



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0112450
(43) 공개일자 2022년08월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2022.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0016019

(22) 출원일자 2021년02월04일

심사청구일자 2021년02월04일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

안근수

대구광역시 수성구 청호로 345, 105동 105호(황금
동, 태왕아너스아파트)

한진이

대구광역시 남구 중앙대로22길 205-4, 104동 202
호(봉덕동, 봉덕로알타운)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 6 항

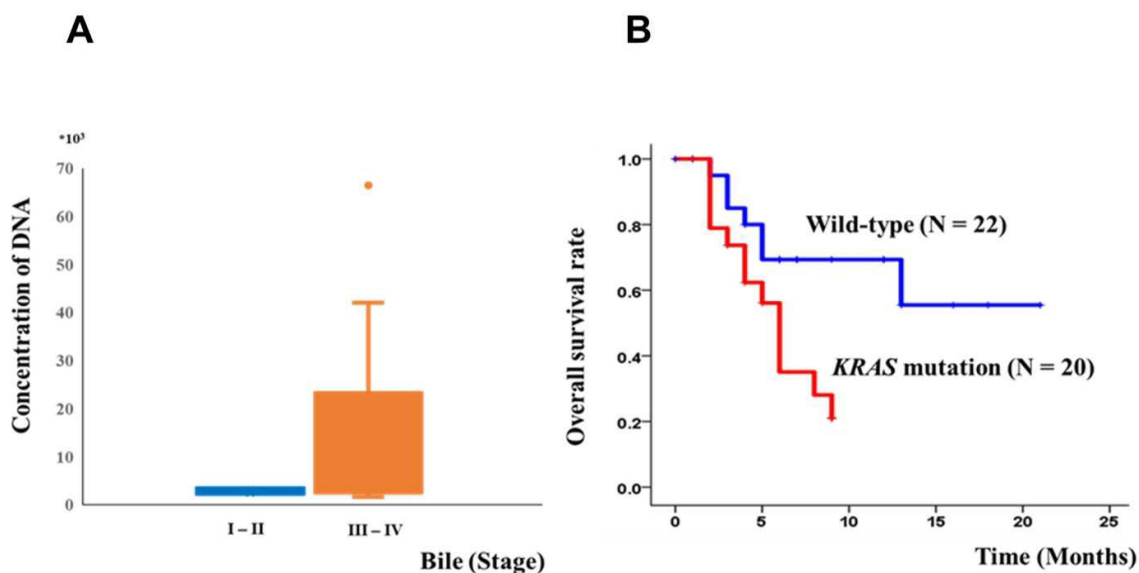
(54) 발명의 명칭 담즙 및 ddPCR 분석을 이용한 담도암 진단용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 담즙(bile) 유래 순환 종양 DNA(ctDNA)에서 KRAS 변이를 ddPCR을 이용하여 검출할 수 있는 제제를 포함하는 암 진단 또는 예후 예측용 조성물 및 이의 용도에 대한 것이다.

본 발명의 조성물은 담즙을 이용함으로써 조직 생검과 유사하거나 보다 우수한 수준으로 담도암을 진단 내지 예후 예측할 수 있으며, 특히 ddPCR 분석을 이용하는 경우 담즙 ctDNA 내 변이를 안정적으로 검출할 수 있어 담도암 진단 내지 예후 예측 효과가 유의적으로 상승할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711109866

과제번호 2018R1C1B3004435

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 신진연구지원사업

연구과제명 임상-유전학적 통합 분석을 통한 담도암의 분자생물학적 아형 예측 모델 확립 및 아형 특이적 표적치료 전략 수립

기 여 율 1/1

과제수행기관명 계명대학교 산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

담즙(bile) 유래 순환 종양 DNA(ctDNA)에서 KRAS 돌연변이를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 KRAS 돌연변이는 G12D, G12V, G13D 및 G12C 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 검출은 ddPCR로 검출하는 것을 특징으로 하는 암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 암은 담도암인 것을 특징으로 하는 암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 5

제1항의 조성물을 포함하는 암 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 6

i) 개체에서 분리된 담즙에서 ctDNA를 수득하는 단계;
ii) ctDNA에서 KRAS 돌연변이를 검출하는 단계;
iii) KRAS 돌연변이가 존재하면 암으로 판단하는 단계;
를 포함하는 암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 담즙(bile) 유래 순환 종양 DNA(ctDNA)에서 KRAS 변이를 ddPCR(droplet digital polymerase chain reaction) 을 이용하여 검출할 수 있는 제제를 포함하는 암 진단 또는 예후 예측용 조성물 및 이의 용도에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 담낭암(gallbladder cancer, GBC), 췌대부암(ampullary carcinoma, AC) 및 간외담관암(extrahepatic cholangiocarcinoma, eCCA)을 포함하는 담도암(Biliary tract cancers, BTC)은 급성장하는 치명적인 암으로, 5년 생존율은 진행성 또는 전이성 담도암 환자의 10% 이하로, 진단으로는 바늘 생검과 같은 침습적 조직 생검이

사용되고 있으나 종양의 이질성과 분자적인 변화를 검출하는 비 침습적 기법이 요구된다.

- [0004] 액체 생검은 암 진단, 모니터링 및 예측 혹은 예후에 매우 유용하다. DNA 단편은 세포유래 DNA로 정상인은 혈장 용액 1ml 당 1 ~ 10ng으로 혈액 중 순환하는 순환 종양 DNA(ctDNA)는 세포 사멸, 순환 또는 생존 종양 세포에서 방출된 DNA로 길이가 약 140nt 이고, 반감기는 약 1.5 시간이다. 혈액은 ctDNA의 비율이 낮아 변이 검출을 위하여서는 높은 특이성이 요구된다. 혈액 ctDNA 진단 정확도는 혈액과 조직간은 일치 하지 않고 특히 내시경 혹은 경피 조직도 50%~90% 부정확하여 담도암의 ctDNA진단은 매우 중요하다.
- [0005] KRAS는 췌장암, 결장암, 담도암과 같은 종양에서 자주 변이를 보이거나, 4 곳의 위치가 (G12D, G12V, G13D, G12C) 전 KRAS 변이의 83 %를 차지하고. 코돈 12 위치 KRAS 변이로 eCCA 환자의 생존율이 더욱 악화되었다. RAS/RAF/MEK/ERK 신호 전달 경로 이상도 CCA에서 자주 관찰된다.
- [0006] KRAS 변이를 검출하기 위한 방법인 NGS(Next Generation Sequencing)는 동시 대량 확인이 가능하나, 저 유전자 검출, 오류와 실 데이터간 구분이 어려운 점, 고비용 등의 임상적 한계가 있다. 반면에, ddPCR(digital droplet PCR)은 특정 영역 카피 수를 정할 수 있고, 짧은 소요 시간, 저용량의 샘플 검출, 저비용등은 NGS보다 많은 장점을 가지고 있으며, 특히 ddPCR은 0.01% 샘플량 까지 정확한 측정이 가능하다.
- [0007] 대한민국 특허출원 제10-2018-0110561호는 담도암을 진단하는 방법에 대한 것으로서, 양성담도질환 환자, 췌장암 및 담도암 환자를 구분할 수 있는 바이오마커로서 GCA(glycocholic acid) 및 TCDA(Taurochenodeoxycholic acid)를 제시하고 있으나, KRAS 변이를 담즙을 이용하여 ddPCR로 검출함으로써 담도암 진단 혹은 그 예후를 예측하는 기술에 대한 연구는 현재까지 이루어진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 조직검사와 유사하거나 더 정확한 특이성으로 다양한 담도암을 진단할 수 있는 비 침습적인 방법을 제공하고자, 담즙을 이용한 담도암 진단 및 그 예후까지 예측가능한 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 담즙(bile) 유래 순환 종양 DNA(ctDNA)에서 KRAS 변이를 검출할 수 있는 체제를 포함하는 암 진단 또는 예후 예측용 조성물 내지 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 담즙(bile) 유래 순환 종양 DNA(ctDNA)에서 KRAS 변이를 검출할 수 있는 체제를 포함하는 암 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 KRAS 변이는 G12D, G12V, G13D 및 G12C 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 검출은 ddPCR로 검출하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 담도암일 수 있다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는 암 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, i) 개체에서 분리된 담즙에서 ctDNA를 수득하는 단계;
- [0018] ii) ctDNA에서 KRAS 변이를 검출하는 단계;
- [0019] iii) KRAS 변이가 존재하면 암으로 판단하는 단계;
- [0020] 를 포함하는 암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 조성물은 담즙을 이용하여 조직생검과 유사하거나 보다 우수한 정도로 담도암을 진단 내지 예후 예측

