

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 3월 15일 (15.03.2018) **WIPO | PCT**



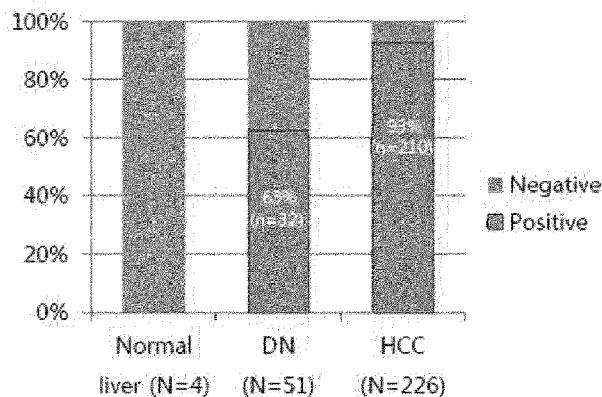
(10) 국제공개번호
WO 2018/048258 A1

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/68* (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/009899
- (22) 국제출원일: 2017년 9월 8일 (08.09.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0116510 2016년 9월 9일 (09.09.2016) KR
10-2017-0049773 2017년 4월 18일 (18.04.2017) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R & DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).
- (72) 발명자: 김규원 (KIM, Kyu Won); 05555 서울시 송파구 잠실로 62, 343동 202호, Seoul (KR). 서지혜 (SEO, Ji Hae); 07258 서울시 영등포구 영신로 193, 3동 807호, Seoul (KR). 정영화 (CHUNG, Young-Hwa); 07340 서울시 영등포구 국제금융로 79, 디동 206호, Seoul (KR). 이단비 (LEE, Danbi); 05232 서울시 강동구 동남로79길 26, 109동 1002호, Seoul (KR). 이혜신 (LEE, Hye Shin); 04182 서울시 마포구 새창로 52, 104동 1103호, Seoul (KR). 박지현 (PARK, Ji-Hyeon); 42687 대구시 달서구 용산로 88, 102동 503호, Daegu (KR). 류수형 (RYU, Soo Hyung); 07344 서울시 영등포구 63로 45, 21동 111호, Seoul (KR). 김정아 (KIM, Jeong A); 01026 서울시 강북구 4.19로 15-8, B동 401호, Seoul (KR). 최진혁 (CHOI, Jin-hyeok); 57718 전라남도 광양시 광영로 141, 106동 1104호, Jeollanam-do (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층, 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: USE OF ARD1 AS MARKER FOR MEASURING PROGNOSIS OF OR DIAGNOSING LIVER CANCER

(54) 발명의 명칭: 간암 예후측정 또는 진단용 마커로서의 ARD1의 용도

ARD1 overexpression



(57) Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) progresses in stages, and dysplastic nodules which occur in a chronic liver disease, particularly high-grade dysplastic nodules, are precancerous lesions and can be seen as an early change in the multistage process of hepatocarcinogenesis. Since a gradual increase in malignancy through the stage of such dysplastic nodules develops into highly metastatic and unfavorable-grade liver cancer, recent efforts are focused on early liver cancer diagnosis. To this end, in order to enable early and effective diagnosis and prediction of liver cancer, the present invention relates a composition for liver cancer stage diagnosis and a liver cancer diagnostic kit. Analysis of the expression level of ARD1 according to the present invention is expected to be useful for early diagnosis and treatment of liver cancer and identification of the progression stage of liver cancer.





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 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 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)은 단계적으로 진행되는바, 만성 간질환에서 발생하는 이형성 결절, 특히 고분화 이형성 결절은 전암병변으로서 다단계 간암발생 과정의 초기 변화로 볼 수 있다. 이와 같은 이형성 결절 단계를 거쳐 점차 악성도가 증가하여 전이도가 높으며 분화도가 좋지 않은 간암으로 발전하게 되므로, 최근 간암을 조기에 진단하기 위하여 노력이 집중되고 있다. 이에, 본 발명은 간암을 조기에 효과적으로 진단 및 예측할 수 있도록 간암 단계 진단용 조성물 및 간암 진단 키트에 관한 것으로, 본 발명에 따라 ARD1 발현 수준을 분석하면 간암을 조기에 진단하여 대응하고, 간암의 진행 단계를 파악하는데 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 간암 예후측정 또는 진단용 마커로서의 **ARD1**의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 간암을 조기에 효과적으로 진단 및 예측할 수 있도록 간암 진행 단계 진단용 조성물 및 간암 진단 키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명자들은 정상인과 비교하여 간암 환자에게서 **ARD1** 발현 수준이 높다는 사실을 확인하였는바, 본 발명에 따라 **ARD1** 발현 수준을 분석하면 간암을 조기에 진단하고, 간암의 진행 단계를 파악할 수 있을 것으로 기대된다.

배경기술

- [2] 간암 또는 간세포암 (hepatocellular carcinoma; HCC)은 세계에서 5번째로 흔한 암이며, 국내에서는 2013년 통계청 자료에 의하면 암에 의한 사망의 22.6%가 간암으로, 암 사망 원인 4위에 해당된다. 간세포암종에 관한 가장 바람직한 치료법은 수술이지만, 종양의 절제할 수 없는 크기 및 수, 간기능 저하, 다양한 간내 또는 원격 전이 등의 요인이 간세포암종 환자의 수술 가능 여부 및 수술 이후 재발에 주요한 제한 요소로 작용하고 있다. 이와 관련된 암의 다양한 증식 및 전이 관련 단백질들이 연구되고 분리되어져 있다.
- [3] 특히 간세포암은 간염바이러스나 알코올, 간경화와 같은 위험인자를 가지고 있는 환자에게서 호발하는 것으로 알려져 있고 조기진단 마커를 이용하여 고위험군에 대한 선별적 감시 검사 (surveillance)를 시행할 대상이 명확하다. 실제로, 6개월 간격으로 시행하는 조기진단은 간암 환자의 생존율 증대 (사망률 37% 감소)하는 것으로 나타났다.
- [4] 정상인에서 간암을 조기에 정확하게 발견해 낼 수 있는 바이오마커 검사는 아직까지 개발되지 못했으며, 고위험군에서 비침습적인 조기 간암 진단을 위하여 사용하고 있는 검사 방법이 혈청 알파태아단백 (α -fetoprotein; AFP) 검사이다. AFP는 개발 당시 민감도와 특이도를 모두 양호한 수준으로 달성할 수 있는 기준값이 20ng/mL로 제시되었으나, 이 경우 민감도가 60%에 지나지 않으며 현재 국제 학회의 간암 진단 가이드라인에 따라 200ng/mL를 기준으로 간암을 진단할 경우 특이도는 상승하지만 민감도가 22%에 불과하다. 기존의 연구 결과, AFP는 전체적으로 약 66%의 민감도와 82%의 특이도를 갖는 것으로 알려져 있어 모든 간암 환자를 진단하는 데에 제한이 있다.
- [5] 그 외 진단 기준으로 확립되어 있지는 않으나 간암 진단에 도움이 되는 혈청 마커로는 Descarboxyprothrombin (DCP), Prothrombin Induced by Vitamin K Absence II (PIVKA-II), 글리코실화 AFP 대 총 AFP (L3 fraction)분포, α -fucosidase, glypican 3, HSP-70 등이 있다. 그러나 각각은 예후 인자로서 의미를 가지는 것이 대부분이고, 단독으로 사용하였을 때 정확도가 낮아 아직 선별 검사로 사용되지 못하고 있으며, 단일 혈청학적 마커로 간암을 조기 진단하는 것은 이미 한계에

다다른 것으로 판단된다. 아울러 실제 수술이나 고주파 열치료술과 같은 근치적 치료가 가능한 단계에서 진단되는 환자들은 전체 간암 환자의 30% 정도에 국한된다(미국 공개특허공보 제2010/0304372호 참조).

