



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월02일
(11) 등록번호 10-2259695
(24) 등록일자 2021년05월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/57419 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0121693
(22) 출원일자 2020년09월21일
심사청구일자 2020년09월21일
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020160073798 A
KR1020160014563 A
KR102150490 B1
KR1020200037182 A
- (73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
서울대학교 산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(뒷면에 계속)
- (72) 발명자
김태수
서울특별시 성북구 북악산로 844, 101동 1304호 (돈암동, 브라운스톤 돈암 아파트)
김형표
경기도 고양시 일산동구 일산로 241, 103동 601호(마두동, 백마마을1단지아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김순용

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 이준혁

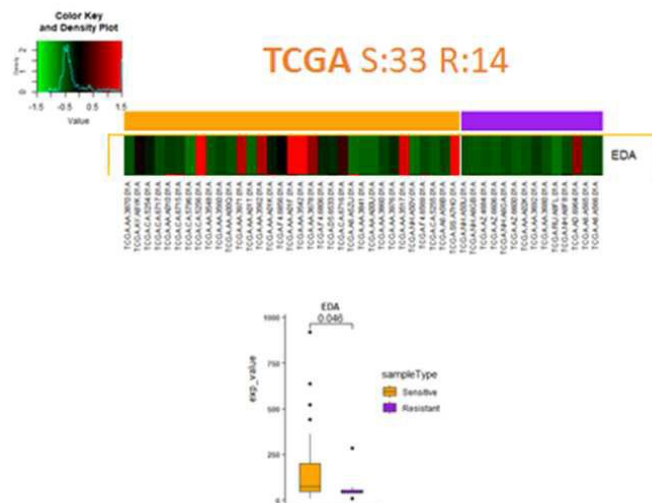
(54) 발명의 명칭 대장암에 대한 항암제 감수성 예측을 위한 신규 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 대장암에 대한 항암제 감수성 예측을 위한 신규 바이오마커 조성물, 이를 이용한 대장암에서 항암제의 감수성 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바이오마커는 대장암에서 항암제의 감수성 예측에 우수한 효과를 보인다.

이에 따라, 개개의 환자의 상기 감수성을 치료 개시 전에 확실하게 판정할 수 있어, 치료 효과가 높은 항암제의 선택이 가능해진다. 또한, 효과가 얻어지지 않는 항암제의 사용을 회피할 수 있기 때문에 불필요한 부작용을 회피할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(73) 특허권자

강원대학교 산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

숙명여자대학교 산학협력단

서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)

(72) 발명자

김황필

경기도용인시 기흥구동백죽전대로527번길 80, 102동 1102호 (중동, 신동백롯데캐슬에코1단지)

조영원

서울특별시 성동구 마조로 55, 101동 2404호 (마장동, 금호어울림아파트)

최선심

강원도 춘천시 방송길 70, 105동 804호 (온의동, 온의 롯데캐슬 스카이크래스)

유경현

서울특별시 용산구 새창로 70, 113동 605호 (도원동, 도원동삼성래미안)

최혜미

서울특별시 양천구 가로공원로56길 37-4, 501호 (신월동, 나우리치빌)

이예은

강원도 춘천시 승지골길16번길 14, 711동 1403호 (퇴계동, 퇴계7단지주공아파트)

우현주

경기도 화성시 병점3로 54, 201동 202호 (병점동, 다정마을 신한에스빌아파트)

이민경

서울특별시 강남구 남부순환로378길 9, 이스트빌리지동 302호 (도곡동, 로텐하우스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104716
과제번호	2017M3C9A5029980
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(과기정통부)
연구과제명	오가노이드를 활용한 약물통합전사체 분석 기반 대장암 맞춤형 치료제 예측 시스템

개발

기 여 율	7/10
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104093
과제번호	2017M3C9A5029978
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(과기정통부)
연구과제명	오가노이드를 활용한 약물후성유전체 분석 기반 대장암 맞춤형 치료제 예측 시스템

개발

기 여 율	3/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Ectodysplasin A (EDA)의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 Ectodysplasin A (EDA)에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함하는 것인, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 유전자 발현 수준의 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의한 것인, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 유전자 발현 수준의 측정은 ChIP-Seq, ChIP-qPCR, ATAC-Seq, DNase-seq, FAIRE-seq 및 luciferase assay로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 단백질 발현 수준의 측정은 웨스턴 블랏, 엘라이자(ELISA), 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 유세포분석 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의한 것인, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측용 키트.

청구항 7

- (a) 분리된 생물학적 시료로부터 Ectodysplasin A (EDA)의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (b) (a) 단계에서 측정한 발현 수준 확인 결과에 기초하여 항암제 5-FU에 대한 감수성을 판정하는 단계;를 포함하는, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계의 발현 수준 측정은 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 것인, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계의 발현 수준의 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의한 것인, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계의 발현 수준의 측정은 웨스턴 블랏, 엘라이자(ELISA), 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 유세포분석 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의한 것인, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대장암에 대한 항암제 감수성 예측을 위한 신규 바이오마커 조성물, 이를 이용한 대장암에서 항암제의 감수성 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 세계적으로 높은 사망률을 보이고 있으며, 서구 사회에서는 심혈관 질환 다음으로 가장 일반적인 사망 원인이다. 특히, 인구의 고령화와 더불어 흡연 인구의 증가 및 대기 오염으로 인해 폐암이 증가하고 있으며, 식생활이 서구화되어 고지방식의 섭취가 일반화되고, 환경오염 물질의 급격한 증가, 음주량의 증가 등으로 대장암, 유방암, 전립선암 등이 지속적으로 증가하는 추세에 있다. 이러한 실정에서 암의 조기 예방 및 치료를 가능하게 하여 인간 건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류 보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다.

[0003] 그 중에서도 대장암은 국내에서 발병하는 전체 암 중 남성에서는 2위, 여성에서 3위로 기록될 만큼 높은 빈도로 발병 (2013년 기준)하며, 특히 국가별 대장암 발병률에서 한국은 2010년 4위, 2015년 통계 기준 1위로 국내 대장암 발병률이 급속한 증가추세를 보이고 있다. 또한, 대장암은 완치 수술 후 약 30% ~ 50%의 환자에서 전이가 발견될 만큼 예후가 좋지 않은 대표적인 악성종양으로, 2015년 기준 전체 암 사망자 중 약 11%의 환자가 대장암으로 사망하며, 대장암 치료제 시장은 세계적으로 2017년 기준 약 78억 달러에 이르며, 지속적인 증가추세를 보일 것으로 예상된다.

