

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2021년 12월 2일 (02.12.2021) WIPO | PCT

WO 2021/242002 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7105 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
A61K 45/06 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(72) 발명자: 김완욱 (KIM, Wan-Uk); 06566 서울시 서초구 서초대로1길 34, 201동 1402호, Seoul (KR). 권리리 (KWON, Ri-Ri); 21526 인천시 남동구 만수로50번길 19, Incheon (KR). 이나은 (LEE, Na-Eun); 04422 서울시 용산구 이촌로65가길 3, 109동 301호, Seoul (KR).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/006538

(22) 국제출원일: 2021년 5월 26일 (26.05.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0063204 2020년 5월 26일 (26.05.2020) KR

(71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).

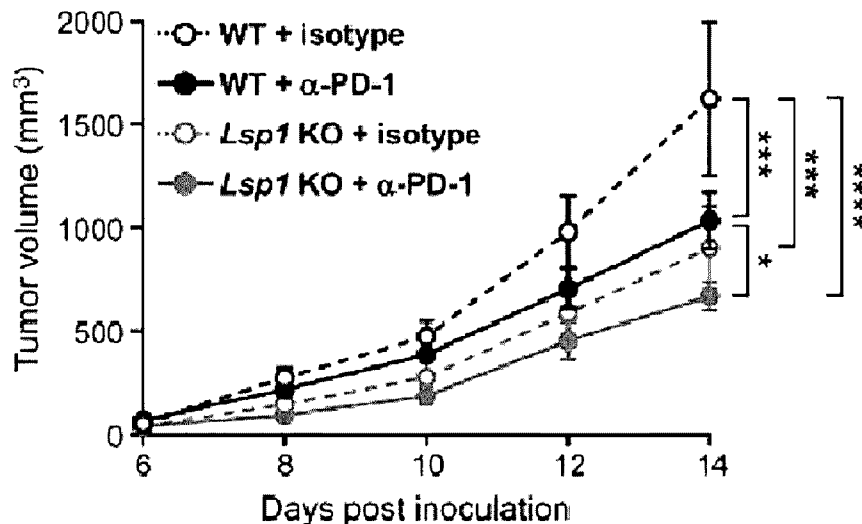
(74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

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

(54) Title: LSP1-DEFICIENT T CELL

(54) 발명의 명칭: LSP1 결핍 T 세포

D



(57) Abstract: The present invention relates to a Leukocyte-specific protein 1 (LSP1)-deficient T cell-based anticancer immunotherapy. According to the present invention, tumor growth, tumor volume and size were reduced by means of LSP1 knockout, and LSP1 deficiency in T cells increases the number, distribution frequency, migration, and invasion of T cells, and increases the production of an anti-tumor cytokine to inhibit tumor growth and enhance tumor-killing ability. Thus, the present invention can be used for T cell-based immunotherapy.

(57) 요약서: 본 발명은 LSP1(Leukocyte-specific protein 1)의 결핍된 T 세포-기반 면역 항암 요법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, LSP1의 낙아웃에 의해 종양 성장, 종양의 부피 및 크기가 감소하였으며, T 세포에서의 LSP1 결핍이 T 세포의 수, 분포 빈도, 이동 및 침윤을 증가시키고, 항 종양 사이토카인의 생산을 증가시킴으로써 종양의 성장을 억제하고 살상능을 향상시키므로, 이를 T 세포-기반 면역 요법에 이용할 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2021/242002 A1



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 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), 유럽 (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))

명세서

발명의 명칭: LSP1 결핍 T 세포

기술분야

- [1] 본 발명은 LSP1(Leukocyte-specific protein 1)의 결핍된 T 세포-기반 면역 항암 요법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 의학 연구에서 수많은 진보에도 불구하고, 암은 문명세계를 통하여 사망의 주요 원인으로 남아있다. 수술, 방사선요법 및 일반화된 화학요법등과 같은 암 치료에 대한 비 특이적인 접근은 순환하며 천천히 자라는 고형암의 선택적인 군의 치료에서 성공적이었다. 그러나, 많은 고형 종양은 이런 접근에 상당한 내성이 있고, 그 경우에 예후(豫後)는 매우 나쁘다. 표준 치료는 세포절제술후에 방사선 요법 또는 화학요법을 포함하나, 완치가 어렵고, 재발이 많다. 이와 같은 암치료를 있어서 부상하는 분야는 면역요법이다. 일반원리는 치료받는 환자에게 특히 악성세포에 대하여 실제로 거부반응인 것을 배치하는 능력을 부여하는 것이다. 1. 다양한 종류의 자극된 자가세포를 사용하는 차용 면역요법(adoptive immunotherapy); 2. 동종이계 림프구의 전신전달; 3. 면역학적으로 반응성인 세포의 종양내 이식; 4. 전신-종양 특이적 면역반응을 발생시키는 먼 부위에서의 백신접종을 포함하는 수 많은 면역학적 전략이 개발중이다. 이들 가운데, 차용 면역요법으로 종양 항원-특이적 림프구의 차용 전달(adoptive transfer)이 유망한데, 지금까지 이들 시도는 말초 혈관으로부터의 단핵 세포 또는 신규 종양 피검체로부터의 종양 침윤 림프구(tumour infiltrating lymphocyte, TIL)에 주로 근거하였다. 최근 악성흑색종 환자의 치료 시도에서, 증식된 TIL의 자가 전달 치료 시도는 51%까지의 객관적 반응률을 보인다고 보고되었다. TIL 세포는 수가 적으며, 종양으로부터의 면역억제 메커니즘으로 인하여 자주 무력(anergic)하게 되므로 증식이 일어나는데 오랜 주기 (수 개월)가 걸린다.
- [3] 종양 침윤 백혈구(tumor-infiltrating leukocytes, TIL)의 밀도, 조성 및 기능적 상태로 구성되는 면역구조(Immune contexture)는 PD-1(programmed cell death protein 1)에 대한 항체(Ab)-기반 면역요법을 포함하는 항-종양 면역요법의 종양 진행 및 효능을 결정한다 (Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, *et al. Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(12):717-34.). 여러 연구에서 고밀도의 T 세포가 결장암, 비소세포폐암, 간세포암, 췌장암, 위암 및 흑색종을 포함하는 다양한 암에 걸린 환자에서 유리한 예후 및 생존과 양의 상관관계가 있다고 보고했다. 따라서, 항원-활성화 된 T 세포, 특히 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)-T 세포를 사용한 차용 세포 전달은 항암 요법의 효능을 향상시키는 유망한 전략 중 하나로 떠오르고있다 (Lim WA, June CH. *Cell* 2017;168(4):724-40.). 예를

들어, CD19-표적화 CAR-T 세포 요법이 재발성 또는 난치성 B-세포 급성림프구성백혈병 및 림프종을 포함하는 혈액 악성 종양 환자에서 현저히 높은 차도를 나타냈다.

- [4] 혈액 악성 종양에서의 성공에도 불구하고 CAR-T 세포 요법은 고형암에서는 항상 효과적이지 않았고 오히려 실망스러웠다. 이와 같은 T-세포 기반 암 면역요법의 주요 장애물 중 하나는 불충분한 T 세포의 종양 덩어리로의 트래피킹일 것이다. 임상 및 전임상 연구에서, 생체 외 확장 후 다량의 T 세포의 주입에도 불구하고 전달된 T 세포의 소량만이 종양 조직의 내부에 도달할 수 있다 (Slaney CY, Kershaw MH, Darcy PK. *Cancer Res* 2014;74(24):7168-74.). 어째서 T 세포의 트래피킹, 침윤 및 침투가 불충분한지는 아직 밝혀지지 않았지만, 고형 종양의 모양이 보다 섬유성이고 덜 침습적이어서 궁극적으로 면역억제성 종양 환경(TME)을 구축하기 때문일 수 있다. 따라서, 고형 종양에 대한 T-세포 기반 면역요법의 효과를 최대화하기 위해서는, 섬유성 및 면역억제성 TME를 파괴 또는 우회함으로써 종양 덩어리 내부에 면역적격성(immunocompetent) T 세포를 성공적으로 전달할 수 있는 방법을 개발할 필요가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [6] 또한, 본 발명의 목적은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 제공하는 것이다.
- [7] 또한, 본 발명의 목적은 항암 보조제를 제공하는 것이다.
- [8] 또한, 본 발명의 목적은 암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 아울러, 본 발명의 목적은 항암 치료 효과를 예측하는 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명의 목적은 LSP1 억제제를 유효성분으로 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 본 발명의 목적은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 본 발명의 목적은 LSP1(Leukocyte-specific protein 1) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [13] 또한, 본 발명의 목적은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 또한, 본 발명의 목적은 LSP1 억제제를 포함하는 약제학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료

방법을 제공하는 것이다.

- [15] 또한, 본 발명의 목적은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [16] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 LSP1 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 LSP1 발현 억제제 또는 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 보조제를 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 암의 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [21] 아울러, 본 발명은 항암 치료 효과를 예측하는 방법을 제공한다.
- [22] 또한, 본 발명은 LSP1 억제제를 유효성분으로 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [23] 또한, 본 발명은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [24] 또한, 본 발명은 LSP1(Leukocyte-specific protein 1) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [26] 또한, 본 발명은 LSP1 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [27] 또한, 본 발명은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [28] 본 발명에 따르면, LSP1의 낙아웃에 의해 종양 성장, 종양의 부피 및 크기가 감소한 것을 확인하였다. 또한, T 세포에서의 LSP1 결핍이 T 세포의 수, 분포 빈도, 이동 및 침윤을 증가시키고, 항 종양 사이토카인의 생산을 증가시킴으로써 종양의 성장을 억제하고 살상능을 향상시키는 것을 확인하였다. 따라서, 이를 T 세포-기반 면역 요법의 표적으로 이용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [29] 도 1a는 *Lsp1* 결핍에 의한 종양에서의 흑색종 성장 변화를 확인한 도이다.
- [30] 도 1b는 *Lsp1* 결핍에 의한 종양에서의 흑색종 부피 변화를 확인한 도이다.
- [31] 도 1c는 *Lsp1* 결핍에 의한 종양에서의 흑색종 무게 변화를 확인한 도이다.
- [32] 도 1d는 *Lsp1* 결핍에 의한 종양에서의 TILs 수의 변화를 확인한 도이다.
- [33] 도 1e는 *Lsp1* 결핍에 의한 종양에서의 CD4⁺ T 세포의 침윤을 면역조직화학염색으로 확인한 도이다.
- [34] 도 1f는 *Lsp1* 결핍에 의한 종양에서의 CD8⁺ T 세포의 침윤을 면역조직화학염색으로 확인한 도이다.
- [35] 도 1g는 *Lsp1* 결핍에 의한 종양에서의 CD4⁺ T 세포의 침윤을 면역조직화학염색으로 확인하여 정량화한 것이다.
- [36] 도 1h는 *Lsp1* 결핍에 의한 종양에서의 CD8⁺ T 세포의 침윤을 면역조직화학염색으로 확인하여 정량화한 것이다.
- [37] 도 2a는 WT 및 *Lsp1* KO 마우스 유래 종양-침윤성 CD45⁺ 백혈구에서 CD3-CD19⁺ B 세포 및 CD3-NK 1.1⁺ NK 세포의 비율을 확인한 도이다.
- [38] 도 2b는 WT 및 *Lsp1* KO 마우스 유래 종양-침윤 CD4⁺ T 세포에서 T_{reg} 세포(Foxp3⁺ 조절 T 세포)의 분포 빈도를 확인한 도이다.
- [39] 도 2c는 WT 및 *Lsp1* KO 마우스 유래 CD45⁺ 백혈구에서 CD11b⁺의 분포 빈도, CD11b⁺에서 TAMs (Ly-6C^{low}F4/80^{high} 세포)의 분포 빈도, 및 Ly-6C^{low}F4/80^{high} 세포에서 M1-유사 TAMs (CD206^{low}MHCII^{high} 세포) 또는 M2-유사 TAMs (CD206^{high}MHCII^{low} 세포)의 분포 빈도를 확인한 도이다.
- [40] 도 3a는 T 세포-특이적 *Lsp1* 과발현 마우스 제조방법을 도식화한 것이다.
- [41] 도 3b는 T 세포-특이적 *Lsp1* 과발현 마우스의 비장에서 CD4⁺ T 세포의 *Lsp1* mRNA 발현 수준을 qRT-PCR로 분석한 것이다.
- [42] 도 3c는 T 세포-특이적 *Lsp1* 과발현 마우스의 비장에서 CD8⁺ T 세포의 *Lsp1* mRNA 발현 수준을 qRT-PCR로 분석한 것이다.
- [43] 도 3d는 T 세포-특이적 *Lsp1* 과발현 마우스의 종양 성장을 확인한 도이다.
- [44] 도 3e는 T 세포-특이적 *Lsp1* 과발현 마우스의 종양 부피를 확인한 도이다.
- [45] 도 3f는 T 세포-특이적 *Lsp1* 과발현 마우스의 종양 무게를 확인한 도이다.
- [46] 도 3g는 T 세포-특이적 *Lsp1* 과발현 마우스에서 B16 흑색종에 침윤된 T 세포를 유세포 분석으로 확인한 도이다.
- [47] 도 3h는 T 세포-특이적 *Lsp1* 과발현 마우스에서 B16 흑색종에 침윤된 T 세포를 유세포 분석으로 확인하여 정량화한 것이다.
- [48] 도 4a는 WT 및 *Lsp1* Tg 마우스 유래 종양-침윤성 CD45⁺ 백혈구에서 CD3-CD19⁺ B 세포 및 CD3-NK 1.1⁺ NK 세포의 비율(%)을 확인한 도이다.
- [49] 도 4b는 WT 및 *Lsp1* Tg 마우스 유래 종양-침윤 CD4⁺ T 세포에서 T_{reg} 세포(Foxp3⁺ 조절 T 세포)의 분포 빈도를 확인한 도이다.
- [50] 도 4c는 WT 및 *Lsp1* Tg 마우스 유래 CD45⁺ 백혈구에서 CD11b⁺의 분포 빈도, CD11b⁺에서 TAMs (Ly-6C^{low}F4/80^{high} 세포)의 분포 빈도, 및 Ly-6C^{low}F4/80^{high}

세포에서 M1-유사 TAMs (CD206^{low}MHCII^{high} 세포) 또는 M2-유사 TAMs (CD206^{high}MHCII^{low} 세포)의 분포 빈도를 확인한 도이다.

- [51] 도 5a는 T 세포에서의 LSP1 발현 및 이의 T 세포 이동에서의 역할을 비장 CD8⁺ T 세포로 수행한 T 세포 이동 분석으로 확인한 도이다.
- [52] 도 5b는 T 세포에서의 LSP1 발현 및 이의 T 세포 이동에서의 역할을 종양-침윤 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포에서 LSP1의 발현 수준으로 확인한 도이다.
- [53] 도 5c는 T 세포에서의 LSP1 발현 및 이의 T 세포 이동에서의 역할을 항-CD3/CD28 Abs 및 IFN- γ 로 자극한 T 세포에서의 LSP1 발현 증가로 확인한 도이다.
- [54] 도 5d는 T 세포에서의 LSP1 발현 및 이의 T 세포 이동에서의 역할을 항-CD3/CD28 Abs 및 IFN- γ 로 자극한 T 세포에서의 LSP1 발현 증가로 확인한 것이다.
- [55] 도 6a는 *Lsp1* KO T 세포에서 세포독성 관련 유전자 및 DEGs 간의 오버랩을 도시한 벤다이어그램을 나타낸 도이다.
- [56] 도 6b는 *Lsp1* KO T 세포에서 '세포독성'의 생물학적 과정과 관련된 10 GOBP 용어(GOBP terms)의 NES(Normalized enrichment scores)를 나타낸 도이다.
- [57] 도 6c는 *Lsp1* KO T 세포에서 배지 또는 항-CD3/28 Abs로 자극된 *Lsp1* KO T 세포가 풍부한 '세포 사멸' 및 '백혈구-매개 세포독성'의 GSEA 도표를 나타낸 도이다.
- [58] 도 7a는 종양-보유 WT 및 *Lsp1* KO 마우스의 비장 중량을 정량화한 도이다.
- [59] 도 7b는 종양-보유 WT 및 *Lsp1* KO 마우스의 비장에서의 세포수를 정량화한 도이다.
- [60] 도 7c는 종양-보유 WT 및 *Lsp1* KO 마우스 비장에서의 T 세포의 조성을 유세포 분석으로 확인한 도이다.
- [61] 도 7d는 종양-보유 WT 및 *Lsp1* KO 마우스 비장 CD4⁺ T 세포에서의 IL-2, TNF- α 및 IFN- γ 발현을 유세포 분석으로 확인한 도이다.
- [62] 도 7e는 종양-보유 WT 및 *Lsp1* KO 마우스 비장 CD8⁺ T 세포에서의 IL-2, TNF- α 및 IFN- γ 발현을 유세포 분석으로 확인한 도이다.
- [63] 도 8a는 *Lsp1* KO 마우스의 종양-침윤 T 세포에서의 TNF- α 및 IFN- γ 발현을 확인한 도이다.
- [64] 도 8b는 *Lsp1* KO 마우스의 종양-침윤 T 세포에서의 TNF- α 및 IFN- γ 발현을 확인한 도이다.
- [65] 도 8c는 *Lsp1* Tg 마우스의 종양-침윤 T 세포에서의 TNF- α 및 IFN- γ 발현을 확인한 도이다.
- [66] 도 8d는 *Lsp1* Tg 마우스의 종양-침윤 T 세포에서의 TNF- α 및 IFN- γ 발현을 확인한 도이다.
- [67] 도 9a는 B16 흑색종이 접종된 WT 및 *Lsp1* Tg 마우스의 비장 중량을 정량화한 것이다.

