



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월14일

(11) 등록번호 10-2769007

(24) 등록일자 2025년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/57419 (2013.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7031563

(22) 출원일자(국제) 2020년02월28일

심사청구일자 2023년02월27일

(85) 번역문제출일자 2021년09월30일

(65) 공개번호 10-2021-0134946

(43) 공개일자 2021년11월11일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/055277

(87) 국제공개번호 WO 2020/178172

국제공개일자 2020년09월10일

(30) 우선권주장

19382156.8 2019년03월01일

유럽특허청(EPO)(EP)

19382157.6 2019년03월01일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

Hongda Chen et al, Clinical Epidemiology
(2017.10.1.), vol 9, pp 517-526.

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 8 항

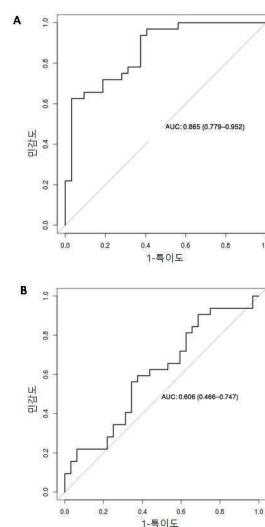
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 대장암 및/또는 이의 전암 단계 진단을 위한 단백질 시그니처

(57) 요약

본 발명은 대장암 및/또는 이의 전암 단계의 진단을 위한 시험관내(in vitro) 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2333/52 (2013.01)

G01N 2800/56 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

H Chen et al, Clinical Cancer Research
(2015.5.26.), vol 21, no 4, pp 3318-3326.

Chen Hongda et al, Journal of Clinical
Epidemiology (2016.2.2.), vol 75, pp 108-114.

Qian Jing et al, (2018.8.1.), vol 104, pp
24-34.

US20140220006 A1

JP2008522172 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

a) 개체로부터 수득한 혈액, 혈청 또는 혈장 시료에서 [F1t3L 및 CYFRA21-1] 조합의 농도 수준을 측정하는 단계를 포함하며, b) 건강한 대조군 개체에서 측정된 기준 농도 수준과 비교하여, 적어도 [F1t3L 및 CYFRA21-1] 조합의 농도 수준의 편차 또는 변동이 확인되는 경우, 개체가 대장암 및/또는 전암 단계를 가진 것을 나타내는 것인,

대장암 및/또는 이의 전암 단계(pre-cancerous stage)를 진단하는 시험관내(in vitro) 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

a) 개체로부터 수득한 혈액, 혈청 또는 혈장 시료에서 적어도 [F1t3L 및 CYFRA21-1 및 AREG] 조합, [F1t3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 ErbB4] 조합, 또는 [F1t3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 CLEC2C] 조합의 농도 수준을 측정하는 단계를 포함하며, b) 건강한 대조군 개체에서 측정된 기준 농도 수준과 비교하여, 단계 a)에 기재된 적어도 하나의 조합의 농도 수준의 편차 또는 변동이 확인되는 경우, 개체가 대장암 및/또는 전암 단계를 가진 것을 나타내는 것인,

대장암 및/또는 이의 전암 단계를 진단하는 시험관내(in vitro) 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

대장암의 전암 단계가 진행성 대장 선종(advanced colorectal adenoma)인, 시험관내 방법.

청구항 4

환자로부터 수득한 혈액, 혈청 또는 혈장 시료 내 [F1t3L 및 CYFRA21-1] 조합의 농도 수준을 결정하기 위한 시약을 포함하는, 대장암 및/또는 이의 전암 단계(pre-cancerous stage)의 진단을 위한 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

환자로부터 수득한 혈액, 혈청 또는 혈장 시료내 [F1t3L 및 CYFRA21-1 및 AREG], 또는 [F1t3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 ErbB4], 또는 [F1t3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 CLEC2C] 조합의 농도 수준을 결정하기 위한 시약을 포함하는, 조성물.

청구항 6

[F1t3L 및 CYFRA21-1], 또는 [F1t3L 및 CYFRA21-1 및 AREG], 또는 [F1t3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 ErbB4], 또는 [F1t3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 CLEC2C]에서 선택되는 적어도 하나의 시그니처의 농도 수준을 결정하기 위한 시약을 포함하는, 부품 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 대장암 및/또는 이의 전암 단계(pre-cancerous stage)의 진단을 위한, 부품 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

대장암의 전암 단계가 진행성 대장 선종인, 부품 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 의료 분야에 포함될 수 있다. 특히, 본 발명은 대장암 및/또는 이의 전암 단계의 진단을 위한 시험관 내(in vitro) 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대장암(Colorectal cancer: CRC)(결장암(colon cancer), 직장암(rectal cancer) 또는 장암(bowel cancer)이라고도 함)은 (대장의 일부인) 결장 또는 직장에 발생한 암이다. 대장암의 대부분은 선암종(adenocarcinoma)이다. 이는, 대장이 조직 내에 수많은 분비샘을 가지고 있기 때문이다. 이들 분비샘이 유전적 수준에서 많은 변화를 겪을 때, 이들은 양성에서 침윤성 악성 대장암으로 옮겨가면서 예측 가능한 방식으로 진행된다. 대장의 선종(adenoma), 특히 진행성 대장 선종(advanced colorectal adenoma: AA)은 악성 선암종의 양성 버전이지만 제거하지 않으면 여전히 악성 잠재력이 있다(이들은 악성이 되고 대장암으로 이어지는 경향이 있으므로 보통 제거됨).

[0003] 검진은 대장암으로 인한 사망을 예방하고 감소시키는 효과적인 방법이며 50세에서 75세 사이에 권장된다. 대장암에 대해 가장 잘 알려지고 가장 많이 사용되는 선별 검사는 분변 면역화학 검사(Fecal Immunochemical Test: FIT)라고 한다. FIT는 분변 시료에서 전암(pre-cancer) 또는 암의 징후일 수 있는 혈액을 검출한다. 비정상적인 결과가 나온 경우, 일반적으로 의사가 결장 및 직장 내부를 관찰하여 진단할 수 있는 대장 내시경 검사가 권장된다. 대장 내시경 검사 중에 작은 용종이 발견되면 제거할 수 있다. 큰 용종이나 종양이 발견되면 암인지 확인하기 위해 생검을 시행할 수 있다. 위장병 전문의는 이러한 선종과 용종을 찾아 제거하기 위해 대장 내시경을 사용하여, 이들이 침윤성 선암종을 야기하는 유전적 변화를 계속해서 획득하는 것을 방지한다.

[0004] 전술한 바와 같이, FIT는 현재 대장암 선별에 사용되지만 FIT가 AA에 대해 낮은 민감도(문헌에 따라 약 20-30%)를 제공한다는 것은, 환자 대부분이 질병에 걸리지 않은 것으로 잘못 분류될 수 있음을 의미한다. 결과적으로 FIT는 민감도가 낮아 선종을 식별할 수 없다. 또한 FIT는 분변 시료를 사용하기 때문에 순응도가 낮다. 한편, 대장 내시경은 침습적 방법으로, 가장 심각한 합병증은 일반적으로 위장관 천공이다. 한편, 대장 내시경은 현재 마취를 수반하는 시술이며, 대장 내시경을 위한 장 준비 과정에서 일반적으로 투여되는 완하제는 여러 소화 장애를 동반한다.

[0005] CRC 또는 AA에 걸릴 위험이 있는 일반 인구집단을 선별하기 위해 현재 사용되는 방법은 높은 비율의 위양성과 관련이 있다는 점에 유의하는 것이 중요하다. 그 결과 요즘에는 불필요한 추적 대장 내시경 검사가 많이 시행되고 있다.

[0006] 본 발명은 혈액, 혈청 또는 혈장과 같은 최소한의 침습적 시료로부터 분리된 단백질 바이오마커의 농도 수준으로부터, 대장암 또는 대장 선종(특히 진행성 대장 선종)에 걸릴 위험이 있는 인간 개체를 식별 또는 선별하기 위한 시험관내 방법에 초점을 맞추고 있기 때문에, 위에서 언급한 문제에 대한 명확한 해결책을 제공한다. 본 발명의 방법은 혈액, 혈청 또는 혈장 시료를 기반으로 하기 때문에, 대장암 선별에 대한 순응도를 향상시킬 것으로 기대된다. 더욱이, 본 발명의 방법은 높은 민감도와 특이도를 제공하는데, 이는 대장암 및 대장 선종의 검출을 위한 강력하고 비용-효율적인 방법임을 의미한다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 혈액, 혈청 또는 혈장과 같은 최소한의 침습적 시료로부터 분리된 단백질 바이오마커의 농도 수준으로부터, 대장암 및/또는 진행성 대장 선종에 걸릴 위험이 있는 인간 개체를 진단, 식별 또는 선별하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 높은 민감도와 특이도를 제공하는데, 이는 대장암 및 대장 선종의 검출을 위한 강력하고 비용-효과적인 방법임을 의미한다.

[0008] 본 발명의 방법은 CRC 또는 AA에 걸릴 위험이 있는 일반 인구집단을 선별하기 위해 현재 사용되는 방법(FIT)에 비해 높은 민감도 및 특이도를 가지기 때문에, 위양성의 낮은 비율과 관련이 있다. 결과적으로, 본 발명에 기술된 방법은 추적 대장 내시경의 횟수를 줄이는 데 분명히 도움이 되며, 따라서 현재 환자를 선별하거나 진단하는 방식을 개선한다. 본 발명의 방법을 수행하여, 환자가 대장암 및/또는 전암 단계를 앓을 수 있다고 판단되는 경우, 대장 내시경 검사를 통해 결과를 확인한다. 그러나 환자가 대장암 및/또는 전암 단계를 앓고 있다고 판단되지 않는 경우에는 대장 내시경 검사를 수행할 필요가 없으며 아래에 정의된 본 발명의 방법으로 정기적인 검사

를 수행하는 것이 권장된다.

