

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 5월 6일 (06.05.2021)



(10) 국제공개번호
WO 2021/086014 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/6886 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/014823
- (22) 국제출원일: 2020년 10월 28일 (28.10.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2019-0136695 2019년 10월 30일 (30.10.2019) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이세훈 (LEE, Se Hoon); 06263 서울시 강남구 도곡로14길 21, 104동 503호, Seoul (KR). 박세훈 (PARK, Sehhoon); 06344 서울시 강남구 개포로

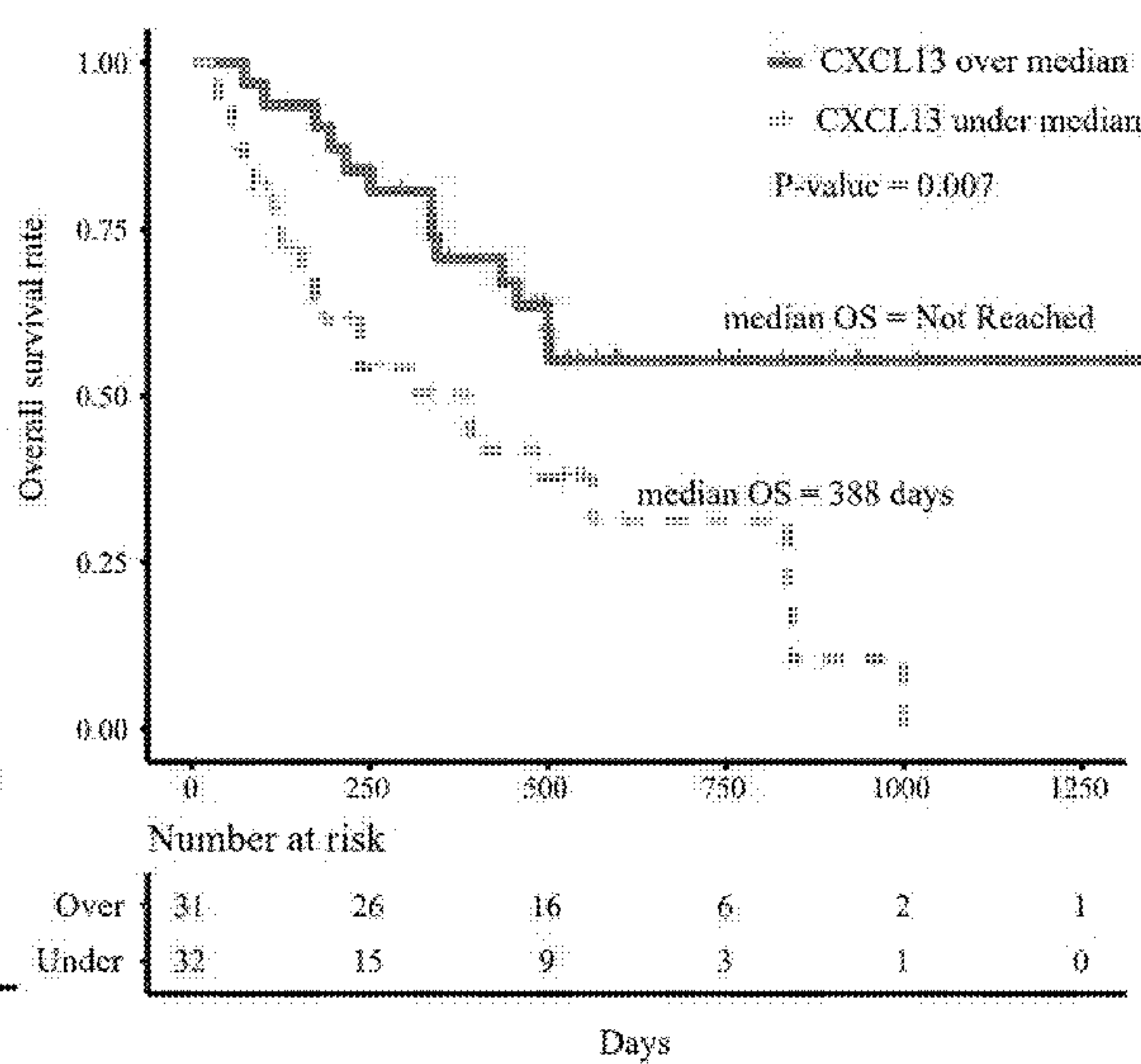
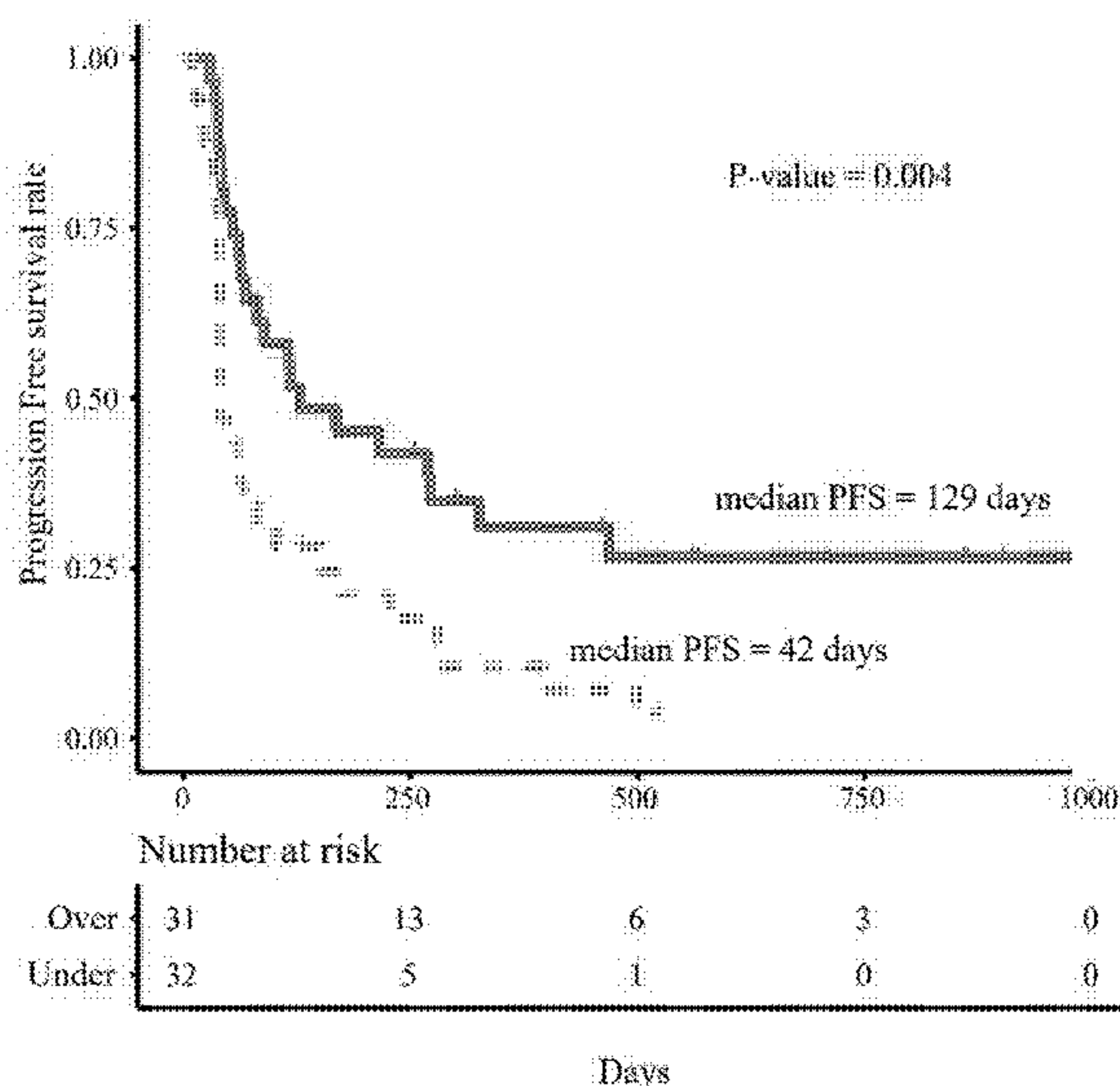
110길 50, 106동 1102호, Seoul (KR). 김홍숙 (KIM, Hong Sook); 16809 경기도 용인시 수지구 성북2로 158, 603-604, Gyeonggi-do (KR). 차홍의 (CHA, Hongui); 03781 서울시 서대문구 연희로 38-20, 107동 1902호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 아이시스 (ISIS IP LAW LLC); 06160 서울시 강남구 테헤란로63길 14, 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: CXCL13 MARKER FOR PREDICTING IMMUNOTHERAPY RESPONSIVENESS IN LUNG CANCER PATIENT AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측용 CXCL13 마커 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a biomarker for predicting responsiveness to immunotherapy of lung cancer patients and a use thereof and, more particularly, to a marker composition for predicting immunotherapy responsiveness of lung adenocarcinoma patients and a composition for predicting immunotherapy responsiveness, which comprise a CXCL13 gene or a protein encoded by the gene, and an information provision method for predicting immunotherapy responsiveness. It was confirmed that CXCL13 was significantly up-regulated in patients administered with an immune checkpoint inhibitor by using the composition according to the present invention. Through this confirmation, the CXCL13 gene or the protein encoded by the gene may be effectively used in related research fields as a predictive marker for anticancer agent treatment responsiveness against lung cancer, and it is expected that it will be

[다음 쪽 계속]

WO 2021/086014 A1

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수
하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

possible to use the CXCL13 gene or the protein encoded by the gene as an immunotherapy adjuvant to increase the anticancer treatment effect of lung cancer through the development of an enhancer that enhances the levels of mRNA of the CXCL13 gene or the protein encoded by the gene.

(57) 요약서: 본 발명은 폐암 환자의 면역치료에 반응성 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 CXCL13 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 폐 선암 환자의 면역치료 반응성 예측용 마커 조성물, 면역치료 반응성 예측용 조성물, 및 면역치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물을 이용하여 면역 체크포인트 억제제를 투여한 환자에게서 CXCL13이 유의하게 상향조절 된 것을 확인하였는바, 이를 통해 CXCL13 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질이 폐암에 대한 항암제 치료 반응성 예측 마커로서 관련 연구 분야에서 유용하게 이용될 수 있으며, CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 증진시키는 증진제의 개발을 통해 폐암의 항암 치료 효과를 높이는 면역 치료 보조제로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측용 CXCL13 마커 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 폐암 환자의 면역치료에 대한 반응성 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 CXCL13 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 폐 선암 환자의 면역치료 반응성 예측용 마커 조성물, 면역치료 반응성 예측용 조성물, 및 면역치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 폐에서 기원하는 악성 종양인 폐암은 그 조직형태에 따라 크게 소세포성 폐암(small cell lung cancer)과 비 소세포성 폐암(non-small cell lung cancer)으로 구분된다. 상기 비 소세포성 폐암은 조직형에 따라 선암, 편평상피세포암 및 대세포암으로 구분된다.
- [3] 비 소세포성 폐암은 상술한 바와 같이 선암(adenocarcinoma), 편평상피세포암(squamous cell carcinoma) 및 대세포암(large-cell carcinoma)으로 구분된다. 먼저, 선암은 폐 말초 부위에서 주로 발생하고, 여성 또는 비흡연자에게서도 잘 발생하며, 크기가 작아도 전이가 되어 있는 경우가 많고, 최근 그의 발생 빈도가 증가하는 추세에 있다. 다음으로, 편평상피세포암은 주로 폐 중심부에서 발견되고, 주로 기관지 내강으로 자라 기관지를 막는 증상을 나타내며, 남성에게 흔하고, 흡연과 밀접하게 관련된 것으로 알려져 있다. 마지막으로, 대세포암은 폐 표면 근처에서 주로 발생하고, 절반 가량은 큰 기관지에서 발생하며, 전체 폐암의 4 내지 10% 정도를 차지하고, 세포 크기가 대체적으로 크며, 그 중 일부는 빠르게 증식 및 전이되는 경향이 있어 다른 비 소세포성 폐암에 비해 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다.
- [4] 특히, 비 소세포성 폐암의 경우, 최근 10년간 생존율은 10% 정도에 불과한데, 이같은 낮은 생존율을 나타내는 주된 이유 중의 하나는 폐암의 진단 성공율이 매우 낮다는 점이다. 이러한 폐암의 진단성공율을 향상시킬 수 있는 방법으로, 폐암 특이적인 유전자 이상을 검출하는 방법이 제안되었고, 이를 위하여 폐암 특이적인 유전자 변이에 대한 다양한 연구결과가 보고 되고 있으나, 폐암의 진행초기에는 이러한 유전자의 이상여부를 판단할 판정기준이 모호하다는 단점이 있었다. 즉, 특정 유전자의 변이수준과 폐암의 발병가능성 사이의 상관관계가 명확하지 않아, 다양한 폐암 관련 유전자가 어느 정도 변이될 경우에 폐암의 발병이 의심되는지에 대한 명확한 기준이 모호하다는 것이며, 이러한 문제점은 폐암뿐만 아니라 다른 모든 암의 진단에도 공통적으로 발생하고 있다.
- [5] 인간 폐 선암종의 검출 또는 진단에 사용되는 마커에 대한 연구가 이루어지고

있으나(한국 등록특허 제1064561호 등), CXCL13 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측에 대해서는 아직 연구가 미비한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측을 위한 바이오마커를 발굴하기 위해 연구 노력한 결과, CXCL13의 발현 및 TLS(tertiary lymphoid structures) 형성 사이의 상관관계를 기반으로, CXCL13의 높은 발현이 종양의 국소 영역 면역에 영향을 미치는 것을 확인하고, CXCL13 및 면역 관련 유전자의 발현 프로파일을 분석하여 폐암에서 차등적으로 발현되는 유전자를 확인함으로써, 본 발명에 따른 면역치료 반응성 바이오마커를 도출하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [7] 이에, 본 발명은 CXCL13 유전자, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측용 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [8] 또한, 본 발명은 CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측용 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 면역치료 반응성 예측용 키트를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [10] 또한, 본 발명은 피검자 유래의 생물학적 시료에 대하여, CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [11] 또한, 본 발명은 CXCL13 유전자의 발현 또는 이의 단백질 활성 증진제를 포함하는 면역 치료 보조제를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [12] 또한, 본 발명은 (a) in vitro 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 세포에서 CXCL13 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준을 측정하여, 후보물질 비처리군에 비해 상기 CXCL13 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현을 증가시킨 후보물질을 선정하는 단계; 및 (c) 상기 선정된 후보물질을 면역치료 보조제로 선정하는 단계를 포함하는, 면역 치료 보조제 스크리닝 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [13] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CXCL13 유전자,

또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측용 마커 조성물을 제공한다.

- [15] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 면역치료는 PD-1 억제제 또는 PDL-1 억제제를 처리하는 것일 수 있다.
- [16] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 폐암은 폐 선암(adenocarcinoma of lung)일 수 있다.
- [17] 또한, 본 발명은 CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측용 조성물을 제공한다.
- [18] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [19] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 면역치료 반응성 예측용 키트를 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 피검자 유래의 생물학적 시료에 대하여, CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [22] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 mRNA의 발현수준은 나노스트링 엔카운터 분석(NanoString nCounter analysis), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay;RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것일 수 있다.
- [23] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 단백질 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것일 수 있다.
- [24] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 생물학적 시료는 폐암 환자유래 조직인 것일 수 있다.
- [25] 또한, 본 발명은 CXCL13 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성 증진제를 포함하는, 면역 치료 보조제를 제공한다.
- [26] 또한, 본 발명은 (a) in vitro 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 세포에서 CXCL13 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준을 측정하여,

후보물질 비처리군에 비해 상기 CXCL13 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현을 증가시킨 후보물질을 선정하는 단계; 및 (c) 상기 선정된 후보물질을 면역치료 보조제로 선정하는 단계를 포함하는, 면역 치료 보조제 스크리닝 방법을 제공한다.

[27] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 후보물질은 핵산, 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 펩타이드, 기질 유사체, 압타머(aptamer), 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[28] 또한, 본 발명은 CXCL13 유전자, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 폐암 환자의 생존율 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은 상기 조성물의 폐암 환자의 면역치료 반응 예측 용도를 제공한다.

[30] 또한, 본 발명은 상기 조성물의 폐암 환자의 생존율 예후 예측 용도를 제공한다.

발명의 효과

[31] 본 발명에 따른 조성물을 이용하여 면역 체크포인트 억제제를 투여한 환자에게서 CXCL13이 유의하게 상향조절된 것을 확인하였는바, 이를 통해 CXCL13 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질은 폐암에 대한 항암제 치료 반응성 예측 마커로서 관련 연구 분야에서 유용하게 이용될 수 있다. 또한, CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 조절함으로써 폐암 환자에 대한 항암 면역 치료효과를 높일 수 있는 새로운 면역 보조제를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[32] 도 1a는 탐색 데이터 세트(n=63)에서 면역 체크포인트 억제제에 반응군 및 비반응군 사이에 유의한 변화를 나타내는 차별 발현 유전자의 Volcano plot을 나타내는 것이다.

[33] 도 1b는 1.5값을 초과하는 폴드변화 및 0.05를 초과하는 P-value를 나타내는 대표유전자의 히트맵(Heatmap)을 나타낸 것이다.

[34] 도 1c는 ESTIMATE에 의해 계산된 CXCL13의 TPM 및 종양 순도를 나타낸 것이다.

[35] 도 1d는 면역 체크포인트 억제제(ICI)에 대해 최고 반응을 나타낸 것을 기반으로 CXCL13의 TPM을 나타낸 것이다.

[36] 도 1e는 CXCL13의 ICI에 대한 예측 값을 나타낸 것이고, 도 1f는 중간 CXCL13의 발현 프로파일의 컷오프 값을 사용하여 무병 생존 및 전체 생존을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[37] 도 2a는 CXCL13의 발현 프로파일 및 세포 독성 활성과 관련된 대표 유전자 사이의 상관관계를 나타내는 것이다.

[38] 도 2b는 TLS(Tertiary lymphoid structure)와 관련된 유전자 세트의 히트맵을 나타낸 것이다.

- [39] 도 2c는 22C3PharDx PD-L1 면역 조직 화학발현 및 Kruskal-Wallis 테스트에 의해 P-value가 측정된 CXCL13발현(n=51) 사이의 상관관계를 나타내는 것이다.
- [40] 도 2d는 CXCL13의 발현을 나타내는 PDCD1 및 CD274의 상관관계를 나타내는 것이다.
- [41] 도 2e는 한가지 이상 값을 제외하고 체세포 돌연변이 프로파일(n=40)에 이용 가능한 샘플에서 종양 돌연변이 및 CXCL13의 상관관계를 나타낸 것이다.
- [42] 도 2f는 CXCL13 및 CD103의 발현을 기반으로 한 생존분석을 나타낸 것이다.
- [43] 도 2g는 중간 TPM을 컷오프 값으로 사용하여 CXCL13 및 CD8A의 발현을 나타낸 것이다.
- [44] 도 3a는 검증 데이터 세트(n=57)에서 면역 체크포인트 억제제에 반응군 및 비반응군 사이에 유의한 변화를 나타내는 차별 발현 유전자의 Volcano plot을 나타내는 것이다.
- [45] 도 3b는 Mann-Whitney 테스트에 의해 P-value를 측정한 CXCL13의 발현 차이를 나타낸 것이다.
- [46] 도 3c는 중간 CXCL13의 발현 프로파일의 컷오프 값을 사용하여 무병 생존 및 전체 생존을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [47] 도 3d는 TCGA 데이터를 통해 정상 조직 및 폐 선암 조직 사이에서 CXCL13의 프로파일이 발현하는 차이를 나타낸 것이다.
- [48] 도 3e는 CXCL13 발현 프로파일을 기반으로, 전체 생존에 차이가 나지 않음을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [49] 도 3f는 신장세포 암종 및 흑색종으로부터 독립적인 데이터 세트를 사용하여 CXCL13의 발현을 통해 약물 반응성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [50] 도 3g는 신장세포 암종 및 흑색종으로부터 독립적인 데이터 세트를 사용하여 CXCL13의 발현을 통해 생존 예측을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [51] 도 4a는 탐색 데이터 세트에서 다중 유전자 세트의 예측 값을 나타낸 것이다.
- [52] 도 4b는 CXCL13과 결합된 CTL유전자 세트 및 GEP유전자 세트의 예측 값을 나타내는 것이다.
- [53] 도 5는 탐색 데이터 세트의 면역 체크 포인트 억제제의 반응에 기반하여 면역 체크 포인트 억제제 반응성과 관련하여 알려진 세포 독성 활성 유전자 CCL19, CCL21, ENTPD1, CXCL12, ITGAE, GZMA, GZMB, CD8A, CXCL9, CD8B, IFNG, CD79B 및 PRF1 유전자의 발현 프로파일을 나타낸 것이다.
- [54] 도 6a는 비반응군과 비교하여 반응군에서 발현 프로파일이 1.5 값을 초과하는 폴드 변화 및 0.05를 초과하는 P-value를 가진 유전자를 확인한 히트맵을 나타낸 것이다.
- [55] 도 6b는 생검 부위를 기반으로 CXCL13 발현 및 종양 순도의 분포를 나타낸 것이다.
- [56] 도 6c는 CXCL13 TPM값의 면역 억제제 반응에 대한 예측 값을 나타낸 것이다.
- [57] 도 6d는 종양 돌연변이 burden에 대한 CXCL13의 상관관계를 나타낸 것이다.

- [58] 도 6e는 PD-L1 면역 조직 화학에 대한 CXCL13의 상관관계를 나타낸 것이다.
- [59] 도 6f는 PDCD1 및 CD274의 TPM 값에 대한 CXCL13의 상호작용에 대해 나타낸 것이다.
- [60] 도 7a는 TLS와 관련된 CXCL13 및 유전자 세트의 히트맵을 나타내는 것이다.
- [61] 도 7b는 CXCL13 및 관심유전자의 상관 관계를 나타낸 것이다.
- [62] 도 8은 검증 데이터 세트에서 면역 체크 포인트 억제제의 반응에 기반하여 면역 체크 포인트 억제제 반응성과 관련하여 알려진 세포 독성 활성 유전자 CCL19, CCL21, ENTPD1, CXCL12, ITGAE, GZMA, GZMB, CD8A, CXCL9, CD8B, IFNG, CD79B, PRF1의 유전자 발현 프로파일을 나타낸 것이다.
- [63] 도 9는 면역 항암제 치료를 받지 않은 TCGA 폐 선암종 샘플에서 CXCL13 발현 프로파일과 세포 독성 활성과 관련된 대표적 유전자 사이의 상관관계를 나타낸 것이다.
- [64] 도 10a는 신장 세포 암종 집단에서 CXCL13의 발현과 독립적인 세포 독성 활성과 관련된 대표 유전자 사이의 상관관계를 나타낸 것이다.
- [65] 도 10b는 흑색종 세포 집단에서 CXCL13의 발현과 독립적인 세포 독성 활성과 관련된 대표 유전자 사이의 상관관계를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [66] 본 발명자들은 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측을 위한 바이오마커를 발굴하기 위해 연구 노력한 결과, CXCL13의 발현 및 TLS(tertiary lymphoid structures) 형성 사이의 상관관계를 기반으로, CXCL13의 높은 발현이 종양의 국소 영역 면역에 영향을 미치는 것을 확인하고, T-검정 방법을 사용하여 CXCL13 및 면역 관련 유전자의 발현 프로파일을 분석하여 폐암에서 차등적으로 발현되는 유전자 및 상기 유전자의 유효성 확인을 통해 본 발명에 따른 면역치료 반응성 바이오마커를 도출하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [67] 이에, 본 발명은 CXCL13 유전자, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측용 마커 조성물, CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측용 조성물, 및 상기 조성물을 포함하는 항암제 치료 반응성 예측용 키트를 제공한다.
- [68] 본 발명에 따른 CXCL13(C-X-C motif chemokine ligand 13) 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 상기 아미노산 서열에서 몇 개의 아미노산이 결실, 추가 또는 치환되는 아미노산 서열, 구체적으로 상기 아미노산 서열에 80%이상, 보다 구체적으로 상기 아미노산 서열에 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 상동성을 갖는 서열은 모두 사용 가능하다.
- [69] 또한, 본 발명에 따른 CXCL13의 유전자(NM_006419.2, NM_001371558.1)는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어질 수 있다.

