

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 5월 19일 (19.05.2023)



(10) 국제공개번호

WO 2023/085864 A1

(51) 국제특허분류:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/017789

(22) 국제출원일:

2022년 11월 11일 (11.11.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0155200 2021년 11월 11일 (11.11.2021) KR

(71) 출원인: 재단법인 한국파스퇴르연구소 (INSTITUT PASTEUR KOREA) [KR/KR]; 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로712번길 16, Gyeonggi-do (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPER-

ATION) [KR/KR]; 44610 울산광역시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).

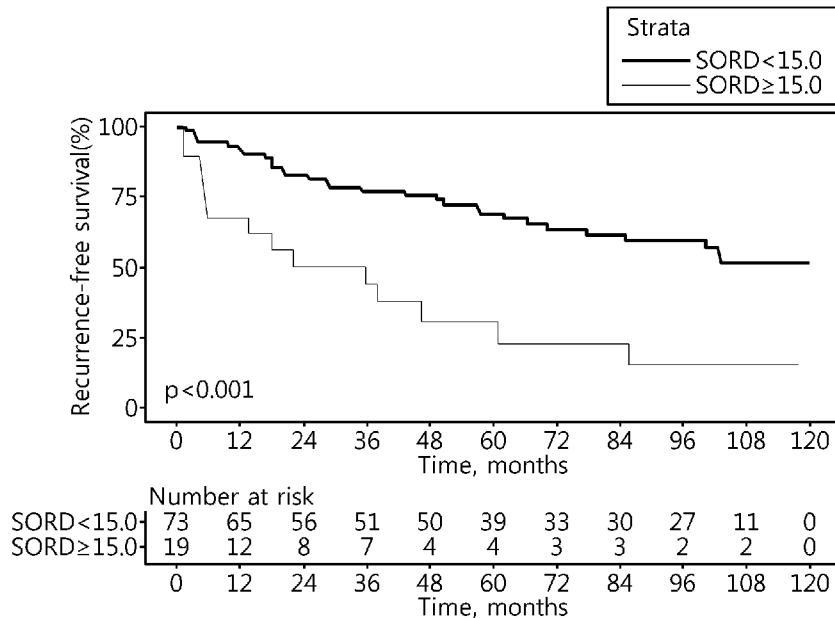
(72) 발명자: 김강모 (KIM, Kang Mo); 06219 서울특별시 강남구 도곡로43길 20, 201동 603호, Seoul (KR). 서행란 (SEO, Haeng Ran); 01813 서울특별시 노원구 공릉로46길 19, 107동 1403호, Seoul (KR). 이수연 (LEE, Su-Yeon); 13477 경기도 성남시 분당구 판교공원로3길 28-1, 201호, Gyeonggi-do (KR). 김진선 (KIM, Jin-Sun); 13622 경기도 성남시 분당구 구미로144번길 7, 802동 1101호, Gyeonggi-do (KR). 송연화 (SONG, Yeonhwa); 05815 서울특별시 송파구 송파대로8길 17, 906동 705호, Seoul (KR). 김상화 (KIM, Sanghwa); 16336 경기도 수원시 장안구 이목로 24, 109동 2805호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 필앤온지 (PHIL & ONZI INT'L PATENT & LAW FIRM); 06643 서울특별시 서초구 서초중앙로 36, 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,

(54) Title: SORD AS BIOMARKER FOR PREDICTING PROGNOSIS AFTER LIVER CANCER SURGERY

(54) 발명의 명칭: 간암 수술 후 예후 예측을 위한 바이오 마커로서의 SORD



(57) Abstract: The present invention relates to a method, a composition, and a kit for preoperative prediction of prognosis after liver cancer surgery at an early stage by detecting, in a blood sample obtained from a liver cancer patient prior to surgery, an SORD marker, or an SORD marker together with an AFP marker.

(57) 요약서: 본 발명은 수술 전 간암 환자로부터 얻은 혈액 시료 내 SORD 마커, 혹은 AFP 마커를 함께 검출하여, 간암 수술 전에 수술 후 예후를 예측하기 위한 방법, 조성물 및 키트에 관한 것으로, 적절한 수술 대상에 대한 의사 결정을 돕고 생존율이 낮을 것으로 예상되는 환자의 불필요한 수술을 피할 수 있게 하는 이점을 제공한다.

[다음 쪽 계속]



WO 2023/085864 A1

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, 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 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, 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, 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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수
하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 간암 수술 후 예후 예측을 위한 바이오 마커로서의 SORD

기술분야

- [1] 본 출원은 2021년 11월 11일 출원된 대한민국출원 제10-2021-0155200호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.
- [2] 본 발명은 간암 수술 후 예후 예측을 위한 바이오 마커에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 최근의 바이오 마커 발굴 과정을 살펴보면 개발비용은 증가하는 반면, 성공 비율은 감소하는 경향을 보이고 있다. 이는 일정부분 기초연구와 임상연구 간의 괴리감에 기인한다. 기초연구자들은 실험의 편의성을 위하여 세포주를 사용하여 실험을 진행하는데 세포주에서 나타나는 현상은 개체 수준에서 나타나는 반응과 상당한 차이점을 보이고 있다.
- [4] 이러한 문제점을 해결하기 위해 개체의 환경과 유사하게 세포주를 배양하는 3차원 입체 배양 시스템이 각광을 받고 있으며, 기초연구와 임상연구 간의 괴리감을 좁힐 방안으로 대두되고 있다.
- [5] 단층 배양(2D 배양, 배양세포가 배지 상에서 한 층으로 퍼져 있는 것)과 달리 세포를 생체와 비슷한 3차원 환경에서 배양할 수 있는 3차원 입체 배양(3D 배양)은 비교적 높은 효율로 세포 및 조직의 특이적인 기능을 오랜 기간 유지하는 특징이 다수의 논문에서 보고되고 있으며, 독성 약물에 대한 민감도를 2D배양과 3D배양, 그리고 in vivo system과 비교 해보았을 때, 3D배양의 결과는 놀라울 정도로 in vivo system과 유사함이 논문으로 보고되고 있다.
- [6] 한편, 간암 또는 간세포암(Hepatocellular carcinoma, HCC)은 성인 암에서 가장 흔한 유형으로, 수술로 절제가 불가능한 경우는 1년 내 사망하는 경우가 많고, 수술적 절제를 하는 경우에도 5년 내 50% 이상에서 재발 소견을 보이는 등 예후가 극히 나쁜 암 중의 하나로 알려져 있다. 이러한 임상적 현실을 고려할 때 암의 예후를 조기에 예측할 수 있는 기술은 암 치료의 가장 현실적 대안이고 차세대 간암 진료의 가이드라인이라고 할 것이다.
- [7] 현재 간암관련 진단, 예후판정, 치료평가 바이오마커로 가장 잘 알려진 마커는 AFP, PIVKA(Protein Induced by Vitamin K Absence)-II 등이 있으나 특이도, 민감도에서 만족스럽지 못하다. 간세포암 진단에 있어서 혈중 알파 태아 단백질(alpha-fetoprotein, AFP)의 유용성은 잘 알려져 있다. 진행된 간세포암의 진단뿐만 아니라 간경변증 환자에서 자연경과 중 매년 3-10%에서 간세포암이 발병하기 때문에 조기발견을 위한 정기적인 AFP 측정이 필요하다. 그러나 AFP는 간세포암뿐만 아니라 알콜성 간염, 만성 간염이나 간경변증과 같은

양성질환에서도 고농도로 상승하기 때문에 위양성이 많고 실제 양성율이 50-60%에 지나지 않는다. PIVKA-II는 DCP(des-r-carboxyprothrombin) 즉 응고작용이 없는 비정상 프로트롬빈으로 혈청 AFP와는 독립적으로 간세포암의 진단에서 각각 48.2% 및 95.9%의 민감도와 특이도가 보고되고 있다. 이러한 생물학적 지표들은 현재 임상적으로 이용되고 있으나 모든 간암의 생물학적 특성을 반영하지 못하고 있다.