할 수 있으며, 특히 ddPCR 분석에 사용하는 경우 담즙 ctDNA 내 변이를 안정적으로 검출할 수 있어 담도암 진단 내지 예후 예측 효과가 유의적으로 상승할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024]

도 1은 임상단계에 따른 담즙 내 KRAS ctDNA 농도 (A), 변이 또는 야생형 KRAS 환자의 2 년 생존율 (B)을 나타낸다. 2 년 생존율은 Kaplan-Meier model을 통해 측정하였다.

도 2a는 담즙 (A), 조직 (B) 및 혈장 (C)에서 KRAS 변이의 DNA 단편 및 히스토그램의 크기 분포를 나타내며, 숫자는 DNA의 크기를 나타낸다.

도 2b는 KRAS 돌연변이가 있는 음성대조군 (D), 양성대조군 (E) 및 담도암 (F) 에서 담즙 ctDNA로 ddPCR KRAS 다중 분석 결과의 2D 플롯을 나타낸다. 플롯의 검은색 클러스터는 음의 droplet을 나타내고, 녹색 클러스터는 야생형 DNA에 대해서만 양성인 droplet을, 파란색 클러스터는 돌연변이 DNA에 대해서만 양성인 droplet을, 주황색 클러스터는 돌연변이 및 야생형 DNA 모두에 대해 양성인 droplet을 나타낸다.

도 3은 모든 담즙 샘플에서 KRAS 이중 분석 및 ctDNA 농도를 나타낸다. 파란색 선은 담즙에서 KRAS 변이에 대한 컷오프 값을 나타낸다 (1500 copy/ml). DNA 변이 농도는(droplet 당 변이 DNA copy) Poisson 분포로 추정되었으며, 모든 패널은 최대 12000의 FAM 진폭과 최대 12000의 HEX진폭을 나타낸다.

도 4는 담즙 및 FFPE 에서 KRAS 다중 분석 및 DNA 농도를 나타낸다. 담즙 ctDNA에서 KRAS 변이가 있는 20 명의 환자중 G12D 및 G12V 변이의 빈도(B) 및 FFPE 조직에서 KRAS 변이가 있는 10 명의 환자중 G12D 및 G12V 변이의 빈도 (C)를 나타낸다. 변이 DNA의 농도 (droplet 당 돌연변이 DNA copy)는 Poisson 분포로 추정되었으며, 모든 패널은 최대 12000의 FAM 진폭과 최대 12000의 HEX 진폭을 나타낸다.

도 5는 담즙 및 FFPE 샘플에서 KRAS 이중 분석 및 DNA 농도를 나타낸다. 담즙과 FFPE 샘플 사이의 KRAS의 변이 일치 (N = 20)를 나타낸다. 파란색 선은 담즙 (1500 copy/ml)에서 KRAS 변이에 대한 컷오프 값을, 주황색 선은 FFPE (4500 copy/ml)에서 컷오프 값을 나타낸다. 변이 DNA의 농도 (droplet 당 변이 DNA copy)는 Poisson 분포로 추정되었으며, 모든 패널은 최대 12000의 FAM 진폭과 최대 12000의 HEX 진폭을 나타낸다.

도 6a는 담즙, 조직 및 혈장샘플의 전사체 시퀀싱결과로서, Agilent 2100 Bioanalyzer로 검출된 즙, 조직 및 혈장 mRNA에 대한 대표적인 전기영동도를 나타낸다.

도 6b는 각각 분석된 BTC 환자의 담즙, 조직 및 혈장샘플에 대한 전사체 시퀀싱결과로서 발현된 KRAS 관련 mRNA의 수에 대한 벤다이어그램 (B) 및 담즙, 조직 및 혈장 샘플(환자 CA34)에서 평가된 66 개의 KRAS 관련 종양 유전자의 발현에 대한 상관 매트릭스의 분포도 (C) 를 나타낸다. 각각의 동그라미는 TPM (백만 read 당 전사체)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

본 발명에서는 ddPCR로 분석된 담즙의 액체 생검이 DNA 변이의 검출에 사용될 수 있음을 확인하였으며, 전사체 시퀀싱으로 KRAS를 포함한 발암 신호 전달 단백질을 암호화하는 많은 유전자의 발현이 BTC 환자의 담즙 및 종양 조직에서 같은 수준으로 검출되는 것을 확인하였다. 이는 담즙이 종양 조직의 생물학적 및 종양학적 특성을 정확하게 반영한다는 것을 의미한다. 임상적으로는, 변이 KRAS 전사체는 말기(III/IV) 종양 담즙에서 자주 발견되었으며, 이들 환자는 야생형 KRAS 전사체 환자보다 생존율이 현저히 낮았다. 따라서, 본 발명은 ctDNA 분석은 조직 생검 대신 담즙의 액체 생검을 사용할 수 있으며, KRAS 변이가 BTC 환자에서 예후 예측용 바이오마커 역할을 할 수 있음을 시사한다. 또한, ctDNA 모니터링은 치료 반응을 실시간으로 확인할 수 있으며 향후 치료법을 제공할 수 있다.

[0026]

담즙과 혈장에서 ctDNA의 유전적 프로파일은 종양 조직에서도 평가할 수 있으나 본 출원인은 혈장 내 ctDNA 검출률이 매우 낮은 것을 실험적으로 확인하였다. 이전의 여러 연구에서도 ctDNA 검출율 (20 % ~ 75 %)과 조직과 혈장 결과의 일치율 (25 % ~ 79 %)는 높지 않았으며, 본 발명에서도 KRAS 변이 검출율은 혈장 ctDNA는 18.8 %, 담즙 ctDNA는 48.0 %에 불과하였다. 또한 담즙과 조직에서 검출된 KRAS 변이 일치율 (80.0 %)은 혈장과 조직의 일치율 (42.9 %)보다 높았다. 따라서 담즙은 BTC 환자 ctDNA 분석은 혈액보다 더 나은 샘플임을 확인하였다. BTC로 인한 폐쇄성 황달인 경우는 담관 상피 및 암세포의 노출빈도가 높으므로 종양 조직으로 파생되는 ctDNA의 농

도가 더욱 높을 수 있다.

