



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월06일

(11) 등록번호 10-2553128

(24) 등록일자 2023년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/57423 (2019.01)

C12Q 1/6886 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0015712

(22) 출원일자 2021년02월03일

심사청구일자 2021년02월03일

(65) 공개번호 10-2022-0112121

(43) 공개일자 2022년08월10일

(56) 선행기술조사문헌

W02019207030 A1

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김혜련

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 402호(신촌동)

하상준

서울특별시 서대문구 가재울미래로 2, 118동 2205호(남가좌동, DMC파크뷰자이)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인인벤싱크

전체 청구항 수 : 총 20 항

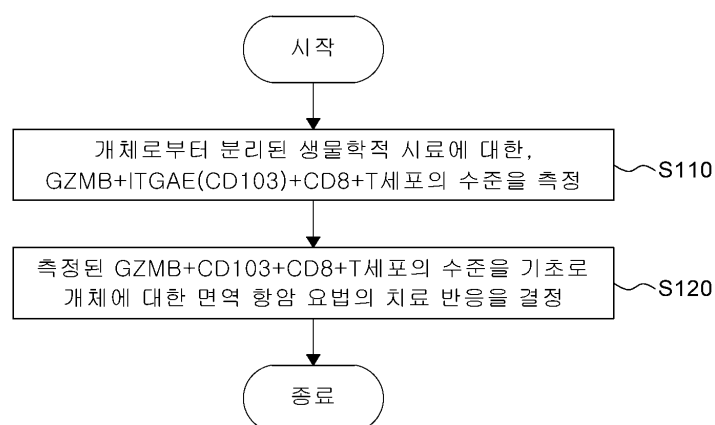
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법

## (57) 요약

본 명세서에서는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, HAVCR2 및 LAG3 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계, 및 측정된 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 기초로 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 결정하는 단계를 포함하는, 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**G01N 33/57484** (2013.01)

**C12Q 2600/106** (2013.01)

**C12Q 2600/158** (2013.01)

**G01N 2800/52** (2021.08)

(72) 발명자

**이인석**

서울특별시 중구 다산로 56, 남산정은스카이라파트  
동 303호(신당동, 남산정은스카이라파트)

**조재원**

서울특별시 강남구 학동로64길 7, 101동 306호(삼성동, 한솔아파트)

**김가민**

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 510호(신촌동)

**박세연**

서울특별시 용산구 새창로 70, 101동 303호(  
도원동, 도원동삼성래미안)

(56) 선행기술조사문헌

Corgnac Stephanie et al, Cell Reports Medicine  
(2020), vol 1, no 7, pp 1-17.

Wang Peiliang et al, Cellular immunology  
(2018), vol 325, pp 48-55.

Zhong Runbo et al, Cancer Immunology  
Immunotherapy (2021.08.11.), vol 70, no 8, pp  
2261-2274.

Singh D et al, bioRxiv (2020), pp 1-42.

- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
- |             |   |
|-------------|---|
| 과제고유번호      | 1711103770                                  |
| 과제번호        | 2017M3A9E9072669                            |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                   |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                      |
| 연구사업명       | 바이오.의료기술개발(R&D)                             |
| 연구과제명       | 환자유래 순환 종양세포를 이용한 고정밀 전임상 모델 구축을 통한 항암제에 대한 |
- 획득 내성 기전 규명과 치료전략 제시
- |         |                         |
|---------|-------------------------|
| 기 여 율   | 2/10                    |
| 과제수행기관명 | 연세대학교 산학협력단             |
| 연구기간    | 2020.02.01 ~ 2020.12.31 |
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
- |             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711104016                            |
| 과제번호        | 2019M3A9B6065231                      |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                             |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                |
| 연구사업명       | 바이오.의료기술개발(R&D)                       |
| 연구과제명       | 단일세포 다중오믹스 기반 정밀 면역항암치료에 대한 임상 유용성 검증 |
| 기 여 율       | 2/10                                  |
| 과제수행기관명     | 연세대학교 산학협력단                           |
| 연구기간        | 2020.03.01 ~ 2020.12.31               |
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
- |             |   |
|-------------|---|
| 과제고유번호      | 1711104174                                  |
| 과제번호        | 2019M3A9B6065192                            |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                   |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                      |
| 연구사업명       | 바이오.의료기술개발(R&D)                             |
| 연구과제명       | 암미세환경 면역리액툼 및 유도인자 발굴을 위한 단일세포 다중오믹스 통합 분석기 |
- 술 개발
- |         |                         |
|---------|-------------------------|
| 기 여 율   | 1/10                    |
| 과제수행기관명 | 연세대학교 산학협력단             |
| 연구기간    | 2020.03.01 ~ 2020.12.31 |
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
- |             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호      | 1711108917              |
| 과제번호        | 2018R1A5A2025079        |
| 부처명         | 과학기술정보통신부               |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                  |
| 연구사업명       | 집단연구지원(R&D)             |
| 연구과제명       | 만성난치질환 시스템의학 연구센터       |
| 기 여 율       | 1/10                    |
| 과제수행기관명     | 연세대학교 산학협력단             |
| 연구기간        | 2020.03.01 ~ 2021.02.28 |
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
- |        |                  |
|--------|------------------|
| 과제고유번호 | 1711104142       |
| 과제번호   | 2018M3C9A5064709 |

---

부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(과기정통부)
연구과제명	유전체 빅데이터 활용을 위한 네트워크증강분석 웹서비스 개발
기 여 율	1/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711108900
과제번호	2018R1A2A1A05076997
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	암-면역 분자네트워크를 활용한 환자별 면역억제에 대한 분자기전 규명 및 정밀 면
역향암치료 플랫폼 개발	
기 여 율	1/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711105688
과제번호	2019M3A9B6065221
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	단일세포 다중오믹스 기술을 활용한 면역리액툼 유도기전 규명
기 여 율	1/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711055832
과제번호	2017R1A5A1014560
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	비임파성 장기 면역 연구센터
기 여 율	1/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.06.01 ~ 2018.02.28

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMH, PDCD1, HAVCR2 및 LAG3 조합의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계, 및

상기 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한 상기 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상 대조군의 수준보다 낮은 경우,

상기 개체를 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 음성인 것으로 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계를 포함하는,

폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한,

ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMH, PDCD1, HAVCR2 및 LAG3 조합의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현하는 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하는 단계, 및

측정된 개체에 대한 상기 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준이 정상 대조군 시료에 대한 GZMB+ITGAE(CD103)+CD8+T세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우,

상기 개체가 PD-1 면역 항암 요법에 대한 반응성이 음성인 것으로 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계를 포함하며,

상기 GNLY의 log FC(fold change)는, 1.5 이상인,

폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 GZMB의 log FC(fold change)는,

1.2 이상이고,

상기 CD103의 log FC는,

0.4 이상인, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 8

제 4항에 있어서,

상기 GZMB+CD103+CD8+T세포에 대한 예측력은, AUC 0.854 인, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 9

제 4항에 있어서,

상기 측정하는 단계는,

정상 대조군의 시료에 대한 GZMB+CD103+CD8+T세포를 측정하는 단계를 포함하고,

상기 PD-1 면역 항암 요법의 치료 반응을 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계는,

측정된 개체에 대한 상기 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준이 상기 정상 대조군 시료에 대한 GZMB+ITGAE(CD103)+CD8+T세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우,

상기 개체가 PD-1 면역 항암 요법에 대한 반응성이 음성인 것으로 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계를 포함하는, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 10

제 4항에 있어서,

상기 측정하는 단계는,

CXCR5+CD20+B세포 또는 CXCL13+CD4+T세포(follicular helper T cells)를 측정하는 단계를 더 포함하는, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 측정하는 단계는,

정상 대조군의 시료에 대한 CXCL13+CD4+T세포를 측정하는 단계를 더 포함하고,

상기 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계는,

측정된 개체에 대한 상기 CXCL13+CD4+T세포의 수준이 상기 정상 대조군에 대한 CXCL13+CD4+T세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우,

상기 개체가 PD-1 면역 항암 요법에 대한 반응성이 음성인 것으로 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계를 포함하는, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 CXCL13+CD4+T세포는,

CD2, CD6, CD82, TMFRSF4, TNFRSF9, ICOS, TIGIT, PDCD1, CTLA4, IL3RG, 및 MAGEH1 조합의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현하는, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한,

ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMH, PDCD1, HAVCR2 및 LAG3 조합의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현하는 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하는 단계,

CXCR5+CD20+B세포 또는 CXCL13+CD4+T세포(follicular helper T cells)를 측정하는 단계,

측정된 개체에 대한 상기 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준이 정상 대조군 시료에 대한 GZMB+ITGAE(CD103)+CD8+T세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우 및

측정된 개체에 대한 상기 CXCR5+CD20+B세포의 수준이 상기 정상 대조군 시료에 대한 CXCR5+CD20+B 세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우,

상기 개체가 PD-1 면역 항암 요법에 대한 반응성이 음성인 것으로 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계를 포함하는,

폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 15

개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한,

ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMH, PDCD1, HAVCR2 및 LAG3 조합의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현하는 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하는 단계,

HLA-DPB1, HLA-DRB5, HLA-DQA2 및 HLA-C 중 적어도 하나의 항원 표시 인자 (antigen presentation molecule)을 발현하고, TAP1 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현하는 CXCR5+CD20+B세포 또는 CXCL13+CD4+T세포(follicular helper T cells)를 측정하는 단계,

측정된 개체에 대한 상기 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준이 정상 대조군 시료에 대한 GZMB+ITGAE(CD103)+CD8+T세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우 및

측정된 개체에 대한 상기 CXCR5+CD20+B세포의 수준이 상기 정상 대조군 시료에 대한 CXCR5+CD20+B 세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우,

상기 개체가 PD-1 면역 항암 요법에 대한 반응성이 음성인 것으로 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계를 포함하는,

폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 항원은,

정상 대조군에 대한 CXCR5+CD20+B세포의 항원 표시 인자 발현 수준보다 감소된 수준을 나타내는, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 17

제 4항에 있어서,

상기 측정하는 단계는,

상기 GZMB+CD103+CD8+T세포 수를 측정하는 단계를 더 포함하고,

상기 결정하기 위해 정보를 제공하는 단계는,

측정된 상기 GZMB+CD103+CD8+T세포 수가  $1 \text{ cells/mm}^2$  이하이거나,

전체 CD103+CD8+T세포에 대한 상기 GZMB+CD103+CD8+T세포 수의 비율이 30 % 미만인 경우,

상기 개체가 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 음성인 것으로 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계를 포함하는, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 18

개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한,

GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하는 단계 및

상기 GZMB+CD103+CD8+T세포의 GZMB+CD103+CD8+T세포로의 전환 확률(transition probability)을 측정하는 단계를 포함하고,

측정된 상기 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 기초로 전체 CD8+T세포로의 전환 확률에 대한 상기 GZMB+CD103+CD8+T세포로의 전환 확률이 41%이하인 경우,

상기 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 결정하는 단계를 포함하는, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

#### 청구항 19

제 4항에 있어서,

상기 측정하는 단계는,

상기 개체 및 정상 대조군의 시료에 대한 3 차 림프절 구조 (tertiary lymphoid structures, TLS)의 면적을 측정하는 단계를 더 포함하고,

상기 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계는,

측정된 개체에 대한 상기 TLS의 면적이, 상기 정상 대조군 시료에 대한 TLS 면적의 수준보다 70 %이상 감소된 수준을 나타내거나,

상기 개체에 대한 TLS의 면적이  $5 \text{ mm}^2$  미만인 경우,

상기 개체가 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 음성인 것으로 결정하기 위한 정보를 제공하는 단계를 포함하는, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 20

제 4항에 있어서,

상기 개체는,

폐암 의심 개체이고,

상기 생물학적 시료는,

조직, 말초 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함하는, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

제 4항에 있어서,

상기 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준은, 제 4항에 있어서,

상기 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준은,

웨스턴 블롯(western blot), 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역전기영동, 면역조직화학법(immunohistochemistry, IHC), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip) 중 적어도 하나의 방법으로 측정되는, 폐암에서 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을



예측하기 위한 정보 제공 방법.

### 청구항 23

개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한,

ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMH, PDCD1, HAVCR2 및 LAG3 조합의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현하는 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하도록 구성된 제제를 포함하며,

상기 GNLY의 log FC(fold change)는, 1.5 이상인,

폐암 개체의 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측용 키트.

### 청구항 24

제 23항에 있어서,

상기 개체는,

폐암 의심 개체이고,

상기 생물학적 시료는,

조직, 말초 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함하는, 폐암 개체의 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측용 키트.

### 청구항 25

제 23항에 있어서,

상기 제제는,

상기 GZMB+CD103+CD8+T세포의 ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMH, PDCD1, HAVCR2 및 LAG3 조합의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 측정하도록 구성된 제제를 더 포함하는, 폐암 개체의 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측용 키트.

### 청구항 26

제 23항에 있어서,

상기 제제는,

CXCR5+CD20+B세포 또는 CXCL13+CD4+T세포의 수준을 측정하도록 구성된 제제를 더 포함하는, 폐암 개체의 PD-1 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측용 키트.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 폐암 (lung cancer) 은 남녀 모두의 성별에서 흔히 발생하는 암 중 하나이다. 폐암 중에서 비소세포성 폐암(non small lung cancer, NSLC)은 상피성 암 (carcinoma)의 일종으로 폐소성암(small lung cancer)이 아닌 모든 상피성 폐암 (epithelial lung cancer)을 일컫는다. 이러한, 비소세포성 폐암은, 전체 폐암의 발병률에 있어서 높은 비율을 차지한다.

[0003] 한편, 비소세포성 폐암은 암세포의 크기, 모양 및 화학적 구성에 따라 몇 가지 하위 종류로 나뉘며, 대표적으로는 선암(adenocarcinoma), 편평상피암(squamous cell carcinoma), 대세포암(large cell carcinoma) 등이 있다. 선암은 폐의 바깥부위(outer region)에서 발견되며 다른 폐암보다 천천히 진행되는 경향이 있으나, 초기에 높은 전이 경향을 보이고 또한 높은 방사선 저항성을 보인다. 편평상피암은 기도 (airway)를 이루고 있는 세포의 초기 단계(early version)에서 시작되며, 주로 흡연자에게서 높은 발병률을 보인다. 나아가, 대세포 암은 폐

의 어느 부위에서나 발병할 수 있으며, 그 진행속도가 소세포성 폐암(small cell lung cancer)과 유사 할 만큼 빠르기 때문에 그 치료는 현재까지도 난제로 떠오르고 있다.

[0004] 이와 같은 비소세포성 폐암의 증상으로는 지속적인 기침, 흉부 통증, 체중감소, 손톱 손상, 관절 통증, 호흡의 단기화(shortness of breath)등이 나타날 수 있다. 그러나, 비소세포성 폐암은 다른 암 보다 천천히 진행되기 때문에 초기에는 그 증상을 거의 보이지 않는다. 따라서, 비소세포성 폐암의 조기 발견 및 치료가 어려우며, 뼈, 간, 소장, 및 뇌 등 전신에 전이된 후에 발견할 가능성이 높다. 이에, 비소세포성 폐암의 진단 시 환자의 반수 이상이 수술을 할 수 없을 정도로 진행된 상태이므로 조기치료는 현실적으로 어렵다. 또한, 비소세포성 폐 암은 외과적 수술을 할 수 있을 만큼 진행되지 않은 경우라면 근치절제술과 같은 우선 수술을 시행하는데, 근치절제술을 시행할 수 있는 경우는 약 30 %에 불과한 실정이다. 나아가, 근치절제술을 시행한 전체환자들 대 다수는 수술 절제 후에 보다 공격적인 질환으로 재발하여 사망하는 것으로 나타난다.

[0005] 이러한 이유로 비소세포성 폐암의 조기 치료를 위해, 새로운 치료법의 개발, 나아가 기존의 치료법에 대한, 치료 반응을 예측할 수 있는 새로운 방법에 대한 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 한편, 아시인의 경우, 비소세포성 폐암 환자 중 약 50%에서 상피세포 성장인자 수용체(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)의 돌연변이가 발견된다. EGFR은 HER 또는 erbB family라고도 불리는 티로신 키나아제 수용체 그룹의 일부로서, erbB family에는 EGFR (HER1/ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) 그리고 HER4 (ErbB4)가 포함된다. 이러한, EGFR의 돌연변이는 EGFR의 티로신 키나아제 도메 인에 발생하여 EGFR 키나아제의 활성을 증가 시킴에 따라, 세포 신호전달 체계를 지속적으로 활성화시켜 세포를 무제한으로 분화 및 성장하도록 한다.

[0008] 이에, 이를 표적으로 하는 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)가 1차 요법으로 주로 사용되고 있으나, EGFR 돌연변이를 포함하는 비소세포성 폐암에 있어 TKIs를 통한 치료 요법은 9 내지 14개월 이내에 후천적 내성이 발생한다.

[0009] 따라서, TKIs에 대한 한계를 극복하기 위하여, 2차 요법으로 PD-1 억제제(Programmed death receptor-1 inhibitors) 또는 PD-L1 억제제(programmed cell death ligand-1)가 사용될 수 있으나, PD-1 및 PD-L1 차단 치료 또한 EGFR 돌연변이 환자에 있어 낮은 민감성 및 생존율을 갖는 것으로 나타남에 따라, 이러한 한계를 극복 할 수 있는 치료 전략이 필요한 실정이다.

[0010] 한편, PD-L1 차단 치료 반응 예측에 있어서, 면역 조직 화학법 (immunohistochemistry, IHC)에 의한 종양 PD-L1 발현이 현재 PD-1 차단에 대한 최선의 예측 바이오 마커로 사용될 수 있다. 그러나, 종양 PD-L1 발현 의 존적인 PD-L1의 치료 반응 예측의 정확도는 약물 효능을 확정할 정도로 높지 않다. 보다 구체적으로, PD-L1 발 현 음성 환자가 PD-1 차단에 반응할 수 있고, PD-L1 발현 양성 환자가 PD-1 차단에 반응하지 않을 수 있다. 나 아가, PD-L1이 없는 일부 반응 환자는 Checkmate 057 trial에서 PD-L1 양성인 경우 비슷한 반응 지속 기간을 보 일 수 있다. 더욱이, PD-L1 발현은 동적이며, 시간적 및 공간적으로 변화할 수 있다. 이러한 PD-L1 발현의 변 화 현상은 종양에 의해 발휘되는 적응 면역 저항성일 수 있다.

[0011] PD-L1 차단 치료 반응 예측에 대한 바이오 마커로서, CD8 T세포 침윤, 염증 종양 표지, T세포 수용체 클론성 및 체성 돌연변이 부담 (somatic mutational burden) 이 이용될 수 있다. 그러나, 이상의 바이오 마커들은, 종 양 조직을 얻는데 어려움을 갖고, 종양의 이질성 및 일부 바이오 마커의 유도 가능성을 가지고 있어, PD-1차단 에 대한 치료 반응 예측에 있어 단일 마커로 이용되는 것에 어려움이 있을 수 있다.

[0012] 한편, 본 발명의 발명자들은 EGFR 돌연변이를 포함하는 환자가 면역 항암 요법에 대한 반응성이 저하되어 있는 것을 인지하였으며, EGFR 돌연변이를 예시로 약물 반응성이 감소되어 있는 개체에서의 차이를 확인하여 이들의 약물 반응성에 대한 한계를 극복하고자 하였다. 이에, 본 발명의 발명자들은 이들이 가지고 있는 특정 면역 세 포의 구성이 면역 항암 요법에 대한 반응성을 갖는 환자와 차별화되어 있다는 것을 발견하였으며, 이에 따라, 면역 항암 요법에 대한 반응성이 감소될 수 있다는 것을 발견할 수 있었다.

[0013] 더욱이, 본 발명의 발명자들은 차별적으로 분포되어 있는 특정 면역 세포들이 종래의 분류에 의한 세포와 메커

니즘이 상이하다는것을 발견하였다. 즉, 본 발명의 발명자들은 면역 항암 요법에 대한 반응성을 예측할 수 있는 특정 면역 세포를 특성화할 수 있는 유전자 지표(gene signature)를 발견하였다.

[0014] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 면역 항암 요법, 즉, 면역 관문 억제제에 대한 치료 반응을 예측하기 위한 바이오 마커로서, GZMB+CD103+CD8+T세포를 통한, 새로운 치료 반응 예측 방법을 개발하기에 이르렀다.

[0015] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 개체에 대한 면역 항암 요법의 반응성일 조기에 예측하여, 치료 효과를 극대화시킬 수 있도록, GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하고, 이의 수준을 기초로 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 결정하여 제공할 수 있는, 치료 반응 예측 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 나아가, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 전술한 치료 반응 예측 방법에 기초한, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측할 수 있는 키트를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0018] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, HAVCR2 및 LAG3 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계, 및 측정된 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 기초로 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 결정하는 단계를 포함하는, 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하는 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 특징에 따르면, 측정하는 단계는, 정상 대조군의 시료에 대한 ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, HAVCR2 및 LAG3 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 결정하는 단계는, 개체에 대한 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상 대조군의 수준보다 낮은 경우, 개체를 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 음성인 것으로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 상기 적어도 하나의 유전자 마커는 ITGAE 및/또는 GZMA이며, mRNA는, 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정되고, 단백질은, 웨스턴 블롯(western blot), 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역전기영동, 면역조직화학법(immunohistochemistry, IHC), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip) 중 적어도 하나의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, mRNA 및 단백질이 측정될 수 있는 다양한 방법을 모두 포함할 수 있다.

