

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 11월 27일 (27.11.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/189203 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/002773
- (22) 국제출원일: 2014년 4월 1일 (01.04.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0056543 2013년 5월 20일 (20.05.2013) KR
- (71) 출원인: 국립암센터 (NATIONAL CANCER CENTER)
[KR/KR]; 410-769 경기도 고양시 일산동구 일산로 323, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김학균 (KIM, Hark-Kyun); 410-769 경기도 고양시 일산동구 일산로 323, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 137-873 서울특별시 서초구 반포대로 26길 21, 소소현빌딩 1층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,

CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

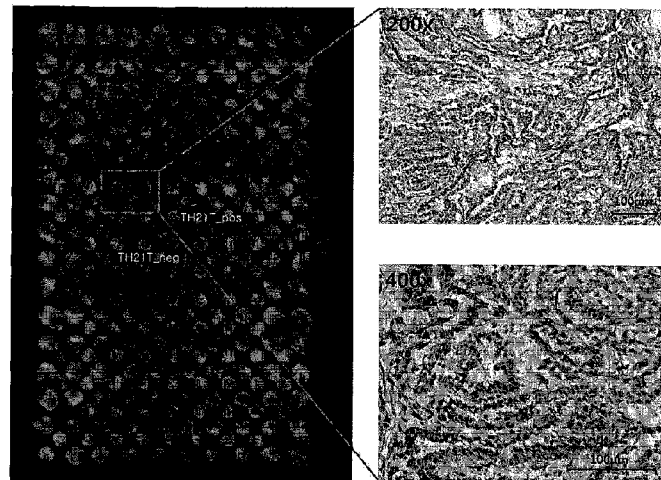
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING CANCER USING PHOSPHOLIPID

(54) 발명의 명칭: 인지질을 이용한 암의 진단 방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for diagnosing cancer using phospholipid, and, specifically, can be useful in determining whether or not a tissue is malignant by measuring and applying standardized peak intensity values for a positive ion mode in the range of m/z 798.0-799.0 or phosphatidylcholine 34:1 $[M+K]^+$ (m/z : 798.6), a positive ion mode in the range of m/z 524.0-525.0 or lysophosphatidylserine 18:1 $[M+H]^+$ (m/z : 524.4), and a positive ion mode in the range of m/z 518.0-519.0 or lysophosphatidylcholine 18:3 $[M+H]^+$ (m/z : 518.4), respectively, using a lipid MALDI MS analysis in a biopsy tissue on which accurate diagnosis is difficult to perform through the existing pathological method.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2014/189203 A1



본 발명은 인지질을 이용한 암의 진단 방법에 관한 것으로, 구체적으로 기존의 병리학적 방법으로 정확한 진단이 어려운 경우가 있는 생검조직에 대해 지질 말디 질량분석법 (lipid MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드 (positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린 (phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+$ (m/z : 798.6), 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린 (lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+$ (m/z : 524.4), 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린 (lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+$ (m/z : 518.4) 각각에 대한 표준화된 피크 강도 값을 측정 및 응용하여 조직의 악성여부를 판단하는데 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 인지질을 이용한 암의 진단 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 피검체로부터 분리된 조직에서 말디 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 각각에 대한 표준화된 피크 강도 값을 측정 및 응용하여 조직의 악성여부를 판단하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의 질량분석 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 조직-직접적 말디 질량분석 이미징(histology-directed matrix-assisted laser desorption/ionization(MALDI) mass spectrometry imaging)은 말디 이온화법을 이용한 이미징 질량분석 방법으로 1999년에 Richard M. Caprioli에 의해서 개발되었다. 분석하고자 하는 조직 표면에 매트릭스(matrix)를 도포하여 말디 이온화법을 적용하여, 조직으로부터 직접 질량 분석 데이터를 얻는다. 조직-직접적 말디 질량분석법은 생검조직에서 이온화된 단백질, 펩타이드, 지질, 또는 소형 분자(small molecules)의 분포에 대한 질량분석 정보를 표지 물질을 사용하지 않고(label-free) 조직으로부터 직접 획득하는 방법이다. 이 방법은 정상 조직과 종양 조직을 구분할 수 있는 민감도가 높은 단백질체학적 분석을 가능하도록 한다(J Proteome Res 2010; 9: 4123-4130).
- [3]
- [4] 말디 질량분석이 인체조직에 직접 이용되기 시작한 기술의 역사는 오래되지 않았으나, 시나피닉 산(sinapinic acid)을 매트릭스로 하여 동결조직(frozen tissue)을 분석하는 경우 암의 진단과 병리학적 분류에 유용한 정보를 제공할 수 있다는 것이 보고되어 있다(Lancet 2003; 362(9382): 433-449, Cancer Res 2005; 65(17): 7674-7681, Mol Cell Proteomics 2006; 5: 1975-1983). 말디 질량분석을 이용하여 정상 조직과 폐암 조직의 지질 프로파일을 비교한 결과, 분명한 차이가 존재함이 보고되었다(Lung Cancer 2012; 76: 197-203). 최근 Ishikawa 등(PLoS One 2012; 7: e48873)이 갑상선암 특이적 지질 말디 질량분석 프로파일을 보고하였으나, 적은 수의 표본에 대한 결과로 많은 수의 환자에 임상적으로 적용가능하지 않다.

[5]

- [6] 이에 본 발명자들은 국립암센터에서 수술적으로 절제된 폐암, 유방암, 대장암,

전립선암, 갑상선 암 등의 동결 수술 조직에 대한 말디 질량분석을 이용하여
암과 주변정상 조직 간의 인지질 차이를 측정한 결과,
포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 [M+K]⁺(m/z: 798.6)의 표준화된 피크
강도 값은 증가하고, 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 [M+H]⁺
(m/z: 524.4) 및 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 [M+H]⁺(m/z:
518.4)의 표준화된 피크 강도 값은 감소함을 확인함(P<10⁻⁷)으로써, 이와 같은
인지질의 발현 차이는 대한민국 호발암에서 전반적으로 관찰되는 현상으로
진단에 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[7]

[8]

그 중 갑상선암을 예로 들면, 갑상선암은 대한민국에서 가장 발병률이 높은
암이고, 이 중 유두갑상선암(papillary thyroid carcinoma)의 조직 형태가 가장
빈번하게 관찰된다(Cancer Res Treat 2012; 44: 11-24, Thyroid 2013). 수술 전
조직학적 진단은 생체검사(biopsy) 표본을 대상으로 이루어진다. National Cancer
Institute Thyroid FNA State of the Science Conference에 따르면, 갑상선 부위는
양성(benign), 이형(atypia), 소낭의 종양(follicular neoplasm), 악성종양
의심(suspicious for malignancy), 및 악성종양(malignant)(Cancer 2008; 114: 71-73,
Thyroid 2009; 19: 1159-1165)으로 분류된다. 악성종양 의심에 상기
유두갑상선암이 포함되며, 이의 조직은 미묘한 핵 중심부(focal nuclear)의
구조적인 변화를 수반한다. 악성종양 의심이라고 명명되는 소결(nodule)은 대개
절제되고, 이 중 60 내지 75%의 대부분은 유두암(papillary carcinoma)으로
판정된다(Thyroid 2009; 19: 1159-1165). 따라서, 작은 조직 표본을 사용하여
유두갑상선암을 진단하는 데에 어려움이 존재하여, 갑상선암에 대한 더욱
민감도 및 특이도가 높은 진단 방법이 시급히 필요한 상황이다(Minerva Chir
2010; 65: 83-93).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9]