- [68] 도 9b는 B16 흑색종이 접종된 WT 및 *Lsp1* Tg 마우스의 비장의 세포수를 정량화한 것이다.
- [69] 도 9c는 B16 흑색종이 접종된 WT 및 *Lsp1* Tg 마우스의 비장의 세포를 유세포 분석으로 확인한 도이다.
- [70] 도 9d는 B16 흑색종이 접종된 WT 및 *Lsp1* Tg 마우스의 비장 CD4⁺ T 세포에서의 IL-2, TNF- α 및 IFN- γ 의 분포 빈도를 유세포 분석으로 확인한 도이다.
- [71] 도 9e는 B16 흑색종이 접종된 WT 및 *Lsp1* Tg 마우스의 비장 CD8⁺ T 세포에서의 IL-2, TNF- α 및 IFN- γ 의 분포 빈도를 유세포 분석으로 확인한 도이다.
- [72] 도 10a는 종양 진행에서 *Lsp1* KO 또는 *Lsp1* Tg T 세포의 *Rag1* KO 마우스로의 차용 전달을 유세포 분석으로 확인한 도이다.
- [73] 도 10b는 종양 진행에서 *Lsp1* KO 또는 *Lsp1* Tg T 세포의 *Rag1* KO 마우스로의 차용 전달을 확인한 도이다.
- [74] 도 10c는 종양 진행에서 *Lsp1* 결핍에 의한 항-PD-1 항체의 항-종양 효과 강화 효과를 확인하기 위한 과정을 도식화한 것이다.
- [75] 도 10d는 종양 진행에서 *Lsp1* 결핍에 의한 항-PD-1 항체의 항-종양 효과 강화 효과를 확인한 것이다.
- [76] 도 10e는 LSP1 결핍의 치료적 의미를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [77] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [78] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [79]
- [80] 일 측면에서, 본 발명은 LSP1(Leukocyte-specific protein 1) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

- [81] 일 구현예에서, 발현 억제제는 siRNA(small interfering RNA), shRNA(small hairpin RNA), miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산 앵타머일 수 있다.
- [82] 일 구현예에서, 상기 발현 억제제는 T 세포-특이적 LSP1 발현 억제제일 수 있다.
- [83] 일 구현예에서, DNA 절단 활성이 불활성화된(nuclease-deactivated) Cas12a 또는 Cas9 단백질, 반복적인 염기 서열(direct repeat, DR) 및 LSP1 유전자에 상보적인 프로토스페이서(protospacer)를 포함하는 crRNA(CRISPR RNA)를 포함할 수 있다.
- [84] 일 구현예에서, 상기 암은 고형암일 수 있으며, 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [85] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 T 세포의 수 및 분포 빈도를 증가시킬 수 있다.
- [86] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 T 세포의 종양으로의 침윤을 증가시킬 수 있다.
- [87] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 T 세포의 이동을 조절할 수 있다.
- [88] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 종양 성장을 억제할 수 있다.
- [89] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 T 세포의 TNF- α 및 IFN- γ 발현 및 분비를 증가시킬 수 있다.
- [90] 일 구현예에서, T 세포는 도움 T 세포(helper T cell) 또는 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell)일 수 있으며, 도움 T 세포는 CD4⁺ T 세포일 수 있고, 세포독성 T 세포는 CD8⁺ T 세포일 수 있다.
- [91] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역체크포인트 억제제(immune checkpoint inhibitor)를 추가로 포함할 수 있으며, 면역체크포인트 억제제(면역 관문 억제제)는 PD-1 억제제 또는 CTLA-4 억제제일 수 있고, 항-PD-1 항체일 수 있다.
- [92] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역체크포인트 억제제와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있다.
- [93] 본 발명에서 사용되는 용어, "발현 억제"란 표적 유전자의 (mRNA로의) 발현 또는 (단백질로의) 번역 저하를 야기하는 것을 의미하며, 바람직하게는 이에 의해 표적 유전자 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을 의미한다.

- [94] 본 발명에서 사용되는 용어, "프로토스페이서"는 타겟 DNA와 혼성화되는 핵산 서열을 의미한다.
- [95] 본 발명에서 사용되는 용어, "혼성화"는 하나 이상의 핵산이 반응하여, 복합체를 형성하고, 이 복합체는 핵산 잔기의 염기 사이의 수소 결합을 통해 안정화되는 반응을 지칭한다.
- [96] 본 발명에서 사용되는 용어, "발현"은 핵산이 DNA 주형으로부터(예를 들어, mRNA 또는 기타 RNA 전사물로) 전사되는 과정 및/또는 이후에 전사된 mRNA가 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역되는 과정을 지칭한다.
- [97] 본 발명의 유전자 발현 억제용 조성물은 DNA 절단 활성이 불활성화된(nuclease-deactivated) Cas12a 단백질 또는 Cas9 단백질을 암호화하는 DNA를 포함하는 제조합 벡터 및 crRNA를 암호화하는 DNA를 포함하는 제조합 벡터의 형태로 세포 또는 유기체에 도입되거나, dCas12a 단백질 또는 Cas9 단백질, 및 crRNA를 포함하는 혼합물 또는 이들이 복합체를 이루는 리보핵산단백질 형태로 세포 또는 유기체에 도입되거나, dCas12a 단백질 또는 Cas9 단백질, 및 crRNA를 함께 포함하는 벡터로 세포 또는 유기체에 도입될 수 있다.
- [98] 본 발명에서, 상기 crRNA의 구체적 서열은 dCas12a 단백질 또는 Cas9 단백질의 종류(유래 미생물)에 따라서 적절히 선택할 수 있다.
- [99] 본 발명에서, 상기 dCas12a 단백질 또는 Cas9 단백질 등의 엔도뉴클레아제는 미생물에서 분리된 것 또는 제조합적 방법 또는 합성적 방법으로 비자연적 생산된 것(non-naturally occurring)일 수 있다. 상기 엔도뉴클레아제는 세포의 핵 내 전달을 위하여 통상적으로 사용되는 요소를 N-말단 또는 C-말단(또는 이를 암호화하는 핵산 분자의 5' 말단 또는 3' 말단)에 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 엔도뉴클레아제 단백질은 정제된 단백질 형태로 사용되거나, 이를 암호화하는 DNA, 또는 상기 DNA를 포함하는 제조합 벡터의 형태로 사용될 수 있다.
- [100] 본 발명에서 사용되는 용어, "암" 및 "종양"은 서로 혼용될 수 있다.
- [101] 일 측면에서, 본 발명은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포에 관한 것이다.
- [102] 일 측면에서, 본 발명은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [103] 일 구현예에서, 상기 T 세포는 활성화 T 세포일 수 있으며, CD45⁺ T 세포일 수 있다.
- [104] 일 구현예에서, 상기 T 세포는 도움 T 세포(helper T cell) 또는 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell)일 수 있으며, 도움 T 세포는 CD4⁺ T 세포일 수 있고, 세포독성 T 세포는 CD8⁺ T 세포일 수 있다.
- [105] 일 구현예에서, 상기 T 세포는 LSP1 결실된 CAR(chimeric antigen receptor)-T 세포일 수 있고, 암세포 항원을 표적으로 하는 CAR를 포함할 수 있다.
- [106] 일 구현예에서, 상기 CAR은 암세포 항원-결합 도메인, 막횡단 도메인, 및

세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

- [107] 일 구현예에서, 상기 T 세포에서 LSP1의 발현 및/또는 기능이 감소되거나 또는 제거될 수 있다.
- [108] 일 구현예에서, 상기 T 세포는 대상체에 대해 자가일 수 있다.
- [109] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역체크포인트 억제제를 추가로 포함할 수 있으며, 면역체크포인트 억제제는 PD-1 억제제 또는 CTLA-4 억제제일 수 있고, 항-PD-1 항체일 수 있다.
- [110] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역체크포인트 억제제와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있다.
- [111] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 발달 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [112] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 암 및 이로 인한 합병증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [113] 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 개체의 상태 등에 따라 달라질 수 있다.
- [114] 본 발명의 약학적조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체의 건강상태, 암의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [115] 일 구현예에서, 상기 약제학적 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다.
- [116] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수,

링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[117] 본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 단백질을 0.0001 내지 10 중량 %로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량 %를 포함한다.

[118] 본 발명의 약제학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[119] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 경구 투여 하는 것이 가장 바람직하다. 투여량은 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[120] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다.

[121] 일 측면에서, 본 발명은 LSP1 발현 억제제 또는 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 보조제에 관한 것이다.

[122] 일 구현예에서, 항암제는 에리불린(eribulin), 카보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 할라벤(Halaven), 5-플루오로우라실(5-FU), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(Vincristine), 빈블라스틴(Vinblastine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파클리탁셀(Paclitaxel), 도세탁셀(Docetaxel), 에토포사이드(Etoposide), 토포테칸(Topotecan), 이리노테칸(Irinotecan),

닥티노마이신(Dactinomycin), 독소루비신(Doxorubicin),
다우노루비신(Daunorubicin), 발루비신(valrubicin), 플로타미드(flutamide),
젬시타빈(gemcitabine), 미토마이신(Mitomycin) 또는 블레오마이신(Bleomycin)일
수 있다.

- [123] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 면역체크포인트 억제제를 추가로 포함할 수 있으며, 면역체크포인트 억제제는 PD-1 억제제 또는 CTLA-4 억제제일 수 있고, 항-PD-1 항체일 수 있다.
- [124] 일 측면에서, 본 발명은 대상으로부터 분리된 T 세포에서 LSP1의 발현 수준을 확인하는 것을 포함하는 암의 진단 또는 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [125] 본 발명에서, 사용된 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [126] 일 측면에서, 본 발명은 a) 대상으로부터 분리된 T 세포에서 LSP1의 발현 수준을 측정하는 단계; b) 항암 치료를 수행하는 단계; c) 대상으로부터 분리된 T 세포에서 LSP1의 발현 수준을 재측정하는 단계; 및 d) 상기 a) 단계의 측정값과 상기 c) 단계의 측정값을 비교하는 단계를 포함하는 항암 치료에 대한 예후를 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [127] 일 구현예에서, 상기 발현 수준 측정은 mRNA의 발현 수준 또는 유전자에 의해 코딩되는 단백질 수준을 확인함으로써 알 수 있다. mRNA의 양은 프라이머 쌍 또는 프로브를 이용하여 확인할 수 있으며, 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR (Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RNase protection assay, RPA), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 양은 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있으며, 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[128]

[129] 또한, 본 발명은 LSP1 억제제를 유효성분으로 포함하는 LSP1 과발현에 의해

유발되는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[130]

[131] 또한, 본 발명은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[132]

[133] 또한, 본 발명은 LSP1(Leukocyte-specific protein 1) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[134]

본 발명에서 용어, "개체"란 암이 이미 발병되었거나 발병될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 발현 억제제 또는 세포를 포함하는 조성물을 개체에 투여함으로써, 상기 질환을 효율적으로 예방 및 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물로 다양한 암 또는 전이성 암이 발병한 인간을 치료할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물로 다양한 암종 또는 종양이 발병한 쥐 또는 돼지를 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물은 기존의 항암제 또는 항암보조제와 병행하여 투여할 수 있다.

[135]

본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체의 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로, 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[136]

또한, 본 발명은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[137]

[138] 또한, 본 발명은 LSP1 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[139]

[140] 또한, 본 발명은 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 LSP1 과발현에 의해 유발되는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[141]

- [142] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [143] 실시예 1. LSP1 억제에 의한 종양 성장 억제

- [144] 1-1. LSP1 억제에 의한 종양 성장 억제 효과

- [145] 5X10⁵ 개의 B16 흑색종(melanoma)을 PBS에 재부유시킨 뒤 8-12 주령 WT 마우스 및 *Lsp1* KO 마우스 (Dr. Laurent Sabbagh, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada)의 우측 옆구리에 피하주사하고 2-3일마다 캘리퍼로 종양 부피를 측정하고 하기 수학적 식 1로 계산하여 3주 동안 종양의 성장을 확인하였다.

- [146] [수학적 식 1]

- [147] $V(\text{mm}^3) = D \times d^2 \times 0.52$

- [148] D (mm): 가장 큰 종양의 수직 직경; 및

- [149] d (mm): 가장 작은 종양의 수직 직경.

- [150]

- [151] 그 결과, WT 마우스에 비해 *Lsp1* KO 마우스에서 종양 성장이 현저하게 감소되었다 (도 1A). 또한, 종양 접종 14일 후 *Lsp1* KO 마우스에서 종양의 부피 및 중량이 WT 마우스에서보다 현저히 낮게 나타났다 (도 1B 및 1C).

- [152]

- [153] 1-2. LSP1 억제에 의한 T 세포의 종양 침윤 촉진 효과

- [154] 상기의 흑색종을 갖는 마우스에서 *Lsp1* 결핍에 의해 영향을 받는 종양 미세환경(tumor microenvironments, TME)에서의 면역 구조(immune contexture)를 확인하기 위해, WT 마우스에서 평균 종양 부피가 약 700 mm³에 도달하였을 때 종양을 가지고 있는(tumor-bearing) WT 및 *Lsp1* KO 마우스의 종양 침윤 백혈구(tumor-infiltrating leukocytes, TILs)를 유세포 분석하였다. 구체적으로, TILs를 분리하기 위해, WT 마우스의 평균 종양 부피가 500 또는 700 mm³에 달했을 때 WT 및 *Lsp1* KO 마우스를 희생시키고 원발성 종양을 기계적으로 절제하고 분리하였다. 그 후 70 μm 세포 여과기로 여과하여 종양 세포 현탁액을 얻고, Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Chicago, IL) 밀도 구배 원심분리기를 이용하여 TILs를 분리하였다. 분리한 단일-세포 현탁액을 PBS로 제척한 뒤 유세포 분석을 수행하였다. 유세포 분석을 위해, CD45 (30-F11, BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ), CD3 (145-2C11, Invitrogen, Carlsbad, CA), CD4 (GK1.5, Biolegend, San Diego, CA) 및 CD8 (53-6.7, Biolegend)와 같은 플로오로크롬-표지된 항-마우스 항체들로 표면 염색을 30분 동안 4 °C에서 수행하였다. 이 후, 세포를 FACS 버퍼에 재부유하고 DIVA 소프트웨어로 FACS CantoII(BD Biosciences) 또는 LSR Fortessa (BD Biosciences)를 이용하여 유세포 분석하였고, 이를 통해 얻은 데이터는 FlowJo 소프트웨어 (FlowJo, LLC, Franklin

Lakes, NJ)로 분석하였다. 그 결과, *Lsp1* KO 마우스의 종양이 WT 마우스의 종양보다 현저히 많은 수의 침윤된 CD45⁺ 세포, CD3⁺, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 가지는 것으로 나타났다 (도 1D). 이를 통해, *Lsp1* KO 마우스에서 흑색종의 성장 감소가 T 세포의 구성보다는 증가된 세포수와 관련될 수 있음을 유추할 수 있다.

- [155] 또한, CD8⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포를 면역조직화학염색하여 종양에서의 T 세포의 침윤을 확인하였다. 구체적으로, OCT-임베딩된 종양 조직의 7 μ m 절편을 차가운 아세톤으로 -20°C에서 10분 동안 고정하고 절편을 상온에서 30분 동안 0.3% H₂O₂에서 인큐베이션함으로써 내인성 퍼옥시다아제를 퀀칭한 뒤, 조직을 10% 정상 당나귀 혈청으로 상온에서 1 시간 동안 블로킹하였다. 그 후, 조직 절편을 랫 항-마우스 CD4 (1:1000, Biolegend) 또는 랫 항-마우스 CD8 (1:1000, Biolegend) Ab로 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하고 각 슬라이드를 PBS로 3회 세척하고 항-랫 이차 Ab (1:100, Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 이용하여 VECTASTAIN Elite ABC HRP kit (Vector Laboratories)로 검출하였다. 양성 세포는 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Vector Laboratories)를 이용하여 검출하고 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 이미지는 Pannoramic MIDI slide scanner (3DHISTECH)로 얻었으며, 염색 양성 세포를 마우스마다 상이한 두 개의 슬라이드, 각 슬라이드의 6개 필드에서 수동으로 계수하였다. 그 결과, CD4⁺ T 세포와 달리, CD8⁺ T 세포의 침윤이 WT 마우스보다 *Lsp1*-결핍 마우스에서 종양의 중심 및 가장자리 둘 다에서 현저히 높게 나타나 (도 1E 내지 1H), *Lsp1* 결핍이 CD8⁺ T 세포의 종양 중심으로의 침윤을 촉진하는 것을 확인할 수 있었다.

[156]

[157] 1-3. 면역 세포 집단 확인

- [158] TME를 구성하는 T 세포 외의 다른 면역 세포 집단에 대한 LSP1 억제에 의한 종양에서의 영향을 확인하기 위해, 종양 내 NK1.1⁺ NK 세포, CD19⁺ B 세포, 조절 T 세포 (T_{reg} cells: Foxp3⁺ CD4⁺ T cells) 및 종양 관련 대식세포(tumor-associated macrophages, TAMs)의 분포 빈도 및 수를 *Lsp1* KO 마우스 및 WT 마우스의 종양에서 유세포 분석으로 확인하였다.

- [159] 그 결과, TILs의 절대수가 *Lsp1* KO 마우스의 종양에서 현저히 많았음에도 불구하고 종양 내 NK1.1⁺ NK 세포 및 CD19⁺ B 세포의 분포 빈도에 차이가 없었으며 (도 2A), 조절 T 세포 (T_{reg} cells: Foxp3⁺ CD4⁺ T cells)의 분포 빈도도 차이가 나타나지 않았다 (도 2B). 또한, CD11b⁺ 골수성 세포(myeloid cell)가 *Lsp1* KO 및 WT 마우스에서 유사하게 나타난 반면, CD11b⁺Ly6C^{low}F4/80^{high} 종양 관련 대식세포 (TAMs)의 분포 빈도는 WT 마우스에 비해 *Lsp1* KO 마우스의 종양에서 현저히 감소하였다 (도 2C). 상기 결과를 통해 주목할만한 것은, *Lsp1* KO 마우스의 종양에서 TAM들 중에 전-염증성 M1-유사 (CD206^{low} MHCII^{high}) TAMs가 현저히 증가했고, 항-염증성 M2-유사 (CD206^{high} MHCII^{low}) TAMs가 현저히 감소한 것이다 (도 2C).

[160]

[161] 상기 결과들을 통해, *Lsp1*-결핍 마우스가 CD8⁺ T 세포의 침윤을 향상시키고, M2-유사 TAM에 비해 전-염증성 M1-유사 TAM의 침윤을 향상시킴으로써 항-종양 면역 환경을 조성하는 것을 알 수 있다.

