(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월22일
(11) 등록번호 10-2280503
(24) 등록일자 2021년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/574 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0065497
(22) 출원일자 2019년06월03일
심사청구일자 2019년06월03일
(65) 공개번호 10-2020-0139002
(43) 공개일자 2020년12월11일
(56) 선행기술조사문헌
Onco Targets Ther. 2016, 9: 2455-2463*
Clujul Med. 2015, 88(2): 111-115*
WO2004044178 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
정혜원
서울특별시 강남구 도곡로93길 12, 202동 707호(대치동, 래미안 대치 하이스턴)
김진주
서울특별시 강서구 양천로 497, 101-1103(가양동, 강나루2차현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
파도특허법인(유한), 이재영

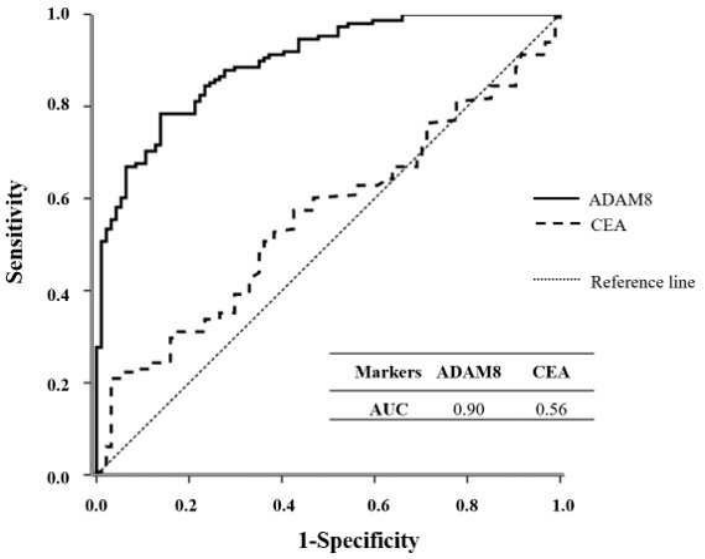
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **암의 진단용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 목적하는 개체의 액체 생검으로부터 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 암의 발병 가능성을 조기에 예측할 수 있고, 암의 병기(stage) 또한 예측이 가능하도록 하는 조성물, 키트 및 상기 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/112 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/96486 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/56 (2013.01)

(72) 발명자
최재일
서울특별시 서대문구 가재울미래로 2, 218동 803호(남가좌동, DMC파크뷰자이)
이해림
인천광역시 부평구 화랑남로9번길 46(산곡동)
임종백
서울특별시 강남구 도곡로93길 12, 202동 707호(대치동, 래미안 대치 하이스턴)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017R1A2B2011728
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구
연구과제명	난치성 항암제 다제 내성 암 원인 바이오마커 발굴을 통한 면역세포치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

ADAM8(A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제; 및

암 배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 위암의 진단용 조성물로,

목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 ADAM8의 발현 수준이 20 ng/ml 이상이고, 상기 암 배아 항원의 발현 수준이 3 ng/ml 이상인 경우, 상기 위암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는, 위암의 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 액체 생검(liquid biopsy)인, 위암의 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 액체 생검은 혈액, 혈청 또는 혈장인, 위암의 진단용 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 ADAM8 또는 상기 암 배아 항원의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 ADAM8 또는 상기 암 배아 항원에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앱타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 위암의 진단용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 ADAM8 또는 상기 암 배아 항원을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 ADAM8 또는 상기 암 배아 항원을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 위암의 진단용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 초기 단계(early stage)의 위암의 발병 여부 또는 발병 가능성을 진단하기 위한 것인, 위암의 진단용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 N-병기(N-stage)의 위암의 발병 여부 또는 발병 가능성을 진단하기 위한 것인, 위암의 진단용 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항 내지 제3항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 위암의 진단용 조성물을 포함하는 위암의 진단용 키트로,

목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 ADAM8의 발현 수준이 20 ng/ml 이상이고, 암 배아 항원의 발현 수준이 3 ng/ml 이상인 경우, 상기 위암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는, 위암의 진단용 키트.

청구항 11

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 암 배아 항원(CEA) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 상기 ADAM8의 발현 수준이 20 ng/ml 이상이고, 상기 암 배아 항원의 발현 수준이 3 ng/ml 이상인 경우, 위암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는, 위암의 진단 또는 위암의 병기에 관한 정보 제공 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 액체 생검(liquid biopsy)인, 위암의 진단 또는 위암의 병기에 관한 정보 제공 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 액체 생검은 혈액, 혈청 또는 혈장인, 위암의 진단 또는 위암의 병기에 관한 정보 제공 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 위암은 초기 단계(early stage)의 위암인, 위암의 진단 또는 위암의 병기에 관한 정보 제공 방법.

청구항 16

제11항에 있어서,

상기 위암의 병기는 림프절 전이 여부에 관한 N-병기(N-stage)인, 위암의 진단 또는 위암의 병기에 관한 정보 제공 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 목적하는 개체의 액체 생검으로부터 암의 발병 가능성을 조기에 예측할 수 있고, 암의 병기(stage) 또한 예측이 가능하도록 하는 조성물, 키트 및 상기 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 위암은 전 세계적으로 한국, 중국, 일본 등에서 많이 발생하는 암으로써 미국, 유럽 등의 서구에서는 발생율이 낮으나, 한국의 경우 암 발생율 1위가 위암이고, 사망율은 폐암에 이어 2위를 차지하고 있다. 위암의 분류를 살펴보면 전체의 95%가 위벽 점막의 샘 세포에서 생기는 선암이며, 그 외 림프계에서 발생하는 림프종, 간질조직에서 발생하는 위장관 간질성종양이 있다.