- [0027] 담즙채취는 내시경 역행 담관 조영술(endoscopic retrograde cholangiopancreatography)이나 경피 간 담즙 배액 (PTBD, percutaneous transhepatic biliary drainage)을 통한 내시경 역행 비담 배액의 침습적 절차가 요구된다. 그러나 BTC 또는 양성 담관 협착으로 인한 폐쇄성 황달인 경우 담도 감압이 종종 필요하며, 양성 담즙 협착과 BTC를 구별하는 것은 여전히 임상적으로 어려워 담즙을 사용한 액체 생검은 임상적으로 중요한 의미를 가진다.
- [0029] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0031] 본 출원인은 담도암(biliary tract cancer, BTC)에서 체세포 변이 혹은 액체 생검(liquid biopsy)이 조직 생검의 대체 가능 여부를 확인하고자, 담즙, FFPE(formalin-fixed paraffin-embedded) 및 동결 혈장으로 ddPCR(droplet digital polymerase chain reaction)을 수행하였다. 샘플은 BTC 환자 42 명으로부터 채취하였으며 FFPE는 20 명, 혈장은 16 명 채취하였다.
- [0032] ctDNA 분석용 담즙 분리는 Abi Zabron (Imperial College, London, England)의 프로토콜에 준하였으며, 담즙은 16000g에서 4 °C, 10 분 동안 원심분리 후 상층액(Bile)을 얻었다. 담즙은 Avanti J-25I(Beckman, CA, USA)로 원심분리 후 -80 °C에 보관하였다. 담즙 ctDNA 분리는 NucleoSpin® cfDNA XS 키트(GmbH & Co. KG) 메뉴얼에 따라 분리하였다. 담즙량은 270 μ l를 사용하고, Agilent 2100 Bioanalyzer 로 분석하였다.
- [0033] 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin fixed paraffin embedded, FFPE)은 외과적 절제술 또는 내시경 생검을 받은 환자 20명으로 부터 얻었고 조직 검사 결과 종양 세포가 30% 이상 있음을 확인하였다. FFPE(5mm) 섹션후 NucleoSpin® FFPE DNA 키트(GmbH & Co. KG) 메뉴얼에 따라 DNA를 분리하였으며, DNA 는 분석 전 -20°C에서 보관 후 사용하였다.
- [0034] KRAS 변이는 BTC 환자 42 명 중 20 명 (48 %)의 담즙 ctDNA로 확인 하였다. KRAS 변이를 가진 환자는 야생형 KRAS 보유 환자보다 생존율이 더욱 나빴으며 (2 년 생존율 : 각각 0 % vs 55.5 %; P = 0.018), 담즙 ctDNA와 FFPE DNA 간의 일치율은 80.0 % 였고, 혈장과 FFPE간은 42.9 %를 나타내었다. 담즙, FFPE 조직 전사체 시퀀싱 결과는 담즙, 조직간 KRAS 관련 발암 유전자의 발현은 높은 양성 상관관계를 나타내었다 (r = 0.991, P <0.001).
- [0036] mRNA-Seq 데이터 분석을 위하여 환자(CA34)의 담즙, 조직 및 혈장으로 NGS(Next generation sequencing)를 수행한 후, 검출된 유전자 발현 프로파일을 비교 분석하였다. 총 RNA 농도는 Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Assay Kit (Invitrogen)로, DV200(RNA 조각의 % > 200bp) 값은 TapeStation RNA 스크린 테이프(Agilent Technologies, Inc.)로 측정하였다. 총 RNA (100ng)는 메뉴얼에 따라 SureSelectXT RNA Direct 시스템(Agilent Technologies, Inc.)으로 시퀀싱 라이브러리를 구성하는데 사용되었다. 전체 RNA는 먼저 고온에서 2가 양이온으로 단편화하고 절단된 RNA 단편은 역전사 효소 및 랜덤 프라이머를 사용하여 첫 번째 가닥 cDNA로 복사 후 두 번째 가닥 cDNA 합성이 이루어졌다. 이러한 cDNA 조각은 단일 'A' 염기를 추가하여 최종 복구 프로세스를 거친 후 어댑터에 연결되었다. 인간 엑손 캡처를 위하여서는 표준 Agilent SureSelect Target Enrichment 프로토콜 (Agilent Technologies, Inc.)에 따라 Agilent SureSelect XT Human All Exon v6+UTRs 키트(Agilent Technologies, Inc.)를 사용하였다. 250ng의 cDNA 라이브러리를 혼성화 버퍼, 블로킹 믹스, RNase 블록 및 5 μ l의 SureSelect XT Human All Exon v6+UTR 캡처 라이브러리와 혼합하였다. 포획 베이트에 대한 혼성화는 PCR 열 사이클러(PCR thermal cycler)에서 24 시간, 105 °C에서 가열된 열 순환기 뚜껑 옵션을 사용하여 65 °C에서 수행되었다. 캡처된 라이브러리를 세척하고 두 번째 PCR 증폭을 수행하였다. 최종 정제된 산물은 qPCR 정량화 프로토콜 가이드(KAPA Library Quantification kits for Illumina Sequencing platforms)에 따라 qPCR을 정량화하고 TapeStation DNA 스크린 테이프 D1000(Agilent)로 검증하였다. 색인된 라이브러리는 Illumina NovaSeq(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)로 페어드 엔드 (2 $\times$ 100bp) 시퀀싱은 Macrogen Incorporated(Seoul, Korea)에서 수행하였다.
- [0038] 각 샘플에서 분리된 RNA는 SMARTer smRNA-Seq Kit (Illumina Inc.) 메뉴얼에 따라 시퀀싱 라이브러리를 구성하

였다. 간단하게, 입력 RNA를 먼저 폴리 아데닐화하여 올리고 (dT) 프라이머에 대한 프라이밍 서열을 제공하였다. cDNA 합성은 비 템플레이트 뉴클레오티드를 추가하기 위해 각 RNA 주형의 5' 끝에 어댑터 서열을 통합하는 3' smRNA dT 프라이머로 프라이밍 하였다. 이러한 뉴클레오티드는 SMART smRNA Oligo에 의해 결합되었으며, 더 큰 감도를 위해 잠금 핵산(LNA, locked nucleic acid) 기술로 강화되었다. 템플릿 전환 단계에서 PrimeScript RT는 SMART smRNA Oligo를 각 첫 번째 가닥 cDNA 분자의 3' 말단에 두 번째 어댑터 시퀀스를 추가하기 위한 템플릿으로 사용한다. 다음은 PCR 증폭 중에 전체 길이 Illumina 어댑터(샘플 다중화를 위한 인덱스 시퀀스 포함)를 추가한다. 정방향(Forward) PCR 프라이머는 SMART smRNA Oligo에 의해 추가된 서열에 결합하는 반면 역방향(Reverse) PCR 프라이머는 3' smRNA dT 프라이머에 의해 추가된 서열에 결합한다. 라이브러리 cDNA 분자는 Illumina 플로우 셀의 클러스터링에 필요한 시퀀스가 포함되었다. 라이브러리는 blue pippin으로 겔 정제되었고 Agilent Bioanalyzer에서 크기, 순도 및 농도를 분석하였다. 라이브러리는 같은 몰량으로 풀링하고 Illumina HiSeq 2500 기기에서 시퀀싱하여 51 개의 기본 read를 생성하였다. 이미지 분해 및 품질 값 계산은 Illumina 파이프 라인의 모듈을 사용하여 수행하였다.

