

명세서

발명의 명칭: 췌장관 선암 아형 판별방법 및 아형 판별키트

기술분야

- [1] 본 발명은 췌장관 선암 아형 판별방법 및 아형 판별키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로 게놈, mRNA, 및 단백질 데이터의 통합에 의한 유전단백체 분석에 따라 계층화된 췌장관 선암의 아형정보를 이용하여, 환자의 췌장관 선암 아형을 판별하는 방법 및 아형 판별키트에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 췌장암은 대한민국에서 발생하는 암 중에서 발생률은 9위이지만, 진단받은 환자들의 대부분이 사망하여 사망률은 5위인 암종이다. 미국에서는 현재 췌장암이 암 관련 사망의 네번째 주요 원인이며 2030년까지 미국에서 암 관련 사망의 두번째 주요 원인이 될 것으로 예측된다. 췌장암은 아주 효과적인 전신 치료 방법이 없기 때문에 수술에 의해서만 완치를 기대할 수 있으나, 해부학적 특성상 주요 혈관 침범이나 전신 전이로 발전되어 환자의 80%에서 완치가 불가능한 상태로 발견된다. 수술이 가능한 2기 이내의 환자(전체 환자 중 20% 내외)에서 수술 및 항암치료 등을 적극적으로 하여도 약 70% 환자에서 재발하며, 5년 생존율은 20% 정도에 불과하여 가장 치료가 안되는 종양이다. 즉, 췌장암은 전체 환자 중 약 5~8%만이 완치가 가능하고 나머지 90%이상의 환자는 현재의 치료 방법인 수술 및 항암치료에 모두 불응성인 종양이므로, 이에 대한 기존 연구 및 그를 이용한 선택적 치료를 통한 췌장암 극복의 노력이 절실하다.
- [3] 전통적으로, 췌장암에는 5-fluoruracil(5-FU) 또는 겐시타빈(gemcitabine)을 기반으로 하는 항암 화학 치료를 시행하지만 반응율이 낮고, 아직까지는 일관되게 뚜렷한 효과를 보이는 항암제가 없으며, 기존의 임상적인 진단 방법인 영상학적, 병리적 검사 등으로는 치료 반응성/저항성, 조기 재발 가능성 및 예후를 예측할 수 없으므로, 췌장암을 생물학적 기전에 따라 분류하고, 그에 따른 적절한 치료 및 예후 예측을 할 수 있는 새로운 접근 방법이 필수적이다.
- [4] 최근 다양한 암 질환에 대한 유전단백체 연구 결과에 따라, 유전체 데이터보다는 유전단백체 통합데이터가 보다 정밀한 암 아형 정보를 제공하며, 분류된 각 아형별 암 발병기전에 대한 보다 완전한 정보를 제공하고 있다. 따라서, 췌장암 역시 유전단백체 데이터 기반 아형별 발병기전에 근거한 췌장암 아형 판별 기술로 췌장암 환자의 아형을 판별함으로써, 향후 아형별 맞춤형 치료제 개발에 따른 아형별 최적 치료가 가능한 췌장암 정밀 의료 기술 개발이 가능해질 것이다. 예를 들어, 특허문헌 1에는 TPI1, GAPDH, ENO1, LDHA, 및 PGK1 등을 이용하여 췌장암의 아형을 4종으로 구분한 췌장 종양의 아형을 결정하기 위한 방법이 게시되어 있다.
- [5] [선행기술문헌]

- [6] [특허문헌]
[7] (특허문헌 0001) 국제공개공보 2020-205993 호 (2020.10.08.)
[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 계층화된 췌장관 선암의 아형정보를 이용하여 환자의 췌장관 선암 아형을 판별하는 방법 및 아형 판별키트를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명의 일 실시형태는 하기 (1) 내지 (4)의 단계를 포함하는 췌장관 선암 아형 판별방법을 제공한다.
- [11] (1) 췌장관 선암 환자로부터 분리된 췌장관 선암 병변 조직을 파쇄하는 단계;
[12] (2) 상기 병변 조직으로부터 단백질을 추출하고 소화하여 환자별 펩티드 시료를 얻는 단계;
- [13] (3) 상기 추출된 환자별 펩티드 시료로부터 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 단계로서, 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상이며;
- [14] 아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, 및 BDH1
- [15] 아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1, COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, 및 CALU
- [16] 아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, 및 ANGPTL2
- [17] 아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7, CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, 및 BZW1
- [18] 아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1, SYNPO2, 및 EPB41L3
- [19] 아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, 및 SEC11C
- [20] (4) 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 비교하여, 췌장관 선암 환자의 아형을 판별하는 단계.
- [21]
- [22] 본 발명의 다른 실시형태는 췌장관 선암 아형을 판별하기 위한 키트를 제공한다. 상기 췌장관 선암 아형 판별 키트는 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 재제를 포함하고, 상기 췌장관 선암 아형 1

내지 6의 대표유전자는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

- [23] 아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, 및 BDH1
- [24] 아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1, COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, 및 CALU
- [25] 아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, 및 ANGPTL2
- [26] 아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7, CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, 및 BZW1
- [27] 아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1, SYNPO2, 및 EPB41L3
- [28] 아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, 및 SEC11C
- [29]
- [30] 본 발명의 또 다른 실시형태는 하기 (1) 내지 (5)의 단계를 포함하는 췌장관 선암 환자의 예후예측방법을 제공한다.
- [31] (1) 췌장관 선암 환자로부터 분리된 췌장관 선암 병변 조직을 파쇄하는 단계;
- [32] (2) 상기 병변 조직으로부터 단백질을 추출하고 소화하여 환자별 펩티드 시료를 얻는 단계;
- [33] (3) 상기 추출된 환자별 펩티드 시료로부터 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 단계로서, 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상이며;
- [34] 아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, 및 BDH1
- [35] 아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1, COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, 및 CALU
- [36] 아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, 및 ANGPTL2
- [37] 아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7, CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, 및 BZW1
- [38] 아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1,

SYNPO2, 및 EPB41L3

- [39] 아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, 및 SEC11C
- [40] (4) 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 비교하여, 췌장관 선암 환자의 아형을 판별하는 단계; 및
- [41] (5) 상기 아형별 판별에 따라 예후를 예측하는 단계.
- [42]

발명의 효과

- [43] 본 발명의 일 실시형태에 따른 유전단백체 분석은 PDAC에 대한 이해와 PDAC 환자의 계층화를 개선하고, 췌장관 선암 아형을 판별하여 췌장암 환자에 대한 치료를 개선할 수 있다.
- [44] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 PDAC의 유전단백체 분석에 따라 췌장관 선암 환자의 아형을 판별할 수 있다. 이는 향후 아형별 맞춤형 치료제 개발에 따른 아형별 최적 치료가 가능한 췌장암 정밀 의료기술을 가능하게 한다.
- [45] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 췌장암 아형을 판별하여 예후를 예측할 수 있고, 아형에 맞는 맞춤형 신약개발이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [46] 도 1 및 도 2는 돌연변이-단백질 풍부 및 인산화 상관관계와 PDAC에서 세포사멸과 액틴 세포골격의 연관에 대한 것임.
- [47] 도 1의 (A) 개별 환자의 메가베이스 당 돌연변이(상단), 환자 각각의 SMG 돌연변이 유형(중간 오른쪽); 환자의 각 유전자에 대한 돌연변이 빈도(왼쪽 가운데); 각 환자에 대한 임상 매개 변수(하단). (B) SMG의 체세포 돌연변이의 빈도 비교. 빨간색 라벨링은 본 코호트에서 다른 코호트에서보다 유의하게 더 높은 빈도(비례 테스트에 의해 $p < 0.05$)로 검출되는 유전자를 나타낸다. (C) KRAS, SMAD4 및 ARID1A에서 체세포 돌연변이를 지닌 종양에서 발현이 상향 조절된 인산화된 펩티드. 컬러 막대는 평균 강도에 비해 인산화된 펩티드 강도의 $\log_2$ -fold-change의 기울기를 나타낸다. (D) 인산화 수준이 KRAS, SMAD4 및 ARID1A에서의 체세포 돌연변이와 상관 관계가 있는 단백질 관련 세포 처리. 열 지도는 돌연변이-인산화 상관 관계가 확인되는 단백질에 의한 각 공정의 농축(enrichment)의 유의성을 보인다. 유의성은 $-\log_{10}(p)$ 로 표시되고, 여기서 p는 농축에 대한 p 값이다. (E-G) 체세포 돌연변이와 TP53(E), RB1(F) 및 ATM(G)에서의 단백질 풍부 또는 인산화 수준과의 연관성. 막대 사탕(lollipop) 플롯은 유전자 구조(상단)에서 검출된 체세포 돌연변이(왼) 및 인산화 부위(삼각형)를 보인다. 막대 사탕의 높이는 해당하는 돌연변이를 갖는 환자의 수를 나타내고, 색상은 돌연변이 유형을 나타낸다(A의 범례 참조). 샘플은 체세포 돌연변이를 기반으로 분류된다. 모든 환자에 걸쳐 평균 수준에 대해 정규화된 인산화된 펩티드 강도 또는 단백질 풍부는 막대 그래프로

표시된다(하단; 빨간색 및 파란색, 평균보다 높고 낮음, 각각). 풍부한 돌연변이 부위는 화살표로 표시된다. (H) EMT-관련 단백질과 KRAS, SMAD4 또는 ARID1A에서 강력한 돌연변이 인산화 상관 관계(주황색 노드) 간의 상호 작용을 설명하는 네트워크 모델. 회색 노드는 노드 간의 연결을 증가시키기 위해 경로에 추가되었지만, 유의한 돌연변이-인산화 상관 관계는 없는 분자를 나타낸다. 실선 화살표는 직접 활성화; 점선 화살표는 간접 활성화; 회색 선은 단백질-단백질 상호 작용; 두꺼운 선은 원형질막. (I) ARID1A에서 단백질 풍부 및 인산화 수준과 체세포 돌연변이의 연관.

