

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2022년 2월 24일 (24.02.2022) WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/039348 A1

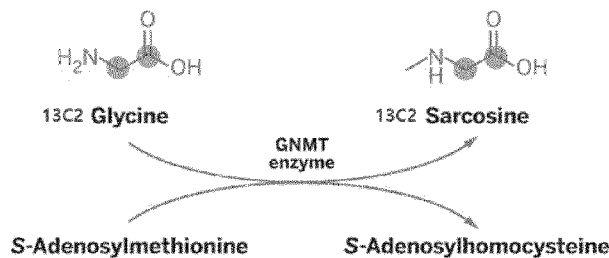
- (51) 국제특허분류:
G01N 33/60 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01) *G01N 33/573* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/005942
- (22) 국제출원일: 2021년 5월 12일 (12.05.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0103469 2020년 8월 18일 (18.08.2020) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1(신림동), Seoul (KR). 인하대학교 산학협력단 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE) [KR/KR]; 22212 인천시 미추홀구 인하로 100, Incheon (KR).
- (72) 발명자: 박성혁 (PARK, Sunghyounk); 06280 서울시 강남구 삼성로 51길 37, 103-902, Seoul (KR). 김진모 (KIM, Jin-Mo); 21061 인천시 계양구 용종로 97, 205-1603, Incheon (KR). 안용진 (AN, Yong Jin); 08815 서울시 관악구 신림로 3가길 40-42, p-105, Seoul (KR). 오세현 (OH, Sehyun); 34137 대전시 유성구 궁동로 5, 102-204, Daejeon (KR). 홍순선 (HONG, Soon Sun); 03625 서울시 서대문구 문화촌길 6-24, 102-1601, Seoul (KR). 정경

희 (JUNG, Kyung Hee); 14778 경기도 부천시 범안로 130-27, 506-102, Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털로 151 이노플렉스 1차 601호, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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, 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 국내 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).

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING ^{13}C OR ^2H ISOTOPE-LABELED GLYCINE AS ACTIVE INGREDIENT FOR DIAGNOSIS OF LIVER CANCER

(54) 발명의 명칭: ^{13}C 또는 ^2H 동위원소로 표지된 글라이신을 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물



(57) Abstract: The present invention is to diagnose liver cancer and relates to a method for diagnosing by evaluating activity of glycine N-methyltransferase with isotope-labeled glycine and a composition comprising isotope-labeled glycine as an active ingredient for diagnosis of liver cancer. In the present invention, it was identified that the activity of glycine N-methyltransferase is associated with the onset of liver cancer at cell and tissue levels and can be evaluated by measuring a degree of conversion of glycine labeled with a isotope harmless to the human body into isotope-labeled sarcosine, whereby the present invention provides a composition comprising isotope-labeled glycine as an active ingredient for diagnosis of liver cancer and a method for diagnosing liver cancer by measuring a level of isotope-labeled sarcosine in urine in a noninvasive manner.

(57) 요약서: 본 발명은 간암을 진단하기 위해 동위원소로 표지된 글라이신을 이용하여 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성을 평가하여 간암을 진단하는 방법 및, 동위원소로 표지된 글라이신을 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물에 관한 것으로, 세포 및 조직 수준에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성이 간암 발병과 관련이 있음을 확인하고, 인체에 무해한 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)이 의해 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)으로 전환되는 정도를 측정함으로써, N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성을 평가할 수 있다는 것을 확인함으로써, 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물을 제공하고, 비침습적으로 소변 내에서 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준을 측정함으로써 간암을 진단하는 방법을 제공한다.

[다음 쪽 계속]

