



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0053875
(43) 공개일자 2016년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2013.01)
G01N 33/57446 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0051616(분할)
(22) 출원일자 2016년04월27일
심사청구일자 2016년04월27일
(62) 원출원 특허 10-2014-0106896
원출원일자 2014년08월18일
심사청구일자 2014년08월18일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
임중백
서울특별시 서초구 신반포로 45, 56동 504호(반포동, 반포아파트)
정혜원
서초구 신반포로 45, 56동 504호
(74) 대리인
특허법인 정안

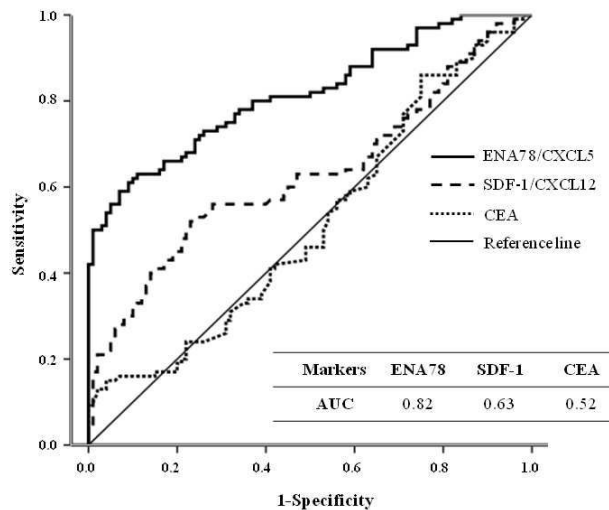
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 위암 진단용 마커

(57) 요약

본 발명은 위암의 진단 및 위암의 병기 분석을 위한, ENA78/CXCL5(epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78/chemokine (C-X-C motif) ligand 5) 또는 SDF-1/CXCL12(stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12)의 단일 및/또는 복합 마커에 관한 것이다. 본 발명에 따른 위암 진단용 마커 또는 위암의 병기 예측용 마커는 기존의 마커들과 비교하여 진단 정확성이 매우 향상되었기 때문에, 조기 위암을 진단하는데 사용가능할 뿐만 아니라 위암의 병기에 관한 정보를 제공할 수 있기 때문에 위암의 예후를 예측하는데 사용할 수 있다. 따라서 본 발명의 마커를 이용하면 다양한 위암 관련 정보를 제공받아 위암 환자의 생존율을 높이는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 SDF-1/CXCL12(stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12)의 수준을 측정하고, 정상 대조군 시료의 수준과 비교하여, 위암의 병기에 관한 정보를 제공하는 방법에 있어서,

상기 위암의 병기는 림프절 전이(N-stage) 또는 원격전이(distant metastasis)에 관한 정보인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장 또는 혈청인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

SDF-1/CXCL12(stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12)에 특이적으로 결합하는 항체(antibody) 또는 앵타머(aptamer)를 포함하는, 위암의 전이 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 위암의 진단 및/또는 위암의 병기에 관한 정보를 제공하기 위한, ENA78/CXCL5(epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78/chemokine (C-X-C motif) ligand 5) 또는 SDF-1/CXCL12(stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12)의 단일 또는 복합 마커에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 위암(Gastric cancer)은 전세계적으로 암으로 인한 사망 원인 중 2위를 차지하고 있을 뿐만 아니라, 한국, 일본 등의 아시아 국가에서도 주요 사망의 원인 중 하나로 잘 알려져 있다(CA.Cancer. J.Clin.(2011) 61:69-90). 위암의 근본적인 치료 방법은 수술을 통한 위암 조직의 제거이지만, 조기 위암 환자를 제외하고는 절제 수술을 받은 50% 이상의 환자에서 재발될 정도로 재발 위험성이 매우 높기 때문에, 2기 위암의 경우는 5년 생존율이 30 내지 70%, 3기 위암의 경우는 5 내지 30%에 불과하다. 따라서 위암을 조기에 진단할 수 있는 방법의 개발은 위암으로 인한 생존율을 높이는데 매우 중요하다. 또한, 위암의 병기(stage)를 예측할 수 있다면 환자의 치료 방법을 결정하거나, 치료 전/후의 경과를 예측하는데 매우 유용하게 사용될 수 있습니다. 따라서 한국, 일본 등과 같은 위암 발병률이 높은 국가에서는 X-선 촬영, 내시경을 통한 위암 진단을 보편적으로 실시하고 있다. 그러나 X-선 촬영, 내시경 등을 통한 진단은 일반적으로 환자들이 이상 증상을 느끼고 검사를 받는 경우가 대부분이며, 위암의 초기에는 증상이 없는 경우가 대부분이기 때문에 환자들이 이상 증상을 느끼고 검사를 받을때면 이미 암의 단계는 많이 진행되어 있는 것이 보편적인 실정이다. 따라서 혈액 내의 바이오 마커를 이용하여 위암을 진단할 수 있다면, 자주 용이하게 검사를 시행할 수 있기 때문에 위암 환자들을 조기에 발견하여 치료하는데 매우 유용할 것이다.

[0003] 이에 따라 위암 진단용 바이오 마커에 대한 다수의 연구가 진행되고 있으며, 지노믹스(genomics), 프로테오믹스(proteomics) 등의 최신 기술을 이용하여 CEA, AFP 등과 같은 다양한 위암 진단용 바이오 마커들이 활발히 개발되고 있다. 그러나 아직까지도 조기 위암을 진단할 수 있을 정도로 진단 정확성이 높은 바이오 마커의 개발은 부족한 실정이며, 환자의 치료 방법을 결정하거나, 치료 전/후의 경과를 예측하는데 매우 중요한 위암의 병기를

예측할 수 있는 바이오 마커의 개발은 매우 부족한 실정이다.

