



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0105155

(43) 공개일자 2021년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2018.05)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0019763

(22) 출원일자 2020년02월18일

심사청구일자 2020년02월18일

(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)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 하나

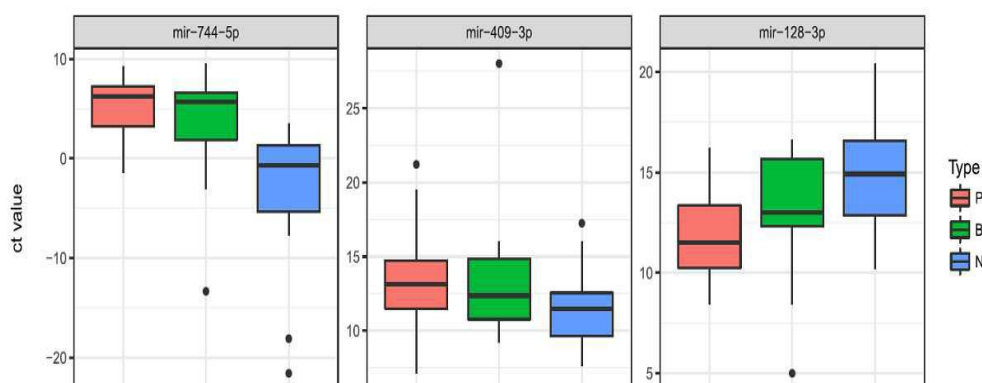
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 암 진단용 바이오마커 및 이의 용도

## (57) 요약

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

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/178 (2013.01)

(72) 발명자

**박수빈**

서울특별시 마포구 월드컵로34길 13, 1316호(성산동)

**조서애**

서울특별시 서초구 잠원로 60, 106동 602호(잠원동, 신반포자이)

---

**김권도**

서울특별시 관악구 관악로 1(신림동)

**유동안**

서울특별시 관악구 남부순환로218길 32, 206호(봉천동)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

mir-744-5p, mir-409-3p, mir-128-3p, mir-142-5p, mir-222-3p 및 mir-6852-5p 로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 담도암 및 췌장암의 진단용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 mir-744-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고,

상기 mir-409-3p는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고,

상기 mir-128-3p는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고,

상기 mir-142-5p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고,

상기 mir-222-3p는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고,

상기 mir-6852-5p는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것인, 담도암 및 췌장암의 진단용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

miRNA에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 miRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드인 것인, 담도암 및 췌장암의 진단용 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

mir-744-5p, mir-409-3p 및 mir-128-3p에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 담도암 및 췌장암의 진단용 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 진단용 조성물은 담도암 및 췌장암을 조기에 구분하여 진단하는 것을 특징으로 하는, 담도암 및 췌장암의 진단용 조성물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 담도암 및 췌장암의 진단용 키트.

#### 청구항 7

- a) 개체로부터 분리된 시료에서 mir-744-5p, mir-409-3p, mir-128-3p, mir-142-5p, mir-222-3p 및 mir-6852-5p 로 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, 담도암 및 췌장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

## 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 mir-744-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고,

상기 mir-409-3p는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고,

상기 mir-128-3p는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고,

상기 mir-142-5p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-222-3p는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고,

상기 miR-6852-5p는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것인, 담도암 및 췌장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

## 청구항 9

제7항에 있어서,

상기 mir-744-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나;

상기 mir-409-3p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나;

상기 mir-128-3p의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나;

상기 mir-142-5p의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나;

상기 mir-222-3p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나;

상기 mir-6852-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소한 경우, 담도암 또는 췌장암으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 담도암 및 췌장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

## 청구항 10

제7항에 있어서,

상기 a) 단계는 mir-744-5p, mir-409-3p 및 mir-128-3p에 대한 발현 수준을 측정하여 담도암 및 췌장암을 구분하는 것을 추가로 포함하는, 담도암 및 췌장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

## 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 mir-744-5p 및 mir-409-3p의 PCR 임계 사이클(threshold cycles, Ct) 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 증가하고,

상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 감소하며,

mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정한 상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값이 10 이상 13미만일

때 채장암으로 판단하는 것인, 담도암 및 채장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 12

제10항에 있어서,

상기 mir-744-5p 및 mir-409-3p의 PCR 임계 사이클(threshold cycles, Ct) 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 증가하고,

상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 감소하며,

mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정한 상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값이 13 이상 17미만일 때 담도암으로 판단하는 것인, 담도암 및 채장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 13

제7항에 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, 담도암 및 채장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 14

제7항에 있어서,

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

#### 청구항 15

a) 검체 시료에 담도암 및 채장암 치료제 후보물질을 처리하는 단계;

b) 상기 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 검체 시료를 mir-744-5p, mir-409-3p, mir-128-3p, mir-142-5p, mir-222-3p 및 mir-6852-5p 로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 측정하는 단계; 및

c) 상기 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 miRNA 발현 수준을 정상 대조구 시료의 해당 miRNA 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 담도암 및 채장암 치료제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서,

상기 miRNA에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 miRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드인 것인, 담도암 및 채장암 치료제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 17

제15항에 있어서,

상기 mir-744-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고,  
 상기 mir-409-3p는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고,  
 상기 mir-128-3p는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고,  
 상기 mir-142-5p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고,  
 상기 miR-222-3p는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고,  
 상기 miR-6852-5p는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것인, 담도암 및 췌장암 치료제의 스크리닝 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

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

### 배경 기술

[0002] 세계적으로 암 발병 환자의 수는 해마다 증가되고 있는 추세이며, 국내에서도 지속적으로 증가하고 있다. 그 중 유방암, 위암, 대장암, 난소암, 간암, 전립선암, 췌장암 및 폐암은 전세계적으로 가장 높은 발병률을 보이고 있으며, 특. 이러한 암의 치료 효율은 조기 진단 여부에 따라 달라지게 된다. 암의 조기 진단은 그 어떤 치료법보다 효과적으로 암 사망률을 낮출 수 있기 때문에, 암의 조기 진단은 개인 뿐만 아니라 국가적인 차원에서도 의료비 절감에 있어서 매우 큰 의미를 가지고 있다.

[0003] 담도암의 예후는 유병율과 사망률이 비슷한 수준으로 매우 좋지 않으며, 아직까지 정립된 치료 방법도 없고, 근처적 절제가 완치를 기대할 수 있는 유일한 치료법이지만, 80% 이상에서 진단 당시 수술이 불가능하고 수술을 하여도 재발이나 전이가 흔하기 때문에 5년 생존률은 5% 미만이다. 담도암은 주위의 조직에 스며들듯이 퍼지는 일이 많고, 명료한 중앙 덩어리를 형성하지 않으므로, 그 덩어리를 정확하게 확인하고 진단하는 것은 쉽지 않아 이로 인한 사망률이 더욱 증가하게 된다.

[0004] 담도암으로 확진을 받기까지 통상적인 진료과정은 다음과 같다. 일반적으로 환자가 황달, 복부 불편감, 체중 감소 등의 증상으로 병원을 내원하게 되면, 1차적으로 영상학적 검사인 복부초음파 (abdominal ultrasound, US), 내시경 초음파 (endoscopic ultrasound, EUS), 복부전산화 단층촬영 (computed tomography, CT)이나 복부자기 공명영상(magnetic resonance imaging, MRI)을 통해 담도암의 존재여부를 의심하게 되는데, 실질적으로 상기 영상학적 검사를 통해서도 종괴를 형성한 담도암에 대해서만 진단의 실효가 있고 비-종괴형성 담도암에 있어서는 영상검사만으로 진단이 어려움에 따라 담도암의 확정적인 진단을 위해서는 추가적인 병리검사가 요구된다.

[0005] 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 근처적 절제가 불가능한 상태에서 발견되기 때문에 예후가 불량하고 치료는 주로 항암 요법에 의존하고 있으므로, 그 어떤 인체 암보다도 조기 진단법 개발이 절실히 요망되고 있다.

[0006] 췌장암 또는 췌장암 전구 병변의 진단은 혈액 검사, 위, 십이지장의 X선 조영검사, 피부 및 간을 통한 담도촬영과 역행성 내시경 담도촬영술 사용되고 있다.

[0007] 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.

