



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월20일

(11) 등록번호 10-2637929

(24) 등록일자 2024년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6876 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6876 (2018.05)

G01N 33/574 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0102568

(22) 출원일자 2023년08월07일

심사청구일자 2023년08월07일

(56) 선행기술조사문헌

NPJ precision oncology. vol. 7, no. 1, pp.
1-9(2023.07.03)

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

김기광

충청남도 청양군 장평면 묵은논길 67

박종일

대전광역시 중구 태평로 35, 201동 1802호 (태평
동, 버드내마을아파트2단지)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 9 항

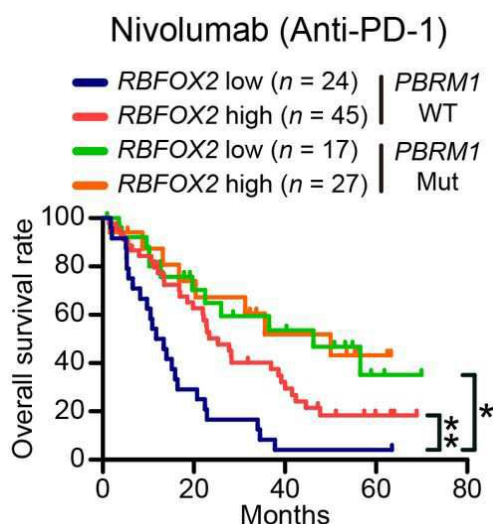
심사관 : 최지다

(54) 발명의 명칭 면역관문 억제제의 효능 예측용 PBRM1 유전자 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 면역관문 억제제의 효능 예측용 PBRM1 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 PBRM1 유전자의 E27 선택적 스플라이싱은 RBFOX2 단백질의 발현량과 역 상관관계가 있으며, PBRM1 유전자에서 E27을 포함하는 암환자는 면역관문 억제제의 효능이 낮고, E27이 배제된 암환자는 면역관문 억제제의 효능이 증진되어 면역관문 억제제를 처방하는 경우 생존율이 증가하는 효과가 있으므로, 면역관문 억제제의 효능 예측에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도8



- (52) CPC특허분류
C12Q 2600/106 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)
- (72) 발명자
조남준
 대전광역시 서구 정림서로 114, 105동 103호 (정림동, 삼정하이츠)
김은미
 대전광역시 중구 유천로47번길 44 (유천동)
- (56) 선행기술조사문헌
 International journal of molecular sciences. vol. 22, no. 20, pp. 1-23(2021.10.14.)
 Annals of Oncology. vol. 33, no. 12, pp. 1-5(2022.12.)*
 NPJ precision oncology. vol. 4, no. 1, pp. 1-4(2020)*
 KR1020230080281 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711195891
과제번호	KK-2313
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	안전성평가연구소
연구사업명	안전성평가연구소연구운영비지원
연구과제명	감염병 대응 첨단바이오의약 안전성평가 원천기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국화학연구원부설 안전성평가연구소
연구기간	2021.01.01 ~ 2030.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

RBFOX2(RNA-binding Fox-1 Homolog 2)의 발현 수준 및 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27)의 스플라이싱 여부를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하며, 신장암 치료용 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제의 효능 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 RBFOX2의 발현 수준 또는 PBRM1 엑손27(E27)의 스플라이싱 여부를 검출할 수 있는 제제는 RBFOX2의 유전자; 또는 엑손27(E27)이 포함되거나 배제된 PBRM1 유전자;에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 신장암 치료용 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제의 효능 예측용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 PBRM1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머는 서열번호 1 및 2로 이루어진 한 쌍의 프라이머인 것을 특징으로 하는 신장암 치료용 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제의 효능 예측용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 RBFOX2의 발현 수준 또는 PBRM1 엑손27(E27)의 스플라이싱 여부를 검출할 수 있는 제제는 RBFOX2 단백질; 또는 엑손27(E27)이 포함된 PBRM1 단백질;에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머인 것을 특징으로 하는 신장암 치료용 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제의 효능 예측용 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 PD-1 억제제는 니볼루맵(nivolumab), 펌브롤리주맵(pembrolizumab), 세미플리맵(cemiplimab), 스파탈리주맵(spartalizumab), 캄렐리주맵(camrelizumab), 신틸리맵(sintilimab), 티슬렐리주맵(tislelizumab), 토리팔리맵(toripalimab), 도스타리맵(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224 및 AMP-514 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신장암 치료용 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제의 효능 예측용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 PD-L1 억제제는 아테졸리주맵(atezolizumab), 아벨루맵(avelumab), 두발루맵(durvalumab), 엔바폴리맵(envalolimab), 코시벨리맵(cosibelimab), AUNP12, CA-170 및 BMS-986189 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신장암 치료용 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제의 효능 예측용 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 따른 조성물을 포함하는 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제의 효능 예측용 키트.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제의 효능 예측용 키트.