[0004] 한편, 국내 암환자의 1인당 평균 의료비는 2013년 기준 4,650천 원으로 막대한 경제적·사회적 손실을 유발하고 있고, 이는 2009년 통계 기준 전체 GDP의 약 1.75%에 해당한다. 이에 따라, 암으로 인한 경제적 부담의 감소를 유도하기 위해 보다 적극적인 암 예방사업 추진, 국내 암환자에 특이적 효능이 있는 신규 항암제의 개발, 그리고 암의 조기발견 및 조기치료를 위한 진단시스템의 개발이 필요하다. 특히, 현재 개발된 대장암 치료제는 환자의 유전체형 및 암의 진행 정도에 따라 다른 치료 효과를 보이기 때문에 환자 맞춤형 항암제 처방을 위한 예측 시스템 개발이 반드시 필요한 상태이다.

[0005] 이러한 환경하에, 현재까지 대장암 환자별 항암제 치료 및 예후를 예측할 수 있는 고성능 바이오마커 및 진단시스템 개발은 부진한 상태이다. 특히, 대장암 신규 치료제 및 진단시스템 개발을 위한 연구는 대장암 유래 세포 배양을 기반으로 하였으며, 세포와 조직·기관과의 차이 때문에 고효율의 치료제 및 진단시스템 개발에 한계가 있었다.

[0006] 한편, 인간 게놈의 약 90%에서 RNA polymerase에 의한 전사가 일어나며 대부분의 RNA는 단백질을 암호화하지 않는 noncoding RNA이다. 이러한 noncoding RNA는 길이 및 기능에 따라 분류되며, transfer RNA, ribosomal RNA, miRNA, siRNA, 그리고 long noncoding RNA (lncRNA)의 기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 non-coding RNA는 인간세포의 기능조절, 발달 및 다양한 질병에 관여하는 것으로 보고되고 있으며, 질병치료를 위한 새로운 주요 타겟으로 인식되고 있다. 특히, non-coding RNA는 세포의 종류, 성장조건, 질병유무, 다양한 약물에 대한 반응 등에 따라 다양한 발현 패턴을 나타내기 때문에 이를 활용하여 대장암 환자 별 약물반응성 예측 예측 시스템 개발이 가능할 것으로 사료된다.

[0007] 따라서 명확한 발병 기전을 이해하고 환자별 효과적인 치료 방법 제시를 위해서 약물반응성 coding RNA 뿐만 아니라 non-coding RNA의 통합적 분석이 반드시 필요하다. 이에 따라, 대장암 세포주, 환자 유래의 조직 및 오가노이드를 기반으로 신규의 마커들을 발굴하여 암 발병기전을 이해하고 대장암에 대한 항암제 감수성 예측 및 치료를 위한 신규 타겟을 제시할 필요성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1438519호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1582723호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 Small Set DEGs(4 OGs), Big Set DEGs (40 OGs), Organoids DERs의 다른 분석 기법을 조합하여 항암제 감수성을 예측하여, 신규 바이오마커를 발굴하였다.

[0010] 이들 서로 상이한 분석 기법으로부터 Overlapping되는 유전자를 TCGA & Organoids data와 비교 분석하여 주요 유전자로 EDA(ectodysplasin A)를 확인하고, 항암제 감수성 마커로서 위 유전자로써의 이용 가능성을 확인하였다.

[0011] 특히, EDA(ectodysplasin A)는 오가노이드를 이용한 분석 및 TCGA 분석에서 항암제, 특히 5-FU에 Sensitive한 세포주에서 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 이에 따라 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 마커로써 이용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0012] 이러한 실험 결과를 바탕으로 검토하여 볼 때, EDA(ectodysplasin A)가 대장암에서 항암제에 대한 감수성 예측용 마커로 활용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0013] 특히, 본 발명에 따른 바이오마커들은 Small Set DEGs(4 OGs), Big Set DEGs (40 OGs), Organoids DERs의 다른 분석 기법을 조합하여, 이로부터 분석 결과를 확보하였다는 점에서 마커로써 우수한 진단 효능을 나타낼 수 있다. 또한, 위 분석 결과에 더하여 TCGA 분석에서 마커로써 우수한 효능을 나타냈다는 점에 민감성 및 정확도가 높은 마커로 이용될 수 있다.

[0014] 본 발명의 하나의 목적은 EDA를 포함하는 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 다른 하나의 목적은 EDA의 유전자 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] EDA의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 EDA의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0018] (b) (a) 단계에서 측정한 발현 수준 확인 결과에 기초하여 상기 대상의 항암제에 대한 감수성을 판정하는 단계;를 포함하는, 대장암에 대한 항암제 감수성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 EDA 바이오마커를 포함하는 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 하나 이상의 바이오마커는 위 EDA 독립적으로, 또는 기타의 마커와 조합으로 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 바이오마커로 사용될 수 있다.

[0021] 대장암이란 대장에 생긴 암세포로 이루어진 악성종양을 말한다.