[0003] 현재 암을 치료하는 방법 중 3가지 주요 치료법으로는 외과적 치료법, 약물 요법, 방사선 요법이 있는데, 약물 요법은 치료에 동반되는 고통이 적고, 외과적 치료나 방사선 치료에 비해 치료 후에도 암의 재발이 상대적으로 적으므로 이에 대해 기대가 모아지고 있다. 따라서 이에 부응할 만한 수많은 항암제가 개발되어 사용되고 있는데, 이들 대부분의 항암제는 암의 이상증식을 염두에 두고 활발하게 분열하는 세포를 선택적으로 죽게 함으로써 항암 효과를 나타내는 것이다. 이러한 항암제는 일반적으로 인체 내에서 활발하게 분열하는 세포인 면역세포, 모근세포와 같은 정상세포도 함께 죽이게 되는 심각한 부작용을 동반하므로 장기간 사용이 불가능한 문제점을 안고 있다. 또한, 위암치료를 위한 방법으로는 림프절 절제술, 내시경적 점막절제술, 복강경적 위절제술 등의 방법이 사용되고 있는데, 내시경적 점막절제술은 점막 내 조기위암에 대해 암 병변이 있는 위 점막 주위에 생리식염수를 주입하여 병변부위를 볼록하게 부풀린 다음 병변이 있는 점막을 절제하는 방법으로, 간단한 내시경 시술로 위 절제수술의 고통을 피할 수 있다는 장점이 있지만, 점막에 국한된 조기위암 중 림프절 전이가능성이 낮은 경우에 한해 사용할 수 있다는 한계가 있다.

[0004] 최근 들어, 전 세계적으로 암의 생성 및 치료와 관련된 유전자의 기능 연구를 통해 치료용 표적을 발굴하고 이들을 진단 및 치료제 개발에 이용하기 위한 연구를 진행하고 있다. 게놈 연구의 활성화와 함께 인간 유전자 DNA 칩 또는 프로테옴 분석 연구가 활발하게 이루어지고 암과 관련된 유전자가 대량 발굴됨에 따라 많은 유전자들의 목록과 관련 데이터베이스는 구축되어 있으나 대부분 이들 유전자들에 대한 세포 내에서의 구체적 생물학적 기능 및 암 관련성은 아직 연구되지 않았거나 불확실하여 실제 암 관련성 또는 진단 및 표적 유전자로서의 활용과 함께 나아가 암을 효과적으로 치료할 수 있는 유전자의 발굴에 상당한 어려움이 있다. 따라서 지금까지 밝혀진 암 관련 유전자 이외에도 새로운 유전자들의 발굴이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 일 목적은 암의 발병 가능성을 조기에 진단할 수 있으며, 암의 병기 등을 높은 정확도로 진단할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 암의 발병 가능성을 조기에, 그리고 암의 병기 등을 높은 정확도로 진단할 수 있는 키트를 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 발병 가능성을 조기에, 그리고 암의 병기 등을 높은 정확도로 진단하기 위해 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 암을 치료하기 위한 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, ADAM8(A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0011] 본 발명에서 상기 "ADAM8"은 *ADAM8* 유전자에 의해 코딩되는 효소로, 뱀독 디스인테그린(snake venom disintegrins)과 구조적으로 관련된 막 고정 단백질(membrane-anchored protein)에 속하며, 세포-세포 및 세포-매트릭스 사이의 다수의 생물학적 과정에 관련되어 있다. 또한, 상기 ADAM8은 신경 퇴화 중 세포 부착에 관여하는 것으로 알려진 바 있다. 본 발명에서 상기 ADAM8은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명에서 상기 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준은 목적하는 개체의 액체 생검(liquid biopsy)으로부터 측정될 수 있다. 본 발명에서 상기 액체 생검은 혈액, 혈청 또는 혈장일 수 있다.

[0013] 일반적으로 암의 진단을 위하여 바이오마커의 발현 수준을 측정하기 위해서는 암이 발생된 조직의 일부를 분리한 뒤 상기 암 조직 내의 바이오마커의 발현 수준을 측정하여 왔다. 따라서 암의 초기 단계에는 자각이 어려워 조직을 취하는 일이 드물기 때문에 초기 진단이 거의 불가능한 단점이 있을 뿐만 아니라, 조직으로부터 세포를 분리하여야 하는 번거로움도 있다.

[0014] 하지만, 본 발명에서는 목적하는 개체로부터 분리된 혈액, 혈청 또는 혈장의 액체 생검에서 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 암의 조기 진단이 가능할 뿐만 아니라, 암의 병기 또한 예측할 수 있는 장점이 있다.

[0015] 본 발명의 조성물은 암 배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 추가로 더 포함함으로써, 상기 암 진단의 정확도를 높일 수 있다.

[0016] 본 발명에서 상기 "암 배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA)"은 세포 부착에 관여하는 당단백질(glycoprotein)로, 태아 발달 과정에서 위장 조직에서 생산되며, 출생 전에 그 생산이 멈춘다. 본 발명에서 상기 암 배아 항원은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에서 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원의 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앱타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명에 상기, "단백질의 발현 수준 측정"이란 암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 암의 진단용 마커인 ADAM8 또는 암 배아 항원의 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정을 의미한다. 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원의 발현 수준 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(Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 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 immunosorbentassay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명에 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 ADAM8 또는 암 배아 항원에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용

이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원의 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.

[0020] 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.

[0021] 본 발명에서 상기 "앱타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앱타머의 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.

[0022] 본 발명에 따른 진단용 조성물에서, 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 ADAM8 및 암 배아 항원의 정보는 알려져 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.

[0023] 본 발명에 상기 "유전자의 발현 수준 측정"이란 암을 진단하기 위하여 상기 액체 생검에서 ADAM8 또는 암 배아 항원을 코딩하는 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 유전자의 양을 측정하는 것을 의미한다. 이를 위한 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.

[0024] 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.

[0025] 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 PNA일 수 있다. 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.

[0026] 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 올리고뉴클레오티드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오티드 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, 뉴클레오티드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0027] 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)를 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 상기한 질환의 발병 여부 또는 발병 가능성(위험성)이나, 상기한 암의 병기, 또는 암 환자의 생존율이나 치료 반응성을 확인하는 것이다.