- [70] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 면역치료는 PD-1 억제제 또는 PDL-1 억제제를 처리하는 것일 수 있으며, sipuleucel-T, ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab, durvalumab, talimogene laherparepvec, tisagenlecleucel에서 선택된 것일 수 있으며, 구체적으로 Pembrolizumab, Nivolumab 또는 atezolizumab를 처리하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [71] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 폐암은 소세포성 폐암 및 비 소세포성 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택 될 수 있으며, 구체적으로는 비 소세포성 폐암인 선암, 편평상피세포암 및 대세포암인 것이 바람직하고, 보다 구체적으로는 폐 선암(adenocarcinoma of lung)인 것이 더욱 바람직하다.
- [72] 본 발명에서 사용되는 용어, "면역치료"란, 면역시스템을 자극하여 질환을 치료하는 방법으로, 본원발명에서는 폐암을 치료하는 것을 의미한다. 수동적 면역치료는 체외에서 다량으로 만들어진 면역반응 성분 예컨대, 면역세포, 항체, 사이토카인 등을 암 환자에게 주입하여 암세포를 공격하는 치료방법이고, 능동적 면역치료는 개인의 항체와 면역세포들을 능동적으로 활성화 또는 생산시키게 하여 암세포를 공격하는 치료방법이다. 본 발명은 이러한 면역치료에 대하여 폐암 환자의 치료 반응성을 예측하기 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.
- [73] 본 발명에서 있어서 "치료 반응성 예측"이란, 환자가 면역 항암제에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응할지 여부를 예측하는 것, 또는 항암제에 대한 내성의 위험성을 예측하는 것, 면역치료 후 환자의 예후 즉, 재발, 전이, 생존, 또는 무병생존 등을 예측하는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 치료 반응성 예측을 위한 바이오마커는 폐암환자에 대한 가장 적절한 면역치료 방식을 선택하도록 하기 위한 정보를 제공할 수 있다.
- [74] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 CXCL13 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [75] 본 발명에서 사용되는 용어, "프라이머"란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [76] 본 발명에서 사용되는 용어, "프로브"란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소, 효소, 또는 형광체 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [77] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는

것은 아니다.

- [78] 본 발명에서 사용되는 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무린 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.
- [79] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 면역치료 반응성 예측용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있다.
- [80] 본 발명의 다른 양태로서, 폐암 환자 유래의 생물학적 시료에서 CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [81] 본 발명에서 사용되는 용어 “폐암 환자의 면역치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법”이란 진단 또는 예후 예측을 위한 예비적 단계로써 폐암 질환 진단을 위하여 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것이며, 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다. 상기 폐암 환자 유래의 생물학적 시료는 이에 제한되는 것은 아니지만, 예를 들면 조직, 세포 등일 수 있고, 폐암 환자 유래 조직 또는 세포인 것이 바람직하다.
- [82] 본 발명에서 상기 mRNA의 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법에 따라 나노스트링 엔카운터 분석(NanoString nCounter analysis), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [83] 본 발명에서 상기 단백질 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법에 따라 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [84] 본 발명자들은 상기 CXCL13 유전자 또는 상기 유전자가 암호화 하는 단백질을 포함하는 면역치료 반응성 예측에 대한 유효성을 확인하였다.
- [85] 본 발명의 일 실시예에서는, ICI 환자에서 탐색 데이터 세트의 CXCL13 상향조절 확인을 위해 차별 발현 유전자(Differentially expressed gene, DEG) 프로파일을 비반응성 환자와 비교하여 반응성 환자에서 21개의 유전자가

상향조절됨을 확인하였다(실시예 3 참조).

- [86] 상기 결과를 통해 본 발명의 CXCL13 유전자 또는 상기 유전자가 암호화 하는 단백질을 포함하는 조성물을 이용하여 폐암 환자의 면역치료의 반응성 예측에 유용하게 이용할 수 있다.
- [87] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 CXCL13 유전자의 발현 또는 이의 단백질 활성 증진제를 포함하는, 면역 치료 보조제를 제공한다.
- [88] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 (a) in vitro 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 세포에서 CXCL13 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현수준을 측정하여, 후보물질 비처리군에 비해 상기 CXCL13 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현을 증가시킨 후보물질을 선정하는 단계; 및 (c) 상기 선정된 후보물질을 면역치료 보조제로 선정하는 단계를 포함하는, 면역 치료 보조제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [89] 본 발명에서 상기 후보물질은 핵산, 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 펩타이드, 기질 유사체, 압타머(aptamer), 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 상기 핵산은 바람직하게는 siRNA, shRNA, microRNA, 안티센스 RNA, LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [90] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 CXCL13 유전자, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 폐암 환자의 생존율 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [91] 본 발명에서 사용되는 용어, “생존율 예후 예측”이란 환자가 화학요법 등 치료법에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응하여 환자의 치료, 예를 들어 특정 시기 동안 화학요법으로 치료된 후 생존할 여부 또는 가능성과 관련된다. 본 발명의 예측용 마커 조성물은 폐암 발병 환자에 대한 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 예측용 조성물은 환자가 예를 들어 소정 치료제 또는 조합물, 외과적 개입, 화학요법 등의 투여를 비롯한 소정 치료 처방과 같은 치료 처방에 선호적으로 반응하는지를 확인하거나, 치료 처방 후 환자의 장기 생존이 가능한지 여부를 예측할 수 있다.
- [92] 본 발명자들은 실시예를 통하여 본 발명에 따른 케모카인 CXCL13의 발현 정도에 따라 폐암 환자의 생존 예후 예측이 가능함을 확인하였다.
- [93] 본 발명의 일 실시예에서는, 생존 분석을 진행한 결과 CXCL13이 높게 발현된 환자에게서 유의적인 무진행 생존율 및 전체 생존율 증가와 유의한 관련이 있음을 확인하였다(실시예 5 참조).
- [94] 상기 결과를 통해 본 발명의 CXCL13 유전자 또는 상기 유전자가 암호화 하는 단백질을 포함하는 조성물을 이용하여 폐암환자의 생존율 예후 예측에 유용하게 이용할 수 있다.

[95] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물의 폐암 환자의 항암제 치료 반응 예측 용도를 제공한다.

[96] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물의 폐암 환자의 생존율 예측 용도를 제공한다.

[97]

[98] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[99]

[100] [실시예]

[101] 실시예 1. 실험준비

[102] 1-1. 임상 및 조직학적 정보제공을 위한 환자 선별

[103] PD-1 또는 PD-L1 억제제 Pembrolizumab, Nivolumab 또는 atezolizumab으로 처리된 조직학적으로 확인된 비소세포 폐암 환자로부터 전향적(retrospectively) 및 후향적(prospectively)으로 샘플을 수득하였다. 전체 전사체 서열분석(whole transcriptome sequencing, WTS)에 이용 가능한 샘플을 갖는 환자를 분석에 포함시켰다. Access kit를 사용하여 WTS 결과 값을 나타내는 63명의 환자의 결과를 탐색적인 데이터세트로 사용하였다. 검증 세트로서, TruSeq kit를 사용하여 WTS 결과 값을 나타내는 57명의 환자의 결과를 사용하였다. 임상정보는 전자 의료 기록에서 수집하였다. PD-L1 면역조직화학(IHC) 결과는 22C3 pharmDx 항체(Agilent, United States)를 사용한 종양 비례 점수(tumor proportional score, TPS)에 기초하여 기록되었다. H&E 염색에 이용 가능한 샘플을 병리학자가 검토하였다. 본 발명은 기관 검토위원회(IRB number : 2018-03-130)의 승인 하에 수행되었다.

[104]

[105] 1-2. 게놈 RNA 준비 및 WTS(whole transcriptome sequencing)

[106] ALLPrep DNA/RNA Mini Kit(Qiagen, United States)를 사용하여 FFPE(formalin fixed paraffin embedded) 또는 신선한 종양 샘플로부터 RNA를 정제하였다. RNA의 농도 및 순도는 NanoDrop 및 Bioanalyzer(Agilent, United States)를 사용하여 측정하였다. 라이브러리는 TruSeq RNA library Prep Kit v2 및 TruSeq RNA Access Library Prep Kit(Illumina)를 사용하여 준비하였다. SuperScript TM II Reverse Transcriptase(Invitrogen/Life Technologies, USA)를 사용하여 폴리(dT) 프라이머와의 역전사 반응에서 단리된 총 RNA를 사용하였다. RNA-seq 라이브러리는 cDNA 증폭, 말단 변형(end repair), 3' 말단 아데닐화, 어댑터 결합(adaptor ligation) 및 증폭을 통해 준비하였다. 라이브러리의 품질 및 수량은 Bioanalyzer 및 Qubit을 사용하여 측정하였다. 시퀀싱은 Hiseq 2500 플랫폼(illumine)에서 수행하였다. FASTQ 파일에 대한 판독은 STAR ver-2.4.0의 2-pass mode를 사용하여 hg 인간 게놈에 대해 맵핑되었다. STAR 1-pass는 hg19

게놈 기준에 대한 판독 및 hg19 게놈을 사용한 샘플 특이적 정렬을 수행하고, STAR 2-pass는 새로생성된 hg19 게놈 및 상기 게놈을 사용한 샘플 특이적 정렬을 수행하는 것을 확인하였다. bam 파일의 품질을 측정하기 위해 RNA-SeQC를 수행하였다. 유전자에 맵핑된 Raw read count는 RSEM ver-1.2.18을 사용하여 전사체 존재비에 대해 분석하였고, read count<1M의 기준에 기반하여 잘못 발현된 샘플을 제거하였다.

[107]

[108] **1-3. 차별 발현 유전자(Differentially expressed gene, DEG)를 통한 종양 순도 및 TMB(tumor mutation burden)계산**

[109] Mann-Whitney 테스트를 사용하여 고형 종양 v1.1에서 반응 평가 기준에 의해 평가된 부분 반응(PR) 및 안정 질환(SD) 또는 진행 질환(PD)을 나타내는 환자 사이에서 차별 발현 유전자(DEG) 분석을 수행하였다. 면역 관련 유전자의 TPM (transcript per million) 값으로 차별 발현 유전자 분석을 수행하였다. 공칭 양면 Mann-Whitney (P-value<0.05)에 의해 분석된 그룹들 사이에서 1.5배의 발현 차이가 유의성에 대한 컷오프 값으로 사용되었다. ESTIMATE를 사용하여 종양 순도를 계산하였다. TMB를 측정하기 위해, SureSelectXT Human All Exon V5에서 라이브러리를 계산하고 HiSeq 2500 플랫폼 (Illumina)에서 시퀀싱을 수행하였다. 정상 대조군에 대한 표적 범위는 50x였고 종양 샘플에 대한 표적 범위는 100x였다. 서열 분석 데이터를 hg19 인간 게놈에 정렬시켰다. 체세포 돌연변이에 대해 Mutect를 사용하여 돌연변이에 주석을 달았다. TMB는 Mb 당 동일한 돌연변이를 제외한 총 돌연변이 수에 의해 측정되었다.

[110]

[111] **1-4. 다른 집단으로부터 관심 유전자 세트 및 ICI 반응 데이터 확인**

[112] Cytolytic activity, Immunoscore, cytolytic(CYT) score, 유전자 발현 프로파일(GEP) 및 Danaher 등으로부터 보고된 종양 침윤 림프구의 유전자 발현 마커 관련 유전자 세트로 공지된 여러 유전자 세트를 사용하였다. 다른 유형의 암을 가진 다른 집단에 대한 연구 결과를 채택하기 위해 신장 세포 암종과 흑색 종의 결과를 사용하였다.

[113]

[114] **1-5. TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터**

[115] Broad GDAC firehorse level 3 (<https://gdac.broadinstitute.org/>)에서 정상 폐 및 폐 선암에 대한 WTS 데이터를 획득하였다. 임상 데이터는 cbiportal (<http://www.cbiportal.org/datasets>)에서 입수하였다. 총 515개의 종양 및 59개의 정상 샘플을 분석에 이용할 수 있었다. T-검정 방법을 사용하여 CXCL13 및 면역 관련 유전자의 발현 프로파일을 비교하였다. 이용 가능한 임상 정보에 기초하여 생존 분석을 수행하였다.

[116]

[117] **1-6. 통계분석**

- [118] Kaplan-Meier 생존 곡선을 사용하여 무 진행 생존(PFS) 및 전체 생존(OS)의 패턴을 파악하였다. 로그 순위 테스트를 사용하여 P-value를 계산하였다. 피어슨 상관법(Pearson correlation method)을 사용하여 상관 관계를 조사하고, Mann-Whitney 검정 방법을 사용하여 두 그룹 간의 차이를 비교하고, Kruskal-Wallis 검정 방법을 사용하여 세 그룹 간의 차이를 비교하였다. 모든 통계 분석은 R-3.6.0 프로그램에서 수행되었으며, 0.05 미만의 P-value는 유의 한 것으로 간주하였다.
- [119]
- [120] **실시예 2. 선별 환자의 특성 확인**
- [121] 기본적인 인구 통계학적 프로파일은 탐색적 데이터와 유효성 검증 데이터 세트 간에 유사성을 나타내었다. 탐색적 데이터 세트에서 대다수의 환자는 pembrolizumab(69.4%), nivolumab(36.5%) 및 atezolizumab(12.7%)으로 치료되었고, 이와 유사한 패턴이 검증 데이터 세트에서 pembrolizumab(49.1%), nivolumab(31.6%), atezolizumab(7.0%)로 환자에게 나타났다. 치료는 주로 3차 이상으로 탐색 데이터 세트(58.7%) 및 검증 데이터 세트(66.7%)로 적용되었다. WTS에 사용된 샘플은 주로 탐색 데이터 세트를 위한 폐 실질 조직(33.3%), 림프절(LN)(69.4%)과 검증데이터 세트를 위한 폐(35.1%), 림프절(21.1%)로부터 획득되었다. TPS PD-L1 IHC에 의해 50%이상으로 정의된 높은 PD-L1 발현 환자는 탐색 데이터 세트에서 36.5%, 검증 데이터 세트에서 42.1%를 나타내는 것을 확인하였다.
- [122]
- [123] **실시예 3. ICI 환자에서 탐색 데이터 세트의 CXCL13 상향조절 확인**
- [124] ICI 환자에서 탐색 데이터 세트의 CXCL13 상향조절 확인을 위해 차별 발현 유전자(Differentially expressed gene, DEG) 프로파일을 비반응군과 비교한 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같이, 반응군에서 21개의 유전자가 상향조절됨을 확인하였고, 도 1b에 나타낸 바와 같이, CXCL13은 1.97배의 변화를 나타냈으며(P=0.002) 히트맵은 부분반응(partial response, PR)환자에게서 더 높은 발현 프로파일 경향을 나타내는 것을 확인하였다.
- [125] 나아가, CXCL13과 면역세포 사이의 관계를 확인한 이전 연구를 기반으로, 생검부위에 대한 추가 분석을 수행한 결과, 도 1c에 나타낸 바와 같이, ESTIMATE에 의해 계산된 종양순도는 폐와 림프절(P=0.991) 사이에 차이가 없음을 확인하였다.
- [126] 상기 결과로부터 샘플링부위(P=0.251)에서 잠재적 편향을 배제하여 추가분석이 가능함을 확인하였다. 또한, 도 1d에 나타낸 바와 같이, 부분반응(PR) 환자에서 CXCL13의 TPM 중간 값은 5.41(95% CI(Confidential interval) 0.48-29.38)이었으며, 이는 안정 질환(SD) 환자의 TPM 중간 값 1.04(95% CI 0.00-11.07) 및 진행 질환(PD) 환자의 TPM 중간 값 1.28(95% CI 0.00-51.10)보다 현저히 높은 값을 나타낸다. 도 1e에 나타낸 바와 같이, CXCL13의 TPM

중양값으로 임의의 컷오프 값을 사용하면 곡선아래 면적(area under curve, AUC)값은 0.77인 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 다른 유전자 세트와의 AUC를 비교한 결과 도 4a에 나타낸 바와 같이, 면역점수(AUC=0.75), CYT점수(AUC=0.65), GEP(AUC=0.75), CTL(AUC=0.70), Danaber 등의 다른 유전자 세트에서 수행된 AUC값과 유사한 결과임을 확인하였고, 도 4b에 나타낸 바와 같이, CXCL13이 다른 유전자 세트와 결합될 때 예측 값이 증가하지 않은 것을 확인하였다.

[127] 이에 더하여, 생존분석 결과, 도 1f에 나타낸 바와 같이, CXCL13 발현이 높은 환자의 경우 PFS(P=0.004) 및 OS(P=0.007)이 상당히 긴 것을 확인하였다.

[128]

[129] **실시예 4. CXCL13 및 다른 면역 관련 바이오마커의 상관관계 확인**

[130] 탐색적 데이터 세트에서, CXCL13 발현과 다른 면역 관련 유전자의 상관관계에 관한 추가 분석을 수행한 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 활성화된 세포 독성 T 세포와 관련된 것으로 알려진 대표적인 유전자들이 CXCL13의 양과 상관관계를 나타내는 것을 확인하였고, 도 2b에 나타낸 바와 같이, CXCL13은 이전에 보고된 TLS의 유전자 세트와 유사한 발현 패턴을 나타내는 것을 확인하였다.

[131] 이에 더하여, PD-L1 단백질 발현을 기반으로 추가 분석을 진행하였고 그 결과 도 2c에 나타낸 바와 같이, PD-L1<50%와 비교하여 PD-L1≥50%(P=0.006)인 샘플에서 CXCL13의 발현이 더욱 향상된 것을 확인하였다.

[132] 나아가, 도 2d에 나타낸 바와 같이, PDCD1(P=0.013) 및 CD274(P<0.001)과 긍정적인 경향을 나타내는 전사수준에서 CXCL13의 발현 및 PD-1/PD-L1의 상관관계를 조사하였다. 그 결과, 도 2e에 나타낸 바와 같이, TMB 분석에 이용가능한 샘플(n=41)에 기초하여, CXCL13 및 TMB 사이의 상관관계는 유의하지 않음을 확인하였다(P=0.054). 또한, 도 2f에 나타낸 바와 같이, CD103 및 CXCL13의 TPM 발현 중간 값에 기초한 하위그룹 생존을 분석한 결과 CXCL13이 ICI에 대한 반응을 결정하는데 주요한 역할을 하는 것을 확인하였다.

[133] 상기 결과에 더하여 유사한 방식으로 CXCL13 및 CD8A의 TPM 발현 중간 값에 기초한 하위그룹 생존을 분석한 결과, 도 2g에 나타낸 바와 같이, CXCL13 및 CD8A 에서 상향 조절된 경우 CXCL13 및 CD8A가 낮은 하위그룹과 비교하여 유의한 PFS 연장을 나타내는 것이 확인되었다(P=0.013).

[134]

[135] **실시예 5. 검증 데이터 세트 및 다른 집단에서의 결과 확인**

[136] 검증 데이터 세트(n=57)에서 ICI에 대한 응답을 기반으로 유사한 조사를 수행하였고, DEG에서 7개의 유전자 CXCL13, CD8B, IFNG, CDH6, CXCL9 및 MMP1에서 유의한 차이를 확인한 결과, 도 3a, 3b 및 6a에 나타낸 바와 같이, CXCL13은 반응자에게서 1.76배 증가(P=0.024)를 나타냈다.

[137] 이에 더하여 생존 분석을 진행한 결과, 도 3c 및 도 6c에 나타낸 바와 같이, CXCL13이 높게 발현된 환자 및 유사한 예측값(AUC=0.72)에서 현저히 연장된

PFS(P=0.050) 및 OS(P=0.026)값을 확인하였다. 또한, 도 7a, 7b 및 도 8에 나타난 바와 같이, TMB와 관련된 유사한 패턴(P=0.614), 면역관련 유전자 및 TLS 관련 유전자 세트가 확인되었다.

[138] 나아가, TCGA 데이터의 ADC 샘플을 사용하여 추가 분석을 수행하였다. 정상샘플과 종양샘플을 비교한 결과, 도 3d에 나타난 바와 같이, CXCL13은 종양샘플에서 유의하게 상향조절 되었고(P<0.001), 도 9에 나타난 바와 같이, 종양샘플에서의 CXCL13의 발현은 대표적인 세포 용해 활성 관련 유전자와 양의 상관관계를 나타내는 것을 확인하였다. TCGA 집단에서 대부분의 치료는 세포 독성제이므로, 도 3e에 나타난 바와 같이, OS 값에서 CXCL13 발현 프로파일에 차이를 나타내지 않았다(P=0.632).

[139] 나아가, 다른 암종에서의 유사성을 확인하기 위해 ICI로 치료된 공개적으로 이용 가능한 신장 세포 암종(RCC) 및 흑색종 집단을 조사한 결과, 도 3f 및 3g에 나타난 바와 같이, 두 집단에서 CXCL13은 반응에 대한 예측 또는 생존 증가에 대한 예측의 특성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

[140] 이에 더하여, 도 10a에 나타난 바와 같이, 신장 세포 암종 집단에서 CXCL13의 발현과 독립적인 세포 독성 활성과 관련된 대표 유전자 사이의 상관관계를 확인하고, 도 10b에 나타난 바와 같이, 흑색종 세포 집단에서 CXCL13의 발현과 독립적인 세포 독성 활성과 관련된 대표 유전자 사이의 상관관계를 확인하였다.

[141]

[142] **실시예 6. NSCLC 선암종에서 3차 림프 구조의 존재 및 CXCL13과의 상관관계 확인**

[143] 전사체 데이터와의 조직학적 상관관계를 평가하기 위해 H&E 슬라이드를 수동으로 검토하여 CXCL13 발현 프로파일과 조직학 슬라이드에서 확인된 TLS 사이의 상관 관계를 확인한 결과, 종양에 인접한 3차 림프 구조에서 CXCL13 발현이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[144]

[145] 상기 진술한 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 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

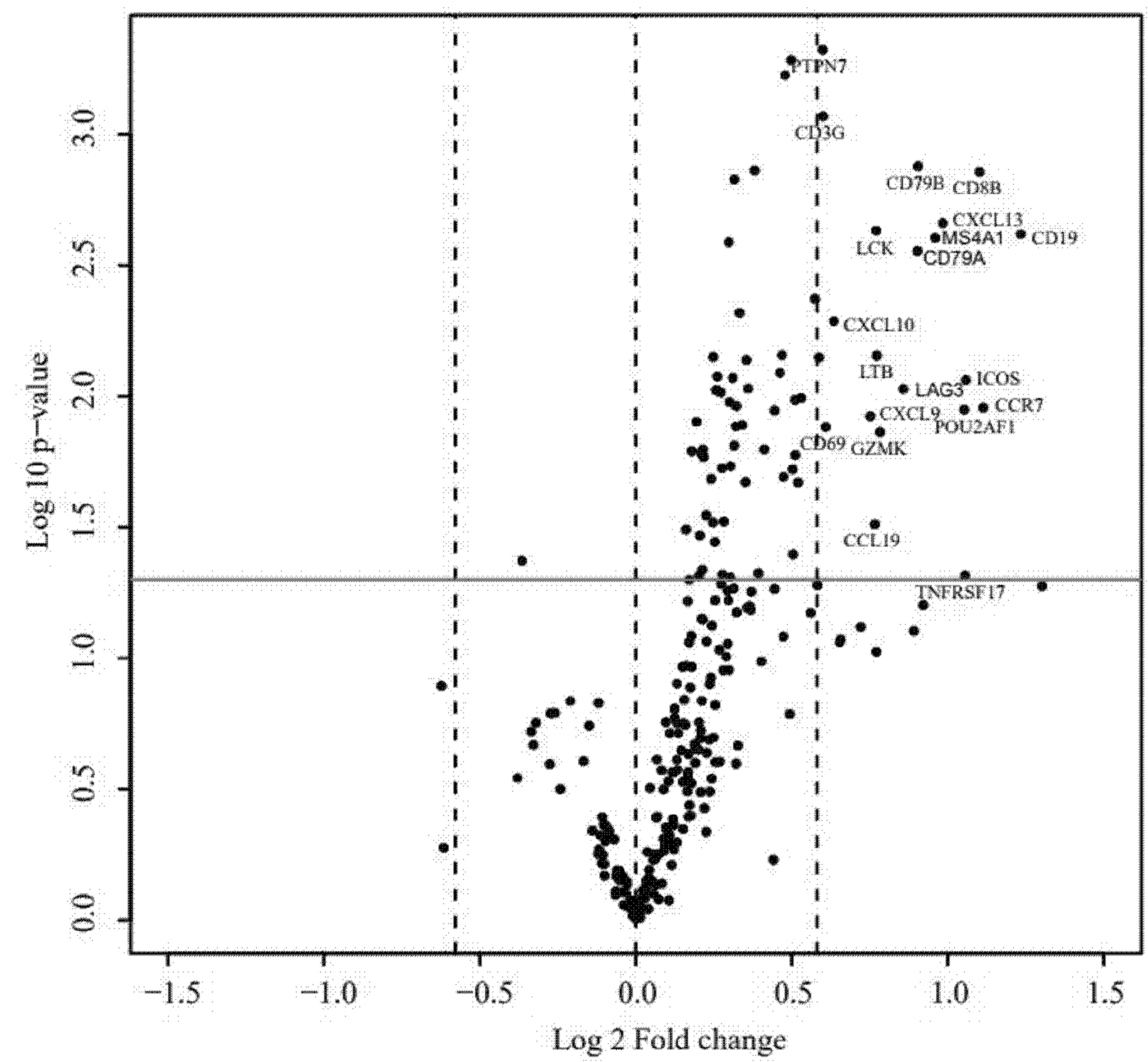
[146] 본 발명에 따른 조성물을 이용하여 면역 체크포인트 억제제를 투여한 환자에게서 CXCL13이 유의하게 상향조절 된 것을 확인하였는바, CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 조절함으로써 폐암 환자에 대한 항암 면역 치료효과를 높일 수 있는 새로운 면역 보조제로서 널리 활용될 수 있을것으로 기대된다.