- [0022] 우리가 음식을 먹게 되면 섭취된 음식물은 소화관을 거쳐 대변으로 배설된다. 우리 몸의 소화기관은 식도, 위, 소장, 대장으로 구분되는데 대장은 소화기관의 마지막 부위이며 주로 수분 및 전해질의 흡수가 일어난다. 대장은 크게 결장과 직장으로 구분되고 결장은 다시 맹장, 상행결장, 횡행결장, 하행결장 그리고 에스(S) 결장으로 나누어지는데, 암이 발생하는 위치에 따라 결장에 생기는 암을 결장암, 직장에 생기는 암을 직장암이라고 하고, 이를 통칭하여 대장암 혹은 결장 직장암이라고 한다. 대략적인 대장의 각 부위별 암 발생률은 맹장과 상행결장 25%, 횡행결장 15%, 하행결장 5%, S 결장 25%, 직장-S 결장 접합부 10%, 직장 20% 정도로 알려져 있다.
- [0023] 대장은 파이프 모양의 관으로 안쪽에서부터 점막층, 점막하층, 근육층, 장막층 등 4개의 층으로 나뉘어져 있다. 대부분의 대장암은 대장의 점막에서 발생하는 선암이며, 이 외에도 림프종, 육종, 편평상피암, 다른 암의 전이성 병변 등이 있다.
- [0024] 즉, 부위별의 명칭인, 맹장암, 결장암, 직장암은 대장암에 포함된다. 대장암은 병리학적으로, 선암, 내분비세포암, 선편평상피암, 편평상피암 등으로 분류되지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0025] 본 발명에 따른 마커를 사용하는 경우 대장암에서의 항암제에 대한 감수성 예측 정보를 제공할 수 있다. 본 발명에서 용어 '항암제 감수성 예측용'이란 항암제 투약이 암의 치료에 유용할 수 있는지의 여부를 투약 전에 예측하는데 사용하기 위한 것으로서, 이의 발현량을 측정하여 항암제에 대한 반응성을 예측하는데 사용된다. 이러한 마커에는 핵산, 폴리펩타이드, 단백질, 지질 또는 당 등과 같은 유기 생체 분자 등이 포함될 수 있다. 본 발명의 목적상, 항암제 치료 반응성 예측용 마커는 대장암 환자에서 항암제 치료 반응성을 예측할 수 있는 바이오마커이다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 "감수성"은 개개의 환자의 암에 대하여 특정 약물이 효과를 나타내는지 여부를 의미한다. 예컨대, 상기 특정 약물은 주로 항암제이며, 이들 항암제에는 암의 종류에 따라 효과를 나타내는 경우와 효과를 나타내지 않는 경우가 있다. 또한, 유효한 것으로 인정되고 있는 종류의 암이더라도, 개개의 환자에 따라 효과를 나타내는 경우와 효과를 나타내지 않는 경우가 있는 것이 알려져 있다. 이와 같은 개개의 환자의 암에 대해 항암제가 효과를 나타내는지 여부를 항암제 감수성이라고 한다. 따라서, 본 발명에 따라 치료 개시 전에 효과를 기대할 수 있는 환자(반응자)와 효과를 기대할 수 없는 환자(무반응자)를 예측할 수 있으면, 유효성과 안전성이 높은 화학 요법이 실현될 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 "예측"은 본원에서 대상 환자가 약물 또는 약물 세트에 대해 유리하게 또는 불리하게 반응할 가능성을 지칭하는데 사용된다. 한 실시양태에서, 예측은 이러한 반응의 정도에 관한 것이다. 예컨대, 예측은 환자가 처치 후, 예를 들어 특정한 치료제의 처치 및/또는 원발성 종양의 수술적 제거 및/또는 특정 기간 동안의 화학요법 후에 암 재발 없이 생존할지의 여부 및/또는 그러할 확률에 관한 것이다. 본 발명의 예측은 대장암 환자에 대한 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료를 결정하는데 임상적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 예측은 환자가 치료 처치, 예컨대 주어진 치료적 처치, 예를 들어 주어진 치료제 또는 조합물의 투여, 수술적 개입, 화학요법 등에 유리하게 반응할 것인지 또는 치료적 처치 후에 환자의 장기 생존이 가능한지의 여부를 예측하는데 있어서 유용한 도구이다.
- [0028] 본 명세서에서 감수성을 언급하면서 사용되는 용어 "민감성"은 해당 약물에 대하여 민감하게 반응하여 약물의 효능이 작용하는 것을 의미하고, 본 명세서 내에서 감수성과 혼용된다.
- [0029] 본 명세서에서 감수성을 언급하면서 사용되는 용어 "저항성"은 해당 약물에 대하여 민감하게 반응하지 아니하여 약물의 효능이 작용하지 않는 것을 의미한다. 즉, 항암제에 대한 내성을 가질 수 있다.
- [0030] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 본 명세서에서 사용되는 표현 "유전자 또는 이의 단백질의 발현 수준 측정"은 해당 시료 내에서 검출하고자 하는 타겟을 검출하는 것을 의미한다. 본 발명에서는, 상기 검출하고자 하는 타겟은 시료 내 해당 유전자의 mRNA 및/또는 단백질이다. 즉, 유전자의 전사 산물인 RNA 또는 유전자 산물인 단백질을 검출함으로써 상기 유전자의 발현 여부를 확인할 수 있다.
- [0032] 즉, 본 발명에서 바이오마커는 대장암에서 항암제 감수성 정보를 제공할 수 있는 물질로, 대장암에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: transfer RNA, ribosomal RNA, miRNA, siRNA, long noncoding RNA (lncRNA), mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 대장암에 대한 약물(항암제) 반응성(감수성) 예측용 바이오마커는 EDA이다. EDA의 발현 수준이 높은 경우 항암제에 대한 감수성이 높은 것으로 판단될 수 있으며, 반대로 이의 발현 수준이 낮은 경우 항암제에 대한 감수성이 낮은 것으로 판단될 수 있다.