[0028] 본 발명에서 상기 "병기(stage)"란 암세포가 퍼진 정도, 암의 진행 단계를 의미하는 것으로, 암의 진행상황에 따른 국제적분류는 일반적으로 TNM 병기 분류에 따른다. 여기서 'T(Tumor Size)'는 원발 종양의 크기에 따른 분류이고, 'N(Lymph Node)'은 림프절 전이 정도에 따른 분류이며, 'M(Metastasis)'은 다른 장기로의 전이 여부에 따른 분류에 해당한다. T, N, M에 있어서 상세 분류는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0030]

TNM 병기		정의
원발 종양의 크기 (T 병기) Size of the primary tumor(T stage)	T0	종양세포의 형태가 악성종양의 모습을 보이나 발생한 점막 또는 상피에 국한돼 있고 아직 기저막을 침윤하지 않은 종양
	T1	원발된 장기에 제한된 병변, 종양이 가동서잉 있으며 인접 및 주위조직에 침범이 없음
	T2	종양의 크기가 2~5cm 정도
	T3	종양의 크기가 T2 보다 크나 장기 내에 국한됨
	T4a	세로사(serosa) 조직과 유착 및 침윤한 상태
	T4b	주변 조직과 유착 및 침윤한 상태
림프절 전이 여부 (N 병기) Lymph node status(N stage)	N0	림프절 병변의 증거가 없음
	N1	촉지되고 가동성이 있으며 첫 번째 위치에 제한되어 있는 림프절(1~2cm 이상, 보통 3cm까지의 크기) 하나에 침범
	N2	촉지되고 부분적으로 가동성이 있는 또는 단단하거나 딱딱한 림프절, 현미경적으로 침범의 증거가 있고 임상적으로 서로 엉켜있으며 반대측 또는 양측에서 나타남(3~5cm)
	N3	완저닣 고정돼 있고 피막을 통과해 뼈나 큰 혈관, 피부, 신경 등에 완전히 고정되어 있으며 6cm 이상의 크기
원격전이 여부 (M 병기) Distant metastasis (M stage)	M0	원격전이가 없음
	M1	원격전이가 있음

[0031] 또한, 상기 암의 TNM의 분류를 종합하여 암의 병기를 하기 표 2와 같이 IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IV로 분류할 수 있고, 여기서 상기 IA, IB, IIA 및 IIB 병기는 암의 초기(early stage)로 분류할 수 있다.

표 2

[0033]

병기	T	N	M
병기 IA	T1	N0	M0
병기 IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
병기 IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0

병기 ⅡB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
병기 ⅢA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
병기 ⅢB	T4b	N0	M0
	T4b	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
병기 ⅢC	T4b	N2	M0
	T4b	N3	M0
	T4a	N3	M0
병기 Ⅳ	모든 T	모든 N	M1

[0034] 본 발명에서는 목적하는 개체의 액체 생검(liquid biopsy)으로부터 ADAM8, 및 선택적으로 암 배아 항원; 또는 이들을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 초기 단계(early stage)의 암의 발병 여부 또는 발병 가능성을 진단할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에서는 목적하는 개체의 액체 생검으로부터 ADAM8, 및 선택적으로 암 배아 항원; 또는 이들을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 N-병기의 암의 발병 여부 또는 발병 가능성이나, 암의 진행이 N-병기에 어느 단계에 속하는 지를 예측할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 진단의 대상이 되는 질환으로 상기 "암"은 포유류에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징 지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리킨다. 본 발명에서 진단의 대상이 되는 암은 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 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 nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 바람직하게는 위암일 수 있다.

[0038] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 암의 진단용 조성물을 포함하는 암의 진단용 키트에 관한 것이다.

[0039] 본 발명에서는 상기 진단용 키트를 이용하여 초기 단계(early stage)의 암의 발병 여부 또는 발병 가능성을 진단하여, 암의 조기 진단을 가능하게 하고, 암의 병기, 바람직하게는 N-병기를 예측할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 상기 진단의 대상이 되는 질환으로 암은 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 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 nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종을 포함할 수 있지만, 바람직하게는 위암일 수 있다.

[0041] 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.

[0042] 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.

[0043] 예를 들면, 본 발명에서 상기 암의 진단용 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 암호화하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오티드로서, 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.

[0044] 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 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0045] 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.

[0047] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암의 진단 또는 암의 병기에 관한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

[0048] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란, 상기 암의 발병 여부가 불확실한 개체로, 발병 가능성이 높은 개체를 의미한다.

[0049] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 액체 생검(liquid biopsy)으로, 본 발명에서 상기 액체 생검은 혈액, 혈청 또는 혈장일 수 있다.

[0050] 본 발명에서는 상기와 같이 분리된 생물학적 시료에서 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명에서는 상기와 같이 분리된 생물학적 시료에 대하여 암 배아 항원(CEA) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 더 포함함으로써, 상기 암 진단의 정확도를 높일 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원의 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앱타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명에 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원의 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(Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 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 immunosorbentassay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명에서 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명에 상기 ADAM8 또는 암 배아 항원을 코딩하는 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 유전자의 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.

[0056] 본 발명에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 ADAM8, 및 선택적으로 암 배아 항원; 또는 이들을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 정상 대조군에서 측정된 수준과 비교하여 암의 발병 가능성 또는 암의 병기를 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명에서는 초기 단계의 암의 발병 가능성 또는 발병 여부를 예측할 수 있어, 암의 조기 진단이 가능하다.

[0058] 또한, 본 발명에서 상기 암의 병기는 림프절 전이 여부에 관한 N-병기(N-stage)일 수 있다.

[0059] 본 발명에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 ADAM8, 및 선택적으로 암 배아 항원; 또는 이들을 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 상기 암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명에서 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 ADAM8의 발현 수준이 20 ng/ml 이상, 25 ng/ml 이상 또는 30 ng/ml 이상, 바람직하게는 25 ng/ml 이상인 경우 상기 암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.

[0061] 본 발명에서 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 암 배아 항원의 발현 수준이 3 ng/ml 이상 또는 5 ng/ml 이상인 경우 상기 암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명에서 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 ADAM8, 및 선택적으로 암 배아 항원; 또는 이들을 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 상기 암의 진행이 N-병기(N-stage)인 것으로, 혹은 상기 암의 림프절 전이의 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명에서 상기 암은 위암, 난소암, 대장암, 췌장암, 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 nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으나, 바람직하게는 위암일 수 있다.

[0065] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 분리된 생물학적 시료에서 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0066] 상기 생물학적 시료에 피검 물질을 접촉시키는 단계; 및

[0067] 상기 피검 물질의 접촉 후 상기 생물학적 시료에서 상기 ADAM8 또는 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암을 치료하기 위한 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0068] 본 발명에서는 상기와 같이 분리된 생물학적 시료에 대하여 암 배아 항원(CEA) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 더 포함함으로써, 상기 암을 치료하기 위한 약물을 스크리닝함에 있어 그 정확도를 높일 수 있다.

[0069] 본 발명에서 상기 피검 물질은 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실재물(entity) 또는 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 이들로 한정되지는 않으나, 단백질, 폴리펩티드, 소유기분자(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함한다. 또한, 천연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수도 있다.