- [6] Arrest-defective 1 protein (ARD1)은 다양한 암에서 발현이 증가되어 있음이 보고되었으며, 암세포 증식 및 암 혈관 신생에 관여됨이 알려져 있다. 그러나 ARD1이 간세포암종 환자에서 암의 악성화, 침윤, 재발 및 생존에 어떠한 역할을 수행하는지에 관한 구체적인 보고는 전무한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 간세포암종 환자의 종양 조직 및 종양 주변 조직을 분석하고, 정상인과 비교하여 간암환자에게서 ARD1 발현 수준이 높다는 사실을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [8] 이에, 본 발명의 목적은 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 수준 또는 ARD1 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 간암 진행 단계 진단용 조성물 및 간암 진행 단계 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 개체로부터 분리한 간암 조직 및 간암 주변 조직에 대하여 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 단백질의 발현량을 측정하는 단계를 포함한 간암 예후예측용 키트 및 간암의 예후측정을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 피검체 유래의 혈액 샘플에서 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 간암 진단을 위한 정보제공방법 및 간암 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [11] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 수준 또는 ARD1 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 간암 진행 단계 진단용 조성물 및 이를 포함하는 간암 진행 단계 진단용 키트를 제공한다.
- [13] 본 발명의 일 구현예로, 상기 ARD1 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가질 수 있다.
- [14] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 ARD1 유전자의 수준을 측정하는 물질은 ARD1 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 ARD1 단백질의 수준을 측정하는 물질은 ARD1 단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.

- [16] 또한, 본 발명은 a) 개체로부터 분리한 간암 조직 및 간암 주변 조직에 대하여 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 단백질의 발현량을 측정하는 단계; b) 상기 a) 단계의 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량을 비교하는 단계; 및 c) 상기 b) 단계에서의 ARD1 단백질 발현량의 비교로부터, 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 비교하여 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량이 크면 클수록, 간암의 예후가 더 나쁠 것으로 판정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 간암 예후예측용 키트를 제공한다.
- [17] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 ARD1 단백질의 발현량을 측정하는 물질은 ARD1 단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.
- [18] 또한, 본 발명은 a) 개체로부터 분리한 간암 조직 및 간암 주변 조직에 대하여 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 단백질의 발현량을 측정하는 단계; b) 상기 a) 단계의 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량을 비교하는 단계; 및 c) 상기 b) 단계에서의 ARD1 단백질 발현량의 비교로부터, 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 비교하여 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량이 크면 클수록, 간암의 예후가 더 나쁠 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 간암의 예후측정을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질의 발현량을 측정하기 위한 방법은 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 유전자 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNaseprotection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 1개 이상의 방법일 수 있다.
- [21] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 혈액 샘플에서 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 간암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [22] 또한, 본 발명은 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는데 사용되는, 간암 진단용 키트로서, 상기 간암 진단을 위하여 피검체 유래의 혈액 샘플을 이용하는 것을 특징으로 하는, 간암 진단용 키트를 제공한다.

[23] 나아가, 본 발명은 상기 간암 진행 단계 진단용 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간암 진행 단계 진단방법을 제공한다.

[24] 뿐만 아니라, 본 발명은 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 수준 또는 ARD1 단백질의 수준을 측정하는 물질의, 간암 진행 단계 진단용도를 제공한다.

발명의 효과

[25] 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)은 단계적으로 진행되는바, 만성 간질환에서 발생하는 이형성 결절, 특히 고분화 이형성 결절은 전암병변으로서 다단계 간암발생 과정의 초기 변화로 볼 수 있다. 이와 같은 이형성 결절 단계를 거쳐 점차 악성도가 증가하여 전이도가 높으며 분화도가 좋지 않은 간암으로 발전하게 되므로, 최근 간암을 조기에 진단하기 위하여 노력이 집중되고 있다. 이에, 본 발명은 간암을 조기에 효과적으로 진단 및 예측할 수 있도록 간암 진행 단계 진단용 조성물 및 간암 진단 키트에 관한 것으로서, 본 발명에 따라 ARD1 발현 수준을 분석하면 간암을 조기에 진단하여 대응하고, 간암의 진행 단계를 파악하는데 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[26] 도 1은 간암 환자의 간암 조직 (T) 및 간암 주변 조직 (NT)에서의 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 발현을 나타내는 도이다.

[27] 도 2는 간암 환자의 간암 조직 (T) 및 간암 주변 조직 (NT)에서의 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 발현량을 정량화하여 나타내는 도이다.

[28] 도 3은 ARD1 발현 레벨과 간암 수술 후 재발률 및 생존율 사이의 관련성을 분석하기 위하여, 실험 대상자인 환자들 총 698명의 clinical characteristics을 나타내는 도이고, 도 4는 상기 실험 대상자인 환자들의 tumor characteristics을 나타내는 도이다.

[29] 도 5는 상기 실험 대상자들 698명의 간세포암종 조직에 면역화학염색을 시행하여 ARD1 발현 정도에 따라 실험 대상자들을 네 개의 그룹으로 나타낸 도이고, 도 6은 이와 같이 간세포암종 조직에서 살펴 본 ARD1의 발현 레벨을 도식화 하여 나타낸 도이다.

[30] 도 7은 면역화학염색 한 조직에서 미세혈관 침윤 (microvascular invasion; MVI)이 존재하는 경우, ARD1 발현이 높은 경향을 보임을 나타낸 도이다.

[31] 도 8은 분화도가 좋지 않은 간암에서 ARD1 과발현 정도가 높은 경향을 보임을 나타낸 도이다.

[32] 도 9는 근치적 간절제술을 시행 받았던 536명의 간세포암종 환자들을 대상으로 간세포암종 조직에서 ARD1의 발현이 높은 그룹에서 수술 후 재발률 (cumulative recurrence rate)이 높은 경향을 보임을 나타낸 도이고, 도 10은 상기 간세포암종 환자들을 대상으로 간세포암종 조직에서 ARD1의 발현이 높은 그룹에서 간암 수술 후 생존율 (survival rate)이 낮은 경향을 보임을 나타내는 도이다.

[33] 도 11은 간암의 전단계인 이형성 결절 (dysplastic nodule; DN)에서의 ARD1

레벨을 간 정상 조직 및 간암 조직과 비교하기 위하여, 실험 대상자들의 clinical characteristics을 나타내는 도이다.

[34] 도 12는 정상조직 (Normal)에서 이형성 결절 (DN), 그리고 간암 (hepatocellular carcinoma; HCC)으로 병세가 진행될수록 ARD1의 발현량이 증가함을 확인한 도이다.

[35] 도 13은 이형성 결절 환자 (DN)와 간암 환자 (HCC)의 ARD1 발현 정도를 비교하였을 때, 간암 환자의 ARD1 과발현 정도가 이형성 결절 환자에 비하여 더 높다는 사실을 확인한 도이다.

[36] 도 14는 이형성 결절의 분화도 (grade)에 따라 ARD1의 발현 정도를 관찰하였을 때, 고분화 이형성 결절 (High-grade DN)에서 ARD1의 발현 비율이 유의하게 높음을 확인한 도이다.

[37] 도 15는 quantitative RT-PCR을 통하여 혈액 샘플에서 ARD1 mRNA의 레벨을 확인한 결과, 대조군에 비하여 간암 환자에게서 상기 ARD1 mRNA의 레벨이 전반적으로 높음을 나타내는 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[38] 본 발명자들은 간세포암종 환자의 종양 조직 및 종양 주변 조직을 분석하고, 정상인과 비교하여 간암환자에게서 ARD1 발현 수준이 높다는 사실을 확인함으로써, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[39]

[40] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[41]

[42] 본 발명은 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 수준 또는 ARD1 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 간암 진행 단계 진단용 조성물을 제공함에 특징이 있다.

[43] 본 발명자들은, ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자가 종양 주변 조직에 비해 종양 조직에서 높게 발현되는 점 및 정상인과 비교하여 간암환자에게서 ARD1 발현 수준이 높다는 사실을 확인할 수 있었으며, 상기 ARD1 유전자의 염기서열을 서열번호 1에 나타내었다.

[44] 본 발명의 일 실시예에서는, 16명의 간암환자들로부터 간 조직 샘플을 얻어 간 종양 조직에서 특이적으로 ARD1의 발현이 증가한다는 것을 확인하였다(실시예 1 참조).

[45] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 면역화학염색 방법을 통하여 ARD1의 발현 레벨을 확인하였다(실시예 2 참조).

[46] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 간암 수술 후의 ARD1 발현 레벨을 확인하여 ARD1과 간암의 재발률 및 간암 환자의 생존율 사이의 관련성을 분석하였다(실시예 3 참조).

