



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월02일

(11) 등록번호 10-2210333

(24) 등록일자 2021년01월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/57438 (2019.01)
G01N 33/57484 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0069004(분할)

(22) 출원일자 2020년06월08일

심사청구일자 2020년06월08일

(65) 공개번호 10-2020-0070177

(43) 공개일자 2020년06월17일

(62) 원출원 특허 10-2018-0165098

원출원일자 2018년12월19일

심사청구일자 2018년12월19일

(30) 우선권주장
1020180023460 2018년02월27일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020160005311 A*
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 10 항

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

송시영

서울특별시 마포구 백범로 205, 104동 1106호 (신공덕동, 마포펜트하우스)

이희승

서울특별시 강남구 광평로31길 27, 101동 603호(수서동, 삼성아파트)

장찬영

경기도 고양시 일산서구 일현로 97-11, 101동 1304호(탄현동, 일산 위브더제니스)

(74) 대리인

이재영

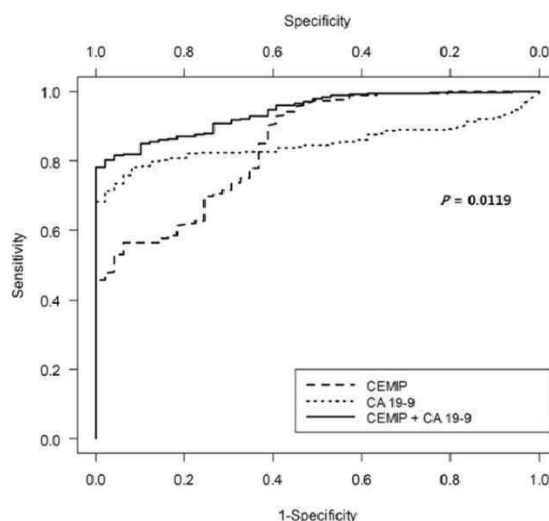
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 암의 진단용 조성물

(57) 요약

본 발명은 CEMP(Cell Migration Inducing Hyaluronidase 1) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제; 및 CA 19-9(carbohydrate antigen 19-9) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제;를 포함하여 암을 진단할 수 있는 조성물, 이를 포함하는 진단용 키트 및 상기 조성물을 이용하여 암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160045547 A*

Fink SP et al, Oncotarget (2015), vol 6(31), pp 30500-30515.

L Li et al, J Cancer (2017), vol 8(12), pp. 2238-2246.

Lumir Kunovsky et al, Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology (2018.08.), vol 2018, pp 1-10.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

CEMIP(Cell Migration Inducing Hyaluronidase 1) 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제; 및

CA 19-9(carbohydrate antigen 19-9) 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제;를 포함하는 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CEMIP 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 CEMIP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CA 19-9 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 CA 19-9 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CEMIP 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 CEMIP 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 진단용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 CA 19-9 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 CA 19-9 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 진단용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 진단용 조성물을 포함하는 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인, 진단용 키트.

청구항 8

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CEMIP(Cell Migration Inducing Hyaluronidase 1) 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CA 19-9(carbohydrate antigen 19-9) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 췌장암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)인, 췌장암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 CEMIP 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준; 및 CA 19-9 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준; 중 적어도 하나가 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 상기 췌장암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 췌장암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암을 진단할 수 있는 조성물, 이를 포함하는 진단용 키트 및 상기 조성물을 이용하여 암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대인의 주요 질환 중에서, 암의 치료 방법과 진단 방법에 관한 연구는 발병 빈도가 높은 폐암, 간암, 위암 등을 중심으로 비교적 활발히 진행되고 있다. 그러나, 발병 빈도가 낮은 식도암, 대장암, 췌장암 등에 대한 연구는 상대적으로 저조한 실정이다.

[0003] 특히, 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 요망되고 있다.

[0004] 현재까지 췌장암에 효과가 있다고 알려진 5-플루오로유라실(5-fluorouracil), 젬시타빈(gemcitabine), 타르세바(tarceva)를 포함한 몇 가지 항암제의 치료 효과는 지극히 저조하며, 항암치료에 대한 반응율은 15% 내외에 불과하고 이러한 사실은 췌장암 환자의 예후를 향상시키기 위해서는 보다 효과적인 조기 진단법 및 치료법의 개발이 절실히 요구되고 있음을 시사한다. 치명적인 췌장암으로 진행되기 전단계인 췌장암의 전구병변에 대한 적절한 진단과 치료가 췌장암 치료 성적 향상에 매우 중요하다.

[0005] 췌장암 또는 췌장암 전구 병변의 진단은 혈액 검사, 위, 십이지장의 X선 조영검사, 피부 및 간을 통한 담도촬영과 역행성 내시경 담도촬영술 사용되고 있다. 이들 방법에 의해 질병의 병변을 발견하였으나, 최근에 초음파 촬영 및 전산화 단층 촬영이 가장 많이 사용된다. 보다 정밀한 조직검사를 수행하여 비교적 정확한 검사 결과를 얻을 수도 있다. 그러나, 상기 진단 방법은 정확도가 떨어지거나, 환자에게 고통이 따르는 등 그 수행 방법이 매우 불편하여 피검자들이 이를 꺼려하는 실정이다. 따라서, 간편하고 신속하게 췌장암 또는 췌장암 전구병변을

진단할 수 있는 검사 방법의 개발이 요구되어 왔다.

[0006] 최근 건강 검진이나 체장 외 다른 질환의 진단을 위하여 복부 초음파(abdominal ultrasound, US), 복부 전산화 단층 촬영(computed tomography, CT), 자기공명 영상진단(magnetic resonance imaging, MRI) 등의 영상진단 검사들이 많이 시행 되면서 체장의 악성 병변이 빈번하게 발견된다. 영상진단에서 양성 병변의 형태를 보이는 병변들은 병리 소견으로는 양성 병변으로부터 전암 병변(premalignant lesion)과 악성 병변에 이르기까지 다양한 질환을 포함하고 있으므로 임상적으로 중요하다.

