



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0060606
(43) 공개일자 2025년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0144811
(22) 출원일자 2023년10월26일
심사청구일자 2023년10월26일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
유창훈
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, 7층 중앙내과 의국
김형돈
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, 7층 중앙내과 의국
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

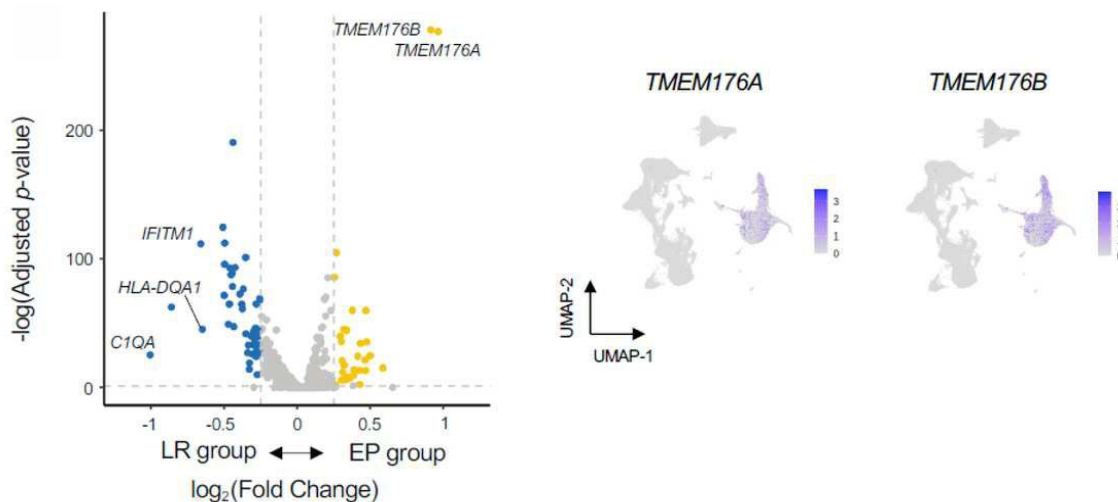
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 면역관문저해제 치료 내성 진단용, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측용, 및 면역관문저해제 치료 내성을 억제하기 위한 타겟으로서의 바이오마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 면역관문저해제 치료 내성 진단용, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측용, 및 면역관문저해제 치료 내성을 억제하기 위한 타겟으로서의 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 본 발명에서는 간세포암종 환자에서 면역관문저해제 치료 후 임상 결과에 따른 CD8⁺ T 세포 및 단핵구 반응을 확인하고, 단핵구에서의 차등 발현 유전자를 확인한 결과, TMEM176A 및 TMEM176B가 면역관문저해제 치료 내성을 가진 환자에서 높게 발현되는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명에 따른 TMEM176A 및 TMEM176B는 면역관문저해제 치료 내성을 진단하거나 면역관문저해제 치료 후 예후를 예측하기 위한 바이오마커로서, 면역관문저해제 치료에 대한 내성을 억제하기 위한 치료제 개발의 타겟으로 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도7a



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

(72) 발명자

고준영

서울특별시 서초구 남부순환로 2575, 3층

정세영

서울특별시 성북구 월계로36길 27, 104동 1202호

명세서

청구범위

청구항 1

TMEM176A 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제(immune checkpoint inhibitor, ICI) 치료 내성 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유전자는 단백질 유래인 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 면역관문저해제는 PD-1, PD-L1, PD-L2, PD-L3, PD-L4, CTLA-4, LAG3, B7-H3, B7-H4, KIR 및 TIM3으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 저해제인 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 간세포암종에 대한 면역관문저해제 치료 시 내성을 가지는 환자를 진단하기 위한 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제제는 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 이의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제제는 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자로부터 암호화되는 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물 및 설명서를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단용 키트.

청구항 8

TMEM176A 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제(immune checkpoint inhibitor, ICI) 치료 후 예후 예측용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조성물은 간세포암종 환자에서 면역관문저해제 치료 후 예후를 예측하기 위한 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측용 조성물.

청구항 10

TMEM176A 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 억제제는 상기 유전자 또는 이의 mRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 안티센스 올리고 뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임 및 PNA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이거나,

상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드인 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 약학적 조성물.

청구항 12

피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액인 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 혈액은 전혈, 혈장, 혈청, 또는 혈액 단백질인 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 피검체는 면역관문저해제 치료를 받은 간세포암종 환자인 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준이 대조군에 비해 높을 경우 면역관문저해제에 대하여 내성을 가지는 것으로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 17

피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 18

피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 19

후보물질을 투여한 피검체로부터 채취된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준이 후보물질 투여 전에 비해 감소한 경우, 상기 후보물질을 면역관문저해제 치료 내성 억제용 후보물질로 선택하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 후보물질은 뉴클레오타이드, DNA, RNA, 아미노산, 펩타이드, 단백질, 줄기세포, 줄기세포 배양액, 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물, 및 천연추출물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 후보물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 면역관문저해제 치료 내성 진단용, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측용, 및 면역관문저해제 치료 내성을 억제하기 위한 타겟으로서의 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)은 우리나라 암 발생 순위 3위인 주요 암이며, 5년 관찰 생존율 9.6 %로 예후가 매우 불량한 암이다. 간세포암종의 원인 인자로는 간염 바이러스, 아플라톡신 B1, 음주, 당뇨 등의 다양한 인자들이 알려져 있으며, 간암의 발생 과정 또한 유전체 및 후성 유전체 변이 등의 다단계 과정을 거쳐 일어나는 것으로 알려져 있다.

[0004] 1차 및 2차 글로벌 임상3상 시험에서 항PD-1 항체 단독요법은 절제 불가능한 간세포암종(HCC) 환자에서 전체 생존(OS) 효과를 제공하지 못했다. 그러나 3상 IMBrave 150 연구 및 HIMALAYA 연구에서는 1차 면역관문저해제(ICI) 기반 복합요법의 전체 생존(OS) 효과가 소라페닙(sorafenib)과 비교하여 입증되어 승인을 받았다. 최근 1차 임상3상 시험에서 VEGFR2 표적 다중 키나아제 억제제(MKI) 리보세라닙(rivoceranib)과 항PD-1 항체 캄렐리주맵(camrelizumab)의 병용요법이 소라페닙에 비해 현저히 향상된 생존 결과를 보였다. 그러나 카보잔티닙(cabozantinib)-아테졸리주맵(atezolizumab), 렌바티닙(lenvatinib)-펄브롤리주맵(pembrolizumab) 등 다른 항PD-1/PD-L1과 MKI 병용요법은 절제 불가능한 HCC에 대한 1차 임상3상 시험에서 MKI 단독요법(각각 소라페닙과 렌바티닙)에 비해 전체 생존(OS) 효과를 나타내지 못했다. 이러한 불일치의 이유는 아직 명확하지 않지만, 결과는 임상적 효능이 특히 면역관문저해제 기반 병용 치료의 맥락에서 병용 파트너의 상세한 분자 및/또는 면역학적 메커니즘의 차이에 부분적으로 좌우될 수 있음을 시사한다.

[0005] 레고라페닙은 VEGFR 1-3, KIT, RET, RAF-1, BRAF, PDGFR, FGFR 및 CSF-1R을 포함한 다양한 표적을 억제하는 항혈관신생 활성을 갖는 다중 키나아제 억제제이다. 이는 소라페닙 치료로 진행된 후 절제 불가능한 간세포암종 환자의 생존 결과를 개선하는 것으로 나타났다. 다양한 표적 중에서 VEGFR 및 CSF1R 경로를 조절하는 레고라페닙의 능력은 골수 세포의 면역억제 구배를 역전시키고 항종양 면역 반응을 강화시키는 잠재력을 강조한다. 특히, CSF1R 경로의 억제는 골수 세포를 항종양 반응을 발휘하도록 분극화할 수 있다. 골수 세포는 HCC의 면역 회피 과정과 면역관문저해제 반응에 결정적으로 연관되어 있으므로 간세포암종 환자에서 레고라페닙과 ICI를 병용하는 데에는 강력한 근거가 있다. 더욱이, 레고라페닙-니볼루맵 조합은 위암 및 대장암 환자를 대상으로 한 임상1b상 시험에서 유망한 효능과 안전성 결과를 보여주었다. CheckMate459 연구에서 니볼루맵 단독요법은 소라페닙에 비해 생존율 향상 추세와 관련이 있었지만, 절제 불가능한 간세포암종 환자의 생존율 향상에 대해 통계적 유의성을 충족시키지는 못했다. 레고라페닙의 항종양 활성 및 잠재적인 면역조절 효과는 레고라페닙과 니볼루맵의 병용요법이 HCC 환자에게 임상적으로 의미있는 효과를 가질 수 있음을 시사한다.

[0006] 한편, 일부 바이오마커가 면역관문저해제로 치료된 간세포암종 환자의 임상 결과와 관련이 있는 것으로 알려졌지만, 면역관문저해제 반응을 예측하는 바이오마커로 사용될 수 있음을 입증한 연구는 아직 알려지지 않았다. 이에, 면역관문저해제 기반 치료에 대한 반응 또는 내성의 상세한 메커니즘에 대하여 추가 조사가 필요한 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 간세포암종 환자에서 면역관문저해제 치료 후 임상 결과에 따른 CD8⁺ T 세포 및 단핵구 반응을 확인하고, 단핵구에서의 차등 발현 유전자를 확인하여, 면역관문저해제 치료 내성을 진단하거나 면역관문저해제 치료 후 예후를 예측할 수 있는 바이오마커로서 활용하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2138171호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 면역관문저해제로 치료받은 간세포암종 환자로부터 연속적으로 수집된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 이용하여 순환 종양 DNA(ctDNA), 단일 세포 RNA 시퀀싱(scRNA-seq), 단일 세포 T세포 레퍼토리(TCR) 및 다색 유세포 분석법을 통해 임상 결과에 따른 CD8⁺ T 세포 및 단핵구 반응을 확인하고, 단핵구에서의 차등 발현 유전자를 확인한 결과 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*가 면역관문저해제 치료 내성을 가진 환자에서 높게 발현되는 것을 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 이에, 본 발명의 목적은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제(immune checkpoint inhibitor, ICI) 치료 내성 진단용 또는 면역관문저해제 치료 후 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 면역관문저해제 치료 내성 진단용 조성물을 포함하는 면역관문저해제 치료 내성 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단을 위한 정보제공방법, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법, 또는 면역관문저해제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 후보물질을 투여한 피검체로부터 채취된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 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

- [0019] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제(immune checkpoint inhibitor, ICI) 치료 내성 진단용 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 유전자는 단핵구 유래인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 면역관문저해제는 PD-1, PD-L1, PD-L2, PD-L3, PD-L4, CTLA-4, LAG3, B7-H3, B7-H4, KIR 및 TIM3으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 저해제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 간세포암종에 대한 면역관문저해제 치료 시 내성을 가지는 환자를 진단하기 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 체제는 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 이의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 체제는 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자로부터 암호화되는 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0025] 또한, 본 발명은 상기 조성물 및 설명서를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단용 키트를 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제(immune checkpoint inhibitor, ICI) 치료 후 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 간세포암종 환자에서 면역관문저해제 치료 후 예후를 예측하기 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 억제제는 상기 유전자 또는 이의 mRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 안티센스 올리고 뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임 및 PNA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이거나,
- [0030] 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 생물학적 시료는 혈액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 혈액은 전혈, 혈장, 혈청, 또는 혈액 단백질을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 피검체는 면역관문저해제 치료를 받은 간세포암종 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 진단을 위한 정보제공방법은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준이 대조군에 비해 높은 경우 면역관문저해제에 대하여 내성을 가지는 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 후보물질을 투여한 피검체로부터 채취된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 스크리닝 방법은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준이 후보물질 투여 전에 비해 감소한 경우, 상기 후보물질을 면역관문저해제 치료 내성 억제용 후보물질로 선택하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 후보물질은 뉴클레오타이드, DNA, RNA, 아미노산, 펩타이드, 단백질, 줄기세포, 줄기세포 배양액, 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물, 및 천연추출물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역관문저해제 치료 내성 진단 용도를 제공한다.

- [0042] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 면역관문저해제 치료 내성 진단용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0043] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역관문저해제 치료 후 예후 예측 용도를 제공한다.
- [0044] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0045] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 억제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역관문저해제 치료 내성 억제 용도를 제공한다.
- [0046] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 억제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0047] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 억제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0049] 본 발명에서는 간세포암종 환자에서 면역관문저해제 치료 후 임상 결과에 따른 $CD8^+$ T 세포 및 단핵구 반응을 확인하고, 단핵구에서의 차등 발현 유전자를 확인한 결과, *TMEM176A* 및 *TMEM176B*가 면역관문저해제 치료 내성을 가진 환자에서 높게 발현되는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명에 따른 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*는 면역관문저해제 치료 내성을 진단하거나 면역관문저해제 치료 후 예후를 예측하기 위한 바이오마커로서, 면역관문저해제 치료에 대한 내성을 억제하기 위한 치료제 개발의 타겟으로 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1a는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 고형 종양의 반응 평가 기준(RECIST) v1.1에 의해 평가된 객관적 반응을 나타낸 것으로서, 표적 병변의 직경 합계의 변화를 폭포수 플롯(왼쪽) 및 스파이더 플롯(오른쪽)으로 나타낸 도면이다.
- 도 1b는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 무진행 생존률(PFS) 및 전체 생존률(OS)을 나타낸 도면이다.
- 도 2a 내지 2c는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 ctDNA 분석을 수행한 결과를 나타낸 것으로서, 도 2a는 Guardant360 CDx를 사용하여 감지된 유전자 변형을 히트맵으로 나타낸 도면이고, 도 2b는 Wnt/ β -카테닌 경로에 관여하는 유전자 변형의 존재에 따른 PFS 및 OS를 나타낸 도면이고, 도 2c는 PI3K/mTOR 경로에 관여하는 유전자 변형의 존재에 따른 PFS 및 OS를 나타낸 도면이다.
- 도 3a는 본 발명의 일 구현예에 따른 초기 면역 역학 분석 방법을 도식화하여 나타낸 도면이다.
- 도 3b는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 전체 PBMC의 차등 발현 유전자(DEG)를 확인한 결과를 나타낸 것으로서, 볼케이노 플롯(왼쪽) 및 유전자 온톨로지 생물학적 경로(오른쪽)를 나타낸 도면이다.
- 도 3c는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 면역세포 유형에 따른 PBMC의 UMAP(uniform manifold approximation and projection) 결과를 나타낸 도면이다.

도 3d는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 PBMC의 면역세포 유형의 비율을 박스 플롯, 볼케이노 플롯, 및 막대 그래프로 나타낸 도면이다.

도 3e는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 C1D1과 C1D15 사이의 각 세포 유형의 피어슨 상관 계수를 나타낸 도면이다.

도 4a는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 $CD8^+$ T 세포의 차등 발현 유전자(DEG)를 확인한 결과를 나타낸 것으로서, 볼케이노 플롯(왼쪽) 및 유전자 온톨로지 생물학적 경로(오른쪽)를 나타낸 도면이다.

도 4b는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 $CD8^+$ T 세포의 수용체(T cell receptor, TCR) 클론의 다양성을 역 심슨 지수로 나타낸 도면이다.

도 4c는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 면역세포 유형에 따른 NK/T 세포의 UMAP 결과를 나타낸 도면이다.

도 4d는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 증식 림프구의 UMAP 결과(왼쪽) 및 증식 림프구의 하위 클러스터에서 마커 유전자의 평균 정규화된 발현을 나타내는 도트 플롯 결과(오른쪽)를 나타낸 도면이다.

도 4e는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 $CD8^+$ T 세포 하위 클러스터에서 마커 유전자의 평균 정규화된 발현을 나타내는 도트 플롯 결과를 나타낸 도면이다.

도 4f는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 $CD8^+$ T 세포 하위 클러스터의 비율을 박스 플롯 및 볼케이노 플롯으로 나타낸 도면이다.

도 4g는 본 발명의 일 구현예에 따른 니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 각 $CD8^+$ T 세포 하위 클러스터에서의 염증 특징(상단) 및 니볼루맙 반응성(하단)과 관련된 유전자 세트에 대한 모듈 점수를 나타내는 바이올린 플롯 결과를 나타낸 도면이다.

도 4h는 본 발명의 일 구현예에 따른 니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 총 $CD8^+$ T 세포 및 하위 클러스터 중 $CD8^+$ T 대리 마커 유전자를 히트맵으로 나타낸 도면이다.

도 4i는 본 발명의 일 구현예에 따른 니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 니볼루맙 반응에 대한 $MKI67^+$ 증식 $CD8^+$ T 세포의 차등 발현 유전자를 히트맵으로 나타낸 도면이다.

도 4j 및 4k는 본 발명의 일 구현예에 따른 니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 각각 $CD8^+$ T 세포 및 $PD-1^+ CD8^+$ T 세포 중 $KI-67^+$ 증식 세포(도 4j) 및 세포 독성 과립(granzyme B/perforin⁺)을 보유하는 세포(도 4k)의 비율을 유세포 분석으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5a는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 총 단핵구의 차등 발현 유전자를 확인한 결과를 나타낸 것으로서, 볼케이노 플롯(왼쪽) 및 유전자 온톨로지 생물학적 경로(오른쪽)를 나타낸 도면이다.