[47] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 간암의 진행 단계에 따라 ARD1의 발현

레벨이 증가한다는 것을 확인하였으며(실시예 4 참조), 또한, quantitative RT-PCR을 통하여 혈액 샘플에서 ARD1 mRNA 레벨을 확인한 결과, 간암 환자의 ARD1 발현 레벨이 높다는 사실을 확인하였다(실시예 5 참조).

- [48] 따라서 본 발명에 따른 ARD1 유전자의 발현 레벨 측정을 통하여 간암을 조기에 진단할 수 있으며, 혈액 샘플을 사용하는 간암 진단 키트를 개발하는 등 간암의 진단이 요구되는 다양한 목적 및 용도로 사용될 수 있다.
- [49] 이에, 본 발명은 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 수준 또는 ARD1 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 간암 진행 단계 진단용 조성물 및 이를 포함하는 간암 진행 단계 진단용 키트를 제공한다.
- [50] 또한, 본 발명은 a) 개체로부터 분리한 간암 조직 및 간암 주변 조직에 대하여 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 단백질의 발현량을 측정하는 단계; b) 상기 a) 단계의 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량을 비교하는 단계; 및 c) 상기 b) 단계에서의 ARD1 단백질 발현량의 비교로부터, 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 비교하여 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량이 크면 클수록, 간암의 예후가 더 나쁠 것으로 판정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 간암 예후예측용 키트를 제공한다.
- [51] 또한, 본 발명은 a) 개체로부터 분리한 간암 조직 및 간암 주변 조직에 대하여 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 단백질의 발현량을 측정하는 단계; b) 상기 a) 단계의 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량을 비교하는 단계; 및 c) 상기 b) 단계에서의 ARD1 단백질 발현량의 비교로부터, 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 비교하여 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량이 크면 클수록, 간암의 예후가 더 나쁠 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 간암의 예후측정을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [52] 본 발명에서, "진단"이란 병리 상태를 확인하는 것을 의미하는 것으로서, 본 발명의 목적상 상기 진단은 간암 진단 마커의 발현 유무를 확인하여 간암의 진행 여부를 확인하는 것을 의미하며, 또한, 본 발명에서의 진단은 간암 진단 마커의 발현 유무 및 발현 정도를 확인하여 간암의 발병여부, 발전 및 경감 등을 판단하는 것도 포함한다.
- [53] 본 발명에서, "예후측정"이란 간암으로 진단 후 치료를 받고 회복 여부를 판별하는 것을 포함하는 것이다.
- [54] 또한, "진단용 마커 (diagnosis marker)"란 간암 세포를 정상 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질을 의미하며, 정상 세포에 비하여 간암 세포에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산 (예컨대, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당 (단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명에서 제공하는 간암 진단용 마커는 정상 세포에 비해 간암 세포에서 발현량이 증가하는 ARD1 유전자 또는 단백질일 수 있으며,

- 바람직하게 상기 **ARD1** 유전자는 서열번호 1로 기재된 염기서열을 갖는 것일 수 있다.
- [55] 본 발명에서 상기 **ARD1** 유전자의 수준을 측정하는 물질은 **ARD1** 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있고, 상기 **ARD1** 단백질의 수준을 측정하는 물질은 **ARD1** 단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.
- [56] 본 발명에서 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형 (template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응 (즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [57] 본 발명에서 "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지 (Labelling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오티드 프로브, 단쇄 DNA (single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA (double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [58] 본 발명에서, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.
- [59] 본 발명의 유전자는 핵산 서열이 유전자 은행에 등록되어 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [60] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브는 포스포르 아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미 데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [61] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 혈액 샘플에서 **ARD1** (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 간암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [62] 또한, 본 발명은 **ARD1** (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는데 사용되는, 간암 진단용

키트로서, 상기 간암 진단을 위하여 피검체 유래의 혈액 샘플을 이용하는 것을 특징으로 하는, 간암 진단용 키트를 제공한다.

[63] 본 발명의 방법은 포유류 특히 인간을 대상으로 포함한다. 이때, 인간 대상체는 간암이 발병했을 것으로 의심되는 사람, 간염, 간경화 환자, 또는 의심되지 않는 사람으로 간암 진단 여부가 필요한 사람을 포함한다.

[64] 본 발명에서 "생물학적 시료"는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 생물학적 시료에서 존재하는 *ARD1* 유전자의 발현량 또는 단백질의 양이 대조군에 비해 증가된 경우, 간암이 진행된 것으로 판정할 수 있다.

[65] 본 발명에서 "유전자 발현량 측정"이란 간암의 진행 여부를 확인하기 위하여 간 조직 세포에서 상기 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정하여 이루어진다. 이를 위한 분석 방법으로는 예를 들어, 역전사 중합효소반응 (RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응 (Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응 (Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[66] 본 발명에서 유전자의 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브이다. 본 발명에서 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서, 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드염기의 서열 및 서브 유닛간 백분을 갖는 올리고머를 지칭한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다. 이 안티센스 올리고머는 mRNA의 번역을 차단 또는 저해하고 mRNA의 스플라이스 변이체를 생산하는 mRNA의 프로세싱 과정을 변화시킬 수 있다.

[67] 본 발명에서 "단백질 발현량 측정"이란 간암의 진행 여부를 확인하기 위하여 간 조직 세포에서 본 발명의 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 단백질의 양을 측정하여 이루어진다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트 (rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법 (Complement Fixation Assay), 유세포분석 (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩 (protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 단백질 발현 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 항체이다.

[68] 본 발명에서 "검출"이란, 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 검출 및 발현량 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에

공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.

- [69] 본 발명에서 "이형성 결절"이란, 1994년 world congress of gastroenterology에서 working international party의 토의를 거쳐 제정한 것으로서, 이형성 결절 (dysplastic nodule; DN)은 현재로서는 양성인지 악성인지 확실히 결정하기 어려우나 앞으로 간세포 암종이 발생할 가능성이 높다는 생물학적 특성에 중점을 둔 명칭이다. 이형성 결절은 이형성을 동반한 장경 1mm 이상의 간의 결절성 병변으로 확실한 악성의 조직학적 소견은 없으며 대부분 간경변증에서 발생한다. 육안 소견상 이형성 결절은 대부분 주위 간조직과 색, 성상 등이 틀리며 절단면이 불룩하게 나오는 특징을 보이며, 이형성 병소 (dysplastic foci)는 장경 1mm 이하의 간세포 군집으로 이형성은 관찰되나 확실한 악성의 조직학적 소견은 없는 것을 지칭하는데, 장경 1mm 이상은 이형성 결절로, 그 이하는 이형성 병소로 정의함으로써 이형성 결절을 진단 시 병변의 크기는 중요성이 줄어들었다.

[70]

- [71] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[72]

[73] [실시예]

[74] 실시예 1. 간암 조직 및 간암 주변 조직에서의 **ARD1** 발현 레벨 확인

[75] **1-1. 시료의 준비 (조직 샘플)**

- [76] 16명의 환자들로부터 간 조직 샘플을 얻었다. 본 실시예에서 사용된 상기 조직 샘플들은 서울아산병원 임상연구심의위원회의 승인을 받은 것이며, 헬싱키 선언의 요구에 부합되도록 사전에 참가자들로부터 동의를 받았다. 각 환자의 특성치는 하기 표 1에 나타내었다.