[0007] 그러나 CT, MRI와 같은 영상진단 검사의 발전에도 불구하고 양성 병변으로부터 전암, 양성 병변까지 다양한 병리 소견을 가지는 체장의 양성 병변을 수술 전에 정확히 감별 하는 것은 아직도 어려운 실정이다. 따라서 임상적으로는 체장의 양성 병변이 악성화할 가능성이 있는 종양 병변인지 아닌지 그리고 악성화 가능성이 있다면 아직 전암 단계의 병변인지 혹은 이미 악성 병변을 동반하고 있는지 감별하는 것이 중요하다.

[0008] 대한민국 출원공개 제2012-0009781호는 개체의 체장암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 개체로부터 분리한 암 조직 중 XIST RNA의 발현량을 측정하는 분석방법을 개시하고 있다. 하지만, 그 진단 효율 및 정확성에서 효과가 미미하므로, 효과가 더 우수한 마커를 발굴하고 이를 이용한 진단 방법을 개발할 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 일 목적은 암 중에서도 특히 체장암을 정확하고 간편하게 진단할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 암 중에서도 특히 체장암을 정확하고 간편하게 진단할 수 있는 키트를 제공하고자 한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 암 중에서도 특히 체장암을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 암 중에서도 특히 체장암을 치료하기 위한 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다.

[0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, CEMIP(Cell Migration Inducing Hyaluronidase 1) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제; 및

[0015] CA 19-9(carbohydrate antigen 19-9) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제;를 포함하는 암의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0016] 본 발명에서 상기 "CEMIP(Cell Migration Inducing Hyaluronidase 1)"는 인간에서 CEMIP 유전자에 의해 코딩되는 단백질로, 히알루론산에 결합하여 CD44 및 히알루로니다제와 독립적으로 상기 히알루론산의 해중합(depolymerization)을 촉매한다. 이러한 기능은 마우스에서도 밝혀진 바 있다. 본 발명에서 상기 CEMIP 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에서 상기 "CA 19-9 (carbohydrate antigen 19-9)"는 시알산화 루이스 A 구조의 에피토프에 해당하며, MUC1과 같은 뮤신의 카보하이드레이트 항원에 해당한다. 본 발명에서 상기 CA 19-9의 서열은 Sia α 2,3Gal β 1,3(Fuc α 1,4)GlcNAc로 정의될 수 있다. 여기서 상기 Sia는 시알산(sialic acid), Gal은 갈락토스(galactose), Fuc는 푸코스(fucose), 그리고 GlcNAc은 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)을 의미한다.

[0018] 본 발명에서 진단의 대상이 되는 질환으로 상기 "암"은 포유류에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리킨다. 본 발명에서 진단의 대상이 되는 암은 체장암, 난소암, 대장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 바람직하게는 체장암일 수 있다.

- [0019] 본 발명에서 상기 "췌장암(pancreatic cancer)"이란 췌장 세포에서 기원하는 암을 의미한다. 췌장암에는 여러 가지 종류가 있는데 췌관 세포에서 발생한 췌관 선암종이 90% 정도를 차지하고 있어 일반적으로 췌장암이라고 하면 췌관 선암종을 의미한다. 그 외에 낭종성암(낭선암), 내분비종양 등이 있다. 췌장암 환자 중 약 5~10%는 유전 소인을 가지고 있는데, 췌장암 환자에서 췌장암의 가족력이 있는 경우는 약 7.8% 정도로 일반인에서의 췌장암 발생률 0.6%에 비해 빈도가 높다. 췌장암은 5년 생존율이 5% 이하로 예후가 매우 나쁜 암이다. 그 이유는 대부분 암이 진행된 후에 발견되기 때문에 발견 당시 수술 절제가 가능한 경우가 20% 이내이고, 육안으로 보기에 완전히 절제되었다 하더라도 미세 전이에 의해 생존율 향상이 적으며, 항암제 및 방사선 치료에 대한 반응이 낮기 때문이다. 따라서, 생존율을 향상시킬 수 있는 가장 중요한 방법은 증상이 없거나 비특이적일 때 조기 발견하여 수술하는 것이다.
- [0020] 본 발명에서 상기 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 상기한 암의 발병 여부 또는 발병 가능성(위험성)을 확인하는 것이다.
- [0021] 본 발명에서 상기 CEMIP 및 CA 19-9의 각각의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 상기 CEMIP 및 CA 19-9의 각각의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 CEMIP 단백질 또는 CA 19-9 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에서 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 CEMIP 단백질 또는 CA 19-9 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991 참조)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0023] 본 발명에 상기 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254 (5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.
- [0024] 본 발명에서 상기 "앵타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.
- [0025] 본 발명에서 상기 CEMIP 및 CA 19-9 각각의 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 CEMIP 단백질 또는 CA 19-9 단백질 각각을 코딩하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을

포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[0027] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 상기 "LNA(Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall Gene Therapy (2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오사이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다. 본 발명에서 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 CEMIP 또는 CA 19-9 단백질이나, 이들을 코딩하는 유전자의 mRNA의 정보는 알려져 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.

[0031] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 암의 진단용 조성물을 포함하는 암의 진단용 키트에 관한 것이다.

[0032] 본 발명에서는 상기 진단용 키트를 이용하여 암 질환의 발병 여부 또는 발병 가능성을 진단할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 상기 진단의 대상이 되는 질환으로 암은 췌장암, 난소암, 대장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종을 포함할 수 있지만, 바람직하게는 췌장암일 수 있다.

