

“PRM 이용 표적단백질체방법 SRM 대비 정확성 · 개발과정 강점

마커 검증이 의존하고 있는 항체반응중심 분석법 대체 방법으로 주목”

글_ 김연진 박사(CRP-Santé, Luxembourg Clinical Proteomics Center)

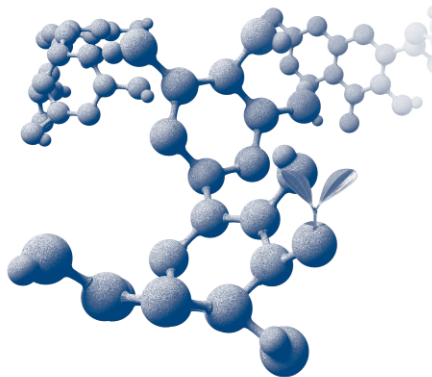
서론

2000년대에 들어서며 글로벌제약회사들은 전체 질병인구를 대상으로 삼는 ‘블록버스터’ 모델에서 벗어나 개인별 맞춤의학의 관점으로 신약개발 프로세스의 틀을 서서히 바꾸게 된다. 이는 기업의 전략적 선택이라기보다 제약산업 전반에 걸친 생산성 저하라는 문제 의식과 급변하는 제약 환경에 순응하며 거대기업으로 생존하기 위한 필연적 움직임이었다. 이러한 변화에는 최근 공식화된 FDA의 ‘치료제와 진단제의 공동개발’ (Drug-Diagnostic Co-Development)을 위한 규정과 건강산업의 복잡한 구조가운데 자리잡은 동반진단제 (Companion Diagnostics)의 필요성이 큰 역할을 하고 있다. 본고에서는 동반진단제가 제약산업에 미치는 영향을 항암제 분야의 실례를 통해 알아보고 이를 통해 핵심요소로 대두되는 바이오마커 개발에 대한 기술적 문제, 그리고 그 해결방안의 중심에 있는 단백질 바이오마커의 대량고속검증을 위한 신기술을 소개하기로 하겠다.

동반진단제가 기존 제약사업에 미치는 영향

항암제시장의 동반진단제 사용경로는 크게 세 가지 경우로 나눌 수 있다. 첫째, 치료제의 상업화가 진행된 이후에 FDA의 권고에 의해 규제가 시작된 경우가 있는데 대표적인 예가 BMS사의 Erbitux (Cetuximab)이다. Erbitux는 대장암말기 환자들에게 투여하는 항체치료제로서 2004년에 이미 FDA 허가를 받아 상용되던 항암제였다. 그러다 임상결과들을 종합한 연구에서 밝혀진 Erbitux의 약효와 KRAS 활성변이의 상관관계가 인정되어, FDA는 Erbitux 처방을 위해 KRAS 유전자검사를 의무화하는 조치를 취하고 이를 라벨에 명시하도록 BMS사에 권고를 보낸다 (2009년). BMS사는 당시 미국 국내시장에만 Erbitux를 통해 7억 5,000만 달러에 달하는 판매고를 올렸으나 KRAS 활성변이 양성 인구에 해당하는 40%의 감소가 발생할 수도 있다는 위기의식과 동반진단제 개발에 대한 초기연구의 필요성을 각인하게 된다.

두 번째 예로는 신약개발 초기단계부터 공동개발에 착수한 경우가 있는데 최근 폐암치료에 대해 FDA승인을 받은 Pfizer사의 Xalcori(Crizotinib)를 예로 들 수 있다. 이 경우엔 MOA에 대한 정확한 인식을 바탕으로 개발초기부터 Abbott사와 함께 치료제-진단제 공동개발을 수행하였고 임상시



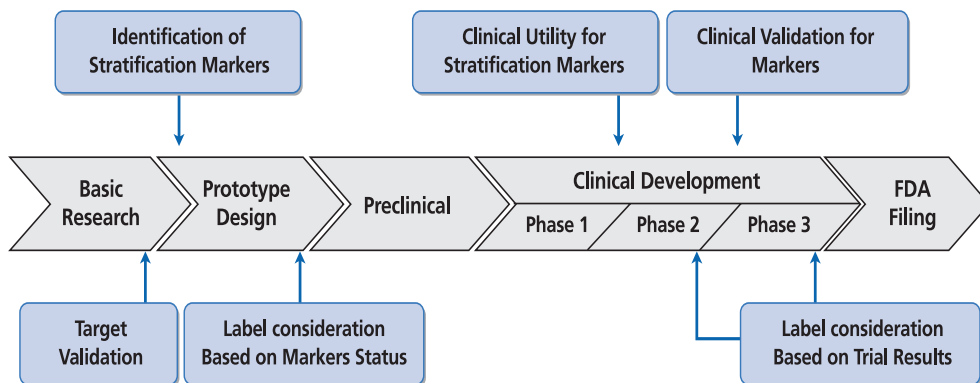
험과 FDA 승인 절차도 함께 추진한 경우이다. 유전자검사를 병행함으로써 임상실험 시 참여 환자를 선택적으로 배치할 수 있어서 개발비용을 대폭적으로 감소시켰을 뿐만아니라 FDA승인 절차도 5개월 이내로 단축시키는 결과를 낳았다.

