

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2017년 10월 12일 (12.10.2017)



(10) 국제공개번호  
WO 2017/175928 A1

- (51) 국제특허분류:  
G01N 21/65 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/009661
- (22) 국제출원일: 2016년 8월 30일 (30.08.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2016-0043731 2016년 4월 8일 (08.04.2016) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145 (안암동 5가), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최연호 (CHOI, Yeon Ho); 02721 서울시 성북구 길음로 9길 50, 912동 802호 (길음동, 길음뉴타운), Seoul (KR). 박재나 (PARK, Jae Na); 13608 경기도 성남시 분당구 백현로 234, 301동 1302호 (정자동, 한솔마을한일아파트), Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다해 (DAHAI INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM); 06235 서울시 강남구 테헤란로 20길 10, 쓰리엠타워 10층(역삼동), 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).

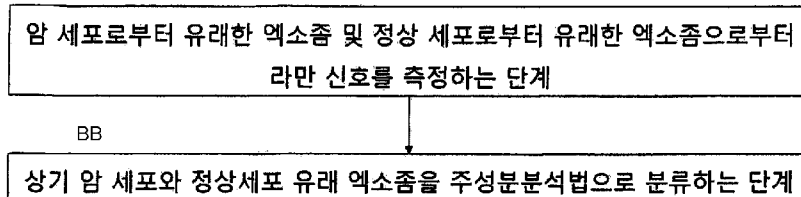
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD FOR CLASSIFYING RAMAN SIGNALS OF EXOSOMES BY PATTERN RECOGNITION AND METHOD FOR DIAGNOSING CELL

(54) 발명의 명칭 : 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류 방법 및 세포 진단 방법

[도1] AA



AA ... Step of measuring Raman signals from exosomes derived from cancer cells and exosomes derived from normal cells

BB ... Step of classifying exosomes derived from cancer cells and exosomes derived from normal cells by principal component analysis

(57) Abstract: The present invention relates to a method for classifying Raman signals of exosomes by pattern recognition and a method for diagnosing cells and, more particularly, to a diagnosis method which obtains Raman signals of exosomes derived from cancer cells and normal cells by Raman spectroscopy, performs a principal component analysis (PCA) by normalizing the signals to more accurately distinguish the cancer cells from the normal cells, thereby enabling early diagnosis of cancer and further providing a patient-friendly diagnosis method.

(57) 요약서: 본 발명은 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류법 및 세포 진단 방법에 관한 것이며, 보다 상세하게는 암 세포와 정상 세포로부터 유래한 엑소좀을 라만 분광법을 통해 라만 신호를 획득하고, 상기 획득된 라만 신호를 정규화시켜 주성분분석법(PCA)을 수행하여 암 세포와 정상 세포를 보다 정확하게 구분하여 암의 조기 진단을 수행할 수 있으며, 나아가 환자 친화적인 진단 방법을 제공할 수 있다.

WO 2017/175928 A1

## 명세서

### 발명의 명칭: 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류 방법 및 세포 진단 방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명의 목적은 암 세포와 정상 세포로부터 유래한 엑소좀을 라만분광법 및 주성분분석법을 이용하여, 보다 정확하게 구분하기 위한 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류 방법 및 세포 진단 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 엑소좀(exosome)은 세포에서 분비되고, 50~200nm 크기를 가지며, 모세포의 특성을 포함하는 입자이다. 엑소좀은 세포가 내포 작용으로 인하여 세포 내부에 다포성소체를 만든 뒤, 이들이 외포 작용에 의해 나감으로써 생성된다. 따라서 엑소좀은 생체막으로 구성되며, 그 내부에 mRNA, RNA 및 단백질 등을 포함하고 있다. 상기 물질들을 수송하며 엑소좀은 세포간 신호전달(intercellular communication)을 수행한다. 특히 암세포에서 유래된 엑소좀은 암의 전이에 관여하여 다른 정상세포가 암세포로 변이하도록 영향을 미친다.
- [3] 라만분광법은 조사되는 빛의 비탄성 산란(inelastic scattering)을 이용하여 분자의 진동상태를 구분해낸다. 분자의 진동상태는 물질의 고유적인 특성이므로 라만분광에 의해 생기는 분광그래프 또한 물질 고유의 그래프이다. 표면 증강 라만 분광법(SERS, Surface enhanced Raman spectroscopy)은 기존의 신호 세기가 약한 라만분광법의 단점을 극복한 기술이다. 이를 이용하면 신호의 세기가 증폭되어 구분이 되지 않던 라만신호가 구분된다. 그 중 금 나노 파티클을 염으로 이용하여 서로 응집시킨 구조는 제작 방법도 매우 간단하며 신호를 증폭시킬 수 있기에 효율적인 표면 증강 라만 분광법의 기판이다. 그러나, 단일 분자가 아닌 생체입자의 라만신호는 복잡한 양상을 띠고 있어 후처리 과정 없이는 해석이 매우 힘들다.
- [4] 주성분분석법(PCA, Principal component analysis)은 많은 변수들을 원하는 몇 개의 변수만으로 축소시키는 기법이다. 이를 이용하여 기존의 다차원 스펙트럼을 몇 개의 변수로 디콘볼루션(deconvolution)하여 2차원으로 만들 수 있고, 차원을 축소시키거나, 주성분이 어느 것인지를 확인하고자 할 때 사용이 가능하다.
- [5] 암은 세계적으로 매년 인구 10만 명당 대략 270명 정도 발병하고, 대략 30%가 이로 인해 사망한다. 폐암의 경우 5년 생존율이 22%로 매우 낮은 편이고, 원격 전이가 되었을 경우 그 생존율은 5%로 급격히 떨어진다. 이처럼 암은 조기진단 및 치료가 매우 중요한 질병이다.
- [6] 암의 조기 진단 방법에는 여러 가지 방법이 존재하나, 보다 향상된 정확도를 가지며, 환자 친화적인 암의 진단 방법이 필요한 실정이다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로, 정확한 암의 조기 진단 및 환자 친화적인 진단 방법을 제공하기 위하여 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류법 및 세포 진단 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 일 실시예에 따른 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류법은, 암 세포로부터 유래한 엑소좀 및 정상 세포로부터 유래한 엑소좀으로부터 라만 신호를 측정하는 단계; 및 상기 암 세포와 정상세포 유래 엑소좀을 주성분분석법으로 분류하는 단계를 포함한다.
- [9] 또한, 본 발명에 따른 상기 주성분분석법으로 분류하는 단계는 상기 라만 신호의 파장을 복수 개로 등분하여 각 등분된 파장대에서의 신호값을 변수로 하여 진행되는 것을 특징으로 한다.
- [10] 또한, 본 발명에 따른 상기 주성분분석법으로 분류하는 단계에서 암 세포 영역과 정상 세포 영역으로 구분되는 것을 특징으로 한다.
- [11] 또한, 본 발명에 따른 상기 암 세포는 폐암 세포인 것을 특징으로 한다.
- [12] 또한, 본 발명에 따른 세포 진단 방법은 엑소좀의 라만 신호를 분류하는 단계; 및 임의 세포로부터의 라만 신호를 측정하는 단계; 및 상기 측정된 라만 신호를 상기 분류된 엑소좀의 라만 신호와 비교하는 단계; 및 상기 비교하는 단계의 결과에 따라 상기 임의 세포의 종류가 결정되는 단계를 포함한다.
- [13] 그리고, 본 발명에 따른 상기 임의 세포의 라만 신호는 파장을 복수 개로 등분하여 신호값을 얻는 것을 특징으로 한다.

