



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0067657
(43) 공개일자 2022년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01) *A61K 31/137* (2006.01)
A61K 31/357 (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 31/5415 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12Q 1/6809* (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2022.01)
A61K 31/137 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0154101

(22) 출원일자 2020년11월17일

심사청구일자 2020년11월17일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김태우

서울특별시 성북구 고려대로 73 고려대학교 의과대학 문석의학관 310호

이효정

경기도 용인시 기흥구 신정로 25 신흥덕롯데캐슬레이시티 109동 2303호

(74) 대리인

공병욱

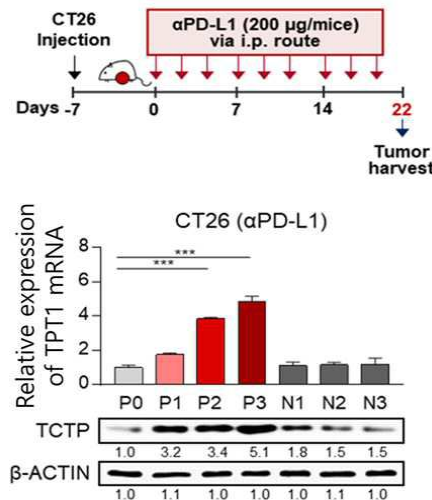
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 면역치료요법의 효능, 예후, 또는 내성 예측을 위한 바이오마커, 및 면역치료요법의 효능 증진을 위한 표적으로서 TCTP의 용도

(57) 요약

본 발명은 면역치료요법의 효능, 예후, 또는 내성 예측을 위한 바이오마커, 및 면역치료요법의 효능 증진을 위한 표적으로서 TCTP의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 바이오마커(TCTP, EGFR, AKT, MCL1, 및/또는 CXCL10)를 이용하는 경우 면역항암제에 대한 내성, 예후를 예측하고, 치료적 이점을 제공하는 치료요법을 선택할 수 있으며, 면역항암제에 내성이 있는 암 또는 종양을 치료하는데 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도2b



(52) CPC특허분류

A61K 31/357 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)
A61K 31/5415 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/6809 (2018.05)
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711120626
과제번호	2020R1A2B5B03095410
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	면역편집에 의한 암의 다중약성적 진화 이해 및 다중약성의 역전 유도 치료 전략 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711098515
과제번호	2019R1A4A1029000
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	면역관문 억제 항체치료 불응암 통합 제어 연구실
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 암 또는 종양의 면역항암제에 대한 내성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법:

- (a) 개체로부터 분리한 시료에서 TCTP(Translationally controlled tumor protein) 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (b) 암 또는 종양의 면역항암제에 대한 내성 예측에 필요한 정보를 제공하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a)에서 측정한 TCTP(Translationally controlled tumor protein) 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정한 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 높다면 암 또는 종양이 면역항암제에 대한 내성을 가질 가능성이 더 크다는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는 EGFR, AKT, MCL1, NANOG 및 CXCL10으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 것을 추가적으로 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 EGFR, AKT, MCL-1, 및 NANOG로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조시료에서 측정한 상기 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준보다 더 높거나, 또는

상기 CXCL10 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조시료에서 측정한 CXCL10 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준보다 더 낮다면,

암 또는 종양이 면역항암제에 대한 내성을 가질 가능성이 더 높다는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 5

다음 단계를 포함하는 면역항암제 투여에 대한 개체의 반응성 또는 예후를 예측하는데 필요한 정보를 제공하는 방법:

- (a) 개체로부터 분리한 시료에서 TCTP(Translationally controlled tumor protein) 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (b) 면역항암제 투여에 대한 반응성 또는 예후를 예측하는데 필요한 정보를 제공하는 단계.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 측정한 TCTP(Translationally controlled tumor protein) 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정한 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 높다면 개체가 면역항암제에 대한 반응성이 더 낮거나 예후가 불량할 가능성이 더 높다는 것을 나타내는

것인, 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 (a) 단계는 EGFR, AKT, MCL-1, NANOG, 및 CXCL10으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 것을 추가적으로 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 EGFR, AKT, MCL-1, 및 NANOG로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조시료에서 측정한 상기 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준보다 더 높거나, 또는

상기 CXCL10 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조시료에서 측정한 CXCL10 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준보다 더 낮다면,

개체가 면역항암제에 대한 반응성이 더 낮거나 예후가 불량할 가능성이 더 높다는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 암을 갖는 개체를 위한 요법을 선택하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법:

(a) 개체로부터 분리한 시료에서 TCTP(Translationally controlled tumor protein) 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 암을 갖는 개체를 위한 요법을 선택하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 측정한 TCTP(Translationally controlled tumor protein) 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정한 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 높다면, TCTP 단백질 또는 유전자 표적 저해제를 사용하는 요법이 상기 개체의 치료적 이익이 클 가능성이 높다는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 (a) 단계는 EGFR, AKT, MCL1, NANOG 및 CXCL10으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 것을 추가적으로 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 EGFR, AKT, MCL-1, 및 NANOG로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조시료에서 측정한 상기 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준보다 더 높거나, 또는

상기 CXCL10 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조시료에서 측정한 CXCL10 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준보다 더 낮다면,

i) EGFR, AKT, MCL-1, 및 NANOG로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 유전자 표적 저해제, ii) CXCL10 단백질 또는 유전자의 활성화제, 및 iii) 이들의 조합 중에서 선택된 하나 이상을 사용하는 것이 상기 개체의 치료적 이익이 클 가능성이 높다는 것을 나타내는 것인, 방법.

청구항 13

(a) 유효성분으로 TCTP 저해제; 및 (b) 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함하는, 암을 겪는 개체에서 면역항암제의 효능 강화용 조성물로서,

상기 개체로부터 분리한 시료에서 측정된 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현의 수준이 암을 겪지 않는 개체, 또는 면역항암제에 대한 내성을 갖지 않는 암을 겪는 개체에서 분리한 참조 시료에서 측정된 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현의 수준과 비교하여 더 높은 것인 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 면역항암제는 면역관문차단제, 또는 양자세포치료제인, 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 TCTP 저해제는 TCTP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체, 화합물, 펩타이드, 융합 단백질, 또는 압타머; 또는 TCTP 유전자에 상보적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인, 조성물.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 TCTP 저해제는 dihydroartemisinin (DHA), rapamycin, sertraline, 및 thioridazine로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 조성물.

청구항 17

제10항에 있어서, 상기 암은 비소세포성 폐암, 소세포성 폐암, 간암, 골암, 뇌암, 설암, 후두암, 신세포암, 직결장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위 암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 메르켈 세포 암 및 혈액 악성종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 조성물.

청구항 18

(a) 유효성분으로 TCTP 저해제 및 면역항암제; 및 (b) 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함하는, 암을 겪는 개체에서 암 치료용 조성물로서,

상기 개체로부터 분리한 시료에서 측정된 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현의 수준은 암을 겪지 않는 개체 또는 상기 면역항암제에 대한 내성을 갖지 않는 암을 겪는 개체에서 분리한 참조 시료에서 측정된 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현의 수준과 비교하여 더 높은 것인, 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 면역항암제는 면역관문차단제, 또는 양자세포치료제인, 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 TCTP 저해제는 TCTP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원 결합 단편, 항체-약

물 접합체, 화합물, 펩타이드, 융합 단백질, 또는 압타머; 또는 TCTP 유전자에 상보적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인, 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 TCTP 저해제는 dihydroartemisinin (DHA), rapamycin, sertraline, 및 thioridazine로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 조성물.

청구항 22

제18항에 있어서, 상기 암은 비소세포성 폐암, 소세포성 폐암, 간암, 골암, 뇌암, 설암, 후두암, 신세포암, 직결장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위 암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 메르켈 세포 암 및 혈액 악성종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 조성물.

청구항 23

암을 갖는 개체로부터 분리한 시료에서 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트.

청구항 24

제23항에 있어서, EGFR, AKT, MCL1, NANOG 및 CXCL10으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하기 위한 하나 이상의 시약을 추가적으로 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역치료요법의 효능, 예후, 또는 내성 예측을 위한 바이오마커, 및 면역치료요법의 효능 증진을 위한 표적으로서 TCTP의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암 면역 요법의 주요 목적은 지속적인 임상 반응을 갖는 항암 면역 반응의 자가 지속주기(self-sustaining cycle of anti-cancer immunity)를 시작하거나 재개하는 것이다. 그러나 대부분의 환자는 주기를 증폭 및 진행하지 못하여 치료 저항성을 나타낸다. 따라서 면역 요법 내성을 극복하기 위해서는 암 면역주기의 하나 이상의 단계를 다루는 내성 인자를 밝히고, 내성인자의 반전을 통해 면역 요법의 내성이 제거되는지 여부를 확인하는 것이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Yang, Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. The Journal of clinical investigation 125, 3335-3337 (2015).

(비특허문헌 0002) Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A. & Ribas, A. Primary, adaptive, and

acquired resistance to cancer immunotherapy. Cell 168, 707-723 (2017).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명자들은 암의 면역치료요법에 대한 내성, 예후를 예측하고, 나아가암의 치료에 적합한 치료요법을 선택하는데 필요한 정보를 제공하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 1) 따라서, 본 발명의 목적은 암 또는 종양의 면역항암제에 대한 내성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 2) 본 발명의 다른 목적은 암 또는 종양의 면역항암제 투여에 대한 반응성 또는 예후를 예측하는데 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 3) 본 발명의 또 다른 목적은 암을 갖는 개체를 위한 치료요법을 선택하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 4) 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 유효성분으로 TCTP 저해제; 및 (b) 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함하는, 암을 겪는 개체에서 면역항암제의 효능 강화용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 5) 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 유효성분으로 TCTP 저해제 및 면역항암제; 및 (b) 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함하는, 암을 겪는 개체에서 암 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 6) 본 발명의 또 다른 목적은 암을 갖는 개체로부터 분리한 시료에서 TCTP의 존재 또는 발현 수준을 측정하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 면역치료요법의 효능, 예후, 또는 내성 예측을 위한 바이오마커, 및 면역치료요법의 효능 증진을 위한 표적으로서 TCTP의 용도에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명은 구체적으로 암 또는 종양의 면역항암제에 대한 내성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법, 암 또는 종양의 면역항암제 투여에 대한 반응성 또는 예후를 예측하는데 필요한 정보를 제공하는 방법, 암을 갖는 개체를 위한 치료요법을 선택하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법, 면역항암제의 효능 강화용 조성물, 암 치료용 조성물, 및 암을 갖는 개체로부터 분리한 시료에서 TCTP의 존재 또는 발현 수준을 측정하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0016] 본 명세서에서 용어 "바이오마커"는 샘플에서 검출될 수 있는 표지자, 예를 들어 예측, 진단 및/또는 예후에 필요한 표지자를 지칭한다. 바이오마커는 특정의 분자, 병리학적인, 조직학적 및/또는 임상적 특징에 의해 특성화된 특정한 하위 유형의 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)의 표지자로서 역할을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이오마커는 유전자이다. 바이오마커는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, DNA 및/또는 RNA), 폴리뉴클레오티드 카피수 변경 (예를 들어, DNA 카피수), 폴리펩티드, 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 변형 (예를 들어, 번역후 변형), 탄수화물 및/또는 당지질-기재 분자 마커를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0017] 개체에 대한 증가된 임상적 이익과 연관된 바이오마커의 "양" 또는 "수준"은 생물학적 샘플 중의 검출가능한 수준이다. 이것은 통상의 기술자에게 공지되고 또한 본 발명에 의해 개시된 방법에 의해 측정될 수 있다. 평가되는 바이오마커의 발현 여부, 수준 또는 양은 치료에 대한 반응을 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0018] 본 명세서에서 용어 "발현 수준"은 일반적으로 생물학적 샘플에서 바이오마커의 양을 지칭한다. "발현"은 일반적으로 정보 (예를 들어, 유전자-코딩 및/또는 후성학)가 세포 내에 존재하고 작동하는 구조로 전환되는 과정을 지칭한다. 따라서, 본원에 사용된 "발현"은 폴리뉴클레오티드로의 전사, 폴리펩티드로의 번역 또는 심지어 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 번역후 변형)을 지칭할 수 있다. 전사된 폴리뉴클레오티드, 번역된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 번역후 변형)은 또한 이들이 대안적 스플라이싱에 의해 생성된 전사체 또는 분해된 전사체로부터 유래하든지 또는 예를 들어 단백질분해에 의한 폴리펩티드의 번역후 프로세싱으로부터 유래하든지 모두 발현되는 것으로 여겨

질 것이다. "발현된 유전자"는 mRNA로서 폴리뉴클레오티드로 전사되고, 이어서 폴리펩티드로 번역되는 것, 또한 RNA로 전사되지만 폴리펩티드로 번역되지 않는 것 (예를 들어, tRNA 및 rRNA)을 포함한다.

[0019] "상승된 발현", "상승된 발현 수준" 또는 "상승된 수준"은 대조군, 예컨대 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)를 앓고 있지 않은 개체 또는 개체들, 또는 내부 대조군 (예를 들어, 하우스키퍼 바이오마커)에 비해 개체에서 바이 오마커의 증가된 발현 또는 증가된 수준을 지칭한다.