[0070] 본 발명에서 상기 피검 물질의 접촉 후 상기 생물학적 시료에서 상기 ADAM8, 및 선택적으로 암 배아 항원(CEA); 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이, 상기 피검 물질의 접촉 전에 비하여 감소된 경우, 상기 피검 물질을 암의 치료제로 판별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0071] 또한, 본 발명에서 상기 피검 물질의 접촉 후 상기 생물학적 시료에서 상기 ADAM8, 및 선택적으로 암 배아 항원(CEA); 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이, 상기 피검 물질의 접촉 전에 비하여 감소된 경우, 상기 피검 물질을 암의 림프절 전이 억제제로 판별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0072] 본 발명에서 상기 목적하는 개체, 생물학적 시료 및 암의 정의와, ADAM8 또는 암 배아 항원; 또는 이들을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법에 관하여는 본 발명의 암의 진단을 위한 정보 제공 방법에 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위해 이하 그 자세한 기재를 생략한다.

[0074] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 분리된 생물학적 시료에 암을 유도할 것으로 예상되는 후보 물질을 처리하는 단계; 및

[0075] 상기 후보 물질이 처리된 생물학적 시료에서 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암을 유도하는 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0076] 본 발명에서는 상기와 같이 분리된 생물학적 시료에 대하여 암 배아 항원(CEA) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 더 포함함으로써, 상기 암을 유도하는 약물을 스크리닝함에 있어 그 정확도

를 높일 수 있다.

[0077] 본 발명에서 상기 후보 물질은 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실재물(entity) 또는 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 이들로 한정되지는 않으나, 단백질, 폴리펩티드, 소유기분자(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함한다. 또한, 천연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수도 있다.

[0078] 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 상기 ADAM8, 및 선택적으로 암 배아 항원(CEA); 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이, 상기 후보 물질의 처리 전에 비하여 증가된 경우, 상기 후보 물질을 암의 유발제로 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0079] 또한, 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 상기 ADAM8, 및 선택적으로 암 배아 항원(CEA); 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이, 상기 후보 물질의 처리 전에 비하여 증가된 경우, 상기 후보 물질을 암의 림프절 전이 유발제로 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명에서 상기 목적하는 개체, 생물학적 시료 및 암의 정의와, ADAM8 또는 암 배아 항원; 또는 이들을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법에 관하여는 본 발명의 암의 진단을 위한 정보 제공 방법에 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위해 이하 그 자세한 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0081] 본 발명에서는 목적하는 개체의 액체 생검에 대하여 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 암을 조기에 진단할 수 있고, 암의 N-병기를 예측할 수 있으며, 종래에 조직을 취하여 질환과 관련된 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 방법과 비교하여 비침습적이면서 간단하고 신속하지만 매우 정확한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 독립 검증 자료에서 위암 예측을 위한 혈액 내 ADAM8 및 CEA의 AUC 및 ROC 커브를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 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.

[0085] **실시예**

[0087] 실험 대상

[0088] 실험 대상을 위염(gastritis)-이형성(dysplasia)-암종(carcinoma)을 포함하여 총 5군으로 분류하였다. 정상 대조군은 정상적인 위 점액 또는 단순성 위염인 개체를 포함하고, 고위험군은 저-등급 또는 고-등급의 이형성 개체를 포함하며, 초기 위암(EGC) 군은 전이 없이 점막하층에 국한하여 위암이 존재하는 개체를 포함하고, 전이 없는 진행 위암(AGC) 군은 전이 없이 근육층을 넘어서 위암이 존재하는 개체를 포함하며, 전이 있는 AGC 군은 전이를 포함하여 근육층을 넘어서 위암이 존재하는 개체를 포함한다.

[0089] 초기 트레이닝 자료(initial training dataset)로는 총 80명의 개체가 선별되었고, 그 중에서 정상 대조군은 20명, 이형성 군은 10명, EGC 군은 20명, 전이 없는 AGC 군은 20명, 전이 있는 AGC 군은 10명이 등록되었다.

[0090] 독립 검증 자료(independent validation dataset)로는 총 241명의 개체가 선별되었고, 그 중에서 정상 대조군은 70명, 이형성 군은 24명, EGC 군은 70명, 전이 없는 AGC 군은 50명, 전이 있는 AGC 군은 27명이 등록되었다.

[0091] 진단 정확성을 향상시킬 수 있는 위암의 진단 및 위암의 병기 진단을 위한 새로운 마커를 확인하기 위하여, 위 증상 또는 일상적 검진을 위하여 연세대학교의료원(Yonsei University Health System)을 방문한 모든 환자에 대하여 위장관 내시경(gastrointestinal endoscopy) (Types XQ-260, Olympus, Tokyo, Japan)을 수행하고, 추가적 치료를 수행하기 전에 혈액 시료를 취득하였다. 모든 위암 환자군에 대하여는 TNM 병기 분류를 위하여, 흉부 X-레이, 복부-골반 나선형 CT 촬영, 및 전신에 대한 양전자방출 단층촬영술(PET)을 수행하였다. 위암의 병기는 7th International Union Against Cancer의 TMN stage에 따라 분류하였다. 로렌 분류법(Lauren classification)을 이용하여 조직 병리학적 분화(histopathologic differentiation)를 진단하였다. 간 경변증,

만성 신장 질환, 당뇨병과 같은 만성 질환을 겪고 있는 환자는 본 실험에서 제외하였다. 다른 암종이나 위장관 기질 종양, 점막 관련 림프 조직 림프종(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma) 및 신경 내분비 종양과 같은 다른 위 종양을 가진 환자도 본 실험에서 제외하였다. 또한, 이전에 위암 또는 전암성 병변(premalignant lesions)으로 인하여 치료를 받은 전적이 있는 환자 역시 본 실험에서 제외하였다.

[0093] 혈액 내 ADAM8; CEA; 인터루킨-23(IL-23); 기질 세포 유래 인자 1α(SDF-1α)/CXC 케모카인 리간드 12(CXCL12); 인터루킨-8(IL-8) 및 용해성 CD40 리간드(sCD40L)의 발현 수준의 측정

[0094] 혈액 내 ADAM8의 발현 수준은 상업적으로 판매되는 ELISA 키트(SEA620Hu, CLOUD-CLONE, Katy, TX, USA)를 사용하여 측정하였다. 간단히는, 혈액 시료 및 표준 시약(standard solution)을 각각 100 μl를 미리 코팅된 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 37 ℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 검출 시약 A(Detection Reagent A) 100 μl를 처리한 뒤 37 ℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 각각의 웰을 3번 세척한 뒤 시약 B(Reagent B) 100 μl를 처리한 뒤 37 ℃에서 30분 동안 반응시켰다. 5회 세척 후, 기질 용액 90 μl를 첨가한 뒤 37 ℃에서 10~20분 동안 반응시켰다. 그 후, VERSA 맥스 마이크로플레이트 리더(VERSA max microplate reader)(Molecular Devices Co., Sunnyvale, Calif., USA)를 이용하여 450 nm에서 혈액 내 ADAM8의 발현 수준을 측정하였다.

