

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 11월 16일 (16.11.2023)



(10) 국제공개번호

WO 2023/219447 A1

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6886 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/006436

(22) 국제출원일:

2023년 5월 11일 (11.05.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0058468 2022년 5월 12일 (12.05.2022) KR

10-2022-0147284 2022년 11월 7일 (07.11.2022) KR

(71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATION-

AL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080

서울특별시 종로구 대학로 101(연건동), Seoul

(KR). 한동대학교 산학협력단 (HANDONG GLOB-

AL UNIVERCITY INDUSTRY-ACADEMIC COOP-

ERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 37554 경상북도

포항시 북구 흥해읍 한동로 558, Gyeongsangbuk-do

(KR).

(72) 발명자: 송용상 (SONG, Yong Sang); 06002

서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 22동 904호

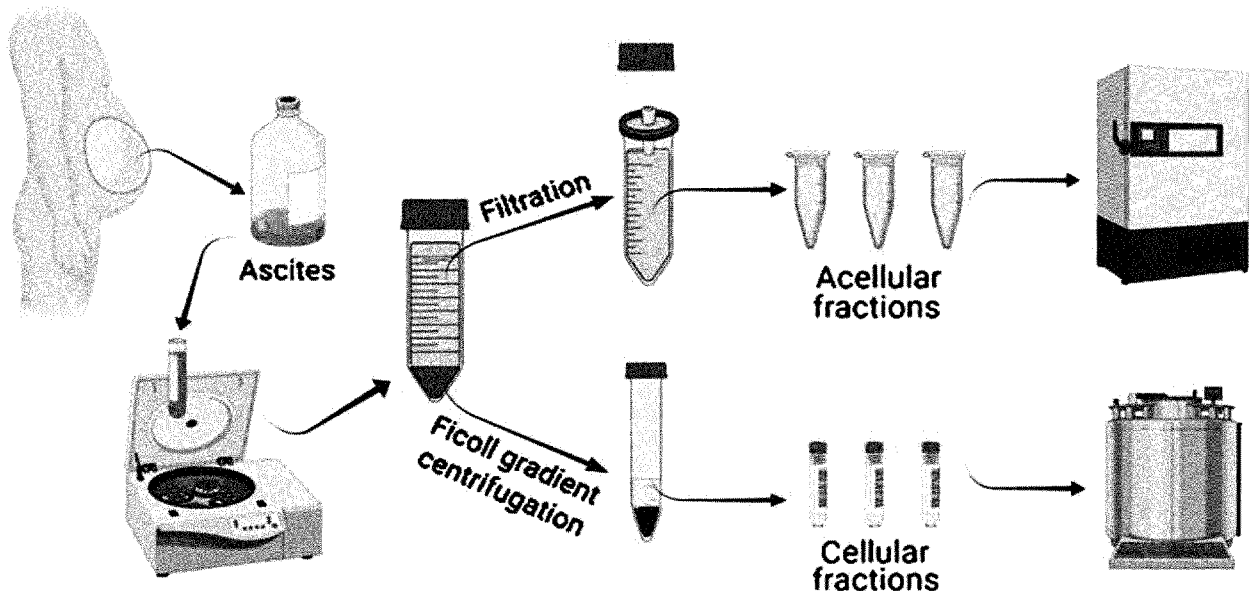
(압구정동,구현대아파트), Seoul (KR). 왕원위 (WANG, Wen Yu); 03087 서울특별시 종로구 이화장길 71 (동숭동, 서울대학교의과대학국제관), Seoul (KR). 김세익 (KIM, Se Ik); 06587 서울특별시 서초구 동광로 32길 60, A동 102호(방배동, 필그림빌라), Seoul (KR). 조현아 (JO, Hyun A); 17353 경기도 이천시 아리역로 38번길 50, 508동 303호(증포동, 한양수자인아파트 5블록), Gyeonggi-do (KR). 안태진 (AHN, Tae Jin); 06592 서울특별시 서초구 서초중앙로29길 28, 306동 210호(반포동, 반포미도아파트), Seoul (KR). 박상익 (PARK, Sang Ick); 37582 경상북도 포항시 북구 법원로 98번길 53-12, 모덴리치 201호(장성동), Gyeongsangbuk-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인리채 (LEECHAE INTELLECTU-AL PROPERTY); 06236 서울특별시 강남구 테헤란로 26길12, 3층, 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,

(54) Title: COMPOSITION FOR DIAGNOSING OVARIAN CANCER COMPRISING AGENT FOR DETECTING EXTRACEL-
LULAR VESICLE-DERIVED MIRNA

(54) 발명의 명칭: 세포의 소포체 유래 MIRNA를 검출하는 제제를 포함하는 난소암 진단용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for diagnosing ovarian cancer. More specifically, the present invention comprises an agent that detects the expression level of at least one extracellular vesicle-derived miRNA selected from the group consisting of miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a, and miR-145-5p, thereby more accurately and conveniently diagnosing ovarian cancer by means of a non-invasive method.

(57) 요약서: 본 발명은 난소암 진단용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포의 소포체 유래 miRNA 의 발현 수준을 검출하는 제제를 포함함으로써 비침습적인 방법으로 보다 더 정확하고 간편하게 난소암을 진단할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2023/219447 A1

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.

- (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))

명세서

발명의 명칭: 세포외 소포체 유래 MIRNA를 검출하는 제제를 포함하는 난소암 진단용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 난소암 진단용 조성물, 난소암 진단용 키트 및 난소암 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 난소암(ovarian cancer)은 부인암 중에서도 가장 사망률이 높은 암으로, 발병 환자 중 50 % 이상이 사망하는 예후가 좋지 않은 암 중의 하나이다. 뿐만 아니라 조기 치료에 성공하였더라도 60 내지 85 %의 환자에서 재발될 수 있다. 난소암의 높은 사망률과 재발률은 조기 진단 바이오 마커와 효과적인 검진 전략이 부족하기 때문이며, 난소암을 조기 진단하고 지속적으로 모니터링 하는 것이 중요하다. 한편 기존의 조직을 이용한 침습적인 암 진단 방법은 반복 검사의 한계를 가지고 있어 지속적인 난소암의 모니터링이 쉽지 않다. 따라서, 이를 대체할 수 있는 비침습적 난소암 진단기법의 개발이 필요한 실정이다.

[4]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명은 난소암 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [6] 본 발명은 난소암 진단용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [7] 본 발명은 난소암 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [8]

과제 해결 수단

- [9] 1. miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제를 포함하는, 난소암 진단용 조성물.
- [10] 2. 위 1에 있어서, 상기 miR-1246는 서열번호 1의 서열로 이루어지고, 상기 miR-1290는 서열번호 2의 서열로 이루어지고, 상기 miR-483-5p는 서열번호 3의 서열로 이루어지고, 상기 miR-429는 서열번호 4의 서열로 이루어지고, 상기 miR-34b-3p는 서열번호 5의 서열로 이루어지고, 상기 miR-34c-5p는 서열번호 6의 서열로 이루어지고, 상기 miR-449a는 서열번호 7의 서열로 이루어지고, 상기 miR-145-5p는 서열번호 8의 서열로 이루어진 것인, 난소암 진단용 조성물.
- [11] 3. 위 1에 있어서, 상기 세포외 소포체는 혈액, 혈청 또는 혈장에서 분리된, 난소암 진단용 조성물.

- [12] 4. 위 1에 있어서, 상기 제제는 프라이머 또는 프로브를 포함하는, 난소암 진단용 조성물.
- [13] 5. 위 1에 있어서, 상기 조성물은 miR-1246, miR-1290 및 miR-483-5p의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제; miR-1246, miR-1290, miR-483-5p 및 miR-429의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제; miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429 및 miR-34b-3p의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제; 또는 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p 및 miR-34c-5p의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제를 포함하는 것인, 난소암 진단용 조성물.
- [14] 6. 위 1에 있어서, 상기 조성물은 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제를 포함하는 것인, 난소암 진단용 조성물.
- [15] 7. 위 1 내지 6 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 난소암 진단용 키트.
- [16] 8. (a) 피검체의 시료로부터 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 대조군 시료의 해당 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 난소암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.
- [17] 9. 위 8에 있어서, 상기 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p 및 miR-429 중 적어도 하나의 발현 수준이 대조군 대비 높거나, 상기 miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p 중 적어도 하나의 발현 수준이 대조군 대비 낮은 경우 상기 피검체가 난소암을 가지는 것으로 결정하는 단계;를 더 포함하는, 난소암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.
- [18] 10. 위 8에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청 또는 혈장인, 난소암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.
- [19] 11. 위 8에 있어서, 상기 시료는 혈액에서 분리된 세포외 소포체, 혈청에서 분리된 세포외 소포체 또는 혈장에서 분리된 세포외 소포체인, 난소암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

[20]

발명의 효과

- [21] 본 발명의 난소암 진단용 조성물, 난소암 진단용 키트 또는 난소암 진단을 위한 정보제공방법을 이용하면 비침습적인 방법으로 보다 더 정확하고 간편하게 난소암을 진단할 수 있다.

[22]

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1A내지 도 1E는 복수와 혈장에서 세포외 소포체를 분리하는 과정을 도식화한 그림과, 분리된 세포외 소포체를 식별한 결과를 나타낸다.

- [24] 도 2A 내지 도 2M은 생체 유체 유래 EV의 miRNA 발현 프로파일링을 기반으로 하는 OCEM(Ovarian cancer EV miRNA) 시그니처 구축 과정 및 OCEM 시그니처의 난소암 진단 효과를 검증한 결과를 나타낸다.
- [25] 도 3은 다양한 miRNA 조합의 OCEM 시그니처 및 8개의 miRNAs 단독의 난소암 진단 효과를 검증한 결과를 나타낸다.
- [26] 도 4A 내지 도 4J는 다양한 공개 데이터 세트를 사용하여 OCEM 시그니처의 난소암 진단 효과를 검증한 결과를 나타낸다 (도 4c에서 y축과 더 가까운 얇은 실선 그래프는 validation set AUC, 이보다 안쪽의 두꺼운 실선 그래프는 training set AUC 그래프임).
- [27] 도 5A 내지 도 5G는 MA-EVs의 처리에 따른 난소암 악성 표현형의 변화를 확인한 결과를 나타낸다.
- [28] 도 6A 내지 도 6L은 EV miR-1246 및 miR-1290이 난소암 세포의 전이 가능성에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸다.
- [29] 도 7A 내지 도 7I는 난소암 전이 및 환자 예후와 관련된 miR-1246 및 miR-1290의 표적을 확인한 결과를 나타낸다.
- [30] 도 8은 일 실시예에 따라 EV 유래 miRNA를 8종 선별하고 이들의 발현 프로파일을 통해 난소암을 효과적으로 진단 또는 예측할 수 있음을 확인한 실험 과정을 나타낸 것이다.
- [31] 도 9A 내지 도 9D는 난소암 진단 시그니처 구축을 위한 8개의 EV 유래 miRNA를 선택하는 과정을 나타낸 것이다.
- [32] 도 10A 내지 도 10F는 EV miR-1246 및 miR-1290이 난소암 세포의 침윤 및 이동에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸다.

[33]

발명의 실시를 위한 형태

- [34] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [35] 본 발명은 난소암 진단 마커를 발견하고, 해당 마커에 특이적으로 결합 가능한 물질을 이용하여 효과적으로 난소암을 진단하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 miRNA 마커를 이용한 방법은 난소암을 조기에 진단 가능하게 하고, 이에 따라 조기 치료 및 예후의 개선을 가능하게 한다. 본 발명에서는 정상군 및 난소암 환자의 시료에서 발현수준이 의미있게 변화하는 miRNA를 8종 선별하고 이들의 발현 프로파일을 통해 난소암을 효과적으로 진단 또는 예측할 수 있음을 확인하였다.
- [36]
- [37] 본 발명은 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제를 포함하는 난소암 진단용 조성물을 제공한다. 검출 대상인 상기 miRNA는 세포외 소포체 유래 miRNA일 수 있다.

- [38] 용어 "miRNA" 또는 "microRNA" 또는 "miR"은 이의 전구체 RNA 전사체가 작은 줄기-루프(stem-loop)를 형성할 수 있고 이로부터 성숙한 "miRNA"가 엔도뉴클레아제 다이서(Dicer)에 의해 절단되는 내인성의, 비-암호화된 유전자의 생성물을 포함하는 RNA(또는 RNA 유사체)를 말한다. miRNA는, 이들이 이의 발현을 조절하는 mRNA와는 구분되는 유전자내에서 암호화된다.
- [39] 일 예에서, 용어 "miRNA" 또는 "microRNA"는 함께 공유결합된 적어도 10개의 뉴클레오타이드 및 35개 이하의 뉴클레오타이드의 단일가닥 RNA 분자를 말한다. 상기 miRNA 또는 이들의 상보가닥 분자는 15 내지 50개, 15 내지 30개, 또는 18 내지 25개의 핵산을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [40] 본 명세서의 miRNA는 상기 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a, miR-145-5p의 특정 염기서열(또는 서열번호)로 나타내어지는 miRNA뿐만 아니라, 상기 miRNA의 전구체(pre-miRNA, pri-miRNA), 이들과 생물학적 기능이 동등한 miRNA, 예를 들면 동족체(즉, 호몰로그 또는 오솔로그), 유전자다형 등의 변이체, 및 유도체도 포함한다. 이러한 전구체, 동족체, 변이체 또는 유도체로서는 구체적으로는 miRBase release 20(<http://www.mirbase.org/>)에 의해 동정할 수 있다.
- [41] 본 명세서의 miRNA는 miR 유전자의 유전자 산물일 수 있으며, 이러한 유전자 산물은 성숙 miRNA 또는 miRNA 전구체(예를 들면, 상기와 같은 pre-miRNA 또는 pri-miRNA)를 포함할 수 있다.
- [42] 본 명세서에서 언급되는 miRNA의 염기서열은 서열번호 1 내지 8일 수 있다(아래 표 1 참조).

- [43] [표1]

서열번호	miRNA 명칭	서열 (5'→3')
1	miR-1246	AAUGGAUUUUUGGAGCAGG
2	miR-1290	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA
3	miR-483-5p	AAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG
4	miR-429	UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU
5	miR-34b-3p	CAAUCACUAACUCCACUGCCAU
6	miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC
7	miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
8	miR-145-5p	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU

- [44]

- [45] 본 발명은 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제를 포함하는 난소암 진단용 조성물을 제공할 수 있다.
- [46] 용어 “세포외 소포체(extracellular vesicle, EV)”는 세포 간 정보교환을 위해 세포들이 외부 환경으로 분비하는 소포체이다. 세포외 소포체는 엑소좀일 수 있다.
- [47] 본 발명의 조성물은 피검체의 세포외 소포체(예컨대, 혈액에서 분리된 세포외 소포체, 혈장에서 분리된 세포외 소포체 또는 혈청에서 분리된 세포외 소포체) 유래의 miRNA 발현 수준을 측정하여 난소암을 진단할 수 있다. 세포외 소포체 유래 miRNA의 검출은 통상적으로는 피검체로부터 분리된 시료부터 세포외 소포체를 추출하고 세포외 소포체의 miRNA의 수준을 측정함으로써 실시할 수 있다. 이러한 세포외 소포체 miRNA의 검출은 하이브리드화 반응 및 증폭반응에 의해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 다양한 기술을 이용하여 용이하게 실시될 수 있다.
- [48] 세포외 소포체는 혈액, 혈청 또는 혈장에서 분리된 것일 수 있다.
- [49] 본 발명의 조성물은 혈액, 혈청 또는 혈장에서 분리된 세포외 소포체로부터 전술한 종류의 miRNA를 검출하여 비침습적인 방식으로 정확한 난소암 진단 효과를 나타낼 수 있다.
- [50] 난소암은 고등급 장액성 난소암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [51] 본 발명자들은 난소암 진단에 대한 바이오 마커로서 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p의 몇몇 조합이 보다 우수한 효능을 나타내는 것을 확인하였다.
- [52] 구체적으로 본 발명의 난소암 진단용 조성물은 miR-1246, miR-1290 및 miR-483-5p; miR-1246, miR-1290, miR-483-5p 및 miR-429; miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429 및 miR-34b-3p; miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p 및 miR-34c-5p; 또는 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p ;에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함할 수 있다.
- [53] 일 실시예에 따르면, 난소암 진단용 조성물은 세포외 소포체 유래 miR-1246, miR-1290 및 miR-483-5p를 검출하는 제제를 포함할 수 있다. 다른 실시예에 따르면, 상기 난소암 진단용 조성물은 세포외 소포체 유래 miR-1246, miR-1290 및 miR-483-5p를 검출하는 제제와 함께 세포외 소포체 유래 miR-429를 검출하는 제제를 더 포함할 수 있다. 다른 실시예에 따르면, 상기 난소암 진단용 조성물은 세포외 소포체 유래 miR-1246, miR-1290 및 miR-483-5p를 검출하는 제제와 함께 세포외 소포체 유래 miR-429 및 miR-34b-3p 를 검출하는 제제를 더 포함할 수 있다. 다른 실시예에 따르면, 상기 난소암 진단용 조성물은 세포외 소포체 유래 miR-1246, miR-1290 및 miR-483-5p를 검출하는 제제와 함께 세포외 소포체 유래 miR-429, miR-34b-3p 및 miR-34c-5p를 검출하는 제제를 더 포함할 수 있다.

- [54] 또 다른 실시예에 따르면, 난소암 진단용 조성물은 세포외 소포체 유래 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p를 검출하는 제제를 포함할 수 있다.
- [55] 제제는 상기 적어도 하나의 miRNA에 특이적으로 결합하는 물질일 수 있고, 예컨대 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다.
- [56] 핵산의 검출은 핵산 분자 또는 상기 핵산 분자의 상보물에 하이브리드화되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 증폭반응에 의해 수행될 수 있다. 예컨대, 프라이머를 이용한 세포외 소포체 miRNAs의 검출은 PCR과 같은 증폭 방법을 사용하여 유전자 서열을 증폭한 다음 당 분야에 공지된 방법으로 유전자의 증폭 여부를 확인함으로써 수행될 수 있다.
- [57] 프라이머는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 갖는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다. 본 발명에서는 상기 적어도 하나의 miRNA에 특이적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 난소암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [58] 프로브는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수십 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 위 하나 이상의 miRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 난소암을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [59] 프라이머 또는 프로브는 공지된 서열을 바탕으로 당업자가 적절히 디자인할 수 있다. 예컨대, 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로 의 변형이 있다.
- [60] miRNA의 발현 수준은 당해 분야에서 통상 사용되는 방법에 따라 측정될 수 있는데, 예컨대 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소

반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응 (RealtimeRT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 유전자 칩 등이 포함되며 이들로 제한되는 것은 아니다.

[61]

[62] 또한, 본 발명은 전술한 조성물을 포함하는 난소암 진단용 키트를 제공한다.

[63] 키트는 전술한 miRNA 또는 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제뿐만 아니라, 난소암 진단 키트로 사용되기에 적합하도록 당 분야에서 일반적으로 사용되는 성분, 도구, 시약 등을 더 포함할 수 있다.

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

[65]

[66] 또한, 본 발명은 난소암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[67] 본 발명의 정보를 제공하는 방법은 (a) 피검체의 시료로부터 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 대조군 시료의 해당 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함할 수 있다.

[68] “대조군 시료의 해당 세포외 소포체 유래 miRNA 발현 수준과 비교” 한다는 것은 진단의 대상인 개체의 시료로부터 분리된 세포외 소포체에서 유래한 특정 miRNA와 동일한 종류의 대조군 miRNA의 발현 정도를 비교한다는 것이다.

[69] 본 발명의 정보를 제공하는 방법은 (b) 상기 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p 및 miR-429 중 적어도 하나의 발현 수준이 대조군 대비 높거나, 상기 miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p 중 적어도 하나의 발현 수준이 대조군 대비 낮은 경우 상기 피검체가 난소암을 가지는 것으로 결정하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[70] 대조군은 정상 대조군일 수 있다.

[71] 피검체는 현재 난소암을 보유하고 있거나 난소암을 보유한 경험이 있는 동물 또는 난소암의 보유가 의심되는 동물일 수 있다.

[72] 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 복수 또는 소변으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[73] 시료는 혈액에서 분리된 세포외 소포체, 혈청에서 분리된 세포외 소포체 또는 혈장에서 분리된 세포외 소포체로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

- [74] 상기 (b) 단계는 상기 miR-1246, miR-1290 및 miR-483-5p 의 발현 수준이 대조군 대비 높으면 상기 피검체를 난소암으로 판단하는 것일 수 있다.
- [75] 상기 (b) 단계는 상기 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p 및 miR-429의 발현 수준이 대조군 대비 높으면 상기 피검체를 난소암으로 판단하는 것일 수 있다.
- [76] 상기 (b) 단계는 상기 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p 및 miR-429의 발현 수준이 대조군 대비 높고, 상기 miR-34b-3p의 발현 수준이 대조군 대비 낮으면 상기 피검체를 난소암으로 판단하는 것일 수 있다.
- [77] 상기 (b) 단계는 상기 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p 및 miR-429의 발현 수준이 대조군 대비 높고, 상기 miR-34b-3p 및 miR-34c-5p의 발현 수준이 대조군 대비 높으면 상기 피검체를 난소암으로 판단하는 것일 수 있다.
- [78] 상기 (b) 단계는 상기 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p 및 miR-429의 발현 수준이 대조군 대비 높고, 상기 miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p의 발현 수준이 대조군 대비 높으면 상기 피검체를 난소암으로 판단하는 것일 수 있다.
- [79] 본 발명의 정보를 제공하는 방법은 상기 (a) 단계를 수행하기 전 피검체의 시료로부터 세포외 소포체를 분리하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [80]
- [81] 추가로, 본 발명은 miR-1246 또는 miR-1290로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제를 포함하는 난소암 전이 예측용 조성물을 제공한다. 검출 대상인 상기 miRNA는 세포외 소포체 유래 miRNA 일 수 있다.
- [82] 세포외 소포체, miRNA, 난소암에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [83] 또한, 본 발명은 전술한 조성물을 포함하는 난소암 전이 예측용 키트를 제공한다.
- [84] 또한, 본 발명은 (i) 피검체의 시료로부터 miR-1246 및 miR-1290로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 대조군 시료의 해당 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 난소암 전이 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [85] 본 발명의 정보를 제공하는 방법은 (ii) 상기 miR-1246 및 miR-1290 중 적어도 하나의 발현 수준이 대조군 대비 높은 경우 상기 피검체가 난소암을 가지는 것으로 결정하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [86] 본 발명의 정보를 제공하는 방법은 상기 (i) 단계를 수행하기 전 피검체의 시료로부터 세포외 소포체를 분리하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [87] 대조군, 피검체 및 시료에 대한 내용은 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [88]

[89] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[90]

[91] **실험 방법**

[92] **1. 임상 샘플 수집**

[93] 본 연구는 서울대학교병원 의학연구윤리심의위원회 (IRB No. 2004-128-1117)의 승인을 받았으며 헬싱키 선언에 따라 수행되었다. 고등급 장액성 난소암(high-grade serous ovarian cancer, HGSOC) 환자로부터 서면 동의서를 취득 후, 악성 복수(malignant ascites) 시료 (N=28)를 수집하였다. 대조군으로는 양성 부인과 질환(benign gynecologic diseases) 환자의 양성 복막액(peritoneal fluids)(N=21)이 사용되었다. 또한, HGSOC 환자(N=109) 및 양성 부인과 질환 환자(N=96)로부터 혈장 시료도 확보하였다.

[94]

[95] **2. 복수 및 혈장 준비**

[96] 수집된 복수(Ascites)시료 2500 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 세포 분획과 무세포 분획으로 분리하여 실험에 사용 및 보관하였다. 무세포 상층액은 Falcon 70 µm 필터 (Corning, USA)를 통해 여과하여 향후 사용을 위해 -70°C에 보관하였다. EDTA 처리된 튜브에서 전혈을 채취하고 2500g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 세포를 제거하였다. 그런 다음 상층액을 수집하고 다시 원심분리하여 혈소판을 제거시키고 향후 사용을 위해 -70°C에서 보관하였다.

[97]

[98] **3. 세포외 소포체 분리 및 식별**

[99] 세포외 소포체 (Extracellular vesicles, EV) 분리 전에 -70°C에서 보관중인 복수, 혈장 및 세포 배양 배지를 해동하고 0.2 µm 주사기 필터(Sartorius, Gottingen, 독일)로 여과하였다. 복수 EV와 혈장 EV를 분리하기 위해 상용 EV isolation kit인 ExoQuick(System Biosciences, 미국)를 이용하였고, 제조업체 프로토콜에 따라 사용하였다.

[100]

[101] **4. 나노입자 추적 분석**

[102] EV 펠렛을 PBS에 현탁시키고 적절한 농도로 희석하였다. NanoSight NS300 system (Malvern Technologies, Malvern, UK)을 사용하여 나노입자 추적 분석(nanoparticle tracking analysis, NTA)으로 EV 농도 및 크기 분포를 측정하였다.

[103]

[104] **5. 투과전자현미경**

[105] PBS에 현탁된 EV 10µL을 200메쉬크기인 폼바르가 코팅된 구리 그리드(formvar-coated copper grid)에 분주하고 건조시켰다. 그런 다음 그리드를 10µL의 2% 포스포텅스텐산으로 음성 염색(negatively stained)하였다. 영상 분석은 JEM

1400 투과형 전자 현미경(Jeol Ltd, Peabody, 미국)을 사용하여 EV의 형태를 확인하였다.

[106]

[107] **6. 웨스턴 블로팅**

[108] 세포 배양 후 얻어진 세포를 용해 완충액에서 용해시키고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 용해된 세포를 13,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 상층액에서 단백질을 얻었고 BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, 미국)를 사용하여 얻은 단백질 농도를 확인하였다. 단백질에 5X loading buffer를 가한 다음 99.9°C에서 5분간 끓여 웨스턴 블로팅 수행을 위해 단백질 구조를 변성시켰다. 단백질을 SDS-PAGE에 로딩하고 전기영동을 통해 단백질의 크기별로 분리한 다음 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 니트로셀룰로오스막을 1시간 동안 5% 탈지유에서 인큐베이션하고 확인하고자 하는 단백질의 1차 항체 및 2차 항체와 함께 배양하였다. 마지막으로 ECL Western Blotting Detection Reagent(Amersham, UK)를 사용하여 신호를 검출하였다.

[109]

[110] **7. Small RNA 시퀀싱**

[111] NanoDrop 2000 Spectrophotometer 시스템(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 미국)을 사용하여 추출된 RNA를 정량화하였다. 제조업체의 지침에 따라 NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep kit New England Bio Labs, Inc.를 사용하여 라이브러리를 구축하였다. 각 샘플에 대해 total RNA 1μg을 사용하여 어댑터를 결합시키고 어댑터 특이적 프라이머와 함께 역전사효소를 사용하여 cDNA 합성을 수행하였다. 라이브러리 증폭을 위해 PCR을 수행하고 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, 독일) 및 AMPure XP beads (Beckman Coulter, CA, 미국)를 사용하여 정제하였다. 고감도 DNA 분석을 위해 Agilent 2100 Bioanalyzer 기기(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 Small RNA 라이브러리의 수율 및 크기 분포를 측정하였다. 그런 다음 NextSeq500 system (Illumina, San Diego, CA, 미국)에서 생성된 높은 처리량 시퀀스에 대해 단일 말단(single-end) 75 시퀀싱을 수행하였다.

[112]

[113] **8. 생물정보분석**

[114] 자체 데이터 세트를 훈련 데이터 세트와 검증 데이터 세트로 나누었다. EdgeR N+1 정규화를 수행하였고 훈련 데이터에서 EdgeR을 사용하여 8개의 miRNA가 선택되었다. OCEM(Ovarian cancer EV miRNA) 시그니처를 기반으로 로지스틱 회귀 모형을 설정하였다. ROC 곡선(receiver operating characteristic)과 risk-probability plot을 생성하였다. 시그니처는 선정된 복수개의 세포외 소포체 유래 miRNA의 집합을 의미한다.

[115] 추가로, OCEM 시그니처의 검증을 위해 다양한 환자 모집단에 걸친 여러 공개 데이터 세트를 사용하였다. 공개 데이터 세트 간의 배치 효과(batch effect)로 인해 각 데이터 세트는 OCEM 시그니처를 사용하여 독립적으로 훈련 및 검증되었다.

[116]

[117] **9. 세포 배양**

[118] 본 연구에는 인간 난소암 세포주 SKOV3 및 KURAMOCHI가 사용되었다. 배지 조성은 RPMI1640 (WelGENE, Seoul, Korea)에 10% 소태아 혈청(FBS; Gibco, MD, USA) 및 100 μ g/mL의 페니실린-스트렙토마이신 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 보충하여 세포를 배양하였다. 배양 조건은 37°C 5% CO₂로 맞춰진 인큐베이터에서 진행했다.

[119] **10. 난소암 세포의 EV 흡수**

[120] 제조업체의 프로토콜에 따라 PKH67 green fluorescent cell linker mini kit (Sigma, USA)를 이용하여 분리된 EV의 지질막을 염색해 표지하였고, 세포막을 PKH26 red fluorescent cell linker mini kit (Sigma, USA)로 표지하였다. 난소암 세포에 표지된 EV를 처리하여 6시간 동안 공동 배양하였다. 공초점 현미경 LSM800 (EVOS, USA)를 사용하여 난소암에 의한 EV 흡수를 확인하였다.

[121]

[122] **11. 침윤 및 이동 분석**

[123] 난소암 세포의 침윤 및 이동 가능성을 조사하기 위해 8 μ m 크기의 Transwell inserts(BD Biosciences, CA, USA)를 사용하였다. 침윤 분석을 위해서는 inserts를 Matrigel(BD Biosciences, CA, USA)로 미리 코팅하였다. 난소암 세포를 무혈청 배지 상태로 상부 챔버에 분주하고 24시간 동안 상태를 유지하였다. 그런 다음 10% FBS가 포함된 배지를 하부 챔버에 추가하여 24시간 동안 인큐베이션했다. Transwell inserts를 PBS로 세척하고 0.5% 크리스탈 바이올렛으로 침윤 및 이동된 세포를 염색하였다. 그런 다음 inserts의 상부 표면에 남아있는 세포를 제거하고, 침윤 및 이동된 세포를 현미경으로 확인하고 Image J 소프트웨어로 추가 분석하였다.

[124]

[125] **12. 오가노이드 확립**

[126] 난소암 오가노이드를 확립하기 위해 악성 복수 유래 세포를 사용하였다. 세포는 페놀레드가 없는 Matrigel Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix(BD Bioscience, CA, USA)과 함께 분주하고 오가노이드용 배양배지에서 배양하였다. 오가노이드용 배양배지는 Penicillin/Streptomycin (Gibco) HEPES(Gibco), GlutaMax (Gibco), b-Estradiol (Sigma), Nicotinamide (Sigma), recombinant human Noggin (Peprotech), recombinant R-Spondin1 (RSPO1; Peprotech), B27 (Invitrogen), EGF (Invitrogen), FGF10 (Peprotech), HeregulinB-1 (Peprotech), Forskolin (bio-technie), Hydrocortisone (Sigma), A83-10 (bio-technie),

Y-27632 dihydrochloride (Sigma), N-acetylcysteine (Sigma), Priomycin (InvivoGen) 가 포함된 고급 DMEM/F12 (Gibco, MD, 미국)을 사용하였다.

[127]

[128] **13. 3D 침윤 분석**

[129] 악성 복수의 원발성 암세포(A37)를 종양 스페로이드 형성 및 3D 침윤 분석에 사용하였다. 세포를 Ultra-Low Attachment 96 웰-플레이트(Corning, USA)에 분주하여 스페로이드를 형성하였다. 3일 후, 3D 침윤 분석을 위해 스페로이드에 Matrigel과 함께 EV를 처리하였다. 72시간 후, 3D 침윤된 정도를 이미지화 시키고 ImageJ를 사용하여 침윤된 정도를 분석하였다.

[130]

[131] **14. RNA 추출 및 정량적 실시간 PCR**

[132] RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 EV에서 RNA를 추출하고, 제조업체의 지침에 따라 spike-in control Unisp6이 추가된 miRCURY LNA RT kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 cDNA로 전사하였다. Mir-X™ miRNA qRT-PCR TB Green® Kit(Takara, Tokyo, Japan)를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 세포는 배양 배지에서 24시간 또는 48시간 배양된 후 추가 분석을 위해 수집되었다.

[133]

[134] **15. 형질전환**

[135] Lipofectamine RNA iMAX(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 miRNA 모방체(mimics) 또는 억제제(inhibitors)를 형질전환하였으며, Lipofectamine 3000™ 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 플라스미드를 형질전환하였다. 형질전환 6시간 후에 배양 배지를 교체하였다. 세포는 배양 배지에서 24시간 또는 48시간 배양된 후 추가 분석을 위해 수집되었다.

[136]

[137] **16. 루시페라제 리포터 분석**

[138] Lipofectamine3000 (Invitrogen, USA)를 사용하여 야생형 또는 돌연변이형 miR-1246 또는 miR-1290 결합 서열을 포함하는 pGL-3-RORα 3'UTR 리포터 플라스미드(Origene, Rockville, USA) 및 miR-1246 또는 miR-1290 모방체 또는 음성 대조군과 함께 세포를 공동 형질전환시켰다. Luciferase Reporter Gene Detection Kit(MilliporeSigma, Missouri, USA)를 사용하여 Firefly luciferase를 검출하였다. Firefly luciferase 활성은 적색 형광 단백질(RFP) 강도에 대해 계산되었다.

[139]

[140] **17. 면역조직화학**

[141] 제조사의 지침에 따라 Benchmark autostainer(Ventana, Tucson, AZ, USA)와 함께 4μm 두께 조직 마이크로어레이(tissue microarray, TMA) 섹션을 사용하여 IHC(Immunohistochemistry) 분석을 수행하였다. 추가 분석을 위해 면역반응의 강도를 점수화하였다.

[142]

[143] **18. 통계 분석**

[144] GraphPad Prism 9를 사용하여 데이터를 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. 통계적 비교는 Bonferroni의 사후 검정과 함께 Student's t-검정 및 ANOVA 분석을 사용하여 수행하였다. 모든 통계 분석은 통계적으로 유의한 것으로 간주되는 p-값 <0.05 로 양면 분석이었다.

[145] 전술한 실시예의 실험 방법을 요약한 플로우 차트를 도 8에 나타내었다.

[146]

[147] **실험 결과**[148] **1. 복수와 혈장으로부터 EV 분리 및 분리된 EV의 확인**

[149] 수술 중, 고등급 장액성 난소암 환자 (High-grade serous ovarian cancer; HGSOC)로부터 얻은 악성 복수를 향후 사용을 위해 세포 분획과 무세포 분획으로 분리하여 실험에 사용 전까지 -70°C 에서 보관하였다 (도 1A). 본 연구에서는 양성 부인과 질환이 있는 여성 환자로부터 채취한 양성 복막액을 대조군으로 사용하였다. 마찬가지로 악성 및 양성 혈장 시료를 HGSOC 또는 양성 질환을 앓고 있는 환자로부터 획득하였다. 상용 키트 ExoQuick을 사용하여 양성 복막액(benign peritoneal fluids, BA), 악성 복수(malignant ascites, MA), 양성 혈장(benign plasma, BP) 및 악성 혈장(malignant plasma, MP)에서 각각 EV를 분리하였다 (도 1B). 양성 복막액에서 분리된 EV는 BA-EV, 악성 복수에서 분리된 EV는 MA-EV, 양성 혈장에서 분리된 EV는 BP-EV, 악성 혈장에서 분리된 EV는 MP-EV로 표현하였다. 나노 크기의 이중막 원형 입자로서의 EV의 전형적인 형태는 TEM으로 확인되었다 (도 1C; 스케일바 200 nm). 웨스턴 블로팅으로 EV 마커 CD9 및 CD81의 양성 발현을 입증하였다 (도 1D). 또한, NTA로 30nm에서 200nm 범위의 EV의 크기 분포를 평가했다(도 1E; 도 1ea 내지 1ed).

[150] 도 1A는 복수를 샘플링하는 과정을 도식화한 것으로, 구체적으로 HGSOC 환자로부터 얻은 악성 복수를 세포 분획 및 무세포 분획으로 처리하는 과정을 나타낸다. 도 1B는 복수 및 혈장으로부터 EV 분리하는 과정을 도식화한 것으로, 복수 무세포 분획 및 혈장을 여과하고, ExoQuick kit를 적용하여 EV를 분리하는 과정을 나타낸다. 도 1C는 TEM을 통해 BA-EV, MA-EV, BP-EV 및 MP-EV의 형태학을 확인한 결과를 나타낸다. 도 1D는 웨스턴 블로팅을 통해 BA-EV, MA-EV, BP-EV 및 MP-EV가 EV 마커를 발현하는 것을 확인한 결과를 나타낸다. 도 1E는 NTA를 통해 BA-EV, MA-EV, BP-EV 및 MP-EV의 크기 분포와 농도를 확인한 결과를 나타낸다. BA-EV: 양성 복막액 유래 EV, MA-EV: 악성 복수 유래 EV, BP-EV: 양성 혈장유래 EV, MP-EV: 악성 혈장유래 EV를 의미한다.

[151]

[152] **2. 난소암 EV miRNA(Ovarian cancer EV miRNA, OCEM) 시그니처 구축 및 검증**

[153] **(1) 시그니처 구축 및 검증**

- [154] MP-EVs (N=31) 및 BP-EVs (N=24)뿐만 아니라 MA-EVs(N=10) 및 BA-EVs(N=9)의 miRNA 프로파일링을 조사하기 위해 small RNA 시퀀싱을 수행하였다. 양성 그룹과 악성 그룹 사이에 P 값이 0.05 미만이고 발현이 최소 4배 이상 차이나는 miRNAs를 차등 발현된 miRNA(differentially expressed miRNAs, DEmiRs)로 간주하였다. 이 기준에 따라 BA-EV에 비해 MA-EV에서 93개의 miRNAs가 상향 조절되었고, 117개의 miRNAs가 하향 조절되었다 (도 2A 및 도 2B). 마찬가지로, BP-EV와 비교하여 MP-EV에서 21개의 miRNAs가 상향 조절되었고 45개의 miRNAs가 하향 조절되었다 (도 2C, 도 2D). 경로 분석은 DEmiRs의 많은 부분이 발암, 암 진행, 여러 암 특징 및 EV 발생 관련 경로에 밀접하게 관련되어 있음을 보여주었다.
- [155] 다음으로 진단 시그니처 구축을 위한 후보 miRNAs를 선정하기 위해, 자체 데이터 세트를 훈련 및 검증 세트로 구분하였다(도 9A). DEmiRs는 훈련 세트에서만 분석되었다(도 9B 및 도 9C). 분석 결과에 따르면 복수 및 혈장 데이터 세트에서 17개의 DEmiRs가 중복되었다 (도 2E). ROC 곡선의 AUC(Area Under the Curve)를 사용하여 각 miRNA의 진단 능력을 확인하기 위해 일변량 로지스틱 회귀 분석을 수행하였다. 복수 및 혈장 훈련 세트에서 난소암 환자를 검출하는 AUC에 따라 상기 17개의 DEmiRs의 순위가 매겨졌다 (도 2F 및 2G). 복수 및 혈장 회귀 분석에서 미세 판별 효과를 보이는 8개의 miRNA(miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a, miR-145-5p)를 선정하였다(도 9D). 복수와 혈장 서브세트에서 상기 8개의 miRNA의 발현을 히트맵으로 나타냈다 (도 2H, 도 2I).
- [156] 자체 데이터 세트의 검증 세트는 8종의 miRNAs를 모두 포함하는 OCEM 시그니처의 성능을 검증하기 위해 적용되었다. 결과는 OCEM 시그니처가 복수 (훈련 세트: AUC=1, 유효성 검사 세트: AUC=1) 및 혈장(훈련 세트: AUC=0.9762, 유효성 검사 세트: AUC=0.9375) 모두에서 우수한 진단 능력을 나타낸다는 것을 입증하였다 (도 2J, 도 2L; 도 2j의 y축과 더 가까운 두꺼운 실선 그래프 및 도 2i의 점선과 가까운 진한 실선 그래프는 validation set AUC, 도 2j의 y축과 더 먼 안쪽 얇은 실선 그래프 및 도 2i의 점선과 먼 얇은 실선 그래프는 training set AUC 그래프임). 위험-확률 플롯은 양성 복막액과 악성 복수 (도 2K), 양성 및 악성 혈장 (도 2M)을 구분하였다.
- [157] 도2A는 복수(ascites) 서브세트에서 DEmiRs를 나타내는 volcano plot이다 (상향 조절: N=93; 하향 조절: N=117). 도 2B(도 2ba 내지 도 2bg)는 복수 서브세트에서 DEmiRs의 발현 패턴을 나타내는 히트맵이다. 도 2C는 혈장 (plasma) 서브세트에서 DEmiRs를 나타내는 volcano plot이다 (상향 조절: N=21; 하향 조절: N=45). 도 2D(도 2da 내지 도 2dd)는 혈장 서브세트에서 DEmiRs의 발현 패턴을 나타내는 히트맵이다. 도 2E는 복수 및 혈장 훈련 세트에서 17개의 DEmiRs가 중복되는 것을 나타내는 벤다이어그램이다 (상향 조절: N=7; 하향 조절: N=10). 도 2F는 복수 훈련 세트에서 상기 17개 DEmiRs가 암 환자를 식별할 수 있는지에 대

한 AUC를 입증한 단변량 로지스틱 회귀 분석 결과를 나타낸다. 도 2G는 혈장 훈련 세트에서 상기 17개 DEmiRs가 암 환자를 식별할 수 있는지에 대한 AUC를 입증한 단변량 로지스틱 회귀 분석 결과를 나타낸다. 도 2H는 복수 서브세트에서 OCEM 시그니처를 구축하기 위해 선택된 8개의 miRNA의 발현을 나타내는 히트맵이다. 도 2I는 혈장 서브세트에서 OCEM 시그니처를 구축하기 위해 선택된 8개의 miRNA의 발현을 나타내는 히트맵이다. 도 2J는 복수 훈련 및 검증 세트에서 OCEM 시그니처의 진단 능력을 나타내는 ROC곡선이다. 도 2K는 복수 훈련 및 검증 세트에서 예측 위험 확률을 나타낸 위험 확률 플롯이다. 도 2L은 혈장 훈련 및 검증 세트에서 OCEM 시그니처의 진단 능력을 나타내는 ROC곡선이다. 도 2M은 혈장 훈련 및 검증 세트에서 예측 위험 확률을 나타낸 위험 확률 플롯이다.

[158]

[159] 추가로, 위에서 선정된 8개의 miRNAs를 다양하게 조합하여, 추가 5가지의 OCEM 시그니처를 구축하였고, 이들 각 시그니처에 대해 난소암 진단 효과를 검증하였다.

[160] 아래 표 2에 검증에 사용한 다양한 조합의 OCEM 시그니처와 검증 결과를 기재하였으며, 또한, 아래 표 3에 선정된 8개의 miRNAs 각각에 대한 검증 결과를 기재하였다. 또한, 이 결과에 관련된 그래프를 도 3에 나타내었다.

[161] [표2]

시그니처 구분	시그니처를 구축하기 위해 선택된 miRNAs 마커	진단 효과 검증 결과(AUC)
OCEM-3	hsa-miR-1246, hsa-miR-1290, hsa-miR-483-5p	0.884
OCEM-4	hsa-miR-1246, hsa-miR-1290, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-429	0.89
OCEM-5	hsa-miR-1246, hsa-miR-1290, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-429, hsa-miR-34b-3p	0.964
OCEM-6	hsa-miR-1246, hsa-miR-1290, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-429, hsa-miR-34b-3p, hsa-miR-34c-5p	0.97
OCEM-8	miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a, miR-145-5p	0.976

[162] [표3]

miRNA 구분	진단 효과 검증 결과(AUC)
miR-429	0.625

miR-34c-5p	0.688
miR-1246	0.688
miR-145-5p	0.688
miR-483-5p	0.75
miR-449a	0.813
miR-34b-3p	0.866
miR-1290	0.884

[163]

[164] **3. 다양한 모집단에서 OCEM 시그니처의 진단 효과 확인**

[165] 여러 공개 데이터 세트를 사용하여 8종의 miRNA를 모두 포함하는 OCEM 시그니처의 정확도와 임상적 사용 가능성을 검증하였다.

[166] 먼저 검증을 위해 마이크로어레이에 의한 혈청 세포외 miRNA 프로파일링 데이터를 포함하는 GSE106817(암: N=333; 비암: N=2788) 및 GSE113486(암: N=40; 비암: N=100)을 적용했다. miRNA 검출 플랫폼의 이질성과 데이터 세트 간의 배치 효과를 고려하여 각 데이터 세트에서 독립적으로 OCEM 시그니처를 재훈련했다. OCEM 시그니처는 GSE106817 (훈련 세트: AUC=0.9557; 유효성 검사 세트: AUC=0.9515) (도 4A)과 GSE113486 (훈련 세트: AUC=0.904; 유효성 검사 세트: AUC=0.095) (도 4C)에서 모든 단계의 난소암 환자를 검출하는 데 큰 차별적 성능을 보였다. 위험 확률 플롯은 OCEM 시그니처가 암과 비암 혈청을 잘 구별한다는 것을 보여주었다 (도 4B 및 도 4D).

[167] 또한 복수와 혈장에서 검출된 EV miRNA 시그니처가 암 조직의 특성을 반영할 수도 있다는 가설에 기초하여 조직 miRNA 프로파일링 데이터 세트 GSE83693 (암: N=80, 비암: N=7) 및 GSE65819 (암: N=16, 비암: N=4)에서 OCEM 시그니처를 검증했다. GSE83693 (훈련 세트: AUC=1, 유효성 검사 세트: AUC=1)과 GSE65819 (훈련 세트: AUC=1, 유효성 검사 세트: AUC=1)에서 OCEM 시그니처는 모두 우수한 진단 능력을 보였다 (도 4G; y축과 더 가까운 실선 그래프는 validation set AUC, 이보다 안쪽인 실선 그래프는 training set AUC 그래프임). 위험 확률 플롯은 OCEM 시그니처가 암과 정상 조직을 거의 완벽하게 구별할 수 있음을 설명했다 (도 4F 및 도 4H).

