



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0056748
(43) 공개일자 2021년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/574 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0143564
(22) 출원일자 2019년11월11일
심사청구일자 2020년08월20일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
김완규
서울특별시 송파구 올림픽로 99, 109동 1801호(잠실동, 잠실엘스)
차혁진
서울특별시 강남구 선릉로126길 22, 104동 901호(삼성동, 롯데캐슬프레미어아파트)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

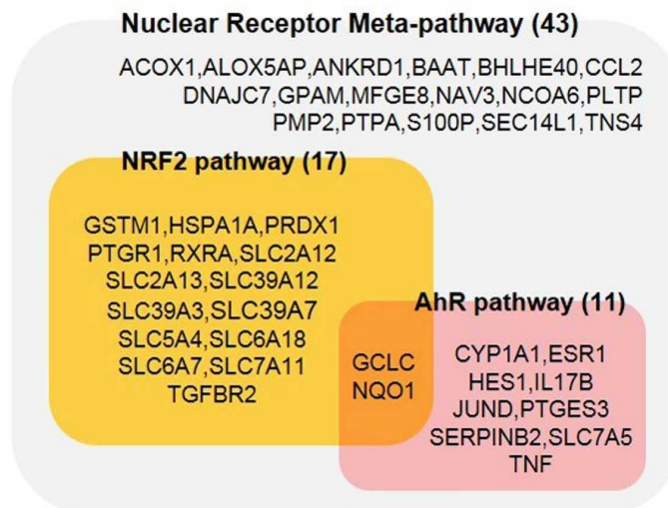
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 이라스틴에 대한 반응성 예측용 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 이라스틴에 대한 반응성 예측용 마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 항암제인 이라스틴에 대한 반응성을 예측할 수 있는 마커 유전자, 이의 발현수준을 측정하는 체제를 포함하는 반응성 예측용 조성물 및 키트, 및 상기 마커 유전자를 이용해 반응성을 예측하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 유전자 바이오마커는 이라스틴 항암제에 대한 반응성을 예측하는데 유효한 마커임을 확인하였는바, 이라스틴 또는 이라스틴 유사체를 이용한 치료에서 상기 유전자들의 발현수준을 측정함으로써 암 환자, 특히 폐암 환자에서 이라스틴 항암제에 대한 반응성을 미리 예측할 수 있고, 이를 통해 반응성 유무에 따라 암 환자를 효율적으로 분류하여 적절하고 효과적인 치료법을 적용하는데 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도2c



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/106 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

G01N 2800/60 (2013.01)

(72) 발명자

권옥선

서울특별시 서대문구 통일로25길 30, 101동 402호
(홍제동, 홍제한양아파트)

이해승

서울특별시 동대문구 이문로12길 3-10, 109동 200
3호(이문동, 래미안이문2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711082477

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업(학술진흥)(2017)-포스트게놈 다부처유전체사업-기반산업화 인프라

연구과제명 시스템 생명정보 분석 기반 약물 작용점 발굴

기 여 율 1/1

과제수행기관명 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

ACOX1(acyl-CoA oxidase 1; GenBank 접근(accession) 번호: NM_001185039, NM_004035, NM_007292), ALOX5AP(arachidonate 5-lipoxygenase activating protein; NM_001204406, NM_001629), ANKRD1(ankyrin repeat domain 1; NM_014391), BAAT(bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase; NM_001127610, NM_001701), BHLHE40(basic helix-loop-helix family member e40; NM_003670), CCL2(C-C motif chemokine ligand 2; NM_002982), CYP1A1(cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1; NM_000499, NM_001319216, NM_001319217), DNAJC7(DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C7; NM_001144766, NM_003315), ESR1(estrogen receptor 1; NM_000125, NM_001122740, NM_001122741, NM_001122742, NM_001291230, NM_001291241, NM_001328100), GCLC(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit; NM_001197115, NM_001498), GPAM(glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial; NM_001244949, NM_020918), GSTM1(glutathione S-transferase mu 1; NM_000561, NM_146421), HES1(hes family bHLH transcription factor 1; NM_005524), HSPA1A(heat shock protein family A (Hsp70) member 1A; NM_005345), IL17B(interleukin 17B; NM_001317987, NM_014443), JUND(JunD proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; NM_001286968, NM_005354), MFGE8(milk fat globule-EGF factor 8 protein; NM_001114614, NM_001310319, NM_001310320, NM_001310321, NM_005928), NAV3(neuron navigator 3; NM_001024383, NM_014903), NCOA6(nuclear receptor coactivator 6; NM_001242539, NM_001318240, NM_014071), NQO1(NAD(P)H quinone dehydrogenase 1; NM_000903, NM_001025433, NM_001025434, NM_001286137), PLTP(phospholipid transfer protein; NM_001242920, NM_001242921, NM_006227, NM_182676), PMP2(peripheral myelin protein 2; NM_001348381, NM_002677), PRDX1(peroxiredoxin 1; NM_001202431, NM_002574, NM_181696, NM_181697), PTGES3(prostaglandin E synthase 3; NM_001282601, NM_001282602, NM_001282603, NM_001282604, NM_001282605, NM_006601), PTGR1(prostaglandin reductase 1; NM_001146108, NM_001146109, NM_012212), PTPA(protein phosphatase 2 phosphatase activator; NM_001193397, NM_001271832, NM_021131, NM_178000, NM_178001, NM_178002, NM_178003), RXRA(retinoid X receptor alpha; NM_001291920, NM_001291921, NM_002957), S100P(S100 calcium binding protein P; NM_005980), SEC14L1(SEC14 like lipid binding 1; NM_001039573, NM_001143998, NM_001143999, NM_001144001, NM_001204408, NM_001204410, NM_003003), SERPINB2(serpin family B member 2; NM_001143818, NM_002575), SLC2A12(solute carrier family 2 member 12; NM_145176), SLC2A13(solute carrier family 2 member 13; NM_052885), SLC39A12(solute carrier family 39 member 12; NM_001145195, NM_001282733, NM_001282734, NM_152725), SLC39A3(solute carrier family 39 member 3; NM_144564, NM_213568), SLC39A7(solute carrier family 39 member 7; NM_001077516, NM_001288777, NM_006979), SLC5A4(solute carrier family 5 member 4; NM_014227), SLC6A18(solute carrier family 6 member 18; NM_182632), SLC6A7(solute carrier family 6 member 7; NM_014228), SLC7A11(solute carrier family 7 member 11; NM_014331), SLC7A5(solute carrier family 7 member 5; NM_003486), TGFBR2(transforming growth factor beta receptor 2; NM_001024847, NM_003242), TNF(tumor necrosis factor; NM_000594) 및 TNS4(tensin 4; NM_032865)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 GSTM1, HSPA1A, PRDX1, PTGR1, RXRA, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7, SLC7A11, TGFBR2, GCLC 및 NQO1은 NRF2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 경로에 관련된 유전자인 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CYP1A1, ESR1, HES1, IL17B, JUND, PTGES3, SERPINB2, SLC7A5, TNF, GCLC 및 NQO1은 AhR(Aryl hydrocarbon receptor) 경로에 관련된 유전자인 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

청구항 4

ACOX1(acyl-CoA oxidase 1; GenBank 접근(accession) 번호: NM_001185039, NM_004035, NM_007292), ALOX5AP(arachidonate 5-lipoxygenase activating protein; NM_001204406, NM_001629), ANKRD1(ankyrin repeat domain 1; NM_014391), BAAT(bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase; NM_001127610, NM_001701), BHLHE40(basic helix-loop-helix family member e40; NM_003670), CCL2(C-C motif chemokine ligand 2; NM_002982), CYP1A1(cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1; NM_000499, NM_001319216, NM_001319217), DNAJC7(DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C7; NM_001144766, NM_003315), ESR1(estrogen receptor 1; NM_000125, NM_001122740, NM_001122741, NM_001122742, NM_001291230, NM_001291241, NM_001328100), GCLC(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit; NM_001197115, NM_001498), GPAM(glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial; NM_001244949, NM_020918), GSTM1(glutathione S-transferase mu 1; NM_000561, NM_146421), HES1(hes family bHLH transcription factor 1; NM_005524), HSPA1A(heat shock protein family A (Hsp70) member 1A; NM_005345), IL17B(interleukin 17B; NM_001317987, NM_014443), JUND(JunD proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; NM_001286968, NM_005354), MFGE8(milk fat globule-EGF factor 8 protein; NM_001114614, NM_001310319, NM_001310320, NM_001310321, NM_005928), NAV3(neuron navigator 3; NM_001024383, NM_014903), NCOA6(nuclear receptor coactivator 6; NM_001242539, NM_001318240, NM_014071), NQO1(NAD(P)H quinone dehydrogenase 1; NM_000903, NM_001025433, NM_001025434, NM_001286137), PLTP(phospholipid transfer protein; NM_001242920, NM_001242921, NM_006227, NM_182676), PMP2(peripheral myelin protein 2; NM_001348381, NM_002677), PRDX1(peroxiredoxin 1; NM_001202431, NM_002574, NM_181696, NM_181697), PTGES3(prostaglandin E synthase 3; NM_001282601, NM_001282602, NM_001282603, NM_001282604, NM_001282605, NM_006601), PTGR1(prostaglandin reductase 1; NM_001146108, NM_001146109, NM_012212), PTPA(protein phosphatase 2 phosphatase activator; NM_001193397, NM_001271832, NM_021131, NM_178000, NM_178001, NM_178002, NM_178003), RXRA(retinoid X receptor alpha; NM_001291920, NM_001291921, NM_002957), S100P(S100 calcium binding protein P; NM_005980), SEC14L1(SEC14 like lipid binding 1; NM_001039573, NM_001143998, NM_001143999, NM_001144001, NM_001204408, NM_001204410, NM_003003), SERPINB2(serpin family B member 2; NM_001143818, NM_002575), SLC2A12(solute carrier family 2 member 12; NM_145176), SLC2A13(solute carrier family 2 member 13; NM_052885), SLC39A12(solute carrier family 39 member 12; NM_001145195, NM_001282733, NM_001282734, NM_152725), SLC39A3(solute carrier family 39 member 3; NM_144564, NM_213568), SLC39A7(solute carrier family 39 member 7; NM_001077516, NM_001288777, NM_006979), SLC5A4(solute carrier family 5 member 4; NM_014227), SLC6A18(solute carrier family 6 member 18; NM_182632), SLC6A7(solute carrier family 6 member 7; NM_014228), SLC7A11(solute carrier family 7 member 11; NM_014331), SLC7A5(solute carrier family 7 member 5; NM_003486), TGFBR2(transforming growth factor beta receptor 2; NM_001024847, NM_003242), TNF(tumor necrosis factor; NM_000594) 및 TNS4(tensin 4; NM_032865)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 체제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 GSTM1, HSPA1A, PRDX1, PTGR1, RXRA, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7, SLC7A11, TGFBR2, GCLC 및 NQO1은 NRF2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 경로에 관련된 유전자인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 CYP1A1, ESR1, HES1, IL17B, JUND, PTGES3, SERPINB2, SLC7A5, TNF, GCLC 및 NQO1은 AhR(Aryl hydrocarbon receptor) 경로에 관련된 유전자인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 9

