



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월26일

(11) 등록번호 10-2560020

(24) 등록일자 2023년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/574 (2013.01)

C12Q 1/6886 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0055483

(22) 출원일자 2021년04월29일

심사청구일자 2021년04월29일

(65) 공개번호 10-2022-0148447

(43) 공개일자 2022년11월07일

(56) 선행기술조사문헌

US20200064347 A1

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

장윤수

서울특별시 강남구 압구정로 201 현대아파트 74동 202호

차윤진

서울특별시 강남구 영동대로 210 쌍용아파트 2동 209호

김은영

서울특별시 서초구 신반포로 270 반포자이아파트 106동 901호

(74) 대리인

파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 9 항

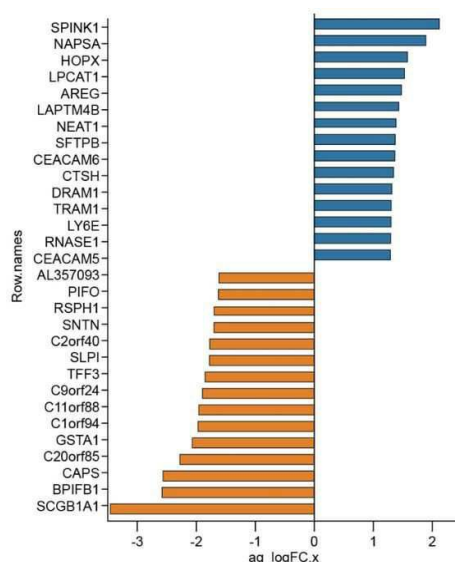
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 암의 진단용 조성물

(57) 요약

본 발명은 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암의 진단용 조성물을 제공한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/112 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/56 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20180164329 A1
US20200033351 A1
KR1020110088264 A
US20190024180 A1
Juan Lin et al, The American Journal of Pathology (2014.11.), vol 184, no 11, pp 2869-2884.
Charles E Birse et al, Clinical Proteomics (2015.), vol 12:18, pp 1-12.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112764
과제번호	2020R1A2B5B01001883
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	주변 정상양 조직과 비소세포폐암의 종양내 이중성 규명을 통한 종양의 생성과 성장
기전 규명 및 바이오 마커 발굴	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제 및 TFF3의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 결절에서 진행되는 초기 폐암의 진단용 조성물로서,

상기 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 증가하고; 상기 TFF3의 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 감소하는 경우; 상기 결절에서 진행되는 초기 폐암이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드의 발현 수준 및 상기 TFF3의 폴리펩타이드의 발현 수준을 측정하는 제제는 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드 및 TFF3의 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 코딩하는 유전자의 발현 수준 및 상기 TFF3를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 제제는 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 코딩하는 유전자 및 TFF3를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 암의 진단용 조성물을 포함하는 암의 진단용 키트.

청구항 9

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단

계 및 TFF3의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 결절에서 진행되는 초기 폐암의 진단에 관한 정보 제공 방법으로서,

상기 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 증가하고; 상기 TFF3의 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 감소하는 경우; 상기 결절에서 진행되는 초기 폐암이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)인, 정보 제공 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준 및 TFF3의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 정상 대조군에서 측정된 수준과 비교하여 결절에서 진행되는 초기 폐암의 발병 가능성을 예측하는 단계를 더 포함하는, 정보 제공 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

분리된 생물학적 시료에서 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준 및 TFF3의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;

상기 생물학적 시료에 피검 물질을 접촉시키는 단계; 및

상기 피검 물질의 접촉 후 상기 생물학적 시료에서 상기 폴리펩타이드 또는 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 결절에서 진행되는 초기 폐암을 치료하기 위한 약물을 스크리닝하는 방법으로서,

상기 생물학적 시료 내 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 감소하고; 상기 TFF3의 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 증가하는 경우; 상기 피검 물질은 결절에서 진행되는 초기 폐암을 치료

하기 위한 약물로 판정한다.

청구항 17

분리된 생물학적 시료에 결절에서 진행되는 초기 폐암의 발병을 유도할 것으로 예상되는 후보 물질을 처리하는 단계; 및

상기 후보 물질이 처리된 생물학적 시료에서 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준 및 TFF3의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 결절에서 진행되는 초기 폐암의 발병을 유도하는 약물을 스크리닝하는 방법으로서,

상기 생물학적 시료 내 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 증가하고; 상기 TFF3의 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 감소하는 경우; 상기 후보 물질은 결절에서 진행되는 초기 폐암의 발병을 유도하기 위한 약물로 판정한다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암의 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폐암은 개발 도상국에서 선진국에 이르기까지 전 세계적으로 암 관련 사망의 주요 원인이 되고 있다. 예를 들어, 한국 통계에 따르면 2017년에만 발병률이 사망률은 각각 10만명당 52.7명과 34.8명으로 고형암 중 암 관련 사망 원인이 가장 높았다. 이 치명적인 질병에 대한 인식이 높아지면서 2019년부터 폐암 고위험군을 대상으로 전국 수준의 폐암 검진 프로그램이 시작되었다.

