	
유전자 기호	배수 변화	p-value	배수 변화	p-value
hsa-miR-130b-3p	64.02	0.133	3.45	0.047
hsa-miR-3126-3p	42.58	0.119	3.90	0.026
hsa-miR-892b	36.35	0.164	3.98	0.036
hsa-miR-4742-3p	35.49	0.168	2.98	0.032
hsa-miR-450b-5p	34.23	0.073	ND	ND
hsa-miR-9-5p	29.09	0.089	6.25	0.009
hsa-miR-372-5p	26.64	0.173	6.47	0.008
hsa-miR-664a-3p	26.49	0.135	5.81	0.010
hsa-miR-1185-1-3p	26.12	0.161	7.49	0.003
hsa-miR-1254	26.03	0.173	2.65	0.040

SCLC DOWN 10	CON/SCLC		CON/SCLC	
유전자 기호	배수 변화	p-value	배수 변화	p-value
hsa-miR-32-3p	28.86	0.347	ND	ND
hsa-miR-505-5p	18.77	0.012	9.160	0.085
hsa-miR-7851-3p	18.64	0.008	13.938	0.023
hsa-miR-200b-5p	17.22	0.165	0.810	0.415
hsa-miR-3614-5p	17.22	0.137	0.828	0.404
hsa-miR-1278	16.89	0.243	1.584	0.102
hsa-miR-6716-3p	16.26	0.320	1.814	0.216
hsa-miR-5189-5p	16.21	0.193	4.074	0.090
hsa-miR-6772-3p	16.09	0.200	0.805	0.390
hsa-miR-146a-3p	16.00	0.150	8.517	0.151

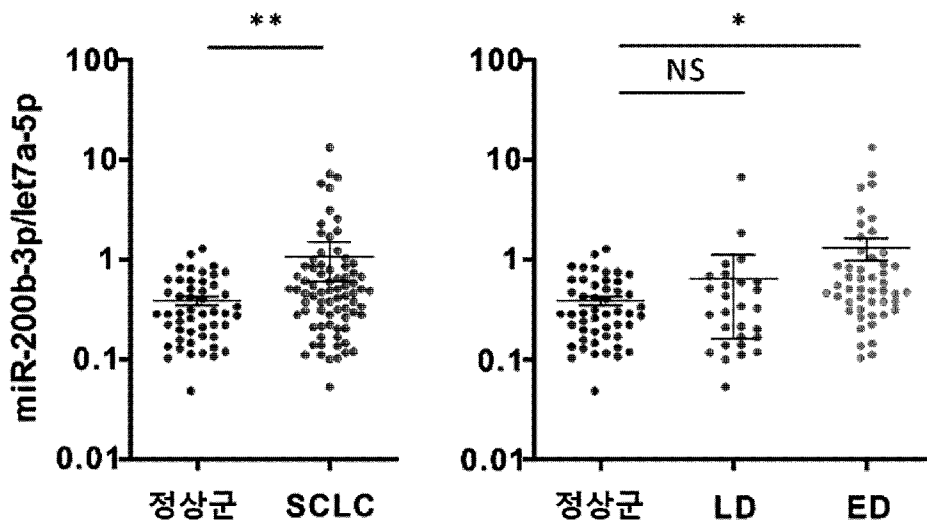
[도5a]



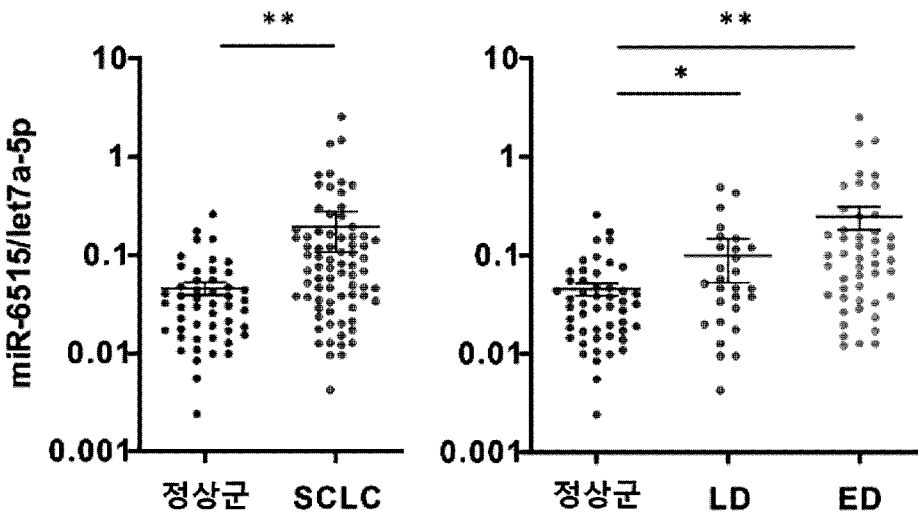
[도5b]



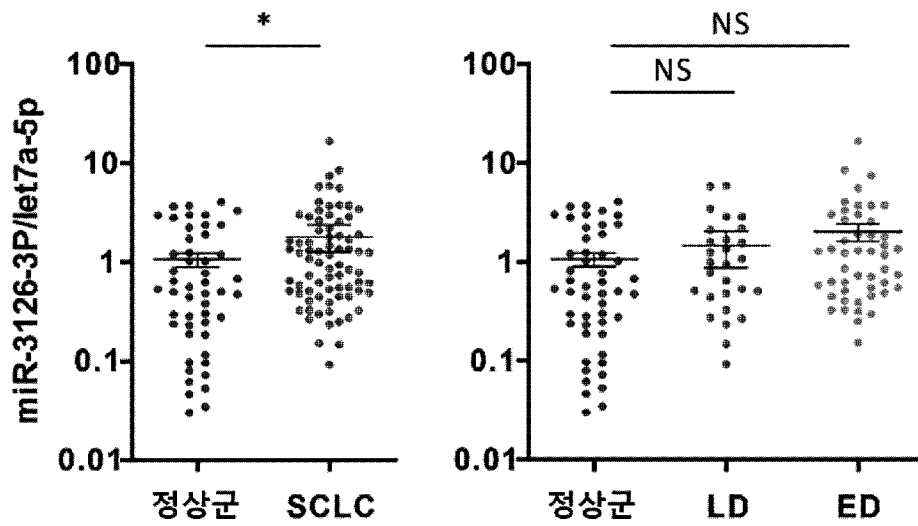
[도5c]



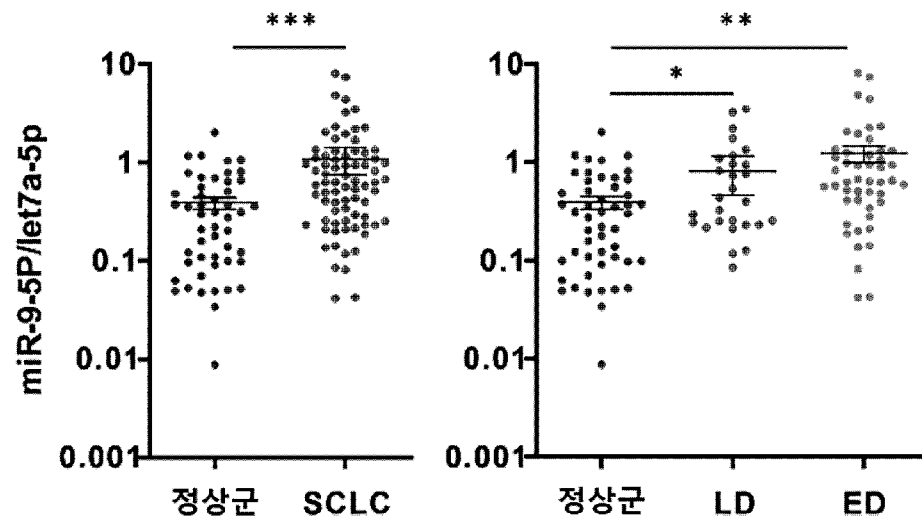
[도5d]