[0095] 혈액 내 CEA 발현 수준은 Beckman Access CEA 어쎄이(Beckman Coulter Inc. Chaska, USA)를 이용하여 측정하였다. IL-23, SDF-1 알파, IL-8 및 sCD40L의 혈액 수준은 화학발광 면역 분석법(chemiluminescent immunoassay)을 이용하여 상업적으로 판매되는 MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine 키트(Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 구체적으로는 필터 플레이트(filter plate)를 어쎄이 버퍼(assay buffer) 200 μl에 상온에서 10분 동안 전-침지시킨 뒤 상기 어쎄이 버퍼를 진공 제거하였다. 표준 또는 대조군 용액 25 μl를 웰에 첨가하고 어쎄이 버퍼 25 μl를 시료 웰에 첨가하고, 배경 웰(background well)에는 첨가하지 않았다. 적절한 기질 용액 25 μl를 배경 웰, 표준 웰 및 대조군 웰에 첨가하고, 시료 25 μl를 첨가하였다. 혼합 후 비드 25 μl를 첨가한 뒤 플레이트를 흔들며 4 ℃에서 밤새 배양하였다. 배양 후 유체를 제거하고 플레이트를 2회 세척하였다. 검출 항체(25 μl)를 첨가한 뒤 플레이트를 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 스트렙타비딘-피코에리트린(25 μl)을 검출 항체 25 μl를 포함하는 각각의 웰에 첨가한 뒤 흔들며 상온에서 1시간 배양하였다. 유체를 제거한 뒤 플레이트를 세척하고, 시스 유체(sheath fluid) 150 μl를 첨가하였다. 5분 동안 재-부유시킨 후 Luminex 100쩨 IS 를 이용하여 중간의 형광 강도를 읽은 뒤 케모카인 농도를 결정하기 위하여 로지스틱-곡선 피팅 방법(logistic curve-fitting method)를 이용하여 분석하였다.

[0097] 통계적 분석

[0098] 측정된 모든 값은 25 내지 75%의 표준편차(standard deviation) 값을 포함하는 평균값(mean)으로 나타내었고, 각각의 그룹 평균값은 post-hoc Bonferroni method의 다중 비교를 이용하여 one-way ANOVA test 방법으로 비교하였다. 독립 시료 t-테스트는 암과 비-암 조건에서 평균을 비교하기 위하여 사용되었다. 그리고 실험을 통하여 측정된 혈청 내 농도와 임상병리학적 인자들 (clinicopathological parameters)과의 상관관계를 확인하기 위해서는 피어슨 상관계수(Pearson's correlation, coefficient, g_p)와 스피어만 상관계수(Spearman뭩 correlation, coefficient, g_s)를 이용하여 확인하였다. 초기 위암 사이즈는, 혈액 내 ADAM8 발현 수준과의 상관 관계를 분석하기 위하여 < 3 cm; 3-5 cm 및 > 5 cm의 3가지 그룹으로 분류하였다. ROC(receiver operating characteristic) 커브를 형성한 뒤 AUC(area under the curves)를 계산하여 위암의 존재를 예측하기 위한 각 값의 진단 정확도를 비교하였다. 위암의 존재를 예측함에 있어 단일 마커 또는 복합 마커 사이의 최적의 민감도/특이도를 얻기 위하여 로지스틱 회귀 분석을 수행하였다. 각각의 마커는 일차항(linear term)으로 포함되었다.

[0100] 초기 트레이닝 자료- 5가지 군에서 혈액 내 ADAM8과 CEA 발현 수준의 비교

[0101] 초기 트레이닝 자료를 위하여 총 80명 개체의 정보가 등록되었다. 위암 발암 과정에서 혈액 내 ADAM8 및 CEA의 발현 수준을 측정하고, 정상 대조군, 이형성 군, EGC 군, 전이 없는 AGC 군 및 전이 있는 AGC 군의 총 5가지 군에서 그 발현 수준을 비교하였다. 그 결과 하기 표 3에서 보는 바와 같이 5가지 군에서 혈액 내 ADAM8의 수준의 평균 값은 전혀 상이하게 측정되었고(ANOVA, $p < 0.001$), 암화 과정이 진행되면서 그 발현 수준이 증가하였다: 정상/위염 군에서 혈액 내 ADAM8의 발현 수준은 1.7±2.6 ng/mL이고, 이형성 군에서는 15.3±13.3 ng/mL, EGC 군에서는 53.9±36.9 ng/mL, 전이 없는 AGC 군은 82.8±52.6 ng/mL, 원발 전이 있는 AGC 군은 53.6±26.3 ng/mL로 측정되었다. 혈액 내 ADAM8 발현 수준은 위암의 초기 단계에서 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 표 3에서 보는 바와 같이, 초기 위암 환자 군인, EGC 군에서 혈액 내 ADAM8의 발현 수준이 이형성증 군(high-risk, post-hoc Bonferroni, $p < 0.001$)이나 정상 대조군(control, post-hoc Bonferroni, $p < 0.001$)에

비하여 현저히 높은 것을 확인할 수 있었다. 그런데 혈액 내 ADAM8의 발현 수준은 위암 환자의 각 군에서는 큰 차이가 없었고, 초기 위암 환자군(EGC)에 비하여 전이는 없이 진행된 위암 환자군(AGC)에서 발현 수준이 약간 증가하였지만(post-hoc Bonferroni between EGC and AGC, $p = 0.086$), 원발 전이 있는 진행된 위암 환자군에서 통계적 유의성은 없었으나 발현 수준이 오히려 감소되었다. 또한, 표 4에서 보는 바와 같이 암 환자 군과 비-암 환자군 사이에서 혈액 내 ADAM8 발현 수준의 평균 값을 비교해본 결과, 암 환자군에서는 65.4±44.0 ng/mL으로 비-암 환자군(6.2±10.1 ng/mL)에 비하여 현저히 높은 값을 보였다(t-test, $p < 0.001$).