[0020] "감소된 발현", "감소된 발현 수준" 또는 "감소된 수준"은 대조군, 예컨대 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)를 앓고 있지 않은 개체 또는 개체들 또는 내부 대조군 (예를 들어, 하우스키퍼 바이오마커)에 비해 개체에서 바이 오마커의 감소된 발현 또는 감소된 수준을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 감소된 발현은 발현이 거의 없거나 또 는 전혀 없는 것을 의미한다.

[0021] 본 명세서에서 용어 "하우스키퍼 바이오마커"는 전형적으로 모든 세포 유형에서 유사하게 존재한 바이오마커 또 는 바이오마커의 군 (예를 들어, 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 하우 스키퍼 바이오마커는 "하우스키퍼 유전자"이다. "하우스키퍼 유전자"는 본원에서 그의 활성이 세포 기능의 유지 에 필수적이고 전형적으로 모든 세포 유형에서 유사하게 존재하는 단백질을 코딩하는 유전자 또는 유전자의 군 을 지칭한다.

[0022] 본 명세서에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단수 또는 복수로 사용될 때 일반적으로 비변형된 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 지칭한다. 따 라서, 예를 들어 본원에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오티드는 비제한적으로 단일- 및 이중-가닥 DNA, 단일- 및 이중-가닥영역을 포함하는 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 및 단일- 및 이중-가닥 영역을 포함하는 RNA, 단일-가 닥 또는 보다 전형적으로는 이중-가닥일 수도 있거나 또는 단일- 및 이중-가닥 영역을 포함할 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함한다. 또한, 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 RNA 또는 DNA, 또는 RNA와 DNA 둘 다를 포함하는 삼중-가닥 영역을 지칭한다. 이러한 영역 내 가닥들은 동일한 분자 또는 상이 한 분자로부터의 것일 수 있다. 상기 영역은 모두 1개 이상의 분자를 포함할 수 있지만, 보다 전형적으로는 오 직 일부 분자의 영역을 포함한다. 삼중-나선 영역의 분자 중 1개는 종종 올리고뉴클레오티드이다. 용어 "폴리뉴 클레오티드"는 구체적으로 cDNA를 포함한다. 용어는 1개 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA (cDNA 포함) 및 RNA를 포함한다. 따라서, 안정성 또는 다른 이유로 인해 변형된 백본을 갖는 DNA 또는 RNA는 본원에서 의도된 용어와 같은 "폴리뉴클레오티드"이다. 또한, 이노신과 같은 비통상적 염기 또는 삼중수소화 염기와 같은 변형된 염기를 포함하는 DNA 또는 RNA가 본원에 정의된 바와 같은 용어 "폴리뉴클레오티드"에 포함된다. 일반적으로, 용어 "폴리뉴클레오티드"는 비변형된 폴리뉴클레오티드의 모든 화학적으로, 효소적으로 및/또는 대사적으로 변 형된 형태 뿐만 아니라 바이러스 및 세포 (단순 및 복합 세포 포함)의 특징적인 DNA 및 RNA의 화학적 형태를 포 함한다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "올리고뉴클레오티드"는 단일-가닥 데옥시리보뉴클레오티드, 단일-가닥 또는 이중-가닥 리 보뉴클레오티드, RNA:DNA 하이브리드 및 이중-가닥 DNA를 포함하나 이에 제한되지 않는 비교적 짧은 폴리뉴클레 오티드를 지칭한다. 올리고뉴클레오티드, 예컨대 단일-가닥 DNA 프로브 올리고뉴클레오티드는 종종 예를 들어 상업적으로 입수가 가능한 자동화 올리고뉴클레오티드 합성기를 이용하여 화학적 방법에 의해 합성된다. 그러나, 올리고뉴클레오티드는 시험관내 재조합 DNA-매개 기술을 비롯한 다양한 다른 방법에 의해 및 세포 및 유기체에서 DNA의 발현에 의해 제조될 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "진단"은 분자 또는 병리학적 상태, 질환 또는 상태 (예를 들어, 암)의 확인 또는 분류를 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 예를 들어, "진단"은 특정한 유형의 암의 확인을 지칭할 수 있다. "진단"은 또 한 예를 들어 조직병리학적 기준, 또는 분자 특징 (예를 들어, 바이오마커 (예를 들어, 특정한 유전자 또는 상 기 유전자에 의해 코딩된 단백질) 중 하나 또는 그의 조합의 발현에 의해 특성화된 하위유형)에 의한 특정한 유 형의 암의 분류를 지칭할 수 있다.

[0025] 본원에 사용된 용어 "시료" 또는 "샘플"은 예를 들어 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적 특징에 기초 하여 특성화 및/또는 확인되는 세포성 및/또는 다른 분자 엔티티를 함유하는 관심 대상체 및/또는 개체로부터 얻거나 이체로부터 유래된 조성물을 지칭한다. 예를 들어, "질환 샘플" 및 그의 변형 표현은 특성화되는 세포 성 및/또는 분자 엔티티를 함유하는 것으로 예상되거나 공지된 관심 대상으로부터 얻은 임의의 샘플을 의미한다. 샘플은 1차 또는 배양된 세포 또는 세포주, 세포 상청액, 세포 용해물, 혈소판, 혈청, 혈장, 유리체 액, 림프액, 활액, 여포액, 정액, 양수, 유액, 전혈, 혈액-유래 세포, 소변, 뇌척수액, 타액, 객담, 누액, 땀, 점액, 종양 용해물, 및 조직 배양 배지, 조직 추출물, 예컨대 균질화된 조직, 종양 조직 및 세포 추출물, 및 그

의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [0026] 본 명세서에서 "조직 샘플", "조직 시료" "세포 샘플", 또는 "세포 시료"는 대상체 또는 개체의 조직으로부터 얻은 유사한 세포의 집합을 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선 및/또는 냉동 및/또는 보존된 기관, 조직 샘플, 생검 및/또는 흡인물로부터의 고체 조직, 혈액 또는 임의의 혈액 구성성분, 예를 들어 뇌 척수액, 양수, 복수액 또는 간질액과 같은 체액 및 대상체의 임신 또는 발생 중 임의의 시점으로부터의 세포 또는 혈장일 수 있다. 또한, 조직 샘플은 1차 또는 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다. 임의로, 조직 또는 세포 샘플은 질환 조직/기관으로부터 수득한다. 조직 샘플은 자연에서 조직과 자연적으로 서로 혼합되지 않는 화합물, 예컨대 보존제, 항응고제, 완충제, 고정제, 영양소, 항생제 등을 함유할 수 있다.
- [0027] 본원에 사용된 "참조 샘플(시료)", "참조 세포", "참조 조직", "대조 샘플", "대조 세포" 또는 "대조 조직"은 비교 목적을 위해 사용되는 샘플, 세포, 조직, 표준 또는 수준을 지칭한다. 한 실시양태에서, 참조 샘플(시료), 참조 세포, 참조 조직, 대조 샘플, 대조 세포 또는 대조 조직은 동일한 대상체 또는 개체의 건강한 및/또는 비-이환된 신체 일부 (예를 들어, 조직 또는 세포)로부터 수득한다. 예를 들어, 건강한 및/또는 비-이환된 세포 또는 조직은 이환된 세포 또는 조직 (예를 들어, 종양에 인접한 세포 또는 조직)에 인접하여 있다. 또 다른 실시양태에서, 참조 샘플은 동일한 대상체 또는 개체의 신체의 비처리 조직 및/또는 세포로부터 수득한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 샘플(시료), 참조 세포, 참조 조직, 대조 샘플, 대조 세포 또는 대조 조직은 대상체 또는 개체가 아닌 개체의 건강한 및/또는 비-이환된 신체의 일부 (예를 들어, 조직 또는 세포)로부터 수득한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 샘플(시료), 참조 세포, 참조 조직, 대조 샘플, 대조 세포 또는 대조 조직은 대상체 또는 개체가 아닌 개체의 신체의 비처리 조직 및/또는 세포로부터 수득한다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 참조 샘플(시료), 참조 세포, 참조 조직, 대조 샘플, 대조 세포 또는 대조 조직은 항암면역요법에 대해 내성을 갖지 않는 개체, 조직 또는 세포로부터 수득한다. 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 항암면역요법에 대해 내성을 갖지 않는 개체 또는 세포는 예컨대, CT26 P0, A375 P0, TC-1 LP0 등을 나타내나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 의약을 사용하는 치료에 대한 환자의 "유효 반응" 또는 환자의 "반응성" 및 유사한 용어는 질환 또는 장애, 예컨대 암에 걸릴 위험이 있거나 또는 이를 앓고 있는 환자에게 부여되는 임상적 또는 치료적 이익을 지칭한다.
- [0030] 한 실시양태에서, 이러한 이익은 생존 (전체 생존 및 무진행 생존 포함) 연장; 객관적 반응 (완전 반응 또는 부분 반응 포함)의 발생; 또는 암의 증상 또는 징후의 개선 중 어느 하나 이상을 포함한다. 한 실시양태에서, 바이오마커 (예를 들어, TCTP 발현 (예를 들어, 실시간 qPCR을 이용하여 결정됨))는 바이오마커를 발현하지 않는 환자에 비해 의약 (예를 들어, 항-PD-L1 항체)을 사용하는 치료에 내성을 가질 가능성이 증가할 것으로 예측되는 환자를 확인하기 위하여 사용된다. 한 실시양태에서, 바이오마커 (예를 들어, TCTP 발현 (예를 들어, 실시간 qPCR을 이용하여 결정됨))는 바이오마커를 더 낮은 수준으로 발현하는 환자에 비해, 의약 (예를 들어, 항-PD-L1 항체)을 사용하는 치료에 내성을 가질 가능성이 증가할 것으로 예측되는 환자를 확인하기 위해 사용된다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 가축 (예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼, 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0033] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 암 또는 종양의 면역항암제에 대한 내성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:
- [0034] (a) 개체로부터 분리한 시료에서 TCTP(Translationally controlled tumor protein) 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0035] (b) 암 또는 종양의 면역항암제에 대한 내성 예측에 필요한 정보를 제공하는 단계.
- [0037] 본 명세서에서 용어 'TCTP(Translationally controlled tumor protein)'는 인간에서 TPT1 유전자에 의해 인코딩되는 단백질이다. TPT1 유전자는 13번 염색체의 13q12-q1413에 위치한다. TPT1 유전자는 5개의 인트론과 6개의 엑손을 포함한다. TPT1 유전자는 포유류에 매우 잘 보존되어 있는 유전자로 세포의 성장, 면역, 암의 발생과 관련성이 있는 것으로 알려져 있다. 본 명세서에서 TCTP는 TPT1과 상호호환적으로 사용된다.

- [0038] 본 명세서에서 용어 'EGFR (epidermal growth factor receptor; ErbB-1; HER1 in humans)'은 세포의 단백질 리간드인 표피성장인자 패밀리 (EGF family)의 수용체로서 막관통 단백질이다. 표피성장인자 수용체는 ErbB 패밀리에 속하는 수용체로, 네 가지의 밀접하게 연관된 수용체 타이로신 키나아제의 서브 패밀리이다(EGFR (ErbB-1), HER2/neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) 및 Her 4 (ErbB-4)). 많은 암 종류에서, EGFR 발현 또는 활성화에 영향을 미치는 돌연변이는 암을 유발한다는 것이 알려져 있다.
- [0039] RAC-alpha serine/threonine-protein kinase는 인간에서 AKT1 유전자에 의해 인코딩되는 효소이다. 이 효소는 SH2 (Src homology 2-like) 도메인을 포함하는 AKT 서브패밀리에 속하는 serine/threonine kinases이다.
- [0040] MCL-1(MCL1)은 유도된 골수성 백혈병 세포 분화 단백질(Induced myeloid leukemia cell differentiation protein)로, 인간에서 MCL1 유전자에 의해 인코딩된다. MCL-1은 Bcl-2 패밀리에 속하는 유전자이다. MCL-1은 선택적 스플라이싱을 통하여 2가지 변이 전사스크립트를 만들어 서로 다른 아이소폼의 단백질을 인코딩한다. 더 긴 유전자 산물 (isoform 1)은 아포토시스를 저해하여 세포 생존을 향상시키는 반면, 더 짧은 유전자 산물 (isoform 2)은 아포토시스를 촉진하여 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [0041] CXCL10 (C-X-C motif chemokine ligand 10)은 IP-10 (Interferon gamma-induced protein 10) 또는 small-inducible cytokine B10으로 알려져 있는 8.7 kDa의 단백질로, 인간에서 CXCL10 유전자에 의해 인코딩된다. CXCL10은 작은 사이토카인으로 CXC chemokine family에 속한다.
- [0042] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 (a) 단계에서 측정된 TCTP(Translationally controlled tumor protein) 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정된 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 높다면 암 또는 종양이 면역항암제에 대한 내성을 가질 가능성이 더 크다는 것을 나타낸다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 (a) 단계는 EGFR, AKT, MCL1, NANOG 및 CXCL10으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것이다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 EGFR, AKT, MCL1, NANOG 또는 이들의 조합으로부터 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 높으면, 암 또는 종양이 면역항암제에 대한 내성을 가질 가능성이 더 크다는 것을 나타낸다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 CXCL10 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정된 CXCL10의 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 낮으면, 암 또는 종양이 면역항암제에 대한 내성을 가질 가능성이 더 크다는 것을 나타낸다.
- [0046] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 바이오마커는 TCTP, EGFR, AKT, MCL1, NANOG 및 CXCL10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 바이오마커는 샘플(시료) 중 0% 포함되는 경우에 샘플에 존재하지 않는다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 바이오마커는 샘플 중 0%를 초과하여 포함되는 경우에 샘플에 존재한다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 바이오마커는 샘플의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 또는 10%에 존재한다.
- [0048] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 바이오마커는 FACS, 웨스턴 블롯, ELISA, 면역침전, 면역조직화학, 면역형광, 방사성 면역검정, 도트 블롯팅, 면역검출 방법, HPLC, 표면 플라즈몬 공명, 광학 분광분석법, 질량 분광측정법, HPLC, qPCR, RT-qPCR, 멀티플렉스 qPCR 또는 RT-qPCR, RNA-seq, 마이크로어레이 분석, SAGE, 매스어레이 기술, 및 FISH, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법을 이용하여 시료로부터 검출된다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 바이오마커는 단백질 검출에 의해 샘플에서 검출된다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 단백질 검출은 면역조직화학 (IHC) 또는 웨스턴 블롯에 의해 수행된다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, TCTP 바이오마커는 항-TCTP 항체를 사용하여 검출된다.
- [0050] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 바이오마커는 핵산 복제에 의해 시료에서 검출된다. 일부 실시양태에서, 핵산 복제는 qPCR, rtPCR, RNA-seq, 멀티플렉스 qPCR 또는 RT-qPCR, 마이크로어레이 분석, SAGE, 매스어레이 기술, 또는 FISH를 이용하여 이루어진다.
- [0051] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 바이오마커는 qPCR 분석과 같이 핵산 발현을 이용하여, 종양 세포, 종양 침윤 면역 세포, 기질 세포 및 그의 조합 상에서 검출된다.
- [0052] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암은 비소세포성 폐암, 소세포성 폐암, 신세포암, 직결장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위 암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자

궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 메르켈 세포 암 및 혈액 악성종양이다.

