



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0047727
(43) 공개일자 2023년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/57419 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0130909
(22) 출원일자 2021년10월01일
심사청구일자 2021년10월01일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김태원
경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 603동 2605호(정자동, 파크뷰)
김형돈
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 113동 1603호(신천동, 파크리오)
김선영
서울특별시 송파구 올림픽로 99, 잠실엘스아파트 127동 603호
(74) 대리인
이명진

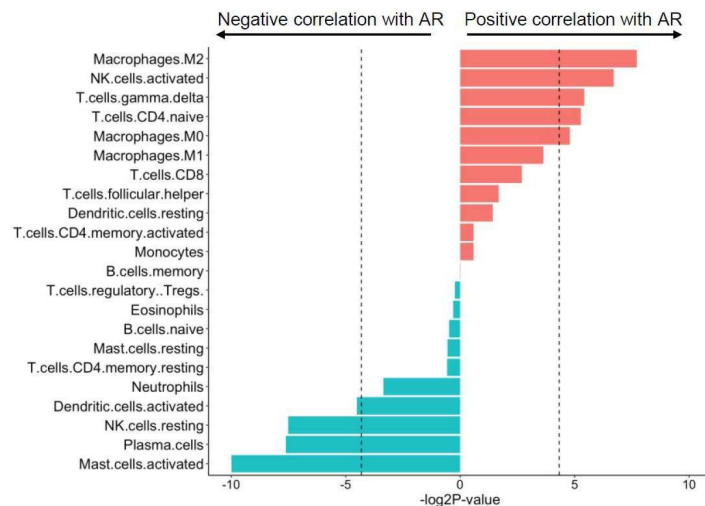
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 대장암 환자에서 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 관련 유전자 마커 및 이를 이용한 내성 획득의 예측 방법

(57) 요약

본 발명은 대장암 환자에서 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 관련 유전자 마커 및 이를 이용한 내성 획득의 예측 방법 등에 관한 것으로, 본 발명자들은 M2 대식세포; 또는 M2 대식세포와 관련된 상위 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 이용하여 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득을 진단하거나, 발병 위험성을 예측할 수 있음을 확인하였다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711082381
과제번호	2017M3A9B6061825
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	차세대응용오믹스사업
연구과제명	종적 대장암 임상·오믹스 정보 확보, 항암 신약 타겟 발굴 및 다기관 검증
기 여 율	80/100
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2017.06.30 ~ 2022.06.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465033623
과제번호	HR18C0016020021
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성(R&D)
연구과제명	암 정밀의료 SMART Cancer Care-Bot 플랫폼 기반 소통형 의료기기 개발
기 여 율	20/100
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2018.07.26 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

M2 대식세포; 또는 M2 대식세포와 관련된 하기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 바이오마커 조성물:

번호	M2 대식세포와 관련된 유전자
1	CYP4A22 (Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member 22)
2	FGA (fibrinogen alpha chain)
3	AL583836.1
4	FGG (fibrinogen gamma chain)
5	TTR (transthyretin)
6	HEPACAM (hepatic and glial cell adhesion molecule)
7	FGB (fibrinogen beta chain)
8	APOB (apolipoprotein B)
9	HPD (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)
10	ORM1 (orosomucoid 1)
11	GOLGA6A (golgin A6 family member A)
12	GNMT (glycine N-methyltransferase)
13	SNX29P2 (sorting nexin 29 pseudogene 2)
14	HP (haptoglobin)
15	SERPINA4 (serpin family A member 4)
16	UGT2B4 (UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4)
17	HPN (hepsin)
18	GOLGA6B (golgin A6 family member B)
19	CDH23 (cadherin related 23)
20	AMBP (alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)

청구항 2

M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 물질; 또는 M2 대식세포와 관련된 하기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질을 검출하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 조성물.

번호	M2 대식세포와 관련된 유전자
1	CYP4A22 (Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member 22)
2	FGA (fibrinogen alpha chain)
3	AL583836.1
4	FGG (fibrinogen gamma chain)
5	TTR (transthyretin)
6	HEPACAM (hepatic and glial cell adhesion molecule)
7	FGB (fibrinogen beta chain)
8	APOB (apolipoprotein B)
9	HPD (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)
10	ORM1 (orosomucoid 1)
11	GOLGA6A (golgin A6 family member A)
12	GNMT (glycine N-methyltransferase)
13	SNX29P2 (sorting nexin 29 pseudogene 2)
14	HP (haptoglobin)
15	SERPINA4 (serpin family A member 4)
16	UGT2B4 (UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4)
17	HPN (hepsin)
18	GOLGA6B (golgin A6 family member B)
19	CDH23 (cadherin related 23)
20	AMBP (alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 물질은 프라이머, 프로브, 압타머, 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 EGFR-표적제제는 세툽시맙(cetuximab), 게피티닙(gefitinib), 엘로티닙(erlotinib), 파니투무맙(panitumumab), PKI-166, EKB-569, HKI-272(WAY-177820), 이코티닙(icotinib), 브리가티닙(brigatinib), 아파티닙(afatinib), 라파티닙(lapatinib), 카네르티닙(canertinib), AEE788, XL647, 및 작티마(Zactima)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 조성물은 암 조직을 시료로 하는 것을 특징으로 하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 전이성 대장암은 KRAS 야생형 전이성 대장암인 것을 특징으로 하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 조성물.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 전이성 대장암 환자는 완전관해, 부분관해, 안정 병변 및 병의 진행으로 이루어진 군으로부터 선택된 상태인 것을 특징으로 하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 조성물.

청구항 8

제2항에 있어서,

상기 M2 대식세포는 $CD68^{+}CD206^{+}$ M2 대식세포 또는 PD-L1 양성인 것을 특징으로 하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 조성물.

청구항 9

제2항의 조성물을 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 키트.

청구항 10

피검체로부터 채취한 시료에서

M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 단계; 또는 M2 대식세포와 관련된 하기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단을 위한 정보제공방법.

번호	M2 대식세포와 관련된 유전자
1	CYP4A22 (Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member 22)
2	FGA (fibrinogen alpha chain)
3	AL583836.1
4	FGG (fibrinogen gamma chain)
5	TTR (transthyretin)
6	HEPACAM (hepatic and glial cell adhesion molecule)
7	FGB (fibrinogen beta chain)
8	APOB (apolipoprotein B)
9	HPD (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)
10	ORM1 (orosomucoid 1)
11	GOLGA6A (golgin A6 family member A)
12	GNMT (glycine N-methyltransferase)
13	SNX29P2 (sorting nexin 29 pseudogene 2)
14	HP (haptoglobin)
15	SERPINA4 (serpin family A member 4)
16	UGT2B4 (UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4)
17	HPN (hepsin)
18	GOLGA6B (golgin A6 family member B)
19	CDH23 (cadherin related 23)
20	AMBP (alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 M2 대식세포가 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우; 또는

상기 M2 대식세포와 관련된 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우, EGFR-표적제에 대한 내성을 획득한 것으로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 12

피검체로부터 채취한 시료에서,

M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 단계; 또는 M2 대식세포와 관련된 하기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성의 발병 위험성 예측을 위한 정보제공방법.

번호	M2 대식세포와 관련된 유전자
1	CYP4A22 (Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member 22)
2	FGA (fibrinogen alpha chain)
3	AL583836.1
4	FGG (fibrinogen gamma chain)
5	TTR (transthyretin)
6	HEPACAM (hepatic and glial cell adhesion molecule)
7	FGB (fibrinogen beta chain)
8	APOB (apolipoprotein B)
9	HPD (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)
10	ORM1 (orosomucoid 1)
11	GOLGA6A (golgin A6 family member A)
12	GNMT (glycine N-methyltransferase)
13	SNX29P2 (sorting nexin 29 pseudogene 2)
14	HP (haptoglobin)
15	SERPINA4 (serpin family A member 4)
16	UGT2B4 (UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4)
17	HPN (hepsin)
18	GOLGA6B (golgin A6 family member B)
19	CDH23 (cadherin related 23)
20	AMBP (alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 M2 대식세포가 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우; 또는

상기 M2 대식세포와 관련된 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우, EGFR-표적제에 대한 내성 위험이 높은 것으로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성의 발병 위험성 예측을 위한 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대장암 환자에서 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 관련 유전자 마커 및 이를 이용한 내성 획득의 예측 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 대장암(CRC)은 대한민국에서 3번째로 흔한 암이며, 암 관련 사망의 2번째 주요 원인으로 연간 약 180만 건의 신규 사례와 900,000명의 사망을 차지한다. CRC 환자의 약 1/3은 궁극적으로 전이성 질환으로 진행하고, 전이성 CRC 환자의 5년 생존율은 12%에 불과하다. 임상 결과를 개선하기 위한 다양한 노력에도 불구하고 전이성 CRC 환자에 대해 더 나은 효능을 가진 새로운 치료 전략의 개발이 시급한 실정이다.
- [0004] 세툽시맵(cetuximab) 및 파니투무맵(panitumumab)과 같은 항-표피성장인자수용체(EGFR) 요법은 RAS 야생형 전이성 CRC 환자를 위한 분자 표적 치료에 주로 이용되어 왔다. 이들 제제는 수용체 티로신 키나제를 억제하여 세포 생존, 증식, 전이 및 혈관신생에 관련된 다중 다운스트림 신호 전달 경로를 차단한다. 그러나 대부분의 환자는 궁극적으로 항-EGFR 기반 치료에 내성을 갖게 된다. 2차 유전적 이상 및 혈관신생 경로의 변형과 같은 여러 과정이 내성 획득(AR)의 메커니즘으로 제시되었으나, 임상적 맥락에서 내성을 극복하기 위한 임상적 이점을 제공하는 치료적 접근에 대해서는 아직 입증된 바 없었다. 세툽시맵(Cetuximab)은 재조합 항-EGFR 인간/마우스 키메라 모노클로날 항체(MoAb)로, 항체-의존성 세포 독성, 및 화학요법과 방사선요법에 대해 종양 세포를 민감화시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 이점을 가져, 단독 요법 또는 화학요법 및/또는 방사선요법과의 병행 요법으로써 세툽시맵을 이용하는 임상적 이점이 두부암 및 전이성 결장암에서 증명된 바 있다.
- [0005] 이처럼 많은 항암제들이 효과적인 치료제로 사용되고 있지만 새롭게 대두되고 있는 문제점은 항암제에 대한 암 세포의 내성(resistance)이다. 항암제에 대한 내성은 장기적인 항암제 사용으로 약물 노출된 세포들이 약물의 세포 내 축적을 감소시키거나, 해독 작용 또는 배출을 활성화하거나, 표적이 되는 단백질을 변형시키는 등의 여러 기전을 통하여 일어나게 된다. 이러한 과정은 암 치료에 가장 큰 장애 요소일 뿐만 아니라 치료의 실패와도 깊은 관련이 있다.
- [0006] 따라서 적합한 내성 획득 마커를 이용하여, 적절한 치료 대상의 선별은 항암제 치료의 획기적인 진보를 위한 필수적인 관문이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) 대한내과학회지: 제 77 권 제 1 호 2009, 진행성 대장암의 맞춤 항암요법의 최신지견