[0008] 상기와 같이 담도암 및 췌장암은 조기 진단이 어려우면서도 사망률이 높은 질환으로서, 증세가 나타나기 전 초기에 정확히 진단할 수 있는 마커의 개발, 진단방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2015-0043790호  
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제 10-1463182호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 담도암 및 췌장암의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.  
[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 진단용 조성물을 포함하는 담도암 및 췌장암의 진단용 키트를 제공하는 것이다.  
[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 담도암 및 췌장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.  
[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 담도암 및 췌장암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0014] 상기과 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 mir-744-5p, mir-409-3p, mir-128-3p, mir-142-5p, mir-222-3p 및 mir-6852-5p 로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 담도암 및 췌장암의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 구체적으로, 상기 mir-744-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-409-3p는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-128-3p는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-142-5p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-222-3p는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-6852-5p는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0016] 담관은 간에서 만들어지는 담즙을 십이지장으로 보내는 관으로서, 간 속에서 나뭇가지가 하나의 가지를 향해 모이듯이 서서히 합류하면서 굽어지며, 간에서 나올 때에 좌우의 담관이 대부분 하나로 합류하게 된다. 담관은 간 속을 지나는 간내 담관과 간을 벗어나 십이지장까지 이어지는 간의 담관으로 나뉜다. 간의 담관 중 담즙을 일시적으로 저장하여 농축하는 주머니를 담낭이라 부르며, 이들 간내의 담관과 담낭을 통틀어 담도라고 부른다.
- [0017] 본 발명에서, “담도암(biliary tract cancer)”은 담관암이라고도 하며, 담관의 상피에서 발생하는 악성종양으로서 발생 부위에 따라 간내 담도암과 간의 담도암의 두 종류로 나뉘는데, 일반적으로 담도암이라고 하면 주로 간의 담관에 발생한 암을 가리킨다. 본 발명에서는 달리 지시되지 않는 한 간내 담도암 및 간의 담도암을 모두 포함한다.
- [0018] 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.
- [0019] 또한 췌장은 두께가 2 cm 정도로 얇으며 피막만으로 싸여 있는데다가 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.
- [0020] 췌장암과 담도암은 기본적으로 해부학적인 위치가 다르므로, 진단시에 영상 검사를 통해 구분이 가능하다. 내시경 초음파 검사와 더불어 CT, MRI, PET 검사에서 발생 위치를 구분 가능하다. 위치적으로 유사한 췌장 두부암과 하부 담도암의 경우 수술 조직이나 영상 검사에서 cancer 의 epicenter 가 더 가까운 장기를 원발 장기로 판단한다.
- [0021] 본 발명에서, “췌장암(pancreatic cancer)”은 췌장에 생긴 암세포로 이루어진 종괴이다. 췌장암에는 여러 가지 종류가 있으며 췌관 세포에서 발생한 췌관 선암종이 90% 정도를 차지하고 있는 췌관 선암종과 함께 낭종성암(낭선암), 내분비종양을 모두 포함한다.
- [0022] 본 발명에서는 상기과 같은 담도암 및 췌장암을 증세가 나타나기 전이라도 진단할 수 있는 정확도 및 민감도가

높은 바이오마커를 규명하여 진단용 조성물로 개발하였다.

- [0023] 본 발명에서, 상기 “제제”는 mir-744-5p, mir-409-3p, mir-128-3p, mir-142-5p, mir-222-3p 및 mir-6852-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 물질로서, 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 프라이머는 짧은 자유 3말단 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.
- [0025] 본 발명에서, “”는 통상 헤어핀 모양 구조의 RNA 전구체로서 전사되고, mRNA의 번역 억제에 관여할 수 있는 15~25염기의 비코딩 RNA를 말한다. 또한, 본 발명의 miRNA는 상기 mir-744-5p, mir-409-3p, mir-128-3p, mir-142-5p, miR-222-3p, miR-6852-5p의 특정 염기서열(또는 서열번호)로 나타내어지는 miRNA뿐만 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 1내지 6의 miRNA의 상보서열과 하이브리다이징하는 염기서열을 갖는 miRNA를 포함할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 명세서에서 사용하는 miRNA는 miR 유전자의 유전자 산물일 수 있으며, 이러한 유전자 산물은 성숙 miRNA(예를 들면, 상기와 같은 mRNA의 번역 억제에 관여하는 15~25염기 또는 19~25염기의 비코딩 RNA) 또는 miRNA 전구체(예를 들면, 상기와 같은 pre-miRNA 또는 pri-miRNA)를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서는 위 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 담도암 및 췌장암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0028] 상기 프로브는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수십 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 말한다. 프로브는 올리고뉴클레오티드(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 담도암 및 췌장암을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건, 라벨링 여부는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0029] 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.
- [0030] 본 발명 일 실시예에서는 상기 mir-744-5p, mir-409-3p, mir-128-3p, mir-142-5p, mir-222-3p 및 mir-6852-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA의 조합을 통해 높은 정확도 및 민감도로 담도암 및 췌장암을 진단할 수 있음을 확인하였다.
- [0031] 더욱 구체적으로, 본 발명의 담도암 및 췌장암의 진단용 조성물은 mir-744-5p, mir-409-3p 및 mir-128-3p에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명 일 실시예에서는 특히 전체적인 누적 정확도에 있어 mir-142-5p, mir-128-3p 및 mir-222-3p의 누적 정확도가 92.7%로 매우 높게 나타남을 확인하였는 바, 담도암 및 췌장암 환자에서 mir-744-5p, mir-409-3p의 발현이 정상인 대비 적은 양이 존재하고 mir-128-3p의 발현이 많으므로, 상기 3개의 miRNA를 조합하여 혈액 분석을 통해 발견이 어려운 담도암 및 췌장암을 진단해낼 수 있음을 확인하였다.
- [0033] 구체적으로, 상기 mir-744-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나; 상기 mir-409-3p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나; 상기 mir-128-3p의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나; 상기 mir-142-5p의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나; 상기 mir-222-3p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나; 상기 mir-6852-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소한 경우, 담도암 또는 췌장암으로 판단할 수 있다.
- [0034] 더욱 구체적으로, 상기 mir-744-5p 및 mir-409-3p의 PCR 임계 사이클(threshold cycles, Ct) 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 증가하고, 상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 감소하며, mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정한 상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값이 10 이상 13미만일 때 췌장암으로 판단될



수 있다.

- [0035] 또한, 상기 mir-744-5p 및 mir-409-3p의 PCR 임계 사이클(threshold cycles, Ct) 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 증가하고, 상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 감소하며, mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정한 상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값이 13 이상 17미만일 때 담도암으로 판단될 수 있다.
- [0036] 상기와 같은 mir-744-5p 및 mir-409-3p의 PCR 임계 사이클 값의 대조군 대비 증가는 mir-744-5p 및 mir-409-3p 발현양이 대조군 대비 감소한 것으로 해석될 수 있다. 또한, mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값의 대조군 대비 감소는 mir-128-3p의 발현양이 대조군 대비 증가한 것으로 해석될 수 있다.
- [0037] 이에 따라, 본 발명의 진단용 조성물은 담도암 및 췌장암을 조기에 구분하여 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 담도암 및 췌장암 진단용 바이오마커로서, 상기 miRNA 마커는 하나만을 사용할 수도 있고, 두 개 이상의 조합으로 사용하여 정상 대조군으로부터 담도암 및 췌장암의 진단 및/또는 예후, 담도암 및 췌장암의 진행 상태를 구분할 수 있는 변별력을 향상시키는 방법으로 활용할 수 있다. 본 발명의 상기 miRNA 마커 중 최적의 효과를 나타내는 조합을 선별하여 사용할 수 있으며, 당업자라면 용도에 맞는 적절한 조합을 선택하여 사용할 수 있다. 구체적인 일 예로 mir-744-5p, mir-409-3p 및 mir-128-3p의 조합을 선택하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 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, 담도암 및 췌장암을 구분하여 진단하는 것을 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로는 담도암 및 췌장암의 증상이 인지되기 전 초기에 진단하는 것으로 포함한다.
- [0040] 본 발명의 다른 일 측면은 상기 담도암 및 췌장암의 진단용 조성물을 포함하는 담도암 및 췌장암의 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0041] 본 발명의 키트는 담도암 및/또는 췌장암의 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.
- [0042] 상기 진단용 키트는 용액, 동결건조 분말, 냉동 용액, 또는 스트립 형태를 포함할 수 있으며, 각각의 형태는 당업계에서 통상적인 방법으로 제제화할 수 있다. 또한 키트를 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 개체로부터 분리된 시료에서 mir-744-5p, mir-409-3p, mir-128-3p, mir-142-5p, mir-222-3p 및 mir-6852-5p 로 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, 담도암 및 췌장암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0044] 구체적으로, 상기 mir-744-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-409-3p는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-128-3p는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-142-5p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-222-3p는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-6852-5p는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0045] 구체적으로, 상기 mir-744-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나; 상기 mir-409-3p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나; 상기 mir-128-3p의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나; 상기 mir-142-5p의 발현이 정상 대조군 대비 증가하거나; 상기 mir-222-3p의 발현이 정상 대조군 대비 감소하거나; 상기 mir-6852-5p의 발현이 정상 대조군 대비 감소한 경우, 담도암 또는 췌장암으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0046] 또한 구체적으로, 상기 a) 단계는 mir-744-5p, mir-409-3p 및 mir-128-3p에 대한 발현 수준을 측정하여 담도암 및 췌장암을 구분하는 것을 추가로 포함하는 것일 수 있다. 이를 위해 환자 및 정상인에 일정 값으로 존재하는 것으로 알려진 mir-451a 값으로 발현 PCR 임계 사이클(threshold cycles, Ct) 값을 보정하여 값을 통해 판단할

