



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월26일

(11) 등록번호 10-2169901

(24) 등록일자 2020년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2018.05)

C12Q 2600/118 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0057913

(22) 출원일자 2019년05월17일

심사청구일자 2019년05월17일

(56) 선행기술조사문헌

JP2008535853 A*

KR1020130041961 A*

KR1020130055553 A*

KR1020130041962 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김혜련

서울특별시 서대문구 가재울미래로 2 DMC파크뷰아파트 118동 2205호

이인석

서울특별시 중구 다산로 56 남산정은스카이라파트 303호

조재원

서울특별시 강남구 학동로64길 7, 101동 306호

(74) 대리인

특허법인인벤싱크

전체 청구항 수 : 총 16 항

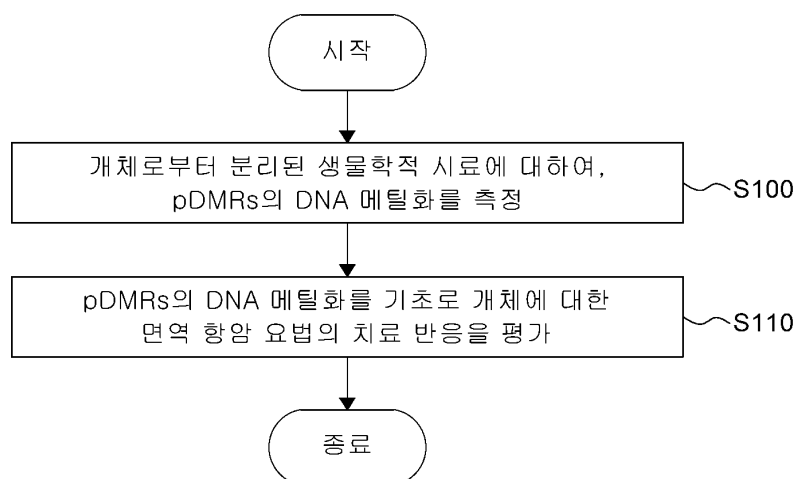
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 DNA 메틸화를 이용한 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법 및 이를 이용한 키트

(57) 요약

본 명세서에서는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하는 단계 및 측정된 pDMRs의 DNA 메틸화를 기초로 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법 및 이를 이용한 정보 제공용 키트가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/154 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1A5A2025079
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 만성난치질환 시스템의학 연구센터
기 여 율 1/4
과제수행기관명 연세대학교 산학협력단
연구기간 2018.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018M3C9A5064709
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 포스트게놈다부처유전체사업
연구과제명 유전체 빅데이터 활용을 위한 네트워크증강분석 웹서비스 개발
기 여 율 1/4
과제수행기관명 연세대학교 산학협력단
연구기간 2018.07.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1B03029874
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 폐암환자 말초혈액의 면역마커를 이용한 면역항암제 치료예측인자 규명을 통한 효율적인 면역항암치료 전략 구축

기 여 율 1/6
과제수행기관명 연세대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 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 1/6
과제수행기관명 연세대학교
연구기간 2019.04.01 ~ 2020.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9E8029717
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명 유전자, 면역 바이오마커를 이용한 진행성 폐암의 치료효과 및 부작용 정밀 예측
기 여 율 1/6
과제수행기관명 연세대학교
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CYTIP 및 TNFSF8로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자에 대한 pDMRs(promoter associated differentially methylated regions)의 DNA 메틸화를 측정하는 단계; 및

측정된 상기 CYTIP 및 TNFSF8로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화를 기초로 상기 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 개체는, 비소세포성 폐암 의심 개체이고,

상기 생물학적 시료는, 종양 조직, 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함하고, 면역 항암 요법이 수행되기 전 상기 개체로부터 분리된, 면역 항암 요법의 치료 반응 예측에 관한 정보 제공 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 pDMRs의 DNA 메틸화 측정하는 단계는,

상기 pDMRs의 DNA 메틸화 여부 또는 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계는,

측정된 상기 CYTIP 및 TNFSF8 로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 미리 결정된 수준 미만일 경우 양성으로, 미리 결정된 수준 이상일 경우 음성으로 결정하는 단계, 및

상기 DNA 메틸화 수준의 양성 또는 음성 여부를 기초로, 상기 면역 항암 요법의 치료반응을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 유전자는 적어도 하나의 상기 CYTIP 유전자를 포함하고,

상기 치료반응을 평가하는 단계는,

상기 생물학적 시료에서 상기 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 50% 미만인 경우, 상기 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 유전자는 적어도 하나의 상기 TNFSF8 유전자를 포함하고,

상기 치료반응을 평가하는 단계는,

상기 생물학적 시료에서 상기 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 60% 미만인 경우, 상기 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법.

청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 유전자는 상기 CYTIP 및 TNFSF8 유전자 조합을 포함하고,

상기 치료반응을 평가하는 단계는,

상기 생물학적 시료에서 상기 CYTIP 및 TNFSF8 유전자 조합에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 미리 결정된 수준 미만인 경우, 상기 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 면역 항암 요법은,

항 CTLA-4 치료, 항 PD-1 치료, 항 CD28 치료, 항 KIR 치료, 항 TCR 치료, 항 LAG-3 치료, 항 TIM-3 치료, 항 TIGIT 치료, 항 A2aR 치료, 항 ICOS 치료, 항 OX40 치료, 항 4-1BB 치료 및 항 GITR 치료로 구성된 그룹 중 선택된 적어도 하나의 요법인, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법.

청구항 9

개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CYTIP 및 TNFSF8로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자에 대한 pDMRs(promoter associated differentially methylated regions)의 DNA 메틸화를 측정하도록 구성된 체제를 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 개체는, 비소세포성 폐암 의심 개체이고,

상기 생물학적 시료는, 종양 조직, 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함하고, 면역 항암 요법이 수행되기 전 상기 개체로부터 분리된, 면역 항암 요법의 치료 반응 예측에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 pDMRs의 DNA 메틸화 측정은,

상기 pDMRs의 DNA 메틸화 여부 또는 메틸화 수준을 측정하는 것을 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 12

제 9항에 있어서,

상기 체제는,

상기 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CYTIP 및 TNFSF8 로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하도록 구성된 체제를 포함하고,

상기 키트는,

측정된 상기 pDMRs의 DNA 메틸화를 기초로 상기 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응에 대하여 양성 또는 음성으로 나타나도록 구성된, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 제제는,

상기 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준을 측정하도록 구성된 적어도 하나의 제제를 포함하고,

상기 키트는,

상기 생물학적 시료에서 상기 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 50% 미만인 경우 상기 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성 또는, 상기 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 50% 이상인 경우 상기 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 음성으로 나타나도록 더 구성된, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 제제는,

상기 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준을 측정하도록 구성된 적어도 하나의 제제를 포함하고,

상기 키트는,

상기 생물학적 시료에서 상기 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 60% 미만인 경우 상기 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성 또는, 상기 TNFSF 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 60% 이상인 경우 상기 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 음성으로 나타나도록 더 구성된, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 15

