

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 3월 7일 (07.03.2019)



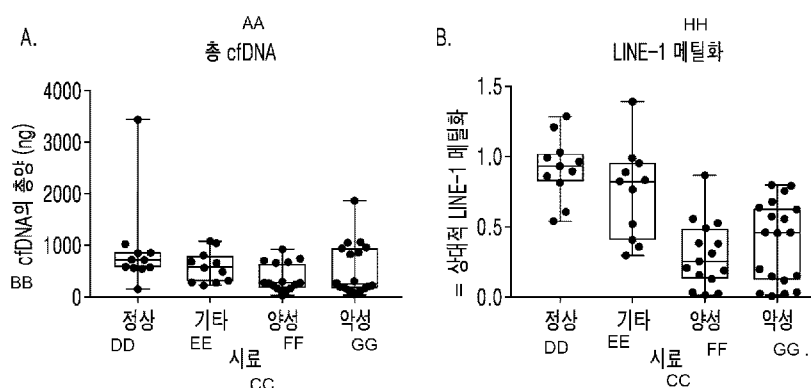
(10) 국제공개번호
WO 2019/045533 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/6886 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/010184
- (22) 국제출원일: 2018년 8월 31일 (31.08.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0111048 2017년 8월 31일 (31.08.2017) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 조제열 (CHO, Je Yoel); 06280 서울시 강남구 삼성로51길 37, 106동 805호, Seoul (KR). 이강훈 (LEE, Kang Hoon); 12797 경기도 광주시 오포읍 마루들길 276, 105동 1005호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, 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, 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, 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 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 AND KIT FOR DIAGNOSING BREAST CANCER BY USING CPG SITE METHYLATION LEVEL IN LINE-1 REGULATORY REGION, AND METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: LINE-1 조절 영역에서 CPG 부위의 메틸화 수준을 이용한 유방암 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 방법



AA ... Total cfDNA
BB ... Total amount of cfDNA (ng)
CC ... Sample
DD ... Normal
EE ... Others
FF ... Benign
GG ... Malignant
HH ... LINE-1 methylation
II ... Relative LINE-1 methylation

(57) Abstract: According to a composition and a kit for diagnosing breast cancer by using a breast cancer-specific biomarker in cfDNA and a method using the same, breast cancer can be diagnosed with a simple method by using blood and breast cancer can be diagnosed with high accuracy and sensitivity.

(57) 요약서: 유방암 특이적 cfDNA 내 바이오마커를 이용한 유방암 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 방법에 의할 경우, 혈액을 이용하여 간편한 방법으로 유방암을 진단할 수 있고, 유방암을 높은 정확도 및 민감도로 진단할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2019/045533 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: LINE-1 조절 영역에서 CPG 부위의 메틸화 수준을 이용한 유방암 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 방법 기술분야

- [1] LINE-1 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정함으로써, 유방암 또는 유선암을 진단하기 위한 조성물, 키트, 및 이를 이용한 진단 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 유방암 또는 유선암은 여성과 암컷 반려견에서 가장 빈번하게 발생하는 암이다. 또한 유전적 소인보다 후성적 요인이 발암에 차지하는 비중이 높은 것으로 알려져 있다. 이러한 유방암을 진단하기 위해 다양한 시도가 진행되어 왔고, 최근에는 혈액의 무세포 DNA(cell-free DNA: cfDNA)를 이용한 진단이 시도되고 있다. 혈액 내의 소량 존재하는 cfDNA의 경우, 그 양의 변화가 여러 질병 상태와 연관되어 있고, 특정 유전자들이 가지는 유전적 변이와 후성유전적 조절이 질병상태의 cfDNA에서 검출될 수 있음이 보고되고 있다(Uehiro et al., Breast Cancer Research (2016) 18:129). 그러나, cfDNA는 혈액 내에 매우 적은 양으로 존재하고 사람마다 편차가 크다는 것은, cfDNA에서 특정 유전자의 변이를 검출하여 진단 마커로 이용하는데 있어 큰 제약으로 작용한다.
- [3] 개와 사람의 유전체는 약 절반이 내인성 역전사인자들(endogenous retroelements)로 채워져 있으며, 이러한 내인성 역전사인자의 기능은 최근 다양한 연구를 통해 이들의 기능이 밝혀지고 있다. 이 내인성 역전사인자들은 일반적으로 정상인 경우 과메틸화(hypermethylation)되어 있으나, 질병 상태에서 메틸화 수준이 변할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 최근 이들 역전사인자의 저메틸화(hypomethylation)와 암의 연관성에 대하여 보고되고 있다.
- [4] 따라서, 유방암을 쉬운 방법으로 시료를 채취하고, 진단의 정확성이 우수한 유방암 특이적 cfDNA 내 바이오마커를 선별하는 것이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 유방암 특이적 cfDNA 내 바이오마커를 이용한 유방암 진단용 조성물을 제공한다.
- [6] 유방암 특이적 cfDNA 내 바이오마커를 이용한 유방암 진단용 키트를 제공한다.
- [7] 유방암 특이적 cfDNA 내 바이오마커를 검출하여 유방암 진단 방법을 제공한다.
- [8] 유방암 특이적 cfDNA 내 바이오마커를 검출하여 유방암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [9] 일 양상은 LINE-1(Long interspersed nuclear element-1)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역(regulatory region)에서 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 유방암 진단용 조성물을 제공한다.
- [10] 용어 "유방암(breast cancer)"은 유방에 생긴 암을 말하고, 상호교환적으로 "유선암"으로도 불릴 수 있다. 상기 유방암은 유선(mammary gland) 유방암, 소엽(lobule) 유방암, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [11] 용어 "진단(diagnosis)"은 병명을 판정하는 일을 말하고, 유방암의 병명, 병의 상태, 병기, 병인, 합병증의 유무, 예후, 및 재발 등을 포함할 수 있다.
- [12] LINE-1(Long interspersed nuclear element-1)은 전이성 인자(transposable elements) 중의 하나로서, 상호교환적으로 "L1"으로도 불릴 수 있다. LINE-1은 인간 게놈의 약 17%를 이룰 수 있다. LINE-1은 약 6000 bp의 DNA일 수 있다. LINE-1은 2개의 열린해독틀(open reading frame: ORF) 및 비번역 영역(untranslated region: UTR)을 포함할 수 있다. 개 LINE-1의 뉴클레오티드 서열은 개의 26번 염색체, 클론 XX-397I18(GenBank Accession No. AC188543.15)의 5'-말단으로부터 41245번째 뉴클레오티드 내지 47245번째 뉴클레오티드에 위치한 것일 수 있다. 사람 LINE-1(LINE-1.3 또는 L1.3)의 뉴클레오티드 서열은 GenBank Accession No. L19088.1의 서열일 수 있다.
- [13] 용어 "조절 영역(regulatory region)"은 특정 유전자의 발현을 증가 또는 감소시킬 수 있는 핵산 부위를 말한다. 상기 조절 영역은 ORF의 5' 방향, 3' 방향, 또는 ORF들 사이에 존재할 수 있다. 상기 조절 영역은 예를 들어 프로모터, 5'-UTR, 오퍼레이터(operator), 인핸서(enhancer), 및 사일런서(silencer)일 수 있다. LINE-1 조절 부위의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1(개 유전체의 LINE-1) 또는 서열번호 2(사람 유전체의 LINE-1)의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [14] 용어 "메틸화(methylation)"은 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 상기 메틸화는 CpG 뉴클레오티드 서열(CpG 부위)의 시토신에 메틸기가 부착되는 것일 수 있다. 메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사 인자의 결합이 방해받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제될 수 있다. 반대로, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가할 수 있다.
- [15] 상기 CpG 부위는 개 LINE-1의 서열번호 1에서 5' 말단으로부터 103번째 뉴클레오티드 내지 104번째 뉴클레오티드일 수 있다. 상기 CpG 부위는 사람 LINE-1의 서열번호 2에서 5' 말단으로부터 482번째 뉴클레오티드 내지 483번째 뉴클레오티드일 수 있다.
- [16] 상기 CpG 부위의 메틸화 수준은 제한효소 절단 후 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR) 또는 메틸화 특이적인 PCR에 의해 측정될 수 있다. 메틸화 특이적인 PCR은 예를 들어 메틸화 특이적 PCR(methylation-specific polymerase chain reaction: MSP), 실시간 메틸화 특이적 PCR(real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 또는 정량적 PCR이다. 상기 CpG 부위의 메틸화

수준은 피로시퀀싱(pyrosequencing), 비술피이트(bisulfite) 시퀀싱에 의해 측정될 수 있다.