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: ^{13}C 또는 ^2H 동위원소로 표지된 글라이신을 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 간암을 진단하기 위해 동위원소로 표지된 글라이신을 이용하여 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성을 평가하여 간암을 진단하는 방법 및, 동위원소로 표지된 글라이신을 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 간암은 암 환자들에게서 흔하게 발견되는 질환으로, 암으로 사망한 환자의 22.6%가 간암으로 진단받았다. 간암을 치료하는 방법은 대부분 암이 발병된 종양 조직을 절제하는 수술이지만, 종양의 크기 및 발병 부위에 따라 수술로 제거하는 데에 한계가 있으며, 재발 및 전이될 가능성이 있기에 치료가 어려운 질환이지만, 간암을 진단함에 따라 생활 습관의 변화와 건강관리를 통해 암의 진행을 늦추고, 병증을 완화하는 방법이 권장되고 있다. 따라서 간암을 정확하게 진단하는 방법이 간암 치료에 매우 중요하다.
- [3] 간암을 진단하는 방법으로는 혈액 또는 조직 내의 간암 마커를 검사하거나 CT 또는 MRI와 같은 의학적 기기로 진단할 수 있다. 만성간염, 간경변 환자들과 같은 간암 고위험군은 간암 조기진단을 위한 선별검사(surveillance test)로 초음파 검사 및 혈청 AFP(α -fetoprotein)를 정기적으로 시행하도록 권고되고 있다. 혈액 내의 AFP(α -fetoprotein) 수준이 간암을 진단하는 바이오 마커로 가장 널리 사용되고 있으나, 일부 간암 환자에서는 진단되지 않는 문제가 보고됨에 따라 진단 정확도에 문제가 있다.
- [4] 또한, 암을 진단하기 위해 조직 검사가 시행되고 있으나, 간암 환자의 경우 간경변을 동반하고 있어 출혈 위험도가 다른 암환자에 비해 높은 문제가 있다. 간암 조직 검사는 초음파로 위치를 파악하여 검사용 바늘을 피부에 삽입하여 진행하는데, 종양의 위치에 따라 바늘이 접근하기 어려운 경우도 있으며, 종양의 크기에 따라 종양의 위치를 파악하는 것이 어려울 수 있다.
- [5] 따라서 간암을 비침습적으로 정확하게 진단할 수 있는 새로운 바이오마커의 개발이 요구되고 있으며, 본 발명자들은 종래에 알려지지 않은 소변과 같이 비침습적 생물학적 시료에서 간암을 진단할 수 있는 새로운 바이오 마커 및 이를 통한 간암 진단 방법을 개발하고자 하였다.
- [6] [선행기술문헌]
- [7] [특허문헌]
- [8] 한국등록특허공보 제10-1516634호
- [9] [비특허문헌]

- [10] The Journal of nutrition, 137(12), 2647-2652.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 발명자들은 비침습적으로 소변에서 간편하게 간암을 진단할 수 있는 방법을 제공하고자 간암조직에서 발현양이 감소하는 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성 변화를 검출하고자 하였다. 이 효소는 사르코신(Sarcosine)을 글라이신(Glycine)으로부터 생성하는 효소이며 이때 생성되는 사르코신(Sarcosine)이 소변에서 검출될 수 있음을 확인하였다. 정확한 효소 활성의 측정에는 이미 생체내에 존재하는 사르코신(Sarcosine)을 배제하고 특정시점에서 투여한 글라이신(Glycine)에 의해서 생성되는 사르코신(Sarcosine)만을 선택적으로 검출해야 한다. 그러므로 인체에 무해한 지방산 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 투여함에 따라 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 소변에서의 수준 변화를 통해 비침습적으로 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성 변화를 측정함으로써 간암을 진단할 수 있는 방법을 제공하고자 하였다.

기술적 해결방법

- [12] 본 발명은 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 간암 진단이 필요한 대상체에게 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 투여하는 단계; 상기 대상체로부터 취득되는 생물학적 시료에서 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준이 건강한 정상 대조군에 비해 낮게 나타나면 간암이 발병했거나 발병할 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계를 포함하는 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 시험물질과 함께 간암 세포주에 처리하는 단계; 및 상기 간암 세포주에서 동위원소로 표시된 사르코신(Sarcosine)의 수준이 시험물질을 처리하지 않은 경우에 비해 증가하면 시험물질을 간암에 대한 치료용 제제로 판단하는 단계를 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 제제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [15] 본 발명에 따르면, 세포 및 조직 수준에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성이 간암 발병과 관련이 있음을 확인하고, 인체에 무해한 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)에 의해 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)으로 전환되는 정도를 소변 또는 혈액에서 측정하여 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성을 평가할 수 있다는 것을 확인함으로써, 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물을 제공하고, 비침습적으로 소변 내에서 동위원소로 표지된

사르코신(Sarcosine)의 수준을 측정함으로써 간편하게 간암을 진단하는 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 동위원소 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)이 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)에 의해 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)으로 전환되는 반응을 나타내는 그림이다.
- [17] 도 2는 건강한 정상 대조군과 암 환자의 간 조직에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성 차이를 나타내는 사진이다.
- [18] 도 3은 건강한 정상 대조군의 혈장에서 사르코신(Sarcosine)이 검출되는지를 확인한 결과이다.
- [19] 도 4는 정상 간 세포주(NKNT3) 및 간암 세포주(HepG2, Hep3B)에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 발현 수준을 측정한 결과이다.
- [20] 도 5는 정상 간 세포주(NKNT3) 및 간암 세포주(HepG2, Hep3B)에서 동위원소 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine) 투여에 따라 생성되는 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준을 측정한 결과이다.
- [21] 도 6은 간암 동물 모델을 제조하기 위해 디에틸니트로사민(Diethylnitrosamine, DEN) 처리 후 시간이 지남에 따라 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델의 간조직 사진이다.
- [22] 도 7은 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델의 간조직에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성을 측정한 결과이다.
- [23] 도 8은 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델의 간조직에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 발현 수준을 측정한 결과이다.
- [24] 도 9는 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델의 소변에 포함된 크레아틴(Creatinine)의 함량을 측정한 그래프이다.
- [25] 도 10은 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델의 소변에서 크레아틴(Creatinine)의 함량 대비 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 비율을 측정한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [26] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

