



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월15일
(11) 등록번호 10-2156215
(24) 등록일자 2020년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/92 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/92 (2013.01)
G01N 30/724 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0025387
(22) 출원일자 2019년03월05일
심사청구일자 2019년03월05일
(56) 선행기술조사문헌
JP2016218085 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
문명희
경기도 광주시 오포읍 수레안길 70-4
이광빈
경기도 성남시 분당구 불곡북로31번길 3, 3층(정자동)
(74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 갑상선암 진단용 지질 바이오마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 갑상선암 진단용 지질 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 지질 발현 수준을 이용하여 갑상선암의 진단을 위한 바이오마커, 이를 포함하는 진단키트 및 갑상선암을 진단하는 용도에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 상기 지질 발현 수준 분석을 이용한 갑상선암 치료제의 모니터링 및 스크리닝 방법을 제공한다.

대표도 - 도9

Liver cancer		Gastric cancer		Lung cancer		Colorectal cancer		Thyroid cancer	
Species	AUC	Species	AUC	Species	AUC	Species	AUC	Species	AUC
a) PI 16:0/18:2	↑ 0.810	PC 34:2	↓ 0.963	SM d18:1/20:0	↓ 0.912	PC 36:2	↓ 0.925	LPI 18:0	↑ 0.870
PI 16:0/20:4	↑ 0.824	PC 36:3	↓ 0.913	LPI 16:0	↑ 0.912			LPI 18:1	↑ 0.925
PI 18:0/20:3	↑ 0.838	PC 36:4	↓ 0.979	TG 50:1	↑ 0.885				
PI 18:1/18:0	↑ 0.974	LPA 18:2	↓ 0.924	TG 54:4	↑ 0.894				
DG 16:1 18:0	↓ 0.833								
b) LPC 16:0	↑ 1.000								
LPC 18:2	↑ 0.940							LPC 18:2	↑ 0.935
		LPE 16:0	↓ 0.913					LPE 18:1	↑ 0.935
		LPE 18:0	↓ 0.905					LPE 18:2	↑ 0.940
		LPE 18:1	↓ 0.926						
		PE 36:1	↓ 0.874	PE 38:3	↓ 0.835	PE 36:1	↓ 0.938		
						PE 38:4	↓ 0.916		
						PE 38:6	↓ 0.922		
						PE 16:0p/20:4	↓ 0.963		
		PE 16:1p/22:6	↓ 0.845			PE 18:0p/20:4	↓ 0.963		
						PE 18:1p/18:1	↓ 0.966		
				PE 18:1p/20:4	↓ 0.879	PE 18:1p/22:4	↓ 0.953		
								LPI 16:0	↑ 0.990
HexCer d18:1/20:0	↑ 0.833			HexCer d18:1/20:0	↓ 0.909				
Total	8	9		7		8		6	

(52) CPC특허분류

G01N 2030/8813 (2013.01)
G01N 2405/04 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Gwang Bin Lee et al., 'Plasma lipid profile comparison of five different cancers by nanoflow ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry', Analytica Chimica Acta, (2019.02.),*

US20110059543 A1

KR1020170140687 A

KR101570143 B1

KR1020180041556 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018019794
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	지질체 다중분석체계 기반 생활습관병의 미래형 진단/분석법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

공지에외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

리소포스파티딜이노시톨(lysophosphatidylinositol, LPI)로 이루어진 a) 군; 및

리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine, LPC), 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine, LPE) 및 리소포스파티딜이노시톨(lysophosphatidylinositol, LPI)으로 이루어진 b) 군의 지질을 포함하는, 갑상선암 진단용 지질 바이오마커 조성물로서,

상기 a) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 18:0 또는 18:1인 것인, 갑상선암 진단용 지질 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 b) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 16:0 이고,

상기 리소포스파티딜콜린은 18:2이고,

상기 리소포스파티딜에탄올아민은 18:1 또는 18:2인 것인,

갑상선암 진단용 지질 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 갑상선암 진단용 키트.

청구항 4

1) 환자의 시료에서 지질의 발현 수준을 측정하는 단계로서,

상기 지질은 리소포스파티딜이노시톨(lysophosphatidylinositol, LPI)로 이루어진 a) 군을 포함하고,

리소포스파티딜이노시톨, 리소포스파티딜콜린 및 리소포스파티딜에탄올아민으로 이루어진 b) 군을 포함하는 단계; 및

2) 상기 환자의 시료에서 상기 a) 군 및 b) 군의 지질의 발현 수준이 정상 시료에서의 발현 수준 대비 증가되거나 감소되는 경우 상기 환자를 갑상선암 환자로 판단하는 것을 특징으로 하는, 갑상선암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법으로서,

상기 a) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 18:0 또는 18:1인, 갑상선암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

1) 환자의 시료에서 지질의 발현 수준을 측정하는 단계로서,

상기 b) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 16:0 이고,

상기 리소포스파티딜콜린은 18:2이고,

상기 리소포스파티딜에탄올아민은 18:1 또는 18:2인 단계; 및

2) 상기 환자의 시료에서 지질의 발현 수준이 정상 시료에서의 발현 수준 대비 a) 군에서 리소포스파티딜이노시톨이 증가하고, b) 군에서 리소포스파티딜이노시톨, 리소포스파티딜콜린 및 리소포스파티딜에탄올아민이 증가한 경우 갑상선암 환자인 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는, 갑상선암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자의 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액 또는 뇨 시료인 방법.

청구항 7

갑상선암 환자 시료에 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제를 처리하는 단계; 및

상기 시료에서 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제를 처리하기 전과 처리한 후의 지질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는,

갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제의 모니터링 방법으로서,

상기 지질은 리소포스파티딜이노시톨로 이루어진 a) 군; 및 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민 및 리소포스파티딜이노시톨로 이루어진 b) 군의 지질이고,

상기 a) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 18:0 또는 18:1인, 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제의 모니터링 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 b) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 16:0 이고,

상기 리소포스파티딜콜린은 18:2이고,

상기 리소포스파티딜에탄올아민은 18:1 또는 18:2인 것인,

갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제의 모니터링 방법.