- [0054] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 면역항암제 투여에 대한 반응성 또는 예후를 예측하는데 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:
- [0055] (a) 개체로부터 분리한 시료에서 TCTP(Translationally controlled tumor protein) 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0056] (b) 개체가 면역항암제 투여에 대해 반응성을 가지거나 또는 예후가 양호할 가능성이 클 것이라는, 면역항암제 투여에 대한 반응성 또는 예후를 예측하는데 필요한 정보를 제공하는 단계.
- [0057] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 (a)에서 측정한 TCTP(Translationally controlled tumor protein) 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정한 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 높으면 개체가 면역항암제에 대한 반응성을 가질 가능성이 더 낮거나 예후가 불량할 가능성이 더 높다는 것을 나타낸다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 (a) 단계는 EGFR, AKT, MCL1, NANOG 및 CXCL10으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것이다.
- [0058] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 EGFR, AKT, MCL1, NANOG 또는 이들의 조합으로부터 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정한 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 높으면, 개체가 면역항암제에 대한 반응성을 가질 가능성이 더 낮다는 것을 나타낸다.
- [0059] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 CXCL10의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정한 CXCL10의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 낮으면, 개체가 면역항암제에 대한 반응성을 가질 가능성이 더 낮다는 것을 나타낸다.
- [0060] 상기 본 발명의 일 양태에 따른 면역항암제 투여에 대한 반응성 또는 예후를 예측하는데 필요한 정보를 제공하는 방법은 상술한 암 또는 종양의 면역항암제에 대한 내성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법과 공통된 단계 및 구성을 포함하므로 중복되는 범위 내에서는 상술한 정보 제공방법과 동일하게 적용된다.
- [0062] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 암을 갖는 개체를 위한 치료요법을 선택하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:
- [0063] (a) 개체로부터 분리한 시료에서 TCTP(Translationally controlled tumor protein)의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0064] (b) 개체가 TCTP 단백질 또는 유전자 표적 저해제를 사용하는 요법을 선택하면 치료적 이익이 클 가능성이 높다는, 암을 갖는 개체를 위한 요법을 선택하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 단계.
- [0065] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 (a)에서 측정한 TCTP(Translationally controlled tumor protein)의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정한 TCTP의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 높으면, 개체의 치료방법으로 TCTP 단백질 또는 유전자 표적 저해제를 사용하는 요법을 선택하면 치료적 이익이 클 가능성이 높다는 것을 나타내는 것이다.
- [0066] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 (a) 단계는 EGFR, AKT, MCL1, 및 CXCL10으로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것이다.
- [0067] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 EGFR, AKT, MCL1, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정한 유전자의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 높으면, 개체의 치료방법으로 TCTP 단백질 또는 유전자 표적 저해제를 사용하는 요법을 선택하면 치료적 이익이 클 가능성이 높다는 것을 나타낸다.
- [0068] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 CXCL10의 존재 또는 발현 수준이 참조 시료에서 측정한 CXCL10의 존재 또는 발현 수준과 비교하여 더 낮으면, 개체의 치료방법으로 TCTP 단백질 또는 유전자 표적 저해제를 사용하는 요법을 선택하면 치료적 이익이 클 가능성이 높다는 것을 나타낸다.
- [0069] 또한, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 EGFR, AKT, MCL-1, 및 NANOG로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질

또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조시료에서 측정한 상기 선택된 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준보다 더 높거나, 또는

- [0070] 상기 CXCL10 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준이 참조시료에서 측정한 상기 CXCL10 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준보다 더 낮으면 개체의 치료방법으로 i) EGFR, AKT, MCL-1, 및 NANOG로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 유전자 표적 저해제, ii) CXCL10 단백질 또는 유전자의 활성화제, 또는 iii) 이들의 조합을 선택하면 치료적 이익이 클 가능성이 높다는 것을 나타낸다. 상기 치료방법은 TCTP 단백질 또는 유전자 표적 저해제와 병용할 수 있다.
- [0071] 상기 본 발명의 일 양태에 따른 암을 갖는 개체를 위한 치료요법을 선택하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법은 상술한 암 또는 종양의 면역항암제에 대한 내성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법과 공통된 단계 및 구성을 포함하므로 중복되는 범위 내에서는 상술한 정보 제공방법과 동일하게 적용된다.
- [0072] 본 명세서에서 "임의의 단백질 또는 유전자에 대한 표적 저해제"(예컨대 EGFR 단백질 또는 유전자 표적 저해제), 또는 "임의의 단백질 또는 유전자에 대한 저해제"(예컨대 EGFR 저해제)는 상호호환적으로 사용되고, 종류에 상관 없이 해당 단백질 또는 유전자의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 의미한다.
- [0073] 상기 "임의의 단백질 또는 유전자에 대한 표적 저해제" 또는 상기 "임의의 단백질 또는 유전자에 대한 저해제"는 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체, 해당 단백질 또는 유전자의 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물, 해당 단백질에 특이적으로 결합하거나 단백질 또는 유전자의 발현 또는 활성을 감소시키는 펩타이드, 해당 단백질에 특이적으로 결합하거나 단백질 또는 유전자의 발현 또는 활성을 감소시키는 융합 단백질, 또는 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 압타머; 또는 해당 유전자에 상보적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0075] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 유효성분으로 TCTP 저해제; 및 (b) 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함하는, 암을 겪는 개체에서 면역항암제의 효능 강화용 약제학적 조성물을 제공한다:
- [0076] 상기 개체로부터 분리한 시료에서 측정한 TCTP의 존재 또는 발현의 수준이 암을 겪지 않는 개체에서 분리한 참조 시료에서 측정한 TCTP의 존재 또는 발현의 수준과 비교하여 증가된 것이다.
- [0077] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 면역항암제는 면역관문차단제, 또는 양자세포치료제이다.
- [0078] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 면역관문차단제는 항-PD-1 제제, 항-PD-L1 제제, 또는 이들의 조합이다.
- [0079] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 TCTP 저해제는 TCTP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체, 화합물, 펩타이드, 융합 단백질, 또는 압타머이다.
- [0080] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 TCTP 저해제는 TCTP 유전자에 상보적으로 결합하는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0081] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 TCTP 유전자에 상보적으로 결합하는 siRNA는 서열번호 9 내지 14 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 TCTP 저해제는 dihydroartemisinin (DHA), rapamycin, sertraline, 및 thioridazine로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상의 약제이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0083] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암은 비소세포성 폐암, 소세포성 폐암, 간암, 골암, 뇌암, 설암, 후두암, 신세포암, 직결장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위 암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 메르켈 세포 암 및 혈액 악성종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0084] 본 발명의 일 구현예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 TCTP 저해제는 PD-L1 제제, ACT와 같은 면역항암제에 내성을 가지는 종양 또는 암세포에 대해 내성을 감소시키고, PD-L1 제제, ACT와 같은 면역항암제에 대한 감수성을 증가시키는 바, 면역항암제의 효능을 강화하는데 유용하게 사용될 수 있다.

- [0086] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 유효성분으로 TCTP 저해제 및 면역항암제; 및 (b) 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함하는, 암을 겪는 개체에서 암 치료용 약제학적 조성물을 제공한다:
- [0087] 상기 개체로부터 분리한 시료에서 측정된 TCTP의 존재 또는 발현의 수준이 암을 겪지 않는 개체에서 분리한 참조 시료에서 측정된 TCTP의 존재 또는 발현의 수준과 비교하여 증가된 것이다.
- [0088] 상기 본 발명의 일 양태에 따른 암 치료용 약제학적 조성물은 상술한 면역항암제의 효능 강화용 약제학적 조성물과 공동된 구성을 포함하므로, 중복되는 범위 내에서는 상술한 약제학적 조성물과 동일하게 적용된다.
- [0089] 본 발명의 일 구현예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 TCTP 저해제는 PD-L1 제제, ACT 와 같은 면역항암제의 내성을 감소시킬 뿐만 아니라, TCTP 저해제와 시너지 효과를 나타내는 바, TCTP 저해제와 면역항암제를 모두 포함하는 병용제제는 보다 효능이 우수한 암 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0091] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 암을 갖는 개체로부터 분리한 시료에서 TCTP 단백질 또는 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0092] 본 발명의 일 구현예에 있어서, EGFR, AKT, MCL1, NANOG, 및 CXCL10으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 존재 또는 발현 수준을 측정하기 위한 하나 이상의 시약을 추가적으로 포함한다.
- [0093] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 TCTP, EGFR, AKT, MCL1, 및 CXCL10으로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자는 시료에서 핵산의 복제에 의하여 검출된다.
- [0094] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 키트를 이용하여 개체에서 검출된 TCTP의 존재 또는 발현 수준과 참조 시료에서 검출된 TCTP의 존재 또는 발현 수준을 비교하여 TCTP 발현 수준이 높으면 개체가 갖는 암이 면역항암제에 대한 내성을 가질 가능성이 더 크다는 것을 의미하고, TCTP 발현 수준이 같거나 낮으면 개체가 갖는 암이 면역항암제에 대한 내성을 가질 가능성이 더 낮다는 것을 의미한다.
- [0095] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 방법 또는 키트는 개체로부터 분리된 시료에서 바이오마커(TCTP, EGFR, AKT, MCL1, 및/또는 CXCL10)의 존재 또는 발현 수준을 측정함으로써 개체에 대한 면역항암제를 이용한 치료를 유지, 조정하거나 또는 중단하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는데 사용될 수 있다.
- [0096] 본 발명의 일 구현예에 있어서, (a) 암을 겪는 개체에 면역항암제를 투여하는 동안 또는 그 후의 시점에서 개체로부터 분리된 시료에서 바이오마커(TCTP, EGFR, AKT, MCL1, 및 CXCL10)의 존재 또는 발현 수준을 측정하고, (b) 이를 바이오마커(예컨대 TCTP)의 면역항암제를 투여하기 전에 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 바이오마커(예컨대 TCTP)의 존재 또는 발현 수준과 비교하여, (c1) 바이오마커(예컨대 TCTP)의 발현 수준이 증가되면 개체가 면역항암제에 대한 반응성이 낮거나 또는 내성을 가질 가능성이 증가하였다는 정보를 제공할 수 있다. 반대로, (c2) 바이오마커(예컨대 TCTP)의 발현 수준이 같거나 감소되면 개체가 면역항암제에 대한 반응성이 높거나, 변동이 없거나, 또는 내성을 가질 가능성이 낮다는 정보를 제공할 수 있다.
- [0097] 따라서, 면역항암제의 투여 전후의 바이오마커(TCTP, EGFR, AKT, MCL1, 및/또는 CXCL10)의 발현 수준 변화를 확인함으로써 면역항암제에 대한 내성이 생기지 않거나 반응성이 유지 또는 높아지면 면역항암제를 이용한 치료를 유지하거나 강화할 수 있다.
- [0098] 반대로, 면역항암제의 투여 전후의 바이오마커(TCTP, EGFR, AKT, MCL1, 및/또는 CXCL10)의 발현 수준 변화를 확인함으로써 면역항암제에 대한 내성이 생기거나 반응성이 낮아지면 면역항암제의 사용을 중단할 수 있다.
- [0099] 상기 바이오마커(TCTP, EGFR, AKT, MCL1, 및/또는 CXCL10) 발현 수준의 측정은 시점을 달리하여 적어도 2회, 3회, 4회, 또는 5회 이상 수행될 수 있고, 바이오마커(TCTP, EGFR, AKT, MCL1, 및/또는 CXCL10) 발현수준의 변화에 따라 면역항암제의 사용을 유지, 중단, 또는 재개할 수 있다.

