



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0163018
(43) 공개일자 2024년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01) C12Q 1/6881 (2018.01)
G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/574 (2006.01)
G16B 40/00 (2019.01) G16B 5/00 (2019.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2022.01)
C12Q 1/6881 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2024-0061182

(22) 출원일자 2024년05월09일

심사청구일자 2024년05월09일

(30) 우선권주장

1020230060147 2023년05월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

(72) 발명자

박숙련

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 204동 2102호

최정균

대전광역시 유성구 대학로 291

안진현

대전광역시 유성구 대학로 291

(74) 대리인

이명진

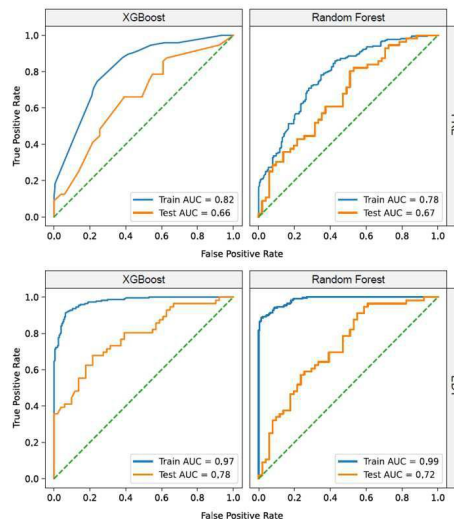
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 RNA 기반 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측 방법

(57) 요약

본 발명은 RNA 기반 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측 방법에 관한 것으로서, 본 발명에서는 면역항암제에 의해 유도되는 면역관련 이상반응의 발병과 관련된 여러 가지 요인을 분석한 결과, 유전자 발현 기반의 호중구 정량값, 또는 면역세포 프로파일이 면역관련 이상반응의 발병과 밀접하게 연관되어 있는 것을 확인하였다. 이에, 상기 호중구 정량값 또는 면역세포 프로파일은 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측 또는 면역항암제에 대한 반응성 예측을 위한 바이오마커로서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 33/5047 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)
G16B 40/00 (2019.02)
G16B 5/00 (2019.02)
C12Q 2535/122 (2019.08)
C12Q 2600/106 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711122475
과제번호	2019M3E5D4064636
부처명	다부처
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	인공지능신약개발플랫폼구축사업(R&D)(과기정통부, 복지부)
연구과제명	면역항암제 대상 다기관 임상연구를 통한 스마트 약물 감시 플랫폼 구축
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유전자의 발현은 시퀀싱(sequencing), RNA 시퀀싱(RNA sequencing), 및 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 통해 측정하는 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 면역세포 프로파일은 호중구(Neutrophil), 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), CD4⁺ 미접촉 T 세포(CD4⁺ naïve T cell), 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem), 및 세포독성 T 세포(Cytotoxic T cell, Tc)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 양을 측정한 값인 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 피검체는 면역항암제 치료를 받기 전 또는 받은 후의 암 환자인 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 피검체로부터 분리된 조직, 세포, 진혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변, 및 대변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 면역관련 이상반응은 면역항암제에 의해 나타나는 피부(skin) 이상반응, 내분비계(endocrine system) 이상

반응, 갑상선(thyroid gland) 이상반응, 근골격계(musculoskeletal system) 이상반응, 위장계(gastrointestinal system) 이상반응, 신경계(neurologic system) 이상반응, 독감 유사 증상(Flu-like), 및 폐렴(pulmonary)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 방법은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 호중구 정량값(Neutrophil score), 면역세포 프로파일 중 호중구의 양, 및 면역세포 프로파일 중 세포독성 T 세포의 양으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이 대조군에 비해 낮을 경우, 면역관련 이상반응의 발병 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 방법은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 면역세포 프로파일 중 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), $CD4^+$ 미접촉 T 세포($CD4^+$ naïve T cell), 및 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 양이 대조군에 비해 높을 경우, 면역관련 이상반응의 발병 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 방법은 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하여 머신러닝 기반 모델을 통해 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 위험도를 예측하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 머신러닝 기반 모델은 XGBoost 및 랜덤 포레스트(Random forest)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 11

호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 체제를 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 면역세포 프로파일은 호중구(Neutrophil), 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), $CD4^+$ 미접촉 T 세포($CD4^+$ naïve T cell), 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem), 및 세포독성 T 세포(Cytotoxic T cell, Tc)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 양을 측정할 수 있는 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역 관련 이상반응의 발병 예측용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 면역관련 이상반응은 면역항암제에 의해 나타나는 피부(skin) 이상반응, 내분비계(endocrine system) 이상반응, 갑상선(thyroid gland) 이상반응, 근골격계(musculoskeletal system) 이상반응, 위장계(gastrointestinal system) 이상반응, 신경계(neurologic system) 이상반응, 독감 유사 증상(Flu-like), 및 폐렴(pulmonary)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 호중구 정량값을 검출하는 제제는 호중구 매개 면역 경로(Neutrophil mediated immunity pathway) 유전자 세트에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 면역세포 프로파일을 검출하는 제제는 호중구(Neutrophil), 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), $CD4^+$ 미접촉 T 세포($CD4^+$ naïve T cell), 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem), 및 세포독성 T 세포(Cytotoxic T cell, Tc)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 면역세포에 대한 마커 유전자 세트에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 조성물.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 키트.

청구항 17

피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 RNA 기반 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 면역 체크포인트 차단(immune checkpoint blockade, ICB) 요법은 다양한 암 유형에 대한 주요 치료법 중 하나가 되었으며, ICB 치료 후 면역관련 이상반응(immune-related adverse event, irAE)으로 인해 보조 요법에서 신보강 설정으로 그 역할을 확장하였다. 대부분의 초기 단계 또는 저등급 irAE는 코르티코스테로이드(corticosteroid) 또는 면역억제제로 관리할 수 있지만, 일부 irAE는 즉시 감지 및 치료하지 않으면 치명적인 상황을 초래하거나 영구적인 이환율을 남길 수 있다. 따라서, ICB 치료 전(pre-treatment, PRE) 또는 초기 치료 중(early during treatment, EDT) irAE 발생 예측은 환자 관리 측면뿐만 아니라 의료 비용 측면에서도 임상적으로 매우 중요하다. 또한, irAE는 일반적으로 면역 활성화제에 대한 반응으로 자가 면역이 어떻게 발달하는지 이해할 수 있는 기회를 제공한다.

[0004] 이전의 irAE 연구는 주로 말초 혈액에서 측정된 임상적 또는 생화학적 특징에 초점을 맞췄다. 전체 혈구 수(CBC)가 광범위하게 연구되었지만 여러 연구에서 상충되는 결과가 나왔으며, 이러한 불일치는 CBC 기반 바이오마커가 환자의 임상 상태 및 병력과 같은 종양과 무관한 요인에 의해 쉽게 영향을 받는다는 것을 나타낸다. 사이토카인 프로파일도 irAE 예측인자로 제안되었는데, 예를 들어, IL-6은 조절 T 세포와 B 세포의 분화를 억제하고 적응 면역 체계의 과잉 활성화에 기여하며, 말초 혈액에서 CD8+ T 세포의 클론 확장은 이필리무맙으로 치료 받은 환자에서 심각한 irAE 발생과 관련이 있었다.

[0005] 말초 혈액 측정과는 별개로, 폐암 및 흑색종에서 상대적으로 높은 irAE 발생률을 설명하기 위한 시도에서 irAE 발생의 지표로 종양 돌연변이 부담이 제안되었다. 그러나 돌연변이 부담이 ICB에 대한 치료 반응을 촉진하여 간접적으로 irAE 위험을 증가시키는 교란 요인으로 작용할 가능성이 있다. 또한, TCGA 다중 오믹스 데이터 분석을 통해 LCP1과 ADPGK가 irAE의 예측 바이오마커로 식별되었으나, 예측력의 검증은 14개의 irAE 샘플과 14개의 대조군 샘플을 비교하는 제한된 수의 폐암 환자로 수행되었다. 이 두 연구는 FDA 부작용 보고 시스템(FAERS)의 데이터에 의존했으나, 이 데이터베이스는 ICB 관련 irAE를 연구하기 위해 특별히 설계되지 않았다. 생식계열 변이의 경우, 계통 차원의 연관성 연구에서 얻은 다유전자성 위험 점수를 아테졸리주맙 유도 피부 또는 갑상선 관련 irAE에 적용하였다.

[0006] 즉, irAE의 유전적, 분자적 및 세포성 위험 인자는 파악하기 어렵고 통합 분석이 필요하며, irAE 병리학의 다양성은 근본적인 메커니즘의 다면적인 복잡성을 의미하며 훨씬 더 포괄적인 조사가 요구된다. 그러나 이전 irAE 연구의 대부분은 특정 약물(예: 이필리무맙 또는 아테졸리주맙), irAE 증상(예: 피부의 자가면역) 및 암 유형(예: 폐암 또는 흑색종)에 국한되어 종종 제한된 수의 irAE 샘플을 이용한 연구였다.

