

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2025년 1월 16일 (16.01.2025)



WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2025/014239 A1

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6886 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/009723

(22) 국제출원일:

2024년 7월 9일 (09.07.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0090455 2023년 7월 12일 (12.07.2023) KR

(71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 조효정 (CHO, Hyo Jung); 16493 경기도 수원시 팔달구 권광로 373, 102동 1605호, Gyeonggi-do (KR). 은정우 (EUN, Jung Woo); 16223 경기도 수원시 영통구 웰빙타운로 50, 8503동 902호, Gyeonggi-do (KR). 정재연 (CHEONG, Jae Youn); 16504 경기도 수원시 영통구 센트럴파크로 100, 6404동 104호, Gyeonggi-do (KR). 김순선 (KIM, Soon Sun); 16517 경기도 수원시 영통구 광교호수공원로 155, 1116동 403호, Gyeonggi-do (KR). 안혜리 (AHN, Hye Ri); 16501 경기도 수원시 영통구 중부대로271번길 27-9, 104동 311호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08505 서울특별시 금천구 가산디지털2로 101, 비동 1802호(가산동,한라원엔원타워), 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

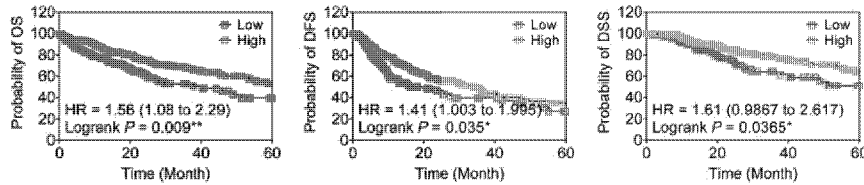
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: COMPOSITION FOR DIAGNOSING LIVER CANCER USING METHYLATION CHANGE OF SORT1 GENE PROMOTER AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: SORT1 유전자 프로모터의 메틸화 변화를 이용한 간암 진단용 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for diagnosing liver cancer using a methylation change of a SORT1 gene promoter and a use thereof, and the present invention has enabled: establishment of a systematic research method and technique for investigating growth and proliferation of liver cancer, apoptosis, metastasis inhibition, and a signaling pathway; confirmation of whether SORT1, which is a target gene, shows clinical significance, on the basis of a basic experiment; and prediction or diagnosis of liver cancer with high accuracy by measuring the methylation degree of the SORT1 gene, specifically cg16988986 in a promoter region of the SORT1 gene. Therefore, a methylation change of the SORT1 gene promoter is highly likely to be used as a target for diagnosing liver cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 SORT1 유전자 프로모터의 메틸화 변화를 이용한 간암 진단용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 간암의 성장과 증식, 세포 사멸과 전이 억제 관련 및 신호 전달 경로 규명에 대해 체계적인 연구 방법과 기술을 확립하고, 기초 실험을 기반으로 타겟 유전자인 SORT1이 임상적 유의성을 보이는지 확인하였으며, SORT1 유전자, 구체적으로는 SORT1 유전자 상의 프로모터 부위 내의 cg16988986의 메틸화 수준을 측정하여 간암을 높은 정확도로 예측 또는 진단할 수 있었다. 이에, SORT1 유전자 프로모터의 메틸화 변화는 간암 진단용 타겟으로 활용될 가능성이 매우 높다.

WO 2025/014239 A1

명세서

발명의 명칭: SORT1 유전자 프로모터의 메틸화 변화를 이용한 간암 진단용 조성물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 SORT1(Sortilin 1) 유전자 프로모터의 메틸화 변화를 이용한 간암 진단용 조성물 및 이의 용도에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 간암은 세계적으로 5번째로 가장 흔한 암이며, 국립암센터가 발표한 통계에 따르면 발생률이 6번째로 높으며 생존율은 37%로 극히 낮은 치명적인 질환이라고 할 수 있다.
- [3] 산업화와 현대화의 지속적인 발전으로 암 발병률은 지속적으로 증가하는 추세이며 특히, 간암은 주요 사망 원인 중 하나이고, 높은 발병률과 낮은 조기 진단율, 낮은 생존율이 특징이다. 간암 환자의 사망률이 높은 이유는 조기 진단을 위한 바이오마커가 없고 근치적 치료가 불가능할 정도로 간암이 진행된 상태에서 진단되는 경우가 많기 때문이다.
- [4] 최근에는 DNA 메틸화 측정을 통하여 암을 진단하는 방법들이 제시되고 있으며 특정 유전자의 과메틸화 및 저메틸화는, 그 유전자의 발현을 차단(gene silencing) 또는 활성화(gene activation) 하는 것으로 알려져 있다. 이는 생체 내에서 유전자의 기능이 소실되거나 활성화되는 주요 기전 중 하나로, 인체 암에서 다수의 종양 억제유전자(tumor suppressor genes)의 기능소실 및 발암유전자(oncogene)의 기능 활성화의 원인으로 해석할 수 있으며 암과 관련된 유전자의 메틸화를 분석하는 것은 암 연구에 큰 기여를 하고 있다.
- [5] 종양의 발생은 복잡한 분자학적 기전을 포함하고, 종양미세환경에서 여러 세포 유형과 상호작용을 함으로써 증식, 전이, 혈관 신생이 진행되며 이를 기초하여 종양의 조기 진단 및 치료를 위한 안전하고 효과적인 기술의 개발이 시급한 실정이다. 이에, 간암에서도 조기 진단 및 예후, 치료 반응 예측을 위한 간암 바이오마커 발굴이 절실한 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 SORT1 유전자 프로모터의 메틸화된 CpG 섬(CpG island) 영역을 포함하는 간암 진단 또는 간암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공하는데 있다.
- [7] 또한, 본 발명의 다른 목적은 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물 및 이를 포함하는 간암 진단용 키트를 제공하는데 있다.