[168] 추가로, 소변 데이터 세트 GSE58517 (암: N=80; 비암: N=7)도 검증에 사용되었다. 흥미롭게도 OCEM 시그니처는 소변 샘플에도 적용할 수 있었다 (훈련 세트: AUC=1, 검증 세트: AUC=1) (도 4I 및 도 4J; 도 4i에서 y축과 더 가까운 실선 그래프는 validation set AUC, 이보다 안쪽인 실선 그래프는 training set AUC 그래프임). 이러한 결과는 여러 샘플 유형에 걸쳐 다양한 환자 모집단에서 8종의 miRNA로 구축된 OCEM 시그니처의 임상 적용 가능성을 강조했다.

- [169] 진단 시그니처 설정을 위한 후보 miRNA를 선택할 때 다양한 플랫폼에서 miRNA의 높은 검출 가능성을 고려했지만 OCEM 시그니처에서 8개 miRNA를 모두 동시에 검출하는 데 실패한 일부 데이터 세트가 확인되었다. 흥미롭게도, OCEM 시그니처에서 단 7개의 miRNA만 검출되었음에도 불구하고 혈청 데이터 세트 E-MTAB-4667 (암: N=106; 비암: N=24)에서 강력한 진단 효능 (훈련 세트: AUC=0.9633 검증 세트: AUC=0.9003)이 관찰되었다. 또한, I기 장액성 암 조직 (N=22) 및 정상 조직 (N=9)을 포함하는 다른 조직 데이터세트 GSE127873도 검증을 위해 적용되었다. 특히, OCEM 시그니처 중 6개의 miRNA는 I기 난소암 환자를 식별하는 데 높은 AUC 및 정확성을 보였다 (훈련 세트: AUC=1; 검증 세트: AUC = 0.9091).
- [170] 도 4A 및 도 4B는 혈청 데이터 세트 GSE106817 (암: N=333; 비암: N=2788)을 사용한 OCEM 시그니처 검증 결과를 나타낸다. 도 4C 및 도 4D는 혈청 데이터 세트 GSE113486 (암: N=40, 비암: N=100)을 사용한 OCEM 시그니처 검증 결과를 나타낸다. 도 4G 및 도 4H는 데이터 세트 GSE65819 (Cancer: N=16; Non-cancer: N=4)를 사용한 OCEM 시그니처 검증 결과를 나타낸다. 도 4I 및 도 4J는 소변 데이터 세트 GSE58517 (암: N=80, 비암: N=7)을 사용한 OCEM 시그니처 검증 결과를 나타낸다.
- [171]
- [172] **4. 악성 복수유래 EV가 난소암 전이 가능성을 촉진시키는 효과 확인**
- [173] NTA를 사용하여 입자 수를 계산하여 양성 복막액과 난소암 환자의 악성 복수 사이의 EV 농도를 비교하였다. 그 결과 양성 복막액에 비해 악성 복수에서 EV 농도가 유의미하게 증가했다 (도 5A). 또한 초기 단계 (I+ 단계)보다 말기 환자에서 (III 및 IV 단계) MA-EV 농도가 높아진 것을 관찰했다 (도 5B). 결과는 MA-EV의 농도는 1차 진단받은 환자에 비해서 화학항암제 사용으로 인해 재발을 경험한 재발 환자에서 더 높은 것으로 나타났다 (도 5C). 이러한 데이터는 MA-EVs 농도가 암 진행 상황을 모니터링하는 데 유의미한 도움이 될 수 있음을 시사한다.
- [174] MA-EVs가 난소암 악성 표현형에 미치는 영향을 조사하기 위해 난소암 세포주 SKOV3, KURAMOCHI에 MA-EVs를 처리했다. 암세포막은 빨간색의 PKH26으로, MA-EVs는 녹색의 PKH-67로 염색되었다. 6시간 공 배양 후 암세포에 의한 MA-EVs의 흡수를 검출하였다 (도 5D). 그 결과, MA-EV 처리는 SKOV3와 KURAMOCHI 세포의 침윤과 이동을 현저하게 촉진하는 반면, BA-EV는 유의미한 효과를 보이지 않았다 (도 5E). 복수에 떠다니는 분리된 난소암 세포는 보통 단세포나 다세포 스펜로이드 중 하나의 전이 부위에 군집한다. 따라서, MA-EVs가 종양 스펜로이드에 미치는 영향을 조사하기 위해 종양 미세-전이를 모방한 3D 스펜로이드 침윤 분석을 수행하였다. MA-EVs로 처리된 3D 스펜로이드는 BA-EVs 또는 PBS로 처리된 스펜로이드에 비해 침윤 능력이 증가했다 (도 5F; 스케일바 200 μ m).

- [175] 인간 샘플 유래 오가노이드 모델은 체외 암 모델과 체내 전임상 암 모델 사이의 격차를 메우는 특별한 모델로 부상했다. 우리는 복수 세포 유래 오가노이드를 개발하고 이 생체 내 유사 체외 모델에서 MA-EVs의 효과를 테스트했다. 그 결과, MA-EVs의 처리는 오가노이드의 수와 크기를 크게 증가시킨 반면, BA-EVs로 처리된 오가노이드는 PBS 대조군과 비슷한 수준을 유지했다 (도 5G).
- [176] 도 5A는 NTA로 확인한 BA-EVs 및 MA-EVs의 농도를 나타낸다. 도 5B는 MA-EVs (단계 I+II) 및 MA-EVs (단계 III+IV)의 농도를 나타낸다. 도 5C는 MA-EVs (일차 진단) 및 MA-EVs (재발)의 농도를 나타낸다. 도 5D는 암세포에 의한 EV 흡수를 나타낸다. 암 세포막은 빨간색으로 PKH26으로 염색된 반면 MA-EV는 녹색으로 PKH-67로 염색되었다. SKOV3 및 KURAMOCHI에 의한 MA-EVs의 흡수는 공초점 현미경으로 감지되었다. 도 5E(도 5ea 내지 5ec)는 난소 세포를 MA-EVs 또는 BA-EVs로 처리하고 침윤 및 이동 능력을 트랜스웰 분석으로 확인하였다. 도 5F(도 5fa 내지 도 5fc)는 3D 침윤 분석 결과를 나타낸다. 암세포가 Matrigel에 침투하는 것을 현미경으로 관찰했다. 도 5G(도 5ga 내지 도 5gc; 도 5gb에서 스케일바는 윗줄 500 μm , 아랫줄 100 μm)는 MA-EVs의 효과를 평가하기 위해 복수 세포 유래 오가노이드 모델을 확립하고 복수 세포를 Matrigel에 분주하여 오가노이드 모델이 형성되는 과정을 도식화한 것이다. 14일 된 오가노이드 모델에 PBS, BA-EVs 또는 MA-EVs로 2주 동안 지속적으로 처리 후 형성된 오가노이드의 수와 크기를 평가했다. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$.
- [177]
- [178] **5. miR-1246 및 miR-1290가 난소암 세포 침윤 및 이동에 미치는 영향 확인**
- [179] EV miRNA 시그니처는 액체 생검에서 임상 바이오마커 역할을 할 뿐만 아니라 암 특징에 영향을 미칠 수 있다. 난소암 전이 능력을 변경하는 것과 관련된 MA-EVs의 miRNA기능을 확인하기 위해, 복수 및 혈장 유래 EV의 miRNA 시퀀싱 결과를 참조하였다. MiR-1246 및 miR-1290은 악성 그룹에서 가장 상향 조절된 miRNA 중 하나이고 이 두 miRNA의 절대 발현 수준이 현저히 높기 때문에 이면 분석(ulterior analysis)을 위한 표적 miRNA로 선택되었다(도 10A 및 도 10B; x축 -2 이하의 부분은 Down, 2 이상의 부분은 UP임; 도 10a에서 위 화살표는 miR-1246, 아래 화살표는 miR-1290; 도 10b에서 위 화살표는 miR-1290, 아래 화살표는 miR-1246임). 복수 및 혈장 서브세트에서 miR-1246 및 miR-1290의 발현은 히트맵에 나타냈다 (도 6A 및 도 6B). miR-1246 및 miR-1290의 발현 패턴을 더 조사하기 위해 추가적으로 복수 (MA-EV: N=18, BA-EV: N=12) 및 혈장 샘플 (MP-EVs: N=78; BP-EVs: N=72)을 사용하여 RT-qPCR을 수행했다. 이 두 miRNA의 발현 수준은 MA-EVs 및 MP-EVs에서 양성EV에 비해 유의하게 상승했다 (도 6C 및 6D). 특히, miR-1246 및 miR-1290 상향 조절은 초기 (I기+II기) 암 환자에서도 관찰되었다 (도 6E 및 6F). miR-1246 및 miR-1290의 발현과 환자 생존의 상관관계를 공개 데이터 세트를 통해 확인한 결과 miR-1246 및 miR-1290발현이 높을수록 환자의 안 좋은 예후와 관련 있는 것으로 확인되었다(도 10D; 도 10da 내지

10db). 여기에서 우리 연구의 생존 분석은 혈장 EV miR-1290 수준이 환자의 전체 생존 및 무진행 생존과 강하게 연관되어 있는 반면 EV miR-1246 발현은 환자 생존과 상관관계가 없는 것으로 나타났으며(도 10E 및 도 10F; 도 10e에서 진한 선이 Low 그래프, 연한 선이 High 그래프임. 도 10f에서 Low 그래프가 High 그래프보다 원점으로부터 멀리 있음) 이는 miR-1290의 잠재적인 예후 예측 가치를 나타낸다.

[180] miR-1246과 miR-1290의 발현이 악성 생체액에서 증가함에 따라 우리는 이러한 경향이 암세포와 정상 상피 세포 사이의 차이는 분비에서 비롯된 것인지 궁금했다. 본 발명자들은 GSE103708의 miRNA 프로파일링 데이터를 사용하여 암세포 (N=13) 및 정상 상피 세포 (N=3) 및 각 EV에서 miR-1246 및 miR-1290의 발현을 분석했다. 그러나 세포 수준과 EV 수준 모두 정상군과 암군 간에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 한편 miR-1246 또는 miR-1290 발현의 차이는 HGSOC와 비-HGSOC 세포주 또는 각각의 EV 사이에서 검출되지 않았다. 특히, 세포 및 각 EV에서 miR-1246 및 miR-1290의 발현은 상관관계가 없었으며, 이는 복잡한 분류 메커니즘이 이 두 miRNA의 분비 과정에 관련될 수 있음을 나타낸다.

[181] 저산소증은 암의 중추적인 특징 중 하나이므로 우리는 저산소증이 EVs에서 miR-1246 및 miR-1290의 발현에 변화를 일으킬 수 있는지 조사했다. SKOV3 및 KURAMOCHI 세포는 정상 산소 및 저산소 조건에서 EV-free FBS가 보충된 배지에서 배양되었다. EV는 72시간 인큐베이션 후 분리되었고 TEM, NTA 및 웨스턴 블롯팅을 통해 CD63 및 CD9 발현과 함께 30 nm에서 200 nm 범위의 이중막 입자로 확인되었다. 흥미롭게도 miR-1246 및 miR-1290의 발현은 정상산소 (normoxic) EV(N-EV)보다 저산소(hypoxic) EV(H-EV)에서 극적으로 증가했다 (도 6I 및 도 6J). 그 후, 우리는 이 두 miRNA가 난소암 전이 가능성에 미치는 영향을 조사했다. 도 6K(도 6ka 내지 도 6kb; 오른쪽의 그래프는 왼쪽 각 경우의 relative cell number를 순차적으로 나타낸 것임)에 명시된 바와 같이, miR-1246 및 miR-1290의 억제는 SKOV3 및 KURAMOCHI 세포의 침윤 및 이동을 현저하게 억제한 반면, 이들 두 miRNA의 과발현은 반대 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 MA-EVs에 캡슐화된 miR-1246 및 miR-1290이 난소암 전이를 촉진하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 입증했다. 난소암의 주된 전이 경로는 복막을 따라 복강 내 여러 장기에 전이가 일어나는 transcolomic이다. 따라서, 본 연구에서는 난소암 환자에서 유래된 그물막 지방 조직을 이용하여 miR-1246과 miR-1290의 난소암 세포의 전이성 능력에 영향을 조사할 새로운 vivo 모델을 만들었다. miR-1246 또는 miR-1290 억제제가 투여된 SKOV3^{luc}는 망막 조직 조각으로 이동 및 식민지화된 경우가 대조군보다 감소된 반면에 miR-1246 또는 miR-1290 모방체가 투여된 경우 이동이 증가하는 것이 확인되었다 (도 6L).

[182] 도 6A는 복수 서브세트에서 miR-1246 및 miR-1290의 발현을 나타내는 히트맵이다. 도 6B는 혈장 서브세트에서 miR-1246 및 miR-1290의 발현을 나타내는 히트맵이다. 도 6C는 RT-qPCR에 의해 MA-EVs (N=18) 및 BA-EVs (N=12)에서

miR-1246 및 miR-1290의 발현을 측정된 결과를 나타낸다. 도 6D는 RT-qPCR에 의해 MP-EVs (N=78) 및 BP-EVs (N=72)에서 miR-1246 및 miR-1290의 발현을 측정된 결과를 나타낸다. 도 6E는 초기 (stage I+II)의 암환자의 MP-EVs (N=16) 및 BP-EVs (N=72)에서의 miR-1246 및 miR-1290 발현을 비교한 결과를 나타낸다. 도 6F는 암 세포주 유래 EV의 형태를 확인하기 위해 TEM을 수행한 결과를 나타낸다. 도 6G는 웨스턴 블롯팅을 통해 암 세포주 유래 EV에서 EV 마커 CD63 및 CD9가 발현되는지 확인한 결과를 나타낸다. 도 6H는 NTA를 사용하여 암세포주 유래 EV의 크기 기여도 및 농도를 확인한 결과를 나타낸다. 도 6I는 산소 및 정상 산소 EV에서 miR-1246의 발현을 나타낸 결과이다. 도 6J는 저산소 및 정상 산소 EV에서 miR-1290의 발현을 나타낸 결과이다. 도 6K는 miRNA 억제제 또는 모방체를 난소암 세포에 처리하여 난소암 침윤 및 이동에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 도 6L은 난소암 환자 유래 망막 지방조직은 miRNA의 억제제 또는 모방체가 처리된 SKOV3^{luc} 세포와 5일 동안 공동 배양했다. 외막 조직 조각으로 이동 및 콜로니를 이룬 SKOV3^{luc} 세포의 수는 IVIS 100 영상 시스템으로 측정된 발광 강도에 의해 측정되었다. (H-EV: 저산소 EV; N-EV: 정상 산소 EV; IN: 억제; OV: 과발현; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001).

[183]

[184] **6. miR-1246/miR-1290-ROR α 의 난소암 전이 및 난소암 환자의 생존에 미치는 영향 확인**

[185] miR-1246과 miR-1290은 유사한 서열을 공유하기 때문에 일부 공통 표적에 결합할 수 있다고 가정하였다. 온라인 도구를 사용하여 miR-1246 및 miR-1290의 공통 표적을 예측했다 (도 7A). 10개의 예측된 표적 중에서 Retinoid orphan receptor alpha (ROR α)는 GEPIA에서 정상 조직보다 난소암 조직에서 명백하게 하향 조절되는 유일한 표적이었다 (도 7B). 잠재적인 표적으로 ROR α 를 선택했다. miR-1246 및 miR-1290의 억제가 SKOV3 및 KURAMOCHI 세포에서 ROR α 의 발현을 유의하게 증가시킬 수 있음을 확인하였다 (도 7C). 야생형(WT) 또는 추정 결합 영역이 변경된 돌연변이된 형태 (MT)의 추정 miRNA 표적 영역을 포함하는 ROR α 의 부분 3'-UTR 서열이 구축되었다 (도 7D). 루시퍼라제 활성은 ROR α WT 및 miR-1246 또는 miR-1290 모방체로 동시 형질감염된 세포에서만 현저하게 감소하였고, 이는 miR-1246 및 miR-1290이 3'-UTR에 결합하여 ROR α 를 직접 조절할 수 있음을 나타낸다 (도 7E). 난소암에서 ROR α 의 기능을 더 조사했다. 난소암 세포에서 ROR α 의 과발현은 그들의 침윤 및 이동 능력을 현저하게 방해했다 (도 7F; 오른쪽의 그래프는 왼쪽 각 경우의 relative cell number를 순차적으로 나타낸 것임). 또한, 이 억제 효과는 miR-1246 또는 miR-1290 과발현에 의해 길항되는 것이 확인되었다 (도 7G; 오른쪽의 그래프는 왼쪽 각 경우의 relative cell number를 순차적으로 나타낸 것임). 또한, ROR α 의 임상적 의미를 알아보기 위해 IHC 분석 (HGSOC 조직: N=58)을 수행했다. ROR α 의 더 높은 발현은 더 긴 전체생존과 관

런이 있는 반면, 더 낮은 발현은 HGSOC 환자에서 더 짧은 전체 생존과 관련이 있었다 (도 7H 및 7I; 도 7i에서 원점과 가까운 진한 선 그래프는 ROR α Low, 원점과 먼 연한 선 그래프는 ROR α High 그래프임). 이러한 결과는 ROR α 가 난소암에서 종양 억제 유전자로 작용할 수 있음을 시사한다.

- [186] 도 7A는 온라인 도구를 사용하여 miR-1246 및 miR-1290의 공통 표적을 예측한 결과를 나타낸다. 도 7B는 GEPIA에서 난소암 조직 및 정상 조직에서의 ROR α 발현을 확인한 결과이다. 도 7C는 miR-1246 및 miR-1290 억제에 따른 SKOV3 및 KURAMOCHI 세포의 ROR α 발현 변화를 웨스턴 블롯팅으로 측정된 결과를 나타낸다. 도 7D는 ROR α 3'-UTR 야생형(WT) 또는 추정 결합 영역이 변경된 돌연변이(MT)의 추정 miRNA 표적 영역을 구축한 결과를 나타낸다. 도 7E(도 7ea 내지 도 7eb)는 이중 루시퍼라제 리포터 유전자 분석을 통해 miR-1246 및 miR-1290의 추정 결합 영역이 ROR α 3'-UTR인 것을 검증한 결과를 나타낸다. 도 7F는 ROR α 로 과발현된 난소암 세포의 침윤 및 이동 능력을 측정된 결과를 나타낸다. 도 7G(도 7ga 내지 도 7gd)는 miR-1246 또는 miR-1290이 ROR α 과발현에 의한 난소암 침윤 및 이동의 효과를 회복할 수 있는지 알아보기 위해 구조 실험을 수행한 결과를 나타낸다. 도 7H는 난소암 조직 및 정상 조직에서의 ROR α 를 분석한 결과를 나타낸다. 도 7I는 IHC 분석을 통해 HGSOC 환자에서 조직 ROR α 발현과 전체 생존 사이의 관계를 조사한 결과를 나타낸다. (OV: 과발현. *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.)

[187]

- [188] 전술한 실험 결과처럼, 본 발명자들은 복수 및 혈장 유래 EV의 miRNA 프로파일링을 조사하고 난소암 액체 생검에서 8 개의 miRNA 진단 시그니처를 확립했다. 이 시그니처는 자체 및 공개 데이터세트의 다양한 샘플에서 강력한 진단 능력을 보여 주었다. 추가로, 상기 8 개 miRNAs를 다양하게 조합한 시그니처를 확립하고 그들의 진단 능력을 확인하였다. 또한, 악성 복수 유래 EV가 miR-1246 및 miR-1290과 같은 기능성 miRNA를 전달함으로써 난소암 전이를 촉진할 수 있다는 것도 확인하였다.

청구범위

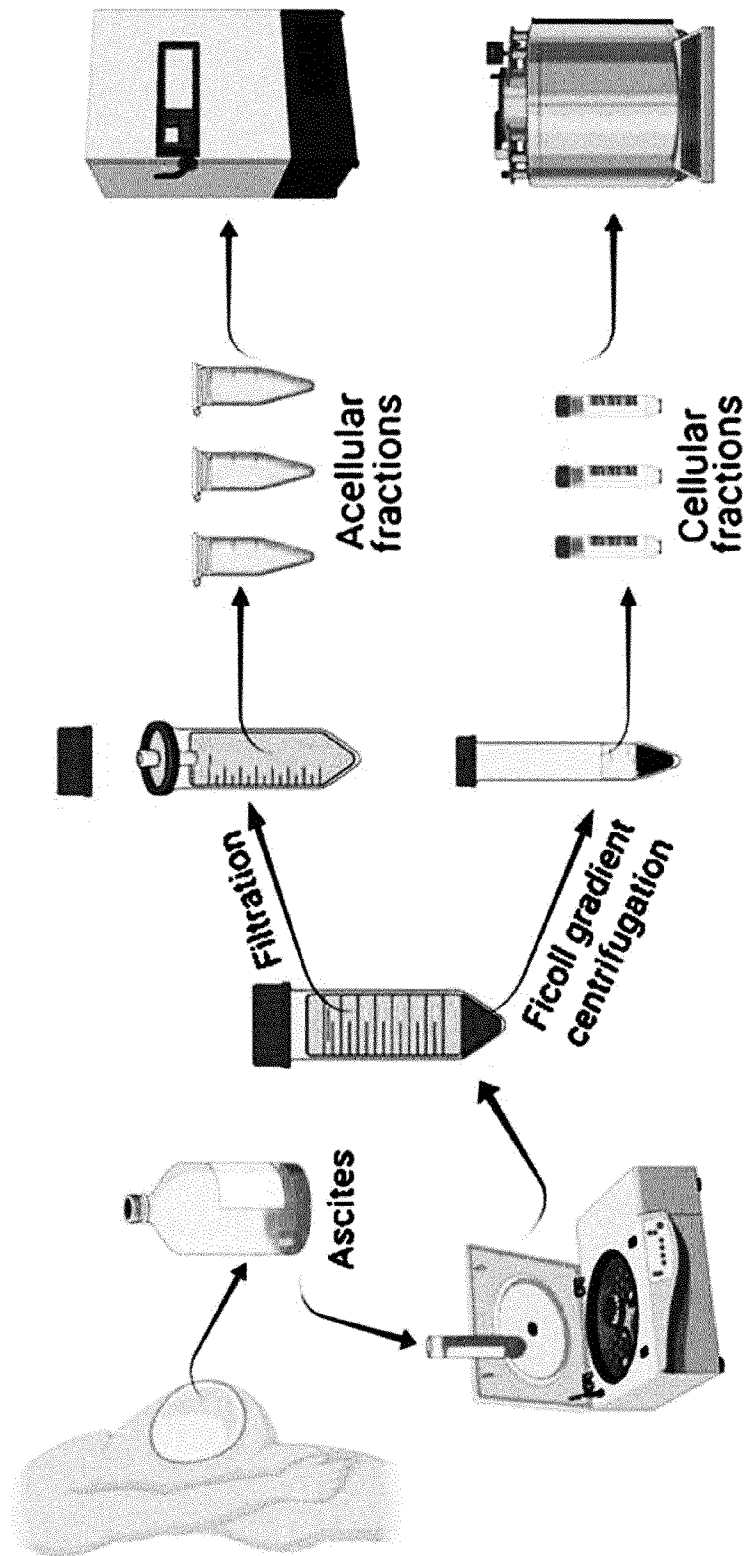
- [청구항 1] miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제를 포함하는, 난소암 진단용 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 miR-1246는 서열번호 1의 서열로 이루어지고, 상기 miR-1290는 서열번호 2의 서열로 이루어지고, 상기 miR-483-5p는 서열번호 3의 서열로 이루어지고, 상기 miR-429는 서열번호 4의 서열로 이루어지고, 상기 miR-34b-3p는 서열번호 5의 서열로 이루어지고, 상기 miR-34c-5p는 서열번호 6의 서열로 이루어지고, 상기 miR-449a는 서열번호 7의 서열로 이루어지고, 상기 miR-145-5p는 서열번호 8의 서열로 이루어진 것인, 난소암 진단용 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 세포외 소포체는 혈액, 혈청 또는 혈장에서 분리된, 난소암 진단용 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 제제는 프라이머 또는 프로브를 포함하는, 난소암 진단용 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 miR-1246, miR-1290 및 miR-483-5p의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제; miR-1246, miR-1290, miR-483-5p 및 miR-429의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제; miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429 및 miR-34b-3p의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제; 또는 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p 및 miR-34c-5p의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제를 포함하는 것인, 난소암 진단용 조성물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 검출하는 제제를 포함하는 것인, 난소암 진단용 조성물.
- [청구항 7] 청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 난소암 진단용 키트.
- [청구항 8] (a) 피검체의 시료로부터 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p, miR-429, miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준을 대조군 시료의 해당 세포외 소포체 유래 miRNA의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 난소암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 miR-1246, miR-1290, miR-483-5p 및 miR-429 중 적어도 하나의 발현 수준이 대조군 대비 높거나, 상기 miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR-449a 및 miR-145-5p 중 적어도 하나의 발현 수준이 대조

군 대비 낮은 경우 상기 피검체가 난소암을 가지는 것으로 예측하는 단계;
를 더 포함하는, 난소암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

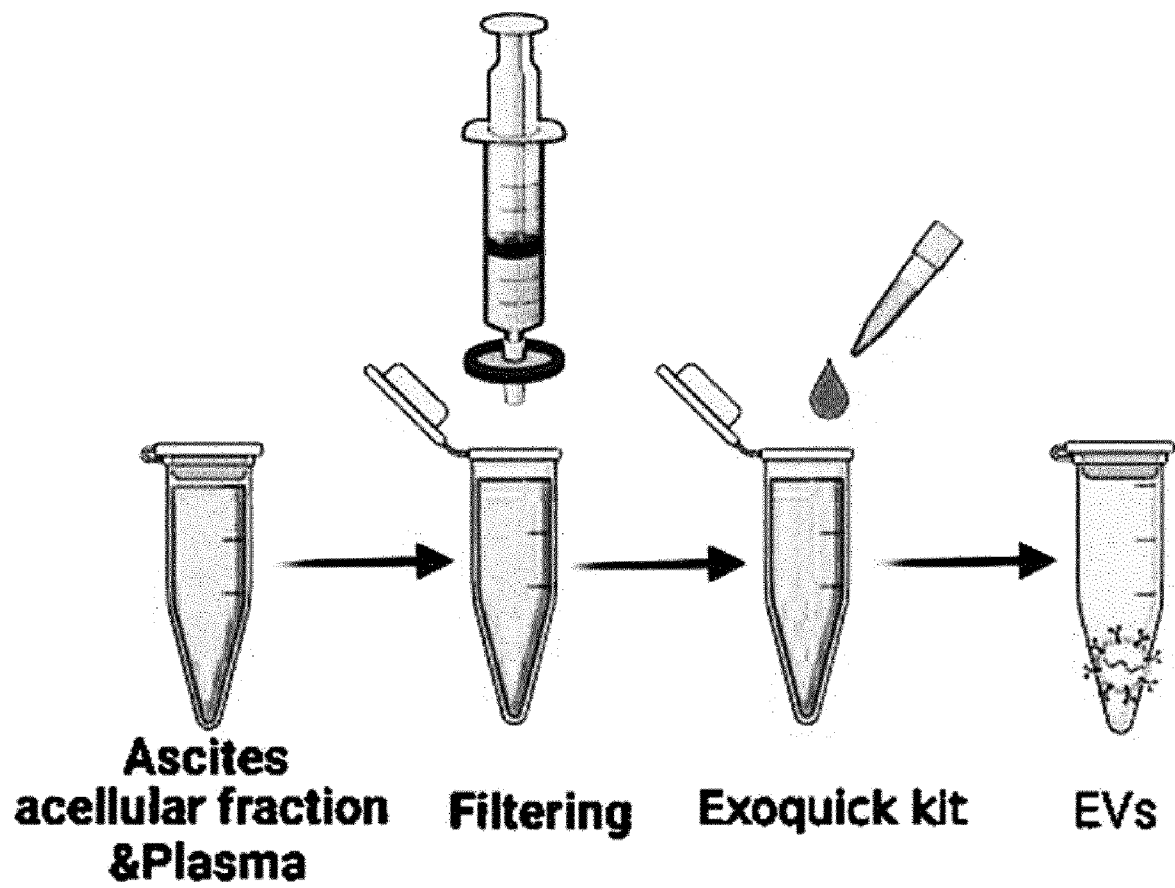
[청구항 10] 청구항 8에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청 또는 혈장인, 난소암 진단을
위한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 11] 청구항 8에 있어서, 상기 시료는 혈액에서 분리된 세포외 소포체, 혈청에
서 분리된 세포외 소포체 또는 혈장에서 분리된 세포외 소포체인, 난소암
진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

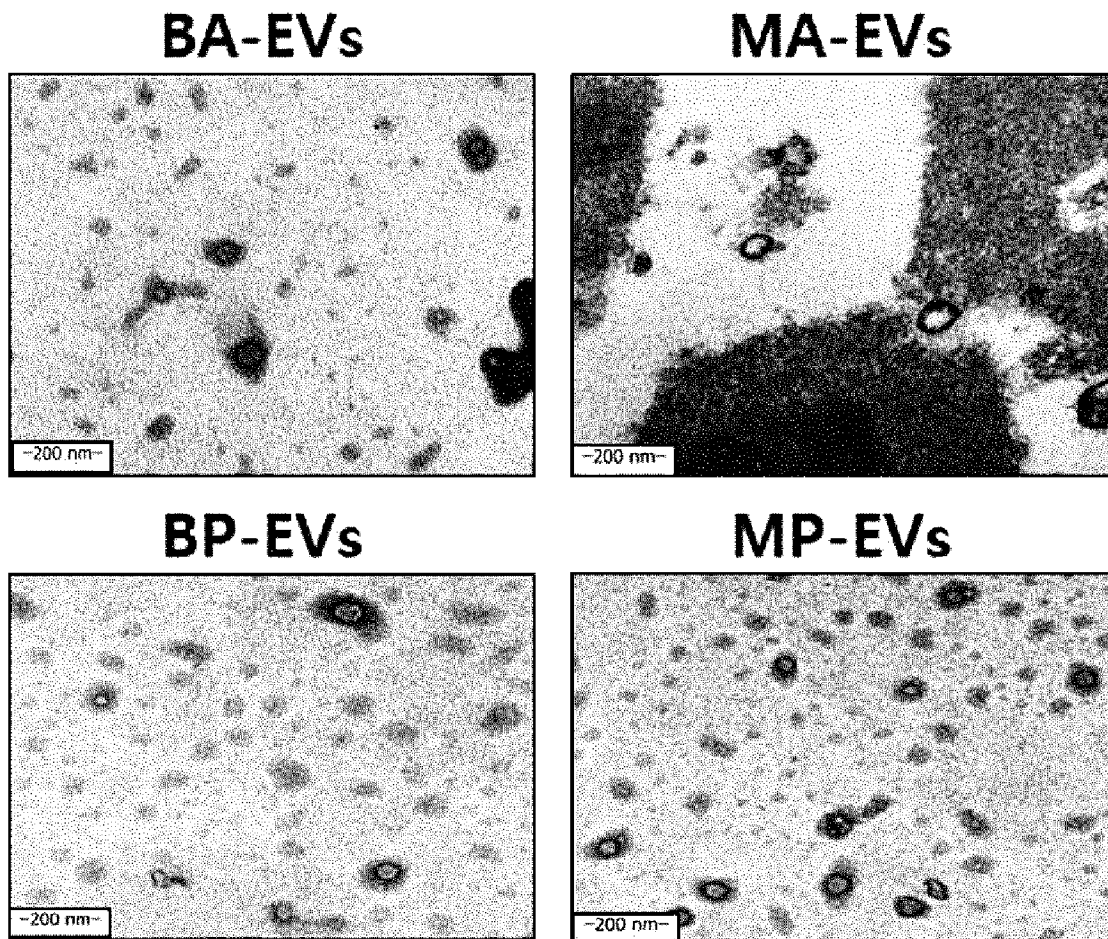
[도 1a]



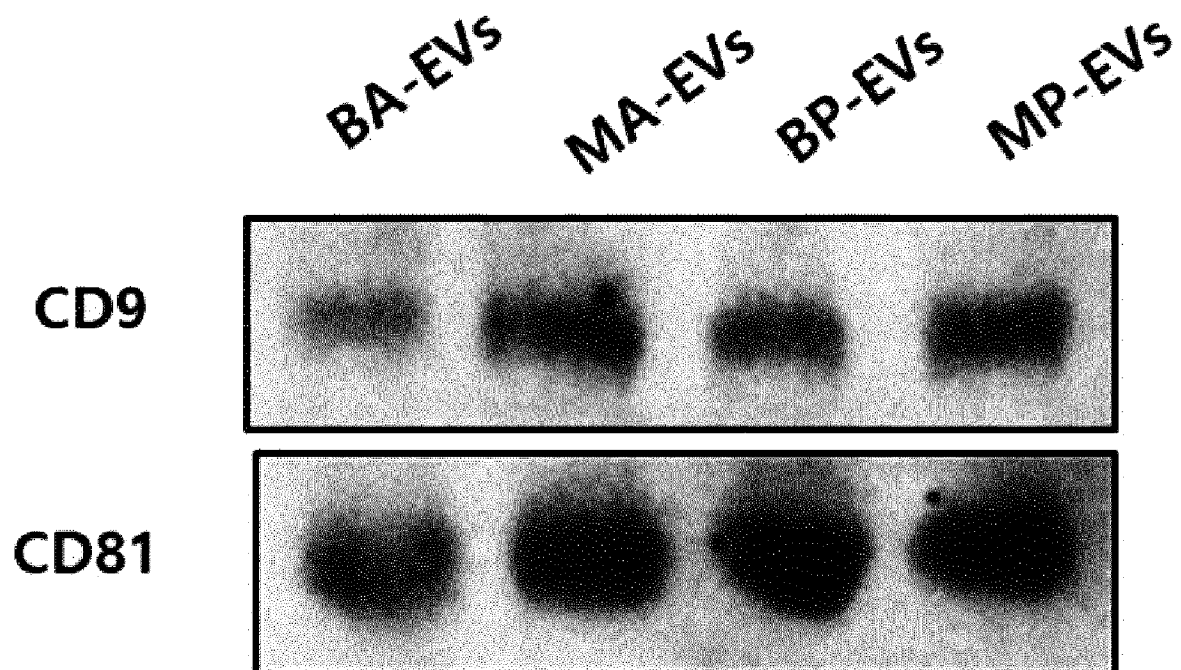
[도 1b]



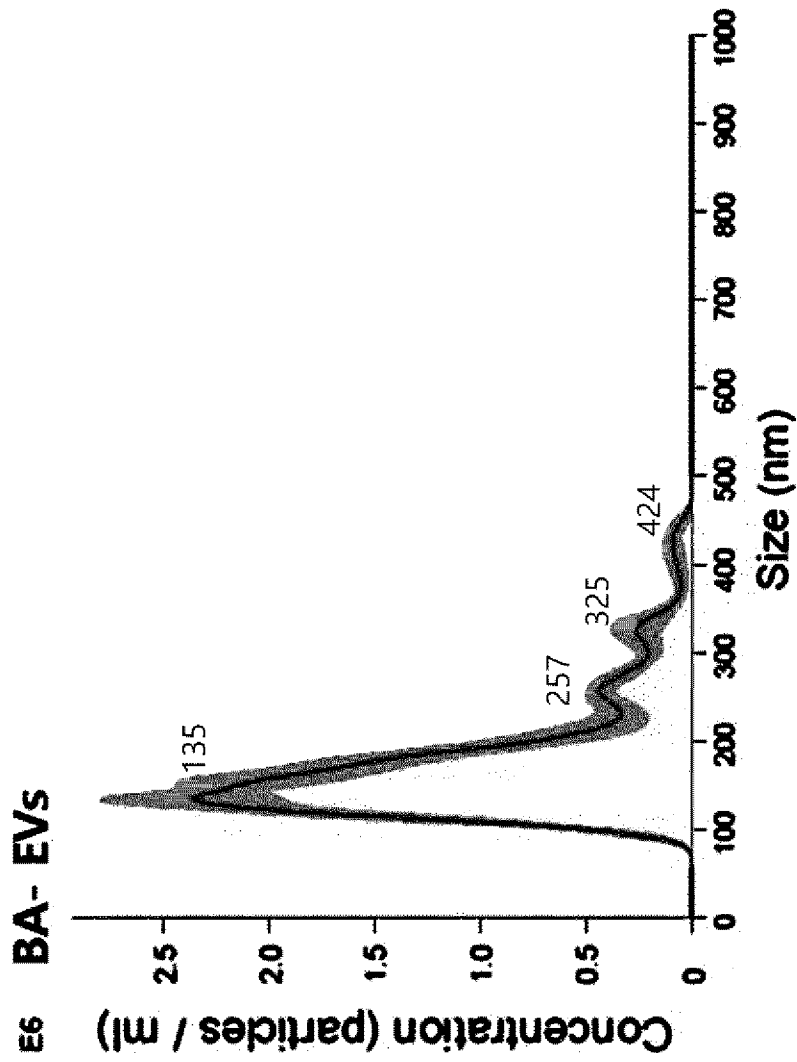
[도1c]



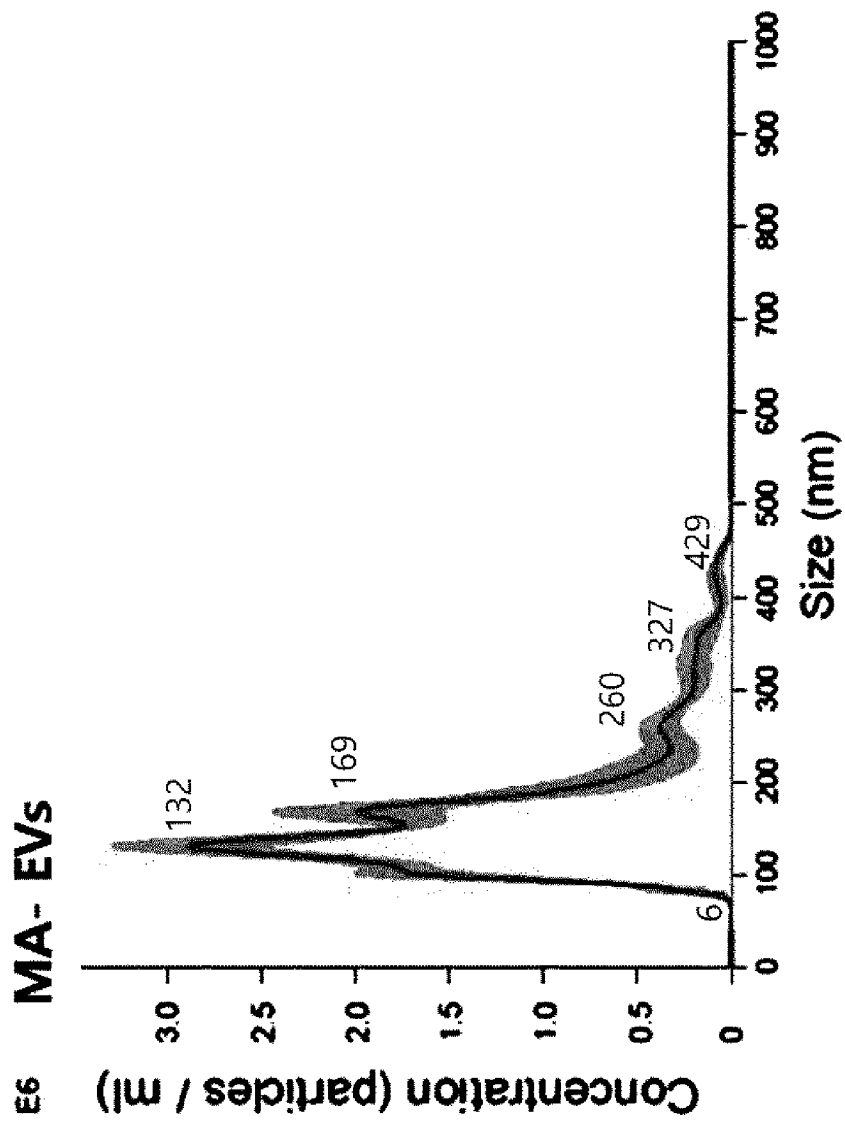
[도1d]



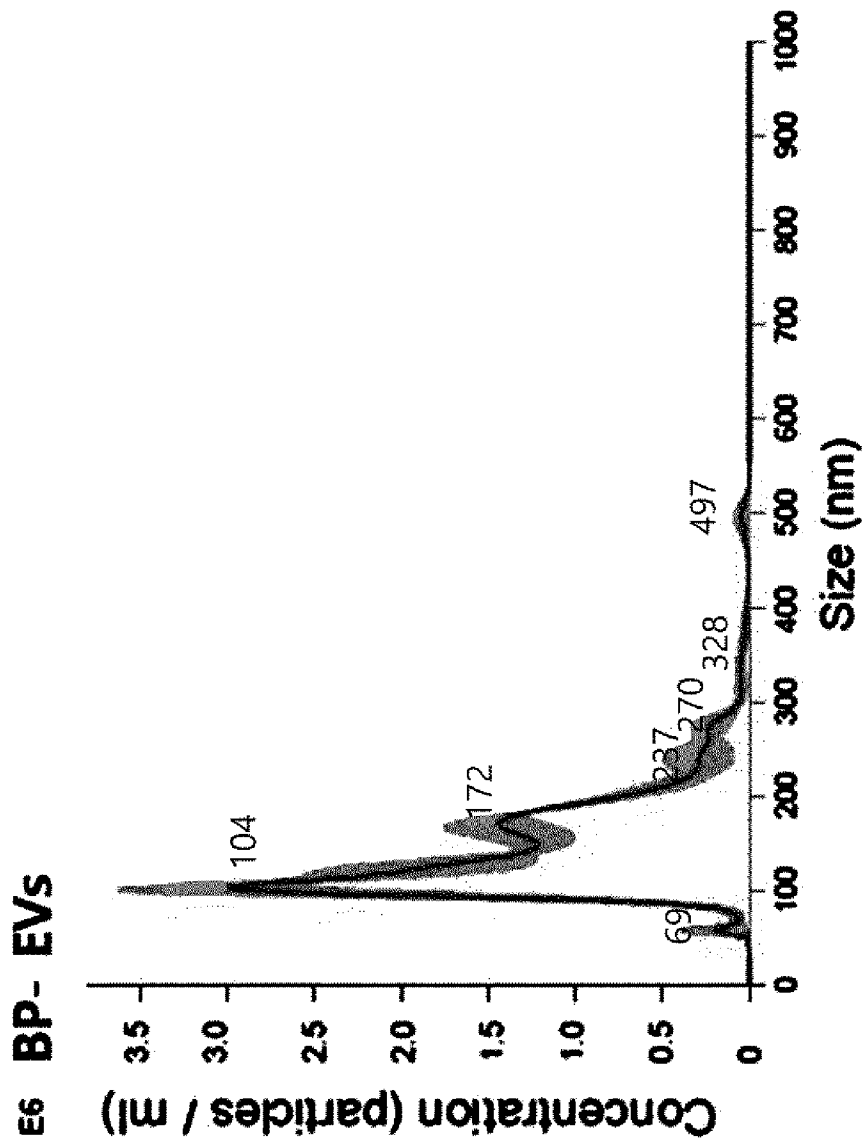
[도 1ea]



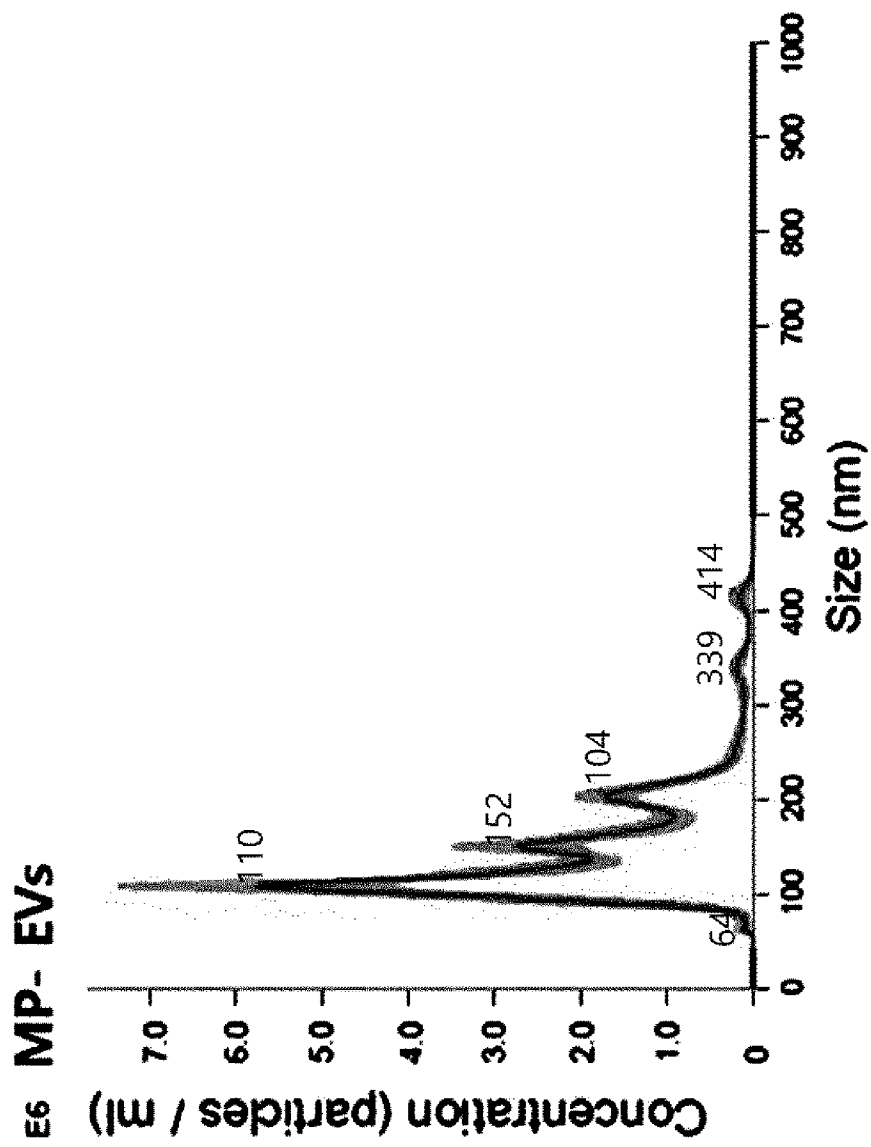
[도 1eb]



