

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0045274

(43) 공개일자 2025년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2022.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0128367

(22) 출원일자 2023년09월25일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

한미령

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 인천대학교(송도동)

황태원

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교(신촌동)

배소현

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 인천대학교(송도동)

(74) 대리인

특허법인지평

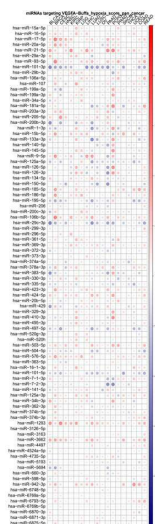
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 범암에서 종양 저산소증 및 종양 미세환경을 예측하기 위한 유전적 바이오 마커

(57) 요약

본 발명은 범암에서 종양 저산소증 및 종양 미세환경을 예측하기 위한 유전적 바이오 마커의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바이오마커를 이용하는 경우, 종양 환자에서 저산소증을 진단할 수 있어, 약물 반응성에 대한 판단과 예후의 정확한 예측이 가능하여, 종양 치료 분야에서 정밀한 의료의 기회를 제공할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도5a



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/106 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711182889
과제번호	2020R1C1C1012288
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	영상 유전체 통합 빅데이터 분석을 활용한 여성암 정밀의료 기반 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2025.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

VEGF 유전자군 중 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 VEGF 유전자군은 VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD 및 PGF로 구성되는, 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 유전자에 의해 전사되는 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제로, 상기 유전자에 특이적인 프라이머쌍, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 유전자에 의해 발현되는 단백질 또는 펩타이드 단편의 발현 수준을 측정하는 제제로, 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적인 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles), PNA(peptide nucleic acid) 및 aptamer(aptamer) 중 하나 이상을 포함하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 VEGFA 및/또는 PGF의 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 높은 경우 종양 저산소증으로 진단하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 VEGFD 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 낮은 경우 종양 저산소증으로 진단하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 키트.

청구항 8

hsa-miR-101-3p 및/또는 hsa-miR-130b-5p의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제제는 miRNA에 특이적인 프라이머쌍, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 hsa-miR-101-3p의 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우 종양 저산소증으로 진단하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 hsa-miR-130b-5p의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우 종양 저산소증으로 진단하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 12

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 키트.

청구항 13

종양 환자로부터 분리된 조직에서 VEGF 유전자군 중 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 발현 수준 및/또는 hsa-miR-101-3p 및/또는 hsa-miR-130b-5p의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 발현 수준은

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, Q-PCR, Digital PCR, Next Generation Sequencing, RNASeq, lab-on-a-chip 및 마이크로어레이로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 방법으로 수행되거나,

웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Flow Cytometry, FACS) 및 단백질 칩(protein chip)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 방법으로 수행되는 것인, 종양 저산소증 진단 또는 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

- (i) VEGFA 및/또는 PGF의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우;
- (ii) VEGFD 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우;
- (iii) hsa-miR-101-3p의 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우; 및/또는

(iv) hsa-miR-130b-5p의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우, 종양 저산소증으로 진단하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 16

제13 내지 제15항 중 어느 한 항에 따라 종양 저산소증으로 진단 또는 예측되는 경우 상기 종양 환자는 약물 치료 반응성이 높을 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 약물 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 범암에서 종양 저산소증 및 종양 미세환경을 예측하기 위한 유전적 바이오 마커의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 종양 저산소증(Tumor hypoxia)은 종양 내에서 산소 공급이 부족한 상태를 말하는데, 정상적인 조직과 달리 종양은 빠르게 성장하고 산소를 확보하기 위한 새로운 혈관을 형성하는 능력이 제한적이기 때문에, 종양 내 부분적 또는 전체적으로 산소 공급이 제한되며, 결과적으로 이는 종양의 성장과 전이에 영향을 미치게 된다(Cancer Cell International volume 21, Article number: 62 (2021)).

[0004] 한편, Vascular Endothelial Growth Factor Family (VEGF 유전자군)는 공통된 기능과 구조를 가지고 있는 관련 유전자 5개 *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD*, *PGF* 로 구성되어 있다. VEGF 유전자군은 종양 내 혈관 생성 조절에 중요한 역할을 하고, 이 유전자들의 발현이 비정상적으로 증가하거나 변조될 경우, 체내 혈관 형성 기전이 불완전해지며, 이로 인해 종양 내 일부 지역은 적절한 혈관이 생성되지 않아 저산소 상태로 전환되어, 종양 저산소증을 유발하는 원인이 된다.

[0005] 저산소증 여부에 따라 항암 치료 저항성, 생존율 등에 차이가 발생하므로, 이에 따른 정밀 의료를 제공할 필요성이 있고 저산소증에 노출된 환자를 선별할 수 있는 유전적 바이오 마커 발굴이 필요하다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 VEGF 유전자군의 발현 수준 분석, 생존 분석, 종양 미세환경 분석, 약물 반응성 분석 외에도 암 진행 단계, 면역 하위 유형, 저산소증 점수와 연관성을 분석하고, 이를 바탕으로 VEGF 유전자군과 종양 저산소증 및 종양 미세환경의 유의한 연관성 확인하고자 하였으며, 저산소증 점수와 해당 유전자군을 표적으로 하는 microRNA (miRNA; 마이크로 RNA)의 발현 수준의 연관성도 확인함으로써, VEGF 유전자군과 이를 조절하는 microRNA의 종양 저산소증 진단 용도를 새롭게 발명하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Cancer Cell International volume 21, Article number: 62 (2021)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 범암에서 종양 저산소증 및 종양 미세환경을 예측하기 위한 유전적 바이오 마커를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 VEGF 유전자군 중 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명에 있어서, 상기 VEGF 유전자군은 VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD 및 PGF로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 상기 유전자에 의해 전사되는 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제로, 상기 유전자에 특이적인 프라이머쌍, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 상기 유전자에 의해 발현되는 단백질 또는 펩타이드 단편의 발현 수준을 측정하는 제제로, 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적인 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles), PNA(peptide nucleic acid) 및 압타머(aptamer) 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 VEGFA 및/또는 PGF의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 VEGFD 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 키트를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, hsa-miR-101-3p 및/또는 hsa-miR-130b-5p의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 miRNA에 특이적인 프라이머쌍, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 hsa-miR-101-3p의 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 hsa-miR-130b-5p의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 키트를 제공한다.
- [0022] 본 발명은 또한, 종양 환자로부터 분리된 조직에서 VEGF 유전자군 중 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 발현 수준 및/또는 hsa-miR-101-3p 및/또는 hsa-miR-130b-5p의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 발현 수준은 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, Q-PCR, Digital PCR, Next Generation Sequencing, RNASeq, lab-on-a-chip 및 마이크로어레이로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 방법으로 수행되거나, 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Flow Cytometry, FACS) 및 단백질 칩(protein chip)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 정보를 제공하는 방법은
- [0025] (i) VEGFA 및/또는 PGF의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우;
- [0026] (ii) VEGFD 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우;
- [0027] (iii) hsa-miR-101-3p의 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우; 및/또는

[0028] (iv) hsa-miR-130b-5p의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우, 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한, 상기 종양 저산소증으로 진단 또는 예측되는 경우 상기 종양 환자는 약물 치료 반응성이 높을 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 약물 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명에 따른 바이오마커를 이용하는 경우, 종양 환자에서 저산소증을 진단할 수 있어, 약물 반응성에 대한 판단과 예후의 정확한 예측이 가능하여, 종양 치료 분야에서 정밀한 의료의 기회를 제공할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1a는 다양한 암 유형에서 VEGF 유전자군의 발현 수준 분포를 조사한 결과이다.
 도 1b는 다양한 암 유형에서 VEGFA 발현 수준 분포를 조사한 결과이다.
 도 1c는 다양한 암 유형에서 VEGFB 발현 수준 분포를 조사한 결과이다.
 도 1d는 다양한 암 유형에서 VEGFC 발현 수준 분포를 조사한 결과이다.
 도 1e는 다양한 암 유형에서 VEGFD 발현 수준 분포를 조사한 결과이다.
 도 1f는 다양한 암 유형에서 PGF 발현 수준 분포를 조사한 결과이다.
 도 2a 내지 도 2q는 다양한 암 유형에서 VEGF 유전자군의 발현 수준과 전체 생존(overall survival)과의 상관관계를 조사한 결과이다.
 도 3a는 KIRC 환자군에서 병기에 따른 VEGF 유전자군의 발현 수준 분포를 조사한 결과이다.
 도 3b는 KIRP 환자군에서 병기에 따른 VEGF 유전자군의 발현 수준 분포를 조사한 결과이다.
 도 3c는 STAD 환자군에서 병기에 따른 VEGF 유전자군의 발현 수준 분포를 조사한 결과이다.
 도 3d는 THCA 환자군에서 병기에 따른 VEGF 유전자군의 발현 수준 분포를 조사한 결과이다.
 도 4a는 다양한 암 유형에서 VEGFA 발현 수준과 저산소증 점수와의 연관성을 분석한 결과이다.
 도 4b는 다양한 암 유형에서 VEGFB 발현 수준과 저산소증 점수와의 연관성을 분석한 결과이다.
 도 4c는 다양한 암 유형에서 VEGFC 발현 수준과 저산소증 점수와의 연관성을 분석한 결과이다.
 도 4d는 다양한 암 유형에서 VEGFD 발현 수준과 저산소증 점수와의 연관성을 분석한 결과이다.
 도 4e는 다양한 암 유형에서 PGF 발현 수준과 저산소증 점수와의 연관성을 분석한 결과이다.
 도 5a 내지 도 5d는 다양한 암 유형에서 VEGF 유전자군을 표적으로 하는 마이크로 RNA와 점수와의 연관성을 분석한 결과이다.
 도 6a는 다양한 암종 환자군에서 VEGF 유전자군과 면역 아형과의 연관성을 분석한 결과이다.
 도 6b는 유방암(BRCA) 환자군에서 VEGF 유전자군과 면역 아형과의 연관성을 분석한 결과이다.
 도 6c는 위암(STAD) 환자군에서 VEGF 유전자군과 면역 아형과의 연관성을 분석한 결과이다.
 도 6d는 뇌종양(TGCT) 환자군에서 VEGF 유전자군과 면역 아형과의 연관성을 분석한 결과이다.
 도 7은 다양한 암종에서 VEGF 유전자군과 종양 미세환경 분석 결과이다.
 도 8a 내지 도 8o는 VEGFA와 VEGFC의 약물 반응성과의 상관관계를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술

분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0035] 본 명세서 및 특허청구범위에서 사용된 특징부의 크기, 양 및 물리적 특성을 표현하는 모든 수는 모든 경우 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대로 나타내지 않는 한, 명세서 및 특허청구범위에 개시된 수치 파라미터는 본 명세서에 개시된 교시 내용을 이용하여 당업자가 얻고자 하는 원하는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다.
- [0037] 본 발명에서는 범암 분석을 통해, 대부분의 암 유형에서의 종양 저산소증 여부와 종양 순수도가 낮은 미세환경을 예측할 수 있는 유전체적 지표를 발굴하였으며, VEGF 유전자군과 해당 유전자군을 표적으로 하는 마이크로 RNA 발현 수준과 연관성 분석을 통해, 특정 마이크로 RNA들의 해당 유전자군에 대한 전사 후 규제 관계가 저산소증과 관련이 있음을 확인하였다.
- [0039] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, VEGF 유전자군 중 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물을 제공한다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 VEGF 유전자군은 VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD 및 PGF로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 체제는 상기 유전자에 의해 전사되는 mRNA 발현 수준을 측정하는 체제로, 상기 유전자에 특이적인 프라이머쌍, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 체제는 상기 유전자에 의해 발현되는 단백질 또는 펩타이드 단편의 발현 수준을 측정하는 체제로, 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적인 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles), PNA(peptide nucleic acid) 및 압타머(aptamer) 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 VEGFA 및/또는 PGF의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 VEGFD 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 유방암 (BRCA; Breast Invasive Carcinoma), 담관암 (CHOL; Cholangiocarcinoma), 결장암 (COAD; Colon Adenocarcinoma), 식도암 (ESCA; Esophageal Carcinoma), 교모세포종 (GBM; Glioblastoma Multiforme), 머리 및 목 편평 세포 암종 (HNSC; Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), 혈액소 신장세포암 (KICH; Kidney Chromophobe), 투명세포형 신장세포암 (KIRC; Kidney Renal Clear Cell Carcinoma), 간세포암 (LIHC; Liver Hepatocellular Carcinoma), 폐암 (LUAD; Lung Adenocarcinoma), 대장암 (READ; Rectum Adenocarcinoma), 위암 (STAD; Stomach Adenocarcinoma) 및 자궁내막암 (UCEC; Uterine Corpus Endometrial Carcinosarcoma)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 종양에서 VEGFA의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 방광암 (BLCA; Bladder Urothelial Carcinoma), 담관암 (CHOL; Cholangiocarcinoma), 결장암 (COAD; Colon Adenocarcinoma), 식도암 (ESCA; Esophageal Carcinoma), 교모세포종 (GBM; Glioblastoma Multiforme), 머리 및 목 편평 세포 암종 (HNSC; Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), 투명세포형 신장세포암 (KIRC; Kidney Renal Clear Cell Carcinoma), 간세포암 (LIHC; Liver Hepatocellular Carcinoma), 폐암 (LUAD; Lung Adenocarcinoma), 폐편평상피세포암 (LUSC; Lung Squamous Cell Carcinoma), 대장암 (READ; Rectum Adenocarcinoma) 및 위암 (STAD; Stomach Adenocarcinoma)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 종양에서 PGF의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 방광암 (BLCA; Bladder Urothelial Carcinoma), 유방암 (BRCA; Breast Invasive Carcinoma), 결장암 (COAD; Colon Adenocarcinoma), 식도암 (ESCA; Esophageal Carcinoma), 교모세포종 (GBM;

Glioblastoma Multiforme), 머리 및 목 편평 세포 암종 (HNSC; Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), 혈액 소 신장세포암 (KICH; Kidney Chromophobe), 투명세포형 신장세포암 (KIRC; Kidney Renal Clear Cell Carcinoma), 유두상 신장세포암 (KIRP; Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma), 폐암 (LUAD; Lung Adenocarcinoma), 폐 편평상피세포암 (LUSC; Lung Squamous Cell Carcinoma), 전립선암 (PRAD; Prostate Adenocarcinoma), 대장암 (READ; Rectum Adenocarcinoma), 위암 (STAD; Stomach Adenocarcinoma), 갑상선암 (THCA; Thyroid Carcinoma), 및 자궁내막암 (UCEC; Uterine Corpus Endometrial Carcinosarcoma)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 종양에서 VEGFD 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 진단은 Wilcoxon signed-rank test를 통해 VEGF 유전자군 발현 수준 차이를 비교한 데이터에 기반하여, 종양 저산소증을 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 데이터는 p값이 0.05의 유의성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 VEGFA 및/또는 PGF의 발현 수준은 정상 대조군과 비교하여 유전자 발현 수준이 10% 이상 증가하면 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 VEGFD 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 유전자 발현 수준이 10% 이상 감소하면 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0051] 상기 종양 저산소증의 진단은 동일 환자에 있어서 종양 미발생 조직(정상 대조군)과 종양 조직의 유전자 발현 수준을 비교하여 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 분석의 모집단은 The cancer genome atlas (TCGA)에서 추출되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0054] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 조성물을 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 키트에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명은 또 다른 관점에서, hsa-miR-101-3p 및/또는 hsa-miR-130b-5p의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 조성물에 관한 것이다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 진단은 Spearman correlation test (스피어맨 상관계수 검정)를 통해 hsa-miR-101-3p 및/또는 hsa-miR-130b-5p 발현 수준 차이를 비교한 데이터에 기반하여, 종양 저산소증을 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 데이터는 p값이 0.05의 유의성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 체제는 miRNA에 특이적인 프라이머쌍, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 hsa-miR-101-3p의 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0060] 즉, 상기 hsa-miR-101-3p 발현 수준은 정상 대조군과 비교하여 10% 이상 감소하면 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 hsa-miR-130b-5p의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0062] 즉, 상기 hsa-miR-130b-5p의 발현 수준은 정상 대조군과 비교하여 10% 이상 증가하면 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0063] 상기 종양 저산소증의 진단은 동일 환자에 있어서 종양 미발생 조직(정상 대조군)과 종양 조직의 유전자 발현 수준을 비교하여 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0064] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 조성물을 포함하는 종양 저산소증 진단 또는 예측용 키트에 관한 것이다.
- [0065] 본 발명에 상기 "mRNA의 발현 수준 측정"이란 본 발명의 질환을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 VEGF 유전자군의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정하는 것을 의미한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중

합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열 또는 miRNA를 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.