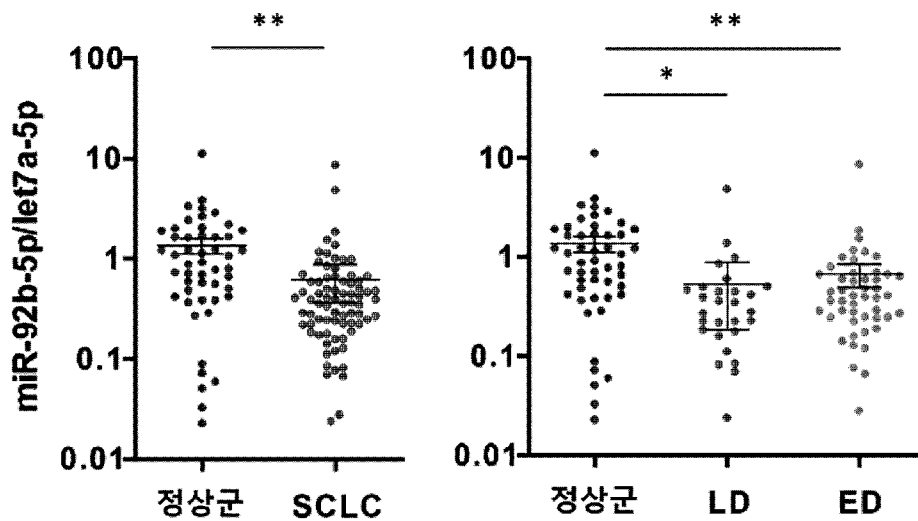
[도5e]



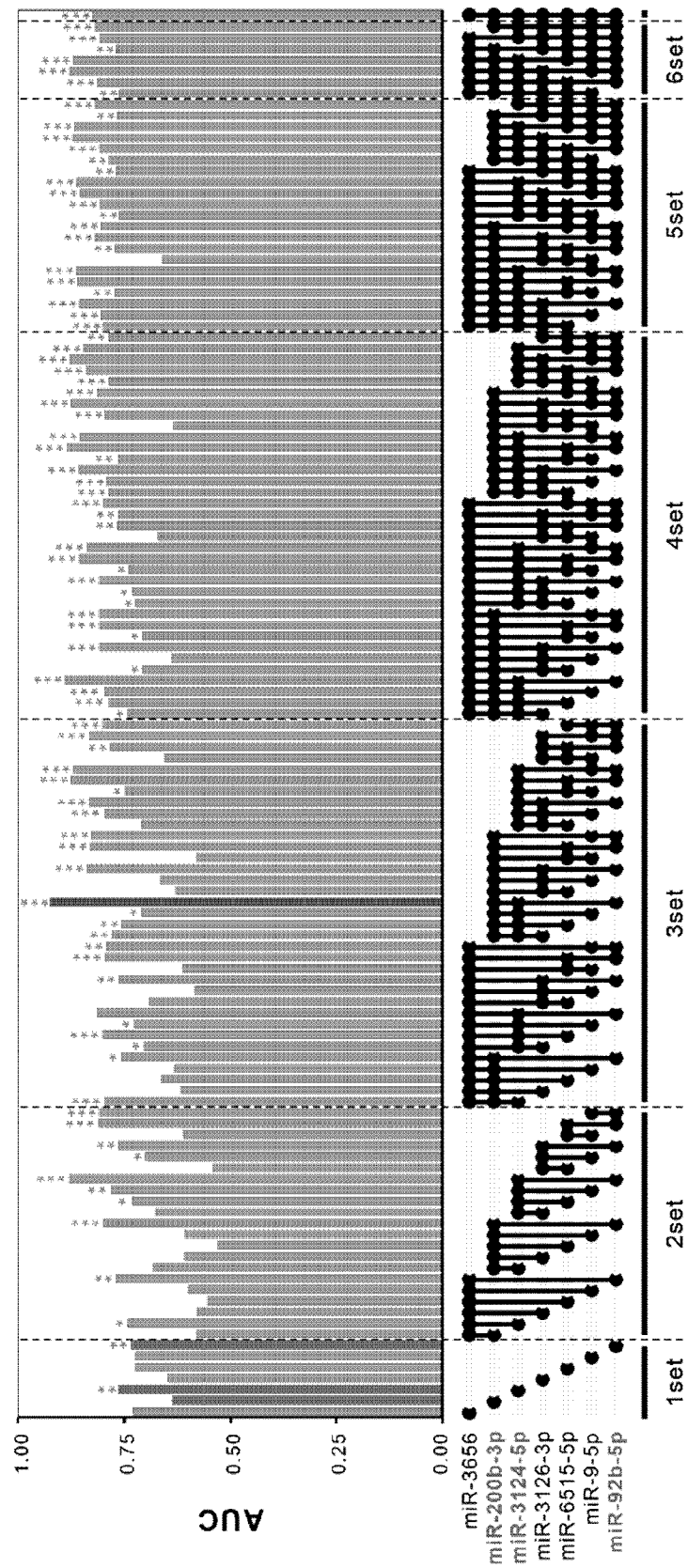
[도5f]



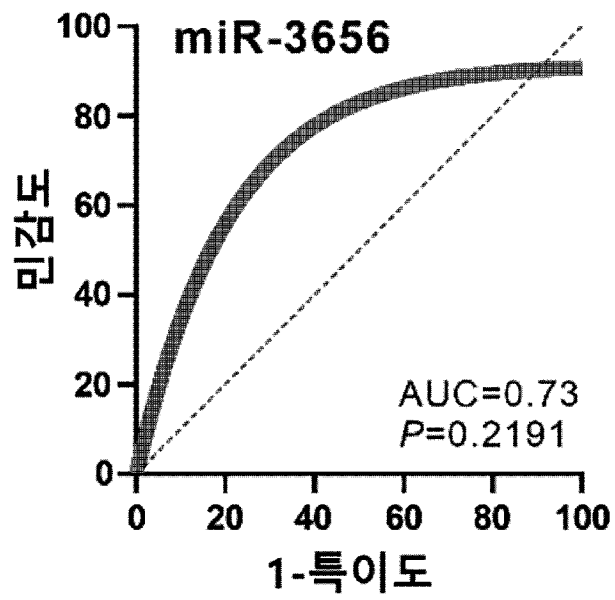
[도5g]



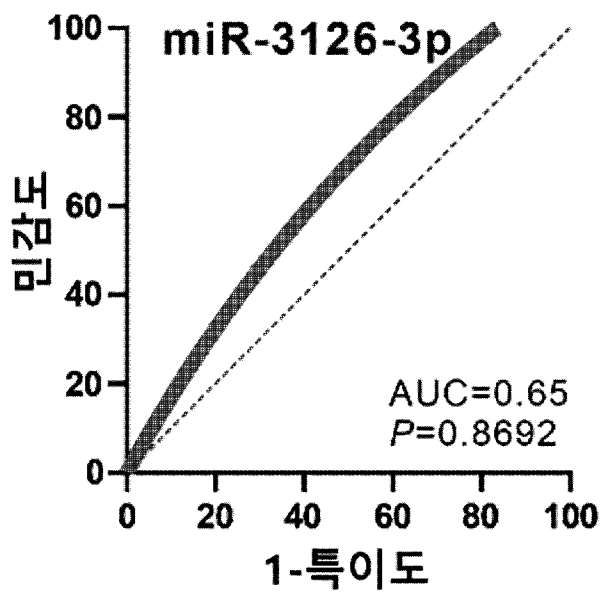
[도6a]



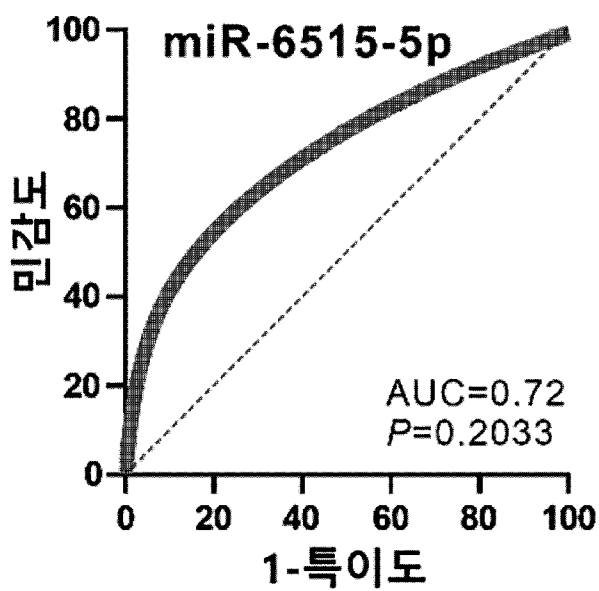
[도6b]