- [0040] 분석 전 낮은 품질과 어댑터 시퀀스를 제거하기 위해 시퀀싱에서 원 read를 전처리하고 HISAT v2.1.0(22)을 사용하여 처리된 read를 Homo sapiens genome assembly(GRCh38)에 정렬하였다. HISAT는 정렬을 위해 전역, 전체 게놈 인덱스(global, whole-genome index) 및 수만 개의 작은 로컬 인덱스(local indices)의 두 가지 유형의 인덱스를 사용한다. 이 두 유형의 인덱스는 Bowtie2와 동일한 BWT(Burrows-Wheeler transform)와 그래프 FM 인덱스(GFM)를 사용하여 구성된다. 이러한 효율적인 데이터 구조와 알고리즘을 사용하기 때문에 HISAT는 널리 사용되는 Bowtie 및 BWA보다 몇 배 빠르게 집합 정렬을 생성한다. 호모 사피엔스(GRCh38)의 참조 게놈 서열과 주석 데이터는 NCBI에서 다운로드하였다. 알려진 트랜스크립트의 어셈블리는 StringTie v2.1.3b(23 [Pertea, 2016 # 1074,24])로 처리하였다. 이 결과를 바탕으로, 전사체 및 발현된 유전자는 샘플 당 read 수로 계산하였다.
- [0042] 본 발명은 담즙(bile) 유래 순환 종양 DNA(ctDNA)에서 KRAS 변이를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 암 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 “진단(diagnosis)”은 넓은 의미로는 환자의 병의 상태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 및 합병증의 유무 등이다. 본 발명에서 진단은 바람직하게는 암 및 이의 발병 위험성을 판단하는 것이다.
- [0044] 본 발명의 “예후(prognosis)”는 병세의 의학적 결과에 대한 전망 내지 예비적 평가를 말하는데, 예를 들면, 좋지 않은 또는 좋은 결과(예를 들면, 장기간 생존의 가능성)를 예측하는 것을 의미한다. 음성 예후 내지 좋지 않은 결과는 재발, 질병의 진행(예를 들면, 암 성장 또는 전이, 또는 약물 내성), 또는 사망 가능성의 예측을 포함하고, 양성 예후 또는 좋은 결과는 질병 완치(예를 들면, 질병이 없는 상태), 완화(예를 들면, 암의 퇴치) 또는 안정화의 예측을 포함한다. 본 발명에서 예후는 암의 재발, 생존(overall survival), 또는 무병생존(disease-free survival)을 의미한다. 예후의 예측(또는 예후의 진단)은 특히 초기 암 환자의 화학치료 여부를 비롯하여 향후 암 치료에 대한 단서를 제시할 수 있다. 예후 예측은 암 치료제에 대한 환자의 반응, 치료 경과에 대한 예측도 포함한다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 KRAS 변이는 G12D, G12V, G13D 및 G12C 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 검출은 ddPCR로 검출하는 것일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 암은 담도암일 수 있다.
- [0048] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는 암 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0049] 본 발명의 키트는 통상적으로 사용되는 발현 수준 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있다. 예를 들어, 단백질 발현을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 키트는 평가 대상체로부터 샘플을 수득하기 위한 샘플 추출 수단을 포함할 수 있다. 샘플 추출 수단

은 바늘 또는 시린지 등을 포함할 수 있다. 키트는 액체, 기체 또는 반고체일 수 있는, 추출된 샘플을 수용하기 위한 샘플 수집 용기를 포함할 수 있다. 키트는 사용 지침을 추가로 포함할 수 있다. 상기 샘플은 KRAS 변이가 존재할 수 있는 임의의 신체 샘플일 수 있다. 예를 들어, 샘플은 소변, 대변, 모발, 땀, 타액, 체액, 혈액, 세포 또는 조직일 수 있다. 신체 샘플에서 KRAS 변이의 측정은 전체 샘플 또는 가공된 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0051] 본 발명은 또한, i) 개체에서 분리된 담즙에서 ctDNA를 수득하는 단계;

[0052] ii) ctDNA에서 KRAS 변이를 검출하는 단계;

[0053] iii) KRAS 변이가 존재하면 암으로 판단하는 단계;

[0054] 를 포함하는 암 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0056] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예로 인한 제한으로 해석되지 않는 것은 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다.

실시예 1

[0058] 환자 및 담즙 수집

[0059] 2018 년 8 월부터 2020 년 3 월까지 계명대학교 동산병원에서 담낭암(GBC), 췌대부암(AC), 간문부 담도암(perihilar bile duct cancer), 원위부 담도암(distal bile duct cancer) 및 간의 담관암(eCCA)의 담도암 환자 42 명과, 양성 담도 질환(원위 담관 (CBD) 결석) 환자 1 명의 담즙을 채취하였다. 담도암 진단은 내시경 역행 담관 췌장 조영술(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP) 또는 경피 간 담즙 배액(percutaneous transhepatic biliary drainage, PTBD)에 의한 외과적 절제술 또는 바늘 생검에서 조직 진단을 기반으로 진단하였다. 다른 악성 종양이 있거나 조직 생검 상 췌장암 또는 간세포 암이 있는 환자는 제외되었으며, 마지막으로 병리학적으로 입증된 42 명의 담도암 환자를 선별하였다. eCCA 환자가 전이성 병변없이 CCA를 분리하고 일반적인 상태가 수술에 견딜수 있을 때 치료적 수술적 절제술이 완료되었다. 그러나 환자가 전이성 병변이 있거나 수술 적 절제술을 거부했을 때 화학 방사선 요법을 시행했다. 종양 단계는 악성 종양의 미국 공동 암위원회(AJCC) 분류의 제 7 판에 따라 분류되었으며, AJCC 단계는 임상(화학 방사선 요법 또는 보존적 요법으로 치료받은 환자) 또는 병리학적 데이터(치료적 수술 적 절제술로 치료받은 환자)를 기반으로 평가되었다. 이 전향적 연구는 계명대학교 동산의료원 기관 심의위원회(DSMC 2018-06-054)의 승인을 받았으며, 인간 유래 물질의 2 차 사용을 포함했다. 담관염 또는 폐쇄성 황달(담도암의 경우)을 완화하고 CBD 결석을 제거하여 담관염을 완화하기 위해(대조군의 경우) PTBD 시 두 그룹의 담즙을 채취하였다. 두 그룹 모두 담관염을 해결한 후 PTBD 시술 후 최소 3 일 후에 담즙을 채취했다. 42 명의 담도암 환자 중 20 명의 FFPE 샘플을 사용하였다. 이 중 수술 전 16 명의 혈장을 채취하여 -80 ℃에 보관한 후 사용하였다. 채취한 담즙은 16,000g에서 10 분, 4 ℃에서 원심 분리하여 상층액(Bile)을 얻었으며 Abi Zabron (Imperial College, London, England)의 프로토콜에 따라 각 펠렛은 냉 PBS(2 배)에 재현탁 후, 16,000g의 4 ℃, 5 분 동안 원심분리 후 담즙 펠렛을 얻었다. 모든 실험은 Avanti J-25I(Beckman, CA, USA)로 원심분리하고 담즙과 펠렛은 -80 ℃에서 보관한 후 모든 실험에 사용했다. 구체적인 환자의 특징은 하기 [표 1]에 나타났다(AJCC; American Joint Committee on Cancer, eCCA; extrahepatic cholangiocarcinoma, GBC; gallbladder cancer, AC; ampulla vater cancer).