[0003] 폐의 간유리음영(ground glass opacity; GGO) 결절은 흉부 고해상도 컴퓨터 단층 촬영 (HRCT)에서 기저 기관지 및 폐 혈관 구조를 가리지 않는 폐조직의 흐릿한 불투명도로 정의된다. 건강 검진에 대한 관심이 높아지면서 저선량 흉부 CT 스캔이 널리 적용되고 있어 GGO의 검출률과 조기 폐암 진단률이 증가하고 있다. GGO는 방사선학적으로 정의된 병변이므로 염증 및 실질 출혈을 포함한 양성 병변을 포함한다. 그러나 3개월 이상 변하지 않은 지속성 GGO는 잠재적인 악성 종양으로 간주되며 병리학적으로 비정형 선종 증식부터 침습성 폐 선암까지 다양한 병변을 보일 수 있다. 초기 폐선 암이 GGO의 형태를 취함에 따라 폐선 암의 각 암 발생에 관심이 집중되고 있다. 이러한 병변은 서서히 성장하다가 점차 크기가 커지고 시간이 지남에 따라 고형 부분이 발달하면서 침윤성 암으로 진행된다. 하지만, GGO의 자연 과정은 방사선학 측면에서 연구되었지만 분자 및 생물학적 측면에 대한 조사는 매우 제한적이다. 따라서, GGO 결절에서 진행되는 폐암은 일반적인 폐암과 상이하여 초기에 이를 구분한 진단을 요하게 되는데, 본 발명자는 상기와 같은 문제의 해결을 위해서 폐암의 진단용 조성물을 고안하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 일 목적은 암의 발병 가능성을 조기에 진단할 수 있으며, 암의 병기 등을 높은 정확도로 진단할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명의 다른 목적은 암의 발병 가능성을 조기에, 그리고 암의 병기 등을 높은 정확도로 진단할 수 있는 키트를 제공하고자 한다. 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 암의 발병 가능성을 조기에, 그리고 암의 병기 등을 높은 정확도로 진단하기 위해 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 암을 치료하기 위한 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다.

[0005] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 이하, 본원에 기재된 다양한 구현예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해

서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구현에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구현예" 또는 "구현예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구현예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구현예에서" 또는 "구현예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구현예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구현예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

- [0007] 본 발명 내 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당 업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0008] 본 발명에서 "SPINK1(Serine Peptidase Inhibitor Kazal Type 1)"는 종양 관련 트립신 억제제 (TATI) 또는 췌장 분비 트립신 억제제 (PSTI)로도 알려져 있으며, 조기 활성화된 트립신을 절단하여 효소가 장기에 세포 손상을 일으키는 것을 방지하는 단백질을 암호화하는 유전자이다. 이의 기능이 없으면 췌장은 반복적으로 손상된다.
- [0009] 본 발명에서 "LPCAT1(Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1)"는 인지질 대사, 특히 아실 -CoA의 존재하에 리소 포스파티딜콜린에서 포스파티딜콜린으로 전환하여, 폐 계면 활성제와 혈소판 활성화 인자 (PAF)의 합성에 중요한 역할을 하는 유전자이다.
- [0010] 본 발명에서 "NEAT1(Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1)"는 다중 내분비 종양 유전자좌에서 전사된 긴 비코딩 RNA (lncRNA; long non-coding RNA)를 생성한다. 이는 핵에 유지되어 파라스펙클(paraspeckles) 하위 세포 기관의 핵심 구조 구성 요소를 형성한다.
- [0011] 본 발명에서 "CEACAM5(Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 5)"는 암 배아 항원 (CEA) 패밀리에 속하는 세포 표면 당단백질을 암호화한다. 암호화된 단백질은 위장 암의 임상 바이오 마커로 사용되며 세포 부착 분자 역할을 통해 종양 발생을 촉진할 수 있다.
- [0012] 본 발명에서 "CEACAM6(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6)"는 글리코실 포스파티딜 이노시톨 (GPI) 고정 세포 표면 당단백질인 암 배아 항원 (CEA) 패밀리에 속하는 단백질을 암호화한다. 이 패밀리는 세포 접착에 역할을 하며 암종의 혈청 면역 분석 측정에서 종양 마커로 널리 사용된다.
- [0013] 본 발명에서 "RNASE1(Ribonuclease A Family Member 1)"는 리보뉴클레아제 A 슈퍼패밀리의 서브세트인 분비성 리보뉴클레아제의 췌장형의 패밀리에 속하는 단백질을 암호화한다.
- [0014] 본 발명에서 "TFF3(Trefoil Factor 3)"는 트레포일 패밀리의 구성원으로, 이들은 3개의 보존된 디설파이드를 함유하는 40개 아미노산 도메인인 트레포일 모티프의 적어도 하나의 카피를 갖는 것을 특징으로 한다. 이들은 위장 점막에서 발견되는 안정한 분비 단백질이다.
- [0015] 본 발명에서 폐의 "간유리음영(ground glass opacity; GGO) 결절" 또는 GGO는 매우 천천히 성장하는 불활성형 폐암으로 분류되지만 초기 형태의 폐암에 대한 방사선학적으로 정의되는 암이며, GGO의 관리는 잘 확립되어 있지 않지만 크기의 증가 또는 고형부의 발달과 같은 방사선학적 소견의 변화는 외과적 치료로 이어진다. GGO의 자연 과정은 방사선학 측면에서 연구되었지만 분자 및 생물학적 측면에 대한 조사는 매우 제한적이었다. 본 발명자들에게 GGO는 폐암 발생의 시작, 즉 초기 폐암을 연구하기 위한 완벽한 모델이다.
- [0016] 본 발명에서 "단백질의 발현 수준 측정"이란 암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 암의 진단용 마커인 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1, 또는 TFF3의 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정을 의미한다. 상기 암의 진단용 마커의 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크레토니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 발명에 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1, 또는 TFF3에 대해 특이적으로 결합하는

항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에서 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1, 또는 TFF3의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법, 또는 파지 항체 라이브러리 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0018] 본 발명에 상기 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩티드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다.

[0019] 본 발명에서 상기 "엡타머"는 올리고핵산 또는 펩티드 분자이며, 단백질에 대하여 고친화도를 가지는 리간드-특이 DNA 또는 RNA 분자를 의미한다. 엡타머는 특정 물질에 대해 특이적 결합 능력을 가지는 단일가닥의 DNA 또는 RNA를 말하며, 그 자체로 고유한 3차 구조를 갖는다. 화학적 합성 기법을 이용하여 짧은 시간과 낮은 비용으로 대량 생산이 가능하며 배치 간 변이가 거의 없어 생산적인 측면에서 탁월한 장점을 갖고 있다. 뿐만 아니라, pH 나 온도와 같이 주변 환경의 변화에 대한 안정성이 높아 최근 표적 물질의 탐지 및 질환 진단 센서 개발과 같이 다양한 분야에서의 활용 가능성이 높이 평가되고 있다.

