



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년05월18일
 (11) 등록번호 10-1622454
 (24) 등록일자 2016년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0025699

(22) 출원일자 2014년03월04일

심사청구일자 2014년03월04일

(65) 공개번호 10-2015-0104264

(43) 공개일자 2015년09월15일

(56) 선행기술조사문헌

Oncotarget., Vol. 4, No. 4, pp. 550-559
 (2013.04.01.)*

WO2013076282 A1

WO2010064702 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

조병철

서울특별시 서대문구 성산로 250(신촌동 134)

김환상

서울특별시 용산구 원효로 1가 41-1 용산동아더프라임 103동 1603호

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 15 항

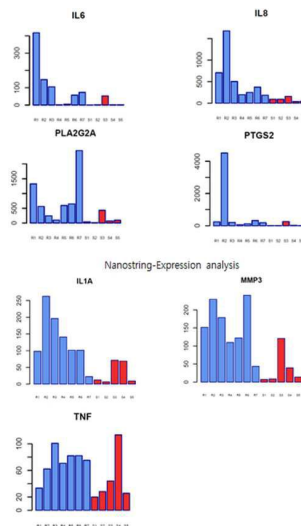
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 항암 치료 반응 예측 마커**

(57) 요약

본 발명은 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후를 예측하기 위한 정보 제공 방법, 암 치료의 예후 예측용 조성물, 및 키트를 제공한다. 본 발명에 따르면 IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준을 측정함으로써 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후를 예측할 수 있게 되므로 환자를 치료하기 위한 약제 선택을 위해 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C1440

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 한국보건산업진흥원-중점연구(역방향)

연구과제명 EGFR 억제제의 치료 반응과 내성에 영향을 미치는 새로운 유전자 변이 발굴 및 기능 연구

기여율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준을 측정하는 단계;

상기 유전자 또는 단백질 발현 수준을 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 약제 반응군에서의 유전자 또는 단백질 발현 수준과 비교하는 단계; 및

상기 유전자 또는 단백질 발현 수준이 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 약제 반응군에서의 유전자 또는 단백질 발현 수준에 비해 높은 경우 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후가 불량한 것으로 판단하는 단계를 포함하는 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후를 예측하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 두경부암인 정보 제공 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암은 편평상피 두경부암인 정보 제공 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 EGFR 티로신 키나아제 억제제는 제피티닙(gefitinib), 에를로티닙(erlotinib), 다코니티닙(dacomitinib) 및 아파티닙(afatinib)으로부터 선택되는 것인 정보 제공 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

IL6 유전자 또는 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 정보 제공 방법.

청구항 6

IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후 예측용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 암은 두경부암인 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후 예측용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 암은 편평상피 두경부암인 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후 예측용 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 EGFR 티로신 키나아제 억제제는 제피티닙(gefitinib), 에를로티닙(erlotinib), 다코니티닙(dacomitinib) 및 아파티닙(afatinib)으로부터 선택되는 것인 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후 예측용 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

IL6 유전자에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 추가로 포함하는 암 치료의 예후 예측용 조성물.

청구항 11

IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후 예측용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 암은 두경부암인 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후 예측용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 암은 편평상피 두경부암인 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후 예측용 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 EGFR 티로신 키나아제 억제제는 제피티닙(gefitinib), 에를로티닙(erlotinib), 다코니티닙(dacomitinib) 및 아파티닙(afatinib)으로부터 선택되는 것인 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후 예측용 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서,

IL6 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 추가로 포함하는 암 치료의 예후 예측용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 항암 치료 반응 예측 마커에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세계적으로 두경부암은 암 사망 원인의 6 번째를 차지하며 매년 65만명이 새로이 진단된다. 약 60%의 편평세포 두경부암 환자들이 진단 시부터 절제 불가능한 국소 진행성이며 다방면 치료를 받게 된다. 다방면 치료에도 대다수 (70%) 환자들이 국소 또는/그리고 국부 재발을 한다. 진단시의 10%의 환자들은 원격전이 발견 된다. 대부분의 재발성 또는 전이성 질병은 단일 항암요법, 병합 항암요법 또는 표적치료를 받게 된다.