- [27] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [28] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.
- [29] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [30] 본 발명은 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물을 제공한다.
- [31] 상기 동위원소는 동위원소 ^{13}C 또는 동위원소 ^2H 일 수 있으며, 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)은 글라이신(Glycine)을 구성하는 탄소(C) 또는 수소(H)에 하나 또는 2개 이상의 동위원소가 표지될 수 있다. 구체적으로 글라이신(Glycine)이 2개의 동위원소로 표지될 경우, 글라이신을 구성하는 두 개의 탄소에 동위원소 ^{13}C 로 표지될 수 있고, 또는, 글라이신을 구성하는 하나의 탄소에 동위원소 ^{13}C 로 표지 되고 글라이신을 구성하는 하나의 수소에 동위원소 ^2H 로 표지될 수 있다.
- [32] 상기 조성물은 간암 진단이 필요한 대상체에게 경구 또는 비경구로 투여되며, 상기 조성물은 액제, 현탁제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 엑스제, 에멀전, 시럽제, 에어로졸 및 주사제로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [33] 본 발명의 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 허용가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 허용가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [34] 또한, 본 발명은 간암 진단이 필요한 대상체에게 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 투여하는 단계; 상기 대상체로부터 수득되는 생물학적 시료에서 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준이 건강한 정상 대조군에 비해 낮게 나타나면 간암이 발병했거나 발병할 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [35] 상기 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준은 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성에 의해 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)이 전환된 것이다.
- [36] 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 또는 소변일 수 있으나, 바람직하게는 소변일 수 있다.
- [37] 또한, 본 발명은 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 시험물질과 함께 간암 세포주에 처리하는 단계; 및 상기 간암 세포주에서 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준이 시험물질을 처리하지 않은 경우에 비해 증가하면 시험물질을 간암에 대한 치료용 제제로 판단하는 단계;를 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 제제를 스크리닝 하는 방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[39]

[40] <실험예> 실험 재료 및 방법

- [41] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[42]

[43] 1. 세포 및 배양 조건

- [44] 본 실험에서 사용된 정상 간 세포주(NKNT3) 및 간암 세포주(HepG2, Hep3B)는 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)으로부터 구입하였다. 세포는 10% FBS (fetal bovine serum), 100 units/ml의 페니실린 및 100 µg/ml의 스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지에서 37°C습윤한 CO₂배양기에서 5% CO₂ 95% air조건으로 배양되었다.

[45]

[46] 2. 동물 모델

- [47] 본 실험에 사용된 간암 동물 모델은 10 주령의 랫트를 오리엔트 바이오(주)로부터 구입하고 일주일의 순화기간을 거친 후,

디에틸니트로사민(Diethylnitrosamine, DEN)을 100 mg/L의 농도로 경구투여하였
실험에 사용하였다.

[48]

[49] 3. 시료

[50] 본 실험에서 사용된 동위원소 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)은 Cambridge
Isotope Laboratories, Inc.로 부터 구입하였다.

[51]

[52] 4. 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성 측정

[53] 세포 또는 생체 시료에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas;
GNMT)의 활성을 측정하기 위해 GNMT 효소에 의한 글라이신(Glycine)의
사르코신(Sarcosine)으로의 전환을 측정하는 방법을 사용하였다.

[54] In vitro 실험의 경우, 1 mM ^{13}C - 글라이신이 포함된 성장배지(growth
medium)에서 세포를 16 시간 배양한 후에, 세포로부터 대사체를 추출하여 세포
내에 생성된 ^{13}C -사르코신의 양을 측정하였다.

[55] In vivo 실험의 경우, 동물모델(랫트)에게 ^{13}C -글라이신을 200 mg/kg body
weight으로 구강 투여하고, 케이지에서 2 시간 동안 소변을 모았다. 마찬가지로
대사체를 추출하여 소변 시료 내에 존재하는 ^{13}C -사르코신의 양을 측정하였다.