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이에, 본 발명자들은 EGFR-표적제제인 세툽시맵에 대해 내성 획득을 나타내는 전이성 대장암 환자의 종양 조직 시료에서 유의한 상위 유전자를 선별하고, 전이성 대장암 환자의 치료 전후에 M2 대식세포의 발현이 유의하게 차이를 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 M2 대식세포; 또는 M2 대식세포와 관련된 하기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

번호	M2 대식세포와 관련된 유전자
1	CYP4A22 (Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member 22)
2	FGA (fibrinogen alpha chain)
3	AL583836.1
4	FGG (fibrinogen gamma chain)
5	TTR (transthyretin)
6	HEPACAM (hepatic and glial cell adhesion molecule)
7	FGB (fibrinogen beta chain)
8	APOB (apolipoprotein B)
9	HPD (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)
10	ORM1 (orosomucoid 1)
11	GOLGA6A (golgin A6 family member A)
12	GNMT (glycine N-methyltransferase)
13	SNX29P2 (sorting nexin 29 pseudogene 2)
14	HP (haptoglobin)
15	SERPINA4 (serpin family A member 4)
16	UGT2B4 (UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4)
17	HPN (hepsin)
18	GOLGA6B (golgin A6 family member B)
19	CDH23 (cadherin related 23)
20	AMBP (alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)

[0011]

[0012]

본 발명의 다른 목적은 M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 물질; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질을 검출하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0014]

본 발명의 또 다른 목적은 피검체로부터 채취한 시료에서

[0015]

M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 단계; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0016]

본 발명의 또 다른 목적은 피검체로부터 채취한 시료에서,

[0017]

M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 단계; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성의 발병 위험성 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0018]

그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명자들은 전이성 대장암 환자의 종양 조직 표본에 대해, RNA 시퀀싱 분석 및 다중 면역조직화학 분석법을 이용하여 세특시맵과 같은 EGFR-표적제제의 내성 획득과 상관관계가 있는 유전자 및 면역 기전을 확인하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0021] 따라서, 본 발명은 M2 대식세포; 또는 M2 대식세포와 관련된 하기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

번호	M2 대식세포와 관련된 유전자
1	CYP4A22 (Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member 22)
2	FGA (fibrinogen alpha chain)
3	AL583836.1
4	FGG (fibrinogen gamma chain)
5	TTR (transthyretin)
6	HEPACAM (hepatic and glial cell adhesion molecule)
7	FGB (fibrinogen beta chain)
8	APOB (apolipoprotein B)
9	HPD (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)
10	ORM1 (orosomucoid 1)
11	GOLGA6A (golgin A6 family member A)
12	GNMT (glycine N-methyltransferase)
13	SNX29P2 (sorting nexin 29 pseudogene 2)
14	HP (haptoglobin)
15	SERPINA4 (serpin family A member 4)
16	UGT2B4 (UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4)
17	HPN (hepsin)
18	GOLGA6B (golgin A6 family member B)
19	CDH23 (cadherin related 23)
20	AMBP (alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)

[0022]

[0023] 또한, 본 발명은 M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 물질; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질을 검출하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 조성물을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 키트를 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 피검체로부터 채취한 시료에서

- [0026] M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 단계; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 피검체로부터 채취한 시료에서,
- [0028] M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 단계; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성의 발병 위험성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 물질은 프라이머, 프로브, 압타머, 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 EGFR-표적제제는 세툽시맙(cetuximab), 게피티닙(gefitinib), 엘로티닙(erlotinib), 파니투무맙(panitumumab), PKI-166, EKB-569, HKI-272(WAY-177820), 이코티닙(icotinib), 브리가티닙(brigatinib), 아파티닙(afatinib), 라파티닙(lapatinib), 카네르티닙(canertinib), AEE788, XL647, 및 작티마(Zactima)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 암 조직을 시료로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 전이성 대장암은 KRAS 야생형 전이성 대장암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 전이성 대장암 환자는 완전관해, 부분관해, 안정 병변 및 병의 진행으로 이루어진 군으로부터 선택된 상태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 M2 대식세포는 $CD68^{+}CD206^{+}$ M2 대식세포 또는 PD-L1 양성일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 진단을 위한 정보제공방법은 상기 M2 대식세포가 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우; 또는
- [0036] 상기 M2 대식세포와 관련된 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우, EGFR-표적제에 대한 내성을 획득한 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 발병 위험성 예측을 위한 정보제공방법은 상기 M2 대식세포가 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우; 또는
- [0038] 상기 M2 대식세포와 관련된 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우, EGFR-표적제에 대한 내성 위험이 높은 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 또한, 본 발명은 M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 단계; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질을 검출하는 물질의 대장암 진단 또는 발병 위험성 예측용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0040] 또한, 본 발명은 M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 물질; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질을 검출하는 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물의 대장암 진단 또는 발병 위험성 예측 용도를 제공한다.
- [0041] 또한, 본 발명은 피검체로부터 채취한 시료에서
- [0042] M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 단계; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0044]

본 발명자들은 EGFR-표적제제인 세특시맵에 대해 획득 내성을 나타내는 전이성 대장암 환자의 종양 조직 시료에서 유의한 상위 유전자를 선별하였다. 뿐만 아니라, 본 발명자들은 전이성 대장암 환자의 치료 전후에 M2 대식세포의 발현이 유의하게 차이를 나타냄을 확인하였는 바, 본 발명에서 신규하게 발굴된 유전자 마커 및 M2 대식세포 마커를 이용하여, 이들의 발현 패턴을 확인함으로써 전이성 대장암 환자에서 EGFR-표적제제에 대한 획득 내성을 나타내는지 진단, 또는 발병 위험성을 예측하는 데에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0046]

도 1a 내지 도 1d는 내성 획득의 유전자 마커를 나타낸 것으로, 도 1a는 연구의 전반적인 계획, 도 1b는 내성 획득이 발생한 환자의 치료 전 및 치료 후 종양 샘플 사이에서 차등적으로 발현된 유전자의 히트맵(n=6쌍), 도 1c는 전체 코호트 및 치료 후 샘플에서 내성 획득 유전자의 풍부도 분석 결과, 및 도 1d는 내성 획득 유전자 마커의 유전자 온톨로지 경로를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2a 내지 도 2b는 내성 획득 유전자 마커의 발현 수준과 M2 대식세포 관련 매개 변수 간의 상관 관계를 나타낸 것으로, 도 2a는 GSVA(Gene Set Variation Analysis) 결과 계산된 농축 점수로 표시되는 내성 획득 마커의 발현 수준 및 CIBERSORT에 의해 추정된 면역 하위 집단의 풍부도 간의 상관 관계를 나타내는 막대 그래프를 나타낸 것이다. 도 2b는 연구 코호트(상단 패널) 및 TCGA 코호트(하단 패널)에서 내성 획득 유전자 마커 및 종양 관련 대식 세포와 M2 대식세포 마커의 발현 수준간의 상관관계를 나타낸 것이다.

도 3a 내지 도 3b는 면역 디콘볼루션에 의해 추정된 M2 대식세포의 풍부도를 비교한 결과로, 도 3a는 전체 코호트에서 치료 전 vs. 치료 후 종양 간의 M2 대식세포의 풍부도를, 도 3b는 부분관해 또는 안정 병변 상태를 갖는 종양 vs. 병의 진행 상태를 갖는 종양 간의 M2 대식세포의 풍부도를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 4a 내지 도 4e는 다양한 임상 설정에 따른 M2 대식세포 밀도의 동적 변화를 나타낸 것으로, 도 4a는 병의 진행 상태(PD) 환자의 치료 전 및 치료 후 종양 사이의 CD68, CD206 및 PD-L1의 동적 변화를 나타내는 다중면역조직화학 결과, 도 4b는 $CD68^{+}CD206^{+}$ M2 대식세포의 밀도 동적 변화, 도 4c는 $PD-L1^{+}CD68^{+}CD206^{+}$ M2 대식세포의 밀도 동적 변화, 도 4d는 $CD68^{+}CD206^{-}$ M1 대식세포의 밀도 동적 변화, 및 도 4e는 $PD-L1^{+}CD68^{+}CD206^{-}$ M1 대식세포의 밀도 동적변화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047]

본 발명의 일 실시예에서는 전이성 대장암 환자에 세특시맵 치료 전후에 종양조직에서 유의한 차이를 나타내는 상위 20개 유전자를 선별하였다(실시예 2 참조).

[0048]

본 발명의 다른 실시예에서는 실시예 2에서 선별된 상위 마커가 M2 대식세포와 유의한 상관관계를 나타냄을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0049]

본 발명의 또 다른 실시예에서는 진행 상태의 종양에서, 부분관해/안정 병변 상태의 종양과 비교하여 M2 대식세포의 풍부도가 유의하게 높음을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0050]

본 발명의 또 다른 실시예에서는 $CD68^{+}CD206^{+}$ M2 대식세포 또는 PD-L1을 발현하는 M2 대식세포의 밀도가 진행성 종양에서 유의하게 증가하는 반면, PR/SD의 종양 샘플에서는 그렇지 않음을 확인하였다(실시예 5 참조).