[0007] 이에, 본 발명에서는 다양한 유형의 irAE를 가진 수백명의 환자를 대상으로 ICB 치료 전후에 대해 유전적 요인, 면역 세포의 분자 및 세포 프로파일, 실험실 데이터 및 임상 변수를 포함한 다차원 데이터를 통합하여 irAE에 대한 포괄적인 분석을 수행함으로써, ICB와 같은 면역항암제 치료에 의해 유도된 irAE의 발병을 예측하기 위한 바이오마커 및 이를 이용한 irAE 발병 예측 방법을 제공하고자 하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Proc Natl Acad Sci USA. 2016 Oct 18;113(42):11919-11924.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 ICB 치료 전후 irAE 발병에 대한 유전적 요인, 면역 세포의 분자 및 세포 프로파일, 실험실 데이터 및 임상 변수 등을 분석한 결과, 유전자 발현 기반 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일과 irAE 발병의 상관관계를 확인하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 이에, 본 발명의 목적은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 제제를 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.
- [0014] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 유전자의 발현은 시퀀싱(sequencing), RNA 시퀀싱(RNA sequencing), 및 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 통해 측정할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 면역세포 프로파일은 호중구(Neutrophil), 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), $CD4^+$ 미접촉 T 세포($CD4^+$ naive T cell), 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem), 및 세포독성 T 세포(Cytotoxic T cell, Tc)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 양을 측정한 값일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 피검체는 면역항암제 치료를 받기 전 또는 받은 후의 암 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 생물학적 시료는 피검체로부터 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변, 및 대변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 면역관련 이상반응은 면역항암제에 의해 나타나는 피부(skin) 이상반응, 내분비계(endocrine system) 이상반응, 갑상선(thyroid gland) 이상반응, 근골격계(musculoskeletal system) 이상반응, 위장계(gastrointestinal system) 이상반응, 신경계(neurologic system) 이상반응, 독감 유사 증상(Flu-like), 및 폐렴(pulmonary)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 호중구 정량값(Neutrophil score), 면역세포 프로파일 중 호중구의 양, 및 면역세포 프로파일 중 세포독성 T 세포의 양으로 이루어진 군으로

로부터 선택된 하나 이상이 대조군에 비해 낮을 경우, 면역관련 이상반응의 발병 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 면역세포 프로파일 중 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), $CD4^+$ 미접촉 T 세포($CD4^+$ naïve T cell), 및 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 양이 대조군에 비해 높을 경우, 면역관련 이상반응의 발병 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하여 머신러닝 기반 모델을 통해 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 위험도를 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 머신러닝 기반 모델은 XGBoost 및 랜덤 포레스트(Random forest)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 또한, 본 발명은 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 제제를 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 호중구 정량값을 검출하는 제제는 호중구 매개 면역 경로(Neutrophil mediated immunity pathway) 유전자 세트에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 면역세포 프로파일을 검출하는 제제는 호중구(Neutrophil), 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), $CD4^+$ 미접촉 T 세포($CD4^+$ naïve T cell), 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem), 및 세포독성 T 세포(Cytotoxic T cell, Tc)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 면역세포에 대한 마커 유전자 세트에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 키트를 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 제제를 포함하는 조성물의 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측 용도를 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 제제의 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0034] 본 발명에서는 면역항암제에 의해 유도되는 면역관련 이상반응의 발병과 관련된 여러 가지 요인을 분석한 결과, 유전자 발현 기반의 호중구 정량값, 또는 면역세포 프로파일이 면역관련 이상반응의 발병과 밀접하게 연관되어 있는 것을 확인하였다. 이에, 상기 호중구 정량값 또는 면역세포 프로파일은 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측 또는 면역항암제에 대한 반응성 예측을 위한 바이오마커로서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 전혈 RNA-seq 데이터에서 세포 유형 풍부도를 PCA 분석으로 확인한 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 치료 전(PRE) 및 치료 후 초기(EDT)의 호중구 정량값과 면역항암제 유도 면

역관련 이상반응 발병의 연관성을 확인한 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 PRE 및 EDT 환자 샘플에서 irAE와 대조군 사이의 호중구 마커 유전자의 발현 수준을 비교한 도면이다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 PRE 및 EDT 환자 샘플에서 irAE와 대조군 사이에 차등적으로 발현되는 유전자를 볼케이노 플롯으로 확인한 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 구현예에 따른 PRE 및 EDT 환자 샘플에서 irAE에서 저발현된 유전자에 대한 경로 풍부도 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 구현예에 따른 PRE 및 EDT 환자 샘플에서 12개의 irAE 유형에 대하여 irAE에서 저발현된 유전자에 대한 경로 풍부도 정도를 확인한 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 구현예에 따른 PRE 및 EDT 환자 샘플에서 면역세포 프로파일과 면역항암제 유도 면역관련 이상반응 발병의 연관성을 확인한 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 구현예에 따른 PRE 및 EDT 환자 샘플에서 XGBoost와 Random forest로 면역항암제 유도 면역관련 이상반응 발병 예측에 대한 트레이닝 세트와 테스트 세트의 AUC를 확인한 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 구현예에 따른 PRE 및 EDT 환자 샘플에서 학습된 XGBoost의 특징 중요도를 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 발명의 일 실험예에서는 ICB 치료된 531명의 환자 중 276명에서 68가지 유형의 irAE를 확인하였으며, 그 중 피부는 가장 빈번한 irAE 유형(26 %)이었고, 독감 유사(21 %) 및 다중(모든 등급) (18 %)가 그 뒤를 잇는 것을 확인하였다(실험예 1 참조).
- [0038] 본 발명의 다른 실험예에서는 ICB 치료 전(PRE)과 치료 초기(EDT)에 531개의 일치하는 전혈 샘플에 대해 RNA 시퀀싱을 수행하여 호중구 정량값을 계산한 결과, irAE가 발생한 환자에서 호중구 정량값이 낮게 나타났으며, 이는 치료 후(EDT) 샘플에서 더 명확한 것을 확인하였다. 또한, irAE 발생과 유의미한 연관성을 보이는 면역세포 타입을 확인하였으며 이의 경향이 치료 후(EDT) 샘플에서 더 명확함을 확인하였다(실험예 2 참조).
- [0039] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 면역항암제 치료 전(PRE) 및 치료 후(EDT) 샘플들에 대하여 XGBoost 및 Random forest를 이용하여 RNA 기반 irAE 예측 모델을 수립하고 검증한 결과, XGBoost로 만든 모델의 test AUC 값이 치료 전 및 치료 후 샘플에서 각각 0.66 및 0.78이고, Random forest로 만든 모델의 test AUC 값은 치료 전 및 치료 후 샘플에서 각각 0.67 및 0.72로 확인되었으며, XGBoost 모델에서 호중구 정량값 및 면역세포 프로파일의 특징에 대하여 중요도를 확인하였을 때, 치료 전의 경우 세포독성 T 세포가 가장 중요한 특징으로 나타나고, 치료 후의 경우 호중구가 가장 중요한 특징으로 나타나고 있음을 확인하였다(실험예 3 참조).
- [0041] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0043] 본 발명은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0044] 또한, 본 발명은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측 방법을 제공한다.
- [0045] 본 발명에 있어서, “면역항암제”는 인체가 가지고 있는 고유의 면역계를 강화시켜 암에 대한 저항력을 높여 주는 약물을 의미한다. 면역항암제는 환자 스스로의 면역 강화를 통해 치료를 한다는 점에서 부작용이 적고 암 환자의 삶의 질을 높이고 생존기간도 대폭 연장되는 효과가 있다. 면역항암제는 면역체계의 특이성(specificity), 기억능력(memory), 적응력(adaptiveness)을 증강시킴으로써 항암효과를 나타낸다. 면역항암제에는 면역 체크포인트 차단(immune checkpoint blockade, ICB)을 위한 제제, 면역세포치료제, 치료용 항체, 또는 면역 체크포인트

트 인헨서(immune checkpoint inhancer) 등이 포함되며, 이의 종류에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 면역 체크포인트 차단을 위한 제제, 즉 면역 체크포인트 억제제(immune checkpoint inhibitor)는 기존의 면역치료제(사이토카인 치료제, 항암백신 등)와는 달리 암세포와 T 세포의 결합 부위에 결합하여 면역회피 신호를 차단함으로써 면역학적 시냅스가 형성되지 못하게 하고 이에 따라 면역회피 방해를 받지 않는 T 세포가 암세포를 파괴하는 기전을 가지고 있으며, 예컨대 니볼루맵(Nivolumab), 아테졸리주맵(Atezolizumab), 펌브롤리주맵(Pembrolizumab), 두발루맵(Duvalumab), 아벨루맵(Avelumab), 이필리무맵(Ipilimumab), 및 트레멜리무맵(Tremelimumab)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명에 있어서, “면역관련 이상반응(immune-related adverse event, irAE)”은 자가면역체계 활성화와 관련되어 발생하는 염증 반응 등을 포함하여 면역항암제 치료에 의해 나타나는 여러 가지 이상반응을 의미한다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 면역관련 이상반응은 면역항암제에 의해 나타나는 피부(skin) 이상반응, 내분비계(endocrine system) 이상반응, 갑상선(thyroid gland) 이상반응, 근골격계(musculoskeletal system) 이상반응, 위장계(gastrointestinal system) 이상반응, 신경계(neurologic system) 이상반응, 독감 유사 증상(Flu-like), 및 폐렴(pulmonary)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예 또는 실험예에 따르면, 상기 면역관련 이상반응은 둘 이상의 증상이 함께 나타날 수 있으며, 이의 중증도도 3등급으로 나뉠 수 있다. 예컨대 본 발명에서 면역관련 이상반응의 중증도에 따라 3개 이상의 면역관련 이상반응 유형이 있는 경우 'Multiple G>=1', 3개 이상의 2등급 이상의 유형이 있는 경우는 'Multiple G>=2', 모든(any) 3등급 이상의 유형이 있는 경우 및 2등급 이상의 중요한(critical) 유형이 있는 경우 'Critical'로 표시되며, 면역관련 이상반응 카테고리에 속하는 모든 경우 'Any'로 표시될 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서, “검출”은 목적하는 물질의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 같은 맥락에서, 본 발명에서 상기 호중구 정량값 또는 면역세포 프로파일을 검출하는 것은 호중구 매개 면역 경로 유전자, 호중구 또는 면역세포의 여부를 측정하는 것(즉, 존재 유무를 측정하는 것), 또는 상기 호중구 매개 면역 경로 유전자, 호중구 또는 면역세포의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 호중구 매개 면역 경로 유전자, 호중구 또는 면역세포의 존재 여부 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다.