[77] [표1]

항목	특성치
연령 (년, 평균 $\pm$ SD)	59 $\pm$ 11.5
성별 (M:F)	12 : 4
간경변 유/무	7/8
원인 (HBV/HCV/NBNC)	12/1/3
HCC 크기 (cm, range)	1.4 ~ 11.8

[78] *간암 환자 (총 16명) 특성치

[79]

[80] **1-2. 간암 조직에서의 **ARD1** 발현 증가 확인**

- [81] ARD1 (Arrest-defective 1 protein)의 발현을 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-1에서와 같이 간암 환자 간암 조직 및 간암 주변 조직을 채취하여 하기와 같이 실험하였다.
- [82] 분리한 간암 조직 및 간암 주변 조직을 세포 용해 버퍼 (lysis buffer)에서 균일화하여 단백질을 추출하고 BCA assay로 정량하였다. 각 샘플당 40 µg의 단백질을 95 °C에서 5 분간 가열하여 변성 (denaturation) 시킨 후, SDS-PAGE 전기영동법으로 분리하였다. 이를 니트로셀룰로스 막 (nitrocellulose membrane)에 옮긴 후 ARD1 항체를 1:3000의 비율로 희석하여 4 °C에서 16 시간, HRP 태그 된 2차 항체를 상온에서 1 시간 반응시키고, 형광이미지 분석기 (LAS-4000)로 HRP 활성을 측정하였다. Image J 프로그램을 이용하여 촬영된 ARD1 밴드의 덴시토메트리 (densitometry)를 측정하여 ARD1의 발현량을 정량화하였으며, 같은 방법으로 빈쿨린 (vinculin)을 정량하여 표준화하였다.
- [83] 그 결과, 도 1 및 2에 나타낸 바와 같이, 간암 주변 조직에 비해 간암 조직에서 ARD1의 발현이 증가하며, ARD1의 발현 증가폭이 클수록 간세포암종의 미세혈관성 침입 (microvascular invasion)이 증가하는 경향을 확인하였다.

[84]

[85] 실시예 2. 면역화학염색 방법을 통한 ARD1 발현 레벨 확인

- [86] 면역화학염색(immunohistochemical staining)을 이용해 ARD1의 발현 레벨을 확인하기 위하여, 실험 대상자들의 tissue microarray block 조직에서 OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical System)를 이용하여 Bench Mark XT automatic immunostaining device (Ventana Medical System, Tucson, AZ)에서 제조업체의 지침에 따라 ARD1 항체 (Ab155687, abcam, CAMBRIDGE, UK)의 면역화학염색을 시행하였다. 각 조직의 절편 (4 µm)을 실레인 처리된 유리 슬라이드 상에 붙인 후, 실온에서 10분간, 65°C 인큐베이터에서 20분간 건조시켰다. 그 후, CC1 buffer를 32분간 처리한 다음, ARD1 항체를 이용하여 조직표본염색장치 (autoimmunostainer)에서 16분간 염색시켰다.
- [87] 상기와 같이 면역화학염색을 시행한 후, ARD1 면역염색의 강도는 전체 세포 중 면역 염색 양성을 보이는 세포의 비율로 결정하였는데, 모든 세포가 전혀 염색되지 않는 경우는 none; 일부의 세포가 양성 소견을 보이지만, 그 비율이 1/3을 넘지 않는 경우는 1+(+); 전체의 1/3에서 2/3사의 비율을 보이는 경우를 2+(++); 2/3이상 세포가 면역 화학 염색에서 양성 소견을 보이는 경우를 3+(+++로 정의하였다.

[88]

[89] 실시예 3. ARD1 발현 레벨과 간암 수술 후 재발률 및 생존율 사이의 관련성 분석

[90] **3-1. 간암 환자들의 ARD1 발현 레벨 확인**

- [91] 조직학적으로 간세포암종으로 확진된 698명의 환자들을 대상으로 ARD1 발현 레벨을 확인하였는데, 이중 162명은 간이식을 받았으며 536명은 근치적

간절제술을 받았다. 도 3 및 도 4는 실험 대상자인 환자들 총 698명의 clinical characteristics과 tumor characteristics을 각각 나타낸 것이다. 간세포암종의 특성과 ARD1 면역화학염색 발현정도 사이의 연관성에 대해 평가하기 위하여, 상기 실험 대상자들의 간세포암종 조직을 이용해 실시예 2에 기재된 방법으로 모든 간세포암종 tissue microarray block 조직에서 ARD1 항체 (Ab155687, abcam, CAMBRIDGE, UK)의 면역화학염색을 시행하였다.

- [92] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 환자별 간세포암종 조직에서의 ARD1 발현 정도가 상이하였으며, ARD1 발현 정도에 따라 실험대상자들을 네 개의 그룹으로 나눌 수 있었다(-, nothing; +, <1/3; ++, 1/3 ~ 2/3; +++, >2/3). 도 6은 상기와 같이 간세포암종 조직에서 살펴 본 ARD1의 발현 레벨을 도식화하여 나타낸 것이다.

[93]

[94] **3-2. 간암 수술 후 ARD1 발현 레벨 확인**

- [95] ARD1 발현 정도와 간암 환자들의 수술 후 간암의 재발 여부 및 생존율 사이의 관련성을 분석하기 위하여, 실험 대상자들을 상대로 간암 수술 후 ARD1 발현 레벨을 확인하였다.

- [96] 그 결과, 실시예 2에 기재된 방법에 따라 면역화학염색 한 조직에서 미세혈관 침윤 (microvascular invasion; MVI) 존재 여부에 따른 ARD1 발현 정도를 비교하였을 때, 미세혈관 침윤이 존재하는 경우, ARD1 발현이 높은 경향을 보였다(도 7 참조). 또한, 면역화학염색을 시행한 간암조직에서 ARD1 발현 정도와 간암 분화도와의 관계를 비교하였을 때, 분화도가 좋지 않은 간암에서 ARD1 과발현 정도가 높은 경향을 보였다(도 8 참조).

- [97] 한편, 실험 대상자 중 간이식을 받았던 경우를 제외하고, 근치적 간절제술을 시행 받았던 536명의 간세포암종 환자들만을 대상으로 간세포암종 조직에서의 ARD1 발현정도와 수술 후 재발률을 분석한 결과, 간세포암종 조직에서 ARD1의 발현이 높은 그룹에서 수술 후 재발률(cumulative recurrence rate)이 높은 경향을 확인하였으며(도 9 참조), 또한, ARD1의 발현이 높은 그룹에서 간암 수술 후 생존율(survival rate)이 낮은 경향을 확인하였다(도 10 참조).

- [98] 상기 결과들을 종합하면, 회복도가 좋지 않은 간암 환자들에게서 ARD1의 발현량이 높다는 것을 관찰할 수 있으므로, 이는 ARD1의 발현정도와 간암의 분화도, 재발률, 및 생존율과의 관련성이 있음을 시사한다.

[99]

[100] **실시예 4. 간암의 진행 단계에 따른 ARD1 발현 레벨 확인**

- [101] 간암의 전단계인 이형성 결절 (dysplastic nodule; DN)에서의 ARD1 레벨을 간 정상 조직 (Normal liver) 및 간암 조직 (hepatocellular carcinoma; HCC)과 비교하기 위하여, 조직학적으로 확진된 이형성 결절 환자 51명 [저분화 이형성 결절 (Low-grade DN) 20명 (39%); 고분화 이형성 결절 (High-grade DN) 31명 (61%)] 의 ARD1 발현 정도를 평가하였으며, 이와 함께 226명의 간세포암종 환자들 및

4명의 정상인의 간조직에서의 ARD1 발현정도를 비교 분석하였다. 도 11은 상기 실험 대상자들의 clinical characteristics을 나타내는 도이다.

- [102] 간암은 저분화 이형성 결절 (Low-grade dysplastic nodule)에서 고분화 이형성 결절 (High-grade dysplastic nodule)을 거쳐 간암으로 여러 단계에 걸쳐서 진행되는데, 상기 과정에서 종양 세포는 분화된 세포에서 점차 더 미분화되는 탈분화(dedifferentiation)가 단계적으로 서서히 일어나고, 이에 따라 악성도는 점차 증가하여, 미세혈관 침윤(microvascular invasion)이 존재하여 전이도가 높으며 분화도가 좋지 않은 간암으로 발전하게 된다.
- [103] 이에 상기 실시예 2의 방법에 따라, 면역화학염색을 시행하여 간암의 진행 단계에 따른 ARD1의 발현 레벨을 분석한 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 정상조직 (Normal)에서 이형성 결절 (DN), 그리고 간암 (HCC)으로 간암이 진행될수록 ARD1의 발현량이 증가함을 확인하였다. 또한, 도 13에 나타낸 바와 같이, 이형성 결절 환자와 간암 환자의 ARD1 발현 정도를 비교하였을 때, 간암 환자의 ARD1 과발현 정도가 이형성 결절 환자에 비하여 더 높다는 사실을 관찰할 수 있었다.
- [104] 아울러, 도 14에 나타낸 바와 같이, 이형성 결절의 분화도 (grade)에 따른 ARD1의 발현 정도를 관찰하였을 때, 고분화 이형성 결절 (High-grade DN)에서 ARD1의 발현 비율이 유의하게 높다는 사실을 확인할 수 있었다.
- [105] 상기 결과들을 종합하면, 간 정상조직에서 이형성 결절, 그리고 간암조직으로 점차 병세가 진행돼 간암이 악성화 되어 갈수록 ARD1의 발현량이 높다는 사실을 관찰할 수 있는바, 이는 ARD1 발현 레벨을 측정하여 이형성 결절의 분화 정도를 판정하고, 간암을 이형성 결절 단계에서 조기에 진단하는 등, ARD1을 간암 진행 단계 진단의 용도로 이용할 수 있음을 시사한다.