청구항 9

갑상선암 환자 시료에 폐암 치료제 후보 물질을 처리하는 단계; 및

상기 시료에서 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 지질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 갑상선암 치료제의 스크리닝 방법으로서,

상기 지질은 리소포스파티딜이노시톨로 이루어진 a) 군; 및 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민 및 리소포스파티딜이노시톨로 이루어진 b) 군의 지질이고,

상기 a) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 18:0 또는 18:1인, 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 b) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 16:0 이고,

상기 리소포스파티딜콜린은 18:2이고,

상기 리소포스파티딜에탄올아민은 18:1 또는 18:2인 것인,

갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 갑상선암 진단용 지질 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 지질 발현 수준을 이용하여 갑상선암 의 진단을 위한 바이오마커, 이를 포함하는 진단키트 및 갑상선암 을 진단하는 용도에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 상기 지질 발현 수준 분석을 이용한 갑상선암 치료제의 모니터링 및 스크리닝 방법을 제공한다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 신체를 구성하는 가장 작은 단위인 세포는 자체조절기능에 의해 분열 및 성장하고, 수명이 다하거나 손상 되면 스스로 사멸하여 전반적인 수의 균형을 유지한다. 하지만 자체조절 기능을 하지 못해 세포가 죽지 않고 비정상적으로 증식하여 생기는 질병인 암은 전 세계 주요 사망원인으로써 해마다 발병률과 사망률이 증가하는 추세를 보이고 있다. 현재까지 암의 발병원인으로는 유전적 요인, 환경적 요인, 생활습관이나 식습관 등이 다양하고 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며, 발병원인을 보다 더 명확하게 파악하기 위해 분자수준의 정교한 접근의 필요성이 대두되고 있다.
- [0003] 암을 진단하는 방법으로는 주로 CT, MRI 등 영상진단 촬영 후 의심부위를 조직 검사하여 확진 하는 방법이 쓰이고 있으나, 이는 암을 조기에 진단하는 방법이 아니고 암세포가 어느 정도 성장하고 발전한 후에야 진단이 가능한 한계가 존재하는 방법이다. 이에 따라, 최근에는 유전자 검사와 단백질 검사 등을 통해 암을 조기에 진단 하는 방법이 활용되며, 특히 갑상선암의 경우 이를 활용한 조기진단 방법이 널리 사용되고 있다.
- [0004] 지질체학(Lipidomics)은 생체 내에서 발생하는 여러 지질체군(lipidome)들의 대사과정에서 생기는 총체적인 현상 및 변화를 정성 및 정량하여 그 생물학적, 생화학적 중요성을 알아내는 것에 초점을 맞춘 학문 분야로써, 각종 질환 관련 표지물질(biomarker)을 찾는 연구에도 그 목적을 두고 있다. 특히, 최근 전자분무이온화-탠덤질량 분석법(ESI-MS-MS)의 비약적인 발전으로, 지질 분자들의 구조적 분석이 가능하게 되었고, 샷건 지질학(shotgun lipidomics) 분야가 생물학적 조직의 분석에도 활용될 수 있다.
- [0005] 또한, 여러 종류의 지질들 중, 인지질(phospholipid, PL)은 세포 내의 신호전달(cell signaling), 세포증식(proliferation) 및 사멸(apoptosis) 등의 생체 내 여러 기능에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 암세포는 이러한 정상적인 세포주기의 균형이 깨져 비정상적으로 증식하는 질병인 바, 지질체학을 활용하여 암의 조기 진단 및 예후 예측을 위한 연구가 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1570143호
(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2018-0041556호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 갑상선암 진단용 지질 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 지질 바이오마커 조성물을 포함하는 갑상선암 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 지질 바이오마커 조성물을 이용한 갑상선암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 지질 바이오마커 조성물을 이용한 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제의 모니터링 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 지질 바이오마커 조성물을 이용한 갑상선암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 특정 지질 종의 발현량 증감을 분석함으로써 갑상선암을 진단 하거나, 갑상선암의 예후를 예측 가능하도록 하는 지질 바이오마커 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 상기 지질 바이오마커 조성물은,
- [0014] a) 군의 리소포스파티딜이노시톨 $\text{-(lysophosphatidylinositol, LPI)}$; 및