- [48] 도 2의 (A) PDAC의 유전단백체 분석을 위한 워크 플로우. 종양 조직과 혈액 샘플의 엑솜-시퀀싱 분석 및 종양 조직의 RNA-시퀀싱은 196 명의 환자로부터의 종양에 대해 수행된 반면 질량 분석-기반 단백질체 분석(글로벌 프로테오믹스 및 인산화프로테오믹스)은 150 명의 환자로부터의 종양에 대해 수행되었다. 종양 세포충실도의 분포는 196 개의 종양에 대해 표시되었다(왼쪽 하단). 15 % 초과와 세포충실도를 갖는 종양은 유전단백체 분석에 사용되었고, 19 % 초과와 세포충실도를 갖는 종양은 단백질체 분석에 사용되었다. (B) 글로벌 프로테오믹스 및 인산화프로테오믹스 데이터에서 확인된 비-중복 펩티드의 숫자. (C) mRNA 시퀀싱 및 프로테오믹스 데이터(글로벌 프로테오믹스 및 인산화프로테오믹스)에서 확인된 단백질-코딩 유전자의 수. 펩티드 및 단백질-코딩 유전자의 평균 수는 각각 (B) 및 (C)에 표시된다. (D) 엑솜-시퀀싱 데이터에서 확인된 돌연변이를 운반하는 단백질 서열 및 유전자를 변경하는 체세포 돌연변이의 수. (E) 본 코호트 및 TCGA(Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address and Cancer Genome Atlas Research, 2017), Bailey et al.(Bailey et al., 2016), Biankin et al.(Biankin et al., 2012), Witkiewicz et al.(Witkiewicz et al., 2015), 및 Waddell et al.(Waddell et al., 2015)의 이전 코호트에서 확인된 유의하게 돌연변이된 유전자(SMG) 간의 관계. (F-H) KMT2D (F), AHNK2 (G) 및 FCGBP (H)에서 단백질 풍부 또는 인산화펩티드 수준과 체세포 돌연변이의 연관성. 각 유전자에 대해, 막대 사탕 플롯(상단)은 검출된 체세포 돌연변이(원) 및 인산화 부위(삼각형)를 보여준다. 막대 사탕의 높이는 해당 돌연변이를 갖는 환자의 수를 나타내고, 색상은 범례에 표시된 돌연변이 유형을 나타낸다. 단백질 풍부 또는 인산화된 펩티드의 강도는 막대 플롯에 보여지는 모든 환자들에 걸쳐 중앙값에 비례하여 정규화되었다(하단, 빨간색 및 파란색, 중앙값보다 더 높거나 중앙값보다 더 낮음). (I) 복제 수 변이(copy number variations)(CNV)와 mRNA(왼쪽) 및 단백질(오른쪽) 발현 수준 간의 상관 관계. 빨간색과 파란색은 각각 양 및 음의 상관 관계를 나타낸다. 열 지도의 대각선 및 비-대각선 요소는 CNV와 mRNA 또는 단백질 발현 수준 사이의 시스 및 트랜스 상관 관계를 나타낸다. 염색체를 따라, 특이적으로 mRNA 또는 단백질 발현 수준 및 일반적으로 mRNA 및 단백질 발현 수준 모두와 상관 관계가 있는 CNV의 수는 파란색(상단)과 검은 색(하단) 막대로 각각 표시되었다.

- [49] 도 3 및 도 4는 mRNA-단백질 풍부 상관관계와 새로운 종양 유전자 및 종양 억제제 후보에 대한 것임
- [50] 도 3의 (A) 유의미한 ($FDR < 0.01$) 및 유의미하지 않은 ($FDR > 0.1$) mRNA-단백질 상관 관계를 갖는 유전자에 대한 생존 차이(카이 제곱 통계값) 분포. $p < 0.01$, Student's t-검정. 바이올린 플롯에서 선은 중앙값을 나타낸다. (B) 양성 및 음성 mRNA 생존 상관 관계를 나타내는 유전자로 표시되는 세포 과정. 각 과정의 농축 유의성은 $-\log_{10}(p)$ 로 표시된다, 여기서 p 는 농축에 대한 p 값이다. 빨간색 점선: $p = 0.05$. (C) 종양 유전자 및 종양 억제제 후보의 선택. 유의미한($FDR < 0.01$) mRNA-단백질 상관 관계를 갖는 유전자 중, 12 종 종양 억제제 및 19 종 종양 유전자 후보는 4 개의 PDAC 코호트 모두에서 각각 유의한 양성(위험 비율 < 1) 및 음성(위험 비율 > 1) mRNA-생존 상관 관계로 식별되었다. 기준(그림 7D)에 따르면, 6 개의 종양 억제제와 4 개의 종양 유전자가 추가 연구를 위해 선택되었다. (D-E) 대조군 shRNA(shCtrl) 또는 녹다운을 유도하기 위해 종양 유전자 후보를 표적으로 하는 표시된 shRNA의 발현시 AsPC1 카운트 (D)($n \geq 3$ /조건). 5 일차에 결정되는 세포 수 (E). (F-G) 표시된 shRNA로 형질 도입된 AsPC1 세포를 스크래치하여 유발된 상처 후 0 또는 48 시간에 측정된 상처 치유의 대표 이미지 (F) 및 정량화 (G) ($n \geq 2$ /조건). 상처 치유는 48 시간에 정량화되었다. (H-I) 표시된 종양 억제제 후보의 과발현 후 AsPC1 카운트 (H)($n \geq 2$ /조건). 세포 수는 3 일(I)에 결정된다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. Dunnett의 사후 수정을 통한 분산(ANOVA)의 양방향 (D 및 H) 및 단방향 (E, G 및 I) 분석에 의해 *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.
- [51] 도 4의 (A) 환자 전체에 걸친 개별 유전자의 mRNA 및 단백질 풍부한 Spearman 상관 계수 분포. 노란색과 파란색은 각각 양 및 음의 상관 관계를 나타낸다. (B) KEGG 경로와의 높고 낮은 mRNA-단백질 풍부 상관 관계를 갖는 유전자의 차별적 관련성. 각 KEGG 경로에 관련된 유전자는 노란색(양의 상관 관계) 및 파란색(음의 상관 관계) 막대에 의해 나타내진다. (C) 가장 높은 mRNA 발현 수준을 갖는 환자와 가장 낮은 mRNA 발현 수준을 갖는 환자의 상위 25 %와 하위 25 % 간의 유의한(파란색) 및 유의하지 않은(빨간색) 생존 차이를 각각 가진 유전자에 대한 mRNA-단백질 상관 관계의 누적 밀도 분포. Kolmogorov-Smirnov 테스트에 의해 $p < 0.01$. (D) 기능적 실험을 위한 종양 억제제 및 종양 유전자 후보 선택. 4개의 PDAC 코호트에서, 각각, 현저하게 양성(위험 비율 < 1) 및 음성(위험 비율 > 1) mRNA-생존 상관 관계를 갖는 종양 억제제(TS) 후보 12 개 및 종양 유전자 후보 19 개 중, 3 개 이상의 PDAC 코호트에서 바람직한 생존 곡선 패턴(빨간색과 파란색 선, 가장 높고 가장 낮은 mRNA 발현 수준을 갖는 환자의 상위 및 하위 25 %)을 갖는 후보가 선택되었으며, 결과적으로 10 개의 TS 및 16 개의 종양 유전자 후보가 생성된다. 그 중 이전에 췌장암에 보고된 적이 없는 9 개의 TS와 7 개의 종양 유전자 후보가 선택되었다. 마지막으로, 그 중, AsPC1 세포에서 발현된 유전자($FPKM > 1$)의 중앙값 발현($\log_2\text{-FPKM} = 3.11$)보다 더

작고 더 큰 발현 수준을 갖는 7 개의 TS 및 5 개의 종양 유전자 후보. 그 중, IQGAP2는 그의 큰 유전자 크기로 인해, 기능적 실험에서 제외되었고, KRT19는 광범위한 기능에 대한 참여로 인해 제외되었다. AsPC1 세포의 mRNA 발현 프로파일은 Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)(Ghandi et al., 2019)로부터 획득되었다. FPKM, 백만 당 전사체 킬로베이스 당 단편. (E) 녹다운 후 AsPC1 세포에서 정량적 RT-PCR 분석을 사용하여 측정된 종양 유전자 후보의 상대 mRNA 발현 수준. mRNA 수준은 GAPDH, 18s RNA 및 HPRT(조건 당 n = 3)에 의해 정규화되었고, 이어서 대조군 shRNA 형질 도입 세포(shCtrl)에 의한 표적 유전자 (예를 들어, shDCBLD2)의 결과 값으로 정규화되었다. Student's t-검정에 의한 **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (F-G) 면역 블롯팅에서 얻은 대표 이미지(F) 및 과발현 후 AsPC1 세포에서 종양 억제제 후보의 상대적 단백질 수준(G). 표적 유전자의 단백질 수준은 α -액틴의 수준으로 정규화되었다.

[52] 도 5 및 도 6은 유전단백체 분석에 의한 PDAC 아형 재정의에 대한 것임.