수 있다.

- [0047] 더욱 구체적으로, 상기 mir-744-5p 및 mir-409-3p의 PCR 임계 사이클(threshold cycles, Ct) 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 증가하고, 상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 감소하며, mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정한 상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값이 10 이상 13미만일 때 췌장암으로 판단할 수 있다.
- [0048] 또한, 상기 mir-744-5p 및 mir-409-3p의 PCR 임계 사이클(threshold cycles, Ct) 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 증가하고, 상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값은 mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정하였을 때 대조군에 비해 감소하며,
- [0049] mir-451a의 PCR 임계 사이클 값을 기준으로 보정한 상기 mir-128-3p의 PCR 임계 사이클 값이 13 이상 17미만일 때 담도암으로 판단할 수 있다.
- [0050] 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.
- [0051] 상기와 같은 비마커 임상정보를 추가로 분석함으로써 담도암 및 췌장암의 진단 또는 예후 예측에 관한 정보를 보다 구체적으로 얻을 수 있으며, 이러한 비마커 임상정보는 상기에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에서, 상기 시료는 혈액, 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액 또는 뇨인 것일 수 있으며, 담도암 및 췌장암의 진단에 적용될 수 있는 시료에 해당하면 상기 예시에 제한되지 않고 시료로서 적용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 검체 시료에 담도암 및 췌장암 치료제 후보물질을 처리하는 단계; b) 상기 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 검체 시료를 mir-744-5p, mir-409-3p, mir-128-3p, mir-142-5p, mir-222-3p 및 mir-6852-5p 로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 발현 수준을 측정하는 단계; 및 c) 상기 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 miRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료의 해당 miRNA 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 담도암 및 췌장암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0054] 구체적으로, 상기 miRNA에 대한 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 miRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드인 것일 수 있다.
- [0055] 또한 구체적으로, 상기 mir-744-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-409-3p는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-128-3p는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-142-5p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-222-3p는 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고, 상기 mir-6852-5p는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0056] 본 발명의 조성물을 이용하여 담도암 및/또는 췌장암의 발병 여부를 확인할 수 있는 바, 담도암 및 췌장암 치료제 후보물질을 처리한 시료에 대한 바이오마커 miRNA의 발현 수준을 측정함으로써 담도암 및 췌장암에 대한 치료 효과를 확인하여 담도암 및/또는 췌장암 치료제를 스크리닝 할 수 있다.
- [0057] 상기 “후보물질”은 담도암 및/또는 췌장암 증상 또는 원인을 감소, 방지 또는 제거시키는 활성이 있는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질(예를 들어, 각종 천연물, 화합물 라이브러리, 유전자 또는 단백질 라이브러리 등)을 말한다.
- [0058] 상기 “치료제”는 담도암 및/또는 췌장암에 대한 약리활성을 나타내는 것으로 알려진, 혹은 나타내는 것으로 확인된 약물(약제학적 조성물), 건강기능식품 또는 식이요법 등을 모두 포함한다.
- [0059] 일 예로, 담도암 및/또는 췌장암에 대한 약리활성이 있을 것으로 예상되는 후보 물질을 적용한 후 담도암 및/또는 췌장암으로 진단된 대상체의 민감성을 진단하거나 예후를 확인함으로써 후보 물질 중 담도암 및/또는 췌장암에 대해 약리활성을 나타내는 물질을 스크리닝 하는 데 적용될 수 있다.

### 발명의 효과

- [0060] 본 발명의 조성물은 증상이 나타나기 전 초기에도 높은 정확성과 민감도로 담도암 및 췌장암 진단이 이루어질

수 있도록 함으로써, 조기에 치료가 가능하도록 하는 바, 담도암 및/또는 췌장암 진단에 대한 활용 가능성이 매우 높다.

[0061] 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

[0062] 도 1은 차등적 혈청 miRNA의 발현을 PCA 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 55개 샘플에서의 혈청 miRNA의 발현을 시각화한 것이다. 가장 왼쪽의 3개의 막대 도표는 3개의 pairwise t test에서 miRNA 발현의 fold change(>2 fold)를 나타낸 것이다(BP: BTC vs. PC; PN: PC vs. HC; 및 BN: BTC vs. HC). 배수 변화의 방향성은 녹색(위)과 빨간색(아래)로 나타내었다.

도 3은 K-최근접 이웃 알고리즘의 최적화 파라미터를 계산한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 각 그룹 분류 분석에서의 miRNA 수에 따른 정확도 및 민감도를 분석한 결과를 나타낸 것이다(a. 3 그룹 분류 분석; b. 2 그룹 분류 분석).

도 5는 qRT-PCR에 의해 검증된 3개 miRNA(mir-744-5p, mir-409-3p 및 mir-128-3p)의 발현을 확인한 박스 플롯(Box plot)을 나타낸 것이다(빨간색: PC 그룹, 초록색: BTC 그룹, 파란색: HC 그룹).

도 6은 qRT-PCR 분석시 보정의 기준값이 된 mir-120a의 Ct 값을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

#### [0064] 실시예 1. 샘플 분석

##### [0065] 1-1. 샘플 정보

[0066] 24개의 췌장암 환자 혈청 샘플(Pancreatic cancer, PC), 10개의 담도암 환자 혈청 샘플(Biliary tract cancer, BTC) 및 대조군인 건강한 사람 21개 샘플(Healthy control, HC), 총 55개 샘플을 분석하였으며, 55개 샘플의 요약 정보는 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

	Pancreatic cancer (n=24)	Biliary tract cancer (n=10)	Healthy control (n=21)
Age, year, mean $\pm$ SD	62.8 $\pm$ 11.1	62.8 $\pm$ 7.8	43.9 $\pm$ 11.8
Sex (%)			
Male	11 (45.8%)	7 (70.0%)	15 (71.4%)
Female	13 (54.2%)	3 (30.0%)	6 (28.6%)
Diabetes (%)	8 (33.3%)	5 (50.0%)	1 (4.8%)
Hypertension (%)	12 (50.0%)	3 (30.0%)	1 (4.8%)
Smoking (%)	4 (16.7%)	5 (50%)	0 (0.0%)
BMI, kg/m <sup>2</sup> , mean $\pm$ SD	21.7 $\pm$ 2.9	23.2 $\pm$ 3.9	23.8 $\pm$ 3.8
CA19-9, U/ml, mean $\pm$ SD	3444.5 $\pm$ 6543.2	807.1 $\pm$ 1457.9	7.9 $\pm$ 6.9
Tumor size, mm, mean $\pm$ SD	31.2 $\pm$ 11.1	34.2 $\pm$ 26.5	n/a
Stage (%)			
I	2 (8.3%)	2 (20.0%)	n/a
II	9 (37.5%)	3 (60.0%)	n/a
III	0 (0.0%)	1 (10.0%)	n/a
IV	13 (54.2%)	4 (40.0%)	n/a
Recurrence after surgery (%)	4/11 (36.4%)	7/8 (87.5%)	n/a
DFS, median (range)	10.5 (3.1-46.8)	15.9 (2.1-44.1)	n/a
OS, month, median (range)	15.2 (3.7-56.8)	21.7 (2.8-44.7)	n/a

Abbreviations: SD, standard deviation; BMI, body mass index; DFS, disease-free survival; OS, overall survival

[0067]

[0068] 구체적으로, HC 샘플 중 2개 샘플(N01 및 N02)은 간내 및 담낭 결석이 있는 것으로 진단되었다. HC의 평균 연령

(43.9세)은 PC 및 BTC 환자의 평균 연령(평균 연령: 각각 62.75세 및 62.8세) 보다 낮았다. PC 그룹의 남성 비율(54.2%)은 여성보다 높았지만, BTC(30% 남성) 및 HC(28.5% 남성) 그룹의 경우는 그렇지 않았다.

