



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0082094
(43) 공개일자 2019년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0162867
(22) 출원일자 2018년12월17일
심사청구일자 2018년12월17일
(30) 우선권주장
1020170184421 2017년12월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
김혜련
서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세의료원 광
혜관 1층 (연세의료원건물)
하상준
서울특별시 서대문구 연세로 50, 과학원 S315 (연
세대학교)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인인벤싱크

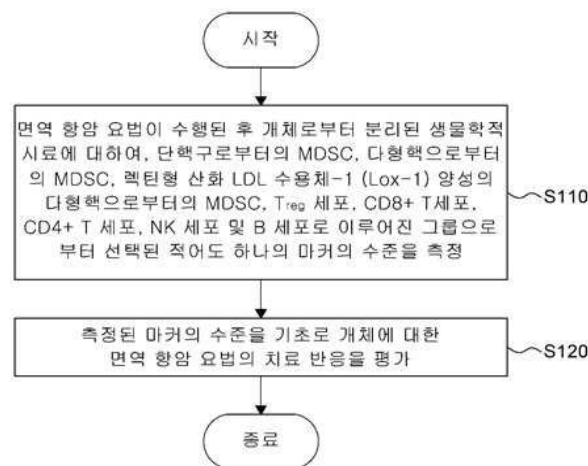
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법

(57) 요약

본 명세서에서는, 면역 항암 요법이 수행된 후 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵 (polymorphnuclear) 으로부터의 MDSC, 렉틴형 산화 LDL 수용체-1 (Lox-1) 양성 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8+ T세포, CD4+ T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커의 수준을 측정하는 단계, 및 측정된 마커의 수준을 기초로 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

연제인

서울특별시 강동구 아리수로50길 50, 122동 201호
(고덕동, 래미안힐스테이트고덕)

박수명

경기도 화성시 동탄대로시범길 122, 1470동 702호
(청계동, 시범호반베르디움)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1D1A1B03029874

부처명 교육부 학술진흥과

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 2017년도 이공학개인지초연구 (기본, 지역)

연구과제명 폐암환자 말초혈액의 면역마커를 이용한 면역항암제 치료예측인자 규명을 통한 효율적인
면역항암치료 전략 구축

기 여 율 1/6

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9E8029714

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 임상과학자 연구역량강화사업

연구과제명 총괄: 차세대 바이오헬스 선도 임상과학자 양성 프로그램(Severance Clinical Scientist
Development Program) 세부: 유전자, 면역 바이오마커를 이용한 진행성 폐암의 치료효과 및 작용 정밀 예측

기 여 율 1/6

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.04.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A5A1014560

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터사업 이학분야 (SRC)

연구과제명 비임과성 장기 면역 연구센터(Center for Immune Research on Non-lymphoid Organ)

기 여 율 1/6

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2024.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A10056084

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업 도약연구(전략)

연구과제명 암 미세환경 내 조절T세포 특이적 표면분자의 기능적 발굴 및 항암면역치료로의 활용
(Functional identification of regulatory T-cell specific and its application for a cancer
immunotherapy)

기 여 율 1/6

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1C1A1A01054596

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구지원사업

연구과제명	골수유래 면역억제세포 특이 마커 발굴 및 이를 활용한 암환자의 면역 기능 모니터링
기 여 율	1/6
주관기관	서울대학교 산학협력단
연구기간	2015.11.01 ~ 2018.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	2012R1A5A2A44671346
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터지원사업
연구과제명	신경면역 정보저장 네트워크 연구센터
기 여 율	1/6
주관기관	서울대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.07 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

면역 항암 요법이 수행된 후 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여, 단핵구로부터의 MDSC (myeloid derived suppressor cell), 다형핵 (polymorphnuclear) 으로부터의 MDSC, 렉틴형 산화 LDL 수용체-1 (Lox-1) 양성의 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포 (regulatory T cell), CD8+ T세포, CD4+ T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커의 수준을 측정하는 단계; 및

측정된 상기 마커의 수준을 기초로 상기 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 개체는, 비소세포성 폐암 의심 개체이고,

상기 생물학적 시료는, 말초 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 면역 항암 요법은,

항 PD-1 치료인, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 면역 항암 요법이 수행된 후 마커의 수준을 측정하는 단계는,

상기 항 PD-1 치료가 수행된 후 획득한 생물학적 시료 내의, 상기 단핵구로부터의 MDSC, 상기 다형핵으로부터의 MDSC 및 상기 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준 및 상기 T_{reg} 세포의 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 평가하는 단계는,

선택된 상기 MDSC의 수준 및 상기 T_{reg} 세포의 수준의 비율을 기초로, 상기 항 PD-1 치료 반응을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 평가하는 단계는,

선택된 상기 MDSC의 수준에 대한 상기 T_{reg} 세포의 수준의 비율이 0.3 이상인 개체의 경우,

상기 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 생물학적 시료에 대하여, 면역 항암 요법이 수행되기 전, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC,

Lox-1 양성 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8⁺ T 세포, CD4⁺ T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커의 수준을 측정하는 단계를 더 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 면역 항암 요법이 수행되기 전 마커의 수준을 측정하는 단계는,

상기 항 PD-1가 수행되기 전 상기 생물학적 시료 내의 상기 T_{reg} 세포의 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 면역 항암 요법이 수행된 후 마커의 수준을 측정하는 단계는,

상기 항 PD-1가 수행된 후 상기 생물학적 시료 내의 상기 T_{reg} 세포의 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 평가하는 단계는,

상기 T_{reg} 세포의 수준이 항 PD-1가 수행되기 전의 수준보다 높은 개체를 상기 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 면역 항암 요법이 수행되기 전 마커의 수준을 측정하는 단계는,

상기 항 PD-1가 수행되기 전 생물학적 시료 내의 상기 단핵구로부터의 MDSC, 상기 다형핵으로부터의 MDSC 및 상기 Lox-1 양성 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 면역 항암 요법이 수행된 후 마커의 수준을 측정하는 단계는,

상기 항 PD-1가 수행된 후 상기 생물학적 시료 내의 상기 단핵구로부터의 MDSC, 상기 다형핵으로부터의 MDSC 및 상기 Lox-1 양성 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 평가하는 단계는,

선택된 상기 MDSC의 수준이 항 PD-1가 수행되기 전의 수준보다 낮은 개체를 상기 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 면역 항암 요법이 수행되기 전 마커의 수준을 측정하는 단계는,

상기 항 PD-1가 수행되기 전 상기 생물학적 시료 내의 상기 NK 세포의 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 면역 항암 요법이 수행된 후 마커의 수준을 측정하는 단계는,

상기 항 PD-1가 수행된 후 상기 생물학적 시료 내의 상기 NK 세포의 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 평가하는 단계는,

상기 NK 세포의 수준이 항 PD-1가 수행되기 전의 수준보다 낮은 개체를

상기 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 10

제3항에 있어서,

상기 면역 항암 요법이 수행된 후 마커의 수준을 측정하는 단계는,

상기 항 PD-1 치료가 수행된 후 획득한 생물학적 시료 내의 상기 단핵구로부터의 MDSC, 상기 다형핵으로부터의 MDSC 및 상기 Lox-1 양성 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준 및 상기 NK 세포의 수준을 측정하는 단계를 포함하고,

상기 평가하는 단계는,

선택된 상기 MDSC의 수준 및 상기 NK 세포의 수준의 비율을 기초로, 상기 항 PD-1 치료 반응을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 평가하는 단계는,

선택된 상기 MDSC의 수준에 대한 상기 NK 세포의 수준의 비율이 5.0 이상인 개체의 경우,

상기 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 조직이고,

상기 적어도 하나의 마커는 면역 관문 리간드 (immune checkpoint ligand) 를 더 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법.

청구항 13

면역 항암 요법이 수행된 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC, Lox-1 양성 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8+ T 세포, CD4+ T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커에 대한 수준을 측정하도록 구성된 재제를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 반응 예측 정보 제공용 키트.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 면역 항암 요법은 항 PD-1 치료인, 면역 항암 요법에 대한 반응 예측 정보 제공용 키트.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 생물학적 시료는, 말초 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함하고,

상기 재제는,

상기 생물학적 시료 내의 상기 단핵구로부터의 MDSC, 상기 다형핵으로부터의 MDSC 및 상기 Lox-1 양성 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준 및 상기 T_{reg} 세포의 수준을 측정하도록 구성되고,

선택된 상기 MDSC의 수준에 대한 상기 T_{reg} 세포의 수준의 비율이 0.3 이상인 경우, 상기 항 PD-1 치료 반응 양성으로 나타나도록 구성된, 면역 항암 요법에 대한 반응 예측 정보 제공용 키트.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 재제는,

상기 생물학적 시료 내의 상기 단핵구로부터의 MDSC, 상기 다형핵으로부터의 MDSC 및 상기 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준 및 상기 NK 세포의 수준을 측정하도록 구성되고,

상기 MDSC의 수준에 대한 상기 NK 세포의 수준의 비율이 5.0 이상인 경우, 상기 항 PD-1 치료 반응 양성으로 나타나도록 구성된, 면역 항암 요법에 대한 반응 예측 정보 제공용 키트.

청구항 17

제13항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 조직이고,

상기 조직 내의 면역 관문 리간드의 수준을 측정하는 제제를 더 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 반응 예측 정보 제공용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 바이오 마커를 이용하여 비소세포성 폐암에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 예측하는 방법에 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, 대세포암은 폐의 어느 부위에서나 발병할 수 있으며, 그 진행속도가 소세포성 폐암 (small cell lung cancer) 과 유사할 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, 비소세포 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 대다수는 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] 비소세포성 폐암의 치료 방법으로 면역 관문 차단제 (Immune checkpoint blockade) 의 이용이 제안되었다. 특

히, 식품 의약청에 의해 승인된 PD-1 (programmed cell death-1) / PD-L1 (programmed cell death ligand-1) 차단은 비소세포성 폐암의 치료에 효과적인 것으로 나타났다.