청구항 13

(1) 암 환자로부터 분리된 암조직 시료로부터 PBRM1 유전자 또는 단백질에서 엑손27의 스플라이싱 여부를 측정하는 단계; 및

(2) 상기 단계 (1)에서 엑손27이 스플라이싱된 PBRM1을 가지고 있는 암 환자는 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제의 효능이 있는 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 PD-1(programmed death 1) 억제제 또는 PD-L1(programmed death ligand 1) 억제제의 효능을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역관문 억제제의 효능 예측용 PBRM1 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대체 pre-mRNA 스플라이싱(Alternative pre-mRNA Splicing; AS)은 단백질의 다양성을 형성하는 생물학적으로 널리 사용되는 과정이다. 암세포는 종종 성장과 생존을 촉진하는 단백질을 생산하기 위해 이 스플라이싱 기능을 사용하지만, 이러한 AS를 조절하는 암 치료 전략은 확립되지 않았다.

[0003] RNA 스플라이싱, 즉, 성숙한 mRNA를 생성하기 위해 pre-mRNA로부터 인트론 서열의 제거 및 엑손의 연결은 대부분의 진핵생물 유전자 발현을 위한 기본 과정으로, RNA 스플라이싱은 매우 정교한 과정이며 스플라이소좀에 의해 촉매된다. 표준 스플라이싱의 경우, U1 snRNP(small nuclear ribonucleoprotein), 스플라이싱 인자 1(SF1) 및 U2 보조 인자(U2AF)는 초기에 각각 5' 스플라이싱 위치, 분기점 위치, 3' 스플라이싱 위치에 결합한다. 이후 U2 snRNP는 분기점 위치에서 SF1을 대체한 다음 U4/U5/U6 tri-snRNP가 결합하여 결합된 엑손과 라리아트(lariat) 인트론 RNA를 생성한다. 흥미롭게도, 고등 진핵생물의 인트론은 종종 mRNA 이전의 스플라이스(AS)를 유발하는 스플라이싱 위치의 퇴화된 연속적인 서열을 갖는다.

[0004] AS는 단일 유전자의 pre-mRNA 내에서 엑손을 차등적으로 선택하여 단백질의 다양성을 확장함으로써 다수의 mRNA 변이체를 생성하는 과정이다. 진핵생물이 진화하는 동안, AS는 강력하게 다양화되고 유기체의 복잡성에 기여하였다. 인간의 경우, 다중 엑손 유전자의 95% 이상이 AS를 통해 다양한 동형단백질(isoform)을 생성하며, 선택적 엑손은 상대적으로 약한 스플라이싱 위치의 컨센스 시퀀스를 갖는다. 따라서 이러한 엑손의 포함 또는 배제는 스플라이소좀의 형성에 기여하거나 방해하는 스플라이싱 인자의 직접적인 pre-mRNA 결합에 의해 강하게 영향을 받는다. 특히 세포 운명을 결정하기 위해 프로그래밍된 AS 이벤트는 고도로 보존된 cis-조절 요소를 포함하며 신호 전달, 분화, 증식 및 생존을 포함한 세포 과정에 반응하여 trans-acting 스플라이싱 인자의 발현 및 활성화의 체계적인 변화를 통해 조절된다.

[0005] AS의 비정상적인 조절은 인간 질병의 장기 기능 장애 및 발병에 결정적인 역할을 한다. 최근의 연구는 새로운 치료제 개발을 위한 특정 스플라이싱 변형에 의해 유발되는 질환을 식별하는 것에 초점을 맞추고 있다. 특정 표적 유전자의 AS 패턴을 조절하는 여러 스플라이스 스위칭 치료제가 현재 임상 시험 중이다. 구체적으로 듀시엔형 근이영양증(duchenne muscular dystrophy) 및 척수근위축증(Spinal muscular atrophy) 치료를 위해 각각 개

발된 DMD와 SMN2의 AS 과정을 표적으로 하는 약물이 미국 식품의약국(FDA)의 승인을 받았고, 비정상적인 AS와 암 진행의 연관성도 연구되었다. 암 환자 검체의 AS 양상에 대한 포괄적인 분석은 전역 접합 풀의 변화를 보여주었다. 하지만, 암에서 기능적으로 중요한 스플라이싱 대체와 암 환자에 대한 임상적 관련성은 대부분 탐구되지 않은 상태로 남아 있는 실정이다.

[0006] 한편, 암 치료를 위한 스프라이싱 관련 기술로는 한국등록특허 제2471898호에 번역관문 억제제를 발현하는 암 특이적 트랜스-스플라이싱 리보자임 및 이의 용도가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1500804호에 AIMP 2 유전자의 스플라이싱 변이체 특이적인 트랜스-스플라이싱 활성을 갖는 핵산 분자 및 이를 이용한 폐암 치료용 약학 조성물 및 폐암 진단용 조성물에 대해 개시되어 있으나, 아직까지 본 발명의 번역관문 억제제의 효능 예측용 PBRM1 유전자 마커 및 이의 용도는 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 번역관문 억제제의 효능 예측용 PBRM1 유전자 마커 및 이의 용도를 제공하고, 본 발명의 PBRM1 유전자의 선택적 스플라이싱은 RBFOX2 단백질의 발현량과 역 상관관계가 있으며, PBRM1 유전자에서 E27의 포함 여부에 따라 번역관문 억제제의 효능이 상이하다는 것을 확인함으로써 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 RBFOX2(RNA-binding Fox-1 Homolog 2)의 발현 수준 또는 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27)의 스플라이싱 여부를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 번역관문 억제제의 효능 예측용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 번역관문 억제제의 효능 예측용 조성물을 포함하는 번역관문 억제제의 효능 예측용 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 (1) 암 환자로부터 분리된 암조직 시료로부터 PBRM1 유전자 또는 단백질에서 엑손27의 스플라이싱 여부를 측정하는 단계; 및

