

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2018/208122 A1

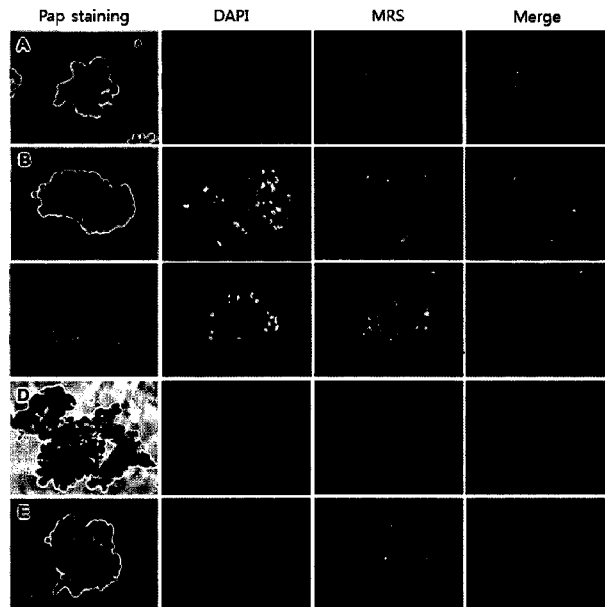
2018년 11월 15일 (15.11.2018) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/574* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/005443
- (22) 국제출원일: 2018년 5월 11일 (11.05.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0059318 2017년 5월 12일 (12.05.2017) KR
- (71) 출원인: 주식회사 온코태그디아그노스틱 (ONCOTAG DIAGNOSTICS CO., LTD.) [KR/KR]; 16229 경기도 수원시 영통구 광교로 145 차세대융합기술연구원내 B동 8층 (이의동), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김성훈 (KIM, Sunghoon); 06269 서울특별시 강남구 남부순환로365길 42, 4동 1005호, Seoul (KR). 권남훈 (KWON, Nam Hoon); 16941 경기도 용인시 수지구 법조로 241, 4611동 1304호, Gyeonggi-do (KR). 이동기 (LEE, Dong Ki); 13556 경기도 성남시 분당구 정자일로 239, 103동 1502호, Gyeonggi-do (KR). 임범진 (YIM, Bum Jin); 07997 서울시 양천구 목동서로 155, 102동 201호(목동), Seoul (KR). 장성일 (JANG, Sung Il); 06217 서울 강남구 역삼로 314, 302동 504호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook); 06141 서울시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS 빌딩), 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSIS OF BILE DUCT CANCER USING METHIONYL-TRNA SYNTHETASE IN BILE DUCT CELL

(54) 발명의 명칭: 담도 세포에서 메티오닐-타알엔에이 합성효소를 이용한 담도암 진단 방법

【도 5】



(57) Abstract: The present invention relates to a method for diagnosis of bile duct cancer, using methionyl-tRNA synthetase (MRS) in bile duct cells and, more particularly, to a composition for diagnosing bile duct cancer, comprising an agent with which an expression level of methionyl-tRNA synthetase protein is measured, a diagnostic kit, and a method for qualitative or quantitative analysis of MRS to provide information necessary for the diagnosis of bile duct cancer. According to the present invention, MRS retains a very high value as a diagnostic marker for bile duct cancer in terms of rapidity and accuracy because MRS allows determination to be made to see whether bile duct cancer is present or absent for bile duct cells, which have been classified as atypical cells by conventional pathological examination methods. Hence, the present invention provides a method for discriminating between cancer cells and normal



WO 2018/208122 A1

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.

- (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 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

---

cells in atypical cells and can make a definite diagnosis of cancer with almost 100 % in all of sensitivity, specificity, and accuracy in contrast to many conventional cancer markers with which an actual result of diagnosis is substantially difficult to obtain at a cell level (that is, cytodiagnosis).

(57) 요약서: 본 발명은 담도 세포에서 메티오닐 -티알엔에이 합성효소 (methionyl-tRNA synthetase, MRS)를 이용한 담도암 진단 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 메티오닐 -티알엔에이 합성효소 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 담도암 진단용 조성물, 진단용 키트 및 담도암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 MRS를 정성 또는 정량 분석하는 방법에 대한 것이다. 본 발명에 따르면 MRS는 기존의 병리검사 방법들이 비정형세포로 분류했던 담도 세포에 대해서도 담도암의 유무 판정이 가능하여, 담도암의 진단마커로서 신속성 및 정확성 면에서 매우 우수한 가치를 지닌다. 이에 따라 본 발명은 비정형 세포에서 암세포와 정상세포를 구분하는 방법을 제공하며, 기존에 많은 암 마커들이 실질적으로 세포수준 (즉, 세포진)에서 진단의 실효를 거두기 어려웠던 것과는 대조적으로 본 발명에 따르면 세포수준에서도 민감도, 특이도 및 정확도가 거의 100%로 암의 확진이 가능하다.

**【명세서】****【발명의 명칭】**

담도 세포에서 메티오닐-티알엔에이 합성효소를 이용한 담도암 진단 방법

**【기술분야】**

본 발명은 담도 세포에서 메티오닐-티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS)를 이용한 담도암 진단 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 메티오닐-티알엔에이 합성효소 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 담도암 진단용 조성물, 진단용 키트 및 담도암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 MRS를 정성 또는 정량 분석하는 방법에 대한 것이다.

**【배경기술】**

본 출원은 2017년 5월 12일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2017-0059318호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

담도암은 국내에서 10만명당 6.3명의 발생율로 전체 암중 9위를 차지하나 사망률로는 6위로 예후가 좋지 않다. 담도암으로 확진을 받기 까지 통상적인 진료과정은 다음과 같다. 일반적으로 환자가 황달, 복부 불편감, 체중 감소 등의 증상으로 병원을 내원하게 되면, 1차적으로 영상학적 검사인 복부초음파 (abdominal ultrasound, US), 내시경 초음파 (endoscopic ultrasound, EUS)복부전산화 단층촬영 (computed tomography, CT)이나 복부자기공명영상(magnetic resonance imaging, MRI)을 통해 담도암의 존재여부를 의심하게 되는데, 실질적으로 상기 영상학적 검사를 통해서만 종괴를 형성한 담도암에 대해서만 진단의 실효가 있고 비-종괴형성 담도암에 있어서는 영상검사만으로 진단이 어렵다. 결국 담도암의 확정적인 진단을 위해서는 병리검사가 필요하다. 다시말해서 담도암이 발생하는 형태는 종괴 형성형, 비-종괴형성형(담도 침윤형, 담도내 성장형)으로 구분되는데, 복부초음파나 복부전산화 단층촬영상에서 접근이 가능한 종괴가 있는 경우에는 이러한 영상검사법을 이용하여 조직검사가 가능하다. 그러나 이러한 영상학적으로 보이는 종괴가 없거나 접근이 어려운 경우, 즉 담도 침윤형이나 담도내 성장형의 경우에는 내시경적 역행성채담도 조영술이나 경피경관 담도배액술을 이용하여 담도내로 접근하여 조직검사나 세포진 검사를 시행한다.

병리검사(pathological examination)란 적출한 세포, 조직, 또는 장기를 이용해 주로 형태학적 입장에서 질병의 근원을 해명하려 하는 검사를 의미하며, 육안적 소견의 파악, 광학, 전자현미경 검색 등의 방법으로 질병의 진단에 응용되는 중요한 검사다. 이러한 병리검사에는 조직병리검사와 세포병리검사가 있다. 담도암에 대한 조직검사방법에는 복부초음파 유도하 조직검사, 복부전산화 단층촬영하 조직검사, 내시경적 역행성췌담도 조영술 (Endoscopic retrograde cholangiogram, ERCP)이나 경피경관 담도배액술 (Percutaneous transhepatic biliary drainage)를 통한 조직검사가 있고, 세포검사로는 내시경적 역행성췌담도 조영술이나 경피경관 담도배액술을 통한 솔세포진 검사법(brushing cytology) 및 담즙 내 세포진 검사법이 있다.

한편, 조직검사와 세포진(cytodiagnosis) 검사는 많은 차이를 지니며, 잘 알려진 암 마커들을 이용한 분석 실험에서 조직검사와 세포진검사 사이에는 진단 민감도 및 특이도에서 많은 차이를 보이는 것으로 알려졌다. 따라서 기존에 알려진 담도암 마커라고 하더라도 구체적인 검체(조직 또는 세포)에 따라서 실질적으로 진단 실효성을 거둘 수 있는지는 별개의 문제로 여겨진다.

조직검사는 목적 부위를 내시경적으로 관찰하거나 암으로의 형질전환이 의심되는 조직으로부터 1g 내지  $10^9$  cells 정도의 일정 세포조직을 채취한 후 염색 등과 같은 생화학적 방식을 통하여 암진단을 수행한다. 이러한 조직검사는 주변의 구조나 세포와 비교를 통해 특정 영역에 암이 있는 것으로 확진하기가 비교적 용이한 것으로 알려져 있다. 한 연구자들은 담도암의 진단 민감도를 높이기 위하여 조직생검을 위한 표본을 몇 개 채취하는 것이 좋은가에 대한 연구 결과를 보고하였다 (Kawashima H, Itoh A, Ohno E, Goto H, Hirooka Y. Transpapillary biliary forceps biopsy to distinguish benign biliary stricture from malignancy: how many tissue samples should be obtained?, Dig Endosc 2012;24 Suppl 1:22-27.). 3개 이상의 표본을 채취할 경우 위음성이 0%로 감소하고 4개 이상인 채취한 생검 표본에서 양성(positive)으로 나온 경우 100% 양성(positive)으로 확진할 수 있다고 보고하였다. 따라서 악성담도질환 진단을 위하여 최소한 3개 이상의 조직 표본을 얻을 필요가 있다. 그러나 생검 표본의 개수가 많아질수록 환자가 받는 신체적

부담은 증가한다.

아직까지도 담도의 다른 양성(benign)질환과 담도암의 세포 또는 조직을 감별하는 데는 Hematoxylin and eosin stain (HE stain), Papanicolaou stain(Pap stain) 등에 의존하고 하고 있으며, 이러한 방법은 진단 민감도가 40~60%로 낮은 상태로 보고되고 있다. 더욱이 세포 또는 조직을 채외로 적출하여 염색 등의 기법을 통해 담도암을 확진하는 병리검사 방법들이, 비침습적으로 수행되는 자기공명영상 방법보다도 민감도가 낮다는데 큰 문제가 있다. Xu 등은 악성 담도 협착이 의심되는 환자에서의 각 진단방법의 민감도와 특이도와 관련하여 보고하였는데(Xu MM, Sethi A. Diagnosing Biliary Malignancy. Gastrointest Endosc Clin N Am 2015;25:677-90), 상기 문헌에 따르면 비침습적인 자기 공명영상(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)의 경우 민감도는 80%이나 특이도가 70~85%로 낮아 확진을 위해서는 조직 검사 및 세포진 검사가 필요하다. 내시경적 역행성췌담도 조영술(ERCP)를 이용한 솔세포진 검사(brushing cytology)를 단독으로 시행할 경우 민감도가 23-56%로 낮으며 ERCP를 이용한 조직검사(biliary biopsy)를 단독으로 시행할 경우 담도암(cholangiocarcinoma, CCA)에서는 44-89%로 민감도가 다양하게 보고되고 있는 실정이다. 상기 솔세포진과 조직검사를 동시에 시행할 경우 민감도가 70%까지 상승하나 여전히 비침습적인 MRCP 방법에 비해 민감도가 낮은 상황이다.

담도암을 포함하여 담도에 발생하는 여러 질환들은 담도협착을 동반하는 경우가 많은데, 이러한 담도협착이 발견된 환자에서 해당 영역이 악성(담도암)인지 아니면 다른 양성(benign) 담도질환이 있는 것인지 감별진단하기가 어려운 실정이다. 담도 협착에 대한 정확한 진단은 치료 방향을 결정하는 데 가장 중요한 부분이며 불필요한 수술이나 치료를 피하고 환자에게 가장 적절한 치료법을 제시할 수 있다. 좁은 담도내강 및 섬유화는 담도질환 진단을 어렵게 만드는 주요 요소 중의 하나로서, 과거에는 주로 내시경적 역행담췌관조영술 또는 경피경관 담도배액술 등을 시행하는 도중에 담즙을 흡인하여 세포검사를 시행하였다. 이러한 방법으로 얻은 세포검체는 세포충실도가 낮고 대부분 세포가 변성 또는 자가용해되어 진단적인 세포를 얻기가 어려웠다(진소영 외, 췌담관질환에서 담관 솔질세포검사의 유용성, The Korean Journal of Cytopathology 17 (1) : 38-45 2006). 따라서 최근에는 내

시경적 역행담취관조영술을 시행하면서 협착을 확인하고 병변이 의심되는 부위에서 직접 솔로 세포검체를 얻는 담도 솔세포진 검사가 보편화되어 있다. 세포진(cytodiagnosis)은 주로 세포를 광학 또는 위상차(位相差) 현미경으로 검사하여 질병을 진단하는 방법을 의미하는 것으로서, 세포진의 경우 주변 구조나 세포와의 비교가 어려워 진단을 확신 하는데 한계점이 있는 실정이다. 게다가, 이러한 세포 수준의 검사에서는 단순히 세포 개수가 많아진다고 해서 진단 효율이 높아지지 않는다. 구체적으로 Jo YG, et al.에 따르면, 세포덩어리 염색법(cell-block techniques)과 일반 솔세포진 검사 결과를 비교하였다. 구체적으로 솔세포진 검사로 얻어진 일반적인 세포를 바로 퍼바른 표본(direct smear)과 세포진을 모아서 세포덩어리로 만든 표본에 대하여 진단 효율을 비교하였는데, 결과적으로 두 방법에서 민감도와 특이도에 차이가 없다고 보고하였다(Jo YG, et al. Diagnostic accuracy of brush cytology with direct smear and cell-block techniques according to preparation order and tumor characteristics in biliary strictures. Korean J Gastroenterol 2014;63:223-30). 또한 Bang KB et al. 들은 솔을 이용한 세포진 검사와 바구니(Basket)를 이용하여 세포진을 채취한 비교연구에서 민감도나 특이도에서 차이가 없었다고 보고하였다(Bang KB, Kim HJ, Park JH, et al. Comparison of brush and basket cytology in differential diagnosis of bile duct stricture at endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2014;13:622-7.)

체내에서 분리된 세포를 병리학적으로 검사함에 있어서 장애가 되는 것 중에 비정형 세포(atypical cell)에 대한 판단의 어려움도 한몫하고 있는 실정이다. 1976년 Melamed 등이 염증성 변화는 아니면서 이형성으로 진단하기에는 미흡한 세포변화를 편평세포 비정형성으로 발표한 후, 비정형적 세포에 대한 진단, 해석 및 치료방침결정에 많은 논란이 있어왔다. 따라서 이의 개선을 위하여 The Bethesda system(TBS)이 제정되었고, TBS에서는 비정형적 세포(atypical cell)라는 용어의 사용을 염증성, 전암성 또는 종양성 세포변화로 진단할 수 없는, 본질을 알 수 없는 경우(undetermined significance)에만 극히 제한하여 사용하고 있다. 비정형 세포에 대한 치료적 방침과 관련하여 다른 견해가 있을 수 있기 때문에, 문제가 된다. 특히, 실제로 암이 진행되고 있는 상태임에도 불구하고 조직 또는 세포 수준의 검사에서 비정형 세포 또는 조직으로만 결과가 판정되어 나오는 경우가 상당하다는

데에 문제가 있다. 부정형의 조직 구조나 세포 형태가 염증성 병변인지 신생물인지 구분이 명확하지 않은 경우 atypism 또는 cellular atypia라고 진단하는 경우가 많다. 따라서 다른 검사수단 등에 의하여 여러번 반복적인 재검사의 필요성이 따르며 이에 따른 시간적 경제적 비용이 상당히 소모되고 있는 실정이다.