[0051]

따라서, 본 발명자들은 M2 대식세포; 또는 M2 대식세포와 관련된 하기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 바이오마커 조성물을 완성하게 되었다.

번호	M2 대식세포와 관련된 유전자
1	CYP4A22 (Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member 22)
2	FGA (fibrinogen alpha chain)
3	AL583836.1
4	FGG (fibrinogen gamma chain)
5	TTR (transthyretin)
6	HEPACAM (hepatic and glial cell adhesion molecule)
7	FGB (fibrinogen beta chain)
8	APOB (apolipoprotein B)
9	HPD (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)
10	ORM1 (orosomucoid 1)
11	GOLGA6A (golgin A6 family member A)
12	GNMT (glycine N-methyltransferase)
13	SNX29P2 (sorting nexin 29 pseudogene 2)
14	HP (haptoglobin)
15	SERPINA4 (serpin family A member 4)
16	UGT2B4 (UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4)
17	HPN (hepsin)
18	GOLGA6B (golgin A6 family member B)
19	CDH23 (cadherin related 23)
20	AMBP (alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)

[0052]

[0053]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0054]

본 발명의 일 양태로서, 본 발명은 M2 대식세포; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군 으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내 성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0055]

본 발명에 있어서, “대장암”이란 결장과 직장에 생기는 악성 종양을 말하며, 다른 암들에 비해 상대적으로 예후가 좋기 때문에 유병률은 유방암에 이어 세계적으로 두 번째로 높는데, 과거 5년 이내에 대장암으로 진단되 어 생존하고 있는 사람이 약 240만 명으로 추정된다. 대장암 예후는 초기(1기) 환자의 경우 5년 생존율이 90% 이상인데 반해 전이된(4기) 환자의 5년 생존율은 5%에 불과하다. 대장암의 경우 제거할 수 있는 전암성 병변이 나 치료할 수 있는 초기단계 암으로부터 발달이 느리기 때문에 대장암 스크리닝은 이 질병의 발생률과 사망률을 줄일 수 있는 가능성이 있다.

[0056]

본 발명에 있어서, “전이”란 어떤 종양이 그 원발 부위에서 여러 경로를 따라 다른 신체의 부위에 이식되어 그곳에 정착 및 증식하는 상태를 말한다. 암의 전이여부는 해당 암의 고유의 특성에 의하여 결정될 뿐만 아니라 암의 예후 결정에 있어서 가장 중요한 단서가 되는 사건이므로, 암 환자의 생존과 관련된 가장 중요한 임상정보 로 다루어진다.

[0057]

본 발명에 있어서, “전이성 대장암”이란 전이의 성질을 가지는 대장암을 말한다. 대장암 환자의 약 15~25%는 진단 당시 이미 간 전이가 있으며, 이 중 80~90%의 경우는 진단 초기에 절제 불가능 한 간 전이가 있는 것으로

보고되고 있다.

- [0058] 본 발명에 있어서, “KRAS 야생형 전이성 대장암”이란 KRAS 변이가 없는 야생형을 나타내는 대장암으로서, HER2 과발현은 원위부암 특히 직장암, 그리고 KRAS 야생형을 가진 대장암의 4.3-5.4%에서, 전이성 대장암 환자의 약 40%가 KRAS-돌연변이 유전형을 보이는 것으로 확인되고 있다. 또한, 세특시맵과 파니투무맵은 상피세포성장인자수용체(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)에 대한 단클론항체이며, 이들의 효과는 KRAS 야생형(wild-type) 전이성 대장암에 국한되는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 있어서, 상기 전이성 대장암은 KRAS 야생형 전이성 대장암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명에 있어서, “EGFR-표적제제”란 항암제를 의미하며, 항암효과를 나타내는 한, 어떠한 EGFR-표적제제도 적용할 수 있으며, 예를 들어 세특시맵(cetuximab), 게피티닙(gefitinib), 엘로티닙(erlotinib), 파니투무맵(panitumumab), PKI-166, EKB-569, HKI-272(WAY-177820), 이코티닙(icotinib), 브리가티닙(brigatinib), 아파티닙(afatinib), 라파티닙(lapatinib), 카네르티닙(canertinib), AEE788, XL647, 및 작티마(Zactima)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명에 있어서, “바이오마커”란 정상이나 병적인 상태를 구분할 수 있거나 치료반응을 예측할 수 있고 객관적으로 측정이 가능한 표지자로서, “전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 바이오마커”란 전이성 대장암 환자의 생물학적 시료에서 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 여부를 구분하여 진단할 수 있는 세포, 단백질, DNA, RNA, 대사 물질 등을 의미한다.
- [0061] 본 발명에 있어서, “내성 획득(Acquisition resistance, AR)” 또는 “획득 내성”이란 어떤 약제에 대하여 저항이 약한 군이 돌연변이나 플라스미드 도입 등에 의해 내성을 갖게 되는 것으로, 자연 내성이 아닌, 외부 투여 약물, 항생제에 의해 내성이 획득되거나 발전되는 것을 의미한다.
- [0062] 본 발명에 있어서, “완전관해”란 종양에 대한 임상적 그리고 방사선학적 모든 증거가 소실되고, 이같은 상태가 4주 이상 지속되는 것을 의미한다.
- [0063] 본 발명에 있어서, “부분관해”란 대상병변 최대직경의 합이 적어도 치료 전 최대직경의 합보다 30%가 감소되고 4주 이상 지속되는 것을 의미한다.
- [0064] 본 발명에 있어서, “안정 병변”이란 병변이 부분관해에 해당되게 충분히 감소된 것도 아니고, 병의 진행에 해당되게 충분히 증가한 경우도 아닌 불변인 상태를 의미한다.
- [0065] 본 발명에 있어서, “병의 진행”이란 병변의 최대직경 합이 최소 20% 증가되었거나 하나 또는 그 이상의 새로운 병변이 나타난 경우를 의미한다.
- [0066] 본 발명에 있어서, “전이성 대장암 환자”란 EGFR-표적제제로 치료되는 환자로서, 구체적으로 KRAS 야생형 대장암에서 1차 항암 요법에서 세포독성 항암제와 함께 EGFR-표적제제로 치료되거나, 3차 이상의 요법에서 EGFR-표적제제 단독으로 치료되는 환자를 의미한다.
- [0067] 본 발명에 있어서, “M2 대식세포”란 대식세포 중에서 염증을 줄이고 조직 복구를 촉진하는 역할을 하는 세포를 의미한다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 상기 M2 대식세포는 $CD68^{+}CD206^{+}$ M2 대식세포 또는 PD-L1 양성일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 전이성 대장암 환자는 완전관해, 부분관해, 안정 병변 및 병의 진행으로 이루어진 군으로부터 선택된 상태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명에 있어서, “M2 대식세포 관련 유전자”는 M2 대식세포와 양의 상관관계에 있는 것을 특징으로 하며, 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 M2 대식세포 관련 유전자들에 대하여 면역 디콘볼루션을 수행한 결과, 여러 면역 세포 및 경로 중에서도 M2 대식세포와 가장 두드러진 양의 상관관계를 나타냄을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [0071] 본 발명에 있어서, CYP4A22(cytochrome P450 4A22, Gene ID: 284541) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001010969.4 또는 NM_001308102.2의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, CYP4A22 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001010969.2, NP_001295031.1, XP_005270824.1 또는 XP_005270827.1의 아미노산 서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0072] 본 발명에 있어서, FGA(fibrinogen alpha chain, Gene ID: 2243) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_000508.5, 또는 NM_021871.4의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, FGA 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_000499.1 또는 NP_068657.1의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0073] 본 발명에 있어서, FGG(fibrinogen gamma chain, Gene ID: 2266) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_000509.6 또는 NM_021870.3의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, FGG 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_000500.2 또는 NP_068656.2의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0074] 본 발명에 있어서, TTR(transthyretin, Gene ID: 7276) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_000371.4의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, TTR 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_000362.1의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0075] 본 발명에 있어서, HEPACAM(hepatic and glial cell adhesion molecule, Gene ID: 220296) 유전자는 NCBI Reference Sequence: XM_00571449.2의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, HEPACAM 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_005271506.1의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 본 발명에 있어서, FGB(fibrinogen beta chain, Gene ID: 2244) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001184741.1, NM_001382759.1, NM_001382760.1, NM_001382761.1, NM_001382762.1, NM_001382763.1, NM_001382764.1, NM_00138276.1, 또는 NM_005141.5의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, FGB 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001171670.1, NP_001369688.1, NP_001369689.1, NP_001369690.1, NP_001369691.1, NP_001369692.1, NP_001369693.1, NP_001369694.1, 또는 NP_005132.2의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 본 발명에 있어서, APOB(apolipoprotein B, Gene ID: 338) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_000384.1의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, APOB 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_000375.3의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0078] 본 발명에 있어서, HPD(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, Gene ID: 3242) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001171993.2 또는 NM_002150.3의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, HPD 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001165464.1 또는 NP_002141.2의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 본 발명에 있어서, ORM1(orosomucoid 1, Gene ID: 5004) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_000607.4의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, ORM1 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_000598.2의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0080] 본 발명에 있어서, GOLGA6A(golgin A6 family member A, Gene ID: 342096) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001038640.2의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, GOLGA6A 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001033729.2의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0081] 본 발명에 있어서, GNMT(glycine N-methyltransferase, Gene ID: 27232) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001318865.2 또는 NM_018960.6의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, GNMT 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001305794.1 또는 NP_061833.1의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0082] 본 발명에 있어서, SNX29P2(sorting nexin 29 pseudogene 2, Gene ID: 440352) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NR_002939.3의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 본 발명에 있어서, HP(haptoglobin, Gene ID: 3240) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001126102.3, NM_001318138.2, 또는 NM_005143.5의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, HP 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001119574.1, NP_001305067.1, 또는 NP_005134.1의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0084] 본 발명에 있어서, SERPINA4(serpin family A member 4, Gene ID: 5267) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001289032.2, NM_00128903.2, 또는 NM_006215.4의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며,

SERPINA4 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001275961.1, NP_001275962.1, 또는 NP_006206.2의 아미노산 서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0085] 본 발명에 있어서, UGT2B4(UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4, Gene ID: 7363) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001297615.2, NM_001297616.2, 또는 NM_021139.3의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, UGT2B4 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001284544.1, NP_001284545.1, 또는 NP_066962.2의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0086] 본 발명에 있어서, HPN(hepsin, Gene ID: 3249) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001375441.1, NM_001384133.1, NM_002151.3, 또는 NM_182983.3의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, HPN 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001362370.1, NP_001371062.1, NP_002142.1 또는 NP_892027.1의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0087] 본 발명에 있어서, GOLGA6B(golgin A6 family member B, Gene ID: 55889) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_018652.5의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, GOLGA6B 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_061122.4의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0088] 본 발명에 있어서, CDH23(cadherin related 23, Gene ID: 64072) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001171930.2, NM_001171931.2, NM_001171932.2, NM_0022124.6, 또는 NM_052836.4의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, CDH23 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001165401.1, NP_001165402.1, NP_001165404.1, NP_071407.4, 또는 NP443068.1의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0089] 본 발명에 있어서, AMBP(alpha-1-microglobulin/bikunin precursor, Gene ID: 259) 유전자는 NCBI Reference Sequence: NM_001633.4의 염기서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으며, AMBP 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001624.1의 아미노산서열을 포함하거나, 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0090] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 물질; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질을 검출하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 조성물을 제공한다.

