



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0101919  
(43) 공개일자 2022년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2022.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0003991

(22) 출원일자 2021년01월12일

심사청구일자 2021년01월12일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

유도현

경상남도 진주시 새평거로 111, 312동 1501호(평거동, 평거휴먼시아3단지)

김지후

울산광역시 남구 대공원입구로9번길 15, 905호(옥동, 한라한솔)

(74) 대리인

위병갑

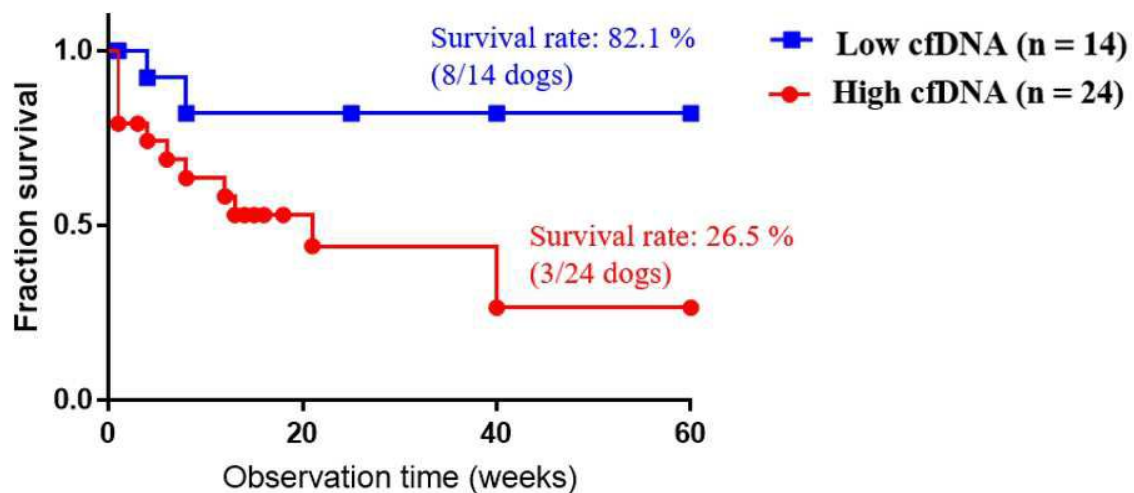
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 세포 유리 핵산의 측정을 통한 반려견의 종양 예후를 진단하는 방법

### (57) 요약

본 발명은 세포 유리 핵산의 측정을 통한 반려견의 종양 예후를 진단하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 (a) 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA(Cell-free DNA) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 측정된 cfDNA 수준을 ROC 곡선 분석에 의해 설정된 컷-오프(cut-off) 값과 비교하는 단계를 포함하는 반려견의 종양 예후 예측 방법 및 (a) 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA(Cell-free DNA) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 정상 대조군의 cfDNA 수준과 비교하는 단계를 포함하는 반려견의 종양 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 반려견의 종양 진단 및 종양 예후를 예측하는 방법은 반려견의 혈액 내에 존재하는 cfDNA의 농도 측정을 통한 간단한 방법으로, 종양의 발병 여부 뿐만 아니라 종양에 걸린 반려견의 생존을 예측을 포함하는 종양의 예후를 신속하고 정확하게 진단할 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711113369                     |
| 과제번호        | 2020R1C1C1008675               |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                      |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                         |
| 연구사업명       | 개인기초연구(과기정통부)(R&D)             |
| 연구과제명       | 반려견 수혈 부작용 개선을 위한 혈액 장기 보관법 개발 |
| 기 여 율       | 1/1                            |
| 과제수행기관명     | 경상대학교                          |
| 연구기간        | 2020.03.01 ~ 2021.02.28        |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA (Cell-free DNA) 수준을 측정하는 단계; 및  
(b) 측정된 cfDNA 수준을 ROC(Receiver Operation Characteristic) 곡선 분석에 의해 설정된 컷-오프(cut-off) 값과 비교하는 단계를 포함하는,  
반려견의 종양 예후 예측방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,  
상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장 또는 혈청인 것을 특징으로 하는, 반려견의 종양 예후 예측방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,  
상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값보다 낮은 경우 상기 반려견의 생존 확률이 높을 것으로 판단하고, 상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값보다 높은 경우 상기 반려견의 생존 확률이 낮을 것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 반려견의 종양 예후 예측방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,  
상기 설정된 컷-오프(cut-off) 값은 1,247.5 ug/L인 것을 특징으로 하는, 반려견의 종양 예후 예측방법.

#### 청구항 5

제3항에 있어서,  
상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값인 1,247.5 ug/L 보다 낮은 경우, 상기 반려견의 상기 생존 확률은 80% 이상일 것으로 예측하는 것을 특징으로 하는, 반려견의 종양 예후 예측방법.

#### 청구항 6

제3항에 있어서,  
상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값인 1,247.5 ug/L 보다 높은 경우, 상기 반려견의 상기 생존 확률은 30% 미만일 것으로 예측하는 것을 특징으로 하는, 반려견의 종양 예후 예측방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,  
상기 종양은 간세포암, 이소성 갑상선암, 폐선암, 유선암, 세포 갑상선암, 편평세포암, 신장세포암, 이행상피암, 장 선암, 림프종, 백혈병, 혈관육종, 간질육종, 구강평활근 육종, 위장기질종양(GIST), 다엽성 뼈종양, 비만세포종양, 갈색 세포종 및 말초 신경초 종양으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 반려견의 종양 예후 예측방법.

#### 청구항 8

(a) 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA(Cell-free DNA) 수준을 측정하는 단계; 및  
(b) 정상 대조군의 cfDNA 수준과 비교하는 단계를 포함하는,

반려견의 종양 진단방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장 또는 혈청인 것을 특징으로 하는, 반려견의 종양 진단방법.

#### 청구항 10

제8항에 있어서,

상기 피검체 유래의 cfDNA 수준이 정상 대조군의 cfDNA 수준에 비해 높은 경우, 종양이 발생한 것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 반려견의 종양 진단방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 피검체 유래의 cfDNA 수준이 1,553.9 ug/L 농도보다 높은 경우, 종양이 발생한 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는, 반려견의 종양 진단 방법.

#### 청구항 12

제8항에 있어서,

상기 종양은 간세포암, 이소성 갑상선암, 폐선암, 유선암, 세포 갑상선암, 편평세포암, 신장세포암, 이행상피암, 장 선암, 림프종, 백혈병, 혈관육종, 간질육종, 구강평활근 육종, 위장기질종양(GIST), 다엽성 뼈 종양, 비만세포종양, 갈색 세포종 및 말초 신경초 종양으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 반려견의 종양 진단 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 유리 핵산의 측정을 통한 반려견의 종양 예후를 예측 또는 진단하는 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 현재 우리나라는 핵가족화를 넘어선 1-2인 가구화가 이루어지고 있고 반려동물을 키우고 있는 인구가 증가하고 있다. 반려동물 중에서 가장 큰 부분을 차지하고 있는 것이 반려견으로, 반려견은 평균적으로 11~13년 정도 사는 것으로 알려져 있으나, 최근에는 공중보건 향상 및 의료 향상으로 15~20년 정도까지 그 수명이 연장되었다. 또한, 국민 의식 수준 향상으로 반려동물도 이제 사람과 비슷한 수준의 인격체로 여겨지는 경우가 많다.

[0003] 하지만, 많은 반려견을 포함하는 반려동물이 대부분 주택 내에서 생활하기 때문에 운동이 부족하고 스트레스를 많이 받게 되어 손쉽게 질환에 노출되는 경향이 있다. 특히 반려동물에서 종양질환은 인간과 달리 정기검진 등 종양에 대한 적절한 바이오마커 등과 같은 진단 수단이 없고, 동물병원에서 조형검사, 조직검사 등 정밀검사를 일상적으로 수행할 수 없는 한계가 있다.

[0004] 따라서 반려동물에서 종양질환을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 기술의 개발이 필요한 시점이다.

[0005] 한편, 세포 유리 핵산(cell-free DNA; cfDNA)은 세포 안에 존재하지 않고 혈액에 떠돌아다니는 DNA 조각을 의미한다. 특히 사람과 동물에서 암에 걸린 개체의 혈액에는 cfDNA가 증가됨이 보고된 바 있으며 이는 종양 세포의 사멸 및 괴사, 활성 세포로부터의 분비, 용해되어 순환하는 세포로부터 종양의 DNA가 파생되기 때문이다. 또한 최근에는 액체 생검(liquid biopsy) 분야에서 체액에 존재하는 암세포 유래의 핵산을 비침습적으로 분석하여 암의 조기 진단, 단계 및 예후 평가, 항암 요법에 대한 반응 모니터링 등 혈장 바이오마커로 주목을 받고 있다.

[0006] 그러나 아직까지 종양 바이오마커로서 cfDNA에 대한 수의학적 연구는 거의 진행되지 못하고 있는 실정이다.

### 선행기술문헌

## 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2020-0049647

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 건강한 개, 비종양성 질환을 가진 개 및 종양에 걸린 개의 혈액으로부터 cfDNA를 각각 추출하고, 각 실험군에 대한 혈액 내 cfDNA의 농도를 측정하여 반려견에서 종양과 cfDNA와의 상관관계를 분석하였고, 나아가 종양에 걸린 개의 경우, 종양 치료에 따른 반응과 cfDNA 농도 변화에 대한 상관관계를 분석하여 반려견의 종양 예후에 대한 진단을 정량적으로 판단할 수 있는 새로운 진단 방법을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은, (a) 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA (Cell-free DNA) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 측정된 cfDNA 수준을 ROC 곡선 분석에 의해 설정된 컷-오프(cut-off) 값과 비교하는 단계를 포함하는, 반려견의 종양 예후 예측방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은, (a) 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA(Cell-free DNA) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 정상 대조군의 cfDNA 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 반려견의 종양 진단방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (a) 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA (Cell-free DNA) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 측정된 cfDNA 수준을 ROC 곡선 분석에 의해 설정된 컷-오프(cut-off) 값과 비교하는 단계를 포함하는, 반려견의 종양 예후 예측방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장 또는 혈청일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값보다 낮은 경우 상기 반려견의 생존 확률이 높을 것으로 판단하고, 상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값보다 높은 경우 상기 반려견의 생존 확률이 낮을 것으로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 설정된 컷-오프(cut-off) 값은 1,247.5 ug/L일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값인 1,247.5 ug/L 보다 낮은 경우, 상기 반려견의 생존 확률은 80% 이상일 것으로 예측할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값인 1,247.5 ug/L 보다 높은 경우, 상기 반려견의 상기 생존 확률은 30% 미만일 것으로 예측할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 종양은 간세포암, 이소성 갑상선암, 폐선암, 유선암, 세포 갑상선암, 편평세포암, 신장세포암, 이행상피암, 장 선암, 림프종, 백혈병, 혈관육종, 간질육종, 구강평활근 육종, 위장기질종양(GIST), 다엽성 폐종양, 비만세포종양, 갈색 세포종 및 말초 신경초 종양으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은, (a) 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA(Cell-free DNA) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 정상 대조군의 cfDNA 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 반려견의 종양 진단방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장 또는 혈청일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 피검체 유래의 cfDNA 수준이 정상 대조군의 cfDNA 수준에 비해 높은 경우, 종양이 발생한 것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 피검체 유래의 cfDNA 수준이 1,553.9 ug/L 농도보다 높은 경우, 종양이 발생한 것으로 판단할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 종양은 간세포암, 이소성 갑상선암, 폐선암, 유선암, 세포 갑상선암, 편평세포암, 신장세포암, 이행상피암, 장 선암, 림프종, 백혈병, 혈관육종, 간질육종, 구강평활근 육종, 위장기질종

양(GIST), 다엽성 폐종양, 비만세포종양, 갈색 세포종 및 말초 신경초 종양으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

### 발명의 효과

[0023] 본 발명은 건강한 개에 비해 종양이 유발된 개의 혈액 내에 cfDNA(Cell-free DNA)의 농도가 증가되어 있음을 확인하였고, 특히 비종양성 질환을 가진 군에 비해 종양 질환을 가진 군에서 cfDNA의 농도가 유의적으로 높은 것을 확인함에 따라 cfDNA의 농도 측정을 통해 반려견의 종양 발생 여부를 진단할 수 있는 효과가 있다. 나아가 본 발명은 종양 치료 기간 중에 치료에 대한 반응과 cfDNA간의 변화 경향성을 분석하여 종양의 예후 및 생존율을 예측할 수 있는 컷-오프(cut off) 값을 규명하였는데, 검출된 cfDNA 농도 측정값을 컷-오프 값인 1,247.5 ug/L 값과 비교하여 종양 치료에 대한 예후 및 생존율을 객관적이고 정확하게 예측 및 진단할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 일실시예에서 건강한 군, 비종양성 질환군 및 종양 질환군에 대한 임상데이터의 평균 변수를 측정한 결과로서, (A)는 백혈구(WBC), 호중구(NEU), C- 반응성 단백질(CRP) 및 알부민의 평균 농도를 측정한 결과이고, (B)는 적혈구(RBC), 헤모글로빈(Hgb) 및 헤마토크릿(Hct)의 평균 농도를 측정한 결과이며, (C)는 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 알칼리성 포스파타제(ALKP) 및 감마-글루타밀 트랜스 펩티다제(GGT)의 평균 간 효소활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 모든 데이터는 평균  $\pm$  SD로 표시하였다.

도 2는 건강한 군과 임상학적으로 질병군 간의 cfDNA의 평균 농도를 측정한 결과를 나타낸 것으로, (A)는 건강한 군과 질병군(비종양성 기저 질환군 및 종양 질환군으로 구성)의 평균 cfDNA 농도를 비교한 것이고, (B)는 건강한 군, 비종양성 질환군 및 종양 질환군에 대한 평균 cfDNA 농도를 비교한 것이다.