이에 따라 세포 검사에서 다양한 단백질 마커들이 암세포를 구분하기 위하여 사용되어왔으나, 실질적으로 괄목할만한 효용성을 거두지 못하고 있다. 일례로 p53의 경우, 1999년에 슬세포진으로 얻어진 세포진에서 p53을 이용한 면역형광염색법이 시도되었다. 민감도가 43%로 낮았으며(Tascilar M, Sturm PD, Caspers E, et al. Diagnostic p53 immunostaining of endobiliary brush cytology: preoperative cytology compared with the surgical specimen. Cancer 1999;87:306-11.), 이후 다른 연구에서 기존의 H&E stain법에 비해 민감도가 낮다고 보고되었다(Stewart CJ, Burke GM. Value of p53 immunostaining in pancreatobiliary brush cytology specimens. Diagn Cytopathol 2000;23:308-13.). 또한 담도암세포 중 28.9%에서 p53이 발현되지 않은 한계가 있는 것으로 알려졌다. 또 다른 일례로서 Minichromosome maintenance (MCM) replication proteins (Mcm2-7) 단백질이 악성 췌담도암에서 발현되지 못하는 점을 이용하여 면역형광염색법을 통해 담도암을 검출하고자 하는 시도가 있었으나, 민감도는 66%로 낮은 수준에 그쳤다.(Ayaru L, Stoeber K, Webster GJ, et al. Diagnosis of pancreaticobiliary malignancy by detection of minichromosome maintenance protein 5 in bile aspirates. Br J Cancer 2008;98:1548-54.). 이처럼 기존에 알려진 담도암 분자 마커들은 세포진 검사 수준에서, 정확도 및 신뢰도가 아직 낮은 수준이어서 실질적인 효용성을 나타내지 못하는 한계가 있는 실정이었다.

이처럼 여러 연구와 노력에도 불구하고 담도암 진단과 관련하여 세포 수준의 검사만으로도 높은 민감도와 특이도로 악성과 양성(benign, 담도암이 아닌 기타 담도 질환)을 정확히 구별 및 판정할 수 있는 효과적인 마커 및 병리학적 진단법이 없는 상태이다.

**【발명의 상세한 설명】**

**【기술적 과제】**

이에 본 발명자들은 세포 수준에서도 정확하게 담도암을 진단할 수 있는 방법을 연구하던 중, 조직검사 뿐만아니라 세포진(cytodiagnosis)에 MRS를 마커로 이용할 시에 담도암의 확정 판정에 있어서 민감도 및 예측도가 거의 100% 수준으로 나타날 뿐만아니라, 특히 비정형 세포(atypical cell)에 대해서도 암세포를 정확히 구별하는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

따라서 본 발명의 목적은, 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 담도암 진단용 조성물 및 이를 포함하는 담도암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 담도암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료로부터 메티오닐 티알엔에이 합성효소 단백질을 정성 또는 정량분석하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 담도암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 민감도 및 특이도를 향상시키는 방법을 제공하는 것이다:

(a) 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소가 발현 증가되었으면 담도암 환자인 것으로 판단하는 단계.

본 발명의 또 다른 목적은, 담도암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 형태학적 검사와 병용하여

(a) 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소가 발현 증가되었으면 담도암 환자인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 보조요법을 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는, 담도암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.



**【기술적 해결방법】**

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 담도암 진단용 조성물 및 이를 포함하는 담도암 진단용 키트를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

담도암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료로부터 메티오닐 티알엔에이 합성효소 단백질을 정성 또는 정량분석하는 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 담도암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 민감도 및 특이도를 향상시키는 방법을 제공한다:

(a) 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소가 발현 증가되었으면 담도암 환자인 것으로 판단하는 단계.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 담도암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 형태학적 검사와 병용하여

(a) 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소가 발현 증가되었으면 담도암 환자인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 보조요법을 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는, 담도암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS)

단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 담도암 진단용 조성물 또는 담도암 진단용 키트를 제공한다.

또한 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제로 구성되는, 담도암 진단용 조성물 또는 담도암 진단용 키트를 제공한다.

또한 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제로 필수적으로 구성되는, 담도암 진단용 조성물 또는 담도암 진단용 키트를 제공한다.

또한 본 발명은 담도암의 진단용 제제를 제조하기 위한 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제의 용도를 제공한다.

본 발명자들은 MRS가 담도암 세포 또는 조직에서 특이적으로 그 발현량이 증가(과발현)되는 것을 최초로 확인하였다. 특히 악성(담도암)과 양성(benign, 암에 대해서는 정상)을 판단하기 어려운 담도협착 환자에 대하여, 세포 수준에서 MRS 발현 증가를 측정하는 것만으로도 악성상태를 특이적으로 구분하였으며, 특히 기존의 세포진 병리검사 방식에서 비정형 세포(atypical cell)로서 확진을 내리기 어려운 세포에 대해서도 민감도 및 특이도가 거의 100%에 가깝게 향상되어 확진가능한 것으로 나타나, 담도암의 진단마커로서 MRS의 가치가 매우 높다는 것을 확인하였다. MRS의 담도암 진단 용도는 본 발명자들에 의해 최초로 밝혀진 것이며, 또한 비정형 세포에 대한 담도암 진단용도 또는 비정형 세포에서 암세포와 정상세포의 구분(구별) 용도는 본원 발명에서 최초로 공개되는 것이다.

본 발명에서 용어 ‘담도’ 는 담즙(쓸개즙)이 십이지장으로 배출되는 모든 경로를 의미하는 것으로, ‘담관’ 으로도 표현된다.

본 발명에서 용어 ‘담도암’ 은 담도에 발생한 악성(malignant) 종양 또는 암을 포함하여, 증식속도가 빠르고 주위조직으로 침투 및 다른 기관으로의 전이하는 특징을 가진 악성(malignant) 신생물을 의미한다. 상기 악성 종양 또는 암은, 성장속도가 느리고 전이되지 않는 특성을 지니는 양성 종양(benign tumor)과 구분된다.

본 발명에서 진단의 목적으로 하는 담도암은, 담도(담관)에 악성 신생물이 발생한 상태라면 이것이 담도에서의 원발암이건 전이에 의해 담도에 암이 생긴 것이건 그 발생 원인이 특별히 제한되지 않는다. 바람직하게 담도에서의 원발암을 대상으로 하는 것일 수 있다.

본 발명에서 용어 '정상' 은 악성 종양 또는 암이 아닌 상태(Negative for malignancy, 악성종양세포 음성)를 의미하는 것으로서, 아무런 질환이 없는 완전 정상 상태와 'Benign' 에 해당하는 (최종)질환 상태 판정에 대한 양성 상태를 포함하는 의미이다. 본 명세서에서 상기 용어 'Benign' 에 해당하는 양성 상태는 'positive' 로 표시되는 해당 검사결과상에서의 양성 표시와 구분되는 것으로, 상기 'positive' 로 표시되는 양성은 해당 검사법에서 반응이 있는 것으로 나옴 또는 해당 검사법에서 암의 가능성을 의미하는 결과가 나옴을 의미한다.

본 발명에서 'MRS' 는 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase)를 의미하는 것으로서, 상기 MRS는 아미노산 메티오닌과 tRNA의 아미노아실레이션(aminoacylation) 반응을 매개하는 효소이다. 본 발명의 MRS 단백질은 당업계에서 공지된 인간 또는 포유류의 MRS 아미노산 서열을 포함하는 것이라면 그 서열이 특별히 제한되지 않는다. 일례로 인간에서는 MARS 유전자에 암호화되어 있으며, MRS의 서열 정보는 NM\_004990(mRNA), NP\_004981.2, P56192.2(단백질) 등의 Genbank accession number로 공지되어 있다. 바람직하게 본 발명의 MRS는 서열번호 1로 표시되는 인간의 MRS 단백질 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 MRS는 cytoplasmic form(cytoplasmic methionyl-tRNA synthetase)과 mitochondrial form(mitochondrial methionyl-tRNA synthetase)의 두 가지 아형(isoform)이 있다. 본 발명에서의 MRS는 바람직하게는 cytoplasmic form일 수 있다.

본 발명에서 용어 '발현(expression)'은 세포에서 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다.

본 발명에서 용어 '단백질'은 '폴리펩타이드(polypeptide)' 또는 '펩타이드(peptide)'와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로

발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.

본 발명에서 용어 '진단'은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성 (susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후 (prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics) (예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 모두 포함하는 개념이다. 본 발명에서의 진단은 MRS 단백질의 발현 여부 또는 발현 수준을 측정하여 담도암의 존재 또는 발병 여부를 확인하는 것이다.

상기 MRS 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는, 당업계에 단백질의 발현수준 측정에 사용가능한 것으로 알려진 것이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게 MRS 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다.

본 발명에서 용어 '항체(antibody)'는 항원성 부위에 특이적으로 결합하는 면역글로불린(immunoglobulin)을 의미한다. 더욱 구체적으로, 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄를 포함하는 당단백질을 가리킨다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (이하, HCVR 또는 VH로 약기) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (이하 LCVR 또는 VL로 약기) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 이루어진다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)이라 일컬어지는 더욱 보존된 영역이 산재된 초가변성 영역 (상보성 결정 영역(CDR)이라 일컬어짐)으로 더욱 세분될 수 있다. VH 및 VL의 각각은 하기 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은, 면역 체계의 다양한 세포 (예, 효과기 세포) 및 전통적인 상보 체계의 첫 번째 성분(C1q)을 포함하여, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다..

본 발명에서의 항체는 MRS 이외에는 다른 종류의 아미노아실 티알엔에이 합성효소를 포함하는 다른 단백질에는 반응하지 않고, MRS 단백질에만 특이적으로 결합하는 항체이다. 본 발명에서 MRS 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질(MRS)에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. MRS 항체는 MRS 유전자를 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 수득하고, 수득한 단백질을 동물에 주입하여 생성되는 항체를 수득하는 등의 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 제조할 수 있다. 상기 MRS 항체는 MRS 전장 서열 단백질을 통해 제작되는 것일 수도 있고, 또는 MRS 항원성 부위를 포함하는 MRS 단백질의 단편을 이용하여 MRS 단백질 특이적인 항체를 제조할 수도 있다. 본 발명의 항체의 구체적 서열과 그 형태는 특별히 제한되지 않으며, 다클론항체(polyclonal antibody) 또는 단일클론항체(monoclonal antibody)를 포함한다. 또한 상기 항체는 제공되는 면역글로불린으로서의 종류가 특별히 제한되지 않으며, 일례로 IgG, IgA, IgM, IgE 및 IgD로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 IgG 항체일 수 있다. 나아가 본 발명의 항체에는 MRS 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메라 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다. 또한 항원-항체 결합성(반응)을 갖는 것이면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, MRS에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체 뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, 디아바디(diabody), scFv 등의 형태일 수 있다.

Fab(fragment antigen-binding)는 항체의 항원 결합 단편으로, 중쇄와 경쇄 각각의 하나의 가변 도메인과 불변 도메인으로 구성되어 있다. F(ab')<sub>2</sub>는 항체를 펩신으로 가수분해시켜서 생성되는 단편으로, 두 개의 Fab가 중쇄 경첩(hinge)에서 이황결합(disulfide bond)으로 연결된 형태를 하고 있다. F(ab')는 F(ab')<sub>2</sub> 단편의 이황결합을 환원하여 분리시킨 Fab에 중쇄 경첩이 부가된 형태의 단량체 항체 단편이다. Fv(variable fragment)는 중쇄와 경쇄 각각의 가변영역으로만 구성된 항체 단편이다. scFv(single chain variable fragment)는 중쇄가변영역(VH)과 경쇄가변영역(VL)이 유연한 펩티드 링커로 연결되어 있는 재조합 항체 단편이다. 디아바디(diabody)는 scFv의 VH와 VL가 매우 짧은 링커로 연결되어 서로 결합하지 못하고, 동일한 형태의 다른 scFv의 VL와 VH와 각각 결합하여 이량체를 형성하고 있는 형태

의 단편을 의미하며, 본 발명의 목적상 항체의 단편은 인간 유래 MRS 단백질에 대한 결합특이성을 유지하고 있는 것이라면 구조나 형태의 제한을 받지 않는다.

본원 발명에서 상기 항체(이의 기능적 단편 포함)는 MRS 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면, 상기 항체가 MRS와 상호작용(즉, 결합)하는 부위 등이 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게 MRS에서 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 영역의 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 기능적 단편일 수 있다. 더욱 바람직하게 서열번호 1로 표시되는 MRS(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 851 번째 내지 880 번째 아미노산 영역을 포함하는 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 기능적 단편이 바람직할 수 있다.

본 발명의 일 실시예에서, 본 발명자들은 담도암 세포에 대한 MRS의 고감도의 검출(염색)을 위해, MRS에서 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열 영역을 에피토프로 하는 항체를 수득하고 이러한 항체가 MRS에 대한 고감도의 검출능을 제공 가능함을 확인한 바 있다.

상기 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 영역의 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합하는 항체는, 목적하는 특이적 결합능을 가지는 한 그 구체적 서열이 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정부위 1(CDR1); 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정부위 2(CDR2); 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정부위 3(CDR3)을 포함하는 경쇄가변영역(VL), 및

서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정부위 1(CDR1); 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정부위 2(CDR2); 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정부위 3(CDR3)을 포함하는 경쇄가변영역(VH)을 포함하는 것일 수 있다.

상기 CDR 구성을 가지는 바람직한 일례로서, 본 발명의 항체(이의 기능적 단편 포함)는 경쇄가변영역이 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 중쇄 가변영역은 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

가장 바람직한 일례로서, 본원 발명은 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 및 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄로 이루어지는 항체를 제공한다.

본 발명의 상기 항체(이의 기능적 단편 포함)는 이의 '검출'을 위하여, 일반적으로 검출가능 모이어티(moiety)로 표지될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, 1991, Coligen 등, Ed. Wiley-Interscience, New York, N. Y., Pubs]에 기술된 기술을 이용하여, 방사성 동위원소 또는 형광표지로 표지될 수 있다. 또는 다양한 효소-기질 표지가 이용 가능하며, 상기 효소적 표지의 예는 초파리 루시퍼라제 및 세균 루시퍼라제(미국 특허 제4,737,456호)와 같은 루시퍼라제, 루시페린 (luciferin), 2,3-다이하이드로프탈라진디오네스, 말레이트 디하이드로게나제, 유라제 (urase), 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRPO)와 같은 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제,  $\beta$ -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 라이소자임, 사카라이드 옥시다제 (예를 들어 글루코스옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나제), 헤테로사이클릭 옥시다제 (예를 들어 유리카제 및 잔틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등을 포함한다. 항체에 효소를 접합시키는 기술은 예를 들어, 문헌 [O'Sullivan 등, 1981, Methods for the Preparation of Enzyme-항체 Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N. Y., 73: 147-166]에 기술되어 있다. 표지는 다양한 공지된 기술을 이용하여 항체에 직접 또는 간접적으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체는 바이오틴(biotin)에 접합될 수 있고 상기에 언급된 3종의 광범위한 카테고리에 속하는 임의의 표지들이 아비딘과, 또는 그 반대로 접합될 수 있다. 바이오틴은 아비딘(avidin)에 선택적으로 결합하고, 따라서 이 표지는 이러한 간접적 방식으로 항체에 접합될 수 있다. 또는, 항체에 표지의 간접적 접합을 달성하기 위하여, 항체는 작은 합텐 (hapten) (예를 들어, 디옥신 [digoxin])과 접합될 수 있고 상기에 언급된 서로 다른 유형의 표지들의 하나가 항-합텐 항체에 접합될 수 있다 (예컨대, 항-디옥신 항체). 따라서, 항체에 대한 표지의 간접적 접합이 달성될 수 있다.