- [0015] 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine, LPC), 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine, LPE) 및 리소포스파티딜이노시톨(lysophosphatidylinositol, LPI) 로 이루어진 b) 군에서 선택되는 하나 이상의 지질을 포함하는, 갑상선암 진단용 지질 바이오마커 조성물에 관한 것이다.
- [0016] 상기 a) 군은 특정 1 종의 암에서 발현의 증가 또는 감소의 특징을 나타내는 지질 군이며, b) 군은 여러 형태의 암 질환에서 공통적으로 동시에 발현의 증가 또는 감소의 특징을 나타내는 지질 군이다.
- [0017] 본 발명에서는 a) 군에 포함되는 지질 종의 발현의 증가 또는 감소 및 b) 군에 포함되는 지질 종의 발현의 증가 또는 감소를 측정 및/또는 분석함으로써 암에 대한 진단 및 예후를 예측할 수 있도록 하였다.
- [0018] 본 발명 내의 지질 표기는 지질체학(Lipidomics)에서 세계 응용화학, 생화학, 분자생물학 표준에 따른 시스템 이름 및 공통 이름(IUPAC-IUBMB)에 따라 표기하였다.
- [0019] 구체적으로, 상기 a) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 18:0 또는 18:1 이고, 상기 b) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 16:0 이고, 상기 리소포스파티딜콜린은 18:2이고, 상기 리소포스파티딜에탄올아민은 18:1 또는 18:2인 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명 일 실시예에서는 정상인 및 암 환자(간암, 위암, 폐암, 대장암 및 갑상선암)로부터 시료를 채취하여 지질 종을 분석하였으며, 리소포스파티딜이노시톨 18:0, 18:1, 16:0; 리소포스파티딜콜린 18:2; 리소포스파티딜에탄올아민은 18:1, 18:2의 AUC 값이 0.8 이상을 나타내어 갑상선암 진단 또는 예후 예측에 있어 바이오마커로서 효율적으로 활용될 수 있음을 확인하였다.
- [0021] 본 발명의 다른 일 측면은 상기 지질 바이오마커 조성물을 포함하는 갑상선암 진단용 키트를 제공한다. 상기 키트는 본 발명의 지질 바이오마커를 검출할 수 있는 체제를 포함할 수 있으며, 상기 체제는 본 발명의 지질 바이오마커를 검출할 수 있는 것이면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 일 측면은, 1) 환자의 시료에서 지질의 발현 수준을 측정하는 단계로서, 상기 지질은 a) 군에서 리소포스파티딜이노시톨을 포함하고, b) 군에서 리소포스파티딜이노시톨, 리소포스파티딜콜린 또는 리소포스파티딜에탄올아민을 포함하는 단계; 및 2) 상기 환자의 시료에서 상기 a) 군 및 b) 군의 지질의 발현 수준이 정상 시료에서의 발현 수준 대비 증가되거나 감소되는 경우 상기 환자를 갑상선암 환자로 판단하는 것을 특징으로 하는, 갑상선암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0023] 구체적으로, 상기 갑상선암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 1) 환자의 시료에서 지질의 발현 수준을 측정하는 단계로서, 상기 a) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 18:0 또는 18:1 이고, 상기 b) 군의 리소포스파티딜이노시톨은 16:0 이고, 상기 리소포스파티딜콜린은 18:2이고, 상기 리소포스파티딜에탄올아민은 18:1 또는 18:2인 단계; 및 2) 상기 환자의 시료에서 지질의 발현 수준이 정상 시료에서의 발현 수준 대비 a) 군에서 리소포스파티딜이노시톨이 증가하고, b) 군에서 리소포스파티딜이노시톨, 리소포스파티딜콜린 및 리소포스파티딜에탄올아민이 증가한 경우 갑상선암 환자인 것으로 판단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서의 "시료"는 갑상선암 질환이 있거나, 있을 것으로 추정 또는 예측되는 임의의 물질을 말한다. 시료는 천연 또는 합성된 것일 수 있고, 통상의 기술자에게 공지된 임의 수단을 통해 획득될 수 있다. 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액 또는 뇨 뿐만 아니라, 시험관 내 세포 배양 성분의 시료, 예를 들면, 세포 성분, 세포배양배지, 재조합세포 등을 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 "환자의 시료"는 갑상선암 질환의 발병 여부를 판단할 대상개체로부터 얻어진 생물학적 시료를 말하며, 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액 또는 뇨일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 "정상 시료"는 갑상선암 질환이 발병하지 않은 개체로부터 얻어진 생물학적 시료를 말한다.
- [0027] 본 발명 일 실시예에서는 갑상선암에서 a) 군의 리소포스파티딜이노시톨 18:0 또는 18:1의 증가가 나타나고, b) 군의 리소포스파티딜콜린 18:2, 리소포스파티딜에탄올아민 18:1 또는 18:2, 리소포스파티딜이노시톨 16:0의 증가가 나타남을 확인하였으며, 특히 상기 각 지질 종들은 모두 AUC 값이 0.8 이상임을 나타내어 각각 갑상선암에 대한 지질 바이오마커로써 활용될 수 있음을 확인하였다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 일 측면은 갑상선암 환자 시료에 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제를 처리하는 단계; 및 상기 시료에서 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제를 처리하기 전과 처리한 후의 지질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제의 모니터링 방법을 제공한다.
- [0029] 구체적으로, 상기 지질은 a) 군의 리소포스파티딜이노시톨; 및 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민

및 리소포스파티딜이노시톨로 이루어진 b) 군에서 선택되는 하나 이상의 지질일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제는 소분자, 화합물, 항체, 면역항암제, 바이러스 등의 형태일 수 있으며, 암의 증식이나 전이를 억제하거나 암 세포를 사멸하는 등의 효과를 통해 갑상선암 질환을 치료 또는 개선시킬 수 있는 제제이면 제한없이 모두 적용될 수 있다.

[0031] 본 발명에서는 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제를 처리한 시료에 대하여 본 발명의 지질 바이오마커의 발현 수준 변화를 측정함으로써, 해당 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제의 암 억제능 및 암 치료 효과를 모니터링 할 수 있다. 예를 들어, 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제의 처리에 따라 시료 내 지질 바이오마커의 발현 수준이 유의적으로 정상 시료의 범위 내에 포함되는 경우, 해당 갑상선암 억제제 또는 갑상선암 치료제의 암 억제능 및 암 치료효과가 우수한 것으로 판단할 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 일 측면은 갑상선암 환자 시료에 갑상선암 치료제 후보 물질을 처리하는 단계; 및 상기 시료에서 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 지질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 갑상선암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0033] 구체적으로, 상기 지질은 a) 군의 리소포스파티딜이노시톨; 및 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민 및 리소포스파티딜이노시톨로 이루어진 b) 군에서 선택되는 하나 이상의 지질일 수 있다.

[0034] 본 발명에서는 갑상선암 치료제 후보물질을 처리한 시료에 대하여 본 발명의 지질 바이오마커의 발현 수준 변화를 측정함으로써, 해당 후보물질의 갑상선암 억제능 및 갑상선암 치료 효과를 판단할 수 있다. 예를 들어, 후보물질의 처리에 따라 시료 내 지질 바이오마커의 발현 수준이 유의적으로 정상 시료의 범위 내에 포함되는 경우, 해당 후보물질을 갑상선암 질환 치료제로 선별할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 지질 바이오마커는 암 질환의 진단 및 예후 예측에 활용될 수 있다. 구체적인 지질 종의 발현 양상에 따라 세부적인 암 종류의 진단이 가능하다. 이에 따라, 본 발명의 지질 바이오마커 세트를 특정하여 조합함으로써 각 암에 대한 조기 진단 및 예후 예측에 광범위하게 활용될 수 있고, 진단 및 예측된 예후에 따라 적절한 치료방향을 결정할 수 있어 암 재발 및 사망률을 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기 시스템을 간략히 도식화하여 나타낸 것이다.

도 2는 지질 표준물질을 검출한 크로마토그램을 나타낸 것으로, a)는 양이온모드(positive ion mode)에서 분석한 것이고, b)는 음이온 모드(negative ion mode)에서 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 분석한 219개의 지질 종을 대상으로 정상군과 종류별 암 환자군 간의 비교 결과를 fold change와 p-value 값으로 표시한 volcano plot을 나타낸 것이다.

도 4는 정상군과 비교했을 때 암 환자군에서 3배 이상의 차이가 발생하고, p-value 값이 0.01 미만인 지질 종들을 표시한 Principal component analysis(PCA) plot을 나타낸 것이다.

도 5는 정상군과 비교했을 때 암 환자군에서 3배 이상의 차이가 발생하고, p-value 값이 0.01 이하인 지질 종들로 heatmap을 표현한 것을 나타낸 것이다.

도 6은 각 지질군 별 고발현된 종들의 조성 변화를 중첩막대그래프(stacked bar graph)로 나타낸 것이다.