- [17] 상기 제제는 CpG 부위 증폭용 프라이머 세트 또는 CpG 부위 특이적 프로브; 메틸화 민감성 제한효소; 및 메틸화 비민감성 제한효소로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [18] 상기 프라이머(primer)는 중합효소에 의한 중합 반응에서 중합 개시점을 제공하는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)로, 상기 프라이머는 핵산 증폭 반응에 사용되는 것일 수 있다. 상기 프라이머는 상기 표적 서열에 상보적인 영역과 혼성화된다. 용어 "증폭(amplification)"은 표적 서열 또는 그의 상보적인 서열의 카피 수를 증가시키는 것을 나타낸다. 상기 핵산 증폭 반응은 당업계에 알려진 방법에 의하여 수행될 수 있다. 핵산의 증폭은 증폭 동안 복수의 사이클을 필요로 하는 방법 또는 단일 온도에서 수행되는 방법을 포함한다. 순환 방법(cycling techniques)의 예는 열 순환을 필요로 하는 방법을 포함한다. 열 순환을 필요로 하는 방법은 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 포함한다. PCR은 당업계에 알려져 있다. 등온 증폭 방법은 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification: SDA), 헬리카제 의존적 증폭(helicase dependant amplification: HDA), 엑소뉴클레아제 의존적 증폭(exonuclease dependant amplification), 리코비나제 중합효소증폭(recombinase polymerase amplification: RPA), 루프 매개된 증폭(loop mediated amplification: LAMP), 핵산 기반 증폭(nucleic acid based amplification: NASBA 및 TMA), 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 프라이머는 선택되는 증폭 방법에 따라 1개, 또는 2개 이상의 세트로 포함될 수 있다.
- [19] 상기 프라이머의 길이는 약 5 내지 약 100 뉴클레오티드(이하, 'nt'라고 함), 약 10 내지 약 80 nt, 약 10 내지 약 60 nt, 약 10 내지 약 50 nt, 약 10 내지 약 40 nt, 약 10 내지 약 30 nt, 또는 약 20 내지 약 30 nt일 수 있다.
- [20] 상기 프라이머 세트는 서열번호 3, 4, 7, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [21] 상기 프로브(probe)는 표적 서열에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프로브는 예를 들어 표적 핵산 서열과 같은 특이적인 핵산 서열의 상보적인 영역을 갖는 서열-특이적인 방법으로 혼성화되도록 고안된 특이적인 부분을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 상기 프로브는 DNA, RNA, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있고, 검출가능한 표지로 표지될 수 있다.
- [22] 상기 프라이머 또는 프로브는 그의 말단 또는 내부에 형광 물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 또는 방사성 동위원소 등으로 표지된 것일 수 있다.
- [23] 용어 "제한효소(restriction enzyme)"은 DNA의 특정한 염기서열을 식별하고 이를 절단하는 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 말한다. 제한효소가 식별하는

염기서열은 인식 서열이라고 한다.

- [24] 용어 "메틸화 민감성 제한효소(methylation sensitive restriction enzyme)"는 제한효소의 인식 서열 중 CpG 부위의 메틸화의 존재에 따라 절단하거나 절단할 수 없는 효소를 말한다. 상기 메틸화 민감성 제한효소는 HpaII, BsiSI, 또는 이들의 조합일 수 있다. LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위가 메틸화될 경우, 핵산 시료가 HpaII, BsiSI, 또는 이들의 조합에 의해 절단되지 않고 그 후의 PCR에 의해 표적 서열이 증폭될 수 있다. 반대로, LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위가 메틸화되지 않을 경우, 핵산 시료가 HpaII, BsiSI, 또는 이들의 조합에 의해 절단되고, 그 후의 PCR에 의해 표적 서열이 증폭되지 않을 수 있다.
- [25] 상기 메틸화 비민감성 제한효소는 제한효소의 인식 서열 중 CpG 부위의 메틸화와 관계 없이 인식 서열을 식별하여 절단할 수 있는 효소를 말한다. 상기 메틸화 비민감성 제한효소는 MspI일 수 있다. LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위가 메틸화되었는지 여부와 무관하게, 핵산 시료가 MspI에 의해 절단될 수 있고, 그 후의 PCR에 의해 표적 서열이 증폭되지 않을 수 있다. MspI에 의해 절단된 핵산 시료는 음성 대조군으로 이용될 수 있다. HpaII와 MspI으로 절편화된 DNA의 증폭량의 차이는 LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 수준의 차이를 나타낼 수 있다.
- [26]
- [27] 다른 양상은 LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제 및 핵산 증폭용 시약을 포함하는 유방암 진단용 키트를 제공한다.
- [28] 상기 유방암, 진단, LINE-1, 조절 영역, CpG 부위, 메틸화 수준, 및 제제는 전술한 바와 같다.
- [29] 상기 핵산 증폭용 시약은 중합효소, dNTP, 완충제, 핵산, 조효소, 형광물질, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 중합 효소는 예를 들어 Taq 중합효소이다.
- [30]
- [31] 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 핵산 시료를 획득하는 단계; 및 획득된 핵산 시료로부터 LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는 유방암 진단 방법을 제공한다.
- [32] 상기 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 핵산 시료를 획득하는 단계를 포함한다.
- [33] 상기 개체는 사람, 개, 마우스, 소, 돼지, 말, 양, 또는 고양이를 포함한 포유동물일 수 있다. 상기 개체는 유방암을 앓거나 앓는 것으로 의심되는 개체일 수 있다.
- [34] 상기 생물학적 시료는 상기 개체로부터 획득된 시료를 말한다. 상기 생물학적

시료는 예를 들면 혈액, 혈장, 혈청, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 점막액, 양수, 또는 이들의 조합일 수 있다.