[0067] 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 PNA이다. 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, 신경세포, 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.

[0068] 본 발명에서 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0070] 본 발명에 상기, "단백질 또는 펩타이드 단편의 발현 수준 측정"이란 본 발명의 질환을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 본 발명에 따른 진단용 마커인 단백질 또는 펩타이드 단편의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정을 의미한다. 상기 수용체의 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어레이, 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, 오우크테로니 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.

[0071] 본 발명에 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 VEGF 유전자군에 의해 발현되는 단백질 또는 펩타이드 단편에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 VEGF 유전자군에 의해 발현되는 단백질 또는 펩타이드 단편을 항원으로 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(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991 참조)을 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.

[0072] 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 펩타이드 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. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December

1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254 (5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.

- [0073] 본 발명에서 상기 "압타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 압타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.
- [0075] 본 발명에서는, 일 구현예로서 상기 종양 저산소증 진단 또는 예측용 키트를 이용하여 종양의 저산소증을 진단할 수 있다.
- [0076] 구체적으로, 본 발명의 키트를 사용하는 경우 종양의 환자군을 구별하여 저산소증 여부를 검출 또는 진단할 수 있다.
- [0077] 본 발명에서 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명의 상기 질환의 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다.
- [0079] 예를 들면, 상기 진단용 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 암호화하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0080] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 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.
- [0083] 본 발명은 또 다른 관점에서, 종양 환자로부터 분리된 조직에서 VEGF 유전자군 중 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 발현 수준 및/또는 hsa-miR-101-3p 및/또는 hsa-miR-130b-5p의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 종양 저산소증 진단 또는 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0084] 본 발명에 있어서, 상기 발현 수준은 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, Q-PCR, Digital PCR, Next Generation Sequencing, RNASeq, lab-on-a-chip 및 마이크로어레이로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 방법으로 수행되거나, 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Flow Cytometry, FACS) 및 단백질 칩(protein chip)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이

상의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0085] 상기 조직은 종양 환자로부터 절제술로 제거된 조직 또는 생검 조직일 수 있다.

[0086] 본 발명에서, "생검"이란, 발병 가능성이 높은 환자의 피부를 절개하지 않고 중공침 등을 생체 내 기관에 자입하여 병리조직학적 검사용으로 채취한 조직으로, 예를 들면, 환자의 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 또는 객담 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 액체 생검으로 환자의 혈액, 혈청 또는 혈장일 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 액체 생검으로부터 분리된 단핵구, 과립구 또는 엑소좀일 수 있다.

[0087] 본 발명에 있어서, 상기 정보를 제공하는 방법은

[0088] (i) VEGFA 및/또는 PGF의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우;

[0089] (ii) VEGFD 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우;

[0090] (iii) hsa-miR-101-3p의 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우; 및/또는

[0091] (iv) hsa-miR-130b-5p의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우, 종양 저산소증으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0093] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 종양 저산소증으로 진단 또는 예측되는 경우 상기 종양 환자는 약물 치료 반응성이 높을 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 약물 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0094] 본 발명에 있어서, 상기 종양은 부신 피질암 (ACC; Adrenocortical carcinoma), 방광암 (BLCA; Bladder Urothelial Carcinoma), 유방암 (BRCA; Breast Invasive Carcinoma), 자궁경부 편평세포암 및 자궁경부내선암 (CESC; Cervical Squamous Cell Carcinoma and Endocervical Adenocarcinoma), 담관암 (CHOL; Cholangiocarcinoma), 결장암(COAD; Colon Adenocarcinoma), 광범위 B형 대세포 (DLBC; Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma), 식도암 (ESCA; Esophageal Carcinoma), 교모세포종 (GBM; Glioblastoma Multiforme), 머리 및 목 편평 세포 암종 (HNSC; Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), 혈액소 신장세포암 (KICH; Kidney Chromophobe), 투명세포형 신장세포암 (KIRC; Kidney Renal Clear Cell Carcinoma), 유두상 신장세포암 (KIRP; Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma), 급성 골수성 백혈병 (LAML; Acute Myeloid Leukemia), 저등급 뇌교종 (LGG; Brain Lower Grade Glioma), 간세포암 (LIHC; Liver Hepatocellular Carcinoma), 폐암 (LUAD; Lung Adenocarcinoma), 폐편평상피세포암 (LUSC; Lung Squamous Cell Carcinoma), 중피종 (MESO; Mesothelioma), 난소암 (OV; Ovarian Serous Cystadenocarcinoma), 췌장암 (PAAD; Pancreatic Adenocarcinoma), 부신 갈색세포종 (PCPG; Pheochromocytoma and Paraganglioma), 전립선암 (PRAD; Prostate Adenocarcinoma), 대장암 (READ; Rectum Adenocarcinoma), 육종 (SARC; Sarcoma), 흑색종 (SKCM; Skin Cutaneous Melanoma), 위암 (STAD; Stomach Adenocarcinoma), 고환암 (TGCT; Testicular Germ Cell Tumors), 갑상선암 (THCA; Thyroid Carcinoma), 흉선종 (THYM; Thymoma), 자궁내막암 (UCEC; Uterine Corpus Endometrial Carcinosarcoma), 자궁암 (UCS; Uterine Carcinosarcoma) 및 포도막 흑색종 (UVM; Uveal Melanoma)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0096] 실시예 1. 데이터 수집

[0098] The cancer genome atlas (TCGA)는 전세계 최대의 암 공공 데이터베이스로 Pan-cancer(범암)에서 VEGF 유전자 군이 발암 유전자의 역할을 하는지 또는 저산소증을 확인할 수 있는 지표 역할을 하는지 조사하기 위해 33개 부신 피질암 (ACC; Adrenocortical carcinoma), 방광암 (BLCA; Bladder Urothelial Carcinoma), 유방암 (BRCA; Breast Invasive Carcinoma), 자궁경부 편평세포암 및 자궁경부내선암 (CESC; Cervical Squamous Cell Carcinoma and Endocervical Adenocarcinoma), 담관암 (CHOL; Cholangiocarcinoma), 결장암(COAD; Colon Adenocarcinoma), 광범위 B형 대세포 (DLBC; Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma), 식도암 (ESCA; Esophageal Carcinoma), 교모세포종 (GBM; Glioblastoma Multiforme), 머리 및 목 편평 세포 암종 (HNSC; Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), 혈액소 신장세포암 (KICH; Kidney Chromophobe), 투명세포형 신장세포암 (KIRC; Kidney Renal Clear Cell Carcinoma), 유두상 신장세포암 (KIRP; Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma), 급성 골수성 백혈병 (LAML; Acute Myeloid Leukemia), 저등급 뇌교종 (LGG; Brain Lower

Grade Glioma), 간세포암 (LIHC; Liver Hepatocellular Carcinoma), 폐암 (LUAD; Lung Adenocarcinoma), 폐편평상피세포암 (LUSC; Lung Squamous Cell Carcinoma), 중피종 (MESO; Mesothelioma), 난소암 (OV; Ovarian Serous Cystadenocarcinoma), 췌장암 (PAAD; Pancreatic Adenocarcinoma), 부신 갈색세포종 (PCPG; Pheochromocytoma and Paraganglioma), 전립선암 (PRAD; Prostate Adenocarcinoma), 대장암 (READ; Rectum Adenocarcinoma), 육종 (SARC; Sarcoma), 흑색종 (SKCM; Skin Cutaneous Melanoma), 위암 (STAD; Stomach Adenocarcinoma), 고환암 (TGCT; Testicular Germ Cell Tumors), 갑상선암 (THCA; Thyroid Carcinoma), 흉선종 (THYM; Thymoma), 자궁내막암 (UCEC; Uterine Corpus Endometrial Carcinosarcoma), 자궁암 (UCS; Uterine Carcinosarcoma), 포도막 흑색종 (UVM; Uveal Melanoma)의 암 유형 데이터를 수집하였다. 구체적으로는, RNA 발현 수준 데이터와 마이크로 RNA 발현 수준 데이터, 임상 데이터로서, overall survival (전체 생존 기간) 데이터와 tumor stage (병기) 데이터, immune subtype (면역 아형) 데이터를 활용하였으며, 저산소증 점수 데이터로는 암 환자의 산소포화도 상태를 점수화한 수치를 사용하였다. 이 경우, 상기 점수가 높을수록 환자의 상태가 저산소증에 가까움을 의미한다.

[0100] 실시예 2. 바이오 마커 발굴을 위한 생물정보학 분석

[0102] 2-1. VEGF 발현 수준 분석

[0103] 전체 암 환자 데이터에서 VEGF 유전자군의 발현 수준 분포를 조사하였다. 구체적으로 정상 조직 샘플이 5개 이상인 18개 암 유형 방광암 (BLCA; Bladder Urothelial Carcinoma), 유방암 (BRCA; Breast Invasive Carcinoma), 담관암 (CHOL; Cholangiocarcinoma), 결장암 (COAD; Colon Adenocarcinoma), 식도암 (ESCA; Esophageal Carcinoma), 교모세포종 (GBM; Glioblastoma Multiforme), 머리 및 목 편평 세포 암종 (HNSC; Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), 혈색소 신장세포암 (KICH; Kidney Chromophobe), 투명세포형 신장세포암 (KIRC; Kidney Renal Clear Cell Carcinoma), 유두상 신장세포암 (KIRP; Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma), 간세포암 (LIHC; Liver Hepatocellular Carcinoma), 폐암 (LUAD; Lung Adenocarcinoma), 폐 편평상피세포암 (LUSC; Lung Squamous Cell Carcinoma), 전립선암 (PRAD; Prostate Adenocarcinoma), 대장암 (READ; Rectum Adenocarcinoma), 위암 (STAD; Stomach Adenocarcinoma), 갑상선암 (THCA; Thyroid Carcinoma), 자궁내막암 (UCEC; Uterine Corpus Endometrial Carcinosarcoma)에서, 암 조직과 정상 조직에서의 VEGF 유전자군 발현 수준을 비교하였다. 각각의 암 유형의 정상 조직과 암 조직에서의 VEGF 유전자군의 발현량을 추출하여, 같은 모집단에서 추출된 두 표본의 중앙값을 비교하는 경우 사용되는 Wilcoxon signed-rank test를 통해 VEGF 유전자군 발현 수준을 비교하였다.

[0104] 그 결과, *VEGFD*를 제외한 4개의 유전자들은, 대부분의 암 유형에서 정상 조직보다 종양 조직에서 높은 수준의 발현을 나타내었으며, 특히, Cholangiocarcinoma (CHOL; 담관암종), Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSC; 두경부 편평세포 암), Kidney Renal Clear Cell Carcinoma (KIRC; 신장 투명세포 암), Liver Hepatocellular Carcinoma (LIHC; 간 세포 암) 암 유형에서 *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGC* 그리고 *PGF* 유전자의 발현이 정상 조직보다 종양 조직에서 높음을 확인하였다 (도 1a 내지 도 1f 참조).

[0106] 2-2. Survival (생존) 및 Tumor stage(병기)와의 연관성 분석

[0107] VEGF 유전자군의 발현이 암을 촉진하는지 또는 억제하는지를 예측하기 위해, 각 암 유형별로 VEGF 유전자군의 발현 수준에 따라 환자 그룹을 나누고 생존율을 비교하였다.

[0108] Survival analysis (생존분석)을 위해 비모수적 방법으로 생존함수를 추정하는 방법인 Kaplan-Meier (카플란-마이어) 추정방법을 사용하였다. 이때, 생존함수는 특정시간 이전에 사망 사건이 발생하지 않은 확률이다. 생존함수 및 생존 곡선을 계산하고 이를 시각화하기 위해 R 패키지 "survival"과 "survminer"를 사용하였다. Log-rank test (로그 순위법 검정)을 적용하여 그룹 간 생존 곡선 차이를 비교하여 유의성을 확인하였다.

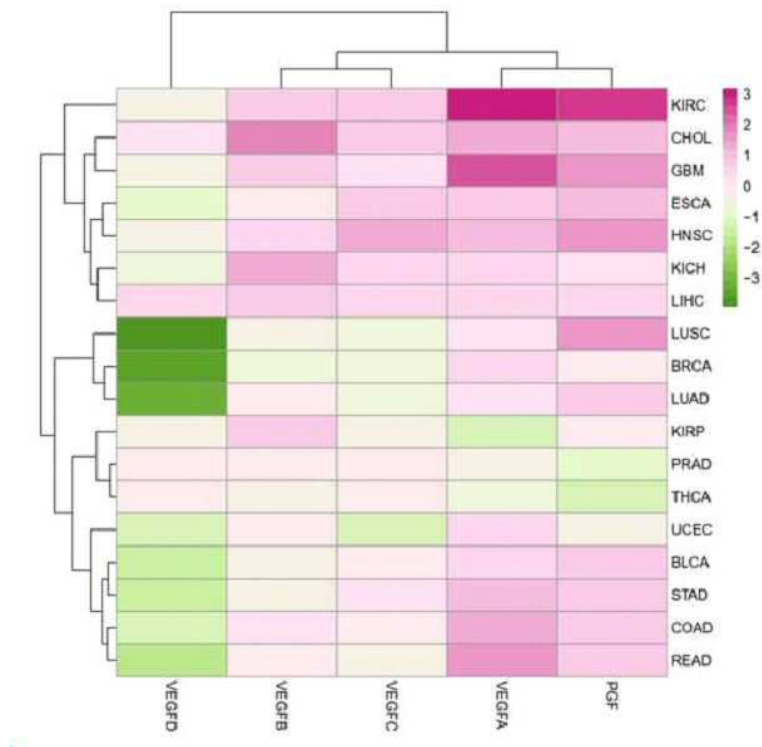
[0109] 그 결과, 다양한 암 유형에서 VEGF 유전자군의 발현 수준과 환자들의 예후가 유의한 상관관계 보임을 확인하였다. 특히 *VEGFA*, *VEGFC*, *PGF* 유전자의 높은 발현 수준은 대체로 나쁜 예후와 연관성을 보였으며, *VEGFB*와 *VEGFD* 유전자의 높은 발현 수준은 암 유형에서 대체로 좋은 예후와 관련이 있었다. 이는 해당 유전자군의 발현 수준이 잠재적인 예후 예측의 임상 지표로 활용될 수 있음을 시사한다(도 2 참조).