- [0009] 특히, 본 발명의 제1 구체예는 a) 개체로부터 수득한 생물학적 시료에서 적어도 FIt3L 의 농도 수준을 측정하는 단계를 포함하며, b) 건강한 대조군 개체에서 측정된 기준 농도 수준과 비교하여, 적어도 FIt3L 의 농도 수준의 편차(deviation) 또는 변동(variation)이 확인되는 경우, 개체가 대장암 및/또는 전암 단계를 가진 것을 나타내는 것인, 대장암 및/또는 이의 전암 단계를 진단하는 시험관내(in vitro) 방법 (이하, "본 발명의 방법")에 관한 것이다.
- [0010] 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 개체로부터 수득된 생물학적 시료에서 적어도 [FIt3L 및 CYFRA21-1] 조합의 농도 수준을 측정하는 것을 포함한다.
- [0011] 이와 관련하여, 본 발명에서 청구된 가장 신뢰할 수 있는 모든 시그니처는 FIt3L, 바람직하게는 [FIt3L 및 CYFRA21-1]을 포함하므로, 우수한 성능으로 CRC 검출을 위해 또한 AA의 검출을 위해 약 0.9의 곡선하 면적(AUC)을 가지는, FIt3L, 바람직하게는 [FIt3L 및 CYFRA21-1], 예를 들어 [FIt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG], [FIt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 ErbB4] 또는 [FIt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 CLEC2C] 을 포함하는 다양한 바이오마커 시그니처의 수득을 고려하는 것이 중요하다 (표 12 참조). FIt3L, 바람직하게는 [FIt3L 및 CYFRA21-1] 을 포함하는 임의의 시그니처가 본 발명에 따라 효과적으로 사용될 수 있지만, FIt3L, 바람직하게는 [FIt3L 및 CYFRA21-1]을 포함하는 다음의 시그니처는 CRC 검출에 대해 및 AA 검출에 대해 우수한 성능으로 0.9 이상의 AUC 값을 제공하기 때문에 특히 바람직하다: [FIt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 ErbB4] (CRC에 대한 AUC = 0.931) 또는 [FIt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 CLEC2C] (CRC에 대한 AUC = 0.915)(표 12 참조).
- [0012] 본 발명의 제2 구체예는 상기 언급된 임의의 시그니처의 농도 수준을 결정하기 위한 시약을 포함하는 부품 키트(kit of parts)에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 FIt3L, 또는 조합 [FIt3L 및 CYFRA21-1], 바람직하게는 [FIt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG], [FIt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 ErbB4] 또는 [FIt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 CLEC2C] 의 농도 수준을 결정하기 위한 시약을 포함하는 키트의, 대장암 및/또는 이의 전암 단계의 진단을 위한 시험관내 용도에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명의 방법에 따르면, 바이오마커의 상기 언급된 임의의 조합의 농도 수준을 측정한 후, 시그니처에 대한 스코어 값을 얻고, 이 스코어 값을 진단 규칙을 정의하는 임계값과 비교한다. 이 스코어 값이 임계값보다 높은 경우, 해당 시료는 양성 시료로 분류되며, 이는 환자가 대장암 및/또는 이의 전암 단계를 앓고 있을 수 있음을 나타낸다. 임계값은 민감도 및 특이도 값을 최적화하기 위해 정의되었다. 결과적으로, 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 a) 개체로부터 수득된 생물학적 시료에서 상기 언급된 임의의 바이오마커 조합의 농도 수준을 측정하는 단계, 및 b) 상기 농도 값을 처리하여 위험 스코어를 얻는 단계를 포함하고, c) 기준 값과 비교하여, 상기 언급된 임의의 바이오마커 조합에 대해 얻은 위험 스코어 값의 편차 또는 변동이 확인되는 경우, 개체는 대장암 및/또는 전암 단계를 가진다는 것을 나타낸다.
- [0014] 본 발명의 제3 구체예는 대장암 및/또는 이의 전암 단계의 진단을 위한, 상기 언급된 임의의 바이오마커 또는 시그니처의 시험관내 용도에 관한 것이다.
- [0015] 바람직한 구체예에서, 대장암의 전암 단계는 진행성 대장 선종이다.
- [0016] 바람직한 구체예에서, 대장암 및/또는 이의 전암 단계의 진단은 영상 기법, 바람직하게는 대장 내시경에 의해 확인된다.
- [0017] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 대장암 및/또는 이의 전암 단계를 검출하기 위한 시험관내 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 a) 인간 환자로부터 혈장 시료를 수득하는 단계; 및 b) 혈장 시료를 단백질 바이오마커 또는 시그니처에 대한 항체와 접촉시키고 단백질과 항체 사이의 결합을 검출함으로써, 상기 언급된 임의의 단백질 바이오마커 또는 시그니처가 혈장 시료에 존재하는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0018] 본 발명의 제4 구체예는 대장암 또는 이의 전암 단계를 진단 및 치료하는 방법에 관한 것으로, a) 인간 환자로부터 혈장 시료를 수득하는 단계; b) 상기 언급된 임의의 단백질 바이오마커 또는 시그니처가 혈장 시료에 존재하는지 여부를 검출하는 단계; c) 혈장 시료에서 상기 단백질 바이오마커 또는 시그니처의 존재가 검출되는 경우 환자가 대장암 또는 이의 전암 단계를 갖는 것으로 진단하는 단계; 및 상기 환자에게 대장 내시경을 시행하고 이후에 대장암 또는 용종을 제거하는 단계를 포함한다.
- [0019] 대안적으로, 본 발명의 제5 구체예는 a) 개체로부터 수득한 생물학적 시료에서 적어도 AREG 의 농도 수준을 측정하는 단계를 포함하며, b) 건강한 대조군 개체에서 측정된 기준 농도 수준과 비교하여, 적어도 AREG 의 농도

수준의 편차 또는 변동이 확인되는 경우, 개체가 대장암 및/또는 전암 단계를 가진 것을 나타내는 것인, 대장암 및/또는 이의 전암 단계를 진단하는 시험관내 방법 (이하, "본 발명의 방법")에 관한 것이다.

- [0020] 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 개체로부터 수득된 생물학적 시료에서 적어도 조합 [AREG 및 CYFRA21-1]의 농도 수준을 측정하는 것을 포함한다.
- [0021] 이와 관련하여, 본 발명에서 청구된 가장 신뢰할 수 있는 모든 시그니처는 AREG, 바람직하게는 [AREG 및 CYFRA21-1]을 포함하므로, 우수한 성능으로 CRC 검출을 위해 또한 AA의 검출을 위해 약 0.9의 곡선하 면적(AUC)을 가지는, AREG, 바람직하게는 [AREG 및 CYFRA21-1]를 포함하는 다양한 바이오마커 시그니처의 수득을 고려하는 것이 중요하다 (표 12bis 참조). 결과적으로, AREG, 바람직하게는 [AREG 및 CYFRA21-1]를 포함하는 임의의 시그니처가 본 발명에 따라 효과적으로 사용될 수 있지만, AREG, 바람직하게는 [AREG 및 CYFRA21-1]을 포함하는 다음의 시그니처는 CRC 검출에 대해 및 AA 검출에 대해 우수한 성능으로 0.9 이상의 AUC값을 제공하기 때문에 특히 바람직하다: [AREG 및 CYFRA21-1 및 F1t3L 및 ErbB4] (CRC에 대한 AUC = 0.931) 또는 [AREG 및 CYFRA21-1 및 F1t3L 및 CLEC2C] (CRC에 대한 AUC = 0.915)(표 12bis 참조).
- [0022] 따라서, 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 개체로부터 수득된 생물학적 시료에서 적어도 조합 [AREG 및 CYFRA21-1 및 F1t3L], 또는 [AREG 및 CYFRA21-1 및 CLEC2C]의 조합, 또는 [AREG 및 CYFRA21-1 및 ErbB4]의 조합, 또는 조합 [AREG 및 CYFRA21-1 및 FasL], 또는 조합 [AREG 및 CYFRA21-1 및 CD147], 또는 조합 [AREG 및 CYFRA21-1 및 HGFR], 또는 [AREG 및 CYFRA21-1 및 F1t3L 및 ErbB4]의 조합, 또는 [AREG 및 CYFRA21-1 및 F1t3L 및 CLEC2C]의 조합, 또는 [AREG 및 CYFRA21-1 및 HGFR 및 CD147]의 조합의 농도 수준을 측정하는 것을 포함한다.
- [0023] 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 개체로부터 수득된 생물학적 시료에서 적어도 조합 [AREG 및 CD147], 또는 [AREG 및 CLEC2C]의 조합, 또는 [AREG 및 HGFR]의 조합, 또는 조합 [AREG 및 CD147 및 HGFR]의 농도 수준을 측정하는 것을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 제6 구체예는 대장암 및/또는 이의 전암 단계의 진단을 위한, 상기 언급된 임의의 시그니처의 시험관내 용도에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 방법에 따르면, 바이오마커의 상기 언급된 임의의 조합의 농도 수준을 측정한 후, 시그니처에 대한 스코어 값을 얻고, 이 스코어 값을 진단 규칙을 정의하는 임계값과 비교한다. 이 스코어 값이 임계값보다 높은 경우, 해당 시료는 양성 시료로 분류되며, 이는 환자가 대장암 및/또는 이의 전암 단계를 앓고 있을 수 있음을 나타낸다. 임계값은 민감도 및 특이도 값을 최적화하기 위해 정의되었다. 결과적으로, 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 a) 개체로부터 수득된 생물학적 시료에서 상기 언급된 임의의 바이오마커 조합의 농도 수준을 측정하는 단계, 및 b) 상기 농도 값을 처리하여 위험 스코어를 얻는 단계를 포함하고, c) 기준 값과 비교하여, 상기 언급된 임의의 바이오마커 조합에 대해 얻은 위험 스코어 값의 편차 또는 변동이 확인되는 경우, 개체는 대장암 및/또는 전암 단계를 가진다는 것을 나타낸다.
- [0026] 본 발명의 제7 구체예는 상기 언급된 임의의 시그니처의 농도 수준을 결정하기 위한 시약을 포함하는 부품 키트에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 상기 언급된 임의의 바이오마커 조합의 농도 수준을 결정하기 위한 시약을 포함하는 키트의, 대장암 및/또는 그의 전암 단계의 진단을 위한 시험관내 용도에 관한 것이다.
- [0027] 바람직한 구체예에서, 대장암의 전암 단계는 진행성 대장 선종이다.
- [0028] 바람직한 구체예에서, 대장암 및/또는 이의 전암 단계의 진단은 영상 기법, 바람직하게는 대장 내시경에 의해 확인된다.
- [0029] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 대장암 및/또는 이의 전암 단계를 검출하기 위한 시험관내 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 a) 인간 환자로부터 혈장 시료를 수득하는 단계; 및 b) 혈장 시료를 단백질 바이오마커 또는 시그니처에 대한 항체와 접촉시키고 단백질과 항체 사이의 결합을 검출함으로써, 상기 언급된 임의의 단백질 바이오마커 또는 시그니처가 혈장 시료에 존재하는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0030] 본 발명의 마지막 구체예는 대장암 또는 이의 전암 단계를 진단 및 치료하는 방법에 관한 것으로, a) 인간 환자로부터 혈장 시료를 수득하는 단계; b) 상기 언급된 임의의 단백질 바이오마커 또는 시그니처가 혈장 시료에 존재하는지 여부를 검출하는 단계; c) 혈장 시료에서 상기 단백질 바이오마커 또는 시그니처의 존재가 검출되는 경우 환자가 대장암 또는 이의 전암 단계를 갖는 것으로 진단하는 단계; 및 상기 환자에게 대장 내시경을 시행하고 이후에 대장암 또는 용종을 제거하는 단계를 포함한다.