[0049] 본 발명에 있어서, “피검체”는 면역항암제 치료를 받고자 하는 암 환자, 즉 면역항암제 치료를 받기 전 암 환자, 또는 면역항암제 치료를 받은 후의 암 환자 모두를 포함할 수 있고, 상기 면역항암제 치료를 받은 후의 암 환자는 면역항암제 치료를 받은 후 초기의 암 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 본 발명에 있어서, “대조군”은 정상인 또는 면역항암제 치료를 받은 후 면역관련 이상반응이 나타나지 않은 암 환자일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 대조군은 면역항암제 치료를 받은 후 면역관련 이상반응이 나타나지 않은 암 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명에 있어서, 상기 암은 비소세포성 폐암 및 소세포성 폐암을 포함하는 폐암, 식도암, 간세포성 암종, 위암, 유방암, 방광암, 신장암, 담관암, 요도암, 두경부암, 흑색종, 대장암, 담낭암, 췌장암, 바터팥대부암, 신경내분비암종, 부신경절종, 난소암, 자궁암, 전립선암, 흉선암, 및 뇌 혈관육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 피검체로부터 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변, 및 대변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예 또는 실험예에 따르면 전혈일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 본 발명에 있어서, 유전자 발현을 측정하는 단계는 당업계에 알려진 통상적인 방법을 사용하여 수행할 수 있으며, 예컨대, 시퀀싱(sequencing), RNA 시퀀싱(RNA sequencing) 및 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0054] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 발현은 RNA 시퀀싱으로부터 얻어진 read를 인간의 표준 참조 게놈(Reference Genome)과 비교하여 그 양을 정량화한 값을 의미하며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 인간의 표준 참조 게놈은 GRCh37(hg19)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 본 발명에 있어서, 상기 호중구 정량값(Neutrophil score)은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 측정될 수

있으며, 예컨대 상기 호중구 정량값은 유전자 발현을 기반으로 하여 유전자 온톨로지(Gene ontology, <http://geneontology.org/>)에서 제공하는 호중구 매개 면역 경로(Neutrophil mediated immunity pathway, GO:0002446) 유전자 세트를 이용하여 단일 샘플 유전자 세트 풍부 정도 시험(Single Sample Gene Set Enrichment Analysis, ssGSEA)을 통해 정량화하고 표준화한 값을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때, 상기 호중구 매개 면역 경로 유전자 세트를 정량화한 값은 유전자 세트의 통합적 발현을 확인하여 총 유전자 발현량을 정량화한 것일 수 있으며, 정량화 및 표준화는 ssGSEA(Barbie et al, Nature, 2009, PMID: 19847166., genepattern.org/modules/docs/ssGSEAProjection/5#gsc.tab=0)의 방법으로 계산될 수 있다.

- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포 프로파일은 호중구(Neutrophil), 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), CD4⁺ 미접촉 T 세포(CD4⁺ naïve T cell), 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem), 및 세포독성 T 세포(Cytotoxic T cell, Tc)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 양을 측정할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 면역세포 프로파일은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 측정될 수 있으며, 예컨대 ImmucellAI(Miao, Y et al., Adv. Sci. 7, 1902880., <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/ImmuCellAI>)로부터 측정될 수 있으나, 면역세포 프로파일을 측정할 수 있는 방법이라면 그 종류에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포 프로파일은 ImmucellAI에서 제공하는 면역세포 마커 유전자 세트의 총 유전자 발현량을 정량화함으로써 측정할 수 있으며, 각 면역세포에 대한 마커 유전자 세트는 다음과 같다:
- [0058] 호중구에 대한 마커 유전자: IL18RAP, BMX, BTNL8, CASP5, CLC, CXCR1, CXCR2, FCGR3B, FPR2, HSPA6, MEFV, PADI4, S100A12, TREML2, TRPM6, SIGLEC5, CREB5, ALPL, AATK, CEACAM3, CSF2RB, CSF3R, FBXO38, MAK, PAK2, TOP1, UBXN2B, 및 VNN3.
- [0059] 자연 살해 T 세포(NKT)에 대한 마커 유전자: CASP5, DOLK, GMIP, PRR5L, SGCA, SLAMF1, TCOF1, TGFBR2.
- [0060] 타입 1 조절 T 세포(Tr1)에 대한 마커 유전자: TNFRSF4, CD4, CCR4, CD28, 및 LAX1.
- [0061] 타입 1 헬퍼 T 세포(Th1)에 대한 마커 유전자: IFNG, IL2, MNAT1, SLAMF1, STAT1, EIF2B2, APBB2, CCL4, CTLA4, GGT1, LTA, SYNGR3, 및 TACO1.
- [0062] 유도 조절 T 세포(iTreg)에 대한 마커 유전자: FOXP3, STAT5A, CCR8, CD5, HS3ST3B1, TTN, CTLA4, FASLG, ICOS, CCR3, GALNT8, NFATC3, SIT1, CD28, IL10RA, PPM1B, ATG2B, CCR4, 및 ZFYVE9.
- [0063] 중심 기억 T 세포(Tcm): CORO7, ATM, GMEB2, SNRPN, ADSL, ITK, TFAP4, NAA16, LY9, CYLD, GIMAP4, PURA, DVL1, RPP38, LRIG2, IL7R, CDKN2AIP, APBB1, IPCEF1, CD247, CD40LG, TRADD, CD3E, TPR, ARID5B, UBASH3A, NCK1, SPTAN1, GPR171, 및 CD5.
- [0064] CD4⁺ 미접촉 T 세포(CD4⁺ naïve T cell): CD2, CD3G, CD4, GIMAP6, GLG1, HMOX2, IL7R, ITK, LIMD2, LY9, NAA16, OBSCN, PACS1, PLCL1, RPL14, SNPH, TPP2, TRAF1, ZBTB40, CD40LG, 및 SEPT9.
- [0065] 효과 기억 세포(Tem): APBA3, CD160, CD2, CD8B, CDK10, CDKN2AIP, CHST12, COG4, CX3CR1, DHX16, EWSR1, GIMAP6, GPR171, GZMK, HOMX2, IKZF3, ITK, KLRD1, KLRG1, MAPKAPK5, MORC2, MRFAP1L1, PLCG1, PSMC5, RNF167, SBF1, SF3B2, SLAMF1, TBCD, USP47, ZFYVE9, 및 ZNF549.
- [0066] 세포 독성 T 세포(Tc): KNG1, PSORS1C2, BLNK, SCN3A, TNFRSF10C, ITGAM, KLRK1, CD8A, GNLY, GZMH, PTGDR2, CD8B, GZMA, 및 PRF1.
- [0067] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 호중구 정량값(Neutrophil score), 면역세포 프로파일 중 호중구의 양, 및 면역세포 프로파일 중 세포독성 T 세포의 양으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이 대조군에 비해 낮을 경우, 면역관련 이상반응의 발병 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 면역세포 프로파일 중 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central

