

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 1월 14일 (14.01.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/006819 A2

- (51) 국제특허분류:
A61B 5/055 (2006.01) *A61K 49/06* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004902
- (22) 국제출원일: 2015년 5월 15일 (15.05.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0086318 2014년 7월 9일 (09.07.2014) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 송호택 (SONG, Ho-Tack); 120-749 서울시 서대문구 연세로 50 연세의료원 세브란스병원 영상의학과, Seoul (KR). 최영숙 (CHOL, Young-suk); 157-897 서울시 강서구 강서로 8길 210, Seoul (KR). 이한솔 (LEE, Hansol); 411-750 경기도 고양시 일산서구 중앙로 1471 1301동 1104호, Gyeonggi-do (KR). 김동현 (KIM, Donghyun); 137-880 서울시 서초구 사임당로 19길 10 102동 703호, Seoul (KR). 이준성 (LEE, Joon-sung); 136-797 서울시 성북구 인촌로 17가길 64 102동 303호, Seoul (KR). 조은혜 (JOE, Eunhae); 120-830 서울시 서대문구 연희로 10가길 9 402호, Seoul (KR). 양승욱 (YANG, Seungwook); 463-922 경기도 성남시 분당구 내정로 165번길 35 526동 201호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 황의만 (HWANG, Euy Man); 135-965 서울시 강남구 개포로 31길 9-8 만성빌딩 만성국제특허법률사무소, Seoul (KR).

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

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

공개:

— 조약 제 17조(2)(a)에 의한 선언서와 함께; 요약서 없이 공개함; 발명의 명칭에 대하여 국제조사기관의 검토가 없었음

(54) Title: METHOD FOR PREDICTING TREATMENT PROGNOSIS OF CANCER PATIENT USING 13C MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPIC IMAGING

(54) 발명의 명칭: 13C-자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법

(57) Abstract:

(57) 요약서:



WO 2016/006819 A2

명세서

발명의 명칭: 13C-자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 13C-자기공명분광영상을 이용하여 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 암 치료 전후에 대상체로부터 획득한 13C-피루베이트와 대사물질인 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상을 이용하여 13C-피루베이트의 13C-락테이트로의 대사전환비율을 계산하고 이로부터 암 환자의 치료 효과를 판단하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 질병의 조기 검출은 발병 시부터 치료학적 치료를 가능하게 하여 성공적인 치료를 가능하게 한다. 암을 진단하고 치료하는 것이 빠르면 빠를수록, 약물치료에 있어 최적의 프로세스를 가능하게 하고, 생존 가능성을 높인다. 암의 검출을 위한 모든 공지된 방법은 대부분 악성 조직 및/또는 순환계에 분비된 그의 병리학적 암 바이오마커(biomarkers)를 확인하는데 초점을 맞추고 있다. 그러나, 이러한 진단 방법은 질병이 비교적 진행된 단계에서만 효과적이어서 문제된다. 1920년대에 오토 와버그 (Otto Warburg)는, 정상 분화 세포와 대조적으로 암 세포는 주로 미토콘드리아 산화적 포스포릴화가 아니라 호기성 해당작용에 의존하여 세포 과정에 필요한 에너지를 위한 에너지로서 ATP를 생성시킨다는 것을 발견하였다. 이러한 역사적 현상을 "와버그 효과 (Warburg effect)"라 칭하였다. 오토 와버그는 대사에 있어서의 이러한 변화가 암의 근본적 원인이라고 주장하였으며, 이 주장은 현재 와버그 가설 (Warburg hypothesis)로 알려져 있다. 현재 암의 치료 반응을 진단 및 모니터링하기 위하여, 양전자 방사 단층촬영(PET)에 의해서 악성 종양에 의한 고 호기성 해당작용에 따라 방사성의 변형된 핵소키나제 기질의 흡수를 영상화하는 방법이 임상적으로 이용된다. 이러한 방법은 최첨단 시설 또는 인시츄 조직생검 (in-situ tissue biopsies)을 필요로 함으로써 번잡하며, 비용이 많이 든다. 따라서, 조기의 간단한 진단을 위한 비침습적 방법이 요구되어져왔다.
- [3] 자기공명영상법은 비침습적이고 조기 진단을 가능하게 한다. 일반적으로 임상진단에 사용되는 자기공명영상은 생체내부의 해부학적 구조를 생체를 구성하는 수소(¹H) 원소의 신호를 검출하여 영상화한다. 암진단에 있어 이러한 해부학적 영상진단은 필수불가결한 요소로 자리잡았다. 그러나 최근 분자치료제의 개발 등 개별화 맞춤 치료의학이 발달함에 따라 해부학적 영상진단 만으로는 항암치료의 치료효과나 환자치료의 예후를 판단하는데 어려움에 직면하게 되면서 암세포의 물질대사를 영상화 할 수 있는 영상진단법의 필요성이 대두하였다. 자기공명영상을 사용한 물질대사 측정

기술은 ^{13}C 원소로 표지된 기질(substrate)과 대사체(metabolite)의 핵자기공명분광영상(nuclear magnetic resonance spectroscopic imaging)에 기반을 둔다. 그러나 자연계에 ^{13}C 원소는 1.1%만 존재하므로 민감도가 매우 낮아 ^{13}C 원소의 신호증폭을 위해 DNP(dynamic nuclear polarization)방법에 의한 초분극화(hyperpolarization)기술이 사용된다. 초분극화는 1953 년 알버트 오버하우저(Albert Overhauser) 에 의해 처음으로 제안된 핵오버하우저효과(Nuclear Overhauser Effect, NOE)에 기반하는데 절대온도 2-4도 극저온의 유리고체상태(glassy state)에서 극초단파(microwave)를 조사하면 비쌍전자(unpaired electron)을 가진 radical의 분극화 상태가 ^{13}C 원소의 핵스핀으로 전이되는 현상(polarization transfer)이다. 이를 통해 온도평형(thermal equilibrium) 상태가 초분극화평형(hyperpolarized equilibrium)상태로 전이되어 약 10,000 배의 자기공명 신호강도 증가 효과가 나타나 민감도가 비약적으로 증가하게 된다.

- [4] 초분극화된 ^{13}C -피루베이트를 기질로 이용하는 물질대사 자기공명영상은 방사능 피폭 없이 암세포에서 증가되어 있는 당대사를 표적으로 하여 ^{13}C -락테이트의 생성을 정량적으로 검출함으로써 암세포에서 증가된 당 대사를 영상화 한다. 이에 따라, 암 치료 전후에 자기공명영상을 획득하고, 이로부터 얻어진 대사전환율을 이용하여, 암의 치료 효과를 판단하는 방법에 관한 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은, 영상획득시간이 비교적 짧은 비방사성 동위원소인 ^{13}C (탄소-13)의 자기공명분광영상을 이용하여 방사선 피폭 없이 비침습적으로 생체 내 물질대사를 측정함에 있다.
- [6] 또한, ^{13}C -자기공명분광영상을 이용하여 실시간으로 정량적인 물질대사 양을 획득함으로써 암 치료 효과를 객관적으로 판단하는 방법을 제공함에 있다.
- [7] 또한, 암 치료 전후에 획득한 영상으로부터 산출한 대사전환율과 대응하는 생존일 데이터에 의하여 정량적이고 객관적으로 치료 효과를 판단할 수 있도록 함에 있다.
- [8] 또한, 암 치료가 이루어지는 기간 중 조기에 치료 효과를 판단하게 됨으로서, 암 환자로 하여금 최적의 치료를 받을 수 있도록 하여 치료 효율을 높이고, 암 치료를 위한 의료비용을 절감함에 있다.