[0011] (2) 상기 단계 (1)에서 엑손27이 스플라이싱된 PBRM1을 가지고 있는 암 환자는 번역관문 억제제의 효능이 있는 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 번역관문 억제제의 효능을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 번역관문 억제제의 효능 예측용 PBRM1 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 PBRM1 유전자의 선택적 스플라이싱은 RBFOX2 단백질의 발현량과 역 상관관계가 있으며, PBRM1 유전자에서 E27을 포함하는 암환자는 번역관문 억제제의 효능이 낮고, E27이 배제된 암환자는 번역관문 억제제의 효능이 증진되어 번역관문 억제제를 처방하는 경우 생존율이 증가하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 TCGA 암 데이터베이스 기반으로 15종 암종에 대한 암 유발 유전자의 선택적 스플라이싱(AS) 변화의 빈도를 나타낸 열지도(Heat map)이다. PSI 값은 0~1사이 값으로 표현되며, 값이 클수록 AS 변화의 빈도가 높다는 것을 의미하며, N. D. 스플라이싱 변화를 검출하지 못했다는 것을 의미한다.

도 2는 TCGA 암 데이터베이스 기반으로 15종 암종의 PBRM1 E27의 선택적 스플라이싱 변화를 확인한 결과이다. UCEC은 자궁내막암조직이고, BLCA은 방광암조직이며, READ은 직장암조직이며, BRCA는 유방암조직이고, PRAD는 전립선암조직이며, STAD는 위암조직이고, LUAD는 폐암조직이며, LUSC는 폐의 편평상피 세포암조직이고, COAD는 대장암조직이며, KIRP는 경부신유두세포암조직이고, LIHC는 간암조직이며, KICH(Kidney Chromophobe)는 신장암조직이고, THCA는 유두갑상선암조직이며, HNSC는 두경부암조직이고, KIRC(Kidney Renal Clear Cell Carcinoma)는 신장암조직이다.

도 3은 인간 자궁내막(A) 및 유방(B)의 정상조직 대비 암조직에서 E27이 배제된 PBRM1 발현량을 비교한 결과이다. **, ***은 정상조직 대비 암조직에서의 E27이 배제된 PBRM1 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는

것으로, **은 $p < 0.01$ 이고, ***은 $p < 0.001$ 이다. n은 시료수를 의미한다.

도 4는 인간 자궁내막(A) 및 유방(B)의 정상조직 및 암조직에서 PBRM1 E27 AS에 대한 PSI 값 및 RBFOX2 mRNA 발현수준 사이의 역 상관관계를 나타내는 열지도이다. FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million)은 발현량을 의미하며, 숫자가 커질수록 발현량이 증가됨을 의미하며, transcript 당 fragment의 수를 이용하여 발현값을 계산한 것이다.

도 5는 15종 암종에 대하여 정상조직에 대비한 암조직에서 PBRM1 E27 AS의 변화(Δ PSI) 대비 RBFOX2 발현의 변화(Δ FPKM)에 대한 상관관계를 나타낸 것이다. Δ FPKM은 암 조직 평균 FPKM - 정상조직 평균 FPKM이고; Δ PSI는 암조직 평균 PSI - 정상조직 평균 PSI이다. r은 피어슨(Pearson)의 상관 계수이고, p 값은 통계적으로 유의미한 정도를 나타낸 것이다.

도 6은 PBRM1 엑손27의 포함여부를 확인할 수 있는 프라이머를 디자인하고(A), CRISPR-Cas9 시스템으로 HeLa 세포주에서 E27을 배제시킨 PBRM1의 발현량을 확인한 RT-PCR(B) 결과이다. 노란색은 총 PBRM1의 발현량을 확인한 것이고, 빨간색은 E27이 포함된 PBRM1의 발현량을 나타낸 것이며, 하늘색은 E26이 포함된 PBRM1의 발현량을 나타낸 것이고, 보라색은 E26 및 E27 둘 다 포함된 PBRM1의 발현량을 나타낸 것이다.

도 7은 인간 신장암 조직에서 PBRM1의 E27 포함 여부에 따른 PD-L1의 발현량 차이를 확인한 결과이다. ###은 PBRM1 E27의 스플라이싱 여부를 구별하지 않고, 신장암조직 전체에서의 PD-L1 발현량 대비 E27이 포함된 PBRM1을 가지고 있는 신장암조직에서의 PD-L1 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p < 0.001$ 이고, ***은 E27이 포함된 PBRM1을 가지고 있는 신장암 조직에서의 PD-L1 발현량 대비 E27을 포함하지 않는 PBRM1를 가지고 있는 신장암 환자의 PD-L1 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로 $p < 0.001$ 이다.