[10]

[11]

본 발명의 목적은

1) 악성종양이 의심되는 실험군 및 대조군에서 각각 조직을 분리하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 분리한 실험군 및 대조군 조직에서 말디

질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI
MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는
포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 [M+K]⁺(m/z: 798.6), 양이온 모드의 m/z
524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 [M+H]⁺(m/z:
524.4), 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는
리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 [M+H]⁺(m/z: 518.4) 각각의
표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계; 및

[12]

3) 상기 단계 2)의 피크 강도 값을 대조군과 비교하여 악성여부를 판단하는

단계를 포함하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의 질량분석 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [14] 1) 악성종양이 의심되는 실험군 및 대조군에서 각각 조직을 분리하는 단계;
- [15] 2) 상기 단계 1)에서 분리한 실험군 및 대조군 조직에서 말디 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 각각의 표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계; 및
- [16] 3) 상기 단계 2)의 피크 강도 값을 대조군과 비교하여 악성여부를 판단하는 단계를 포함하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의 질량분석 방법을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은
- [18] 1) 피검체로부터 분리된 조직에서 말디 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 각각의 표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계;
- [19] 2) 상기 단계 1)의 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 각각에 대하여 측정한 피크 강도 값을 하기 [수학식 1]에 대입하여 결과값을 산출하는 단계; 및
- [20] [수학식 1]
- [21] $10.3 \times (m/z 798.6) - 6.4 \times (m/z 524.4) - 6.2 \times (m/z 518.4)$
- [22] (m/z 798.6): 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린 34:1 $[M+K]^+$ 의 표준화된 피크 강도 값;
- [23] (m/z 524.4): 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린 18:1

- [M+H]⁺의 표준화된 피크 강도 값; 및
- [24] (m/z 518.4): 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린 18:3 [M+H]⁺의 표준화된 피크 강도 값.
- [25] 3) 상기 단계 2)의 결과값을 이용하여 조직의 악성여부를 판단하는 단계를 포함하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의 질량분석 방법을 제공한다.
- [26] 또한, 본 발명은
- [27] 1) 피검체로부터 분리된 조직에서 말디 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 [M+K]⁺(m/z: 798.6), 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 [M+H]⁺(m/z: 524.4), 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 [M+H]⁺(m/z: 518.4) 각각의 표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계;
- [28] 2) 상기 단계 1)의 양이온 모드의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 [M+K]⁺(m/z: 798.6), 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 [M+H]⁺(m/z: 524.4), 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 [M+H]⁺(m/z: 518.4) 각각에 대하여 측정한 피크 강도 값을 하기 [수학식 1]에 대입하여 결과값을 산출하는 단계; 및
- [29] [수학식 1]
- [30]
$$10.3 \times (m/z 798.6) - 6.4 \times (m/z 524.4) - 6.2 \times (m/z 518.4)$$
- [31] (m/z 798.6): 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린 34:1 [M+K]⁺의 표준화된 피크 강도 값;
- [32] (m/z 524.4): 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린 18:1 [M+H]⁺의 표준화된 피크 강도 값; 및
- [33] (m/z 518.4): 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린 18:3 [M+H]⁺의 표준화된 피크 강도 값.
- [34] 3) 상기 단계 2)의 결과값을 이용하여 조직의 악성여부를 판단하는 단계를 포함하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의 질량분석 방법을 제공한다:
- [35] i) 갑상선 조직의 경우, 결과값이 43.4 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [36] ii) 대장 조직의 경우, 결과값이 97.9 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [37] iii) 유방 조직의 경우, 결과값이 -85.5 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [38] iv) 폐 조직의 경우, 결과값이 64.7 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [39] v) 췌장 조직의 경우, 결과값이 54.4 이상이면 악성종양으로 판정하고; 및
- [40] vi) 전립선 조직의 경우, 결과값이 80.6 이상이면 악성종양으로 판정함.

발명의 효과

- [41] 본 발명은 말디 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 각각에 대한 표준화된 피크 강도 값을 측정 및 응용하여 기존의 병리학적 방법으로 정확한 진단이 어려운 상기 암 생검조직에 대하여 악성종양 여부를 판정 가능하도록 하고, 임상적 치료지침을 제공하여, 악성종양 여부 진단법으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [42] 도 1은 악성 종양 표본에 대한 크리오섹션(cryosection) ITO 슬라이드 및 확대된 H&E 염색 슬라이드를 나타내는 도이다.
- [43] 도 2는 평균 말디 질량분석(MALDI MS) 스펙트럼을 나타내는 도이다; 적색은 갑상선암조직 및 녹색은 정상조직을 나타낸다.
- [44] 도 3은 유두갑상선암(papillary thyroid carcinoma)의 주성분 분석 플랏(Principal component analysis plot)을 나타내는 도이다; 각각의 구는 단일 샘플을 나타내고, 녹색은 유두갑상선암 및 적색은 정상 샘플을 의미하며, 샘플들의 지질 MALDI 프로파일은 매우 유사하여 서로 근접하게 위치한다.
- [45] 도 4는 말디 리프트(MALDI LIFT(MS/MS)) 분석을 이용한 분자구조 동정을 나타내는 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [46] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[47]

[48] 본 발명은

[49] 1) 악성종양이 의심되는 실험군 및 대조군에서 각각 조직을 분리하는 단계;

[50] 2) 상기 단계 1)에서 분리한 실험군 및 대조군 조직에서 말디

질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 각각의 표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계; 및

[51] 3) 상기 단계 2)의 피크 강도 값을 대조군과 비교하여 악성여부를 판단하는 단계를 포함하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의 질량분석 방법을

제공한다.

- [52] 구체적으로, 상기 조직은 갑상선, 대장, 유방, 폐, 췌장, 및 전립선 유래 조직인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [53] 상기 조직은 생검조직의 동결절편을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [54] 상기 피크 강도 값은 정상 대조군과 비교하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+$ (m/z : 798.6)의 피크 강도 값은 증가하고, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+$ (m/z : 524.4)의 피크 강도 값은 감소하며, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+$ (m/z : 518.4)의 피크 강도 값은 감소한다.
- [55]
- [56] 또한, 본 발명은
- [57] 1) 피검체로부터 분리된 조직에서 말디 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+$ (m/z : 798.6), 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+$ (m/z : 524.4), 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+$ (m/z : 518.4) 각각의 표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계;
- [58] 2) 상기 단계 1)의 양이온 모드의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+$ (m/z : 798.6), 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+$ (m/z : 524.4), 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+$ (m/z : 518.4) 각각에 대하여 측정한 피크 강도 값을 하기 [수학식 1]에 대입하여 결과값을 산출하는 단계; 및
- [59] [수학식 1]
- [60] $10.3 \times (m/z 798.6) - 6.4 \times (m/z 524.4) - 6.2 \times (m/z 518.4)$
- [61] (m/z 798.6): 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린 34:1 $[M+K]^+$ 의 표준화된 피크 강도 값;
- [62] (m/z 524.4): 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린 18:1 $[M+H]^+$ 의 표준화된 피크 강도 값; 및
- [63] (m/z 518.4): 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린 18:3 $[M+H]^+$ 의 표준화된 피크 강도 값.

