



- (51) 국제특허분류:
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/010354
- (22) 국제출원일: 2014년 10월 31일 (31.10.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0131150 2013년 10월 31일 (31.10.2013) KR
10-2013-0131248 2013년 10월 31일 (31.10.2013) KR
- (71) 출원인: 에스케이텔레콤 주식회사 (SK TELECOM CO., LTD.) [KR/KR]; 100-999 서울시 중구 을지로 65, Seoul (KR). 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-015 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 한상조 (HAN, Sangjo); 463-814 경기도 성남시 분당구 불정로 195, 616 동 901 호, Gyeonggi-do (KR). 최용환 (CHOI, Yonghwan); 448-545 경기도 용인시 수지구 푸른솔로 55, 102 동 506 호, Gyeonggi-do (KR). 이성곤 (YL, Sung Gon); 461-801 경기도 성남시 수정구 회망로 506 번길 13, 603 호, Gyeonggi-do (KR). 윤태균

(YUN, Taegyun); 448-753 경기도 용인시 수지구 용구대로 2742, 107 동 1702 호, Gyeonggi-do (KR). 남궁정현 (NAMKUNG, Junghyun); 151-050 서울시 관악구 은천로 93, 104 동 808 호, Seoul (KR). 김영수 (KIM, Young-soo); 135-969 서울시 강남구 삼성로 212, 31 동 1315 호, Seoul (KR). 박태성 (PARK, Taesung); 137-796 서울시 서초구 나루터로 4 길 28, 309 동 203 호, Seoul (KR). 장진영 (JANG, Jin-Young); 135-842 서울시 강남구 삼성로 64 길 36, 102 동 601 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 제일특허법인 (FIRSTLAW P.C.); 137-739 서울시 서초구 마방로 60, Seoul (KR).

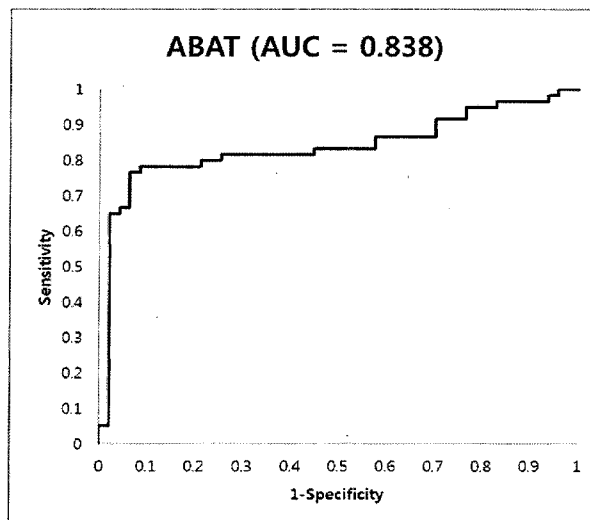
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR DIAGNOSING PANCREATIC CANCER AND METHOD FOR DIAGNOSING PANCREATIC CANCER USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 췌장암 진단용 조성물 및 이를 이용한 췌장암 진단방법

FIG. 2



(57) Abstract: The present invention relates to a composition and kit for diagnosing pancreatic cancer, containing a preparation measuring the expression level of a protein or a gene thereof, which can be used to determine the risk of pancreatic cancer, and to a method for diagnosing pancreatic cancer using the same. The present invention can significantly predict or recognize the risk, an earlier diagnosis, and the severity of pancreatic cancer by providing a diagnostic marker for pancreatic cancer, and can be utilized in research on tumorigenesis of pancreatic cancer. Furthermore, the diagnosis method of the present invention can simply perform an early diagnosis from blood or the like in a noninvasive manner.

(57) 요약서: 본 발명은 췌장암의 발병 가능성 여부의 판단을 위해 사용될 수 있는, 단백질 또는 이의 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 췌장암 진단용 조성물, 키트, 이를 이용한 췌장암 진단방법에 관한 것으로서, 본 발명은 췌장암의 진단 마커를 제공함으로써, 췌장암의 발병 가능성, 조기 진단 및 질병 정도를 유의적으로 예측 또는 파악할 수 있으며, 췌장암의 종양 형성 연구에 활용될 수 있다. 또한, 본 발명의 진단방법은 비침습적으로 혈액 등으로부터 간단하게 췌장암을 조기 진단할 수 있다.



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

췌장암 진단용 조성물 및 이를 이용한 췌장암 진단방법

발명의 분야

5

본 발명은 췌장암의 발병 또는 발병 가능성의 판단에 사용될 수 있는, 특정 단백질의 발현 수준 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 췌장암 진단용 조성물과 키트, 및 이를 이용한 췌장암 진단방법에 관한 것이다.

10

발명의 배경

현대인의 주요 질환 중에서, 암의 치료방법과 진단방법에 관한 연구는 발병빈도가 높은 폐암, 간암, 위암 등을 중심으로 비교적 활발히 진행되고 있다. 그러나, 발병빈도가 낮은 식도암, 대장암, 췌장암 등에 대한 연구는 상대적으로 저조한 실정이다. 특히, 췌장암은 초기에는 별로 증세를 느끼지 못하다가, 이미 전신전이가 일어난 후에 통증과 체중감소 등의 증세가 나타나는 것이 보통이어서, 치유율이 상당히 낮은 편이므로 정기적인 진단이 매우 중요하다. 임상 증세는 대부분이 서서히 발병하고, 식욕감퇴를 동반하여 허약해지기 쉬우며, 체중감소를 나타낸다. 췌장암은 5년 생존율이 1-4%에 불과할 정도로 치명적인 암으로서 인체의 암 중에서 가장 불량한 예후를 보이므로, 그 어떤 인체 암보다도 조기 진단법 개발이 절실히 요망되고 있다. 현재까지 췌장암에 효과가 있다고 알려진 5-플루오로유라실, 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.

5 췌장암의 진단은 혈액검사(CA19-9), 위, 십이지장의 X선 조영검사, 피부
 및 간을 통한 담도촬영(膽道撮影)과 역행성 내시경 담도촬영술 등에 의해
 시행되어 왔으나, 최근에 초음파촬영 및 전산화 단층촬영이 가장 많이 사용되고
 있다. 이들 방법에 의해 질병의 병변이 발견되는 경우, 보다 정밀한 조직검사를
 10 수행하여 비교적 정확한 검사결과를 얻을 수도 있으나, 상기의 진단방법은
 정확도가 떨어지거나, 환자에게 고통이 따르는 등 그 수행방법이 매우 불편하여
 피검자들이 이를 꺼려하는 실정이다. 따라서, 간편하고 신속하게 췌장암 여부를
 진단할 수 있는 검사방법의 개발이 요구되어 왔다.

이와 관련하여, 대한민국 특허 제10-0819122호는 매트릴린(matrilin),
 10 트랜스티레틴(transthyretin) 및 스트라티핀(stratifin)을 췌장암 마커로 이용한
 기술을 개시하고 있으며, 대한민국 출원공개 제2012-0082372호는 여러 가지
 췌장암 마커를 이용한 기술을 개시하고 있다. 또한, 한국 출원공개
 제2009-0003308호는 개체의 혈액 시료에서 REG4 단백질의 발현량을 검출하여
 췌장암을 진단하는 방법을 개시하고 있으며, 한국 출원공개
 15 제2012-0009781호는 개체의 췌장암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여
 개체로부터 분리한 암 조직 중 XIST RNA의 발현량을 측정하는 분석방법을,
 한국 출원공개 제2007-0119250호는 정상 인간의 췌장 조직과 비교하여 인간
 췌장암 조직에서 다르게 발현된 신규 유전자 LBFL313 패밀리를 개시하고 있고,
 미국 출원공개 제2011/0294136호는 케라틴 8 단백질 등의 바이오 마커들을
 20 이용한 췌장암 진단방법을 개시하고 있다. 하지만, 마커마다 그 진단 효율 및
 정확성에서 큰 차이를 나타내므로, 효과가 더 우수한 마커를 발굴할 필요가
 있다.

본 발명자들은 췌장암의 조기 진단에 유용한 마커를 개발하기 위해 예의
 25 노력한 결과, 췌장암에서 특이적으로 증가 또는 감소하는 단백질을 발굴하고,
 이를 이용하여 췌장암을 손쉽게 진단할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을
 완성하였다.

발명의 요약

따라서, 본 발명의 목적은 췌장암의 발병 가능성을 간편하게 조기 진단할 수 있는 신규 췌장암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 췌장암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 췌장암 진단용 조성물 또는 키트를 이용하여 췌장암을 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ABAT(4-aminobutyrate aminotransferase; GenBank Accession No: NP_001120920.1) 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 췌장암 진단용 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준, 및 CHI3L1(Chitinase-3-like protein 1 precursor; GenBank Accession No: NP_001267.2) 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 췌장암 진단용 조성물을 제공한다.

상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 췌장암 진단용 키트를 제공한다.

상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계; (b) 상기 시료로부터 ABAT(4-aminobutyrate aminotransferase; GenBank Accession No: NP_001120920.1) 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 상기 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)의 비교

결과, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높은 경우 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정하는 단계를 포함하는, 췌장암의 진단방법을 제공한다.

- 5 또한, 본 발명은 (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계; (b) 상기 시료로부터 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준, 및 CHI3L1(Chitinase-3-like protein 1 precursor; GenBank Accession No: NP_001267.2) 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;
- 10 (c) 상기 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준, 및 상기 CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)의 비교 결과, 췌장암 발병 여부를
- 15 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높고, CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 낮은 경우 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정하는 단계를 포함하는, 췌장암의 진단방법을 제공한다.

본 발명은 췌장암의 진단 마커를 제공함으로써, 췌장암의 발병 가능성, 20 조기 진단 및 질병 정도를 유의적으로 예측 또는 파악할 수 있으며, 췌장암의 종양형성 연구에 활용될 수 있다. 또한, 본 발명의 진단방법은 비침습적으로 혈액 등으로부터 간단하게 췌장암을 조기 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

25

도 1은 MRM 정량 분석에 의한 대조군 및 췌장암 환자군에서의 ABAT의 상대 농도를 나타낸 그래프이다.