[0020] 본 발명에 따른 암의 진단용 조성물에서, SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기한 것을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1의 정보는 알려져 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.

[0021] 본 발명에서 상기 "유전자의 발현 수준 측정"이란 암을 진단하기 위하여 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 코딩하는 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 유전자의 양을 측정하는 것을 의미한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[0023] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경 세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 상기 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반

응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)를 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 상기한 질환의 발병 여부 또는 발병 가능성(위험성)이나, 상기한 암의 병기, 또는 암 환자의 생존율이나 치료 반응성을 확인하는 것이다.

[0025] 본 발명에서 상기 "병기(stage)"란 암세포가 퍼진 정도, 암의 진행 단계를 의미하는 것으로, 암의 진행상황에 따른 국제적분류는 일반적으로 TNM 병기 분류에 따른다. 여기서 'T(Tumor Size)'는 원발 종양의 크기에 따른 분류이고, 'N(Lymph Node)'은 림프절 전이 정도에 따른 분류이며, 'M(Metastasis)'은 다른 장기로의 전이 여부에 따른 분류에 해당한다.

[0027] 상기 목적을 달성하기 위하여, SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 암의 진단용 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드의 발현 수준을 측정하는 체제는 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 체제는 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 암은 유방암, 난소암, 대장암, 위암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인 것이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 암의 진단용 조성물은 초기 단계(early stage)의 암의 발병 여부 또는 발병 가능성을 진단하기 위한 것이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 초기 단계의 암은 결절에서 진행되는 것이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 암의 진단용 조성물은 TFF3의 수준 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 체제를 추가로 포함한다.

[0029] 상기 목적을 달성하기 위하여, 상기 암의 진단용 조성물을 포함하는 암의 진단용 키트를 제공한다.

[0030] 상기 목적을 달성하기 위하여, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암의 진단 또는 암의 병기에 관한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 정상 대조군에서 측정된 수준과 비교하여 암의 발병 가능성 또는 암의 병기를 예측하는 단계를 더 포함한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 암은 초기 단계(early stage)의 암이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 초기 단계의 암은 결절에서 진행되는 것이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 암의 진단 또는 암의 병기에 관한 정보 제공 방법은 TFF3의 수준 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 암은 유방암, 난소암, 대장암, 위암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암,

흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌종양, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervoussystem) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종이다.

[0032] 상기 목적을 달성하기 위하여, 분리된 생물학적 시료에서 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 상기 생물학적 시료에 피검 물질을 접촉시키는 단계; 및 상기 피검 물질의 접촉 후 상기 생물학적 시료에서 상기 단백질 또는 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암을 치료하기 위한 약물을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0033] 상기 목적을 달성하기 위하여, 분리된 생물학적 시료에 암을 유도할 것으로 예상되는 후보 물질을 처리하는 단계; 및 상기 후보 물질이 처리된 생물학적 시료에서 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암을 유도하는 약물을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0034] 본 발명에서는 목적하는 개체의 액체 생검에 대하여 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 암을 조기에 진단할 수 있고, 암의 병기를 예측할 수 있다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 scRNA-seq 및 비악성 인접 폐 조직 및 초기 폐 선암에서 나온 세포를 클러스터링시, 각 주요 세포 클러스터를 나타내는 상위 3개의 마커 유전자를 보여주는 히트맵을 나타낸다.

도 2는 각 폐 상피 하위 클러스터의 대표적인 유전자를 보여주는 히트맵을 나타낸다.

도 3은 폐포 (i), 기관지 상피 (ii ~ iii), 비늘형(lepidic) 요소를 갖는 폐암 세포 (iv), 고형 요소를 갖는 폐암 세포, 및 양성 대조군으로 사용된 태반 (vi)에서 CAPS의 발현을 보여주는 염색 사진이다.

도 4는 결절에서 진행되는 초기 폐암 세포 나머지 폐 상피 세포 집단 사이에 15개의 차별적으로 발현된 유전자의 수평 막대 그래프이다.

도 5는 기관지 (i), 세기관지 (ii), 저배율 폐암 (iii), 선포형 요소를 갖는 폐암 (iv), 비늘형(lepidic) 요소를 갖는 폐암 (v) 및 고형 요소를 갖는 폐암 (vi)에서 CEACMA6의 발현을 관찰한 사진이다.

도 6은 세포 유형별로 분할된 폐암 세포 및 상피 세포 하위 클러스터의 감독되지 않은 궤적 플롯을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0038] 실시예

[0040] 실험 대상 및 샘플 준비

[0041] 샘플은 2019년부터 2020년까지 서울의 연세대학교 부속병원을 방문한 환자로부터 조직학적 확인 및 지속적인 순수 또는 일부 고체 GGO(ground glass opacity)형 폐 결절의 치료를 위해 수집되었다. 다음과 같은 세부 포함 기준은 (1) 흉부 CT 폐창 설정에서 부분 고형 GGO 또는 퓨어 GGO 상태의 결절, (2) 추가 병기 검사인 PET 및 뇌 MRI에서 전이를 시사하는 병변이 나타나지 않음, (3) 암에 대한 이전 병력 또는 치료가 없음, (4) 비흡연자 또는 20년 이상 금연한 사람, (5) 잔류 종양 및 인접한 정상 폐 조직 샘플을 제공하는 데 동의한 사람인 것을 들 수 있다. 보조 화학 요법 또는 신 보조 화학 요법을 받은 사례는 제외시켰다.

[0042] 5명의 환자에서 종양 조직과 인접한 정상 폐 조직의 쌍을 이루는 샘플을 얻었고, 1명의 환자에서 폐 종양 조직을 얻었으며, 연구를 위해 총 11개의 샘플을 수집하였다. 수술실에서 채취한 검체를 병리학 검사실로 옮기

고 전체적으로 발견된 반투명 결절을 동결 절편으로 검사하여 폐암을 확인하였다.