memory T cell, Tcm), $CD4^+$ 미접촉 T 세포($CD4^+$ naïve T cell), 및 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 양이 대조군에 비해 높을 경우, 면역관련 이상반응의 발병 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0069] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하여 머신러닝 기반 모델을 통해 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 위험도를 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 머신러닝 기반 모델은 XGBoost 및 랜덤 포레스트(Random forest)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0071] 본 발명에 있어서, “XGBoost”는 Extreme Gradient Boosting의 약자로, 앙상블의 부스팅 기법의 한 종류이다. 이전 모델의 오류를 순차적으로 보완해나가는 방식으로 모델을 형성하는데, 이전 모델에서의 실제값과 예측값의 오차(loss)를 훈련데이터 투입하고 gradient를 이용하여 오류를 보완하는 방식을 사용한다.
- [0072] 본 발명에 있어서, “랜덤 포레스트(Random forest)”는 분류, 회귀 분석 등에 사용되는 앙상블 학습 방법의 일종으로, 훈련 과정에서 구성한 다수의 결정 트리로부터 부류(분류) 또는 평균 예측치(회귀 분석)를 출력함으로써 동작한다.
- [0074] 또한, 본 발명은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0075] 또한, 본 발명은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제에 대한 반응성 예측 방법을 제공한다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 호중구 정량값(Neutrophil score), 면역세포 프로파일 중 호중구의 양, 및 면역세포 프로파일 중 세포독성 T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이 대조군에 비해 낮을 경우, 면역항암제에 대한 반응성이 낮을 것으로 예측할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 본 발명에 있어서, 상기 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 면역세포 프로파일 중 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), $CD4^+$ 미접촉 T 세포($CD4^+$ naïve T cell), 및 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 양이 대조군에 비해 높을 경우, 면역항암제에 대한 반응성이 높을 것으로 예측할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 또한, 본 발명은 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 제제를 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 조성물을 제공한다.
- [0080] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 호중구 정량값 또는 면역세포 프로파일을 검출할 수 있는 제제라면 그 종류에 제한이 없으며, 호중구 정량값 또는 면역세포 프로파일을 검출할 수 있는 당업계에 공지된 방법에 사용되는 제제가 모두 포함될 수 있다. 예컨대, 상기 제제는 호중구 정량값을 검출하기 위한 방법으로서, 유전자 발현을 기반으로 하여 유전자 온톨로지(Gene ontology, <http://geneontology.org/>)에서 제공하는 호중구 매개 면역 경로(Neutrophil mediated immunity pathway) 유전자 세트를 이용한 단일 샘플 유전자 세트 풍부 정도 시험(Single Sample Gene Set Enrichment Analysis, ssGSEA)에 통상적으로 필요한 구성성분, 조성물, 용액, 장치 등이 포함될 수 있으며, 면역세포 프로파일을 검출하기 위한 방법으로서, ImmucellAI(Miao, Y et al., Adv. Sci. 7, 1902880.)에 통상적으로 필요한 구성성분, 조성물, 용액, 장치 등이 포함될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 호중구 정량값을 검출하는 제제는 호중구 매개 면역 경로(Neutrophil mediated immunity pathway) 유전자 세트에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있으며, 상기 면역세포 프로파일을 검출하는 제제는 호중구(Neutrophil), 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory

T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), CD4⁺ 미접촉 T 세포(CD4⁺ naïve T cell), 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem), 및 세포독성 T 세포(Cytotoxic T cell, Tc)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0081] 본 발명에 있어서, “프라이머(primer)”는 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(single strand oligonucleotide)이다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)과 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하고, DNA 중합효소가 프라이머에 주형 DNA에 상보적인 염기를 갖는 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 추가하여 연결함으로써 DNA가 합성된다. 프라이머는 일반적으로 15 내지 30개의 염기서열로 이루어져 있으며, 염기 구성과 길이에 따라 주형 가닥에 결합하는 온도(melting temperature, T_m)가 달라진다. 프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 mRNA 또는 cDNA의 특정 구간을 증폭하여 mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 따라서 본 발명에서 상기 유전자 또는 이의 mRNA의 cDNA 또는 genomic DNA의 염기서열을 참조하여 프라이머 쌍을 용이하게 디자인할 수 있다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다.

[0082] 본 발명에 있어서, “프로브(probe)”는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA), DNA 등에 특이적으로 결합할 수 있는 짧은 수는 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오타이드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 상기 프로브는 대립형질(또는 대립유전자, allele)을 검출하기 위한 진단 방법 등에 사용될 수 있다. 상기 진단 방법에는 서던 블롯 등과 같은 핵산의 혼성화에 근거한 검출 방법들이 포함되며, DNA 칩을 이용한 방법에서 DNA 칩의 기판에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다.

[0083] 본 발명에서, 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 검출하고자 하는 표적이 되는 폴리뉴클레오타이드와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.

[0084] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 또는 프로브는 호중구 정량값 또는 면역세포 프로파일을 검출할 수 있는 것이라면 특정 서열로 한정되지 않는다.

[0085] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 키트 또는 면역항암제에 대한 반응성 예측 키트를 제공한다.

[0086] 본 발명에 있어서, “키트”는 상기 호중구 정량값 또는 면역세포 프로파일을 검출하는 제제를 포함함으로써, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병을 예측하거나 암 환자의 면역항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있도록 하는 도구를 의미한다. 본 발명의 키트에는 상기 제제 외에도 이들의 측정 또는 검출 방법에 통상적으로 필요한 다른 구성성분, 조성물, 용액, 장치 등이 포함될 수 있다.

[0087] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 컨테이너; 지시서; 및 상기 호중구 정량값 또는 면역세포 프로파일을 검출하는 제제를 포함할 수 있다. 상기 컨테이너는 상기 제제를 포장하는 역할을 할 수 있고, 보관 및 고정하는 역할을 할 수도 있다. 상기 컨테이너의 재질은 예컨대, 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있고, 이들은 부분적 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있으며, 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 지시서를 포함할 수 있다.

[0088] 또한, 본 발명은 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 제제를 포함하는 조성물의 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측 용도; 또는 면역항

암제에 대한 반응성 예측 용도를 제공한다.

[0089] 또한, 본 발명은 호중구 정량값(Neutrophil score) 및 면역세포 프로파일로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 검출하는 제제의 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측용 제제의 제조를 위한 용도; 또는 면역항암제에 대한 반응성 예측을 위한 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

[0090] 또한, 본 발명은 암 환자의 면역항암제 치료 후 면역관련 이상반응의 발병 위험도가 높을 것으로 의심되는 피검체 또는 면역항암제에 대한 반응성이 낮을 것으로 의심되는 피검체와 대조군에서 분리된 치료 전후의 생물학적 시료에서 얻어진 RNA에서 유전자 발현을 측정된 후, 호중구 정량값(Neutrophil score), 면역세포 프로파일 중 호중구의 양, 및 면역세포 프로파일 중 세포독성 T 세포의 양으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 낮은 값이 측정될 경우; 또는 면역세포 프로파일 중 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), CD4⁺ 미접촉 T 세포(CD4⁺ naïve T cell), 및 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 높은 값이 측정될 경우 면역항암제 치료 후 면역관련 이상반응의 발병 위험도가 높은 피검체 또는 면역항암제에 대한 반응성이 낮은 피검체임을 가리키는 것으로 보는, 면역항암제 유도 면역관련 이상반응의 발병 예측 또는 면역항암제에 대한 반응성 예측에 대한 감수성이 높은 피검체인지 결정/분석하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0091] 본 발명에 있어서, “포함하는”이라는 용어가 사용될 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.

[0093] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1. 면역관련 이상반응(irAE) 환자 다기관 전향적 코호트

[0097] 서울아산병원에 등록된 면역 체크포인트 차단(ICB) 요법을 받은 irAE 환자군 276명 및 non-irAE 환자군 255명으로 이루어진 총 531명의 환자를 모집하여 연구를 수행하였다.

[0098] 환자의 연령, 성별, 암 유형, 및 투여받은 ICB 치료제의 종류 등을 포함하여 환자 코호트의 기본 특징을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

	irAE group (N=276)	non-irAE group (N=255)
Age		
Median, years (range)	64.4 ± 9.9	62.7 ± 9.9
Sex		
Male	214 (77.5%)	187 (73.3%)
Female	62 (22.5%)	68 (26.7%)
Cancer type		
Gastrointestinal cancer	96 (34.8%)	56 (22.0%)
NSCLC	94 (34.1%)	102 (40.0%)
Urothelial cancer	41 (14.9%)	41 (16.1%)
Pancreatic, hepatic, and biliary cancer	32 (11.6%)	35 (13.7%)
Melanoma	5 (1.8%)	7 (2.7%)
Breast cancer	4 (1.4%)	1 (0.4%)
Head and neck cancer	2 (0.7%)	9 (3.5%)

Other cancer	4 (1.4%)	1 (0.4%)
Ovary cancer	0 (0.0%)	2 (0.8%)
ICB type*		
Nivolumab	131 (47.5%)	93 (36.5%)
Atezolizumab	75 (27.2%)	84 (32.9%)
Pembrolizumab	38 (13.8%)	64 (25.1%)
Nivolumab + Ipilimumab	14 (5.1%)	7 (2.7%)
Duvalumab	8 (2.9%)	4 (1.6%)
Ipilimumab	1 (0.4%)	0 (0.0%)
Investigational Immune checkpoint treatment	9 (3.2%)	3 (1.2%)
ICB treatment regimen*		
ICB monotherapy	231 (83.7%)	215 (84.3%)
ICB + ICB	11 (4.0%)	7 (2.7%)
ICB + cytotoxic chemotherapy	31 (11.2%)	26 (10.2%)
ICB + molecular targeted therapy	3 (1.1%)	6 (2.4%)
ICB+ cytotoxic chemotherapy + molecular targeted therapy	0 (0.0%)	1 (0.4%)
Treatment setting*		
Palliative	258 (93.5%)	240 (94.1%)
Maintenance after definitive CRT	10 (3.6%)	11 (4.3%)
Adjuvant	6 (2.2%)	3 (1.2%)
Neoadjuvant	2 (0.7%)	1 (0.4%)
Prior treatment**		
Cytotoxic chemotherapy	178 (65.4%)	160 (68.7%)
Molecular targeted agent	64 (24.2%)	46 (20.0%)
RT	45 (16.5%)	52 (22.3%)
CRT	37 (13.6%)	18 (7.7%)
ECOG performance		
0	22 (8.1%)	12 (4.8%)
1	221 (81.0%)	200 (80.3%)
2	20 (7.3%)	22 (8.8%)
>=3	10 (3.6%)	15 (6.0%)

[0100] (irAE, 면역 관련 이상반응; NSCLC, 비소세포 폐암; ICB, 면역 체크포인트 차단; RT, 방사선 요법; CRT, 화학 방사선 요법; ECOG performance, 전신활동도)

[0102] 실시예 2. irAE 환자의 분류

[0103] 통합 모델의 추가 분석 및 트레이닝을 위해 68개 유형의 irAE(단일 라벨)를 12개의 주요 라벨('Any' 라벨 포함)로 분류하였다. 12개의 주요 라벨 각각으로 구성된 단일 라벨 목록은 하기 실험예 1의 표 3에 나타내었으며, 12개의 주요 라벨 각각에 대한 환자 수는 하기 실험예 1의 표 4에 나타내었다.