[0003] 상피 성장인자 수용체(EGFR)은 편평세포 두경부암에서 과발현이 자주 확인 되며, 나쁜 예후와 관련성이 알려져 있다. 다른 여러 연구들에 의해서 EGFR 활성 신호 전달체계와 종양 생존의 관계는 잘 알려져 있다.

[0004] 표적 치료제인 EGFR 억제제는 크게 단클론 항체와 소분자 EGFR 티로신 키나아제 (tyrosine kinase) 억제제로 나뉜다. 단클론 항체인 erbitux®(Cetuximab)는 US FDA 승인하에 전이성 두경부암의 치료제로 광범위하게 사용중에 있으며, 소분자 EGFR 티로신 키나아제 (tyrosine kinase) 억제제인 제피티닙(gefitinib), 에를로티닙(erlotinib), 다코니티닙(dacomitinib), 아파티닙(afatinib)은 현재 전이성 두경부암과 국소 진행성 두경부암 환자를 대상으로 임상 연구 중에 있다.

[0005] EGFR 표적 항체 치료제 중 특히 세특시맵(Cetuximab)은 편평세포 두경부암에서 임상적 항암효과를 보여 주었다. 일차약제로 5FU 및 백금제에 세특시맵을 추가하였을 때 중앙 전체 생존값이 10.1개월로 5FU 및 백금제제만 사용하였을 때 7.4개월에 비해서 향상 되었다.

[0006] 그러나, EGFR가 두경부암의 중요한 치료적 타겟으로 알려져 있음에도 일반적인 약제 반응률은 10~15%로 알려져 있으며 이는 폐암에서 EGFR 표적치료제의 효과가 60~70% 인 것에 비해 현저히 낮은 수치이다. 그 이유는 어느 환자 군에서 약제 반응이 좋은지 알려져 있지 않기 때문인데, 따라서 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 효과를 극대화 할 수 있는 환자군을 선별하는 바이오마커의 발굴이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 EGFR 티로신 키나아제 억제제의 암 치료 효과에 대한 예후 예측 마커를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 두경부암 환자의 종양 조직에서 유전자 발현을 측정하여 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 약제 반응군과 약제 비반응군간에 차이가 나는 유전자군을 발굴하고자 하였다.

[0009] 그 결과, 본 발명에서는 IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및/또는 PTGS2의 유전자 발현이 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 약제 비반응군에서 높게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서, 예후 예측의 대상이 되는 환자의 치료에서 상기 유전자 또는 단백질 발현 수준이 높은 경우에는 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후가 불량한 것으로 예측하고, 이를 환자의 암 예후 진단 또는 항암제의 선택을 위한 정보로 활용할 수 있다.