[0044] GEM(Gel Bead in Emulsion), 라이브러리 구성, 시퀀싱 및 분석

[0045] GEMS와 라이브러리는 Chromium Single Cell 3'Protocol을 사용하여 각 샘플에서 최대 10,000개의 세포를 바코드로 작성하여 만들었다. 간단히 말해서, 바코드가 있는 올리고 뉴클레오타이드를 포함하는 단일 세포, 시약 및 단일 겔 비드는 GemCode 기술을 사용하여 나노 리터 크기의 GEM으로 캡슐화시켰다. 각 세포의 성적표는 GemCode Technology를 사용하여 개별적으로 색인화하였다. 폴리(dT) 프라이머를 사용하여 폴리아데닐화된 mRNA를 캡처한 후, 역전사를 통해 바코드화된 전장 cDNA를 생성하고 Illumina 시퀀싱 시스템으로 쌍말단 시퀀싱(paired-end sequencing)을 수행하였다. 실험실에서 얻은 데이터는 Seurat R 패키지 버전 3.2.2를 사용하여 분석되었다. 독립적인 실험에서 얻은 데이터를 먼저 통합하여 배치 효과를 최소화한 다음 주성분 분석을 통해 개별 폐 세포 유형으로 클러스터링하였다. 각 세포 클러스터를 분리하고 추가 하위 클러스터링을 위해 독립적으로 분석하였다.

[0047] 암세포 식별

[0048] 폐 중앙 조직에서 상피 세포의 바코드를 확보한 후 염색체 유전자 발현이 교란된 세포의 바코드를 infercnv를 통해 확보하여 중앙 조직에서 혼합될 수 있는 비악성 상피 세포와 구별되도록 하였다. 중앙 조직에서 발견되는 상피 세포를 폐암 세포로 가정하고, 동일한 개체의 인접한 정상으로 보이는 폐 조직에서 얻은 세포와 중앙 조직에서 얻은 비상피 세포를 참조로 지정하였다. 그런 다음 infercnv:run () 함수는 analysis_mode = "subclusters", cluster_by_groups = F, k_obs_groups = 3 옵션을 사용하여 실행되었다. 저발현 유전자를 제거한 후, 세포당 리딩 카운트는 세포에 대한 전체 리딩 카운트의 중앙값의 합으로 조정하였다. 매트릭스의 각 값을 $\log(x+1)$ 로 변환하고, 정상 세포에서 얻은 해당 유전자의 평균값에서 해당 유전자 발현 수준을 뺀 log-fold 변화 값을 구하였다. log-fold-change의 절대 값이 3 이상인 값을 확보하고, 염색체 순서에 따라 유전자를 배열하고, 가장 실행 평균을 사용하여 발현 강도를 평활화하였다. 대부분의 세포에 CNV가 없다는 가정하에 개별 세포의 각 유전자의 중앙 발현 강도는 0에 집중되었고 중앙 세포의 발현 값은 정상 세포의 평균 값으로 다시 한 번 차감시켰다. 이 값을 평균 주위에 대칭으로 배치하여 증폭 또는 삭제의 시각적 식별이 용이하게 하였다.

[0050] 면역 조직 화학 연구

[0051] 관심 유전자의 검증을 위해 표 1에 표시된 항체 및 조건을 사용하여 면역 조직 화학 염색을 수행하였다. GGO 유형 폐암의 포르말린 고정 파라핀 포매 조직 블록은 기관 조직 아카이브에서 확보하여 4 μ m 섹션으로 만들었다. 자일렌을 이용한 탈파라핀화 및 재수화 후, 연속 희석된 에탄올과 PBS, 0.3% 과산화수소를 각각 10분 동안 처리하여 내인성 과산화효소 활성을 쉼치하였다. 그 후, 예열된 0.1M 시트레이트 완충액 (pH 6.0)에 담그고 5분 동안 3회 끓여서 항원 회수를 수행하였다. 30분의 차단액으로 차단한 후, 1차 항체와 2차 항체가 순차적으로 처리하였다. 시각화를 위해 슬라이드를 Envision + System-HRP로 표지된 폴리머 항 토끼/마우스 용액 (K5007, Dako, Carpinteria, CA, USA) 및 DAB 크로모젠 (NovocastraTM)으로 처리하였다. 마지막으로, 슬라이드를 Mayer의 헤마톡실린 용액으로 1분 동안 카운터 염색하고 세척하고 탈수하고 커버 슬립으로 장착하였다.

표 1

[0052]

Gene Name	Antibody Name	Vendor	Catalog #	Not #	Dilution
CAPS	calcyphosine mouse Ab	Novous Ab	NBP1-91746	000007612	1:1,000
CEACAM6	CEACAM6 mouse Ab	Origene	TA809254	W001	1:200

[0053] 초기 폐 선암의 단일 세포 시퀀싱

[0054] 총 6명의 피험자로부터 얻은 11개의 샘플을 사용하여 단일 세포 시퀀싱을 수행하였다. 미토콘드리아 유전자 비율 ($<20\%$), 유전자 수 (200 ~ 10,000) 및 UMI 수 (100 ~ 150,000)를 사용하여 필터링을 수행하여 빈 물방울, 파편, 이중선 및 삼중선에서 노이즈를 제거하였다. 이 필터링 과정 후 정상 폐 조직에서 얻은 세포 수는 53,705개 (55.0%), 중앙 조직에서 얻은 세포 수는 42,371개 (44.1%)이었다. 총 96,076개의 세포를 처음에 차원 축소 및 분류를 통해 7개의 주요 세포 그룹으로 나누고, 각 클러스터는 Seurat's FindConservedMarkers 기능에서 얻은 각 클러스터를 나타내는 마커와 알려진 폐 세포의 표준 마커를 비교하였다. 획득한 상피 세포 클러스터에서 폐암 세포의 바코드를 infercnv R 패키지를 사용하여 확보한 후, 나머지 상피 세포 그룹을 하위 클러스터로 분류하였다(도 1 참조). 폐암 세포의 정제를 위해 각 중앙 조직에서 상피 특징을 가진 클러스터를 획득한 다음, 정상으로 보이는 폐 조직에서 얻은 세포를 사용하여 inferCNV에 의해 뚜렷한 유전적 이상을 갖는 세포를 폐암

세포로 정의하였다. 획득한 세포 클러스터 중 T 세포와 관련 세포 유형이 다른 연구에서와 같이 가장 많은 비율을 차지하고 암세포와 골수 세포를 포함한 상피 세포가 그 뒤를 이었다.