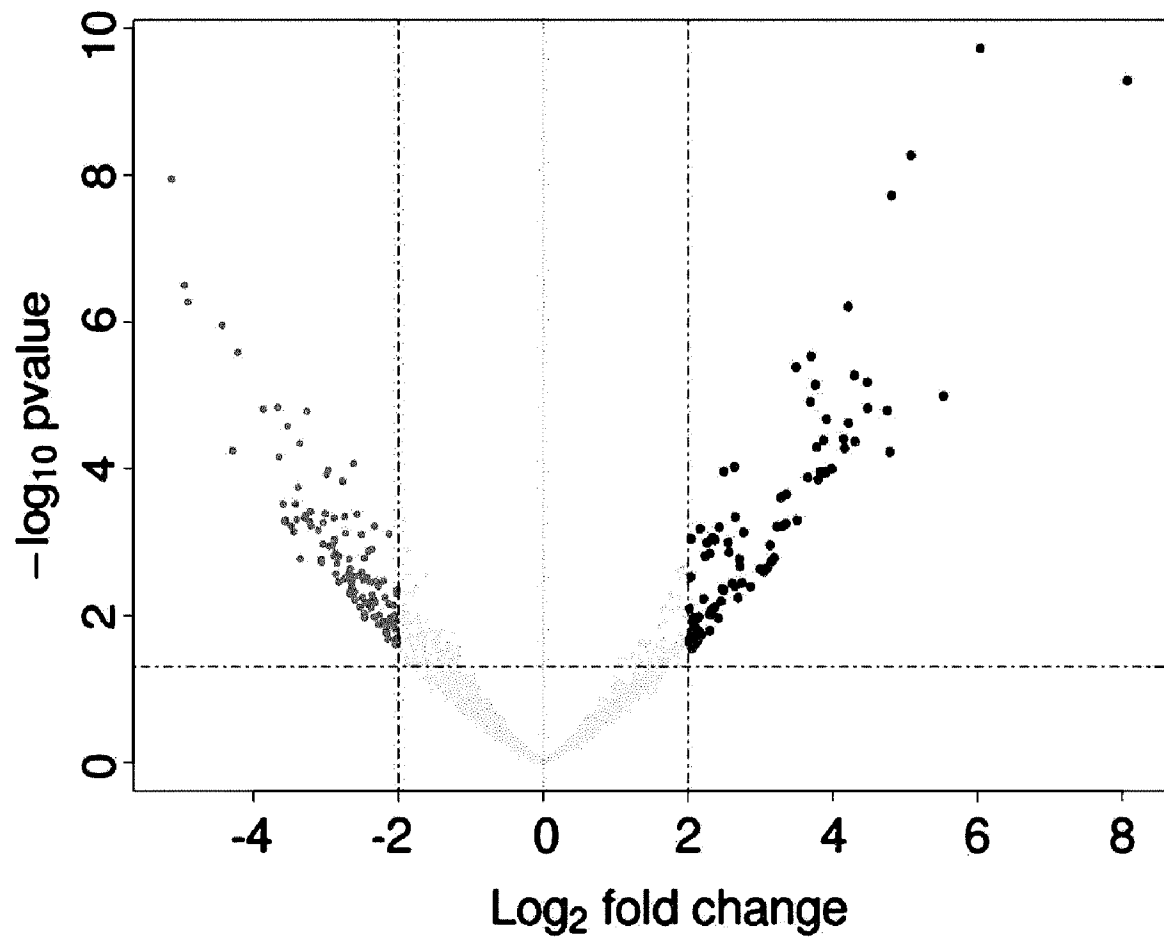
[도 1ec]



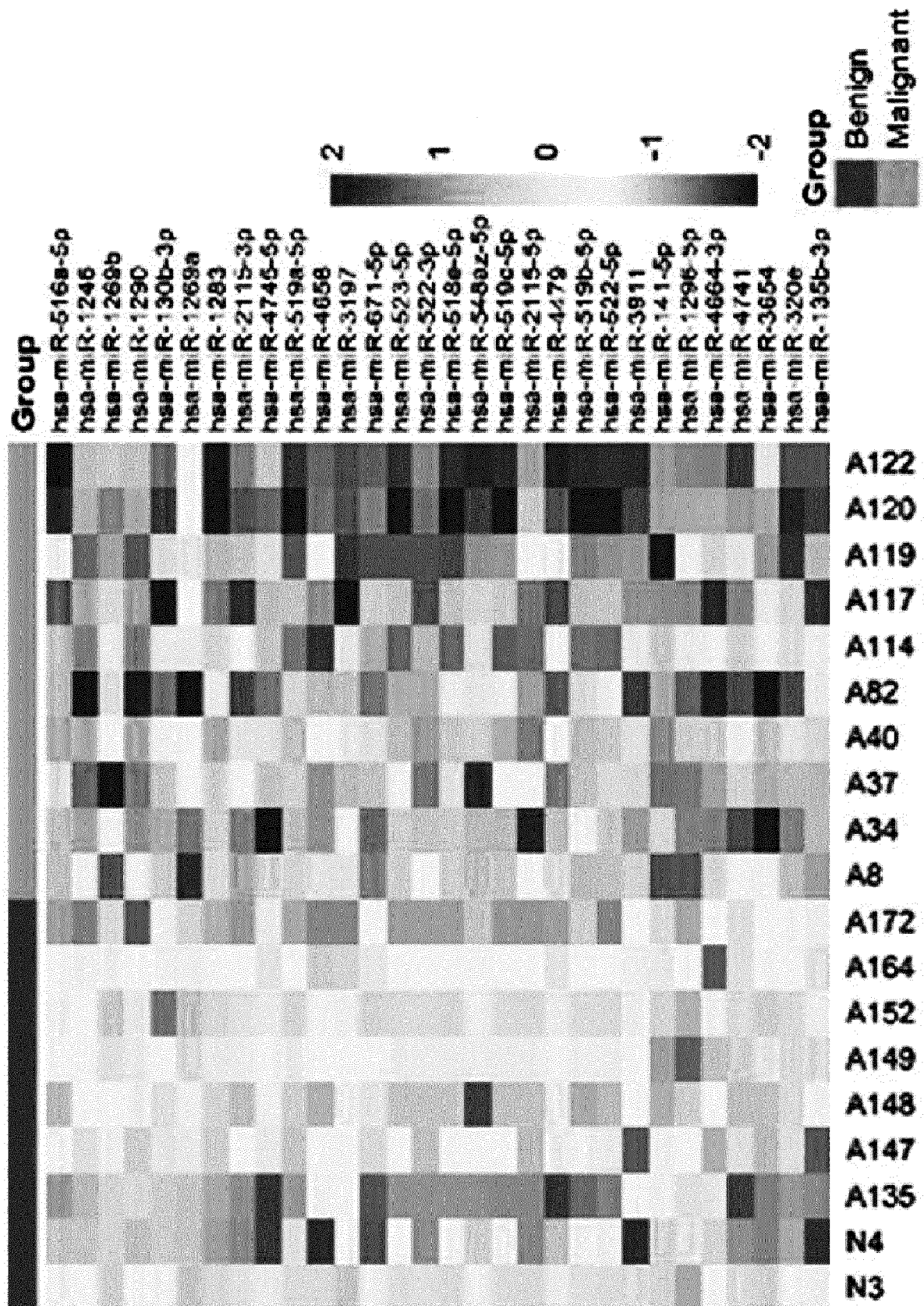
[도 1ed]



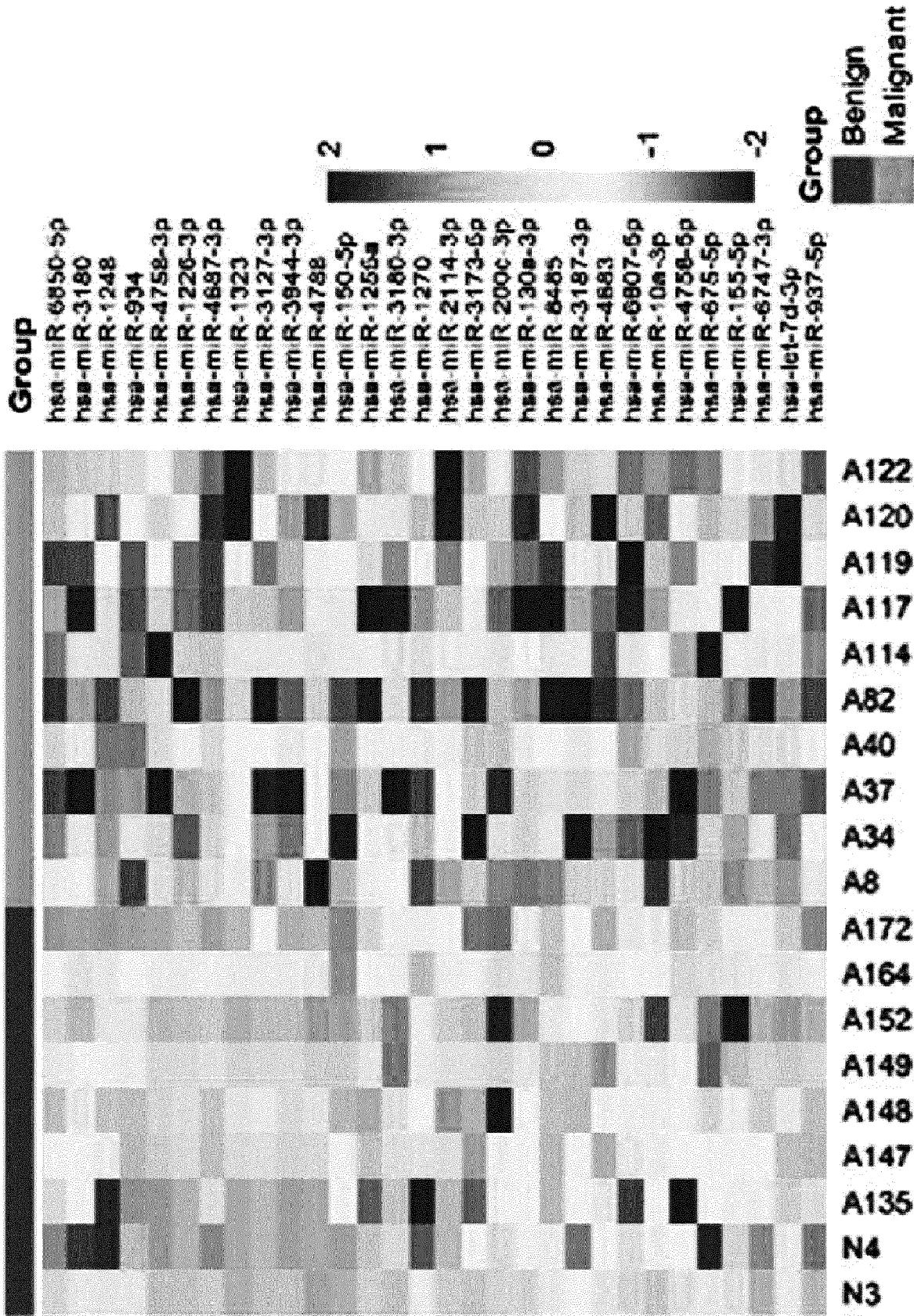
[도2a]



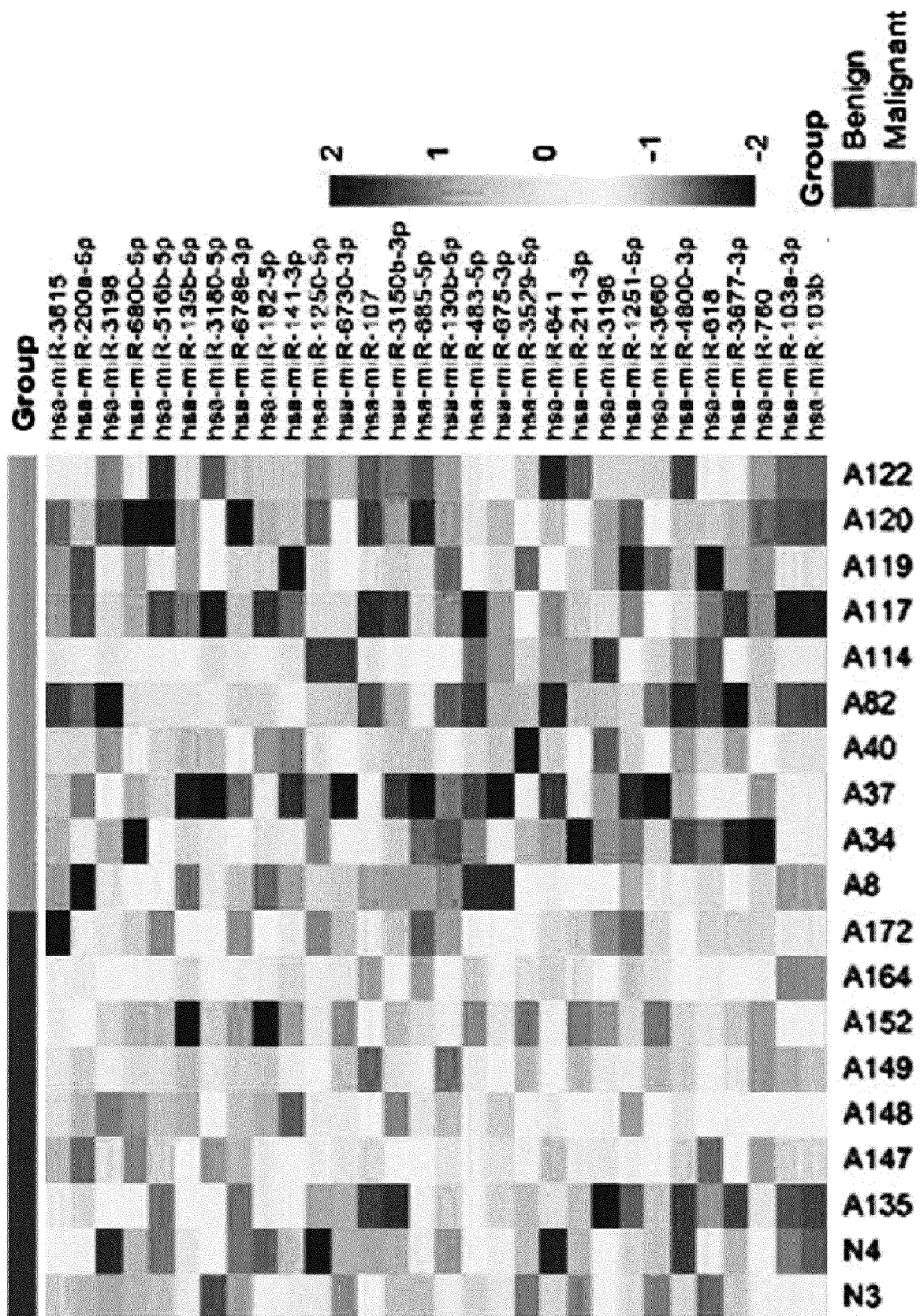
[도2ba]



[도2bb]



[도2bc]



Group

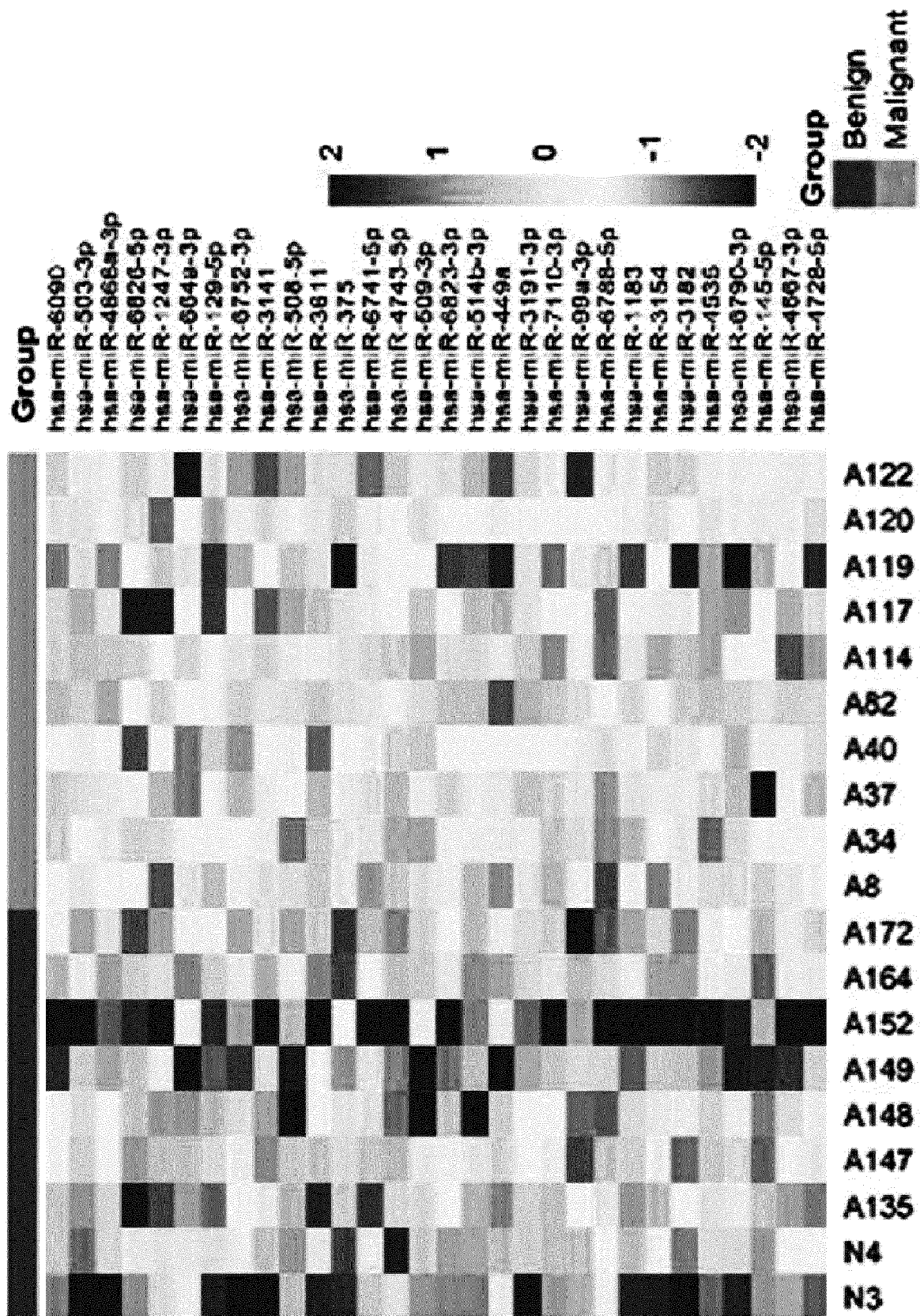
hsa-miR-6820-3p
hsa-miR-769-3p
hsa-miR-876-5p
hsa-miR-4671-5p
hsa-miR-4657
hsa-miR-561-5p
hsa-miR-305-3p
hsa-miR-1249-5p
hsa-miR-449D-5p
hsa-miR-3851
hsa-miR-4720-3p
hsa-miR-4716-3p
hsa-miR-485-3p
hsa-miR-1258
hsa-miR-1291
hsa-miR-6865-5p
hsa-miR-217
hsa-miR-3162-3p
hsa-miR-342-5p
hsa-miR-145-3p
hsa-miR-6734-5p
hsa-miR-6124
hsa-miR-4701-5p
hsa-miR-6769b-5p
hsa-miR-8072
hsa-miR-1321
hsa-miR-449c-5p
hsa-miR-196a-5p
hsa-miR-1973
hsa-miR-154-5p

Group

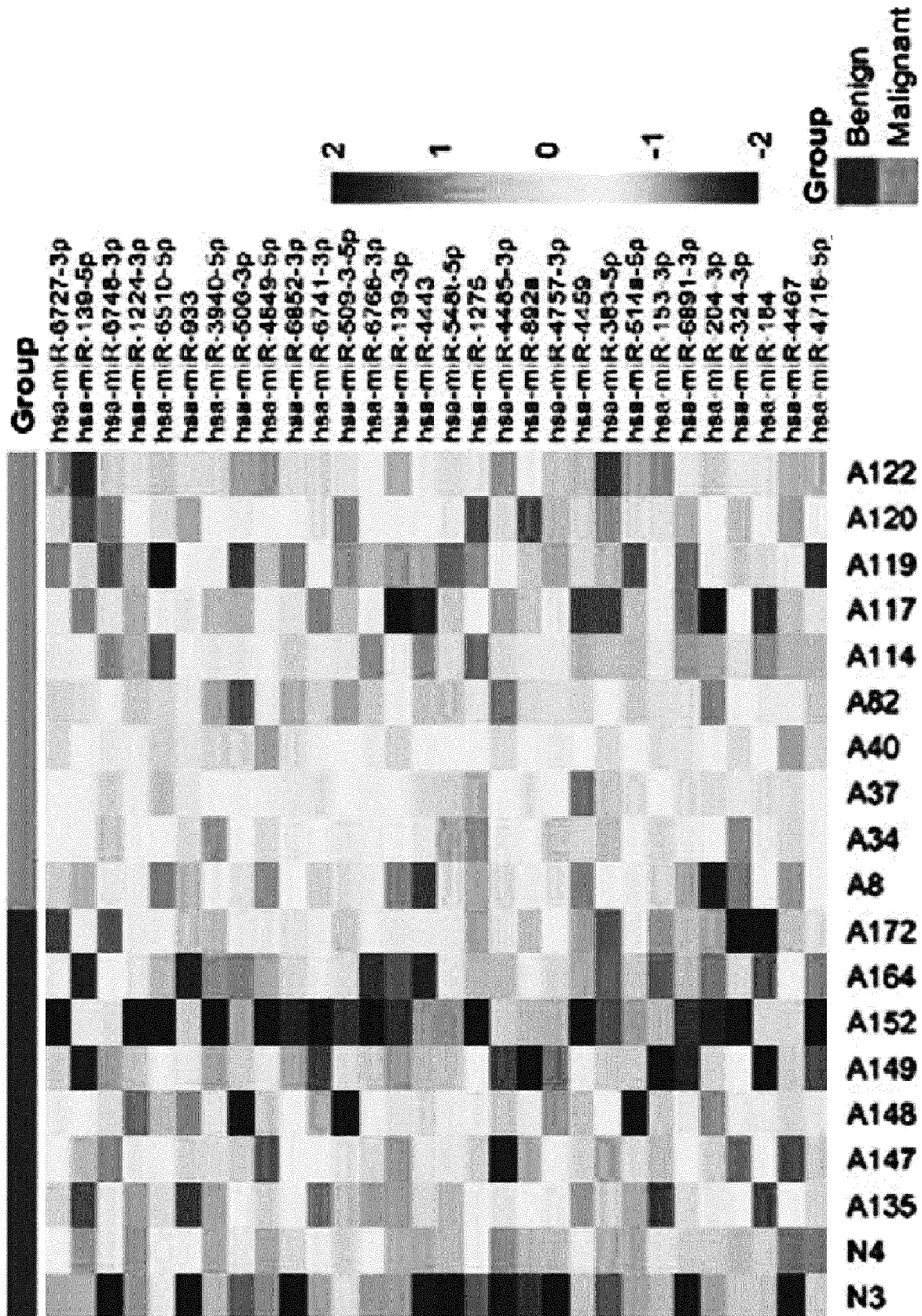
Benign
Malignant

A122
A120
A119
A117
A114
A82
A40
A37
A34
A8
A172
A164
A152
A149
A148
A147
A135
N4
N3

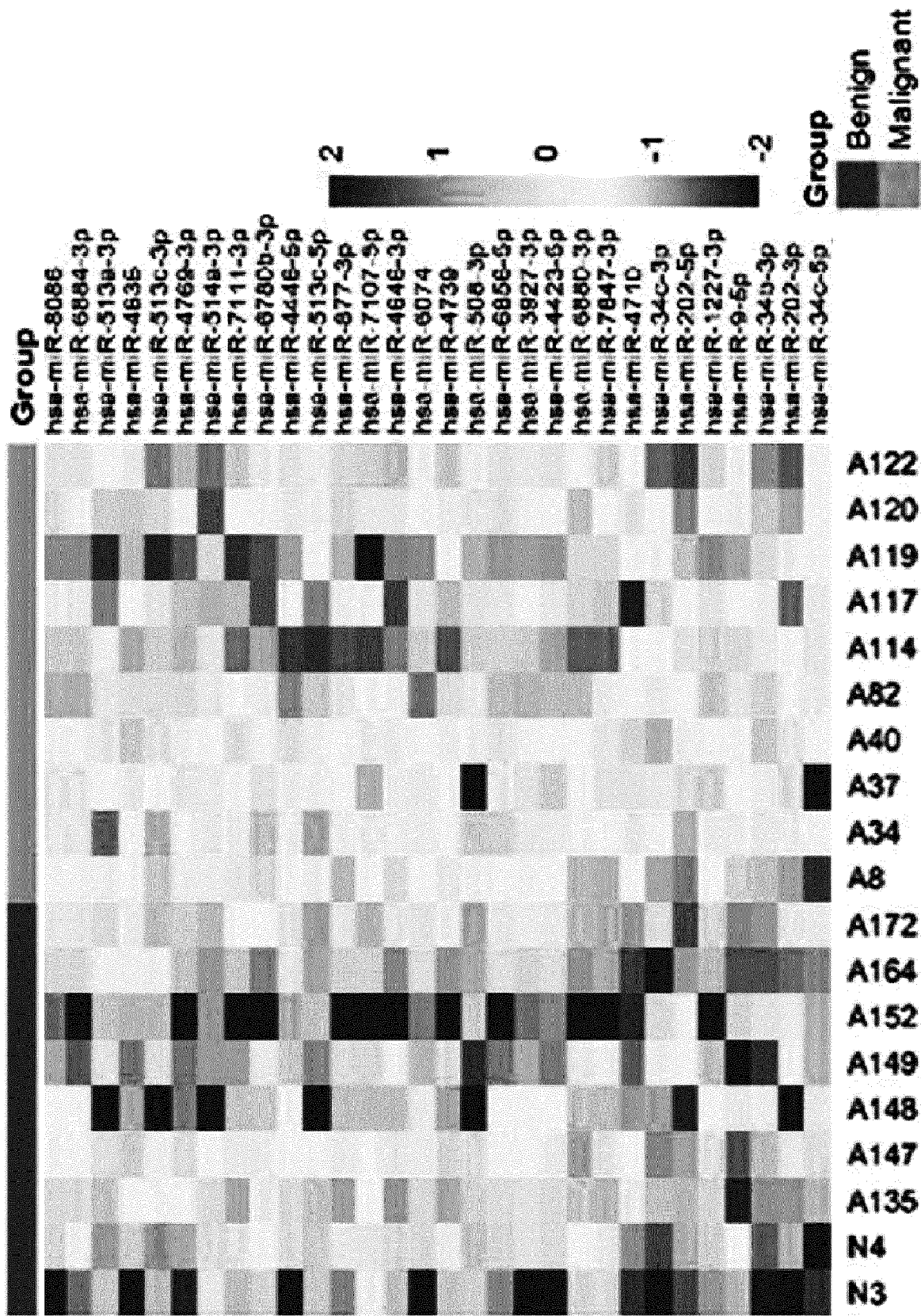
[도2be]



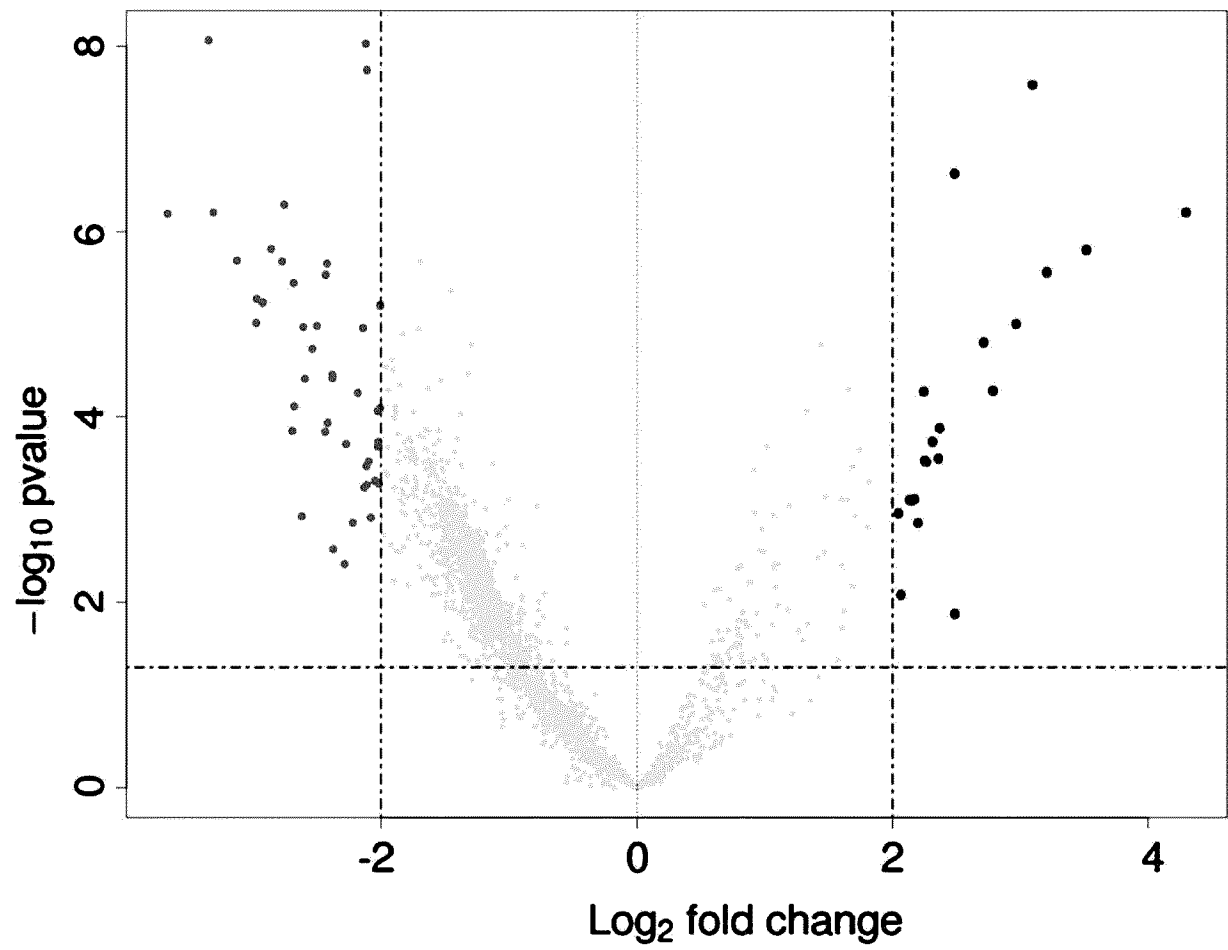
[도2bf]



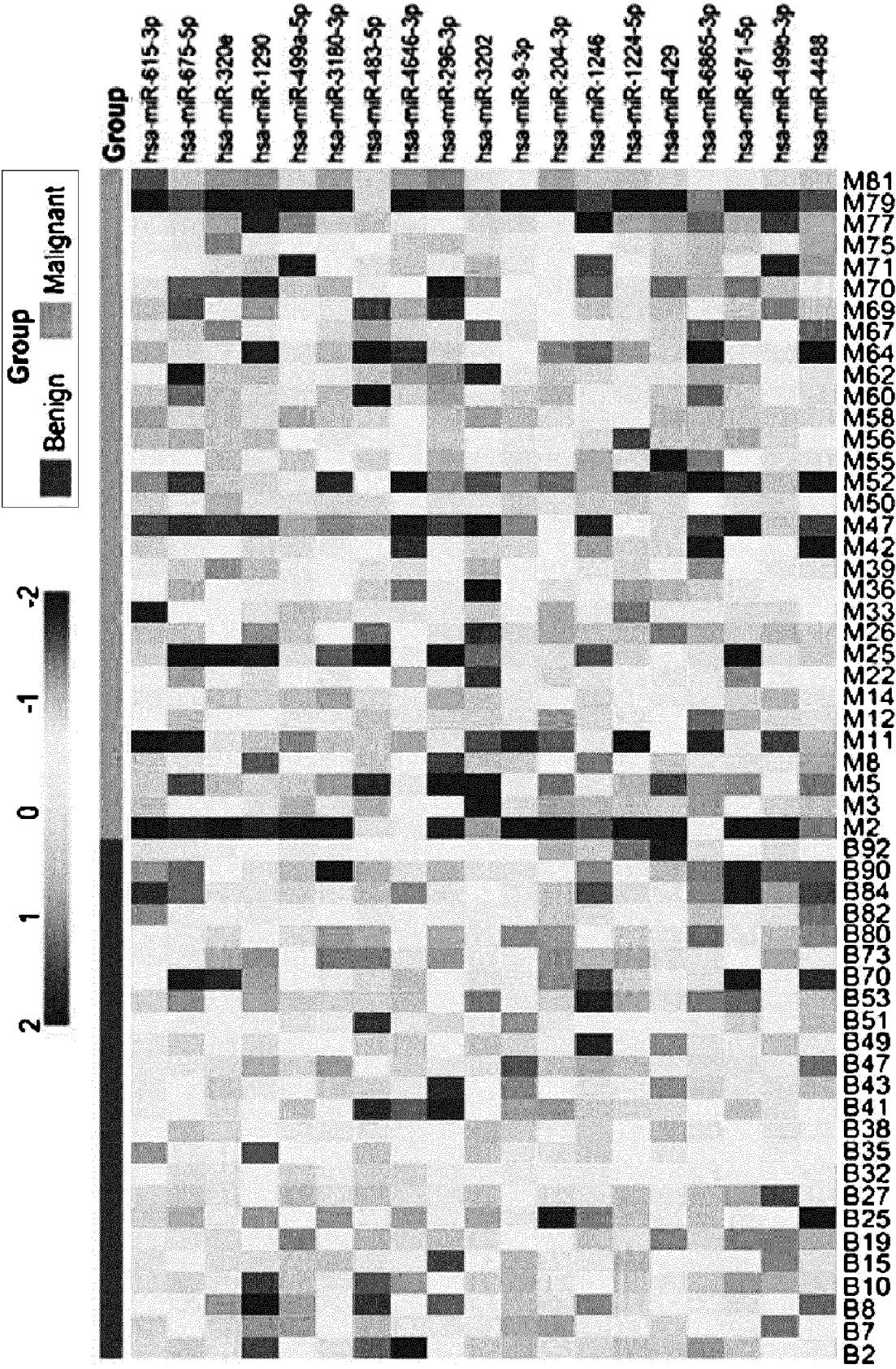
[도2bg]



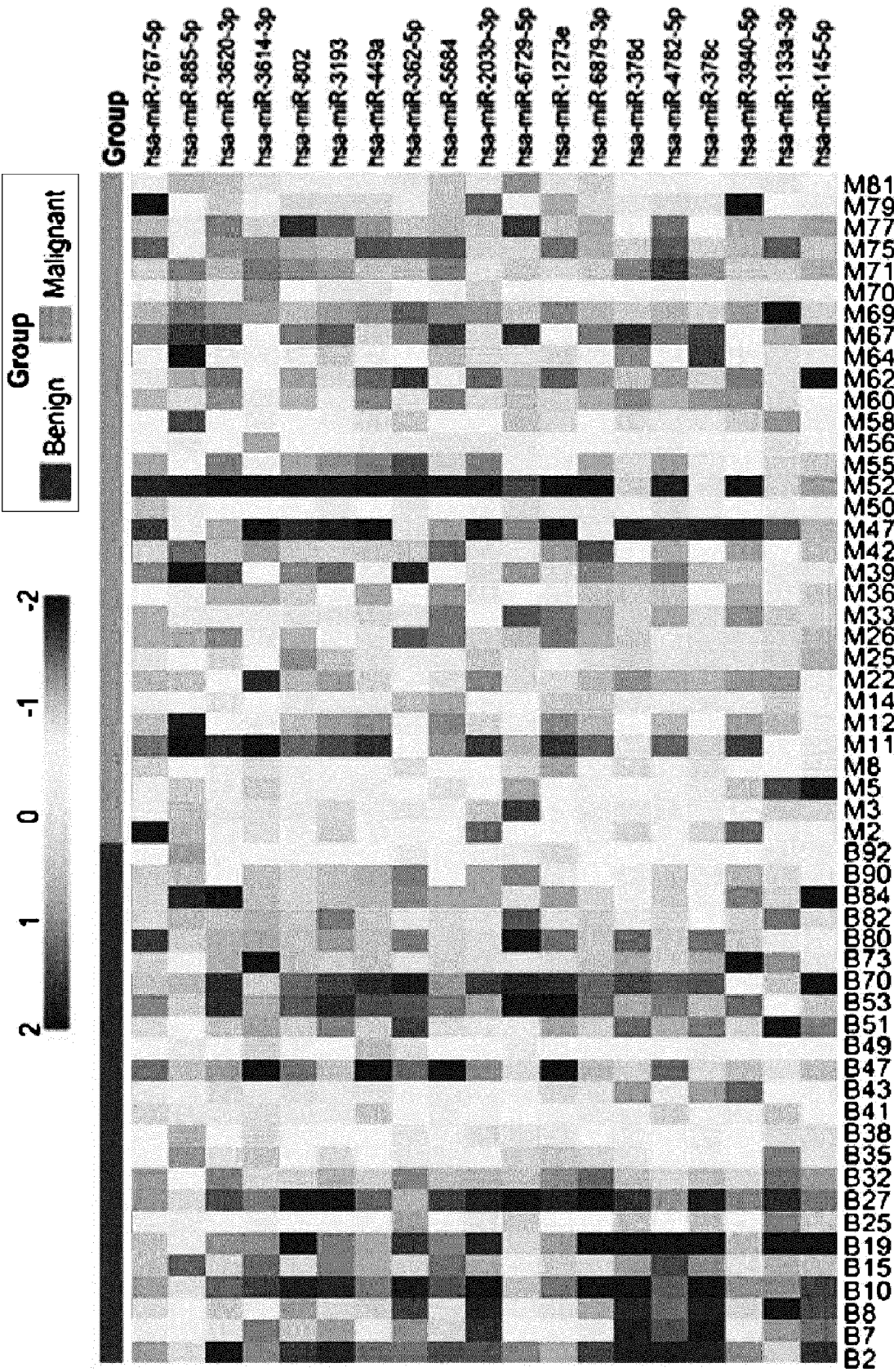
[도2c]



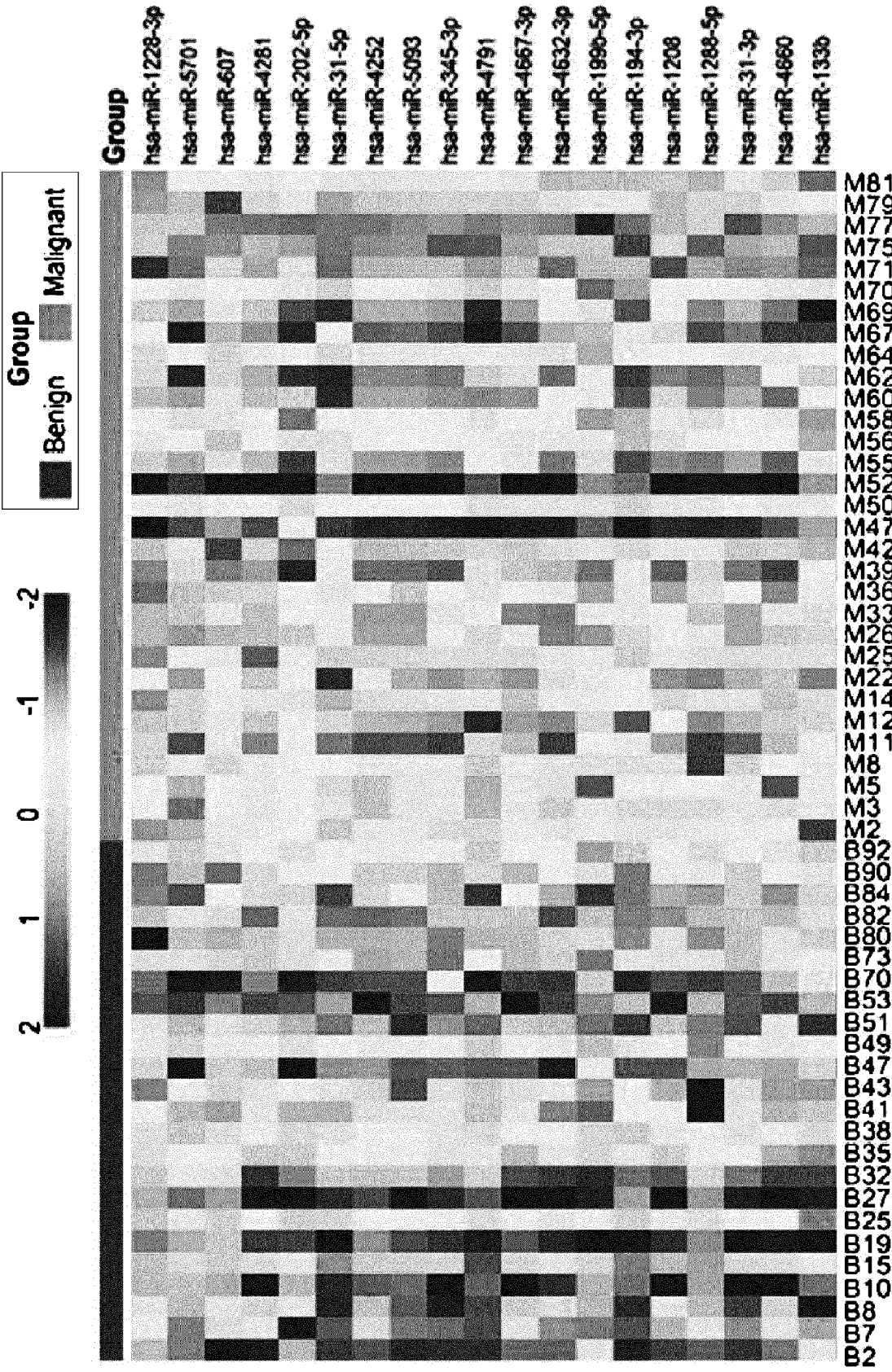
[도2da]



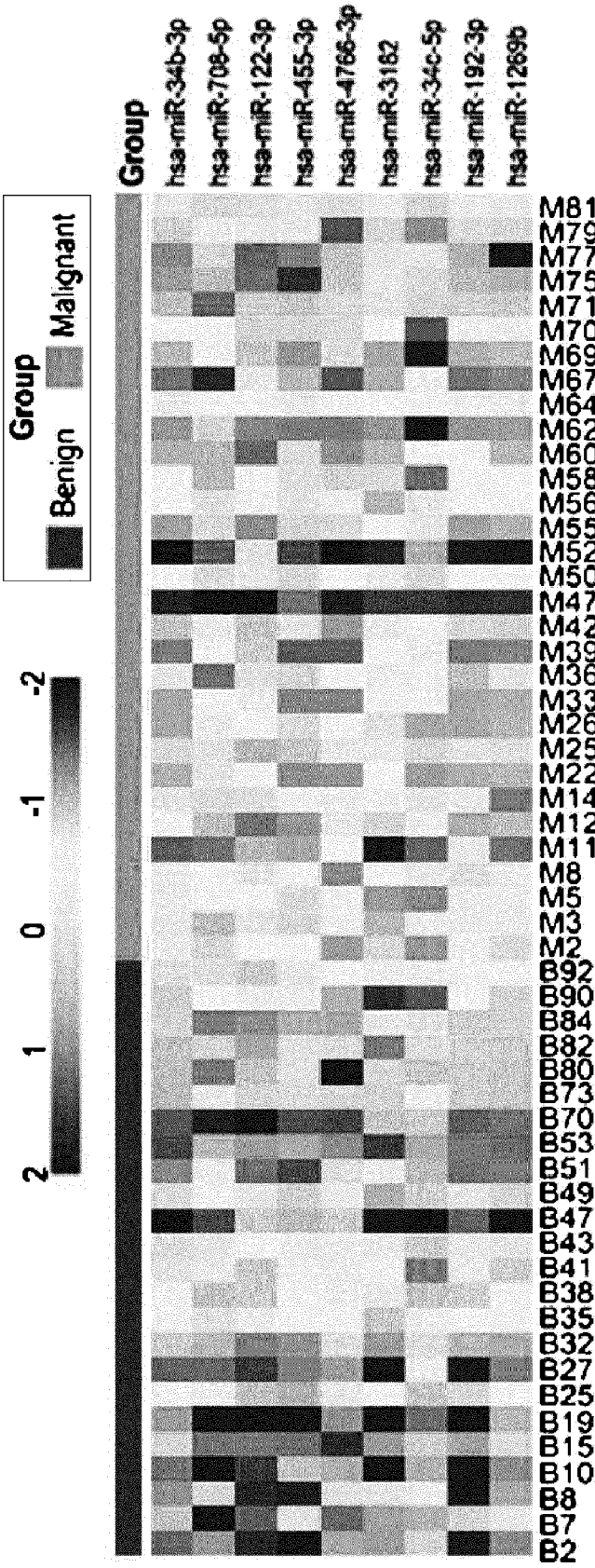
[도2db]



[도2dc]

