(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0101331
(43) 공개일자 2024년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
G01N 33/72 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57407 (2013.01)
G01N 33/581 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0090422
(22) 출원일자 2023년07월12일
심사청구일자 2023년07월12일
(30) 우선권주장
1020220182530 2022년12월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
안근수
대구광역시 수성구 청호로 345, 105동 105호(황금동, 태왕아너스아파트
한진이
대구광역시 남구 중앙대로22길 205-4, 104동 202호(봉덕동,봉덕로얄타운)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

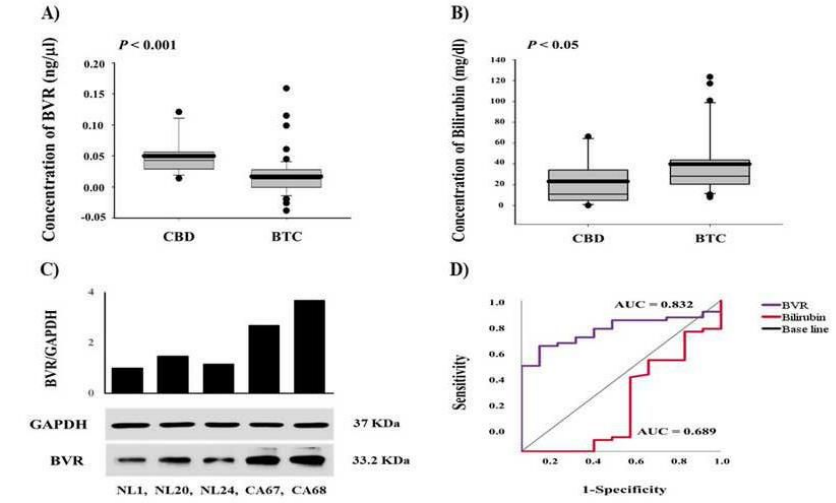
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **담도암 진단용 조성물 및 이에 관한 정보를 제공하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 담도암 진단용 조성물에 관한 것으로, 더 상세하게는 담즙 내 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및 직접 빌리루빈(direct bilirubin)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 바이오마커를 측정할 수 있는 제제를 포함하는 담도암 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 진단용 조성물을 이용하는 경우, 양성 담도 협착과 담도암을 구별할 수 있고, 비침습적인 방법으로 진단을 할 수 있으며, 폐쇄성 황달의 영향을 받지 않아 담도암을 조기에 정확하게 진단할 수 있는 장점이 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 33/728 (2013.01)
G01N 2333/90206 (2013.01)
G01N 2333/90274 (2019.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711156692
과제번호	2022R1A2C4001769
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연계 신진후속
연구과제명	담도암 진단과 치료 생체표지자 발굴을 위한 담즙에서의포괄적 액체생검 분석 시스템 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및 직접 빌리루빈(direct bilirubin)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 바이오마커를 측정할 수 있는 제제를 포함하는 담도암 진단용 조성물로,

상기 바이오마커는 담즙 내 존재하는 바이오마커인, 담도암 진단용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 담즙은 외과적 절제술 및/또는 경피 경간 담도 배액술(PTBD; percutaneous transhepatic biliary drainage)로 채취되는, 담도암 진단용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 담도암은 간내 담도암 및/또는 간외 담도암인, 담도암 진단용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 제제는 상기 바이오마커의 발현량 또는 활성을 측정하는 제제인, 담도암 진단용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 바이오마커의 발현량은 브래드포드(Bradford)법 및/또는 웨스턴 블로팅(Western blotting)으로 측정되는, 담도암 진단용 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 바이오마커의 활성은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 측정되는, 담도암 진단용 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 헴 산화효소(HO-1)의 활성이 담즙 내 0.019 ng/mg 단백질 이상인 경우 담도암인 것으로 진단하는, 담도암 진단용 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 빌리베르딘 환원효소(BVR)의 활성이 담즙 내 0.023 ng/mg 단백질 이상인 경우 담도암인 것으로 진단하는, 담도암 진단용 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 직접 빌리루빈의 농도가 담즙 내 12.8 ng/mg 단백질 이상인 경우 담도암인 것으로 진단하는, 담도암 진단용 조성물.

청구항 10

다음 단계를 포함하는, 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법:

(a) 담즙 내 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및 직접 빌리루빈(direct bilirubin)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 바이오마커의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 바이오마커의 발현량이 대조군보다 높은 경우 또는 상기 바이오마커의 활성이 대조군보다 낮은 경우 담도암으로 판단하는 단계.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 바이오마커는 외과적 절제술 또는 경피 경간 담도 배액술(PTBD; percutaneous transhepatic biliary drainage)로 채취된 담즙 내 존재하는, 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 담도암은 간내 담도암 또는 간외 담도암인, 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서, 상기 바이오마커의 발현량은 브래드포드(Bradford)법 및/또는 웨스턴 블로팅(Western blotting)으로 측정되는, 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 14

제 10항에 있어서, 상기 바이오마커의 활성은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 측정되는, 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 15

제 10항에 있어서, 상기 단계 (b)의 대조군은 담도암 진단을 받지 않은 개체 및/또는 총담관 결석을 가진 환자인, 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 16

제 10항에 있어서, 상기 헴 산화효소(HO-1)의 활성이 0.019 ng/mg 단백질 이상인 경우 담도암인 것으로 진단하는, 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 17

제 10항에 있어서, 상기 빌리베르딘 환원효소(BVR)의 활성이 0.023 ng/mg 단백질 이상인 경우 담도암인 것으로 진단하는, 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 18

제 10항에 있어서, 상기 직접 빌리루빈의 농도가 담즙 내 12.8 ng/mg 단백질이상인 경우 담도암인 것으로 진단하는, 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및 직접 빌리루빈(direct bilirubin)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 바이오마커를 측정할 수 있는 제제를 포함하는 담도암 진단용 조성물 및 담도암 진단에 관한 정보를 제공하는 방법에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 담관은 담즙의 형성, 분비 및 순환하는 물질의 배설에 중요한 역할을 하는 기관으로, 담관의 상피조직은 담즙에서 간 조직으로 독성 물질이 확산되는 것을 막아준다. 담즙은 물, 담즙염, 담즙 색소 및 콜레스테롤로 구성된다.

[0003] HO-1(heme oxygenase-1)은 헴이 일산화탄소, 유리, 철, 빌리베르딘(biliverdin)으로 전환되는 것을 촉매하는 속도 제한 효소이다. 빌리베르딘은 빌리베르딘 환원효소(BVR; biliverdin reductase)에 의해 빌리루빈으로 전환되어 간으로 이동한 후 담관을 통해 담즙액과 함께 십이지장으로 배출된다.

[0004] 담도암 진단을 위한 기존 방법으로는 혈청 빌리루빈 수치 또는 암 조직에서 HO-1 수치 측정을 통한 방법이 제시되어 왔으나, 혈청 빌리루빈 수치는 폐쇄성 황달에 의한 영향이 있을 수 있고, 암 조직에서의 측정은 침습적 절차를 수반하는 단점이 있다. 담도암을 진단하기 위한 바이오마커에 대한 종래 선행기술로서, 특허문헌 1(대한민국공개특허공보 제10-2020-0059996호)에 따르면, 카텝신 E 단백질이 개시되어있고, 특허문헌 2에 따르면, 글라이코콜산, 타우로케노디옥시콜산이 개시되어 있으나, 담즙 내 담즙산 대사와 관련된 효소나 분자를 이용한 바이

오마커에 대해서는 개시된 바 없다.

[0005] 비특허문헌 1에 따르면, 담도암은 초기에 증상이 거의 없는 경우가 흔하여, 진단이 가능한 시기에는 이미 전이된 상태로 발견되어 적절한 치료가 어렵고 사망률이 높아진다. 초기 악성 담도 협착을 감지하지 못하는 경우, 치료 기회를 놓치거나 부정확한 진단으로 인해 불필요한 수술이 필요할 수 있으며, 이러한 이유로 조기 진단을 위한 새로운 생체 마커가 필요한 상황이다.

