(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0037392
(43) 공개일자 2024년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0115041
(22) 출원일자 2022년09월13일
심사청구일자 2022년09월13일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
하창훈
서울특별시 강동구 고덕로 360, 323동 903호(상일동, 고덕아르테온)
명승재
서울특별시 강남구 압구정로 29길71, 24동 803호(압구정동, 현대아파트)
(74) 대리인
이명진

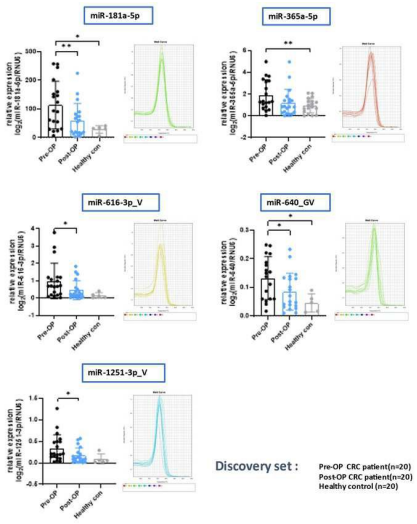
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **대장암 진단 및 대장암 수술 후 예후 예측을 위한 바이오마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 대장암 진단 및 대장암 수술 후 예후 예측을 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 5개의 혈액 유래 엑소좀 내 miRNA(miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p)는 간단히 혈액 채혈을 통해서 측정될 수 있어, 대장암 진단검사에 있어서 환자의 접근성이 매우 뛰어나고, 혈액 내 바이오마커로서 엑소좀 내 miRNA, 즉 세포외 소포 내에 들어있는 miRNA를 타겟으로 하여 진단하기 때문에 비교적 안정적으로 정확한 진단이 가능하다는 장점이 있다. 이에, 본 발명에 따른 혈액 유래 엑소좀 내 miRNA는 대장암 진단 및 대장암 수술 후 예후 예측을 위한 바이오마커로서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345347257
과제번호 2021R1A6A1A03040260
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 울산대학교(의대) 소화기병연구소 : 다중오믹스 기반 소화기질환 진단 및 치료기술 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2030.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대장암 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 miRNA는 혈액 내 엑소좀 유래인 것을 특징으로 하는, 대장암 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제제는 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 대장암 진단용 조성물.

청구항 4

miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 miRNA는 혈액 내 엑소좀 유래인 것을 특징으로 하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 제제는 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 대장암 진단용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 키트는 혈액을 이용하여 대장암을 진단하는 키트인 것을 특징으로 하는, 대장암 진단용 키트.

청구항 9

피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 높은 경우 대장암으로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 대장암 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 11

대장암 수술 후의 피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 수술 전에 비해 감소한 경우 대장암 환자의 수술 후 예후가 좋은 것으로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 13

후보물질을 투여한 대장암 동물모델로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 후보물질 투여 전에 비해 감소한 경우, 상기 후보물질을 대장암 치료용 후보물질로 선택하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 대장암 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 후보물질은 뉴클레오티드, DNA, RNA, 아미노산, 앱타머, 단백질, 줄기세포, 줄기세포 배양액, 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물, 및 천연추출물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 대장암 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대장암 진단 및 대장암 수술 후 예후 예측을 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 대장암은 대장에서 발생하는 악성종양으로, 세계 암 발병률 2위의 암으로서 현대에 들어서 발병률이 급속도로 증가하고 있는 암이다. 또한 국내 남성의 대장암 발병률은 10만명당 약 50여명으로 전세계에서 1위이다.

[0004] 대장암 사망률이 계속해서 증가하는 다른 원인은 바로 대장암의 초기증상이 거의 없다는 것과 그로 인해 한국의 대장암 조기 발견율이 낮다는 것에 있다. 많은 대장암 환자들이 상당히 진전된 3기와 다른 장기로 전이가 된 4기의 전이성 대장암이 되어서야 암을 진단 받는다. 대장암 1기의 경우 5년 생존율 약 90%를 보이지만, 3기 생존율은 약 30-40%로 떨어지고, 대장암 4기는 생존율 10% 미만으로 매우 예후가 불량하다. 따라서, 대장암의 조기진단이 매우 중요하다.

[0005] 이러한 대장암의 조기발견 및 치료가 최근 의학계의 가장 주목되는 관심사인데 현재 대장암 진단은 분변 내 잠혈검사 및 대변 DNA 등의 대변을 분석하는 방법과 대장내시경을 통한 직접 검사법이 있다. 그런데, 분변 잠혈검사법은 대변 채취가 어려워서 검사 순응도가 떨어지고, 선종 등의 진단율이 매우 낮은 문제가 있고, 대변 DNA검사는 비용이 높아서 아직 우리나라에서 사용되고 있지 않다.

[0006] 대개의 경우, 대장 전체의 관찰이 가능하고, 조직검사까지 동시에 할 수 있는 대장 내시경이 대장암 진단을 위한 가장 효과적이면서 정확한 검사 방법으로 많이 추천되고 있다. 하지만, 대장 내시경의 경우 검사 전 대장정결이 필요하고, 수면 내시경이 아닐 경우 환자가 불편할 수 있으며, 장 천공 등의 중대한 부작용이 발생할 수 있고, 암 등으로 대장 내강이 막혀 있으면 더 이상 검사를 진행할 수 없는 문제점이 있다.

[0007] 또한, 기존에 환자별 암의 분자적 분석을 위하여 암 조직 검체가 주로 이용되어 왔으나, 조직을 얻는 방법은 침습적일 수 밖에 없어, 위험 및 비용 등을 고려할 반복 검사가 현실적으로 매우 어렵다. 그 결과 한 환자에서의 암의 공간적 이질성(tumor heterogeneity) 및 치료에 따른 시간적 이질성(clonal evolution), 항암치료 후 발생하는 항암제에 대한 저항성의 기전을 파악하기 어렵다는 단점이 있었다.

[0008] 반면 혈액 검체는 채취가 용의하고, 종양에서 유래한 성분을 검출할 수 있다면, 종양내 이질성을 반영하기에 적합한 모델이다. 최근 혈액 검체를 활용하는 cfDNA(cell free DNA)를 통한 검사법은 검체를 얻기가 쉽고 환자가 감수해야 하는 위험 및 비용이 적어, 조직을 통한 검사법의 한계를 극복할 수 있다고 알려져 있어 임상 적용을 시도하고 있다.