- [0008] 한편, PD-L1 차단에 대한 치료 반응 예측에 있어서, 면역 조직 화학 법 (immunohistochemistry, IHC) 에 의한 종양 PD-L1 발현이 현재 PD-1 차단에 대한 최선의 예측 바이오 마커로 사용될 수 있다. 그러나, 종양 PD-L1 발현의 종양 PD-L1의 치료 반응 예측의 정확도는 약물 효능을 확정할 정도로 높지 않다. 보다 구체적으로, PD-L1 발현 음성 환자가 PD-1 차단에 반응할 수 있고, PD-L1 발현 양성 환자가 PD-1 차단에 반응하지 않을 수 있다. 나아가, PD-L1이 없는 일부 반응 환자는 Checkmate 057 trial에서 PD-L1 양성인 경우 비슷한 반응 지속 기간을 보일 수 있다. 더욱이, PD-L1 발현은 동적이며, 시간적 및 공간적으로 변화할 수 있다. 이러한 PD-L1 발현의 변화 현상은 종양에 의해 발휘되는 적응 면역 저항성일 수 있다.
- [0009] PD-L1 차단에 대한 치료 반응 예측에 대한 바이오 마커로서, CD8 T 세포 침윤, 염증 종양 표지, T 세포 수용체 클론성 및 체성 돌연변이 부담 (somatic mutational burden) 이 이용될 수 있다. 그러나, 이상의 바이오 마커들은, 종양 조직을 얻는 데 어려움을 갖고, 종양의 이질성 및 일부 바이오 마커의 유도 가능성을 가지고 있어, PD-1 차단에 대한 치료 반응 예측에 있어 단일 마커로 이용되는 것에 어려움이 있을 수 있다.
- [0010] 한편, 본 발명의 발명자들은 면역 조절 항암제가 T 세포 활성화를 통해 조절된 면역계의 능력을 나타내고 CD8 + 및 CD4 + T 세포, NK 세포, B 세포, T_{reg} 세포 (regulatory T cell), 골수 유래 억제 세포 (myeloid derived suppressor cell, MDSC) 등 다양한 면역 세포 서브세트 (immune cell subsets) 에 영향을 줄 수 있음을 인식할 수 있었다.
- [0011] 보다 구체적으로, 본 발명의 발명자들은 MDSC, CD4 + / CD25 + / FOXP3 + T_{reg} 세포의 기저 수준 빈도 (baseline frequencies) 와 높은 수준의 호산구가 이필리무맙 (ipilimumab) 으로 치료받은 흑색 종 환자의 임상적 이점과 관련이 있다는 것에 주목하였다. 그 결과, 본 발명의 발명자들은 순환 T_{reg} 세포의 높은 기저 수준 빈도가 이러한 코호트 (cohort) 에서의 생존을 개선과 관련이 있음을 발견할 수 있었다.
- [0012] 특히, 본 발명의 발명자들은, MDSC와 T_{reg} 세포의 축적 및 활성화가 종양 미세 환경에서 중요한 면역 억제 기전일 수 있으며, MDSC 또는 T_{reg} 세포가 암 환자, 특히 비소세포성 폐암의 예후와 관련성이 있음을 인지할 수 있었다.
- [0013] 이때, 본 발명의 발명자들은, 비소세포성 폐암의 예후와 관련하여 MDSC의 서브 세트에 주목하였고, 그 결과 다형핵 (polymorphnuclear) 으로부터의 MDSC의 수준이 비소세포성 폐암의 예후와 관련성이 있음을 발견할 수 있었다.
- [0014] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 면역 항암 치료, 특히 PD-1 차단에 대한 치료 반응 예측을 위한 혈액 바이오 마커로서, 말초 림프구에서의 MDSC, 특히 다형핵으로부터의 MDSC 및 T_{reg} 세포의 분석을 통한, 새로운 치료 반응 예측 방법을 개발하기에 이르렀다.
- [0015] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 면역 항암 요법을 수행한 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, 단핵구 (monocytic) 으로부터의 MDSC, 다형핵 (polymorphnuclear) 으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8+ T세포, CD4+ T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커의 수준을 측정하고, 이를 기초로 면역 항암 요법, 특히 PD-1 차단에 대한 치료 반응을 예측하도록 구성된, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는, 생물학적 시료로부터 측정된 MDSC 및 T_{reg} 세포의 수준의 비율을 기초로, PD-1 차단에 대한 조기 치료 반응을 예측하도록 구성된, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는, 면역 항암 요법이 수행된 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8+ T 세포, CD4+ T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커에 대한 수준을 측정하도록 구성된 제제를 포함하도록 구성된, 면역 항암 요법에 대한 반응 예측 정보 제공용 키트를 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재

로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 면역 항암 요법이 수행된 후 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8⁺ T세포, CD4⁺ T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커의 수준을 측정하는 단계, 및 측정된 마커의 수준을 기초로 개체에 대한 항 PD-1 치료 반응을 평가하는 단계를 포함하는 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법이 제공된다.
- [0020] 본 발명의 특징에 따르면, 개체는 비소세포성 폐암 의심 개체이고, 생물학적 시료는 말초 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함할 수 있다. 나아가, 면역 항암 요법은 바람직하게 항 PD-1 치료일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 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.
- [0022] 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.
- [0023] 한편, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8⁺ T 세포, CD4⁺ T 세포, NK 세포 또는 B 세포의 마커는, 항 PD-1 치료에 대한 반응 예측을 위한 마커로서 이용될 수 있다. 이때, MDSC는 단핵성 식작용성 백혈구를 포함하는 "단핵구"로부터 유래되거나, 다형핵 백혈구를 포함하는 "다형핵"으로부터 유래될 수 있다. 나아가, MDSC는 선택형 산화 LDL 수용체-1가 발현하는 양성 (Lox-1⁺) 다형핵으로부터 유래될 수 있다. 이와 같은 MDSC의 서브 세트들 (단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC), T_{reg} 세포, CD8⁺ T세포, CD4⁺ T 세포, NK 세포 또는 B 세포는 항 PD-1 치료 반응 예측에 이용될 수 있다.
- [0024] 예를 들어, 항 PD-1 치료가 수행된 개체에 대한 말초 혈액 내의, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8⁺ T세포, CD4⁺ T 세포, NK 세포 또는 B 세포의 마커 수준은, 개체의 항 PD-1 치료 반응 양성 또는 항 PD-1 치료 반응 음성을 결정하는 것에 이용될 수 있다.
- [0025] 이때, 본 명세서에서 사용되는 용어 "항 PD-1 치료 반응 양성"은, PD-1 차단제에 의해 T 세포의 표면의 PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2의 결합의 차단 반응의 발생을 의미할 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않고, 항 PD-1 치료 반응 양성은 PD-1 차단제에 의한 비소세포성 폐암 증상의 완화 또는 좋은 예후 (favorable prognosis) 와 연관된 모든 반응의 발생을 포함할 수 있다. 따라서, 항 PD-1 치료 반응 양성인 개체는, 항 PD-1 치료에 따라 비소세포성 폐암의 증상이 완화될 수 있다.
- [0026] 한편, 본 명세서에서 이용되는 용어 "개체"는 전술한 것에 제한되는 것이 아니며, 항 PD-1 요법이 수행된 모든 개체일 수 있다. 나아가, "생물학적 시료"는, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8⁺ T세포, CD4⁺ T 세포, NK 세포, 또는 B 세포의 바이오 마커에 대한 수준을 측정할 수 있는 한, 다양한 시료를 포함할 수 있다.
- [0027] 예를 들어, 본 발명의 다른 특징에 따르면, 생물학적 시료는 조직일 수 있다. 이에, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 조직에 대한 면역 관문 리간드 (immune checkpoint ligand) 의 수준을 측정하는 단계가 더 수행될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 마커의 수준을 측정하는 단계는, 생물학적 시료 내의 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준 및 T_{reg} 세포의 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 평가하는 단계는 선택된 MDSC의 수준 및 T_{reg} 세포의 수준의 비율을 기초로, 항 PD-1 치료 반응을 평가하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0029] 이때, MDSC 및 T_{reg} 세포의 수준은 항 PD-1 치료 반응과 연관이 있을 수 있다. 예를 들어, 항 PD-1 치료 반응 양성인 개체는, 항 PD-1 치료 수행 후의 T_{reg} 세포의 수준이 항 PD-1 치료 수행 전 보다 유의하게 높을 수 있다. 나아가, 항 PD-1 치료 반응 양성인 개체는, 항 PD-1 치료 수행 후의 MDSC의 수준이 항 PD-1 치료 수행 전 보다 유의하게 낮을 수 있다. 특히, MDSC의 서브세트인 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준은, 항 PD-1 치료 반응 양성인 개체에 대하여 치료 전 후의 차이가 유의할 수 있다.
- [0030] 바람직하게, 마커의 수준을 측정하는 단계는, 생물학적 시료 내의 T_{reg} 세포의 수준 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준을 측정하도록 구성될 수 있고, 평가하는 단계는 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준에 대한 T_{reg} 세포의 수준의 비율을 기초로, 항 PD-1 치료 반응을 평가하도록 구성될 수 있다.
- [0031] 예를 들어, 항 PD-1 치료에 대하여 반응하는 양성 개체는, 음성 개체와 비교하여 항 PD-1 치료 후, T_{reg} 세포의 수준이 유의하게 증가할 수 있고, Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준이 감소할 수 있다. 이때, 항 PD-1 치료에 대하여 반응하는 개체에 대한 생물학적 시료 내의 T_{reg} 세포 및, Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 면역 세포의 수준은 역 상관 관계를 가질 수 있다. 이에, Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준에 대한 T_{reg} 세포의 수준의 비율은, 항 PD-1 치료에 대하여 반응하는 개체를 선별하기 위한 마커로서 이용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 평가하는 단계는 선택된 MDSC의 수준에 대한 T_{reg} 세포의 수준의 비율이 0.3 이상인 개체를 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하도록 구성될 수 있다.
- [0033] 바람직하게, 평가하는 단계는, Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준에 대한 T_{reg} 세포의 수준의 비율이 0.3 이상인 개체를 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하도록 구성될 수 있다.
- [0034] 보다 바람직하게, 평가하는 단계에서는 상기 비율이 0.39 이상인 개체는, 개체를 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정할 수 있다.
- [0035] 한편, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 면역 항암 요법이 수행되기 전에 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8+ T세포, CD4+ T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 마커 중 선택된 하나에 대한 수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 나아가, 마커의 수준을 측정하는 단계에서는, 전술한 마커들 중 선택된 하나에 대한 수준을 측정하고, 평가하는 단계에서는, 항 PD-1가 수행되기 전과 후, 각각에 대한 마커의 수준을 비교하여 항 PD-1 치료 반응을 예측하도록 구성될 수 있다.
- [0036] 특정한 실시예에 따르면, 마커의 수준을 측정하는 단계는 생물학적 시료 내의 T_{reg} 세포의 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 평가하는 단계는 T_{reg} 세포의 수준이 항 PD-1가 수행되기 전의 수준보다 높은 개체를 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하도록 구성될 수 있다.
- [0037] 특정한 실시예에 따르면, 마커의 수준을 측정하는 단계는 생물학적 시료 내의, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준을 단계를 포함하고, 평가하는 단계는 선택된 MDSC의 수준이 항 PD-1가 수행되기 전의 수준보다 높은 개체를 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하도록 구성될 수 있다.
- [0038] 특정한 실시예에 따르면, 마커의 수준을 측정하는 단계는 생물학적 시료 내의 NK 세포의 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 평가하는 단계는 NK 세포의 수준이 항 PD-1 치료가 수행되기 전의 수준보다 높은 개체를 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하도록 구성될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 마커의 수준을 측정하는 단계는 생물학적 시료 내의 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준 및 NK 세포의 수준을 측정하고, 평가하는 단계는 선택된 MDSC의 수준에 대한 NK 세포의 수준의 비율을 기초로, 항 PD-1 치료 반응을 평가하도록 구성될 수 있다.
- [0040] 이때, MDSC 및 NK 세포의 수준은 항 PD-1 치료 반응과 연관이 있을 수 있다. 예를 들어, 항 PD-1 치료 반응 양성인 개체는, 항 PD-1 치료 수행 후의 NK 세포의 수준이 항 PD-1 치료 수행 전 보다 유의하게 높을 수 있다. 나아가, 항 PD-1 치료 반응 양성인 개체는, 항 PD-1 치료 수행 후의 MDSC의 수준이 항 PD-1 치료 수행 전 보다