### 발명의 효과

- [14] 본 발명은 암세포의 엑소좀의 라만 신호를 분석하고, 이를 정상세포로부터 유래한 엑소좀의 라만 신호와 비교 및 분석할 수 있으며, 상기 분석 결과에 따라, 암 세포와 정상 세포를 용이하게 구분할 수 있다.
- [15] 또한, 본 발명은 X선 검사, 생체 검사 등의 기존 암 진단 방법과 비교하여 보다 환자 친화적인 진단 방법을 통해 암 세포와 정상 세포를 구분하는 방법을 제시할 수 있다. 그리고, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 컴퓨터 프로그램을 이용하여 보다 용이하게 엑소좀의 라만 신호를 해석 및 분류할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 엑소좀의 라만 신호 분류방법의 단계도이다.
- [17] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 폐암세포인 H522와 H1299, 그리고 정상세포(Alveolar)에서 측정된 라만신호 결과이다.
- [18] 도 3은 상기 등분된 라만시프트 파장대의 신호값을 기준으로 폐암세포와 암세포를 주성분분석법으로 분류한 결과이다.

- [19] 도 4는 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 세포 진단 방법의 단계도이다.
- [20] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 라만 신호 분석방법의 모식도이다.
- [21] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 주성분분석법(PCA)으로 분석한 score plot이다.
- [22] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 주성분 분석법(PCA)으로 분석한 loading plot이다.
- [23] 도 8 및 9는 혈액암 세포에 대한 라만 분석 결과이다.
- [24] 도 10은 상기 실험결과를 바탕으로한 PCA 분류 결과이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [25] 이하 본 발명의 바람직한 실시를 보다 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 다수의 상이한 형태로 구현될 수 있고, 기술된 실시 예에 제한되지 않음을 이해하여야 한다. 하기에 설명되는 본 발명의 실시 예는 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위한 것임에 유의하여야 한다.
- [26] 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위하여, 암 세포로부터 유래한 엑소좀 및 정상 세포로부터 유래한 엑소좀으로부터 라만 신호의 신호값을 등분한 후, 각 신호값을 변수로 하여 이를 주성분분석법을 분류하여 암고 정상세포 영역을 분류하는 방법을 제공한다.
- [27] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 엑소좀의 라만 신호 분류방법의 단계도이다.
- [28] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 엑소좀의 라만 신호 분류방법은, 암 세포로부터 유래한 엑소좀 및 정상 세포로부터 유래한 엑소좀으로부터 라만 신호를 측정하는 단계; 및 상기 암 세포와 정상세포 유래 엑소좀을 주성분분석법으로 분류하는 단계를 포함하는 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류방법을 제공한다.
- [29] 본 발명의 일 실시예에서는 암세포 유래 엑소좀과 정상세포 유래 엑소좀에 785nm 파장대의 레이저를 조사하여 라만신호를 측정하였는데, 상기 측정된 라만신호의 라만시프트 신호를 474cm<sup>-1</sup> 부터 1800cm<sup>-1</sup>까지 1030 등분하여 이를 주성분분석법의 변수로 활용한다.
- [30]
- [31] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 폐암세포인 H522와 H1299, 그리고 정상세포(Alveolar)에서 측정된 라만신호 결과이다.
- [32] 도 2를 참조하면, 정상세포와 달리 폐암세포는 일부 라만시프트 파장대에서 특징적인 피크값을 보이는 것을 알 수 있다(적색 부분 참조). 즉, 폐암세포군(H522, H1299)은 정상세포군에 비해 570, 602, 642, 732, 781, 837~844, 869, 911, 1051, 1072, 1195, 1365, 1445, 1539, 1404, 1480 cm<sup>-1</sup> 에서 강한 라만 피크를 나타내는 것을 알 수 있다.
- [33] 도 3은 상기 등분된 라만시프트 파장대의 신호값을 기준으로 폐암세포와

암세포를 주성분분석법으로 분류한 결과이다.