[162]

[163] 실시예 2. **LSP1** 과발현에 의한 종양 성장 촉진

[164] 2-1. *LSP1* 과발현에 의한 종양 성장 촉진 효과

[165] 종양 발달 동안 *LSP1*의 T 세포-특이적 효과를 확인하기 위해 T 세포에서 *Lsp1*를 과발현하는 형질전환(transgenic, Tg) 마우스를 제작하였다 (도 3A). 구체적으로, 마우스 *Lsp1*의 cDNA를 인간 CD2 프로모터를 포함하는 백혈구-특이적 발현 카세트에 클로닝하고, 컨스트럭트를 수정란의 원핵에 직접 주입하고 유전체 DNA를 PCR로 분석하여 형질전환 파운더(transgenic founder)를 선별하였다. 그 후, RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 이의 비장의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포로부터 총 RNA를 분리하고 RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 cDNA로 변환하였다. 그 후, SYBR Green PCR premix (Bio-Rad, Hercules, CA) 및 프라이머 (5'-CCAGCCCTTTGGCCTTAGAA-3' 및 5'-TGGAAATGGGCAAGGTGTTGGT-3')를 이용하여 CFX96 real-time PCR 시스템으로 *Lsp1* mRNA의 발현 정도를 분석하여 WT 마우스와 비교함으로써 *Lsp1* Tg 마우스를 검증하였다. 이렇게 제작한 *Lsp1* Tg 마우스와 WT 마우스에 상기 실시예 1에서와 같이 흑색종을 피하 접종하고 종양의 성장 정도를 확인한 결과, WT 마우스에 비해 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포가 *Lsp1* mRNA를 현저히 많이 발현하는 *Lsp1* Tg 마우스 (도 3B 및 C)가 *Lsp1* KO 마우스와는 대조적으로 3주 동안 WT 마우스에 비해 현저히 종양 성장이 가속화되는 것으로 나타났다 (도 3D). *Lsp1* Tg 마우스의 종양의 부피 및 중량 또한 종양 접종 14일차에 WT 마우스에 비해 현저히 높게 나타났다 (도 3E 및 F).

[166]

[167] 2-2. 면역 세포 집단 확인

[168] *Lsp1* Tg 마우스의 TME에서 면역 세포 집단을 평가하기 위해, WT 마우스의 종양 부피가 약 500 mm³에 도달할 때 종양을 수집하여 유세포 분석함으로써 TIL의 수 및 분포 빈도를 분석하였다.

[169] 그 결과, 종양-침윤 CD3⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포의 분포 빈도가 WT 및 *Lsp1* Tg 마우스 사이에 유사한 것으로 나타났으나, *Lsp1* KO 마우스에서의 결과와는 반대로 CD8⁺ T 세포의 분포 빈도가 *Lsp1* Tg 마우스에서 WT 마우스에 비해 감소하는 것으로 나타났다 (도 3G). 또한, 종양 내 CD45⁺ T 세포, CD3⁺ T 세포, 특히 CD8⁺ T 세포의 절대수가 WT 마우스에 비해 *Lsp1* Tg 마우스에서 현저히 낮았다 (도 3H). 아울러, *Lsp1* 과발현이 T 세포에 특이적이기 때문에 종양 내 NK1.1⁺ NK 세포, CD19⁺ B 세포 및 CD11b⁺ 골수성 세포의 분포 빈도 차이는 나타나지 않았다 (도 4A 내지 C).

[170]

- [171] 상기 결과들을 통해, T 세포에서 *Lsp1*의 특이적 과발현이 B16 흑색종의 성장을 향상시키고, 이는 TILs, 특히, CD8⁺ T 세포의 수 및 분포 빈도의 감소와 관련되어 있음을 알 수 있다.
- [172]
- [173] 실시예 3. LSP1의 T 세포 이동 조절
- [174] 3-1. LSP1의 CD8⁺ T 세포 이동 억제
- [175] 상기 실시예에서 유전적 *Lsp1* 억제(결핍)이 B16 흑색종에서 T 세포 침윤을 조절하였으므로, LSP1가 직접적으로 T 세포의 이동을 조절하는지 확인하기 위해, CD8⁺ T 세포를 종양 미세환경으로 트래피킹하고, 항-PD-1 요법 동안 TME에서 종양-특이적 T 세포 및 수지상 세포 사이의 상호 작용을 촉진하는 CXCL9 및 CXCL10에 LSP1가 응하여 CD8⁺ T 세포 이동을 조절하는지 확인하였다. 구체적으로, WT 및 *Lsp1* KO CD8⁺ T 세포의 주화성(Chemotaxis)을 확인하기 위해 5 μ m의 공극 크기를 가지는 Transwell 삽입물 (Corning Inc., Corning, NY)이 장착된 24-웰 플레이트의 하부 챔버에 묶인 CXCL9 및 CXCL10 (R&D Systems, Minneapolis, MN)을 이동 배지 (0.1% FBS 포함 RPMI1640)에 희석하여 위치시키고, 50만 개의 CD8⁺ T 세포를 상부 챔버의 이동 배지에 분주하였다. 37°C에서 인큐베이션하고 4시간 후, 하부 챔버로 이동된 세포들을 헤모사이토미터(hemocytometer)로 계수하였다.
- [176] 그 결과, *Lsp1*-결핍 CD8⁺ T 세포가 WT CD8⁺ T 세포보다 CXCL9 및 CXCL10에 현저한 화학주성반응(chemotactic response)을 보이는 것을 확인하였다 (도 5A). 반면, *Lsp1*-과발현 CD8⁺ T 세포는 WT 및 *Lsp1*-결핍 CD8⁺ T 세포에 비해 감소된 화학주성 이동을 나타내 (도 5A), LSP1이 CD8⁺ T 세포의 이동을 음성적으로 조절하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 10% FBS로 자극된 CD8⁺ T 세포 이동은 CD8⁺ T 세포의 3 가지 유형 (도 5A) 간에 차이가 나타나지 않아, LSP1의 CD8⁺ T 세포 이동 조절이 CXCL9 및 CXCL10에 특이적임을 시사하였다.
- [177]
- [178] 3-2. TIL 및 LSP1의 병리적 관련성 확인
- [179] 종양 조건에서 T 세포와 LSP1의 병리적 관련성을 확인하기 위해, B16 흑색종의 TILs에서 LSP1 발현 수준을 유세포 분석으로 확인하였다. 구체적으로, 정상 마우스 또는 종양-보유 마우스의 비장에서 세포를 분리하고 단일-세포 현탁액으로 준비하였다. CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포를 항-CD4 비드 또는 항-CD8 비드 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 이용하여 마그네틱 분리(magnetic separation)로 정제하였다. T 세포에서 LSP1 발현을 검출하기 위해, 정제한 CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포를 완전배지(complete media)에서 재조합 IFN- γ (10 ng/ml, R&D Systems), TGF- β (transforming growth factor beta) (2 ng/ml, R&D Systems), IL-10(interleukin 10) (10 ng/ml, R&D Systems) 또는 항-마우스 CD3 Ab (1 μ g/ml, 145-2C11, Invitrogen)와 함께 항-마우스 CD28 Ab (1 μ g/ml, 37.51, Invitrogen)로 72시간 동안 자극시켰다. 배양된 세포들을 수거 및 염색하여 세포

내 LSP1 발현을 유세포 분석으로 검출하였다. 또한, 상기 T 세포들을 파쇄 버퍼로 파쇄한 뒤 12% SDS-PAGE 겔에서 전기영동하여 단백질을 분리하고 PVDF 멤브레인에 트랜스퍼한 뒤 일렉트로블로팅하였다. 멤브레인들을 LSP1 (1:1000, Cell Signaling Technology) 항체 또는 β -tubulin (1:1000, Abcam, Cambridge, U.K.) 항체와 인큐베이션하고 enhanced chemiluminescent detection system (Thermo fisher scientific)을 이용하여 밴드를 시각화하였다.

- [180] LSP1 발현 수준을 확인한 결과, B16 흑색종에 침윤된 CD4⁺ T 세포는 종양이 없는 마우스의 비장 T 세포보다 LSP1의 발현 수준이 현저히 높게 나타났다 (도 5B). 또한, B16 흑색종에 침윤된 CD8⁺ T 세포도 유사한 결과를 나타내, T 세포에서 LSP1의 고발현이 B16 흑색종에 의해 유도될 수 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 *in vivo* 종양 침윤 T 세포에서 LSP1 발현의 상향 조절이 어떻게 일어나는지 확인하기 위해, 어떤 종류의 종양-관련 자극이 LSP1 발현을 유도할 수 있는지 상기 유세포 분석을 통해 확인한 결과, 항-CD3/CD28 Abs 또는 전-염증 사이토카인인 IFN- γ 로 T 세포를 자극하자 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 모두에서 LSP1 발현이 강하게 증가한 반면, TGF- β 및 항-염증 사이토카인인 IL-10는 LSP1 발현을 상향조절하지 못했다 (도 5C). 아울러, 이러한 T 세포 수용체 활성화 및 IFN- γ 에 의한 LSP1 발현 증가를 웨스턴 블롯 분석으로도 확인하였다 (도 5D).
- [181] 상기 실시예를 통해 T 세포에서 LSP1이 T 세포의 이동을 음성 조절하는 것을 확인한 것을 고려하면, 이와 같은 결과는 B16 흑색종이 TME 내의 T 세포에서 LSP1 발현을 상향조절함으로써 숙주의 T 세포의 항-종양 활성을 회피할 수 있음을 시사한다.

[182]

[183] 실시예 4. *Lsp1*-결핍 T 세포의 세포 독성 증가

[184] 4-1. *Lsp1* 결핍에 의한 T 세포 세포독성 증가 확인

[185] 종양 성장에서 LSP1의 조절이 온전히 T 세포의 이동 조절에 의한 것인지 확인하기 위해, 종양 침윤 T 세포가 종양 성장을 억제하는 필수 단계인 T 세포의 세포 독성에 대한 LSP1의 영향을 확인하고자 하였다. 이를 위해, *Lsp1* KO T 세포 (GSE75123)의 유전자 발현 프로파일을 T 세포-매개 세포 독성에 중점을 두어 WT T 세포와 비교 분석하였다. 구체적으로, 항-CD3/CD28 Abs로 6시간 동안 자극된 *Lsp1* KO 및 WT 마우스의 비장 T 세포로부터 총 RNA를 분리하고 역전사 및 증폭한 뒤 24,241 개의 주석달린 유전자 (GSE75123)에 대한 62,976 개의 프로브가 포함된 어레이 칩 (SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray, Agilent)에 혼성화하였다. 정규화 후 각 유전자의 log2 fold 변화 값 및 *P* 값을 계산하였다. *Lsp1* KO T 세포의 DEGs의 컷오프 값은 $|\text{fold change values}| > 0.58$ 였고 *P* values < 0.05 였다. 또한, GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)를 clusterProfiler (R package, ver.3.4.6)로 수행하였으며 GSEA 도표는 enrichrplot (R package)로 생성하였다. 아울러, *Lsp1* KO T 세포에서의 DEGs와 세포독성-관련 유전자들 간의 오버랩의 유의성을 순열 검증(permutation test strategy)으로 결정하였다. 오버랩된 DEGs의

경험적 P -값을 계산하기 위해 총 100,000 개의 무작위 치환 시료가 사용되었다.

- [186] 그 결과, 세포독성 및 세포 사멸과 관련된 10 GOBP(Gene Ontology Biological Process) 용어를 대표하는 171 개의 유전자 중, 24 개의 유전자 (14%)가 *Lsp1* KO T 세포의 DEGs(differentially expressed genes)와 유의하게 오버랩된 것으로 나타났다 (도 6A). 또한, GSEA(Gene Set Enrichment Analysis) 결과에서도 세포 사멸 및 백혈구 매개 세포독성의 생물학적 과정이 *Lsp1* KO T 세포에서 증가한 반면 (도 6B 및 C), 세포 사멸의 음성 조절이 감소되었음 (도 6B)을 확인할 수 있었다. 이를 통해, T 세포에서 *LSP1* 결핍이 T 세포의 종양-사멸 세포독성의 증가와 연관되어 있음을 알 수 있다.

[187]

[188] 4-2. *Lsp1* 결핍에 의한 T 세포 세포독성 이펙터 기능 촉진 확인

- [189] *Lsp1* 결핍에 의해 T 세포의 세포독성 이펙터 기능이 촉진되는지 확인하기 위해, 대표적인 항-종양 이펙터 사이토카인인 IFN- γ 및 TNF- α 의 발현 수준을 WT 및 *Lsp1* KO 마우스의 비장 및 종양-침윤 T 세포에서 유세포 분석 방법으로 측정하였다.

- [190] 그 결과, 종양 보유 WT 및 *Lsp1* KO 마우스 간에 비장 크기, 비장 세포 수, 및 비장 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포는 차이가 없었으며 (도 7A, B 및 C), 두 군의 비장에서 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 중 TNF- α ⁺ 및 IFN- γ ⁺ 세포의 분포 빈도는 유사한 정도로 나타났다 (도 7D 및 E). 반면, 종양에서는 WT 마우스에 비해 *Lsp1* KO 마우스의 침윤된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서 TNF- α ⁺ 및 IFN- γ ⁺ 세포의 분포 빈도가 현저히 높게 나타나 (도 8A 내지 도 8D), *Lsp1* 결핍이 종양-침윤 T 세포에서 TNF- α ⁺ 및 IFN- γ ⁺ 발현을 유도함으로써 항-종양 면역성을 증가시키는 것을 알 수 있었다.

[191]

[192] 4-3. *Lsp1* 과발현에 의한 T 세포 세포독성 이펙터 기능 저하 확인

- [193] *Lsp1* Tg 마우스가 WT 마우스의 비장 중량 및 비장 세포수를 확인하였을 때, *Lsp1* Tg 마우스의 비장 중량 및 비장 세포수가 WT 마우스와 비교하여 감소함을 확인하였다(도 9A 및 B).

- [194] 또한, 상기 실시예와 반대로 *Lsp1* Tg 마우스와 WT 마우스의 비장 및 종양-침윤 T 세포에서 IFN- γ 및 TNF- α 의 발현 수준을 유세포 분석으로 확인한 결과, 종양 접종 후 WT 마우스에 비해 *Lsp1* Tg 마우스에서 비장 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포의 TNF- α 및/또는 IFN- γ ⁺ 세포의 분포 빈도가 현저히 낮게 나타났다 (도 9C, D 및 E). 또한, 종양에서 *Lsp1*-과발현 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 WT CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에 비해 TNF- α ⁺ 및/또는 IFN- γ ⁺의 분포 빈도가 각각 현저히 감소된 것으로 나타났다 (도 9C, D 및 E). *Lsp1* Tg 마우스의 비장 CD8⁺ T 세포가 WT 마우스보다 덜 팽창된 반면, *Lsp1* Tg 마우스의 비장 CD4⁺ T 세포가 WT 마우스보다 더 팽창되었다 (도 9C). 이러한 결과들을 통해, T 세포에서 *Lsp1*가 과발현되면 침윤된 CD8⁺ T 세포를 현저히 감소시키고, CD8⁺ T 세포에 의한 TNF- α ⁺ 및 IFN- γ ⁺ 생산을

하향조절함으로써 흑색종의 성장을 촉진하는 것을 알 수 있다.

[195]

[196] 실시예 5. *Lsp1* 결핍에 의한 항-PD-1 항체의 항-종양 활성 강화 효과

[197] 5-1. *Lsp1*-결핍의 T 세포에서의 항-종양 매개 효과

[198] 상기 결과들을 바탕으로 *Lsp1*-결핍 T 세포가 증가된 T 세포 트래피킹과 세포독성능에 의해 종양 성장을 더욱 효과적으로 억제한다고 가정하고, 성숙 T 세포 및 B 세포가 결핍된 *Rag1* KO 마우스에서 *Lsp1* KO 및 *Lsp1* Tg T 세포를 이용한 차용 전달(adoptive transfer) 실험을 수행하여 이를 확인하였다. 구체적으로, *Rag1* KO 마우스의 오른쪽 옆구리에 1×10^5 개의 B16 흑색종을 피하 접종하고 하루 뒤, Pan T cell isolation kit (Miltenyi Biotec)를 이용하여 마그네틱 분리로 종양이 없는 *Lsp1* KO 마우스 및 *Lsp1* Tg 마우스의 바장으로부터 T 세포를 분리하였다. 비히클로서의 PBS 또는 *Lsp1* KO 마우스 또는 *Lsp1* Tg 마우스 유래 1×10^7 개의 T 세포를 상기 B16 흑색종을 가진 *Rag1* KO 마우스에 정맥 주사하였다. 종양 성장은 2일마다 기록되었다.

[199] 그 결과, 차용 전달 실험 전에는 *Lsp1* KO T 세포 및 *Lsp1* Tg T 세포가 CD3⁺ T 세포에서 유사한 CD4/CD8 비율을 가졌으나 (도 10A), 차용 전달 실험 후, *Lsp1*-과발현 T 세포 및 비히클 단독에 비해 *Lsp1*-결핍 T 세포가 B16 흑색종이 차용 전달된 *Rag1* KO 마우스에서 종양 진행을 더욱 강하게 억제하였고 (도 10B), 이는 T 세포에서 *Lsp1*의 결핍이 항-종양 효과를 특이적으로 매개하는 것을 증명한다.

[200]

[201] 5-2. *Lsp1*-결핍의 항-PD-1 항체와의 병용처리에 의한 효과 확인

[202] 흑색종을 포함한 다양한 진행된 암 환자에게 면역요법으로 사용되어 온 면역체크포인트 억제제인 항-PD-1 차단(Anti-PD-1 blockade)과 본 발명의 접근법이 서로 상이한 항-종양 메커니즘 (억제성 면역 관문의 차단/T 세포 트래피킹)을 가지므로, *Lsp1* 결핍에 의한 항-종양 효과가 항-PD-1 Ab와의 병용 투여에 의해 영향을 받는지를 확인하였다. 구체적으로, 항-PD-1 차단 요법을 위해, 5×10^5 개의 B16 흑색종을 WT 마우스 및 *Lsp1* KO 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 접종하고 (0일), 3, 6, 9 및 12일 뒤에 항-PD-1 항체 (RMP1-14, Bio X cell, Lebanon, NH) 또는 이의 아이소파입 대조군 항체인 랫 IgG2a 아이소타입 대조군 (2A3, Bio X cell)을 10 mg/kg로 복강 내 투여하였다 (도 10C).