[0102] 한편, 표 3에서 보는 바와 같이, 혈액 내 CEA 발현 수준은 전이 있는 AGC 군을 제외하고는 각 군 간에 발현 수준에 큰 차이가 없었으며, 전이 있는 AGC 군에서만 현저히 증가하였다(ANOVA, $p = 0.013$). 혈액 내 CEA의 평균 발현 수준을 암 환자군과 비-암 환자군 사이에서 비교해본 결과, 두 군 간에 발현 수준에 큰 차이가 없었다($p = 0.235$, t-test).

표 3

[0104]

그룹 (N)	정상/위염 (20)	이형성증 (10)	EGC (20)	AGC (20)	전이 (10)	*p*-value
혈청 ADAM8 (ng/mL)	1.7 ± 2.6	15.3 ± 13.3	53.9 ± 36.9	82.8 ± 52.6	53.6 ± 26.3	<0.001
혈청 CEA(ng/mL)	1.9 ± 1.1	3.7 ± 1.9	2.0 ± 1.2	3.6 ± 6.7	9.8 ± 14.1	0.013

표 4

[0105]

그룹 (N)	비-암 환자군 (30)	암 환자군 (50)	*p*-value
혈청 ADAM8(ng/mL)	6.2 ± 10.1	65.4 ± 44.0	<0.001
혈청 CEA(ng/mL)	2.5 ± 1.6	4.2 ± 7.9	0.235

[0107] 독립 검증 자료-위암의 암화 진행에 따른 혈액 내 ADAM8과 CEA 발현 수준의 비교

[0108] 앞선 초기 트레이닝 자료의 결과의 재현성을 확인하기 위하여, 독립 검증 자료를 이용하였다. 검증 자료에는 총 241명 개체의 정보가 등록되었다. 트레이닝 자료와 유사하게, 암화 진행에 따라 혈액 내 ADAM8 발현 수준의 평균 값이 증가하였다. 표 5에 따르면, 정상/위염 군에서 혈액 내 ADAM8의 발현 수준은 6.4±8.7 ng/mL이고, 이형성 군에서는 23.7±16.0 ng/mL, EGC 군에서는 54.5±42.7 ng/mL, 전이 없는 AGC 군은 67.9±55.1 ng/mL, 원발 전이 있는 AGC 군은 55.0±29.7 ng/mL로 측정되었다(ANOVA, $p < 0.001$). 독립 검증 자료에서도 혈액 내 ADAM8의 발현 수준은 초기 위암 단계에서 현저히 증가하였고, 초기 위암 단계에 비하여 전이 없는 진행된 위암 단계에서 상기 혈액 내 ADAM8의 발현 수준이 약간 증가하였지만, 암 환자 군 사이에서 유의적 차이는 없었다. 또한, 표 6에서 보는 바와 같이, 암 환자군과 비-암 환자군에서 상기 혈액 내 ADAM8의 발현 수준의 평균 값을 비교해본 결과, 초기 트레이닝 자료와 동일하게, 암 환자군에서의 혈액 내 ADAM8의 발현 수준(59.1±45.4 ng/mL)이 비-암 환자군에서 측정된 상기 혈액 내 ADAM8의 발현 수준의 값(10.8±13.3 ng/mL)에 비하여 현저히 높은 값을 보였다(t-test, $p<0.001$).

[0109] 한편, 혈액 내 CEA 발현 수준 또한 초기 트레이닝 자료와 유사하게 전이 있는 AGC 군에서만 현저히 증가하였고, 암 환자군과 비-암 환자군 사이에서 유의적인 차이점이 없었다.

표 5

[0111]

그룹 (N)	정상/위염 (70)	이형성증 (24)	EGC (70)	AGC (50)	전이 (27)	*p*-value
혈청 ADAM8(ng/mL)	6.4 ± 8.7[표]	23.7 ± 16.0	54.5 ± 42.7	67.9 ± 55.1	55.0 ± 29.7	<0.001
혈청 CEA(ng/mL)	1.9 ± 1.0	3.5 ± 4.3	2.1 ± 1.4	2.5 ± 2.8	6.7 ± 4.3	<0.001

표 6

[0112]

그룹 (N)	비-암 환자군 (94)	암 환자군 (148)	*p*-value
혈청 ADAM8(ng/mL)	10.8 ± 13.3	59.1 ± 45.4	<0.001
혈청 CEA(ng/mL)	2.3 ± 2.4	3.0 ± 3.1	0.053

[0114] 검증 자료를 통한 혈액 내 ADAM8의 발현 수준과 임상 병리학적 특성 사이 상관 관계의 규명

[0115] 하기 표 7에서 보는 바와 같이, 혈액 내 ADAM8 발현 수준은 개체의 나이(Pearson's correlation; r_p = -0.064, p = 0.319) 및 성별(Spearman's correlation; r_s = -0.095, p = 0.143)에는 영향을 받지 않았다. 조직 병리학적으로, 혈청 내 ADAM8의 발현 수준은 위암의 조직학적 분화(r_s = 0.139, p = 0.193), 초기 위암의 위치(r_s = 0.058, p = 0.397), 그리고 초기 위암의 크기(r_s = 0.121, p = 0.249)와는 유의적 상관 관계가 없었다. 또한, 상기 혈청 내 ADAM8의 발현 수준은 암 세포의 침윤의 깊이(T-병기, r_s = 0.197, p = 0.085) 및 원발 전이(M-병기, r_s = 0.140, p = 0.193)와도 유의적 상관 관계가 없었으나, N-병기(r_s = 0.320, p = 0.011)와는 높은 상관 관계를 보였다.