[0004] 이와 같이, 조기 위암을 진단할 수 있을 뿐만 아니라 위암의 병기(stage)를 예측할 수 있는 진단 정확성이 향상되어 상업적으로 이용 가능한 위암 진단 또는 위암의 병기 진단용 바이오 마커의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 위암의 진단 또는 위암의 병기에 관한 정보를 제공할 수 있는, 진단 정확성이 향상된 ENA78/CXCL5(epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78/chemokine (C-X-C motif) ligand 5) 또는 SDF-1/CXCL12(stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12)의 단일 또는 복합 마커 및 이를 이용한 위암 진단 또는 위암 병기 진단용 키트를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0006] 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

[0007] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물, 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0008] 본 명세서에 있어서, "케모카인(chemokine)의 수준"이란 시료 내의 케모카인 농도, 양, 활성 등을 의미하며, 시료 내의 케모카인을 정량적으로 비교할 수 있는 요소라면 이에 제한되지 않는다. 상기 수준을 측정하는 방법은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 샌드위치 분석법(sandwich assay) 등 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있으며, 케모카인의 수준을 측정할 수 있는 방법이라면 이에 제한되지 않는다.

[0009] 본 명세서에 있어서, "시료"란 환자의 케모카인 농도, 양, 활성 등을 측정할 수 있도록 환자로부터 분리된 케모카인을 포함하고 있는 모든 시료를 의미하며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 혈청 등일 수 있으나, 케모카인의 수준을 측정할 수 있는 종류라면 이에 제한되지 않는다.

[0010] 본 명세서에 있어서, "마커"란 위암의 진행 과정과 정량적 또는 정성적으로 연관된 분자를 의미하며, 바람직하게는 케모카인(chemokine), 단백질(protein), 핵산(nucleic acid) 등 일 수 있으나, 위암의 진단 및/또는 위암의 병기에 관한 정보를 제공할 수 있는 분자라면 이에 제한되지 않는다.

[0011] 본 명세서에 있어서, "병기(stage)"란 위암의 진행 정도를 나타내는 병의 단계를 의미하며, 위암의 크기(cancer size), 위암의 침투 깊이(T-stage), 림프절 전이 여부(N-stage), 원격전이 여부(distant metastasis), 일반적인 위암의 단계(overall cancer stage, I, II, III, IV 단계) 등 위암의 진행 정도를 파악할 수 있는 하나 이상의 정보이며, 바람직하게는 TMN stage일 수 있으나, 위암의 진행 정도에 관한 정보를 제공할 수 있는 요소라면 이에 제한되지 않는다. 본 명세서의 병기를 통하여 위암의 진행 정도를 파악하고, 이를 통하여 치료 방법의 결정, 예후 판정, 치료 결과 평가 등에 이용할 수 있다.

[0012] 본 명세서에 있어서, "정보를 제공하는 방법"이란 위암의 진단 및/또는 위암의 진행 정도를 나타낼 수 있는 요소들에 대한 정보를 획득하는 방법으로서, 바람직하게는 정상 대조군과 환자의 시료에서 본 발명의 단일 또는 복합 마커의 수준을 측정 및 비교하여 위암이 발생하였는지 여부에 대한 정보와 위암의 크기, 침투 깊이, 전이 여부 등과 관련된 정보를 예측하여 위암의 진행 단계(병기)에 관한 정보를 획득하는 방법을 의미하나, 생물학적

시료로부터 위암과 관련된 정보를 획득할 수 있는 방법이라면 이에 제한되지 않는다.

- [0013] 본 명세서에 있어서, "키트"란 위암의 진단 또는 위암의 병기를 진단하는데 사용할 수 있는 검진용 기기를 의미하며, 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 본 발명의 단일 또는 복합 마커의 수준을 측정할 수 있는 형태라면 제한이 없다. 바람직하게는, 케모카인인 ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12, 및/또는 CEA에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하고 있어, 케모카인에 결합되는 물질의 양을 측정할 수 있는 형태일 수 있으며, 상기 물질은 바람직하게는 항체(antibody), 앵타머(aptamer) 등 일 수 있으나, ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12, 및/또는 CEA에 특이적으로 결합하는 물질이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 본 발명은 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 ENA78/CXCL5(epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78/chemokine (C-X-C motif) ligand 5) 및/또는 SDF-1/CXCL12(stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12)의 수준을 측정하고, 정상 대조군 시료의 수준과 비교하여, 위암 진단 또는 위암의 병기에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 이 외에도 위암 진단 또는 위암의 병기에 관한 정보를 제공할 수 있는 마커라면 더 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청 등일 수 있으며, 환자로부터 분리되며 케모카인을 포함하고 있는 시료라면 제한이 없다.
- [0016] 또한 본 발명은 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터, ENA78/CXCL5(epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78/chemokine(C-X-C motif) ligand 5), SDF-1/CXCL12(stromal cell-derived factor-1/chemokine(C-X-C motif) ligand 12), 및 CEA(carcinoembryonic antigen)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 수준을 측정하고, 정상 대조군 시료의 수준과 비교하여, 위암의 원격전이(distant metastasis)에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 ENA78/CXCL5(epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78/chemokine(C-X-C motif) ligand 5)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는, 위암의 진단 또는 위암의 병기 진단용 키트를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 SDF-1/CXCL12(stromal cell-derived factor-1/chemokine(C-X-C motif) ligand 12)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머 및/또는 CEA(carcinoembryonic antigen)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 더 포함할 수 있다. 이 외에도 위암의 진단 또는 위암의 병기를 진단할 수 있는 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 위암 진단용 마커 또는 위암의 병기 진단용 마커는 기존의 마커들과 비교하여 진단 정확성이 매우 향상되었기 때문에, 조기 위암을 진단하는데 사용가능할 뿐만 아니라 위암의 예후를 예측하는데 사용될 수 있으며, 본 발명의 마커를 이용하면 다양한 위암 관련 정보를 제공하는데 사용가능하기 때문에 위암 환자의 생존율을 높이는 데 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 ROC curve 및 AUC를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 ROC curve 및 AUC를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 ROC curve 및 AUC를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0022] 실시예