- [35] 상기 핵산 시료는 무세포 DNA(cell free DNA: cfDNA)일 수 있다. 상기 cfDNA는 세포 내에 존재하지 않고, 혈류에 존재하는 절단된 DNA를 말한다.
- [36] 상기 생물학적 시료로부터 핵산 시료를 획득하는 방법은 당해 업계에서 통상적으로 사용되는 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 핵산 시료는 예를 들어, 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법, CTAB(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) 분리법, 및 상업적으로 이용가능한 DNA 추출 키트를 이용하여 획득될 수 있다.
- [37] 상기 방법은 획득된 핵산 시료로부터 LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [38] CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는 상기 핵산 시료에 메틸화 민감성 제한효소, 메틸화 비민감성 제한효소, 또는 이들의 조합을 가하여 핵산 시료를 절단하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 핵산 시료는 LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 여부에 따라 절단될 수 있다.
- [39] 상기 방법은 핵산 시료를 절단하는 단계 후에 상기 핵산 시료를 증폭하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 핵산 시료가 메틸화 민감성 제한효소 또는 메틸화 비민감성 제한효소에 의해 절단되지 않을 경우, 상기 핵산 시료의 표적 서열은 증폭될 수 있다. 반대로, 상기 핵산 시료가 메틸화 민감성 제한효소 또는 메틸화 비민감성 제한효소에 의해 절단될 경우, 상기 핵산 시료의 표적 서열은 증폭되지 않을 수 있다.
- [40] 상기 방법은 LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 수준이 정상 대조군의 메틸화 수준에 비해 작은 경우 상기 개체는 유방암에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [41] LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 수준이 정상 대조군의 메틸화 수준에 비해 작은 경우, 즉 LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 저메틸화가 검출되는 경우, 상기 개체는 유방암에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정될 수 있다.
- [42]
- [43] 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 핵산 시료를 획득하는 단계; 및
- [44] 획득된 핵산 시료로부터 LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는 유방암 진단을 위하여 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [45] 유방암 특이적 cfDNA 내 바이오마커를 이용한 유방암 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 방법에 의할 경우, 혈액을 이용하여 간편한 방법으로 유방암을 진단할 수 있고, 유방암을 높은 정확도 및 민감도로 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [46] 도 1은 혈장 내 존재하는 무세포 DNA(cfDNA)의 LINE-1 메틸화 수준을 이용한 유방암 진단 방법의 모식도이다.
- [47] 도 2는 정상 세포에서 CpG 부위의 메틸화 수준과 암 세포에서 CpG 부위의 메틸화 수준으로부터 산출된 정상 세포에 대해 상대적인 메틸화된 CpG의 비를 나타내는 그래프이다(A: 사람, B: 개).
- [48] 도 3은 다른 두 위치의 CCGG를 대상으로 하는 프라이머 세트를 사용하여 증폭하였을 때, 유방암과 정상 시료 간의 메틸화된 dCCGG 서열의 양상을 나타내는 그래프이다(A: 특이적 dCCGG 증폭용 프라이머 세트 사용, B: 비특이적 dCCGG 증폭용 프라이머 세트 사용).
- [49] 도 4a 및 도 4b는 각각 개 및 사람에서 LINE-1 조절 부위에서 유전암 특이적인 메틸화 부위 및 특이적 dCCGG 증폭용 역방향 프라이머에 상응하는 염기 서열을 나타내는 그림이다(▧: 정방향 프라이머와 동일한 염기 서열, ▨: 역방향 프라이머에 상보적인 염기 서열, 밑줄: 메틸화 부위, ▩: 유전암 특이적 메틸화 부위).
- [50] 도 5는 암에 걸린 개와 정상인 개의 혈액 중 cfDNA의 총 양(ng)을 나타내는 그래프이다.
- [51] 도 6은 혈액 cfDNA 전체 양(A) 및 산출된 LINE-1의 메틸화 수준(B)을 나타내는 그래프이다.
- [52] 도 7은 유전암 또는 유선 양성 종양에 대한 LINE-1의 메틸화 수준의 민감 및 특이도를 나타내는 그래프이다(N: 정상, O.T.: 기타 암, B.T.: 양성 종양, M.T.: 악성 종양 또는 유전암).
- [53] 도 8은 사람의 시료에서 총 cfDNA의 양(A), 산출된 LINE-1의 메틸화 수준(B), 및 민감도와 특이도의 그래프(C)이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [54] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [55]
- [56] 실시예 1. 유방암 환자의 혈액내 존재하는 무세포 DNA에서 LINE-1의 메틸화 수준의 확인
- [57] 1. 사람과 반려견의 유방암 세포주에서 LINE-1의 메틸화 수준의 확인
- [58] 사람 유방암 세포주 및 개의 유전암 유래 세포에서 LINE-1 유전자의 메틸화 수준을 확인하였다.

- [59] 구체적으로, 인간 유방 상피 세포주 MCF-10a(American Type Culture Collection: ATCC), 인간 유방암 세포주 MBA-MD-231(ATCC) 및 인간 유방암 세포주 MCF7(ATCC)를 준비하였다. 개의 "Abs Nors"는 완전 정상의 비글견 조직으로, 서울대학교 동물병원 실험견으로부터 수득하였고, "Near Nors"는 반려견의 암조직 주변에서 얻어진 조직으로, 서울대학교 동물병원으로부터 입수하였다. "cfPCs" 및 "cfMC"는 Nobuo Sasaki 연구실(일본)에서 구입하였고, cfPCs는 개의 1차적 유선암 조직으로부터 만들어진 세포주이고, cfMC는 전이된 암세포에서 만들어진 세포주이다.
- [60] 준비된 세포에서 DNeasy Blood & Tissue QiaKit(Qiagen)를 사용하여 게놈 DNA를 분리하였다. 분리된 게놈 DNA를 EZ DNA Methylation-Lightning 키트(Zymo Research)를 사용하여 메틸화되지 않은 시토신(C) 염기를 모두 우리딘(U) 염기로 치환하는 비설파이트 변환(bisulfite conversion)을 수행하였다. 이후, PCR 방법을 통해 LINE-1 조절 부위를 증폭하고, 클로닝을 거쳐 염기서열을 분석하였다. 개의 LINE-1 염기서열은 개에서 알려진 LINE-1 ORF2의 mRNA (GenBank Accession No. AB012223.1) 뉴클레오타이드 서열을 바탕으로 개 유전체로부터 LINE-1 전체 서열을 확인하였다. 개의 26번 염색체, 클론 XX-397I18의 5'-말단으로부터 41245번째 뉴클레오타이드 내지 47245번째 뉴클레오타이드 위치에서 완전한 LINE-1 구조를 찾을 수 있었다(GenBank Accession No. AC188543.15).
- [61] LINE-1 유전자의 C 부위의 메틸화 수준을 산출하였다. 정상 세포에서 CpG 부위의 메틸화 수준과 암 세포에서 CpG 부위의 메틸화 수준으로부터, 정상 세포에 대해 상대적인 메틸화된 CpG의 비를 산출하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다(A: 사람, B: 개).
- [62] 도 2에 나타난 바와 같이, 정상 세포에서 LINE-1의 조절 부위의 메틸화 수준에 비해, 사람 유방암 세포주 및 개의 유선암 유래 세포에서 LINE-1의 조절 부위의 메틸화 수준이 유의하게 낮았다. 따라서, 개와 사람 모두에서, LINE-1 유전자의 메틸화 수준은 정상 세포에 비해 암에서 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다.
- [63]
- [64] **2. 유방암과 연관성이 있는 LINE-1 메틸화 부위의 확인**
- [65] LINE-1 역전사인자(transposable element), 예를 들어 LINE-1 조절 부위에는 매우 많은 수의 메틸화 부위가 존재한다. LINE-1 역전사인자의 수많은 메틸화 부위들 중에서 유방암과 유의하게 연관성이 있는 메틸화 부위를 확인하기 위하여, 프라이머 서열에 따라 유방암 특이적인 LINE-1 메틸화 양상이 나타나는지 확인하였다.
- [66] 실시예 1.1에 기재된 바와 같이, 개의 MT 세포주로부터 분리된 게놈 DNA를 준비하였다(B: 정상비글의 유선조직, Chmm 및 Cipm: 전이된 암으로부터 만들어진 세포주, Chmp 및 cimp: 전이되지 않은 1차 종양조직으로부터 생성된 세포주).

- [67] 준비된 게놈 DNA를 주형으로 사용하고, 다른 두 위치의 CCGG 서열을 표적으로 하는 하기 서열의 프라이머 세트를 사용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 게놈 DNA 중 LINE-1 조절 부위의 염기 서열은 서열번호 1(개) 및 서열번호 2(사람)로 기재하였다.
- [68] 특이적 dCCGG 증폭용 정방향 프라이머:
5'-GGAAGAGTAGGGTCTCCAAATC-3' (서열번호 3)
- [69] 특이적 dCCGG 증폭용 역방향 프라이머: 5'-CCGTCTTCCTACCTTGATAG-3' (서열번호 4)
- [70] 비특이적 dCCGG 증폭용 정방향 프라이머:
5'-AGTTCGCGCTTCTATCAAGGT-3' (서열번호 5)
- [71] 비특이적 dCCGG 증폭용 역방향 프라이머: 5'-CTCCTGTCCTGGGGACACTC-3' (서열번호 6)
- [72] 실시간 PCR을 수행하여 LINE-1 메틸화 수준을 산출하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3은 다른 두 위치의 CCGG를 대상으로 하는 프라이머 세트를 사용하여 증폭하였을 때, 유방암과 정상 시료 간의 메틸화된 CCGG 서열의 양상을 보여준다.
- [73] 도 3에 나타난 바와 같이, 특이적 dCCGG 증폭용 프라이머 세트를 사용한 경우, 암과 정상 시료 간에 메틸화 양상의 차이가 분명하였다. 그러나, 유사한 조절부위라 하더라도, 비특이적 dCCGG 증폭용 프라이머 세트를 사용한 경우 암과 정상 시료 간에 메틸화 양상의 차이가 분명하지 않았다. 또한, LINE-1의 조절 부위가 아닌 LINE-1의 ORF 2 위치의 dCCGG 서열의 경우, 암의 메틸화 수준이 오히려 정상 메틸화 수준보다 약간 높게 나타났다. 따라서, 특이적 dCCGG 증폭용 프라이머 세트가 표적으로 하는 위치가 유선암 특이적인 메틸화 부위임을 확인하였다.
- [74] LINE-1 조절 부위에서 유선암 특이적인 메틸화 부위 및 특이적 CCGG 증폭용 역방향 프라이머에 상응하는 염기 서열을 도 4a(개) 및 도 4b(사람)에 나타내었다(☐: 정방향 프라이머와 동일한 염기 서열, ☒: 역방향 프라이머에 상보적인 염기 서열, 밑줄: 메틸화 부위, ▨: 유선암 특이적 메틸화 부위).
- [75]
- [76] **3. 무세포 DNA의 양과 개의 유선암의 관련성**
- [77] 사람의 경우, 암 환자의 혈액 중의 무세포 DNA(cell free DNA: cfDNA)의 양이 정상인의 혈액 중 cfDNA의 양에 비해 증가한다고 알려져 있다. 개의 경우에도, 암에 걸린 개체의 혈액 중 cfDNA의 양이 정상인 개체에 비해 유의하게 차이가 있는지 여부를 확인하였다.
- [78] 암에 걸린 개와 정상인 개의 혈액을 서울대학교 동물병원과 해마루 동물병원으로부터 입수하였다. 입수된 개의 혈액으로부터 혈구세포(Peripheral blood mononuclear cell: PBMC)를 제외한 혈장을 분리하였다. Ficoll-paque(GE healthcare)를 사용하고, 400g에서 30분간 원심분리하여 PBMC와 혈장을