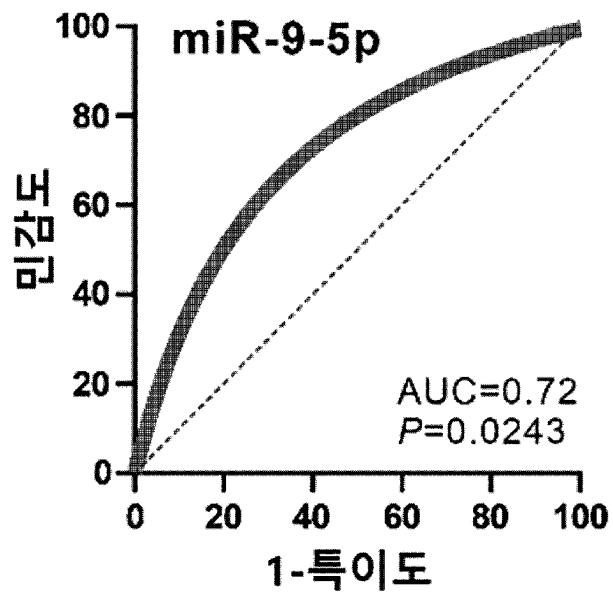
[도6c]



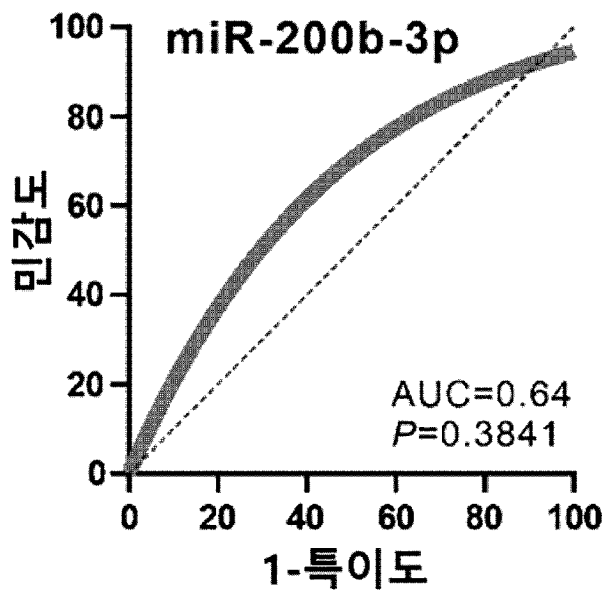
[도6d]



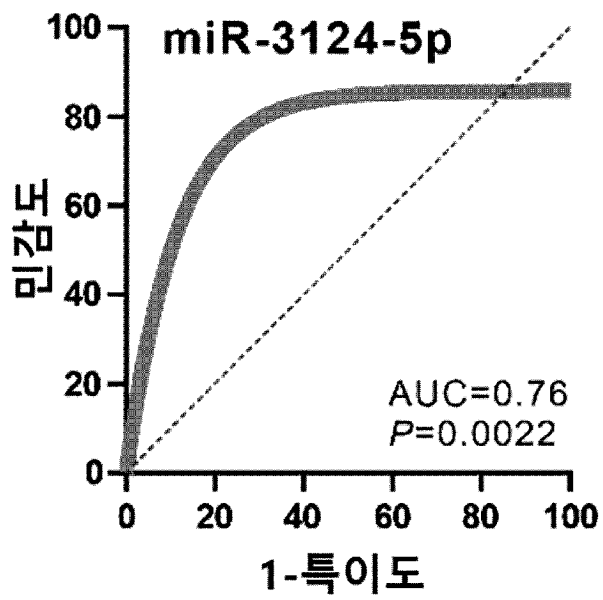
[도6e]



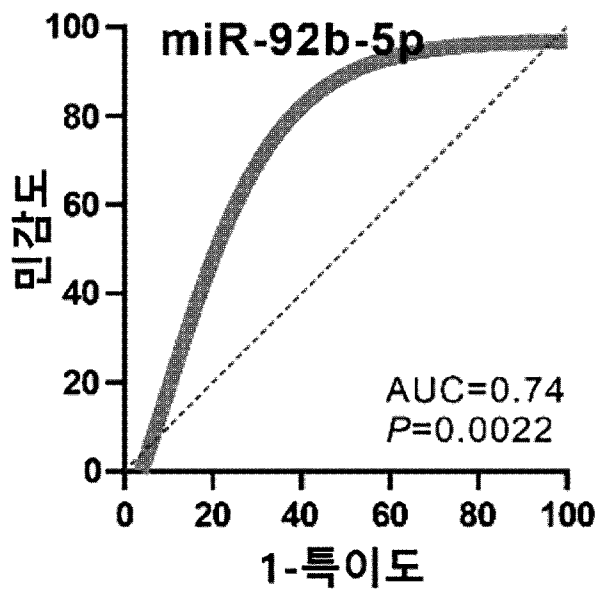
[도6f]



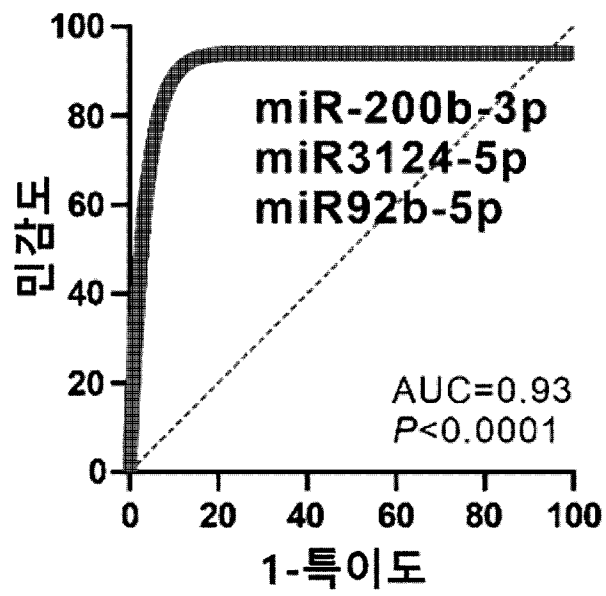
[도6g]



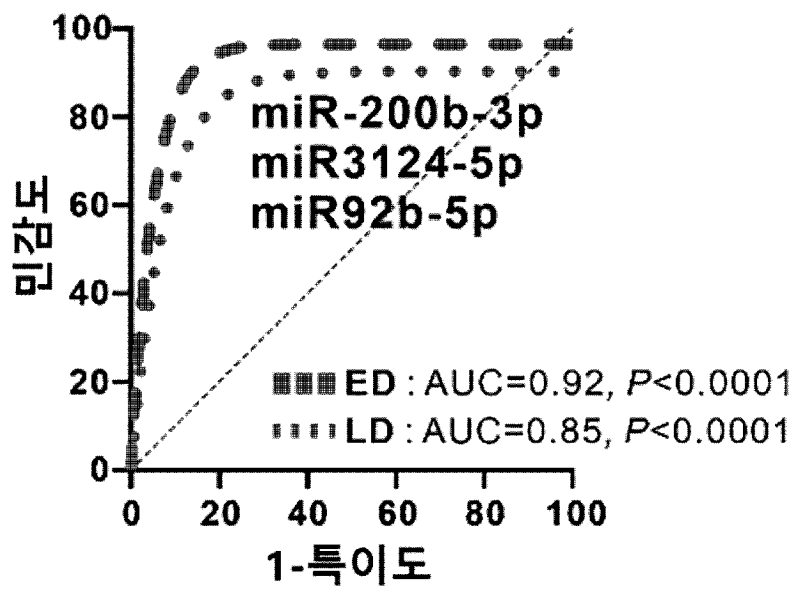
[도6h]