- [8] 또한, 간세포암 수술 전에 예후를 정확하게 예측해 낼 수 있는 바이오 마커 검사는 아직까지 개발되지 못했으며, 예후 인자로서 의미를 가지는 것이 있다고 하더라도 정확도가 낮아 아직 선별 검사로 사용되지 못하고 있는 실정이다.
- [9] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명자들은 간암 예후를 조기 진단할 수 있는 방법, 특히 간암 환자가 수술 후 생존 또는 재발할 확률을 수술 전에 진단할 수 있는 분자 진단법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 혈액 시료 내 SORD (L-iditol-2 dehydrogenase) 단백질이 간암 수술 후 예후와 밀접한 관련이 있으며, 수술 전에 수술 후 예후를 예측하는데 이용될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [11] 따라서, 본 발명의 목적은 혈액 시료로부터 SORD 마커를 검출하여 간암 수술 예후를 수술 전에 진단하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 혈액 시료로부터 SORD 마커를 검출하는 간암 수술 예후 조기 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 혈액 시료로부터 SORD 마커를 검출하는 간암 예후 조기 진단용 키트를 제공하는 데 있다.
- [14] 보다 구체적으로 본 발명은 다음의 구현예들을 제공한다.
- [15] 구현예 1. 간암 수술 후 예후진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 간암 환자로부터 얻은 혈액 시료로부터 SORD (L-iditol-2 dehydrogenase) 마커를 검출하는 방법.
- [16] 구현예 2. 구현예 1에 있어서, 상기 정보는 간암 수술 전에 제공되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [17] 구현예 3. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 혈액 시료는 혈청인 것을 특징으로 하는 방법.
- [18] 구현예 4. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은
- [19] - 간암 수술 전에 간암 환자의 혈청 내 포함된 SORD 레벨을 검출하는 단계; 및
- [20] - 상기 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상인지 여부를 판별하는 단계

- [21] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [22] 구현예 5. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상인 경우, 간암 수술 후 나쁜 예후를 진단하는 정보를 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [23] 구현예 6. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은
- [24] - 간암 수술 전에 간암 환자의 혈청 내 포함된 AFP(alpha-fetoprotein) 레벨을 검출하는 단계; 및
- [25] - 상기 혈청 AFP 레벨이 400 ng/mL 이상인지 여부를 판별하는 단계
- [26] 를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [27] 구현예 7. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상이고, 그리고 상기 혈청 AFP 레벨이 400 ng/mL 이상인 경우, 간암 수술 후 나쁜 예후를 예측하는 정보를 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [28] 구현예 8. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 SORD 또는 AFP 레벨의 검출은 면역분석법(immunoassay) 또는 면역염색법(immunostaining)에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [29] 구현예 9. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역분석법(immunoassay) 또는 면역염색법(immunostaining)은 SORD 또는 AFP에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [30] 구현예 10. 혈액 시료로부터 SORD 마커를 검출하기 위한 간암 수술 예후 조기 진단용 조성물로서, SORD (L-idoitol-2 dehydrogenase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 조성물.
- [31] 구현예 11. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 AFP (alpha-fetoprotein) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [32] 구현예 12. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 혈청 단백질 검출용 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [33] 구현예 13. 혈액 시료로부터 SORD 마커를 검출하기 위한 간암 수술 예후 조기 진단용 키트로서, SORD (L-idoitol-2 dehydrogenase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인 키트.
- [34] 구현예 14. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 키트는 AFP (alpha-fetoprotein) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.
- [35] 구현예 15. 선행하는 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 상기 혈액 시료는 혈청이고, 상기 키트는 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상인 경우에; 또는 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상 및 혈청 AFP 레벨이 400 ng/mL 이상인 경우에, 간암 수술 후 나쁜 예후를 예측하는 정보를 제공하는 것을 지시하는 설명서를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

- [36] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결 수단

- [37] 본 발명의 하나의 관점은 간암 수술 후 예후진단에 필요한 정보를 조기에, 바람직하게는 간암 수술 전에 제공하기 위하여, 간암 환자로부터 얻은 혈액 시료로부터 SORD (L-iditol-2 dehydrogenase) 마커를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.
- [38] 간세포 암종(hepatocellular carcinoma; HCC)은 아시아에서 유병률과 발생률이 높은 가장 흔한 유형의 원발성 간암이다. 간절제술은 간세포 암종 초기 또는 절제 가능한 간세포 암종 환자에게 선택되는 치료법이지만, 결과는 만족스럽지 못하다. 높은 재발률로 인해 이들 환자의 생존율은 여전히 낮다. 간절제술 후 단일 간세포 암종(2cm) 환자에서 5년 재발률은 68%였으며, 간세포 암종의 재발은 환자의 장기 생존에 악영향을 미친다. 따라서 간세포 암종에 대한 절제 후 재발을 예측하는 것은 적절한 수술 후보를 선택하는 데 중요하다. 이전 연구에서는 수술 전 혈청 알파태아단백(alpha-fetoprotein; AFP) 수치와 종양 크기 및 미세혈관 침범과 같은 종양의 다양한 조직학적 특징이 절제술 후 재발의 독립적인 예측인자라는 점에 주목했다. 그러나 조직학적 특징은 수술 전에 평가할 수 없기 때문에 제한적이다. 또한 AFP는 간세포 암종을 정확하게 예측하는 민감도와 특이도가 상대적으로 낮으며(Tateishi, R. et al., Diagnostic accuracy of tumor markers for hepatocellular carcinoma: a systematic review, *Hepatology international*, 2008(2):17-30), AFP와 수술 결과의 연관성에 대해서는 여전히 논란 중인 상태이다(Blank, S. et al., Assessing prognostic significance of preoperative alpha-fetoprotein in hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma: normal is not the new normal., *Ann Surg Oncol* 2014(21):986-994; Shim, J.H. et al., Is serum alpha-fetoprotein useful for predicting recurrence and mortality specific to hepatocellular carcinoma after hepatectomy? A test based on propensity scores and competing risks analysis. *Ann Surg Oncol* 2012(19):3687-3696). 그리하여, 절제 수술 이후 간세포 암종 환자의 결과를 예측하기 위한 새로운 예후 마커가 여전히 필요하다.
- [39] 다양한 간질환에 의해 유발되는 염증, 괴사, 간재생은 간세포 암종의 발생을 촉진하는 중요한 역할을 한다. 간세포 암종의 90% 이상이 간 손상 및 염증과 관련하여 발생하여 염증 관련 암의 분명한 예가 된다. 소르비톨을 과당으로 전환시키는 폴리올 경로의 효소인 소르비톨 탈수소효소(SORD)는 간 손상을 반영한다. SORD는 ALT(alanine aminotransferase)와 유사하게 간에 주로 집중되어 있다.
- [40] 본 발명의 목적은 간 손상을 반영하는 효소인 소르비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase; SORD) 수치가, 무재발 생존(Recurrence-free survival; RFS) 기간과

관련이 있는지 확인하는 것이었다. SORD 수준 ≥ 15 ng/mL가 더 짧은 무재발 생존(Recurrence-free survival; RFS)과 관련이 있다는 본 발명의 발견은 HCC에서 어떤 환자가 수술에 더 적합한지 결정하는 데 도움이 될 수 있다.