[0023] 실시예 1: 시료의 준비

- [0024] 진단 정확성을 향상시킬 수 있는 위암의 진단 및 위암의 병기 진단을 위한 새로운 마커를 확인하기 위하여, 연세대학교의료원(Yonsei University Health System)을 방문한 환자 중에서 위장관 내시경(gastrointestinal

endoscopy)과 생검(biopsy)을 통하여 이형성증(dysplasia)을 나타내는 환자 또는 위암 진단을 받은 환자를 1차적으로 분류하였다. 분류된 대상자들에게는 연구의 목적과 내용을 충분히 설명하였으며, 고지된 승낙을 얻은 후에 연구를 진행하였다. 1차적으로 분류된 환자들 중에서 실험에 대한 정확성을 높이기 위하여, 만성 질환을 가지고 있는 환자들(만성 신질환(chronic renal disease), 간경변증(liver cirrhosis), 당뇨병(diabetes mellitus) 등), 다른 암 진단을 받은 환자들, 다른 위종양(위장관 기질종양(gastrointestinal stromal tumor, GIST), 말트림프종(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma) 등) 진단을 받은 환자들, 기존에 위암 진단을 받고 치료를 받은 전적이 있는 환자들을 제외하여 2차적으로 분류하였다. 2차적으로 분류된 환자들 중에서 위암 진단을 받은 환자들은 X-ray, CT 촬영, PET 촬영 등의 이미지 분석을 통하여 위암의 병기(stage)를 확인하였다. 위암의 병기는 7th International Union Against Cancer의 TMN stage에 따라 분류하였고, 이에 따라 총 300명의 환자들을 최종적으로 위암의 진행 단계에 따라 네 개의 그룹으로 분류하였다. 장상피화생(intestinal metaplasia) 및 이형성증을 나타내는 환자들은 고위험군(high-risk group), 점막하조직층(submucosal layer)에서 위암이 진단된 환자들은 조기위암군(early gastric cancer group, EGC), 고유근층(proper muscle layer) 이상에서 위암이 진단된 환자들은 진행위암군(advanced gastric cancer group, AGC)으로 분류하였고, 대조군(정상군, normal control group)으로는 정상적인 위 점막을 가지고 있거나 단순성 위염(simple gastritis)을 가진 환자들을 대상으로 하였다. 최종적으로 분류된 환자들은 의료적 처치(치료)를 받기 전에 혈액 시료를 채취하여 보관하였고, 이후 실험에는 보관된 혈액 시료를 이용하여 진행하였다.

[0025] 300명의 환자들 중에서 각각 네 개의 군에 해당하는 환자들의 혈액 시료 25개씩을 이용하여 초기 트레이닝 자료(initial training dataset)로 활용하였고, 나머지 200명의 환자들의 혈액 시료는 독립적 검증 자료(independent validation dataset)로 활용하였다. 상기 200명의 환자들에는 대조군 70명, 고위험군 30명, 조기 위암군 50명, 진행위암군 50명이 각각 포함되어 있었다.

[0026] 위암 진단을 받은 환자들의 혈액 시료 중 일부는 검사 용액(Giemsa solution)을 이용하여 염색한 후에, 헬리코박터 파이로니(*Helicobacter pylori*)에 감염되어 있는지 확인하였다.

[0027] **실시예 2: 초기 트레이닝 자료(initial training dataset)**

[0028] **2.1. 위암의 진행 단계에 따른 ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 및 CEA의 혈청 내 농도 확인**

[0029] 위암의 진행 단계에 따라 ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 및 CEA(carcinoembryonic antigen)의 혈청 내 농도가 어떻게 변화하는지 확인하기 위하여, 각각의 마커의 혈청 내 농도를 측정하였다. CEA 농도는 Beckman Access CEA assay 방법을 이용하여 측정하였고, 혈청 내의 ENA78/CXCL5(epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78/chemokine(C-X-C motif) ligand 5)과 SDF-1/CXCL12(stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12)의 농도는 MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Kit를 이용하여 측정하였다. 혈청 내 농도를 측정하기 위하여, 키트 내에 포함되어 있는 필터 플레이트(filter plate)는 각각의 웰(well)에 분석용 완충용액(assay buffer) 200uL를 첨가한 후에 실온(RT)에서 10분간 반응시킨 후에 진공(vacuum)을 이용하여 완충용액을 완전히 제거하여 준비하였고, 준비된 필터 플레이트의 일부 웰에 키트에서 제공되는 표준시약(standard solution) 25uL를 첨가하고, 실험용 시료들을 첨가할 웰에는 25uL의 분석용 완충용액을 첨가하였다. 그리고 매트릭스 용액(matrix solution)을 배경값(background well) 웰, 표준시약 웰 및 실험용 시료 웰에 모두 25uL씩 첨가한 후에, 실시예 1의 방법으로 준비된 시료를 25uL씩 실험용 시료 웰에 첨가하였다. 25uL의 구슬(beads)을 각각의 웰에 첨가한 후에 4° C에서 흔들며 반응시키고, 16시간 정도의 반응 시간 후에 각 웰에 담긴 모든 용액을 제거하고, 2번 세척하였다. 그리고 각각의 웰에 검출용 항체(detection antibody)를 25uL씩 첨가하고 실온에서 1시간 동안 흔들며 반응시킨 후에, Streptavidin-phycoerythrin 용액 25uL를 각각의 웰에 추가로 첨가하고 추가로 1시간 동안 실온에서 흔들며 반응시켰다. 반응이 종료된 후에 웰에 담긴 용액을 모두 제거하고 세척하였다. 세척된 웰에는 각각 150uL의 시스 용액(sheath fluid)을 첨가하고 잘 섞어 준 다음 5분간 반응시킨 후에 Luminex 100™ IS를 이용하여 형광을 측정하였다. 그리고 표준시약을 이용하여 측정된 값으로 각각의 마커의 혈청 내 농도를 측정하였다. 그 결과는 표 1 및 표 2에 나타내었다.