- [64] 3) 상기 단계 2)의 결과값을 이용하여 조직의 악성여부를 판단하는 단계를 포함하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의 질량분석 방법을 제공한다.
- [65] 구체적으로, 상기 조직은 갑상선, 대장, 유방, 폐, 췌장, 및 전립선 유래 조직인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [66] 상기 조직은 생검조직의 동결절편을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [67] 상기 조직은 세포흡인검체의 용해물(lysate), 또는 흉수 및 복수와 같은 근위 체액(proximal fluid)을 대상으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [68] 또한, 상기 암은 갑상선암, 대장암, 유방암, 폐암, 췌장암, 및 전립선암을 포함한 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [69] 상기 방법에 있어서, 단계 3)에서 결과값은 정상 대조군 유래 결과값과 비교하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [70] 또한, 상기 단계 3)에서 갑상선 조직의 경우, 결과값이 43.4 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [71] 대장 조직의 경우, 결과값이 97.9 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [72] 유방 조직의 경우, 결과값이 -85.5 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [73] 폐 조직의 경우, 결과값이 64.7 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [74] 췌장 조직의 경우, 결과값이 54.4 이상이면 악성종양으로 판정하고; 및
- [75] 전립선 조직의 경우, 결과값이 80.6 이상이면 악성종양으로 판정하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않고, 비교 검체(training set)에서의 악성종양 조직과 정상 조직의 중간값을 기준으로 재설정 가능하다.
- [76]
- [77] 또한, 본 발명은
- [78] 1) 피검체로부터 분리된 조직에서 말디 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 각각의 표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계;
- [79] 2) 상기 단계 1)의 양이온 모드의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 각각에 대하여 측정한 피크 강도 값을 하기 [수학식 1]에 대입하여 결과값을 산출하는 단계; 및

- [80] [수학식 1]
- [81] $10.3 \times (m/z 798.6) - 6.4 \times (m/z 524.4) - 6.2 \times (m/z 518.4)$
- [82] (m/z 798.6): 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린 34:1 [M+K]⁺의 표준화된 피크 강도 값;
- [83] (m/z 524.4): 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린 18:1 [M+H]⁺의 표준화된 피크 강도 값; 및
- [84] (m/z 518.4): 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린 18:3 [M+H]⁺의 표준화된 피크 강도 값.
- [85] 3) 상기 단계 2)의 결과값을 이용하여 하기와 같이 조직의 악성여부를 판단하는 단계를 포함하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의 질량분석 방법을 제공한다:
- [86] i) 갑상선 조직의 경우, 결과값이 43.4 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [87] ii) 대장 조직의 경우, 결과값이 97.9 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [88] iii) 유방 조직의 경우, 결과값이 -85.5 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [89] iv) 폐 조직의 경우, 결과값이 64.7 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- [90] v) 췌장 조직의 경우, 결과값이 54.4 이상이면 악성종양으로 판정하고; 및
- [91] vi) 전립선 조직의 경우, 결과값이 80.6 이상이면 악성종양으로 판정함.
- [92] 구체적으로, 국립암센터 갑상선암 환자로부터 채취한 생검조직 38개에 대하여 동결절편을 얻어 크리오섹션(cryosection)하였다(도 1). 준비된 시료로 말디 질량분석을 수행하였고, 그 결과로 얻은 데이터를 FlexImaging 소프트웨어 및 ClinProTools 프로그램을 이용하여 분석하였다(도 2). 정상 대조군의 결과와 비교하여 갑상선암 환자에서 인지질 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 [M+K]⁺(m/z: 798.6)의 표준화된 피크 강도 값은 유의적으로 증가하였고, 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 [M+H]⁺(m/z: 524.4) 및 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 [M+H]⁺(m/z: 518.4)의 표준화된 피크 강도 값은 유의적으로 감소하였다(표 1). 상기 세 인지질에 대한 데이터세트(dataset)의 피크 강도 값을 기반으로 하여 화합물 공변량 예측변수 알고리즘을 산출하였다(수학식 1). 갑상선암 조직의 피크 강도 값의 중간값인 43.4를 컷오프(cutoff)로 하여 악성종양 여부를 판단할 수 있음을 확인하였다.
- [93] 또한, 대장암, 유방암, 폐암, 췌장암 및 전립선암으로 구성된 암 환자로부터 채취한 생검조직 총 60개에 대하여 동결절편을 얻어, 상기 기재된 갑상선암 조직을 이용한 말디 질량분석과 동일하게 말디 질량분석을 수행하였다. 그 결과, 상기 암 환자의 조직에서도 갑상선암 조직의 결과와 유사하게, 인지질 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 [M+K]⁺(m/z: 798.6)의 표준화된 피크 강도 값은 유의적으로 증가하였고, 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 [M+H]⁺(m/z: 524.4) 및 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 [M+H]⁺(m/z: 518.4)의 표준화된 피크 강도 값은 유의적으로 감소하였다(표 2).

화합물 공변량 예측변수 알고리즘의 악성종양 여부 판별 컷오프를 대장암의 경우 97.9로, 유방암의 경우 -85.5로, 폐암의 경우 64.7로, 췌장암의 경우 54.4로, 전립선암의 경우 80.6으로 할 수 있음을 확인하였다.

- [94] 따라서, 기존의 병리학적 방법으로 정확한 진단이 어려운 경우가 있는 생검조직에 대해 지질 말디 질량분석법을 이용하여 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 [M+K]⁺(m/z: 798.6), 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 [M+H]⁺(m/z: 524.4), 및 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 [M+H]⁺(m/z: 518.4) 각각에 대한 표준화된 피크 강도 값을 측정 및 응용하여 조직의 악성여부를 판단하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[95]

- [96] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

- [97] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 설명하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 이에 한정되지 않는다.

발명의 실시를 위한 형태

- [98] <실시예 1> 조직의 준비

- [99] <1-1> 갑상선암 조직의 준비

- [100] 국립암센터 갑상선암 센터에서 2012년 내지 2013년 동안 갑상선 전절제술 또는 부분절제술을 시행 받은 환자 38명으로부터 생검조직을 채취하였다. 갑상선 생검조직으로부터 10 μm 두께로 동결절편을 얻어 크리오섹션(cryosection)하였다. 말디(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 질량분석(mass spectrometry, MS)을 시행하기 위한 준비 단계로, 동결절편 중 하나는 H&E(hematoxylin/eosin) 염색을 수행하여, 상피 세포에 해당하는 부위(spot)만 선택하도록 표시하였다(도 1의 우측). 나머지 동결절편은 크리오섹션 ITO(indium tin oxide) 슬라이드로 준비하기 위하여, 상피세포 부위에 해당하는 곳에 Chip-1000(Shimadzu, Kyoto, Japan) 기계를 이용하여 7 mg의 2,5-디히드록시벤조산(2,5-dihydroxy benzoic acid, DHB)/알파-시아노-4-하이드록시나믹산(α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid, CHCA)(1 ml의 70% 메탄올 및 0.1% TFA/1% 피페리딘(piperidine))을 매트릭스(matrix)로 하여 100 μl을 도포하였다(도 1의 좌측). 이때, Chip-1000 대신 마이크로피펫(micropipette)으로 250 μl씩 두 번 상기 매트릭스를 도포할 수도 있다. 동결절편을 ITO 슬라이드에 녹이면서 붙인(thaw-mount) 후, 진공건조기에서 건조하였다.