과제 해결 수단

- [9] 전술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 따른 ^{13}C -자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법은, 초분극화된 ^{13}C -피루베이트(pyruvate)를 포함하는 조성물이 주사된 대상체로부터 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -자기공명분광영상 및 상기 ^{13}C -피루베이트의

대사물질인 13C-락테이트(lactate)의 13C-자기공명분광영상을 획득하는 제 1단계; 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적으로 나눈 13C-대사전환비율(R_1)을 계산하는 제 2단계; 암 치료가 수행된 상기 대상체로서, 초분극화된 13C-피루베이트를 포함하는 조성물이 주사된 대상체로부터 13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상 및 상기 13C-피루베이트의 대사물질인 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상을 획득하는 제 3단계; 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적으로 나눈 13C-대사전환비율(R_2)을 계산하는 제 4단계; 및 상기 제 2단계에서 얻어진 13C-대사전환비율(R_1)을 상기 제 4단계에서 얻어진 13C-대사전환비율(R_2)로 나눈 전환비율증감율(R_3)에 기초하여 암 환자의 치료 효과를 판단하는 제 5단계로 이루어진다.

- [10] 이 때, 상기 제 1단계 또는 상기 제 3단계는, 상기 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상의 신호곡선에 5배를 곱하여 보정하는 것을 특징으로 한다.
- [11] 이 때, 상기 초분극화된 13C-피루베이트를 포함하는 조성물은, 13C-피루브산에 트리틸 라디칼(trityl radical)을 혼합하고, DNP(dynamic nuclear polarization)방법에 의하여 일정시간 동안 초분극화시킨 후, 완충액으로 용해시킴으로써 얻어지는 것을 특징으로 한다.
- [12] 이 때, 상기 제 1단계 또는 상기 제 3단계에서 획득하는 13C-자기공명분광영상은, 상기 13C-피루베이트를 포함하는 조성물을 주사한 후 180초 경과되기 전까지 획득하는 것을 특징으로 한다.
- [13] 이 때, 상기 제 5단계는, 상기 전환비율증감율(R_3)을 암 치료가 행해지지 않은 대조군의 전환비율증감율(C_3)과 비교하여 치료효과를 판단하는 것을 특징으로 한다.
- [14] 이 때, 상기 제 5단계는, 상기 전환비율증감율(R_3)이 암 치료가 행해지지 않은 대조군의 전환비율증감율(C_3)보다 작을 때 치료효과가 있다고 판단하는 것을 특징으로 한다.
- [15] 이 때, 상기 제 5단계는, 상기 전환비율증감율(R_3)이 1 이상인 경우 치료효과가 없다고 판단하고, 상기 전환비율증감율(R_3)이 1 미만인 경우 치료효과가 있다고 판단하는 것을 특징으로 한다.
- [16] 이 때, 상기 제 5단계는, 상기 전환비율증감율(R_3)과 대응하는 기 측정된 생존일(S)에 기초하여 치료효과를 판단하는 것을 특징으로 한다.
- [17] 이 때, 상기 제 5단계는, 상기 전환비율증감율(R_3)과 대응하는 기 측정된 생존일(S)에 기초하여 치료효과의 등급을 결정하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [18] 본 발명에 따르면, 영상획득시간이 비교적 짧은 비방사성 동위원소인 13C(탄소-13)의 자기공명분광영상을 이용하여 방사선 피폭 없이 비침습적으로 생체 내 물질대사를 측정하는 효과가 있다.
- [19] 또한, 13C-자기공명분광영상을 이용하여 실시간으로 정량적인 물질대사 양을 획득함으로써 암 치료 효과를 객관적으로 판단하는 효과가 있다.
- [20] 또한, 암 치료 전후에 획득한 영상으로부터 산출한 대사전환율과 대응하는 생존일 데이터에 의하여 정량적이고 객관적으로 치료 효과를 판단하는 효과가 있다.
- [21] 또한, 암 치료가 이루어지는 기간 중 초기에 치료 효과를 판단하게 됨으로서, 암 환자로 하여금 최적의 치료를 받을 수 있도록 하여 치료 효율을 높이고, 암 치료를 위한 의료비용을 절감하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 본 발명에 따른 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법의 각 단계를 나타낸 흐름도이다.
- [23] 도 2는 도 1에 도시된 S100 단계에서 얻어지는 자기공명분광영상으로서, 상기 초분극화된 13C-피루베이트를 포함하는 조성물이 주사된 대상체로부터 획득한 13C-피루베이트와 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상이다.
- [24] 도 3은 도 2에 도시된 13C-피루베이트와 13C-락테이트의 자기공명분광영상으로부터 획득한 시간 영역에서의 신호 곡선이다.
- [25] 도 4는 대상체에 방사선 치료를 수행하기 전과 후 각각의 경우, 도 3에 도시된 13C-피루베이트의 신호 곡선과 13C-락테이트의 신호 곡선으로부터 1초단위로 계산된 13C-대사전환비율의 분포를 나타낸 도면이다.
- [26] 도 5는 암 치료가 수행되지 않은 대상체의 경우, 13C-피루베이트의 신호 곡선과 13C-락테이트의 신호 곡선으로부터 1초단위로 계산된 계산된 13C-대사전환비율의 분포를 나타낸 도면이다.
- [27] 도 6은 본 발명에 따른 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법의 일 실시예로서, 전환비율증감율(R_3)이 1 이상인 경우와 1 미만인 경우의 치료효과를 판단하기 위한 예시를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [28] 이하에는, 본 발명의 바람직한 실시예를 상세하게 설명하되, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있을 정도로 상세하게 설명하기 위한 것이지, 이로 인해 본 발명의 기술적인 사상 및 범주가 한정되는 것을 의미하지는 않는다.
- [29]
- [30] 도 1은 본 발명에 따른 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법의 각 단계를 나타낸 흐름도이다.
- [31] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법은

초분극화된 ^{13}C -피루베이트(pyruvate)를 포함하는 조성물이 주사된 대상체로부터 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -자기공명분광영상 및 상기 ^{13}C -피루베이트의 대사물질인 ^{13}C -락테이트(lactate)의 ^{13}C -자기공명분광영상을 획득한다(S100, 제 1단계). 상기 S100 단계 이후에, ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적으로 나눈 ^{13}C -대사전환비율(R_1)을 계산한다(S200, 제 2단계). 상기 S200 단계 이후에, 암 치료가 수행된 상기 대상체로서, 초분극화된 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 조성물이 주사된 대상체로부터 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -자기공명분광영상 및 상기 ^{13}C -피루베이트의 대사물질인 ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상을 획득한다(S300, 제 3단계). 상기 S300 단계 이후에, ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적으로 나눈 ^{13}C -대사전환비율(R_2)을 계산한다(S400, 제 4단계). 상기 S400 단계 이후에, 상기 S200 단계에서 얻어진 ^{13}C -대사전환비율(R_1)을 상기 S400 단계에서 얻어진 ^{13}C -대사전환비율(R_2)로 나눈 전환비율증감율(R_3)에 기초하여 암 환자의 치료 효과를 판단한다(S500, 제 5단계). 이하에서는, 도 2 내지 도 6을 참조하여 본 발명에 따른 암 환자의 치료 여부를 예측하는 방법의 각 단계를 상세하게 설명한다.