- [0033] 본 발명에서, 항암제는 5-플루오르우라실(5-FU), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 이리노테칸(irinotecan), 세특시맵(cetuximab), 베바시주맵(Bevacizumab), 파니튜뮤맵(panitumumab) 및 트라스투주맵(Trastuzumab)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다. 바람직하게, 5-플루오르우라실(5-FU)일 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 ectodysplasin A (ENSG00000158813) 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 에 Gene ID: 1896로 등록되어 있다.
- [0037] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 5-FU 약물처리 전에 획득한 저항성 오가노이드 및 민감성 오가노이드, 그리고 하루 동안 약물처리 후에 획득한 저항성 오가노이드 및 민감성 오가노이드의 RNA-seq데이터 활용하여 유의한 차등발현 보이는 유전자인 DEGs 선별에서, EDA는 항암제 감수성과 관련된 유전자로 확인되었다(Small set DEGs).
- [0038] 또한, 본 발명의 일실시양태에 따르면, 40종의 오가노이드를 이용한 관련 분석으로 IC50=2.8을 기준으로 하여 분류된 민감성, 저항성 기준의 DEG를 이용할 때, EDA는 항암제 감수성과 관련된 유전자로 확인되었다(Big set DEGs).
- [0039] 또한, 본 발명의 일실시양태에 따르면, 5-FU 약물처리전 (Con-DER)과 5-FU 약물처리 후 (D1-DER)에 대하여 유의한 차등 변화를 보이는 유전체 부위 ($P < 0.0001$)인 DERs 찾아 이를 기초로 분석을 수행할 때, EDA는 항암제 감수성과 관련된 유전자로 확인되었다(오가노이드 DER 분석).
- [0040] 이들 분석 결과를 기초로 하여, 유전자들을 그룹핑한 결과 위 언급한 EDA가 대장암에서 항암제 감수성을 나타낼 수 있는 유전자로 확인되었다.
- [0041] 이에 따라, 본 발명의 일실시양태에 따르면, 대장암 40종 오가노이드 샘플에서 상기 실험 결과를 기초로 5-FU sensitive와 resistant 그룹에서 분석한 결과, EDA 유전자가 5-FU에 대해 resistant한 그룹에서 특이적으로 발현이 감소하는 것으로 나타났다.
- [0042] 또한, 본 발명의 일실시양태에 따르면, 상기 실험 결과를 기초로 The Cancer Genome Atlas(TCGA)의 대장암 약물 반응성 데이터(sensitive 33례, resistant 14례)를 분석한 결과, EDA 유전자의 발현이 resistant한 그룹에서 특이적으로 감소하는 것으로 나타났다.
- [0044] 이러한 실험 결과를 바탕으로 검토하여 볼 때, EDA가 대장암에 대한 항암제 감수성 예측을 위한 특이적인 바이오마커로 활용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 즉, 상기 결과들을 통해 위 EDA가 대장암에서 항암제의 치료 반응성을 예측할 수 있는 마커로 유용하게 이용될 수 있고, 항암제의 항암 치료 효과가 위 언급된 유전자를 높게 발현하는 특정 환자군에서 유의적으로 우수하다는 것을 알 수 있다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 바이오마커 조성물은 EDA 단독, 또는 기타 추가의 바이오마커의 조합을 제한없이 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명은 또한, EDA 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0047] EDA의 바이오마커의 발현 수준은 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 확인함으로써 알 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 "mRNA 발현수준 측정"이란 대장암에서 항암제의 감수성에 대한 정보를 제공하기 위하여 생물학적 시료에서 상기 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0049] mRNA 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 프라이머 쌍 또는 프로브이며, EDA의 핵산 서열이 밝혀져 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 프라이머는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 합성을 개시할 수 있

다.

- [0051] 본 발명에서는 EDA의 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 대장암에서 항암제의 감수성을 예측할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 프로브는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 EDA의 폴리뉴클레오티드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 대장암의 항암제 감수성을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포라미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 조성물은 단독 또는 2 이상의 바이오마커의 조합에 대한 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 제한없이 포함할 수 있다.
- [0057] 또한, 필요에 따라, 마커의 양을 확인할 수 있는 공지된 방법이면 제한없이 이용할 수 있기 때문에, 다중 마커들, 즉 RNA의 다량 분석을 위해 ChIP(Chromatin Immunoprecipitation)-Seq, ChIP-qPCR, ATAC(Assay for Transposase-Accessible Chromatin)-Seq, DNase-seq, FAIRE(Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements)-seq, CLIP(Cross-linking immunoprecipitation)-seq, RIP(RNA immunoprecipitation)-seq 및 luciferase assay로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상이 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] "단백질의 수준 측정"이란 암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 구체적으로는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다.
- [0059] 본 발명에서, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기한 바와 같이 마커 단백질이 규명되었으므로, 이를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.
- [0060] 다클론 항체는 상기한 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.
- [0061] 단일클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0063] 상기 항체를 이용하여 이와 결합한 표적 단백질의 양을 확인하기 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석

(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

- [0065] 본 발명은 또한 EDA의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 키트를 제공한다.
- [0066] 본 발명의 키트는 대장암에 대한 항암제 감수성 예측을 위한 바이오마커인 EDA 바이오마커, 즉 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 확인함으로써 검출할 수 있다. 본 발명의 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 키트에는 바이오마커의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0067] 구체적으로, EDA의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 바이오마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 RT-PCR 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPCwater), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 또한 바람직하게는, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 예측용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 예를 들어, 핵산 증폭용 시약은 중합효소, dNTP, 완충제, 핵산, 조효소, 형광물질, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 중합 효소는 예를 들어 Taq 중합효소이다. 상기 키트는 핵산 분리용 시약을 더 포함할 수 있다. 상기 핵산 분리용 시약은 세포 용해 용액을 포함할 수 있다. 세포 용해 용액은 염, 계면활성제, 금속 이온, 당, 환원제(예, DTT), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 키트는 예를 들어, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 대장암에 대한 항암제 감수성 예측용 키트는 앞서 살핀 조성물에서와 같이 단독, 2 이상의 바이오마커의 조합에 대한 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 제한없이 포함할 수 있으며, 바람직한 예는 앞서 살핀 바와 같다.
- [0072] 본 발명은 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 EDA의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0073] (b) (a) 단계에서 측정한 발현 수준 확인 결과에 기초하여 상기 대상의 항암제에 대한 감수성을 판정하는 단계;를 포함하는, 대장암에 대한 항암제 감수성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0075] 본 발명의 정보를 제공하는 방법은, 대상 환자로부터 획득되어 분리된 생물학적 시료에서 상술한 유전자들의 발현 여부를 측정한 후, 정상 시료(또는 대조군)와 비교하여 기재된 유전자의 발현 수준이 상승하는 경우 감수성이 높다고 판정하여 정보를 제공할 수 있다.
- [0076] 즉, 본 발명의 대장암에 대한 항암제 감수성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법은 시료 내에서의 특정 유전자들의 발현 수준의 정도를 항암제에 대한 감수성의 지표로 하는 점을 특징으로 한다.
- [0077] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 방법은 (b) 단계에서 감수성을 판단하는 방법은 EDA의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준이 증가한 경우에 감수성이 높은 것으로 판단하고, 반대로 발현 수준이 감소한 경우에 감수성이 낮은 것으로 판정한다.
- [0078] 즉, EDA 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준이 고발현되거나 고활성화된 경우 감수성이 높은 것으로 판단한다. 반대로, EDA 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준이 저발현되거나 저활성화된 경우 감수성이 낮은 것으로 판단한다.
- [0080] 즉, 상기 (b) 단계에서 감수성이 높은 것으로 판단된 시료를 가진 환자에 대해서는 위 항암제에 대한 처방이 이루어질 수 있고 우수한 치료 효과를 나타낼 가능성이 높다.