[101]

- [102] <1-2> 대장암, 유방암, 폐암, 췌장암 및 전립선암 조직의 준비

- [103] 각각 대장암, 유방암, 폐암, 췌장암 및 전립선암으로 치료받고 있는 환자로부터 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 시료를 준비하였다. 이때, 생검조직의

용해물(lysate), 또는 흉수 및 복수와 같은 근위 체액(proximal fluid)을 사용하였으나, 이에 한정하지 않는다. 구체적으로, 대장암, 유방암, 폐암, 췌장암 및 전립선암을 포함한 종양 조직에 대하여 각각 13, 26, 11, 4 및 6개, 즉 전체 60개를 시료를 수득하였다.

[104]

[105] <실시예 2> 말디 질량분석(MALDI MS)을 이용한 인지질 발현 양상 확인

[106] 말디 질량분석은 UltrafleXtreme MALDI time-of-light 질량 분석기(Bruker Daltonics, Bremen, Germany)로 스캔(scan)하였다. 이때 m/z 범위는 500 내지 1,100 Da으로 하고, 3000 consecutive laser shots(빈도: 1,000 Hz)을 주고 그 값을 평균으로 산출하였다.

[107] FlexImaging 소프트웨어(version 2.1, Bruker Daltonics)를 사용하여 다시 한번 악성종양 표본의 상피세포 유래 인지질 구성에 대한 질량분석 데이터를 추출하였다(도 2). 이때 H&E 슬라이드를 참조하여 상피세포의 적색으로 표시된 해당 부분(도 1)에서의 질량 패턴만 ClinProTools(버전 2.2, Bruker Daltonics)에서 분석처리되도록 하였다. ClinProTools를 사용할 경우의 변수(parameter)는 하기와 같았다: 해상도(resolution), 800; 바탕선 제거시 최소 10% 길이로 바탕선 이동한 탑 햇 바탕선(top hat baseline with 10% minimal baseline width as baseline subtraction); 참조 및 피크 무게 사이에 2,000 ppm만큼 최대 피크 이동으로 재보정(recalibration with a maximal peak shift of 2,000 ppm between reference and peak masses); 보정된 피크와 일치하는 퍼센트(% match to calibrant peaks), 10%; 신호-대-소음 비율 컷오프(signal-to-noise ratio cutoff), 5; 영점 수준으로 통합된 피크 계산을 위한 피크 지역(peak area for peak calculation with zero level integration).

[108] 갑상선암 조직 환자 1명의 시료(sample)로부터 하나의 스펙트럼(spectrum)만을 얻었고, 전체 38 개의 시료에 대한 피크 강도(intensity) 값의 평균값으로 데이터를 표준화(normalization)하였다. 표준화한 피크 강도 값의 분석 결과, 악성 갑상선암 조직에서 공통적으로 인지질 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC) 34:1 [M+K]⁺(m/z : 798.6)이 통계적으로 유의하게 증가하였고, 리소포스파티딜세린(lysophosphatidyl serine, LPS) 18:1 [M+H]⁺(m/z : 524.4) 및 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidyl choline, LPC) 18:3 [M+H]⁺(m/z : 518.4)이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(표 1 및 도 3).

[109] 표 1

[Table 1]

갑상선 정상 및 악성종양 조직에서 변화한 표준화된 피크 강도 값 및 해당 인지질

m/v	P	FDR	정상 조직	갑상선암 악성종양 조직	비율 ¹	인지질
p798.6	0.0001	0.0005	7.5	14.5	1.9	PC (34:1) K ⁺
p524.4	0.0002	0.0012	2.2	3.5	0.4	LPS (18:1)
p518.4	0.0003	0.0015	1.7	1.2	0.7	LPC (18:3)

[110] ¹비율, 정상 조직에 대한 갑상선암 종양 조직(38개 시료)의 해당 지질 발현 비율
[111] PC, 포스파티딜콜린; LPS, 리소포스파티딜세린; LPC, 리소포스파티딜콜린

[112]

[113] 또한, 데이터세트(dataset)에서 t-값을 근간으로 하여, 상기 3개의 인지질의 피크
강도 값을 이용한 악성종양 조직과 정상 조직을 감별하는 직선 알고리즘(near
algorithm) 기반의 화합물 공변량 예측변수(compound covariate predictor)
알고리즘(수학식 1)을 산출하였다.

[114]

[115] [수학식 1]

[116] $10.3 \times (m/z 798.6) - 6.4 \times (m/z 524.4) - 6.2 \times (m/z 518.4)$

[117] (m/z 798.6): 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는
포스파티딜콜린 34:1 [M+K]⁺의 표준화된 피크 강도 값;

[118] (m/z 524.4): 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린 18:1
[M+H]⁺의 표준화된 피크 강도 값; 및

[119] (m/z 518.4): 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린 18:3
[M+H]⁺의 표준화된 피크 강도 값.

[120]

[121] 구체적으로, 각 시료에서 말디 질량분석으로 측정된 m/z 798.6;
포스파티딜콜린 34:1 [M+K]⁺, m/z 524.4; 리소포스파티딜세린 18:1 [M+H]⁺, 및
m/z 518.4, 리소포스파티딜콜린 18:3 [M+H]⁺의 표준화된 피크 강도 값을 각각
[수학식 1]의 상응하는 위치에 대입하여, 계산한 결과값의 크기에 따라 악성종양
여부를 예측할 수 있다. 그 값이 클수록 악성종양일 확률이 높아지는 것을
확인하였다.

[122]

[123] <실험예 1> 갑상선암 조직의 말디 질량분석

[124] 상기 실시예 <1-1>에서 획득한 갑상선암의 동결절편을 <실시예 2>에 따라
말디 질량분석을 수행하였다. 그 결과를 바탕으로 각 m/z 798.6; 포스파티딜콜린

34:1 [M+K]⁺, m/z 524.4; 리소포스파티딜세린 18:1 [M+H]⁺, m/z 518.4, 및 리소포스파티딜콜린 18:3 [M+H]⁺의 표준화된 피크 강도 값을 각각 상기 <실시예 2>의 [수학식 1]의 괄호 안에 대입하여 산출하고 악성종양 여부를 판정하였다(수학식 1).

[125] 그 결과, 대비교(paired comparison)로 시행하는 경우, 38개 시료에서의 예측률은 정확도가 100% (민감도(sensitivity), 100%; 특이도(specificity), 100%)이며, 산출 결과값이 중간값(median value)인 43.4 이상이면 악성종양으로 판정하였다. 또한, 상기 산출 결과값이 중간값인 43.4 미만이면 양성종양이거나 정상일 수 있다.

[126] 또한, 상기 <실시예 2>의 [수학식 1]에 대입한 결과가 43.4보다 낮으면 양성질환으로 판정하는 컷오프를 일률적으로 적용하는 경우, 정확도는 84.2%(민감도, 87.5%; 특이도, 80%)였다. 이때 양성질환 20개 시료의 평균값은 22.0(범위, -4.5 내지 74.2)이고, 악성질환 16개 시료의 평균값은 133.9(범위, 28.2-294.8)였다.

[127]

[128] <실험예 2> 대장암, 유방암, 폐암, 췌장암 및 전립선암 조직 분석

[129] 상기 실시예 <1-2>에서 수득한 대장암, 유방암, 폐암, 췌장암 및 전립선암으로부터 선택된 각 조직의 동결절편을 <실시예 2>와 동일한 방법으로 말디 질량분석을 수행하였다.

[130] 그 결과, 하기 표 2에 나타낸 바와 같이 갑상선암 조직에서 유의적으로 변화한 m/z 798.6; 포스파티딜콜린 34:1 [M+K]⁺, m/z 524.4; 리소포스파티딜세린 18:1 [M+H]⁺, 및 m/z 518.4; 리소포스파티딜콜린 18:3 [M+H]⁺로 이루어진 3개의 인지질 발현 양상이, 대장암, 유방암, 폐암, 췌장암 및 전립선암으로 이루어진 군의 악성종양 조직에서도 유사한 발현 양상을 나타냄을 확인하였다(표 2).