표 7

[0117]

임상 병리학적 특성	혈청 ADAM8
	g_s (*p*-value)
나이 (년)	-0.064 (0.319)
성별 (남:여)	-0.095 (0.143)
조직 (잘 분화됨:중간 분화됨:분화가 잘 되지 않음: 반지모양 위암)	0.139 (0.193)
종양 위치 (아래(lower):중간(middle):위(upper))	0.058(0.397)
종양 크기 (<3 cm; 3-5 cm 및 >5 cm)	0.121 (0.249)
T-병기 (T1a:T1b:T2:T3:T4)	0.197 (0.085)
N-병기 (N0:N1:N2:N3)	0.320 (0.011)
원발 전이 (M0:M1)	0.140 (0.193)

[0119] 검증 자료를 통한 위암의 존재 예측을 위한 혈액 ADAM8, CEA 및 이들의 조합의 진단적 응용

[0120] 검증 자료에 있어서 위암의 예측을 위한 혈액 내 ADAM8과 CEA의 ROC 커브 및 측정된 AUC 값을 확인한 결과, 도 1에서 보는 바와 같이 혈액 ADAM8의 AUC는 0.90(95% CI, 0.86-0.33)인 반면, 혈액 CEA의 AUC는 0.56(95% CI, 0.49-0.63)에 불과하여, 혈액 내 ADAM8이 위암의 존재를 예측함에 있어서 혈액 CEA에 비하여 진단의 정확도가 뛰어남을 알 수 있었다. 또한, 표 8에서 보는 바와 같이, 로지스틱 회귀 분석에 의한 위암의 존재를 예측함에 있어서 혈액 내 ADAM8은 민감도 및 특이도가 각각 73.7% 및 86.2%(컷-오프 값: 30 ng/mL)로 측정되었는데, 혈액 내 CEA의 민감도 및 특이도는 각각 23.1% 및 91.4%에 불과하였다(컷-오프 값: 4 ng/mL).

[0121] 혈액 내 ADAM8 및 CEA의 암 진행에 있어 증가되는 패턴이 현저히 다르므로, 이 둘의 마커를 병용으로 이용하는 경우 시너지 효과가 있을 것으로 예측되었다. 그 결과, 하기 표 8에서 보는 바와 같이, 혈액 내 ADAM8와 혈액 내 CEA를 각각 단독 마커로 사용한 경우에 비하여 이들을 병용으로 사용한 경우 진단의 정확도가 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(민감도: 81.8%, 특이도: 84.0%).

표 8

[0123]

마커	컷-오프 값	민감도(sensitivity)	특이도(specificity)
ADAM8	30 ng/mL	73.7%	86.2%
CEA	5 ng/mL	23.1%	91.4%
ADAM8 + CEA	25, 5 ng/mL	81.8%	84.0%

[0125] 검증 자료를 통한 혈액 내 ADAM8의 발현 수준과 암 관련 사이토카인의 상관 관계의 규명

[0126] 위암의 진행 과정에서 혈액 내 ADAM8의 역할을 확인하기 위하여, 검증 자료에 있어서 혈액 내 ADAM8의 발현 수

준과 위암 관련 전-염증성(pre-inflammatory) 또는 신생 혈관 유발성(pro-angiogenic) 사이토카인의 상관 관계를 분석하였다. 그 결과 하기 표 9에서 보는 바와 같이 혈액 내 ADAM8은 전-염증성 사이토카인인 혈액 내 IL-23 (γ_p = 0.235, p = 0.036) 및 혈액 내 SDF-1α/CXCL12(γ_p = -0.233, p = 0.037)와 상관 관계가 높은 반면, 신생 혈관 유발성 사이토카인인 혈액 내 IL-8 (γ_p = 0.113, p = 0.313) 및 혈액 내 sCD40L (γ_p = 0.043, p = 0.702)와는 별다른 상관 관계가 없는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 혈액 내 ADAM8는 위암의 초기 단계에서 암과 관련된 염증 또는 국소적 침윤과 관련성이 있는 반면, 원발 전이를 위한 혈관 신생과는 관련성이 없는 것을 알 수 있었다.

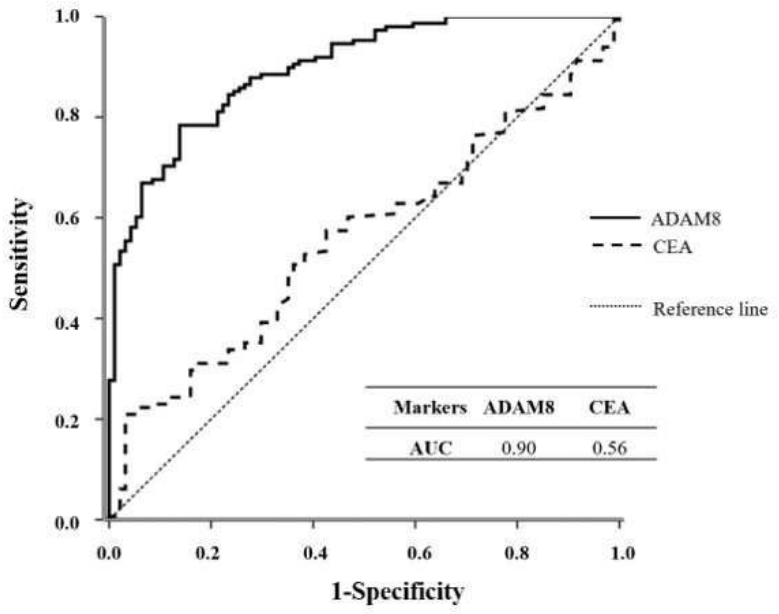
표 9

[0128]

	IL-23 g_p (*p*-value)	SDF-1a g_p (*p*-value)	IL-8 g_p (*p*-value)	sCD40L g_p (*p*-value)
ADAM8	0.235 (0.036)	-0.233 (0.037)	0.113 (0.313)	0.043 (0.702)

도면

도면1



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Composition for diagnosing cancer

<130> PDPB193257

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 824

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Gly Leu Gly Leu Trp Leu Leu Gly Ala Met Met Leu Pro Ala
1 5 10 15

Ile Ala Pro Ser Arg Pro Trp Ala Leu Met Glu Gln Tyr Glu Val Val
20 25 30

Leu Pro Arg Arg Leu Pro Gly Pro Arg Val Arg Arg Ala Leu Pro Ser
35 40 45

His Leu Gly Leu His Pro Glu Arg Val Ser Tyr Val Leu Gly Ala Thr
50 55 60

Gly His Asn Phe Thr Leu His Leu Arg Lys Asn Arg Asp Leu Leu Gly
65 70 75 80

Ser Gly Tyr Thr Glu Thr Tyr Thr Ala Ala Asn Gly Ser Glu Val Thr
85 90 95

Glu Gln Pro Arg Gly Gln Asp His Cys Phe Tyr Gln Gly His Val Glu
100 105 110

Gly Tyr Pro Asp Ser Ala Ala Ser Leu Ser Thr Cys Ala Gly Leu Arg
115 120 125

Gly Phe Phe Gln Val Gly Ser Asp Leu His Leu Ile Glu Pro Leu Asp
130 135 140

Glu Gly Gly Glu Gly Gly Arg His Ala Val Tyr Gln Ala Glu His Leu
145 150 155 160

Leu Gln Thr Ala Gly Thr Cys Gly Val Ser Asp Asp Ser Leu Gly Ser
165 170 175

Leu Leu Gly Pro Arg Thr Ala Ala Val Phe Arg Pro Arg Pro Gly Asp
180 185 190

Ser Leu Pro Ser Arg Glu Thr Arg Tyr Val Glu Leu Tyr Val Val Val
195 200 205

Asp Asn Ala Glu Phe Gln Met Leu Gly Ser Glu Ala Ala Val Arg His
210 215 220

Arg Val Leu Glu Val Val Asn His Val Asp Lys Leu Tyr Gln Lys Leu
225 230 235 240

Asn Phe Arg Val Val Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Asn Ser Gln Asp