[0034] 본 발명에서 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 상기 암의 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다.

[0036] 예를 들면, 본 발명에서 상기 암의 진단용 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의

단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [0038] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CEMIP(Cell Migration Inducing Hyaluronidase 1) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0041] 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CA 19-9(carbohydrate antigen 19-9) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 암의 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란, 상기 암의 발병 여부가 불확실한 개체로, 발병 가능성이 높은 개체를 의미한다.
- [0043] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있지만, 바람직하게는 발병 가능성이 높은 환자의 피부를 절개하지 않고 중공침 등을 생체 내 기관에 자입하여 병리조직학적 검사용으로 채취한 액체 생검(예를 들면, 환자의 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 또는 복수(ascites) 등)일 수 있다.
- [0044] 본 발명에서는 상기과 같이 분리된 생물학적 시료에서 CEMIP 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명에서는 상기과 같이 분리된 생물학적 시료에서 CA 19-9 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 상기 CEMIP 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA; 혹은 CA 19-9 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA;의 발현 수준을 측정하는 순서는 특별히 제한하지 않으며, 상기 CEMIP 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 먼저 측정한 뒤 CA 19-9 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정할 수 있고, 혹은 CA 19-9 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 먼저 측정한 뒤 CEMIP 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정할 수 있으며, 혹은 CEMIP 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준과 CA 19-9 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 동시에 측정할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 상기 CEMIP 단백질 또는 상기 CA 19-9 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는 상기 CEMIP 및 CA 19-9의 각각의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 상기 CEMIP 단백질 또는 상기 CA 19-9 단백질의 발현 수준을 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass

Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0049] 본 발명에서 상기 CEMIP 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA 또는 상기 CA 19-9 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 CEMIP 및 CA 19-9 각각의 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 상기 CEMIP 및 CA 19-9 각각의 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 CEMIP 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준; 및 CA 19-9 단백질을 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준; 중 적어도 하나가 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 상기 암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명에서 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 CEMIP 단백질의 발현 수준이 0.2 ng/ml 이상, 0.21 ng/ml 이상, 또는 0.218 ng/ml 이상인 경우; 및 CA 19-9 단백질의 발현 수준이 35 U/ml 이상, 36 U/ml 이상, 또는 37 U/ml 이상인 경우; 중 적어도 하나인 경우, 상기 암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 상기 암은 췌장암, 난소암, 대장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 바람직하게는 췌장암일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CEMIP(Cell Migration Inducing Hyaluronidase 1) 단백질을 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암의 예후를 예측하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란, 상기 암이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 개체를 의미한다.
- [0057] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있지만, 바람직하게는 발병 가능성이 높은 환자의 피부를 절개하지 않고 중공침 등을 생체 내 기관에 자입하여 병리조직학적 검사용으로 채취한 액체 생검(예를 들면, 환자의 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 또는 복수(ascites) 등)일 수 있다.
- [0058] 본 발명에서는 상기와 같이 분리된 생물학적 시료에서 CEMIP 단백질을 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 상기 CEMIP 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는 상기 CEMIP의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명에 상기 CEMIP 단백질의 발현 수준을 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조

직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명에서 상기 CEMIP 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 CEMIP 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0062] 본 발명에 상기 CEMIP 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 본 발명에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 CEMIP 단백질의 발현 수준이 0.4 ng/ml 이상, 0.41 ng/ml 이상, 0.42 ng/ml 이상 또는 0.429 ng/ml 이상인 경우, 예후가 나쁠 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 CEMIP 단백질의 발현 수준이 0.4 ng/ml 이상, 0.41 ng/ml 이상, 0.42 ng/ml 이상 또는 0.429 ng/ml 이상인 경우, 생존 기간이 12 개월 이하, 11 개월 이하, 10 개월 이하, 또는 9.8 개월 이하인 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0065] 본 발명에서 상기 암은 췌장암, 난소암, 대장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 바람직하게는 췌장암일 수 있다.

발명의 효과

[0066] 본 발명에서는 목적하는 개체의 생물학적 시료로부터 CEMIP와 CA 19-9 마커의 발현 수준을 측정함으로써 암 중에서도 특히 췌장암의 발병 여부나 발병 가능성을 높은 정확하게 예측 또는 진단할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 췌장암 환자와 정상 대조군의 혈청 내 CEMIP 단백질의 발현 수준을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 췌장암을 진단하기 위한 CEMIP, CA 19-9, 또는 이들 단백질의 조합의 ROC 커브를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에서 췌장암 환자에서 CEMIP 및 CA 19-9 단백질의 발현 수준의 분포를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에서 췌장암 환자의 생존 기간과 CEMIP 단백질의 발현 수준 사이의 상관 관계를 카플란-마이어 곡선으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0070] 실시예

[0072] 환자

[0073] 2007년과 2015년 사이 수집된 췌장암 환자와 정상 대조군 시료에 대하여 회고 분석을 수행하였다. 정상 대조군으로는 췌장암 진단을 받지 않은 개체로 선별하되, 건강한 개체와 양성 종양 환자로 분류하였다. 하기와 같은 진단을 위하여 혈액 시료를 채취하였다. 환자에 관한 기본적 정보와 진단, 성별, 암의 위치, 혈청 내 CA 19-9 수준, 항암 치료, 암 병기에 관한 임상적 데이터는 전자 의료 기록에서 얻었다. 암 병기는 미국암연합위원회

(American Joint Committee on Cancer; AJCC)의 7판 병기를 기준으로 분류하였다.