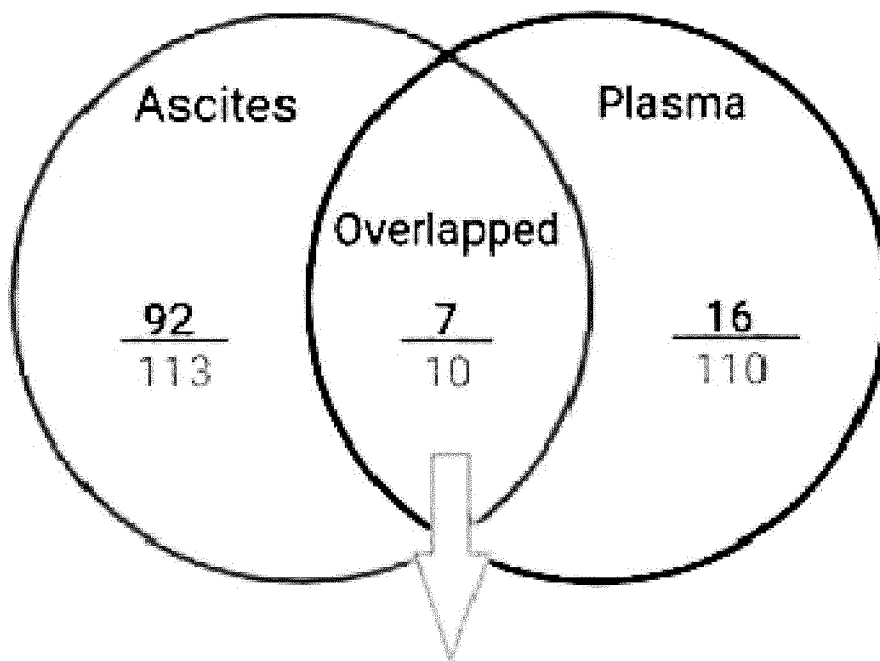


[도2dd]



[도2e]

Training set



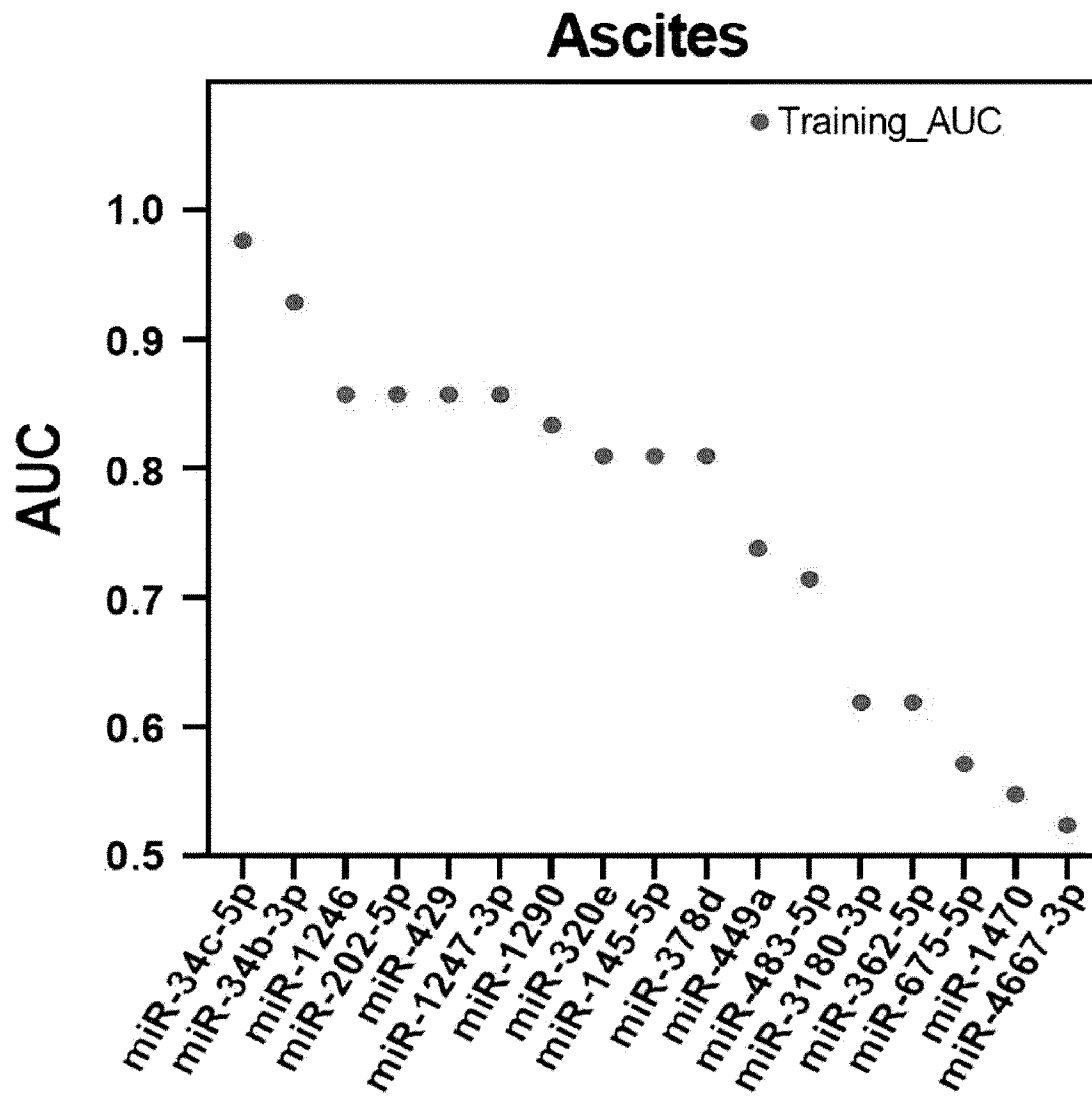
Upregulated:

hsa-miR-1246
hsa-miR-1290
hsa-miR-320e
hsa-miR-3180-3p
hsa-miR-675-5p
hsa-miR-483-5p
hsa-miR-429

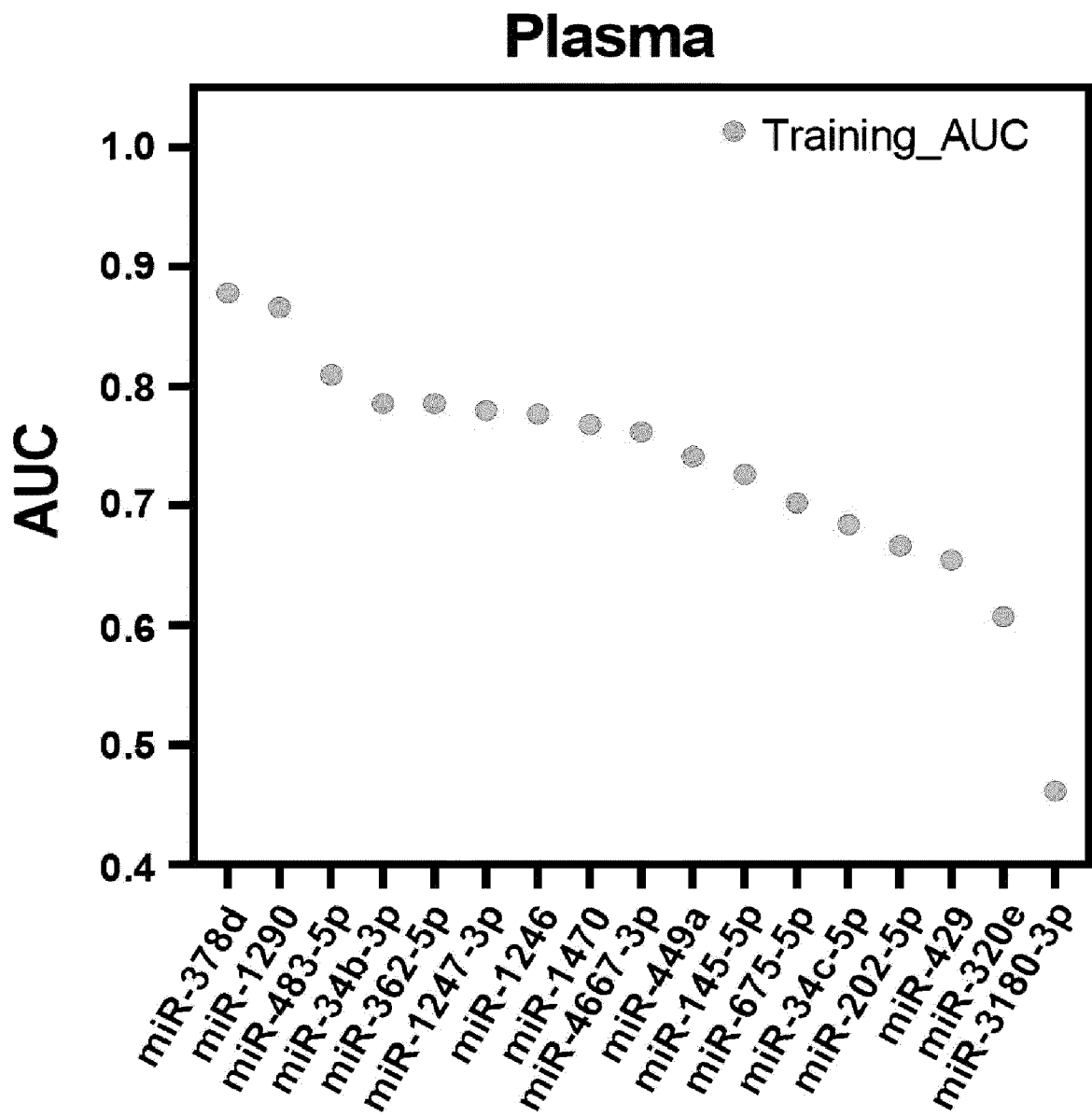
Downregulated:

hsa-miR-34b-3p
hsa-miR-202-5p
hsa-miR-34c-5p
hsa-miR-4667-3p
hsa-miR-449a
hsa-miR-145-5p
hsa-miR-1247-3p
hsa-miR-378d
hsa-miR-1470
hsa-miR-362-5p

[도2f]



[도2g]



Group

Benign

Malignant

Group

hsa-miR-1246

hsa-miR-1290

hsa-miR-483-5p

hsa-miR-429

hsa-miR-34b-3p

hsa-miR-34c-5p

hsa-miR-449a

hsa-miR-145-5p

A122

A120

A119

A117

A114

A82

A40

A37

A34

A8

A172

A164

A152

A149

A148

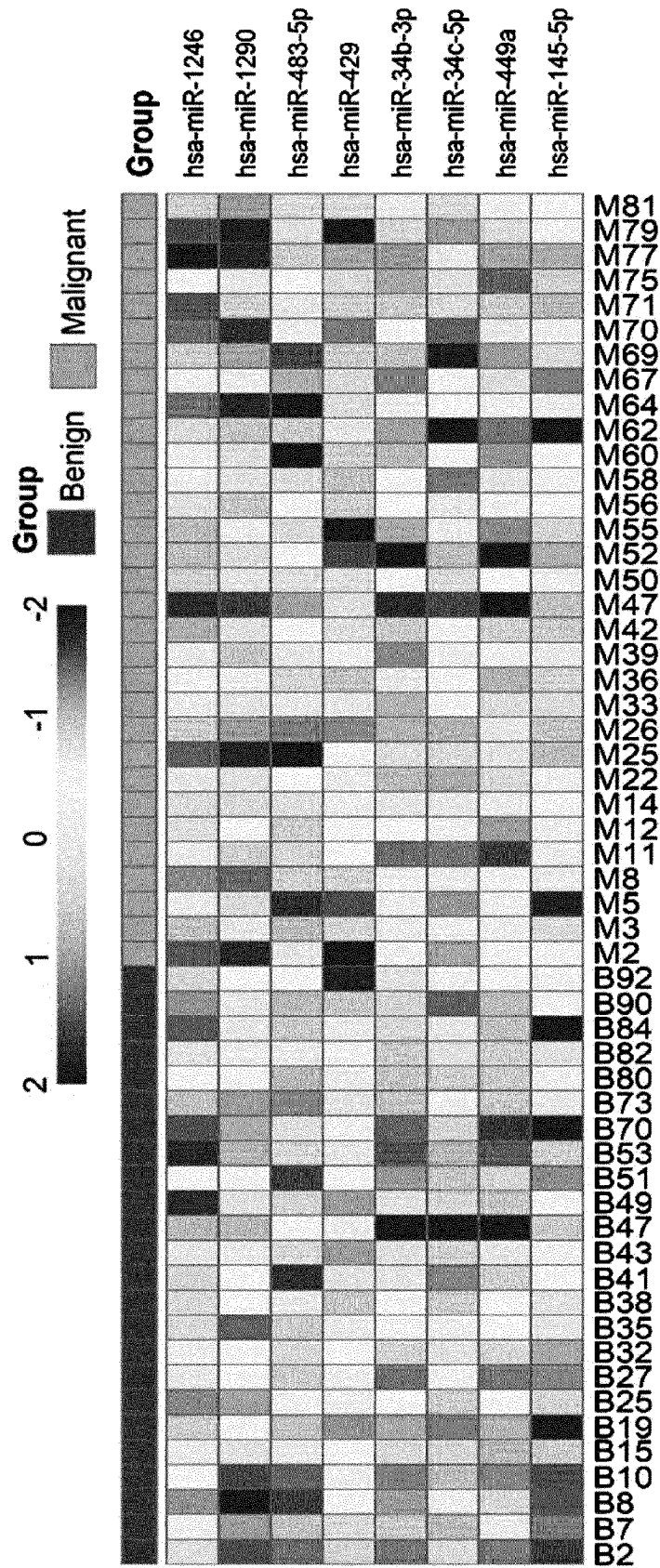
A147

A135

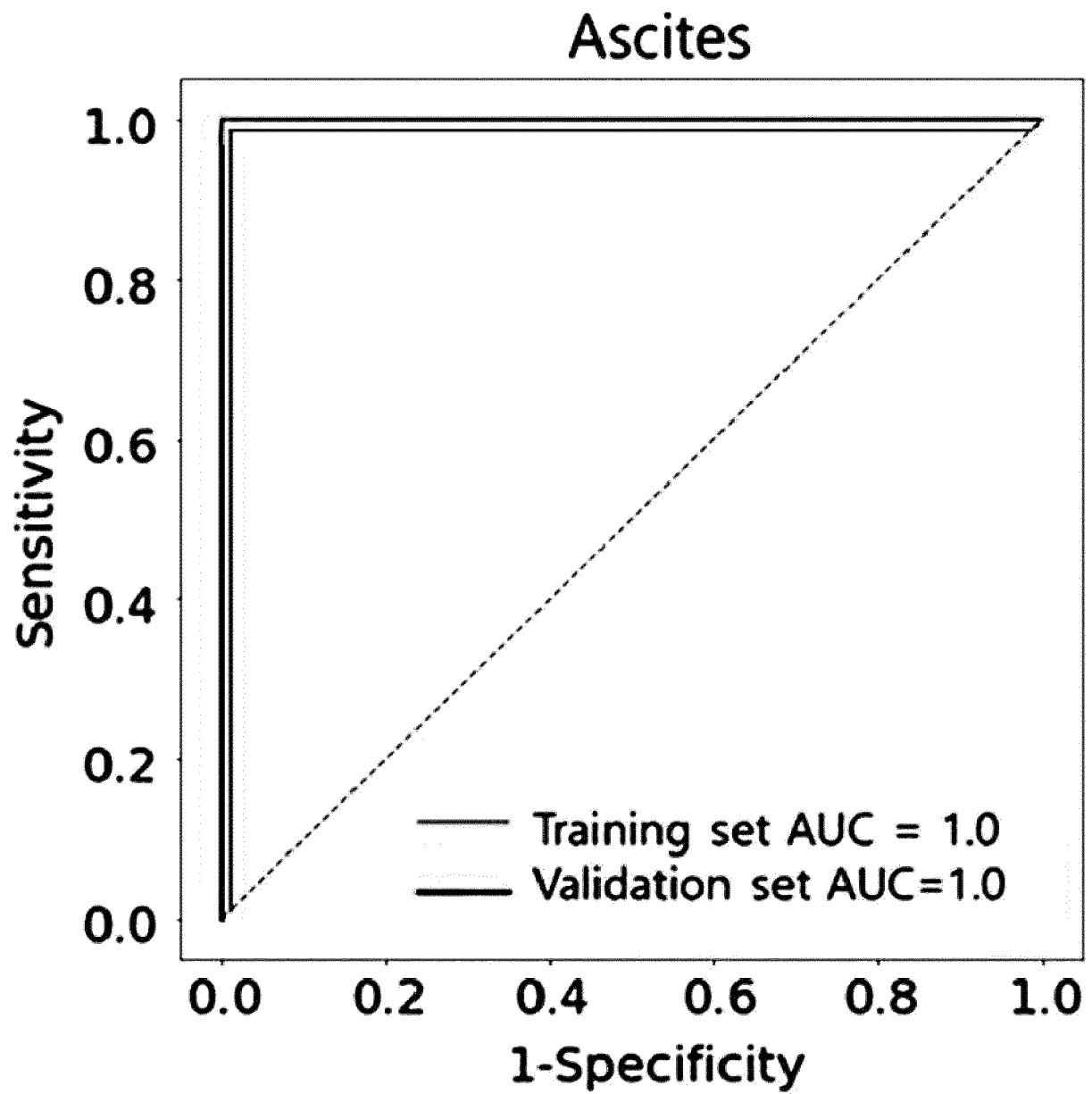
N4

N3

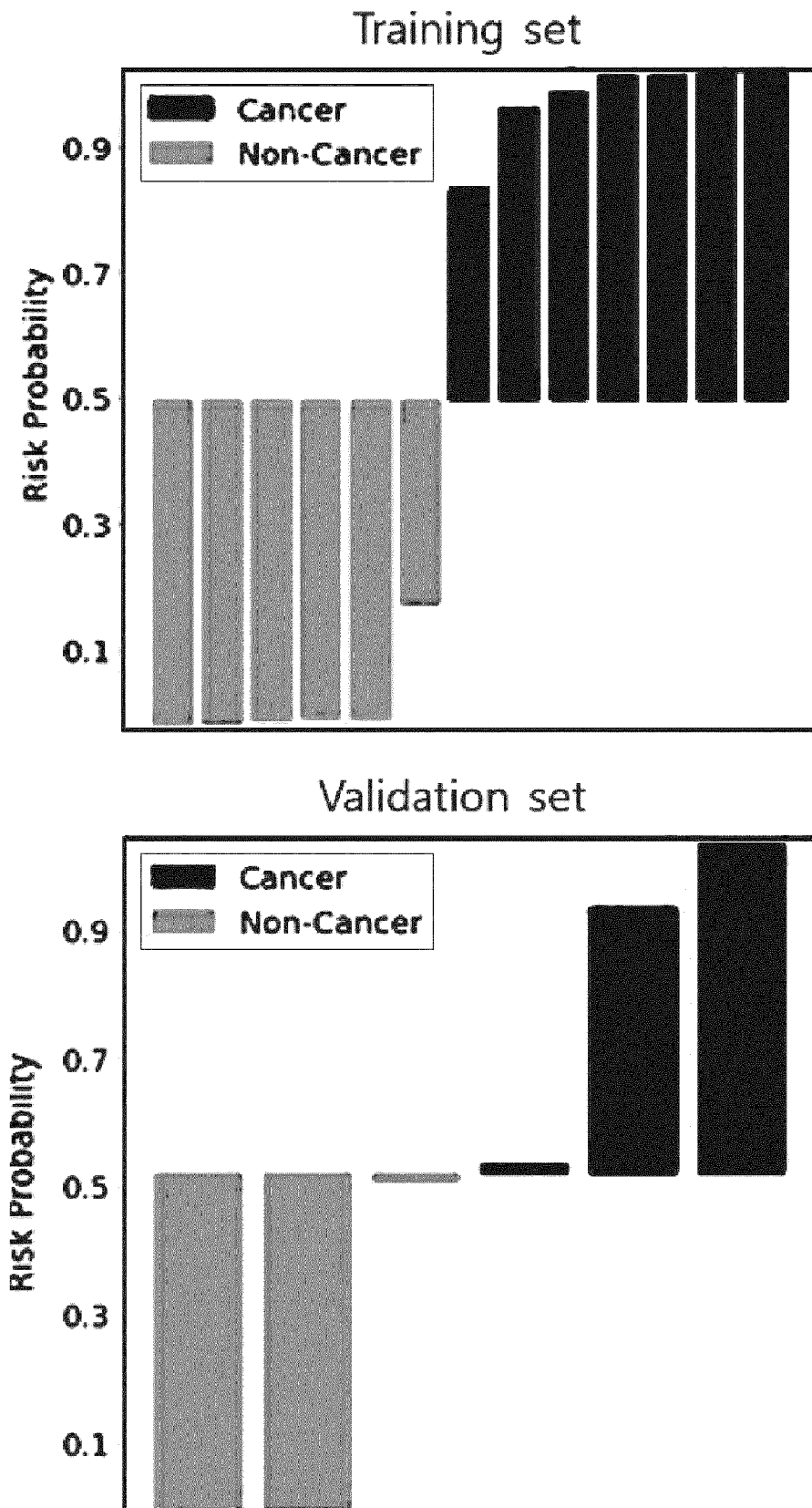
[도2i]



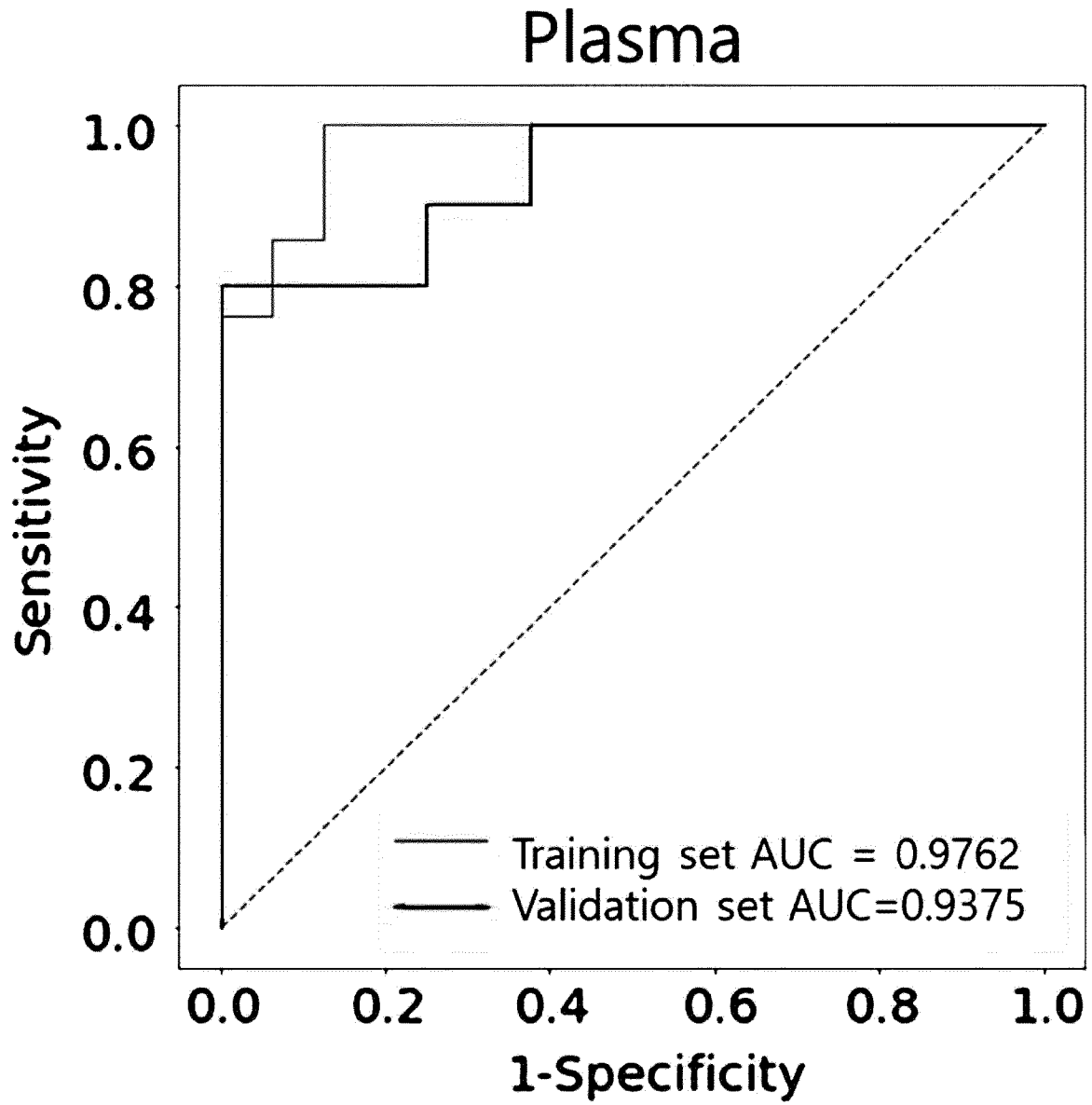
[도2j]



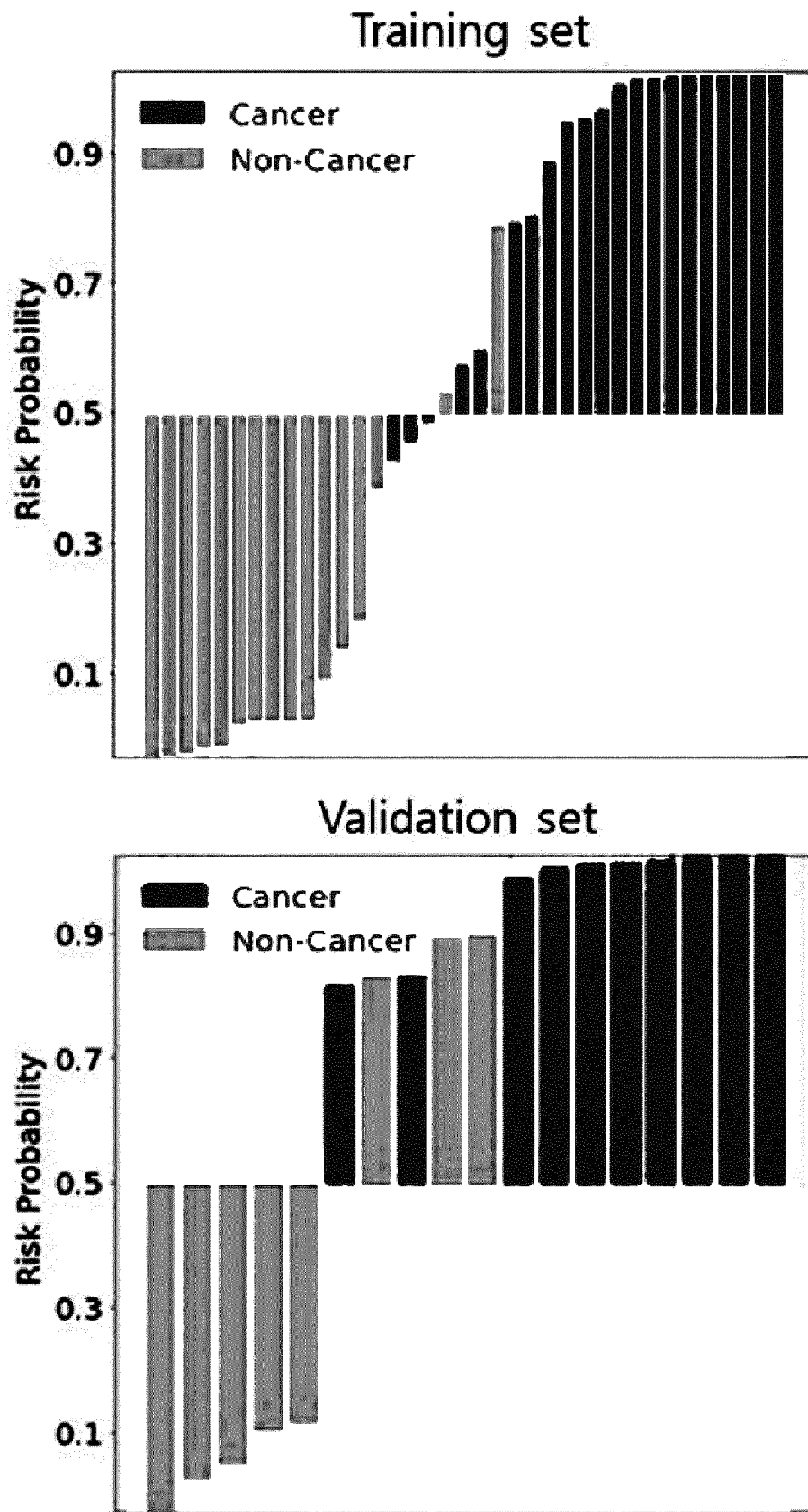
[도2k]



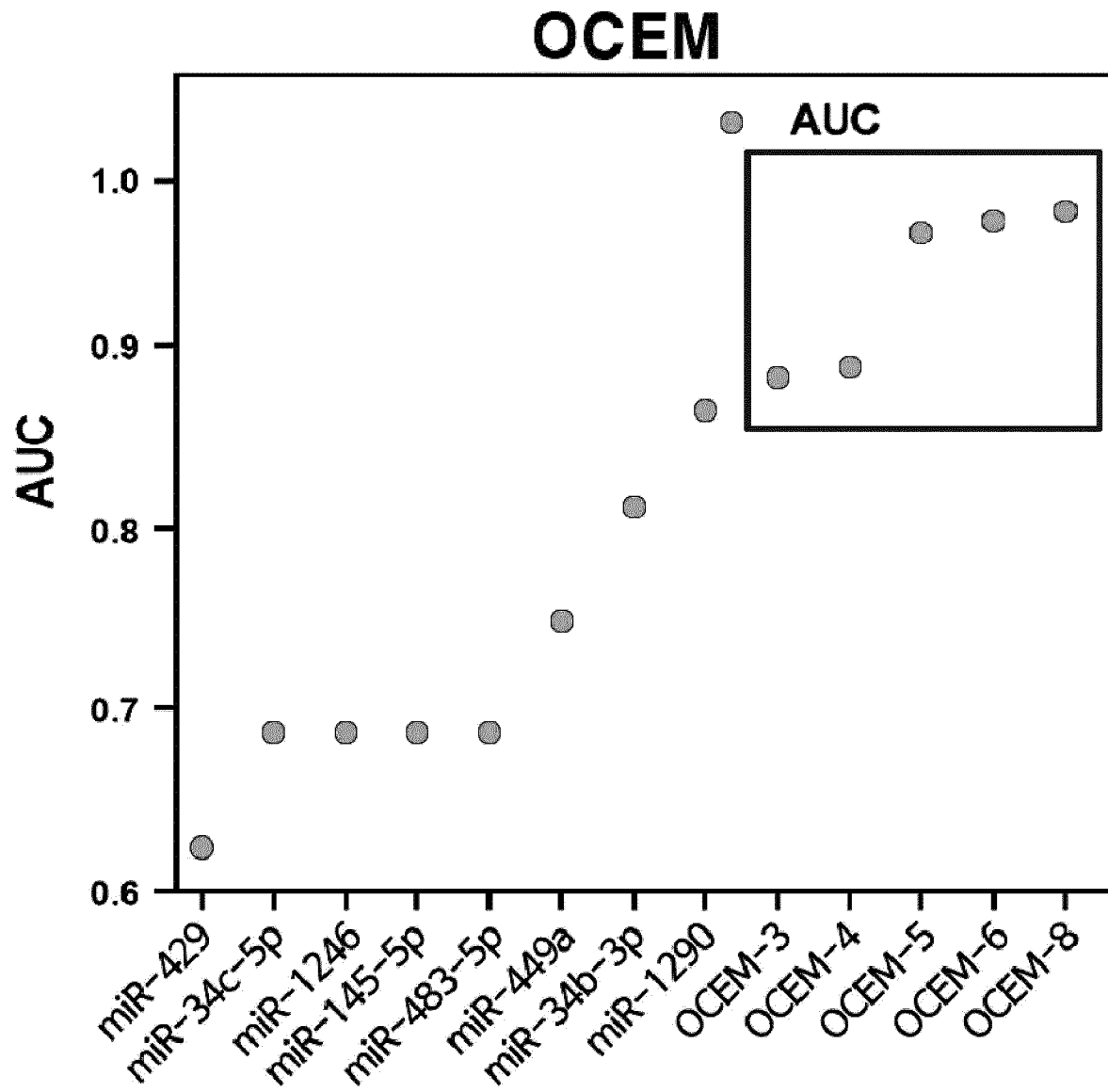
[도21]



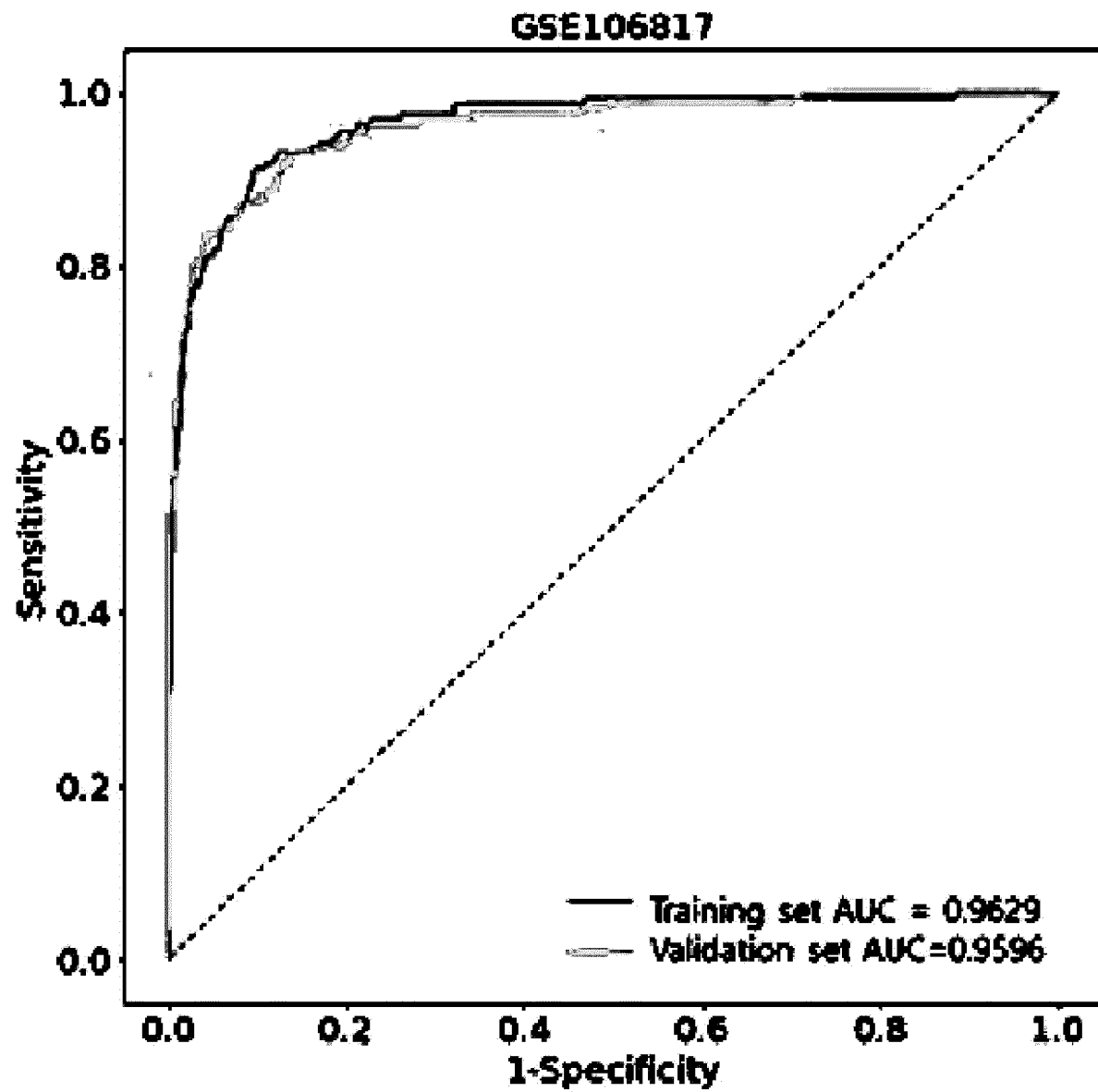
[도2m]



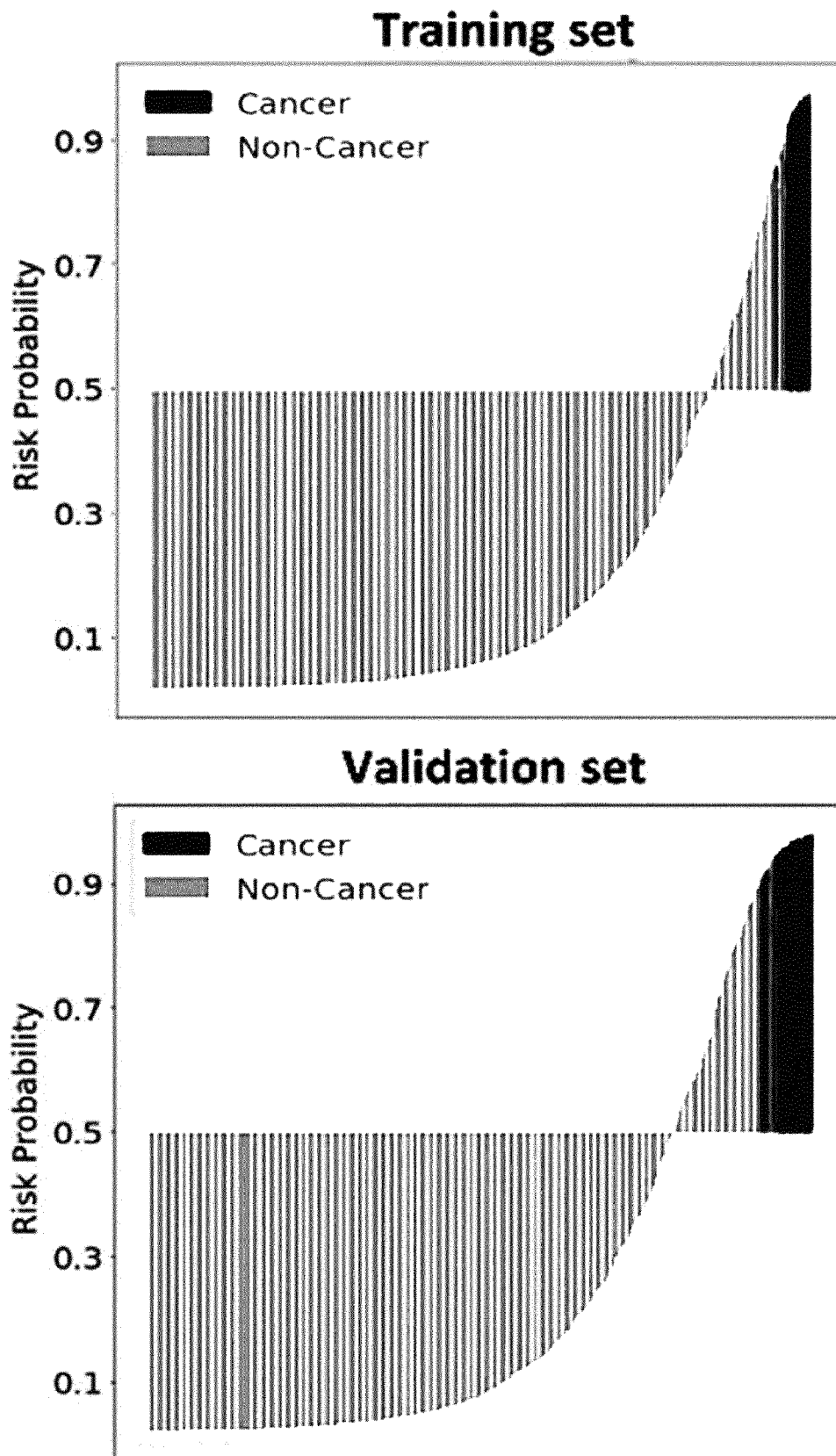
[도3]



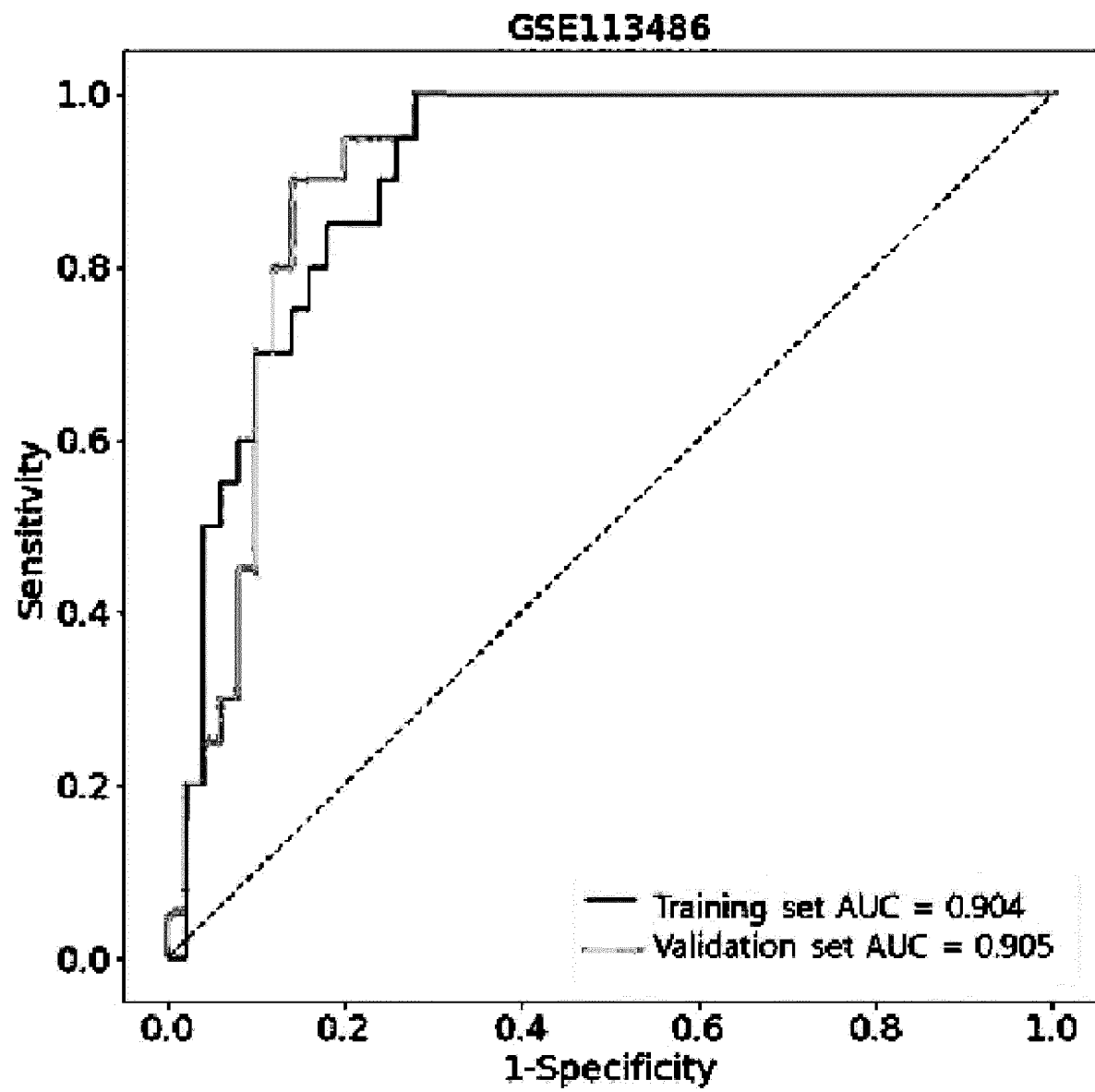
[도4a]



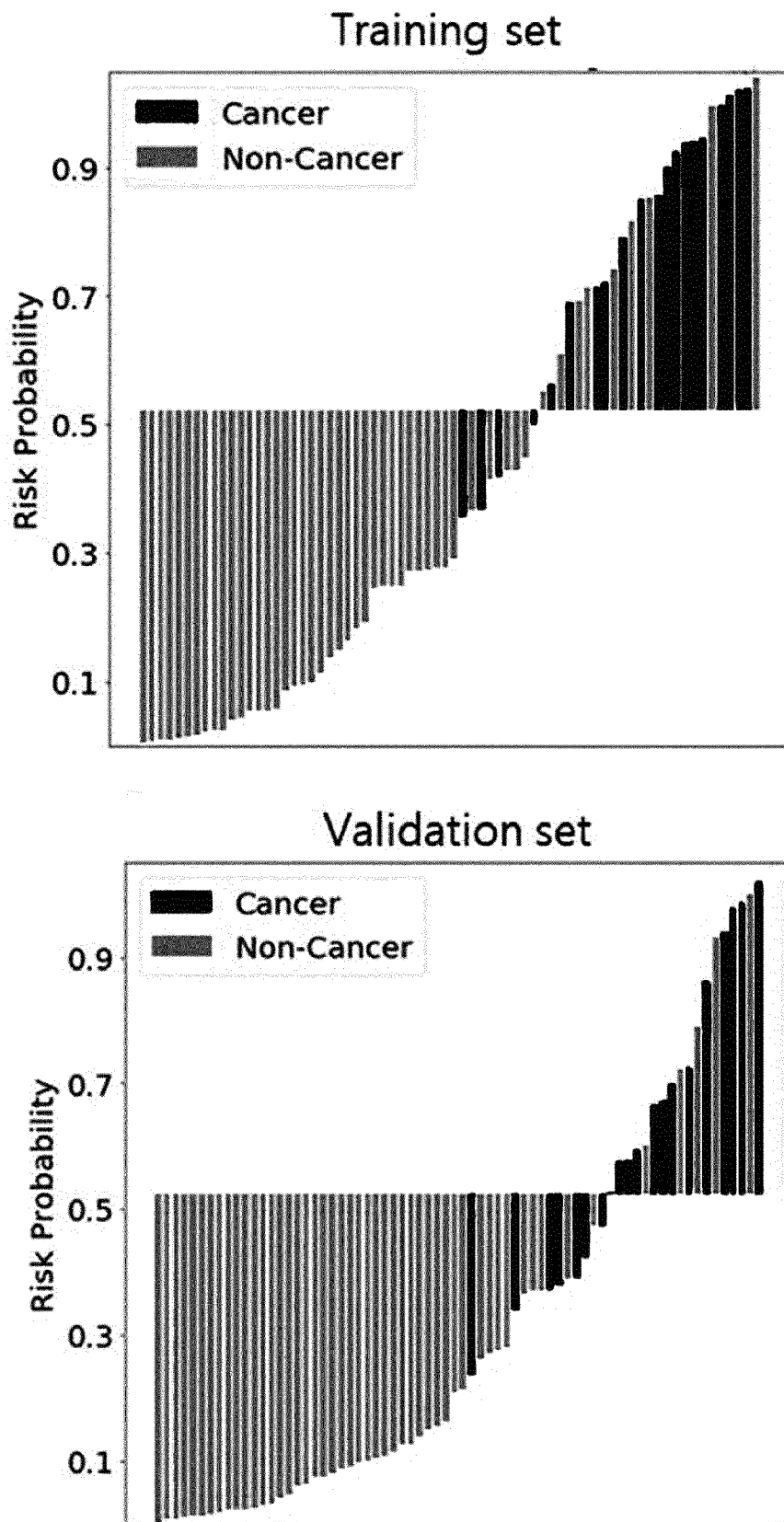
[도4b]