본 발명에서 용어 '애타머'는 시료 내의 검출하고자 하는 분석물질과 특이

적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산 (DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 앵타머의 제조는 일반적인 앵타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오티드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오티드의 5' 말단이나 3' 말단을 앵타머 칩의 관능기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 -NH<sub>2</sub>로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

본 발명의 담도암 진단용 키트에는 MRS의 발현 수준을 측정하기 위하여 선택적으로 MRS 단백질을 마커로 인식하는 항체 또는 앵타머 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다. 구체적인 양태로서 상기 키트는 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 방법을 수행하기 위해 필요한 공지의 필수요소 및 부수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

일례로, 상기 키트는 MRS 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 MRS 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 상기 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 키트에 제공되는 항체는 그 자체로서 검출가능한 모이어티로 표지될 수 있으며, 이는 전술한 바와 같다. 그 외 상기 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 별도의 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(항체와 컨주게이트된 형태로서) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 잉여의 발색 기질 및 결합되지 않은 단백질 등은 제거하고 항체와 결합된 단백질 마커만을 보유할 수 있는 세척액 또는 용리액을 포함할 수 있다.

상기 MRS 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는, 또한 MRS mRNA를 검출하는 제제를 포함하는 의미일 수 있다. 단백질 발현 수준의 증가는 상기 단백질을 암호화하는 유전자로부터의 전사물(예를 들어 mRNA)의 증가가 동반되는 것이므로, 당업자라면 전술한 것과 같이 MRS 단백질 자체를 검출하는 수단 뿐만아니라 간접적으로



MRS 단백질 발현과 직접적으로 관계된 전사물들을 검출하는 수단을 사용가능함이 자명하게 이해 가능하다.

상기 MRS mRNA를 검출하는 체계는 MRS mRNA에 특이적으로 부착 또는 혼성화(hybridization)하는 리간드라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 프라이머(쌍) 또는 프로브 일 수 있다.

상기 “프라이머”는 짧은 자유 3-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서 MRS mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머는 MRS 코딩 유전자 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 MRS mRNA 또는 MRS cDNA의 특정 구간을 증폭하여 MRS mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 MRS mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다. 프라이머는 당업자라면 MRS mRNA 또는 cDNA 염기서열을 참조하여 용이하게 디자인할 수 있다.

'프로브(probe)'는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA)에 특이적으로 결합할 수 있는 짧은 것은 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오티드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서는 MRS mRNA에 상보적인 프로브를 피검체의 시료와 혼성화 반응(hybridization)을 수행하여 MRS mRNA의 발현량을 측정함으로써 알츠하이머병의 진단에 이용할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다.

본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체

지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 MRS mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.

본 발명의 진단용 키트에는 MRS의 발현 수준을 측정하기 위하여 MRS mRNA를 마커로 인식하는 프라이머 또는 프로브 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다. 상기 키트는 당업계에 프라이머(프라이머쌍) 또는 프로브를 구성품으로 제공하는 분석 키트로서 알려진 것이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 PCR(polymerase chain reaction, 중합효소연쇄반응), RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, 서던 블랏팅 또는 DNA 마이크로어레이 칩용 키트 등을 포함한다.

일례로, 상기 진단 키트는 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 중합효소반응 키트는 마커 유전자(mRNA)에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 각 마커 유전자(mRNA)의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7bp 내지 50bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10bp 내지 30bp의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), DNA 폴리머라아제(예를 들어 Taq-폴리머라아제) 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

본 발명의 용어 ‘~을 포함하는(comprising)’ 이란 ‘함유하는’ 또는 ‘특징으로 하는’ 과 동일하게 사용되며, 조성물 또는 방법에 있어서, 언급되지 않은 추가적인 성분 요소 또는 방법 단계 등을 배제하지 않는다. 용어 ‘~로 구성되는(consisting of)’ 이란 ‘~로 이루어지는’ 과 동일하게 사용되며, 별도로 기재되지 않은 추가적인 요소, 단계 또는 성분 등을 제외하는 것을 의미한다. 용어 ‘필수적

으로 구성되는(essentially consisting of)' 이란 조성물 또는 방법의 범위에 있어서, 기재된 성분 요소 또는 단계와 더불어 이의 기본적인 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 성분 요소 또는 단계 등을 포함하는 것을 의미한다.

본 발명은 피검체 시료 내의 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 단백질의 발현 수준을 측정하는 것을 특징으로 하는 담도암 진단 방법을 제공한다.

본 발명의 상기 피검체란 동물, 바람직하게는 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 더 바람직하게는 진단이 필요한 인간 또는 환자(patient)일 수 있다. 피검체에 대해서는 이하에서 더욱 자세하게 후술된다.

구체적으로 본 발명은, 담도암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료로부터 메티오닐 티알엔에이 합성효소 단백질을 정성 또는 정량분석하는 방법을 제공한다.

구체적으로, 상기 방법은

(a) 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소가 발현 증가되었으면 담도암 환자인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

본 발명에서 용어 '분석'은 바람직하게 '측정'을 의미하는 것일 수 있으며, 본 발명에서 분석 또는 측정은 정성적인 방법과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한없이 수행될 수 있다. 단백질 수준의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 전술한 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다.

본 발명자들은 MRS가 담도암 진단 마커로서 기능할 수 있음을 최초로 발견하였으며, 특히 MRS는 세포진(cytodiagnosis)용 마커로서 뛰어난 담도암 진단효과를 가진다. 이에 본 발명은 MRS의 발현 수준을 측정하여 담도암의 진단에 필요한 정보

를 제공하는 방법을 제공한다. 이하 본 발명의 방법을 단계에 따라 설명한다.

상기 (a) 단계는 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료를 제공하고 상기 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계이다.

상기 시료는 담도암의 존재 여부를 진단하고자하는 개체(환자) 또는 피검체로부터 채취된 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 담도 조직 또는 담도 세포일 수 있다. 구체적으로 담도에서 생검(biopsy)에 의하여 수득한 담도 조직이나 세포, 세침흡인, 솔세포진 또는 담즙흡인법 등으로 얻어진 담도 세포일 수 있다. 가장 바람직하게는 솔세포진 방법으로 수득된 담도 세포일 수 있다.

바람직한 일 실시 양태(mode)로서, 상기 담도 세포 시료에는 담도로부터 유래한 것이 분명한 상피세포가 존재해야 한다.

상기 수득된 담도 세포 또는 조직은 당업계에서 공지된 통상의 시료 전처리(예를 들어 고정, 원심분리, 슬라이드에 도말 등) 방식에 따라 전처리되어 제공될 수 있다. 바람직한 일 실시 양태로서, 상기 담도 세포 시료는 통상의 액상 단층세포 슬라이드 제작법(액상세포검사용 슬라이드 제작법)에 의해 전처리되어 준비되는 것일 수 있으며, 일례로 ThinPrep, SurePath, CellPrep 등을 사용하여 액상 기반 단층 부착 방법에 의해 실험용 슬라이드(slide) 상에 제공 되는 것일 수 있다.

본 발명에서 용어 ‘솔세포진(brush cytology) 방법으로 채취’란 통상의 세포진 솔(cytology brush)을 이용해 담도 표면(특히, 환부 의심 부위)을 문질러서 세포를 채취하는 방식을 의미하는 것으로서, 솔질세포진, 쇠자세포진 등 당업계에서 통상적으로 호환 가능하게 사용되는 명칭으로 본 명세서에서 기재될 수 있다.

본 발명에서 용어 ‘잠재 환자’는 담도암으로 의심되는 환자를 의미하는 것으로서, 임상 증상, 혈액학적 검사 또는 영상학적 검사상 등 다양한 검사들을 통해 담도암이 있는 것으로 의심되는 환자를 의미한다.

즉, 상기 잠재 환자는 영상학적 검사상으로 담도암 판정 가능한 환자 및 판정 불가능 환자를 포함하며, 영상학적 검사상으로 담도암 판정이 불가능하다고 하

더라도 임상 증상, 혈액학적 검사에서 담도암이 의심되는 환자를 의미한다. 담도암 환자에서 나타날 수 있는 임상증상으로는 복부 통증, 황달, 체중 감소 등이 있으나 이러한 증상들이 담도암에만 국한된 특이 증상은 아니다. 또한 혈액학적 검사상 황달이나 당뇨 검사 수치, CEA, CA19-9와 같은 종양표지자가 상승될 수 있으나 이러한 것들이 모든 담도암 의심환자에서 나타나지는 않는다. 영상학적검사는 복부 초음파, 복부 내시경 초음파, 복부 CT, 복부 MRI, PET-CT를 시행할 수 있으며, 이러한 영상학적 검사는 담도암이 종괴형성형으로 존재하고 있을 시에는 비교적 암의 의심이 용이하지만, 담도 침윤형 및 담도내 성장형으로 존재하고 있을 때 및 담도 협착 등의 동반 될 때는 영상학적 방법만으로는 담도암의 진단이 매우 어렵다. 상기 영상학적 검사들 만으로는 담도암을 확진할 수 없다. 담도암의 최종적인 확진은 병리학적 검사로 진행되며, 수술이 가능한 환자에서는 수술 후 얻어진 조직을 통해 확진되고 수술이 가능하지 않는 환자에서는 조직검사나 세포진 검사를 통해 확진하게 된다.

바람직하게 담도암에서 일반적으로 관찰되는 증상인 복부통증, 황달, 체중감소, 등의 일반증상이 있고, CT, 초음파, MRI 등과 같은 영상진단장비를 통해 담도암으로 확진할 수 없는 환자를 의미하는 것일 수 있다. 더욱 바람직하게, 상기 잠재 환자는 넓은 부위의 침습적 조직 검사가 불가능한 환자로서 세포검사(세포진)에 의존적으로 담도암을 명확히 진단할 필요성이 있는 환자일 수 있다. 즉, 수술을 할 수 없어 담도 조직검사가 불가능하거나 또는 합병증 등 여러 원인에 의하여 담도 생검 조차도 불가능하기 때문에, 세포학적 분석에 의해 담도암을 명확히 진단할 필요성이 있는 환자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 MRS 단백질의 발현수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것(즉, 발현 유무를 측정하는것), 또는 상기 단백질의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다.

본 발명에서 MRS 단백질의 ‘발현 증가’ 라는 의미는 발현되지 않던 것이 발현된 것(즉, 검출되지 않던 것이 검출된 것) 또는 정상적인 수준보다 상대적으로 과발현된 것(즉, 검출량이 많아지는 것)을 의미한다.

이에 제한되지 않으나, 일례로 상기 MRS 단백질 발현 수준은 MRS 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 검출하거나 측정할 수 있다. 본 발명에서 MRS 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에 대해서는 전술한 바와 같다. MRS 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에서 공지되어있는 방법이라면 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 웨스턴 블랏, ELISA(효소면역측정법), 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역염색법(면역조직화학염색, 면역세포화학염색 및 면역형광염색 등 포함), 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 방법 중 어느 하나를 이용하는 것일 수 있다. 이외에도 상기 측정 방법은, 본원 발명에서 제공하는 MRS 발현수준 측정 제제 및 이를 포함하는 키트에 대하여 전술한 바에 준하여 그 측정 방법이 이해된다.

종래 보고된 담도암 진단 마커들의 경우 세포진 검사의 적용에 있어서, 조직 검사에서와는 다르게 세포 수준의 진단에서는 민감도 및 특이도가 좋지 못하여 실효성을 거두고 있지 못하는 실정이다. 더욱이 담도협착이 있는 환자에서 기존 세포진 검사결과들은 담도암 발병된 것인지 아니면 기타 다른 양성(benign)담도질환이 있는 것인지에 관하여 판단의 어려움을 겪고 있다. 즉, 기존 세포진 검사들의 경우에는 담도암인지 또는 정상세포(담도암이 아닌 양성(benign)질환 세포 포함)인지 여부가 명확하지 않은 비정형 세포(atypical cell)로서 병리소견을 내는 경우가 많으며, 이러한 경우 추가적이고 다수의 반복적인 재검을 필요로 한다.

이에 반하여 본 발명에 따른 MRS의 경우에는 세포진 검사에 적용하여도 민감도 및 특이도가 100% 수준으로 나타나 검진의 정확성이 매우 현저하여 세포진 검사만으로 담도암의 확진이 가능할 것으로 사료되며, 이러한 점은 특히 담도협착이 있는 환자에서 담도암과 정상세포를 구분하는데 있어서도 커다란 이점을 제공한다. 담도협착이 발견된 환자에게 수행되는 기존 세포진 검사에서는 종종 세포들이 비정형으로 판정되어 진단 불명의 상태가 되곤하였지만, 담도 세포 수준에서 본 발명에 따른 MRS의 경우에는 종양인지 여부에 대한 명확한 판단이 가능하기 때문에 보다 정확하게 담도암을 진단할 수 있다. 암을 진단하기 위해 일반적으로 사용되고 있는 H&E 염색, pap 염색을 통해서는 종양인지 또는 담도염 등과 같은 기타 양성(benign)질환인지 구분이 매우 어려운 비정형 세포(atypical)에서 악성종양여부의 판정이 임상적으로 매우 중요한데, 이러한 비정형 세포에서 MRS의 (고)발현이 확인되면 악성종양세포로 판정할 수 있다는 점에서 매우 의미가 있다고 할 수 있다. 또

한 생검을 필요로하는 조직검사의 경우 세포진 검사 보다 시료 취득에 있어서 환자에 신체적 부담이 가중되는 것을 고려하였을 때, 세포 수준에서 정확한 진단을 제공하는 본원 발명은 더욱 큰 장점을 지닌다고 할 수 있다.

이에 본 발명은, 상기 (a) 단계 이전에, 동시에 또는 이후에, 기존에 사용되어오고 있는 형태학적 진단 방식의 병리검사를 수행할 수 있다. 즉, 상기 (a) 단계 이전에, 동시에 또는 이후에 하기 (i) 및 (ii) 단계를 추가적으로 수행할 수 있다:

(i) 잠재 환자로부터 채취한 담도 세포를

세포핵을 염색하는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole), 메틸렌블루(methylene blue), 아세트산카민(acetocarmine), 톨루이딘블루(toluidine blue), 헤마톡실린(hematoxylin) 및 핵스트(Hoechst)로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 염색용액, 및

세포질을 염색하는 에오신(eosin), 크리스탈바이올렛(crystal violet) 및 오렌지 G(orange G)로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 염색 용액으로 세포 염색하는 단계; 및

(ii) 상기 세포염색에 의해 담도 세포를 악성종양세포, 비정형세포(atypical cell) 또는 정상세포로 판별하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

상기 (ii) 단계에서 판별되는 악성종양세포는, 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 상기 형태학적 진단 방식의 병리검사에서 Suspicious of malignancy(악성종양세포 의심) 및 positive for malignancy(악성종양세포양성)로 판정되는 것을 모두 포함하는 의미일 수 있다.

본 발명에서, 용어 '형태학적 진단 방식의 병리검사' 또는 '형태학적 검사'란, 정상 세포가 암으로 변화될 때의 비정상적인 형태학적 변화를 검사하는 것을 의미한다. 상기 비정상적인 형태학적 변화에 관한 구체적 검사 항목 또는 기준은, 당업계에 암세포가 가지는 형태학적 변화의 종류라면 그 구체적 내용이 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게 세포 균집성; 세포핵/세포질 비율(N/C ratio); 핵막의 모양(핵막 모양의 불규칙성); 염색질의 뭉침 현상; 핵 내 핵소체의 출현; 및 유사분열의 출현으로 이루어지는 균에서 선택되는 하나 이상을 검사하는 것일 수 있다. 상기 형태학적 검사는 전술한 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 담도암 진단에 필요한

정보를 제공하는 방법과 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 수행될 수 있다.

이에, 상기 (ii) 단계에서 상기 (i) 단계의 세포 염색결과로부터 담도 세포를 악성종양세포, 비정형 세포 또는 정상세포로 판별하는 것은 정상 세포가 암으로 변화될 때의 비정상적인 형태학적 변화에 근거하여 판별되는 것일 수 있으며, 그 구체적 판별 기준은 당업계에 잘 알려져 있다. 이때 비정형 세포란 형태학적 변화로는 악성 종양세포(암세포) 또는 정상세포로 명확한 판정이 불가능한 세포를 의미한다.