[0105] 실시예 3. 임상적 특징

[0106] 본 발명의 코호트의 환자에 대해 이용 가능한 임상적 특징에는 약물 유형, 암 유형, ECOG 수행 상태, 자가면역 질환의 병력, 및 당뇨 또는 고혈압의 병력이 포함된다. 전처리 실험실 테스트에는 전혈구수(CBC), 화학적 성질, 및 호중구 대 림프구 비율(NLR)과 같은 값으로부터 계산된 여러 조합 값이 포함되고, 혈소판 대 림프구 비율(PLR) 또한 후보 특징으로 포함되었다.

[0108] 실시예 4. RNA 시퀀싱 및 데이터 처리

- [0109] 전혈 샘플에서 생성된 라이브러리는 Illumina 플랫폼에서 150개 염기 페어드-엔드(paired-end) 리드로 시퀀싱되었다. raw FASTQ 파일의 품질은 FastQC(v.0.11.9), MultiQC(v.1.9), 및 Trimmomatic(v.0.39)(어댑터 시퀀싱 트리밍을 위한 TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10:2:keepBothReads LEADING:3 TRAILING:3 MINLEN:36)을 사용하여 컨트롤되었으며, SortMeRNA(v.2.1b)(silva-euk-18s-id95.fasta, silva-euk-28s-id98.fasta)는 rRNA 필터링에 사용되었다.
- [0110] 리드는 1000 Genomes Project에서 제공하는 GRCh37(hg19) 빌드에 정렬되었으며 유전자는 --sjdbOverhang 150 옵션이 있는 STAR 2 패스 매핑을 사용하여 gencode.v37.annotation.gtf를 기반으로 할당되었다. 정렬된 리드는 SAMtools(v.1.7)를 사용하여 분류되었으며 리드 수는 HTSeq(v.0.12.4)에 의해 계산되었다. 리드 수는 하우스 코드를 사용하여 TPM 값을 계산함으로써 정규화되었다.
- [0112] **실시예 5. RNA-seq 데이터에서 세포 유형 풍부도의 디컨볼루션(deconvolution)**
- [0113] ImmuCellAI를 사용하여 전혈 RNA-seq 데이터로부터 총 24개의 면역 세포 풍부도를 계산하였다(Miao, Y et al., Adv. Sci. 7, 1902880.). 서로 다른 시퀀싱 배치에서 시퀀싱 데이터 간에 가능한 편향을 최소화하기 위해 PCA 분석을 수행하였으며(도 1 참조), PCA 플롯은 서로 다른 시퀀싱 배치에서 샘플이 조화된 혼합물을 형성함을 보여주었다.
- [0115] **실시예 6. 트레이닝 및 테스트 그룹 지정**
- [0116] 수집된 코호트에 대하여 irAE 발생과 연관된 특징(feature) 발굴과 모델 학습에 사용될 트레이닝 그룹 및 모델 성능 검증에 사용될 테스트 그룹을 8:2의 비율로 나누었다. 치우쳐지지 않은 모델 학습 및 검증을 위하여 각 그룹을 유사한 irAE 발생 빈도에 기반하여 분류하였다.
- [0118] **실시예 7. 통계적 시험**
- [0119] irAE 발생과 유의미한 연관성을 보이는 특징을 찾기 위하여 윌콕스 검정 (Wilcoxon test)를 시행하였다. 면역세포 프로파일과 같이 여러 특징들에 대해 한 번에 검정하는 경우 p-값 보정(p-value adjustment)을 FDR 방식으로 해주었으며, 최종 특징을 결정하기 위해서 irAE 발생에 대하여 FDR 값<0.01을 보이는 특징들을 선별하였다.
- [0121] **실시예 8. 통합 모델의 트레이닝 및 예측**
- [0122] 통합 모델은 irAE 발생에 대해 트레이닝 하였다. 통합 모델의 특징에는 상기에서 기재한 바와 같이 irAE 발생과 밀접한 연관성이 있는 호중구 정량값과 함께 유의한 FDR 값을 가지는 면역세포 프로파일이 포함된다. 통합 모델을 트레이닝하기 위해 XGBoost 프레임워크 및 랜덤포레스트(Random forest) 프레임워크를 구현하였다. 모델을 트레이닝 하기 위해, irAE가 있는 환자(true case) 및 irAE가 없는 환자(false case)를 트레이닝(training) 및 검증(validation) 세트에 대해 각각 8:2로 나누었다. 트레이닝 세트의 모든 특징은 StandardScaler를 사용하여 정규화되었으며 트레이닝 세트에 맞는 스케일러 scaler)는 검증 세트의 특징 변환에 채택되었다. irAE 발생의 예측이 주요 목표이기 때문에 곡선 아래 영역(AUC) 값을 기반으로 최적의 모델을 선택하였으며, 모델을 검증하기 위해 모델 트레이닝에 사용되지 않은 테스트 세트를 사용하였다.
- [0124] **실시예 9. XGBoost 모델링**
- [0125] Python의 XGBoost 패키지를 사용하여 5-fold cross validation이 적용된 XGBoost 프레임워크를 구현하였다. 하이퍼 파라미터 튜닝을 위하여 gridSearchCV 알고리즘을 사용하였으며 파라미터 셋은 다음과 같은 리스트가 사용되었다 (n_estimators : [50, 100, 200, 500, 1000], learning_rate : [0.01, 0.05, 0.1, 0.3], max_depth : [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10], subsample : [0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0], colsample_bytree : [0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0], gamma : [0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4], min_child_weight : [1, 3, 5, 7]).

[0127] **실시예 10. Random forest 모델링**

[0128] Python의 RandomForestClassifier 패키지를 사용하여 5-fold cross validation이 적용된 Random forest 프레임워크를 구현하였다. 하이퍼 파라미터 튜닝을 위하여 gridSearchCV 알고리즘을 사용하였으며 파라미터 셋은 다음과 같은 리스트가 사용되었다 (n_estimators : [50, 100, 200, 500, 1000], max_depth : [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10], min_samples_split : [2, 5, 10], min_samples_leaf : [1, 2, 4], bootstrap : [True, False]).

[0130] **실시예 11. 특징 중요도(feature importance) 평가**

[0131] 각 특징이 예측 결과에 미치는 영향을 해석하기 위한 특징 중요도 값은 xgboost 패키지의 feature_importances_ 기능을 사용하여 계산하였다. 특징 중요도의 상대적 비교를 위해 각 특징들의 중요도는 가장 높게 나타나는 특징 중요도 값으로 나눈 값으로 나타내었다.

[0133] **[실험예]**

[0134] **실험예 1. irAE의 다기관 전암종(pan-cancer) 전향적 코호트**

[0135] ICB 치료된 531명의 환자 중 276명에서 68가지 유형의 irAE를 확인하였다(하기 표 2 참조). 피부(skin), 내분비계(endocrine system), 갑상선(thyroid gland), 근골격계(musculoskeletal system), 위장계(gastrointestinal system) 및 신경계(neurologic system)와 같은 영향을 받는 장기 시스템을 기반으로 각 irAE에 라벨을 지정하였다. irAE의 중증도에 따라 3개 이상의 irAE 유형이 있는 환자는 Multiple G $\geq$ 1, 3개 이상의 2등급 이상의 irAE 유형이 있는 환자는 Multiple G $\geq$ 2, 모든(any) 3등급 이상의 irAE 유형이 있는 환자 및 2등급 이상의 중요한(critical) irAE 유형이 있는 환자를 Critical로 추가 라벨링하였다. 다른 라벨에는 Flu-like(독감 유사 증상) 및 Pulmonary(ICB 치료로 인한 폐렴)가 포함되며, 모든 irAE 카테고리 하의 환자들은 Any로 표시하였다(하기 표 3 참조).