도 3은 건강한 군, 비종양성 기저 질환군 및 다양한 종류의 종양 질환군에 대한 cfDNA 농도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 종양질환이 있는 개의 예후 마커로서 cfDNA에 대한 진단 민감도 및 1- 특이성을 식별하는 ROC(receiver operating characteristic) 분석 곡선을 나타낸 것이며, AUC에 대한 95% 신뢰 구간은 cfDNA의 경우 0.701(0.523-0.880)이었고 통계적으로 유의했다( $P < 0.05$ ).

도 5는 종양질환이 있는 개에서 cfDNA 대 생존율의 상관 관계를 분석한 결과로, cfDNA 농도 1,247.5  $\mu$ g/L을 컷-오프로 사용한 Kaplan-Meier 플롯은 통계적으로 유의한 차이를 보여주었다( $n = 38$ ,  $P < 0.05$ ).

도 6은 치료반응에 따른 cfDNA 농도를 비교한 결과로서, cfDNA 농도는 실선으로 표기되어있고, 다양한 시점에서의 LD 함계는 점선으로 표시되어 있다. (A)~(C)에서 각 그래프의 왼쪽의 세로축은 cfDNA 농도를, 오른쪽의 세로축은 LD의 함을 나타낸 것이다. 또한, 모든 그래프 각각에서 가로축 레이블은 혈장 샘플링 날짜 및 종양 반응상태를 나타낸 것이며, (A)~(J)는 각각 개 no.1 ~ no.10에 해당하는 종양을 갖는 개에 대한 분석 결과이다.

도 7은 다중심성 림프종(multicentric lymphoma)이 있는 개를 대상으로 LD의 함 및 cfDNA 농도 사이의 상관관계를 분석한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 반려견의 종양을 진단하고 또한 종양의 예후를 예측할 수 있는 새로운 방법을 제공하는 기술로서, 구체적으로 본 발명은 반려견의 생물학적 시료에서 cfDNA(Cell-free DNA) 수준을 측정하고, 반려견의 종양을 진단 또는 예후를 예측할 수 있는 객관적 지표로서 cfDNA 수준에 대한 컷-오프(cut-off) 값을 규명한 점에 특징이 있다.

[0026] 앞서 종래기술에서도 언급했던 바와 같이, 아직까지 반려동물의 종양을 객관적이고 정확하게 진단할 수 있는 방법이 부재한 실정이었다.

[0027] 이에 본 발명자들은 반려견을 대상으로 건강한 군, 비종양성 질환군 및 종양 질환군으로 분류된 실험군을 대상으로 혈액으로부터 cfDNA(Cell-free DNA)를 분리하고, 이의 농도를 정량적으로 측정하여, 종양 발생 또는 종양의 예후를 예측할 수 있는 판단 기준이 되는 정량적인 기준값, 즉 컷-오프(cut-off) 값을 규명하였다.

[0028] 특히 본 발명에서는 반려견 종양 진단을 위한 수단으로 cfDNA를 이용하였는데, 상기 “cfDNA(Cell-free DNA)”는 혈장에 존재하는 세포에서 유래한 DNA를 의미하며, 혈액 안에는 작은 무세포 DNA 혹은 세포 유리 DNA가 섞여



있다. 이러한 세포 유리 DNA는 태아의 성별, 유전자 변이나 염색체 수 이상을 검사하기 위한 비침습적 검사에 사용되고 있다. 그러나 아직까지 반려건의 종양을 진단하거나 종양의 예후를 예측하기 위한 용도로는 사용되지 않고 있었다.

- [0029] 한편, 본 발명의 일실시예에 따르면, cfDNA의 수준(농도) 분석을 통해 반려건의 종양 발생을 진단할 수 있는지를 확인하였는데, 이를 위해 반려견들을 대상으로 임상학적 분석을 통해 건강한 군, 비종양성 질환군 및 종양 질환군으로 구분하고, 각 반려견으로부터 혈액 내 cfDNA의 농도를 측정된 다음, 평균 농도를 분석한 결과, 건강한 군은  $877.8 \pm 181.7 \mu\text{g/L}$ , 비종양성 질환군은  $1,154.4 \pm 326.5 \mu\text{g/L}$ , 종양 질환군에서는  $1,553.9 \pm 544.3 \mu\text{g/L}$ 의 평균 cfDNA 농도가 측정되었다.
- [0030] 이를 통해 본 발명자들은 혈액 내 cfDNA의 수준 측정을 통해 반려건의 종양 발생 여부를 확인할 수 있음을 알 수 있었으며, 나아가 비종양성 질환과 종양 질환도 구분하여 진단할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0031] 본 발명의 다른 일실시예에서는, 다양한 종양 유형의 질환군에 대하여 cfDNA 농도를 비교 분석하였는데, 이를 위해 각각 림프종(n = 13), 암종 (n = 15), 육종 (n = 5), 기타 종양 (n = 5)에서의 cfDNA 농도를 분석하였다.
- [0032] 그 결과, 건강한 군에 비해 종양 질환군에서의 cfDNA 농도가 유의하게 높은 것으로 나타났고, 다양한 종양 유형의 질환군 중에서 림프종에서 cfDNA 농도가 가장 높은 수준으로 증가해 있는 것으로 나타났다.
- [0033] 그러므로 본 발명은, (a) 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA(Cell-free DNA) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 정상 대조군의 cfDNA 수준과 비교하는 단계를 포함하는 반려건의 종양 진단방법을 제공할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 상기 피검체 유래의 생물학적 시료는 전혈(혈액), 혈장 또는 혈청일 수 있다.
- [0035] 상기 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA(Cell-free DNA) 수준을 측정하는 것은, 상기 생물학적 시료로부터 cfDNA를 분리하고 농도를 측정하는 과정을 통해 수행되어지는데, cfDNA의 분리는 해당 시료로부터 핵산을 추출, 분리 및 정제하는 단계에 공지된 방법을 통해 수행할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 혈장 또는 혈청 샘플을  $16,000\times\text{g}$  및  $4^\circ\text{C}$ 에서 10분 동안 원심분리하여 무세포(cell-free) 혈장 또는 혈청을 수득하였고, 원심분리 후 정제된 cfDNA를 포함하는 상층액을 수득한 후, 이를 정량분석에 사용하였다.
- [0036] 또한 본 발명에서 진단할 수 있는 상기 반려건의 종양으로는, 이에 제한되지는 않으나, 간세포암, 이소성 갑상선암, 폐선암, 유선암, 세포 갑상선암, 편평세포암, 신장세포암, 이행상피암, 장 선암, 림프종, 백혈병, 혈관육종, 간질육종, 구강평활근 육종, 위장기질종양(GIST), 다엽성 뼈종양, 비만세포종양, 갈색 세포종 및 말초 신경초 종양으로 이루어진 군 중에서 선택된 것일 수 있다. 바람직하게는 림프종일 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 상기 “진단(diagnosis)”이란 넓은 의미로는 질환에 걸린 개체의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 및 합병증의 유무 등을 포함한다.
- [0038] 나아가 본 발명자들은 반려건의 혈액 내 cfDNA의 수준 측정을 통해 반려건의 종양 예후를 예측할 수 있는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였는데, 본 발명의 일실시예에 따르면 38 마리의 종양 질환군에 대한 혈장 cfDNA를 관찰기간(최대 60주) 동안 분석하였다.
- [0039] 그 결과, 각 실험군 반려건의 cfDNA 수준을 기반으로 ROC 곡선을 생성하였고, cfDNA 농도에 대한 컷-오프 값을 분석한 결과, 컷-오프 값이  $1,247.5 \mu\text{g/L}$ 인 것으로 측정되었다. 컷-오프 값을 이용하여 종양으로 진단받은 반려견들에 대한 생존 곡선을 분석한 결과, cfDNA 농도가 컷-오프 값인  $1,247.5 \mu\text{g/L}$  보다 낮은 수치를 보인 군들은 생존 확률이 82.1%로 비교적 높은 생존율을 보이는 것으로 나타난 반면, cfDNA 농도가  $1,247.5 \mu\text{g/L}$  보다 높은 수치를 보인 군들은 생존 확률이 26.5%로 낮은 생존율을 보이는 것으로 나타났다.
- [0040] 그러므로 본 발명자들은 종양이 발병된 반려견에 대해서도 혈액 내 cfDNA 농도를 측정하여 상기 반려건의 종양 예후의 예측이 가능함을 알 수 있었다.
- [0041] 이에 본 발명은 (a) 피검체 유래의 생물학적 시료에서 cfDNA(Cell-free DNA) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 측정된 cfDNA 수준을 ROC(Receiver Operation Characteristic) 곡선 분석에 의해 설정된 컷-오프(cut-off) 값과 비교하는 단계를 포함하는 반려건의 종양 예후 예측방법을 제공할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기 “예후”는 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체 즉, 검사 개체가 질환을 차후에 가지게 될지의 여부를 판정하는 것, 치료에 대한 검사 개체의 반응성을 판정하는 것, 또는 치료 효능에 대한 정보를 제공하

기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것을 모두 포함한다.

[0043] 또한, 상기 “종양 예후”는 종양의 치료 후에 해당 개체의 개발, 전이, 약물 반응성, 내성, 생존율 등과 같은 여부를 판단하는 것을 의미한다.

[0044] 또한 상기 방법은 상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값보다 낮은 경우 상기 반려견의 생존 확률이 높을 것으로 판단하고, 상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값보다 높은 경우 상기 반려견의 생존 확률이 낮을 것으로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0045] 이때 상기 설정된 컷-오프(cut-off) 값은 1,247.5 ug/L일 수 있다.

[0046] 보다 구체적으로, 상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값인 1,247.5 ug/L 보다 낮은 경우, 상기 반려견의 상기 생존 확률은 80% 이상일 것으로 예측할 수 있고, 상기 측정된 cfDNA 수준이 컷-오프(cut-off) 값인 1,247.5 ug/L 보다 높은 경우, 상기 반려견의 상기 생존 확률은 30% 미만일 것으로 예측할 수 있다.

[0047] 또한 cfDNA 수준 측정을 통해 예후를 예측할 수 있는 상기 종양 질환은, 이에 제한되지는 않으나, 간세포암, 이소성 갑상선암, 폐선암, 유선암, 세포 갑상선암, 편평세포암, 신장세포암, 이행상피암, 장 선암, 림프종, 백혈병, 혈관육종, 간질육종, 구강평활근 육종, 위장기질종양(GIST), 다엽성 뼈종양, 비만세포종양, 갈색 세포종 및 말초 신경초 종양으로 이루어진 군 중에서 선택된 것일 수 있다.

[0048]

[0049] 이하, 본 발명의 구성요소와 기술적 특징을 다음의 실시예들을 통하여 보다 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

## [0051] <실험재료 및 방법>

### [0052] 1. 실험설계

[0053] 하기 실시예의 실험은 경상 동물 의료원을 방문한 개를 대상으로 무작위 시험관 내 실험을 수행한 것으로, 모든 개의 혈장 cfDNA 농도를 측정하고 질병 분류에 따라 임상 데이터를 분석하였으며, 경상대학교(GNU)의 기관동물 관리위원회 (IACUC)의 승인 하에 실험을 수행하였다.

### [0055] <1> 케이스 선택

[0056] 본 실험은 2019년부터 2020년까지 경상 동물 의료원을 방문한 120 마리의 동물을 무작위로 선별하여 채취한 혈액 샘플을 사용하여 분석하였고, 대조군 샘플은 전주와 광주에 있는 지역 병원에서 수득한 것을 사용하였다. 반려견의 품종, 성별 및 나이는 모두 다양했고, 진단서에 종양 질환군, 비종양성 질환군 및 정상군(건강한 반려견군)으로 분류하였다. 또한 모든 개의 임상데이터와 의료기록을 수집하고 이를 함께 평가하였다. 샘플에 대한 데이터에는 개의 연령, 성별, 품종, 전혈검사 (CBC; complete blood count), 혈청 생화학, 정맥혈 가스 분석 및 진단 영상 결과, 기저 질환진행 및 임상결과가 포함되어 있으며, 이러한 데이터는 생존 퇴원 vs 죽거나 안락사된 것으로 정의하였다.

### [0058] <1-1> 건강한 군

[0059] 건강한 견주 소유의 개는 기저 질병에 걸린 개와의 비교를 위한 대조군으로 사용하였다. 혈액 샘플은 전주와 광주 지역의 동물병원에 전달된 임상적으로 정상적인 고객 소유의 개 35 마리로부터 채취하여 수득하였다. 또한 현재 질병의 이력, 정기 임상검사에서 발견된 이상소견 또는 전혈(CBC), 혈청 생화학 또는 소변 분석에서 이상증상이 있는 반려견들은 제외시켰다.

### [0061] <1-2> 비종양성 질환군(기저 질환이 있는 군)

[0062] 비종양군에는 임상 증상을 보이며 종양 이외의 기저 질환으로 진단된 모든 반려견을 포함하도록 하였다. 모든 비종양성 군은 물리적 테스트, 실험실 테스트 및 진단영상 분석을 수행하였다. 비종양성군의 의료 기록은 진료



기록, 병력, 신체 검사, 임상 징후, 일상적인 혈액 분석, 완전 소변검사 및 진단영상을 포함하도록 하였다.