표 1

[0060]

	Bile (N = 42)			FFPE (N = 20)			Plasma (N = 16)		
	야생형 (N=22)	KRAS 돌연 변이 (N=20)	P	야생형 (N=10)	KRAS 돌연 변이 (N=10)	P	야생형 (N=13)	KRAS 돌연 변이 (N=3)	P
나이 (Mean,SD)	74.4±9.6	71.9±9.5	0.408	75.3±8.3	65.7±8.8	0.022	73.1±8.3	74.3±1.5	0.802
성별 (Male,%)	10 (45.5)	13 (65.0)	0.337	6 (60.0)	7 (70.0)	0.774	7 (53.8)	2 66.7)	1.000

AJCC 단계 (I, II/III, IV)	5(22.7)/17 (77.3)	3(15.0)/17 (85.0)	0.808	3(30.0)/7 (70.0)	5(50.0)/5 (50.0)	0.478	7(53.8)/6 (46.2)	0(0.0)/3 (100.0)	0.238
암 유형			0.544			0.589			0.809
eCCA	19 (86.4)	17 (85.0)		9 (90.0)	8 (80.0)		12 (92.3)	3 (100.0)	
GBC	3 (13.6)	2 (10.0)		1 (10.0)	1 (10.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	
AC	0 (0.0)	1 (5.0)		0 (0.0)	1 (10.0)		1 (7.7)	0 (0.0)	
담즙 수득 방법			0.476			1.000			0.809
수술	10 (45.5)	6 (30.0)		7 (70.0)	8 (80.0)		12 (92.3)	2(66.7)	
Palliative care	12 (54.5)	14 (70.0)		3 (30.0)	2 (20.0)		1(7.7)	1(33.3)	

[0061] BTC 환자는 남성 23 명과 여성 19 명으로 평균 연령은 73.2 ± 9.5 세 (범위 50-88 세)이었다. BTC (N = 42) 환자 중 5 명은 GBC, 1 명은 AC, 36 명은 eCCA 였다. 42 명의 환자 중 FFPE 종양 조직은 20 명, 수술 전에 채취한 냉동 혈장은 16 명의 환자가 측정 가능했다. 16 명의 환자는 치료적 수술적 절제술(curative surgical resection)을 받았으며 26 명의 환자는 완화 화학 방사선 요법(palliative chemoradiotherapy) 또는 보존적 치료(conservative therapy)를 받았다. 말기 단계(III/IV) 단계 BTC에서 담즙 ctDNA의 평균 농도는 초기 단계(I/II) BTC보다 높았으며, 유의성(각각 16,100 ± 18,700 vs 2300 ± 800 copy/ml, P = 0.083) ; 도 1 A)을 나타내었다.

[0063] 또한, Kaplan-Meier model 분석에서 담즙 ctDNA에 KRAS 변이가 있는 환자는 야생형 KRAS를 가진 환자보다 더 나쁜 생존율을 나타내었다 (2 년 생존율 : 각각 0 % 대 55.5 %, P = 0.018) (도 1 B). 이러한 결과는 담즙 ctDNA의 KRAS 변이가 BTC의 예후 바이오마커로 사용될 수 있음을 나타내었다.

실시예 2

[0065] DNA 단편 크기 분석 및 KRAS 변이 히스토그램

[0066] 담즙, 혈장 및 FFPE 조직으로 ctDNA 분자의 크기를 비교하고, 변이 유전자를 평가하기 위하여 ddPCR(Droplet digital PCR) KRAS duplex assay 를 담즙, 혈장 및 조직에 응용하였다.

[0067] ddPCR은 Bio-Rad QX200 ddPCR 시스템에서 ddPCR™ KRAS Screening Multiplex Kit 및 ddPCR™ KRAS G12/G13 Screening Kit(Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)를 사용하여 DNA 라이브러리로 수행하였다. QuantaSoft™ 소프트웨어로 생성된 2D 플롯은 혼합 변이 및 야생형을 나타낸다. 2D플롯은 음성대조군 NTC(non-template control), 양성대조군, BTC 환자의 담즙 유래 ctDNA에 적용된 ddPCR KRAS 다중 분석 결과이다. 증폭 산물은 C1000 Tough Thermal Cycler(Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 검출되었다. 반응은 95 °C에서 10 분 동안 인큐베이션한 다음, 94 °C에서 30 초, 55 °C에서 60 초, 98 °C에서 10 분 동안 40 주기로 반복하였다. 담즙 ctDNA 및 FFPE DNA의 크기 분포는 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Inc.)로 분석하였다.

[0068] 그 결과, [도 2a] 및 [도 2b] 에서 나타나는 바와 같이, 담즙에서는 대부분의 DNA 단편은 100bp 미만이고 10bp 주기성 피크가 관찰되었다(도 2a A, 35-70bp). FFPE (0-300 bp)DNA는 담즙DNA 단편보다 피크가 컸으며 (도 2a B), 혈장에서는 피크가 거의 나타나지 않았다 (도 2a C). 담즙의 음성대조군, 양성대조군 및 BTC 변이의 히스토그램은 [도 2b] D-F 에 나타냈다. 모든 그림은 y축 12,000(FAM), x 축 12000 (HEX)의 크기로 나타낸다.

실시예 3

[0070] ctDNA 간 KRAS 변이 일치 여부

[0071] KRAS DNA 변이정도 (droplet 당 돌연변이 DNA copy)는 Poisson 분포로 추정하였다. BTC 환자 (14,995 copy/ml)의 담즙 ctDNA에서 변이 DNA의 평균 농도는 CBD 결석 (1000 copy/ml; 도 3 A)인 환자 양성대조군보다 약 10 배 증가하였으며, KRAS 변이 컷오프 값은 > 1500 copy/ml 로 설정하였다(표 2). KRAS변이는 dual multiplex

assay 로 BTC 환자 (N = 42) 중 20 명 (48 %)의 담즙 ctDNA에서 확인하였으며 G12D, G12V, G13D, G12A, G12C, G12R 및 G12S 가 포함되었다. 담즙 ctDNA에 KRAS 변이는 20 명의 환자 중 G12D 및 G12V의 빈도는 각각 20/20(100 %), 9/20(45 %) 이었다 (도 4 B).