제 12항에 있어서,

상기 제제는,

상기 CYTIP 및 TNFSF8 유전자 조합에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준을 측정하도록 구성된 제제를 포함하고,

상기 키트는,

상기 생물학적 시료에서 상기 CYTIP 및 TNFSF8 유전자 조합에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 미리 결정된 수준 미만인 경우 상기 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성 또는, 상기 CYTIP 및 TNFSF8 유전자 조합에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 미리 결정된 수준 이상인 경우 상기 개체를 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 음성으로 나타나도록 더 구성된, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공용 키트.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 면역 항암 요법은,

항 CTLA-4 치료, 항 PD-1 치료, 항 CD28 치료, 항 KIR 치료, 항 TCR 치료, 항 LAG-3 치료, 항 TIM-3 치료, 항 TIGIT 치료, 항 A2aR 치료, 항 ICOS 치료, 항 OX40 치료, 항 4-1BB 치료 및 항 GITR 치료로 구성된 그룹 중 선택된 적어도 하나의 요법인, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공용 키트.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 면역 항암 요법의 치료 반응과 관련한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 바이오

[0001]

마커를 이용하여 비소세포성 폐암에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보를 제공하는 방법과 이를 기초한 키트에 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 종양 세포의 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.

문헌번호 한국 공개특허공보 제10-2013-0041961호(2013.04.25.)

문헌번호 한국 공개특허공보 제10-2013-0055553호(2013.05.28.)

문헌번호 일본 공표특허공보 제2008-535853호(2008.09.04.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 비소세포성 폐암의 치료 방법으로 면역 관문 차단제 (Immune checkpoint blockade)의 이용이 제안되었다. 특히, 식품의약품안전처에 의해 승인된 PD-1 (programmed cell death-1) / PD-L1 (programmed cell death ligand-1) 차단제는 비소세포성 폐암의 치료에 효과적인 것으로 나타났다.

[0008] 한편, PD-L1 차단제의 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 세포에서의 PD-L1 발현 의존적인 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 임상시험, (예를 들어 Checkmate 057)에서 PD-L1 양성인 경우와 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] 한편, 본 발명자의 발명자들은, DNA 메틸화(methylation)를 통한 종양의 후성적 조절이 면역원성회복 뿐 아니라 암세포의 면역 회피와 연관되어 있으며, 메틸화 기반 바이오마커는 종양 샘플의 이질성에 대한 내성과 안정성을 포함하여 계층 및 전사 바이오마커에 비해 많은 장점이 있다는 것을 주목하였다.

- [0010] 이에, 본 발명자들은 강력한 예측력을 갖춘 후보를 선택하기 위하여 DNA 메틸화와 mRNA 발현 데이터를 통합하여 기능적으로 더 관련성 있는 DMRs(differentially methylated regions)을 엄격한 기준으로 선별하였다. 그 결과, 후속 검증을 위한 후보 바이오 마커로 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs(promoter associated differentially methylated regions) 발견할 수 있었다.
- [0011] 특히, 본 발명의 발명자들은 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화가 비소세포성 폐암의 면역 항암 요법인 항 PD-1 치료 반응자 및 비-반응자에 따라 유의한 차이를 나타내는 것에 주목하였다. 그 결과, 본 발명의 발명자들은 CYTIP 및 TNFSF8 에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하여 항 PD-1 치료에 대한 반응자 또는 비-반응자를 예측할 수 있는 새로운 정보 제공 방법을 개발할 수 있었다. 특히 본 방법은, 종래의 항 PD-1 치료의 반응성 예측 방법인 종양 PD-L1발현 보다 우수한 예측력을 갖는 것으로 나타남에 따라 PD-L1 이외에 독립적으로 사용될 수 있는 바이오 마커로 활용될 수 있다.
- [0012] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하고, 이들의 pDMRs의 DNA 메틸화를 기초로 면역 항암 요법, 특히 항 PD-1 치료에 대한 치료 반응을 예측하도록 구성된, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법 및 이를 이용한 키트를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는, 면역 항암 요법이 수행되기 전 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA의 메틸화를 측정하고, pDMRs의 DNA 메틸화에 대하여 미리 결정된 임계치를 기초로 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 보다 정확하게 예측하도록 구성된, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법 및 이를 이용한 키트를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는, 생물학적 시료로부터 측정된 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화를 기초로, 개체마다 예측가 좋을 것으로 예측되는 면역 항암 요법을 제시할 수 있는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법 및 이를 이용한 키트를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는, 폐암, 특히 비소세포성 폐암에 대하여 진단에 연관된 정보를 제공할 수 있는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법 및 이를 이용한 키트를 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하는 단계, 바람직하게는 CYTIP 및 TNFSF8 로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자의 pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하는 단계 및 pDMRs의 DNA 메틸화를 기초로 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계를 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법이 제공된다.
- [0018] 이때, pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하는 단계는, pDMRs의 DNA 메틸화의 여부 또는 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 특징에 따르면, 개체는 비소세포성 폐암 의심 개체이고, 생물학적 시료는 종양 조직, 말초 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0020] 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 치료일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 항 CTLA-4 치료, 항 CD28 치료, 항 KIR 치료, 항 TCR 치료, 항 LAG-3 치료, 항 TIM-3 치료, 항 TIGIT 치료, 항 A2aR 치료, 항 ICOS 치료, 항 OX40 치료, 항 4-1BB 치료 및 항 GITR 치료로 구성된 그룹 중 선택된 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항 PD-1 치료"는, T 세포가 종양 세포를 공격하지 못하는 기전을 차단하도록 구성된 치료법일 수 있다. 보다 구체적으로, 항 PD-1 치료는, 종양 세포의 표면 단백질 중 면역 관문 리간드인 PD-L1, 및 PD-L2가 T 세포의 표면에 있는 단백질의 면역 관문 수용체인 PD-1과 결합하는 것을 차단하는 것에 기초할 수 있다. 예를 들어, 면역 항암제가 T 세포의 PD-1 수용체에 결합하면, 종양 세포에 의한 T 세포 기능 저하가 차단되고 결과적으로 활성화된 T 세포가 종양 세포를 살상할 수 있다. 이에, 본 명세서에서 "항 PD-1 치료"는 "PD-1 경로 차단"과 동일한 의미로 이용될 수 있다.

- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 “pDMRs (promoter associated differentially methylated regions)”는 면역 항암 요법의 반응자와 비-반응자 종양 조직 사이에서 유전자에 대한 프로모터의 DNA 메틸화 존재 여부가 다른 영역 또는, 메틸화의 수준이 차이가 나는 영역을 의미한다. 그러나 이에 제한되는 것은 아니며, 조직, 세포 및 개체들 간 메틸화 상태가 다른 DNA 영역을 포함할 수 있다. 또한, DMR은 유전자 전사 조절이 가능한 기능적 영역일 수 있으며, DMR의 확인은 인간 조직의 후성적 차이에 대한 정보를 제공할 수도 있다.
- [0023] 한편, 개체로부터 획득한 생물학적 시료에서 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화는 면역 항암 치료, 특히 항 PD-1 치료에 대한 반응 예측을 위한 바이오 마커로서 이용될 수 있다. 이때, 생물학적 시료는, 면역 항암 요법이 수행되기 전의 개체로부터 획득한 종양 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 나아가, 전술한 바이오마커는 치료 반응 예측을 위해 각각 독립적으로, 또는 다양한 조합으로 이용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다양한 실시예에서, 면역 항암 요법이 수행되기 전 개체로부터 획득된 종양 조직에서 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화는, 개체의 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성 또는 음성을 결정하는 것에 이용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 면역 항암 요법이 수행되기 전 개체에서 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이, 미리 결정된 수준 미만인 경우 상기 개체는 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성으로, 미리 결정된 수준 이상인 경우 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 음성으로 평가될 수 있다. 이때, 치료반응 여부 평가에서 미리 결정된 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준은 50%일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 면역 항암 요법이 수행되기 전 개체에서 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이, 미리 결정된 수준 미만인 경우 상기 개체는 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성으로, 미리 결정된 수준 이상인 경우 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 음성으로 평가될 수 있다. 이때, 치료반응 여부 평가에서 미리 결정된 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준은 60%일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 면역 항암 요법이 수행되기 전 개체에서 CYTIP 및 TNFSF8 유전자 조합에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이, 미리 결정된 수준 미만인 경우 상기 개체는 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성으로, 미리 결정된 수준 이상인 경우 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 음성을 평가될 수 있다.
- [0028] 한편, 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료 반응 양성"은, PD-1 차단제 같은 면역 관문 차단제에 의해 T 세포의 표면의 수용체가 종양 세포 표면의 리간드와의 결합이 차단되는 반응의 발생을 의미할 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않고, 치료 반응 양성은 면역 관문 차단제에 의한 비소세포성 폐암 증상의 완화 또는 좋은 예후 (favorable prognosis)와 연관된 모든 반응의 발생을 포함할 수 있다. 따라서, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성인 개체는, 면역 항암 요법에 따라 비소세포성 폐암의 증상이 완화될 수 있고, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 음성인 개체는 면역 항암 요법에 따른 예후가 상대적으로 좋지 않을 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하도록 구성된 제제, 바람직하게는 CYTIP 및 TNFSF8 로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자의 pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하도록 구성된 제제를 포함하는, 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공용 키트가 제공된다.
- [0030] 본 발명의 특징에 따르면, 정보 제공용 키트는 CYTIP 및 TNFSF8 로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자의 pDMRs의 DNA 메틸화, 바람직하게는 pDMRs의 DNA 메틸화 여부 또는 수준을 기초로 면역 항암 요법의 치료 반응에 대하여 양성 또는 음성으로 나타나도록 구성되고, 면역 항암 요법은 항 PD-1 치료일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 이때, 개체는 비소세포성 폐암 의심 개체이고, 생물학적 시료는, 종양 조직, 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나를 포함하고, 면역 항암요법이 수행되기 전 개체로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 나아가, 본 발명의 다른 실시예에 따른 키트는, 전체 생존 (OS), 무진행 생존 (PFS), 완전 반응 (CR) 또는, 부분 반응 (PR) 과 같은 임상 이익 증가에 대한 정보를 더 제공하도록 구성될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 특징에 따르면 키트는, 면역 항암 요법이 수행되기 전에 개체로부터 획득한 생물학적 시료에서 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 50% 미만인 경우 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성으로 또는, CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 50% 이상인 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 음성으로

나타나도록 구성될 수 있다.

[0034] 본 발명의 다른 특징에 따르면 키트는, 면역 항암 요법이 수행되기 전에 개체로부터 획득한 생물학적 시료에서 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 60% 미만인 경우 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성으로 또는, TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 메틸레이션 수준이 60% 이상인 경우, 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 음성으로 나타나도록 구성될 수 있다.

[0035] 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

[0036] 본 발명은, 면역 항암 요법, 특히 PD-1 차단에 대한 치료 반응을 예측할 수 있는 새로운 바이오 마커를 제공할 수 있는 효과가 있다.

[0037] 보다 구체적으로, 본 발명은 면역 항암 요법, 바람직하게는 항 PD-1 치료가 수행되기 전에 개체로부터 획득한 생물학적 시료에 대하여 치료 반응성에 대한 예측의 정확도가 높은 바이오마커를 제공할 수 있다. 이에, 본 발명은 종래의 항 PD-1 치료의 반응성을 예측하기 위한 바이오마커들에 기초한 예측 방법보다, 정확한 진단에 효과적일 수 있는 정보를 제공할 수 있다.

[0038] 나아가, 본 발명은 바이오 마커에 대한 DNA 메틸화 측정을 기초로 보다 효과적일 수 있는 면역 항암 요법을 제공할 수 있는 효과가 있다. 예를 들어, 본 발명은 항 PD-1 치료 반응 양성인 개체와 음성인 개체를 구별할 수 있고, 개체에 대한 치료 반응 양성 또는 음성으로의 판별 여부에 따라 효과적인 치료가 선택될 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법의 절차를 예시적으로 도시한 것이다.

도 2a 내지 2b는 비소세포성 폐암 환자들의 종양 조직에서 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준과 PD-L1 발현 양상에 따른, 면역 항암 요법인 항 PD-1 치료에 대한 반응 군 및 비-반응군에 대한 평가 결과를 도시한 것이다.

도 3a 내지 3b는 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준과 PD-L1 발현 양상에 따른, 비소세포성 폐암 환자에 대한 면역 항암 치료인 항 PD-1치료 반응 예측의 평가 결과를 도시한 것이다.

도 4a 내지 4e는 비소세포성 폐암 환자들의 종양 조직에서 본 발명의 바이오 마커로서 이용되는 유전자의 pDMR의 결정 단계를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 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.

[0042] 이하에서 도 1을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법의 절차에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0043] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 항암 요법에 대한 치료 반응에 관한 정보 제공 방법의 절차를 예시적으로 도시한 것이다.

[0044] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 항암 요법의 치료 반응에 관한 정보 제공 방법은 먼저 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하고 (S100), 측정된 pDMRs의 DNA 메틸화의 수준을 기초로 개체에 대한 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하도록 구성된다 (S110).