도 8은 니볼루맵(면역관문 억제제)을 투여한 신장암(ccRCC) 환자의 생존율을 확인한 결과이다. *, **은 비교하는 그룹 간의 생존율이 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, *은 $p < 0.05$ 이고, **은 $p < 0.01$ 이다. NS는 통계적으로 유의미한 차이가 없다는 것을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 RBFOX2(RNA-binding Fox-1 Homolog 2)의 발현 수준 또는 PBRM1(Polybromo 1) 엑손27(E27)의 스플라이싱 여부를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 면역관문 억제제의 효능 예측용 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 상기 RBFOX2의 발현 수준 또는 PBRM1 엑손27(E27)의 스플라이싱 여부를 검출할 수 있는 제제는 RBFOX2의 유전자; 또는 엑손27(E27)이 포함되거나 배제된 PBRM1 유전자;에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않으며, 상기 PBRM1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머는 바람직하게는 서열번호 1 및 2로 이루어진 한 쌍의 프라이머이며, 상기 서열번호 1은 정방향 프라이머이고, 서열번호 2는 역방향 프라이머이다.
- [0016] 또한, 상기 RBFOX2의 발현 수준 또는 PBRM1 엑손27(E27)의 스플라이싱 여부를 검출할 수 있는 제제는 RBFOX2 단백질; 또는 엑손27(E27)이 포함된 PBRM1 단백질;에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [0017] 상기 면역관문 억제제는 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, CTLA4 억제제 및 LAG3 억제제 중에서 선택된 하나 이상인 것이 특징이며, 상기 면역관문 억제제는 항-PD-1 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 이의 변이체; 항-PD-L1 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 이의 변이체; 항-CTLA4 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 이의 변이체; 및 항-LAG3 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 이의 변이체; 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않으며, 상기 PD-1 억제제는 니볼루맵(nivolumab), 펌브롤리주맵(pembrolizumab), 세미플리맵(cemiplimab), 스파탈리주맵(spartalizumab), 캄렐리주맵(camrelizumab), 신틸리맵(sintilimab), 티슬렐리주맵(tislelizumab), 토리팔리맵(toripalimab), 도스타리맵(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224 및 AMP-514 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않고, 상기 PD-L1 억제제는 아테졸리주맵(atezolizumab), 아벨루맵(avelumab), 두발루맵(durvalumab), 엔바폴리맵(envalofolimab), 코시벨리맵(cosibelimab), AUNP12, CA-170 및 BMS-986189 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [0018] 상기 면역관문 억제제의 효능 예측은 암 치료에 대한 효능 예측인 것으로, 상기 암 치료는 방광암(BLCA: The Cancer Genome Atlas Urothelial Bladder Carcinoma), 유방암(BRCA: Breast Cancer), 대장암(COAD: Colon Adenocarcinoma), 두경부암(HNSC: head and neck squamous cell carcinoma), 신장 염상세포암(KICH: Kidney

chromophobe), 신장 세포암(KIRC; Kidney renal clear cell carcinoma), 경부신유두세포암(KIRP; Cervical Kidney renal papillary cell carcinoma), 간암(LIHC; Liver Hepatocellular Carcinoma), 폐암(LUAD; Lung Adenocarcinoma), 폐의 편평상피 세포암(LUSC; Lung Squamous Cell Carcinoma), 전립선암(PRAD; Prostate Adenocarcinoma), 직장암(READ; Rectum Adenocarcinoma), 위암(STAD; Stomach Adenocarcinoma) 및 자궁내막암(UCEC; Uterine Corpus Endometrial Carcinoma) 중에서 선택된 어느 하나의 암에 대한 치료인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0019] 또한, 본 발명은 RBF0X2의 발현 수준 또는 PBRM1 엑손27(E27)의 스플라이싱 여부를 검출할 수 있는 제제를 유효 성분으로 포함하는 면역관문 억제제의 효능 예측용 조성물;을 포함하는 면역관문 억제제의 효능 예측용 키트에 관한 것이다.

[0020] 상기 면역관문 억제제의 효능 예측용 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것이 바람직하지만 이에 제한하는 것은 아니다.

[0021] 또한, 본 발명은 (1) 암 환자로부터 분리된 암조직 시료로부터 PBRM1 유전자 또는 단백질에서 엑손27의 스플라이싱 여부를 측정하는 단계; 및

[0022] (2) 상기 단계 (1)에서 엑손27이 스플라이싱된 PBRM1을 가지고 있는 암 환자는 면역관문 억제제의 효능이 있는 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 면역관문 억제제의 효능을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0023] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0024] 실시예 1. 암 게놈 지도(TCGA) 데이터 기반으로 인간 암에서 PBRM1의 선택적 스플라이싱(AS) 분석

[0025] TCGA 환자의 mRNA 발현 데이터는 UCSC Xena 데이터 포털(<https://xena.ucsc.edu>)에서 확보하였다. 상위 60개 체세포 돌연변이 암 구동 유전자 정보는 UCSC Xena에서 TCGA 환자의 돌연변이 정보를 다운로드하였고, IntOGen 플랫폼(<https://www.intogen.org>)에서 암 구동 유전자 후보를 추출하였다. 선택적 스플라이싱에 대한 엑손의 PSI 값은 SpliceSeq 데이터베이스(<http://projects.insilico.us.com/TCGASpliceSeq/>)에서 다운로드하였다.

[0026] 다운로드한 TCGA 암 데이터 베이스의 데이터를 기반으로, 15종의 암종에 대하여 60종 유전자의 선택적 스플라이싱 변화를 분석하였다. TCGA SliceSeq 데이터베이스(<https://bioinformatics.mdanderson.org/TCGASpliceSeq/>)를 사용하여 암종별 주요 암유발 유전자의 PSI(percent-splice-in) 값이 50% 이상 나타낸 AS를 확인하였고, 암유발 유전자 중에서, PBRM1의 스플라이싱 변화가 다양한 암종에서 매우 높게 나타내는 것을 확인하였다(도 1).