[32]

[33] 도 2는 도 1에 도시된 S100 단계에서 얻어지는 자기공명분광영상으로서, 상기 초분극화된 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 조성물이 주사된 대상체로부터 획득한 ^{13}C -피루베이트와 ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상이다.

[34] ^{13}C -피루베이트와 ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상을 획득하기 위하여 먼저, 초분극화된 ^{13}C -피루베이트(pyruvate)를 포함하는 조성물을 준비한다.

[35] ^{13}C -피루베이트의 초분극화는, 동위원소가 농축된 ^3He , ^{129}Xe 또는 이러한 희기체(noble gas)의 혼합물을 사용하거나, 매우 낮은 온도 및 높은 자기장에서 열역학적 평형에 의해 NMR 활성 핵으로 나누는 방법에 의하거나, 상자성 물질을 혼합한 후 자기장 내에서 물리적으로 회전시킴으로서 핵 스핀 편극화시키거나, 또는 DNP(동적 핵 분극화, dynamic nuclear polarization)을 통해 이루어질 수 있다. 즉, 초분극화된 ^{13}C -피루베이트를 얻기 위해 ^{13}C -피루베이트를 직접 분극화시키거나, 또는 ^{13}C -피루브산을 분극화시킨 후 염기로 중화시킴으로서, 분극화된 ^{13}C -피루브산(pyruvic acid)을 분극화된 ^{13}C -피루베이트로 전환시킬 수 있다.

[36] 본 발명에서는 초분극화된 ^{13}C -피루베이트를 얻기 위하여 DNP방법을 이용한다. ^{13}C -피루베이트의 DNP는, 분극화될 화합물로서 ^{13}C -피루브산에 상자성 화합물을 혼합한 후, 마이크로파 방사선 형태의 에너지를 가하여 상자성 화합물을 여기시키고, 상자성 화합물의 쌍을 이루지 않은 전자로부터 ^{13}C -피루브산의 ^{13}C 의 핵으로 분극화가 이동함으로써 이루어진다. 상기

^{13}C -피루브산은 Cambridge isotope laboratories의 제품으로서 CLM-8077-1이 사용될 수 있다. 상기 상자성 화합물로는 전이 금속, 유리 라디칼, 니트록시드 라디칼 등이 사용될 수 있고, 바람직하게는 트리틸 라디칼(trityl radical)이 사용될 수 있으며, 이 때, 상기 트리틸 라디칼을 피루브산에 용해시키기 위한 공용매로서 물을 사용할 수 있다. DNP 공정에서 혼합되는 ^{13}C -피루브산과 상자성 화합물의 물분율 비율은 5:1 임이 바람직하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. DNP 공정은 분극화가 이루어지기 위하여, 1T 내지 25T의 자기장 및 0.5K 내지 8K의 온도에서 이루어지고, 바람직하게는 1T의 자기장 및 4K의 초저온에서 이루어질 수 있다. 상기 ^{13}C -피루브산을 분극화시키는 초분극장비는 하이퍼센스(HyperSense)를 이용할 수 있다.

- [37] 고체 상태의 ^{13}C -피루브산은 염기가 첨가된 완충액에 용해됨으로서 액체 상태의 ^{13}C -피루베이트로 전환되는데, 이 때 완충액으로는 인산염 완충액이 사용될 수 있고 바람직하게는 트리스(Tris)가 사용될 수 있으며, 염기로는 탄산나트륨(Na_2CO_3)수용액 또는 탄산수소나트륨(NaHCO_3)수용액이 사용될 수 있고 바람직하게는 수산화나트륨(NaOH)수용액이 사용될 수 있다. 이 때, 완충액에는 EDTA와 같은 킬레이팅제 및 삼투압을 유지하기 위한 염화나트륨(NaCl)이 포함될 수 있다.
- [38] 상술한 방법에 의하여 초분극화된 ^{13}C -피루베이트는 75% 이상으로 동위원소가 농축되고, 바람직하게는 90% 이상의 동위 원소가 농축된다. 그리고 ^{13}C -피루베이트를 포함한 조성물은 상기 ^{13}C -피루베이트를 주성분으로 하며, 안정화제, 삼투압 조절제, 가용화제를 포함할 수 있다.
- [39] 본 발명에서는 75mM의 ^{13}C -피루브산을 15mM의 트리틸 라디칼(GE Healthcare사의 OX063 제품)과 혼합하여 용해시킨 후, 4K 온도에서 60분간 초분극화 과정을 수행하였다. 이후에, 1M Tris-HCl, 1M NaCl, 2g/L EDTA, 1M NaOH 조성의 180°C 3.6ml 완충액으로 용해 시킨 후 37°C로 냉각하였다.
- [40] ^{13}C -자기공명분광영상을 획득하기 위하여, 치료 효과를 예측하기 위한 대상체로서 살아있는 인간 또는 인간 이외의 동물을 자기공명분광기의 자석에 위치시킨 후, ^{13}C -자기공명 RF-코일이 대상체 내 종양이 위치한 영역을 덮도록 위치시킨다. 다음으로, 초분극화된 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 조성물을 종양을 가지고 있는 대상체에 주사한다. 본 발명에서는 대상체로서, 유방암 세포를 뇌의 조직에 주입한 후 2주가 경과한 누드마우스(nude mouse)에 주사하였다. 이 때, 상기 초분극화된 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 조성물을 대상체의 혈관을 통해 약 10ml/s의 속도로 주사할 수 있다. 주사한 후 180초 경과하기 전까지 대상체 내 종양으로부터 도 2에 도시된 ^{13}C -자기공명분광영상(Averaged Spectrum)을 획득한다(제 1단계, S100). 이 때, RF-펄스를 가하여 얻어지는 자기공명 신호에 대하여 자기공명영상화 연쇄를 적용하여 종양의 부피를 인코딩하고, 종양의 부피에 해당하는 ^{13}C -자기공명분광영상을 획득한다. ^{13}C -자기공명영상을 스펙트럼으로

영상화하기 위한 방법으로, ^{13}C -피루베이트와 ^{13}C -락테이트의 자기공명분광영상에서 신호강도의 최대값으로 표준화시킬 수 있고, 기선(base line)과 전역 0차 위상보정(Global zero order phasing) 한 뒤, 각 대사물질의 신호 곡선의 최대값이 포함되도록 주파수 영역을 선택할 수 있다. 이로부터 ^{13}C -자기공명분광영상의 데이터는 도 2에 도시된 ^{13}C -자기공명분광 형태로 나타내지며, ^{13}C -피루베이트 및 ^{13}C -락테이트는 기 알려진 각각의 공명주파수에 따라 독특한 스펙트럼을 나타내고, 분광주파수에서 신호강도의 최대값을 나타낸다.