- [34] 도 3을 참조하면, 상기 분류 결과 중 붉은색 면은 폐암군, 파란색 면은 정상세포군이다. 즉, 본 발명은 상기 주성분분석법으로 분류하는 단계에서 암 세포 영역과 정상 세포 영역으로 라만 신호를 구분하며, 그 결과를 임의 세포의 라만 신호와 비교하여 상기 임의 세포가 정상세포인지 또는 암세포인지를 구분한다.
- [35] 도 4는 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 세포 진단 방법의 단계도이다.
- [36] 도 4를 참조하면, 상기 세포 진단 방법은, 상술한 방법에 따라 엑소좀의 라만 신호를 분류하는 단계; 임의 세포로부터의 라만 신호를 측정하는 단계; 상기 측정된 라만 신호를 상기 분류된 엑소좀의 라만 신호와 비교하는 단계; 및 상기 비교하는 단계의 결과에 따라 상기 임의 세포의 종류가 결정되는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 진단 방법을 제공한다.
- [37] 즉, 본 발명에서 상기 임의 세포의 라만 신호는 제 2항과 동일하게 등분되어 신호값을 얻으며, 이에 따라 미리 분류된 결과와 이를 매칭하여 그 결과가 도 3의 붉은색 면에 있는 경우, 암일 가능성이 높은 세포로 판단하여, 암을 진단한다.
- [38]
- [39] 1. 엑소좀 분리
- [40] 암 세포 및 정상 세포를 24~48시간 키운 각각의 배지 50ml를 원심분리기에서 500×g의 조건으로 원심분리시킨 후, 바닥에 영긴 세포 파편을 제외한 상층액만을 분리시켰다. 상기 분리시킨 상층액을 다시 10,000×g의 조건으로 원심분리시키고, 세포파편들을 제외한 상층액만을 여과시켰다. 상기 여과시킨 상층액을 100,000의 분획분자량(MWCO, molecular weight cut-off)을 가지는 필터(centrifugal filter)를 이용하여 농축시켰다. 상기 농축액을 컬럼크로마토그래피를 이용하여 크기별로 분류하고, 나노입자분석기(DLS, dynamic light scattering) 또는 NTA(nanoparticle tracking analysis)를 이용하여 엑소좀에 해당하는 50~200nm 부분만을 분류하였다.
- [41]
- [42] 2. 표면 증강 라만 분석법(SERS, Surface enhanced Raman spectroscopy)
- [43] 커버그라스 위에 금 나노 파티클과 10mM의 CuSO<sub>4</sub>를 처리하고, 상온에서 건조시켰다. 상기의 과정으로 제작된 기판 위에 엑소좀을 처리하고 상온에서 건조시켰다. 10mW의 785nm 레이저를 엑소좀 위에 조사하고, 스펙트로미터 앞에 785nm의 필터를 설치하고 획득 시간은 10초로 설정하여, 스펙트로미터에서 찍히는 400~2200nm의 라만 신호를 얻었다.
- [44]
- [45] 3. 주성분분석법(PCA, Principal component analysis)
- [46] 상기 표면 증강 라만 분석법을 통해 획득된 라만 신호의 baseline을 깎고, 전체 신호의 면적이 1이 되도록 정규화시켰다. 각 세포군별로 얻은 라만 신호를 MATLAB 프로그램을 이용하여 주성분분석(PCA)을 진행하였으며, 이 때

주성분(Principal component)는 구분이 잘되는 축을 선택하여 사용하였다.

- [47] 보다 구체적으로, 주성분분석법(PCA)을 수행함에 있어서, 각 폐암세포 유래의 엑소솜, 폐포 유래의 엑소솜, PBS의 라만 신호를 1030개의 wavenumber로 나누어( $474.655\text{cm}^{-1}$ ,  $476.123\text{cm}^{-1}$ ,  $477.590\text{cm}^{-1}$ , ...,  $1799.126\text{cm}^{-1}$ ) variable로 설정한 후, 각각의 샘플이 최대 공분산을 이루도록 하는 축인 PC 2개를 채택하여 score plot에 점(각 샘플별 라만 신호)으로 나타낸다. 도 6은 폐암세포(H1299) 유래의 엑소솜, 폐포(alveolar) 유래의 엑소솜, PBS의 라만 신호를 각각 빨간색, 파란색, 검은색의 점으로 나타낸 score plot이다. 상기 도 6의 score plot으로부터 각각의 세포군의 엑소솜이 서로 분리되는 것을 확인할 수 있다.
- [48] 이 때, 상기 엑소솜의 분리 기준은 loading plot을 이용하여 확인할 수 있다. 도 7은 loading plot을 나타내며, 가로축은 PC 1으로, 세로축은 PC 2로 이루어진 점들을 통합한 것을 뜻한다. 암 세포의 라만 신호가 PC 1의 음의 peak 부분(도 7의 파란색 삼각형)에서 intensity가 높고, PC 2의 양의 peak 부분(도 7의 빨간색 삼각형)에서 intensity가 높은 경우, 상기 도 6의 score plot에서 좌측 상단에 점들이 찍히게 된다. 즉, 각 PC의 peak들이 폐암 세포 유래의 엑소솜, 폐포 유래의 엑소솜, PBS의 라만 신호를 분류하는 기준 peak로 작용할 수 있다.
- [49]
- [50]
- [51] <실시예 1>
- [52] 표면 증폭 라만 산란(SERS)을 위한 기판을 제작하기 위하여 80nm의 금 나노 파티클  $5\mu\text{l}$ 를 커버 글라스 위에 처리하고,  $\text{CuSO}_4$ 를 이용하여 응집시킨 후 건조시켰다. 상기 건조된 금 나노 파티클 위에  $1 \times 10^9 \text{particle/ml}$ 의 엑소솜  $50\mu\text{l}$ 를 처리한 후, 다시 건조시켰다. 상기 건조시킨 커버글라스를 현미경 위에 올린 후, 파장이 785nm인 레이저로 조사하고, 방출되는 산란광을 분광기를 통하여 측정하였다. 이에 따라, 획득되는  $500 \sim 2000\text{cm}^{-1}$ 에 해당하는 라만 산란을 추출하였다. 그 결과, 암 세포로부터 유래한 엑소솜 및 정상 세포로부터 유래한 엑소솜으로부터 라만 신호를 측정할 수 있었다. 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 라만 신호 분석방법의 모식도이다.
- [53]
- [54] 본 발명에서는 상기 암 세포와 정상세포로부터 유래한 엑소솜을 주성분분석법을 통하여 분류하기 위하여, 통제 집단으로 PBS 용액을 이용했고, 암 세포는 H1299(폐암)를 사용 했으며, 정상 세포는 폐포(Alveolar cell)를 사용하였다. 이로부터 유래한 엑소솜의 라만 산란 그래프를 종류별로 측정한 뒤, 주성분분석(PCA)을 수행하였다.
- [55] 특히, 상기 주성분분석법을 수행하기 위하여 상기 측정된 라만 신호의 파장을 복수 개로 등분하여 각 등분된 파장대에서의 신호값을 변수로 이용하여 진행되도록 하였다. 또한, 주성분분석은 90%의 confidence ellipse를 가지도록 원을 구분하였다.