[0021] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하는 단계, 및 측정된 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 기초로 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 결정하는 단계를 포함하는, 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 특징에 따르면, GZMB+CD103+CD8+T세포는,

[0023] ID2, IFNG, CD7, TNFRSF4, CCR7, IL7R, CXCR4, CXCR6, PRF1, GZMA, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, PDCD1, CTAL4, TIGIT, HAVCR2, LAG3, ICOS, TOX 및 TCF7 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, CD8+T세포가 발현할 수 있는 다양한 마커 유전자를 더 포함할 수 있다.

[0024] 이때, GNLY의 log FC(fold change)는, 1.5 이상이고, GZMB의 log FC(fold change)는, 1.2 이상이고, ITGAE의 log FC는, 0.4 이상일 수 있으며, 이들은 각각 양의 log FC를 포함함에 따라, GZMB+CD103+CD8+T세포는 전술한 GNLY, GZMB 및 ITGAE의 발현이 증가(up-regulation)되어 있을 수 있다.

[0025] 본 발명의 다른 특징에 따르면, GZMB+ITGAE(CD103)+CD8+T세포에 대한 예측력은, AUC 0.854 일 수 있다.

- [0026] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 측정하는 단계는, 정상 대조군의 시료에 대한 GZMB+CD103+CD8+T세포를 측정하는 단계를 포함하고, 면역 항암 요법의 치료 반응을 결정하는 단계는, 측정된 개체에 대한 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준이 정상 대조군 시료에 대한 GZMB+ITGAE(CD103)+CD8+T세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우, 개체가 면역 항암 요법에 대한 반응성이 음성인 것으로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 측정하는 단계는, CXCR5+CD20+B세포 또는 CXCL13+CD4+T세포(Follicular helper T cell)를 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 측정하는 단계는, 정상 대조군의 시료에 대한 CXCL13+CD4+T세포를 측정하는 단계를 더 포함하고, 결정하는 단계는, 측정된 개체에 대한 CXCL13+CD4+T세포의 수준이 정상 대조군에 대한 CXCL13+CD4+T세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우, 개체가 면역 항암 요법에 대한 반응성이 음성인 것으로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0029] 이때, CXCL13+CD4+T세포는, CD2, CD6, CD82, TMFRSF4, TNFRSF9, ICOS, CD27, CD28, TIGIT, PDCD1, CTLA4, CCR6, IL7R, SELL, CD52, ANXA1, ANXA2, CXCR4, FOXP3, IL3RA, IL2RB, IL3RG, IL10RA, MAGEH1, LAYN 및 GATA3 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 나아가, CXCL13+CD4+T세포는, PDCD1, MAF 및 SH2D1A 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 더 발현할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 측정하는 단계는, 정상 대조군의 시료에 대한 CXCR5+CD20+B세포의 수준을 측정하는 단계를 더 포함하고, 결정하는 단계는, 측정된 개체에 대한 CXCR5+CD20+B세포의 수준이 정상 대조군 시료에 대한 CXCR5+CD20+B 세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우, 개체가 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 음성인 것으로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0031] 이때, CXCR5+CD20+B세포는, HLA-DPB1, HLA-DRB5, HLA-DQA2, 및 HLA-C 중 적어도 하나의 항원 표시 인자(antigen presentation molecule)를 발현할 수 있으며, TAP1 마커 유전자를 발현할 수 있다. 나아가, 항원 표시 인자 및 전술한 마커 유전자는, 정상 대조군에 대한 CXCR5+CD20+B세포의 항원 표시 인자 및 전술한 마커 유전자 발현 수준보다 감소된 수준을 나타낼 수 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 측정하는 단계는, GZMB+CD103+CD8+T세포의 수를 측정하는 단계를 더 포함하고, 결정하는 단계는, 측정된 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수가  $1 \text{ cells/mm}^2$  이하이거나, 전체 CD103+CD8+T세포에 대한 GZMB+CD103+CD8+T세포의 비율이 30 % 미만인 경우, 개체가 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 음성인 것으로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 측정하는 단계는, GZMB+CD103+CD8+T세포의 GZMB+CD103+CD8+T세포로의 전환 확률(transition probability)을 측정하는 단계를 더 포함하고, 결정하는 단계는, 전체 CD8+T세포로의 전환 확률에 대한 상기 GZMB+CD103+CD8+T세포로의 전환 확률이 41%이하인 경우, 개체가 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 음성인 것으로 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 측정하는 단계는, 개체 및 정상 대조군의 시료에 대한 3 차 림프절 구조(tertiary lymphoid structures, TLS)의 면적을 측정하는 단계를 더 포함하고, 결정하는 단계는, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한 TLS의 면적이, 정상 대조군 시료에 대한 TLS 면적의 수준보다 70 % 이상 감소된 수준을 나타내거나, 개체에 대한 TLS의 면적이  $5 \text{ mm}^2$  미만인 경우, 개체가 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 음성인 것으로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 개체는, 폐암 의심 개체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 종양 및 다양한 질병을 통하여 본 발명의 일 실시예에 따른 CXCR5+CD20+B세포, CD4+T세포, CXCL13+CD4+T세포, CD8+T세포, CD103+CD8+T세포 및 GZMB+CD103+CD8+T세포가 감소되어 있을 것으로 예측되는 개체는 모두 포함할 수 있다.
- [0036] 생물학적 시료는, 조직, 말초 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 세포가 측정될 수 있는 모든 시료를 다 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 면역 항암 요법은, 항 PD-1 치료일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 종양 미세 환경을 통하여 세포 독성 효과가 억제될 수 있는 요소를 차단하는 억제제 및 물질을 통한 치료 요법을 모두 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 면역 세포의 수준은, 웨스턴 블롯(western blot), 엘라이자(enzyme linked

immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역전기영동, 면역조직화학법(immunohistochemistry, IHC), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Flow Cytometry, FACS) 및 단백질 칩(protein chip) 중 적어도 하나의 방법으로 측정되는, EGFR 돌연변이를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 세포를 측정할 수 있는 다양한 방법이 모두 포함될 수 있다.

[0039] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하도록 구성된 체제를 포함하는, 폐암 개체의 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측용 키트를 제공할 수 있다.

[0040] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

### 발명의 효과

[0041] 본 발명은, PD-1 차단 및 다양한 면역 관문 억제제에 대한 치료 반응을 예측할 수 있는 새로운 바이오 마커를 제공할 수 있는 효과가 있다.

[0042] 보다 구체적으로, 본 발명은 개체 내 다양한 시료에서 바이오 마커에 대한 비율을 기초로 PD-1 차단에 대한 치료 반응을 예측할 수 있는 효과가 있다. 이에, 본 발명은 바이오 마커를 이용하여 개체에 대한 PD-1 차단에 대한 조기 치료 반응을 예측함에 따라, 항 PD-1 치료에 대한 진행 여부를 빠르게 결정하도록 정보를 제공할 수 있으며, 치료 반응성이 효과적일 수 있는 환자와 무반응성 환자를 조기 선별하여, 이에 대한 부작용 및 불필요한 비용적 소모를 감소시키며, 임상에서의 치료 효과를 극대화시킬 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 대한 절차를 예시적으로 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 EGFR 돌연변이를 포함하는 폐암에서 면역 항암 요법에서 이용되는 면역 세포의 작용 기전을 예시적으로 도시한 것이다.

도 3a 내지 3i는 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 이용되는 CD8 세포에 대한 결과를 도시한 것이다.

도 4a 내지 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법을 통한 항 PD-1 치료 반응 예측 결과를 도시한 것이다.

도 5a 내지 5d는 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 이용되는 면역 세포에 대한 전체 분석 결과를 도시한 것이다.

도 6a 내지 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 이용되는 NKT 및 B 세포에 대한 결과를 도시한 것이다.

도 8a 내지 8e는 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 이용되는 CD4 및 Treg 세포에 대한 결과를 도시한 것이다.

도 9a 내지 10d는 본 발명의 일 실시예에 따른 EGFR 돌연변이를 포함하는 개체의 면역 항암 요법에서 사용되는 면역 세포에 대하여 항상성(homeostasis) 및 TLS를 통한 T세포의 활성화를 검증한 결과를 도시한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명



은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

- [0046] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아형 또는 아집단(subtype or subpopulation)" 전체 세포 집단의 일부를 구성하는 세포 집단을 의미하며, 세포에 포함되어 있는 바이오마커(biomarker) 따라 병리학적으로 구별 및 분류될 수 있다.
- [0047] 본 명세서에서 사용되는 용어 "비소세포성 폐암"은 상피성 암의 일종으로 폐소성암(small lung cancer)이 아닌 모든 상피성 폐암을 의미한다. 한편, 이러한 비소세포성 폐암의 면역 항암 요법으로, 항 PD-1 치료가 이용될 수 있다.
- [0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항 PD-1 치료"는, T 세포가 암세포를 공격하지 못하는 기전을 차단하도록 구성된 치료법일 수 있다. 보다 구체적으로, 항 PD-1 치료는, 암세포의 표면 단백질인 PD-L1, 및 PD-L2가 T 세포의 표면에 있는 단백질인 PD-1과 결합하는 것을 차단하는 것에 기초할 수 있다. 예를 들어, 면역 항암제가 T 세포의 PD-1 수용체에 결합하면, T 세포의 암세포에 대한 회피 기능을 억제할 수 있다. 이에, 본 명세서에서 "항 PD-1 치료"는 "PD-1 차단"과 동일한 의미로 이용될 수 있다.
- [0049] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료 반응 음성" 면역 항암 요법 즉, 면역 관문 억제제에 의하여 T 세포의 표면의 수용체 및 리간드의 결합 반응이 차단되지 못하거나, 차단에 따른 싸이토카인과 같은 세포 독성 물질에 대한 분비력이 향상되지 못함을 의미할 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않고, 면역 항암 요법에 의한 폐암 증상의 완화 또는 좋은 예후와 연관된 모든 반응의 발생을 포함할 수 있다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 "양성 또는 +"는 세포를 특징화할 수 있는 마커가 발현되었음을 의미할 수 있다. 예를 들어, 세포 독성을 가지는 T세포의 경우, 세포 표면에 CD8이 발현되어 있으며, 이에 따라, 세포 독성을 가지는 T세포는 CD8+T세포로 표기될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, '+'에 대한 표기를 제외하고 CD8 T세포로도 표기될 수 있다.
- [0051] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약"은, 당업자에게 용이하게 알려진 각각의 값에 대한 보통의 오차 범위를 지칭한다. 본 명세서에서 "약" 값 또는 파라미터 지칭은 그 값 또는 파라미터 자체에 관한 실시예를 포함한다.
- [0052] 본 명세서에서 사용되는 용어 "환자 또는 개체"는, 상호교환적으로 사용되고 치료가 요구되는 임의의 단일 동물, 더 바람직하게는 포유동물 (그와 같은 비-인간 동물, 예를 들어, 고양이, 개, 말, 토끼, 동물원 동물, 소, 돼지, 양, 및 비-인간 영장류 포함)을 지칭한다. 특정 실시예에서, 본원에서 환자는 인간이다. 환자는 "암 환자" 즉, 암의 하나 또는 그 이상의 증상을 앓거나, 암을 앓을 위험이 있거나, 또는 암을 앓고 있는 사람일 수 있다.
- [0053] 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현의 수준" 또는 "발현 수준"은 상호교환하여 사용가능하고, 일반적으로 생물학적 샘플 중 바이오마커의 양을 가리킨다. "발현"은 일반적으로 정보(예컨대, 유전자-암호화 및/또는 후성적 정보)가 상기 세포에 존재하고 작동하는 구조체로 전환되는 과정을 가리킨다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "발현"은 폴리뉴클레오티드로 전사, 폴리펩티드, 또는 더욱이 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 변형으로 번역 (예를 들면, 폴리펩티드의 번역후 변형)을 지칭한다. 전사된 폴리뉴클레오티드, 번역된 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 변형 (예컨대, 폴리펩티드의 번역 후 변형)의 단편 또한 이들이 대안적 스플라이싱(대안적인 스플라이싱)에 의해 생성된 전사물 또는 분해된 전사물에서 유래되든지, 또는 예컨대, 단백질 가수분해에 의한 폴리펩티드의 번역후 과정에서 유래되든, 발현된 것으로 간주되어야 한다.
- [0054] "발현된 유전자"는 mRNA로 폴리뉴클레오티드로 전사되고 그리고 그 다음 폴리펩티드로 번역된 것 및 또한 RNA로 전사되었지만 폴리펩티드로 번역되지 않은 것 (예를 들면, 이동 및 리보솜 RNA들)을 포함한다. 하나 초과와 관심 유전자에 대한 발현 수준은 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있고 또한 본 명세서에 개시된, 예를 들어, 관심 유전자의 모든 발현 수준의 중앙 또는 평균을 계산함에 의한 것을 포함하는, 응집 방법에 의해 결정될 수 있다. 응집 전에, 각각의 관심 유전자의 발현 수준은, 예를 들어, 하나 이상의 하우스키핑 유전자의 발현 수준으로 정규화되거나, 또는 총 라이브러리 크기로 정규화되거나, 또는 측정된 모든 유전자에 걸쳐 중앙 또는 평균 발현 수준 값으로 정규화되는 것을 포함하여, 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있고 또한 본 명세서에 개시된 통계적인 방법을 사용하여 정규화될 수 있다. 일부 사례에서, 관심 다중 유전자에 걸친 응집 전에, 각각의 관심 유전자의 정규화된 발현 수준은, 예를 들어, 각각의 관심 유전자의 정규화된 발현 수준의 Z-점수를 계산함에 의한 것을 포함하여, 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있고 또한 본 명세서에 개시된 통계적인 방법을 사용함에 의해 표준화될 수 있다.

- [0055] 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법
- [0056] 이하에서는 도 1 및 2를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 대하여 구체적으로 설명하도록 한다.
- [0057] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하는 단계(S110) 및 측정된 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 기초로 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 결정하는 단계(S120)를 포함할 수 있다.
- [0058] 먼저, GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하는 단계(S110)는 전술한 GZMB+CD103+CD8+T세포뿐만 아니라, CXCR5+CD20+B세포, CD4+T세포, CXCL13+CD4+T세포, CD8+T세포 및 CD103+CD8+T세포와 같은 다양한 면역세포들을 더 측정할 수 있다.
- [0059] 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에서 이용되는 CXCR5+CD20+B세포, CD4+T세포, CXCL13+CD4+T세포, CD8+T세포, CD103+CD8+T세포 및 GZMB+CD103+CD8+T세포는 각 세포간의 연쇄적인 반응을 통하여 종양에 대한 면역 반응 즉, 항암 효과를 가질 수 있는 면역 세포들이다.
- [0060] 보다 구체적으로, 도 2를 참조하면, T<sub>FH</sub> 세포는 CXCL13를 분비하여, B세포를 유도 즉, 세포의 여포 내로 침투시킬 수 있다. T<sub>FH</sub> 세포에 의하여 분비된 CXCL13는 B세포에서 발현된 CXCR5에 결합하여 B세포를 활성화시킬 수 있으며, 이에 따라, B세포는 이에 대한 항원을 분해한 뒤, 다양한 항원(HLA 및 MHC1)와 결합시킨 후, 세포의 표면에 표출시킬 수 있다. 그 다음, 이렇게 B세포의 표출된 항원이 세포 독성 효과를 갖는 T<sub>RM</sub> 세포 및 이의 아형 세포들의 TCR과 결합하여, T<sub>RM</sub> 세포 및 이의 아형세포들을 활성화시킬 수 있다. 나아가, B세포의 표출된 항원은 T<sub>RM</sub> 세포의 활성화뿐만 아니라, CXCL13을 분비할 수 있는 T<sub>FH</sub> 세포의 TCR과도 결합하여, T<sub>FH</sub> 세포를 활성화시켜 CXCL13의 분비를 더욱 촉진시킬 수 있다. 이에, 면역 항상성 및 독성 효과가 더욱 향상될 수 있다. 또한, 활성화된 T<sub>RM</sub> 세포 및 이의 아형세포들은 종양을 표적할 수 있는 종양 특이적 마커인 CD103을 포함함에 따라, 종양 이외의 다른 세포에는 반응하지 않고, 강한 세포 독성 분자인 GZMB를 분비하여 종양을 직접적으로 공격할 수 있다. 이러한, CXCR5+CD20+B세포, CD4+T세포, CXCL13+CD4+T세포, CD8+T세포, CD103+CD8+T세포 및 GZMB+CD103+CD8+T세포는, 종양 내에 침윤되어 면역 효과 즉, 면역 세포의 지속성 및 공격성을 향상시킬 수 있는 3 차 림프절 구조(tertiary lymphoid structures, TLS)를 형성할 수 있다. 이러한, TLS의 형성은, 면역 항암 요법 즉, 종양 미세 환경에 의하여 면역 세포의 세포 독성 효과를 억제시킬 수 있는 면역 관문 억제제에 대한 반응성을 향상시킬 수 있다.
- [0061] 그러나, EGFR 돌연변이는 이러한 TLS의 형성 및 이의 구성 요소인 면역 세포들의 발현을 저해할 수 있다. 이에, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 효과가 감소될 수 있다.
- [0062] 나아가, EGFR 돌연변이를 포함하지 않더라도, 전술한 바와 같이, TLS의 형성 및 이의 구성 요소인 면역 세포들의 발현을 저하되어 있는 경우에도, 면역 항암 요법에 대한 효과가 감소될 수 있다.
- [0063] 이에, TLS의 형성 및 이의 구성 요소인 면역 세포들인 CXCR5+CD20+B세포, CD4+T세포, CXCL13+CD4+T세포, CD8+T세포, CD103+CD8+T세포 및 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준을 측정하여, 면역 항암 요법에 대한 반응성을 예측할 수 있다. 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에서, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 가장 효과적으로 예측할 수 있는 면역 세포는, 바람직하게, GZMB+CD103+CD8+T세포(T<sub>RM</sub>-like cells)일 수 있다.
- [0064] 이때, GZMB+CD103+CD8+T세포는 ID2, IFNG, CD7, TNFRSF4, CCR7, IL7R, CXCR4, CXCR6, PRF1, GZMA, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, PDCD1, CTAL4, TIGIT, HAVCR2, LAG3, ICOS, TOX 및 TCF7 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현할 수 있으며, 이들 중 특정 마커를 차별적으로 발현할 수 있다. 예를 들어, GZMB+CD103+CD8+T세포는 GZMB, ITGAE(CD103) 및 GNLY의 발현량이 차별적으로 증가되어 있을 수 있다.
- [0065] 또한, CD4+T세포 및 CXCL13+CD4+T세포는, CD2, CD6, CD82, TNFRSF4, TNFRSF9, ICOS, CD27, CD28, TIGIT, PDCD1, CTLA4, CCR6, IL7R, SELL, CD52, ANXA1, ANXA2, CXCR4, FOXP3, IL3RA, IL2RB, IL3RG, IL10RA, MAGEH1, LAYN 및 GATA3 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현할 수 있으며, CXCL13+CD4+T세포는, PDCD1, MAF 및 SH2D1A 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 더 발현할 수 있

다.