[41] ^{13}C -자기공명분광영상을 검출하기 위하여 ^{13}C -자기공명 RF-코일이 사용되는데 이 때, ^{13}C -자기공명 RF-코일은 영상부위에 최적화된 ^{13}C -자기공명 RF-코일이 사용될 수 있고, 본 발명에서는 직경 20mm의 ^{13}C 듀얼 튠 서페이스 트랜스미트/리시브 코일(dual-tuned surface transmit/receive coil)을 사용하였으나 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[42]

[43] 도 3은 도 2에 도시된 ^{13}C -피루베이트와 ^{13}C -락테이트의 자기공명분광영상으로부터 획득한 시간 영역에서의 신호 곡선이다.

[44] 도 3을 참조하면, ^{13}C -피루베이트의 신호강도의 최대값이 나타난 이후에 ^{13}C -락테이트의 신호강도의 최대값이 나타난다. 종양세포는 '와버그 효과'(Warburg effect)로 알려진 바와 같이, 산소의 이용성과 관계없이 세포질에서의 해당과정(glycolysis)이 증가되어 있고, 세포 내에서 피루베이트에서 락테이트로의 대사전환이 매우 활발하게 일어나게 된다. ^{13}C -자기공명분광영상으로부터 획득한 시간 영역에서의 신호 곡선(Dynamic curve)은 종양세포를 가지고 있는 대상체에 주사된 ^{13}C -피루베이트가 LDH 효소(lactate dehydrogenase, 락트산탈수소 효소)에 의한 대사과정을 통해 ^{13}C -락테이트로 전환된 결과를 보여준다. 이로부터 암 세포의 활성지표로서 피루베이트에서 락테이트로의 대사전환율이 활용될 수 있음을 알 수 있다.

[45] S100 단계에서 획득한 ^{13}C -피루베이트와 ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상에 대하여 영상신호처리기술을 이용하여 시간 영역에서의 각 대사물질의 신호 곡선 데이터를 획득한다. 신호 곡선을 보정하기 위하여, ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선에 기 설정된 배수를 곱하여 신호 곡선을 보정한다. 이 때, 기 설정된 배수는 도 3에 나타난 바와 같이 5배임이 바람직하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[46]

[47] 상기 S100 단계 이후에, 보정된 ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적으로 나눈 ^{13}C -대사전환비율(R_1)을 계산한다(제 2단계, S200). 이 때, ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적은 신호 곡선 아래의 영역에 대한 면적이고, 이 때 시간은 0초에서 180초임이 바람직하고, 더욱 바람직하게는

10초에서 50초 사이로 설정할 수 있다. 이 때, 13C-대사전환비율(R_1)은 13C-피루베이트의 양에 대한 그의 대사물질인 13C-락테이트로 전환된 양의 비율으로서, 값이 클수록 암 세포가 활성화되어있음을 의미하게 되고, 암 세포의 활성지표로 이용된다.

[48]

[49] 상기 제 2단계 이후에, 대상체에 대하여 암 치료를 수행한 후, 상기 대상체에 초분극화된 13C-피루베이트를 포함하는 조성물이 주사된 대상체로부터 13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상 및 상기 13C-피루베이트의 대사물질인 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상을 획득하고(제 3단계, S300), 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적으로 나눈 13C-대사전환비율(R_2)을 계산한다(제 4단계, S400). 이 때, 대상체에 대해 수행되는 암 치료는 방사능 치료일 수 있고 이 외에 다양한 암을 치료하기 위한 방법이 수행될 수 있다. 본 발명에서는 X-Rad 320 방사선 장비를 이용하여 누드마우스의 머리부위에 국한하여 방사선 치료를 수행하였고, 구체적으로 300kV, 12.5mA의 강도로 3그레이(Gy)의 방사선을 5일 동안 조사하였으며, S100 단계 및 S200 단계를 수행한 시점으로부터 1주일이 경과한 후에 S300 단계 및 S400 단계를 수행하였다.

[50]

[51] 상기 S400 단계 이후에, 상기 S200 단계에서 얻어진 13C-대사전환비율(R_1)을 상기 S400 단계에서 얻어진 13C-대사전환비율(R_2)로 나눈 전환비율증감율(R_3)에 기초하여 암 환자의 치료 효과를 판단한다(제 5단계, S500). 치료 효과를 판단하기 위하여, 암 치료 전 대상체의 피루베이트에서 락테이트로의 대사전환비율(R_1)을 암 치료가 수행된 대상체의 피루베이트에서 락테이트로의 대사전환비율(R_2)를 비교하는데, 이 때 전환비율증감율(R_3)을 이용한다. 전환비율증감율(R_3)은 치료 전 대사전환비율(R_1)에 대한 치료 후 대사전환비율(R_2)의 비로서, 값이 작을수록 치료 효과가 있음을 의미한다.

[52] 전환비율증감율(R_3)이 1 이상인 경우, 치료 후 대사전환비율(R_2)이 치료 전 대사전환비율(R_1)에 비하여 증가하였으므로 치료효과가 없다고 판단할 수 있고, 전환비율증감율(R_3)이 1 미만인 경우, 치료 후 대사전환비율(R_2)이 치료 전 대사전환비율(R_1)에 비하여 감소하였으므로 치료효과가 있다고 판단할 수 있다.

[53] 전환비율증감율(R_3)에 기초하여 암 환자의 치료 효과를 판단하기 위한 다른 실시예로서, 암 치료가 행해지지 않은 대조군의 전환비율증감율(C_3)과 비교하여 치료효과를 판단할 수 있다. 암 치료가 행해지지 않는 대조군으로부터 획득한 13C-자기공명분광영상에 대하여, 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적으로 나눈 13C-대사전환비율(C_1)을 계산한다. 암 치료가 수행된 대상체의 경우와 동일한 기간이 경과한 후, 암 치료가 행해지지 않은 대조군으로부터 획득한

13C-자기공명분광영상에 대하여, 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적으로 나눈 13C-대사전환비율(C_2)을 계산한다. 기간 경과 후 얻어진 13C-대사전환비율(C_2)을 기간 경과 전 얻어진 13C-대사전환비율(C_1)로 나눈 13C-전환비율증감율(C_3)을 암 치료가 수행된 대상체의 전환비율증감율(R_3)과 비교하여 치료 효과를 판단한다. 이 때, 암 치료가 수행된 대상체의 전환비율증감율(R_3)이 암 치료가 행해지지 않은 대조군의 전환비율증감율(C_3)보다 작을 때($R_3 < C_3$), 치료효과가 있다고 판단할 수 있고, 암 치료가 수행된 대상체의 전환비율증감율(R_3)이 암 치료가 행해지지 않은 대조군의 전환비율증감율(C_3)과 같거나 암 치료가 행해지지 않은 대조군의 전환비율증감율(C_3)보다 클 때($R_3 \geq C_3$), 치료효과가 없다고 판단할 수 있다. 대조군의 13C-전환비율증감율(C_3)을 계산하기 위하여, 통계학적으로 유의한 수의 환자에 대하여, 13C-자기공명분광영상을 획득하는 것이 바람직하며, 이에 기초한 평균 13C-전환비율증감율(C_3)을 이용하여 치료 효과를 판단하는 것이 바람직하다.