- [0031] 본 발명의 목적을 위해 하기 용어들이 정의된다:
- [0032] - 용어 "대장암(colorectal cancer)"은 소장 아래의 장관의 세포들의 암을 특징으로 하는 의학적 병태이다 (즉, 맹장, 상행결장, 횡행결장, 하행결장, S상 결장 및 직장을 포함하는 대장(결장)).
- [0033] - "대장 선종(colorectal adenoma)"이라는 표현은 선종성 용종(adenomatous polyp)이라고도 하는, 대장의 선종을 말하며, 이는 대장암의 양성 및 전암 단계이지만 여전히 대장암으로의 진행 위험이 높다.
- [0034] - "진행성 대장 선종(advanced colorectal adenoma)"이라는 표현은 10mm 이상의 크기를 가지거나 조직학적으로 고도 이형성이거나 또는 용모 성분이 20% 이상인 선종을 의미한다.
- [0035] - "최소한의 침습적 생물학적 시료(minimally-invasive biological sample)"라는 표현은 환자의 혈액을 채취할 때 사용하는 가는 바늘 외에 유해한 기구를 사용하지 않고 환자의 몸에서 채취하여 결과적으로 환자에 유해하지 않은 모든 시료를 말한다. 구체적으로, 최소한의 침습적인 생물학적 시료는 본 발명에서 혈액, 혈청 또는 혈장 시료를 말한다.
- [0036] - "건강한 대조군 개체에서 측정된 기준 농도 수준(reference concentration level measured in healthy control subject)"이라는 표현은 단백질 농도 수준의 "기준 값(reference value)"을 의미한다. 상기 "건강한 대조군 개체에서 측정된 기준 농도 수준" 대비 단백질 농도 수준의 편차(deviation)가 확인된다면, 이는 대장암 또는 이의 전암 단계의 징후이다. 특히, 본 발명의 바이오마커 또는 시그니처의 농도 수준이 상기 "기준 값" 대비 유의적으로 높거나 낮은 경우, 이는 대장암 또는 그의 전암 단계의 표지이다.
- [0037] - "위험 스코어(risk score)"라는 표현은 하나 이상의 농도 값을 단일 값(또는 위험 값)으로 처리하여 얻은 위험 값을 말하며, 이는 개인에 대한 질병의 확률을 나타낸다. 이 위험 값을 기준 값과 비교하여 환자가 대장암 및/또는 이의 전암 단계를 앓고 있는지 여부를 평가할 것이다.
- [0038] - "기준 값(reference value)"은 임계값 또는 컷오프 값일 수 있다. 일반적으로 "임계값(threshold value)" 또는 "컷오프 값(cut-off value)"은 실험적으로, 경험적으로, 또는 이론적으로 결정될 수 있다. 임계값은 또한 당업자에 의해 인식되는 바와 같이 기존의 실험 및/또는 임상 조건에 기초하여 임의로 선택될 수 있다. 검사 기능과 유의성/위해성 균형(위양성 및 위음성의 임상적 결과)에 따라 최적의 민감도와 특이성을 얻기 위해 임계값을 결정해야 한다. 바람직하게는, 당업자는 본 발명의 방법에 따라 수득된 바이오마커 수준(또는 스코어)을 정의된 역치 값과 비교할 수 있다. 일반적으로 최적의 민감도와 특이도 (및 임계값)는 실험 데이터를 기반으로 하는 ROC(수신기 작동 특성) 곡선을 사용하여 결정할 수 있다. 예를 들어, 기준 그룹(group of reference)에서 바이오마커의 수준을 결정한 후, 검사대상 생물학적 시료에서 측정된 바이오마커 농도의 통계적 처리를 위해 알고리즘 분석을 사용할 수 있으며, 따라서 시료 분류에 중요한 분류 표준을 얻을 수 있다. ROC 곡선의 전체 이름은 수신기 작동 특성 곡선(receiver operation characteristic curve)이라고도 하는 수신기 작동자 특성 곡선(receiver operator characteristic curve)이다. 이는 주로 임상 생화학적 진단 검사에 사용된다. ROC 곡선은 참양성률(민감도)과 위양성률(1-특이도)의 연속변수를 반영하는 종합지표이다. 이는 이미지 합성법을 통해 민감도와 특이도의 관계를 나타낸다. 일련의 서로 다른 컷오프 값(임계값(thresholds or critical value), 진단 테스트의 정상 및 비정상 결과 사이의 경계값)을 연속 변수로 설정하여 일련의 민감도 및 특이도 값을 계산한다. 그런 다음 민감도를 수직 좌표로 사용하고 특이도를 수평 좌표로 사용하여 곡선을 그린다. 곡선하 면적(AUC)이 높을수록 진단 정확도가 높아진다. ROC 곡선에서, 좌표도의 가장 왼쪽 상단에 가장 가까운 점은 높은 민감도 값과 높은 특이도 값을 모두 갖는 임계점이다. ROC 곡선의 AUC 값은 1.0에서 0.5 사이이다. AUC>0.5 일 때, AUC가 1에 가까워질수록 진단 결과가 점점 좋아진다. AUC가 0.5와 0.7 사이이면 정확도가 낮다. AUC가 0.7와 0.9 사이이면 정확도가 좋다. AUC가 0.9보다 높으면 정확도가 상당히 높다. 이 알고리즘 방법은 컴퓨터로 수행하는 것이 바람직하다. MedCalc 9.2.0.1 의료 통계 소프트웨어 SPSS 9.0과 같은 당해 기술 분야의 기존 소프트웨어 또는 시스템이 ROC 곡선을 그리는 데 사용될 수 있다.
- [0039] - "포함하는"은 "포함하는"이라는 단어 뒤에 오는 모든 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 의미이다. 따라서 용어 "포함하는"의 사용은 나열된 요소가 필요하거나 필수적이지만 다른 요소는 선택 사항이며 존재할 수도 있고 없을 수도 있음을 나타낸다.
- [0040] - "~로 구성된"은 "~로 구성된"이라는 문구 뒤에 오는 것이 무엇이든 "포함하고, 이에 제한되는"을 의미한다. 따라서 "~로 구성된"이라는 문구는 나열된 요소가 필요하거나 필수적이며 다른 요소가 없을 수 있음을 나타낸다.

[0041] 본 발명의 목적을 위해 하기 단백질들이 Uniprot 데이터베이스에서 확인된다:

표 1

[0042]

약어	단백질명	Uniprot ID.
AREG	Amphiregulin	P15514
CD147	Basigin	P35613
CLEC2C	Early activation antigen CD69	Q07108
CYFRA21-1	Cytokeratin fragment antigen 21-1	N/A
ErbB4	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4	Q15303
FasL	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	P48023
Flt3L	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand	P49771
HGFR	Hepatocyte growth factor receptor	P08581
IFNgamma	Interferon gamma	P01579

도면의 간단한 설명

[0043]

도 1. A) 대장암에서 [Flt3L 및 CYFRA21-1]에 대한 ROC (Receiver-operating-characteristic) 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.865. B) 진행성 대장 선종에서 [Flt3L 및 CYFRA21-1]에 대한 ROC 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.606. X축은 특이도(Specificity)를 나타낸다. Y축은 민감도(Sensitivity)를 나타낸다.

도 2. A) 대장암에서 [Flt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG]에 대한 ROC (Receiver-operating-characteristic) 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.899. B) 진행성 대장 선종에서 [Flt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG]에 대한 ROC 곡선.

곡선하 면적(AUC) = 0.720. X축은 특이도(Specificity)를 나타낸다. Y축은 민감도(Sensitivity)를 나타낸다.

도 3. A) 대장암에서 [Flt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 ErbB4]에 대한 ROC (Receiver-operating-characteristic) 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.931. B) 진행성 대장 선종에서 [Flt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 ErbB4]에 대한 ROC 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.707. X축은 특이도(Specificity)를 나타낸다. Y축은 민감도(Sensitivity)를 나타낸다.

도 4. A) 대장암에서 [Flt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 CLEC2C]에 대한 ROC (Receiver-operating-characteristic) 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.915. B) 진행성 대장 선종에서 [Flt3L 및 CYFRA21-1 및 AREG 및 CLEC2C]에 대한 ROC 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.727. X축은 특이도(Specificity)를 나타낸다. Y축은 민감도(Sensitivity)를 나타낸다.

도 5. A) 대장암에서 [AREG 및 CYFRA21-1]에 대한 ROC (Receiver-operating-characteristic) 곡선. Area Under Curve (AUC) = 0.878. 곡선하 면적(AUC) = 0.878. B) 진행성 대장 선종에서 [AREG 및 CYFRA21-1]에 대한 ROC 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.722. X축은 특이도(Specificity)를 나타낸다. Y축은 민감도(Sensitivity)를 나타낸다.

도 6. A) 대장암에서 [AREG 및 CYFRA21-1 및 Flt3L 및 ErbB4]에 대한 ROC (Receiver-operating-characteristic) 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.931. B) 진행성 대장 선종에서 [AREG 및 CYFRA21-1 및 Flt3L 및 ErbB4]에 대한 ROC 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.707. X축은 특이도(Specificity)를 나타낸다. Y축은 민감도(Sensitivity)를 나타낸다.

도 7. A) 대장암에서 [AREG 및 CYFRA21-1 및 Flt3L 및 CLEC2C]에 대한 ROC (Receiver-operating-characteristic) 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.915. B) 진행성 대장 선종에서 [AREG 및 CYFRA21-1 및 Flt3L 및 CLEC2C]에 대한 ROC 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.727. X축은 특이도(Specificity)를 나타낸다. Y축은 민감도(Sensitivity)를 나타낸다.

도 8. A) 대장암에서 [AREG 및 CYFRA21-1 및 CD147 및 HGFR]에 대한 ROC (Receiver-operating-characteristic) 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.888.

B) 진행성 대장 선종에서 [AREG 및 CYFRA21-1 및 CD147 및 HGFR]에 대한 ROC 곡선. 곡선하 면적(AUC) = 0.769. X축은 특이도(Specificity)를 나타낸다. Y축은 민감도(Sensitivity)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시에 1. 재료 및 방법.

실시에 1.1. 연구 집단.

8개의 스페인 병원(Hospital de Burgos, Hospital de Vigo, Hospital de Donosti, Hospital de Ourense, Hospital del Bierzo, Hospital de Belvígte 및 Hospital de Zaragoza)으로부터 총 96명의 개체가 이 연구에 전향적으로 포함되었다: 산발성 대장 종양(sporadic colorectal neoplasia)(CRC 32명, AA 32명)으로 새로이 진단된 64명의 환자 및 개인 암 병력이 없으며 최근 대장내시경을 통해 결장직장종양 병변이 없음을 확인한 32명의 건강한 개인. AA 환자는 10mm 이상의 크기를 갖는 선종이 있거나, 조직학적으로 고도 이형성이거나, 또는 >20% 용모 성분을 갖는 환자였다. 참가자의 특성은 표 1에 나타내었다. 모든 개인에서 내시경 또는 수술 전에 혈액 시료를 수집하였다.