[0006] 또한, 비특허문헌 2에 따르면, 조기 담도암 환자의 주요 증상 중에는 일반 담도암 환자들이 겪는 복통이나 황달이 거의 없으므로, 담도암을 조기에 진단하기 위해서는 황달 여부와 무관한 진단 방법이 필요한 실정이다.

[0007] 따라서 본 발명자들은 담도암 환자의 담즙 내 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및 직접 빌리루빈(direct bilirubin)의 발현량과 활성이 양성 담도 협착을 가진 환자와 상이함을 확인하여, 담즙 내 담즙산 대사와 관련된 효소나 분자들이 담도암과 양성 담도 협착을 구별하기 위한 바이오마커로서 활용될 수 있음을 규명하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허공보 제10-2020-0059996호(2020.05.29)

(특허문헌 0002) 대한민국공개특허공보 제10-2020-0031482호(2020.03.24)

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Hong Ja Kim, Korean J Pancreas Biliary Tract 2021; 26(1): 33-42.

(비특허문헌 0002) Jae Myung Cha et al, World J Gastroenterol. 2007 Jul 7; 13(25): 3409-3416.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 비침습적이고, 폐쇄성 황달의 영향 없이 담도암을 진단할 수 있는 조성물 및 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및 직접 빌리루빈(direct bilirubin)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 바이오마커를 측정할 수 있는 제제를 포함하는 담도암 진단용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및 직접 빌리루빈(direct bilirubin)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 바이오마커의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계 및 상기 바이오마커의 발현량 또는 활성이 대조군보다 높으면 담도암으로 판단하는 단계를 포함하는 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 담도암 진단용 조성물을 이용하는 경우, 비침습적인 방법으로 담도암과 양성 담도 협착을 구별할 수 있으며, 폐쇄성 황달의 영향을 받지 않는다. 이를 통해 기존의 내시경, 경피적 조직 채취 방법 및 혈청 성분 분석 방법보다 더 안정적이고 유용한 진단방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1A는 혈청 및 담즙 빌리루빈 수치간 상관관계를, 도 1B는 혈청 빌리루빈과 담즙의 상관관계를 그리고 도 1C

는 혈청 빌리루빈과 담즙 BVR(B), 혈청 빌리루빈 및 담즙 HO-1간 상관관계를 나타낸 것이다.

도 2는 BTC 그룹과 CBD 결석 환자 그룹의 담즙 내 BVR 및 빌리루빈 수치의 비교 변화를 나타낸 것이다. 도 2A는 BVR의 활성을 나타낸 것으로, CBD 환자는 14명, BTC 환자는 56명이었다. 도 2B는 빌리루빈의 수치를 나타낸 것으로, CBD 환자는 11명, BTC 환자는 53명이었다. 도 2C는 BVR의 단백질 수치 및 상대적인 발현 정도를 나타낸 것이다. 도 2D는 BVR 및 빌리루빈의 ROC 분석 그래프를 나타낸 것이다. 동일한 단백질 로딩을 확인하기 위하여 GAPDH 수치를 측정하였으며, 환자는 두 그룹(n = 11 - 56/그룹)으로 분류되었다.

도 3은 CBD 결석 및 BTC 환자의 담즙 내 3가지 담즙 색소의 색상을 나타낸 것이다.

도 4는 CBD 결석 환자 그룹 및 BTC 환자 그룹의 담즙에서 HO-1의 조절을 나타낸 것이다. 도 4A는 HO-1의 활성을 나타낸 것으로, CBD 환자는 13명, BTC 환자는 57명이다. 도 4B는 단백질의 수치와 상대적인 발현도를 나타낸 것이다. 도 4C는 HO-1의 ROC 분석을 나타낸 것이다. 동일한 단백질 로딩을 확인하기 위해 GAPDH 수치를 측정했으며, 환자는 두 그룹(n = 13 - 57/group)으로 분류되었다.

도 5는 다양한 암 조직에서 HMOX1 및 BLVRA의 발현을 나타낸 것이다(firebrowe.org).

도 6A 및 도 6B는 BTC 암 조직과 인접한 정상 간 조직 사이 HMOX1를, 도 6C 및 도 6D는 BTC 암 조직과 인접한 정상 간 조직 사이 BLVRA의 발현을 나타낸 것이다.

도 7은 R로 그린 BVR AUC 값에 대한 그래프를 나타낸 것으로, AUC 값은 0.831 (0.735-0.927) $p<0.001$, 컷오프 값은 0.023 ng/mg 단백질로 나왔다.

도 8은 R로 그린 HO-1 AUC 값에 대한 그래프를 나타낸 것으로, AUC 값은 0.891 (0.789-0.993) $p<0.001$, 컷오프 값은 0.019 ng/mg 단백질로 나왔다.

도 9는 R로 그린 빌리루빈 AUC 값에 대한 그래프를 나타낸 것으로, AUC 값은 0.689 (0.483-0.896) $p<0.001$, 컷오프값은 12.8 ng/mg 단백질로 나왔다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이상에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0016] 본 발명에 있어서, 용어 “담도암”이란, 담관 내부를 이루고 있는 담관 세포에 만성적인 염증, 담관 결석, 경화성 담관염, 간디스토마(간흡충증), 염증성 대장 질환, 담관이 선천적으로 확장되어 생긴 담관낭종 등에 의하여 생기는 암으로, 담관암으로도 불린다.

[0017] 상기 담도암은 발생하는 해부학적 위치에 따라 간내 담도암과 간외 담도암으로 구분되며, 간외 담도암은 간문주변부 담도암과 원위부 담도암으로 분류된다.

[0018] 본 발명에 있어서, 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 상기 진단은 담도암 또는 담관암의 발명 또는 진행 여부를 확인하는 것으로 해석될 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 담도암의 진단은 대상에서의 상기한 담도암의 발명 여부, 발병 가능성, 담도암 조직 성장 가능성 및/또는 담도암의 전이 가능성을 확인하는 것으로 해석될 수 있다.

[0020] 본 발명은 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및 직접 빌리루빈(direct bilirubin)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 바이오마커를 측정할 수 있는 제제를 포함하며, 상기 바이오마커는 담즙 내 존재하는 바이오마커인 담도암 진단용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 담즙은 개체에서 분리된 것일 수 있다.

[0022] 상기 "개체"란 인간을 포함하는 포유 동물로, 예를 들면 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양, 닭, 오리, 거위 등 담도암이 발병될 수 있는 동물이라면 제한없이 포함될 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 담즙은 개체로부터 외과적 절제술 및/또는 경피 경간 담도 배액술로 채취될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 담도암은 간내 담도암 및/또는 간외 담도암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 상기 바이오마커의 발현량 또는 활성을 측정하는 제제일 수 있다.

[0026] 상기 제제를 이용하는 경우, 상기 헴 산화효소(HO-1) 및/또는 빌리베르딘 환원효소(BVR)의 활성 발현량과 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및/또는 직접 빌리루빈(direct bilirubin)의 발현량을 측정할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 상기 단백질 바이오 마커의 발현량은 브래드포드(Bradford)법, 웨스턴 블로팅(Western blotting)법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 상기 바이오 마커 중 효소의 활성정도는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 상기 제제는 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 또한, 상기 제제는 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 상기 제제는 또한, 빌리루빈의 발현량을 측정하기 위해 디아조 방법(diazo method)을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 상기 디아조 방법은 담즙 내의 결합된 빌리루빈과 δ-빌리루빈(직접 빌리루빈)이 산성 버퍼 속에서 3,5-이클로로페닐 디아조늄 염(3,5-dichlorophenyl diazonium salt)과 직접 반응하여 붉은 색의 아조빌리루빈(azobilirubin)을 형성하는 것을 기반으로 한다.

[0033] 상기 아조빌리루빈의 색 강도는 빌리루빈의 농도와 직접 비례하며, 광도계(photometrically)를 사용하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 헴 산화효소(HO-1)의 활성이 0.019 ng/mg 단백질(0.019 ng /mg protein) 이상인 경우 담도암인 것으로 진단될 수 있다.

