<붙임 4>

기관고유연구사업 최종보고서

연구분야(코드)		과제번호		지원 프로그램	*목적과제*
과제성격(기초,응용,개발)	응용	실용화 대상여부	비실용화	공개가능여부 (공개,비공개)	*공개*

연구과제명	(국문) DRF1의 표적항암제 내성 극복 기법 연구
	(영문) Drug development for DRF1 to overcome resistance for the targeted anti-cancer therapy

과제책임자	소 속	특수암연구과	직 위	수석역구원
	성 명	이승훈	전 공	의학

	구분	세부과제명	세부과제책임자		
			성명	소속(직위)	전 공
세부과제	1				
	2				
	3				

총 연구기간	2012년 3월~2013년 12월(총2 년)	참여연구원수 (단위: 명, MY)	7

	구분	연 구 기 간	계	국 립 암센터	기 업 부 담 금		
					소계	현금	현물
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	계	2012.01~2013.12	800,000	800,000			
	제1차	2012.01~2012.12	500,000	500,000			
	제2차	2013.01~2013.12	300,000	300,000			
	제3차	~					

참 여 기 업	명 칭		전화		FAX	

기관고유연구사업관리규칙에 따라 본 연구개발사업을 성실히 수행하였으며 아래와 같이 최종보고서를 제출합니다.

2013년 월 일

과제책임자 이 승 훈 (서명)

국 립 암 센 터 원 장 귀 하

(첨부서류)

< 요 약 문 >

연구목표 (200자 이내)	<최종목표> DRF1에 의한 표적항암제 내성 유도 기전 규명 및 치료제 개발 <당해연도목표> 표적 항암제 내성유도과정에서 DRF1의 역할 검증 및 DRF1에 대한 표적치료제 개발 가. 표적 항암제 내성 유도 과정에서 DRF1역할 검증 나. DRF1 chemical 저해제 개발 다. DRF1 중화 항체 개발
연구내용 및 방법 (500자 이내)	가 . 표적 항암제 내성 유도 과정에서 **DRF1**역할 검증 **1) 다양한 표적 항암제의 내성유도과정에서 DRF1의 발현 증가 검증** - a. Avastin b. Erbitux, c. Herceptin, d. anti-HGF. 등의 현재임상에서 쓰이고 있는 RTK를 표적으로 하는 표적항암제를 처리한 후 내성과정에서 DRF1의 증가 확인 **2) anti-HGF, Avastin 내성 동물모델에서 shDRF1을 이용한 역할 검증** - Anti-HGF내성 모델에서 shDRF1을 이용한 combination 효과 검증 - Avastin 내성 모델에서 shDRF1을 이용한 combination 효과 검증 **6) DRF1의 항암제 내성 유도 기전 연구** - DRF1의 과발현에 의한 내성 유도기전 연구 나. DRF1 chemical 저해제 개발 1) 선도 물질의 확보 - 본 연구진은 선행연구를 통하여 피라졸 및 피리미딘의 스캐폴드로 이루어진 DRF1저해 화합물 100 여종을 합성하였고, 그중에서 엔자임에서 IC50이 30nM이하인 화합물들을 확보 2) 확보된 선도물질의 활성 최적화 - 선도물질의 구조변형을 통해 세포내에서의 DRF1 저해 efficacy를 높이는 화합물 도출 3) in vitro assay, in vivo assay system의 개발 - 세포주를 이용한 assay system 개발 - 동물모델을 이용한 assay system 개발 4) 세포주를 이용한 assay에서 IC50 30nM이하 화합물확보 다. DRF1 중화 항체 개발 선도 항체 탐색 동물면역/합성 항체 라이브러리로부터 DRF1에 결합하는 항체 탐색 hit 항체를 발현, 정제하여 결합력 확인

<table>
<tr><td colspan="2"></td><td colspan="3">Phospho DRF1 항체 개발
기존 알려진 DRF1의 타이로신 인산화 잔기를 인지 할 수 있는
Phospho-DRF1 항체 확보</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발에 따른
기대성과</td><td colspan="3"><정성적 성과>
- Anti-HGF therapy의 저항유도기전 발굴
- DRF1의 저해제 발굴을 위한 세포 및 동물 모델 시스템 확립
- 30nM 이하수준에서 IC50를 갖는 DRF1 저해제 Lead compound 발굴
- 세계 최초로 DRF1의 Extracellular domain을 인지하는 항체 발굴
- DRF1의 활성을 모니터할 수 있는 phospho-DRF1 항체 개발
향후 환자에서의 DRF1 활성을 모니터할 수 있는 새로운 툴확보</td></tr>
<tr><td rowspan="6">색인어</td><td rowspan="3">국문</td><td>항암제 내성</td><td>DRF1</td><td>화합물 저해제</td></tr>
<tr><td>항체 개발</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="3">영문</td><td>Drug resistance</td><td>DRF1</td><td>Chemical inhibitor</td></tr>
<tr><td>antibody development</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
</table>

Project Summary

Title of Project	Drug development for DRF1 to overcome resistance for the targeted anti-cancer therapy
Key Words	Drug resistance, antibody development, chemical inhibitor
Project Leader	Seung Hoon Lee
Associated Company	

Drug and radiation resistance represent a challenge for most anticancer therapies. Diverse experimental approaches have provided evidence that the tumor-associated signaling constitutes both a protective shell that impedes drug or radiation access and a permissive or promotive microenvironment. Better understanding of the effects of the signaling on drug resistance before, during and immediately after chemo- or radiotherapy is imperative to design new therapies aimed at targeting this tumor-protective resistance mechanisms.

Objective; Identification of drug resistance mechanism by DRF1

Methods

1. Identification of anti-HGF resistance mechanism by DRF1`
   - Development of shRNA that can decrease and block the effect of DRF1 funtion in glioma model
   - test effect of silecing of DRF1 in anti-HGF treatment model
2. Development of chemical inhibitor of DRF1
   - Lead compound as a specific inhbitor with IC50 30 nM for DRF1 was developed
   - Efficacy for the cell based system was confirmed
3. Development of anti-DRF1 antibody
   - specific antibody for DRF1 was developed
   - specific antibody for phosphpo-DRF1 was developed

1. 연구의 최종목표

1. 연구의 최종목표와 2012년도 목표

<최종목표>

DRF1에 의한 표적항암제 내성 유도 기전 규명 및 치료제 개발

<세부목표>

표적 항암제 내성유도과정에서 DRF1의 역할 검증 및 DRF1에 대한 표적치료제 개발

가. 표적 항암제 내성 유도 과정에서 DRF1역할 검증

나. DRF1 chemical 저해제 개발

다. DRF1 중화 항체 개발

* 초기 과제 개발단계에서 보안성 유지를 위해 ROS1을 DRF1으로 표기하였음. 결과에서는 원래 이름인 ROS1으로 표기.

2. 연구의 내용 및 결과

(가) 뇌암 동물 모델 1: HGF 항체에 대한 내성동물에서 ROS1의 발현

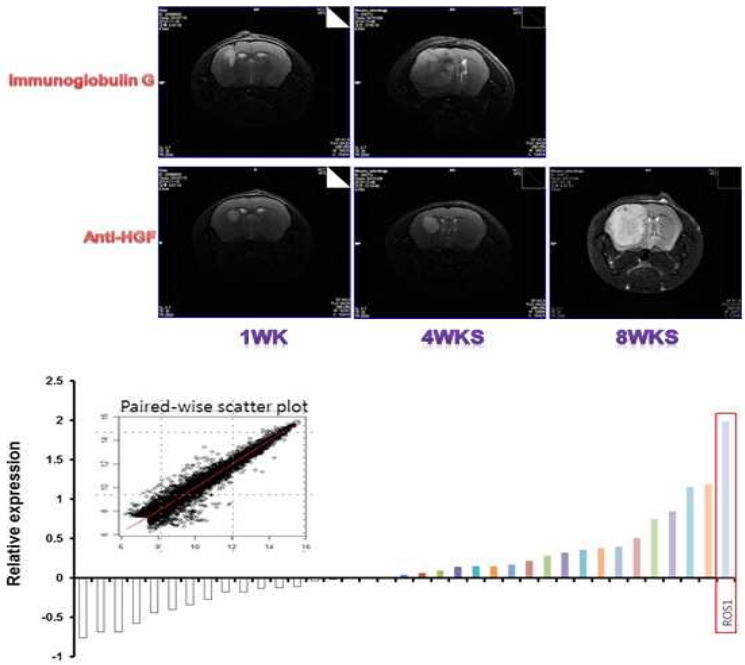


그림 1. HGF 항체에 대한 내성 동물모델에서 ROS1의 발현 증가

A. 기존 HGF 및 avastin 항체의 뇌종양 모델에서 내성 유도 인자로 ROS1 발견

- 뇌종양 세포주를 이용하여 orthotopic xenograft 동물모델을 만든 후 HGF 및 avastin 항체

를 3일 간견으로 투여 하여 치료효과 검증.

- 치료 시작 후 3주간 치료 효과가 매우 탁월했지만 그 이후 암조직이 커지면서 재발됨.
- 재발된 암 조직을 추출 후 microArray를 통한 발현 패턴을 분석한 결과 세포표면 단백질 중 ROS1의 발현이 4배이상 증가함을 확인.