분리하였다. 분리된 혈장으로부터 QIAamp Circulating Nucleic Acid 키트를 사용하여 cfDNA를 수득하였다. 수득된 cfDNA의 양은 NanoDrop 분광광도계(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 정량하고, cfDNA의 총 양(ng)을 산출하였다. 산출된 cfDNA의 총 양을 도 5에 나타내었다.

[79] 도 5에 나타난 바와 같이, 개의 정상 개체와 암에 걸린 개체에서 혈액 중 cfDNA의 총 양은 유의적 차이를 나타내지 않았다. 또한, cfDNA의 총 양은 시료 간의 편차가 매우 크게 나타났는데, 이는 개체 간의 차이일 수도 있고, 시료 준비 과정에 의해 그 결과가 영향을 받을 수 있음을 보여준다.

[80]

[81] **4. 개의 유선암과 혈액 cfDNA에서 LINE-1 메틸화 수준의 관련성**

[82] 실시예 1.3에 기재된 바와 같이 준비된 cfDNA를 시료로 하고, cfDNA에서 LINE-1의 메틸화 수준이 유선암과 유의한 관련성이 있는지 여부를 확인하였다.

[83] 우선, 유선암에 걸린 개 19 마리, 양성 종양 개 15마리, 기타 암 개 11마리, 및 정상인 개 11마리(총 56마리)를 채혈하고, 혈액으로부터 혈장을 수득하였다. 혈장에서 cfDNA를 수득하고, 수득된 cfDNA를 정량하였다. 동량의 cfDNA에 HpaII 제한효소(엔지노믹스, 한국) 및 MspI 제한효소(엔지노믹스, 한국)을 가하였다.

[84] 그 후, 실시간 PCR에서, 시료를 95°C에서 3분 동안 인큐베이션하여 DNA를 변성시키고, 95°C에서 10초, 60°C에서 10초, 및 72°C에서 30초를 1 사이클로 하여 50 사이클을 반복하였다.

[85] HpaII는 메틸화 민감성 제한효소로서, 메틸화되지 않은 제한효소 인식 서열(CCGG)을 절단할 수 있다. MspI은 메틸화 비민감성 제한효소로서, HpaII와 인식 서열이 동일한 제한효소이다. 제한효소 인식 서열의 CpG 부위가 메틸화되면, MspI은 인식 서열을 절단할 수 있으나, HpaII는 절단할 수 없다. 제한효소 인식 서열의 CpG 부위가 메틸화되어 있지 않으면, LINE-1은 HpaII에 의해 절단되어 PCR에서 증폭되지 않는다. 반대로, 제한효소 인식 서열의 CpG 부위가 메틸화되어 있으면, LINE-1은 HpaII에 의해 절단되지 않아 PCR에서 증폭될 수 있다. MspI은 메틸화 여부와 상관 없이 인식 서열을 절단할 수 있으므로, MspI 처리군은 대조군으로 사용되었다. HpaII와 MspI 각각에서 절편화된 DNA의 증폭 CT(threshold cycle) 값 차이는 해당 위치의 메틸화 수준을 나타낸다. LINE-1의 메틸화 수준은 하기 수학적식을 이용하여 산출하였다:

[86] 메틸화된 LINE-1 = $2^{-[\Delta][\Delta]CT}$, $[\Delta]CT = CT(HpaII) - CT(MspI)$, $[\Delta\Delta]CT = [\Delta]CT(Cancer) - [\Delta]CT(healthy)$.

[87] (CT MspI: MspI-절단된 시료에 대한 실시간 PCR의 CT 값, CT HpaII: HpaII 절단된 시료에 대한 실시간 PCR의 CT 값)

[88] 혈액 cfDNA 전체 양을 도 6의 A에 나타내고, 산출된 LINE-1의 메틸화 수준을 도 6의 B에 나타내었다. 도 6의 A 및 B에 나타난 바와 같이, 정상 개체와 유선암 개체의 혈액 cfDNA 전체 양은 큰 차이가 나지 않지만, LINE-1의 메틸화 수준은

유의한 차이가 있었다. 이러한 차이는 각각 개의 유선암 및 유선 양성 종양 모두에서 매우 높은 특이도와 감도를 나타내었다. 이렇게 높은 특이도와 감도는 시료에서는 나타나지 않았다(도 7, N: 정상, O.T.: 기타 암, B.T.: 양성 종양, M.T.: 악성 종양 또는 유선암).

[89]

[90] **5. 사람의 유방암과 혈액 cfDNA에서 LINE-1 메틸화 수준의 관련성**

[91] 실시에 1.4와 유사하게, 사람 혈액 cfDNA에서 LINE-1의 메틸화 수준이 유방암과 유의하게 관련되어 있는지 여부를 확인하였다.

[92] 유방암 환자 26명과 정상인 10명의 혈액을 삼성병원으로부터 수집하였다. 유방암 환자군의 연령은 32세 내지 64세였고, 유방암 시료는 3개 시료 0 병기, 12시료는 I 병기, 10시료는 II 병기, 1개의 시료는 III 병기였다. 암 종류와 관련하여는 ER, PR, 및 HER-2에 대해 +++/++/-/--를 모두 포함하고 있는 것으로 확인되었다.

[93] 수집된 혈액으로부터 혈장을 수득하였다. 실시에 1.4에 기재된 바와 같이, 혈장으로부터 cfDNA를 수득하고, 수득된 cfDNA를 HpaII와 MspI로 처리하고, 실시간 PCR로 증폭하였다. 실시간 PCR에서 사용된 사람 LINE-1 증폭용 프라이머 세트는 하기와 같다:

[94] 사람 hCCGG 증폭용 정방향 프라이머: 5'-CTACGCCCACGGAATCTCGC-3' (서열번호 7)

[95] 사람 hCCGG 증폭용 역방향 프라이머: 5'-GCTCCACCCAGTTCGAGCT-3' (서열번호 8)