[56]

[57] 5. 샘플 내 ^{13}C -사르코신(^{13}C -Sarcosine) 함량 측정

[58] 샘플 내 ^{13}C -사르코신 함량을 측정하기 위해 메탄올(methanol),
클로로포름(chloroform), 및 증류수(water)을 이용하여 대사체를 추출하였다. ^{13}C -
사르코신은 LC-MS를 이용하여 측정하였다. 4000 Q TRAP 질량
분석기(AB/SCIEX, Framingham)를 이용하여 HMDB 사르코신 스탠다드를
분석하고, ^{13}C -사르코신의 측정 조건을 설정하였다. ^{13}C -사르코신 정량은
HPLC1290 Infinity (Agilent Technologies) 기기를 이용하였으며, 이동상 조건은
수산화 암모늄으로 pH 9.0인 20 mM 아세트산 암모늄(Ammonium acetate)을 버퍼
A로 사용하고, 아세토니트릴(Acetonitrile)을 버퍼 B로 사용하였다. SeQuant®
ZIC®-pHILIC 컬럼(5 μm polymer 150 x 2.1 mm, Merck KGaA, 64271 Darmstadt,
Germany)을 사용하였으며, 하기 표 1과 같은 이동상 구매 조건으로 수행하였다.

[59]

[60]

[61] [표1]

Total Time (min)	Flow Rate (ul/min)	버퍼 A (%)	버퍼 B (%)
0	150	20	80
5	150	65	35
7	150	95	5
14	150	95	5
15	150	20	80
20	150	20	80

[62]

[63] 6. 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 발현 수준 측정

[64] 조직에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 발현 수준을 측정하기 위해 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하였다. 웨스턴 블롯(Western blot)에 사용된 조직시료는 정상대조군 동물모델의 간조직, 디에틸니트로사민(Diethylnitrosamine, DEN)으로 유도한 간암 동물모델의 간조직으로 구성하였다. 조직시료의 농도를 BCA 분석으로 결정한후 40 ug의 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE 젤에 전기영동하였고, 나이트로셀룰로스 막(NC membrane)으로 전달 후 5% 탈지유를 포함하고 25 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 및 0.05% (w/v) Tween-20로 구성되는 TBST 용액(Tris Buffered Saline with Tween 20)으로 실온에서 1시간 블록킹하였다. 단백질이 전달된 나이트로셀룰로스 막을 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas) 일차항체(Santa Cruz Biotechnology, sc-83830)를 1:1000 비율로 실온에서 2 시간 처리하고, TBST 용액으로 3회 세척하였다. 퍼옥시다제가 붙어있는 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, sc-2004)를 1:5000 비율로 실온에서 1 시간 처리하고, TBST 용액으로 3회 세척하였다. 표적 단백질의 밴드를 화학발광기질 키트 WESTSAVESTAR(Abfrontier, LF-QC0106)를 사용하여 발색하였다. 밴드강도는 화상이미지분석기(Chemi-DOC)로 측정하였다. 샘플 간의 발현 수준을 정확하게 대비하기 위해 하우스키핑(housekeeping) 유전자인 β -액틴 항체(Proteintech Group, 66009-I-IG)를 1:5000 비율로 사용하여 β -액틴의 발현 수준을 측정하였다.

[65]

[66] 7. 간암 동물 모델 실험

[67] 동위원소 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)을 이용하여 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성 수준을 평가하기 위해 간암 동물 모델에 동위원소 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)을 투여하고, 소변으로 배출되는 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준 변화를 측정하였다.