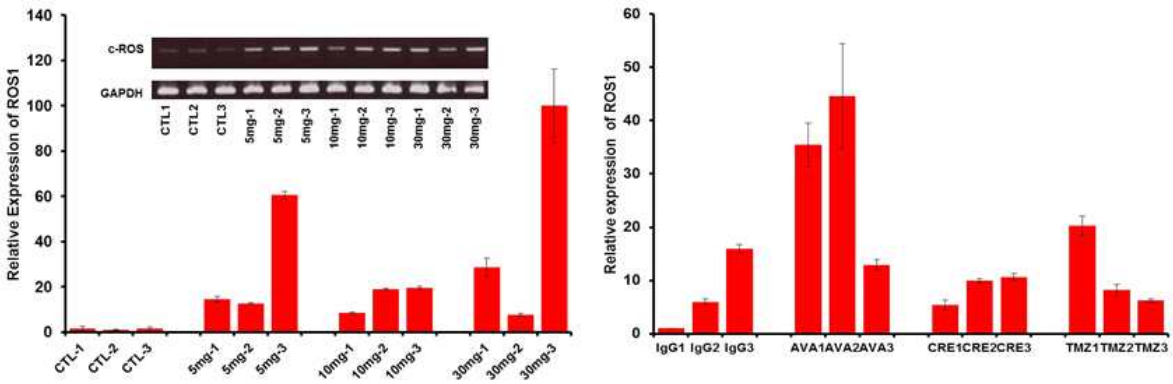


그림 2. HGF 항체에 대한 내성 동물에서 ROS1의 발현량 개체 수준 검증

B. RT-PCR을 통한 개체 variation에 대한 검증

- HGF 및 avastin 항체를 뇌종양 동물 모델에 처리한 후 이들을 4주후에 조직을 떼어내어 ROS1의 발현 양상을 확인.
- ROS1은 HGF 및 avastin 항체에 의해 발현이 증가되고 이러한 증가 양상은 모든 동물에서 보여줌으로써 개채간의 variation이 크지 않음을 보여줌. 하지만 발현 양의 경우 각각 다른 양상을 보임으로써 암의 microenvironment에 의한 영향을 받을 가능성을 제시함.
- HGF 및 Avastin과 같은 항체 치료제의 경우 뇌종양 재발과정에 ROS1이 과발현됨이 확인 되었지만 Temozolomide (TMZ)의 경우 발현의 변화가 없음. 이러한 사실로부터 ROS1이 모든 암의 재발과정이 아니라 c-MET, VEGFR과 같은 Extracellular remodeling, 혹은 receptor tyROS1 kinase저해제에 특이적인 항암 내성 유도기전을 매개할 것임을 제시.

(나) ROS1 발현을 특이적으로 저해하는 shRNA 발굴 및 HGF 항체에 내성 극복

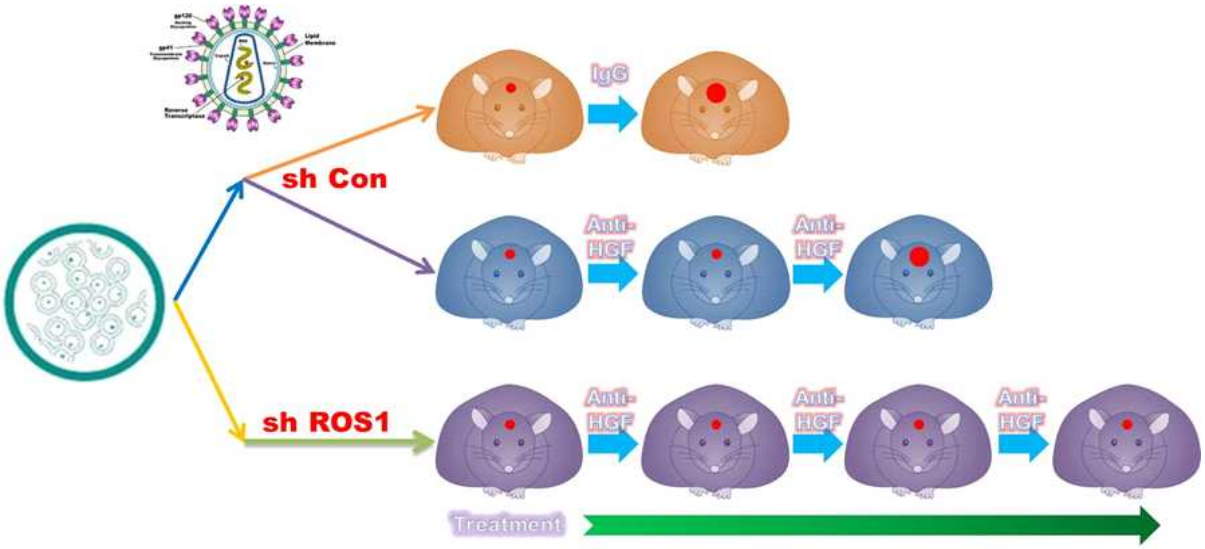


그림 3. HGF 항체에 대한 내성 동물모델에서 ROS1의 기능적 중요성 검증을 위한 모식도

● shROS1을 이용한 HGF 항체 내성 동물모델에서 ROS1 역할 검증

- 선별된 shRNA를 lentiviral system을 이용하여 u87 세포주에 주입한 후 selection 을 진행
- selection 된 세포주를 마우스모델에 주입한 후 anti-HGF 처리에 따른 종양 크기를 MRI를 이용하여 측정

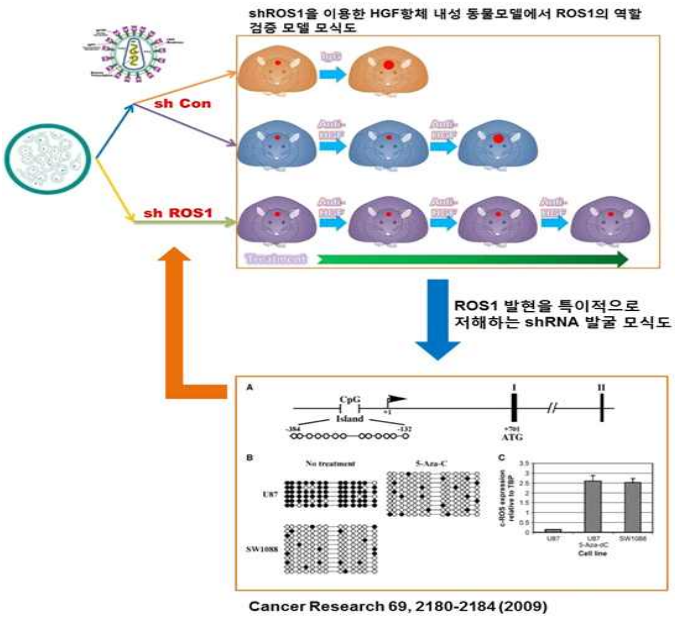


그림 4. ROS1 발현을 특이적으로 저해하는 shRNA 발굴 모식도

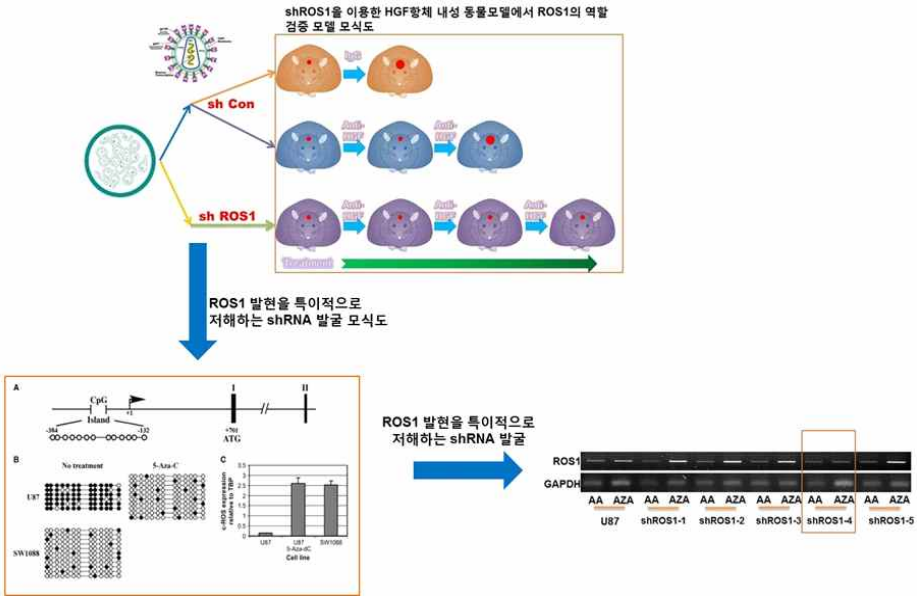


그림 5. ROS1 발현을 특이적으로 저해하는 shRNA 발굴

● ROS1 발현을 특이적으로 저해하는 shRNA 발굴

- ROS1에 대한 shRNA를 OPENBIOSYSTEM을 통해 구입하여 실제 ROS1의 발현을 저해 할 수 있는 shRNA를 선별.
- 기존 보고(Cancer Research, 2009)에 의한면 ROS1의 promoter region에 DNA methylation site가 있음이 발견.
- 따라서, DNA methylation을 저해 할 수 있는 chemical inhibitor인 5-aza를 처리한 후 증가한 ROS1의 발현을 확인한 후 이 세포에서 ROS1의 발현을 저해하는 shRNA를 선별하는 연구방법을 선택함.
- shRNA들 중 shROS1-4가 ROS1의 발현을 특이적으로 저해하는 것을 확인.