[53] 도 5의 (A) TCGA, PACA AU 및 PACA-CA 코호트에서 mRNA 시그니처(rna1-3)에 의해 정의된 RNA1-3 클러스터. RNA1-3을 정의하는 rna1-3은 각각 첫번째 열 지도에서 보여진다. ran1-3에서 mRNA의 수는 괄호 안에 표시된다. 각 코호트에 대해 열 지도는 rna1-3(왼쪽) 및 rna1-3과 관련이 없는 종양(오른쪽)을 기반으로 RNA1-3으로 분류된 종양을 보여준다. 아형 막대 플롯은 Moffitt et al.(Moffitt et al., 2015), Collisson et al.(Collisson et al., 2011), Bailey et al.(Bailey et al., 2016)에 의해 정의된 분자 시그니처에 의해 예측된 아형을 보여준다. (B) TCGA, PACA-AU 및 PACA-CA 코호트에서 RNA1-3 클러스터에 속하는 종양 환자의 진단 후 생존. (C-D) 글로벌 프로테오믹 및 인산화프로테오믹 데이터를 기반으로 Prot1-5(C) 및 Phos1-4(D)를 정의하는 단백질 시그니처(prot1-5 및 phos1-4). 단백질과 인산화펩티드의 수는 괄호 안에 표시된다. (E) mRNA, 단백질 및 인산화 데이터의 통합 클러스터링으로 식별되는 6 개의 아형(Sub1-6). 열 지도는 개별 데이터 유형의 클러스터링으로부터 식별된 해당 클러스터(행)에 대한 지시 벡터를 보여준다. 빨간색, 해당 클러스터에 속하는 개별 샘플의 멤버십; 상단의 색상 막대, Sub1-6; rna1-3에 의해 정의된 RNA1-3 클러스터. (F) Sub1-6에서 종양이 있는 환자의 생존 기간. (G) Sub1-6에서 SMG의 체세포 돌연변이 분포 및 각 환자에 대한 임상 매개 변수(하단). (H) Sub1-6의 종양에서 확인된 체세포 메가베이스 당 돌연변이 분포. 바이올린 플롯에서, 선은 중앙값을 나타낸다. Sidak의 사후 보정을 사용하는 단방향 ANOVA에 의해 *, $p < 0.05$.

[54] 도 6의 (A) mRNA 시퀀싱 데이터의 클러스터링 결과. 개별 클러스터링 결과에서, 공표형(cophenetic) 상관 계수 플롯(왼쪽)은 어떻게 계수가 서로 다른 수의 클러스터($k = 2 \sim 6$)로 다양해지는지 및 중간 절대 편차(MAD)의 다중 백분율(10-30 %)로 선택된 분자의 서로 다른 수는 언제 클러스터링에 사용되는지를 보여준다. 실루엣 너비(silhouette width) 점수 플롯(가운데)는 개별

유형의 데이터로부터 식별된 클러스터에서 양의 점수를 갖는 핵심 샘플을 보여준다. 열 지도(오른쪽)은 페어-와이즈 클러스터링(pair-wise clustering)으로부터 얻은 샘플 컨센서스(consensus)를 보여준다. 파란색에서 빨간색으로의 그라데이션은 결정된 클러스터 수($k = 3$)로 100 번 클러스터링 시행하여 얻어진 클러스터링에서의 일치 비율을 나타낸다. 하단의 색상 막대는 클러스터에 속하는 샘플을 나타낸다: RNA1-3(A); Prot1-5(C); 및 Phos1-4(D). (B) RNA1-3에서 Moffitt et al.(Moffitt et al., 2015), Collisson et al.(Collisson et al., 2011), Bailey et al.(Bailey et al., 2016)에 의해 제공된 mRNA 시그니처 기반으로 정의된 아형의 비율(아형 범례 참조) 및 PDAC 코호트에서 상관 관계가 없는 종양이 표시되었다. (C-D) 프로테오믹 데이터(C) 및 인산화프로테오믹 데이터(D)의 글로벌 클러스터링 결과. (A)의 범례를 참조. 클러스터의 수 k 는 단백질(C) 및 인산화(D) 데이터에 대해 $k = 5$ 및 4로 각각 결정되었다.

- [55] 도 7 및 도 8은 PDAC 아형과 별개의 세포 네트워크와의 연관에 관한 것임
- [56] 도 7의 (A) Sub1-6을 정의하는 유전자(S1-G에서 S6-G)와 단백질(S1-P에서 S6-P)에 의해 표현되는 세포 과정. 열 지도는 Sub1-6을 정의하는 유전자 또는 단백질에 의한 세포 과정의 농축 유의성을 보여준다. 유의성은 $-\log_{10}(p)$, 여기서 p 는 농축에 대한 p 값으로 표시된다. (B-C) 면역-관련 과정(B, 상단), 췌장 분비(B, 하단)에 관련된 유전자 및 단백질과 Sub5-6(B) 및 Sub2-4(C)과 각각 관련된 RHOA 신호 간의 상호 작용을 보이는 네트워크 모델. 노드의 중심 및 경계 색상은 해당 유전자와 단백질이 Sub5-6(Sub5의 경우 녹색, Sub6의 경우 진한 녹색) 및 Sub2-4(Sub2의 경우 주황색, Sub3의 경우 빨간색, Sub4의 경우 진한 빨간색)의 시그니처로 선택되었는지 여부를 나타낸다. 노드의 원 P는 해당 아형을 정의하는 인산화된 펩티드를 나타낸다. 화살표, 활성화; 억제 기호, 억제; 실선 화살표, 직접 활성화; 점선 화살표, 간접 활성화; 회색 선, 단백질-단백질 상호 작용. (D) Sub1-6에서 종양 세포충실도의 분포. 세포충실도 중앙값은 빨간색 선으로 표시된다. (E) 배양된 Sub4(SNU3608) 및 Sub6(SNU3573) 종양에 대한 세포 수. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 전체 시간 범위에 대해 Sidak의 사후 보정을 사용한 양방향 ANOVA에 의해 ****; $p < 0.0001$.
- [57] 도 8은 Sub1-6을 정의하는 mRNA, 단백질 및 인산화 시그니처가 유전자 세트 농축 분석(GSEA)에 대한 것으로, 도 8의 (A) Sub6을 정의한 mRNA 및 단백질 시그니처를 어떻게 선택하고 GSEA를 위해 사용하는지가 예로 표시된다. 통합 클러스터링(왼쪽 상단)은 Sub6가 RNA3, Prot5 및 Phos4 클러스터에 의해 정의된다는 것을 보인다. 이 정보를 바탕으로, RNA3를 정의하는 416 개의 유전자(rna3)가 mRNA 시그니처(S6-G)로 선택되었고, 각각 Prot5 및 Phos5를 정의하는 945 개의 단백질(prot5) 및 1030 개의 인산화펩티드(phos4)는 단백질 시그니처(S6-P)로 선택되었다(오른쪽 하단 및 상단). 인산화펩티드를 phosphorylated 단백질로 맵핑하고, 그들을 945 개의 단백질(prot5)과 결합한 후, 생성된 단백질은 GSEA에 사용되었다. (B) TP53 또는 ARID1A의 체세포

돌연변이를 가지고 있으며 단백질 풍부 또는 상응하는 단백질-코딩 유전자의 인산화 수준을 변경시킨 종양의 아형 분포. 막대 플롯 아래의 열 지도 색상은 환자의 아형을 나타낸다. (C) 단백질이 풍부한 돌연변이가 있거나 없는, 또는 인산화된 펩티드의 강도가 환자에 걸쳐 중앙값보다 높거나(양성) 낮은(음성) 환자의 수. 누적 막대 플롯의 색상은 환자의 아형을 나타낸다.