- [68] 간암 동물 모델은 디에틸니트로사민(Diethylnitrosamine, DEN)을 100mg/L의 농도로 13주 또는 17주 동안 음수로 경구 투여하여 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델을 준비하였다.
디에틸니트로사민(Diethylnitrosamine, DEN)은 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.
- [69] 건강한 정상 동물 모델과 간세포암종이 발병한 동물 모델을 실험당일 동위원소 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)을 경구투여 방법으로 200mg/kg 용량으로 1ml로 1회 투여하고, 두시간 후 각 동물모델로부터 소변을 수집하여 크레아틴(Creatinine) 및 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준을 LC/MS방법으로 측정하였다.
- [70]
- [71] 실시예 1. 간암 발병에 따른 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성 변화 평가
- [72] 간 조직에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성 정도와 간암 발병을 진단하는 관련 인자라는 것을 확인하기 위해, protein atlas(proteinatlas.org)에서 건강한 정상 대조군과 암 환자의 간 조직에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성 차이를 비교한 결과를 참고하였다.
- [73] 도 2는 건강한 정상 대조군과 암 환자의 간 조직에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성을 측정한 결과이다. 도 2에 나타난 바와 같이, 건강한 정상 대조군에서는 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성이 25% 내지 75% 수준으로 나타났으나, 암 환자의 간 조직에서는 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성이 전혀 나타나지 않았다.
- [74] 상기 결과는 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성 감소가 간암을 진단할 수 있는 마커로 사용될 수 있음을 입증한다.
- [75]
- [76] 실시예 2. 혈장 내 사르코신(Sarcosine) 함량 측정
- [77] 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성을 비침습적으로 측정하여 간암을 진단하기 위해, 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)로 글라이신(Glycine)이 사르코신(Sarcosine)으로 전환되는 반응을 이용하였다.
- [78] 도 1은 동위원소 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)이 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)에 의해 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)으로 전환되는 반응을 나타내는 그림이다.
- [79] 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)은 간에서 글라이신(Glycine)을 사르코신(Sarcosine)으로 전환하는 효소이며, N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 기질인 글라이신(Glycine)에 인체에 무해한 동위원소 ^{13}C 로 표지하고, ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)

수준을 측정함으로써, N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성 정도를 평가할 수 있다.

- [80] ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)의 투여에 따른 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine) 수준을 비침습적으로 측정되는지를 확인하기 위해, 혈장에서 사르코신(Sarcosine)의 검출 여부를 측정하였다.
- [81] 도 3은 건강한 정상 대조군의 혈장에서 사르코신(Sarcosine)이 검출되는지를 확인한 결과이다. 도 3에 나타난 바와 같이, 혈장 내에 사르코신이 검출되는 것을 확인하였으며, 상기 결과는 사르코신(Sarcosine)의 수준 변화를 이용한 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성 평가를 비침습적으로 수행할 수 있음을 입증한다.
- [82]
- [83] **실시예 3. 간암 세포주에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성 변화 평가**
- [84] 세포 수준에서 간암 발병과 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 연관성을 확인하기 위해, 정상 세포주 및 간 세포주에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 발현 수준을 측정하였다.
- [85] 도 4는 정상 간 세포주(NKNT3) 및 간암 세포주(HepG2, Hep3B)에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 발현 수준을 측정한 결과이다. 도 4에 나타난 바와 같이, 정상 간 세포주(NKNT3)에서는 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 발현이 높은 수준으로 나타나는 반면, 간암 세포주(HepG2, Hep3B)에서는 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 발현이 감소하거나 거의 나타나지 않았다.
- [86] 상기 결과는 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성 감소가 간암을 진단할 수 있는 마커로 사용될 수 있음을 입증한다.
- [87]
- [88] **실시예 4. 간암 세포주에서 사르코신(Sarcosine) 수준 변화 평가**
- [89] 세포 수준에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferas)의 활성을 통해 간암을 진단할 수 있는지를 확인하기 위해 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)을 세포에 투여하고, 생성되는 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준을 측정하였다.
- [90] 도 5는 정상 간 세포주(NKNT3) 및 간암 세포주(HepG2, Hep3B)에서 동위원소 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine) 투여에 따라 생성되는 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준을 측정한 결과이다. 도 5에 나타난 바와 같이, 정상 간 세포주(NKNT3)에서는 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준이 높게 나타나는 반면, 간암 세포주(HepG2, Hep3B)에서는 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)이 거의 검출되지 않았다.
- [91] 상기 결과는 동위원소 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)을 투여함에 따른

생성되는 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준 변화를 통해 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성을 평가할 수 있으며, 이는 간암의 발병 여부를 평가하는 수단으로 사용될 수 있음을 입증한다.

[92]

[93] 실시예 5. 간암 동물 모델에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성 변화 평가

[94] 동물 모델에서 간암 발병과 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 연관성을 확인하기 위해, 간암 동물모델을 제조하고, 각 동물 모델의 간조직에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성 및 발현 수준을 측정하였다.

[95] 도 6은 간암 동물 모델을 제조하기 위해 디에틸니트로사민(Diethylnitrosamine, DEN) 처리 후 시간이 지남에 따라 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델의 간조직 사진이다.

[96] 도 7은 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델의 간조직에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성을 측정한 결과이다. 도 8은 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델의 간조직에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 발현 수준을 측정한 결과이다.

[97] 도 7 및 8에 나타난 바와 같이, 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병함에 따라 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성이 감소하고, 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 발현 수준 감소하는 것으로 나타났다.

[98] 상기 결과는 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성 감소가 간암을 진단할 수 있는 마커로 사용될 수 있음을 입증한다.