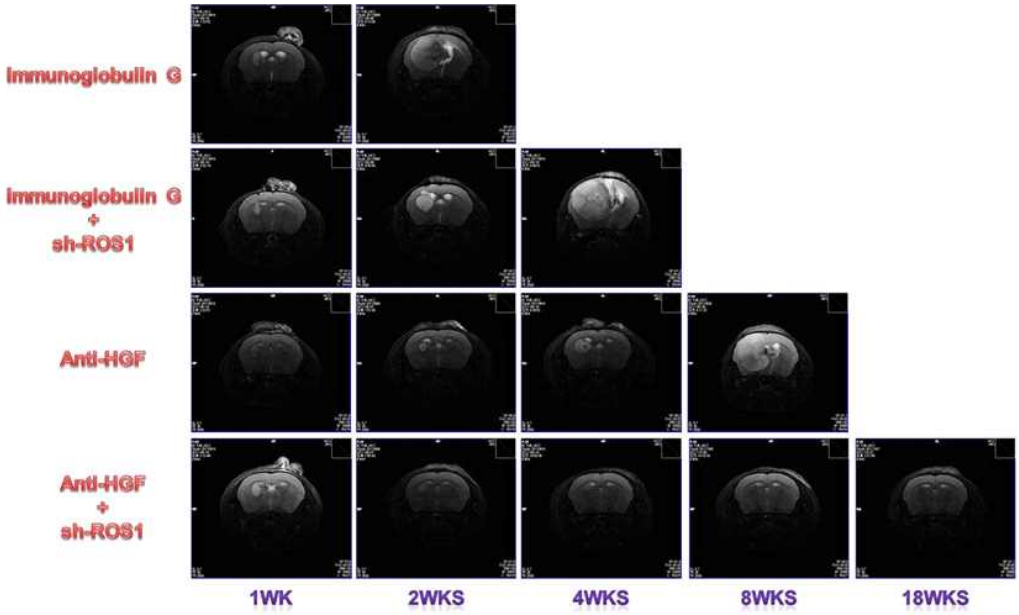


그림 6. shROS1에 의한 HGF 항체에 대한 저항성 극복

● ROS1의 발현 저해에 따른 HGF 항체 내성 극복

- 뇌종양 동물모델에서 letivirus를 이용하여 ROS1을 silencing한 뇌종양 세포와 control shRNA가 들어있는 세포주를 뇌종양 모델을 만든 후 각각 HGF 항체를 투여한 후 MRI를 통해 뇌종양의 진행 과정을 관찰함.
- shROS1을 발현 한 세포주와 그렇지 않은 세포주를 각각 동물에 주입 한 후 HGF 항체를 투여
- 각각의 그룹을 비교해 본 결과 MRI 사진 결과로부터 IgG 투여 그룹의 경우 4주가 지났을 때 이미 암 조직이 전체 반구를 뒤덮고 개체가 사망에 이르게 됨.
- shROS1이 들어간 그룹의 경우 6주경에 유사한 경과를 보여 줌.
- anti-HGF의 경우 8주경에 유사한 경과를 보여줌.
- anti-HGF와 shROS1을 combination한 결과 놀랍게도 일부의 동물에서 완전한 remission이 발견되고 survival 또한 현저히 증가함.

(다) ROS1 활성화 기전 연구

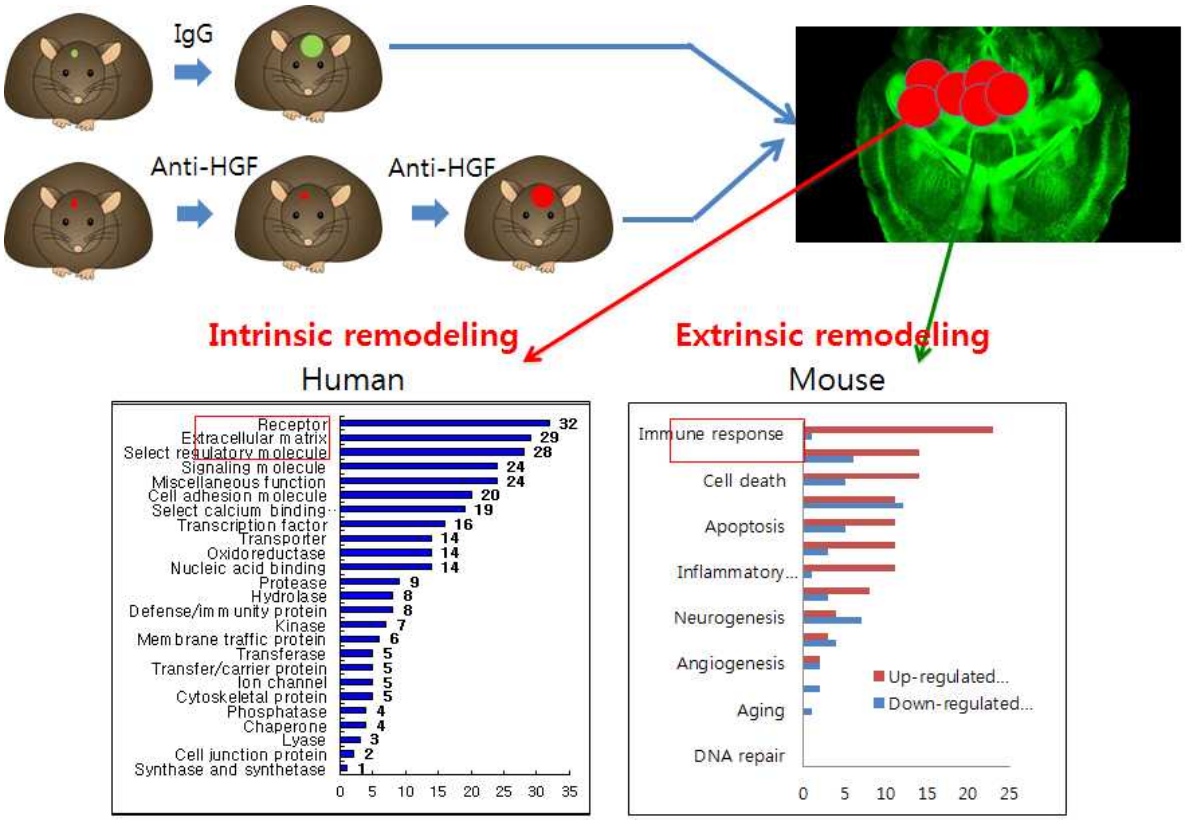


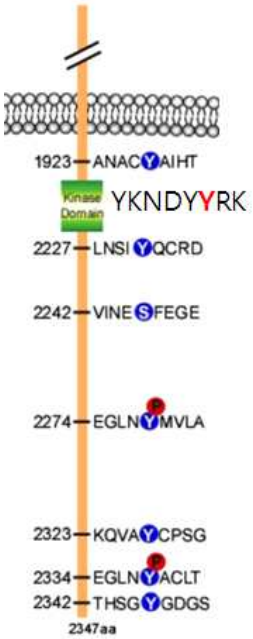
그림 7 anti-HGF 내성과정에서 발현되는 유전자

- ROS1의 활성화 기전 연구를 위해 ROS1과 동시에 anti-HGF 저항성 조직에서 발현이 증가되는 분자 탐색;

  암세포내에서 발현이 변화된 유전자와 tumor microenvrionment 즉 주변 세포에서 변화된 유전자를 구분하기 위해 각각 human mRNA expression array와 mouse mRNA expression array를 수행한 후 변화된 유전자의 패턴분석을 한 결과 암세포주에서는 주로 수용체와 세포외 기질의 변화가 뚜렸한 반면 마우스 유전자의 경우는 면역반응과 관련된 다양한 리간드의 변화가 뚜렸함

  이러한 결과로부터 **암세포주와 마우스 세포에서 분비되는 다양한 유전자를 ROS1의 Ligand후보로 압축하여 연구를 진행하고자 함**

(라) ROS1의 활성을 모니터하는 phospho-antibody제작 및 ROS-fusion 돌연변이체 과발현 세포제작



Peptide Analysis Data Sheet

Peptide Y2274					
Name	sequence	conjugation	amount		phospho-
pep1	C G G G N R E G L N **pY** M V L A T E	BSA	3mg	4ml	N-term linker
		KLH	1mg	2ml	
		OVA	1mg	2ml	
pep2	N R E G L N **pY** M V L A T E G G G C	BSA	3mg	4ml	C-term linker
		KLH	1mg	2ml	
		OVA	1mg	2ml	
pep3	C G G G N R E G L N Y M V L A T E	BSA	3mg	4ml	N-term linker
		OVA	0.2mg	0.1ml	
pep4	N R E G L N Y M V L A T E G G G C	BSA	3mg	4ml	C-term linker
		OVA	0.2mg	0.1ml	

Peptide Y2115					
Name	sequence	conjugation	amount		phospho-
pep1	C G G G I Y K N D Y **pY** R K R G E G	BSA	3mg	1.5ml	N-term linker
		KLH	1mg	0.5ml	
		OVA	1mg	0.5ml	
pep2	I Y K N D Y **pY** R K R G E G G G G C	BSA	3mg	1.5ml	C-term linker
		KLH	1mg	0.5ml	
		OVA	1mg	0.5ml	
pep3	C G G G I Y K N D Y Y R K R G E G	BSA	3mg	1.5ml	N-term linker
		OVA	0.2mg	0.1ml	
pep4	I Y K N D Y Y R K R G E G G G G C	BSA	3mg	1.5ml	C-term linker
		OVA	0.2mg	0.1ml	

그림 8 ROS1의 intracellular domain 인산화 부위에 대한 항체 제작

- ROS1의 intracellular domain의 tyrosine 인산화 잔기 주위를 인산화 펩타이드로 제작하였음
- KLH와 ovalbumin에 conjugation 한 다음 닭에 면역하였음
- 이 cDNA library로부터 1x10^9이상의 complexity를 가진 scFv 형태의 phage 항체 라이브러리를 제작하였음
- 본 연구진이 기확보하고 있는 human synthetic antibody library (complexity 1 X 10E12)도 이용하였음