제4항의 조성물을 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 키트.

청구항 10

암 환자유래의 생물학적 시료에서 ACOX1(acyl-CoA oxidase 1; GenBank 접근(accession) 번호: NM_001185039, NM_004035, NM_007292), ALOX5AP(arachidonate 5-lipoxygenase activating protein; NM_001204406, NM_001629), ANKRD1(ankyrin repeat domain 1; NM_014391), BAAT(bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase; NM_001127610, NM_001701), BHLHE40(basic helix-loop-helix family member e40; NM_003670), CCL2(C-C motif chemokine ligand 2; NM_002982), CYP1A1(cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1; NM_000499, NM_001319216, NM_001319217), DNAJC7(DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C7; NM_001144766, NM_003315), ESR1(estrogen receptor 1; NM_000125, NM_001122740, NM_001122741, NM_001122742, NM_001291230, NM_001291241, NM_001328100), GCLC(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit; NM_001197115, NM_001498), GPAM(glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial; NM_001244949, NM_020918), GSTM1(glutathione S-transferase mu 1; NM_000561, NM_146421), HES1(hes family bHLH transcription factor 1; NM_005524), HSPA1A(heat shock protein family A (Hsp70) member 1A; NM_005345), IL17B(interleukin 17B; NM_001317987, NM_014443), JUND(JunD proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; NM_001286968, NM_005354), MFGE8(milk fat globule-EGF factor 8 protein; NM_001114614, NM_001310319, NM_001310320, NM_001310321, NM_005928), NAV3(neuron navigator 3; NM_001024383, NM_014903), NCOA6(nuclear receptor coactivator 6; NM_001242539, NM_001318240, NM_014071), NQO1(NAD(P)H quinone dehydrogenase 1; NM_000903, NM_001025433, NM_001025434, NM_001286137), PLTP(phospholipid transfer protein; NM_001242920, NM_001242921, NM_006227, NM_182676), PMP2(peripheral myelin protein 2; NM_001348381, NM_002677), PRDX1(Peroxiredoxin 1; NM_001202431, NM_002574, NM_181696, NM_181697), PTGES3(prostaglandin E synthase 3; NM_001282601, NM_001282602, NM_001282603, NM_001282604, NM_001282605, NM_006601), PTGR1(prostaglandin reductase 1; NM_001146108, NM_001146109, NM_012212), PTPA(protein phosphatase 2 phosphatase activator; NM_001193397,

NM_001271832, NM_021131, NM_178000, NM_178001, NM_178002, NM_178003), RXRA(retinoid X receptor alpha; NM_001291920, NM_001291921, NM_002957), S100P(S100 calcium binding protein P; NM_005980), SEC14L1(SEC14 like lipid binding 1; NM_001039573, NM_001143998, NM_001143999, NM_001144001, NM_001204408, NM_001204410, NM_003003), SERPINB2(serpin family B member 2; NM_001143818, NM_002575), SLC2A12(solute carrier family 2 member 12; NM_145176), SLC2A13(solute carrier family 2 member 13; NM_052885), SLC39A12(solute carrier family 39 member 12; NM_001145195, NM_001282733, NM_001282734, NM_152725), SLC39A3(solute carrier family 39 member 3; NM_144564, NM_213568), SLC39A7(solute carrier family 39 member 7; NM_001077516, NM_001288777, NM_006979), SLC5A4(solute carrier family 5 member 4; NM_014227), SLC6A18(solute carrier family 6 member 18; NM_182632), SLC6A7(solute carrier family 6 member 7; NM_014228), SLC7A11(solute carrier family 7 member 11; NM_014331), SLC7A5(solute carrier family 7 member 5; NM_003486), TGFBR2(transforming growth factor beta receptor 2; NM_001024847, NM_003242), TNF(tumor necrosis factor; NM_000594) 및 TNS4(tensin 4; NM_032865)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 GSTM1, HSPA1A, PRDX1, PTGR1, RXRA, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7, SLC7A11, TGFBR2, GCLC 및 NQO1은 NRF2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 경로에 관련된 유전자인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 CYP1A1, ESR1, HES1, IL17B, JUND, PTGES3, SERPINB2, SLC7A5, TNF, GCLC 및 NQO1은 AhR(Aryl hydrocarbon receptor) 경로에 관련된 유전자인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 mRNA의 발현수준은 in situ 교잡법(in situ hybridization), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 단백질의 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 이라스틴에 대한 반응성 예측용 마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 항암제인 이라스틴에 대한 반응성을 예측할 수 있는 마커 유전자, 이의 발현수준을 측정하는 체제를 포함하는 반응성 예측용 조성물 및 키트, 및 상기 마커 유전자를 이용해 반응성을 예측하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 이라스틴(Erastin)은 원래 RAS 발암유전자를 갖는 암세포에서 활성화된 RAS-RAF-MEK 신호전달 하에 산화적, 비-아폽토시스 세포사멸을 통한 합성 치사를 유도하는 저분자로 발견되었다. 이후, 이라스틴에 의한 세포사멸의 작용 기전이 비-아폽토시스 세포사멸의 독특한 철-의존적 형태인 페롭토시스(ferroptosis)인 것으로 확인되었다. 이라스틴은 시스틴(cystine) 유입을 통한 글루타티온(glutathione; GSH) 합성 과정에서 SLC7A11에 의해 암호화되는 시스틴/글루타메이트(cystine/glutamate)의 역수용체인 시스템 Xc-(XCT)를 억제함에 따라, 항산화 방어능의 손상에 의해 세포의 산화적 사멸이 유발된다. 신경퇴행성질환, 뇌졸중, 허혈성 손상 및 발암과 같은 다양한 병리학적 세포사멸에서 페롭토시스에 대한 새로운 연구가 진행됨에 따라, 저분자 억제제 또는 페롭토시스 유도제가 치료제로 개발되고 있으며, 새로운 항암제로서 이라스틴과 같은 페롭토시스 유도제(ferroptosis inducers; FIN)가 광범위하게 검증되어 왔다. 그럼에도 불구하고, 신경교종 환자들을 대상으로 한 다른 XCT 억제제인 설파살라진(sulfasalazine)의 임상시험 결과는 임상적 반응이 없는 것으로 보고되었다.

[0003] 최근 연구에 따르면, 다양한 유형의 암세포에서 대사적 이질성 또는 중간엽 특성, 분화 상태와 같은 세포의 특성이 페롭토시스 세포사멸에 대한 감수성을 결정한다고 보고되었다(Nature. 2017 Jul 27;547(7664):453-457). 특히, 치료 저항성 중간엽 암세포에서 인지질 글루타티온 과산화효소 4(glutathione peroxidase 4; GPX4)에 의해 진행되는 지질 과산화효소 경로에 대한 높은 의존성이 GPX4 억제 또는 이라스틴에 의한 GSH 고갈에 의한 페롭토시스에 대하여 높은 취약성을 부여한다. 그러나, 페롭토시스에 대하여 GPX4의 높은 의존성을 나타내는 ‘약물 내성 지속성 암세포’는 이라스틴에 덜 민감하다. 이라스틴에 의해 유도되는 페롭토시스 세포사멸에 대한 GPX4 의존성은 세포 유형에 특이적인데, p53 상태, 전사인자, 신호전달 경로(예컨대, MAPK, ATM 또는 YAP), 인테그린 및 GSH 조절자와 같은 다양한 세포 및 분자적 기능이 여러 세포의 모델 시스템에서 이라스틴에 의한 페롭토시스의 취약성을 결정하는 요인으로 나타났다. 따라서 XCT 억제 또는 GPX4 억제에 의한 암세포의 페롭토시스에 대한 감수성은 세포/분자적 특성에 따라 다양하며 완전히 규명되지 않았다. 이와 관련하여, 이라스틴에 대한 감수성을 예측할 수 있는 독특한 세포/분자적 시그니처를 확립하는 것은 현재 임상 시험 중인 이라스틴 유사체를 이용한 항암치료에서 효능을 최대화하고 독성을 최소화하기 위해 매우 중요하다.