유의하게 낮을 수 있다. 특히, MDSC의 서브세트인 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준은, 항 PD-1 치료 반응 양성인 개체에 대하여 치료 전 후의 차이가 유의할 수 있다.

- [0041] 바람직하게, 마커의 수준을 측정하는 단계는, 생물학적 시료 내의 NK 세포의 수준 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 평가하는 단계는 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준에 대한 NK 세포의 수준의 비율을 기초로, 항 PD-1 치료 반응을 평가하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 특징에 따르면, 평가하는 단계는 선택된 MDSC의 수준에 대한 NK 세포의 수준의 비율이 5.0 이상인 개체를 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하도록 구성될 수 있다.
- [0043] 바람직하게, 평가하는 단계는, Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준에 대한 NK 세포의 수준의 비율이 5.5 이상인 개체를 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정하도록 구성될 수 있다.
- [0044] 보다 바람직하게, 평가하는 단계에서는 상기 비율이 5.75 이상인 개체는, 개체를 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 항 PD-1가 수행된 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대한, 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC, T_{reg} 세포, CD8+ T세포, CD4+ T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커에 대한 수준을 측정하도록 구성된 체제를 포함하는, 면역 항암 요법에 대한 반응 예측 정보 제공용 키트가 제공된다.
- [0046] 본 발명의 특징에 따르면, 제제는 생물학적 시료, 예를 들어 말초 혈액 내의 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준 및 T_{reg} 세포의 수준을 측정하도록 구성되고, MDSC의 수준에 대한 T_{reg} 세포의 수준의 비율이 0.3 이상인 경우, 항 PD-1 치료 반응 양성으로 나타나도록 구성될 수 있다.
- [0047] 바람직하게 제제는, 생물학적 시료 내의 T_{reg} 세포의 수준 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준을 측정하도록 구성되고, Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준에 대한 T_{reg} 세포의 수준의 비율이 0.39 이상인 경우, 항 PD-1 치료 반응 양성으로 나타나도록 구성될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 제제는 생물학적 시료내의 단핵구로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC 및 NK 세포의 수준을 측정하도록 구성될 수 있다. 나아가, 선택된 MDSC의 수준에 대한 NK 세포의 수준의 비율이 미리 결정된 수준, 예를 들어, 5.0 이상인 경우, 항 PD-1 치료 반응 양성으로 나타나도록 구성될 수 있다.
- [0049] 바람직하게 제제는, Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준에 대한 NK 세포의 수준의 비율이 5.5 이상인 경우, 항 PD-1 치료 반응 양성으로 나타나도록 구성될 수 있다. 보다 바람직하게 제제는, Lox-1 양성의 다형핵으로부터의 MDSC의 수준에 대한 NK 세포의 수준의 비율이 5.79 이상인 경우, 항 PD-1 치료 반응 양성으로 나타나도록 구성될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 생물학적 시료는 조직이고, 치료 반응 예측 정보 제공용 키트는 조직 내의 면역 관문 리간드의 수준을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있다.
- [0051] 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 아니 된다.
- 발명의 효과**
- [0052] 본 발명은, PD-1 차단에 대한 치료 반응을 예측할 수 있는 새로운 혈액 바이오 마커를 제공할 수 있는 효과가 있다.
- [0053] 보다 구체적으로, 본 발명은 혈액 바이오 마커에 대한 비율을 기초로 PD-1 차단에 대한 치료 반응을 예측할 수 있는 효과가 있다. 이에, 본 발명은 혈액 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 있는 효과가 있다.
- [0054] 나아가 본 발명은, 항 PD-1 치료가 효과적일 수 있는 환자와 그렇지 않은 환자를 구별할 수 있어, 임상에 적용될 경우 치료 효과를 극대화하는 데 도움이 될 수 있다.

[0055] 본 발명은, 개체로부터 획득한 적은 양의 생물학적 시료로 혈액을 이용함으로써, 비 침습적인 방법으로 개체에 대한 항 PD-1 치료 반응을 예측할 수 있는 효과가 있다. 나아가,

[0056] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법의 절차를 예시적으로 도시한 것이다.

도 2a 및 2b는 PD-1 차단제 처리에 따른 항 PD-1 치료에 대한 반응군 및 비-반응군에 대한 면역 세포들의 패턴을 도시한 것이다.

도 3a 내지 3d는 PD-1 차단제 처리에 따른 항 PD-1 치료에 대한 반응군 및 비-반응군에 대한 면역 세포들의 패턴에 대한 평가 결과를 도시한 것이다.

도 4a 내지 4d는 MDSC에 대한 T_{reg} 세포의 비율과 PD-1 차단제에 대한 치료 반응의 상관관계 분석 결과를 도시한 것이다.

도 5a 내지 5c는 MDSC에 대한 NK 세포의 비율과 PD-1 차단제에 대한 치료 반응의 상관관계 분석 결과를 도시한 것이다.

도 6a 내지 6c는 PD-L1 발현에 기초한 비율과 PD-1 차단제에 대한 치료 반응의 상관관계 분석 결과를 도시한 것이다.

도 7a 및 7b는 비세포성 폐암 환자에 대한 다형핵으로부터의 MDSC의 존재를 확인하기 위한, Lox-1 및 DCFDA의 수준 측정 결과를, 호중구와 비교하여 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 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 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0059] 이하에서는 도 1을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법의 절차에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0060] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법의 절차를 예시적으로 도시한 것이다.

[0061] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 예측 방법은 먼저 면역 항암 요법이 수행된 개체로부터 분리된 생물학적 시료내의 마커의 수준을 측정하고 (S110), 측정된 마커의 수준을 기초로 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하도록 구성된다 (S120).

[0062] 보다 구체적으로, 마커의 수준을 측정하는 단계 (S110)에서는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여, 단핵세포로부터의 MDSC, 다형핵으로부터의 MDSC, Lox-1의 다형핵 MDSC, T_{reg} 세포, CD8+ T세포, CD4+ T 세포, NK 세포 및 B 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커의 수준을 측정한다.

[0063] 일 실시예에 따르면, 개체는 비소세포성 폐암 의심 개체이고, 생물학적 시료는, 말초 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함할 수 있다. 나아가, 면역 항암 요법은 항 PD-1 치료일 수 있다. 바람직하게, 생물학적 시료는, 항 PD-1 치료가 수행된 비소세포성 폐암 의심 개체로부터 획득한 말초 혈액일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 다른 실시예에 따르면, 마커의 수준을 측정하는 단계 (S110)는 생물학적 시료 내의 단핵세포로부터의 MDSC, 상기 다형핵으로부터의 MDSC 및 Lox-1 양성 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의

MDSC의 수준 및 T_{reg} 세포의 수준 측정하도록 구성될 수 있다.