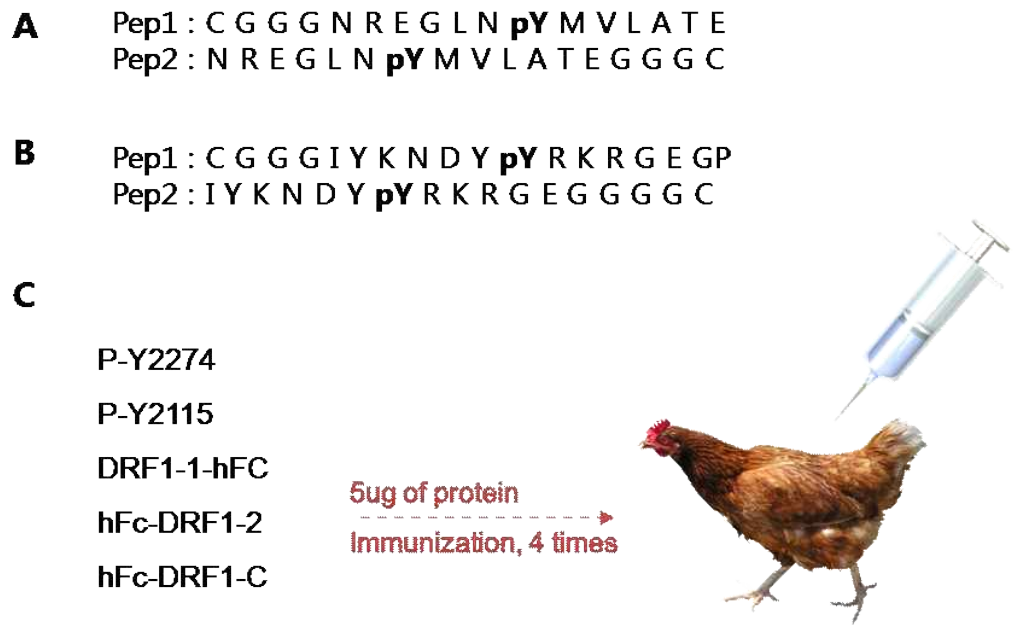


그림 9. ROS1 인산화 펩타이드 sequence 및 재조합 단백질 면역

A. ROS1 세포 내 도메인중 인산화가 된다고 알려진 Y2274에 인산화기를 추가시킨 펩타이드를 BSA, OVA, KLH가 결합된 형태로 합성하였음. 각 펩타이드의 N-terminal과 C-terminal 에 GGGS linker를 추가하여 두 가지 형태의 펩타이드로 합성하였음 B. ROS1 세포내 도메인중 Y2115의 인산화 펩타이드를 같은 방법으로 합성하였음. C. 기확보된 DFR1 세포 외 도메인 3종류와 펩타이드 2종류를 닭에게 2주 간격으로 4회에 걸쳐 항체 생성을 위한 면역반응을 유도함.

- 인산화 펩타이드가 conjugation된 BSA를 이용한 biopanning과정을 거쳐 ROS1 인산화 펩타이드에 결합하는 항체를 phage ELISA를 통하여 선별하였음
- 비인산화 펩타이드가 comjugation된 BSA를 이용하여 인산화 펩타이드에만 결합하는 항체, 인산화 및 비인산화 펩타이드 모두에 결합하는 항체를 선별하였음
- 선별된 항체의 염기서열을 sequencing을 통해 확인

A Y2115-p-BSA peptide에는 positive이나 Y2115-BSA peptide에는 negative

Y2115

1.497	1.494	1.388	1.423	1.439	1.384	1.097	1.501	1.477	1.427	1.389	1.415	1.475	1.423	1.5	1.446	1.43	1.46	1.451	1.466	1.48	1.375	1.439	1.424
1.432	1.379	1.497	1.471	1.48	1.443	1.496	1.444	1.418	1.34	1.404	1.516	1.481	1.468	1.455	1.375	1.373	1.409	1.423	1.42	1.421	1.451	1.444	1.394
1.342	1.463	1.231	1.43	0.12	0.125	1.468	1.447	1.384	1.412	1.384	1.499	1.466	1.422	1.431	1.402	1.379	1.295	1.401	1.396	1.42	1.404	1.394	1.449
1.413	1.416	1.399	0.126	1.446	1.189	1.175	1.416	1.409	1.442	1.442	1.514	1.49	1.469	1.305	1.38	1.354	1.368	1.323	1.292	1.376	1.405	1.444	1.472
1.307	1.448	1.4	0.121	0.15	1.442	1.434	1.452	1.41	1.417	1.48	1.461	1.469	1.399	1.414	1.402	1.359	1.336	1.35	1.337	1.331	1.377	1.425	1.458
1.374	1.452	1.453	1.447	1.358	0.122	1.449	1.471	1.33	1.438	1.47	1.577	1.493	1.274	1.387	1.436	1.353	1.388	1.365	1.402	1.337	1.21	1.396	1.426
1.446	1.304	1.485	1.398	1.342	1.422	0.126	1.487	1.493	1.489	1.446	1.453	1.479	1.439	1.414	1.314	1.39	1.331	1.384	1.387	1.449	1.419	1.43	1.445
1.253	1.473	1.49	1.373	1.484	1.492	1.529	1.557	1.359	1.524	1.443	1.574	1.571	1.422	1.388	1.359	1.392	1.433	1.433	1.379	1.423	1.474	1.439	1.418

Y2274-p-BSA peptide에는 positive이나 Y2274-BSA peptide에는 negative

Y2274

0.111	0.113	0.136	0.2	0.104	0.107	0.112	0.108	0.527	1.384	1.313	1.369	1.368	0.102	1.161	1.219	1.344	1.383	1.362	1.399	0.111	1.278	1.35	1.426
0.121	0.12	0.141	0.154	0.128	0.101	0.118	0.123	1.346	1.368	1.228	0.106	0.221	1.354	1.379	1.382	1.301	1.222	1.351	1.392	1.384	1.372	1.416	1.434
0.116	0.114	0.128	0.122	0.136	0.108	0.108	0.101	1.283	1.195	1.223	0.11	0.114	1.34	1.353	1.339	1.352	0.109	1.336	1.168	1.323	1.353	1.367	1.368
0.108	0.102	0.111	0.115	0.106	0.106	0.099	0.109	1.302	1.302	1.294	1.357	1.356	0.11	1.235	0.109	1.164	1.321	1.171	1.391	1.293	1.32	1.326	1.323
0.121	0.114	0.12	0.118	0.109	0.144	0.111	0.102	1.262	1.297	0.1	1.307	1.239	0.102	0.107	0.105	1.295	1.302	1.33	1.305	1.301	1.321	1.356	1.335
0.117	0.16	0.139	0.127	0.133	0.115	0.121	0.11	1.321	0.097	1.317	1.31	1.402	1.361	1.376	1.328	1.318	1.318	1.108	1.299	1.339	1.36	1.203	1.332
0.165	0.11	0.107	0.127	0.116	0.115	0.103	0.106	1.288	1.183	1.322	1.326	1.356	0.106	0.109	1.31	1.211	1.327	1.333	1.316	1.343	1.331	1.331	1.296
0.193	0.105	0.11	0.145	0.104	0.135	0.106	0.102	1.136	0.111	1.258	0.102	1.374	0.103	1.357	1.331	1.334	1.369	1.16	1.348	1.308	1.218	1.143	1.299

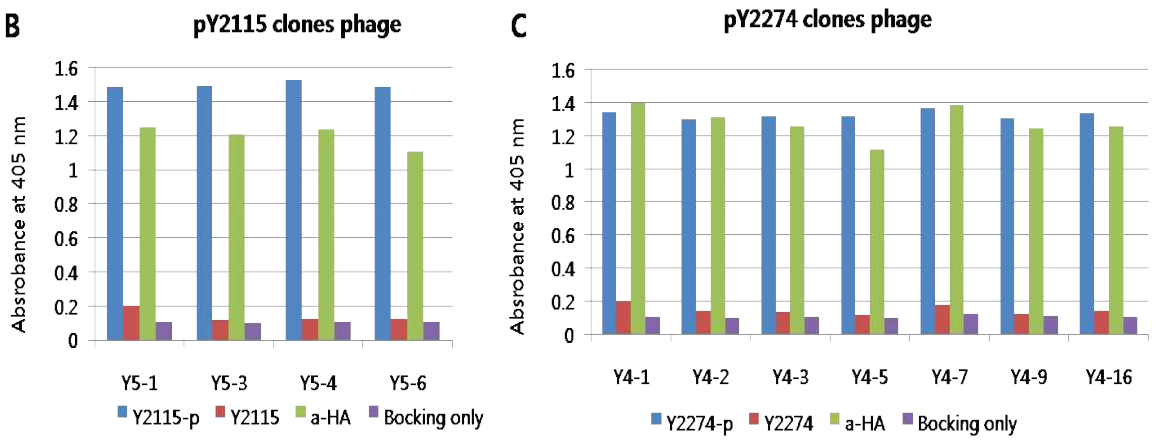
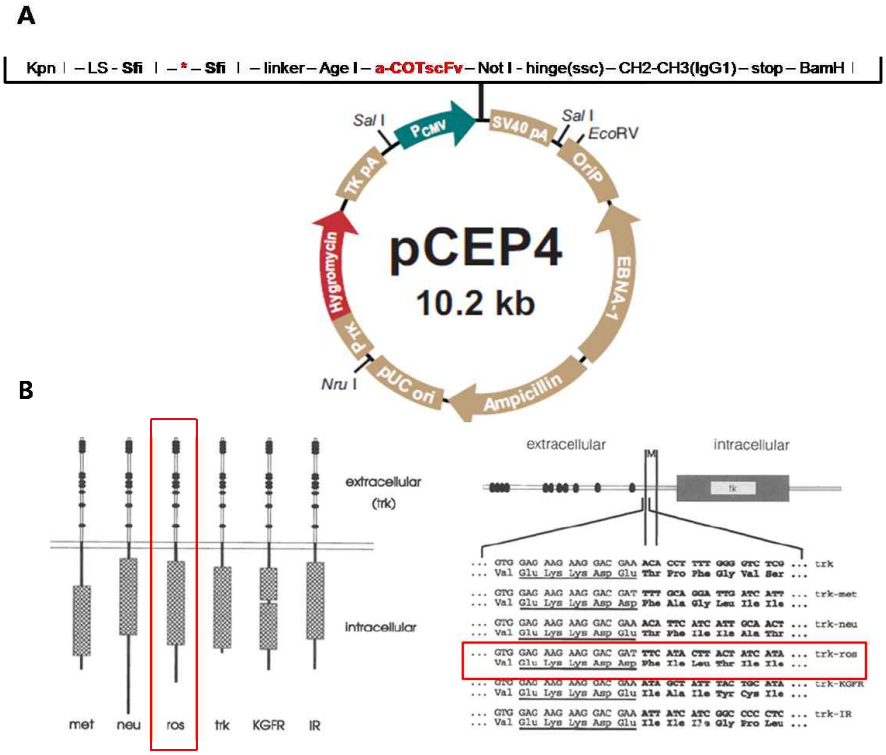