- [0081] 상기 정보의 제공은 항암제에 대한 대장암의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 발병한 대장암이 항암제 내성을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 또는 항암제 내성 대장암의 예후(prognosis)(예컨대, 항암 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것 등을 포함한다.
- [0083] 상기 (a) 단계의 발현 수준의 측정은 분리된 시료에서 mRNA 수준에서 검출할 수 있다. 생물학적 시료에서 mRNA 분리는 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0084] 본 발명에서 "시료"란 세포, 조직, 전혈, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 타액, 객담 또는 뇨와 같은 시료를 포함하며, 바람직하게 대장 조직 시료이다. 이러한 대장 조직은 맹장, 결장, 직장 등의 조직을 모두 포함한다.
- [0085]
- [0086] mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 측정 방법들을 통하여, 기준(대조) 시료의 mRNA 발현량과 대장암 의심환자, 대장암 환자 등에서의 mRNA 발현량을 비교할 수 있고, mRNA의 유의한 발현량의 증감여부를 판단하여 대장암에 대한 항암제의 감수성(민감성)에 대한 예측을 수행한다.
- [0087] mRNA 발현수준 측정은 바람직하게는, 상기 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하는 역전사효소 중합효소반응법 또는 DNA 칩을 이용하는 것이다.
- [0088] 상기의 역전사효소 중합효소반응은 반응 후 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인함으로써 대장암 바이오마커로 사용되는 유전자의 mRNA 발현 여부와 정도를 확인 가능하고 이를 대조군과 비교함으로써, 대장암에 대한 항암제의 감수성(민감성)에 대한 예측 정보를 제공할 수 있다.
- [0089] DNA 칩은 상기 바이오마커 유전자 또는 그 단편에 해당하는 핵산이 유리 같은 기관에 고밀도로 부착되어 있는 DNA 칩을 이용하는 것으로서, 시료에서 mRNA를 분리하고, 그 말단 또는 내부를 형광 물질로 표지된 cDNA 프로브를 조제하여, DNA 칩에 혼성화시킨 다음 대장암의 발병 여부를 판독할 수 있다.
- [0090] 단백질 수준의 측정 방법은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 분석 방법들을 통하여, 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 이의 발현량의 증가여부를 판단하여, 정보를 제공할 수 있다.
- [0091] 본 발명에서 용어 "항원-항체 복합체"란 마커 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.
- [0092] 본 발명에 있어서, 상기 대장암에 대한 항암제 감수성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법은 앞서 살핀 조성물에서와 같이 2 이상의 바이오마커의 조합에 대한 발현 수준 측정을 제한없이 포함할 수 있으며 바람직한 예는 앞서 살핀 바와 같다.
- [0094] 본 발명은 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 EDA의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0095] (b) (a) 단계에서 측정된 발현 수준 확인 결과에 기초하여 상기 대상의 항암제에 대한 감수성을 판정하는 단계;
- [0096] (c) (b) 단계에서 감수성이 높은 것으로 판정된 시료를 가진 환자에게 약학적으로 유효한 양의 항암제를 투여하는 단계를 포함하는 대장암의 치료 방법을 제공한다.
- [0097] 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 혈관 투과성 증가를 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0098] 상기 투여는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 항암제를 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0099] 본 발명에 따른 EDA 바이오마커는 대장암에서 항암제의 감수성 예측에 우수한 효과를 보인다. 이에 따라, 개개의 환자의 상기 감수성을 치료 개시 전에 확실하게 판정할 수 있어, 치료 효과가 높은 항암제의 선택이 가능해진다. 또한, 효과가 얻어지지 않는 항암제의 사용을 회피할 수 있기 때문에 불필요한 부작용을 회피할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0100] 도 1은 TCGA 및 오가노이드를 기반으로 Small Set DEGs(4 OGs), Big Set DEGs (40 OGs), Organoids DERs의 다른 분석 기법을 조합하여 항암제 감수성을 예측하기 위한 전체 모식도를 나타내는 도이다.

도 2는 총 40개 오가노이드를 약물에 대한 IC50과 Q, P value를 기준으로 분류하고, IC=2.8의 기준 설정을 통해 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 3은 도 2의 Big set DEGs를 이용하여 TCGA 대장암 환자 샘플에서 저항성 관련하여 차등 발현된 DEG와 중첩하여 주요 유전자를 확인한 결과를 나타낸다 (분홍색 계열- 주요 유전자(p<0.05))

도 4는 Small set DEGs를 이용하여 확인한 항암제에 대한 저항성을 나타내는 주요 유전자의 리스트를 나타내는 도이다(보라색으로 나타날수록 빈도가 높은 유전자)

도 5는 5-FU 약물처리전 (Con-DER)과 5-FU 약물처리후 (D1-DER)에 대하여 유의한 차등 변화를 보이는 유전체 부위 (P < 0.0001)인 DERs 찾아, 이들 각각은 Con-DEG 및 D1-DEG와 중첩하여 정리한 결과를 나타낸다.

도 6은 도 5의 기준을 기초로 TCGA 약물저항성 DEG와 중첩하여 주요 유전자로 48종을 분류한 것을 나타낸다(보라색으로 나타날수록 빈도가 높은 유전자)

도 7은 EDA 유전자가 5-FU에 대해 resistant한 그룹에서 특이적으로 발현이 감소하는 것으로 나타나는 것을 확인한 결과를 나타낸다.

도 8은 EDA 유전자가 5-FU에 대해 resistant한 그룹에서 특이적으로 발현이 감소하는 것으로 나타나는 것을 TCGA의 대장암 약물반응성 데이터 분석을 기초로 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0101] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 또는 제제예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0103] <실험예 1> 대장암 오가노이드 제조 및 항암제 감수성 분석 방법

[0104] 대장내시경 및 수술적 치료시 발생하는 대장암 조직을 획득하고, 이에 효소 처리를 통해 조직 유화 및 암 세포 추출을 수행하였다. 그리고 나서, 매트릭셀을 이용한 3차원 배양을 수행하고, 대장암 오가노이드 전용 배양액에서 배양함으로써 대장암 오가노이드를 제조하였다. 이에 따라 총 49개의 오가노이드를 제조하였다.

[0105] 배양 중인 오가노이드에서 매트릭셀을 제거한 후, 오가노이드를 추출하였다. 그리고 나서, 효소 및 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 복합 처리를 통해 오가노이드를 분해하였다. 2% 매트릭셀이 포함된 대장암 오가노이드 전용 배양액 이용하여 분해된 오가노이드와 항암제 분주 6일간 배양 후 대조군과 항암제 처리 군간의 ATP 레벨 차이를 확인하였다.