[106]

[107] 실시예 5. 혈액 샘플에서의 ARD1 발현 레벨 확인

- [108] 상기 실시예 2의 방법에 따른 면역화학염색 방법뿐만이 아니라, 혈액 샘플을 통해서도 ARD1 발현 레벨을 관찰하여 간암을 진단할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같이 실험하였다.

- [109] 먼저, 혈액 시료를 2500 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 3개의 층 [hematocrit (아래층), buffy coat (중간층), plasma (상층)]으로 분리하였다. 그 다음 상층 혈장을 제거한 후, buffy coat를 조심스럽게 분리하여 1.5ml 튜브에 옮겼다. 분리한 buffy coat를 RBC lysis buffer에 현탁 시켜, 섞여 있는 적혈구를 용해시킨 후, 다시 2500 rpm에서 5분간 원심분리 하여 RBC lysis buffer를 제거하고, 세포 펠렛 (pellet)을 얻었다. 이 pellet을 TRIzol reagent로 용해하여 RNA를 분리한 후, 2ug의 RNA를 MMLV reverse transcriptase (Promega)로 역전사하여, cDNA를 얻어내었다. 그 후, StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems)를 사용하여, quantitative real-time PCR을 수행해 mRNA 상대량 (Relative quantity)을 측정하였다. mRNA 상대량은 GAPDH로 표준화하였다.

[110] 이와 같이 혈액 샘플에서 quantitative RT-PCR을 통하여 ARD1 mRNA 레벨을 확인한 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비해 간암 환자에서 ARD1 mRNA 레벨이 전반적으로 높음을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통하여, 간암 진단 키트를 개발하는데 혈액에서 검출한 ARD1 발현 레벨을 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

[111]

[112] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

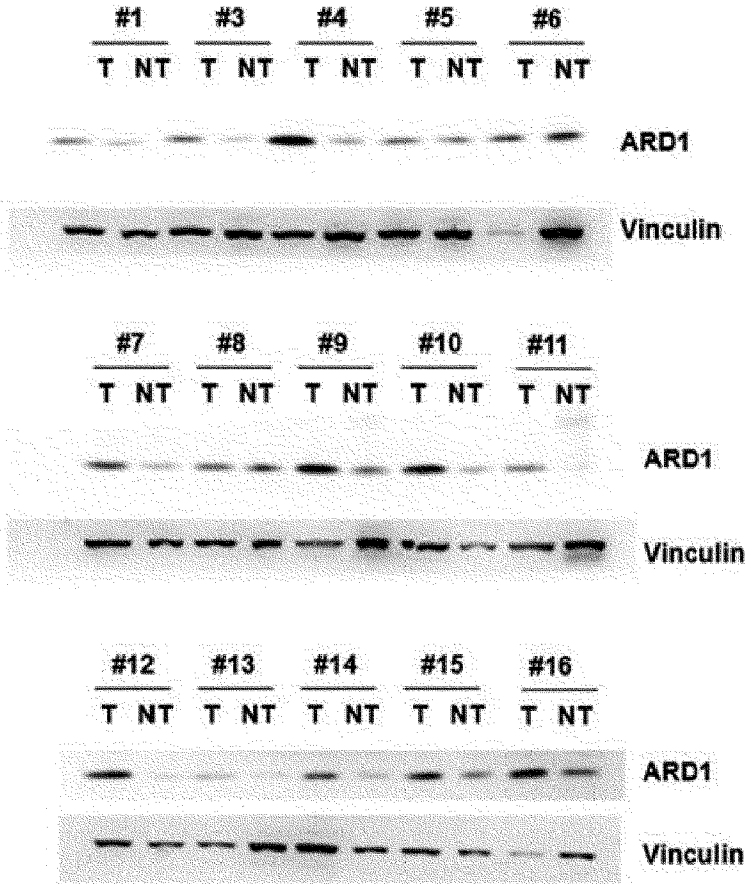
[113] 본 발명은 간암을 조기에 효과적으로 진단 및 예측할 수 있도록 하는 간암 단계 진단용 조성물 및 간암 진단 키트에 관한 것으로, 본 발명에 따라 ARD1 발현 수준을 분석하면 간암을 조기에 진단하여 대응하고, 간암의 진행 단계를 파악하는데 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

청구범위

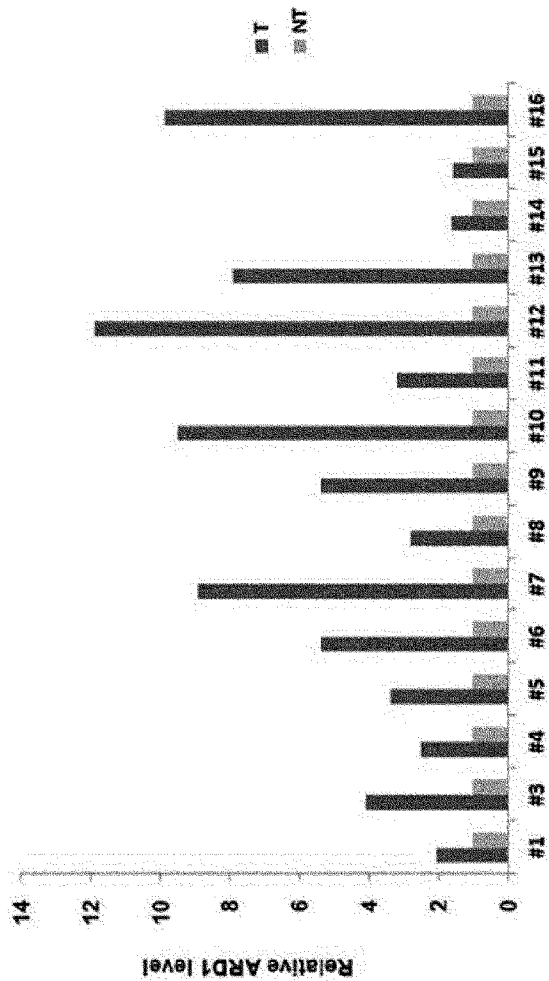
- [청구항 1] ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 수준 또는 ARD1 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 간암 진행 단계 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 ARD1 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 간암 진행 단계 진단용 조성물.
- [청구항 3] 제1항의 조성물을 포함하는, 간암 진행 단계 진단용 키트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 ARD1 유전자의 수준을 측정하는 물질은 ARD1 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 간암 진행 단계 진단용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 ARD1 단백질의 수준을 측정하는 물질은 ARD1 단백질을 특이적으로 인식하는 항체인 것을 특징으로 하는, 간암 진행 단계 진단용 조성물.
- [청구항 6] ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 단백질의 발현량을 측정하는 물질을 포함하는, 간암 예후예측용 키트로서,
상기 간암의 예후측정은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 간암 예후예측용 키트:
- a) 개체로부터 분리한 간암 조직 및 간암 주변 조직에 대하여 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 단백질의 발현량을 측정하는 단계;
 - b) 상기 a) 단계의 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량을 비교하는 단계; 및
 - c) 상기 b) 단계에서의 ARD1 단백질 발현량의 비교로부터, 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 비교하여 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량이 크면 클수록, 간암의 예후가 더 나쁠 것으로 판정하는 단계.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 ARD1 단백질의 발현량을 측정하는 물질은 ARD1 단백질을 특이적으로 인식하는 항체인 것을 특징으로 하는, 간암 예후예측용 키트.
- [청구항 8] a) 개체로부터 분리한 간암 조직 및 간암 주변 조직에 대하여 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 단백질의 발현량을 측정하는 단계;
- b) 상기 a) 단계의 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량을 비교하는 단계; 및
 - c) 상기 b) 단계에서의 ARD1 단백질 발현량의 비교로부터, 간암 주변 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량과 비교하여 간암 조직에서의 ARD1 단백질의 발현량이 크면 클수록, 간암의 예후가 더 나쁠 것으로 판정하는