- [8] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 전이 예후 예측용 조성물 및 이를 포함하는 간암 전이 예후 예측용 키트를 제공하는데 있다.
- [9] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는 간암 진단 또는 간암 전이 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SORT1 유전자 프로모터의 메틸화된 CpG 섬(CpG island) 영역을 포함하는 간암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 SORT1 유전자 프로모터의 메틸화된 CpG 섬(CpG island) 영역을 포함하는 간암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 간암 진단용 키트를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 간암 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 (1) 환자로부터 분리된 시료로부터 게놈 DNA를 획득하는 단계; (2) 상기 획득된 게놈 DNA에서 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (3) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (4) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준이 대조군 시료에 비해 감소된 경우, 간암으로 판단하는 단계를 포함하는 간암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 (1) 환자로부터 분리된 시료로부터 게놈 DNA를 획득하는 단계; (2) 상기 획득된 게놈 DNA에서 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (3) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (4) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준이 대조군 시료에 비해 감소된 경우, 간암 전이 가능성이 높은 것으로 예측 판단하는 단계를 포함하는 간암 전이 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [18] 본 발명은 SORT1 유전자 프로모터의 메틸화 변화를 이용한 간암 진단용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 간암의 성장과 증식, 세포 사멸과 전이 억제 관련 및 신호 전달 경로 규명에 대해 체계적인 연구 방법과 기술을 확립하고, 기초 실험을 기반으로 타겟 유전자인 SORT1이 임상적 유의성을 보이는지 확인하

였으며, SORT1 유전자, 구체적으로는 SORT1 유전자 상의 프로모터 부위 내의 cg16988986의 메틸화 수준을 측정하여 간암을 높은 정확도로 예측 또는 진단할 수 있었다. 이에, SORT1 유전자 프로모터의 메틸화 변화는 간암 진단용 타겟으로 활용될 가능성이 매우 높다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 TCGA_LIHC 데이터 세트에서 SORT1의 발현과 copy number와의 연관성을 나타낸다.
- [20] 도 2는 TCGA_LIHC 데이터 세트에서 SORT1 활성화와 메틸화 간의 상관관계 분석 결과를 나타낸다.
- [21] 도 3은 SORT1의 활성화를 조절하는 특정 probe region 확인 결과를 나타낸다.
- [22] 도 4는 선별된 네 개의 probe region의 beta-value 분석 결과를 나타낸다.
- [23] 도 5는 cg16988986 메틸화 수준에 따른 전체 생존, 무병 생존 및 질병 특이적 생존 곡선 결과를 나타낸다.
- [24] 도 6은 qMSP 분석을 통한 간암 환자 조직에서의 메틸화 수준 측정 결과를 나타낸다.
- [25] 도 7은 SORT1의 메틸화수준을 이용한 간암 진단력 평가 결과를 나타낸다.
- [26] 도 8은 SORT1의 메틸화수준과 간암 임상적 연관성 확인 결과를 나타낸다.
- [27] 도 9는 qRT-PCR과 qMSP 데이터에서의 SORT1의 발현과 메틸화 수준의 상관관계 확인 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 본 발명은 SORT1 유전자 프로모터의 메틸화된 CpG 섬(CpG island) 영역을 포함하는 간암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [29] 또한, 본 발명은 SORT1 유전자 프로모터의 메틸화된 CpG 섬(CpG island) 영역을 포함하는 간암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [30]
- [31] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.
- [32]
- [33] 본 명세서에서 용어 "예후 예측"이란, 병리 상태의 진행 상황 및 치료 과정의 데이터를 취합하여, 병리 상태의 치료 결과를 예측하는 과정을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 예후 예측은 간암 치료 후 전이 가능성을 판단하거나, 이로 인한 사망 가능성을 판단하는 것으로 해석될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [34]

- [35] 본 발명에서 용어, "메틸화"는 특정 유전자의 프로모터 부위의 CpG 섬(CpG island)의 사이토신에서 일어나고, 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 차단되는 것으로서, 본 발명의 목적상, 메틸화 여부는 SORT1 유전자 프로모터 부위의 CpG 섬에서의 메틸화를 의미한다.
- [36]
- [37] 본 발명에서 용어, "CpG 섬(CpG island)"은 CpG가 예외적으로 높은 빈도로 모여 있는 게놈 영역을 의미하며, C+G 함유량이 50% 이상이고, CpG 비율이 3.75% 이상인 0.2~3kb 길이의 부위를 말한다. 상기 CpG에서, C는 사이토신을, G는 구아닌을 나타내며 p는 사이토신과 구아닌과의 사이에 있는 포스포디에스테르 결합을 의미한다. 인간 게놈에는 약 45,000개의 CpG 섬이 있으며, 이들 대부분이 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 부위에서 발견된다. 실제로, 상기 CpG 섬은 인간 유전자의 약 50%에 달하는 하우스키핑(housekeeping) 유전자의 프로모터에서 발견된다(Cross, S. and Bird, A., Curr. Opin. Gene Develop., 5:309, 1995). 정상인의 체세포에서, 상기 하우스키핑 유전자 프로모터 부위의 CpG 섬은 비메틸화되어 있으며, 임프린티드(imprinted) 유전자 및 비활성화 상태의 X 염색체 상의 유전자와 같이 발달과정 동안 발현되지 않는 유전자들은 메틸화되어 있다.
- [38] 포유동물 세포의 게놈 DNA에서는 A, C, G 및 T에 더하여, 사이토신 링(5-mC)의 다섯번째 탄소에 메틸 그룹이 부착된 5-메틸시토신(5-methylcytosine)이라는 5번째 염기가 존재한다. 5-mC는 CpG라고 불리는, CG 디뉴클레오타이드(5'-mCG-3')의 C에만 부착된다. CpG의 C는 메틸 그룹의 접촉에 의하여 대부분 메틸화된다. CpG의 메틸화는 트랜스포존과 게놈의 반복서열이 발현되는 것을 억제한다. 또한, 상기 CpG는 포유동물 세포에서 대부분의 후생유전학적 변화가 자주 일어나는 부위이다. 상기 CpG의 5-mC가 자연적으로 탈아미노화하여 티민(T)이 되기 쉽기 때문이다.
- [39]
- [40] 또한, 본 발명은 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물을 제공한다.
- [41] 또한, 본 발명은 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 전이 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [42] 바람직하게는, 상기 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 SORT1 유전자의 메틸화된 CpG 섬 영역 내의 단편을 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 상기 SORT1 유전자의 메틸화된 CpG 섬 영역과 혼성화할 수 있는 프로브, 상기 SORT1 유전자의 메틸화된 CpG 섬 영역과 결합할 수 있는 메틸화 특이적 결합 단백질, 상기 SORT1 유전자의 메틸화 특이적 결합 항체 또는 압타머; 및 메틸화 민감성 제한효소로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [43] 바람직하게는, 상기 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역은 cg16988986일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [44]
- [45] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [46] 본 발명의 프라이머는 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 CpG 섬의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍일 수 있다.
- [47] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [48] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 PMVK에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [49] 본 명세서에서 용어 "애포타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 애포타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오타이드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [50] 본 명세서에서 용어 "메틸화 민감성 제한효소"는 CpG 섬의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효

소일 수 있다. 예를 들면, SmaI, SacII, EagI, HpaII, MspI, BssHII, BstUI, NotI 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 상기 제한효소 인식부위의 C에서의 메틸화 또는 비메틸화에 따라 제한효소에 의한 절단 여부가 달라지고 이를 PCR 또는 서던블롯(Southern Blot) 분석을 통해 검출할 수 있게 된다. 상기 제한효소 이외의 다른 메틸화 민감성 제한효소는 당업계에 잘 알려져 있다.