[203] 그 결과, 아이소타입 대조군 Ab를 처리한 WT 마우스에서 종양 부피가 1500 mm^3 에 달했을 때, 항-PD-1 Ab를 처리한 WT 마우스에서 종양 부피가 1000 mm^3 이고, 항-PD-1 Ab를 처리한 *Lsp1* KO 마우스에서 종양 부피가 500 mm^3 였다 (도 10D). 즉, 항-PD-1 Ab의 처리가 WT 마우스에서 흑색종의 성장을 현저하게 감소시켰으며, 특히, 항-PD-1 차단(anti-PD-1 blockade)이 처리된 *Lsp1* KO 마우스가 항-PD-1 항체가 있거나 없는 WT 마우스보다 항-종양 효과가 현저하게 나타나 (도 10D), *Lsp1* 결핍에 의한 항-종양 효과가 항-PD-1 항체 처리와 관계없이 유지되는 것을 알 수 있다.

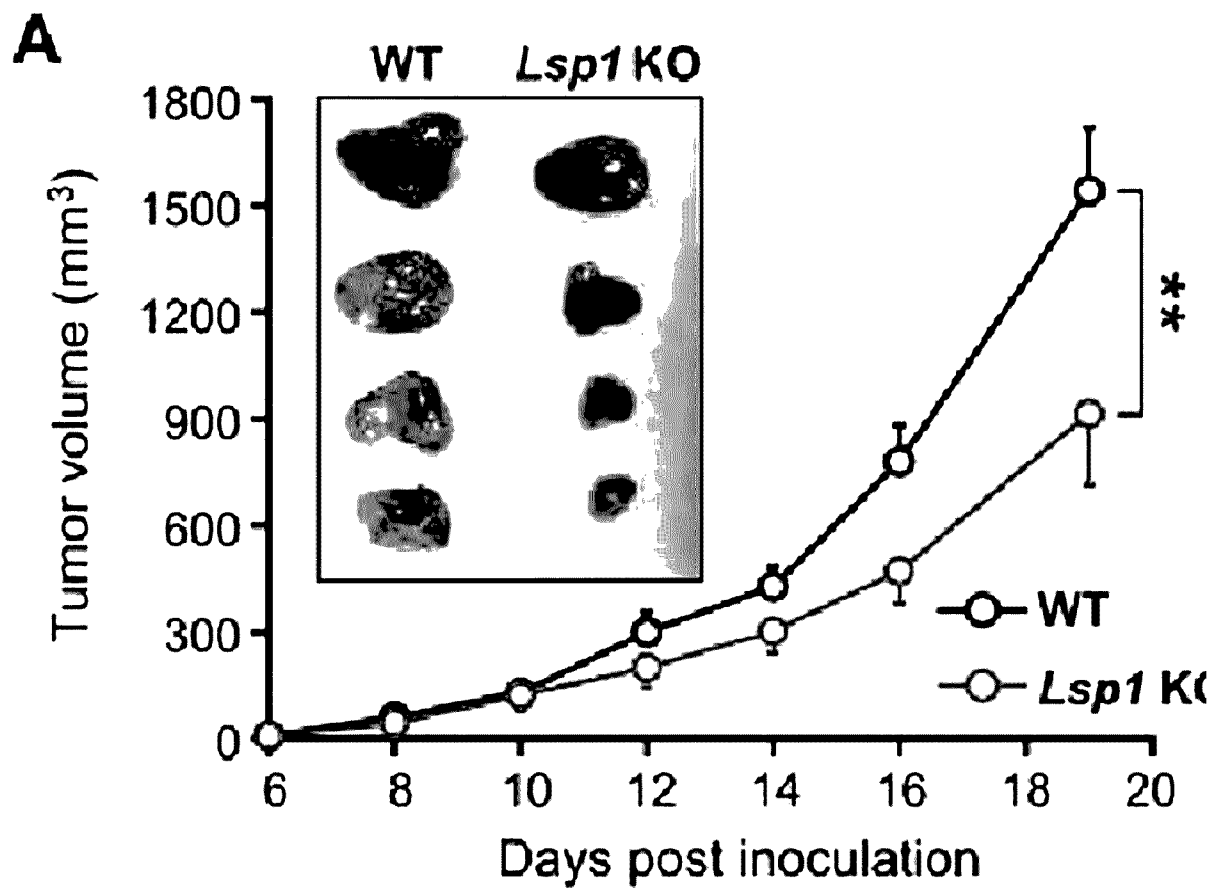
- [204] 이를 통해, T 세포에서 *Lsp1*의 유전적 제거(genetic ablation)가 흑색종에 대한 항-PD-1 Ab를 포함하는 면역 관문 억제제의 치료 효능을 향상시키는 유용한 전략임을 시사한다(도 10E).

청구범위

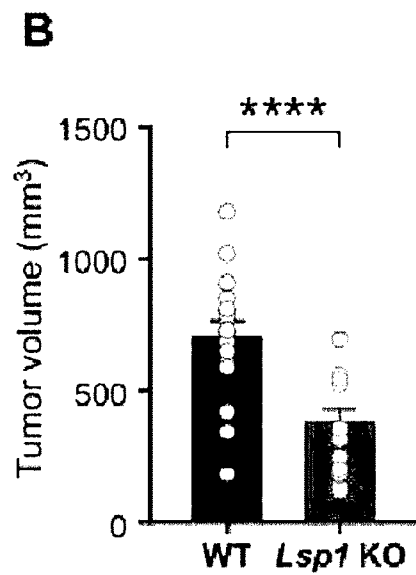
- [청구항 1] LSP1(Leukocyte-specific protein 1) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 발현 억제제는 siRNA(small interfering RNA), shRNA(small hairpin RNA), miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산 앵타머인, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, T 세포-특이적 LSP1 발현 억제제인, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, DNA 절단 활성이 불활성화된(nuclease-deactivated) Cas12a 또는 Cas9 단백질, 반복적인 염기 서열(direct repeat, DR) 및 LSP1 유전자에 상보적인 프로토스페이서(protospacer)를 포함하는 crRNA(CRISPR RNA)를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 암은 고형암인, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, T 세포의 수 및 분포 빈도를 증가시키는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, T 세포의 종양으로의 침윤을 증가시키는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, TNF- α 및 IFN- γ 발현 및 분비를 증가시키는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 9] 제 1항에 있어서, 면역체크포인트 억제제(immune checkpoint inhibitor)를 추가로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 10] LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, T 세포는 LSP1 결실된 CAR(chimeric antigen receptor)-T 세포인, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 12] 제 11항에 있어서, CAR은 암세포 항원-결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 13] 제 10항에 있어서, 면역체크포인트 억제제를 추가로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서, 면역체크포인트 억제제는 PD-1 억제제 또는 CTLA-4 억제제인, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 15] LSP1 발현 억제제 또는 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 T 세포에서 LSP1가 과발현되어 유발되는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 16] LSP1 발현 억제제 또는 LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로

- 포함하는 항암제 활성화 증진을 위한 항암 보조제.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서, 면역체크포인트 억제제를 추가로 포함하는, 항암 보조제.
- [청구항 18] 대상으로부터 분리된 T 세포에서 LSP1의 발현 수준을 확인하는 것을 포함하는 암의 진단 또는 예후를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 19] LSP1(Leukocyte-specific protein 1) 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 20] LSP1 유전자가 결실된 T 세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법.

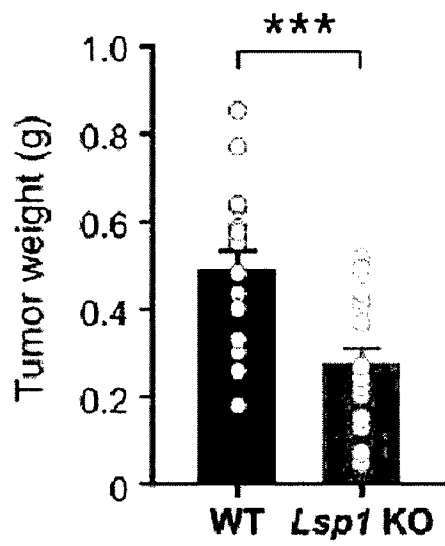
[도 1a]



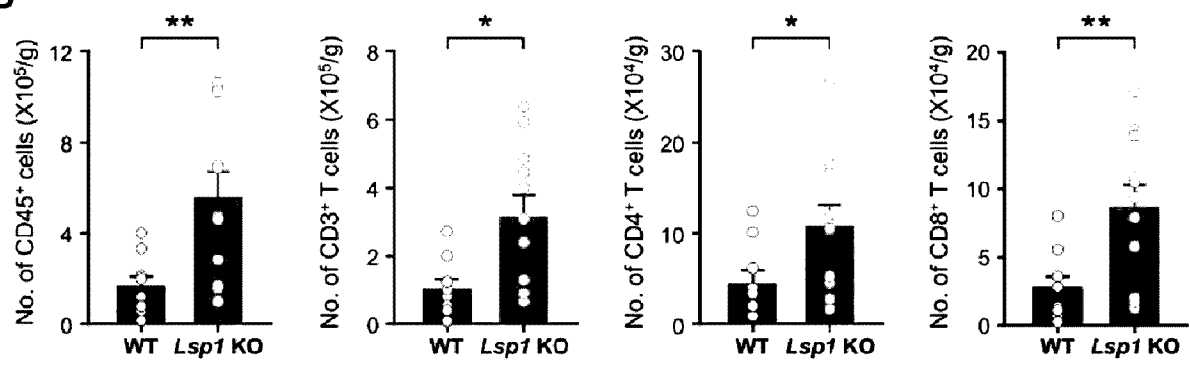
[도 1b]



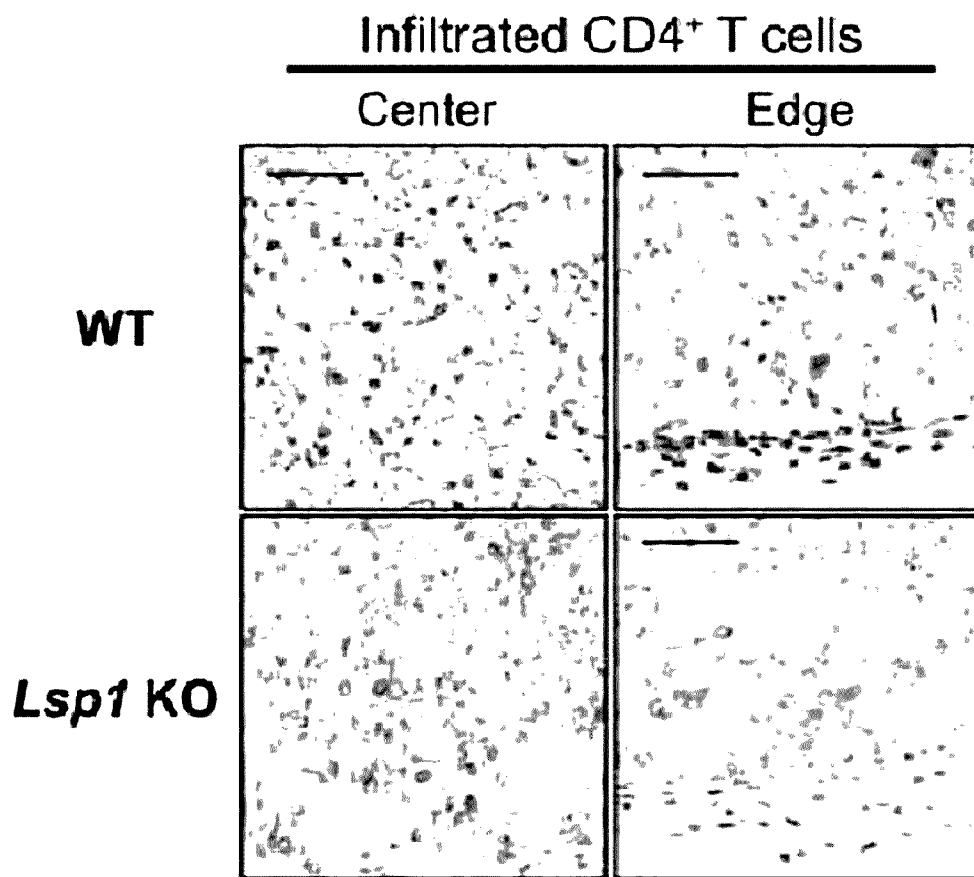
[도1c]

C

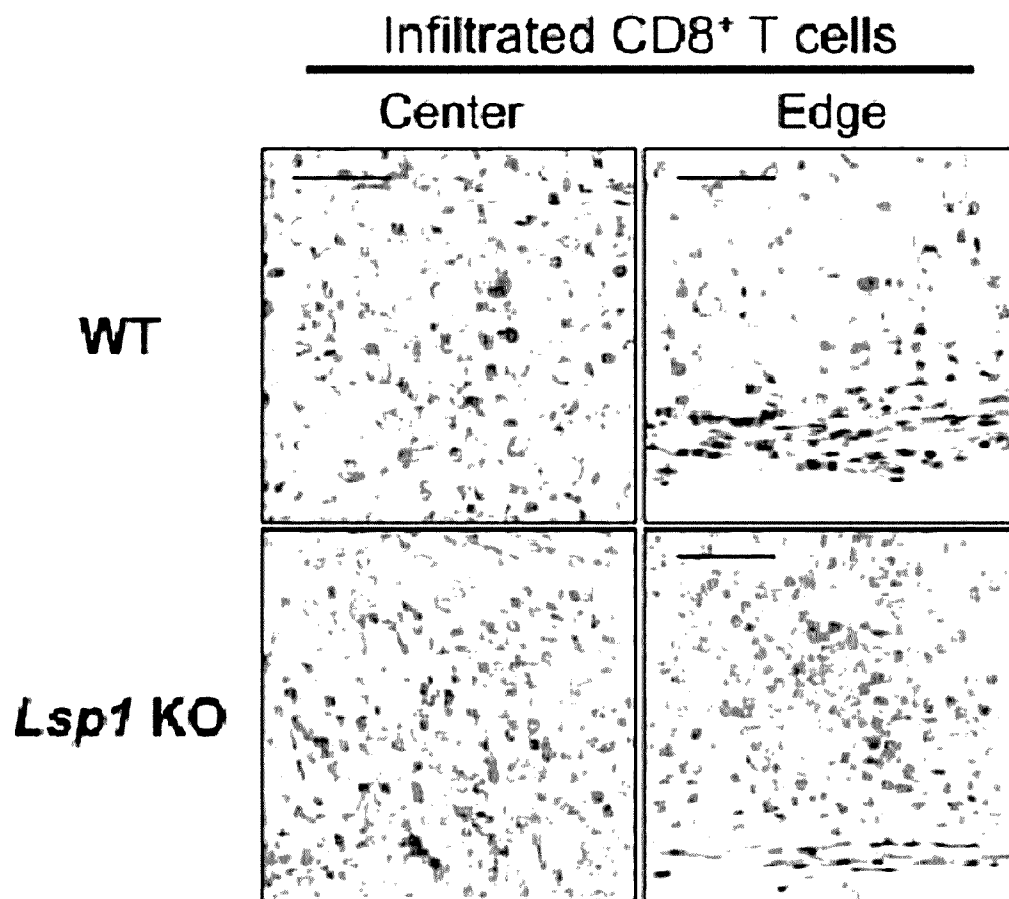
[도1d]

D

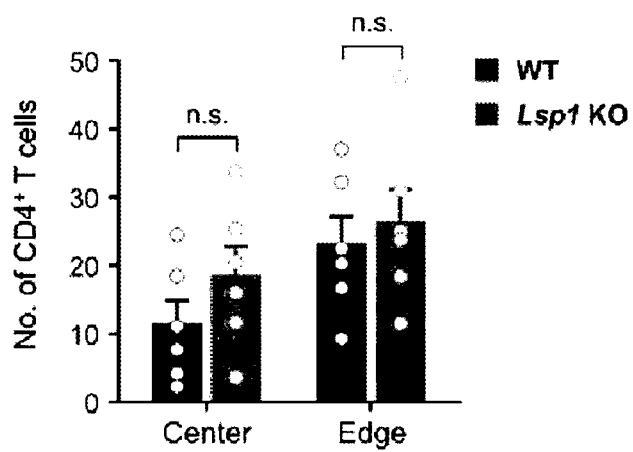
[도1e]

E

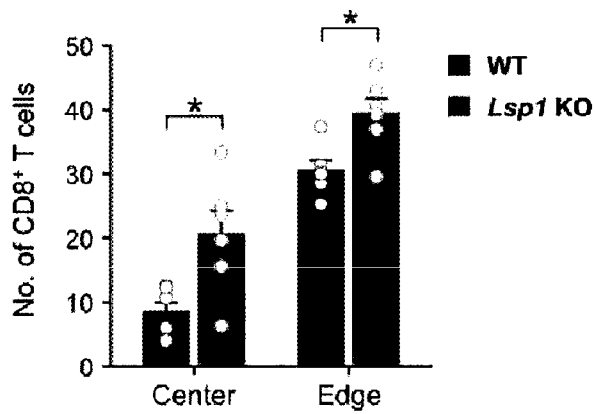
[도1f]

F

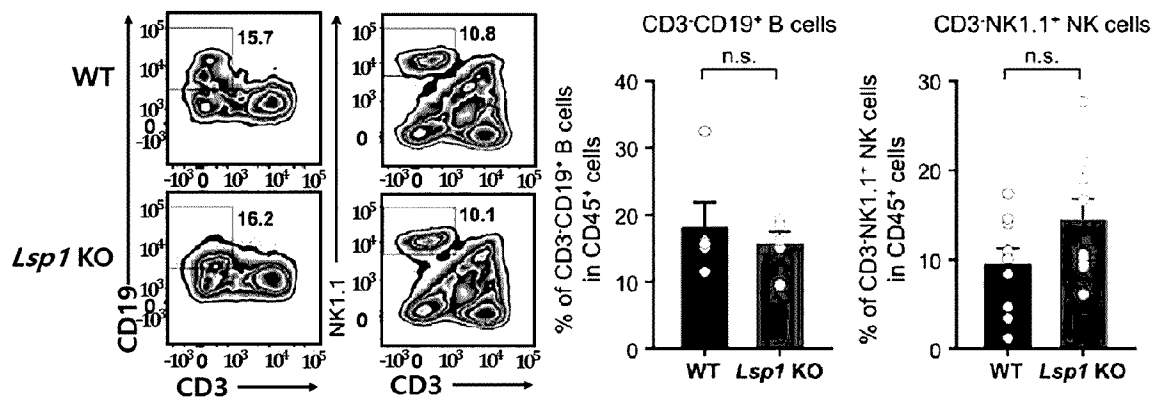
[도1g]