- 단계를 포함하는, 간암의 예후측정을 위한 정보제공방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
 상기 단백질의 발현량을 측정하기 위한 방법은 웨스턴 블롯,
 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA:
 Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion),
 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동,
 조직 면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정
 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated
 Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터
 선택된 1개 이상의 방법인 것을 특징으로 하는, 간암의 예후측정을 위한
 정보제공방법.
- [청구항 10] 피검체 유래의 혈액 샘플에서 ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의
 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는
 단계를 포함하는, 간암 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 11] ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가
 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는데 사용되는, 간암 진단용
 키트로서,
 상기 간암 진단을 위하여 피검체 유래의 혈액 샘플을 이용하는 것을
 특징으로 하는, 간암 진단용 키트.
- [청구항 12] ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 수준 또는 ARD1 단백질의
 수준을 측정하는 물질을 포함하는 간암 진행 단계 진단용 조성물을
 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간암 진행 단계 진단방법.
- [청구항 13] ARD1 (Arrest-defective 1 protein) 유전자의 수준 또는 ARD1 단백질의
 수준을 측정하는 물질의, 간암 진행 단계 진단용도.

[도1]



[도2]



[도3]

Clinical characteristics (N=698)

Variables	Values
Age*, years	52 (17~81)
Gender M/F, n (%)	565/133 (81/19)
Etiology, HBV/HCV/NBNC, n (%)	614/43/41 (88/6/6)
Presence of LC, n (%)	474 (68)
AFP*, ng/mL	51 (1~585000)
PT*, %	83 (13~132)
Albumin*, g/dL	3.6 (1.8~5.3)
ALT*, IU/L	38 (1~425)
Total bilirubin*, mg/dL	1.0 (0.2~49)
FU duration*, months	86 (1 ~232)

*median (range)

[도4]

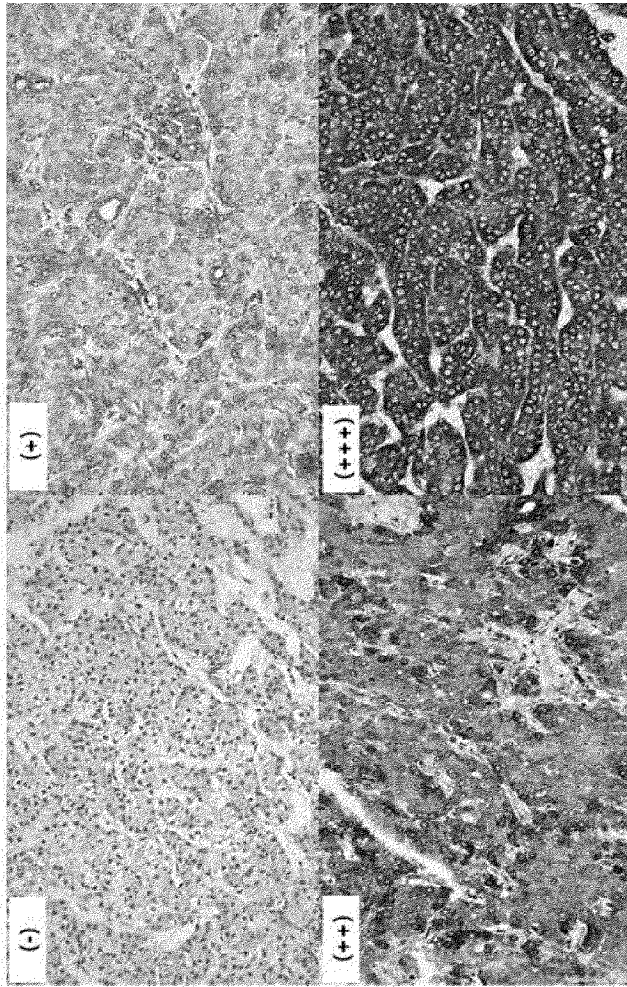
Tumor characteristics (N=698)

Variables	Values
Single nodular/multi-nodular tumor, n (%)	605/93 (87/13)
Size, cm*	4.0 (1~21)
Presence of MVI, n (%)	215 (31)
ES grade I/II/III/IV, n(%)	37/216/319/126 (5/31/46/18)

*median (range)

[도5]

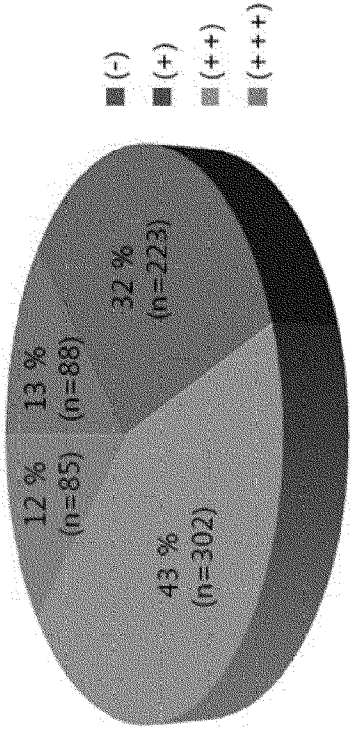
ARD1 immunohistochemical staining in HCC tissues



[도6]

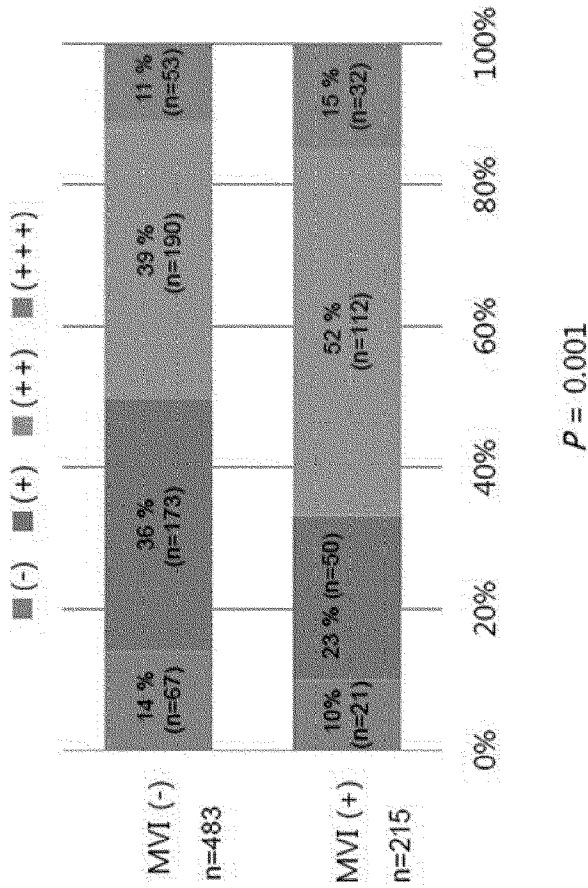
ARD1 expression

• Tumor



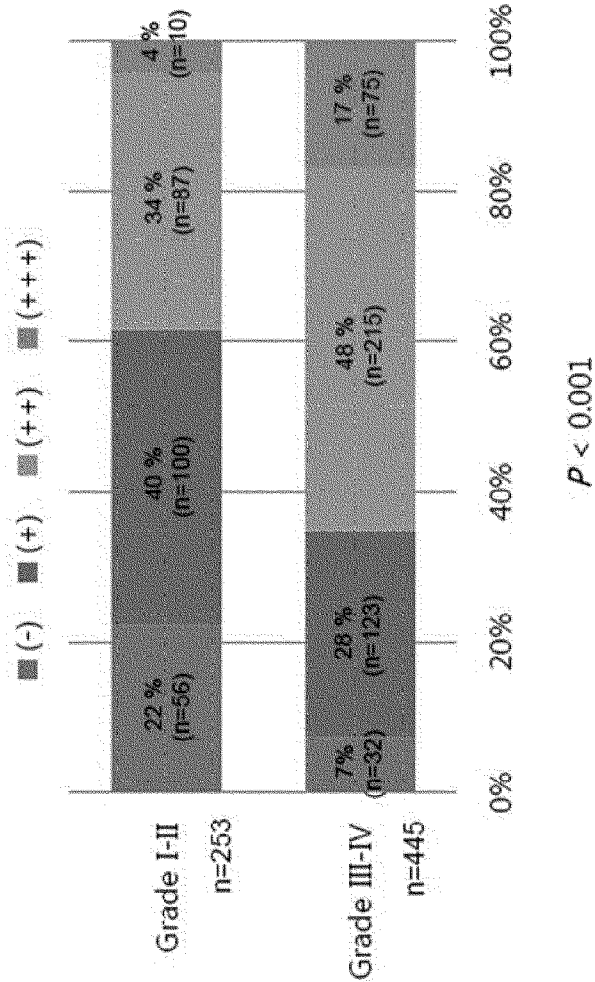
• Surrounding liver tissues
-ARD1 (+): 2 patients