[0004] 약물 반응에서 계층의 역할을 탐구하는 약물유전체학적 접근법은 약물 반응에 기여하는 분자적 시그니처를 체계적으로 확인함으로써 약물 MoA에 대한 우리의 이해를 향상시켰다. 특히, NCI-DREAM 약물 민감성 예측 챌린지에 대한 엄격한 평가에서, 유전자 발현 데이터는 다수의 �믹스 데이터 세트(예를 들어, 계층, 프로테오믹스 및 후성적 프로파일링) 중에서 인간 유방암 세포의 약물 반응을 예측하는데 가장 효과적인 것으로 확인되었다. 정밀종양학 분야에서, 전사체 프로파일링은 수 내지 수천 개의 배양된 인간 세포를 사용하여 치료 방안을 결정하기 위한 예측 유전자 시그니처를 스크리닝하는데 널리 이용되어왔다.

[0005] 본 발명은 대규모 약물유전체학 데이터 세트를 기반으로 이라스틴에 대한 감수성을 예측하기 위한 효율적인 모델을 확립하였다. 본 발명자들은 유전자 예측 변수에서 NRF2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 및 아릴 탄화수소 수용체(Aryl hydrocarbon receptor; AhR) 활성이 이라스틴에 매개 페롭토시스 세포 사멸에 대한 중요한 결정 인자임을 발견하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 전술한 바와 같이 약물유전체학 데이터세트를 기반으로 이라스틴에 대한 반응성을 효과적으로 예측할 수 있는 모델을 확립하였고, 결과적으로 NRF2 및 AhR 경로를 포함하는 핵 수용체 메타-경로에 관련된 43개 유전자를 유효한 예측 마커로 발굴하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 이에, 본 발명은 ACOX1, ALOX5AP, ANKRD1, BAAT, BHLHE40, CCL2, CYP1A1, DNAJC7, ESR1, GCLC, GPAM, GSTM1, HES1, HSPA1A, IL17B, JUND, MFGE8, NAV3, NCOA6, NQO1, PLTP, PMP2, PRDX1, PTGES3, PTGR1, PTPA, RXRA, S100P, SEC14L1, SERPINB2, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7,

SLC7A11, SLC7A5, TGFBR2, TNF 및 TNS4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ACOX1, ALOX5AP, ANKRD1, BAAT, BHLHE40, CCL2, CYP1A1, DNAJC7, ESR1, GCLC, GPAM, GSTM1, HES1, HSPA1A, IL17B, JUND, MFGE8, NAV3, NCOA6, NQO1, PLTP, PMP2, PRDX1, PTGES3, PTGR1, PTPA, RXRA, S100P, SEC14L1, SERPINB2, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7, SLC7A11, SLC7A5, TGFBR2, TNF 및 TNS4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일구현예로, 상기 GSTM1, HSPA1A, PRDX1, PTGR1, RXRA, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7, SLC7A11, TGFBR2, GCLC 및 NQO1은 NRF2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 경로에 관련된 유전자인 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 CYP1A1, ESR1, HES1, IL17B, JUND, PTGES3, SERPINB2, SLC7A5, TNF, GCLC 및 NQO1은 AhR(Aryl hydrocarbon receptor) 경로에 관련된 유전자인 것일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 ACOX1, ALOX5AP, ANKRD1, BAAT, BHLHE40, CCL2, CYP1A1, DNAJC7, ESR1, GCLC, GPAM, GSTM1, HES1, HSPA1A, IL17B, JUND, MFGE8, NAV3, NCOA6, NQO1, PLTP, PMP2, PRDX1, PTGES3, PTGR1, PTPA, RXRA, S100P, SEC14L1, SERPINB2, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7, SLC7A11, SLC7A5, TGFBR2, TNF 및 TNS4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일구현예로, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 키트를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 암 환자유래의 생물학적 시료에서 ACOX1, ALOX5AP, ANKRD1, BAAT, BHLHE40, CCL2, CYP1A1, DNAJC7, ESR1, GCLC, GPAM, GSTM1, HES1, HSPA1A, IL17B, JUND, MFGE8, NAV3, NCOA6, NQO1, PLTP, PMP2, PRDX1, PTGES3, PTGR1, PTPA, RXRA, S100P, SEC14L1, SERPINB2, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7, SLC7A11, SLC7A5, TGFBR2, TNF 및 TNS4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 mRNA의 발현수준은 in situ 교잡법(in situ hybridization), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질의 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 유전자 바이오마커는 이라스틴(Erastin) 항암제에 대한 반응성을 예측하는데 유효한 마커임을 확인하였는바, 이라스틴 또는 이라스틴 유사체를 이용한 치료에서 상기 유전자들의 발현수준을 측정함으로써 암 환자, 특히 폐암 환자에서 이라스틴 항암제에 대한 반응성을 미리 예측할 수 있고, 이를 통해 반응성 유무에 따라 암 환자를 효율적으로 분류하여 적절하고 효과적인 치료법을 적용하는데 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 이라스틴 감수성과 NRF2 경로의 높은 상관관계를 확인한 결과를 나타낸 것으로서, 도 1a는 123개 폐암 세포주에서 NOX4, GPX4, 및 ZEB1 유전자의 발현수준(logTPM)과 이라스틴에 대한 감수성(AUC) 간의 상관관계를 분석한 결과이고, 도 1b는 598개 비-혈액암 세포주에서 KRAS 및 HRAS의 돌연변이 상태(야생형(Wt) 또는 돌연변이(Mut))에 따른 이라스틴에 대한 감수성(AUC) 분포를 분석한 결과이며, 도 1c는 세포의 치료-저항성 EMT 시그니처와 CTRP 데이터의 543개 화합물에 대한 감수성 간의 상관관계를 분석한 결과이고, 도 1d는 이라스틴에 대한 감수성을 기준으로 랭크된 6개의 폐암 세포주의 분포를 나타낸 것이며, 도 1e는 이라스틴 약물 반응과 관련된 신호전달 경로의 상관관계 정도를 나타낸 결과이고, 도 1f는 6개의 NRF2 표적 유전자(NQO1, GCLC, GCLM, SLC7A11, ME1 및 SRXN1)의 유전자 발현 정도와 이라스틴 감수성 간의 상관관계를 분석한 결과이다.

도 2는 이라스틴 감수성 예측을 위한 통합된 NRF2/AhR 경로 관련 유전자 시그니처를 확인한 결과로서, 도 2a는 18개 유전자 각각에 기반한 ssGSEA, 선형회귀 및 elastic net 회귀 분석을 실시한 후 이라스틴 감수성에 대한 예측 성능을 비교한 결과이고, 도 2b는 모든 598개 암세포에 대하여 핵 수용체 메타-경로에 관련된 312개 유전자의 최종 모델을 제작하고 분석하여 도출된 43개 유전자의 결과를 나타낸 것이며, 도 2c는 핵 수용체 메타-경로와 관련된 43개 유전자에 기반한 elastic net 모델의 예측인자 가운데 NRF2 경로 및 AhR 경로에 관련된 유전자와 나머지 유전자들을 분류하여 도시한 것이고, 도 2d는 각각 이라스틴과 페롭토시스 유도체(FINs; RSL3, ML210, 및 ML162) 약물에 대한 반응을 보여주는 대표적인 기능성 유전자 시그니처를 벤다이어그램으로 도시한 것이며, 도 2e는 NRF2/AhR 모델을 기반으로 하여 CTRP에서의 543개 화합물에 대한 상관관계를 분석하여 이라스틴에 대한 반응성을 예측한 결과이고, 도 2f는 NRF2/AhR 모델과 이전 연구에서 얻은 3개의 EMT 점수를 사용한 이라스틴 감수성 예측 성능을 보여주는 ROC 곡선 결과이며, 도 2g는 A549 및 TD 세포의 예측 점수 및 CCL6에서 얻은 모든 암세포주의 전사체 데이터의 점수 분포를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

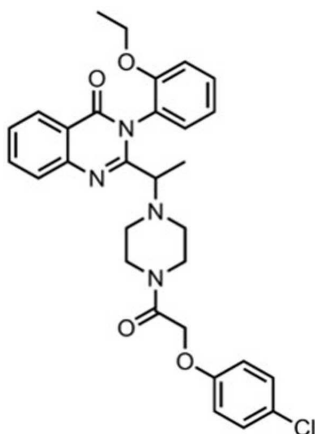
[0024] 본 발명자들은 약물유전체학 데이터셋을 기반으로 이라스틴에 대한 반응성을 효과적으로 예측할 수 있는 모델을 확립하고, 결과적으로 NRF2 및 AhR 경로를 포함하는 핵 수용체 메타-경로에 관련된 43개 유전자를 유효한 예측 마커로 발굴하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0025] 이에, 본 발명은 ACOX1(acyl-CoA oxidase 1; GenBank 접근(accession) 번호: NM_001185039, NM_004035, NM_007292), ALOX5AP(arachidonate 5-lipoxygenase activating protein; NM_001204406, NM_001629), ANKRD1(ankyrin repeat domain 1; NM_014391), BAAT(bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase; NM_001127610, NM_001701), BHLHE40(basic helix-loop-helix family member e40; NM_003670), CCL2(C-C motif chemokine ligand 2; NM_002982), CYP1A1(cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1; NM_000499, NM_001319216, NM_001319217), DNAJC7(DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C7; NM_001144766, NM_003315), ESR1(estrogen receptor 1; NM_000125, NM_001122740, NM_001122741, NM_001122742, NM_001291230, NM_001291241, NM_001328100), GCLC(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit; NM_001197115, NM_001498), GPAM(glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial; NM_001244949, NM_020918), GSTM1(glutathione S-transferase mu 1; NM_000561, NM_146421), HES1(hes family bHLH transcription factor 1; NM_005524), HSPA1A(heat shock protein family A (Hsp70) member 1A; NM_005345), IL17B(interleukin 17B; NM_001317987, NM_014443), JUND(JunD proto-oncogene, AP-1 transcription factor