[0075] CA 19-9 및 CEMIP 발현 수준의 측정

[0076] VITROS 3600 면역 진단 시스템(VITROS 3600 Immunodiagnostic System) (Ortho-Clinical Diagnostics Inc., Raritan, NJ, USA) 상에서 화학발광 면역검사(chemiluminescence immunoassay)를 이용하여 CA 19-9의 발현 수준을 측정하였다. CA 19-9의 진단 컷-오프(cut-off) 값은 37 U/ml에 해당하였다. 효소 면역 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 이용하여 CEMIP의 발현 수준을 측정하였다. 췌장암 환자와 암이 없는 정상 대조군으로부터 혈액 시료를 추출하여 CEMIP 단백질의 발현 수준을 측정하였다. 96-웰(well) CEMIP ELISA 키트(SER965Hu)는 USCN Life Science, Inc. (Wuhan, China)로부터 구입하였다. 사용된 ELISA 키트의 검출 범위는 0.156 ~ 10 ng/ml에 해당하였다. ELISA의 표준 커브 농도는 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 및 0.156 ng/ml에 해당하였다. 이러한 분석의 민감도 또는 검출의 최소 허용 치수(lower limit)(LLD)는 0으로부터 구별될 수 있는 가장 적은 단백질 농도로 정의하였다. 이는 20회 표준 반복한 평균 흡광도 값에 두 표준 편차를 더한 뒤 대응 농도를 계산하여 측정하였다. CEMIP와 유사체(analogues) 사이에 유의한 교차반응성(cross-reactivity) 또는 간섭(interference)은 관찰되지 않았다.

[0078] 통계적 분석

[0079] 모든 통계적 분석은 Windows용 SPSS 버전 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), SAS (version 9.4, SAS Inc., Cary, NC, USA), 및 R 패키지 버전 3.0.1을 이용하여 수행하였다. 정상 대조군과 췌장암 환자의 혈청 값을 비교하기 위하여 스튜던트 T 검정(Student's t test)을 수행하였다. 진단과 관련된 적정의 CEMIP 컷-오프 값은 수신자 조작 특성 곡선(receiver operating characteristic curve; ROC curve)과 ROC 커브 아래 면적(area under the ROC curve; AUROC)을 이용하여 계산하였다. ROC 분석(MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)을 위하여 MedCalc 버전 11.1을 사용하였다. AUROC의 내부 확인(internal validation)을 위하여 부트스트래핑(bootstrapping) 방법(1,000번 반복)을 적용하였다. 전체 생존율을 위하여 고 위험군과 저 위험군으로 환자를 분류하기 위하여 Contal 및 O'Quigley's 방법을 사용하였고, CEMIP 컷-오프 값을 선택하였다. 생존 곡선은 카플란-마이어 방법(Kaplan-Meier method)을 이용하여 분석하였고, 곡선 사이 차이점은 로그-순위 검정(log-rank tests)을 이용하여 분석하였다. P -값 < 0.05인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 췌장암 환자의 생존에 영향을 미치는 위험 요소를 분석하기 위하여 Cox 회귀 분석(Cox regression analysis)을 이용해 단변량(univariate) 및 다변량(multivariate) 분석을 수행하였다. 그래프는 GraphPad Prism 4 소프트웨어(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)로 그렸다.

[0081] 환자 특성

[0082] 세브란스 병원으로부터 췌장암으로 진단받은 324명의 환자와 49명의 정상 대조군으로부터 혈청 시료를 확보하였다. 정상 대조군은 30명의 건강한 개체와 담관 결석(n=2), 담낭 결석(n=4), 간내 결석(n=1), 담낭염(n=4), 간농양(n=1), 급성 간염(n=1), 급성 췌장염(n=1), 십이지장 용종(n=1), 위궤양(n=1), 양성 췌장 낭종(n=3)의 19명의 환자군으로 분류하였다. 하기 표 1은 본 실험의 환자 특성을 나타낸 것으로, 환자의 중간 나이는 63세(남성, 64.5%)이었고, 환자의 대략 75%가 고식적 항암치료를 받았으며, 170명의 환자(52%)가 병기 IV 췌장암으로 진단 받았다. 전체 생존율의 중간 값은 314일(169 ~ 581일)에 해당하였다. 췌장암 환자에서 CA 19-9 및 CEMIP 발현 수준의 중간 값은 각각 410.5 U/ml (40.8 ~ 3342.5) 및 0.67 ng/ml (0.40 ~ 1.08)에 해당하였다.

[0084] 췌장암 환자의 진단(1)

[0085] Mann-Whitney U 검정을 이용하여, 정상 대조군 대비 췌장암 환자에서 CA 19-9의 발현 수준이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(중간 값, 췌장암 환자: 410.5 U/ml, 정상 대조군: 10.8 U/ml, $P < 0.001$). 게다가, CEMIP 또한 정상 대조군 대비 췌장암 환자에서 그 발현 수준이 현저히 증가하여 있는 것을 확인할 수 있었다(췌장암 환자: 0.67 ng/ml, 정상 대조군: 0.16 ng/ml, $P < 0.001$)(도 1). ROC 커브 분석 결과, 상기 CEMIP와 CA 19-9의 마커의 조합을 췌장암 진단용 마커로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다(도 2). 보다 상세하게 CA 19-9 또는 CEMIP 단독을 이용하여 췌장암을 진단하였을 때 두 마커 모두 민감도(sensitivity)는 대략 0.82에 불과한 반면, 상기 CA 19-9와 CEMIP의 조합으로 췌장암을 진단한 경우 민감도가 0.92로 현저히 향상되는 것을 확인할 수 있었다(특이도(specificity)는 0.62)(표 1).

