



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0103067  
(43) 공개일자 2022년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6886 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6886 (2022.01)  
C12Q 2600/158 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-0005860  
(22) 출원일자 2022년01월14일  
심사청구일자 2022년01월14일  
(30) 우선권주장  
1020210005227 2021년01월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
송시영  
서울특별시 용산구 원효로 216, 111동 401호(신계동, 용산e편한세상)  
정다운  
서울특별시 마포구 월드컵북로 501, 916동 601호(상암동, 상암월드컵파크9단지)  
박수빈  
서울특별시 마포구 월드컵로34길 13, 1316호(성산동)  
(74) 대리인  
특허법인 하나

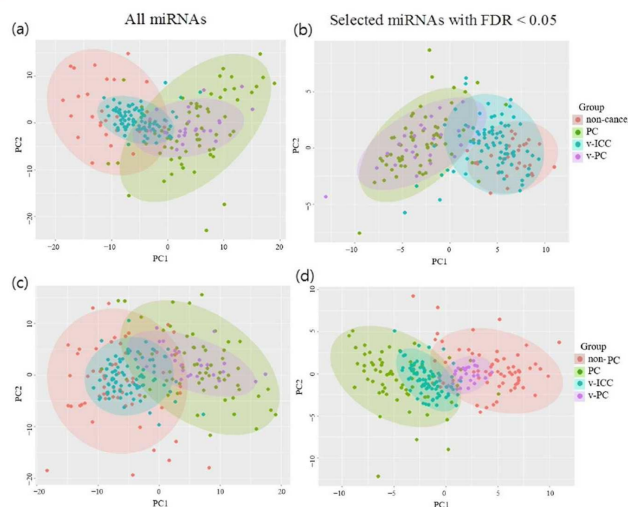
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 신규 췌장암 바이오마커 및 이의 용도

### (57) 요약

본 발명은 췌장암의 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 대표도



(52) CPC특허분류  
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415141621
과제번호	10040174
부처명	지식경제부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	바이오의료기기 산업원천기술개발사업(바이오)
연구과제명	차세대 생명정보 통합분석을 이용한 다중 바이오마커 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)지노믹트리
연구기간	2011.06.01 ~ 2016.05.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

miR-7154-5p, miR-4486, let-7b-5p 및 miR-4703-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 체장암 진단용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 miR-7154-5p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-4486은 서열번호 8의 염기서열로 이루어지고,

상기 let-7b-5p는 서열번호 9의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-4703-5p는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것인, 체장암 진단용 조성물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 진단용 조성물은,

miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-5100, miR-661 및 miR-22-3p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것인, 체장암 진단용 조성물.

#### 청구항 4

제2항에 있어서,

상기 miR-155-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-4284는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-346는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-5100는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-661는 서열번호 6의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-22-3p는 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 것인, 체장암 진단용 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

miRNA에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 miRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드인 것인, 체장암 진단용 조성물.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서,

miR-7154-5p, miR-4486, let-7b-5p 및 miR-4703-5p에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 체장암 진단용 조성물.

#### 청구항 7

제2항에 있어서,

miR-7154-5p, miR-4486, let-7b-5p, miR-4703-5p, miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-5100, miR-661 및

miR-22-3p에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 췌장암 진단용 조성물.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 진단용 조성물은 췌장암 및 간내 담관암을 조기에 구분하여 진단하는 것을 특징으로 하는, 췌장암 진단용 조성물.

#### 청구항 9

제 1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 췌장암 진단용 키트.

#### 청구항 10

a) 개체로부터 분리된 시료에서 miR-7154-5p, miR-4486, let-7b-5p 및 miR-4703-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 측정하는 단계; 및

b) 상기 miRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료의 해당 miRNA 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 췌장암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 miR-7154-5p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-4486은 서열번호 8의 염기서열로 이루어지고,

상기 let-7b-5p은 서열번호 9의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-4703-5p는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것인, 췌장암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 miR-7154-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나;

상기 miR-4486의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나;

상기 let-7b-5p의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나;

상기 miR-4703-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소한 경우, 췌장암으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 췌장암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 13

제10항에 있어서,

상기 a) 단계는 miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-5100, miR-661 및 miR-22-3p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 추가로 측정하는, 췌장암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,

상기 miR-155-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-4284는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-346는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-5100는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-661는 서열번호 6의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-22-3p는 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 것인, 췌장암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서,

상기 miR-155-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나;

상기 miR-4284의 발현이 있거나;

상기 miR-346의 발현이 없거나;

상기 miR-5100의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나;

상기 miR-661의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나;

상기 miR-22-3p의 발현이 정상 대조군 대비 증가한 경우, 췌장암으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 췌장암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 16

제 10항에 있어서,

상기 b) 단계는 검사 대상자의 나이, 성별, 체중, 식습관, 체질량, 기저질환, 자기공명영상법(MRI), SPECT(single-photon emission computed tomography), MMSE(mini-mental status examination) 및 양전자 방사 단층촬영(positron emission tomography; PET)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 비마커 임상정보를 연관시키는 것을 추가로 포함하는, 췌장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 17

제 10항에 있어서,

상기 시료는 혈액, 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액 또는 뇨인 것인, 췌장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 췌장암 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 췌장암(pancreatic cancer, PC)은 암과 관련된 사망의 주요 원인 중 하나로, 췌장암의 증상은 질병의 초기 단계에는 거의 나타나지 않고, 상기 암이 대부분 다른 기관으로 전이된 후에 발견된다. 2020년 암 통계에 따르면, 췌장암 환자의 5년 생존율은 9 %에 불과하지만, 2009년부터 2015년까지 췌장암 진단을 받은 환자를 기준으로 국부 췌장암 환자의 생존율은 37 % 이상이다.

[0003] 췌장암은 초기에는 별로 증세를 느끼지 않으며, 이미 전신 전이가 일어난 후에 통증과 체중 감소 등의 증세가 나타나는 것이 보통이어서, 더욱 치유율이 낮은 편이므로 정기적인 진단이 매우 중요하다. 임상 증세는 대부분이 서서히 발병하고, 허약해지기 쉬우며, 식욕 감퇴, 체중 감소는 가장 흔한 증세이다. 췌장암은 5년 생존율이 1 ~ 4%, 중앙생존기간 5개월에 이르는 치명적인 암으로 인체의 암 중에서 가장 불량한 예후를 보이고 있다. 또한, 80 ~ 90 % 환자에서 진단 시 완치를 기대하는 근치적 절제가 불가능한 상태에서 발견되기 때문에 예후가 불량하고 치료는 주로 항암 요법에 의존하고 있으므로, 그 어떤 인체 암보다도 조기 진단법 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0004] 췌장암 또는 췌장암 전구 병변의 진단은 혈액 검사, 위, 십이지장의 X선 조영검사, 피부 및 간을 통한 담도촬영과 역행성 내시경 담도촬영술 사용되고 있다. 추가적으로 초음파 촬영 및 전산화 단층 촬영이 많이 사용되고 있으나, 현재까지의 검사 방법들은 정확도가 떨어지거나, 환자에게 고통이 따르는 등 그 수행 방법이 매우 불편한 단점이 있다.

[0005] 이와 같이 췌장암은 조기 진단이 어려우면서도 사망률이 높고, 검사 방법 역시 환자들에게 고통이 수반되는 바, 조기에 정확히 진단하면서도 검사시 환자의 고통이 감소될 수 있는 진단 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 10-1463182호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 췌장암의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 진단용 조성물을 포함하는 췌장암의 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 췌장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 췌장암 진단 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 miR-7154-5p, miR-4486, let-7b-5p 및 miR-4703-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 췌장암 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0012] 구체적으로, 상기 miR-7154-5p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-4486은 서열번호 8의 염기서열로 이루어지고, 상기 let-7b-5p는 서열번호 9의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-4703-5p는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0013] 또한 구체적으로, 상기 진단용 조성물은 miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-5100, miR-661 및 miR-22-3p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0014] 더욱 구체적으로, 상기 miR-155-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-4284는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-346는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-5100는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-661는 서열번호 6의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-22-3p는 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0015] 췌장은 위장의 뒤쪽, 몸의 가운데에 있으며 길이가 20 cm 정도로 길다. 위, 십이지장, 소장, 대장, 간, 담낭, 비장 등의 장기에 둘러싸여 있다. 전체 길이는 약 15 내지 20 cm, 무게는 100 g 정도이고, 두부(頭部), 체부(體部), 미부(尾部)로 구분된다. 췌장은 섭취한 음식물 중의 탄수화물, 지방, 단백질을 분해하는 소화 효소를 분비하는 외분비 기능과 혈당을 조절하는 인슐린과 글루카곤 등의 호르몬을 분비하는 내분비 기능을 갖는다.

[0016] 또한 췌장은 두께가 2 cm 정도로 얇으며 피막만으로 싸여 있으며 소장에 산소를 공급하는 상장간막 동맥과 장에서 흡수한 영양분을 간으로 운반하는 간문맥 등과 밀착되어 있어 암의 침윤이 쉽게 일어난다. 또한 췌장 후면의 신경 다발과 임파선에도 조기에 전이가 발생하는 특징이 있다. 특히 췌장 암세포는 성장 속도가 빠르다. 발병시 4 개월 내지 8 개월밖에 살지 못하는 경우가 대부분으로, 예후가 좋지 않고, 수술에 성공하여 증상이 나아진다고 해도 5 년 이상 생존하는 비율이 17 % 정도로 적은 편이다.

[0017] 본 발명에서, “췌장암(pancreatic cancer)”은 췌장에 생긴 암세포로 이루어진 종괴이다. 췌장암에는 여러 가지 종류가 있으며 90 % 정도를 차지하고 있는 췌관 세포에서 발생한 췌관 선암종과 함께 낭종성암(낭선암), 내분비종양을 모두 포함한다.

[0018] 본 발명에서 상기와 같은 췌장암을 증세가 나타나기 전이라도 진단할 수 있는 정확도 및 민감도가 높은 바이오마커를 규명하여 진단용 조성물로 개발하였다.