그림 10. 합성된 ROS1 세포내부 펩타이드를 면역한 치킨 라이브러리부터의 항체선별

A. 합성한 p-Y2274와 p-Y2115 인산화펩타이드 conjugate를 면역한 치킨의 골수, 비장, 파브리시우스낭으로부터 RNA를 추출하여 cDNA를 만들어 닭-항체 라이브러리를 구축하였음, 구축한 면역 라이브러이와 synthetic human antibody library로부터 인산화 펩타이드 BSA conjugate에 대한 biopanning을 통하여 인산화된 펩타이드에 특이적인 phage 항체 클론을 선별하였음. B. 선별된 항체 clone의 특이적 반응성을 phage ELISA를 통하여 확인하였음

- Human Fc domain, anti-cotinine scFv와 함께 융합단백질로 만들어 발현하여 protein A column을 이용하여 정제함
- Trk-ROS1 fusion protein (Trk extracellular domain과 ROS1 intracellurar domain의 fusion prtein)을 과발현 vector를 제조하여 과발현 시킨 후, fetal bovine serum을 가하여 과발현 시킨 후, immunoblot에서 선별된 scFv가 인산화된 Trk-ROS1 단백질에 결합 여부를 평가하였음



The journal of cell biology, Volume 133, Number5, June 1996 1095-1107

그림 11. 인산화된 ROS1에 결합하는 DFR1 scFv / 항 cotinine scFv / human Fc fusion protein 발현 및 Trk extracellular domain - ROS1 intracellular domain

A. 인산화된 ROS1에 결합하는 DFR1 scFv / 항 cotinine scFv / human Fc fusion protein 벡터 B. 인산화된 ROS1을 발현시키기 위한 Trk 융합 단백질의 모식도. 이 재조합 단백질의 세포 외부에는 Trk 단백질 세포 내부에는 ROS1 단백질이 존재하는 fusion receptor protein 임. 이 재조합 단백질을 동물세포에 발현하고, fetal bovine serum에 의한 인산화반응을 유도할 수 있어, 항 ROS1 인산화 항체의 반응성을 검증하는데 이용할 수 있음.

- 인산화된 Y2274 펩타이드에 결합하는 항체는 immunoblot에서 인산화된 native protein과 잘 결합하였음

- 인산화된 Y2115 펩타이드에 결합하는 항체는 인산화된 native protein과 결합하지 않았으며, 이는 Y2115가 인산화되지 않거나, 항체의 반응성이 없을 수 있는 두 가지 가능성이 있음.

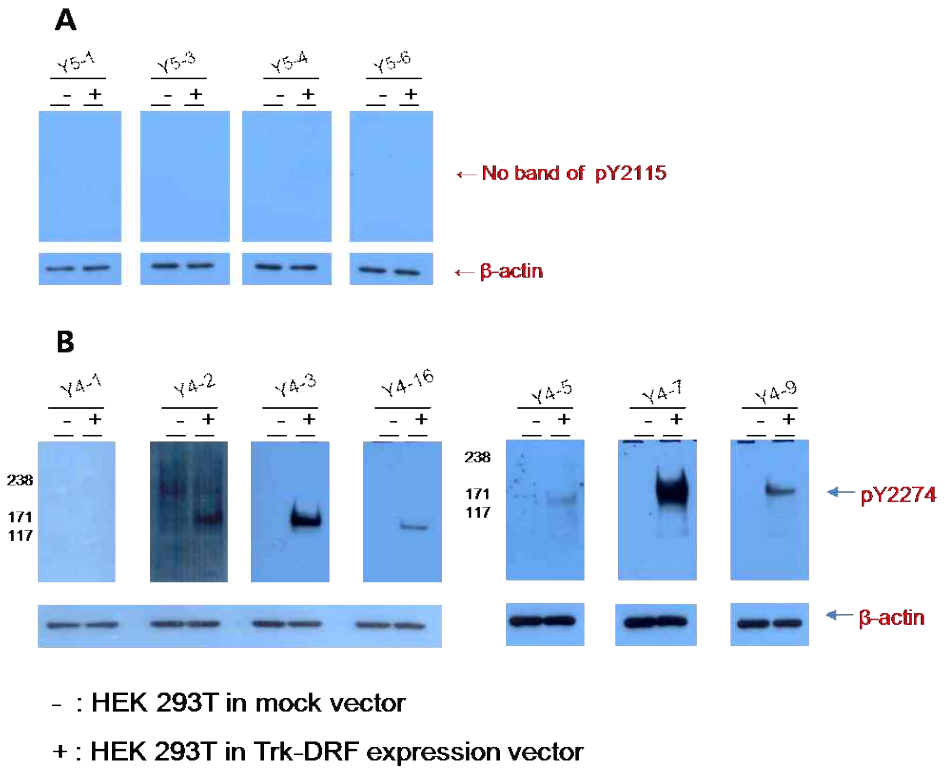


그림 12. 인산화된 Y2115와 Y2274에 결합하는 항체의 반응성

A. 인산화된 Y2115 펩타이드에 결합하는 항체들의 native protein 특히 인산화된 native protein에 대한 반응성을 평가하기 위하여 Trk / ROS1 furion protein을 발현시킨 HEK293T cell의 cell lysate를 획득하여 immunoblot을 시행하였음 방법을 이용해 anti-코티닌-HRP로 밴드를 확인하였음. B. 인산화된 Y2274에 대한 항체의 반응성을 같은 방법으로 확인

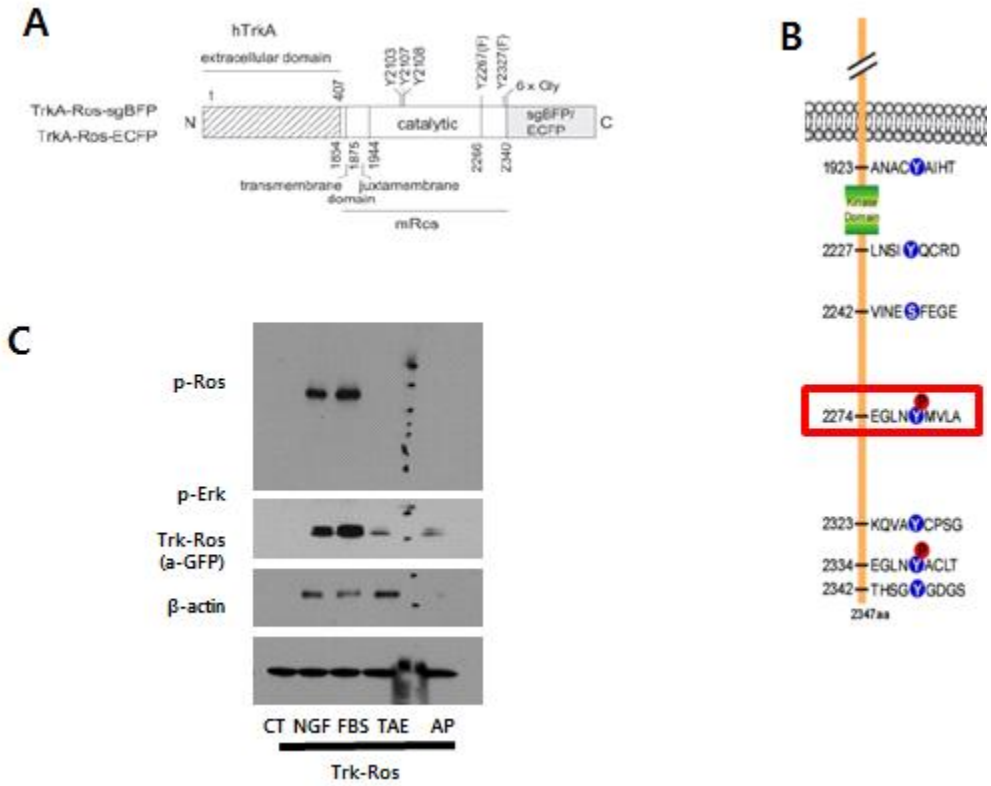


그림 13. 인산화된 Y2274에 결합하는 항체의 반응성 검증

- o Ligand가 없는 ROS1의 활성유도를 위해 extracellular domain을 Trk receptor로 치환한 후 NGF에 의해 활성이 유도되는 새로운 fusion form 제작 (그림 A)
- o 이들 fusioon 돌연변이체를 세포주에 과발현 한 후 fusion form을 활성화 시킬수 있는 NGF, serum을 처리한 후 활성을 monitor함
- o 이 Fusion form의 phosphorylation을 표지할 수 있는 항체를 제작 (그림 B)
  - ROS1의 활성을 모니터할 수 있는 가장 좋은 방법은 활성화된 ROS1을 대변하는 Phosphorylation site를 찾고 이 site의 phsophorylation을 감지 할 수 있는 특이적인 항체를 개발하는 것이다.
- o 본 연구진은 cytosolic domain의 Y2274 가 ROS1의 활성을 대변함을 확인하고 이 위치의 phosphorylation을 특이적으로 인지하는 항체를 개발함
- o 세포에 Trk ROS1을 과발현 한 후 NGF와 Serum에 의한 효소활성을 monitoring할 수 있음을 확인(그림 C)