G

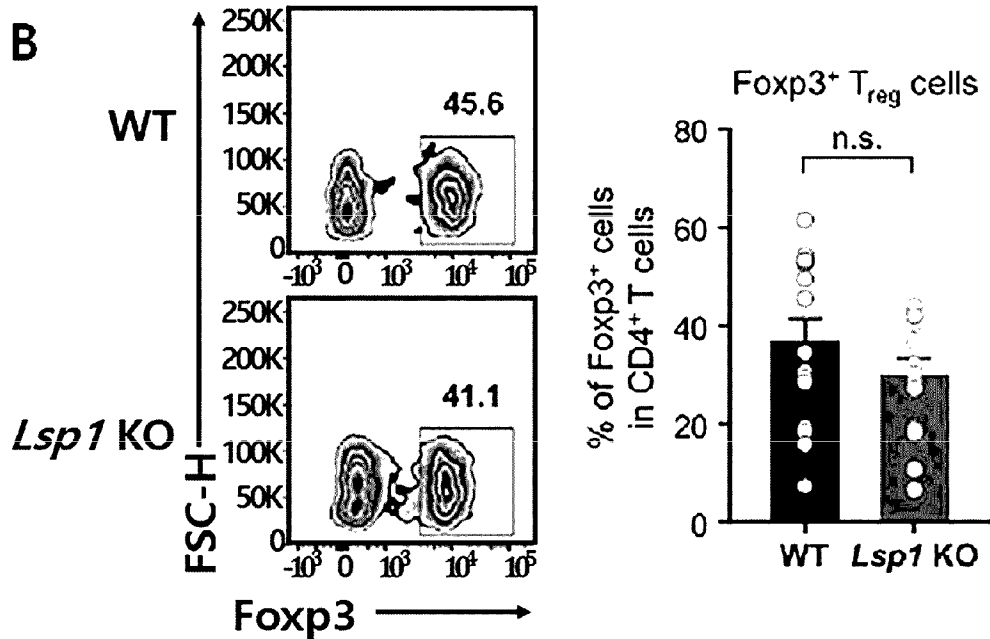
[도1h]

H

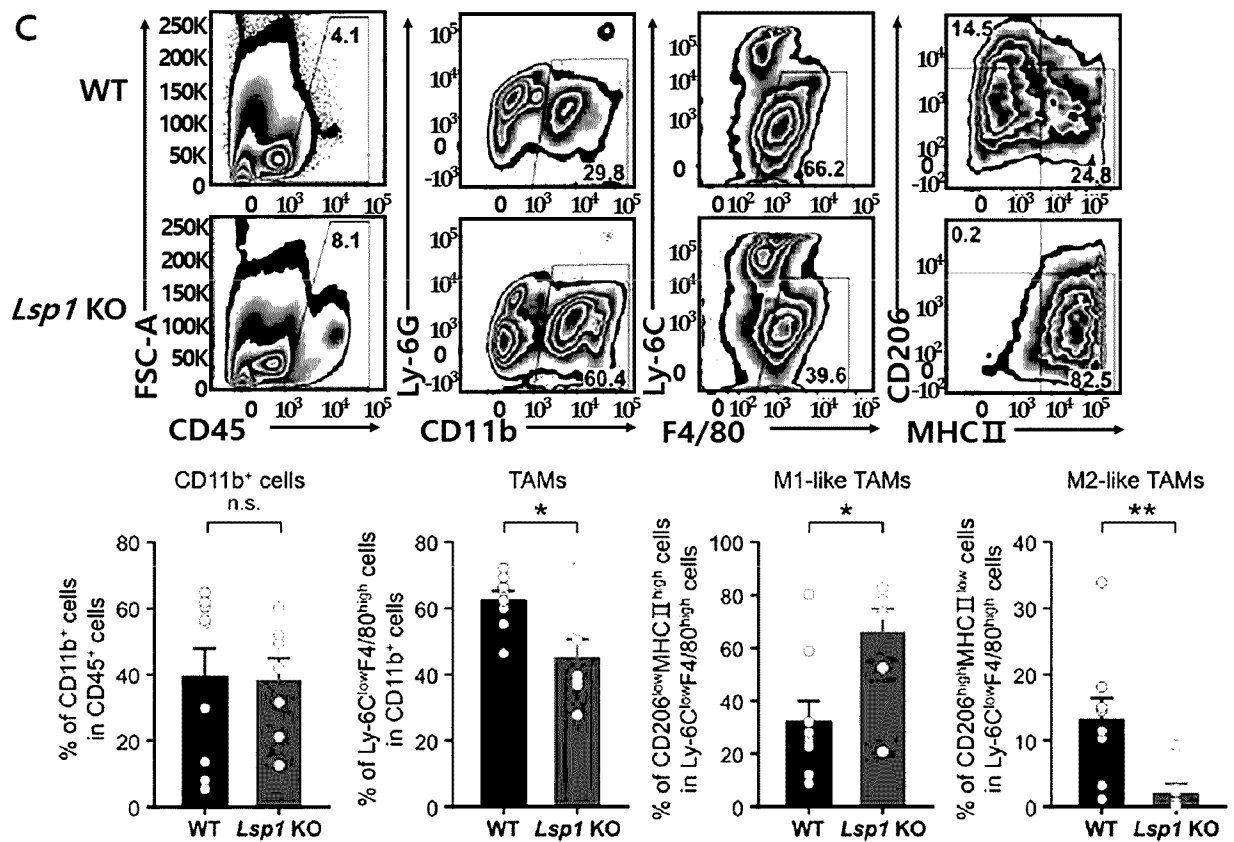
[도2a]

A

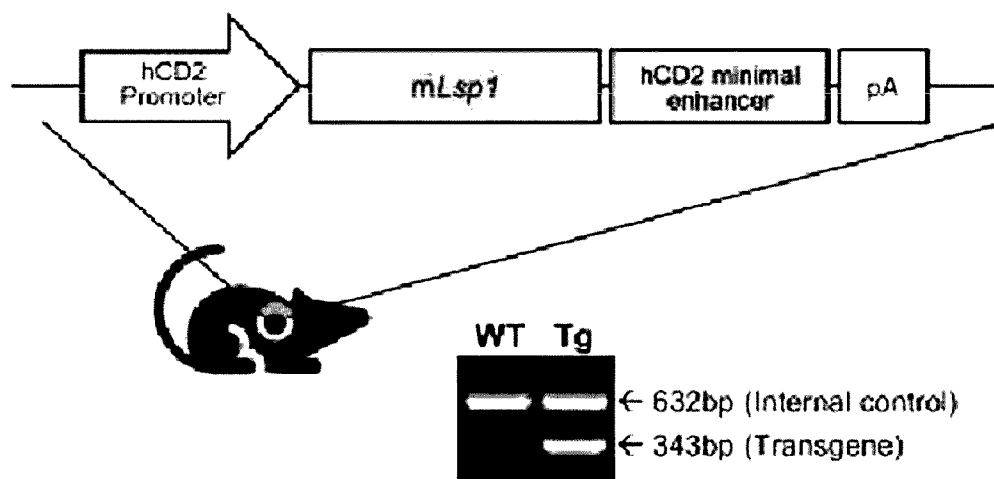
[도2b]



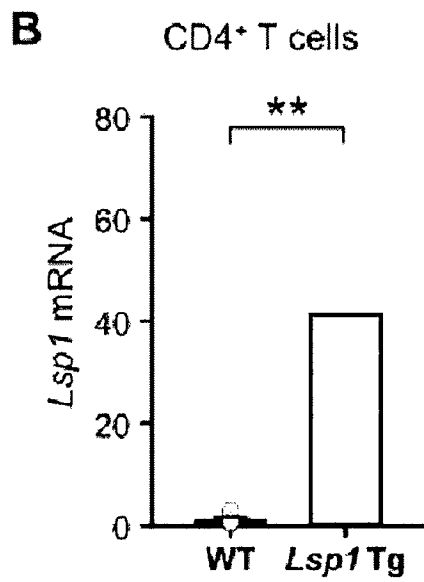
[도2c]



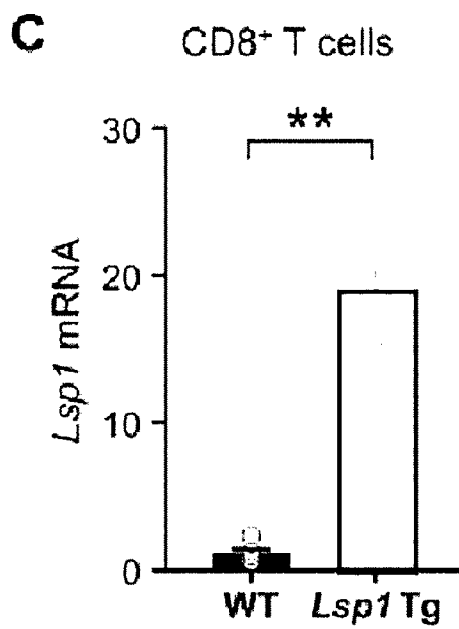
[도3a]

A

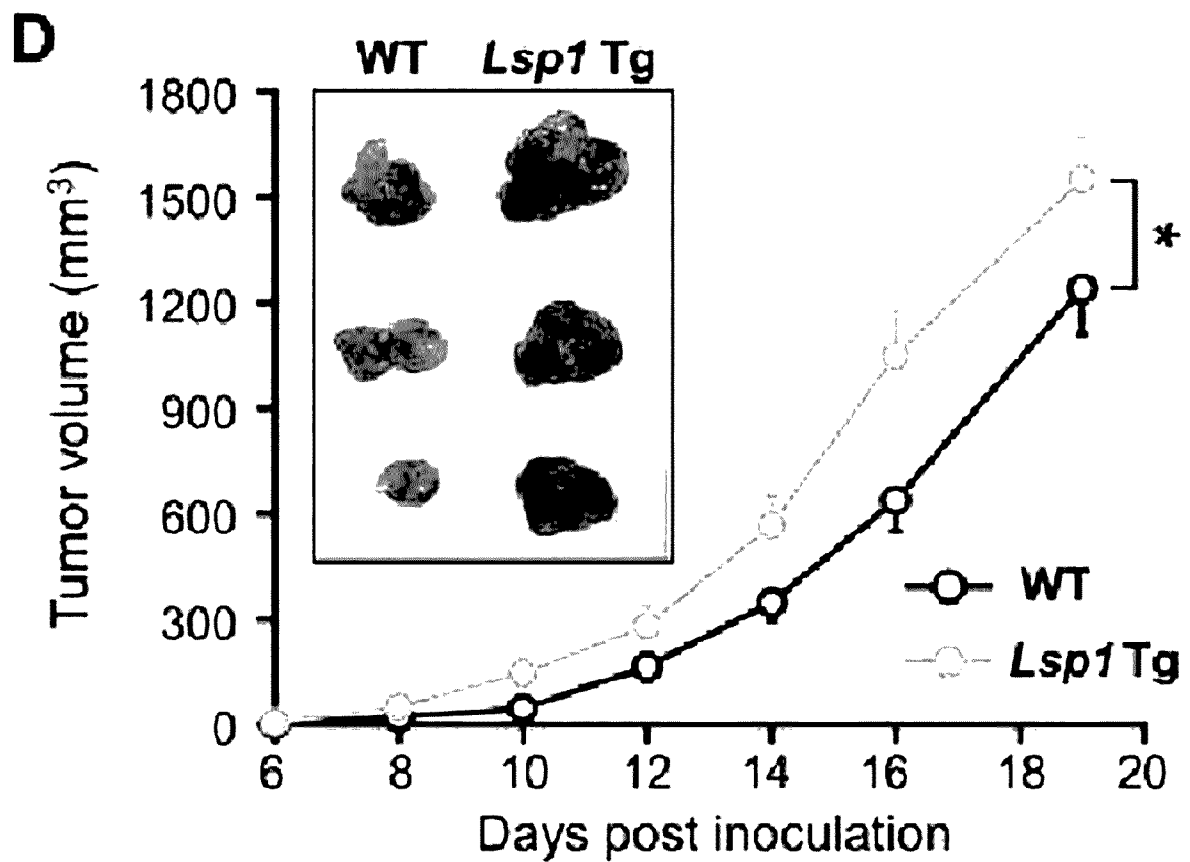
[도3b]



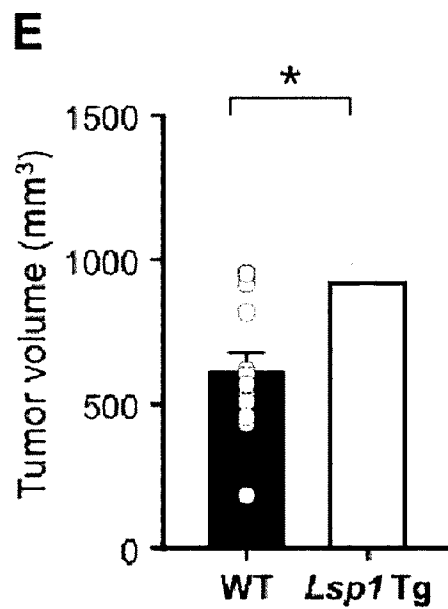
[도3c]



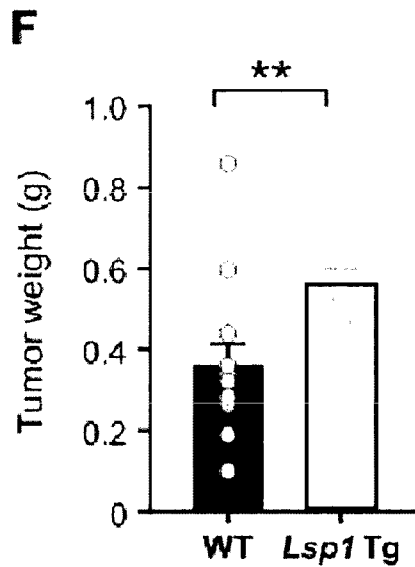
[도3d]



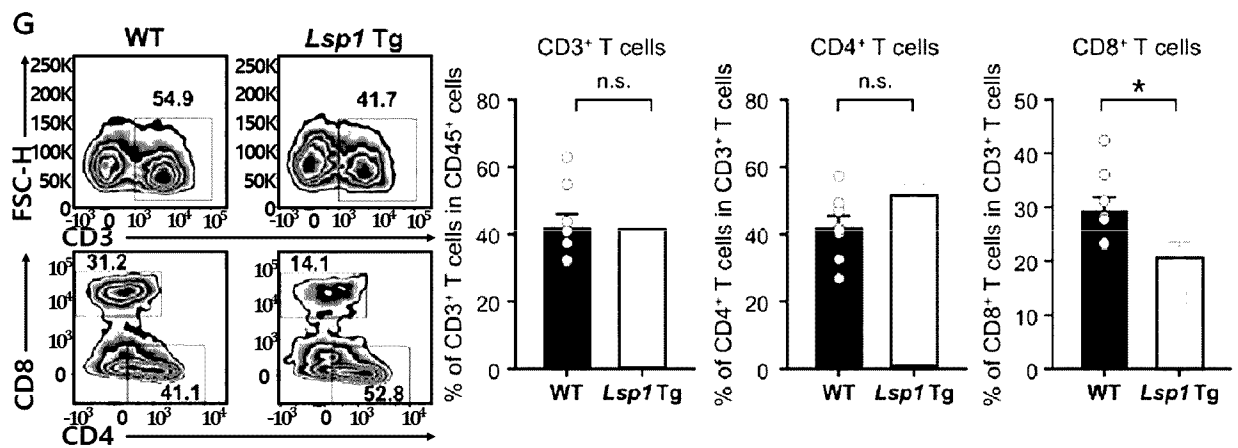
[도3e]



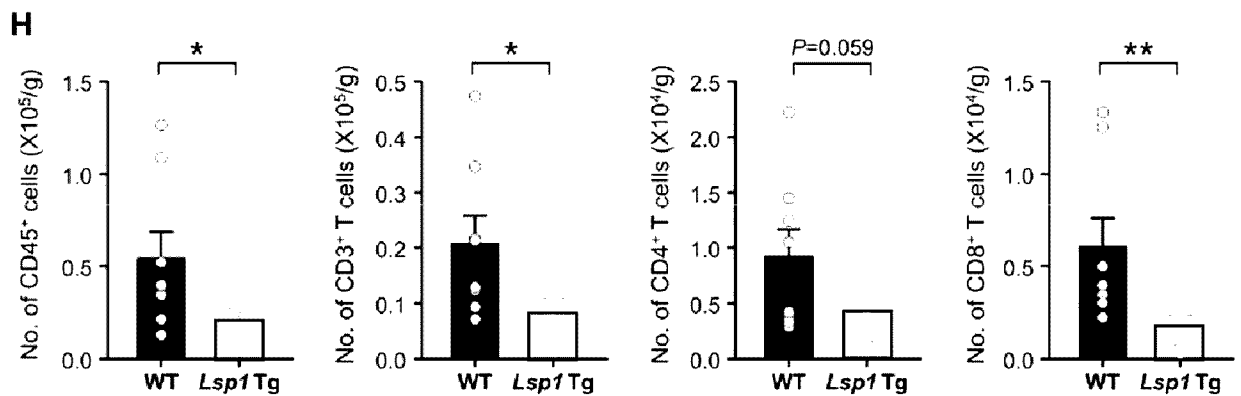
[도3f]