- [0019] 본 발명에서, 상기 “제제”는 miRNA에 특이적으로 결합하는 물질로서, 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 상기 프라이머는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 갖는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서, “miRNA”는 통상 헤어핀 모양 구조의 RNA 전구체로서 전사되고, mRNA의 번역 억제에 관여할 수 있는 15~25 염기의 비코딩 RNA를 말한다. 또한, 본 발명의 miRNA는 miR-7154-5p, miR-4486, let-7b-5p, miR-4703-5p, miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-5100, miR-661 또는 miR-22-3p의 특정 염기서열(또는 서열번호)로 나타내어지는 miRNA 뿐만 아니라 상기 miRNA의 전구체(pre-miRNA, pri-miRNA), 이들과 생물학적 기능이 동등한 miRNA, 예를 들면 동족체(즉, 호몰로그 또는 오솔로그), 유전자다형 등의 변이체, 및 유도체도 포함한다. 이러한 전구체, 동족체, 변이체 또는 유도체로서는 구체적으로는 miRBase release 20(<http://www.mirbase.org/>)에 의해 동정할 수 있고, 엄격한 조건 하에서 서열번호 1 내지 10의 miRNA의 상보 서열과 혼성화하는 염기서열을 갖는 miRNA를 포함할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 명세서에서 사용하는 miRNA는 miR 유전자의 유전자 산물일 수 있으며, 이러한 유전자 산물은 성숙 miRNA(예를 들면, 상기와 같은 mRNA의 번역 억제에 관여하는 15~25 염기 또는 19~25 염기의 비코딩 RNA) 또는 miRNA 전구체(예를 들면, 상기와 같은 pre-miRNA 또는 pri-miRNA)를 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서는 상기 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 채장암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0024] 상기 프로브는 짧은 수 염기 내지 길게는 수십 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 말한다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 위 하나 이상의 miRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 채장암을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건, 라벨링 여부는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0025] 상기 안티센스 뉴클레오티드는 본 발명의 miRNA에 대해 상보적으로 결합할 수 있는 RNA, DNA, PNA 등 핵산이 포함된 모든 형태를 의미하며, 안티센스 뉴클레오티드의 길이, 형태, 라벨링 여부 등은 필요에 따라 적절히 변형하여 적용할 수 있다.
- [0026] 본 발명 일 실시예에서는 상기 miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-7154-5p, miR-5100, miR-661, miR-22-3p, miR-4486, let-7b-5p 및/또는 miR-4703-5p의 단독 및/또는 조합을 통해 높은 정확도 및 민감도로 채장암을 진단할 수 있음을 확인하였다.
- [0027] 구체적으로, 본 발명의 채장암 진단용 조성물은 miR-7154-5p, miR-4486, let-7b-5p 및 miR-4703-5p에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 더욱 구체적으로, miR-7154-5p, miR-4486, let-7b-5p, miR-4703-5p, miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-5100, miR-661 및 miR-22-3p에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명 일 실시예에서는 채장암 환자, 정상 대조군(non-cancer), 비-채장암(non-pancreatic cancer) 사이에 차등적으로 발현되는 miRNA를 선별하고, 선별된 miRNA의 발현 수준을 qRT-PCR을 이용하여 검증하였다. 이를 통해 신규 채장암 바이오마커로서 miR-7154-5p, miR-4486, let-7b-5p 및 miR-4703-5p를 발굴하였으며, 정상 대조군과의 miRNA 차등 발현을 확인함으로써 채장암이 진단될 수 있음을 확인하였다. 나아가, 상기 신규 miRNA 마커 외에도 miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-5100, miR-661 및 miR-22-3p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA와의 조합을 통해 높은 정확도 및 민감도로 채장암을 진단할 수 있음을 확인하였다.
- [0030] 또한, 상기 진단용 조성물은 채장암 및 간내 담관암을 조기에 구분하여 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명 일 실시예에서는 상기 miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-7154-5p, miR-5100, miR-661, miR-22-3p, miR-4486, let-7b-5p 및/또는 miR-4703-5p의 발현이 채장암 환자군과 간내 담관암 환자군 간 차이가 나타남을 확인하였는 바, 상기 miRNA의 단독 및/또는 조합을 통해 채장암 및 간내 담관암을 조기에 구분하여 진단할 수



있다.

- [0032] 본 발명에서, “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체 즉 검사 대상자의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것 또는 테라메트릭스(therapeutics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다. 특히, 뇌장암 및 간내 담관암을 구분하여 진단하는 것을 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로는 뇌장암 및 간내 담관암의 증상이 인지되기 전 초기에 진단하는 것으로 포함한다.
- [0033] 본 발명의 다른 일 측면은 상기 뇌장암 진단용 조성물을 포함하는 뇌장암 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명의 키트는 뇌장암의 발병이 의심되는 개체의 혈액, 혈청, 뇨 등에서 발현되는 miRNA의 수준을 측정하여 암의 발병을 진단하는데 사용될 수 있으며, 상기 miRNA의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브, 안티센스 뉴클레오타이드 등 측정 또는 분석에 필요한 성분, 용액, 장치 등을 제한없이 포함하여 구성할 수 있다. 일 예로, RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 상기 진단용 키트는 용액, 동결건조 분말, 냉동 용액, 또는 스트립 형태를 포함할 수 있으며, 각각의 형태는 당 업계에서 통상적인 방법으로 제제화할 수 있다. 또한 키트를 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 개체로부터 분리된 시료에서 miR-7154-5p, miR-4486, let-7b-5p 및 miR-4703-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 측정하는 단계; 및 b) 상기 miRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료의 해당 miRNA 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 뇌장암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0037] 구체적으로, 상기 miR-7154-5p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-4486은 서열번호 8의 염기서열로 이루어지고, 상기 let-7b-5p는 서열번호 9의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-4703-5p는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0038] 또한 구체적으로, 상기 miR-7154-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나; 상기 miR-4486의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나; 상기 let-7b-5p의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나; 상기 miR-4703-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소한 경우, 뇌장암으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0039] 또한 구체적으로, 상기 a) 단계는 miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-5100, miR-661 및 miR-22-3p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 추가로 측정할 수 있다.
- [0040] 더욱 구체적으로, 상기 miR-155-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-4284는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-346는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-5100는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-661는 서열번호 6의 염기서열로 이루어지고, 상기 miR-22-3p는 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0041] 더욱 구체적으로, 상기 miR-155-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나; 상기 miR-4284의 발현이 있거나; 상기 miR-346의 발현이 없거나; 상기 miR-5100의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나; 상기 miR-661의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나; 상기 miR-22-3p의 발현이 정상 대조군 대비 증가한 경우, 뇌장암으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0042] 또한 구체적으로, 상기 b) 단계는 검사 대상자의 나이, 성별, 체중, 식습관, 체질량, 기저질환, 자기공명영상법(MRI), SPECT(single-photon emission computed tomography), MMSE(mini-mental status examination) 및 양전자 방사 단층촬영(positron emission tomography; PET)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 비마커 임상정보를 연관시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 상기와 같은 비마커 임상정보를 추가로 분석함으로써 뇌장암의 진단 또는 예후 예측에 관한 정보를 보다 구체적으로 얻을 수 있으며, 이러한 비마커 임상정보는 상기에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명에서, 상기 시료는 혈액, 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액 또는 뇨인 것일 수 있으며, 뇌장암의 진단에 적용될 수 있는 시료에 해당하면 상기 예시에 제한되지 않고 시료로서 적용될 수 있다.



## 발명의 효과

- [0045] 본 발명의 조성물은 증상이 나타나기 전 초기에도 높은 정확성과 민감도로 췌장암 진단이 이루어질 수 있도록 함으로써, 조기에 치료가 가능하도록 하는 바, 췌장암 진단에 대한 활용 가능성이 매우 높다.
- [0046] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

## 도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 주성분 분석을 통해 환자군 및 대조군 사이의 miRNA 프로파일의 차이를 확인한 결과를 나타낸 것이다 ((a, b) 63 개 췌장암 샘플 및 29 개의 비-암 샘플; (c, d) 63개의 췌장암 샘플 및 63개의 비-췌장암 샘플; (a, c) 모든 miRNA(all miRNA); (b, d) FDR < 0.05로 선별된 miRNA; non-cancer, 비-암 샘플; PC, 췌장암 샘플; v-ICC, 검증된 간내 담관암 샘플; v-PC, 검증된 췌장암 샘플; non-PC, 비-췌장암 샘플).
- 도 2는 K 최상위 마커를 기반으로 한 예측 성능을 나타낸 것이다. 5-폴드 교차 검증의 200 회 반복에서 곡선하 면적(area under the curve, AUC), 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)를 포함하는 모델 예측 성능 메트릭스(metrics)를 특정 K 로 평균화하였다. 정확도(accuracy)는 민감도 및 특이도의 평균이다.
- 도 3은 차등적으로 발현된 miRNA 및 선별된 39개 바이오마커의 벤다이어그램을 나타낸 것이다. 상위 39 개 miRNA에는 췌장암(PC) 샘플 및 비-암 샘플 간에 차등적으로 발현된 28 개의 miRNA(FDR < 0.05) 및 췌장암과 비-췌장암 간에 차등적으로 발현된 11 개의 miRNA(FDR < 0.05)가 포함되었다.
- 도 4는 본 발명 진단 모델 및 CA19-9를 기반으로 한 췌장암(PC) 진단을 위한 수신자 조작 특성(Receiver-operating characteristic, ROC) 곡선을 나타낸 것이다((a) 본 발명 진단 모델; (b) CA19-9 이용 진단 모델). ROC 곡선의 신뢰 구간은 음영으로 표시하였으며, 점은 각 플롯에서 미리 정의된 임계값을 기반으로 하는 민감도와 특이도를 나타낸다.
- 도 5는 qRT-PCR을 사용하여 확인한 miRNA 발현 수준을 나타낸 것이다((a) miR-155-5p; (b) miR-4284; (c) miR-346; (d) miR-7154-5p; (e) miR-5100; (f) miR-661; (g) miR-22-3p; (h) miR-4486; (i) let-7b-5p; 및 (j) miR-4703-5p) (\*,  $p$ -value < 0.05). 각 군 하단에 (miRNA 발현 샘플 수(Number<sub>Expression</sub>)/총 샘플 수(Number<sub>Total</sub>))를 나타내었다(PC, 췌장암; ICC, 간내 담관암; NL, 정상 대조군).