[0091] 상기 단백질은 상기 M2 대식세포와 관련된 유전자에 의해 암호화되는 것일 수 있다.

[0092] 본 발명에 있어서, “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득 여부를 확인하는 것이다.

[0093] 본 발명에 있어서, “발병 위험”은 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제에 대한 내성 획득이 발병할 수 있는 상대적인 위험일 수 있다. 예를 들면, 상기 위험은 발병의 확률이 정상 대조군, 부분관해 환자군, 안정 병변 환자 군에 비하여 증가되어 있는지, 또는 감소되어 있는지를 나타내는 것일 수 있다.

[0094] 본 발명에 있어서, “검출”이란 목적하는 물질의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 같은 맥락에서, 본 발명에서 M2 대식세포; M2 대식세포와 관련된 상기 유전자, 이의 mRNA, 또는 단백질의 발현수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것(즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 상기 유전자, 이의 mRNA, 또는 단백질의 존재 여부 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다.

[0095] 본 발명에 있어서, 상기 물질은 M2 대식세포; 또는 M2 대식세포와 관련된 유전자, 이의 mRNA, 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 압타머, 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0096] 본 발명에 있어서, “프라이머(primer)”란 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(single strand oligonucleotide)이다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)와 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하고, DNA 중합효소가 프라이머에 주형 DNA에 상보적인 염기를 갖는 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 추가하여 연결함으로써 DNA가 합성된다. 프라이머는 일반적으로 15 내지 30개의 염기서열로 이루어져 있으며, 염기 구성과 길이에 따라 주형 가닥에 결합하는 온도(melting

temperature, Tm)가 달라진다. 프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 mRNA 또는 cDNA의 특정 구간을 증폭하여 mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 따라서 본 발명에서 상기 유전자 또는 이의 mRNA의 cDNA 또는 genomic DNA의 염기서열을 참조하여 프라이머 쌍을 용이하게 디자인할 수 있다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다.

[0097] 본 발명에 있어서, “프로브(probe)”는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA), DNA 등에 특이적으로 결합할 수 있는 짧게는 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오티드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 상기 프로브는 대립형질(또는 대립유전자, allele)을 검출하기 위한 진단 방법 등에 사용될 수 있다. 상기 진단 방법에는 서던 블롯 등과 같은 핵산의 혼성화에 근거한 검출 방법들이 포함되며, DNA 칩을 이용한 방법에서 DNA 칩의 기판에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다.

[0098] 본 발명에서, 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 검출하고자 하는 표적이 되는 폴리뉴클레오티드와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.

[0099] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 또는 프로브는 상기 M2 대식세포와 관련된 유전자 또는 이의 mRNA를 검출할 수 있는 것이라면 특정 서열로 한정되지 않는다.

[0100] 본 발명에 있어서, “압타머(aptamer)”란 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)을 의미하며, SELEX(Systematic Evolution of Ligands of Exponential enrichment)라는 방법으로 원하는 다양한 목적 물질(단백질, 당, 염색물질, DNA, 금속이온, 세포 등)에 대한 압타머를 개발할 수 있다. 상기 압타머는 M2 대식세포; 또는 상기 M2 대식세포와 관련된 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 검출할 수 있는 것이라면 특정 압타머의 종류로 한정되지 않는다.

[0101] 본 발명에 있어서, “항체(antibody)”란 항원성 부위에 대해서 지시되어 특이적으로 결합하는 단백질 분자를 의미한다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법, 재조합 DNA 방법, 또는 파아지 항체 라이브러리 방법 등에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항체의 단편은 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 또는 낙타 등을 포함한, 상이한 유기체에서 유래될 수 있으며, 예컨대 단클론 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성인 단편, 항체 중쇄, 인간화 항체, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 Fv 분자, 또는 키메라 항체 등일 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 항체는 M2 대식세포; 또는 상기 M2 대식세포와 관련된 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 검출할 수 있는 것이라면 특정 항체의 종류로 한정되지 않는다.

[0102] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단 또는 발병 위험성 예측용 키트를 제공한다.

[0103] 본 발명에 있어서, “키트”는 상기 M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 물질; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질을 검출하는 물질을 포함함으로써, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득을 진단하거나 또는 발병을 예측할 수 있도록 하는 도구를 의미한다. 본 발명의 키트에는 상기 유전자, mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 물질 외에도 이들의 검출 방법에 통상적으로 필요한 다른 구성성분, 조성물, 용액, 장치 등이 포함될 수 있다. 이때, 상기 유전자, mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 물질은 1회 이상 횟수에 제한 없이 작용시킬 수 있으며, 각 물질을 적용하는 선후에는 제한이 없고, 각 물질의 적용은 동시에 진행될 수도 있고 미시에 진행될 수도 있다.

[0104] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 컨테이너; 지시서; 및 상기 유전자, mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 물질을 포함할 수 있다. 상기 컨테이너는 상기 물질을 포장하는 역할을 할 수 있고, 보관 및 고정하는 역할을

할 수도 있다. 상기 컨테이너의 재질은 예컨대, 플라스틱, 유리병 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0105] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 피검체로부터 채취한 시료에서 M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 단계; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성 획득 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0106] 본 발명에 있어서, 상기 M2 대식세포가 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우; 또는
- [0107] 상기 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우, EGFR-표적제제에 대한 내성을 획득한 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0108] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 피검체로부터 채취한 시료에서,
- [0109] M2 대식세포를 검출 또는 정량하는 단계; 또는 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 전이성 대장암 환자의 EGFR-표적제제에 대한 내성의 발병 위험성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0110] 본 발명에 있어서, 상기 M2 대식세포가 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우; 또는
- [0111] 상기 M2 대식세포와 관련된 상기 20개의 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 상기 유전자의 mRNA, 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군, 부분관해 환자, 또는 안정 병변 환자에 비해 증가된 경우, EGFR-표적제제에 대한 내성 위험이 높은 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0112] 본 발명에 있어서, “발현”은 폴리펩티드(polypeptide)가 구조 유전자로부터 생산되는 과정을 지칭한다. 상기 과정은 유전자의 mRNA로의 전사, 및 이러한 mRNA의 폴리펩티드(들)로의 해독을 포함한다.
- [0113] 본 발명에 있어서, 상기 M2 대식세포를 검출 또는 정량하기 위한 방법으로는, 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들어 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 분석법, 유세포분석법, 또는 면역형광세포 염색(immunofluorescence cell staining)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 M2 대식세포는 하기 유전자, mRNA 또는 단백질을 검출하기 위한 방법을 통해 검출 또는 정량될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0114] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 또는 이의 mRNA 발현 수준을 검출하기 위한 방법으로는, 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예컨대 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR, quantitative PCR, quantitative real-time PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 서던 블롯팅(southern blotting), 노던 블롯팅(Northern blotting), 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0115] 본 발명에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 검출하기 위한 방법으로는, 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예컨대 웨스턴블롯팅, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0116] 본 발명에 있어서, “피검체”는 대장암의 진단 또는 발병 위험성을 예측하기 위한 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0117] 본 발명에 있어서, “시료”는 대장암을 진단하거나 발병 위험성을 예측하고자 하는 피검체로부터 채취된 것이 라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 생검 등으로 얻어진 세포나 조직, 혈액, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 각종 분비물, 소변, 대변 등일 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 시료는 피하지방 조직, 내장 그물 조직, 대동맥 조직, 관상동맥 조직, 경골동맥 조직, 골격근 조직, 혈액, 전혈, 림프구, 및 섬유아세포로 이루어

진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 있어서, 상기 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다.

[0118] 본 발명에 있어서, “포함하는”이라는 용어가 사용될 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.

[0119] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0120] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0122] 실험방법

[0123] 환자 연구 및 종양 조직 표본 분석

[0124] 2011년 5월부터 2018년 9월까지 서울 아산병원에서 세특시맵(cetuximab) 기반 치료로 1차 또는 3차 치료를 받은 RAS/BRAF 야생형 전이성 대장암(Colorectal cancer, CRC) 환자 총 106명이 연구에 포함되었다. 종양 반응은 고형 종양 버전 1.1의 반응 평가 기준에 따라 6-8주마다 평가하였다.

[0125] 치료 전 및 치료 후 종양 조직 샘플은 고식적 수술(palliative surgery) 동안 얻은 원발성 또는 전이성 부위 또는 조직의 생검으로부터 수득하였다(도 1a 참조). 한 쌍의 치료 전 대조군 및 치료 후 샘플은 35명(33.0%)명의 환자로부터 얻은 반면, 55명(51.9%) 및 16명(15.1%)은 각각 치료 전 및 치료 후 샘플만을 기초로 확인되었다.

[0126] 기관 검토 위원회(Institutional Review Board)로부터 연구 프로토콜을 승인하고 사전 동의를 얻었으며, 이후의 모든 절차는 인간 실험에 대한 책임 위원회(기관 및 국가)의 윤리적 기준과 1964년 헬싱키 선언 및 그 이후 버전에 따라 수행되었다.