발명의 효과

- [0101] 본 발명자들은 면역항암제의 내성을 일으키는 인자로서의 바이오마커(TCTP, EGFR, AKT, MCL1, 및/또는 CXCL10)를 발굴하고, 이의 저해 또는 촉진을 통하여 내성을 제어할 수 있음을 확인하였다. 본 발명의 바이오마커(TCTP, EGFR, AKT, MCL1, 및/또는 CXCL10)를 이용하는 경우 면역항암제에 대한 내성, 예후를 예측하고, 치료적 이점을

제공하는 치료요법을 선택할 수 있으며, 면역항암제에 내성이 있는 암 또는 종양을 치료하는데 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0103]

도 1a 내지 1d는 TPT1의 발현 증가가 항-PD-L1 치료요법에 대한 비반응자 표현형과연관이 있음을 나타내는 도이다. 도 1a는 반응자(responders) (R, $n = 68$) 및 비반응자(non-responders) (NR, $n = 230$) 간의 TPT1 발현을 비교하여 나타낸 도이다. 도 1b는 전체 생존율의 카플란-마이어 분석(Kaplan-Meier analysis) 결과 및 TPT1 발현 수준의 중앙 발현 컷오프값 ($TPT1^{high} > median$; $TPT1^{low} < median$, $p = 0.00822$)을 나타낸 도이다. 도 1c는 $TPT1^{low}$ 및 $TPT1^{high}$ 환자의 $CD8^+ T$ cell 시그니처 스코어를 나타낸 도이다. 도 1d는 $TPT1^{low}$ 및 $TPT1^{high}$ 환자의 항-아포토시스 시그니처 스코어를 나타낸 도이다. 박스 플롯에서, 박스의 맨 위와 아래 모서리는 최대값과 최소값을 각각 나타낸다; 중앙의 선은 중앙값을 나타낸다.

도 2a는 PD-L1 항체 치료에 대한 마우스 내성암 모델 CT26 P3를 확립한 결과를 나타낸다(A, B). 또한 내성암 모델에서 모암세포 CT26 P0 보다 종양 내 $CD8^+ T$ 세포 수 (C-E) 및 암세포의 세포사멸이 감소되어 있는 것을 나타낸다 (F).

도 2b 내지 2i는 TCTP의 사일런싱이 면역-불응성 암에서 CTL-매개 세포살해에 대한 종양 내인성 내성 및 비-T 세포 염증성 종양 미세환경을 반전시킨다는 것을 나타내는 도이다. 도 2b의 상단 도는 CT26 P0 또는 CT26 P3 세포로 이식된 BALB/c 마우스에서의 치료 요법의 개략도를 나타낸다. 도 2b-e는 siRNA로 형질감염된 CT26 P3 세포에 대해 나타낸 도이다. 도 2c는 웨스턴 블롯 분석으로 측정된 TCTP 단백질 수준을 나타낸 도이다. 도 2d는 트랜스웰-기반 T 세포 화학주성 분석을 나타낸 도이다. siGFP 및 siTPT1#1, 2, 3-처리된 CT26 P3 세포에서 유래한 조건 배지(conditioned media, CM)를 하단 챔버에 첨가하고, T 세포는 상단 챔버에 플레이팅하였다. 6시간 후 하단 챔버로 이동한 T 세포의 수를 카운팅하였다. 도 2e는 CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)로 라벨링 된 종양세포가 종양특이적 CTL에 노출되었고, active-caspase-3의 유세포 분석에 의해 CFSE⁺ 아포토틱 종양 세포의 빈도가 측정되었다.

도 2f는 CT26 P3로 이식된 BALB/c 마우스에서 치료 요법의 개략도를 나타낸다. 도 2g-2i는 CT26 P3 종양-보유 마우스에 siGFP- 또는 siTPT1-가 로딩된 키토산 나노입자를 PD-L1 항체와 투여하는 실험 결과를 나타낸다. 도 2g는 종양의 성장을 나타내고, 도 2h는 상기 체계로 처리된 CT26 P3세포를 접종한 마우스의 생존율을 나타낸다. 도 2i는 종양-침윤 $CD8^+ T$ 세포의 유세포 분석 프로파일을 나타낸 도이다. 도 2j는 $CD4^+$, Foxp3⁺ Treg 세포에 대한 종양-침윤 $CD8^+ T$ 세포의 비를 나타낸 도이다. 도 2k는 $CD8^+ T$ 세포 중 granzyme B⁺ 세포의 백분율을 나타낸 도이다. 도 2l은 종양 내 아포토틱 세포의 빈도를 나타낸 도이다. 인 비보 실험에서 각 그룹마다 10마리의 마우스가 사용되었다.

도 3a 내지 도 3i는 TCTP의 과발현이 종양 세포 특성 변화에 미치는 영향을 나타낸 도이다. CT26 세포는 공 벡터(empty vector) (No) 또는 TCTP를 포함하는 벡터로 안정하게 형질감염되었다. 도 3a는 웨스턴 블롯으로 분석된 TCTP, CXCL10, 및 MCL-1 단백질 수준을 나타낸 도이다. 도 3b는 CT26 No 또는 CT26 TCTP 세포-유래 조건 배지를 포함하는 하단 챔버와, $CD8^+ T$ 세포를 플레이팅한 상단 챔버를 이용하여 수행한 T 세포 화학주성 분석 실험 결과를 나타낸 도이다. 하단 챔버로 이동한 T 세포의 수를 카운팅하였다. 도 3c는 이동한 T 세포를 공 벡터 또는 CXCL10로 형질감염된 CT26 TCTP 세포에서 유래한 조건 배지로 배양한 후에 계수한 결과를 나타낸 도이다.

도 3d 및 도 3e는 CFSE-표지된 종양 세포를 종양-특이적 CTL과 함께 배양하고 CFSE⁺ 세포 사멸 종양 세포의 빈도를 활성-카스파제-3(active-caspase-3) 유세포 분석에 의해 결정한 결과를 나타낸 도이다.

도 3f는 CT26 No 또는 CT26 TCTP를 이식한 BALB/c mice에서의 치료요법에 대한 개략도를 나타낸다. 도 3g-3i는 PD-L1 항체로 처리 또는 비처리한 종양-보유 마우스에 대한 실험 결과를 나타낸 도이다. 도 3g는 PD-L1 항체로 처리 또는 비처리한 CT26 No 또는 CT26 TCTP 세포로 접종한 마우스의 종양 성장을 나타내고, 도 3h는 마우스의 생존율을 나타낸다. 도 3i는 종양-침윤 $CD8^+ T$ 세포의 유세포 분석 프로파일을 나타낸 도이다. 도 3j는 $CD4^+$, Foxp3⁺ Treg 세포에 대한 종양-침윤 $CD8^+ T$ 세포의 비를 나타낸 도이다. 도 3k는 종양-침윤 $CD8^+ T$ 세포의 그랜자임 B 양성 세포의 백분율을 나타낸 도이다. 도 3l은 지시된 체계로 처리된 종양 내의 아포토틱 세포의

빈도를 나타낸 도이다. 인 비보 실험을 위해 그룹당 10마리의 마우스가 사용되었다. p-값은 일원 분산 분석 (3b)-(3d) 및 (3i)-(1), 양방향 분산 분석 (3g) 및 로그 순위 (Mantel-Cox) 검정 (3h)에 의해 표시되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 나타내었다.

도 4a는 인간유래 NY-ESO1 특이 T 세포 치료에 대해 내성을 가진 A375(NY-ESO1 종양항원 발현) P3 세포주를 확립한 결과를 나타낸 도이다.

도 4b 내지 4m은 CTL-매개 면역 선택이 TCTP+ 면역-불응성 종양세포를 풍부화한다는 것을 설명하는 도이다. 도 4b 상단 그림은 A375 P0 또는 A375 P3 세포로 이식된 NOD/SCID 마우스에 대한 치료 요법의 개략도이다. 도 4b 하단 그림은 면역저항성의 다양한 단계에서 A375 세포에서의 TPT1 mRNA 및 TCTP 단백질의 수준을 qRT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석으로 측정된 결과를 나타낸 도이다. 도 4c는 유세포 분석법으로 TCTP⁺ 종양 세포의 빈도를 정량화한 결과를 나타낸 도이다. 도 4d는 웨스턴 블롯으로 측정된 CXCL10 및 MCL-1의 단백질 수준을 나타낸 도이다. 도 4e 내지 4g는 지시된 siRNA로 형질감염된 A375 P3 세포와 관련된 실험 결과를 나타낸 도이다. 구체적으로 도 4e는 웨스턴 블롯으로 측정된 TCTP, CXCL10, 및 MCL-1 단백질 수준을 나타낸 도이다. 도 4f는 *siTPT1*-처리된 A375 P3 세포-유래 조건 배지를 이용하여 수행된 트랜스웰-기반 T 세포 화학 주성 기반의 이동능 분석 결과를 나타낸 도이다. 도 4g는 종양-특이적 CTL에 노출된 CFSE-라벨링된 종양세포와 CFSE+ 아포토틱 종양 세포 (활성-카스파제-3)의 빈도를 유세포 분석법으로 분석하여 나타낸 도이다.

도 4h는 A375 P3 세포로 이식된 NOD/SCID에 대한 치료 요법의 개략도이다. 도 4i-4m은 NY-ESO1 특이적 T 세포 양자적 전달 요법을 사용하거나 사용하지 않고 siGFP 또는 siTPT1-로딩된 키토산 나노 입자 (CNP)를 투여한 A375 P3 종양 보유 마우스를 나타낸 도이다. 도 2i는 CFSE+ 양자전달된 NY-ESO1 특이적 T 세포의 유세포 분석 프로파일을 나타낸 도이다. 도 2j는 표시된 시약으로 처리된 종양에서 활성-카스파제-3+ 아포토시스 세포의 백분율을 나타낸 도이다. 도 2k는 종양으로 이동한 NY-ESO1 특이적 T 세포와 비교한 종양에서의 세포 사멸 세포의 빈도를 나타낸 도이다. 도 2l은 표시된 시약으로 처리된 A375 P3 세포로 접종된 마우스의 종양 성장을 나타낸 도이다. 도 2m은 마우스의 생존을 나타낸 도이다. 생체 내 실험을 위해 각 그룹에서 10 마리의 마우스를 사용하였다. 도 2b, 2c, 2f, 2g, 2i-2k는 일원 분산 분석, 2l은 이원 분산 분석으로 p-값을 구하였고, 2m은 로그 순위 (Mantel-Cox) 테스트로 구하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 나타내었다.

도 5a 내지 5h는 TCTP 인산화가 Na, K ATPase와의 결합을 통해 EGFR/NANOG 신호 전달 경로를 활성화하는 데 중요함을 나타낸다. 도 5a는 EGFR, pEGFR, pAKT, AKT, MCL-1 및 CXCL10의 단백질 수준이 웨스턴 블롯 분석으로 측정되었음을 나타낸다. 도 5b는 siGFP 또는 siEGFR 처리 A375 TCTP 세포에서 pEGFR, EGFR, pAKT, AKT, MCL-1 및 CXCL10의 단백질 수준을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸다. 도 5c는 siGFP 또는 siEGFR 처리된 A375 TCTP 세포 CM을 하부 챔버에 첨가하고, CD8 + T 세포를 상부 챔버에 플레이팅 한 트랜스웰 시험 결과를 나타낸 도이다. 하부 챔버 배지로 이동 한 T 세포를 6 시간 후에 수집하여 계수 하였다. 도 5d는 CFSE- 표시된 종양 세포를 NY-ESO 1-특이적 CTL에 노출시키고 CFSE 세포 사멸 종양 세포의 빈도를 활성-카스파제-3의 유세포 분석에 의해 결정된 결과를 나타낸 도이다.

도 5e 내지 5h는 A375 세포를 FLAG-TCTP 야생형 (TCTP), FLAG-TCTP S46A 돌연변이 또는 FLAG-TCTP S46D 돌연변이로 형질 감염시킨 결과를 나타낸다. 도 2e는 웨스턴 블롯으로 분석한 EGFR의 활성화, AKT 신호 전달 및 MCL-1 및 CXCL10의 발현을 나타낸 도이다. 도 5f는 표시된 종양 세포 유래 CM을 사용하여 수행한 T 세포의 화학 주성 기반의 이동능 분석 결과를 나타낸 도이다. 도 5g는 CTL과 함께 배양한 후 유세포 분석법에 의해 분석된 활성-카스파제-3+ 세포 사멸 종양 세포를 나타낸 도이다. 도 5h는 anti-Na, K ATPase 항체로 면역 침전된 가교 결합된 용해물을 나타낸다. 면역 침전된 단백질은 웨스턴 블롯 분석에 의해 분석되었다. 블롯 이미지 아래의 숫자는 측정된 fold-change를 나타낸다. 오차 막대는 평균 $\pm$ SD를 나타낸다.

도 6a 내지 도 6f는 DHA에 의한 TCTP의 억제제는 TCTPhigh 종양 세포를 T 세포 매개 사멸에 민감하게하고 T 세포 이동을 증가시킨을 나타낸다. 도 6a는 CT26 No 및 TCTP 세포가 표시된 농도의 cisplatin, DHA, rapamycin, sertraline 및 thioridazine으로 24 시간 동안 처리된 결과와 IC₅₀을 나타낸다. 도 6b는 CT26 TCTP 세포를 지시된 제제로 처리하고 지시된 종양:T 세포 비율로 종양 특이 적 CTL과 함께 배양한 결과로, 활성-카스파제 3+ 세포 사멸성 종양 세포의 백분율을 나타낸다. 병용 스코어는 CTL이 있거나 없는 약물 처리된 종양 세포에서 아포토시스 백분율의 변화를 기반으로 계산되었다.