subunit; NM_001286968, NM_005354), MFGE8(milk fat globule-EGF factor 8 protein; NM_001114614, NM_001310319, NM_001310320, NM_001310321, NM_005928), NAV3(neuron navigator 3; NM_001024383, NM_014903), NCOA6(nuclear receptor coactivator 6; NM_001242539, NM_001318240, NM_014071), NQO1(NAD(P)H quinone dehydrogenase 1; NM_000903, NM_001025433, NM_001025434, NM_001286137), PLTP(phospholipid transfer protein; NM_001242920, NM_001242921, NM_006227, NM_182676), PMP2(peripheral myelin protein 2; NM_001348381, NM_002677), PRDX1(Peroxiredoxin 1; NM_001202431, NM_002574, NM_181696, NM_181697), PTGES3(prostaglandin E synthase 3; NM_001282601, NM_001282602, NM_001282603, NM_001282604, NM_001282605, NM_006601), PTGR1(prostaglandin reductase 1; NM_001146108, NM_001146109, NM_012212), PTPA(protein phosphatase 2 phosphatase activator; NM_001193397, NM_001271832, NM_021131, NM_178000, NM_178001, NM_178002, NM_178003), RXRA(retinoid X receptor alpha; NM_001291920, NM_001291921, NM_002957), S100P(S100 calcium binding protein P; NM_005980), SEC14L1(SEC14 like lipid binding 1; NM_001039573, NM_001143998, NM_001143999, NM_001144001, NM_001204408, NM_001204410, NM_003003), SERPINB2(serpin family B member 2; NM_001143818, NM_002575), SLC2A12(solute carrier family 2 member 12; NM_145176), SLC2A13(solute carrier family 2 member 13; NM_052885), SLC39A12(solute carrier family 39 member 12; NM_001145195, NM_001282733, NM_001282734, NM_152725), SLC39A3(solute carrier family 39 member 3; NM_144564, NM_213568), SLC39A7(solute carrier family 39 member 7; NM_001077516, NM_001288777, NM_006979), SLC5A4(solute carrier family 5 member 4; NM_014227), SLC6A18(solute carrier family 6 member 18; NM_182632), SLC6A7(solute carrier family 6 member 7; NM_014228), SLC7A11(solute carrier family 7 member 11; NM_014331), SLC7A5(solute carrier family 7 member 5; NM_003486), TGFBR2(transforming growth factor beta receptor 2; NM_001024847, NM_003242), TNF(tumor necrosis factor; NM_000594) 및 TNS4(tensin 4; NM_032865)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 “이라스틴(Erastin)”은 과산화지질의 축적에 의해 특징지어지는 철 의존성 세포사멸인 페롭토시스(ferroptosis)라는 비-아포토시스 세포사멸을 유발하는 저분자 화합물로, 하기의 화학식으로 표시될 수 있다. 상기 화합물은 VDAC2(Voltage-dependent anion-selective channel protein 2) 및 VDAC3(Voltage-dependent anion-selective channel protein 3)에 결합하고 이를 억제하며 기능적으로 시스틴-글루타메이트 역수송체(cystine-glutamate antiporter)인 시스템 Xc-를 저해한다고 알려져 있다. 이라스틴이 처리된 세포는 시스테인이 고갈되어 항산화제인 글루타티온을 합성할 수 없게 되며 결국 초과적인 지질 과산화 및 세포사멸에 이르게 된다.

[0027] [화학식]



[0028]

[0029] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 상기 43개 유전자에 대하여 이라스틴에 대한 유효한 반응성 예측 효과를 입증하였다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 핵 수송체 메타-경로에 관련된 43개 유전자 가운데 GSTM1, HSPA1A, PRDX1, PTGR1, RXRA, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7, SLC7A11, TGFBR2, GCLC 및 NQO1은 NRF2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 경로에 관련된 유전자이고, CYP1A1, ESR1, HES1, IL17B, JUND, PTGES3, SERPINB2, SLC7A5, TNF, GCLC 및 NQO1은 AhR(Aryl hydrocarbon receptor) 경로에 관련

된 유전자이며, GCLC 및 NQO1은 상기 두 가지 경로에 공통적으로 관련된 유전자일 수 있다.

- [0031] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 ACOX1, ALOX5AP, ANKRD1, BAAT, BHLHE40, CCL2, CYP1A1, DNAJC7, ESR1, GCLC, GPAM, GSTM1, HES1, HSPA1A, IL17B, JUND, MFGE8, NAV3, NCOA6, NQO1, PLTP, PMP2, PRDX1, PTGES3, PTGR1, PTPA, RXRA, S100P, SEC14L1, SERPINB2, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7, SLC7A11, SLC7A5, TGFBR2, TNF 및 TNS4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 키트를 제공한다.
- [0032] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어, “프라이머(primer)”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 용어, “프로브(probe)”란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소, 효소, 또는 형광체 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [0035] 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무인 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.
- [0037] 본 발명의 항암제 반응성 예측용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 암 환자유래의 생물학적 시료에서 ACOX1, ALOX5AP, ANKRD1, BAAT, BHLHE40, CCL2, CYP1A1, DNAJC7, ESR1, GCLC, GPAM, GSTM1, HES1, HSPA1A, IL17B, JUND, MFGE8, NAV3, NCOA6, NQO1, PLTP, PMP2, PRDX1, PTGES3, PTGR1, PTPA, RXRA, S100P, SEC14L1, SERPINB2, SLC2A12, SLC2A13, SLC39A12, SLC39A3, SLC39A7, SLC5A4, SLC6A18, SLC6A7, SLC7A11, SLC7A5, TGFBR2, TNF 및 TNS4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 암 환자유래의 생물학적 시료에서 상기 유전자들의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현이 증가된 경우 이라스틴 항암제에 대한 반응성이 있음을 예측할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어, “예측”은 본원에서 대상 환자가 약물 또는 약물 세트에 대해 유리하게 또는 불리하게 반응할 가능성을 지칭하는데 사용된다. 한 실시양태에서, 예측은 이러한 반응의 정도에 관한 것이다. 예컨대, 예측은 환자가 치료 후, 예를 들어 특정한 치료제의 치료 및/또는 초발성 종양의 수술적 제거 및/또는 특정 기간 동안의 화학요법 후에 암 재발 없이 생존할지의 여부 및/또는 그러할 확률에 관한 것이다. 본 발명의 예측은 암 환자에 대한 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료를 결정하는데 임상적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 예측은 환자가 치료 처치, 예컨대 주어진 치료적 처치, 예를 들어 주어진 치료제 또는 조합물의 투여, 수술적 개입, 화학요법 등에 유리하게 반응할 것인지 또는 치료적 처치 후에 환자의 장기 생존이 가능한지의 여부를 예측하는데 있어서 유용한 도구이다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 세포, 조직, 혈액, 혈장 또는 혈청일 수 있으며, 본 발명에 따른 이라스틴(Erastin)에 대한 반응성 예측용 바이오마커를 검출할 수 있는 환자유래 시료라면 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 상기 유전자의 mRNA의 발현수준은 in situ 교잡법(in situ hybridization), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection

assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 상기 단백질의 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법 (ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법 (flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044]

[0045] 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.

[0047] [실시예]

[0048] 실시예 1. 실험준비 및 실험방법

[0049] 1-1. RNA 서열분석 및 데이터 처리

[0050] Trizol 시약을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 총 RNA를 분리하였고, 라이브러리 구축에는 TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit(Illumina, San Diego, CA)를 이용하였다. 간단하게, 가닥-특이적 프로토콜 단계는 다음과 같다: 제1가닥 cDNA 합성; dTTP 대신 dUTP를 사용하여 제2가닥 합성; 말단 수리, A-tailing 및 어댑터 접합; PCR 증폭. 다음으로, 제조사의 권장 프로토콜에 따라 Illumina NextSeq 500에서 페어-리드 시퀀싱(2 X 75bp)의 76 사이클 동안 각 라이브러리를 8 pM로 희석하였다.

[0051] Raw FASTQ 파일의 서열분석 품질은 FastQC(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)를 이용해 확인하였고, BBDuk(<http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bb-tools/>)을 이용하여 품질이 낮은 리드 및 리드의 어댑터 서열을 제거하였다. 이후 검수된 리드는 STAR aligner(v2.6.0a)를 사용하여 GRCh37 게놈 레퍼런스(build 38)에 정렬시켰으며, 리드 수는 Gencode v19 주석 GTF 파일과 함께 HTSeq를 사용하여 얻었다. FASTQ 파일 및 전처리 데이터는 Gene Expression Omnibus(GEO : GSE135402)를 통해 이용 가능하다. 한편, A549와 TD 세포 사이에 차등적으로 발현되는 유전자는 DESeq2를 사용하여 확인하였다.

[0053] 1-2. 암세포주의 이라스틴 감수성 및 전사체 데이터 분석

[0054] 이라스틴에 대한 886개 암세포주의 약물 반응 데이터는 CTD2 데이터 포털(<https://ocg.cancer.gov/programs/ctd2/data-portal>)에서 다운로드하였다. 세포 생존율(cell viability) 값을 성장 억제(growth inhibition)로 전환하고 0~100% 범위로 조정하였다. 조정된 성장 억제 값을 4-매개변수 로지스틱 회귀법을 통해 맞추고 저품질 프로파일(적합성 < 0.7)은 제거하였다. 커브 아래 면적 값인 AUC는 주어진 농도 범위에서 0% 성장 억제로 가정된 최대 AUC에 의해 0-1의 범위로 정규화하였다. 또한 이라스틴 감수성에 대해 스크리닝된 암세포주의 기저수준의 유전자 발현 프로파일은 BAM 파일 형식으로 Genomics Data Common(GDC, <https://gdc.cancer.gov/>)에서 다운로드하였다. 리드 수는 Gencode v19 주석 GTF 파일과 함께 HTSeq를 사용하여 얻었다. 비인간 및 혈액학적 조직 유형의 세포주를 제외하고, 598개 암세포주의 유전자 발현 프로파일을 분석에 사용하였다.