도 2는 ABAT의 췌장암 진단 성능(AUC)을 나타낸 ROC(Receiver Operating Characteristic) 그래프이다.

도 3은 기존의 췌장암 혈액 마커로 알려진 CA19-9의 췌장암 진단 성능(AUC)을 나타낸 ROC 그래프이다.

5 도 4는 ABAT와 CA19-9의 췌장암 진단 성능(AUC)을 비교한 ROC 그래프이다.

도 5는 ABAT와 CA19-9를 동시에 사용했을 때의 췌장암 진단 성능(AUC)을 나타낸 ROC 그래프이다.

10 도 6은 ABAT와 CA19-9를 동시에 사용했을 때의 췌장암 진단 성능(AUC)과 ABAT 혹은 CA19-9를 각각 사용했을 때의 췌장암 진단 성능을 비교한 ROC 그래프이다.

도 7은 MRM 정량 분석에 의한 대조군 및 췌장암 환자군에서의 CHI3L1의 상대 농도를 나타낸 그래프이다.

15 도 8은 ABAT 및 CHI3L1의 조합의 췌장암 진단 성능(AUC)을 나타낸 ROC(Receiver Operating Characteristic) 그래프이다.

도 9는 ABAT 및 CHI3L1의 조합과 CA19-9의 췌장암 진단 성능(AUC)을 비교한 ROC 그래프이다.

도 10은 ABAT 및 CHI3L1의 조합과 CA19-9를 동시에 사용했을 때의 췌장암 진단 성능(AUC)을 나타낸 ROC 그래프이다.

20 도 11은 ABAT 및 CHI3L1의 조합과 CA19-9를 동시에 사용했을 때의 췌장암 진단 성능(AUC)과 ABAT 및 CHI3L1의 조합 혹은 CA19-9를 각각 사용했을 때의 췌장암 진단 성능을 비교한 ROC 그래프이다.

발명의 상세한 설명

25

이하 본 발명에 사용된 용어를 정의한다.

본 발명에서 사용된 용어 "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 5 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, 진단은 췌장암 발병 여부 또는 발병 가능성(위험성)을 확인하는 것이다.

본 발명에서 용어 "췌장암(pancreatic cancer)"이란 췌장 세포에서 10 기원하는 암을 의미한다. 췌장암에는 여러 가지 종류가 있는데 췌관세포에서 발생한 췌관 선암종이 90% 정도를 차지하고 있어 일반적으로 췌장암이라고 하면 췌관 선암종을 의미한다. 그 외에 낭종성암(낭선암), 내분비종양 등이 있다.

본 발명에서 사용된 용어 "마커", "바이오 마커" 또는 "진단용 마커"란 정상이나 병적인 상태를 구분할 수 있거나 치료반응을 예측할 수 있고 15 객관적으로 측정할 수 있는 표지자를 의미한다. 특히, 본 발명에서 췌장암과 관련해서는, 정상 대조군(췌장암이 아닌 개체)에 비해 췌장암을 갖거나 췌장암 발병 가능성(위험성)이 있는 개체에서 단백질 발현 수준 또는 유전자 발현 수준이 유의적으로 증가하거나 감소하는 양상을 보이는, 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 20 등과 같은 유기 생체 분자 등을 의미한다.

본 발명은 ABAT(4-aminobutyrate aminotransferase; GenBank Accession No: NP_001120920.1) 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 췌장암 25 진단용 조성물을 제공한다.

본 발명은 ABAT를 췌장암 진단용 마커로서 활용함으로써 대상으로부터 췌장암의 발병 여부 또는 발병 가능성 여부를 효과적으로 진단하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에서 췌장암 진단용 마커로서 사용되는 ABAT(4-aminobutyrate
5 aminotransferase)는 GABA 트랜스아미나아제 또는 4-아미노부티레이트
트랜스아미나아제라고도 불리며, 중추신경계에서 중요한 억제성 신경전달물질인
감마-아미노부티르산(GABA)을 석시닉 세미알데하이드로 분해시키는데 관여하는
효소이다. 상기 활성 효소는 피리독살-5-포스페이트와 복합된 50 kD
서브유닛의 호모다이머(homodimer)이다. ABAT의 결핍은 정신 지체, 근력
10 저하, 과다 반사, 무기력, 고질적 발작 및 뇌파 이상을 보인다. 하지만, ABAT가
췌장암 진단을 위한 바이오마커로 사용될 수 있음을 개시한 종래 기술은 전혀
알려진 바 없다.

본 발명자들은 ABAT를 췌장암 진단용 마커로 사용함으로써 개체로부터
췌장암의 발병 또는 그 가능성에 대해 민감도 및 신뢰도가 높은 결과를 얻을 수
15 있음을 확인하였다. 구체적으로, 본 발명자들은 췌장암 환자, 췌관내 점액성
유두종양(Intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN) 환자 및 만성
담낭염(chronic cholecystitis) 환자 개체의 혈장 시료를 분석하여 췌장암에서
과발현되는 바이오마커로서 ABAT를 발굴하였고, 정상 대조군(췌장암이 아닌
개체)의 혈장 시료를 분석하여 상기 발굴한 바이오마커의 유효성을 확립하였다.

20

또한, 본 발명은 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을
암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준, 및 CHI3L1(Chitinase-3-like protein 1
precursor; GenBank Accession No: NP_001267.2) 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1
단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는
25 췌장암 진단용 조성물을 제공한다.

본 발명은 ABAT 및 CHI3L1의 조합을 췌장암 진단용 마커로서 활용함으로써 대상으로부터 췌장암의 발병 여부 또는 발병 가능성 여부를 효과적으로 진단하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에서 췌장암 진단용 마커로서 사용되는 ABAT는 전술한 바와
5 같으며, 본 발명에서 또 다른 췌장암 진단용 마커로서 사용되는 CHI3L1(Chitinase-3-like protein 1 precursor; GenBank Accession No: NP_001267.2)은 연골 당단백 39(Cartilage glycoprotein 39)로도 알려져 있으며, 글라이코실 하이드롤라아제(glycosyl hydrolase) 18 패밀리에 속한다. CHI3L1은 세포 밖으로 배출되는 당단백의 일종으로 유방암, 대장암, 전립선암, 난소암,
10 감상선암, 폐암, 간암 등의 암세포에서 그 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. 하지만, 상기 ABAT 및 CHI3L1의 조합이 췌장암 진단을 위한 바이오마커로 사용될 수 있음을 개시한 종래 기술은 전혀 알려진 바 없다.

본 발명자들은 ABAT 및 CHI3L1의 조합을 췌장암 진단용 마커로 활용함으로써 개체로부터 췌장암의 발병 또는 그 가능성에 대해 민감도 및
15 신뢰도가 높은 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다. 구체적으로, 본 발명자들은 췌장암 환자, 췌관내 점액성 유두종양(Intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN) 환자 및 만성 담낭염(chronic cholecystitis) 환자 개체의 혈장 시료를 분석하여 췌장암에서 과발현되는 바이오마커로서 ABAT와 저발현되는 바이오마커로서 CHI3L1을 발굴하였고, 정상 대조군(췌장암이 아닌 개체)의 혈장
20 시료를 분석하여 상기 발굴한 바이오마커의 조합의 유효성을 확립하였다.

본 발명에 사용된 용어, "단백질의 발현 수준 측정"이란 췌장암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 췌장암 진단용 마커(단백질) 또는 이를 암호화하는 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정을 의미한다. 상기
25 단백질의 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(Surface 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 immunosorbent assay) 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명에 따른 체장암 진단용 조성물에서, ABAT 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제, 또는 CHI3L1 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 ABAT 단백질 또는 CHI3L1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)를 포함할 수 있다.

본 발명에 사용된 용어 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 ABAT 또는 CHI3L1의 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 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.

본 발명에 사용된 용어 "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.

5 본 발명에서 "애타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 애타머의 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*
10 Acad Sci USA. 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.

 본 발명에 사용된 용어 "mRNA의 발현 수준 측정"이란, 웨장암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 웨장암 진단용 단백질을 암호화하는 유전자들의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을
15 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.

20 본 발명에 따른 웨장암 진단용 조성물에서, ABAT 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 ABAT 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명에 따른 ABAT 단백질 또는 CHI3L1 단백질의 정보는 UniProt 등에 알려져 있으므로, 당업자라면 이를
25 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.

본 발명에서 사용된 용어 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다.

본 발명에서 사용된 용어 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적
5 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 DNA 일 수 있으며, 가장 바람직하게는
10 PNA이다.

본 발명에서 사용된 용어 "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.
15 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

일 실시양태에서, 본 발명에 따른 췌장암 진단용 조성물은 CA19-9 (Carbohydrate Antigen 19-9) 단백질의 발현 수준 또는 CA19-9 단백질을
20 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 췌장암 진단용 조성물은 ABAT 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 췌장암 진단용 조성물은 ABAT, CHI3L1(Chitinase-3-like protein 1 precursor; GenBank
25 Accession No: NP_001267.2) 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함한다.

상기 CA19-9 단백질은 종래 췌장암 마커로서 문헌[[Safi F. et al., "Diagnostic importance of the tumor marker CA 19-9 in pancreatic cancer", Dtsch Med Wochenschr 109(49):1869-73(1984); Wang FM et. al., "The significance of CA19-9 tumor antigen in the serum of patients with carcinomas".

- 5 Proc Natl Sci Counc Repub China B, Apr 9(2):119-25(1985)]에 공지되어 있다. 본 발명의 조성물은 2종의 마커, 즉 ABAT 및 CA19-9의 측정값을 조합함으로써, 또는 3종의 마커, 즉 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9의 측정값을 조합함으로써 보다 효과적이고 보다 정확한 췌장암의 진단을 가능하게 한다.

- 10 또한, 본 발명은 상기 췌장암 진단용 조성물을 포함하는 췌장암 진단용 키트를 제공한다. 바람직하게, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.

- 상기 췌장암 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의
15 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 바람직하게, 상기 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 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의
20 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
25 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

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 기관, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

- 5 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
- 10 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.

나아가, 본 발명은 췌장암을 진단하는 방법을 제공한다.