도 7은 정상군 대비 high abundance lipid가 2배 이상 차이 나고 p-value 값이 0.05 미만인 지질 종을 선정한 막대그래프로, a)는 5 종의 암에서, b)는 4 종, c)는 3 종, d)는 2 종, e)는 1 종의 암에서 특징을 보이는 지질 종을 나타낸 것이다.

도 8은 암 종별 지질 바이오마커로 선정된 지질 종의 ROC(Receiver operating characteristic) 커브를 나타낸 것이다.

도 9는 암 종별 AUC 값이 0.8 이상인 지질 바이오마커 목록표를 나타낸 것으로, a) 군은 1 가지 암에서만 특징을 보이는 지질 종이며, b) 군은 여러 종류의 암에서 동시에 특징을 보이는 지질 종이다. ↑는 2배 이상 증가, ↓는 2배 이상 감소를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1. 혈장 샘플의 준비

[0039] 혈장샘플은 임상시험심사위원회(institutional review board; IRB)의 승인을 얻어 대학제휴 종합병원(university affiliated general hospital)에서 제공받았다. 혈장 샘플은 평균나이 50세 남성들을 대상으로 하여 각각 정상인(n=20), 간암(n=21), 위암(n=20), 폐암(n=17), 대장암(n=16), 갑상선암 환자(n=10)에게서 수득하였고, 각 환자에 대한 인구통계학적 정보는 아래 표 1에 나타내었다.

표 1

		대조군	간암	위암	폐암	대장암	갑상선암
환자 수		20	21	20	17	16	10
평균연령		50.2 ± 10.9	56.1 ± 10.6	58.5 ± 13.1	61.1 ± 9.6	58.9 ± 10.9	46.9 ± 19.9
진행 단계(Cancer stage)	I	0	0	3	2	4	정보없음
	II	0	4	1	1	3	정보없음
	III	0	1	13	3	7	정보없음
	IV	0	7	1	10	0	정보없음
p-value (vs.control)			0.504	0.151	0.021	0.115	0.977

[0041] 실시예 2. 혈장 내 지질의 정량 및 정성 분석

[0042] 실시예 1의 혈장샘플로부터 얻어낸 지질의 분석은 모두 초고성능 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기 시스템(nanoflow ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, nUHPLC-ESI-MS/MS)을 이용하여 정성 및 정량분석 두 단계로 수행되었다. 정성분석의 경우 액체크로마토그래피(Liquid Chromatography, LC) 모델은 Dionex Ultimate 3000 RSLC nano system을 사용하였고, 질량분석기는 Thermo Scientific (San Jose, CA, USA)사의 LTQ Velos ion trap 질량분석기를 사용하였다.

[0043] 각 군 별로 풀링(Pooling)한 샘플의 혈장 내 지질 추출물을 각 지질 종마다 특징적으로 나타나는 CID fragment pattern에 따라서 지질 종을 식별하게 되는데, 본 발명자들이 개발한 컴퓨터 소프트웨어 프로그램인 LiPilot을 사용해 정성 분석하였다(등록특허 10-1502694).

[0044] 이후, 정성 분석한 지질 종들만 선택적으로 정량하는 selected reaction monitoring (SRM) 모드로 정량분석을 수행하였고, LC는 Waters (Milford, MA)사의 nanoACQUITY UPLC를 사용하였으며, 질량분석은 Thermo Scientific 사의 TSQ Vantage triple stage quadrupole 질량분석기를 사용하여 분석하였다.

[0045] 총 7 cm 길이의 homemade 모세관 컬럼을 분석컬럼으로 사용하였고, Polymicro Technologies, LLC (Phoenix, AZ)에서 구입한 내경이 100 μm인 (외경 360 μm) 모세관을 torch를 이용하여 길게 뽑아낸 후 끝 부분을 잘라 콘 모양으로 만들어 전기분무이온화가 가능하도록 해주었다. 또한 높은 압력에서도 컬럼의 충전제가 빠져나가지 않도록 Isu Industry Corp.(서울, 대한민국)사에서 구입한 3 μm 크기의 Watchers® ODS-P C18 particles (2.1mm x 100 mm) 충전물을 질소가스로 압력을 가하면서 0.5cm 정도의 길이로 채워주었다. 상기 과정을 간략하게 도 1에 나타내었다.

[0046] 지질 분리방법

[0047] 지질 분리는 기울기 용리법을 통해 극성이 높은 순서대로 분리하였다. 사용된 이동상A와 B의 조성은 각각 H₂O:ACN (9:1, v/v), CH₃OH:ACN:IPA (2:2:6, v/v/v)이며, 이온화 매개체(ionization modifier)로 5mM Ammonium formate와 0.05% Ammonium hydroxide 혼합액을 두 이동상에 각각 첨가하였다.

[0048] 정성분석

[0049] 정성분석을 위하여 IDEX Health & Science (Oak Harbor, WA, USA)사에서 구입한 stainless steel 소재의 micro cross에 분석 컬럼과 펌프로부터 flow가 오도록 하는 모세관을 연결하고, 다른 한쪽에는 ESI voltage가 형성이 되도록 전압을 걸어주는 Pt wire 그리고 나머지 한쪽에는 split flow를 조절할 수 있는 on-off valve를 연결해

주었다. 이후, 시료의 loading을 위하여 on-off 밸브를 닫은 후 14분 동안 550 nL/min의 유속으로 이동상A 100%를 분석 컬럼에 흘려준 다음 on-off valve를 열어 펌프로부터 오는 유속을 7 μ L/min으로 증가시켜 분석 컬럼에는 약300 nL/min의 유속으로 흐르도록 하였다. 또한, 이동상 B를 4분 동안 75%에서 80%로 변화시킨 후, 8분 동안 80%조건으로 유지하였다. 이후 18분 동안 90%까지 올려 준 후 5분 동안 100%까지 올려주고 100%를 다시 5분 동안 유지하였다. 이와 같은 조건의 기울기 용리법으로 지질 표준물질을 분리한 크로마토그램을 도 2에 나타내었다.

[0050] 정량분석

[0051] 지질은 종류에 따라 질량분석기의 음이온 모드 또는 양이온 모드에서 관찰되므로 LPC, PC, LPE, PE, PEP, DG, TG, Cer, SM, HexCer, SulfoHexCer의 정량분석은 양이온 모드에서, LPG, PG, LPI, PI, LPA, PA의 경우는 음이온 모드에서 분석하였다.

[0052] 충돌에너지는 각 지질 중 마다 표준물질을 사용해 최적화된 값을 찾아 아래 표 2와 같이 설정하였다.