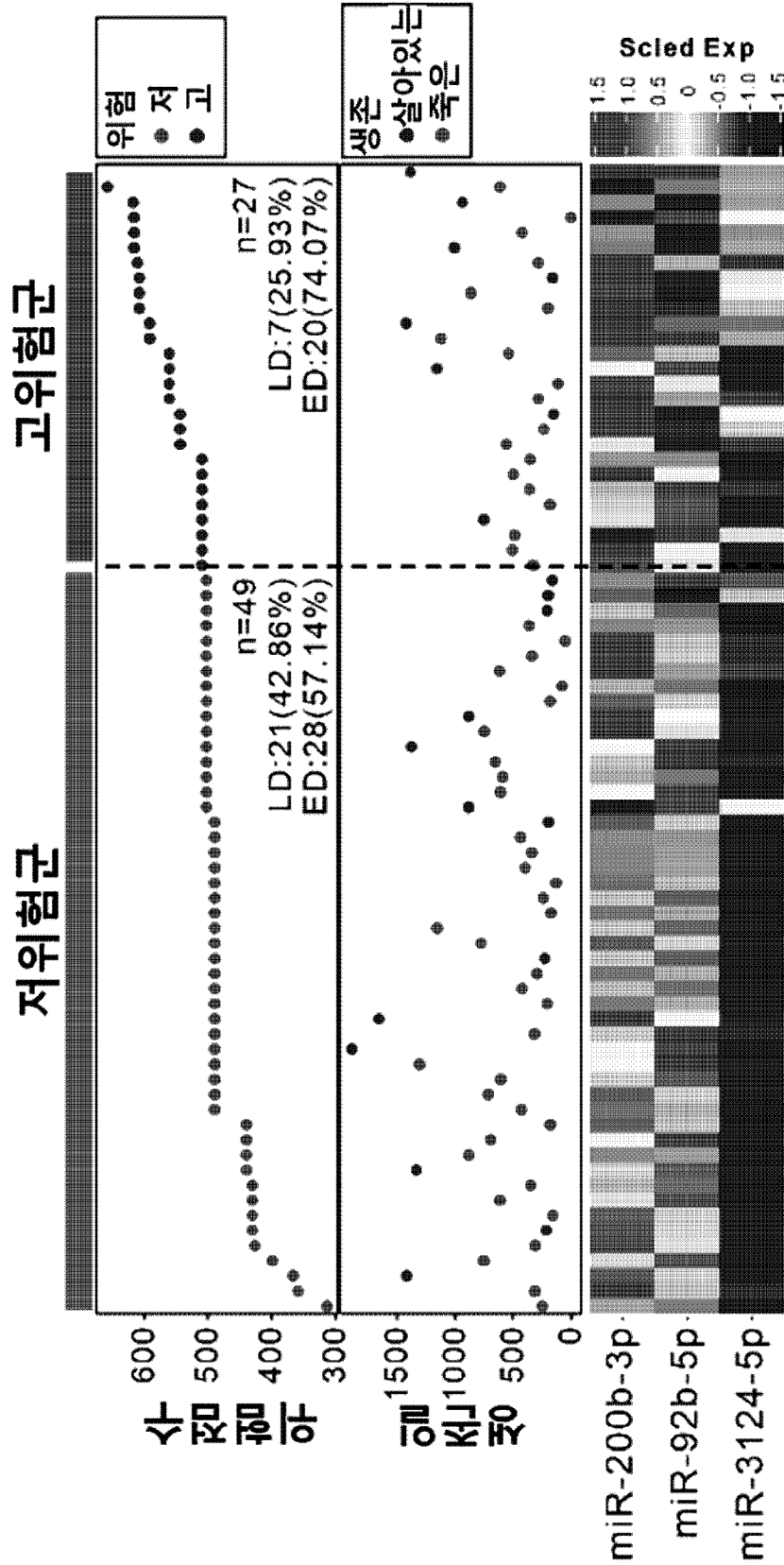
[도6i]



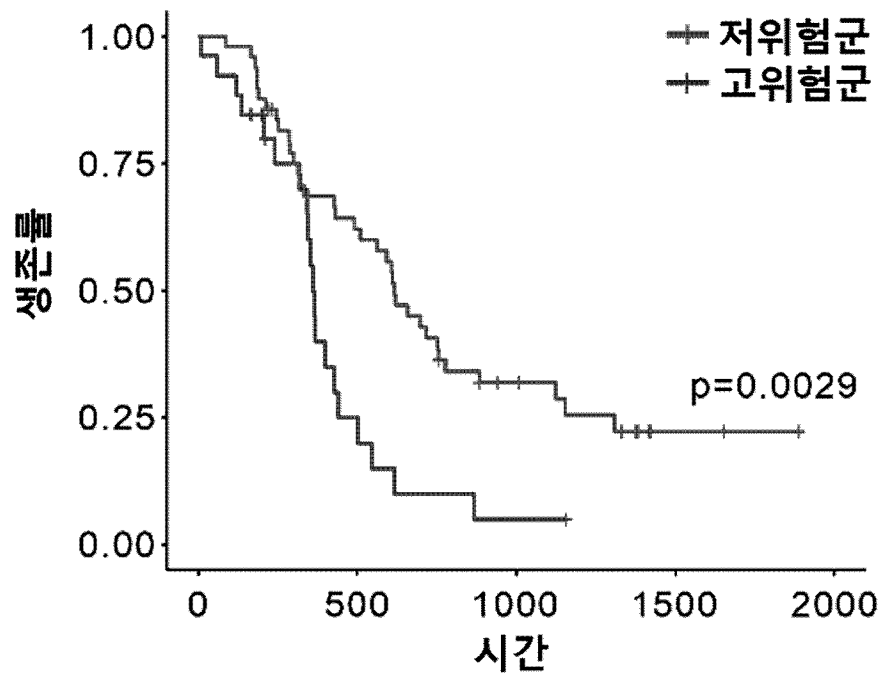
[도6j]



[도7a]



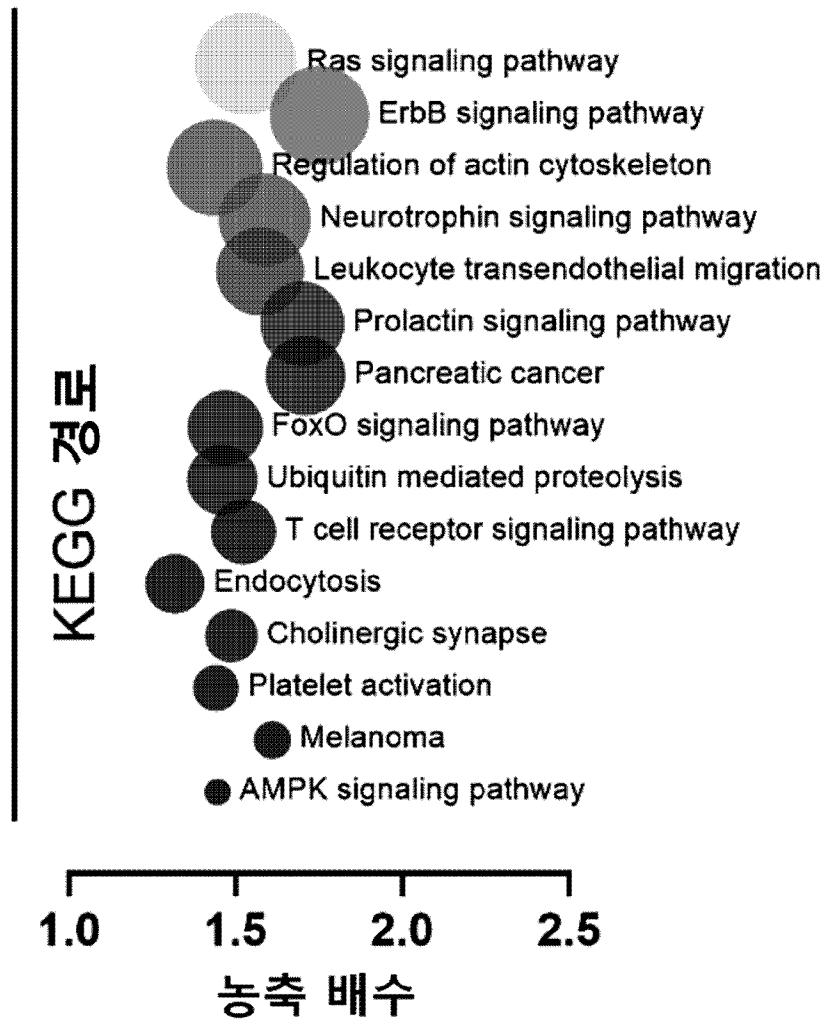
[도7b]