표 1

[0030]

Groups (n)	Normal (25)	High-risk (25)	EGC (25)	AGC (25)	p-value [†]
Serum ENA78 (ng/ml)	1008.9±536.7*	989.6±605.9	2234.3±1103.9	3065.8±1487.3	<0.001
Serum SDF-1 (ng/ml)	1655.5±729.0	1774.9±712.7	2762.4±1654.9	4474.2±2460.5	<0.001
Serum CEA (ng/ml)	2.2±1.7	3.0±2.6	3.0±3.3	6.1±8.6	0.028

[0031] 표 1에 나타난 바와 같이, ENA78/CXCL5 및 SDF-1/CXCL12의 혈청 내 농도는 고위험군까지는 큰 증가가 나타나지 않는 반면, 조기위암군(EGC)에서는 약 2배 정도 증가하고, 진행위암군(AGC)에서는 약 3배 이상 증가하는 것을 확인하였으며, post-hoc Bonferroni method를 이용하여 각각의 p-value가 0.001 이하로 신뢰성 있는 값을 확인하였다. 반면, 위암 진단용 마커로 알려져 있는 CEA는 진행위암군에서만 농도가 증가하는 것을 확인하였으며, ENA78/CXCL5 및 SDF-1/CXCL12의 결과와 비교하여 유의성이 낮은 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여, ENA78/CXCL5 및 SDF-1/CXCL12는 위암 발생 전까지는 혈청 내 농도에 큰 변화가 없다가, 조기위암군부터 농도가 급격하게 증가하는 것을 통하여 상기 두 개의 마커는 위암의 조기 진단에 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었으며, 또한, 위암의 진행 단계에 따라 혈청 내 농도가 확연히 증가하기 때문에 위암의 병기 진단에 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

표 2

[0032]

Groups (n)	Non-cancer groups (50)	Cancer groups (50)	p-value [†]
Serum ENA78 (ng/ml)	999.3±566.5*	2650.0±1362.6	<0.001
Serum SDF-1 (ng/ml)	1715.2±716.0	3618.3±2248.1	<0.001
Serum CEA (ng/ml)	2.6±2.2	4.6±6.6	0.051

[0033] 또한 표 2에 나타난 바와 같이, ENA78/CXCL5 및 SDF-1/CXCL12의 혈청 내 농도는 위암군에서 유의성 있게 2배 이상의 증가하는 것을 확인하였다. 반면, 기존의 위암 진단용 마커인 CEA의 경우에는 평균값에서 2배 정도의 증가를 보여주었지만, 유의성이 낮은 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, ENA78/CXCL5 및 SDF-1/CXCL12는 기존의 위암 진단용 마커와 비교하여 향상된 정확성을 가지는 위암 진단용 마커로 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0034] 2.2. ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12, 및 CEA의 혈청 내 농도와 임상병리학적 인자들(clinicopathological parameters)과의 상관관계 확인

[0035] 측정된 값의 통계적 분석(Statistical analysis)을 위하여, IBM SPSS Statistics 20.0을 사용하였다. 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. 그리고 실시예 2.1의 방법으로 측정된 혈청 내 농도와 임상병리학적 인자들(clinicopathological parameters)과의 상관관계를 확인하기 위해서는 피어슨 상관계수(Pearson's correlation, coefficient, r_p)와 스피어만 상관계수(Spearman's correlation, coefficient, r_s)를 이용하여 확인하였다. 위암의 위치(tumor location)에서 lower는 전정부(antrum)-위각부(angle)를 의미하며, middle은 위의 하위 부분-중간 부분을 의미하며, upper는 위의 상위 부분-들문(cardia)을 의미한다. 암의 크기(tumor size)는 3cm 미만의 암, 3cm 내지 5cm의 암, 5cm 초과인 암으로 분류하였으며, TMN stage는 7th International Union Against Cancer의 TMN 분류에 따라 분류하였다. 그리고 overall stage는 전체 암의 단계를 I, II, III, 및 IV로 분류한 것으로 I 단계는 위암의 초기 단계, IV는 위암의 말기 단계를 의미한다. T-stage에 따른 혈청 농도를 확인한 결과는 표 3에, N-stage에 따른 혈청 농도를 확인한 결과는 표 4에, M-stage에 따른 혈청 농도를 확인한 결과는 표 5에, overall stage에 따른 혈청 농도를 확인한 결과는 표 6에 나타내었으며, 상관관계를 확인한 결과는 표 7에 나타내었다.