[99]

[100] 실시예 6. 간암 동물 모델에서 소변 내 사르코신(Sarcosine) 수준 변화 평가

[101] 동물 모델에서 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성을 통해 간암을 진단할 수 있는지를 확인하기 위해 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)을 각 동물 모델에 투여하고, 소변에서 검출되는 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준을 측정하였다.

[102] 소변의 사르코신(Sarcosine)의 수준은 사구체 여과율을 고려하여 각 동물 모델의 크레아틴(Creatinine)의 함량을 측정하고, 크레아틴(Creatinine)의 함량 대비 검출되는 사르코신(Sarcosine)의 함량으로 계산하였다.

[103] 도 9는 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델의 소변에 포함된 크레아틴(Creatinine)의 함량을 측정한 그래프이다. 도 10은 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병한 동물 모델의 소변에서 크레아틴(Creatinine)의 함량 대비 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 비율을 측정한 그래프이다.

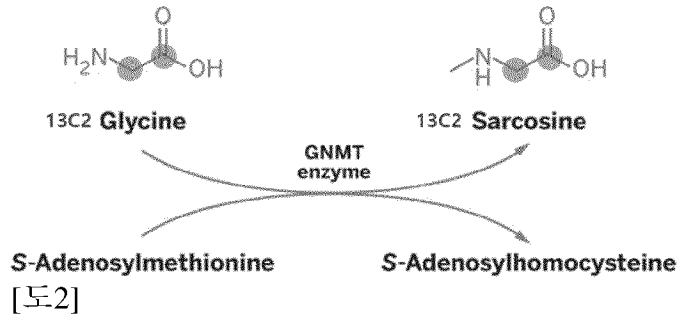
- [104] 도 10에 나타난 바와 같이, 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)이 발병함에 따라 소변에서 검출되는 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준이 감소하는 것으로 나타났다.
- [105] 상기 결과는 동위원소 ^{13}C 로 표지된 글라이신(Glycine)을 투여함에 따라 동위원소 ^{13}C 로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준을 비침습적으로 측정할 수 있을 뿐만 아니라, 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성을 평가할 수 있기 때문에, 비침습적으로 간암의 발병 여부를 평가할 수 있는 수단으로 사용될 수 있음을 입증한다.
- [106]
- [107] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 동위원소는 동위원소 ^{13}C 또는 동위원소 ^2H 인 것을 특징으로 하는 간암 진단용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 간암 진단이 필요한 대상체에게 경구 또는 비경구로 투여되는 것을 특징으로 하는 간암 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 액제, 현탁제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 엑스제, 에멀전, 시럽제, 에어로졸 및 주사제로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형인 것을 특징으로 하는 간암 진단용 조성물.
- [청구항 5] 간암 진단이 필요한 대상체에게 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 투여하는 단계;
상기 대상체로부터 수득되는 생물학적 시료에서 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준을 측정하는 단계; 및
상기 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준이 건강한 정상 대조군에 비해 낮게 나타나면 간암이 발병했거나 발병할 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준은 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성에 의해 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)이 전환된 것을 특징으로 하는 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 또는 소변인 것을 특징으로 하는 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법.
- [청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 동위원소는 동위원소 ^{13}C 또는 동위원소 ^2H 인 것을 특징으로 하는 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법.
- [청구항 9] 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 시험물질과 함께 세포에 처리하는 단계; 및
상기 세포에서 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)의 수준이 시험물질을 처리하지 않은 경우에 비해 증가하면 시험물질을 간암에 대한 치료용 제제로 판단하는 단계;를 포함하는 간암의 예방 또는 치료용 제제를 스크리닝 하는 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 세포는 글라이신 N-메틸전달효소(Glycine N-methyltransferase)의 활성을 나타내어 동위원소로 표지된 글라이신(Glycine)을 동위원소로 표지된 사르코신(Sarcosine)으로 전환하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 간암의 예방 또는 치료용 제제를 스크리닝 하는 방법.

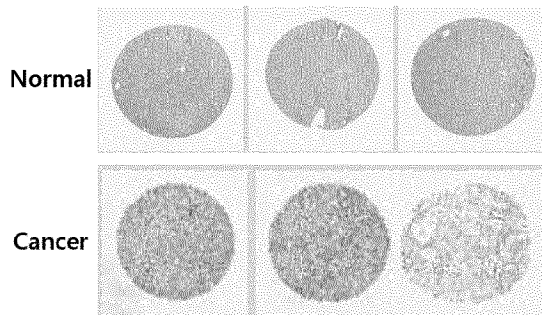
[청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 동위원소는 동위원소 ^{13}C 또는 동위원소 ^2H 인 것을 특징으로 하는 간암의 예방 또는 치료용 제제를 스크리닝 하는 방법.