[41] 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 인 비트로 방법일 수 있다. 본 발명의 방법은, 간암 수술 전에 간암 환자의 혈청 내 포함된 SORD 레벨을 검출하는 단계; 및 상기 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상인지 여부를 판별하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상인 경우 간암 수술 후 나쁜 예후를 진단하는 정보를 제공할 수 있다.

[42] 특히나, 바람직한 구현예에서, 혈청 AFP 및 SORD 수준은 RFS에 대한 두 가지 독립적인 예후 인자로 사용된다. 구체적으로, 상기 방법은 간암 수술 전에 간암 환자의 혈청 내 포함된 AFP(alpha-fetoprotein) 레벨을 검출하는 단계; 및 상기 혈청 AFP 레벨이 400 ng/mL 이상인지 여부를 판별하는 단계를 더 포함한다.

[43] 환자를 수술 전 혈청 SORD 및/또는 AFP 레벨로 계층화했을 때, 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상인 경우 간암 수술 후 나쁜 예후를 진단하는 정보를 제공하게 되며, 혈청 SORD 수준이 15 ng/mL 이상이면서 동시에 혈청 AFP 수준이 400 ng/mL 이상인 환자는 가장 낮은 RFS 비율로서 뚜렷하게 불량한 예후를 보였다.

[44] 이와 같이, 수술 전 혈청 SORD는 절제 후 간세포 암종에 대한 효과적인 예후 인자이며, 특히 혈청 AFP 수치와 같이 확인 시 수술을 위한 적절한 환자 선택에 데 임상적 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

[45] 본 발명의 예후 진단 방법에 있어서, SORD 및/또는 AFP 단백질의 발현 레벨을 분석하는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다.

바람직하게는, 상기 분석은 면역분석(immunoassay) 또는 면역염색(immunostaining) 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.

[46] 상기 면역분석 또는 면역염색 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 등의 문헌에 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[47] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C14, I125, P32 및 S35)로 표지된 항체(상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체)가 이용될 수 있다.

[48] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i)

분석하고자 하는 미지의 시료를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 상기 마커-특이 항체와 상기 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

- [49] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤, 또는 마이크로타이터 플레이트 등이 있다.
- [50] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용될 수 있고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [51] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 상기 분자 마커에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, 상기 분자 마커에 대한 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.
- [52] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있는데, 상기 레이블은 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450), 방사능물질((예컨대, C14, I125, P32 및 S35), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.
- [53] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 만일,

레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

- [54] 한편, 본 발명의 방법은 종래의 유세포 분석 방법(flow cytometry; Ormerod, M. G., ed. 1990, Flow Cytometry: A Practical Approach. IRL Press), MACS(magnetic-activated cell sorting; Robert David, et al., Stem Cells, 23:477-482(2005) 또는 면역친화성 정제방법(Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)에 따라 실시될 수 있다.
- [55] 상기 분자 마커에 특이적으로 결합하는 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 제조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [56] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 간암의 수술 이후 예후를 예측할 수 있다.
- [57] 본 발명의 다른 관점은 혈액 시료로부터 SORD 마커를 검출하기 위한 간암 수술 예후 조기 진단용 조성물로서, SORD (L-iditol-2 dehydrogenase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인 조성물을 제공하는 것이다.
- [58] 바람직한 구현예에서, 상기 간암 수술 예후 조기 진단용 조성물은 AFP (alpha-fetoprotein) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 더 포함하는 것일 수 있으며, 혈청 단백질 검출용 조성물일 수 있다.
- [59] 본 발명의 또 다른 관점은 혈액 시료로부터 SORD 마커를 검출하기 위한 간암 수술 예후 조기 진단용 키트로서, SORD (L-iditol-2 dehydrogenase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인 키트를 제공하는 것이다.
- [60] 바람직한 구현예에서, 상기 간암 수술 예후 조기 진단용 키트는 AFP (alpha-fetoprotein) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [61] 상기 키트는 혈액 시료로서 혈청을 사용하는 혈청 단백질 검출용 키트일 수 있으며, 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상인 경우에; 또는 바람직하게는 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상 및 혈청 AFP 레벨이 400 ng/mL 이상인 경우에, 간암 수술 후 나쁜 예후를 진단하는 정보를 제공하는 것을 지시하는 설명서를 포함할 수 있다.
- [62] 본 발명의 간암 수술 예후 조기 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본

발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

발명의 효과

- [63] 본 발명은 간암 환자로부터 얻은 혈액 시료 내 SORD 마커, 바람직하게는 AFP 마커를 함께 검출하는 것에 의하여, 간암 수술 전에 수술 후 예후를 예측하는 기술을 제공한다. 따라서 본 발명은 적절한 수술 대상에 대한 의사 결정을 돕고 생존율이 낮을 것으로 예상되는 환자에서 불필요한 수술을 피할 수 있게 한다.

도면의 간단한 설명

- [64] 도 1a는 치료 목적 절제술 후 간세포 암종 환자의 무재발 생존(RFS)에 대한 Kaplan—Meier 플롯으로서, 환자를 수술 전 혈청 SORD 수준(<15ng/mL 및 ≥15 ng/mL)에 따라 두 그룹으로 계층화한 것을 나타낸 것이다.
- [65] 도 1b는 치료 목적 절제술 후 간세포 암종 환자의 무재발 생존(RFS)에 대한 Kaplan—Meier 플롯으로서, 환자를 수술 전 혈청 SORD 수준(<5, 5-10, 10-15, ≥15 ng/mL)에 따라 네 그룹으로 계층화한 것을 나타낸 것이다.
- [66] 도 2는 다양한 환자 하위 그룹에서 수술 전 혈청 SORD 수준에 의한 무재발 생존의 포레스트 플롯으로서, 혈청 SORD 수준이 낮은(<15 ng/mL) 환자와 비교하여 상승된 혈청 SORD 수준(≥ 15 ng/mL)을 가진 환자의 위험 비율을 나타낸 것이다.
- [67] 도 3은 AFP 및 SORD의 혈청 수준으로 계층화된 무재발 생존에 대한 Kaplan-Meier 플롯으로서, 성별 및 ICG R15(indocyanine green retention rate at 15 minutes)에 대해 조정된 위험 비율을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [68] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[69]

[70] 실시예

[71] I. 재료 및 방법

[72] 1. 연구 설계 및 모집단

[73] 2011년 1월부터 2012년 12월까지 서울아산병원에서 간세포 암종으로 간절제술을 받고 말초혈액을 서울아산병원 바이오자원센터에 보관한 150명의 기록을 무작위로 추출하여 분석에 포함시켰다. 환자들은 모두 향후 연구에서 이 정보를 사용하기 위한 사전 동의서에 서명했다. 제외 기준은 (a) 간 이식을 받은 환자, (b) 불완전하게 종양이 절제된 환자, (c) BCLC(Barcelona Clinic Liver Cancer) B 또는 C기로 분류된 환자로 구성되었다. 이러한 BCLC B 또는 C 환자는

나중에 확장 분석에 포함시켰다. 궁극적으로 92명의 환자가 1차 분석에 포함되었고 120명의 환자가 확장 분석에 포함되었다. 연구 프로토콜은 사전 동의서 서명을 근거로 서울아산병원 기관심사위원회의 승인을 받았다(No. 2020-1173). 이 연구는 헬싱키 선언에 따라 수행되었다.