청구범위

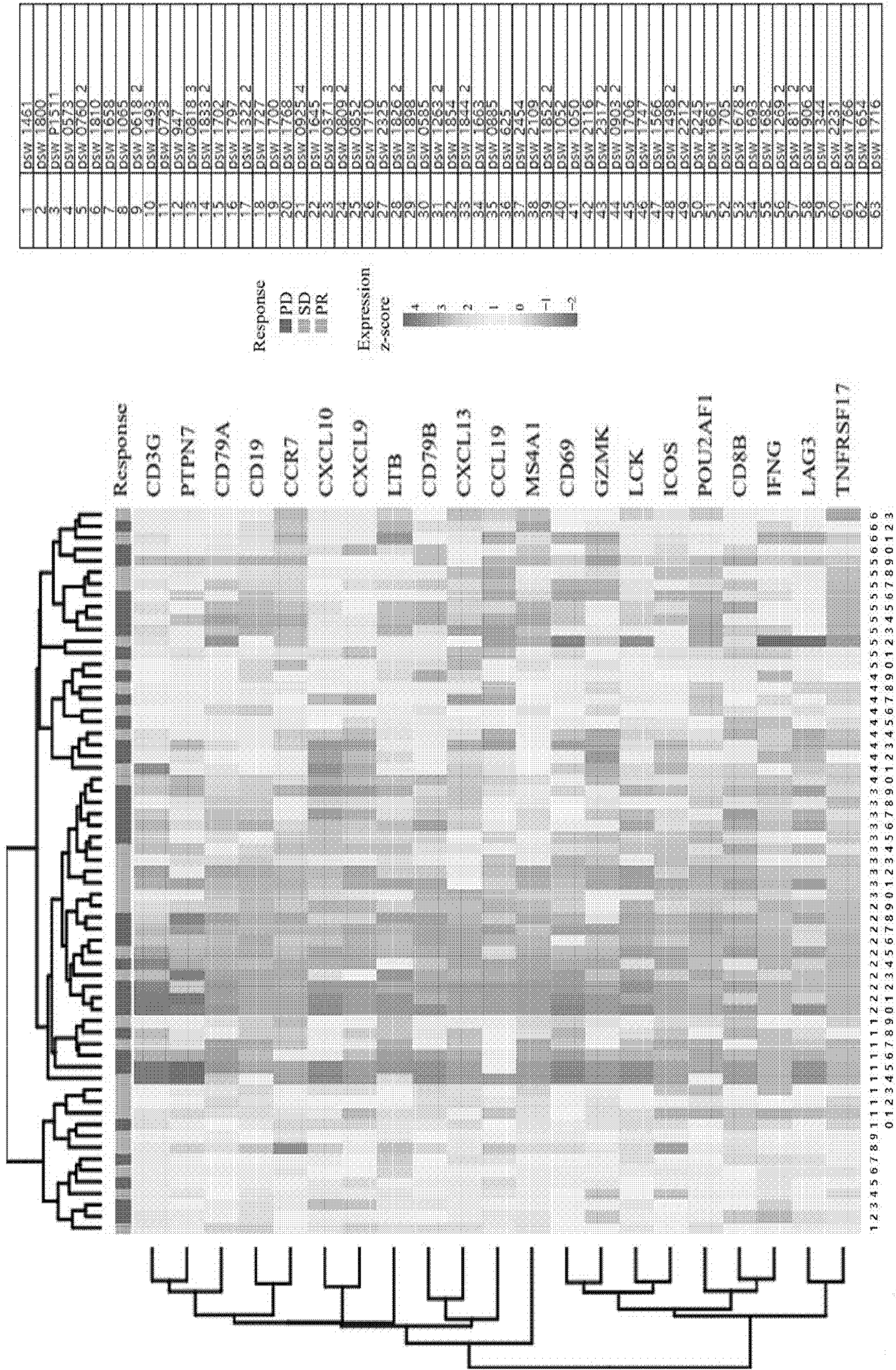
- [청구항 1] CXCL13 유전자, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측용 마커 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 면역치료는 PD-1 억제제 또는 PDL-1 억제제를 처리하는 것을 특징으로 하는, 면역치료 반응성 예측용 마커 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 폐암은 폐 선암(adenocarcinoma of lung)인 것을 특징으로 하는, 면역치료 반응성 예측용 마커 조성물.
- [청구항 4] CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측용 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 면역치료는 PD-1 억제제 또는 PDL-1 억제제를 처리하는 것을 특징으로 하는, 면역치료 반응성 예측용 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 폐암은 폐 선암(adenocarcinoma of lung)인 것을 특징으로 하는, 면역치료 반응성 예측용 조성물.
- [청구항 7] 제4항에 있어서,
상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 면역치료 반응성 예측용 조성물.
- [청구항 8] 제4항에 있어서,
상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 면역치료 반응성 예측용 조성물.
- [청구항 9] 제4항의 조성물을 포함하는, 면역치료 반응성 예측용 키트.
- [청구항 10] 폐검자 유래의 생물학적 시료에 대하여, CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 폐암 환자의 면역치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 mRNA의 발현수준은 나노스트링 엔카운터 분석(NanoString nCounter analysis), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay;RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을

- 특징으로 하는, 정보제공방법.
- [청구항 12] 제10항에 있어서,
 상기 단백질 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting),
 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역
 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA),
 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry),
 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체
 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로
 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을
 특징으로 하는, 정보제공방법.
- [청구항 13] 제10항에 있어서,
 상기 생물학적 시료는 폐암 환자 유래 조직인 것을 특징으로 하는,
 정보제공방법.
- [청구항 14] CXCL13 유전자의 발현 또는 이의 단백질의 활성 증진제를 포함하는,
 면역치료 보조제.
- [청구항 15] (a) in vitro 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
 (b) 상기 세포에서 CXCL13 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의
 발현수준을 측정하여, 후보물질 비처리군에 비해 상기 CXCL13 유전자의
 mRNA 또는 이의 단백질의 발현을 증가시킨 후보물질을 선정하는 단계;
 및
 (c) 상기 선정된 후보물질을 면역치료 보조제로 선정하는 단계를
 포함하는, 면역치료 보조제 스크리닝 방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
 상기 후보물질은 핵산, 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물
 추출물, 펩타이드, 기질 유사체, 압타머(aptamer), 및 항체로 이루어진
 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.
- [청구항 17] CXCL13 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을
 측정하는 제제를 포함하는, 조성물의 폐암 환자 면역치료 반응성 예측
 용도.

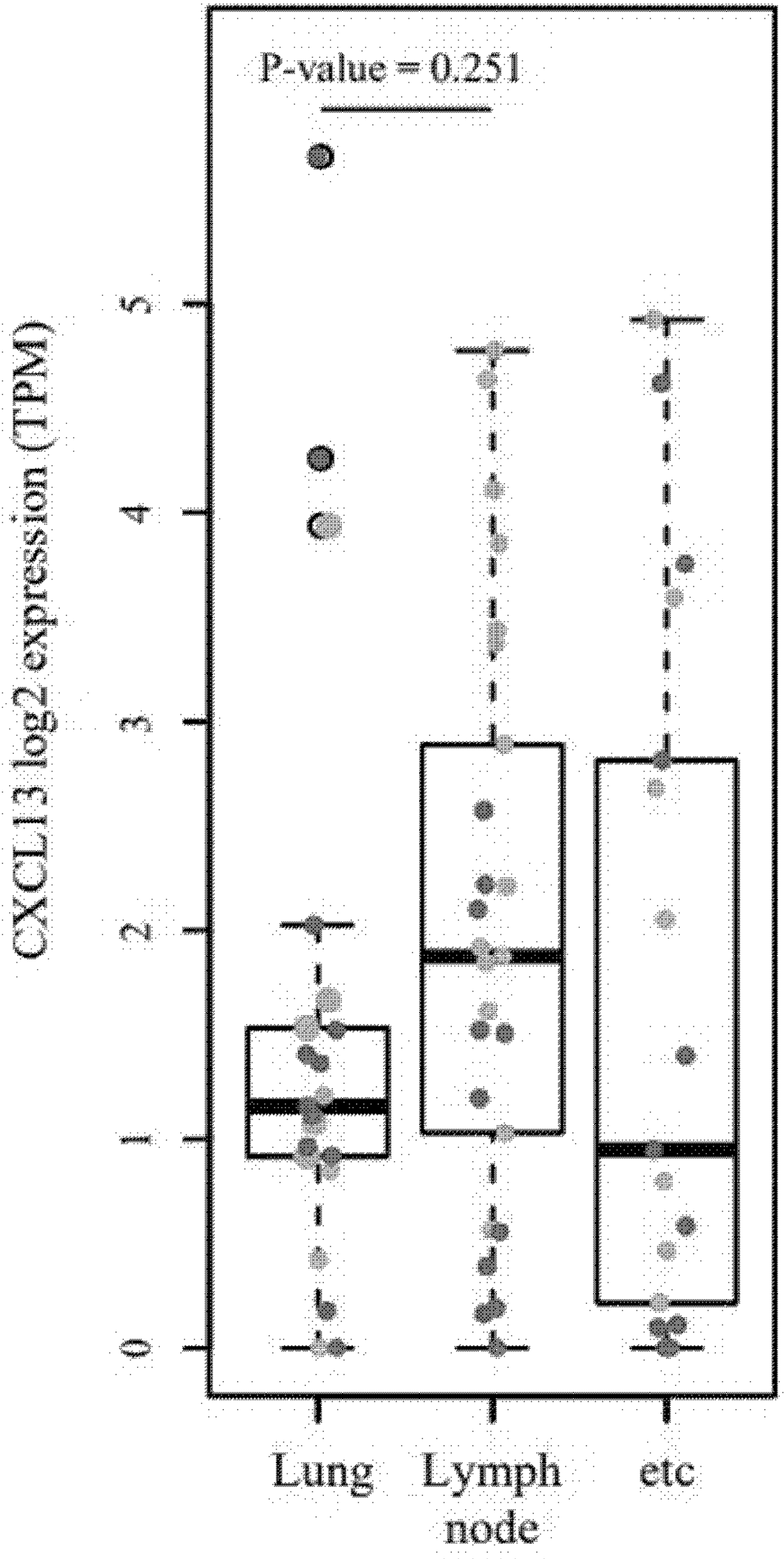
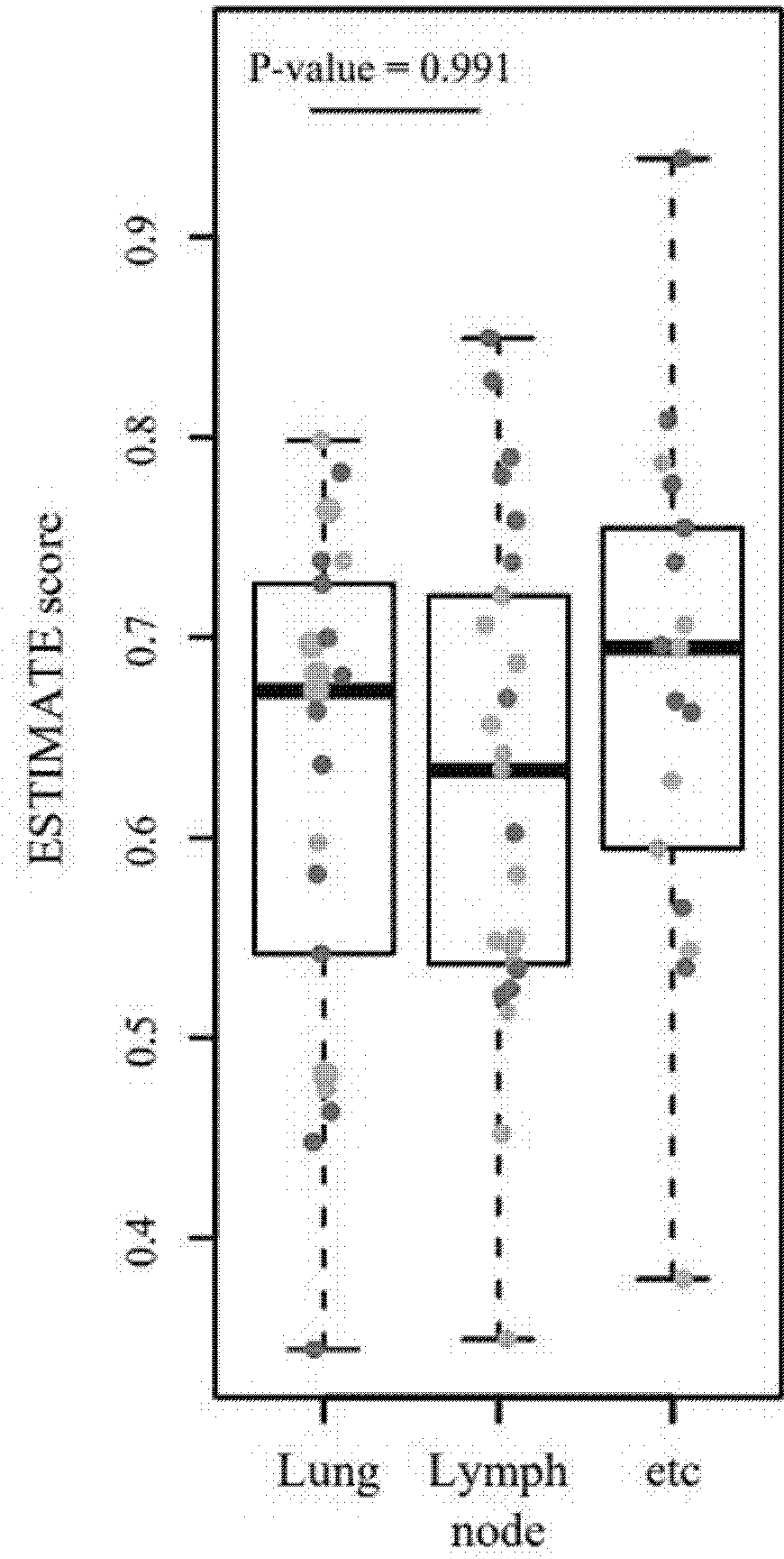
[도1a]



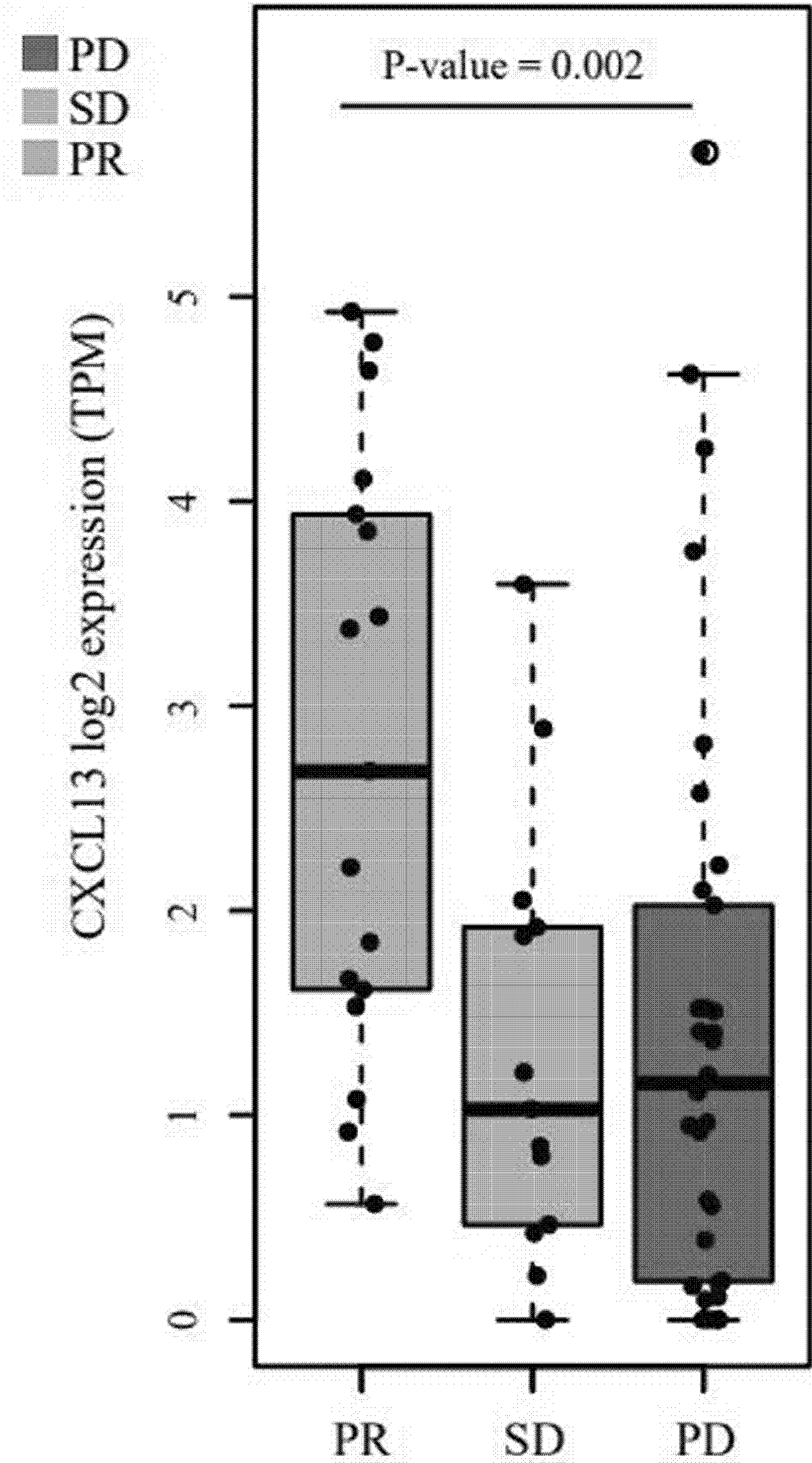
[도1b]



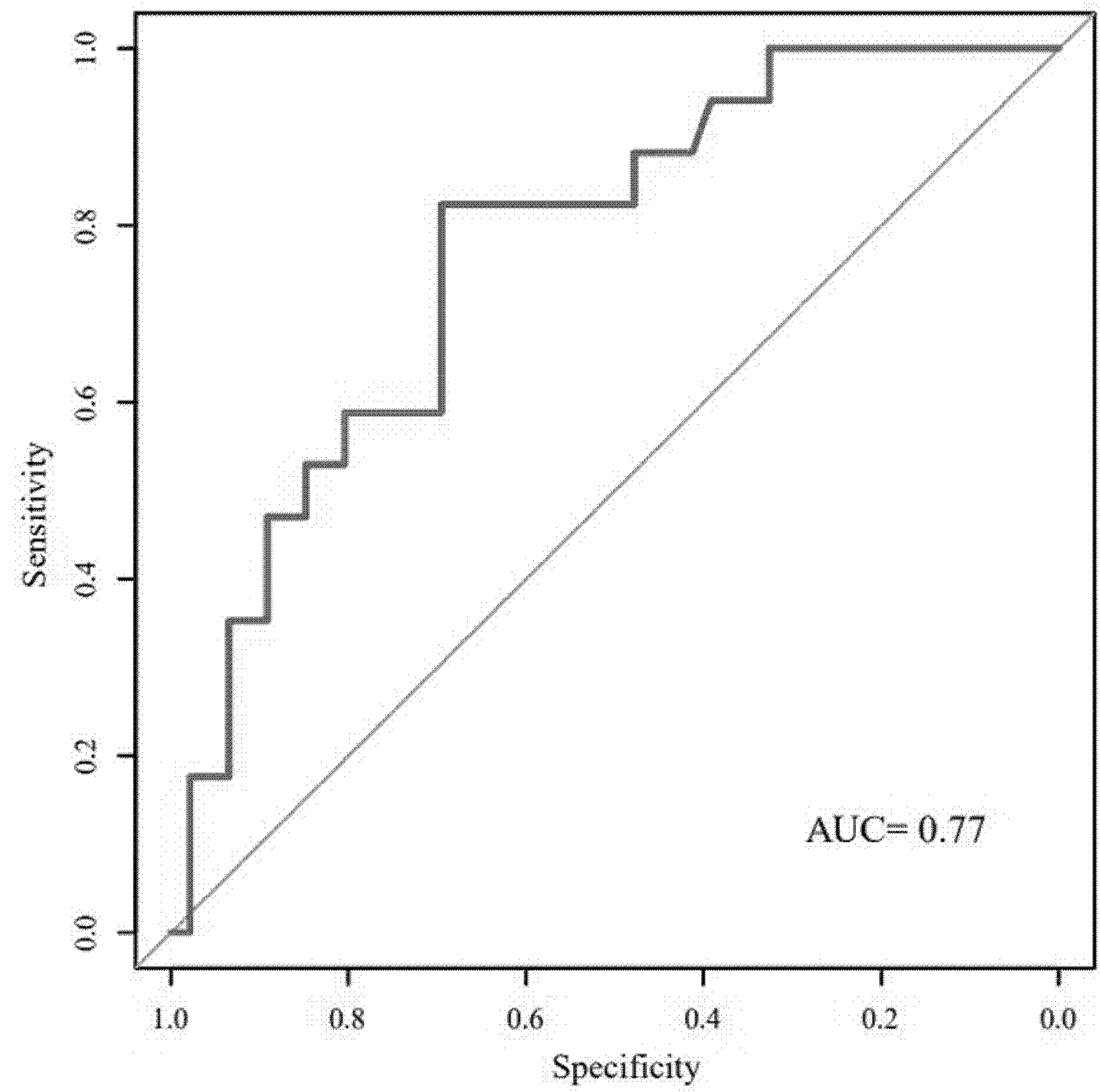
[도1c]



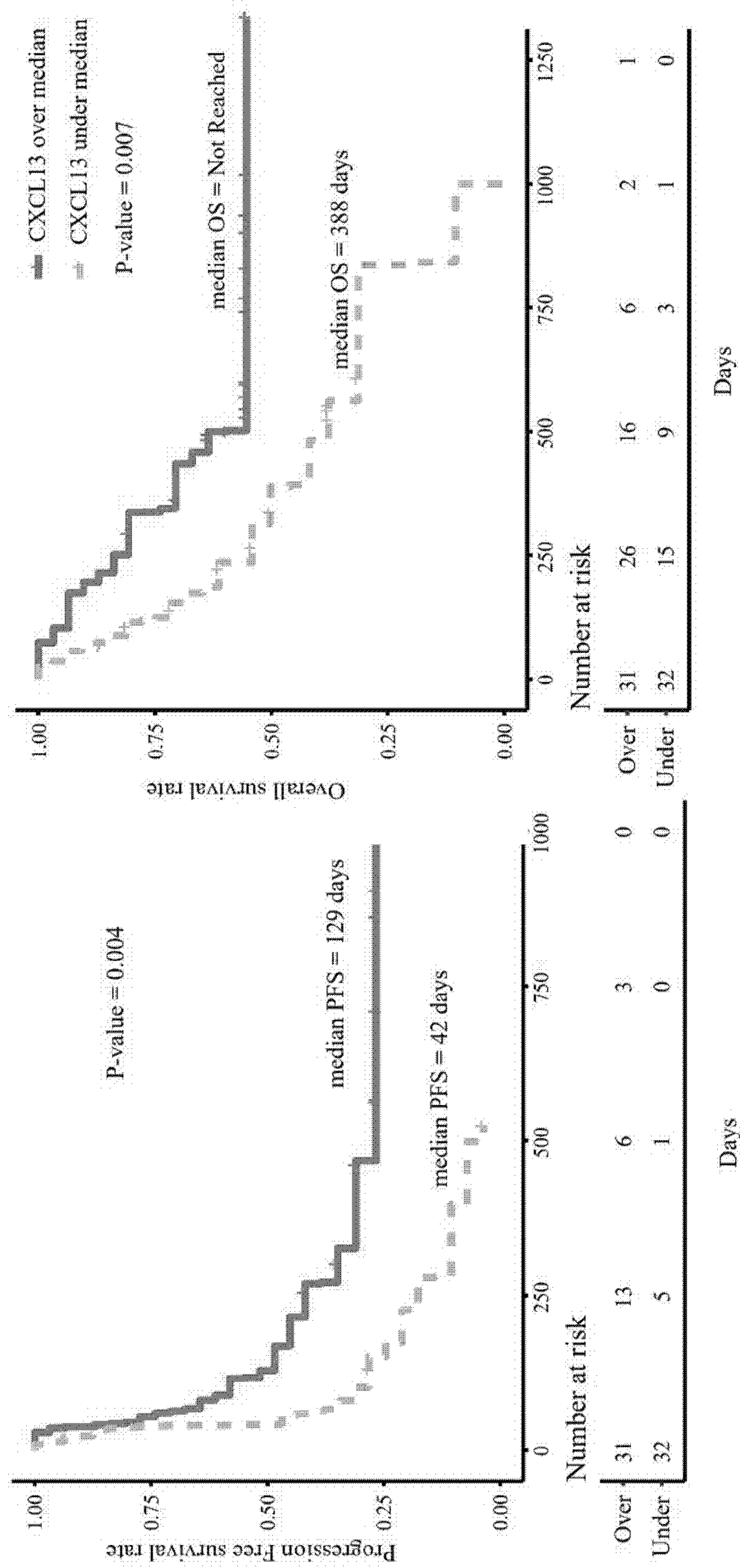
[도1d]