[0009] 한편, 엑소좀은 세포 외부로 방출되는 30~150 nm 크기의 세포밖 소포로 구조적으로 인지질 이중층 막을 구성하므로 체내의 다양한 효소에 의해 분해될 가능성이 없다. 암세포는 정상 세포보다 10 배 더 많은 엑소좀을 분비하며, 성장 인자, 케모카인, 마이크로RNA(miRNA) 등을 엑소좀 내부에 포함하여 암 주변의 미세 환경을 조절하고 암세포의 성장과 소통을 촉진한다. 최근 엑소좀에 포함된 miRNA에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 보다 효과적으로 대장암을 진단하고 대장암 수술 후 예후를 예측할 수 있는 방법에 대하여 연구한 결과, 수술 전 대장암 환자에 비해 수술 후 대장암 환자 및 정상 대조군에서 발현이 유의적으로 변화한 혈액 유래 엑소좀 내 miRNA를 선별하였는 바, 이를 대장암 진단 뿐만 아니라 대장암 수술 후 예후적 바이오마커로서 수술 후 재발 방지를 위한 대안으로 활용하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) KR 10-2022-0105294

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명자들은 수술 전 대장암 환자와 비교하여 수술 후 대장암 환자 및 건강한 대조군에서 발현이 감소되어 있는 5개의 혈액 유래 엑소좀 내 miRNA(miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p)를 확인하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0014] 이에, 본 발명의 목적은 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대장암 진단용 또는 대장암 환자의 수술 후 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 대장암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 진단 또는 대장암 환자의 수술 후 예후 예측을 위한 정보제공방법, 또는 대장암 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대장암 진단용 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 대장암 진단용 키트를 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 miRNA는 혈액 내 엑소좀 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 제제는 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 키트는 혈액을 이용하여 대장암을 진단하는 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 또한, 본 발명은 피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포

함하는, 대장암 진단 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 대장암 진단을 위한 정보제공방법 또는 진단 방법은 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 높은 경우 대장암으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 또한, 본 발명은 대장암 수술 후의 피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 대장암 수술 후의 피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 대장암 환자의 수술 후 예후 예측을 위한 정보제공방법 또는 예후 예측 방법은 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 수술 전에 비해 감소한 경우 대장암 환자의 수술 후 예후가 좋은 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 또한, 본 발명은 후보물질을 투여한 대장암 동물모델로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0033] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 스크리닝 방법은 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 후보물질 투여 전에 비해 감소한 경우, 상기 후보물질을 대장암 치료용 후보물질로 선택하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 후보물질은 뉴클레오티드, DNA, RNA, 아미노산, 앱타머, 단백질, 줄기세포, 줄기세포 배양액, 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물, 및 천연추출물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 또한, 본 발명은 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 대장암 진단 또는 대장암 환자의 수술 후 예후 예측 용도를 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 대장암 진단 또는 대장암 환자의 수술 후 예후 예측용 제제의 제조를 위한 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0038] 본 발명에 따른 5개의 혈액 유래 엑소좀 내 miRNA(miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p)는 간단히 혈액 채혈을 통해서 측정될 수 있어, 대장암 진단검사에 있어서 환자의 접근성이 매우 뛰어나고, 혈액 내 바이오마커로서 엑소좀 내 miRNA, 즉 세포외 소포 내에 들어있는 miRNA를 타겟으로 하여 진단하기 때문에 비교적 안정적으로 정확한 진단이 가능하다는 장점이 있다. 이에, 본 발명에 따른 혈액 유래 엑소좀 내 miRNA는 대장암 진단 및 대장암 수술 후 예후 예측을 위한 바이오마커로서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 대장암 환자의 혈액에서 추출한 엑소좀의 입자 크기 및 분포를 확인한 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 대장암 환자의 혈액에서 추출한 엑소좀 내 miRNA의 통계적 분석 결과를 나

타낸 도면이다.

도 3a는 본 발명의 일 구현예에 따른 대장암 환자의 혈액에서 추출한 엑소좀 내 miRNA의 1차 후보군을 수술 후 증가된 그룹과 감소된 그룹으로 나타낸 도면이다.

도 3b는 본 발명의 일 구현예에 따른 대장암 환자의 혈액에서 추출한 엑소좀 내 miRNA의 1차 후보군을 대상으로 NCBI GEO 공개 데이터베이스를 이용하여 2차 분석을 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 대장암 환자의 수술 전/후 및 정상 대조군에서 5개의 대장암 특이적 엑소좀 내 miRNA 마커의 발현 증감을 확인한 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 구현예에 따른 최종 후보 miRNA 마커의 대장암 진단 및 예후 예측에 대한 특이도 및 민감도 분석 결과를 확인한 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 구현예에 따른 miRNA 마커 선별 과정을 도식화하여 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명의 일 실시예에서는 대장암 수술 전/후 환자에서 혈액을 채취하여 혈액 내 엑소좀을 분리하고 이의 크기 및 분포를 분석한 결과, 상기 엑소좀이 인체 유래 세포외 소포의 규격에 준하는 것을 확인하였다(실시예 1 참조).

[0042] 본 발명의 다른 실시예에서는 대장암 환자에서 분리된 혈액 유래 엑소좀 내 miRNA의 통계적 분석을 실시하여, 통계적으로 유의미하게 증감하는 miRNA 후보군을 도출하였다(실시예 2 참조).

[0043] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 실시예 2의 결과 도출된 28개의 miRNA 후보군을 대상으로 GEO 공개 데이터베이스를 이용하여 2차 분석을 실시한 결과, 수술 후 증가된 엑소좀 내 miRNA 후보군은 3개, 감소된 엑소좀 내 miRNA 후보군은 9개가 동일하게 증감된 것을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0044] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 qRT-PCR을 통해 대장암 수술 후 감소되며 건강한 대조군에서도 발현이 매우 감소되어 있는 5개의 대장암 특이적 엑소좀 내 miRNA(miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p)를 선별하였다(실시예 4 참조).

[0045] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 실시예 4에서 발견한 5가지 miRNA 마커의 대장암 진단 및 예후 예측에 대한 특이도와 민감도를 분석한 결과, 수술 전과 수술 후를 비교한 예후적 바이오마커 평가 및 수술 전과 건강한 대조군을 비교한 진단적 바이오마커 평가에서 5가지 후보군 모두 특이도, 민감도가 AUC값 0.7 이상을 나타내는 것을 확인함으로써, 상기 5가지 miRNA 마커가 진단 및 수술 후 예후 예측의 평가가 가능한 바이오마커로서 잠재력이 충분함을 입증하였다(실시예 5 참조).

[0047] 이에, 본 발명은 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대장암 진단용 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명에 있어서, "바이오마커"란 정상이나 병적인 상태를 구분할 수 있거나 치료반응을 예측할 수 있고 객관적으로 측정이 가능한 표지자를 의미하며, 본 발명에 따른 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상은 수술 전 대장암 환자에 비하여 수술 후 대장암 환자 및 정상 대조군의 혈액 유래 엑소좀 내에서 발현이 유의적으로 감소되어 있는 것을 확인하였는 바, 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상은 대장암 진단 또는 대장암 수술 후 예후 예측을 위한 바이오마커로 이용될 수 있다.

[0049] 본 발명에 있어서, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 대장암 발병 여부를 확인하는 것이나 이에 제한되지 않고, 대장암의 중증도를 확인하는 것도 모두 포함한다.

[0050] 본 발명에 있어서, "측정"이란 목적하는 물질의 존재(발현) 여부를 검출 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 검출 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 존재 여부 측정에 있어서 정성적

방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다.