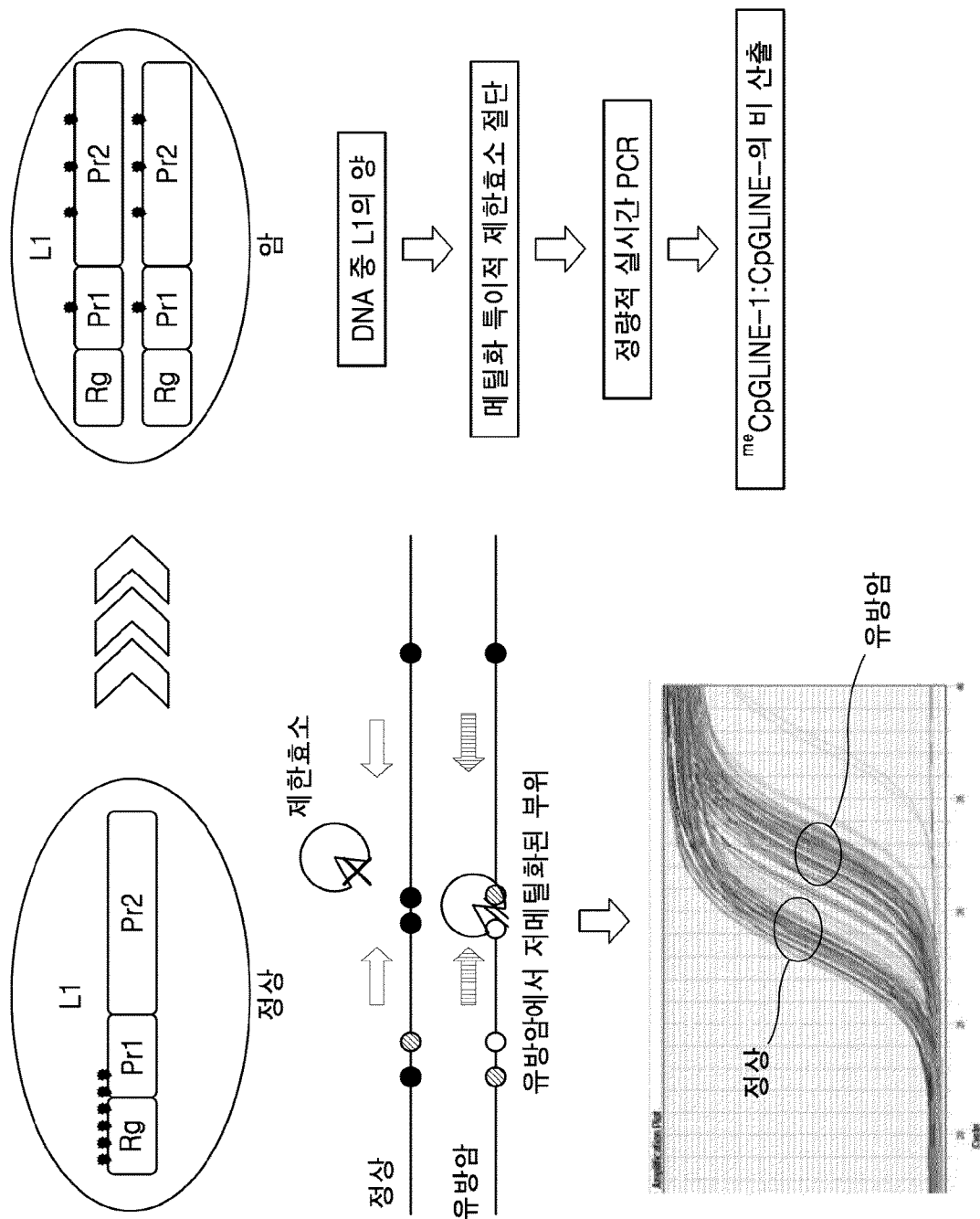
[96] 그후 LINE-1의 메틸화 수준을 산출하였다. 총 cfDNA의 양, 산출된 LINE-1의 메틸화 수준, 및 민감도와 특이도의 그래프를 각각 도 8의 A 내지 C에 나타내었다.

[97] 도 8의 A에 나타난 바와 같이, 건강한 정상 대조군과 유방암 환자 시료에서 cfDNA의 양은 약간 증가하고 오히려 기타 암에서는 감소한 양상으로 나타났다. 하지만, 유방암 환자의 혈액 cfDNA에서 LINE-1의 메틸화 수준은 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 따라서, 혈액 cfDNA에서 LINE-1의 저메틸화는 유방암 진단에 유의한 바이오마커임을 확인하였다(도 8의 B). 개 만큼의 높은 감도와 특이도를 나타내지는 못했지만, 사람에서도 0.78의 AUC 값을 나타내어 바이오마커 가능성을 보였다(도 8의 C).

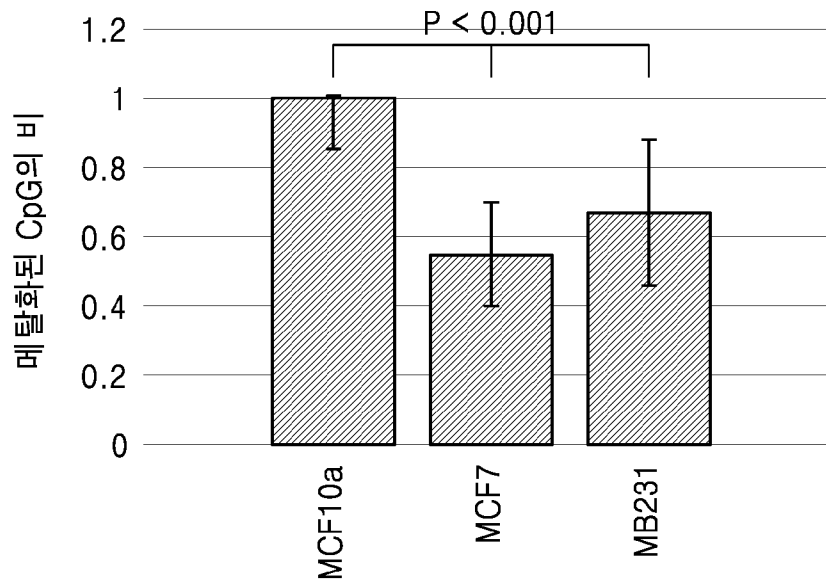
청구범위

- [청구항 1] LINE-1(Long interspersed nuclear element-1)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역(regulatory region)에서 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 유방암 진단용 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 CpG 부위는 서열번호 1에서 5' 말단으로부터 103번째 뉴클레오티드 내지 104번째 뉴클레오티드, 또는 서열번호 2에서 5' 말단으로부터 482번째 뉴클레오티드 내지 483번째 뉴클레오티드인 것인 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 제제는 CpG 부위 증폭용 프라이머 세트 또는 CpG 부위 특이적 프로브; 메틸화 민감성 제한효소; 및 메틸화 비민감성 제한효소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 3, 4, 7, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 5] 청구항 3에 있어서, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 HpaII, BsiSI, 또는 이들의 조합인 것인 조성물.
- [청구항 6] 청구항 3에 있어서, 상기 메틸화 비민감성 제한효소는 MspI인 것인 조성물.
- [청구항 7] LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제 및 핵산 증폭용 시약을 포함하는 유방암 진단용 키트.
- [청구항 8] 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 핵산 시료를 획득하는 단계; 및 획득된 핵산 시료로부터 LINE-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 조절 영역에서 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는 유방암 진단 방법.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 개체는 사람, 개, 마우스, 소, 돼지, 말, 양, 또는 고양이인 것인 방법.
- [청구항 10] 청구항 8에 있어서, 상기 핵산 시료는 무세포 DNA(cell free DNA: cfDNA)인 것인 방법.
- [청구항 11] 청구항 8에 있어서, CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는 상기 핵산 시료에 메틸화 민감성 제한효소, 메틸화 비민감성 제한효소, 또는 이들의 조합을 가하여 핵산 시료를 절단하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- [청구항 12] 청구항 11에 있어서, 상기 방법은 핵산 시료를 절단하는 단계 후에 상기 핵산 시료를 증폭하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.
- [청구항 13] 청구항 8에 있어서, 상기 방법은 상기 CpG 부위의 메틸화 수준이 정상 대조군의 메틸화 수준에 비해 작은 경우 상기 개체는 유방암에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