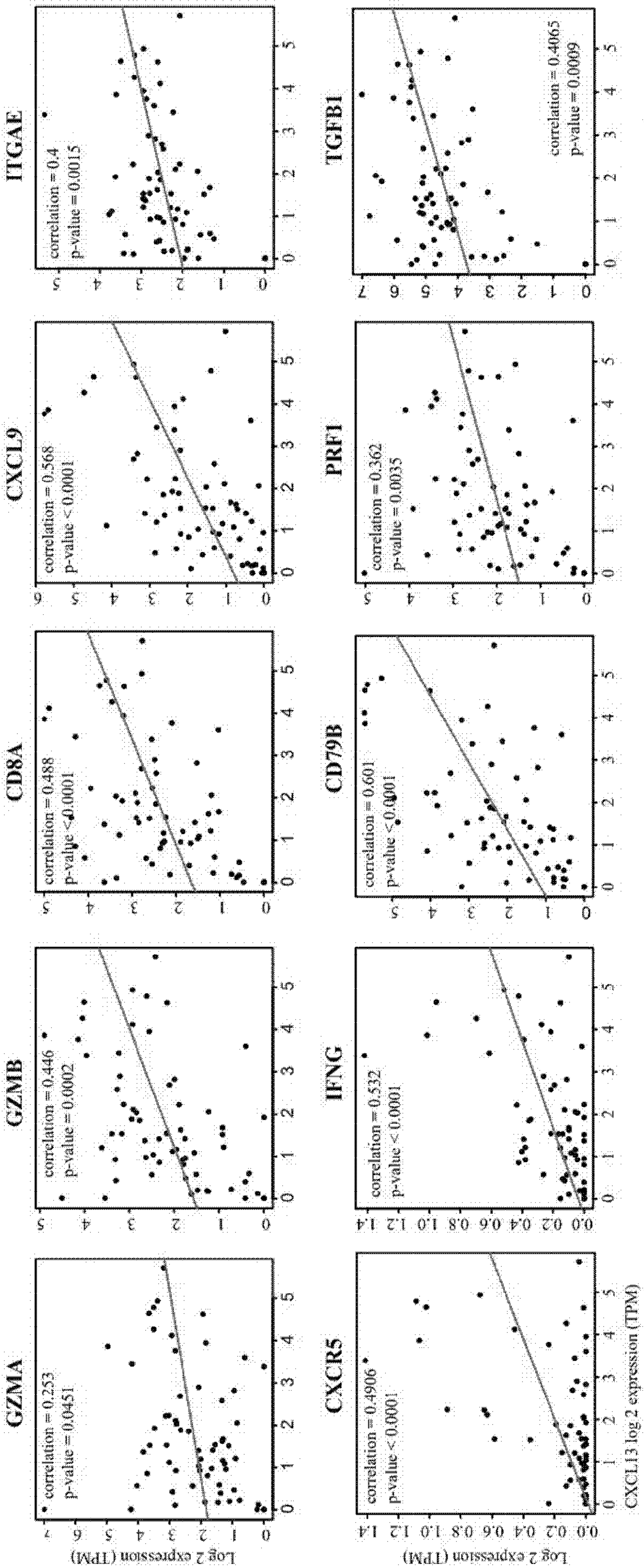
[도 1e]



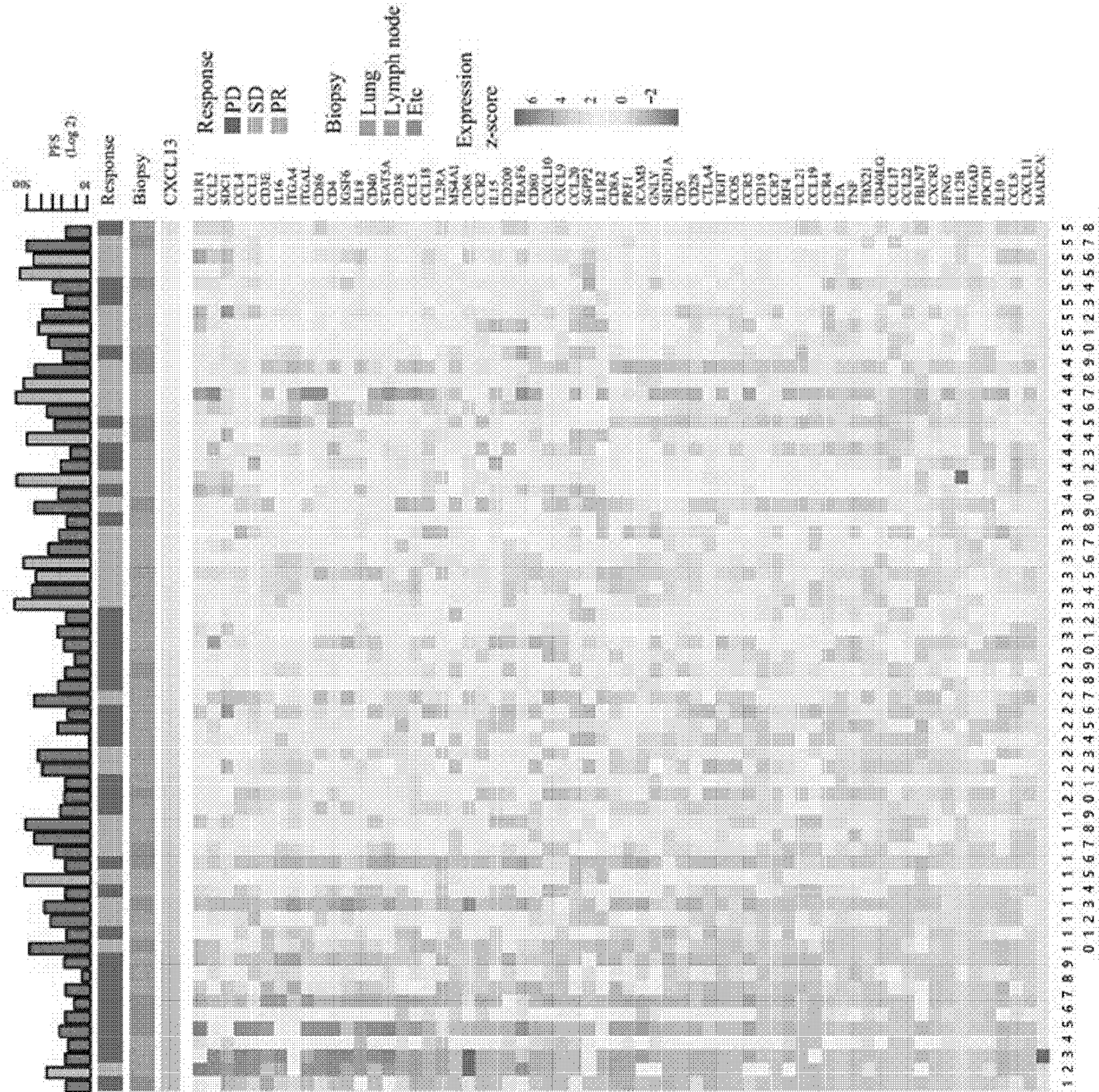
[도 1f]



[도2a]

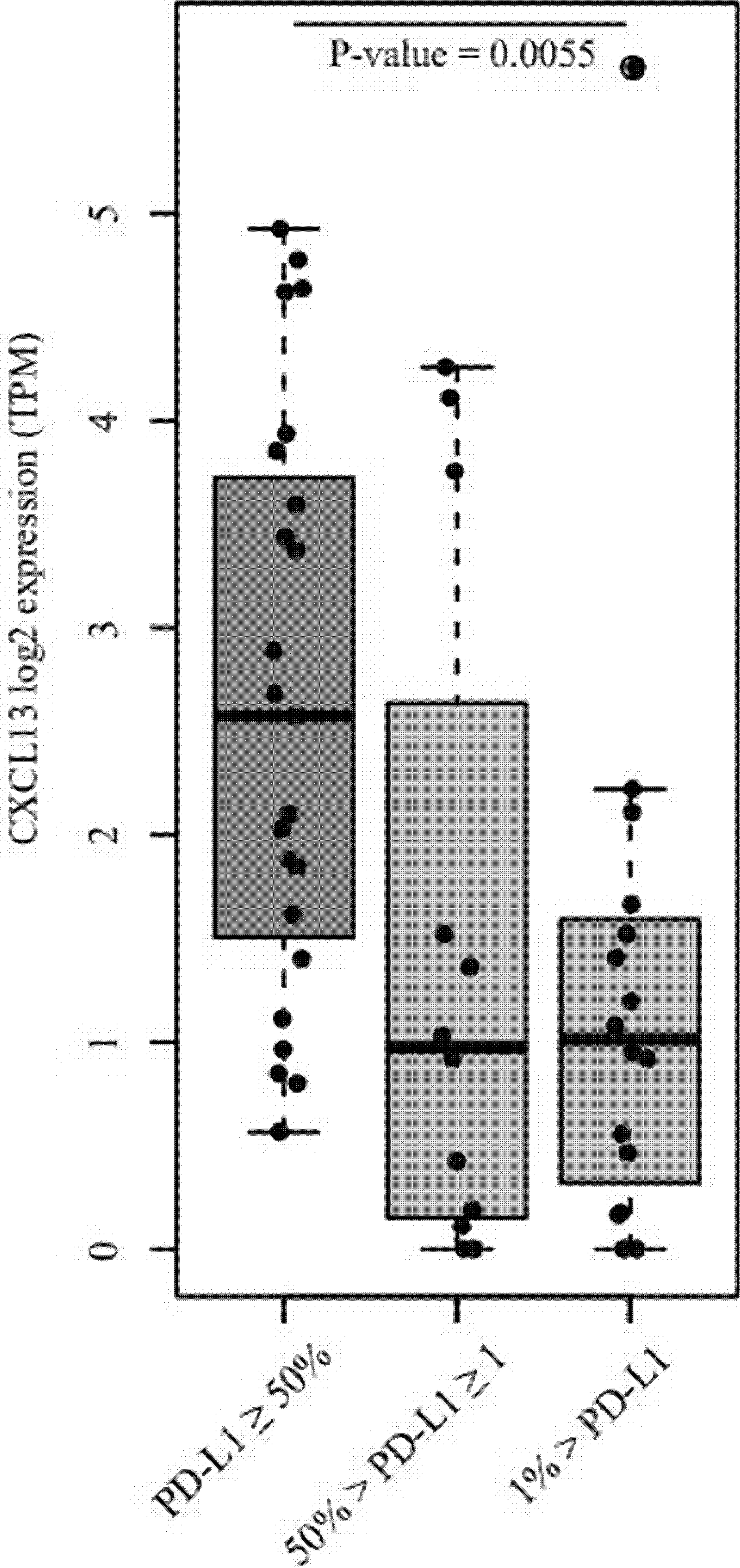


[도2b]

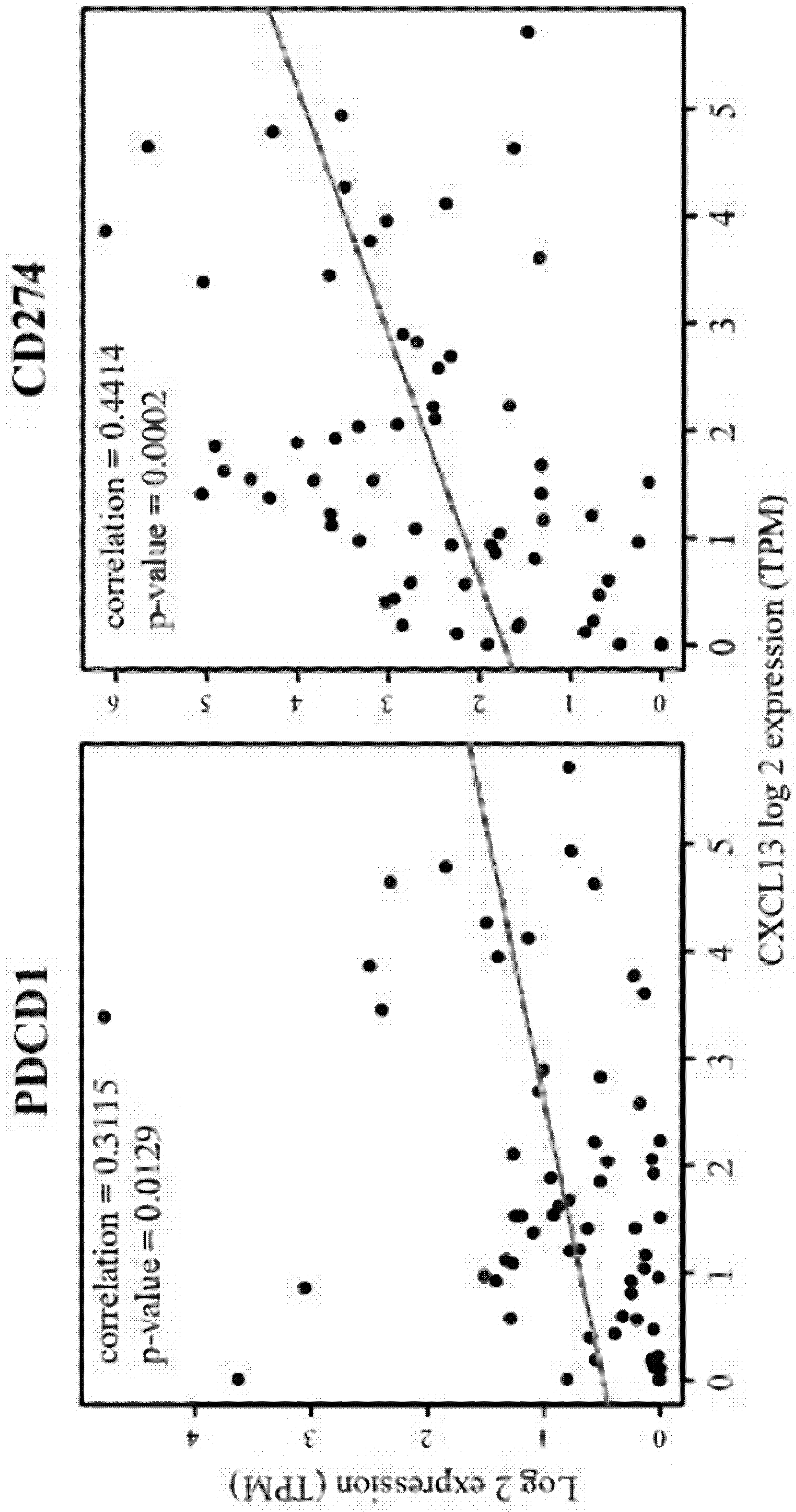


1	DSW 1344
2	DSW 1269 2
3	DSW 2231
4	DSW 1678 5
5	DSW 0575
6	DSW 1844 2
7	DSW 1727
8	DSW 947
9	DSW 1263 2
10	DSW 0760 2
11	DSW 1906 2
12	DSW 1898
13	DSW 1654
14	DSW 1602
15	DSW 1766
16	DSW 1854
17	DSW 1700
18	DSW 1511
19	DSW 1797
20	DSW 1706
21	DSW 0585
22	DSW 1768
23	DSW 1658
24	DSW 1800
25	DSW 1693
26	DSW 1645
27	DSW 2325
28	DSW 0618 2
29	DSW 1702
30	DSW 0371 3
31	DSW 1065
32	DSW 1826 2
33	DSW 1493
34	DSW 0809 2
35	DSW 1566
36	DSW 1710
37	DSW 0852
38	DSW 1747
39	DSW 1810
40	DSW 1461
41	DSW 0885
42	DSW 625
43	DSW 1833 2
44	DSW 0925 4
45	DSW 1050
46	DSW 1663
47	DSW 1498 2
48	DSW 1852 2
49	DSW 2454
50	DSW 2109
51	DSW 1052
52	DSW 2317 2
53	DSW 0723
54	DSW 0903 2
55	DSW 1322 2
56	DSW 2212
57	DSW 2245
58	DSW 2116

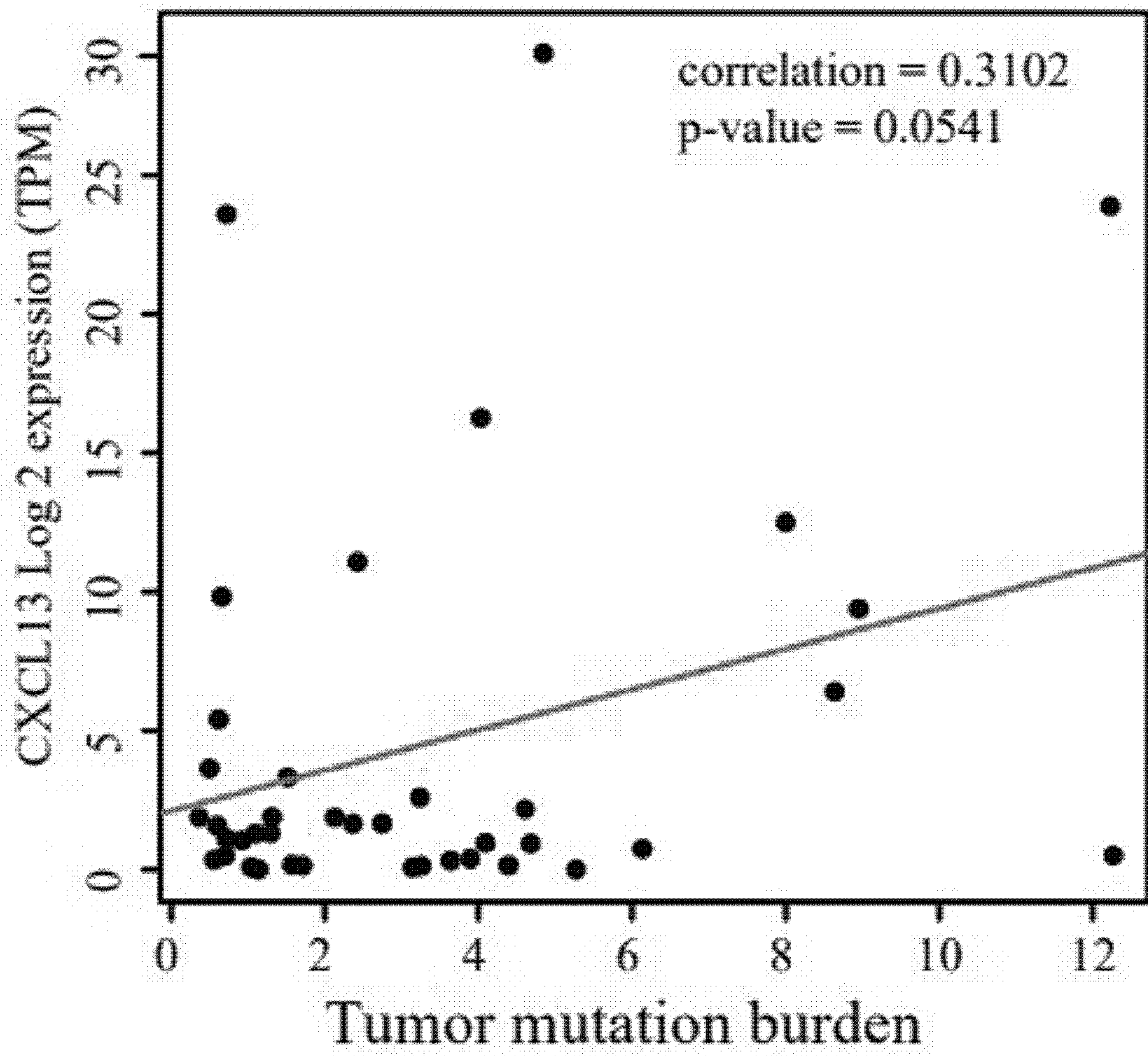
[도2c]



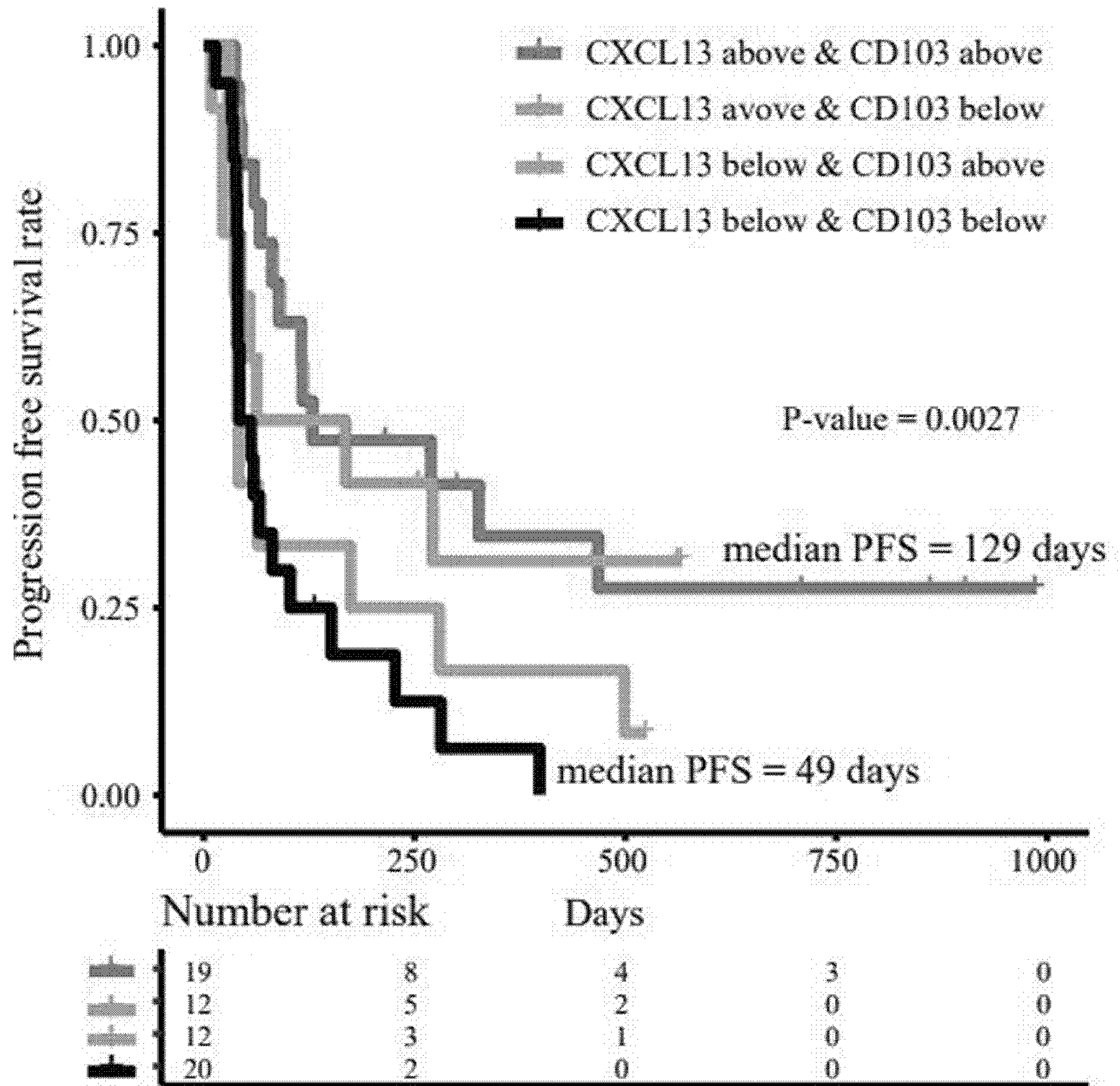
[도2d]