[74]

[75] 2. SORD 측정

[76] SORD는 서울아산병원 Bio-Resource Center에서 채취한 혈청 시료로 측정하였다. 혈청 샘플은 -196°C 에서 신선 냉동 상태로 보관되었다. 샘플을 해동한 후 효소 반응을 시작하기 전에 24시간의 충분한 사전 배양 시간을 사용했다. 이것은 혈청의 대사 산물, 특히 케톤이 혈청의 SORD와 반응할 수 있기 때문에 측정의 정확도를 높였다. SORD의 기준 혈청 레벨은 제조업체의 지침에 따라 Human Sorbitol dehydrogenase ELISA 키트(MyBioSource, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정되었다.

[77]

[78] 3. 위험 요소 및 결과

[79] Child-Pugh 분류에 의한 간 기능 예비 평가, ALBI 등급(albumin-bilirubin grade) 및 ICG-R15(indocyanine green retention rate at 15 minutes)를 포함한 임상 병리학 데이터를 수집했다. 간절제술은 Couinoud 분류에 따라 4개 이상의 분절이 절제된 경우 대절제술로 분류되었고 4개 미만의 분절이 절제된 경우 소절제술로 분류되었다. 종양 크기는 수술 표본에서 가장 큰 종양의 직경으로 정의되었다.

[80] 관심 결과는 무재발 생존기간(Recurrence-free survival; RFS)였다. RFS는 수술 날짜와 재발 혹은 사망 날짜 사이의 시간 간격으로 정의되었다. 혈청 AFP(α -fetoprotein) 및 PIVKA-II(protein induced by vitamin K absence or antagonist-II)를 포함한 종양 표지자 측정과 함께 역동적 컴퓨터 단층 촬영 또는 자기 공명 영상을 수행했다(절제술 후 1개월, 그 후 첫 2년 동안은 3개월 간격으로, 다음 해에는 3~6개월마다). 모든 환자는 수술 날짜부터 종양 재발 또는 사망 날짜까지 또는 2020년 12월 31일까지 추적되었다.

[81]

[82] 4. 통계 분석

[83] 기술 통계는 중앙값으로 표시되었다(연속 및 범주형 변수 각각에 대한 백분율이 있는 사분위수 범위 및 숫자). 연속형 변수는 Mann-Whitney U 테스트를 사용하여 비교되었다. 범주형 변수는 Fisher의 정확한 테스트 또는 카이-제곱 테스트를 적절하게 사용하여 비교되었다. 사건 발생까지의 시간에 대한 생존 곡선은 Kaplan-Meier 분석을 사용하여 결정되었으며 수술 전 SORD 레벨에 따른 로그 순위 테스트를 사용하여 비교되었다. RFS에 대한 HR(hazard ratio) 및 95% CI(confidence interval)는 Cox 비례 위험 모델을 사용하여 계산되었다. Spearman의 순위 상관 계수는 RFS에 대한 수술 전 SORD 레벨과 기타 예후 인자 사이에 추정되었다. 통계 분석은 R 통계 소프트웨어 버전 3.5.0(R Foundation for

Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://cran.r-project.org/>)을 사용하여 수행하였다. 모든 테스트는 양측으로 이루어졌으며 $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[84]

[85] **II. 결과**

[86] **1. 환자 기본 특성**

[87] 총 92명의 간세포 암종에 대한 치료 목적의 간절제술을 받은 환자가 연구에 포함되었다. 그들의 중앙 연령은 55.0세였고 대부분이 남성(76/92, 82.6%)이었고, HCC의 병인은 만성 B형간염이었고(82/92, 89.1%), Child-Pugh 점수가 5(80/92, 87.0%) 였으며, 소절제술을 받았다(74/92, 80.4%). 간 기능 특성, 치료 방법 및 임상 병리학적 요인을 포함한 기타 인구 통계는 표 1에 나와 있다. 환자를 수술 전 혈청 SORD 레벨에 따라 두 그룹으로 나누었을 때 73명은 수술 전 SORD가 15 ng/mL 미만이었고, 19명은 수술 전 SORD가 15 ng/mL 이상이였다. 모든 기준 특성은 절제 유형을 제외하고 두 그룹 간에 유사했다. 수술 전 SORD가 15 ng/mL 이상인 환자는 수술 전 SORD가 15ng/mL 미만인 환자보다 더 자주 대절제술을 받았다. 이와 같은 연구 모집단 기본 특성을 하기 표 1에 나타내었다.

[88] **[표 1]**

[89]

	Total	SORD <15ng/mL	SORD ≥15ng/mL	P-value
	[N = 92]	[N = 73]	[N = 18]	
Age, median [IQR], y	55.0 [47.5, 60.3]	54.0 [46.0, 61.0]	57.0 [51.0, 59.5]	0.386
Male, n (%)	75 (82.6)	56 (76.5)	18 (84.7)	0.220
Etiology, n (%)				0.791
Hepatitis B	82 (89.1)	65 (89.0)	17 (89.5)	
Hepatitis C	3 (3.3)	2 (2.7)	1 (5.3)	
Others	7 (7.6)	6 (8.2)	1 (5.3)	
Diabetes, n (%)	19 (20.7)	12 (16.4)	7 (36.8)	0.101
Previous TACE, n (%)	15 (15.3)	11 (15.1)	4 (21.1)	0.779
AFP, ng/mL	32.1 [6.3, 300.5]	51.4 [6.4, 270.0]	11.6 [7.0, 1501.5]	0.839
<400, n (%)	70 (76.1)	57 (78.1)	14 (88.4)	0.564
≥400, n (%)	22 (23.9)	16 (21.9)	3 (31.6)	0.564
PIVKA-II, mAU/mL	45.0 [21.8, 366.5]	45.0 [23.0, 300.0]	68.0 [19.0, 495.5]	0.912
<40, n (%)	43 (46.7)	34 (46.6)	8 (47.4)	1.000
≥40, n (%)	49 (53.3)	39 (53.4)	10 (52.6)	1.000
AST, median [IQR], IU/L	31.5 [26.8, 44.0]	31.0 [26.0, 42.0]	38.0 [28.0, 56.0]	0.180
ALT, median [IQR], IU/L	33.0 [24.0, 44.5]	32.0 [24.0, 43.0]	38.0 [28.0, 53.0]	0.243
Platelet, median [IQR], x10 ³ /μL	131.50 [110.8, 175.6]	131.0 [113.0, 178.0]	132.0 [102.0, 159.5]	0.534
Albumin, median [IQR], g/dL	3.9 [3.5, 4.2]	3.9 [3.5, 4.2]	3.7 [3.5, 4.2]	0.319
Bilirubin, median [IQR], IU/L	0.9 [0.7, 1.1]	0.9 [0.7, 1.1]	0.9 [0.7, 1.2]	0.892
Creatinine, median [IQR], mg/dL	0.8 [0.7, 0.9]	0.8 [0.7, 0.9]	0.8 [0.8, 1.0]	0.635
Prothrombin time, median [IQR], INR	1.06 [1.01, 1.13]	1.06 [1.01, 1.13]	1.05 [1.01, 1.14]	0.599
Child-Pugh score, n (%)				0.665
5	80 (87.0)	63 (86.3)	17 (89.5)	
6	9 (9.8)	8 (11.0)	1 (5.3)	
7	3 (3.3)	2 (2.7)	1 (5.3)	