표 2

표 1: 연구 코호트의 임상-병리학적 특성

사례	대조군(CTL)	AA	CRC	총
평균 연령(SD)	64.3(44-86)	65.1(52-88)	71.6(54-85)	67(44-88)
성				
남성	13	18	18	49(51%)
여성	19	14	14	47(49%)
대장 특징				
TNM 단계				
I			4	
II			9	
III			10	
IV			6	
모름			3	
위치				
상행결장 및 맹장			10	
하행결장 및 S상 결장			12	
횡행결장			3	
직장			3	
모름			4	
진행성 대장 선종 특성				
크기 (10mm 이상)		28		
작은 AA (15mm 이하)		19		
큰 AA (15mm 초과)		13		
평균 크기(mm)(SD)		18.8		
No.AA 평균(SD)		2.3		
고도 이형성				
해당		9		
해당하지 않음		21		
모름		2		
용모성분				
해당		13		
해당하지 않음		17		
모름		2		

연구는 각 병원의 기관 윤리 위원회의 승인을 받았으며 헬싱키 선언에 따라 모든 참가자로부터 서면 동의서를 받았다.

- [0049] **실시예 1.2. 시료 준비.**
- [0050] 각 참가자로부터 10mL의 전혈을 EDTA K2 함유 튜브에 수집했다. 혈액 시료는 혈장이 분리될 때까지 4℃에 두었다. 시료를 4℃에서 10분 동안 1,600 x g에서 원심분리하여 혈액 세포를 회전시키고, 혈장을 새 튜브로 옮긴 후 4℃에서 10분 동안 16,000 x g에서 추가로 원심분리하여 세포 성분을 완전히 제거하였다.
- [0051] **실시예 1.3. 분자적 분석.**
- [0052] 혈장 시료에서 바이오마커의 농도는 상용 ELISA(효소 결합 면역흡착 분석) 및 CLIA(화학발광 면역분석) 테스트를 사용하고 해당 사용 설명서에 따라 설정하였다. HGFR 및 ErbB4는 Cloud clone Corp.의 ELISA 키트로 분석하였다. CD147, CLEC2C, Flt3L 및 FasL의 수준은 Elabscience의 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다. IFNgamma의 경우, Abcam의 ELISA 키트를 사용하였다. CLIA 테스트와 관련하여, CYFRA21-1 및 AREG는 Cloud Clone Corp.의 CLIA 테스트로 분석하였다.
- [0053] **실시예 1.4. 데이터 정량화.**
- [0054] 단백질 정량화 단계를 위해 시료를 해당 키트(ELISA/CLIA)로 처리하고 실험 플레이트에 배포하였다. 각 플레이트에는 표준 곡선을 구성하는 데 사용되는 대조군 데이터도 포함되어 있다. 각 실행에서 얻은 형광 데이터(정수로 표시)는 각 시료에 대해 배경 보정을 하고 2차 다항식 회귀 모델을 사용하여 생성된 표준 곡선을 사용하여 정량화하였다.
- [0055] **실시예 1.5. 통계적 분석.**
- [0056] 개체들의 세 그룹을 분석에서 고려하였다. CRC(대장암 진단을 받은 개체), AA(진행성 선종 진단을 받은 개체) 및 CTL(질병이 없는 개체).
- [0057] 원시 정량 데이터는 제공된 함수를 적용한 다음 변환 후, 각 단백질 측정값이 평균 0과 표준 편차 1을 갖도록 센터링 및 스케일링을 통해 변환하였다. 정량 값은 표 2 및 표 3에 요약되어 있으며, 여기서 각 단백질은 고려되는 다른 그룹의 중앙값 및 사분위수 범위로 기재된다.
- [0058] 데이터의 비정규성은 Shapiro-Wilk 테스트에 의해 확인하였으며, 결과적으로 Wilcoxon 순위-합 테스트를 사용하여 CRC 사례 또는 AA 사례를 CTL 개체와 비교하였다.
- [0059] 개별 단백질 및 이들의 일부 조합에 대한 진단 성능은 수신기 작동 특성(ROC) 곡선과 ROC 곡선하 면적(AUC)으로 평가하였다. 또한, 상이한 테스트들에 대한 민감도, 특이도, 양의 예측값 및 음의 예측값(PPV 및 NPV)은 최고의 Youden 지수(또는 동등하게, 민감도와 특이도의 합을 최대화하는 ROC 지점)에 의해 정의된 최적의 컷오프 지점에서 계산되었다.
- [0060] ROC-AUC 및 나머지 성능 값을 유도하는 데 사용된 점수는 개별 단백질에 대한 단변량 로지스틱 회귀 모델 및 고려된 다양한 단백질 조합에 대한 다변량 로지스틱 회귀 모델을 사용하여 얻었다. AUC에 대한 95% CI는 개별 마커 및 이들의 조합 모두에서 DeLong 방법론으로 획득하였다.
- [0061] **실시예 2. 결과.**
- [0062] **실시예 2.1. 개별 마커 결과.**
- [0063] 개별 단백질을 평가하기 위한 다양한 측정기준을 결정하였으며, CRC/AA 대 CTL 비교도 가능하였다. AREG, CYFRA21-1 및 Flt3L은 CRC 그룹과 CTL 그룹 간에 유의적으로 다르며, 이들의 AUC는 0.5 부터 유의적으로 다르다는 것을 확인할 수 있다(95% 신뢰 구간에는 0.5가 포함되지 않음). AA 그룹의 경우에도, AREG 가 CTL군과 통계적으로 차이가 있음을 보여준다.
- [0064] 표 2 및 표 3은 최고의 Youden 지수를 사용하여 ROC 곡선의 컷오프 지점에서 계산된, Wilcoxon 테스트의 p-값(p.Wilc), ROC 곡선하 면적(AUC) 및 민감도(Sens.), 특이도(Spec.), 양성 예측값(VPP) 및 음성 예측값(VPN)을 포함한 개별 단백질에 대한 측정기준을 보여준다. 기호 옆은 p-값이 0.25 미만인 바이오마커의 경우 마커의 높은 수준이 질병 위험을 증가 또는 감소시키는지(각각 + 및 -) 여부를 나타낸다.

[0065]

표 2

	CRC 대 CTL						
	p.Wilc.	기호	AUC	Sens.	Spec.	VPP	VPN
AREG	0.0008	+	0.744 (0.619,0.868)	65.62	81.25	77.78	70.27
CD147	0.5280		0.546 (0.402,0.691)	53.12	62.50	58.62	57.14
CLEC2C	0.2021	+	0.593 (0.452,0.734)	93.75	28.12	56.60	81.82
CYFRA21-1	0.0000	+	0.795 (0.682,0.909)	90.62	68.75	74.36	88.00
ErbB4	0.1177	-	0.614 (0.47,0.758)	53.12	75.00	68.00	61.54
FasL	0.1859	+	0.598 (0.454,0.741)	54.84	68.75	62.96	61.11
FIt3L	0.0191	-	0.67 (0.531,0.809)	56.25	84.38	78.26	65.85
HGFR	0.1729	+	0.6 (0.452,0.747)	65.62	68.75	67.74	66.67
IFNgamma	0.1537	+	0.604 (0.464,0.745)	68.75	53.12	59.46	62.96

표 4

[0066]

표 3

	AA 대 CTL						
	p.Wilc.	기호	AUC	Sens.	Spec.	VPP	VPN
AREG	0.0286	+	0.66 (0.525,0.795)	87.50	40.62	59.57	76.47
CD147	0.1772	+	0.599 (0.458,0.739)	87.50	31.25	56.00	71.43
CLEC2C	0.7831		0.521 (0.376,0.665)	100.00	9.38	52.46	100.00
CYFRA21-1	0.1412	+	0.607 (0.467,0.748)	90.62	37.50	59.18	80.00
ErbB4	0.3270		0.572 (0.427,0.716)	50.00	71.88	64.00	58.97
FasL	0.5730		0.542 (0.394,0.689)	74.19	46.88	57.50	65.22
FIt3L	0.8155		0.518 (0.372,0.663)	43.75	75.00	63.64	57.14
HGFR	0.0678	+	0.633 (0.493,0.773)	68.75	62.50	64.71	66.67
IFNgamma	0.8467		0.515 (0.37,0.659)	81.25	31.25	54.17	62.50

[0067]

실시예 2.2. 최고의 바이오마커 조합.

[0068]

개별 진단 능력을 향상시키기 위해, 단백질 조합들을 다음 절차에 따라 탐색하였다: CRC 대 CTL(표 3) 또는 AA 대 CTL(표 4) 비교에서 $p < 0.25$ 인 마커를 토대로, 다변량 로지스틱 회귀를 사용하여, 동시에 취해진 이들 단백질 중 2, 3, 4개의 모든 가능한 조합을 탐색하였다.

[0069]

표 4, 표 5, 표 5 bis, 표 6 및 표 6 bis는 각각 CRC 대 CTL을 구별하는 2개, 3개 및 4개의 바이오마커의 조합에 대해 달성된 AUC를 보여준다.

표 5

[0070]

표 4

CRC 대 CTL 에 대한 2개 바이오마커의 조합	AUC
AREG, CYFRA21-1	0.8779297
FIt3L, CYFRA21-1	0.8652344
CYFRA21-1, ErbB4	0.8359375
AREG, CLEC2C	0.8349609
CYFRA21-1, IFNgamma	0.8017578
CYFRA21-1, FasL	0.7993952
CLEC2C, CYFRA21-1	0.7988281
CYFRA21-1, HGFR	0.7919922
AREG, FIt3L	0.7832031
AREG, HGFR	0.7626953
AREG, IFNgamma	0.7431641

AREG, ErbB4	0.7324219
AREG, FasL	0.7247984
Flt3L, HGFR	0.6982422
CLEC2C, Flt3L	0.6953125
ErbB4, Flt3L	0.6914062
FasL, Flt3L	0.6814516
Flt3L, IFNgamma	0.6708984
ErbB4, IFNgamma	0.6318359
ErbB4, HGFR	0.6142578
CLEC2C, IFNgamma	0.6083984
CLEC2C, ErbB4	0.6064453
FasL, HGFR	0.6018145
HGFR, IFNgamma	0.5869141
CLEC2C, FasL	0.5866935
ErbB4, FasL	0.5856855
FasL, IFNgamma	0.5836694
CLEC2C, HGFR	0.5810547

표 6

표 5

[0071]