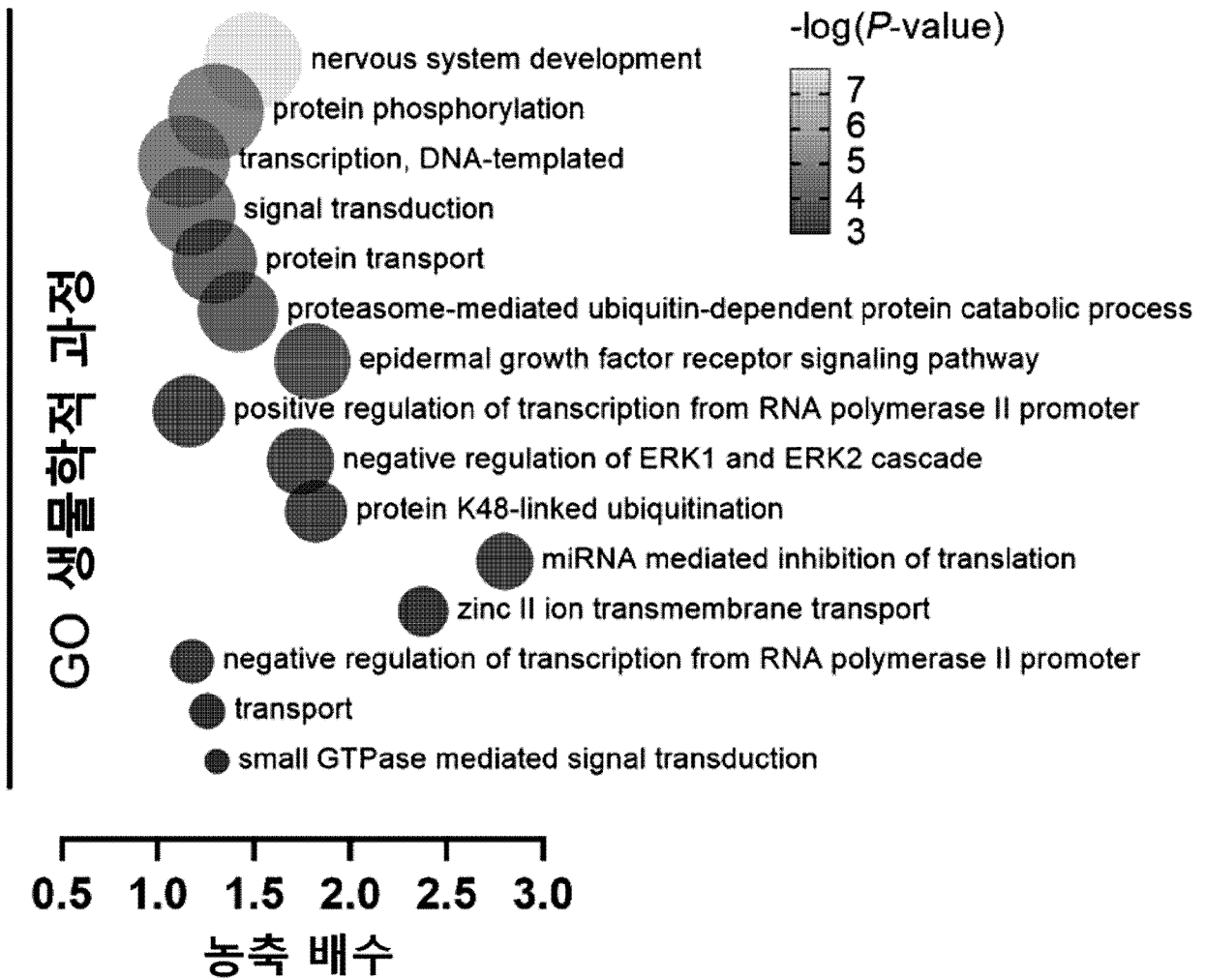
The figure displays a complex network of interactions between three microRNAs (hsa-miR-92b-5p, hsa-miR-3124-5p, and hsa-miR-200b-3p) and their predicted target genes. The miRNAs are represented by central black nodes, while the target genes are shown as smaller grey nodes. Lines connect each miRNA node to its respective set of target genes.

- hsa-miR-92b-5p** targets include: NFIC, HIVEP3, FAM186A, AGO2, ACOX1, PRICKLE1, FAHD1, MRPL34, FAM241A, PIEZO1, NPLOC4, RAB11B, ARHGAP39, FOXJ2, CSK, MID1IP1, B3GALNT2, SRGAP1, GATAD2A, LARP1, RNASEK, GCK, FKRP, SRCIN1, CALU, SOCS7, MINT, ERCC6L, KIAA1671, GNAI2, GPI, KHSRP, AKT2, SOC57, GPATCH3, CNBP, and TMEM184B.
- hsa-miR-3124-5p** targets include: CACNG8, BCL2L11, PRR14L, and RAB7A.
- hsa-miR-200b-3p** targets include: IRS1 NGRN, CASP2, E2F3, N4BP2, CAMSAP2, TXNDC16, INO80D, DDX53, PKD1, ETS1, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA, CDC14B, ZMAT3, FKBP5, ROCK2, CD274, KLHL42, C6orf47, ABI2, SHC8P1, FRS2, PAK2, VAC14, HNRNP3A, ADAM12, MTDH, CELF1, XIAPI, CREB1, KLF11, SESN1, PSD3, RAB3B, LDHA, TP53INP1, RASSF8, CLPB, RND3, PTPN4, DENND5B, C21orf91, ATG12, ZEB1, DNMT3A, OXR1, VEGFA,

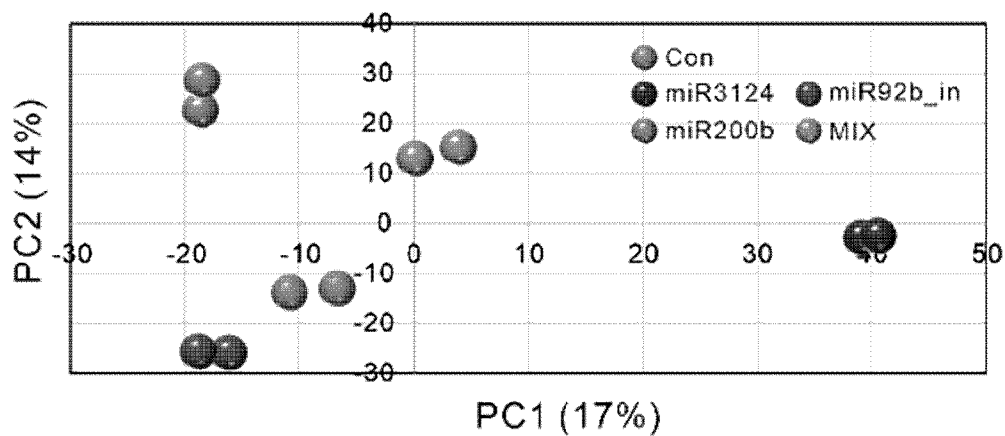
[도7d]



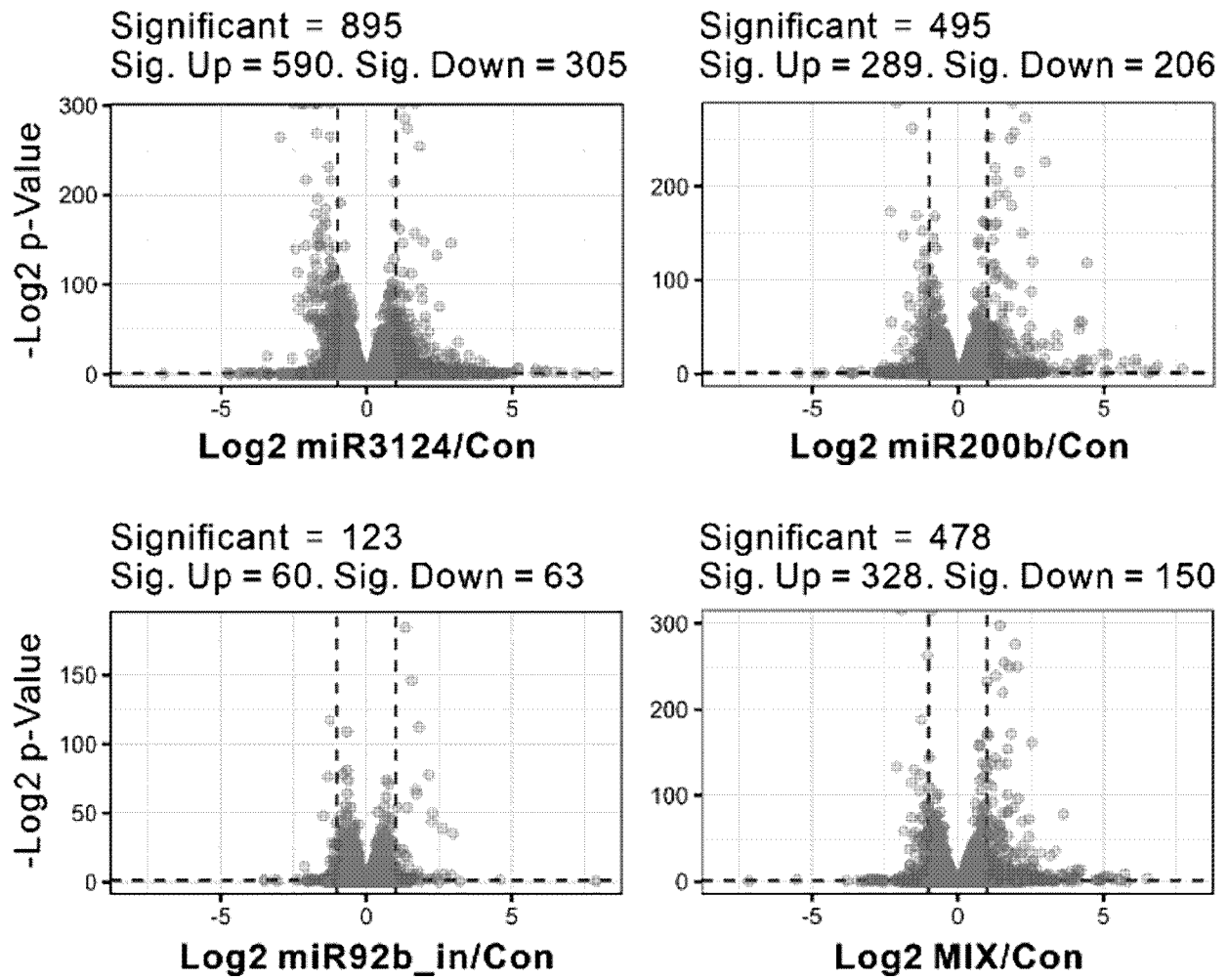
[도7e]