- 15 본 발명에 따른 췌장암 진단 방법의 일 실시양태는 하기의 단계를 포함한다:

- (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계;
- (b) 상기 시료로부터 ABAT(4-aminobutyrate aminotransferase; GenBank Accession No: NP_001120920.1) 단백질의 발현 수준 또는 ABAT
- 20 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;
- (c) 상기 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 상기 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- (d) 상기 단계 (c)의 비교 결과, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는
- 25 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높은 경우 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정하는 단계.

본 발명의 또 다른 실시양태에 따른 진단방법은 하기의 단계를 포함한다:

(a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계;

(b) 상기 시료로부터 각각 ABAT 및 CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 ABAT
5 및 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

(c) 상기 ABAT 및 CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 및 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

(d) 상기 단계 (c)의 비교 결과, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는
10 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높고, CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 낮은 경우 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정하는 단계.

15

상기 방법에서 "시료"란 생물학적 시료(biological sample)로서 췌장암 발병에 의해 단백질 발현 수준 또는 유전자 발현 수준이 차이가 나는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 의미하며, 바람직하게는 혈액, 혈청 또는 혈장을 의미한다.

20 상기 ABAT 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA는 췌장암 환자에서의 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준과 비교하여 증가하는 특징을 가지므로, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준보다
25 높으면 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정할 수 있다.

또한, 상기 ABAT 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA는 췌장암 환자에서의 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준과

비교하여 증가하는 특징을 가지고, CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA는 췌장암 환자에서의 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준과 비교하여 감소하는 특징을 가지므로, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준보다 높고 동시에 CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준보다 낮으면 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정할 수 있다.

10 상기 '췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높다'는 것은 다양한 방법에 의해 측정될 때 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 1.0배를 초과, 1.5배를 초과, 2배를 초과, 3배를 초과, 5배를 초과 또는 10배를 초과하는 것을 의미한다.

 또한, 상기 '췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 CHI3L1 단백질을 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 낮다'는 것은 다양한 방법에 의해 측정될 때 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 1.0배 미만, 1.5배 미만, 2배 미만, 3배 미만, 5배 미만 또는 10배 미만인 것을 의미한다.

 하나의 구현예에서, 상기 '췌장암 발병 가능성이 높다고 판정하는 것'은 췌장암 진단 함수를 이용하여 수행될 수 있다. 상기 췌장암 진단 함수의 예로는 하기 함수식 1을 들 수 있다:

<함수식 1>

$$f(x) = \text{sgn}\left(\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i \langle x, x_i \rangle + b\right)$$

상기 식에서, x 는 ABAT 또는 ABAT와 CHI3L1의 신규 측정값을, α_i 는 SVM에서의 라그랑주 승수를, y_i 는 정상군/채장암군의 구분자를, x_i 는 기준 측정값을, 그리고 b 는 보정치를 의미한다.

5 상기 함수는 SVM(Support Vector Machine)으로부터 도출된다. SVM은 라그랑주 최적화 이론(Lagrangian optimization theory)에 기반하여 주어진 조건을 만족하는 함수를 추정하는 알고리즘으로, 이 중에서 최대 마진 분류자(Maximum margin classifier)를 사용하는 분류분석 방법을 적용하는 경우를 서포트 벡터 분류(Support Vector Classification, SVC)라 한다. 상기
10 함수에 ABAT 또는 ABAT와 CHI3L1의 MRM(Multiple reaction monitoring)으로 정량을 실시하였다. SIM(Selected Ion Monitoring) 상대 측정값을 대입하였을 때, 함수 값이 1이면 채장암 발병 가능성이 높은 것으로 진단하고, 함수 값이 -1이면 정상으로 진단한다.

본 발명의 방법은 채장암 발병 가능성을 ABAT 단백질 또는 이의
15 mRNA의 발현 수치, 또는 ABAT와 CHI3L1 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수치를 채장암 진단 함수에 대입하여 그 결과로 채장암 발병 가능성을 즉각적으로 판정할 수 있는바, 의사의 임상학적 판단이 필요하지 않다.

본 연구에서는 진단 함수를 SVM으로 구축하였으나, 이는 용도에 따라 Neural Network, Random Forest 등의 여러 기계학습법(Machine Learning)을
20 비롯한 여러 종류의 판별함수 구축법(Discriminant Analysis)으로 구현될 수 있다.

본 발명의 방법에서, 상기 단백질 발현 수준은 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 측정 및 비교할 수 있다. 상기 항체와 생물학적 시료
25 내의 해당 단백질이 항원-항체 복합체를 형성하도록 하고, 이를 검출하는 방법을

이용한다.

본 발명에서 사용된 용어 "항원-항체 복합체"는 생물학적 시료 중의 해당 유전자의 존재 또는 부존재를 확인하기 위한 단백질 항원과 이를 인지하는 항체의 결합물을 의미한다. 상기 항원-항체 복합체의 검출은 당업계에 공지된
5 바와 같은 방법, 예를 들어 분광학적, 광화학적, 생물화학적, 면역화학적, 전기적, 흡광적, 화학적 및 기타 방법을 이용하여 검출할 수 있다.

본 발명의 목적상, 상기 단백질 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
10 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, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS),
15 LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, ABAT 및 CHI3L1의 단백질 발현 수준 자체를 측정 및 비교하기 위해서, LC-MRM 방법을 사용하였다.

20 구체적으로 생물학적 시료 중의 단백질을 부피% 기준으로 5% 증류수, 95% 아세트니트릴 및 0.1% 포름산의 용액으로 50분간 5%에서 85%까지 농도구배를 하면서 LC 분석 컬럼을 통과시켰다. 용액 혼합 비율에 따라 특정 물질에 대한 분해능이 달라질 수 있기 때문에 농도 구배를 실시하였고, 상기 범위는 다양한 단백질들을 동시에 분리하기 위한 최적 범위를 선정한 것이다.

25 질량 분석에서는 MS/MS 모드인 MRM이 질량분석기의 소스 부분에서 한 번 충돌하여 생긴 이온을 이용하는 방법인 반면, MRM은 한 번 깨진 이온 중에서 특정 이온을 한 번 더 선택하여 연속적으로 연결된 또 다른 MS의 소스를 한 번

더 통과시켜 충돌시킨 후 이 중에서 얻은 이온들을 이용하는 방법이다. SIM에서는 선택한 정량이온이 혈장에서도 검출되는 이온인 경우에 정량에 방해가 될 수 있다는 문제점이 있다. 반면, MRM을 이용하는 경우, 같은 질량을 가진 이온이라도 한 번 더 깨지면 분자구조가 달라지면서 차별화된 경향을 나타내므로, 이를 정량이온으로 사용하게 되면 백그라운드에서 방해되는 피크가 제거되어 한 층 더 깨끗한 베이스 라인을 얻을 수 있다. 따라서, 질량 분석 시에 MRM 모드를 사용함으로써 보다 우수한 분석 감도에서 원하는 물질들을 동시에 분석할 수 있었다.

상기 분석 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 단백질 발현 수준과 췌장암 개체에서의 단백질 발현 수준을 비교할 수 있고, 췌장암 마커 유전자에서 단백질로의 유의한 발현량 증감여부를 판단하여, 췌장암 발병 가능성 여부를 진단할 수 있다.

또한, 본 발명의 방법에서, ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준의 측정 또는 비교는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 측정 방법들을 통하여 정상 대조군에서의 mRNA 발현량과 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상의 mRNA 발현량을 확인할 수 있고, 이들 발현량 정도를 비교함으로써 췌장암 발병 가능성 여부를 진단 또는 예측할 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명에 따른 ABAT 및 CHI3L1 마커 외에 종래 췌장암 마커로서 알려진 CA19-9를 조합하여 췌장암을 진단하는 방법을 제공한다.

상기 진단방법의 하나의 실시양태는 하기의 단계를 포함한다:

- (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계;
- (b) 상기 시료로부터 각각 ABAT 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는

ABAT 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

(c) 상기 ABAT 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 상기 ABAT 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군
5 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

(d) 상기 단계 (c)의 비교 결과, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높고, CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현
10 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높은 경우 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정하는 단계.

나아가, 진단방법의 또 다른 실시양태는 하기의 단계를 포함한다:

(a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는
15 단계;

(b) 상기 시료로부터 각각 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

(c) 상기 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 ABAT, CHI3L1
20 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

(d) 상기 단계 (c)의 비교 결과, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높고, CHI3L1 단백질의 발현
25 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 낮으며, CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현

수준보다 높은 경우 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정하는 단계.

한편, 본 발명은 췌장암 진단방법을 위한 정보를 제공하기 위하여, (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계; (b) 상기
5 시료로부터 ABAT(4-aminobutyrate aminotransferase; GenBank Accession No: NP_001120920.1) 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 상기 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 췌장암 마커의 검출
10 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 췌장암 진단방법을 위한 정보를 제공하기 위하여, (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계; (b) 상기 시료로부터 각각 ABAT 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계; 및
15 (c) 상기 ABAT 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 상기 ABAT 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 췌장암 마커의 검출 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 췌장암 진단방법을 위한 정보를 제공하기 위하여, (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계; (b) 상기
20 시료로부터 각각 ABAT 및 CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 및 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 ABAT 및 CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 및 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 췌장암 마커의 검출 방법을 제공한다.

25 나아가, 본 발명은 췌장암 진단방법을 위한 정보를 제공하기 위하여, (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계; (b) 상기 시료로부터 각각 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 ABAT, CHI3L1

및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 췌장암 마커의 검출 방법을 제공한다.

5

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

10 실시예 1: 췌장암 과발현 또는 저발현 단백질의 발굴 및 성능 분석

(1) 혈액 시료 전처리

췌장암에서 과발현 또는 저발현되는 단백질을 발굴하기 위해, 하기 표 1에서와 같이 췌장암 환자 50명, 악성 췌관내 점액성 유두종양 환자 10명, 만성 담낭염 환자 22명 및 정상 대조군 25명으로부터 각각 혈액을 채취하였다. 이 중
15 정상 대조군과 만성 담낭염 시료는 정상군으로, 췌장암과 악성 췌관내 점액성 유두종양 시료는 췌장암군으로 분류하여 실험 및 분석을 진행하였다.