[51]

[52] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 간암 진단용 키트를 제공한다.

[53] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 간암 전이 예후 예측용을 제공한다.

[54] 본 발명에서 상기 키트는 RT-PCR 키트, 마이크로어레이 칩 키트, DNA 키트, 및 단백질 칩 키트로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[55]

[56] 또한, 본 발명은 (1) 환자로부터 분리된 시료로부터 게놈 DNA를 획득하는 단계; (2) 상기 획득된 게놈 DNA에서 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (3) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (4) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준이 대조군 시료에 비해 감소된 경우, 간암으로 판단하는 단계를 포함하는 간암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[57]

또한, 본 발명은 (1) 환자로부터 분리된 시료로부터 게놈 DNA를 획득하는 단계; (2) 상기 획득된 게놈 DNA에서 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (3) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (4) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준이 대조군 시료에 비해 감소된 경우, 간암 전이 가능성이 높은 것으로 예측 판단하는 단계를 포함하는 간암 전이 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[58]

바람직하게는, 상기 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준 측정은 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 메틸화 DNA 특이적 결합 항체 또는 압타머를 이용한 ChIP 분석, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이셀파이트 시퀀싱으로 이루어진 군에서 선택된 방법에 의해 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[59]

바람직하게는, 상기 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역은 cg16988986일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[60]

바람직하게는, 상기 (4) 단계는 컷오프(cut-off) 값에 의하여 수행되는 것으로, 상기 컷오프(cut-off) 값은 상기 SORT1 유전자 프로모터의 상대적 메틸화 수준이 log10 치환시 0.0885일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[61] 바람직하게는, 상기 분리된 시료는 분리된 세포, 조직, 혈액, 타액 또는 뇨일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[62] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[63]

[64] <실험예>

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

[66]

[67] 1. 간암 시료 준비

[68] 메틸화 분석에 사용된 간암 조직 시료는 총 116개로 간절제술을 시행한 환자 58명의 비간암 주변조직 (Non-tumor, NT)와 간암조직 (Tumor, T)을 사용하였다.

[69]

[70] 2. 공개 오믹스 데이터 분석

[71] 메틸화, 발현 및 생존 분석을 검증하기 위해 TCGA LIHC 데이터를 사용하였다.

[72]

[73] 3. 조직 샘플에서 DNA 추출

[74] 조직의 genomic DNA는 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, #69504)를 이용하여 상기 kit의 매뉴얼에 따라 실험을 진행하였다.

[75] 대략 8mm³ 크기의 조직을 액체질소로 얼린 후 멸균된 막자사발로 갈아준 다음, Buffer ATL 180ul와 proteinase K 20ul를 넣고 vortex 해준 후, 56°C의 교반 배양기 (shaking incubator)에서 12시간 이상 반응시켰다.

[76] 앞의 반응액을 짧게 vortex 한 후, Buffer AL 200ul와 EtOH 200ul를 넣고 vortex로 잘 혼합시켰다. DNA spin column과 collection tube를 준비하여 반응액 전량을 column에 옮겨준 후 상온에서 12,000rpm, 1분간 원심분리한 다음, column만 새로운 collection tube에 끼워주었다.

[77] column에 washing buffer 500ul를 넣어주고 상온에서 12,000rpm, 1분간 원심분리 및 collection tube 교체 후 반복작업 후 14,000rpm, 3분간 원심분리를 진행하여 column의 membrane을 건조시켰다.

[78] column에 흡착된 DNA를 elution buffer를 이용하여 분리하고, 분리된 genomic DNA의 양 및 순도는 NanoPhotometer (Implen)을 이용해 측정하였다.

[79]

[80] 4. DNA의 바이설파이트 변형 (Bisulfite modification)

- [81] EZ DNA Methylation-Gold™ kit (Zymo research, D5005)를 사용하여 1ug의 genomic DNA에 대하여 바이설파이트를 처리하였다.
- [82] 1ug DNA와 DW를 합하여 20ul에 맞추고 CT conversion reagent를 130ul 넣어서 총 150ul로 DNA 바이설파이트 변형을 진행하였다.
- [83] 위의 샘플을 98°C 10분, 64°C 2시간 30분, 4°C 보관 순서로 처리한 후, Zymo-Spin IC column에 샘플과 binding buffer 600ul를 함께 넣어준 다음 12,000 g, 30초간 원심분리하여 column에 DNA가 흡착되도록 하였다.
- [84] M-wash buffer로 column을 한차례 wash한 다음, M-desulphonation buffer 200ul를 넣고 상온에서 20분이내로 놔둔 후 다시 12,000 g, 30초간 원심분리하였다.
- [85] M-wash buffer로 2차례 wash한 후 M-elution buffer를 이용하여 바이설파이트로 전환된 genomic DNA를 column에서 분리하였다.

[86]

[87] 5. Quantitative methylation -specific polymerase chain reaction (qMSP)

[88] 유전자의 메틸화 분석에서 도출된 프로브의 정보는 다음과 같다.

[89] [표1]

후보 ID	프로브 위치	염기서열	사이즈
cg16988986	chr1:109,398,437-109,398,556	CCCGCTCACTGGAGCGCCCATTTGCT TGCTAAGCAGCTGCCTTGCTGCAAG AAGGTGAATG[CG]AACTGATGTGGG CCACATCCTACGGAGACAGACATCA GGACATCCGTGACTCCTGCAAGC	122 bp

[90] UCSC genome browser (<https://genome.ucsc.edu/index.html>)에서 타겟 프로브의 위치를 확인하고 타겟 프로브 및 CpG islands를 포함하는 chr1:109,397,301-109,399,000 (1700bp) 의 서열에 대해서 MethPrimer (<https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)을 이용하여 qMSP를 위한 프라이머를 디자인하였다.

[91] AmfiSure qGreen Q-PCR Master Mix (GenDEPOT)를 사용하여 실시간 모니터링 하였다. 프라이머 시퀀스는 다음과 같다.