[0051] 본 발명에 있어서, 상기 miRNA는 혈액 내 엑소좀 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 본 발명에 있어서, "프라이머(primer)"란 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오티드(single strand oligonucleotide)이다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)와 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고, DNA 중합효소가 프라이머에 주형 DNA에 상보적인 염기를 갖는 뉴클레오사이드 트리포스페이트를 추가하여 연결함으로써 DNA가 합성된다. 프라이머는 일반적으로 15 내지 30개의 염기서열로 이루어져 있으며, 염기 구성과 길이에 따라 주형 가닥에 결합하는 온도(melting temperature, Tm)가 달라진다. 프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 miRNA 또는 cDNA의 특정 구간을 증폭하여 miRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 따라서 본 발명에서 상기 miRNA 또는 이의 cDNA의 염기서열을 참조하여 프라이머 쌍을 용이하게 디자인할 수 있다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 miRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다.

[0054] 본 발명에 있어서, "프로브(probe)"는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA), DNA, miRNA 등에 특이적으로 결합할 수 있는 짧게는 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오티드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 miRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 상기 프로브는 대립형질(또는 대립유전자, allele)을 검출하기 위한 진단 방법 등에 사용될 수 있다. 상기 진단 방법에는 서던 블롯 등과 같은 핵산의 혼성화에 근거한 검출 방법들이 포함되며, DNA 칩을 이용한 방법에서 DNA 칩의 기판에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다.

[0055] 본 발명에서, 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 검출하고자 하는 표적이 되는 폴리뉴클레오티드와의 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.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 또는 프로브는 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA 발현을 측정할 수 있는 것이라면 특정 서열로 한정되지 않는다.

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 miRNA는 각각 다음의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0058] miR-365a-5p: 5'- agggacuuuuggggggcagaugug-3'(서열번호 1),

[0059] miR-181a-5p: 5'-aacauucaacgcugucggugagu-3'(서열번호 2),

[0060] miR-616-3p: 5'-agucauuggaggguuugagcag-3'(서열번호 3),

[0061] miR-640: 5'-augauccaggaaccugccucu-3'(서열번호 4), 및

[0062] miR-1251-3p: 5'-cgcuuugcucagccaguguag-3'(서열번호 5).

[0063] 본 발명에 있어서, 대장암 진단을 위해 상기 5가지 miRNA의 발현을 각각 측정하여 단독으로 바이오마커로서 사용할 수 있으며, 이들 마커의 조합을 바이오마커로서 사용할 수도 있다.

[0064] 예컨대, 상기 miRNA 바이오마커는 miR-365a-5p; miR-181a-5p; miR-616-3p; miR-640; miR-1251-3p;

[0065] miR-365a-5p 및 miR-181a-5p; miR-365a-5p 및 miR-616-3p; miR-365a-5p 및 miR-640; miR-365a-5p 및 miR-1251-3p; miR-181a-5p 및 miR-616-3p; miR-181a-5p 및 miR-640; miR-181a-5p 및 miR-1251-3p; miR-616-3p 및

miR-640; miR-616-3p 및 miR-1251-3p; miR-640 및 miR-1251-3p;

[0066] miR-365a-5p, miR-181a-5p, 및 miR-616-3p; miR-365a-5p, miR-181a-5p, 및 miR-640; miR-365a-5p, miR-181a-5p, 및 miR-1251-3p; miR-365a-5p, miR-616-3p, 및 miR-640; miR-365a-5p, miR-616-3p, 및 miR-1251-3p; miR-365a-5p, miR-640, 및 miR-1251-3p; miR-181a-5p, miR-616-3p, 및 miR-640; miR-181a-5p, miR-616-3p, 및 miR-1251-3p; miR-181a-5p, miR-640, 및 miR-1251-3p; miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p;

[0067] miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, 및 miR-640; miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, 및 miR-1251-3p; miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-640, 및 miR-1251-3p; miR-365a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p; miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p; 또는

[0068] miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0069] 또한, 본 발명은 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0070] 본 발명에 있어서, “예후 예측”이란 대장암 환자의 수술 후 앞으로의 암의 결과나 경과를 예측하는 것으로서, 암의 전이, 재발 또는 전이성 재발의 확률 등을 상기 miRNA 발현 수준을 통해 예측하는 것을 의미한다.

[0072] 또한, 본 발명은 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 포함하는, 대장암 진단용 키트를 제공한다.

[0073] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 혈액을 이용하여 대장암을 진단하는 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0074] 본 발명에 있어서, “키트”는 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함함으로써, 대장암을 진단할 수 있도록 하는 도구를 의미한다. 본 발명의 키트에는 상기 제제 외에도 이들의 측정 또는 검출 방법에 통상적으로 필요한 다른 구성성분, 조성물, 용액, 장치 등이 포함될 수 있다. 이때, 상기 miRNA의 발현 수준을 측정하는 물질은 1회 이상 횟수에 제한 없이 적용될 수 있으며, 각 물질을 적용하는 선후에는 제한이 없고, 각 물질의 적용은 동시에 진행될 수도 있고 미시에 진행될 수도 있다.

[0075] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 컨테이너; 지시서; 및 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함할 수 있다. 상기 컨테이너는 상기 제제를 포장하는 역할을 할 수 있고, 보관 및 고정하는 역할을 할 수도 있다. 상기 컨테이너의 재질은 예컨대, 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있고, 이들은 부분적 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있으며, 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는 스토퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 지시서를 포함할 수 있다.

[0077] 또한, 본 발명은 피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0078] 또한, 본 발명은 피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 진단 방법을 제공한다.

[0079] 본 발명에 있어서, 상기 miRNA 발현 수준을 검출하기 위한 방법으로는, 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예컨대 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR, quantitative PCR,

quantitative real-time PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 이용할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 qRT-PCR을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0080] 본 발명에 있어서, 상기 피검체는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0081] 본 발명에 있어서, 상기 대장암 진단을 위한 정보제공방법 또는 진단방법은 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 높은 경우 대장암으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0082] 또한, 본 발명은 대장암 수술 후의 피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0083] 또한, 본 발명은 대장암 수술 후의 피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 환자의 수술 후 예후 예측 방법을 제공한다.

[0084] 본 발명에 있어서, 상기 대장암 환자의 수술 후 예후 예측을 위한 정보제공방법 또는 예후 예측 방법은 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 수술 전에 비해 감소한 경우 대장암 환자의 수술 후 예후가 좋을 것으로 예측하거나, 예후가 좋은 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0085] 또한, 본 발명은 피검체로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0086] 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 높은 경우 대장암으로 판정하는 단계; 및

[0087] 상기 피검체가 대장암에 걸린 것으로 판정된 경우, 피검체의 대장암을 치료하는 단계를 포함하는, 대장암의 치료 방법을 제공할 수 있다.