도 5b는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 각 단핵구 클러스터에 대한 차등 발현 유전자를 히트맵으로 나타낸 도면이다.

도 5c는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 단핵구 하위 집단 내 단핵구 집단의 상대적 풍부도를 박스 플롯으로 나타낸 도면이다.

도 5d는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 차별화된 의사시간 정렬 분석을 수행한 결과를 UMAP으로 나타낸 도면이다.

도 5e는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 총 단핵구 중 M1 또는 M2 편향 단핵구의 비율을 나타낸 도면이다.

도 5f는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자에서 활성화된 고전적 단핵구₂ 하위 집합 내의 M1 유사 유전자 세트에 대한 모듈 점수를 나타낸 도면이다.

도 5g는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자에서 M2 편향 비고전적 단핵구의 종양 관련 대식세포(TAM) 관련 유전자 세트에 대한 모듈 점수를 나타낸 도면이다.

도 5h는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자에서 고전적 단핵구와 비고전적 단핵구의 비율 및 총 단핵구 중 고전적($CD14^{+}CD16^{-}$), 중간($CD14^{+}CD16^{+}$) 및 비고전적($CD14^{dim}CD16^{+}$) 단핵구의 비율을 나타낸 도면이다.

도 5i는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자의 각 단핵구 클러스터에서 레고라페닙에 의해 상향 조절되는 유전자 세트에 대한 모듈 점수를 바이올린 플롯으로 나타낸 도면이다.

도 5j는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자의 각 단핵구 클러스터에서 CSF1R의 녹아웃 시 상향 조절되는 유전자 세트에 대한 모듈 점수를 바이올린 플롯으로 나타낸 도면이다.

도 6a는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자 중 장기 반응자와 초기 진행자 사이의 $MK167^{+}$ 이펙터 $CD8^{+}$ T 세포와 단핵구 하위 클러스터 간의 세포-세포 커뮤니케이션을 시각화하기 위한 코드 다이어그램을 나타낸 도면이다.

도 6b는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자 중 장기 반응자와 초기 진행자 사이의 IFN-II 신호 전달 경로 네트워크에서 세포 그룹과 잠재 패턴의 연관성을 도트 플롯으로 나타낸 도면이다.

도 7a는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자 중 C1D15에 대한 초기 진행자와 장기 반응자 사이의 고전적 단핵구의 차등 발현 유전자를 볼케이노 플롯 및 UMAP으로 나타낸 도면이다.

도 7b는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자 중 장기 반응자 및 초기 진행자에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B* 유전자의 평균 발현을 바이올린 플롯으로 나타낸 도면이다.

도 7c는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자에서 염증 조절 복합체 관련 유전자(*NLRP3* 및 *IL18*)의 발현 변화를 나타낸 도면이다.

도 7d는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자의 전체 단핵구에서 *NLRP3* 염증 조절 복합체 신호 전달 경로와 관련된 유전자 세트에 대한 모듈 점수를 나타낸 도면이다.

도 7e는 본 발명의 일 구현예에 따른 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자 중 장기 반응자 및 초기 진행자에서 C1D1과 C1D15 사이의 IL1RA의 혈청 수준을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 본 발명의 일 실험예에서는 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자의 임상 결과를 확인하였다(실험예 1 참조).
- [0053] 본 발명의 다른 실험예에서는 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자에서 ctDNA 분석을 수행한 결과, PI3K/mTOR 경로에 관여하는 유전자의 변형이 있는 환자에서 유리한 전체 생존 경향을 보였다(실험예 2 참조).
- [0054] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자에서 전체 PBMC의 차등 발현 유전자(DEG)를 분석한 결과, 장기 반응자에서 강력한 면역 활성화 신호와 관련된 유전자가 상향조절된 것을 확인하고, 고전적 단핵구 집단의 정량적 및 정성적 변화가 레고라페닙-니볼루맵 치료의 효능과 연관될 수 있음을 확인하였다(실험예 3 참조).
- [0055] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자 중 장기 반응자에서 TCR 레퍼토리의 다양화 및 면역관문저해제 반응성 및 세포 독성과 관련된 신호가 풍부한 증식 $CD8^{+}$ T 세포의 상대적 풍부도가 현저히 증가하였음을 확인하였다(실험예 4 참조).
- [0056] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 레고라페닙-니볼루맵으로 치료받은 간세포암종 환자 중 장기 반응자에서 총 단

핵구 중 M1 분지 세포(활성화된 고전적 단핵구_1 방향)의 비율이 증가하는 것을 확인하였다(실험예 5 참조).

[0057] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 구별되는 임상 결과에 따라 레고라페닙-니볼루맙 치료에 대해 서로 다른 CD8⁺ T 세포 및 단핵구 반응이 나타남을 확인하였다(실험예 6 참조).

[0058] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 레고라페닙-니볼루맙으로 치료받은 간세포암종 환자에서 C1D15에 대한 초기 진행자와 장기 반응자 사이의 고전적 단핵구의 DEG를 조사한 결과, *TMEM176A* 및 *TMEM176B*가 초기 진행자에서 상향 조절된 유전자임을 확인하였다. 또한, 염증 조절 복합체 반응과 관련된 유전자의 발현 수준을 확인함으로써 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*의 상향조절에 의해 염증 조절 복합체 반응이 억제될 수 있음을 확인하였다(실험예 7 참조).

[0060] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0062] 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제(immune checkpoint inhibitor, ICI) 치료 내성 진단용 조성물을 제공한다.

[0063] 본 발명에 있어서, 상기 유전자는 단핵구 유래인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0064] 본 발명에 있어서, 상기 “단핵구(monocyte)”는 혈액 내에 존재하는 식세포의 일종으로 수지상 세포(dendritic cell, DC) 또는 대식세포(macrophage)로 분화할 수 있는 골수(bone marrow) 유래의 미분화 전구체 세포이다. 통상 혈액 내 1 % 미만을 차지하는 백혈구의 가장 큰 유형이며, 척추 동물의 선천 면역을 담당하면서도, 후천 면역 과정에도 영향을 끼친다.

[0065] 본 발명에 있어서, 상기 “면역관문저해제(immune checkpoint inhibitor, ICI)”는 암 면역 요법의 한 형태로 T 세포와 같은 일부 면역세포 및 암세포에서 발현되는 면역관문(immune checkpoint)이라고 하는 단백질을 차단하는 약물 유형이다. 본 발명에 있어서, 상기 면역관문저해제는 예컨대, PD-1, PD-L1, PD-L2, PD-L3, PD-L4, CTLA-4, LAG3, B7-H3, B7-H4, KIR 및 TIM3으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 저해제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 PD-1 저해제에는 니볼루맙(nivolumab), 펌브롤리주맙(Pembrolizumab), 또는 스파르탈리주맙(Spartalizumab) 등이 포함되고, PD-L1 저해제에는 아테졸리주맙(atezolizumab) 등이 포함되며, CTLA-4 저해제에는 이필리무맙(ipilimumab) 등이 포함될 수 있다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 면역관문저해제는 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor, TKI)와 병용 치료되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 티로신 키나아제 억제제는 레고라페닙(regorafenib), 소라페닙(sorafenib), 렌바티닙(lenvatinib), 이메티닙(imatinib), 게피티닙(gefitinib), 또는 트라스투주맙(trastuzumab) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 이에, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제 및 티로신 키나아제 억제제 병용 치료에 대한 내성 진단용 조성물을 제공할 수 있다.

[0068] 본 발명에 있어서, 상기 *TMEM176A*는 인간 유래 유전자일 수 있으며, *TMEM176A*(Transmembrane protein 176A) 단백질을 암호화할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 *TMEM176A*는 NCBI Reference Sequence: NM_018487.3의 염기 서열과 70 % 이상, 75 % 이상, 80 % 이상, 85 % 이상, 90 % 이상, 95 % 이상, 98 % 이상, 70 내지 100 %, 75 내지 100 %, 80 내지 100 %, 85 내지 100 %, 90 내지 100 %, 95 내지 100 %, 98 내지 100 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 또는 100 %의 서열 상동성을 가지는 염기서열로 이루어지거나 이를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0069] 본 발명에 있어서, 상기 *TMEM176A* 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_060957.2의 아미노산 서열과 70 % 이상, 75 % 이상, 80 % 이상, 85 % 이상, 90 % 이상, 95 % 이상, 98 % 이상, 70 내지 100 %, 75 내지 100 %, 80 내지 100 %, 85 내지 100 %, 90 내지 100 %, 95 내지 100 %, 98 내지 100 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 또는 100 %의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 *TMEM176B*는 인간 유래 유전자일 수 있으며, *TMEM176B*(Transmembrane protein 176B) 단백질의 암호화할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 *TMEM176B*는 NCBI Reference Sequence: NM_001101311.1의 염기서열과 70 % 이상, 75 % 이상, 80 % 이상, 85 % 이상, 90 % 이상, 95 % 이상, 98 % 이상, 70 내지 100 %, 75 내지 100 %, 80 내지 100 %, 85 내지 100 %, 90 내지 100 %, 95 내지 100 %, 98 내지 100 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 또는 100 %의 서열 상동성을 가지는 염기서열로 이루어지거나 이를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 *TMEM176B* 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_001094781.1의 아미노산 서열과 70 % 이상, 75 % 이상, 80 % 이상, 85 % 이상, 90 % 이상, 95 % 이상, 98 % 이상, 70 내지 100 %, 75 내지 100 %, 80 내지 100 %, 85 내지 100 %, 90 내지 100 %, 95 내지 100 %, 98 내지 100 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 또는 100 %의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 “내성”은 약물을 정량 반복적으로 사용했을 때 해당 약물의 효과가 감소하는 것을 말하며, 약물 내성이 있는 환자에게 이전에 경험한 동일한 효과를 얻기 위해서는 그 사용량을 늘리거나 사용 빈도를 증가시켜야 하거나 혹은 이전과 같은 용량의 물질을 투여해도 전과 똑같은 효과를 얻지 못하는 상태를 말한다.
- [0073] 본 발명에 있어서, “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 면역관문저해제 치료 내성 여부를 확인하는 것이나 이에 제한되지 않고, 내성의 정도를 확인하는 것도 모두 포함한다.
- [0074] 본 발명에 있어서, “측정”이란 목적하는 물질의 존재(발현) 여부를 검출 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 검출 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 상기 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 존재 여부 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다.
- [0075] 본 발명에 있어서, “발현(expression)”은 폴리펩티드(polypeptide)가 구조 유전자로부터 생산되는 과정을 지칭한다. 상기 과정은 유전자의 mRNA로의 전사, 및 이러한 mRNA의 폴리펩티드(들)로의 해독을 포함한다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 간세포암종에 대한 면역관문저해제 치료 시 내성을 가지는 환자를 진단하기 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 본 발명에 있어서, 상기 “간세포암종”은 간세포에서 시작되는 암으로서, 원발성 간암의 90 % 이상을 차지하는 고형암으로, 재발이 흔하고, 동반될 수 있는 간경변증과 같은 만성 간질환으로 인하여 전체적으로 생존율이 1년을 넘지 못하는, 예후가 불량한 암종으로 잘 알려져 있다.
- [0078] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 이의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 본 발명에 있어서, “프라이머(primer)”는 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오티드(single strand oligonucleotide)이다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)와 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오티드에 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 유전자 또는 mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 따라서 본 발명에서 상기 유전자, mRNA 또는 이의 cDNA의 염기서열을 참조하여 프라이머 쌍을 용이하게 디자인할 수 있다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 유전자 또는 mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다.
- [0080] 본 발명에 있어서, “프로브(probe)”는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA), DNA, miRNA 등에 특이적으로 결합할 수 있는 짧은 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오티드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 유전자, 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 기관에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다.

[0081] 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.

[0082] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 또는 프로브는 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 이의 mRNA 발현을 측정할 수 있는 것이라면 특정 서열로 한정되지 않는다.

[0083] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자로부터 암호화되는 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0084] 본 발명에 있어서, “항체(antibody)”는 항원성 부위에 대해서 지시되어 특이적으로 결합하는 단백질 분자를 의미한다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법, 재조합 DNA 방법, 또는 파아지 항체 라이브러리 방법 등에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항체의 단편은 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 또는 낙타 등을 포함한, 상이한 유기체에서 유래될 수 있으며, 예컨대 단클론 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성인 단편, 항체 중쇄, 인간화 항체, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 Fv 분자, 또는 키메릭 항체 등일 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 항체는 본 발명의 단백질을 검출할 수 있는 것이라면 특정 항체의 종류로 한정되지 않는다.

[0085] 본 발명에 있어서, “앵타머(aptamer)”란 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)을 의미하며, SELEX(Systematic Evolution of Ligands of Exponential enrichment)라는 방법으로 원하는 다양한 목적 물질(단백질, 당, 염색물질, DNA, 금속이온, 세포 등)에 대한 앵타머를 개발할 수 있다.

[0087] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제(immune checkpoint inhibitor, ICI) 치료 후 예후 예측용 조성물 또는 면역관문저해제 치료 반응성 예측용 조성물을 제공한다.

[0088] 본 발명에 있어서, “예후 예측”은 면역관문저해제 치료 후 앞으로의 암의 결과나 경과를 예측하는 것으로서, 암의 전이, 재발 또는 전이성 재발의 확률 등을 상기 유전자, mRNA, 또는 단백질 발현 수준을 통해 예측하는 것을 의미한다.

[0089] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 간세포암종 환자에서 면역관문저해제 치료 후 예후를 예측하기 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0091] 또한, 본 발명은 상기 면역관문저해제 치료 내성 진단용 조성물 또는 면역관문저해제 치료 후 예후 예측용 조성물을 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단용 키트 또는 면역관문저해제 치료 후 예후 예측용 키트를 제공하며, 상기 키트는 본 발명에 따른 면역관문저해제 치료 내성 진단 또는 면역관문저해제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법을 교시하는 설명서를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0092] 본 발명에 있어서, “키트”는 상기 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현을 측정하는 제제를 포함함으로써, 면역관문저해제 치료 내성을 진단 또는 면역관문저해제 치료 후 예후를 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. 이때, 상기 유전자, mRNA, 또는 단백질의 발현을 검출하는 물질은 1회 이상 횟수에 제한 없이 작용시킬 수 있으며, 각 물질을 적용하는 선후에는 제한이 없고, 각

물질의 적용은 동시에 진행될 수도 있고 미시에 진행될 수도 있다.

- [0093] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 컨테이너; 지시서(설명서); 및 상기 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현을 측정하는 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.
- [0095] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0096] 본 발명에 있어서, 상기 억제제는 상기 유전자 또는 이의 mRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임 및 PNA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이거나,
- [0097] 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0098] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0099] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 실하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방갑셀제, 장용갑셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타폴라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [0100] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0101] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0102] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀라, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트린, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 젤화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린,

스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동 파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, d1-로이신, 경질무수규산 등의 활택제가 사용될 수 있다.

[0103] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 물은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에칠렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0104] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0105] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0106] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0107] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스틴산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정팅산아미드, 헥사민, 디메틸아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비설파이드 0.1%, 소듐포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비설파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠티나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0108] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위템솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스펀, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 테고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0109] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0110] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

- [0111] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0112] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0113] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0114] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0116] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 진단을 위한 정보제공방법 또는 면역관문저해제 치료 내성 진단 방법을 제공한다.
- [0117] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법 또는 면역관문저해제 치료 후 예후 예측 방법을 제공한다.
- [0118] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법 또는 면역관문저해제 치료 반응성 예측 방법을 제공한다.
- [0119] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 체내의 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 유무 또는 발현 수준을 확인할 수 있는 모든 시료를 의미하며, 바람직하게는 생체검사에서 얻어지는 모든 시료, 혈액, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 복막액, 머리카락, 비강액, 소변, 대변 등일 수 있고, 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 생물학적 시료는 혈액일 수 있으나, *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질을 포함하고 있는 시료라면 이에 제한되지 않는다.
- [0120] 본 발명에 있어서, 상기 혈액은 전혈, 혈장, 혈청, 또는 혈액 단핵구일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 혈액 단핵구일 수 있고, 구체적으로 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0121] 본 발명에 있어서, 상기 피검체는 인간 또는 비-인간인 영장류, 마우스(mouse), 래트(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 포함할 수 있으며, 면역관문저해제 치료 내성을 진단하고자 하는 환자를 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 피검체는 면역관문저해제 치료를 받은 간세포암종 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0122] 본 발명에 있어서, 상기 면역관문저해제 치료 내성 진단을 위한 정보제공방법은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준이 대조군에 비해 높을 경우 면역관문저해제에 대하여 내성을 가지는 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0123] 본 발명에 있어서, 상기 면역관문저해제 치료 후 예후 예측 또는 면역관문저해제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준이 대조군에 비해 높을 경우, 면역관문저해제 치료 후 예후가 좋지 않을 것으

로 예측하거나 면역관문억제제 치료에 대한 반응성이 낮을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0124] 본 발명에 있어서, 상기 대조군은 정상인 또는 면역관문저해제를 치료받은 후 내성이 없거나 치료 반응성이 높게 나타난 간세포암종 환자를 모두 포함하는 의미일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0125] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 또는 mRNA 발현 수준은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR, quantitative PCR, quantitative real-time PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0126] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 발현 수준은 질량 분석법, 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunoassay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 방사선면역분석법, 방사능면역분석, 방사면역확산법, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역형광염색, 면역친화성정제, 방사능면역침전, 면역침전분석, 보체고정분석, 유세포 분석법(FACS) 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0128] 또한, 본 발명은 후보물질을 투여한 피검체로부터 채취된 생물학적 시료에서 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0129] 본 발명에 있어서, 상기 스크리닝 방법은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준이 후보물질 투여 전에 비해 감소한 경우, 상기 후보물질을 면역관문저해제 치료 내성 억제용 후보물질로 선택하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0130] 본 발명에 있어서, “후보물질”은 면역관문저해제 치료를 받은 간세포암종 환자에서의 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 여부 또는 발현 정도를 확인하기 위하여 스크리닝에 사용되는 미지의 물질을 의미하며, 예컨대 뉴클레오타이드, DNA, RNA, 아미노산, 펩타이드, 단백질, 화합물, 천연물, 및 천연추출물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0132] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역관문저해제 치료 내성 진단 용도를 제공한다.
- [0133] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 면역관문저해제 치료 내성 진단용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0134] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역관문저해제 치료 후 예후 예측 용도를 제공한다.
- [0135] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0136] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 억제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역관문저해제 치료 내성 억제 용도를 제공한다.
- [0137] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이

로부터 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 억제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 면역관문저해제 치료 내성 억제용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

[0138] 또한, 본 발명은 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 억제제; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역관문저해제 치료 내성 억제 방법을 제공한다.