(마) ROS1의 Extracellular domain을 특이적으로 인지하는 항체 발굴

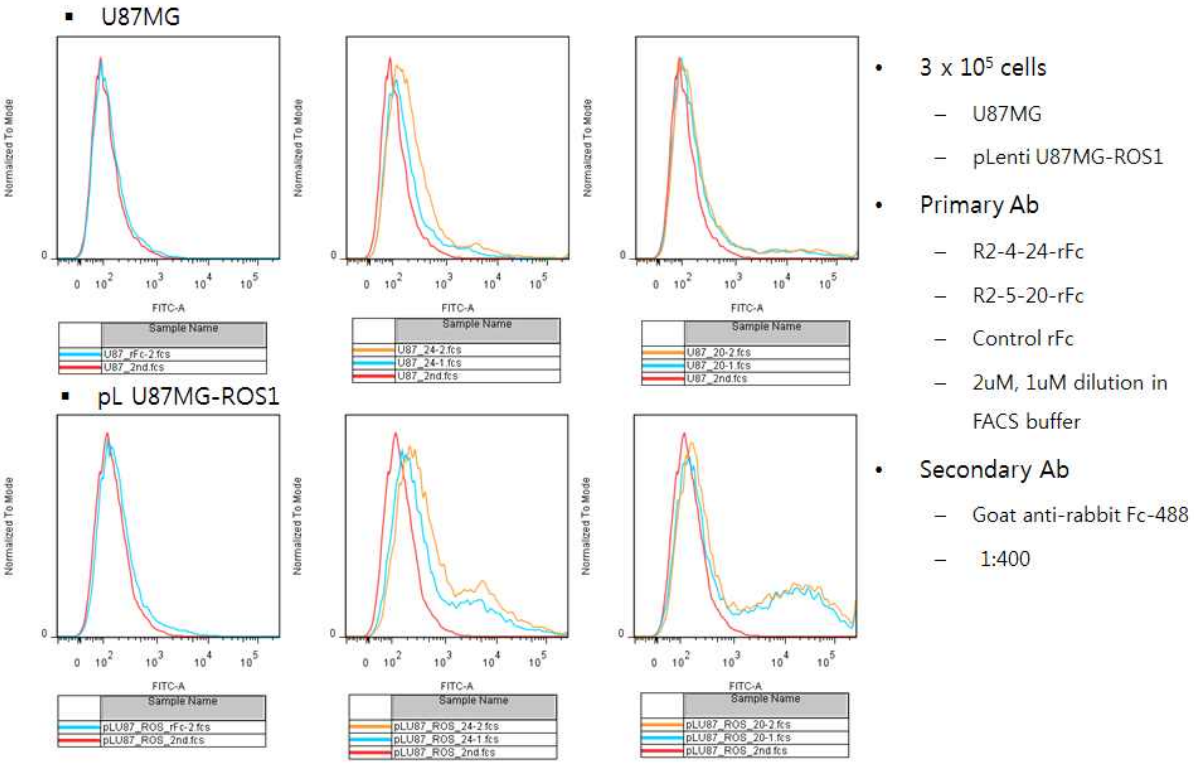


그림 14 FACS를 통한 항체 결합력 확인

- ROS1의 extracelluar domain을 이용하여 ROS1을 특이적으로 인지하는 항체 개발
- 이들중 가장 높은 Affinity를 가지는 항체를 이용하여 ROS1을 발현하는 세포주와 그렇지 않은 세포주를 FACS analsys를 진행 한 결과 특이적으로 세포를 인지함을 확인

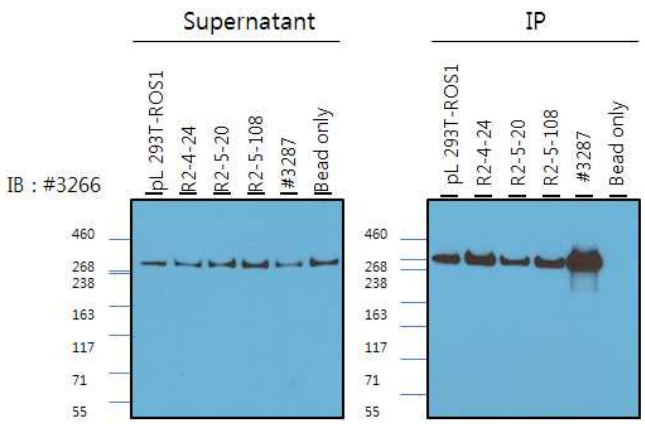


그림 15 항체의 면역침강능력 확인

- 이들 클론 중 4개이상이 특이적으로 ROS1을 면역 침강할 수 있음을 확인함으로써 이들이 ROS1 특이적 항체임을 확인함

(마) ROS1의 발현을 저해하는 chemical 저해제 preliminary test I

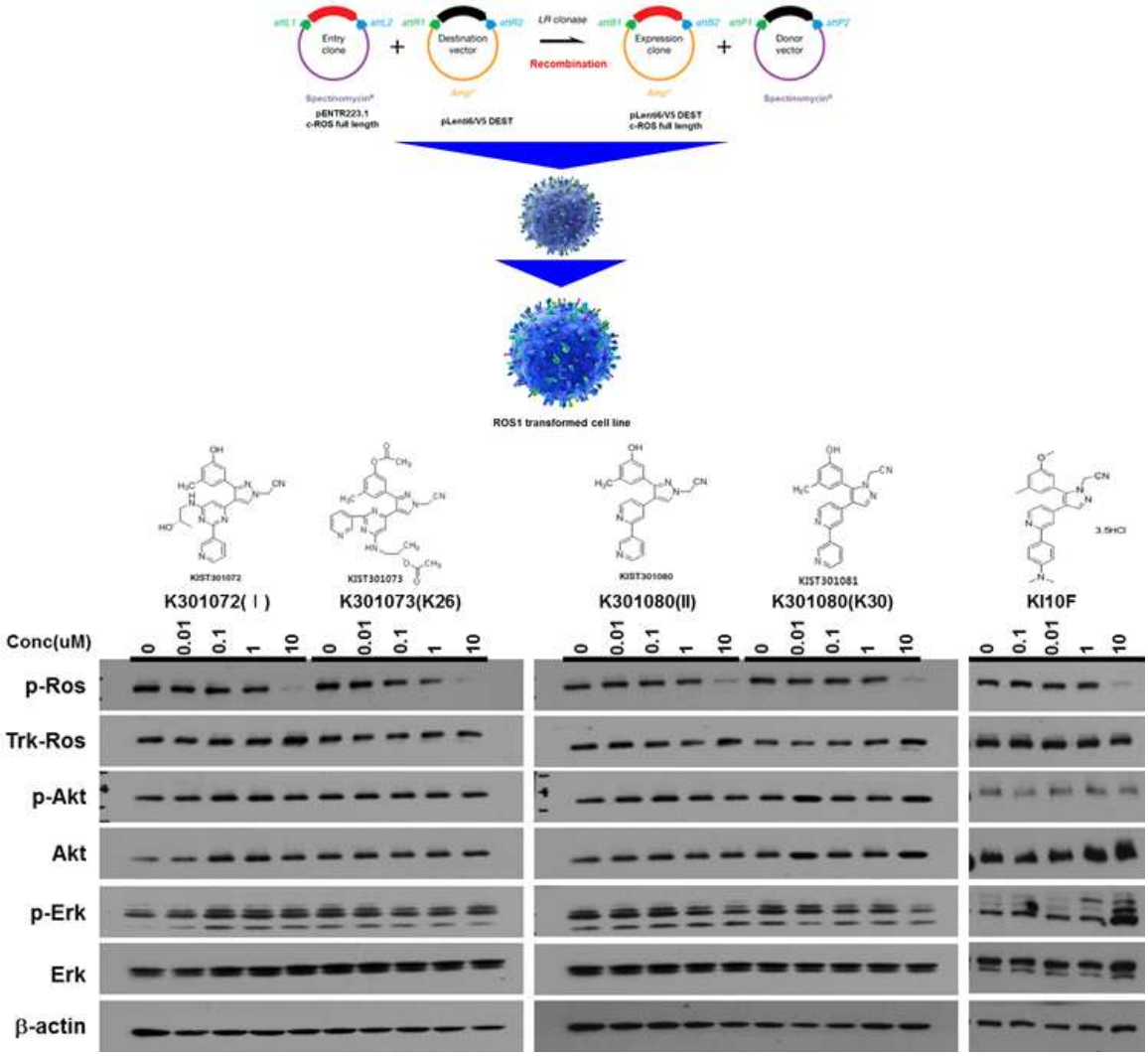


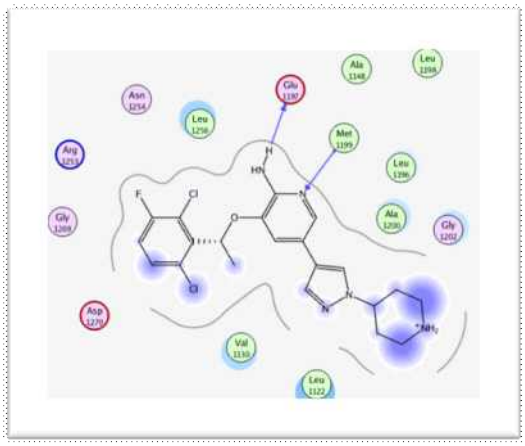
그림 16 ROS1 저해제 탐색 I

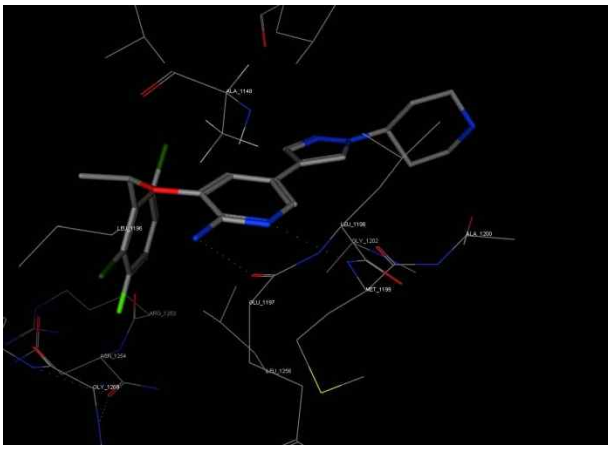
- 본 화합물의 세포수준에서 ROS1 저해능을 확인하기 위해 Trk-ROS1 fusion protein을 과발현한 세포에서 저해제를 처리한 후 ROS1의 인산화 정도를 확인.
- 기존 TAE684에 비해 저해능은 조금 떨어지지만 ROS1을 저해하고 그 downstream인 ERK 혹은 AKT의 활성도 저해함을 확인.
- 따라서, 본 화합물을 구조체로 한 **새로운 화합물의 합성이 필요**한 시점임.

(바) ROS1의 발현을 저해하는 chemical 저해제 preliminary test Ⅱ

o ROS와 ALK는 같은 Receptor tyrosine kinase로 구조의 유사성에 있어서 selectivity 비율이 약 7x로 구조석인 유사성을 갖고 있으며 PDB에 ALK kinase와 Crizotinib의 cocrystal 구조를 참고하였음.

o Figure 1에 나타나 있듯이 Crizotinib와 ALK kinase의 결정은 약 1.9 Å으로 ATP-binding 사이트에서 결합하며, hinge 지역에서의 수소결합은 Crizotinib의 pyridine의 N은 ALK kinase의 Met1199, 피리딘 옆의 아민그룹과 Glu1197과 상호작용함을 알수 있음.