- [0110] 또한, 병기와 VEGF 유전자군의 발현 수준의 연관성을 조사하였다.
- [0111] TCGA 암의 tumor stage (병기) 데이터를 UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu/>)를 통해 다운로드 받았다. VEGF 유전자군의 발현 수준과 tumor stage (병기) 사이의 관련성을 분석하기 위해 크루스칼-왈리스 검정 (Kruskal-Wallis test) 을 사용했다. 크루스칼-왈리스 검정 (Kruskal-Wallis test) 은 순위 합 검정법의 일종으로 독립된 세 군 이상의 크기를 비교하는 비모수적 방법이다.
- [0112] 그 결과, *VEGFA*, *VEGFC*, 및 *PGF* 유전자가 종양의 병기가 진행됨에 따라 발현 수준이 증가하는 경향을 보였는데, 이와 같은 결과를 통해, VEGF 유전자군의 발현 수준이 임상 병리학적 표지로 작용할 수 있음을 알 수 있었다(도 3a 내지 도 3d 참조).
- [0114] 2-3. 저산소증 점수 및 해당 유전자군을 표적으로 하는 마이크로 RNA와의 연관성 분석
- [0115] VEGF 유전자군이 저산소증 조절 기전과 관련이 있는지 확인하기 위하여, 각 암 유형별로 VEGF 유전자군의 발현 수준과 저산소증 점수 간의 연관성을 조사하였다.
- [0116] TCGA 암 환자의 저산소증 점수 데이터를 이전 연구 논문 (<https://www.nature.com/articles/s41588-018-0318-2>)에서 얻었다. 각 종류의 암에서 저산소 서명 유전자의 발현 수준이 상위 50%의 속하는 경우 +1점을 할당 받았고, 하위 50%에 속할 경우 -1점을 할당 받았다. 따라서 저산소증 점수가 높을수록 저산소증에 가까운 상태를 의미하며, 낮을 수록 정상에 가깝다는 것을 의미한다. VEGF 유전자군의 발현 수준과 저산소증 점수 간의 연관성을 조사하기 위해 스피어맨 상관계수 (Spearman correlation) 분석 방법을 사용하였다.
- [0117] 그 결과, 대부분의 암 유형에서 *VEGFA*와 *PGF*의 발현 수준과 저산소증 점수의 양의 상관관계가 확인되었고, 또한 대부분의 암 유형에서 *VEGFD* 발현 수준과 저산소증 점수 사이의 뚜렷한 음의 상관관계가 확인되었다(도 4a 내지 도 4e 참조). 이는 VEGF 유전자군의 발현 수준이 저산소증과 강한 연관성을 있음을 나타내고, 저산소증이 유도하는 암의 심화 기전을 주도하는데 있어서 잠재적인 역할을 한다는 것을 시사한다.
- [0118] 또한, 저산소증에 관여하는 VEGF 유전자군 관련 Post-transcriptional control (전사 후 조절)을 확인하기 위해, 해당 유전자군을 표적으로 하는 마이크로 RNA와 저산소증 점수 간의 연관성을 조사하였다.
- [0119] 암 환자의 마이크로 RNA 발현 수준 데이터를 UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu/>)를 통해 다운로드 받았다. miRTarBase에 등록된 VEGF 유전자군을 표적으로 하는 마이크로 RNA만을 선별하여 발현 수준을 추출하였다. 앞서 언급한 저산소증 점수와 마이크로 RNA의 연관성을 조사하기 위해 스피어맨 상관계수 (Spearman correlation) 분석 방법을 사용하였다.
- [0120] 그 결과, *VEGFA*와 *VEGFC*를 동시에 표적 하는 hsa-miR-101-3p 가 대부분의 암 유형에서 저산소증 점수와 음의 상관관계를 보이며, 해당 마이크로 RNA가 종양 억제자로서 역할을 할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, *VEGFB*를 표적 하는 hsa-miR-130b-5p는 다양한 암에서 저산소증 점수와 양의 상관관계임을 확인하였다(도 5 참조). 이를 통해 해당 마이크로 RNA가 VEGF 유전자군과의 전사 후 규제 관계를 통한 저산소증에 대한 영향을 확인할 수 있었다.
- [0122] 2-4. 종양 미세환경 분석 및 면역 하위 유형과의 연관성 분석
- [0123] 암 유형에 따른 VEGF 유전자군의 발현과 면역 아형의 연관성을 조사하였다. 고형 종양에서의 C1 (wound healing), C2 (IFN- γ dominant), C3 (inflammatory), C4 (lymphocyte depleted), C5 (immunologically quiet), C6 (TGF- β dominant) 여섯 가지 면역 아형이 있음이 밝혀졌다. 암 환자 별로 어떤 면역 아형에 해당되는지 표시된 데이터를 UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu/>)를 통해 다운로드 받았다. VEGF 유전자군의 발현 수준과 여섯 가지 면역 아형의 연관성을 분석하기 위해, 크루스칼-왈리스 검정 (Kruskal-Wallis test) 을 사용했다. 크루스칼-왈리스 검정 (Kruskal-Wallis test) 은 순위 합 검정법의 일종으로 독립된 세 군 이상의 크기를 비교하는 비모수적 방법이다.
- [0124] 그 결과, 전반적인 암 유형에서 VEGF 유전자군의 발현 수준이 면역 아형에 따라 유의한 차이를 보임을 확인할 수 있었다. 또한, *VEGFC*와 *PGF*의 발현 수준이 공격적인 면역 아형인 C6 (TGF- β dominant)에서 높음을 확인하였다(도 6a 내지 도 6d 참조) .

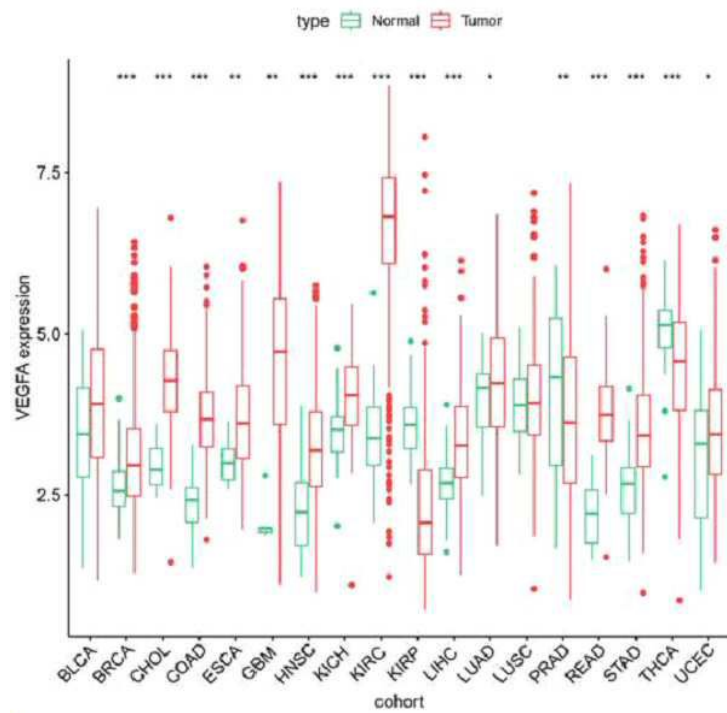
- [0126] 한편, VEGF 유전자군과 Tumor purity (종양 순도)와의 관련을 확인하기 위해, 해당 유전자군의 발현과 종양 내 기질·면역세포 비율과의 연관성을 확인하였다.
- [0127] Tumor microenvironment (종양 미세환경)은 암 세포 뿐만 아니라 기질 세포, 면역 세포 등의 다양한 정상 세포로 구성된다. Tumor purity (종양 순도)는 암 조직 내에서 암 세포가 차지하는 비율을 나타내며, 주로 암 조직 내에 있는 정상 세포와 비교하여 사용된다.
- [0128] 암 조직 내의 Tumor purity (종양 순도)를 확인하기 위해 ESTIMATE 알고리즘 사용하였다. 해당 알고리즘은 stromal cell (기질 세포)와 immune cell (면역 세포)의 비율을 추정해 stromal score (기질 점수)와 immune score (면역 점수)로 반환하는 알고리즘이다. 각 점수 값이 높을수록 해당 세포의 비율이 높다는 것을 의미하며, 이에 따라 Tumor purity (종양 순도)는 낮아진다.
- [0129] ESTIMATE 알고리즘에 TCGA RNA-seq 데이터를 입력하여, stromal score와 immune score를 계산하였고, 이 두 점수를 합쳐 총합적인 점수로 표현한 ESTIMATE score도 계산하였다. 다섯 가지 VEGF 유전자군의 발현 수준과 위에서 언급한 세 가지 종양 순도 점수 사이의 상관 관계를 조사하기 위해 스피어맨 상관계수 (Spearman correlation) 분석 방법을 사용했다.
- [0130] ESTIMATE 알고리즘 : <https://www.nature.com/articles/ncomms3612>
- [0131] 그 결과, 특히 *VEGFC*의 높은 발현 수준이 높은 기질·면역 세포의 비율과 관련이 있음을 확인할 수 있었다. 이는 나쁜 예후를 나타내는 것으로 알려진 낮은 종양 순도 상태와 연관성이 있음을 의미한다(도 7 참조).
- [0133] 2-5. 약물 반응성 분석
- [0134] VEGF 유전자군의 발현 수준이 약물의 효과에 미치는 영향을 조사하기 위해, 해당 유전자군의 발현 수준에 따른 약물 반응성을 확인하였다.
- [0135] VEGF 유전자군의 전사체 발현 데이터와 약물 활성 데이터는 CellMiner 데이터베이스 (<https://discover.nci.nih.gov/cellminer/>)에서 다운로드 하였고, 데이터 전처리를 위해 R 패키지 "impute"를 사용했다.
- [0136] 임상 시험 중이거나 FDA 승인을 받은 약물들의 약물 감수성과 VEGF 유전자군의 발현 사이의 상관 관계를 조사하기 위해 Pearson correlation (피어슨 상관계수) 분석을 진행했다. Pearson correlation (피어슨 상관계수) 분석은 선형적으로 연관된 변인들 간 관계의 정도를 측정하기 위해 가장 널리 사용되는 통계 방법이다.
- [0137] 그 결과, *VEGFA*와 *VEGFC*의 높은 발현 수준은 다양한 항암 치료 약물에 대한 반응성을 증가시키는 것으로 확인되었다(도 8 참조).
- [0139] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