[0139] 또한, 본 발명은 면역관문저해제에 대하여 내성을 가지는 것으로 의심되는 피검체 또는 면역관문저해제 치료 후 예후가 좋지 않거나 면역관문억제제 치료에 대한 반응성이 낮은 것으로 의심되는 피검체와 대조군에서 분리된 생물학적 시료에서 상기 유전자, 이의 mRNA, 또는 이로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정 후, 이 수준 차이가 (2배 이상으로) 증가한 경우 면역관문저해제에 대하여 내성을 가지는 피검체, 면역관문저해제 치료 후 예후가 좋지 않거나 면역관문저해제 치료에 대한 반응성이 낮은 피검체를 가리키는 것으로 보는, 면역관문저해제 치료 내성, 면역관문저해제 치료 후 예후 예측, 또는 면역관문저해제 치료에 대한 반응성 예측에 대한 감수성이 높은 피검체인지 결정/분석하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0140] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0141] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0142] 본 발명에서 “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0143] 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.

[0145] 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. 연구 설계 및 치료

[0149] RENOBATE는 국내 3개의 위탁 기관(서울아산병원, 삼성서울병원, 및 분당차병원)에서 진행된 오픈 라벨, 다기관, 단일군 2상 임상시험이다. 주요 포함 기준에는 미국 간 질환 연구 협회 기준에 따른 HCC 진단; 간암 화학색전술(transarterial chemoembolization, TACE)-실행 불가능하거나 난치성 바르셀로나 임상 간암(Barcelona Clinic Liver Cancer) 병기 B기 또는 C기; 이전에 전신 화학 요법을 받은 적이 없는 경우; 연령 $\geq$ 19세; 미 동부 종양학 협력 그룹(eastern cooperative oncology group, ECOG) 성과 상태 0 또는 1; Child-Pugh 클래스 A; 및 고형 종양의 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST) v1.1에 따라 적어도 하나의 측정 가능한 병변이 포함되었다. 모든 환자는 등록 전에 서면 동의서를 제공했으며 해당 시험은 ClinicalTrials.gov에 NCT04310709로 등록되었다. 프로토콜은 각 참여 센터의 임상시험심사위원회의 승인을 받았다. 레고라페닙(regorafenib) 및 니볼루맙(nivolumab)은 각각 Bayer와 Ono Pharmaceuticals에서 공급받았다.

[0150] 위암 및 대장암 환자를 대상으로 한 레고라페닙-니볼루맙의 이전 1b상 시험 결과를 토대로, 시험 대상 환자는 1일차에 니볼루맙 480 mg 및 1~21일차에는 레고라페닙 80 mg을 1일 1회 투여받았고, 이를 매 4주마다 투여받았다. RECIST v1.1에 따라 반응을 매 8주마다 평가하였으며, 진행성 질환이 임상적으로 나타날 때마다 추가 영상 촬영을 진행하였다. 안전 프로파일(safety profile)은 주기 1의 1일과 15일, 그리고 모든 후속 주기의 1일에 평가하였다.

[0151] RECIST v1.1에 따르면 일차 평가변수(endpoint)는 객관적 반응률(objective response rate, ORR)이었으며, 2차 평가변수에는 미국 국립 암연구소(National Cancer Institute, NCI)에서 이상사례의 정도를 평가하는 기준(Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE) v5.0., 변형된 RECIST, 무진행 생존(progression-free survival, PFS) 및 전체 생존(overall survival, OS)에 따른 안전 프로파일 포함되었다. 소라페닙

(sorafenib)의 7 %(P0)에 비해 레고라페닙-니볼루맵은 ORR을 25 %(P1)로 향상시킬 수 있다는 가정에 기초하여, 본 발명은 양면 알파가 0.05이고 검정력이 90 %인 Fleming의 단일 단계 2상 설계에 따라 35명의 환자를 포함해야 했다. 15 %의 추적 손실률을 예상하여, 본 발명에서는 총 42명의 환자가 포함되었다.

[0153] 실시예 2. 샘플 처리

[0154] 말초 혈액 샘플은 기준선(cycle 1, day 1; C1D1) 및 치료 중(C1D15, C2D1 및 C3D1)에 수집하였고, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 표준 Histopaque(GE Healthcare, Uppsala) 밀도 구배 원심분리를 사용하여 전혈로부터 분리하였다.

[0156] 실시예 3. 순환 종양 DNA 분석

[0157] 순환 종양 DNA(ctDNA) 분석은 Guardant360 CDx 플랫폼(Guardant Health, Redwood City, CA, 미국)을 사용하여 수행하였다. 돌연변이 상태는 실험실 표준 운영 절차, GCLP 지침, 및 제조업체 프로토콜에 따라 평가하였다. 또한, 직교 조직 및 혈장 기반 방법론을 이용하여 혈장 기반 종합 암 유전자형 분석을 사용하였다.

[0159] 실시예 4. scRNA-seq 데이터의 전처리 및 초기 클러스터링

[0160] Chromium Next GEM Single Cell 5' Reagent Kits v2(Dual Index, 10X Genomics)를 사용하여 크롬 단일 세포 라이브러리를 구축하였다. 2 x 150-bp, 20,000개의 페어드-엔드(paired-end) 리드/캡처된 세포로 NovaSeq 6000(Illumina)을 사용하여 시퀀싱을 수행하였다. 시퀀싱된 데이터는 mkfastq 기능(Cell Ranger, 10X Genomics, v3.0.1)을 사용하여 역다중화되어 fastq 파일을 생성하였다. 다음으로, 유전자 발현의 역다중화된 fastq 파일을 참조 인간 게놈(GRCh38; 10X Cell Ranger reference GRCh38 v3.0.0)에 정렬하였다. RNA 발현의 특징-바코드 매트릭스는 Seurat R 패키지(Seurat, v4.1.1)를 사용하여 분석하였다. 기본적인 품질 관리를 위해, 샘플 ID를 디콘볼루팅(deconvolute)하고, demuxlet 패키지를 사용하여 개체간 다중선을 필터링하였다. 그런 다음 전체 유전자 발현의 5 % 초과 또는 4,500개 초과 유전자에서 미토콘드리아 유전자를 발현하는 저품질 세포를 필터링하였다. 또한 demuxlet 패키지를 통해 주석이 달린 이중선으로 처음에 클러스터링된 이중선도 제외하였다.

[0161] 다음으로, FindIntegrationAnchors 함수를 사용하여 배치 효과가 수정 변형된 "통합" 데이터 매트릭스를 구성하였다. 변형된 "통합" 데이터 매트릭스의 차원 축소를 위해 주성분 분석(PCA; RunPCA 함수)을 수행하였다. 그런 다음, 공유된 최근접 이웃(shared nearest neighbor, SNN) 그래프(FindNeighbors 함수, 상위 50개 주요 구성 요소(principal components, PC) 사용; FindClusters 함수, 해상도 = 0.2)에 따라 세포는 비감독 클러스터링(unsupervised clustering)을 수행하고, 상위 50개 주요 구성 요소를 사용하여 UMAP(uniform manifold approximation and projection)으로 시각화 하였다. 하위 클러스터링 분석을 위해, 상에서 기재한대로 하위 클러스터의 각 카운트 매트릭스를 정규화 및 확장하고, 주요 구성 요소를 사용하여 비감독 클러스터링을 수행하였다(단핵구 하위 클러스터: PC = 15, 해상도 = 0.4; NKT 하위 클러스터: PC = 25, 해상도 = 0.4; 증식하는 림프구 하위 클러스터: PC = 50, 해상도 = 0.1).

[0163] 실시예 5. scRNA-seq 데이터의 각 하위 클러스터 특성 분석

[0164] 마커 유전자를 식별하기 위해, FindAllMarkers 함수(매개변수: 다른 클러스터와 비교한 로그 배수 변화>0.25, >0.6 min.pct2 [다른 클러스터의 세포에서 검출된 테스트 유전자의 최소 비율], 및 본페로니(Bonferroni) 교정된 P<0.05)를 사용하여 Wilcoxon 순위 합계 테스트를 기반으로 다른 클러스터에 비해 각 클러스터에서 차별적으로 발현된 유전자(DEG)를 선택하였다. 각 하위 클러스터의 특성을 설명하기 위해 유전자 세트 모듈 점수(Seurat 패키지의 AddModule-Score), 결합 점수(enrichR), 및 농축 점수(GSEA v4.2.3, Broad Institute, CA, 미국)를 Gene Ontology: Biological process databases(GO.BP) 및 KEGG를 포함하는 공개적으로 이용 가능한 유전자 세트를 사용하여 계산함으로써 유전자 세트 풍부도 분석을 수행하였다.

[0165] 각 세포 유형에 대한 치료 효과를 정성적으로 비교하기 위해, 치료에 따른 각 세포 유형의 피어슨 상관 계수(PCC)를 계산하였다. 이를 위해, C1D1 및 C1D15(Seurat 패키지의 AverageExpression)에서 각 세포 유형의 평균

유전자 발현을 계산하였다. 그런 다음, PCC를 수행하고(stats 패키지의 cor) 히트맵(ComplexHeatmap 패키지의 히트맵)으로 시각화 하였다. 정량적 변화를 위해, 먼저 모든 환자와 장기간 반응자 및 조기 진행자의 하위 그룹에서 각 세포 유형의 비율을 계산하였다. 비율에 있어서 농축 배수는 C1D15의 각 세포 유형의 비율을 C1D1의 비율로 나눈 다음 $\log_2$ 변환을 통해 계산하였다. 대응 그룹에 대한 Wilcoxon 부호 순위 테스트를 사용하여 반응자 사이의 통계 분석을 수행하였다.

[0167] **실시예 6. 의사시간(pseudotime) 및 상호작용체(interactome) 분석**

[0168] 단핵구 면역 하위 집합의 동적 변화를 조사하기 위해, 단안경의 표준 분석 프로세스(monocle v3)를 위한 단핵구 면역 하위 집합에서 세포를 내보냈다. CellDataSet 개체는 as.cell_data_set 함수를 사용하여 정규화된 개수(변환된 "RNA" 데이터 매트릭스)를 기반으로 구축하였다. 이어서, learn_graph 함수(minimal_branch_len = 7, geodesic_distance_ratio = 0.5) 및 orderCells 함수(기본 옵션)를 사용하여 scRNA-seq 데이터에서 단핵구 하위 집합의 궤적을 생성하였다. 그런 다음, choose_graph_segments 함수를 사용하여 궤적의 특정 분지에 대한 다운스트림 분석을 수행하였다.

[0169] scRNA-seq 데이터로부터 각 세포 유형 간의 세포간 커뮤니케이션을 분석하기 위해, CellChat 패키지(v1.5.0)를 사용하여 상호작용체 분석을 수행하였다. CellChat 개체는 createCellChat 함수를 사용하여 정규화된 개수를 기반으로 구축되었다. 이후, 문헌에 뒷받침되는 리간드-수용체 상호작용의 CellChatDB 데이터베이스를 기반으로, 인간에서 identifyOverExpressedGenes 함수(기본 옵션), identifyOverExpressedInteractions 함수(기본 옵션), computeCommunProb 함수(기본 옵션), computeCommunProbPathway 함수(기본 옵션), aggregateNet 함수(기본 옵션)를 이용하여 과발현된 유전자 및 각 세포 유형 간의 상호작용을 계산하였다.

[0171] **실시예 7. 유세포분석**

[0172] 냉동보존된 PBMC를 해동하고 형광색소 결합 항체로 실온에서 15분 동안 염색하였으며, 죽은 세포를 배제하기 위해 Live/Dead Cell Stain Kit(Invitrogen)를 사용하였다. 세포 내 염색을 위해 Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit(Invitrogen)를 사용하여 15분 동안 세포를 고정하고 투과화시킨 후, 세포질 단백질을 표지하기 위해 항체를 추가로 15분 동안 첨가하였다. 그런 다음, LSR II 기기(BD Bioscience)를 사용하여 유세포 분석을 수행하고 FlowJo 소프트웨어 버전 10.4(Treestar)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0174] **실시예 8. 멀티플렉스 ELISA**

[0175] 멀티플렉스 ELISA는 Human XL Cytokine Premixed Kit(R&D Systems, MN)를 사용하여 수행하였고, MAGPIX(Luminex, TX)를 사용하여 측정하였다.

[0177] **실시예 9. 통계 분석**

[0178] 무진행 생존(PFS)은 무작위 배정부서 질병 진행일(RECIST v1.1 기준에 따라 결정됨) 또는 사망일까지의 시간으로 정의하였으며, 전체 생존(OS)은 무작위 배정과 임의의 원인에 따른 사망일 사이의 시간 간격으로 정의하였다. Kaplan-Meier 방법을 사용하여 생존 결과를 추정하고, 로그 순위 검정을 사용하여 하위 그룹 간의 생존 결과를 비교하였다. 통계 분석은 R 소프트웨어 버전 3.4.1을 사용하여 수행하였다.

[0179] 본 발명에서 통계적 유의성은 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001로 표시하였다.

[0181] **[실험예]**

[0182] **실험예 1. 레고라페닙-니블루맙의 임상 결과**

[0183] 2020년 7월부터 2021년 1월 사이에 총 42명의 환자가 등록되었다. 하기 표 1에 환자의 특징을 나타내었다.

표 1

Characteristics	(n = 42)
Age, years	61 (40–79)
Male sex	31 (73.8%)
Liver cirrhosis	31 (73.8%)
Tumor stage	
BCLC B	5 (11.9%)
BCLC C	37 (88.1%)
Etiology	
HBV	30 (71.4%)
HCV	5 (11.9%)
Others	7 (16.7%)
Extrahepatic spread	
Lung	20 (47.6%)
Lymph node	11 (26.2%)
Peritoneum	8 (19.1%)
Bone	5 (11.9%)
Other	4 (9.5%)
Previous treatment for HCC	
Surgical resection	21 (50.0%)
Radiation therapy	12 (28.6%)
Transarterial chemoembolization	35 (83.3%)
Radiofrequency ablation	5 (11.9%)
Transarterial embolization	1 (2.4%)
Transarterial radioembolization	1 (2.4%)

HCC, hepatocellular carcinoma; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus.

[0184]

[0186]

평균 연령은 61세(범위, 40~79세)였고, 환자 31명(73.8 %)은 남성이었다. 대부분의 환자는 BCLC C기(n=38, 90.5 %)이고 간세포암종(HCC)의 원인으로 B형 간염 바이러스 감염(n=30, 71.4 %)이 있었다. 임상 시험의 1차 평가변수는 고형 종양의 반응 평가 기준(RECIST) v1.1에 의해 평가된 객관적 반응률(ORR)이었다. RECIST v1.1에 따른 ORR은 31.0 %로 1차 평가변수(ORR ≥ 25 %)를 충족하였다: 도 1a에 나타난 바와 같이, 1명(2.4 %)의 환자에서 완전 반응(complete response, CR) 및 12명(28.6 %)의 환자에서 부분 반응(partial response, PR)을 보였다.

[0187]

mRECIST에 따른 ORR은 33.3 %였으며, 2명(4.8 %)의 환자에서 완전 반응, 12명(28.6 %)의 환자에서 부분 반응이 나타났고, 추적 관찰 기간의 중앙값(median follow-up duration)은 11.1개월(95 % CI, 6.11~14.0개월)이었다. 무진행 생존(PFS)은 도 1b에 나타난 바와 같이 중앙값이 7.38개월(95 % CI, 4.12~13.0개월)이었으며, 1년 PFS 비율은 37.8 %였다.