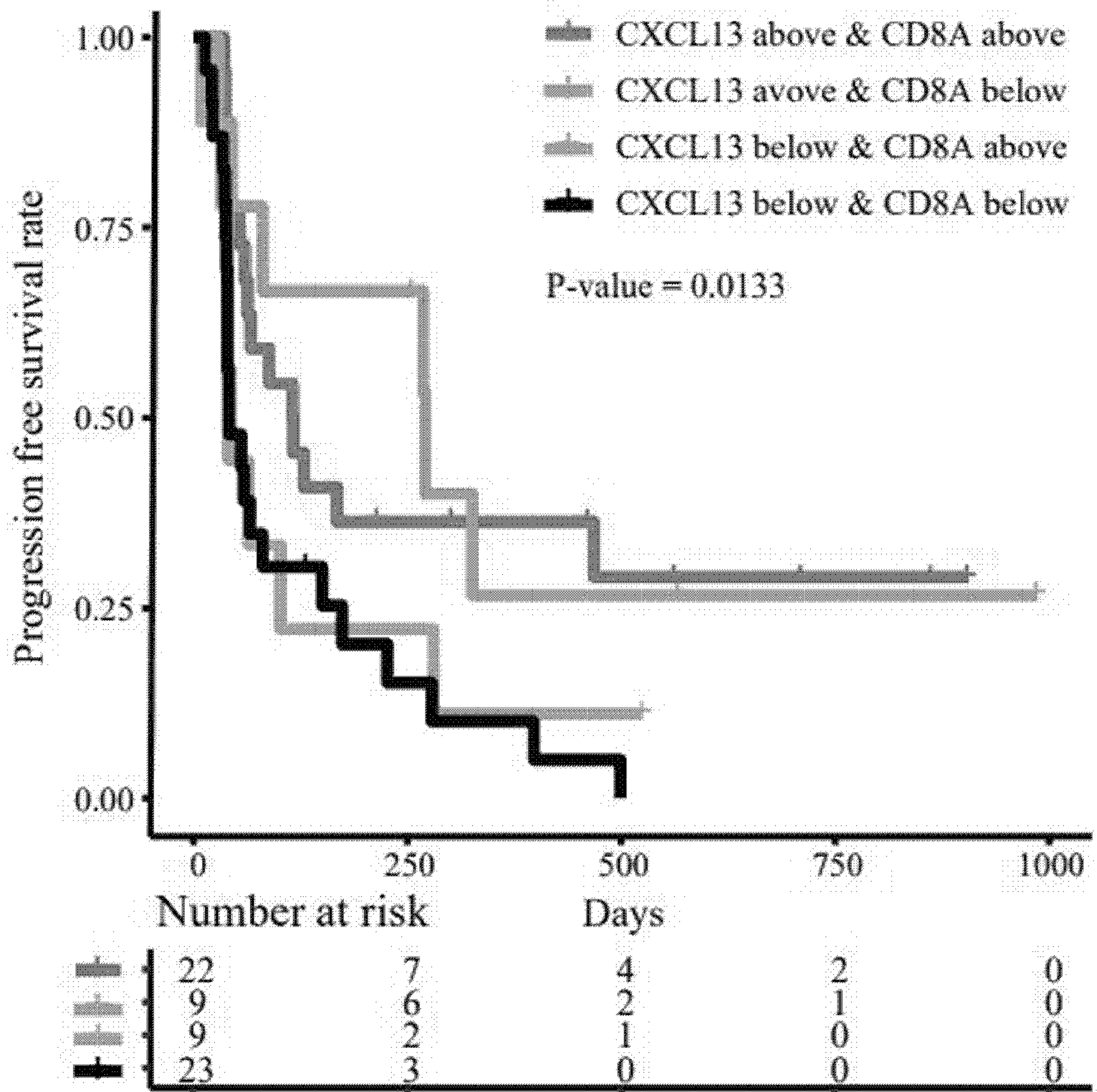
[도2e]



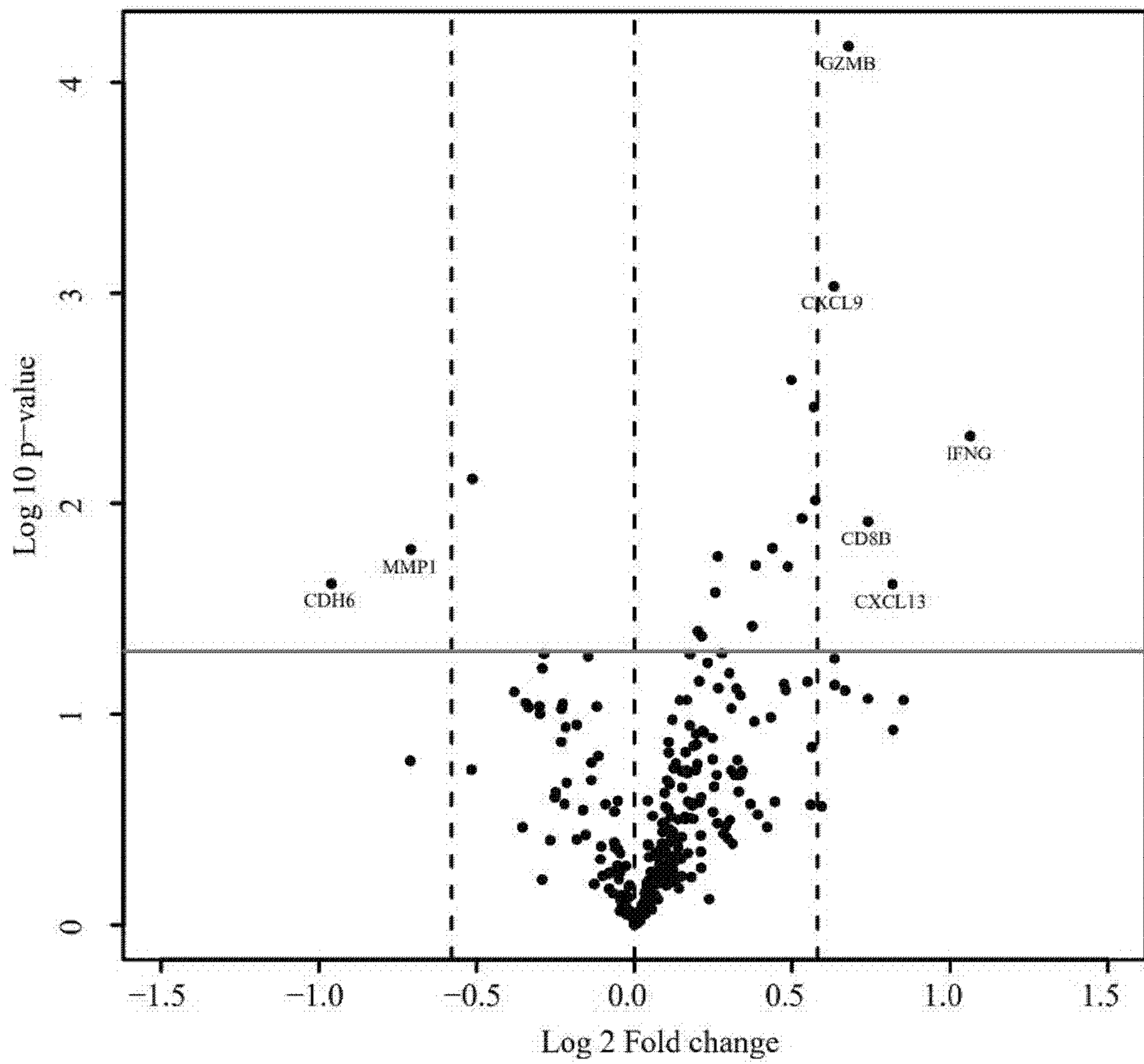
[도2f]



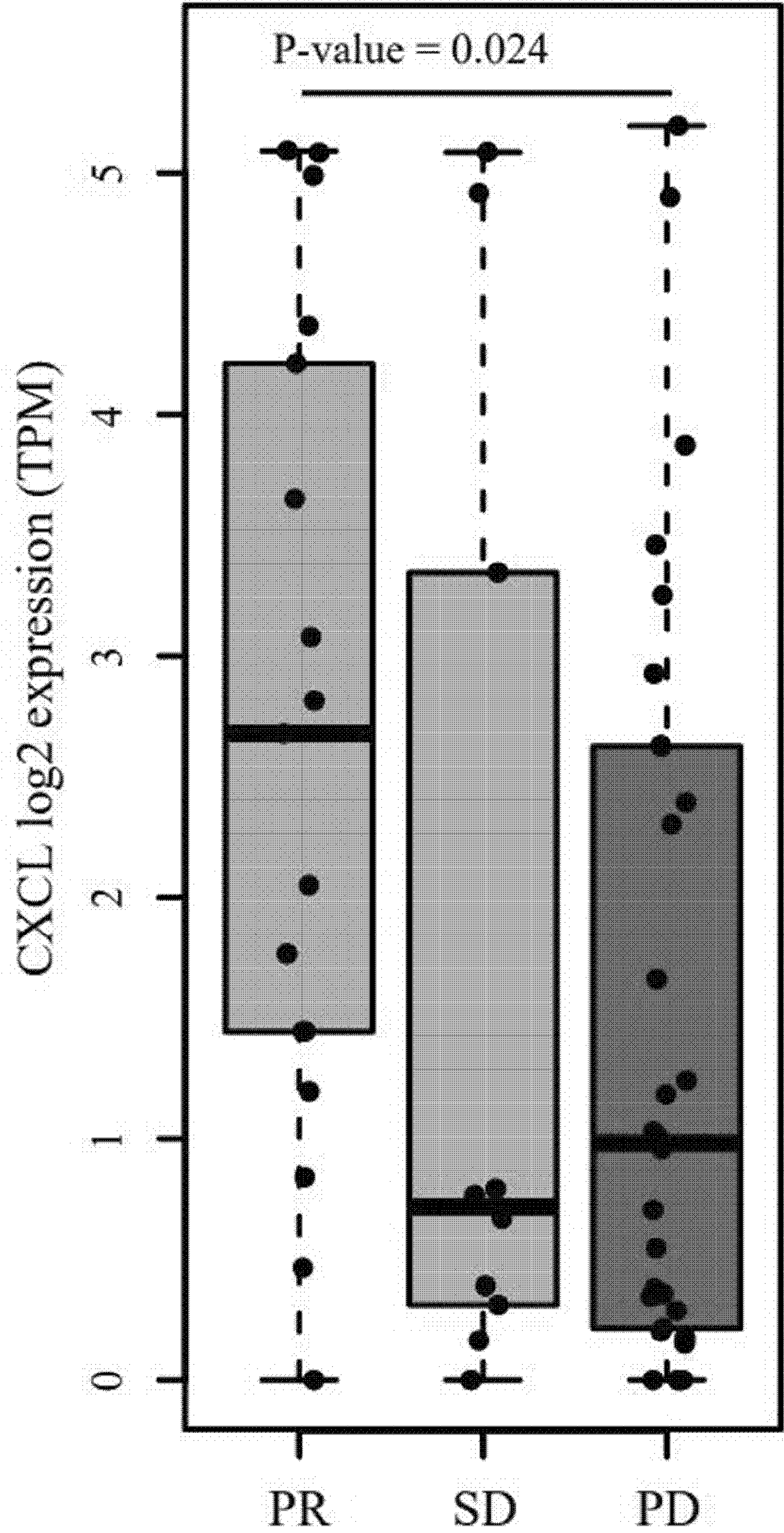
[도2g]



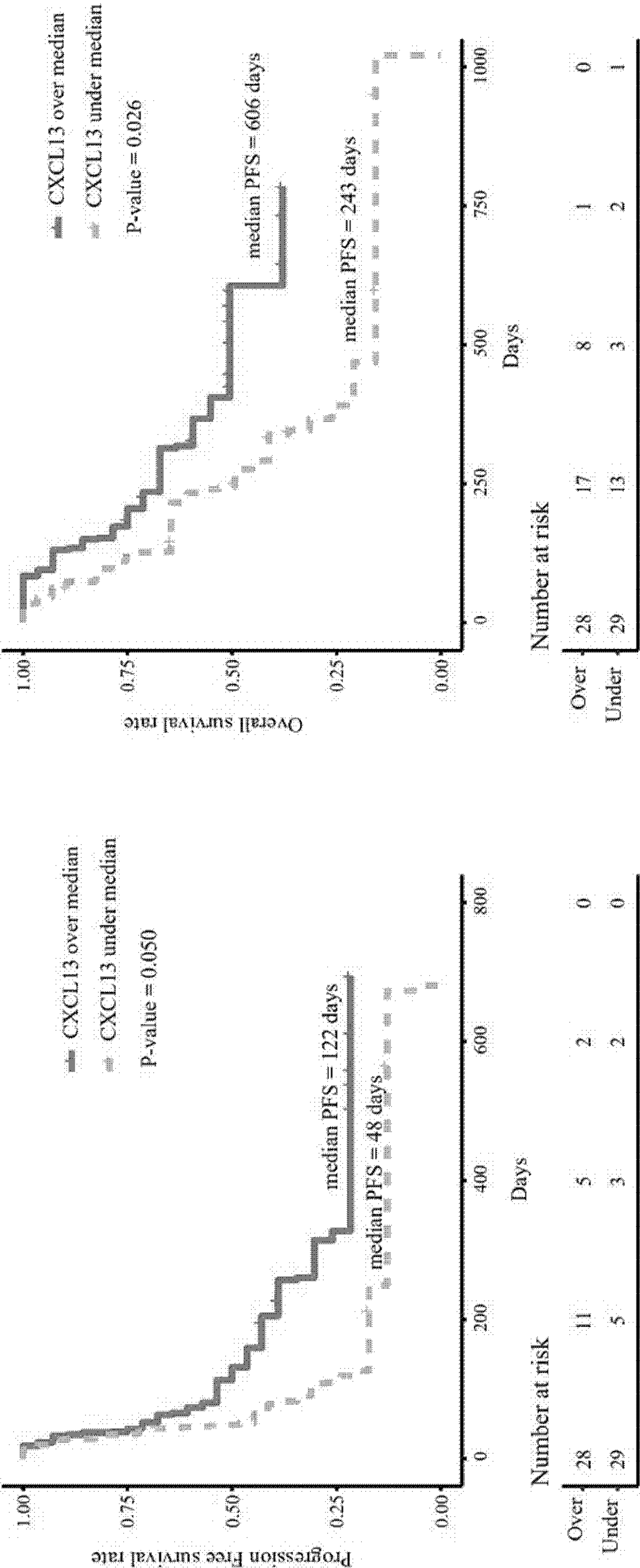
[도3a]



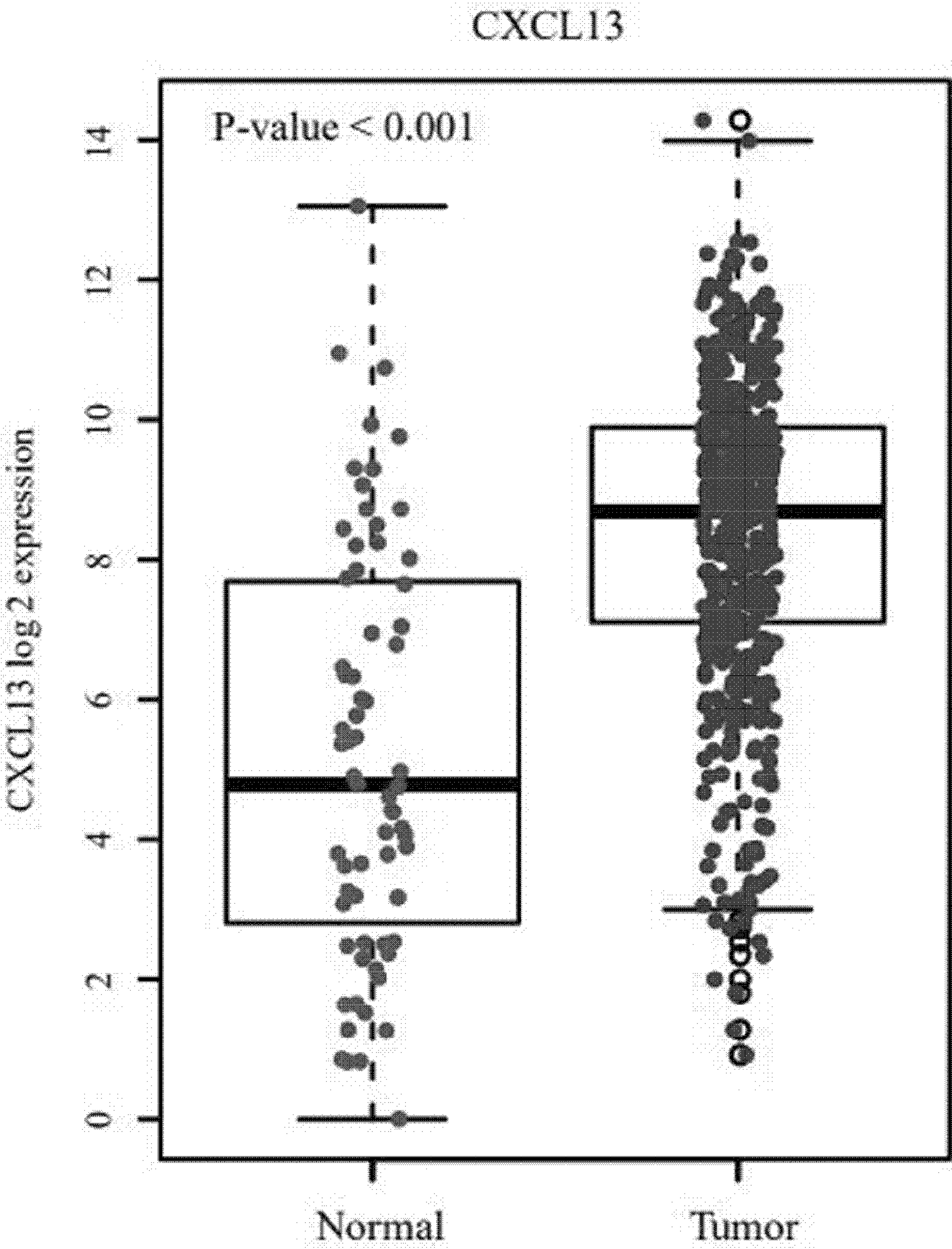
[도3b]



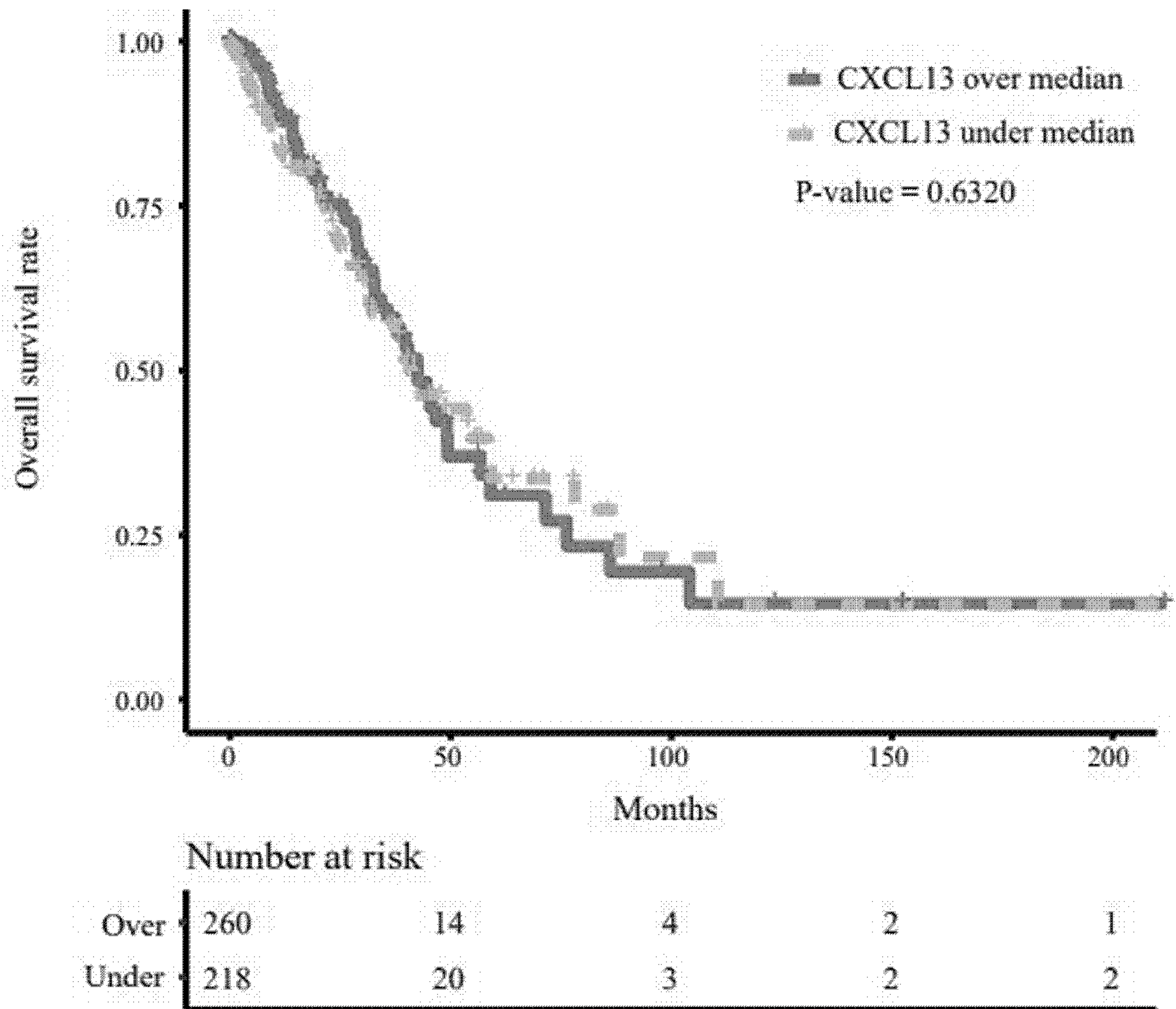
[도3c]



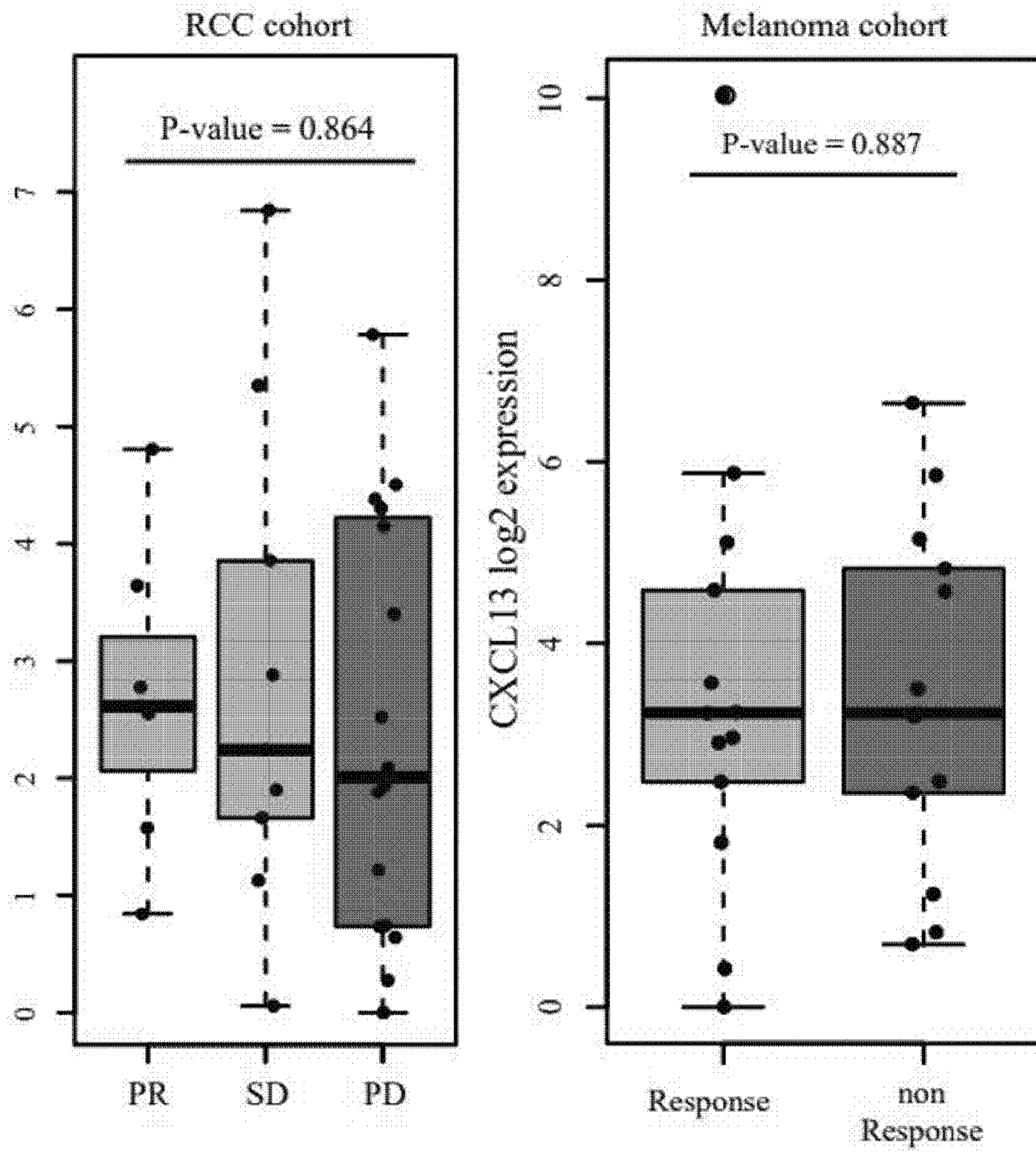
[도3d]