Flt3L+CYFRA21-1 조합을 지지하는 CRC 대 CTL 에 대한 3개 바이오마커의 조합	AUC
Flt3L, CYFRA21-1, AREG	0.8994141
AREG, CLEC2C, CYFRA21-1	0.8955078
AREG, CYFRA21-1, ErbB4	0.8955078
AREG, CYFRA21-1, FasL	0.8931452
Flt3L, CYFRA21-1	0.8847656
AREG, CYFRA21-1, IFNgamma	0.8837891
AREG, CYFRA21-1, HGFR	0.8759766
Flt3L, CYFRA21-1, CLEC2C	0.8681641
Flt3L, CYFRA21-1, FasL	0.8679435
Flt3L, CYFRA21-1, IFNgamma	0.8671875
Flt3L, CYFRA21-1, HGFR	0.8662109
AREG, CLEC2C, Flt3L	0.8427734
CYFRA21-1, ErbB4, HGFR	0.8388672
CYFRA21-1, ErbB4, IFNgamma	0.8359375
CLEC2C, CYFRA21-1, ErbB4	0.8349609
AREG, CLEC2C, HGFR	0.8330078
CYFRA21-1, ErbB4, FasL	0.8326613
AREG, CLEC2C, FasL	0.8316532
AREG, CLEC2C, ErbB4	0.8300781
AREG, CLEC2C, IFNgamma	0.8173828
AREG, Flt3L, HGFR	0.8066406
CLEC2C, CYFRA21-1, IFNgamma	0.8066406
CYFRA21-1, FasL, IFNgamma	0.8054435
CYFRA21-1, HGFR, IFNgamma	0.8037109
CYFRA21-1, FasL, HGFR	0.8014113
CLEC2C, CYFRA21-1, FasL	0.7973790
CLEC2C, CYFRA21-1, HGFR	0.7968750
AREG, ErbB4, Flt3L	0.7841797
AREG, Flt3L, IFNgamma	0.7832031
AREG, FasL, Flt3L	0.7782258
AREG, ErbB4, HGFR	0.7705078
AREG, HGFR, IFNgamma	0.7666016
AREG, FasL, HGFR	0.7641129
AREG, ErbB4, IFNgamma	0.7451172

AREG,FasL,IFNgamma	0.7358871
AREG,ErbB4,FasL	0.7197581
ErbB4,Flt3L,HGFR	0.7119141
CLEC2C,FasL,Flt3L	0.7076613
CLEC2C,ErbB4,Flt3L	0.7031250
ErbB4,FasL,Flt3L	0.7006048
CLEC2C,Flt3L,HGFR	0.6962891
FasL,Flt3L,HGFR	0.6935484
CLEC2C,Flt3L,IFNgamma	0.6933594
Flt3L,HGFR,IFNgamma	0.6894531
ErbB4,Flt3L,IFNgamma	0.6875000
FasL,Flt3L,IFNgamma	0.6814516
ErbB4,FasL,IFNgamma	0.6250000
ErbB4,HGFR,IFNgamma	0.6230469
CLEC2C,ErbB4,IFNgamma	0.6191406
ErbB4,FasL,HGFR	0.6139113
CLEC2C,ErbB4,HGFR	0.6123047
CLEC2C,ErbB4,FasL	0.6068548
CLEC2C,FasL,IFNgamma	0.6048387
FasL,HGFR,IFNgamma	0.5997984
CLEC2C,FasL,HGFR	0.5967742
CLEC2C,HGFR,IFNgamma	0.5966797

표 7

표 5 bis

[0072]

AREG+CYFRA21-1 조합을 지지하는 CRC 대 CTL 에 대한 3개 바이오마커의 조합	AUC
AREG,CYFRA21-1,Flt3L	0.8994141
AREG,CYFRA21-1,CLEC2C	0.8955078
AREG,CYFRA21-1,ErbB4	0.8955078
AREG,CYFRA21-1,FasL	0.8931452
CYFRA21-1,ErbB4,Flt3L	0.8847656
AREG,CYFRA21-1,IFNgamma	0.8837891
AREG,CYFRA21-1,HGFR	0.8759766
CLEC2C,CYFRA21-1,Flt3L	0.8681641
CYFRA21-1,FasL,Flt3L	0.8679435
CYFRA21-1,Flt3L,IFNgamma	0.8671875
CYFRA21-1,Flt3L,HGFR	0.8662109
AREG,CLEC2C,Flt3L	0.8427734
CYFRA21-1,ErbB4,HGFR	0.8388672
CYFRA21-1,ErbB4,IFNgamma	0.8359375
CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4	0.8349609
AREG,CLEC2C,HGFR	0.8330078
CYFRA21-1,ErbB4,FasL	0.8326613
AREG,CLEC2C,FasL	0.8316532
AREG,CLEC2C,ErbB4	0.8300781
AREG,CLEC2C,IFNgamma	0.8173828
AREG,Flt3L,HGFR	0.8066406
CLEC2C,CYFRA21-1,IFNgamma	0.8066406
CYFRA21-1,FasL,IFNgamma	0.8054435
CYFRA21-1,HGFR,IFNgamma	0.8037109
CYFRA21-1,FasL,HGFR	0.8014113
CLEC2C,CYFRA21-1,FasL	0.7973790
CLEC2C,CYFRA21-1,HGFR	0.7968750
AREG,ErbB4,Flt3L	0.7841797
AREG,Flt3L,IFNgamma	0.7832031

AREG,FasL,Flt3L	0.7782258
AREG,ErbB4,HGFR	0.7705078
AREG,HGFR,IFNgamma	0.7666016
AREG,FasL,HGFR	0.7641129
AREG,ErbB4,IFNgamma	0.7451172
AREG,FasL,IFNgamma	0.7358871
AREG,ErbB4,FasL	0.7197581
ErbB4,Flt3L,HGFR	0.7119141
CLEC2C,FasL,Flt3L	0.7076613
CLEC2C,ErbB4,Flt3L	0.7031250
ErbB4,FasL,Flt3L	0.7006048
CLEC2C,Flt3L,HGFR	0.6962891
FasL,Flt3L,HGFR	0.6935484
CLEC2C,Flt3L,IFNgamma	0.6933594
Flt3L,HGFR,IFNgamma	0.6894531
ErbB4,Flt3L,IFNgamma	0.6875000
FasL,Flt3L,IFNgamma	0.6814516
ErbB4,FasL,IFNgamma	0.6250000
ErbB4,HGFR,IFNgamma	0.6230469
CLEC2C,ErbB4,IFNgamma	0.6191406
ErbB4,FasL,HGFR	0.6139113
CLEC2C,ErbB4,HGFR	0.6123047
CLEC2C,ErbB4,FasL	0.6068548
CLEC2C,FasL,IFNgamma	0.6048387
FasL,HGFR,IFNgamma	0.5997984
CLEC2C,FasL,HGFR	0.5967742
CLEC2C,HGFR,IFNgamma	0.5966797

표 8

[0073]

표 6

Flt3L+CYFRA21-1 조합을 지지하는 CRC 대 CTL 에 대한 4개 바이오마커의 조합	AUC
Flt3L,CYFRA21-1,ErbB4,AREG	0.9306641
Flt3L,CYFRA21-1,AREG,CLEC2C	0.9150391
AREG,CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4	0.9023438
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,FasL	0.9022177
AREG,CLEC2C,CYFRA21-1,IFNgamma	0.9003906
Flt3L,CYFRA21-1,HGFR,AREG,	0.9003906
AREG,CLEC2C,CYFRA21-1,FasL	0.9002016
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,IFNgamma	0.8994141
Flt3L,CYFRA21-1,IFNgamma,AREG	0.8984375
Flt3L,CYFRA21-1,FasL,AREG	0.8981855
AREG,CYFRA21-1,FasL,IFNgamma	0.8951613
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,HGFR	0.8945312
AREG,CLEC2C,CYFRA21-1,HGFR	0.8935547
AREG,CYFRA21-1,FasL,HGFR	0.8901210
Flt3L,CYFRA21-1,ErbB4,HGFR	0.8867188
Flt3L,CYFRA21-1,ErbB4,IFNgamma	0.8867188
AREG,CYFRA21-1,HGFR,IFNgamma	0.8847656
Flt3L,CYFRA21-1,ErbB4,CLEC2C	0.8847656
Flt3L,CYFRA21-1,ErbB4,FasL	0.8830645
Flt3L,CYFRA21-1,FasL,IFNgamma	0.8689516
Flt3L,CYFRA21-1,HGFR,IFNgamma	0.8671875
Flt3L,CYFRA21-1,FasL,HGFR	0.8669355
Flt3L,CYFRA21-1,IFNgamma,CLEC2C	0.8662109
Flt3L,CYFRA21-1,FasL,CLEC2C	0.8649194

F1t3L, CYFRA21-1, HGFR, CLEC2C	0.8632812
AREG, CLEC2C, F1t3L, HGFR	0.8564453
AREG, CLEC2C, ErbB4, F1t3L	0.8457031
AREG, CLEC2C, FasL, F1t3L	0.8447581
AREG, CLEC2C, F1t3L, IFNgamma	0.8447266
CYFRA21-1, ErbB4, HGFR, IFNgamma	0.8417969
CLEC2C, CYFRA21-1, ErbB4, HGFR	0.8398438
AREG, CLEC2C, ErbB4, HGFR	0.8378906
CLEC2C, CYFRA21-1, ErbB4, IFNgamma	0.8359375
AREG, CLEC2C, ErbB4, FasL	0.8346774
AREG, CLEC2C, FasL, HGFR	0.8326613
CLEC2C, CYFRA21-1, ErbB4, FasL	0.8326613
CYFRA21-1, ErbB4, FasL, IFNgamma	0.8326613
CYFRA21-1, ErbB4, FasL, HGFR	0.8316532
AREG, CLEC2C, HGFR, IFNgamma	0.8271484
AREG, CLEC2C, ErbB4, IFNgamma	0.8251953
AREG, CLEC2C, FasL, IFNgamma	0.8245968
AREG, ErbB4, F1t3L, HGFR	0.8203125
CLEC2C, CYFRA21-1, FasL, IFNgamma	0.8074597
AREG, F1t3L, HGFR, IFNgamma	0.8066406
CYFRA21-1, FasL, HGFR, IFNgamma	0.8064516
CLEC2C, CYFRA21-1, HGFR, IFNgamma	0.8056641
AREG, FasL, F1t3L, HGFR	0.7993952
CLEC2C, CYFRA21-1, FasL, HGFR	0.7983871
AREG, ErbB4, F1t3L, IFNgamma	0.7861328
AREG, ErbB4, HGFR, IFNgamma	0.7802734
AREG, ErbB4, FasL, F1t3L	0.7802419
AREG, FasL, F1t3L, IFNgamma	0.7772177
AREG, ErbB4, FasL, HGFR	0.7721774
AREG, FasL, HGFR, IFNgamma	0.7681452
AREG, ErbB4, FasL, IFNgamma	0.7419355
ErbB4, FasL, F1t3L, HGFR	0.7358871
CLEC2C, ErbB4, FasL, F1t3L	0.7167339
CLEC2C, FasL, F1t3L, HGFR	0.7086694
CLEC2C, FasL, F1t3L, IFNgamma	0.7056452
CLEC2C, ErbB4, F1t3L, HGFR	0.7050781
ErbB4, F1t3L, HGFR, IFNgamma	0.7050781
CLEC2C, ErbB4, F1t3L, IFNgamma	0.7011719
ErbB4, FasL, F1t3L, IFNgamma	0.6985887
CLEC2C, F1t3L, HGFR, IFNgamma	0.6933594
FasL, F1t3L, HGFR, IFNgamma	0.6895161
CLEC2C, ErbB4, FasL, IFNgamma	0.6290323
CLEC2C, ErbB4, FasL, HGFR	0.6239919
CLEC2C, ErbB4, HGFR, IFNgamma	0.6220703
ErbB4, FasL, HGFR, IFNgamma	0.6118952
CLEC2C, FasL, HGFR, IFNgamma	0.6088710