[0056] **섬모 기관지 상피 세포 마커로 CAPS 사용**

[0057] 합병된 정상 인접 폐 조직 및 종양 조직의 전체 상피 세포에서 암세포를 제거한 후, 하위 클러스터링 후 폐 상피 세포를 추가로 특성화하였다. 상피 세포 중 우세한 세포 유형은 CAPS, C20orf85 및 C9orf24의 과발현이 특징이며, 그 다음이 SCGB1A1 및 SCGB3A1을 특징으로 하는 분비 클립 세포, 작은 세크레토글로빈 및 BPIFB1에 속하는 단백질을 코딩하는 유전자로 박테리아 노출에 대한 선천적 면역 반응에 관여하였다. 가스 교환의 기능 단위인 호흡 기관지와 폐포는 주로 말기 분화 세포군, I형 폐포 세포 및 II형 폐포 세포로 구성되었다. 폐 모세 혈관 내피 세포와 함께 넓은 표면적의 공기-혈액 장벽을 형성하는 I형 폐포 세포는 AGER, CAV1, RTKN2와 같은 고유한 유전자의 과발현을 보였다. 반면에, 물로부터 폐포 표면 장력을 감소시키고 이를 통해 폐 붕괴를 방지하는 계면 활성제를 생성하는 II형 폐포 세포는 I형 폐포 세포와 유사한 세포 분획에서 관찰되었으며 계면 활성제 단백질 패밀리의 과발현을 보였다. GRP, CALCA 및 CPE와 같은 고유한 유전자를 과발현하는 신경 내분비 기능을 가진 몇몇 세포가 관찰되었으며(도 2 참고), 폐 신경 내분비 세포로 추정할 수 있었다.

[0059] CAPS는 세포 신호 전달에 관여하는 칼슘 결합 단백질이며 중추 신경계의 체액으로 채워진 공동의 상피를 감싸는 체액 수송 세포에서 과발현되는 것으로 알려져 있다. 폐에서 CAPS는 기관지 상피 세포에서 부분적으로 발현되는 것으로 알려져 있지만 폐 조직 및 폐암에 대한 관찰은 매우 제한적이었다. 따라서 이러한 세포 그룹을 특성화하기 위해 CAPS에 대한 면역 조직 화학 (IHC) 염색은 나팔관 조직을 참조 샘플로 사용하여 정상으로 보이는 폐 조직 및 초기 폐 선암의 포르말린 고정, 파라핀 내장 (FFPE) 조직으로 수행되었다. CAPS 발현은 정상 폐포 I형 및 II형 세포에서 부족한 반면(도 3의 i 참고), 기관지 및 세기관지의 섬모 세포에서 강하게 발현되었다(도 3의 ii, iii 참고). 높은 CAPS 발현을 나타내는 폐의 비악성 세포는 유전자 세트 관련 섬모 및 미세소관 형성 및 움직임으로 풍부하여 CAPS가 폐 섬모 세포의 형태와 기능에 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었다. 폐암 표본에서 다양하게 발현되었다(도 3의 vi, v 참고). 31명의 폐암 조직의 8명의 사례는 5% 이상의 CAPS 양성을 보였고, 4명의 사례는 50% 이상의 암세포에서 중등도 내지 강한 발현을 보이고, 4명은 약하거나 중간 정도의 강도로 10-30%의 발현을 나타냈다. 폐암 조직의 성분과 CAPS 발현 사이에는 유의한 상관 관계가 없었다. 초기 폐암만을 표적으로 삼았기 때문에, 포르말린 고정, 파라핀 내장 조직에서 다른 CAPS 발현은 CAPS 수준이 폐암의 다양한 발달 상태에서 감소하거나 암세포 기원이 각 폐암마다 다를 수 있다고 가정할 수 있었다.

[0061] **말기 분화 폐 상피 세포 클러스터에 더 가깝게 위치한 폐암세포**

[0062] 폐암 세포는 말단 분화 폐 상피 세포 클러스터에 더 가깝게 위치하였다. 시료의 폐암 세포는 세기관지 폐포 도관 접합부에서 시작된 것이었다. UMAP에서 폐암 세포는 섬모 세포, 곤봉 세포, 폐포 유형 I 및 폐포 유형 II의 중심에 모여 있음을 관찰하였다. 폐암 세포와 나머지 폐 상피 세포 사이의 상위 15개 고도로 차별적으로 발현된 유전자는 도 4 및 표 2에 나타내었다. 이러한 차별적으로 발현된 유전자는 분비 세포 및 계면 활성제 경로에서 활발히 발현하여 초기 폐 발암의 기원이 II형 폐포 세포와 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다. 폐암 세포는 II형 폐포 세포와 I형 및 섬모 기관지 세포 순서에 따라 마커가 상이함을 확인하였다. 이들은 칼슘과 피브로넥틴에 독립적인 방식으로 세포간 접착에 역할을 하는 표면 당단백질인 CEACAM6 및 CEACAM5를 과발현시킴을 확인하였다. CEACAM6은 정상으로 보이는 폐 조직의 성분에서 전혀 염색되지 않았고, 조직학적 아형에 관계없이 폐암 세포에서 강하게 발현되어 초기 종양 형성에 관여할 수 있음을 확인하였다(도 5 참고).