[0069] 1-2. 혈청 샘플에서의 miRNA 추출

[0070] 혈청 샘플을 10-mL BD 혈청 튜브에 수집하고 4° C에서 3,000 rpm으로 20분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 얻은 후, 제조사의 지시에 따라 혈청 miRNA 정제 키트(Genolution, Seoul, Korea)를 사용하여 샘플로부터 miRNA를 함유하는 총 RNA를 추출하였다.

[0071] 1-3. miRNA 시퀀싱(Sequencing) 및 cDNA 합성

[0072] NEXTflex small RNA-seq kit(Bioo Scientific, Austin, TX, USA)를 사용하여 50-bp single-end 상기 1-2에서 추출한 miRNA의 시퀀싱을 수행하였다.

[0073] 구체적으로, 작은 RNA 분자를 어댑터 결합을 통해 1 µg의 총 RNA로부터 분리한 후, 역-전사를 프라이밍을 통해 단일 가닥 cDNA를 합성하였다. 상기 합성한 cDNA를 주형으로 하여, PCR을 통해 이중가닥 cDNA를 제조하고, 겔 전기 영동 후 크기 선택에 따라 서열 분석을 위해 단편 (~150 bp)을 추출하였다.

[0074] cDNA 라이브러리 품질은 Agilent 2100 BioAnalyzer(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 평가하였으며, 이후 제조사 프로토콜에 따라 KAPA 라이브러리 정량 키트(Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA)를 이용하여 정량화 하였다. 템플릿의 클러스터 증폭 후, Illumina HiSeq2500 시스템(Illumina, San Diego, CA, USA)을 사용하여 싱글-엔드(50bp) 시퀀싱을 수행하였다.

[0075] 실시예 2. miRNA-seq 데이터 전-처리 및 발현 정량화

[0076] fastQC-0.11.3을 사용하여 미가공 서열 데이터에 대해 품질관리(Quality control)를 수행한 후, 시퀀스 정렬 전에 Trimmomatic-0.32를 사용하여 잠재적 어댑터와 저-품질 시퀀스를 제거하였다. ~ 16-35 bp 길이 이내의 다듬어진 판독값을 걸러냈다. miRBase version 21 에 대해 판독 값을 정렬하고 miRDeep2 를 사용하여 정량화하였다. miRNA 서열과의 고유 일치치를 정량화하고, 2개 이상의 샘플에서 발현된 miRNA (> 10회 판독)를 추적하였다.

[0077] 실시예 3. miRNA 바이오마커의 일차 선별

[0078] 3-1. 담도암, 췌장암 및 대조군 그룹에서 차등적으로 발현된 miRNA 선별

[0079] 인간 miRNA 데이터베이스(miRBase v21; <http://www.mirbase.org/>)를 통해 miRNA 서열 데이터를 정렬 후, 혈액 샘플에서 677개의 miRNA가 검출됨을 확인하였다. 이후 주성분 분석(PCA)은 개별 샘플의 지정된 그룹에 관한 정보를 사용하지 않고 2차원 산점도에서 샘플 분포를 시각화하여 암과 대조군 그룹 사이에 별도의 클러스터를 나타내었다.

[0080] 677개 miRNA의 통계 분석을 수행하여 세 그룹(PC, BTC 및 HC)을 잠재적으로 구별할 수 있는 차등적으로 발현된 miRNA를 확인하였다. 연령, 성별 및 체질량 지수(BMI)를 포함한 임상적 공변량에 대한 다중 회귀 분석 및 조정 후, 차등적으로 발현된 42개의 후보 miRNA를 확인하였다[false discovery rate (FDR)-adjusted  $p \leq 0.05$ ]. 이후 상기 42개 miRNA에 대해 주성분 분석(Principal component analysis, PCA)을 수행하였다.

[0081] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 그룹 간 샘플이 밀접하게 분포되며, 담도암 환자 그룹(BTC) 및 췌장암 환자 그룹(PC)의 샘플 분포가 유사하게 나타남으로써, PCA 분석만으로는 담도암 및 췌장암을 명확히 구별할 수 없음을 확인하였다.

[0082] 또한, 상기 42개 miRNA의 발현 수준을 시각화한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 간내 결석 및 담낭 결석으로 진단된 대조군(HC) 그룹의 두 개체(N01, N02)를 포함하는 일부 특이치를 제외하고 암 그룹(PC, BTC)과 대조군 그룹 간에는 명확히 패턴이 구별되어 나타남을 확인하였다. 다만, PCA 분석 결과와 유사하게 담도암 및 췌장암의 구별이 명확하지 않았다.

[0083] 3-2. 그룹 분류 분석(Classification analysis)

[0084] 담도암 및 췌장암을 진단할 수 있는 miRNA 서브셋(subset)을 선별하기 위하여, 그룹 분류 분석을 수행하였다. BTC, PC 및 HC로 구분된 3그룹 분류 분석, 암 그룹(BTC, PC) 및 HC 그룹으로 분류된 2그룹 분류 분석으로 구분하여 수행하였다.

[0085] 구체적으로, 대표성 휴리스틱 방법(representative heuristic method)인 K-최근접 이웃 알고리즘(K-nearest neighbor, KNN)으로 가장 가까운 이웃의 다수결(majority voting)에 따라 분류하였다. KNN 알고리즘을 사용하여

miRNA를 선택하고 miRNA-발현 값 사이를 유클리디안 거리 측정법에 따라 건강 상태가 다른 환자를 분류하였다.

[0086] KNN 분류 시 최적의 K 값을 선택하는 것은 중요하며, 본 발명에서는 다수결 비율 및 부트스트래핑(bootstrapping)에 의해 생성된 정확도를 기반으로 K=11의 가장 가까운 이웃을 선별하였다(도 3). miRNA 세트의 분류 모델을 단일 관측치를 제거한 교차 검증으로 평가하였다.

[0087] 3그룹 분류 분석에 따른 miRNA의 평가 결과는 하기 표 2에 나타난 바와 같다. 이 중 8개의 miRNA, mir-1246, mir-6131, mir-7641, mir-4454, mir-4707-3p, mir-483-3p, mir-1302 의 fold change가 2배 이상 차이를 나타내었으나, 담도암 및 췌장암을 구분하는 것에 대해서는 한계가 있었다.