[0188]

1년 전체 생존(OS) 비율은 도 1b에 나타난 바와 같이 80.5 %(95 % CI, 63.0~90.3 %)였지만, OS 중앙값에는 도달하지 못했다. RECIST v1.1에 따른 CR/PR을 달성한 환자의 경우, 반응 기간의 중앙값은 10.3개월(95 % CI, 8.2~13.9개월)이었다.

[0189]

안전성 프로파일은 하기 표 2에 요약하였다.

표 2

Adverse events	Any grade n (%)	Grade 3–4 n (%)
Palmar-plantar erythrodysesthesia syndrome	14 (33.3)	0 (0.0)
Alopecia	11 (26.2)	0 (0.0)
Rash	9 (21.4)	0 (0.0)
Abdominal pain	7 (16.7)	0 (0.0)
Dyspepsia	6 (14.3)	0 (0.0)
Diarrhea	5 (11.9)	0 (0.0)
Pyrexia	5 (11.9)	0 (0.0)
Asthenia	5 (11.9)	0 (0.0)
Fatigue	5 (11.9)	0 (0.0)
Dysphonia	5 (11.9)	0 (0.0)
Aspartate aminotransferase increased	5 (11.9)	2 (4.8)
Decreased appetite	6 (14.3)	0 (0.0)
Type 1 diabetes mellitus	1 (2.4)	0 (0.0)
Hypothyroidism	5 (11.9)	0 (0.0)
Thyroiditis	1 (2.4)	0 (0.0)
Total	39 (92.86)	10 (23.8)

[0190]

[0192]

가장 흔한 부작용은 손발 피부 반응(n=14, 33.3 %), 탈모증(n=11, 26.2 %), 및 피부 발진(n=9, 21.4 %)이었다. 3등급 부작용은 10명의 환자(23.8 %)에서 나타났으며, 가장 빈번한 3등급 부작용은 아스파테이트 아미노전이효소가 증가되는 것(n=2, 4.8 %)이었다. 4등급 부작용이나 치료 관련 사망은 발생하지 않았다.

[0194]

실험예 2. ctDNA 분석 및 생존 결과

[0195]

42명의 환자 모두에서 ctDNA 분석을 수행한 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 가장 빈번하게 돌연변이된 유전자는 *TP53*(69 %)이었고, *CTNNB1*(β -카테닌을 코딩함)(26 %)이 그 뒤를 이었다. Wnt/ β -카테닌 경로에 관여하는 유전자의 변형은 도 2b에 나타난 바와 같이 낮은 생존 결과와 관련이 없었다. 또한, 도 2c에 나타난 바와 같이 PI3K/mTOR 경로에 관여하는 유전자의 변형이 있는 환자는 그러한 변형이 없는 환자에 비해 유리한 OS 경향을 보였다.

[0197]

실험예 3. 레고라페닙-니블루맵 치료 시 면역 관련 유전자의 발현 강화 및 고전적 단핵구의 빈도 증가 확인

[0198]

기준선(baseline)(C1D1) 및 치료 중(C1D15)에 수집된 PBMC 샘플의 scRNA-seq를 수행하여 초기 면역 역학을 분석하였으며, 분석 방법을 도 3a에 도식화하여 나타내었다. 첫 번째 평가에서 질병 진행이 있거나 종양 부담이 점진적으로 증가한 환자(즉, 각각 첫 번째 평가에서 종양 크기 증가를 보이는 안정 반응(stable disease, SD) 및 두 번째 평가에서 진행성 반응(progressive disease, PD)) (초기 진행자(early progressor, EP), n=14, 도 1a의 오른쪽 도면에서 빨간색 박스로 표시) vs. 최소 10개월 동안 지속된 종양 부담의 지속적인 감소를 보인 환자(즉, 종양 크기 감소를 보이는 PR 또는 SD) (장기 반응자(long-term responder, LR), n=15, 도 1a의 오른쪽 도면에서 파란색 박스로 표시)의 두 가지 임상 하위 그룹에 초점을 맞췄다.

[0199]

먼저, 레고라페닙-니블루맵 치료에 대해 전체 PBMC의 차등 발현 유전자(DEG)를 분석하였다. 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이 C1D15에서 상향조절된 DEG는 선천성 면역 반응 및 강력한 I형 및 II형 인터페론(IFN) 반응을 포함하여 전반적으로 강력한 면역 활성화 신호와 관련이 있었다. 특히, 이는 장기 반응자 사이에서 더 두드러졌다.

[0200]

비감독 클러스터링은 도 3c에 나타난 바와 같이 13개의 서로 다른 면역 하위 집합을 식별하였다. 또한, 도 3d에

나타낸 바와 같이 고전적 단핵구(classical monocyte)와 증식하는 림프구의 비율은 두 임상 하위 그룹 모두에서 레고라페닙-니볼루맵 치료를 통해 유의하게 증가한 반면 중간 단핵구(intermediate monocyte)의 비율은 초기 진행자에서만 증가했다. 피어슨 상관 계수(PCC) 분석에 따르면 도 3e에 나타낸 바와 같이 고전적 단핵구는 C1D1과 C1D15 사이의 유전자 발현 프로파일에서 가장 큰 차이가 있는 것으로 나타났으며, 이는 고전적 단핵구가 치료에 걸쳐 현저한 전사체 재프로그래밍을 겪었음을 나타낸다. 이러한 정성적인 변화는 초기 진행자보다 장기 반응자 사이에서 더 두드러졌으며, 이는 고전적 단핵구 집단의 정량적 및 정성적 변화가 레고라페닙-니볼루맵 치료의 효과와 연관될 수 있음을 시사한다.

[0202] 실험예 4. TCR 레퍼토리의 다양화 및 장기 반응자에서 CD8⁺ T 세포의 ICI 반응성을 나타내는 유전자의 풍부도 확인

[0203] C1D1 및 C1D15에서 CD8⁺ T 세포의 차등 발현 유전자를 확인한 결과, 도 4a에 나타낸 바와 같이 치료 중 CD8⁺ T 세포는 I형 및 II형 IFN 반응과 관련된 유전자 발현의 상향 조절을 나타냈는데, 이는 장기 반응자 사이에서 더 두드러졌으며 세포사멸에 관여하는 경로와 관련된 유전자 발현의 하향 조절도 있었다. 또한, 도 4b에서 역 심슨 지수의 증가로 표시된 것과 같이, 장기 반응자 중에서만 치료를 통해 CD8⁺ T 세포의 수용체(T cell receptor, TCR) 클론의 다양성이 유의하게 증가했는데, 이는 유리한 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor, ICI) 반응과 관련이 있는 것으로 알려졌다.

[0204] 또한, 도 4c 및 4d에 나타낸 바와 같이 NK/T 세포의 비감독 클러스터링(도 4c) 및 주로 증식하는 CD8⁺ T 세포로 구성된 증식 림프구 분석(도 4d)을 수행하였다. 이를 통해 도 4e에 나타낸 바와 같이 5개의 서로 다른 CD8⁺ T 세포 하위 클러스터가 식별되었다: naive CD8⁺ T 세포; 세포독성 분자를 코딩하는 유전자(예를 들어, *GZMH*, *GZMB* 및 *PRF1*)를 과발현하는 이펙터 CD8⁺ T 세포; *PDCD1*(PD-1을 코딩함), *GZMK* 및 *EOMES*를 과발현하는 *PDCD1*⁺ CD8⁺ T 세포, *MKI67*⁺ 증식 CD8⁺ T 세포; 및 선천적으로 유사한 이펙터 CD8⁺ T 세포. 이러한 CD8⁺ T 세포 하위 집합 중에서 도 4f에 나타낸 바와 같이 이펙터 CD8⁺ 및 *MKI67*⁺ 증식 CD8⁺ T 세포는 치료 전반에 걸쳐 전체 인구에서 유의하게 증가된 빈도를 나타냈으며 이는 초기 진행자보다 장기 반응자 사이에서 더 두드러졌다.

[0205] ICI 기반 치료를 받을 때 CD8⁺ T 세포 증식 비율의 동적 증가는 유리한 임상 결과와 관련이 있는 것으로 보고되었다. HCC에서 니볼루맵 단독요법으로 유리한 임상 결과와 관련된 염증 특징의 발현 수준을 분석한 결과, 도 4g에 나타낸 바와 같이 장기 반응자 중 *MKI67*⁺ 증식 CD8⁺ T 세포가 눈에 띄게 풍부했지만, 초기 진행자는 그렇지 않은 것으로 나타났다(도 4g의 상단 도면).

[0206] 또한, 도 4g에 나타낸 바와 같이 반응자 사이에서 니볼루맵 단독요법 후 전사체 변화를 나타내는 특징의 발현 수준을 측정한 결과, *MKI67*⁺ 증식 CD8⁺ T 세포의 증가 추세를 발견했는데 이는 초기 진행자보다 장기 반응자 사이에서 더 두드러졌다(도 4g의 하단 도면). 이에 더하여, 도 4h에 나타낸 바와 같이 *MKI67*⁺ 증식 CD8⁺ T 세포에는 T 세포 반응과 관련된 유전자가 풍부해졌다. 특히, 도 4i에 나타낸 바와 같이 C1D15에서 세포독성 관련 유전자는 장기 반응자 중에서만 *MKI67*⁺ 증식 CD8⁺ T 세포에서 상향조절되었다. 이러한 발견은 다색 유동 세포 분석법에 의해 검증되었으며, 도 4j 및 4k에 나타낸 바와 같이 이는 각 CD8⁺ T 세포 및 PD-1⁺ CD8⁺ T 세포 중에서 KI-67⁺ 증식 세포(도 4j) 및 세포 독성 과립(granzyme B⁺/perforin⁺)을 보유하는 세포(도 4k)의 비율이 장기 반응자에서만 크게 증가하고 초기 진행자에서는 증가하지 않은 것을 나타내었다.

[0207] 즉, 이러한 결과는 장기 반응자가 TCR 레퍼토리의 다양화 및 ICI 반응성 및 세포 독성과 관련된 신호가 풍부한 증식 CD8⁺ T 세포의 상대적 풍부도가 현저히 증가하였음을 보여주었다. 이는 유효성 결과가 레고라페닙-니볼루맵 치료 후 CD8⁺ T 세포의 정성적 및 정량적으로 구별되는 재프로그래밍과 관련될 수 있음을 시사한다.

[0209] 실험예 5. 장기 반응자에서 레고라페닙-니볼루맵 치료 후 우선적인 M1 지향 분극화 확인

- [0210] 단핵구 하위 집단을 조사한 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이 C1D15에서 이러한 세포 집단 내의 IFN 반응 및 항원 제시와 관련된 유전자의 상향 조절을 확인하였으며 이는 장기 반응자 사이에서 더 두드러졌다.
- [0211] 또한, 도 5b에 나타난 바와 같이 5개의 구별되는 단핵구 클러스터를 확인하였다: $S100^{+}$ 초기 활성화된 고전적 단핵구(CM); *IL1B*, *FOSB*, *JUN* 및 *IER2*를 과발현하는 활성화된 고전적 단핵구_1; *LGALS2* 및 *IFI6*을 과발현하는 활성화된 고전적 단핵구_2; 항원 제시 불확정 단핵구; 및 *CSF1R*, *SIGLEC10*, 및 *VSIR*(VISTA 인코딩)을 포함하여 면역 억제와 관련된 유전자를 과발현하는 M2 편향 비고전적 단핵구. 단핵구 하위 집단 내에서 이러한 단핵구 집단의 상대적 풍부도는 도 5c에 나타난 바와 같이 치료에 따라 크게 변하지 않았다.
- [0212] 다음으로, 차별화된 의사시간 정렬 분석을 수행한 결과, 도 5d에 나타난 바와 같이 두 개의 구별되는 발산 궤적을 나타내었다. 고전적 단핵구_2 하위 그룹이 분기점이고, 하나의 궤적은 활성화된 고전적 단핵구_1(면역 자극 M1 유사 분지)을 향한 궤적이고, 다른 하나는 M2 편향 비고전적 단핵구(면역억제성 M2 유사 분지)를 향한 궤적이다. 레고라페닙-니볼루맙 치료 시, 도 5e에 나타난 바와 같이 장기 반응자의 총 단핵구 중 M1 분지 세포(활성화된 고전적 단핵구_1 방향)의 비율이 증가하는 것을 관찰했지만, 초기 진행자에서는 그렇지 않았다. 반면, M2 분지 세포(비고전적 단핵구 방향)의 비율은 두 임상 하위 그룹 모두에서 치료에 따라 크게 변하지 않았다. 분기점에서 M1 유사 유전자 특징의 발현 수준은 도 5f에 나타난 바와 같이 초기 진행자보다 장기 반응자에서 더 두드러지게 증가했다. 이러한 결과는 레고라페닙-니볼루맙 치료 후 유리한 결과가 단핵구 세포가 M1 유사 특징으로 분극화될 가능성이 더 높다는 것과 연관된다. 반면, 종양 관련 대식세포(TAM) 특징의 발현 수준은 도 5g에 나타난 바와 같이 초기 진행자로부터의 M2 편향 비고전적 단핵구에서는 유의하게 증가했지만, 장기 반응자의 발현 수준에서는 그렇지 않았다. 다색 유세포 분석 결과, 도 5h에 나타난 바와 같이 CD14-low CD16-high 비고전적 단핵구에 대한 $CD14^{+}$ 고전적 단핵구의 상대적 풍부도가 장기 반응자 사이에서만 유의하게 증가한 것으로 나타났다.
- [0213] 단일 식세포 하위 집합의 전사체 변화가 부분적으로 레고라페닙에 기인하는지 여부를 추가로 조사하기 위해, HCC 모델의 다양한 시험관 내 맥락에서 파생된 레고라페닙 반응 유전자 세트를 조사하였다. 그 결과, 도 5i에 나타난 바와 같이 레고라페닙-니볼루맙 치료 전반에 걸쳐 이러한 레고라페닙 유도 특징의 발현 수준은 장기 반응자 중 고전적 단핵구 하위 집합에서 크게 증가한 반면, 초기 진행자에서는 발현 수준이 거의 변하지 않거나 감소하는 추세를 보였다. 이는 도 5j에 나타난 바와 같이 CSF1R의 녹아웃(레고라페닙에 의해 표적화됨)을 나타내는 유전자 특징이 초기 진행자의 것이 아닌 장기 반응자의 C1D15 고전적 단핵구 하위 세트에서 풍부하다는 결과에 의해 추가로 입증되었다. 이러한 결과는 레고라페닙이 구별되는 임상 결과를 보이는 환자에서 CSF1R 경로의 차단을 통해 고전적 단핵구의 차등 전사체 재프로그래밍을 추진하는 역할을 한다는 것을 시사한다.
- [0215] **실험예 6. 장기 반응자에서 IFN- γ 경로를 통한 증식 CD8 $^{+}$ T 세포 및 고전적 단핵구 사이의 상호작용 확인**
- [0216] 치료하는 동안 단핵구 하위 집단 및 CD8 $^{+}$ T 세포 증식 사이의 동적 상호작용 가능성을 조사하기 위해 상호작용 분석을 수행하였으며, 도 6a의 다이어그램을 통해 이들의 커뮤니케이션을 나타내었다. 그 결과, 도 6b에 나타난 바와 같이 증식하는 CD8 $^{+}$ T 세포가 $S100^{+}$ 초기 활성화된 고전적 단핵구에 IFN- γ 관련 신호를 제공하고, 장기 반응자 중에서 고전적 단핵구_1 하위 집합을 활성화하는 것을 확인하였다. 대조적으로, 초기 진행자 중에서 CD8 $^{+}$ T 세포 하위 집합과 $S100^{+}$ 초기 활성화된 고전적 단핵구 및 활성화된 고전적 단핵구_1 하위 집합 사이에서는 의미있는 상호작용을 발견하지 못했다. 오히려 초기 진행자에서는 선천적으로 유사한 CD8 $^{+}$ T 세포가 고전적 단핵구_1, 중간 단핵구, 및 비고전적 단핵구 하위 집합과 상호작용 하였다.
- [0217] 종합해 보면, 이러한 결과는 구별되는 임상 결과에 따라 레고라페닙-니볼루맙 치료에 대해 서로 다른 CD8 $^{+}$ T 세포 및 단핵구 반응이 나타남을 시사한다. 더욱이, 이러한 반응은 레고라페닙 및/또는 니볼루맙의 면역-약학적 효과와 이들의 동적 상호작용에 의해 유도된 것임을 알 수 있었다.

[0219] **실험예 7. 초기 진행자의 고전적 단핵구에 대한 TMEM176A/B의 상향조절 확인**

- [0220] 고전적 단핵구에서 동적 변화의 임상적 관련성을 확인한 후, C1D15에 대한 초기 진행자와 장기 반응자 사이의 고전적 단핵구의 DEG를 조사하였다. 그 결과, 도 7a에 나타난 바와 같이 *TMEM176A* 및 *TMEM176B*가 초기 진행자

(장기 반응자 대비)에서 가장 크게 상향조절된 유전자임을 확인하였다. 도 7b에 나타난 바와 같이, *TMEM176B*는 특히 초기 진행자의 항원 제시 불확정 단핵구 및 M2 편향 비고전적 단핵구에서 과발현되었다.