- [58] 도 9 및 도 10은 친-종양형성의(pro-tumorigenic) PMN-MDSC의 T 세포 증식 억제에 관한 것임
- [59] 도 9의 (A-B) Sub4(SNU3608) 및 Sub6(SNU3573) 종양에서 유래한 세포로 이식된 동소이식 PDAC 모델에서 시간 경과에 따른(A) 및 최종 포인트(B)에서 종양 부피 비교($n = 10/\text{그룹}$). (C) SNU3608 및 SNU3573 종양에 침투하는 면역 세포 하위 집합의 수($n = 10/\text{그룹}$). M-MDSC, 단핵구 MDSC. (D-E) 표시된 마커를 사용한 대표적인 FACS 데이터. 상자는 PMN-MDSC를 나타낸다. 위 첨자 H: 높음, L: 낮음. (F-G) CXCR2 및 CXCR4에 대한 발현 수준을 기반으로 정의된 PMN-MDSC의 표시된 그룹 네 가지의 백분율(F) 및 비율(G)($n = 8/\text{그룹}$). (H) 높은 수준의 CXCR2 및 CXCR4를 나타내는 PMN-MDSC의 백분율. (I) PMN-MDSC 및 동소 이식 PDAC 모델 및 나이브 Balb/c 마우스 각각으로부터 단리된 T 세포의 공동 배양. CD8+ 및 CD4+ 에 대한 CFSE 분석을 위한 FACS 스킴이 보여진다. (J-M) CD8+(J) 및 CD4+ T 세포(L)용 CFSE 강도 분포. CFSE의 MFI는 결정된다(K 및 M; $n = 3-4/\text{그룹}$). Sidak의 사후 보정을 사용한 양방향 ANOVA(A, C 및 F) 및 Student's t-검정(B, H, K 및 M)에 의해 *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.
- [60] 도 10의 (A) Sub1-6에 걸친 면역 세포 마커의 mRNA 및 단백질 발현 패턴. 열 지도는 Sub1-6에서 마커의 mRNA(왼쪽) 및 단백질(오른쪽) Z-점수를 보여준다. 각 아형에서, 각 마커에 대해, Z-점수는 Sub1-6에 걸친 발현 수준의 중앙값 및 표준 편차를 사용하는, 아형에서 중앙값 발현 수준을 자동-크기 조정하는 것을 통해 Sub1-6에서 계산되었다. (B) Sub1-6에서의 T 세포(CD4 및 CD8A) 및 호중구(CXCL1, CXCL8, 및 LCN2)를 위한 대표 마커의 발현 수준 분포. 바이올린 플롯에서 중앙선은 각 아형 마커의 중앙값 발현 수준을 나타낸다. (C) Balb/c-nu 마우스에서 Sub4(SNU3608) 및 Sub6(SNU3573) 종양으로부터 유래된 세포로 이식된 동소 이식 PDAC 모델의 개발을 위한 개략적 절차. (D) 8, 22 및 36 일에 찍은 SNU3608 및 SNU3573 종양의 대표 초음파 이미지. 점선 원은 종양을 나타낸다. (E) 42 일에 찍은 SNU3608 및 SNU3573 종양의 총 이미지. (F) 42 일에 측정된 SNU3608 및 SNU3573 종양의 무게 비교. Student's t-검정에 의해 $p = 0.062$. (G) 골수성 집단 및 케모카인 수용체에 대한 FACS 게이팅 방식. 등고선은 세포 밀도 분포를 보여준다. 실선은 개별 플롯에서 표시된 세포 집단을 나타낸다. 빨간색 화살표 머리는 FACS 게이팅의 흐름을 나타낸다. (H-J) 혈액(H), 비장(I) 및 골수(BM, J)에서 측정된 SNU3608 및 SNU3573 종양에서 표시된 면역 세포의 백분율. PMN-MDSC, 다형 핵 골수-유래 억제 세포; M-MDSC, 단핵구 MDSC. (K-N) SNU3608 및 SNU3573 종양(K)뿐 아니라,

SNU3608 및 SNU3573 종양을 보유한 Balb/c-nu 마우스의 혈액(L), 비장(M), 및 BM(N)에서 측정된 CXCR2 및 CXCR4의 발현 수준에 따라 정의된, 4 개의 표시된 PMN-MDSC 그룹의 수 또는 백분율. $n = 3$ 또는 4(나이프), 8 ~ 10(SNU3608 또는 SNU3573). Sidak의 사후 수정을 사용한 양방향 ANOVA에 의해 *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.0001$.

[61] 도 11은 췌장관 선암 환자의 병변 조직으로부터 추출된 단백질과 아형 1 내지 6의 대표유전자의 안정동위원소 표지펩티드의 혼합물에 대한 MRM-MS 분석 수행에 대한 모식도이다.

[62] 도 12는 환자 시료와 아형별 대표 펩티드간의 MRM 신호 세기 및 등고선 지도이다.

[63] 도 13은 췌장암 조직 파쇄 과정과 초고압 압력순환기술을 적용한 췌장암 시료 처리방법을 나타내는 것이다.

[64]

발명의 실시를 위한 형태

[65] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 구현에 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 구현에 및 실시예에 한정되지 않는다.

[66] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 개시 형태로 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[67]

[68] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로서 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 단계, 동작, 구성요소, 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 단계, 동작, 구성요소, 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[69] 또한, 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다.

일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[70]

- [71] 본 발명은 췌장관 선암 아형판별 방법 및 아형판별 키트에 관한 것이다.
- [72] 본 발명의 목표는 췌장관 선암(Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC) 환자 계층화를 개선하고, 잠재적인 치료 표적 또는 치명적 질병인 췌장암에 대한 환자 관리를 개선하기 위한 진단 마커를 식별하는 것이다.
- [73] 본 발명은 단백질 및 게놈 데이터가 상호 보완적이라는 것을 보여준다. 인산화 데이터의 가용성은 췌장관 선암(Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC)에서 돌연변이 및 신호 경로 사이의 연관성을 시사하는, SMG의 체세포 돌연변이와 상관 관계가 있는 활동을 갖는 신호 경로에 대한 정보를 제공한다.
- [74] PDAC에서 종양 유전자 및 종양 억제제 후보를 선별하기 위하여, mRNA-단백질 풍부 상관 관계를 사용했다. 또한 PDAC 아형을 보다 정확하게 정의하기 위하여, 단백질 풍부 및 인산화 데이터는 mRNA 풍부와 결합되었다. PDAC 아형을 정의하는 mRNA 및 단백질 시그니처의 GSEA 및 네트워크 분석은 아형의 특성을 밝혀낸다. 게놈, mRNA, 및 단백질 데이터의 효과적인 통합을 통한 유전단백체 분석은 PDAC 병인을 밝히고, PDAC 환자를 계층화하고 잠재적으로 치료 표적을 식별할 수 있게 도울 수 있는 유용한 정보를 제공한다.
- [75]
- [76] 본 발명은 췌장관 선암 병변 조직 샘플에 대한 mRNA 발현 데이터를 글로벌 단백질 데이터 및 인산화 단백질 데이터와 결합하여 PDAC 샘플에 대한 유전단백체(proteogenomic) 분석을 수행하였고, 이에 따라 하기 췌장관 선암 전아형 대표 유전자, 6개의 췌장관 선암 아형 및 각 아형의 대표유전자를 판별하였다.
- [77] 아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, BDH1
- [78] 아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1, COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, CALU
- [79] 아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, ANGPTL2
- [80] 아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7, CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, BZW1
- [81] 아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1, SYNPO2, EPB41L3
- [82] 아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, SEC11C
- [83]
- [84] 췌장관 선암 전아형 대표유전자(All Sub): KRT19, RAB27B, QSOX1, VILL, GNPAT, ABCC3, GP2, ETHE1, BPNT1, AGR2, PIGR, SRC, CTSE, JUP, RPL7,

TSPAN8, SRM, VDAC1, SCP2, RPS3, AK4, RPL9, RDX, RPL3, RPL13A, RPL5, RPS9, HK2, RAB25, GNG2, RPL15, RPL37, RPS7, RPL8, RPL18A, RPL6, PABPC4, INF2, SLC25A24, MYH14, GALNT7, GOLM1, MCU, GSDMB, CYP2S1, HTATIP2, SDCBP2, SYTL2, PREB, MYO6, PKP3, SNTB2, S100A11

[85]

[86] 본 발명의 일 실시형태에 따른 췌장관 선암 아형 판별방법은 하기 (1) 내지 (4) 단계를 포함할 수 있다.

[87] (1) 췌장관 선암 환자로부터 분리된 췌장관 선암 병변 조직을 파쇄하는 단계;

[88] (2) 상기 병변 조직으로부터 단백질을 추출하고 소화하여 환자별 펩티드 시료를 얻는 단계;

[89] (3) 상기 환자별 펩티드 시료로부터 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 단계로서, 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되며;

[90] 아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, BDH1

[91] 아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1, COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, CALU

[92] 아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, ANGPTL2

[93] 아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7, CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, BZW1

[94] 아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1, SYNPO2, EPB41L3

[95] 아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, SEC11C

[96] (4) 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 비교하여, 췌장관 선암 환자의 아형을 판별하는 단계.

[97]

[98] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 상기 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준은 췌장관 선암 전아형 대표유전자(All Sub)의 발현수준과 비교될 수 있다. 이에 따라 아형 판별의 신뢰성을 높일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 아형 1 내지 6 및 하기 췌장관 선암 전아형을 서로 구분하는 데에 가장 기여가 큰 유전자의 발현 수준을 조합하여 비교할 수 있다.

[99] 상기 췌장관 선암 전아형 대표 유전자(All Sub)는 KRT19, RAB27B, QSOX1, VILL, GNPAT, ABCC3, GP2, ETHE1, BPNT1, AGR2, PIGR, SRC, CTSE, JUP, RPL7, TSPAN8, SRM, VDAC1, SCP2, RPS3, AK4, RPL9, RDX, RPL3, RPL13A,

RPL5, RPS9, HK2, RAB25, GNG2, RPL15, RPL37, RPS7, RPL8, RPL18A, RPL6, PABPC4, INF2, SLC25A24, MYH14, GALNT7, GOLM1, MCU, GSDMB, CYP2S1, HTATIP2, SDCBP2, SYTL2, PREB, MYO6, PKP3, SNTB2, 및 S100A11로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[100]

[101] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 상기 채장관 선암 전아형 대표유전자 및 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준의 측정 및 비교는 채장관 선암 전아형 대표유전자 및 각 아형별 유전자들을 대표하는 안정동위원소 표지펩티드 패널을 구축하는 단계; 상기 환자별 펩티드 시료와 상기 안정동위원소 표지펩티드 패널을 혼합하는 단계; 및 상기 혼합물을 정량 질량분석법(Quantitative Mass Spectrometry)으로 분석하여 채장관 선암 환자의 아형을 판별하는 단계로 수행될 수 있다.

[102] 이에 제한되지 않으나, 상기 정량 질량분석법은 MRM-MS(Multiple Reaction monitoring-Mass Spectrometry), PRM-MS(Parallel Reaction Monitoring-Mass Spectrometry), DIA-MS (Data Independent Acquisition Mass Spectrometry) 등 일 수 있다.

[103]

[104] 도 11은 채장관 선암 환자의 병변 조직으로부터 추출된 펩티드와 아형 1 내지 6의 대표유전자의 안정동위원소 표지펩티드 패널의 혼합물에 대한 MRM-MS 분석 수행에 대한 모식도이다.