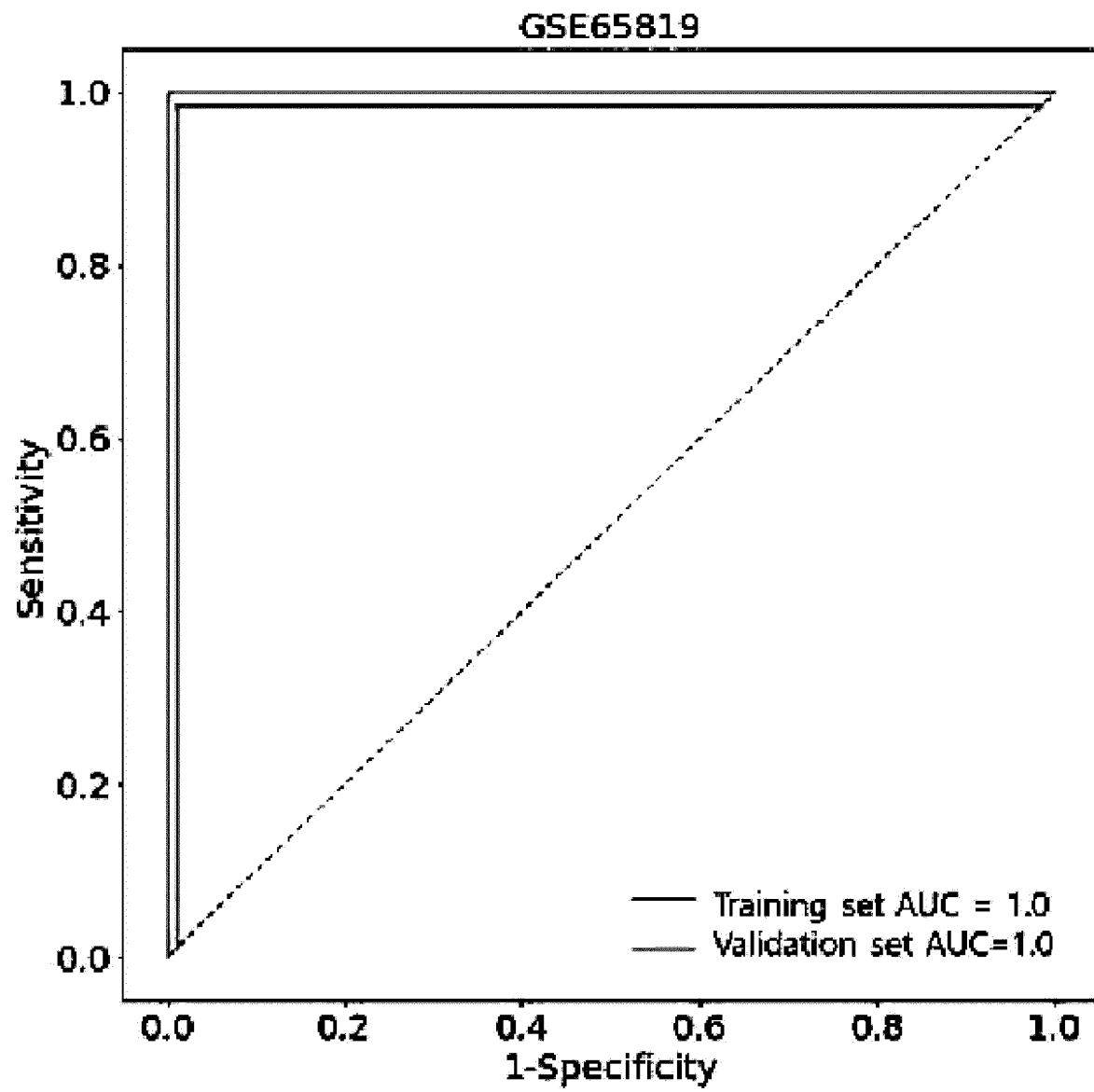
[도4c]



[도4d]

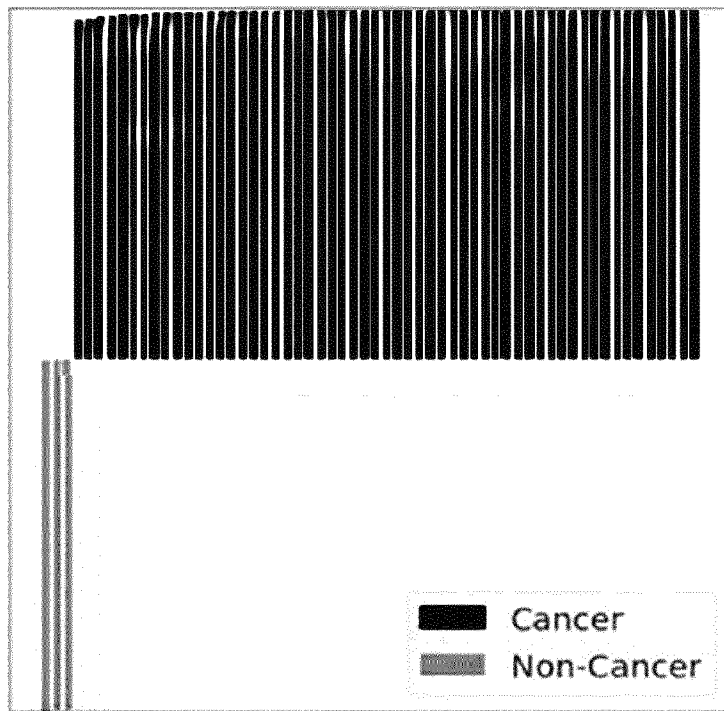


[도4e]

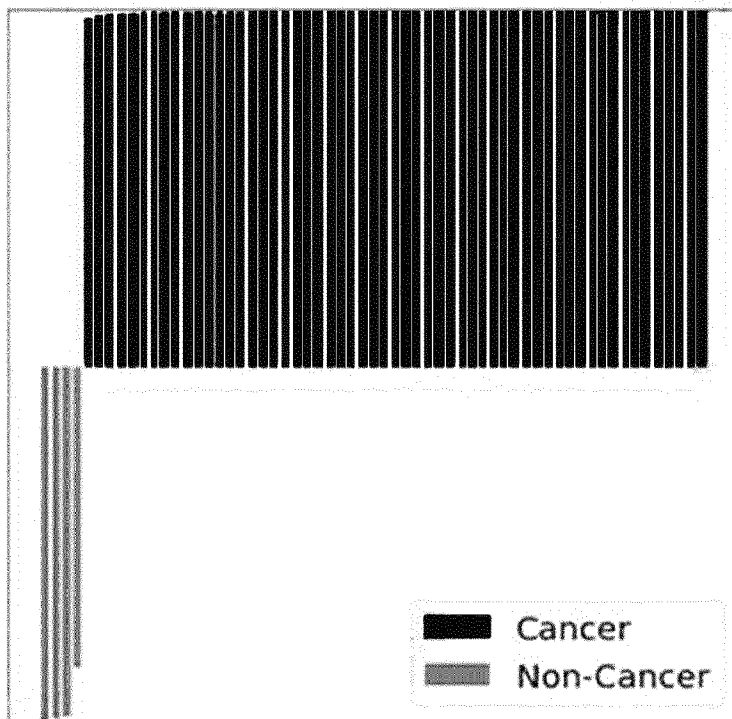


[도4f]

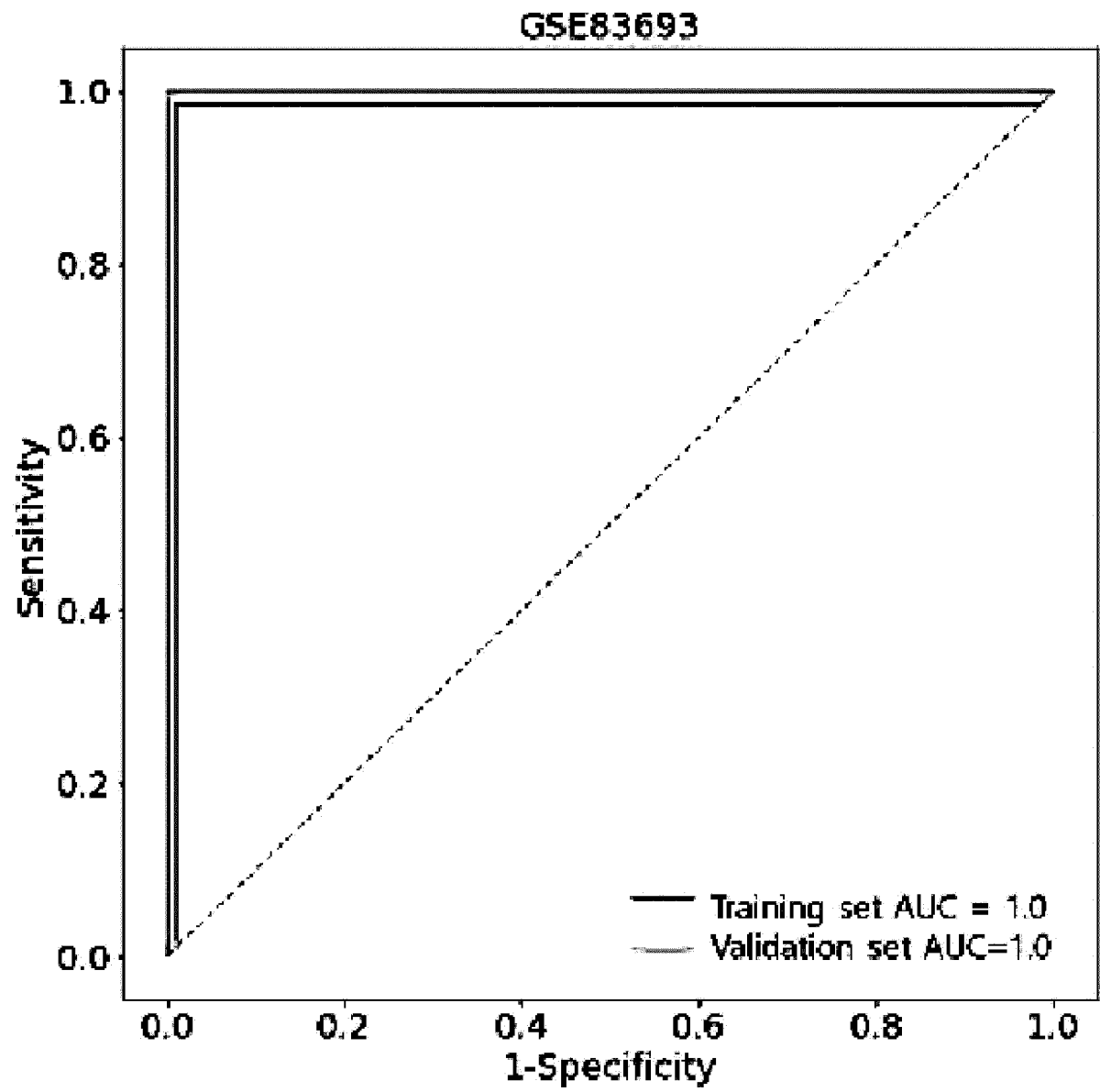
Training set



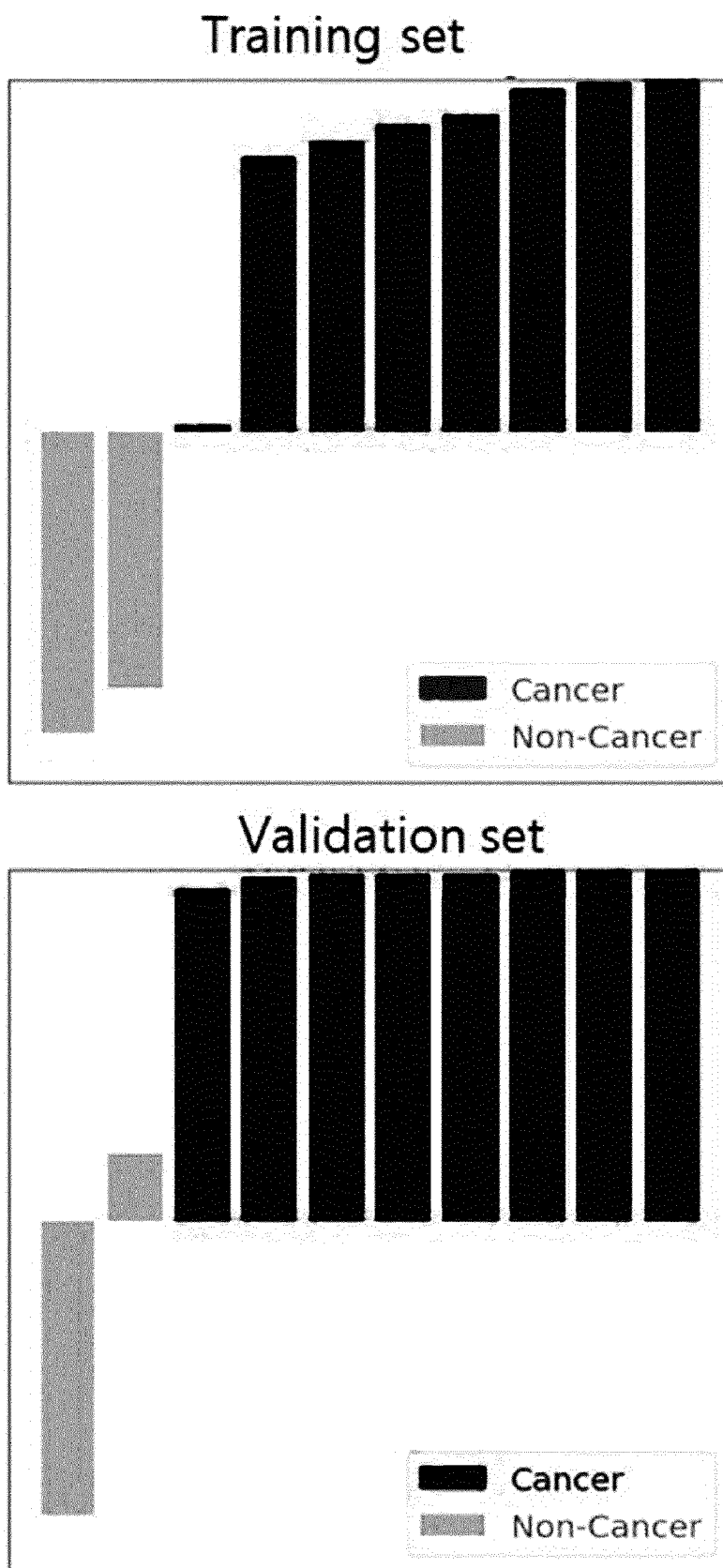
Validation set



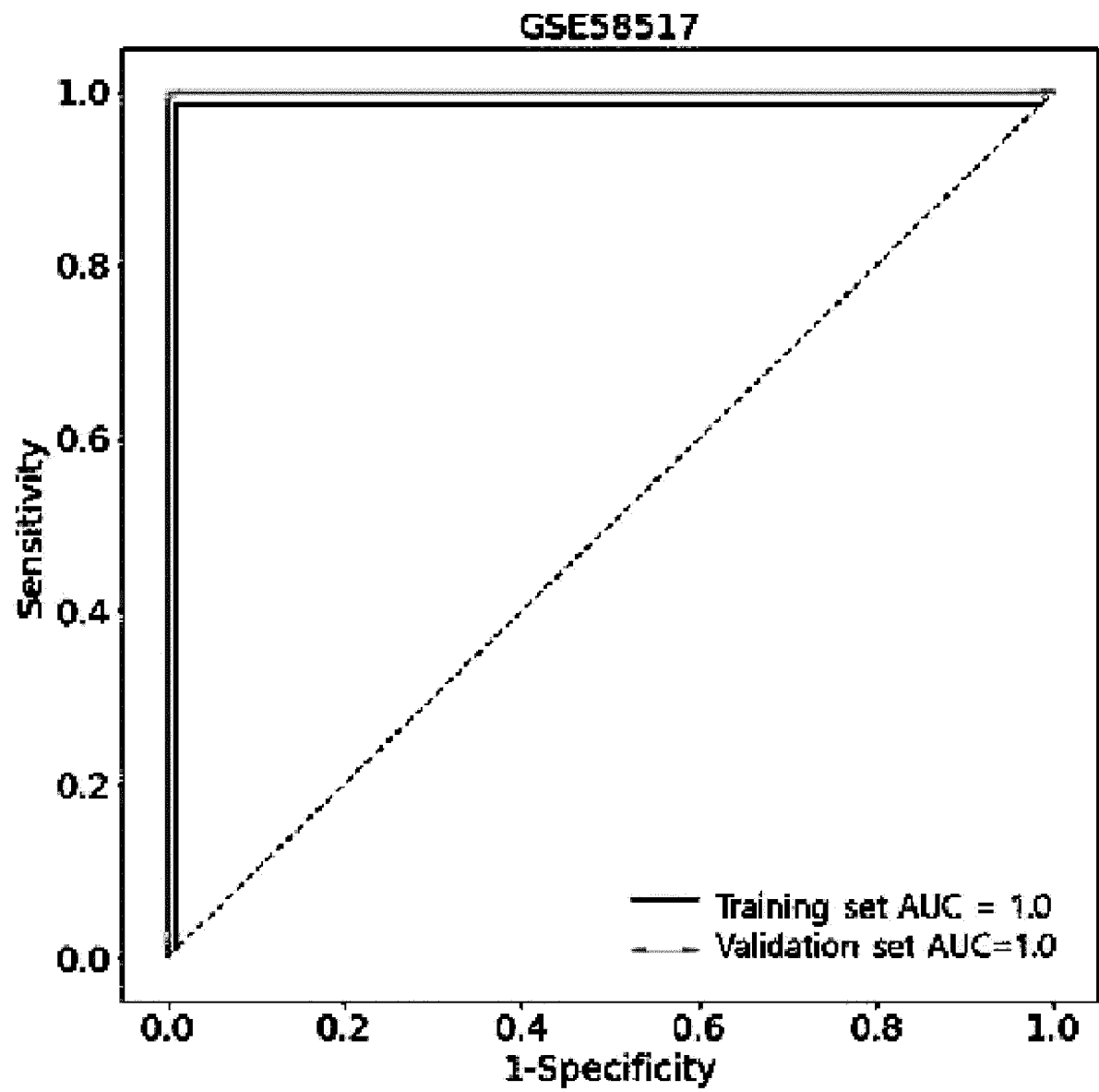
[도4g]



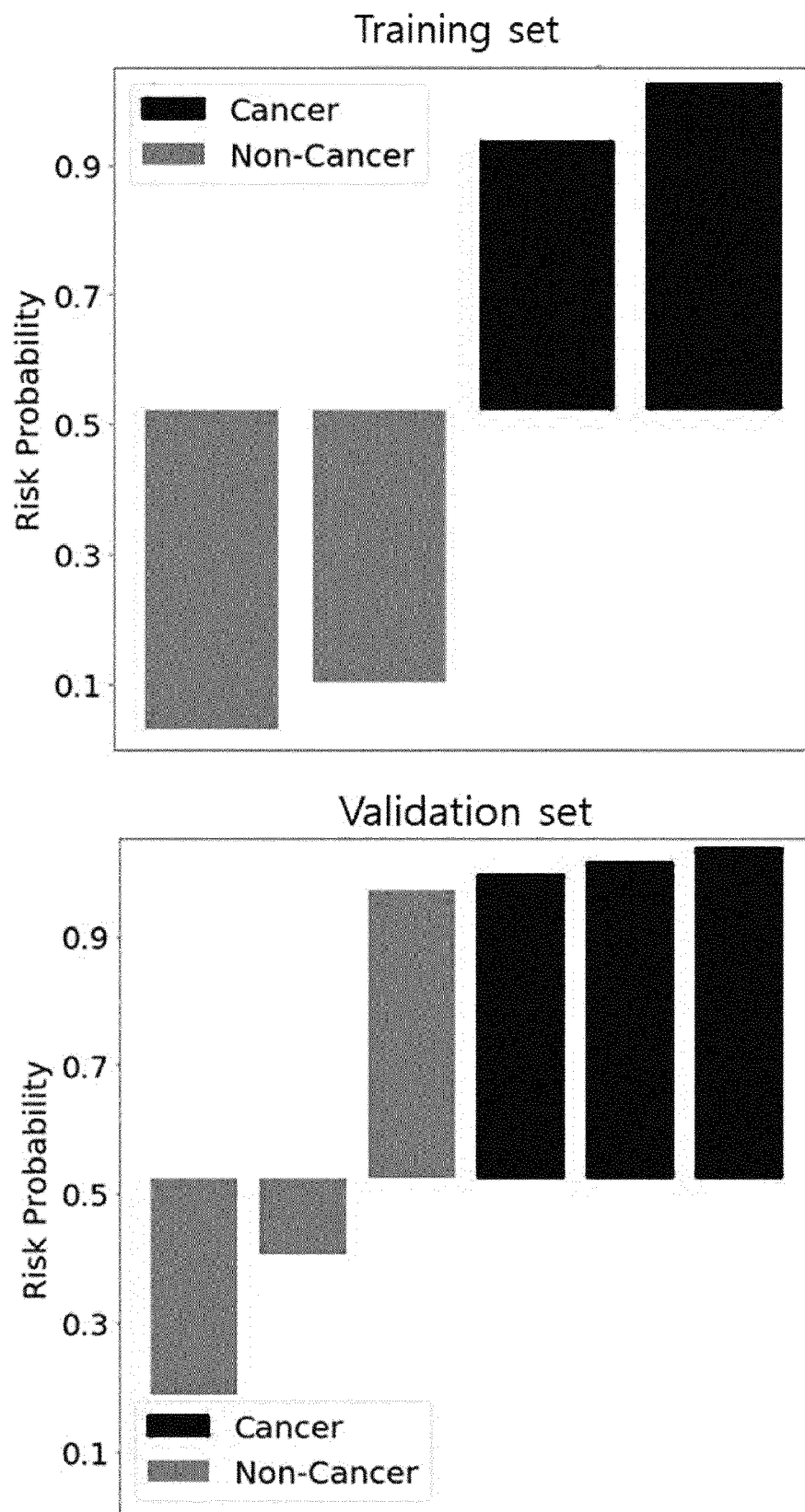
[도4h]



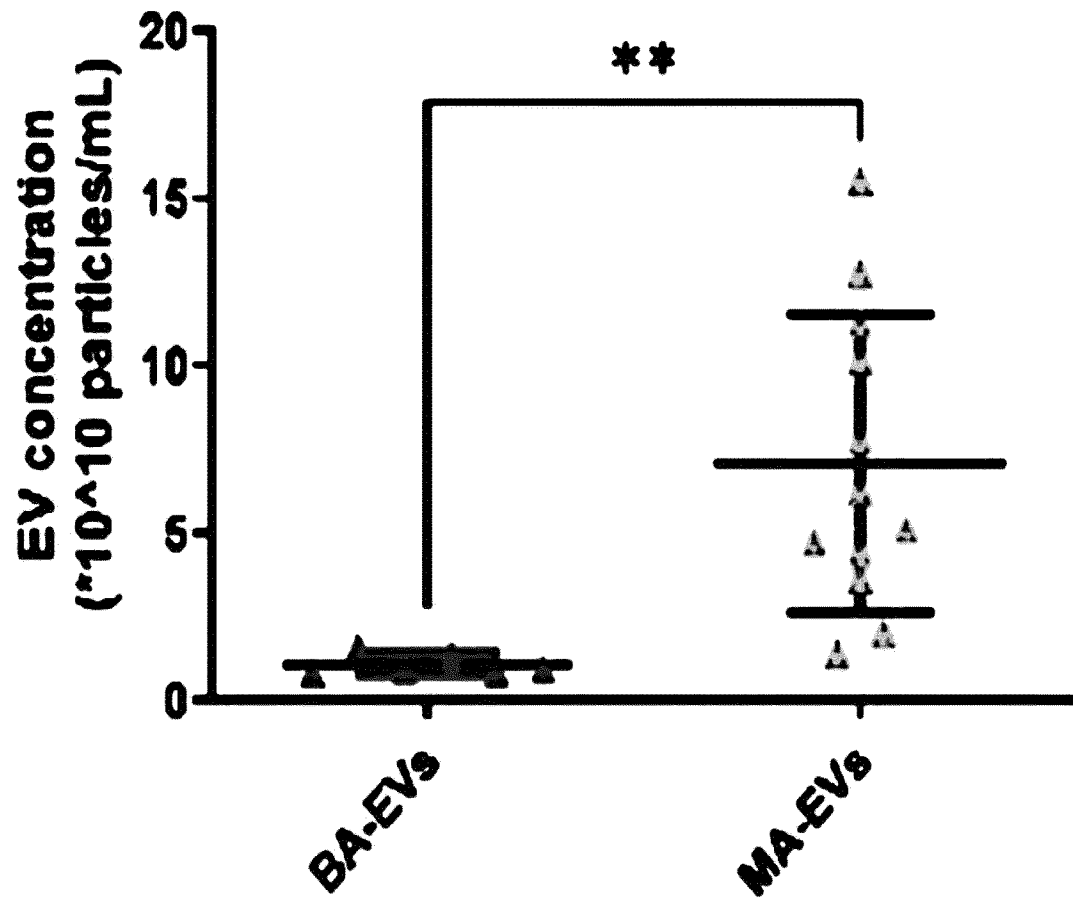
[도4i]



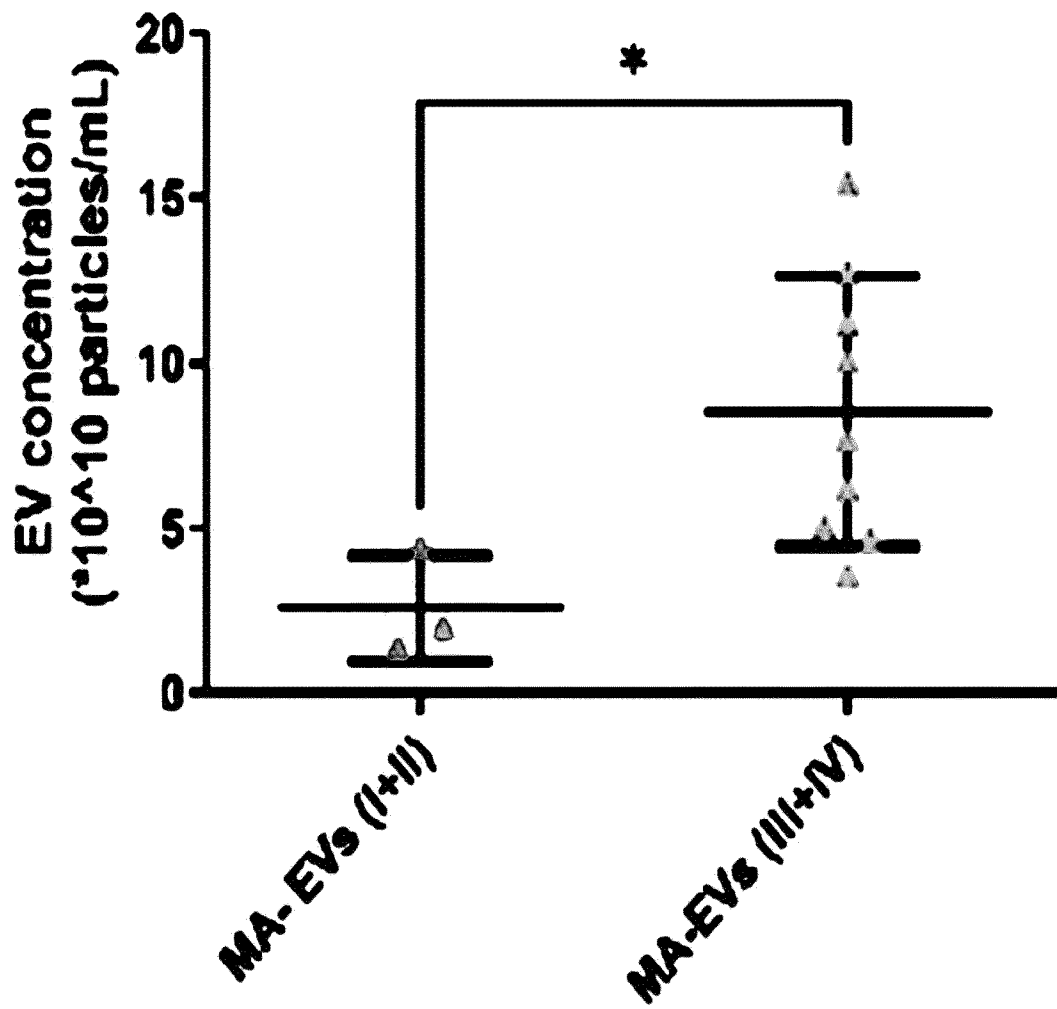
[도4j]



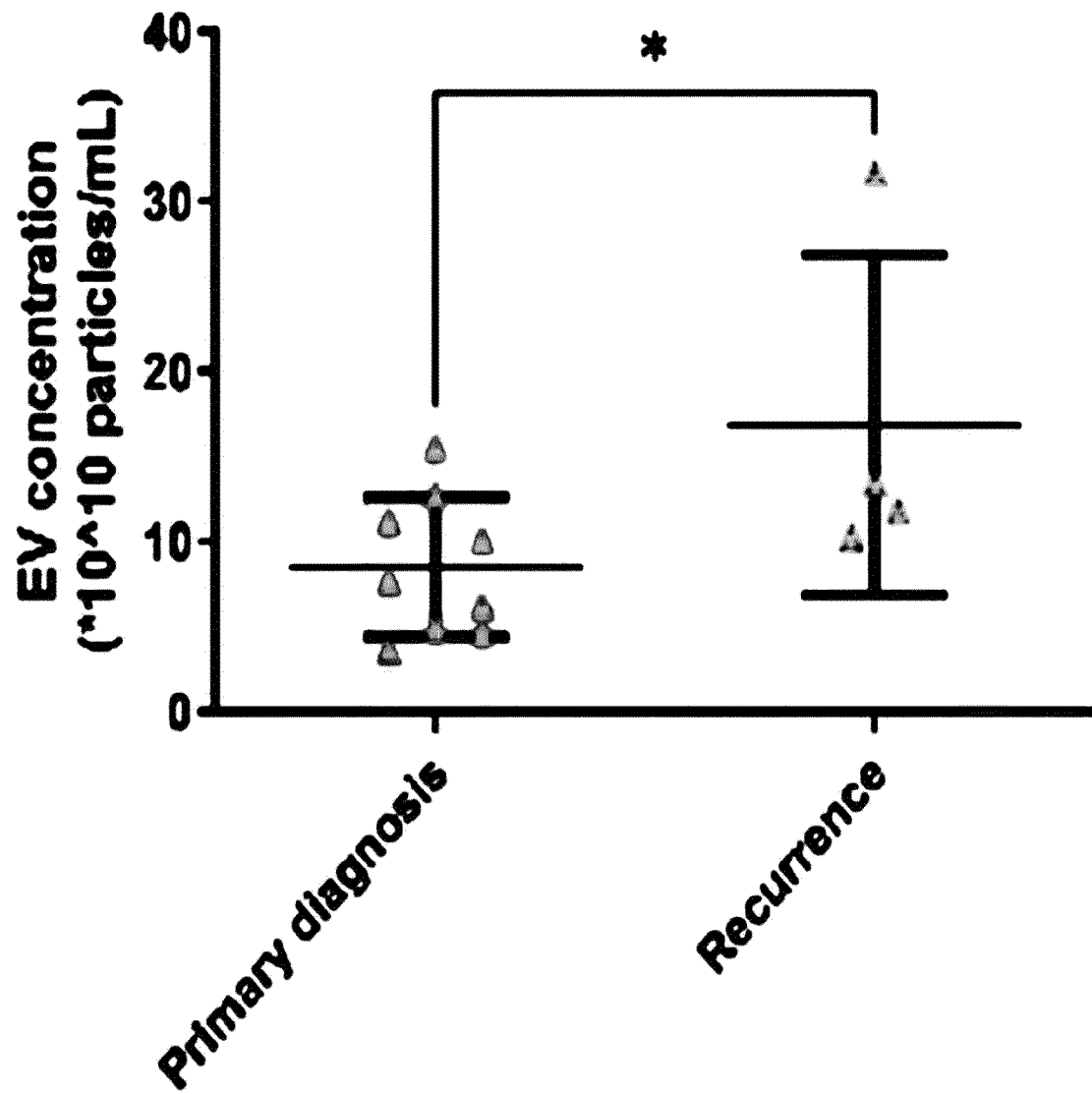
[도5a]



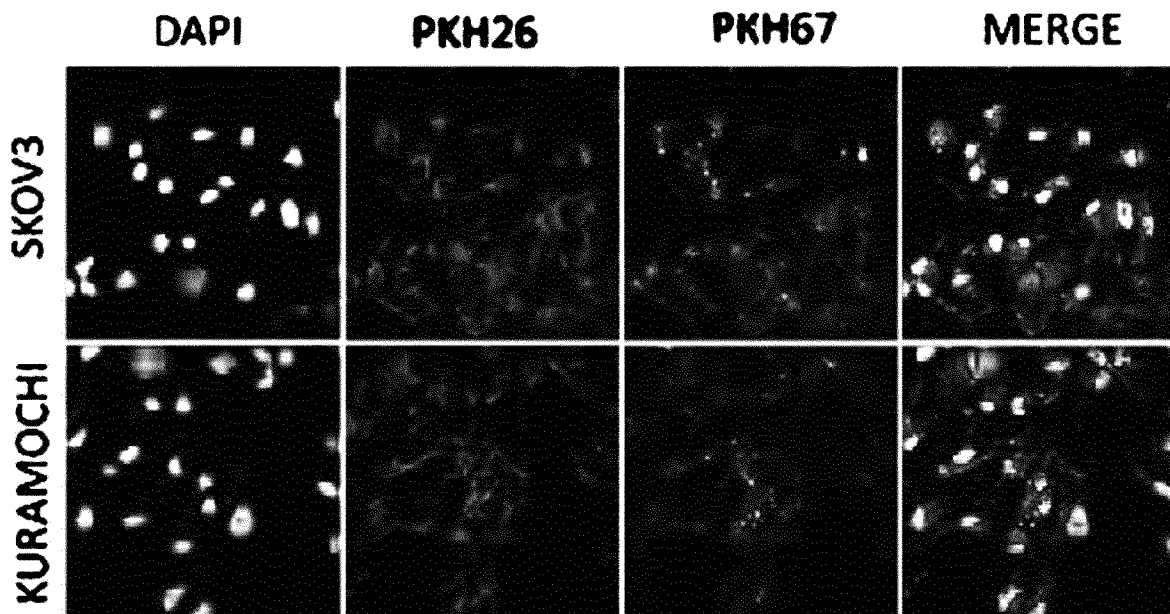
[도5b]



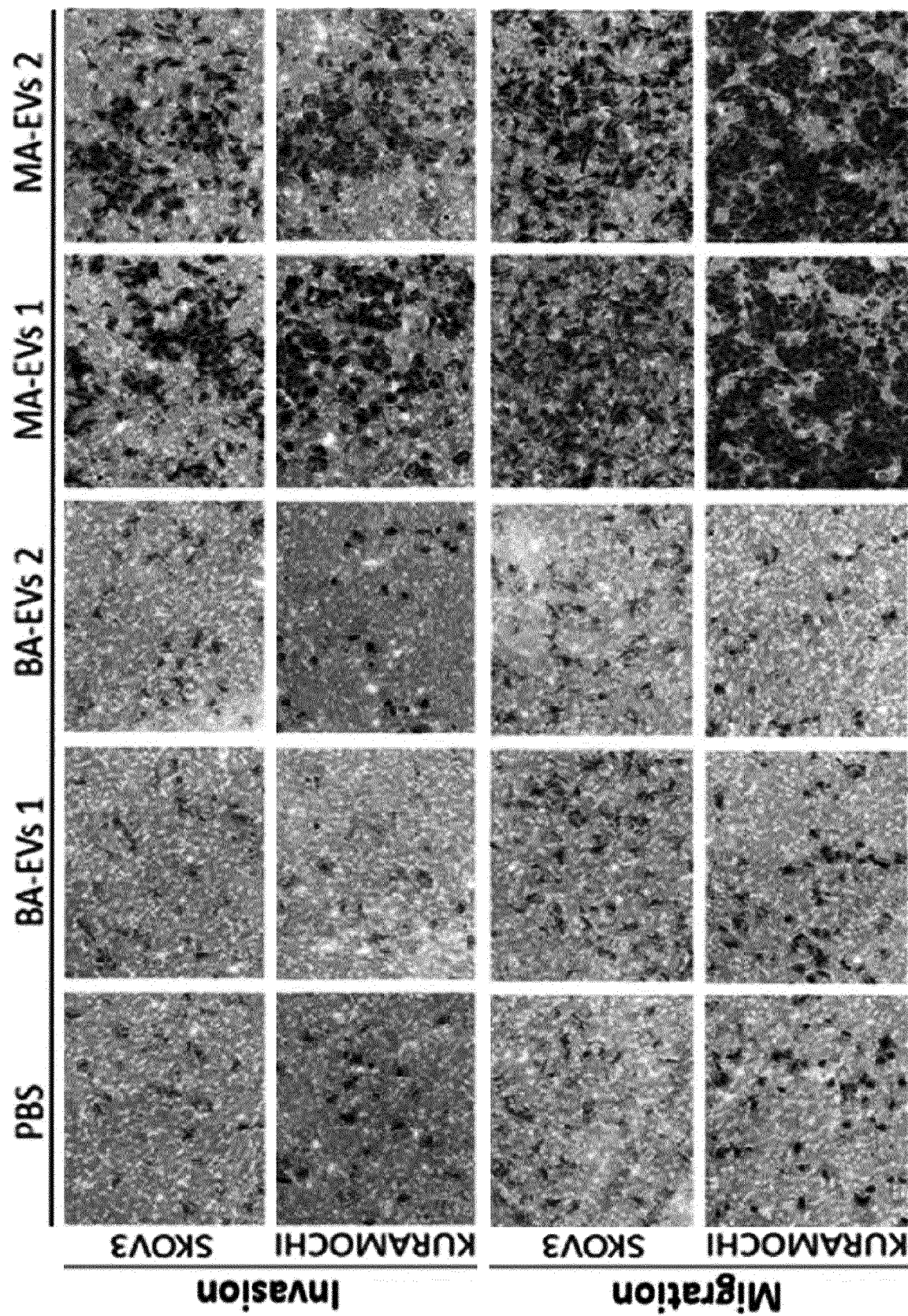
[도5c]



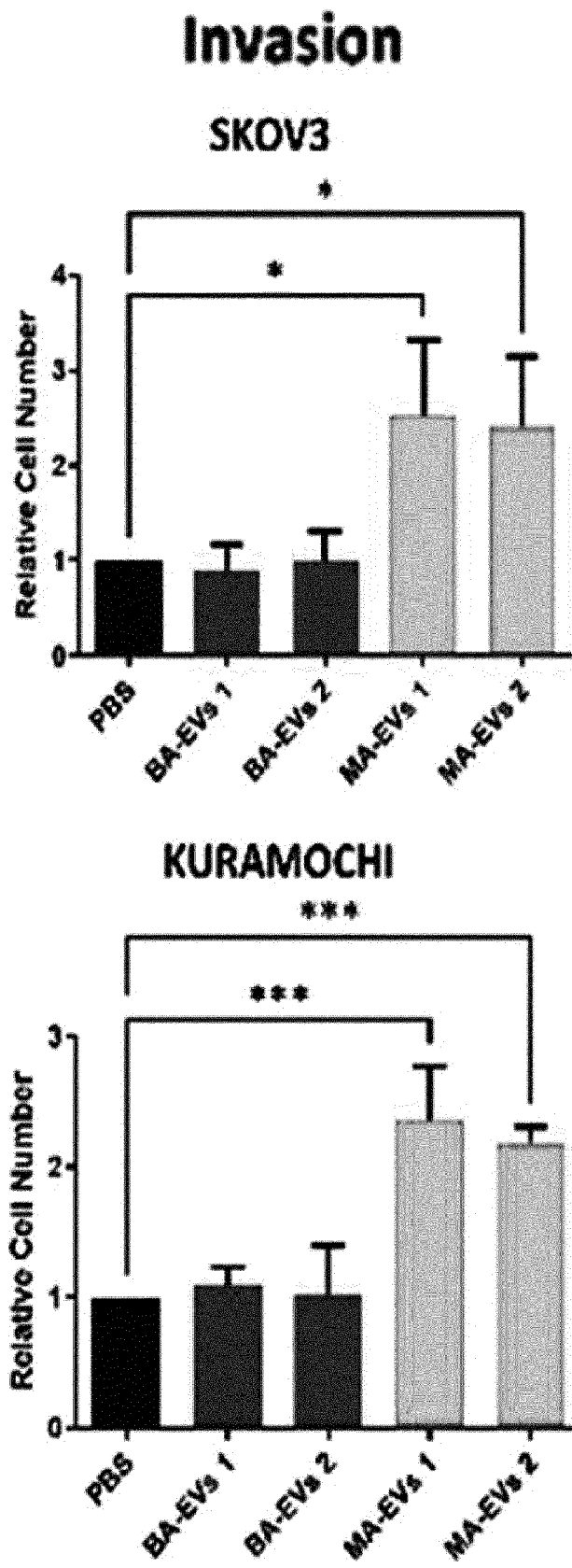
[도5d]



[도5ca]



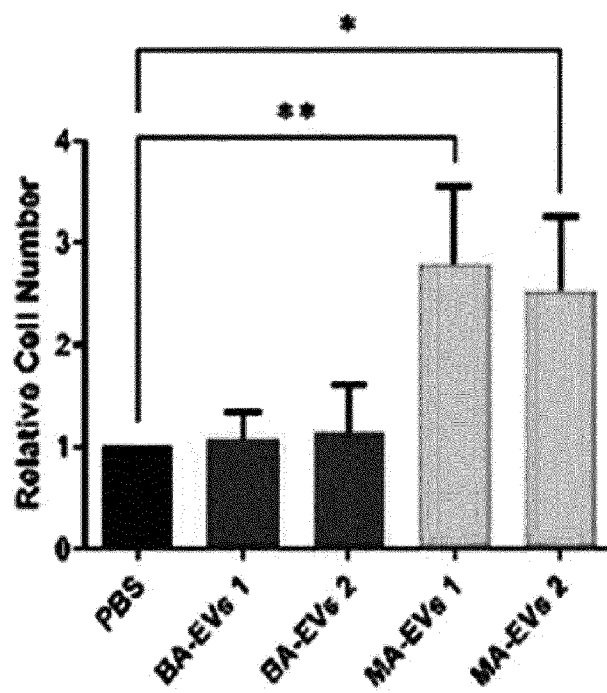
[도5cb]



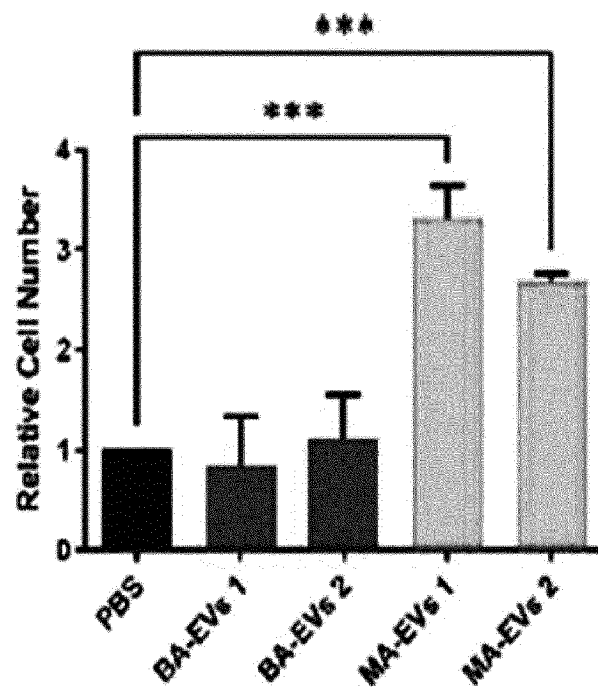
[도5ec]