[0221] *TMEM176B*는 염증 조절 복합체(inflammasome) 반응을 억제하고 ICI에 대한 반응성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 알려졌다. 이에, 염증 조절 복합체 반응과 관련된 유전자의 발현 수준을 추가로 비교한 결과, 도 7c에 나타난 바와 같이 *NLRP3* 및 *IL18*이 장기 반응자에서 레고라페닙-니볼루맵 치료 전반에 걸쳐 눈에 띄게 상향조절되었음을 확인하였다. 따라서, 도 7d에 나타난 바와 같이 *NLRP3* 염증 조절 복합체 경로를 나타내는 유전자 세트의 발현 수준은 레고라페닙-니볼루맵 치료 전반에 걸쳐 장기 반응자 사이에서 유의하게 증가했지만, 초기 진행자에서는 그렇지 않았다. 또한, 혈장 IL1RA(염증 조절 복합체 반응을 반영) 수준은 도 7e에 나타난 바와 같이 장기 반응자 사이에서만 치료 후(C1D15) 증가하는 경향이 있었다.

[0222] 이러한 결과는 초기 질병 진행이 *TMEM176A/B*의 상향조절과 연관될 수 있으며, 이는 이러한 치료 맥락에서 효과적인 염증 조절 복합체 반응을 억제할 수 있음을 시사한다.

[0223] 본 발명의 상기 실험예들에서 확인한 레고라페닙-니볼루맵 치료에 따른 PBMC의 면역 특성을 하기 표 3에 요약하여 나타내었다.

표 3

Feature	Common	Early progressors	Long-term responders
Whole PBMCs	↑ Immune activation		↑↑ Immune activation
	↑ Type I · II IFN response		↑↑ Type I · II IFN response
	↑ Frequency of classical monocytes, proliferating lymphocytes	↑ Frequency of intermediate monocytes	
	↑ Transcriptomic changes in classical monocytes		↑↑ Transcriptomic changes in classical monocytes
CD8 ⁺ T cells	↑ Effector subcluster		↑ Clonal diversity
	↑ <i>MKI67</i> ⁺ subcluster		↑ Cytotoxic subpopulation
			↑ KI-67 ⁺ subpopulation
			↑↑ Inflammatory signature in the <i>MKI67</i> ⁺ subcluster
Monocytes			↑ anti PD-1 responsive signature in the <i>MKI67</i> ⁺ subcluster
			↑ Cytotoxic features in the <i>MKI67</i> ⁺ subcluster
	↑ IFN response and antigen presentation		↑↑ IFN response and antigen presentation
		↑ TAM associated signature in nonclassical monocytes	↑ M1-skewness in classical monocytes
Monocytes			↑ Regorafenib-responsive signature in classical and nonclassical monocytes
		↑ <i>TMEM176A/B</i> expression on C1D15	↑ <i>CSF1R</i> KO signature in classical monocytes
		↓ <i>NLRP3</i> , <i>IL18</i> expression on C1D15	IFN-II signaling pathway to CD8 ⁺ T cells
			↑ NLRP3 inflammasome signaling
			↑ IL-1RA level in serum

HCC, hepatocellular carcinoma; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; IFN, interferon; TAM, tumor-associated macrophages; M1, classically activated macrophages

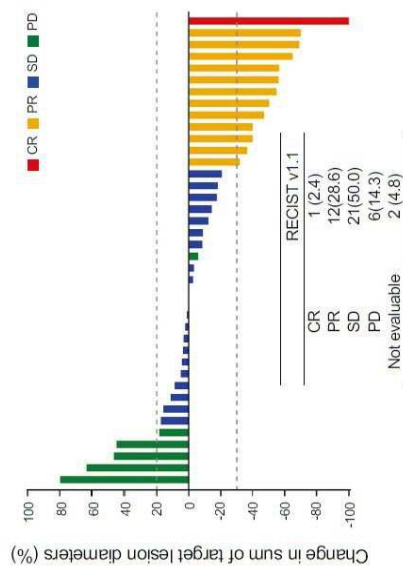
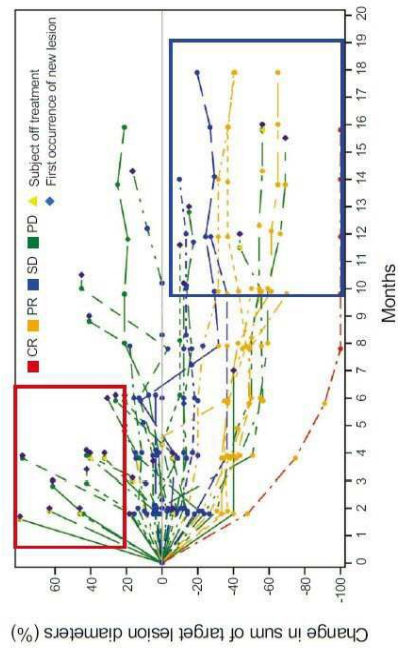
[0224]

[0226]

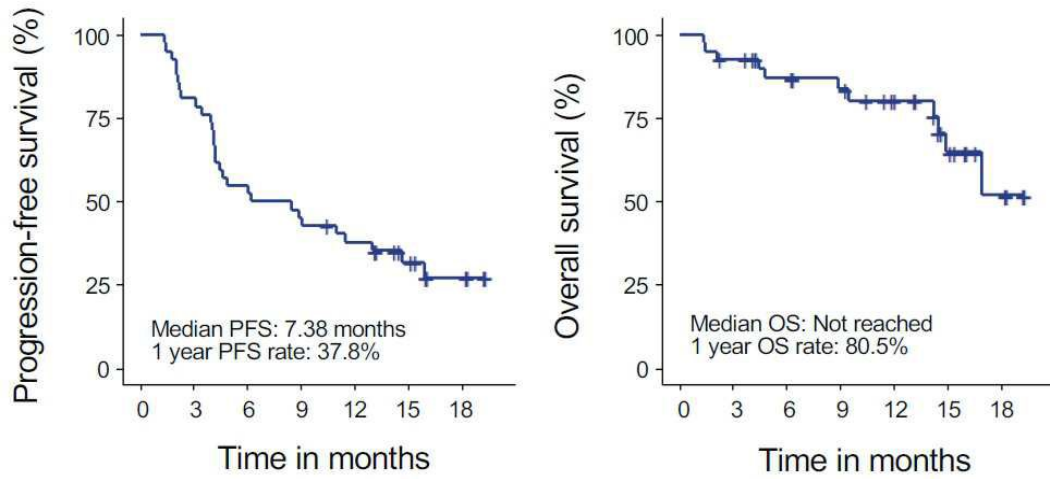
진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