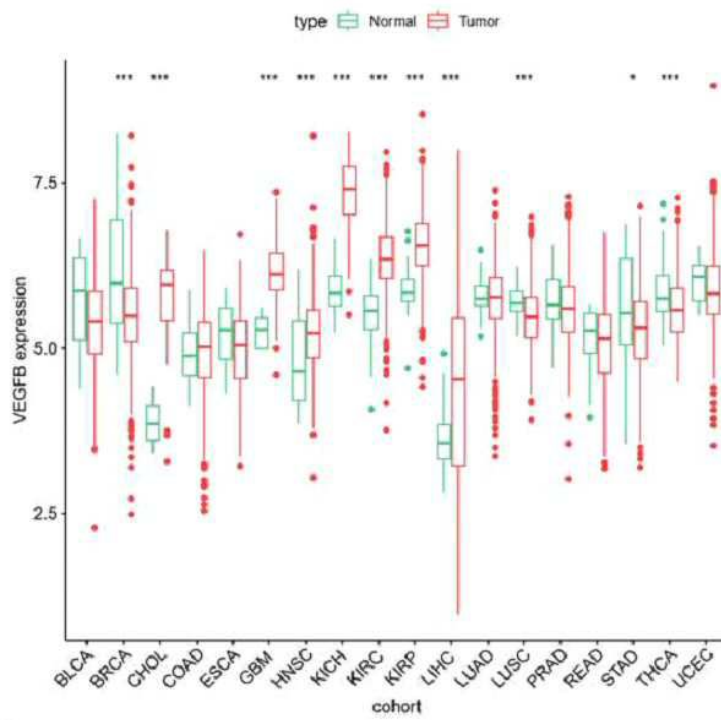
도면1a



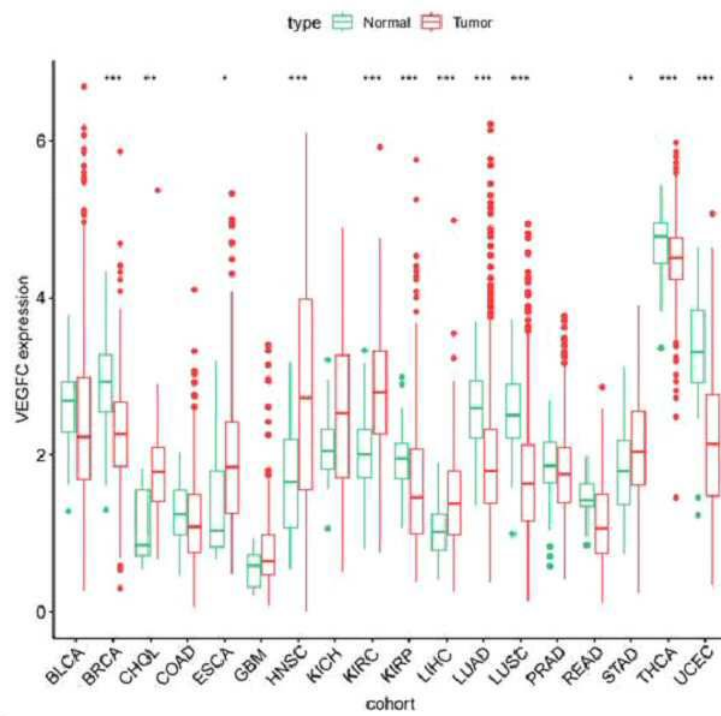
도면1b



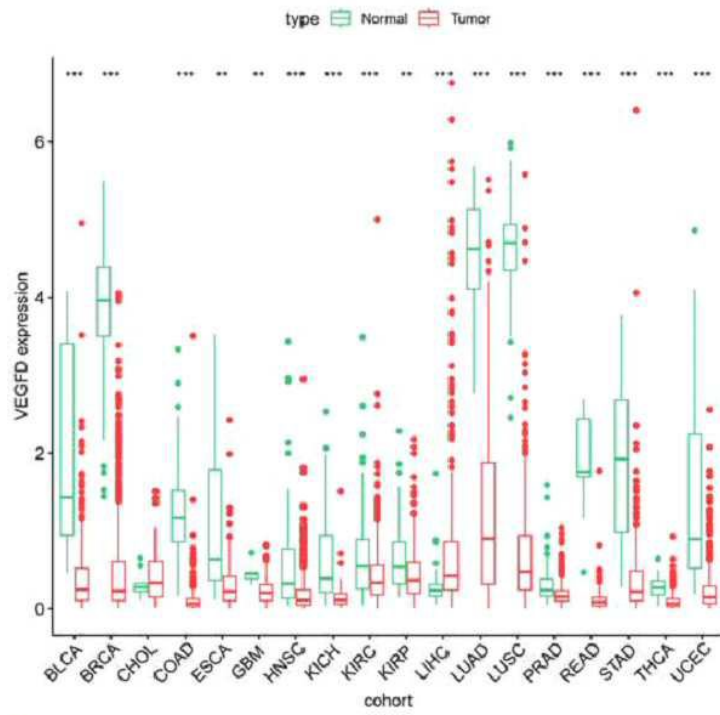
도면1c



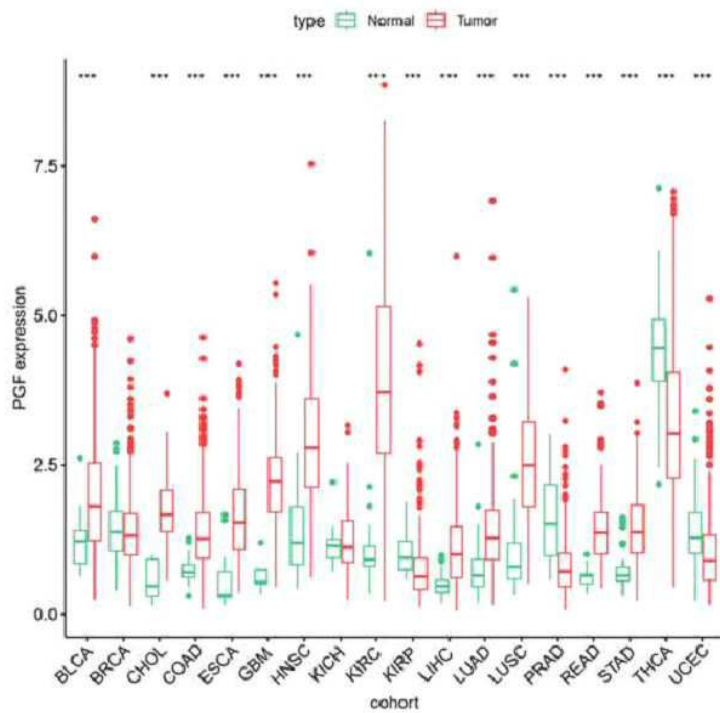
도면1d



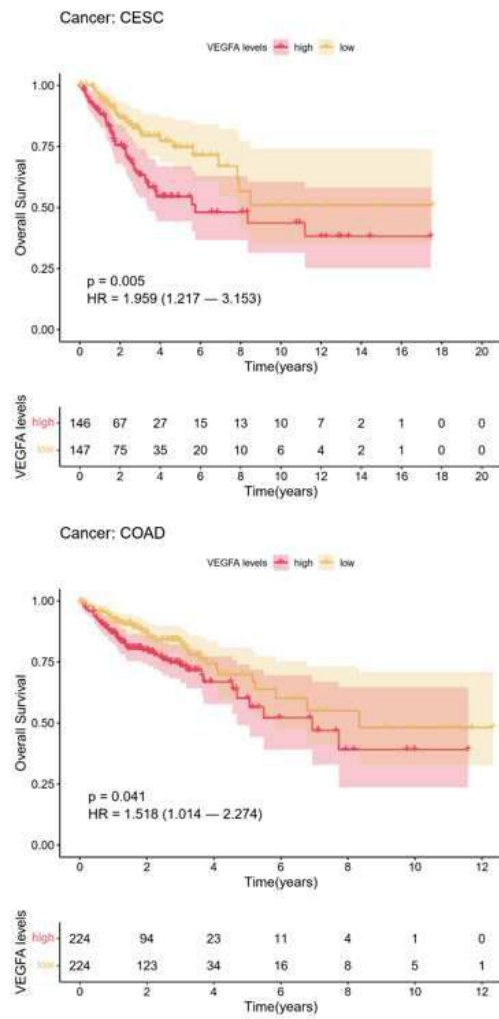
도면1e



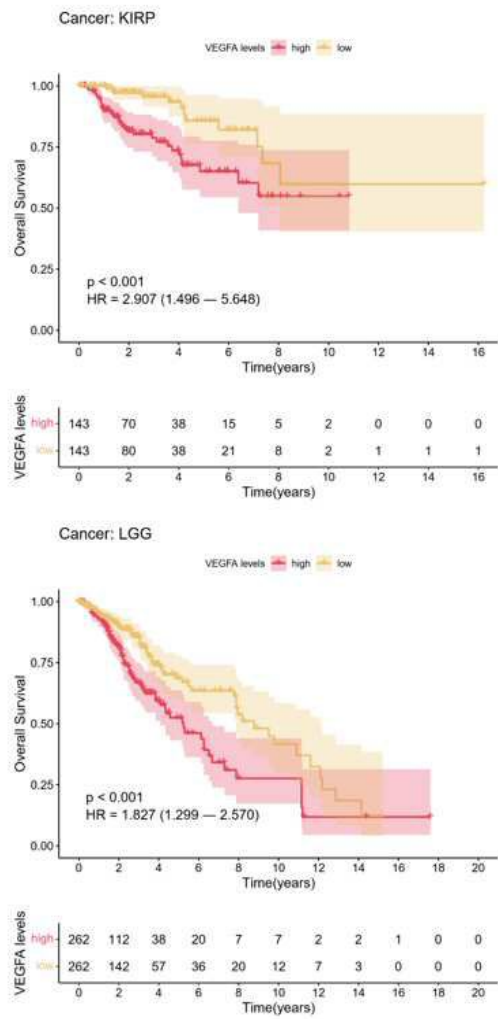
도면1f



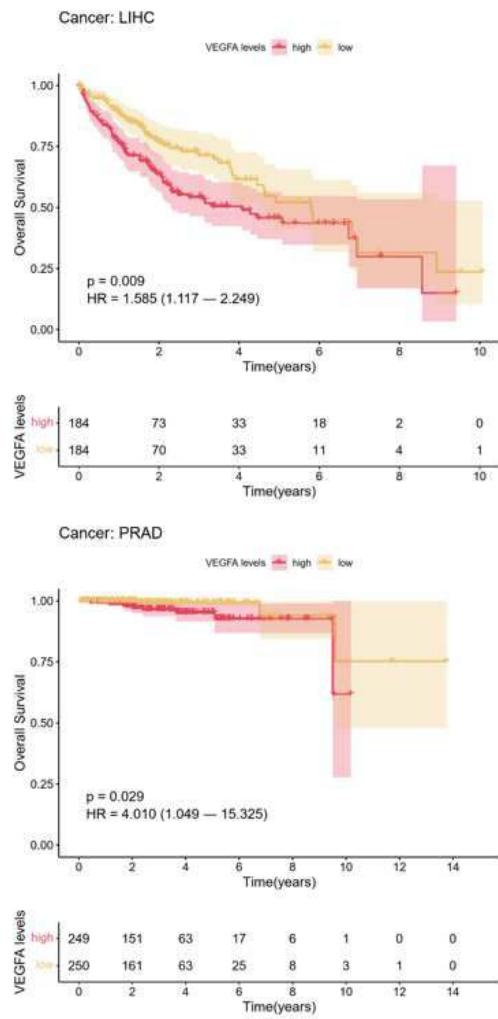
도면2a



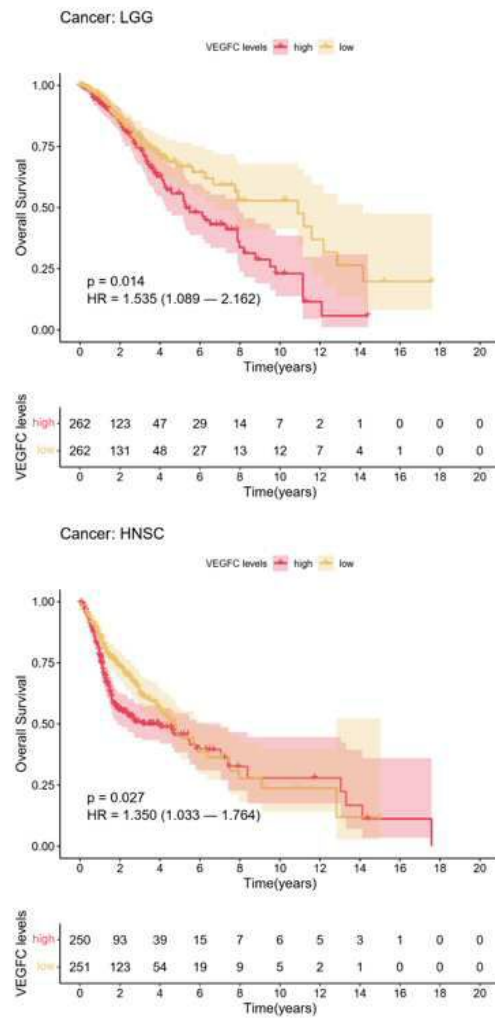
도면2b



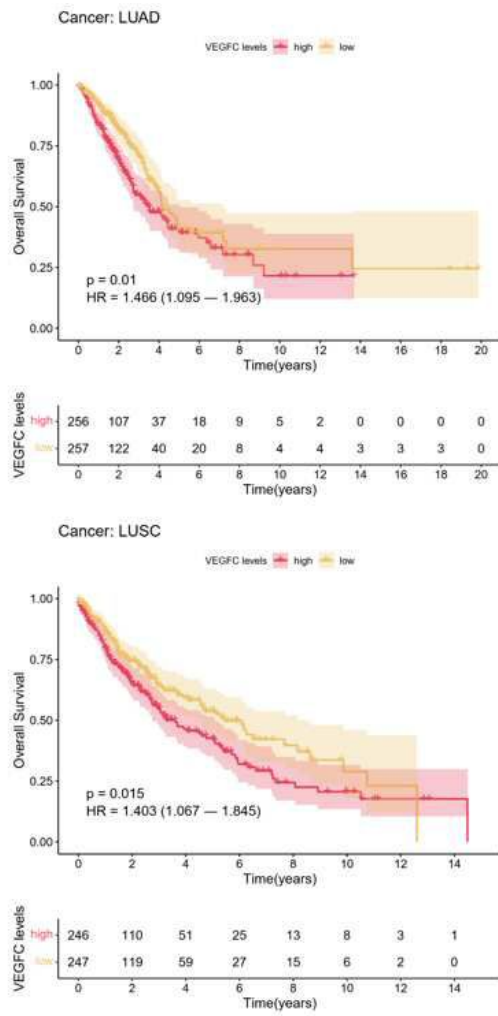
도면2c



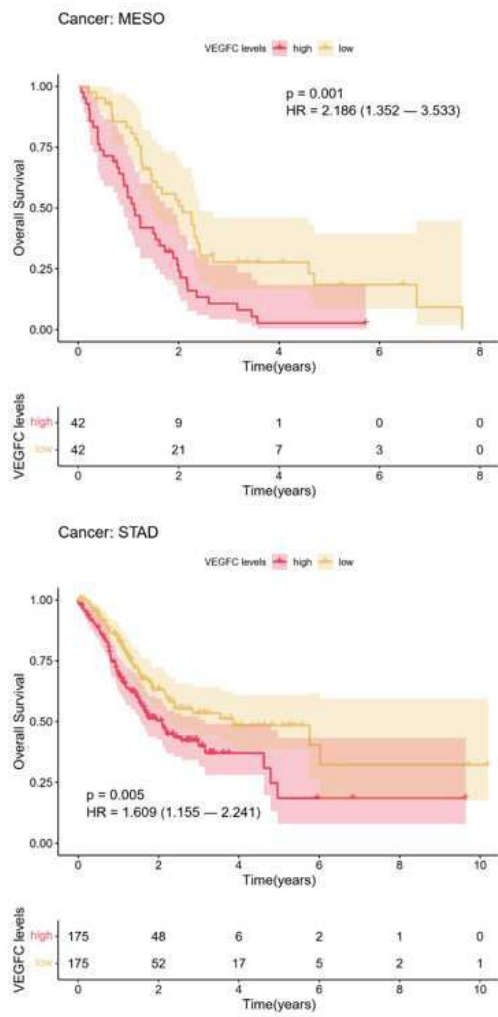
도면2d