[92]

[93] [표2]

	Forward sequence	Reverse sequence
<i>SORT1</i> <i>_Methyl</i>	5'-GTTTTGTTGTAA GAAGGTGAATGC-3'	5'-AAAAAAATAAAA AAAACCAAACGTA-3'
<i>SORT1</i> <i>_Unmethyl</i>	5'-GTTTTGTTGTAAAG AAGGTGAATGTG-3'	5'-AAAAAAATAAAA AAAACCAAACATA-3'

[94] 2X qPCR master mix (Gendepot, Q5602)와 10uM primer, 바이설파이트-변형된 DNA를 포함한 반응 혼합물 총 10ul를 아래의 조건으로 qMSP를 진행하였다.

[95] A. Stage 1 : 95°C, 2분

[96] B. Stage 2 : 95°C, 15초

[97] C. : 58°C, 34초

[98] D. : 72°C, 30초

[99] E. Stage 2를 40 cycle 반복

[100]

[101] **6. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT - PCR)**

[102] 5X PrimeScript™RT Master Mix (Takara)를 사용하여 총 부피 10 µl에서 RNA 500 ng으로 cDNA를 합성하였고, AmfiSure qGreen Q-PCR Master Mix (GenDEPOT)를 사용하여 95°C에서 2분 후에 95°C에서 15초, 60°C에서 34초, 72°C에서 30초를 40 cycles로 하였고, 이어서 dissociation stage에서는 95°C에서 10초, 65°C에서 5초, 95°C에서 5초 진행하였다. 실시간 모니터링은 CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)을 통해 확인하였다. SORT1의 프라이머 NM number는 NM_001205228.1이며 product 사이즈는 198 bp이고, 시퀀스는 다음과 같다.

[103] Forward: 5'-AGTTTCAGTGACCCACGTCAG-3'

[104] Reverse: 5'-AGTAGGTCAGGTAACAAAGTCCAGT-3'

[105]

[106] **<실시예>**

[107] 간암에서 비특이적으로 과발현이 되어있는 SORT1이 어떠한 조절 메커니즘에 의해 발현이 활성화가 되는지 확인하기 위해, 첫 번째로 유전자 복제 수 변이에 변화가 있는지 TCGA_LIHC 데이터세트를 통해 분석하고자 하였다. 유전자 복제 수 변이는 인간 유전체에 존재하는 유전적 구조 변이 중 하나로 유전자의 발현과 밀접한 관련이 있으며 유전자의 최종 활성화도, 유전자 산물인 전사체, 즉 단백질 발현의 증가와 감소에 영향을 미친다. 따라서, 염색체의 일부가 유전자 재조합 과정에서 손실이 생겨 일어나는 돌연변이 deletion, 두배수체 집합인 diploid, 정상 배수체에서 비이상적으로 복제된 gain, 유전자 사본 수가 증가한 amplification 이 SORT1에서는 어느 정도의 비율로 일어났는지 확인하였고, SORT1의 발현과 copy number의 상관관계에서 연관성이 없는 것을 확인하였다(도 1).

[108] 다음으로, 후성유전학의 핵심 프로세스로 알려져 있는 메틸화에 의해 SORT1의 발현이 조절이 되는지 확인하기 위해, 메틸화 비율 측정 지표로 알려진 beta-value를 분석하고자 하였고, beta-value가 0과 1의 수치에서 1에 밀집될수록 메틸화 강도가 높은 것이며 TCGA_LIHC 데이터세트에서 간암환자 371명에 대한 SORT1의 발현과 beta-value의 상관관계를 분석하였을 때, SORT1의 발현이 높을수록 beta-value의 수치는 0에 가까운 것으로 나타났으며 강한 음의 상관관계가 있음을 확인하였다(도 2, Pearson r=-0.626).

- [109] 추가적으로, 동일한 간암 환자 50명의 간암 및 비간암조직에서 beta-value를 확인하였을 때, 비간암조직에 비해 간암조직에서 beta-value의 수치가 0에 밀집되어 있는 것으로 SORT1의 메틸화가 상대적으로 낮은 것을 확인하였다(도 2).
- [110] SORT1의 발현 활성화가 메틸화와 밀접한 관련이 있다는 선행 분석을 기반으로, SORT1 5' 프로모터 영역의 CpG island에서 간암환자에서 유의한 차이가 있는지 확인하기 위해, 각각의 SORT1의 CpG probe region의 메틸화와 SORT1 발현 사이의 상관관계를 MEXPRESS를 이용하여 분석하였고, SORT1의 프로모터의 CpG 부위에 존재하는 총 4개의 probe region이 비간암과 간암샘플의 메틸화 사이에 유의한 상관관계를 보이는 것을 확인하였다(도 3).
- [111] TCGA_LIHC 데이터세트를 이용하여 선별된 네 개의 probe region 중에서 50명의 간암 환자의 비종양 그룹과 종양 그룹에서의 beta-value를 분석하였을 때, cg16988986만이 유의하게 비종양 그룹에 비해 종양 그룹에서 beta-value 수치가 떨어지는 저메틸화 현상을 확인하였다(도 4).
- [112] 특정 probe region인 cg16988986의 메틸화 정도와 환자의 예후와의 연관성을 확인하기 위해 TCGA데이터를 이용하여 전체생존기간 (OS, Overall Survival)과 무병생존기간 (DFS, Disease Free Survival), 질병특이생존기간(DSS, Disease Specific Survival)을 분석하였고, cg16988986의 메틸화 수준이 낮을수록 예후가 좋지 않은 것을 확인하였다(도 5).
- [113] 아주대학교 병원에서 간절제술을 받은 간암환자로부터 확보한 조직에서 qMSP 이용하여 SORT1 프로모터의 CpG cg16988986의 메틸화 수준을 분석하고자 하였다. 테스트 코호트 (n = 20) 및 검증 코호트 (n = 38)에서 유의하게 저메틸화가 관찰된 환자는 각각 65% 및 57.9%로 (도 6), 종양 조직이 비종양 조직과 비교하여 메틸화의 비율이 높게 평가되었으며, 총 58개의 조직쌍으로 메틸화 수준을 분석하였을 때, 비종양 그룹에 비해 종양 그룹에서 메틸화의 비율이 떨어져 있는 것을 확인하였다. 구체적으로는 qMSP의 메틸화수준을 log10으로 전환하여 나타내었을 때 비종양조직의 평균값은 0.1874이고, 간암조직의 평균값은 -0.1729로 나타났다.
- [114] 또한 SORT1의 메틸화 수준으로 간암 진단력을 평가 시, SORT1의 상대적 메틸화수준이 log10 치환시 0.0885일 때 AUC 값 0.80 (95% CI=0.716 to 0.86)으로 높은 정확도를 보였다(도 7).
- [115] SORT1의 메틸화와 임상적 연관성을 평가하기 위해 여러 임상변수와 비교 분석하였다. 간암의 전이에서 전이가 있는 경우 메틸화수준이 더 낮았으며, mUICC 병기가 진행될수록 메틸화수준이 감소하는 것으로 나타나고, 분화도 정도를 나타내는 Edmondson grad에서도 상대적으로 분화 정도가 불량한 G3/G4에서 메틸화 수준이 낮은 것으로 나타났다(도 8). 종합적으로 SORT1의 메틸화의 수준이 낮을수록 임상적으로 좋지 않은 결과를 보였다.