Combination score = (% of active-caspase 3+ tumor cells by drug and CTLs)/(% of active-caspase 3+ tumor cells by drug).

도 6d는 SiGFP- 또는 siTPT1 처리된 CT26 P3, MDA-MB231, 526Mel 및 HCT116 세포를 PBS 또는 DHA로 처리한 결과를 나타낸다. TCTP, pEGFR, EGFR, pAKT, AKT, MCL-1, CXCL10 및 beta-Actin의 수준은 웨스턴 블롯으로 분석되었다. 도 6e는 유세포 분석에 의해 결정된 CTL-매개 항-아포토시스 종양 세포의 백분율을 나타낸다. 도 6f는 PBS 또는 DHA 처리된 siGFP- 또는 siTPT1 처리된 종양 세포 CM을 사용하여 수행된 T 세포 화학 주성 기반의 이동성 분석 결과를 나타낸다. 블롯 이미지 아래의 숫자는 fold-change로 측정된 표현을 나타낸다. 오차 막대는 평균 $\pm$ SD를 나타낸다.

도 7a 내지 7c는 생체 내에서 CT26 P3에 DHA 약물을 처리하여 TCTP를 표적하고 PD-L1 항체 치료를 병용했을 시 치료 효율이 증가함을 확인한 결과이다. 또한 도 7d 내지 도 7f는 TCTP 표적 시 종양내 T 세포의 수 및 암세포의 세포사멸이 증가함을 확인한 결과이다.

도 7g 내지 도 7i는 생체 내에서 CT26 P3에 DHA 약물을 처리하여 TCTP를 표적하고 PD-L1 항체 치료를 병용했을 시 치료 효율이 증가함을 확인한 결과이다. 또한 도 7j 내지 도 7m은 TCTP 표적 시 종양내 T 세포의 수 및 암세포의 세포사멸이 증가함을 확인한 결과이다.

도 8a 내지 도 8c는 A375 P3 내성암에서 TCTP의 세포 외 분비 또한 증가되어 있으며 TCTP 중화 항체를 이용하여 표적 시 항암면역내성 표현형이 감소되고 AKT 신호기전 뿐 아니라, 기 보고한 면역내성 및 교차내성(Cisplatin 저항성), 다중약성(암전이, 암줄기능) 조절인자 NANOG의 발현이 감소됨을 확인한 결과이다. 이를 통해 세포 외로 분비된 TCTP가 내성암의 치료내성 및 다중약성 표현형에 중요한 기능을 하며, 항체를 통한 중화 시 역전될수 있음을 확인하였다.

도 9는 다양한 암종의 환자 샘플에서 TCTP의 발현과 기 보고한 면역내성 및 교차내성(Cisplatin 저항성), 다중약성(암전이, 암줄기능) 조절인자 NANOG의 발현이 유의적 상관관계가 있음을 확인한 결과이다.

도 10은 면역관문 항체치료-불응성 직립성 폐암 모델 TC-1 LP3에서 세포 내 TCTP 발현 및 세포 외 TCTP 분비가 현저히 증가됨을 확인한 결과이다.

도 11a 및 도 11b는 면역관문 항체치료-불응성 직립성 폐암 모델 TC-1 LP3에서 TCTP 중화 항체를 처리할 시 기 보고한 면역내성 및 교차내성(Cisplatin 저항성), 다중약성(암전이, 암줄기능)이 감소됨을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0104] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0106] 실시예

[0108] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0110] 실험방법

[0111] 마우스 및 세포주

[0112] 6-8 주령의 암컷 BALB/c 및 NOD/SCID 마우스는 중앙실험동물(Central Lab Animal, Inc., 한국 서울)에서 구입하였다. 모든 마우스는 고려대학교 동물 실험 및 사용위원회 (KUIACUC-2014-175)에서 승인한 프로토콜에 따라 취급 및 유지되었다. 모든 동물실험 절차는 실험실 동물의 적절한 사용 및 관리에 대한 권장 사항에 따라 수행되었다.

[0113] A375, CaSki, 526Mel, MDA-MB-231 및 HCT116 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 모든 세포주는 2010 년과 2014 년 사이에 구입했으며 Mycoplasma Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)를 사용하여 마이코 플라스마에 대해 테스트하였다. 세포주의 신원은 IDEXX Laboratories, Inc.의 STR (short tandem repeat) 프로파일링으로 확인되었으며 6개월 이내에 시험에 사

용되었다.

[0114] A375/TCTP 세포를 생성하기 위해 pMSCV-TCTP 플라스미드를 먼저 바이러스 패키징 플라스미드 (VSVG 및 Gag-pol)와 함께 HEK293FT 세포에 형질 감염시켰다. 3 일 후, 바이러스 상청액을 0.45 μ m 필터를 통해 여과하고 A375 세포에 도입하였다. 그런 다음, 감염된 세포를 1 μ g/ml 푸로마이신으로 선택하였다. A375/P3 종양 계통의 생성을 위해 1×10^6 A375 세포를 NOD/SCID 마우스에 피하로 접종하였다. 최초 종양의 공격 접종 후, 2×10^6 NY-ESO1-특이적 CD8+ T 세포와 3000U의 IL-2 (Novartis, Basel, Switzerland)를 정맥 내로 주입하였다. T 세포 양자적 이식 후, 외식된 종양(explanted tumor)은 시험관 내에서 확장되었다. 이 회피 변이 세포주(escape variant cell line)는 A375/P1으로 명명하였고 새로운 그룹의 마우스에 주입되고 양자적 T 세포 전달에 의해 다시 선택되었다. 이 처치 요법은 3 회 반복되었고, 그 결과 A375/P3를 제조하였다. 모든 세포는 5% CO₂ 가습 인큐베이터 챔버에서 37℃에서 성장하였다.

[0116] 화학 시약

[0117] 이 연구에서는 다음과 같은 화학 시약이 사용되었다: BI2536 및 시스플라틴 (Selleckchem, Houston, TX, USA). Dihydroartemisinin (DHA), sertraline hydrochloride, rapamycin (Sigma-Aldrich, USA) 및 thioridazine (Tocris, UK).

[0119] DNA 컨스트럭트.

[0120] TCTP 유전자의 DNA 단편은, *Bam*HI 사이트 및 *Xho*I 사이트에 대한 프라이머 (5'-GGATCCATGATTATCTACCGGGAC-3', 5'-CTCCAGTTAACATTTTCCATTCT-3')를 사용하여 A549 세포에서 추출한 게놈 DNA에서 PCR-기반 전략으로 생성되었다. PCR 산물의 *Bam*HI 및 *Xho*I 제한효소 단편(*Bam*HI and *Xho*I restriction fragments)은 pGEM-T 벡터 (Promega, USA)로 서브 클로닝되었다.

[0122] 사이트-지정 돌연변이 유발 (Site-directed mutagenesis).

[0123] TCTP 인산화 사이트에서 돌연변이를 생성하기 위해, QuikChange 사이트-지정 돌연변이 유발 키트 (Stratagene, San Diego, CA, USA)를 제조업체의 지침에 따라 사용했습니다. 구체적으로 다음 프라이머가 사용되었다(표 1).

표 1

연번	프라이머	서열 (5' to 3')	SEQ ID NO:
1	TCTP S46D forward	GGTAACATTGATGACGACCTCATTGGTGGAAATGCCTCCGC	1
2	TCTP S46D reverse	GCGGAGGCATTTCCACCAATGqAGGTCGTCATCAATGTTACC	2
3	TCTP S46A forward	CGAGGGCGAAGGTACCGAAGCAACAGTAATCACTGGTGTCTG	3
4	TCTP S46A reverse	CGACACCAGTGATTACTGTTGCTTCGGTACCTTCGCCCTCG	4

[0125] PCR 순환 조건은 5분 동안 95 ℃; 1 분간 95 ℃, 1 분간 64 ℃, 15 분간 68 ℃이었고, 이를 18 사이클 반복하였다. PCR 산물을 *Dpn*I으로 37 ℃에서 1 시간 동안 분해하여 XL10-Gold ultracompetent 세균 세포로 형질 전환시켰다. DNA 시퀀싱을 통해 돌연변이가 확인되었다.

[0127] 실시간 정량적 RT-PCR.

[0128] 세포로부터의 총 RNA는 제조사에 의해 권장되는 프로토콜에 따라, RNeasy Micro 키트 (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 정제하였고 cDNA는 iScript cDNA 합성 키트 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 역전사 효소 (reverse transcriptase)에 의해 합성되었다. CFX96 실시간 PCR 검출 시스템에서 특정 프라이머와 함께 iQ SYBR Green Super mix (Bio-Rad)를 사용하여 Real-time PCR을 수행하였다. 모든 실험은 3회 반복하여로 수행되었으며 정량화 주기 (quantification cycle, Cq) 값은 Bio-Rad CFX 96 Manager 3.0 소프트웨어를 사용하여 측정되었다.

[0129] 미리 디자인 된 QPCR 프라이머는 Bioneer (한국)에서 구입하였다.

표 2

연번	프라이머	서열 (5' to 3')	SEQ ID NO:
1	TPT1 forward	ATGACGAGCTGTTCTCCGAC	5
2	TPT1 reverse	AACACCGGTGACTACTGTGC	6

[0131] mRNA 수준의 상대적 정량화는 참조 유전자로 beta-actin과 비교 Ct 방법을 사용하여 수행되었다. Fold-change는 대조군 세포에서 mRNA의 발현 수준과 비교하여 계산되었다.

[0133] siRNA 컨스트럭트.

[0134] 합성 siRNA 인 *siGFP*, *siTPT1*, 및 *siEGFR*는 Bioneer (South Korea)에서 구입하였고, 다음과 같은 서열을 포함하였다.

표 3

연번	siRNA 명칭	서열 (5' to 3')	SEQ ID NO:
1	GFP sense	GCAUCAAGGUGAACUCAA	7
2	GFP antisense	UUGAAGUUCACCUUGAUGC	8
3	mouse TPT1 #1 sense	GAAAUACUCAAGGCAAA	9
4	mouse TPT1 #1 antisense	UUUGCCUUUGAGUGAUUUC	10
5	mouse TPT1 #2 sense	CUGUUCUCCGACAUCUACA	11
6	mouse TPT1 #2 antisense	UGUAGAUGUCGAGAACAG	12
7	mouse TPT1 #3 sense	AGCACAUCCUUGCUAUUUTT	13
8	mouse TPT1 #3 antisense	AAAUUAGCAAGGAUGUCUTA	14
9	human TPT1 sense	GCAUGGUUGCUCUAUUGGA	15
10	human TPT1 antisense	UCCAAUAGAGCAACCAUGC	16
11	human EGFR sense	AGGAAUUAAGAGAAGCAACAU	17
12	human EGFR reverse	AUGUUGCUUCUCUAAAUCCU	18
13	mouse MCL-1 sense	GGGCGGAUUGUGACUUAUUUCU	19
14	mouse MCL-1 antisense	AGAAAUAAAGAGUCACAAUCCGCC	20

[0136] siRNA는 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 시험관 내에서 200 pmol/well의 용량으로 6-웰 플레이트에 전달되었다. siRNA는 키토산 나노 입자로 제형화 한 후 마우스로 전달되었다. 간단히, siRNA (1 µg/µl)와 tripolyphosphate (0.25 % w/v)를 RGD-chitosan 용액에 혼합하고 혼합물을 4 °C에서 40 분 동안 인큐베이션하였다. siRNA가 로딩된 나노 입자는 원심 분리에 의해 정제되고 종양을 가진 마우스의 미정 맥에 주입되었다.

[0138] 그랜자임 B 아포토시스 분석(Granzyme B apoptosis assays).

[0139] Granzyme B (Enzo Life Sciences, NY, USA)는 BioPORTER QuikEasy Protein Delivery Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 의해 세포로 전달되었다. 종양 세포 (5x10⁴)를 12-웰 플레이트에 플레이트팅하고 37 °C에서 밤새 배양하였다. 세포를 세척하고 200 ng의 그랜자임 B가 있는 BioPORTER 포함 Opti-MEM을 각 웰에 첨가하였다. 4 시간 동안 배양한 후, 항-활성 카스파제-3 항체로 염색하고 세포 사멸 세포의 빈도를 결정하고 유세포 분석으로 분석하였다.

[0141] 인 비트로 CTL 분석(In vitro CTL assays).

[0142] 종양 세포를 트립신 처리하여 수확하고 0.1 % FBS를 포함하는 DMEM 혹은 RPMI(Thermo Fisher, USA)으로 1회 세척하고, 재현탁한 다음, 10 µM CFSE 포함 0.1% DMEM에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 10 분 동안 라벨링 하였다. 그

후 CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)로 표지된 (MCF-7, HCT116, CaSki, MDA-MB-231) 종양 세포를 10 μ M MART-1 펩타이드를 포함하는 DMEM 1 ml에 재현탁 시켰다. A375 및 526Me1의 경우 펩타이드-펄스 공정이 필요하지 않았다. 1 시간 동안 펩타이드-펄싱한 후, 세포를 1:1의 E/T 비율로 MART-1- 또는 NY-ESO1- 특이적 CD8+ T 세포주와 함께 4 시간 동안 배양하였다. 항-활성 카스파제-3 항체로 염색하고 유세포 분석을 수행하여 세포 사멸 세포의 빈도를 분석하였다. 모든 분석은 Becton Dickinson FACSverse (BD Bioscience, USA)를 사용하여 수행되었다. 항-활성 카스파제-3 항체로 염색하고 유세포 분석을 수행하여 세포 사멸 세포의 빈도를 분석하였다. 모든 분석은 Becton Dickinson FACSverse (BD Bioscience, USA)를 사용하여 수행되었다.