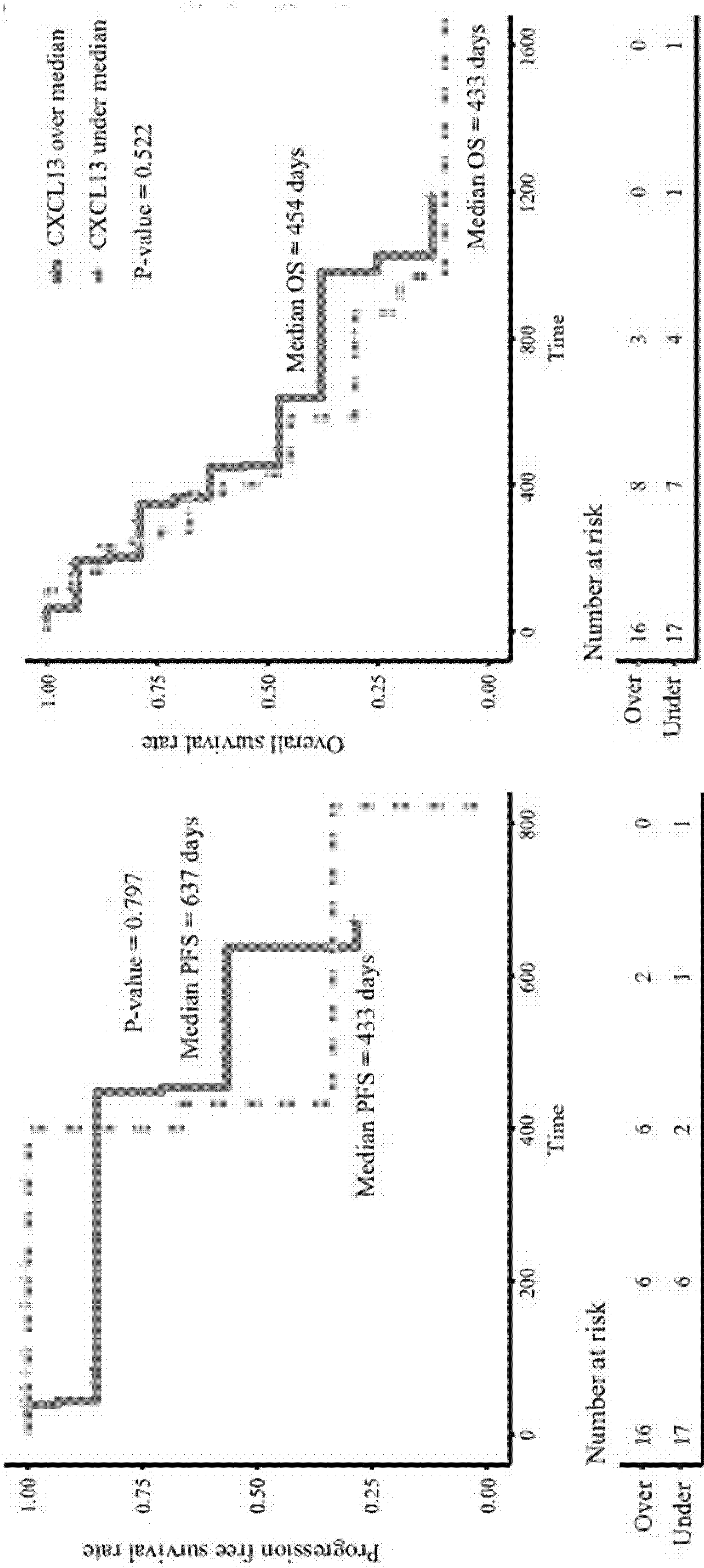
[도3e]



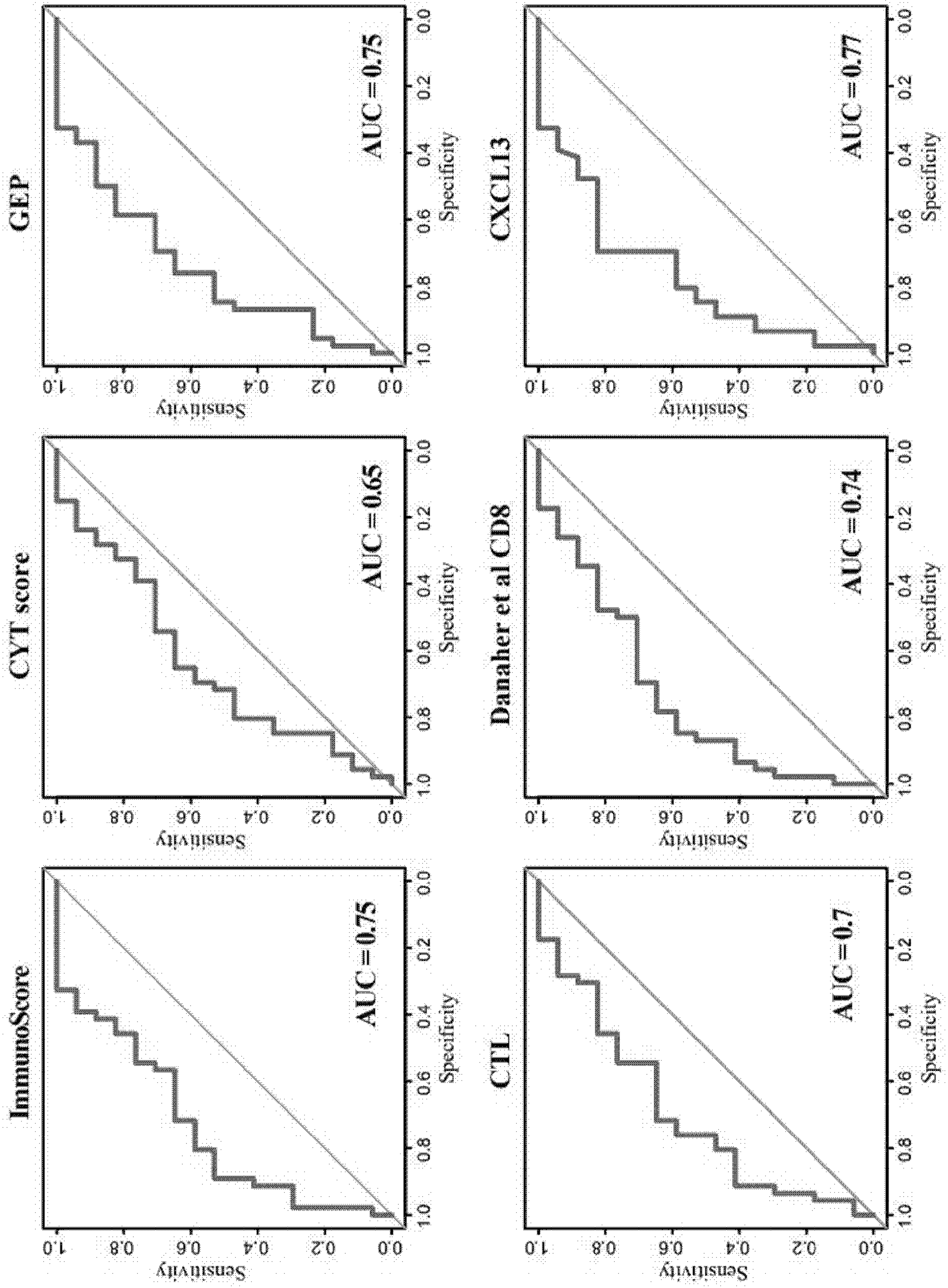
[도3f]



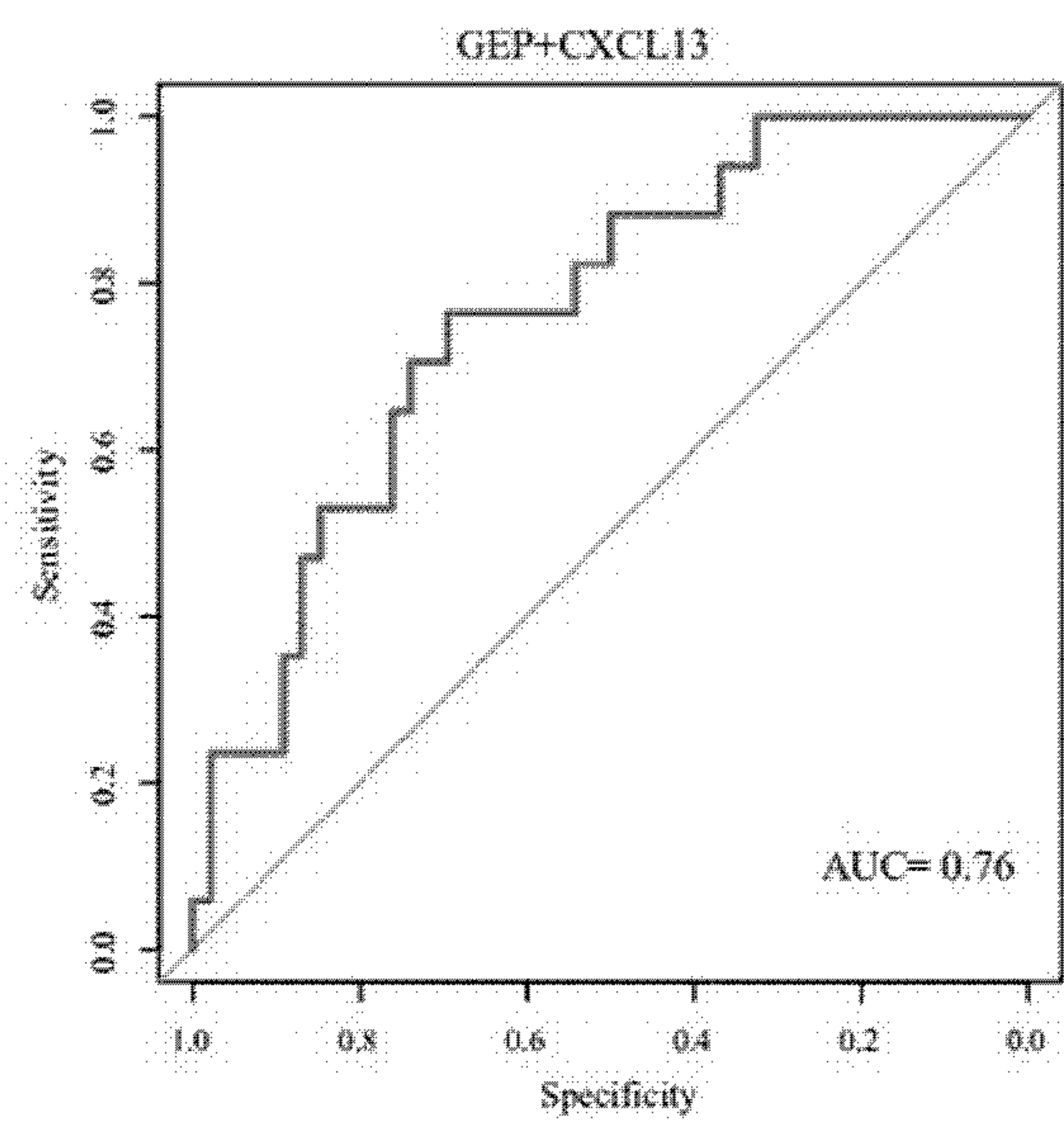
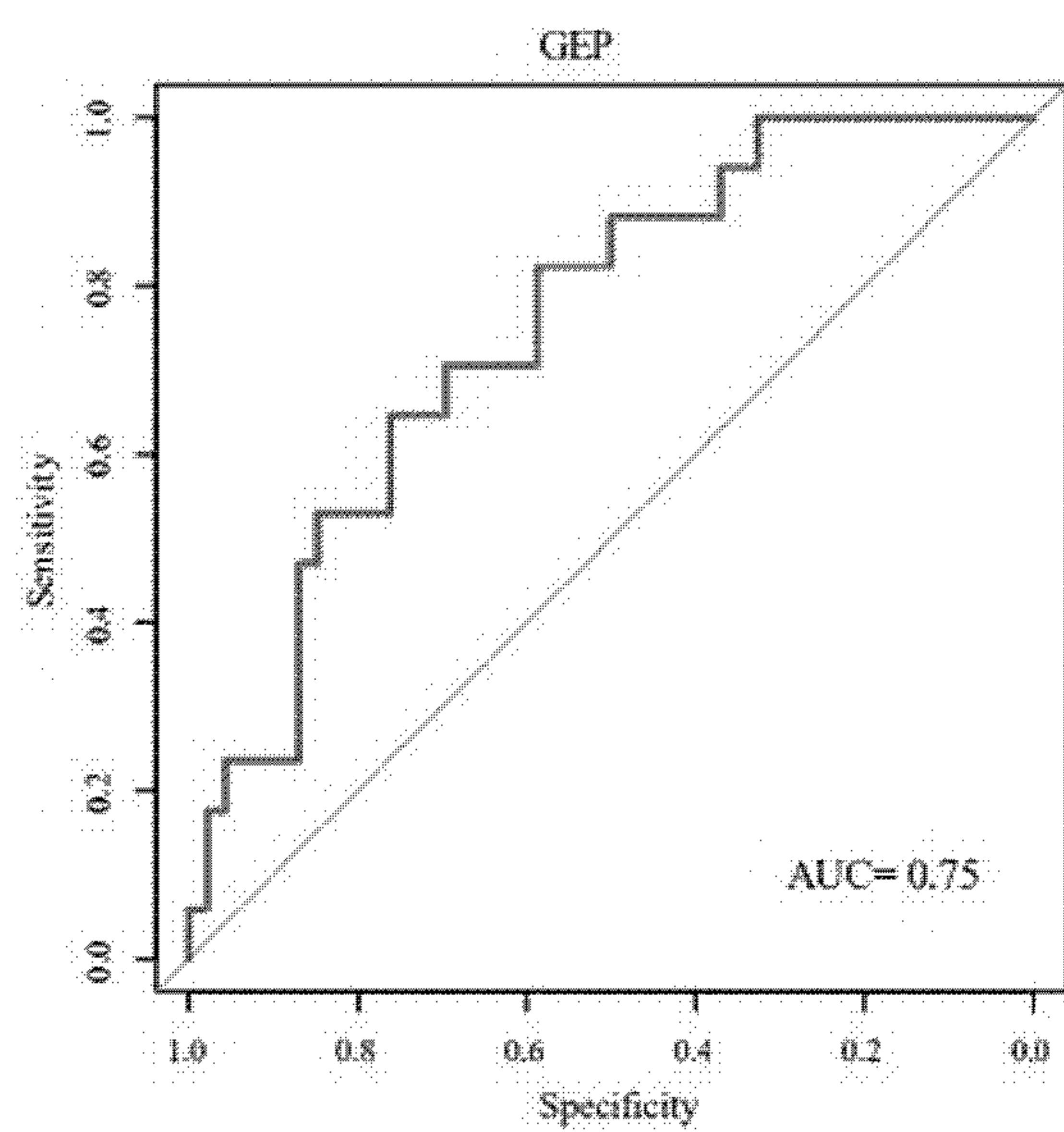
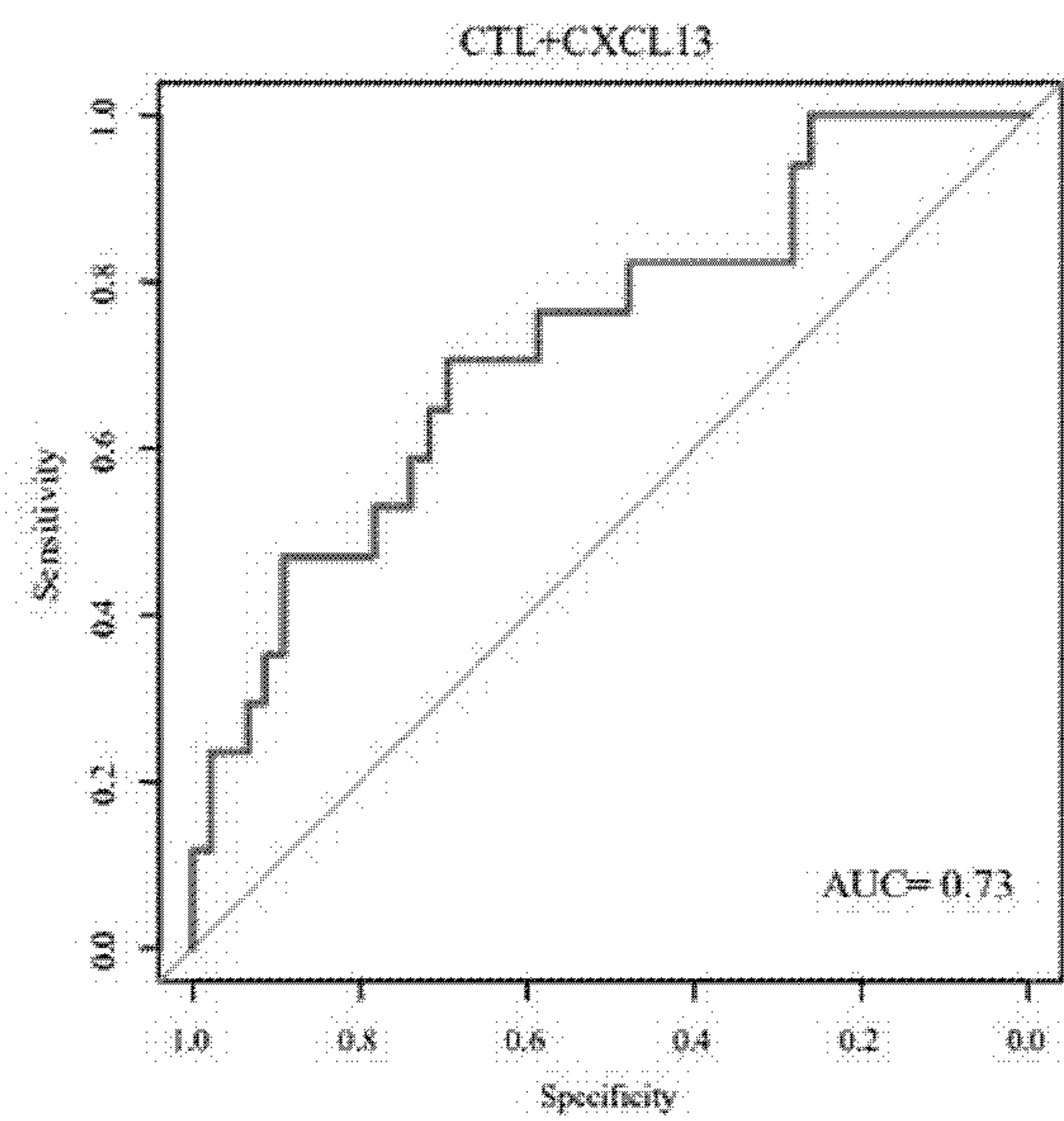
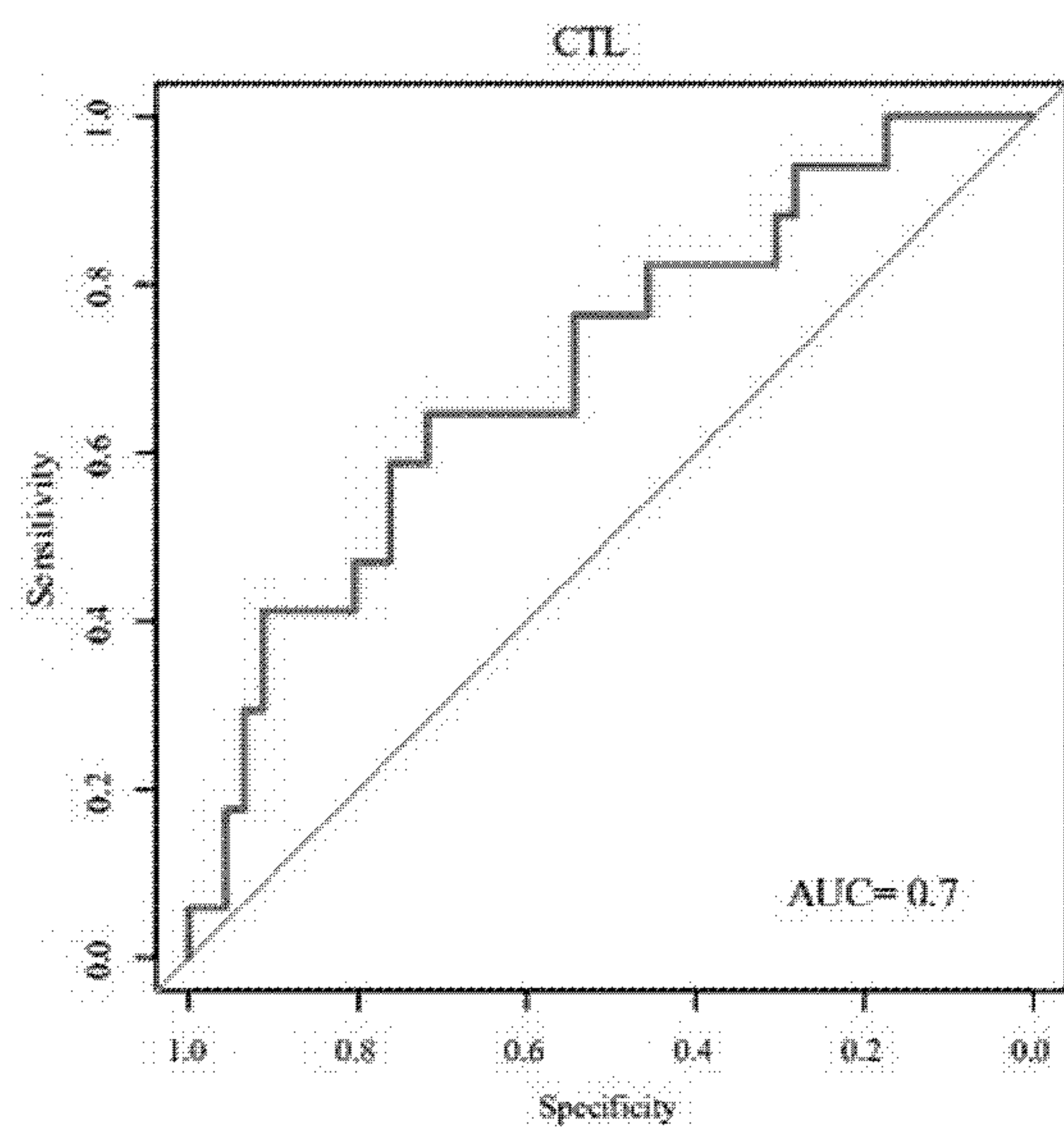
[도3g]



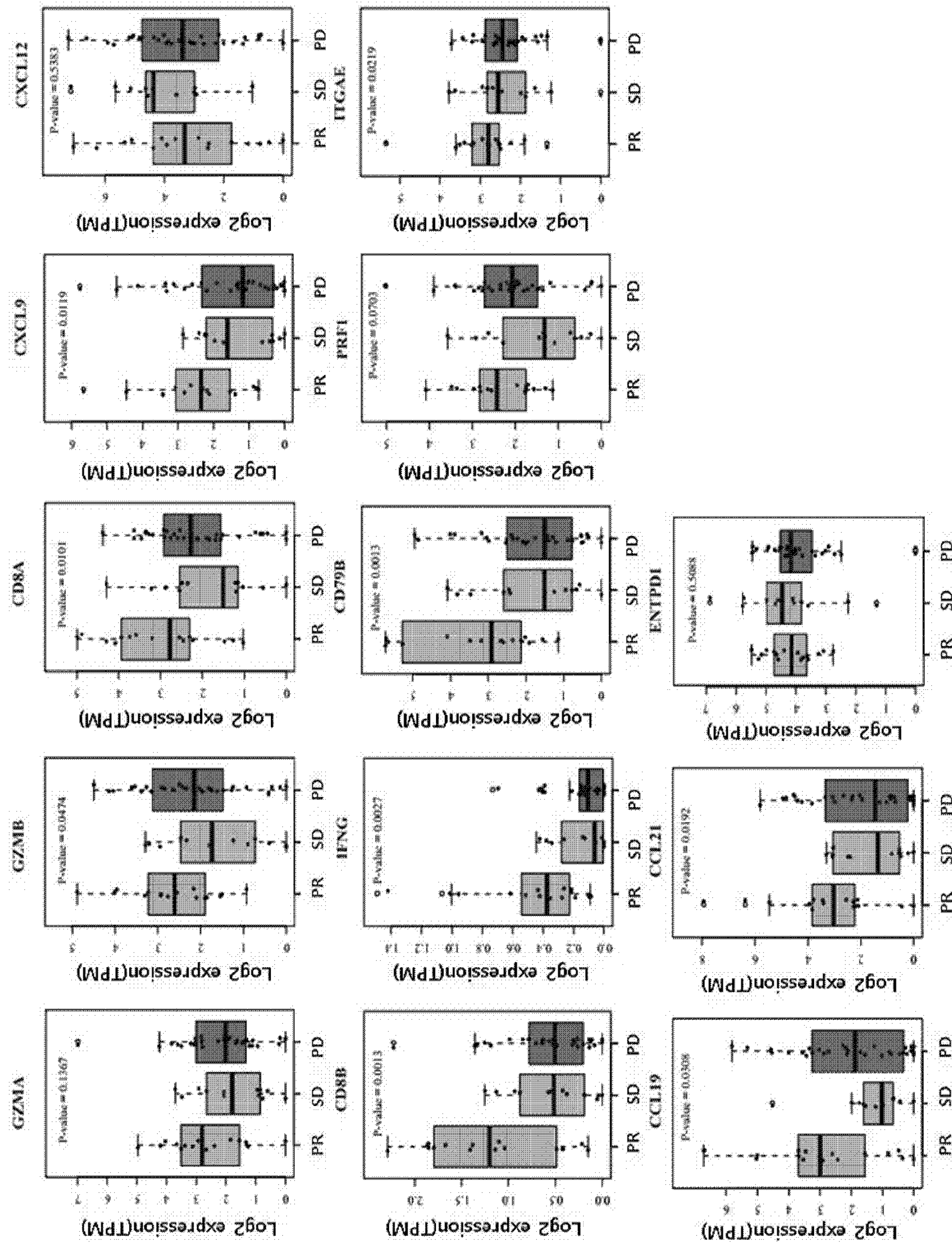
[도4a]