[116] 마지막으로, SORT1의 발현과 메틸화 수준을 아주대병원 코호트로 재분석한 결과, 발현이 높을수록 메틸화가 낮게 일어나는 것을 확인하였고, 이는 처음 TCGA 데이터 분석과 일치하는 것을 확인하였다(도 9).

[117]

[118] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 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.

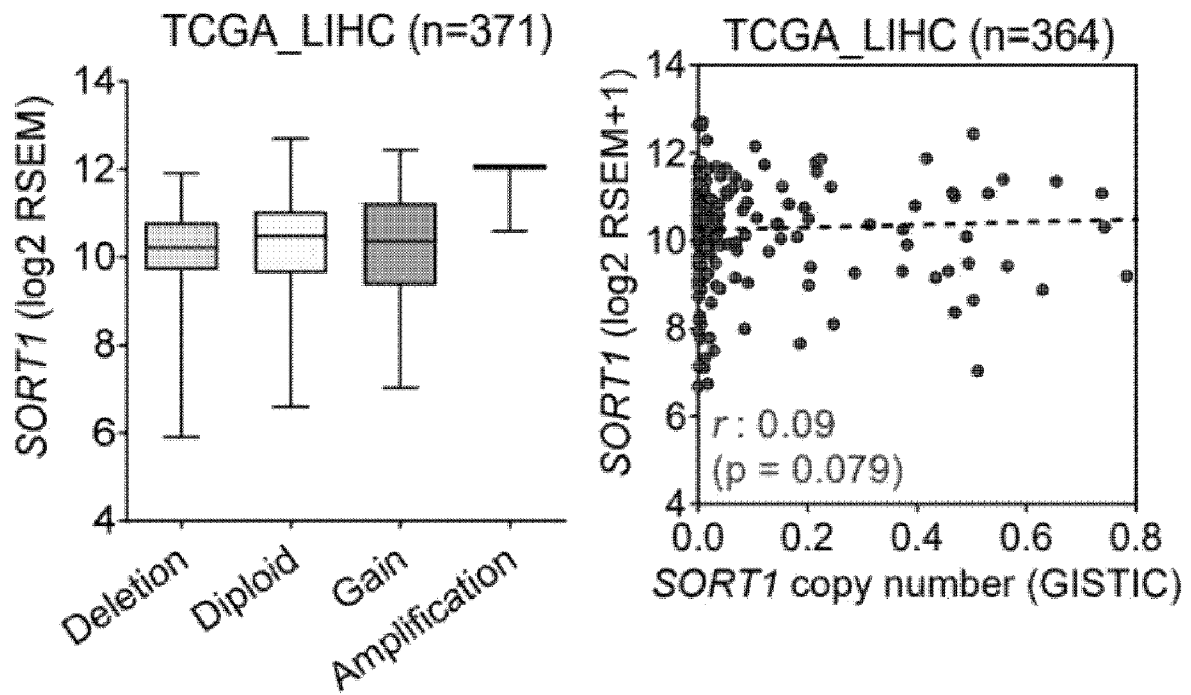
청구범위

- [청구항 1] SORT1 유전자 프로모터의 메틸화된 CpG 섬(CpG island) 영역을 포함하는 간암 진단용 바이오마커 조성물.
- [청구항 2] SORT1 유전자 프로모터의 메틸화된 CpG 섬(CpG island) 영역을 포함하는 간암 전이 예후 예측용 바이오마커 조성물.
- [청구항 3] SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 SORT1 유전자의 메틸화된 CpG 섬 영역 내의 단편을 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 상기 SORT1 유전자의 메틸화된 CpG 섬 영역과 혼성화할 수 있는 프로브, 상기 SORT1 유전자의 메틸화된 CpG 섬 영역과 결합할 수 있는 메틸화 특이적 결합 단백질, 상기 SORT1 유전자의 메틸화 특이적 결합 항체 또는 압타머; 및 메틸화 민감성 제한효소로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 간암 진단용 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역은 cg16988986인 것을 특징으로 하는 간암 진단용 조성물.
- [청구항 6] 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 간암 진단용 키트.
- [청구항 7] SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 간암 전이 예후 예측용 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 SORT1 유전자의 메틸화된 CpG 섬 영역 내의 단편을 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 상기 SORT1 유전자의 메틸화된 CpG 섬 영역과 혼성화할 수 있는 프로브, 상기 SORT1 유전자의 메틸화된 CpG 섬 영역과 결합할 수 있는 메틸화 특이적 결합 단백질, 상기 SORT1 유전자의 메틸화 특이적 결합 항체 또는 압타머; 및 메틸화 민감성 제한효소로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 간암 전이 예후 예측용 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역은 cg16988986인 것을 특징으로 하는 간암 전이 예후 예측용 조성물.
- [청구항 10] 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 간암 전이 예후 예측용 키트.
- [청구항 11] (1) 환자로부터 분리된 시료로부터 게놈 DNA를 획득하는 단계;
(2) 상기 획득된 게놈 DNA에서 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정하는 단계;
(3) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및