- [0066] 나아가, CXCR5+CD20+B세포는 HLA-DPB1, HLA-DRB5, HLA-DQA2 및 HLA-C 및 TAP1 중 적어도 하나의 항원 표시 인자 (antigen presentation molecule) 를 발현할 수 있으며, TAP1 마커 유전자를 발현할 수 있다.
- [0067] 더 나아가, 면역 세포는, NK 세포(Natural killer cells) 또는 NKT세포(Natural Killer T cells)를 더 포함할 수 있다.
- [0068] 더 나아가, 개체는, 폐암 의심 개체이고, EGFR 돌연변이를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 더 나아가, 생물학적 시료는, 조직, 말초 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 면역 항암 요법은, 항 PD-1 치료일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 종양 미세 환경으로부터 억제될 수 있는 다양한 리간드에 대한 면역 관문 억제제를 모두 포함할 수 있다.
- [0070] 다시 도 1을 참조하면, 측정하는 단계(S110)에서는, 정상 대조군의 시료에 대한 GZMB+CD103+CD8+T세포를 측정할 수 있으며, 나아가, GZMB+CD103+CD8+T세포뿐만 아니라 정상 대조군의 시료에 대한 CXCR5+CD20+B세포, CD4+T세포, CXCL13+CD4+T세포, CD8+T세포 및 CD103+CD8+T세포와 같은 다양한 면역세포들을 더 측정할 수 있다.
- [0071] 또한, 측정하는 단계(S110)에서는 전술한 면역 세포의 측정이 아닌, 이에 특징적으로 발현되는 분자의 전사체 등의 측정이 이용될 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에서 이용되는 CD8+T세포는 전술한 GZMB 및 CD103(ITGAE)뿐만 아니라, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, HAVCR2 및 LAG3 중 적어도 하나의 마커 유전자가 차별적으로 발현되어 있을 수 있다.
- [0072] 이에, 측정하는 단계(S110)에서는 전술한 마커 유전자가 이용될 수 있다. 즉, 측정하는 단계(S110)에서는 개체 및 정상 대조군에 대한 ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, HAVCR2 및 LAG3 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정할 수 있다.
- [0073] 또한, 측정하는 단계(S110)에서는 GZMB+CD103+CD8+T세포 수 즉, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서의 단위 면적당 GZMB+CD103+CD8+T세포의 갯수를 더 측정할 수 있다.
- [0074] 또한, 측정하는 단계(S110)에서는 GZMB+CD103+CD8+T세포의 GZMB+CD103+CD8+T세포로의 전환 확률(transition probability) 더 측정할 수 있다.
- [0075] 또한, 측정하는 단계(S110)에서는 CXCR5+CD20+B세포의 수준을 측정하는 경우, 정상 대조군의 시료에 대한 CXCR5+CD20+B세포의 수준을 더 측정할 수 있으며, 이때, CXCR5+CD20+B세포는 HLA-DPB1, HLA-DRB5, HLA-DQA2 및 HLA-C 중 적어도 하나의 항원 표시 인자 (antigen presentation molecule) 와 TAP1 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 측정할 수 있으며, 이러한 항원은 정상 대조군에 대한 CXCR5+CD20+B세포의 항원 표시 인자 및 전술한 마커 유전자의 발현 수준보다 감소된 수준일 수 있다.
- [0076] 또한, 측정하는 단계(S110)에서는 PRF1, GZMB, TNFRSF18, IL2RB, CD7, CD44, TYROBP 및 TNFRSF1B 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현하는 NKT세포(Natural Killer T cells) 및 정상 대조군의 시료에 대한 NKT세포를 더 측정할 수 있으며, 이때의 NKT에서 발현되는 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질은 정상 대조군에 대한 NKT세포의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질 발현 수준보다 감소된 수준일 수 있다.
- [0077] 또한, 측정하는 단계(S110)에서는 개체 및 정상 대조군의 시료에 대한 3 차 림프절 구조 (tertiary lymphoid structures, TLS)의 면적을 더 측정할 수 있다.
- [0078] 또한, 측정하는 단계(S110)에서 GZMB+CD103+CD8+T세포를 포함하는 다양한 면역 세포의 수준은, 웨스턴 블롯 (western blot), 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역전기영동, 면역 조직화학법(immunohistochemistry, IHC), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법 (Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip) 중 적어도 하나의 방법으로 측정될 수 있으며,
- [0079] mRNA의 발현 수준은, 드롭렛 디지털 증합효소반응(Droplet digital PCR, dd-PCR), 역전사 증합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 증합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 증합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩으로 이루어진 군



에서 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정될 수 있으며,

- [0080] 단백질의 발현 수준은, 웨스턴 블롯(western blot), 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역전기영동, 면역조직화학법(immunohistochemistry, IHC), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip) 중 적어도 하나의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 면역 세포, 단백질 및 mRNA가 측정될 수 있는 다양한 방법을 모두 포함할 수 있다.
- [0081] 결정하는 단계(S120)에서는, 측정된 개체에 대한 GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준이 정상 대조군 시료에 대한 GZMB+ITGAE(CD103)+CD8+T세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우, 개체가 면역 항암 요법에 대한 반응성이 음성인 것으로 결정할 수 있다.
- [0082] 또한, 결정하는 단계(S120)에서는, 측정된 개체에 대한 CXCL13+CD4+T세포 또는 CXCR5+CD20+B세포의 수준이 정상 대조군 시료에 대한 CXCL13+CD4+T세포 또는 CXCR5+CD20+B세포의 수준보다 감소된 수준을 나타내는 경우, 개체가 면역 항암 요법에 대한 반응성이 음성인 것으로 결정할 수 있다.
- [0083] 또한, 결정하는 단계(S120)에서는 측정된 개체에 대한 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상 대조군의 수준보다 낮은 경우, 개체를 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 음성인 것으로 결정할 수 있다.
- [0084] 또한, 결정하는 단계(S120)에서는 CD4+T세포의 수준이  $750 \text{ cells/mm}^2$  이하이거나, CXCL13+CD4+T세포의 수준이  $230 \text{ cells/mm}^2$  이하이거나, CD8+T세포의 수준이  $120 \text{ cells/mm}^2$  이하이거나, CD103+CD8+T세포의 수준이  $5 \text{ cells/mm}^2$  이하이거나, 전체 CD8+T세포에 대한 CD103+CD8+T세포의 비율이 20 % 미만이거나, GZMB+CD103+CD8+T세포의 수준이  $1 \text{ cells/mm}^2$  이하이거나, 전체 CD103+CD8+T세포에 대한 GZMB+CD103+CD8+T세포의 비율이 30 % 미만이거나, 전체 CD8+T세포로의 전환 확률에 대한 상기GZMB+CD103+CD8+T세포로의 전환 확률이 41%이하인 경우, 개체가 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 음성인 것으로 결정할 수 있다.
- [0085] 또한, 결정하는 단계(S120)에서는 측정된 개체에 대한 NKT세포의 수준이 정상 대조군 시료에 대한 NKT세포의 수준보다 증가된 수준을 나타내는 경우이거나, 측정된 개체에 대한 TLS의 면적이, 정상 대조군 시료에 대한 TLS 면적의 수준보다 70 %이상 감소된 수준을 나타내는 경우 이거나, 개체에 대한 TLS의 면적이  $5 \text{ mm}^2$  미만인 경우, 개체가 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 음성인 것으로 결정할 수 있다.
- [0086] 이상의 절차에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법은 다양한 마커의 수준을 측정함으로써 개체에 대한 면역 항암 요법 특히, 항 PD-1 치료에 대한 치료 반응을 조기에 예측할 수 있도록 정보를 제공할 수 있다. 이때, GZMB+CD103+CD8+T세포( $T_{RM}$ -like cells)의 항 PD-1 치료에 대한 예측력은 AUC 0.854일 수 있다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법은 GZMB+CD103+CD8+T세포( $T_{RM}$ -like cells)를 통하여 높은 예측력으로 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 결정하여 제공할 수 있다.
- [0087] 한편, 본 발명은 전술한 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 기초하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암 개체의 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측용 키트를 제공할 수 있다.
- [0088] 이때, 본 발명의 일 실시예에 따른, 폐암 개체의 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측용 키트는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, GZMB+CD103+CD8+T세포( $T_{RM}$ -like cells)의 수준을 측정하도록 구성된 제제를 포함할 수 있다.
- [0089] **본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법의 GZMB+CD103+CD8+T세포 차이 확인 및 이에 따른 항 PD-1 치료 반응 예측**
- [0090] 이하에서는, 도 3a 내지 4b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에서 이용되는 GZMB+CD103+CD8+T세포에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0091] 먼저, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에서 이용되는 CD8 T세포의 아형에 대한 특성을 확인하기 위하여, DEGs(Differentially Expressed Genes) 분석을 수행되었다. 이에, 도 3a를 참조하면, CD8 T세포의 아형에 대한 DEGs 분석 결과 즉, mRNA 및 이의 단백질의 발현량을 도시한 도트

플롯(Dot plot)이 도시된다.

- [0092] CD8 T세포의 아형인 C2는 가장 높은 수준으로 세포 독성(cytotoxicity)에 관여하는 유전자인 PRF1, GZMA, GZMB, GNLY 및 GZMH를 발현하고 있으며, 나아가, CD8 T세포의 분화(differentiation)에 관여하는 유전자인 ITGAE, ID2, IFNG, CD7 및 CXCR6 또한, C2 아형에서 가장 많이 발현되어 있는 것으로 나타난다. 이때, ITGAE는 조직 상주 기억 T세포 (tissue-resident memory CD8+T,  $T_{RM}$ )에 대한 마커임에 따라, 이를 발현하는 C2 세포는 높은 세포 독성을 가지며, CD8 T세포로의 분화를 촉진시킬 수 있는  $T_{RM}$  세포의 아형( $T_{RM}$ -like cells)일 수 있다.
- [0093] 결국, CD8 T세포의 아형인 C2는 3a에 도시된 바와 같이, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMH, ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PDCD1, HAVCR2 및 LAG3을 차별적으로 발현할 수 있다. 이에, 도 3b를 참조하면, 전술한 CD8 T세포의 아형인 C2의 시그니처 유전자 마커에 대한 발현양 결과가 도시된다. 이때, 발현양은 CD8 T세포의 아형인 C0, C11 및 C14와의 비교를 통하여 도출되었으며, 이에 대한 발현양의 비율인 FC(fold change) 값을 나타내었다.
- [0094] 보다 구체적으로, CD8 T세포의 아형인 C2는 GZMB가 1.2 이상, CD7이 0.9 이상, ID2가 0.5이상 및 ITGAE가 0.4 이상인 양(+)의 FC 값을 갖는 것으로 나타남에 따라, 이들이 3a에서와 마찬가지로 발현이 증가된(up-regulation) 유전자임을 의미할 수 있다. 나아가, CD8 T세포의 아형인 C2는 GZMK가 -1.4 미만인 음(-)의 FC 값을 갖는 것으로 나타남에 따라, GZMK가 3a에서와 마찬가지로 발현이 감소된(down-regulation) 유전자임을 의미할 수 있다.
- [0095] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에서 이용되는 CD8 T세포의 아형인 C2는 다른 CD8 T세포와 차별화된 유전자 발현 양상을 나타내며, 이에 따라 구별될 수 있다. 더욱이, CD8 T세포의 아형인 C2는 다른 CD8 T세포와 상이한 유전자 발현 양상을 나타남에 따라, 이에 따른 특성도 분명하게 구별될 수 있다.
- [0096] 결국, 이러한 차별적인 유전자 발현 양상 및 이에 따른 특성에 의하여 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에서 이용되는 CD8 T세포의 아형인 C2는 개체에 대한 면역 항암 요법의 반응성에 영향을 미칠 수 있다. 이에, 도 3c를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 CD8 세포에 대한 UMAP 및 모자이크 플롯 결과가 도시된다. 이때, EGFR 돌연변이는 면역 항암 요법의 반응성이 낮은 대표적인 예시적 요인으로서, EGFR 돌연변이에 의하여 차별적인 요인을 분석할 경우, 낮은 면역 항암 요법 즉, 약물 반응성에 대한 원인을 유추할 수 있다. 이에, 면역 항암 요법의 반응성에 대한 예측 또는 치료 전략을 위하여, 예시적으로 EGFR 돌연변이의 유무를 비교하여, 이들의 차별적 구성을 도출하였다.
- [0097] 보다 구체적으로, EGFR 돌연변이 유무에 따라, 통계적으로 유의한 값을 나타내는 CD8 T세포의 아형은 C2인 것으로 나타나며, C2의 피어슨 잔차의 값은 -6.44인 것으로 나타난다. 즉, EGFR 돌연변이를 포함하는 경우, CD8 T세포의 아형인 C2 세포가 감소되어 있는 것으로 나타난다. 더욱이, 이러한 CD8 T세포의 아형인 C2 세포는 EGFR 돌연변이를 포함 개체에서 통계적으로 차별적인 발현은 타남에 따라, 면역 항암 요법의 반응성을 낮출수 있는 원인임을 의미할 수 있다.
- [0098] 결국, 도 3a 내지 3c의 결과에 따라, 낮은 면역 항암 요법의 반응성의 요인인 CD8 T세포의 아형인 C2는 ID2, IFNG, CD7, TNFRSF4, CCR7, IL7R, CXCR4, CXCR6, PRF1, GZMA, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, PDCD1, CTAL4, TIGIT, HAVCR2, LAG3, ICOS, TOX 및 TCF7 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현할 수 있으며, 바람직하게, CD8 T세포의 아형인 C2는 PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMH, ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PDCD1, HAVCR2 및 LAG3의 발현이 차별적으로 증가된 세포를 의미할 수 있다. 이에, CD8 T세포의 아형인 C2는 전술한 유전자 마커에 의하여, 분별될 수 있으며, 분별된 CD8 T세포의 아형인 C2를 통하여, 개체에 대한 면역 항암 요법의 반응성을 예측할 수 있다.
- [0099] 한편,  $T_{RM}$  세포는 순환하지 않고 말초 조직에 존재하는 활성화된 기억 T세포(effector memory T cells)의 하위 집단으로, 강한 세포독성에 관련된 분자인 PRF1(perforin), GZMB(granzyme B) 및 IFNG(IFN-gamma)을 발현 및 생산할 수 있다. 이에, 도 3d를 참조하면, CD8 T세포의 아형( $T_{RM}$ -like cells)에서  $T_{RM}$  세포와 관련된 마커에 대한 발현 결과가 도시된다.
- [0100] 세포 독성에 관련된 유전자인 PRF1, GZMA 및 GZMB은, CD8 T세포의 아형인 C2에서 가장 많이 발현되어 있는 것으로 나타나며, 면역에 대한 효과를 나타낼 수 있는 활성화(effector)에 관련된 유전자인 ID2 및 IFNG 또한, CD8

T세포의 아형인 C2에서 가장 많이 발현되어 있는 것으로 나타난다. 이에, CD8 T세포의 아형인 C2는 종양에서 세포 독성을 갖는 용해성 림프구(cytolytic lymphocyte)인 것을 의미할 수 있다. 나아가, 나이브(naïve) 및 기억(memory)에 관련된 유전자인 CCR7 및 IL7R은 C14에서 가장 많이 발현되어 있음에 따라, C14는 나이브 T세포의 아형인 것을 의미할 수 있으며, C0 및 C11은 세포 독성에 관련된 유전자의 발현이 적으며, 활성화에 관련된 유전자가 발현되어 있음에 따라, 낮은 세포 독성을 갖는 활성화된 T세포의 아형임을 의미할 수 있다.

[0101] 한편, 도 3e를 참조하면, CD8 T세포의 아형에서  $T_{RM}$  세포에 특이적인 표면 마커인 ITGAE(CD103) 및 종양 특이적 반응에 관련된 마커인 ENTPD1에 대한 발현 결과가 도시된다. CD8 T세포의 아형인 C2는  $T_{RM}$  세포에 특이적인 표면 마커인 ITGAE(CD103)와 종양 특이적 반응에 관련된 마커인 ENTPD1이 가장 많이 발현되어 있는 것으로 나타나며, 이에 따라, CD8 T세포의 아형인 C2는 무차별적 면역 반응 활성화는 방관자 T세포(bystander T cells)가 아닌, 종양 특이적 반응성을 나타내는  $T_{RM}$  유사(아형, tumor-reactive  $T_{RM}$ -like cells) 세포이다.

[0102] 이에, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체는 전술한 바와 같이 세포 독성을 가지는 C2의 아형이 감소되어 있음에 따라, 종양에 대한 독성 즉, 항암 효과가 감소되어 있으며, 이에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 감소될 수 있다.

[0103] 즉, ITGAE, ID2, IFNG, CD7, TNFRSF4, CCR7, IL7R, CXCR4, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, PDCD1, CTAL4, TIGIT, HAVCR2, LAG3, ICOS, TOX 및 TCF7 중 적어도 하나, 바람직하게는, ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, HAVCR2 및 LAG3의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현하는 CD8 T세포의 수가 정상 대조군 또는 EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체보다 감소된 수준을 나타내는 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).

[0104] 더욱이, ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMK, GZMH, GZMM, HAVCR2 및 LAG3의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상 대조군 또는 EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체보다 감소된 수준을 나타내는 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체). 특히, ITGAE 및/또는 GZMA의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상 대조군 또는 EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체보다 감소된 수준을 나타내는 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다.

[0105] 나아가, 도 3f를 참조하면, CD8 T세포의 아형에서 EGFR 유전자 돌연변이 유무에 따른 세포 독성(cytotoxicity) 및 활성화(activation)에 관여하는 유전자에 대한 발현 결과가 도시된다. 세포 독성에 관여하는 유전자인 GZMB 및 활성화에 관여하는 유전자인 CD7, CD27 및 CXCR6 모두 EGFR 유전자 돌연변이를 포함하지 않는 개체(EGFR-WT)의 CD8 T세포의 아형인 C2에서 가장 많이 발현되는 것으로 나타난다. 이에, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체는 종양을 직접적으로 공격하여 항암 효과를 발휘할 수 있는  $T_{RM}$  유사 세포( $T_{RM}$ -like cells)인 C2의 활성화 및 분포를 감소시킬 수 있으며, EGFR 돌연변이로 인하여  $T_{RM}$  유사 세포( $T_{RM}$ -like cells)인 C2가 감소됨에 따라, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 감소될 수 있다.

[0106] 더 나아가, 도 3g를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 종양 조직에서의 CD8+T세포, CD8+CD103+T세포 및 CD8+CD103+GZMB+T세포에 대한 면역조직화학법 결과가 도시된다. 먼저, 도 3g의 (a)를 참조하면, EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체의 종양 조직에서 CD8+T세포, CD8+CD103+T세포 및 CD8+CD103+GZMB+T세포가 더 많은 면적을 차지하며, 더 많은 수를 가지고 분포되어 있는 것으로 나타난다.

[0107] 이에, 단위 면적당 각 세포수를 계수한 결과인 도 3g의 (b)를 참조하면, EGFR-WT에 대한 종양 조직에서의 CD8+T세포의 개수는 약  $200 \text{ no/mm}^2$  이상인 것으로 나타나며, EGFR-MT에 대한 종양 조직에서의 CD8+T세포의 개수는 약  $120 \text{ no/mm}^2$  이하인 것으로 나타난다.

[0108] 또한, EGFR-WT에 대한 종양 조직에서의 CD8+CD103+T세포의 개수는 약  $37 \text{ no/mm}^2$  이상인 것으로 나타나며, EGFR-MT에 대한 종양 조직에서의 CD8+CD103+T세포의 개수는 약  $5 \text{ no/mm}^2$  이하인 것으로 나타난다.

[0109] 또한, EGFR-WT에 대한 종양 조직에서의 CD8+CD103+GZMB+T세포의 개수는 약  $1.5 \text{ no/mm}^2$  이상인 것으로 나타나며, EGFR-MT에 대한 종양 조직에서의 CD8+CD103+GZMB+T세포의 개수는 약  $1 \text{ no/mm}^2$  이하인 것으로 나타난다.

- [0110] 더 나아가, 보다 정확한 측정을 위하여 유세포 분석을 수행하였다. 이에, 도 3h를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 종양 조직에서의 CD8+T세포, CD8+CD103+T세포 및 CD8+CD103+GZMB+T세포에 대한 유세포 분석(Fluorescence-activated cell sorting, FACS) 결과가 도시된다. 이때, t-SNE를 이용하여 데이터의 차원을 줄여 시각화하였으며, 각 세포의 관측된 값은, 평균값과의 거리를 표현해주는 z-score로 표현되었다.
- [0111] 원안의 영역에서(area within the solid circle) EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체(EGFR-WT)의 CD8, CD103 및 GZMB는 융합(merged) 이미지와 유사하게 높은 발현량을 갖는 것으로 나타난다. 즉, 전술한 세포 독성에 관여하는 마커를 발현하는 세포가 EGFR-WT에서는 고도로 농축되어 있으며, 이와 대조적으로, EGFR 돌연변이를 포함한 경우, 전술한 마커를 발현하는 세포가 결핍되어 있는 것으로 나타난다. 즉, EGFR 돌연변이로 인하여, 세포 독성을 갖는 세포가 감소될 수 있다.
- [0112] 보다 구체적으로, 도 3i의 (a)를 참조하면, EGFR-WT의 경우, 전체 CD8+ T세포에 대하여 CD103을 발현하는 CD8+CD103+T세포의 비율은 약 57 %인 것으로 나타나며, EGFR-MT의 경우, 약 30 %인 것으로 나타나며, EGFR-MT에서 CD8+CD103+T세포가 유의하게 감소되어 있는 것으로 나타난다( $p<0.05$ ). 나아가, 도 7h의 (b)를 참조하면, 전술한 7h의 (a)에 대한 CD8+CD103+T세포 내에서 GZMB를 발현하는 CD8+CD103+GZMB+T세포의 비율은 EGFR-WT의 경우, 약 67 %인 것으로 나타나며, EGFR-MT의 경우, 약 30 %인 것으로 나타나며, EGFR-MT에서 CD8+CD103+ GZMB+T세포가 유의하게 감소되어 있는 것으로 나타난다( $p<0.05$ ).
- [0113] 결국, EGFR 돌연변이와 같은 다양한 원인으로 인하여, CD8 T세포에서 세포 독성을 발휘할 수 있는 CD103 및 GZMB에 대한 발현이 억제되어 있는 경우, 이를 발현하는 CD8 T세포의 종양 내 분포 및 개수가 감소될 수 있으며, 이에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 감소될 수 있다.
- [0114] 따라서, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체는 종양 특이적이며, 종양에 직접적으로 세포 독성 효과를 나타낼 수 있는 CD8+T세포 바람직하게는, CD8+CD103+T세포 및 CD8+CD103+GZMB+T세포를 포함하는,  $T_{RM}$  유사 세포인 CD8 T세포의 아형인 C2가 감소되어 있음에 따라, 종양에 대한 저항성 및 독성 즉, 항암 효과가 감소되어 있으며, 이에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 감소될 수 있다.
- [0115] 이에, 종양 조직 및 일반 조직에 대한 CD8+T세포의 수준이  $120 \text{ no/mm}^2$  이하인 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).
- [0116] 또한, 종양 조직 및 일반 조직에 대한 CD8+CD103+T세포의 수준이  $5 \text{ no/mm}^2$  이하인 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).
- [0117] 또한, 종양 조직 및 일반 조직에 대한 CD8+CD103+GZMB+T세포의 수준이  $1 \text{ no/mm}^2$  이하인 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).
- [0118] 이상의 결과에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법은 PRF1, GZMA, GZMB, GNLY, GZMH, ITGAE, ID2, IFNG, CD7, CXCR6, PDCD1, HAVCR2 및 LAG3의 발현이 차별적으로 발현하는 CD8 T세포의 아형인 C2를 통하여, 개체에 대한 면역 항암 요법의 반응성을 정확하게 예측할 수 있다.
- [0119] 이에, 이하에서는, 도 4a 및 4b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법을 통한 항 PD-1 치료 반응 예측에 대하여 설명하도록 한다.
- [0120] 먼저, 면역 항암 요법은 종양의 면역 회피 및 억제의 기능을 저해하여, 세포 독성을 갖는 면역 세포의 활성을 향상시켜 항암 효과를 발휘함에 있다. 그러나, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체의 경우, 이러한 세포 독성을 갖는 면역 세포의 개수가 감소되어 있음에 따라, 이의 효과를 향상시킬 수 있는 면역 억제제 즉, 면역 항암 요법의 치료 반응성이 낮을 수 있다. 그러나, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체에서도 이러한 면역 세포가 향상되어 있을 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 긍정적일 수 있다.
- [0121] 따라서, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체에서 특이적인 빈도를 갖는 면역세포 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른, 다양한 면역 세포의 아형의 수준에 따라, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 예측될 수 있다.
- [0122] 이에, 본 발명의 CD8 T세포의 아형인 C2( $T_{RM}$ -like cells)를 TCGA (The Cancer Genome Atlas)의 비소세포성폐암(lung adenocarcinoma, LUAD) 및 편평세포암(lung squamous cell carcinoma, LUSC)에서 EGFR 돌연변이 유무에 따라 검증한 결과인 도 4a를 참조하면, CD8 T세포의 아형인 C2( $T_{RM}$ -like cells)가 EGFR-MT에서 감소되어 있는



것으로 나타나며, 본 발명의 결과와 일치하는 것으로 나타난다. 즉, CD8 T세포의 아형인 C2(T<sub>RM</sub>-like cells)가 EGFR 돌연변이를 포함하는 폐암 및 이를 포함하지 않는 다양한 폐암에 있어, 공통적으로 모두 적용될 수 있는 적절한 평가 항목임을 의미할 수 있다.