[54]

[55] 도 4는 대상체에 방사선 치료를 수행하기 전과 후 각각의 경우, 도 3에 도시된 13C-피루베이트의 신호 곡선과 13C-락테이트의 신호 곡선으로부터 1초단위로 계산된 13C-대사전환비율의 분포를 나타낸 도면이고, 도 5는 암 치료가 수행되지 않은 대상체의 경우, 13C-피루베이트의 신호 곡선과 13C-락테이트의 신호 곡선으로부터 1초단위로 계산된 계산된 13C-대사전환비율의 분포를 나타낸 도면이다.

[56] 도 4를 참조하면, 대상체에 방사선 치료를 수행하기 전과 후 각각의 경우, 13C-피루베이트를 주입한 후 10초에서 50초 사이에 각 1초마다의 13C-대사전환비율을 계산하여 그 분포를 나타내었다. 여기서 13C-대사전환비율(Lactate/Pyruvate ratio)이란 각 1초마다의 13C-락테이트의 신호를 13C-피루베이트의 신호로 나눈 값으로서, 본 발명의 S200 단계에서 얻어지는 13C-피루베이트 신호 곡선의 면적에 대한 13C-락테이트의 신호 곡선의 면적의 비율인 13C-대사전환비율(R_1 , R_2)과 표시하는 방식이 다르다. 방사선 치료를 수행하기 전 대상체의 각 초에서의 13C-대사전환비율은 파란색 곡선(Pre-treatment)에 해당하고, 방사선 치료를 수행한 후 대상체의 각 초에서의 13C-대사전환비율은 빨간색 곡선(Post-treatment)에 해당한다. 도 5를 참조하면, 암 치료가 수행되지 않은 대조군에 대하여, 암 치료가 수행된 대상체의 경우와 동일한 기간이 경과하기 전과 후 각각의 경우, 13C-피루베이트를 주입한 후 10초에서 50초 사이에 각 1초마다의 13C-대사전환비율을 계산하여 그 분포를 나타내었다. 상기 동일한 기간이 경과하기 전 대상체의 각 초에서의 13C-대사전환비율은 파란색 곡선(Pre-treatment)에 해당하고, 상기 동일한 기간이 경과한 후 대상체의 각 초에서의 13C-대사전환비율은 빨간색

곡선(Post-treatment)에 해당한다. 도 4 및 도 5로부터 방사선 치료가 행해지지 않은 대조군의 경우, 상기 동일한 기간 경과 전과 후에 ^{13}C -대사전환비율의 차이가 없거나 소폭 증가한 반면, 방사선 치료가 수행된 대상체의 경우 치료 전보다 치료 후에 ^{13}C -대사전환비율이 감소하였음을 확인할 수 있다.

[57]

[58] 도 6은 본 발명에 따른 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법의 일 실시예로서, 전환비율증감율(R_3)이 1 이상인 경우와 1 미만인 경우의 치료효과를 판단하기 위한 예시를 나타낸 도면이다.

[59] 도 6을 참조하면, 전환비율증감율(R_3)이 1 이상인 경우 생존일(S)이 40일 내지 60일로서 치료효과가 없음을 확인할 수 있고, 전환비율증감율(R_3)이 1 미만인 경우 생존일이 50일 내지 90일로서 치료효과가 있음을 알 수 있다. 상술한 바와 같공한다.

[60]

[61] 본 발명에 따른 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법의 다른 실시예로서, 전환비율증감율(R_3)에 대응하는 기 측정된 생존일(S)에 따라 치료효과의 등급을 결정하기 위한 예시를 하기의 표 1에 나타내었다.

[62] 표 1

[표1]

전환비율증감율(R_3)	생존일(S)	치료 효과 등급
0.2 이상 0.4 미만	80일	1등급
0.4 이상 0.6 미만	75일	2등급
0.6 이상 0.8 미만	70일	3등급
0.8 이상 1 미만	65일	4등급

[63]

[64] 상기 표 1에서와 같이, 특정 유형의 암을 가진 통계학적으로 유의한 수의 환자군에 대하여, 본 발명의 S100 단계 내지 S400 단계를 수행한 후, 환자군의 생존일(S)을 측정하고 이에 따라, 암 치료가 수행된 환자군의 전환비율증감율(R_3)과 생존일(S)이 서로 대응되는 데이터를 생성한다. 이 때, 생존일(S)은 당업계에 공지된 통계학적 방법에 의해 환자군의 평균 생존일을 나타낼 수 있다. 이후에, 치료 효과를 판단하고자 하는 대상체로부터 전환비율증감율(R_3)을 획득하고, 상기 데이터에 기초하여 전환비율증감율(R_3)과 대응하는 생존일(S)로부터 치료 효과를 판단한다. 이 때, 생존일(S)은 치료 효과를 판단하기 위한 지표로서, 대상체의 생존일(S)을 예측하는 데 사용될 수 있다. 경우에 따라, 기 측정된 생존일(S)에 따라 치료 효과의 등급을 나누고, 대상체의 예측되는 생존일(S)에 따라 치료 효과의 등급을 결정할 수 있다. 상기 표 1에서와 같이, 대상체의 전환비율증감율(R_3)이 0.5인 경우 생존일(S)은 75일로 예측할 수 있고, 치료

등급은 2등급으로 결정할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 치료 효과의 등급을 1등급 내지 4등급으로 나누었으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[65]

[66] 이상 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있으므로 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 의해 한정되는 것이 아니다.