[0063] 이러한 선별 검사를 바탕으로 정확한 진단을 위해 추가 검사를 통한 여러 사례를 평가하였다. 심내막염(Endocarditis)은 1시간 간격으로 정맥 천자를 통해 최소 3개의 다른 부위에서 동일한 원인균을 배양했을 때, 심초음파 및 혈액 배양을 통해 추가로 진단하였다. *Mycoplasma haemocanis* 및 *Babesia canis*와 같은 혈액 기생충은 중합효소연쇄반응(PCR)의 분석을 통해 진단하였다. 면역 매개 용혈성 빈혈(IMHA; immune-mediated hemolytic anemia)이 있는 모든 개는 식염수 응집 검사와 혈액 필름 검사를 통해 용혈을 기반으로 확인하였다. 개의 부신피질 과다증(HAC; Hyperadrenocorticism)은 저용량 텍사메타손 억제 검사(LDDST)에 근거하여 뇌하수체 의존성 부신피질 과다증(PDH) 또는 부신종양(AT)으로 진단하였다. 외인성 스테로이드 치료 이력이 있는 개는 치료 중단 후 최소 2주 후에 검사를 받았다. 췌장염은 SNAP 키트를 이용한 개 췌장리파제(cPL) 검사(Canine SNAP® cPLTM; IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA)를 사용한 검사, 혈액 검사 및 약물 또는 음식 이력을 포함하여 복통, 구토, 설사, 발열, 복부 초음파와 같은 임상 징후를 기반으로 종합적으로 진단하였다. 급성 췌장염의 경우, 개 췌장 특이적 리파아제(Spec cPL; 개 사양 cPL® 테스트, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA)를 통해 치료에 대한 반응을 모니터링하였다. 림프관 확장증(Lymphangiectasia)과 혈관 확장증(vascular ectasia)은 생검 샘플의 육안 병변과 조직 병리에 근거하여 위장 내시경을 통해 확인하였다. 피부 석회증(calcosinosis cutis)이 있는 개는 포피 주위에 병변이 있는 것으로 확인하였고, 확실한 진단은 병변의 피부 생검을 기반으로 확인하였다. 마지막으로 컴퓨터 단층 촬영(CT) 스캔(Canon Aquilion Lightning 160; Canon Medical Systems Corporation, Otawara, Japan)을 기반으로 기관지 연화증과 죽상 동맥 경화증을 진단하였다.

#### [0065] <1-3> 종양 질환군

[0066] 종양 질환군의 종양 유형은 다양했지만 악성 종양이 발병한 개 38 마리로 구성된 단일 종양군에 대한 분석을 진행하였는데, 모든 진단은 병력, 임상 징후, 혈액 검사, 진단 영상 및 미세바늘흡인(FNA; fine needle aspiration)을 통한 세포 검사를 기반으로 수행하였다. 조직병리학적으로 생검 또는 수술적 절제를 통해 확실한 진단을 내렸다. 반려견의 종양이 수술적 절제 또는 생검이 어려운 부위에 있는 경우에는 이전 진단 방법을 종합적으로 평가하여 진단을 내렸다. 전산화 단층 촬영, 복부 초음파 및 혈액 검사를 포함하여 세계보건기구 병기 결정 시스템(OwenLN, 1980)에 따라 종양 유형에 따른 악성 종양의 병기를 진단하였다. 개 림프종의 임상적 병기 결정(OwenLN, 1980)은 표면 림프절, 간 및 비장 침범에 대한 임상 검사 및 미세바늘흡인 분석을 기반으로 하였다. 골수 흡인을 사용하여 말기 침윤을 평가하였다. 모든 말초 마디 및 기타 종양 덩어리는 2차원으로, 가능하면 3차원으로 측정하였다. 관찰 시간은 진단 직후 계산하였다. cfDNA 수준이 질병 진행과 관련이 있는지 확인하기 위해 시간이 지남에 따라 악성 종양이 있는 10 마리의 개로부터 혈액을 반복적으로 채취하였다. 내과 기록, 품고, 성별, 병력, 신체 검사, 임상 징후, 일상적인 혈액 분석 및 진단 영상을 포함한 종양 집단의 의료 기록을 검토하였다. 방사선 치료는 양산의 S 동물병원에서 시행하였고 Elekta Synergy® (Elekta, Stockholm, Sweden)를 사용하였다. 모든 방사선 치료 프로토콜은 각 반려견에 대해 개별적으로 적용되도록 하였다.

#### [0068] <2> 혈액 샘플 수집 및 처리

[0069] 임상적으로 정상인 개와 병에 걸린 개의 모든 샘플들은 경정맥 천자를 통해 수집하였고 EDTA 튜브 또는 리튬 헤파린 튜브 또는 혈청 분리 튜브에 보관하였다. EDTA 혈액 샘플은 자동 혈액 분석기를 사용하여 분석하였다. 헤파린화 된 혈장 또는 혈청은 샘플 수집 후 30 분 이내에 2,000×g에서 5 분 동안 원심 분리하여 말초 혈액에서 분리하였다. 혈장 또는 혈청의 상등액을 플라스틱 저온 튜브로 옮겼다. 지역 동물병원의 샘플은 드라이아이스로 보관하여 GNU로 이송되었다. 모든 샘플은 DNA 분석 전에 초저온 냉동고에서 -80° C의 온도로 냉동된 상태로 보관하였다. 헤파린화된 혈장 또는 혈청 샘플을 실온(RT)에서 해동하고 분석 직전에 원심 분리를 수행하였다. 종양질환 개에서 여러 차례 채취한 혈액 샘플은 화학 요법이 투여되기 전에 샘플링하였다.

#### [0071] 2. 임상데이터의 비교분석

[0072] 의료 기록에서 수집된 데이터에는 품종, 나이, 성별, 체중, 이력, 임상 징후, 신체 검사 결과, 전체 혈구수 및 혈청 생화학을 포함한 모든 임상 병리학적 데이터의 평가 자료가 포함되도록 하였다.

[0074] <2-1> 임상병리학적 매개변수

[0075] 120 마리 개의 임상 상태는 혈액학적 분석, 산-염기 균형, 전해질 농도, 혈청 생화학적 분석 및 소변 분석을 ProCytex 완전 혈구수 카운트(IDEXX, Westbrook, ME, USA), 혈액 가스 분석기(Nova pHOX analyzer, Nova Biomedical, Waltham, MA, USA)를 이용하여 수행하였고, 혈액요소질소(BUN), 크레아티닌, 인, 포도당, 총 단백 질, 알부민, 글로불린, 총 빌리루빈, ALKP, 알라닌 아미노전이효소(ALT), GGT, 콜레스테롤, 아밀라아제, 리파아 제의 분석을 위해 Catalyst Dx 화학분석기(IDEXX, Westbrook, ME, USA) 및 소변 분석기(IDEXX, Westbrook, ME, USA)로 분석하였다.

[0077] <2-2> 결절 림프종(nodal lymphoma)에 대한 평가 기준

[0078] 다중심성 림프종(Multicentric lymphoma) 견에서 표재성 림프절의 길이는 기존 합의 기준(Vail et al., 2010) 에 근거하여 림프절의 가장 긴 지름에 비해 지름이 20mm 이상인 림프절의 총합으로 평가하였다. 다중심성 림프 종에 있는 개의 림프절 직경은 화학요법 직전에 각 신체 검사 중에 측정되었다. 평가자는 두 명의 수의사를 포 함하도록 하였다. 결과는 기존 합의 기준에 따라 각 평가자의 림프절 직경(LD) 값의 합의 차이가 20% 미만일 때 기록하도록 하였다.

[0080] <2-3> 화학요법 반응평가 기준

[0081] 치료 및 재발 기준에 대한 반응은 신체 검사 및 추가 검사를 기반으로 당업계에 알려진 림프종((Vail et al., 2010) 및 기타 고형 종양((Nguyen et al., 2015)에 따른 기준 설명에 따라 정의하였다. 병변 반응은 모든 내방 시 평가하였다.

[0082] 결절 림프종의 치료 반응 평가에서 표적 병변은 기준선에서 LD가 20mm 이상인 말초 림프절(PLN)을 측정하도록 하였다. 표적 병변은 크기(LD가 있는 PLN) 및 정확한 반복 측정에 대한 적합성(즉, 영상기술 없이 임상적으로) 을 기준으로 선택하였다. LD는 각 표적 병변에 대해 측정하였다. 모든 표적 병변에 대한 LD의 합계를 계산하고 기준선 합계 LD로 기록하였다. 다른 모든 병변은 비표적 병변으로 정의하여 병변의 길이를 기록하였다.

[0083] 고형 종양의 치료 반응 평가에서 표적 병변의 최소 크기는 다음과 같이 정의하였다.

[0084] i) 임상 검사: 캘리퍼 측정에 기반하고 디지털 사진을 근거로 한 10mm,

[0085] ii) CT 스캔, 자기공명영상(MRI): 10mm; 최대 슬라이스 두께 5mm,

[0086] iii) 흉부 방사선 사진: 20 mm, 및

[0087] iv) LN : 짧은 중심축이 > 15mm

[0088] 다른 모든 병변은 측정 불가능한 것으로 간주하였다. 예컨대, 캘리퍼 측정에 기초한 병변이 <10 mm; 병리학 적 LN <15 mm 단축; 복수, 흉막 및 심낭 삼출; 신체 검사에 의해 발견된 기관 비대와 같은 조건일 시 측정 불가능 한 병변으로 정의하였다(Nguyen et al., 2015).

[0090] 3. cfDNA 분리 및 정량분석

[0091] 혈장 또는 혈청 샘플을 실온에서 10분 동안 해동한 다음, 모든 샘플을  $16,000 \times g$  및  $4^\circ C$ 에서 10 분 동안 원 심분리하여 무세포(cell-free) 혈장을 수득하였다. 원심분리 후 정제된 상층액만을 cfDNA 분석에 사용하였다. cfDNA는 제조업체의 사양에 따라 Qubit dsDNA HS Assay Kit 및 Qubit 1.0 형광계(Life Sciences, Carlsbad, CA, USA)로 정량화하였다. Qubit 분석은 dsDNA에 결합할 때 높은 강도를 갖는 형광염료를 사용하여 분석하는 것 이며, 측정된 형광염료의 양은 시료 내에 있는 dsDNA의 양에 비례한다. 1회 분석 당 사용되는 반응 부피는 10  $\mu L$ 의 혈장 또는 혈청시료를 포함하여 200  $\mu L$ 로 하였다. Qubit 1.0 (Life Science, Carlsbad, CA, USA) 내에 서 제조업체가 제공하는 희석 알고리즘을 사용하여 cfDNA의 농도를 계산하였다. Qubit 1.0은 각 분석 전에 지정 된 표준물질로 보정하였고, 모든 샘플은 2번씩 분석하였다.

[0093] **4. 통계처리**

[0094] 평균, 표준 편차 및 유의한 차이를 계산하였는데, cfDNA 데이터의 농도는 Shapiro-Wilk 테스트에서 정상적으로 분포되지 않았으므로 데이터는 정규화를 위해 역변환시켰다. 범주형 변수(예컨대: 질병 상태, 종양의 존재) 간의 비교는 Mann-Whitney U 테스트를 사용하여 수행하였고 종양 유형 간의 비교는 Kruskal-Wallis 테스트와 Dunnett T3 테스트를 통해 수행하였다. 생존 시간 예측을 위한 cfDNA의 진단 값은 ROC(receiver operating characteristic) 곡선을 사용하여 평가하였다. Kaplan-Meier 곡선 분석은 ROC에서 얻은 컷-오프 값으로 종양 그룹의 생존 시간을 결정하기 위해 생존 곡선을 분석하는데 사용하였다. Spearman의 상관 관계 테스트는 표재성 림프절의 함과 다중심성 림프종의 DNA 농도에 대한 상관성을 분석하는데 사용하였다. 연속적으로 모니터링되는 질병 진행이 있는 개체의 cfDNA 값과 혈액학적 매개변수 간의 상관관계는 선형 혼합 모델을 사용하여 분석하였다. cfDNA 농도와 모든 임상 병리학적 변수 사이의 연관성은 단계적 배제가 있는 다중 선형 회귀 모델을 개량하여 분석하였다.

[0095] 통계적 유의성은  $P < 0.05$  및  $P < 0.01$ 로 설정하였고, 통계 소프트웨어 패키지 SPSS(SPSS 25.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 모든 통계 평가를 수행하였다. 모든 그래프는 GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 사용하여 플롯하였고, 모든 결과는 평균  $\pm$  표준 편차(SD)로 표시하였다.

[0097] **<실시예 1>**

[0098] **개들의 분류와 특성**

[0099] 다양한 품종, 체중 및 연령의 총 120 마리의 개를 연구에 사용하였다. 이 동물들은 기저 질환의 유무에 따라 85 마리의 질병군 및 35 마리의 건강한 대조군으로 분류하였다. 질병군은 종양성 질환의 유무에 따라 다시 38 마리는 종양 질환군으로 47 마리는 비종양 질환군으로 분류하였다.

[0100] 총 85 마리에 대하여 전혈구 수, 혈액가스 분석, 생화학 분석 및 진단 영상을 포함한 임상 데이터를 분석하였고, 35 마리의 건강한 대조군에 대해서는 임상 기록, 전혈구 수 및 생화학 방법에 따라 분석하였다. 혈액 가스 및 전해질 분석은 동물의 운송 및 운송 중에 혈액 가스 및 전해질 변화가 발생할 수 있기 때문에 부분적으로 분석을 수행하였다.

[0101] 구체적으로 본 실험에 사용된 반려견들의 분류와 특징을 설명하면 다음과 같다.

[0102] 건강한 개 35 마리는 수컷 21 마리(중성화 하지 않은 수컷 4 마리)와 암컷 14 마리(중성화 하지 않은 암컷 4 마리)가 포함되며, 평균 연령은 5.4세(범위 : 1-19 세)이다. 비종양성 질환이 있는 47 마리의 개는 수컷 26 마리(온전한 4 마리)와 암컷 21 마리(온전한 9 마리)이며, 평균 연령은 9.5세(범위 : 1-17 세)이다. 38마리의 종양성 질환이 있는 개는 평균 연령 11 세(범위 : 3-20 세)이며, 11 마리의 수컷과 27 마리의 암컷(온전한 4마리)을 포함한다. 종양성 질환 및 비종양성 질환의 개의 연령은 건강한 대조군보다 유의하게 높았다(종양성 질환군은 평균 11세, 비종양성 질환군 9.5세, 건강한 군은 5.4세, 각각  $P < 0.01$  및  $P < 0.05$ ). 종양의 기원에 따른 가장 흔한 악성 종양 유형은 암종( $n=15$ ; 간세포암 3 마리, 이소성 갑상선암 3 마리, 폐선암 2 마리, 유선암 2 마리, C-세포 갑상선암 1 마리, 편평세포암 1 마리, 신장세포암 1 마리, 이행상피암 1 마리, 장 선암 1 마리)인 것으로 나타났고, 그 다음으로 림프종 또는 백혈병( $n = 13$ ), 육종 ( $n = 5$ , 혈관육종 1 마리, , 간질육종 1 마리, 구강평활근 육종 1 마리, 위장기질종양(GIST) 1마리 및 다엽성 뼈종양 1 마리), 비만세포종양( $n = 2$ ), 및 갈색 세포종 및 말초 신경초 종양 각각 1 마리의 순으로 나타났다. 상기와 같이 분류된 각 실험군에 대한 특성 확인은 하기 표 1(본 발명의 실험에 사용된 건강한 군, 비종양성 기저질환군 및 종양질환 군에 대한 특성 확인)에 정리하여 나타내었다.