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0049] **실시예 1. 연구 설계 및 샘플 준비**
- [0050] **1-1. 연구 설계**
- [0051] 췌장암 환자와 대조군 그룹 사이에 차등적으로 발현된 miRNA(differentially expressed miRNA, DE miRNA)를 식별하고 췌장암에 대한 진단 모델을 구축하기 위해 환자-대조군 연구를 설계하였다. 본 연구 설계는 1975 년 헬싱키 선언의 윤리 지침을 준수하였으며, 연세대학교 의과대학 윤리 위원회 및 기관 검토 위원회로부터 승인받았다. 모든 참여 환자 및 건강한 피험자로부터 서면 사전 동의서를 받았다(IRB 승인 코드 4-2012-0528, 2012년 9 월 20일).
- [0052] 환자의 경우, 63 명의 췌장암(pancreatic cancer, PC) 환자를 대상으로 하였으며, 대조군의 경우 두 가지 유형으로 구성하였다. 첫번째 유형의 대조군은 비-암군은 19 명의 건강한 피험자 및 10 명의 담석증(cholelithiasis, Ch) 환자로 구성하였으며, 두 번째 유형의 대조군은 비-췌장암군(non-PC group)으로서, 비-암(non cancer) 피험자 및 다른 암 환자의 샘플도 포함하였다. 특히, 20 명의 간내 담관암(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 환자, 7 명의 위암(stomach cancer, SC) 환자, 5 명의 대장암(colorectal cancer, CRC) 환자, 2 명의 위장관기질종양(gastrointestinal stromal tumor, GIST) 환자를 포함하였다. 검증(validation) 을 위해 25 개 췌장암(PC) 및 81 개의 간내 담관암(ICC) 샘플을 따로 설정하였다. 마이크로어레이 실험을 통한 샘플의 임상적 특성과 그룹화 세부 사항은 표 1에 나타난 바와 같다. 각 암 단계는 American Joint Committee on Cancer 제 7판의 단계 분류를 기반으로 하였으며, 변수는 평균  $\pm$  표준 편차, 중앙값  $\pm$  표준 편

차, 또는 n (%)로 표현하였다 (PC, 췌장암; ICC, 간내 담관암; SC, 위암; CRC, 대장암; GIST, 위장관기질종양; Ch, 담석증; N, 정상; SD, 표준편차; CA19-9, 탄수화물 항원(carbohydrate antigen) 19-9.).

표 1

변수	트레이닝 코호트(Training Cohort)							밸리데이션 코호트 (Validation Cohort)	
	PC	ICC	CRC	SC	GIST	Ch	N	PC	ICC
수(n)	63	20	5	7	2	10	19	25	81
연령	63.0 ± 9.6	66.4 ± 10.5	66.2 ± 5.2	60.0 ± 14.4	54.5 ± 10.6	60.2 ± 12.1	46.8 ± 9.8	66.0 ± 8.1	64.6 ± 7.1
여성	19 (30.2)	8 (40.0)	2 (40.0)	1 (14.3)	1 (50.0)	6 (54.5)	6 (30.0)	7 (28.0)	6 (33.3)
암 단계									
I	4	1	1	1	2			1	7
II	12	7	2	1				4	18
III	13	-	-	1	-			8	8
IV	34	-	2	4	-			12	48
CA19-9, U/ml									
중앙값	336.5 ±6055.7	181.5 ±4441.1	20.0± 28.8	62.1± 355.6	8.91± 9.89		10.1± 5.5	196.9± 5985.5	45.8±5 287.2
≤37	16 (25.4)	6 (30.0)	4 (80.0)	3 (42.9)	2 (100)		19 (100)	7 (28.0)	37 (46.8)
>37	47 (74.6)	14 (70.0)	1 (20.0)	4 (57.1)	0 (0)		0 (0)	18 (72.0)	42 (53.2)
전 체 생존 기간 (월)	15.4	19.6	32.8	62.4	25.9		-	12	21.9

#### 1-2. 샘플 수집 및 보관

샘플은 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에서 상세한 임상 검사 및 진단을 받은 동의한 개인으로부터 전향적으로 획득하였다. 63 명의 췌장암 환자, 63 명의 비-췌장암 대조군 피험자 및 또 다른 25 명의 췌장암 환자 및 81 명의 간내 담관암 환자의 혈청 샘플을 10 mL BD 혈청 튜브에 수집하였다. 샘플은 3,000 x g에서 20 분동안 4 °C에서 원심분리하였다. 이후 혈청의 상층액을 분취하고 추가 사용이 있을 때까지 -80 °C에서 보관하였다.

#### 1-3. miRNA 추출

miRNA를 포함하는 총 RNA를 혈청 miRNA 정제 키트(Genolution, Seoul, Korea)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 상기 혈청 샘플로부터 추출하고, 상기 RNA를 RNase가 없는 물 12 µL에 재현탁하고 마이크로어레이 또는 qRT-PCR 분석때까지 -80 °C에서 보관하였다.

#### 1-4. miRNA 마이크로어레이 실험

- [0059] 품질관리를 위해, RNA의 순도(purity) 및 무결성(integrity)을 OD260/280 비율을 기반으로 평가하고, Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 array(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)를 사용한 분석은 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. RNA 샘플 130 ng을 FlashTag Biotin RNA Labeling Kit(Genisphere, Hatfield, PA, USA)를 사용하여 라벨링하였다. 라벨링 된 RNA는 제조사가 제공한 표준 절차에 따라 정량화, 분획화 및 miRNA 마이크로어레이에 혼성화하였다.
- [0060] 다음으로, 상기 라벨링 된 RNA를 99 °C에서 5 분 동안 가열한 다음 45 °C에서 5분 동안 가열하였다. RNA-어레이 혼성화는 Affymetrix 450 Fluidics Station 상에서 48 °C에서 16 시간 동안 분당 60 회전으로 교반하면서 수행하였다. GeneChip Fluidics Station 450(Affymetrix)을 사용하여 상기 칩을 세척하고 염색하였다. 이후 Affymetrix GCS 3000 스캐너를 사용하여 칩을 스캔하고, Expression Console software를 사용하여 232 개의 세포 파일을 분석 및 정규화하였다. Affymetrix GeneChip Micro 4.0 어레이는 단색 접근법(one-color approach)을 사용하여 100 % miRBase v20 coverage (www.mirbase.org)를 제공하였다. 상기 칩은 내부 및 음성 대조군을 포함하는 미성숙(pre-mature) miRNA(n=2,025) 및 다른 스몰(small) RNA(n=1,996)가 포함된 6,658 개의 인간 프로브 세트를 포함하며, 추가 분석을 위해 모든 프로브 세트에서 2,578 개의 성숙한(mature) 인간 miRNA를 추출하였다.
- [0061] **실시예 2. 차등 발현 유전자(Differentially Expressed Genes, DEGs) 기반 주성분 분석(Principal components analysis, PCA)**
- [0062] 환자군과 대조군 간의 발현 수준의 차이를 알아보기 위해 2,578개의 인간 성숙 miRNA에 대한 Log2-변환 및 정규화된 강도를 분석하였다. DEMiRNA(Differentially Expressed miRNA)를 식별하기 위해 로지스틱 회귀 분석을 사용하였다. 오발견 비율(false discovery rate, FDR) 방법을 사용하여 통계적 유의성을 결정하였으며, FDR < 0.05를 유의한 것으로 간주하였다.
- [0063] 환자군 및 대조군 사이의 miRNA 프로파일의 차이를 조사하기 위해 주성분 분석 을 수행하였다. 상기 두 그룹의 주성분은 i) 모든 miRNA 및 ii) FDR < 0.05인 서로 다른 miRNA 세트를 기반으로 분석하였다. 검증(validation) 샘플((25개의 췌장암 샘플 및 81개의 간내 담관암 샘플) 역시 상기 PCA 모델을 기반으로 주성분을 예측하였다. 각 그룹의 패턴을 시각화하기 위해, 다변량 t 분포를 기반으로 PCA 플롯에서 주성분의 95% 신뢰 타원을 추가하였다.
- [0064] 구체적으로, DEMiRNA 분석에서 63 개 췌장암 샘플 및 29 개의 비-암 샘플을 비교하였으며, 두 그룹(FDR < 0.05) 간의 상당한 발현의 차이를 보이는 103 개의 miRNA를 선별하였다(표 2).
- [0065] 또한, 도 1에 나타난 바와 같이 모든 miRNA(all miRNA)를 대상으로 췌장암 샘플 및 비-암 샘플을 비교한 경우(도 1a)에 비해, FDR < 0.05로 선별된 103 개의 miRNA를 대상으로 하였을 때(도 1b) 63 개의 췌장암 샘플(PC) 및 29 개의 비-암(non-cancer) 샘플의 구분이 보다 명확한 것을 확인하였다. 특히, 검증된 PC 샘플(v-PC)의 경우 도 1a 및 1b에 나타난 바와 같이 63 개의 췌장암 샘플과 유사한 패턴을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0066] 반면, 81 개의 검증된 간내 담관암 샘플(v-ICC)의 경우 췌장암 샘플의 패턴과 겹치는 패턴이 나타났다. 따라서, 비-암 샘플만을 대조군으로 이용할 경우, 다수의 위양성이 유도될 수 있으며, 췌장암 특이적인 진단으로는 정확하지 않을 수 있다. 예를 들어, 간내 담관암 환자를 췌장암 환자로 진단할 수 있다.