- [0010] 이에, 본 발명은
- [0011] 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0012] 상기 유전자 또는 단백질 발현 수준을 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 약제 반응군에서의 유전자 또는 단백질 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- [0013] 상기 유전자 또는 단백질 발현 수준이 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 약제 반응군에서의 유전자 또는 단백질 발현 수준에 비해 높은 경우 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후가 불량한 것으로 판단하는 단계를 포함하는
- [0014] EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후를 예측하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명에 있어서, “약제 반응군”은 약제에 대한 무진행생존기간 (Progression-free survival)이 특정 기간 이상인 환자를 의미하며, 무진행생존기간이 상기 기간 미만인 환자를 “약제 비반응군”이라 일컫는다. 약제 반응군과 약제 비반응군을 나누는 기간은 약제의 종류, 질환의 중증도 및 상태 등에 따라 달라질 수 있으나, 예를 들어, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 등의 기간을 두고 약제 반응군과 약제 비반응군을 나눌 수 있을 것이다. 본 발명의 일 실시예에서는 무진행생존기간에 대해 4개월 전후로 약제 반응군과 약제 비반응군을 나누었다.
- [0016] 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 약제 반응군과 비교할 때 높다고 판단하는 것은 약제 반응군에서의 평균 발현량 등과 비교하여 통계적 분석이 유의할 만큼 높은 경우를 의미한다.
- [0017] 본 발명에 있어서, IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2 중 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준이 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 약제 반응군에서의 유전자 또는 단백질 발현 수준에 비해 높은 경우 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 대한 약제 내성을 나타낼 가능성이 높으며, 이로써 암 치료의 예후가 불량한 것으로 예측할 수 있다. 하기 실시예에서는 암 환자의 종양 조직을 시료를 사용하여 이들의 유전자 수준을 비교하였으나, 이들 바이오마커의 경우 혈액 내에서도 검출가능하기 때문에 단백질 수준의 비교 또한 가능하다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료는 암 환자의 종양 조직, 이로부터 분리된 세포 또는 핵산; 혈액, 혈청, 혈장 또는 이로부터 분리된 단백질 등을 포함한다.
- [0019] 상기 방법에서 유전자 또는 단백질의 발현 수준 측정하는 방법은 공지 기술을 이용하여 생물학적 시료로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다. 상기 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, 유전자의 발현 수준의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press (2001)), 노던블롯팅(Peter B. Kaufma et al., Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press (2001)) 또는 인 시투(in situ) 혼성화 반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press (2001))을 이용하여 실시할 수 있다.
- [0020] 예를 들어, RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시료를 처리한 세포에서 총 RNA를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 단일가닥 cDNA를 제조한다. 이어, 단일가닥 cDNA를 주형으로 이용하고, 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 유전자의 발현량 변화를 측정할 수 있다.
- [0021] 또한, 단백질 발현 수준은 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 측정할 수 있다. 예를 들어, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gastra, W., Enzymelinked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 에 기재되어 있다. 본 발명에 있어서, 상기 암은 두경부암, 특히 편평상피 두경부암일 수 있다.
- [0022] 한편, 상기 EGFR 티로신 키나아제 억제제는 제피티닙(gefitinib), 에를로티닙(erlotinib), 다코니티닙(dacomitinib) 및 아파티닙(afatinib)으로부터 선택되는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, IL6, IL8, PLA2G2A, PTGS2 등의 염증유발성 사이토카인의 유전자 발현 수준으로 다코니티닙에 의한 암 치료의 예후를 예측

할 수 있음을 보였으나, EGFR 티로신 키나아제 억제제의 종류가 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0023] 본 발명은 또한 IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 조성물은 상기 유전자들의 발현 수준을 확인함으로써 암 치료의 예후 예측을 하는데 사용되는 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 상기 유전자에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하게 된다.
- [0025] 용어 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화 할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일쇄이며, 올리고 디옥시리보뉴클레오타이드이다.
- [0026] 용어 “프라이머”는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.
- [0027] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화 되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0028] 본 발명은 또한 IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0029] 상기 조성물은 상기 단백질들의 발현 수준을 확인함으로써 암 치료의 예후 예측을 하는데 사용되는 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 상기 단백질들에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 포함하게 된다.
- [0030] 상기 단백질들에 대해 특이적인 항체로는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간항체 및 인간화 항체를 사용할 수 있다. 상기 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체(Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)); 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체 등이 포함된다.
- [0031] 폴리클로날 항체의 제조방법은 당업자에게 공지되어 있다. 폴리클로날 항체는 포유동물에 1회 이상 면역화제를 주입, 필요한 경우 면역보강제와 함께 주입하여 제조할 수 있다. 통상, 면역화제 및(또는) 면역보강제는 포유동물에 피하주사 또는 복강내 주사로 수 회 주입된다. 항체는 문헌(Kohler et al., Nature, 256:495 (1975))에 기재된 하이브리도마 방법으로 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국특허 제4,816,576호 참조)으로 제조할 수 있다.
- [0032] 모노클로날 항체는 또한 예를 들어, 문헌(Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al., J.Mol.Biol., 222:581-597(1991))에 기재된 기술을 이용하여 파지항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 본 발명에서의 모노클로날 항체는 구체적으로, 목적하는 활성을 발휘한다면 중쇄 및(또는) 경쇄의 일부분이 특정 종으로부터 유래된 항체 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이 있지만, 쇠(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래된 항체 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 또는 그러한 항체의 단편과 동일하거나 상동성이 있는 "키메라" 항체를 포함한다(Morrison et al., Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA, 81:6851-6855(1984)).
- [0033] 본 발명에 따른 암 치료의 예후 예측용 조성물은 키트의 형태로 포함될 수 있다.
- [0034] 상기 키트는 IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준 또는 단백질의 양을 측정할 수 있는 프로브, 프라이머 또는 항체를 포함할 수 있고,

이들의 정의는 상술한 바와 같다.