표 2

[0088]

miRNA	Accuracy	P_sensitivity	P_specificity	B_sensitivity	B_specificity	N_sensitivity	N_specificity
mir-128-3p	70.9%	83.3%	64.5%	0.0%	100.0%	90.5%	85.3%
mir-142-5p	70.9%	83.3%	61.3%	0.0%	100.0%	90.5%	88.2%
mir-222-3p	70.9%	95.8%	58.1%	0.0%	100.0%	76.2%	91.2%
mir-361-5p	69.1%	75.0%	74.2%	0.0%	100.0%	95.2%	73.5%
mir-6852-5p	69.1%	91.7%	58.1%	0.0%	100.0%	76.2%	88.2%
mir-3150b-3p	67.3%	83.3%	58.1%	0.0%	100.0%	81.0%	85.3%
mir-4773	67.3%	75.0%	71.0%	0.0%	100.0%	90.5%	73.5%
let-7g-5p	63.6%	58.3%	80.6%	0.0%	100.0%	100.0%	58.8%
<b>mir-4492</b>	<b>63.6%</b>	<b>75.0%</b>	<b>64.5%</b>	<b>0.0%</b>	<b>100.0%</b>	<b>81.0%</b>	<b>73.5%</b>
mir-744-5p	63.6%	70.8%	67.7%	0.0%	88.9%	85.7%	85.3%
mir-15a-5p	61.8%	62.5%	74.2%	0.0%	100.0%	90.5%	61.8%
mir-223-5p	61.8%	70.8%	54.8%	0.0%	97.8%	81.0%	82.4%
mir-424-3p	61.8%	66.7%	64.5%	20.0%	95.6%	76.2%	76.5%
mir-30a-3p	60.0%	66.7%	67.7%	0.0%	100.0%	81.0%	64.7%
mir-127-3p	58.2%	66.7%	54.8%	0.0%	91.1%	76.2%	85.3%
mir-20a-5p	58.2%	58.3%	64.5%	0.0%	100.0%	85.7%	64.7%
mir-24-3p	58.2%	66.7%	51.6%	0.0%	95.6%	76.2%	82.4%
mir-32-3p	58.2%	70.8%	51.6%	0.0%	100.0%	71.4%	76.5%
mir-32-5p	58.2%	58.3%	67.7%	0.0%	100.0%	85.7%	61.8%
mir-3613-5p	58.2%	70.8%	61.3%	0.0%	100.0%	71.4%	67.6%
mir-371b-3p	58.2%	70.8%	58.1%	0.0%	100.0%	71.4%	70.6%
mir-409-3p	58.2%	66.7%	54.8%	0.0%	91.1%	76.2%	85.3%
mir-548d-5p	58.2%	54.2%	77.4%	0.0%	100.0%	90.5%	52.9%
let-7a-5p	56.4%	75.0%	54.8%	0.0%	100.0%	61.9%	70.6%
<b>mir-1246</b>	<b>56.4%</b>	<b>62.5%</b>	<b>54.8%</b>	<b>10.0%</b>	<b>95.6%</b>	<b>71.4%</b>	<b>76.5%</b>
mir-454-3p	56.4%	62.5%	64.5%	0.0%	100.0%	76.2%	61.8%
mir-485-5p	56.4%	62.5%	54.8%	10.0%	95.6%	71.4%	76.5%
mir-548l	56.4%	75.0%	51.6%	0.0%	97.8%	61.9%	76.5%
<b>mir-6131</b>	<b>54.5%</b>	<b>75.0%</b>	<b>38.7%</b>	<b>0.0%</b>	<b>95.6%</b>	<b>57.1%</b>	<b>88.2%</b>
mir-651-5p	54.5%	75.0%	45.2%	0.0%	93.3%	57.1%	85.3%
mir-222-5p	50.9%	58.3%	48.4%	10.0%	88.9%	61.9%	82.4%
mir-548ay-5p	50.9%	50.0%	74.2%	0.0%	95.6%	76.2%	50.0%
<b>mir-7641</b>	<b>49.1%</b>	<b>58.3%</b>	<b>54.8%</b>	<b>0.0%</b>	<b>93.3%</b>	<b>61.9%</b>	<b>67.6%</b>
mir-141-3p	47.3%	54.2%	51.6%	20.0%	88.9%	52.4%	73.5%
mir-190b	47.3%	45.8%	58.1%	0.0%	93.3%	71.4%	61.8%
mir-548ad-5p	47.3%	58.3%	58.1%	0.0%	91.1%	57.1%	64.7%
mir-548ae-5p	47.3%	58.3%	58.1%	0.0%	91.1%	57.1%	64.7%
mir-26b-5p	43.6%	37.5%	61.3%	0.0%	100.0%	71.4%	44.1%
<b>mir-4454</b>	<b>43.6%</b>	<b>37.5%</b>	<b>51.6%</b>	<b>0.0%</b>	<b>88.9%</b>	<b>71.4%</b>	<b>67.6%</b>
<b>mir-4707-3p</b>	<b>36.4%</b>	<b>37.5%</b>	<b>48.4%</b>	<b>10.0%</b>	<b>86.7%</b>	<b>47.6%</b>	<b>61.8%</b>
<b>mir-483-3p</b>	<b>32.7%</b>	<b>37.5%</b>	<b>35.5%</b>	<b>0.0%</b>	<b>84.4%</b>	<b>42.9%</b>	<b>70.6%</b>
<b>mir-1302</b>	<b>29.1%</b>	<b>29.2%</b>	<b>58.1%</b>	<b>0.0%</b>	<b>91.1%</b>	<b>42.9%</b>	<b>35.3%</b>



[0089] 3그룹 분류 분석에 있어서, 담도암 및 췌장암의 진단을 위한 miRNA 최적의 서브셋의 정확도는 76.4%로 나타났다 (도 4a). 췌장암에 대해서는 90% 이상의 높은 민감도를 보인 반면, 담도암에 대해서는 30% 이하의 검출능을 나타내었다. 또한, 담도암에 대한 누적 민감도는 miRNA가 추가될수록 감소하며, 오히려 담도암과 특이적으로 관련된 miRNA의 패턴을 방해하는 것으로 나타났다. 이는 추가된 miRNA로 인하여 담도암이 췌장암으로 오인되는 경우가 발생되면서 담도암과 췌장암의 miRNA 시그니처 간에 유사성이 나타난 것으로 보인다.

[0090] 반면, 2그룹 분류 분석의 경우 최고 정확도는 92.7%에 달하였으며, 4개의 miRNA만 사용한 경우, 암 환자를 진단해낼 수 있는 최고 민감도는 97.1%에 달하였다(도 4b). 최고 누적 정확도는 6개의 miRNA를 이용할 때까지 유지되고, 12개 miRNA까지 변동이 나타났으며, 더 많은 miRNA가 포함됨에 따라 정확도가 감소하는 경향을 나타내었다.

[0091] 정확도(accuracy)에 있어서, 2 그룹 분류 분석에서는 hsa-mir-142-5p(89.1%), hsa-mir-128-3p(87.3%), hsa-mir-222-3p(85.5%), hsa-mir-6852-5p(85.5%) 및 hsa-mir-744-5p(85.5%)의 순서로 높게 나타났다.

[0092] 상기 5개 miRNA에 있어 민감도(sensitivity)는 hsa-mir-222-3p 및 hsa-mir-6852-5p(91.2%), hsa-mir-142-5p(88.2%), hsa-mir-744-5p(88.2%), hsa-mir-128-3p(85.3%) 순서로 나타났다.

[0093] 또한, 특이도(specificity)는 hsa-mir-142-5p 및 hsa-mir-128-3p가 90.5%로서 hsa-mir-744-5p(81.0%), hsa-mir-222-3p(76.2%) 및 hsa-mir-6852-5p(76.2%)에 비해 높게 나타났으며, 전체적인 누적 정확도에 있어 hsa-mir-142-5p, hsa-mir-128-3p 및 hsa-mir-222-3p의 누적 정확도가 92.7%로 가장 높은 것으로 나타났다.

[0094] 구체적인 2 그룹 분류 분석에 따른 miRNA의 평가 결과는 하기 표 3에 나타난 바와 같다.