표 3

[0036]

Groups	T1a (34)	T1b (16)	T2 (17)	T3 (15)	T4 (18)	p-value [†]
ENA78 (ng/mL)	1974.3±1083.5	2356.9±1368.3	2824.3±2012.0	2912.2±1291.5	3002.6±1451.7	0.063

SDF-1 (ng/mL)	2627.0±1626.7	2716.7±1674.4	2645.3±1883.7	3710.0±2490.4	3558.2±2329.1	0.246
CEA (ng/mL)	2.8±3.1	1.9±2.0	3.7±5.6	4.0±6.9	5.1±5.9	0.346

표 4

Groups (n)	N0 (70)	N1 (8)	N2 (5)	N3 (17)	p-value [†]
ENA78 (ng/mL)	2278.6±1389.4	2531.1±1484.7	2856.6±1630.6	3326.3±1467.1	0.057
SDF-1 (ng/mL)	2592.9±1624.2	2761.3±1764.6	3786.9±1798.1	4407.3±2749.3	0.005
CEA (ng/mL)	3.1±4.6	4.1±6.1	1.5±0.4	4.8±5.2	0.467

표 5

Groups (n)	M0 (84)	M1 (16)	p-value [†]
ENA78 (ng/mL)	2291.3±1358.1	3632.0±1463.8	0.001
SDF-1 (ng/mL)	2548.8±1641.1	5209.5±2125.8	<0.001
CEA (ng/mL)	2.4±2.4	9.0±8.9	<0.001

표 6

Groups	Ia (50)	Ib (9)	II (13)	III (11)	IV (17)	p-value [†]
ENA78 (ng/mL)	2149.7±1085.0	2904.0±2103.3	2410.7±1755.0	2108.4±1231.8	3672.4±1401.1	<0.001
SDF-1 (ng/mL)	2437.1±1700.0	2768.8±2075.7	2735.7±1204.3	2915.3±1515.8	4884.9±2402.6	<0.001
CEA (ng/mL)	2.4±2.5	2.1±1.1	2.9±3.2	1.8±0.8	8.5±8.8	0.018

표 7

	ENA78/CXCL5	SDF-1/CXCL12	CEA
Clinicopathological characteristics	g _s (p-value)	g _s (p-value)	g _s (p-value)
Sex(Male:Female)	-0.169 (0.098)	-0.008 (0.938)	-0.010 (0.921)
Age(years)*	0.058 (0.575)	0.187 (0.066)	0.072 (0.486)
H.pylori infection(-/+)	-0.014 (0.893)	0.041 (0.687)	-0.133 (0.186)
Histology (Well:Mod:Poorly:Signet-ring)	-0.011(0.922)	0.159 (0.269)	0.147 (0.309)
Tumor location(Lower:Middle:Upper) [†]	0.117 (0.420)	0.222 (0.124)	0.064 (0.660)
Size of tumor(< 3 cm; 3-5 cm and > 5 cm) [‡]	0.186 (0.238)	0.044 (0.783)	0.200 (0.204)

T-stage (T1a:T1b:T2:T3:T4) [§]	0.280 (0.049)	0.232 (0.105)	0.106 (0.462)
N-stage (N0:N1:N2:N3) [§]	0.271 (0.057) [¶]	0.304 (0.032)	0.093 (0.520)
Distant Metastasis (M0:M1) [§]	0.461 (0.001)	0.532 (<0.001)	0.303 (0.032)
Overall stage (I:II:III:IV)	0.367 (0.009)	0.334 (0.018)	0.175(0.224)

표 3 내지 표 7에 나타난 바와 같이, 혈청 내 ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 및 CEA의 농도는 성별, 나이, 헬리코박터 파이로니 감염 등과는 모두 관계 없는 것을 확인하였다. ENA78/CXCL5의 혈청 내 농도는 암이 주변으로 침윤된 정도를 나타내는 T stage와 원격 전이를 나타내는 M stage와 밀접한 연관관계가 있는 것을 확인하였으며, 위암의 overallstage와도 높은 연관관계를 나타내는 것을 확인하였다. SDF-1/CXCL12의 혈청 내 농도의 경우에는, 림프절 전이를 나타내는 N-stage, 원격 전이를 나타내는 M stage, 위암의 overallstage와 연관관계를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통하여, ENA78/CXCL5를 위암의 진단 마커로 사용하면 TM stage 및 위암의 단계 등을 파악할 수 있기 때문에 이를 통하여, 암의 진행 단계를 확인할 수 있으며, 암의 진행 단계를 통하여 위암의 예후 예측, 치료 효과 예측, 치료 방법의 결정 등의 위암과 관련된 다양한 정보를 제공할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, ENA78/CXCL5과 SDF-1/CXCL12를 함께 사용하면 N stage의 단계 확인도 추가로 가능하기 때문에 TMN stage, 위암의 단계 등 위암의 병기(진행 정도)를 파악할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 기존의 위암 진단 마커인 CEA의 경우에는 원격 전이를 나타내는 M-stage와의 연관관계만을 나타내는 것을 통하여, CEA를 위암의 발생 여부를 파악하는 진단 마커로는 사용 가능하지만, 병기와 관련된 정보를 제공하기에는 적합하지 않은 것을 확인할 수 있었다.