표 2

[0063]

Gene name	avg_logFC	pct.1	pct.2
SPINK1	2.119588	0.47	0.056
NAPSA	1.891179	0.951	0.199
HOPX	1.580921	0.928	0.371
LPCAT1	1.528898	0.844	0.186
AREG	1.478092	0.844	0.451
LAPTM4B	1.430558	0.805	0.214
NEAT1	1.384919	0.949	0.884
SFTPB	1.372976	0.976	0.398
CEACAM6	1.36579	0.852	0.414
CTSH	1.34259	0.941	0.745
DRAM1	1.314869	0.819	0.18

TRAM1	1.303142	0.871	0.604
LY6E	1.300678	0.912	0.716
RNASE1	1.293394	0.905	0.394
CEACAM5	1.287858	0.536	0.033
PIFO	-1.6252	0.245	0.611
RSPH1	-1.69681	0.249	0.634
SNTN	-1.69975	0.058	0.579
C2orf40	-1.77478	0.031	0.54
SLPI	-1.77846	0.782	0.913
TFF3	-1.84996	0.265	0.689
C9orf24	-1.89412	0.239	0.654
C11orf88	-1.95616	0.079	0.613
C1orf194	-1.97282	0.131	0.622
GSTA1	-2.06876	0.248	0.739
C20orf85	-2.27844	0.088	0.64
CAPS	-2.56457	0.49	0.81
BPIFB1	-2.5811	0.088	0.41
SCGB1A1	-3.45752	0.844	0.947

[0064] 표 1에서 나타난 바와 같이, GGO형 폐암 세포에서 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1가 발현 증가함을 관찰하였다. 이를 통해, 초기 폐암 중에서도 방사선학적으로 밖에 진단할 수 없었던 초기 폐암 결절에서 SPINK1, LPCAT1, NEAT1, CEACAM5, CEACAM6, 및 RNASE1의 발현 증가 또는 TFF3의 발현 감소를 관찰함으로써 이를 진단할 수 있었다. 섬모세포를 뿌리 상태로 설정한 폐 상피 세포군에 대해 웨직 분석을 수행한 결과, 섬모세포에서 유사 시간에 따른 I형 및 II형 폐포 세포로의 분화가 관찰되었다. 실제로, 폐암 세포가 정상으로 보이는 폐 상피 세포 그룹의 웨직에 투영되었을 때, 그들은 I형 폐포 세포 또는 II형 폐포 세포를 추적하였다 (도 6 참고). 이전 발견과 유사하게, 클립 세포는 기관지 세포와 폐포 세포 사이의 분화의 유사 시간에 따라 모든 과정에서 관찰된 반면, 신경 내분비 세포는 섬모 세포에서 폐포 세포로의 분화 시점 중간에 관찰되었다. 주요 폐 상피 세포 클러스터의 대표적인 유전자를 경시에 따라 정렬했을 때 계면 활성제 항상성과 관련된 유전자와 CEACAM6과 같은 암 특정 유전자 사이의 동시성이 관찰되어 계면 활성제 관련 경로가 조기 폐암 발생에 강하게 관여함을 확인할 수 있었다.

[0066] 폐암 병기와 유전자 마커간의 상관 관계

[0067] 섬모세포를 폐 상피 세포군에 대해 웨직 분석을 수행한 결과, 섬모세포에서 I형 및 II형 폐포 세포로의 분화를 관찰하였다. 주요 폐 상피 세포 클러스터의 대표적인 유전자를 경시에 따라 정렬했을 때 계면 활성제 항상성과 관련된 유전자와 CEACAM6과 같은 암 특정 유전자 사이에 동시성을 확인하였다. 이는 계면 활성제 관련 경로가 조기 폐암 발생에 강하게 관여함을 확인할 수 있었다.

[0068] GGO형 폐암과 정상으로 보이는 인접한 말초 폐 조직을 사용한 연구에서 B 세포, 여포성 및 MALT B 세포의 2-아형으로 구성된 총 820개의 B 세포를 관찰하였다. 이들 B 세포 중, 89.1%가 종양 조직에서 발견되었는데, 이는 폐 조직을 구성하는 면역 세포 중 종양 조직이 풍부한 가장 두드러진 세포이었다. 여포성 B 세포는 MALT B 세포 아형에 비해 상대적으로 높은 비율을 보였다.