본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 상기 (ii) 단계에서 상기 (i) 단계의 세포 염색결과로부터 담도 세포를 악성종양세포, 비정형 세포 또는 정상세포로 판별하는 것은 바람직하게 하기와 같은 기준에 의해 수행되는 것일 수 있다:

세포가 3차원으로 도달됨; 세포핵/세포질 비율(N/c ratio, Nuclear to cytoplasmic ratio)이 높음; 염색질의 뭉침 현상 출현; 거친 모양의 핵막(핵막의 불규칙 정도가 커짐); 핵소체의 출현; 및 유사분열의 출현으로 이루어지는 군에서 선택된 두 가지 이상의 형태학적 이상을 보이는 경우에 악성 세포로 판정하며,

세포가 한 겹으로 도달되어 있으며 세포핵/세포질 비율(N/C ratio)이 작고 핵막이 매끄러운 모양일 경우에는 정상 세포로 판정하고,

세포의 변화가 악성 세포에는 미치지 못하나 정상(benign 포함)으로 판정할 수 없는 경우 비정형 세포(atypical cell)로 판정.

상기 (i) 및 (ii) 단계를 (a) 단계 이전에, 동시에 또는 이후에 병행하여 수행하게 되면, 세포수준의 검사(즉, 세포진 검사)만으로도 매우 높은 정확도의 진단 결과를 얻을 수 있는 것이 특징이다. 일례로, (a) 단계 이전에 상기 단계를 수행하는 경우에 있어서, 세포염색을 통해 종양세포 또는 정상세포로 판단이 된 담도세포의 경우에는 후속적으로 수행되는 (a) 단계에서 MRS의 발현수준(여부)을 추가적으로 재분석함으로써 보다 확실하게 담도암인지 정상인지 여부를 판단할 수 있어 진단 오류를 현저히 줄일 수 있으며, 상기 세포염색을 통해 비정형 세포로 판단이 된 경우에는 후속적으로 수행되는 (a) 단계에서 MRS 발현수준(여부)을 분석함으로써 종양인지 여부에 대한 명확한 판단이 가능하다. 이렇게 세포수준의 검사에서 정확도 높은 확정 진단이 가능한 것은, 기준에 비정형 세포로 검진결과가 나왔을 때 조



직생검을 다시 수행하여 재진단하여야하는 번거로움과, 생검 조직시료로부터 정확한 담도암 확정을 위해 3개 이상의 조직표본이 필요하여 환자에 신체적 부담을 야기하는 등 기존 병리 조직검사의 문제점을 획기적으로 개선한 것으로서, 매우 우수한 진단 효과를 가진다고 할 수 있다.

(b) 단계는 상기 (a) 단계에서 측정된 담도 시료에서 MRS 수준이 증가되었으면, 해당 담도시료를 채취한 환자를 담도암 환자인 것으로 판정하는 단계이다.

상기 (b) 단계에서 담도암 진단의 기준이 되는 MRS 발현 수준 증가의 정도에 대하여서는, 당업자가 사용되는 측정 방법에 따라 발현의 유무로, 혹은 발현 정도의 등급을 나누어 결정할 수 있다. 예를 들어, 다수의 정상인과 환자의 시료에서 MRS의 발현 수준을 측정하여 데이터를 축적하고 분석함으로써 MRS의 발현 수준의 정도에 따라 정상 범주, 담도암 발병 범주 등으로 구분하여 적절한 진단의 기준을 제공할 수도 있다.

상기 (b) 단계는 대조군(음성 대조군)과 비교적으로 수행되는 것일 수 있으며, 상기 대조군이란 검사 대상(즉, 동일 잠재환자) 개체로부터의 정상 담도시료 또는 다른 정상 개체(담도암이 없는 개체)로부터의 담도 시료를 모두 포함하는 의미이다. 또한 본원 발명에서 제공하는 MRS 발현수준 측정 체제 및 이를 포함하는 키트에 명시되었거나, 혹은 부수적으로 제공되는 대조군일 수 있다. 이러한 대조군에 비해 검사 대상의 시료에서 MRS 발현 수준이 높으면 담도암 환자인 것으로 판단할 수 있다.

또한, 본원 발명은 (a) 및 (b) 단계를 포함하여, 비정형 세포를 암세포와 정상세포로 구분하는 방법을 제공한다고 할 수 있다.

본 발명에서 용어 ‘민감도’란 최종 임상병리학적 진단이 담도암인 시료 또는 환자에 대하여, 대상 검사법(ex. 본원 발명의 검사법)을 통해 담도암 진단이 내려진 비율을 의미한다.

본 발명에서 용어 ‘특이도’란 최종 임상병리학적 진단이 정상인 시료 또는 환자에 대하여, 대상 검사법(ex. 본원 발명의 검사법)을 통해 정상 진단이 내려진

비율을 의미한다.

담도암 진단에 있어서, MRS를 마커로 사용하여 이의 증가를 검출하는 방식을 채용하는 경우, 조직 및 세포 수준의 검사에 있어서 진단의 민감도 및 특이도가 거의 100% 수준을 나타내는 것이 특징이다.

구체적으로 상기 민감도 및 특이도는 90% 이상의 수준(90% 내지 100%, 바람직하게는 90% 내지 99%, 더욱 바람직하게는 90 내지 98% 수준)을 나타내는 것이 특징이다.

바람직하게 상기 민감도 및 특이도는 95% 이상의 수준(95% 내지 100%, 바람직하게는 95% 내지 99%, 더욱 바람직하게는 95 내지 98% 수준)을 나타내는 것이 특징이다.

이에 본 발명은 또한,

담도암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 민감도 및 특이도를 향상시키는 방법을 제공한다:

(a) 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소가 발현 증가되었으면 담도암 환자인 것으로 판단하는 단계.

상기 민감도 및 특이도의 향상이 정확도의 향상으로 이어지는 것임은 당업자에게 자명하다. 따라서 본 발명의 방법은 정확도를 향상시키는 방법으로 이해될 수 있으며, 바람직하게 정확도가 90% 내지 100%, 더욱 바람직하게 정확도가 90% 내지 99%, 더욱 바람직하게 93% 내지 98%, 가장 바람직하게 95% 내지 98% 수준을 나타내는 것일 수 있다.

또한 본 발명은, 담도암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 형태학적 검사와 병용하여

(a) 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소가 발현 증가되었으면 담도암 환자인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 보조요법을 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는, 담도암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

상기 형태학적 검사란, 바람직한 일례로 전술한 (i) 및 (ii) 단계 과정을 포함하여 수행되는 검사를 포함하여, 이러한 방식에 준하는 다른 형태학적 검사 방식들도 모두 포함하는 의미이다. 이에 대한 설명은 전술한 바를 참조로 하여 당업자라면 그 방식을 적의 선택하여 사용 가능하다.

상기 (a) 및 (b) 단계에 대한 구체적 설명은 전술한 바와 같으며, 이러한 단계가 보조적으로(즉, 보조요법으로서) 수행되는 경우, 상기 형태학적 검사와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 수행될 수 있다. 또한, 상기 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 보조요법은 형태학적 검사 이전에, 동시에 또는 이후에 수행 가능하다.

#### 【발명의 효과】

MRS는 정상세포 및 다른 양성 담도질환과 구분하여 담도암일때만 과발현되고, 기존의 세포진 병리검사 방식에서 비정형 세포(atypical cell)로서 확진을 내리기 어려운 세포에 대해서도 MRS를 이용하면 민감도, 특이도 및 정확도가 거의 100%로 담도암을 확진 가능한 것으로 나타나, 담도암의 진단마커로서 MRS의 가치가 매우 높다. 이에 따라 본 발명은 비정형 세포에서 암세포와 정상세포를 구분하는 방법을 제공하며, 기존에 많은 암 마커들이 실질적으로 세포수준(즉, 세포진)에서 진단의 실효를 거두기 어려웠던 것과는 대조적으로, 본 발명에 따르면 세포수준에서도 민감도, 특이도, 정확도가 거의 100%로 암의 확진이 가능하다.

#### 【도면의 간단한 설명】

도 1은 si-MRS를 처리한 H460 세포의 세포 용출액을 사용하여, 8A12 항체의 MRS 결합 강도를 공지의 시판 MRS 항체와 비교한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 2는 8A12 항체의 다른 ARS(aminoacyl-tRNA synthetase), AIMP 단백질에

대한 교차 활성을 확인하기 위하여 ELISA를 실시한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 8A12 항체의 MRS+AIMP3 단백질에 대한 항체 친화력을 확인하기 위하여 수행한 SPR(Surface plasmon resonance) 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 8A12 항체가 AIMP3에 대해서는 반응성이 없음을 확인한 SPR(Surface plasmon resonance) 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 담도암에 대한 여러 가지 진단 사례들에 있어서, 기존 세포학적 검사 방식으로서 pap staining 후 형태학적 관찰 결과와 본원 발명의 MRS 면역염색 검사법을 적용한 결과를 비교적으로 나타낸 것으로, x400 배율 현미경 이미지이다(이하의 모든 실험군에서 본 발명의 MRS 염색법 수행 전, 해당 시료가 어떤 판정을 받았는지는 미지인 상태에서 수행되었다).

A: 기존염색법(pap staining)을 통하여 담도암 세포로 병리소견을 받고, 최종적인 임상병리 진단으로서 담도암으로 진단받은 환자의 담도 세포에 대하여, 본 발명의 MRS 염색법을 수행한 결과 MRS가 강하게 염색(검출)되었음을 확인한 결과를 나타낸다.

B: 기존염색법(pap staining)을 통하여 담도암 의심 세포로 병리소견을 받고, 최종적인 임상병리 진단으로서 담도암으로 진단받은 환자의 담도 세포에 대하여, 본 발명의 MRS 염색법을 수행한 결과 MRS가 강하게 염색(검출)되었음을 확인한 결과를 나타낸다.

C: 기존염색법(pap staining)을 통하여 비정형 세포로 병리 소견을 받고, 최종적인 임상병리 진단으로서 담도암으로 진단받은 환자의 담도 세포에 대하여, 본 발명의 MRS 염색법을 수행한 결과 MRS가 강하게 염색(검출)되었음을 확인한 결과를 나타낸다.

D: 기존염색법(pap staining)을 통하여 비정형 세포로 병리 소견을 받고, 최종적인 임상병리 진단으로서 정상(담도암이 아닌 양성(benign)담도협착)으로 진단받은 환자의 담도 세포에 대하여, 본 발명의 MRS 염색법을 수행한 결과 MRS가 염색(검출)되지 않음을 확인한 결과를 나타낸다.

E: 기존염색법(pap staining)을 통하여 정상 담도세포로 병리소견을 받고,

최종적인 임상병리 진단으로서 정상으로 진단받은 환자의 담도세포에 대하여, 본 발명의 MRS 염색법을 수행한 결과 MRS가 염색(검출)되지 않음을 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 기존의 염색법인 H&E stain을 통하여 정상 담도 조직으로 판정된 조직을 대상으로, 본 발명의 MRS 염색법을 수행한 결과 MRS가 염색(검출)되지 않음을 확인한 결과를 나타낸다(A: H&E stain 결과(x100), B: 본 발명의 MRS 염색법 결과(x100)).

도 7은 기존의 염색법인 H&E stain을 통하여 담도암 조직으로 판정된 조직을 대상으로, 본 발명의 MRS 염색법을 수행한 결과 강하게 염색(검출)되었음을 확인한 결과를 나타낸다(A: 본 발명의 MRS 염색법을 수행한 전체 조직 표본, B: A에서 붉은색 네모 표시된 영역에 대응되는 H&E stain 결과(x100), C: A에서 붉은색 네모 표시된 영역의 확대(x100)).

도 8은 담도암과 정상 담도 조직이 공존하는 조직에서 본 발명 MRS 염색법의 암조직 구분효과를 비교적으로 나타내는 것으로서, 기존의 염색법인 H&E stain을 통하여 담도암 조직으로 판정된 영역에서만 특이적으로 본 발명의 MRS 염색법(x100)에 의해 강한 염색(검출) 결과를 나타내나, 정상 담도에서는 염색이 되지 않음을 확인하였다(A: 본 발명의 MRS 염색법을 수행한 전체 조직 표본, B: A에서 붉은색 네모 표시된 영역에 대응되는 H&E stain 결과(x100), C: A에서 붉은색 네모 표시된 영역의 확대(x100), 검정색 화살표: 담도암 조직, 흰색 화살표: 정상담도 조직).

#### 【발명의 실시를 위한 형태】

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### <실시예 1>

본원 발명의 담도암 검사법에 대한 유용 항체 제작(MRS에 대한 특이성이 높

### 은 항체의 수득)

생체 내에서 MRS(methionyl-tRNA synthetase)는 AIMP3(Aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 3)와 결합된 상태로 존재하며, UV 조사 등에 의해서 이러한 결합상태가 분리되는 것으로 알려졌다. 따라서 실질적으로 MRS의 정확한 검출을 위해서는 MRS가 AIMP3와 결합하고 있는 상태 등의 상황에서도 MRS만을 특이적으로 검출할 필요가 있으나, 현재 AIMP 종류 및 ARS 종류들에는 단백질 구조상 유사한 점이 많아서 시중 항체의 경우 다른 AIMP 및 ARS 종류들과 교차반응성이 나타나는 문제점이 있다. 이에, 본 발명의 담도암 검사법의 진단 정확도를 위하여, 본 발명자는 다른 단백질에는 교차반응성이 없는 고감도의 MRS 항체를 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

#### <1-1> MRS-AIMP3 단백질 제조

대장균(*E. coli*) 상에서 MRS-AIMP3 co-purified 단백질을 발현 및 정제하였으며 구체적인 실험방법은 다음과 같다. BL21DE3 strain을 이용하여 MRS(서열번호 1)와 AIMP3(서열번호 21, NCBI ref.NM\_004280.4)가 발현되도록 형질전환하고, LB 배지에서 배양한 뒤 단일 콜로니를 암피실린(ampicilin)을 포함하는 5ml LB 액체 배지에서 OD 600값이 0.6 내지 0.8이 되도록 배양하였다. 이후 1mM의 IPTG를 넣어준 다음 37°C에서 3시간 동안 배양하였고, 그 다음 10분 동안 원심분리하여 세포만을 획득하였다. 세포액으로 SDS-PAGE를 실시하여 쿠마시 용액(coomassie stain)을 이용하여 상기 단백질들의 발현을 확인하였다. 이 후, IPTG로 과발현을 유도하였던 세포액을 모아 원심 분리를 실시하여 세포를 획득하였다. 1ml DPBS로 세포를 풀어준 후 초음파분쇄기를 이용하여 세포 용해하였고, 그 다음 용해된 세포로 원심분리를 실시하여 MRS-AIMP3 co-purified 단백질을 분리하였다.

#### <1-2> MRS-AIMP3 단백질의 주입을 통한 마우스 면역화

하이브리도마 세포의 제조에 필요한 면역화된 마우스를 얻기 위하여, 상기 실시예 1-1에서 획득한 MRS-AIMP3 co-purified 단백질을 8~10주령 마우스 4마리의 복강 내에 1차 주사하였다. 몸무게 25 내지 30g의 10주령 BALB/c 마우스들을 Orient Bio Co.(Sungnam, KyungKiDo, Republic of Korea)로부터 구입하였고, 동물사의 일정한 조건(온도 : 20±2°C, 습도 : 40~60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)하에서 충분히 적응시킨 후에 본 연구에 이용하였다. 동물 실험은 서울대

학교의 대학 동물 관리 및 사용 위원회 지침을 준수하였다.

1차 면역화 후 마우스의 면역성을 높이기 위하여 2주 후에 동일한 용량의 MRS-AIMP3 co-purified 단백질을 마우스의 복강 내에 2차 주사하였다. 그 후 1주일 후에, 세포융합 실험을 실시하기 3일 전 MRS-AIMP3 co-purified 단백질을 마우스의 꼬리 정맥에 부스터(booster) 주사하였다. 상기 면역화된 마우스를 에테르로 마취 시킨 후 헤파린 처리된 주사기로 심장에서 채혈한 후, 혈액을 4°C에서 하룻밤 정치 시키고 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 적당히 나누어 -80°C에 보관하였다.