표 2

[0053]

충돌에너지	지질 종
20V	LPE, PE, DG
25V	LPC, TG, LPA
30V	Cer, PA,
35V	LPG, PG
40V	PC, SM, HexCer
50V	ST, LPI, PI

[0054] 또한, 정량 및 오차를 보정해 주기 위해서 생체 내에서는 존재하지 않는 홀수 체인을 가지고 있는 지질 물질을 각 종류별로 시료에 첨가해 주어 내부 표준물질(Internal standard, IS)로 사용하였고 개별 지질이 갖는 면적을 내부 표준물질의 피크 면적으로 나누어 보정하고 지질의 양을 계산하여 정량하였다. 상기 기술한 방법대로 총 335 개의 개별 지질 종을 정성분석하였고, 이를 바탕으로 총 219종의 개별 지질 종을 정량분석 한 결과를 아래 표 3에 나타내었다.

표 3

[0055]

	PC	PE	PG	PI	PA	Sphingolipid	Glycerolipid	Total
정성분석	58	37	17	36	20	27	140	335
정량분석	55	56	10	23	11	17	47	219

[0056] 정량분석 한 지질 종들은 Minitap과 SPSS (version 24.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) 소프트웨어를 사용하여 PCA와 일원 분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA), 회귀분석, Receiver operating characteristic(ROC) 커브와 같은 통계분석을 진행하였다.

[0057] 실시예 3. 지질 종의 증감비율 비교분석 결과

[0058] volcano plot 분석

[0059] 실시예 2에서 분석한 219 개의 지질 종을 대상으로 정상군과 암 종류별 환자군을 비교하여 개별 암 환자군에서 어떤 지질 종이 얼마나 증감하였는지를 나타내는 비율인 fold change와 이 결과가 신뢰할만한 데이터인지 의미하는 p-value 값을 각각x, y축으로 나타낸 volcano plot을 도 3에 나타내었다.

[0060] 도 3의 x축은 fold change에 관한 수치로, 0값에 가까이 존재할수록 정상군과 비교하여 큰 차이가 없다는 것을 의미하며, 절대값으로 1만큼 증가할수록 정상군과 비교하여 수치가 2배 이상 감소하거나 증가하는 것을 나타낸다. y축은 p-value에 관한 값으로 그 값이 클수록 정상군과 환자군 간의 유의미한 차이가 있다는 것을 의미한다.

[0061] Volcano plot을 이용한 비교분석 결과 간암과 갑상선암에서 혈장 내 지질 변화가 증가하는 경향과 감소하는 경향을 모두 보이고 있으며, 위암과 폐암, 대장암의 경우 증가하는 지질 종들에 비해 감소하는 지질 종들이 더 많은 것을 확인할 수 있었다.

- [0062] 주성분 분석(Principal component analysis; PCA)
- [0063] 실시예 2에서 분석한 219개의 지질 중 중에서 정상군과 비교했을 때 암 환자군에서 3배 이상의 차이가 발생하고, p-value 값이 0.01 미만인 지질 종들을 표시한 Principal component analysis(PCA) plot을 도 4에 나타내었다.
- [0064] PCA plot은 각각의 개별 환자가 갖는 데이터 행렬에 고유벡터를 곱해 하나의 점으로 나타내어 2차원으로 표현함으로써 데이터가 갖는 패턴을 해석 가능하게 해준다. 정상군을 기준으로 봤을 때, 각각의 암 종류별로 정상군과 다른 패턴을 보이는 것을 나타내고 있으며, 암 종류별로 서로 다른 패턴을 보이는 것을 확인할 수 있었다.
- [0065] 히트맵(heatmap) 분석
- [0066] PCA plot과 같은 조건으로 정상군과 비교했을 때 암 환자군에서 3배 이상의 차이가 발생하고, p-value 값이 0.01 이하인 지질 종들만 선택하여 구성한 heatmap을 도 5에 나타내었다.
- [0067] Heatmap은 데이터 행렬을 z-score로 바꿔주어 표현한 것으로 음의 값을 가질 경우 파란색, 양의 값을 가질 경우 빨간색으로 표현하였다.
- [0068] LPC의 경우 정상군과 비교했을 때 간암과 갑상선암에서 증가하는 경향을 보이고 있으며, 위암의 경우 환자간에 차이는 있지만 전반적으로 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 또한, LPI는 갑상선암에서만 증가하는 패턴을 보이고 있으며, PI는 간암에서만 증가하는 경향을 보임을 확인하였다. 이와는 반대로 PC, LPE, PE의 경우 갑상선암을 제외한 대부분의 암환자에게서 감소하는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었다.
- [0069] 고발현(high abundance) 지질 종 분석
- [0070] 본 발명자들은 PCA plot과 Heatmap에서 보이는 경향들을 조금 더 자세하게 확인하기 위해서 High abundance 종들의 조성변화를 비교하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0071] High abundance는 정상군을 기준으로 하여 계산하였으며, 한 종류의 지질군 안에서 검출된 개별 지질 종의 피크 면적을 지질군 안에서 검출된 모든 종들의 피크면적 합으로 나누어 상대적인 abundance를 계산하였다. 그 결과, Heatmap에서 나타난 것처럼 LPC는 간암과 위암에서 증가하는 것으로 나타났으며, LPI 역시 갑상선암에서 4배 이상으로 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. PE의 경우 모든 종류의 암에서 모두 감소하는 경향을 나타내고 있다. 또한, PI는 Heatmap의 결과와 마찬가지로 간암에서만 2배 이상 증가하는 특징을 보이고 있으며 TG에서도 2배 이상 증가하는 모습을 확인하였다. 간암과는 반대로 위암의 경우 TG에서 2배 이상 감소하는 특징을 보이고 있음 또한 확인할 수 있었다.
- [0072] 분석결과 종합
- [0073] 본 발명자들은 상기 분석결과를 종합하여 정상군 대비 high abundance lipid가 2배 이상 차이 나고 p-value값이 0.05미만인 지질 종들을 선정하여 총 50종의 지질 종을 선별하였다.
- [0074] 선별된 지질 종들을 도 7에 막대그래프로 나타내었다. a)는 5 종의 암 모두에서 의미있는 변화를 보이는 지질 종이며, b)는 4 종, c)는 3 종, d)는 2 종, e)는 1 종의 암에서만 특징을 보이는 지질 종이다.
- [0075] PI 18:1/18:0의 경우 유일하게 모든 암에서 변화를 보였으며 간암에서만 2배 이상 증가하는 반면에 나머지 4가지 암에서는 감소하는 특징이 있다. 간암에서만 유의미하게 변하는 나머지 PI종들도 18:1/18:0과 마찬가지로 증가하는 경향을 보이며 이는 heatmap의 결과와도 일치하는 것을 확인하였다.
- [0076] b)와 c), d)에서 의미 있는 변화를 보이는 PE는 대부분의 암 종에서 감소하는 특징을 보임을 확인하였고, 위암의 경우 LPC 16:0, 18:2가 증가하는 특징을, 갑상선암의 경우 역시 heatmap의 결과와 일치하게 LPI가 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 도 7에 선정된 지질 종들을 암 예후 예측을 위한 지질 바이오마커로 선정하였다.
- [0077] 또한, 도 8에 나타낸 Receiver operating characteristic(ROC) curve를 통해서 선별된 지질 종들의 진단 효율을 평가하였다. ROC curve의 아래 면적(area under curve, AUC) 값에 따라서 효율성이 평가되며 값이 1에 가까울수록 높은 효율성을 나타내는 것으로 판단하였다. 선별된 지질 종들은 각각의 암 종류별로 선정된 50개의 지질 종들을 대상으로 하였으며, AUC값이 0.8 이상인 종들을 도 9에 나타내었다.
- [0078] 그 결과 선정된 50개의 지질 중에 간암은 8종, 위암은 9종, 폐암은 7종, 대장암은 8종, 갑상선 암은 6종의 지질이 AUC 값이 0.8 이상으로 효율이 좋은 것을 확인하였다. 구체적으로, AUC 값이 0.8 이상인 지질 종은 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol, PI) 16:0/18:2, 16:0/20:4, 18:0/20:3, 18:1/18:0; 디아실글리세롤