[0123] 따라서, 도 4b에서는 EGFR 돌연변이를 포함하는 특이적인 빈도를 갖는 면역세포 중 하나인 세포 독성을 나타내는 CD8 T세포의 아형인 C2(T<sub>RM</sub>-like cells)를 통하여 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하도록 한다.

[0124] 도 4b를 참조하면, CD8 T세포의 아형인 C2(T<sub>RM</sub>-like cells)에 대한 면역 항암 요법 즉, 항 PD-1 반응에 대한 각각의 코호트에서의 검증 결과가 도시된다.

[0125] 먼저, 도 4b의 (a)를 참조하면, 중앙 침윤성 CD8 T세포의 아형인 C2(T<sub>RM</sub>-like cells)과 항 PD-1 치료 반응 간의 양의 상관 관계를 갖는 것으로 나타난다.

[0126] 나아가, 도 4b의 (b)를 참조하면, 전술한 도 4b의 (a)에서 가장 높은 점수를 나타낸 환자에 대한 민감도 및 특이도에 대한 AUC 곡선이 도시된다.

[0127] YCC 코호트의 AUC는 0.854으로 높은 민감도 및 특이도를 가지는 것으로 나타남에 따라, 중앙 침윤성 CD8 T세포의 아형인 C2(T<sub>RM</sub>-like cells)에 따른 항 PD-1 치료에 대한 반응 예측력이 우수함을 의미할 수 있다. 한편, YCC의 코호트에서는 18명의 환자 중 EGFR-MT 개체가 2명이었으며, 그 중 1명만이 반응자였다. 이에, CD8 T세포의 아형인 C2(T<sub>RM</sub>-like cells) 항 PD-1 치료에 대한 반응 예측력은 EGFR 돌연변이를 포함하는 개체뿐만 아니라 항 PD-1 치료 위한 다양한 폐암 개체에서도 적용될 수 있다. 즉, CD8 T세포의 아형인 C2(T<sub>RM</sub>-like cells)는 다양한 폐암 개체에서 항 PD-1 치료에 대한 치료 반응을 예측할 수 있는 바이오 마커로 이용될 수 있다.

[0128] **EGFR 돌연변이에 따른 면역 세포 분포 차이 확인**

[0129] 이하에서는 도 5a 내지 5d를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 이용되는 다양한 면역 세포에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0130] 도 5a를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 면역 세포 확인 과정이 도시된다. 먼저, 면역 항암 요법에 대한 반응성을 예측하기 위하여, 면역 항암 요법에 대한 반응성을 낮출 수 있는 대표적인 원인인 EGFR 돌연변이를 예시적으로 선정하여 비교하였다.

[0131] EGFR 돌연변이에 따른 특이적인 면역 세포 분포 차이 확인을 위하여, EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 비소세포성 폐암 개체(EGFR-WT) 및 EGFR 돌연변이를 포함하는 비소세포성 폐암 개체(EGFR-MT)의 중앙 조직(tumor tissue)을 외과적으로 절제하여 수집한 뒤, 백혈구 공통 항원인 CD45에 중앙에 침윤된 백혈구(tumor-infiltrating CD45+leukocytes)를 선별(sorting)한 뒤, 10X Genomics 기술을 사용하여 단일 세포 RNA 시퀀싱(Single cell RNA sequencing, scRNA-seq)을 수행하였다.

[0132] 이에, 도 5b를 참조하면, 전술한 과정에 의하여 도출된 EGFR 돌연변이 유무에 따른 면역 세포 결과가 도시된다. 이때, EGFR 돌연변이 유무에 따른 면역 세포 결과는 Seurat v.3.0 package16를 사용하여 전술한 과정에 의하 도출된 scRNA-seq 결과를 전처리한 뒤, UMAP를 통하여 차원을 축소시켜 시각화하였다. 나아가, 각각의 세포는 세포 내에 발현되어 있는 바이오마커(biomarker) 따라 C0 내지 C17의 아형(subtype)으로 구별 및 분류되었다. 나아가, T세포의 경우, CD3D, CD3E, CD3G, 및 CD28 이며, CD4+T세포의 경우, CD4, CD8+세포의 경우, CD8A 및 CD8B, Treg 세포의 경우, FOXP3 및 IL2RA, NK 및 NKT세포의 경우, FCGR3A, FCGR3B, NCAM1, KLRB1, KLRC1, KLRD1, KLRF1, 및 KLRK1, 대식세포 및 단핵구의 경우, CD14, CD68, CD163, 및 C8F1R, B세포의 경우, CD19, MS4A1, CD79A, CD79B, 및 BLNK, 수지상 세포의 경우, IL3RA, CLEC4C, 및 NRP1, ILC2 세포의 경우, KIT 및 IL1RL1의 바이오 마커의 발현을 통하여, 면역 세포 및 이의 아형을 구별 및 분류하였다.

[0133] EGFR-MT 그룹과 EGFR-WT 그룹 간의 면역 세포가 차별적으로 분포되어 있는 것으로 나타나며, 각각의 면역 세포의 종류에 따른 아형의 구성의 분포 또한 상이한 것으로 나타난다.

[0134] 보다 구체적으로, Treg 세포는 C4, NK 세포는 C13, B 세포는 C8, 단핵구(monocytes) 및 대식세포(macrophage)는 C15, 수지상 세포(dendritic cells)는 C16, 및 IL-2 세포는 C17인 것으로 나타나며, 각각의 면역 세포의 개수는 EGFR 돌연변이 유무에 따라 차이가 있는 것으로 나타난다.

[0135] 또한, CD8 T세포의 경우, C0, C2, C11 및 C14의 아형을 포함하고 있는 것으로 나타나며, CD4 T세포의 경우, C1,

C3, C5, C6 및 C9의 아형을 포함하고 있는 것으로 나타나며, NKT세포의 경우, C7, C10 및 C12의 아형을 포함하고 있는 것으로 나타나며, 각각의 면역 세포에 대한 아형의 개수 및 비율은 EGFR 돌연변이 유무에 따라 차이가 있는 것으로 나타난다.

[0136] 한편, 도 5c를 참조하면, 전술한 C15의 대식세포 및 단핵구, C16의 수지상 세포 및 C17의 IL-2 세포는 대부분 6번 개체(P6)로부터 파생된 것으로 나타난다. 즉, C15, C16 및 C17의 면역 세포는 특정 환자로부터 파생된 편향 데이터임에 따라, 이를 제외하였다.

[0137] 이에, 도 5d를 참조하면, 전술한 편향 데이터가 제외되어 도출된 모자이크 플롯(mosaic plot) 결과가 도시된다. 이때, 하기의 수학적 식 1의 피어슨 잔차(Pearson residual,  $r_{ij}$ )를 통하여, EGFR 돌연변이 유무에 따라, 각 면역 세포들의 비례 변화가 평가되었으며,  $r > 3.5$  (augmentation) 및  $r < -3.5$  (depletion) 값의 임계치(threshold)를 갖는 집단에 대해서만 평가되었다 ( $|\text{Pearson residual}| > 2$  for  $p\text{-value} < 0.05$ ,  $|\text{Pearson residual}| > 4$  for  $p\text{-value} < 0.01$ ).

### 수학적 식 1

$$\text{Pearson residual } (r_{ij}) = \frac{O_{ij} - E_{ij}}{\sqrt{E_{ij}}}$$

[0138]

[0139] 수학적 식의 i는 각 면역세포의 인덱스(indices for each group), j는 아형(indices for cell subsets), O는 관찰된 세포 개수(observed cell counts) 및 E는 기대 세포 개수(expected cell counts)를 의미한다.

[0140] 또한, 모자이크 플롯의 면적은 세포의 빈도수에 비례적이며, 관찰된 세포 개수와 기대 세포 개수에 대한 편차에 대한 결과는 파랑, 빨강 및 회색으로 표시하였으며, 각각 파랑은 증가(augmentation), 빨강은 감소(고갈, depletion) 및 회색은 통계적 변화 없음(no significant change) 의미할 수 있다.

[0141] 먼저, CD8 T세포의 경우, C2의 아형이 EGFR 돌연변이 유무에 따라 편향된 세포 수를 갖는 것으로 나타나며, EGFR 돌연변이 개체 집단에서 C2의 아형이 고갈되어 있는 것으로 나타난다.

[0142] 그 다음, CD4 T세포의 경우, C1, C3 및 C9의 아형이 EGFR 돌연변이 유무에 따라 편향된 세포 수를 갖는 것으로 나타나며, EGFR 돌연변이 개체 집단에서 C1 및 C3의 아형이 증가되어 있으며, C9의 아형이 고갈되어 있는 것으로 나타난다.

[0143] 그 다음, Treg 세포(C4)은 EGFR 돌연변이 개체 집단에서 고갈되어 있는 것으로 나타난다.

[0144] 그 다음, NKT세포의 경우, C7 및 C10의 아형이 EGFR 돌연변이 유무에 따라 편향된 세포 수를 갖는 것으로 나타나며, EGFR 돌연변이 개체 집단에서 C7 및 C10의 아형이 모두 증가되어 있는 것으로 나타난다.

[0145] 마지막으로, B 세포(C8)은 EGFR 돌연변이 개체 집단에서 고갈되어 있는 것으로 나타난다.

[0146] 결국, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체(EGFR-MT)는 돌연변이를 포함하지 않는 개체(EGFR-WT)와 상이한 면역 세포의 분포 및 비율을 가짐에 따라, 면역 항암 요법에 대한 반응성 및 이에 대한 효과가 상이할 수 있으며, 이를 통하여 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측할 수 있다.

[0147] 나아가, EGFR-MT에서 감소되어 있거나 증가되어 있는 특정 면역 세포의 조절을 통하여, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 향상시킬 수 있다.

### [0148] EGFR 돌연변이에 따른 NKT 및 B세포의 아형에 대한 차이 확인

[0149] 이하에서는 도 6a 내지 7을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 이용되는 NKT 및 B 세포에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0150] 먼저, 도 6a를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 NK 및 NKT세포에 대한 UMAP 및 모자이크 플롯 결과가 도시된다.

[0151] 도 5d에서 전술한 바와 같이, 통계적으로 유의한 값을 나타내는 NKT세포의 아형은 C7 및 C10인 것으로 나타나며, 각각에 대한 피어슨 잔차의 값은 6.35 및 10.57인 것으로 나타난다. 즉, EGFR 돌연변이를 포함한 경

우, NKT세포의 아형인 C7 및 C10 가 증가되어 있는 것으로 나타난다.

- [0152] 이때, NK 및 NKT세포의 아형에 대한 특성을 확인하기 위하여 DEGs(Differentially Expressed Genes) 분석을 수행하였다. 이에, 도 6b를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 NK 및 NKT세포의 아형에 대한 DEGs 분석 결과가 도시된다.
- [0153] 보다 구체적으로, 세포독성(cytotoxicity)에 관여하는 유전자인 PFR1 및 GZMB은 NKT세포의 C10 아형에서 발현이 감소되어 있는 것으로 나타나며, 세포활성(activation)에 관여하는 유전자인 TNFRSF18, IL2RB, CD7, CD44, TYROBP 및 TNFRSF1B은 NKT세포의 C7 및 C10 아형에서 발현이 모두 감소되어 있는 것으로 나타난다.
- [0154] 즉, NKT세포의 아형인 C7는 세포활성이 감소(activation-L)되어 있는 세포이며, C7는 세포활성 및 세포독성이 감소(cytotoxicity-L, activation-L)되어 있는 세포이다.
- [0155] 결국, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체는 전술한 바와 같이 세포활성 및 세포독성이 감소되어 있는 아형을 다수 포함함에 따라, 종양에 대한 저항성 및 독성 즉, 항암 효과가 감소되어 있으며, 이에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 감소될 수 있다.
- [0156] 이에, PRF1, GZMB, TNFRSF18, IL2RB, CD7, CD44, TYROBP 및 TNFRSF1B 중 적어도 하나의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현하는 NKT세포의 수가 정상 대조군 또는 EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체(EGFR-WT)보다 증가된 수준을 나타내는 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).
- [0157] 그 다음, 도 7을 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 B세포에 대한 UMAP 및 모자이크 플롯 결과 및 구조적 적합 유전자 복합체(major histocompatibility complex, MHC)에 대한 발견 결과가 도시된다. 이때, B세포는 CD20 항원의 발현을 통하여 다른 면역 세포들과 구별될 수 있다.
- [0158] B세포(C8)의 피어슨 잔차의 값은 -6.23인 것으로 나타난다. 즉, EGFR 돌연변이를 포함한 경우, 종양 침윤 B세포가 감소되어 있는 것으로 나타난다.
- [0159] 나아가, MHC에 대한 HLA-DPB1, HLA-DRB5, HLA-DQA2, HLA-C 및 TAP1의 유전자 발현은 EGFR 유전자를 포함하는 개체에서 모두 감소되어 있는 것으로 나타난다. 이때, MHC 발현이 결핍되거나 감소된 경우, 외부 항원에 대한 개체의 면역 반응이 약화될 수 있다. 이에, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체는 전술한 바와 같이 B세포의 외부 항원 제시에 대한 MHC 발현이 감소되어 있음에 따라, B세포에 의한 T세포(CD4+T세포 및 CD8+T세포) 활성화가 감소될 수 있으며, 이에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응이 감소될 수 있다.
- [0160] 즉, EGFR 돌연변이에 의하여 B세포의 항원 제시로 활성화된 T세포 수가 감소되어 있음에, 면역 관문 억제제를 통한 면역 항암 요법에 따른 T세포의 사이토카인 분비 즉, 세포 독성 효과가 감소될 수 있다.
- [0161] 결국, CD20+B세포의 수가 정상 대조군 또는 EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체(EGFR-WT)보다 감소된 수준을 나타내는 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).
- [0162] **EGFR 돌연변이에 따른 CD4 및 Treg 세포의 아형에 대한 차이 확인**
- [0163] 이하에서는 도 8a 내지 8e를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 이용되는 CD4 및 Treg 세포에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0164] 먼저, 도 8a를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 CD4 및 Treg 세포에 대한 UMAP 및 모자이크 플롯 결과가 도시된다.
- [0165] 통계적으로 유의한 값을 나타내는 CD4 T세포의 아형은 C1, C3 및 C9인 것으로 나타나며, 각각에 대한 피어슨 잔차의 값은 8.48, 7.66 및 -7.37인 것으로 나타나며, Treg 세포(C4)의 피어슨 잔차의 값은 -7.07인 것으로 나타난다. 즉, EGFR 돌연변이를 포함한 경우, CD4 T세포의 아형인 C1 및 C3는 증가되어 있는 것으로 나타나며, CD4 T세포의 아형인 C9 및 Treg 세포는 감소되어 있는 것으로 나타난다.
- [0166] 이때, CD4 T세포의 아형 및 Treg 세포에 대한 특성을 확인하기 위하여 DEGs(Differentially Expressed Genes) 분석을 수행하였다. 이에, 도 8b를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 CD4 T세포의 아형 및 Treg 세포에 대한 DEGs 분석 결과 즉, mRAN 및 이의 단백질의 발현량을 도시한 도트 플롯(Dot plot)이 도시된다.
- [0167] 보다 구체적으로, 면역 억제(immune suppression)에 관여하는 유전자인 CD52, ANXA1, ANXA2, 및 CXCR4은 C1 및 C3 아형에서 가장 많이 발현되어 있는 것으로 나타난다. 즉, 조력 T세포(helper T cell)인 CD4 T세포의 C1 및

C3는 면역억제를 억제하는 세포이다.

- [0168] 결국, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체는 전술한 바와 같이 면역반응을 억제하는 C1 및 C2의 아형을 다수 포함하고 있음에 따라, 종양에 대한 저항성 및 독성 즉, 항암 효과가 감소되어 있으며, 이에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 감소될 수 있다.
- [0169] 이에, CD2, CD6, CD82, TMFRSF4, TNFRSF9, ICOS, CD27, CD28, TIGIT, PDCD1, CTLA4, CCR6, IL7R, SELL, CD52, ANXA1, ANXA2, CXCR4, FOXP3, IL3RA, IL2RB, IL3RG, IL10RA, MAGEH1, LAYN 및 GATA3 중 적어도 하나, 바람직하게는, CD52, ANXA1, ANXA2, 및 CXCR4의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질을 발현하는 CD4 T세포의 수가 정상 대조군 또는 EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체보다 증가된 수준을 나타내는 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).
- [0170] 한편, 세포활성(activation) 및 면역관문(immune checkpoint)에 관여하는 유전자인 CD2, CD6, CD82, TMFRSF4, TNFRSF9, ICOS, CD27, CD28, TIGIT, PDCD1 및 CTLA4은 CD4 T세포의 C9 아형에서 가장 많이 발현되어 있는 것으로 나타나며, 이러한 CD4 T세포의 C9 아형은 전술한 유전자 이외의 자가 항체 생성에 필수적인 여포 보조 T세포(Follicular helper T cells, T<sub>FH</sub>)의 마커인 CXCL13, ICOS, MAF, PDCD1, 및 SH2D1A 유전자와도 관련되어 있는 것으로 나타난다.
- [0171] 여포 보조 T세포는 B세포의 발달 및 면역 활성화 등의 다양한 기능을 조절하며, IL-4, IL-21, PD-1, CD69, OX40 및 CXCL13 등의 다양한 항원을 발현하고 있으며, 이 중 PD-1은 T<sub>FH</sub> 세포의 배아 중심(germinal centers)의 위치를 조절하고, T<sub>FH</sub> 세포의 기능을 보조하는 역할을 함에 따라, 여포 보조 T세포가 감소되어 있는 경우, 항 PD-1 치료의 효과가 경감될 수 있다.
- [0172] 나아가, T<sub>FH</sub> 세포는 B세포에 대한 여포(follicles) 내로 침투(homing)를 유도하기 위하여, CXCL13을 생산한다. 즉, T<sub>FH</sub> 세포에서 분비하는 CXCL13에 의하여 3 차 림프절 구조(tertiary lymphoid structures, TLS)가 형성될 수 있다. 이때, TLS는 림프 노드가 아닌 곳에 T세포 및 B세포가 섬유성 그물망 세포(fibroblasts-like synovial cell, FRC)-유사 그물망 세포, HEV (high endothelial venules) 및 FDC (follicular dendritic cells)과 함께 구성된 면역 구조를 의미할 수 있다.
- [0173] 이에, 도 8c를 참조하면, Treg 세포 및 CD4 T세포에서의 아형에서의 T<sub>FH</sub> 세포와 관련된 마커에 대한 발현 결과 및 EGFR 돌연변이 유무에 따른 C9 아형의 CXCL13 발현 결과가 도시된다.
- [0174] 먼저, 도 8c의 (a)를 참조하면, T<sub>FH</sub> 세포의 마커 유전자인 CXCL13, PDCD1, MAF 및 SH2D1A의 발현은, CD4 T세포의 아형인 CD9에서 증가되어 있는 것으로 나타난다.
- [0175] 나아가, 도 8c의 (b)를 참조하면, CD4 T세포의 아형인 CD9에 대한 CXCL13의 발현은 EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체(EGFR-WT)에서 더 많은 것으로 나타난다. 즉, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체(EGFR-MT)에서 CXCL12의 발현이 감소되어 있는 것으로 나타남에 따라, EGFR 돌연변이는 CD4 T세포의 아형인 CD9에 대한 CXCL13의 발현을 감소시킬 수 있다.
- [0176] 한편, CD4 T세포의 아형인 CD9에서는 T<sub>FH</sub> 세포의 또 다른 특징 중 하나에 해당하는 CXCL13에 대한 수용체인 CXCR5과 T<sub>FH</sub> 세포 계통의 전사 인자(lineage-defining transcription factor)인 BCL6가 검출되지 않았다. 즉, CD4 T세포의 아형인 CD9은 일반적인 T<sub>FH</sub> 세포가 아닌 T<sub>FH</sub> 유사 세포(T<sub>FH</sub>-like cell)인 것을 의미할 수 있으며, 이는 TLS가 자주 발생하는 국부적인 염증 부위(local inflammatory sites)에서 주로 발견된다.
- [0177] 결국, T<sub>FH</sub> 세포의 주요 역할이 B세포의 유도임에 따라, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체에서의 감소된 T<sub>FH</sub> 유사 세포의 수준은 비효율적인 TLS 형성을 초래하여, TLS 발달을 감소시키고, 이에 따라 종양에 대한 면역 세포의 면역 반응을 감소시킬 수 있다.
- [0178] 이에, 도 8d를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 종양 조직에서의 CD4+T세포 및 CXCL13+CD4+T세포에 대한 면역조직화학법 결과가 도시된다.
- [0179] 먼저, 도 8d의 (a)를 참조하면, EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체(EGFR-WT)의 종양 조직에서 CD4+T세포 및 CXCL13+CD4+T세포가 더 많은 면적을 차지하는 것으로 나타난다. 이에, 단위 면적당 각 세포수를 계수한 결과인



도 8d의 (b)를 참조하면, EGFR-WT에 대한 종양 조직에서의 CD4+T세포의 개수는 약  $1300 \text{ no/mm}^2$  이상인 것으로 나타나며, EGFR-MT에 대한 종양 조직에서의 CD4+T세포의 개수는 약  $750 \text{ no/mm}^2$  이하인 것으로 나타난다.