### <1-3> 하이브리도마 세포(hybridoma cell) 제조

먼저, 세포융합을 위해 골수종 세포(myeloma cell)를 준비하였다. 골수종 세포를 배양하고, 세포밀도를  $2.5\sim 5\times 10^4$  cell/ml로 하였다. 세포융합 24시간 전에 골수종 세포를 1/3로 희석하여 준비하였다. 상기 실시예 1-2에서 면역화된 마우스를 에테르로 마취시키고 비장을 채취하여 B 세포를 분리한 뒤, SF-DMEM2(DMEM +  $2\times$ AA)로 세척하고 세포를 용출시켰다. 세포 현탁액을 수거하여 튜브에 담고 정치 시켜 무거운 덩어리들을 가라앉히고 상층액을 새 튜브로 옮긴 다음 1500rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리된 비장세포의 상층액을 제거하고 탭핑한(tapping) 후 SF-DMEM2를 채웠다. B 세포와 골수종 세포를 각각 원심분리하고 세척한 다음, 세척과정을 1회 더 반복하였다. 세척한 골수종 세포의 상층액을 제거하고 탭핑한 후 SF-DMEM2를 채웠다. 또한, 세척한 B 세포의 상층액을 제거하고 탭핑한 후, LB(lysis buffer) 1ml에 적혈구(RBC, red blood cell)를 넣어 처리한 후 SF-DMEM2를 채웠다. 그 다음, B 세포와 골수종 세포를 각각 원심분리하고, 원심분리된 B 세포와 골수종 세포의 상층액을 제거한 다음 탭핑하고 SF-DMEM2 10ml를 채웠다. B 세포와 골수종 세포를 각각 e-튜브에서 100배로 희석하고 계수하여 농도를 결정하였다[B 세포의 농도( $1\times 10^8$ ,  $8\times 10^7$ ,  $5\times 10^7$ ), 골수종 세포의 농도( $1\times 10^7$ ,  $8\times 10^6$ ,  $5\times 10^6$ )]. B 세포와 골수종 세포는 10:1의 비율로 결정하였다. 결정된 농도의 B 세포와 골수종 세포를 튜브에 함께 넣고 원심분리하였다. 원심분리된 세포의 상층액을 제거한 후 알콜솜 위에 얹어 놓고 30초~1분 동안 반건조시키고 탭핑하였다. 여기에 PEG(2ml)를 1분 동안 천천히 넣으면서 피펫팅하여 반응시키고 SF-DMEM2를 넣으면서 튜브를 흔들어준 다음 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 탭핑하지 않은 상태에서 HT 배지[HT50×(HT(sigma) 1 vial + SF-DMEM1 10ml) 1

ml, FBS 10ml, SF-DMEM1(DMEM + 1×AA) 30ml]를 방울방울 떨어뜨리고, 조금씩 속도를 올리면서 50ml가 되도록 하였다. 이 현탁액을 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3시간 동안 배양하였다.

#### <1-4> MRS 특이적 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 선별

상기 실시예 1-3에서 제조한 융합세포군 중에서 MRS를 잘 인식하면서, AIMP3를 인식하지 않는 세포를 선별하고, 항체의 생성여부를 확인하기 위하여, 다음과 같이 실험을 실시하였다.

먼저, 세포융합 후 8-9일째에 배지를 교환하고, 96 웰에서 배양시 및 24 웰에서 배양시, 잘 자랄 때까지 cDMEM2에서 배양하였다. 배지를 교환한 후 5-7일째에 색이 변한 웰의 상층액을 거두고 cDMEM2로 채운 후, 각 융합세포에서 생산된 항체와 MRS 및 AIMP3와의 결합성에 대한 ELISA 시험을 수행하였다. ELISA 시험 후 웰을 선택하여 24 웰로 옮겨 배양하였다. 24 웰에서 배양한 후 다시 ELISA 시험을 수행하였다. 구체적으로는, 24 웰의 융합세포 농도를 확인하고, 96 웰 플레이트에 0.5 cell/well이 되도록 15ml의 배양액에 융합세포를 희석하였다. 융합세포 희석액을 각 웰당 150 $\mu$ l씩 분주하였다. 현미경으로 검경하여 1개의 세포가 들어있는 웰을 체크하였다. 세포가 어느 정도 자란 웰의 상층액을 거두어 ELISA 및 웨스턴 블랏으로 각 융합세포에서 생산된 항체와 MRS 및 AIMP3와의 결합성을 확인하여 1차 스크리닝을 수행하였다. 1차 스크리닝을 토대로 선택된 융합세포를 24 웰로 옮겨 배양하고 원심분리한 후 상층액을 거두어 ELISA 및 웨스턴 블랏으로 확인하여 2차 스크리닝을 수행하였다. 24 웰에서 키운 융합세포의 흡광도(O.D 값)를 ELISA로 확인하고, 흡광도가 1.0이 넘는 융합세포만 선택하여 25T/C 배양 플라스크로 옮겨 배양하고 원심분리한 후 상층액을 거두어 ELISA 및 웨스턴 블랏으로 확인하여 3차 스크리닝을 수행하였다. 3차 스크리닝을 토대로 선택된 융합세포를 다시 75T/C 배양 플라스크로 옮겨 배양하고 ELISA로 흡광도를 확인하여 MRS를 잘 인식하면서 AIMP3를 인식하지 않는 세포를 선택하였고, 최종적으로 "8A12" 클론을 확보하였다.

#### <1-5> MRS 특이적 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 배양 및 항체 정제

MRS에 대한 단일클론항체는 상기 실시예 1-4에서 선택된 최종 융합세포(하이브리도마 세포 "8A12")로부터, 각각 다음의 두가지 방법을 통해 수득될 수 있다.



1) 7~8 주령의 암컷 마우스 복강(abdominal cavity)에 프리스탄(pristane) 500 $\mu$ l를 주사하였다. 75T/C 배양 플라스크에서 배양한 융합세포를 수거하여 원심분리한 다음, 상층액을 제거하고 인산염 완충액에 넣고 피펫팅하였다. 프리스탄 투여 7~10일 후 상기 실시예 1-4에서 선택한 융합세포를 각각  $8 \times 10^5 \sim 4 \times 10^7$ 으로 마우스의 복강 내에 주사하였다. 1~2주 후에 마우스의 복강에 복수(ascites)가 가득찼을 때 18G 주사 바늘을 이용하여 복수를 뽑았다. 복수를 4°C에서 하룻밤 두었다가 다음날 원심분리하여 노란 지방층을 포함한 덩어리 물질을 제거하고 상층액만을 분리하였다. 분리한 상층액은 분주하여 -20°C에 보관하였다.

상기 복수액으로부터 항체 정제를 위하여, 저장액(20% 에탄올)에 저장되어 있는 Protein A를 적당량 컬럼에 채우고 20% 에탄올을 흘려 내린 후, 5 Bed Volume의 결합 완충액(20mM sodium phosphate, pH 7.0)으로 세척하였다. 복수액을 인산염 완충액으로 적당량 희석시킨 후 Protein A 컬럼에 로딩하였다. 3 Bed Volume의 결합 완충액(20mM sodium phosphate, pH 7.0)으로 결합한 후, 3 Bed Volume의 용출 완충액(0.1M glycine buffer, pH 3.0~2.5)으로 0.5ml씩 분획을 용출하였다. 각 분획을 35 $\mu$ l의 중화 완충액(1M Tris-HCl, pH 9.0)으로 중화시켰다. 70% 에탄올로 냉장 온도에서 하룻밤 정치시킨 후, 다시 저장액(20% 에탄올)에서 다음번 사용시까지 냉장 보관하였다. SDS-PAGE를 통해, 분획의 순도를 확인하였고, Amersham GE 컬럼으로 탈염(desalting)하였다.

2) 상기 실시예 1-4에서 수득한 하이브리도마세포를 Cellstack-5 (Corning, Corning, NY)를 사용하여 최대 배양 부피 860 mL에서 배양을 수행하였다. 무혈청 배지(Thermo)에 GlutaMAX(Gibco)(최종 5 mM)와 1x Cholesterol lipid concentrate (Gibco)를 첨가하였으며, 초기 세포 농도는  $1.4 \sim 2.0 \times 10^5$  cell/mL로 접종하였다. 접종 4~5일 후, 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 제거하고 배양액 상층액을 회수하였다. 상층액의 pH를 확인 한 후 제조된 20X 결합 용액(1M Potassium phosphate dibasic) (pH 9.0)을 사용하여 pH 7.6을 맞추었다. 이후 0.22 $\mu$ m 필터를 사용하여 여과하여 중화된 항체배양액을 수득하였다.

수득한 항체배양액을 protein A 컬럼을 통해 정제를 하였다. protein A 컬럼에 10 컬럼 부피의 증류수를 흘려준 뒤 동량의 1X 결합용액(50mM Potassium phosphate dibasic) (pH 9.0)을 흘려주었다. 이후, 수득한 항체배양액을 흘려주어 항체를 protein A에 결합시킨 뒤 1X 결합용액 (50mM Potassium phosphate dibasic) (pH 9.0)으로 washing하였다. 그 다음, protein A 에 결합된 항체를 용출하기 위해

2 컬럼 부피의 용출 용액(0.2M Citric acid)(pH 3.0)을 흘려주어 용출액을 얻었다. 1M Tris 로 중화한 뒤 항체의 농도를 280nm 흡광도에서 측정하여 확인하였다.

그 후, GE PD-10 컬럼을 생리식염수 25 ml로 평형시킨 후, 원심분리 (1000 g, 2분) 하였다. 이후 protein A 컬럼에서 얻어진 항체 용출액 2.5 ml를, 상기 GE PD-10 컬럼에 넣고 원심분리 (1000g, 2분) 하여, 생리 식염수로 용액 교환이 된 항체를 수거하였다. 항체 농도를 280nm 흡광도에서 측정하여 확인하고 분주하여 -80°C에 보관하였다.

#### <1-6> 항체의 서열정보 분석 및 클로닝

8A12 클론 발현 항체의 클로닝 및 서열 분석은 YBIO inc. 및 앵클론(Abclon Inc. Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 간략하게, 먼저 8A12 하이브리도마 세포에서 RNA를 추출하여 cDNA를 합성 하였다. 그 다음, 각각 VL, CL, VH 및 CH1에 특이적인 프라이머들을 사용하여 PCR을 수행하였다. 예상되는 크기의 PCR product를 agarose gel에서 정제하여 sequencing을 통해 서열을 확인하였고 Kabat numbering을 통해 CDR region을 확인하였다. 항원 결합부위의 서열확인 결과를 표 1에 나타낸다. 확인된 서열로 Fab을 합성하여 MRS에 높은 결합력을 보임을 ELISA로 확인하였다.

또한 상기에서 확인된 서열은, 상기 실시예 1-5에서 하이브리도마 세포를 마우스 복강에 주입한 뒤 복수 정제를 통해 얻어진 항체의 단백질 서열 분석 결과(mass spectrometry 결과)와도 일치됨을 확인하였다.

얻어진 8A12 Fab 서열을 mouse IgG heavy chain(pFUSE-mIgG2a-Fc, InvivoGen) 및 mouse light chain 서열 벡터(pFUSE2-CLlg-mK, InvivoGen)에 클로닝 하였다. 그 다음, 상기 벡터를 freestyle 293F 세포에 PEI(Polysciences, 23966-2)를 이용하여 공동형질전환시켜, 항체의 경쇄와 중쇄가 세포 안에서 함께 동시에 발현되도록 하였다. 형질전환된 293F 세포를 37°C, 8% CO<sub>2</sub>조건에서 7일 동안 배양하였다. 그 다음, 세포를 수득하여 원심분리한 뒤 상층액을 수득하였다. 상층액의 pH를 확인 한 후, 제조된 20X 결합 용액(1M Potassium phosphate dibasic) (pH 9.0)을 사용하여 상층액의 pH를 7.6으로 조정하였다. 이후 0.22µm 필터로 상층액을 여과하여 중화된 항체배양액을 수득하였다. 항체배양액으로부터 상기 실시예 1-5의 2)에서 기술된 방법으로 항체를 수득하였다. 이렇게 수득된 8A12 IgG의 전체 항체는 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 및 서열번호 19의 아미노산 서열로

이루어지는 중쇄로 이루어지는 것을 확인하였다.

【표 1】

		Amino acid sequence	DNA sequence
VH	FR1	DVKLQESGPGLVKPSQSL SLTCTVTGYSIT	gatgtgaagcttcaggagtcgggacctggcctggtgaa accttctcagtcctctgtccctcacctgcactgtcactg gctattcaatcacc
	CDR-H1	SEYAWT	agtgagtatgcctggacc
	FR2	WIRQFPGNKLEWMG	tggatccggcagtttccaggaaacaaactggaatggat gggc
	CDR-H2	YINYNGNTNLNPSLKS	tacataaactacaatggcaacactaacttaaattccatc tctcaaaagt
	FR3	RISIIIRDTSKNQFFLQLN SVTTEDTATYYCAR	cgaatctctatcattcgagacacatccaagaaccagtt cttctgcagttgaattctgtgacaactgaggacacag ccacatattactgtgcaaga
	CDR-H3	SLWPRGWFAY	tcactttggcccaggggctggtttgcttac
	FR4	WGQGTLVTVSA	tggggccaagggactctggtcactgtctctgca
VL	FR1	DIQMTQSPSSMYASLGER VTITC	gacattCtgatgaccagtcctccatcttccatgtatgc atctctaggagagagagtcactatcacttgc
	CDR-L1	KASQDINSYLS	aaggcgagtcaggacattaatagctattttaagc
	FR2	WFQQKPGKSPKTLMY	tggttccagcagaaaccagggaaatctcctaagacct gatgat
	CDR-L2	RANRLVD	cgtgcaaacagattggtagat
	FR3	GVPSRFSGSGSGQDYSLT ISSLEYEDMGIYYC	gggggtcccatcaaggttcagtgaggcagtgatctggcca agattattctctcaccatcagcagcctggaatatgaag atatgggaatttattattgt
	CDR-L3	LQYDEFPRT	ctacagtatgatgagtttctcctggacg
	FR4	FGGGTKLEIK	ttcgggtggaggcaccaagctggaaatcaaa

#### <1-7> MRS에 대한 항체의 결합 특이성 비교 확인- 웨스턴 블랏 실험

상기 실시예에서 획득한 8A12 항체의 MRS 결합능력을 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. H460 세포를 10% FBS(Fetal bovine serum, Hyclone, GE lifesciences), 1% 페니실린 (Hyclone, GE lifesciences)을 포함하는 DMEM (Hyclone, GE lifesciences)배지에서 배양하였다. 각 세포는 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건에서 배양하였다. 상기 배양된 H460 세포에 si-MRS를 72시간 동안 처리하였다. 그 다음 H460 세포를 수득한 뒤, 용해시킨 후, H460 세포 용해물로 웨스턴 블랏을 실시하였다. 실험은 2번 반복되었다. 1차 항체로서 8A12 항체를 1:5000(0.2 µg/ml)으로 희석하여 사용하였고, 결합능력 비교를 위하여 시중에서 유통되고 있는 MRS 항체 (Abcam, Ab50793)을 동일한 방법으로 사용하였으며, 대조군으로는 튜블린 (Tublin)을 사용하였다.

실험 결과 도 1에 나타난 바와 같이, 시중에 유통되고 있는 기존 MRS 항체는 si-MRS를 처리한 군에서 MRS를 전혀 검출하지 못하였고, si-MRS를 비처리한 군에서도 본원 발명의 8A12 항체와 비교하여 현저히 낮은 수준의 검출능(MRS와의 결합능)을 보였다. 반면 본원 발명의 8A12 항체는 기존 시중 MRS 항체보다 현저히 MRS 특이적 결합능이 뛰어난 것을 확인하였다.