[0128] 내성 획득의 정의

[0129] 내성 획득은 세특시맵 치료로 인해 완전관해(CR), 부분관해(PR) 또는 안정병변(SD)이 달성되었던 환자에서 마지막 세특시맵 치료 후 3개월 이내에 병의 진행(PD)이 나타나는 것으로 정의되었다.

[0131] RNA 시퀀싱

[0132] RNA는 TRIzol 시약을 사용하여 포르말린 고정 및 파라핀 포매 조직의 마크로-절개된 종양 부분에서 추출되었다. TruSeq RNA Access Library Prep Kit(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 cDNA 라이브러리를 구성하고 HiSeq 2500 플랫폼(Illumina Inc.)을 사용하여 paired-end 시퀀싱을 수행하였다. 시퀀싱이 완료된 후 RNA-seq 분석 파이프라인으로 원시 데이터를 처리하였다. 품질 관리를 위해, 모든 fastq 형식 판독을 FASTQC 소프트웨어(v0.11.8)를 사용하여 평가하였다. Illumina 시퀀싱 플랫폼 특이적 어댑터 및 품질이 낮은 리드 염기를 Trim Galore(v.0.4.5)를 사용하여 트리밍하였다. 유전자 발현 추정 전에 트리밍된 판독값을 STAR 정렬기(v. 2.6.0)를 사용하여 참조 게놈(human reference genome build version GRCh38/hg38)에 매핑하고 출력 sam/bam 파일을 얻었다. 리드 수는 유효한 라이브러리 크기에 대해 정규화하였다.

[0133] DESeq2를 사용하여 차등적으로 발현된 유전자를 분석하였다. 차등적으로 발현된 유전자는 조정된 P 값 < 0.05 및 절대 배수 변화 > 2로 정의되었다. 또한, Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)를 수행하여 정규화된 농축 점수(NES, Normalized enrichment score)를 계산하였다. CIBERSORT로 면역 디콘볼루션을 수행하여 22개의 면역 하위 집합의 상대적 비율을 추정하였다. 유전자 발현에 대한 농축 점수는 유전자 세트 변이 분석(GSVA)로 계산하였다. TCGA 코호트의 RNA 시퀀싱 데이터는 Firebrowse(Broad Institute)에서 얻었다.

[0135] 다중 면역조직화학

[0136] 문헌 [Kim HD, Kim JH, Ryu YM, Kim D, Lee S, Shin J, et al. Spatial Distribution and Prognostic Implications of Tumor-Infiltrating FoxP3⁺ CD4⁺ T Cells in Biliary Tract Cancer. Cancer research and treatment 2021;53:162-71.]에서 설명된 바와 같이, Leica Bond Rx Automated Stainer(Leica Biosystems, Newcastle, UK)에서 티라미드 신호 증폭을 사용하여 최적화된 형광 mIHC를 수행하였다. 세포를 CD68(M0876, DAKO, Glostrup, Denmark), CD206(NBP1-90020, Novus Biological, Littleton, CO, USA), PD-L1(13684S, Abcam, Cambridge, UK) 및 사이토케라틴(NBP2- 29429, Novus, Littleton, CO, USA)으로 염색하고, 형광 신호는 다음 형광단으로 캡처되었다: Opal 570, Opal 620, Opal 690 및 Opal 780. 다중 염색 슬라이드는 Vectra Polaris Quantitative Pathology Imaging System(Akoya Biosciences, Marlborough, MA/Menlo Park, CA, USA)을 사용하여 얻었다. 침습성 종양 가장자리 또는 활성 종양-기질 인터페이스에 초점을 맞춘 관심 영역(ROI)은 헤마톡실린 및 에오신 슬라이드 및 사이토케라틴 발현을 기반으로 숙련된 병리학자가 신중하게 선택하였다. 이미지는 inForm 2.4.11 이미지 분석 소프트웨어(Akoya Biosciences, Marlborough, MA/Menlo Park, CA, US) 및 Spotfire 소프트웨어(TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA)를 사용하여 분석하였다. 데이터는 각 세포 집단에 대한 평균 세포 수/mm²로 표현하였다.

[0138] 통계 분석

[0139] 무진행 생존(PFS, Progression-free survival)은 세톡시맙 투여의 초기 날짜(색인 날짜)부터 질병 진행 날짜(RECIST v1.1에 따름) 또는 사망까지의 간격으로 정의하였다. Kaplan-Meier 방법을 사용하여 생존 결과를 추정하였다. Mann-Whitney U-test는 쌍을 이루지 않은 연속 변수를 비교하는 데 사용되었다. 쌍을 이루는 값은 비모수 Wilcoxon 대응쌍 부호 순위 검정을 사용하여 비교하였다. 두 매개변수 간의 상관 관계는 Pearson 또는 Spearman 상관 계수를 사용하여 평가하였다. P-값이 0.05 미만인 것은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. R 소프트웨어 버전 3.6.2(R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다.

[0141] 실시예 1. 환자 특성 확인

[0142] 연구 환자의 기준 특성은 표 1에 요약하였다. 중앙 연령은 57세(범위 20-80세)였고 69명의 환자(65.1%)가 남성이었다. 환자의 약 80%가 좌측 종양을 갖고 있었고 대부분의 환자(n=96, 90.6%)는 진단 당시 전이성 질환을 갖고 있었다. 세톡시맙 기반 치료를 1차 및 3차 치료로 받은 환자는 각각 89명(84.0%)과 17명(16%)이었다.

[0143] 화학 요법에 대한 세부 사항 또한 표 1에 나타내었다.

표 1

Variable	Study population (n=106)
Age (years)	57 (range 22-80)
Male sex	69 (65.1%)
Primary tumor location	
Right side	21 (19.8%)
Left side	85 (80.2%)
RAS wild-type	106 (100%)
BRAF wild-type	106 (100%)
Disease setting	
Recurrent	10 (9.4%)
Initially metastatic	96 (90.6%)
Treatment line	
1st line	89 (84.0%)
3rd line	17 (16.0%)

Best response	
Complete response	7 (6.6%)
Partial response	78 (73.6%)
Stable disease	12 (11.3%)
Progressive disease	9 (8.5%)
Treatment regimen	
Cetuximab + FOLFIRI	74 (69.8%)
Cetuximab + FOLFOX	5 (4.7%)
Cetuximab + Irinotecan	12 (11.3%)
Cetuximab alone	15 (14.2%)

[0146] **실시예 2. 내성 획득(AR) 환자에서의 유전자 발현 확인**

[0147] 세특시맙 기반 치료 중 내성 획득의 발달과 관련된 유전자 발현을 조사하였다. 구체적으로, 내성 획득(n = 6)이 발생한 치료 전 기준 종양 조직과 치료 후 종양 조직을 짝지은 환자의 유전자 발현 프로파일을 분석하였다.

[0148] 도 1b에 나타난 바와 같이, 차등적으로 발현된 유전자 분석을 통해 치료 후 내성 획득 환자의 종양 조직 샘플에서 특이적으로 상향 조절된 394개의 유전자를 확인했으며, 그중 유의한 상위 20개 유전자를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

유전자	치료 후 log2 배수 변화	Adjusted P value
CYP4A22 (Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member 22)	7.39207	7.50E-20
FGA (fibrinogen alpha chain)	10.11674	2.00E-10
AL583836.1	5.398978	1.95E-09
FGG (fibrinogen gamma chain)	9.433257	4.50E-09
TTR (transthyretin)	10.22646	4.94E-09
HEPACAM (hepatic and glial cell adhesion molecule)	7.180468	2.51E-08
FGB (fibrinogen beta chain)	9.989125	6.71E-08
APOB (apolipoprotein B)	8.369986	6.71E-08
HPD (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)	8.63221	6.89E-08
ORM1 (orosomucoid 1)	9.167378	1.23E-07
GOLGA6A (golgin A6 family member A)	5.801478	1.23E-07
GNMT (glycine N-methyltransferase)	4.248459	1.23E-07
SNX29P2 (sorting nexin 29 pseudogene 2)	1.691966	1.23E-07
HP (haptoglobin)	8.009319	4.80E-07
SERPINA4 (serpin family A member 4)	4.479688	5.77E-07
UGT2B4 (UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4)	11.09421	8.82E-07

HPN (hepsin)	4.856778	1.26E-06
GOLGA6B (golgin A6 family member B)	7.284821	1.62E-06
CDH23 (cadherin related 23)	1.948995	1.64E-06
AMBIP (alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)	7.184815	1.73E-06

- [0151] 다음으로 전체 코호트의 샘플에서 내성 획득 유전자 마커의 발현 수준을 조사하였다.
- [0152] 도 1c에 나타난 바와 같이, 본 발명의 내성 획득 마커는 세특시맙 치료 후 샘플에서 풍부하였다(처리 전 샘플 대비)(NES -2.62, 잘못된 발견 비율[FDR] < 0.001). 또한, 치료 후 샘플 중에서 병의 진행 상태(PD)의 종양 샘플은 부분관해(PR)/안정병변(SD) 종양 샘플(NES -1.77, FDR < 0.001)에 비해 내성 획득 마커가 풍부한 것으로 나타났다.
- [0153] 이는 본 발명의 내성 획득 마커가 치료 후 종양 샘플, 특히 세특시맙 기반 치료 동안 진행된 샘플에서 두드러지게 발현되었음을 시사하는 결과이다.
- [0154] 한편, 도 1d에 나타난 바와 같이, 유전자 온톨로지 경로 분석을 통해 염증 및 면역 반응의 여러 경로를 AR 시그니처와 관련된 상위 신호로 식별하였다.