[0027] TCGA 데이터에서 스플라이싱 변형 분석 결과, E26과 E27은 PBRM1의 카세트 엑손이며, E26은 TCGA 환자의 정상조직과 암조직에서 모두 배제되는 것을 확인하였고, PBRM1 E27 AS은 암조직에서의 PSI 값이 비교적 다양하게 분포하는 것을 확인하였다. 즉, 암조직에서 PBRM1 스플라이싱에서, E27을 포함하거나 배제하는 스플라이싱 패턴이 암종별 개인별 차이가 있다는 것을 확인하였다(도 2).

[0028] 실시예 2. 자궁내막 조직(UCEC) 및 유방암 조직(BLCA)을 이용한 PBRM1 E27의 AS 패턴 분석

[0029] 자궁내막 조직 및 유방암 조직을 이용하여 PBRM1 E27의 AS 패턴을 분석하고자, PBRM1의 E25와 E28을 대상으로 한 프라이머 쌍을 사용하여 RT-PCR을 실시하였다.

[0030] Hybrid-RTM RNA 추출 키트(GeneA11)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. cDNA 합성을 위해 1 μ g의 총 RNA를 랜덤 헥사머, M-MLV 역전사효소(Promega), RNase 억제제(Enzynomics)를 이용하여 역전사하였다. 40개의 암조직 cDNA 및 8개의 정상 cDNA를 각각 포함하는 자궁내막조직 cDNA 배열(ORIGEN, EDRT102)과, 30개의 암조직 cDNA 및 6개의 정상 cDNA를 각각 포함하는 유방조직 cDNA 배열(ORIGEN, BCRT101)을 구매하여 패턴으로 PBRM1 E27의 AS에 대하여 확인하였다.

[0031] QRT-PCR은 GREN(실시간 Mixelentia) Mixtime Mixeria를 사용하여 실시하였다. PCR은 핫 스타트 PCR 마스터 믹스(Bionier)를 사용하여 수행한 후, 아가로스 겔 전기영동을 실시하였다. PBRM1 스플라이싱 변형의 밴드 강도는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정하였다. 엑손 배제 비율을 계산하기 위해 PCR 강도를 정규화하였다.

[0032] 8개의 정상조직(주변조직)과 40개의 자궁내막암 암조직으로부터 확보한 cDNA 및 6개의 정상조직(주변조직)과 30

개의 유방암 암조직으로부터 확보한 cDNA를 분석한 결과, 정상조직 보다 암조직에서 PBRM1 E27의 배제 패턴이 감소하는 것으로 나타났다. 즉, 정상조직 대비 암조직에서의 PBRM1은 엑손27을 포함하는 선택적 스플라이싱이 유도되는 것을 확인하였고, 정상 조직 대비 암조직에서는 E27의 선택적 스플라이싱이 비교적 넓게 분포하는 것으로 확인되었다(도 3).

[0033] 실시예 3. PBRM1 E27 AS 및 RBFOX2의 발현량의 상관관계 분석

[0034] TCGA 데이터 기반으로, UCEC(자궁내막암조직) 및 BLCA(방광암조직)에서 PBRM1 E27의 PSI 값 변화와 RBFOX2의 mRNA 발현량의 관계를 열지도 분석하였다.

[0035] 그 결과, PBRM1 E27 PSI 값과 RBFOX2 mRNA 발현량은 강한 반비례 관계인 것으로 나타났고, 정상조직에 대비하여 암조직에서 PBRM1 E27 포함하는 패턴을 가지며, 암종은 암조직에서 RBFOX2 mRNA 수준의 하향 조정된 패턴을 나타내는 것을 확인하였다(도 4).

[0036] 또한, 15종 암종에 대하여 정상조직에 대비한 암조직에서 PBRM1 E27 AS의 변화(Δ PSI) 대비 RBFOX2 발현의 변화(Δ FPKM)에 대한 상관관계를 확인한 결과, RBFOX2의 발현량과 E27 포함 PBRM1의 PSI 값은 통계적으로 유의미한 반비례 관계를 보였다(도 5).

[0037] 실시예 4. PBRM1 E27 AS의 확인을 위한 프라이머 디자인 및 검증

[0038] PBRM1 E27의 3' 스플라이스 부위를 대상으로 한 최적화된 sgRNA 서열은 CRISPOR 도구(<http://crispor.tefor.net/>)에서 설계되었다. DNA 올리고뉴클레오타이드는 PCR 기기를 사용하여 어닐링되고 px330 벡터로 클로닝 후 HeLa 세포로 형질전환하였다. 형질전환하고 4일 후, 96웰 플레이트에서 단일 세포 클론을 얻었다. 클론은 RT-PCR을 수행하였다.