- [56] 그 결과, 암 세포 영역과 정상 세포 영역으로 서로의 영역이 각각 구분되어, 암의 조기 진단이 가능한 것을 확인할 수 있었다.
- [57] H1299(폐암) 및 Alveolar cell(폐포)로부터 유래한 엑소좀의 라만 신호를 획득하고, 상기 획득된 라만 신호로부터 라만픽을 구분하였다. 상기 획득된 라만 신호를 주성분분석(PCA)을 통하여 폐암 세포와 정상 세포로부터 유래한 엑소좀을 구분할 수 있었으며, 그 결과는 상기 도 2 내지 3에 도시된 바와 같다.
- [58] 본 발명의 또 다른 실시예로, 폐암에 해당하는 다른 암세포를 이용하거나 섬유아세포 등의 다른 정상세포를 사용할 수 있다. 또한, 혈액암 세포로부터 유래한 엑소좀과 정상 세포로부터 유래한 엑소좀을 구분할 수 있다.
- [59] 엑소좀의 라만 신호를 분류하여 임의의 세포로부터의 라만 신호를 측정하고, 상기 측정된 라만 신호를 상기 분류된 엑소좀의 라만 신호와 비교하였다. 그 후, 상기 비교 결과에 따라 상기 임의의 세포의 종류를 결정하였다. 상기 기재된 방법에 따라, 세포 진단이 가능한 것을 확인할 수 있다.
- [60] 특히, 상기 임의의 세포의 라만 신호는 파장을 복수 개로 등분하여 각 등분된 파장대에서의 신호값을 획득할 수 있다.
- [61] 본 발명에 따른 암 세포는 폐암세포 뿐만 아니라 혈액암 세포에도 적용될 수 있다.
- [62] 도 8 및 9는 혈액암 세포에 대한 라만 분석 결과이다.
- [63] 도 8 및 9를 참조하면, 혈액암세포군(HL60,KG-1)은 정상세포군(CD34+,HDF,MSC)에 비해 600, 820, 1072, 1441, 1570cm<sup>-1</sup>에서 강한 라만 피크를 나타내는데(도 8), 이를 정상세포와 비교하면 도 9에서 보는 바와 같이 혈액암세포군(HL60,KG-1)은 정상세포군(CD34+,HDF,MSC)에 비해 600, 820, 1072, 1441, 1570cm<sup>-1</sup>에서 강한 라만 피크를 나타낸다.(빨간 색)
- [64] 도 10은 상기 실험결과를 바탕으로 한 PCA 분류 결과이다.
- [65] 도 10을 참조하면, PCA를 통한 라만신호 분류법을 이용, 왼쪽의 그림과 같이 혈액암세포군(HL60,KG-1) vs. 정상세포군(CD34+,HDF,MSC)을 구분해낼 수 있다.
- [66]
- [67] 이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 도시하고 설명하였지만, 본 발명은 상술한 특징의 실시예에 한정되지 아니하며, 청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변형 실시가 가능한 것은 물론이고, 이러한 변형 실시들은 본 발명의 기술적 사상이나 전망으로부터 개별적으로 이해되어져서는 안될 것이다.
- [68]

## 청구범위

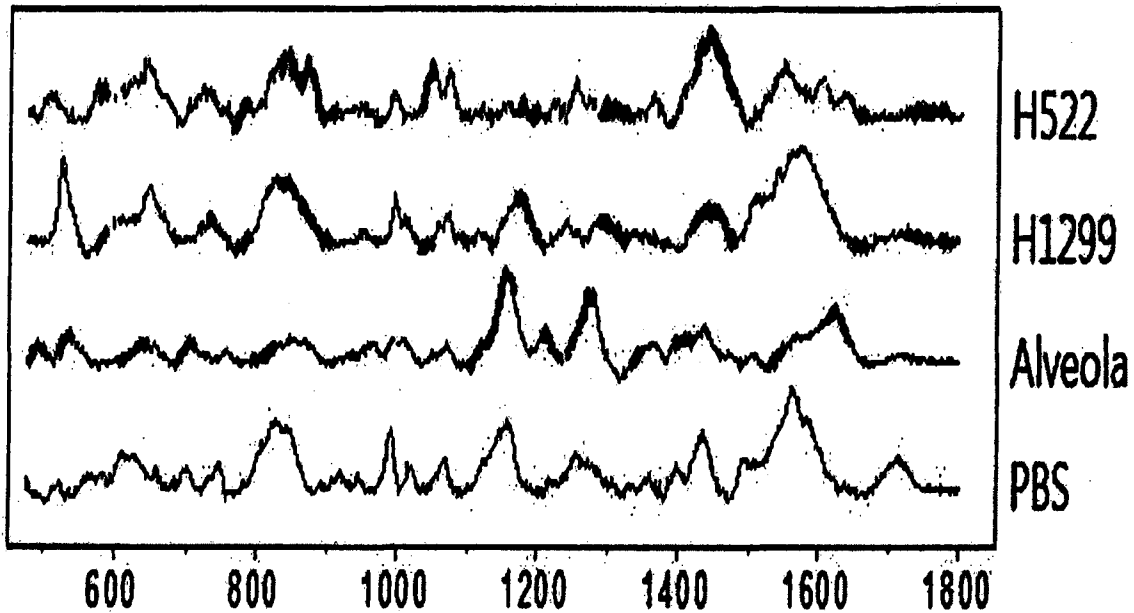
- [청구항 1] 암 세포로부터 유래한 엑소좀 및 정상 세포로부터 유래한 엑소좀으로부터 라만 신호를 측정하는 단계; 및  
상기 암 세포와 정상세포 유래 엑소좀을 주성분분석법으로 분류하는 단계를 포함하는 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 주성분분석법으로 분류하는 단계는 상기 라만 신호의 파장을 복수개로 등분하여 각 등분된 파장대에서의 신호값을 변수로 하여 진행되는 것을 특징으로 하는 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류방법.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,  
상기 주성분분석법으로 분류하는 단계에서 암 세포 영역과 정상 세포 영역으로 구분되는 것을 특징으로 하는 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,  
상기 암 세포는 폐암 또는 혈액암 세포인 것을 특징으로 하는 엑소좀의 라만 신호 분류방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,  
상기 암 세포가 폐암 세포인 경우, 정상세포 대비 570, 602, 642, 732, 781, 837~844, 869, 911, 1051, 1072, 1195, 1365, 1445, 1539, 1404, 1480  $\text{cm}^{-1}$  에서 강한 라만 피크를 갖는 것을 특징으로 하는 엑소좀의 라만 신호 분류방법.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서,  
상기 암 세포가 혈액암 세포인 경우, 정상세포 대비 600, 820, 1072, 1441, 1570 $\text{cm}^{-1}$  에서 강한 라만 피크를 갖는 것을 특징으로 하는 엑소좀의 라만 신호 분류방법.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 따라 엑소좀의 라만 신호를 분류하는 단계; 및  
임의 세포로부터의 라만 신호를 측정하는 단계; 및  
상기 측정된 라만 신호를 상기 분류된 엑소좀의 라만 신호와 비교하는 단계; 및  
상기 비교하는 단계의 결과에 따라 상기 임의 세포의 종류가 결정되는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 암세포 진단 방법.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서,  
상기 임의 세포의 라만 신호는 제 2항과 동일하게 등분되어 신호값을 얻는 것을 특징으로 하는 암세포 진단 방법.