[0035] 헴 산화효소(HO; heme oxygenase)는 헴의 분해를 촉매하여 빌리베르딘, 제일철, 일산화탄소를 생성하는 효소이다. 헴 산화효소 중 HO-1은 비장, 간, 신장에서 높은 농도로 존재하며, HMOX1 유전자에 의해 암호화되는, 288개의 아미노산 잔기를 포함하는 효소이다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 빌리베르딘 환원효소(BVR)의 활성이 0.023 ng/mg 단백질(0.023 ng/mg protein) 이상인 경우 담도암인 것으로 진단될 수 있다.

[0037] 상기 빌리베르딘 환원효소(BVR; Biliverdin reductase)는 모든 조직에서 발견되는 효소이며, 특히 간과 비장에 풍부하게 존재한다. 빌리베르딘 환원효소는 빌리베르딘을 빌리루빈으로 전환시키는 과정에서, 이중 결합을 단일 결합으로 환원시키는 역할을 한다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 직접 빌리루빈의 농도가 12.8 ng/mg 단백질(12.8 ng/mg protein) 이상인 경우 담도암인 것으로 진단될 수 있다.

[0039] 상기 빌리루빈은 담즙색소로서 헴(heme)의 분해산물이며, 주로 세망내피세포에서 적혈구의 혈색소를 분해하여 만들어진다. 빌리루빈은 알부민과 결합해 혈장 내에서 순환하며, 간 세포에 포착되어 빌리루빈 다이글루쿠로나이드의 형태로 포함된다. 이는 수용성 색소로 담즙 내로 배설된다. 또한, 빌리루빈은 "직접 빌리루빈(direct bilirubin)" 및 "간접 빌리루빈(indirect bilirubin)"으로 나뉘며, 혈액 중 알부민과 결합해 운송되어 간에서 해독된 후 담즙으로 배설되는 것을 직접 빌리루빈이라 부르고, 결합 전의 형태를 간접 빌리루빈이라 부른다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 헴 산화효소(HO-1)의 활성이 0.019 ng/mg 단백질 이상이고, 상기 빌리베르딘 환원효소(BVR)의 활성이 0.023 ng/mg 단백질 이상이며, 상기 직접 빌리루빈의 농도가 12.8 ng/mg 단백질 이상인 경우 담도암인 것으로 진단될 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및/또는 직접 빌리루빈(direct bilirubin)의 발현량 및 이의 활성 측정은 당업계에 공지된 측정법에 의한 것이라면 그 방법이 특별히 제한되지 않으나, 효소면역분석법(ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴 블로팅(western blotting), 방사

능면역분석법(radioimmunoassay), 샌드위치 효소면역분석법, 면역침강법(immunoprecipitation), 면역조직화학염색법(immunohistochemistry), 형광면역법(fluoroimmunoassay) 및/또는 그 조합으로 수행될 수 있고, 바람직하게는 효소면역분석법(ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴 블로팅(western blotting) 및/또는 그 조합으로 수행될 수 있다.

[0042] 효소면역분석법(ELISA) 방법을 포함한 면역분석 방법에서, 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다.

[0043] 본 발명은 또한 담즙 내 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및 직접 빌리루빈(direct bilirubin) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 바이오마커의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계 및 상기 바이오마커의 발현량이 대조군보다 높은 경우 또는 상기 바이오마커의 활성이 대조군보다 낮은 경우 담도암으로 판단하는 단계를 포함하는 담도암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0044] 상기 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 및/또는 직접 빌리루빈(direct bilirubin)은 개체에서 분리된 담즙에서 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명에 있어서, 상기 담즙은 개체로부터 외과적 절제술 및 경피 경간 담도 배액술로 채취될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명에 있어서, 상기 담도암은 간내 담도암 및/또는 간외 담도암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 대조군은 정상환자 및/또는 총담관 결석을 가진 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 바이오마커의 발현량은 브래드포드(Bradford)법 및/또는 웨스턴 블로팅(Western blotting)으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 바이오마커의 활성은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 헴 산화효소(HO-1)의 활성이 0.019 ng/mg 단백질(0.019 ng /mg protein) 이상인 경우 담도암인 것으로 진단될 수 있다.

[0051] 본 발명에 있어서, 상기 빌리베르딘 환원효소(BVR)의 활성이 0.023 ng/mg 단백질(0.023 ng/mg protein) 이상인 경우 담도암인 것으로 진단될 수 있다.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 직접 빌리루빈의 농도가 12.8 ng/mg 단백질(12.8 ng/mg) 이상인 경우 담도암인 것으로 진단될 수 있다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 헴 산화효소(HO-1)의 활성이 0.019 ng/mg 이상이고, 상기 빌리베르딘 환원효소(BVR)의 활성이 0.023 ng/mg 이상이며, 상기 직접 빌리루빈의 농도가 12.8 ng/mg 이상인 경우 담도암인 것으로 진단될 수 있다.

[0054] 본 발명에 있어서, 상기 헴 산화효소(HO-1), 빌리베르딘 환원효소(BVR) 또는 직접 빌리루빈(direct bilirubin)의 발현량 및 이의 활성 측정은 당업계에 공지된 측정법에 의한 것이라면 그 방법이 특별히 제한되지 않으나, 효소면역분석법(ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴 블로팅(western blotting), 방사능면역분석법(radioimmunoassay), 샌드위치 효소면역분석법, 면역침강법(immunoprecipitation), 면역조직화학염색법(immunohistochemistry), 형광면역법(fluoroimmunoassay) 및/또는 그 조합으로 수행될 수 있고, 바람직하게는 효소면역분석법(ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴 블로팅(western blotting) 및/또는 그 조합으로 수행될 수 있다.

[0055] 이상, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진자에 있어서 자명할 것이다.

[0056] **실시예 1: 실험 재료 및 방법**

[0057] **1-1. 대상 환자**

[0058] 계명대학교 동산병원에서 2018년 8월부터 2021년 3월까지 총 78명의 환자가 연구에 참여했다. 나이, 성별, 종양 부위, 담즙 채취 방법, 암 단계 등을 포함한 환자 특성은 표 2에 나와 있다. 78명의 환자 중 담도암 환자 그룹

은 63명 이었으며, 대조군인 총담관 결석이 있는 환자는 15명이었다. 담도암 환자 중 남성은 37명, 여성은 26명이었으며, 평균 연령은 73.0 ± 9.1세였다(범위, 45 - 92세). 63명이 담도암 초기 진단을 받은 후, 32명(50.7%)이 수술 절제를 받았고, 31명(49.2%)이 완화적인 항암 방사선요법 또는 보존 치료를 받았다. 암 단계는 수술 절제를 받은 환자는 병리학적 결과를 기반으로 판단되었고, 수술 절제를 받지 않은 환자는 영상학적 소견을 기준으로 판단되었다.

[0059] **1-2. 담즙 채취 및 준비**

[0060] 총 65명의 환자의 폐쇄성 황달로 인한 담관염 완화를 위해 최소 3일간 경피 경간 담도 배액술(PTBD; percutaneous transhepatic biliary drainage)로 담관염을 완화시킨 후 경피 경간 담도 배액술로 담즙 검체를 시행하였다. 나머지 13명의 환자에서는 외과적 절제술 중에 담즙을 채취했다. 채취한 담즙액을 즉시 4° C에서 10분간 16,000g으로 원심분리하여 상층액(담즙)을 얻었다. 각 펠릿을 차가운 인산 완충 식염수(PBS; phosphate-buffered saline)에 재부유한 다음 4° C에서 5분간 16,000g으로 원심분리하여 담즙 펠릿을 얻었다. 모든 실험은 Avanti J-25I(미국 캘리포니아주 베크만)를 사용하여 수행했으며 담즙과 펠릿은 -80° C에서 보관했다.