청구범위

- [청구항 1] 초분극화된 ^{13}C -피루베이트(pyruvate)를 포함하는 조성물이 주사된 대상체로부터 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -자기공명분광영상 및 상기 ^{13}C -피루베이트의 대사물질인 ^{13}C -락테이트(lactate)의 ^{13}C -자기공명분광영상을 획득하는 제 1단계;
 ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적으로 나눈 ^{13}C -대사전환비율(R_1)을 계산하는 제 2단계;
 암 치료가 수행된 상기 대상체로서, 초분극화된 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 조성물이 주사된 대상체로부터 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -자기공명분광영상 및 상기 ^{13}C -피루베이트의 대사물질인 ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상을 획득하는 제 3단계;
 ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적으로 나눈 ^{13}C -대사전환비율(R_2)을 계산하는 제 4단계; 및
 상기 제 2단계에서 얻어진 ^{13}C -대사전환비율(R_1)을 상기 제 4단계에서 얻어진 ^{13}C -대사전환비율(R_2)로 나눈 전환비율증감율(R_3)에 기초하여 암 환자의 치료 효과를 판단하는 제 5단계로 이루어진 ^{13}C -자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
 상기 제 1단계 또는 상기 제 3단계는,
 상기 ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -자기공명분광영상의 신호곡선에 5배를 곱하여 보정하는 것을 특징으로 하는 ^{13}C -자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
 상기 초분극화된 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 조성물은,
 ^{13}C -피루브산에 트리틸 라디칼(trityl radical)을 혼합하고, DNP(dynamic nuclear polarization)방법에 의하여 일정시간 동안 초분극화시킨 후, 완충액으로 용해시킴으로써 얻어지는 것을 특징으로 하는 ^{13}C -자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
 상기 제 1단계 또는 상기 제 3단계에서 획득하는 ^{13}C -자기공명분광영상은,
 상기 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 조성물을 주사한 후 180초 경과되기 전까지 획득하는 것을 특징으로 하는 ^{13}C -자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서,

상기 제 5단계는,
 상기 전환비율증감율(R_3)을 암 치료가 행해지지 않은 대조군의
 전환비율증감율(C_3)과 비교하여 치료효과를 판단하는 것을 특징으로
 하는 ^{13}C -자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료 예후를 예측하는
 방법.

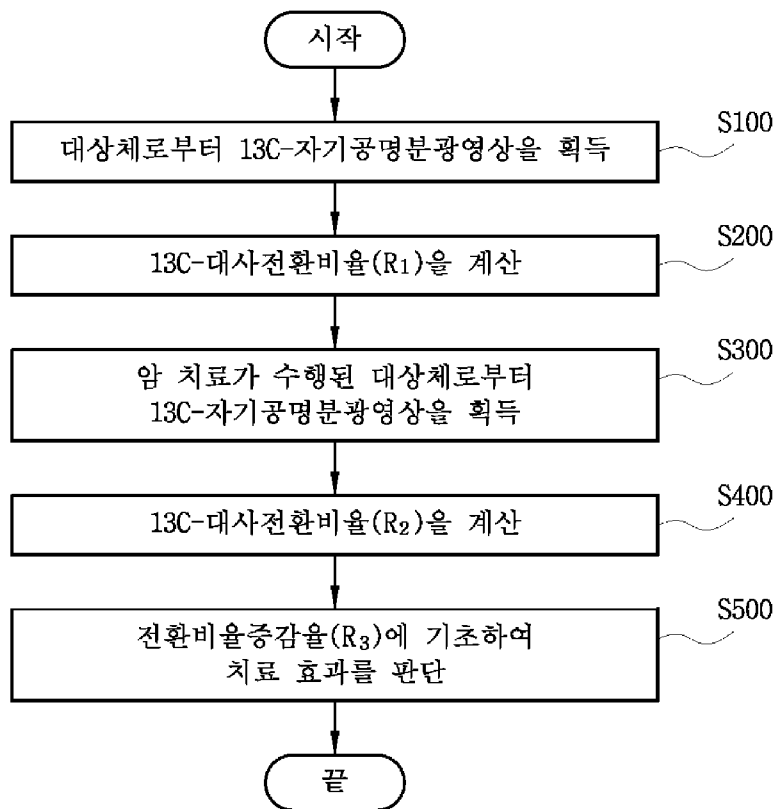
[청구항 6] 제 5항에 있어서,
 상기 제 5단계는,
 상기 전환비율증감율(R_3)이 암 치료가 행해지지 않은 대조군의
 전환비율증감율(C_3)보다 작을 때 치료효과가 있다고 판단하는 것을
 특징으로 하는 ^{13}C -자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료 예후를
 예측하는 방법.

[청구항 7] 제 1항에 있어서,
 상기 제 5단계는,
 상기 전환비율증감율(R_3)이 1 이상인 경우 치료효과가 없다고 판단하고,
 상기 전환비율증감율(R_3)이 1 미만인 경우 치료효과가 있다고 판단하는
 것을 특징으로 하는 ^{13}C -자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료
 예후를 예측하는 방법.

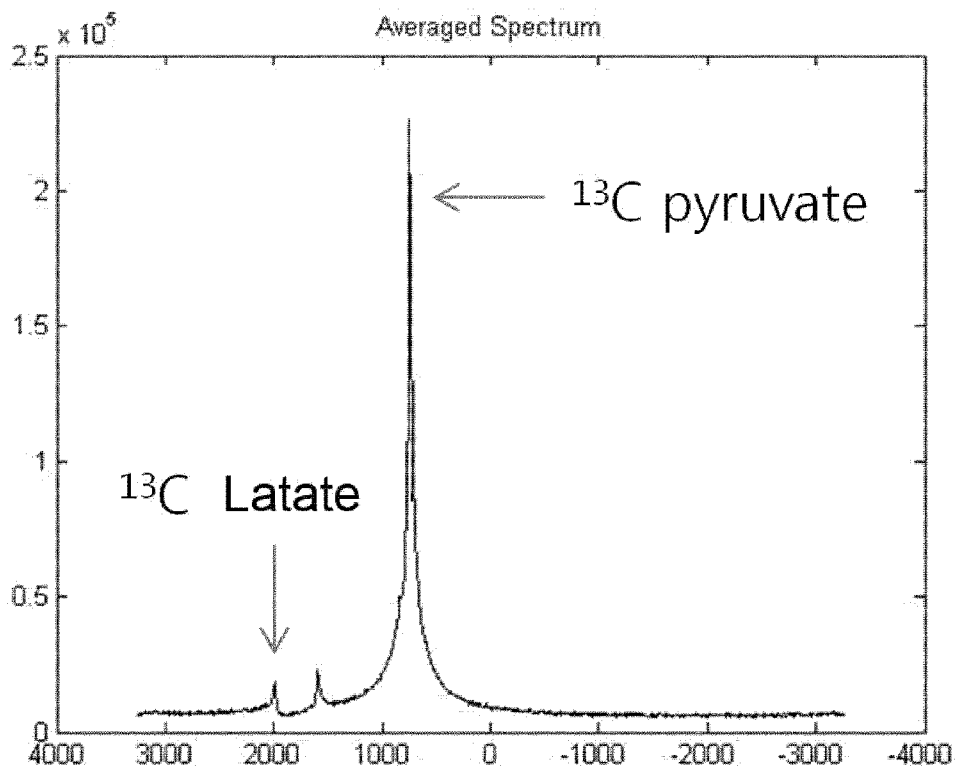
[청구항 8] 제 1항에 있어서,
 상기 제 5단계는,
 상기 전환비율증감율(R_3)과 대응하는 기 측정된 생존일(S)에 기초하여
 치료효과를 판단하는 것을 특징으로 하는 ^{13}C -자기공명분광영상을
 이용한 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법.