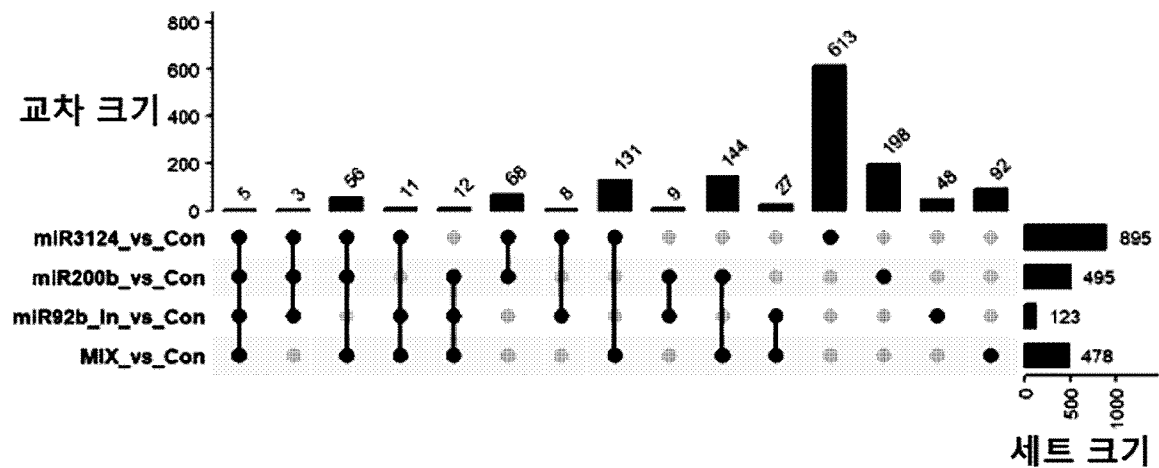
[도8a]



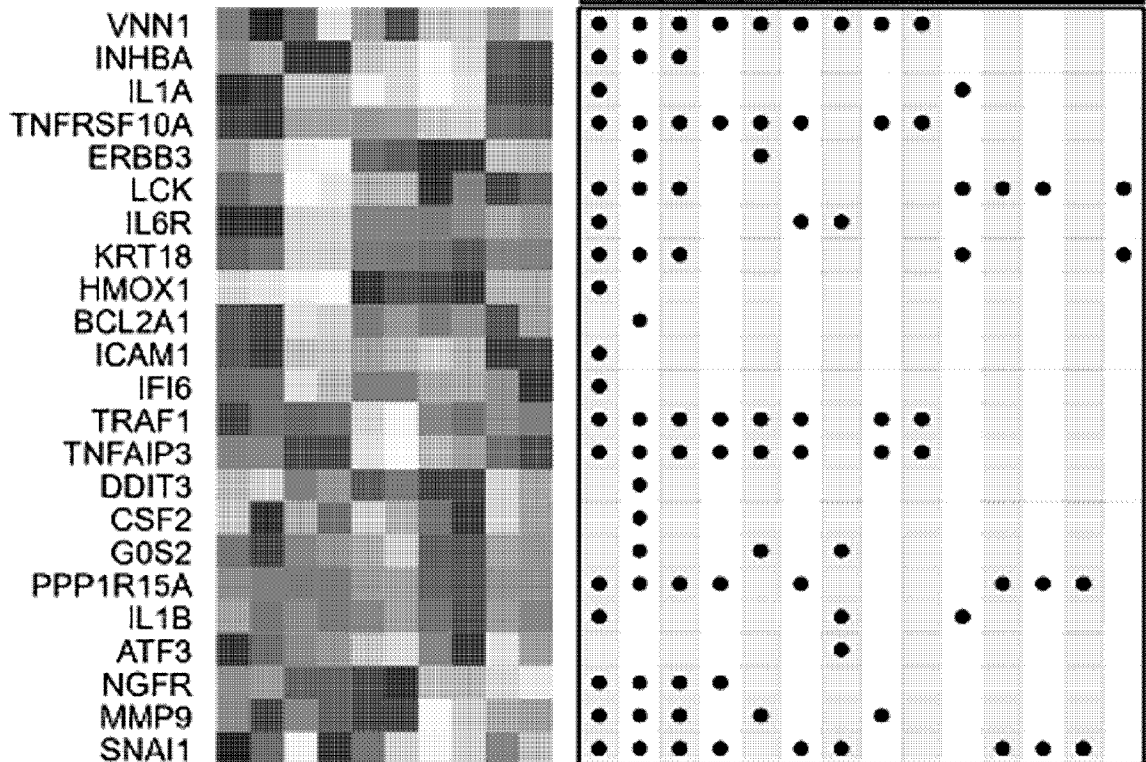
[도8b]



[도8c]



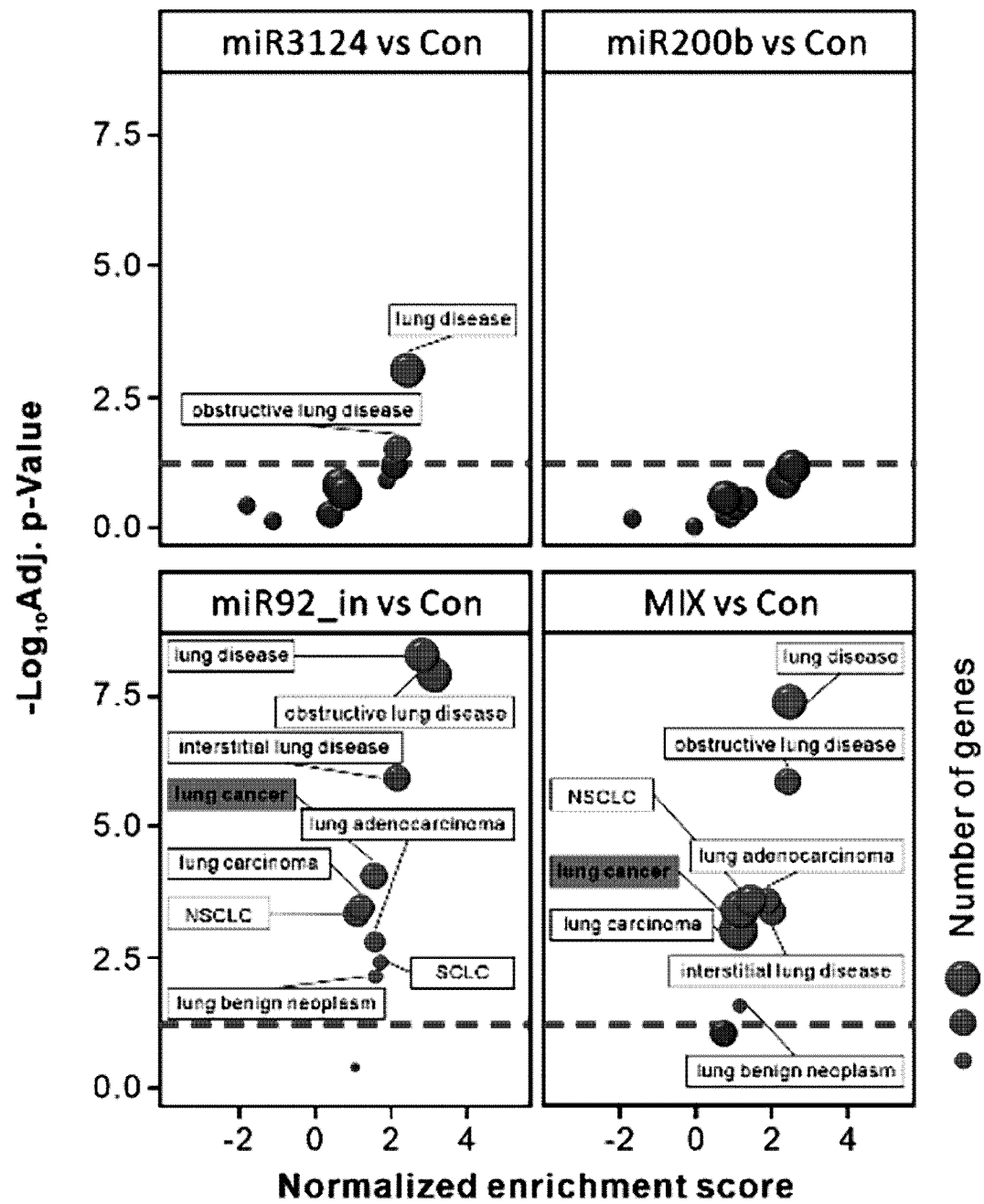
miR3124	-	-	+	+	-	-	-	+	+
miR200b	-	-	-	-	+	+	-	+	+
miR92b inhibitor	-	-	-	-	-	-	+	+	+