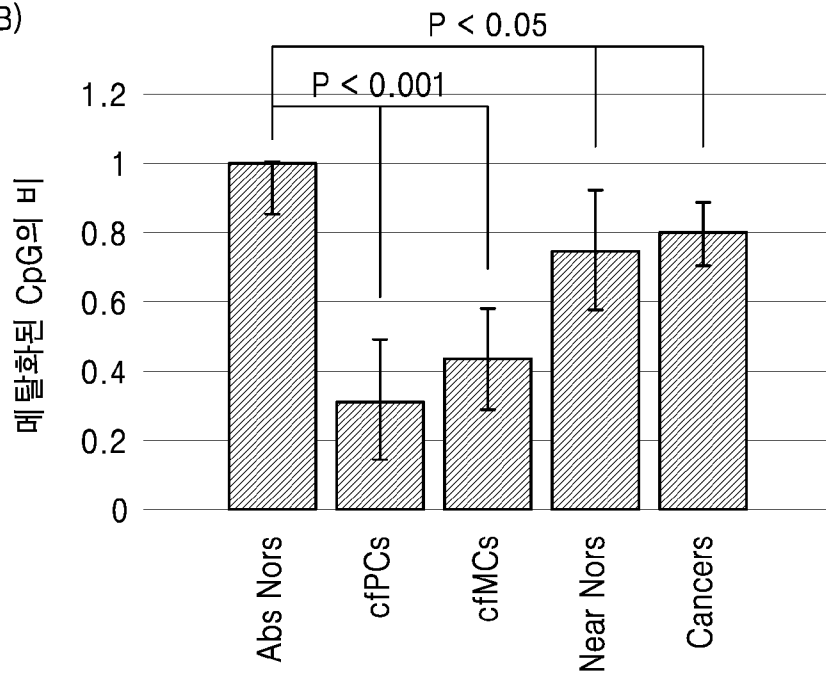
[도 1]



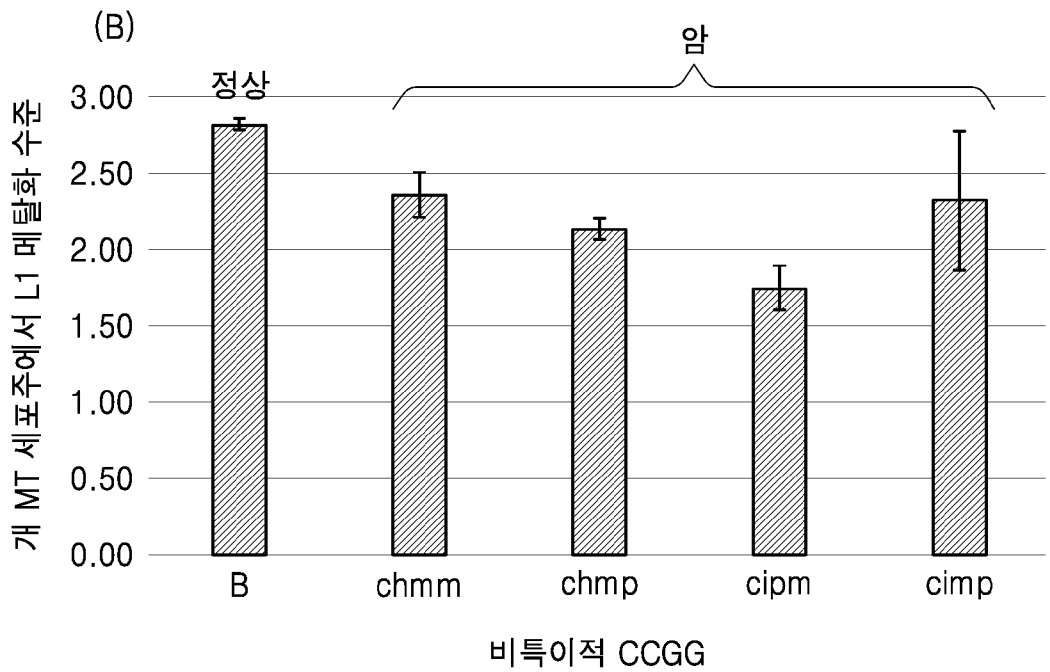
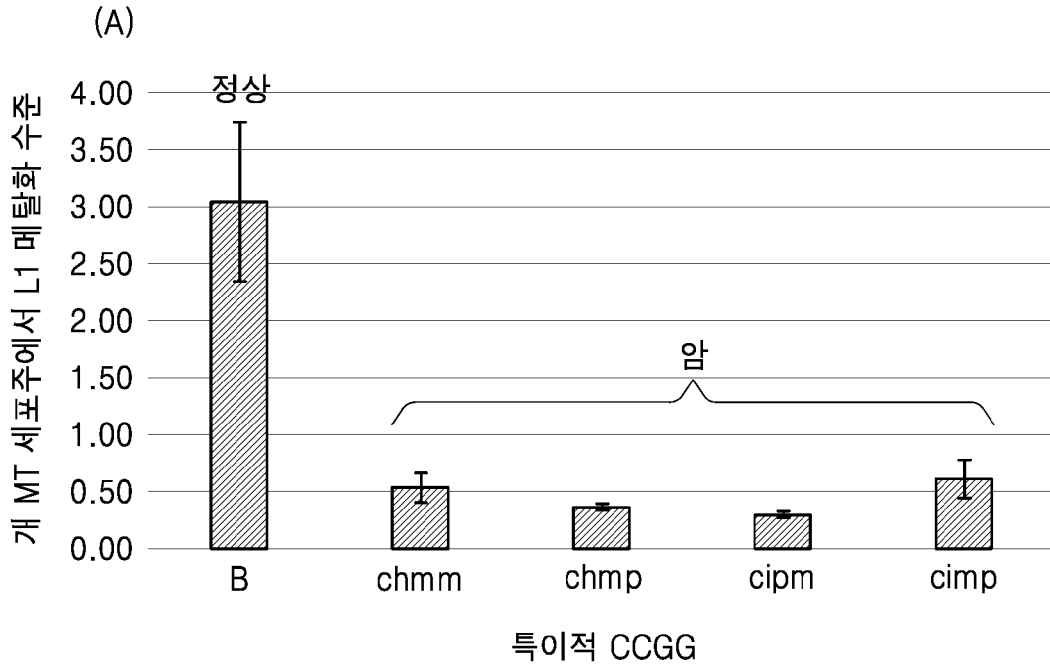
[도2]
(A)



(B)



[도3]



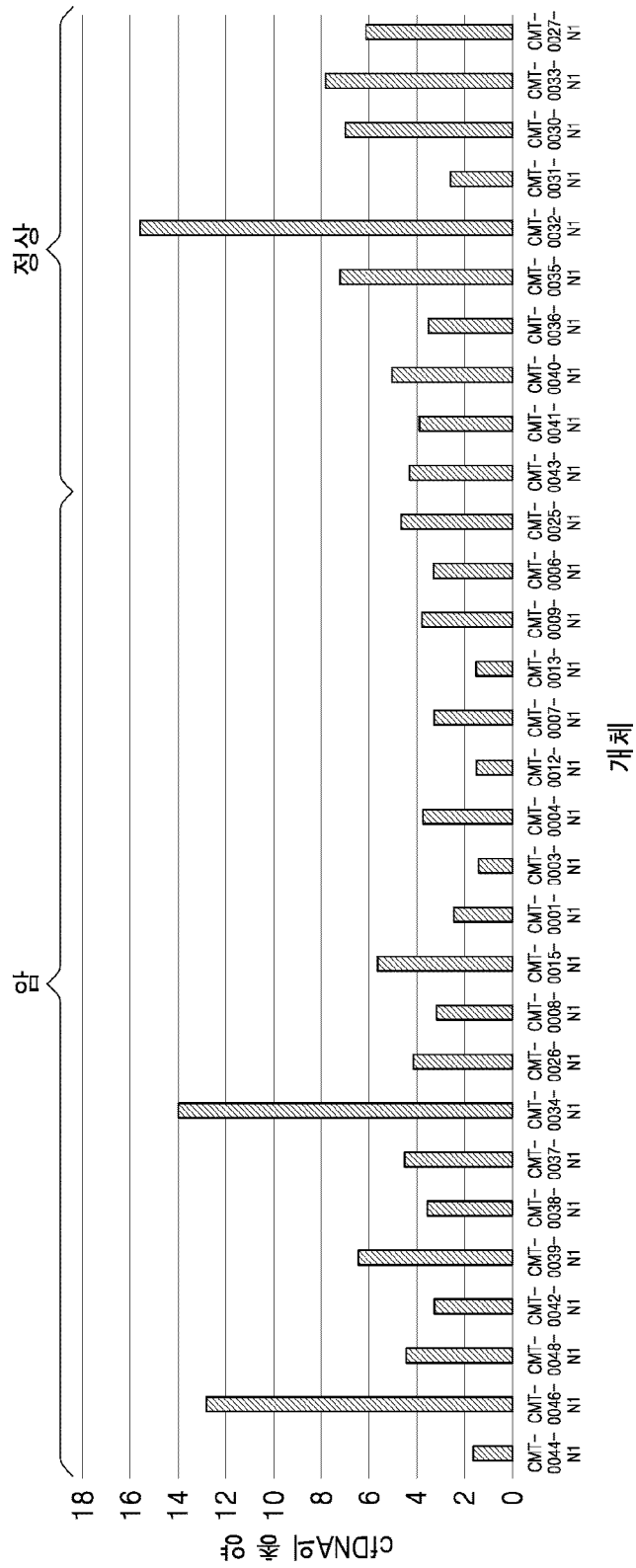
[도4a]