표 3

[0095]

miRNA	Accuracy	C_sensitivity	C_specificity	N_sensitivity	N_specificity
mir-142-5p	89.1%	88.2%	90.5%	90.5%	88.2%
mir-128-3p	87.3%	85.3%	90.5%	90.5%	85.3%
mir-222-3p	85.5%	91.2%	76.2%	76.2%	91.2%
mir-6852-5p	85.5%	91.2%	76.2%	76.2%	91.2%
mir-744-5p	85.5%	88.2%	81.0%	81.0%	88.2%
mir-3150b-3p	83.6%	88.2%	76.2%	76.2%	88.2%
mir-409-3p	83.6%	88.2%	76.2%	76.2%	88.2%
mir-1246	81.8%	88.2%	71.4%	71.4%	88.2%
mir-127-3p	81.8%	85.3%	76.2%	76.2%	85.3%
mir-361-5p	81.8%	73.5%	95.2%	95.2%	73.5%
mir-223-5p	80.0%	85.3%	71.4%	71.4%	85.3%
mir-32-3p	80.0%	85.3%	71.4%	71.4%	85.3%
mir-6131	80.0%	94.1%	57.1%	57.1%	94.1%
mir-20a-5p	78.2%	76.5%	81.0%	81.0%	76.5%
mir-4773	78.2%	73.5%	85.7%	85.7%	73.5%
mir-485-5p	78.2%	85.3%	66.7%	66.7%	85.3%
mir-4492	76.4%	76.5%	76.2%	76.2%	76.5%
mir-651-5p	76.4%	88.2%	57.1%	57.1%	88.2%
mir-24-3p	74.5%	85.3%	57.1%	57.1%	85.3%
mir-5481	74.5%	85.3%	57.1%	57.1%	85.3%
let-7a-5p	72.7%	79.4%	61.9%	61.9%	79.4%
mir-222-5p	72.7%	82.4%	57.1%	57.1%	82.4%
mir-32-5p	72.7%	70.6%	76.2%	76.2%	70.6%
mir-371b-3p	70.9%	73.5%	66.7%	66.7%	73.5%
mir-424-3p	70.9%	76.5%	61.9%	61.9%	76.5%
mir-4454	70.9%	70.6%	71.4%	71.4%	70.6%
mir-483-3p	70.9%	88.2%	42.9%	42.9%	88.2%
let-7g-5p	69.1%	58.8%	85.7%	85.7%	58.8%
mir-141-3p	69.1%	79.4%	52.4%	52.4%	79.4%
mir-15a-5p	69.1%	67.6%	71.4%	71.4%	67.6%
mir-190b	69.1%	73.5%	61.9%	61.9%	73.5%
mir-30a-3p	65.5%	67.6%	61.9%	61.9%	67.6%
mir-3613-5p	65.5%	76.5%	47.6%	47.6%	76.5%

mir-454-3p	65.5%	67.6%	61.9%	61.9%	67.6%
mir-548ay-5p	63.6%	73.5%	47.6%	47.6%	73.5%
mir-548ad-5p	61.8%	76.5%	38.1%	38.1%	76.5%
mir-548ae-5p	61.8%	76.5%	38.1%	38.1%	76.5%
mir-548d-5p	61.8%	61.8%	61.9%	61.9%	61.8%
mir-1302	54.5%	82.4%	9.5%	9.5%	82.4%
mir-26b-5p	54.5%	58.8%	47.6%	47.6%	58.8%
mir-7641	54.5%	73.5%	23.8%	23.8%	73.5%
mir-4707-3p	52.7%	64.7%	33.3%	33.3%	64.7%

[0096] 상기와 같은 분류 분석에 있어, 3 그룹 분류 분석에 비해 2 그룹 분류 분석의 경우 miRNA의 바이오마커로서의 기능이 더 효과적임이 나타났다. 3 그룹 분류 분석에 있어, 췌장암 환자에 대해서는 정확하고 높은 민감도로 예측되었으나, 담도암 환자의 경우 췌장암으로 잘못 예측되는 경우가 발생하여 정확도와 민감도가 감소하는 것을 알 수 있었다(도 4c).

[0097] 3-3. miRNA 바이오마커의 타겟 유전자에 대한 유전자 온톨로지(Gene Ontology) 및 신호전달경로 확인

[0098] 42개의 차등적으로 발현된 miRNA의 기능을 판단하기 위해, 이들의 영향을 받는 과정을 조사하였다. 구체적으로, DAVID분석을 통해 전사 조절 메커니즘, 세포사멸적 프로세스 및 세포 증식과 관련된 것을 확인하였다(표 4).

표 4

Biological process	Count	%	P-value	Fold Enrichment	Bonferroni
transcription, DNA-templated	581	13.30	4.86E-13	1.29	3.52E-09
positive regulation of transcription, DNA-templated	188	4.30	4.20E-12	1.58	3.04E-08
regulation of transcription, DNA-templated	448	10.25	2.78E-10	1.29	2.01E-06
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	238	5.45	4.90E-10	1.43	3.54E-06
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	304	6.96	4.36E-09	1.34	3.16E-05
cellular response to hypoxia	48	1.10	2.53E-08	2.17	1.83E-04
negative regulation of transcription, DNA-templated	168	3.84	5.34E-08	1.46	3.86E-04
positive regulation of cell migration	76	1.74	6.07E-08	1.79	4.39E-04
transforming growth factor beta receptor signalling pathway	45	1.03	1.66E-07	2.12	0.001199
apoptotic process	181	4.14	9.54E-07	1.38	0.00688
peptidyl-serine phosphorylation	54	1.24	1.21E-06	1.87	0.008702
positive regulation of cell proliferation	151	3.46	3.27E-06	1.40	0.02335
protein autophosphorylation	67	1.53	4.51E-06	1.69	0.03212
G1/S transition of mitotic cell cycle	45	1.03	5.50E-06	1.91	0.03899

Gene Ontology designations were generated via DAVID functional annotation. Only terms with a Bonferroni-adjusted  $p \leq 0.05$  are presented

[0099]

[0100] 또한, KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 경로에 따라 42개의 miRNA가 관여하는 신호전달경로를 분석하였다. 그 결과, 하기 표 5에 나타난 바와 같이 '암 경로(Pathways in cancer)', '췌장암(Pancreatic cancer)' 등 암의 형성, 진행 등에 관여하는 경로와 관련이 있음을 확인하였다.

표 5

KEGG Pathway	Count	%	P-value	Fold Enrichment	Bonferroni
Pathways in cancer	158	3.62	1.19E-13	1.69	3.49E-11
FoxO signalling pathway	68	1.56	2.26E-11	2.14	6.65E-09
Glioma	40	0.92	3.67E-10	2.59	1.08E-07
Chronic myeloid leukaemia	42	0.96	1.22E-09	2.46	3.58E-07
Prostate cancer	47	1.08	5.20E-09	2.25	1.53E-06
Neurotrophin signalling pathway	56	1.28	7.08E-08	1.97	2.08E-05
Cell cycle	57	1.30	1.01E-07	1.94	2.97E-05
ErbB signalling pathway	44	1.01	1.37E-07	2.13	4.03E-05
Hepatitis B	63	1.44	2.44E-07	1.83	7.16E-05
p53 signalling pathway	36	0.82	3.64E-07	2.27	1.07E-04
PI3K-Akt signalling pathway	122	2.79	6.84E-07	1.49	2.01E-04
Viral carcinogenesis	80	1.83	1.08E-06	1.65	3.16E-04
Non-small cell lung cancer	31	0.71	1.24E-06	2.33	3.64E-04
Bladder cancer	25	0.57	1.76E-06	2.57	5.17E-04
Renal cell carcinoma	34	0.78	1.82E-06	2.21	5.35E-04
Pancreatic cancer	34	0.78	1.82E-06	2.21	5.35E-04
Proteoglycans in cancer	77	1.76	3.21E-06	1.62	9.43E-04
TGF-beta signalling pathway	40	0.92	3.82E-06	2.01	0.001123
MAPK signalling pathway	93	2.13	4.08E-06	1.54	0.001198
Signalling pathways regulating pluripotency of stem cells	58	1.33	4.85E-06	1.75	0.001425
Fc epsilon RI signalling pathway	34	0.78	6.49E-06	2.11	0.001905
Small cell lung cancer	39	0.89	1.52E-05	1.93	0.004457
Ras signalling pathway	82	1.88	2.03E-05	1.53	0.00595
Melanoma	34	0.78	2.05E-05	2.02	0.005999
T cell receptor signalling pathway	44	1.01	3.41E-05	1.80	0.009978
Endocytosis	90	2.06	4.31E-05	1.47	0.01259
Epstein-Barr virus infection	70	1.60	5.12E-05	1.55	0.014945
Hippo signalling pathway	58	1.33	6.68E-05	1.62	0.019459
Insulin signalling pathway	54	1.24	7.01E-05	1.65	0.020398
Thyroid hormone signalling pathway	46	1.05	1.15E-04	1.70	0.033145
Oestrogen signalling pathway	41	0.94	1.50E-04	1.75	0.043177
Acute myeloid leukaemia	27	0.62	1.56E-04	2.03	0.044742
Rap1 signalling pathway	74	1.69	1.58E-04	1.49	0.045381
Colorectal cancer	29	0.66	1.59E-04	1.97	0.045785