[0104] [ 표 1 ]

|               | No. | Breed             | Age (years) | Sex | Diagnosis |
|---------------|-----|-------------------|-------------|-----|-----------|
| Healthy group | 1   | Beagle            | 4           | NM  |           |
|               | 2   | Beagle            | 5           | NM  |           |
|               | 3   | Beagle            | 4           | NM  |           |
|               | 4   | Beagle            | 5           | NM  |           |
|               | 5   | Beagle            | 6           | NM  |           |
|               | 6   | Maltese           | 4           | NM  |           |
|               | 7   | Maltese           | 13          | FS  |           |
|               | 8   | Chihuahua         | 2           | NM  |           |
|               | 9   | Chihuahua         | 7           | F   |           |
|               | 10  | Chihuahua         | 2           | F   |           |
|               | 11  | Boston terrier    | 4           | F   |           |
|               | 12  | Pomptitz          | 3           | FS  |           |
|               | 13  | Yorkshire terrier | 16          | NM  |           |
|               | 14  | Poodle            | 7           | FS  |           |
|               | 15  | Poodle            | 5           | M   |           |
|               | 16  | Maltese           | 7           | FS  |           |
|               | 17  | Poodle            | 6           | FS  |           |
|               | 18  | Poodle            | 4           | NM  |           |
|               | 19  | Maltese           | 2           | FS  |           |
|               | 20  | Shih-Tzu          | 5           | NM  |           |
|               | 21  | Maltese           | 10          | FS  |           |
|               | 22  | Maltese           | 9           | FS  |           |
|               | 23  | Maltese           | 19          | NM  |           |
|               | 24  | French Bulldog    | 7           | NM  |           |
|               | 25  | Chihuahua         | 1           | M   |           |

[0105]

|                               | No. | Breed               | Age (years) | Sex | Diagnosis                                   |
|-------------------------------|-----|---------------------|-------------|-----|---------------------------------------------|
| Healthy group                 | 26  | Bichon Frise        | 3           | FS  |                                             |
|                               | 27  | Welsh Corgi         | 4           | NM  |                                             |
|                               | 28  | Poodle              | 4           | M   |                                             |
|                               | 29  | Pomeranian          | 4           | F   |                                             |
|                               | 30  | Bichon Frise        | 1           | M   |                                             |
|                               | 31  | Shih-Tzu            | 3           | FS  |                                             |
|                               | 32  | Poodle              | 3           | NM  |                                             |
|                               | 33  | Maltese             | 5           | NM  |                                             |
|                               | 34  | Poodle              | 4           | NM  |                                             |
|                               | 35  | Pomeranian          | 2           | NM  |                                             |
| Mean ± SD                     |     |                     | 5.4 ± 3.4   |     |                                             |
| Non-neoplastic diseased group | 1   | Maltese             | 4           | NM  | Fever of unknown origin (FUO)               |
|                               | 2   | Maltese             | 9           | FS  | Endocarditis                                |
|                               | 3   | Yorkshire Terrier   | 8           | F   | Perineal hernia                             |
|                               | 4   | Samoyed             | 7           | NM  | Chronic liver disease                       |
|                               | 5   | Maltese             | 8           | M   | IMHA, Mycoplasma                            |
|                               | 6   | Old English Bulldog | 6           | NM  | Parotid gland sialadenitis                  |
|                               | 7   | Maltese             | 11          | FS  | IMHA                                        |
|                               | 8   | Maltese             | 8           | NM  | HAC                                         |
|                               | 9   | Dachshund           | 1           | NM  | GI granulomatous inflammation               |
|                               | 10  | Cocker Spaniel      | 9           | NM  | Splenitis                                   |
|                               | 11  | Maltese             | 10          | NM  | Myxomatous mitral valve degeneration (MMVD) |
|                               | 12  | Maltese             | 13          | NM  | HAC                                         |
|                               | 13  | German Shepherd     | 4           | NM  | Foreign body ingestion, SIRS                |
|                               | 14  | Maltese             | 13          | FS  | MMVD                                        |
|                               | 15  | Maltese             | 5           | F   | Chronic hepatopathy                         |
|                               | 16  | Maltese             | 4           | F   | Mucometra                                   |

[0107]

|                               | No. | Breed             | Age (years) | Sex | Diagnosis                                                   |
|-------------------------------|-----|-------------------|-------------|-----|-------------------------------------------------------------|
| Non-neoplastic diseased group | 17  | Yorkshire Terrier | 15          | FS  | HAC                                                         |
|                               | 18  | Maltese           | 8           | NM  | Neurological problem                                        |
|                               | 19  | Maltese           | 8           | NM  | Chronic kidney disease (CKD), pancreatitis                  |
|                               | 20  | Maltese           | 12          | NM  | Hyperlipidemia                                              |
|                               | 21  | Maltese           | 5           | NM  | Erythroid hypoplasia                                        |
|                               | 22  | Bichon Frise      | 9           | F   | Lymphangiectasia                                            |
|                               | 23  | Mixed             | 16          | FS  | Sialoceles, tracheal collapse                               |
|                               | 24  | Mixed             | 11          | FS  | MMVD                                                        |
|                               | 25  | Poodle            | 15          | F   | Meningoencephalitis of unknown etiology (MUE)               |
|                               | 26  | Maltese           | 9           | FS  | Atypical Cushing's syndrome                                 |
|                               | 27  | Maltese           | 11          | NM  | Calcinosis cutis                                            |
|                               | 28  | Maltese           | 13          | FS  | MMVD                                                        |
|                               | 29  | Pomptitz          | 4           | NM  | Babesiosis                                                  |
|                               | 30  | Maltese           | 11          | NM  | Cholelithiasis, cholecystitis                               |
|                               | 31  | Yorkshire Terrier | 8           | F   | Tracheal hypoplasia                                         |
|                               | 32  | Dachshund         | 10          | NM  | Vascular ectasia                                            |
|                               | 33  | Maltese           | 12          | NM  | HAC                                                         |
|                               | 34  | Pomeranian        | 11          | F   | CKD                                                         |
|                               | 35  | Maltese           | 8           | M   | MMVD                                                        |
|                               | 36  | Schnauzer         | 17          | FS  | Atherosclerosis, hypertriglyceridemia                       |
|                               | 37  | Border Collie     | 7           | M   | Leukocytosis, fever                                         |
|                               | 38  | Chihuahua         | 11          | NM  | MMVD                                                        |
|                               | 39  | Pekingese         | 15          | FS  | Immune-mediated thrombocytopenia (ITP)                      |
|                               | 40  | Yorkshire Terrier | 12          | FS  | Protein-losing enteropathy, pancreatitis, tracheal collapse |
|                               | 41  | Poodle            | 9           | F   | Sebaceous adenitis                                          |

[0109]

|                               | No. | Breed             | Age (years) | Sex | Diagnosis                              |
|-------------------------------|-----|-------------------|-------------|-----|----------------------------------------|
| Non-neoplastic diseased group | 42  | Spitz             | 12          | NM  | Diabetes Mellitus, IMHA                |
|                               | 43  | Shih-Tzu          | 16          | FS  | Bronchomalacia                         |
|                               | 44  | Maltese           | 3           | NM  | MUE                                    |
|                               | 45  | Maltese           | 11          | NM  | MMVD                                   |
|                               | 46  | Pekingese         | 12          | F   | ovarian mass, MMVD                     |
|                               | 47  | Saparee           | 6           | M   | Prostatic cyst                         |
| Mean ± SD                     |     |                   | 9.5 ± 2.7   |     |                                        |
| Neoplastic group              | 1   | Maltese           | 12          | FS  | Mammary carcinoma                      |
|                               | 2   | Maltese           | 13          | F   | Hepatocellular carcinoma               |
|                               | 3   | Maltese           | 13          | FS  | Histiocytic sarcoma                    |
|                               | 4   | Pug               | 9           | FS  | Mast cell tumor                        |
|                               | 5   | Maltese           | 9           | FS  | Pheochromocytoma                       |
|                               | 6   | Maltese           | 10          | NM  | C-cell thyroid carcinoma               |
|                               | 7   | Dachshund         | 10          | FS  | multicentric lymphoma                  |
|                               | 8   | Mini pinscher     | 20          | NM  | salivary gland squamous cell carcinoma |
|                               | 9   | Pomeranian        | 3           | NM  | Acute Lymphocytic leukemia             |
|                               | 10  | Yorkshire Terrier | 13          | FS  | Splenic lymphoma                       |
|                               | 11  | Shih-Tzu          | 11          | FS  | Hepatocellular carcinoma               |
|                               | 12  | Poodle            | 11          | NM  | Mast cell tumor                        |
|                               | 13  | Coton de Tulear   | 8           | FS  | Multicentric T-cell lymphoma           |
|                               | 14  | Golden Retriever  | 12          | F   | Ectopic thyroid tumor                  |
|                               | 15  | Samoyed           | 11          | NM  | Ectopic thyroid tumor                  |
|                               | 16  | Dogo Canario      | 8           | FS  | Multicentric lymphoma                  |
|                               | 17  | Maltese           | 9           | NM  | Gastrointestinal stromal tumor         |
|                               | 18  | Mixed             | 13          | FS  | Peripheral nerve sheath tumor          |
|                               | 19  | Shih-Tzu          | 6           | NM  | Multicentric lymphoma                  |

|                  | No. | Breed            | Age (years) | Sex | Diagnosis                                     |
|------------------|-----|------------------|-------------|-----|-----------------------------------------------|
| Neoplastic group | 20  | Maltese          | 14          | FS  | Hepatic tumor suspected                       |
|                  | 21  | Poodle           | 14          | NM  | Oral leiomyosarcoma                           |
|                  | 22  | Maltese          | 10          | FS  | Renal cell carcinoma                          |
|                  | 23  | Poodle           | 5           | FS  | Aberrant multicentric lymphoma                |
|                  | 24  | Mixed            | 14          | FS  | Retroperitoneal hemangiosarcoma               |
|                  | 25  | Golden Retriever | 14          | FS  | Chronic lymphocytic leukemia                  |
|                  | 26  | Shih-Tzu         | 10          | FS  | Transitional cell carcinoma                   |
|                  | 27  | Maltese          | 12          | FS  | Ectopic thyroid carcinoma                     |
|                  | 28  | Maltese          | 9           | FS  | Acute lymphocytic leukemia                    |
|                  | 29  | Mixed            | 7           | FS  | Intestinal lymphoma                           |
|                  | 30  | Siberian Husky   | 9           | F   | Multilobular osteochondroma                   |
|                  | 31  | Mixed            | 13          | FS  | High grade primary lung adenocarcinoma        |
|                  | 32  | Mixed            | 16          | FS  | Multicentric lymphoma                         |
|                  | 33  | Poodle           | 12          | F   | Inflammatory mammary carcinoma                |
|                  | 34  | Mixed            | 9           | FS  | Non-epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma |
|                  | 35  | Japanese Chin    | 12          | NM  | Hemangiosarcoma                               |
|                  | 36  | Mixed            | 14          | NM  | Intestinal adenocarcinoma                     |
|                  | 37  | Maltese          | 14          | FS  | Intestinal lymphoma                           |
|                  | 38  | Pomeranian       | 9           | NM  | Low grade primary lung adenocarcinoma         |
| Mean ± SD        |     |                  | 11 ± 3.0    |     |                                               |

F, female; FS, female spayed; M, male; NM, neutered male

## <실시예 2>

### 임상데이터의 비교결과

혈액학, 생화학 및 전해질 매개변수를 포함하여 상기 실시예 1의 각 실험군에 대한 임상 데이터를 분석하였다. 임상 병리학적 데이터의 비교를 위해 종양 유무에 따라 실험동물군을 세분화 하였고, 종양질환 군 및 건강한 군 간에는 유의한 차이가 확인되었고, 120 마리 모두의 혈액학적 데이터를 분석하였다.