GGGGGGAGGAGCAAGATGGCGGAGAGTAGGGTCTCCAAATCACCTGTCTCCACCAAACCTACCTAGAAAA
 CCTTCAAATTATCCTGAAAACTATGAATTCGGCCTGAGATTTAAAGAGAGACCAGCTGGAATGCTACAG
 TGAGAAGAGTTTCGCGCTTCTATCAAGGTAGGAAGACGGGAAAAAGAAGTAAAGAAACAAAGGCCTCCAA
 GGGGGAGGGGCCCCGCGAGGAGCCGGGCTGAGGCCGGGCGAGTGTCCCAGGACAGGAGAGCCCCGTCCC
 GGAGGAGCAGGAGCTGCACCGACCTTCCCGGGCGGAAAGGGGCTCGTGGGGAGTTGGAGCAGGACCCAGG
 AGGGCGGGGATGCCCTCGGGCTCCCGGGGACAGTAACAGCAACTGCGCACCCAGGAGAGTGCGCCGAGCT
 CCCTAAGGGCTGCAGCGCGCACGGCGGGACCCGGCGGGACCCGGAGCAGCTGAAGGGGCTCGGGCGGGCGG
 CTCAGCGGAGGGGGCTGCGCGGCCCCAGGAGCAGCTCGGCCGGGCTCGGGCAGAGGAAGAGGCTCCGTGC
 AGAGGGGGCTGCGCGGTTCCAGGAGCAGCTCGGAGGGGCTCGGGCGGGGCTCCGCGGAGGGGGCTGCGC
 GGTCCGGGAGCGCAATCCACCAGCGCAGGCTCCGGAGCACAGGGCGCCGGGACACAGCCCAGGATCCC
 CCTCCCCGGGACAGGCAGAGGCCGGGAGGGCCAGGACAGCAAGGACGCTCCTGCCCCAGCTGAGCACA
 TCAGCGGCCGCGCCCCGGAGCCTCCAGGCCCTGCAGACGGAGTTCCTGCCGGAGCTGAATCCAGGTTTCC
 AGAGCTGCCCCGACACTGGGGCTGTTCTCTGCGGCCTCACGGGGTAAACAACCCCCACCGAGCCCTGC
 ACCAG

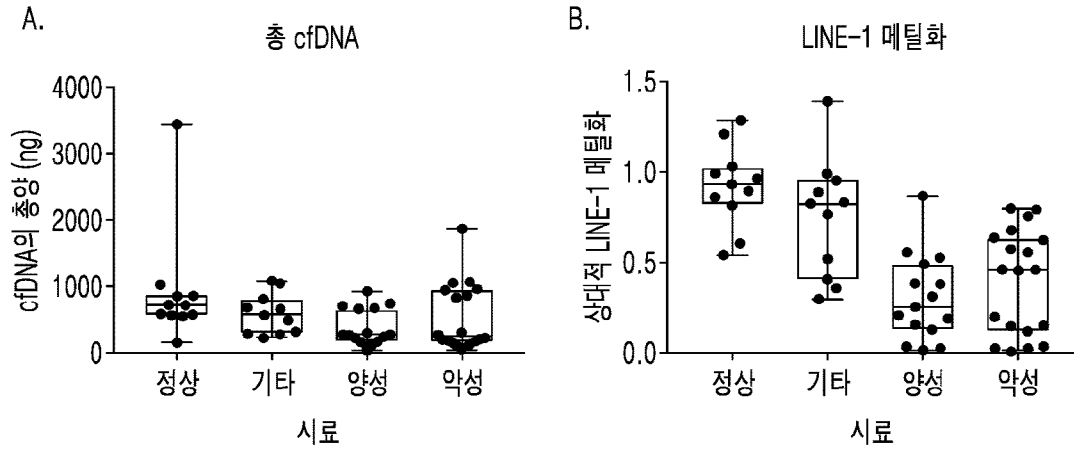
[도4b]

GGGGGAGGAGCCAAGATGGCCGAATAGGAACAGCTCCGGTCTACAGCTCCCAGCGTGAGCGACGCAGAAG
 ACGGTGATTTCTGCATTTCCATCTGAGGTACCGGTTTCATCTCACTAGGGAGTGCCAGACAGTGGGCGCA
 GGCCAGTGTGTGTGCGCACCGTGCGGAGCCGAAGCAGGGCGAGGCATTGCCTCACCTGGGAAGCGCAAG
 GGGTCAGGGAGTTCCCTTTCTGAGTCAAAGAAAGGGGTGACGGTTCGCACCTGGAAAATCGGGTCACTCCC
 ACCCGAATATTGCGCTTTTCAGACCGGCTTAAGAAACGGCGCACCCAGAGACTATATCCACACCTGGCT
 CGGAGGGTCTACGCCACCGGAATCTCGCTGATTGCTAGCACAGCAGTCTGAGATCAAATGCAAGGCGG
 CAACGAGGCTGGGGGAGGGGCGCCCGCCATTGCCCAGGCTTGCTTAGGTAAACAAAGCAGCCGGGAAGCT
 CGAACTGGGTGGAGGCCACCACAGCTCAAGGAGGCCTGCCTGCCTCTGTAGGCTCCACCTCTGGGGGCAG
 GGCACAGACAAACAAAAGACAGCAGTAACCTCTGCAGACTTAAGTGTCCCTGTCTGACAGCTTTGAAGA
 GAGCAGTGGTTCTCCAGCACGCAGCTGGAGATCTGAGAACGGGCAGACAGACTGCCCTCCTCAAGTGGGT
 CCCTGACTCCTGACCCCGAGCAGCCTAAGTGGGAGGCACCCCCAGCAGGGGCACACTGACACCTCACA
 CGGCAGGGTATTTCAACAGACCTGCAGCTGAGGGTCTGTCTGTTAGAAGGAAACTAACAACCAGAAAG
 GACATCTACACCGAAAACCATCTGTACATCACCATCATCAAAGACCAAAGTAGATAAAACCACAAAGA
 TGGGGAAAAACAGAAC