KEGG pathways were generated by DAVID functional annotation. Only terms with a Bonferroni-adjusted  $p \leq 0.05$  are presented

#### 실시예 4. qRT-PCT을 통한 miRNA 바이오마커 후보군의 선별 및 타당성 검증(validation)

TaqMan Advanced miRNA cDNA 합성 키트 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, TaqMan Advanced miRNA 분석(Applied Biosystems) 및 Taq-Man Fast Advanced master mix(Applied Biosystems)를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 qRT-PCR을 수행하였다.

qRT-PCR은 ABI Prism 7300 system(Applied Biosystems)을 사용하여 수행하였고, 프라이머는 Applied Biosystems에서 TaqMan 프라이머를 구입하여 사용하였다. PCR 증폭은 95 ° C에서 10분 동안의 개시 단계, 이어서 95 ° C에서 30초 동안, 56 ° C에서 30초 동안 및 72 ° C에서 15초 동안 45회 사이클로 이루어졌다.

qRT-PCR 분석은 17명의 췌장암 환자, 17명의 담도암 환자 및 19명의 건강한 사람으로부터의 총 RNA 샘플을 수득하여 3회 수행하였다. 암 및 HC 그룹의 miRNA-발현 수준을 비교하기 위해 pairwise t test 를 하였다.

또한, qRT-PCR 분석은 상대적 값을 확인하는 경우로 분석 때마다 값이 변동될 수 있음에 따라, 이를 보정하기 위해 mir-451a를 이용하였다. 각 miRNA의 값은 mir-451a의 Ct값을 기준으로 보정하였으며, 상기 mir-451a의 Ct 값을 기준으로 보정한 것은, 개별 환자의 mir-451a와 각 miRNA의 발현양을 검출하여 Ct 값을 빼준 것을 의미하며 하기 수식에 따라 계산된 Ct 값으로 나타내었다. 상대적으로 Ct값이 큰 경우, 상대적으로 발현이 적은 것으로 해석한다.

<수식>



[0108] 개별 환자의 Ct 값 =  $Ct_{miRNA} - Ct_{miRNA451a}$

[0109] 타당성 검증(validation)을 위한 샘플의 특성을 분석한 결과는 하기 표 6에 나타난 바와 같으며, 80% 이상의 정확도를 나타낸 miRNA에 대해 qRT-PCR 및 pairwise t test 를 이용하여 암 그룹(PC 및 BTC) 및 대조군(HC) 그룹 간의 밸리데이션을 수행하였다.

표 6

	Pancreatic cancer (n=19)	Biliary tract cancer (n=16)	Healthy control (n=19)
Age, year, mean ± SD	62.9 ± 8.8	62.6 ± 11.3	47.8 ± 10.1
Sex (%)			
Male	13 (68.4%)	9 (56.3%)	13 (68.4%)
Female	6 (31.6%)	7 (43.8%)	6 (31.6%)
Diabetes (%)	9 (47.4%)	3 (18.8%)	0 (0.0%)
Hypertension (%)	11 (57.9%)	4 (25.0%)	0 (0.0%)
CA19-9, U/ml, mean ± SD	2706.6 ± 6162.1	1767.7 ± 4999.0	10.0 ± 5.6
Stage (%)			
I	1 (5.3%)	0 (0.0%)	n/a
II	3 (15.8%)	5 (31.3%)	n/a
III	7 (36.8%)	3 (18.8%)	n/a
IV	8 (42.1%)	8 (50.0%)	n/a
OS, month, median (range)	16.1 (2.5-40.3)	20.8 (2.2-68.5)	n/a

Abbreviations: SD, standard deviation; BMI, body mass index; DFS, disease-free survival; OS, overall survival.

[0110]

[0111] 그 결과, mir-128-3p 및 mir-409-3p의 경우 암 그룹에서 대조군 그룹 대비 유의하게 조절 장애가 나타나는 것을 볼 수 있었다( $p = 2.85E-9$  및  $p = 0.0405$ , respectively). 또한, mir-744-5p의 경우에도 마찬가지로의 경향이 나타남을 볼 수 있었다( $p = 0.0562$ ).

[0112] 특히, 상기 3개의 miRNA의 조합을 사용하여 분류 분석을 한 경우, 87.3%의 정확도 및 91.2%의 민감도를 나타냄으로써 담도암 및 췌장암을 진단할 수 있음을 확인하였다(도 5).

[0113] 본 발명의 담도암 및 췌장암을 진단해낼 수 있는 miRNA 바이오마커 서열은 하기 표 7에 정리된 바와 같다.

표 7

서열번호	miRNA	서열(5'-3')
1	mir-744-5p	UGCGGGGCUAGGGCUAACAGCA
2	mir-409-3p	GAAUGUUGCUCGGUGAACCCCU
3	mir-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
4	mir-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
5	miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
6	miR-6852-5p	CCCUGGGGUUCUGAGGACAUG
7	mir-451a	AAACCGUUAACCAUACUGAGUU

[0114]

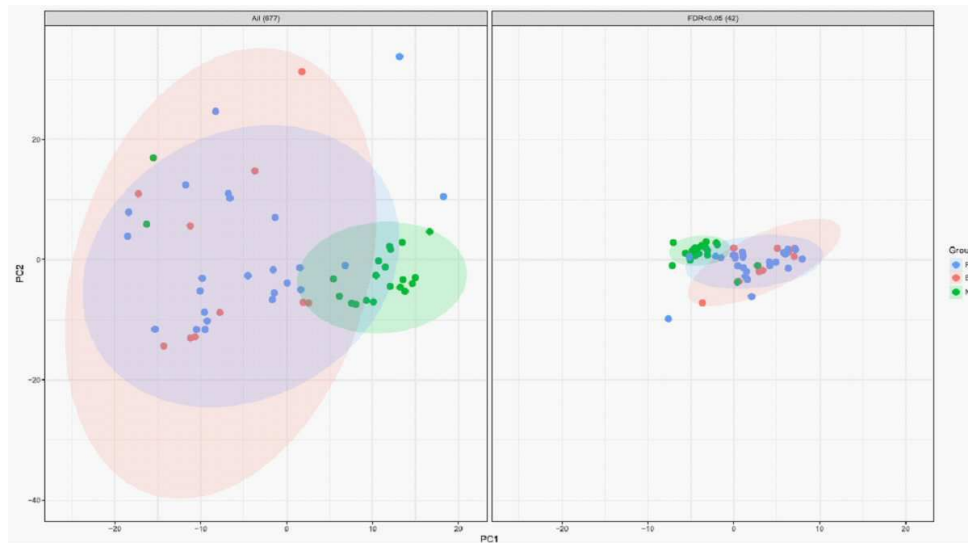
[0115] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0116] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으

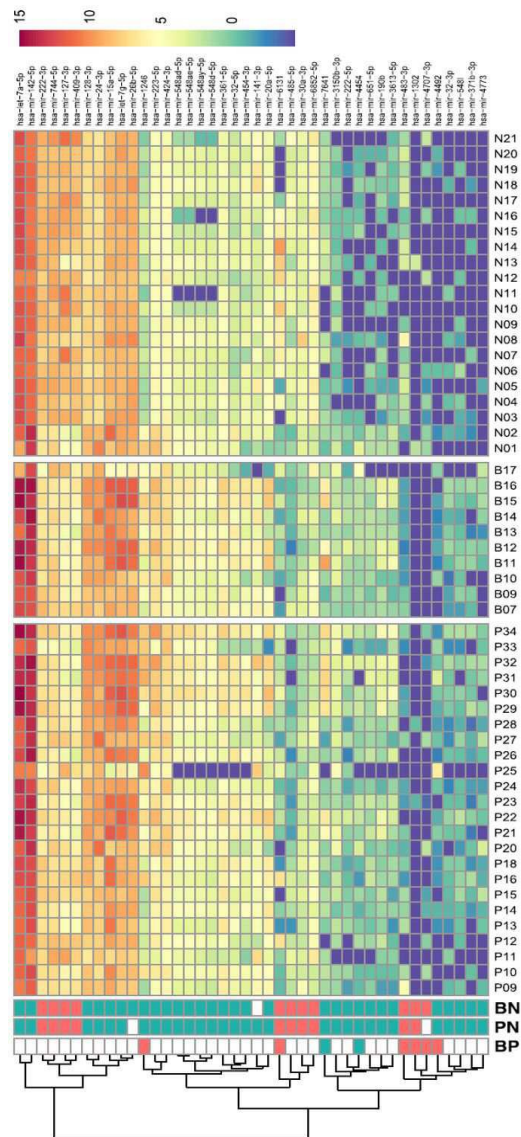
로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