[0156] **실시예 3. 내성 획득 마커와 M2 대식세포 간의 연관성 확인**

- [0157] AR 마커가 면역 관련 신호와 연결되어 있다는 점에 기초하여, CIBERSORT를 사용하여 전사체 데이터의 면역 디콘볼루션을 수행하였다.
- [0158] 도 2a에 나타난 바와 같이, 농축 점수로 표시되는 22개의 면역 하위 집합의 분획과 AR 마커의 발현 수준 간의 상관 관계를 확인하였다. M2 대식세포는 내성 획득 마커의 발현 수준과 가장 두드러진 양의 상관관계를 보였다($P = 0.005$).
- [0160] 다음으로, 내성 획득 마커의 발현 수준과 종양 관련 대식세포(TAM) 및 M2 마커의 발현 수준 사이의 관계를 조사하였다.
- [0161] 도 2b의 상단에 나타난 바와 같이, TAM 및 M2 발현은 내성 획득 마커(각각 $R = 0.40$, $P < 0.001$ 및 $R = 0.34$, $P < 0.001$)와 양의 상관관계를 보였다.
- [0162] 도 2b의 하단에 나타난 바와 같이, 상기 결과는 TCGA CRC 코호트(각각 $R = 0.46$, $P < 0.001$ 및 $R = 0.53$, $P < 0.001$)에서도 검증되었으며, 이는 대장암에서 내성 획득과 M2 관련 마커 간의 연관성을 더욱 뒷받침한다.

[0164] **실시예 4. 임상 설정에 따른 M2 대식세포의 풍부도 확인**

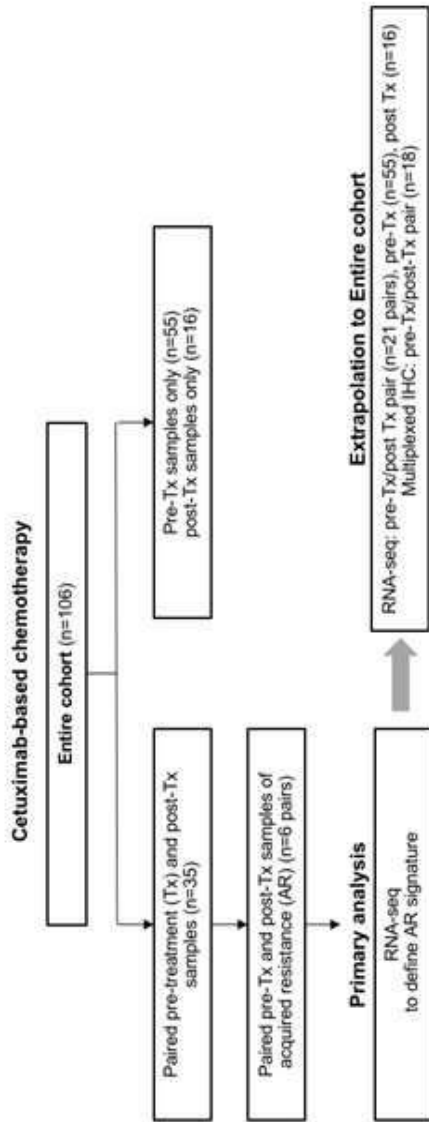
- [0165] 다양한 임상 설정에 따라 CIBERSORT에 의해 추정된 M2 대식세포의 풍부도를 비교하였다.
- [0166] 도 3a에 나타난 바와 같이, M2 대식세포의 풍부도는 전체 치료 전 및 치료 후 샘플($P = 0.16$) 사이에서 비슷하게 나타났다.
- [0167] 한편, 도 3b에 나타난 바와 같이, 치료 후 샘플 중에서 PD 종양은 PR/SD 종양에 비해 M2 대식세포 풍부도가 유의하게 높은 결과를 보였다($P < 0.001$).

[0169] **실시예 5. 쌍을 이루는 치료 전 및 치료 후 종양 조직에서의 M2 대식세포 확인**

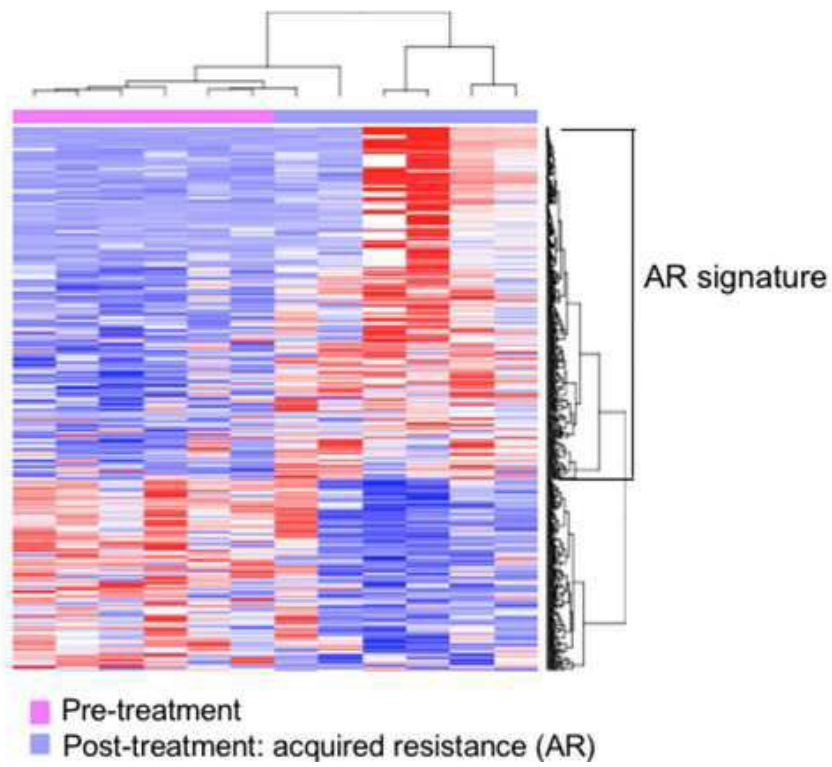
- [0170] 전사체 데이터에서 치료 후 PD 종양 샘플에서 M2 대식세포의 풍부도를 검증하기 위해, 쌍을 이루는 치료 전 및 치료 후 종양 조직을 사용하여 다중 면역조직화학을 수행하였다 (도 4a 참조).
- [0171] 도 4b에 나타난 바와 같이, $CD68^{+}CD206^{+}$ M2 대식세포의 밀도는 세특시맵 기반 치료 후 진행성 종양에서 유의하게 증가한 반면($P = 0.039$), PR/SD의 종양 쌍 간에는 치료 전후에서 유의한 변화를 나타내지 않았다($P = 0.700$).
- [0172] 또한, 도 4c에 나타난 바와 같이, PD-L1을 발현하는 M2 대식세포의 밀도도 치료 후 PD 종양에서는 유의하게 증가하였으나($P = 0.039$), PR/PD 샘플은 그렇지 않았다($P = 0.770$).
- [0173] 한편, 도 4d에 나타난 바와 같이, $CD68^{+}CD206^{-}$ M1 대식세포의 밀도는 반응에 관계없이 치료에 의해 크게 변하지 않았다(PR/SD 및 PD 샘플 각각에 대해 $P = 0.850$ 및 $P = 0.250$). 도 4e에 나타난 바와 같이, PD-L1을 발현하는 $CD68^{+}CD206^{-}$ M1 대식세포도, 치료에 의해 유의한 변화를 나타내지 않았다(PR/SD 및 PD 샘플에 대해 각각 $P = 0.320$ 및 $P = 0.160$).
- [0175] 따라서, 상기 결과를 통해 세특시맵 기반 화학요법으로 치료를 받은 전이성 대장암 환자로부터 세특시맵 기반 치료 후의 내성 획득과 관련된 유전자 마커를 발굴하였다.
- [0176] 또한, 본 발명자들은 다중면역화학조직을 통해 M2 대식세포의 밀도 증가를 확인하였는 바, 대장암 환자의 세특시맵 기반 치료에 대한 내성 획득과 M2 대식세포와의 관계를 최초로 확인하였다.
- [0178] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