표 1

[0039] PBRM1 엑손27의 포함/배제 여부를 확인하기 위한 프라이머 서열

서열번호	프라이머 (5'→3')	방향
1	5 '-GGCCTTGTTAGCATGGGCAG-3'	정방향
2	5 '-GCTGGAGTCCCTACCATAGG-3'	역방향
3	5 '-GAAACAGAGCATGAGCCAC-3'	정방향
4	5 '-CTTCATCTGCTGTGCTGCTCTC-3'	역방향
5	5 '-GATTAAGGCCCAACACCCAGAC-3'	정방향
6	5 '-GAAGCACTCGGCTGCTGTTG-3'	역방향

[0040] 그 결과, 각각의 프라이머를 이용하여 PBRM1 유전자에서 엑손27의 배제/포함 여부를 확인하였다(도 6).

[0041] 실시예 5. PBRM1 E27 AS이 PD-L1을 상향 조절하는지 여부 확인

[0042] 인간 신장암 환자 전체의 PD-L1 발현량, PBRM1의 PSI 값이 높은 군과 낮은 군의 PE-L1 발현량을 비교한 결과, 전체 신장암 환자 대비 PBRM1 E27의 PSI 값이 높은 환자에서 발현되는 PD-L1의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가한 것을 확인하였다. 또한, PSI 값이 낮은 환자군에서는 PD-L1 값이 통계적으로 유의미하게 감소된 것을 확인하였다(도 7).

[0043] 실시예 6. PBRM1 스플라이싱 아이소폼의 발현과 니볼루맙의 치료 효과 확인

[0044] PBRM1 스플라이싱 아이소폼의 발현이 신장암(ccRCC) 환자에서 면역관문 억제제의 임상 결과에 영향을 미치는지 분석하였다. 신장암 환자의 40%는 PRRM1 단백질에 돌연변이가 발생하였으며, 상기 실시예 1~4의 결과를 기반으로, RBFOX2의 낮은 발현량을 가지고 있는 실험군은 E27이 포함된 PBRM1이 발현되고, 반대로, RBFOX2의 높은 발현량을 가지고 있는 실험군은 E27이 배제된 PBRM1이 발현되는 것으로 간주하였다.

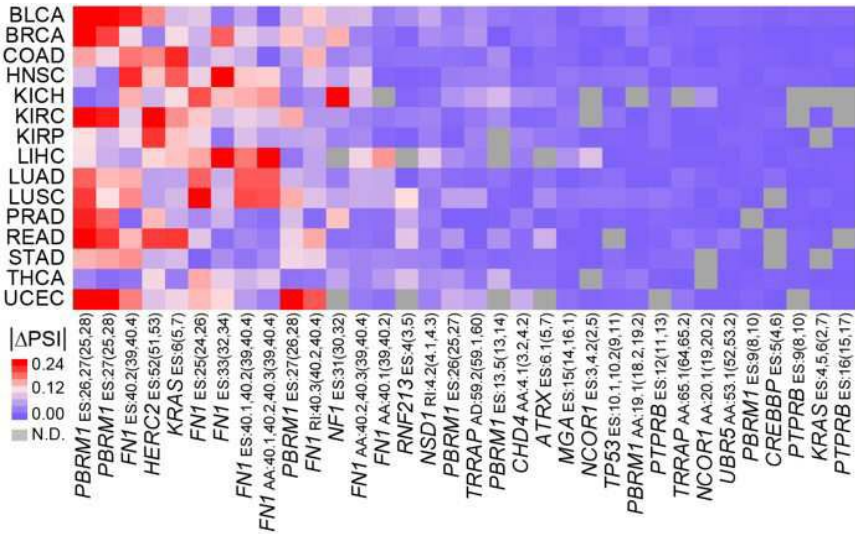
[0045] 본 실시예 6에서는 니볼루맙 투여군 투여군은 각각 4개의 군으로 실험군을 분류하였다. PBRM1 WT(정상군)과 Mut(돌연변이군)으로 나누고 이들은 각각, RBFOX2의 발현량에 따라 저발현량 군, 고발현량군으로 분류하였다.

[0046] 그 결과, 도 8에 개시한 바와 같이 PBRM1 WT(정상군)에서는 RBFOX2의 발현량에 따라 생존율이 통계적으로 유의미한 차이가 나타났으며, PBRM1 돌연변이군은 AS에 무관하게 면역관문 억제제인 니볼루맙의 효과가 우수한 것으로 나타났다. 따라서 본 발명의 PBRM1 AS 또는 RBFOX2의 발현량 분석을 통해 면역관문 억제제의 효능을 예측할

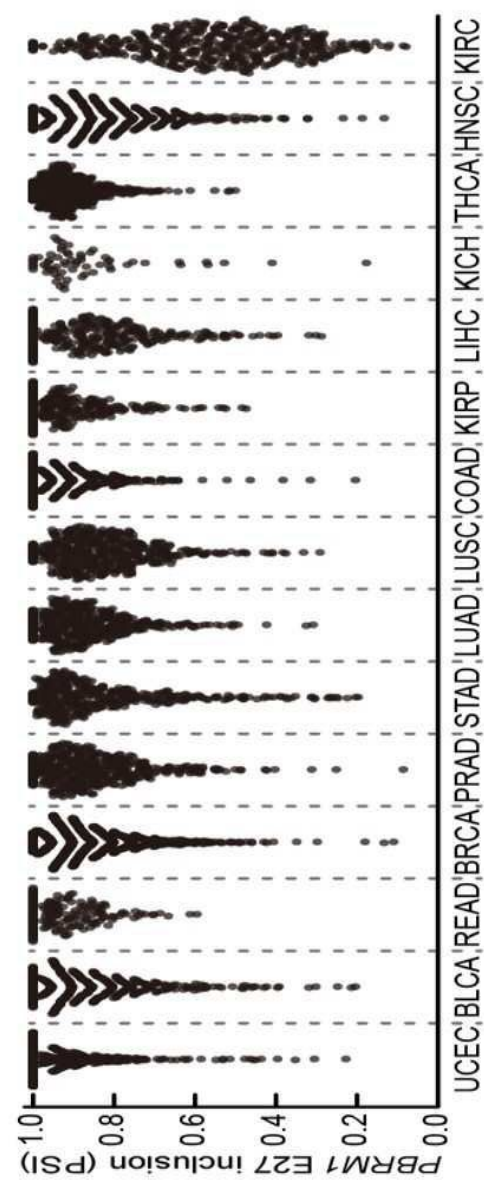
수 있는 것으로 판단하였다.