[90]	ALBI grade, <i>n</i> (%)				0.556
	1	38 (41.3)	31 (42.5)	7 (36.8)	
	2	52 (56.5)	41 (56.2)	11 (57.9)	
	3	2 (2.2)	1 (1.4)	1 (5.3)	
	ICG-R15, median [IQR], %	11.2 [8.2, 13.8]	11.0 [8.2, 13.4]	13.6 [8.9, 16.8]	0.230
	Resection type*, <i>n</i> (%)				0.014
	Major	18 (19.6)	10 (13.7)	8 (42.1)	
	Minor	74 (80.4)	63 (86.3)	11 (57.9)	
	Tumor size, median [IQR], cm	3.0 [2.3, 4.2]	3.0 [2.1, 4.3]	3.3 [2.8, 3.5]	0.322
	Microscopic vascular invasion, <i>n</i> (%)	24 (26.1)	16 (21.9)	8 (42.1)	0.136
	Edmondson grade, <i>n</i> (%)				1.000
	I or II	19 (20.7)	15 (20.5)	4 (21.1)	
	III or IV	73 (79.3)	58 (79.5)	15 (78.9)	
	Recurrence, <i>n</i> (%)	43 (46.7)	29 (39.7)	14 (73.7)	0.017
	Follow up, median [IQR], month	57.1 [19.8, 102.6]	66.3 [25.7, 104.3]	19.7 [5.3, 44.1]	0.003

[91] 비정규 분포를 따르는 연속 변수는 중앙값(사분위수 범위[IQR])으로 보고하였다. 범주형 변수는 백분율(%)이 있는 숫자로 보고하였다.

[92] * 대절제술은 4개 이상의 간분절을 절제하는 것으로 정의하고 나머지는 소절제술로 간주하였다.

[93] AFP, α -태아단백; ALBI 등급, 알부민-빌리루빈 등급; AST, 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제; ALT, 알라닌 아미노전이효소; ICG-R15, 15분에서 인도시아닌 그린 보유율; INR, 국제 표준화 비율; IU, 국제 단위; IQR, 사분위수 범위; PIVKA-II, 비타민 K 부재 또는 길항제-II에 의해 유도된 단백질; SORD, 소르비톨 탈수소효소; TACE, 경동맥 동맥 화학색전술.

[94]

[95] **2 SORD 레벨에 따른 재발**

[96] 추적관찰 기간 중앙값 57.1개월 동안 43명의 환자에서 재발이 관찰되었다. 재발이 있는 사람과 없는 사람 사이에 혈청 SORD 수치 중앙값이 각각 10.0 ng/mL 및 7.1 ng/mL로 유의한 차이가 있었다. 재발이 있는 환자와 없는 환자에 있어서, 간 기능(Child-Pugh 점수, 알부민-빌리루빈(ALBI) 등급, 인도시아닌 그린(ICG) 제거율)을 포함한 다른 기본 특성과 크기, 현미경적 혈관 침범 및 에드먼슨 등급과 같은 중앙 요인에는 유의한 차이가 없었다.

[97] 치료 목적 절제술 후 간세포 암종 환자의 무재발 생존(RFS)에 대한 Kaplan—Meier 플롯을 혈청 SORD 레벨로 계층화하여 얻어진 무재발 생존(recurrence-free survival; RFS)의 Kaplan—Meier 추정치는 도 1에 나타내었다. 도 1a는 수술 전 혈청 SORD 레벨(<15ng/mL 및 ≥ 15 ng/mL)에 따라 두 그룹으로

계층화된 환자를 나타내고, 도 1b는 수술 전 혈청 SORD 레벨(<5, 5-10, 10-15, ≥ 15 ng/mL)에 따라 네 그룹으로 계층화된 환자를 나타낸다. 전체적으로 HCC의 치료 목적 절제 후 중앙값 및 2년 RFS 비율은 각각 100.3개월 및 76.3%였다.

피험자들을 수술 전 혈청 SORD 레벨에 따라 두 그룹(≥ 15 ng/mL 대 <15ng/mL)으로 계층화했을 때, 혈청 SORD 레벨이 낮은 사람들의 경우 83.0%($p < 0.001$)의 RFS 비율을 갖는 것과 비교하여, 높은 레벨을 가진 그룹은 2년 RFS 비율이 50.1%로서 더 나쁜 결과를 보였다(도 1a). 환자를 수술 전 혈청 SORD 레벨(<5, 5-10, 10-15, ≥ 15 ng/mL)에 따라 4개의 그룹으로 분류했을 때 RFS는 레벨이 <15ng/mL인 환자에서는 유사했다(도 1b). 그러나 RFS는 SORD 레벨이 ≥ 15 ng/mL인 환자에서는 다른 그룹과 비교하여 유의하게 낮았다.

[98] 바르셀로나 간암(Barcelona Liver Cancer; BCLC) B기 또는 C기 질환 환자가 확장 분석에 포함되었을 때, 결과는 기준 혈청 SORD 레벨이 ≥ 15 ng/mL인 환자에서 더 나쁜 결과를 가진 원 분석 결과와 유사했다.

[99]

[100] 3. 무재발 생존과 관련된 예후 인자

[101] 단변량 및 다변량 Cox 비례 위험 회귀 분석을 수행하여 치료 목적의 간절제술 후 RFS에 대한 예후 인자를 조사하였다(하기 표 2 참조).

[102] [표 2]

[103]

Variable	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
Age ≥ 60 y	1.02	0.52~1.98	0.96	---	---	---
Male	2.57	0.92~7.18	0.073	1.83	0.64~5.21	0.261
ICG R15 $\geq 10\%$	1.71	0.90~3.36	0.099	1.77	0.93~3.38	0.083
Child-Pugh score ≥ 6	0.77	0.30~1.97	0.591	---	---	---
ALBI grade ≥ 2	1.37	0.74~2.54	0.310	---	---	---
Tumor size ≥ 5 cm	0.98	0.44~2.21	0.966	---	---	---
Microscopic vascular invasion	1.48	0.77~2.83	0.242	---	---	---
AFP ≥ 400 ng/mL	1.68	0.86~3.27	0.129	2.03	1.01~4.07	0.047
PIVKA-II ≥ 40 mAU/mL	1.24	0.68~2.27	0.479	---	---	---
SORD ≥ 15 ng/mL	3.29	1.72~6.28	<0.001*	3.46	1.76~6.81	<0.001
Major hepatectomy*	1.63	0.80~3.30	0.18	---	---	---

[104] * 대절제술은 4개 이상의 간 분절을 절제하는 것으로 정의되었다.

[105] AFP, α -태아단백; ALBI 등급, 알부민-빌리루빈 등급; CI, 신뢰 구간; HR, 위험 비율; ICG-R15, 15분에서 인도시아닌 그린 보유율; PIVKA-II, 비타민 K 부재

또는 길항제-II에 의해 유도된 단백질; SORD, 소르비톨 탈수소효소.

[106]

[107] 다변량 회귀 분석에서 높은 혈청 α -태아단백(AFP) 레벨(≥ 400 ng/mL; 위험 비율(HR), 2.03, 95% 신뢰 구간(CI, 1.01-4.07, $p = 0.047$)) 및 높은 혈청 SORD 레벨(≥ 15 ng/mL; HR, 3.46, 95% CI 1.76-6.81, $p < 0.001$)이 RFS에 대한 독립적인 예후 인자로 확인되었다(표 2 참조).

[108] 환자 하위 그룹에서 수술 전 혈청 SORD 레벨에 의한 무재발 생존의 포레스트 플롯은 도 2에 나타내었는데, 혈청 SORD 레벨이 낮은(<15 ng/mL) 환자와 비교하여 높은 혈청 SORD 레벨(≥ 15 ng/mL)을 가진 환자의 RFS에 대한 위험 비율을 의미한다. 하위 그룹 분석이 수행되었을 때 수술 전 SORD 레벨이 높은 환자는 수술 전 SORD 레벨이 낮은 환자에 비해 모든 하위 그룹에서 RFS가 더 나쁜 것으로 확인되었다(도 2 참조).