[0061] **1-3. 시약**

[0062] HO-1 및 BVR에 대한 항체는 Abcam(미국 매사추세츠주 케임브리지)에서 구입했다. 빌리루빈 다이렉트 2세대(BILD2) 키트는 Roche(독일 만하임)에서, 인간 BVR 및 HO-1 ELISA 키트는 바이오마틱(캐나다 온타리오주 캠브리지)에서 구입했다. 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 멤브레인은 아머샴(Amersham, Hybond TM-P: GE 헬스케어, 영국 버킹엄셔)에서 구입했다. 에탄올 및 기타 모든 화학 물질은 시그마(미국 미주리주 세인트루이스)에서 구입했다.

[0063] **1-4. 빌리루빈 측정**

[0064] 담즙 내 빌리루빈(직접 형태)의 양은 SCL 헬스케어(경기도 용인, 대한민국)의 코바스 C502 시스템(SCL 헬스케어)에서 BILD2 키트(Roche, 독일)를 사용하여 분석했다.

[0065] **1-5. HO-1 및 BVR의 활성 측정**

[0066] 제조업체의 지침에 따라 담즙 내 BVR 및 HO-1 활성 발현량을 ELISA 키트를 사용하여 정량화했다. 담즙 100㎕(1:10 희석)와 각 표준의 2배 직렬 희석액(two-fold serial dilutions)을 포획 항체(capture antibody)로 미리 코팅된 마이크로 플레이트 웰에 분배했다. 측정을 위해 마이크로플레이트의 각 웰에 담즙 100 ㎕를 추가하고 37° C에서 60~90분 동안 배양했다. 배양 후 담즙을 제거하고 각 웰에 100㎕의 바이오틴화 항체 작동 용액과 검출기 항체를 추가한 후 37° C에서 60분간 배양했다. 세척 후, 스트렙타비딘-홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRP; streptavidin-horseradish peroxidase) 접합체로 37° C에서 30분간 배양하고, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 기질 90㎕로 암실에서 37° C에서 10~20분간 반응시킨 후 각 웰에 50㎕의 정지 용액을 첨가하여 중단시켰다. 흡광도는 인피니트 M 200 프로 다기능 마이크로플레이트 판독기(TECAN, 스위스 메네도르프)를 사용하여 450nm에서 판독하고 표준 곡선에 따라 BVR 및 HO-1 농도를 계산하여 표준 농도 단위(ng)/단백질의 단위(mg)로 표시했다. 담즙 내 단백질 농도는 소 혈청 알부민(BSA; bovine serum albumin)을 표준으로 사용하여 브래드포드(Bradford) 정량법(미국 일리노이주 록포드 피어스)으로 측정했다.

[0067] **1-6. HO-1 및 BVR에 대한 웨스턴 블로팅(Western blotting)**

[0068] 프로테아제 억제제 칵테일(Cat. #PPI1015, Quartette)이 포함된 RIPA 용해 버퍼(Cat. #MB-030-0050, Rockland)를 사용하여 총 단백질을 추출했다. 총 단백질 10㎍을 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide) 겔 전기영동으로 처리한 다음, 트랜스 블롯 터보 트랜스퍼 시스템(Trans-Blot Turbo Transfer System, 바이오-라드, 미국 캘리포니아주 헤라클레스)을 사용하여 니트로셀룰로스 막으로 단백질을 옮겼다. 니트로셀룰로스 막은 5% 탈지유(skim milk, 바이오-라드) 및 0.2% 트윈 20(바이오-라드)을 함유한 삼중 완충 식염수(Tris-buffered saline)로 차단했다. 다음과 같은 1차 항체를 사용했다: HO-1, BVR(1:500, Abcam, ab68477, ab192925) 및 GAPDH(1:2000, Cell Signaling Technology, #2118). 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase) 접합 이차 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc.)와 반응한 후 제조업체에서 제안한 절차에 따라 막의 밴드를 클래리티 웨스턴 ECL 기판 화학발광(Bio-Rad)으로 시각화했다. 밴드의 밀도 측정은 chem-Doc XRS+ 이미징 시스템(Bio-Rad, 미국 캘리포니아주 헤라클레스)을 사용하여 측정하고 로딩 제어 역할을 하는 GAPDH로 정규화했다.

[0069] **1-7. DNA 추출 및 시퀀싱**

[0070] 제조업체의 지침에 따라 DNeasy 파워 소일 키트(DNeasy Power Soil Kit, Qiagen, 독일 힐덴)를 사용하여 담즙 1mL에서 DNA를 추출했다. 추출한 DNA는 퀀트-IT 피코 그린(Quant-IT Pico Green, 인비트로젠)을 사용하여 정량화했다. 시퀀싱 라이브러리(sequencing library)는 일루미나 16S 메타게놈 시퀀싱 라이브러리 프로토콜에 따라 준비하여 V3 및 V4 영역을 증폭했다. 5배 반응 완충액(reaction buffer), 1mM dNTP 혼합물, 500nm 범용 F/R PCR 프라이머, 헤라클레스(Herculase) II 융합 DNA 중합효소(미국 캘리포니아주 산타클라라 소재 애질런트 테크놀로지스)로 2ng의 gDNA를 PCR 증폭에 사용했다. 첫 번째 PCR의 사이클링 조건은 다음과 같다: 95° C에서 3분간 열 활성화한 후, 25 사이클 동안 95° C에서 30초, 55° C에서 30초, 72° C에서 30초로 반복하고 72° C에서 5분간 최종 연장하였다. 첫 번째 증폭에 사용된 일루미나 어댑터 오버행 서열이 있는 범용 프라이머 쌍은 다음과 같다:

표 1

[0071]

V3-F:	5' -TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3 (서열번호 1)
V4-R:	5' -GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (서열번호 2)

[0072] 첫 번째 PCR 산물을 AMPure 비드(미국 매사추세츠주 베벌리 소재 에이젠코트 바이오사이언스)로 정제했다. 정제 후, 인덱스를 포함하는 최종 라이브러리 구성을 위해 첫 번째 PCR 산물 2μl를 넥스테라 XT 인덱싱 프라이머(Nextera XT Indexed Primer)를 사용하여 증폭했다. 두 번째 PCR의 사이클 조건은 10사이클만 사용되었다는 점을 제외하고 첫 번째 PCR의 사이클 조건과 동일했다. PCR 제품은 AMPure 비드를 사용하여 정제했다. 최종 정제된 제품은 qPCR 정량화 프로토콜 가이드(일루미나 시퀀싱 플랫폼용 KAPA 라이브러리 정량화 키트)에 따라 정량적 PCR(qPCR)을 사용하여 정량화하고 테이프 스테이션 D1000 스크린 테이프(Tape Station D1000 Screen Tape, 애질런트 테크놀로지스, 독일 발트브론)를 사용하여 검증했다. 마크로젠(한국, 서울)에서 MiSeq쩨 플랫폼(일루미나, 미국 캘리포니아주 샌디에이고)을 사용하여 2X300 bp로 페어링 엔드(Paired end) 시퀀싱을 수행했다.

[0073] **1-8. 통계 분석**

[0074] 데이터 분석은 R(http//www.r-project.org) 및 Simplot(미국 캘리포니아주 팔로알토에 위치한 SysTest 소프트웨어 Inc.)을 사용하여 수행되었다. 개별 값에 대한 컷오프 값은 수신기 작동 특성(ROC) 곡선을 기반으로 했다. 연속 값은 평균 ± SD로 표시하였다. 두 그룹 간의 비교를 위해 연속형 변수에 대해서는 독립적인 t-검정을, 범주형 변수에 대해서는 χ2 테스트를 사용했다. 유의 발현량은 $p < 0.05$로 표시하였다.

[0075] **실시예 2: 실험 결과**

[0076] **2-1. 연구 모집단의 인구통계학적 특성**

[0077] 연구 대상자의 평균 연령은 74.0±11.1세였으며 여성 31명, 남성 47명이었다. 총담관 결석을 가진 환자 그룹과 담도암 환자 그룹 간에는 연령이나 성별에 통계적으로 유의미한 차이가 없었다. BTC 그룹에서는 환자의 74.6%가 미국 합동 암 위원회(AJCC; American Joint Committee on Cancer)의 3기보다 진행된 단계에 있었다(표 2).