Migration

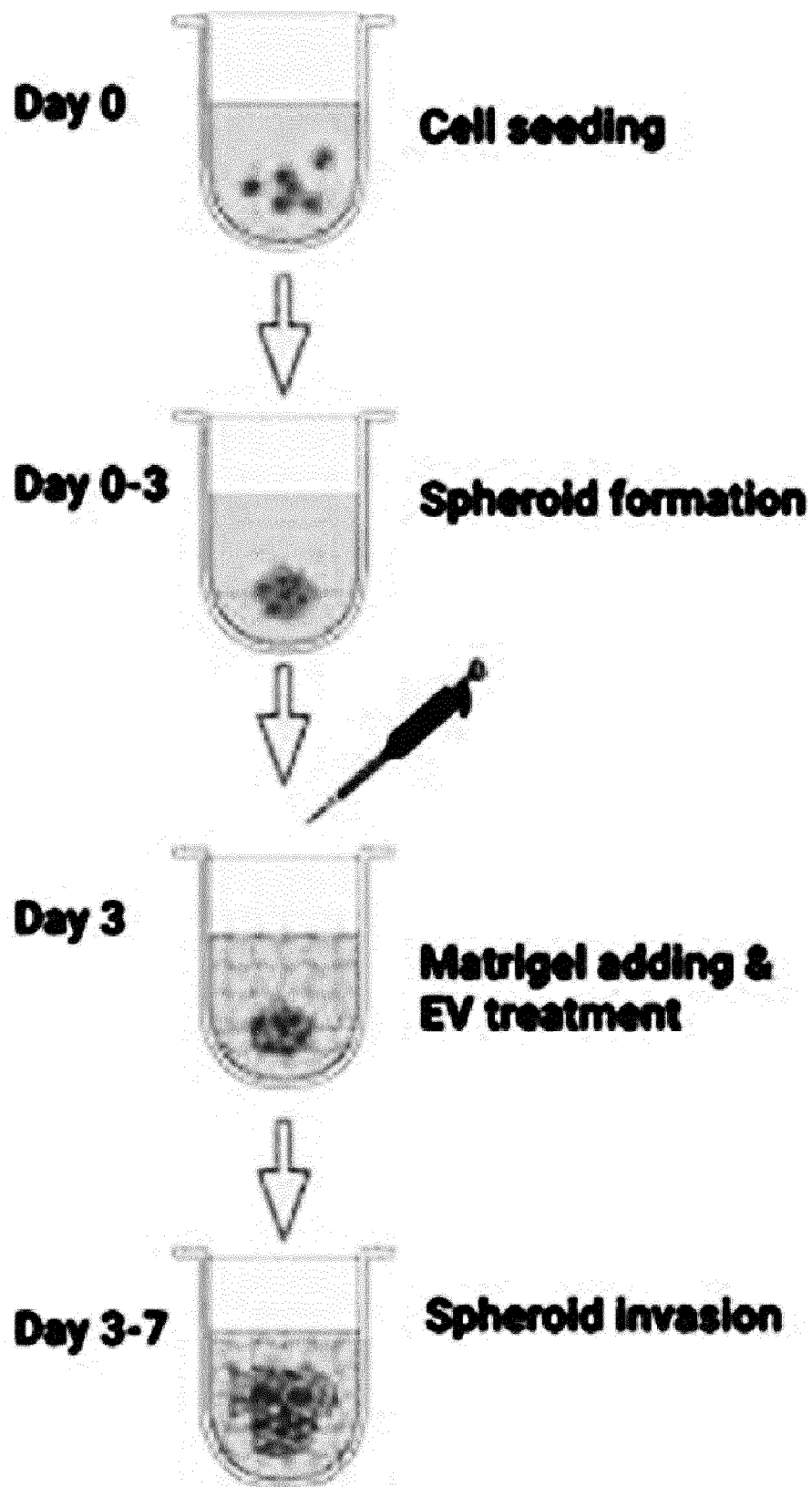
SKOV3



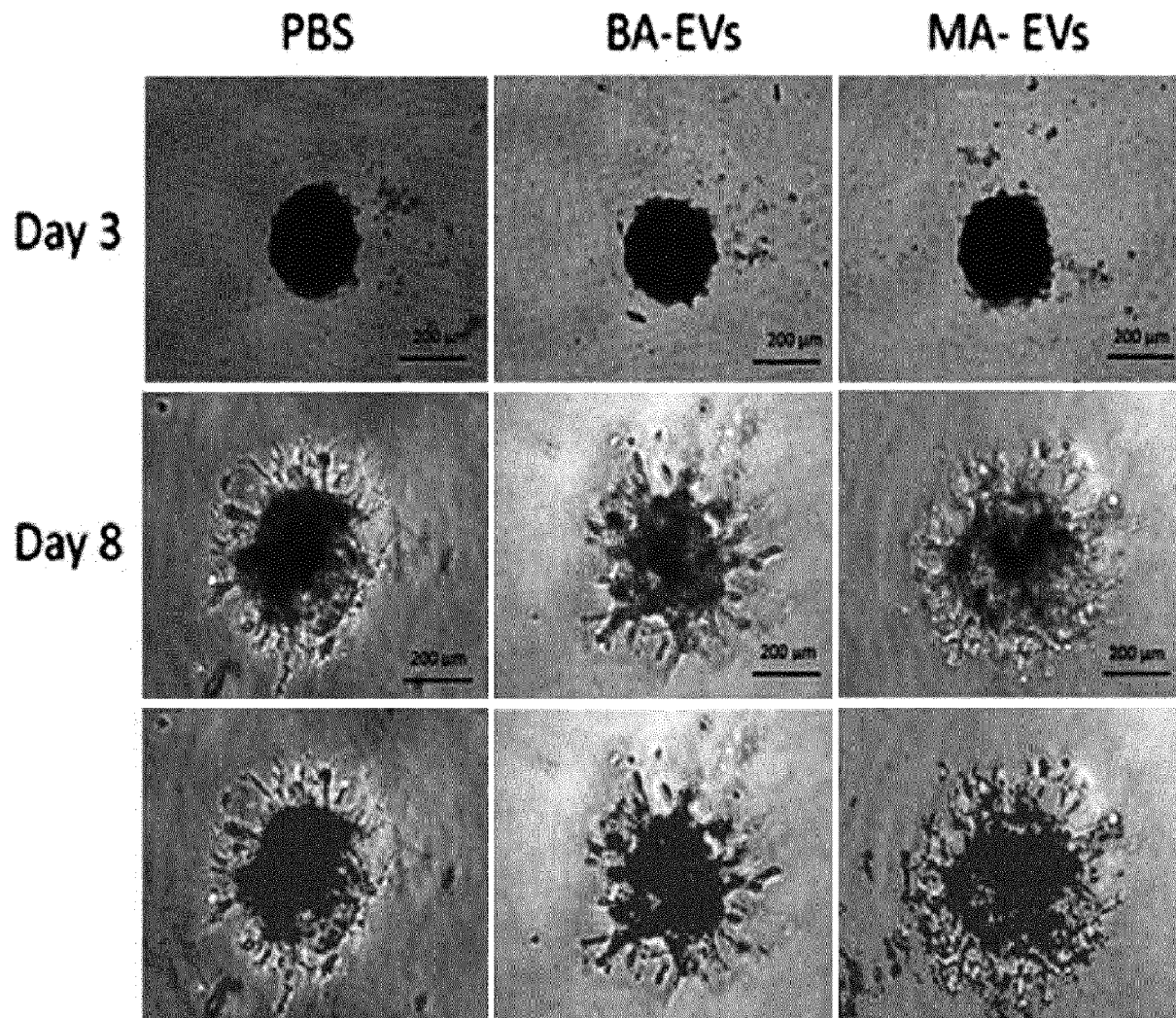
KURAMOCHI



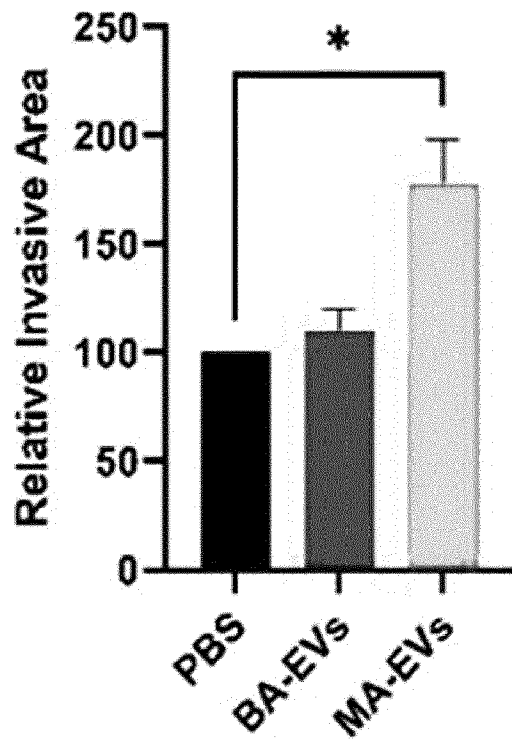
[도5fa]



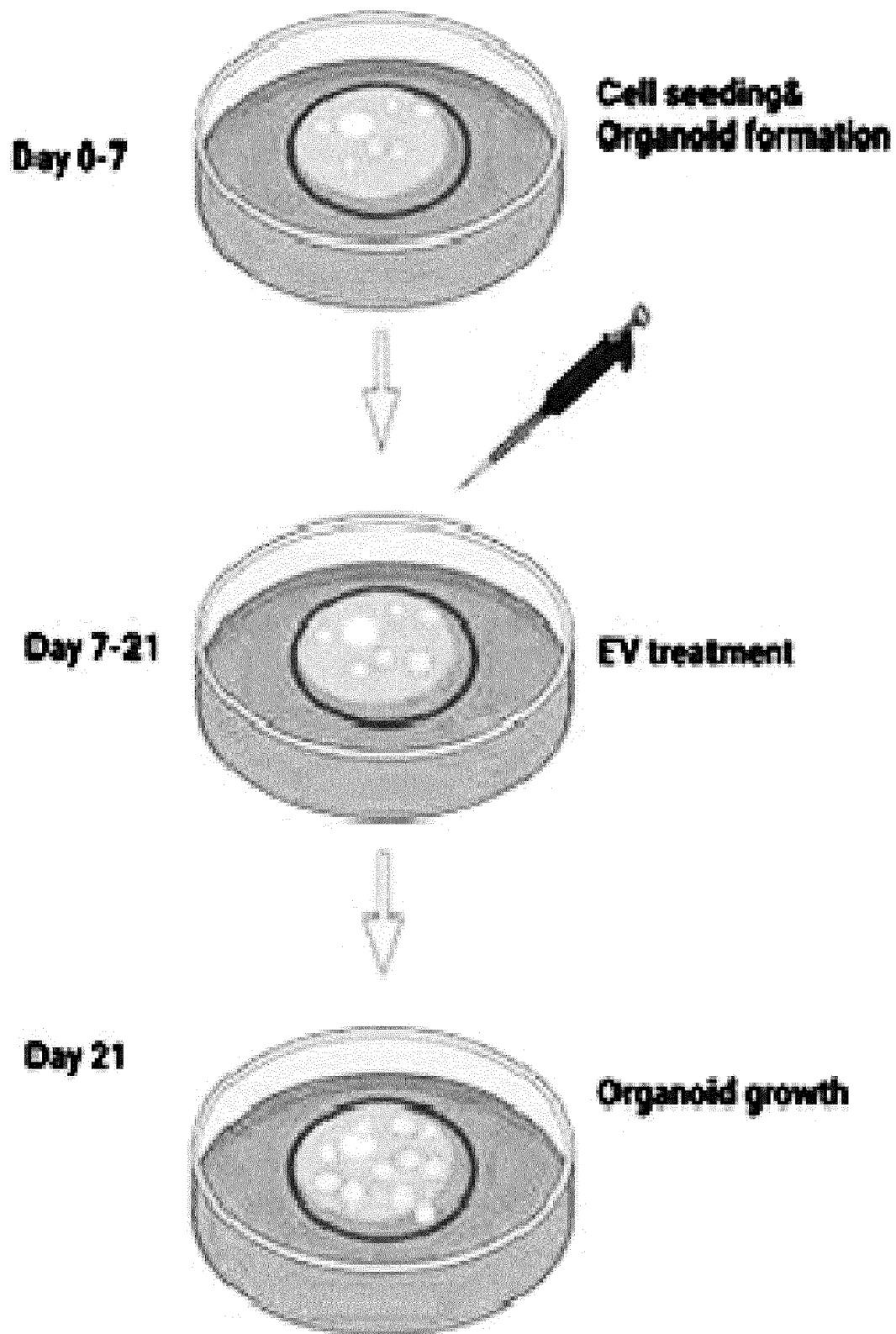
[도5fb]



[도5fc]

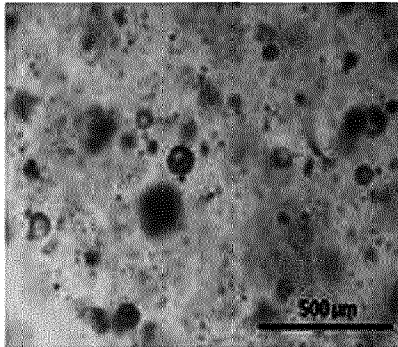


[도5ga]

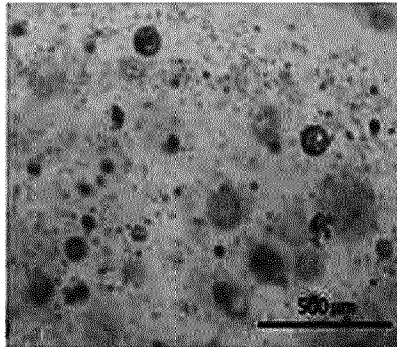


[도5gb]

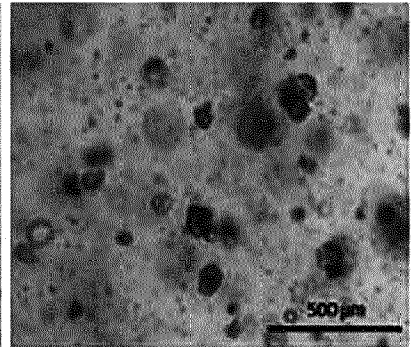
PBS



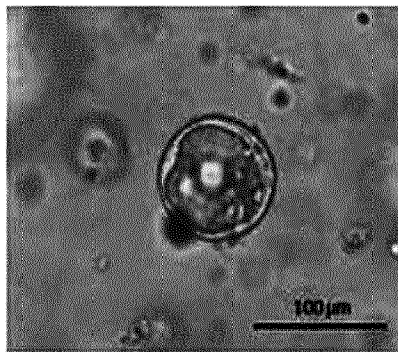
BA-EVs



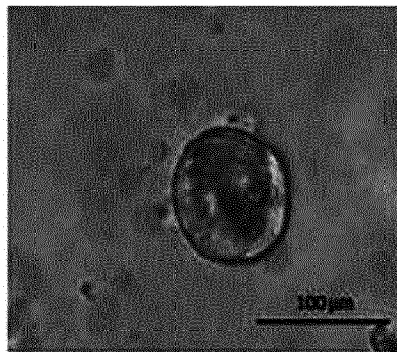
MA-EVs



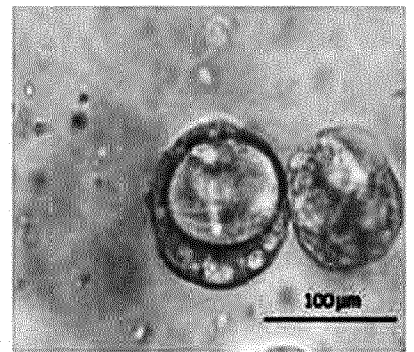
PBS



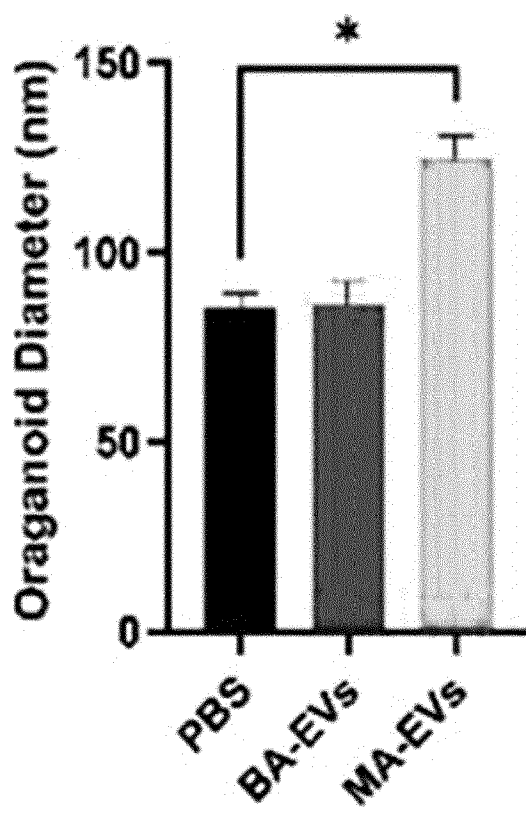
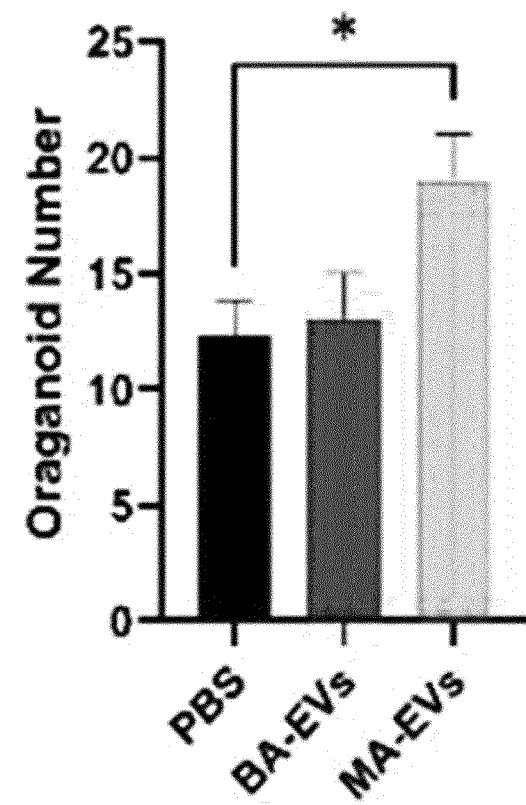
BA-EVs



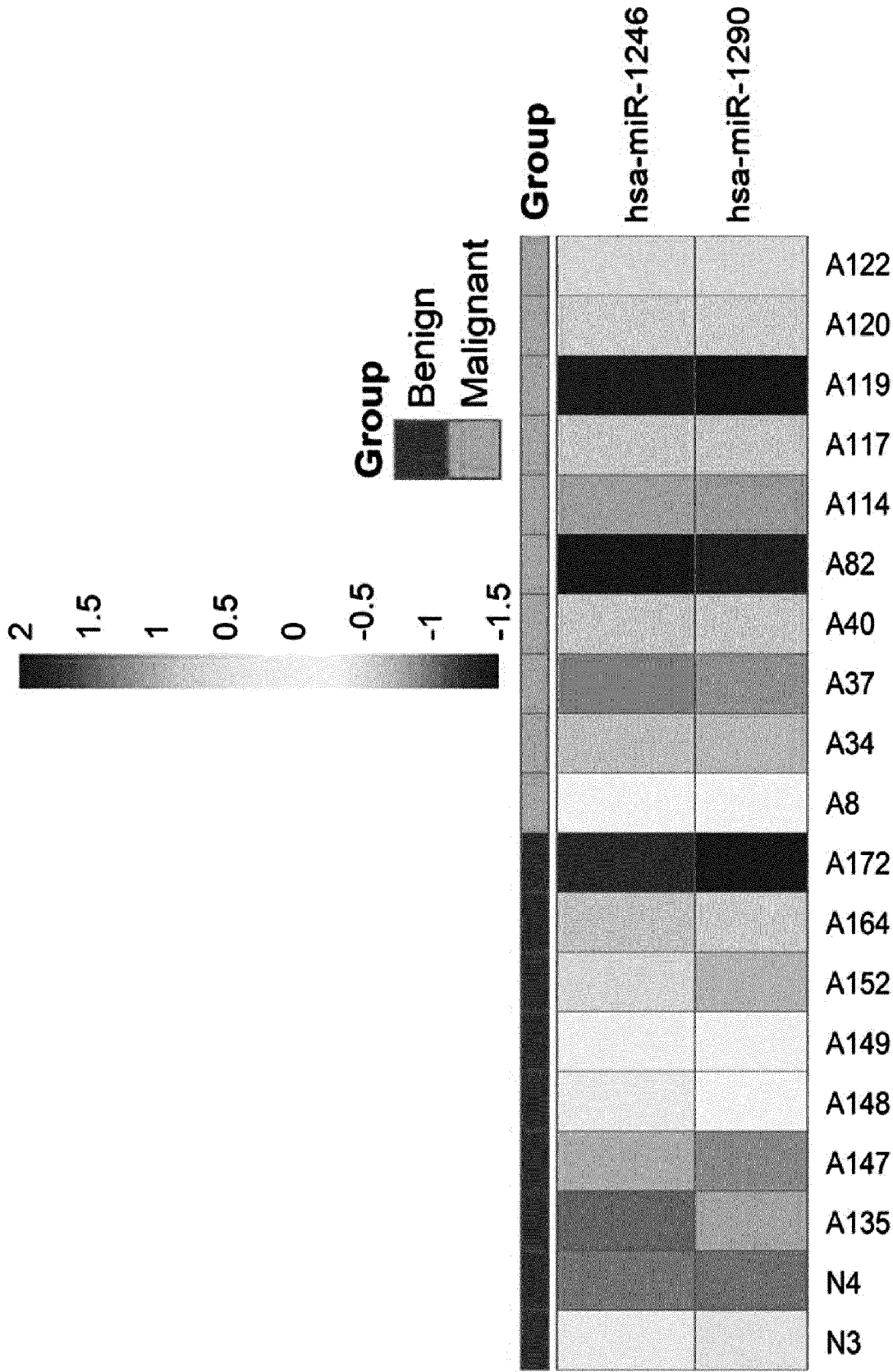
MA-EVs



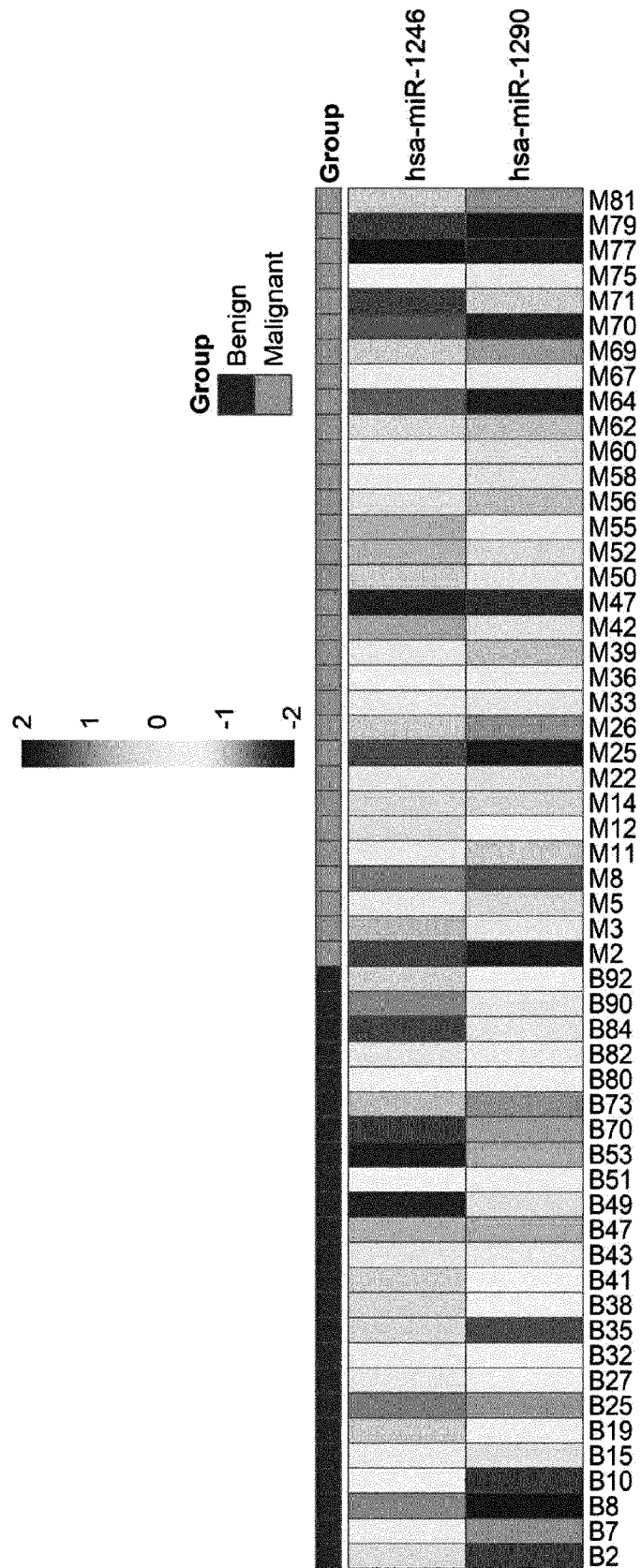
[도5gc]



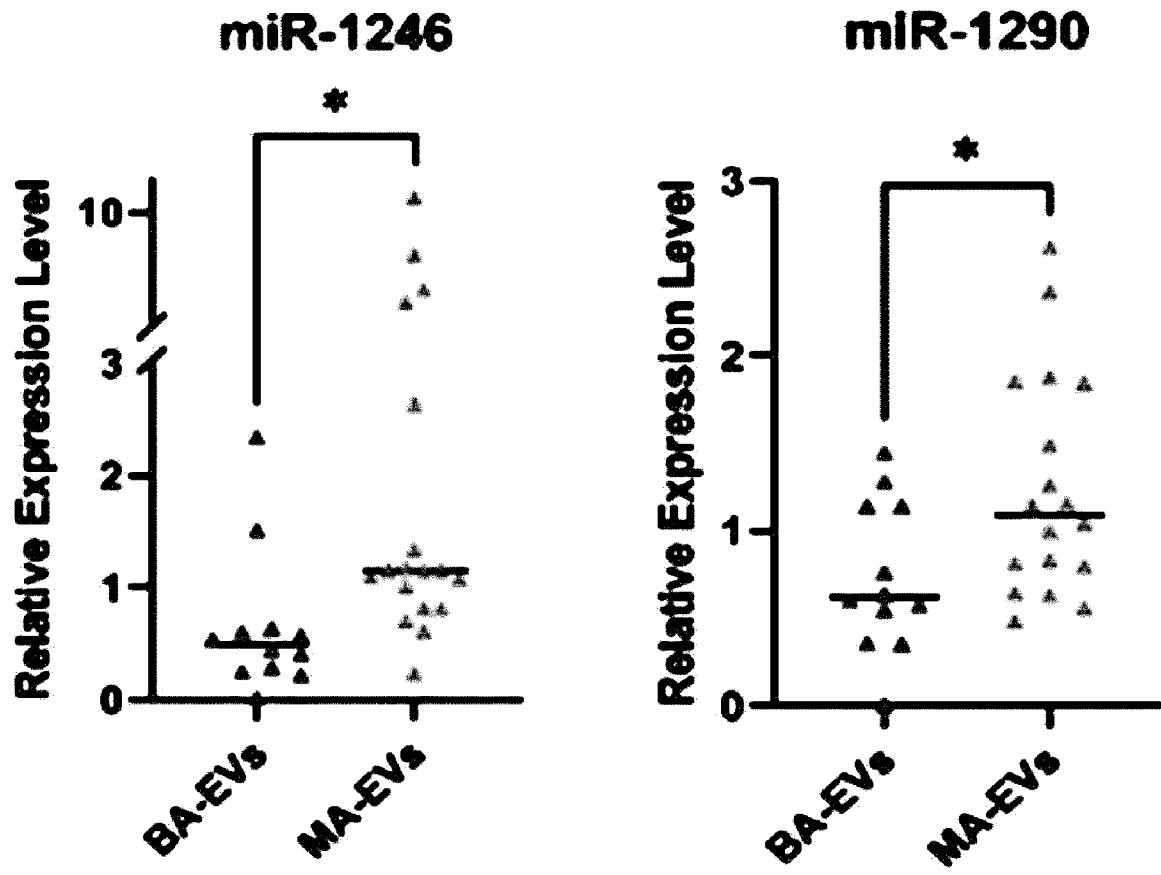
[도6a]



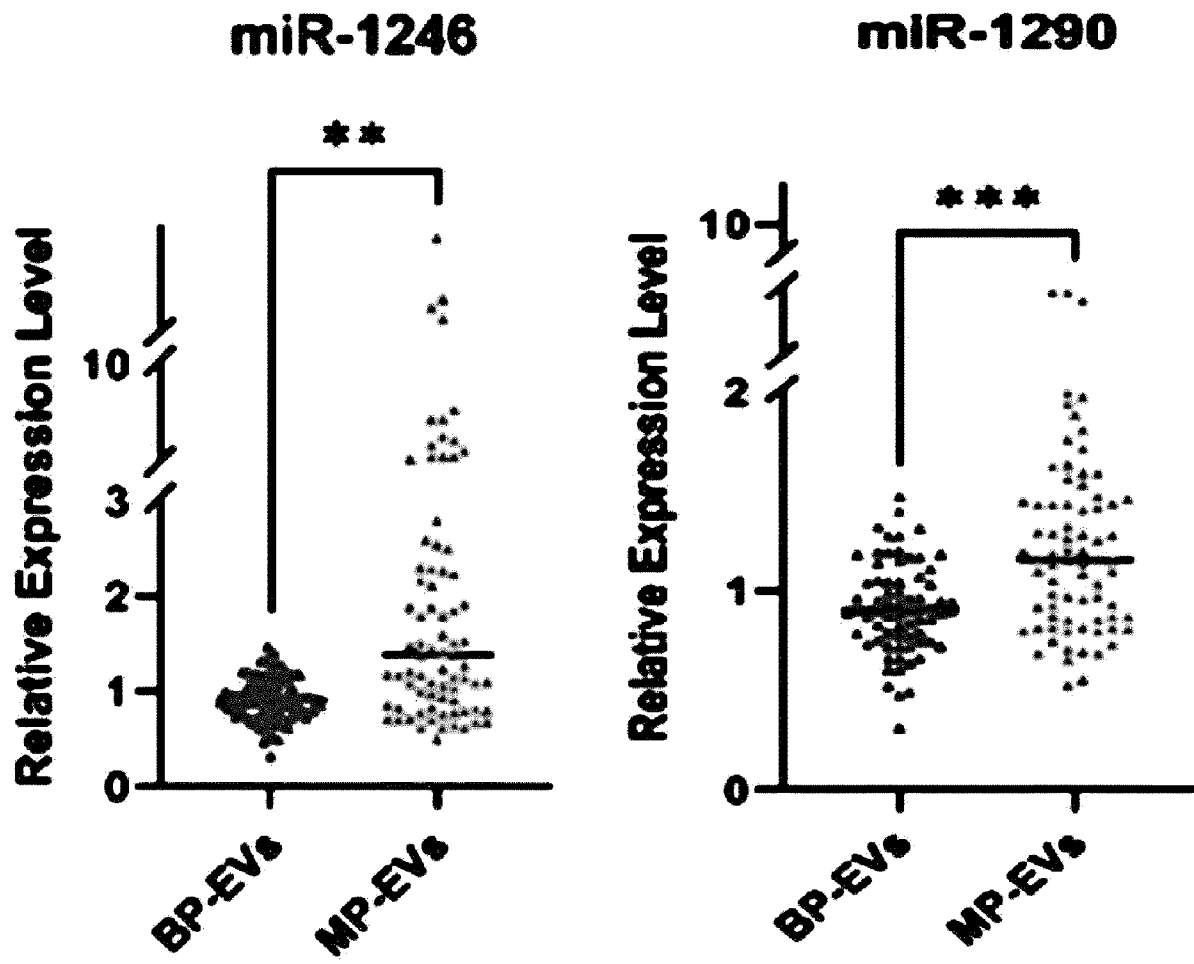
[도6b]



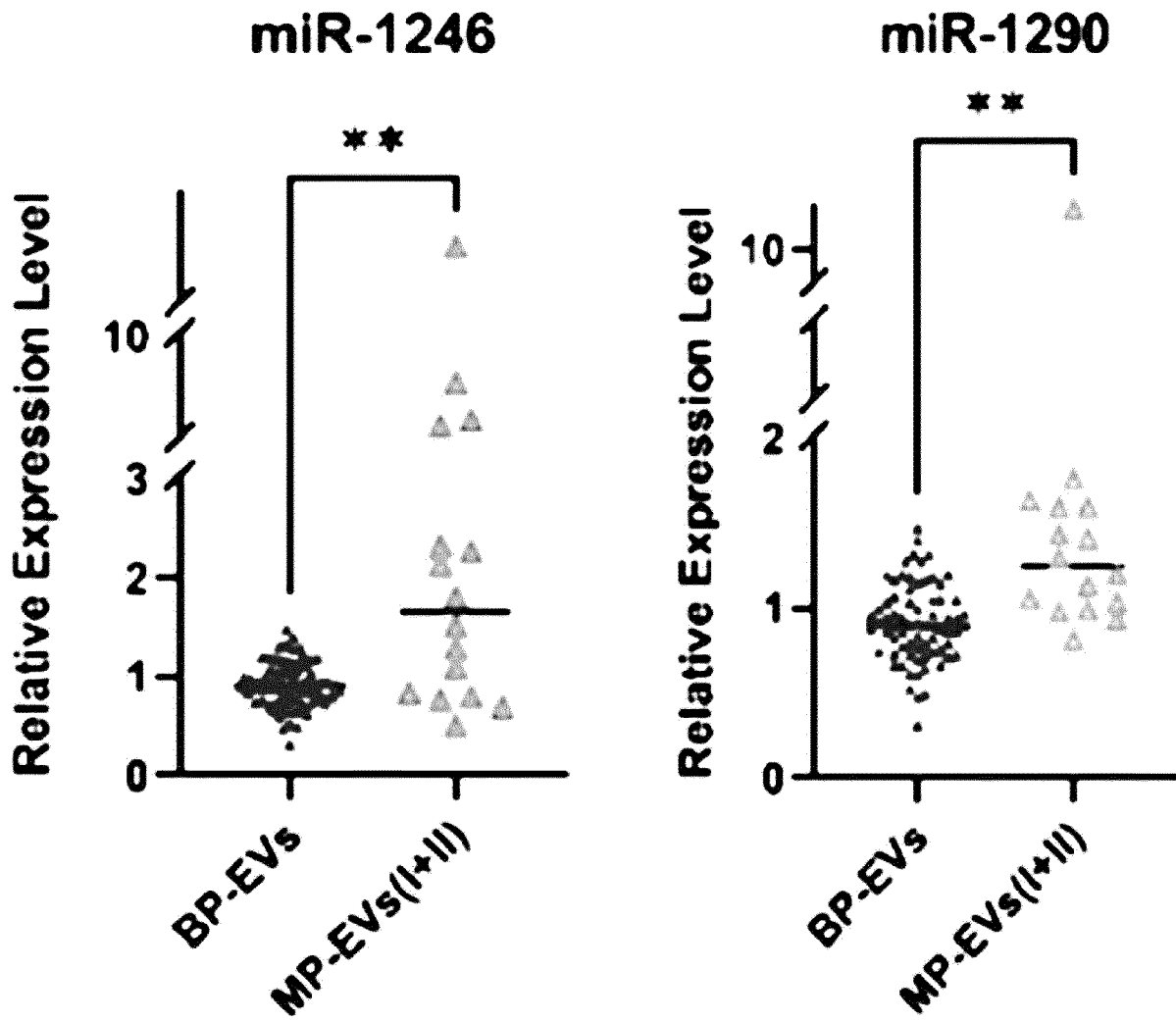
[도6c]



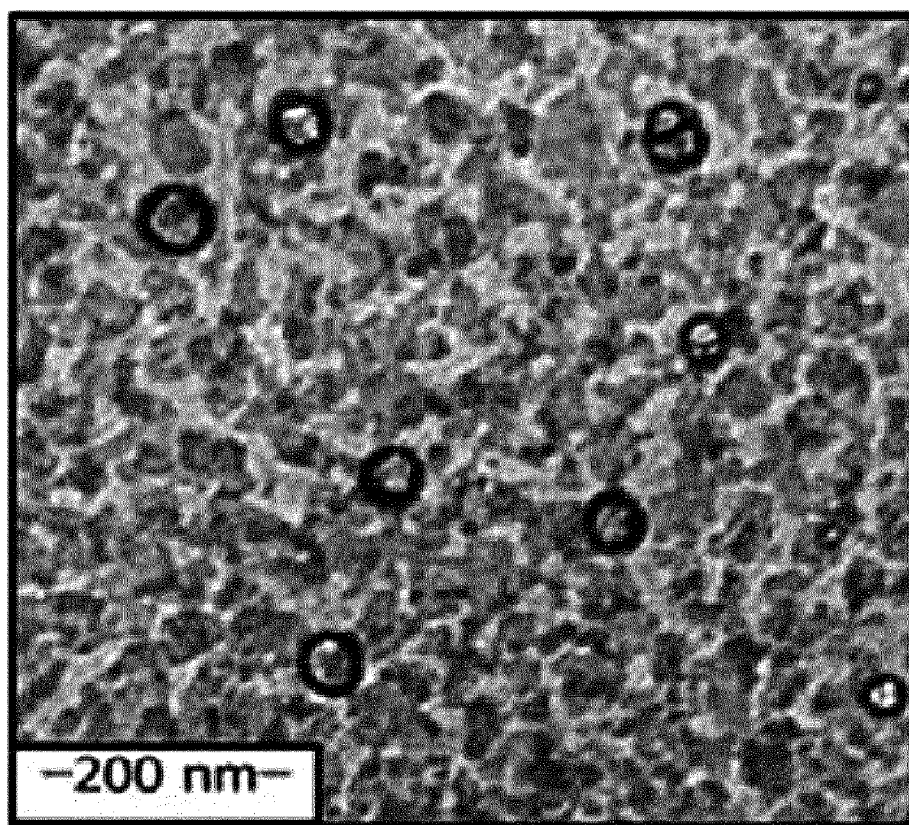
[도6d]



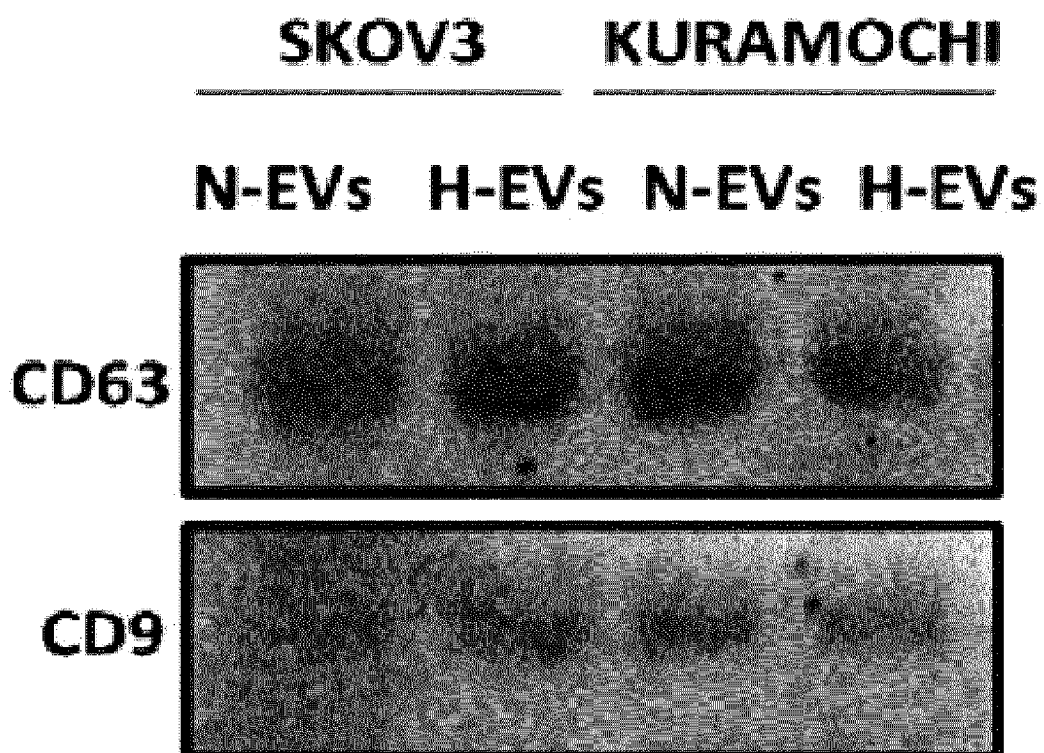
[도6e]



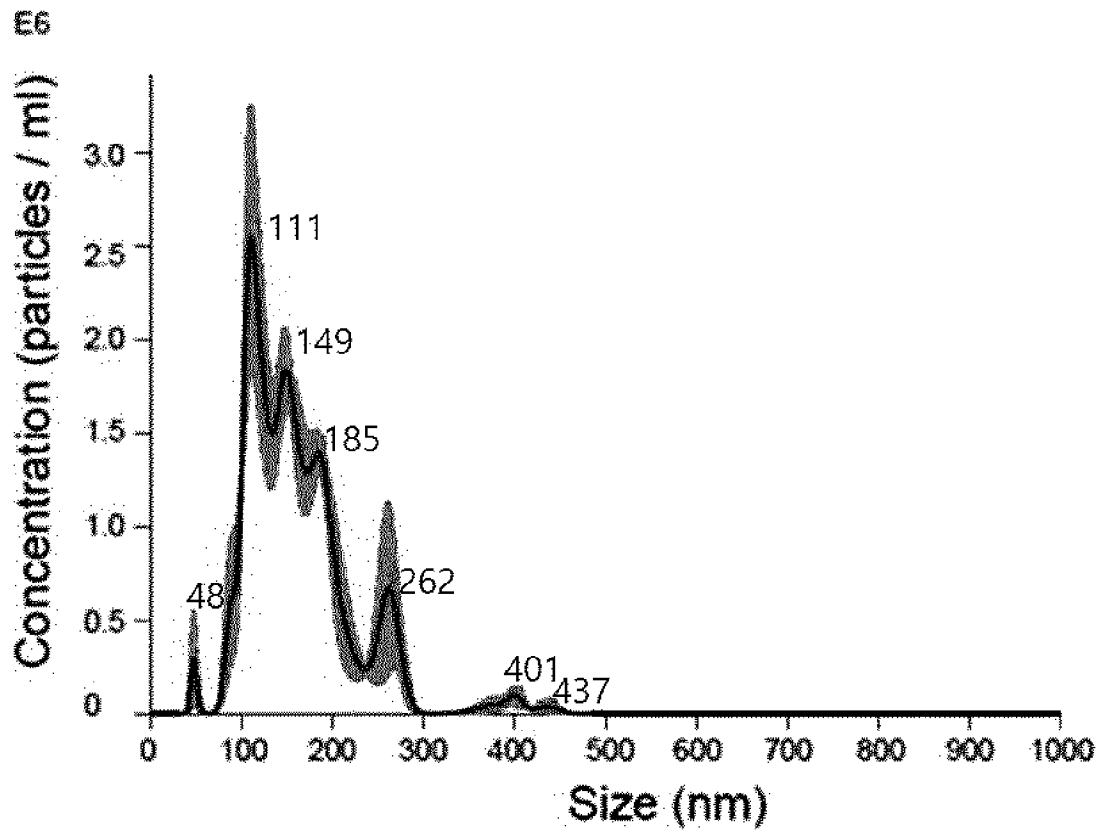
[도6f]



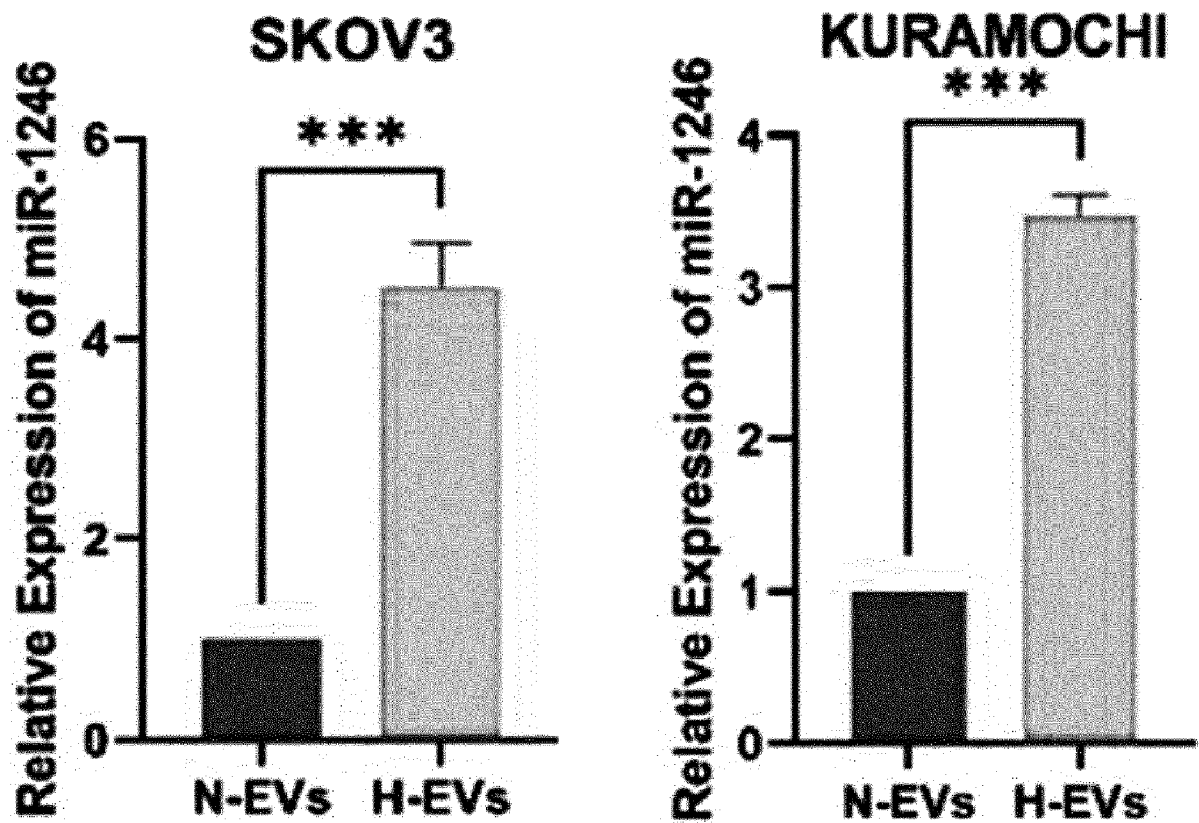
[도6g]