[109] 참고로, RFS에 대한 수술 전 SORD 레벨의 효과 크기는 혈청 AFP 레벨이 낮은 환자(<400 ng/mL; HR, 2.22; 95% CI, 0.99-5.00; $p = 0.054$)에 비해 높은 혈청 AFP 레벨(≥ 400 ng/mL; HR, 8.87; 95% CI, 2.14-36.78; $p = 0.003$)을 가진 환자에서 더 높았다. 이는 수술 전 혈청 SORD 레벨이 혈청 AFP 레벨이 높은 환자에서 특히 결과를 잘 예측하고 혈청 AFP 레벨과 함께 재발 위험이 높은 환자를 추가로 계층화할 수 있음을 시사한다. 이 결과를 바탕으로 환자를 수술 전 혈청 SORD와 AFP로 계층화했을 때 AFP와 SORD 수치가 모두 상승한 환자는 RFS 비율이 가장 낮았고 예후가 뚜렷하게 좋지 않았다(HR, 22.08; 95% CI, 6.91-70.50; $p < 0.001$)). 다른 두 그룹의 RFS 비율은 비슷한 것으로 확인되었다(HR, 1.40; 95% CI, 0.71-2.78; $p = 0.30$)(도 3 참조).

[110]

[111] 4. 혈청 SORD와 상관관계가 있는 인자

[112] Spearman의 순위 상관 계수는 SORD 레벨과 상관 관계가 있는 요인을 조사하기 위해 계산되었다. SORD 레벨은 15분(ICG-R15)($r = 0.27$, $p = 0.008$) 및 AST($r = 0.23$, $p = 0.027$)에서의 인도시아닌 그린 보유율과 양의 상관관계가 있었고 알부민($r = -0.26$)과 음의 상관관계가 있었다($r = -0.26$; $p = 0.011$). SORD 레벨과 AFP ($r = 0.002$, $p = 0.99$) 및 비타민 K 결핍 또는 길항제-II(PIVKA-II)에 의해 유도된 단백질을 포함하는 다른 종양 표지자 사이에는 상관관계가 없었다($r = 0.08$, $p = 0.46$).

[113] HCC의 병리학적 특성과 수술 전 혈청 SORD 레벨 간의 상관 관계를 평가할 때 미세 혈관 침범 또는 Edmonson-Steiner 등급의 존재는 수술 전 SORD 레벨과 관련이 없었다. 그러나 ALBI 등급이 높은 피험자는 혈청 SORD 레벨이 더 높은 경향이 있었다. BCLC B 또는 C를 가진 환자가 확장 분석에 포함되었을 때 ALBI 등급이 더 높거나 Child-Pugh 점수가 더 높은 환자는 수술 전 혈청 SORD 레벨이 더 높은 것으로 확인되었다. 이는 기준 수술 전 SORD 레벨이 간 기능을 반영할 수 있음을 나타낸다.

[114]

[115] **III. 토론**

[116] 이 연구는 간세포 암종으로 치료 목적 절제술을 받은 환자에서 수술 전 혈청 SORD 레벨과 수술 결과 사이의 연관성을 평가했다. 수술 전 혈청 SORD 레벨(<15ng/mL)이 낮은 환자의 2년 RFS가 83.0%인 것에 비해, 수술 전 혈청 SORD 레벨(≥15ng/mL)이 높은 환자는 2년에 50.1%로 유의하게 더 예후가 좋지 않았다. 다변량 Cox 회귀 분석 시, 높은 SORD 레벨은 HCC에 대한 완치 목적 절제술 후 RFS와 연관된 통계적으로 유의한 예후 인자로 확인되었다. 참고로, 하위 그룹 분석에서 수술 전 SORD 레벨은 특히 낮은 혈청 AFP 레벨(<400ng/mL)을 가진 환자에서 수술 결과를 잘 예측했다. 환자를 수술 전 혈청 AFP 및 SORD 레벨로 계층화했을 때 수술 전 AFP 및 SORD 레벨이 모두 상승한 환자는 뚜렷하게 불량한 예후를 보였다.

[117] SORD는 신체의 여러 조직에 존재하지만 주로 간에서 발견되는 효소이다. 일반적으로 혈청 SORD 수치는 낮으나 간 손상이 있는 경우 ALT 및 AST와 함께 수치가 증가한다. 이것은 상승된 SORD 레벨이 간세포 손상을 나타냄을 시사한다. 만성 간세포 손상 및 간세포 괴사는 근섬유아세포 활성화를 일으켜 간 섬유증과 간경변증을 유발한다. 간경변증에서 지속적인 간세포 손상은 텔로미어를 파괴하고 활성 산소 종을 방출하며 세포 미세 환경에서 측분비 신호를 변경함으로써 발암에 기여한다. 또한 이전의 proteomic 연구에서는 간세포 암종 환자의 간 조직에서 SORD 발현이 낮을수록 생존율이 낮다는 사실이 밝혀졌다(Human Protein Atlas. Available online:

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140263-SORD/pathology/liver+cancer> (accessed on 26 July).

[118] 간에서 SORD 활성이 낮거나 없을 때 소르비톨은 간세포에 축적될 수 있다. 소르비톨을 포함한 당알코올이 SORD 활성의 부족으로 간에 축적되면 간암 발생에 기여할 수 있다. 또한, SORD 활성의 부족이 암세포에서 폴리올 경로와 같은 해당 경로를 활성화시키면 소르비톨의 추가 축적에 기여하며 이는 HCC의 불량한 분화를 촉진하는데 기여할 수 있다.

[119] 본 발명에서 높은 혈청 AFP 레벨(≥400ng/mL) 및 높은 혈청 SORD 레벨(≥15ng/mL)은 다변량 Cox 회귀 분석을 기반으로 하는 RFS에 대한 두 가지 독립적인 예후 인자로 확인되었지만, 본 연구에서 수술 결과를 예측하기 위한 SORD의 효과 크기는 AFP보다 더 컸다. 흥미롭게도 상호 작용(하위 그룹) 분석은 SORD와 AFP가 수술 결과 예측에 상호 작용하고 AFP 수치가 상승한 환자에서 SORD의 예측 능력이 향상된다는 것을 보여주었다. 이 결과는 SORD가 완치 목적의 HCC 절제술을 받은 간세포 암종 환자에서 AFP의 예후 능력을 보완할 수 있음을 시사한다. 실제로, SORD 및 AFP 수치가 모두 상승한 환자는 6개월 미만의 RFS 중앙값으로 심각한 예후를 보였다.