[0180] 나아가, EGFR-WT에 대한 종양 조직에서의 CXCL13+CD4+T세포의 개수는 약  $420 \text{ no/mm}^2$  이상인 것으로 나타나며, EGFR-MT에 대한 종양 조직에서의 CXCL13+CD4+T세포의 개수는 약  $230 \text{ no/mm}^2$  이하인 것으로 나타난다.

[0181] 결국, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체는 전술한 바와 같이 B세포를 유도하고, 이에 따른 면역 반응 구조인 TLS를 형성할 수 있는 CXCL13을 생산하는 CD4 T세포인 C9 아형이 감소되어 있음에 따라, 종양에 대한 저항성 및 독성 즉, 항암 효과가 감소되어 있으며, 이에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 감소될 수 있다.

[0182] 이에, 종양 조직 및 일반 조직에 대한 CD4+T세포의 수준이  $750 \text{ no/mm}^2$  이하인 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).

[0183] 또한, 종양 조직 및 일반 조직에 대한 CXCL13+CD4+T세포의 수준이  $230 \text{ no/mm}^2$  이하인 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).

[0184] 다시, 도 8a를 참조하면, 종양 침윤(tumor-infiltration)에 관여하는 유전자인 FOXP3, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL10RA, MAGEH1, LAYN, 및 GATA3은 C4에서 가장 많이 발현되어 있는 것으로 나타남에 따라, C4는 자가면역억제 및 면역 항상성을 유지하는 Treg 세포의 아형이다.

[0185] 결국, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체는 자가면역반응을 억제하고 면역 항상성을 유지시킬 수 있는 C4의 아형이 감소되어 있음에 따라, 종양에 대한 저항성 및 독성 즉, 항암 효과가 감소되어 있으며, 이에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성 및 지속성이 감소될 수 있다.

[0186] 이에, CD2, CD6, CD82, TNFRSF4, TNFRSF9, ICOS, CD27, CD28, TIGIT, PDCD1, CTLA4, CCR6, IL7R, SELL, CD52, ANXA1, ANXA2, CXCR4, FOXP3, IL3RA, IL2RB, IL3RG, IL10RA, MAGEH1, LAYN 및 GATA3 중 적어도 하나, 바람직하게는, FOXP3, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL10RA, MAGEH1, LAYN, 및 GATA3의 마커 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질 발현을 발현하는 Treg 세포의 수가 정상 대조군 또는 EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체보다 감소된 수준을 나타내는 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).

[0187] 한편, Treg 세포는 전술한 FOXP3, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL10RA, MAGEH1, LAYN, 및 GATA3 유전자 마커 이외의 T세포 활성화에 관여하는 CD27, CD28, ICOS, and TNFRSF4 encoding OX40, TNFRSF9 encoding 41BB, 및 TNFRSF18 encoding GITR 마커 유전자 및 면역 관문 분자인 TIGIT 및 CTLA4 마커 유전자에서도 높은 발현 수준을 가질 수 있다.

[0188] 나아가, 도 8e를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 Treg 세포의 아형인 C4에서 Treg 세포 활성 촉진 인자와 관련된 유전자 발현 결과가 도시된다. Treg 세포의 아형인 C4에서 TSC22D3 및 NR4A2의 발현은, EGFR-MT에서 증가되어 있는 것으로 나타난다. 이때, TSC22D3는 GILZ 및 NR4A2를 인코딩하는 유전자이며, 특히 GILZ는 수지상 세포 및 T세포에서 면역 억제 효과를 중재하는데, 종양 미세 환경과 같은 면역 억제성 환경에서의 GILZ의 과잉은 T세포의 암 항원에 대한 내성을 유발할 수 있다.

[0189] 이에, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체는 Treg 세포의 아형인 C4에 의하여 과잉 분비된 GILZ로 인하여, T세포의 항원에 대한 내성이 유도되어, 종양에 대한 저항성 및 독성 즉, 항암 효과가 감소되어 있으며, 이에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 감소될 수 있다.

[0190] **본 발명의 일 실시예에 따른 폐암에서 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에서 사용되는 면역 세포 검증**

[0191] 이하에서는, 도 9a 내지 10d를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 EGFR 돌연변이를 포함하는 개체의 면역 항암 요법에서 사용되는 면역 세포에 대하여 항상성(homeostasis) 및 TLS를 통한 T세포의 활성화를 검증하도록 한다.

[0192] 먼저, 면역 세포의 항상성에 대한 도 9a를 참조하면, EGFR 돌연변이를 포함하는 특이적인 빈도를 갖는 면역 세포인 CD8 T세포의 아형 간의 전환 확률에 대한 결과가 도시된다.

[0193] C2에서 C2로 다시 전환될 확률은, EGFR-WT인 경우, 0.57인 것으로 나타나며, EGFR-MT인 경우, 0.41인 것으로 나

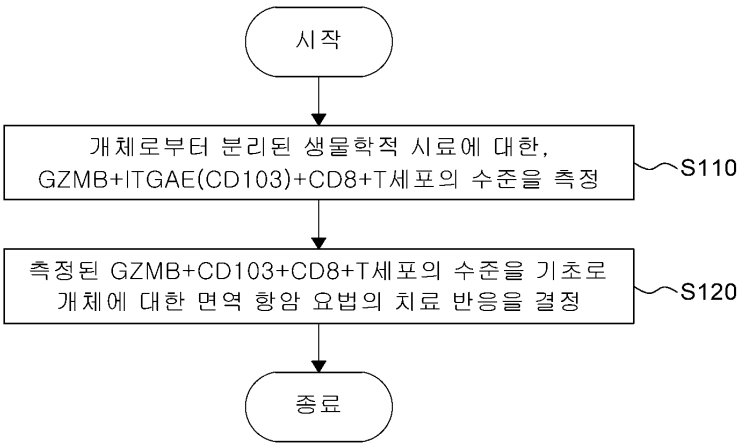
타나며, EGFR 돌연변이를 포함한 경우, C2에서 C2로 전환 확률이 더 낮은 것으로 나타난다.

- [0194] 이와는 대조적으로, C2에서 C0로 전환될 확률은, EGFR-WT인 경우, 0.39인 것으로 나타나며, EGFR-MT인 경우, 0.52인 것으로 나타나며, EGFR 돌연변이를 포함한 경우, C2에서 C0로 전환 확률이 더 높은 것으로 나타난다.
- [0195] 즉, EGFR 돌연변이는 강한 세포 독성을 나타내는 CD8 T세포에 대한 아형인 C2의 지속성(persistence)이 감소시키고, 낮은 세포 독성을 효과를 갖는 CD8 T세포에 대한 아형인 C0 세포로의 전환을 증가시키는 것으로 나타난다. 이에, EGFR 돌연변이를 포함한 경우, 종양 특이적으로 강한 세포 독성을 갖는  $T_{RM}$  유사 세포( $C2$ ,  $T_{RM}$ -like cells)의 항상성이 감소되어, 면역 항암 요법에 대한 항암 효과의 효과 즉, 항암 유지 지속 기간이 감소될 수 있다.
- [0196] 결국, 종양 조직 및 일반 조직에 대한 CD8 T세포에 대한 아형인 C2( $T_{RM}$  유사 세포, GZMB+CD103+CD8+T세포)에서 C2 세포로의 전환 확률이 41 % 이하인 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).
- [0197] 나아가, 종양 조직 및 일반 조직에 대한 CD8 T세포에 대한 아형인 C2( $T_{RM}$  유사 세포, GZMB+CD103+CD8+T세포)에서 C0 세포로의 전환 확률이 52 % 이상인 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(+) 개체).
- [0198] 그 다음, 면역 세포의 전사 조절에 대한 도 9b를 참조하면, CD8 T세포에 대한 아형인 C2( $T_{RM}$  유사 세포,  $T_{RM}$ -like cells)에서 차등적으로 발현되어 있는 전사 인자에 대한 DEGs 결과가 도시된다. 이때, 상향조절(upregulated)되어 있는 전사 인자(transcription factors, TFs)는 점선 테두리로 표시되었다.
- [0199] CD8 T세포에 대한 아형인 C2( $T_{RM}$  유사 세포)에서 상향 조절되어 있는 전사 인자는, SERTAD1, IRF1, ARID5B, ELF1, SLAZ, BHLHE40, FOSL2, RBPJ, ID2 및 HOPX인 것으로 나타나며, 이 중, ID2, RBPJ 및 BHLHE40은  $T_{RM}$  세포의 발달 및 항상성에 관여하는 할 수 있다. 특히, RBPJ는 노치(NOTCH)와 관련되어  $T_{RM}$  세포를 분화, 유지 및 활성화하는데 필요한 전사 활성화체(transcriptional activator)를 형성함에 관련되어 있다.
- [0200] 이에, 도 9c를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른,  $T_{RM}$  세포를 분화, 유지 및 활성화에 관여하는 RBPJ 및 NOTCH1 유전자에 대한 발현 결과가 도시된다. 이때, 발현 결과는 스피어만 상관 계수(Spearman's rank correlation)를 통하여 표현되었으며, 상관 계수가 커질수록 두 유전자가 연관되어 있음을 의미할 수 있다.
- [0201] EGFR-WT의 경우, CD8 T세포에 대한 아형인 C2( $T_{RM}$  유사 세포)에서 RBPJ 및 NOTCH1 모두  $T_{RM}$  세포의 분화 및 유지에 관련된 다양한 유전자와 높은 양(+)의 상관 관계를 갖는 것으로 나타난다.
- [0202] 이와는 대조적으로, EGFR-MT의 경우, CD8 T세포에 대한 아형인 C2( $T_{RM}$  유사 세포)에서 RBPJ 및 NOTCH1 모두  $T_{RM}$  세포의 분화 및 유지에 관련된 다양한 유전자와 낮은 음(-)의 상관 관계를 갖는 것으로 나타난다.
- [0203] 보다 구체적으로, 전술한 도 9c의 발현 결과를 산점도(scatter plots) 및 회귀 곡선(regression curver)으로 나타낸, 도 9d를 참조하면, EGFR-MT의 경우, EGFR-WT보다 유전자 간의 상관 관계에 대한 계수가 0에 가깝거나 음의 상관 계수를 가짐에 따라, 관계가 소실되거나, 역 상관 관계를 갖는 것으로 나타난다.
- [0204] 결국, EGFR 돌연변이는 RBPJ 및 NOTCH1에 의한  $T_{RM}$  세포 및  $T_{RM}$  유사 세포의 분화, 유지 및 항상성을 감소시킬 수 있으며,  $T_{RM}$  세포 및  $T_{RM}$  유사 세포는 RBPJ 및 NOTCH1 네트워크에 의하여 분화, 유지 및 항상성이 조절됨을 의미할 수 있다.
- [0205] 그 다음, TLS를 통한 T세포의 활성화에 대한 도 10a를 참조하면, EGFR 돌연변이 유무에 따른 세포 및 세포간의 상호 작용(cell-cell interaction) 즉, 리간드(ligand) 및 수용체(receptor)에 대한 DEGs 분석 결과 즉, mRNA 및 이의 단백질의 발현량을 도시한 도트 플롯(Dot plot)이 도시된다. 이때, 결과값은 유전자 쌍의 평균 발현값을 의미할 수 있다.
- [0206] EGFR-MT의 경우, CXCL13-CXCR5 축(axis)을 통한  $T_{RM}$  세포 및 B세포의 상호 작용이 약한 것으로 나타난다. 즉, 각 세포에서 발현되는 리간드 및 수용체에 대한 발현이 낮으며, 이에 따라, 리간드 및 수용체의 결합 및 상호작용으로 발생하는 면역 효과가 감소될 수 있다.

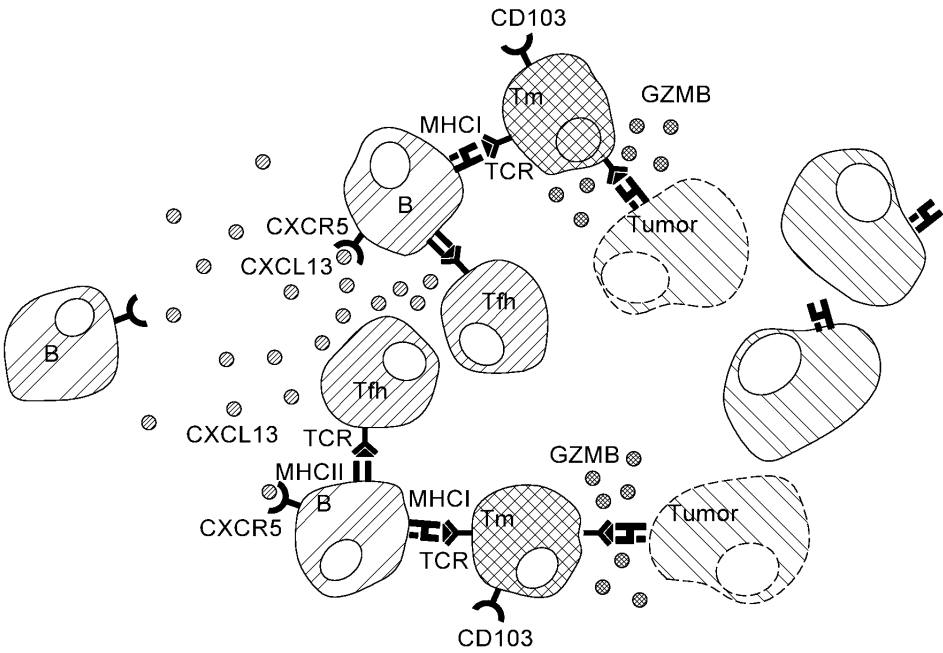
- [0207] 이에, 도 10b를 참조하면, CXCL13-CXCR5를 통한 면역 상호 작용을 검증하기 위하여, EGFR 돌연변이 유무에 따른 T세포 및 B세포의 리간드 및 수용체의 결합을 통하여 발생된 TLS 구조에 대한 면역조직화학법 결과가 도시된다.
- [0208] 먼저, 도 10b의 (a)를 참조하면, EGFR 돌연변이를 포함하지 않는 개체(EGFR-WT)의 종양 조직에서 CD4+T세포, CD8+T세포 및 B세포에 의하여 형성된 TLS가 더 많은 면적을 차지하는 것으로 나타난다. 이에, 면적을 측정하여, 수치적으로 비교한 결과인 도 10b의 (b)를 참조하면, EGFR-WT에 대한 종양 조직에서의 TLS의 면적은 약  $17 \text{ mm}^2$  이상인 것으로 나타나며, EGFR-MT에 대한 종양 조직에서의 TLS의 면적은 약  $5 \text{ mm}^2$  이하인 것으로 나타난다. 즉, EGFR 돌연변이는 면역 세포의 상호 작용인 TLS 형성을 EGFR-WT에 비하여 약 70 % 감소시킬 수 있다.
- [0209] 나아가, 10c를 참조하면, 전술한 9b의 TLS 영역에서 EGFR 돌연변이 유무에 따른 면역 세포에 대한 면역조직화학법 결과가 도시된다.
- [0210] CD4, CD20, CD8, CXCL13, CXCR5 및 CD103을 발현하는 세포의 빈도 및 개수는 EGFR-WT의 TLS에서 더 많은 것으로 나타난다. 보다 구체적으로, 도 9c에 대한 결과를 단위 면적당 각 세포수를 계수한 결과인 도 10d를 참조하면, EGFR-WT에 대한 종양 조직에서의 CD4+T세포의 개수는 약  $27000 \text{ no/mm}^2$  이상인 것으로 나타나며, EGFR-MT에 대한 종양 조직에서의 CD4+T세포의 개수는 약  $600 \text{ no/mm}^2$  이하인 것으로 나타난다.
- [0211] 또한, EGFR-WT에 대한 종양 조직에서의 CXCL13+CD4+T세포의 개수는 약  $10000 \text{ no/mm}^2$  이상인 것으로 나타나며, EGFR-MT에 대한 종양 조직에서의 CXCL13+CD4+T세포의 개수는 약  $1500 \text{ no/mm}^2$  이하인 것으로 나타난다.
- [0212] 또한, EGFR-WT에 대한 종양 조직에서의 CD8+T세포의 개수는 약  $7500 \text{ no/mm}^2$  이상인 것으로 나타나며, EGFR-MT에 대한 종양 조직에서의 CD8+ CD4+T세포의 개수는 약  $1000 \text{ no/mm}^2$  이하인 것으로 나타난다.
- [0213] 또한, EGFR-WT에 대한 종양 조직에서의 CD103+CD8+T세포의 개수는 약  $2900 \text{ no/mm}^2$  이상인 것으로 나타나며, EGFR-MT에 대한 종양 조직에서의 CD103+CD8+ CD4+T세포의 개수는 약  $500 \text{ no/mm}^2$  이하인 것으로 나타난다.
- [0214] 결국, EGFR 돌연변이를 포함하는 개체는 TLS를 형성할 수 있는 B세포, CD4+T세포 및 CD8+T세포 바람직하게는, 및 B세포, B세포와 상호 작용을 야기할 수 있는 리간드인 CXCL12를 발현하는 CD4+T세포(CXCL13+CD4+T세포), 종양 특이적으로 강한 세포 독성을 나타낼 수 있는 CD103+CD8+T세포 및 GZMB+CD103+CD8+T세포가 감소되어 있음에 따라, 종양에 대한 저항성 및 독성 즉, 항암 효과가 감소되어 있으며, 이에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 감소될 수 있다.
- [0215] 이에, 종양 조직 및 일반 조직에 대한 TLS의 면적이  $5\text{mm}^2$  이하이거나, 정상 대조의 조직에 대한 TLS 면적의 수준보다 70 %이상 감소된 수준을 나타내는 개체의 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응성이 낮은 것으로 결정할 수 있다(치료 반응 음성(-) 개체).
- [0216] 이상의 결과에 따라, EGFR 돌연변이와 같은 원인에 의하여 면역 항암 요법에 대한 반응성이 낮은 개체의 경우, CD8 T세포의 아형인 C2뿐만 아니라, CXCR5+CD20+B세포 또는 CXCL13+CD4+T세포를 포함하는 다양한 면역 세포들의 수준이 차별적으로 분포되어 있음에 따라, 이를 통하여 면역 항암 요법에 대한 반응성을 예측할 수 있다.
- [0217] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시 예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시 예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