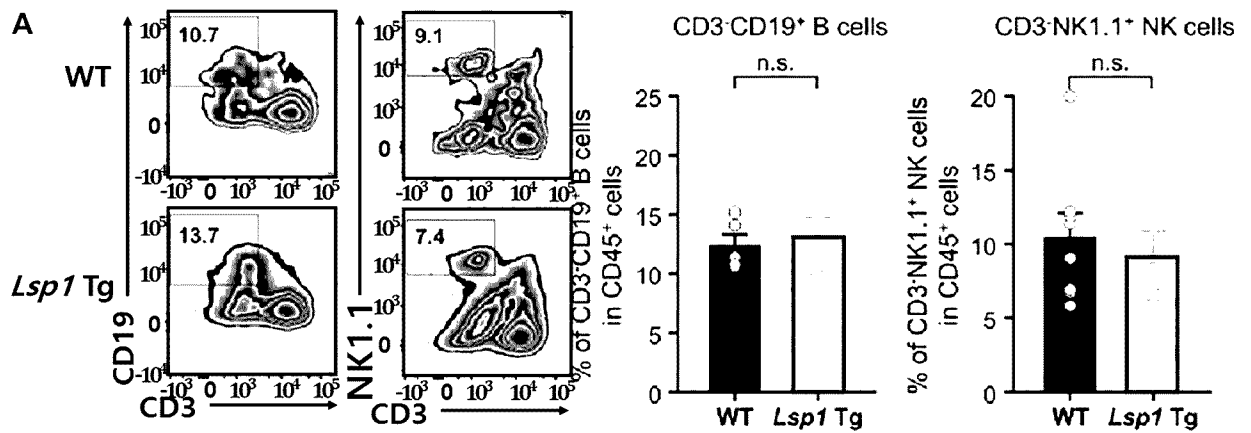
[도3g]



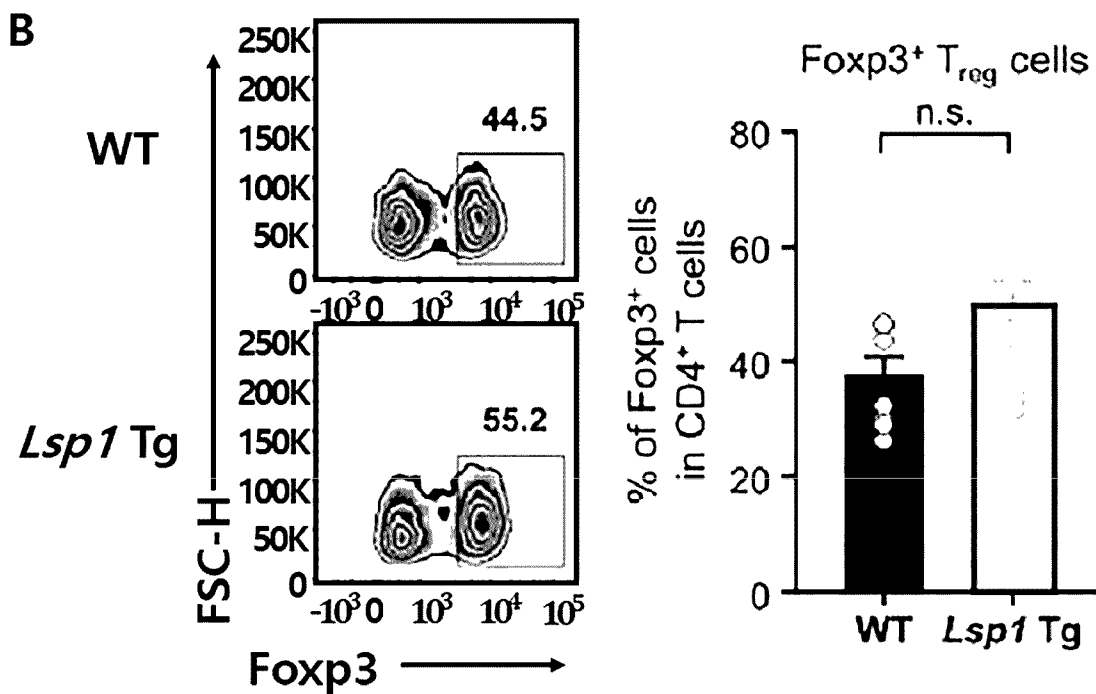
[도3h]



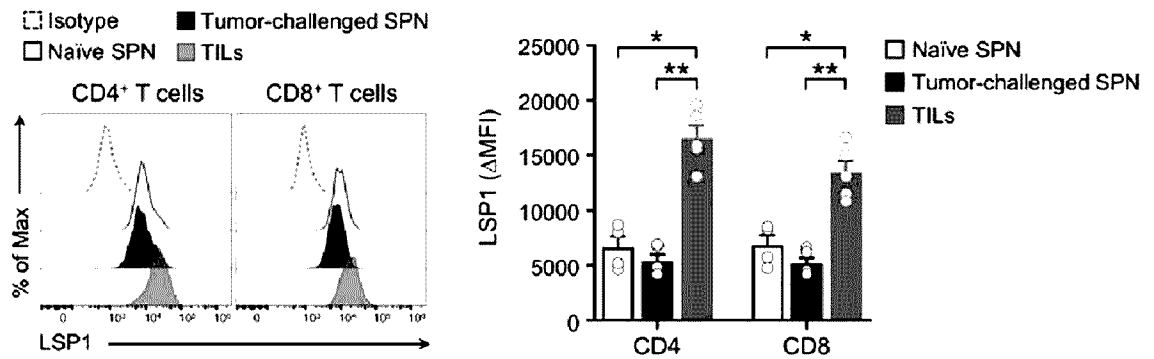
[도4a]



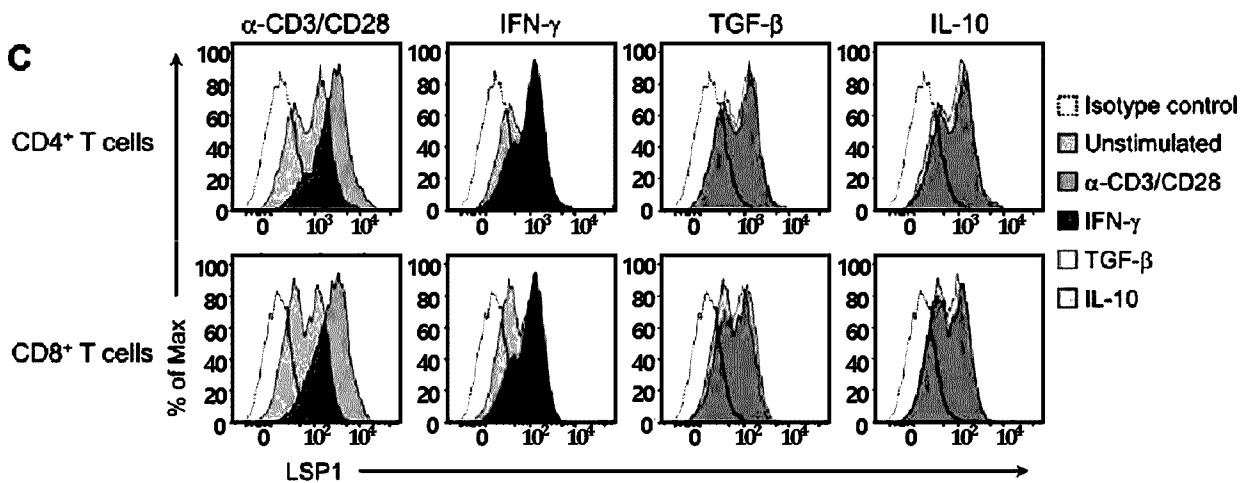
[도4b]



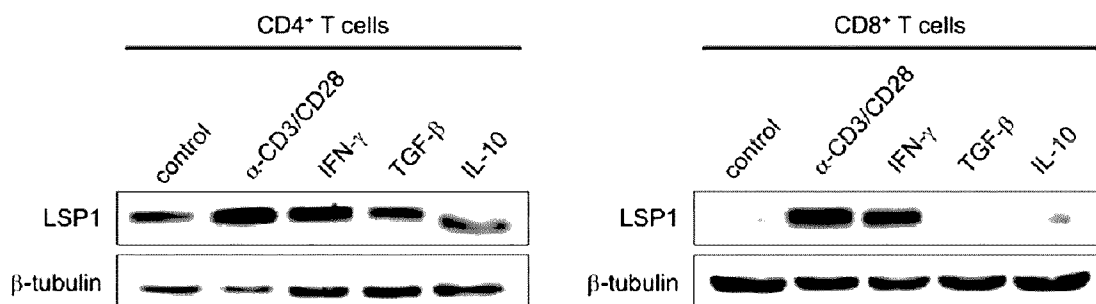
[도5b]

B

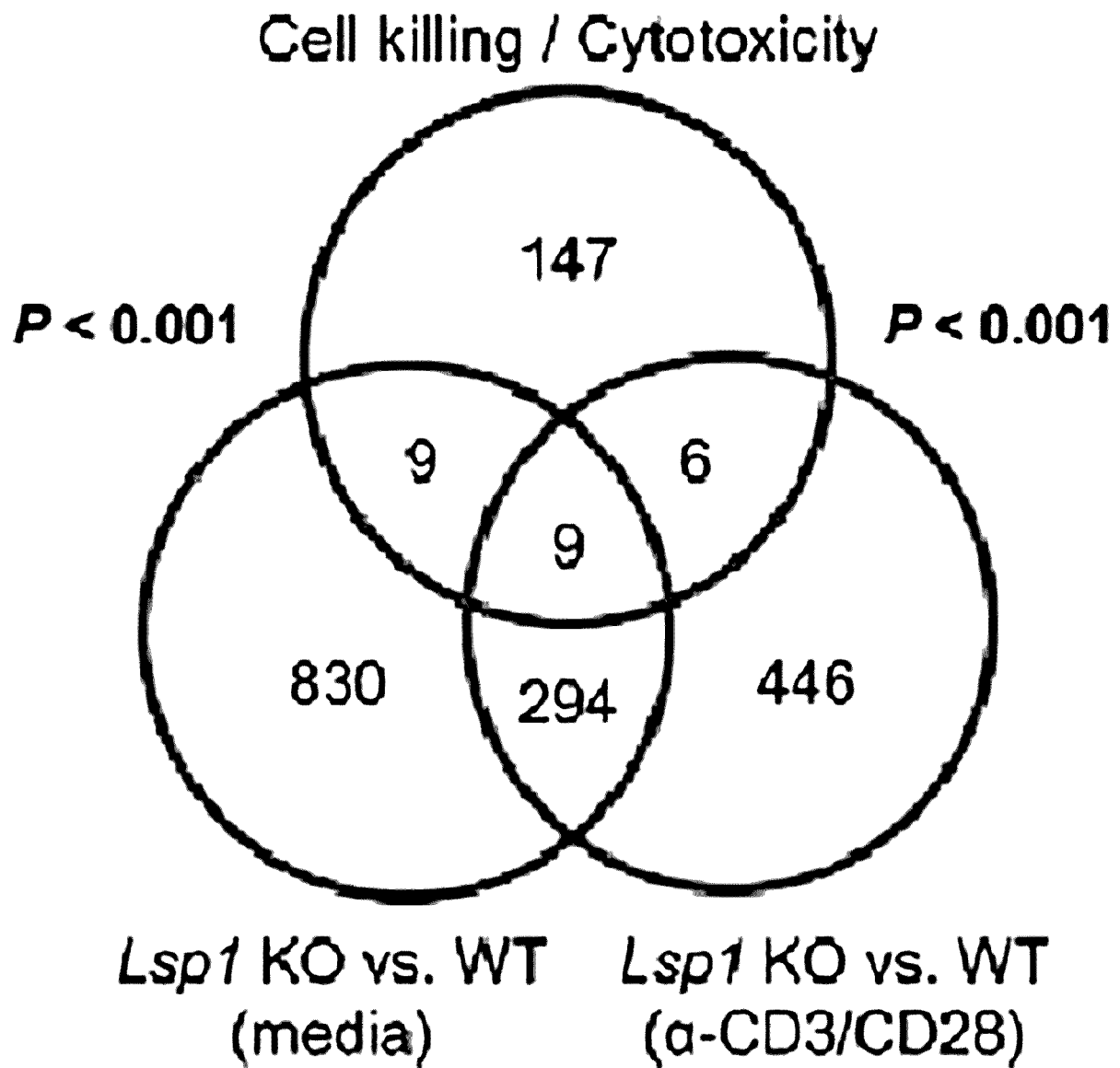
[도5c]

C

[도5d]

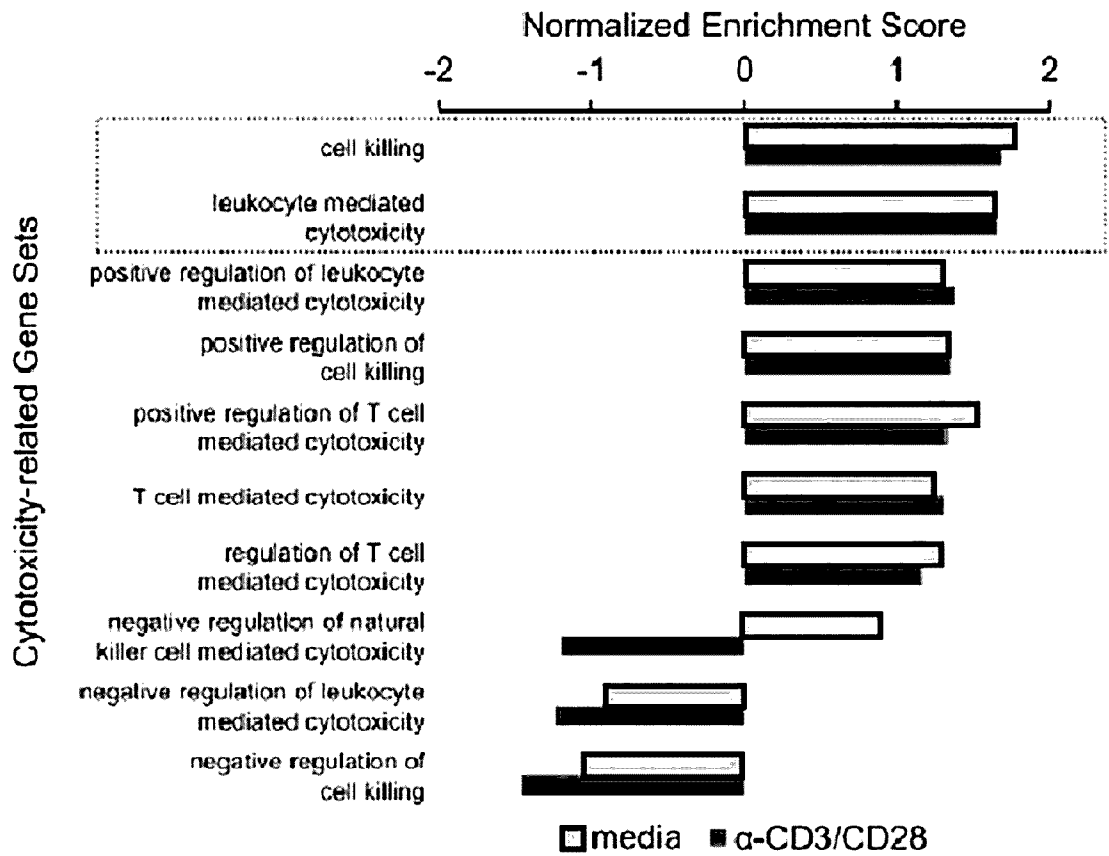
D

[도6a]

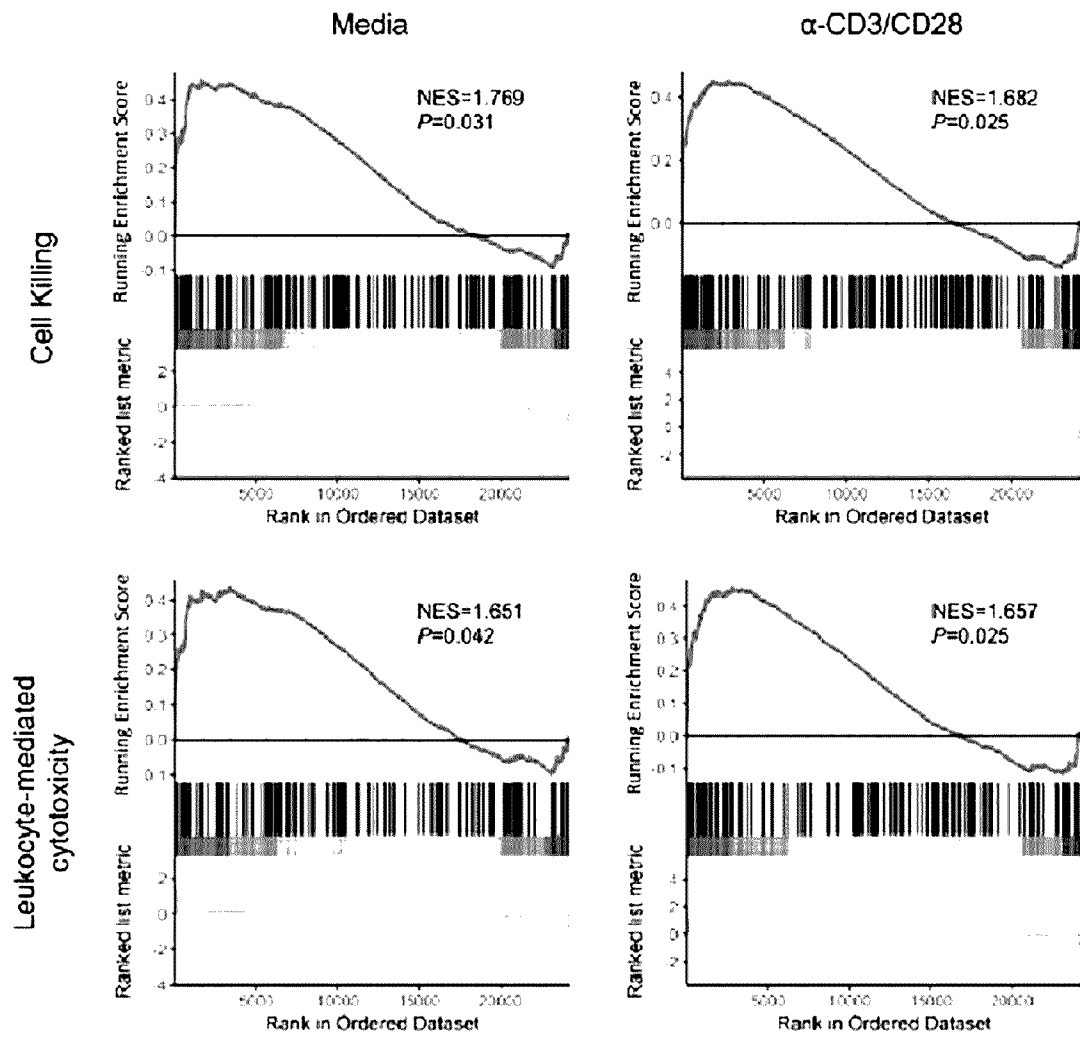
A

[도6b]