도면

도면1

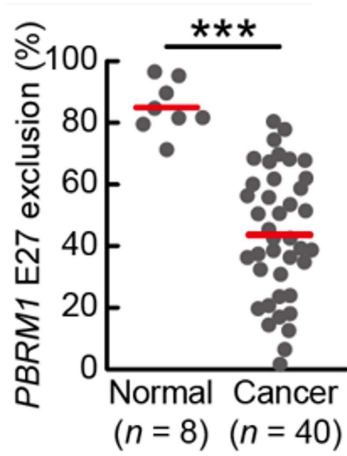


도면2

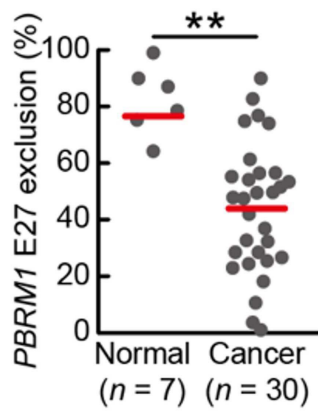


도면3

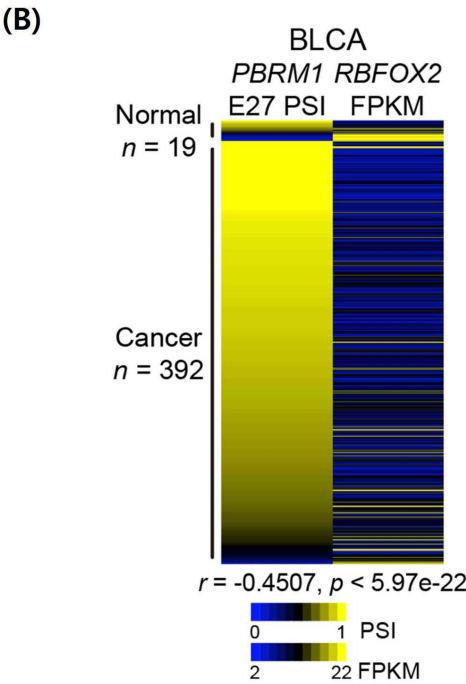
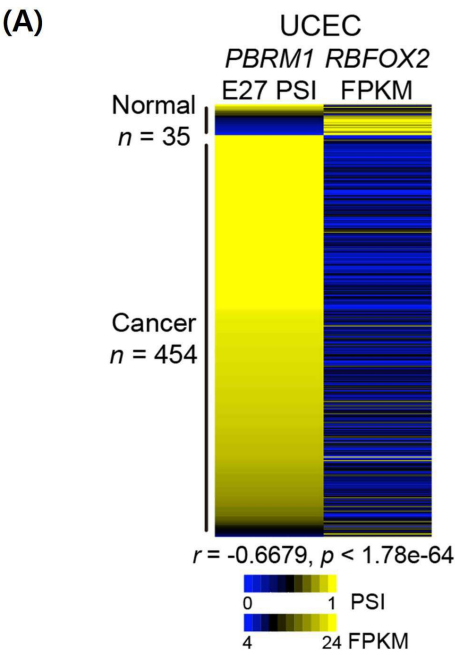
(A)



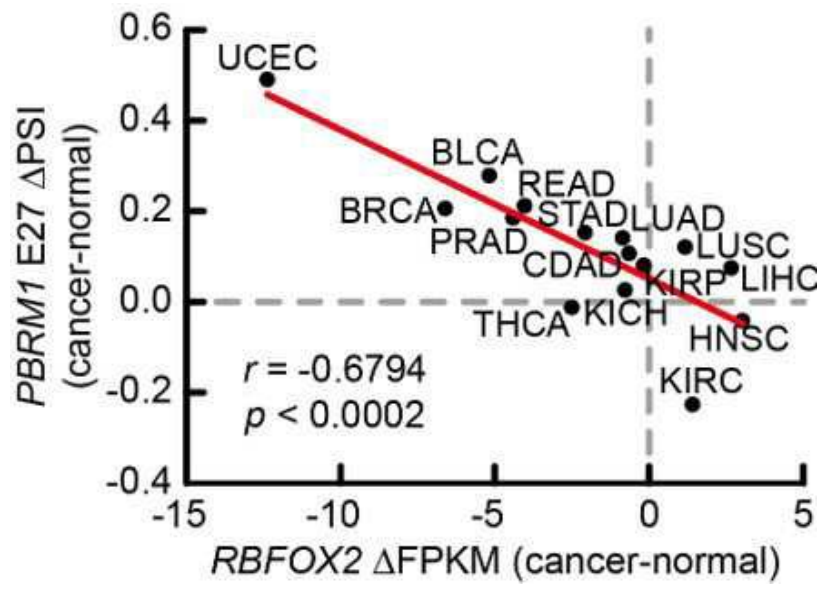
(B)