【표 1】

그룹	연령		성별		
	범위	평균표준편차	여성	남성	총계
췌장암	44-88	65.72±9.85	23	27	50
악성 췌관내 점액성 유두종양	49-81	63.6±9.66	4	6	10
만성 담낭염	43-82	56.96±9.13	11	11	22
정상 대조군	35-65	49.04±8.92	16	9	25

20 각 혈액 시료 40 μ l를 MARS(Multiple Affinity Removal System) 컬럼(Agilent, USA)에 통과시켜 혈액에서 가장 많은 비율을 차지하고 있는 14개의 단백질을 결실시키고, 3 kDa 필터로 농축한 후, BCA 정량을 수행하여 이중 200 μ g에 해당하는 혈장을 취해 6 M 우레아(urea)로 변성시키고, 20 mM

DTT 및 50 mM 이오도아세트산(iodoacetic acid)을 사용하여 환원 및 알킬화시켰다. 여기에 트립신을 50:1(단백질:트립신, w/w)의 비율로 37℃에서 16시간 동안 처리하여 단백질을 펩타이드로 만든 후, 상기 펩타이드를 C18 OASIS 컬럼(Waters, USA)을 사용하여 탈염하고 동결건조하였다. 상기

5 동결건조된 펩타이드를 용액 A(98% 증류수, 2% 아세토니트릴, 0.1% 포름산)에 녹이고 여기에 내부 표준인 베타-갈락토시다아제 펩타이드 5 fmol을 추가한 후, 이에 대하여 MRM 분석을 수행하였다.

(2) 트랜지션 선정

10 MRM 분석을 수행하기 위해, 특정 단백질의 특징적인 전하 대 질량비(m/z)를 가지는 펩타이드를 선정하고(Q1), 이 펩타이드를 전기적인 충격으로 단편화시켰을 때 발생하는 여러 절편 이온 중 해당 펩타이드에 대해 특징적인 m/z를 가지는 단편 이온을 선정하였다(Q3). 이 Q1과 Q3의 조합은 특정 단백질에 특이적인 이온들의 조합으로서 이를 트랜지션이라 명칭하며,

15 고분해능(triple quadrupole) 질량 분광 분석기에서 이 특징적인 Q1과 Q3로 이온들을 순차적으로 통과시켰을 때 얻어지는 신호를 정량적 정보로 환산하여 정량 분석을 수행하였다. 미국 워싱턴 대학교의 MacCoss 연구팀에서 개발한 스카이라인(SKYLine)이라는 공개 소프트웨어를 이용하여 NIST(National Institute of Standards and Technology) 라이브러리의 펩타이드 탠덤 질량

20 스펙트럼(peptide tandem mass spectra)을 기반으로 ms/ms 데이터가 존재하는 펩타이드에 대해, 총 강도가 높은 순으로 1개의 단백질당 최대 10개의 펩타이드를 선정하였다. 펩타이드의 길이는 아미노산 최소 7개부터 최대 24개로 선정하였다.

단, 트립신에 의해 절단되어 생성될 수 있는 전체 펩타이드 중에서

25 아래에 해당되는 아미노산을 포함하거나 특정 모티프(motif)를 갖고 있는 펩타이드는 다음과 같이 신호 값이 좋지 않다고 알려져 있어서 제외하였다:

① 해당 펩타이드 내에 메티오닌이 존재할 경우, 생체 내 ROS(reactive

oxygen species)에 의해 산화가 발생하여 질량 값이 32Da 증가;

⑥ 해당 펩타이드 내에 히스티딘이 존재할 경우, R-그룹의 양전하로 인해 해당 펩타이드의 전하 상태가 바뀜;

⑦ 해당 펩타이드 내에 NxS/T 모티프가 존재할 경우, N-당화가 발생하여
5 질량 값이 이동(shift)함;

⑧ 해당 펩타이드 내에 트립신에 의해 잘릴 수 있는 R이나 K 다음에 프롤린이 존재하는 경우, 미절단(missed cleavage)이 발생할 수 있음.

전구체(precursor) 전하는 +2가 전하를 갖는 펩타이드를 선정하고, 이온
10 전하는 +1가 전하, 이온 타입은 y-이온을 사용하였다. 단백질을
블라스트(Protein Blast) P 및 스카이라인(Skyline) 프로그램을 이용하여 독특한
트랜지션 및 펩타이드를 선별하고, 최종 선별된 트랜지션은 예측하는 정체
시간(Retention time, RT) 범위 내에 속한 것들만 사용하였다. RT 예측을 위해,
600개의 SIS 펩타이드 MRM 분석을 진행하고, 이를 통하여 소수성
15 도표(hydrophobicity scale)와 RT 크로마토그램에 기초한 검량선(calibration
curve)을 계산하였다.

(3) LC 및 MRM

LC는 애질런트사의 1260-모세관 LC를 사용하고, 펩타이드의 분리를
20 위해 모세관 RR 0.5 x 150 3.5 μ m의 컬럼을 사용하였다. 시료는 5 μ l를
주입하였고, 유속은 20 μ l/분으로 설정하였다. 우선 컬럼을 Sol A(95% 증류수,
5% 아세토니트릴, 0.1% 포름산)으로 10분간 평형화한 후 Sol B(5% 증류수, 95%
아세토니트릴, 0.1% 포름산)로 50분간 5%에서 85%까지, 5분간 85%의 농도
구배를 통해 펩타이드를 용출하였다.

25 질량분석기(Mass spectrometer)로서 애질런트사의 triple quadrupole
6490-QQQ 장비를 이용하여 선정 단백질들에 대한 트랜지션에 대해 MRM
모드로 모니터링하였다. 배치(Batch) 간 편차를 보정하기 위해 각 시료에

스파이킹(spiking)된 5 fmol 베타-갈락토시다아제 펩타이드(GDFQFNISR[C13N15], 547.3/646.4)도 동시에 모니터링하였다.

(4) 데이터 정량 분석

5 정량성을 확인하기 위해, 내부 표준 펩타이드인 베타-갈락토시다아제 펩타이드(GDFQFNISR[C13N15], 547.3/646.4 m/z)를 0.09, 0.27, 0.82, 2.5, 7.4, 22.2, 66.7 및 200 fmol로 각각 희석한 다음, 여기에 표적 펩타이드 분석 조건과 동일하게 혈장 10 ug을 매트릭스로 넣어서 분석을 진행하였다. 또한
10 내인성(endogenous) 신호를 확인할 목적으로 내부 표준 펩타이드를 넣지 않은 경우도 분석에 포함시켰으며, 모든 9개의 농도 점에서 3회 반복하여 MRM 정량하여 표준 곡선(standard curve)을 결정하였다.

각 개인별 MRM 결과는 스카이라인(MacCoss Lab, ver1.4.1)을 사용하여 해당 MRM 트랜지션의 이온 추출 크로마토그래피(XIC, Extract ion chromatography)를 생성하였으며, 각 트랜지션의 피크 면적을 계산하고 이를
15 다시 시간 경과에 따라 도식화하였다. 각 XIC된 피크의 면적을 내부 표준인 베타-갈락토시다아제 펩타이드(GDFQFNISR[C13N15], 547.3/646.4 m/z)의 XIC된 피크 면적으로 정규화하고 이 값으로 각 단백질 별로 상대 정량 분석을 수행하였다.

상기 MRM 정량 분석 결과, 도 1에서 보는 바와 같이 ABAT 단백질의
20 발현이 정상군에 비해 췌장암 환자군에서 특이적으로 증가됨을 확인할 수 있었고, 상기 ABAT를 췌장암 진단용 마커로 선발하였다.

(5) 데이터 통계 분석

통계 분석을 위해서 SVM(Support Vector Machine)을 이용하였다.
25 SVM은 라그랑주 최적화 이론(Lagrangian optimization theory)에 기반하여 주어진 조건을 만족하는 함수를 추정하는 알고리즘으로, 이 중에 최대 마진 분류기(Maximum margin classifier)를 사용하는 분류 분석방법을 사용하는

경우를 서포트 벡터 분류(Support Vector Classification, SVC)라고 한다. 본 실시예에서는 두 집단(정상 집단과 암환자 집단) 간의 차이를 최대화 하는 SVC를 이용하여 아래와 같은 췌장암 진단 함수를 구성하였다:

<함수식 1>

$$f(x) = \text{sgn}\left(\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i \langle x, x_i \rangle + b\right)$$

상기 식에서, 함수 값이 1이면 췌장암으로, -1이면 정상으로 판단한다.

상기 함수를 이용하여 췌장암 여부를 판단하였다. 3명의 정상 대조군으로부터 ABAT의 MRM 상대 측정값으로서 각각 0.000100328, 0.000252726 및 0.000301919를 얻었고, 이를 상기 진단 함수에 대입한 결과, 함수 값이 각각 $f(0.000100328) = -1$, $f(0.000252726) = -1$, $f(0.000301919) = -1$ 로 계산되어 상기 대상을 정상으로 판별할 수 있었다. 또한, 3명의 췌장암 환자로부터 ABAT의 MRM 상대 측정값으로서 각각 0.087803242, 0.039893973 및 0.038009273을 얻었고, 이를 상기 진단 함수에 대입한 결과, 함수 값이 각각 $f(0.087803242) = 1$, $f(0.039893973) = 1$ 및 $f(0.038009273) = 1$ 로 계산되어 상기 대상을 췌장암으로 판별할 수 있었다.

한편, 췌장암 진단 함수를 사용한 경우 ABAT의 췌장암 진단 마커로서의 성능을 ROC 그래프의 AUC로 나타내었다. ROC 그래프는 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)가 어떤 관계를 갖고 변하는지를 이차원 평면 상에 표현한 것인데, ROC 그래프 아래의 면적(AUC; $0 \leq \text{AUC} \leq 1$)이 넓을수록 정확하다고 판단할 수 있다.

본 발명에 따른 ABAT는 AUC가 0.838로서 췌장암 진단 마커로서의 성능이 매우 우수한 것으로 나타났다(도 2). 특히, 상용 췌장암 마커인 CA19-9의 AUC가 0.825임을 고려할 때(도 3), 본 발명의 ABAT는 CA19-9보다 췌장암 진단 성능이 더 우수함을 확인할 수 있었다(도 4).