[도1]

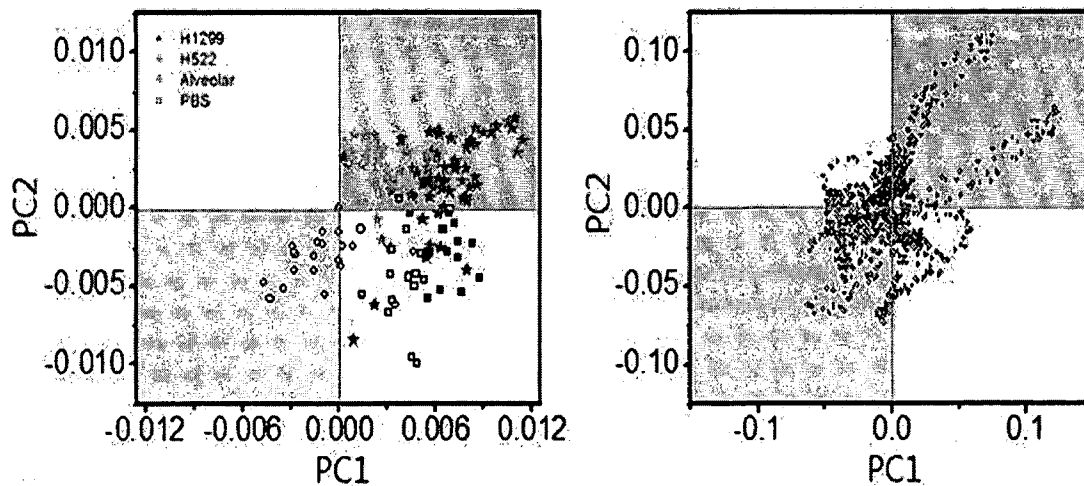
암 세포로부터 유래한 엑소좀 및 정상 세포로부터 유래한 엑소좀으로부터  
라만 신호를 측정하는 단계

상기 암 세포와 정상세포 유래 엑소좀을 주성분분석법으로 분류하는 단계

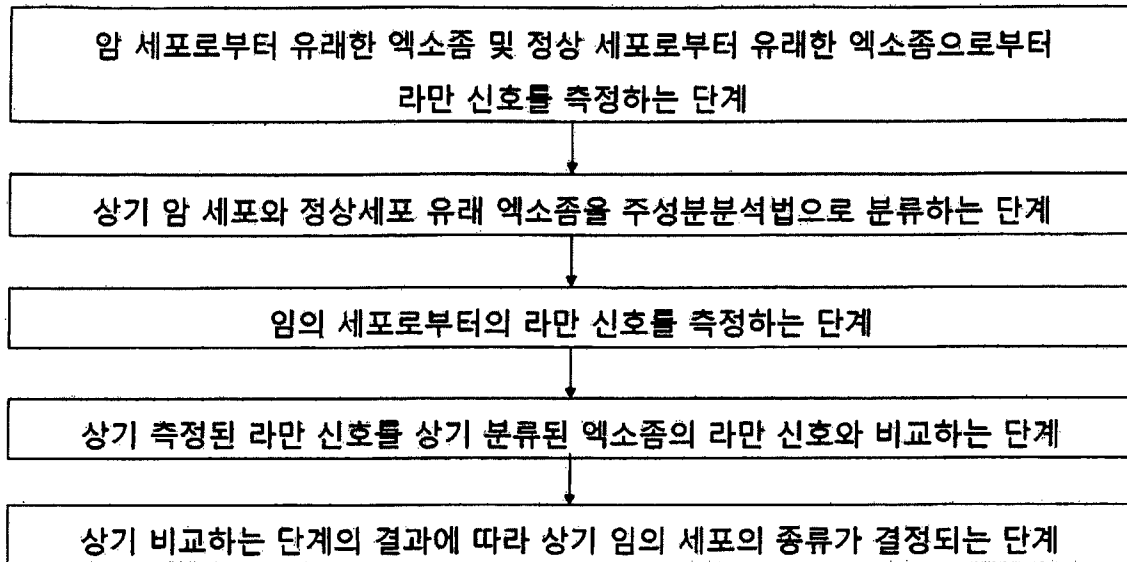
[도2]