표 2

miRNA	Z-값	p-값	FDR	곡선하면적 (AUC)
hsa-miR-4668-5p*	-5.060	4.19E-07	0.000584	0.910783
hsa-miR-3613-3p*	-5.045	4.53E-07	0.000584	0.903667
hsa-miR-548ac*	-4.610	4.02E-06	0.002278	0.90312
hsa-miR-1298-3p*	-4.604	4.15E-06	0.002278	0.906951
hsa-miR-16-2-3p*	-4.580	4.66E-06	0.002278	0.86809
hsa-miR-4708-3p*	-4.553	5.30E-06	0.002278	0.873563
hsa-miR-548a-3p*	-4.467	7.93E-06	0.002919	0.835249
hsa-miR-3201*	-4.418	9.97E-06	0.003155	0.925014
hsa-miR-8084*	-4.397	1.10E-05	0.003155	0.86809
hsa-miR-548aq-3p*	-4.321	1.55E-05	0.003244	0.834702
hsa-miR-628-5p*	-4.264	2.01E-05	0.003244	0.847291
hsa-miR-455-3p*	4.262	2.03E-05	0.003244	0.836891
hsa-miR-548h-3p*	-4.248	2.16E-05	0.003244	0.834154
hsa-miR-548z*	-4.248	2.16E-05	0.003244	0.834154
hsa-miR-32-5p*	-4.243	2.21E-05	0.003244	0.831418
hsa-miR-22-3p*	-4.240	2.24E-05	0.003244	0.819923
hsa-miR-1269b*	-4.227	2.37E-05	0.003244	0.904762
hsa-miR-346*	4.225	2.39E-05	0.003244	0.793651
hsa-miR-3910*	-4.225	2.39E-05	0.003244	0.843459
hsa-miR-4797-5p*	-4.209	2.57E-05	0.003244	0.853859
hsa-miR-1263*	-4.202	2.64E-05	0.003244	0.837438
hsa-miR-548ae*	-4.133	3.58E-05	0.004194	0.840175
hsa-miR-642a-3p*	4.099	4.15E-05	0.004475	0.800766
hsa-miR-1184*	-4.096	4.20E-05	0.004475	0.808976
hsa-miR-1825*	-4.089	4.34E-05	0.004475	0.81445
hsa-miR-762*	4.042	5.31E-05	0.005055	0.760263
hsa-miR-5100*	-4.038	5.39E-05	0.005055	0.792009
hsa-miR-335-5p*	-4.030	5.58E-05	0.005055	0.834702
hsa-miR-548aj-3p*	-4.025	5.69E-05	0.005055	0.789272
hsa-miR-1272*	-3.993	6.52E-05	0.005605	0.793103
hsa-miR-486-5p*	-3.976	7.01E-05	0.005753	0.781609
hsa-miR-642b-3p*	3.972	7.14E-05	0.005753	0.789819
hsa-miR-6865-5p*	3.919	8.90E-05	0.006797	0.776136
hsa-miR-4423-3p*	-3.912	9.15E-05	0.006797	0.80405
hsa-miR-3128*	-3.910	9.23E-05	0.006797	0.80624
hsa-miR-548x-3p*	-3.886	0.000102	0.007318	0.812808
hsa-miR-1281*	-3.879	0.000105	0.007318	0.798577
hsa-miR-603*	-3.872	0.000108	0.007344	0.793651
hsa-miR-4486*	-3.859	0.000114	0.007516	0.788725

[0067]



miRNA	Z-값	p-값	FDR	꼭선택하면적 (AUC)
hsa-miR-548u*	-3.844	0.000121	0.007652	0.77723
hsa-miR-640*	3.842	0.000122	0.007652	0.746579
hsa-miR-4742-5p*	-3.828	0.000129	0.007943	0.791461
hsa-miR-3152-3p*	-3.810	0.000139	0.008337	0.782157
hsa-miR-1323*	-3.793	0.000149	0.008618	0.772852
hsa-miR-5787*	3.791	0.00015	0.008618	0.755884
hsa-miR-6068*	-3.758	0.000171	0.009597	0.77723
hsa-miR-6840-5p	-3.751	0.000176	0.009669	0.786535
hsa-miR-6750-5p*	3.729	0.000192	0.010302	0.785441
hsa-miR-5681a*	-3.713	0.000205	0.010634	0.765736
hsa-miR-548ay-5p*	3.712	0.000206	0.010634	0.773946
hsa-miR-6075*	-3.702	0.000214	0.010841	0.762452
hsa-miR-4502	3.679	0.000234	0.011623	0.756979
hsa-miR-3064-5p*	3.614	0.000301	0.014624	0.768473
hsa-miR-5001-5p*	-3.604	0.000313	0.014935	0.775588
hsa-miR-155-3p*	-3.593	0.000327	0.01525	0.770115
hsa-miR-155-5p*	3.590	0.000331	0.01525	0.843459
hsa-miR-1237-5p*	3.569	0.000358	0.016206	0.733443
hsa-miR-7641*	-3.547	0.00039	0.017356	0.759715
hsa-miR-5004-5p*	-3.542	0.000397	0.017365	0.764641
hsa-miR-4690-5p*	-3.496	0.000472	0.020262	0.747674
hsa-miR-4497*	-3.492	0.00048	0.020293	0.74439
hsa-miR-4745-5p*	-3.458	0.000545	0.022645	0.721949
hsa-miR-4703-5p*	-3.429	0.000606	0.024817	0.725233
hsa-miR-5189-3p*	3.414	0.00064	0.025762	0.722496
hsa-miR-512-3p*	-3.392	0.000693	0.02687	0.737274
hsa-miR-939-5p*	-3.391	0.000696	0.02687	0.720854
hsa-miR-4445-3p*	-3.390	0.000698	0.02687	0.759715
hsa-miR-2278*	3.364	0.000768	0.029108	0.718664
hsa-miR-1231*	-3.352	0.000802	0.02994	0.728517
hsa-miR-3612*	-3.348	0.000813	0.02994	0.735085
hsa-miR-6790-5p*	-3.338	0.000844	0.030633	0.726327
hsa-miR-877-5p*	3.330	0.00087	0.031163	0.739464
hsa-miR-6808-5p	-3.319	0.000904	0.03193	0.747674
hsa-miR-3620-3p*	3.315	0.000917	0.031947	0.723043
hsa-miR-6893-5p	-3.311	0.000931	0.032001	0.721401
hsa-miR-1275	3.299	0.000971	0.032941	0.689655
hsa-miR-466*	-3.293	0.00099	0.033141	0.738369
hsa-miR-190a-3p*	-3.267	0.001087	0.035934	0.723591

[0068]

miRNA	Z-값	p-값	FDR	곡선하면적 (AUC)
hsa-miR-200b-5p*	-3.262	0.001107	0.036111	0.727969
hsa-miR-4721*	-3.253	0.001143	0.036836	0.755884
hsa-miR-4490*	-3.242	0.001187	0.037766	0.7526
hsa-miR-3197	-3.238	0.001203	0.037824	0.721401
hsa-miR-191-5p*	-3.222	0.001275	0.039517	0.76902
hsa-miR-3171	3.218	0.001293	0.039517	0.719212
hsa-miR-92a-3p	-3.213	0.001315	0.039517	0.712096
hsa-miR-651-5p	3.212	0.001318	0.039517	0.732895
hsa-miR-5571-5p	-3.206	0.001344	0.039694	0.724685
hsa-miR-6799-3p*	-3.201	0.001369	0.039694	0.70717
hsa-miR-202-5p*	-3.201	0.00137	0.039694	0.730159
hsa-miR-149-3p*	3.192	0.001413	0.040478	0.718664
hsa-miR-670-5p*	3.182	0.001462	0.041422	0.71538
hsa-miR-5001-3p	3.178	0.001483	0.041543	0.732895
hsa-miR-130a-3p*	-3.171	0.001521	0.042071	0.711549
hsa-miR-7703*	3.168	0.001534	0.042071	0.68254
hsa-miR-3921	-3.162	0.001565	0.042228	0.73399
hsa-miR-4791	-3.161	0.001573	0.042228	0.723043
hsa-miR-338-3p	3.156	0.001601	0.042553	0.702791
hsa-miR-4253*	-3.147	0.00165	0.043398	0.713738
hsa-miR-6868-5p	-3.125	0.00178	0.046361	0.738369
hsa-miR-7112-5p	-3.120	0.001811	0.046697	0.747674
hsa-miR-4701-3p*	3.102	0.001922	0.048675	0.701149
hsa-miR-1278	-3.101	0.001926	0.048675	0.720307
hsa-miR-4775*	3.098	0.001948	0.048758	0.70717

[0069]

[0070]

상기 표 2에서 \*로 표시된 miRNA는 췌장암 샘플과 비-췌장암 샘플 간에도 차등적으로 발현된 마커이며, 그 외 miRNA는 췌장암 샘플 및 비-암 샘플 사이에서만 차등적으로 발현된 마커이다.

[0071]

또한, DEmiRNA 분석에서 63개의 췌장암 샘플 및 63개의 비-췌장암 샘플을 비교하였으며, 두 그룹(FDR < 0.05) 간의 상당한 발현의 차이를 보이는 149 개의 miRNA를 선별하였다(표 3).

[0072]

모든 miRNA(all miRNA)를 대상으로 췌장암 샘플 및 비-췌장암 샘플을 비교한 경우 췌장암 샘플 및 비-췌장암 샘플 간 주성분의 중복 패턴이 나타났으며(도 1c), 이에 비해, FDR < 0.05로 선별된 149 개의 miRNA를 대상으로 하였을 때(도 1d) 63 개의 췌장암 샘플(PC) 및 63 개의 비-췌장암 샘플의 클러스터링 패턴이 거의 구별되는 것을 확인하였다. 특히, 검증된 샘플(25 개 v-PC 및 81 개 v-ICC)의 경우 도 1d에 나타난 바와 같이 트레이닝(training) 환자-대조군 샘플과 유사한 패턴을 나타내는 것을 확인하였다.