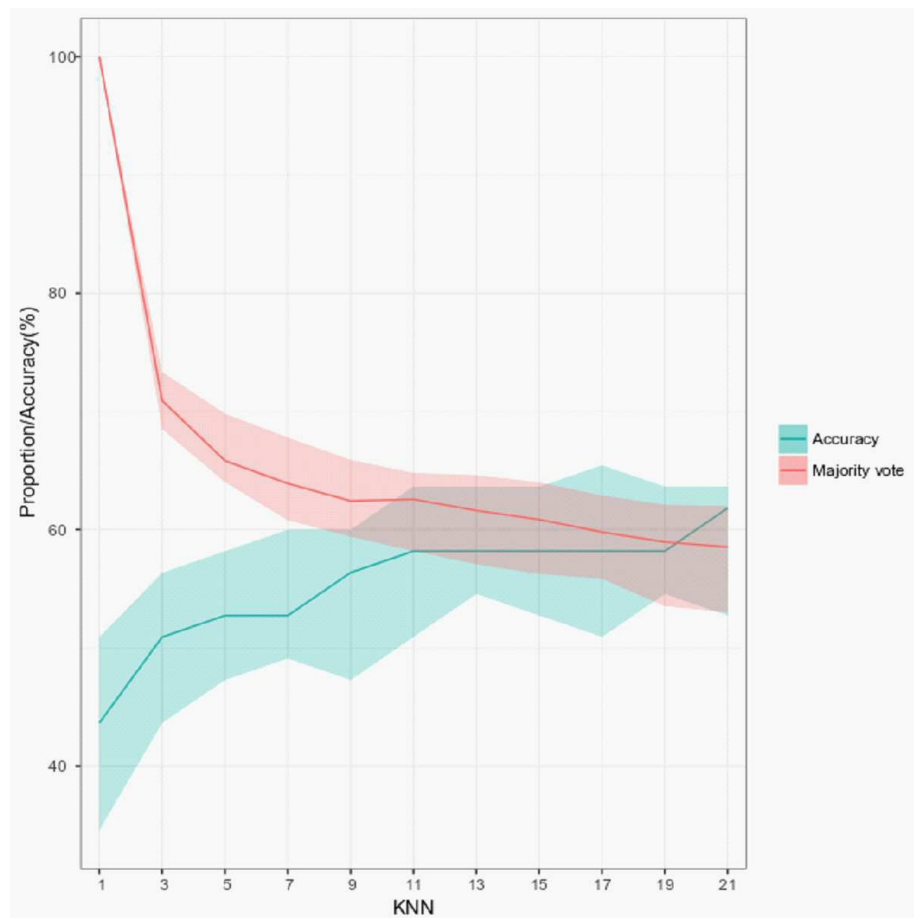
도면1



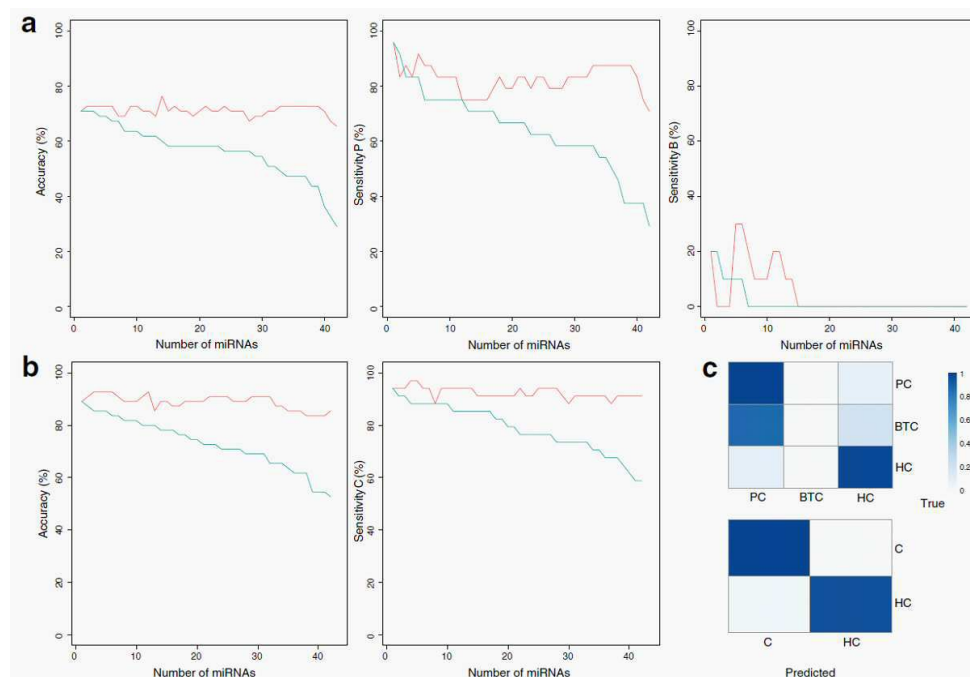
도면2



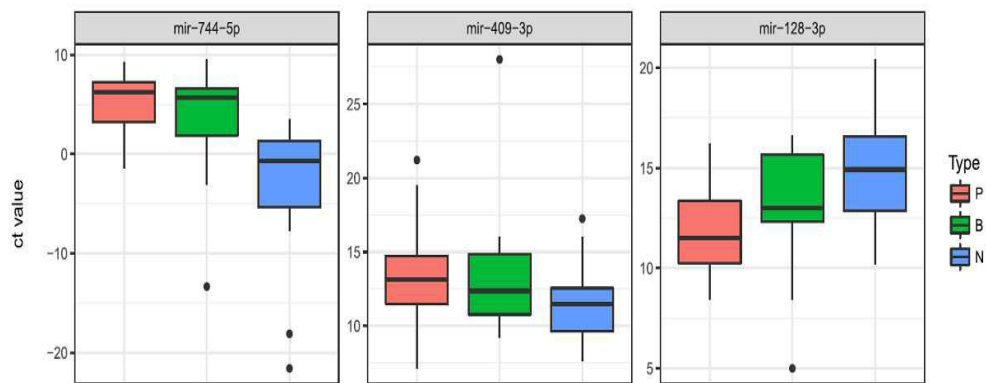
도면3



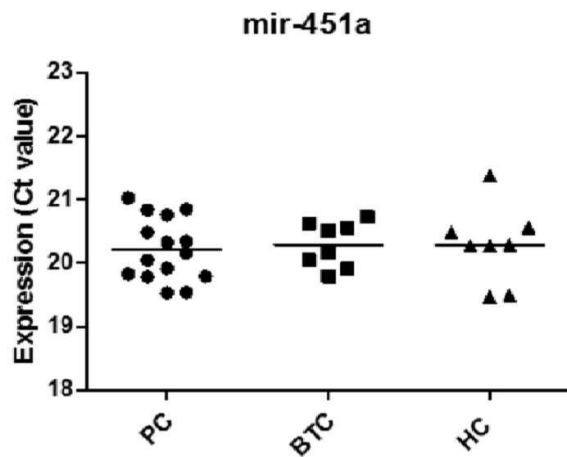
도면4



도면5



도면6



## 서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> BIOMARKER FOR DIAGNOSIS OF CANCER AND USE THEREOF

<130> 19PP30449

<160> 7

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mir-744-5p

<400> 1

ugcggggcua gggcuaacag ca

<210> 2

<211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> mir-409-3p  
 <400> 2  
 gaauguugcu cggugaaccc cu 22

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> mir-128-3p  
 <400> 3  
 ucacagugaa ccggucucu u 21

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> mir-142-5p  
 <400> 4  
 cauaaaguag aaagcacuac u 21

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miR-222-3p  
 <400> 5  
 agcuacaucu ggcuacuggg u 21

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miR-6852-5p  
 <400> 6

cccuggggguu cugaggacau g	21
<210> 7	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mir-451a	
<400> 7	
aaaccguuac cauuacugag uu	22