- [0045] 본 발명의 일 실시예에 따르면, pDMR의 DNA 메틸화를 측정하는 단계 (S100)에서는 비소세포성 폐암 의심 개체로부터 분리된 종양 조직, 혈액, 혈청 또는 혈장의 생물학적 시료에서 CYTIP 및 TNFSF8 로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하도록 구성될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계 (S110)에서는, 측정된 CYTIP 및 TNFSF8 로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 미리 결정된 수준 미만일 경우 양성으로, 미리 결정된 수준 이상일 경우 음성으로 결정하고, pDMRs의 DNA 메틸화의 양성 또는 음성 여부를 기초로, 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하도록 구성될 수 있다.
- [0047] 이때, 면역 항암 요법은 항 PD-1 치료 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 면역 항암 요법은 항 CTLA-4 치료, 항 CD28 치료, 항 KIR 치료, 항 TCR 치료, 항 LAG-3 치료, 항 TIM-3 치료, 항 TIGIT 치료, 항 A2aR 치료, 항 ICOS 치료, 항 OX40 치료, 항 4-1BB 치료 및 항 GITR 치료로 구성된 그룹 중 선택된 적어도 하나의 요법일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계 (S110)에서는, 생물학적 시료에서 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 50% 미만인 경우, 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성으로 평가하도록 구성될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계 (S110)에서는, 생물학적 시료에서 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 60% 미만인 경우, 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성으로 평가하도록 구성될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 면역 항암 요법의 치료 반응을 평가하는 단계 (S110)에서는, 생물학적 시료에서 CYTIP 및 TNFSF8 유전자조합에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 미리 결정된 수준 미만인 경우, 상기 개체를 상기 면역 항암 요법에 대한 치료 반응 양성으로 평가하도록 구성될 수 있다.
- [0051] 이상의 절차에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 치료 반응에 관한 정보 제공 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.
- [0052] **실시예 1: pDMRs의 DNA 메틸화에 기초한 PD-1 차단제에 대한 치료 반응 예측**
- [0053] 이하에서는 도 2a 및 2b를 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 면역 항암 요법, 특히 항 PD-1 치료 반응의 예측 방법에서 이용되는 바이오 마커와, 이를 이용한 치료 반응 예측 방법에 대하여 설명한다.
- [0054] 도 2a 및 2b는 본 발명의 다양한 실시예에서 이용되는 바이오마커의 수준에 따른, 비소세포성 폐암 환자에 대한 면역 항암 치료인 항 PD-1 치료 반응 예측의 평가 결과를 도시한 것이다.
- [0055] 도 2a의 (a), (b)를 참조하면, 항 PD-1 치료가 수행되기 전의 비소세포성 폐암환자로부터 획득한 종양 조직내의 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준을 항 PD-1 치료에 대한 반응군(R, responder)과 비-반응군(NR, non-responder)로 나누어 상자수염데이터로 나타내었다. 또한, 도 2a의 (c)를 참조하면, 항 PD-1 치료가 수행되기 전의 비소세포성 폐암환자로부터 획득한 종양 조직내의 PD-L1 발현률을 항 PD-1 치료에 대한 반응군(R)과 비-반응군(NR)로 나누어 상자수염데이터로 나타내었다. 각 상자의 끝은 집단의 25%, 75%를, 중간선은 50%의 비례치를 의미하며, 상자의 끝에 달린 수염은 각 집단의 최고치와 최저치를 의미한다.
- [0056] 나아가, pDMR의 DNA 메틸화 수준을 통한 항 PD-1 치료 반응의 양성 또는 음성 판별 수준은 양성 예측도(positive predictive value, PPV; #true responders) 및 음성 예측도(negative predictive value, NPV; # true non-resonders)를 모두 고려했을 때, 각 비율이 최대가 되는 임계 수준으로 결정된다. 이때, 양성 예측도는 항 PD-1 치료에 대한 반응자와 비-반응자 중 임계 수준 미만의 반응자 비율이며, 음성 예측도는 항 PD-1 치료에 대한 반응자와 비-반응자 중 임계 수준 이상의 비-반응자 비율로 정의된다.
- [0057] 도 2a의 (a)를 참조하면, 반응자와 비-반응자에서 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준은 유의한 ($p=0.0346$) 차이로 나타난다. 또한 비-반응군에서 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준값의 분포는 전반적으로 고메틸화 수준을 가지고 있으며, 반응군에서 CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준값의 분포는 전반적으로 저 메틸화 수준을 가지고 있는 것으로 나타난다. 이때, 양성 예측도와 음성 예측도의 비율이 최대가 되는 임계 수준은 40%일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항 PD-1 치료에 대한 반응이 양성 또는 음성을 판별하는 임계 수준은 40%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 바람직하게 20%, 30%, 50% 또는 60%일 수도 있다. 이를 기준으로, CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 임계 수준 미만인 경우를 면역 항암 요

법인 항 PD-1 치료에 대한 반응이 양성으로, 임계 수준 이상인 경우를 음성으로 평가할 수 있다.