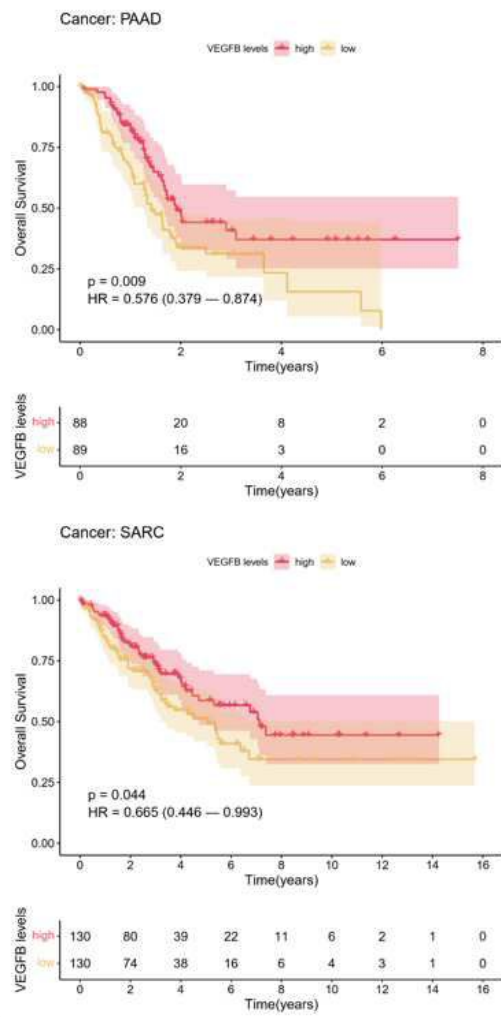
도면2e



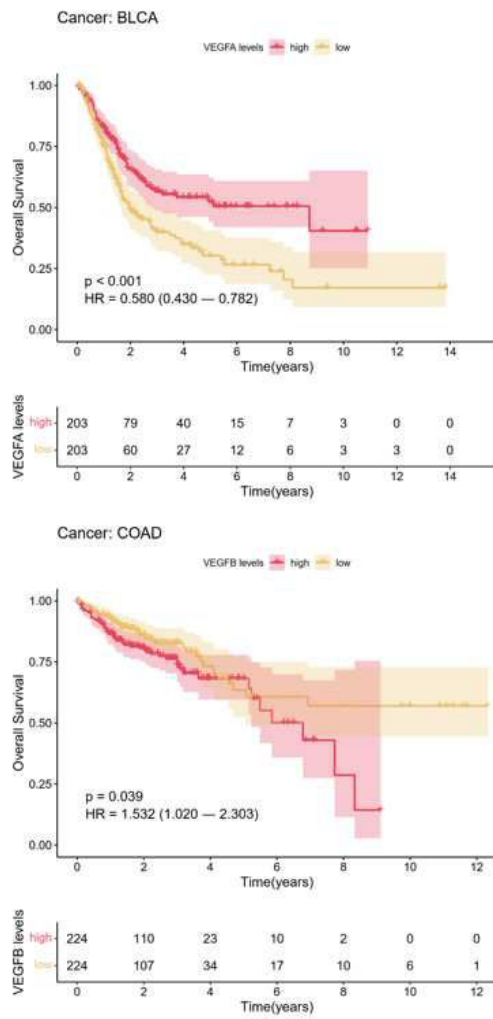
도면2f



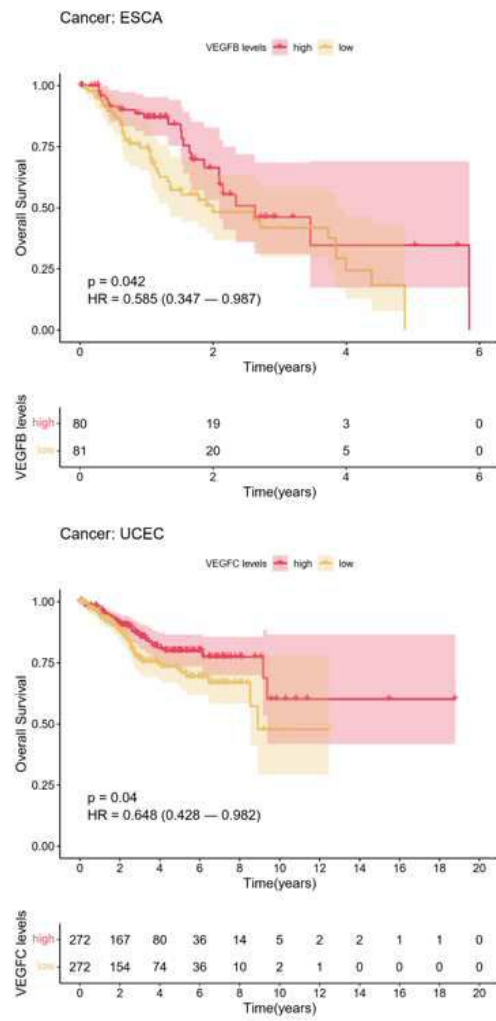
도면2g



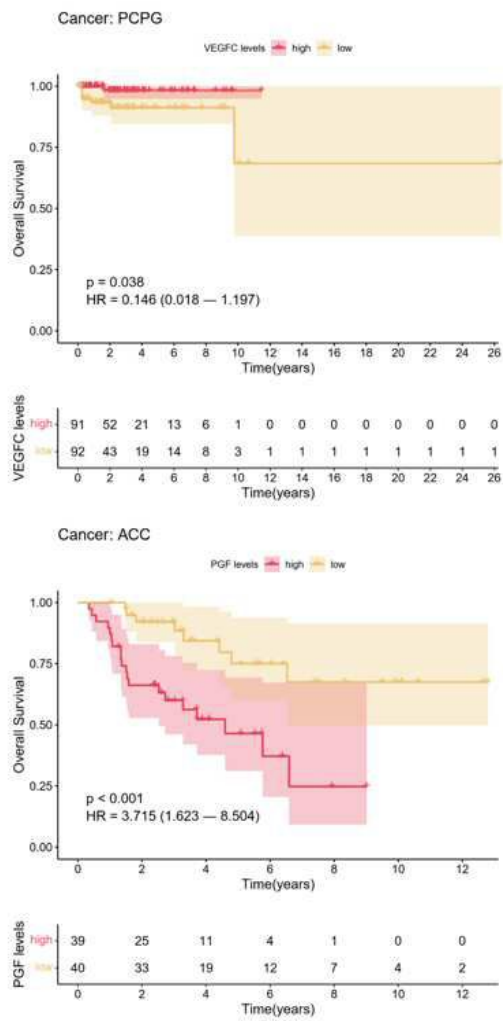
도면2h



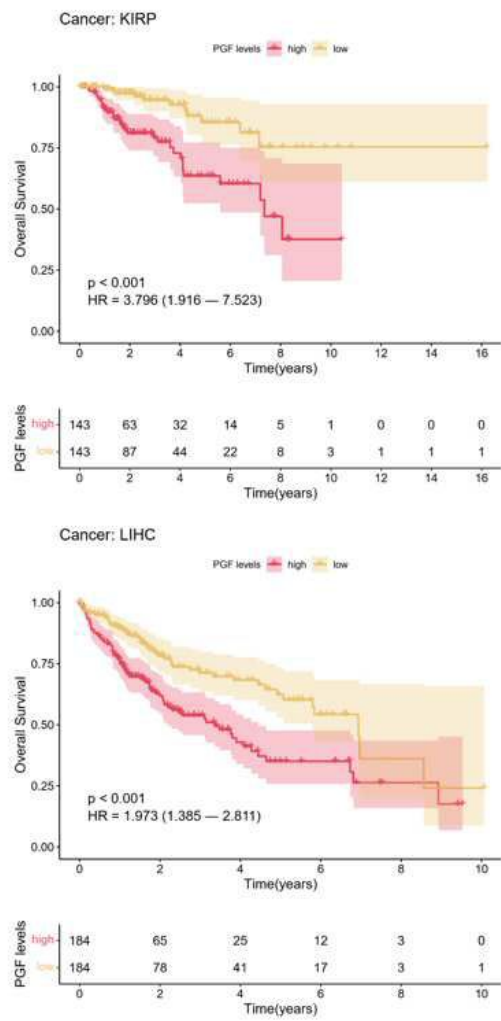
도면2i



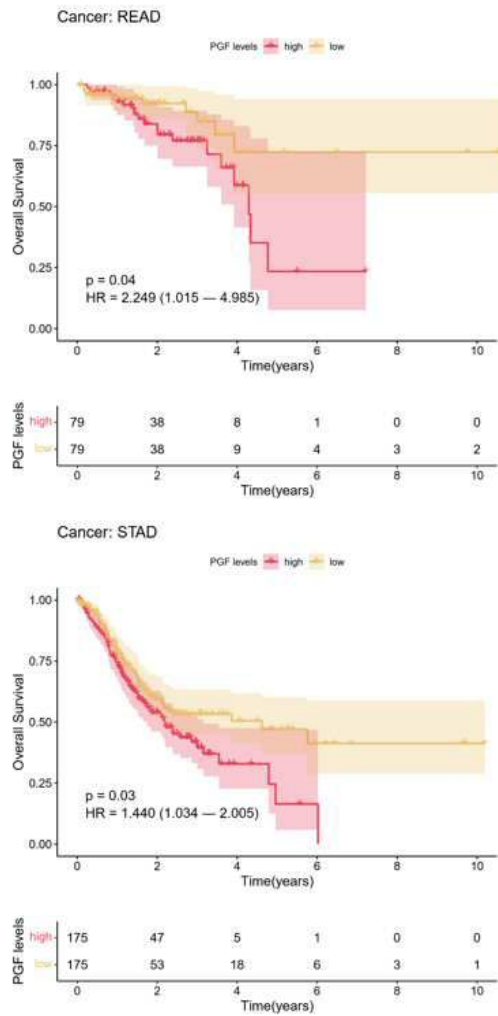
도면2j



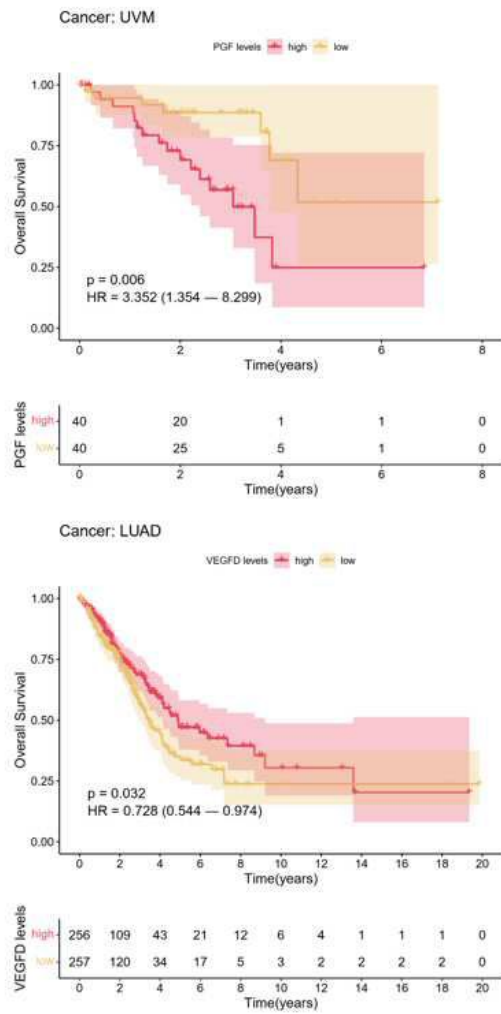
도면2k



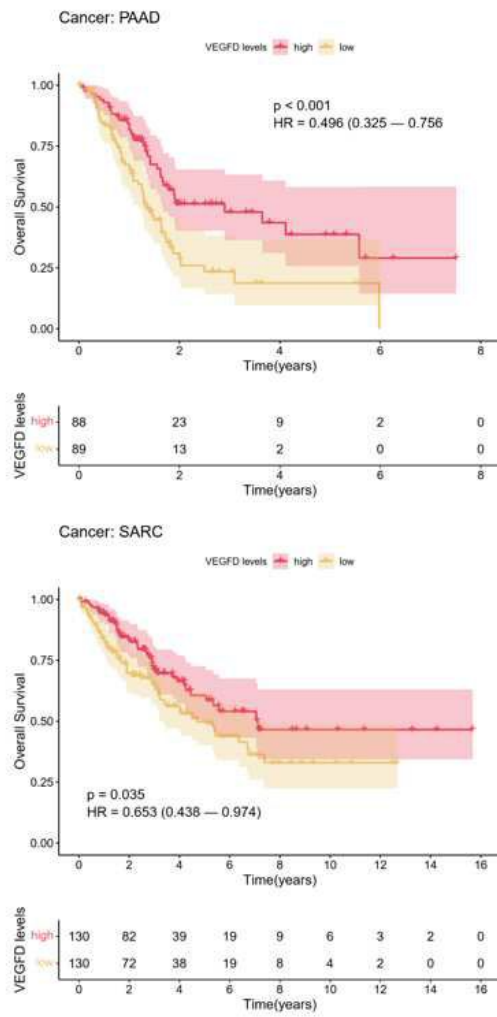
도면21



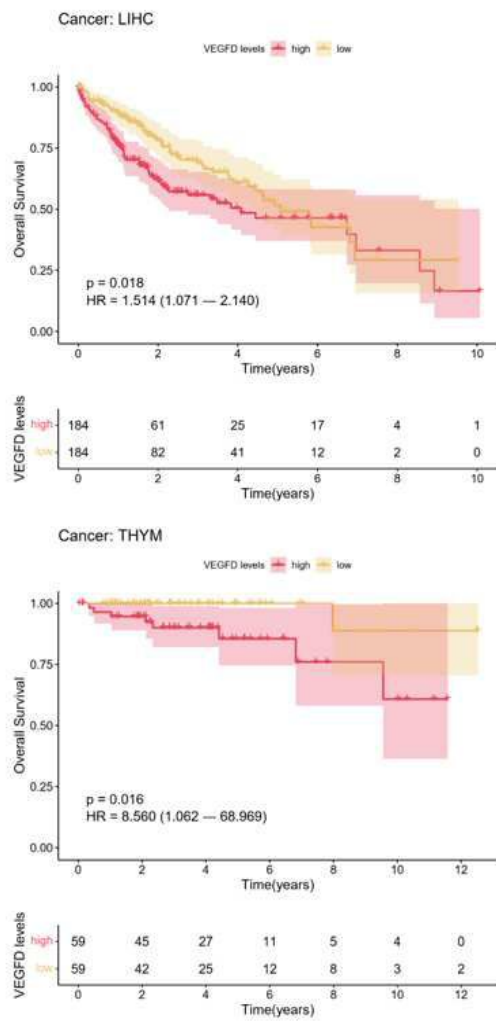
도면 2m



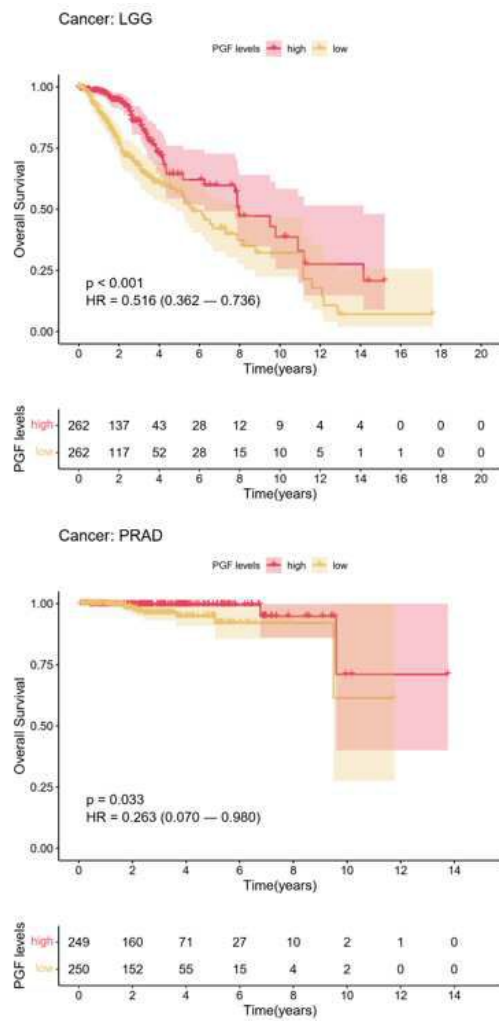
도면20