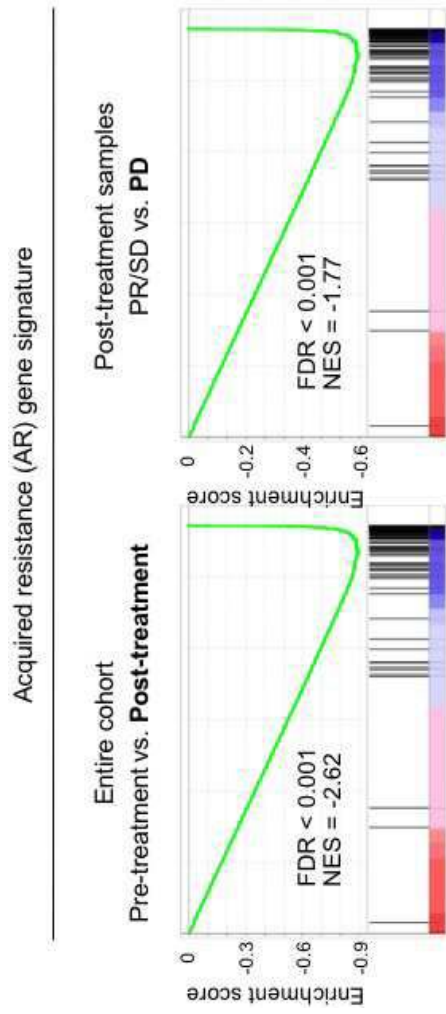
도면1a



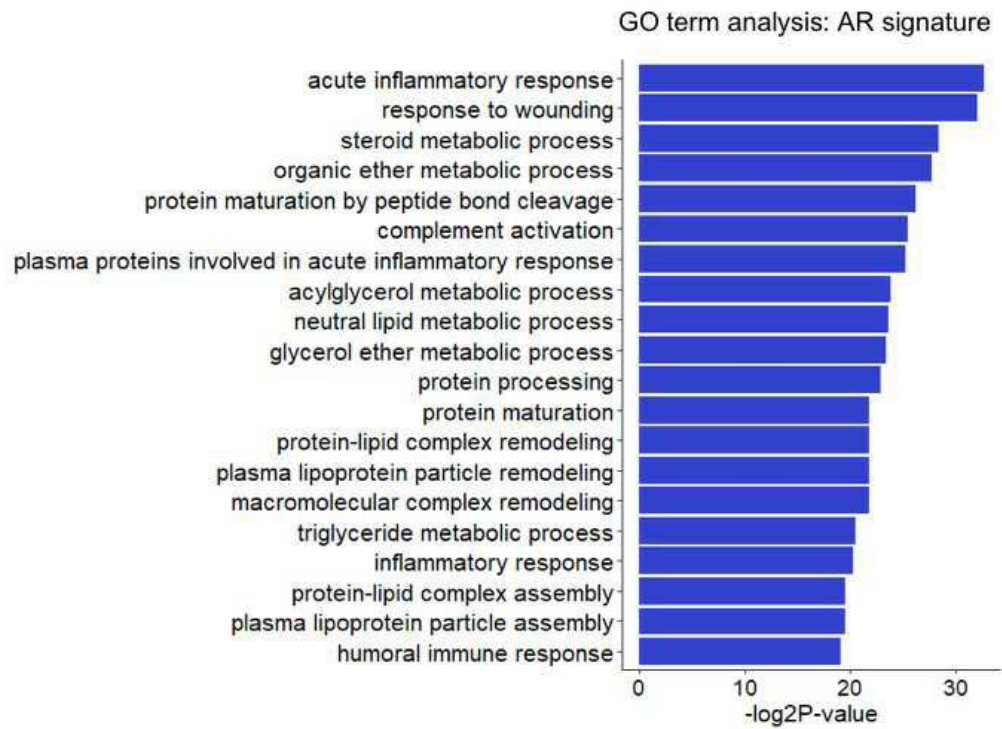
도면1b



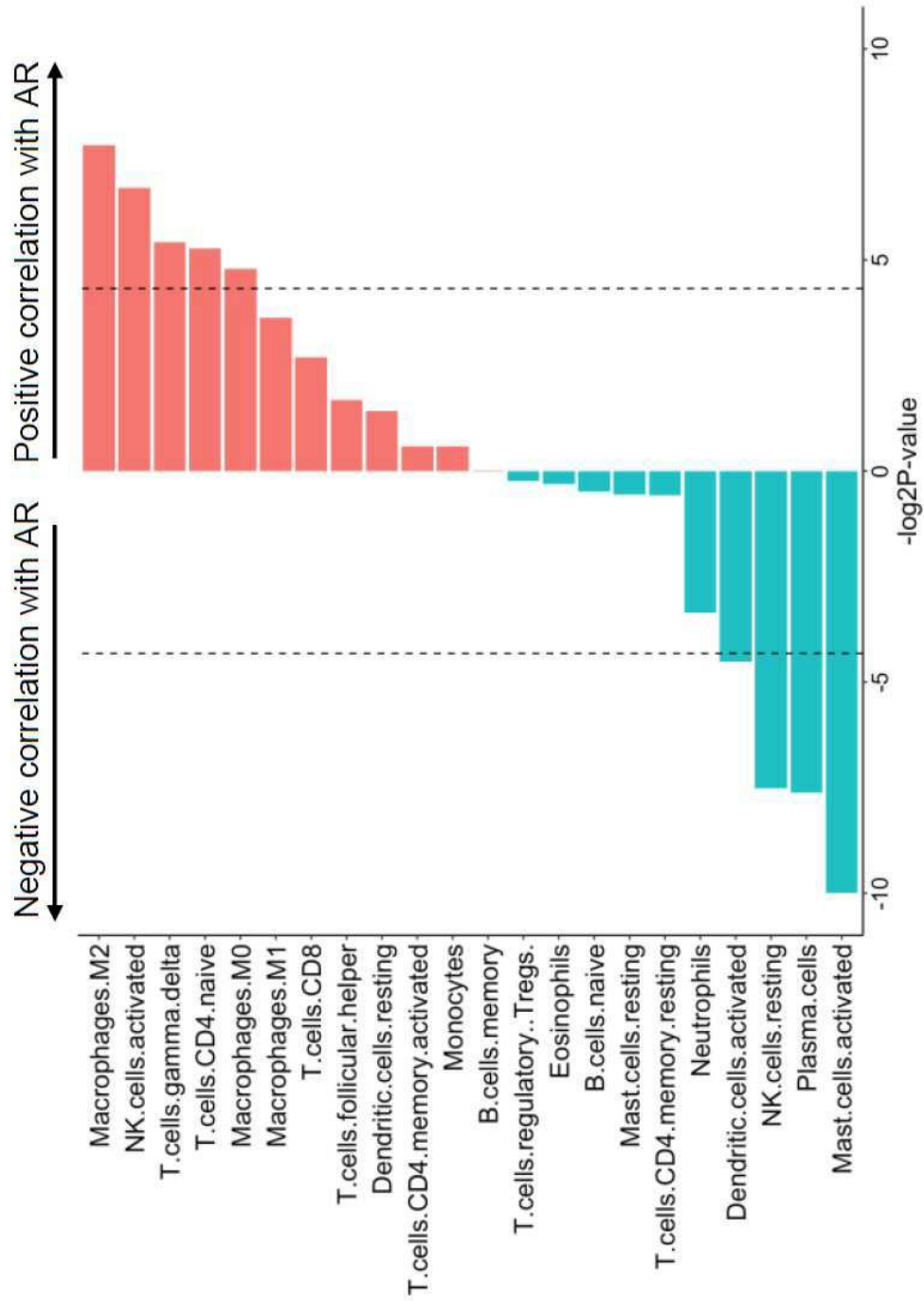
도면1c



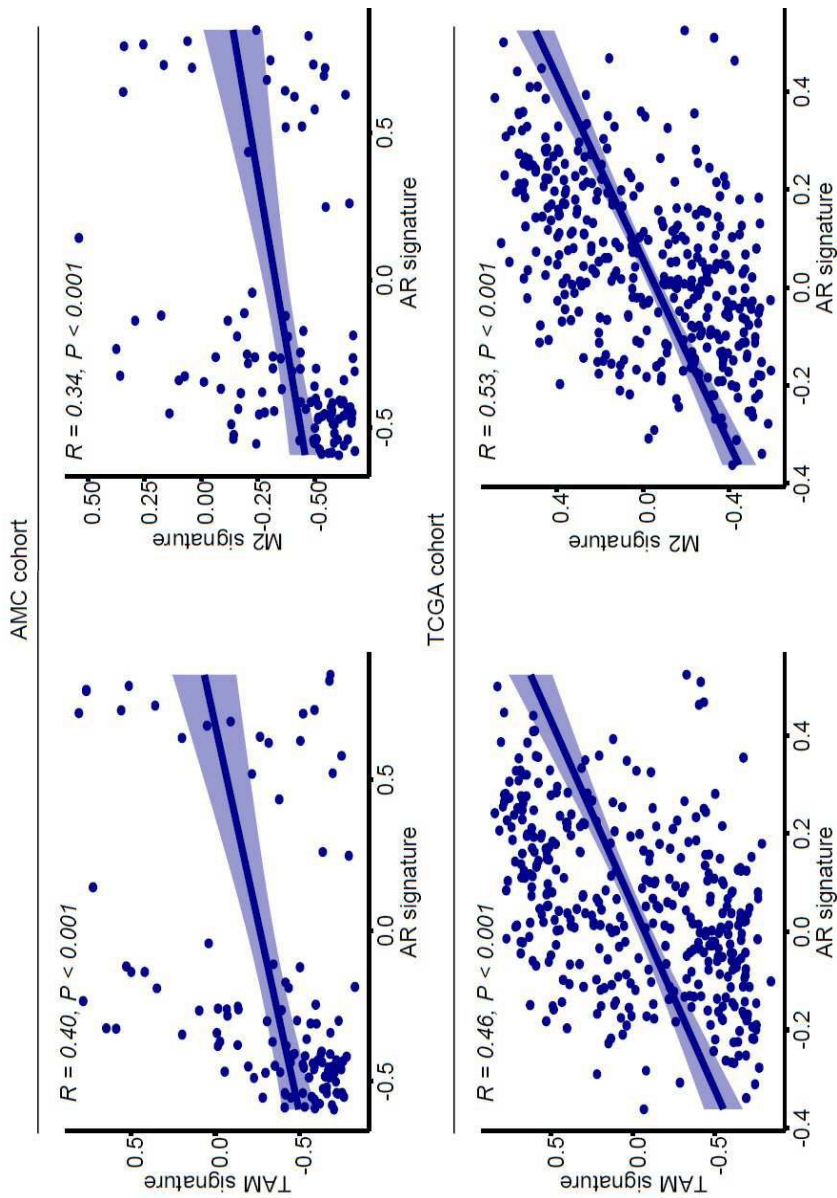
도면1d



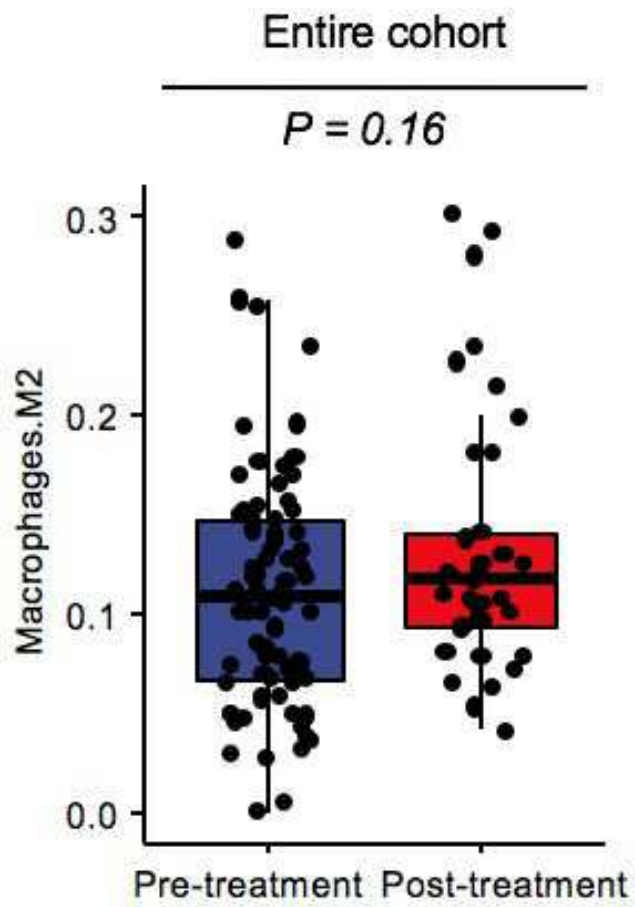
도면2a