- [0065] 또 다른 실시예에 따르면, 마커의 수준을 측정하는 단계 (S110)에는 생물학적 시료 내의 단핵구로부터의 MDSC, 상기 다형핵으로부터의 MDSC 및 상기 Lox-1 양성 다형핵으로부터의 MDSC로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 MDSC의 수준 및 NK 세포의 수준을 측정하도록 구성될 수 있다.
- [0066] 다음으로, 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계 (S120)는, 선택된 MDSC의 수준 및 T_{reg} 세포의 수준의 비율을 기초로, 항 PD-1 치료 반응을 평가하도록 구성될 수 있다. 나아가, 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계 (S120)에서는 선택된 MDSC의 수준에 대한 T_{reg} 세포의 수준의 비율이 0.3 이상인 개체, 바람직하게는 상기 비율이 0.39 이상인 개체의 경우 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정할 수 있다.
- [0067] 다른 실시예에 따르면, 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계 (S120)에서는, T_{reg} 세포의 수준 또는 NK 세포의 수준이 항 PD-1가 수행되기 전의 수준보다 높은 개체와 MDSC의 수준이 항 PD-1가 수행되기 전의 수준보다 낮은 개체를 항 PD-1 치료 반응 양성으로 결정할 수 있다.
- [0068] 또 다른 실시예에 따르면, 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계 (S120)에서는, MDSC의 수준 및 NK 세포의 수준의 비율을 기초로, 상기 항 PD-1 치료 반응을 평가할 수 있다.
- [0069] 이상의 절차에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 치료 반응 예측 방법은, 다양한 마커의 수준을 측정함으로써 개체에 대한 면역 항암 요법, 특히 항 PD-1에 대한 치료 반응을 조기에 예측할 수 있도록 정보를 제공할 수 있다.
- [0070] 이하에서는 실시예 1 내지 실시예 3을 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 항 PD-1 치료 반응 예측 방법에서 이용되는 바이오 마커와, 이를 이용한 치료 반응 예측 방법에 대하여 설명한다.
- [0071] 이때, 20 세 이상의 재발성/전이성 비소세포성 폐암으로 확진 되었으며, 이전의 백금 기반 화학요법의 실패하였고, PD-1 차단제 1 회 이상 수행한 53명의 환자가 실험군으로 설정되었다. 이때, 치료 효능은 1 차 니볼루맙 (nivolumab) 주입 후 약 8 주째에 조영 증강 CT를 사용하여 CR (complete response), PR (partial response) 및 SD (stable disease) 로 정의된 임상 반응을 평가한다. 반응군 (R, responders) 는 PR 또는 SD가 6 개월 이상이고 비-반응군 (NR, non-responders) 는 6 개월 미만의 PR 또는 SD인 환자로 정의된다. 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 항 PD-1 치료 반응 예측 방법은 이에 제한되지 않고 다양한 비소세포성 폐암 개체에 대하여 적용될 수 있다.
- [0072] 나아가, 이하의 실시예에서는 환자로부터 획득된 말초 혈액을, PD-1 차단 반응 예측을 위한 생물학적 시료로 이용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0073] **실시예 1: PD-1 차단제에 대한 조기 치료 반응 예측을 위한 바이오 마커의 설정**
- [0074] 이하에서는, 도 2a 및 2b, 3a 내지 3d를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 항 PD-1 치료 반응을 예측하는 방법에 이용되는 바이오 마커에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0075] 도 2a 및 2b는 PD-1 차단제 치료에 따른 항 PD-1 치료에 대한 반응군 및 비-반응군에 대한 면역 세포들의 패턴을 도시한 것이다. 도 3a 내지 3d는 PD-1 차단제 치료에 따른 항 PD-1 치료에 대한 반응군 및 비-반응군에 대한 면역 세포들의 패턴에 대한 평가 결과를 도시한 것이다.
- [0076] 도 2a를 참조하면, 면역 세포에 대한 PD-1 차단 효과를 더 잘 확인하기 위해 치료 후 다른 시점에서 진행된 비소세포성 폐암 환자의 말초 혈액에서 B 세포, T세포, T_{reg} 세포, NK 세포 및 MDSC를 포함한 다양한 면역 세포의 비율을 모니터링한 결과가 도시된다.
- [0077] 도 2b를 참조하면, 항 PD-1 치료에 있어서, 면역 억제성 골수성 세포 (immunosuppressive myeloid cells) 인 MDSC의 영향을 평가하기 위해 MDSC를 단핵구 (M-MDSC, MDSC into monocytic) 및 다형핵 (PMN-MDSC, MDSC into polymorphnuclear) 의 하위 집합으로 포괄적으로 분석한 결과가 도시된다. 또한, PMN-MDSC의 개체군을 구별하는 마커로서 Lox-1를 이용하였다. 이때, PMN-MDSC (CD14-CD11b + CD33 + CD15 +), Lox-1 + PMN-MDSC (Lox-1 + PMN-MDSC) 및 M-MDSC (CD11b + HLA-DR^{low} / CD14 +) 를 종합적으로 분석하였다.
- [0078] 본 평가를 위해, 항 PD-1 치료법이 수행된 환자에 대하여, 전 처리 (pre-treatment), 1 차, 2 차 및 3 차 치료 시기 각각에서 혈액 샘플을 획득하였고, 각각의 처리 시기에 따른 면역 세포들의 변화를 모니터링 하였다.

- [0079] 보다 구체적으로 도 3a를 참조하면, 기저 수준 (baseline) 의 반응군 및 비-반응군에서, 전술한 면역 세포들의 패턴의 차이에 대한 결과가 나타난다. 기저 수준에서 B 세포, T 세포, CD4 + T 세포, T_{reg} 세포, Lox1 + PMN-MDSC의 비율은 반응군에서 높았지만 NK 세포, NKT 세포, CD8 + T 세포, M-MDSC, PMN-MDSC는 반응군에서 더 낮은 것으로 나타난다.
- [0080] 도 3b를 참조하면, 1 차 치료 후 NKT 세포, CD8 + T 세포, M-MDSC, PMN-MDSC 및 Lox-T 세포의 %는 1 차 치료 후 반응군에서 낮은 것으로 나타났으며, B 세포, NK 세포, T 세포, T 세포, CD4 + T 세포 및 T_{reg} 세포의 비율은 높은 것으로 나타난다.
- [0081] 도 3c를 참조하면, 그 중 기저 수준에서, CD45 + 세포에서 T_{reg}의 중간값 %는 반응군에서 비-반응군보다 유의하게 높은 것으로 나타난다.
- [0082] 도 3d의 (a), (b) 및 (c)를 참조하면, 1차 치료 후 (After 1st tx) T_{reg} 세포와 NK 세포의 중간값 %가 비-반응군보다 반응군에서 유의하게 높은 것으로 나타나며, 반응군에서의 Lox-1 + PMN-MDSC의 중간값 %는 비-반응군에서보다 유의하게 낮은 것으로 나타난다. 특히, T_{reg} 세포 및 Lox-1 + PMN-MDSC의 수준은 비-반응군과 반응군에서 유의한 차이를 보이는 것으로 나타난다.
- [0083] 이상의 실시예 1의 결과로 항 PD-1 치료 반응 유무에 따라 혈액 내의 T_{reg} 세포, NK 세포의 수준과 Lox-1 + PMN-MDSC의 수준이 유의한 차이를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이에, T_{reg} 세포, Lox-1 + PMN-MDSC 나아가 NK 세포 각각 또는, 이들의 조합은, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 면역 항암 요법에 대한 반응 예측 법에서 치료 반응의 예측을 위한 바이오 마커로서 이용될 수 있다.
- [0084] **실시예 2: Lox-1 + PMN-MDSC 수준에 대한 T_{reg} 세포의 비율에 기초한 PD-1 차단제에 대한 조기 치료 반응 예측**
- [0085] 이하에서는 도 4a 내지 4d를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 Lox-1 + PMN-MDSC 수준에 대한 T_{reg} 세포의 비율에 기초한, PD-1 차단제에 대한 조기 치료 반응 예측방법을 설명한다.
- [0086] 도 4a 내지 4d는 MDSC에 대한 T_{reg} 세포의 비율과 PD-1 차단제에 대한 치료 반응의 상관관계 분석 결과를 도시한 것이다.
- [0087] 도 4a를 참조하면, CD45 + 세포의 % T_{reg} 세포와 Lox-1 + PMN MDSC는 역상관 관계를 갖는 것으로 나타난다. 보다 구체적으로, T_{reg} 세포가 증가할수록, Lox-1 + PMN MDSC는 감소하는 것으로 나타난다.
- [0088] 도 4b를 참조하면, 1 차 PD-1 차단 후 (After 1st tx), 반응군의 T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 비가 비-반응군의 T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율보다 현저하게 높은 것으로 나타난다. 이는, T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율이 PD-1 차단 반응에 대한 바이오 마커로서 이용될 수 있음을 의미하는 결과일 수 있다.
- [0089] 한편, [표 1]을 참조하면, 진단 테스트의 차별 능력 측정 수단으로 사용되는 ROC 곡선의 AUC값, 임계의 cut-off 값, 민감도 및 특이도가 나타난다.