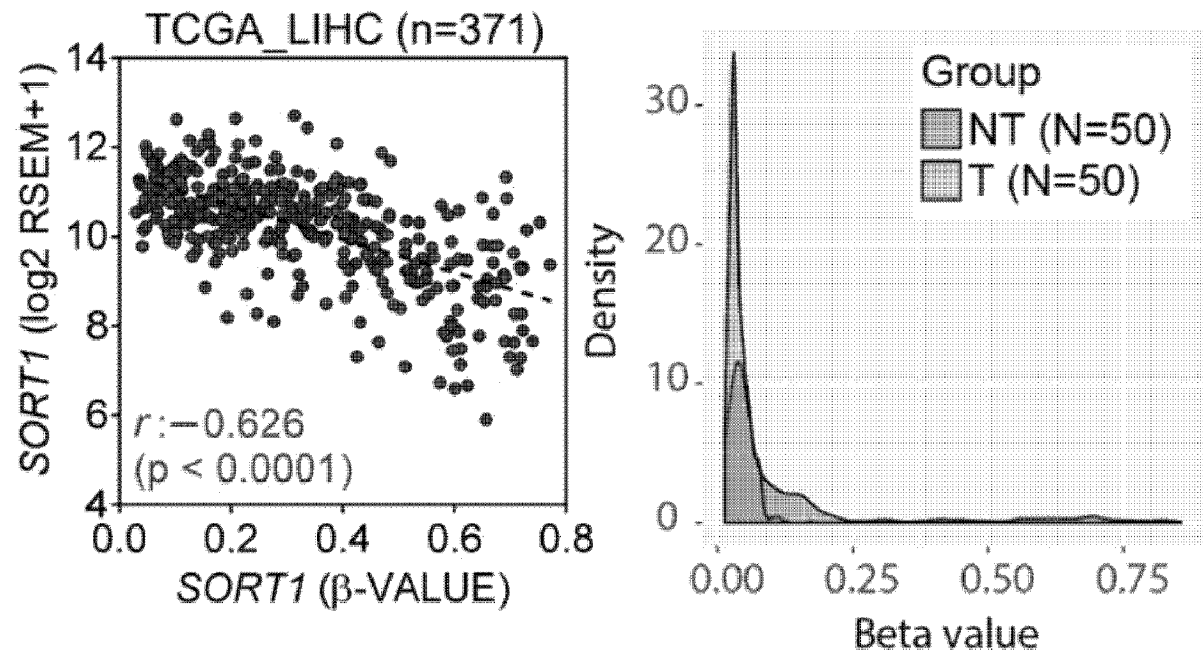
(4) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준이 대조군 시료에 비해 감소된 경우, 간암으로 판단하는 단계를 포함하는 간암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

- [청구항 12] (1) 환자로부터 분리된 시료로부터 게놈 DNA를 획득하는 단계;
 (2) 상기 획득된 게놈 DNA에서 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 측정하는 단계;
 (3) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및
 (4) 상기 측정된 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준이 대조군 시료에 비해 감소된 경우, 간암 전이 가능성이 높은 것으로 예측 판단하는 단계를 포함하는 간암 전이 여부 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 13] 제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역의 메틸화 수준 측정은 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 메틸화 DNA 특이적 결합 항체 또는 애타머를 이용한 ChIP 분석, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이셀파이트 시퀀싱으로 이루어진 군에서 선택된 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 SORT1 유전자 프로모터의 CpG 섬 영역은 cg16988986인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 (4) 단계는 컷오프(cut-off) 값에 의하여 수행되는 것으로, 상기 컷오프(cut-off) 값은 상기 SORT1 유전자 프로모터의 상대적 메틸화 수준이 $\log_{10}$ 치환시 0.0885인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 분리된 시료는 분리된 세포, 조직, 혈액, 타액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

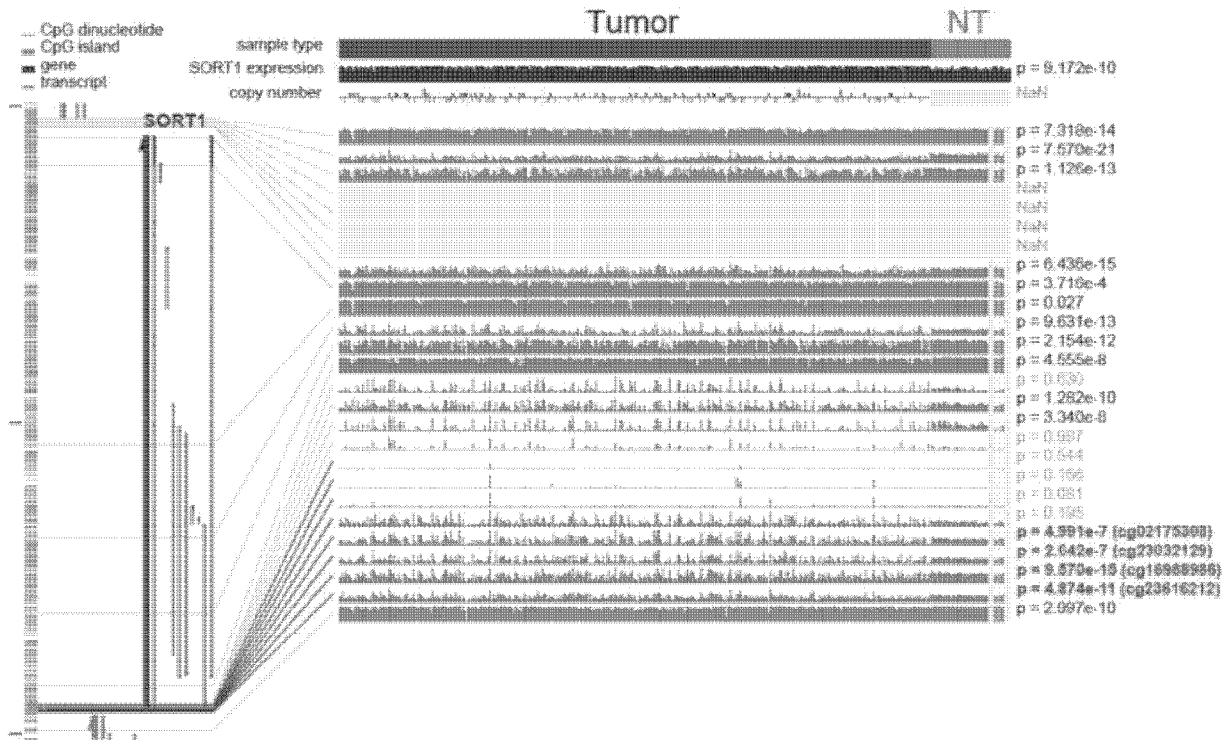
[도1]