표 2

[0136]

Type of irAE	Control	irAE of interest	irAE of non-interest
Pruritus	255	111	165
Skin rash	255	87	189
Fatigue	255	45	231
Myalgia	255	41	235
Hypothyroidism	255	32	244
Pneumonitis	255	24	252
Arthralgia	255	17	259
Amylase	255	16	260
Lipase	255	16	260
Enterocolitis	255	15	261
Headache	255	15	261
Dry mouth	255	13	263
Fever	255	13	263
Nausea	255	12	264
Anorexia	255	10	266
Liver enzyme	255	10	266
Hyperthyroidism	255	9	267
Neuropathy	255	9	267
Sweating	255	9	267
Adrenal insufficiency	255	7	269
Dizziness	255	7	269
Edema facial	255	6	270
Urticaria	255	5	271
Infusion chills	255	5	271
Infusion	255	5	271
Dermatitis	255	4	272

Abdominal pain	255	4	272
Vomiting	255	4	272
Muscle weakness	255	4	272
Creatine phosphokinase elevation	255	4	272
Dry eye	255	4	272
Lichen planus	255	3	273
Pancreatitis	255	3	273
Constipation	255	3	273
Stomatitis	255	3	273
Type I diabetes mellitus	255	3	273
Edema limb	255	3	273
Hand foot syndrome	255	2	274
Paronychia	255	2	274
Dysesthesia	255	2	274
Cognitive dysfunction	255	2	274
Pericarditis	255	2	274
Hoarseness	255	2	274
Infusion chest	255	2	274
Skin hypopigmentation	255	1	275
Dry skin	255	1	275
Bullous pemphigoid	255	1	275
Myositis	255	1	275
Exacerbation of rheumatoid arthritis	255	1	275
Myopathy	255	1	275
Meningoencephalitis	255	1	275
Eosinophilia	255	1	275
Nephritis	255	1	275
Creatinine increased	255	1	275
Proteinuria	255	1	275
Hematuria	255	1	275
Renal thrombotic microangiopathy	255	1	275
Blurred vision	255	1	275
Retinopathy	255	1	275
Tinnitus	255	1	275
Hyposmia	255	1	275
Sore throat	255	1	275
Insomnia	255	1	275
Herpes zoster	255	1	275
Infusion throat	255	1	275
Hypercalcemia	255	1	275
Eczema	255	1	275
Acute tubular necrosis	255	1	275

표 3

Type of irAE	Description	Components
Any	Any kinds of irAE	single labels
Critical	Any irAEs of grade ≥ 3 or critical irAEs* of grade ≥ 2	*adrenal insufficiency, type I diabetes mellitus, pancreatitis, meningoencephalitis, pericarditis, nephritis, renal thrombotic microangiopathy, pneumonitis
Skin	irAEs related with skin	skin hypopigmentation
		hand foot syndrome
		dry skin
		dermatitis
		skin rash
		paronychia
		lichen planus
		pruritus
		urticaria
		bullous pemphigoid
Thyroid	irAEs related with thyroid gland	hyperthyroidism
		hypothyroidism
		subclinical hypothyroidism with TSH >10 μ U/mL
Endocrine	irAEs related with endocrine system	hyperthyroidism
		hypothyroidism
		subclinical hyperthyroidism
		subclinical hypothyroidism
		subclinical hypothyroidism with TSH >10 μ U/mL
		adrenal insufficiency
Musculoskeletal	irAEs related with musculoskeletal system	type I diabetes mellitus
		arthralgia
		myalgia
		myositis
		myopathy
		muscle weakness
		exacerbation of rheumatoid arthritis

[0138]

Neurologic	irAEs related with neurologic system	meningoencephalitis
		headache
		dizziness
		cognitive dysfunction
		dysesthesia
Pulmonary	Pneumonitis of any grade	pneumonitis
Gastrointestinal	irAEs related with gastrointestinal system	pancreatitis
		asymptomatic amylase/lipase elevation
		enterocolitis
		nausea
		vomiting
		anorexia
		abdominal pain
		constipation
Flu-like	Flu-like symptoms	fever
		sweating
		fatigue
		arthralgia
		muscle weakness
		myalgia
		sore throat
		headache
Multiple (any grade)	Patients with 3 or more irAEs of any grade	single labels
Multiple (grade ≥ 2)	Patients with 3 or more irAEs of grade ≥ 2	single labels

[0139]

[0141]

하기 표 4에 따르면, 모든 사례의 52 %가 Any로 라벨링된 반면, 피부는 가장 빈번한 irAE 유형(26 %)이었고, 독감 유사(21 %) 및 다중(모든 등급) (18 %)가 그 뒤를 이었다.

표 4

[0142]

Type of irAE	Control	irAE of interest	irAE of non-interest
Any	255	276	0
Skin	255	140	136
Flu-like	255	110	166
Multiple (any grade)	255	95	181
Endocrine	255	83	193
Gastrointestinal	255	65	211
Musculoskeletal	255	58	218
Critical	255	49	227
Thyroid	255	46	230
Multiple (grade ≥ 2)	255	44	232
Neurologic	255	33	243
Pulmonary	255	24	252

[0144]

이에 더하여, 유전, 분자, 및 세포의 irAE 위험 인자를 식별하기 위해 이 코호트에 대해 다차원 시퀀싱을 수행하였다. ICB 치료 전(PRE)과 치료 초기(EDT)에 531개의 일치하는 전혈 샘플에 대해 RNA 시퀀싱을 수행하여 irAE가 있거나 없는 환자 간 및 PRE와 EDT 간의 차별적인 분자 활성 및 면역 세포 프로파일을 조사하였다.

[0146] **실험예 2. PRE 및 EDT irAE 샘플 모두에서 irAE와 연관된 호중구 및 면역 세포 프로파일 확인**

[0147] ICB 치료 전(PRE)과 치료 초기(EDT)에 531개의 일치하는 전혈 샘플에 대해 RNA 시퀀싱을 통해 유전자 발현을 정리하였다. 생산한 기관별, 채혈 시점 별로 일괄 처리 효과(batch effect)가 있는지 확인하기 위해 주성분 분석(Principal component analysis)을 수행하였다. 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 생산한 기관 및 채혈 시점에 구분 없이 모든 샘플들이 잘 융화되어있음을 확인할 수 있었다.

[0149] 모델 구성을 위해서 전체 샘플을 irAE 발생률에 기반하여 8:2의 비율로 트레이닝 세트와 테스트 세트로 분류하였다(트레이닝 세트 수 = 424명, 테스트 세트 수 = 107명). 호중구에 대한 포괄적인 특징을 잡아내기 위하여 유전자 발현을 기반으로 하여 호중구 정량값을 계산하였다. 호중구 정량값은 유전자 발현을 기반으로 하여 유전자 온톨로지(Gene ontology, <http://geneontology.org/>)에서 제공하는 호중구 매개 면역 경로(Neutrophil mediated immunity pathway) 유전자 세트를 이용하여 단일 샘플 유전자 세트 풍부 정도 시험(Single Sample Gene Set Enrichment Analysis)을 통해 정량화하고 표준화하여 계산하였다.

[0150] 호중구 정량값과 irAE 발생의 연관성을 트레이닝 세트에서 확인해본 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 irAE가 발생한 환자에서 호중구 정량값이 낮음을 확인할 수 있었으며, 이 경향성은 치료 후(EDT) 샘플에서 더 명확하게 드러나고 있었다.

[0152] 또한, 상기 호중구 정량값 확인을 위한 호중구 매개 면역 경로 유전자 세트의 발현 확인과는 별개로, 호중구 마커 유전자의 발현 수준을 확인하였으며, 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 PRE 및 EDT 샘플 모두에서 대조군보다 irAE 그룹에서 유의하게 낮았다(irAE=137명, 대조군=122명).

[0153] 그런 다음 세포 수를 넘어 분자 수준에서 irAE 관련 수치를 특성화하였다. 이를 위해 irAE 샘플에서 더 높거나 더 낮은 발현을 가진 유전자를 확인하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 특히 차등 유전자 발현은 대부분 irAE 그룹에서 저발현이 특징으로 나타났으며, 이는 PRE 샘플보다 EDT 샘플에서 더 잘 나타났다. 경로 풍부도 분석은 도 5에 나타난 바와 같이 irAE 관련 유전자 역제가 PRE 및 EDT 샘플 모두에서 호중구 매개 면역뿐만 아니라 호중구 활성화 및 탈과립에서 발생했음을 보여주었다. 그러나, 경로 풍부도 정도는 EDT 샘플에서 확인된 유전자의 경우 훨씬 더 컸다. 12개의 irAE 그룹 각각에 대하여 확인했을 때, 도 6에 나타난 바와 같이 12개의 irAE 그룹 각각과 대조군 사이의 비교로부터 저발현된 유전자가 확인되었을 때 유사한 패턴이 관찰되었다.

[0155] 그런 다음 상기 호중구 정량값 및 호중구 마커 유전자 발현 수준 확인과는 별개로 면역 세포 수준에서 irAE와의 연관성을 트레이닝 세트에서 확인하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 치료 전후 모두에서 irAE 발생과 유의미한 연관성을 보이는 면역 세포 타입을 확인할 수 있었으며, 그 경향성은 치료 후(EDT) 샘플에서 더 심화되었다.

[0157] **실험예 3. RNA 기반 irAE 예측 모델 수립 및 평가**

[0158] 상기 실험예 2에서 확인한 바와 같이 치료 전후의 샘플에 대하여 트레이닝 세트에서 irAE와 연관된 특징들을 확인한 결과, 치료 후(EDT)에서 그 경향성이 심화됨을 확인하였다. 이에 기반하여 치료 전후 샘플들에 대하여 irAE 발생과 유의미한 연관성을 가진 호중구 정량값 및 면역세포 프로파일(호중구(Neutrophil), 자연 살해 T 세포(natural killer T cell, NKT), 타입 1 조절 T 세포(type 1 regulatory T cell, Tr1), 타입 1 헬퍼 T 세포(type 1 T helper, Th1), 유도 조절 T 세포(induced regulatory T cell, iTreg), 중심 기억 T 세포(central memory T cell, Tcm), CD4⁺ 미접촉 T 세포(CD4⁺ na^ïve T cell), 효과 기억 세포(effector memory T cell, Tem), 및 세포독성 T 세포(Cytotoxic T cell, Tc))의 10개의 특징(FDR 값<0.01)을 사용하여 irAE 발생 예측 모델을 수립하였다.