표 9

표 6 bis

AREG+CYFRA21-1 조합을 지지하는 CRC 대 CTL 에 대한 4개 바이오마커의 조합	AUC
AREG, CYFRA21-1, F1t3L, ErbB4	0.9306641
AREG, CYFRA21-1, F1t3L, CLEC2C	0.9150391
AREG, CYFRA21-1, ErbB4, CLEC2C	0.9023438
AREG, CYFRA21-1, ErbB4, FasL	0.9022177
AREG, CYFRA21-1, CLEC2C, IFNgamma	0.9003906

AREG, CYFRA21-1, Flt3L, HGFR	0.9003906
AREG, CYFRA21-1, CLEC2C, FasL	0.9002016
AREG, CYFRA21-1, ErbB4, IFNgamma	0.8994141
AREG, CYFRA21-1, Flt3L, IFNgamma	0.8984375
AREG, CYFRA21-1, Flt3L, FasL,	0.8981855
AREG, CYFRA21-1, FasL, IFNgamma	0.8951613
AREG, CYFRA21-1, ErbB4, HGFR	0.8945312
AREG, CYFRA21-1, HGFR, CLEC2C,	0.8935547
AREG, CYFRA21-1, FasL, HGFR	0.8901210
CYFRA21-1, ErbB4, Flt3L, HGFR	0.8867188
CYFRA21-1, ErbB4, Flt3L, IFNgamma	0.8867188
AREG, CYFRA21-1, HGFR, IFNgamma	0.8847656
CLEC2C, CYFRA21-1, ErbB4, Flt3L	0.8847656
CYFRA21-1, ErbB4, FasL, Flt3L	0.8830645
CYFRA21-1, FasL, Flt3L, IFNgamma	0.8689516
CYFRA21-1, Flt3L, HGFR, IFNgamma	0.8671875
CYFRA21-1, FasL, Flt3L, HGFR	0.8669355
CLEC2C, CYFRA21-1, Flt3L, IFNgamma	0.8662109
CLEC2C, CYFRA21-1, FasL, Flt3L	0.8649194
CLEC2C, CYFRA21-1, Flt3L, HGFR	0.8632812
AREG, CLEC2C, Flt3L, HGFR	0.8564453
AREG, CLEC2C, ErbB4, Flt3L	0.8457031
AREG, CLEC2C, FasL, Flt3L	0.8447581
AREG, CLEC2C, Flt3L, IFNgamma	0.8447266
CYFRA21-1, ErbB4, HGFR, IFNgamma	0.8417969
CLEC2C, CYFRA21-1, ErbB4, HGFR	0.8398438
AREG, CLEC2C, ErbB4, HGFR	0.8378906
CLEC2C, CYFRA21-1, ErbB4, IFNgamma	0.8359375
AREG, CLEC2C, ErbB4, FasL	0.8346774
AREG, CLEC2C, FasL, HGFR	0.8326613
CLEC2C, CYFRA21-1, ErbB4, FasL	0.8326613
CYFRA21-1, ErbB4, FasL, IFNgamma	0.8326613
CYFRA21-1, ErbB4, FasL, HGFR	0.8316532
AREG, CLEC2C, HGFR, IFNgamma	0.8271484
AREG, CLEC2C, ErbB4, IFNgamma	0.8251953
AREG, CLEC2C, FasL, IFNgamma	0.8245968
AREG, ErbB4, Flt3L, HGFR	0.8203125
CLEC2C, CYFRA21-1, FasL, IFNgamma	0.8074597
AREG, Flt3L, HGFR, IFNgamma	0.8066406
CYFRA21-1, FasL, HGFR, IFNgamma	0.8064516
CLEC2C, CYFRA21-1, HGFR, IFNgamma	0.8056641
AREG, FasL, Flt3L, HGFR	0.7993952
CLEC2C, CYFRA21-1, FasL, HGFR	0.7983871
AREG, ErbB4, Flt3L, IFNgamma	0.7861328
AREG, ErbB4, HGFR, IFNgamma	0.7802734
AREG, ErbB4, FasL, Flt3L	0.7802419
AREG, FasL, Flt3L, IFNgamma	0.7772177
AREG, ErbB4, FasL, HGFR	0.7721774
AREG, FasL, HGFR, IFNgamma	0.7681452
AREG, ErbB4, FasL, IFNgamma	0.7419355
ErbB4, FasL, Flt3L, HGFR	0.7358871
CLEC2C, ErbB4, FasL, Flt3L	0.7167339
CLEC2C, FasL, Flt3L, HGFR	0.7086694
CLEC2C, FasL, Flt3L, IFNgamma	0.7056452
CLEC2C, ErbB4, Flt3L, HGFR	0.7050781
ErbB4, Flt3L, HGFR, IFNgamma	0.7050781
CLEC2C, ErbB4, Flt3L, IFNgamma	0.7011719
ErbB4, FasL, Flt3L, IFNgamma	0.6985887

CLEC2C, Flt3L, HGFR, IFNgamma	0.6933594
FasL, Flt3L, HGFR, IFNgamma	0.6895161
CLEC2C, ErbB4, FasL, IFNgamma	0.6290323
CLEC2C, ErbB4, FasL, HGFR	0.6239919
CLEC2C, ErbB4, HGFR, IFNgamma	0.6220703
ErbB4, FasL, HGFR, IFNgamma	0.6118952
CLEC2C, FasL, HGFR, IFNgamma	0.6088710

표 7, 표 8 및 표 9는 각각 AA 대 CTL을 구별하는 2개, 3개 및 4개의 바이오마커의 조합에 대해 달성된 AUC를 보여준다.

표 10

표 7

AA 대 CTL에 대한 바이오마커 조합	AUC
AREG, CD147	0.7548828
AREG, HGFR	0.7460938
AREG, CYFRA21-1	0.7221680
CYFRA21-1, HGFR	0.6250000
CD147, HGFR	0.6191406
CD147, CYFRA21-1	0.6152344

표 11

표 8

AA 대 CTL에 대한 바이오마커 조합	AUC
AREG, CD147, CYFRA21-1	0.7617188
AREG, CYFRA21-1, HGFR	0.7607422
AREG, CD147, HGFR	0.7539062
CD147, CYFRA21-1, HGFR	0.6337891

표 12

표 9

AA 대 CTL에 대한 바이오마커 조합	AUC
AREG, CYFRA21-1, HGFR, CD147	0.7685547

각각의 AUC를 기반으로 최고의 모델이 선택되었다. 표 10 및 표 10bis는 CRC에 대한 최상의 결과를 보여준다. 표 11 및 표 11bis는 AA에 대한 최상의 결과를 보여준다. 최고의 Youden 지수를 사용하여 ROC 곡선의 컷오프 지점에서 계산된, ROC 곡선하 면적(AUC), 민감도(Sens.), 특이도(Spec.), 양성 예측값(VPP) 및 음성 예측값(VPN)을 포함하는, 단백질들의 최고의 조합에 대한 측정기준이 포함된다.

표 13

표 10

	CRC 대 CTL				
Flt3L+CYFRA21-1 을 지지하는 바이오마커 조합	AUC (95%CI)	Sens	Spec	PPV	NPV
Flt3L, CYFRA21-1	0.865(0.779, 0.952)	0.625	0.969	0.952	0.721
Flt3L, CYFRA21-1, AREG	0.899(0.821, 0.978)	0.781	0.938	0.926	0.811
Flt3L, CYFRA21-1, AREG, ErbB4	0.931(0.861, 1)	0.875	0.938	0.933	0.882
Flt3L, CYFRA21-1, AREG, CLEC2C	0.915(0.848, 0.982)	0.844	0.844	0.844	0.844

표 14

표 10bis

	CRC 대 CTL				
AREG+CYFRA21-1 을 지지하는 바이오마커 조합	AUC (95%CI)	Sens	Spec	PPV	NPV
AREG, CYFRA21-1	0.878(0.789, 0.966)	0.875	0.844	0.848	0.871
AREG, CLEC2C	0.835(0.729, 0.941)	0.906	0.812	0.829	0.897
AREG, HGFR	0.763(0.643, 0.883)	0.656	0.812	0.778	0.703
AREG, CD147	0.842(0.734, 0.95)	0.844	0.844	0.844	0.844
AREG, CYFRA21-1, Flt3L	0.899(0.821, 0.978)	0.781	0.938	0.926	0.811
AREG, CYFRA21-1, CLEC2C	0.896(0.814, 0.977)	0.875	0.844	0.848	0.871
AREG, CYFRA21-1, ErbB4	0.896(0.812, 0.979)	0.875	0.844	0.848	0.871
AREG, CYFRA21-1, FasL	0.893(0.81, 0.976)	0.903	0.812	0.824	0.897
AREG, CYFRA21-1, CD147	0.886(0.797, 0.975)	0.875	0.844	0.848	0.871
AREG, CYFRA21-1, HGFR	0.876(0.787, 0.965)	0.875	0.844	0.848	0.871
AREG, CD147, HGFR	0.843(0.735, 0.951)	0.844	0.844	0.844	0.844
AREG, CYFRA21-1, ErbB4, Flt3L	0.931(0.861, 1)	0.875	0.938	0.933	0.882
AREG, CYFRA21-1, Flt3L, CLEC2C	0.915(0.848, 0.982)	0.844	0.844	0.844	0.844
AREG, CYFRA21-1, CD147, HGFR	0.888(0.801, 0.975)	0.875	0.844	0.848	0.871

표 15

표 11

		AA 대 CTL			
Flt3L+CYFRA21-1 을 지지하는 바이오마커 조합	AUC (95%CI)	Sens	Spec	PPV	NPV
Flt3L, CYFRA21-1	0.606(0.466, 0.747)	0.906	0.312	0.569	0.769
Flt3L, CYFRA21-1, AREG	0.72(0.591, 0.848)	0.812	0.625	0.684	0.769
Flt3L, CYFRA21-1, AREG, ErbB4	0.707(0.578, 0.836)	0.656	0.75	0.724	0.686
Flt3L, CYFRA21-1, AREG, CLEC2C	0.727(0.6, 0.853)	0.812	0.625	0.684	0.769