[도7]
ARD1 & microvascular invasion

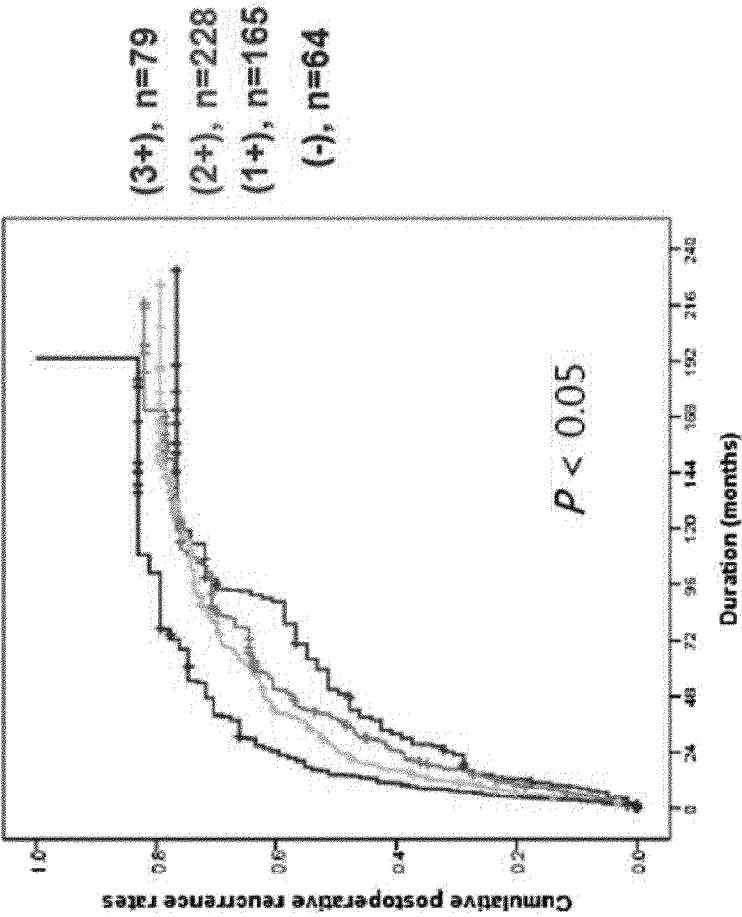


[도8]

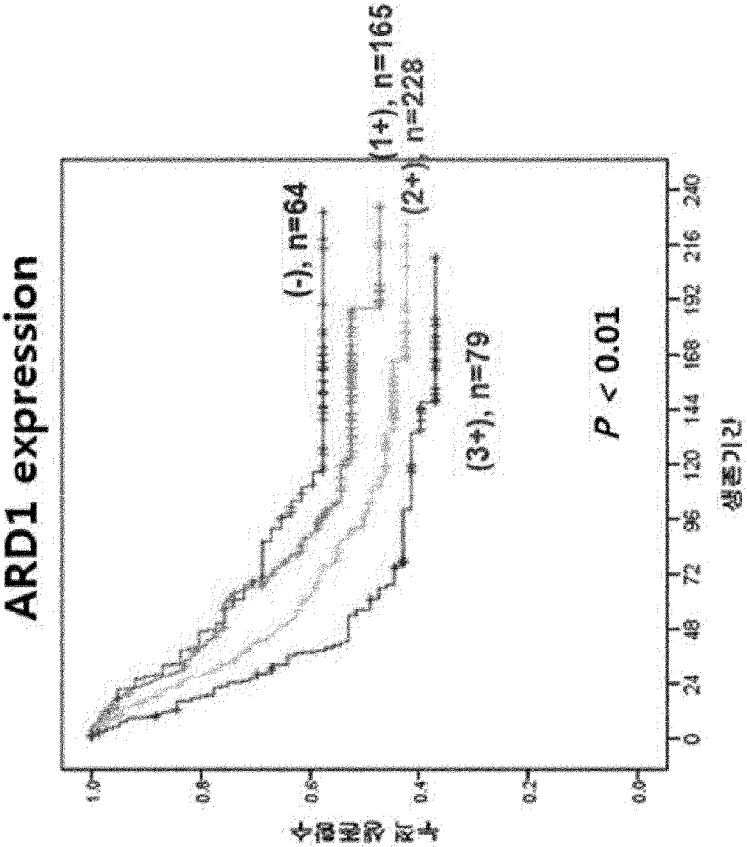
ARD1 & differentiation



[도9]



[도10]



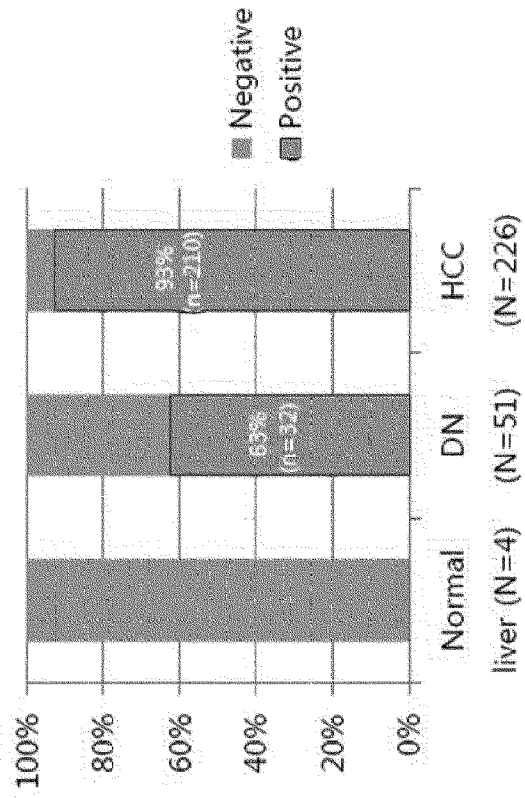
[도11]