[0160] 트레이닝 세트로 학습한 모델을 테스트 셋에 검증한 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 치료 전(PRE)의 경우

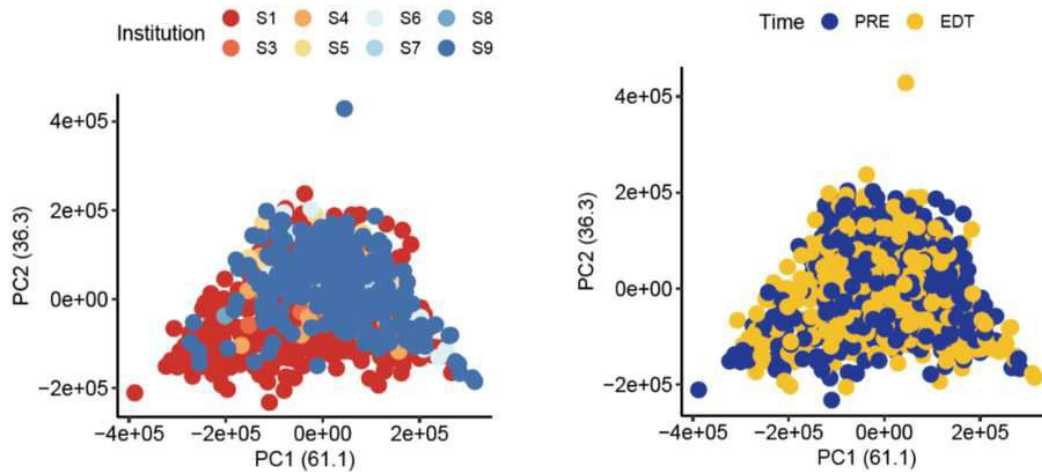
XGBoost로 만든 모델의 test AUC 값이 0.66이고, Random forest로 만든 모델의 test AUC 값은 0.67로 확인되었으며, 치료 후(EDT)의 경우 XGBoost로 만든 모델의 test AUC 값이 0.78이고, Random forest로 만든 모델의 test AUC 값은 0.72로 확인되었다. 이에, XGBoost로 만든 모델이 Random forest로 만든 모델보다 더 좋은 성능을 보이고 있음을 알 수 있었다. 또한 XGBoost 모델에서 상기 10개의 특징에 대하여 중요도를 확인하였을 때, 도 9에 나타난 바와 같이 치료 전의 경우 Tc가 가장 중요한 특징으로 나타났으며, 치료 후의 경우 Neutrophil이 가장 중요한 특징으로 나타나고 있음을 확인하였다.

[0162]

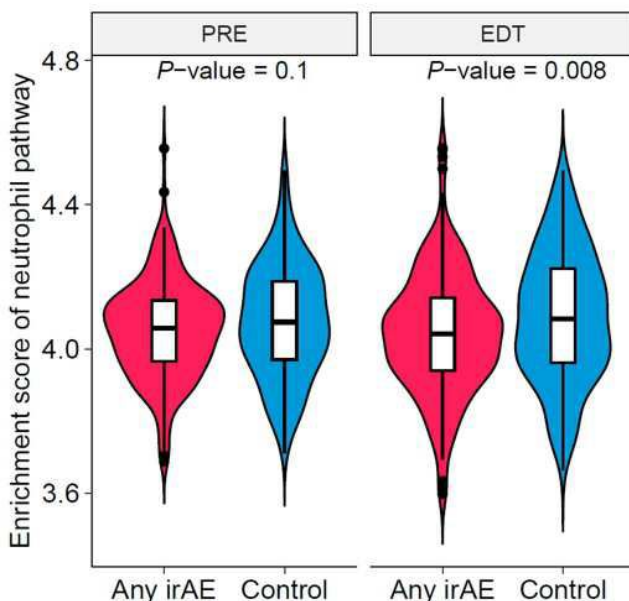
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