[0072] FFPE DNA의 평균 농도 (24,515 copy/ml)는 양성대조군 (4100 copy/ml)보다 약 5 배 증가하였다. 따라서 KRAS 변이에 대한 컷오프 값은 > 4500 copy/ml로 설정 하였다 (표 2). FFPE에서 KRAS 변이는 10 명의 환자 중 대부분 이 G12D 또는 G12V임이 확인되었다 (도 4 C).

[0073] 본 발명자들은 담즙 ctDNA의 농도를 FFPE DNA의 20 쌍 농도와 비교하여 변이 일치율을 평가했다. 동일 담즙 ctDNA 와 FFPE(16/20)간은 80 % 일치하였다 (도 5 D). 이 결과로 담도암에서는 담즙 ctDNA와 FFPE DNA 사이의 변이 일치율을 확인하였으며 KRAS 변이가 예후에 유의한 영향을 미쳤음을 나타낸다.

[0074] 혈장 KRAS ctDNA의 변이 농도는 매우 낮았으며 KRAS 변이는 60 copy/ml의 컷오프 값으로 3 개의 샘플 (18.8 %)에서만 검출되었다 (표 2). 16 개의 혈장 중 14 개의 샘플이 FFPE와 동일샘플이었고 변이 일치율은 42.9 % (6/14)였다.

표 2

	담즙(N=42)		FFPE(N=20)		혈장(N=16)	
	N(%)	DNA 농도	N(%)	DNA 농도	N(%)	DNA 농도
KRAS 다중 돌연변이	20 (47.6)	14995.0 ± 17602.6	10 (50.0)	24515.0 ± 17128.9	3 (18.7)	12.5 ± 26.9
KRAS 점 돌연변이						
p. G12D	20 (100.0)	7917 ± 15436.7	9 (90.0)	6982.0 ± 14951.6	1 (33.3)	4.3 ± 17.5
p. G12V	9 (45.0)	1775.5 ± 3782.3	10 (100.0)	5647.0 ± 8185.9	3 (100.0)	11.8 ± 25.6
p. G12D + p. G12V	20 (100.0)	9692.5 ± 15287.9	10 (100.0)	12632.0 ± 15207.5	3 (100.0)	16.2 ± 37.5

실시예 4

[0077] 동일 환자 담즙, 혈장 및 조직에 대한 전사체 시퀀싱

[0078] 동일 환자 담즙, 조직 및 혈장에서 mRNA 발현 정도를 확인하기 위해 전사체 시퀀싱(transcriptomic sequencing)을 수행하였다.

[0079] DNA 1000 칩 (RNA 단편 > 200bp)을 사용하여 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer로 템플릿 크기 분포를 확인하였다. 동일 환자 담즙, 조직 및 혈장에서 관독된 백만개당 전사체 수가 10 개 미만으로, 발현이 약한 mRNA 는 분석에서 제외하였다. Homo sapiens (GRCh38; release 109.20190607)에 대한 유전자 주석은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 검색하였다. KRAS 유전자 발현의 프로파일은 아래의 옵션으로 RSEM(RNA-Seq by Expectation-Maximization) (v1.3.1)로 결정하였다: estimate, rpsd; seed-length, 15; strandedness, forward.

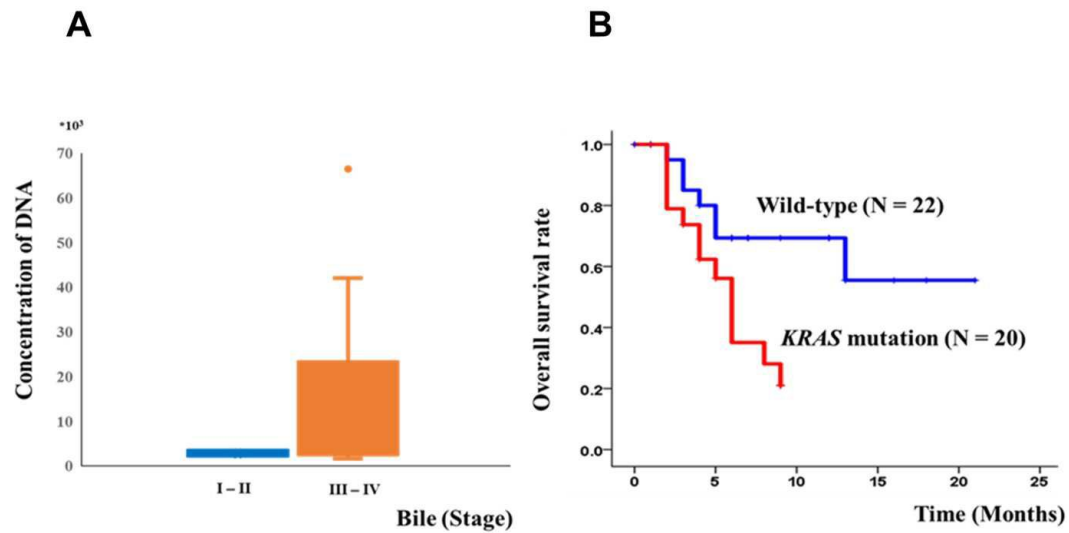
[0080] 동일 환자 담즙, 조직 및 혈장 mRNA에 대한 대표적인 전기 영동도는 [도 6a]에 나타났다. 총 46,425개의 유전자 와 RAS 및 RAF를 포함한 66개의 KRAS 관련 유전자를 세 그룹에서 관찰하였다. KRAS 유전자의 수를 보여주는 벤 다이어그램과 KRAS 관련 발암 유전자의 57.6 %는 담즙과 조직 모두에서 발현되었고(도 6b B), 담즙과 조직간 관련성은 66 개의 KRAS 관련 유전자의 발현이, 담즙과 혈장 (r = 0.985, P < 0.001) 혹은 조직과 혈장 (r = 0.991, P < 0.001)은 강한 양의 상관성(r = 0.991, P < 0.001)을 나타내었다 (도 6b C). 이 결과는 mRNA-Seq로 담즙에서 검출된 KRAS 유전자 발현을 증명한다. 또한 BRAF 및 NRAS와 같이 BTC에서 나타나는 많은 종양 유전자도 담즙에서 검출되었다(데이터는 표시되지 않음). 이러한 데이터는 유전자 발현과 변이 모두 담즙에서 검출될 수 있으며 담즙이 BTC 조직의 유전자 발현 프로파일을 반영함을 시사하고 있다.