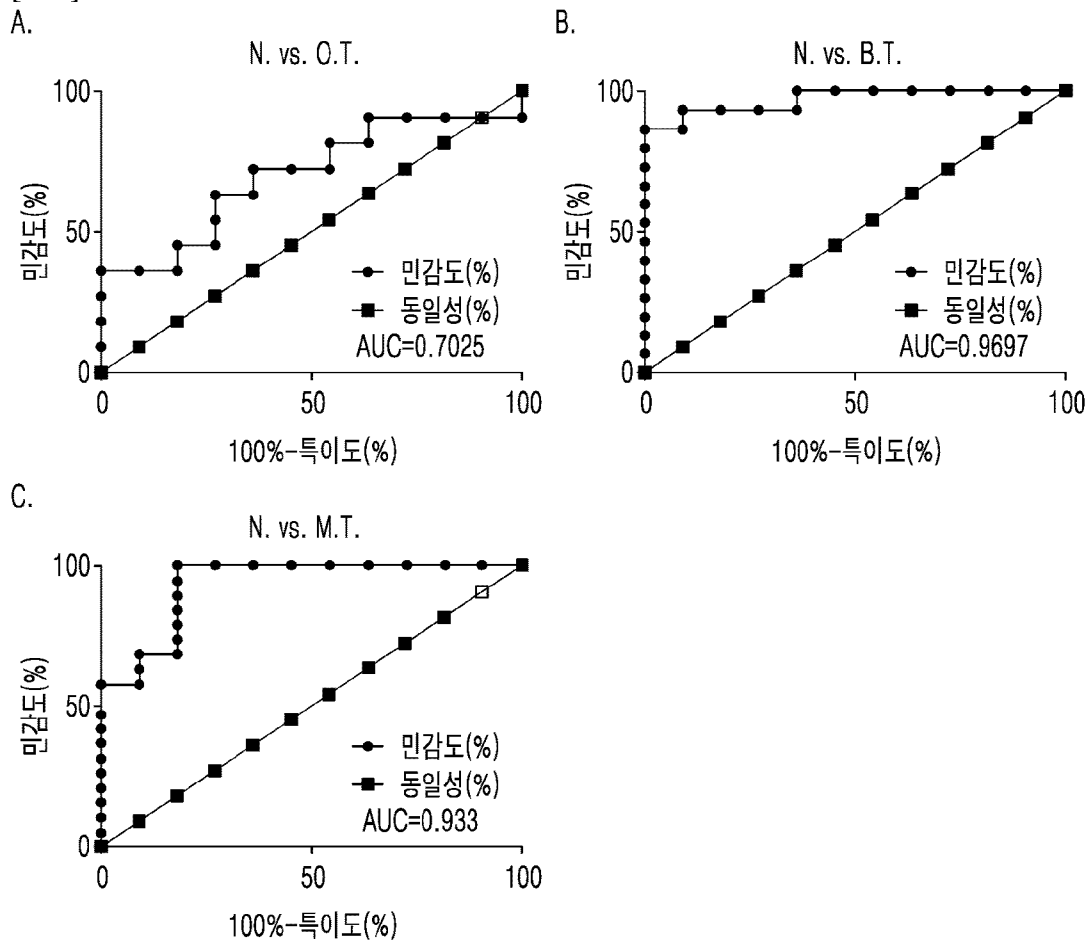
[도5]



[도6]

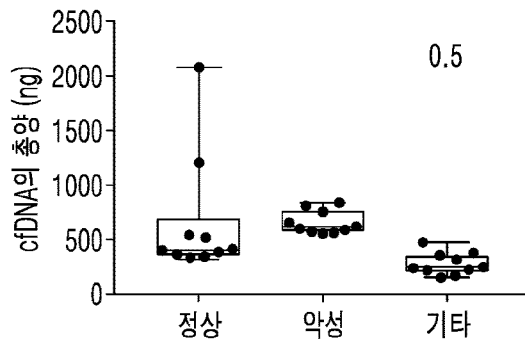


[도7]

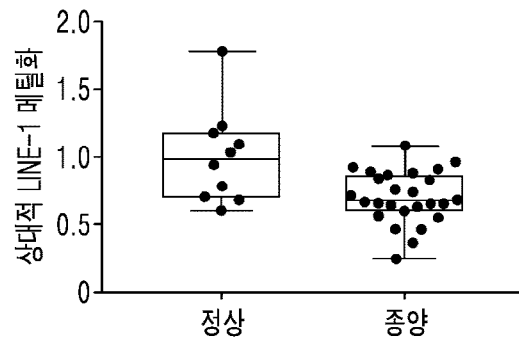


[도8]

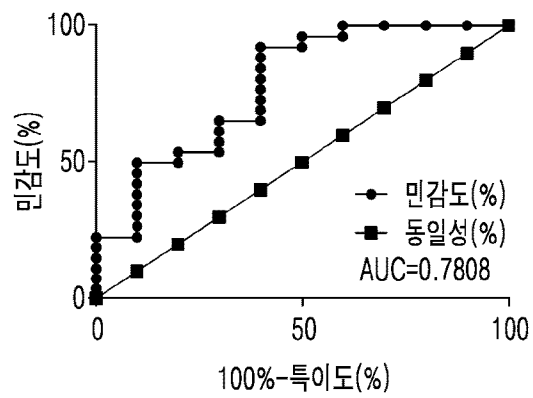
A.



B.



C.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010184

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6886(2018.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6886; C12Q 1/68

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: LINE-1, CPG, methylation, breast cancer, cell-free DNA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BEDIAGA, N. G. et al., "DNA Methylation Epigenotypes in Breast Cancer Molecular Subtypes", Breast Cancer Research, 2010, vol. 12, article no. R77, pages 1-12 See abstract; page 4, right column; table 1.	1-9, 11-13
Y		10
Y	TANG, Q. et al., "Blood-based DNA Methylation as Biomarker for Breast Cancer: a Systematic Review", Clinical Epigenetics, 2016, vol. 8, article no. 115, pages 1-18 See abstract; page 14, left column, fourth paragraph-right column, first paragraph.	10
Y	NAGAI, Y. et al., "LINE-1 Hypomethylation Status of Circulating Cell-free DNA in Plasma as a Biomarker for Colorectal Cancer", Oncotarget, 02 January 2017, vol. 8, no. 7, pages 11906-11916 See abstract; page 11907, left column, first paragraph.	10
A	VAN HOESEL, A. Q. et al., "Hypomethylation of LINE-1 in Primary Tumor Has Poor Prognosis in Young Breast Cancer Patients: a Retrospective Cohort Study", Breast Cancer Research and Treatment, 2012, vol. 134, pages 1103-1114 See the entire document.	1-13



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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 DECEMBER 2018 (10.12.2018)

Date of mailing of the international search report

10 DECEMBER 2018 (10.12.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010184

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARK, S. Y. et al., "Alu and LINE-1 Hypomethylation Is Associated with HER2 Enriched Subtype of Breast Cancer", PLoS ONE, June 2014, vol. 9, no. 6, article no. e100429, pages 1-9 See the entire document.	1-13
PX	KR 10-2018-0014283 A (NATIONAL CANCER CENTER) 08 February 2018 See claims 1, 2, 9 and 10; paragraphs [0003]-[0005].	1-9, 11-13

Information on patent family members

PCT/KR2018/010184

28/02/2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6886(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6886; C12Q 1/68

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: LINE-1, CPG, 메틸화, 유방암, 무세포 DNA

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	BEDIAGA, N. G. 등, 'DNA methylation epigenotypes in breast cancer molecular subtypes', Breast Cancer Research, 2010, 제12권, 아티클 번호 R77, 페이지 1-12 초록; 페이지 4, 우컬럼; 표 1 참조.	1-9, 11-13
Y		10
Y	TANG, Q. 등, 'Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review', Clinical Epigenetics, 2016, 제8권, 아티클 번호 115, 페이지 1-18 초록; 페이지 14, 좌컬럼, 네번째 단락-우컬럼, 첫번째 단락 참조.	10
Y	NAGAI, Y. 등, 'LINE-1 hypomethylation status of circulating cell-free DNA in plasma as a biomarker for colorectal cancer', Oncotarget, 2017.01.02, 제8권, 제7호, 페이지 11906-11916 초록; 페이지 11907, 좌컬럼, 첫 번째 단락 참조.	10
A	VAN HOESEL, A. Q. 등, 'Hypomethylation of LINE-1 in primary tumor has poor prognosis in young breast cancer patients: a retrospective cohort study', Breast Cancer Research and Treatment, 2012, 제134권, 페이지 1103-1114 전체 문헌 참조.	1-13

☒ 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

2018년 12월 10일 (10.12.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 12월 10일 (10.12.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



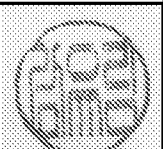
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	PARK, S. Y. 등, 'Alu and LINE-1 hypomethylation is associated with HER2 enriched subtype of breast cancer', PLoS ONE, 2014.06, 제9권, 제6호, 아티클 번호 e100429, 페이지 1-9 전체 문헌 참조.	1-13
PX	KR 10-2018-0014283 A (국립암센터) 2018.02.08 청구항 1, 2, 9 및 10; 단락 [0003] 및 [0005] 참조.	1-9, 11-13

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2018-0014283 A

2018/02/08

KR 10-1833023 B1

2018/02/28