표 2

| Variables                        | Healthy             | Non-neoplastic diseased | Neoplastic            |
|----------------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|
| RBC ( $\times 10^{12}/L$ )       | 7.96 $\pm$ 0.90     | 5.84 $\pm$ 1.62**       | 5.72 $\pm$ 1.46**     |
| Hematocrit (%)                   | 52.72 $\pm$ 5.31    | 38.36 $\pm$ 11.19**     | 36.45 $\pm$ 9.68**    |
| Fibrinogen (mg/dL)               | 405.74 $\pm$ 166.70 | 490.96 $\pm$ 172.68     | 462.28 $\pm$ 209.69   |
| Hemoglobin (g/dL)                | 18.13 $\pm$ 1.66    | 13.18 $\pm$ 3.73**      | 12.50 $\pm$ 3.33**    |
| MCV (fL)                         | 66.31 $\pm$ 2.45    | 65.15 $\pm$ 5.55        | 63.58 $\pm$ 6.05*     |
| MCHC (g/dL)                      | 33.25 $\pm$ 3.71    | 34.40 $\pm$ 2.55        | 34.23 $\pm$ 1.31      |
| Reticulocyte ( $\times 10^3/L$ ) | 80.60 $\pm$ 31.45   | 73.07 $\pm$ 74.80*      | 77.18 $\pm$ 86.27     |
| WBC ( $\times 10^9/L$ )          | 9.91 $\pm$ 2.27     | 15.35 $\pm$ 10.55*      | 22.18 $\pm$ 24.57*    |
| Neutrophil ( $\times 10^9/L$ )   | 6.32 $\pm$ 1.71     | 11.54 $\pm$ 8.29**      | 12.50 $\pm$ 8.95**    |
| Lymphocyte ( $\times 10^9/L$ )   | 2.50 $\pm$ 0.78     | 2.60 $\pm$ 2.86         | 6.49 $\pm$ 16.23      |
| Monocyte ( $\times 10^9/L$ )     | 0.64 $\pm$ 0.34     | 0.84 $\pm$ 0.81         | 2.77 $\pm$ 5.60       |
| Eosinophil ( $\times 10^9/L$ )   | 0.41 $\pm$ 0.24     | 0.30 $\pm$ 0.34*        | 0.35 $\pm$ 0.30       |
| Platelet ( $\times 10^9/L$ )     | 353.48 $\pm$ 128.75 | 436.29 $\pm$ 202.43     | 366.23 $\pm$ 219.52   |
| Glucose (mg/dL)                  | 91.90 $\pm$ 24.17   | 116.17 $\pm$ 82.78      | 100.68 $\pm$ 42.81    |
| Creatinine (mg/dL)               | 0.82 $\pm$ 0.18     | 0.88 $\pm$ 0.99*        | 0.85 $\pm$ 0.44       |
| BUN (mg/dL)                      | 16.81 $\pm$ 4.19    | 23.86 $\pm$ 27.46       | 22.83 $\pm$ 21.69     |
| Phosphorus (mg/dL)               | 3.71 $\pm$ 0.88     | 4.94 $\pm$ 3.14         | 3.93 $\pm$ 0.95       |
| Total Ca (mg/dL)                 | 9.53 $\pm$ 0.89     | 9.58 $\pm$ 0.98         | 9.31 $\pm$ 1.54       |
| Total protein (g/dL)             | 6.92 $\pm$ 0.50     | 6.77 $\pm$ 1.00         | 6.75 $\pm$ 1.03       |
| Albumin (g/dL)                   | 3.40 $\pm$ 0.32     | 3.01 $\pm$ 0.48**       | 2.94 $\pm$ 0.51**     |
| Globulin (g/dL)                  | 3.50 $\pm$ 0.45     | 3.77 $\pm$ 0.77         | 3.77 $\pm$ 0.85       |
| ALT (U/L)                        | 93.78 $\pm$ 57.68   | 216.68 $\pm$ 378.29     | 139.81 $\pm$ 170.70   |
| ALKP (U/L)                       | 92.34 $\pm$ 119.31  | 738.70 $\pm$ 1370.21**  | 555.15 $\pm$ 798.71** |
| GGT (U/L)                        | 1.13 $\pm$ 3.24     | 33.97 $\pm$ 72.35**     | 10.65 $\pm$ 15.64**   |
| Total bilirubin (mg/dL)          | 0.28 $\pm$ 0.16     | 0.45 $\pm$ 0.93         | 0.80 $\pm$ 2.51       |
| Cholesterol (mg/dL)              | 189.57 $\pm$ 45.24  | 225.69 $\pm$ 85.39      | 188.42 $\pm$ 69.44    |
| Amylase (U/L)                    | 606.40 $\pm$ 187.96 | 770.44 $\pm$ 300.54*    | 888.96 $\pm$ 446.48** |
| Lipase (U/L)                     | 735.71 $\pm$ 296.10 | 1006.76 $\pm$ 1092.59   | 758.65 $\pm$ 820.52   |
| pH                               | 7.37 $\pm$ 0.04     | 7.39 $\pm$ 0.06         | 7.41 $\pm$ 0.03       |
| Na (mmol/L)                      | 148.30 $\pm$ 2.65   | 144.99 $\pm$ 5.69**     | 146.14 $\pm$ 3.50*    |
| K (mmol/L)                       | 4.71 $\pm$ 0.49     | 4.21 $\pm$ 0.62**       | 4.18 $\pm$ 0.50**     |
| Cl (mmol/L)                      | 113.79 $\pm$ 3.31   | 113.16 $\pm$ 5.93       | 113.69 $\pm$ 3.60     |
| iCa (mmol/L)                     | 1.21 $\pm$ 0.07     | 1.26 $\pm$ 0.09*        | 1.27 $\pm$ 0.06*      |
| iMg (mmol/L)                     | 0.49 $\pm$ 0.03     | 0.47 $\pm$ 0.08         | 0.48 $\pm$ 0.11       |
| Lactate (mmol/L)                 | 2.74 $\pm$ 0.71     | 2.14 $\pm$ 1.20         | 1.7 $\pm$ 1.15**      |
| HCO <sub>3</sub> (mmol/L)        | 24.03 $\pm$ 2.59    | 21.17 $\pm$ 4.04*       | 22.07 $\pm$ 4.01*     |

[0120]

[0121] 건강한 군, 비종양성 질환군 및 종양 질환군의 임상 데이터에 대한 평균 변수

[0122] 데이터는 평균  $\pm$  SD로 표시하였고, Kruskal-Wallis 테스트, P < 0.05; Mann-Whitney U 테스트, \*는 P < 0.05를 나타내고 \*\*는 P < 0.01을 나타낸 것이다.

[0123] BUN: 혈액 요소 질소, iCa: 이온화 칼슘, iMg: 이온화된 마그네슘, HCO<sub>3</sub>: 중탄산염을 나타낸 것이다.

[0125] 혈액학적 분석 결과는 상기 표 2에 나타내었는데, 분석결과에 의하면 종양질환 군 및 비종양성 질환군 모두 평균 호중구 수(종양 질환군, 12.50  $\pm$  8.95  $\times 10^9/L$ , 비종양성 군, 11.54  $\pm$  8.29  $\times 10^9/L$ )가 유의하게 높은 것으로 나타났고(P < 0.01), 적혈구, 적혈구 용적을 및 헤모글로빈 농도의 수준은 건강한 군에 비해 유의적으로 낮은 것(종양 질환군: 5.72  $\pm$  1.46  $\times 10^{12}/L$ , 36.45  $\pm$  9.68 %, 12.50  $\pm$  3.33 g/dL 각각, 비종양성 질환군: 5.84  $\pm$  1.62  $\times 10^{12}/L$ , 38.36  $\pm$  11.19 %, 13.18  $\pm$  3.73 g/dL 각각) 으로 나타났다(도 1A 및 1B). 또한, 종양 질환군(63.58  $\pm$  6.05 fL)은 건강한 군(66.31  $\pm$  2.45 fL)에 비해 감소된 MCV를 나타내었고, 반면 비종양성 질환군(73.07  $\pm$  74.80  $\times 10^3/L$ , 0.30  $\pm$  0.34  $\times 10^9/L$ , 각각)은 건강한 군(80.60  $\pm$  31.45  $\times 10^3/L$  및 0.41



$\pm 0.24 \times 10^9/L$ , 각각)에 비해 망상 적혈구 및 호산구 수가 감소된 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ).

[0127] 또한, ALKP, GGT 및 아밀라아제 수치는 종양 질환군 및 비종양성 질환군(종양 질환군:  $555.15 \pm 798.71$  U/L,  $10.65 \pm 15.64$  U/L 및  $888.96 \pm 446.48$  U/L, 각각, 비종양성 질환군:  $738.70 \pm 1370.21$  U/L,  $33.97 \pm 72.35$  U/L 및  $770.44 \pm 300.54$  U/L, 각각) 모두에서 건강한 군( $92.34 \pm 119.31$  U/L,  $1.13 \pm 3.24$  U/L,  $606.40 \pm 187.96$  U/L, 각각)에 비해 유의하게 증가한 것으로 나타났다(도 1A 및 1C). 또한, 비종양성 질환군( $0.88 \pm 0.99$  mg/dL)의 크레아티닌 수치는 건강한 군( $0.82 \pm 0.18$  mg/dL)에 비해 유의하게 증가한 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 그러나 알부민 수치는 건강한 군( $3.40 \pm 0.32$ g)에 비해 종양 질환군 및 비종양성 질환군( $2.94 \pm 0.51$  g/dL 및  $3.01 \pm 0.48$  g/dL, 각각)에서 유의하게 감소한 것으로 나타났다( $P < 0.01$ ).(도 1A).

[0129] 또한, 전해질 및 혈액 가스 분석 결과, 종양 질환군과 비종양성 질환군 모두 나트륨, 칼륨 및 중탄산염 농도가 건강한 군에 비해 감소한 것으로 나타났다(종양 질환군:  $146.14 \pm 3.50$  mmol/L,  $4.18 \pm 0.50$  mmol/L 및  $22.07 \pm 4.01$  mmol/L, 각각, 비종양성 질환군:  $144.99 \pm 5.69$  mmol/L,  $4.21 \pm 0.62$  mmol/L,  $21.17 \pm 4.04$  mmol/L, 각각, 건강한 군:  $148.30 \pm 2.65$  mmol/L,  $4.71 \pm 0.49$  mmol/L 및  $24.03 \pm 2.59$  mmol/L, 각각)( $P < 0.05$ ). 그러나 이온화된 칼슘 농도는 건강한 군( $1.21 \pm 0.07$  mmol/L)보다 종양 및 비종양성 질환군( $1.27 \pm 0.06$  mmol/L 및  $1.26 \pm 0.09$  mmol/L, 각각)에서 유의하게 증가한 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 종양 질환군에서 젖산 농도가 낮다는 점을 제외하고는 종양 질환군 및 비종양성 질환군 간의 다른 전해질의 차이는 관찰되지 않았다.

[0131] <실시예 3>

[0132] cfDNA 농도 비교결과

[0133] <3-1> 건강한 군 및 질병군에서의 cfDNA 분석

[0134] 건강한 개(건강한 군) 및 임상적으로 질환이 있는 개(질병군)에 대한 cfDNA 농도 분석 결과를 도 2A에 나타내었다. 구체적으로, 건강한 군에서의 cfDNA 평균 농도는  $877.8 \pm 181.7$   $\mu$ g/L인 것으로 확인되었다. 클리닉에서 진단 또는 치료를 받은 총 85 마리의 개를 임상학적으로 질환이 있는 군으로 분류하였다. 질환군에서의 cfDNA 평균 농도는  $1,333 \pm 478.3$   $\mu$ g/L인 것으로 나타났고, 이러한 결과는 건강한 군에서보다 그 농도가 유의하게 높은 것으로 확인되었다( $P < 0.001$ ).

[0135] 다음으로 임상적으로 질병이 있는 개들에 대해서는, 종양이 있는 군 및 종양이 없는 군으로 분류하였다. 종양 질환을 앓고 있는 개의 수는 38 마리였고, 47 마리는 다른 질병으로 진단받았다. 건강한 군, 비종양성 질환군 및 종양 질환군에서의 평균 cfDNA 농도는 각각  $877.8 \pm 181.7$   $\mu$ g/L,  $1,154.4 \pm 326.5$   $\mu$ g/L 및  $1,553.9 \pm 544.3$   $\mu$ g/L인 것으로 나타났다. 종양 질환군과 비종양성 질환군 간에는 cfDNA 농도에 상당한 차이가 있는 것으로 나타났고( $P < 0.001$ ), 종양 질환군 및 건강한 군 간에도 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다( $P < 0.001$ )(도 2B).

[0137] <3-2> 다양한 종양 유형에서의 cfDNA 농도 비교

[0138] 나아가 본 발명자들은 종양의 원인에 따른 다양한 종양 유형에서의 cfDNA 농도를 비교 분석하였다. 이를 위해 각각 림프종양( $n = 13$ ), 암종( $n = 15$ ), 육종( $n = 5$ ), 기타 종양( $n = 5$ )에서의 cfDNA 농도를 분석하였고, 또한 건강한 군과도 비교하였다.

[0140] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 종양 질환군에서의 혈장 DNA가 건강한 군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다( $P < 0.001$ ). 한편, cfDNA의 농도를 종양 기원에 따라 비교했을 때 림프종양이 가장 높은 농도로 존재하는 것으로 나타났다.

[0141] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 반려견에서 종양이 발생한 경우, 종양이 발생하지 않은 경우에 비해 혈액 내 cfDNA의 농도가 증가한다는 사실을 토대로, cfDNA의 농도 분석을 통해 반려견의 종양 발생 여부를 예측 또는 진

단할 수 있음을 알 수 있었다.

[0143] <실시예 4>

[0144] cfDNA 분석을 통한 종양이 있는 개의 예후 평가

[0145] cfDNA의 농도 변화가 질환에 대한 예후 평가에 있어서 중요한 지표로 사용될 수 있는지를 분석하기 위해, 38 마리의 종양 질환군에 대한 혈장 cfDNA를 관찰 기간 동안 분석하였다.

[0147] 그 결과, cfDNA 수준을 기반으로 ROC 곡선을 생성하였고 cfDNA 농도에 대한 컷-오프 값을 분석한 결과, 컷-오프 값이 1,247.5 µg/L인 것으로 나타났으며, 곡선아래면적(AUC)은 0.701 (95 % 신뢰 구간, 0.523-0.880; P <0.05), 86.7 % 민감도 및 52.2 % 특이도인 것으로 나타났다(도 4).