[도1]

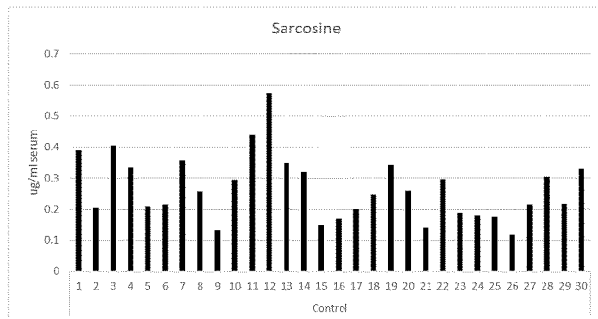


[도2]

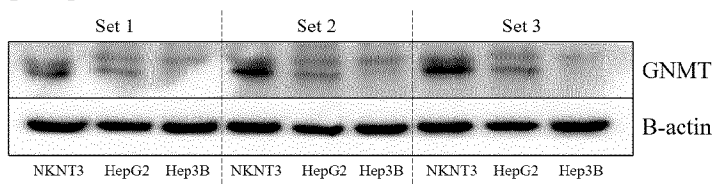
Liver



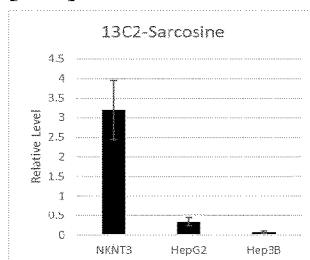
[도3]



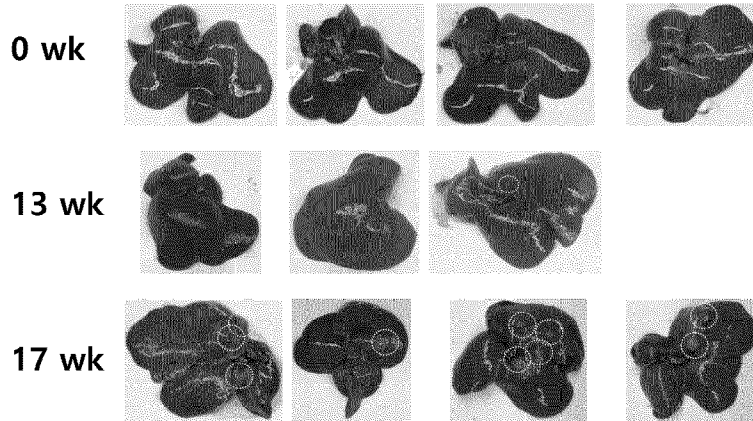
[도4]



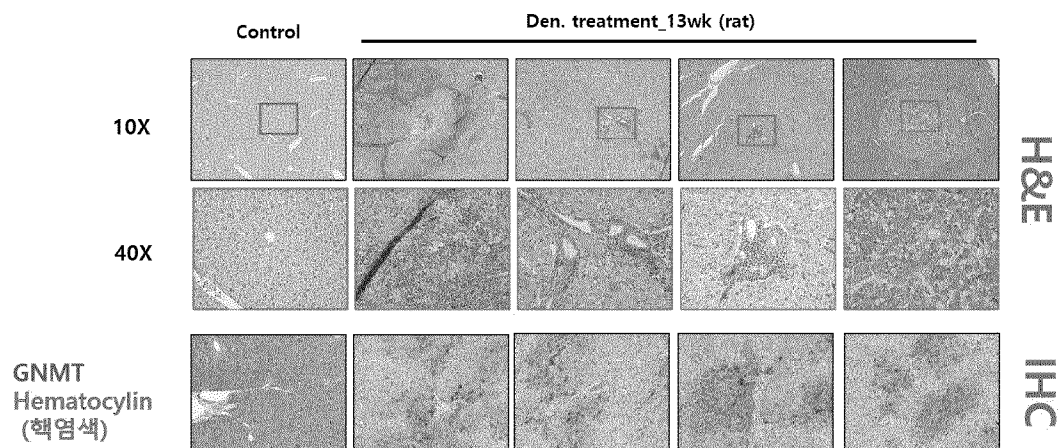
[도5]



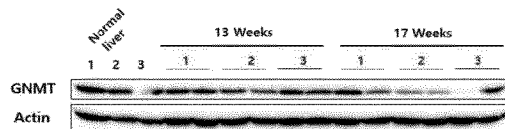
[도6]