또한, ABAT를 CA19-9와 동시에 사용할 경우, AUC가 0.972로서(도 5),

ABAT 또는 CA19-9를 단독으로 사용할 때보다 훨씬 우수한 성능을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 6).

상기 결과는 본 발명에 따른 ABAT가 췌장암 진단 마커로서 유용하게 사용될 수 있음을 보여준다.

5

실시에 2: 췌장암 과발현 또는 저발현 단백질의 발굴 및 성능 분석

실시에 1에서와 마찬가지로 단계 (1) 내지 (4)를 수행한 후 MRM 정량 분석 결과, 도 7에서 보는 바와 같이, CHI3L1 단백질의 발현이 정상군에 비해
10 췌장암 환자군에서 특이적으로 감소됨을 확인할 수 있었고, 상기 CHI3L1을 췌장암 진단용 마커로 선발하였다.

(1) 데이터 통계 분석

통계 분석을 위해서 SVM(Support Vector Machine)을 이용하였다. SVM은
15 라그랑주 최적화 이론(Lagrangian optimization theory)에 기반하여 주어진 조건을 만족하는 함수를 추정하는 알고리즘으로, 이 중에 최대 마진 분류기(Maximum margin classifier)를 사용하는 분류 분석방법을 사용하는 경우를 서포트 벡터 분류(Support Vector Classification, SVC)라고 한다. 본
실시예에서는 두 집단(정상 집단과 암환자 집단) 간의 차이를 최대로 하는 SVC를
20 이용하여 아래와 같은 췌장암 진단 함수를 구성하였다:

<함수식 1>

$$f(x) = \text{sgn}\left(\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i \langle x, x_i \rangle + b\right)$$

상기 식에서, 함수 값이 1이면 췌장암으로, -1이면 정상으로 판단한다.

상기 함수를 이용하여 췌장암 여부를 판단하였다. 3명의 정상
25 대조군으로부터 ABAT 및 CHI3L1의 MRM 상대 측정값으로서 각각 0.000100328와 0.14771372, 0.000252726과 0.260673196 및 0.000301919와 0.190724435를 얻었고,

이를 상기 진단 함수에 대입한 결과, 함수 값이 각각 $f(0.000100328, 0.14771372) = -1$, $f(0.000252726, 0.260673196) = -1$, $f(0.000301919, 0.190724435) = -1$ 로 계산되어 상기 대상을 정상으로 판별할 수 있었다. 또한, 3명의 췌장암 환자로부터 ABAT 및 CHI3L1의 MRM 상대 측정값으로서 각각 0.037046485와
 5 0.023796806, 0.039893973과 0.092394263 및 0.039590355와 0.071735919를 얻었고, 이를 상기 진단 함수에 대입한 결과, 함수 값이 각각 $f(0.037046485, 0.023796806) = 1$, $f(0.039893973, 0.092394263) = 1$, $f(0.039590355, 0.071735919) = 1$ 로 계산되어 상기 대상을 췌장암으로 판별할 수 있었다.

10 한편, 췌장암 진단 함수를 사용한 경우 ABAT 및 CHI3L1의 조합의 췌장암 진단 마커로서의 성능을 ROC 그래프의 AUC로 나타내었다. ROC 그래프는 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)가 어떤 관계를 갖고 변하는지를 이차원 평면 상에 표현한 것인데, ROC 그래프 아래의 면적(AUC; $0 \leq AUC \leq 1$)이 넓을수록 정확하다고 판단할 수 있다.

15 본 발명에 따른 ABAT 및 CHI3L1의 조합은 AUC가 0.956으로서 췌장암 진단 마커로서의 성능이 매우 우수한 것으로 나타났다(도 8). 특히, 상용 췌장암 마커인 CA19-9의 AUC가 0.825임을 고려할 때(도 3), 본 발명의 ABAT 및 CHI3L1의 조합은 CA19-9보다 췌장암 진단 성능이 더 우수함을 확인할 수 있었다(도 9).

또한, ABAT 및 CHI3L1의 조합을 CA19-9와 동시에 사용할 경우, AUC가
 20 0.984로서(도 10), ABAT 및 CHI3L1의 조합 또는 CA19-9를 단독으로 사용할 때보다 훨씬 우수한 성능을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 11).

상기 결과는 본 발명에 따른 ABAT 및 CHI3L1의 조합이 췌장암 진단 마커로서 유용하게 사용될 수 있음을 보여준다.

특허청구범위:

청구항 1. ABAT(4-aminobutyrate aminotransferase; GenBank Accession No: NP_001120920.1) 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 체장암 진단용 조성물.

청구항 2. 제1항에 있어서, CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 체장암 진단용 조성물.

청구항 3. ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준, 및 CHI3L1(Chitinase-3-like protein 1 precursor; GenBank Accession No: NP_001267.2) 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 체장암 진단용 조성물.

청구항 4. 제3항에 있어서, CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 체장암 진단용 조성물.

청구항 5. 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 체장암 진단용 조성물.

청구항 6. 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA의 발현

수준을 측정하는 제제가 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 췌장암 진단용 조성물.

- 5 청구항 7. 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 췌장암 진단용 키트.

10 청구항 8. 제7항에 있어서, 상기 키트가 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것을 특징으로 하는 췌장암 진단용 키트.

15 청구항 9. (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계;

(b) 상기 시료로부터 ABAT(4-aminobutyrate aminotransferase; GenBank Accession No: NP_001120920.1) 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

20 (c) 상기 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 상기 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

(d) 상기 단계 (c)의 비교 결과, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높은 경우 췌장암 발병 가능성이
25 높다고 판정하는 단계
를 포함하는, 췌장암의 진단방법.

청구항 10. (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계;

(b) 상기 시료로부터 각각 ABAT 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

5 (c) 상기 ABAT 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 상기 ABAT 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

(d) 상기 단계 (c)의 비교 결과, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA
10 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높고, CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높은 경우 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정하는 단계
를 포함하는, 췌장암의 진단방법.

15

청구항 11. (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계;

(b) 상기 시료로부터 각각 ABAT 및 CHI3L1(Chitinase-3-like protein 1 precursor; GenBank Accession No: NP_001267.2) 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 및
20 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

(c) 상기 ABAT 및 CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 및 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

(d) 상기 단계 (c)의 비교 결과, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는
25 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높고, CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상

대조군에서의 발현 수준보다 낮은 경우 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정하는 단계

를 포함하는, 췌장암의 진단방법.

- 5 청구항 12. (a) 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상으로부터 시료를 얻는 단계;
- (b) 상기 시료로부터 각각 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계;
- 10 (c) 상기 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 ABAT, CHI3L1 및 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료에서의 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- (d) 상기 단계 (c)의 비교 결과, 췌장암 발병 여부를 진단하고자 하는 대상에서의 ABAT 단백질의 발현 수준 또는 ABAT 단백질을 암호화하는 유전자의
- 15 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높고, CHI3L1 단백질의 발현 수준 또는 CHI3L1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 낮으며, CA19-9 단백질의 발현 수준 또는 CA19-9 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준이 정상 대조군에서의 발현 수준보다 높은 경우 췌장암 발병 가능성이 높다고 판정하는 단계
- 20 를 포함하는, 췌장암의 진단방법.

청구항 13. 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료가 혈액, 혈청 또는 혈장인 것을 특징으로 하는, 췌장암의 진단방법.

- 25 청구항 14. 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준 측정이 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)를 이용하는 것을 특징으로

하는, 체장암의 진단방법.

청구항 15. 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준 측정 또는 비교가 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, 5 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, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 10 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 체장암의 진단방법.

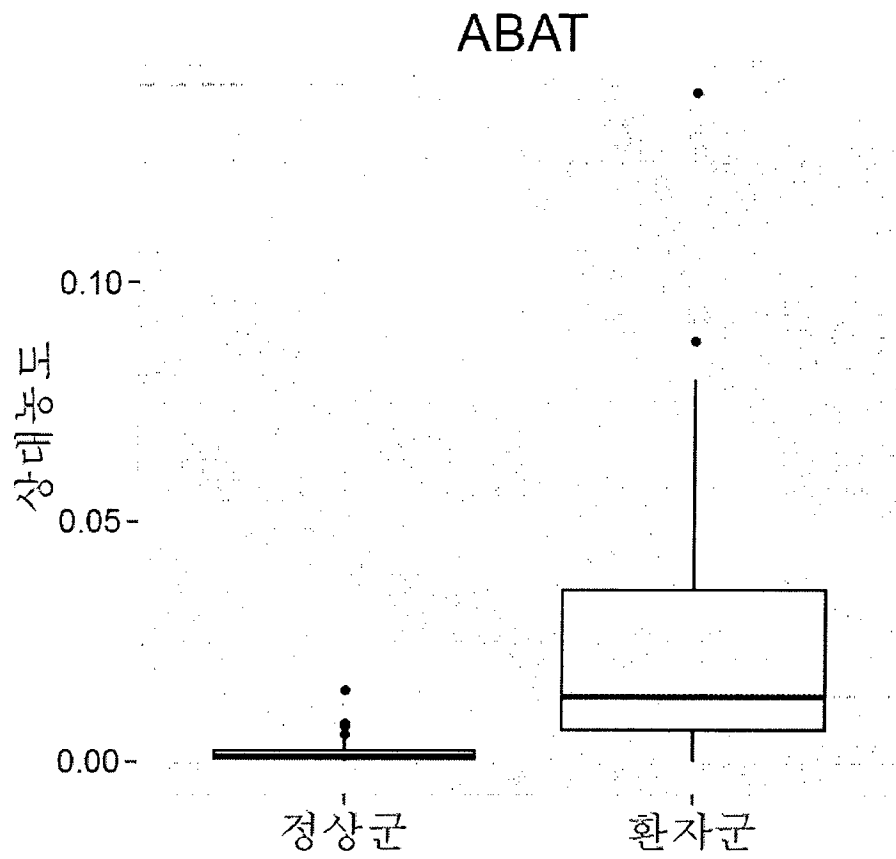
15

청구항 16. 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준 측정이 역전사효소 중합효소 반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 체장암의 진단방법.