- [0035] 상기 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합효소 보조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 상기 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 암 치료의 예후 예측용 조성물은 마이크로어레이의 형태로 포함될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 프로브, 프라이머, 또는 항체는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.
- [0038] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지될 수 있고, 마이크로어레이 상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명에 따르면 IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준을 측정함으로써 EGFR 티로신 키나아제 억제제에 의한 암 치료의 예후를 예측할 수 있게 되므로 환자를 치료하기 위한 약제 선택을 위해 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 무진행 생존기간(progression free survival, PFS) 4개월을 기준으로 약제 반응군 (S, 붉은색)과 비반응군 (R, 하늘색) 사이에서 염증유발성 사이토카인에 해당하는 유전자 발현 값을 나타낸 것이다. (IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2)

도 2는 무진행 생존기간 4개월을 기준으로 약제 반응군 (S, 붉은색)과 비반응군 (R, 하늘색) 사이에서 염증유발성 사이토카인에 해당하는 유전자 발현을 heatmap 형태로 도식화 한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 두경부암에서 EGFR 티로신 키나아제 억제제의 사용에 따른 치료적 예후와 관련된 마커를 발견하기 위해 본 발명자들은 여러 유전자의 발현을 나노스트링(NanoString®) 방법을 적용하여 수행하였다.
- [0042] 본 연구에서는 EGFR 티로신 키나아제 억제제인 다코미티닙(dacomitinib)을 투여받은 48명의 재발성/전이성 편평상피 두경부암 환자를 대상으로 하여 진행하였다. 이들은 3.9 개월의 무질병 생존기간(PFS)와 8.2 개월의 생존기간(overall survival, OS)을 보였으며, 이중 유전자 발현 분석이 가능한 환자의 종양 조직의 수는 12개였다. 본 연구에서는 도 1 및 2의 데이터는 무질병생존기간이 4개월 이상인 경우를 약제 반응군, 4개월 미만인 경우를 약제 비반응군으로 나눠 분석하였으나, 실험 당시 실험자는 임상데이터에 대해서는 모르는 상태로 실험을 진행하였다.
- [0043] (종양 조직에서 mRNA의 추출)

[0044] 유전자 발현 분석을 위해 상기 12개의 중앙 조직에서 mRNA를 추출하였다. 정량적인 분석으로 농도를 측정하며 정성적인 분석으로 bioanalyzer를 이용하여 mRNA의 분절화(fragmentation) 정도를 측정하여 정성, 정량적 분석이 모두 통과된 시료로 유전자 발현을 측정하였다.

[0045] (나노스트링을 이용한 유전자 발현 측정 및 분석)

[0046] 나노스트링(NanoString® Technologies, <http://www.nanostring.com/>)은 2008년 네이처 바이오테크 (Nat Biotechnol. 2008 Mar;26(3): 317-25)에 소개된 기술로서, 극소량의 RNA로도 유전자 발현을 정량적으로 측정할 수 있는 기술이다.

[0047] 먼저 시료 조직에서 추출된 mRNA와 캡처 프로브(capture probe)를 혼성화시키고, 혼성화된 mRNA-캡처 프로브 분자만을 선별하여 이를 데이터 분석기에 삽입한 후 유전자 발현값을 정량적으로 측정하였다. 캡처 프로브의 말단에는 6개의 형광물질이 부착되어 있어 이들의 조합으로 원하는 유전자의 발현값을 정량적으로 측정할 수 있다.

[0048] (유전자 발현의 분석)

[0049] 나노스트링(NanoString®) 방법을 통해 유전자 발현을 측정한 결과, 하기 표 1과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

표 1

[0050]

	비반응군 1	비반응군 2	비반응군 3	비반응군 4	비반응군 5	비반응군 6	비반응군 7	반응군 1	반응군 2	반응군 3	반응군 4	반응군 5
IL1A	98.29	262.74	196.34	140.79	101.49	101.3	22.56	12.13	6.75	71.21	69.02	9.09
TNF	33.46	62.2	100.69	70.83	82.09	82.3	75.21	20.04	28.35	44.15	113.38	25.67
IL8	707.38	1677.26	503.45	197.8	252.23	373.53	185.01	93.86	93.17	158.09	36.97	48.66
IL6	417.21	146.92	105.72	2.59	5.97	56.98	73.7	1.05	2.03	52.7	2.46	2.67
PTGS2	241.02	4512.73	213.96	70.83	123.88	322.88	189.53	11.07	14.85	266.33	27.11	8.02
MMP3	151.62	229.5	178.72	109.7	122.38	240.58	43.62	7.38	8.78	121.06	39.44	13.9
PLA2G2A	1326.39	561.95	244.17	99.33	594	645.76	2451.8	45.35	15.53	431.54	69.02	96.79