표 1

구분	민감도(sensitivity)
CEMIP 단독	0.82

CA 19-9 단독	0.82
CEMIP + CA 19-9	0.92

[0089] 췌장암 환자의 진단(2)

[0090] 췌장암으로 진단받은 324명의 환자 중 79명의 환자에서는 CA 19-9의 발현 수준이 37 U/ml 이하로 측정되었고, 19명의 환자에서는 루이스 혈액형이 A-B-에 해당하였다. 췌장암 환자 중 CA 19-9의 발현 수준은 37 U/ml 미만으로 상대적으로 낮은 반면, CEMIP 발현 수준이 0.218 ng/ml 이상의 상대적으로 높은 환자의 비율은 86.1%에 해당하였다. 즉, CA 19-9의 발현 수준이 37 U/ml 미만으로 낮은 79명의 환자 중, CEMIP 발현 수준이 0.218 ng/ml 이상인 68명의 환자(검은 원형의 점)(86.1%)를 췌장암 환자로 진단할 수 있었다(도 3).

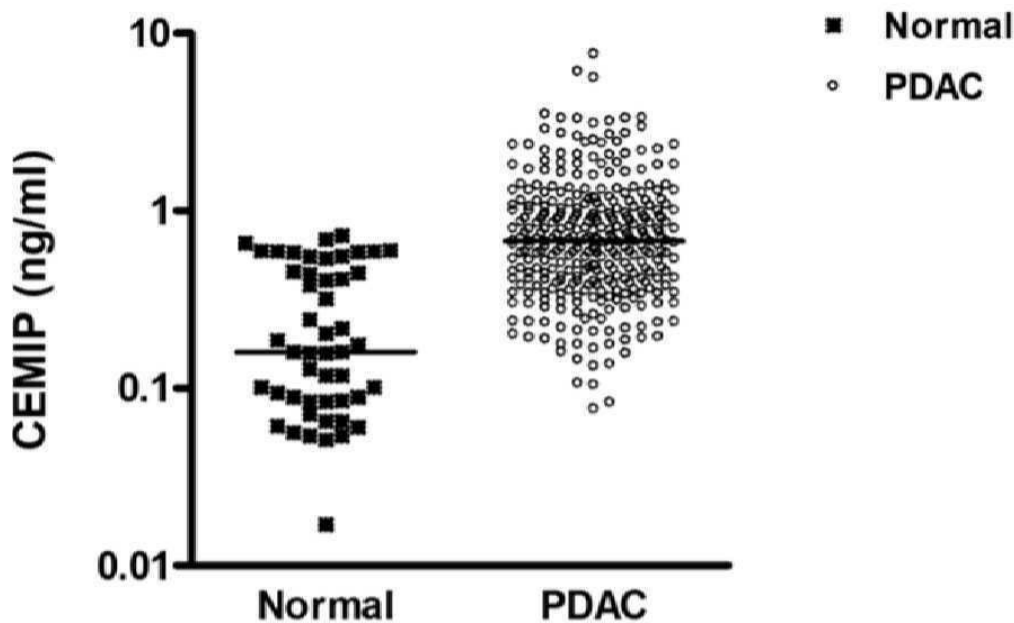
[0092] 췌장암 환자의 예후 예측

[0093] Contal 및 O'Quigley 방법을 이용하여 생존율 차이를 극대화할 수 있는 CEMIP 적정 컷-오프 값을 결정하였다(CEMIP=0.429ng/ml). 카플란-마이어 곡선으로, CEMIP 발현 수준과 췌장암 환자의 생존 기간을 분석한 결과, CEMIP 발현 수준이 0.429 ng/ml 이상인 환자의 경우 평균 생존 기간이 9.8 개월인 반면, 상기 CEMIP 발현 수준이 0.429 ng/ml 미만의 환자의 경우 평균 생존 기간이 13.7 개월로, 상기 CEMIP 발현 수준이 0.429 ng/ml 이상인 환자군이 상기 CEMIP 발현 수준이 0.429 ng/ml 미만의 환자군에 비하여 생존 기간이 유의적으로 짧은 것을 확인할 수 있었다(log-rank test P=0.0175) (도 4).

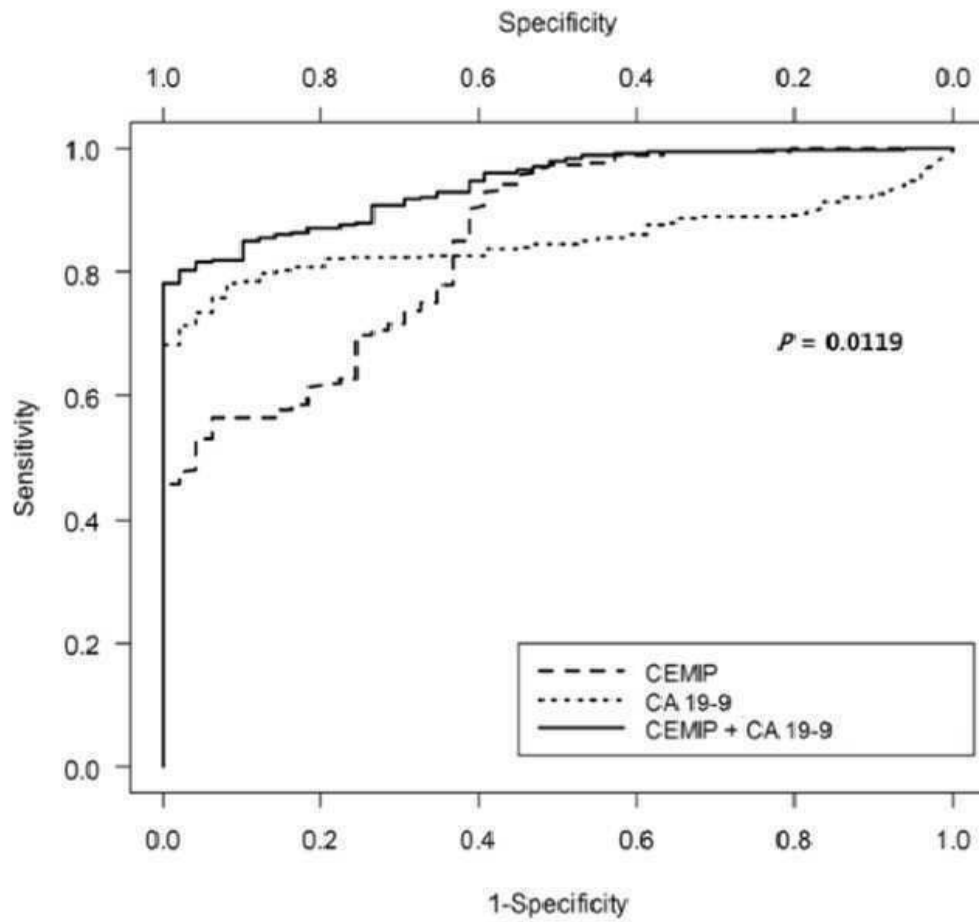
[0094] 이상에서 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