표 1

	AUC	P-value	Cut-off value	Sensitivity (%)	Specificity (%)
% T _{reg} /CD45	0.747	0.0060	1.003	70.0	68.18
% Lox-1 PMN-MDSC/CD45	0.82	0.0009	2.444	76.47	72.22
Ratio T _{reg} / Lox-1 PMN-MDSC	0.869	0.0001939	0.3929	88.24	72.22
PD-1	0.6648	0.0824			

[0090]

- [0091] 이때, 우수한 진단 능력과 연관된, 결과 적중률을 의미하는AUC (Area Under the Curve) 값은 Lox-1 PMN-MDSC의 퍼센트와 T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율에서 가장 높은 것으로 나타난다. 보다 구체적으로, T_{reg} /

CD45, Lox-1 + PMN-MDSC / CD45 및 T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC 비율에 해당하는 ROC 곡선은 각각 0.747, 0.820 및 0.869의 AUC를 나타낸다. 이에, T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율은 PD-1 차단 반응 예측을 위한 마커로서 이용될 수 있다. 나아가, 종래의 항 PD-1 차단 반응 예측을 위한 마커로 이용되는 PD-L1에 대한 AUC 값은 0.6648로 가장 낮은 것으로 나타난다. 이는, T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 발명의 다양한 실시예에서 이용되는 마커가, 종래의 PD-L1의 보다 항 PD-1 차단 반응 예측에 있어서 우수한 마커일 수 있음을 의미할 수 있다.

[0092] 도 4c를 함께 참조하면 통계적으로 유의한 이들 3 가지 후보 중, T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율이 가장 높은 AUC인 0.869를 나타내었으며, 높은 민감도와 특이성을 나타낸다. 이때, T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율의 cut off 값은 0.39로, 0.39 이상의 비율에서는 PD-1 차단 치료에 반응을 보이고, 0.39 이하의 비율에서는 PD-1 차단 치료에 반응을 보이지 않는 것으로 진단할 수 있다.

[0093] 도 4d를 참조하면, T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 계산된 cut-off 값을 확인하기 위해 cut-off 값인 0.39에 따라 KM 생존 곡선에 log-rank test를 수행한 결과가 나타난다. 1 차 치료 후 T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC / CD45 비율이 0.39 이상인 환자의 무진행 생존기간 (PFS, progress-free survival)은 0.39 미만인 환자보다 유의하게 긴 것으로 나타난다 (PFS, 103 일 VS 35 일, $P = 0.0079$).

[0094] 이상의 실시예 2의 결과로, T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율이 면역 항암 요법에 대한 반응 예측을 위한 마커로서 이용될 수 있으며, cut off 값인 0.39를 기준으로 항 PD-1 치료에 대한 반응군 및 비-반응군으로 분류할 수 있다. 이에, 본 발명은 개체의 PD-1 차단에 대한 조기 치료 반응을 높은 민감도로 예측함에 따라, 항 PD-1 치료에 대한 진행 여부를 빠르게 결정하도록 정보를 제공할 수 있는 효과가 있다.

[0095] 나아가, 암 환자의 종양 미세 환경에서 억제 기능을 발휘하는 MDSC는 말초 혈액 바이오 마커로서 비 침습적인 방법으로 적은 양의 혈액으로 항 PD-1 치료 반응 예측에 이용될 수 있다. 이상의 실시예 1 및 실시예 2의 결과는 MDSC에 의해 비소세포성 폐암 환자의 1 차 치료 후 반응이 초기에 예측될 수 있기 때문에 MDSC가 실용적인 지표가 될 수 있음을 시사할 수 있다. 나아가, 이상의 결과는 MDSC의 억제가 항 PD-1 치료에 항 종양 활성을 유도할 수 있음을 시사할 수 있다.

[0096] 또한, 전술한 실시예 1 및 실시예 2에서 비소세포성 폐암 환자에서 항 PD-1 요법에 대한 PMN-MDSC의 역할을 규명하기 위해 말초 혈액에서 과립구 특이 CD15 항체로 세포를 표지하고 CD15 + 세포에서 Lox-1의 발현을 평가한 결과, 1 차 치료 후 Lox-1 + PMN-MDSC가 M-MDSC 및 PMN-MDSC보다 PD-1 차단에서 보다 민감하게 변화하는 것을 보였다. 이 결과는 Lox-1 PMN-MDSC가 비소세포성 폐암 환자에 대한 면역 억제 기능이 있는 MDSC의 특이적인 서브세트이며 PD-1 차단의 예측 가능성이 있음을 시사할 수 있다.

[0097] 결론적으로, 1 차 치료 후 말초 혈액에서의 T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC 비율은, PD-1 차단 치료 후 비소세포성 폐암 환자로부터 치료 반응을 효과적으로 예측할 수 있다. 이러한 예측 바이오 마커는 이미징 스캔에 의한 종양 평가보다 치료를 진행할지 유무를 초기에 결정할 수 있는 근거를 제공할 수 있으므로, 비소세포성 폐암 환자에 대한 PD-1 차단 효과를 극대화할 수 있다.

[0098] **실시예 3: Lox-1 + PMN-MDSC 수준에 대한 NK 세포의 비율에 기초한 PD-1 차단제에 대한 조기 치료 반응 예측**

[0099] 이하에서는 도 5a 내지 5c를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 Lox-1 + PMN-MDSC 수준에 대한 NK 세포의 비율에 기초한, PD-1 차단제에 대한 조기 치료 반응 예측방법을 설명한다.

[0100] 도 5a 내지 5c는 MDSC에 대한 NK 세포의 비율과 PD-1 차단제에 대한 치료 반응의 상관관계 분석 결과를 도시한 것이다.

[0101] 도 5a의 (a)를 참조하면, 니볼루맵을 이용한 1 차 항 PD-1 치료 후, 항 PD-1 치료에 대한 반응군의 MDSC에 대한 NK 세포의 비율 (NMR, NK cells to Lox-1⁺PMN-MDSC ratio)은, 항 PD-1 치료에 대한 비-반응군보다 현저하게 높은 것으로 나타난다.

[0102] 보다 구체적으로, 도 5a의 (b)를 참조하면, 니볼루맵이 투여된 비소세포성 폐암 환자에 있어서, MDSC에 대한 NK 세포의 비율이 5.75 이상인 그룹의 무진행 생존기간은 103 일로, MDSC에 대한 NK 세포의 비율이 5.75 미만인 그룹의 38 일보다 유의하게 긴 것으로 나타난다. 즉, 이상의 결과는 MDSC에 대한 NK 세포의 비율이 5.75 이상인

그룹은 5.75 미만인 그룹보다, 니볼루맵에 대한 치료 반응성이 높음에 따라 무진행 생존 기간이 길어진 것을 의미할 수 있다.

[0103] 도 5b를 참조하면, MDSC에 대한 NK 세포의 비율이 5.75 이상인 그룹에서, 항 PD-1 치료에 대한 반응군의 비율은 약 80 %이고, MDSC에 대한 NK 세포의 비율이 5.75 미만인 그룹에서, 항 PD-1 치료에 대한 비-반응군의 비율은 약 90 %로 나타난다. 즉, 이상의 결과는 MDSC에 대한 NK 세포의 비율이 5.75 이상인 그룹은 5.75 미만인 그룹보다, 니볼루맵에 대한 치료 반응성이 높다는 것을 의미할 수 있다.

[0104] 도 5c를 참조하면, MDSC에 대한 NK 세포의 비율의 ROC 곡선은, 0.862의 높은 AUC 값을 갖으며, 특이도 및 민감도가 높은 것으로 나타난다. 이에, MDSC에 대한 NK 세포의 비율은 PD-1 차단 반응 예측을 위한 마커로서 이용될 수 있다.

[0105] 이상의 실시예 3의 결과로, NK / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율이 면역 항암 요법에 대한 반응 예측을 위한 마커로서 이용될 수 있으며, cut off 값인 5.57을 기준으로 항 PD-1 치료에 대한 반응군 및 비-반응군으로 분류할 수 있다. 이에, 본 발명은 개체의 PD-1 차단에 대한 조기 치료 반응을 높은 민감도로 예측함에 따라, 항 PD-1 치료에 대한 진행 여부를 빠르게 결정하도록 정보를 제공할 수 있는 효과가 있다.

[0106] 나아가, 1 차 치료 후 말초 혈액에서의 NK / Lox-1 + PMN-MDSC 비율은, PD-1 차단 치료 후 비소세포성 폐암 환자로부터 치료 반응을 효과적으로 예측할 수 있다. 이러한 예측 바이오 마커는 이미징 스캔에 의한 종양 평가보다 치료를 진행할지 유무를 조기에 결정할 수 있는 근거를 제공할 수 있으므로, 비소세포성 폐암 환자에 대한 PD-1 차단 효과를 극대화할 수 있다.

[0107] **비교예 1: PD-L1 발현 수준에 기초한 PD-1 차단제에 대한 조기 치료 반응 예측**

[0108] 이하에서는 도 6a 내지 6c를 참조하여, 종래의 항 PD-1 차단 반응 예측을 위한 마커로 이용되는 PD-L1 발현에 기초한, PD-1 차단에 대한 치료 반응 예측 결과를 설명한다.

[0109] 도 6a 내지 6c는 PD-L1 발현에 기초한 비율과 PD-1 차단제에 대한 치료 반응의 상관관계 분석 결과를 도시한 것이다.

[0110] 도 6a를 참조하면, PD-L1 발현 양성인 그룹에 있어서, 항 PD-1 치료에 대하여 반응성을 갖는 반응군은 약 40 %의 비율로, 비-반응군은 약 60 %의 비율로 나타난다. 나아가, PD-L1 발현 음성인 그룹에 있어서, 항 PD-1 치료에 반응하는 반응군은 약 30 %의 비율로, 비-반응군은 약 70 %의 비율로 나타난다. 이러한 결과는, PD-L1 발현 양상에 따른 종래의 항 PD-1 치료에 대한 치료 반응 예측 방법은 큰 변별력이 없는 것을 의미할 수 있다.