[131]

[132] 표 2

[Table 2]

대장암, 유방암, 폐암, 췌장암, 전립선암 종양 조직에서 변화한 표준화된 피크 강도 값 데이터에서 t-값을 기반으로 분석한 결과

m/z	P	FDR	비율 ¹
p798.6	<1e-07	<1e-07	1.8
p524.4	<1e-07	<1e-07	0.6
p518.4	<1e-07	<1e-07	0.7

[133] ¹비율, 정상 조직에 대한 종양 조직(대장암, 유방암, 폐암, 췌장암 및 전립선암 조직 포함 총 60개 시료)의 해당 지질 발현 비율.

[134]

[135] <2-1> 대장암 조직의 말디 질량분석

[136] 대장암 조직의 경우, 13개의 시료를 상기 실시예 <1-2>의 방법으로 준비하고, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 말디 질량분석을 수행하였다. 비교 검체(training set)로 분석하여 상기 <실시예 2>에 따라 말디 질량분석 결과의 양상을 비교할 때 100%(13/13)의 정확도를 보였다.

[137] 상기 <실시예 2>의 [수학식 1]을 대장암 조직의 데이터에 적용한 결과, 악성종양 여부를 판단하는 기준 컷오프 값을 중간값인 97.9로 지정할 수 있음을 확인하였다. 일률적으로 97.9 이상인 경우 악성종양으로 판정하였고, 이의 정확도는 84.6%였다. 또한, 상기 산출 결과값이 중간값인 97.9 미만이면 양성종양이거나 정상일 수 있다.

[138]

[139] <2-2> 유방암 조직의 말디 질량분석

[140] 유방암 조직의 경우, 26개의 시료를 상기 실시예 <1-2>의 방법으로 준비하고, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 말디 질량분석을 수행하였다. 비교 검체로 분석하여 상기 <실시예 2>에 따라 말디 질량분석 결과의 양상을 비교할 때 84.6%(22/26)의 정확도를 보였다.

[141] 상기 <실시예 2>의 [수학식 1]을 유방암 조직의 결과에 적용한 결과 악성종양 여부를 판단하는 기준 컷오프 값을 중간값인 -85.5로 지정할 수 있음을 확인하였다. 일률적으로 -85.5 이상인 경우 악성종양으로 판정하였고, 이의 정확도는 69.2%였다. 또한, 상기 산출 결과값이 중간값인 -85.5 미만이면 양성종양이거나 정상일 수 있다.

[142]

[143] <2-3> 폐암 조직의 말디 질량분석

[144] 폐암 조직의 경우, 11개의 시료를 상기 실시예 <1-2>의 방법으로 준비하고, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 말디 질량분석을 수행하였다. 비교 검체로 분석하여 상기 <실시예 2>에 따라 말디 질량분석 결과의 양상을 비교할 때 90.9%(10/11)의 정확도를 보였다.

[145] 상기 <실시예 2>의 [수학식 1]을 폐암 조직의 결과에 적용한 결과 악성종양 여부를 판단하는 기준 컷오프 값을 중간값인 64.7로 지정할 수 있음을 확인하였다. 일률적으로 64.7 이상인 경우 악성종양으로 판정하였고, 이의 정확도는 90.9%였다. 또한, 상기 산출 결과값이 중간값인 64.7 미만이면 양성종양이거나 정상일 수 있다.

[146]

[147] <2-4> 전립선암 조직의 말디 질량분석

[148] 전립선암 조직의 경우, 6개의 시료를 상기 실시예 <1-2>의 방법으로 준비하고, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 말디 질량분석을 수행하였다. 비교 검체로 분석하여 상기 <실시예 2>에 따라 말디 질량분석 결과의 양상을 비교할 때 100%(6/6)의 정확도를 보였다.

- [149] 상기 <실시예 2>의 [수학식 1]을 전립선암 조직의 결과에 적용한 결과 악성종양 여부를 판단하는 기준 컷오프 값을 중간값인 80.6으로 지정할 수 있음을 확인하였다. 일률적으로 80.6 이상인 경우 악성종양으로 판정하였고, 이의 정확도는 83.3%였다. 또한, 상기 산출 결과값이 중간값인 80.6 미만이면 양성종양이거나 정상일 수 있다.
- [150]
- [151] <2-5> 췌장암 조직의 말디 질량분석
- [152] 췌장암 조직의 경우, 4개의 시료를 상기 실시예 <1-2>의 방법으로 준비하고, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 말디 질량분석을 수행하였다. 비교 검체로 분석하여 상기 <실시예 2>에 따라 말디 질량분석 결과의 양상을 비교할 때 100%(4/4)의 정확도를 보였다.
- [153] 상기 <실시예 2>의 [수학식 1]을 췌장암 조직의 결과에 적용한 결과 악성종양 여부를 판단하는 기준 컷오프 값을 중간값인 54.4로 지정할 수 있음을 확인하였다. 일률적으로 54.4 이상인 경우 악성종양으로 판정하였고, 이의 정확도는 75.0%였다. 또한, 상기 산출 결과값이 중간값인 54.4 미만이면 양성종양이거나 정상일 수 있다.
- [154] 따라서 상기 실시예 <2-1>과 같이 갑상선암의 진단뿐 아니라, 기타 대장암, 유방암, 폐암, 췌장암 또는 전립선암의 진단에도 적용 가능하다.
- [155] 따라서, 향후 신환의 생검조직에 대한 분석도 동일한 방법으로 진행하되, 이때 기존 양성/악성 생검조직은 비교 검체로 항상 동시에 분석을 수행하여 이들과 표준화된 피크 강도를 상기 식에 대입 후, 계산을 수행하여 암의 악성 여부를 유의적으로 감별할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 1) 악성종양이 의심되는 실험군 및 대조군에서 각각 조직을 분리하는 단계;
2) 상기 단계 1)에서 분리한 실험군 및 대조군 조직에서 말디 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 각각의 표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계; 및
3) 상기 단계 2)의 피크 강도 값을 대조군과 비교하여 악성여부를 판단하는 단계를 포함하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의 질량분석 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 조직은 갑상선, 대장, 유방, 폐, 췌장, 및 전립선 유래 조직인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 조직은 생검조직의 동결절편인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 피크 강도 값은 정상 대조군과 비교하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$ 의 피크 강도 값은 증가하고, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$ 의 피크 강도 값은 감소하며, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 의 피크 강도 값은 감소하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 1) 피검체로부터 분리된 조직에서 말디 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z: 524.4)$, 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z: 518.4)$ 각각의 표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 양이온 모드의 m/z 798.0-799.0 또는
 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+$ (m/z : 798.6),
 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는
 리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+$ (m/z :
 524.4), 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는
 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+$ (m/z :
 518.4) 각각에 대하여 측정된 피크 강도 값을 하기 [수학식 1]에
 대입하여 결과값을 산출하는 단계; 및
 [수학식 1]

$$10.3 \times (m/z 798.6) - 6.4 \times (m/z 524.4) - 6.2 \times (m/z 518.4)$$

(m/z 798.6): 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는
 포스파티딜콜린 34:1 $[M+K]^+$ 의 표준화된 피크 강도 값;
 (m/z 524.4): 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는
 리소포스파티딜세린 18:1 $[M+H]^+$ 의 표준화된 피크 강도 값; 및
 (m/z 518.4): 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는
 리소포스파티딜콜린 18:3 $[M+H]^+$ 의 표준화된 피크 강도 값.