[0082] [통계 분석]

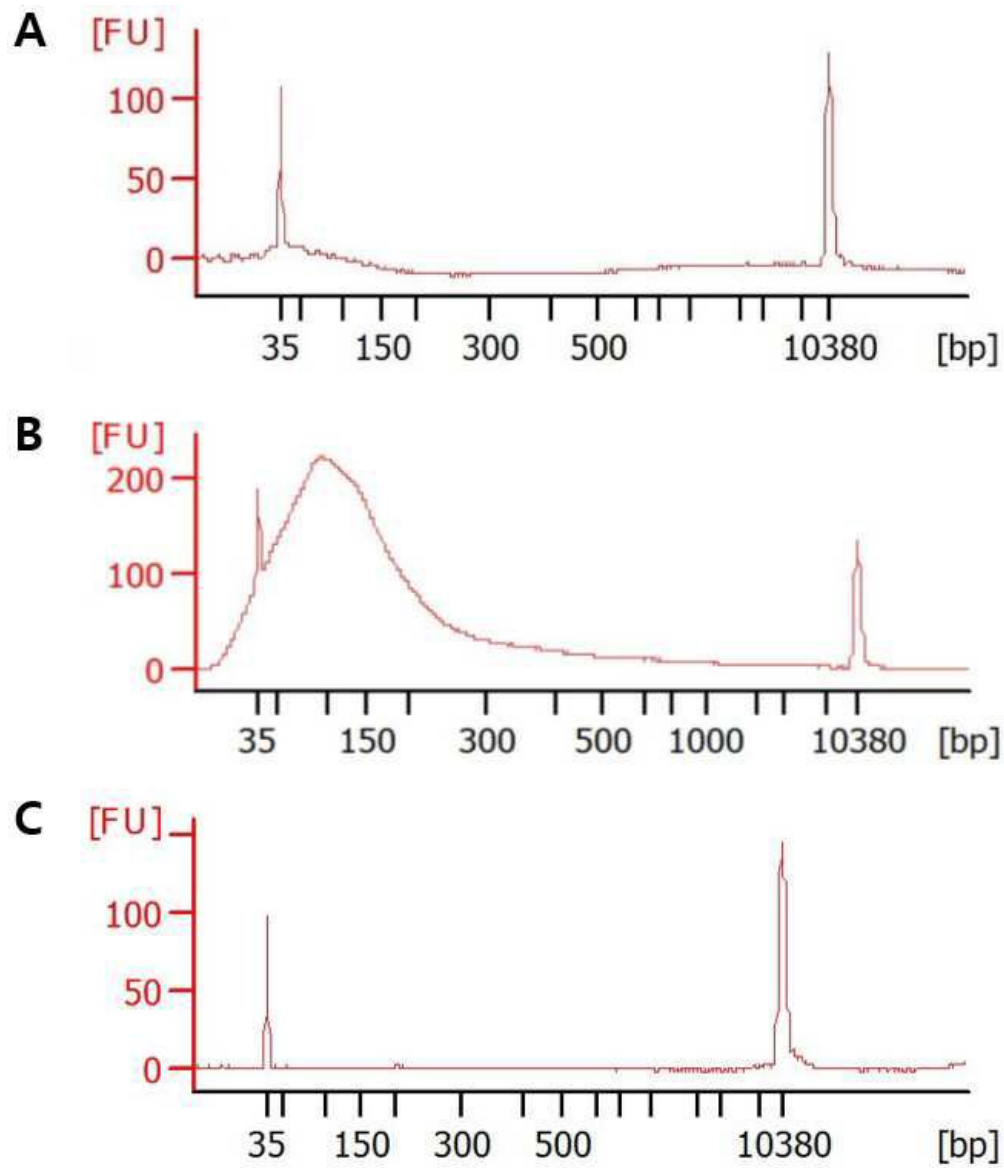
[0083] 모든 통계 분석은 SigmaStat 통계 소프트웨어 (ver. 14.0-ESD, USA)로 수행되었다. 통계 분석 결과에 대한 연속 값은 평균 $\pm$ SD로 표현되었다. 두 그룹 간의 비교를 위해 연속 변수에는 독립 t 검정을 사용하고 범주 변수에는 χ^2 검정을 사용했다. P 값이 0.05 미만인 차이는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