[0111] 도 6b를 참조하면, PD-L1 발현 양상은, 진단 능력과 연관된 ROC 곡선의 AUC값이 0.578의 낮은 수준을 나타냄에 따라, 항 PD-1 치료에 대한 치료 반응과 관련하여 큰 변별력이 없는 것으로 나타난다. 이는 전술한 도 4c 및 5c에서, 본 발명의 다양한 실시예에서 이용되는 $T_{reg} / \text{Lox-1} + \text{PMN-MDSC}$ 의 비율 및 NK / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율 각각이 0.869 및 0.862의 높은 AUC 값을 나타낸 결과와 대조적이다. 나아가, PD-L1 발현 양상은, 낮은 특이도에서 민감도 또한 매우 낮은 수준으로 나타난다.

[0112] 도 6c의 (a)를 참조하면, 46세의 비소세포성 폐암 환자는, 종래의 PD-1 차단에 대한 바이오마커로서 이용되는 PD-L1 발현 수준이 90 %로 나타남에 따라, PD-1 차단 치료에 대하여 반응성이 높을 것으로 예측될 수 있다. 그러나, 치료가 수행되기 전의 기저 수준 및 1 차 치료 결과를 보았을 때, PD-1 차단 치료에 대하여 반응성이 높을 것으로 예측된 환자는 PD-1 차단제를 투여에 따른 치료 효과가 없는 것으로 나타난다.

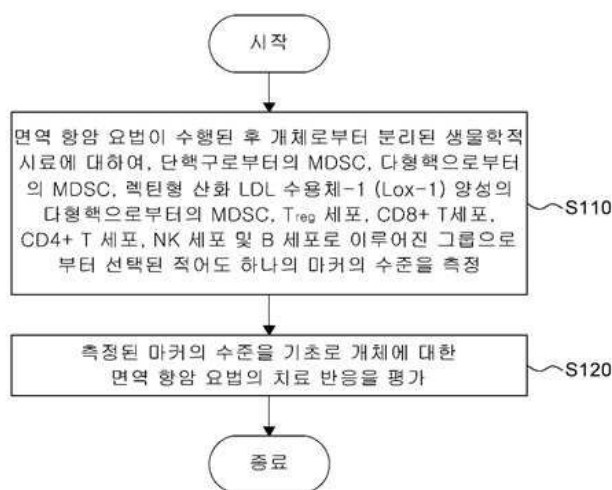
[0113] 나아가, 도 6 c의 (b)를 참조하면, 65세의 비소세포성 폐암 환자는, 종래의 PD-1 차단에 대한 바이오마커로서 이용되는 PD-L1의 발현이 나타나지 않음에 따라, PD-1 차단 치료에 대하여 반응성이 낮을 것으로 예측될 수 있다. 그러나, 치료가 수행되기 전의 기저 수준 및 1 차 치료 결과를 보았을 때, 병변의 크기는 1 차 치료 후 감소됨에 따라 PD-1 차단 치료에 대하여 효과가 있는 것으로 나타난다.

[0114] 한편, 다시 도 6c의 (a)를 참조하면 본 발명의 다양한 실시예에서 이용되는 $T_{reg} / \text{Lox-1} + \text{PMN-MDSC}$ 의 비율 (TMR, T_{reg} cells to Lox-1+PMN-MDSC ratio) 을 고려했을 때, 0.115의 TMR을 나타내는 비소세포성 폐암 환자 (TMR<0.39) 는, 항 PD-1에 대하여 치료 반응성이 낮은 것으로 정확하게 평가될 수 있다. 나아가, 6c의 (b)를 참조하면, 1.060의 TMR을 나타내는 비소세포성 폐암 환자 (TMR ≥ 0.39) 는, 항 PD-1에 대하여 치료 반응성이 높은 것으로 정확하게 평가될 수 있다.

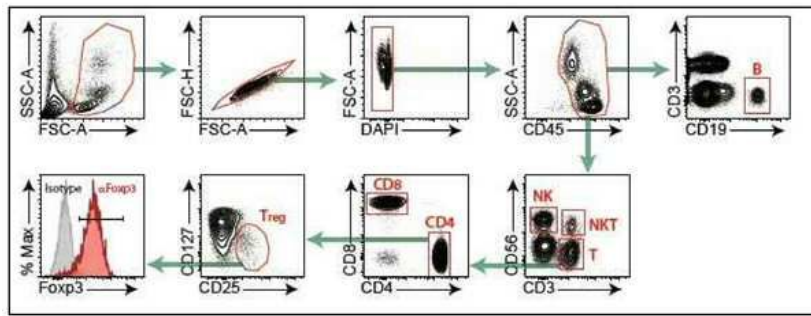
- [0115] 이상의 비교예 1의 결과로, 면역 항암 요법 특히 항 PD-1 치료에 대한 치료 반응성 예측을 위해 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 T_{reg} / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율 및 NK / Lox-1 + PMN-MDSC의 비율은, 종래의 PD-L1의 발현 양상보다 높은 정확도로 치료 반응성을 예측할 수 있다.
- [0116] **비교예 2: 호중구와 PMN-MDSC의 비교**
- [0117] 이하에서는 도 7a 내지 7b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 항-PD-1 치료 반응 예측 방법에서 이용되는 바이오 마커인, PMN-MDSC와 호중구 (neutrophil) 을 비교하여 설명한다.
- [0118] 도 7a 및 7b는 비세포성 폐암 환자에 대한 다형핵으로부터의 MDSC의 존재를 확인하기 위한, Lox-1 및 DCFDA의 수준 측정 결과를, 호중구와 비교하여 도시한 것이다.
- [0119] 도 7a의 (a) 및 (b)를 참조하면, 비세포성 폐암 환자 내에서의 PMN-MDSC의 존재를 확인하기 위해, 호중구와 구별될 수 있는 Lox-1과 같은 특정 마커를 측정한 결과가 나타난다. 그 결과, Lox-1은 호중구가 아닌 PMN-MDSC에서 고도로 발현하는 것으로 나타난다.
- [0120] 도 7b의 (a) 및 (b)를 참조하면, 면역 억제 기능에 기여하는 활성 산소 종 (ROS) 에 대한 지표 마커인 DCFDA (dichlorodihydrofluorescein diacetate) 를, 호중구 및 PMN-MDSC에 처리한 결과가 나타난다. 그 결과, DCFDA는 호중구와 비교하여 PMN-MDSC상에서 고도로 나타난다. 이는, PMN-MDSC가 암 환자에서 면역 억제 기능을 갖는 진정한 MDSC 집단임을 시사하는 것이다.
- [0121] 본 발명의 여러 실시예들의 각각 특징들이 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실시예들이 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.
- [0122] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 37-25 2017-12-29 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