도면

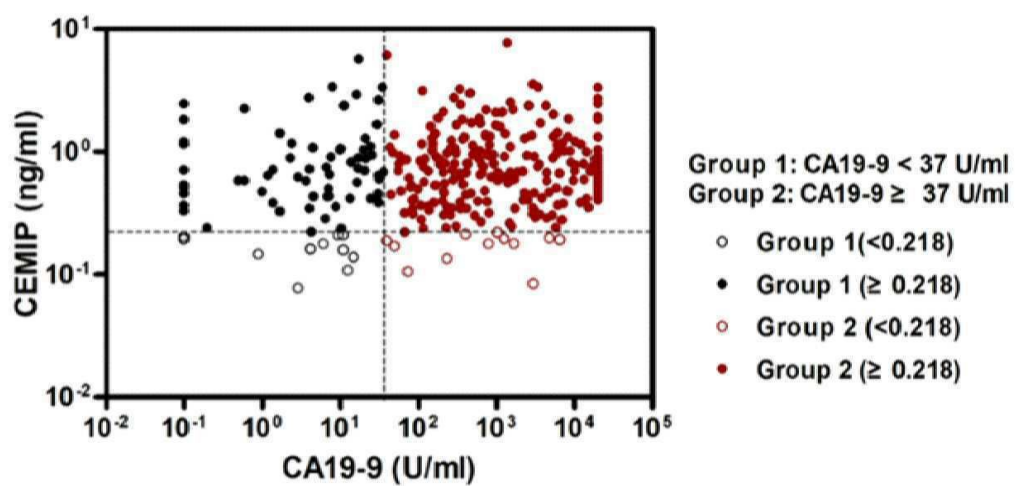
도면1



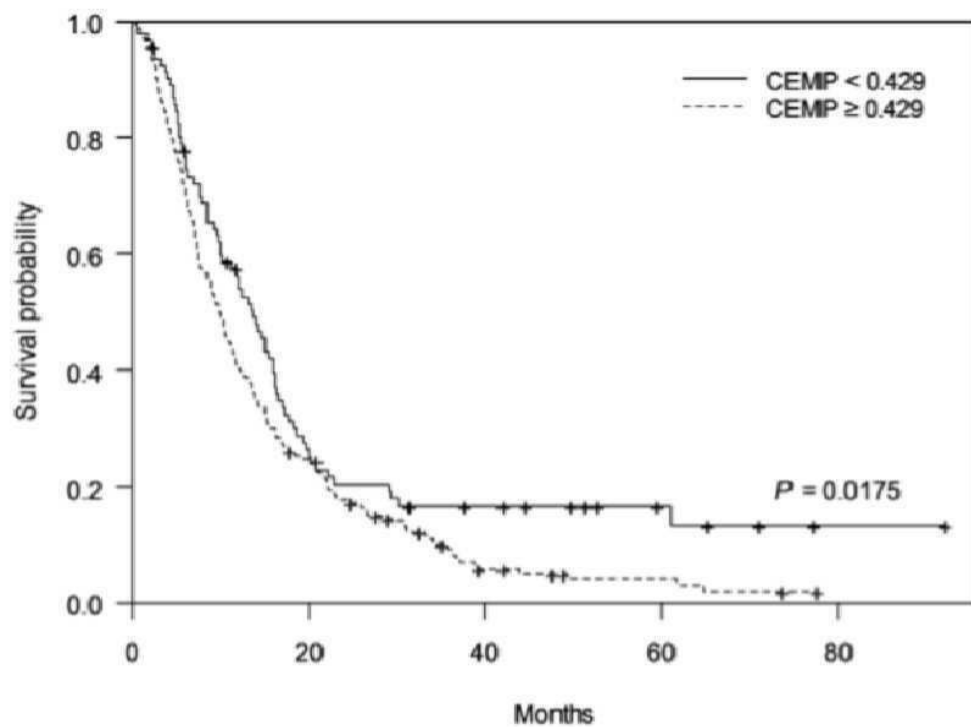
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Composition for diagnosing cancer

<130> PDPB182221k01

<150> KR 10-2018-0023460

<151> 2018-02-27

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1361

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ala Ala Gly Arg Gln Asp Phe Leu Phe Lys Ala Met Leu Thr