표 3

miRNA	Z-값	p-값	FDR	곡선하면적 (AUC)
hsa-miR-127-3p	-4.241	2.23E-05	0.001646	0.743512
hsa-miR-3152-3p*	-4.209	2.57E-05	0.001841	0.737717
hsa-miR-4423-3p*	-4.191	2.78E-05	0.00191	0.730411
hsa-miR-4690-5p*	-4.188	2.82E-05	0.00191	0.737969
hsa-miR-548aj-3p*	-4.140	3.47E-05	0.002223	0.72386
hsa-miR-640*	4.138	3.50E-05	0.002223	0.721088
hsa-miR-2278*	4.136	3.54E-05	0.002223	0.727891
hsa-miR-6075*	-4.105	4.04E-05	0.00248	0.731922
hsa-miR-4701-3p*	4.092	4.27E-05	0.00256	0.721844
hsa-miR-1272*	-4.057	4.97E-05	0.002912	0.755102
hsa-miR-455-3p*	4.050	5.13E-05	0.002938	0.732174
hsa-miR-5787*	4.041	5.33E-05	0.002988	0.719829
hsa-miR-200b-5p*	-4.033	5.50E-05	0.003017	0.719073
hsa-miR-7641*	-3.992	6.54E-05	0.003464	0.714286
hsa-miR-6511b-5p	3.991	6.58E-05	0.003464	0.730915
hsa-miR-4741	-3.982	6.84E-05	0.003526	0.703704
hsa-miR-155-3p*	-3.974	7.08E-05	0.003531	0.716049
hsa-miR-6068*	-3.972	7.12E-05	0.003531	0.720585
hsa-miR-4647	3.950	7.80E-05	0.003793	0.734694
hsa-miR-191-5p*	-3.946	7.96E-05	0.003801	0.74704
hsa-miR-548h-3p*	-3.929	8.54E-05	0.003933	0.753842
hsa-miR-548z*	-3.929	8.54E-05	0.003933	0.753842
hsa-miR-939-5p*	-3.919	8.90E-05	0.004027	0.707735
hsa-miR-4284	-3.909	9.28E-05	0.004035	0.710254
hsa-miR-4745-5p*	-3.908	9.31E-05	0.004035	0.707735
hsa-miR-8075	3.906	9.39E-05	0.004035	0.720081
hsa-miR-1281*	-3.865	0.000111	0.004701	0.73293
hsa-miR-5681a*	-3.832	0.000127	0.005283	0.705467
hsa-miR-6894-3p	3.823	0.000132	0.005388	0.699169
hsa-miR-5189-3p*	3.803	0.000143	0.005744	0.702192
hsa-miR-548x-3p*	-3.773	0.000161	0.006376	0.739985
hsa-miR-486-5p*	-3.761	0.000169	0.006517	0.706727
hsa-miR-7154-5p	3.761	0.000169	0.006517	0.707735
hsa-miR-6799-3p*	-3.741	0.000183	0.00695	0.698665

[0073]



miRNA	Z-값	p-값	FDR	곡선하면적 (AUC)
hsa-miR-450b-5p	-3.728	0.000193	0.007198	0.697153
hsa-miR-4775*	3.696	0.000219	0.008078	0.703956
hsa-miR-661	3.690	0.000224	0.008147	0.697657
hsa-miR-1184*	-3.666	0.000246	0.008699	0.709247
hsa-miR-7855-5p	3.666	0.000246	0.008699	0.698665
hsa-miR-6506-5p	-3.657	0.000255	0.008881	0.690854
hsa-miR-221-5p	-3.653	0.000259	0.008891	0.699924
hsa-miR-6751-5p	3.640	0.000273	0.009275	0.689594
hsa-miR-4721*	-3.633	0.00028	0.009275	0.715294
hsa-miR-3620-3p*	3.632	0.000281	0.009275	0.697153
hsa-miR-3942-5p	-3.599	0.000319	0.01042	0.693878
hsa-miR-202-5p*	-3.595	0.000325	0.010459	0.704712
hsa-miR-7852-3p	-3.585	0.000337	0.010717	0.683799
hsa-miR-1237-5p*	3.566	0.000363	0.011406	0.705971
hsa-miR-26a-5p	-3.554	0.000379	0.011782	0.696649
hsa-miR-4445-3p*	-3.542	0.000397	0.012171	0.706475
hsa-miR-503-5p	3.538	0.000403	0.012222	0.713278
hsa-miR-670-5p*	3.535	0.000408	0.012222	0.678256
hsa-miR-5004-5p*	-3.509	0.00045	0.013204	0.679768
hsa-miR-6800-5p	-3.508	0.000451	0.013204	0.68254
hsa-miR-1825*	-3.469	0.000523	0.015107	0.756866
hsa-miR-595	3.464	0.000533	0.015107	0.677501
hsa-miR-6780a-5p	3.464	0.000533	0.015107	0.683547
hsa-miR-149-3p*	3.428	0.000609	0.016975	0.692618
hsa-miR-425-5p	-3.426	0.000612	0.016975	0.678508
hsa-miR-2467-3p	-3.400	0.000675	0.018521	0.672965
hsa-miR-6737-3p	-3.388	0.000705	0.019122	0.684303
hsa-miR-4767	-3.373	0.000744	0.019716	0.672714
hsa-miR-4497*	-3.373	0.000744	0.019716	0.668934
hsa-miR-6849-5p	3.371	0.000749	0.019716	0.683799
hsa-miR-6732-5p	3.338	0.000845	0.021902	0.669186
hsa-miR-4454	-3.336	0.00085	0.021902	0.683044
hsa-let-7b-5p	3.319	0.000902	0.02303	0.674729
hsa-miR-4703-5p*	-3.301	0.000964	0.024212	0.664147

[0074]

miRNA	Z-값	p-값	FDR	곡선하면적 (AUC)
hsa-miR-4487	3.300	0.000967	0.024212	0.690854
hsa-miR-3149	3.295	0.000983	0.024376	0.681028
hsa-miR-762*	3.291	0.000998	0.024502	0.69035
hsa-miR-1277-3p	-3.287	0.001011	0.024577	0.678005
hsa-miR-6856-5p	3.283	0.001027	0.024744	0.704963
hsa-miR-1226-5p	-3.269	0.001081	0.025806	0.68002
hsa-miR-4490*	-3.258	0.001123	0.026571	0.669186
hsa-miR-5692a	3.244	0.001177	0.027429	0.679516
hsa-miR-512-3p*	-3.241	0.001191	0.027429	0.671706
hsa-miR-218-5p	3.241	0.001192	0.027429	0.67095
hsa-miR-1260a	3.233	0.001224	0.027452	0.657092
hsa-miR-4799-3p	-3.233	0.001226	0.027452	0.676745
hsa-miR-603*	-3.231	0.001234	0.027452	0.688335
hsa-miR-7847-3p	-3.231	0.001235	0.027452	0.670446
hsa-miR-1231*	-3.221	0.001278	0.028163	0.652053
hsa-miR-6756-5p	3.191	0.001419	0.031	0.686571
hsa-miR-4674	-3.185	0.001446	0.031132	0.662383
hsa-miR-891b	-3.185	0.001449	0.031132	0.671202
hsa-miR-572	-3.176	0.001491	0.031771	0.671202
hsa-miR-466*	-3.164	0.001557	0.032892	0.67221
hsa-miR-6814-5p	-3.155	0.001603	0.033592	0.67095
hsa-miR-3612*	-3.152	0.001621	0.033705	0.668934
hsa-miR-20a-3p	-3.149	0.00164	0.033829	0.657848
hsa-miR-377-5p	3.141	0.001686	0.034506	0.670446
hsa-miR-4253*	-3.127	0.001764	0.035804	0.666415
hsa-miR-6827-5p	-3.107	0.001889	0.037573	0.650038
hsa-miR-3143	3.107	0.001893	0.037573	0.670194
hsa-miR-5001-5p*	-3.106	0.001895	0.037573	0.676241
hsa-miR-4722-3p	3.102	0.001925	0.037892	0.666163
hsa-miR-4769-5p	3.090	0.002003	0.03912	0.657596
hsa-miR-6741-5p	3.082	0.002059	0.039863	0.670698
hsa-miR-6796-5p	-3.080	0.002072	0.039863	0.65936
hsa-miR-6807-5p	-3.076	0.002095	0.040014	0.671202
hsa-miR-770-5p	3.073	0.00212	0.040192	0.672965

[0075]

miRNA	Z-값	p-값	FDR	곡선하면적 (AUC)
hsa-miR-190a-3p*	-3.061	0.002203	0.041014	0.675485
hsa-miR-4706	3.061	0.002207	0.041014	0.645251
hsa-miR-6503-5p	3.060	0.002211	0.041014	0.655581
hsa-miR-5093	-3.054	0.002255	0.041516	0.650542
hsa-miR-6790-5p*	-3.051	0.002281	0.041705	0.662383
hsa-miR-7703*	3.042	0.002347	0.042603	0.650542
hsa-miR-130a-3p*	-3.006	0.00265	0.047444	0.64777
hsa-miR-8071	-3.002	0.002681	0.047444	0.679768
hsa-miR-2110	3.001	0.002689	0.047444	0.656085
hsa-miR-4482-3p	3.000	0.002697	0.047444	0.660368
hsa-miR-6751-3p	2.999	0.002705	0.047444	0.650038
hsa-miR-606	-2.997	0.002728	0.04752	0.661628
hsa-miR-423-5p	-2.993	0.002759	0.047741	0.656337

[0076]

[0077]

상기 표 3에서 \*로 표시된 miRNA는 췌장암 샘플 및 비-암 샘플 간에도 차등적으로 발현된 마커이며, 그 외 miRNA는 췌장암 샘플 및 비-췌장암 샘플 사이에서만 차등적으로 발현된 마커이다.

[0078]

따라서, 췌장암 대 비-췌장암 그룹화가 췌장암 특이적 진단 마커의 식별에 있어서 췌장암 대 비-암 그룹화보다 더 적합한 것을 확인하였다.

[0079]

### 실시예 3. miRNA 마커 선별 및 진단모델 구축

[0080]

#### 3-1. 진단을 위한 바이오마커 선별

[0081]

췌장암 진단을 위해 2,578 개의 인간 성숙 miRNA 중에서 miRNA 바이오마커를 다음 절차에 따라 선택하였다.

[0082]

1) 1단계(트레이닝/테스트 데이터 할당):

[0083]

- 전체 데이터를 대략적으로 동일한 크기의 서브세트(폴드) 5 개로 무작위로 분류하였다.

[0084]

- 상기 5 개 폴드 각각을 테스트 데이터로 간주하고 나머지 폴드를 트레이닝 데이터로 지정하였다(5-폴드 교차 검증).

[0085]

2) 2단계(후보 변수 선택):

[0086]

- 개별적으로 할당된 트레이닝 데이터를 사용하여 로지스틱 회귀 분석을 수행하고, 각 miRNA에 대한 p-값 및 조정된 p-값(FDR)을 계산하였다.

[0087]

- 첫 번째 후보 miRNA를 선별하였다(FDR < 0.05).

[0088]

- 첫 번째 후보 miRNA에 SCAD(smoothly clipped absolute deviation) 패널티를 적용하여 계수가 0이 아닌 두 번째 후보 miRNA를 선별하였다.