3) 상기 단계 2)의 결과값을 이용하여 조직의 악성여부를 판단하는
 단계를 포함하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의
 질량분석 방법.

[청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 조직은 갑상선, 대장, 유방, 폐, 췌장, 및
 전립선 유래 조직인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 7] 제 5항에 있어서, 상기 조직은 생검조직의 동결절편인 것을
 특징으로 하는 방법.

[청구항 8] 제 5항에 있어서, 상기 조직은 세포흡인검체의 용해물(lysate), 또는
 흡수 또는 복수를 포함하는 근위 체액(proximal fluid)을 대상으로
 하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 9] 제 5항에 있어서, 상기 암은 갑상선암, 대장암, 유방암, 폐암,
 췌장암, 및 전립선암을 포함한 군으로부터 선택되는 것을
 특징으로 하는 방법.

[청구항 10] 제 5항에 있어서, 상기 단계 3)에서 결과값은 정상 대조군 유래
 결과값과 비교하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 11] 제 5항에 있어서, 상기 단계 3)에서
 갑상선 조직의 경우, 결과값이 43.4 이상이면 악성종양으로
 판정하고;
 대장 조직의 경우, 결과값이 97.9 이상이면 악성종양으로
 판정하고;
 유방 조직의 경우, 결과값이 -85.5 이상이면 악성종양으로

판정하고;

폐 조직의 경우, 결과값이 64.7 이상이면 악성종양으로 판정하고;

췌장 조직의 경우, 결과값이 54.4 이상이면 악성종양으로

판정하고; 및

전립선 조직의 경우, 결과값이 80.6 이상이면 악성종양으로

판정하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 12]

1) 피검체로부터 분리된 조직에서 말디 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)을

이용하여 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는

포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$,

양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는

리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z:$

524.4), 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는

리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z:$

518.4) 각각의 표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 분리한 실험군 및 대조군 조직에서 말디

질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass

spectrometry, MALDI MS)을 이용하여 양이온 모드(positive ion

mode)의 m/z 798.0-799.0 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)

34:1 $[M+K]^+(m/z: 798.6)$, 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는

리소포스파티딜세린(lysophosphatidylserine) 18:1 $[M+H]^+(m/z:$

524.4), 및 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는

리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 18:3 $[M+H]^+(m/z:$

518.4) 각각의 표준화된 피크 강도 값을 측정하는 단계; 및

[수학식 1]

$$10.3 \times (m/z 798.6) - 6.4 \times (m/z 524.4) - 6.2 \times (m/z 518.4)$$

(m/z 798.6): 양이온 모드(positive ion mode)의 m/z 798.0-799.0 또는

포스파티딜콜린 34:1 $[M+K]^+$ 의 표준화된 피크 강도 값;

(m/z 524.4): 양이온 모드의 m/z 524.0-525.0 또는

리소포스파티딜세린 18:1 $[M+H]^+$ 의 표준화된 피크 강도 값; 및

(m/z 518.4): 양이온 모드의 m/z 518.0-519.0 또는

리소포스파티딜콜린 18:3 $[M+H]^+$ 의 표준화된 피크 강도 값.

3) 상기 단계 2)의 결과값을 이용하여 하기와 같이 조직의

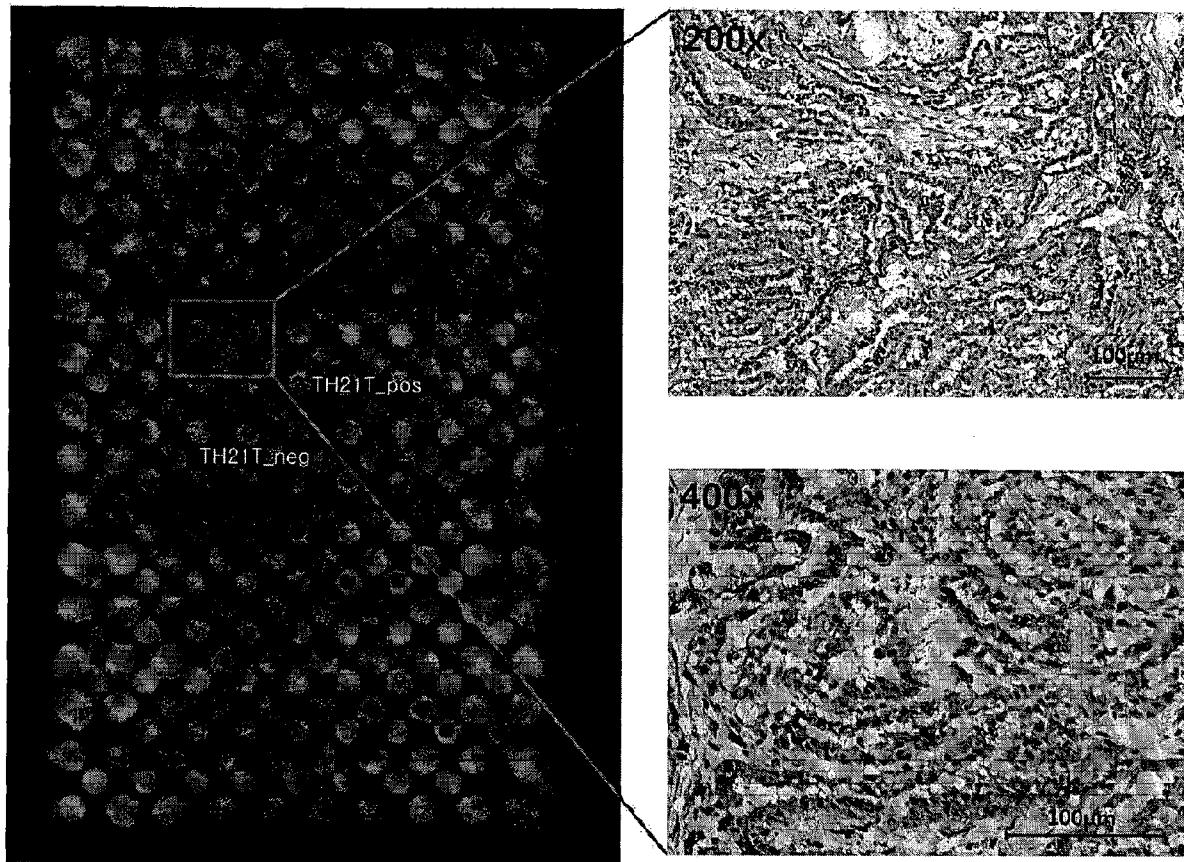
악성여부를 판단하는 단계를 포함하는 암 진단의 정보를 제공하기 위한 인지질의 질량분석 방법:

i) 갑상선 조직의 경우, 결과값이 43.4 이상이면 악성종양으로

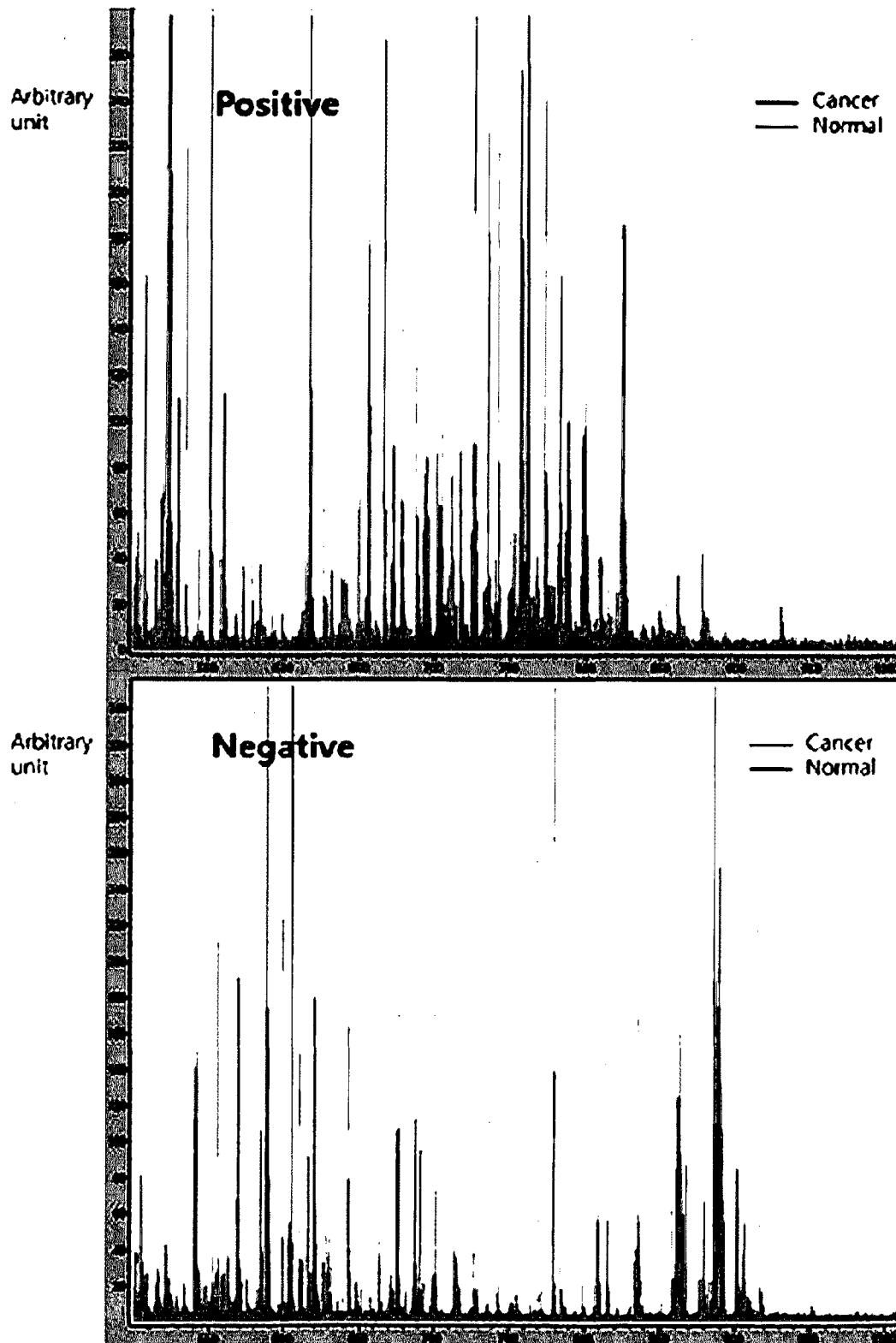
판정하고;

- ii) 대장 조직의 경우, 결과값이 97.9 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- iii) 유방 조직의 경우, 결과값이 -85.5 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- iv) 폐 조직의 경우, 결과값이 64.7 이상이면 악성종양으로 판정하고;
- v) 췌장 조직의 경우, 결과값이 54.4 이상이면 악성종양으로 판정하고; 및
- vi) 전립선 조직의 경우, 결과값이 80.6 이상이면 악성종양으로 판정함.

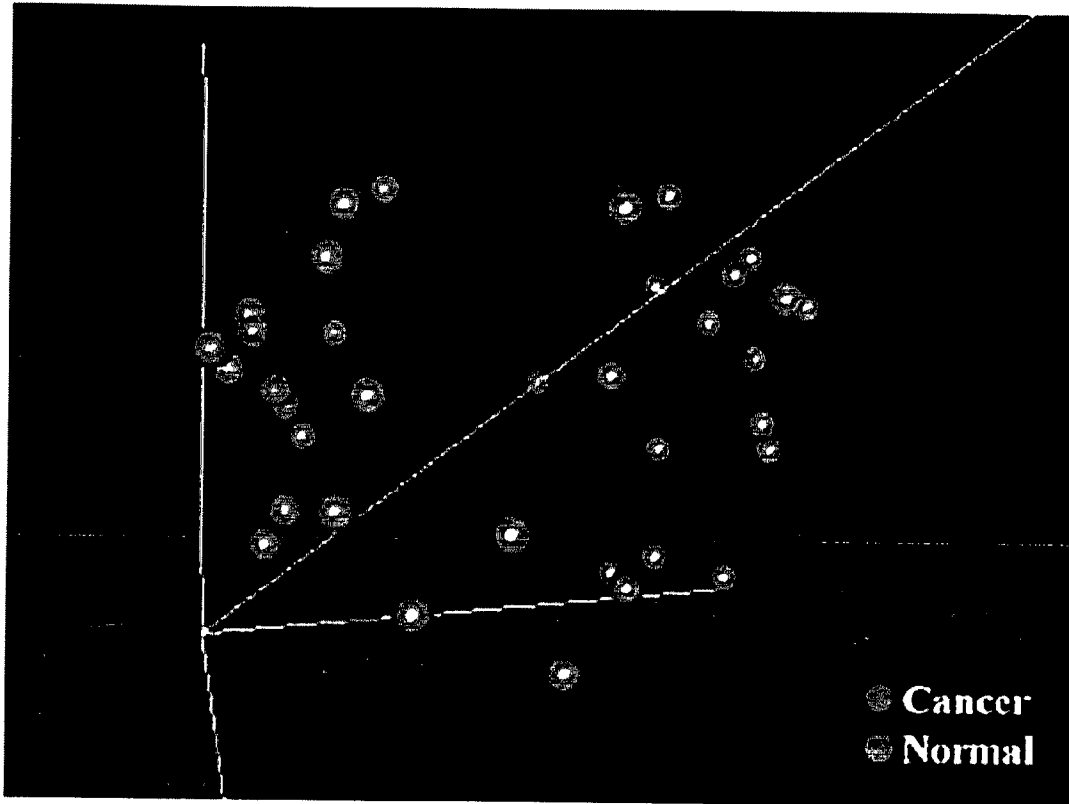
[Fig. 1]