마지막으로 올해 초에 성사된 Roche사의 Tarceva (Erlotinib)의 1차 치료제 승인의 예도 흥미롭다. Tarceva 는 2004년에 폐암 환자에 대한 2, 3차 치료제로 승인된 바 있으며 2012년 기준으로 13억 달러의 수익을 기록한 블랙버스터이다. 이제는 EGFR 활성변이 데이터가 있는 폐암환자에 한해 1차 치료제로 처방이 인정되었고 보험비 적용도 보장되었다. 치료제의 작용메커니즘과 적용대상을 정확히 이해함으로써 보다 안정된 치료를 예측할 수 있기 때문이다. 이로 인해 Tarceva의 시장은 더욱 더 넓어지며 EGFR 활성변이도 측정을 위한 동반진단제의 사용 빈도도 높아질 전망이다.

이와 같이 동반진단제가 도입됨으로서 환자에게는 본인의 병리적상태에 따른 적합한 치료제 선택을 통해 치료성공률을 높게 되고 제약기업에게는 보다 계획적인 개발과 임상으로 인해 비용절감 및 승인혜택에 대한 기회가 주어지게 된다. 또한 국가적으로는 불필요한 치료와 진단을 줄임으로써 보건경제에 큰 영향을 미칠 수 있으며 이 때문에 보편적 복지제도가 이루어지고 있는 유럽에서는 맞춤형의학에 필요한 정책들을 적극적으로 수용하고 이를 위한 제반시설 확충에 대대적인 투자를 추진하고 있다. 또한 첫 번째 Erbitux 예에서 보듯이 맞춤형의학체제가 보편화되면서 치료제사용의 규제가 보다 구체적으로 변화되므로 이에 대한 적응은 불가피하게 되었다.

그러나 문제점도 많이 지적되고 있다. 특히 제약과 진단이라는 두 갈래의 상이한 분야가 접목되면서 겪는 시행착오와 기존의 치료제개발 프로세스로는 해결되지 않는 절차상 문제들이 있는데 이를 위해 2011년 FDA는 치료제-진단제 공동 개발을 위한 가이드라인을 제시하였다 (그림 1). 여기서 중요하게 지목되는 부분이 바로 진단과 치료 각 단계에서 판단근거가 되는 바이오마커의 개발과 검증이다.

■ 그림 1. FDA의 치료제-진단제 공동개발 프로세스의 주요골자
(Adopted from Co-Development Concept Paper, FDA 2005, 2011).



동반진단제를 위한 바이오마커 개발과 기술적 한계

그렇다면 동반진단제를 위한 바이오마커의 개발상황은 어떨까? 인간게놈프로젝트가 결실을 맺기 시작한 2000년을 기점으로 새로운 마커를 발견해 진단제로서의 가능성을 제시하는 연구에는 가속도가 붙기 시작했다. 특히 오믹스(-omics) 분야의 고속분석법들이 대거 등장하면서 진단과 치료를 위한 바이오마커 후보들이 쏟아져 나왔다. 그러나 이러한 대량정보의 도움에도 불구하고 실제로 그 효능이 인정되어 실제 진료에 사용된 예는 극히 일부에 불과하다. 기하급수적으로 증가하는 바이오마커에 대한 논문보고 숫자에 비해 특허출현으로 이어진 경우의 수는 매우 미미할 뿐 아니라 오히려 2009년 이후 감소추세를 보이고 있다. 이러한 현상을 설명할 수 있는 가장 큰 요인으로 제한된 실험조건에서 양산되는 false-positive 결과들을 체계적으로 검증해낼 기술의 부재를 들 수 있다.