[105]

[106] 삼중 사중극자 질량분석기(Triple Quadrupole, QQQ)를 이용한 다중반응검지법(MRM-MS, Multiple Reaction Monitoring/Mass Spectrometry)은 이온을 4개의 전극주로 구성되는 사중 양극에 유도하여 질량/전하 비율에 따라 분석하는 방식이다. 선정된 타겟 단백질들에 특이적인 질량/전하를 가지는 펩티드(Precursor ion, MS1)를 선택하고, 두번째 사중극자에서 이 펩티드를 충돌시켰을 때 발생하는 파편들 중에서 특징적인 질량/전하를 가지는 단편(Fragment ion, MS2)을 선택하는데 이 때 MS1, MS2에서 각각 얻어지는 precursor ion/fragment ion의 쌍을 타겟 단백질의 특이적 transition(타겟 단백질의 특이적 질량 지문)이라 한다. 이 모든 transition들을 모든 타겟 단백질(100~300개 단백질)에 대해서 다중반응검지법을 측정하면 정량정보를 알고 있는 동위원소로 치환된 동일 아미노산서열의 펩티드인 표준물질을 통해 시료에 있는 모든 타겟 단백질의 양을 동시에 상대 혹은 절대 정량을 짧은 시간내에 분석할 수 있다. 이러한 원리로 MRM-MS는 목적하는 분석 대상만을 높은 민감도로 선택적 검출 및 정량이 가능하며, 분석에 필요한 비용이 감소할 수 있다.

[107]

[108] 현재 단백질 정량 분석에 가장 많이 사용되는 대표적 방법은 ELISA 어세이와

같은 항체에 의존하는 방법으로, 이는 새로운 항체들을 찾고 분석 과정을 최적화시키는 과정에서 비용이 많이 들고 시간이 오래 걸린다.

[109]

[110] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 MRM-MS 분석은 아형 대표펩티드 대비 환자 유래 펩티드의 신호세기 비교를 통해 수행될 수 있으며, 상기 신호세기 비율은 펩티드와 펩티드 용출시간을 두 개의 축으로 한 펩티드별 신호세기 등고선 지도로 표현될 수 있다.

[111] 도 12는 환자 시료와 아형별 대표 펩티드간의 MRM 신호 세기 및 등고선 지도이다.

[112] 이와 같은 아형별 아형대표펩티드 세기 등고선 지도는 진단이 피병원에 내원하는 췌장암 환자의 내시경 조직에서 얻은 아형대표펩티드 세기 등고선 지도와 패턴 비교를 하는 데 이용될 수 있으며, 이에 따라 환자의 아형을 판정할 수 있다.

[113]

[114] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 단계 (1)의 췌장암 병변 조직 파쇄는 극저온에 의한 냉동 파쇄에 의할 수 있다. 상기 극저온에 의한 냉동 파쇄에 의하여 미세조직가루(fine tissue powder)를 얻을 수 있다.

[115] 극저온에 의한 냉동 파쇄는 종양 조직의 손실을 최소화하기 위한 최적의 조직시료 처리 기술이다. 이에 제한되지 않으나, 극저온은 액체질소온도(-196°C) 일 수 있다.

[116] 대규모의 췌장암 환자에 대한 아형 판별을 수행하기 위해서는 아형 대표 펩티드와 혼합될 환자 조직유래의 펩티드 시료가 빠르게 획득되어야 한다. 조직으로부터 펩티드를 획득하기 위한 첫번째 과정은 조직의 균질화 과정으로 극저온상태에서 1분 이내에 조직을 처리하여 조직의 변성을 최소화할 수 있다.

[117]

[118] 극저온에 의한 냉동파쇄는 조직이 분말 상태로 파쇄되는 과정 동안 외부로 노출되는 과정이 없기 때문에 시료의 손실이 발생하지 않아 극미량의 췌장암 환자 시료에도 최적화된 방법이다.

[119]

[120] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 단계 (2)의 단백질 추출하고 소화하여 펩티드 시료를 얻는 단계는 압력순환기술에 의할 수 있다.

[121]

[122] 압력순환기술은 파쇄된 췌장암 조직 시료에 초고압(45,000psi)과 저압(~15psi)을 교차 적용하는 것으로, 이에 따라 보다 효과적으로 단백질을 추출하고 소화할 수 있다. 이에 따르면 조직으로부터 펩티드를 획득하는 시간이 3시간 이하일 수 있다. 이는 30시간이 소요되는 기존 방식과 비교하여 매우 빠르며, 동시에 16개의 조직시료를 적용할 수 있는 고효율 기법이다. 따라서 대규모 환자에 대한 아형 판별을 수행할 수 있다.

- [123]
- [124] 도 13은 췌장암 조직 파쇄 과정과 초고압 압력순환기술을 적용한 췌장암 시료 처리방법을 나타내는 것이다.
- [125]
- [126] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 아형 2 내지 아형 4는 침습적 특성을 가지며, 상기 아형 5 및 아형 6은 면역원성을 가질 수 있다.
- [127] 또한 상기 아형 4는 침습적 특성 및 증식성을 가지며, 낮은 T 세포 증식을 가질 수 있다.
- [128]
- [129] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 아형 2 내지 아형 4는 상피 중간엽 전이(EMT)-관련 과정과 연관되어 있는 것일 수 있다.
- [130]
- [131] 또한 상기 아형 5 및 아형 6은 면역-관련 과정과 연관되어 있는 것일 수 있다.
- [132]
- [133] 상기 아형 1은 탄수화물/지질 대사에 관여하는 하는 것일 수 있다.
- [134]
- [135] 상기 PDAC 아형은 각 아형에 대한 mRNA/단백질 시그니처 및 세포 경로가 포함될 뿐 아니라, 항-염증성 면역 세포 프로파일도 포함한다. PDAC 환자는 그들 종양의 mRNA 및 단백질 시그니처에 기반한 아형 2-4 (불량한 예후 아형들) 또는 아형 1, 5, 6 (양호한 예후 아형들)로 분류하여 예후에 따라 추가 계층화할 수 있다.
- [136]
- [137] 본 발명의 다른 실시형태는 췌장관 선암 아형을 판별할 수 있는 키트에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시형태에 따른 췌장관 선암 아형 판별 키트는 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하고, 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자는 하기로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [138] 아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, BDH1
- [139] 아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1, COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, CALU
- [140] 아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, ANGPTL2
- [141] 아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7, CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, BZW1
- [142] 아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1,

SYNPO2, EPB41L3

- [143] 아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, SEC11C
- [144]
- [145] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 췌장관 선암 아형 판별키트는 췌장관 선암 전아형 대표유전자(All Sub)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하고, 상기 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준은 췌장관 선암 대표유전자의 발현수준과 비교될 수 있다.
- [146]
- [147] 상기 췌장관 선암 전아형 대표 유전자(All Sub)는 KRT19, RAB27B, QSOX1, VILL, GNPAT, ABCC3, GP2, ETHE1, BPNT1, AGR2, PIGR, SRC, CTSE, JUP, RPL7, TSPAN8, SRM, VDAC1, SCP2, RPS3, AK4, RPL9, RDX, RPL3, RPL13A, RPL5, RPS9, HK2, RAB25, GNG2, RPL15, RPL37, RPS7, RPL8, RPL18A, RPL6, PABPC4, INF2, SLC25A24, MYH14, GALNT7, GOLM1, MCU, GSDMB, CYP2S1, HTATIP2, SDCBP2, SYTL2, PREB, MYO6, PKP3, SNTB2, 및 S100A11로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [148]
- [149] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 췌장관 선암 전아형 대표유전자 및 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 제제는 췌장관 선암 전아형 대표유전자 및 각 아형별 유전자들을 대표하는 안정동위원소 표지 펩티드 패널을 포함할 수 있다.
- [150]
- [151] 본 발명의 또 다른 실시형태는 하기 (1) 내지 (5)의 단계를 포함하는 췌장관 선암 환자의 예후예측방법에 관한 것이다.
- [152] (1) 췌장관 선암 환자로부터 분리된 췌장관 선암 병변 조직을 파쇄하는 단계;
- [153] (2) 상기 병변 조직으로부터 단백질을 추출하고 소화하여 환자별 펩티드 시료를 얻는 단계;
- [154] (3) 상기 환자별 펩티드 시료로부터 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 단계로서, 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되며;
- [155] 아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, BDH1
- [156] 아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1, COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, CALU
- [157] 아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, ANGPTL2
- [158] 아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7,

- CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, BZW1
- [159] 아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1, SYNPO2, EPB41L3
- [160] 아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, SEC11C
- [161] (4) 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 비교하여, 췌장관 선암 환자의 아형을 판별하는 단계; 및
- [162] (5) 상기 아형별 판별에 따라 예후를 예측하는 단계.
- [163]
- [164] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 상기 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준은 췌장관 선암 전아형 대표유전자(All Sub)의 발현수준과 비교될 수 있다.
- [165] 상기 췌장관 선암 전아형 대표유전자는 KRT19, RAB27B, QSOX1, VILL, GNPAT, ABCC3, GP2, ETHE1, BPNT1, AGR2, PIGR, SRC, CTSE, JUP, RPL7, TSPAN8, SRM, VDAC1, SCP2, RPS3, AK4, RPL9, RDX, RPL3, RPL13A, RPL5, RPS9, HK2, RAB25, GNG2, RPL15, RPL37, RPS7, RPL8, RPL18A, RPL6, PABPC4, INF2, SLC25A24, MYH14, GALNT7, GOLM1, MCU, GSDMB, CYP2S1, HTATIP2, SDCBP2, SYTL2, PREB, MYO6, PKP3, SNTB2, 및 S100A11로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [166]
- [167] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 상기 아형 2 내지 아형 4는 아형1, 아형 5 및 아형 6에 비하여 예후가 좋지 않은 것으로 예측될 수 있다.
- [168]
- [169] 또한, 치료 전략은 아형 및 관련 경로 및/또는 면역 세포 프로필에 기반하여 채용될 수 있다. 예를 들면, Sub4는 높은 침습적 활동 및 T 세포 활성을 감소시켜 종양 세포 증식에 기여하는 증가된 PMN-MDSC를 보인다. 이러한 패턴은 침습성 및 PMN-MDSC 은 모두 Sub4 종양을 치료할 때, 침습-관련 RHOA 및/또는 TGFβ 신호 및 프로-종양 형성 PMN-MDSC를 한 번에 표적화함으로써, 다루어져야 함을 시사한다. 흥미롭게도, PDAC 코호트는 선포(acinar) 세포 암종을 포함하지 않음에도 불구하고, Sub6 은 낮은 세포충실도를 갖고 일부 내분비 특성을 갖는다. 낮은 세포충실도 종양에서, 이러한 특성은 관 세포의 탈분화(Martens et al., 2019), 다량의 간질 세포(Bailey et al., 2016), 또는 선포 세포 오염(Puleo et al., 2018)으로 인해 발생한다고 시사되어진다. 유전단백체 시그니처는 내분비 특성이 있는, Sub6 로 분류된 낮은 세포충실도 종양에 적용된다. 그러나 그들이 또한 선포 세포 암종에 적용 가능한지 여부는 대규모 코호트에서 검사되어야 할 것이다.
- [170]
- [171] 수 많은 면역 체크포인트 분자가 보고되었다(Kalbasi 및 Ribas, 2020; Wei et al.,

2018). CEACAM1, PVR 및 PVRL2의 mRNA 발현 수준은 Sub5-6에서 보다 Sub2-4에서 더 높았지만, CD48, IGSF11, CD96, CD244 및 BTLA의 수준은 Sub5-6에서 더 높았다. 또한, CEACAM1, HMGB1 및 CD274는 모든 아형에 걸쳐 Sub4에서 가장 높은 mRNA 발현 수준을 나타냈다. mRNA 데이터와 일치하여, 더 높은 수준의 단백질 CEACAM1 및 PVR 이 Sub5-6 보다 Sub1-4에서 검출되었으며, CD274의 가장 높은 단백질 수준은 Sub4에서 감지되었다. CEACAM1, PVR 및 CD274는 T 세포, 및/또는 자연 살해(NK) 세포의 활성을 억제한다(Qin et al., 2019). 이러한 유형의 면역 억제는 PDAC를 포함한 다양한 암에서 관찰된다(Dong et al., 2002; Feig et al., 2013; Nishiwada et al., 2015). Sub5-6에서 밝혀진 면역 체크포인트는 단백질체(proteomic) 분석에 의해 검출되지 않는다. 또한, 주로 Pro-tumorigenic 호중구인 PMN-MDSC는 Sub4 종양에 높은 수준으로 침투하였다. PMN-MDSC 매개 면역 억제는 폐암에서(Huang et al., 2013), 결장암에서(Jung et al., 2017a; Jung et al., 2017b), 유방암에서(Alizadeh et al., 2014), 두부암(head cancer) 및 경부암(neck cancer)에서(Brandau et al., 2011), 신장암에서(Rodriguez et al., 2009) 및 위암에서(Wang et al., 2013)뿐 아니라 PDAC에서(Porembka et al., 2012) 보고되었다. 인간 혈액 atlas(Uhlen et al., 2019)에 따르면, CEACAM1, PVR 및 CD274는 면역 체크포인트 및 PMN-MDSC의 잠재적 연관성을 제안하는, PMN-MDSC에서 높은 수준으로 발현된다. 이러한 단백질이 Sub4 종양에서 항-종양 면역 결핍과 어떻게 연관되는지는 향후 상세한 기능 연구에서 조사할 수 있다.

[172]

[173] 이하, 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[174] [실시예]

[175] 유전단백체 기반 PDAC 환자 아형 도출을 위해 먼저 mRNA 발현 데이터, 글로벌 프로테오믹 데이터, 인산화프로테오믹 데이터 각각을 사용하여 환자 종양 샘플들을 클러스터링하였으며, 이를 통해 각 데이터로부터 3개(RNA1-3), 5개(Prot1-5), 5개(Phos1-5)의 환자 클러스터를 확인하였다. 또한 각 환자 클러스터의 특성을 이해하기 위해 통계적 비교 분석을 통해 각 클러스터의 환자 샘플들에서 나머지 환자 샘플들에 비해 유의하게 높은 발현을 보이는 시그니처 유전자들(rna1-3), 단백질들(prot1-5), 인산화펩티드들(phos1-5)을 선정하였다. 마지막으로 150명 환자 샘플의 통합 클러스터링을 수행하여 최종적으로 6개의 아형(Sub1-6)을 도출하였다.

[176] 도출된 각 아형과 연관이 있는 세포 프로세스를 결정하기 위해 먼저 각 아형에 대응되는 시그니처 유전자들 및 단백질들을 선택하였다. 이후 해당 유전자들 및 단백질들에 대한 기능농축분석을 통해 해당 세포 프로세스를 확인하였다. 이를

통해 Sub2-4는 공통적으로 상피 중간엽 전이(EMT) 관련 유전자들의 발현이 높는데, 그 중에서도 Sub2-3은 동일한 EMT 관련 단백질들의 발현이 높은 반면 Sub4는 세포주기 관련 단백질들의 발현이 높음을 확인하였다. Sub5-6의 경우 공통적으로 면역 관련 유전자들의 발현이 높는데, 그 중에서도 Sub5는 동일한 면역 관련 단백질들의 발현이 높은 반면 Sub6은 외분비 관련 단백질들의 발현이 높음을 확인하였다. 마지막으로, Sub1의 경우 고전적인 전구 PDAC 아형의 특징인 탄수화물/지질 대사 관련 유전자들 및 단백질들의 발현이 높음을 확인하였다.

- [177] 이러한 6개의 환자 아형 구분을 위한 아형대표펩티드 도출을 위해 앞서 선정된 시그니처 단백질들 (prot1-5) 및 인산화펩티드들 (phos1-5)에 대해 Partial least squares (PLS) 분석을 수행하였다. 시그니처 단백질들의 경우 각 단백질에 대응되는 sibling 펩티드들로 변환한 후 PLS 분석을 수행하였다. PLS 분석을 통해 펩티드들의 150명 환자에서의 $\log_2$ -fold-change 값을 이용해 150명 환자들이 특정 아형(Sub1-6)에 속하는지 여부 혹은 150명 환자의 전체 아형을 동시에 예측하는 모델을 생성하였다. 또한 개별 펩티드의 환자 아형 예측에 기여하는 정도를 variable importance in projection (VIP) 값으로 정량화하였다.
- [178] 6개의 각 아형별 대표 인산화펩티드 도출을 위해 먼저 해당 아형에서 1) 시그니처로 동정되었고, 2) VIP 값이 1.5보다 크며, 3) VIP 값이 다른 아형에서의 VIP 값에 비해 크고, 4) 80% 이상의 환자에서 검출된 인산화펩티드들을 선정하였다. 전체 아형을 예측하는 대표 인산화펩티드의 경우 1) VIP 값이 1.5보다 크고, 2) 전체 환자의 80% 이상에서 검출된 인산화펩티드들을 선정하였다. 이후 이들 중 phosphorylation을 하나만 포함하며, MRM-MS 분석에 사용하기에 적합한 (펩티드의 길이, signal 펩티드 여부, missed cleavage 존재 여부 등을 고려) 펩티드들을 선별하였고, 최종적으로 16개의 인산화펩티드들을 도출하였다.
- [179] 다음으로, 6개의 각 아형별 대표 글로벌 펩티드 도출을 위해 먼저 해당 아형에서 1) 시그니처로 동정되었고, 2) 80% 이상의 환자에서 검출된 단백질을 선정하였다. 선정된 단백질의 sibling 펩티드들 중 해당 아형에서 1) VIP 값이 1.15보다 크고, 2) VIP 값이 다른 아형에서의 VIP 값에 비해 크며, 3) 80% 이상의 환자에서 검출된 펩티드들을 선정하였다. 전체 아형을 예측하는 대표 글로벌 펩티드의 경우 전체 환자의 80% 이상에서 검출된 단백질의 sibling 펩티드들 중 1) VIP 값이 1.15보다 크고, 2) 전체 환자의 80% 이상의 환자에서 검출된 펩티드들을 선정하였다. 이후 이들 중 MRM-MS 분석에 사용하기에 적합한 펩티드들을 각 시그니처 단백질 당 2개 이내로 선별하였고, 최종적으로 132개의 글로벌 펩티드들을 도출하였다.
- [180] 위 과정을 통해 최종 도출된 16개의 인산화펩티드들, 132개의 글로벌 펩티드들에 아형 간 발현차를 보이는 KRAS 돌연변이 단백질 펩티드 2개를 추가하여 최종 150개의 아형대표 펩티드들을 도출하였다.