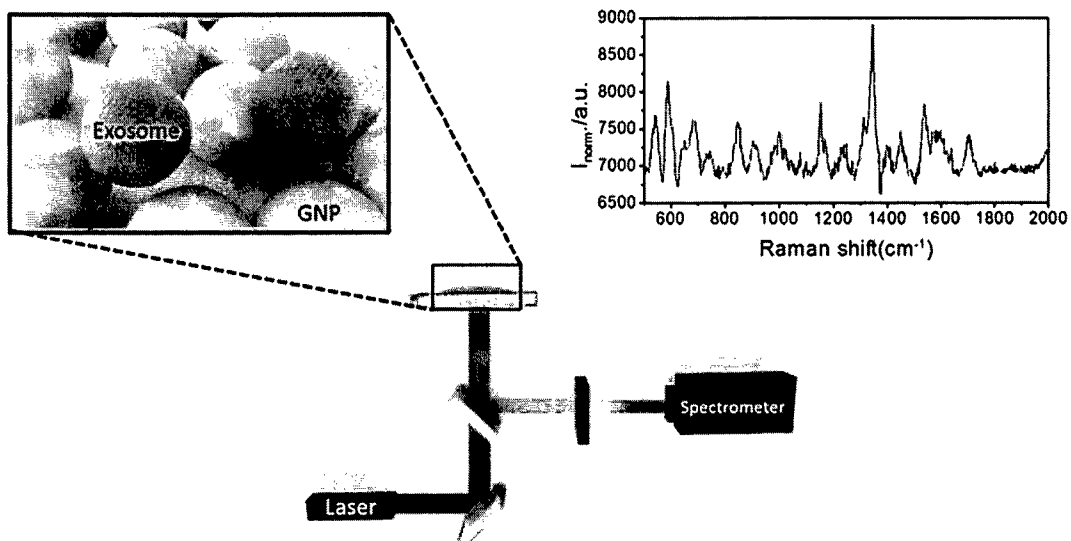
[도3]



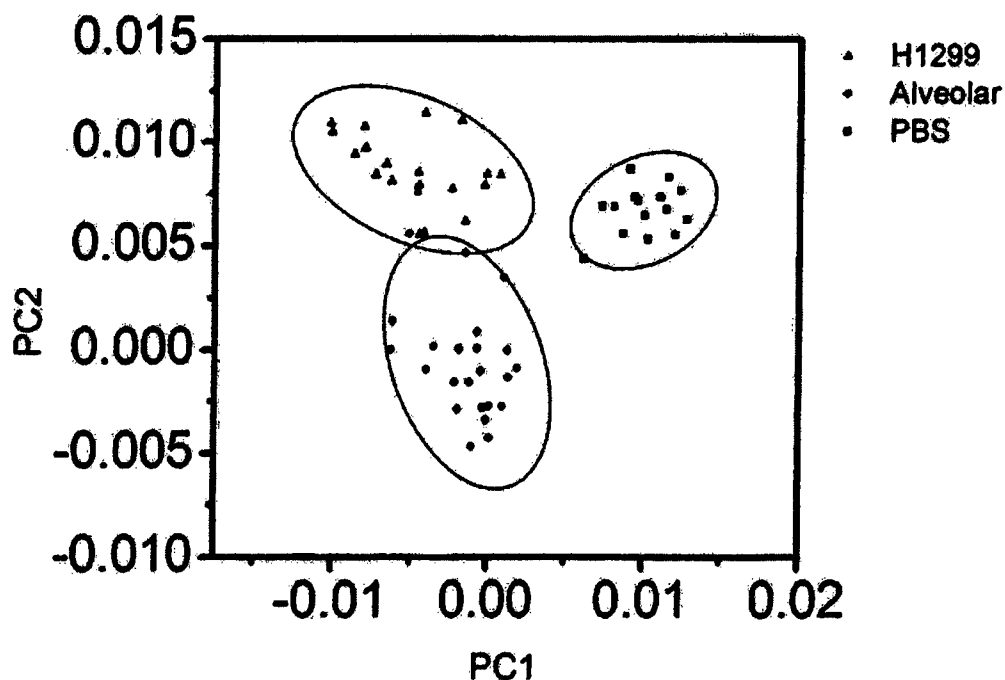
[도4]



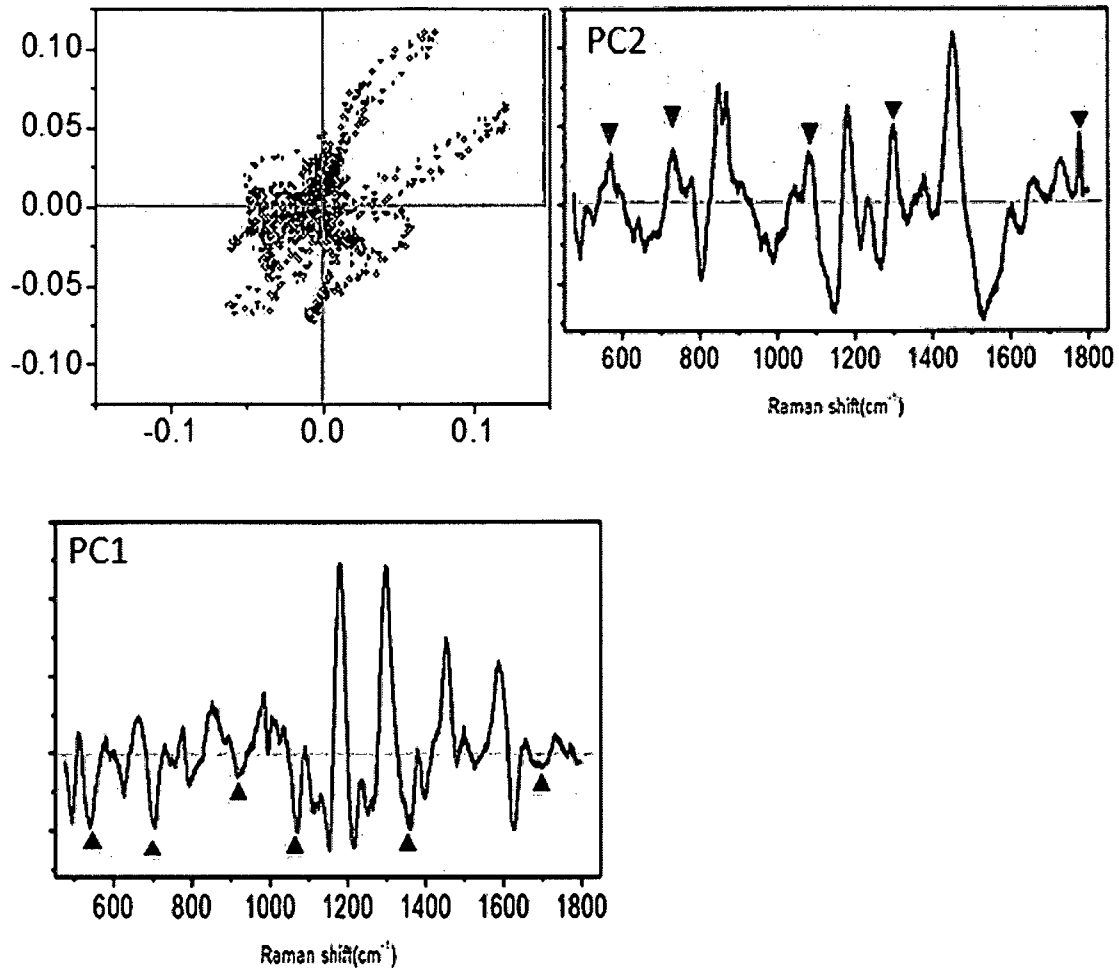
[도5]