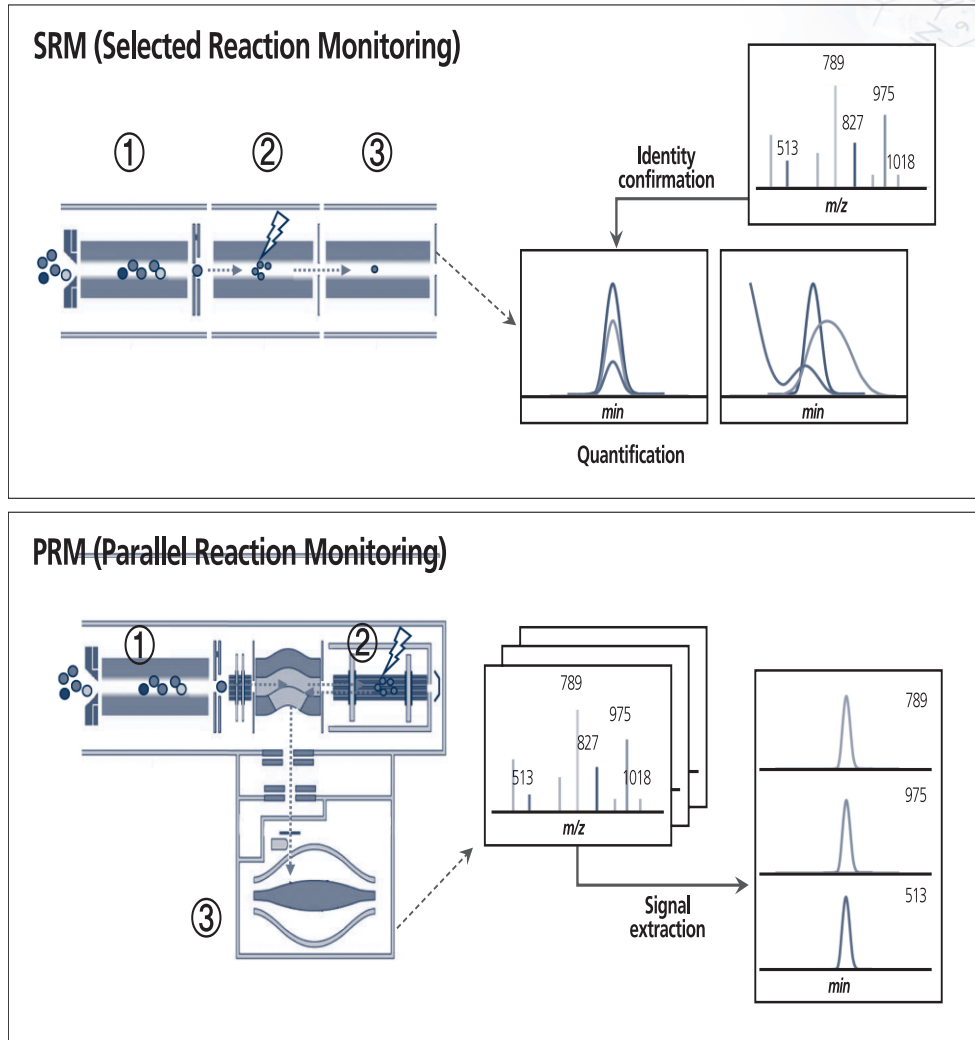
환자의 병리상태를 진단하기 위한 바이오마커는 조직이나 혈액 등의 샘플로부터 객관적 방법에 의한 검출 및 정량이 가능해야 할 뿐 아니라 치료제 선택기준에 맞는 차별적 검출이 명확히 증명되어야 한다. 새로운 바이오마커를 발견한 경우 상당수가 검출방법과 실험디자인의 한계에 의한 오류로 판명되거나, 참여환자의 개체수가 큰 규모의 연구로 옮겨갔을 때 특정 환자군에 대한 특이성이 사라지는 경우가 많다. 단백질 마커의 경우 검증 단계의 문제는 더욱 더 심각해진다. 현재 단백질 마커의 검증을 위해 사용되는 대표적 방법은 ELISA와 같은 항체에 의존하는 방법이다. 이렇게 항체반응을 이용한 방법들은 일단 개발이 완료되고 assay가 표준화 된 후에는 임상시험과 같은 대규모 연구에 적합한 요인을 갖출 수 있다. 그러나 쌓여있는 새로운 마커후보군을 고속으로 스크린하여 그 효능을 입증하기 위해서는, 새로운 항체들을 찾고 최적화시키는 과정에 요구되는 비용과 소요되는 시간이 매우 크기에 적합하지 않다. 따라서 쏟아져나오는 바이오마커 후보물질들을 빠르고 정확하게 검증한 후 선별된 후보군만 대규모연구 또는 임상단계로 넘길 수 있는 체계적이고 정량적인 분석기술이 절실히 요구된다.