[0056] 1-3. Elastic net 회귀 모델링

[0057] 세포주의 유전자 발현에 기초한 이라스틴에 대한 반응성(AUC)을 설명하는 예측 모델을 도출하기 위해 Elastic net 회귀를 적용하였다. 보다 구체적으로, 나머지 샘플(예컨대, 597개 세포)에 의해 훈련된 모델을 시험하는데 단일 샘플(예컨대, 세포주)을 사용하는 LOOCV(nested leave-one-out cross-validation) 프로세스로 상기 예측 모델을 평가하였으며, 모든 샘플이 테스트 데이터셋으로 사용될 때까지 상기 프로세스를 반복하였다. 각 테스트에서, 최적화된 매개변수(알파, 람다)는 테스트 데이터에 대해 10회 반복하여 5배 교차 검증에 대한 평균 오차를 최소화하는 것으로 결정되었다. 그런 다음 각 테스트 세트에서 독립적으로 예측된 반응 값을 Pearson 상관

계수를 사용하여 측정된 AUC 값과 비교해 예측 성능을 추정했다. 전체적 절차는 R의 glmnet 및 caret 패키지를 이용하여 구현하였다.

실시예 2. 이라스틴 감수성과 NRF2 경로의 높은 상관관계 확인

본 발명자들은 이라스틴에 의해 유도되는 선택적 폐롭토시스와 관련된 원인 유전자(예컨대, NOX4, GPX4 및 ZEB1)를 조사하고자 하였다. 이를 위해, 먼저 CTRP 및 CCLE 데이터베이스에서 이라스틴에 대한 감수성을 갖는 123개 폐암 세포주의 mRNA 발현 프로파일을 얻어 이들의 상관관계를 조사하였으나, 도 1a에서 볼 수 있는 바와 같이 어떠한 상관관계도 발견하지 못하였다. 따라서, 본 발명자들은 단일 유전자의 발현수준이 이라스틴에 의해 유도되는 폐롭토시스에 대한 감수성을 설명하기에 충분하지 않다는 결론을 내렸다. 이에, 단일 유전자와 이라스틴에 대한 감수성의 낮은 상관관계를 고려하여, 수백 개의 암세포주를 이용해 CCLE 및 CTRP 데이터베이스의 전 사체 및 이라스틴 반응에 대한 데이터셋으로부터 이라스틴에 대한 감수성과 관련된 주요 분자 시그니처를 체계적으로 조사하였다. 그 결과 중요하게도, 도 1b에 나타난 바와 같이 RAS 돌연변이와 이라스틴 감수성 사이의 일관된 연관성이 관찰되지 않았으며, 오히려 HRAS 돌연변이 세포주는 이라스틴에 대한 중간 저항성을 나타냈다(t -test $P < 0.05$). 이러한 결과로부터 RAS의 돌연변이 상태는 이라스틴 감수성을 예측하기에 충분하지 않음을 알 수 있었다.

종래 연구 보고에 따르면, GPX4 억제제에 대해 높은 감수성을 갖는 치료 저항성 중간엽 암세포는 이라스틴에도 민감하다고 보고되어 있다. 그러나, 세포주의 중간엽 점수와 약물 감수성에 대한 AUC 측정 값 사이의 상관관계 분석 결과, 도 1c에 나타난 바와 같이 이라스틴이 치료-저항성 암세포에 대해 중간 정도의 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 유사한 계통에서, 세포 유형에 특이적 방식으로 이라스틴 및 GPX4 억제제 간의 일치하지 않는 것이 있었다. 이러한 결과는 돌연변이 상태 또는 치료 저항성 EMT 시그니처 외에 이라스틴에 대한 감수성을 결정하는 인자가 존재한다는 것을 암시하는 것이다.

상기 이라스틴에 대한 감수성을 결정하는 인자를 조사하기 전에, 본 발명자들은 먼저 TD 모델의 발현 프로파일 이 CCLE에서 이라스틴-감수성 세포의 발현 프로파일과 유사한지 여부를 조사하였다. 이를 위해, 도 1d에서 볼 수 있는 바와 같이 사전에 테스트한 6개 폐암 세포주를 기반으로 세포를 이라스틴 S 및 R 그룹으로 분류하기 위해 컷오프(AUC = 0.7)를 대략적으로 정의하였다. 다음으로, 생물학적 신호전달 경로 정보를 이용하여 598개 비-혈액암 세포에 대해 ssGSEA(single-sample gene set enrichment analysis)를 수행하였고, 각 세포주에 대하여 445개 PES(pathway enrichment score)를 산출한 후 이들 세포주의 PES를 이라스틴에 대한 감수성(AUC)과 연관시켜 분석하였다. 그 결과, 도 1e에 나타난 바와 같이 이라스틴에 대한 반응이 폐롭토시스 내성을 유발하는 항산화 반응의 마스터 조절자인 NRF2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)와 높은 상관관계가 있는 것을 발견하였다. 한편, EMT 관련 또는 치료-저항성 관련 유전자는 이라스틴에 대한 반응성과 관련이 없는 것으로 나타났다. 이와 일치하게, 도 1f에서 볼 수 있는 바와 같이 항산화 활성화에 관여하는 6가지 전형적인 NRF2 표적 유전자(SLC7A11, NQO1, GCLC, GCLM, ME1 및 SRXN1)의 발현은 폐암뿐만 아니라 모든 암세포에서 이라스틴에 대한 감수성과 유의한 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 NRF2 관련 유전자의 발현으로부터 이라스틴에 대한 감수성을 예측할 수 있음을 시사한다.

실시예 3. 이라스틴 감수성 예측을 위한 통합된 NRF2/AhR 경로 관련 유전자 시그니처 확인

NRF2 관련 유전자들의 밀접한 상관관계에 비추어, 본 발명자들은 통합된 유전자 발현이 이라스틴 감수성을 가장 잘 나타내는 최적의 유전자 시그니처임을 추가적으로 확인하고자 하였다. 이를 위해, 관심 있는 유전자 즉, 상기 도 1e에서 확인된 11개의 양의 상관관계와 5개의 음의 상관관계, 및 추가적으로 두 개의 EMT 시그니처를 포함한 18개 유전자 세트의 발현을 이용하여 598개 CCLE 세포주에 대하여, 계층 규모 데이터에서 특징 선별에 널리 사용되는 벌점 모델(penalized model)인 elastic net 회귀 분석을 적용하였다. 주어진 유전자 세트에 대해, 이라스틴에 대한 개별 세포주의 반응은 일회성 교차 검증 체계를 통해 예측하였고, 예측 성능을 평가하기 위해 피어슨의 상관 계수 (r)를 사용하여 측정된 AUC 값과 비교하였다. 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 전반적으로 elastic net은 일반적인 선형 회귀 및 ssGSEA를 능가했으며, 이는 이라스틴에 대한 감수성은 몇 가지 지정된 신호전달 경로 관련 유전자 세트에 의해 예측될 수 있음을 제시하는 것이다. 특히, 핵 수용체 메타-경로(Nuclear Receptor Meta-Pathway) 유전자에 기반한 elastic net 모델은 최고 성능을 나타냈으며($r = 0.456$), 이는 놀랍게도 도 2a의 붉은색 선으로 나타내어진 총 18,965개의 유전자($r = 0.429$)에 기초한 모델보다 더 높게 나타난