20

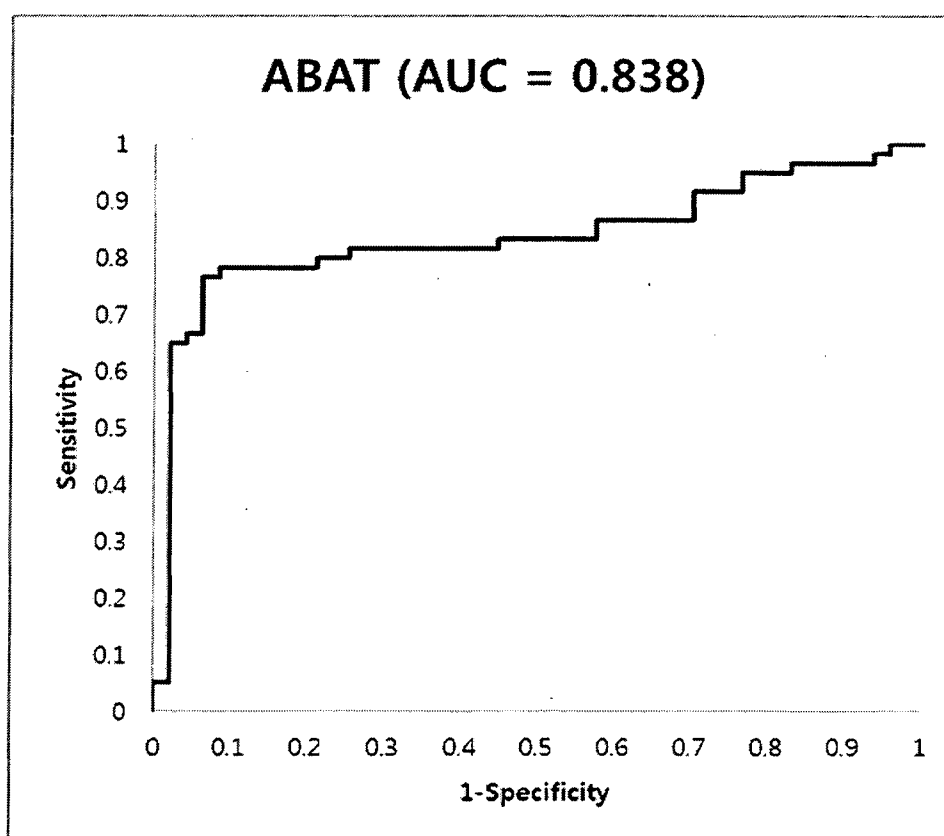
1/11

FIG. 1



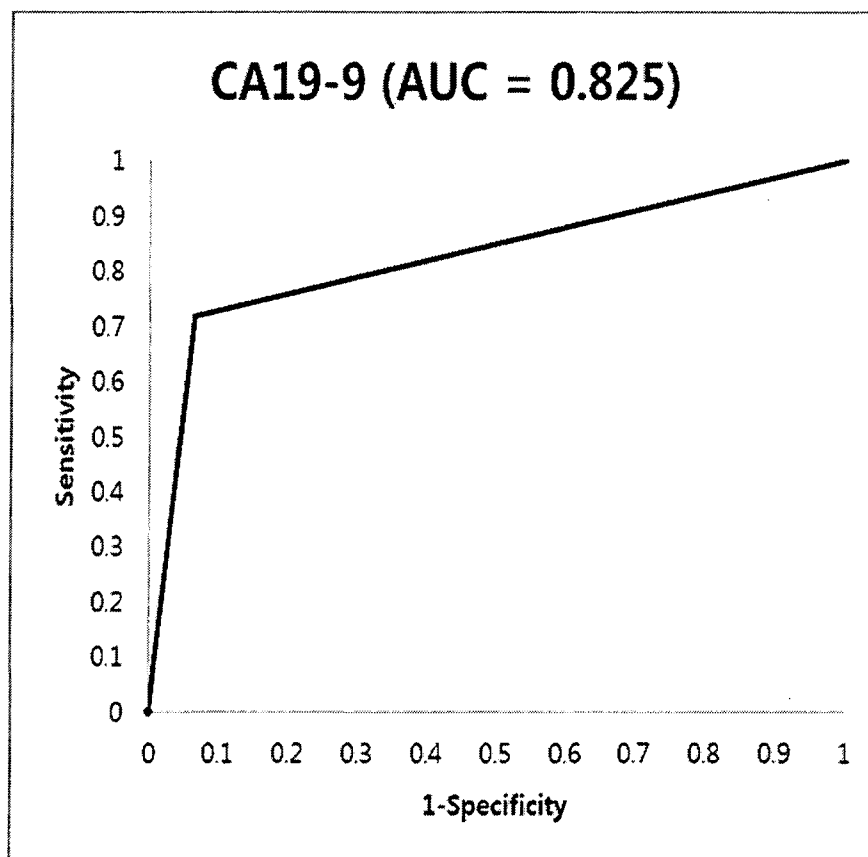
2/11

FIG. 2



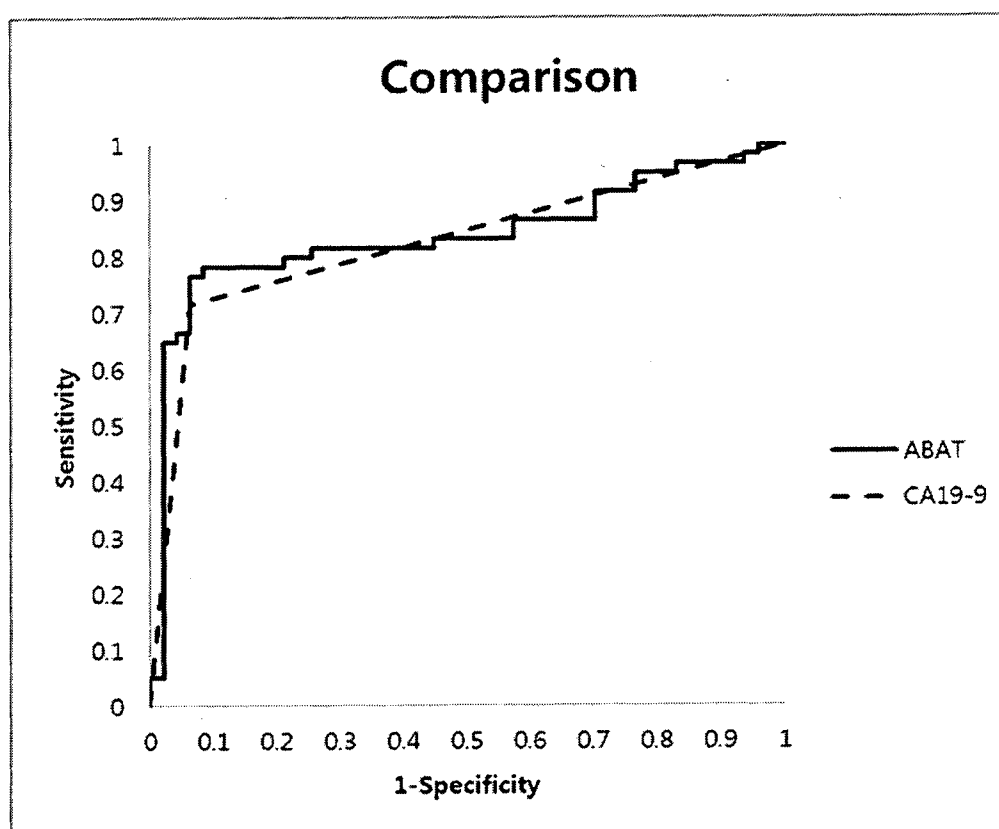
3/11

FIG. 3



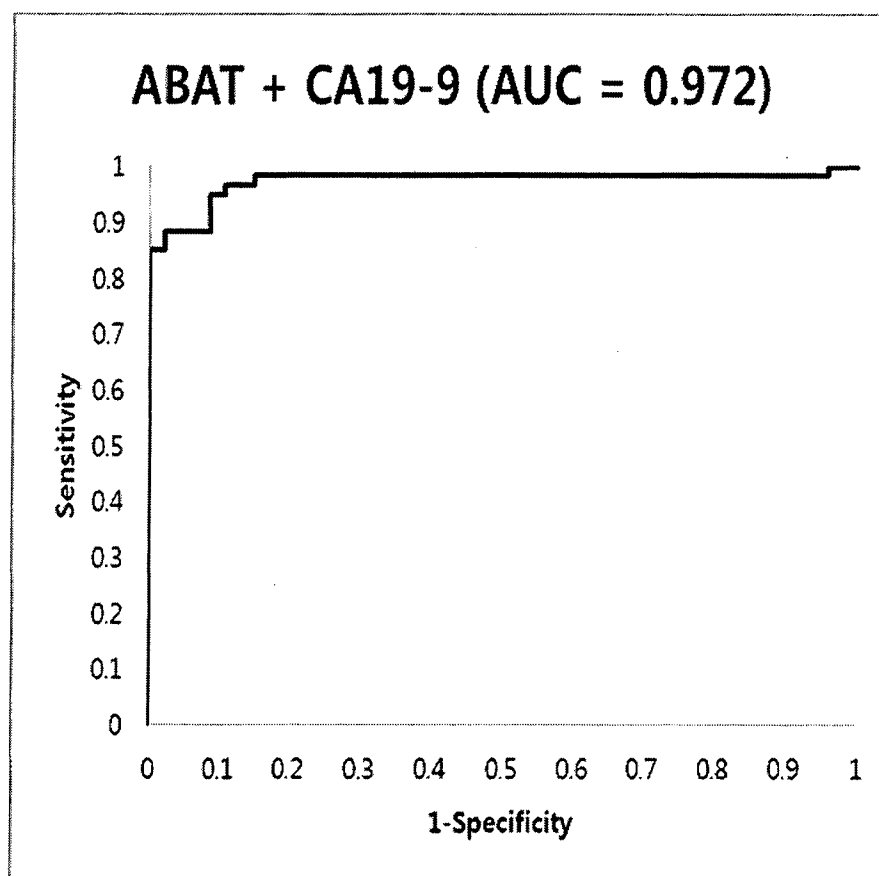
4/11

FIG. 4



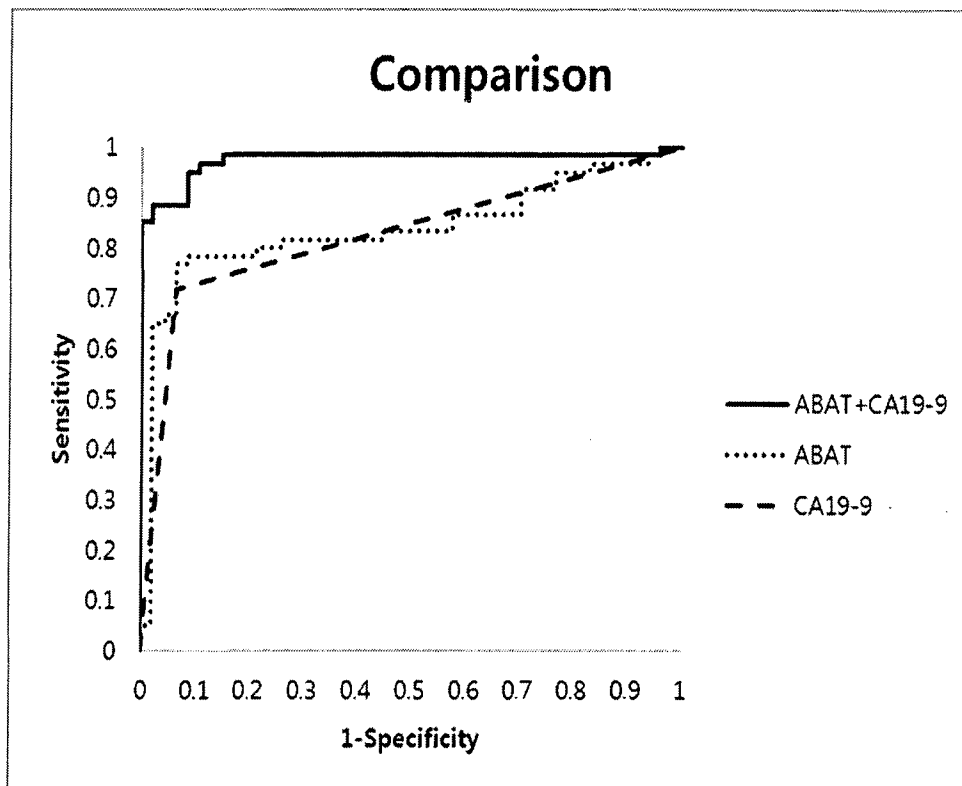
5/11

FIG. 5



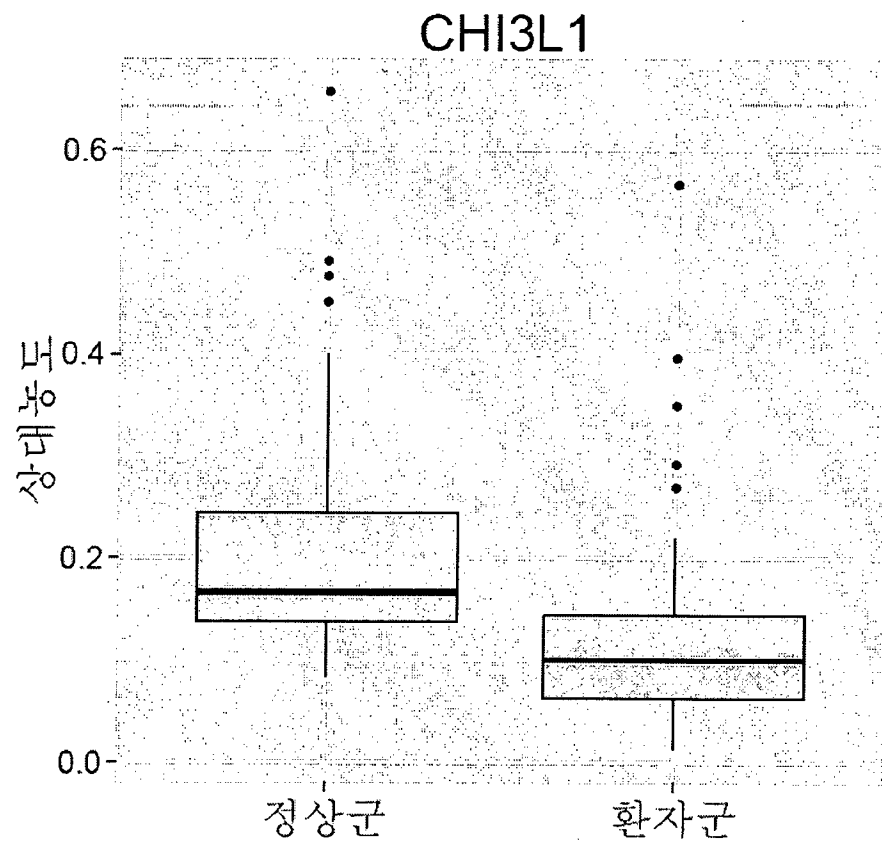
6/11

FIG. 6



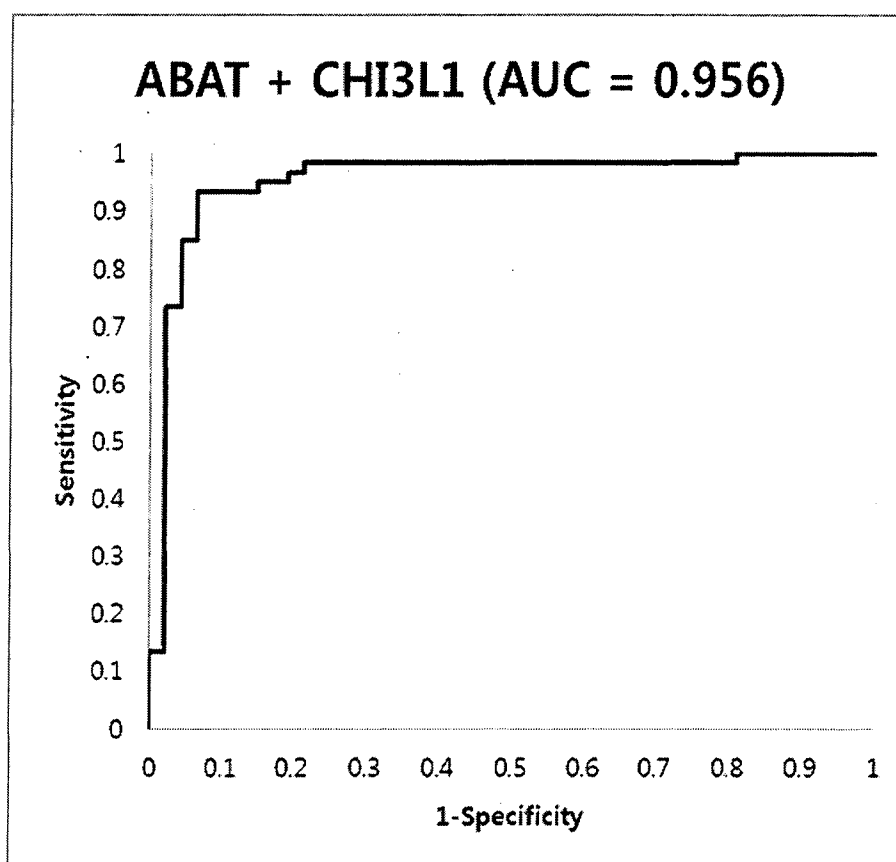
7/11

FIG. 7



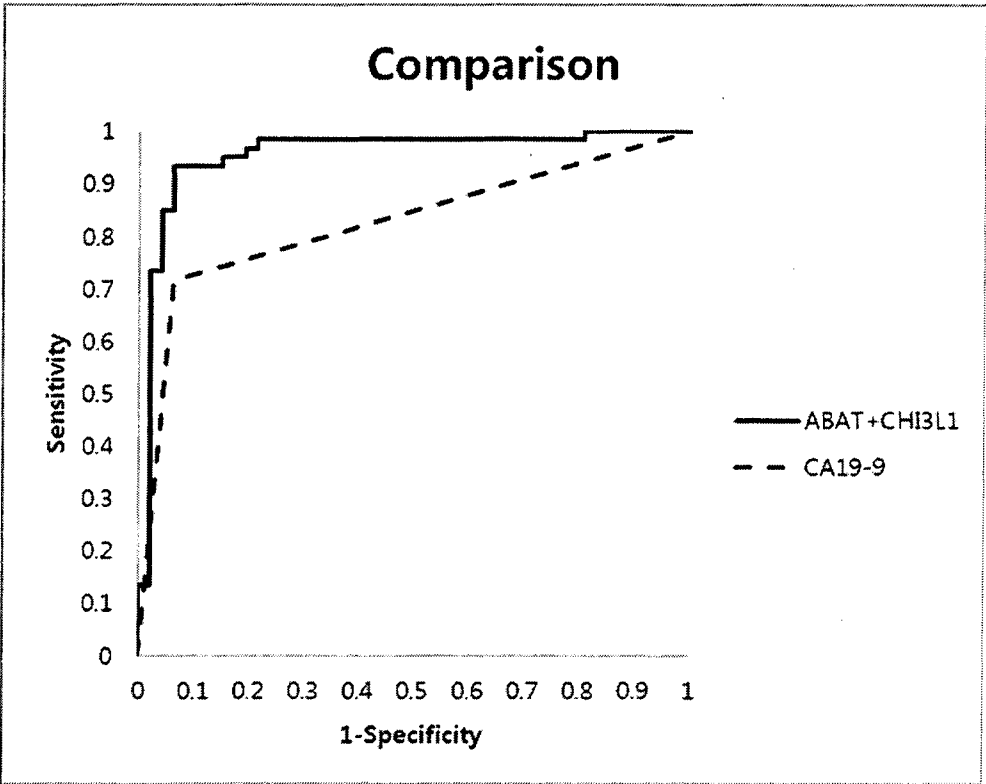
8/11

FIG. 8



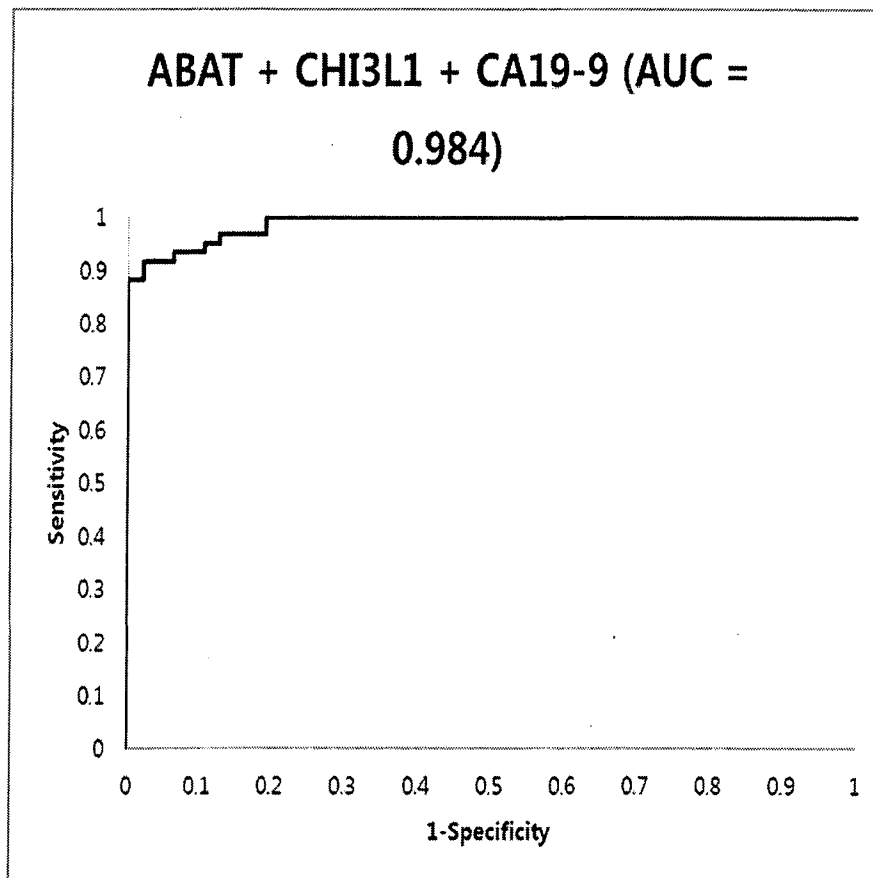
9/11

FIG. 9



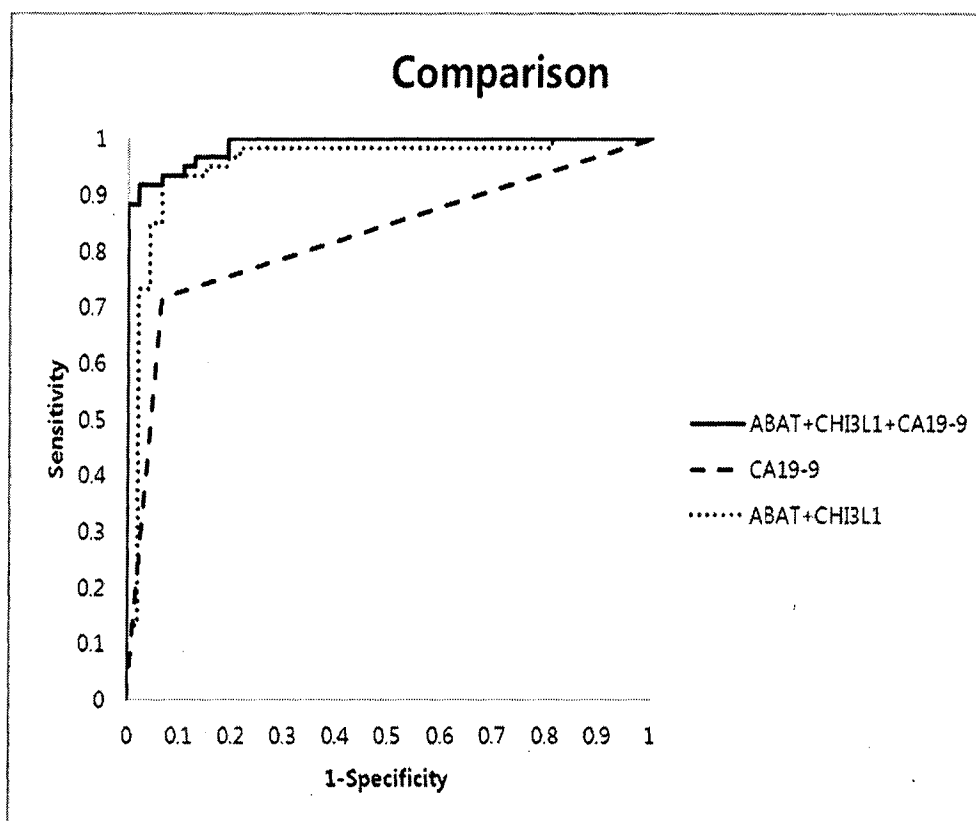
10/11

FIG. 10



11/11

FIG. 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/010354**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/574; C12Q 1/34; C12Q 1/02; C40B 40/06; C12Q 1/68; C40B 30/04; G01N 33/68; G01N 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: ABAT, 4-aminobutyrate aminotransferase, GABA transaminase, 4-aminobutyrate transaminase, CHI3L1, cartilage glycoprotein 39, CA 19-9, pancreatic cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010-0190686 A1 (WELLS, Robert L. et al.) 29 July 2010 See abstract, claims 1, 42, 43.	1-8
A	US 2012-0295803 A1 (BEER, David et al.) 22 November 2012 See abstract, claim 1.	1-8
A	EP 2366800 A1 (CENTRUM ONKOLOGII-INSTYTUT IM M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE ODDZIAŁ W GLIWICACH) 21 September 2011 See abstract, claim 1.	1-8
A	WO 2008-077165 A1 (AUSTRIAN RESEARCH CENTERS GMBH - ARC) 03 July 2008 See abstract, claim 1.	1-8
A	US 2012-0040861 A1 (WILLIAMS, Stephen Alaric et al.) 16 February 2012 See abstract, claims 1, 19.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 FEBRUARY 2015 (09.02.2015)