[0106] <실험예 2>RNA-seq 분석

[0107] RNA seq를 위하여, 'FastQC' 로 리드 퀄리티 체크 진행 후, 'Trimmomatic' 으로 리드 필터링을 진행하였다. 'STAR' 을 사용하여 RNA-seq 리드를 Reference genome에 alignment하였다. Reference genome은 Gencode를 이용해 GRCh38.p12 파일을 다운받아 사용하였다. 이후 'HTSeq-count' 를 수행하고, 유전자의 발현량을 read counts로 구하였다.

[0108] Chip seq를 위하여, 'FastQC' 로 리드 퀄리티 체크 진행 후, 'Trimmomatic' 으로 리드 필터링을 진행하였다. 'Bowtie2' 을 사용하여 RNA-seq 리드를 Reference genome에 alignment하였다. Reference genome은 Gencode를 이용해 GRCh38.p12 파일을 다운받아 사용하였다. 이후 'MACS14' 를 통해 peak calling을 진행하고, 'DiffReps' 를 이용하여 DER을 구하였다.

- [0109] <실험예 3> 통합분석
- [0110] (1) Small set DEG 분석
- [0111] 저항성 오가노이드 2개 샘플(OG21, OG32), 민감성 오가노이드 2개 샘플 (OG29, OG57)의 RNA-seq 데이터를 활용하여 유의한 차등 발현을 보이는 유전자, 이른바 DEGs 선별함 (Small set)으로 선별하였다(Small set DEGs).
- [0112] a. 5-FU 약물을 처리하기 전 오가노이드 (민감성 2개 : 저항성 2개)에서 생산된 RNA-seq 이용하여 유의한 차등 발현 가진 유전자 선별 (Con-DEG)
- [0113] b. 5-FU 약물을 하루 동안 처리한 오가노이드 (민감성 2개: 저항성 2개)에서 생산된 RNA-seq 이용하여 유의한 차등발현 가진 유전자 선별 (D1-DEG)
- [0114] (2) Big Set DEG 분석
- [0115] 약물 저항성 정보를 가지는 총 40개 오가노이드를 저항성과 민감성 두 카테고리로 나누고, 앞서 (1)의 경우와 같이 DEG 선별하였다(Big set DEGs).
- [0116] (3) DER 분석
- [0117] 민감성 오가노이드 2개와 저항성 오가노이드 2개로부터 얻은 H3K27Ac Chip-seq 시그널을 비교하여 두 가지 그룹에서 유의한 차이를 보이는 부위 선별하고, 이를 DEG에 오버랩하여 active chromatin signal의 차이가 발현차이를 유도했는지 테스트하였다. (DER).
- [0118] <실험결과>
- [0119] 1) Big set 분석에서 도출한 약물반응성 예측 유전자
- [0120] 약물 저항성 정보를 가지는 총 40개 오가노이드를 도 2와 같이 다양한 기준을 이용하여 민감성과 저항성 카테고리로 나누었다(Big set). 테스트한 기준 중에서 IC50=2.8에서 민감성과 저항성 사이 유의한 차등발현 DEG가 가장 많은 수 도출되었으며, IC50=2.8을 향후 분석의 저항성 판별기준으로 사용하였다.
- [0121] 상기 유전자들을 TCGA 대장암 환자 샘플에서 저항성 관련하여 차등 발현된 DEG와 중첩하였으며, 그 결과를 아래 도 3에 나타내었다.
- [0122] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 오버랩되는 주요 유전자로 분홍색으로 표기한 33종의 유전자를 확인하였다. 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, EDA가 관련 유전자로 확인되었다.
- [0123] 2) Small set DEGs 분석
- [0124] 5-FU 약물처리 전에 획득한 저항성 오가노이드 2개 샘플 및 민감성 오가노이드 2개 샘플, 그리고 하루 동안 약물처리 후에 획득한 저항성 오가노이드 2개 샘플 및 민감성 오가노이드 2개 샘플의 RNA-seq 데이터 활용하여 유의한 차등발현 보이는 유전자, 이른바 DEGs 선별하였다(Small set). 총 세 번에 걸쳐 독립적으로 실험 세트가 구성되었고, 선별된 DEG와 서로 다른 독립된 실험 세트에서 반복적으로 나타나는 저항성 관련 유전자는 도 4에 나타내었다.
- [0125] 도 4에서 모든 결과를 합친 후, 이를 카운팅한 결과를 색깔로 표기하였다(Union 오른쪽, 카운팅 : 1 내지 4에 따라 보라색 표기 변화로 기재). 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, EDA가 확인되었다(2회 Counting).
- [0126] 3) DER 분석 결과: H3K27Ac Chip-seq 시그널 비교 및 DEG 오버랩을 통한 분석 결과
- [0127] 민감성 오가노이드 2개와 저항성 오가노이드 2개로부터 얻은 H3K27Ac Chip-seq 시그널을 비교하여 두 가지 그룹에서 유의한 차이를 보이는 부위 선별하고, 이를 DEG에 오버랩하여 active chromatin signal의 차이가 발현차이를 유도했는지 테스트하였다 (DER). 총 두 번에 걸쳐 독립적으로 Chip-seq 데이터가 생산되었다.
- [0128] 앞서 DEG 분석과 동일하게 5-FU 약물처리전 (Con-DER)과 5-FU 약물처리후 (D1-DER)에 대하여 유의한 차등 변화를 보이는 유전체 부위 ($P < 0.0001$)인 DERs 찾았고, 이들 각각은 Con-DEG 및 D1-DEG와 중첩한 결과 아래와 같은 수의 유전자가 선별되었다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0129] 그리고 나서, 이들 각각을 TCGA 약물저항성 DEG와 중첩하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0130] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 총 48종의 유전자가 오버랩되었고, 오버랩 정도에 따라 보라색 표기를 진하게 하였다(Union 오른쪽, 카운팅 : 1 내지 4에 따라 보라색 표기 변화로 기재). EDA가 관련 유전자로 확인되

었다.

[0131] 4) 분석 결과 정리

[0132] 상기 1) 내지 3) 분석을 통해 분리된 유전자들을 모아서, 저항성 유전자들을 선별하였다. 구체적으로, 위 살핀 바와 같은 Small set DEG, Big set DEG, DER를 통해서 확인된 유전자들에서 관련되는 유전자들을 모았으며, 여기서 주요 유전자로 EDA를 선정하였다.