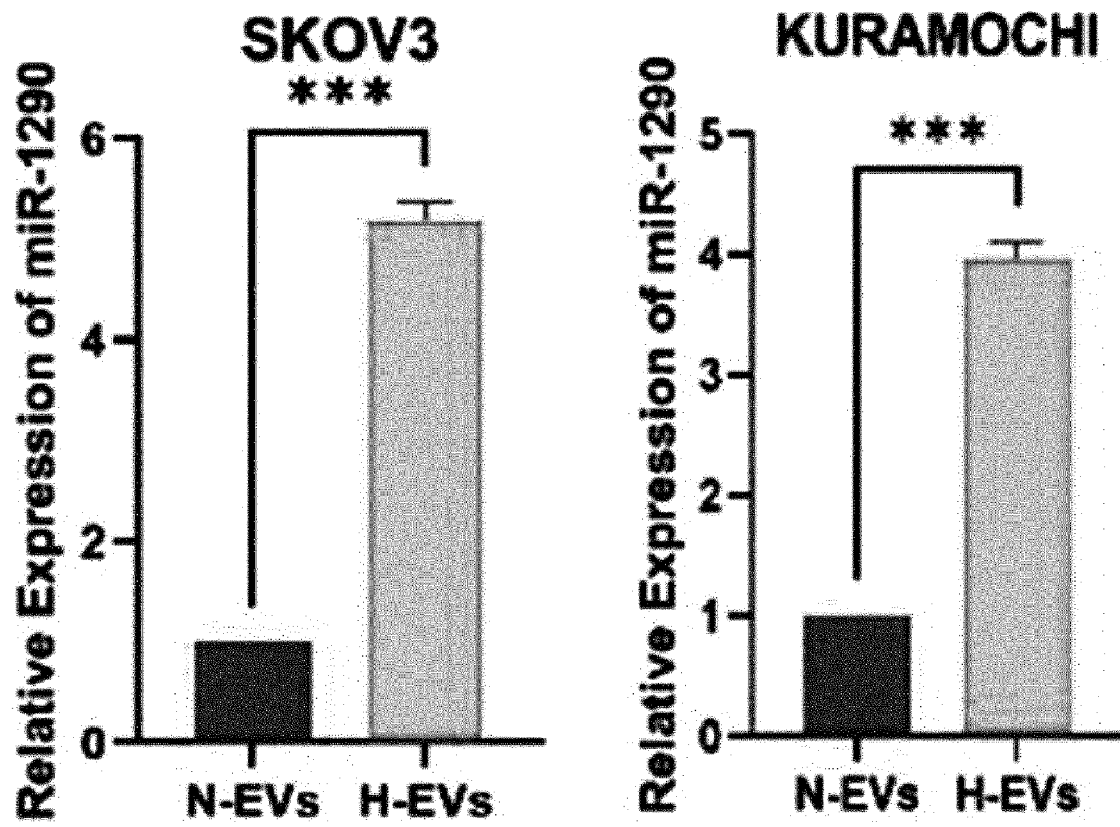
[도6h]



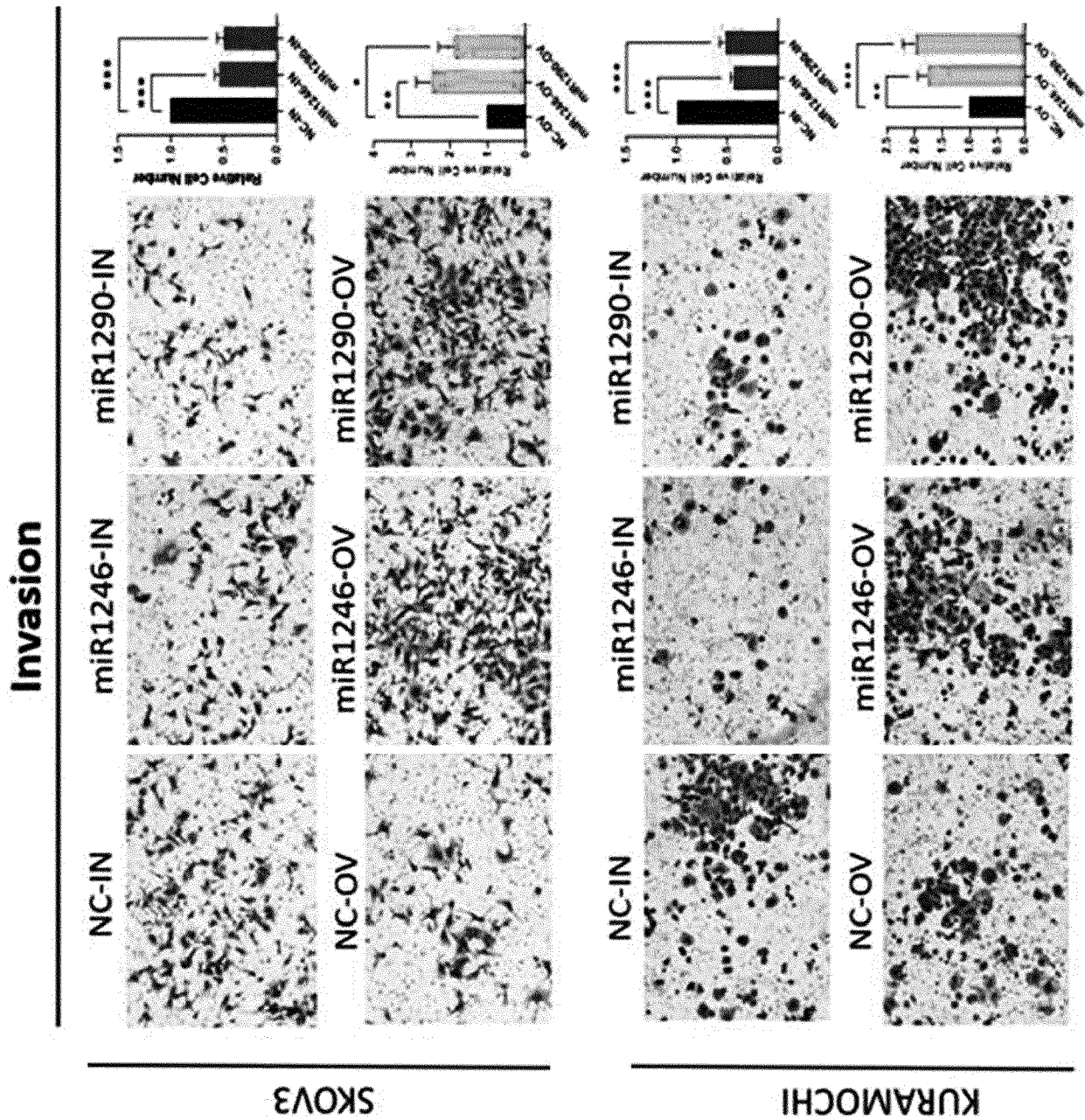
[도6i]



[도6j]

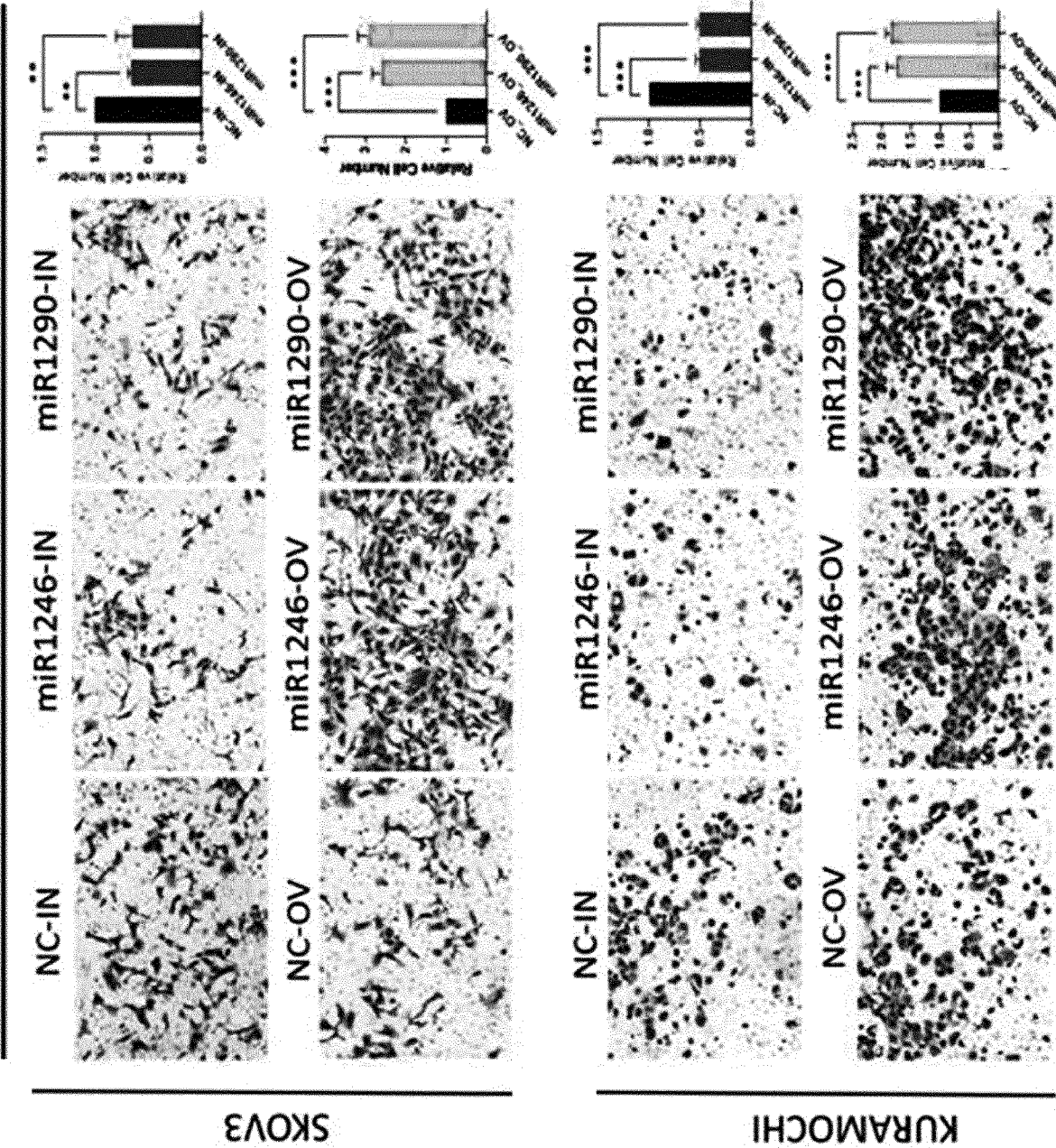


[도6ka]

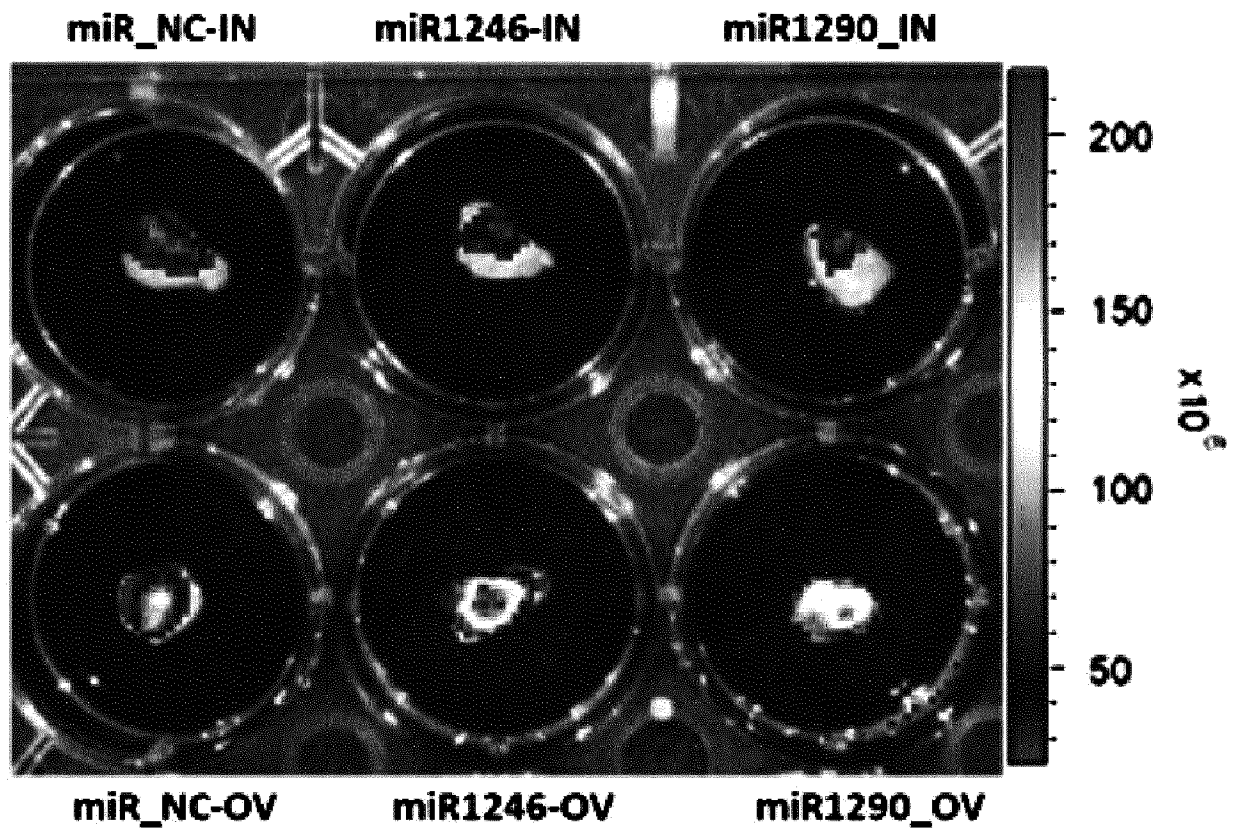


[도6kb]

Migration



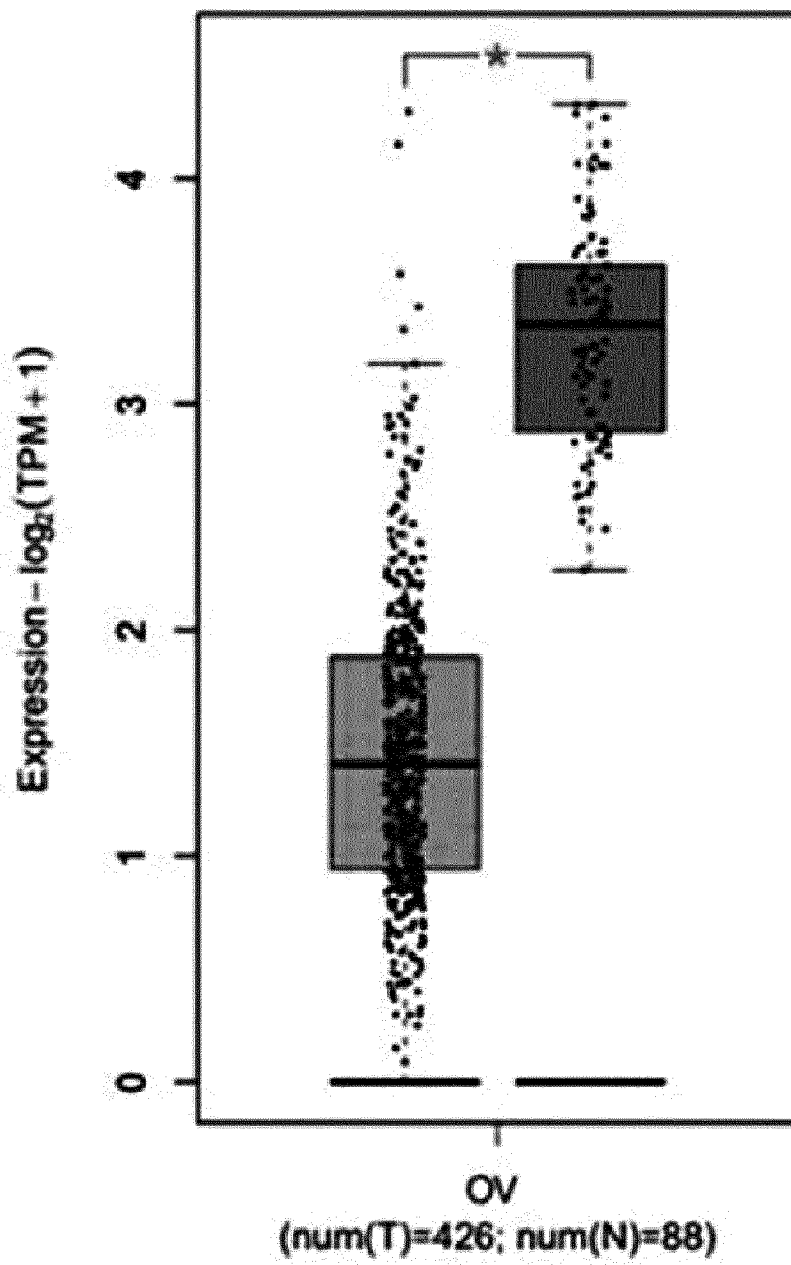
[도6]



[도7a]



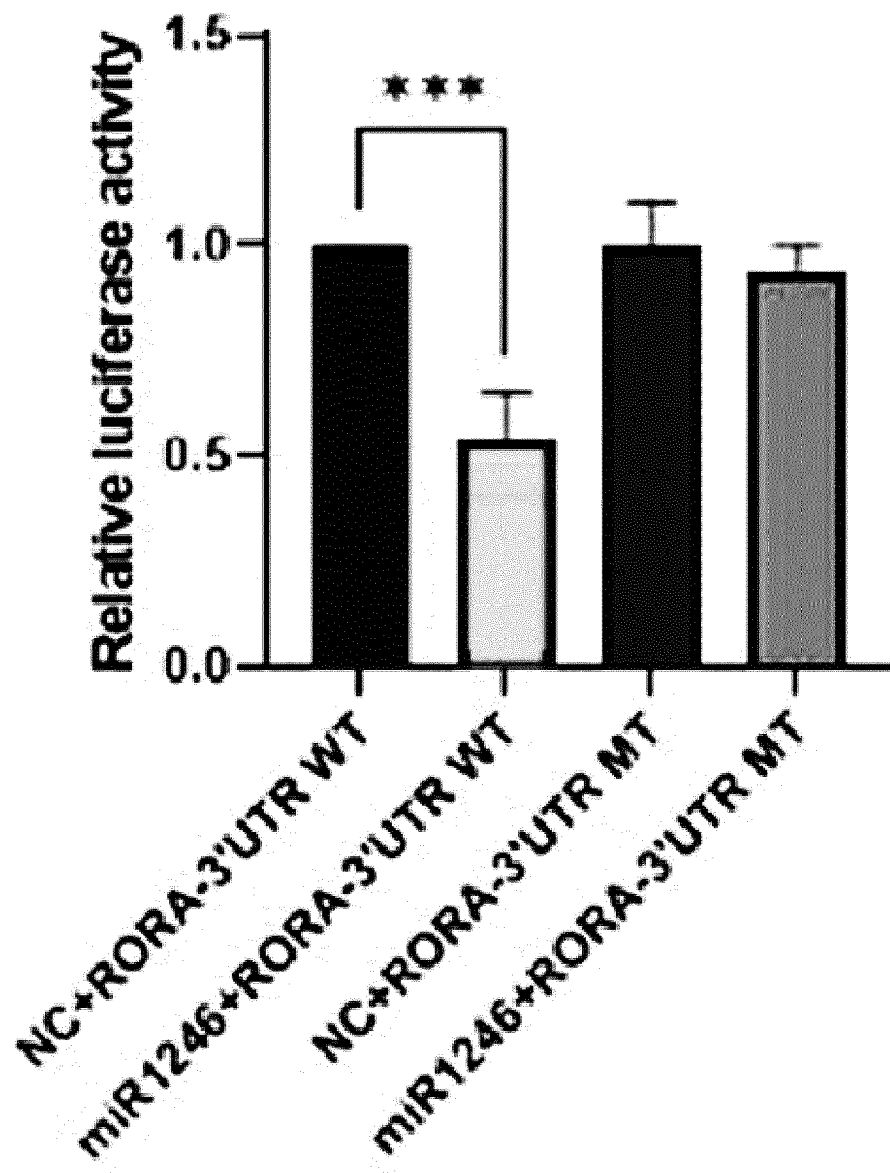
[도7b]



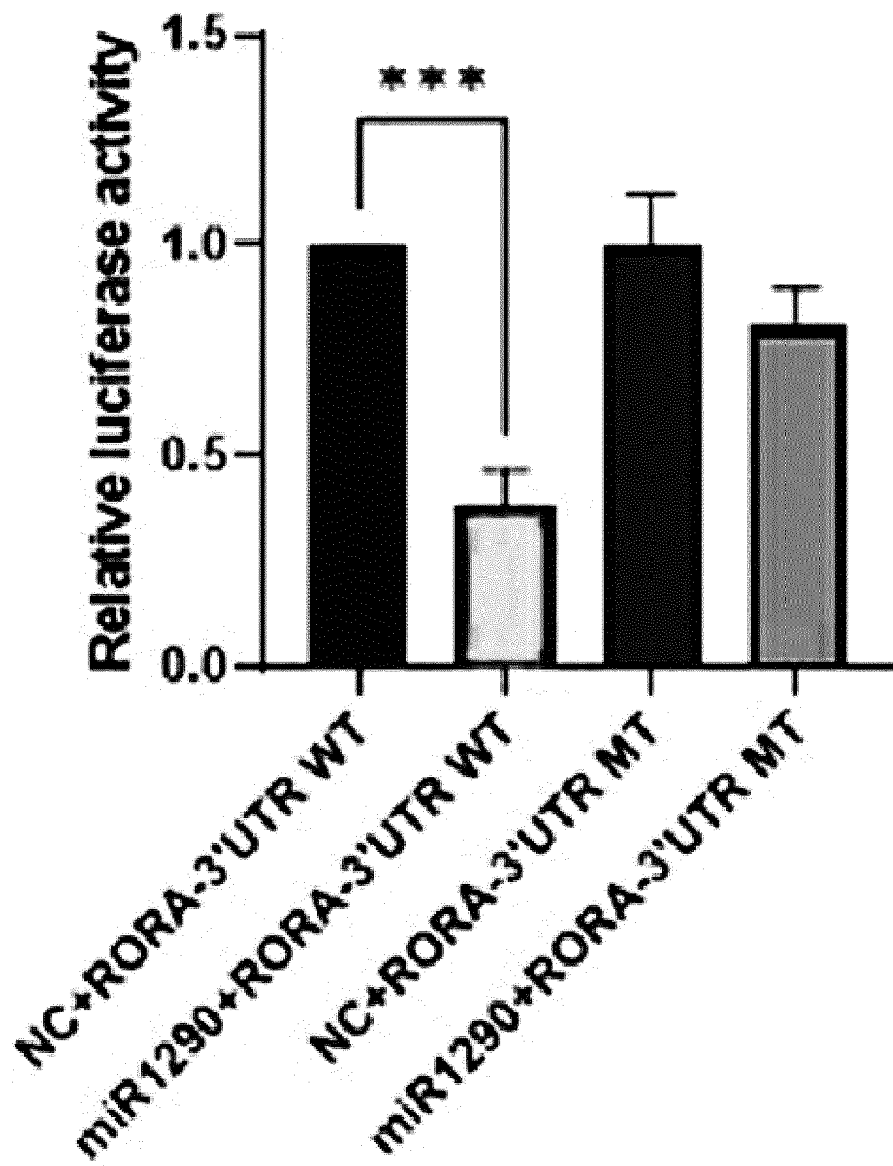
Western blot analysis of RORα and GAPDH protein levels in SKOV3 and KURAMOCHI cells. The blots show RORα and GAPDH protein levels across three conditions: NC-IN, miR1246-IN, and miR1290-IN. RORα levels are significantly reduced in the miR1246-IN and miR1290-IN conditions compared to the NC-IN condition. GAPDH levels are consistent across all conditions, serving as a loading control.

RORA 3' UTR MT - AAAAUCCA-
 |||||
miR-1246 GGACGAGGUUUUUAGGUA
miR-1290 AGGGACUAGGUUUUUAGGU
 XXXXXXXXX
RORA 3' UTR WT - UUGGAAUC-

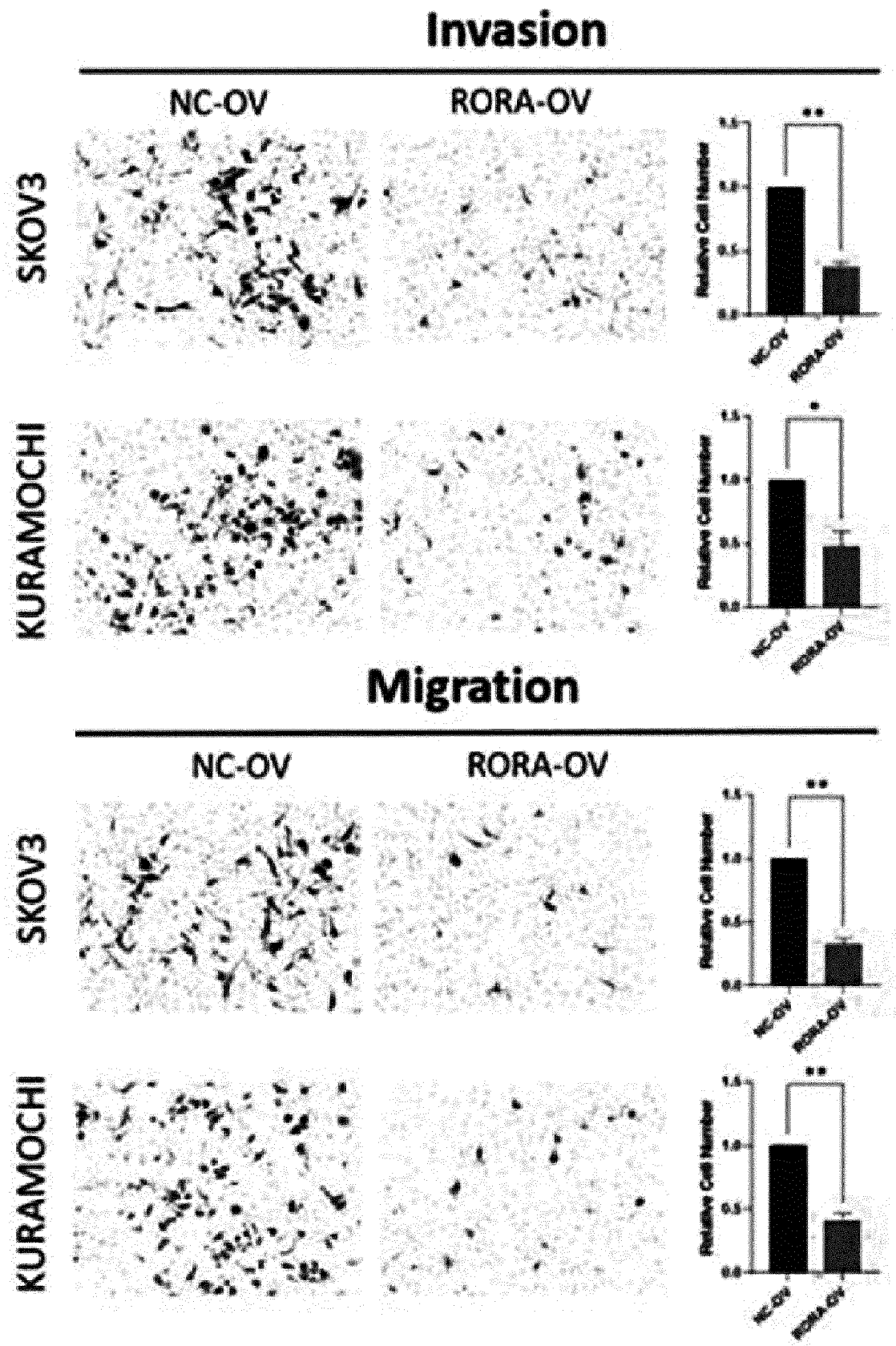
[도7ea]



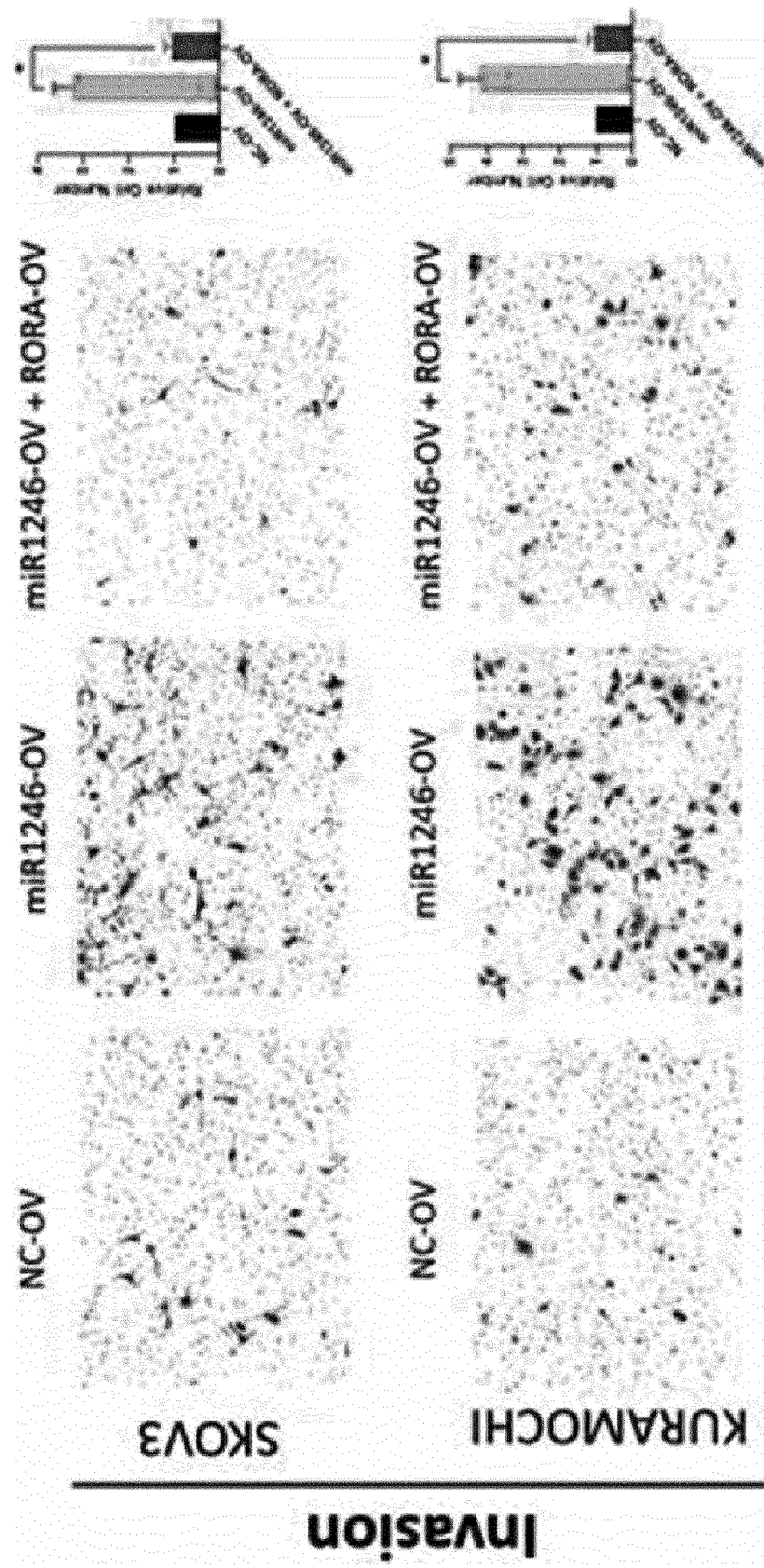
[도7eb]



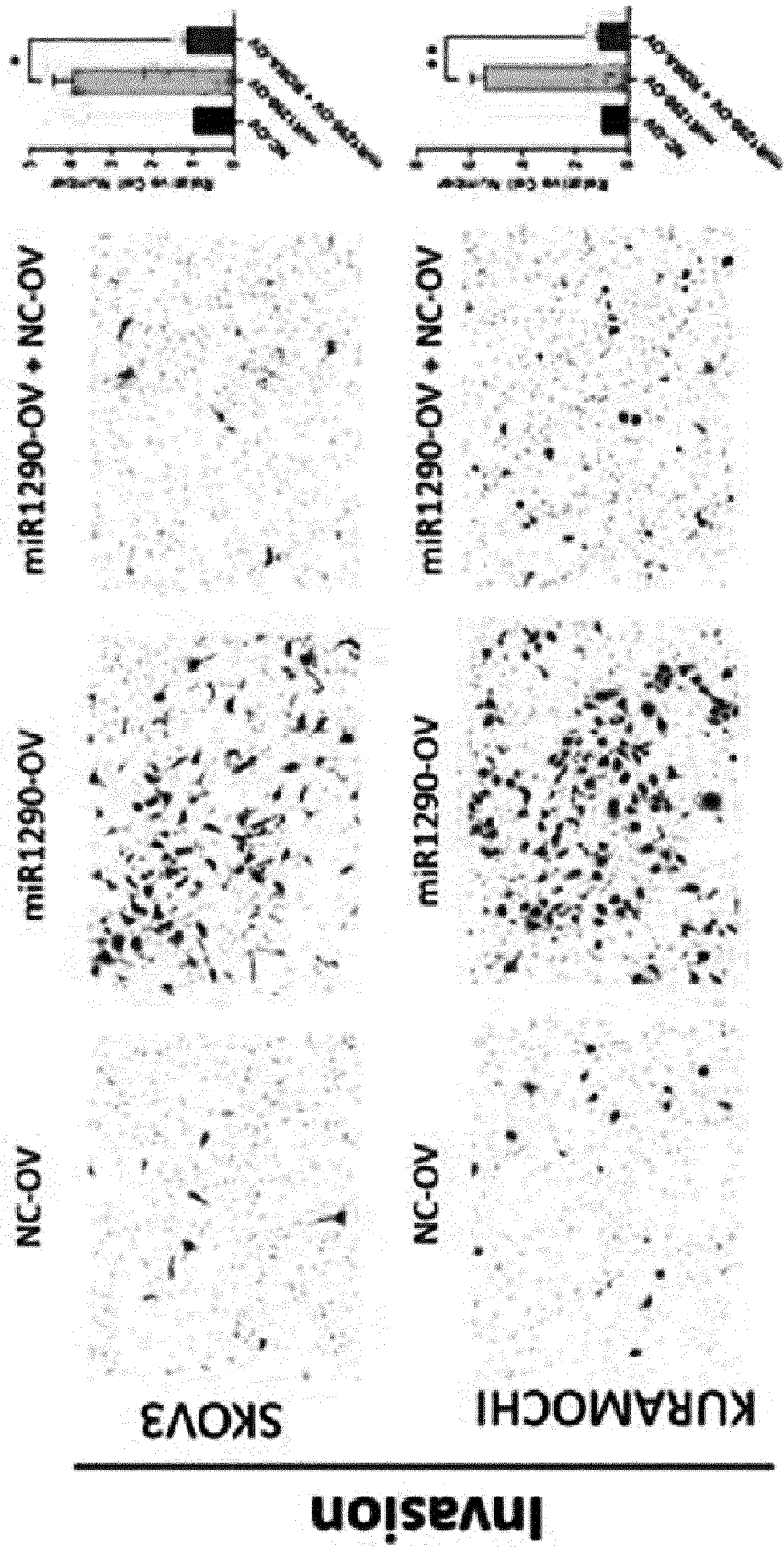
[도7f]



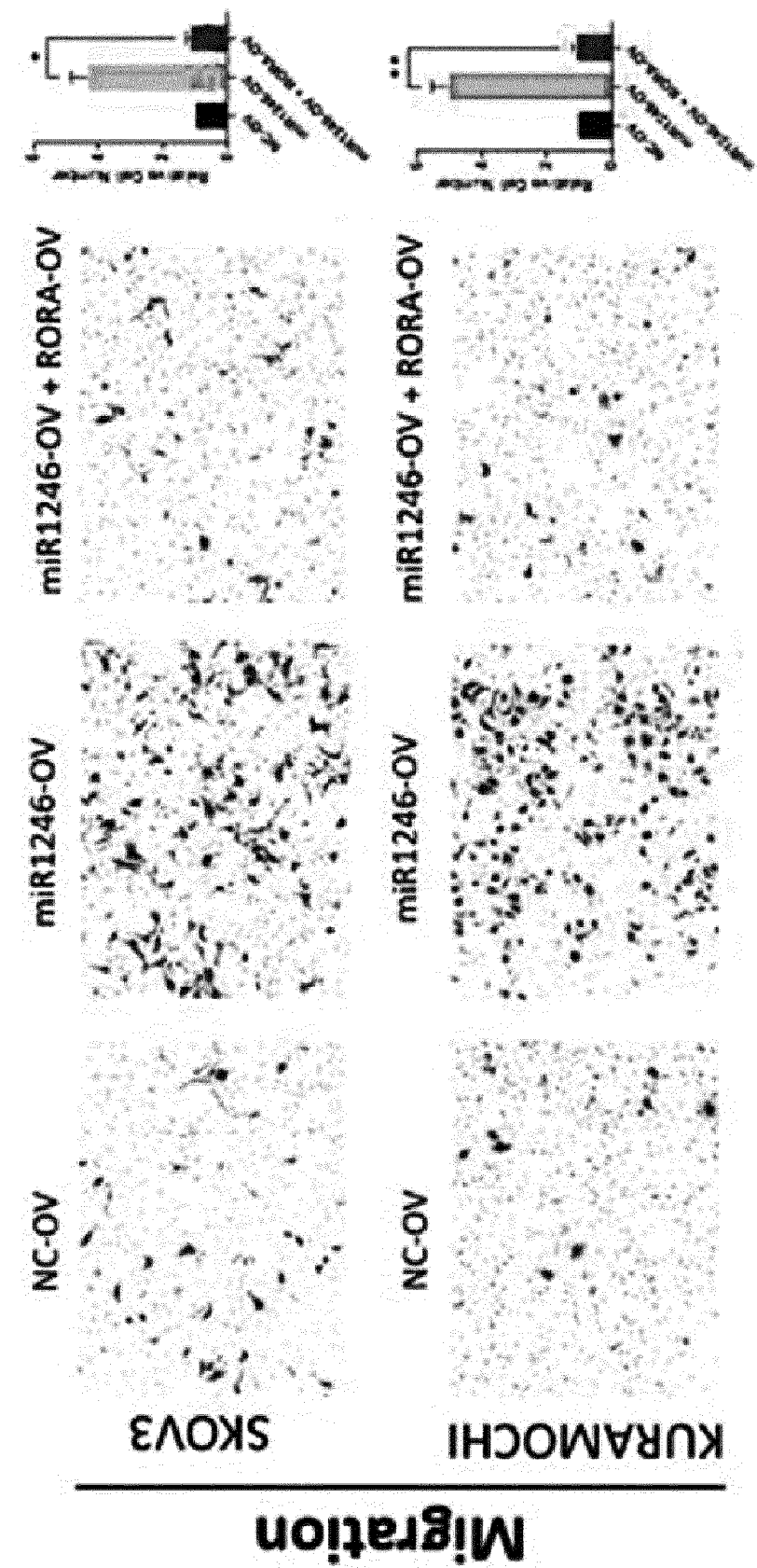
[도7ga]



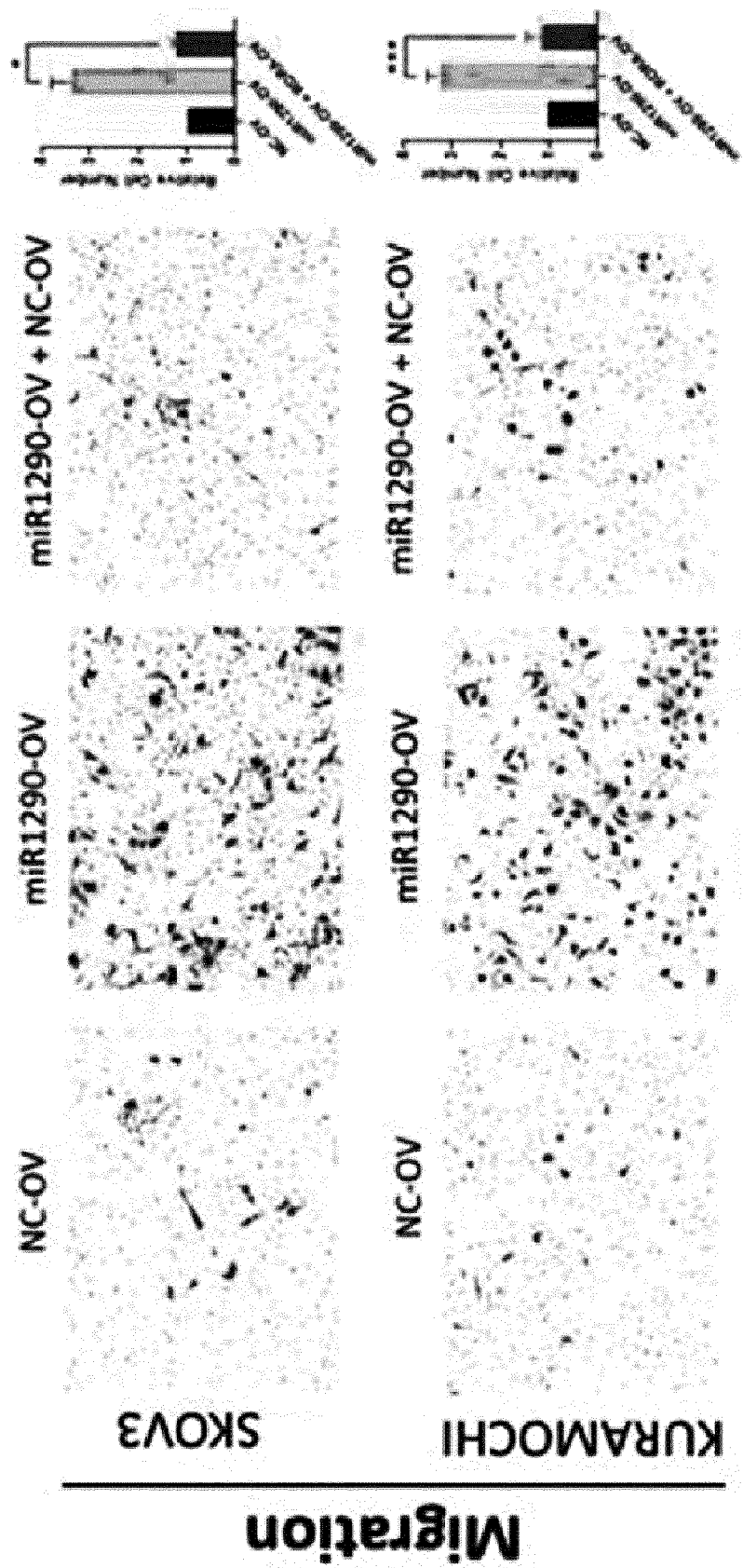
[도7gb]



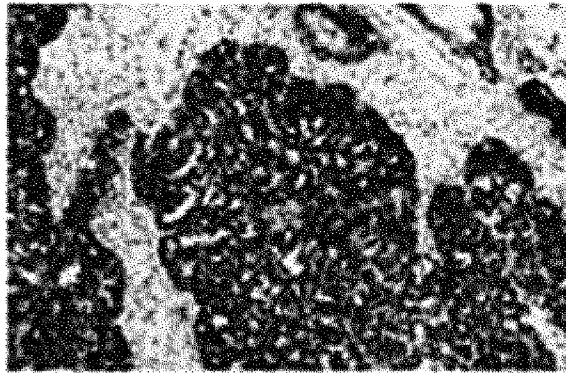
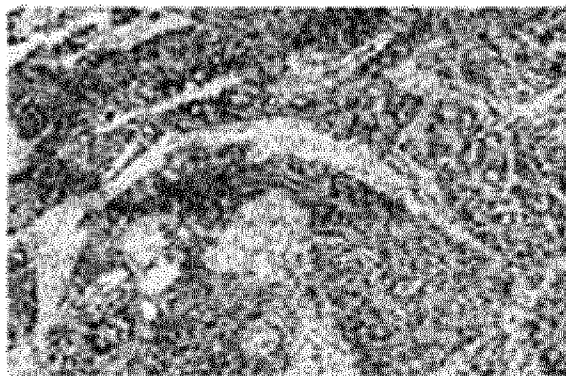
[도7gc]



[도7gd]

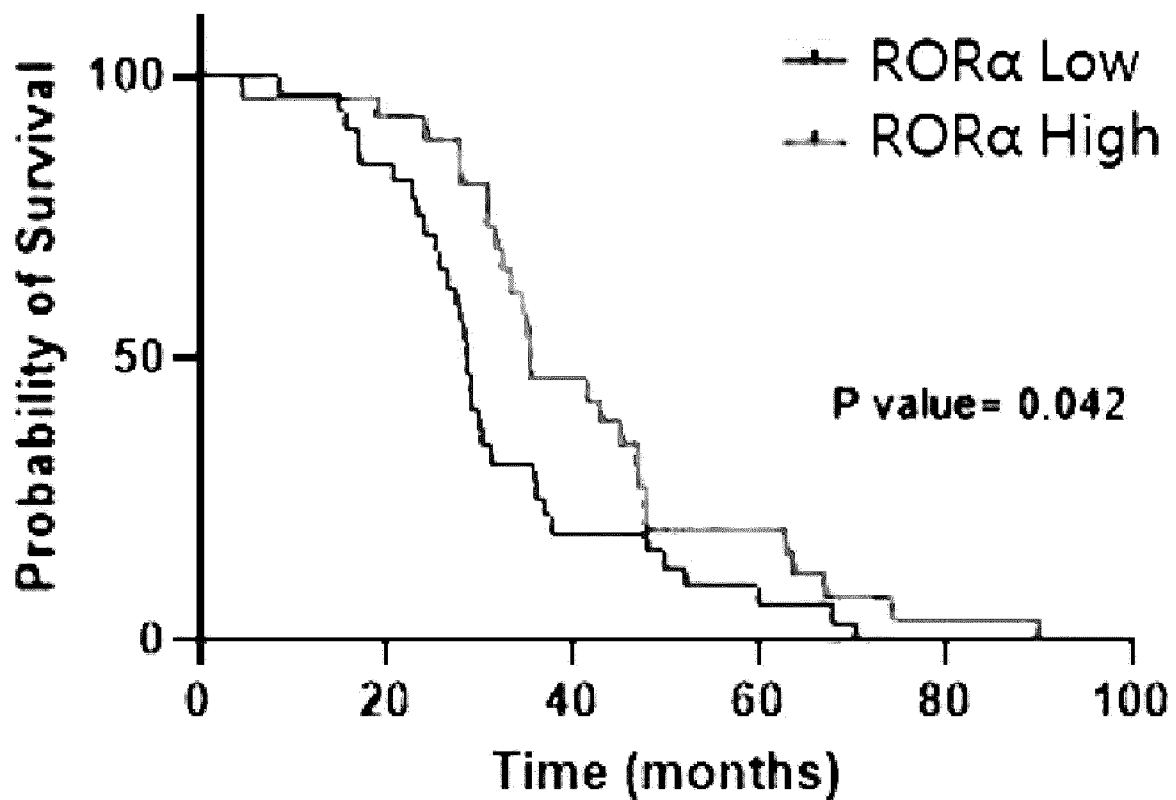


[도7h]