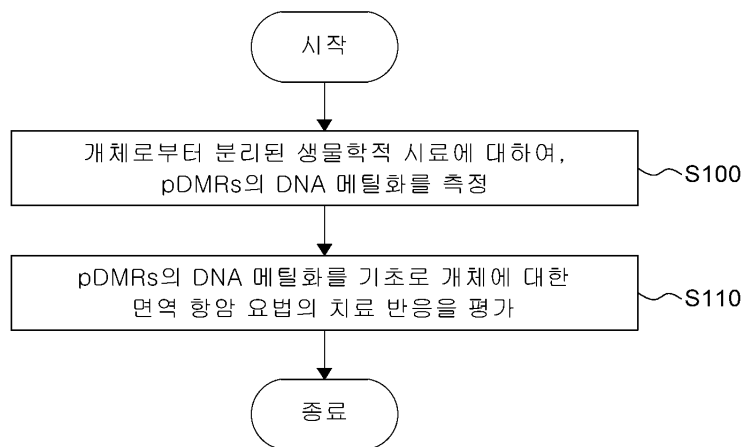
- [0058] 도 2a의 (b)를 참조하면, 반응자와 비-반응자에서 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준은 유의한 ($p=0.0378$) 차이로 나타난다. 또한 비-반응군에서 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준값의 분포는 전반적으로 고메틸화 수준을 가지고 있으며, 반응군에서 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준값의 분포는 전반적으로 저 메틸화 수준을 가지고 있는 것으로 나타난다. 이때, 양성 예측도와 음성 예측도의 비율이 최대가 되는 임계 수준은 50%일 수 있다. 다양한 실시예에서, 항 PD-1 치료에 대한 반응이 양성 또는 음성을 판별하는 임계 수준은 50%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 바람직하게 30%, 40% 60% 또는 70%일 수도 있다. 이를 기준으로, TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준이 임계 수준 미만인 경우를 면역 항암 요법인 항 PD-1 치료에 대한 반응이 양성으로, 임계 수준 이상인 경우를 음성으로 평가할 수 있다.
- [0059] 도 2a의 (c)를 참조하면, 반응자와 비-반응자간에서 PD-L1 발현률은 일부 유의한 ($p=0.0414$) 차이로 나타난다. 그러나, 도 2a의 (a)와 (b)에서 전술한 반응자와 비-반응자에서 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준값의 분포와는 대조적으로 비-반응군에서 PD-L1 발현률의 분포는 다수가 저메틸화 수준값을 가지고 있으며, 반응군에서는 산발적인 분포를 가지고 있는 것으로 나타난다. 이에, 이러한 결과는 도 2a의 (a)와 (b)에서 전술한 반응자와 비-반응자에서 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 결과보다 상대적으로 낮은 유의한 차이로 나타난다. 즉, CYTIP 및 TNFSF8, 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화가 종래의 항 PD-1 치료 반응 예측인 PD-L1 발현보다 항 PD-1 치료 반응 예측에 있어서 높은 상관관계를 갖는 것으로 나타난다.
- [0060] 도 2b의 (a), (b), (c) 및 (d)를 참조하면, CYTIP 및 TNFSF 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준과 PD-L1 발현에 따른 면역 항암 요법인 항 PD-1 치료의 양성 예측도와 음성 예측도를 도시한 것이다
- [0061] 도 2b의 (a)를 참조하면, CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준을 통하여 결정된 양성 예측도는 60.7%(17/28)이며, 음성 예측도는 73.9%(17/23)로 나타난다. 나아가, 도 2b의 (b)를 참조하면, TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준을 통하여 결정된 양성 예측도는 61.8%(21/34)이며, 음성 예측도는 77.8%(14/18)로 나타난다. 더 나아가, 두 유전자의 조합에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준을 통하여 결정된 양성 예측도는 70%(14/20)이며, 음성 예측도는 69%(20/29)로 나타난다. 한편, PD-L1 발현률을 통하여 결정된 양성 예측도는 47.7%(21/44)이며, 음성 예측도는 66.7%(8/12)로 나타났으며, 이는 전술한 DNA 메틸화를 통하여 결정된 양성 예측도와 음성 예측도보다 상대적으로 낮은 것으로 나타난다.
- [0062] 이상의 실시예 1의 결과로, pDMRs의 DNA 메틸화는, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 치료 반응에 관한 정보 제공 방법에서 종래의 항 PD-1 치료 반응의 예측방법인 PD-L1보다 우수한 예측력을 가진 바이오 마커로서 이용될 수 있다.
- [0063] **실시예 2: pDMRs의 DNA 메틸화에 기초한 PD-1 차단제에 대한 치료 반응 예측_비소세포성 폐암 환자**
- [0064] 이하에서는 도 3a 및 3b를 참조하여, 비소세포성 폐암 환자로부터 획득한 종양 조직 내의 CYTIP 및 TNFSF8에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준과 PD-L1 발현에 기초한, 면역 항암 요법 반응 예측에 대한 평가 결과를 설명한다. 이때, 이용된 생물학적 시료는 비소세포성 폐암 환자로부터 획득한 종양 조직이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 도 3a 및 3b는, CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준과 PD-L1 발현 양상에 따른 비소세포성 폐암 환자에 대한 면역 항암 치료인 항 PD-1 치료 반응 예측의 평가 결과를 도시한 것이다.
- [0066] 도 3a의 (a)를 참조하면, CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준에 따른 양성 예측군과 음성예측군의 무진행 생존률 (progression free survival, PFS)이 도시된다. 양성 예측군과 음성 예측군은 유의한 ($p=0.076$) 차이로 나타나며, 양성 예측군이 음성 예측군보다 무진행 생존률이 현저하게 긴 것으로 나타난다.
- [0067] 나아가, 도 3a의 (b)를 참조하면, TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준에 따른 양성 예측군과 음성 예측군은 유의한 ($p=0.015$) 차이로 나타나며, 양성 예측군이 음성 예측군보다 무진행 생존률이 현저하게 긴 것으로 나타난다.
- [0068] 더 나아가, 도 3a의 (d)를 참조하면, CYTIP 및 TNFSF8 유전자 조합에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준에 따른 양성 예측군과 음성 예측군은 유의한 ($p=0.0044$) 차이로 나타나며, 양성 예측군이 음성 예측군보다 무진행 생존률이 현저하게 긴 것으로 나타난다.
- [0069] 대조적으로, 도 3a의 (c)를 참조하면, PD-L1 발현에 따른 양성 예측군과 음성 예측군에서는 유의한($p=0.063$) 차이가 나타나지 않았다.

- [0070] 도 3b의 (a)를 참조하면, CYTIP 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준에 따른 양성 예측군과 음성예측군의 전체 생존률 (Overall survival, OS)이 도시된다. 양성 예측군과 음성 예측군은 유의한 ($p=0.023$) 차이로 나타나며, 양성 예측군이 음성 예측군보다 전체 생존률이 현저하게 긴 것으로 나타난다.
- [0071] 나아가, 도 3b의 (b)를 참조하면, TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준에 따른 양성 예측군과 음성 예측군은 유의한 ($p=0.015$) 차이로 나타나며, 양성 예측군이 음성 예측군보다 전체 생존률이 현저하게 긴 것으로 나타난다.
- [0072] 더 나아가, 도 3b의 (d)를 참조하면, CYTIP 및 TNFSF8 유전자 조합에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준에 따른 양성 예측군과 음성 예측군은 유의한 ($p=0.0043$) 차이로 나타나며, 양성 예측군이 음성 예측군보다 전체 생존률이 현저하게 긴 것으로 나타난다.
- [0073] 대조적으로, 도 3b의 (c)를 참조하면, PD-L1 발현에 따른 양성 예측군과 음성 예측군에서는 유의한($p=0.15$) 차이가 나타나지 않았다.
- [0074] 이상의 실시예 2의 결과로, pDMRs의 DNA 메틸화가 종래의 PD-L1 발현보다 비소세포성 폐암 환자에서 면역 항암 요법인 항 PD-1 치료 반응 예측에 있어서 우수한 마커일 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0075] **실시예 3: 면역 항암 요법 인 항 PD-1 치료 반응 예측을 위한 바이오 마커의 설정**
- [0076] 이하에서는, 도 4를 참조하여, 비소세포성 폐암 환자의 종양 조직에서 면역 항암 요법 인 항 PD-1 치료 반응과 관련된 유전자의 메틸화 분류와, 이를 이용한 면역 항암 요법의 치료 반응 예측을 위한 바이오 마커의 설정 방법에 대하여 설명한다.
- [0077] 도 4a 내지 4e는 본 발명의 다양한 실시예에서 바이오 마커로 이용되는 CYTIP 및 TNFSF8 유전자에 대한 pDMRs의 설정의 분류 과정을 도시한 것이다.
- [0078] 도 4a를 참조하면, pDMRs의 설정을 위한 분류는 면역 항암 요법인 항 PD-1 치료에 대한 6명의 반응자와 12명의 비-반응자를 대상으로 전사체 프로파일 (transcriptome profile)과 메틸화체 프로파일 (methylome profile)을 측정하고, DMRcate를 통해 DMR을 동정하여 항 PD-1 치료 반응에 관련된 1007개의 pDMRs과 607개의 eDMRs로 분류된다. 나아가, Consensus Coding gene sequence (CCDS) database에서 프로모터와 인핸서-프로모터 상호작용 (enhancer-promoter interaction, EPI)을 고려하여 1109개 pDMR 표적 유전자들과 1176개의 eDMR 표적유전자를 선별하였다.
- [0079] 이러한 결과는, 도 4b에서 각 염색체의 면역 항암 요법인 항 PD-1 치료 반응에 연관된 pDMR과 eDMR의 비율로 도시 된다. 모든 염색체 내에서 DMR 비율은 pDMR가 차지하는 비율이 eDMR이 차지하는 비율보다 높은 것으로 나타난다.
- [0080] 도 4c를 참조하면, DMR의 표적 유전자가 많은 면역 관련 경로에 연관되어 있으며, pDMR 표적 유전자도 인 유두 종바이러스 감염과 같은 면역 경로에 연관되어 있는 것으로 나타난다.
- [0081] 도 4d 내지 4e를 참조하면, 도 4a에서 기술한 방법에 의해 선별된 유전자와 유전자의 프라이머 정보를 도시한 것이다. 도 4d를 참조하면, 차별적으로 메틸화된 프로모터 중에서, 기능적인 DMR은 메틸화 수준과 유전자 발현 수준 사이에서 음의 상관 관계가 있는 것으로 나타난다. 이에, 메틸화 수준과 유전자 발현 수준의 상관관계를 나타내는 PCC(Pearson correlation coefficient)의 p value가 0.05미만이고, 메틸화 변화가 양성인 유전자의 경우 차별 발현 유전자의 분석(differential expressed gene analysis, DEG analysis)에서 $FC < 1/2$ ($q < 0.01$)으로 나타남에 따라, mean beta FC > 0.15 값을 갖고, \log_2FC (fold change)는 유전자가 표현력을 의미하므로 $\log_2FC > 2$ 값을 가지며, 유전자 오류발견율을 나타내는 FDR(false discovery rate)는 $FDR < 0.01$, 그리고 p adjusted 값은 0.01미만인 기준치를 선정하여 기능적으로 더 관련성 있는 DMR, 즉 저 메틸화된 DMRs가 동시에 표적 유전자를 상향 조절하거나 과 메틸화된 DMRs가 동시에 표적유전자를 하향 조절하는 DMR을 선별하였다. 그 결과 CYTIP, TNFSF8 및 C11orf21에 대한 pDMRs가 선택되었다. 선택된 3가지 유전자의 메틸화를 측정하기 위하여 bisulfite pyrosequencing 방법을 이용하였고, 이때 사용되는 프라이머의 시퀀스 정보는 도 4e로 도시된다
- [0082] 실시예 1 내지 실시예 3의 결과는 pDMRs의 DNA 메틸화 측정에 기초하여 비소세포성 폐암 환자의 치료 반응이 보다 정확하게 예측될 수 있음을 나타낸다. 보다 구체적으로, CYTIP 및 TNFSF8 로 구성된 그룹 중 적어도 하나의 유전자에 대한 pDMRs의 DNA 메틸화 수준은 면역 항암 요법인 항 PD-1 치료에 대한 반응성 예측에 대한 실용적인 지표가 될수 있다.