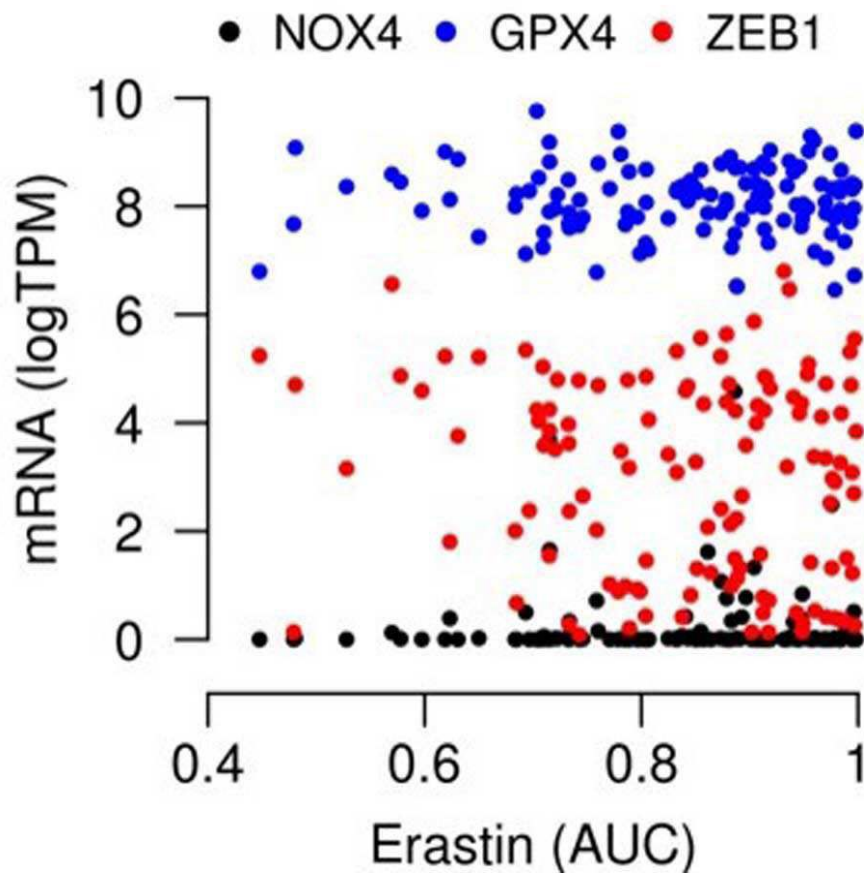
결과였다. 따라서, 본 발명자들은 핵 수용체 메타-경로에 초점을 맞추고 상기 경로에 관련된 312개 유전자의 발현으로 모든 598개 암세포에 대한 최종 모델을 제작하였다. 결과 모델은 도 2b에서 볼 수 있는 바와 같이 0이 아닌 계수를 나타내는 43개 유전자를 포함했으며, 대부분 다른 상위 경로에 관여했다. 그 중에서도, 도 2c에서 볼 수 있는 바와 같이 NRF2와 아릴 탄화수소 수용체(AhR) 경로가 가장 큰 비중을 차지하였다. 그 외에 다른 페롭토시스 유도제(FIN)인 GPX4 억제제(RSL3, ML162 및 ML210)에 대한 감수성과 세포주 PES의 상관 분석결과, 도 2d에 나타낸 바와 같이 NRF2와 산화-관련 유전자가 일반적으로 FIN에 대한 저항과 관련이 있는 것으로 나타났다. 그러나 AhR 경로는 이라스틴에 대한 저항성과 관련된 유일한 인자임을 알 수 있었다. 흥미롭게도, 게놈 전체의 CRISPR-Cas9 스크리닝 데이터 세트(DepMap 19Q2)는 GPX4 또는 종래 연구결과와 일치하게 모든 FINs에 감수성을 갖는 세포에서 셀렌단백질(selenoproteins)(SEPSECS, EEFSEC 및 SEPHS2)을 암호화하는 유전자의 높은 의존성을 밝혀냈으나, 이와 반대로 본 발명자들은 AHR(AhR을 암호화하는 유전자)의 소실이 이라스틴 저항성 세포주에서 취약성을 설명하며, 반면에 NFE2L2(NRF2를 암호화하는 유전자)는 이라스틴 및 GPX4 억제제 둘 다의 원인임을 확인하였다. 이러한 결과는 AhR(AHR의해 암호화됨) 경로가 이라스틴 저항성과 독특한 상관관계가 있음을 의미한다.

[0066] 도 1c에 개시된 EMT 시그니처를 기반으로 한 예측과 달리, NRF2/AhR-enriched 모델(이하, NRF2/AhR 모델)을 기반으로 한 이라스틴에 대한 반응 예측 결과 도 2e에 나타낸 바와 같이 CTRP에서의 543개 화합물 가운데 FINs이 이라스틴에 대한 감수성과 가장 크게 연관되어 있는 것으로 나타났다. 단, 페롭토시스를 유발하는 것으로 밝혀진 STATIN(Fluvastatin, Lovastatin 및 Simvastatin)은 아니었다. 실제로, 도 2f에서 볼 수 있는 바와 같이 이라스틴에 대한 감수성을 예측하기 위한 본 발명에 따른 모델은 이전 연구에서 FIN을 최적의 치료 옵션으로 도출하는 데 사용된 3개의 독립적인 EMT 시그니처를 능가했다. 더욱이, 도 2g에 나타낸 바와 같이 본 발명자들은 A549와 TD의 유전자 발현 데이터에 NRF2/AhR 모델을 적용하고, 각 세포주에서 이라스틴에 대한 감수성을 정확히 예측하였다. 이는 본 발명에 따른 NRF2/AhR 모델이 다른 코호트에서 생성된 전사체 데이터에 보편적으로 적용 가능하며, 효과적으로 이라스틴에 대한 감수성을 예측할 수 있음을 의미하는 것이다.

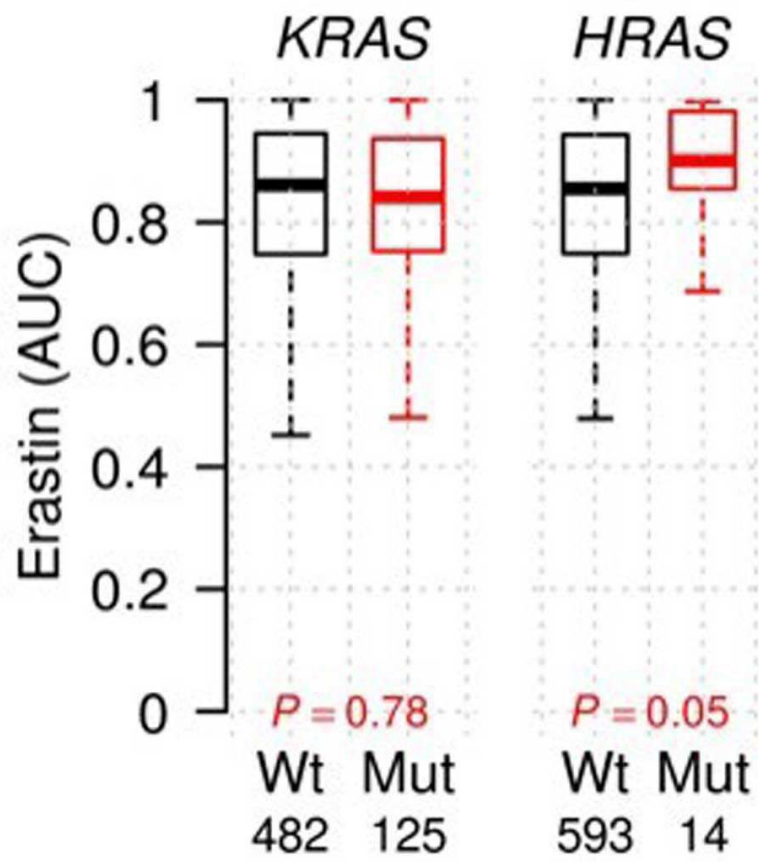
[0068] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