1 5 10 15

Ile Ser Trp Leu Thr Leu Thr Cys Phe Pro Gly Ala Thr Ser Thr Val

20 25 30

Ala Ala Gly Cys Pro Asp Gln Ser Pro Glu Leu Gln Pro Trp Asn Pro

35 40 45

Gly His Asp Gln Asp His His Val His Ile Gly Gln Gly Lys Thr Leu
 50 55 60
 Leu Leu Thr Ser Ser Ala Thr Val Tyr Ser Ile His Ile Ser Glu Gly
 65 70 75 80
 Gly Lys Leu Val Ile Lys Asp His Asp Glu Pro Ile Val Leu Arg Thr
 85 90 95
 Arg His Ile Leu Ile Asp Asn Gly Gly Glu Leu His Ala Gly Ser Ala
 100 105 110
 Leu Cys Pro Phe Gln Gly Asn Phe Thr Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Ala
 115 120 125
 Asp Glu Gly Ile Gln Pro Asp Pro Tyr Tyr Gly Leu Lys Tyr Ile Gly
 130 135 140
 Val Gly Lys Gly Gly Ala Leu Glu Leu His Gly Gln Lys Lys Leu Ser
 145 150 155 160
 Trp Thr Phe Leu Asn Lys Thr Leu His Pro Gly Gly Met Ala Glu Gly
 165 170 175
 Gly Tyr Phe Phe Glu Arg Ser Trp Gly His Arg Gly Val Ile Val His
 180 185 190
 Val Ile Asp Pro Lys Ser Gly Thr Val Ile His Ser Asp Arg Phe Asp
 195 200 205
 Thr Tyr Arg Ser Lys Lys Glu Ser Glu Arg Leu Val Gln Tyr Leu Asn
 210 215 220
 Ala Val Pro Asp Gly Arg Ile Leu Ser Val Ala Val Asn Asp Glu Gly
 225 230 235 240
 Ser Arg Asn Leu Asp Asp Met Ala Arg Lys Ala Met Thr Lys Leu Gly
 245 250 255
 Ser Lys His Phe Leu His Leu Gly Phe Arg His Pro Trp Ser Phe Leu
 260 265 270
 Thr Val Lys Gly Asn Pro Ser Ser Ser Val Glu Asp His Ile Glu Tyr
 275 280 285
 His Gly His Arg Gly Ser Ala Ala Ala Arg Val Phe Lys Leu Phe Gln
 290 295 300

Thr Glu His Gly Glu Tyr Phe Asn Val Ser Leu Ser Ser Glu Trp Val
305 310 315 320

Gln Asp Val Glu Trp Thr Glu Trp Phe Asp His Asp Lys Val Ser Gln
325 330 335

Thr Lys Gly Gly Glu Lys Ile Ser Asp Leu Trp Lys Ala His Pro Gly
340 345 350

Lys Ile Cys Asn Arg Pro Ile Asp Ile Gln Ala Thr Thr Met Asp Gly
355 360 365

Val Asn Leu Ser Thr Glu Val Val Tyr Lys Lys Gly Gln Asp Tyr Arg
370 375 380

Phe Ala Cys Tyr Asp Arg Gly Arg Ala Cys Arg Ser Tyr Arg Val Arg

385 390 395 400

Phe Leu Cys Gly Lys Pro Val Arg Pro Lys Leu Thr Val Thr Ile Asp
405 410 415

Thr Asn Val Asn Ser Thr Ile Leu Asn Leu Glu Asp Asn Val Gln Ser
420 425 430

Trp Lys Pro Gly Asp Thr Leu Val Ile Ala Ser Thr Asp Tyr Ser Met
435 440 445

Tyr Gln Ala Glu Glu Phe Gln Val Leu Pro Cys Arg Ser Cys Ala Pro
450 455 460

Asn Gln Val Lys Val Ala Gly Lys Pro Met Tyr Leu His Ile Gly Glu
465 470 475 480

Glu Ile Asp Gly Val Asp Met Arg Ala Glu Val Gly Leu Leu Ser Arg
485 490 495

Asn Ile Ile Val Met Gly Glu Met Glu Asp Lys Cys Tyr Pro Tyr Arg
500 505 510

Asn His Ile Cys Asn Phe Phe Asp Phe Asp Thr Phe Gly Gly His Ile
515 520 525

Lys Phe Ala Leu Gly Phe Lys Ala Ala His Leu Glu Gly Thr Glu Leu

530 535 540

Lys His Met Gly Gln Gln Leu Val Gly Gln Tyr Pro Ile His Phe His

545 550 555 560
 Leu Ala Gly Asp Val Asp Glu Arg Gly Gly Tyr Asp Pro Pro Thr Tyr
 565 570 575
 Ile Arg Asp Leu Ser Ile His His Thr Phe Ser Arg Cys Val Thr Val
 580 585 590
 His Gly Ser Asn Gly Leu Leu Ile Lys Asp Val Val Gly Tyr Asn Ser
 595 600 605

 Leu Gly His Cys Phe Phe Thr Glu Asp Gly Pro Glu Glu Arg Asn Thr
 610 615 620
 Phe Asp His Cys Leu Gly Leu Leu Val Lys Ser Gly Thr Leu Leu Pro
 625 630 635 640
 Ser Asp Arg Asp Ser Lys Met Cys Lys Met Ile Thr Glu Asp Ser Tyr
 645 650 655
 Pro Gly Tyr Ile Pro Lys Pro Arg Gln Asp Cys Asn Ala Val Ser Thr
 660 665 670
 Phe Trp Met Ala Asn Pro Asn Asn Asn Leu Ile Asn Cys Ala Ala Ala