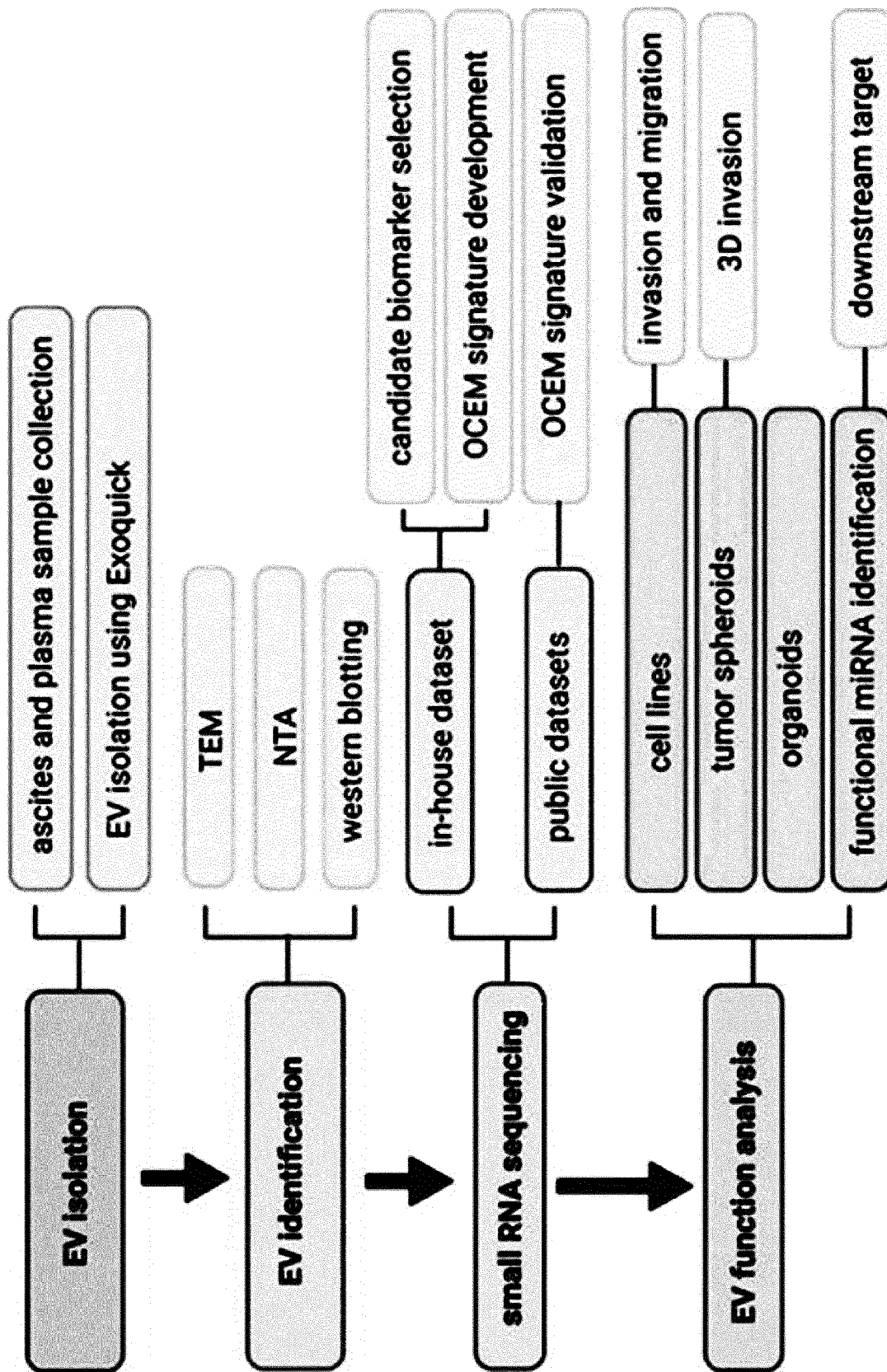
ROR α HighROR α Low

[도7i]

Overall Survival



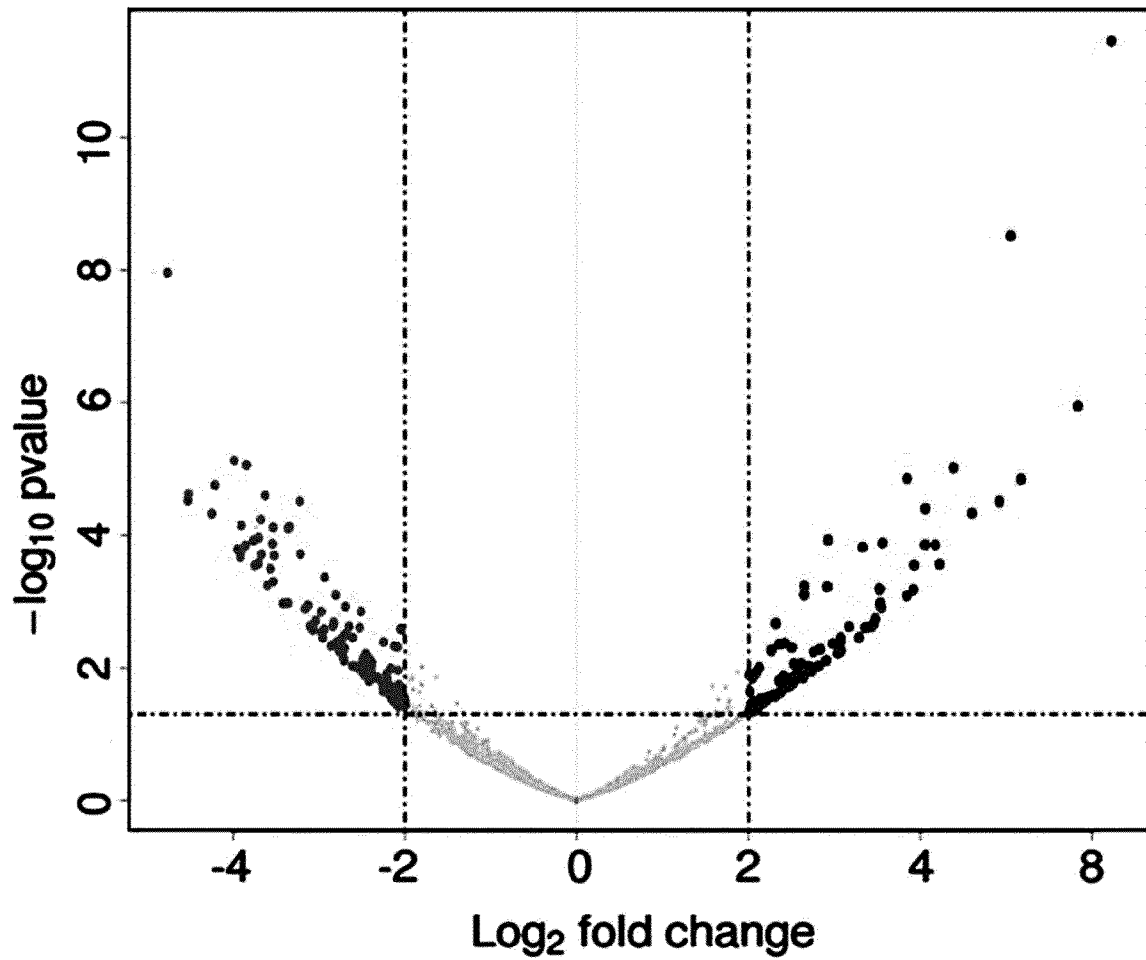
[도8]



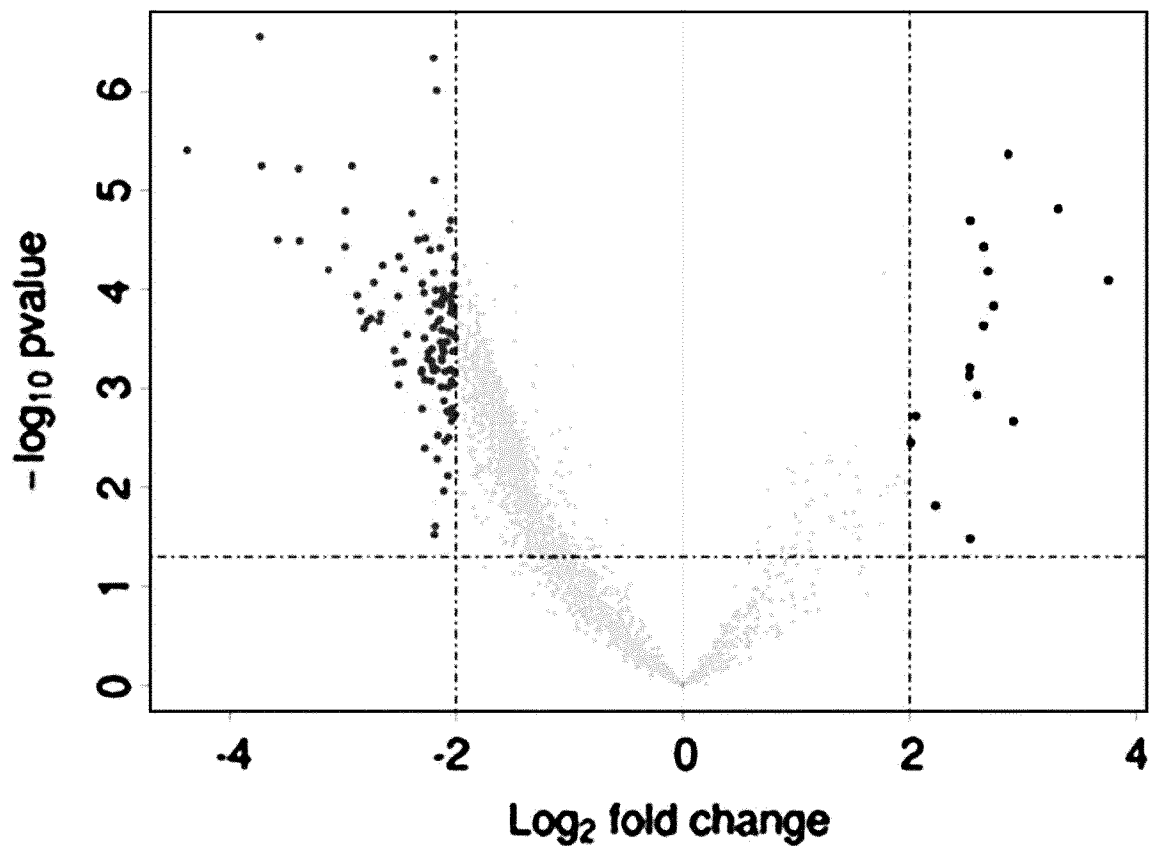
[도9a]

Sample	Training		Validation		Total
	B	M	B	M	
Ascites	6	7	3	3	19
Plasma	16	21	8	10	55

[도9b]



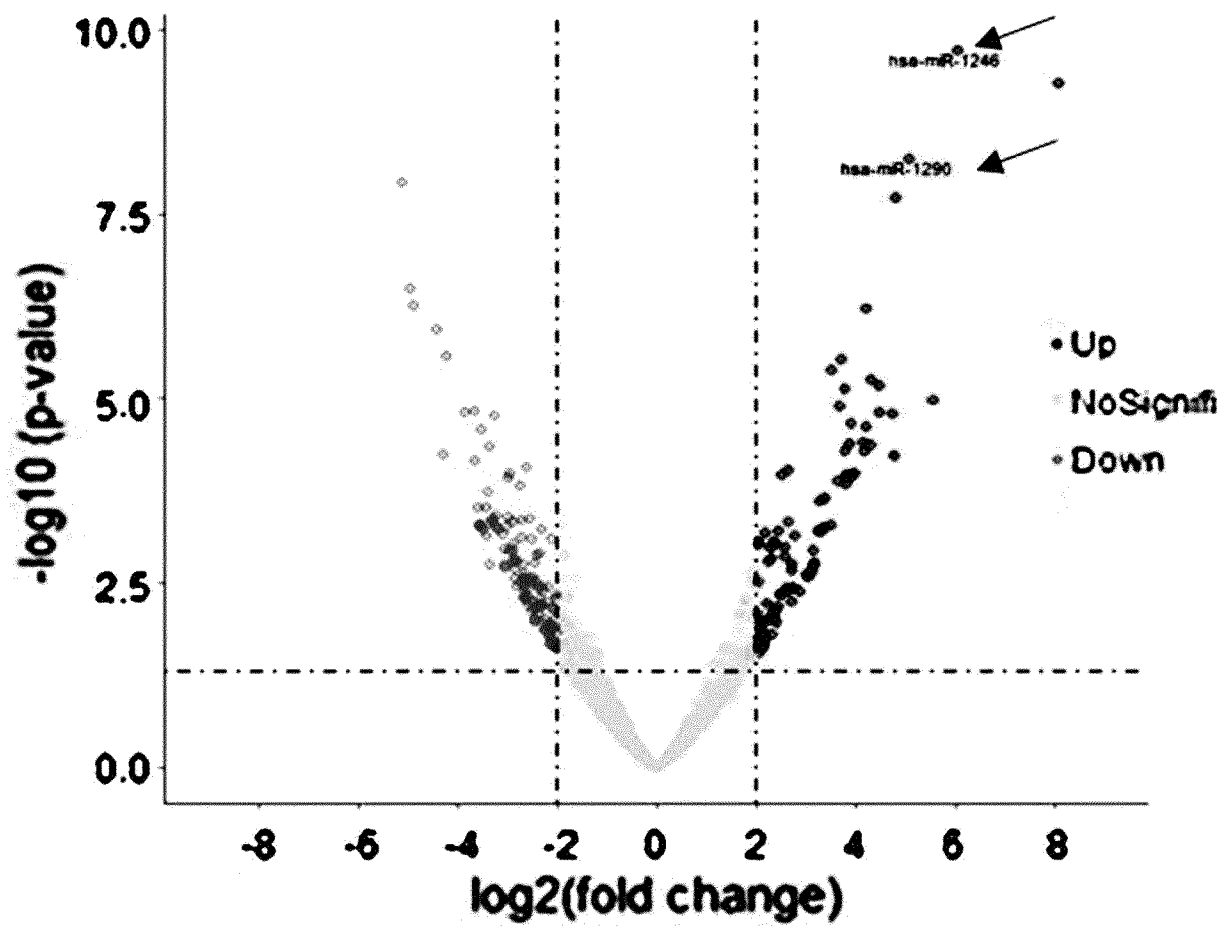
[도9c]



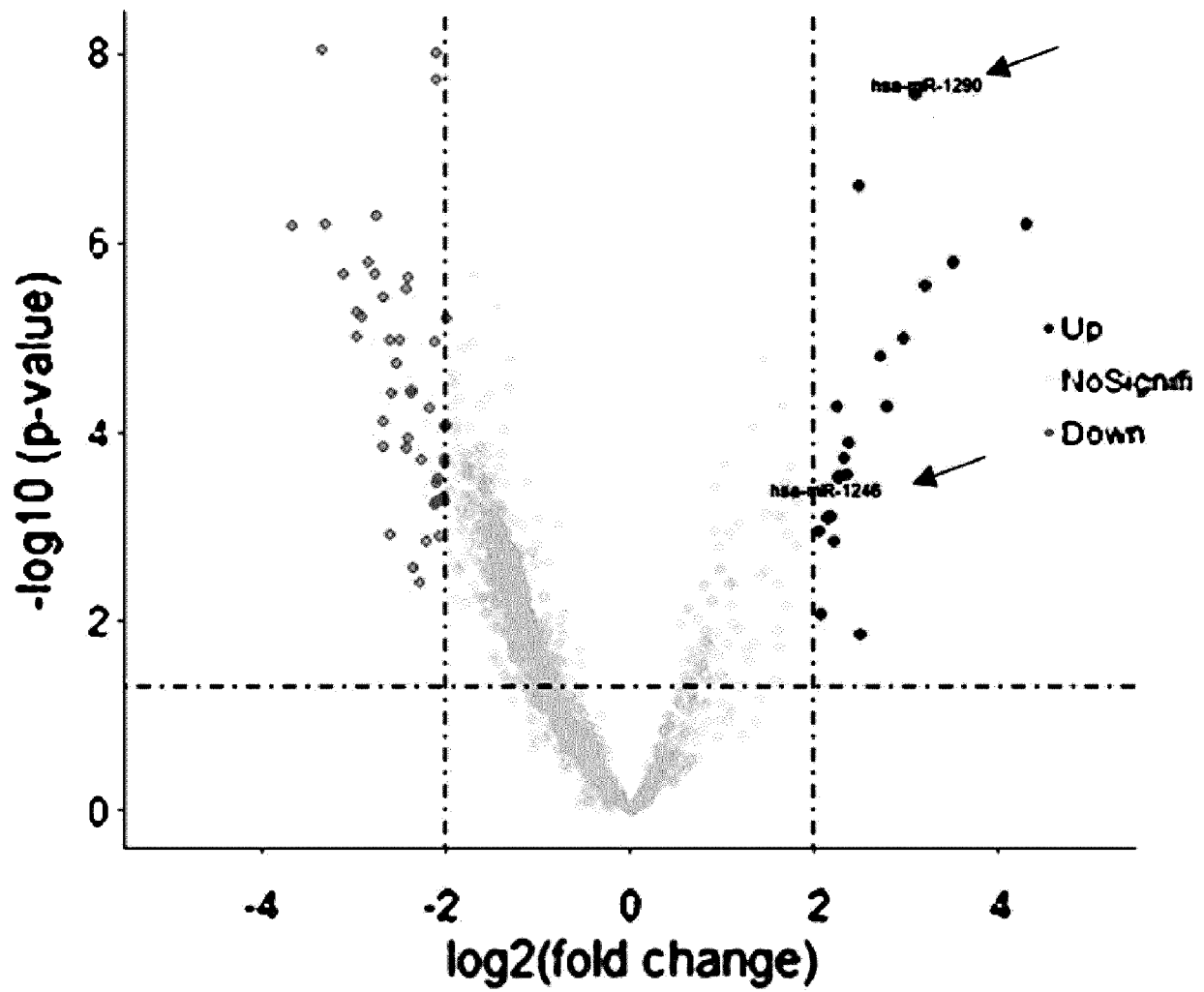
[도9d]

No.	miRNA	Expression in M
1	hsa-miR-1246	Upregulated
2	hsa-miR-1290	Upregulated
3	hsa-miR-483-5p	Upregulated
4	hsa-miR-429	Upregulated
5	hsa-miR-34b-3p	Downregulated
6	hsa-miR-34c-5p	Downregulated
7	hsa-miR-449a	Downregulated
8	hsa-miR-145-5p	Downregulated

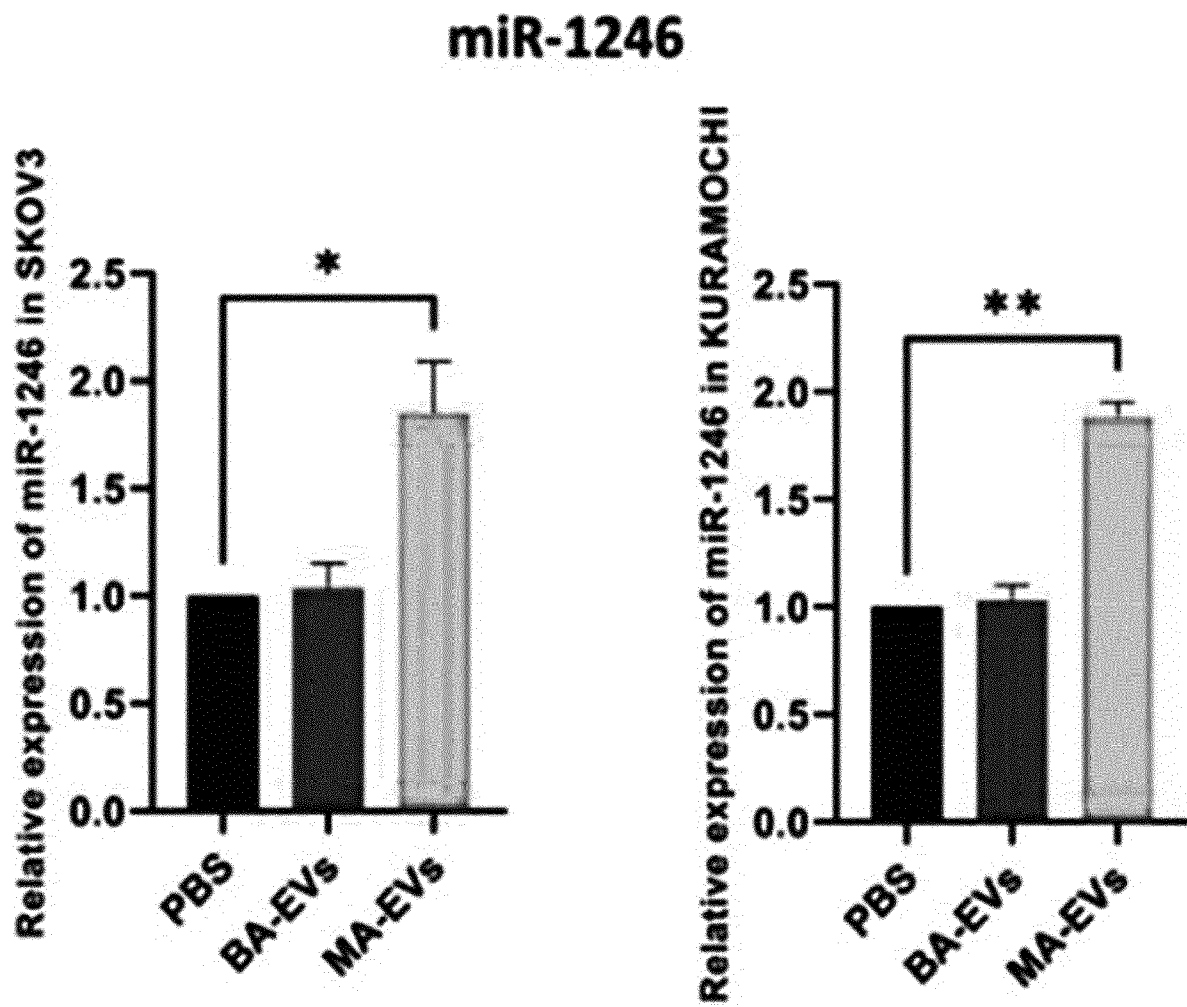
[도 10a]



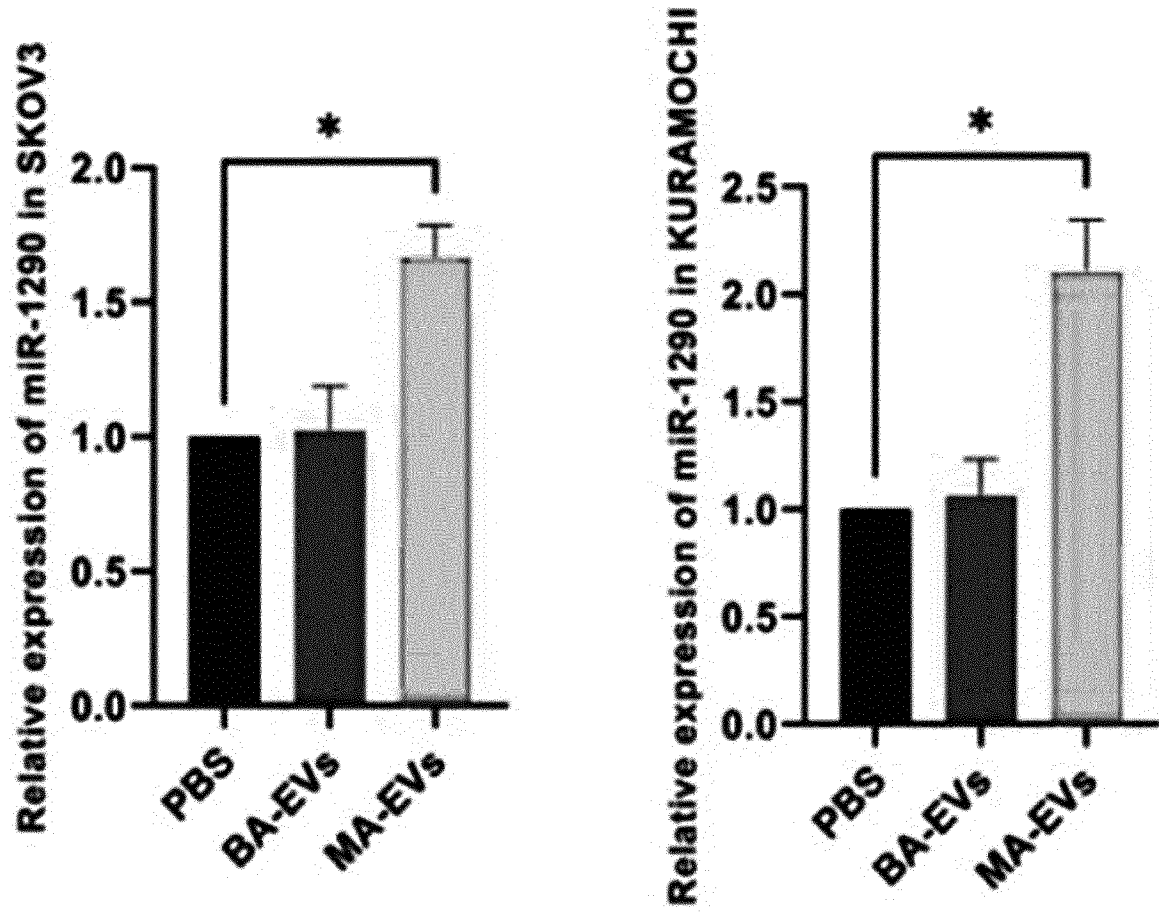
[도 10b]



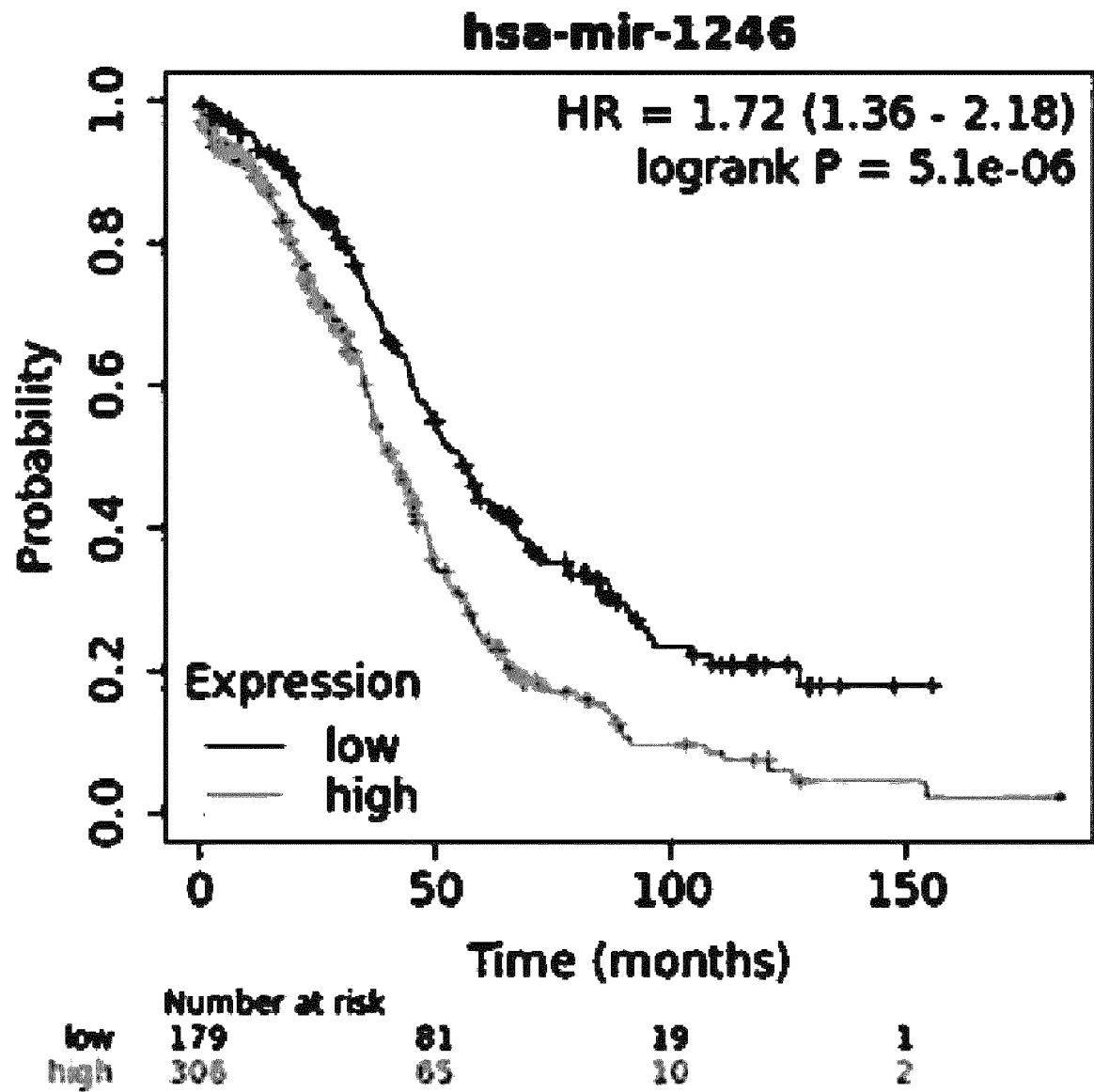
[도 10ca]



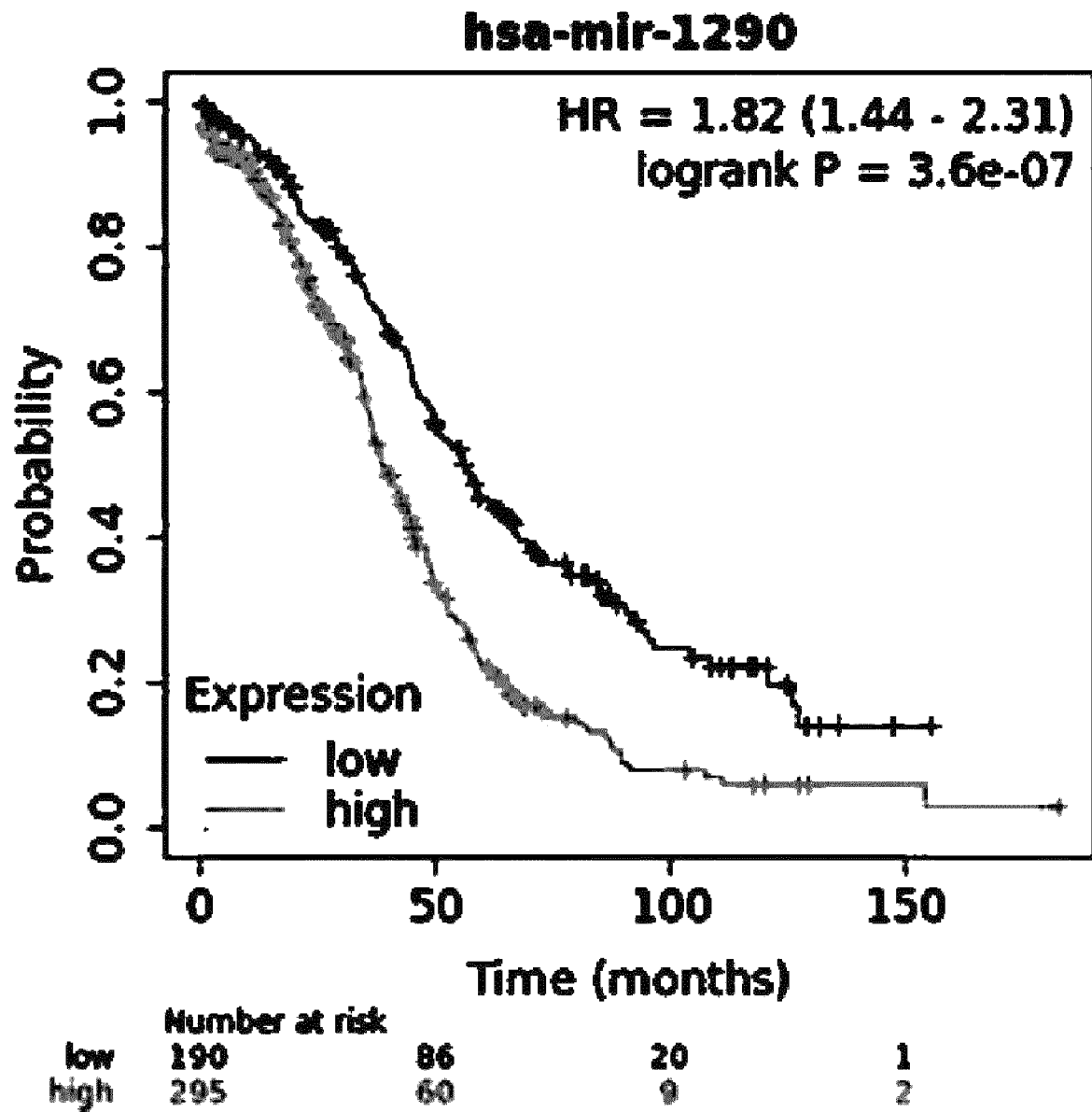
[도10cb]

miR-1290

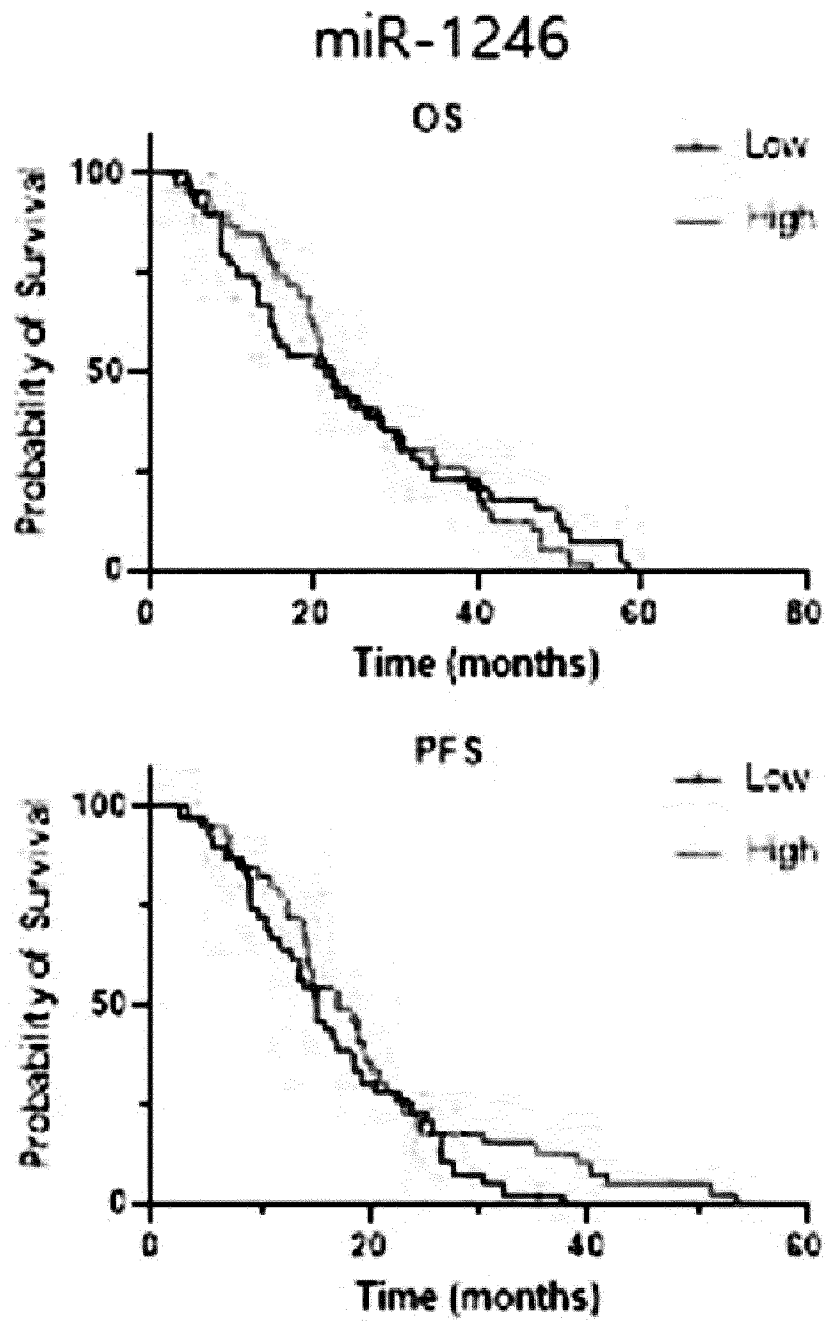
[도10da]



[도10db]

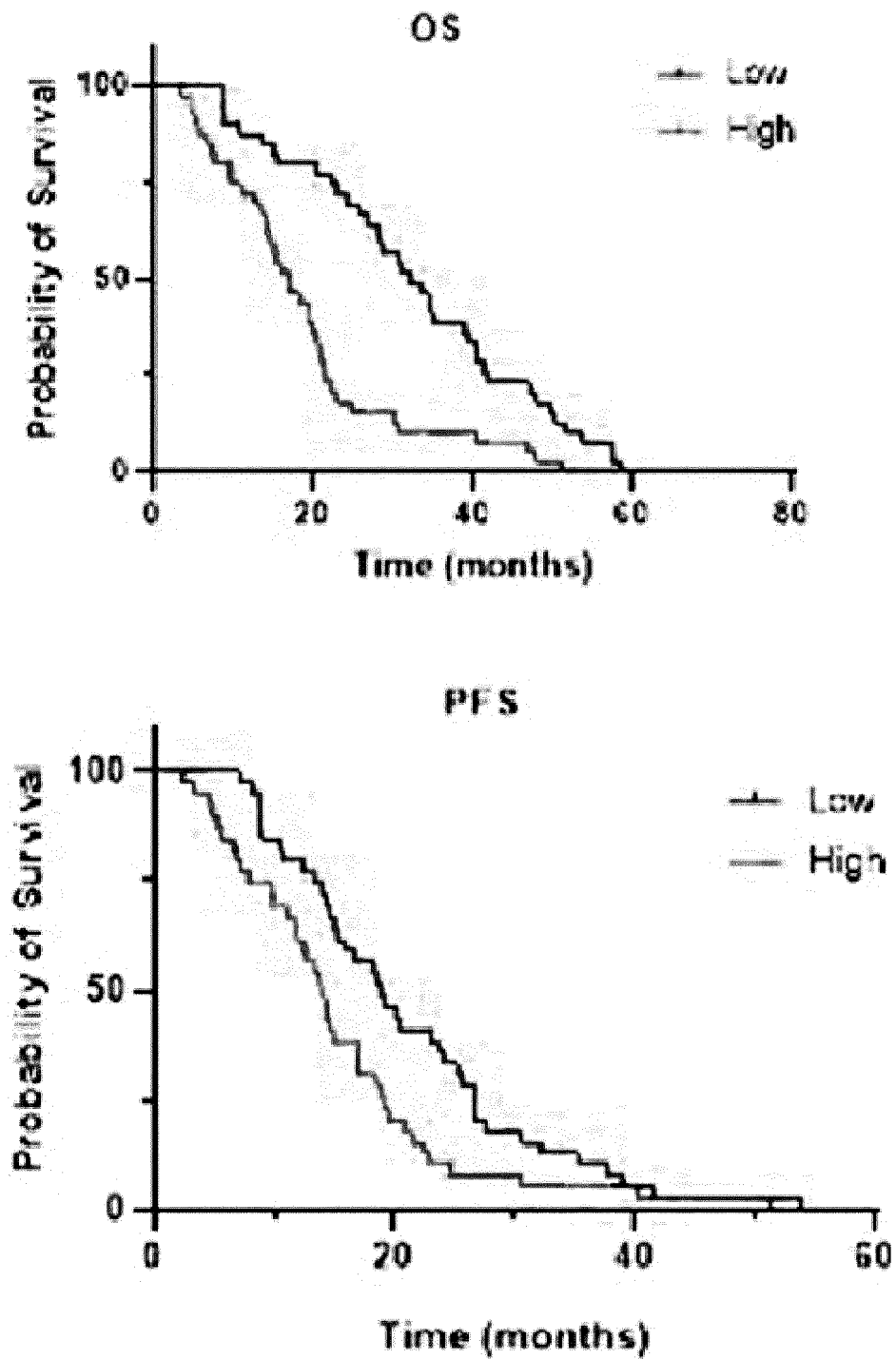


[도10e]



[도10f]

miR-1290



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006436

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); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6883(2018.01); C40B 30/04(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: 마이크로RNA(microRNA), 난소암(ovarian cancer), 발현(expression), 검출(detection), 세포외 소포체(extracellular vesicle)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2020-0002809 A (TORAY INDUSTRIES, INC. et al.) 08 January 2020 (2020-01-08) See abstract; claims 1 and 11; paragraphs [0093], [0094], [0107], [0374], [0377], [0386], [0395], [0941] and [0948]; and SEQ ID NOs: 257, 260 and 269.	1-5,7-11
Y		6
Y	US 2012-0309645 A1 (KELLER, A. et al.) 06 December 2012 (2012-12-06) See claim 1; and paragraphs [0139] and [0206].	6
Y	AZIZ, N. B. et al. MicroRNAs in ovarian cancer and recent advances in the development of microRNA-based biosensors. Analyst. 2020, vol. 145, pp. 1-49. See abstract; and pages 16 and 17.	6
A	KR 10-2022-0052461 A (SOONCHUNHYANG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 28 April 2022 (2022-04-28) See entire document.	1-11
☒ 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 21 August 2023		Date of mailing of the international search report 21 August 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/KR2023/006436

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2021-0110073 A (CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 07 September 2021 (2021-09-07) See entire document.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006436

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/KR2023/006436

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2020-0002809	A	08 January 2020	BR	112019021215	A2	02 June 2020
				CA	3059480	A1	01 November 2018
				CN	110546263	A	06 December 2019
				EP	3628736	A1	01 April 2020
				JP	2022-188256	A	20 December 2022
				JP	7165329	B2	04 November 2022
				US	10975444	B2	13 April 2021
				US	2020-0140956	A1	07 May 2020
				US	2021-0230706	A1	29 July 2021
				WO	2018-199275	A1	01 November 2018
US	2012-0309645	A1	06 December 2012	EP	2354246	A1	10 August 2011
				EP	2531611	A2	12 December 2012
				EP	2531611	B1	28 December 2016
				EP	3202916	A1	09 August 2017
				EP	3202916	B1	01 January 2020
				US	9822416	B2	21 November 2017
				WO	2011-095623	A2	11 August 2011
				WO	2011-095623	A3	01 December 2011
KR	10-2022-0052461	A	28 April 2022	KR	10-2492149	B1	26 January 2023
KR	10-2021-0110073	A	07 September 2021	KR	10-2316507	B1	22 October 2021
				US	2023-0131962	A1	27 April 2023
				WO	2021-172676	A1	02 September 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6886(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6886(2018.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6883(2018.01); C40B 30/04(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: 마이크로RNA(microRNA), 난소암(ovarian cancer), 발현(expression), 검출(detection), 세포외 소포체(extracellular vesicle)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2020-0002809 A (도레이 카부시키가이샤 등) 2020.01.08 요약; 청구항 1, 11; 단락 [0093], [0094], [0107], [0374], [0377], [0386], [0395], [0941], [0948]; 서열번호 257, 260, 269	1-5,7-11
Y		6
Y	US 2012-0309645 A1 (KELLER, A. 등) 2012.12.06 청구항 1; 단락 [0139], [0206]	6
Y	AZIZ, N. B. 등, "MicroRNAs in ovarian cancer and recent advances in the development of microRNA-based biosensors", Analyst, 2020, 145권, 페이지 1-49 초록; 페이지 16, 17	6
A	KR 10-2022-0052461 A (순천향대학교 산학협력단) 2022.04.28 전체 문헌	1-11
A	KR 10-2021-0110073 A (차의과학대학교 산학협력단) 2021.09.07 전체 문헌	1-11
☐ 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 2023년08월21일(21.08.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년08월21일(21.08.2023)
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
KR 10-2020-0002809 A	2020/01/08	BR 112019021215 A2	2020/06/02
		CA 3059480 A1	2018/11/01
		CN 110546263 A	2019/12/06
		EP 3628736 A1	2020/04/01
		JP 2022-188256 A	2022/12/20
		JP 7165329 B2	2022/11/04
		US 10975444 B2	2021/04/13
		US 2020-0140956 A1	2020/05/07
		US 2021-0230706 A1	2021/07/29
		WO 2018-199275 A1	2018/11/01
US 2012-0309645 A1	2012/12/06	EP 2354246 A1	2011/08/10
		EP 2531611 A2	2012/12/12
		EP 2531611 B1	2016/12/28
		EP 3202916 A1	2017/08/09
		EP 3202916 B1	2020/01/01
		US 9822416 B2	2017/11/21
		WO 2011-095623 A2	2011/08/11
		WO 2011-095623 A3	2011/12/01
KR 10-2022-0052461 A	2022/04/28	KR 10-2492149 B1	2023/01/26
KR 10-2021-0110073 A	2021/09/07	KR 10-2316507 B1	2021/10/22
		US 2023-0131962 A1	2023/04/27
		WO 2021-172676 A1	2021/09/02