- [181]
- [182] 아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, BDH1
- [183] 아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1, COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, CALU
- [184] 아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, ANGPTL2
- [185] 아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7, CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, BZW1
- [186] 아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1, SYNPO2, EPB41L3
- [187] 아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, SEC11C
- [188]
- [189] 췌장관 선암 전아형 대표유전자(All Sub): KRT19, RAB27B, QSOX1, VILL, GNPAT, ABCC3, GP2, ETHE1, BPNT1, AGR2, PIGR, SRC, CTSE, JUP, RPL7, TSPAN8, SRM, VDAC1, SCP2, RPS3, AK4, RPL9, RDX, RPL3, RPL13A, RPL5, RPS9, HK2, RAB25, GNG2, RPL15, RPL37, RPS7, RPL8, RPL18A, RPL6, PABPC4, INF2, SLC25A24, MYH14, GALNT7, GOLM1, MCU, GSDMB, CYP2S1, HTATIP2, SDCBP2, SYTL2, PREB, MYO6, PKP3, SNTB2, S100A11
- [190]
- [191] 도출된 150개의 아형 대표유전자 펩티드시료는 모두 혼합되어 아형대표펩티드 시료를 구성하였으며, 이는 췌장암 환자의 아형을 판별하기 위해 췌장암 환자 유래 펩티드 시료와 혼합한다. 이 때 췌장암 환자 유래 펩티드 시료를 획득하기 위해 압력순환기술 기반의 Barocycler 장비를 사용하였다. 우선 조직시료와 용해버퍼가 담겨있는 마이크로튜브에 45,000psi의 초고압과 15psi의 저압을 교차로 적용하여 효과적으로 세포벽을 붕괴한 후 단백질을 추출하였다. 이 후 단백질 소화를 수행하기 위해 소화효소인 Lys-C와 Trypsin을 추가하였으며, 20,000psi의 초고압과 15psi의 저압을 교차로 적용하여 전체적으로 3시간 이내에 16개의 췌장암 조직시료로부터 펩티드 시료를 획득하였다. 그 다음으로 획득한 췌장암 환자의 펩티드 시료는 C18 스피널럼 기반의 탈염과정을 수행한 후 BCA 정량을 통해 최종적으로 정량정보를 포함하는 췌장암 환자 유래 펩티드 시료를 획득하였다.
- [192] 다음으로 췌장암 환자의 아형을 판별하기 위해 환자 유래 펩티드 시료와 150개의 아형 대표유전자 정보를 포함하는 아형대표펩티드 시료와 혼합하여 아형판별펩티드 시료를 구성하였으며, 각 펩티드별 재현성 있고 안정적으로

MRM 분석이 가능한 Top-3 transition으로 charge state +2, +3가에 대한 y-ion을 선정하였다.

- [193] 전체 150개 아형 대표 펩티드의 아형 정보, 유전자 심볼, 단백질명칭은 다음 표 1과 같다.

[194] [표1]

아형 정보	유전자심볼	단백질명칭
Sub1	CLDN18	claudin 18
Sub1	EPS8L3	phosphatase and actin regulator 2
Sub1	CAPN5	calpain 5
Sub1	GMDS	GDP-mannose 4,6-dehydratase
Sub1	BCAS1	breast carcinoma amplified sequence 1
Sub1	IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP]
Sub1	DDAH1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
Sub1	SOD1	superoxide dismutase 1
Sub1	VIL1	villin 1
Sub1	GPX2	glutathione peroxidase 2
Sub1	AOC1	amine oxidase, copper containing 1
Sub1	LGALS4	galectin 4
Sub1	MICU2	mitochondrial calcium uptake 2
Sub1	POF1B	premature ovarian failure, 1B
Sub1	MICU1	mitochondrial calcium uptake 1
Sub1	PLS1	plastin 1
Sub1	BDH1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1
Sub2	UNC5B	unc-5 netrin receptor B
Sub2	PPP1R3G	protein phosphatase 1 regulatory subunit 3G
Sub2	IGFBP3	insulin like growth factor binding protein 3
Sub2	EDIL3	EGF like repeats and discoidin domains 3
Sub2	CLSTN1	Calsyntenin-1
Sub2	COL11A1	collagen type XI alpha 1 chain
Sub2	P4HA1	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1
Sub2	PDLIM4	PDZ and LIM domain 4
Sub2	ST5	DENN domain-containing protein 2B

Sub2	FSTL1	Follistatin-related protein 1
Sub2	PPP1R13L	RelA-associated inhibitor
Sub2	PLTP	phospholipid transfer protein
Sub2	PDLIM7	PDZ and LIM domain protein 7
Sub2	CALU	Calumenin
Sub3	MYH9	myosin heavy chain 9
Sub3	FLNA	Filamin-A
Sub3	P4HA2	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2
Sub3	LOXL2	lysyl oxidase like 2
Sub3	FN1	fibronectin 1
Sub3	CD55	CD55 molecule (Cromer blood group)
Sub3	FLT1	fms related tyrosine kinase 1
Sub3	ECM1	extracellular matrix protein 1
Sub3	CCDC80	coiled-coil domain containing 80
Sub3	TSKU	tsukushi, small leucine rich proteoglycan
Sub3	HTRA1	HtrA serine peptidase 1
Sub3	COL12A1	collagen type XII alpha 1 chain
Sub3	SPON2	spondin 2
Sub3	ANGPTL2	angiopoietin like 2
Sub4	PLEC	Plectin
Sub4	LPGAT1	Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1
Sub4	NRDC	Nardilysin
Sub4	PRPF40A	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A
Sub4	CSDE1	Cold shock domain-containing protein E1
Sub4	IPO7	Importin-7
Sub4	CDK1	cyclin dependent kinase 1
Sub4	HMGA1	high mobility group AT-hook 1
Sub4	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5

Sub4	RASA1	Ras GTPase-activating protein 1
Sub4	ADSS	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2
Sub4	GMPS	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]
Sub4	CSE1L	Exportin-2
Sub4	PSME3	proteasome activator subunit 3
Sub4	CAPRIN1	Caprin-1
Sub4	BZW1	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1
Sub5	HSPB6	heat shock protein family B (small) member 6
Sub5	HSPA12A	heat shock protein family A (Hsp70) member 12A
Sub5	ANXA6	Annexin A6
Sub5	VIM	Vimentin
Sub5	UCHL1	ubiquitin C-terminal hydrolase L1
Sub5	PRPH	peripherin
Sub5	MAP1B	Microtubule-associated protein 1B
Sub5	CD81	CD81 molecule
Sub5	ANK2	ankyrin 2
Sub5	AKAP12	A-kinase anchoring protein 12
Sub5	ITSN1	Intersectin-1
Sub5	RTN1	Reticulon-1
Sub5	COL28A1	collagen type XXVIII alpha 1 chain
Sub5	KCTD12	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12
Sub5	SPON1	spondin 1
Sub5	SYNPO2	synaptopodin 2
Sub5	EPB41L3	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3
Sub5	AKAP12	A-kinase anchoring protein 12
Sub6	CTNND2	catenin delta 2

Sub6	DTNA	dystrobrevin alpha
Sub6	REG1A	regenerating family member 1 alpha
Sub6	PRSS2	protease, serine 2
Sub6	CPA1	carboxypeptidase A1
Sub6	CPB1	carboxypeptidase B1
Sub6	ACAT1	acetyl-CoA acetyltransferase 1
Sub6	CPA2	carboxypeptidase A2
Sub6	PNLIPRP1	pancreatic lipase related protein 1
Sub6	PRDX4	peroxiredoxin 4
Sub6	SNTB1	syntrophin beta 1
Sub6	PDCD4	programmed cell death 4
Sub6	CTRC	chymotrypsin C
Sub6	FKBP11	FK506 binding protein 11
Sub6	SEC11C	SEC11 homolog C, signal peptidase complex subunit
Sub6	CPA1	carboxypeptidase A1
All Sub	KRT19	Keratin, type I cytoskeletal 19
All Sub	RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family
All Sub	QSOX1	quiescin sulfhydryl oxidase 1
All Sub	VILL	villin like
All Sub	GNPAT	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase
All Sub	ABCC3	ATP binding cassette subfamily C member 3
All Sub	GP2	glycoprotein 2
All Sub	ETHE1	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial
All Sub	BPNT1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1
All Sub	AGR2	anterior gradient 2, protein disulphide isomerase family member
All Sub	PIGR	polymeric immunoglobulin receptor

All Sub	SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
All Sub	CTSE	cathepsin E
All Sub	JUP	Junction plakoglobin
All Sub	RPL7	ribosomal protein L7
All Sub	TSPAN8	tetraspanin 8
All Sub	SRM	spermidine synthase
All Sub	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
All Sub	SCP2	sterol carrier protein 2
All Sub	RPS3	ribosomal protein S3
All Sub	AK4	adenylate kinase 4
All Sub	RPL9	60S ribosomal protein L9
All Sub	RDX	Radixin
All Sub	RPL3	ribosomal protein L3
All Sub	RPL13A	ribosomal protein L13a
All Sub	RPL5	ribosomal protein L5
All Sub	RPS9	ribosomal protein S9
All Sub	HK2	hexokinase 2
All Sub	RAB25	RAB25, member RAS oncogene family
All Sub	GNG2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2
All Sub	RPL15	ribosomal protein L15
All Sub	RPL37	ribosomal protein L37
All Sub	RPS7	40S ribosomal protein S7
All Sub	RPL8	ribosomal protein L8
All Sub	RPL18A	60S ribosomal protein L18a
All Sub	RPL6	ribosomal protein L6
All Sub	PABPC4	poly(A) binding protein cytoplasmic 4
All Sub	INF2	Inverted formin-2
All Sub	SLC25A24	Calcium-binding mitochondrial carrier

		protein SCaMC-1
All Sub	MYH14	Myosin-14
All Sub	GALNT7	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7
All Sub	GOLM1	Golgi membrane protein 1
All Sub	MCU	Calcium uniporter protein, mitochondrial
All Sub	GSDMB	gasdermin B
All Sub	CYP2S1	Cytochrome P450 2S1
All Sub	HTATIP2	Oxidoreductase HTATIP2
All Sub	SDCBP2	syndecan binding protein 2
All Sub	SYTL2	synaptotagmin like 2
All Sub	PREB	Prolactin regulatory element-binding protein
All Sub	MYO6	Unconventional myosin-VI
All Sub	PKP3	plakophilin 3
All Sub	SNTB2	syntrophin beta 2
All Sub	S100A11	S100 calcium binding protein A11
Mutation	KRAS	GTPase KRas
Mutation	KRAS	GTPase KRas