Clinical characteristics

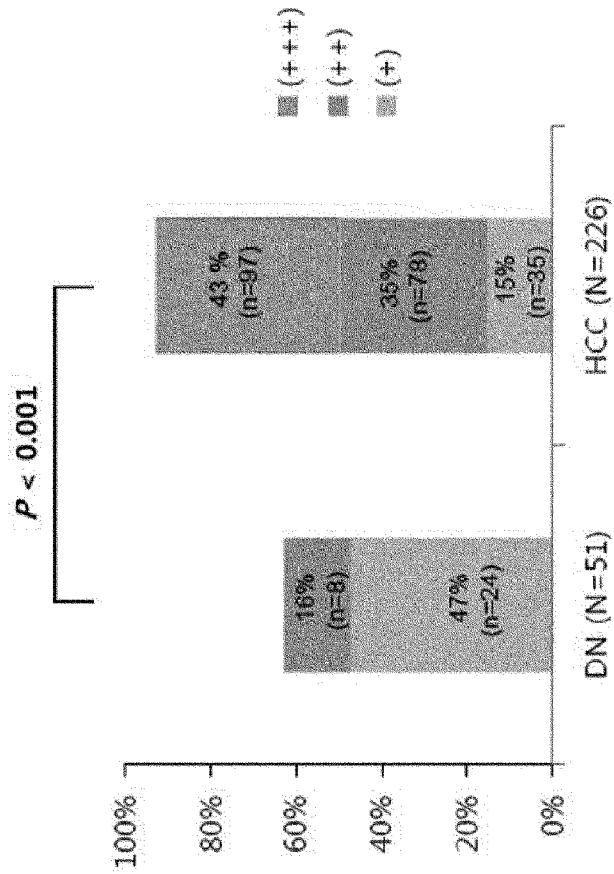
Variables	DN (n=51)		Normal liver (n=4)	HCC (n=226)	
	Low-grade (n=20)	High-grade (n=31)		ES I-II (n=148)	ES III-IV (n=78)
Age*, years	54 (41-71)		25 (19-31)	55 (26-80)	
Gender M/F, n (%)	40/11 (78/22)		2/2 (50/50)	171/55 (76/24)	
Etiology. HBV/HCV/NBNC, n (%)	51/0/0		-	163/21/41 (73/9/18)	
Presence of LC, n (%)	50 (98)		0	108 (48)	
PLT*, x10 ³ /μL	75 (22-235)		253 (202-343)	158 (50-410)	
PT*, %	68 (20-106)		95 (92-125)	93 (64-131)	
Albumin*, g/dL	3.3 (2.0-4.1)		4.4 (4.3-4.6)	3.9 (3.0-4.7)	
ALT*, IU/L	33 (8-100)		9 (8-11)	30 (10-367)	
Total bilirubin*, mg/dL	1.2 (0.3-34.5)		0.9 (0.4-1.5)	0.9 (0.3-2.9)	

*median (range)

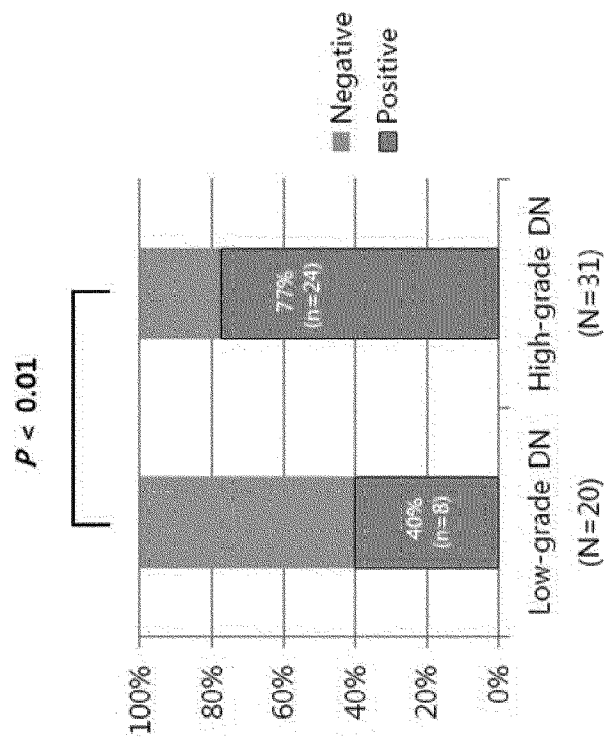
[도12]

ARD1 overexpression

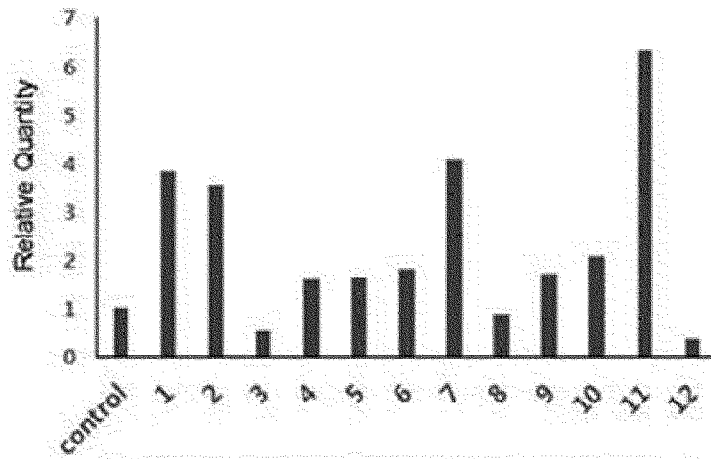
[도 13]

Degree of ARD1 expression between DN & HCC

[도 14]

ARD1 overexpression in patients with DN

[도15]



No_sample	etiology	clinical Dx	size_cm	RQ
1	HBV	HCC	12	3.84
2	alc	HCC	3	3.54
3	HBV	HCC	4.2	0.54
4	none	r/o CCC	4	1.61
5	HBV	HCC	2.4	1.63
6	HBV	HCC	8.5	1.80
7	HBV	LC환자		4.05
8	HBV	HCC	6.2	0.89
9	HCV	HCC	4.7	1.71
10	HBV	HCC	2.5	2.06
11	HBV	HCC	3.6	6.31
12	HBV	HCC	12	0.36
control		normal		1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/009899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(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)

C12Q 1/68; A61K 38/00; 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) & Keywords: ARD1, Arrest-defective 1 protein, liver cancer, prognostic diagnosis, kit

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUANG, G. -L. et al., "LOH Analysis of Genes around D4S2964 Identifies ARD1B as a Prognostic Predictor of Hepatocellular Carcinoma", World Journal of Gastroenterology, 28 April 2010, vol. 16, no. 16, pages 2046-2054 See pages 2052-2053; abstract.	1-11,13
X	MIDORIKAWA, Y. et al., "Identification of Genes Associated with Dedifferentiation of Hepatocellular Carcinoma with Expression Profiling Analysis", Jpn. J. Cancer Res., June 2002, vol. 93, pages 636-643 See pages 637-638; abstract.	1-11,13
X	SHIM, J. H. et al., "Clinical Implications of Arrest-defective Protein 1 Expression in Hepatocellular Carcinoma: a Novel Predictor of Microvascular Invasion", Digestive Diseases, December 2012, vol. 30, pages 603-608 See abstract.	1-11,13
X	YU, M. et al., "Immunohistochemical Analysis of Human Arrest-defective-1 Expressed in Cancers in Vivo", Oncology Reports, 2009, vol. 21, pages 909-915 See table 1; abstract.	1-11,13



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

12 JANUARY 2018 (12.01.2018)

Date of mailing of the international search report

15 JANUARY 2018 (15.01.2018)

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

International application No.

PCT/KR2017/009899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2004-0047674 A (KIM, Kyu Won) 05 June 2004 See claim 1.	1-11,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/009899

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.: **12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 12 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to 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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/009899

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2004-0047674 A	05/06/2004	AU 2003-284772 A1	18/06/2004
		KR 10-2004-0047675 A	05/06/2004
		WO 2004-047852 A1	10/06/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; A61K 38/00; 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: ARD1, Arrest-defective 1 protein, 간암, 예후진단, 키트

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	HUANG, G. -L. 등, 'LOH analysis of genes around D4S2964 identifies ARD1B as a prognostic predictor of hepatocellular carcinoma', World Journal of Gastroenterology, 2010.04.28, 16권, 16호, 페이지 2046-2054 페이지 2052-2053; 초록 참조.	1-11, 13
X	MIDORIKAWA, Y. 등, 'Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis', Jpn. J. Cancer Res., 2002.06, 93권, 페이지 636-643 페이지 637-638; 초록 참조.	1-11, 13
X	SHIM, J. H. 등, 'Clinical implications of arrest-defective protein 1 expression in hepatocellular carcinoma: a novel predictor of microvascular invasion', Digestive Diseases, 2012.12, 30권, 페이지 603-608 초록 참조.	1-11, 13
X	YU, M. 등, 'Immunohistochemical analysis of human arrest-defective-1 expressed in cancers in vivo', Oncology Reports, 2009, 21권, 페이지 909-915 표 1; 초록 참조.	1-11, 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 01월 12일 (12.01.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 01월 15일 (15.01.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



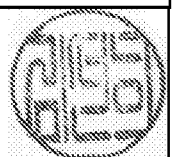
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2004-0047674 A (김규원) 2004.06.05 청구항 1 참조.	1-11, 13

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: 12
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 12는 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(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.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2004-0047674 A

2004/06/05

AU 2003-284772 A1

2004/06/18

KR 10-2004-0047675 A

2004/06/05

WO 2004-047852 A1

2004/06/10