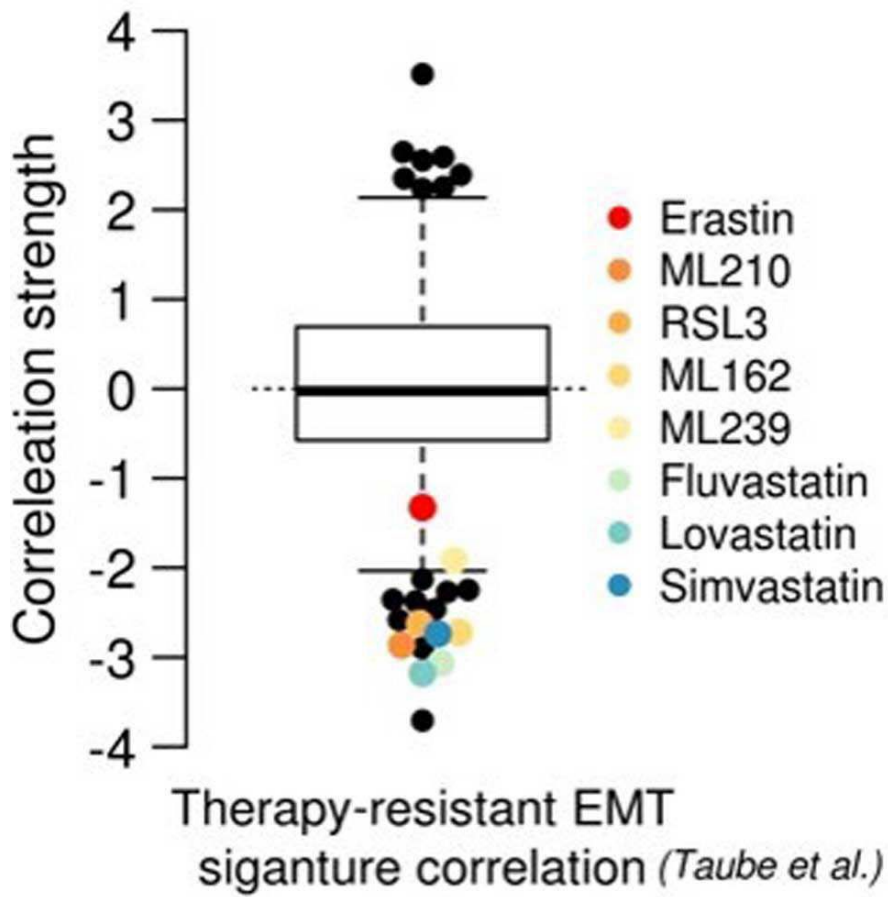
도면1a



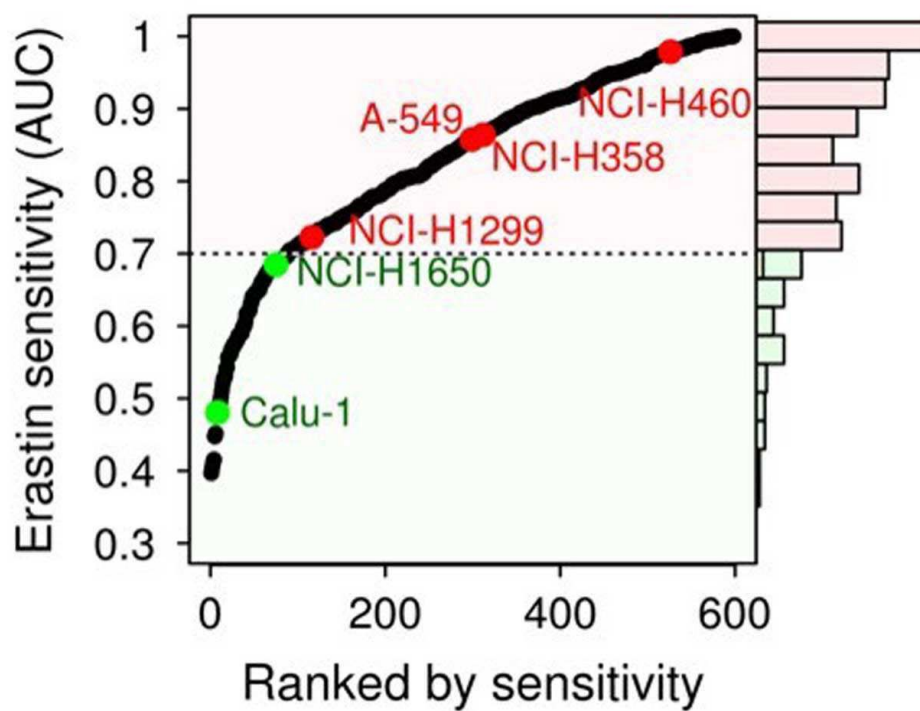
도면1b



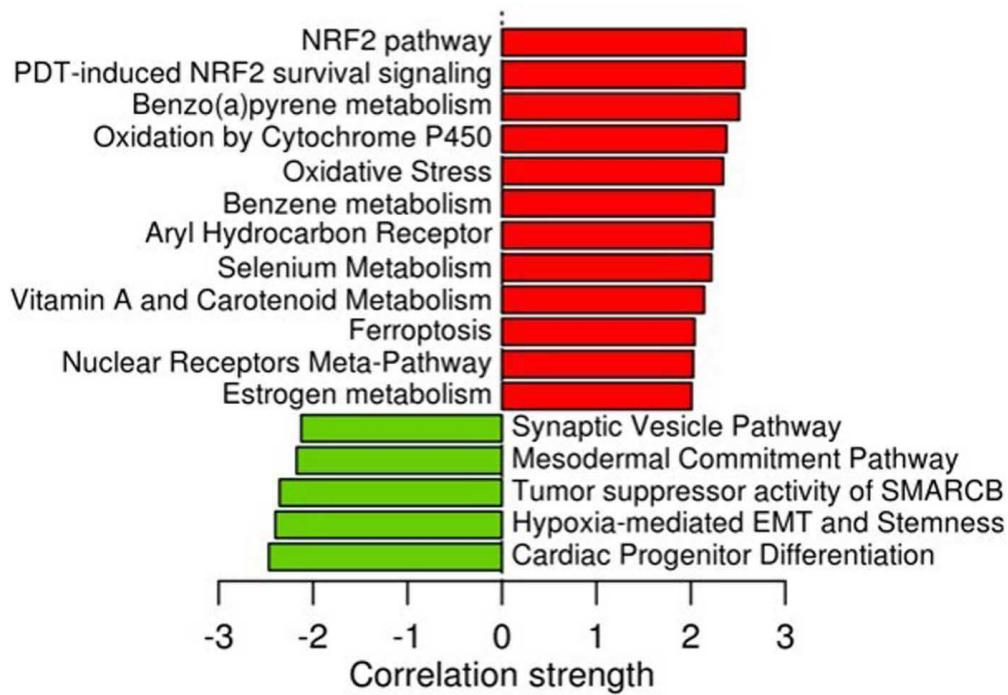
도면1c



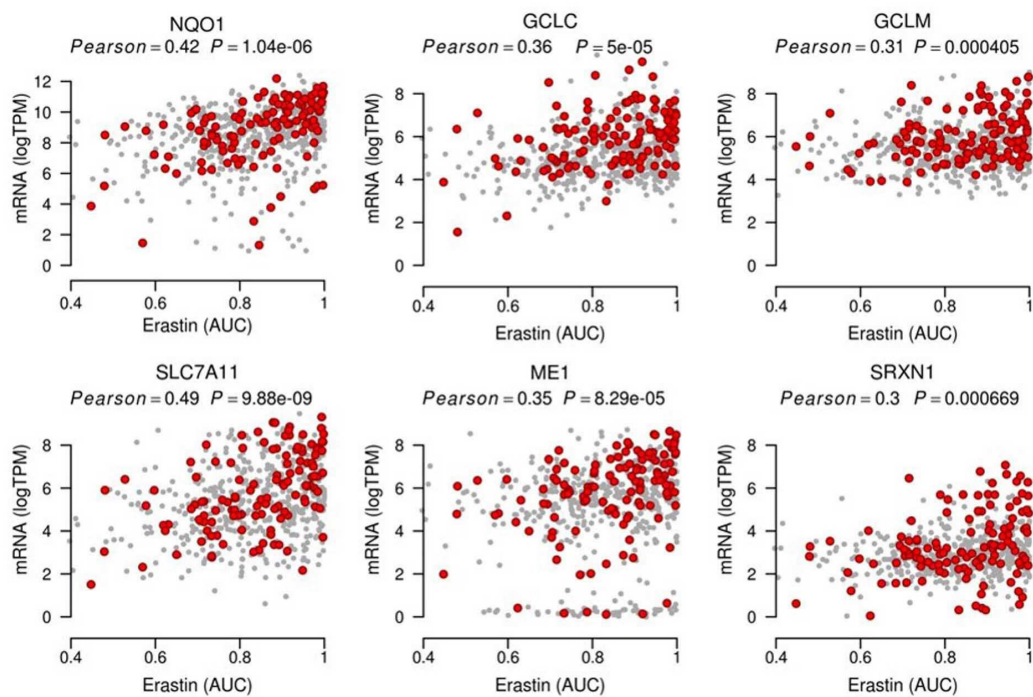
도면1d



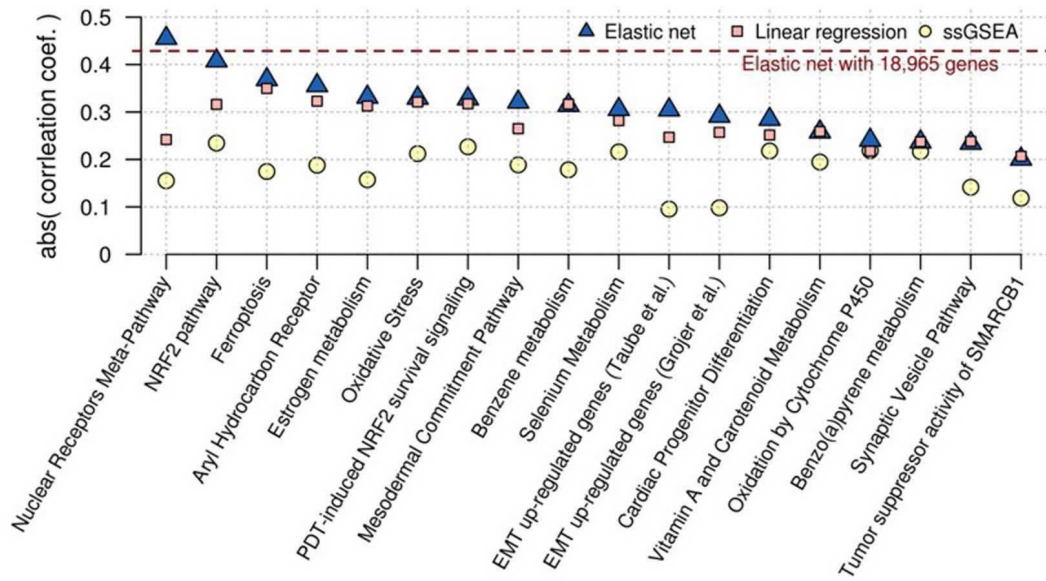
도면1e