2.3. ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12의 진단용 마커로서의 가능성 확인

ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12가 기존의 위암 진단용 마커인 CEA와 비교하여 진단용 마커로서 사용 가능한지 확인하기 위하여, 실시예 2.1에서 산출된 값을 이용하여 IBM SPSS Statistics 20.0로 진단 검사의 정확도를 나타내는 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)를 나타내는 수신자 조작 특성 곡선(receiver operating characteristic(ROC) curves)(Pattern Recognition Letters (2006) 27(8): 861-874)을 그리고, 상기 수신자 조작 특성 곡선으로부터 곡선의 면적(area under the curves, AUC)을 산출하여 각각의 마커의 진단 정확성을 비교하였다. Cut-off point는 위암의 여부 만을 판단하는 이원로지스틱 회귀(binary logistic regression)에서 환자를 분류할 때의 확률을 의미한다. 또한, 추가적으로 로지스틱 회귀분석(Logistic regression)을 시행하여 단일 마커 및 복합 마커의 진단 정확성을 각각 측정하였다. 그 결과는 도 1 및 표 8에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, ENA78/CXCL5의 AUC 값은 0.90(95% CI, 0.84-0.96), SDF-1/CXCL12는 0.75(95% CI, 0.65-0.85)이고, 기존의 위암 진단용 마커인 CEA는 0.52(95% CI, 0.41-0.64)인 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)가 가장 높게 나타나는 ENA78/CXCL5이 진단 정확성이 가장 높은 마커인 것을 확인할 수 있었으며, 기존의 위암 진단용 마커인 CEA와 비교해서도 진단 정확성을 향상시킬 수 있는 진단용 마커인 것을 확인할 수 있었다.

표 8

Marker panel [*]	Cut-off point [†]	Sensitivity [‡]	Specificity
ENA78/CXCL5	0.45	78.0%	80.0%
SDF-1/CXCL12	0.40	70.0%	64.0%
CEA	0.46	54.0%	40.0%
ENA78/CXCL5+SDF-1/CXCL12	0.58	78.0%	90.0%
ENA78/CXCL5+CEA	0.45	78.0%	80.0%
SDF-1/CXCL12+CEA	0.40	70.0%	64.0%
ENA78/CXCL5+SDF-1/CXCL12+CEA	0.58	78.0%	90.0%

또한 표 8에 나타난 바와 같이, ENA78/CXCL5는 민감도와 특이도가 각각 78.0%, 80.0%으로 진단 정확성이 가장 높은 마커인 것을 확인하였으며, 복합 마커로 사용할 경우에는 ENA78/CXCL5과 SDF-1/CXCL12를 함께 사용하면, 특이도를 90.0%까지 증가시킬 수 있는 것을 확인하였다. 반면, CEA를 함께 사용하는 경우에는 민감도와 특이도에

서 차이를 보이지 않는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12는 기존의 위암 진단 마커보다 진단 정확성이 향상되었으며, 두 개의 마커를 복합 사용할 경우에는 진단 정확성을 더 향상시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 3: 독립적 검증 자료(independent validation dataset)

3.1. 위암의 진행 단계에 따른 ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 및 CEA의 혈청 내 농도 확인

초기 트레이닝 자료로부터 확인한 결과들의 정확도를 높이기 위하여, 독립적 검증 자료를 수행하였다. 실시예 2.1과 동일한 방법으로 ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 및 CEA의 혈청 내 농도를 측정하였다. 그 결과는 표 9에 나타내었다.

표 9

Groups (n)	Normal (70)	High-risk (30)	EGC (50)	AGC (50)	p-value [†]
Serum ENA78 (ng/ml)	1125.5±521.2*	1092.3±609.4	2133.6±1146.9	2878.0±1635.5	<0.001
Serum SDF-1 (ng/ml)	1928.0±1094.6	2169.6±1144.6	2587.8±1595.7	3361.3±2244.0	<0.001
Serum CEA (ng/ml)	2.0±1.5	3.3±2.6	2.4±2.7	5.1±7.4	0.005
Groups (n)	Non-cancer groups (100)		Cancer groups (100)		p-value [†]
Serum ENA78 (ng/ml)	1115.5±546.2*		2505.8±1454.3		<0.001
Serum SDF-1 (ng/ml)	2000.4±1109.6		2974.5±1975.8		<0.001
Serum CEA (ng/ml)	2.4±1.9		3.8±5.7		0.025

표9에 나타난 바와 같이, 초기 트레이닝 자료와 동일하게 ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12는 모두 위암 환자 군에서는 농도가 2배 이상 증가하여 위암 진단에 사용가능하다는 것을 확인할 수 있다. 또한, ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12는 위암의 단계가 진행할 수록 혈청 내 농도가 증가하며, 특별히, ENA78/CXCL5는 고위험군에서는 증가 형태를 보이지 않다고, 조기위암군에서 약 2배 정도의 증가를 보여주므로 위암의 조기 진단에 사용 가능한 마커인 것을 확인할 수 있었다. 한편, 기존의 위암 진단용 마커인 CEA는 진행위암군에서만 혈청 내 농도가 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 ENA78/CXCL5 또는 SDF-1/CXCL12를 이용하면 초기 위암을 진단하는데 있어서 기존의 마커와 비교하여 진단의 정확성을 향상시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

3.2. ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12, 및 CEA의 혈청 내 농도와 임상병리학적 인자들(clinicopathological parameters)과의 상관관계 확인

ENA78/CXCL5 또는 SDF-1/CXCL12의 혈청 내 농도와 임상병리학적 인자들과의 상관관계를 확인하기 위하여, 피어슨 상관계수(Pearson's correlation, coefficient, g_p)와 스피어만 상관계수(Spearman's correlation, coefficient, g_s)를 이용하였다. 위암의 위치(tumor location)에서 lower는 전정부(antrum)-위각부(angle)를 의미하며, middle은 위의 하위 부분-중간 부분을 의미하며, upper는 위의 상위 부분-등문(cardia)을 의미한다. 암의 크기(tumor size)는 3cm 미만의 암, 3cm 내지 5cm의 암, 5cm 초과인 암으로 분류하였으며, TMN stage는 7th International Union Against Cancer의 TMN 분류에 따라 분류하였다. 그리고 overall stage는 전체 암의 단계를 I, II, III, 및 IV로 분류한 것으로 I 단계는 위암의 초기 단계, IV는 위암의 말기 단계를 의미한다. 상관관계를 확인한 결과는 표 10에 나타내었다.