245 250 255

Arg Phe His Val Ser Pro Asp Pro Ser Val Thr Leu Glu Asn Leu Leu
260 265 270
Thr Trp Gln Ala Arg Gln Arg Thr Arg Arg His Leu His Asp Asn Val
275 280 285
Gln Leu Ile Thr Gly Val Asp Phe Thr Gly Thr Thr Val Gly Phe Ala
290 295 300
Arg Val Ser Ala Met Cys Ser His Ser Ser Gly Ala Val Asn Gln Asp
305 310 315 320
His Ser Lys Asn Pro Val Gly Val Ala Cys Thr Met Ala His Glu Met

325 330 335
Gly His Asn Leu Gly Met Asp His Asp Glu Asn Val Gln Gly Cys Arg
340 345 350
Cys Gln Glu Arg Phe Glu Ala Gly Arg Cys Ile Met Ala Gly Ser Ile
355 360 365
Gly Ser Ser Phe Pro Arg Met Phe Ser Asp Cys Ser Gln Ala Tyr Leu
370 375 380
Glu Ser Phe Leu Glu Arg Pro Gln Ser Val Cys Leu Ala Asn Ala Pro
385 390 395 400

Asp Leu Ser His Leu Val Gly Gly Pro Val Cys Gly Asn Leu Phe Val
405 410 415
Glu Arg Gly Glu Gln Cys Asp Cys Gly Pro Pro Glu Asp Cys Arg Asn
420 425 430
Arg Cys Cys Asn Ser Thr Thr Cys Gln Leu Ala Glu Gly Ala Gln Cys
435 440 445
Ala His Gly Thr Cys Cys Gln Glu Cys Lys Val Lys Pro Ala Gly Glu
450 455 460
Leu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Met Cys Asp Leu Glu Glu Phe Cys Asp

465 470 475 480
Gly Arg His Pro Glu Cys Pro Glu Asp Ala Phe Gln Glu Asn Gly Thr
485 490 495

Pro Cys Ser Gly Gly Tyr Cys Tyr Asn Gly Ala Cys Pro Thr Leu Ala
500 505 510
Gln Gln Cys Gln Ala Phe Trp Gly Pro Gly Gly Gln Ala Ala Glu Glu
515 520 525
Ser Cys Phe Ser Tyr Asp Ile Leu Pro Gly Cys Lys Ala Ser Arg Tyr
530 535 540

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

610 615 620
His Lys Gln Glu Cys His Cys His Ala Gly Trp Ala Pro Pro His Cys
625 630 635 640
Ala Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala Ser Gly Ser Leu Pro Val
645 650 655
Leu Val Val Val Val Leu Val Leu Leu Ala Val Val Leu Val Thr Leu
660 665 670
Ala Gly Ile Ile Val Tyr Arg Lys Ala Arg Ser Arg Ile Leu Ser Arg
675 680 685

Asn Val Ala Pro Lys Thr Thr Met Gly Arg Ser Asn Pro Leu Phe His
690 695 700
Gln Ala Ala Ser Arg Val Pro Ala Lys Gly Gly Ala Pro Ala Pro Ser
705 710 715 720
Arg Gly Pro Gln Glu Leu Val Pro Thr Thr His Pro Gly Gln Pro Ala
725 730 735
Arg His Pro Ala Ser Ser Val Ala Leu Lys Arg Pro Pro Pro Ala Pro
740 745 750

Pro Val Thr Val Ser Ser Pro Pro Phe Pro Val Pro Val Tyr Thr Arg

755 760 765

Gln Ala Pro Lys Gln Val Ile Lys Pro Thr Phe Ala Pro Pro Val Pro

770 775 780

Pro Val Lys Pro Gly Ala Gly Ala Ala Asn Pro Gly Pro Ala Glu Gly

785 790 795 800

Ala Val Gly Pro Lys Val Ala Leu Lys Pro Pro Ile Gln Arg Lys Gln

805 810 815

Gly Ala Gly Ala Pro Thr Ala Pro

820

<210> 2

<211

> 702

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln

1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr

20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly

35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly

50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile

65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser

85 90 95

Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile

100 105 110

Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp

115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu

130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys

145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr

165 170 175

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln

180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn

195 200 205

Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg

210 215 220

Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro

225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn

245 250 255

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe

260 265 270

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn

275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser

290 295 300

Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala

305 310 315 320

Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu

325 330 335

Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr

340 345 350

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg

355 360 365

Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr

370 375 380

Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser

385 390 395 400

Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp

405 410 415

Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn

420 425 430

Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser

435 440 445

Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile

450 455 460

Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn

465 470 475 480

Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val

485 490 495

Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro

500 505 510

Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln

515 520 525

Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser

530 535 540

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn

545 550 555 560

Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser

565 570 575

Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly

580 585 590

Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly

595 600 605

Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln

610 615 620

Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu

625 630 635 640

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
645 650 655

Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
660 665 670

Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
675 680 685

Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
690 695 700

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 11

【변경전】

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 암 배아 항원(CEA) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 상기 ADAM8의 발현 수준이 20 ng/ml 이상이고, 상기 암 배아 항원의 발현 수준이 3 ng/ml 이상인 경우, 상기 위암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는, 위암의 진단 또는 위암의 병기에 관한 정보 제공 방법.

【변경후】

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ADAM8 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 암 배아 항원(CEA) 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 상기 ADAM8의 발현 수준이 20 ng/ml 이상이고, 상기 암 배아 항원의 발현 수준이 3 ng/ml 이상인 경우, 위암의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는, 위암의 진단 또는 위암의 병기에 관한 정보 제공 방법.