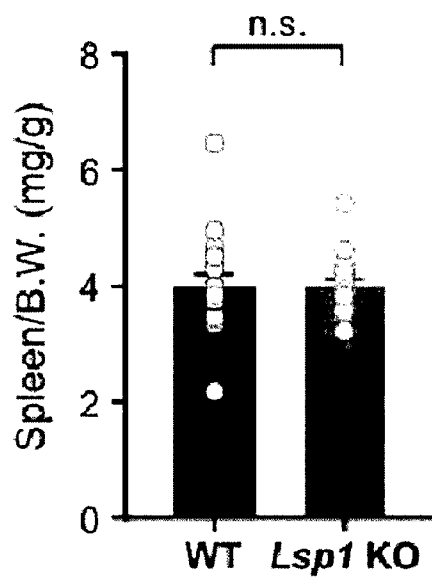
B



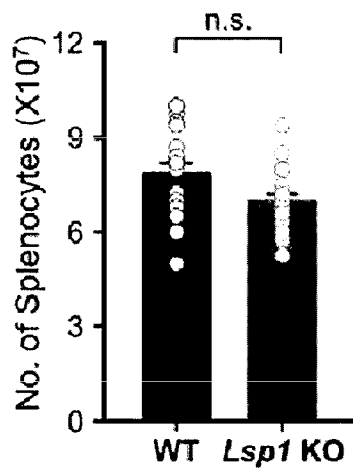
[도6c]

C

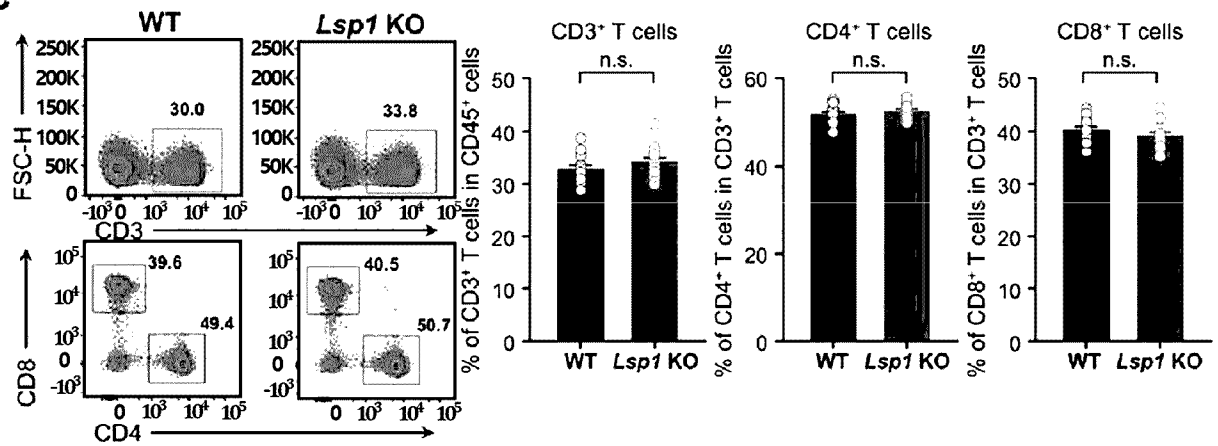
[도7a]

A

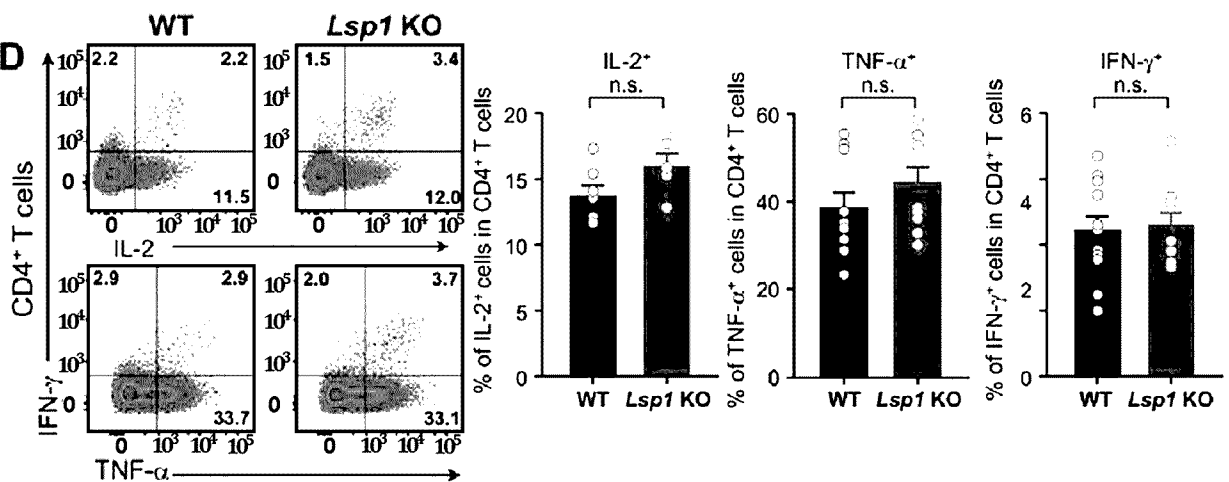
[도7b]

B

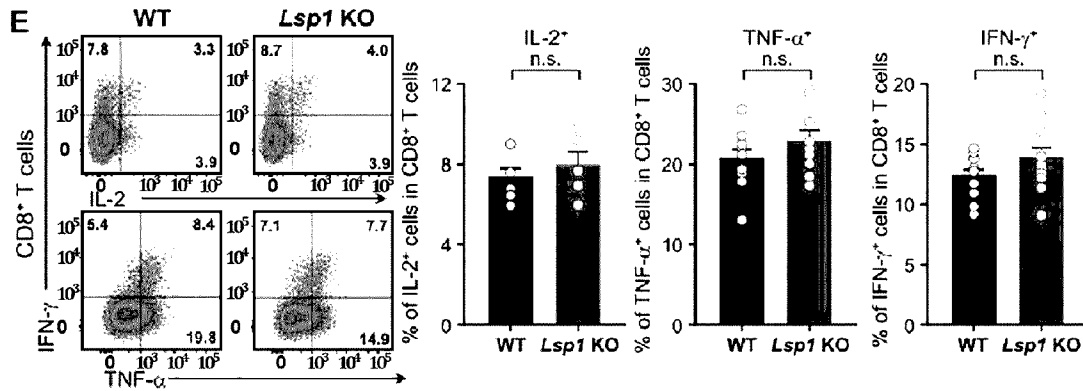
[도7c]

C

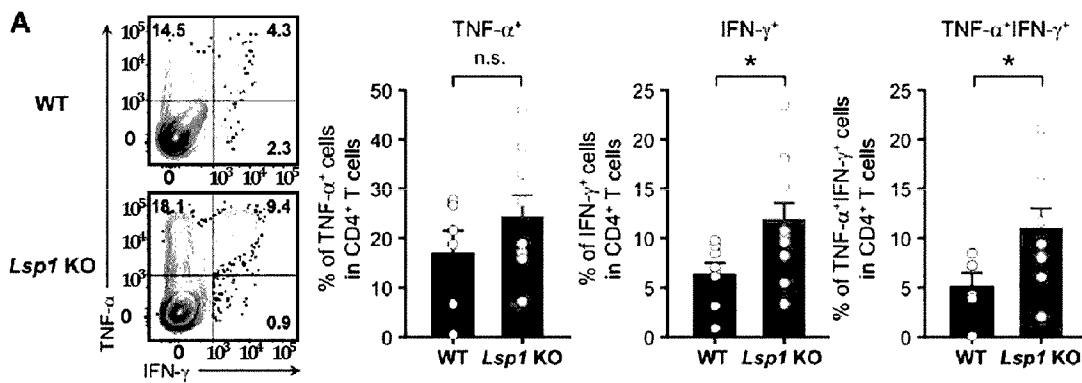
[도7d]

D

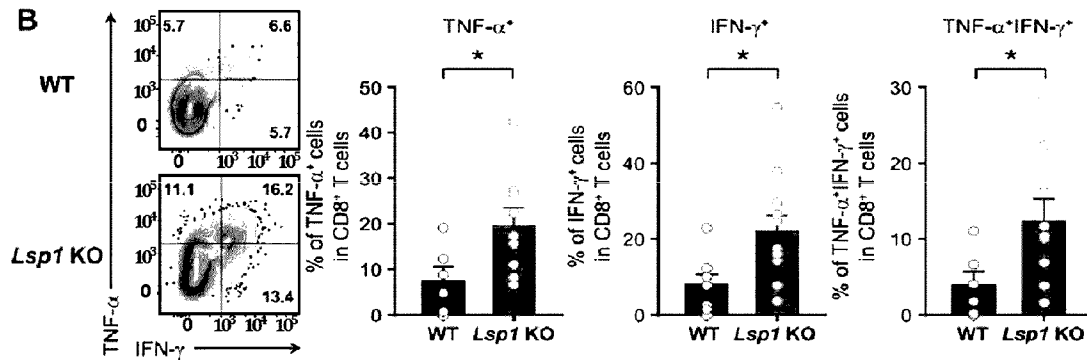
[도7e]



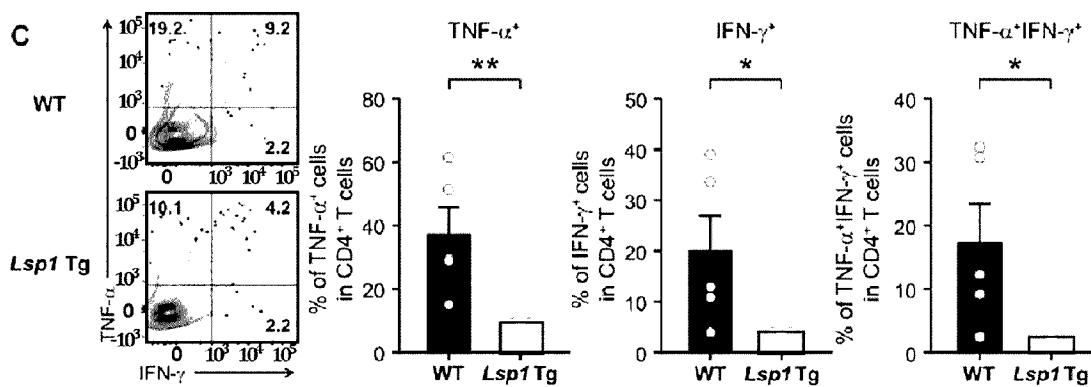
[도8a]



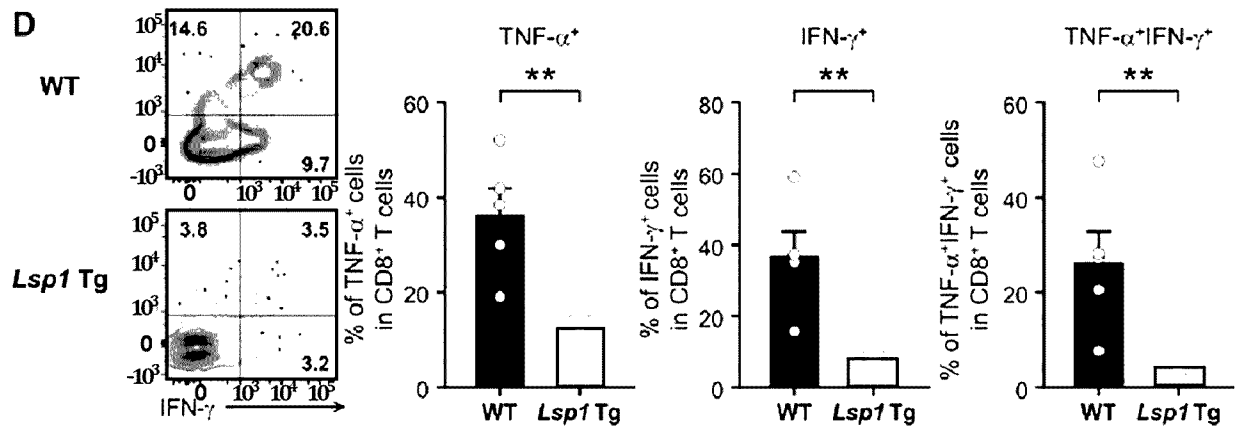
[도8b]



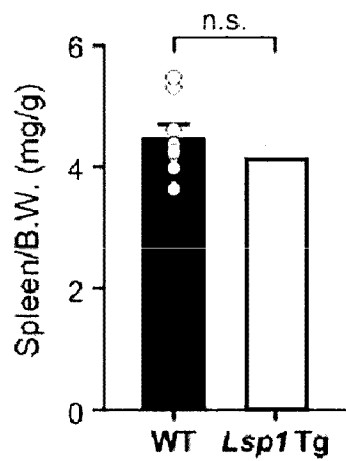
[도8c]



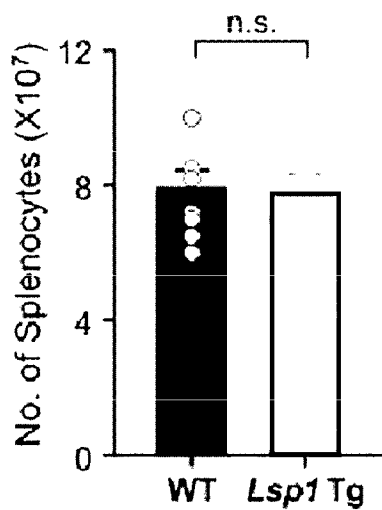
[도8d]



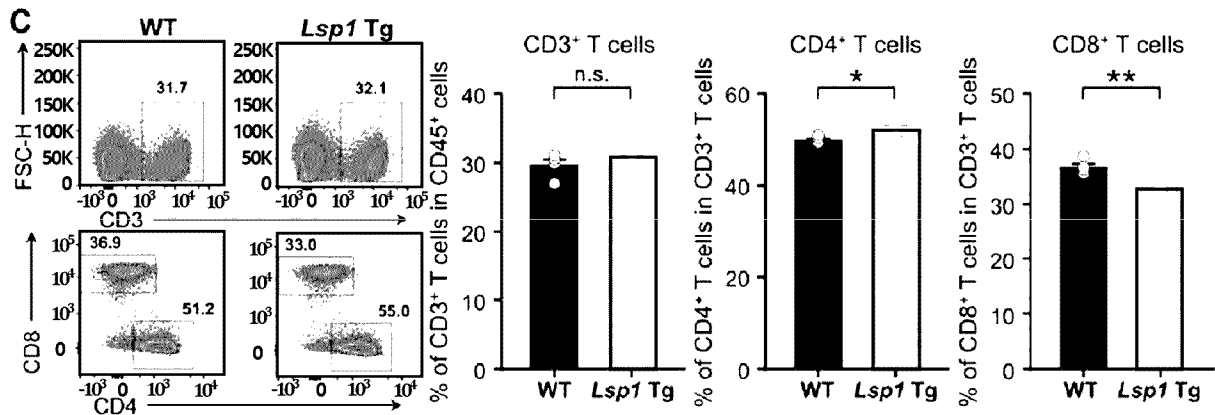
[도9a]

A

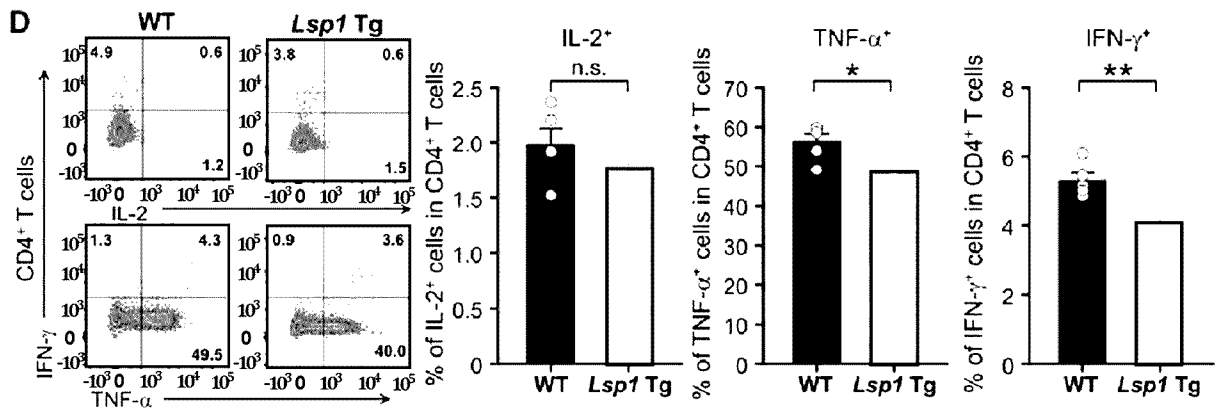
[도9b]

B

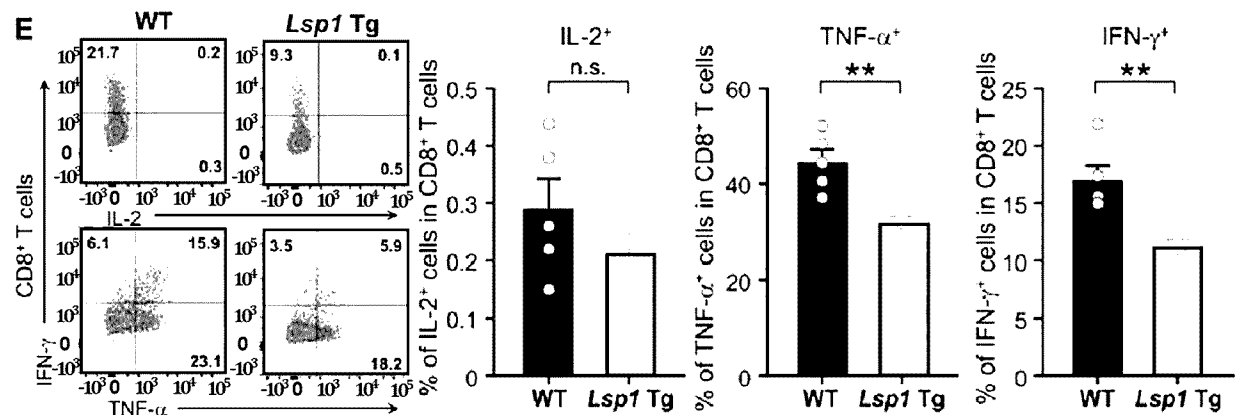
[도9c]