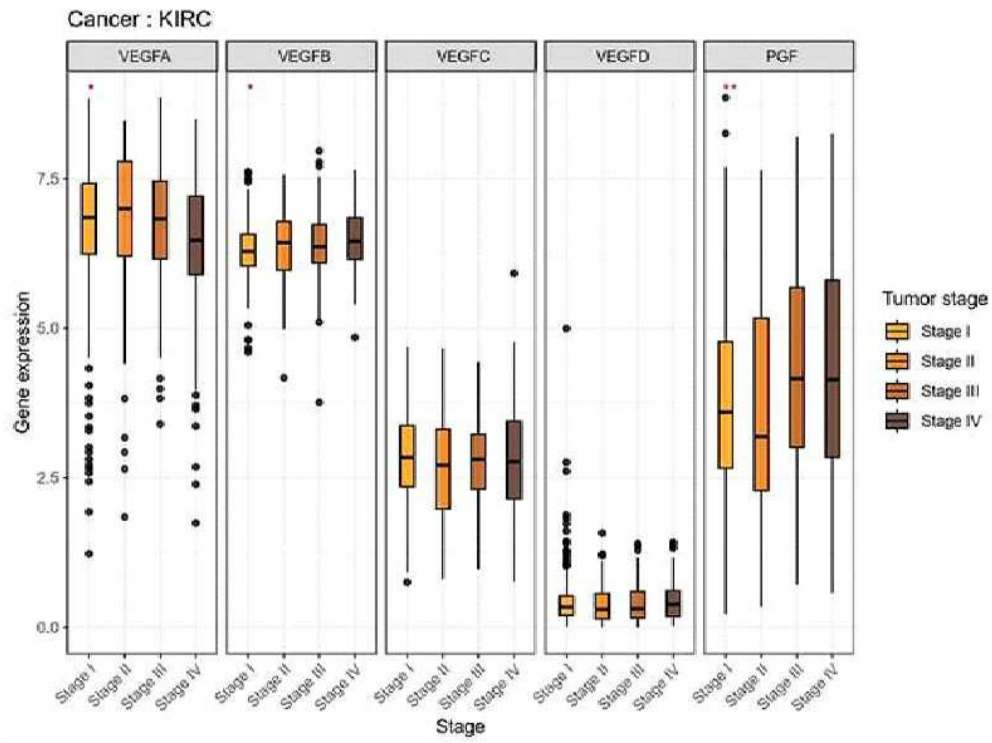
도면2p



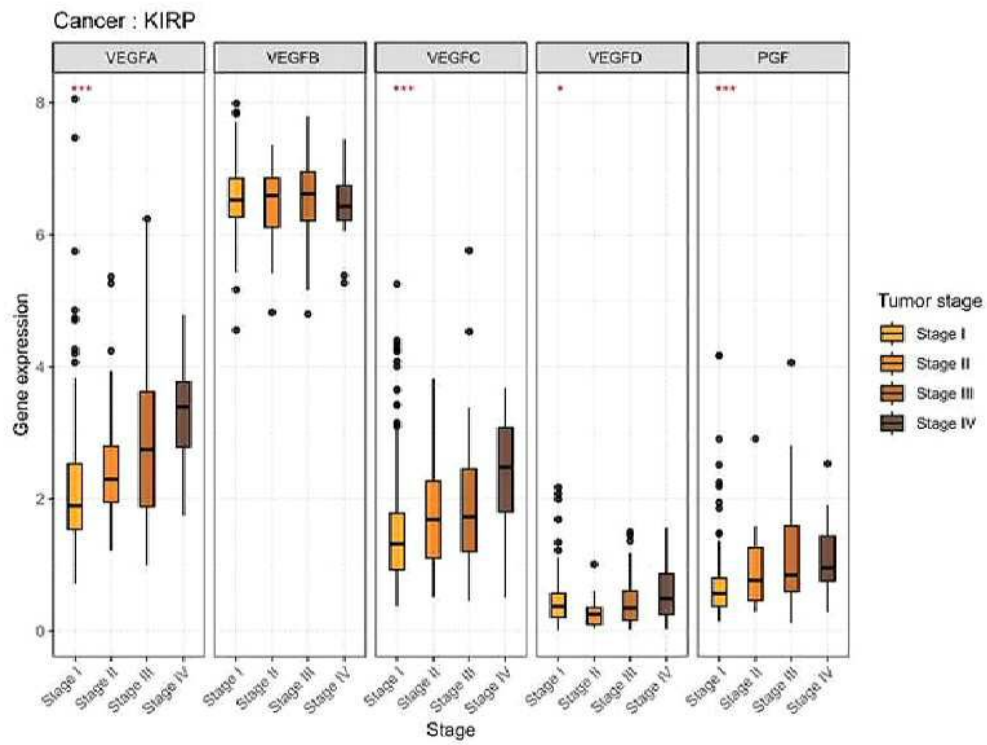
도면2q



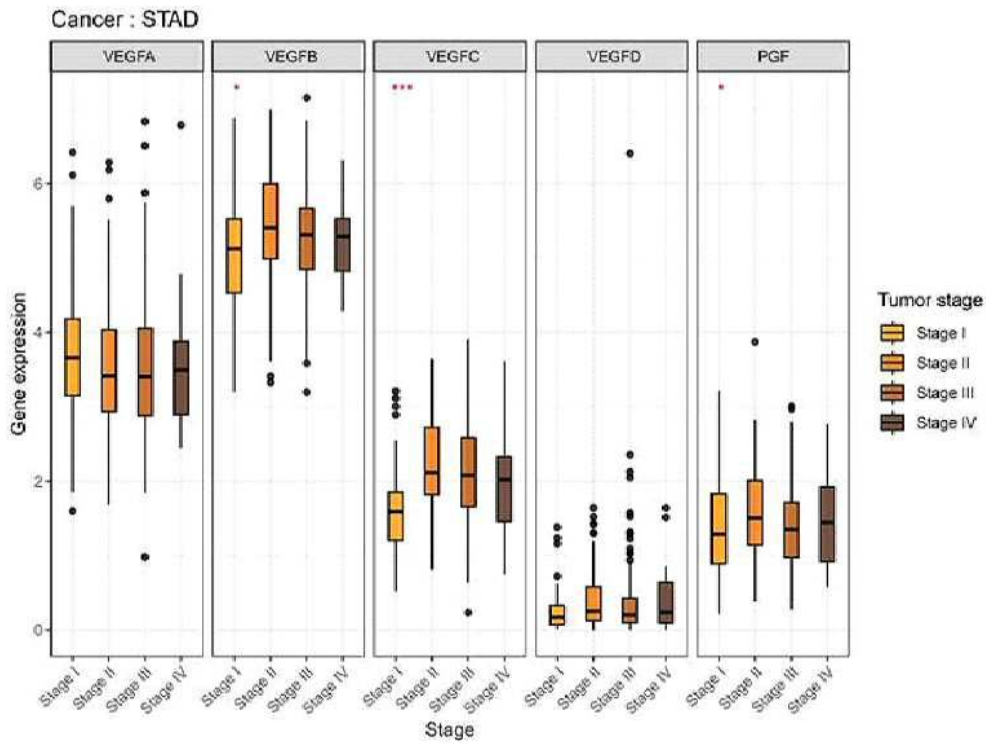
도면3a



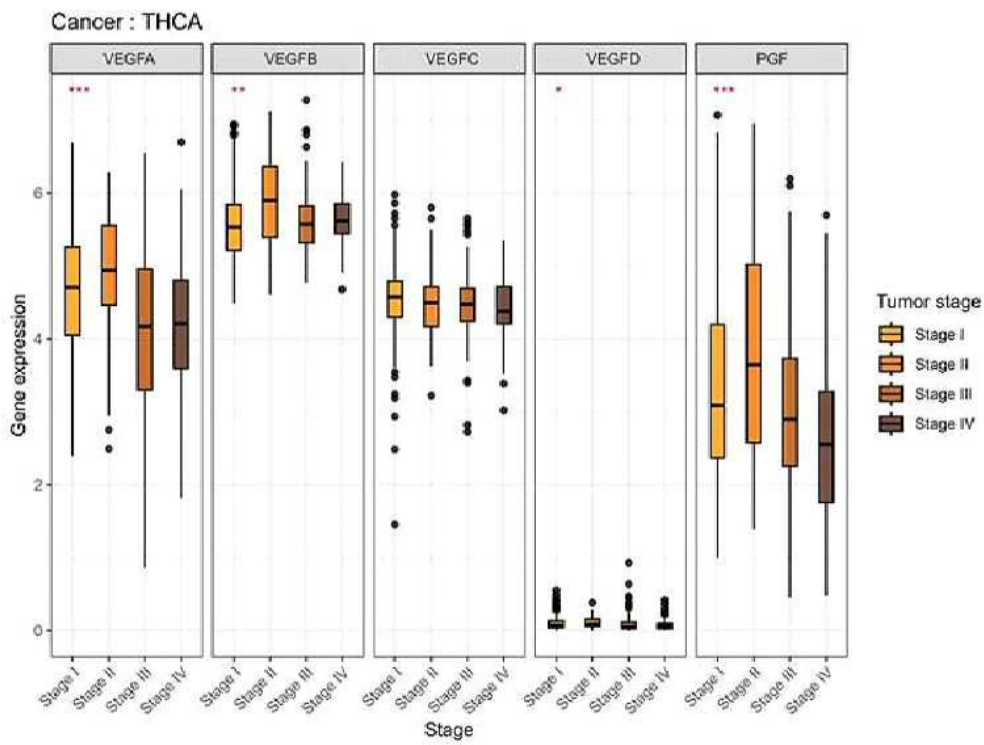
도면3b



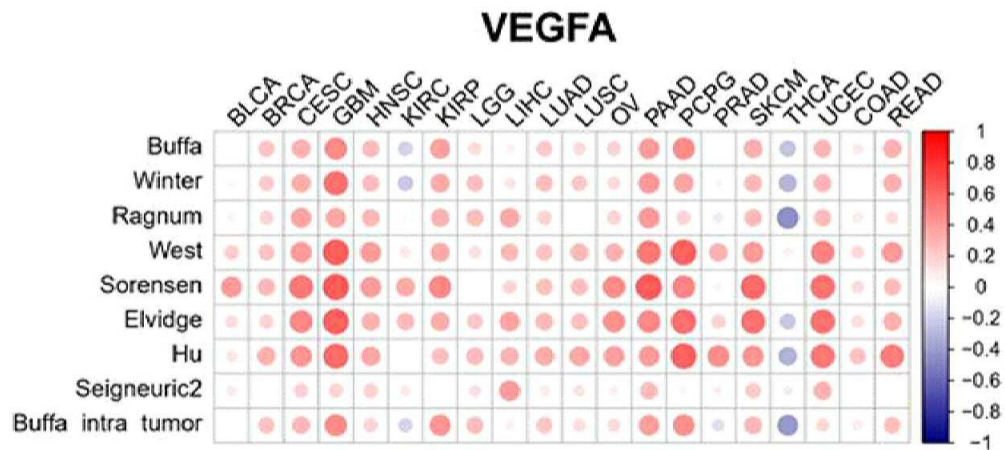
도면3c



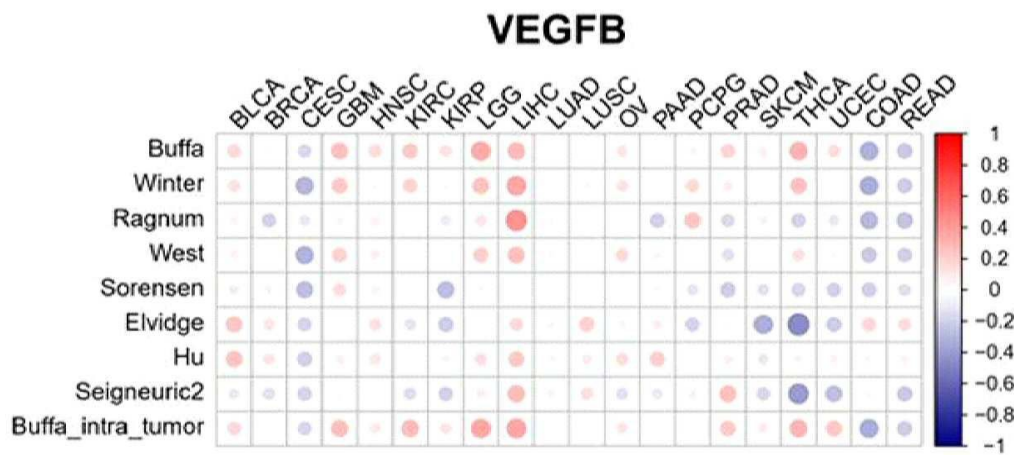
도면3d



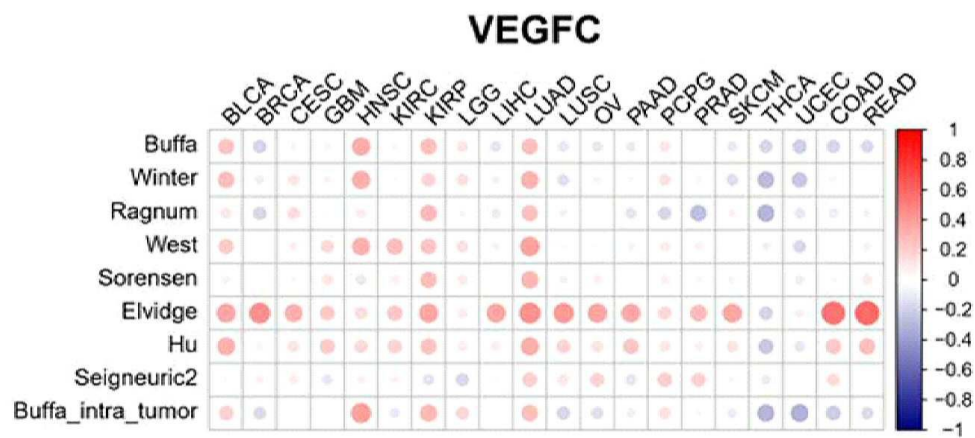
도면4a



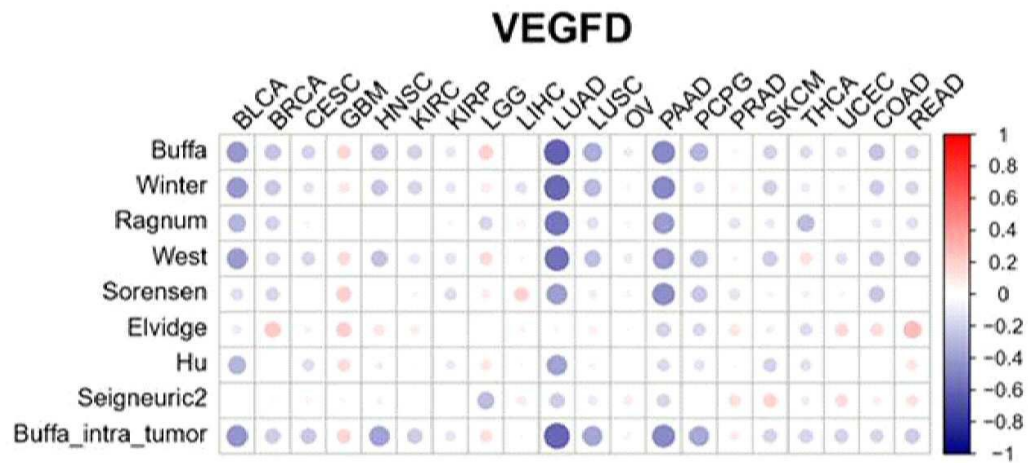
도면4b



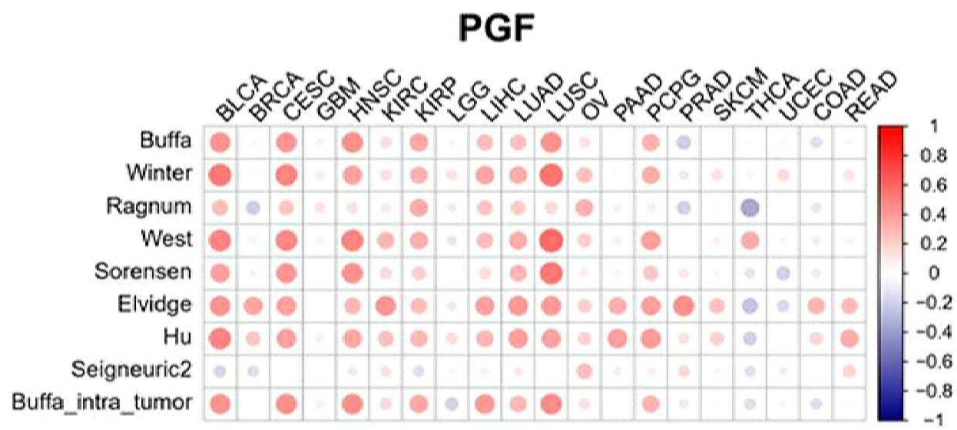
도면4c



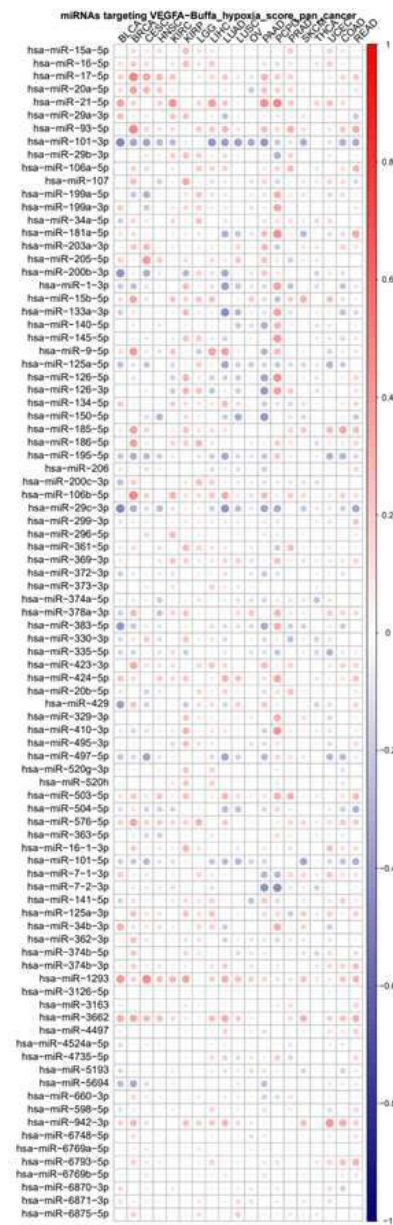
도면4d



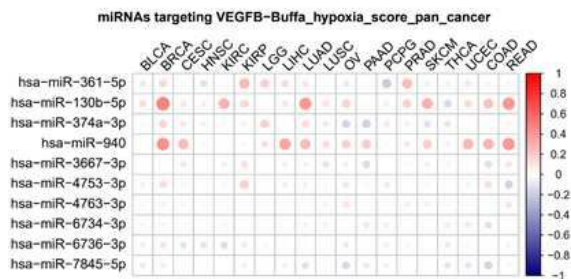