표 2

특징	CBD (N=15)	BTC (N=63)	P
나이	74.2 ± 13.0	73.0 ± 9.1	0.680
성별			0.786
여성	5 (33.3%)	26 (41.3%)	
남성	10 (66.7%)	37 (58.7%)	
AJCC Stage			
I		3 (4.8%)	
II		13 (20.6%)	
III		36 (57.1%)	
IV		11 (17.5%)	
담즙 채취 방법			
PTBD	15	50	
외과적 절제술		13	

[0078]

[0079] **2-2. 혈청 빌리루빈과 담즙 HO-1, BVR, 빌리루빈의 상관관계 분석**

[0080] 담즙 HO-1, BVR 및 빌리루빈 수치가 혈청 빌리루빈 수치와 관련이 있는지 평가하기 위해 상관관계 분석을 수행했다. 혈청 빌리루빈과 담즙 내 세 가지 마커 사이의 피어슨 상관 계수는 통계적으로 유의미하지 않고 매우 낮았다(도 1). 따라서 담즙 HO-1, BVR 및 빌리루빈 수치는 혈청 빌리루빈 수치에 영향을 받지 않음을 알 수 있다.

[0081] **2-3. 암 조직에서 HMOX1 및 BLVRA의 RNA 발현정도**

[0082] 많은 암에서 HMOX1(HO-1의 RNA)과 BLVRA(BVR의 RNA)의 발현은 가변적이다. 담도암 환자의 조직에서 BLVRA의 RNA 발현량은 전장엑솜분석(Whole-exome sequencing)으로 측정하였고 정상 인접 간 조직보다 유의하게 높은 결과를 보였다(도 5 및 도 6)(Ahn et al., Hepatol Int. 2019;13(4):490-500.; Farshidfar et al., Cell Rep. 2017 Mar 14;18(11):2780-2794).

[0083] **2-4. 담즙 담석과 BTC 환자에서 BVR 및 빌리루빈 수치의 변화**

[0084] 빌리베르딘과 빌리루빈은 헴 분해의 최종 생성물로서 주요한 담즙 색소이다. 구성 성분의 비율을 파악하기 위해, 담도암 환자(BTC) 그룹과 총담관 결석을 가진 환자(CBD) 그룹의 담즙에서 BVR 활성과 빌리루빈 양을 조사했다. BVR 활성은 BTC 그룹의 담즙에서 CBD 그룹에 비해 유의하게 감소했다 (0.033 ± 0.091, 0.050 ± 0.030 ng/㎍ 단백질; $p < 0.001$; 도 2A), 그리고 직접 빌리루빈 양은 BTC 그룹에서 CBD 그룹에 비해 유의하게 증가했다 (42.6 ± 37.4, 23.0 ± 22.5 ng/ml; $p = 0.05$; 도 2B). BTC 그룹의 담즙에서 BVR의 발현은 CBD 그룹에 비해 2배 또는 3배 더 높았다(도 2C). BTC 진단을 위한 각 매개변수의 예측 능력을 평가하기 위해 ROC 곡선 분석을 수행했다. BVR의 ROC 분석에서 곡선 아래 면적 (AUC)은 0.832 (0.736 - 0.928; $p < 0.001$; 도 2D)이었으며, BVR 활성에 대한 최적 컷오프(cut-off) 값은 0.023 ng/mg 단백질이었다. 이 값은 민감도 69.0%와 특이도 92.9%를 가졌다.

[0085] 빌리루빈의 ROC 분석에서 곡선 아래 면적(AUC)은 0.689 (0.483-0.896) $p<0.001$(도 7)이었으며, 빌리루빈 발현량에 대한 최적 컷오프(cut-off) 값은 12.8 ng/mg 단백질이었다. 이 값은 민감도 90.7%와 특이도 54.5%를 가졌다.

[0086] **2-5. 담석 및 BTC 환자의 담즙 내 담즙색소 분류**

[0087] 담즙 색은 담즙의 BVR 및 빌리루빈 성분에 의해 결정되므로, 담즙 색은 BTC 및 CBD 그룹으로 구분할 수 있다. 담즙 색소는 크게 도 3과 같이 녹색, 갈색, 검은색의 세 가지 색상으로 분류된다. CBD 그룹의 환자에서는 녹색보다 갈색-검정색이 더 빈번했다. 그러나 담즙 색에 따른 BVR, 빌리루빈, HO-1 수치는 차이가 없었다(표 3).

표 3

[0088]

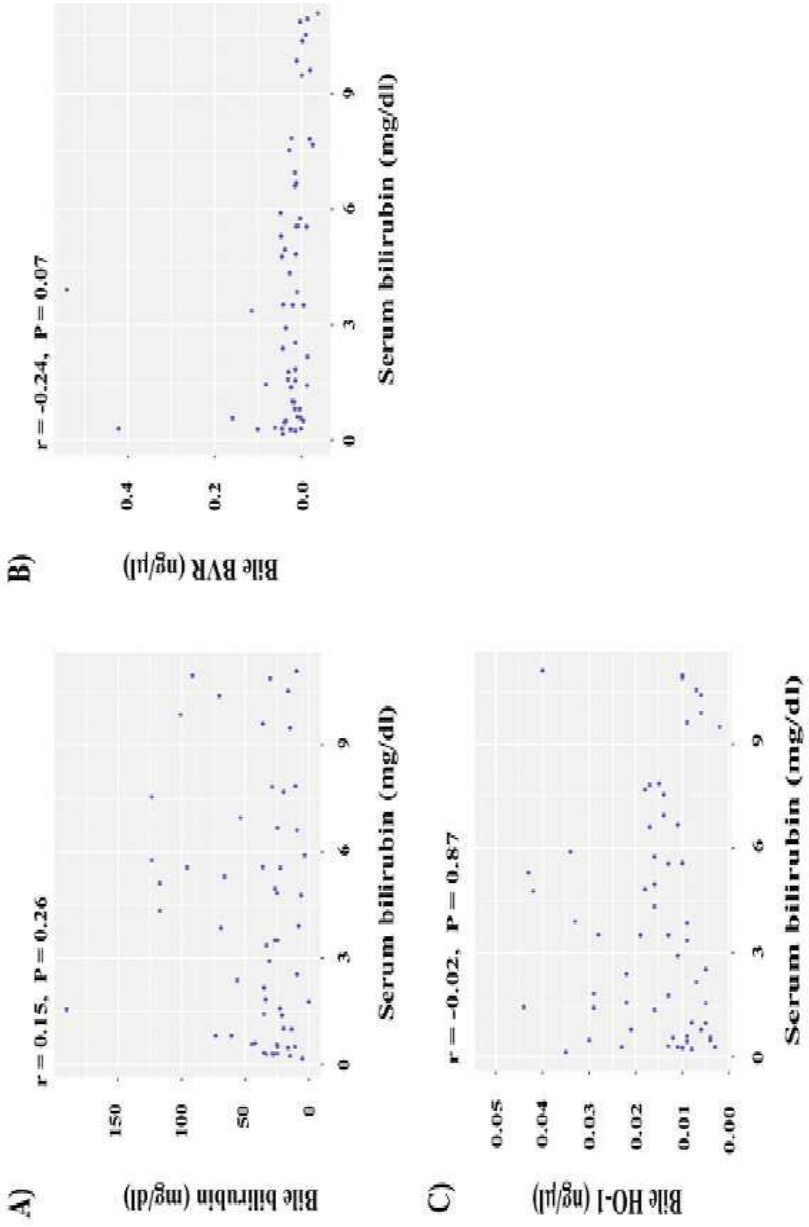
	초록색 (n=21)	갈색-검정색 (n=52)	P
CBD/BTC	3/18	12/40	<0.001
BVR	0.017 ± 0.020 (18)	0.019 ± 0.037 (35)	0.831
빌리루빈	31.1 ± 13.9 (17)	45.3 ± 12.9 (35)	0.08
HO-1	0.013 ± 0.006 (17)	0.011 ± 0.0306 (35)	0.162