#### <1-8> 다른 단백질에 대한 교차반응성 여부 확인 - ELISA

상기 실시예에서 획득한 8A12 항체가 다른 ARS(aminoacyl-tRNA synthetase) 단백질에 대한 교차 활성(cross activity)이 있는지 여부를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다.

96 웰 플레이트(Corning 3690 flat bottom, 96-well half-area plates)에 MRS 단백질(His-MRS, MRS full)과 다른 ARS 단백질(DX2 tag free, 34S-DX2, 34S-AIMP2, His-CRS, His-AIMP1, His-GRS, His-WRS, His-KRS)을 각각 1 µg/ml의 농도로 코팅하였다. 8A12 항체를 500 ng/ml 농도로 각각의 ARS 단백질이 코팅된 96웰 플레이트에 넣은 뒤 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 HRP-conjugated anti-mouse IgG 2차 항체를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰고, ELISA를 실시하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 기질로는 TMB(3,3', 5,5' -Tetramethylbenzidine)을 사용하였다.

그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, 8A12 항체는 MRS에만 결합하여 반응하고, 다른 ARS 단백질과 AIMP 단백질에는 반응하지 않는 것으로 나타났다. 이를 통해, 8A12 항체는 다른 ARS 단백질과 AIMP 단백질에 대하여 교

차 활성이 없으며, MRS만 특이적으로 검출하는 것을 확인할 수 있었다.

#### <1-9> 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 항체 친화성 확인

8A12 항체의 MRS 특이적 친화성을 확인하기 위해, MRS-AIMP3 co-purified 단백질(이하, MRS+AIMP3 단백질) 및 AIMP3 단백질을 이용하여 SPR(Surface plasmon resonance, 표면 플라즈몬 공명) 실험을 실시하였다. MRS+AIMP3 또는 AIMP3 단백질을 CM5 chip에 코팅하고, 8A12 항체를 다양한 농도로 흘려보내면서 단백질과의 결합 반응 정도를 측정하였다. 분석시료나 버퍼는 30  $\mu$ l/min의 유속으로 8분 동안 주입하였고, 20분 동안 세척하였다.

그 결과 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 8A12 항체는 MRS+AIMP3 단백질에는 결합하나 AIMP3 단백질에는 결합하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한 8A12 항체는 MRS에 대하여 1.56nM KD value를 갖는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

#### <1-10> MRS 항체의 결합부위 확인

상기 8A12 항체가 결합하는 부위(에피토프)를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다.

먼저, MRS 전체 단백질에서 GST, catalytic domain, tRNA binding domain 부위들을 고려하여 각각 길이와 위치가 상이한 여러 개의 MRS 단편을 제작하였으며, pcDNA3 vector(EV)에 MRS 전체 단백질 또는 각각의 MRS 단편(MRS fragment)을 클로닝 하였다. 각 MRS 단편의 위치는 서열번호 1의 MRS 전체 아미노산 서열 중에서, 1 ~ 266aa 단편, 267~597aa 단편, 1~598aa 단편, 598~900aa 단편, 660~860aa 단편, 660~900 단편, 730~900 단편 등을 비롯하여 여러 가지 소단위 영역을 포함하는 위치에서 선정되었다. 이때, Myc 단백질을 각각의 펩타이드 N-말단에 결합시켰고, Myc 단백질을 대조군으로 사용하였다. 그 다음 H460 세포에 클로닝한 벡터 DNA 2  $\mu$ g을, 제조사의 지침에 따라 Turbofect(Thermo)를 사용하여 트랜스펙션(transfection)시켰다. 24시간 후 세포를 수득하여 웨스턴 블랏을 실시하였다. 이때 8A12 항체를 1:5000(0.2 $\mu$ g/mL)으로 희석하여 사용하였다.

상기 실험을 통하여 8A12 항체는 서열번호 1의 MRS 단백질 중에서 최소한 861-900 aa 영역에 epitope가 존재하는 것으로 나타났다.

이에, 811-840aa 단편, 821-850aa 단편, 831-860aa 단편, 841-870aa 단편, 846-875aa 단편, 851-880aa 단편, 856-885aa 단편, 861-890aa 단편,

866-895aa 단편, 871-900aa 단편을 비롯하여 다양한 소단위 단편 펩타이드를 제작하고, 각각의 펩타이드를 300 ng/well 씩 96 well ELISA plate에 coating하여 통상의 프로토콜에 따라 ELISA를 수행하였다. 1차 항체로서 8A12 항체는 10nM 농도로 희석(1x PBST-Tween 0.05%)하여 사용하였으며, 2차 항체로 HRP conjugated Goat anti-mouse IgG(Thermo)를 1:10000희석(1xPBST-Tween0.05%)하여 사용하였고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험결과, 8A12 항체는 MRS 단백질 중에서 851-880aa 영역(KQGNIVRELKAQKADKNEVAEVAKLLDLK, 서열번호 20)을 에피토프로 특이적으로 인식하는 것을 확인하였다. 이러한 실험 결과는 851-880aa 영역을 에피토프로 인식하는 다른 결합분자(다른 항체 및 이의 기능적 단편 등)들도, MRS 특이적 결합 및 MRS 구분능이 뛰어난 것임을 시사한다.

이하에서, 본 발명자들이 신규하게 고안한 담도암에 검사법에 대하여, 상기에서 제작한 MRS 검출능이 뛰어난 항체를 적용한 일 실시예를 보여준다.

#### <실시예 2>

##### 세포진 검사법에 있어서, 담도 암세포 특이적 MRS 발현 검출법(염색법)의 정립 및 효과 확인

1) 검체를 통상적인 쓸세포진 검사방법(Osnes M, Serck-Hanssen A, Myren J. Scand J Gastroenterol. 1975;10(8):829-31.)에 따라 수득하였다. 구체적으로, GRBH-230-3-3.5 brush(Wilson-Cook Medical, Inc., Winston-Salem, NC)를 이용하여 담관 쓸질(Bile duct brushing)을 수행하였다. 쓸(brush)은 병변 부위를 가로질러 5-8회 정도 왕복운동(to-and-fro movement)하였다. 그 후, 상기 쓸을 Roswel Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (GibcoBRL, Rockville, MA, USA) 배지로 세척한 후, 액상-기반 세포학검사(Thinprep)를 위하여 즉시 세포학 실험실로 이동되었다. 상기 쓸(brush)을 ThinPrep 고정액(PreservvCyt solution)에 흔들여 담도 세포를 유리시키고, 이렇게 수득된 검체(담도 세포들)를 ThinPrep (Hologic.Inc)을 이용하여 통상적인 방법으로 ThinPrep 슬라이드에 도말하여 세포 시료를 준비하였다. 이들 세포 시료는 각각 하기의 검사법을 적용하여 결과가 비교되었다.

2) 기존 세포학적 검사 방식에 의한 병리소견은 현재까지 흔히 사용되고 있는 Pap staining 방법에 의하여 내려졌으며, 상기 Pap staining은 hematoxylin, OG-6(Orange G-6), eosin azure를 통상적 프로토콜에 따라 사용하여 수행되었다. 상기 pap staining된 검체를 형태학적으로 분석하여, ThinPrep 슬라이드 상에 세포가 한 겹으로 도달되어 있으며 세포핵/세포질 비율(N/C ratio)이 작고 핵막이 매끄러운 모양일 경우 양성(benign, 정상) 세포로 판정하고, 세포가 3차원으로 도달되며 세포핵/세포질 비율이 높고 염색질의 뭉침 현상이 보이며 핵막이 거친 모양이고 핵소체 및 유사분열이 출현할 경우 악성종양 세포로 판정하며, 세포의 변화가 악성 세포에는 미치지 못하나 양성(benign)으로 판정할 수 없는 경우 비정형 세포(atypical cell)로 판정한다.

3) 임상적 최종 진단 결과는 영상학적 검사(복부 초음파, 복부전산화 단층촬영, 복부 자기공명영상, 내시경적 역행성채담도 조영술, 양전자방출 단층촬영)와 병리학적 검사(세포진 검사, 조직검사)에 의하여 측정된 결과들에 의하여 의사가 종합적으로 최종 판단하였다.

4) 본 발명자들은 담도암 세포와 정상 담도 세포(암이 아닌 양성(benign) 담도협착 세포 포함)에서의 MRS의 발현도를 측정하기 위한 면역형광염색법(immunofluorescence staining)을 하기와 같이 개발하였다. 구체적으로, 상기 ThinPrep 슬라이드 시료를 다음과 같이 처리하였다.

① D.W washing 2회

② 전처리 : 2% Normal goat serum, 0.1% Tween-20 및 0.09% sodium azide를 포함한 PBS로 실온에서 1시간 반응(인큐베이션)

③ 1차 항체 처리 : MRS 항체를 2  $\mu$ g/ml 농도로 PBS(0.1% BSA, 0.09% sodium azide 포함)에 희석하여, 실온에서 1시간 반응. 본 실험에서는 MRS 항체로서 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 및 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는 MRS 항체(8A12 항체)를 사용함

④ 1x washing solution TBST(1X TBS with 0.01% Tween-20)로 2회 세척

⑤ 발색: 2차 항체(Goat-anti-mouse IgG(H+L)-Alexa Fluor 488(Thermo, cat# A11001))를 1:100으로 PBS(0.1% BSA, 0.09% sodium azide 포함)에 희석하여, 실온에서 1시간 반응

⑥ 1x washing solution TBST(1X TBS with 0.01% Tween-20)로 2회 세

척

⑦ DAPI (Invitrogen P36931) 적용 후 커버글라스로 덮음

상기 시료 표본에서 MRS 염색 강도가 음성 대조군에 비하여 2배 이상 증가한 세포를 담도 암세포인 것으로 판단하였으며, 이러한 결과를 상기 검체에 대한 병리소견 및 임상적 최종 진단결과와 비교하여 진단의 정확성(민감도 및 특이도)을 확인하였고, 그 결과는 하기 표 2 내지 표 4에서 보여준다.

**【표 2】**

비교 상세: 최종 임상병리학적 진단 결과 대비, 기존 세포학적 검사 결과 (conventional cytology)와 본원 발명의 MRS 면역염색을 통한 검사 결과 비교

기존 세포학적 검사	최종 임상병리학적 진단	MRS 면역염색	
		Positive	Negative
positive for Malignancy(n=18)	Malignancy(n=18)	18	0
	Benign(n=0)	0	0
Suspicious of malignancy (n=16)	Malignancy(n=15)	14	1
	Benign(n=1)	1	0
Atypia(n=26)	Malignancy(n=15)	15	0
	Benign(n=11)	0	11
Negative for malignancy(n=13)	Malignancy(n=0)	0	0
	Benign(n=13)	0	13



【표 3】

비교 요약 : 최종 임상병리학적 진단 결과 대비, 기존 세포학적 검사 결과 (conventional cytology)와 본원 발명의 MRS 면역염색을 통한 검사 결과 비교(상기 표 2의 기존 세포학적 검사 결과에서 positive for malignancy 판정 및 suspicious malignancy 판정은 최종 positive로 분류하고, Atypia 판정 및 Negative for malignancy 판정은 최종 negative로 분류함)

		최종 임상병리학적 진단 결과	
		Malignancy (n=48)	Benign (n=25)
기존 세포학적 검사	Positive (n=34)	33	1
	Negative (n=39)	15	24
MRS 면역염색	Positive (n=48)	47	1
	Negative (n=25)	1	24

【표 4】

기존 세포학적 검사방법(conventional cytology)과 본원 발명의 MRS 면역염색을 통한 검사방법의 민감도, 특이도, 양성 예측치(PPV, positive predictive value), 음성 예측치(NPV, negative predictive value) 및 진단 정확도 비교

	민감도(%)	특이도(%)	정확도(%)	PPV(%)	NPV(%)
기존 세포학적 검사	68.8	96	78.1	97.1	61.5
MRS 면역염색	97.9	96	97.2	97.9	96

실험결과 상기 표 2 내지 표 4에서 보는 바와 같이, 기존 세포학적 검사방법과 대비하여 본 발명에서 제공하는 MRS 면역염색 검사법은 민감도(Sensitivity)가 97.9% 및 특이도(Specificity)가 96%로 거의 100% 수준을 나타내었으며, 정확도가 97.2(%)를 나타냈다. 이는 본원 발명의 검사방법이 세포 수준에서의 진단에 있어서 담도암 세포와 정상 담도 세포(암이 아닌 양성담도 협착조직 포함)를 거의 100% 수준으로 정확하게 구분 검출 가능함을 나타내는 것으로서, 기존에 사용되어오고 있는 세포학적 검사 방법이 78.1%의 정확도 수준인 것과 현저히 대비되는 것이다.

도 5는 상기 표 2의 각 진단 유형별로 대표적 진단 사례를 보여준다.

담도암 세포는 MRS가 세포막과 세포질에서 널리 분포되고 강한 염색신호를 보였으나(도 5의 A 내지 C 참조), 정상(benign)세포는 세포질막을 비롯하여 음성 또는 매우 약한 정도의 염색신호가 나타나는 것으로 관찰되었다(도 5의 D 및 E 참조). 상기 실험을 통하여 담도암 세포진에 있어서 본원 발명에서 제공하는 MRS를 이용한 새로운 염색법은 높은 민감도와 특이도를 가지는 매우 유용한 염색법임을 확인하였다. 특히 쓸세포진으로 얻어진 검체에 대해 기존 염색법으로 감별이 어려운 비정형세포에 대해서도 MRS 염색(검출) 여부에 따라 감별이 가능하여, 본 발명에 따른 세포진 검사만으로도 임상적으로 담도암에 대한 정확한 진단이 가능한 것으로 사료되었다.

### <실시예 3>

#### 생검 조직 검사법에 있어서, 담도 암세포 특이적 MRS 발현 검출법의 정립 및 효과 확인

담도암 조직과 정상 담도 조직(암이 아닌 양성(benign)담도 협착조직 포함)에서의 MRS의 발현도를 측정하기 위한 면역조직화학법(immunohistochemistry, IHC)을 하기와 같이 개발하였다. 구체적으로, 미지의 55개 담도 생검 조직에 대하여, 일반적으로 파라핀 포매하고 박절되었다. 그후 다음과 같은 순서로 처리하여 최종 표본을 수득하였다:

- ① 박절 조직을 24시간 동안 자일렌에 담가둠 → 100% 알코올 2분 2회 처리 → 95% 알코올 2분 1회 처리 → 90% 알코올 2분 1회 처리 → 70% 알코올 2분 1회 처리 → DW washing 2-3 회
- ② Antigen retrieval : 시판 citrate buffer 희석(DW 9 : citrate buffer 1) 2분간 preheating 후 슬라이드 넣고 10분간 가열(전자레인지)
- ③ 가열 후 바로 수돗물에 2번 담구어 쿨링(cooling) - 1TBST 5분 3회 세척
- ④ 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 실온 10분 처리 → Blocking (2% goat serum + 2% BSA, 1PBS base) 실온 30분
- ⑤ Primary Antibody (MRS 항체) 1 : 500 비율로 희석 처리, 실온 overnight → 1TBST 5분 3회 세척. 본 실험에서는 MRS 항체로서 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 및 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는 MRS 항체를 사용함
- ⑥ HRP (secondary antibody) 적용 후 실온 30분 처리 → 1TBST 5분 3회 세척

- ⑦ DAB 1분간 적용, 발색 후 DW washing 2-3회 → 헤마톡실린 3분간 적용, 발색 후 DW washing 2-3회
- ⑧ 70% 알코올 2분 1회 처리 → 90% 알코올 2분 1회 처리 → 95% 알코올 2분 1회 처리 → 100% 알코올 2분 2회 처리 → 자일렌 5분 3회 처리
- ⑨ 마운팅솔루션 적용 후 커버글라스로 덮음

상기 표본에서, 침윤 양상을 보이는 세포에서 MRS가 내부 대조조직(internal control)인 췌장 선세포(acinar cell)보다 강하게 염색될 때 담도 암세포인 것으로 판단하였으며, 이러한 결과를 상기 검체에 대한 임상적 최종 진단결과와 비교하여 진단의 정확성(민감도 및 특이도)을 확인하였으며 그 결과는 하기 표 5에서 보여준다. 임상적 최종 진단 결과는 의사가 종합적으로 최종 판단하였다.