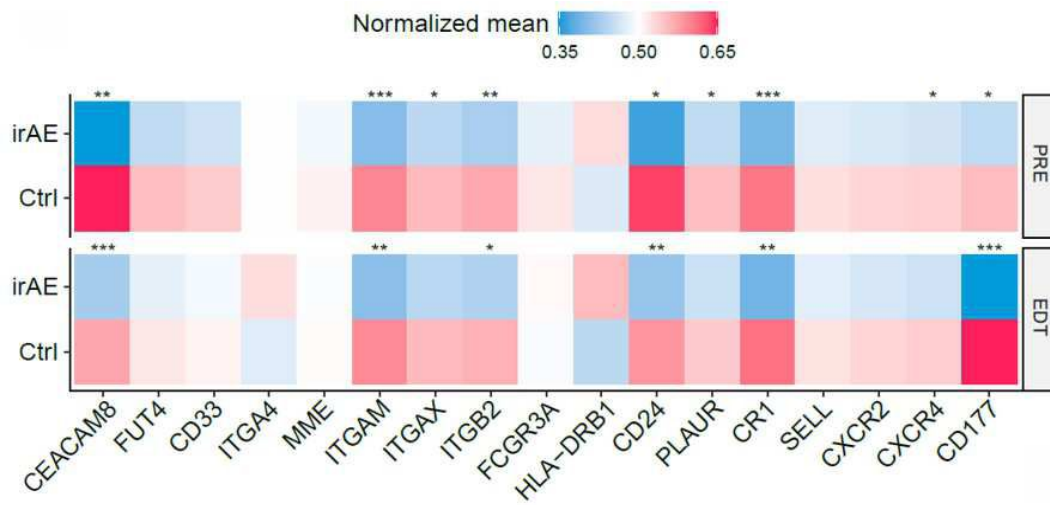
도면1



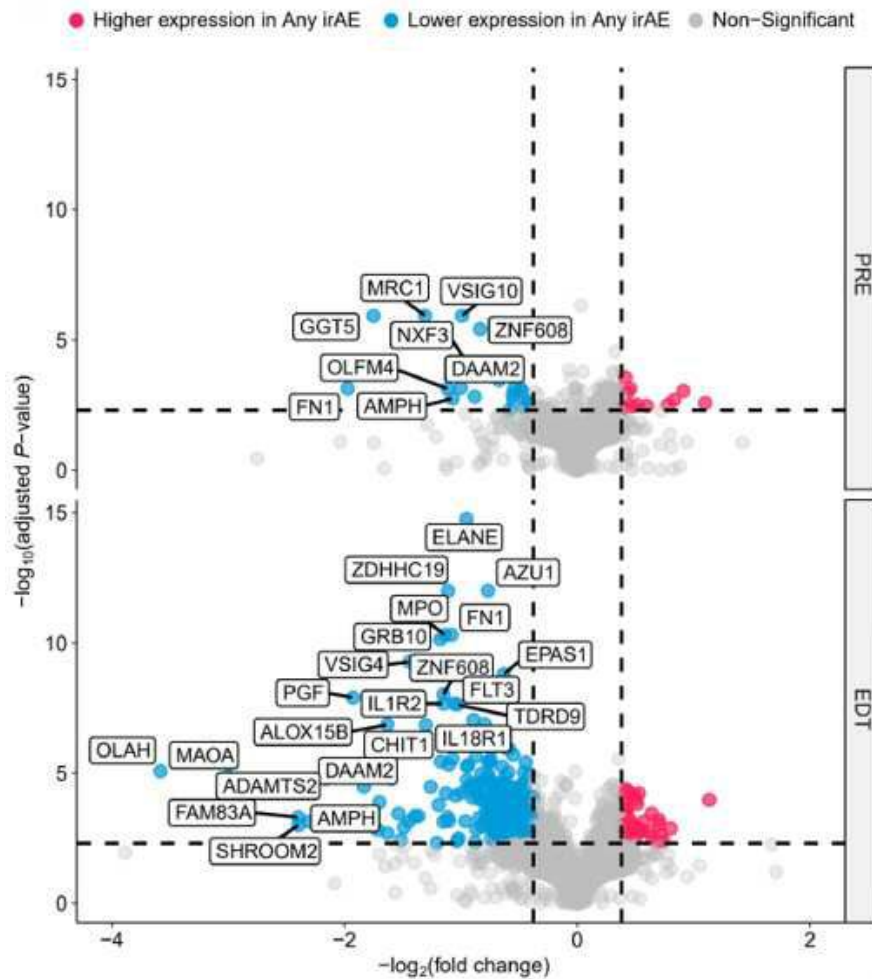
도면2



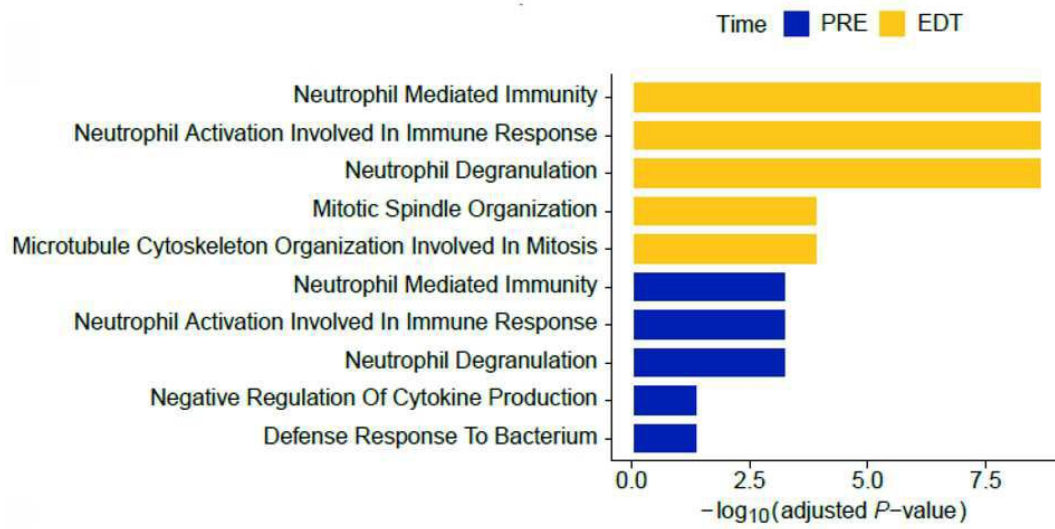
도면3



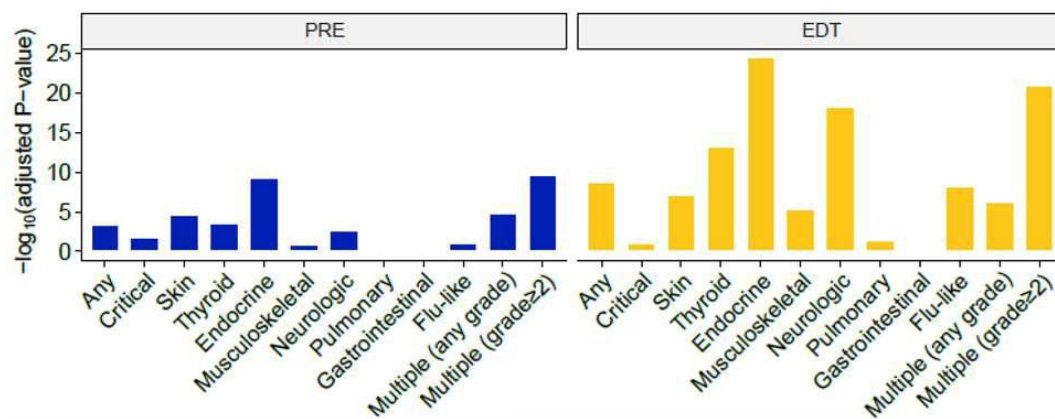
도면4



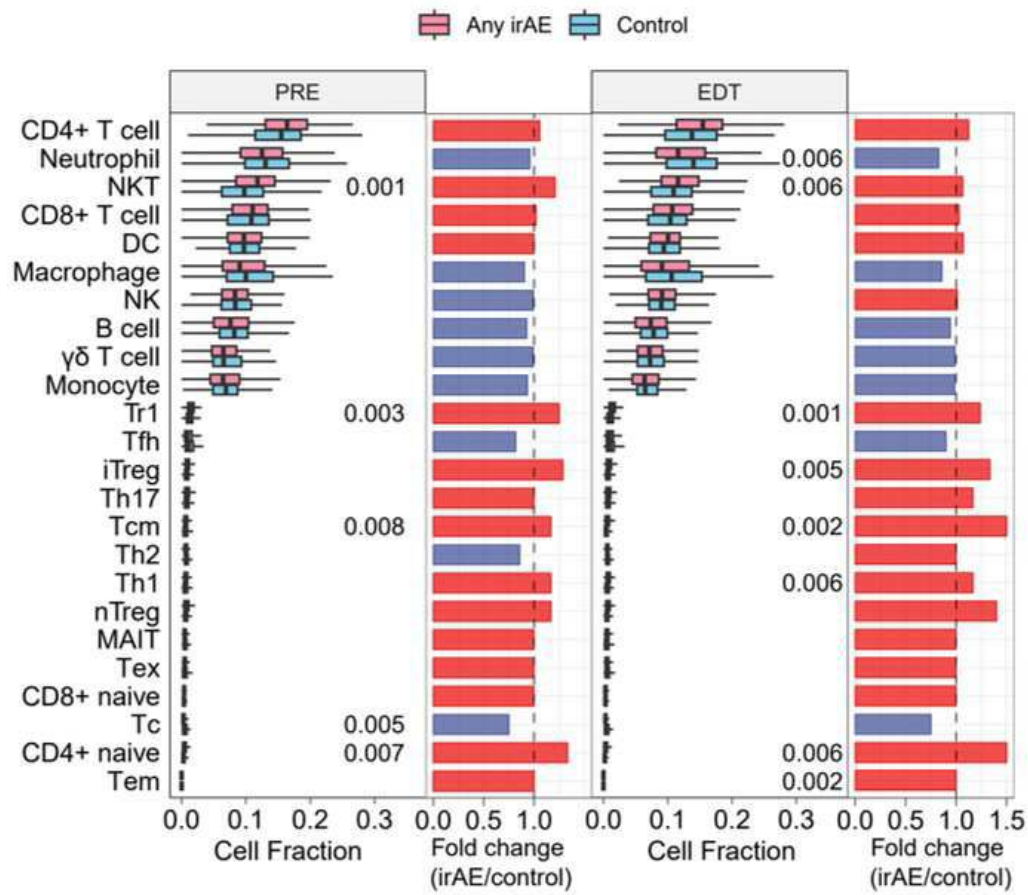
도면5



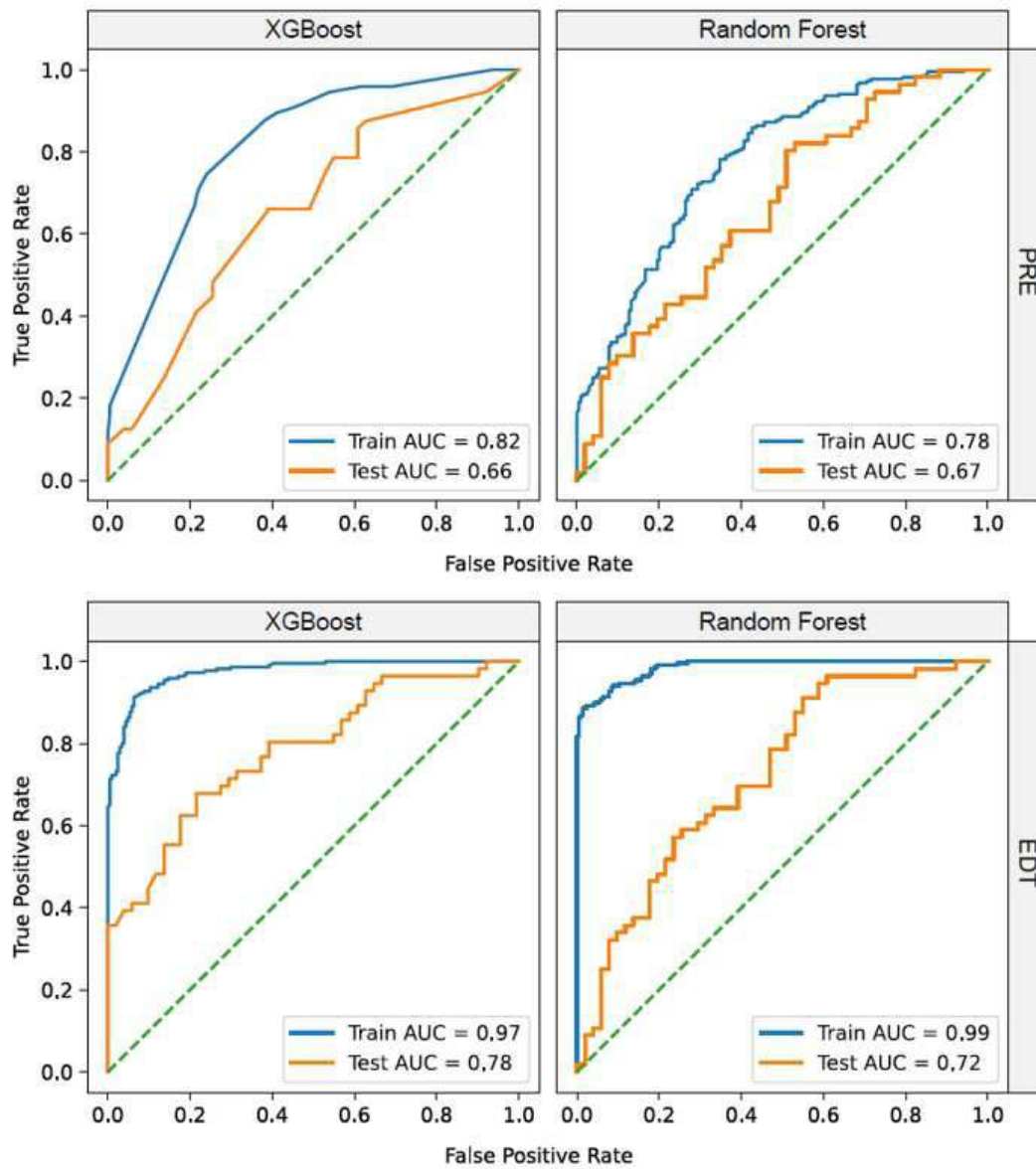
도면6



도면7



도면8



도면9