Date of mailing of the international search report

09 FEBRUARY 2015 (09.02.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/010354

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **9-16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9-16 pertain to a method for treatment of the human by surgery or therapy, or to a diagnostic method, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/010354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0190686 A1	29/07/2010	WO 2009-002472 A1	31/12/2008
US 2012-0295803 A1	22/11/2012	US 2014-057794 A1	27/02/2014
		WO 2012-158780 A2	22/11/2012
		WO 2012-158780 A3	11/07/2013
EP 2366800 A1	21/09/2011	NONE	
WO 2008-077165 A1	03/07/2008	AT 504702 A1	15/07/2008
		WO 2008-077165 A9	04/09/2008
US 2012-0040861 A1	16/02/2012	AU 2011-289284 A1	21/02/2013
		CA 2804857 A1	16/02/2012
		CN 103415624 A	27/11/2013
		EP 2603622 A2	19/06/2013
		JP 2013-541697 A	14/11/2013
		KR 20130100096 A	09/09/2013
		MX 2013001042 A	03/04/2013
		SG 187045 A1	28/02/2013
		US 2014-073522 A1	13/03/2014
		WO 2012-021795 A2	16/02/2012
		WO 2012-021795 A3	06/09/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/574; C12Q 1/34; C12Q 1/02; C40B 40/06; C12Q 1/68; C40B 30/04; G01N 33/68; G01N 33/53

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: ABAT, 4-aminobutyrate aminotransferase, GABA transaminase, 4-aminobutyrate transaminase, CHI3L1, cartilage glycoprotein 39, CA 19-9, pancreatic cancer

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2010-0190686 A1 (WELLS ROBERT L. 외 2명) 2010.07.29 요약, 청구항1,42,43 참조.	1-8