[0089]

3) 3단계 (반복):

[0090]

- 상기 1 단계 및 2 단계를 무작위 시드로 200 회 반복하였다.

[0091]

- 후보 miRNA 1,000 개 세트(5-폴드 CV \* 200 회 반복)를 얻었다.

[0092]

4) 4단계 (투표(voting)를 통한 최종 변수 선택):

[0093]

- 후보 miRNA 100개 세트로부터, 각 후보 miRNA의 빈도를 계산하였다.

[0094]

- 후보 miRNA는 빈도별로 분류하였다.

[0095]

5) 5 단계 (예측 모델 구축):

[0096]

- 상위 K 등급 miRNA로부터 방사형 기저 함수(radial basis function, RBF) 커널 SVM(Support Vector

Machines) 모델을 구축하였다( $K = 2, \dots, 50$ ).

[0097] - 각 모델( $K=2, \dots, 50$ )에서 최적의 하이퍼파라미터와 성능을 이중 교차-검증을 사용하여 계산하였다.

[0098] - 각 모델의 성능에 따라 최적의  $K$ 를 결정하였다.

[0099] - 최종 모델로, 전체 트레이닝 데이터 세트를 사용하여  $K$  개의 최상위 miRNA가 포함된 RBF(Radial Basis Function)-커널(kernel) SVM을 적용하였다.

### [0100] 3-2. 이중 교차 검증

[0101] 진단 모델의 파라미터화 및 검증을 위해, 내부 및 외부 교차 검증으로 구성된 이중 교차-검증을 사용하였다. 최적의  $K$  값을 결정하기 위해 외부 5-폴드 교차 검증 및 SVM의 하이퍼파라미터 할당에 대한 내부 5-폴드 교차 검증을 수행하였다. 내부 5-폴드 교차 검증에서 핵심 하이퍼파라미터의 그리드 서치를 위해  $-2^{-10}$  부터  $2^{10}$  ( $-2^{-10}, 2^{-9}, \dots, 2^9, 2^{10}$ ) 범위의 감마 값 및  $-2^{-7}$  부터  $2^7$  ( $2^{-7}, 2^{-6}, \dots, 2^6, 2^7$ ) 범위의 비용 값을 할당하였다. 외부 5폴드 교차 검증에서  $K$  최상위 miRNA가 있는 진단 모델을 테스트 데이터에 적용하고, 곡선 아래 면적(AUC), 민감도, 및 특이성을 각 폴드에 대해 계산하였다. 여러  $K$  값 ( $K=2, \dots, 50$ )에 대해 이러한 성능을 계산하였다. 상기 이중 교차 검증은 무작위 시드에서 20회 반복하였다. 그런 다음 성능 매트릭스(metrics)는 5-폴드 20회 반복에 대하여 평균화하였다. 이 성능을 기반으로, 최종 바이오마커 수( $=K$ )를 결정하였다.

### [0102] 3-3. SCAD(Smoothly clipped absolute deviation, SCAD) 패널티

[0103] SCAD는 비-오목형 패널티 함수로, 특징 선택을 위한 SCAD가 있는 최소 SVM으로 간주된다. 각 계수  $t_j$ 에 대한 SCAD-패널티 항의 수식은 다음과 같다.

$$p_{\lambda}(t_j) = \begin{cases} \lambda |t_j| & \text{if } |t_j| < \lambda \\ -\frac{(|t_j|^2 - 2a\lambda|t_j| + \lambda^2)}{2(a-1)} & \text{if } \lambda < |t_j| \leq a\lambda \\ \frac{(a+1)\lambda^2}{2} & \text{if } |t_j| > a\lambda \end{cases}$$

[0104] 본 발명에서는 Fan, J., & Li, R., J. Am. Stat. Assoc. 2001, 96, 1348-1360, 「Variable Selection via Nonconcave Penalized Likelihood and its Oracle Properties」를 참고하여  $a$  값을 3.7로 적용하였다. 매개변수  $\mu$ 는 대략적인 일반화된 교차 검증 통계를 최소화하여 할당되었다. 특징 선택에 대한 다양한 패널티 방법 중, SCAD를 선택하였다. SCAD는 큰 계수에 대해 거의 편향되지 않은 추정치를 생성하고, SCAD를 사용하여 선택한 세트의 특징은 실제 신호 특징 세트와 점근적으로 동일하여, SCAD는 oracle 속성을 충족하기 때문이다. 연구의 이중 교차-검증에서 다중 miRNA 선택을 위해 SCAD 패널티를 포함하는 패널티 SVM을 수행하였다.

### [0106] 3-4. 선별 miRNA 마커 기반 진단 모델 구축 및 검증

[0107] 진단 모델을 구축하기 위해, 췌장암 환자 샘플과 대조군으로 다른 암 환자의 샘플을 포함한 비-췌장암 환자 샘플 간의 비교 결과를 사용하였다. 진단 마커를 선택하기 위해 200 회 반복되는 5 폴드 교차 검증을 사용하였다. 교차 검증의 각 폴드에서, 공변량 없이 로지스틱 회귀 분석을 수행하고, FDR이 0.05 보다 적은 후보 miRNA 마커 세트를 선택하였다. 그런 다음, SCAD 패널티 함수와 함께 SVM을 사용하여, 후보 마커를 0이 아닌 계수를 가진 마커로 좁혔다.

[0108] 선택 빈도에 따라 마커의 순위를 매겼다. 이러한 빈도를 기반으로  $K$  최상의 miRNA를 사용하여 RBF 커널 SVM 모델을 구축하였다.  $K$  값을 결정하기 위해, 이중 교차-검증을 통하여,  $K$ 를 변경함으로써  $K$  최상위 miRNA를 갖는 모델의 진단 성능을 추정하였다.

[0109] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이,  $K$ 가 증가함에 따라 성능 측정 값이 증가하고  $K$ 가 39 일 때, AUC 0.98 및 정확도(accuracy) 0.93에서 포화되기 시작하였다. 따라서, 후보 miRNA 중 췌장암에 대한 진단 마커로서 상위 39 개의 miRNA를 선택하였다(표 4).



표 4

miRNA	선택 빈도 (Selection Freq)	곡선하면적(AUC)
hsa-miR-548ay-5p*	950	0.734
hsa-miR-155-5p*	842	0.808
hsa-miR-4284	836	0.708
hsa-miR-939-5p*	810	0.734
hsa-miR-642b-3p*	805	0.759
hsa-miR-346*	736	0.749
hsa-miR-4690-5p*	690	0.716
hsa-miR-7154-5p	675	0.698
hsa-miR-3064-5p*	625	0.785
hsa-miR-1269b*	607	0.854
hsa-miR-4708-3p*	580	0.82
hsa-miR-5100*	580	0.792
hsa-miR-548aq-3p*	580	0.76
hsa-miR-661	523	0.701
hsa-miR-4701-3p*	509	0.699
hsa-miR-1272*	455	0.771
hsa-miR-455-3p*	454	0.732
hsa-miR-26a-5p	422	0.711
hsa-miR-22-3p*	388	0.758
hsa-miR-6894-3p	384	0.697
hsa-miR-3620-3p*	377	0.679
hsa-miR-4775*	377	0.759
hsa-miR-4745-5p*	371	0.688
hsa-miR-6737-3p	371	0.673
hsa-miR-5189-3p*	357	0.693
hsa-miR-4647	356	0.741
hsa-miR-4486*	349	0.788
hsa-miR-6865-5p*	345	0.764
hsa-miR-200b-5p*	344	0.726
hsa-miR-548ac*	313	0.852
hsa-let-7b-5p	298	0.676
hsa-miR-2278*	291	0.741
hsa-miR-4703-5p*	262	0.603
hsa-miR-1226-5p	257	0.653
hsa-miR-640*	245	0.725
hsa-miR-1277-3p	240	0.672
hsa-miR-218-5p	232	0.624
hsa-miR-512-3p*	218	0.664
hsa-miR-16-2-3p*	213	0.8

[0110]

[0111] 상기 표 4에서 \*로 표시된 miRNA는 췌장암 샘플 및 비-암 샘플 간에도 차등적으로 발현된 마커이며, 그 외 miRNA는 췌장암 샘플 및 비-췌장암 샘플 사이에서만 차등적으로 발현된 마커이다.

[0112] 도 2에 나타난 바와 같이,  $K = 39$ 에서 진단 모델의 평균 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)는 최적의 결정 임계 값이 주어졌을 때, 각각 0.93 및 0.93이었다. 상기 최적 임계값은 임계값 0.5, 0.55, 0.6, 0.65 및 0.7 일 때의 성능 결과를 비교하여 0.55로 결정하였다.

[0113] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이 39 개 miRNA 중 28 개의 miRNA가 췌장암 샘플 및 비-암 샘플 간에 차등적으로 발현되었으며(FDR < 0.05), 11 개의 miRNA가 췌장암 샘플 및 비-췌장암 샘플 간에 차등적으로 발현되었다(FDR < 0.05).

[0114] 검증을 위해, 상기 본 발명의 췌장암 특이적 진단 모델을 다른 샘플 세트인 25 개의 췌장암 및 81 개의 간내 담

관암 샘플 세트에 적용하였다. 진단 모델에서 췌장암-진단 확률이  $> 0.55$ 일 때, 췌장암인 것으로 진단하였다. 또한 비교를 위해 동일한 샘플에 CA19-9 진단을 적용하였으며, CA19-9 값  $> 37$ 일 때, 췌장암인 것으로 진단하였다.

[0115] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 진단 모델의 곡선하면적(AUC)은 CA19-9를 이용한 진단 모델에 비해 약 1.5 배 높게 나타났으며, 민감도(sensitivity)는 약 1.3 배, 특이도(specificity)는 약 2 배 높게 나타남을 확인하였다.

[0116] **실시예 4. qRT-PCR을 통한 검증**

[0117] qRT-PCR을 사용하여 39 개의 마커 중 10 개의 miRNA를 검증하였다.

[0118] TaqMan Advanced miRNA cDNA 합성 키트(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 cDNA를 합성하였으며, TaqMan Advanced miRNA Assays(Applied Biosystems) 및 TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems)를 제조사의 프로토콜에 따라 사용하여 qRT-PCR을 수행하였다.