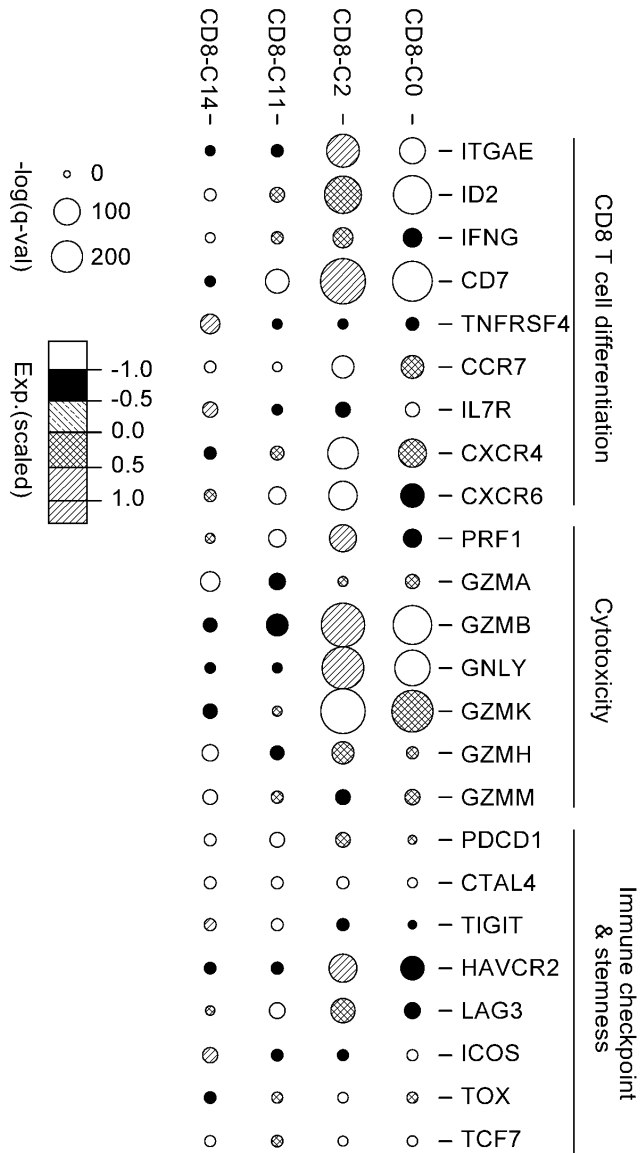
도면1



도면2



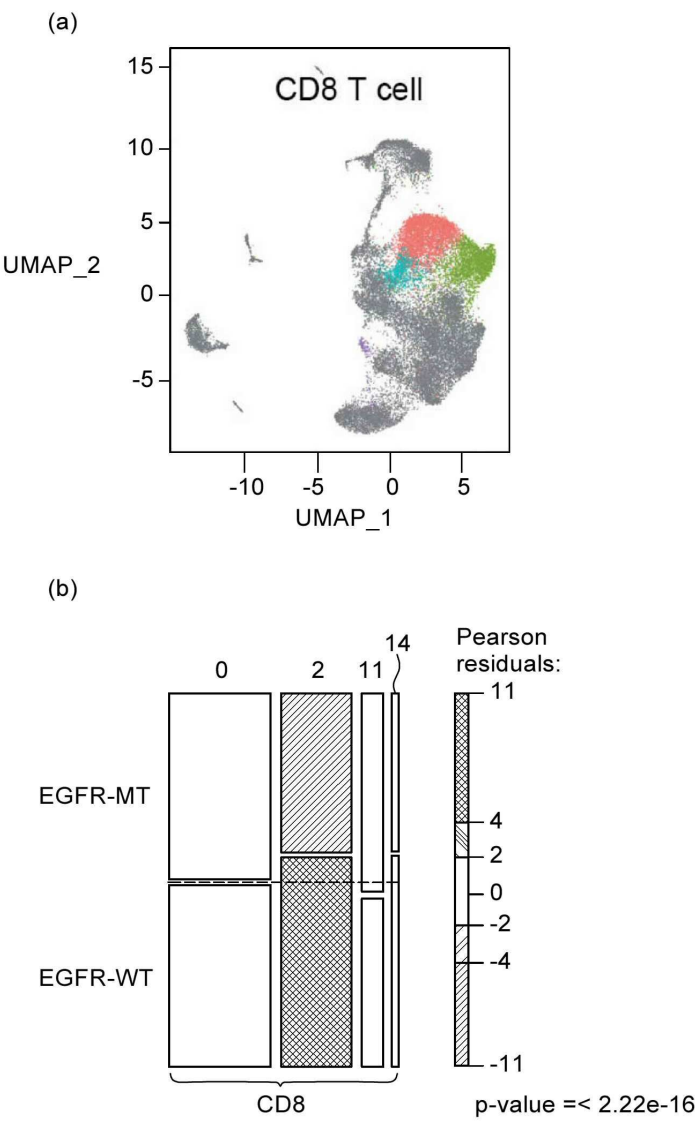
도면3a



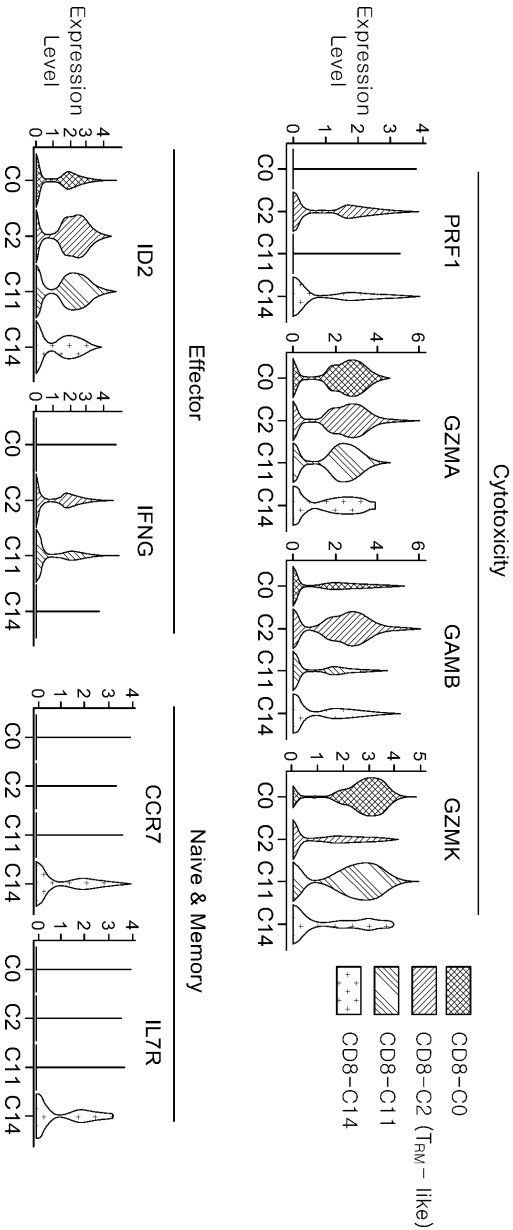
3b면도

Gene name	avg. log(fold change)	Gene name	avg. log(fold change)	Gene name	avg. log(fold change)	Gene name	avg. log(fold change)
GNL Y	1.857576731	MT1X	0.42973809	IL32	0.292324476	H2AFZ	-0.316819565
GZMB	1.274586174	XCL2	0.415349736	BLOC1S1	0.29049724	UBE2S	-0.318287086
AC0092580.4	1.093839854	CTSD	0.406114999	ACTB	0.288210653	TUBB4B	-0.325955962
CD7	0.903778998	LSP1	0.395017609	CD8B	0.2879224	ELF1	-0.328395928
HOPX	0.90140102	SLA2	0.391454558	CD3D	0.284751917	SEPTAD1	-0.331305824
ST00A4	0.86937427	MT1E	0.390162757	GLPR1	0.284647935	HSPH1	-0.339663422
CD63	0.82342819	IFITM2	0.380555033	CD96	0.284262385	DUSP1	-0.343321577
KLHD1	0.762645979	GPR65	0.374567229	PTPN22	0.282812411	NEU1	-0.351608949
LGALS1	0.741356584	FKBP1A	0.373725188	DSTN	0.280074915	YPEL5	-0.354291245
CAPG	0.723939767	CLIC1	0.370058489	SYTL3	0.280005646	IFPD1	-0.368677069
KLHB1	0.715994309	PGK1	0.361648821	CHST12	0.27119231	DNAJA1	-0.380917971
LDLRAD4	0.658947923	IL2RB	0.360946161	IL2RG	0.270848379	ARID5B	-0.38596715
ALOX5AP	0.641149446	VIM	0.355404156	C12orf75	0.262978657	GPR183	-0.398323981
CD52	0.6257301	LGALS3	0.351594056	CLEC2D	0.262362149	RGCC	-0.41177318
CLIC3	0.612984188	NR3C1	0.351594056	IFNG	0.262307574	MARCKSL1	-0.461656838
ANKRD28	0.604635258	CCL5	0.344297381	MSN	0.259421437	TUBA4A	-0.462134464
ID2	0.552210828	JAML	0.340699842	ST00A10	0.257730478	CSIT7	-0.466158953
ST00A6	0.525950383	NINJ1	0.336654	CD8A	0.253485027	CXCH4	-0.466370498
SH3BGRL3	0.515282606	FOSL2	0.321762444	PFN1	0.252600653	SH2D1A	-0.506016142
PHLDA1	0.506019432	TPM4	0.313061803	RHOH	-0.256708406	DNAJB1	-0.591054217
ITGAE	0.495490342	MT1F	0.311684275	IRF1	-0.259521105	DUSP2	-0.658948539
MT2A	0.486821532	GAPDH	0.309472806	SRSF7	-0.260528286	TRAF1	-0.735435356
CXCR6	0.476516726	TSP0	0.309097568	PIK3R1	-0.26228658	CMC1	-1.086272116
HBPJ	0.440711009	CKLF	0.308167337	ID11	-0.287380387	GZMK	-1.479729665
PRF1	0.437250573	BHLHE40	0.30436057	CLDND1	-0.296699017		
ST00A11	0.437079435	SH2D2A	0.296404103	SOCBP	-0.298614439		
CTSW	0.43698281	MYL12A	0.293975765	CHMP1B	-0.298633397		