도면

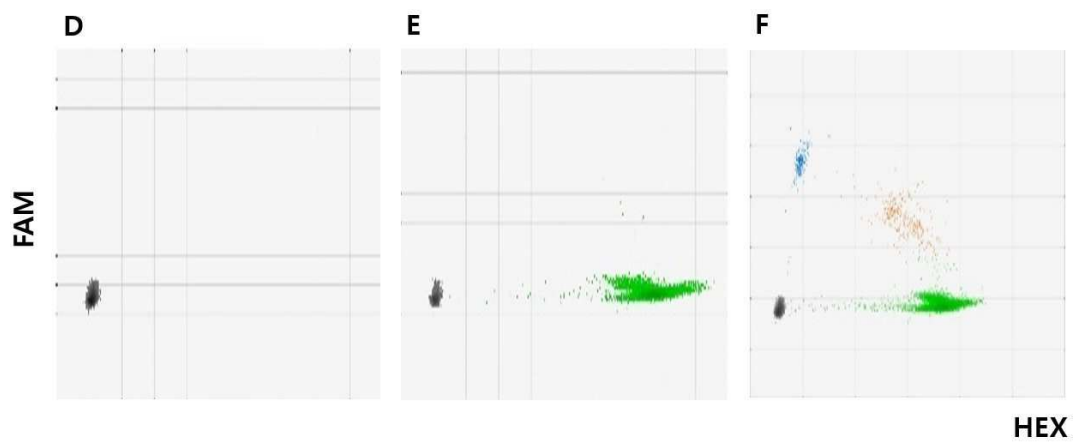
도면1



도면2a

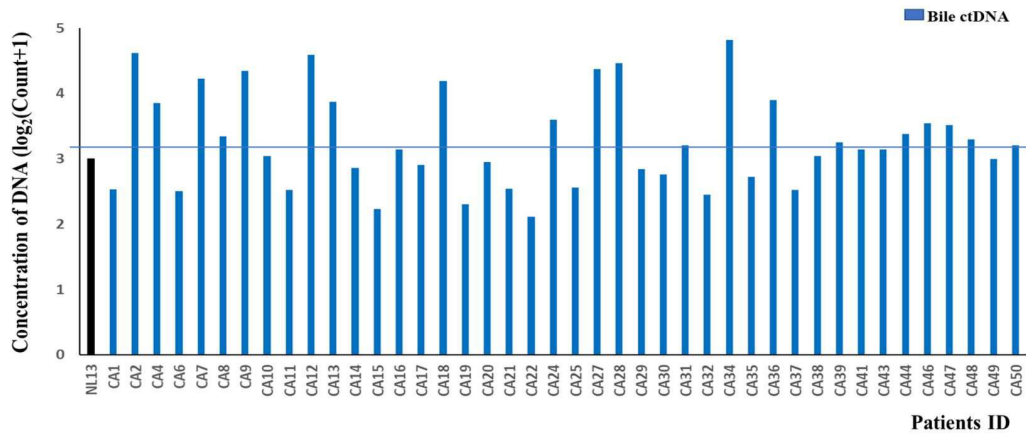


도면2b



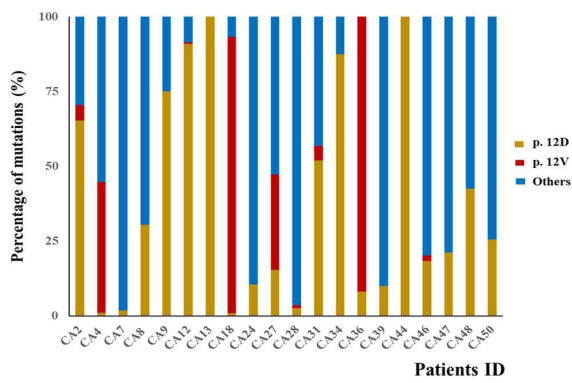
도면3

A

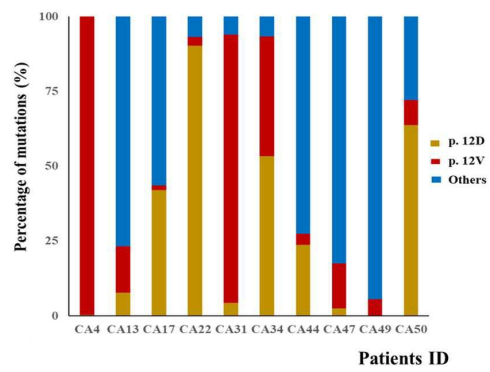


도면4

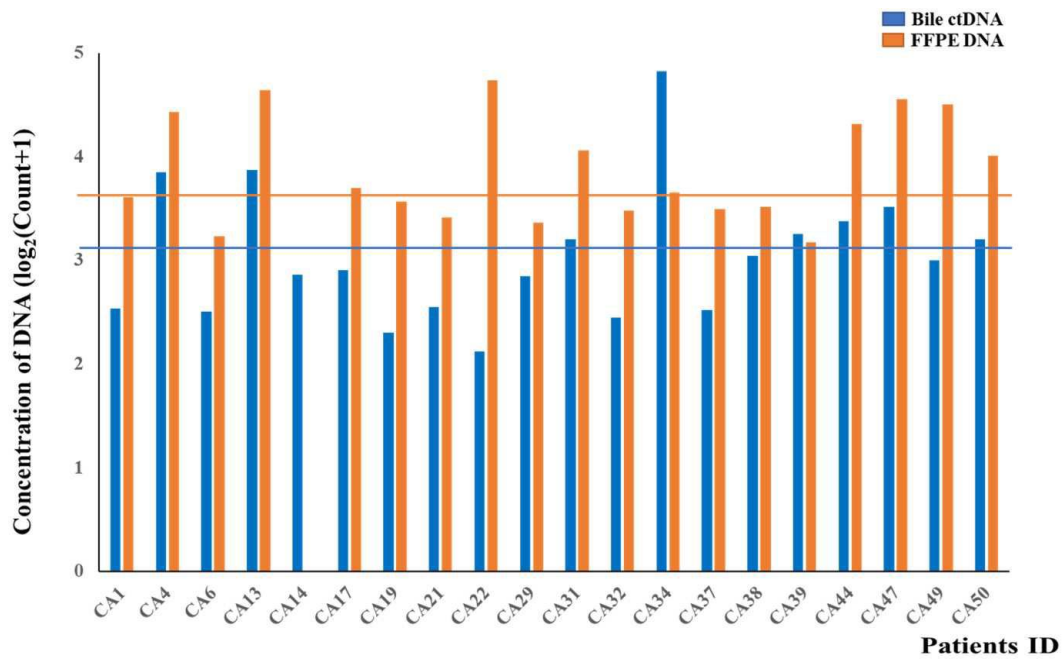
B



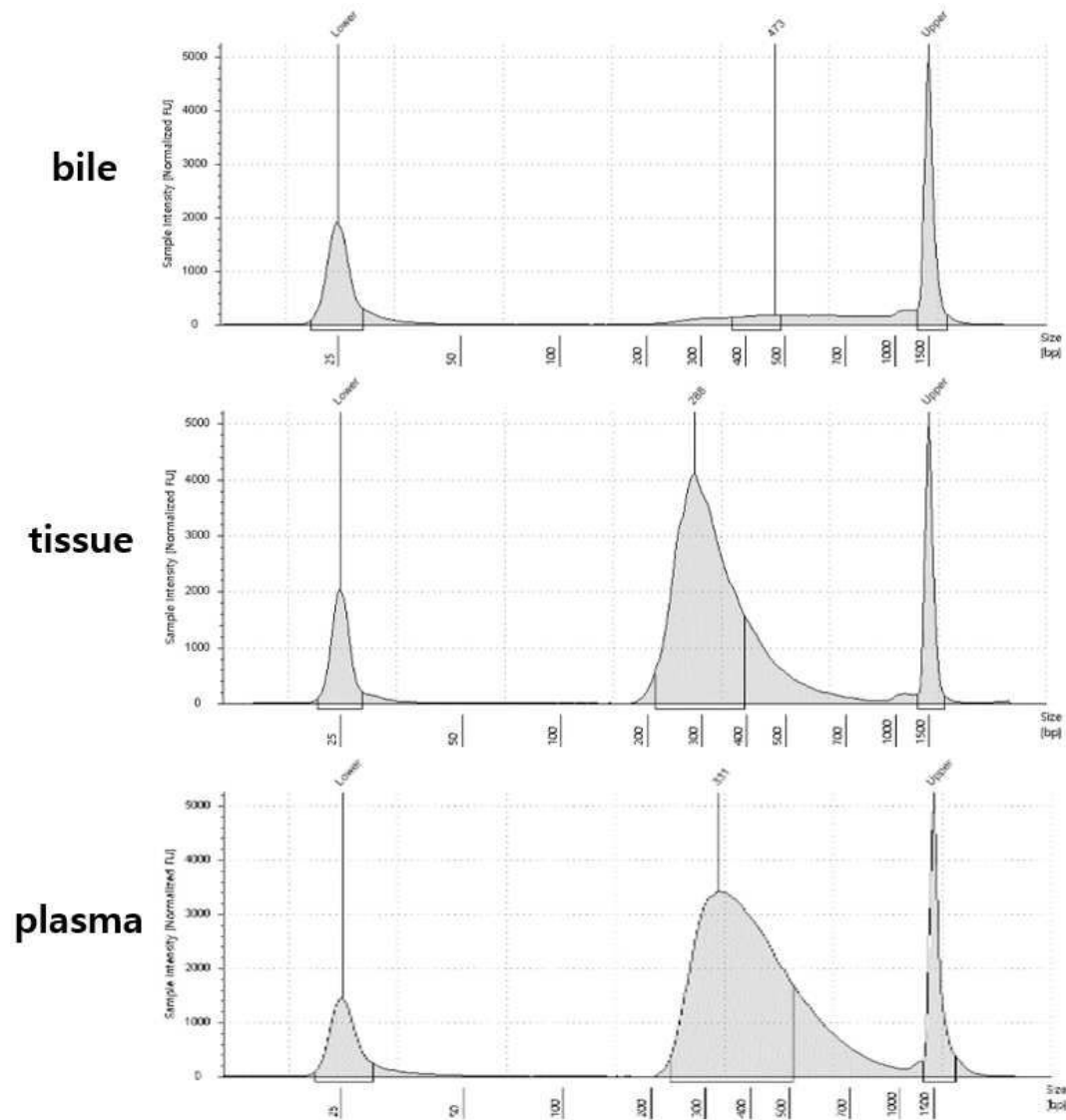
C



도면5



도면6a



도면6b