[0089] **2-6. CBD 결석 및 BTC 환자에서 담즙 내 HO-1의 변화**

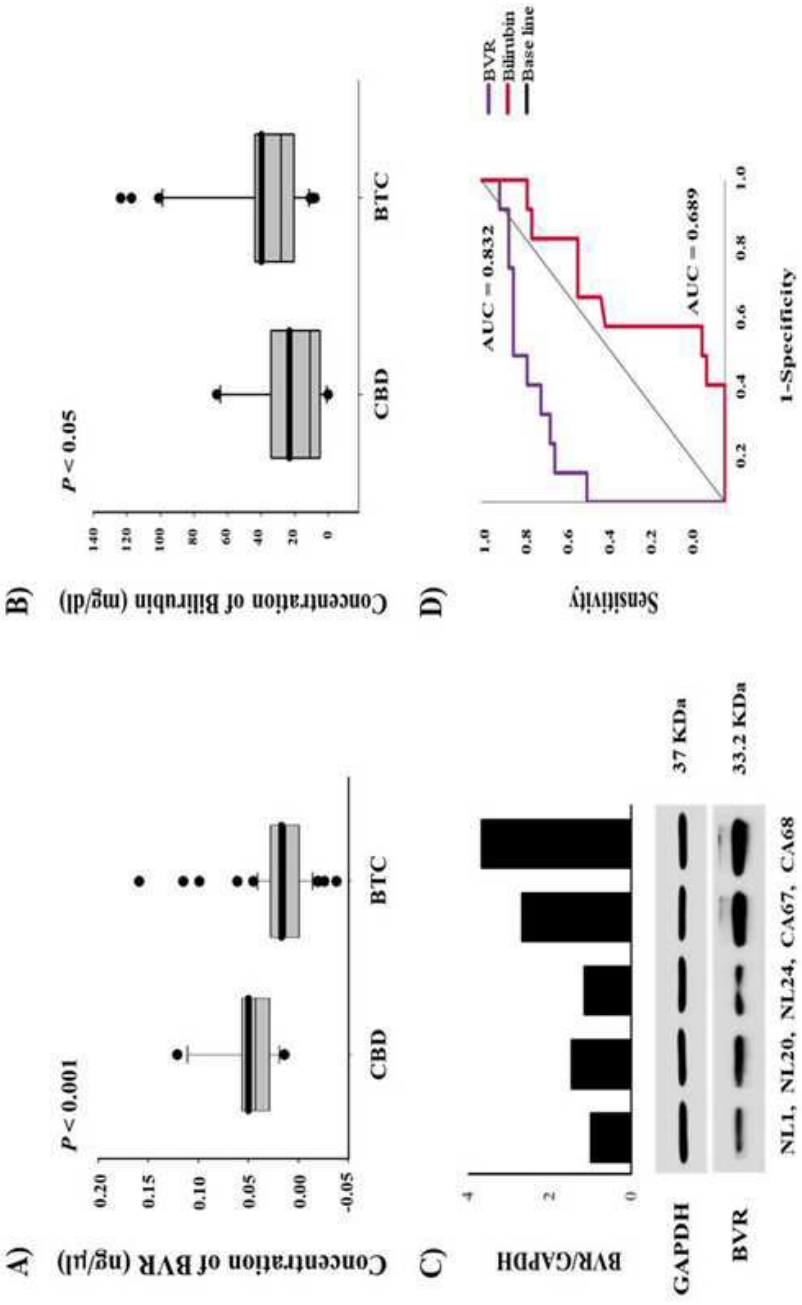
[0090] 가능한 분해 메커니즘을 확인하기 위해 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 사용하여 HO-1의 활성을 추정했다. 도 4A에 표시된 바와 같이 BTC 그룹은 CBD 그룹보다 HO-1 활성이 현저히 낮았다(0.012 ± 0.007 및 0.036 ± 0.017 ng/μg 단백질; p <0.001). HO-1 활성과 더불어 HO-1의 상대적 발현을 분석한 결과, BTC 그룹에서 CBD 그룹에 비해 2배 또는 3배 증가한 것으로 나타났다(도 4B). HO-1의 ROC 분석에서 AUC는 0.891(0.789 - 0.993; p <0.001)이었다. 최적의 컷오프(cut-off) 값은 0.019ng/mg 단백질로, 민감도는 87.7%, 특이도는 78.6%였다(도 4C). 상기 데이터는 BTC 환자의 헴 분해가 CBD 결석 환자의 헴 분해에 비해 HO-1 상향 조절을 통해 가속화될 수 있음을 시사한다.

도면

도면1


A)
Bile bilirubin (mg/dl)
r = 0.15, P = 0.26
Serum bilirubin (mg/dl)
B)
Bile BVR (ng/μl)
r = -0.24, P = 0.07
Serum bilirubin (mg/dl)
C)
Bile HO-1 (ng/μl)
r = -0.02, P = 0.87
Serum bilirubin (mg/dl)

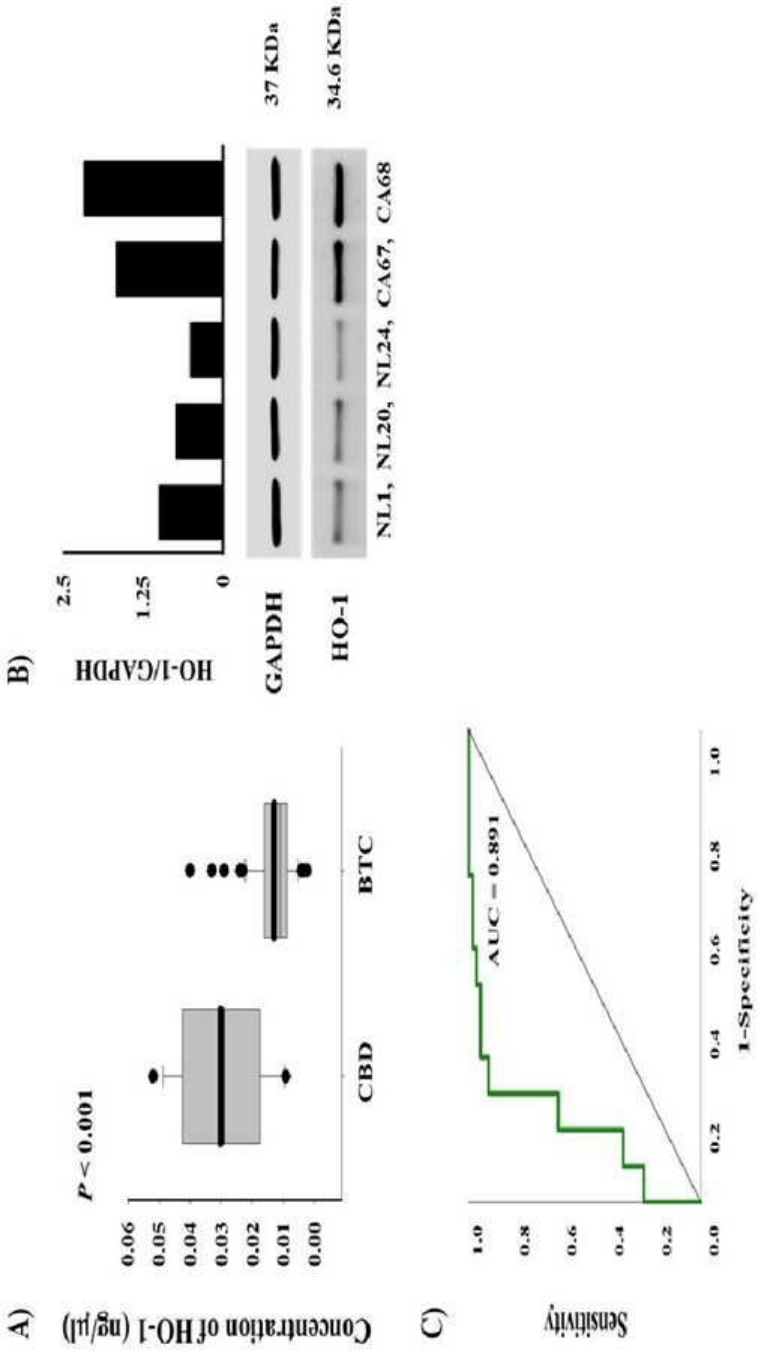
도면2


A)
Concentration of BVR (ng/μl)
P < 0.001
CBD
BTC
B)
Concentration of Bilirubin (mg/dl)
P < 0.05
CBD
BTC
C)
BVR/GAPDH
GAPDH
BVR
37 KDa
33.2 KDa
NL1, NL20, NL24, CA67, CA68
D)
Sensitivity
1-Specificity
AUC = 0.832
AUC = 0.689
BVR
Bilirubin
Base line