[0144] 인 비트로 트랜스웰-기반 T 세포 화학주성 분석(In vitro Transwell-based T cell chemotaxis assays).

[0145] T 세포는 3.0 μ m 24-웰 세포 배양 인서트의 상부 웰 (upper well) (Corning Lowell, MA, USA)에 1×10^5 세포/웰로 적용되었다. 웰을 종양 세포-유래 조건 매지(tumor cell-derived conditioned media, CM)로 채웠다. 37 °C에서 4 시간 동안 배양한 후, 이동된 T 세포를 하부 웰 (bottom well)에서 수집하고 유세포 분석으로 계수하였다.

[0147] 세포 생존력 분석(Cell viability assays).

[0148] CT26 종양 세포를 표지된 농도의 cisplatin, dihydroartemisinin, rapamycin, sertraline, 및 thioridazine으로 24시간 동안 각각 처리하였다. 세포 생존력은 트립판 블루 배제 분석에 의해 측정되었고, 세포 생존력을 50 % 감소시키는 농도 (IC₅₀ 값)가 결정되었다.

[0150] 시그니처용으로 사용된 유전자 세트(Gene set used for signatures)

[0151] KEGG 경로는 종종 느슨하게 연관된 기능만을 가진 많은 수의 유전자를 포함하기 때문에, 본 발명자들은 두 가지 핵심적인 정제된 유전자 세트를 제작하였다. 구체적으로:

[0152] - CD8+ T-효과기 시그니처 유전자

[0153] - 항-아포토시스 시그니처 유전자, 본 발명자들은 아포토시스 과정의 음성적 조절 범위 내에서 사용하였음.

[0155] 시그니처용으로 사용된 유전자 세트(Gene set used for signatures)

[0156] 유전자 분석을 위하여, 시그니처 내에서 각 유전자의 발현은 1차 z-스코어-변형되었다. 그 후 T 세포 시그니처 유전자 (CD8A, CD8B, CXCL10, CXCL9, GZMA, GZMB, IFNG, PRF1, TBX21), 항세포사멸 시그니처 유전자 (IL1RAP, IRAK2, IRAK3, PPP3CA, PRKAR2B, CHP1, CHP2, TNFRSF10B, IKBKG, CFLAR, PIK3R1, FAS, XIAP, CYCS, BCL2)의 발현 값에 대한 주성분분석(principal component analysis)을 수행하였고, PC1(principal component 1)값을 시그니처 스코어 값으로 추출하였다.

[0158] 인 비보 종양 치료 시험 (In vivo tumor treatment experiments)

[0159] TCTP에 의해 부여되는 항-PD-L1에 대한 인 비보 내성의 특성을 확인하고자, BALB/C 마우스에 피하로 마우스 1두당 1×10^5 cells의 CT26 종양세포를 접종하였다. 종양세포의 공격접종을 하고 7일 후, 실험 프로토콜에 따라 siGFP (siGFP-loaded chitosan nanoparticles) 또는 siTPT1이 로딩된 키토산 나노입자 (siTPT1-loaded chitosan nanoparticles) (5 μ g/animal)를 항-PD-L1 (BioXcell, NH, USA) (200 ug/mice) 항체를 IV로 투여하거나, 또는 이소타입 항체 대조군을 복강 내 투여하였다.

[0160] 또한, TCTP에 의해 부여되는 CTL 세포살해에 대한 인 비보 내성의 특성을 확인하고자, NOD/SCID에 피하로 마우스 1두당 1×10^6 cells의 A375 종양세포를 접종하였다. 종양세포의 공격접종을 하고 7일 후, 실험 프로토콜에 따라 siGFP (siGFP-loaded chitosan nanoparticles) 또는 siTPT1이 로딩된 키토산 나노입자 (siTPT1-loaded chitosan nanoparticles) (5 μ g/animal)를 NY-ESO1-특이적 CTL을 투여하기 전에 IV로 투여하였다. 이 치료 프

로토콜은 3주기 반복되었다. 마우스들은 종양세포 접종 후 22일과 60일에 각각 종양 부담(tumor burden) 및 생존여부가 모니터링 되었다.

통계.

제시된 모든 데이터는 적어도 3회의 별도 반복 실험의 대표값이다. Comparisons between individual experimental data points were made using the 2-tailed Student's *t* test. All *p*-values of < 0.05 were considered statistically significant.

실시예 1: TCTP와 항-PD-L1 치료 요법에 대한 낮은 반응성과의 연관성

ICB (immune checkpoint blocker) 요법에 대한 반응 결과에서 TCTP의 임상적 관련성을 확인하기 위해, 본 발명자들은 항-PD-L1 요법에 대하여 반응자 (R, responders) 또는 비-반응자 (NR, non-responders)로 분류된 전이성 요도상피암 (metastatic urothelial cancer, mUC) 환자에서 분류된 전사체 데이터를 사용하였다. 두 환자 그룹에서 차별적으로 발현된 유전자 (differentially expressed genes, DEG)의 비교 전사체 분석에서, 본 발명자들은 TPT1 (TCTP 인코딩)의 발현 수준이 반응성을 나타낸 R에 비해 불응성을 나타낸 NR에서 유의하게 더 높음을 발견하였다 (도 1a).

또한, 종양 내에서 TPT1 발현이 높은 환자(TPT1^{high})들은 TPT1의 발현이 낮은 환자(TPT1^{low})들과 비교하여 예후가 나빴다 ($p < 0.02$) (도 1b). 이는 TPT1이 항-PD-L1 치료요법에 대한 낮은 반응성 (poor response)과 환자의 생존율 결과가 관련이 있음을 가리켰다.

본 발명자들은 다음으로 TCTP가 항-PD-L1 치료요법에 대한 불응성에 책임이 있는지에 대해 확인하고자 하였다. ICB 치료요법의 임상적 효능에 복수 개의 유전자 시그니처가 연관되어 있다는 점이 보고된 바 있다. 이와 관련하여 ICB 치료요법에 대한 반응 결과는 CD8+ T 세포 시그니처 유전자의 발현을 통하여 가장 강력하게 측정될 수 있는 침윤된 CD8+ T 세포의 기능성을 평가함으로써 예측이 가능하다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 TPT1 발현은 환자에서 CD8+ T 세포의 침윤성 지표(CD8+ T effector cell score)과 역상관관계가 있음을 발견하였다 (도 1c).

즉, TPT1 유전자의 발현이 높을수록 환자의 생존율과 종양 내 T 세포 수의 지표가 감소되었다.

암 면역 치료요법의 성공에 있어 주요한 장애물 중 하나는 CTL-매개 아포토시스에 대한 종양 세포의 내인성 내성 (intrinsic resistance)이다. 상기 CTL-매개 아포토시스에 대한 종양 세포의 내인성 내성 (intrinsic resistance)은 항-아포토시스 경로를 담당하는 유전자 시그니처 (항-세포사멸 유전자 지표)를 특징으로 한다. 도 1d에 나타난 바와 같이, 실제로 항-세포사멸 유전자 지표 (anti-apoptosis score)는 항-PD-L1 요법에 대해, 반응성 환자 그룹 R에 비해 불응성 환자 그룹 NR에서 더 높았으며 TPT1 발현과 양의 상관 관계가 있었다 (도 1d).

종합하면, 이러한 결과는 TPT1 mRNA 발현이, 비-T 세포 염증 종양 (non-T cell inflamed tumors) 및 CTL-매개 세포살해에 대한 내성 (resistance to CTL-mediated killing)과 같은, 면역-불응성 표현형 (immune-refractory phenotypes)과 매우 관련이 높음을 강력하게 나타낸다. 상기 결과로부터 TPT1은 항 PD-L1 요법에 대한 반응과 임상 결과를 예측하는 데 바이오 마커가 될 수 있음을 알 수 있었다.

실시예 2: 항-PD-L1 요법에 대한 면역-불응성 유도에 있어서 TCTP의 필요성과

TCTP 유전자 발현억제를 통한 면역-불응성의 반전

본 발명자들은 ICB 치료에 대한 종양의 불응성 표현형을 담당하는 메커니즘을 탐구하기 위해, ICB에 민감한 모 세포주인 CT26 P0로부터 생성된 ICB 불응성 CT26 P3 종양 모델을 개발하였다. CT26 P3 종양 모델은 항-PD-L1 요법에 의한 *in vivo* 선택을 3회 수행함으로써 새롭게 개발되었다 (도 2a).

항-PD-L1 항체 치료는 CT26 P0 종양 보유 마우스에서 종양 성장을 성공적으로 지연시키고 마우스 생존을 연장시켰지만, CT26 P3 종양 보유 마우스에서는 현저한 치료 효과를 나타내지 않았다 (도 2a, A-B). 전체 CD8+ T 세포의 감소된 수준, T reg에 대한 CD8+ T 세포의 비율 및 그랜자임 B를 만드는 종양 반응성 CD8+ T 세포의 감소에 의해 입증된 바와 같이, CT26 P0 종양에 비해 P3 종양은 비-T 세포 염증 면역 표현형 (non-T cell inflamed

immune phenotypes) 및 anti-apoptotic 표현형을 나타냈다(도 2a, C-F).

- [0177] 특히, 항-PD-L1 요법은 CT26 P0 종양에서 T 세포 염증 면역 표현형(T cell-inflamed immune phenotypes) 및 아포토틱 세포 사멸(apoptotic cell death)을 유의하게 유도하였다. 그러나 CT26 P3 종양에서는 불응성이 나타났으며, 이러한 불응성 표현형은 PD-L1 차단(anti-PD-L1)에 의해서도 사라지지 않았다. 따라서, 이러한 데이터는 환자에서 나타난 항-PD-L1 요법에 대한 불응성이 본 발명자들이 제작한 ICB-불응성 종양 모델(ICB-refractory tumor model)에서도 유사하게 나타남을 의미한다.
- [0178] ICB-불응성 특성에서 TCTP의 역할을 확인하기 위해, 본 발명자들은 항-PD-L1 요법에 의한 *in vivo* 선택을 3회 수행함으로써 CT26 P3 종양 모델을 제작하였고, 항-PD-L1 요법 (P0부터 P3까지) 또는 IgG 처리된 (N1부터 N3까지) 모델에서 TCTP mRNA 및 단백질의 발현 수준을 측정하였고, P0에서 P3까지 항-PD-L1 요법의 처리에 의해 TCTP 수준이 단계적 증가됨을 발견하였다(도 2b).
- [0179] 본 발명자들은 종양 세포가 T 세포 트래피킹(T cell trafficking)을 조절할 수 있다는 점을 기초로 하여, 시험관 내 트랜스 웰-기반 화학 주성 이동능 분석(*in vitro* Transwell-based chemotaxis assay)을 수행했으며, 그 결과 CT26 P3 세포가 CT26 P0 세포에 비해 T 세포를 모집하는 능력이 훨씬 낮다는 것을 발견하였다. 또한, CT26 P0 또는 P3 세포에서 유래한 컨디셔닝 된 배지 (conditioned media, CM)를 사용하여 T 세포 화학 주성(T cell chemotaxis) 기반의 이동능을 테스트했으며, CT26 P3 유래 CM이 CT26 P0 유래 CM에 비해 T 세포 이동능 유도 정도가 현저하게 낮은 것을 관찰하였다(도 2d). 이러한 결과는 ICB-불응성 CT26 P3 세포가 T 세포 화학 주성을 담당하는 가용성 인자의 생성을 감소시킴으로써 T 세포 침윤을 억제할 수 있음을 시사한다.
- [0180] 본 발명자들은 또한 TCTP 유전자와 CT26 P3 종양 세포의 ICB-불응성 표현형과의 직접적인 연관성을 확인하고자 siRNA (siTPT1 #1, #2, #3)를 사용하여 CT26 P3 세포에서 TPT1을 침묵(silencing)시켰다 (도 2c).
- [0181] 특히, siGFP-형질 감염된 CT26 P3 세포에 비해 siTPT1-형질 감염된 CT26 P3 세포로부터 유래된 CM과 함께 배양될 때 T 세포 이동이 증가함을 확인하였다 (도 2d).
- [0182] TPT1 녹다운은 또한 AH-1-특이적 CTL에 의해 유도된 아포토시스에 대한 CT26 P3 세포의 민감도를 증가시켰다 (도 2e).
- [0183] 상기 시험관 내 관찰을 기반으로, 본 발명자들은 TPT1의 생체 내 침묵(*in vivo* silencing of TPT1)이 항-PD-L1 요법에 대한 CT26 P3 종양의 불응성 표현형을 반전시킬 수 있다고 추론하였다. 이를 테스트하기 위해, 본 발명자들은 종양에 siRNA를 생체 내 전달하기 위해 siTPT1 또는 siGFP를 운반하는 키토산 나노 입자 (Chitosan nanoparticle, CNP)의 정맥내 투여와 함께 항-PD-L1 요법으로 CT26 P3 보유 마우스를 처리하였다 (도 2f).
- [0184] 그 결과 항 PD-L1 요법만으로는 종양 성장에 영향을 미치지 않았지만, 항 PD-L1 항체 및 siTPT1이 로딩 된 CNP를 사용한 조합 요법은, 종양 성장을 크게 지연시키고 (도 2g), 마우스의 생존을 연장하였다 (도 2h).
- [0185] 특히, 종양에 침윤하는 기능성 CD8+ T 세포의 수와 아포토틱 종양 세포(세포자멸사 된 종양세포, apoptotic cells)의 비율이, 항 PD-L1 항체 또는 siTPT1이 로딩 된 CNP 각각의 단독 치료에 비해, 항 PD-L1 항체 및 siTPT1이 로딩 된 CNP 두 가지를 병용한 치료요법에서 유의하게 증가했음을 발견하였다 (도 2i - 도 2l). 상기 결과로부터, 본 발명자들은 TCTP를 표적화하면 면역-불응성 종양 표현형을 역전시켜 항-PD-L1의 치료 효능을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.
- [0187] **실시예 3: TCTP의 이소성 발현의 면역-불응성 표현형 촉진 및 항-PD-L1 요법에 대한 내성의 기여**
- [0188] ICB 불응성 종양에서 TCTP의 중요한 역할을 감안할 때, 본 발명자들은 TCTP 발현만으로 면역 불응성 표현형을 촉진할 수 있는지 여부를 조사하였다. CT26 P0 세포에서 TPT1의 과발현은 T 세포 이동능을 감소시키고 CTL-매개 아포토시스에 대한 저항성을 증가시켰다 (도 3a, 3b, 및 3d).
- [0189] TCTP-매개 T 세포 이동능 억제에서 핵심 분자를 밝히고자, 본 발명자들은 케모카인이 T 세포 수송(T cell trafficking)에서 필수적인 역할을 한다는 점에 주목하였다. 특히, CXCL10의 수준은 TPT1 과발현에 의해 크게 감소되었고(도 3a), TCTP-이소적 발현 CT26 P0 세포(도 3b)와 CT26 TCTP 세포에서 CXCL10 발현 회복(도 3c)은 T 세포 화학주성을 반전시켰으며, 이는 TCTP에 의해 매개되는 특징에 있어서 CXCL10의 역할이 중요함을 가리킨다.
- [0190] CTL에 대한 TCTP-매개 항-아포토시스 반응(도 3d)에 대해, 본 발명자들은 CT26 TCTP 세포에서 CT26-No 세포와