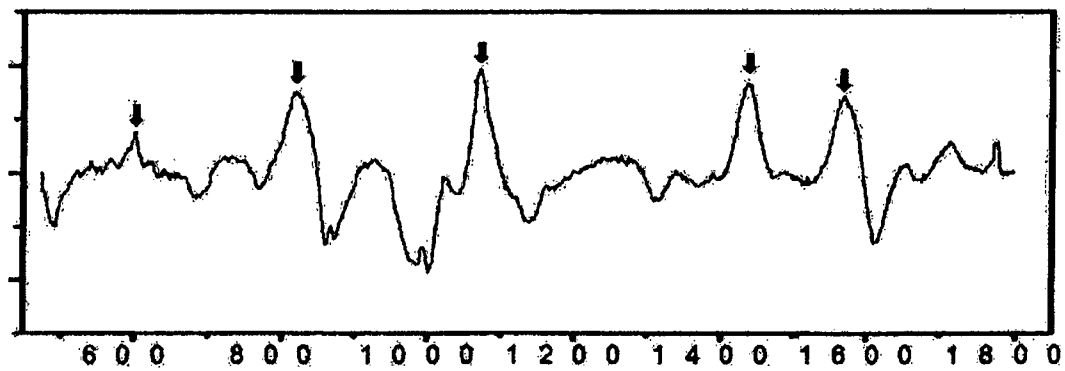
[도6]



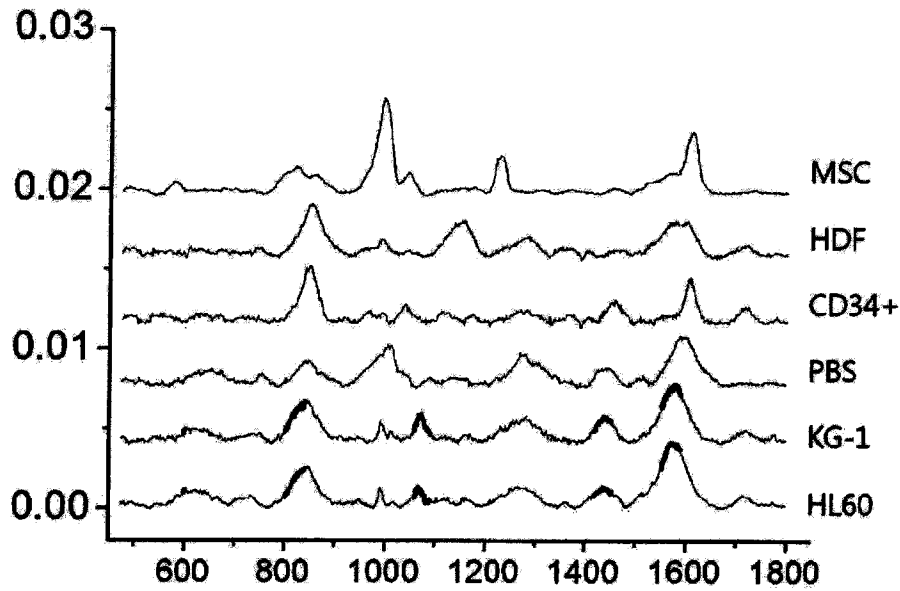
[도7]