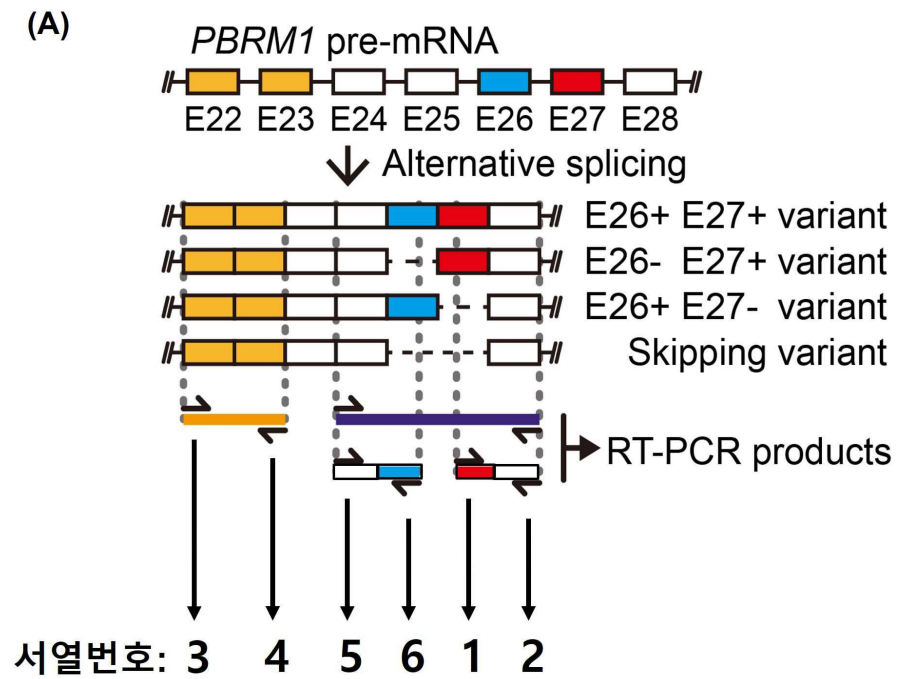
도면4



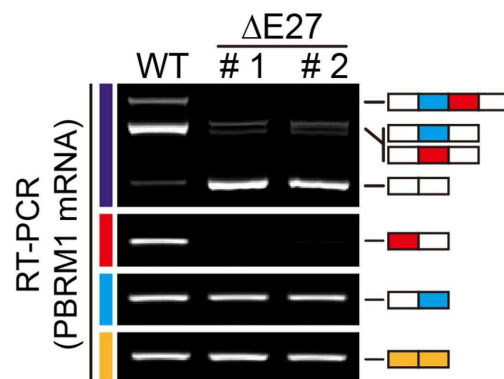
도면5



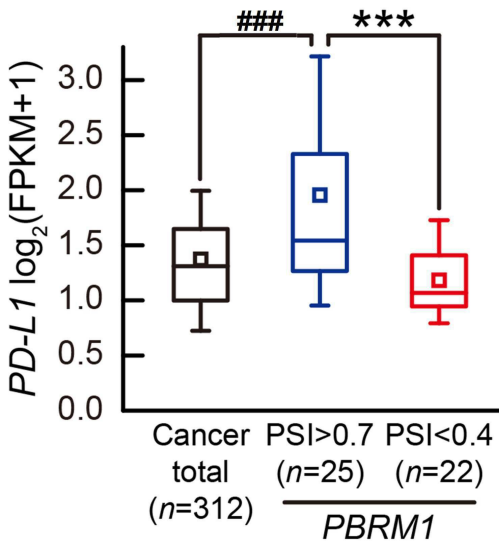
도면6



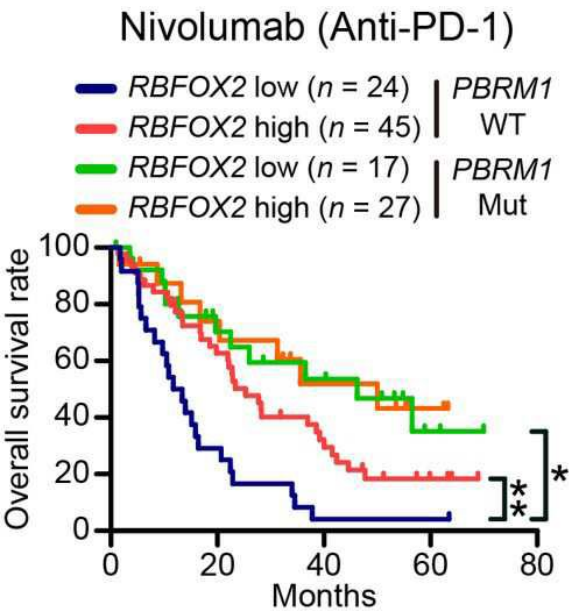
(B)



도면7



도면8



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.