[0088] 본 발명에 있어서, 상기 “치료”는 목적하는 질병과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, 화학 요법, 외과적 수술, 또는 생물학적 요법 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0089] 본 발명에 있어서, 상기 대장암의 치료를 위해 통상적으로 사용되는 치료 방법을 사용하거나, 통상적으로 사용되는 대장암 치료 약물을 투여할 수 있으며, 예컨대 5-플루오로우라실(5-FU, fluorouracil), 카페시타빈(capecitabine) 같은 플루오로피리미딘(flouropyrimidine)계열 약물들, 이리노테칸(irinotecan), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 또는 표적치료제인 베바시주맙(bevacizumab), 세툭시맙(cetuximab), 레고라페닙(regorafenib), 또는 아플리버셉트(aflibercept) 등을 투여할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0090] 또한, 본 발명은 후보물질을 투여한 대장암 동물모델로부터 채취된 혈액 시료에서 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대장암 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0091] 본 발명에 있어서, 상기 스크리닝 방법은 상기 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 후보물질 투여 전에 비해 감소한 경우, 상기 후보물질을 대장암 치료용 후보물질로 선택하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0092] 본 발명에 있어서, “후보물질”은 대장암 동물모델에 투여하여 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 증감을 측정하기 위하여 스크리닝에서 사용되는 미지의 물질을 의미하며, 뉴클레오티드, DNA, RNA, 아미노산, 앱타머, 단백질, 줄기세포, 줄기세포 배양액, 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물, 및 천연추출물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0093] 또한, 본 발명은 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 대장암 진단 또는 대장암 환자의 수술 후 예후 예측 용도를 제공한다.

[0094] 또한, 본 발명은 대장암 진단 또는 대장암 환자의 수술 후 예후 예측용 제제의 제조를 위한 miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제의 용도를 제공한다.

[0095] 본 발명에 있어서, "포함하는" 이라는 용어가 사용될 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~ 를 위한 단계"를 의미하지 않는다.

[0097] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0099] **[실시예]**

[0100] **실시예 1. 혈액 내 엑소좀 분리 및 분석**

[0101] 종양 제거 수술 전/수술 3주 후 대장암 환자 10명의 혈액샘플을 이용하여 혈액 내 엑소좀의 크기와 분포를 분석하였다. 혈액에서 엑소좀은 일련의 초원심분리(1,000g-100,000g)를 통해 분리되었다.

[0102] 분리된 엑소좀의 분석에는 나노 입자 추적 분석(Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) 기술로 나노 입자의 크기 및 분포도를 분석할 수 있는 레이저 입도분석기 NANOSIGHT(NS300)가 사용되었으며, 이를 통해 각 환자의 혈액 내 엑소좀의 정량적 분석과 정성적 분석이 수행되었다.

[0103] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 본 데이터를 기반으로 대장암 환자의 혈액에서 추출한 엑소좀이 1 내지 300 nm 크기 범위를 나타내는 등 공식적으로 인체 유래 세포외 소포(extracellular vesicle)의 규격에 준하는 것을 확인하였다.

[0105] **실시예 2. 혈액 유래 엑소좀 내 miRNA의 통계적 분석**

[0106] 대장암 바이오마커로서 엑소좀 내 마이크로RNA(miRNA)의 분석이 수행되었다. small-RNA 고처리량 시퀀싱(high throughput sequencing)을 통하여 1차적으로 수술 전/후 유의미하게 증가 또는 감소된 miRNA후보군을 선출하였으며, 후보군 선출을 위해 먼저 시퀀싱 데이터를 이용하여 수술 전과 비교하여 수술 후 증가 혹은 감소된 miRNA의 발현을 히트맵(Heatmap)을 통해 분석하였다. 이후 개별(individual) 분석을 통해 개별적으로 개개인간 발현이 증감된 후보군을 도출하였고, 그룹핑(grouping) 분석으로 수술 전/수술 후 두 그룹으로 나누어 유의미한 통계치를 나타내는 후보군을 도출하였다.

[0107] 또한, 벤 다이어그램(venn diagram), 분산 플롯(scatter plot), 및 볼케이노 플롯(volcano plot) 분석을 통해 모든 환자군에서 통계적으로 유의미하게 증감하는 miRNA 후보군을 도출하였다.

[0108] 도 2에 상기 엑소좀 내 miRNA의 통계적 분석 결과를 나타내었다.

[0109] 도 2의 A 및 B는 히트맵, C는 볼케이노 플롯, D는 분산 플롯, E는 벤 다이어그램 결과를 각각 나타낸 것이다.

[0111] **실시예 3. GEO(gene expression omnibus) 데이터베이스 분석**

[0112] 상기 실시예 2의 결과 도출된 총 28개의 1차적 엑소좀 내 miRNA 후보군을 수술 후 증가된 그룹과 감소된 그룹으로 나누어 분석하였으며, 상기 증가된 그룹 및 감소된 그룹에 속하는 miRNA들은 도 3a에 나타내었다.

[0113] 이후 1차적 후보군의 신빙성을 더하기 위해 NCBI GEO 공개 데이터베이스를 이용하여 2차 분석을 수행하였다. 분석에 사용된 NCBI GEO 데이터베이스는 GSE 40246으로서, 본 발명의 목적과 유사하게 수술 전/후 대장암 환자 24명의 엑소좀 내 miRNA를 분석한 데이터베이스이다. 분석 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이, 수술 후 증가된 엑소좀 내 miRNA 후보군은 3개, 감소된 엑소좀 내 miRNA 후보군은 9개가 동일하게 증감된 것을 확인하였다($p<0.05$).

[0115] **실시예 4. 대장암 진단 및 예후 예측을 위한 최종 후보 miRNA의 확인**

[0116] miRNA는 mRNA와 달리 poly A tail이 없기 때문에 일반적인 qRT-PCR이 불가능한 바, 인위적으로 miRNA에 poly A tail을 붙여주고 특정 poly T 어댑터 프라이머를 제작하여 각 miRNA의 특이적인 서열을 기반으로 qRT-PCR을 진행한다.

[0117] 이에, 증감된 후보군의 확인(validation)을 위해 각각의 후보군 서열을 활용하여 프라이머를 제작하고, 어댑터 기반의 qRT-PCR을 수행하였다. 이를 위해, 대장암 환자의 수술 전 혈액 20개, 수술 후 혈액 20개, 건강한 대조군 혈액 20개로 구성하여 진행하였다.

[0118] qRT-PCR 수행 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 1차 분석 결과와 동일하게 수술 후 감소되며 건강한 대조군에서도 발현이 매우 감소되어 있는 5개의 대장암 특이적 엑소좀 내 miRNA(miR-365a-5p, miR-181a-5p, miR-616-3p, miR-640, 및 miR-1251-3p)가 발견되었고 검증되었다. qRT-PCR의 효율을 나타낼 수 있는 각 후보군의 malt curve 분석(도 4의 각 그래프의 우측 도면)에서도 5개의 엑소좀 내 miRNA는 안정적으로 한 온도지점에서 정점을 찍는 유사한 곡선의 형태를 나타내는 것을 확인하였다.

[0120] **실시예 5. 최종 후보 miRNA 마커의 대장암 진단 및 예후 예측에 대한 특이도 및 민감도 분석**

[0121] 상기 실시예 4에서 발견한 5가지 대장암 특이적 엑소좀 내 miRNA의 대장암 진단 및 예후 예측에 대한 특이도와 민감도를 측정하기 위해, AUROC(Area Under the ROC)분석을 수행하였다.