표 16

표 11bis

		AA 대 CTL			
AREG+CYFRA21-1 을 지지하는 바이오마커 조합	AUC (95%CI)	Sens	Spec	PPV	NPV
AREG, CYFRA21-1	0.722(0.594, 0.85)	0.844	0.625	0.692	0.8
AREG, CLEC2C	0.738(0.613, 0.864)	0.781	0.688	0.714	0.759
AREG, HGFR	0.746(0.621, 0.871)	0.531	0.938	0.895	0.667
AREG, CD147	0.755(0.633, 0.877)	0.656	0.844	0.808	0.711
AREG, CYFRA21-1, Flt3L	0.72(0.591, 0.848)	0.812	0.625	0.684	0.769
AREG, CYFRA21-1, CLEC2C	0.728(0.601, 0.854)	0.812	0.625	0.684	0.769
AREG, CYFRA21-1, ErbB4	0.71(0.582, 0.838)	0.656	0.75	0.724	0.686
AREG, CYFRA21-1, FasL	0.711(0.581, 0.84)	0.774	0.625	0.667	0.741
AREG, CYFRA21-1, CD147	0.762(0.642, 0.882)	0.844	0.656	0.711	0.808
AREG, CYFRA21-1, HGFR	0.761(0.634, 0.887)	0.75	0.75	0.75	0.75
AREG, CD147, HGFR	0.754(0.632, 0.876)	0.562	0.906	0.857	0.674
AREG, CYFRA21-1, Flt3L, ErbB4,	0.707(0.578, 0.836)	0.656	0.75	0.724	0.686
AREG, CYFRA21-1, Flt3L, CLEC2C	0.727(0.6, 0.853)	0.812	0.625	0.684	0.769
AREG, CYFRA21-1, CD147, HGFR	0.769(0.65, 0.888)	0.781	0.719	0.735	0.767

마지막으로, 표 12 및 표 12bis는 본 발명에서 청구하는 가장 중요한 시그니처들이 중복되는 것을 보여주도록

하였다. 모든 최고의 시그니처는 [Flt3L 및 CYFRA21-1] 및 [AREG 및 CYFRA21-1]로 구성되어 있음을 분명히 보여준다.

표 17

표 12

AREG	CLEC2C	CYFRA21-1	Flt3L	ErbB4	CRC vs CTL	AA vs CTL
X		X	X	X	0.931	0.707
X	X	X	X		0.915	0.727
X		X	X		0.899	0.720
		X	X		0.865	0.606

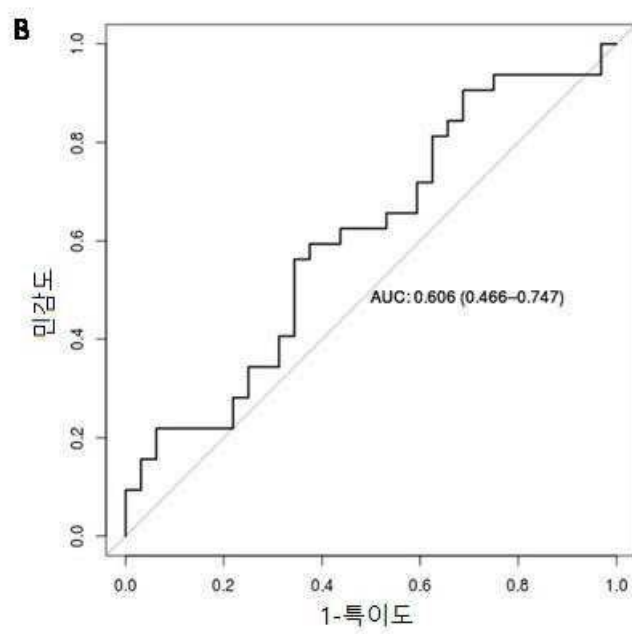
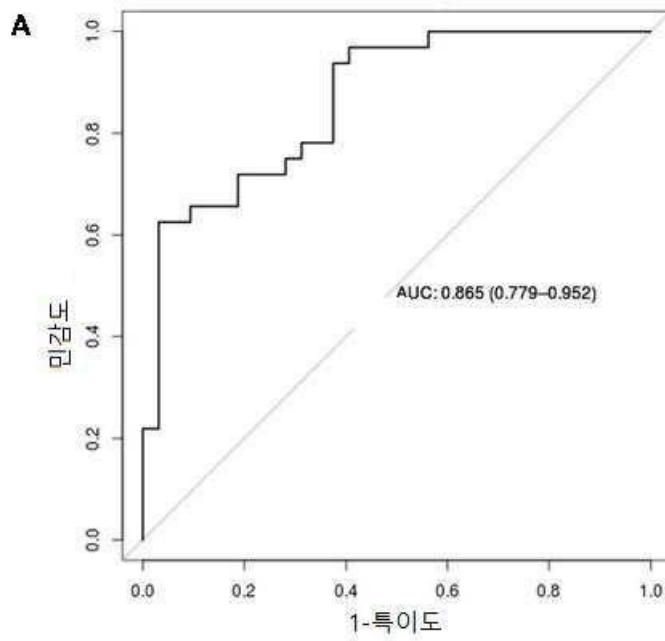
표 18

표 12 bis

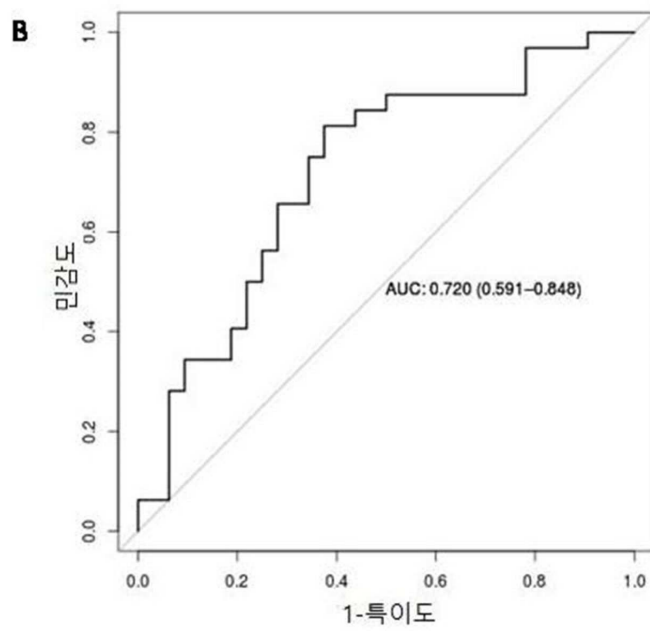
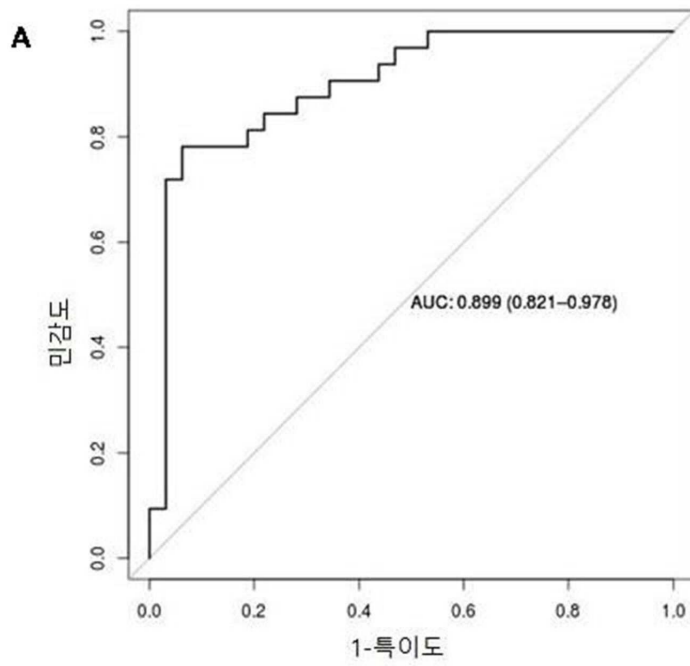
CD147	FasL	CLEC2C	AREG	CYFRA21-1	Flt3L	ErbB4	HGFR	CRC	AA
			X	X	X	X		0.931	0.707
		X	X	X	X			0.915	0.727
			X	X	X			0.899	0.720
		X	X	X				0.896	0.728
			X	X		X		0.896	0.710
	X		X	X				0.893	0.711
X			X	X			X	0.888	0.769
X			X	X				0.886	0.762
			X	X				0.878	0.722
			X	X			X	0.876	0.761
X			X				X	0.843	0.754
X			X					0.842	0.755
		X	X					0.835	0.738
			X				X	0.763	0.746

도면

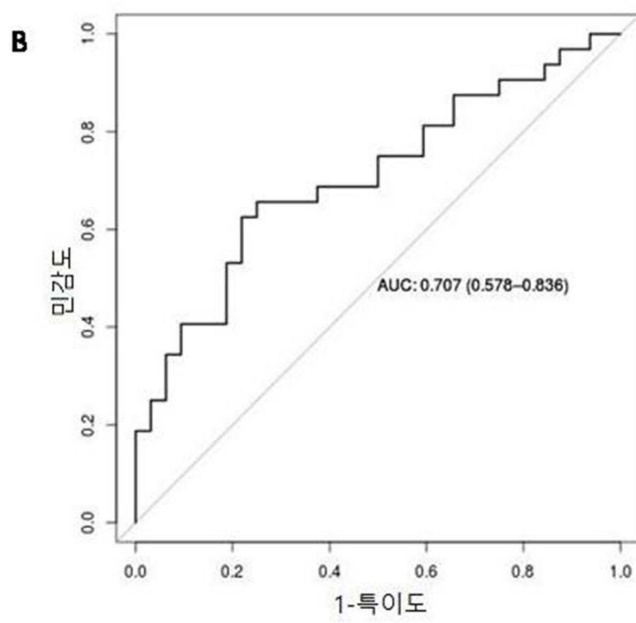
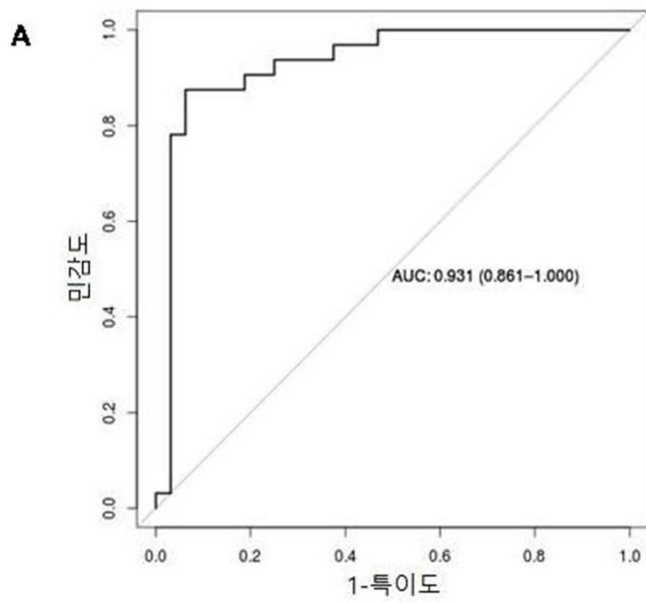
도면1