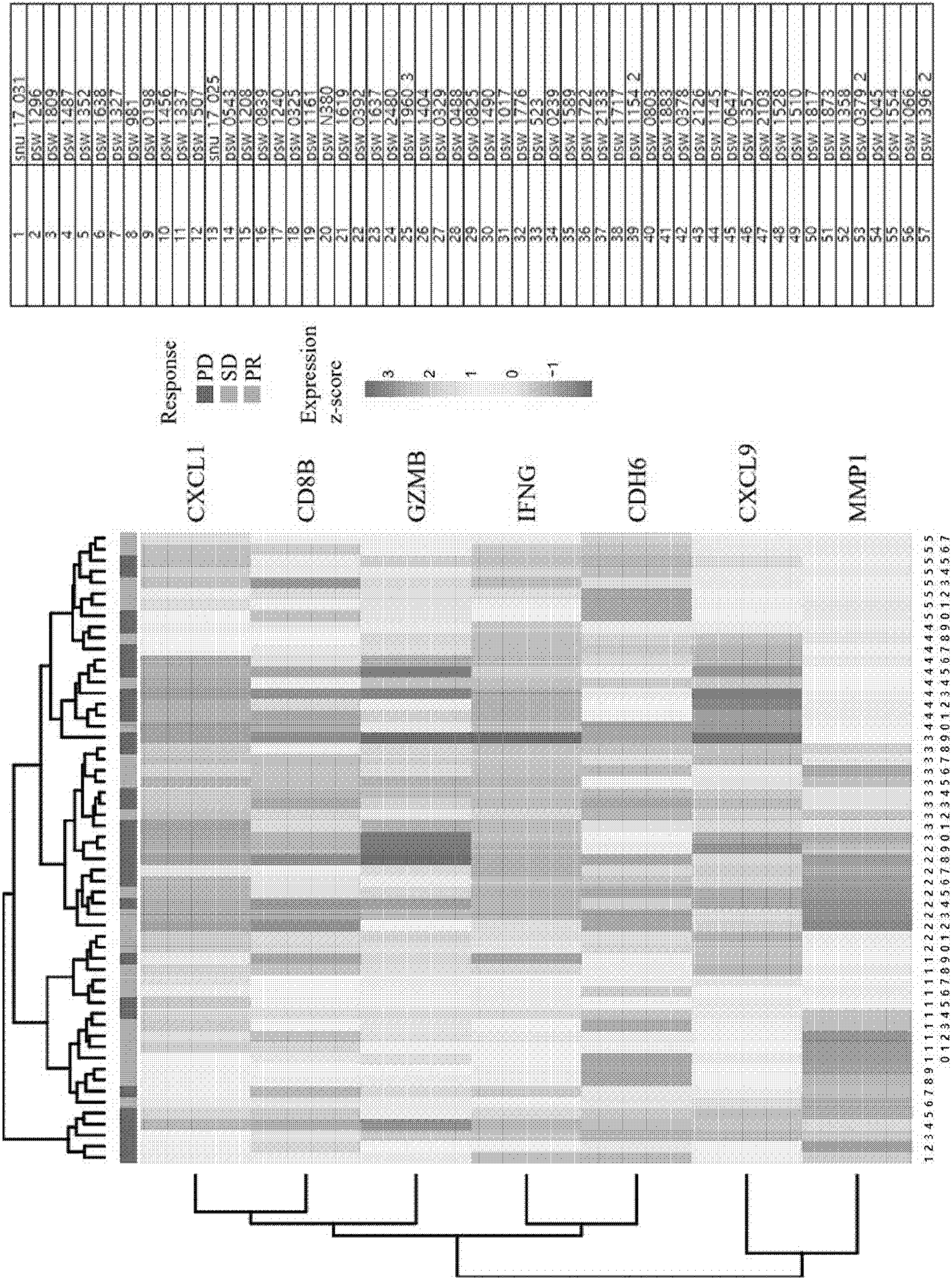
[도4b]



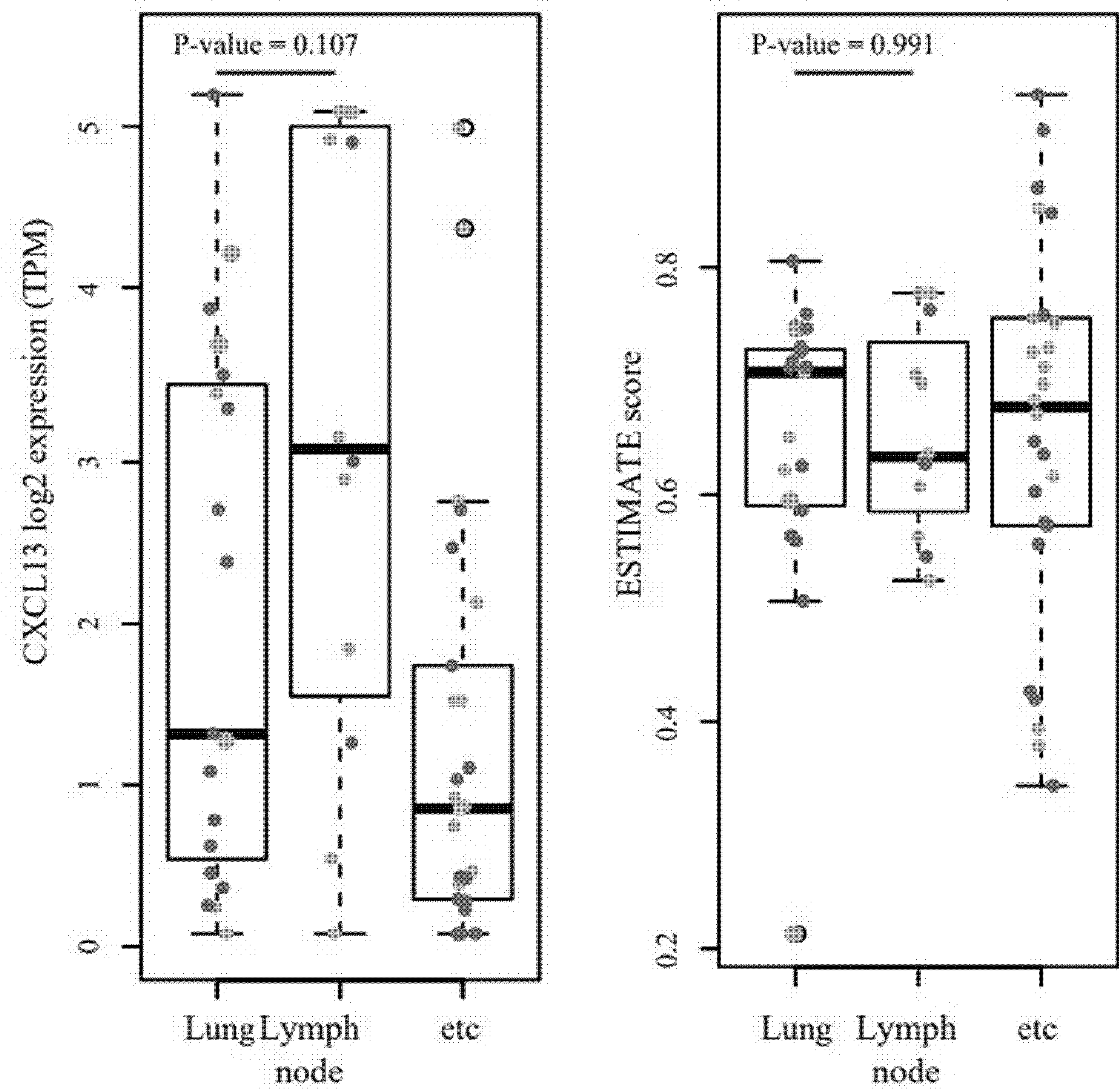
[도5]



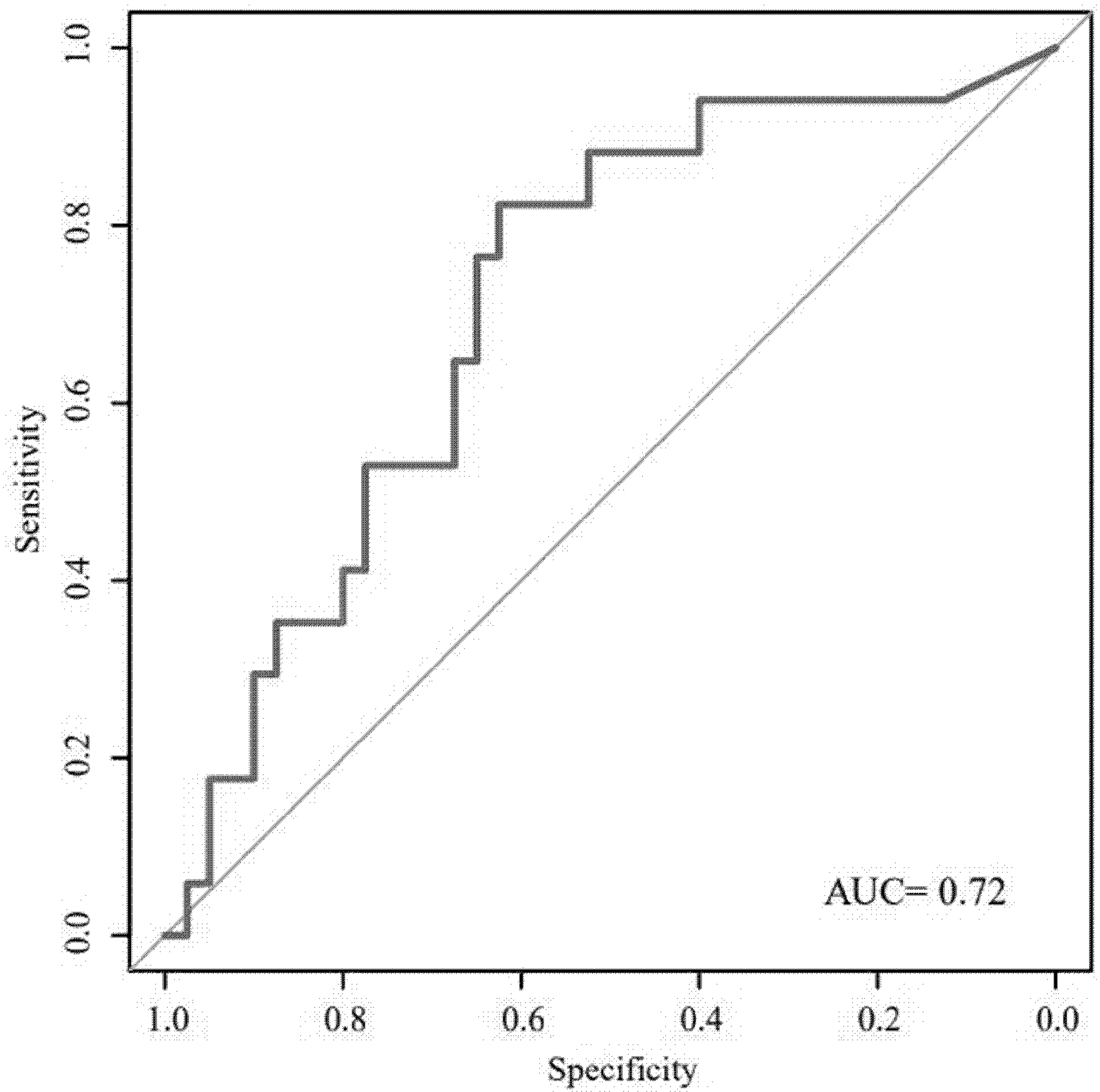
[도6a]



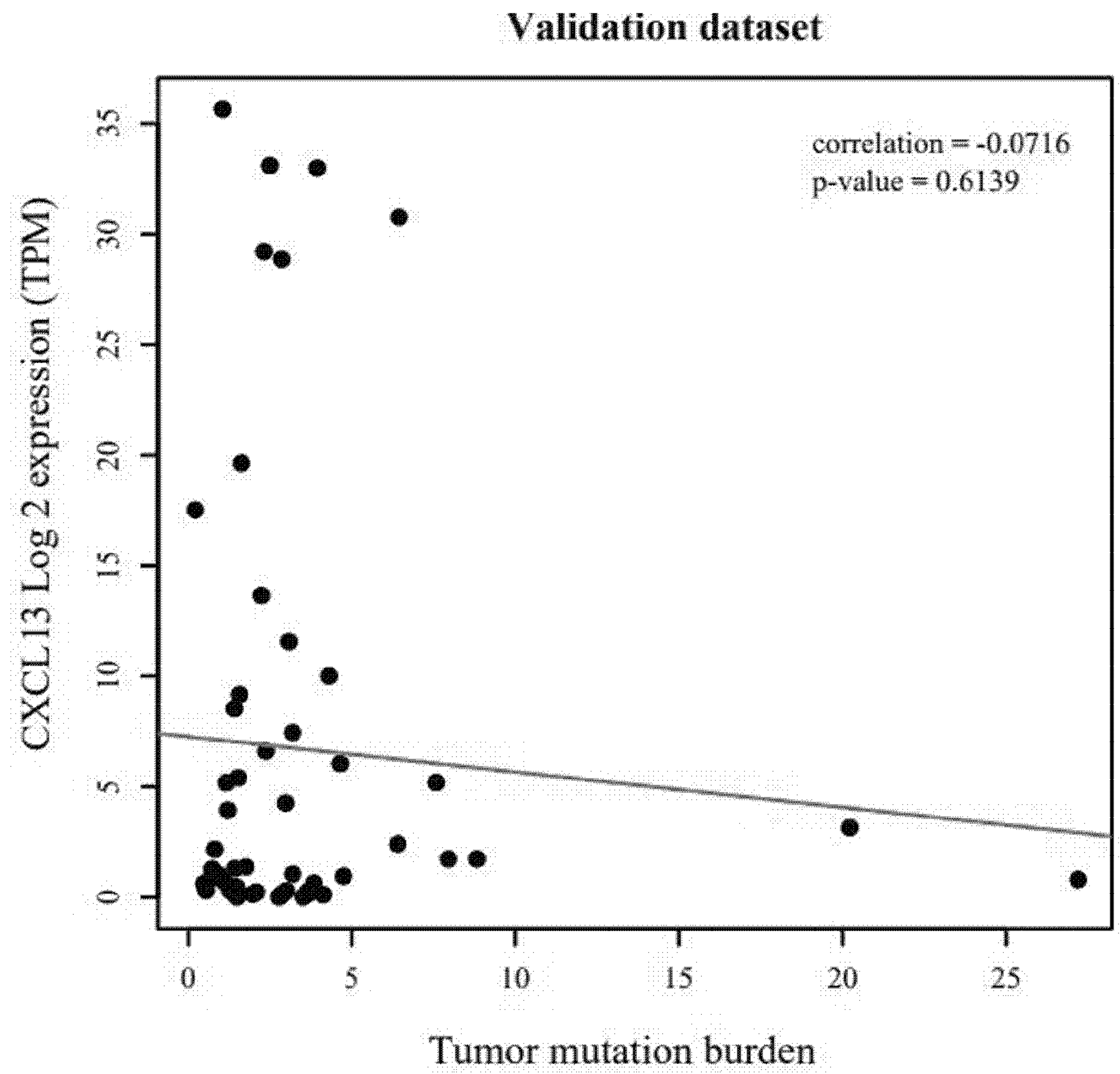
[도6b]



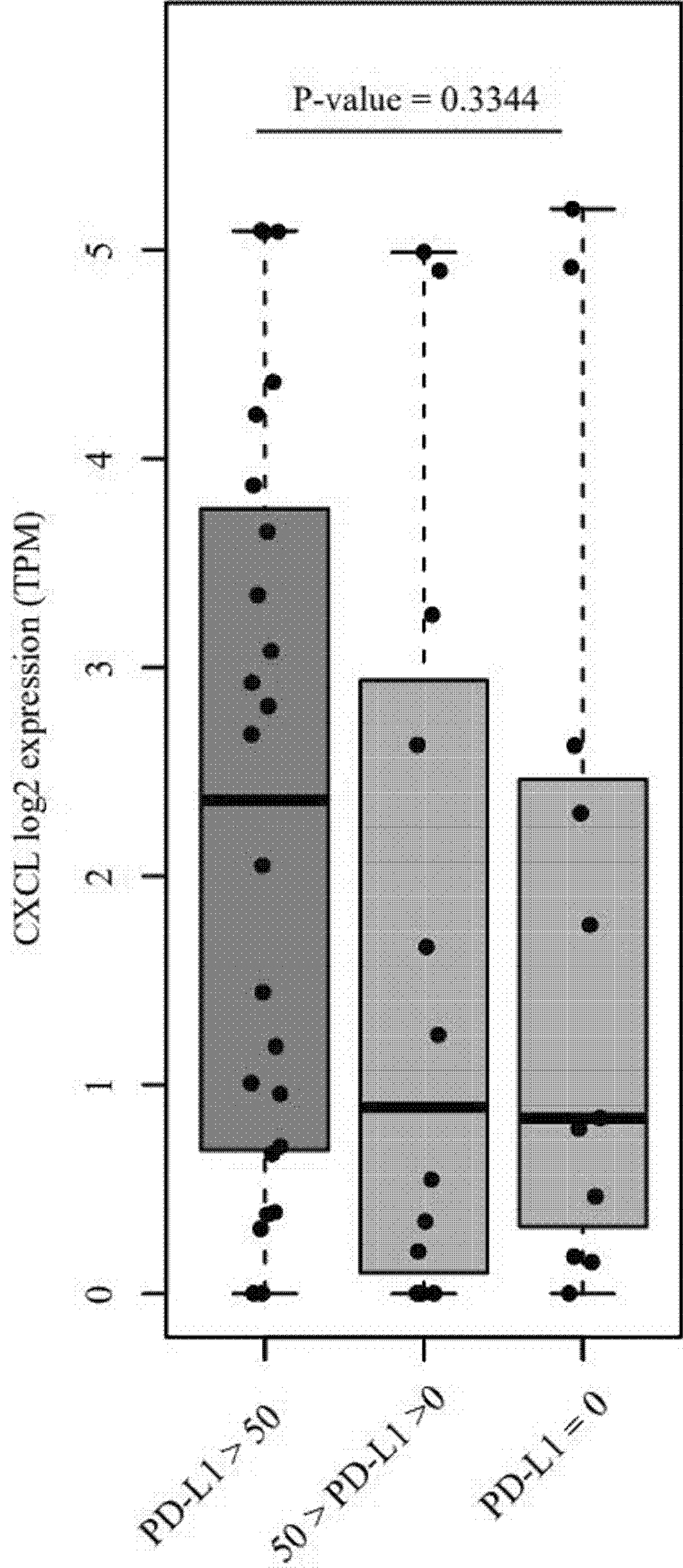
[도6c]



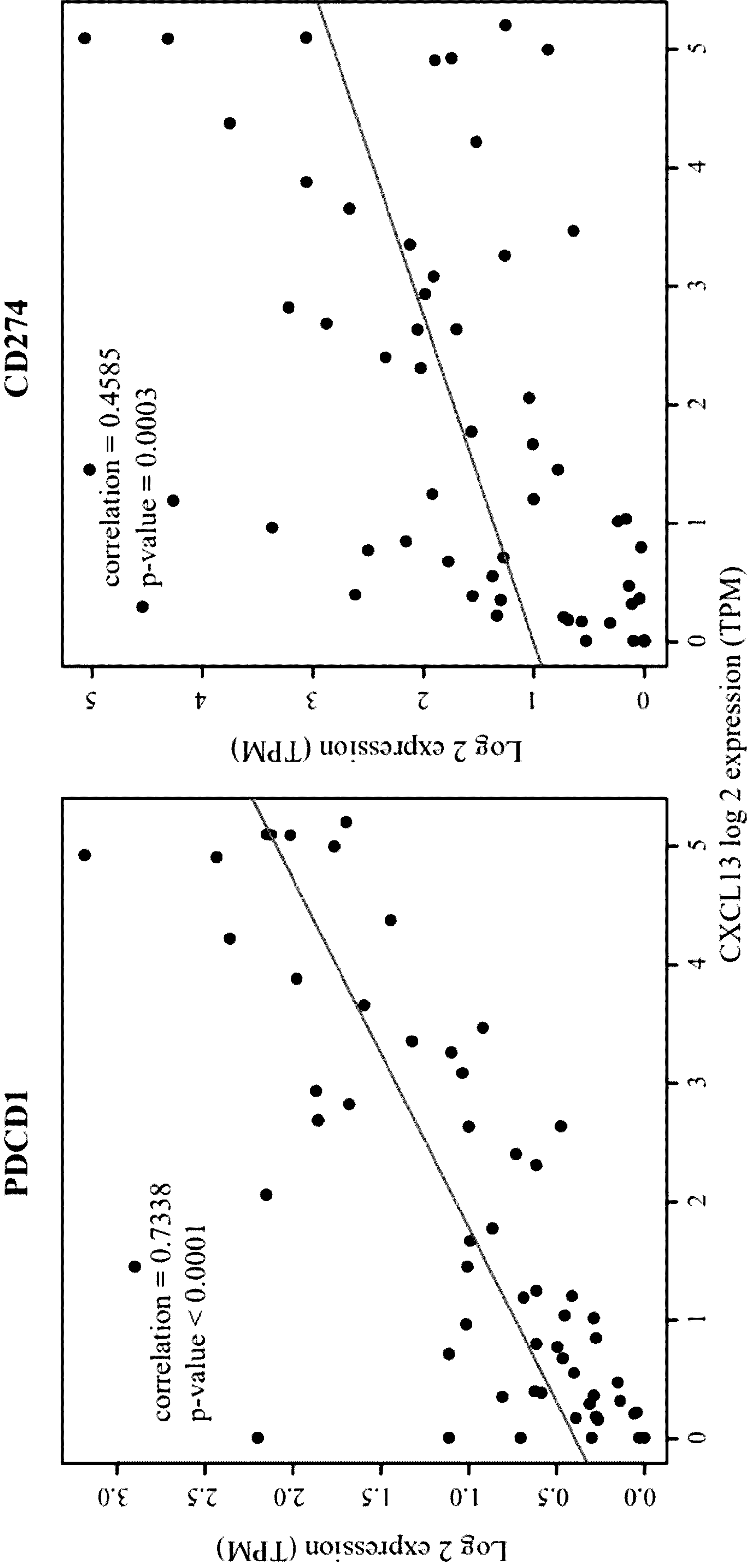
[도6d]