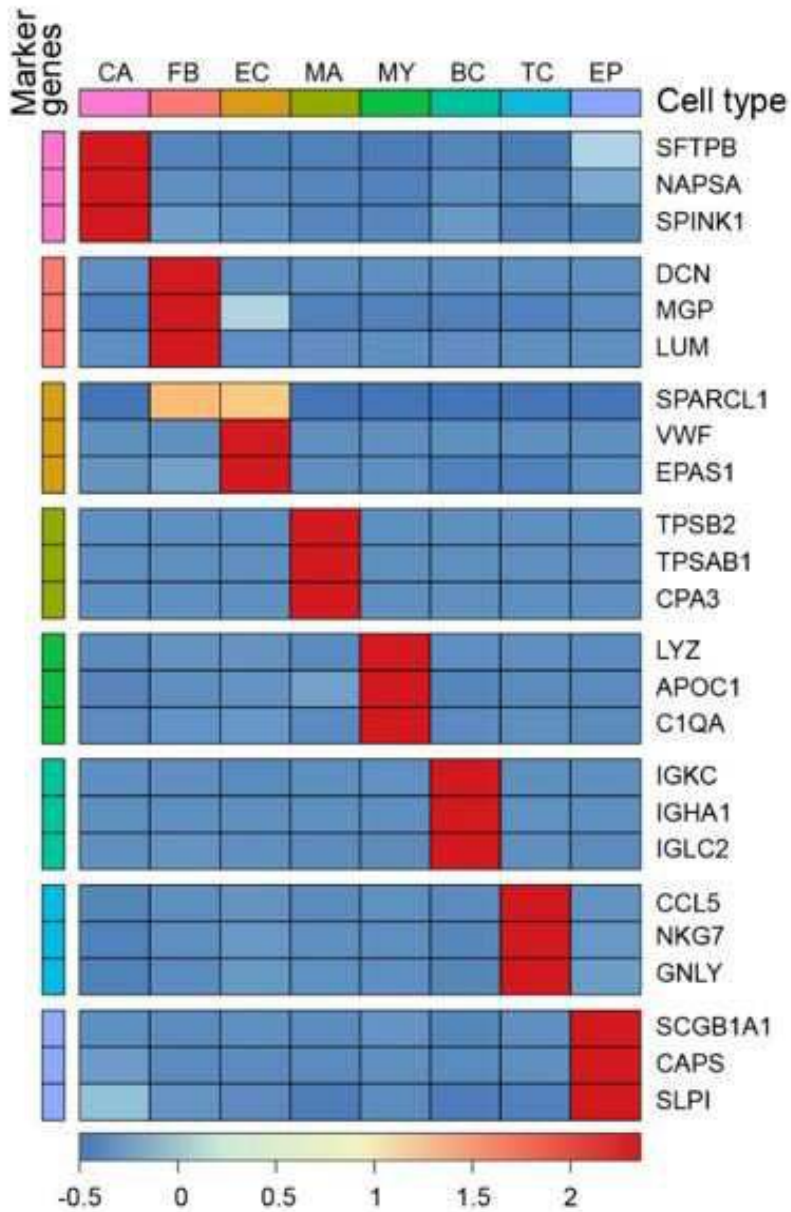
[0069] 본 발명자들은 (i) 개별 종양 샘플 및 인접한 정상 폐 조직에서 얻은 독립적으로 클러스터링된 세포, (ii) 종양 조직에서 얻은 개별적으로 추출된 상피 세포 바코드, (iii) 정상 폐 조직에서 얻은 세포 그룹 및 비-참조로 종양 조직에서 얻은 상피 클러스터, (iv) inferecnv 패키지의 적용된 비지도 클러스터링 방법, (v) 명확한 염색체 유전자 발현에 작은 변화가 있는 세포를 폐암 세포로 정의하였다. 이는 종양 조직 내의 다른 비 악성 상피 성분으로부터 암세포를 정확하게 지정함으로써 획득된 종양 바이오 마커, 웨직 및 차별적으로 발현된 유전자 결과의 정확성을 향상시키는 데 의미가 있었다. 흥미롭게도 이러한 초기 비흡연자로부터 얻은 암세포는 샘플 간의 이질성을 보여줄뿐만 아니라 개별 샘플 내에서 CNV의 이질성을 분명히 보여주었다. 이는 비늘형(lepidic), 선포형(acinar), 유두상(papillary), 세유두상(micropapillary) 및 고형(solid) 부분으로 구성된 비율을 조직학적 구성 요소와 연결하여 중요한 결과를 얻을 수 있었다.

[0071] 본 발명자들은 초기 GGO형 폐암에서도 종양간 이질성뿐만 아니라 종양내 이질성에서도 확인함으로써 매우 초기의 폐암 발생과 종양 증식에 대한 새로운 진단 방법을 제공할 수 있었다.

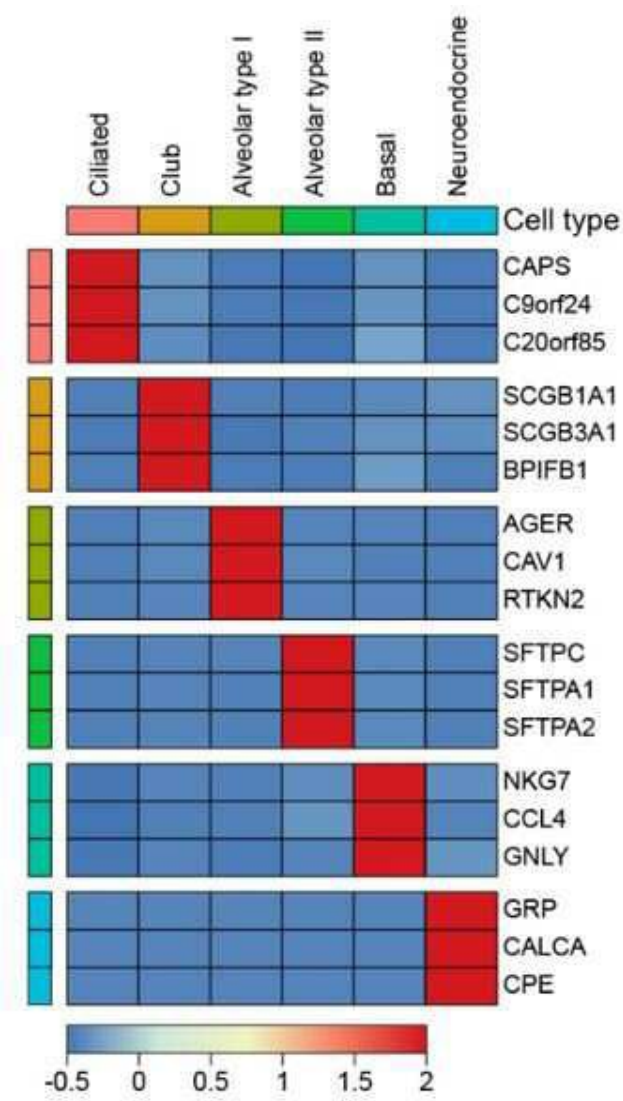
[0073] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