**【표 5】**

담관암 조직 및 정상 담관 조직에 대한 본원 발명의 MRS 면역염색 검사법 적용 결과

최종 임상병리학적 진단	검체 수	본 발명 MRS 면역염색		양성율 †
		Positive	Negative	
담도암	45	45	0	100
정상담도 조직	10	0	10	0

†: 양성율(Positive rate)은 MRS발현 정도를 %로 표시함.

실험결과, 상기 표 5에서 보는 바와 같이 본 발명에서 제공하는 검출법(염색법)을 통해 담도암 조직과 정상 담도 조직에 대하여 민감도와 특이도가 100%로 구분 검출가능함을 확인하였다. 도 6 내지 도 8에서는 상기 표 5의 55개 검체의 진단에 있어서 각 유형별로 대표적인 진단 사례를 보여준다. 특히 기존 담도 조직 염색방법인 H&E 염색을 통한 병리소견(H&E를 통한 형태학적 진단 방법은 전술한 실시예 2와 유사)과 비교하여도, 일치하는 결과를 보였다.

**【산업상 이용가능성】**

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 담도 세포에서 메티오닐-티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS)를 이용한 담도암 진단 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 메티오닐-티알엔에이 합성효소 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 담도암 진단용 조성물, 진단용 키트 및 담도암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 MRS를 정성 또는 정량 분석하는 방법에 대한 것이다.

MRS는 정상세포 및 다른 양성 담도질환과 구분하여 담도암일 때만 과 발현되고, 기존의 세포진 병리검사 방식에서 비정형 세포(atypical cell)로서 확진을 내리기 어려운 세포에 대해서도 MRS를 이용하여 담도암을 민감도, 특이도 및 정확도가 거의 100%로 확진 가능한 것으로 나타나, 담도암의 진단마커로서 MRS의 가치가 매우 높기 때문에 체외진단산업 분야에 활용가능성이 매우 높다.

**【청구의 범위】****【청구항 1】**

메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 담도암 진단용 조성물.

**【청구항 2】**

제1항에 있어서, 상기 메티오닐 티알엔에이 합성효소 단백질은 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 3】**

제1항에 있어서, 상기 제제는 메티오닐 티알엔에이 합성효소 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 4】**

메티오닐 티알엔에이 합성효소 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 담도암 진단용 키트.

**【청구항 5】**

담도암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료로부터 메티오닐 티알엔에이 합성효소 단백질을 정성 또는 정량분석하는 방법.

**【청구항 6】**

제5항에 있어서, 상기 방법은

(a) 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소가 발현 증가되었으면 담도암 환자인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 방법.

**【청구항 7】**

제6항에 있어서, 상기 시료는 담도 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 8】**

제6항에 있어서, 상기 방법은 (a) 단계 이전에, 동시에 또는 이후에 하기 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(i) 잠재 환자로부터 채취한 담도 세포를

세포핵을 염색하는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole), 메틸렌블루(methylene blue), 아세트산카민(acetocarmine), 톨루이딘블루(toluidine blue), 헤마톡실린(hematoxylin) 및 핵스트(Hoechst)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염색용액, 및

세포질을 염색하는 에오신(eosin), 크리스탈바이올렛(crystal violet) 및 오렌지 G(orange G)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염색 용액으로 세포 염색하는 단계; 및

(ii) 상기 세포염색에 의해 담도 세포를 악성종양세포, 비정형세포(atypical cell) 또는 정상세포로 판별하는 단계.

#### 【청구항 9】

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 담도 세포는 솔세포진 방법으로 채취되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 10】

제6항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 방법 중 어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 11】

제3항에 있어서, 상기 항체는 MRS에서 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 영역의 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 기능적 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 12】

제11항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역(VL); 및

서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 (VH)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 13】**

제8항에 있어서, 상기 (ii) 단계는

상기 (i) 단계의 세포 염색결과로부터

세포가 3차원으로 도말됨; 세포핵/세포질 비율(N/c ratio)이 높음; 염색질의 뭉침 현상 출현; 거친 모양의 핵막; 핵소체의 출현; 및 유사분열의 출현으로 이루어지는 군에서 선택된 두 가지 이상의 형태학적 이상을 보이는 경우에 악성 세포로 판정하며,

세포가 한 겹으로 도말되어 있으며 세포핵/세포질 비율(N/C ratio)이 작고 핵막이 매끄러운 모양일 경우에는 정상 세포로 판정하고,

세포의 변화가 악성 세포에는 미치지 못하나 정상으로 판정할 수 없는 경우 비정형 세포(atypical cell)로 판정

하는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 14】**

담도암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 민감도 및 특이도를 향상시키는 방법:

(a) 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소가 발현 증가되었으면 담도암 환자인 것으로 판단하는 단계.

**【청구항 15】**

제14항에 있어서, 상기 민감도 및 특이도가 90% 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 16】**

제14항에 있어서, 상기 세포진 검사는 슬세포진 검사인 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 17】**

담도암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직검사에 있어서, 형태학적 검사와 병용하여

(a) 잠재 환자로부터 채취한 담도 시료에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase) 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 메티오닐 티알엔에이 합성효소가 발현 증가되었으면 담도암 환자인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 보조요법을 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는, 담도암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

**【청구항 18】**

제17항에 있어서, 상기 보조요법은 형태학적 검사와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 수행되는 것을 특징으로 하는 담도암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

**【청구항 19】**

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 형태학적 검사는

세포 균집성; 세포핵/세포질 비율(N/C ratio); 핵막의 모양; 염색질의 뭉침 현상; 핵 내 핵소체의 출현; 및 유사분열의 출현으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상을 검사하는 것을 특징으로 하는, 담도암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

**【청구항 20】**

제1항에 있어서, 상기 제제는 메티오닐 티알엔에이 합성효소 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 21】**

담도암의 진단용 제제를 제조하기 위한 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제의 용도.

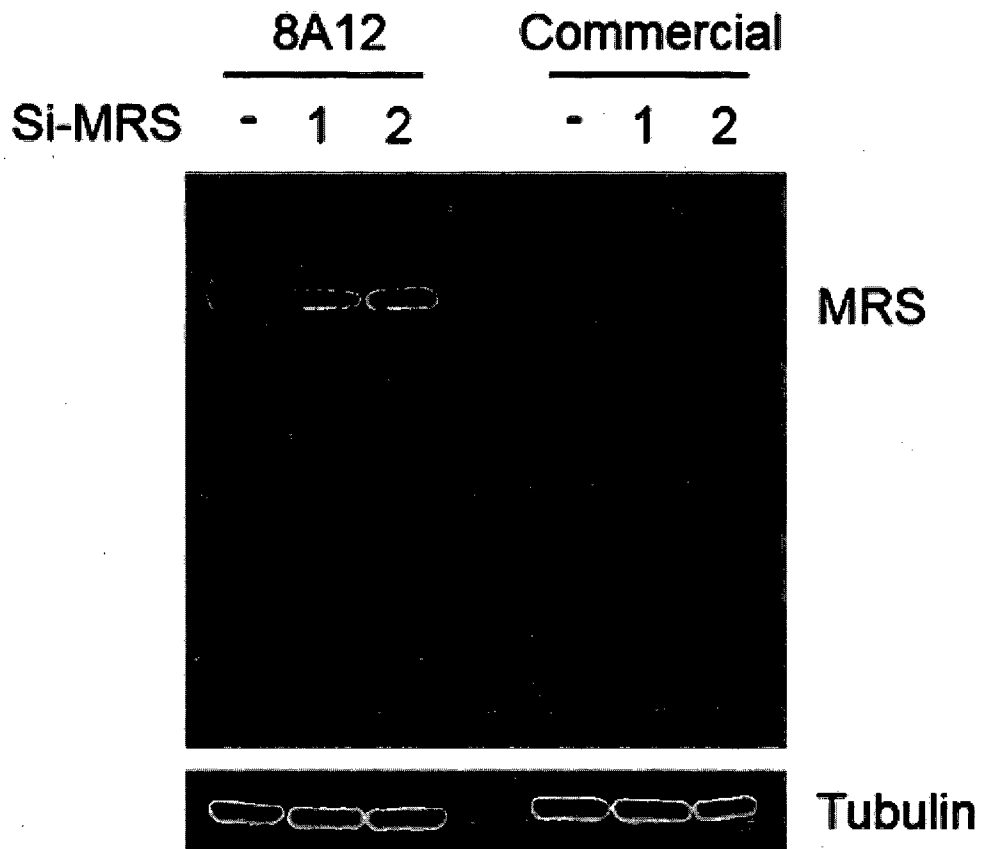


**【청구항 22】**

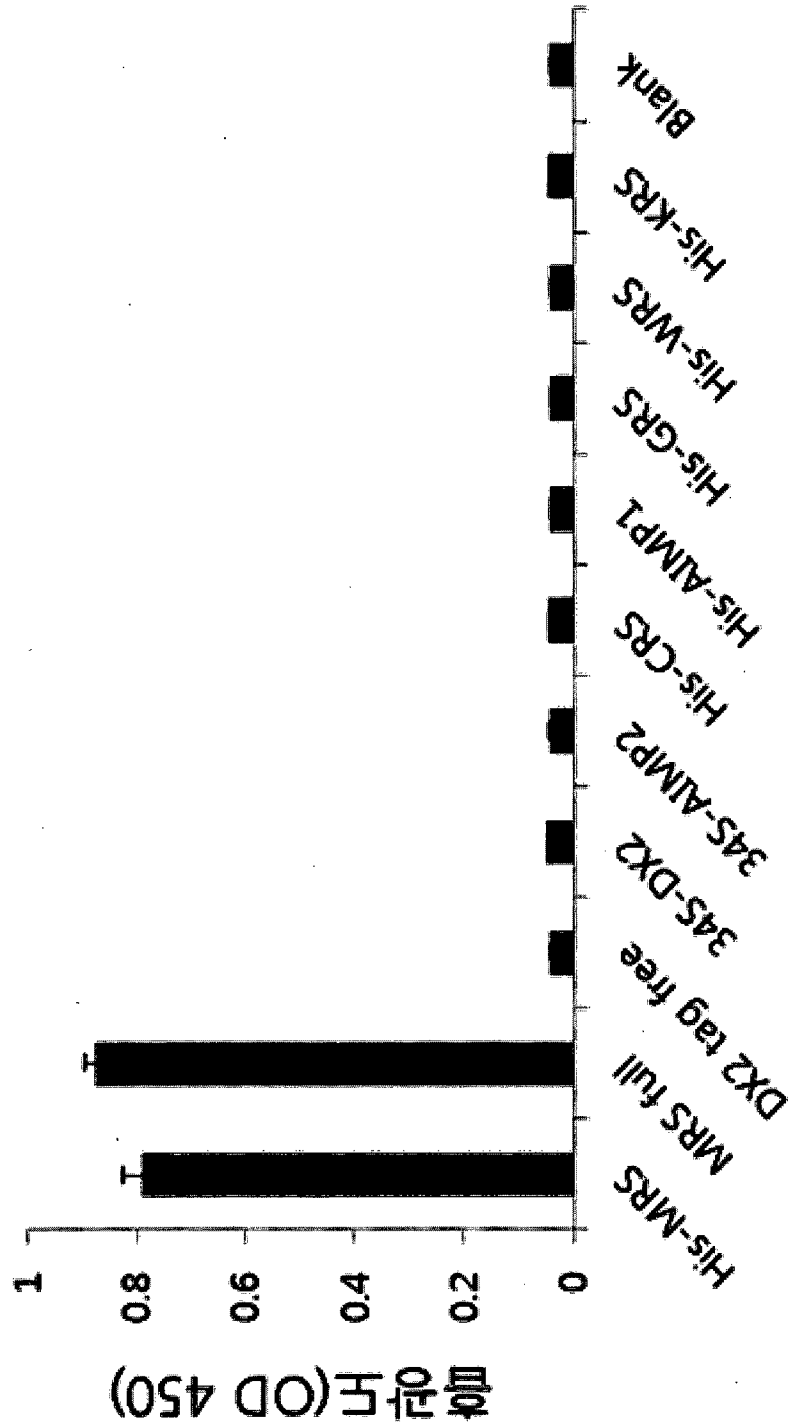
피검체 시료 내의 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 단백질의 발현 수준을 측정하는 것을 특징으로 하는 담도암 진단 방법.