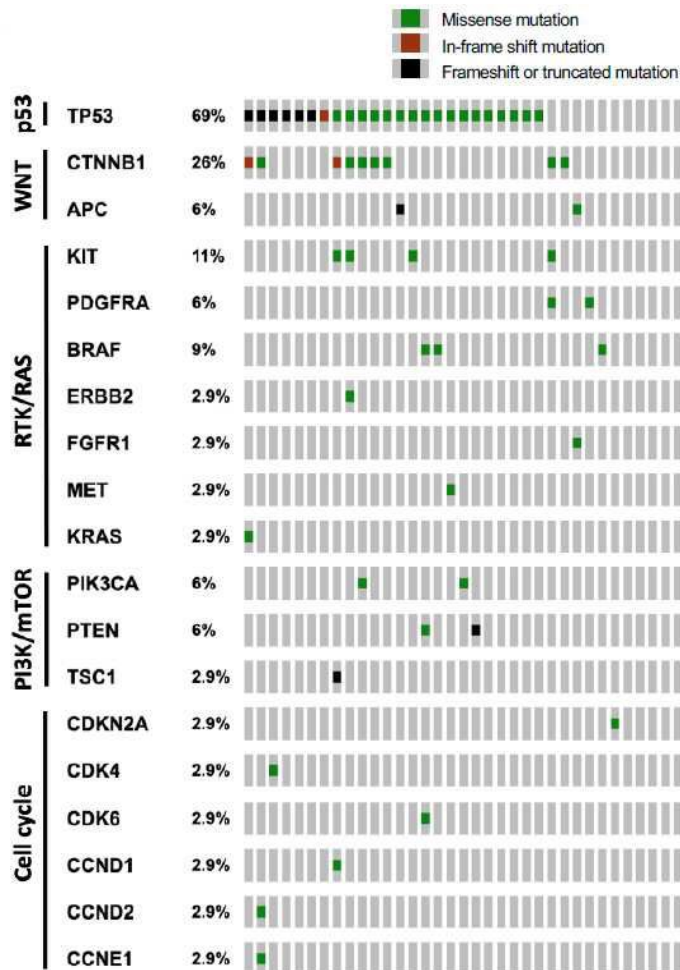
도면1a



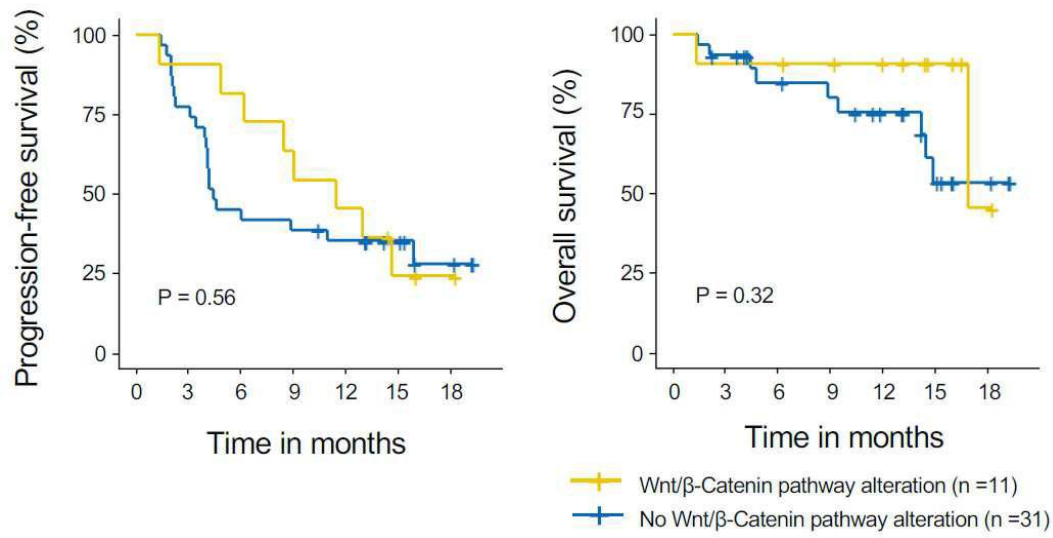
도면1b



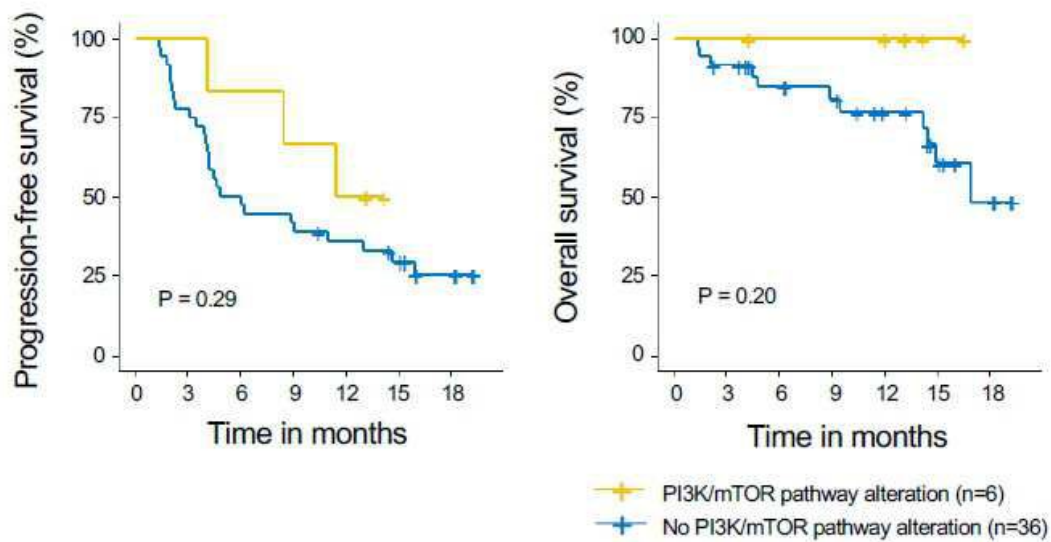
도면2a



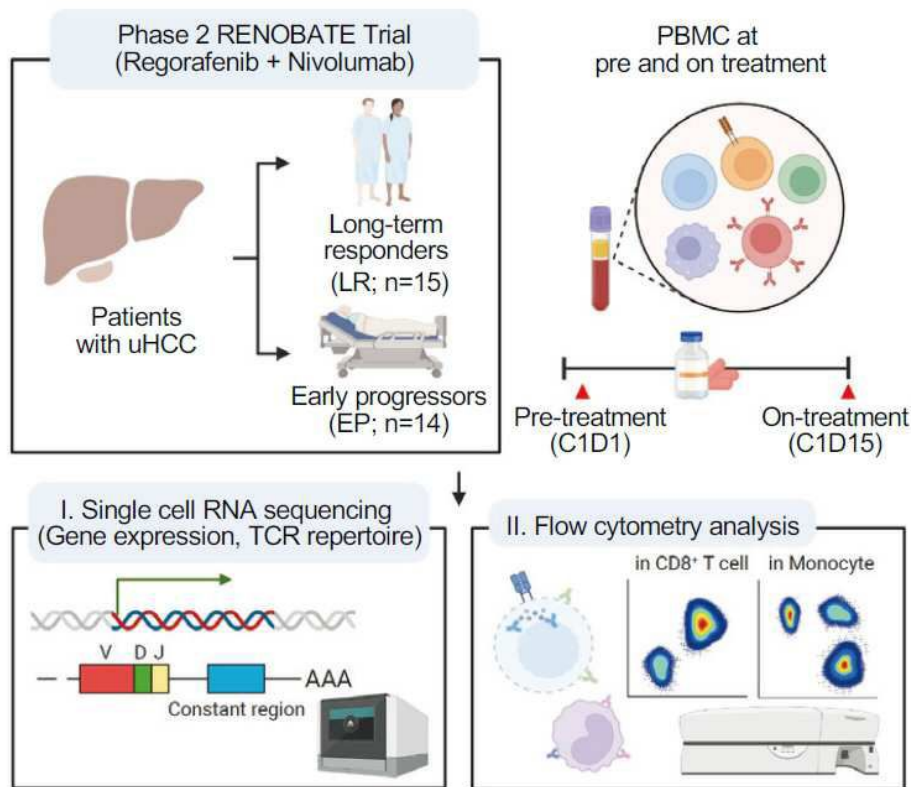
도면2b



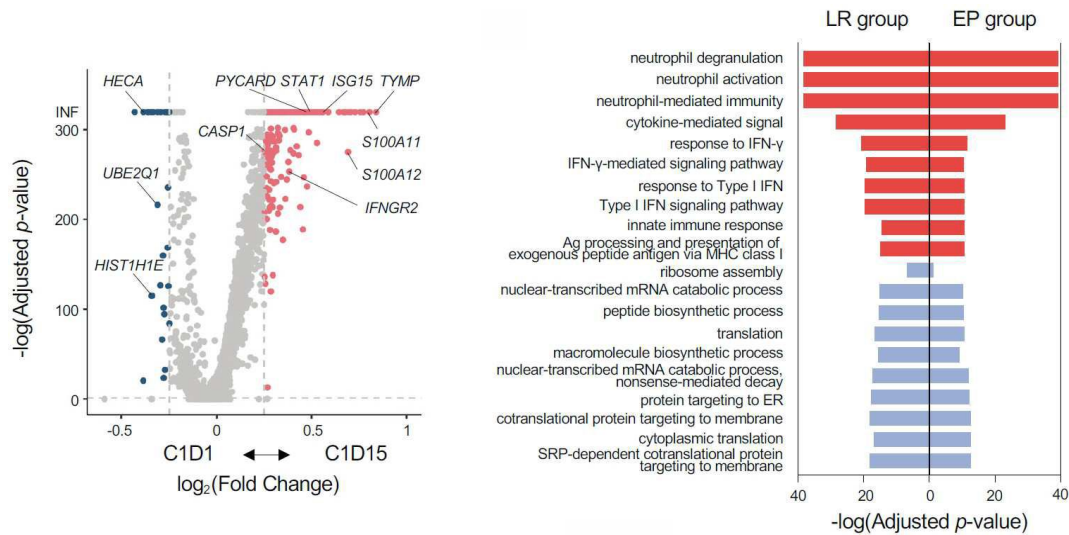
도면2c



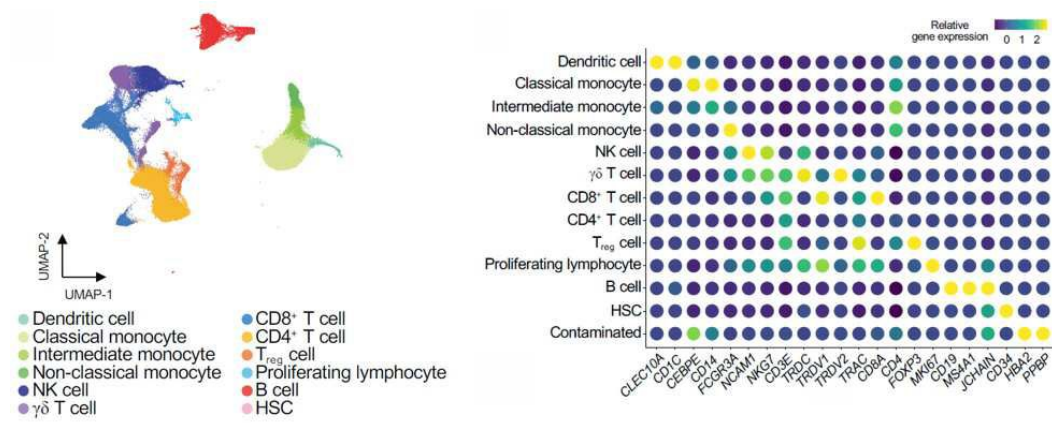
도면3a



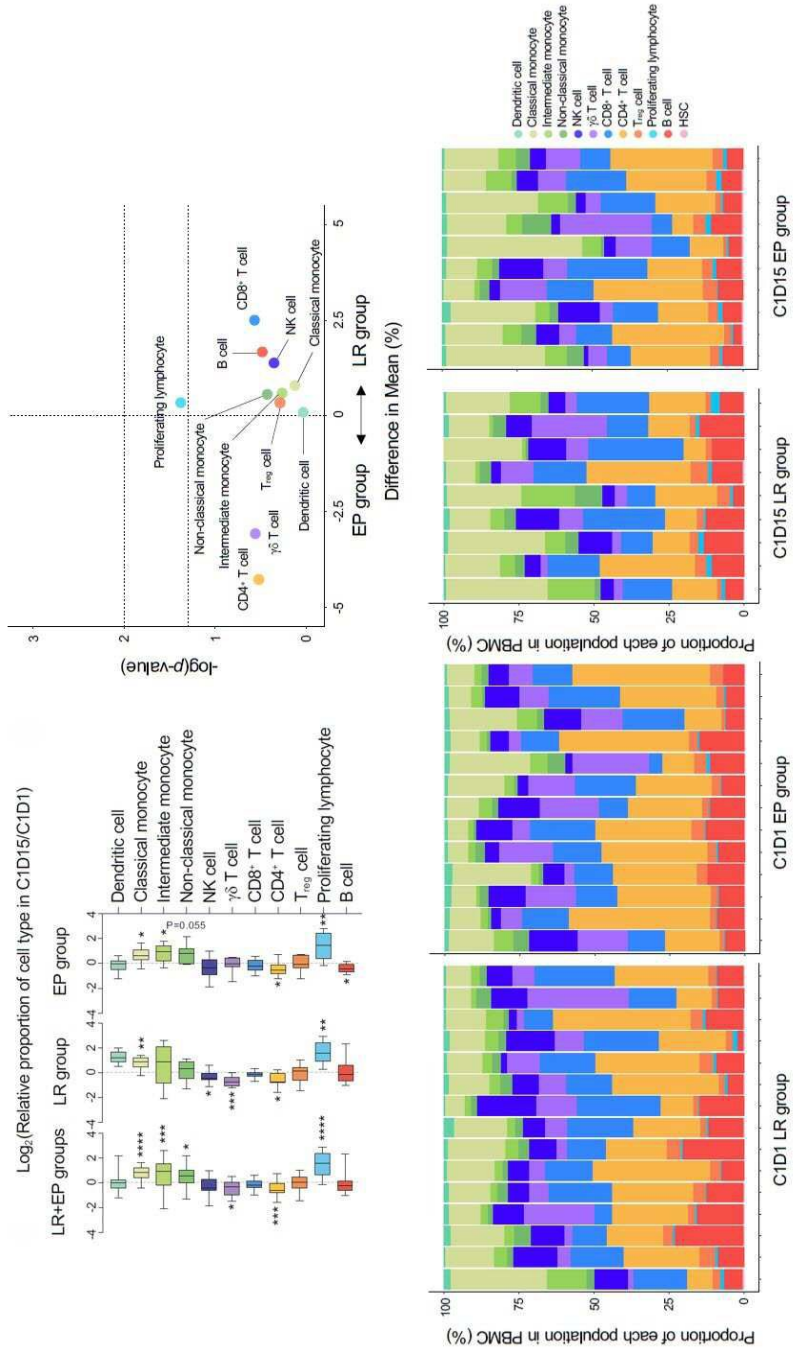
도면3b



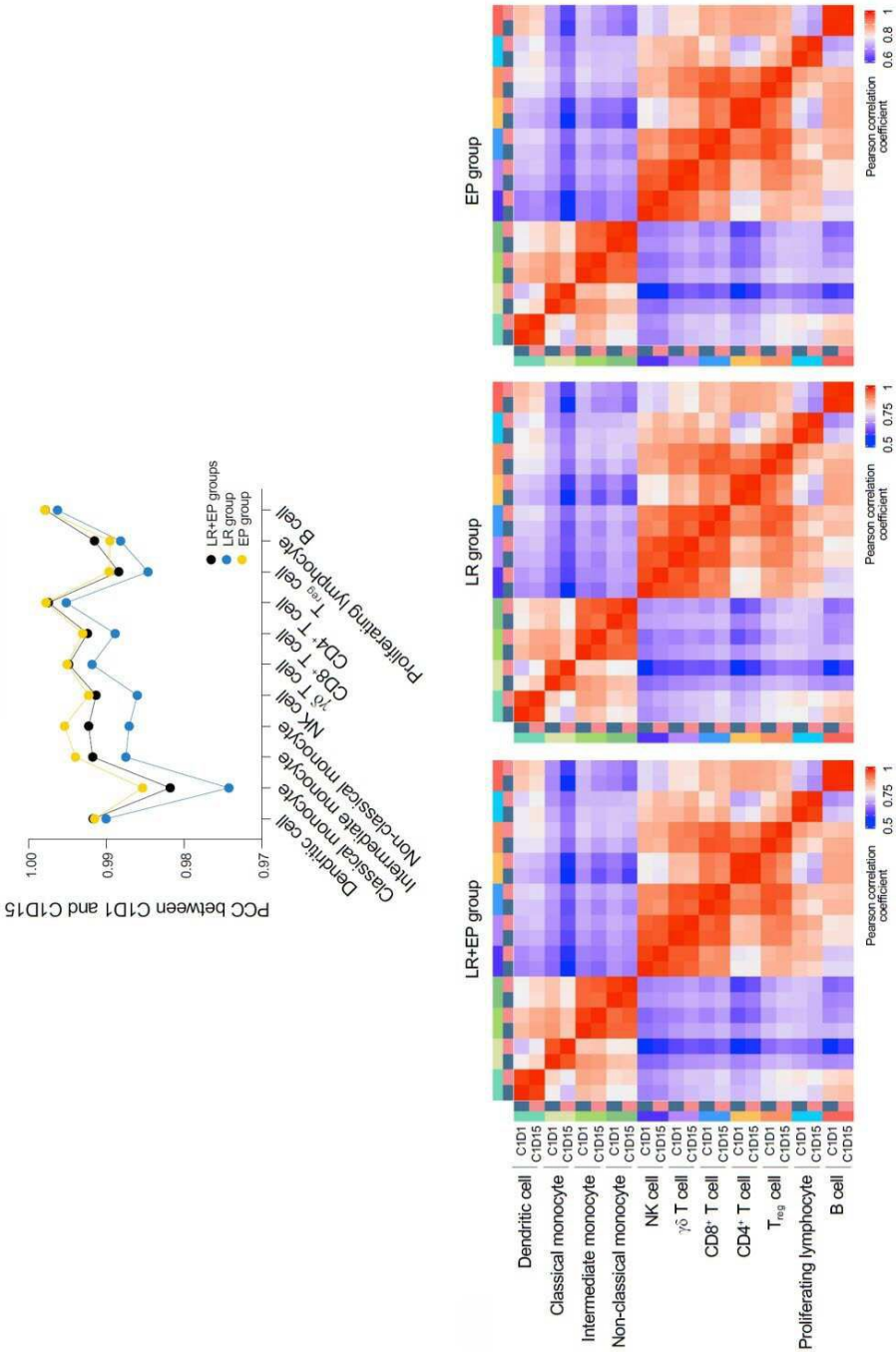
도면3c



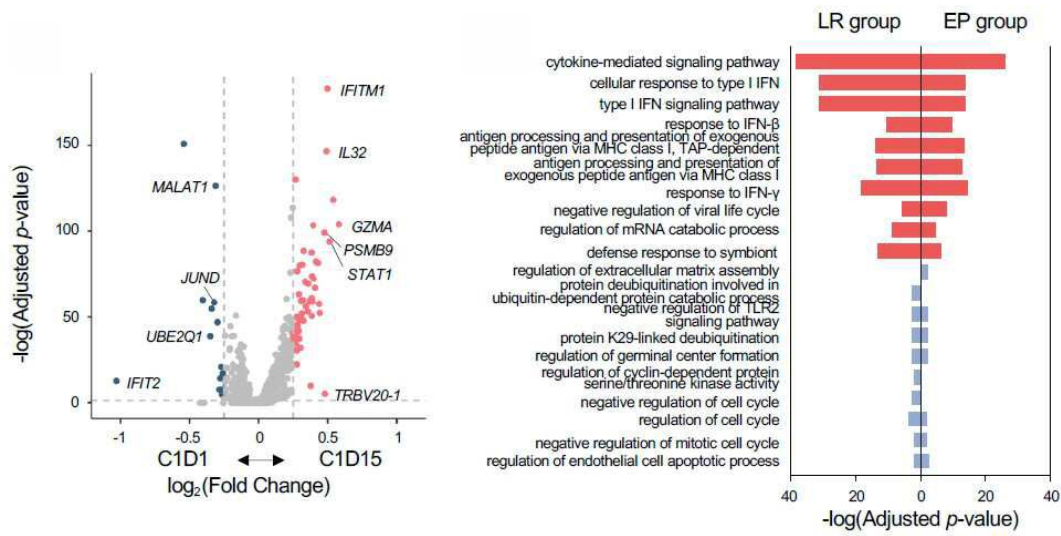
도면3d



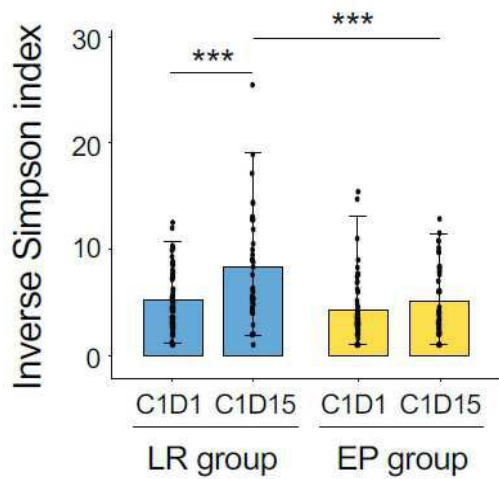
도면3e



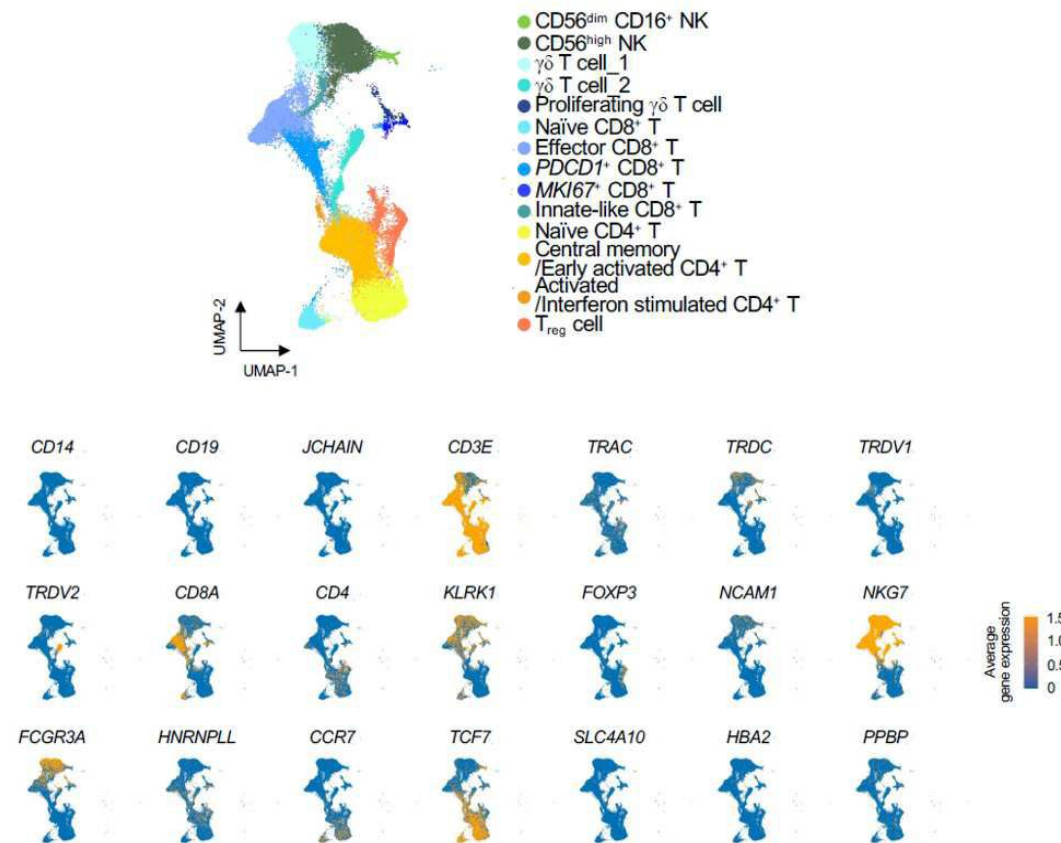
도면4a



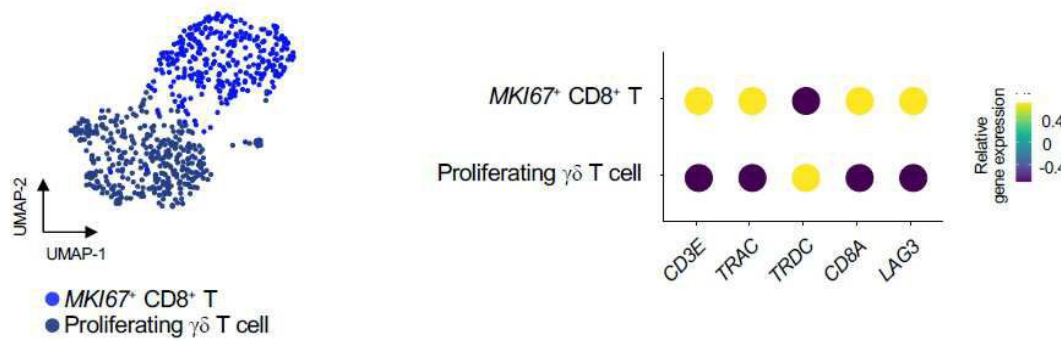