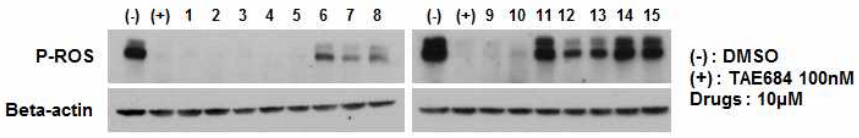




o 이러한 크리스탈 정보를 이용하여 화합물 1의 경우 Crizotinib binding과 비교 시 Figure 2와 3에서 볼 수 있듯이 비슷한 공간을 차지하고 수소결합이 화합물 1의 경우 피리딘의 N과 ALK 카이네이즈의 Met1199, 화합물 1의 OH 그룹이 Gly1193, 또한 aliphatic OH 그룹와 GLu1132와 수소결합함을 알 수 있음.

o 위 분석한 구조적 유사성에 기인하여 기존 ALK 저해제를 기본 구조로 ROS1의 저해제를 탐색하는 새로운 전략 구축

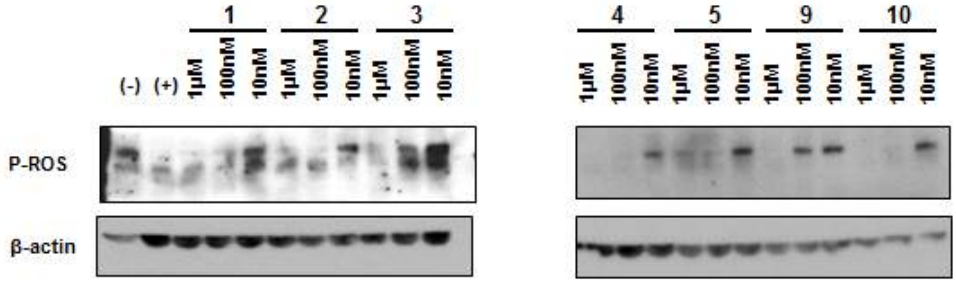
o 한국화학연구원의 난치성 사업단의 김형래 박사님과 공동연구를 통해 기존의 ALK, c-MET 저해제 선도물질을 이용하여 ROS1 저해효과 확인



No.	Code	major target
1	KRCA-0008	ALK
2	KRCA-0013	ALK
3	KRCA-0080	ALK
4	KRCA-0083	ALK
5	KRCA-0087	ALK
6	KRCA-0088	ALK
7	KRCA-0207	ALK
8	KRCA-0252	ALK
9	KRCA-0259	ALK
10	KRCA-0260	ALK
11	KRC-00660	C-Met
12	KRC-00798	C-Met
13	KRC-00867	C-Met
14	KRC-00868	C-Met
15	KRCB-00047	BTK

그림 17 ROS1 저해제 탐색 II

o 기존 개발된 ALK와 c-MET의 저해제 탐색을 위한 선도 물질군을 이용하여 ROS1의 fusion form을 과발현 한 세포주에서 ROS1 저해 효과를 확인한 결과 ALK 저해효과가 있는 선도물질들이 비교적 높은 저해 효과를 보임



(-) : DMSO
(+) : TAE684 100nM
P-ROS : ECL 10min/35min
1st Y4-3 p-ROS 4μg/ml
2nd COT-HRP 1:1000
β-actin : ECL(+) 0s
1st 1:1000
2nd Mouse 1:5000

No.	Code	major target
1	KRCA-0008	ALK
2	KRCA-0013	ALK
3	KRCA-0080	ALK
4	KRCA-0083	ALK
5	KRCA-0087	ALK
9	KRCA-0259	ALK
10	KRCA-0260	ALK

그림 18. ROS1 저해제 탐색 III

o ROS1 저해 효과를 보이는 ALK 저해 선도물질을 10nM의 낮은 농도까지 저해 효과를 확인한 결과 그중 5개의 화합물에서 높은 저해 활성을 보임을 확인

o 이들 화합물은 기존 NOVATIS사에서 ROS1의 저해제로 개발중인 TAE684와 거의 유사한 저해 효능을 보여줌

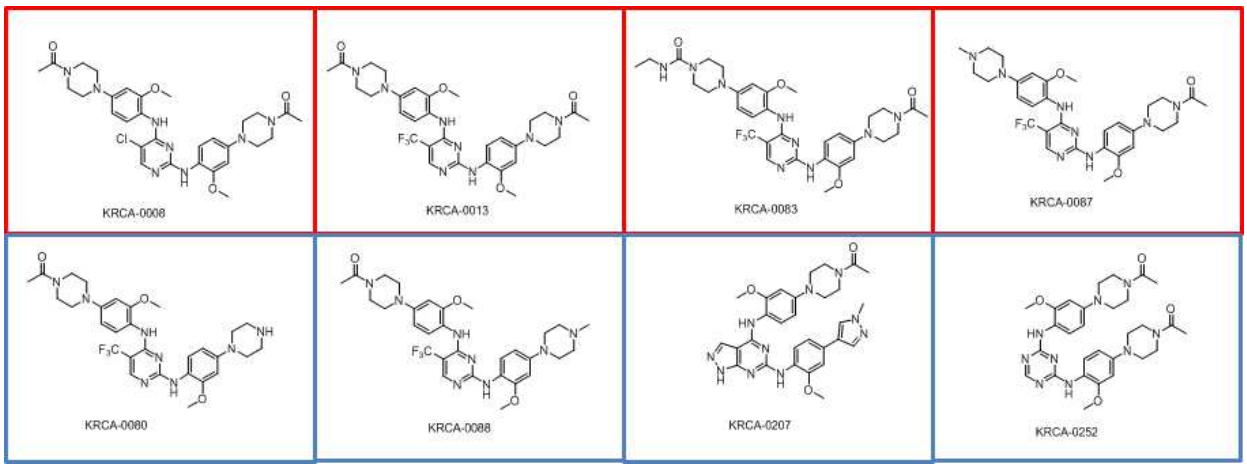


그림 19 ROS1 저해화합물의 구조적 특징

o 이들 화합물의 구조적 특징으로부터 앞으로의 합성에 관한 방향성을 예측 가능함.

Molecular weight: ~600
tPSA: 114.3, CLogP: 4.02
Solubility (5% DMSO-water): 54 uM
Solubility (5% DMSO-PBS): 150 uM
Plasma protein binding (rat): 93%
Poor BBB penetration [Cbrain/Cplasma = ~0.02]
hERG: <1% inhibition @ 10 uM (binding assay)
hERG Patch Clamp IC_{50}: 30 uM
Ames test (1000 ug/plate): negative
Chromosomal aberration assay: negative
Micronucleus assay: negative

Table 1. % of CYP inhibition of compounds at 10 μM

Compounds	1A2	2C9	2D6	3A4	-	-
NKRR-098	0.00	0.00	0.00	0.00		
KRA-0013	0.00	0.00	6.91	0.37		
KRA-0002	0.00	0.00	0.00	0.00		
Inhibitor*	94.57	91.63	97.65	96.49		

* 1A3: a-naphthoflavone, 2C9: sulfaphenazole, 2D6: quinidine, 3A4:ketoconazole

Table 1. Liver microsomal stability (% of remaining after 30 min)

Compounds	Mouse (%)	Rat (%)	Human (%)
NKRR-098	52.4	89.2	71.7

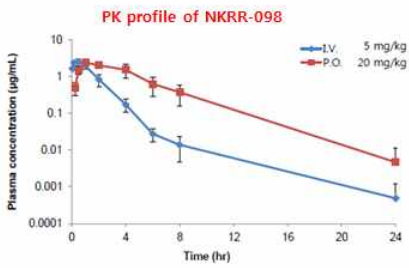


Figure 1. Plasma concentration-time profiles in male rats

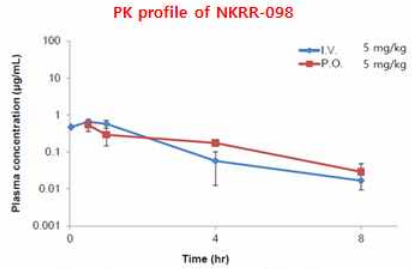


Figure 1. Plasma concentration-time profiles in male mice

▶현재 본 연구진이 개발중인 ROS1 inhibitor 선도물질은 경쟁약물인 Crizotinib과 다른 골격구조를 가지며, ALK과 ROS1 억제에도 매우 우수한 효능을 보여주었음. 따라서, ROS1 돌연변이체에 대한 잠재적 효능도 우수할 것으로 예측함.

▶기초독성 평가시험에서도 우수한 결과를 보여줌.