비교하여, 항-아포토시스 단백질 MCL-1이 증가됨에 주목하였다(도 3a). 여기에서 MCL-1의 녹다운은 CT26 TCTP 세포의 CTL-매개 아포토시스에 대한 감수성을 회복시켰다(도 3d 및 3e).

[0191] 따라서 본 발명자들은 CXCL10과 MCL-1이 TCTP 유도 면역 불응성 표현형의 핵심적인 매개체라고 결론지었다. 시험관 내 결과와 일관적으로, TCTP 과발현은 생체 내 항-PD-L1 요법에 대해 불량한 반응을 부여하였다(도 3f-3h). 이것은 종양 세포 집단의 아포토틱 세포 사멸(도 3l) 뿐만 아니라, 종양에 침윤된 CD8+ T 세포의 수, T regs에 대한 CD8+ T 세포의 비율 및 종양-반응성 CD8+ T 세포의 감소를 동반하였다(도 3i - 3k).

[0192] 이러한 결과를 감안할 때, 본 발명자들은 TCTP 자체가 비-T 세포에 염증이 있는 면역 표현형(non-T cell inflamed immune-phenotype)과 CTL 세포 살해에 대한 종양 세포의 내성을 촉진하기에 충분하여, 항-PD-L1 요법 내성에 기여한다는 결론을 내렸다.

[0194] 실시예 4: CTL 매개 면역 선택에 의한 TCTP⁺ 면역-불응성 암 세포의 풍부화

[0195] 종양 항원-특이적 CTL이 항-PD-L1 요법의 핵심적인 효과기 세포(effector cell)이기 때문에, 본 발명자들은 항-PD-L1 요법에서 증가된 TCTP 발현이 CTL에 의해 부과된 면역 선택의 결과라고 추론하였다. 이 가능성을 테스트 하기 위해, 본 발명자들은 양자적 CD8+ T 세포 전달 요법(adoptive cell transfer, ACT)의 임상 적용을 위한 가장 전형적인 암인 A375 인간 흑색종 세포를 선택하고, *in vivo* 에서 NY-ESO1-특이적 CD8⁺ T cells의 선별에 의해 모 A375 P0 세포로부터 NY-ESO1-특이적 CD8⁺ T 세포 치료에 대해 내성을 가진 A375(NY-ESO1 종양항원 발현) P3 모델을 확립하였다(도 4a).

[0196] NY-ESO1-특이적 CTL의 양자적 수송(adoptive transfer)은 A375 P0 종양 보유 NOD/SCID 마우스에서 종양 성장을 상당히 지연시키고 마우스 생존을 연장시켰지만, A375 P3 종양 보유 마우스에서는 현저한 치료 효과가 없었다. ICB 불응성 종양 모델과 관련하여 A375 P3 세포는 T 세포 이동을 유도하는 능력이 낮았고, CTL-매개 세포 살해에 대한 내성을 포함하는 면역 불응성의 특성을 가졌다. 실제로, TCTP mRNA 및 단백질의 수준은 CTL 매개 면역 선택에 의해(도 4b) 증가하였다.

[0197] CTL-매개 면역 선택은 ACT 동안 TCTP⁺ 세포의 풍부화(enrichment)로 인해 발생했을 가능성이 있으며, 이는 TCTP⁺ 세포의 비율이 A375 P0 세포에서 약 8.9 %에서 A375 P3 세포에서 약 94.9 %로 증가한 것에 의해 입증된다(도 4c).

[0198] MCL-1 및 CXCL10 단백질 수준의 변화는 P0 세포와 비교하여 A375 P3 세포에서도 관찰되었다(도 4d).

[0199] 특히, A375 P3 세포에서 TCTP 녹다운(siTPT1)은 T 세포 이동을 증가시키고 종양 세포의 CTL-매개 세포사멸을 감소시켰으며, 이는 CXCL10의 증가 및 MCL-1의 감소와 동반되었다(도 4e - 4g).

[0200] 본 발명자들은 TCTP 억제제 치료적 가치를 입증하기 위하여, A375 P3 세포를 NOD/SCID 마우스에 접종하고 siTPT1-CNP 또는 siGFP-CNP를 정맥으로 투여하였다(도 4h). 침윤된 기능성 T 세포 및 아포토틱 종양 세포는 siGFP 처리된 A375 P3 종양에 비해 siTPT1 처리된 A375 P3 종양에서 증가 하였다(도 4i 및 4j).

[0201] 도 4k에 나타난 바와 같이, 양자적 T 세포 전달 효능에 상대적으로, siGFP 처리 마우스와 비교하여 siTPT1 처리 마우스의 종양에서 아포토틱 세포의 백분율이 증가하였다. 이는 종양으로 유도된 CTL-트래피킹 및 증가된 CTL-매개 아포토틱 종양 세포 모두에 의해, TCTP 표적화 및 ACT의 조합 치료 효과가 영향을 받았음을 나타낸다. 일관적으로, siTPT1-CNP 및 ACT의 조합 요법은 종양 성장을 크게 지연시켰고(도 4l) 마우스의 생존을 연장하였다(도 4m).

[0202] 종합하면, 상기 데이터는 CTL-매개 면역 선택 하에서 TCTP⁺ 면역-불응성 종양 세포의 풍부화가 ACT 치료에 불응하는 종양 표현형을 유발할 수 있음을 나타낸다. 따라서 TCTP를 표적으로 하는 치료 전략은 면역-불응성 표현형을 역전시킬 수 있으며, 이에 따라 ACT 및 ICB 요법의 효능을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0204] 실시예 5: Na, K ATPase와의 인-의존적 결합에 의한, TCTP의 EGFR-AKT 신호 전달 활성화 및 종양 세포의 면역 불응성 촉진

[0205] 다음으로 본 발명자들은 TCTP가 면역 불응성 표현형을 일으키는 신호 경로를 밝히고자 노력하였다. 본 발명자들

은 EGFR-AKT 경로의 과활성화가 종양 세포의 면역 회피와 밀접하게 관련되어 있음을 발견하였다. 또한, TCTP가 Na, K ATPase $\alpha 1$ 서브 유닛에 대한 결합을 통해 EGFR 신호 전달 경로를 활성화한다는 것을 밝혔다. 특히, TCTP 과발현은 EGFR과 AKT의 인산화를 증가시켰고, T 세포의 이동능 및 CTL 감수성을 감소시켰다. 이들은 CXCL10 하향 조절 및 MCL-1 상향 조절과 함께 동반되었다(도 5a).

[0206] 반대로, A375 TCTP 세포에서 EGFR의 녹다운(siEGFR)은 인산화 된 AKT 및 MCL-1의 수준을 강력하게 감소시켰지만, CXCL10 수준을 증가시켜 (도 5b), TCTP에 의한 EGFR-AKT-MCL-1/CXCL10 축의 활성화를 입증하였다. 즉, TCTP의 과발현은 EGFR, AKT, 및 MCL-1의 활성화를 촉진하고, CXCL10의 활성화를 저해하였다.

[0207] 일관적으로, EGFR의 손실은 A375 TCTP 세포에서 T 세포의 이동능과 CTL에 대한 감수성을 현저하게 증가시켰다 (도 5c 및 5d).

[0208] 상기 결과로부터, 본 발명자들은 TCTP에 의한 EGFR 신호 전달의 과활성화가 면역 불응성 표현형을 주도한다는 결론을 내렸다.

[0209] 본 발명자들은 phospho-loss 돌연변이 TCTP (phospho-loss mutant TCTP, TCTP S46A)와 phospho-mimic 돌연변이 TCTP (phospho-mimic mutant TCTP, TCTP S46D)를 포함하는 두 가지 돌연변이 형태의 TCTP를 사용함으로써 TCTP의 인산화가 면역-불응성 및 EGFR-AKT 신호전달에 중요함을 추가적으로 확인하였다.

[0210] TCTP WT (wild type)와 유사하게, A375 P0 세포의 TCTP S46D 형질 감염은 EGFR-AKT 신호 전달 경로의 활성화를 유도하고 종양 세포의 면역 불응성 특성을 촉진하였다 (도 5e-5g).

[0211] 대조적으로, TCTP S46A는 TCTP WT의 생화학적 및 기능적 특성을 반영하지 못하였고, TCTP에 의해 매개되는 이러한 특성에서 인산화의 중요성을 입증하였다 (도 5e-5g).

[0212] 또한, Na, K ATPase $\alpha 1$ 서브 유닛에 대한 TCTP의 결합은 EGFR 신호 전달 경로의 활성화에 기여함을 확인하였다. TCTP WT 또는 S46D는 Na, K ATPase $\alpha 1$ 과 공-침전된 반면 TCTP S46A는 그렇지 않았으며 (도 5h), 이는 TCTP와 Na, K ATPase $\alpha 1$ 간의 인산화 의존적 상호 작용을 나타낸다.

[0213] 따라서, 상기 결과로부터 Na, K ATPase에 대한 TCTP의 인-의존적 결합이 EGFR-AKT 신호 전달의 활성화로 이어짐을 확인하였고, TCTP 인산화를 차단하는 것이 T 세포-매개 요법과의 추가 조합 전략이 될 수 있음을 알 수 있었다.

[0215] **실시예 6: TCTP 표적 약물의 i) TCTP 억제 효과 및 ii) TCTP^{high} 암 세포의 T 세포-매개 세포 살해에 대한 감작 및 iii) 종양 세포의 T 세포 주화 능력의 증가 효과**

[0216] TCTP를 표적으로 하는 것이 면역 요법 불응성을 극복하기 위한 잠재적인 치료 전략이 될 수 있다는 것을 탐구한 결과, 본 발명자들은 TCTP를 표적으로 삼아 TCTP^{high} 종양 세포의 면역 불응성 표현형을 역전시킬 수 있는 임상적으로 실행 가능한 약물을 스크리닝하는 것을 목표로 하였다. dihydroartemisinin (DHA), rapamycin, sertraline 및 thioridazine과 같은약물이 TCTP 기능에 대한 억제 효과가 있다고 제안되었다. 실제로, CT26 TCTP 세포는 이전에 보고된 바와 같이 시스플라틴에 불응성이 있었지만, 이 세포는 TCTP 표적화제, 특히 말라리아 치료에 임상적으로 이용 가능한 약물인 DHA에 더 민감하였다 (CT26 No IC₅₀ = 407.6 μ M, CT26 TCTP IC₅₀ = 22.67 μ M, 약 20 배) (도 6a).

[0217] CTL 매개 세포살해에 대한 TCTP^{high} 종양 세포를 감작하는 각 약물의 효과를 추가로 조사하기 위해, 각 약물의 준 치사 용량으로 처리한 후 CT26 TCTP 종양 세포를 다양한 종양 세포 -T 세포 비율로 CTL과 함께 배양하였다. PBS 또는 시스플라틴에 비해 TCTP-표적 약물(DHA, rapamycin, sertraline 및 thioridazine)은 시너지 방식으로 CTL-매개 세포 독성을 증가시켰다 (도 6b).