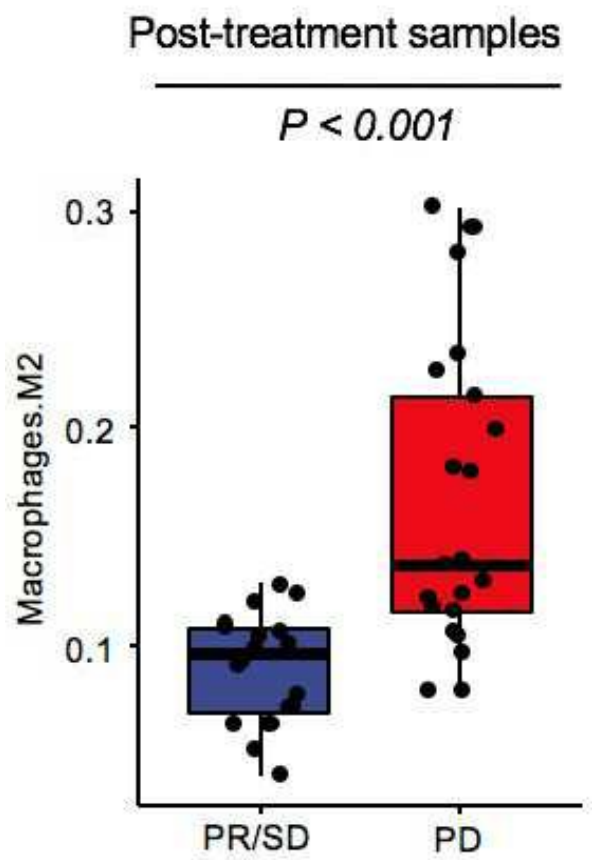
도면2b



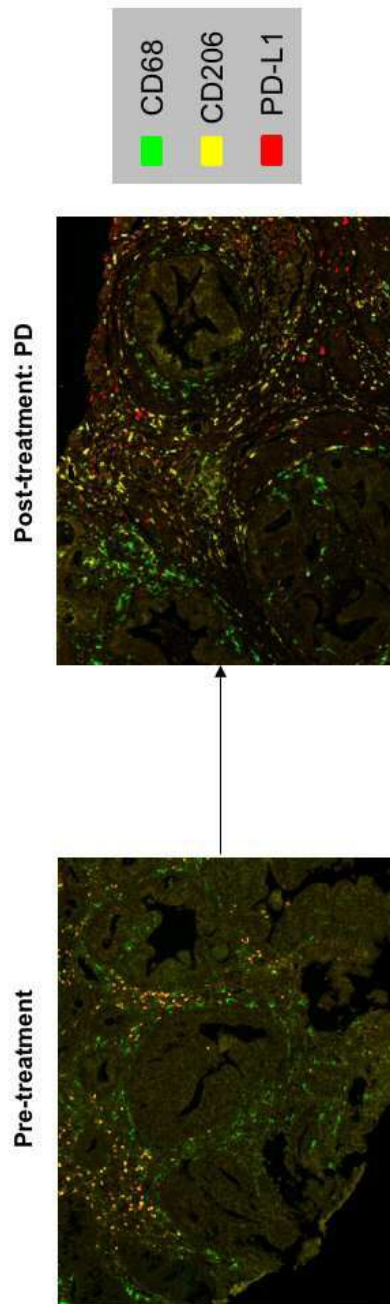
도면3a



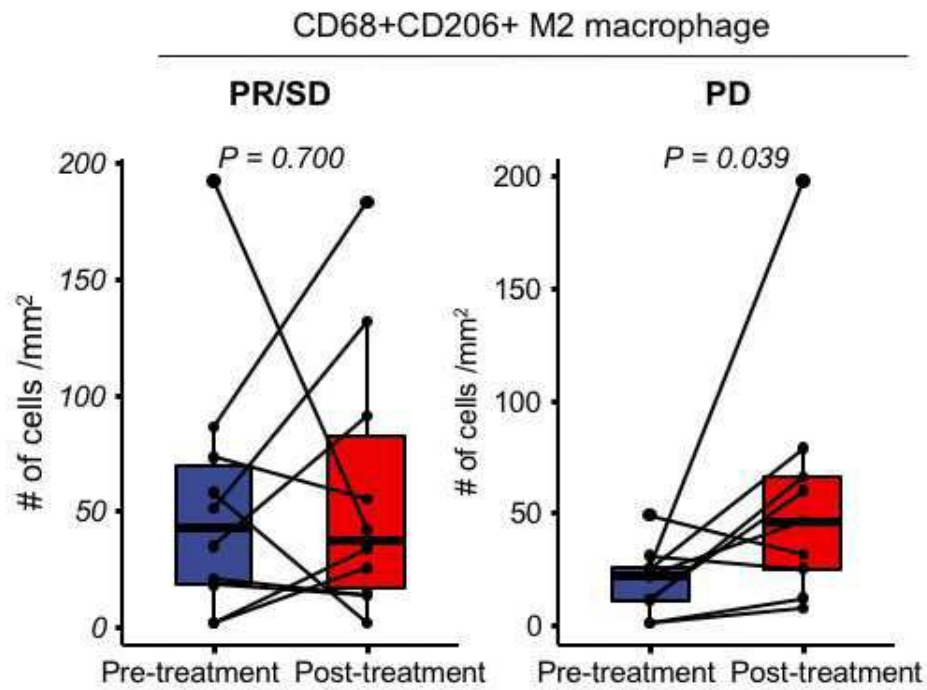
도면3b



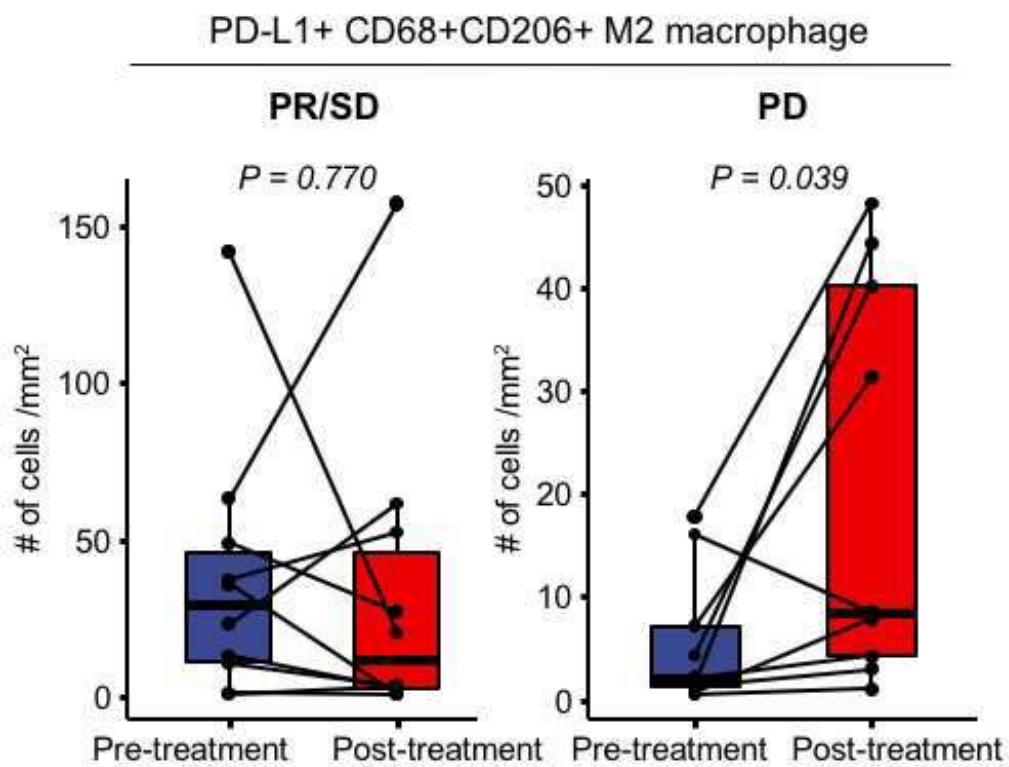
도면4a



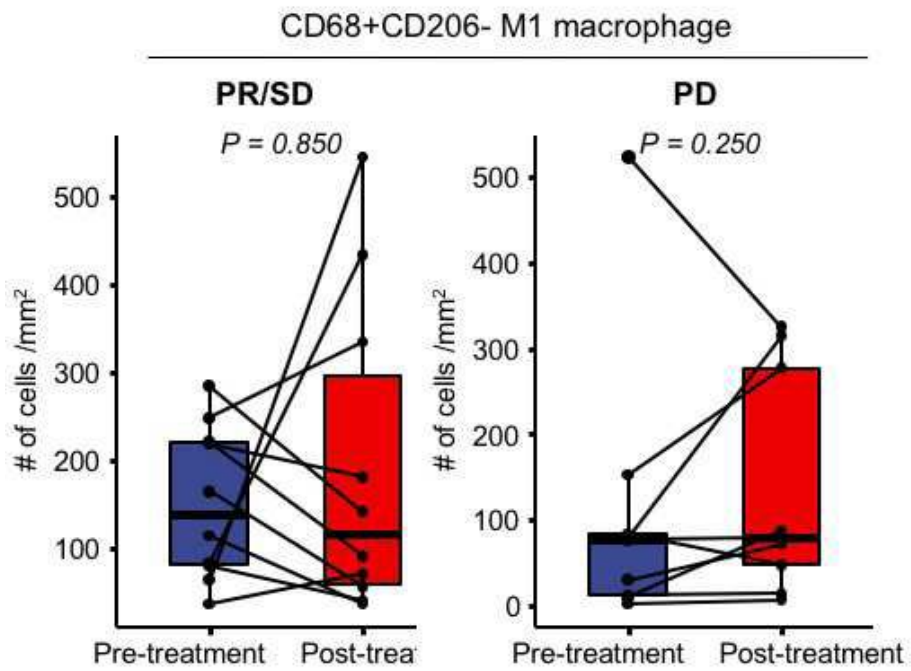
도면4b



도면4c



도면4d



도면4e