[청구항 9] 제 8항에 있어서,
 상기 제 5단계는,
 상기 전환비율증감율(R_3)과 대응하는 기 측정된 생존일(S)에 기초하여
 치료효과의 등급을 결정하는 것을 특징으로 하는
 ^{13}C -자기공명분광영상을 이용한 암 환자의 치료 예후를 예측하는 방법.

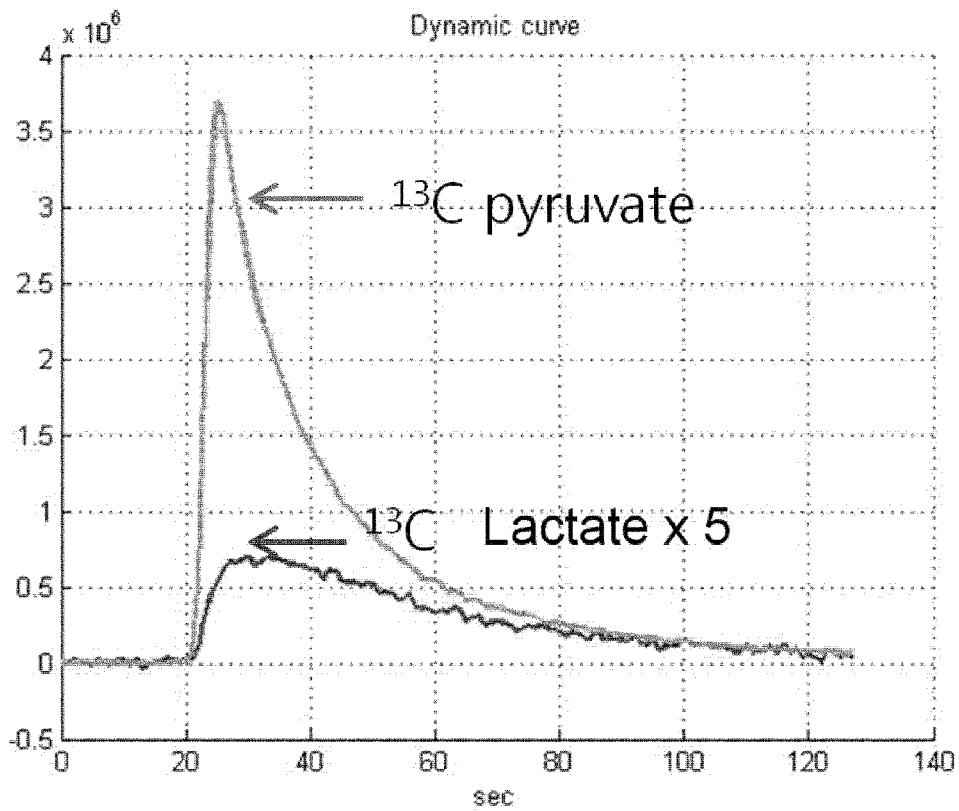
[도1]



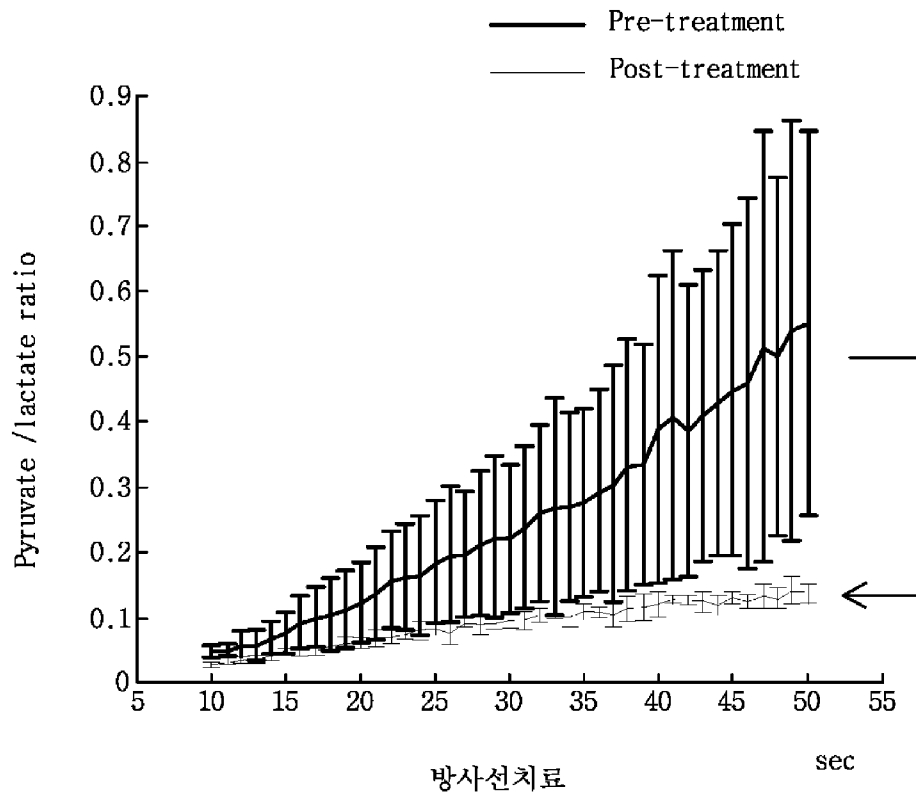
[도2]



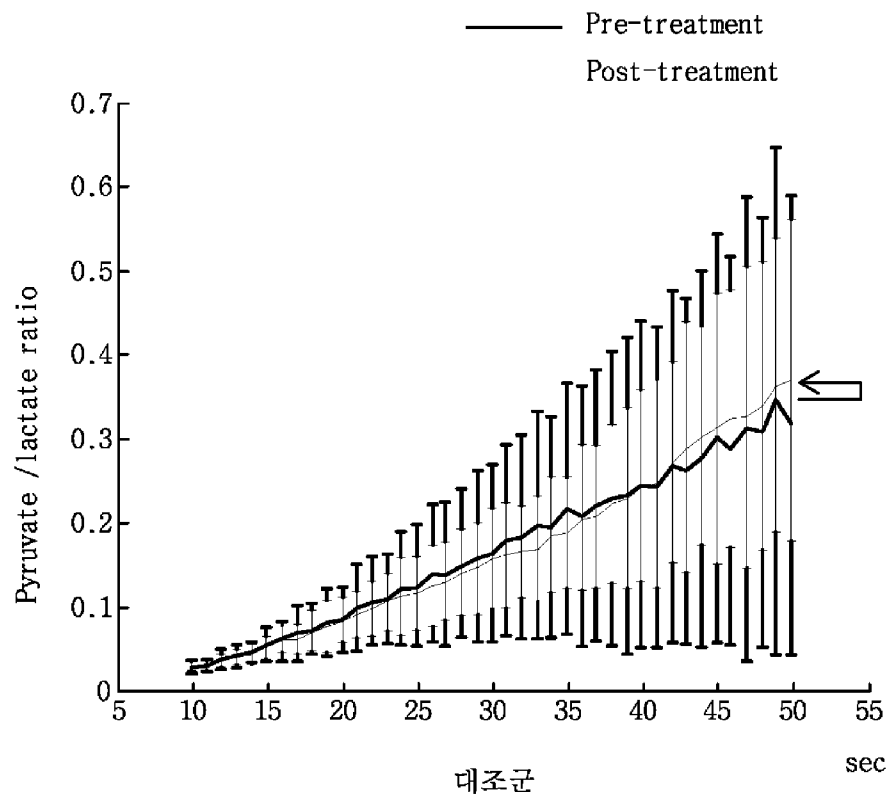
[도3]