[도8e]

ID	설명
A GO:0038127	ERBB signaling pathway
D GO:1901186	positive regulation of ERBB signaling pathway
G GO:1901184	regulation of ERBB signaling pathway
B GO:0007173	EGFR signaling pathway
C GO:0045742	positive regulation of EGFR signaling pathway
F GO:0042058	regulation of EGFR signaling pathway
E GO:0046425	regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT
H GO:0046427	positive regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT
I GO:1904894	positive regulation of receptor signaling pathway via STAT
J GO:0007259	receptor signaling pathway via JAK-STAT
K GO:0097696	receptor signaling pathway via STAT
L GO:1904892	regulation of receptor signaling pathway via STAT
A GO:2001233	regulation of apoptotic signaling pathway
B GO:0097191	extrinsic apoptotic signaling pathway
C GO:2001236	regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway
D GO:2001237	negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway
E GO:0097192	extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand
F GO:2001234	negative regulation of apoptotic signaling pathway
G GO:0097193	intrinsic apoptotic signaling pathway
H GO:2001239	regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand
I GO:2001240	negative regulation of extrinsic apoptotic in absence of ligand
J GO:2001235	positive regulation of apoptotic signaling pathway
K GO:1902041	regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors
L GO:0008625	extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors
M GO:1902042	negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors
N GO:2001238	positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway

[도8f]

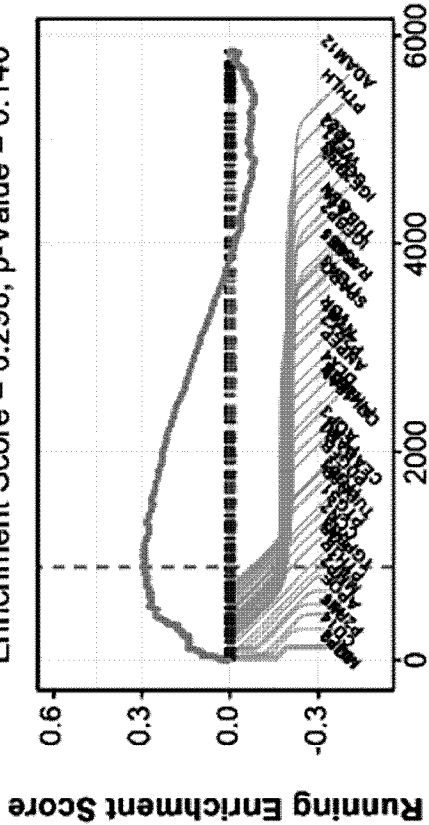


[도8g]