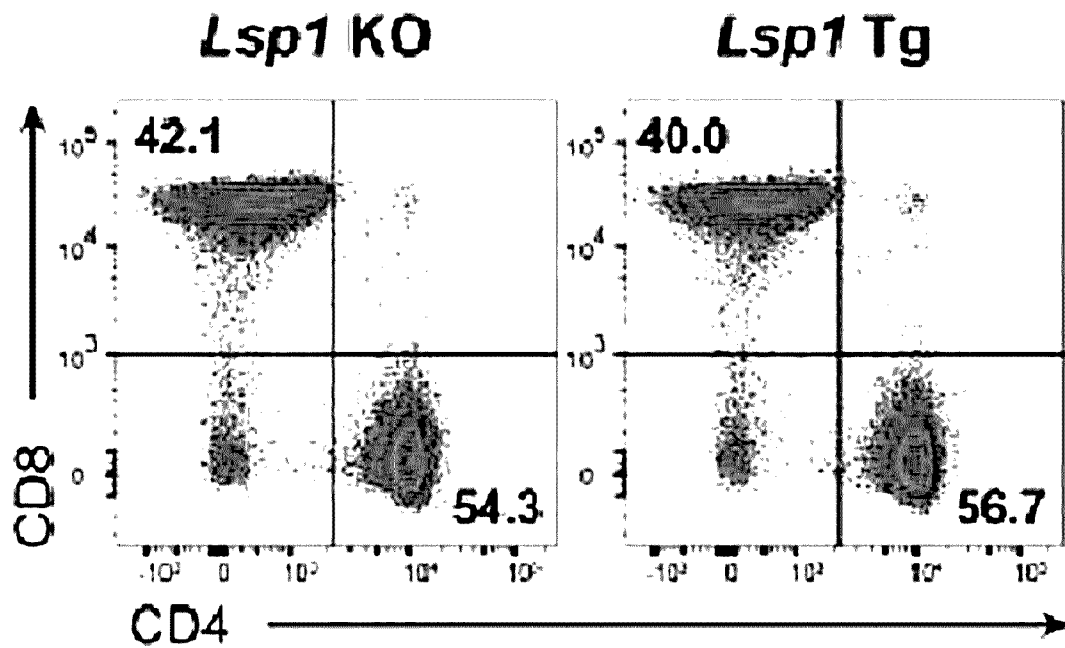
[도9d]



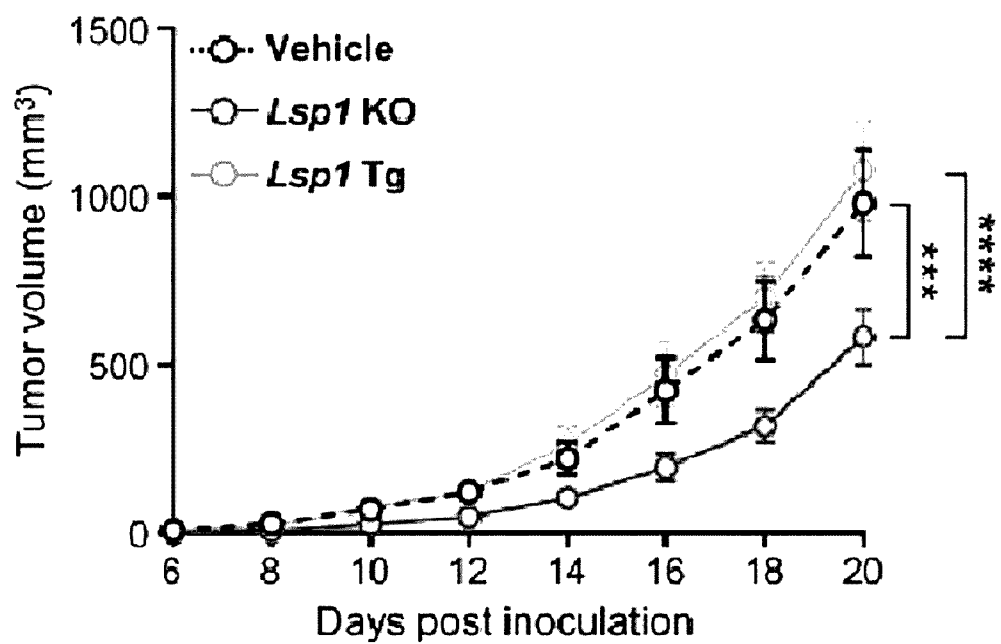
[도9e]



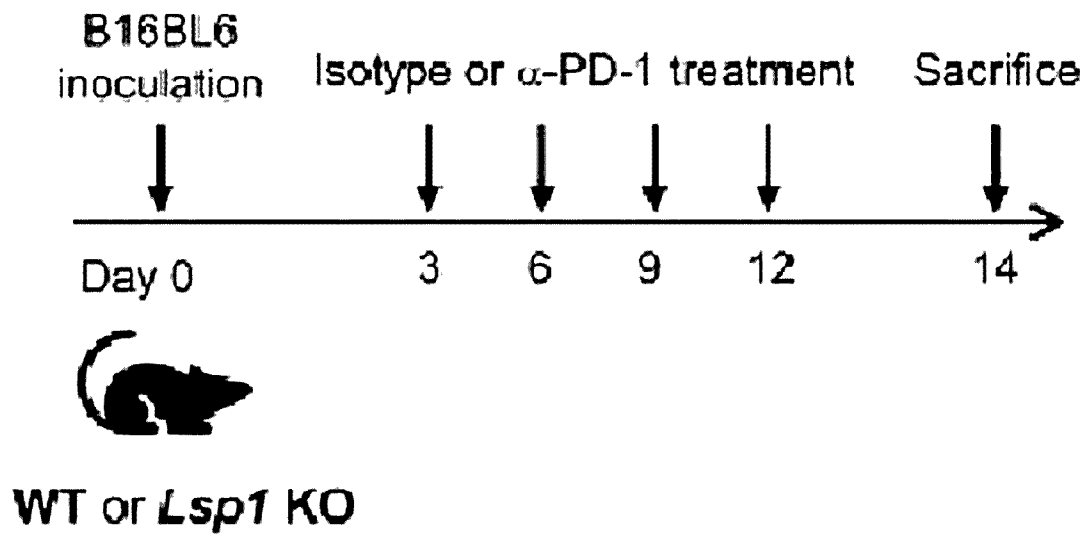
[도10a]

A

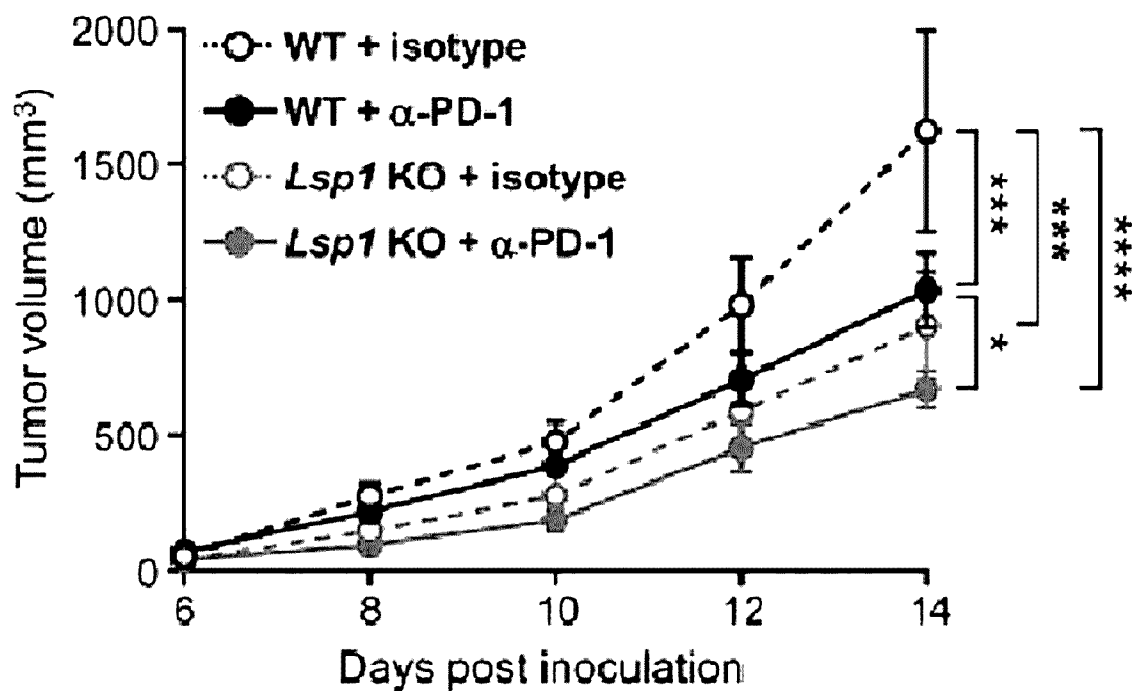
[도10b]

B

[도10c]

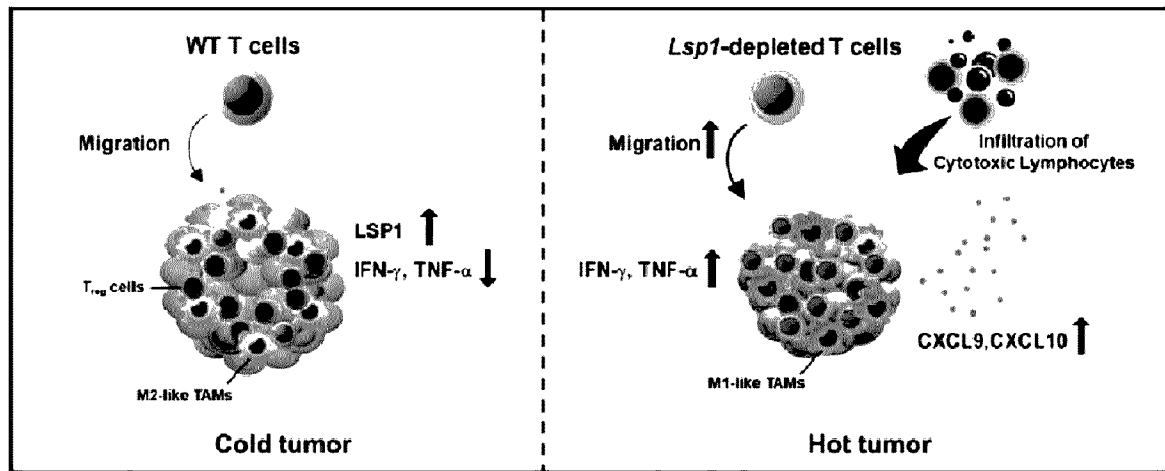
C

[도10d]

D

[도 10e]

E



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/006538

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i; G01N 33/68(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)

A61K 48/00(2006.01); C07K 16/30(2006.01); C12M 1/42(2006.01); G01N 33/50(2006.01); G01N 33/574(2006.01); G01N 33/68(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: 백혈구 특이 단백질 1(leukocyte specific protein 1), 종양 침윤 백혈구(tumor infiltrating leukocyte), T 세포(T cell), 흑색종(melanoma), 결핍(deficient), 녹아웃(knockout)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CAO, Jing-Yuan et al. Elevated lymphocyte specific protein 1 expression is involved in the regulation of leukocyte migration and immunosuppressive microenvironment in glioblastoma. Aging. 2020, vol. 12, no. 2, pp. 1656-1684(publication date: 29 January 2020). See abstract, pages 1659-1680 and Figures 2-6.	1-18
A	HWANG, Seong-Hye et al. Leukocyte-specific protein 1 regulates T-cell migration in rheumatoid arthritis. PNAS. 2015, vol. 112, no. 47, pp. E6535-E6543. See abstract.	1-18
A	US 2019-0367635 A1 (INSTITUT CURIE et al.) 05 December 2019 (2019-12-05) See claims 16-29.	1-18
A	KR 10-2019-0142330 A (UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES) 26 December 2019 (2019-12-26) See entire document.	1-18



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

01 September 2021

Date of mailing of the international search report

02 September 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/KR2021/006538

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2017-0074235 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 29 June 2017 (2017-06-29) See entire document.	1-18
PX	KWON, Riri et al. Regulation of tumor growth by leukocyte-specific protein 1 in T cells. Journal of Immuno Therapy of Cancer. 2020, vol. 8, e001180, inner pp. 1-16(publication date: 05 October 2020). See abstract, inner pages 4-15 and Figures 1-6.	1-18
PX	KWON, Riri. Regulation of tumor growth by leukocyte-specific protein 1 in T cells. 가톨릭대학교 대학원 석사학위논문 (thesis, The Graduate School of Catholic University of Korea). February 2021. See pages 16-58 and Figures 1-15.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/006538

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **19,20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 19 and 20 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/006538

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2019-0367635	A1	05 December 2019	EP	3526253	A1	21 August 2019
				US	10968281	B2	06 April 2021
				WO	2018-069480	A1	19 April 2018
KR	10-2019-0142330	A	26 December 2019	AU	2018-235021	A1	12 September 2019
				AU	2018-235021	A1	20 September 2018
				CA	3054915	A1	20 September 2018
				EP	3596467	A1	22 January 2020
				IL	269315	D0	28 November 2019
				JP	2020-512549	A	23 April 2020
				US	2021-0190787	A1	24 June 2021
				WO	2018-167312	A1	20 September 2018
KR	10-2017-0074235	A	29 June 2017	AU	2015-338893	A1	04 May 2017
				AU	2015-338893	A1	06 May 2016
				BR	112017009050	A2	30 January 2018
				CA	2964392	A1	06 May 2016
				CN	107109362	A	29 August 2017
				EP	3212772	A1	06 September 2017
				IL	252005	A	29 June 2017
				IL	252005	D0	29 June 2017
				JP	2017-533702	A	16 November 2017
				RU	2017118935	A	03 December 2018
				RU	2017118935	A3	01 October 2019
				RU	2020139190	A	26 January 2021
				RU	2739794	C2	28 December 2020
				SG	10201903912	A	30 May 2019
				SG	11201703044	A	30 May 2017
				US	2018-0142198	A1	24 May 2018
				WO	2016-070136	A1	06 May 2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i; G01N 33/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 48/00(2006.01); C07K 16/30(2006.01); C12M 1/42(2006.01); G01N 33/50(2006.01); G01N 33/574(2006.01); G01N 33/68(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: 백혈구 특이 단백질 1(leukocyte specific protein 1), 종양 침윤 백혈구(tumor infiltrating leukocyte), T 세포(T cell), 흑색종(melanoma), 결핍(deficient), 녹아웃(knockout)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CAO, JING-YUAN 등, Elevated lymphocyte specific protein 1 expression is involved in the regulation of leukocyte migration and immunosuppressive microenvironment in glioblastoma, Aging, 2020년, 12권, 2호, 페이지 1656-1684(공개: 2020.01.29) 요약, 페이지 1659-1680 및 Fig. 2-6	1-18
A	HWANG, SEONG-HYE 등, Leukocyte-specific protein 1 regulates T-cell migration in rheumatoid arthritis, PNAS, 2015년, 112권, 47권, 페이지 E6535-E6543 요약	1-18
A	US 2019-0367635 A1 (INSTITUT CURIE 등) 2019.12.05 청구항 16-29	1-18
A	KR 10-2019-0142330 A (유니베르시테 리브레 드 브록셀즈) 2019.12.26 문헌 전체	1-18
A	KR 10-2017-0074235 A (메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지 등) 2017.06.29 문헌 전체	1-18
☒ 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 2021년09월01일(01.09.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년09월02일(02.09.2021)
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

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KWON, RIRI 등, Regulation of tumor growth by leukocyte-specific protein 1 in T cells, Journal of Immuno Therapy of Cancer, 2020년, 8권, e001180, 내부페이지 1-16(공개: 2020.10.05) 요약, 내부페이지 4-15 및 Fig. 1-6	1-18
PX	KWON, RIRI, Regulation of tumor growth by leukocyte-specific protein 1 in T cells, 가톨릭대학교 대학원 석사학위논문, 2021년 2월 페이지 16-58 및 Fig. 1-15	1-18

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **19,20**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 19, 20은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조 (2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2019-0367635 A1	2019/12/05	EP 3526253 A1	2019/08/21
		US 10968281 B2	2021/04/06
		WO 2018-069480 A1	2018/04/19
KR 10-2019-0142330 A	2019/12/26	AU 2018-235021 A1	2019/09/12
		AU 2018-235021 A1	2018/09/20
		CA 3054915 A1	2018/09/20
		EP 3596467 A1	2020/01/22
		IL 269315 D0	2019/11/28
		JP 2020-512549 A	2020/04/23
		US 2021-0190787 A1	2021/06/24
		WO 2018-167312 A1	2018/09/20
KR 10-2017-0074235 A	2017/06/29	AU 2015-338893 A1	2017/05/04
		AU 2015-338893 A1	2016/05/06
		BR 112017009050 A2	2018/01/30
		CA 2964392 A1	2016/05/06
		CN 107109362 A	2017/08/29
		EP 3212772 A1	2017/09/06
		IL 252005 A	2017/06/29
		IL 252005 D0	2017/06/29
		JP 2017-533702 A	2017/11/16
		RU 2017118935 A	2018/12/03
		RU 2017118935 A3	2019/10/01
		RU 2020139190 A	2021/01/26
		RU 2739794 C2	2020/12/28
		SG 10201903912 A	2019/05/30
		SG 11201703044 A	2017/05/30
		US 2018-0142198 A1	2018/05/24
		WO 2016-070136 A1	2016/05/06