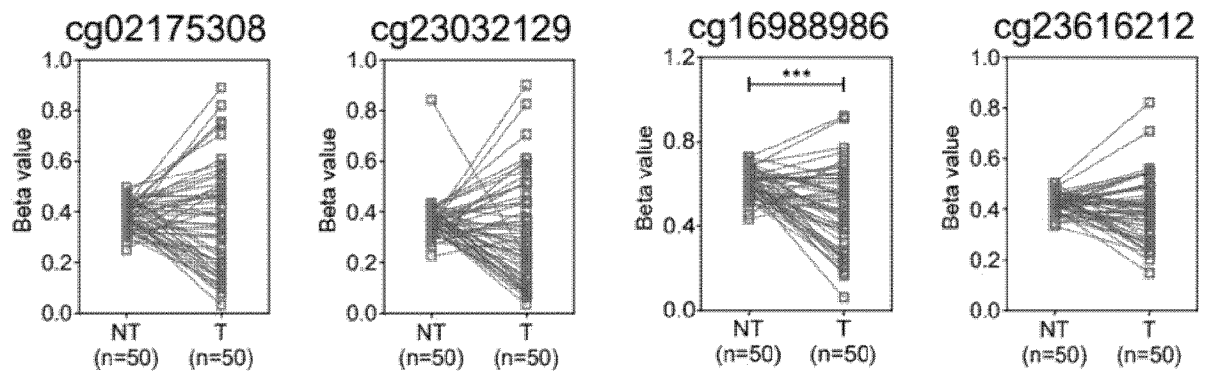
[도2]



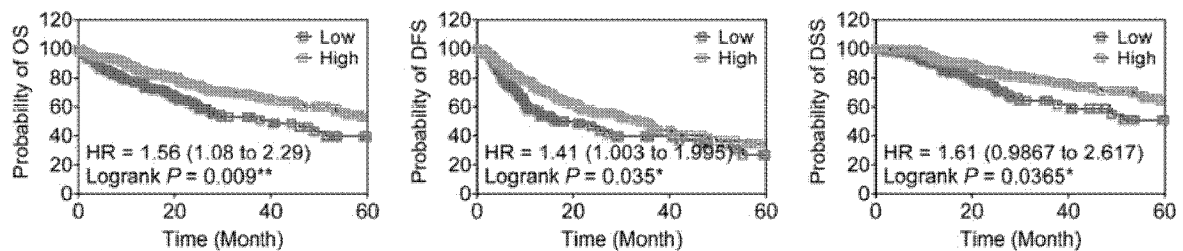
[도3]



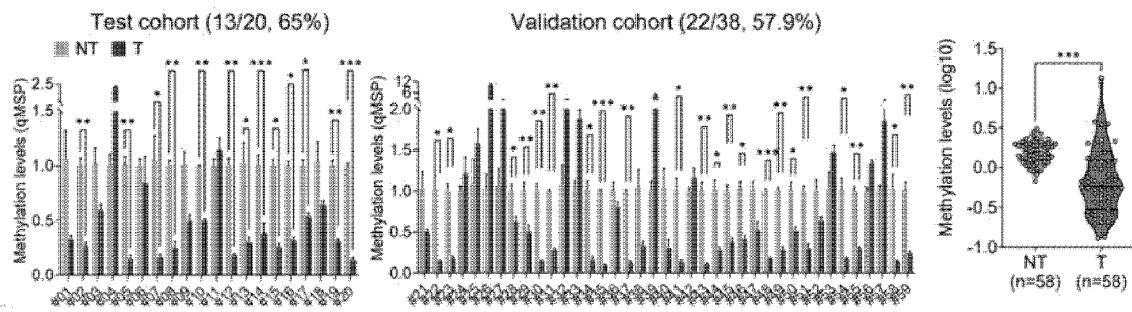
[54]



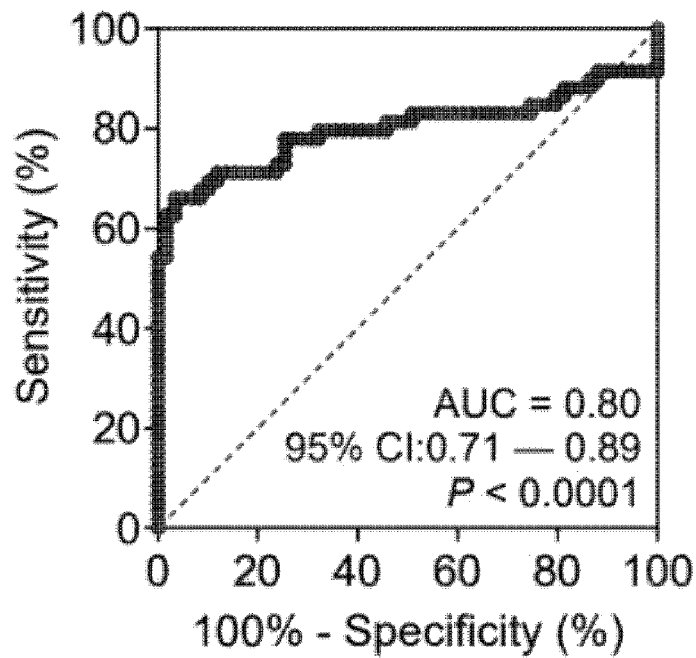
[도5]



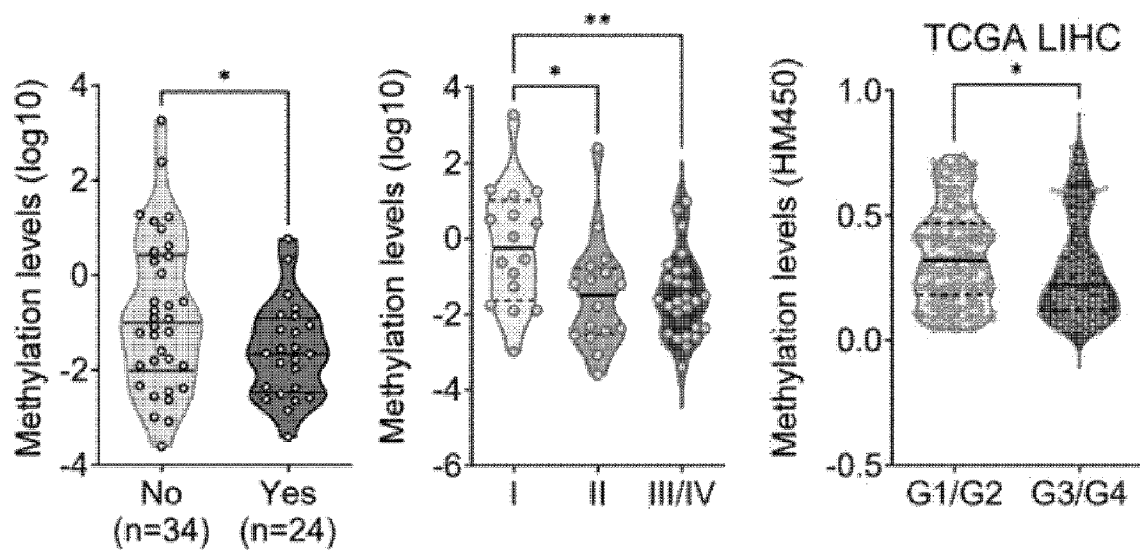
[도6]