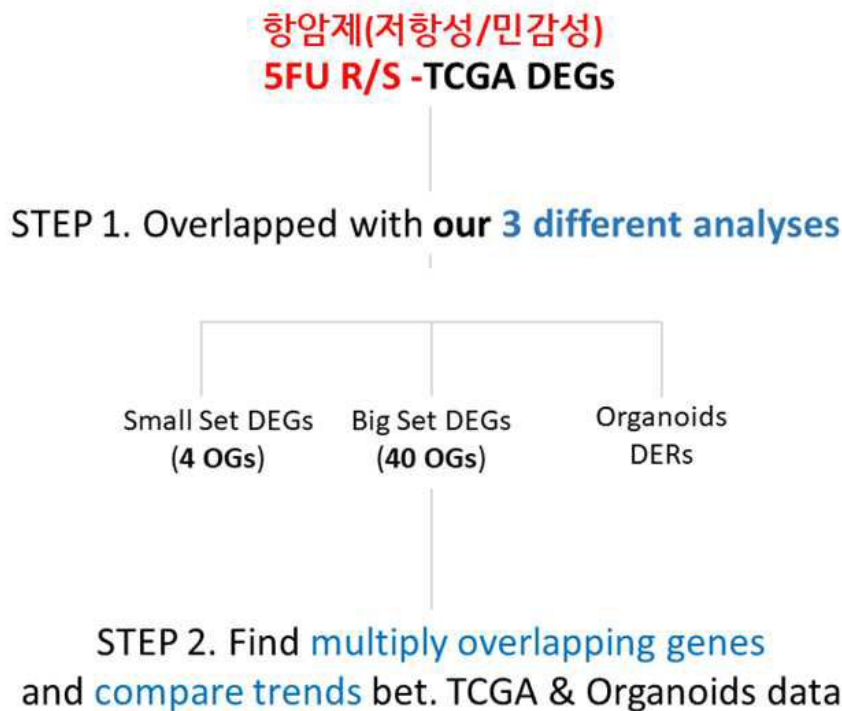
[0133] 또한, 위 선별된 EDA 유전자를 기초로 하여 발현 패턴을 5-FU sensitive와 resistant 오가노이드 그룹을 기초로 분석하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, EDA 유전자가 5-FU에 대해 resistant한 그룹에서 특이적으로 발현이 감소하는 것으로 나타났다.

[0134] 그리고 나서, TCGA의 대장암 약물반응성 데이터(sensitive 33례, resistant 14례)를 분석한 결과, EDA 유전자의 발현이 resistant한 그룹에서 특이적으로 감소한다는 것을 확인하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0135] 상기 결과를 기초로 EDA 유전자는 대장암의 약물반응성을 예측할 수 있는 새로운 마커로 이용이 가능할 것으로 판단되었다.

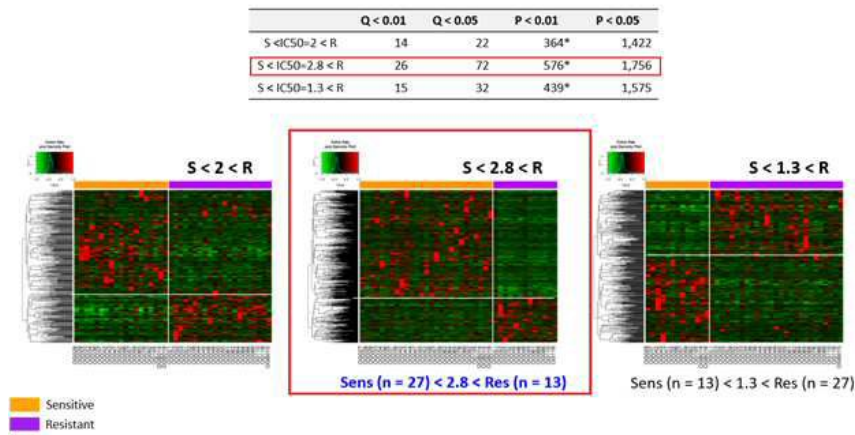
도면

도면1



도면2

Define IC50 threshold to determine Res vs. Sen using Big Set (40 OGs)-DEGs

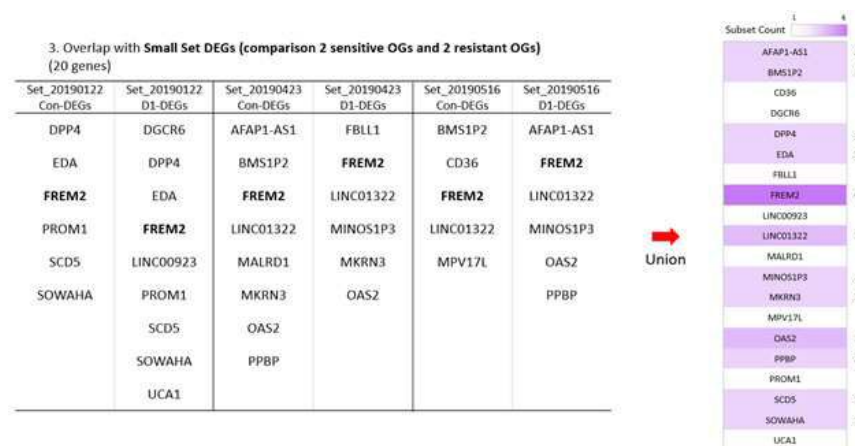


도면3

. Overlap with Big Set DEGs identified from 40 OGs (33 genes)

P < 0.05 (33)		P < 0.01 (13)	Q < 0.05	Q < 0.01
SNCAIP	PRSS57	SNCAIP	IFI44L	IFI44L
CABP7	FAM83A-AS1	APOL4	MKRN3	
APOL4	EWSAT1	GLRA2	AFAP1-AS1	
GLRA2	PTTG3P	F10		
PACRG	MIAT	DSG3		
HOXC11	HOTAIR	IFI44L		
F10	PCDHAC1	FREM2		
GALNT8	RN7SKP116	EDA		
XAF1	C1QTNF1-AS1	MKRN3		
DSG3	WDR45BP1	HS3ST4		
IFI44L	AFAP1-AS1	PRSS57		
IFI44	PCDHGB9P	PCDHAC1		
ASXL3	AC004009.2	AFAP1-AS1		
FREM2				
EDA				
IGF2				
SERPINF2				
CNGB3				
MKRN3				
HS3ST4				