(Diacylglycerol, DG) 16:1_18:0; 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC) 34:2, 36:2, 36:3, 36:4; 리소포스파티딘 산(lysophosphatidic acid, LPA) 18:2; 스핑고미엘린(Sphingomyelin, SM) d18:1/20:0 ; 리소포스파티딜이노시톨(lysophosphatidylinositol, LPI) 16:0, 18:0, 18:1; 트리아실글리세롤(Triacylglycerol, TG) 50:1, 54:4; 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine, LPC) 16:0, 18:2; 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine, LPE) 16:0, 18:0, 18:1, 18:2; 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine, PE) 36:1, 38:3, 38:4, 38:6, 16:0p/20:4, 16:1p/22:6, 18:0p/20:4, 18:1p/18:1, 18:1p/20:4, 18:1p/22:4; 헥소실세라마이드(Hexosylceramide, HexCer) d18:1/20:0 로서, 상기 지질들이 암 진단 또는 예후 예측에 있어 바이오마커로 활용될 수 있음을 확인하였다.

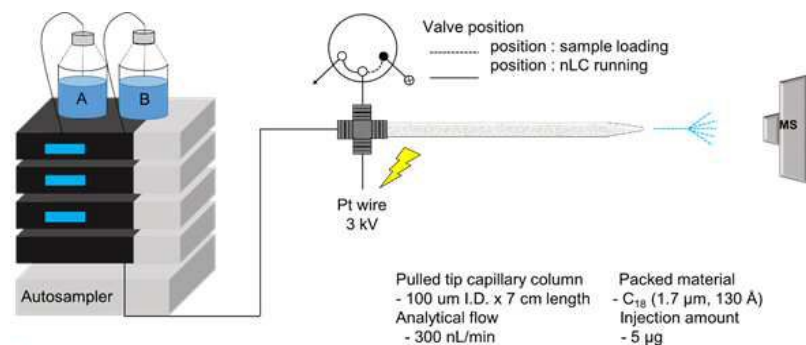
[0079] 특히, 리소포스파티딜이노시톨 18:0, 18:1 및/또는 16:0, 리소포스파티딜콜린 18:2, 리소포스파티딜에탄올아민 18:1 및/또는 18:2는 감상선암에 대한 진단 또는 예후 예측에 바이오마커로서 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0080] 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.

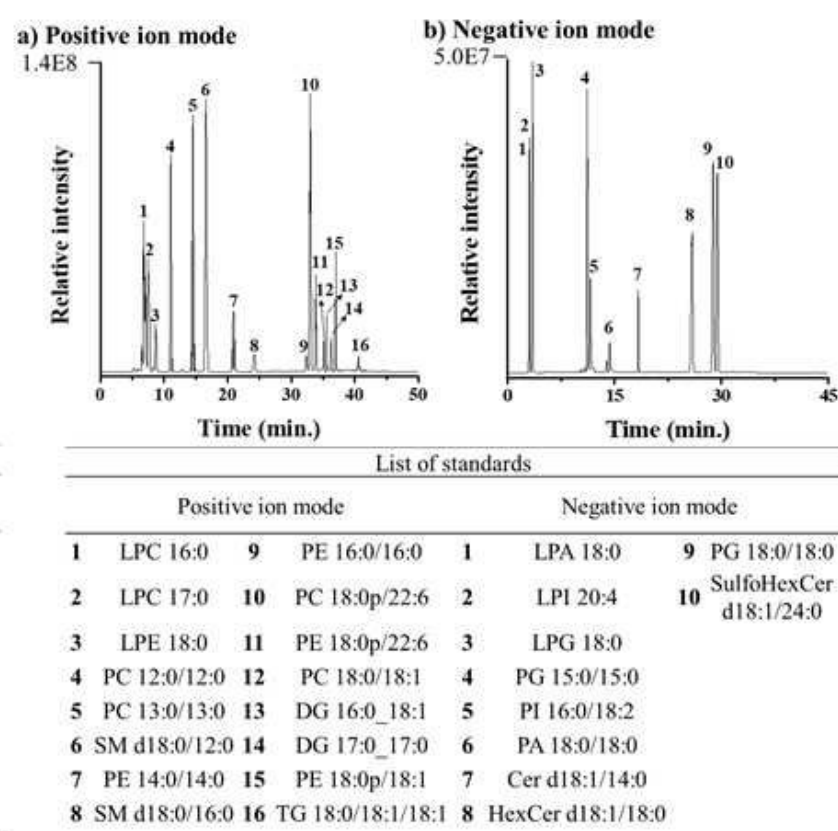
[0081] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