도면4b



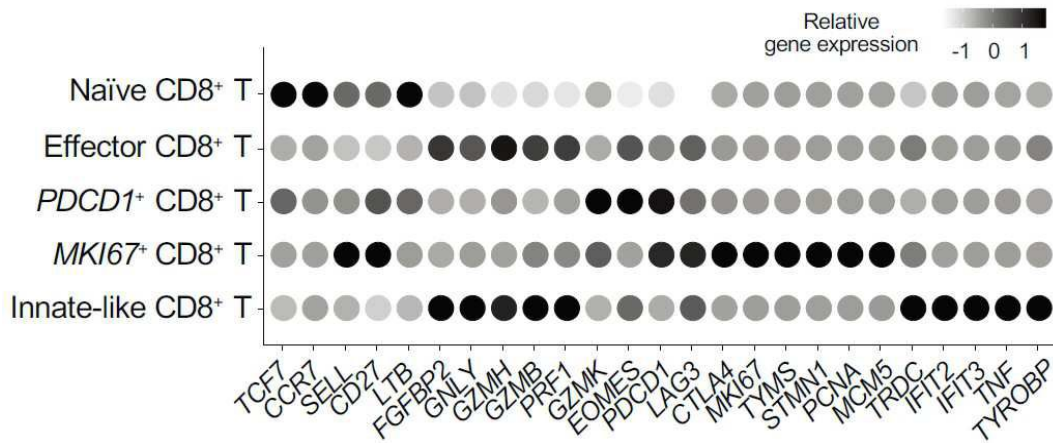
도면4c



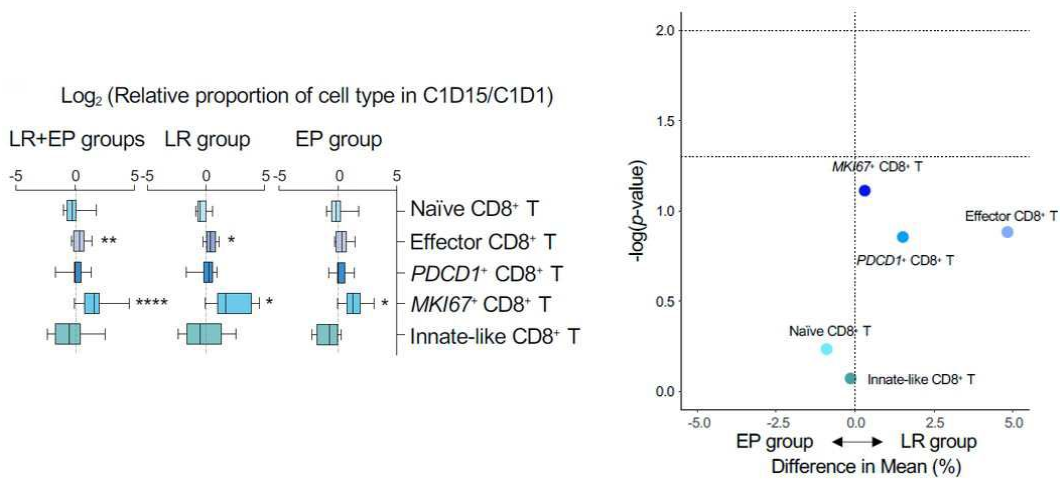
도면4d



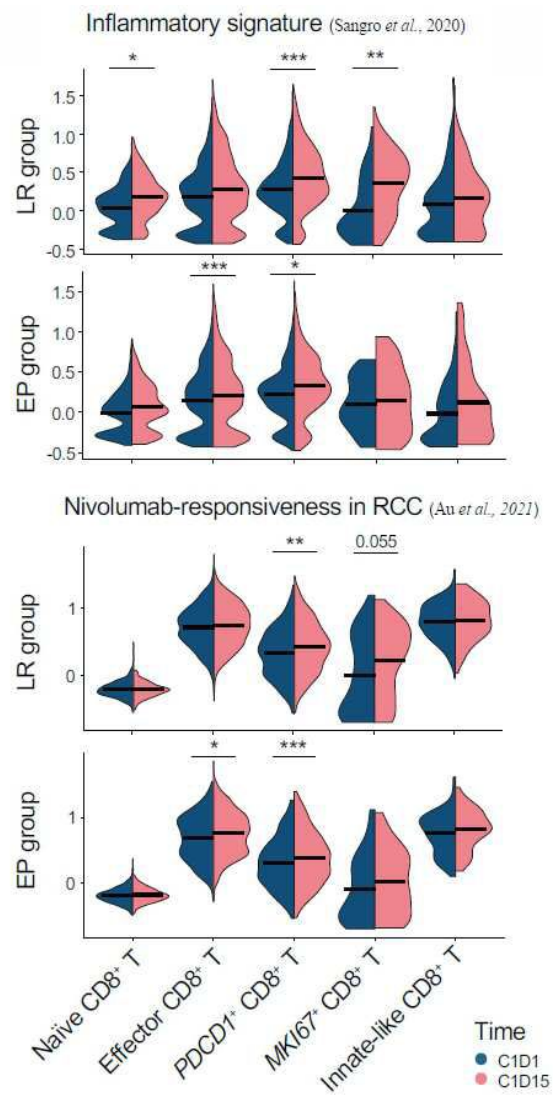
도면4e



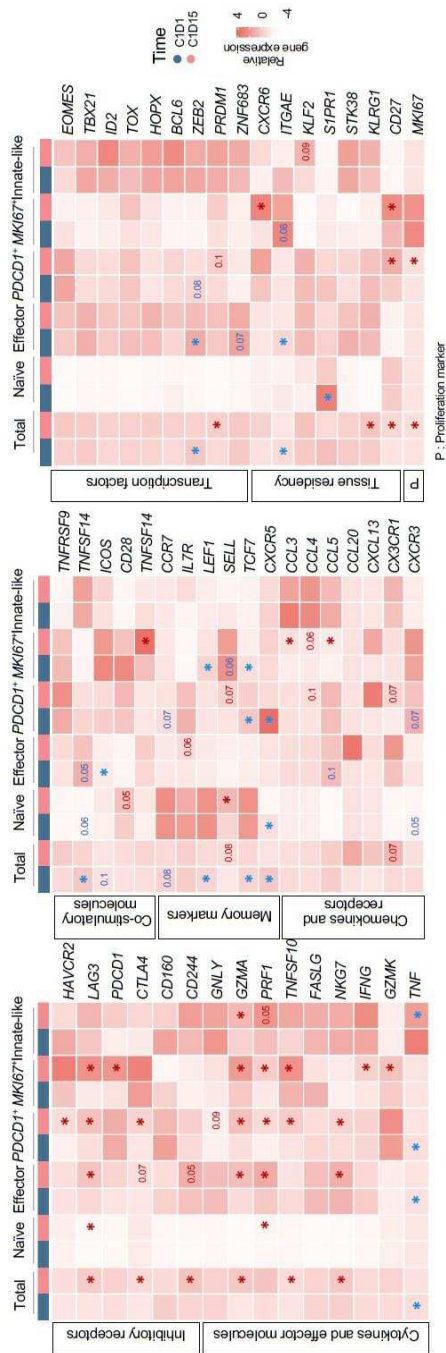
도면4f



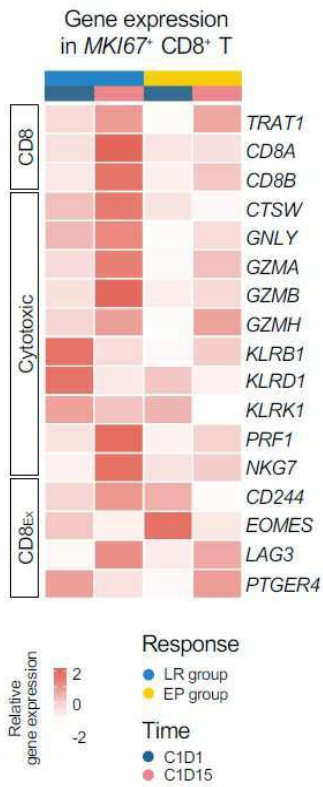
도면4g



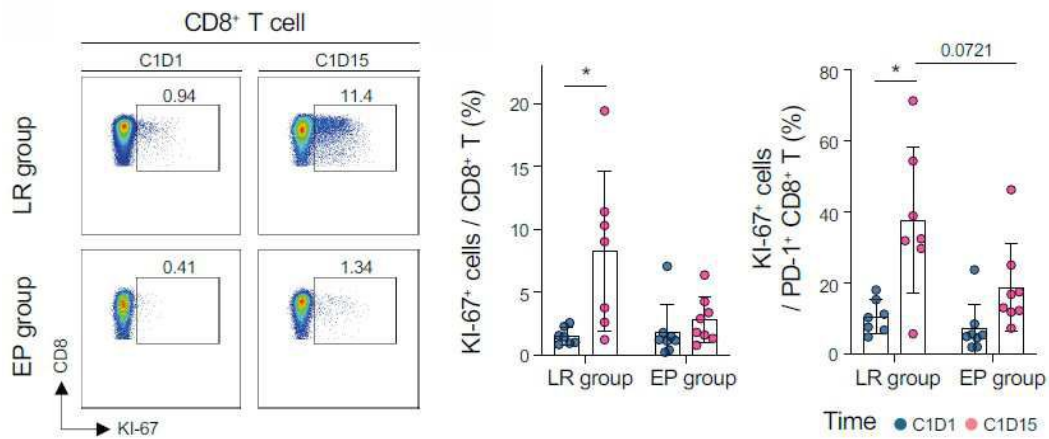
도면4h



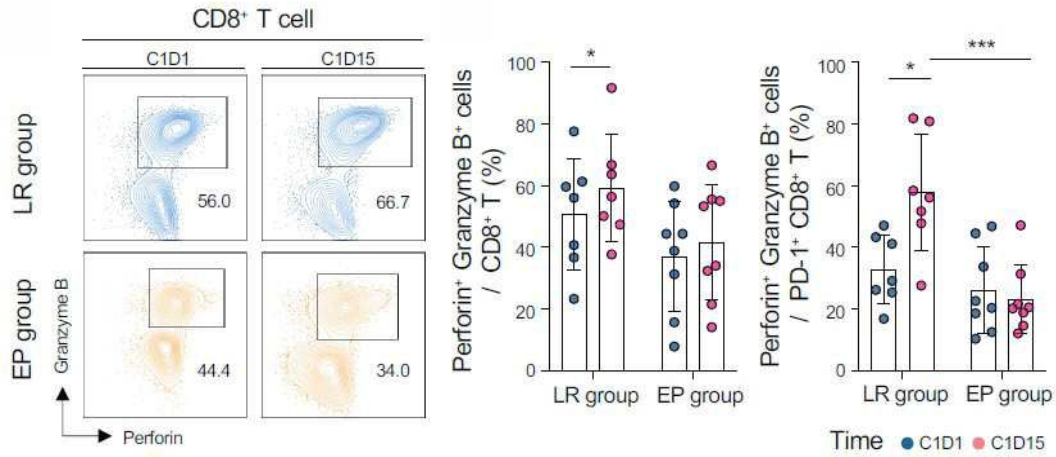
도면4i



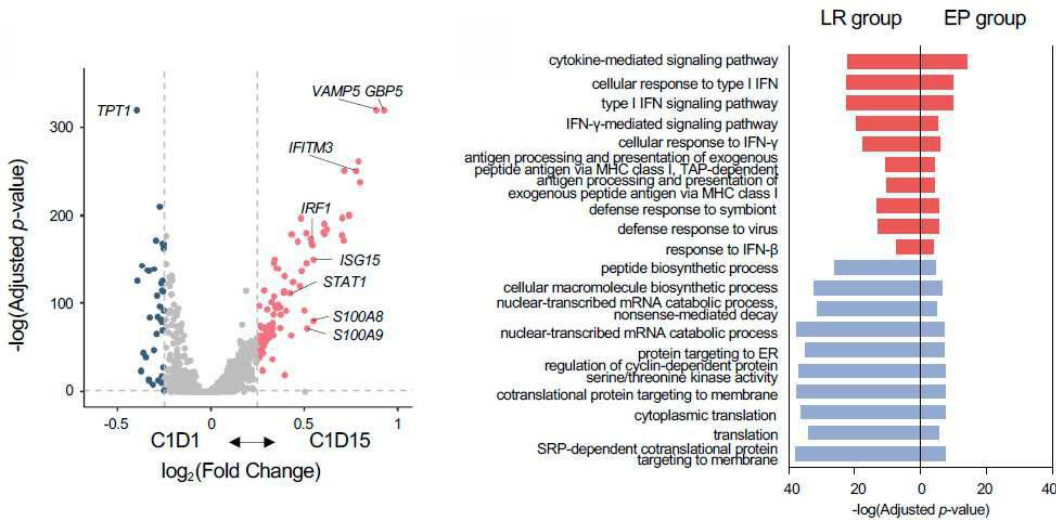
도면4j



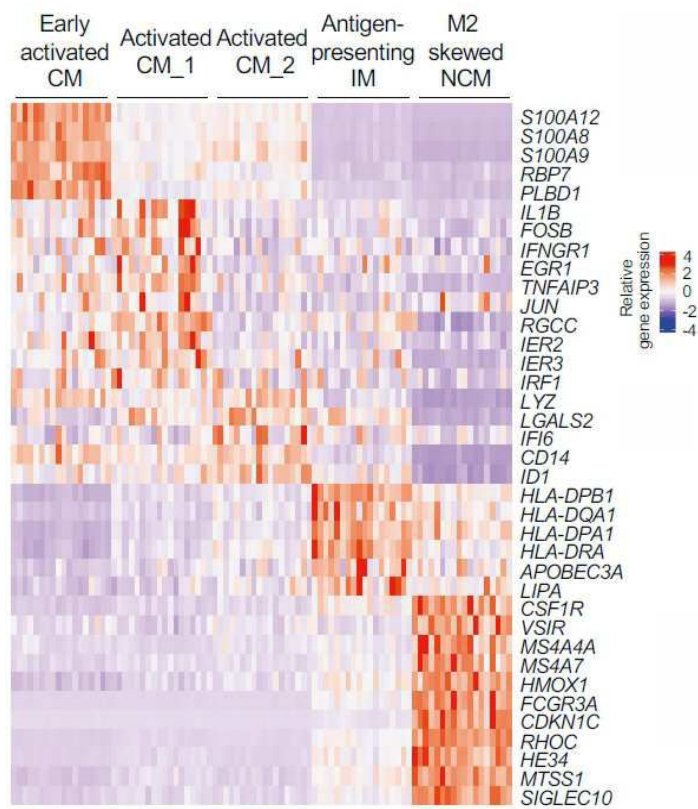
도면4k



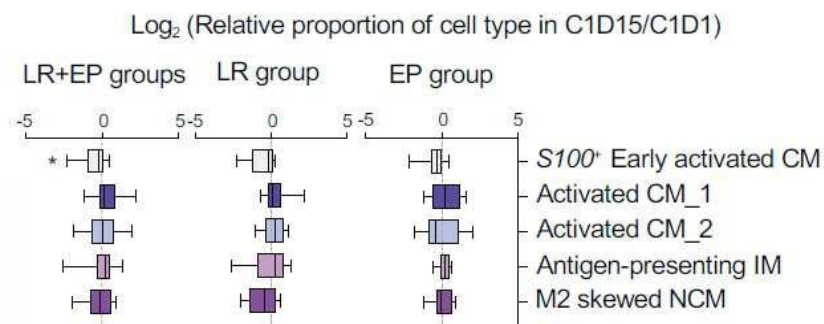
도면5a



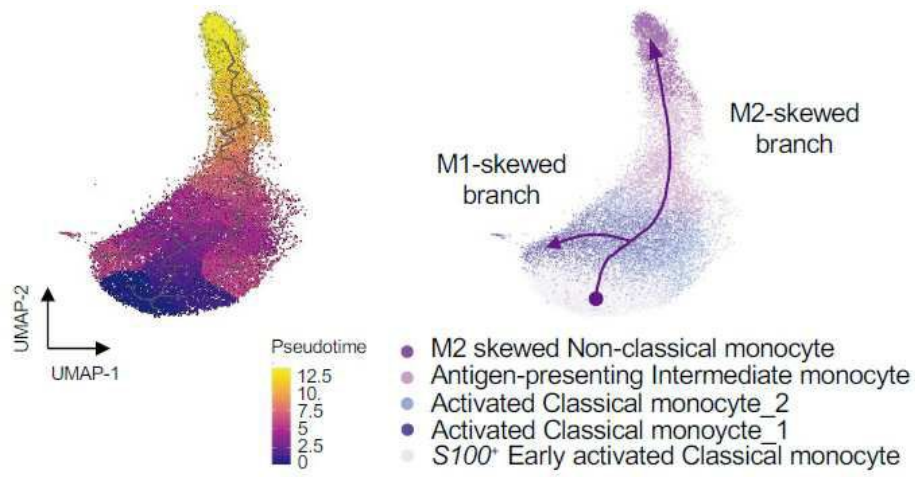
도면5b



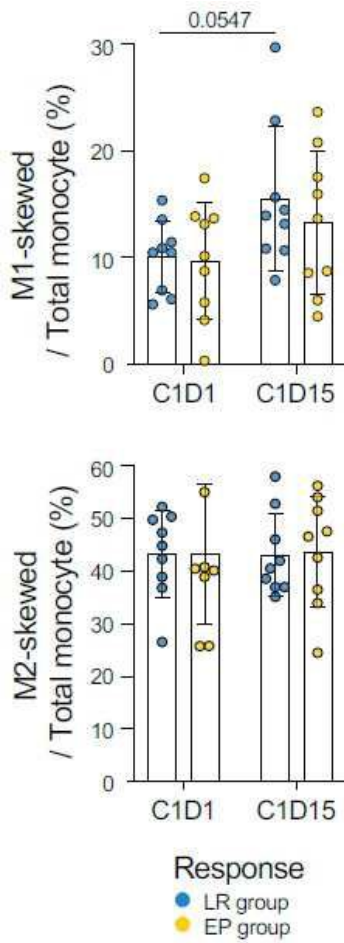