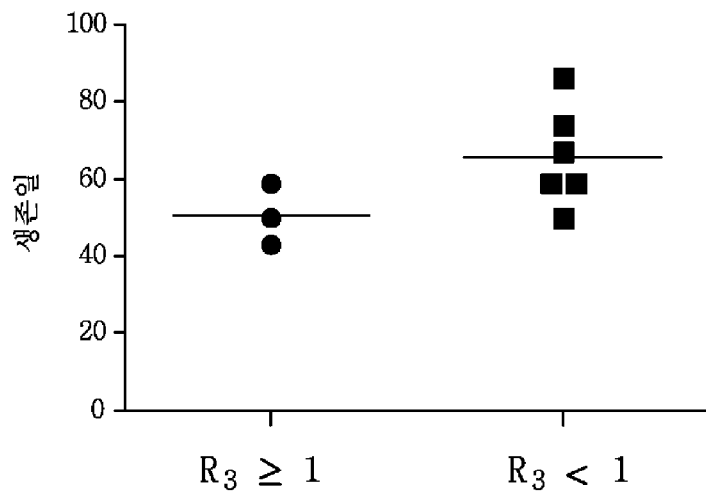
[도4]



[도5]



[도6]



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 17(2)(a), Rules 13*ter*.1(c) and (d) and 39)

Applicant's or agent's file reference YS-004-PCT	IMPORTANT DECLARATION	Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 01 JULY 2015 (01.07.2015)
International application No. PCT/KR2015/004902	International filing date (<i>day/month/year</i>) 15 MAY 2015 (15.05.2015)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 09 JULY 2014 (09.07.2014)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC A61B 5/055(2006.01)i, A61K 49/06(2006.01)i		
Applicant Industry-Academic Cooperation Foundation Office of Research Affairs, Yonsei University		

This International Searching Authority hereby declares, according to Article 17(2)(a), that **no international search report will be established** on the international application for the reasons indicated below.

1. ☒ The subject matter of the international application relates to:
 - a. ☐ scientific theories
 - b. ☐ mathematical theories
 - c. ☐ plant varieties
 - d. ☐ animal varieties
 - e. ☐ essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes
 - f. ☐ schemes, rules or methods of doing business
 - g. ☐ schemes, rules or methods of performing purely mental acts
 - h. ☐ schemes, rules or methods of playing games
 - i. ☐ methods for treatment of the human body by surgery or therapy
 - j. ☐ methods for treatment of the animal body by surgery or therapy
 - k. ☒ diagnostic methods practised on the human or animal body
 - l. ☐ mere presentations of information
 - m. ☐ computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art
2. ☐ The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:

☐ the description
 ☐ the claims
 ☐ the drawings
3. ☐ A meaningful search could not be carried out without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13*ter*.1(a) or (b).
4. Further comments:

Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.
---	---

특허협력조약

PCT

국제조사보고서 부작성 선언서

(PCT 제17조(2)(a), PCT규칙 13의3.1(c) 및 (d) 및 39)

출원인 또는 대리인의 서류참조기호 YS-004-PCT	중요 선언	발송일 (일/월/년) 2015년 07월 01일 (01.07.2015)
국제출원번호 PCT/KR2015/004902	국제출원일 (일/월/년) 2015년 05월 15일 (15.05.2015)	(최) 우선일 (일/월/년) 2014년 07월 09일 (09.07.2014)
국제특허분류(IPC) A61B 5/055(2006.01)i, A61K 49/06(2006.01)i		
출원인 연세대학교 산학협력단		

본 국제조사기관은 PCT 제17조(2)(a)에 따라 아래와 같은 이유로 이 국제출원의 국제조사보고서가 작성되지 아니할 것을 선언합니다.

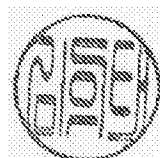
- ☒ 국제출원의 대상이 아래 해당 항목에 관련됩니다.
 - ☐ 과학 이론
 - ☐ 수학 이론
 - ☐ 식물 품종
 - ☐ 동물 품종
 - ☐ 동식물의 생산에 관한 생물학적인 방법. 단, 미생물학적 방법 및 미생물학적 방법에 의한 생산물은 제외
 - ☐ 사업활동에 관한 계획, 규칙 또는 방법
 - ☐ 순수한 정신적 행위에 관한 계획, 규칙 또는 방법
 - ☐ 게임에 관한 계획, 규칙 또는 방법
 - ☐ 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치 방법
 - ☐ 수술 또는 치료에 의한 동물의 처치 방법
 - ☒ 인체 또는 동물의 진단 방법
 - ☐ 정보의 단순한 제시
 - ☐ 국제조사기관이 선행기술을 조사할 수 없는 컴퓨터프로그램
- ☐ 국제출원의 다음 부분이 소정의 요건을 충족하지 아니하여 유효한 국제조사를 할 수 없습니다.

☐ 발명의 설명
 ☐ 청구범위
 ☐ 도면
- ☐ 서열목록이 없이 유효한 국제조사를 할 수 없었습니다. 출원인은 소정의 기간내에

☐ 서열목록을 부록 C/ST.25 텍스트 파일 형태로 제출하지 아니하였으며, 국제조사기관은 허용 가능한 형태 및 방법으로 그 서열목록을 이용할 수 없었습니다; 혹은 제출된 서열목록이 시행세칙 부록 C에서 규정하는 표준과 부합하지 않습니다.

☐ 서열목록을 시행세칙 부록 C에 규정된 표준과 부합하는 서면 혹은 이미지 파일의 형태로 제출하지 아니하였으며, 국제조사기관은 허용 가능한 형태 및 방법으로 그 서열목록을 이용할 수 없었습니다; 혹은 제출된 서열목록이 시행세칙 부록 C에서 규정하는 표준과 부합하지 않습니다.

☐ PCT규칙 13의3.1(a) 또는 (b)의 규정에 따른 서열목록 제출요구에 대응하여 서열목록 제출에 필요한 가산료를 납부하지 아니하였습니다.
- 추가 의견:

ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스번호 +82-42-472-7140	심사관 김의태 전화번호 +82-42-481-8710	
--	------------------------------------	---