[0122] 분석은 예후적 바이오마커로서 평가하기 위해 수술 전과 수술 후를 비교하였으며 진단적 바이오마커로서 평가하기 위해 수술 전과 건강한 대조군으로 나누어 분석하였다.

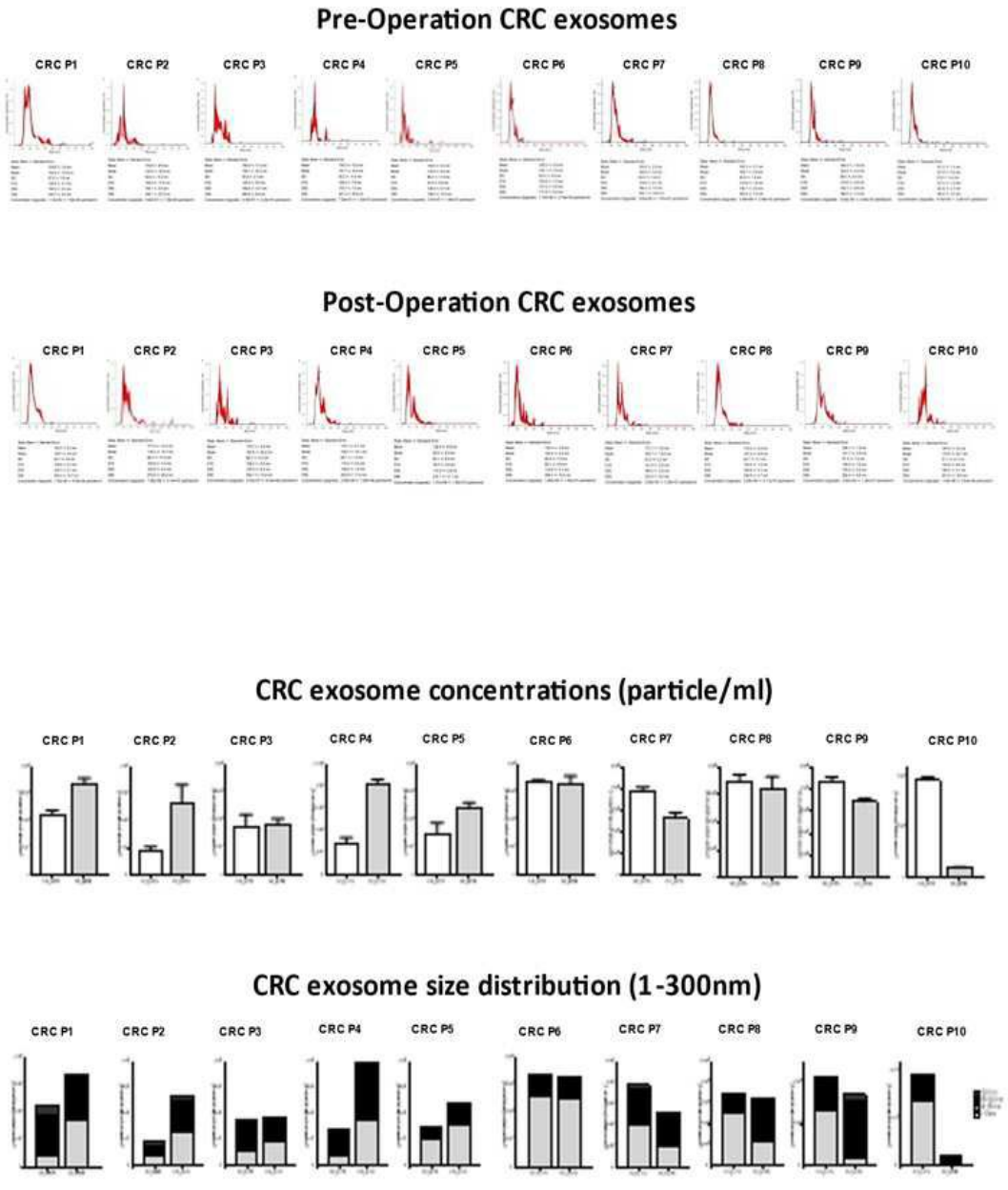
[0123] 분석 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 수술 전과 수술 후를 비교한 예후적 바이오마커 평가에서 5가지 후보군 모두 특이도, 민감도가 AUC값 0.7이상을 나타내며 수술 후 예후적 판단에 있어 유의미한 바이오마커임을 확인하였다. 뿐만 아니라 진단적 바이오마커 평가를 위해 수술 전과 건강한 대조군을 비교한 분석 평가에서도 5가지 후보군 모두 특이도, 민감도가 AUC값 0.7-0.8을 나타내며 진단적 평가가 가능한 바이오마커로서 잠재력이 충분함을 입증하였다.

[0124] 상기와 같은 본원발명의 miRNA 마커 선별 과정을 도 6에 도식화하여 나타내었다.

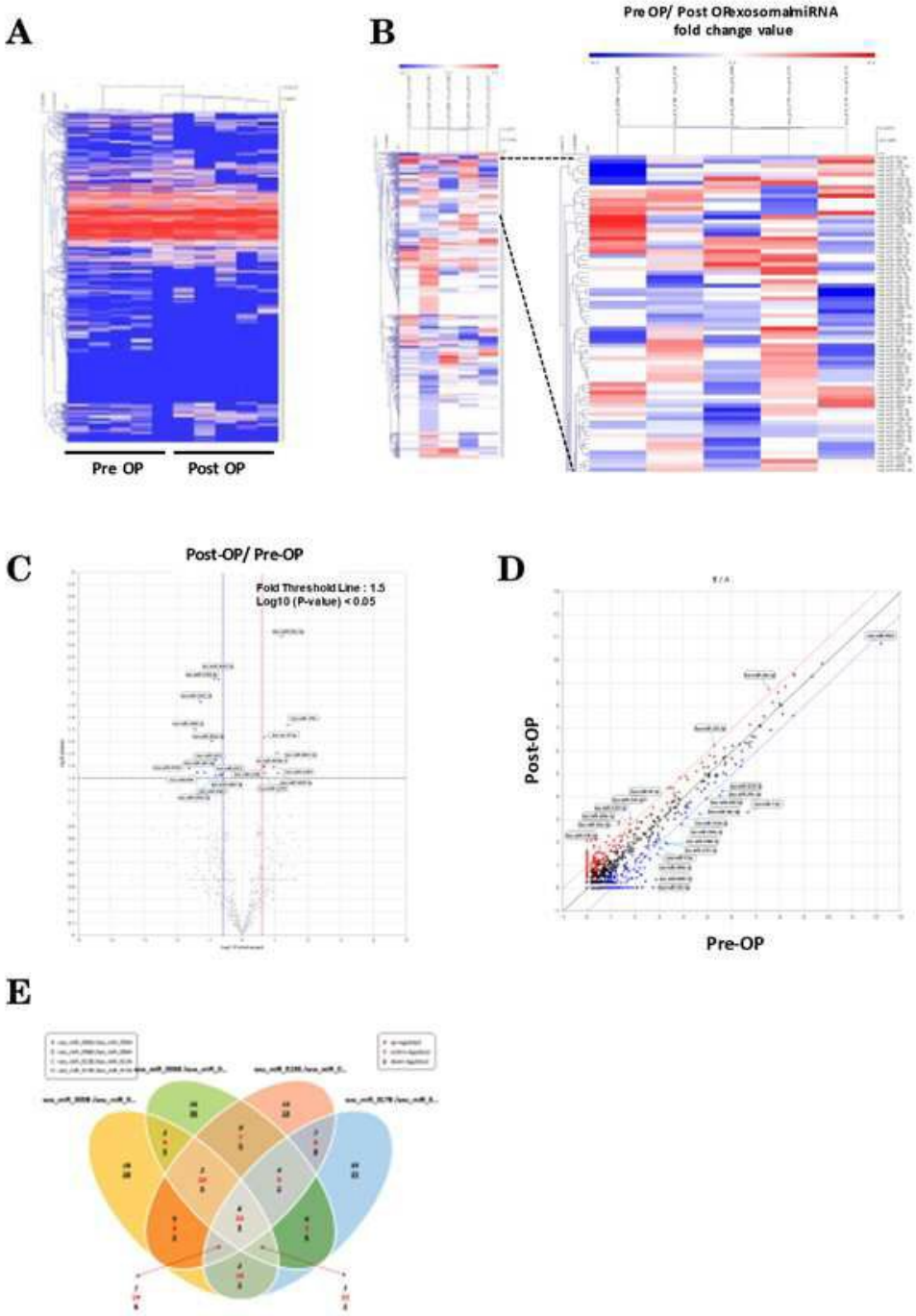
[0126] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