도면5c



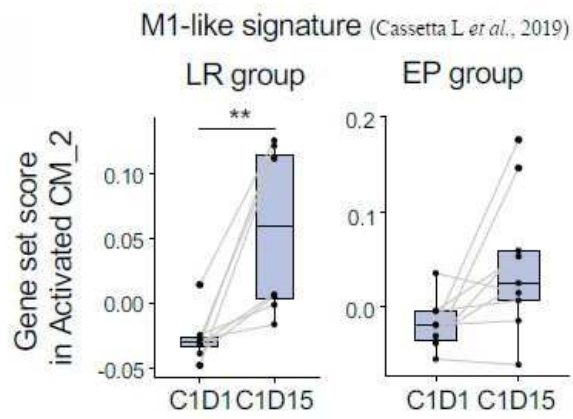
도면5d



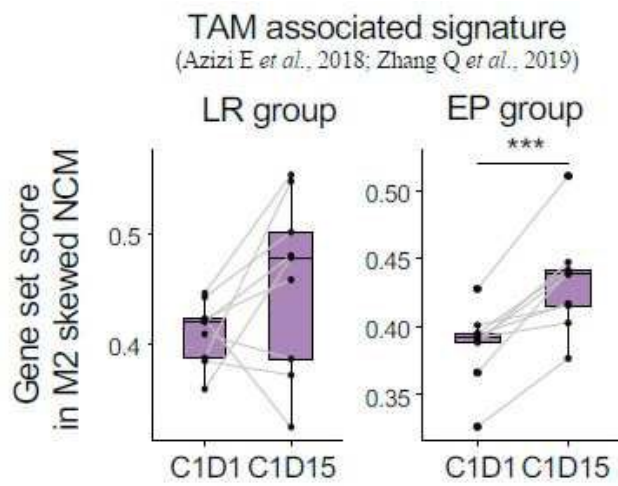
도면5e



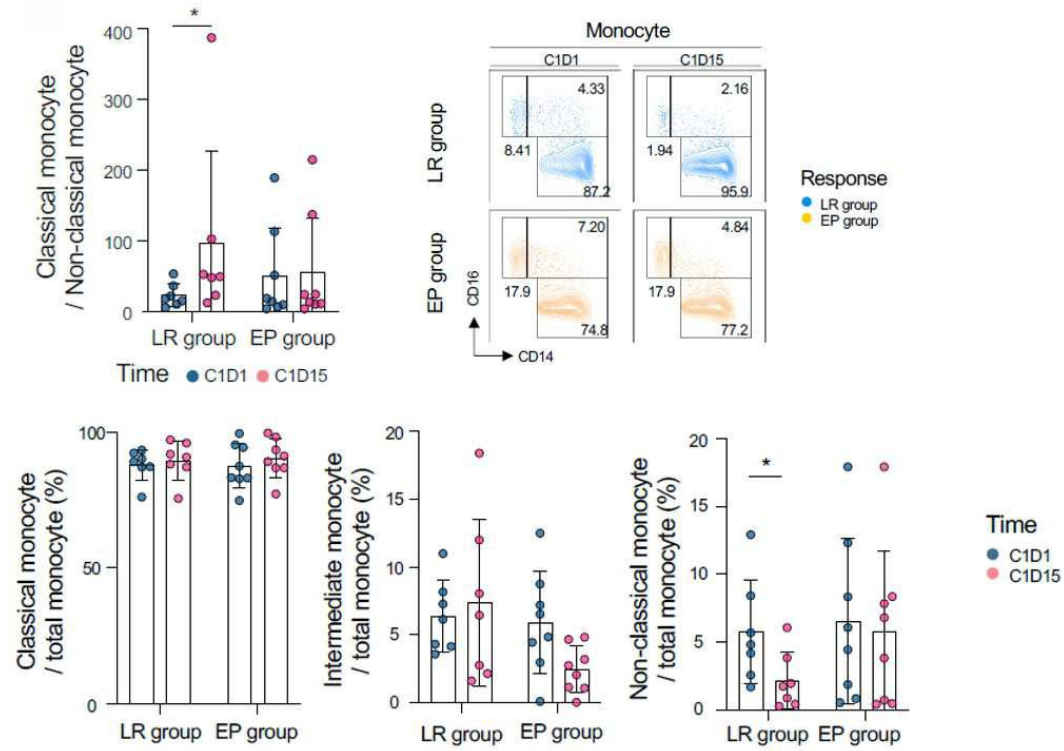
도면5f



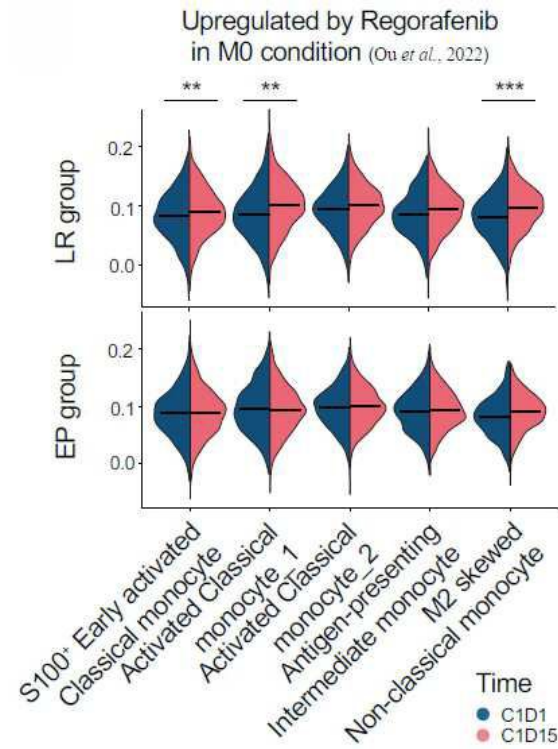
도면5g



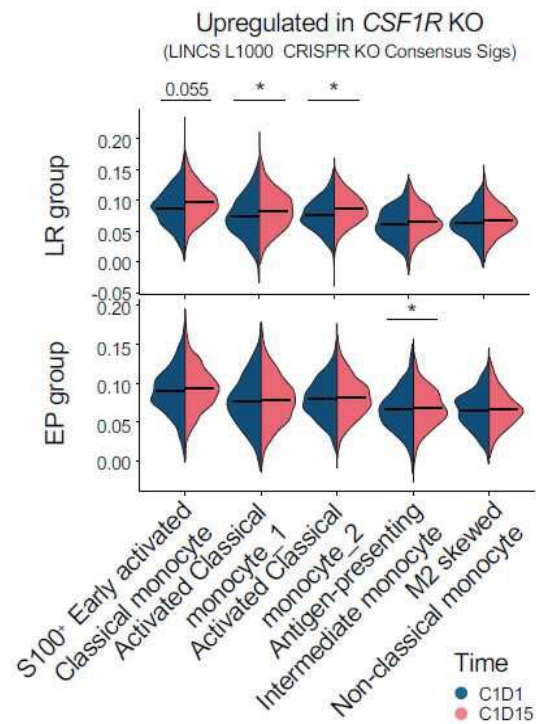
도면5h



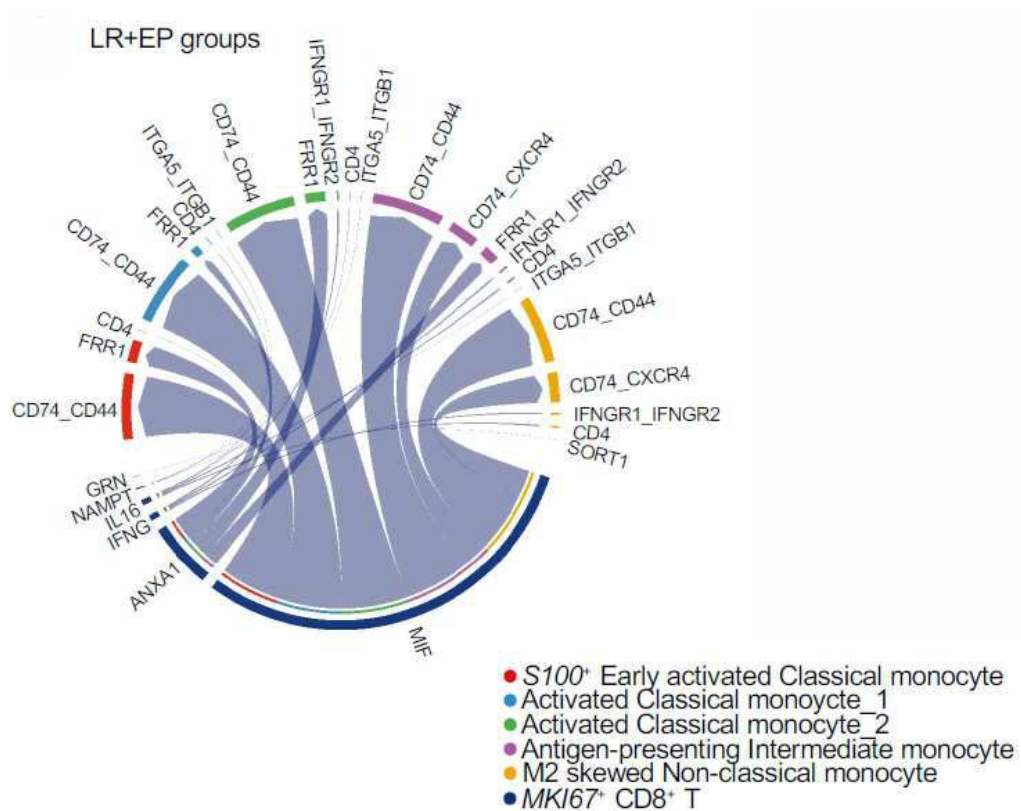
도면5i



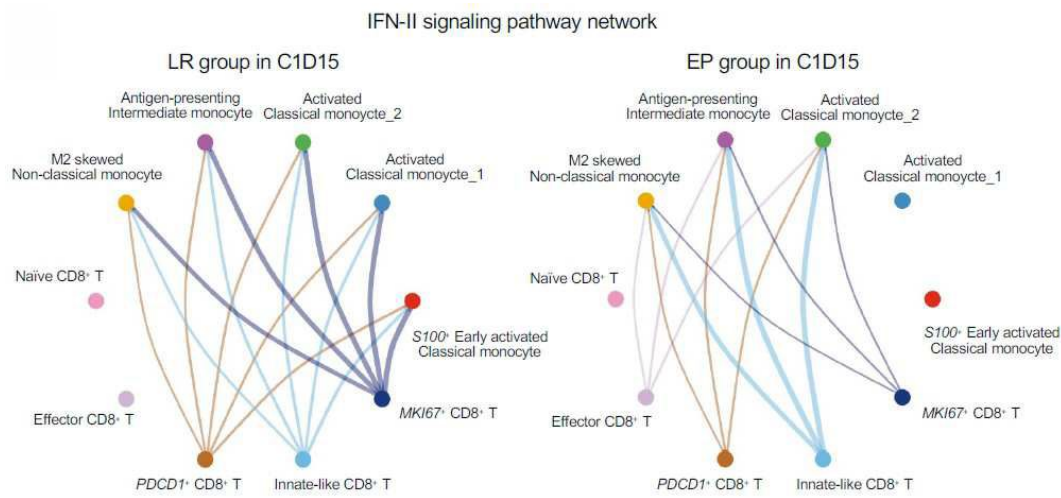
도면5j



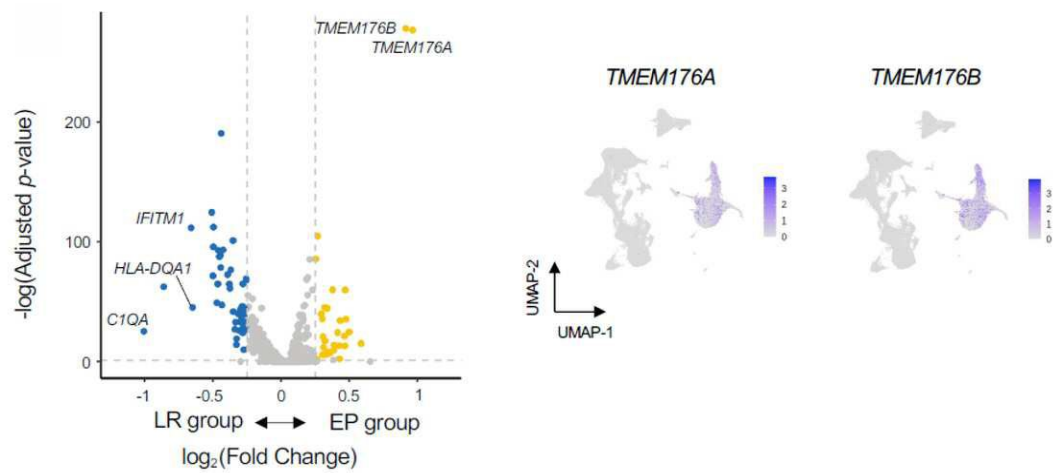
도면6a



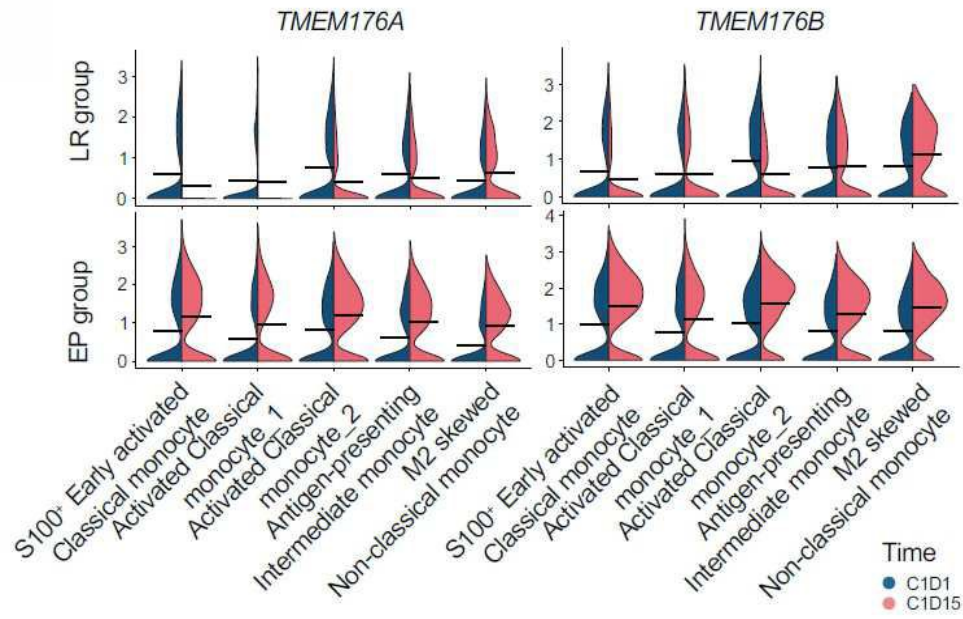
도면6b



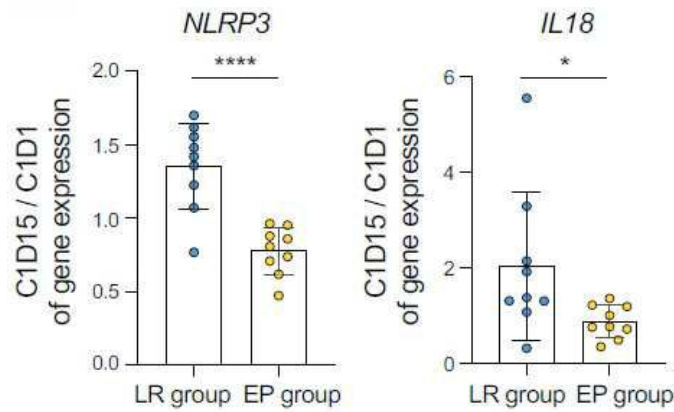
도면7a



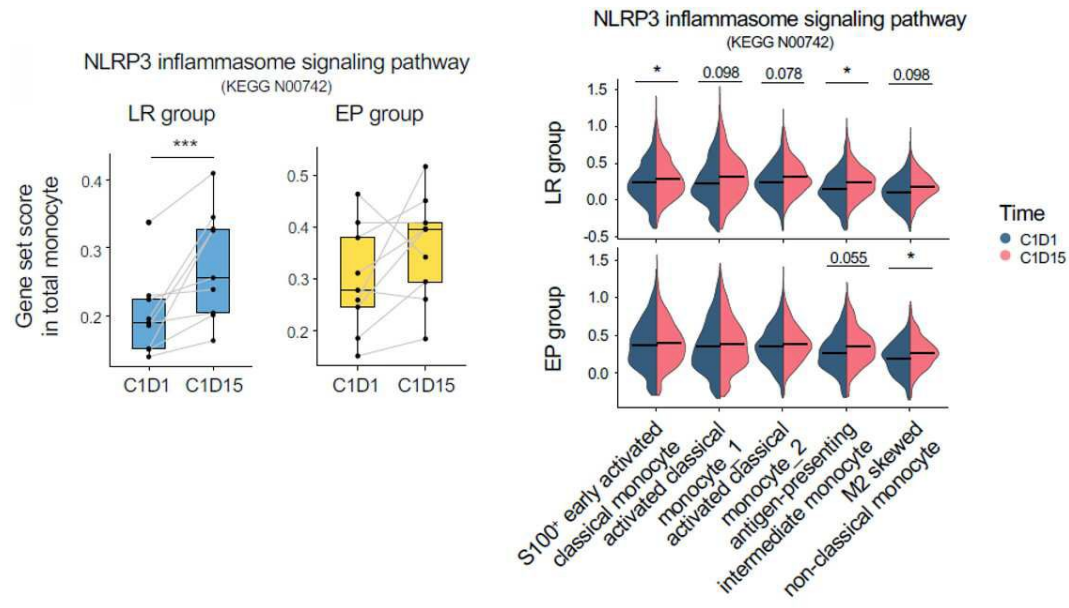
도면7b



도면7c



도면7d



도면7e