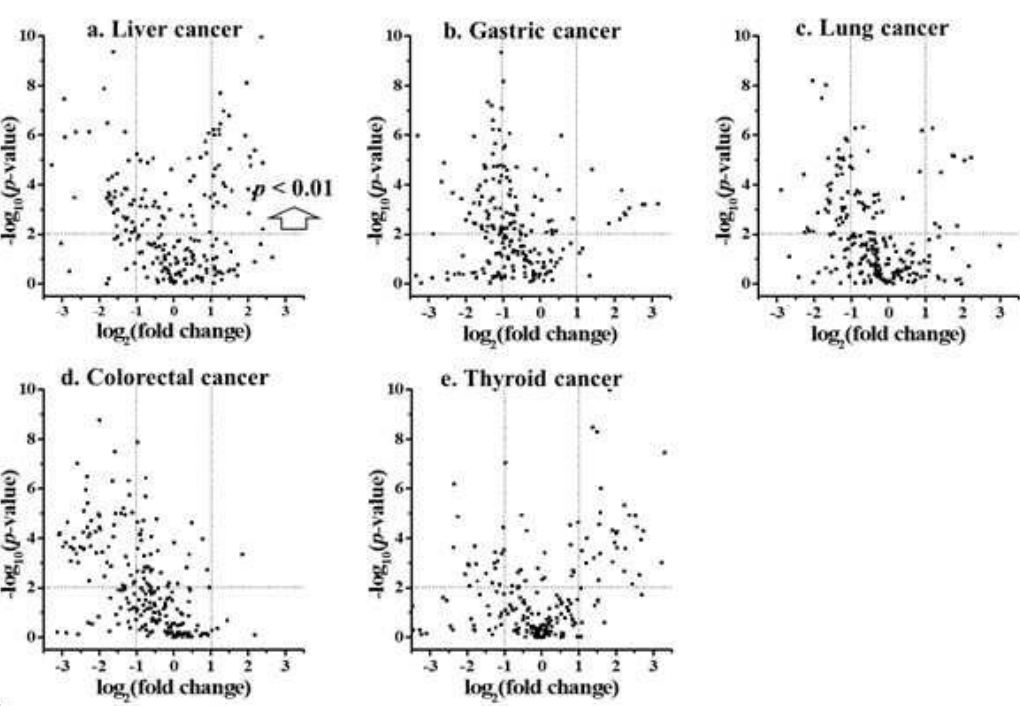
도면1



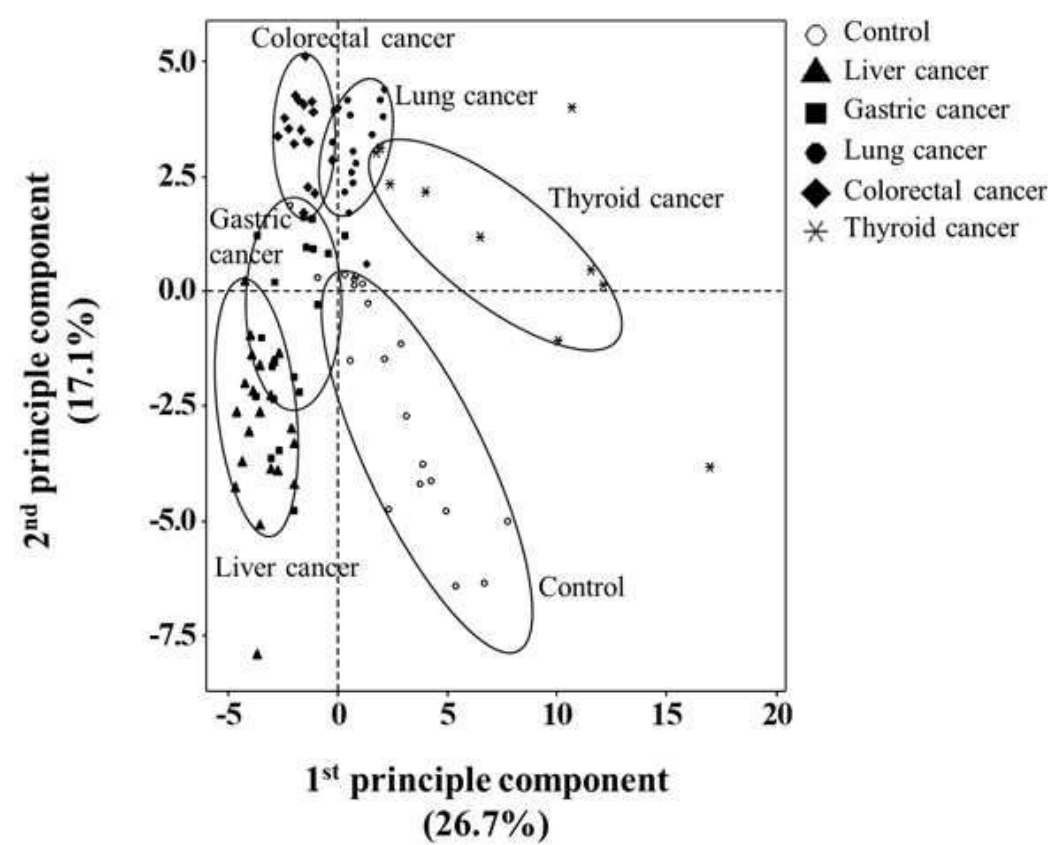
도면2



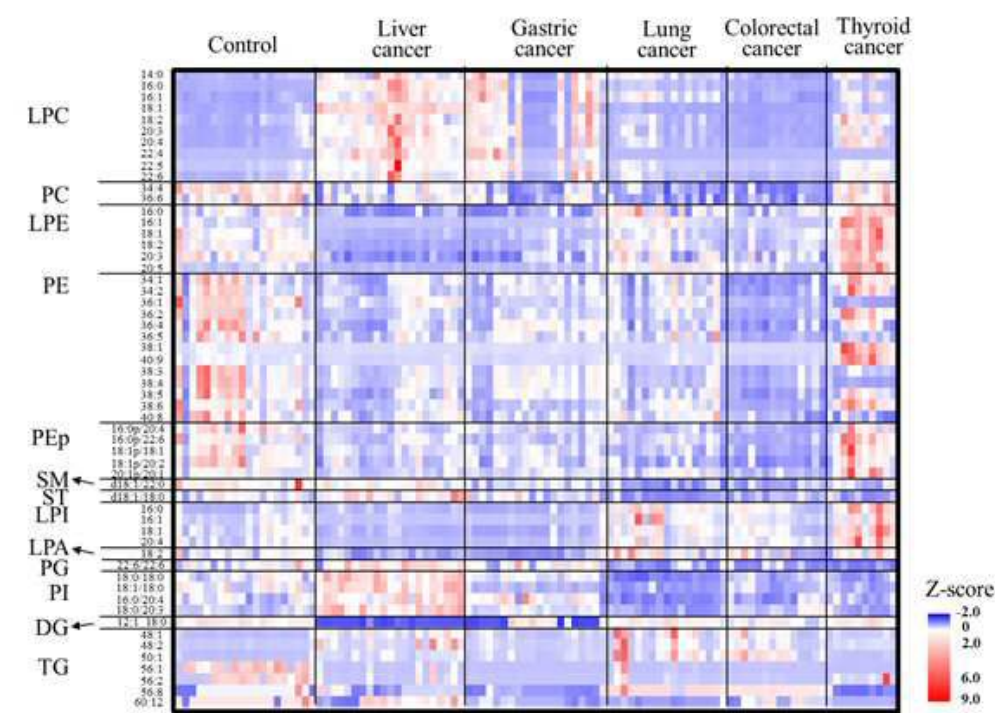
도면3



도면4

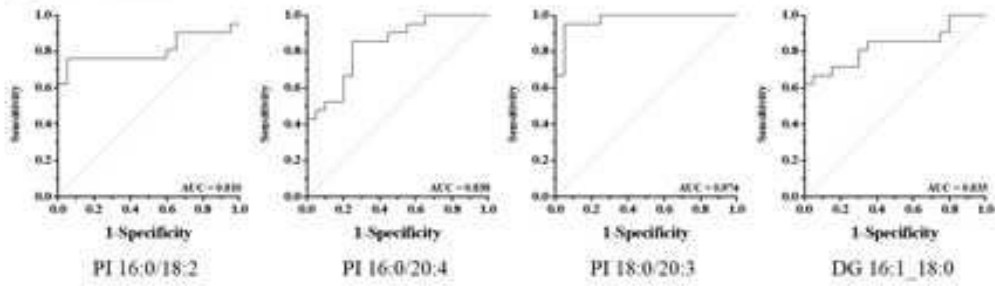


도면5

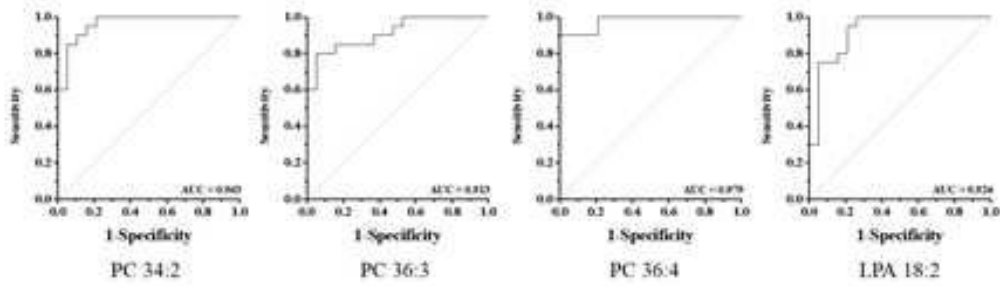


도면8

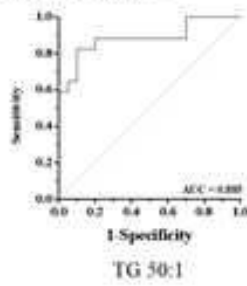
a) Liver cancer



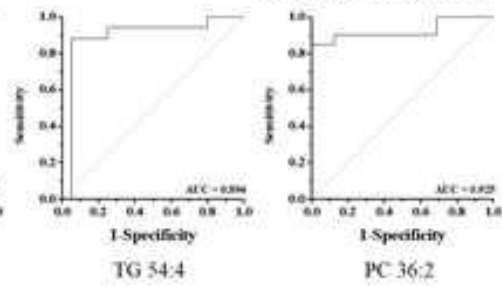
b) Gastric cancer



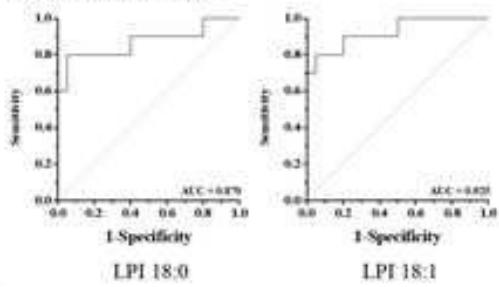
c) Lung cancer



d) Colorectal cancer



e) Thyroid cancer



도면9

Liver cancer		Gastric cancer		Lung cancer		Colorectal cancer		Thyroid cancer	
Species	AUC	Species	AUC	Species	AUC	Species	AUC	Species	AUC
a) PI 16:0/18:2	↑ 0.810	PC 34:2	↓ 0.963	SM d18:1/20:0	↓ 0.912	PC 36:2	↓ 0.925	LPI 18:0	↑ 0.870