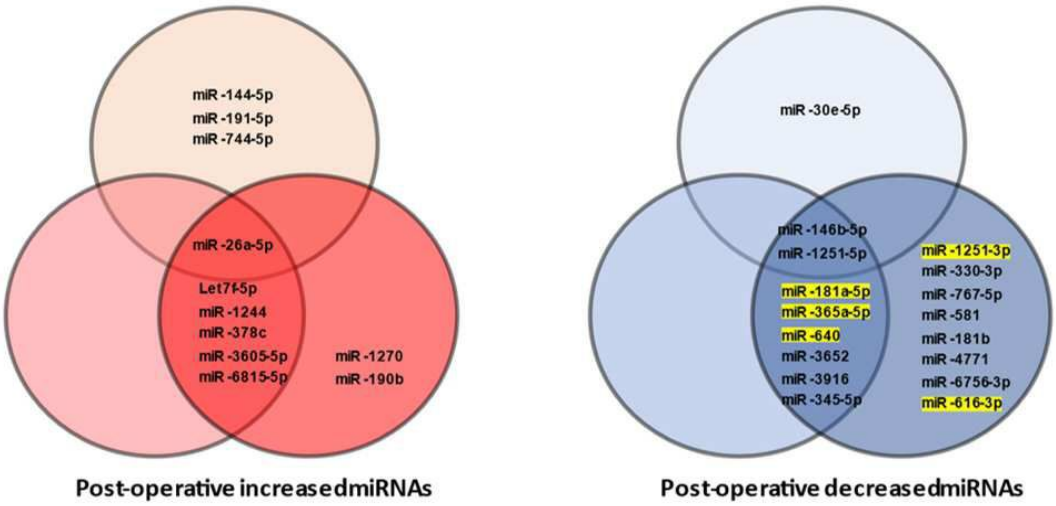
도면1


Pre-Operation CRC exosomes
CRC P1
CRC P2
CRC P3
CRC P4
CRC P5
CRC P6
CRC P7
CRC P8
CRC P9
CRC P10
Post-Operation CRC exosomes
CRC P1
CRC P2
CRC P3
CRC P4
CRC P5
CRC P6
CRC P7
CRC P8
CRC P9
CRC P10
CRC exosome concentrations (particle/ml)
CRC P1
CRC P2
CRC P3
CRC P4
CRC P5
CRC P6
CRC P7
CRC P8
CRC P9
CRC P10
CRC exosome size distribution (1-300nm)
CRC P1
CRC P2
CRC P3
CRC P4
CRC P5
CRC P6
CRC P7
CRC P8
CRC P9
CRC P10

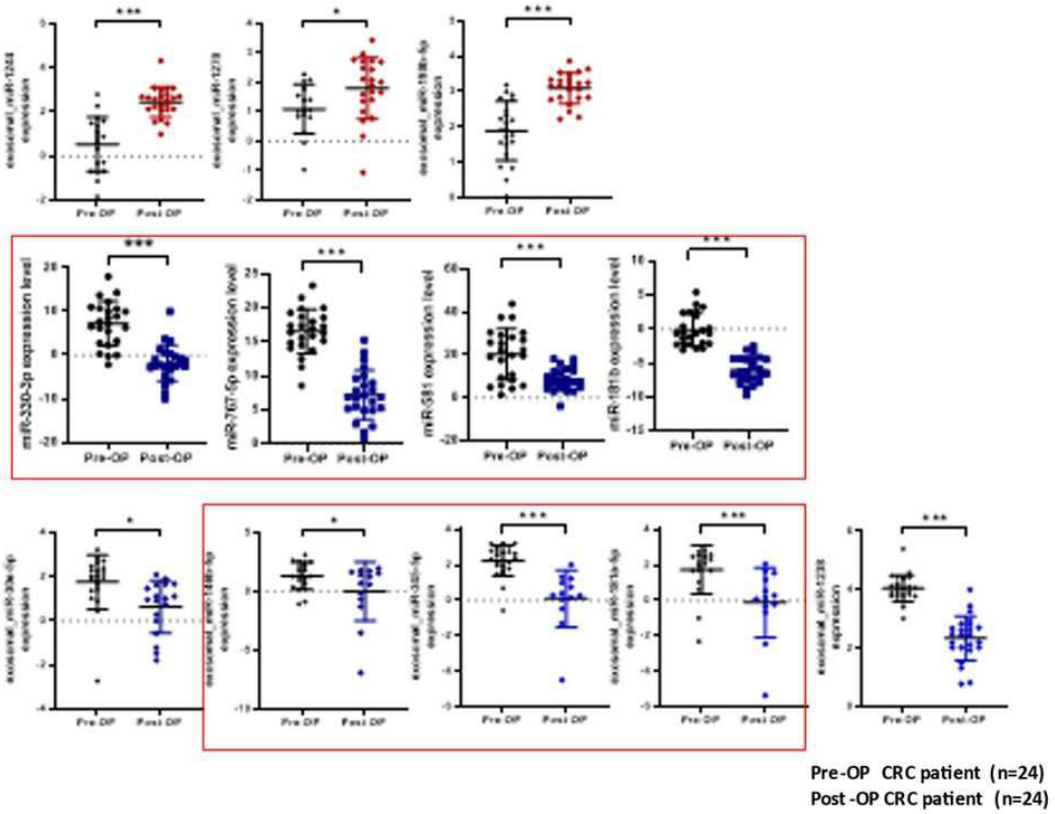
도면2


A
Pre OP
Post OP
B
Pre OP/ Post OR exosomalmiRNA
fold change value
C
Post-OP/ Pre-OP
Fold Threshold Line : 1.5
Log10 (P-value) < 0.05
D
Post-OP
Pre-OP
E