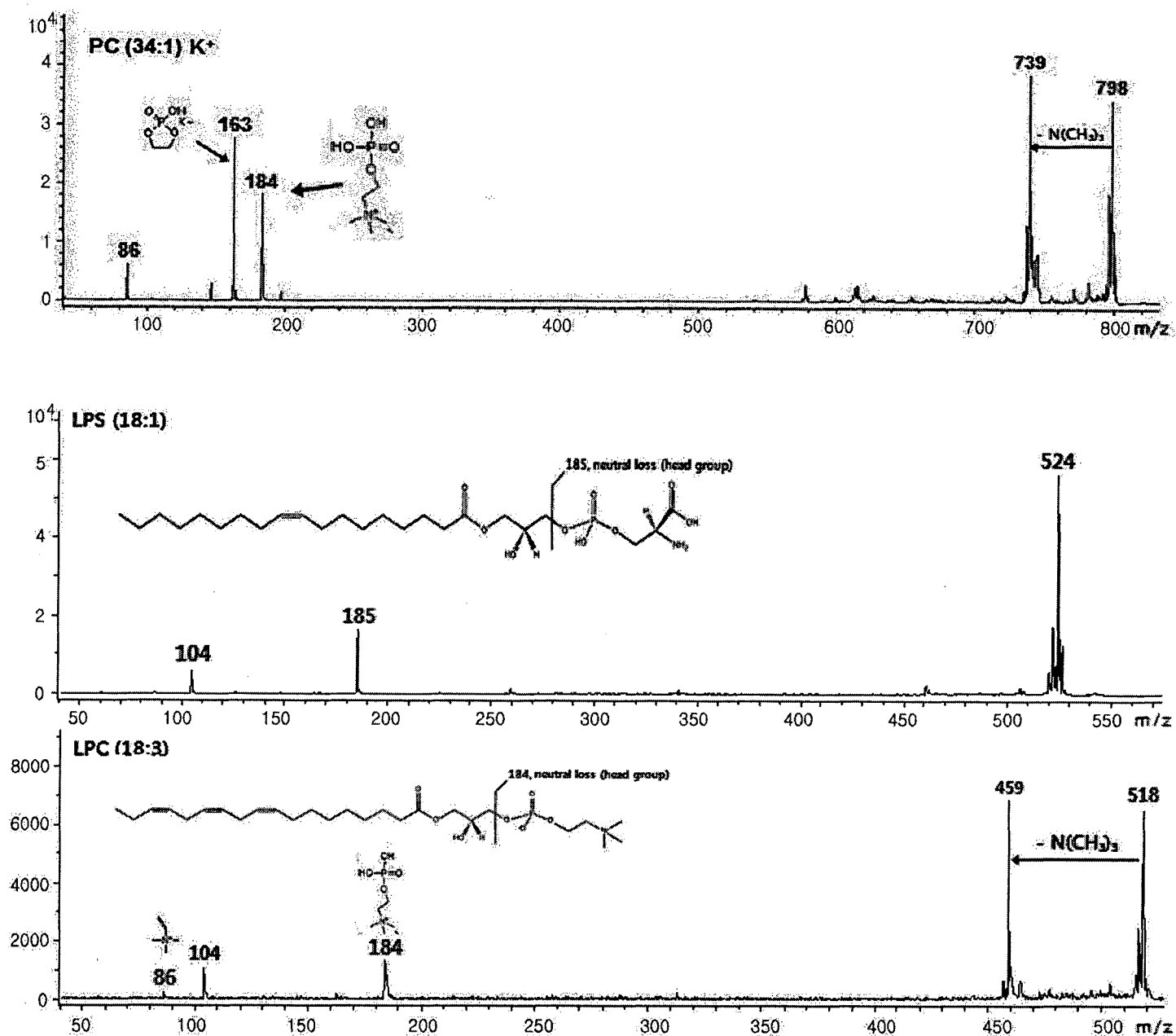
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/002773

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/48(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68; G06F 19/00; G01N 33/483; G01N 27/62; G01N 27/64; G06F 19/10; G01N 33/92; G01N 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: lysophosphatidylserine, lysophosphatidylcholine, diagnosis of cancer, tumor, cancer, phospholipids, MALDI, mass spectrometry, thyroid, large intestine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RYU, J. et al.. Lipid MALDI MS profiling accurately distinguishes papillary thyroid carcinoma from normal tissue. J Proteomics Bioinform. 2013, vol. 6, no. 4, pp. 65-71. See page 67 right column, figure 4, abstract.	1-12
A	LEE, G-K. et al.. Lipid MALDI profile classifies non-small cell lung cancers according to the histologic type. LUNG CANCER. 2012, vol. 76, pp. 197-203. See the entire document.	1-12
A	WO 2012-153964 A2 (NATIONAL CANCER CENTER) 15 November 2012 See the entire document.	1-12
A	KR 10-2012-0126194 A (NATIONAL CANCER CENTER) 21 November 2012 See abstract.	1-12
A	KR 10-1223270 B1 (NATIONAL CANCER CENTER) 17 January 2013 See abstract.	1-12
A	JP 2009-270996 A (SUMITOMO BAKELITE CO LTD) 19 November 2009 See abstract.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 MAY 2014 (02.05.2014)

Date of mailing of the international search report

07 MAY 2014 (07.05.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/002773

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2012-153964 A2	15/11/2012	KR 10-1384693 B1 KR 2013-0140845 A WO 2012-153964 A3	14/04/2014 24/12/2013 21/03/2013
KR 10-2012-0126194 A	21/11/2012	NONE	
KR 10-1223270 B1	17/01/2013	EP 2623983 A2 US 2013-0206977 A1 WO 2012-021042 A2 WO 2012-021042 A3	07/08/2013 15/08/2013 16/02/2012 31/05/2012
JP 2009-270996 A	19/11/2009	EP 2275809 A1 EP 2275809 A4 JP 05212893 B2 US 2011-0065141 A1 US 8372647 B2 WO 2009-136506 A1	19/01/2011 13/07/2011 19/06/2013 17/03/2011 12/02/2013 12/11/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/48(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; G06F 19/00; G01N 33/483; G01N 27/62; G01N 27/64; G06F 19/10; G01N 33/92; G01N 33/574

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 리소포스파티딜세린, 리소포스파티딜콜린, 암 진단, tumor, cancer, phospholipids, MALDI, 질량 분석, 갑상선, 대장

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	RYU, J. 등. Lipid MALDI MS profiling accurately distinguishes papillary thyroid carcinoma from normal tissue. J Proteomics Bioinform. 2013년, 6권, 4호, 65-71면. 67면 우측칼럼, 도4, 요약 참조.	1-12
A	LEE, G-K. 등. Lipid MALDI profile classified non-small cell lung cancers according to the histologic type. LUNG CANCER. 2012년, 76권, 197-203면. 전문 참조.	1-12
A	WO 2012-153964 A2 (NATIONAL CANCER CENTER) 2012.11.15 전문 참조.	1-12
A	KR 10-2012-0126194 A (국립암센터) 2012.11.21 요약 참조.	1-12
A	KR 10-1223270 B1 (국립암센터) 2013.01.17 요약 참조.	1-12
A	JP 2009-270996 A (SUMITOMO BAKELITE CO LTD) 2009.11.19 요약 참조.	1-12



추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.



대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 05월 02일 (02.05.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 05월 07일 (07.05.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

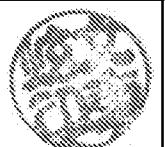
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

문동현

전화번호 +82-42-481-3482



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2012-153964 A2	2012/11/15	KR 10-1384693 B1 KR 2013-0140845 A WO 2012-153964 A3	2014/04/14 2013/12/24 2013/03/21
KR 10-2012-0126194 A	2012/11/21	없음	
KR 10-1223270 B1	2013/01/17	EP 2623983 A2 US 2013-0206977 A1 WO 2012-021042 A2 WO 2012-021042 A3	2013/08/07 2013/08/15 2012/02/16 2012/05/31
JP 2009-270996 A	2009/11/19	EP 2275809 A1 EP 2275809 A4 JP 05212893 B2 US 2011-0065141 A1 US 8372647 B2 WO 2009-136506 A1	2011/01/19 2011/07/13 2013/06/19 2011/03/17 2013/02/12 2009/11/12