[0149] 대부분의 개는 cfDNA가 1,247.5 µg/L 이하인 군(14 마리)과 cfDNA가 1,247.5 µg/L 이상인 군(24 마리)의 두 그룹으로 나뉘었고, 컷-오프 값을 이용하여 생존 곡선을 분석한 결과, 컷-오프 값보다 낮은 개는 생존 확률이 82.1 %인 것으로 나타난 반면, 컷-오프 값보다 높은 개는 생존 확률이 26.5 %인 것으로 나타났다(도 5). 따라서 60주 동안 종양 질환군의 개에 대한 cfDNA의 농도를 모니터링한 결과, cfDNA의 농도 분석을 통해 종양 질환군에 대한 예후, 구체적으로는 생존 확률을 예측할 수 있음을 알 수 있었으며, cfDNA의 농도가 컷-오프 값 1,247.5 µg/L 보다 낮은 경우, 생존 확률이 높을 것으로 예측 또는 진단할 수 있으며, 반면 cfDNA의 농도가 컷-오프 값 1,247.5 µg/L 보다 높은 경우에는 생존 확률이 낮을 것으로 예측 또는 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[0151] <실시예 5>

[0152] cfDNA 분석을 통한 종양의 치료반응 모니터링

[0153] <5-1> 케이스 설명

[0154] 총 10 마리의 종양 진단을 받은 개를 대상으로 화학 요법 또는 방사선 요법 동안 지속적으로 cfDNA 농도를 모니터링하였다. 10 마리의 종양 진단을 받은 동물 중, 6 마리의 개는 림프종(lymphoma), 2 마리는 이소성 갑상선암(ectopic thyroid carcinoma), 1 마리는 장 선암(intestinal adenocarcinoma) 및 다른 1 마리는 혈관 육종(hemangiosarcoma)으로 진단되었다. 또한 10 마리 중, 6 마리는 화학 요법을 처치하였고, 1 마리는 외과적 절제술을, 다른 1 마리는 완화 요법 처치를 받았다. 나머지 2 마리는 방사선 요법 치료를 받았다. 다중심성 B 세포 림프종 진단을 받은 4 마리의 개 모두 CHOP (UW-Madison-19) 프로토콜에 기반한 화학요법 치료를 받았다. L-asparaginase는 이들 4마리 모두에 대해 유도 시 사용하였다. 10 마리 중 3 마리는 완전완화(complete remission)로 평가되었고, 1 마리는 안정(stable disease)으로 평가되었으며, 2 마리는 진행성 질환 반응으로, 나머지 4 마리는 질병 진행으로 인한 사망으로 평가되었다. 이들 각 개에 대한 특성은 하기 표 3에 나타내었고, 각 실험 동물에 대한 모니터링 절차는 아래에 기술되어 있으며, 도 6에 나타나 있다.

표 3

| No. | Age (y) | Sex | Breed            | Tumor site                 | Tumor type                             | Immuno-phenotyping | Clinical stage* | Treatment                       | Disease response | Observation time |
|-----|---------|-----|------------------|----------------------------|----------------------------------------|--------------------|-----------------|---------------------------------|------------------|------------------|
| 1   | 10      | FS  | Dachshund        | Multicentric               | Lymphoma                               | B-cell             | IVb             | UW-Madison-19 (L-CHOP)          | CR               | 9 months         |
| 2   | 5       | FS  | Poodle           | Multicentric               | Lymphoma                               | B-cell             | Vb              | UW-Madison-19 (L-CHOP)          | Expired          | 10 months        |
| 3   | 16      | FS  | Mixed            | Multicentric               | Lymphoma                               | B-cell             | IVb             | UW-Madison-19 (L-CHOP)          | Expired          | 3 months         |
| 4   | 8       | FS  | Coton de Tulear  | Multicentric               | Lymphoma                               | T-cell             | Vb              | Lomustine-based rescue protocol | CR               | 15 months        |
| 5   | 14      | NM  | Mixed            | Small intestine            | Adenocarcinoma                         | NA                 | NA              | Surgical resection              | CR               | 13 months        |
| 6   | 14      | FS  | Mixed            | Retroperitoneal            | Hemangiosarcoma                        | NA                 | IV              | VAC protocol                    | PD               | 5 months         |
| 7   | 9       | FS  | Mixed            | Systemic disseminated form | Non-epitheliotropic cutaneous lymphoma | T-cell             | NA              | Palliative therapy              | Expired          | 2 months         |
| 8   | 8       | FS  | Dogo Canario     | Multicentric               | Lymphoma                               | T-cell             | IVb             | UW-Madison-19 (L-CHOP)          | Expired          | 2 days           |
| 9   | 12      | F   | Golden Retriever | Heart base                 | Ectopic thyroid carcinoma              | NA                 | NA              | Radiation therapy               | SD               | 9 months         |
| 10  | 12      | FS  | Maltese          | Heart base                 | Ectopic thyroid carcinoma              | NA                 | NA              | Radiation therapy               | PD               | 3 months         |

[0156]

[0157] 후속연구 동안 평가된 종양질환 군에 대한 10 마리 개의 임상적 특징

[0158] CR: complete remission, SD: stable disease, PD: progressive disease, NA: not available. \* According to the WHO staging system(Liptak et al., 2004; Valli et al., 2011).

[0160] 개 no. 1: 단계 IVb의 다중심성 B 세포 림프종이며, L-CHOP 화학요법(UW-Madison-19)을 2차로 (cyclophosphamide) 받기 직전 cfDNA 농도는 1,070  $\mu\text{g/L}$ 였다. 개는 화학요법을 받기 위해 매주 병원을 방문하였고, 진단 당시 LD의 합은 268mm 였으나 점차 감소하여 화학요법 2 개월 후 LD의 합은 0mm였다. 복부 림프절 크기, 간 및 비장도 2개월마다 모니터링하였다. 그 결과 항암 화학요법 후, 2 개월마다 림프절 크기가 점차 감소하고 마지막 평가에서 간과 비장으로의 종양 세포 침윤이 관찰되지 않았다. 동시에, cfDNA의 농도는 860  $\mu\text{g/L}$ 로 가장 낮은 것으로 나타났다(도 6A). 질병이 진행되는 동안 cfDNA 양은 림프절 크기와 유의하게 상관 관계가 있는 것으로 나타났다( $P < 0.01$ ) (도 7).

[0162] 개 no. 2: 단계 Vb 다중심성 B 세포 림프종 질환이 있고, L-CHOP 화학 요법 전에 처음 측정된 cfDNA 농도는 1,585  $\mu\text{g/L}$  이었고 LD의 합은 205 mm였다. 2가지 변수는 화학요법 시작 2 주 후에 감소한 것으로 나타났다(도 6B). 다음 2 개월 동안 약 2 주 간격으로 cfDNA와 LD의 합을 측정했을 때, LD와 cfDNA의 합을 기준으로 부분 완화(PR; partial remission)로 평가되었다. 부분 완화 상태로 166일 후 혈장의 cfDNA는 이전 농도 보다 2배인 것으로 나타났고, LD의 합도 화학요법 시작 6 개월 후 증가한 것으로 나타났다. 동시에 신체검사서 발열과 저혈압이 확인되었고 혈액 검사에서 호중구 좌방 이동(band cell, 10,809 cells/ $\mu\text{l}$ )를 동반한 백혈구 증가( $60.59 \times 10^9/\text{L}$ )와 심한 혈소판 감소증( $27 \times 10^3/\mu\text{l}$ )이 확인되었다. 일주일 후, 임상 징후는 기준선과 유사했으며 혈액 검사에서 범혈구 감소증이 확인되었다. LD 및 혈장 DNA 수준은 모두 이전보다 낮았다. 개는 5일 후에 사망하였다. 질병이 진행되는 동안 cfDNA와 림프절 크기는 유의한 상관 관계가 있는 것으로 나타났다( $P < 0.01$ ) (도 7).

[0164] 개 no. 3: 화학요법 시작 전 혈장 cfDNA 수준이 930  $\mu\text{g/L}$ 인 단계 IVb 다중심성 B 세포 림프종이 있다. L-CHOP 화학요법 (UW-Madison-19) 처치를 시작한 지 한달 후 LD의 합은 감소했지만 cfDNA는 유사한 농도를 보였다(도 6C). 그러나 no. 3의 개는 호중구 감소증으로 인해 일주일 동안 실험이 일시 중단되었다. 1주일 후 34 일에 cfDNA 농도가 1,705  $\mu\text{g/L}$ 이고 LD의 합이 137.5 mm으로 확인되어 2가지 변수의 급격한 증가가 관찰되었다. 이들 변수는 독소루비신 (L-CHOP 프로토콜 4주기) 주사 후 1 주일 후에 감소하였다. 그러나 개는 화학요법 시작 후 3 개월 만에 사망했으며, 식욕 부진, 우울증, 질병 진행 및 약물 내성에 따른 발열과 같은 심각한 임상 징후가 있었다. LD와 cfDNA 농도의 합은 유의한 상관 관계가 있는 것으로 나타났다( $P < 0.01$ ) (도 7).

- [0166] 개 no. 4: 단계 Vb의 다중심성 T 세포 림프종 질환이 있으며, 화학요법 전 첫 방문에서 cfDNA 농도는 1,860  $\mu$ g/L이었고 LD의 합은 59 mm였다. 4 일째에는 L-아스파라기나제 주사로 로무스틴 기반 화학요법(구조 프로토콜)을 시작했다. 마지막으로, 개가 3 주 후 두 번째로 치료를 받았을 때, 2 일에 표면 림프절이 거의 만져지지 않았고 혈장 DNA 수준이 866.5  $\mu$ g/L로 떨어진 것으로 나타났다(도 6D). 그 이후로 cfDNA는 3주마다 분석하였는데 cfDNA의 농도는 도 6D와 같이 전반적으로 비슷한 수치를 보였다. 정확한 수치는 기록되지 않았지만 2번째 화학요법 처치 이후 표면 림프절이 발전하지 않은 것으로 나타났다. 마지막 5 주기 이후 개는 완전 완화 (CR; complete remission)를 보였고 지금까지 CR 상태를 계속 유지하고 있다.
- [0168] 개 no. 5: 개는 소장을 외과적으로 절제한 후 장의 선암을 진단 받았다. 수술 후 전이 평가를 위해 동물병원으로 이송했고, 당시 측정된 최초의 cfDNA 농도는 1,555  $\mu$ g/L였다. 이후 2개월 마다 전이 평가를 위해 임상 징후, 혈액 매개 변수 및 CT 스캔을 모니터링하고 치료에 대한 반응을 CR로 평가하였으며, cfDNA 농도는 2 개월 마다 측정하였는데, 점진적으로 농도가 감소하는 것으로 나타났다(도 6E).
- [0170] 개 no. 6: 단계 IV의 후복강 혈관육종 질환이 있으며, 복부 종괴는 처음 방문했을 때 주된 문제였으며 당시 cfDNA의 농도는 1,400  $\mu$ g/L였다. 종괴를 수술적으로 절제한 다음, piroxicam(Piroxicam; GL Pharma, Chungbuk, Korea) 0.3 mg/kg, cyclophosphamide(Alkyloxan; Ildong Pharm, Seoul, Korea) 15 mg/m<sup>2</sup>, doxycycline (Doxycycline Hyclate; Kukje Pharm, Seongnam, Korea) 5 mg/kg을 생검 결과까지 24시간 마다 경구 투여하는 화학요법 처치를 진행하였다. 3주 후 cfDNA 수치는 1,120  $\mu$ g/L로 감소했다(도 6F). VAC 프로토콜 (Alvarez et al., 2013)을 시작하기 전에 cfDNA 수준은 989.5  $\mu$ g/L로 더 떨어졌다. 그러나 개 DNA 농도는 VAC 화학요법 2회차 이후 점차 증가했다. 마지막으로 마지막 cfDNA 농도가 가장 높은 날에 SDMA가 증가하고 혈액 검사에서 질소혈증(azotemia)이 확인되었다. 개 주인은 마지막 cfDNA 측정일인 74일째에 화학요법을 중단하기로 결정했다.
- [0172] 개 no. 7: 개는 비상피성 피부 T세포 림프종으로 진단 받았다. 최초 방문시 혈장 DNA 농도는 985.5  $\mu$ g/L였다. 그러나 식욕 부진, 우울증, 흑색변과 같은 임상 징후가 악화되어 화학요법을 시행하지 않았다. 대신 완화요법을 처치하였다. 주인은 40 일째에 개를 안락사시키기로 결정했고, 개의 마지막날의 cfDNA 농도는 1,435  $\mu$ g / L로 이전보다 약간 높은 수치를 나타내었다(도 6G).
- [0174] 개 no. 8: 단계 IVb의 다중심성 T 세포 림프종으로 진단받았다. L-CHOP 프로토콜을 이용한 화학요법이 시작되었고 다음날 cfDNA 농도가 증가한 것으로 나타났다(도 6H). 마지막으로 개는 화학요법 4일 후 종양 용해 증후군으로 사망했다.
- [0176] 개 no. 9: 개는 조직 병리학상 심장의 이소성 갑상선암으로 진단 받았다. 첫 방문 시 cfDNA는 1,490  $\mu$ g/L로 측정되었다. 이후 3 주마다 cfDNA 수준을 분석하고 췌장염 치료와 치료를 병행하여 복강 천자를 통한 복막 삼출을 제거했다. 개는 51 일에 심낭 절제술을 받고 한 달 후 3일 동안 방사선 요법을 받았다(도 6I). cfDNA는 1개월과 3개월 간격으로 분석되었고 수치는 점차 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 개의 임상징후 중 하나였던 복막 삼출은 첫 방문부터 현재까지 지속적으로 관찰되었으며, CT를 통해 주기적으로 모니터링했을 때 종양 크기는 일정하게 유지되는 것으로 나타났다.
- [0178] 개 no. 10: 상기 9번 개와 같은 부위에서 이소성 갑상선 암종을 진단 받았으며 심낭 절제술과 방사선 요법을 통해 치료 받았다. 초기 진단 전에 측정된 DNA 농도는 1,200  $\mu$ g/L였다. 2 주 후, 개는 심낭 절제술을 받고 총 12 번의 방사선 치료를 받았다. 마지막 방사선 치료 후 약 한 달 후에 측정된 두 번째 cfDNA 농도는 1,860  $\mu$ g/L로 2 개월 전 수준보다 증가한 것으로 나타났다(도 6J). 또한 개를 치료했지만 심장 기저부에 위치한 종괴의 크기가 증가하여 기관 이탈을 일으켜 기침을 유발했다.