표 10

Clinicopathological characteristics	ENA78/CXCL5	SDF-1/CXCL12	CEA
	g_s (p-value)	g_s (p-value)	g_s (p-value)
Sex (Male:Female)	-0.048 (0.501)	-0.020 (0.776)	-0.046 (0.522)

Age (years)*	0.058 (0.419)	0.088 (0.218)	0.087 (0.224)
<i>H. pylori</i> infection(-/+)	0.045 (0.523)	0.049 (0.487)	-0.014 (0.848)
Histology (Well:Mod:Poorly:Signet- ring)	0.016 (0.876)	0.066 (0.518)	0.101 (0.156)
Tumor location (Lower:Middle:Upper) [†]	0.015 (0.883)	0.090 (0.374)	0.157 (0.120)
Size of tumor (< 3 cm; 3-5 cm and > 5 cm) [‡]	0.051 (0.647)	-0.061 (0.584)	0.293 (0.007)
T-stage (T1a:T1b:T2:T3:T4) [§]	0.231 (0.021)	0.191 (0.058) [¶]	0.197 (0.093) [¶]
N-stage (N0:N1:N2:N3) [§]	0.181 (0.073) [¶]	0.220 (0.029)	0.107 (0.292)
Distant Metastasis (M0:M1) [§]	0.357 (<0.001)	0.425 (<0.001)	0.264 (0.008)
Overall stage (I:II:III:IV)	0.315 (0.001)	0.248 (0.013)	0.188 (0.062) [¶]

[0055] 표 10에 나타난 바와 같이, 초기 트레이닝 자료와 유사한 결과를 나타내는 것을 확인하였다. ENA78/CXCL5의 혈청 내 농도는 암의 침투 깊이(T-stage), 원격 전이(M stage), 암의 단계(overall stage)와 높은 연관관계를 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, SDF-1/CXCL12의 혈청 내 농도의 경우에는, 림프절 전이(N-stage), 원격 전이(M stage), 암의 단계(overall stage)와 연관관계가 있는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통하여, CEA와는 상이하게 ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12는 암의 병기(진행 단계)를 파악하는데 사용 가능한 마커인 것을 재확인할 수 있었다.

[0056] 3.3. ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12의 진단용 마커로서의 가능성 확인

[0057] ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12의 위암 진단용 마커로서의 가능성을 확인하기 위하여, 실시예 2.3과 동일한 방법으로 ROC curve 및 AUC를 산출하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0058] 도 2에 나타난 바와 같이, ENA78/CXCL5의 AUC는0.82(95% CI, 0.76-0.87),SDF-1/CXCL12는 0.63(95% CI, 0.55-0.71), CEA는 0.52(95% CI, 0.43-0.60)인 것을 확인하였으며, 이를 통하여 ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12는 기존에 위암 진단용 마커로 사용되고 있는 CEA 보다 진단 정확성이 향상된 것을 확인할 수 있었다.

[0059] 또한, 추가적으로 로지스틱 회귀분석(Logistic regression)을 시행하여 단일 마커 및 복합 마커의 진단 정확성을 측정하였다. 그 결과는 표 11에 나타내었다.

표 11

[0060]

Marker panel [*]	Cut-off point [†]	Sensitivity [‡]	Specificity
ENA78/CXCL5	0.43	71.0%	75.0%
SDF-1/CXCL12	0.46	56.0%	59.0%
CEA	0.47	54.0%	46.0%
ENA78/CXCL5+SDF-1/CXCL12	0.44	71.0%	76.0%
ENA78/CXCL5+CEA	0.46	71.0%	75.0%
SDF-1/CXCL12+CEA	0.46	56.0%	64.0%
ENA78/CXCL5+SDF-1/CXCL12+CEA	0.47	71.0%	76.0%

[0061] 표 11에 나타난 바와 같이, ENA78/CXCL5의 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)는 모두 70% 이상으로 단일 마커 중에서 가장 높은 값을 나타내는 것을 확인하였으며, ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12를 함께 사용하면 특이도가 76%가 되는 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여 ENA78/CXCL5는 단일 진단용 마커로 사용 가능하며, ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12를 함께 복합 진단용 마커로 사용할 경우 진단 정확성을 향상시킬 수 있

다는 것을 확인할 수 있었다.

[0062] 3.4. ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12, 및 CEA의 원격전이 진단용 마커로서의 가능성 확인

[0063] 실시예 3.2를 통하여, ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 및 CEA가 모두 원격 전이(M stage)와 밀접한 연관관계가 있는 것을 확인하였다. 따라서 각각의 마커를 원격전이 여부를 예측하는 마커로 사용 가능한지 확인하기 위하여, 실시예 2.3과 동일한 방법으로 ROC curve 및 AUC를 산출하였다. 또한, 추가적으로 로지스틱 회귀분석(Logistic regression)을 시행하여 단일 마커 및 복합 마커의 진단 정확성을 각각 측정하였다. 그 결과는 도 3 및 표 12에 나타내었다.