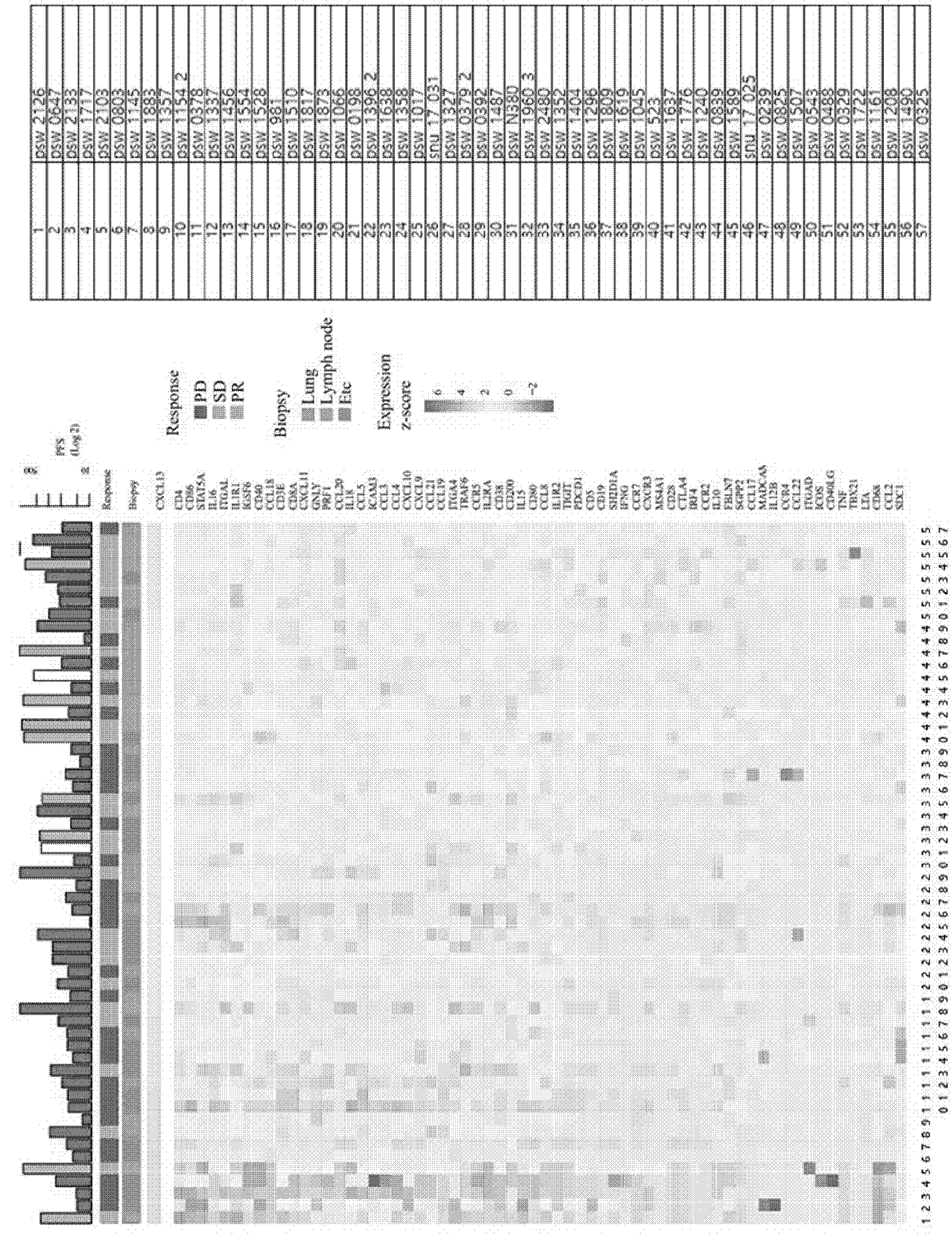
[도6e]



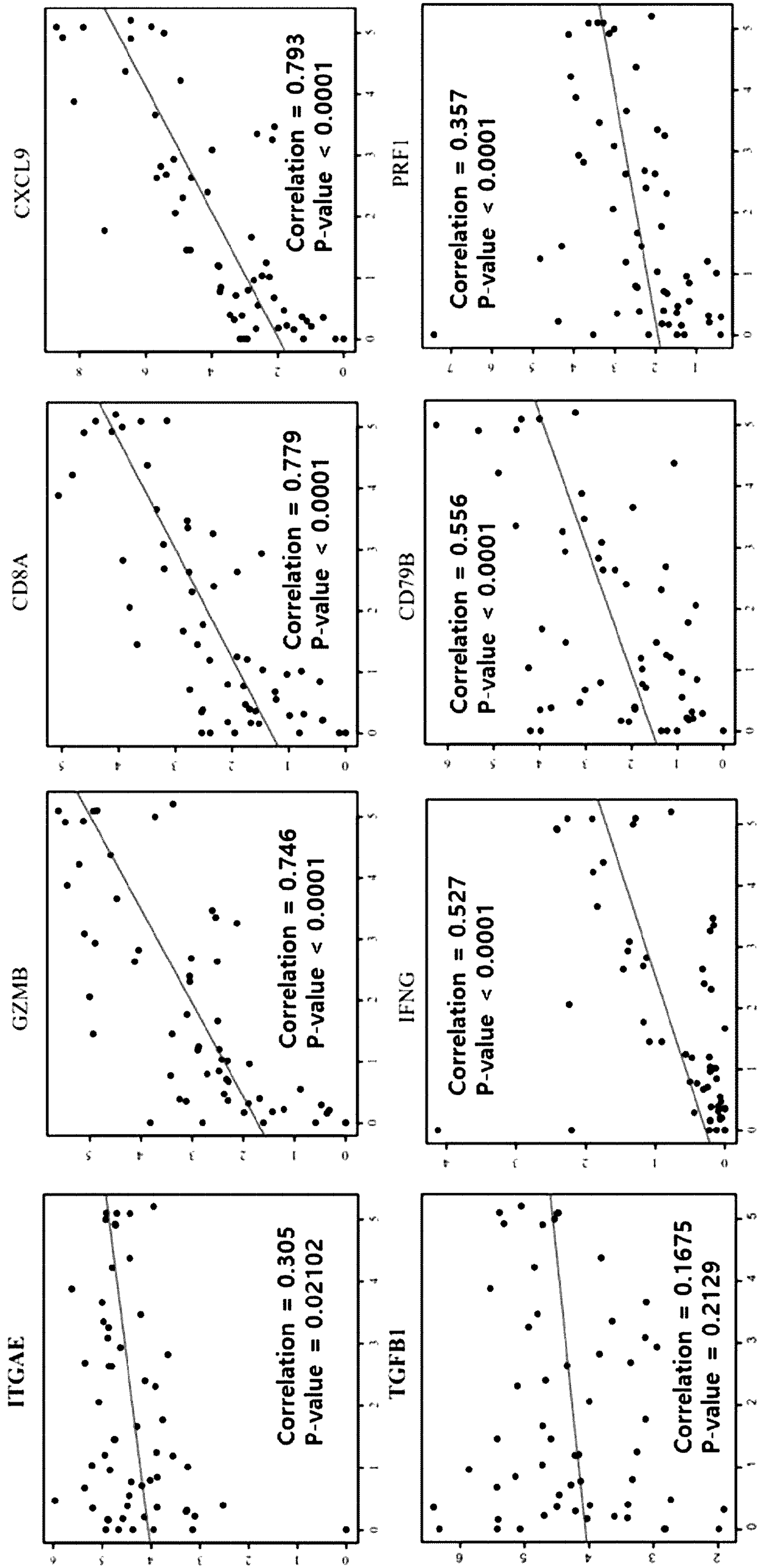
[도6f]



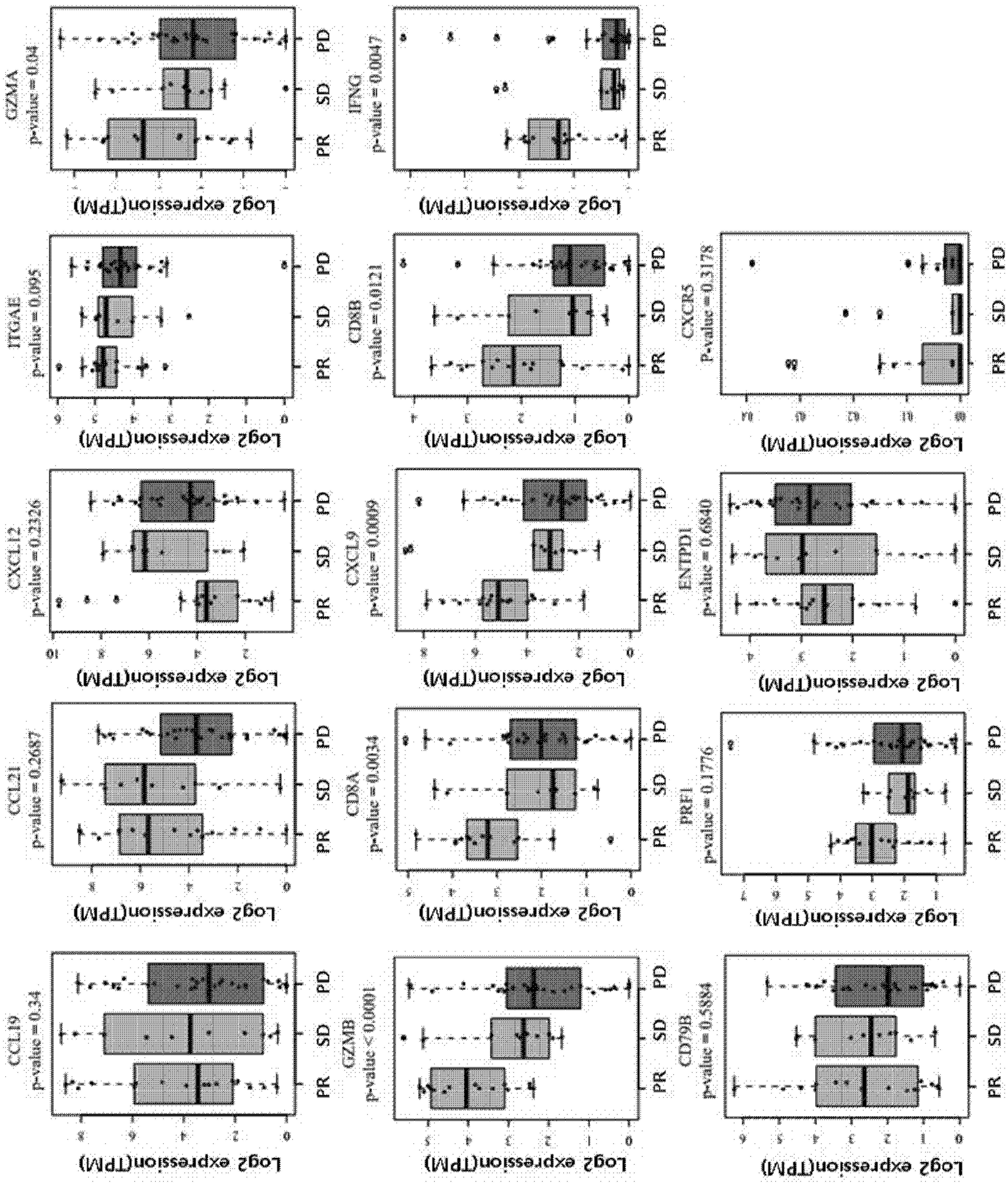
[도7a]



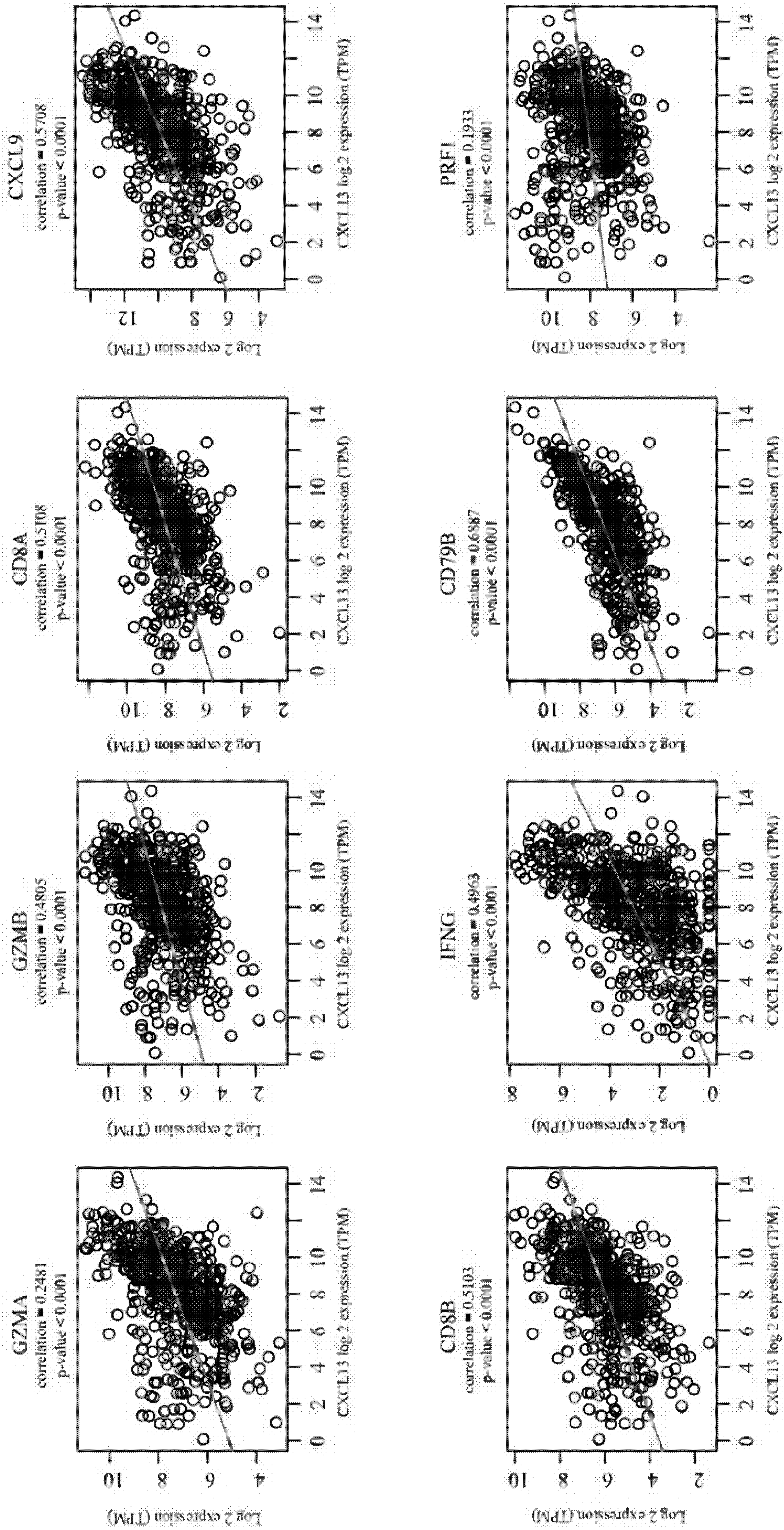
[도7b]



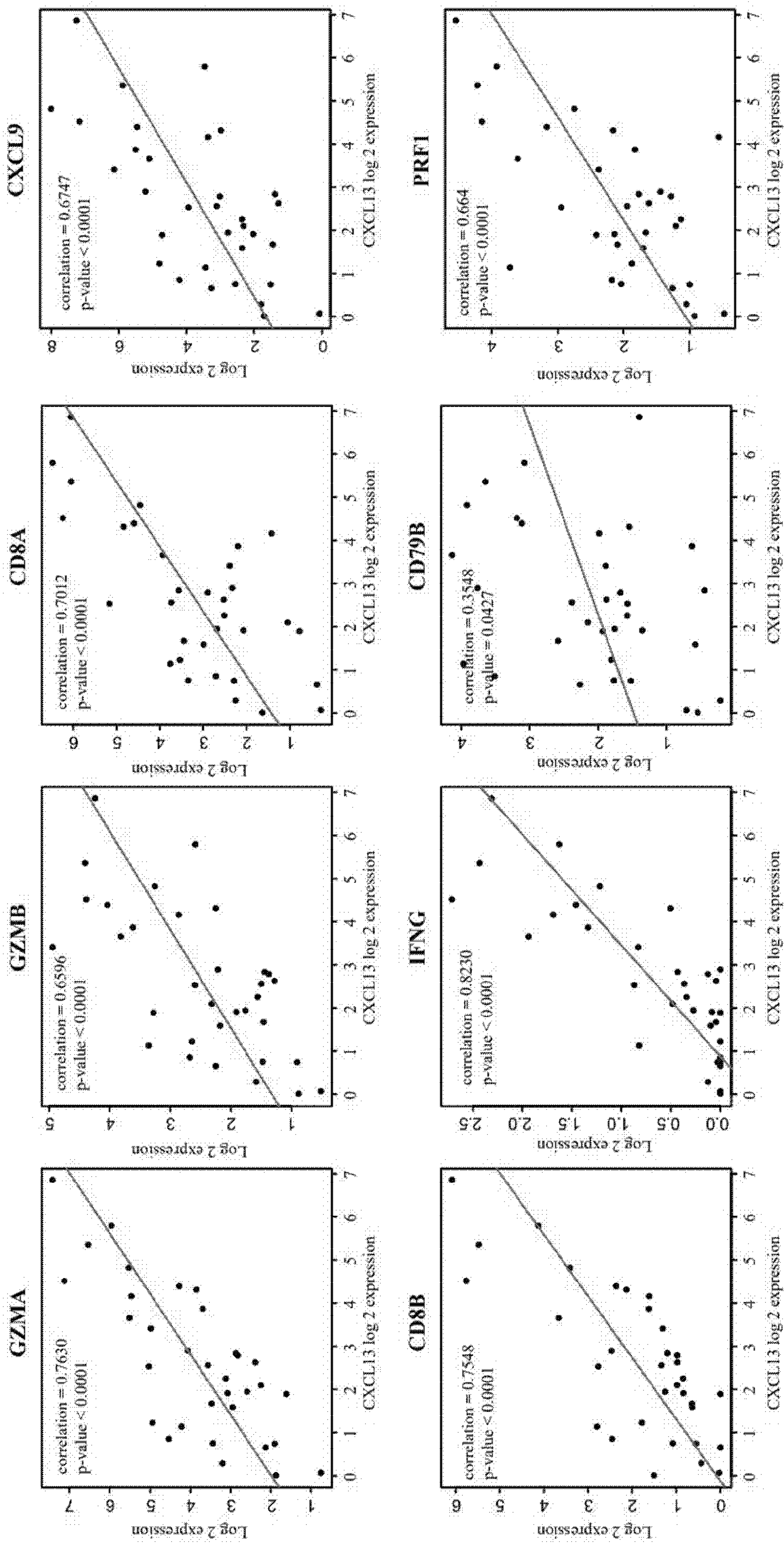
[도8]



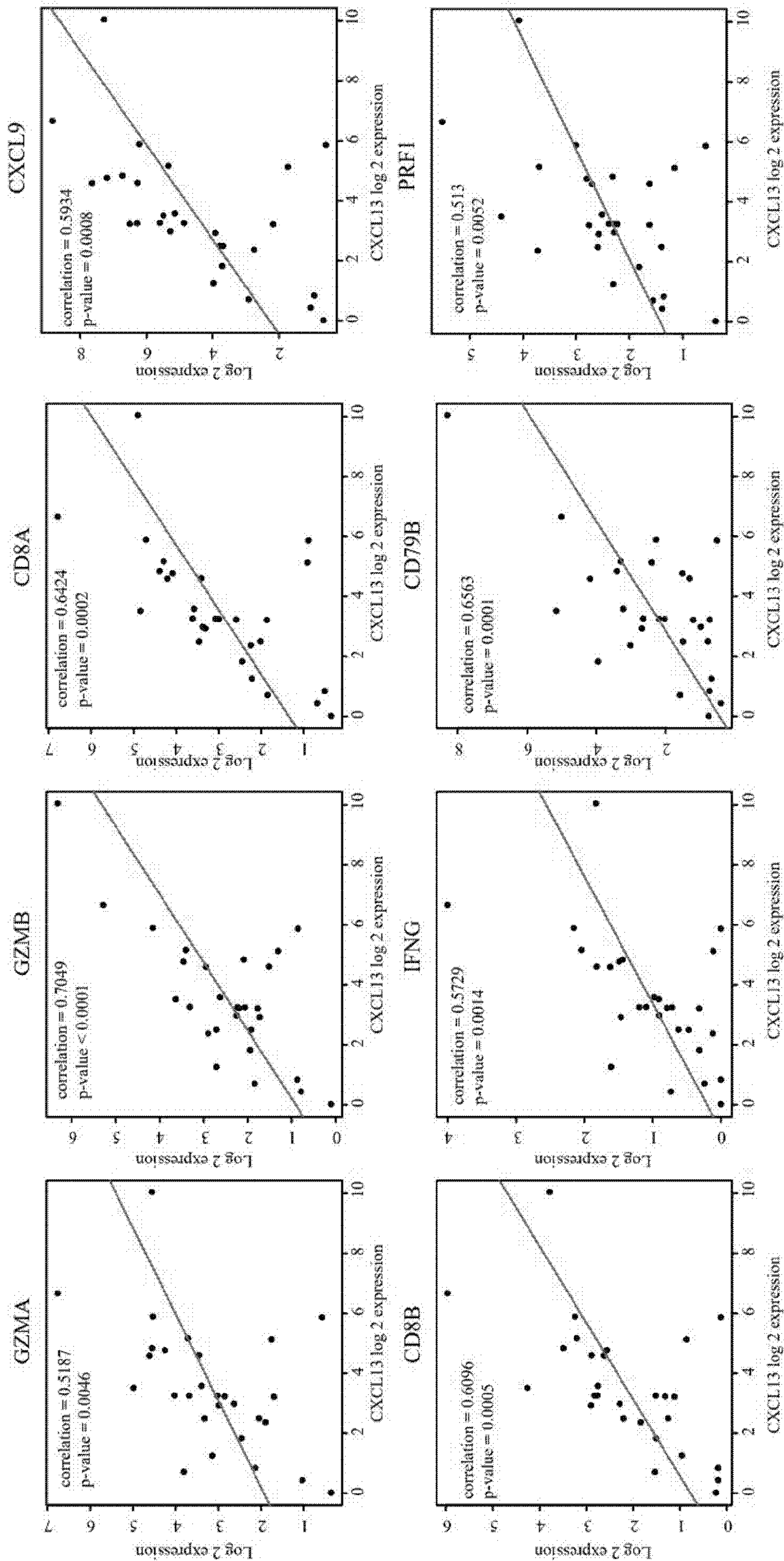
[도9]



[도10a]



[도10b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/014823

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6886(2018.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: CXCL13(C-X-C motif ligand 13), 발현(expression), 폐암(lung cancer), 면역치료 (immune therapy), PD-1, PD-L1, 반응(response), 예측(predict)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAZANIETZ, M. G. et al. CXCL13 and its receptor CXCR5 in cancer : inflammation, immune response, and beyond. Frontiers in Endocrinology. 12 July 2019, vol. 10, thesis no.: 471 (pp. 1-15). See abstract, pages 3 and 6-7, and figures 1-2.	1-17
A	KR 10-2019-0003957 A (GENENTECH, INC.) 10 January 2019 (2019-01-10) See entire document.	1-17
A	TAN, P. et al. Regulative role of the CXCL13-CXCR5 axis in the tumor microenvironment. Precision Clinical Medicine. 2018, vol. 1, no. 1, pp. 49-56. See entire document.	1-17
A	WEI, Y. et al. CXCL13 expression is prognostic and predictive for postoperative adjuvant chemotherapy benefit in patients with gastric cancer. Cancer Immunology Immunotherapy. published online : 31 October 2017, vol. 67, pp. 261-269. See entire document.	1-17
A	CN 105012952 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCE) 04 November 2015 (2015-11-04) See entire document.	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- “D” document cited by the applicant in the international application
- “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
- “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 2021

Date of mailing of the international search report

23 February 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/KR2020/014823

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
	1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/014823

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2019-0003957	A	10 January 2019	CN	109154027	A	04 January 2019
				EP	3443120	A2	20 February 2019
				JP	2019-515670	A	13 June 2019
				US	2019-038734	A1	07 February 2019
				WO	2017-181079	A2	19 October 2017
				WO	2017-181079	A3	28 December 2017
CN	105012952	A	04 November 2015	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6886(2018.01)i; G01N 33/574(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6886(2018.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: CXCL13(C-X-C motif ligand 13), 발현(expression), 폐암(lung cancer), 면역치료(immune therapy), PD-1, PD-L1, 반응(response), 예측(predict)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KAZANIETZ, M. G. 등, "CXCL13 and its receptor CXCR5 in cancer : inflammation, immune response, and beyond", Frontiers in Endocrinology, 2019.07.12, 제10권, 논문번호 : 471 (페이지 1-15) 초록, 페이지 3, 6-7, 도면 1-2	1-17
A	KR 10-2019-0003957 A (제넨테크, 인크.) 2019.01.10 전체 문헌	1-17
A	TAN, P. 등, "Regulative role of the CXCL13-CXCR5 axis in the tumor microenvironment", Precision Clinical Medicine, 2018, 제1권, 제1호, 페이지 49-56 전체 문헌	1-17
A	WEI, Y. 등, "CXCL13 expression is prognostic and predictive for postoperative adjuvant chemotherapy benefit in patients with gastric cancer", Cancer Immunology Immunotherapy, 온라인공개 : 2017.10.31, 제67권, 페이지 261-269 전체 문헌	1-17
A	CN 105012952 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCE) 2015.11.04 전체 문헌	1-17
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년02월22일(22.02.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년02월23일(23.02.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2. ☐추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0003957 A	2019/01/10	CN 109154027 A	2019/01/04
		EP 3443120 A2	2019/02/20
		JP 2019-515670 A	2019/06/13
		US 2019-038734 A1	2019/02/07
		WO 2017-181079 A2	2017/10/19
		WO 2017-181079 A3	2017/12/28
CN 105012952 A	2015/11/04	없음	