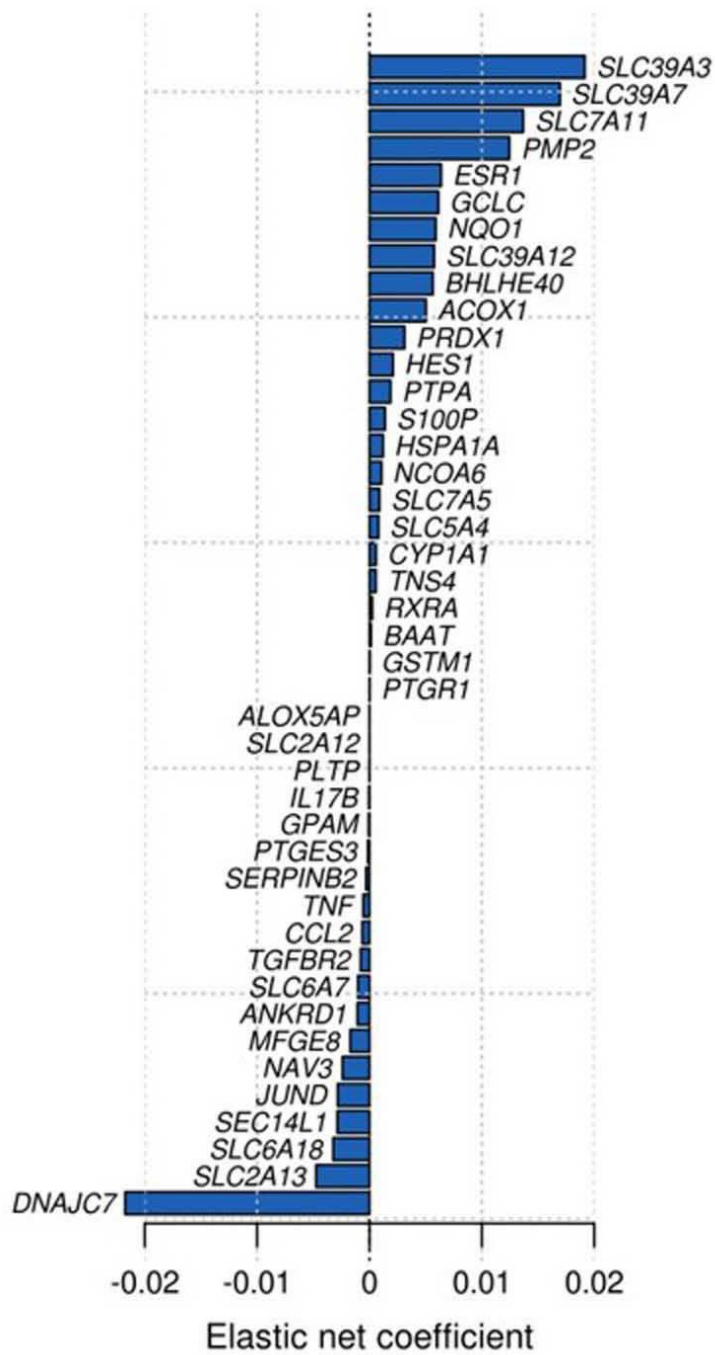
도면1f



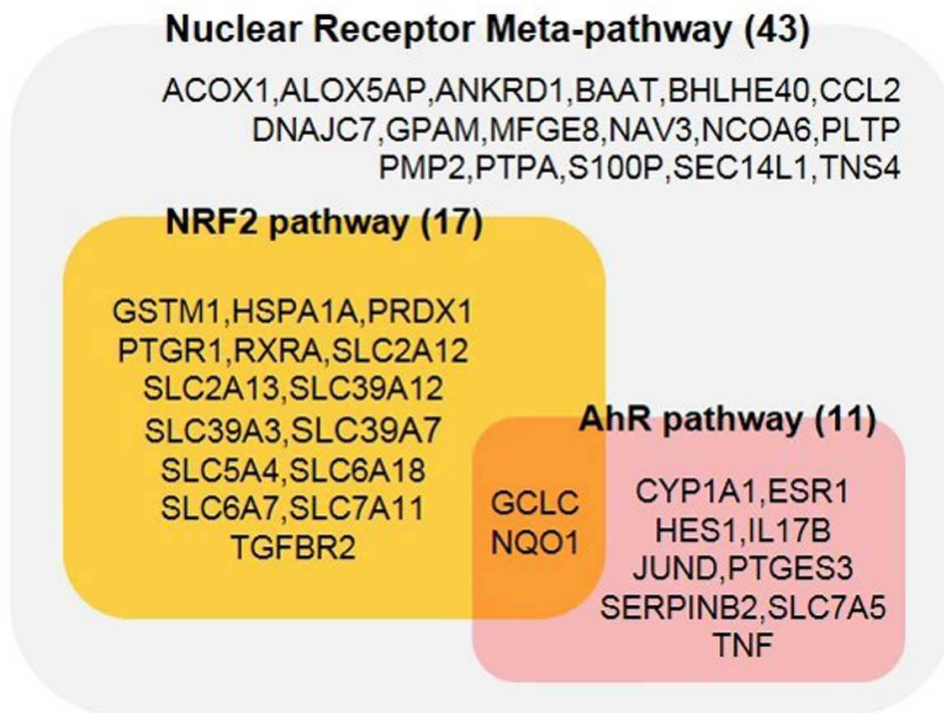
도면2a



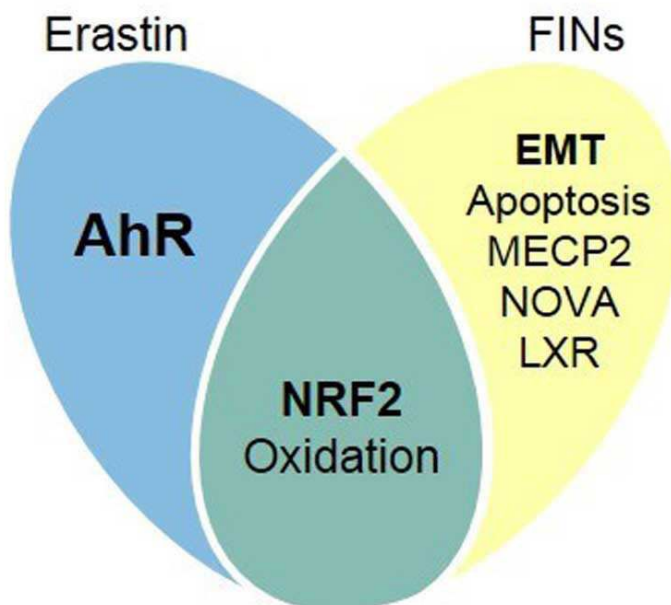
도면2b



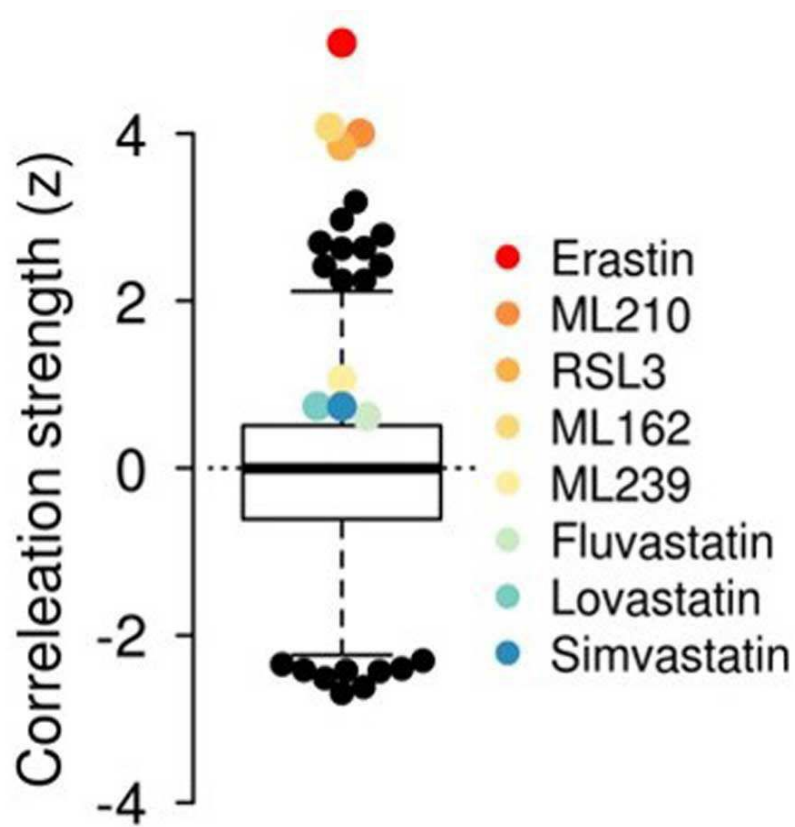
도면2c



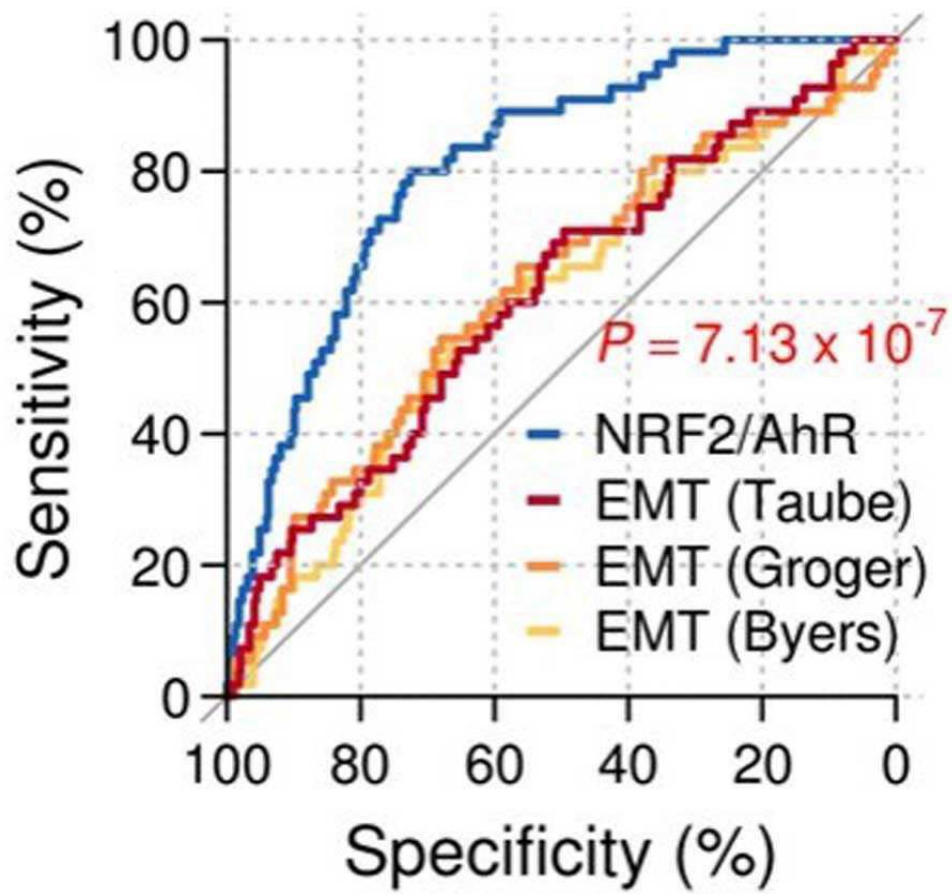
도면2d



도면2e



도면2f



도면2g