[0064] 도 3에 나타난 바와 같이, ENA78/CXCL5의 AUC는 0.78(95% CI, 0.68-0.88), SDF-1/CXCL12는 0.83(95% CI, 0.73-0.94), CEA는 0.71(95% CI, 0.54-0.87)인 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여, ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12, 및 CEA는 모두 위암의 원격전이 여부를 진단하는데 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 특히, SDF-1/CXCL12는 가장 높은 진단 정확성을 나타내었다.

표 12

[0065]

Marker panel [*]	Cut-off point [†]	Sensitivity [‡]	Specificity
ENA78/CXCL5	0.13	75.0%	61.4%
SDF-1/CXCL12	0.15	75.0%	75.9%
CEA	0.47	68.8%	57.8%
ENA78/CXCL5+SDF-1/CXCL12	0.13	75.0%	78.3%
ENA78/CXCL5+CEA	0.13	75.0%	77.0%
SDF-1/CXCL12+CEA	0.22	75.0%	83.1%
ENA78/CXCL5+SDF-1/CXCL12+CEA	0.20	75.0%	92.8%

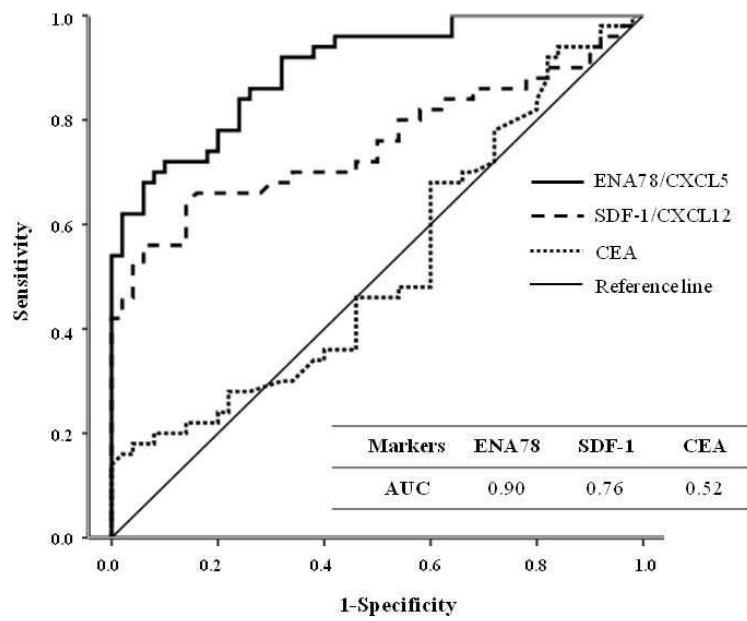
[0066] 또한, 표 12에 나타난 바와 같이, ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 및 CEA 모두 단일 마커로서 위암의 원격전이 여부를 진단하는데 사용 가능하다는 것을 확인하였으며, 복합 마커로 사용하는 경우에는 특이도가 증가하여, 진단 정확성을 더욱 높일 수 있다는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 및/또는 CEA를 위암의 진단 마커로 사용하면 원격전이 여부의 정보도 획득할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0067] 상기 결과들을 통하여, ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12는 단일 마커로서 기존의 위암 진단용 마커인 CEA와 비교하여 더욱 정확하게 조기 위암을 진단하는데 사용 가능할 뿐만 아니라, ENA78/CXCL5와 SDF-1/CXCL12를 병합하여 복합 마커로 사용하면 위암을 진단하는데 있어서 정확성을 더 향상시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 ENA78/CXCL5 또는 SDF-1/CXCL12를 위암 진단용 마커로 사용하면 침투 깊이, 전이, 암의 진행 단계, 암의 크기 등과 관련된 다양한 정보를 획득할 수 있어 위암의 병기(진행 단계)를 진단하는데 사용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, ENA78/CXCL5, SDF-1/CXCL12 및 CEA는 모두 원격전이와 밀접한 연관관계를 가지고 있으므로, 상기 마커들을 단일 또는 복합 마커로 사용하면 원격전이 여부를 진단할 수 있다는 것도 확인할 수 있었다.

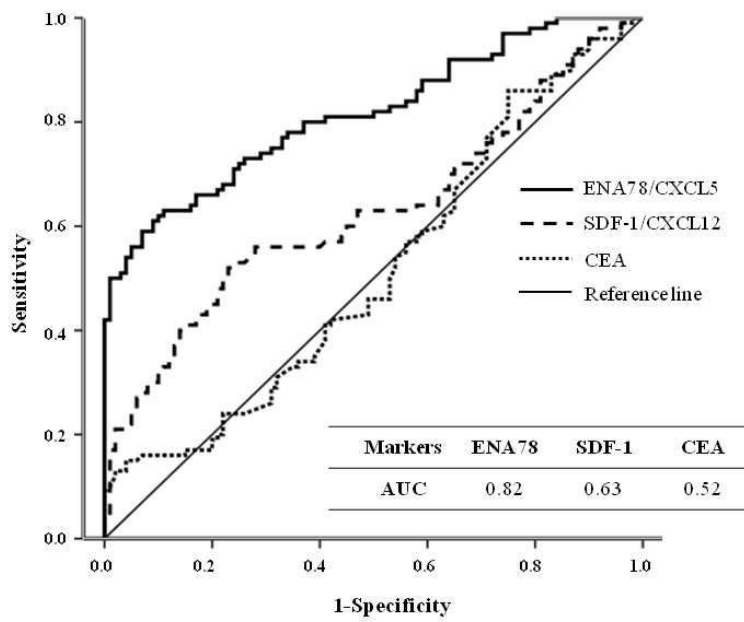
[0068] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