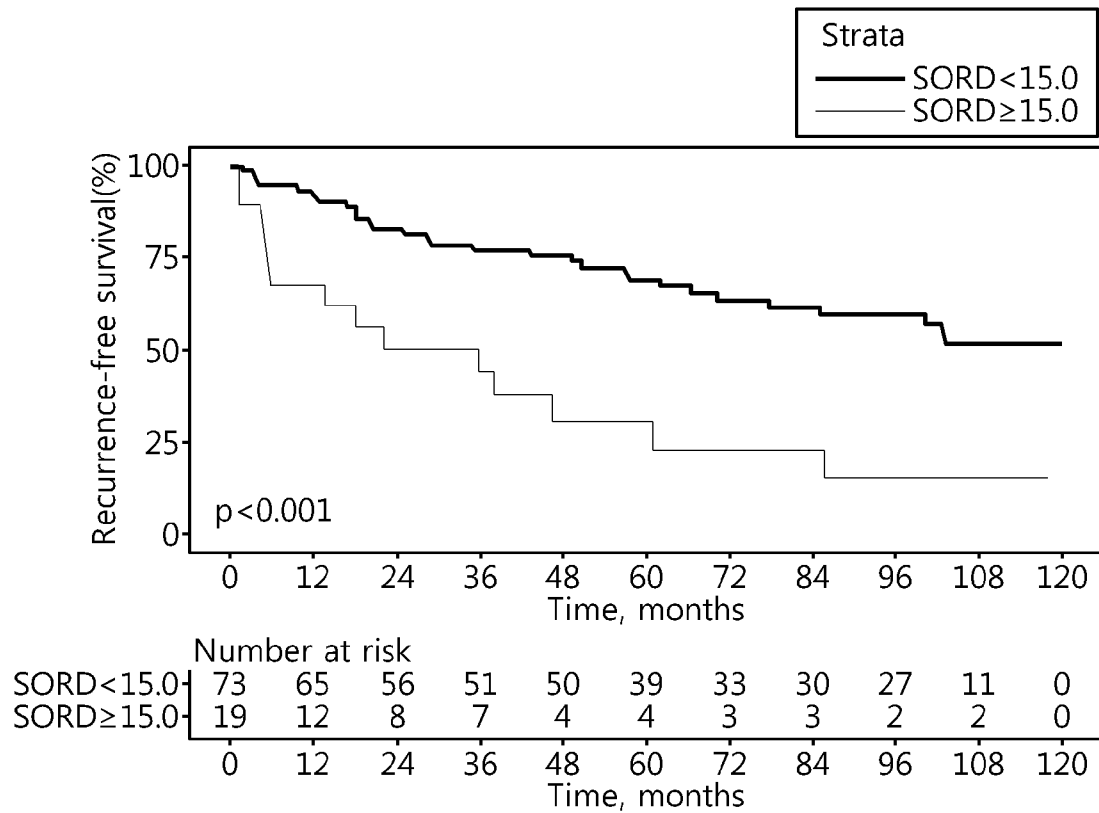
- [120] 완치 목적 절제술 후 간세포 암종의 재발에 대한 잘 알려진 다른 예후 인자로는 미세혈관 침범과 종양 크기가 있다. 그러나 현재 연구에서 이러한 조직학적 요인은 RFS와 유의한 관련이 없었다. 이는 모두 BCLC 0기 또는 A기이고 작은 종양(중양값, 3.0cm)이 있는 환자의 특성 때문일 수 있다. 진행성 BCLC 병기와 큰 종양 크기를 가진 환자는 완치 목적의 절제가 치료의 표준이 아니기 때문에 이 연구에 포함되지 않았다. 이전 연구에서는 특히 초기 단계의 간세포 암종 환자에서 미세혈관 침범이 장기간의 수술 결과에 영향을 미치지 않는다고 언급한 바 있었다.
- [121] 우리가 아는 한, 간세포 암종에 대한 다른 예후 인자와 혈청 SORD 수치 사이의 상관관계를 조사한 이전 연구는 없다. 이 연구에서 SORD 레벨과 종양 크기, AFP 및 PIVKA-II와 같은 종양 예후 인자 사이에는 유의한 연관성이 없었다. 그러나 SORD 레벨은 간 손상 또는 간 기능을 반영하는 AST 레벨, ICG-R15 및 ALBI 등급과 양의 관련이 있었다. SORD 레벨은 AFP 및 PIVKA-II와 같은 기존의 다른 종양 표지자와 비교하여 예후를 예측하고 간 기능을 반영하는 이점이 있다. 그러나 간 기능을 평가하는 SORD 레벨의 유효성을 확인하기 위해서는 추가 연구가 필요하다. 그럼에도 불구하고 조직 샘플과 달리 혈액 샘플을 얻는 것이 더 쉽기 때문에 SORD는 HCC 환자의 임상에서 더 효율적이고 유용한 예후 예측 인자로 활용될 수 있다.
- [122] 결론적으로, 수술 전 혈청 SORD의 상승된 레벨(≥ 15 ng/mL)은 치료 목적의 절제술 후 간세포 암종 환자에서 나쁜 예후와 유의하게 연관되었다. 더욱이, 수술 전 혈청 SORD 및 AFP 레벨은 같이 활용 시에 결과를 더 잘 예측할 수 있었고, SORD(≥ 15 ng/mL) 및 AFP(≥ 400 ng/mL) 레벨이 모두 상승한 환자에서 특히 나쁜 예후를 예측할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 임상에서 혈청 SORD를 단독으로 또는 AFP 레벨과 함께 사용하면 수술적 치료가 적절한 환자를 선별하는데 있어 의사 결정을 돕고 수술 후 생존율이 낮을 것으로 예상되는 환자에서는 불필요한 수술을 피할 수 있을 것으로 기대한다.

청구범위

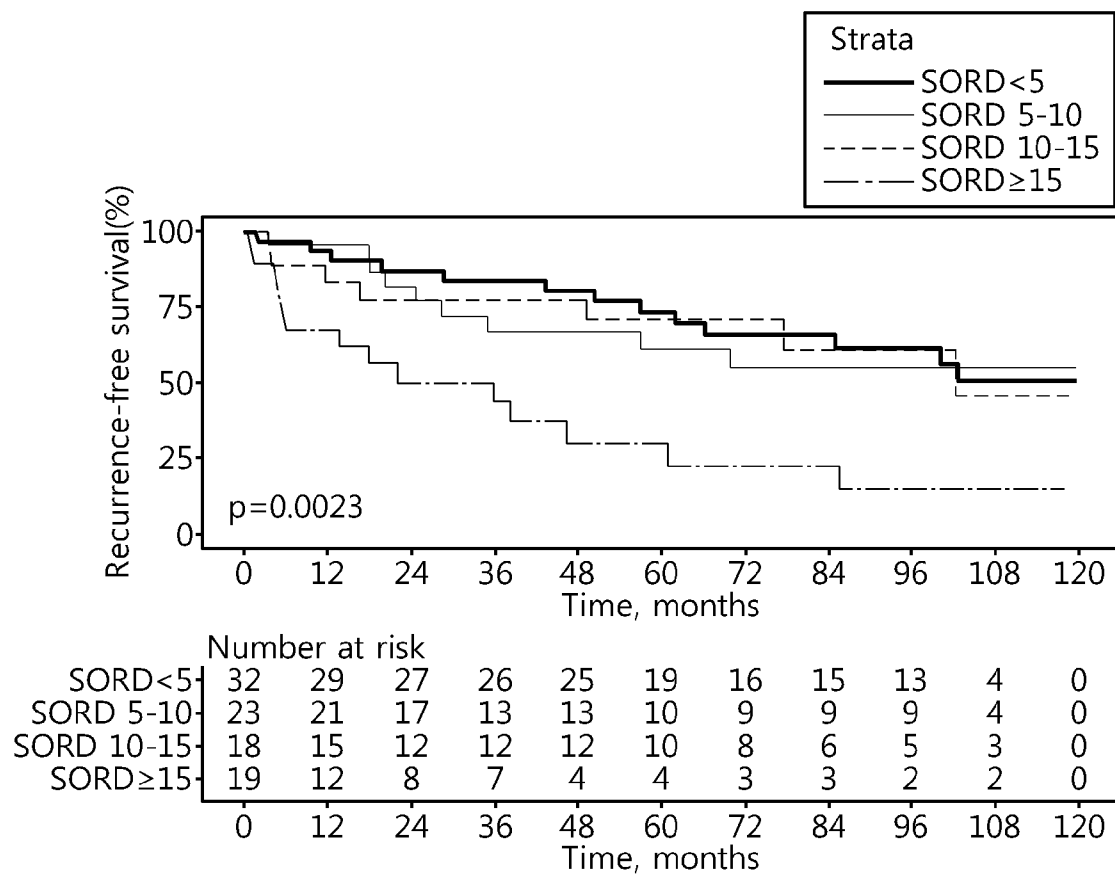
- [청구항 1] 간암 수술 후 예후진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 간암 환자로부터 얻은 혈액 시료로부터 SORD (L-idoitol-2 dehydrogenase) 마커를 검출하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 정보는 간암 수술 전에 제공되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 혈액 시료는 혈청인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 방법은
- 간암 환자의 혈청 내 포함된 SORD 레벨을 검출하는 단계; 및
 - 상기 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상인지 여부를 판별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상인 경우, 간암 수술 후 나쁜 예후를 진단하는 정보를 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 방법은
- 간암 환자의 혈청 내 포함된 AFP(alpha-fetoprotein) 레벨을 검출하는 단계; 및
 - 상기 혈청 AFP 레벨이 400 ng/mL 이상인지 여부를 판별하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상이고, 그리고 상기 혈청 AFP 레벨이 400 ng/mL 이상인 경우, 간암 수술 후 나쁜 예후를 예측하는 정보를 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제4항 또는 제6항에 있어서, 상기 SORD 또는 AFP 레벨의 검출은 면역분석법(immunoassay) 또는 면역염색법(immunostaining)에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 면역분석법(immunoassay) 또는 면역염색법(immunostaining)은 SORD 또는 AFP에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 혈액 시료로부터 SORD 마커를 검출하기 위한 간암 수술 예후 조기 진단용 조성물로서, SORD (L-idoitol-2 dehydrogenase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 조성물은 AFP (alpha-fetoprotein) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 조성물은 혈청 단백질 검출용 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 13] 혈액 시료로부터 SORD 마커를 검출하기 위한 간암 수술 예후 조기 진단용 키트로서, SORD (L-idoitol-2 dehydrogenase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인 키트.

- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 키트는 AFP (alpha-fetoprotein) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 15] 제13항 또는 제14항에 있어서,
상기 혈액 시료는 혈청이고,
상기 키트는 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상인 경우에; 또는 혈청 SORD 레벨이 15 ng/mL 이상 및 혈청 AFP 레벨이 400 ng/mL 이상인 경우에, 간암 수술 후 나쁜 예후를 예측하는 정보를 제공하는 것을 지시하는 설명서를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

[도 1a]



[도 1b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/017789

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01)i; C07K 16/40(2006.01)i; C07K 16/18(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/574(2006.01); C07K 16/18(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6886(2018.01); H01J 49/04(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: SORD, AFP, 간암(liver cancer), 수술(surgery), 예후(prognosis), 진단(diagnosis)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	KR 10-2019-0026179 A (INSTITUT PASTEUR KOREA) 13 March 2019 (2019-03-13) See paragraph [0001]; and claims 1, 3, 5-6 and 8.	1-4,6,8-14 5,7,15
Y	US 2015-0147761 A1 (MEYER, Helmut E. et al.) 28 May 2015 (2015-05-28) See claims 6-10 and 12.	1-4,6,8-14
Y	US 2017-0146540 A1 (MEDIZINISCHE UNIVERSITAT WIEN) 25 May 2017 (2017-05-25) See paragraphs [0128], [0410] and [0582].	6,11,14
Y	재단법인 한국파스퇴르연구소. 한국형 간암 종양구상체 유래 대사 조절 인자 제어 후보물질 발굴 및 이를 활용한 간암 신규 타겟 발굴. 최종보고서. February 2020, pp. 1-29 (INSTITUT PASTEUR KOREA. Identification of metabolic regulators from Korean type-HCC microenvironment for development novel therapeutic targets and Hits. Final Report). Retrieved from <URL: ">https://scienceon.kisti.re.kr/commons/util/originalView.do?cn=TRKO202000004876&dbt=TRKO&rn=> >.	1-4,6,8-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“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

03 March 2023

Date of mailing of the international search report

03 March 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/KR2022/017789**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2021-0122602 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 12 October 2021 (2021-10-12) See entire document.	1-15
PX	KR 10-2456139 B1 (INSTITUT PASTEUR KOREA et al.) 18 October 2022 (2022-10-18) See claims 1-2, 6-9 and 13-15. (This document is the published patent of a priority of the present international application.)	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/017789

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2019-0026179	A	13 March 2019	KR	10-2419635	B1	08 July 2022
US	2015-0147761	A1	28 May 2015	EP	2864791	A2	29 April 2015
				WO	2013-190075	A2	27 December 2013
US	2017-0146540	A1	25 May 2017	EP	2921857	A1	23 September 2015
				EP	2921857	B1	03 May 2017
				US	10823737	B2	03 November 2020
				WO	2015-140231	A1	24 September 2015
KR	10-2021-0122602	A	12 October 2021	KR	10-2336498	B1	06 December 2021
KR	10-2456139	B1	18 October 2022	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/574(2006.01)i; C07K 16/40(2006.01)i; C07K 16/18(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/574(2006.01); C07K 16/18(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6886(2018.01); H01J 49/04(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: SORD, AFP, 간암(liver cancer), 수술(surgery), 예후(prognosis), 진단(diagnosis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y A	KR 10-2019-0026179 A (재단법인 한국파스퇴르연구소) 2019.03.13 단락 [0001]; 청구항 1, 3, 5-6, 8 참조.	1-4,6,8-14 5,7,15
Y	US 2015-0147761 A1 (MEYER, HELMUT E. 등) 2015.05.28 청구항 6-10, 12 참조.	1-4,6,8-14
Y	US 2017-0146540 A1 (MEDIZINISCHE UNIVERSITAT WIEN) 2017.05.25 단락 [0128], [0410], [0582] 참조.	6,11,14
Y	재단법인 한국파스퇴르연구소, '한국형 간암 종양구상체 유래 대사 조절 인자 제어 후보물질 발굴 및 이를 활용한 간암 신규 타겟 발굴', 최종보고서, 2020.02, 페이지 1-29, <URL: ">https://scienceon.kisti.re.kr/commons/util/originalView.do?cn=TRKO202000004876&dbt=TRKO&rn=> > 페이지 3, 9-10, 12-14 참조.	1-4,6,8-14
A	KR 10-2021-0122602 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2021.10.12 전체 문헌 참조.	1-15
☒ 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 2023년03월03일(03.03.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년03월03일(03.03.2023)
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

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KR 10-2456139 B1 (재단법인 한국파스퇴르연구소 등) 2022.10.18 청구항 1-2, 6-9, 13-15 참조. (위 문헌은 본 국제출원 우선권의 등록공보임.)	1-15

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0026179 A	2019/03/13	KR 10-2419635 B1	2022/07/08
US 2015-0147761 A1	2015/05/28	EP 2864791 A2	2015/04/29
		WO 2013-190075 A2	2013/12/27
US 2017-0146540 A1	2017/05/25	EP 2921857 A1	2015/09/23
		EP 2921857 B1	2017/05/03
		US 10823737 B2	2020/11/03
		WO 2015-140231 A1	2015/09/24
KR 10-2021-0122602 A	2021/10/12	KR 10-2336498 B1	2021/12/06
KR 10-2456139 B1	2022/10/18	없음	