[0180] <5-2> 화학요법에 대한 반응에서 혈장 cfDNA의 역학 분석

[0181] cfDNA 농도의 변화 추세는 종양 질환군 8 마리의 치료 기간 동안 분석하였다(도 6). 다중심성 B 세포 림프종으로 진단된 1번, 2번 및 3번 개에서, cfDNA는 치료 기간 동안 한 사람에게 의해 지속적으로 모니터링하였다. 각 개의 표재성 림프절 LD의 함은 cfDNA 농도와 유의하게 관련이 있는 것으로 나타났다( $P < 0.01$ ) (도 7). 또한 cfDNA와 LD의 함에 대한 그래픽 분석은 시간이 지남에 따라 증가 및 감소하는 경향을 보여주었다. 또한 일반적으로 화학요법에 반응하는 CR(완전완화) 또는 PR(부분완화)은 두 곡선에서 모두 감소하는 경향을 보였고 PD(부분질환)에서 증가하는 경향을 나타내었다(도 6). 한편, 2번과 3번 개는 진행성 질환으로 사망했으나, cfDNA와 LD의 함은 사망 5 ~ 7 일 전 1주일 전에 비해 감소한 것으로 나타났다. 또한 범혈구 감소증(호중구 감소증 ( $0.889 \times 10^3/\mu l$ , 기준 범위,  $2.95-11.64 \times 10^3/\mu l$ ), 혈소판 감소증 ( $12 \times 10^3/\mu l$ , 기준 범위,  $200-500 \times 10^3/\mu l$ ), 비재생성 경증 빈혈( PCV, 33 %; 기준 범위, 37.3 ~ 61.7 %)은 2가지의 변수 감소와 동시에 2번 개의 혈액 검사에서 확인되었으며, 3번 개도 만료 1 주일 전에 범혈구 감소증이 있는 것으로 확인되었다. 그리고 cfDNA와 LD의 함이 동시에 감소한 것으로 나타났다(도 6B 및 6C).

[0182] 또한, 4번 및 5번 개는 모두 CR(완전완화)로 평가되었다. 4번 개에서는 화학요법이 진행됨에 따라 cfDNA 농도가 두드러지게 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 6번, 7번 및 8번 개에서는 진행성 질환 또는 사망하는 것으로 나타났다. 6번 개의 경우, 화학요법 시작 시 DNA 농도가 감소하였으나 다시 증가하는 경향으로 확인되었다. 8번 개에서는 화학요법 시작 1일 후 증가하였으나, 결국 화학요법 4일 후 종양 용해 증후군으로 사망하였다.

[0184] <5-3> 방사선요법에 대한 반응에서 혈장 cfDNA의 역학 분석

[0185] 나아가 종양 질환군의 2마리의 개에 대하여 방사선 치료를 받은 이후의 cfDNA 경향을 분석하였다(도 6I 및 6J). 9번 및 10번 개 모두 방사선 상태를 기초로 안정 질병(SD)으로 평가되었으나, cfDNA 농도는 2개월 후까지 증가하는 것으로 나타났다. 또한 종양 크기와 임상 징후는 치료 전과 유사한 것으로 나타났다. 10번 개는 방사선 치료 후, 한 달 동안 기침증상을 보였고, 초음파에서 종괴의 크기가 이전보다 커진 것으로 나타났다.

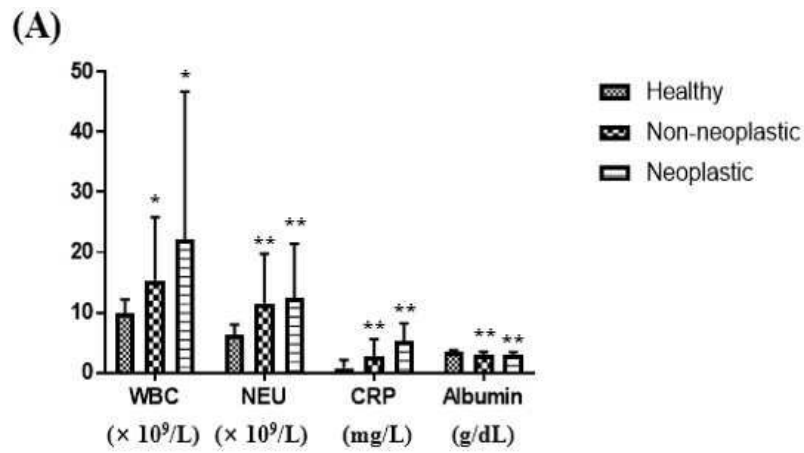
[0187] 이상과 같은 실험 결과들에 의하면, 반려견들을 대상으로 건강한 군, 비종양성 질환군 및 종양 질환군 사이의 cfDNA 농도의 차이가 있음을 확인함으로써, cfDNA를 반려견의 종양 진단용 바이오 마커로 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 본 발명자들은 종양 질환의 개에 대한 혈액 내 cfDNA 농도를 측정하여 종양에 따른 개의 생존율에 대한 정량적인 컷-오프 값을 최초로 제공하였고, 지속적인 cfDNA에 대한 모니터링을 통해 종양 치료에 따른 치료 반응과 질환의 진행을 예측 또는 진단하는데 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0189] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