【도면】

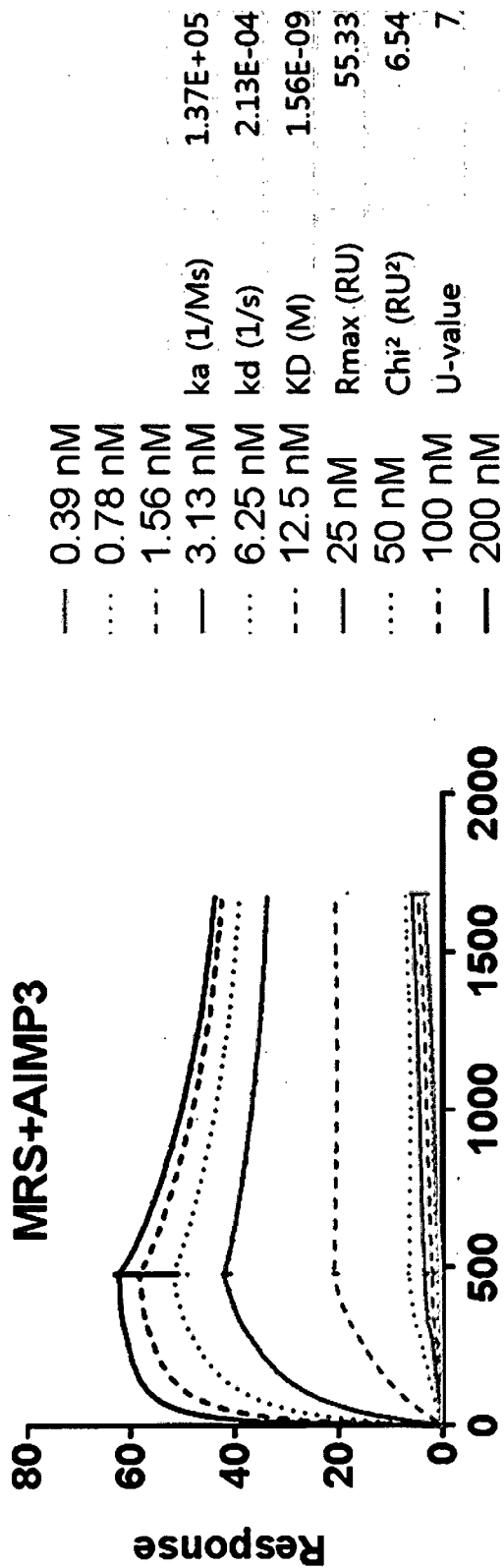
【도 1】



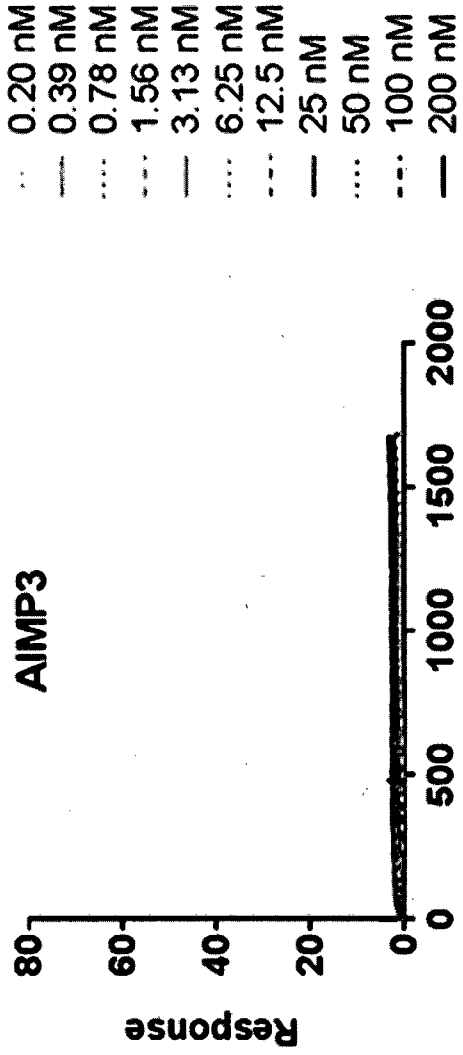
【도 2】



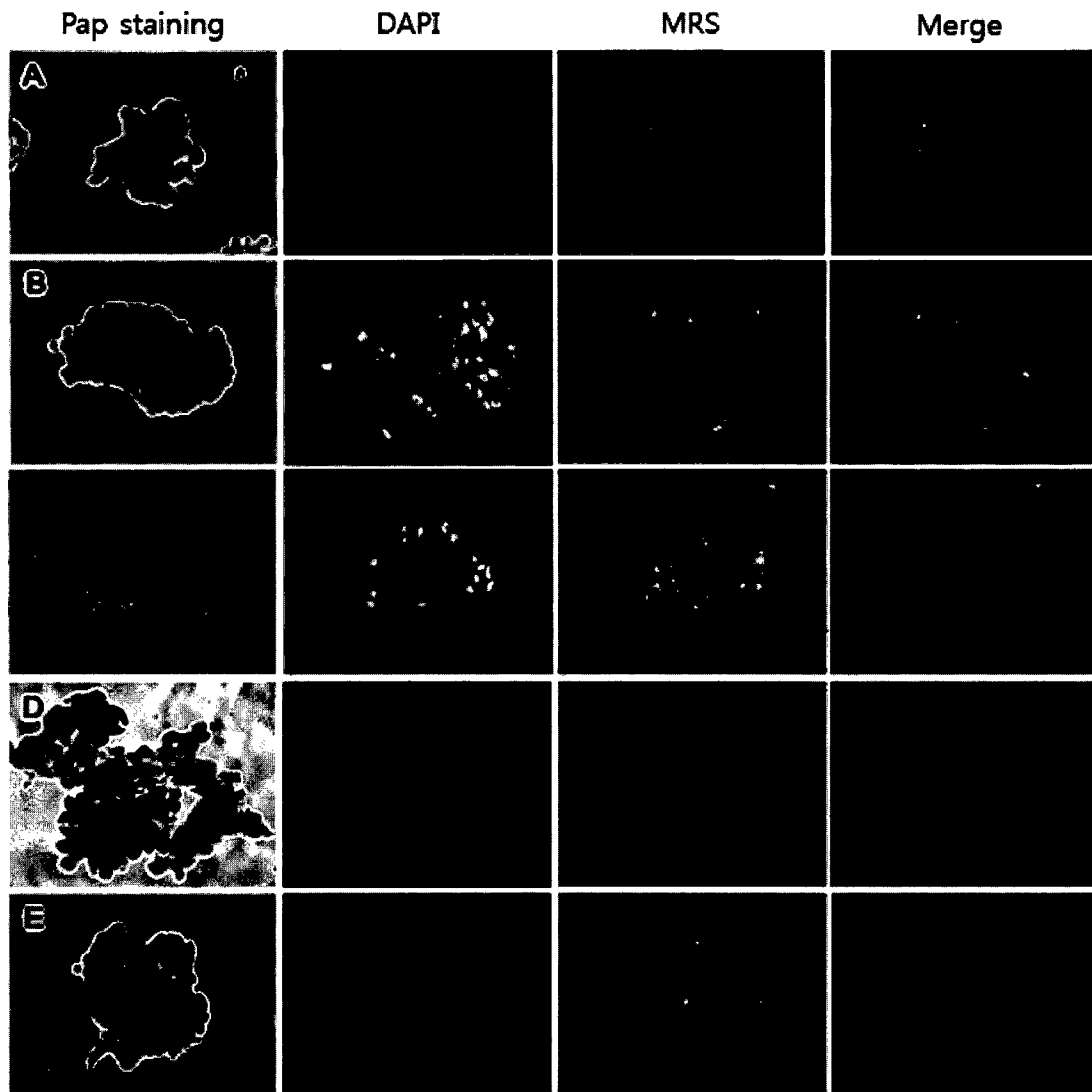
【표 3】



【도 4】



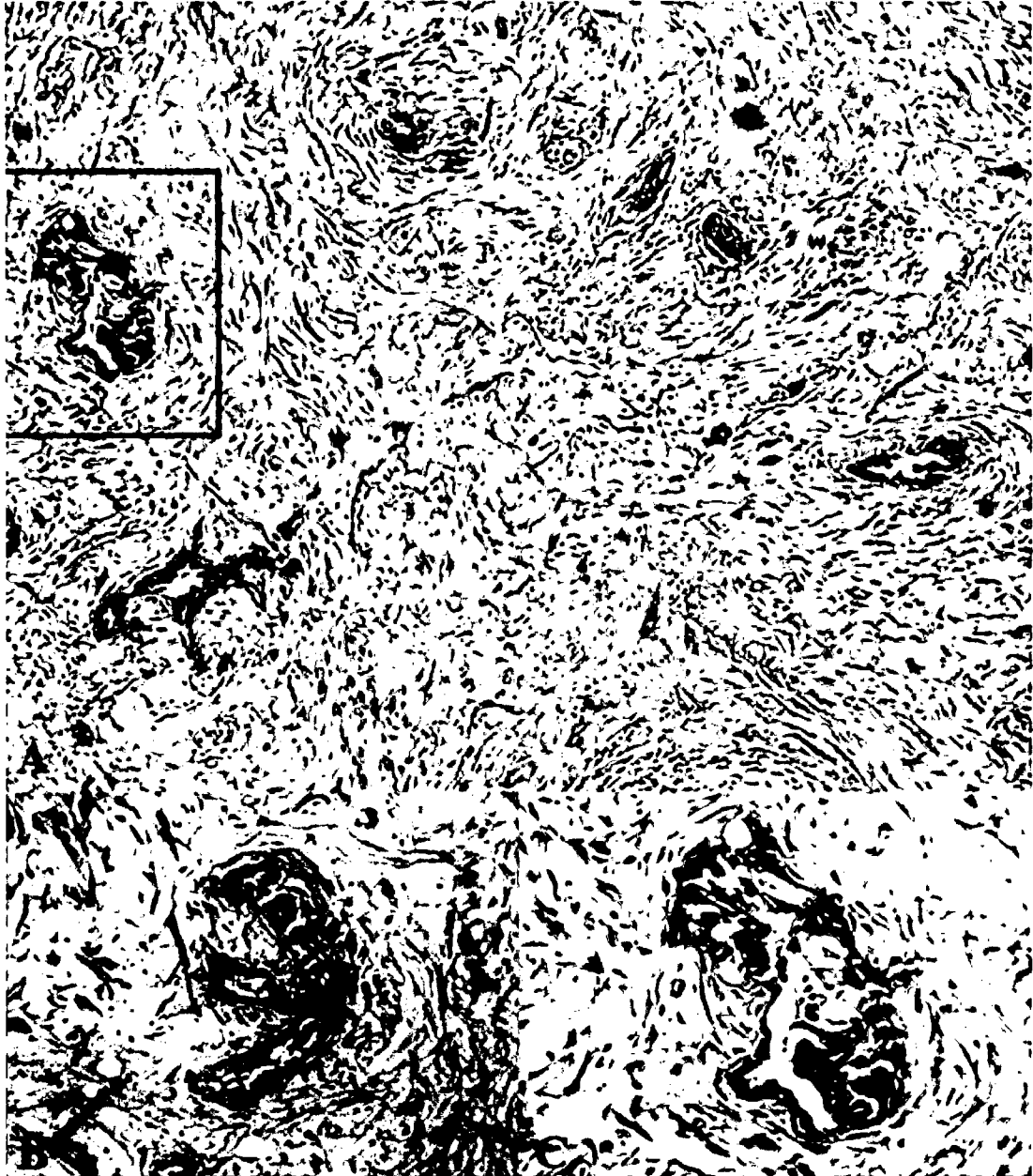
【도 5】



【도 6】

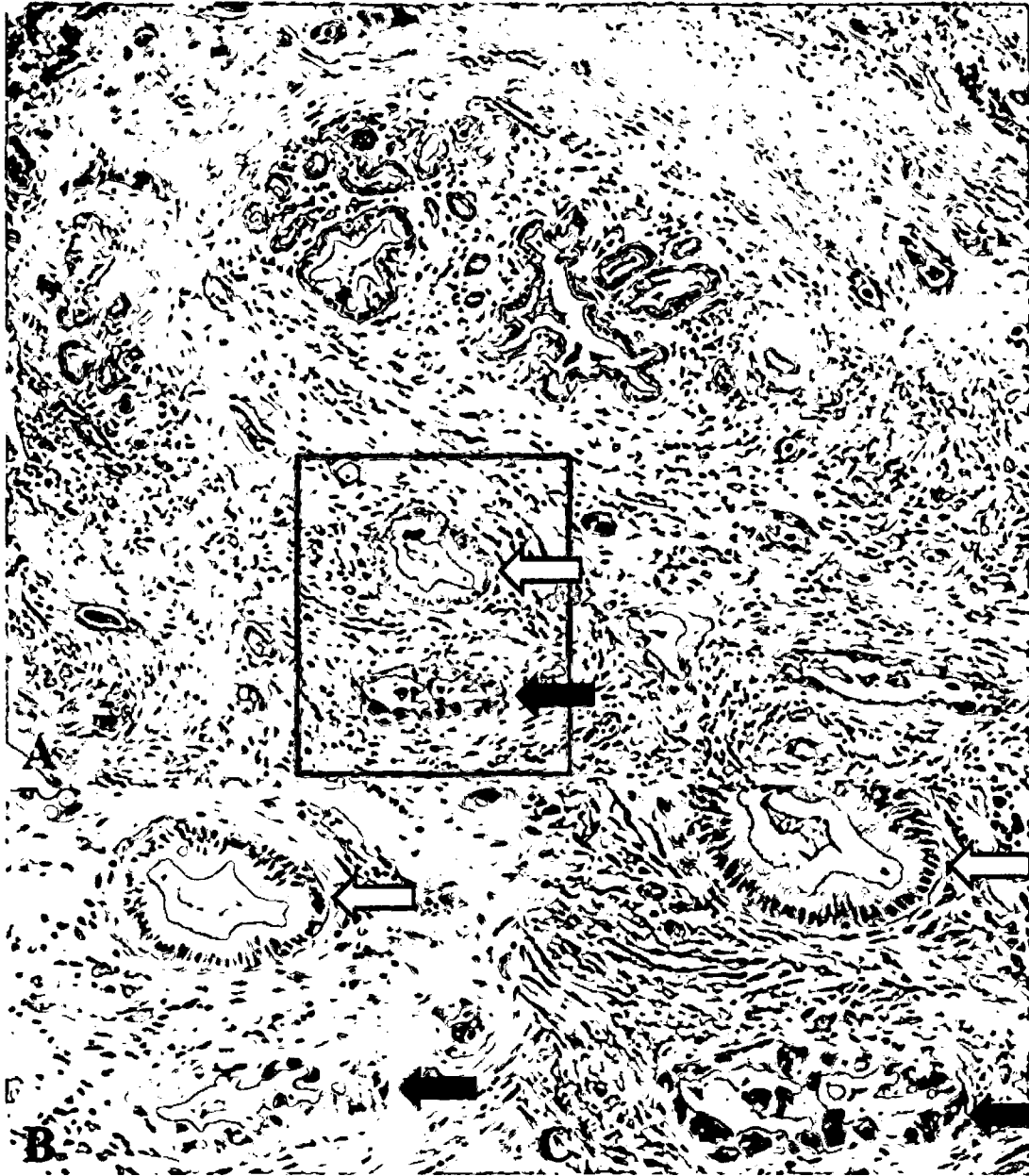


【도 7】





【도 8】



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/005443

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(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; C07K 14/47; G01N 27/62; C40B 30/04; G01N 33/68

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) &amp; Keywords: methionyl tRNA synthetase, bio marker, biliary tract cancer, diagnosis

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-237685 A (TOHOKU UNIV) 06 December 2012 See abstract, and claims 1-5.	1-22
A	US 2012-0065089 A1 (KUNO, A. et al.) 15 March 2012 See the entire document.	1-22
A	JP 2011-099858 A (UNIV CHIBA NAT UNIV CORP.) 19 May 2011 See the entire document.	1-22
A	KR 10-2005-0099581 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 13 October 2005 See the entire document.	1-22
A	MURAKAMI, Y. et al., "Comprehensive Analysis of Transcriptome and Metabolome Analysis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma", Scientific Reports, 2015, vol. 5, thesis no. 16294, inner pages 1-12 See the entire document.	1-22



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

"T" 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 AUGUST 2018 (28.08.2018)

Date of mailing of the international search report

28 AUGUST 2018 (28.08.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,  
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2018/005443**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2012-237685 A	06/12/2012	JP 5736947 B2	17/06/2015
US 2012-0065089 A1	15/03/2012	CN 102356316 A	15/02/2012
		CN 102356316 B	08/07/2015
		CN 104634974 A	20/05/2015
		CN 104634974 B	08/08/2017
		EP 2405269 A1	11/01/2012
		EP 2405269 B1	24/08/2016
		EP 2405269 B8	12/10/2016
		JP 2015-007654 A	15/01/2015
		JP 5704570 B2	22/04/2015
		JP 5787389 B2	30/09/2015
		US 8557602 B2	15/10/2013
		WO 2010-100862 A1	10/09/2010
JP 2011-099858 A	19/05/2011	JP 5656064 B2	21/01/2015
		US 2011-0108722 A1	12/05/2011
		US 8563235 B2	22/10/2013
KR 10-2005-0099581 A	13/10/2005	KR 10-0568724 B1	07/04/2006

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
G01N 33/574; C07K 14/47; G01N 27/62; C40B 30/04; G01N 33/68

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: 메티오닐 티알엔에이 합성효소, 바이오마커, 담도암, 진단

**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2012-237685 A (TOHOKU UNIV) 2012.12.06 요약; 및 청구항 1-5 참조.	1-22
A	US 2012-0065089 A1 (KUNO, A. 등) 2012.03.15 전체 문헌 참조.	1-22
A	JP 2011-099858 A (UNIV CHIBA NAT UNIV CORP.) 2011.05.19 전체 문헌 참조.	1-22
A	KR 10-2005-0099581 A (한국생명공학연구원) 2005.10.13 전체 문헌 참조.	1-22
A	MURAKAMI, Y. 등, 'Comprehensive analysis of transcriptome and metabolome analysis in intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma' Scientific Reports, 2015년, 5권, 논문번호 16294, 내부페이지 1-12 전체 문헌 참조.	1-22

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  
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌  
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌  
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌  
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌  
 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌  
 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.  
 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.  
 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2018년 08월 28일 (28.08.2018)	국제조사보고서 발송일 2018년 08월 28일 (28.08.2018)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516
---	------------------------------------

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2012-237685 A	2012/12/06	JP 5736947 B2	2015/06/17
US 2012-0065089 A1	2012/03/15	CN 102356316 A	2012/02/15
		CN 102356316 B	2015/07/08
		CN 104634974 A	2015/05/20
		CN 104634974 B	2017/08/08
		EP 2405269 A1	2012/01/11
		EP 2405269 B1	2016/08/24
		EP 2405269 B8	2016/10/12
		JP 2015-007654 A	2015/01/15
		JP 5704570 B2	2015/04/22
		JP 5787389 B2	2015/09/30
		US 8557602 B2	2013/10/15
		WO 2010-100862 A1	2010/09/10
JP 2011-099858 A	2011/05/19	JP 5656064 B2	2015/01/21
		US 2011-0108722 A1	2011/05/12
		US 8563235 B2	2013/10/22
KR 10-2005-0099581 A	2005/10/13	KR 10-0568724 B1	2006/04/07