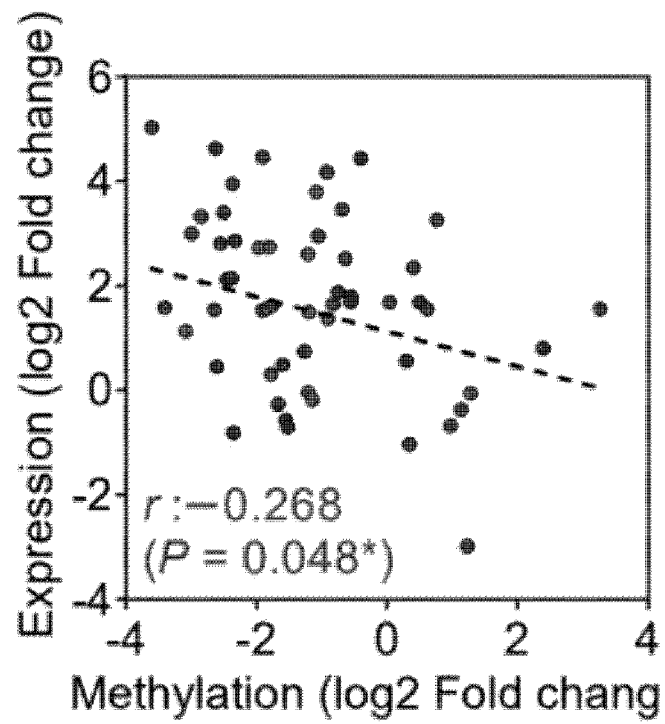
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009723

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(2018.01) 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: SORT1 (sortilin 1), 간암 (liver cancer), 간세포암 (hepatocellular carcinoma), 프로모터 (promoter), CpG 섬 (CpG island), 메틸화 (methylation)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AHN, H. R. et al. SORT1 with oncogenic potential associated hypomethylation and promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma. In: The Liver Week 2023. May 2023, p. 689, Poster PE-15. See Methods, Results and Conclusions. (This document is a document 'declaring exceptions to lack of novelty' in an earlier application that serves as a basis for claiming priority of the present international application.)	1-16
X	AHN, H. R. et al. SORT1 with oncogenic potential associated hypomethylation and promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma. In: 34th EORTC-NCI-AACR Symposium. October 2022, p. S94, Poster 258. See Materials and methods, Results and Conclusions. (This document is a document 'declaring exceptions to lack of novelty' in an earlier application that serves as a basis for claiming priority of the present international application.)	1-16
☒ 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 04 November 2024		Date of mailing of the international search report 04 November 2024
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/KR2024/009723

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AHN, H. R. et al. Hypomethylation-mediated upregulation of the SORT1 promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma. In: KSBMB International conference 2023. May 2023, Poster D-44. See abstract. (This document is a document 'declaring exceptions to lack of novelty' in an earlier application that serves as a basis for claiming priority of the present international application.)	1-4,6-8,10-13,15,16
X	LIN, X.-H. et al. Six immune-related promising biomarkers may promote hepatocellular carcinoma prognosis: a bioinformatics analysis and experimental validation. Cancer Cell International. 23 March 2023, vol. 23, no. 5, inner pp. 1-20. See inner pages 8 and 18; and figure 6.	1-4,6-8,10-13,15,16
A	LIN, M. et al. Prognostic potential and mechanism of SORT1 and its co-expressed genes in hepatocellular carcinoma based on integrative analysis of multiple database. Precision Medical Sciences. 2022, vol. 11, pp. 161-173. See abstract.	1-16
A	GAO, Y. et al. Sortilin 1 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration by regulating immune cell infiltration. Journal of Oncology. 2022, vol. 2022, article no. 6509028, inner pp. 1-13. See abstract.	1-16

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6886(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6886(2018.01) 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: SORT1 (sortilin 1), 간암 (liver cancer), 간세포암 (hepatocellular carcinoma), 프로모터 (promoter), CpG 섬 (CpG island), 메틸화 (methylation)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	AHN, H. R. 등, "SORT1 with oncogenic potential associated hypomethylation and promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma", In: The Liver Week 2023, 2023년 05월, 페이지 689, Poster PE-15 Methods, Results, Conclusions (위 문헌은 본 국제출원의 우선권주장의 기초가 되는 선출원에서 '공지예외주장'된 문헌임.)	1-16
X	AHN, H. R. 등, "SORT1 with oncogenic potential associated hypomethylation and promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma", In: 34th EORTC-NCI-AACR Symposium, 2022년 10월, 페이지 S94, Poster 258 Materials and methods, Results, Conclusions (위 문헌은 본 국제출원의 우선권주장의 기초가 되는 선출원에서 '공지예외주장'된 문헌임.)	1-16
X	AHN, H. R. 등, "Hypomethylation-mediated upregulation of the SORT1 promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma", In: KSBMB International conference 2023, 2023년 05월, Poster D-44 요약 (위 문헌은 본 국제출원의 우선권주장의 기초가 되는 선출원에서 '공지예외주장'된 문헌임.)	1-4,6-8,10-13,15,16
☒ 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 2024년11월04일(04.11.2024)	국제조사보고서 발송일 2024년11월04일(04.11.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LIN, X-H. 등, “Six immune-related promising biomarkers may promote hepatocellular carcinoma prognosis: a bioinformatics analysis and experimental validation”, Cancer Cell International, 2023년 03월 23일, 23권, 5호, 내부페이지 1-20 내부페이지 8, 18; 도 6	1-4,6-8,10-13,15,16
A	LIN, M. 등, “Prognostic potential and mechanism of SORT1 and its co-expressed genes in hepatocellular carcinoma based on integrative analysis of multiple database”, Precision Medical Sciences, 2022년, 11권, 페이지 161-173 요약	1-16
A	GAO, Y. 등, “Sortilin 1 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration by regulating immune cell infiltration”, Journal of Oncology, 2022년, 2022권, 기사번호 6509028, 내부페이지 1-13 요약	1-16