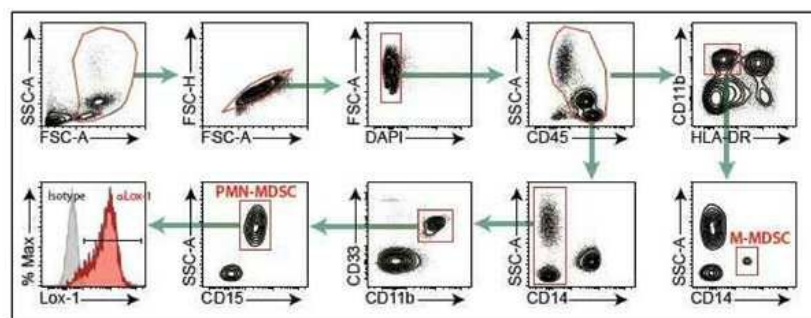
도면1



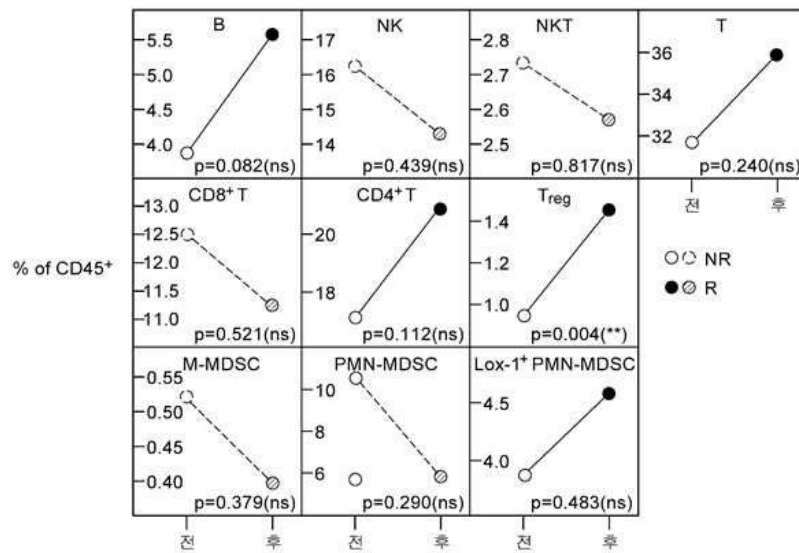
도면2a



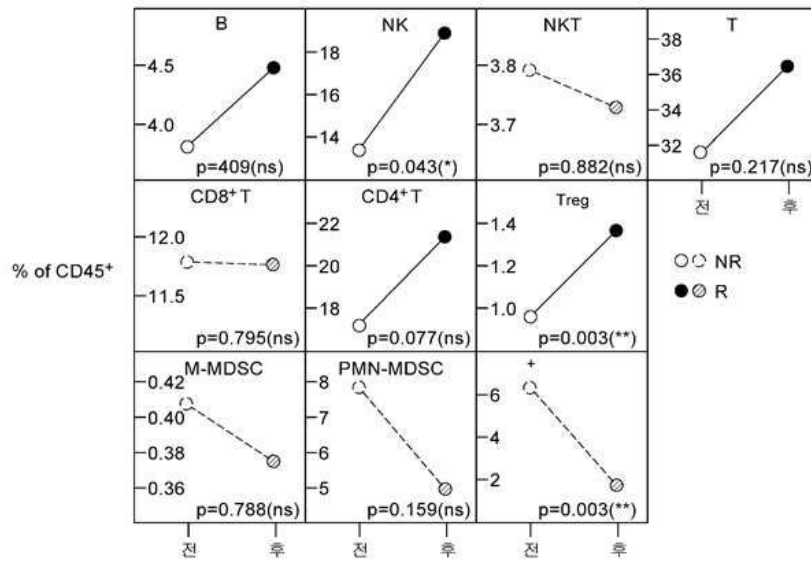
도면2b



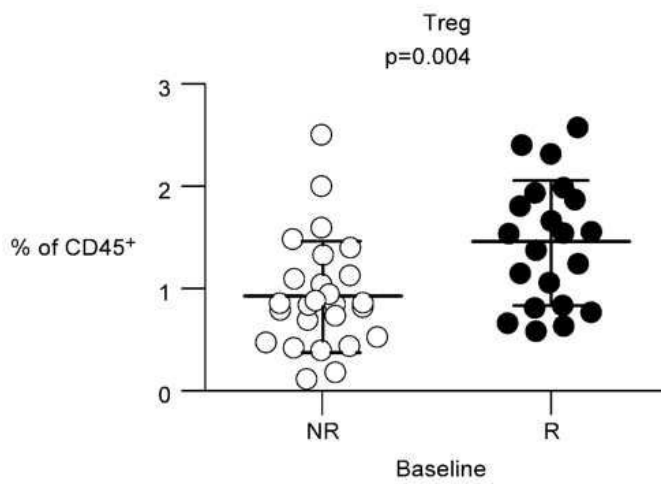
도면3a



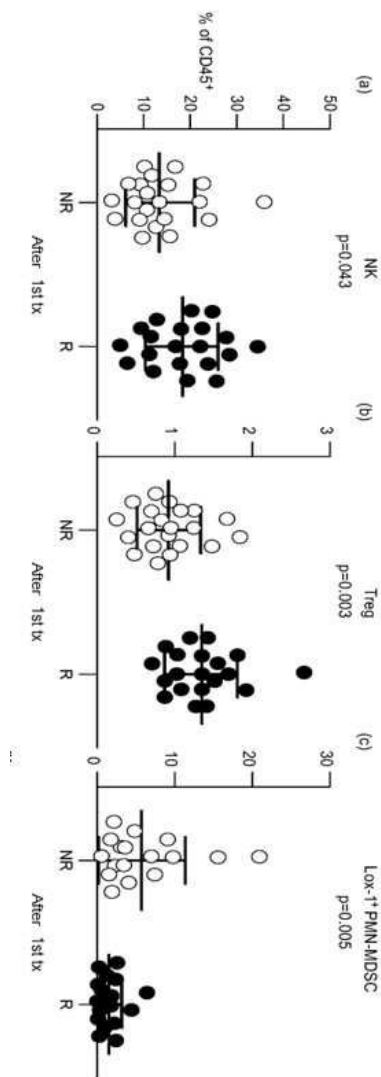
도면3b



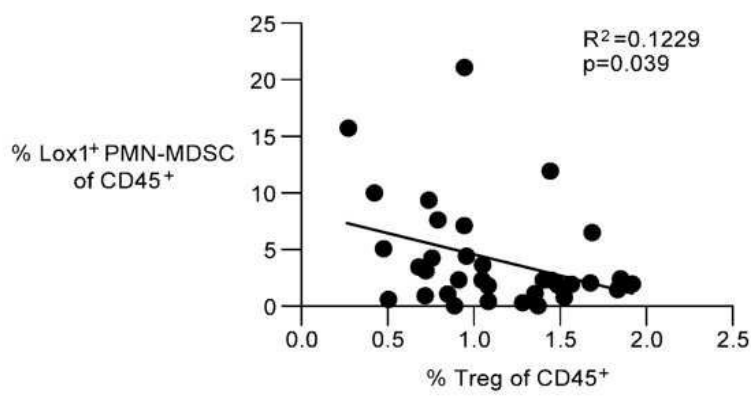
도면3c



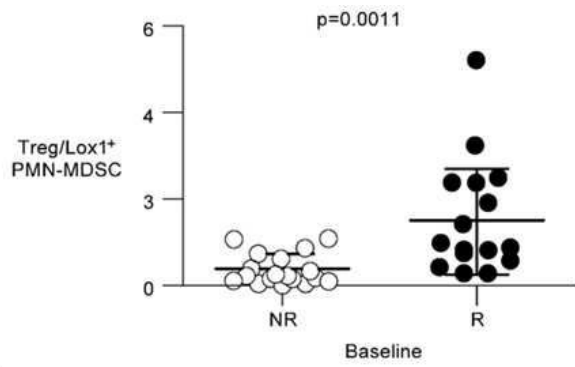
도면3d



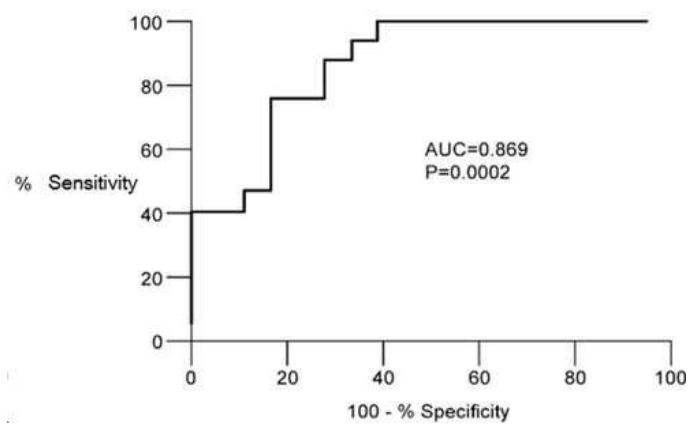
도면4a



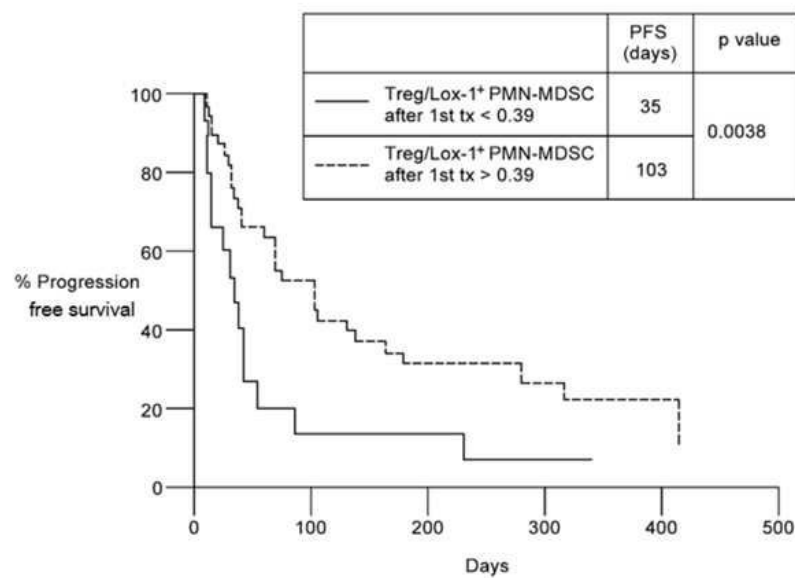