도면4e



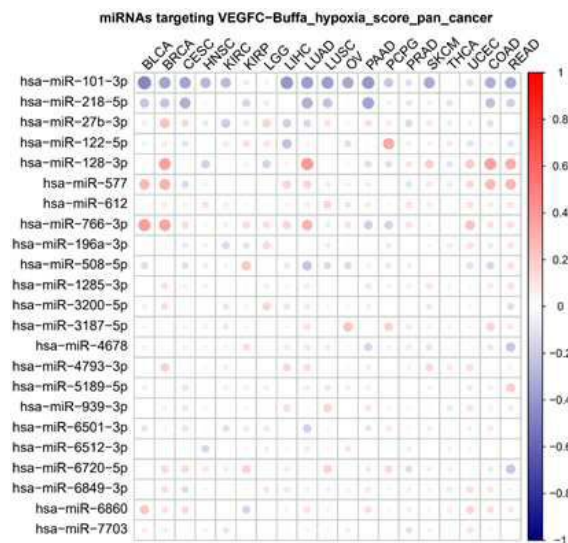
도면5a



도면5b



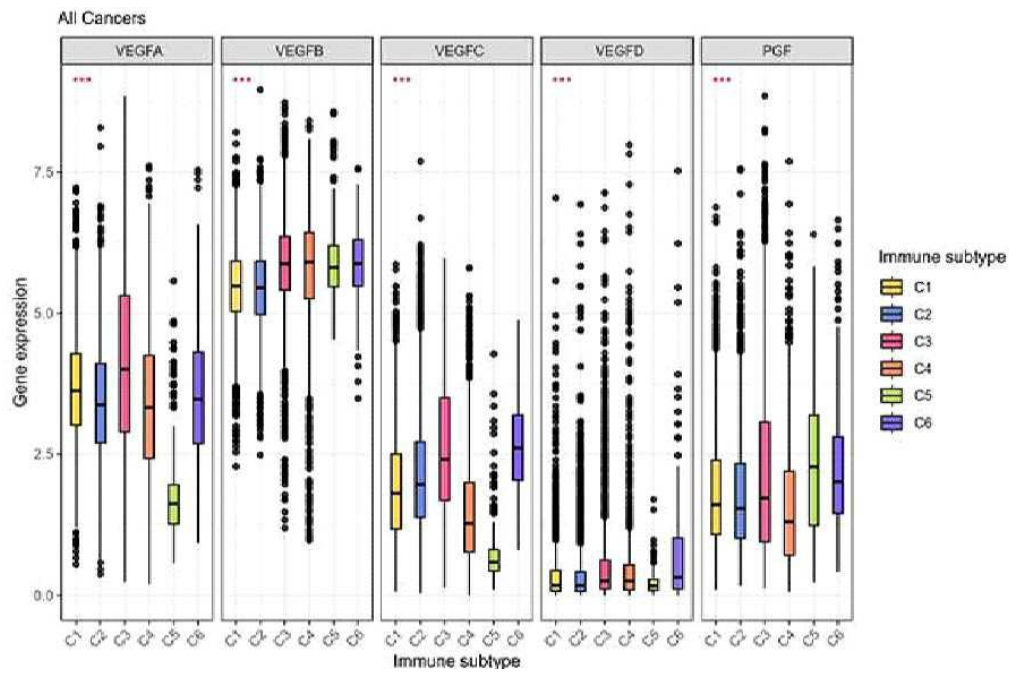
도면5c



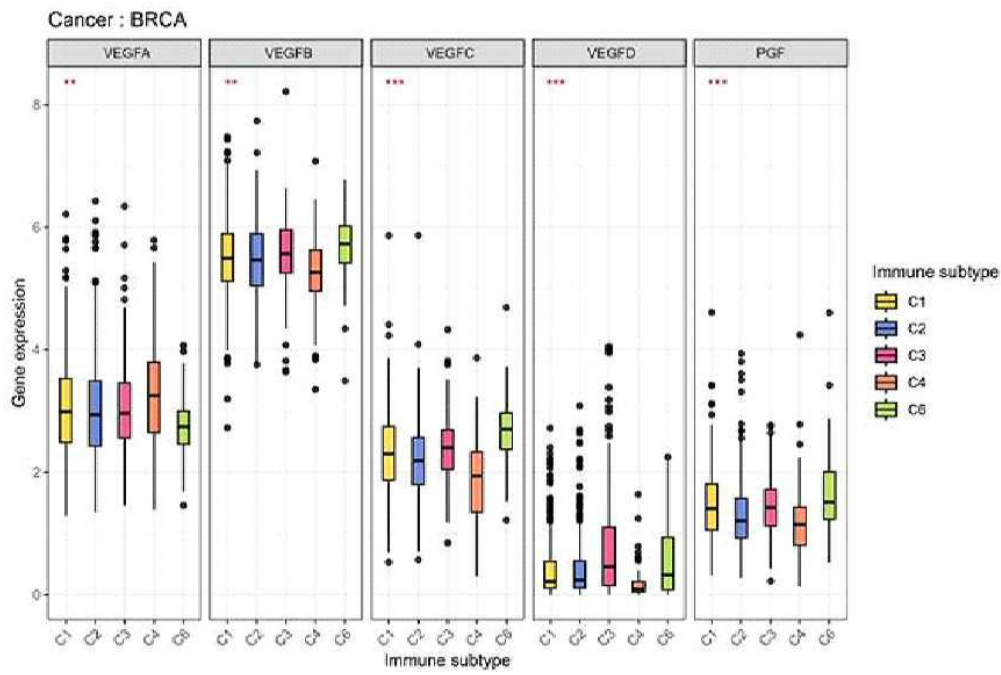
도면5d



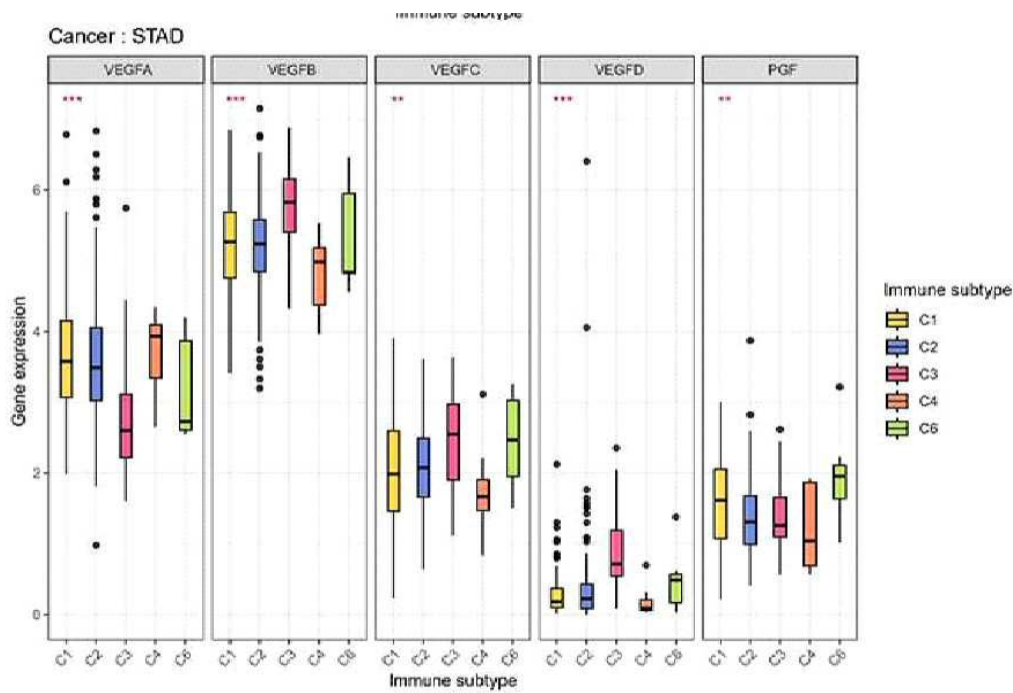
도면6a



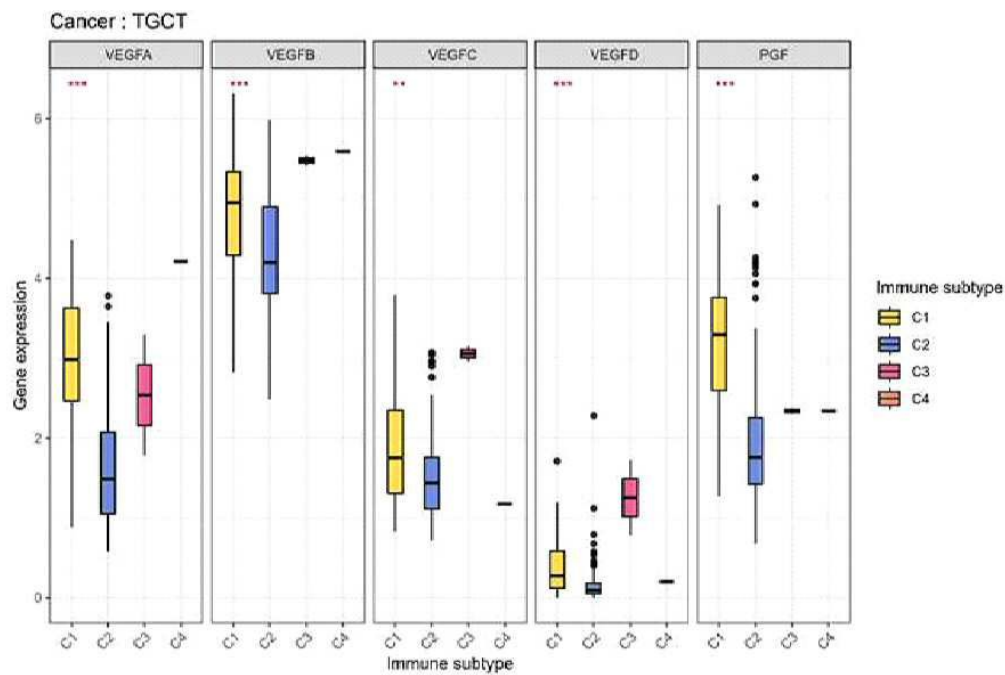
도면6b



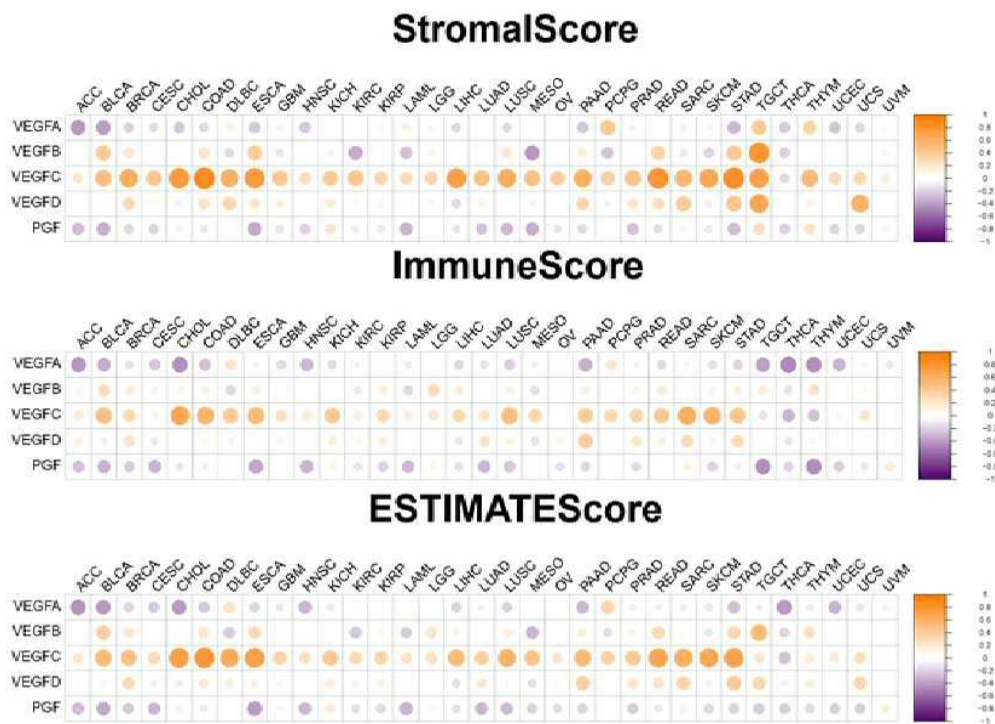
도면6c



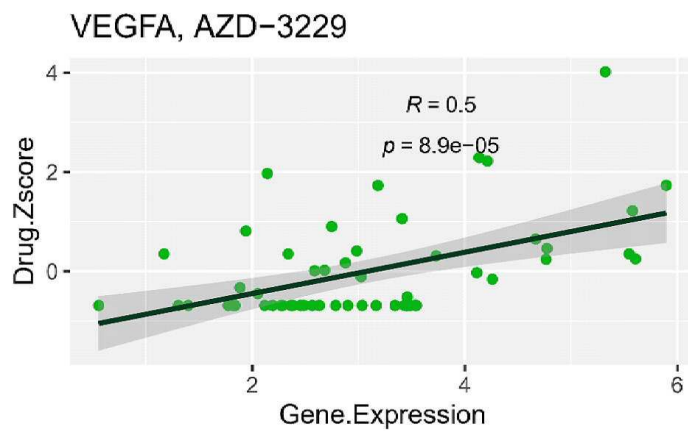
도면6d



도면7



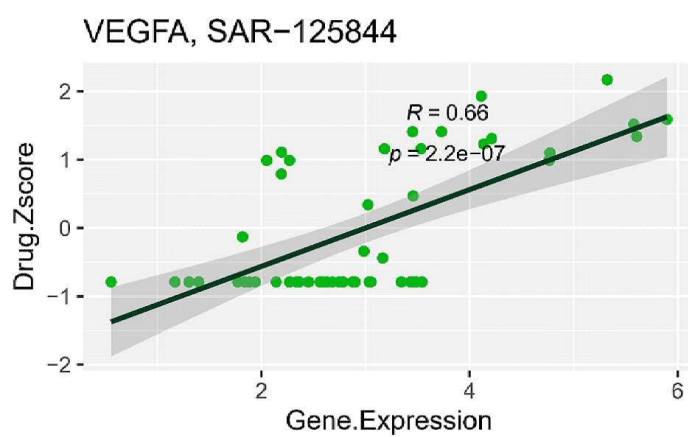
도면8a



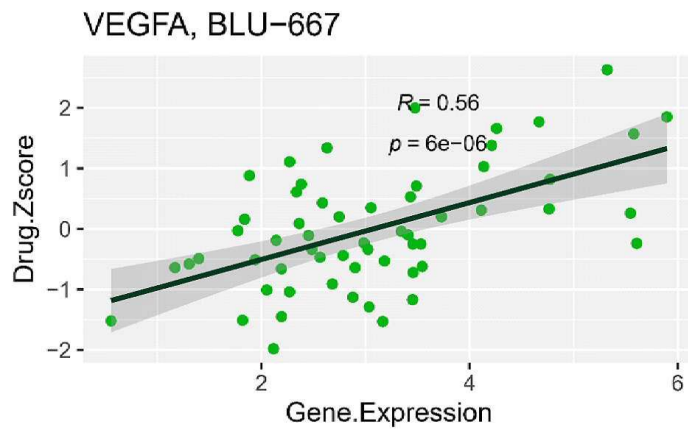
도면8b