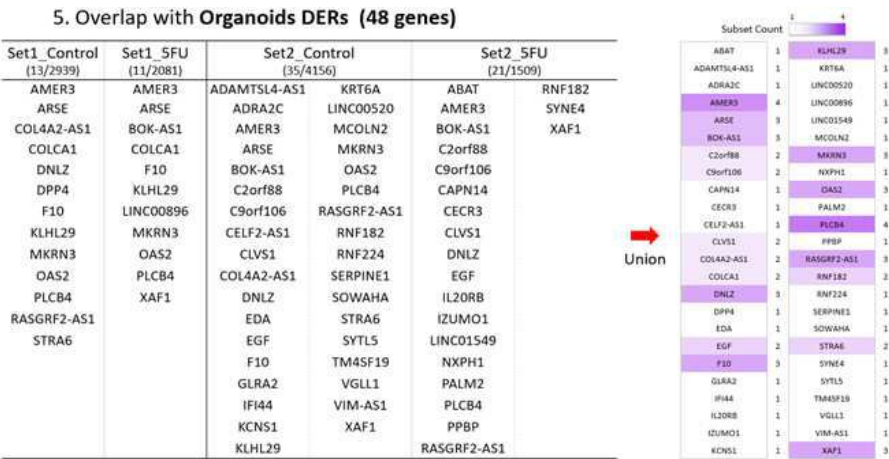
도면4



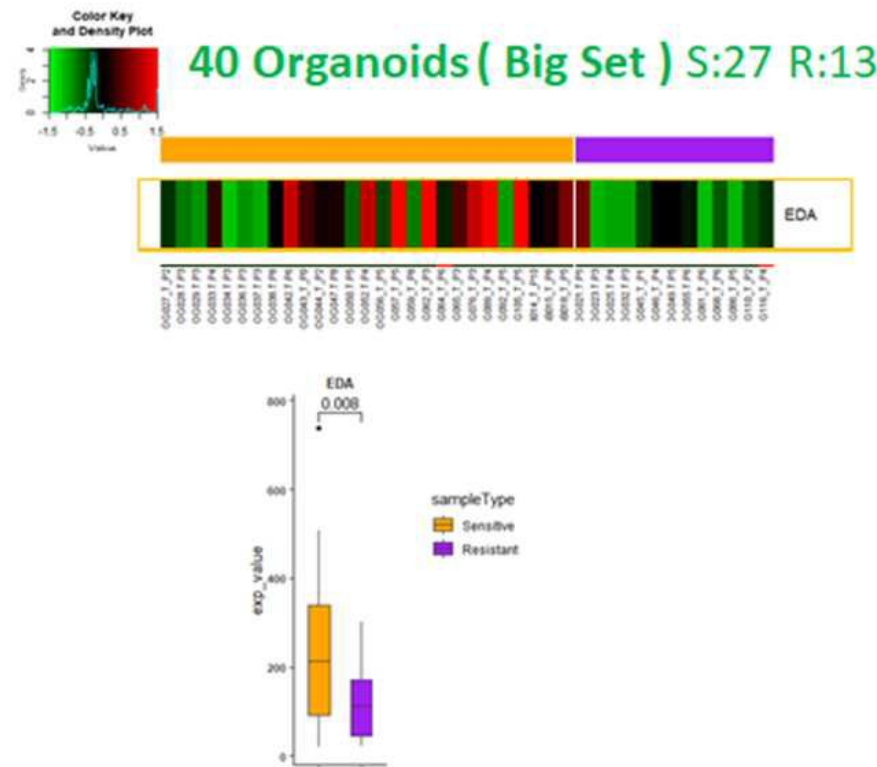
도면5

	Con-DEGs	D1-DEGs
Set1 promoter DERs	91 DERs with 62 DEGs	112 DERs with 66 DEGs
Set2 promoter DERs	104 DERs with 65 DEGs	163 DERs with 92 DEGs

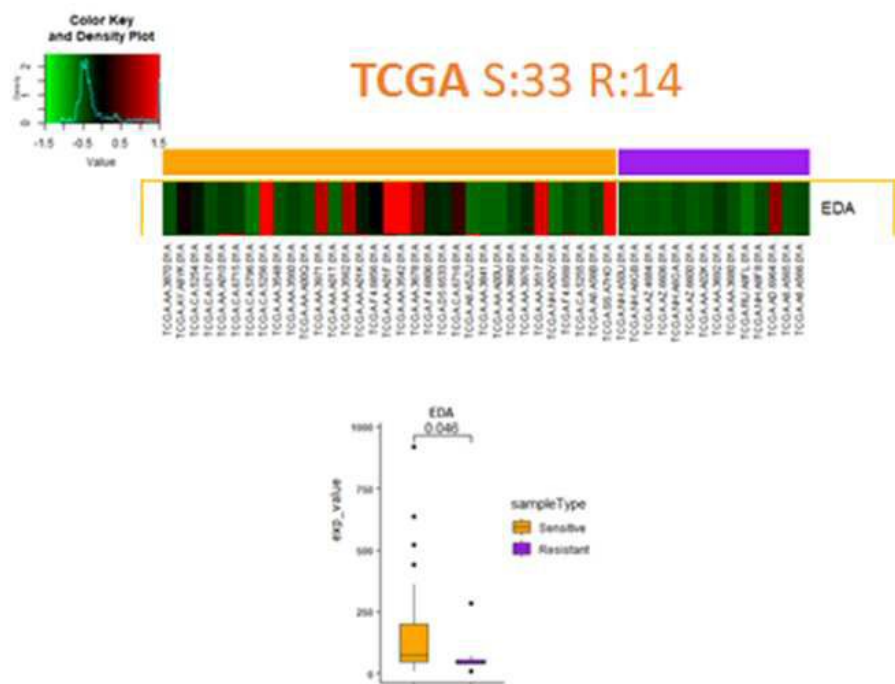
도면6



도면7



도면8



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 7

【변경전】

(a) 분리된 생물학적 시료로부터 Ectodysplasin A (EDA)의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) (a) 단계에서 측정한 발현 수준 확인 결과에 기초하여 상기 대상의 항암제에 대한 감수성을 판정하는 단계;를 포함하는, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

【변경후】

(a) 분리된 생물학적 시료로부터 Ectodysplasin A (EDA)의 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) (a) 단계에서 측정한 발현 수준 확인 결과에 기초하여 항암제 5-FU에 대한 감수성을 판정하는 단계;를 포함하는, 대장암에 대한 항암제 5-FU 감수성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.