항체중심기술을 대체하면서 단백질마커를 검증하기 위해 사용될 수 있는 기술이 SRM (Selected Reaction Monitoring)이라 불리는 질량분석법이다. SRM은 이미 신약개발 과정의 ADME 및 PK 연구에 필요한 약물분석과 PD연구를 위한 바이오마커 분석에 전통적으로 쓰여왔던 방법이다. 높은 감도와 정확도를 보일 뿐 아니라 고도의 멀티플렉스 분석이 용이하며 assay 디자인을 시스템화할 수 있기 때문에 위에서 언급한 바이오마커 고속검증에 매우 적합하다고 할 수 있다. 현재 이 방법을 개선, 강화하여 단백질 바이오마커 검증을 위해 적극적으로 사용할 수 있도록 활발한 연구가 진행 중이다. 그 중의 하나로 본연구소에서 직접 개발에 참여하고 작년말 Nature지가 'Method of the Year'로 선정한 PRM (Parallel Reaction Monitoring) 기술을 주목할만한 신기술로 소개하고자 한다.

바이오마커 검증을 위한 신기술과 페암마커검증 적용 예

그림2에서 설명하듯이 PRM방법은 기존의 SRM에 사용되는 장비에 비해 높은해상도 (약 70배 이상)를 구현할 수 있는 분석기를 도입하는데 이는 바이오마커 검출의 선택성을 높임으로서 결국은 검출한도를 낮추는 중요한 역할을 한다. 또한 이 방법은 데이터를 얻고 난 이후에 최적 assay를 디자인하는 방식을 취하기 때문에 전체 개발 프로세스를 훨씬 간소화시킬 수 있다. 동시에 SRM의 강

■ 그림 2. 바이오마커의 대량고속검증에 사용하기위해 개발중인 PRM방식의 단백질마커분석법



그림설명 : 기존의 SRM 방식은 세계의 Quadrupole이 연결된 질량분석기를 사용하여 표적단백질의 일부인 표적펩티드에 대한 질량과 그 펩티드의 조각들의 질량을 동시에 모니터링 한다. PRM 방식은 이 기본형식을 유지하되 마지막 Quadrupole을 Orbitrap과 같은 고해상도의 분석기로 대체하여 선택성을 높인다. 특히 Quadrupole의 'filtering' 방식에서 벗어나 모든 펩티드 조각들에 대한 데이터를 축적함으로써 최적 assay를 분석 이후에 선택한다.

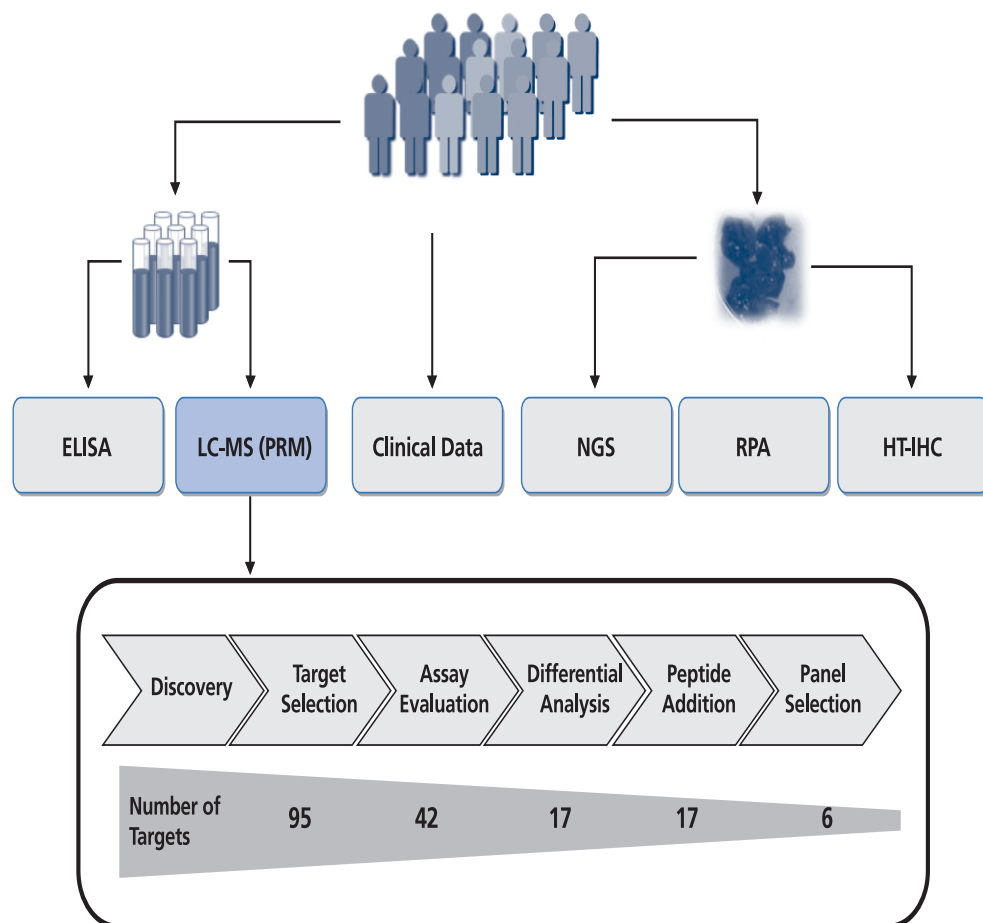
점진 대량분석 시스템화의 특징은 계속 유지한다. 이런 PRM 방식은 생체물질, 특히 혈액과 같이 고도로 복잡한 내용물을 가진 샘플분석에 진가를 발휘 할 수 있고 ELISA를 비롯한 항체반응중심의 분석법을 대체하는 바이오마커 고속검증법으로 유망하다. 본 연구소에서는 이를 폐암진단과 치료에 사용할 바이오마커 검증에 사용하였다.