청구범위

- [청구항 1] 하기 (1) 내지 (4)의 단계를 포함하는 췌장관 선암 아형 판별방법:
- (1) 췌장관 선암 환자로부터 분리된 췌장관 선암 병변 조직을 파쇄하는 단계;
 - (2) 상기 병변 조직으로부터 단백질을 추출하고 소화하여 환자별 펩티드 시료를 얻는 단계;
 - (3) 상기 환자별 펩티드 시료로부터 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 단계로서, 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상이며;
 아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, 및 BDH1
 아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1, COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, 및 CALU
 아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, 및 ANGPTL2
 아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7, CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, 및 BZW1
 아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1, SYNPO2, 및 EPB41L3
 아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, 및 SEC11C
 - (4) 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 비교하여, 췌장관 선암 환자의 아형을 판별하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 아형 1 내지 6의 대표유전자의 발현 수준의 비교는 상기 아형 1 내지 6 및 하기 췌장관 선암 전아형을 서로 구분하는 데에 가장 기여가 큰 유전자의 발현 수준을 조합하여 비교하는 췌장관 선암 아형 판별방법.
 췌장관 선암 전아형 대표유전자(All Sub): KRT19, RAB27B, QSOX1, VILL, GNPAT, ABCC3, GP2, ETHE1, BPNT1, AGR2, PIGR, SRC, CTSE, JUP, RPL7, TSPAN8, SRM, VDAC1, SCP2, RPS3, AK4, RPL9, RDX, RPL3, RPL13A, RPL5, RPS9, HK2, RAB25, GNG2, RPL15, RPL37, RPS7, RPL8,

RPL18A, RPL6, PABPC4, INF2, SLC25A24, MYH14, GALNT7, GOLM1, MCU, GSDMB, CYP2S1, HTATIP2, SDCBP2, SYTL2, PREB, MYO6, PKP3, SNTB2, 및 S100A11

- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 단계 (1)의 췌장암 병변 조직 파쇄는 극저온 냉동파쇄에 의한 것인 췌장관 선암 아형 판별방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 단계 (2)의 단백질 추출은 압력순환기술에 의한 것인 췌장관 선암 아형 판별방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 단계 (3)의 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자는 췌장관 선암 병변 조직 샘플에 대한 mRNA 데이터 및, 글로벌 단백질체 데이터 및 인산화 단백질체 데이터를 결합한 유전단백체 분석으로 식별된 것인 췌장관 선암 아형 판별방법.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 췌장관 선암 전아형 대표유전자 및 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준의 측정 및 비교는
상기 췌장관 선암 전아형 대표유전자 및 각 아형별 유전자들을 대표하는 안정동위원소 표지펩티드 패널을 구축하는 단계;
상기 환자별 펩티드시료와 상기 안정동위원소 표지펩티드 패널을 혼합하는 단계; 및
상기 혼합물을 정량 질량분석법(Quantitative Mass Spectrometry)으로 분석하여 췌장관 선암 환자의 아형을 판별하는 단계;
를 포함하는 췌장관 선암 아형 판별방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 정량 질량분석법은 안정동위원소 표지펩티드 대비 환자 추출 펩티드의 신호세기 비교를 통해 수행되는 췌장관 선암 아형 판별방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 신호세기 비율은 펩티드와 펩티드 용출시간을 두 개의 축으로 한 펩티드별 신호세기 등고선 지도로 표현되는 췌장관 선암 아형 판별방법.
- [청구항 9] 췌장관 선암 아형을 판별하기 위한 키트로서, 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하고, 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 췌장관 선암 아형 판별키트:
아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, 및 BDH1
아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1,

COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, 및 CALU

아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, 및 ANGPTL2

아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7, CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, 및 BZW1

아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1, SYNPO2, 및 EPB41L3

아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, 및 SEC11C

- [청구항 10] 제9항에 있어서,
 상기 췌장관 선암 아형 판별키트는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 췌장관 선암 전아형 대표유전자의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하고, 상기 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준과 비교되는 것인 췌장관 선암 아형 판별키트.
 췌장관 선암 전아형 대표유전자(All Sub): KRT19, RAB27B, QSOX1, VILL, GNPAT, ABCC3, GP2, ETHE1, BPNT1, AGR2, PIGR, SRC, CTSE, JUP, RPL7, TSPAN8, SRM, VDAC1, SCP2, RPS3, AK4, RPL9, RDX, RPL3, RPL13A, RPL5, RPS9, HK2, RAB25, GNG2, RPL15, RPL37, RPS7, RPL8, RPL18A, RPL6, PABPC4, INF2, SLC25A24, MYH14, GALNT7, GOLM1, MCU, GSDMB, CYP2S1, HTATIP2, SDCBP2, SYTL2, PREB, MYO6, PKP3, SNTB2, 및 S100A11
- [청구항 11] 제9항 또는 제10항에 있어서,
 상기 췌장관 선암 전아형 대표유전자 및 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 제제는 췌장관 선암 전아형 대표유전자 및 각 아형별 유전자들을 대표하는 안정동위원소 표지펩티드 패널을 포함하는 췌장관 선암 아형 판별 키트.
- [청구항 12] 하기 (1) 내지 (5)의 단계를 포함하는 췌장관 선암 환자의 예후예측방법:
 (1) 췌장관 선암 환자로부터 분리된 췌장관 선암 병변 조직을 파쇄하는 단계;
 (2) 상기 병변 조직으로부터 단백질을 추출하고 소화하여 환자별 펩티드시료를 얻는 단계;
 (3) 상기 환자별 펩티드 시료로부터 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 측정하는 단계로서, 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나

이상이며;

아형 1(Sub1) 대표유전자: CLDN18, EPS8L3, CAPN5, GMDS, BCAS1, IDH1, DDAH1, SOD1, VIL1, GPX2, AOC1, LGALS4, MICU2, POF1B, MICU1, PLS1, 및 BDH1

아형 2(Sub2) 대표유전자: UNC5B, PPP1R3G, IGFBP3, EDIL3, CLSTN1, COL11A1, P4HA1, PDLIM4, ST5, FSTL1, PPP1R13L, PLTP, PDLIM7, 및 CALU

아형 3(Sub3) 대표유전자: MYH9, FLNA, P4HA2, LOXL2, FN1, CD55, FLT1, ECM1, CCDC80, TSKU, HTRA1, COL12A1, SPON2, 및 ANGPTL2

아형 4(Sub4) 대표유전자: PLEC, LPGAT1, NRDC, PRPF40A, CSDE1, IPO7, CDK1, HMGA1, DDX5, RASA1, ADSS, GMPS, CSE1L, PSME3, CAPRIN1, 및 BZW1

아형 5(Sub5) 대표유전자: HSPB6, HSPA12A, ANXA6, VIM, UCHL1, PRPH, MAP1B, CD81, ANK2, AKAP12, ITSN1, RTN1, COL28A1, KCTD12, SPON1, SYNPO2, 및 EPB41L3

아형 6(Sub6) 대표유전자: CTNND2, DTNA, REG1A, PRSS2, CPA1, CPB1, ACAT1, CPA2, PNLIPRP1, PRDX4, SNTB1, PDCD4, CTRC, FKBP11, 및 SEC11C

(4) 상기 췌장관 선암 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준을 비교하여, 췌장관 선암 환자의 아형을 판별하는 단계; 및

(5) 상기 아형별 판별에 따라 예후를 예측하는 단계.

[청구항 13]

제12항에 있어서,

상기 아형 1 내지 6의 대표유전자 발현 수준은 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 췌장관 선암 전아형 대표유전자의 발현수준과 비교되는 것인 췌장관 선암 환자의 예후예측방법.

췌장관 선암 전아형 대표유전자(All Sub): KRT19, RAB27B, QSOX1, VILL, GNPAT, ABCC3, GP2, ETHE1, BPNT1, AGR2, PIGR, SRC, CTSE, JUP, RPL7, TSPAN8, SRM, VDAC1, SCP2, RPS3, AK4, RPL9, RDX, RPL3, RPL13A, RPL5, RPS9, HK2, RAB25, GNG2, RPL15, RPL37, RPS7, RPL8, RPL18A, RPL6, PABPC4, INF2, SLC25A24, MYH14, GALNT7, GOLM1, MCU, GSDMB, CYP2S1, HTATIP2, SDCBP2, SYTL2, PREB, MYO6, PKP3, SNTB2, 및 S100A11

[청구항 14]

제12항에 있어서,

상기 아형 2 내지 아형 4는 아형1, 아형 5 및 아형 6에 비하여 예후가 좋지 않은 것으로 예측되는 췌장관 선암 환자의 예후예측방법.