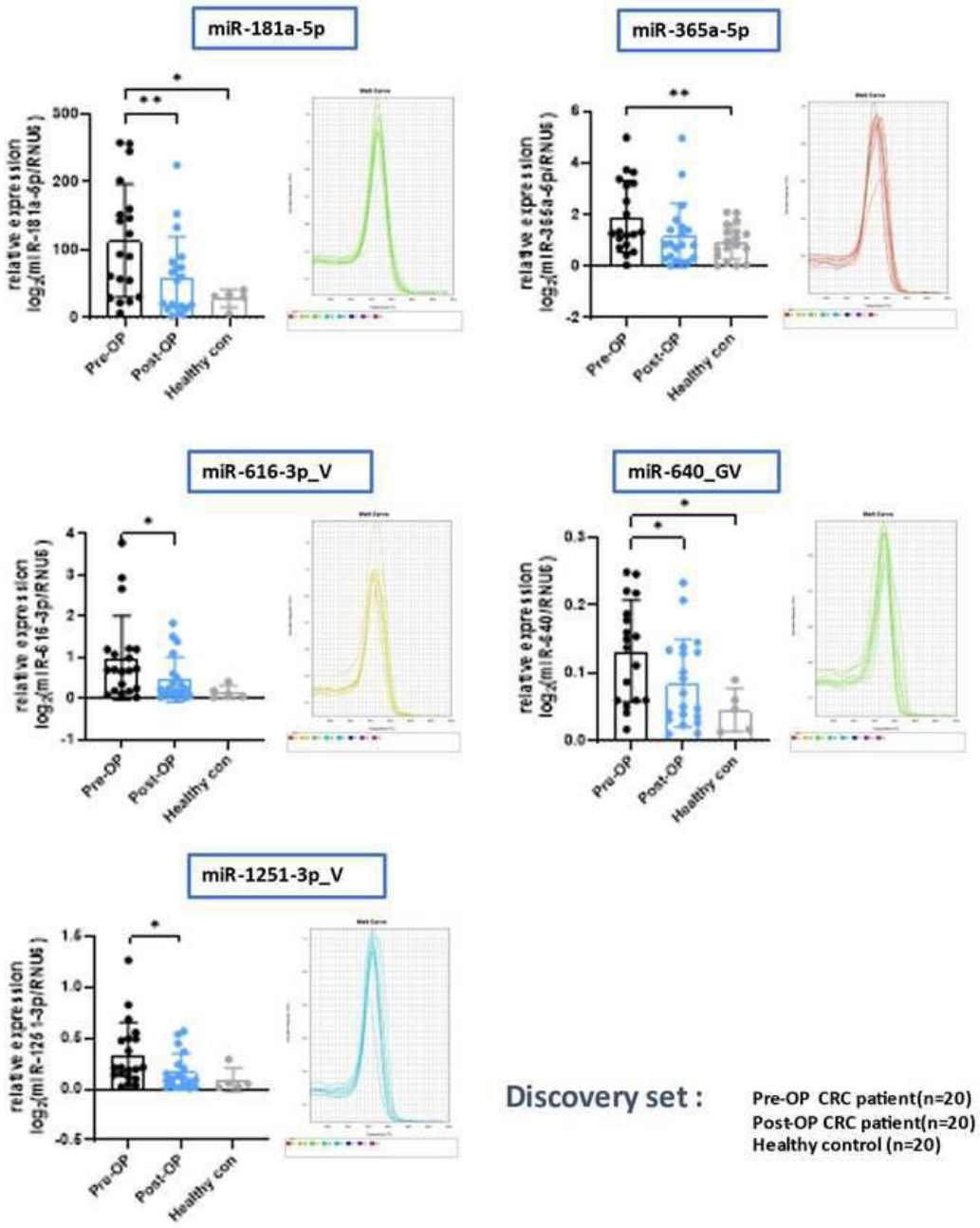
도면3a


miR-144-5p
miR-191-5p
miR-744-5p
miR-26a-5p
Let7f-5p
miR-1244
miR-378c
miR-3605-5p
miR-6815-5p
miR-1270
miR-190b
Post-operative increasedmiRNAs
miR-30e-5p
miR-146b-5p
miR-1251-5p
miR-181a-5p
miR-365a-5p
miR-640
miR-3652
miR-3916
miR-345-5p
miR-1251-3p
miR-330-3p
miR-767-5p
miR-581
miR-181b
miR-4771
miR-6756-3p
miR-616-3p
Post-operative decreasedmiRNAs