[0051] 표 1은 유전자 발현값을 0 내지 5000까지의 양의 값을 갖도록 표시한 것으로 값이 높을수록 발현이 높음을 나타낸다.

[0052] 이를 [도 1] 및 [도 2]로 도식화하여 데이터를 분석한 결과, [도 1]에 도식화된 것처럼 IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2 와 같은 유전자 발현이 약제 반응군(무질병 기간 4개월 이상)와 약제 비반응군 (무질병 기간 4개월 미만)에서 차이가 났음을 확인할 수 있었다.

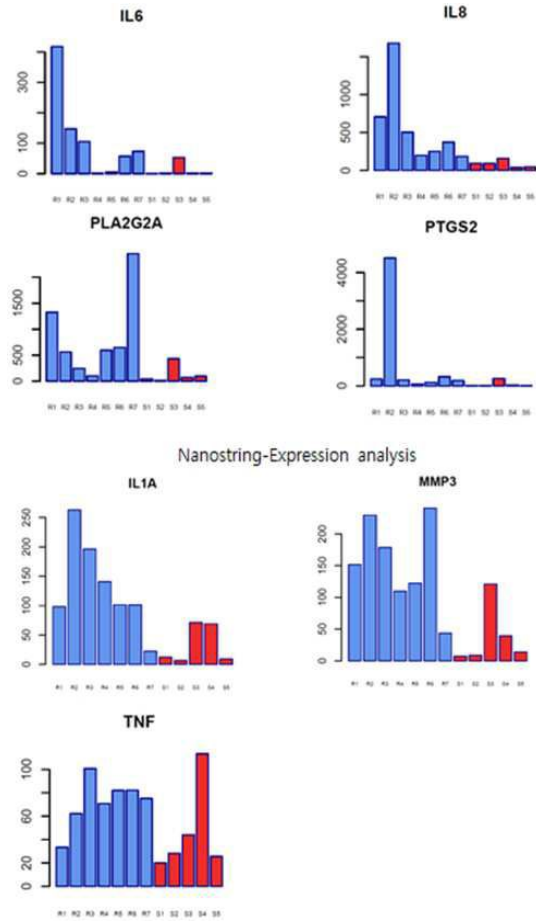
[0053] 이를 하나의 그림으로 보기 위해 [도 2]의 heatmap으로 표시한 결과 IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF, MMP3 및 PTGS2의 유전자 발현이 다코네티닙에 대한 비반응군에서 높게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다.

[0054] 특히 IL6, IL8, PLA2G2A, IL1A, TNF 및 PTGS2는 염증유발성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)으로서 본 연구에서는 약제 저항성과 염증유발성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)간의 상관성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0055] 염증유발성 사이토카인 (proinflammatory cytokine)은 종양 형성, 성장과 전이에 영향을 미친다고 보고된 바 있으나(Klampfer L. Cytokines, inflammation and colon cancer. Current Cancer Drug Targets. 2011, 11, 451-464.), 현재까지 중앙 주변부 또는 혈청내의 염증유발성 사이토카인의 증가가 EGFR 억제제의 항암 효능과 관련 된다는 보고는 없었다. 본 연구를 통해 중앙 주변부 또는 혈청내 염증유발성 사이토카인의 증가는 항암제에 대한 저항성을 증가시킬 수 있음이 확인되었다. 이는 염증유발성 사이토카인의 증가가 중앙 세포의 생존 시그널을 강화하고 세포 고사 시그널을 약화시키는 것에 근거하는 것으로 보인다. 따라서, 염증유발성 사이토카인의 발현 증가는 EGFR 억제제의 항암 효능을 예측하는 유용한 바이오마커로 활용될 수 있다.

도면

도면1



도면2