[0119] qRT-PCR은 ABI Prism 7300 Sequence Detection System(Applied Biosystems)을 사용하여 수행하였고, 프라이머는 Applied Biosystems에서 TaqMan 프라이머를 구입하여 사용하였다.

[0120] PCR 증폭은 95 °C에서 10분 동안의 개시 단계, 이어서 95 °C에서 20 초, 56 °C에서 30 초 및 72 °C에서 15 초를 55 사이클로 이루어졌다.

[0121] 모든 qRT-PCT 분석은 3 회 반복 수행하였으며, 17 명의 췌장암 환자, 8명의 간내 담관암 환자, 8 명의 건강한 사람의 총 RNA 샘플을 대상으로 하였다(각 암 단계는 American Joint Committee on Cancer 제 7 판의 단계 분류를 기반으로 하였으며, 변수는 평균  $\pm$  표준 편차, 중앙값  $\pm$  표준 편차, 또는 n (%)로 표현하였다 (PC, 췌장암; ICC, 간내 담관암; N, 정상; SD, 표준편차; CA19-9, 탄수화물 항원(carbohydrate antigen) 19-9.)).

**표 5**

변수	qRT-PCR		
	PC	ICC	N
수(n)	17	8	8
연령	65.0 $\pm$ 11.4	63.0 $\pm$ 8.2	44.0 $\pm$ 9.4
여성	10 (58.8)	3 (37.5)	2 (25.0)
암 단계			
I	2	2	
II	7	1	
III	-	7	
IV	8	4	
CA19-9, U/ml			
중앙값	698 $\pm$ 6505.3	93.9 $\pm$ 1590.1	6.6 $\pm$ 7.44
$\leq 37$	4 (23.5)	3 (37.5)	8 (100)
$> 37$	13 (76.5)	5 (62.5)	-
전체생존기간(월)	21.7	15.3	-

[0122]

[0123] 통계 분석은 GraphPad 5(GraphPad Software)를 사용하여 분석하였다. 그룹 간의 miRNA 발현은 일원분산분석(One-way ANOVA) 및 본페로니(Bonferroni) 사후 검정을 통해 계산하였다.

[0124] 구체적으로, miR-155-5p, miR-4284, miR-346, miR-7154-5p, miR-5100, miR-661, miR-22-3p, miR-4486, let-7b-5p, 및 miR-4703-5p의 발현 수준을 검증하였으며, 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 췌장암 샘플, 간내 담관암 샘플 및 정상 대조군(건강한 사람) 샘플에서 차등적인 발현이 나타남을 확인하였다. 췌장암 환자 샘플에서 miR-155-5p, miR-7154-5p, miR-661 및 miR-4703-5p의 발현이 감소하였으며, miR-5100, miR-22-3p, miR-4486 및 let-7b-5p의 발현이 증가하였다. miR-4284는 췌장암 및 간내 담관암 샘플에서만 발현이 나타났으며, 정상 대조군에서는 발현이 나타나지 않았다. 또한, miR-346는 간내 담관암 샘플 및 정상 대조군 샘플에서만 발현이 나타났으며, 췌장암 환자 샘플에서는 발현되지 않았다.

[0125] 본 발명의 췌장암을 진단해낼 수 있는 miRNA 바이오마커 서열은 하기 표 6에 정리된 바와 같다.

표 6

서열번호	miRNA	서열(5'-3')
1	miR-155-5p	UUAAUGCUGAAUCGUGAUAGGGGUU
2	miR-4284	GGGCUCACAUCACCCCAU
3	miR-346	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCU
4	miR-7154-5p	UUCAUGAACUGGGUCUAGCUUGG
5	miR-5100	UUCAGAUCCCAGCGGUGCCUCU
6	miR-661	UGCCUGGGUCUCUGGCCUGCGCGU
7	miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU
8	miR-4486	GCUGGGCGAGGCUGGCA
9	let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
10	miR-4703-5p	UAGCAAUACAGUACAAAUAUAGU

[0126]

[0127] 이와 같은 본 발명의 miRNA 마커는 췌장암의 조기 진단에 활용될 수 있으며, 이를 통해 췌장암의 진단을 할 수 있는 상용 모델 개발의 주요 플랫폼 역할을 할 것으로 기대된다.

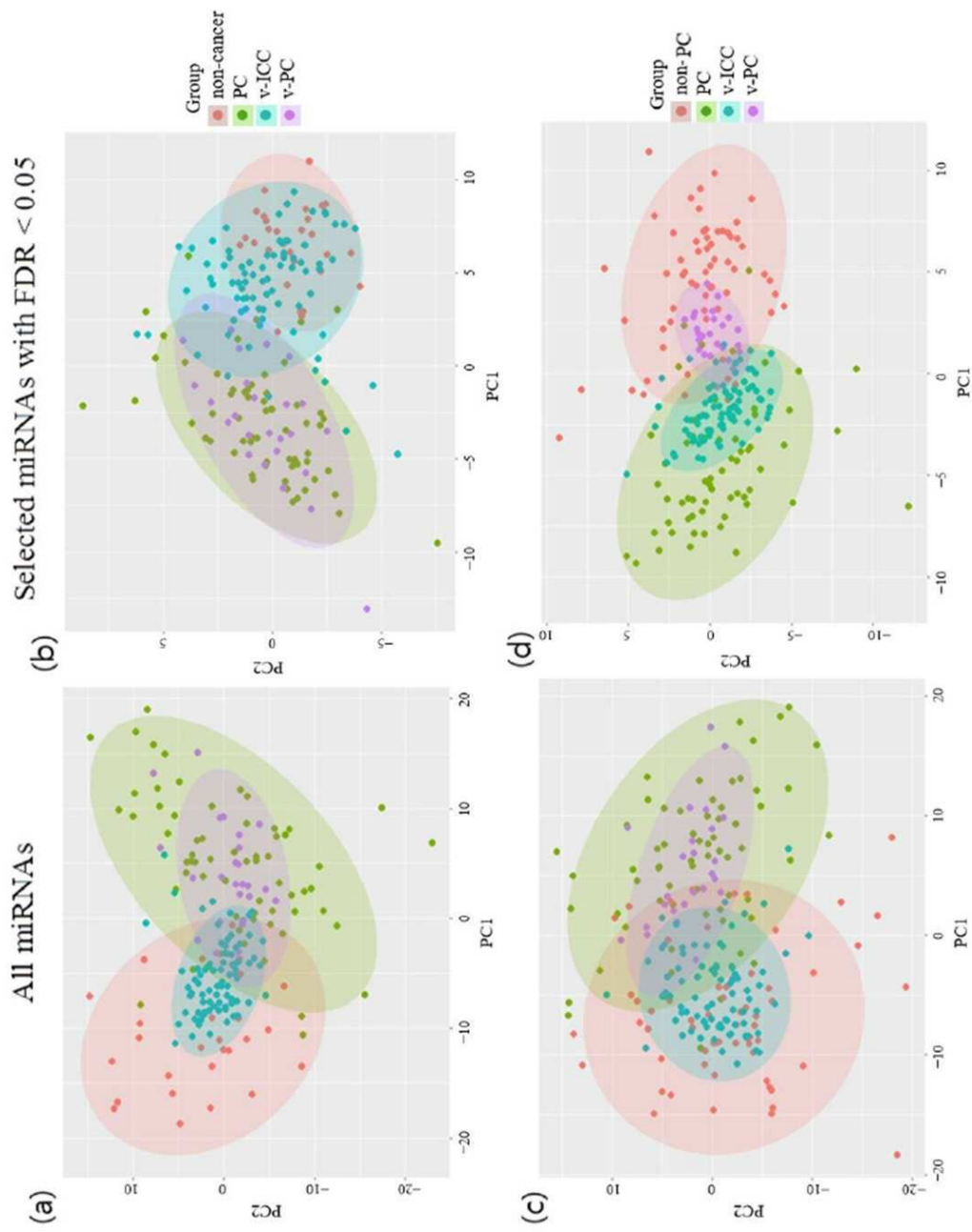
[0128] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0129] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