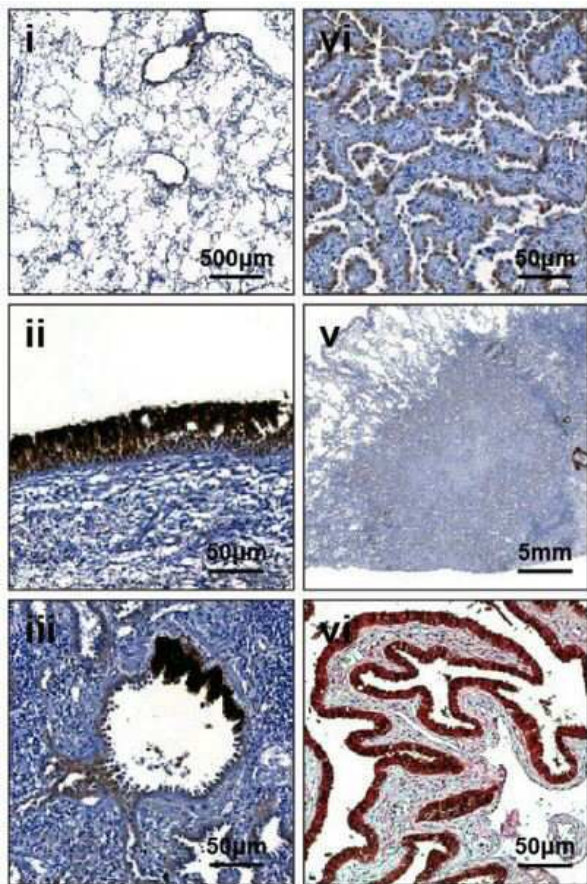
도면1



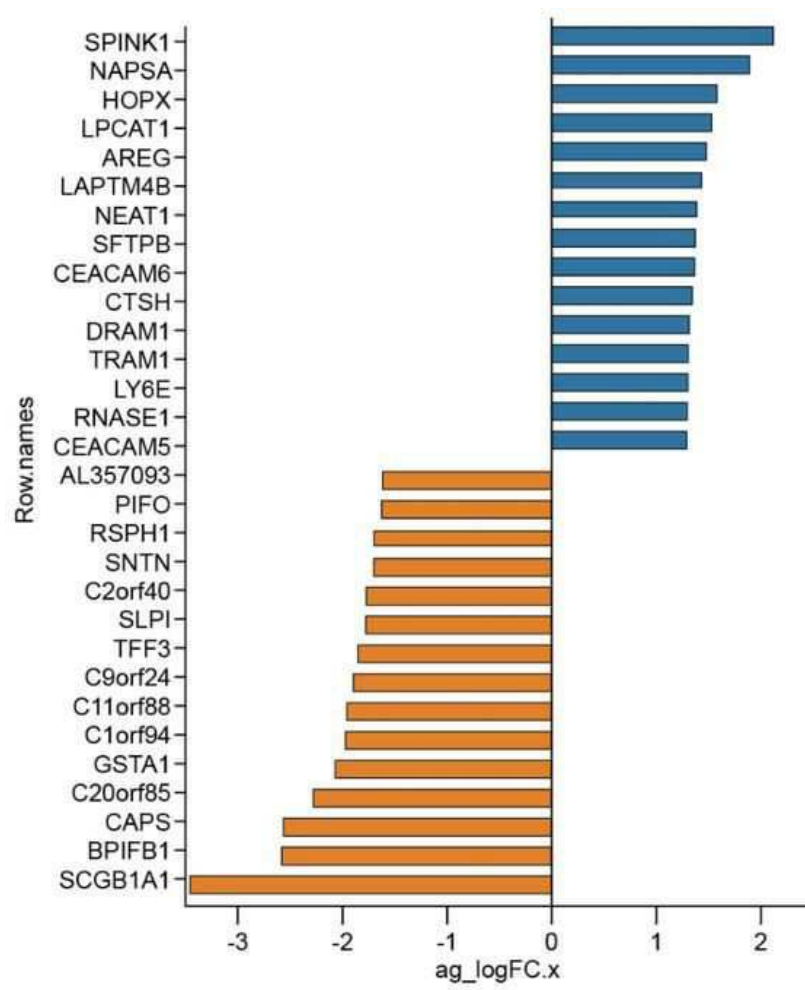
도면2



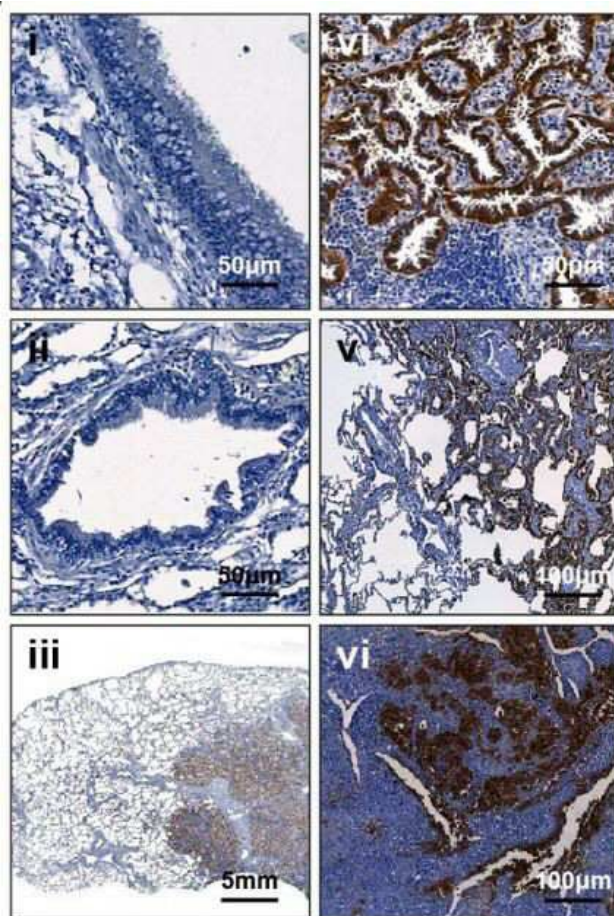
도면3



도면4



도면5



도면6