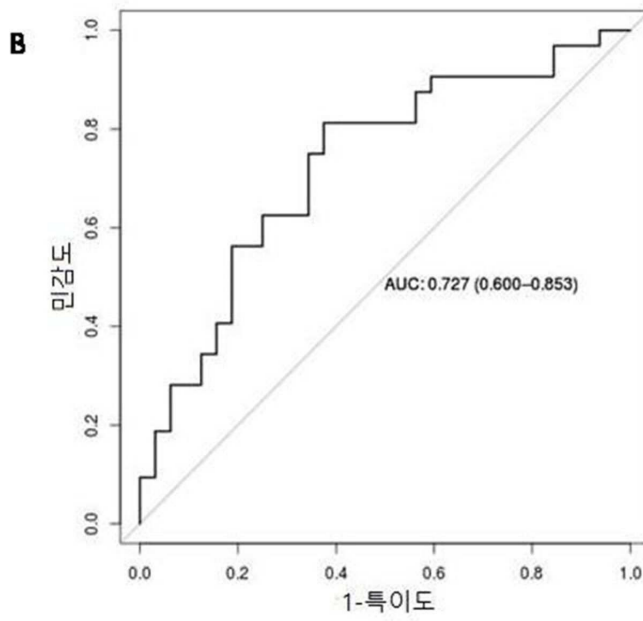
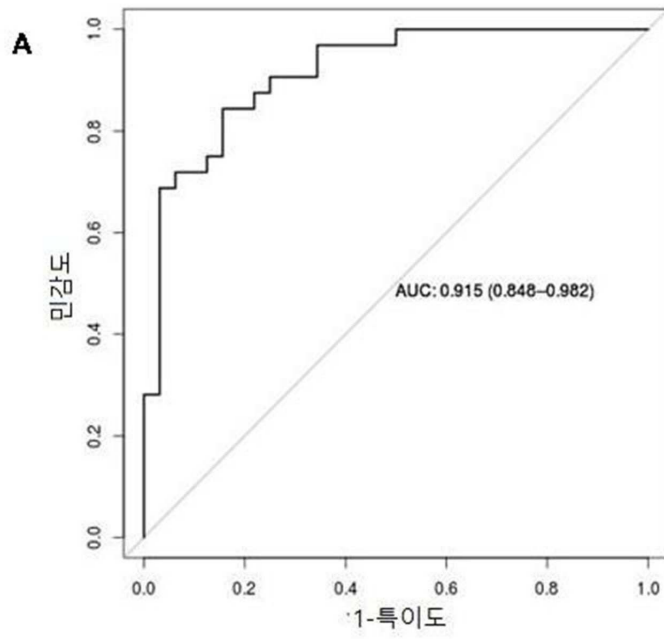
도면2



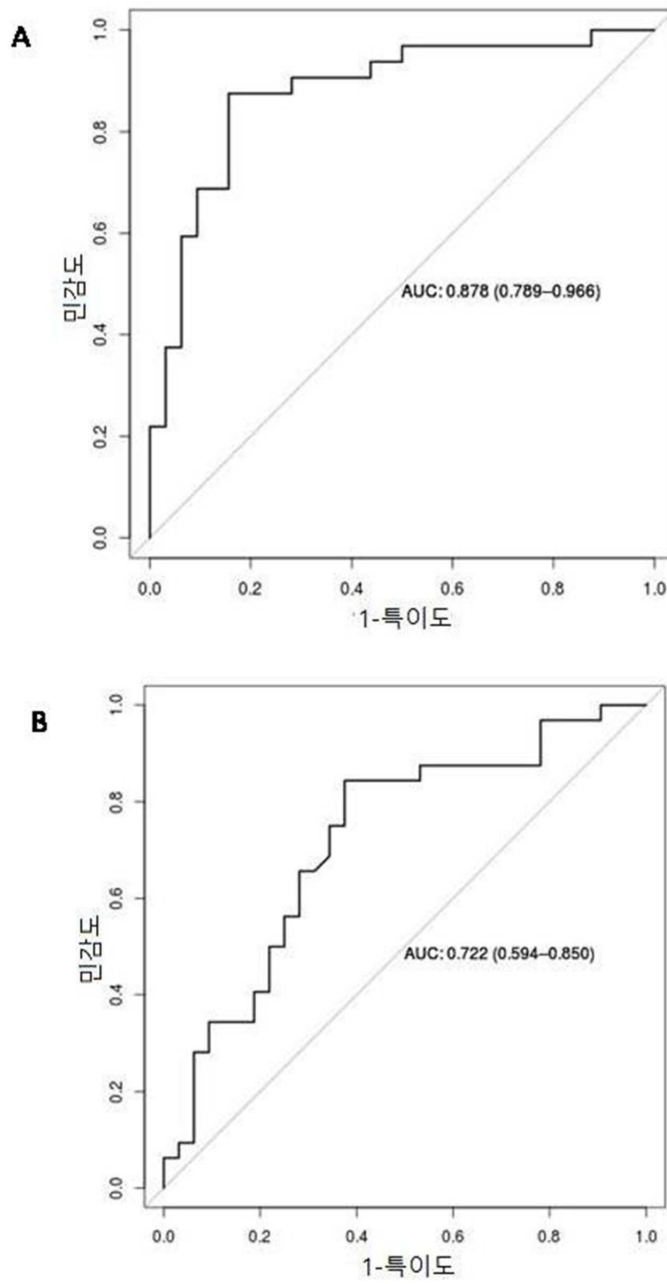
도면3



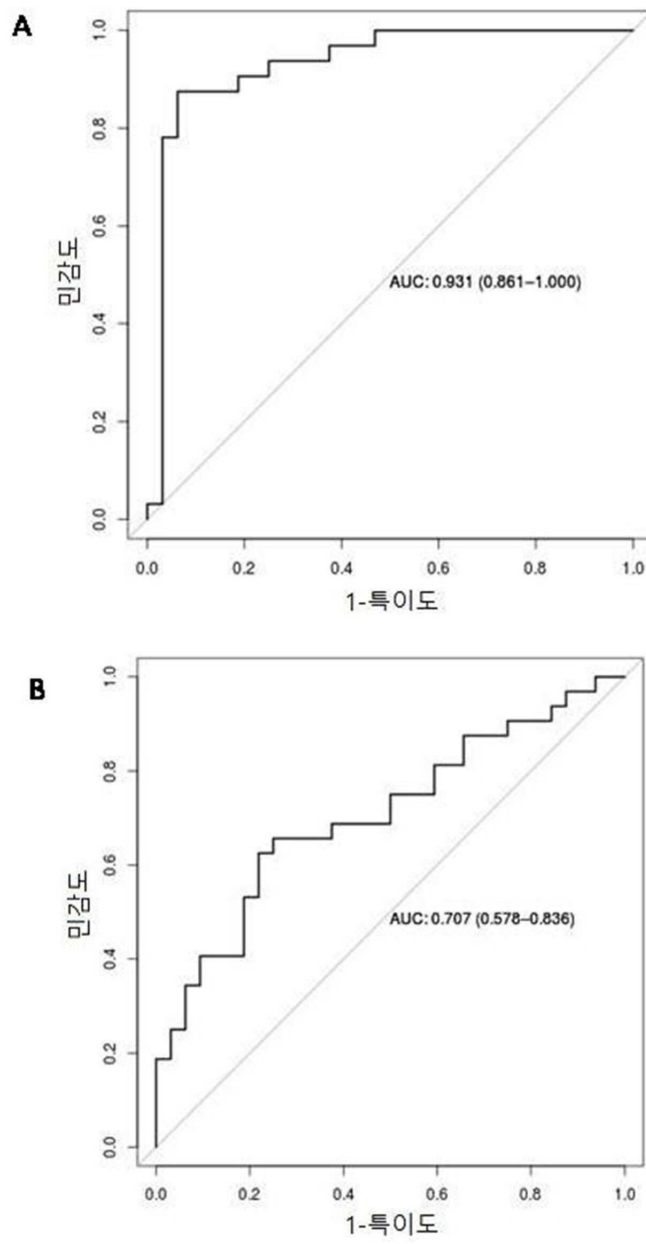
도면4



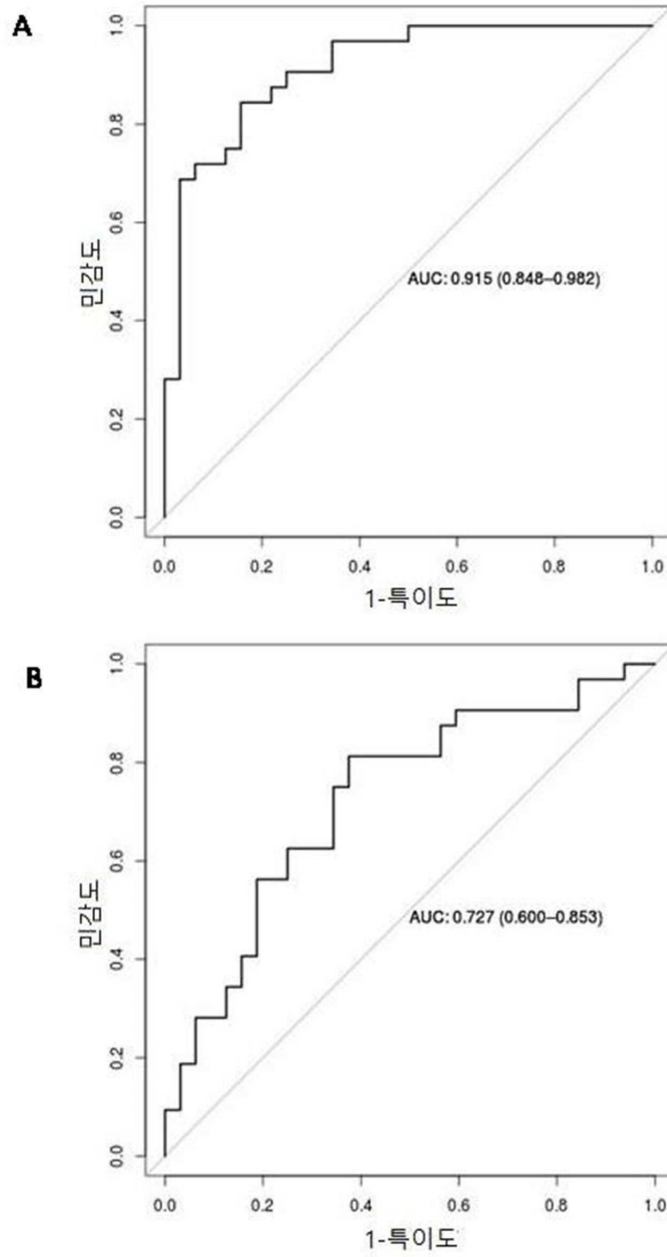
도면5



도면6



도면7



도면8