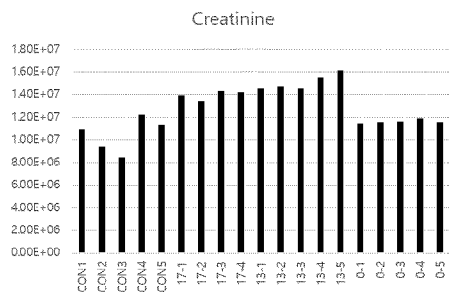
[도7]



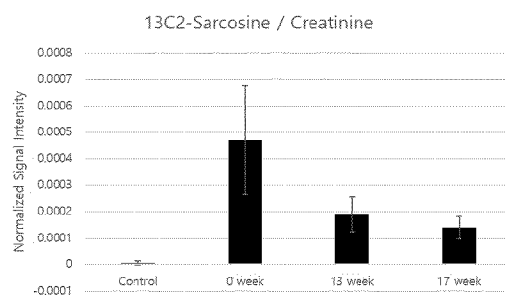
[도8]



[도9]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/005942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/60(2006.01)i; C12Q 1/48(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/573(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 33/60(2006.01); C07K 16/40(2006.01); G01N 33/573(2006.01); G01N 33/68(2006.01); G01N 33/70(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: 간암(liver cancer), 글라이신(glycine), 표지(label), 동위원소(isotope), 13C, 2H

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WOO, C. C. et al. Downregulating serine hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2) suppresses tumorigenesis in human hepatocellular carcinoma. Oncotarget. 06 July 2016, vol. 7, no. 33, pp. 53005-53017. See abstract; page 53006; and figure 1.	1-4
Y	GAO, Y. et al. Quantitative proteomics by SWATH-MS reveals sophisticated metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma tissues. Scientific Reports. 05 April 2017, vol. 7, document 45913, pp. 1-12. See abstract; page 6; and figure 6.	1-4
A	JP 2005-162714 A (SHOKEN SEIKA KAGI KOFUN YUGENKOSHI) 23 June 2005 (2005-06-23) See entire document.	1-4
A	JP 2011-232164 A (KEIO, Gijuku et al.) 17 November 2011 (2011-11-17) See entire document.	1-4
A	WANG, Y. C. et al. Glycine-N Methyltransferase Expression in HepG2 Cells Is Involved in Methyl Group Homeostasis by Regulating Transmethylation Kinetics and DNA Methylation. The Journal of Nutrition. 2011, vol. 141, pp. 777-782. See entire document.	1-4

☐ 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

28 September 2021

Date of mailing of the international search report

28 September 2021

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/KR2021/005942

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **5-11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 5-11 pertain to a method including a step of performing direct medical treatment on the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/005942

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2005-162714	A	23 June 2005	None	
JP	2011-232164	A	17 November 2011	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/60(2006.01)i; C12Q 1/48(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/573(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/60(2006.01); C07K 16/40(2006.01); G01N 33/573(2006.01); G01N 33/68(2006.01); G01N 33/70(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: 간암(liver cancer), 글라이신(glycine), 표지(label), 동위원소(isotope), 13C, 2H		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	WOO, C. C. 등, 'Downregulating serine hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2) suppresses tumorigenesis in human hepatocellular carcinoma', Oncotarget, 2016.07.06, 7권, 33호, 페이지 53005-53017 초록; 페이지 53006; 및 도면 1	1-4
Y	GAO, Y. 등, 'Quantitative proteomics by SWATH-MS reveals sophisticated metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma tissues', Scientific Reports, 2017.04.05, 7권, 문헌 45913, 페이지 1-12 초록; 페이지 6; 및 도면 6	1-4
A	JP 2005-162714 A (SHOKEN SEIKA KAGI KOFUN YUGENKOSHI) 2005.06.23 전체 문헌	1-4
A	JP 2011-232164 A (KEIO GIJUKU 등) 2011.11.17 전체 문헌	1-4
A	WANG, Y. C. 등, 'Glycine-N Methyltransferase Expression in HepG2 Cells Is Involved in Methyl Group Homeostasis by Regulating Transmethylation Kinetics and DNA Methylation', The Journal of Nutrition, 2011, 141권, 페이지 777-782 전체 문헌	1-4
☐ 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 2021년09월28일(28.09.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년09월28일(28.09.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **5-11**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 5-11은 인체에 대한 직접적인 의료행위 단계를 포함하고 있는 방법에 관한 것이므로 PCT 제 17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2005-162714 A	2005/06/23	없음	
JP 2011-232164 A	2011/11/17	없음	