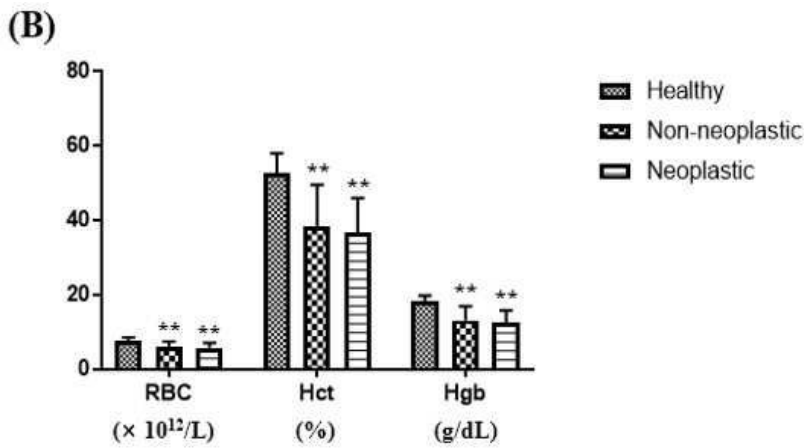


도면

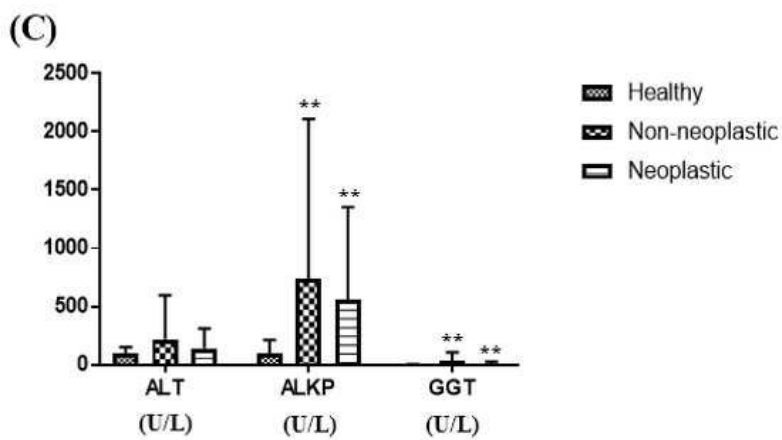
도면1a



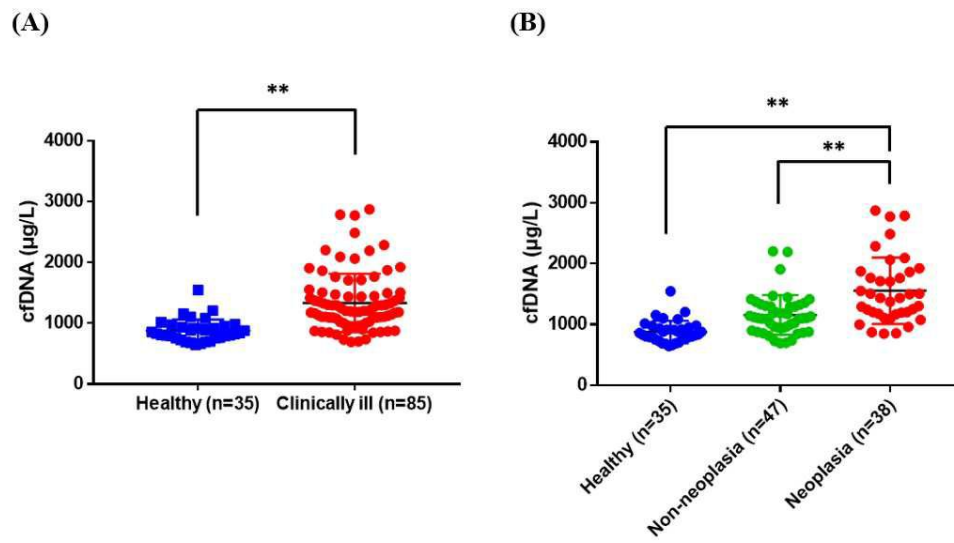
도면1b



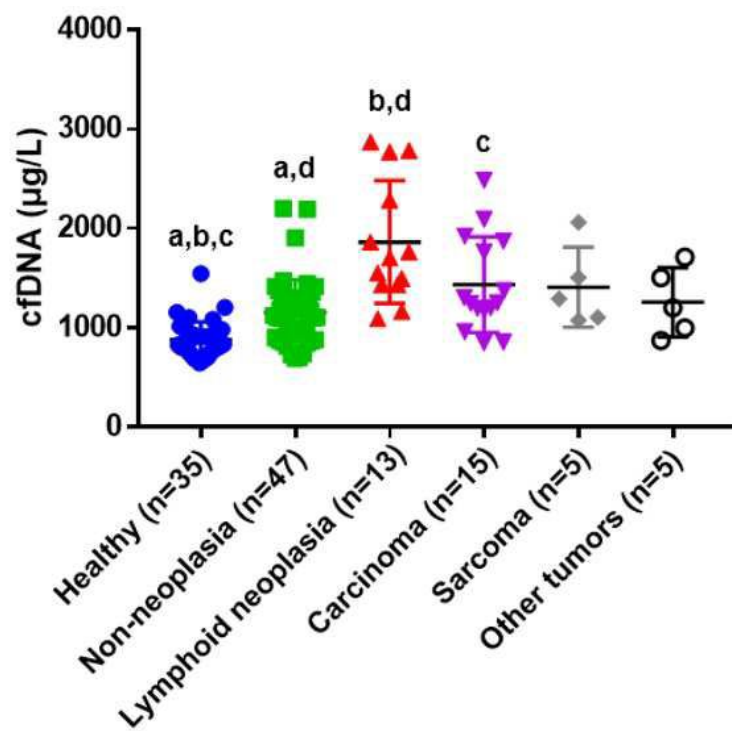
도면1c



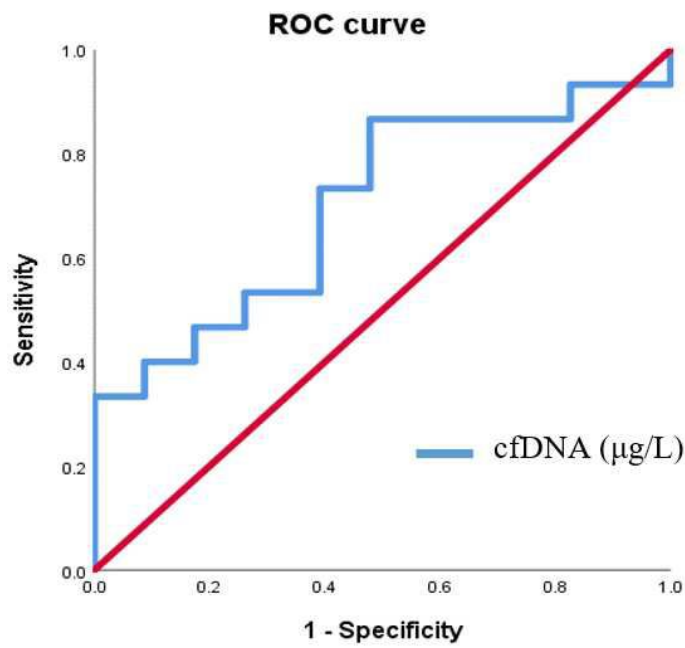
도면2



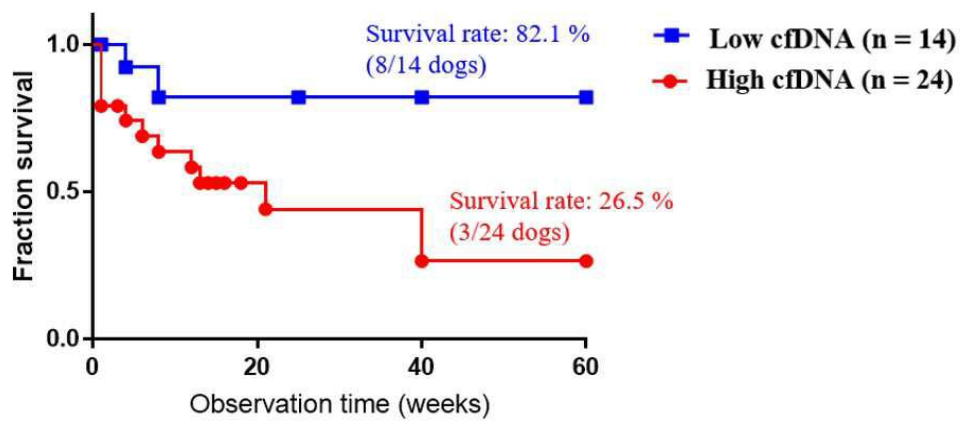
도면3



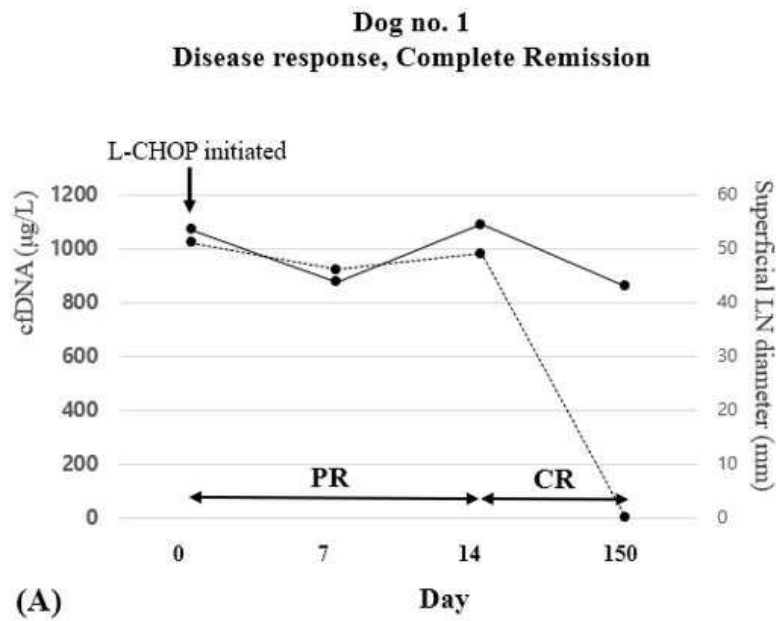
도면4



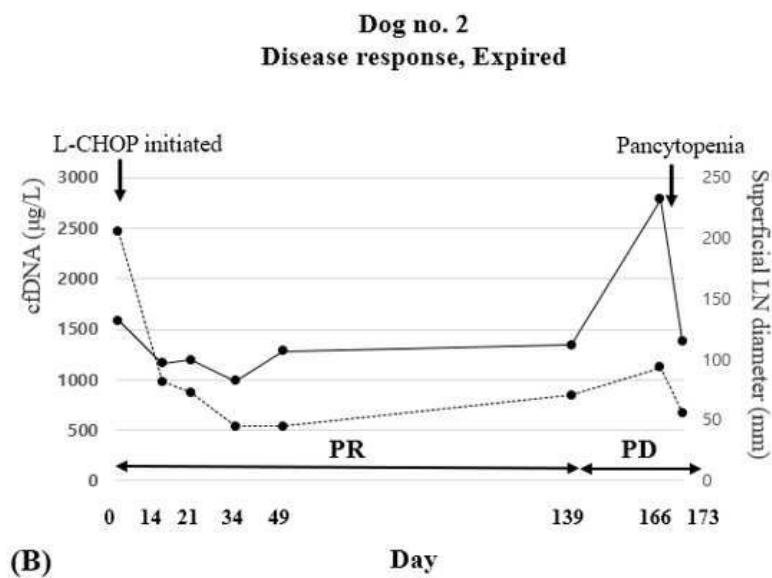
도면5



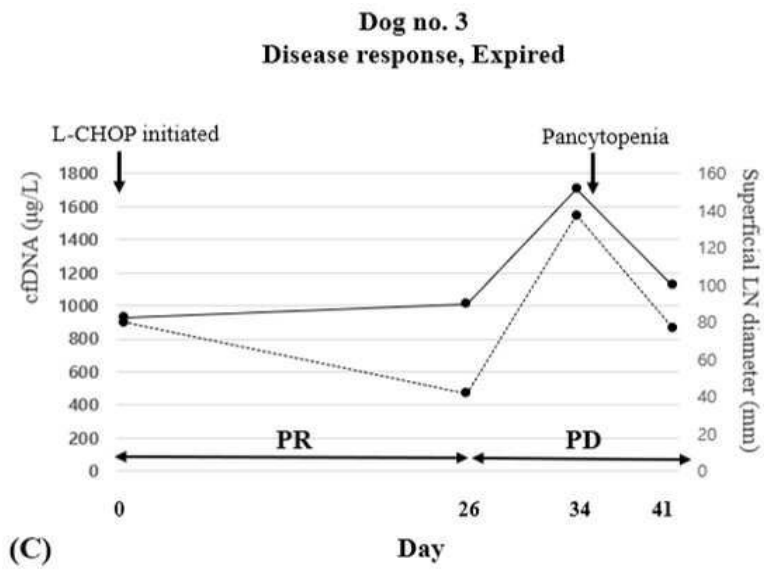
도면6a



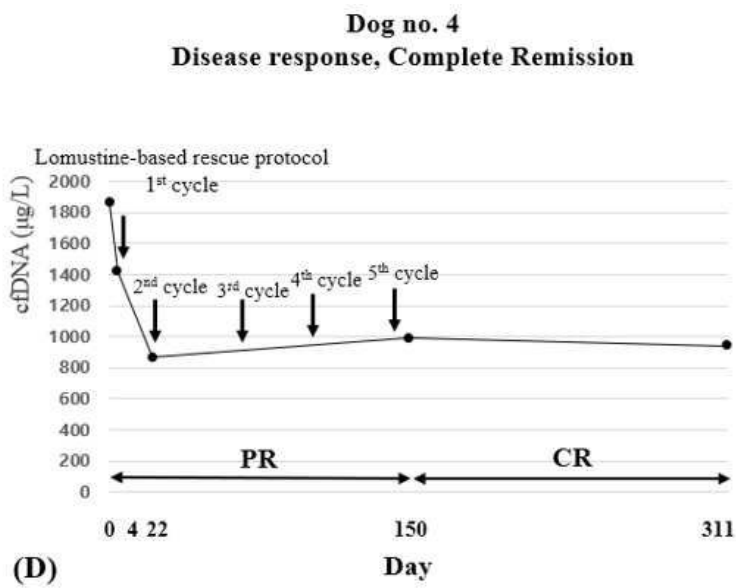
도면6b



도면6c

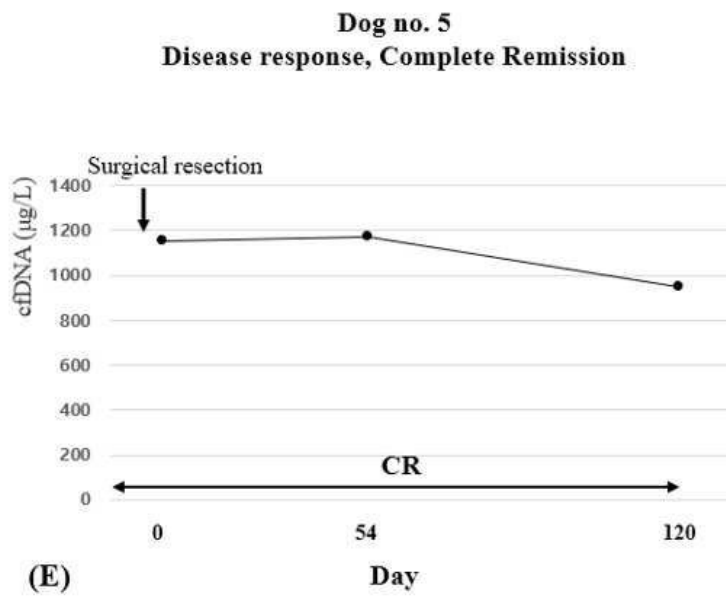


도면6d

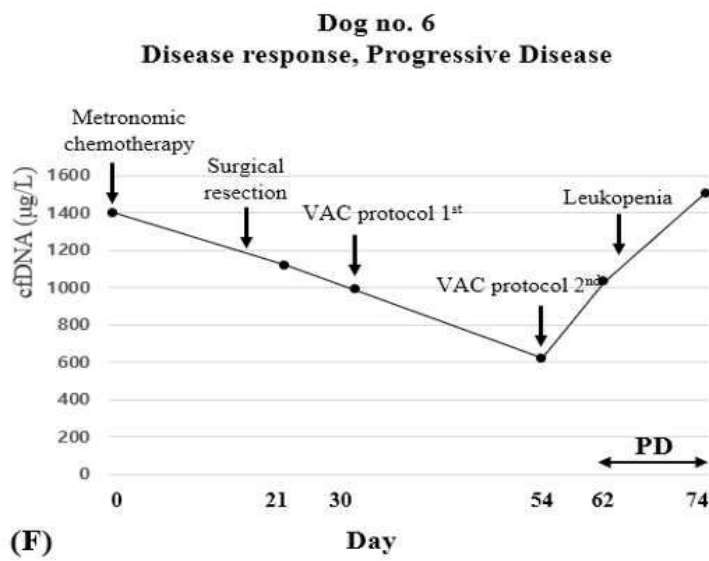




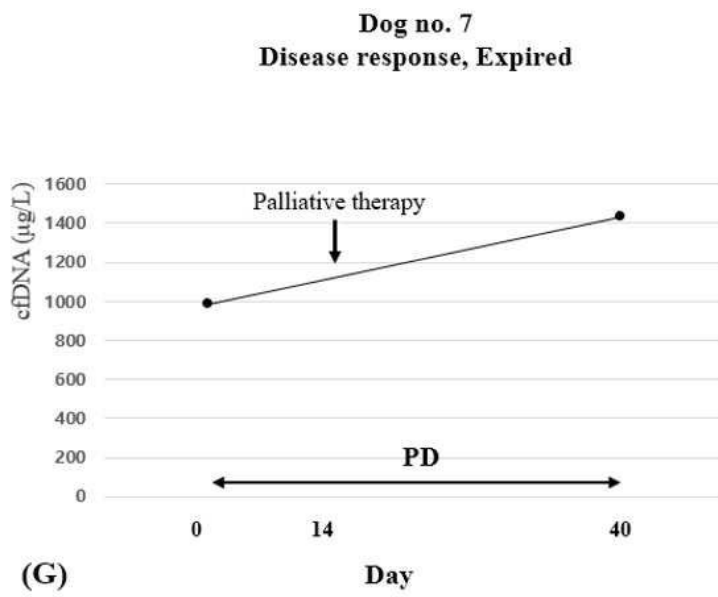
도면6e



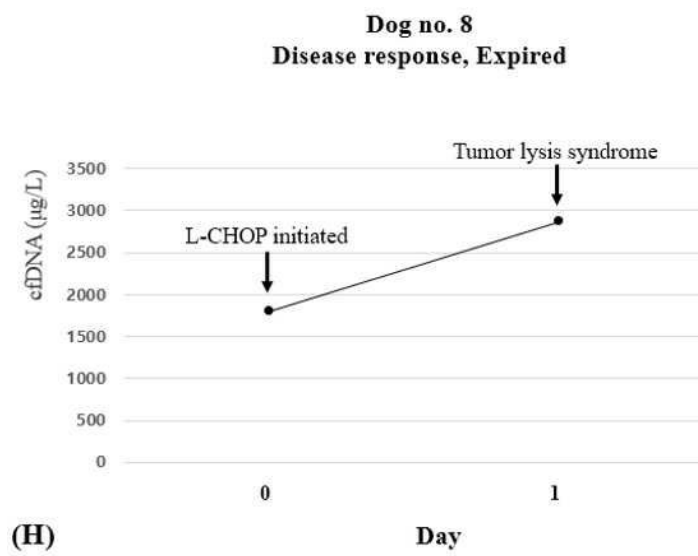
도면6f



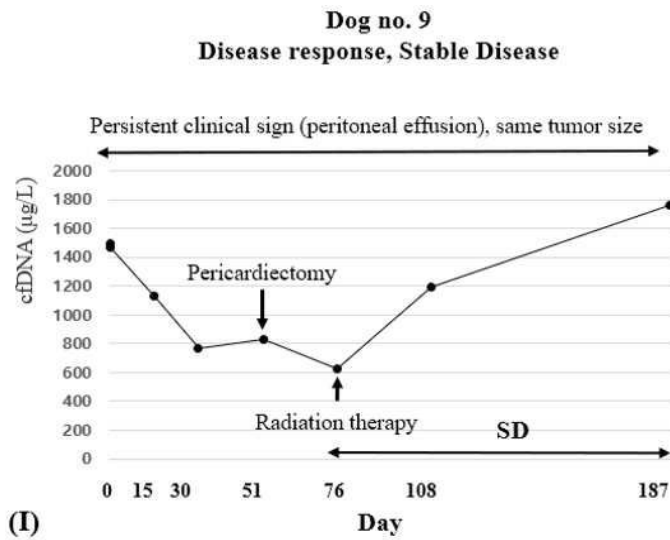
도면6g



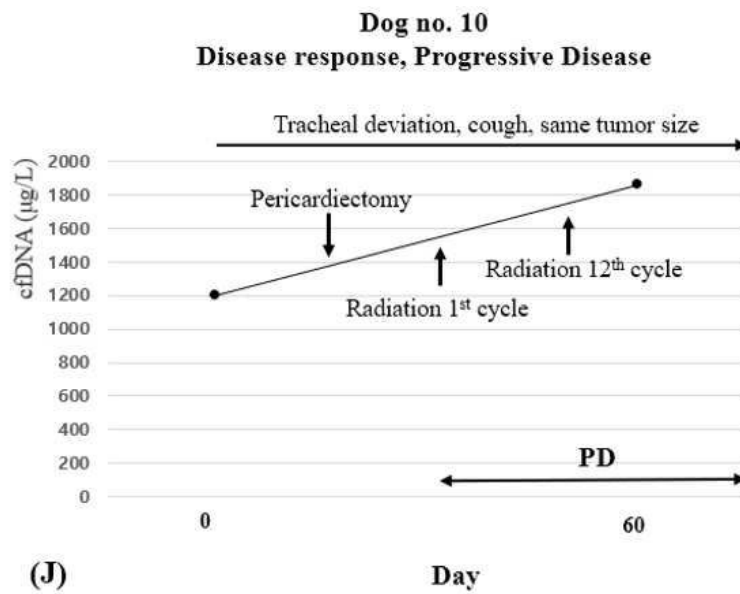
도면6h



도면6i



도면6j



도면7