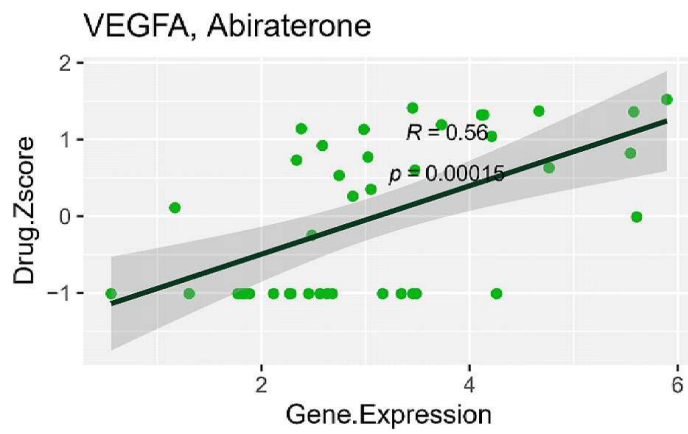
도면8c



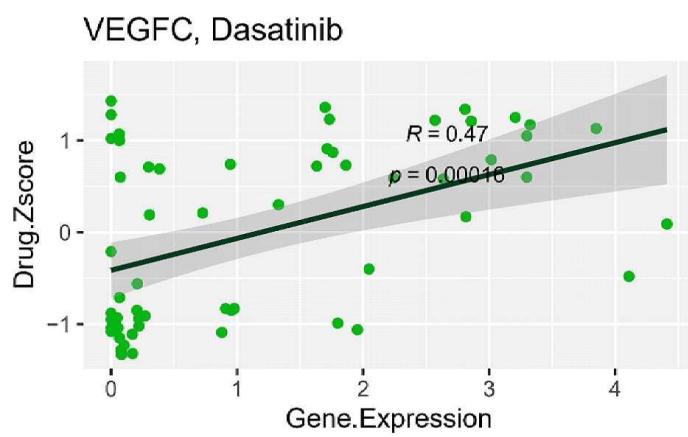
도면8d



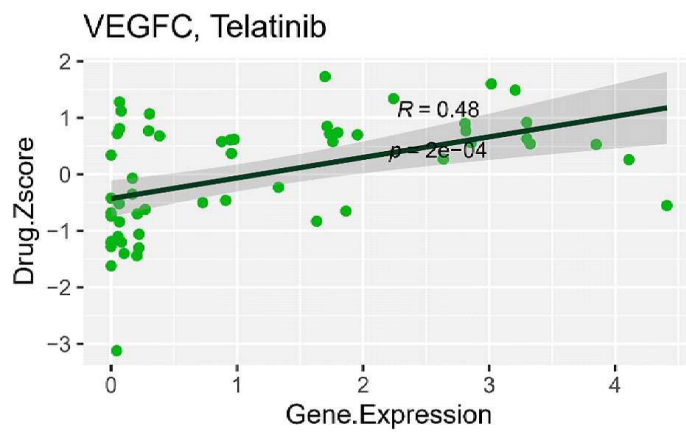
도면8e



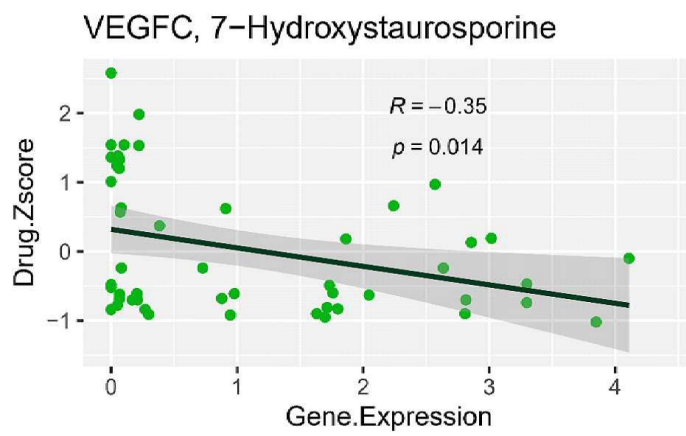
도면8f



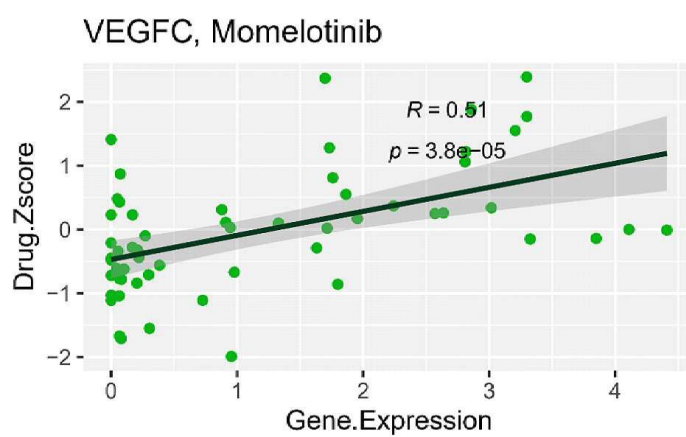
도면8g



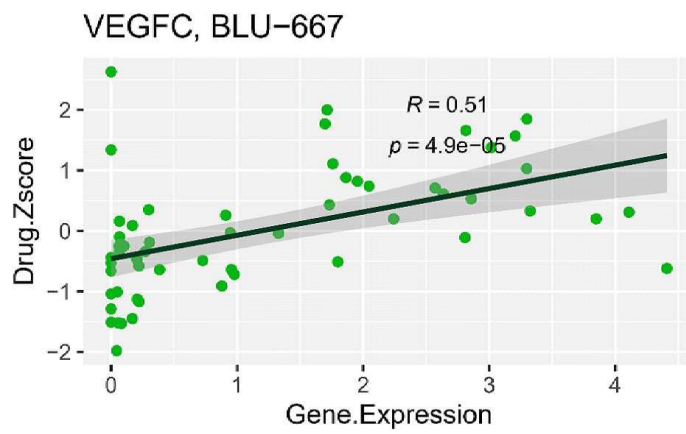
도면8h



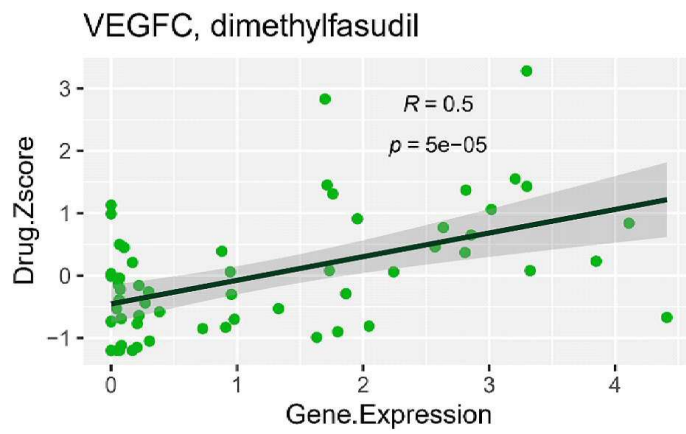
도면8i



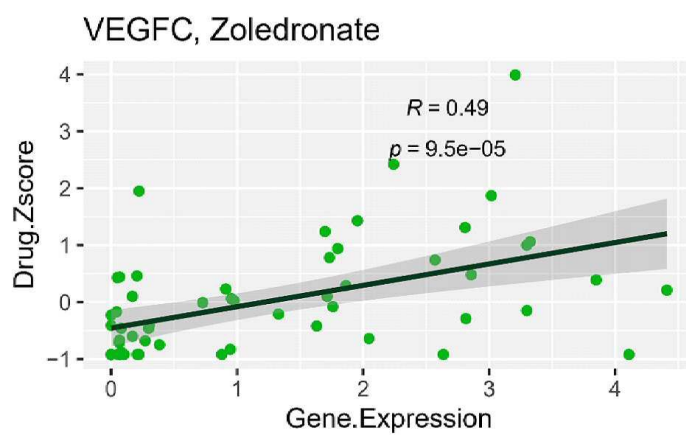
도면8j



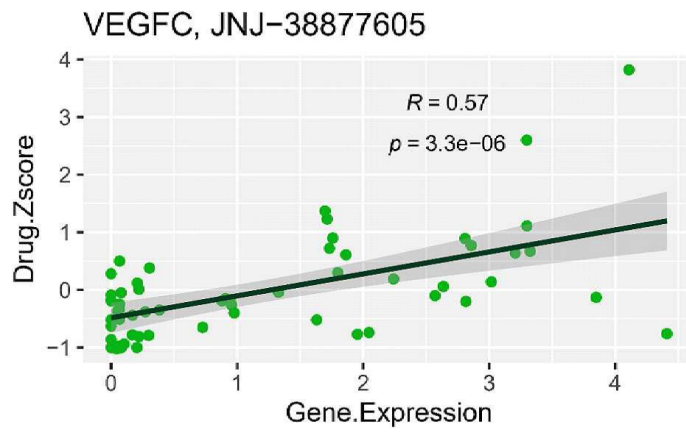
도면8k



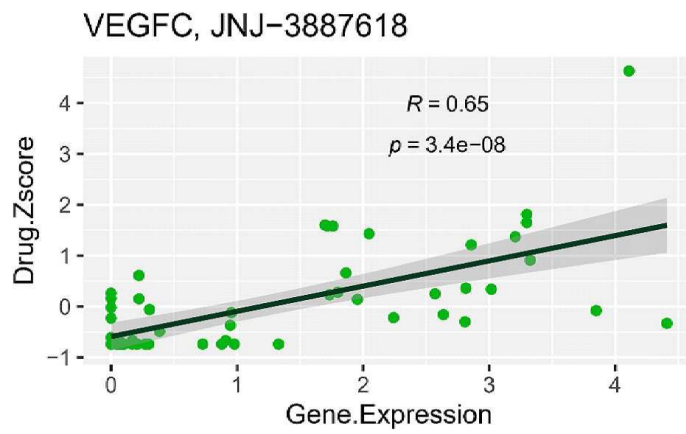
도면8l



도면8m



도면8n



도면8o