질병 온톨로지=폐암

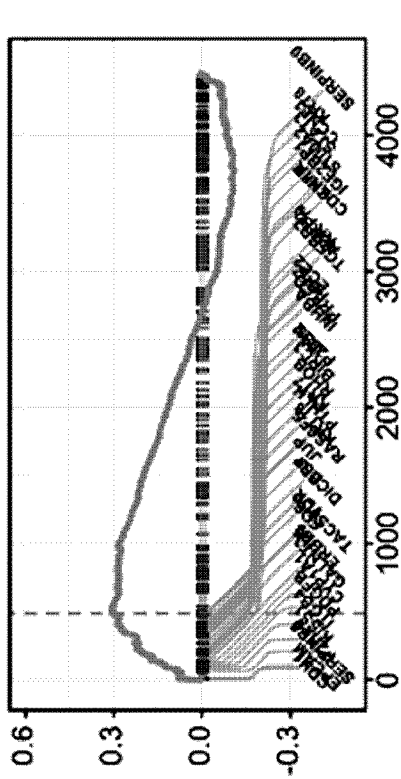
miR3124_vs_Con

Enrichment Score = 0.298, p-Value = 0.146



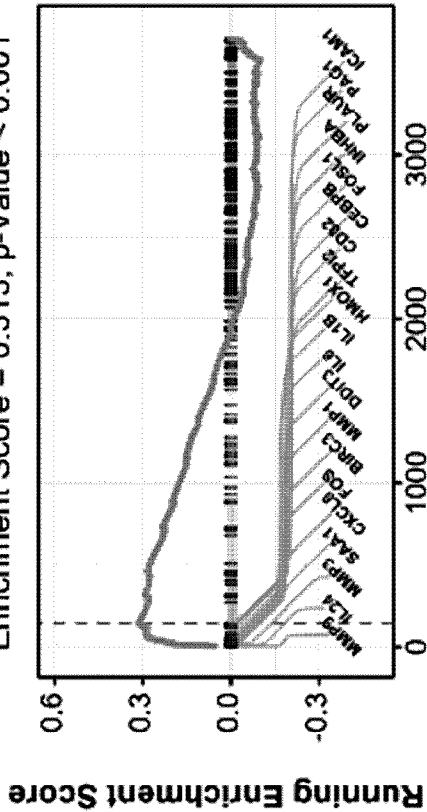
miR200b_vs_Con

Enrichment Score = 0.307, p-Value = 0.245



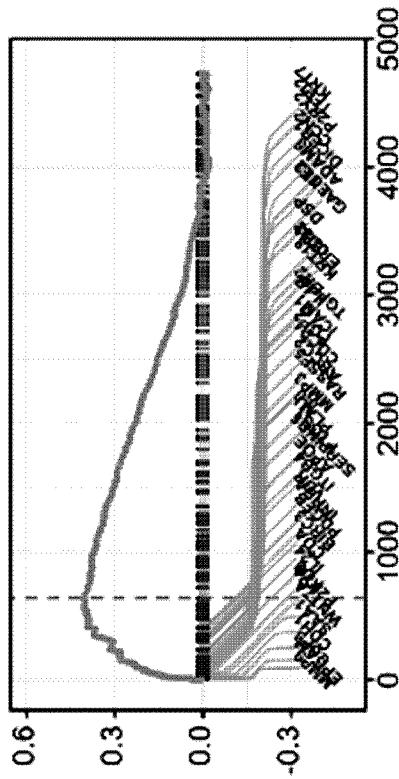
miR92b_in_vs_Con

Enrichment Score = 0.313, p-Value < 0.001



MIX_vs_Con

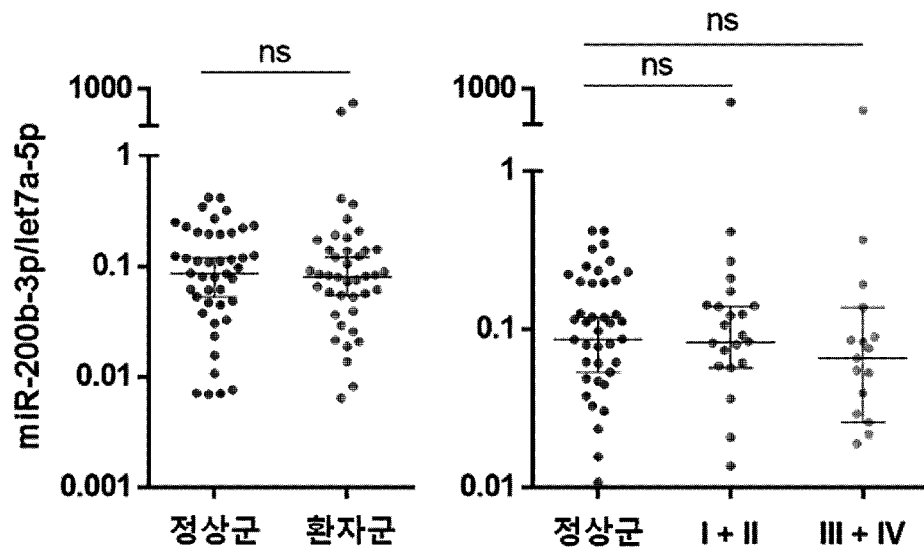
Enrichment Score = 0.407, p-Value < 0.001



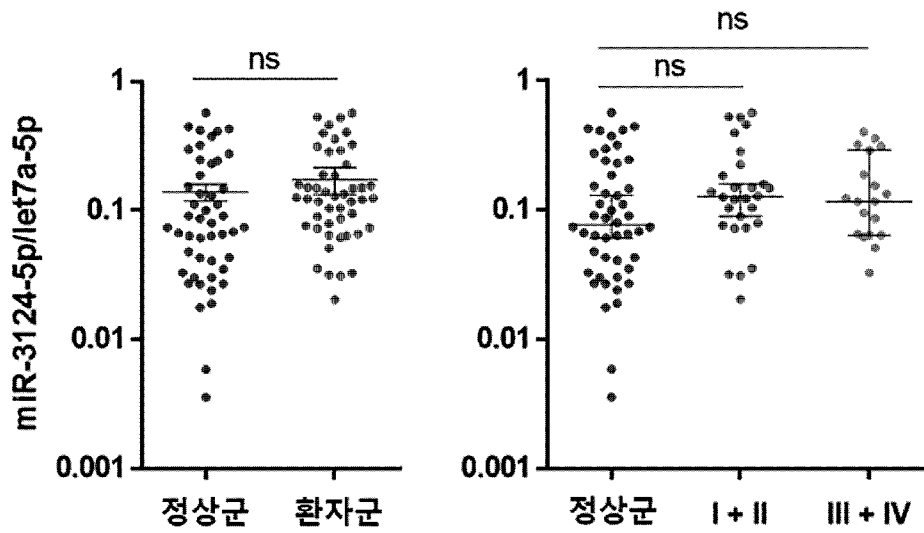
정렬된 데이터 세트의 순위

정렬된 데이터 세트의 순위

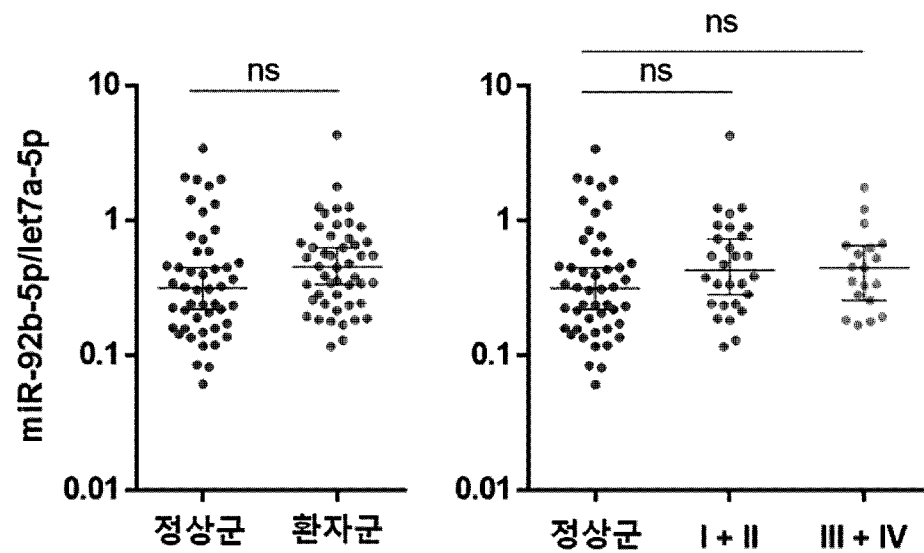
[도9a]



[도9b]



[도9c]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/011690

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(2018.01); C12N 15/11(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/493(2006.01) 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: miR-200b-3p, miR-3124-5p, miR-92b-5p, 소세포폐암(small cell lung cancer), 진단 (diagnosis), 예후(prognosis)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	박효정. 소세포폐암 유래 exosomal miRNAs을 활용한 진단 및 예후 예측. 울산대학교 석사학위 학위논문. pp. 1-31, February 2022 (PARK, Hyo-Jung. Clinical application of exosomal miRNAs in small cell lung cancer. Master's thesis, University of Ulsan.) See abstract; pages 5 and 18; and figure 7.	1-9
Y	LI, Ming et al. Circulating miR-92b and miR-375 for monitoring the chemoresistance and prognosis of small cell lung cancer. Scientific Reports. 2020, vol. 10, article no. 12705, pp. 1-9. See pages 4 and 7.	1-9
A	CN 102899390 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CAS) 30 January 2013 (2013-01-30) See entire document.	1-9
A	US 2020-0255906 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY et al.) 13 August 2020 (2020-08-13) See entire document.	1-9
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 20 November 2023		Date of mailing of the international search report 21 November 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/011690

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2020-0019849 A (TORAY INDUSTRIES, INC. et al.) 25 February 2020 (2020-02-25) See entire document.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/011690

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/011690

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102899390	A	30 January 2013	None			
US	2020-0255906	A1	13 August 2020	JP	2020-092688	A	18 June 2020
				JP	2023-123592	A	05 September 2023
KR	10-2020-0019849	A	25 February 2020	CN	110799648	A	14 February 2020
				EP	3647422	A1	06 May 2020
				JP	2023-116750	A	22 August 2023
				JP	7306633	B2	11 July 2023
				US	11634778	B2	25 April 2023
				US	2020-0140958	A1	07 May 2020
				US	2023-0193402	A1	22 June 2023
				WO	2019-004436	A1	03 January 2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6886(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6886(2018.01); C12N 15/11(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/493(2006.01) 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: miR-200b-3p, miR-3124-5p, miR-92b-5p, 소세포폐암(small cell lung cancer), 진단(diagnosis), 예후(prognosis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	박효정, '소세포폐암 유래 exosomal miRNAs을 활용한 진단 및 예후 예측', 울산대학교 석사학위 학위논문, 페이지 1-31, 2022.02. 요약; 페이지 5, 18; 도면 7 참조.	1-9
Y	LI, MING 등, 'Circulating miR-92b and miR-375 for monitoring the chemoresistance and prognosis of small cell lung cancer', Scientific Reports, 2020, 10권, article no. 12705, 페이지 1-9 페이지 4, 7 참조.	1-9
A	CN 102899390 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CAS) 2013.01.30 전체 문헌 참조.	1-9
A	US 2020-0255906 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY 등) 2020.08.13 전체 문헌 참조.	1-9
A	KR 10-2020-0019849 A (도레이 카부시키가이샤 등) 2020.02.25 전체 문헌 참조.	1-9
☐ 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 이후에 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 2023년11월20일(20.11.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년11월21일(21.11.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 102899390 A	2013/01/30	없음	
US 2020-0255906 A1	2020/08/13	JP 2020-092688 A	2020/06/18
		JP 2023-123592 A	2023/09/05
KR 10-2020-0019849 A	2020/02/25	CN 110799648 A	2020/02/14
		EP 3647422 A1	2020/05/06
		JP 2023-116750 A	2023/08/22
		JP 7306633 B2	2023/07/11
		US 11634778 B2	2023/04/25
		US 2020-0140958 A1	2020/05/07
		US 2023-0193402 A1	2023/06/22
		WO 2019-004436 A1	2019/01/03