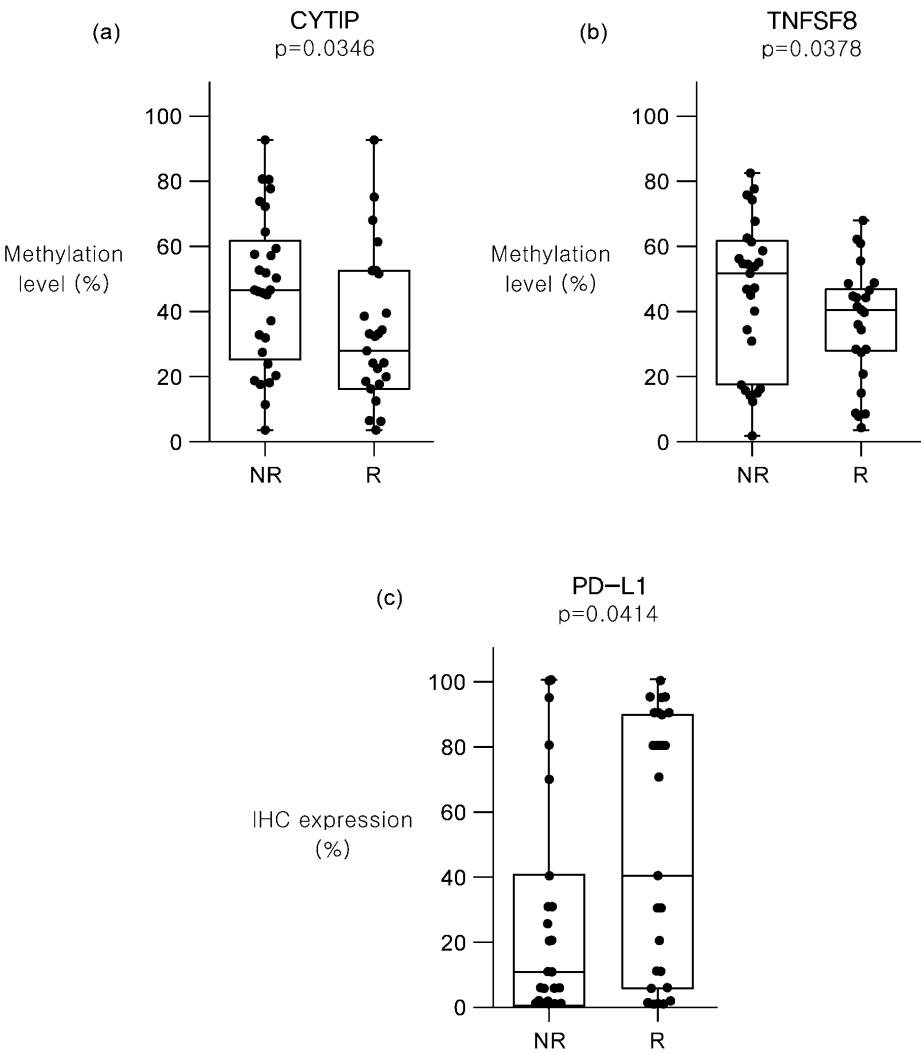
- [0083] 그러나, 본 발명은 전술한 것에 제한되지 않고 보다 다양한 면역 치료 방법에 대하여 치료 반응 예측에 대한 정보를 제공하는 것에 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 항 CTLA-4 치료, 항 CD28 치료, 항 KIR 치료, 항 TCR 치료, 항 LAG-3 치료, 항 TIM-3 치료, 항 TIGIT 치료, 항 A2aR 치료, 항 ICOS 치료, 항 OX40 치료, 항 4-1BB 치료 및 항 GITR 치료로 구성된 그룹 중 선택된 적어도 하나의 요법에 대하여 치료 반응의 예측에 관한 정보를 제공하도록 구성될 수 있다.
- [0084] 나아가, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여, pDMRs의 DNA 메틸화를 측정하도록 구성된 제제를 포함함에 따라 면역 항암 요법에 대한 치료 반응을 예측하도록 구성된 정보 제공용 키트를 더 제공할 수 있다.
- [0085] 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.
- [0086] 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 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 권리 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