도면3c

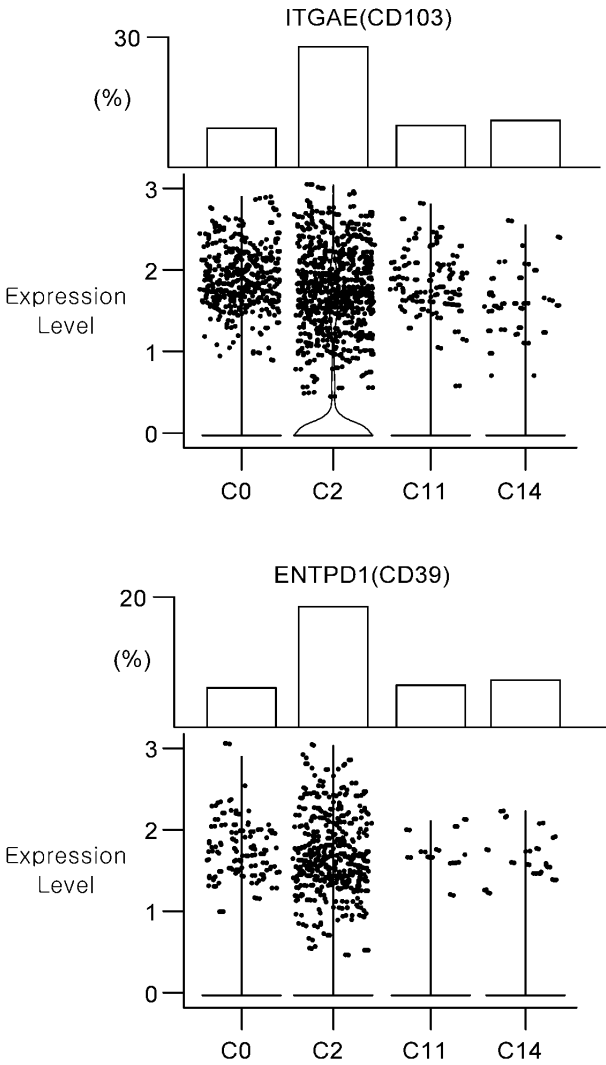


도면3d

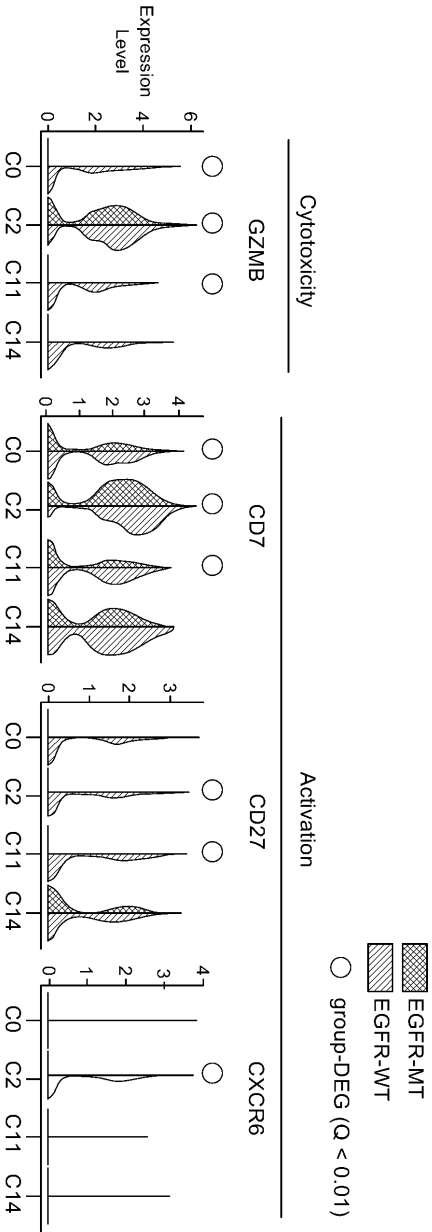




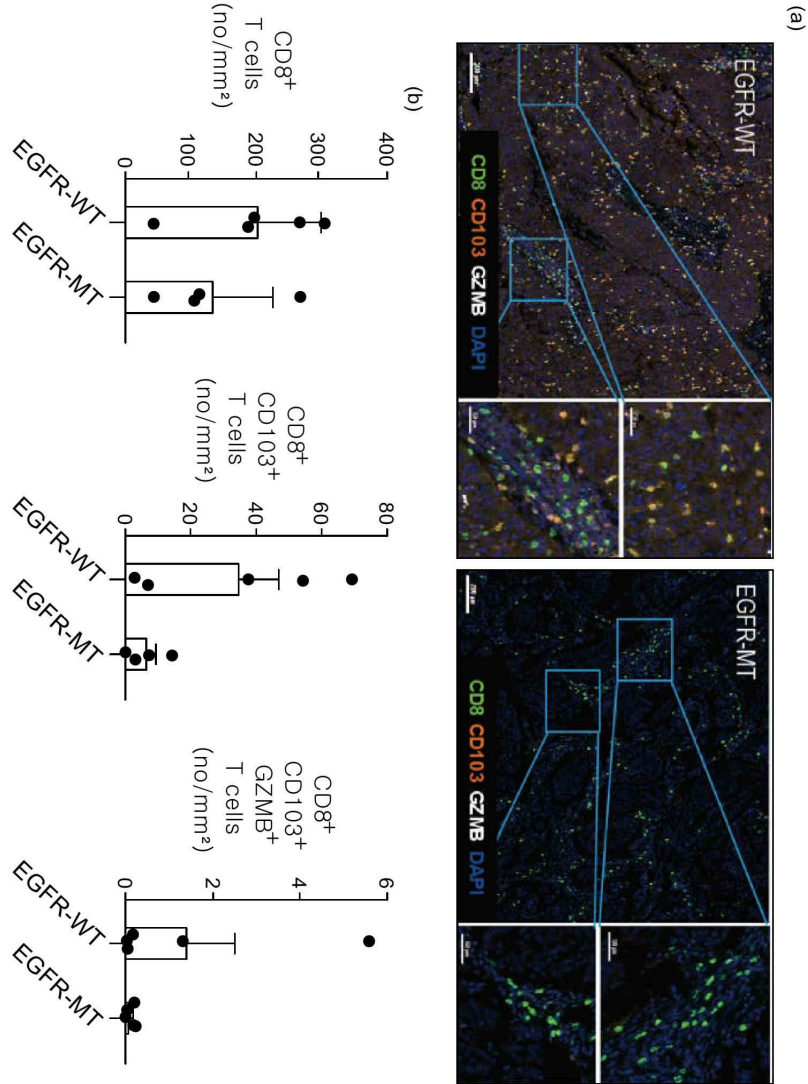
도면3e



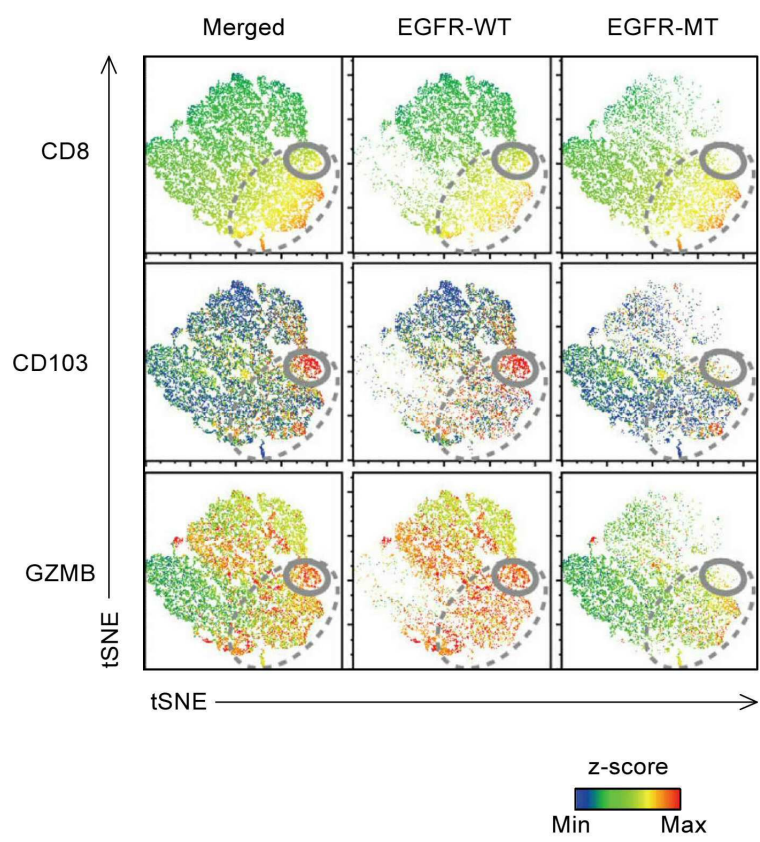
도면3f



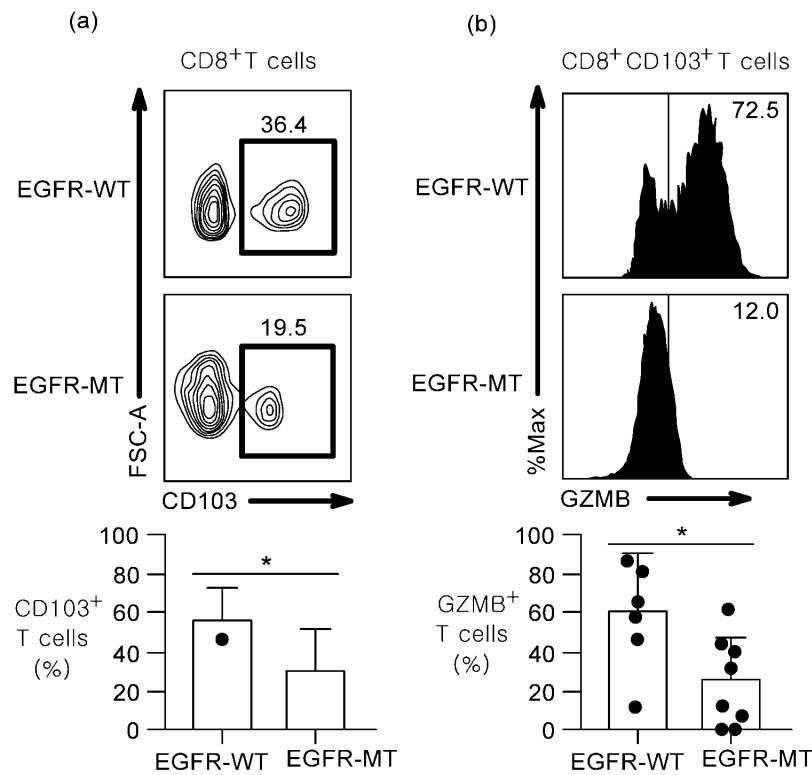
도면3g



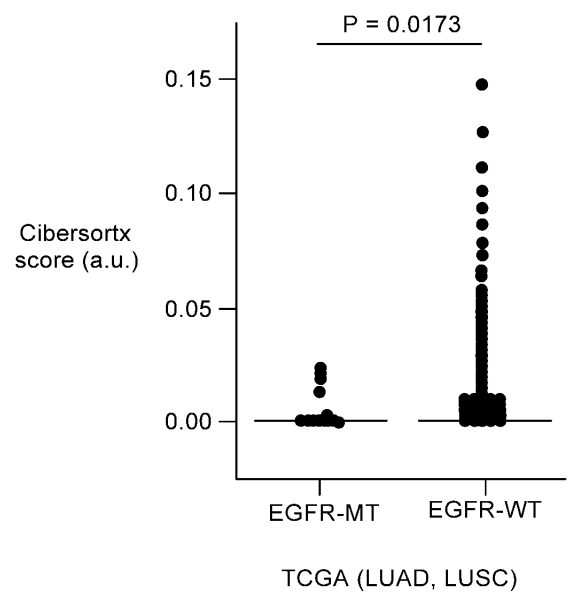
도면3h



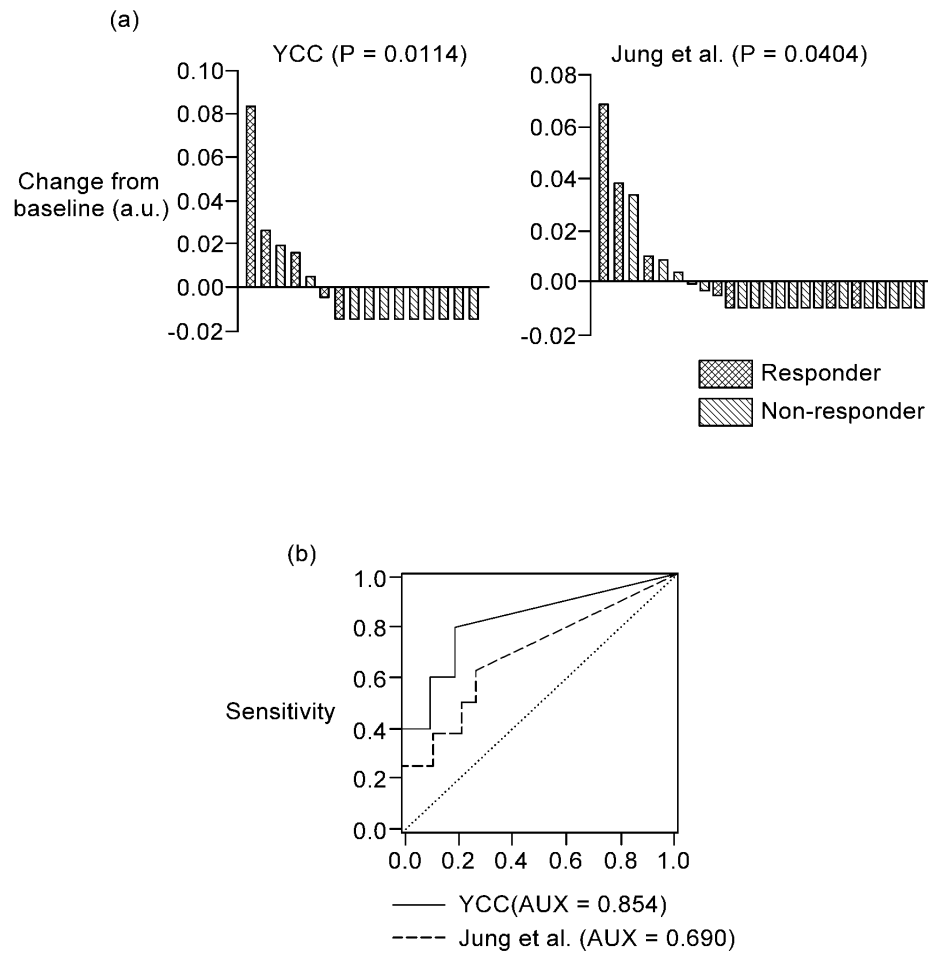
도면3i



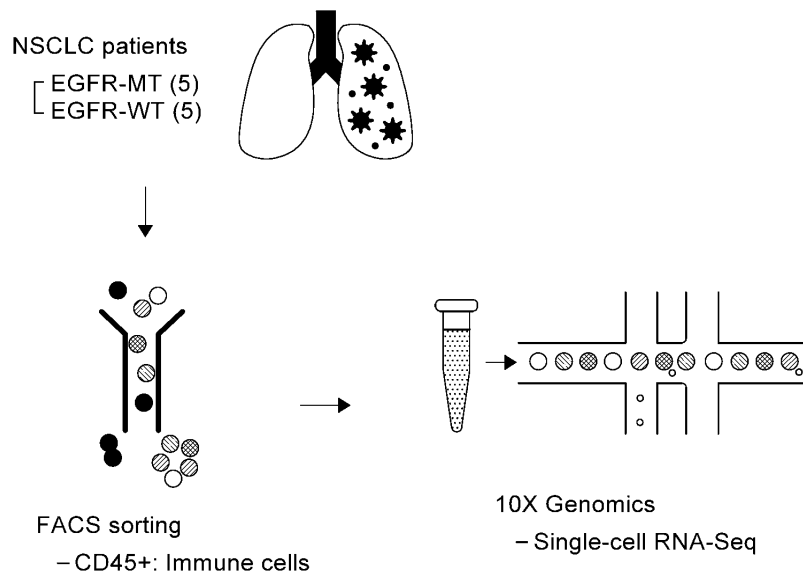
도면4a



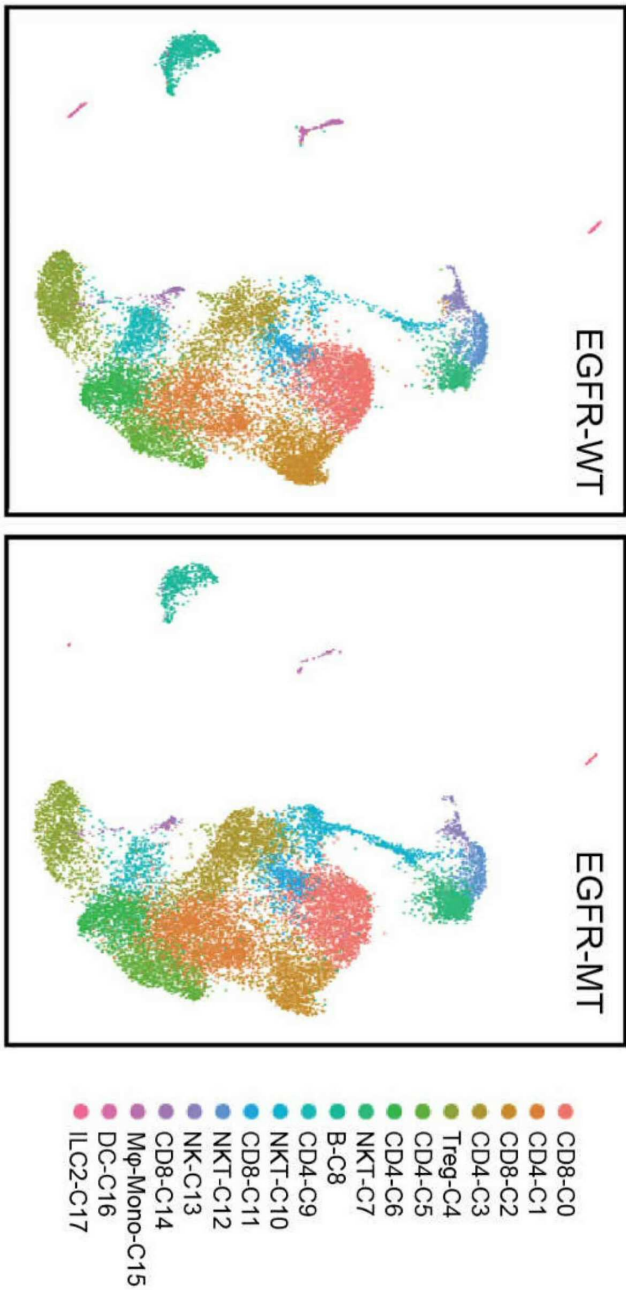
도면4b



도면5a

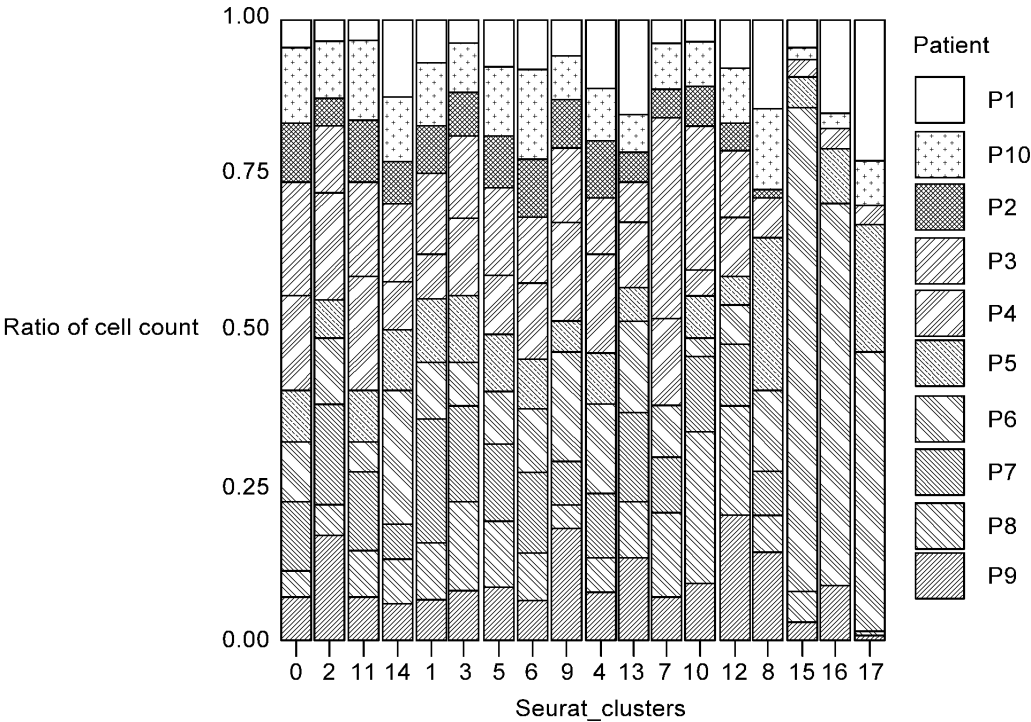


도면5b

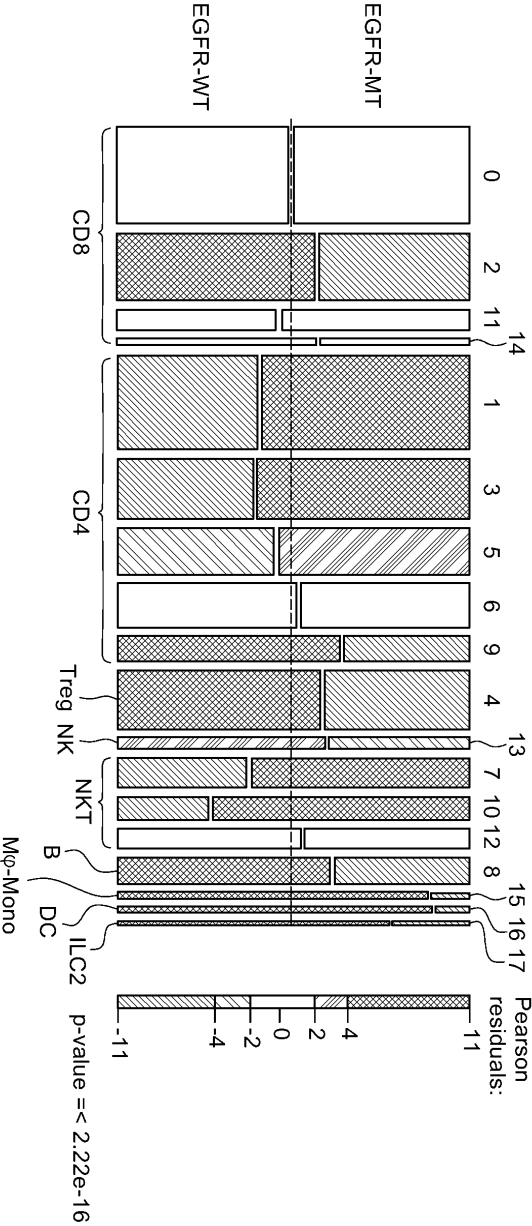




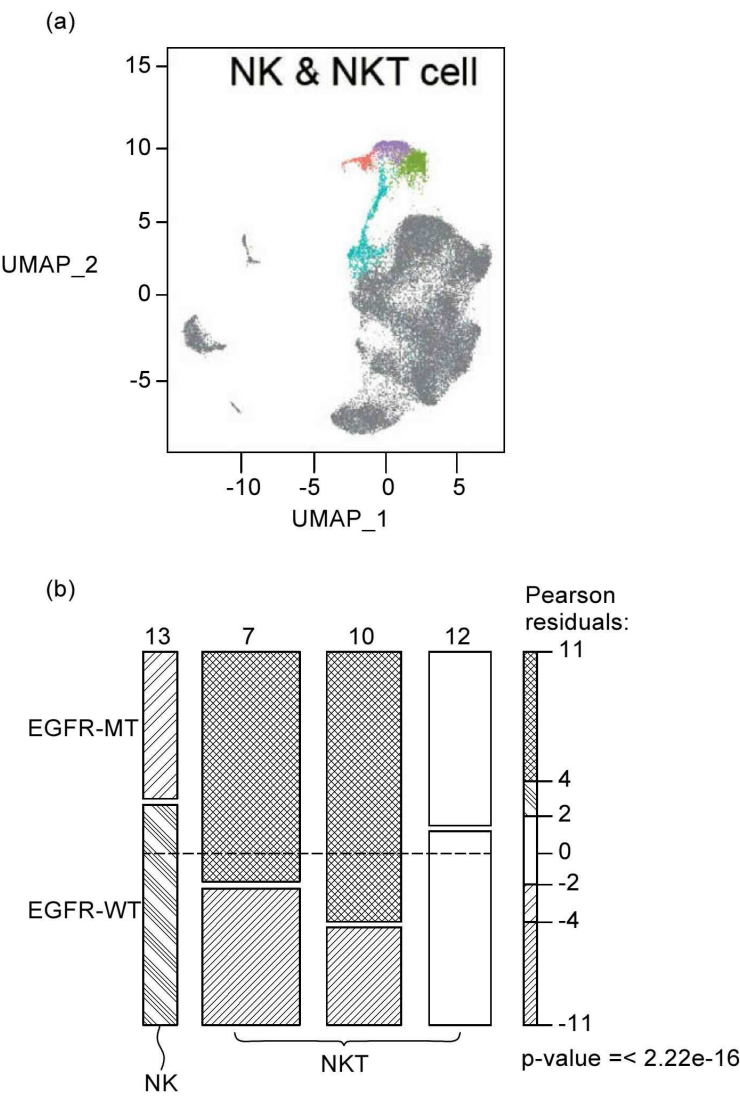
도면5c



도면5d

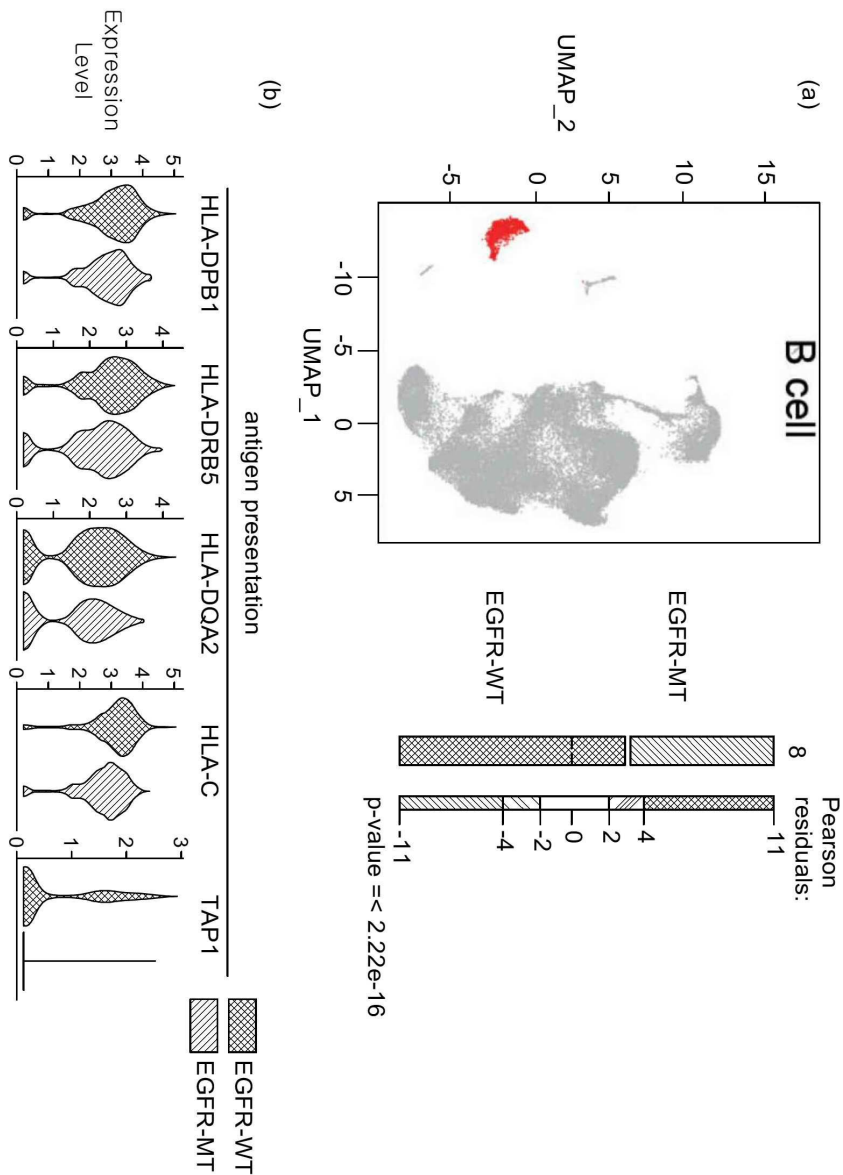


도면6a