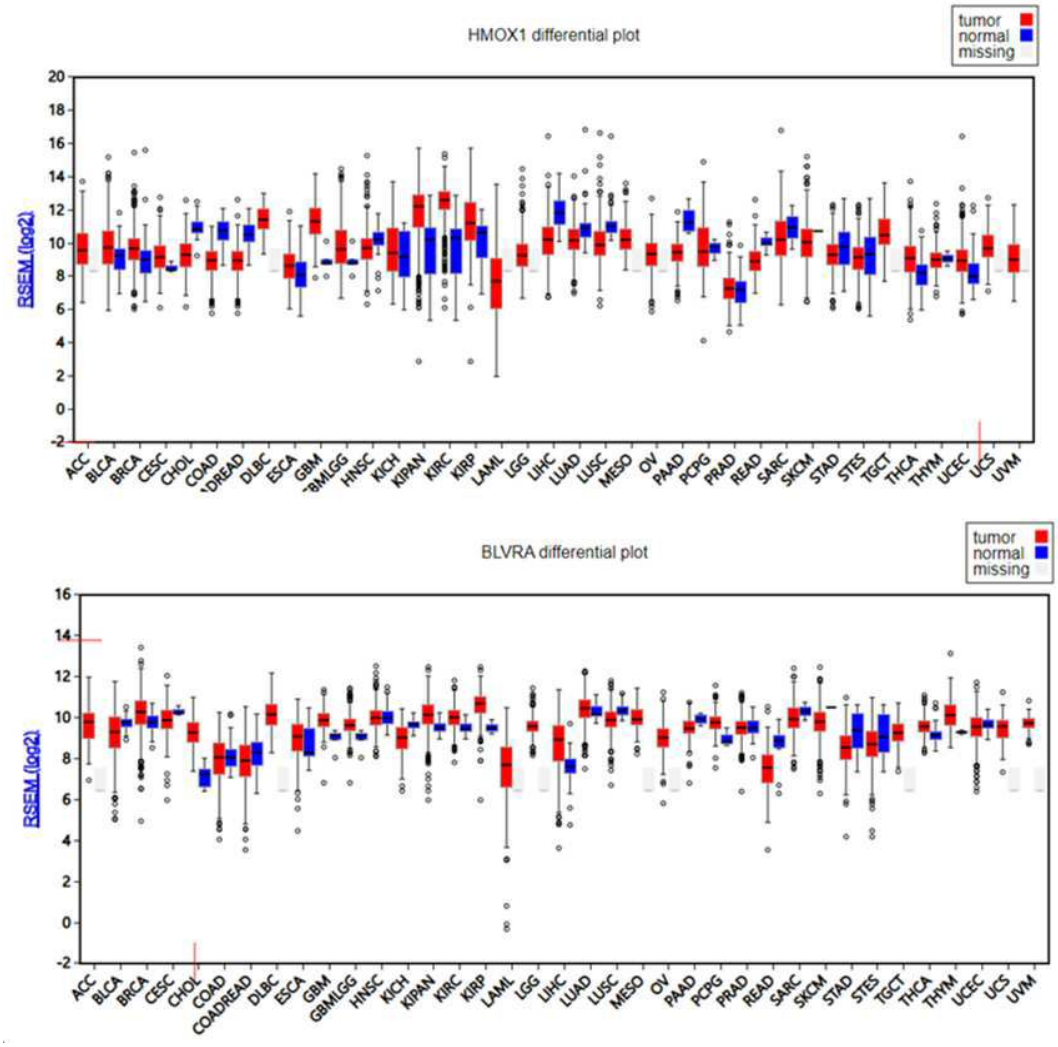
도면3



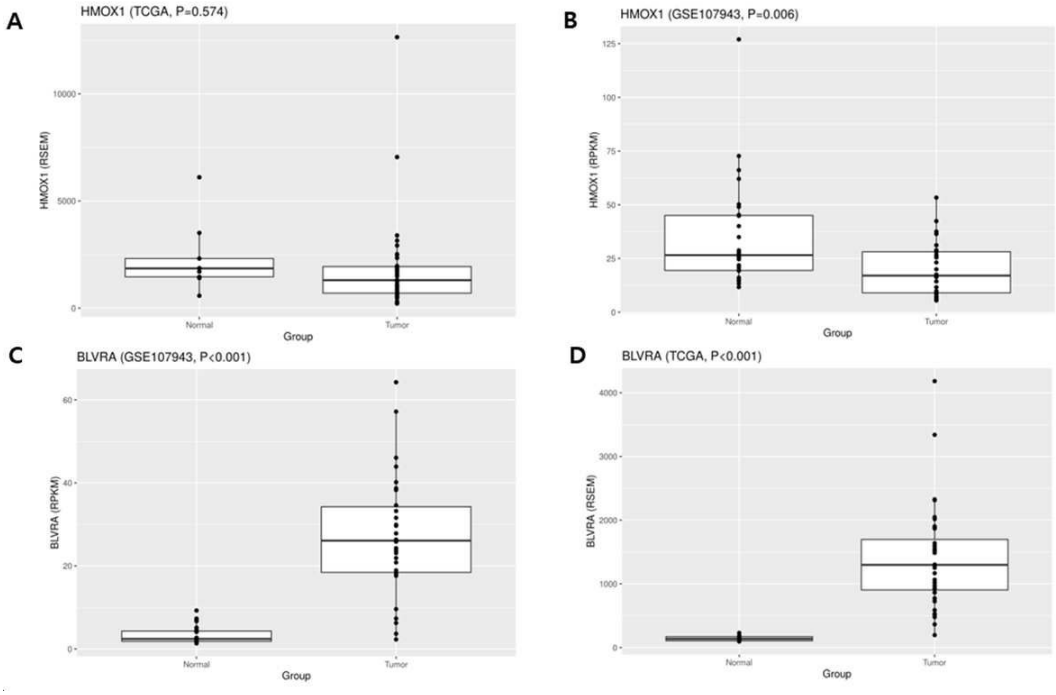
도면4


A)
Concentration of HO-1 (ng/μl)
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
P < 0.001
CBD
BTC
B)
HO-1/GAPDH
2.5
1.25
0
GAPDH
HO-1
37 KDa
34.6 KDa
NL1, NL20, NL24, CA67, CA68
C)
Sensitivity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
AUC = 0.891
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1-Specificity