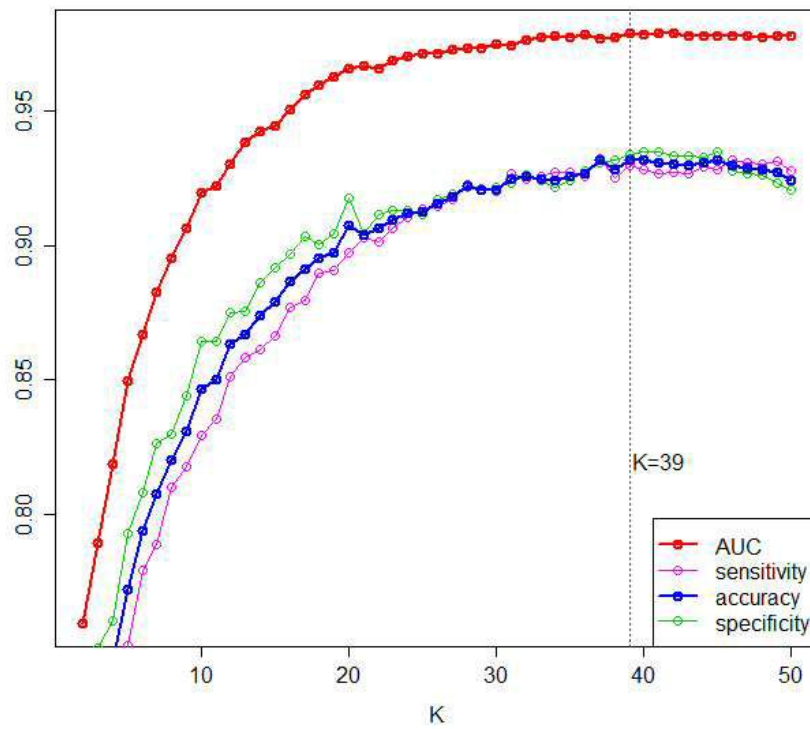


도면

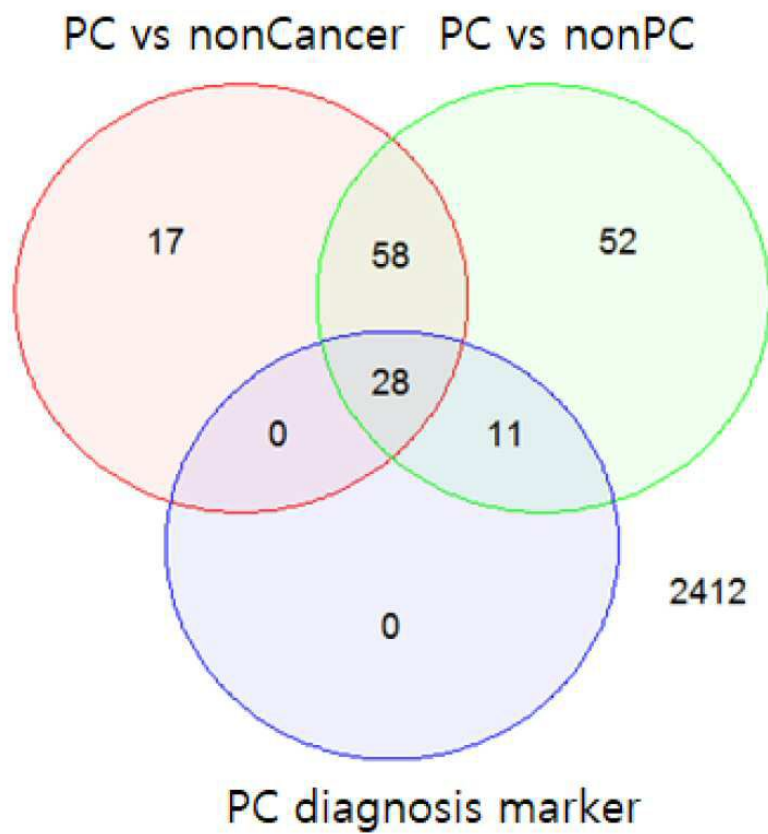
도면1



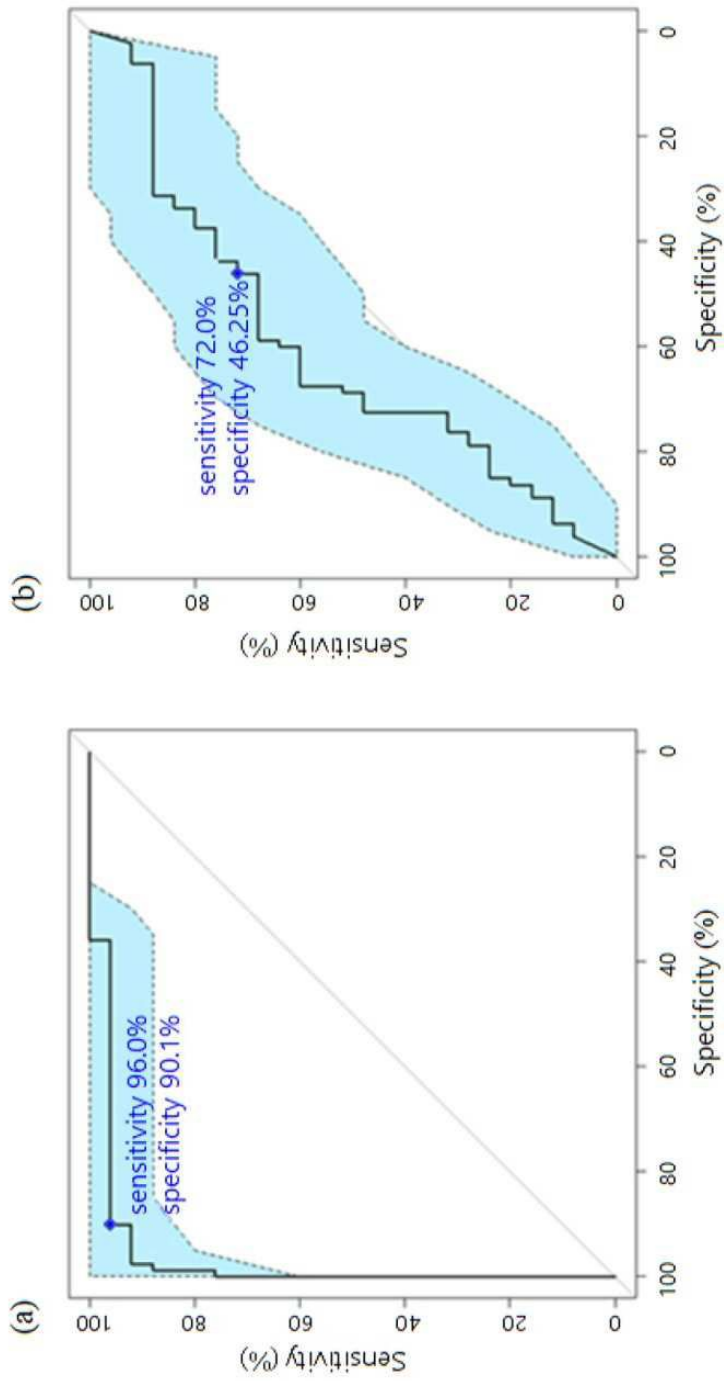
도면2



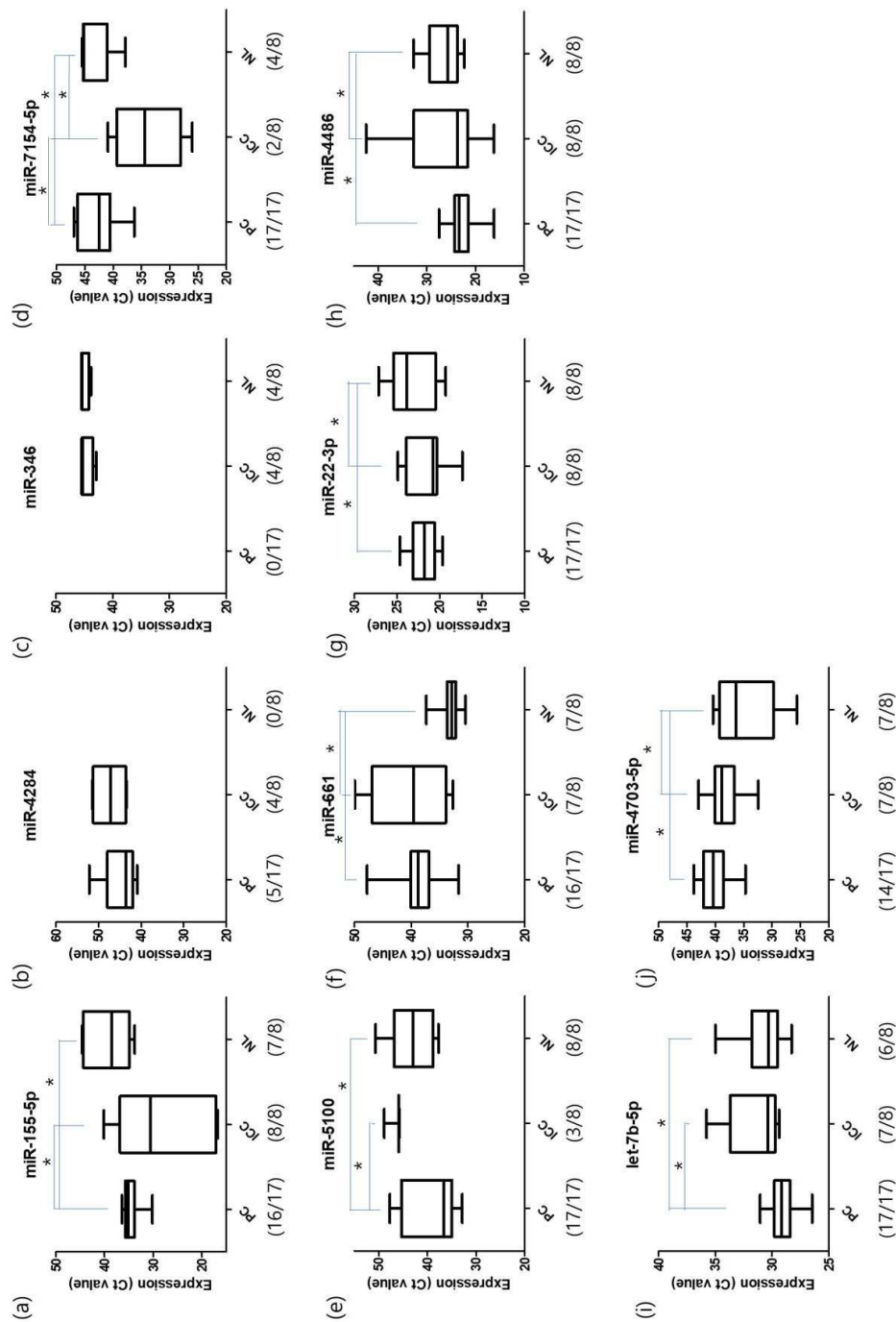
도면3



도면4



## 도면5



## 서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> NOVEL PANCREATIC CANCER BIOMARKER AND USES THEREOF
- <130> 21PP31219
- <150> KR 10-2021-0005227
- <151> 2021-01-14
- <160> 10
- <170> KoPatentIn 3.0

<210> 1  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miR-155-5p  
 <400> 1  
 uuaaugcuaa ucgugauagg gguu 24  
 <210> 2  
 <211> 18  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 ><223> miR-4284  
 <400> 2  
 gggcucacau caccceau 18  
 <210> 3  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miR-346  
 <400> 3  
 ugucugcccg caugccugcc ucu 23  
 <210> 4  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miR-7154-5p  
 <400> 4  
 uucaugaacu gggucuagcu ugg 23  
 <210> 5  
 <211>  
 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miR-5100

<400>	5	
uucagauccc agcggugccu cu		22
<210>	6	
<211>	24	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-661	
<400>	6	
ugccuggguc ucuggccugc gcgu		24
<210>	7	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-22-3p	
<400>	7	
aagcugccag uugaagaacu gu		22
<210>	8	
<211>	17	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-4486	
<400>	8	
gcugggcgag gcuggca		17
<210>	9	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	let-7b-5p	
<400>	9	
ugagguagua gguugugugg uu		22
<210>	10	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> miR-4703-5p

<400> 10

uagcaauaca guacaaauau agu

23