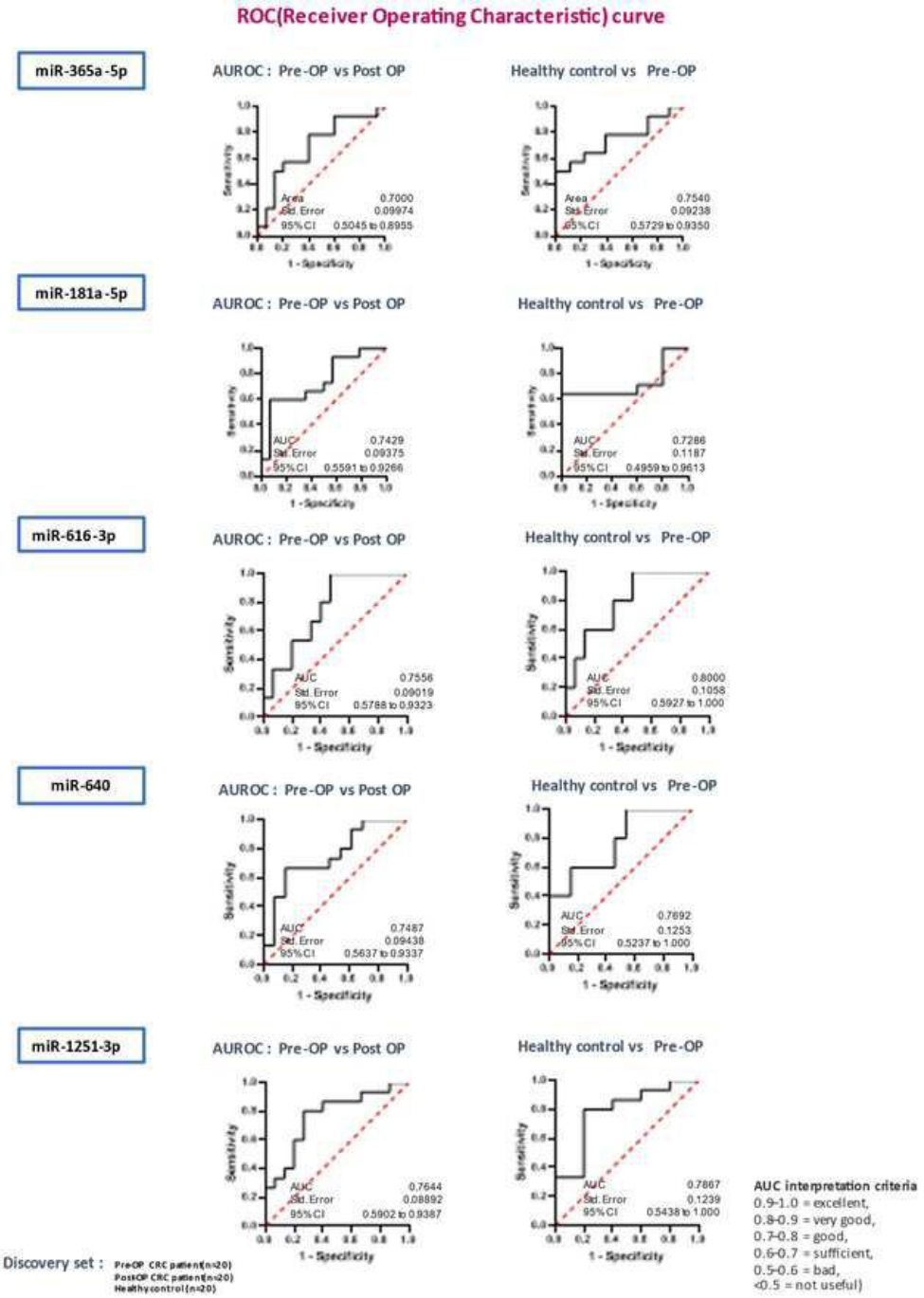
도면3b


Pre-OP
Post-OP
Pre-OP CRC patient (n=24)
Post-OP CRC patient (n=24)

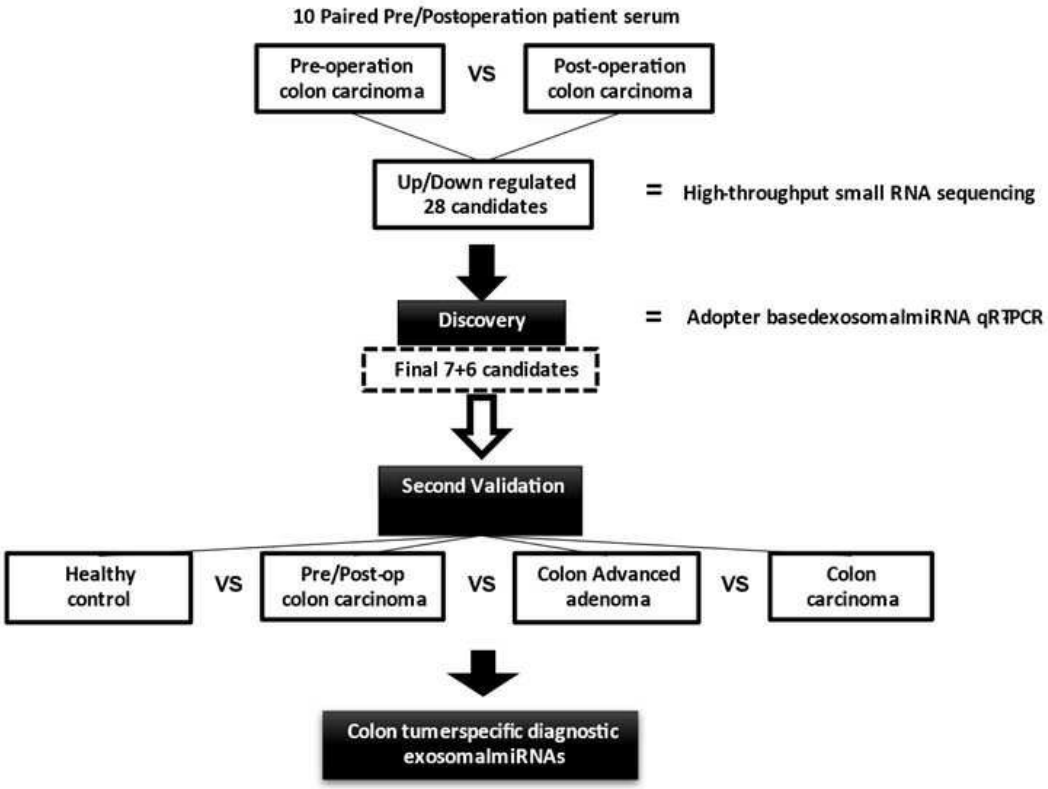
도면4


miR-181a-5p
miR-365a-5p
miR-616-3p_V
miR-640_GV
miR-1251-3p_V
relative expression
log2(miR-181a-5p/RNU6)
log2(miR-365a-5p/RNU6)
log2(miR-616-3p/RNU6)
log2(miR-640/RNU6)
log2(miR-1251-3p/RNU6)
Pre-OP
Post-OP
Healthy con
Discovery set :
Pre-OP CRC patient(n=20)
Post-OP CRC patient(n=20)
Healthy control (n=20)

도면5


ROC(Receiver Operating Characteristic) curve
miR-365a-5p
AUROC : Pre-OP vs Post OP
Area 0.7000
Std. Error 0.09974
95% CI 0.5045 to 0.8955
Healthy control vs Pre-OP
Area 0.7540
Std. Error 0.09238
95% CI 0.5729 to 0.9350
miR-181a-5p
AUROC : Pre-OP vs Post OP
AUC 0.7429
Std. Error 0.09375
95% CI 0.5591 to 0.9266
Healthy control vs Pre-OP
AUC 0.7286
Std. Error 0.1187
95% CI 0.4959 to 0.9613
miR-616-3p
AUROC : Pre-OP vs Post OP
AUC 0.7556
Std. Error 0.09019
95% CI 0.5788 to 0.9323
Healthy control vs Pre-OP
AUC 0.8000
Std. Error 0.1058
95% CI 0.5927 to 1.000
miR-640
AUROC : Pre-OP vs Post OP
AUC 0.7487
Std. Error 0.09438
95% CI 0.5637 to 0.9337
Healthy control vs Pre-OP
AUC 0.7692
Std. Error 0.1253
95% CI 0.5237 to 1.000
miR-1251-3p
AUROC : Pre-OP vs Post OP
AUC 0.7644
Std. Error 0.08892
95% CI 0.5902 to 0.9387
Healthy control vs Pre-OP
AUC 0.7867
Std. Error 0.1239
95% CI 0.5438 to 1.000
Sensitivity
1 - Specificity
Discovery set : PreOP CRC patient(n=20)
PostOP CRC patient(n=20)
Healthy control(n=20)
AUC interpretation criteria
0.9-1.0 = excellent,
0.8-0.9 = very good,
0.7-0.8 = good,
0.6-0.7 = sufficient,
0.5-0.6 = bad,
<0.5 = not useful)

도면6


10 Paired Pre/Postoperation patient serum
Pre-operation colon carcinoma
VS
Post-operation colon carcinoma
Up/Down regulated 28 candidates
= High-throughput small RNA sequencing
Discovery
= Adopter basedexosomalmiRNA qRTPCR
Final 7+6 candidates
Second Validation
Healthy control
VS
Pre/Post-op colon carcinoma
VS
Colon Advanced adenoma
VS
Colon carcinoma
Colon tumerspecific diagnostic exosomalmiRNAs

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.