현재 진행중인 PPM (Partnership for Personalized Medicine) 컨소시엄의 폐암프로젝트에서는 약 200명의 폐암환자를 대상으로 개인별 분자정보들을 확보한다 (그림3). 조직샘플로부터는 체세포 유전자변이 상태, 단백질 마커 후보물질 분포도, 활성단백질 PTM분포도를 각각 NGS (Next

Generation Sequencing), HT-IHC (High-Throughput Immunohistochemistry), RPA (Reverse Protein Array)를 통해 분석하고, 혈액샘플로부터는 PRM을 이용한 표적단백질체분석을 통해 미리 선정한 마커후보들을 검증한다. 이러한 분자정보들을 환자 개개인의 항암치료 진행상태와 함께 그 상관관계를 분석함으로써 개인맞춤형 치료제에 대한 결론을 도출할 예정이다.

혈액내의 후보물질 분포도 분석에서는 95개의 단백질 마커 후보 검증 사례를 통해 고속검증을 위한 PRM의 유용성을 확인하였다. 특히 PRM의 높은 선택성과 이로 인한 보다 정확한 정량을 통해 각 마커의 allele type과 정량적인 변이 분석까지도 가능했고 이는 기존의 SRM이나 항체중심의 assay로는 얻기 힘든 결과이다.

■ 그림 3. PPM 폐암프로젝트의 분석 scheme



※ 그림설명 : 각환자로부터 얻은 조직과 혈액샘플에서 다양한 분자정보를 얻어내고 이 정보는 이후 개개환자의 치료진행상태 정보와 함께 상관관계분석을 실시한다. 혈액분석에는 PRM을 이용한 단백질마커 검증이 실시되었다 (검증의 진행단계와 각 단계마다 검증된 마커의 개수를 아래 box에 표시하였다).

결론

이제 바이오마커개발은 제약산업의 필수요소가 되었으며 그동안 바이오마커 (특히 단백질 마커) 개발의 난제로 알려진 고속검증과정을 해결할 신기술에 대한 적극적 수용을 검토할 때다. 본고에서 소개한 PRM을 이용한 표적단백질체방법은 기존의 SRM 방법에 비해 높은 선택성과 정확성을 보이고 개발과정을 간소화시키는 장점을 보인다. 이 때문에 현재 대부분의 마커 검증이 의존하고 있는 항체반응중심의 분석법을 대체할 수 있는 강력한 방법으로 주목할만 하다. 특히 폐암연구사례에서 얻은 allele type 분포확인이나 정량적인 체세포변이 분석 등은 개인별 맞춤의학을 위한 단백질 바이오마커분석에 응용도가 매우 높다. 정확한 검증법은 검증의 신뢰도를 높일 뿐 아니라 대량 연구에 필요한 표본수를 현격히 감소시킴으로서 경비절감의 효과도 있다. ▣

참고문헌

- [1] E. Drucker, EPMA J. 4, 7 (2013)
- [2] V. Marx, Nat. Methods 10, 19-21, (2013)
- [3] Y. J. Kim, Prot. Clin. Appl. 7, 739-747, (2013)