도면4b



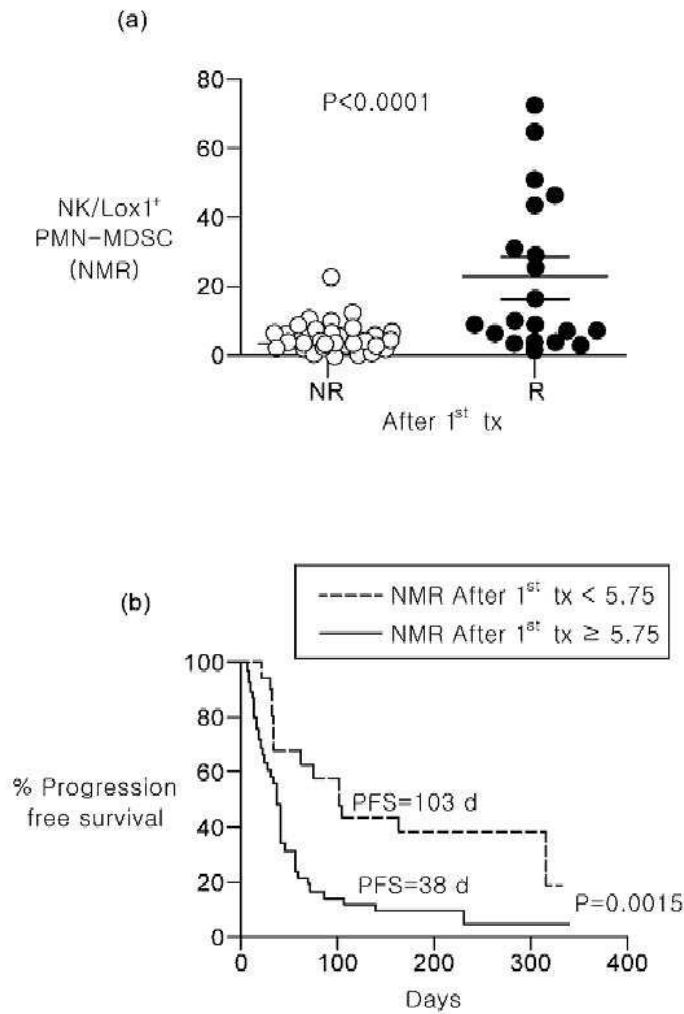
도면4c



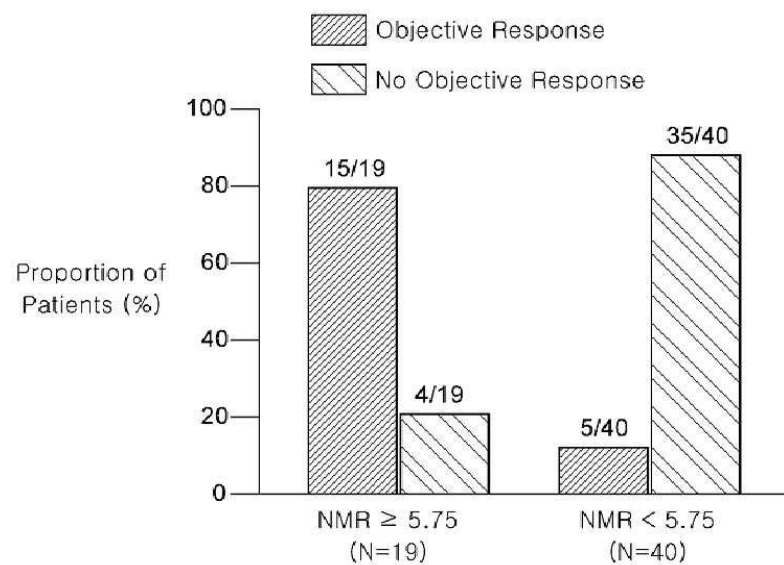
도면4d



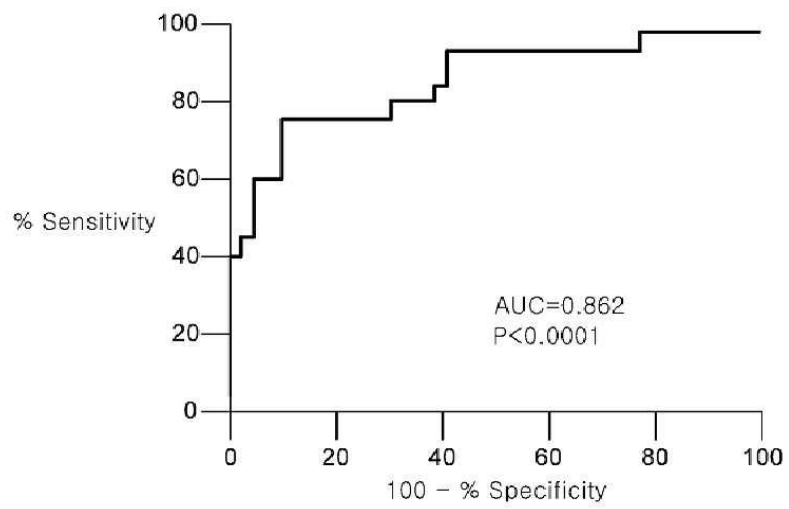
도면5a



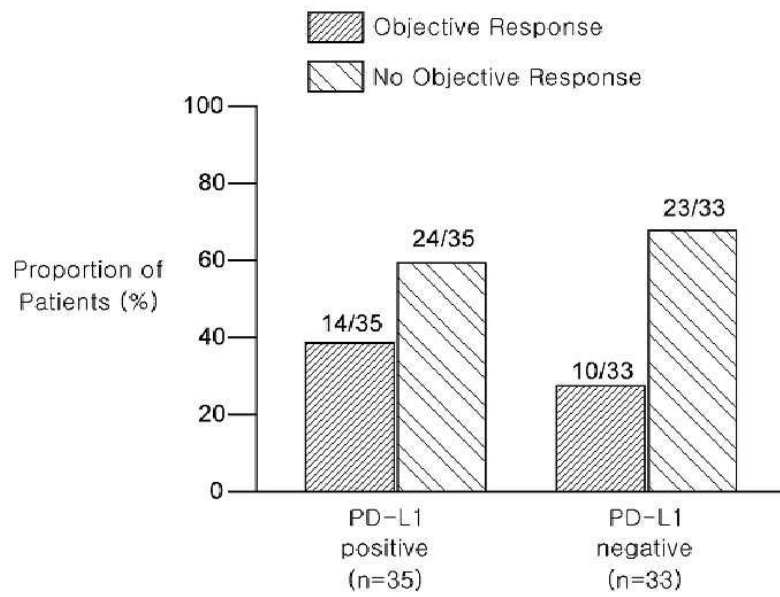
도면5b



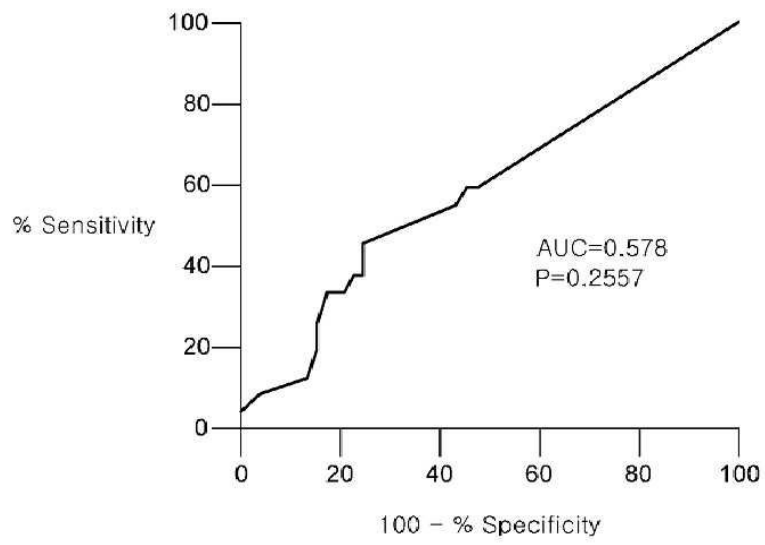
도면5c



도면6a

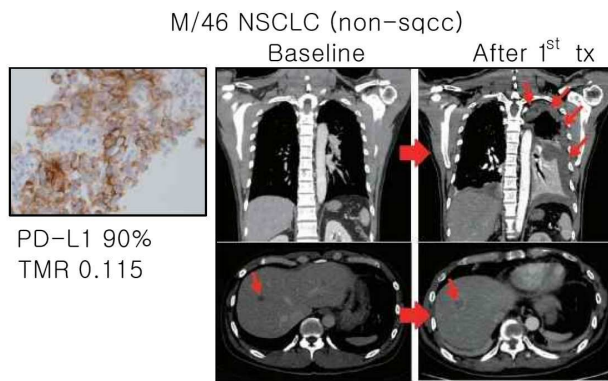


도면6b

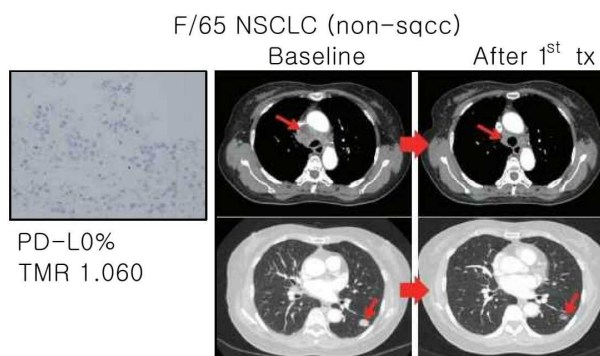


도면6c

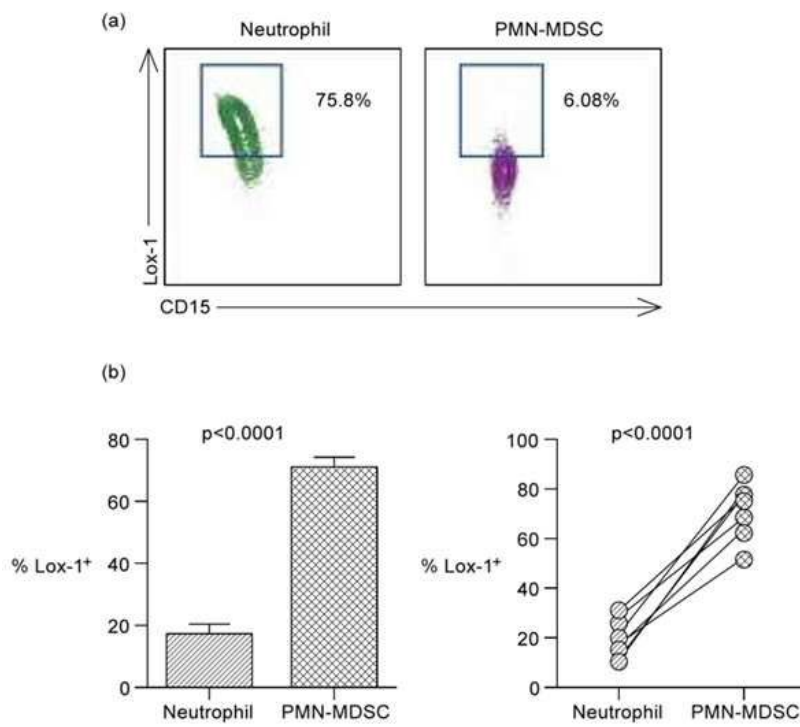
(a)



(b)



도면7a



도면7b