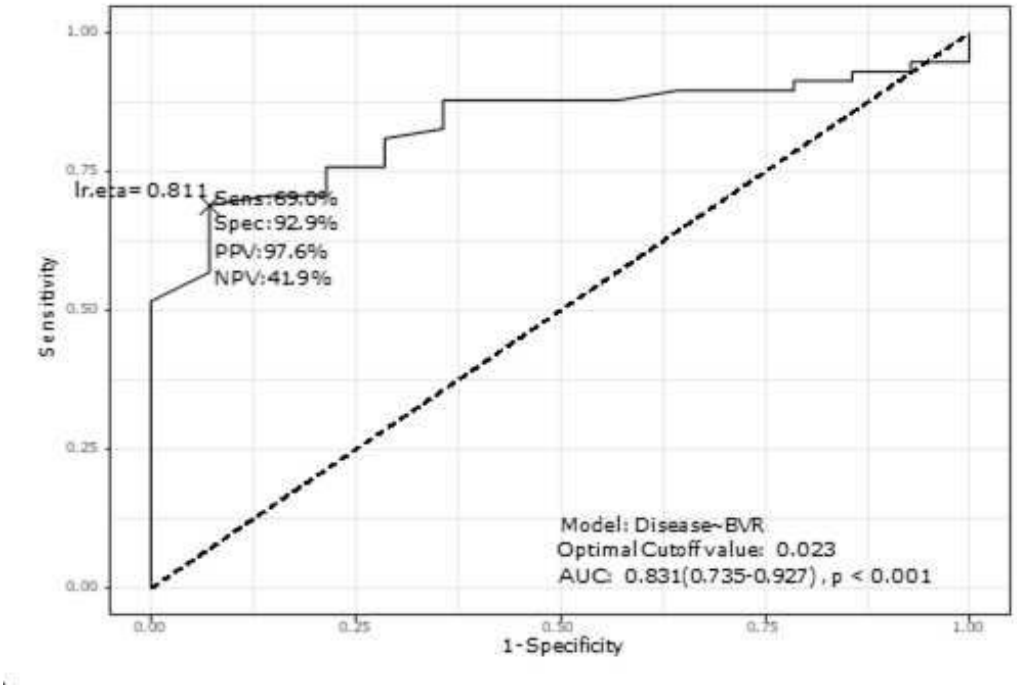
도면5


HMOX1 differential plot
tumor
normal
missing
RSEM (log2)
ACC BLCA BRCA CESC CHOL COAD DREAD DLBC ESCA GBM BMLGG HNSC KICH KIPAN KIRC KIRP LAML LGG LIHC LUAD LUSC MESO OV PAAD PCPG PRAD READ SARC SKCM STAD STES TGCT THCA THYM UCEC UCS UVM
BLVRA differential plot
tumor
normal
missing
RSEM (log2)
ACC BLCA BRCA CESC CHOL COAD COADREAD DLBC ESCA GBM GBMLGG HNSC KICH KIPAN KIRC KIRP LAML LGG LIHC LUAD LUSC MESO OV PAAD PCPG PRAD READ SARC SKCM STAD STES TGCT THCA THYM UCEC UCS UVM

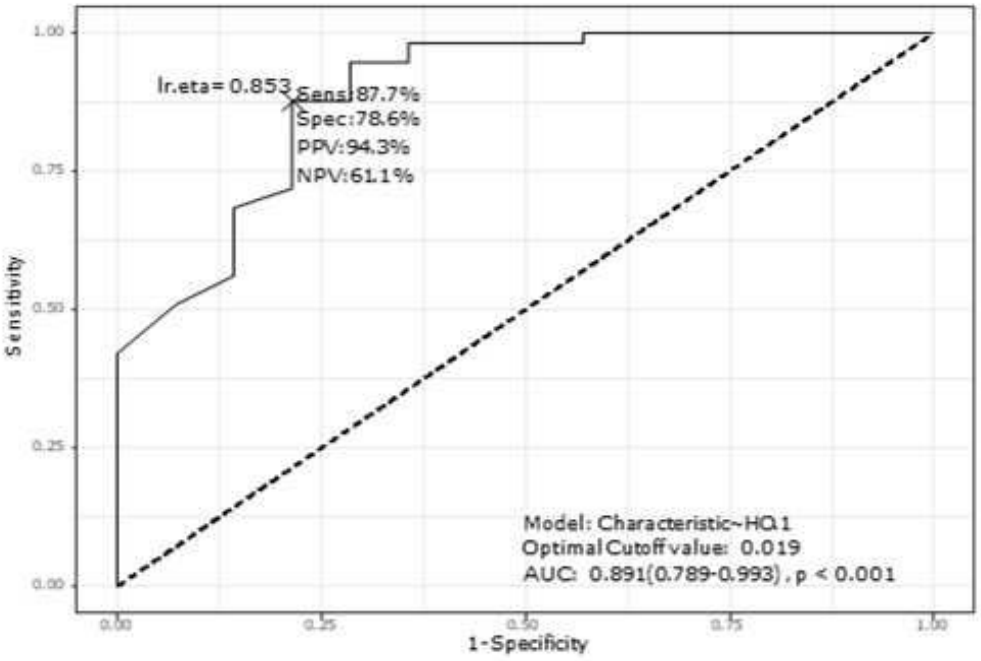
도면6


A
HMOX1 (TCGA, P=0.574)
HMOX1 (RSEM)
Normal
Tumor
Group
B
HMOX1 (GSE107943, P=0.006)
HMOX1 (RPKM)
Normal
Tumor
Group
C
BLVRA (GSE107943, P<0.001)
BLVRA (RPKM)
Normal
Tumor
Group
D
BLVRA (TCGA, P<0.001)
BLVRA (RSEM)
Normal
Tumor
Group

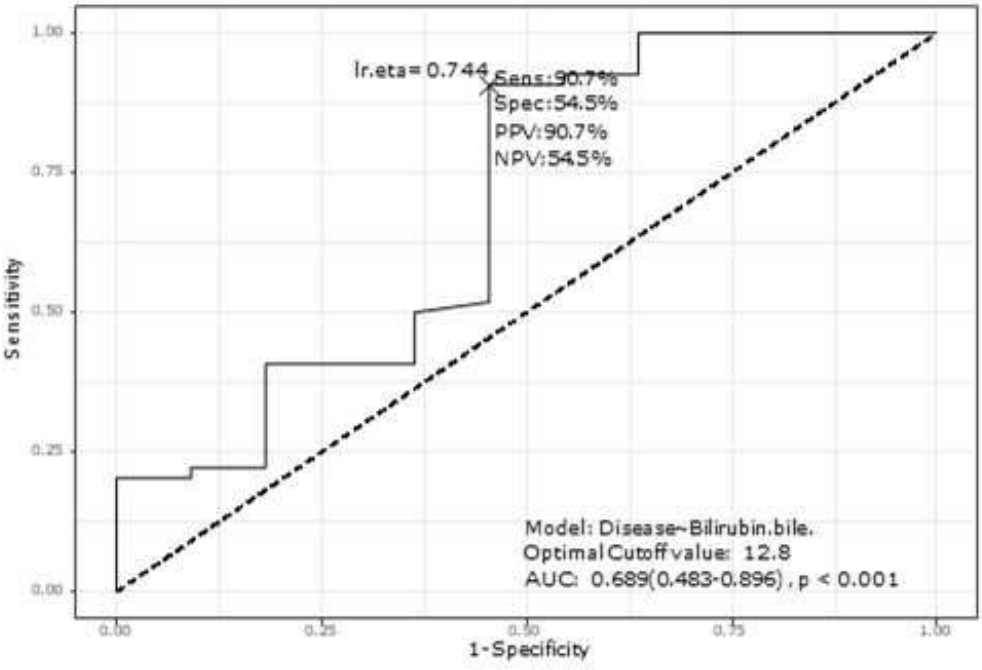
도면7


Ir.eta= 0.811
Sens:69.0%
Spec:92.9%
PPV:97.6%
NPV:41.9%
Sensitivity
1-Specificity
Model: Disease~BVR
Optimal Cutoff value: 0.023
AUC: 0.831(0.735-0.927), p < 0.001

도면8


lr.eta= 0.853
Sens:87.7%
Spec:78.6%
PPV:94.3%
NPV:61.1%
Model: Characteristic~HQ.1
Optimal Cutoff value: 0.019
AUC: 0.891(0.789-0.993), p < 0.001
Sensitivity
1-Specificity
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00

도면9


lr.eta= 0.744
Sens:90.7%
Spec:54.5%
PPV:90.7%
NPV:54.5%
Model: Disease~Bilirubin.bile.
Optimal Cutoff value: 12.8
AUC: 0.689(0.483-0.896), p < 0.001
Sensitivity
1-Specificity
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00