 675 680 685
 Gly Ser Glu Glu Thr Gly Phe Trp Phe Ile Phe His His Val Pro Thr
 690 695 700
 Gly Pro Ser Val Gly Met Tyr Ser Pro Gly Tyr Ser Glu His Ile Pro
 705 710 715 720
 Leu Gly Lys Phe Tyr Asn Asn Arg Ala His Ser Asn Tyr Arg Ala Gly
 725 730 735
 Met Ile Ile Asp Asn Gly Val Lys Thr Thr Glu Ala Ser Ala Lys Asp
 740 745 750

 Lys Arg Pro Phe Leu Ser Ile Ile Ser Ala Arg Tyr Ser Pro His Gln
 755 760 765
 Asp Ala Asp Pro Leu Lys Pro Arg Glu Pro Ala Ile Ile Arg His Phe
 770 775 780
 Ile Ala Tyr Lys Asn Gln Asp His Gly Ala Trp Leu Arg Gly Gly Asp
 785 790 795 800
 Val Trp Leu Asp Ser Cys Arg Phe Ala Asp Asn Gly Ile Gly Leu Thr

805 810 815
Leu Ala Ser Gly Gly Thr Phe Pro Tyr Asp Asp Gly Ser Lys Gln Glu

820 825 830
Ile Lys Asn Ser Leu Phe Val Gly Glu Ser Gly Asn Val Gly Thr Glu

835 840 845
Met Met Asp Asn Arg Ile Trp Gly Pro Gly Gly Leu Asp His Ser Gly

850 855 860
Arg Thr Leu Pro Ile Gly Gln Asn Phe Pro Ile Arg Gly Ile Gln Leu

865 870 875 880
Tyr Asp Gly Pro Ile Asn Ile Gln Asn Cys Thr Phe Arg Lys Phe Val

885 890 895

Ala Leu Glu Gly Arg His Thr Ser Ala Leu Ala Phe Arg Leu Asn Asn

900 905 910
Ala Trp Gln Ser Cys Pro His Asn Asn Val Thr Gly Ile Ala Phe Glu

915 920 925
Asp Val Pro Ile Thr Ser Arg Val Phe Phe Gly Glu Pro Gly Pro Trp

930 935 940

Phe Asn Gln Leu Asp Met Asp Gly Asp Lys Thr Ser Val Phe His Asp

945 950 955 960

Val Asp Gly Ser Val Ser Glu Tyr Pro Gly Ser Tyr Leu Thr Lys Asn

965 970 975
Asp Asn Trp Leu Val Arg His Pro Asp Cys Ile Asn Val Pro Asp Trp

980 985 990

Arg Gly Ala Ile Cys Ser Gly Cys Tyr Ala Gln Met Tyr Ile Gln Ala

995 1000 1005

Tyr Lys Thr Ser Asn Leu Arg Met Lys Ile Ile Lys Asn Asp Phe Pro

1010 1015 1020

Ser His Pro Leu Tyr Leu Glu Gly Ala Leu Thr Arg Ser Thr His Tyr

1025 1030 1035 1040

Gln Gln Tyr Gln Pro Val Val Thr Leu Gln Lys Gly Tyr Thr Ile His

1045 1050 1055

Trp Asp Gln Thr Ala Pro Ala Glu Leu Ala Ile Trp Leu Ile Asn Phe
 1060 1065 1070
 Asn Lys Gly Asp Trp Ile Arg Val Gly Leu Cys Tyr Pro Arg Gly Thr
 1075 1080 1085
 Thr Phe Ser Ile Leu Ser Asp Val His Asn Arg Leu Leu Lys Gln Thr
 1090 1095 1100
 Ser Lys Thr Gly Val Phe Val Arg Thr Leu Gln Met Asp Lys Val Glu

 1105 1110 1115 1120
 Gln Ser Tyr Pro Gly Arg Ser His Tyr Tyr Trp Asp Glu Asp Ser Gly
 1125 1130 1135
 Leu Leu Phe Leu Lys Leu Lys Ala Gln Asn Glu Arg Glu Lys Phe Ala
 1140 1145 1150
 Phe Cys Ser Met Lys Gly Cys Glu Arg Ile Lys Ile Lys Ala Leu Ile
 1155 1160 1165
 Pro Lys Asn Ala Gly Val Ser Asp Cys Thr Ala Thr Ala Tyr Pro Lys
 1170 1175 1180

 Phe Thr Glu Arg Ala Val Val Asp Val Pro Met Pro Lys Lys Leu Phe
 1185 1190 1195 1200
 Gly Ser Gln Leu Lys Thr Lys Asp His Phe Leu Glu Val Lys Met Glu
 1205 1210 1215
 Ser Ser Lys Gln His Phe Phe His Leu Trp Asn Asp Phe Ala Tyr Ile
 1220 1225 1230
 Glu Val Asp Gly Lys Lys Tyr Pro Ser Ser Glu Asp Gly Ile Gln Val
 1235 1240 1245
 Val Val Ile Asp Gly Asn Gln Gly Arg Val Val Ser His Thr Ser Phe

 1250 1255 1260
 Arg Asn Ser Ile Leu Gln Gly Ile Pro Trp Gln Leu Phe Asn Tyr Val
 1265 1270 1275 1280
 Ala Thr Ile Pro Asp Asn Ser Ile Val Leu Met Ala Ser Lys Gly Arg
 1285 1290 1295
 Tyr Val Ser Arg Gly Pro Trp Thr Arg Val Leu Glu Lys Leu Gly Ala
 1300 1305 1310

Asp Arg Gly Leu Lys Leu Lys Glu Gln Met Ala Phe Val Gly Phe Lys
1315 1320 1325

Gly Ser Phe Arg Pro Ile Trp Val Thr Leu Asp Thr Glu Asp His Lys
1330 1335 1340

Ala Lys Ile Phe Gln Val Val Pro Ile Pro Val Val Lys Lys Lys Lys
1345 1350 1355 1360

Leu