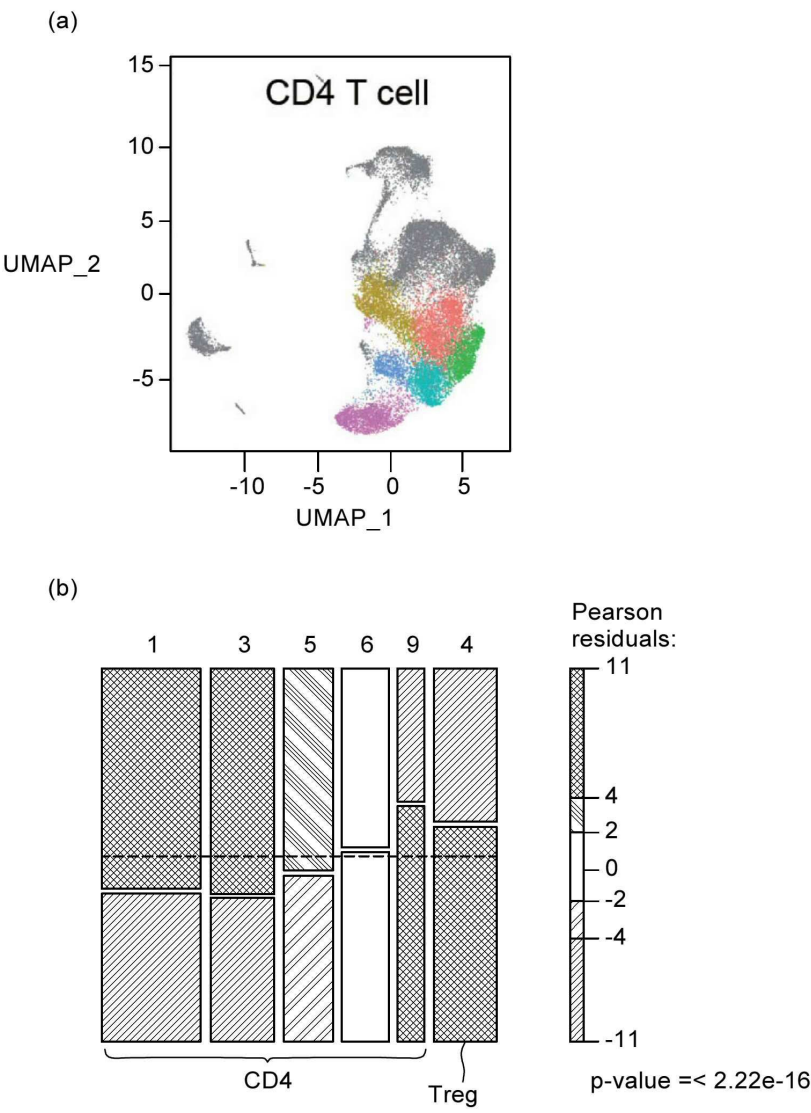




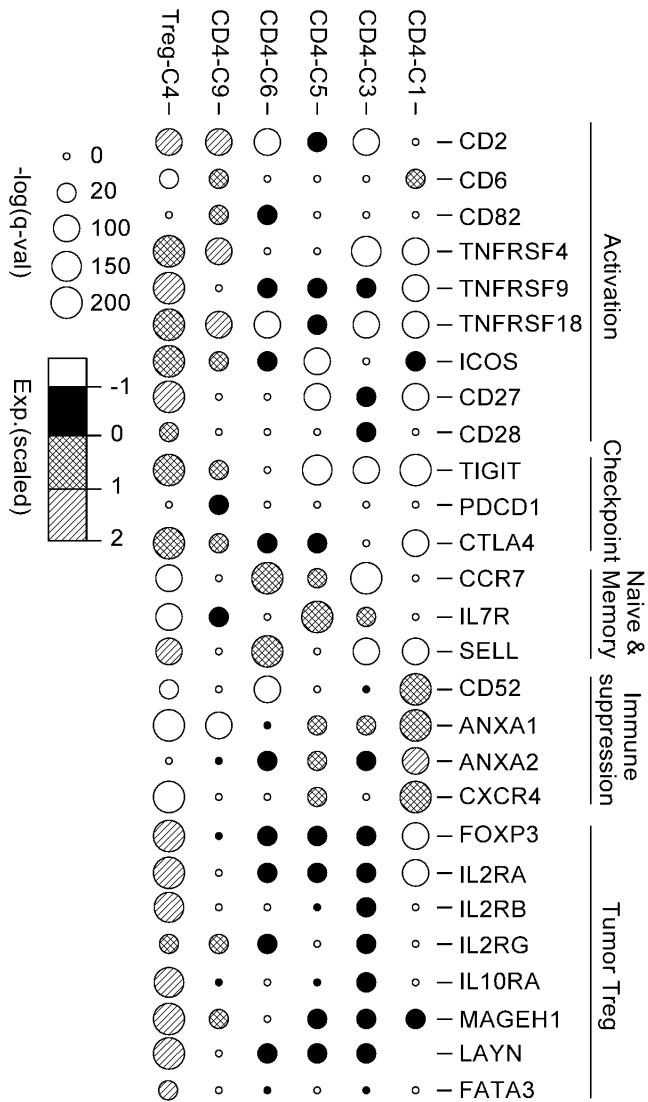
도면7



도면8a

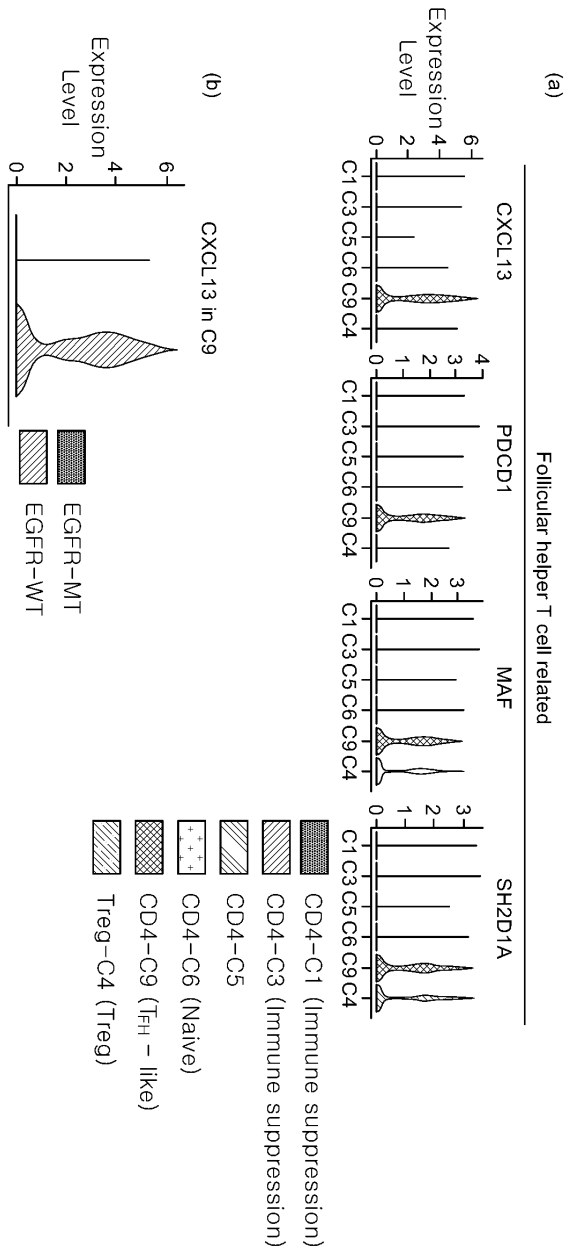


도면8b



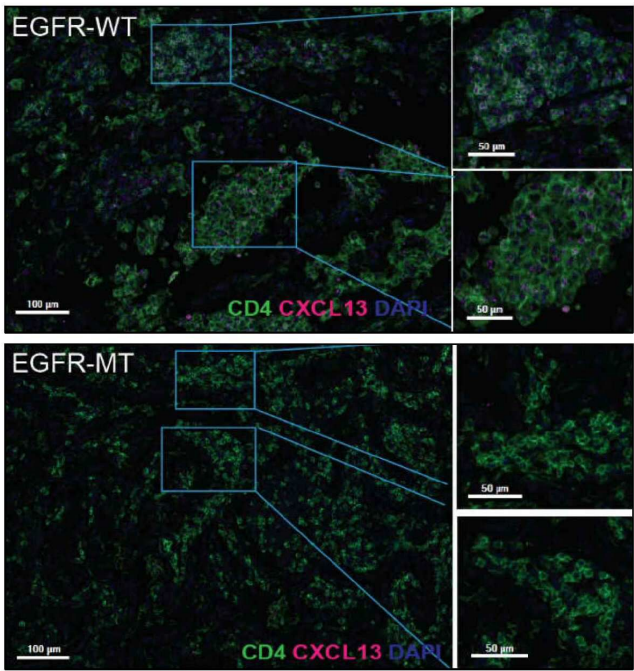


도면8c

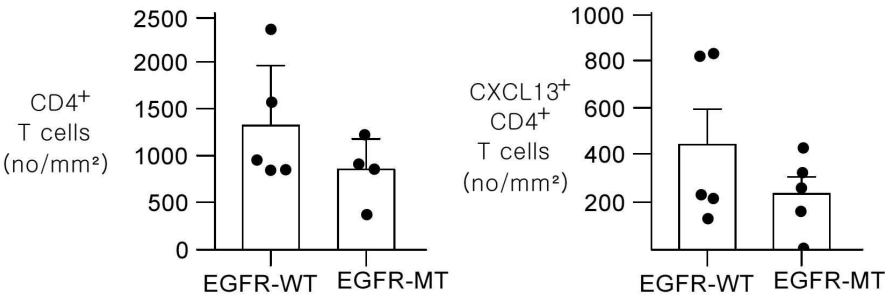


도면8d

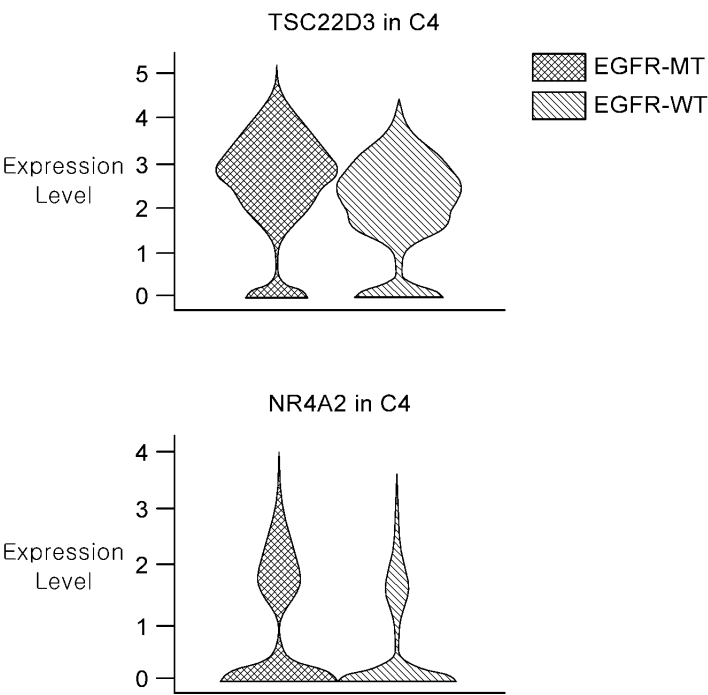
(a)



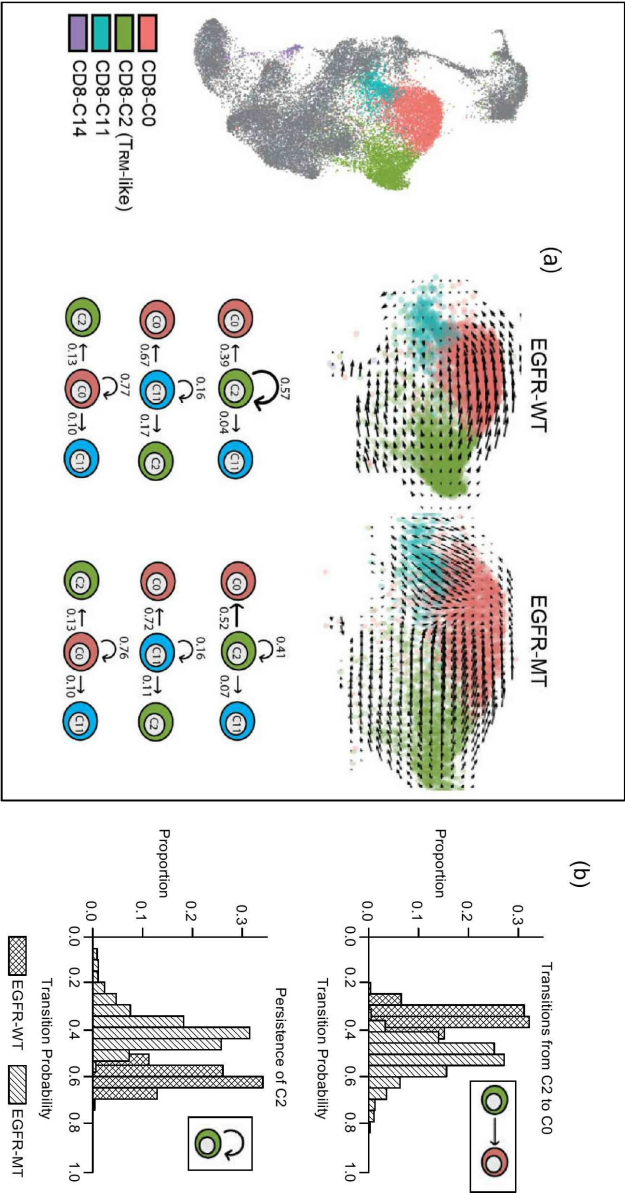
(b)



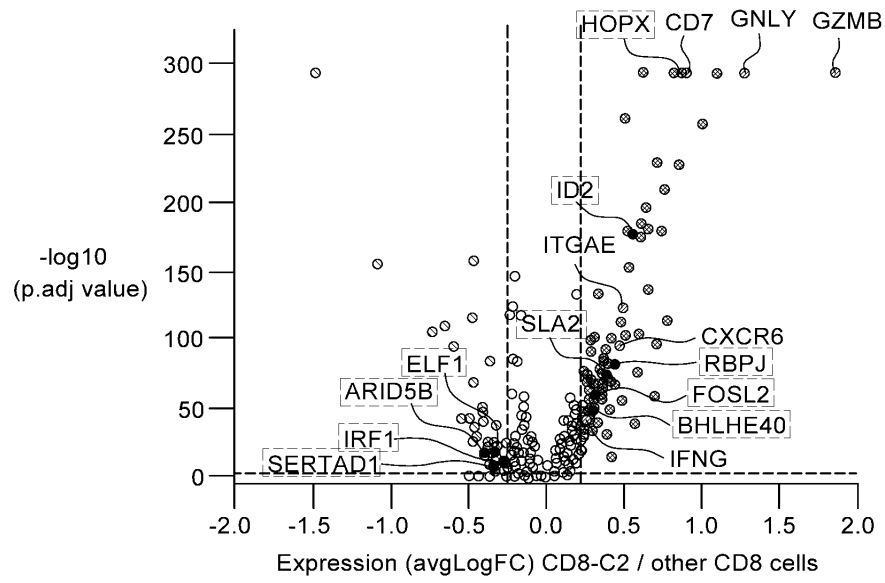
도면8e



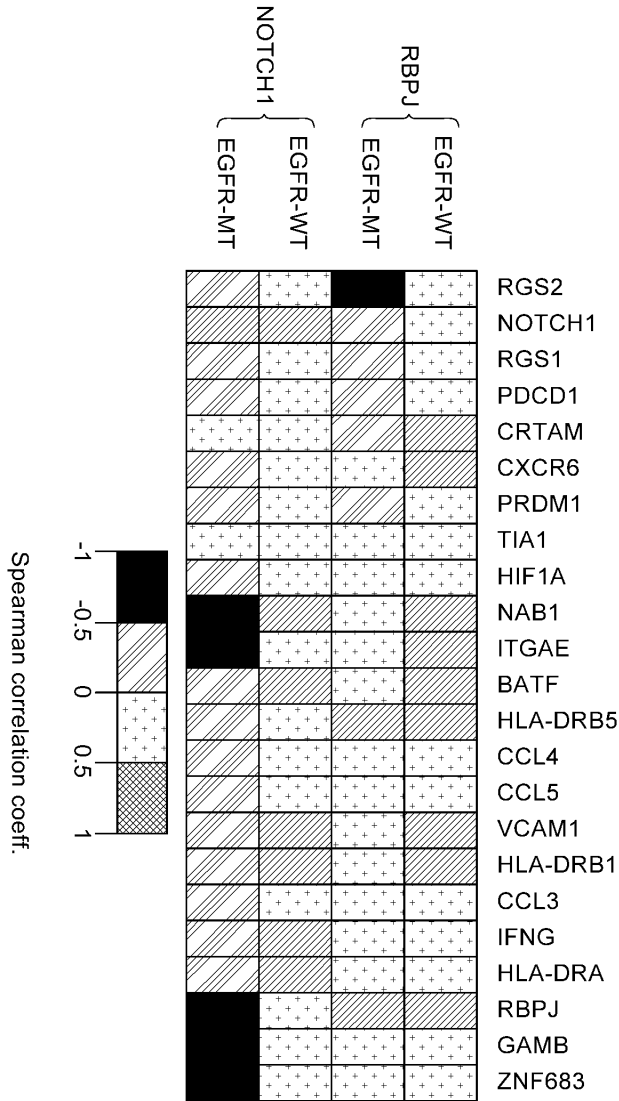
도면9a



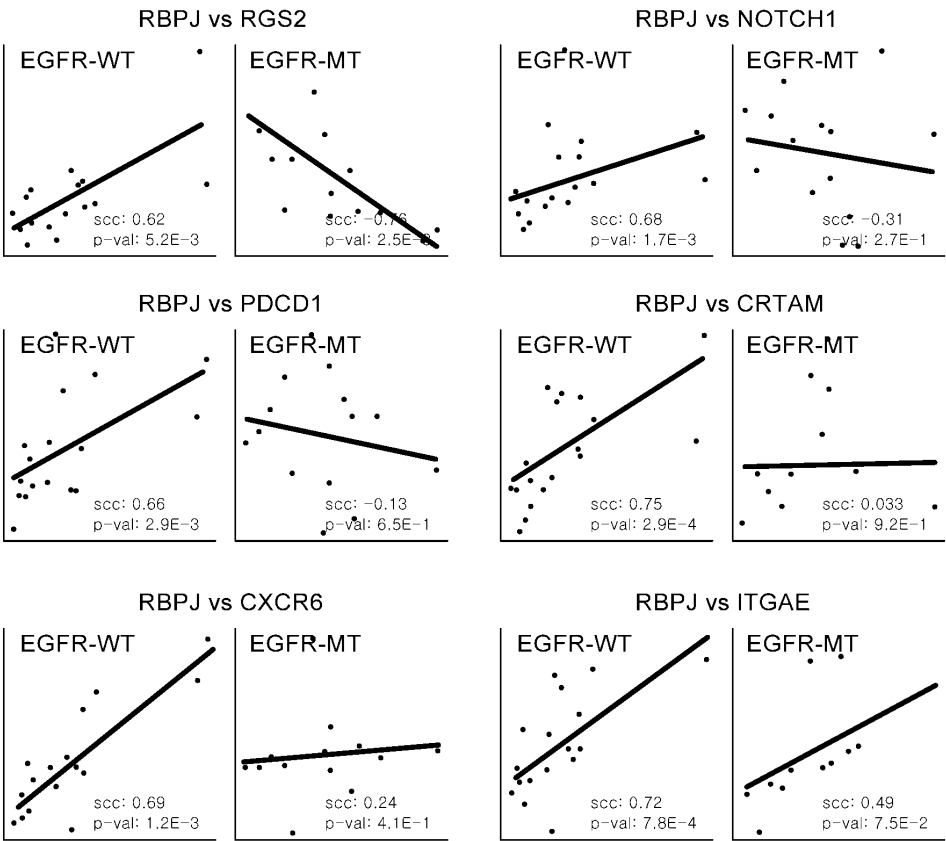
도면9b



도면9c

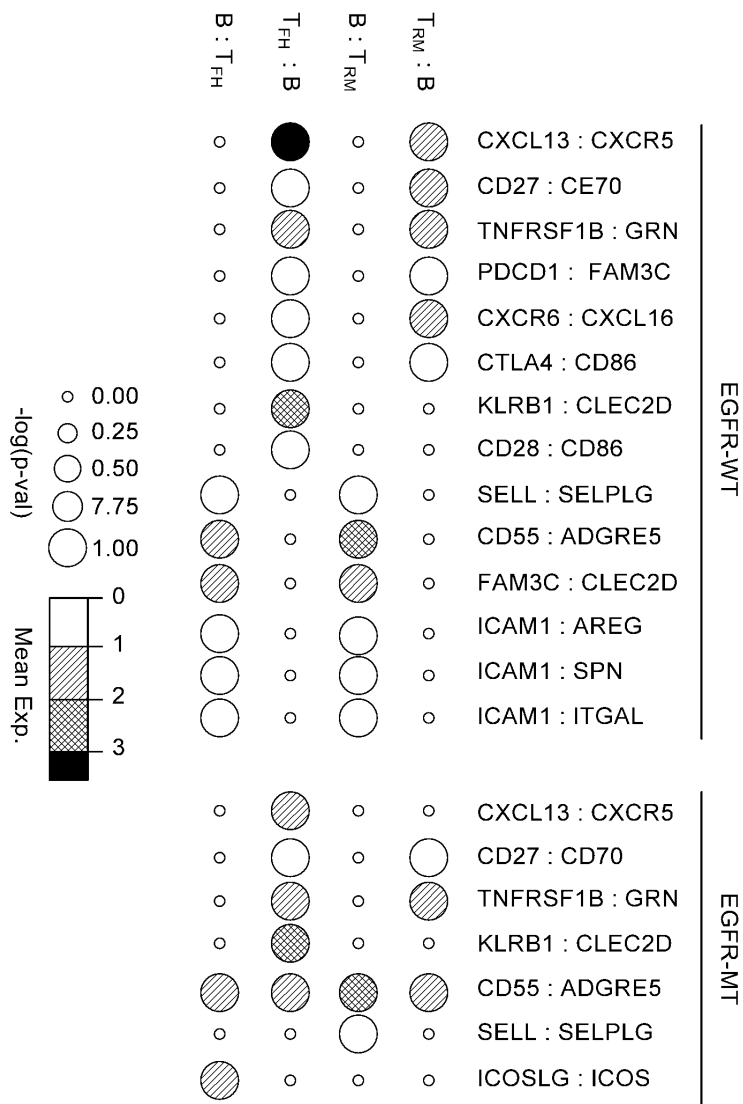


도면9d

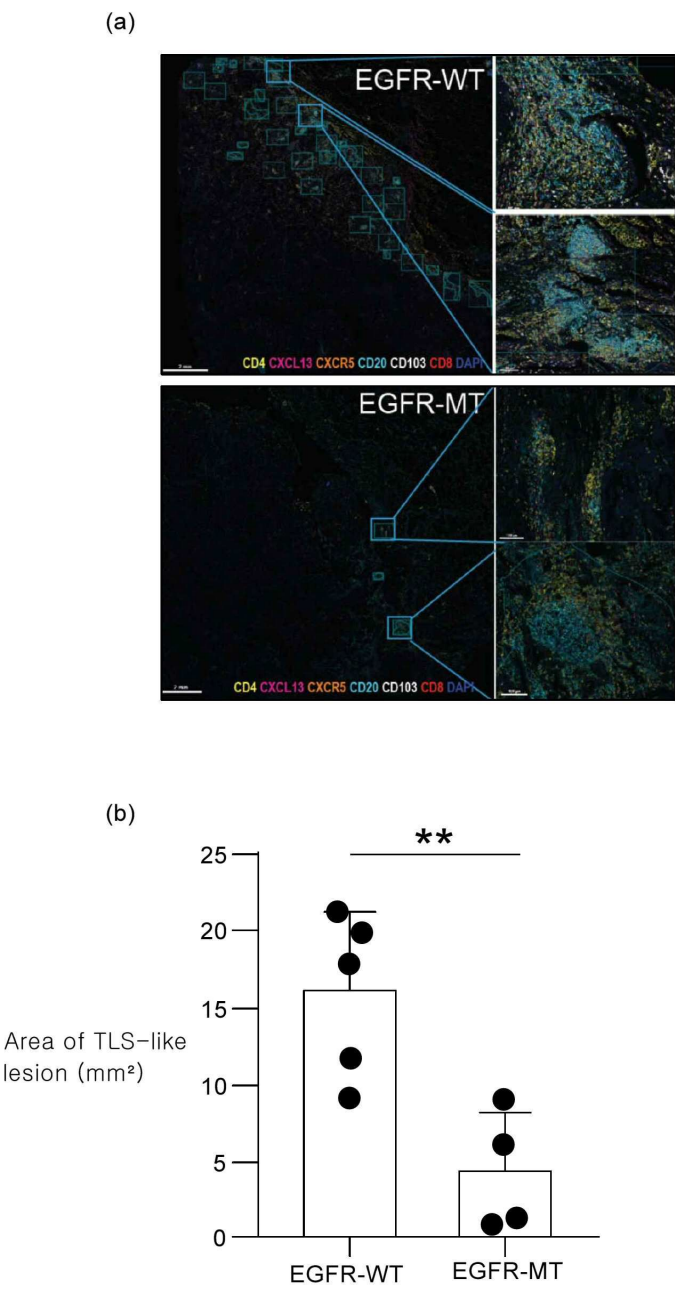




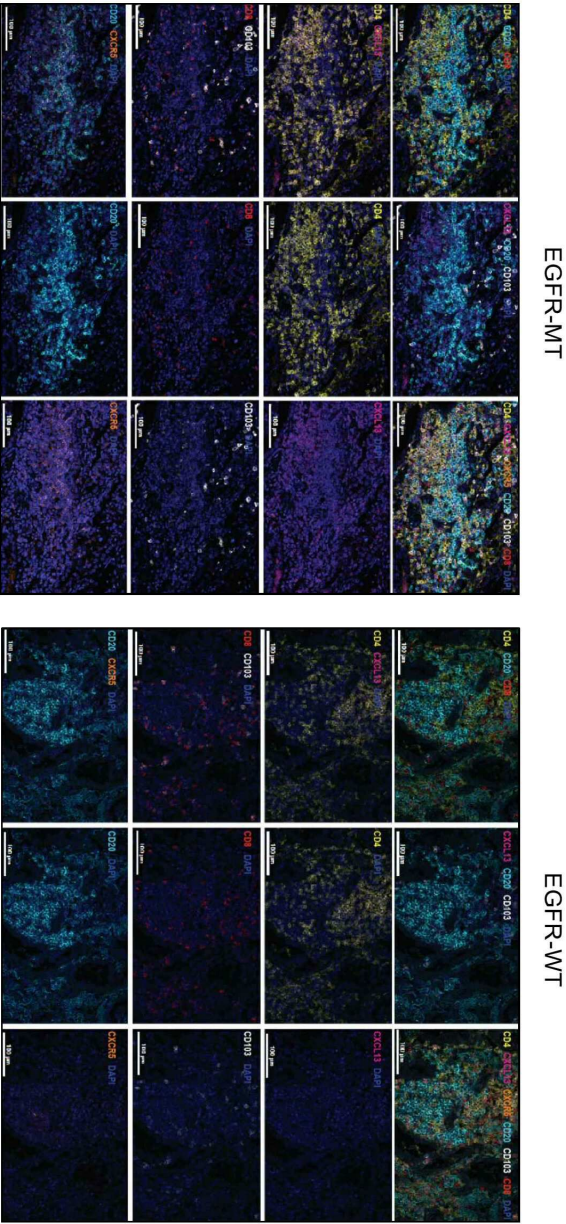
도면10a



도면10b



도면10c



10d면도