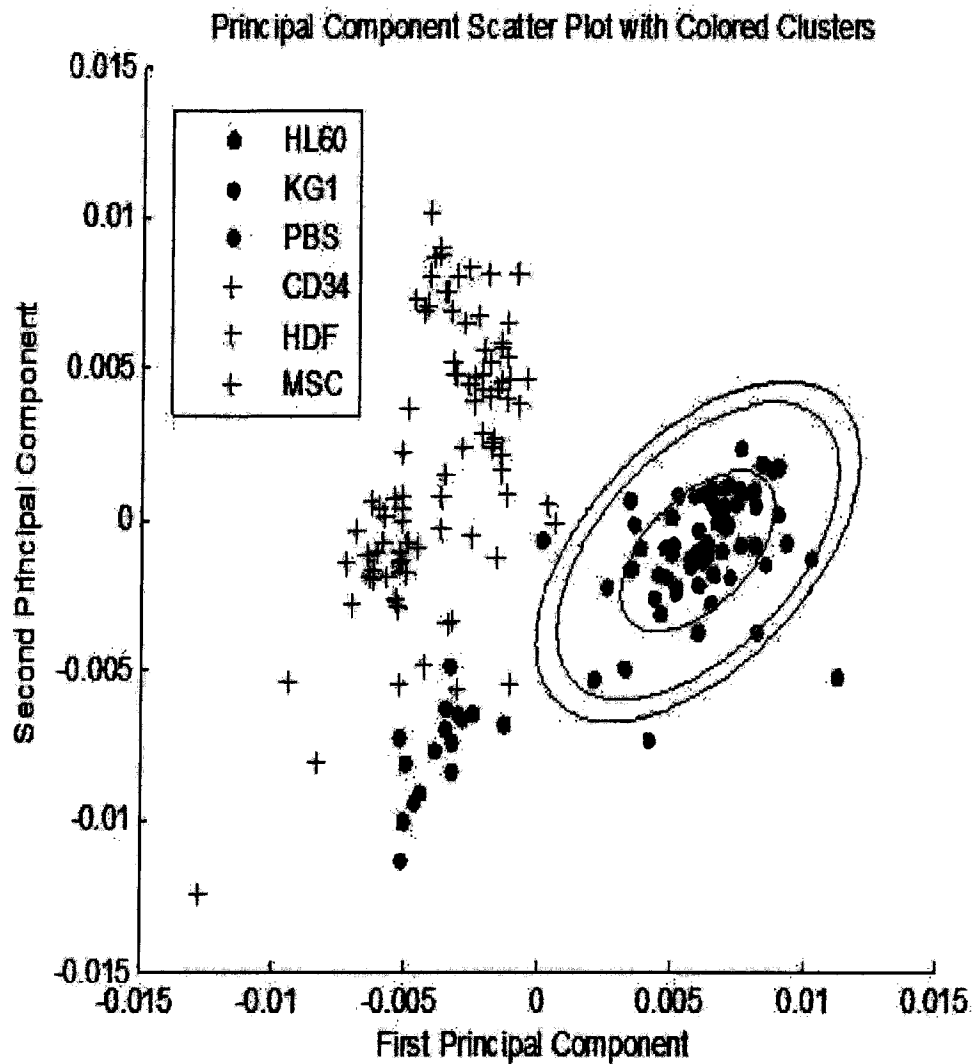
[도8]



[도9]



[도10]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/009661

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*G01N 21/65(2006.01)i, G01N 33/483(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 21/65; G01N 33/483; A61B 5/1455; G01N 33/53; C12Q 1/70; G01N 21/35; G01N 33/574

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) &amp; Keywords: cancer cell, normal cell, exosome, raman signal, principal component analysis, pattern recognition and signal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | SMITH et al., "Single Exosome Study Reveals Subpopulations Distributed among Cell Lines with Variability Related to Membrane Content", Journal of Extracellular Vesicles 2015, 4:28533, pages 1-15 (07 December 2015)<br>See pages 1-15. | 1-8                   |
| A         | KR 10-2010-0002434 A (JUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 07 January 2010<br>See paragraphs [0026]-[0036] and figures 1-3.                                                                         | 1-8                   |
| A         | KR 10-2014-0038213 A (SMARTEOME CO., LTD.) 28 March 2014<br>See paragraphs [0011]-[0041] and figure 1.                                                                                                                                   | 1-8                   |
| A         | JP 2008-134217 A (NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 12 June 2008<br>See paragraphs [0013]-[0032] and figures 1-7.                                                                                                     | 1-8                   |
| A         | US 2008-0113337 A1 (SAKUDO et al.) 15 May 2008<br>See paragraphs [0017]-[0053].                                                                                                                                                          | 1-8                   |



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

"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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 DECEMBER 2016 (30.12.2016)

Date of mailing of the international search report

**30 DECEMBER 2016 (30.12.2016)**

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2016/009661**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| KR 10-2010-0002434 A                      | 07/01/2010          | KR 10-0979727 B1        | 03/09/2010          |
| KR 10-2014-0038213 A                      | 28/03/2014          | KR 10-1523337 B1        | 28/05/2015          |
| JP 2008-134217 A                          | 12/06/2008          | JP 4131744 B2           | 13/08/2008          |
| US 2008-0113337 A1                        | 15/05/2008          | WO 2006-051847 A1       | 18/05/2006          |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

G01N 21/65(2006.01)i, G01N 33/483(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 21/65; G01N 33/483; A61B 5/1455; G01N 33/53; C12Q 1/70; G01N 21/35; G01N 33/574

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: 암 세포, 정상 세포, 엑소좀, 라만 신호, 주성분분석법, 패턴 인식 및 신호

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                  | 관련 청구항 |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| X     | SMITH et al., 'SINGLE EXOSOME STUDY REVEALS SUBPOPULATIONS DISTRIBUTED AMONG CELL LINES WITH VARIABILITY RELATED TO MEMBRANE CONTENT' , JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES 2015, 4:28533, 페이지 1-15 (2015.12.07) 페이지 1-15 참조. | 1-8    |
| A     | KR 10-2010-0002434 A (한양대학교 산학협력단) 2010.01.07<br>단락 [0026]-[0036] 및 도면 1-3 참조.                                                                                                                                              | 1-8    |
| A     | KR 10-2014-0038213 A (주식회사 스마테움) 2014.03.28<br>단락 [0011]-[0041] 및 도면 1 참조.                                                                                                                                                  | 1-8    |
| A     | JP 2008-134217 A (NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 2008.06.12<br>단락 [0013]-[0032] 및 도면 1-7 참조.                                                                                                          | 1-8    |
| A     | US 2008-0113337 A1 (SAKUDO et al.) 2008.05.15<br>단락 [0017]-[0053] 참조.                                                                                                                                                       | 1-8    |

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 12월 30일 (30.12.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 12월 30일 (30.12.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이현길

전화번호 +82-42-481-8525



| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌            | 공개일        |
|-----------------------|------------|-------------------|------------|
| KR 10-2010-0002434 A  | 2010/01/07 | KR 10-0979727 B1  | 2010/09/03 |
| KR 10-2014-0038213 A  | 2014/03/28 | KR 10-1523337 B1  | 2015/05/28 |
| JP 2008-134217 A      | 2008/06/12 | JP 4131744 B2     | 2008/08/13 |
| US 2008-0113337 A1    | 2008/05/15 | WO 2006-051847 A1 | 2006/05/18 |