A	US 2012-0295803 A1 (BEER DAVID 외 3명) 2012.11.22 요약, 청구항1 참조.	1-8
A	EP 2366800 A1 (CENTRUM ONKOLOGII-INSTYTUT IM M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE ODDZIAŁ W GLIWICACH) 2011.09.21 요약, 청구항1 참조.	1-8
A	WO 2008-077165 A1 (AUSTRIAN RESEARCH CENTERS GMBH - ARC) 2008.07.03 요약, 청구항1 참조.	1-8
A	US 2012-0040861 A1 (WILLIAMS STEPHEN ALARIC 외 2명) 2012.02.16 요약, 청구항1, 19 참조.	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 02월 09일 (09.02.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 02월 09일 (09.02.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



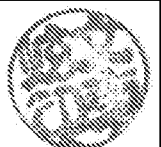
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 3473

심사관

문동현

전화번호 +82-42-481-3482



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 9-16
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제9항 내지 제16항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법 또는 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1 (iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2010-0190686 A1	2010/07/29	WO 2009-002472 A1	2008/12/31
US 2012-0295803 A1	2012/11/22	US 2014-057794 A1	2014/02/27
		WO 2012-158780 A2	2012/11/22
		WO 2012-158780 A3	2013/07/11
EP 2366800 A1	2011/09/21	없음	
WO 2008-077165 A1	2008/07/03	AT 504702 A1	2008/07/15
		WO 2008-077165 A9	2008/09/04
US 2012-0040861 A1	2012/02/16	AU 2011-289284 A1	2013/02/21
		CA 2804857 A1	2012/02/16
		CN 103415624 A	2013/11/27
		EP 2603622 A2	2013/06/19
		JP 2013-541697 A	2013/11/14
		KR 20130100096 A	2013/09/09
		MX 2013001042 A	2013/04/03
		SG 187045 A1	2013/02/28
		US 2014-073522 A1	2014/03/13
		WO 2012-021795 A2	2012/02/16
		WO 2012-021795 A3	2013/09/06