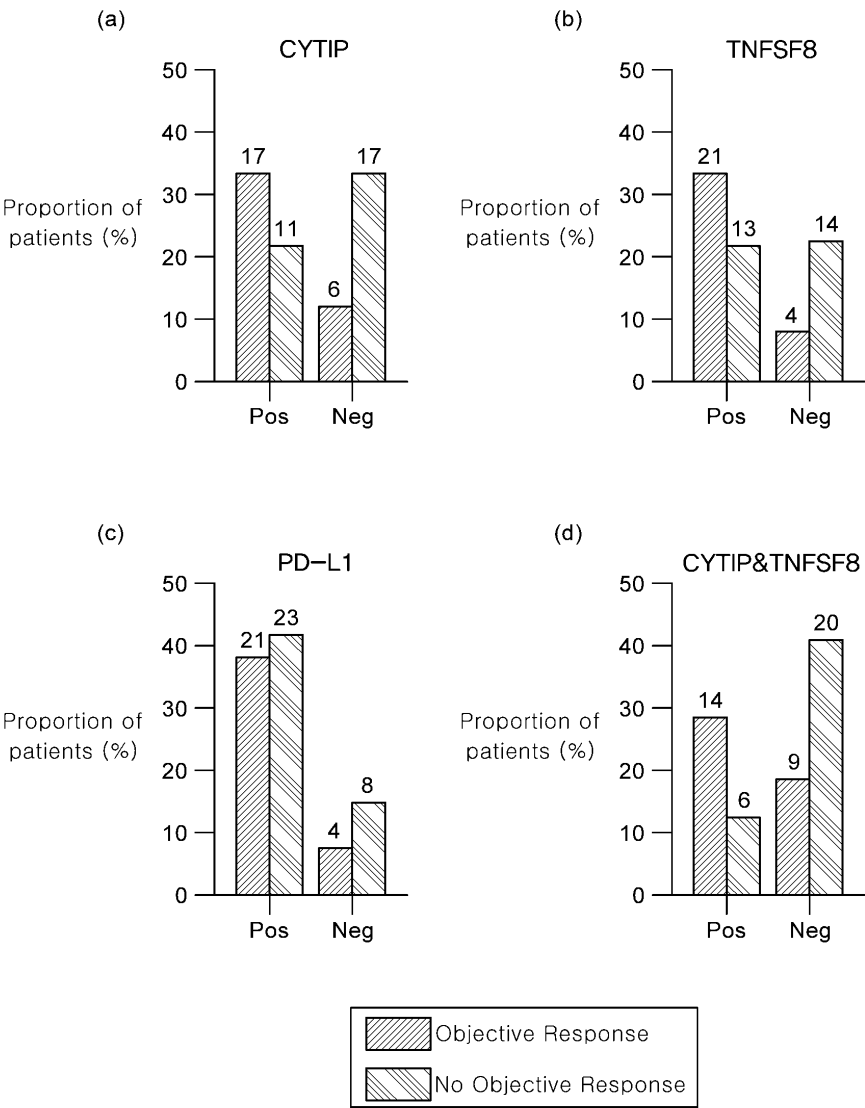
도면1



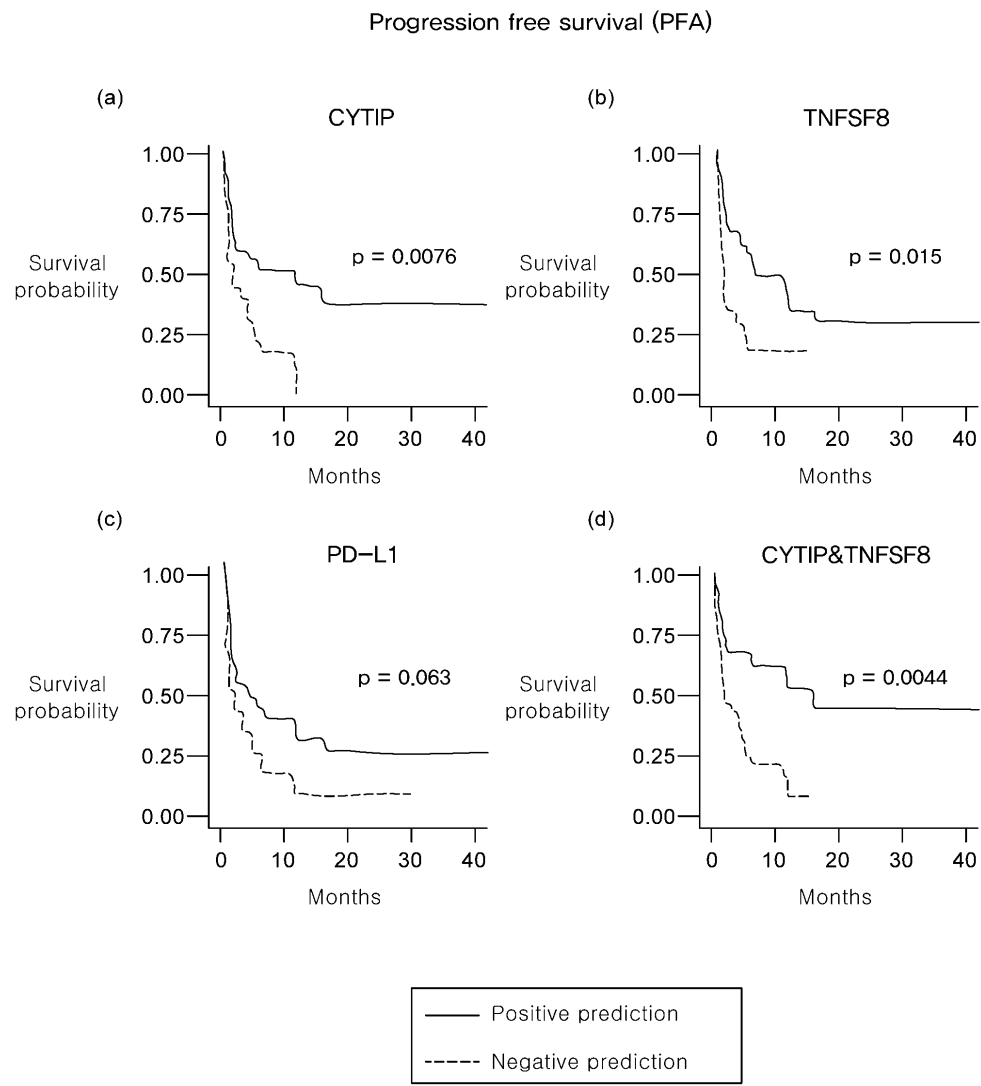
도면2a



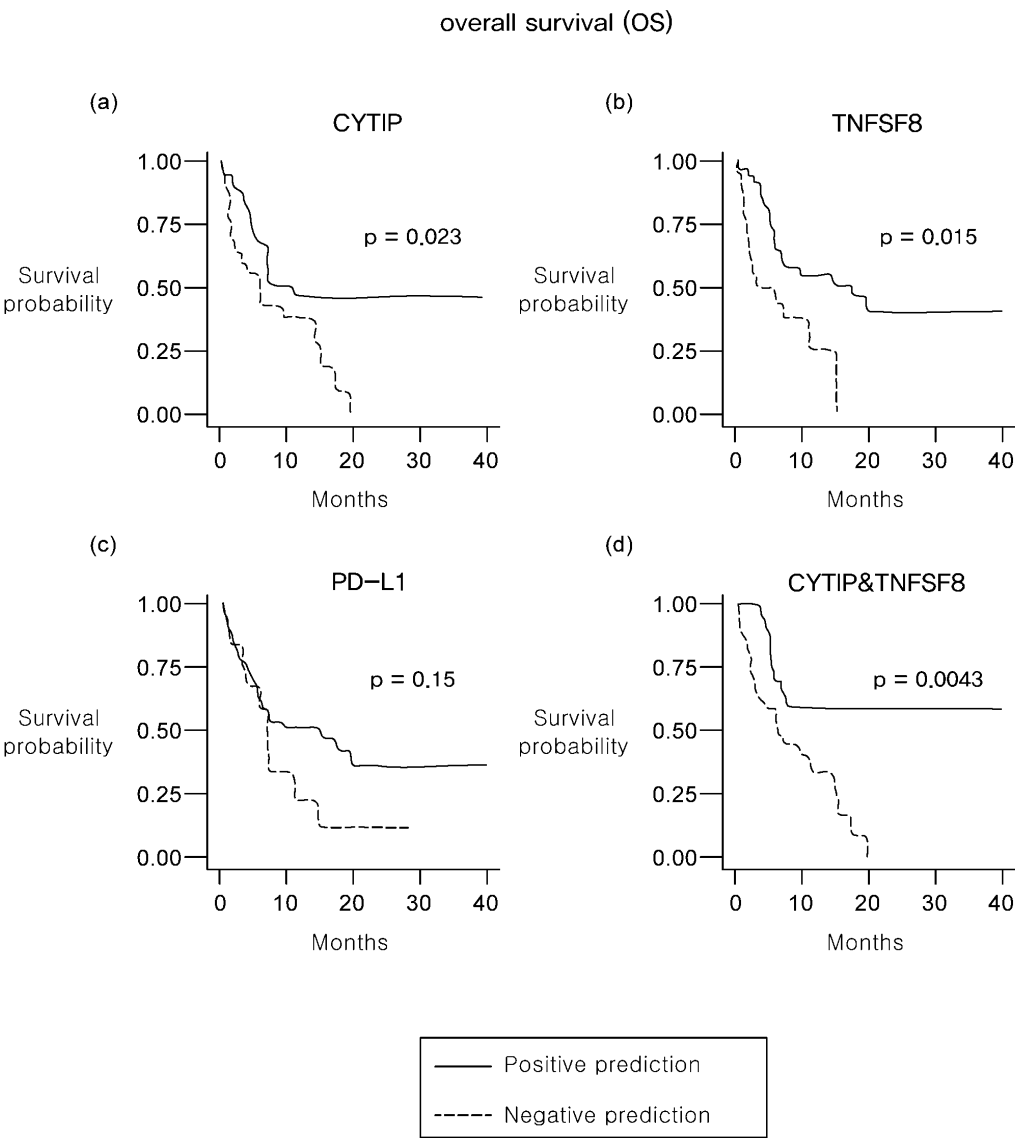
도면2b



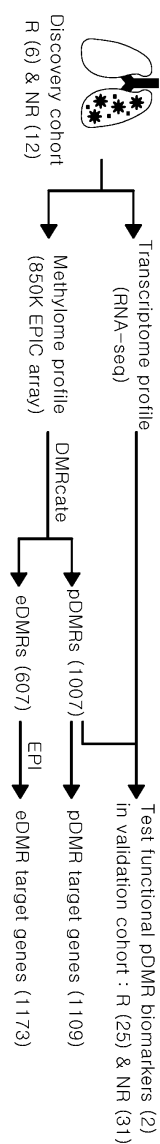
도면3a



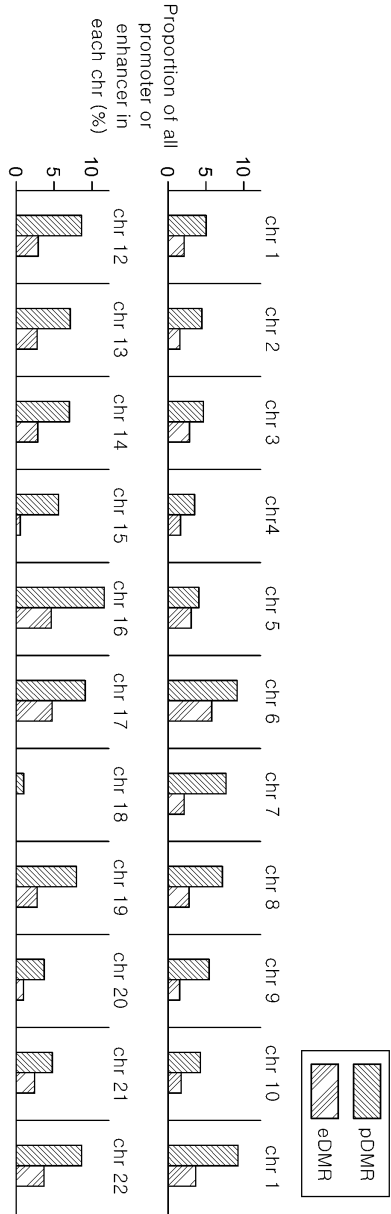
도면3b



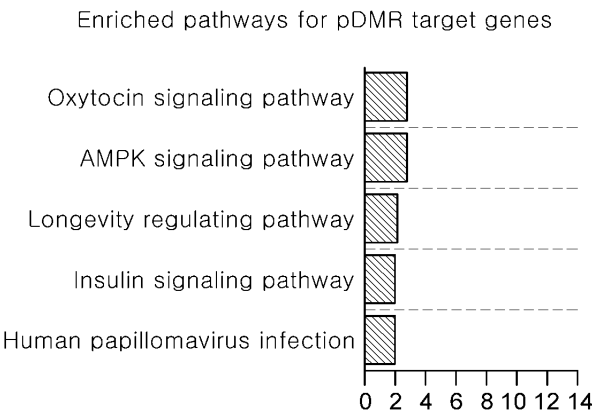
도면4a



도면4b



도면4c



도면4d

DMR	Position	Gene	PCC	PCC p value	MeanbetaFC	DMR_minFDR	log2FC	DEG_p.adj
172	chr2:158300475-158300811	CYTIP	-0.559	0.0244	-0.343	1.06E-05	2.778	4.48E-03
519	chr9:117691764-117694255	TNFSF8	-0.513	0.0421	-0.17	6.89E-04	2.809	8.85E-03

도면4e

Gene	Primer		size (bp)
CYTIP	Forward	5'- GGTGAGTGTGGAGTAAGAGTTA -3'	147
	Biotinylated-reverse	5'- CCCATCCTACAAAACCACTCAAC -3'	
	Sequencing primer	5'- AGTGTGGAGTAAGAGTTATA -3'	
TNFSF8	Forward	5'- GTTAGAGTGGTTGTGGTTAAATAGAA -3'	122
	Biotinylated-reverse	5'- CAAACACTCAACCAAATAACCCCTCCT -3'	
	Sequencing primer	5'- GTTTTtaggtggttgg -3'	