PI 16:0/20:4	↑ 0.824	PC 36:3	↓ 0.913	LPI 16:0	↑ 0.912			LPI 18:1	↑ 0.925
PI 18:0/20:3	↑ 0.838	PC 36:4	↓ 0.979	TG 50:1	↑ 0.885				
PI 18:1/18:0	↑ 0.974	LPA 18:2	↓ 0.924	TG 54:4	↑ 0.894				
DG 16:1 18:0	↓ 0.833								
b) LPC 16:0	↑ 1.000							LPC 18:2	↑ 0.935
LPC 18:2	↑ 0.940								
		LPE 16:0	↓ 0.913					LPE 18:1	↑ 0.935
		LPE 18:0	↓ 0.905					LPE 18:2	↑ 0.940
		LPE 18:1	↓ 0.926						
		PE 36:1	↓ 0.874	PE 38:3	↓ 0.835	PE 36:1	↓ 0.938		
						PE 38:4	↓ 0.916		
						PE 38:6	↓ 0.922		
						PE 16:0p/20:4	↓ 0.963		
		PE 16:1p/22:6	↓ 0.845			PE 18:0p/20:4	↓ 0.963		
				PE 18:1p/20:4	↓ 0.879	PE 18:1p/18:1	↓ 0.966		
						PE 18:1p/22:4	↓ 0.953	LPI 16:0	↑ 0.990
HexCer d18:1/20:0	↑ 0.833			HexCer d18:1/20:0	↓ 0.909				
Total	8	9		7		8		6	