3. 연구결과 고찰 및 결론

가. 기존 연구 수행과정에서 ROS1의 기능적 중요성 확인

- anti-HGF 내성 유도과정에서 ROS1의 발현 증가가 내성유도에 매우 중요함을 동물모델을 통해 확인
- 타 연구팀의 연구결과 ROS1의 다양한 fusion form이 존재하고 이들이 폐암 뿐만아니라 대부분의 암종에서 나타나고 있음이 알려짐
- 따라서, 이들의 다양한 fusion form을 저해하고 또한 변이가 일어나지 않은 ROS1도 동시에 저해할 수 있는 **저해제의 필요성 대두**

나. ROS1 저해제 개발을 위한 선도물질의 발굴

- 위탁연구를 통해 KIST 화합물 중 10uM 수준에서 IC50를 가지는 화합물 도출
- 한국 화학연구원의 난치성질환 연구사업단과의 공동연구를 통해 ALK kinase 저해제 선도

물질 중 ROS1을 100nM 이하 수준에서 저해하는 매우 강력한 저해제 발굴

- 따라서, 이들 화합물을 optimizing하는 과정을 통해 새로운 **ROS1 저해물질을 발굴하고 사업화 할 필요성 대두**

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

○ 과제시작시점부터 과제종료시점까지의 연구성과(학술지 게재, 학회발표, 학위논문, 산업재산권 출원·등록, 워크샵 또는 심포지움 개최, 전시회 참가, 임상응용, 기술성과 이전, 벤처 창업 등의 실적)를 기재하되, 본 과제와 관련성이 있는 성과에 한하여 기재 ※ 논문, 특허성과는 과제 시작시점이후 게재 신청 또는 출원된 실적만 기재. 다만, 후속과제의 경우는 예외

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분[1])	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분[2]	지원과제번호[3]
Phase Ⅱ Study of Irinotecan Plus Cisplatin Induction Followed by Concurrent Twice-Daily Thoracic Irradiation With Etoposide Plus Cisplatin Chemotherapy for Limited-Disease Small-Cell Lung Cancer	O O O (교신)	Journal of Clinical Oncology (10.864)	2005; 23(15):3488-94	국외 SCI	0210140
Gefitinib is of more benefit in chemotherapy-naive patients with good performance status and adenocarcinoma histology: Retrospective analysis of 575 Korean patients	O O O (공동)	Lung Cancer (3.172)	2006; 53(3):339-45	국외 SCI	없음

1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동
2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등
3) 지원과제번호(Acknowledgement)
- 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역[1]	지원과제번호

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분[1]	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

- 현재 세계 최초로 ROS1의 Extracellular domain을 인지할 수 있는 항체 개발
- 항체의 affinity maturation을 통해 First-in-class Drug으로 개발 가능
- chemical inhibitor의 경우 ROS1 저해제개발의 lead compound 확보
- 세포수준에서의 IC50 가 30nM이하의 매우 뛰어난 efficacy를 가짐 확인
- 경쟁약물과도 다른 구조를 가지며 기초독성 및 PK도 매우 뛰어남을 확인
- 따라서, 차세대 ROS1저해제 개발을 위한 선도물질로 충분함을 확인

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

○ 사업목표에 대한 달성내용 및 관련분야 기술발전에의 공헌도 등을 기술 ○ 달성도(%)는 연차별목표대비 당해연도 달성도 및 최종목표대비 당해연도까지의 누적 달성도를 반드시 기입

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
	1차년도	표적항암제 내성유도 과정에서 DRF1의 발현 증가 검증	- anti-HGF, Avastin 내성 모델에서 ROS1의 발현 증가 확인	100	100
		암재발 동물모델에서 ROS1의 기능검증	- anti-HGF 재발 동물모델에서 shROS1을 이용한 ROS1의 기능적 중요성 검증		
		ROS1 저해제 개발을 위한 세포 스크리닝 시스템 확립	- ROS1-TrkA fusion 단백질을 과발현 한 세포주 확립 - 이들 세포주에서 ROS1 활성 확인		
		항체개발을 위한 Extracellular domain 발현	- ROS1의 Extracellular domain을 약 세 개의 fragmnet로 나누어 발현 정제		
		ROS1 과발현 세포주 확립	- ROS1 Full length를 과발현한 세포주 확립		
	2차년도	DRF1의 항암제 내성유도 기전 연구	- ROS1 저해에 의한 내성유도기전이 주위 STROMA에서의 Collagen 발현 및 면역세포와의 상호작용을 통해 일어남을 발견	80	80
		DRF1 chemical 선도물질의 확보	- ROS1을 IC50 30nM 이하에서 저해하고 기초독성이 없는 뛰어난 선도물질 확보		
		DRF1 중화항체 확보	- ROS1 인산화그룹을 표지할 수 있는 인산화 항체 확보 ROS1의 Extracellular doamin에 결합하는 항체 확보		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
표적항암제 내성유도과정에서 DRF1의 발현 증가 검증	-anti-HGF, Avastin 내성 모델에서 ROS1의 발현 증가 확인 및 shROS를 이용한 표적으로서의 효용성 검증 **처음 의도했던 목표를 완벽하게 달성함**
암재발 동물모델에서 ROS1의 기능 검증	- anti-HGF 재발 동물모델에서 shROS1를 이용하여 병용 사용하였을 때 생존기간을 200일 가량 증가시킴을 확인함으로써 ROS1을 표적으로 하는 항암제 개발의 필요성을 확인함. **초기 목표치를 완벽하게 달성.**
ROS1 저해제 개발을 위한 세포 스크리닝 시스템 확립	- ROS1-TrkA fusion 단백질을 과발현 한 세포주 확립 - 이들 세포주에서 ROS1 활성 확인함으로써 ROS저해제 탐구를 위한 세포주 스크리닝 시스템 확립 완료 **초기 목표를 완벽하게 달성**
ROS1 과발현 세포주 확립	- ROS1 Full length를 과발현한 세포주 확립 ROS1의 크기로 인해 기존 방법으로 확립할 수 없었던 세포주를 세계최초로 확립하여 항체개발을 위한 중요한 툴확보; **초기 목표 달성**
항체개발을 위한 Extracellular domain 발현	- ROS1의 Extracellular domain을 약 세 개의 fragmnet로 나누어 발현 정제후 이들을 이용하여 항체 개발완료 ; **초기목표 달성**
DRF1의 항암제 내성 유도 기전 연구	- ROS1 저해에 의한 내성유도기전이 주위 STROMA에서의 Collagen 발현 및 면역세포와의 상호작용을 통해 일어남을 발견; 기존 알려지지 않았던 새로운 ROS1 활성기전 확립 및 저항성 유도 기전에 대한 중요한 정보제공 ; **초기 목표 달성**
DRF1 chemical 선도 물질의 확보	- ROS1을 IC50 30nM 이하에서 저해하고 기초독성이 없는 뛰어난 선도물질 확보 ; **초기 목표보다 상향 달성, 약물개발을 위한 중요한 교두보 확립**
DRF1 중화항체 확보	- ROS1 인산화그룹을 표지할 수 있는 인산화 항체 확보 ROS1의 Extracellular doamin에 결합하는 항체 확보 하지만, 중화능을 확인할 수 없었음. ;**초기목표보다 미진함.**

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	SCI IF 4.0 이상 논문에 출판 예정
산업재산권 등록	1	국내 특허 및 PCT 출원 예정
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

가) 국내외 제약사 기술이전 (제약사의 기술이전 욕구를 충족시킨 경우)

- 현재 국내외 제약사의 가장 큰 목표는 암의 driver mutation에 대한 정확한 표적이 가능한 저해제 개발임

- 이러한 측면에서 ROS 저해제는 최근 대두된 ROS-Fusion 단백질의 driver mutation으로의 기능 평가와 함께 가장 hot한 제약회사의 표적임.

- 하지만 최근의 1세대 저해제의 임상결과 대두된 두가지 문제점 즉 BBB 통과와 G2032R을 비롯한 저항성 돌연변이에 대한 해결책이 반드시 필요한 상황임. 따라서, 많은 국내외 제약회사들이 현재 이를 위해 연구를 진행중임.

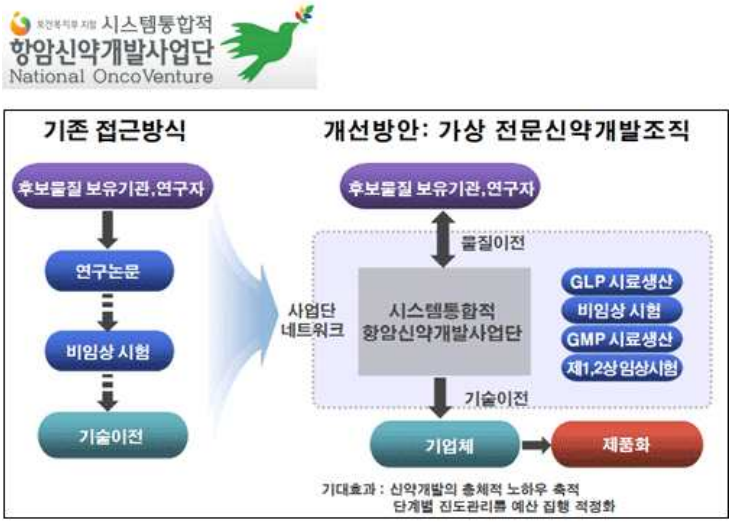
- 특히, 이미 임상2상에 있는 Pfizer 나 Novartis의 경우 차세대 저해제 개발에 모든 역량을 쏟고 있음.

- 가장 중요한 점은 전임상 후보물질의 도출시점인데, 현재 경쟁사의 약물중 어느것도 BBB 통과나 Crizotinib mutant를 극복하지 못함으로알려짐.

- 따라서, 빠른시일내에 가장 효과적인 방법으로 새로운 저해제를 만드는 것이 현재의 UNMET NEEDS를 충족할 수 있슴.

나) 후속 국가연구개발사업 참여 (제약사의 기술이전 조건을 충족하지 못하였을 경우)

- 최종 목표인 비임상 후보물질 도출에 성공하였지만 비임상 후보물질로서 모든 조건을 갖추지 못한 경우; 임상 1상과 2상을 진행한 후 기술이전



- 시스템 통합적 항암신약개발사업단은 우수한 drug candidate를 비임상부터 임상 1상 2상을 수행하고 기술이전을 추진해 주는 국가연구개발사업으로서 이미 몇몇 저해제들을 임상 2상으로 이끈 노하우를 가지고 있음

- 따라서 본연구결과 우수한 candidate를 확보했지만 자체적인 비임상시험을 완료하지 못한 경우 시스

템 항암신약 개발사업을 통해 임상 2상까지의 과정을 수행하고자 함.

- 범부처 개발사업단의 경우 위와 유사한 기능을 하지만 좀 더 포괄적인 범위의 support와 큰 규모의 fund를 유지하므로 이들과제를 통한 좀 더 신속한 진행 가능.

6. 참고문헌

○ 보고서 작성시 인용된 모든 참고문헌을 열거

7. 첨부서류

○ 본 연구의 성과로 논문, 저서, 산업재산권, 정책정책 기여 등이 있을 경우 관련 증빙자료를 첨부토록 함