[0218] CTL과 각 약물 치료의 시너지 효과를 정량화하기 위하여, CTL이 있거나 없는 경우의 약물 처리된 종양 세포에서 아포토시스의 비율의 변화를 기반으로 병용 스코어(combination score)를 계산하였다(하기 식 1 참조).

[0219] 식 1

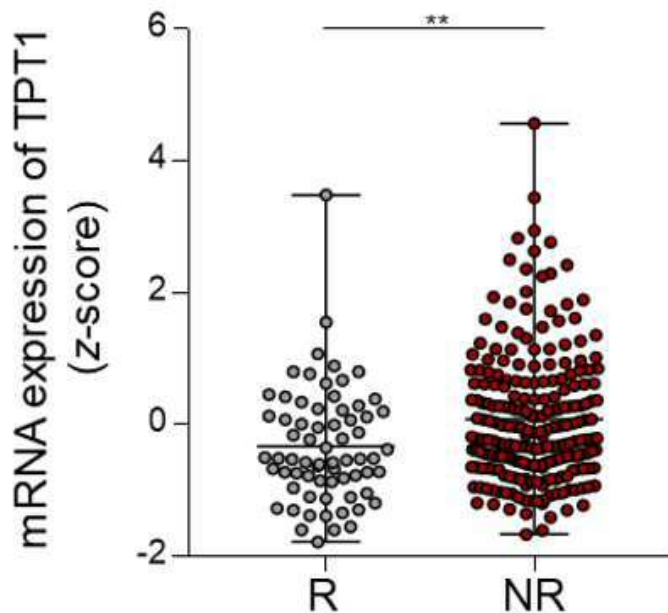
[0220] 병용스코어=(각 약물 및 T 세포에 의한 종양세포의 아포토시스 %)/(약물에 의한 종양세포의 아포토시스 %).

- [0221] 이 분석에서 본 발명자들은 DHA와의 병용 스코어가 모든 비율에서 다른 약물보다 높음을 발견하였다 (도 6c).
- [0222] 상기 결과로부터, 본 발명자들은 DHA (dihydroartemisinin)를 TCTP^{high} 종양 세포의 면역 불응성 표현형을 역전시키는 약물로 선택하여, 추가 실험을 수행하였다.
- [0223] 여러 유형의 TCTP^{high} 종양 세포에서 DHA의 표현형 효과를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 이전에 확립된 ACT-불응성 MDA-MB-231 P3 세포와 높은 수준으로 TCTP를 발현하는 인간 암 세포 526Me1 및 HCT116을 추가로 사용하였다. 일관되게 TCTP의 녹다운은 모든 테스트 된 세포(CT26 P3, MDA-MB231 P3, 526Me1, 및 HCT116)에서 EGFR-AKT-MCL-1/CXCL10 경로를 강력하게 감쇠시킴이 확인되었다 (도 6d). 특히, DHA 처리는 siTPT1 처리와 비교하여 이러한 분자들의 수준에 동일한 효과를 나타내었다 (도 6d). 더 중요한 것은, siTPT1- 및 DHA 처리 된 종양 세포 모두 CTL-매개 아폽토시스에 더 민감하였으며, 각각 siGFP 또는 PBS 처리 된 대조군 세포에 비해 증가된 T 세포 이동능 능력을 나타내었다는 것이다 (도 6e 및 6f).
- [0224] 이러한 결과로부터, 본 발명자들은 상술한 TCTP 축의 생화학적 및 기능적 특성이 여러 유형의 암 세포에서 보존되며, DHA를 포함하는 TCTP 신호 전달 저해제를 사용하여 TCTP 신호 전달을 방해하는 것이 면역 불응성 TCTP^{high} 암 세포를 제어하는 데 효과적인 전략임을 알 수 있었다.
- [0226] **실시예 7: 전임상 모델에서 DHA를 이용한, TCTP 표적화의 i) ACT 요법 및 ii) 항-PD-L1 요법에 대한 내성의 역전 (Targeting TCTP by using DHA reverses resistance to ACT therapy and anti-PD-L1 therapy in a preclinical model)**
- [0227] 상기 *in vitro* 관찰 결과를 고려하여, 본 발명자들은 DHA의 *in vivo* 투여가 T 세포 매개 요법에 대한 TCTP^{high} 종양 세포의 내성을 역전시킬 것이라고 추론하였다.
- [0228] 이 가능성을 테스트하기 위해, ACT-불응성 A375 P3 종양-보유 NOD/SCID 마우스를 DHA가 있을 때와 없을 때 동족 NY-ESO1 특이적 CTL(cognate NY-ESO1-specific CTLs)로 처리하였다 (도 7a). CTL만으로는 종양 성장에 영향을 미치지 않았지만, CTL 및 DHA를 사용한 이중 요법(dual therapy)은 종양 성장을 지연시켰으며 (도 7b), 다른 그룹에 비해 마우스의 생존 기간을 연장시켰다 (도 7c).
- [0229] 종양에서 NY-ESO1-특이 적 CTL의 비율은 PBS-처리 된 마우스에 비해 DHA-처리 된 마우스의 종양에서 증가했으며 (도 7d), 이들 CTL의 전반적인 세포 독성 효과는 PBS 대조군에 비해 DHA 처리 후에 더 크게 나타났으며, 이는 종양 집단에서 세포 사멸 세포(apoptotic cells)의 백분율로 표시되었다 (도 7e 및 7f).
- [0230] 다음으로 본 발명자들은 ICB 치료에서 DHA의 전임상 치료적 가치를 확대하였다. 이를 위해 ICB 불응성 CT26 P3 종양 보유 마우스에게 항-PD-L1 항체를 단독으로 투여하거나 DHA와 조합하여 투여하였다 (도 7g).
- [0231] 항-PD-L1 또는 DHA 단독 치료와 비교하여, 항-PD-L1 및 DHA와의 병용 요법은 CT26 P3 종양 보유 마우스에서 현저한 치료 효과를 나타냈다 (도 7h).
- [0232] 중요한 것은 항-PD-L1 차단제와 DHA를 모두 투여받은 마우스의 90 %가 생존하였으나, 다른 그룹의 모든 마우스는 폐사하였다는 것이다 (도 7i).
- [0233] 또한, 침윤된 기능성 CD8⁺ T 세포의 수와 이들 CTL의 세포 독성 효과는 다른 마우스 그룹보다 공동 처리 된 마우스 그룹에서 유의하게 더 높았다 (도 7j-7m).
- [0234] 종합하면, 본 발명자들은 DHA를 사용하여 TCTP를 표적화 하는 것이, ACT 및 ICB 치료에 대한 반응을 향상시키는 잠재적인 병용 전략이라는 결론을 내렸다.
- [0236] 본 발명자들은 또한 DHA 뿐만 아니라, TCTP를 표적화하는 TCTP 중화항체가 항암면역 내성을 역전시킬 수 있을 것으로 추론하였다.
- [0237] 먼저 ACT-불응성인 A375 P3에서 TCTP의 세포외 분비도 증가하는 지 여부를 확인하고자, A375 P0 및 A375 P3의 세포 내 및 세포 외 상층액에서의 TCTP 단백질 수준을 웨스턴블랏으로 확인하였다. 그 결과, A375 P3 내성암에서 TCTP의 세포 외 분비 또한 증가됨을 확인하였다(도 8a).

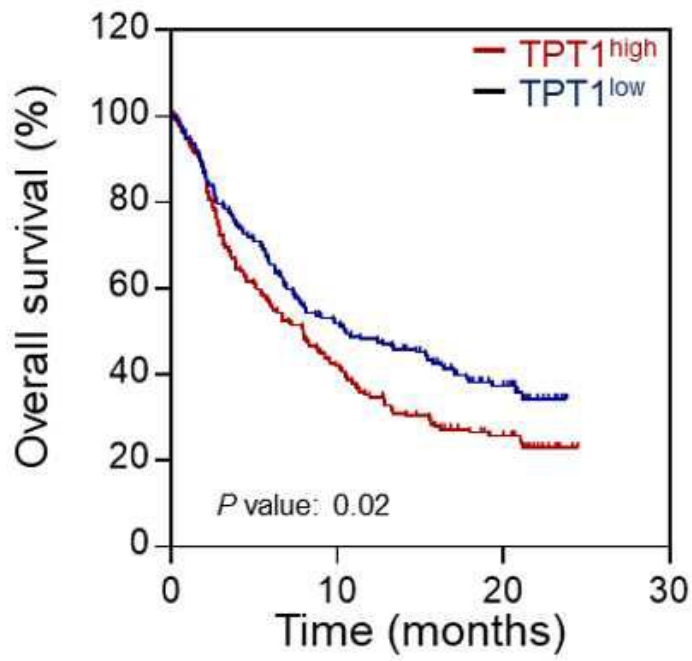
- [0238] 또한, TCTP를 표적화하는 항-TCTP 중화항체가 항암면역 내성에 미치는 효과를 확인하고자, CTL 및 항-TCTP 중화항체 처리 유무에 따른 종양세포의 세포자멸사 비율과, TCTP-AKT-MCL-1, NANOG 경로에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, TCTP 중화 항체를 이용하여 TCTP 표적 시 항암면역내성에 대한 표현형이 감소되고(도 8b) AKT 신호기전 뿐 아니라 기 보고한 면역내성 및 교차내성(Cisplatin 저항성), 다중약성(암전이, 암줄기능) 조절인자 NANOG의 발현이 감소됨을 확인하였다(도 8c).
- [0239] 상기 결과로부터, 종양 세포 외로 분비된 TCTP가 내성암의 치료내성 및 다중약성 표현형에 중요한 기능을 하며, 항-TCTP 중화 항체를 통한 TCTP의 중화 시 항암면역 내성암의 표현형이 역전될수 있음을 확인하였다.
- [0241] 본 발명자들은 또한, 다양한 암종의 환자 샘플에서 TCTP의 발현 수준($TCTP^{high}/TCTP^{low}$)에 따라 기 보고한 면역내성 및 교차내성(Cisplatin 저항성), 다중약성(암전이, 암줄기능)을 조절하는 인자인 NANOG의 발현 간에 유의적인 상관관계가 있음을 확인하였다.
- [0242] 본 발명자들은 또한, 면역관문 항체치료 불응성 직립성 폐암 모델로서 제작한 TC-1 LP3에서 세포 내 TCTP 발현 및 세포 외 TCTP 분비가 현저히 증가되며(도 10), 항-TCTP 중화 항체를 통한 TCTP의 중화 시, 기 보고한 면역내성 및 교차내성(Cisplatin 저항성)이 감소되며, 다중약성(암전이, 암 줄기능) 또한 감소됨을 확인하였다.

도면

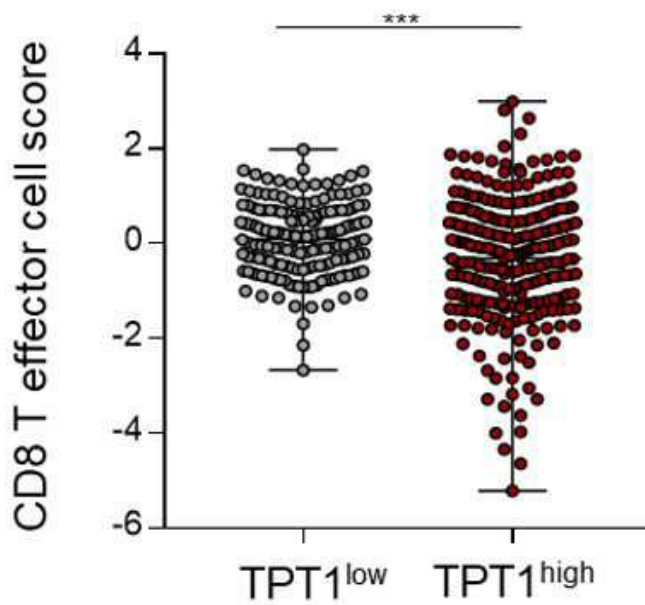
도면1a



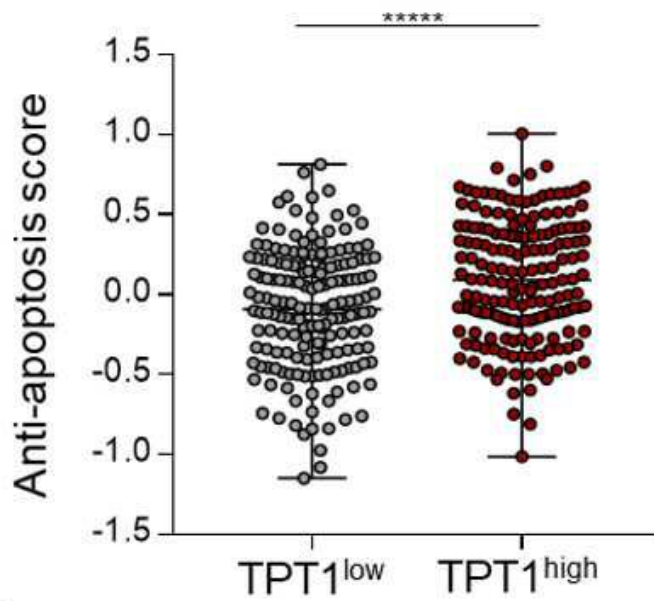
도면1b



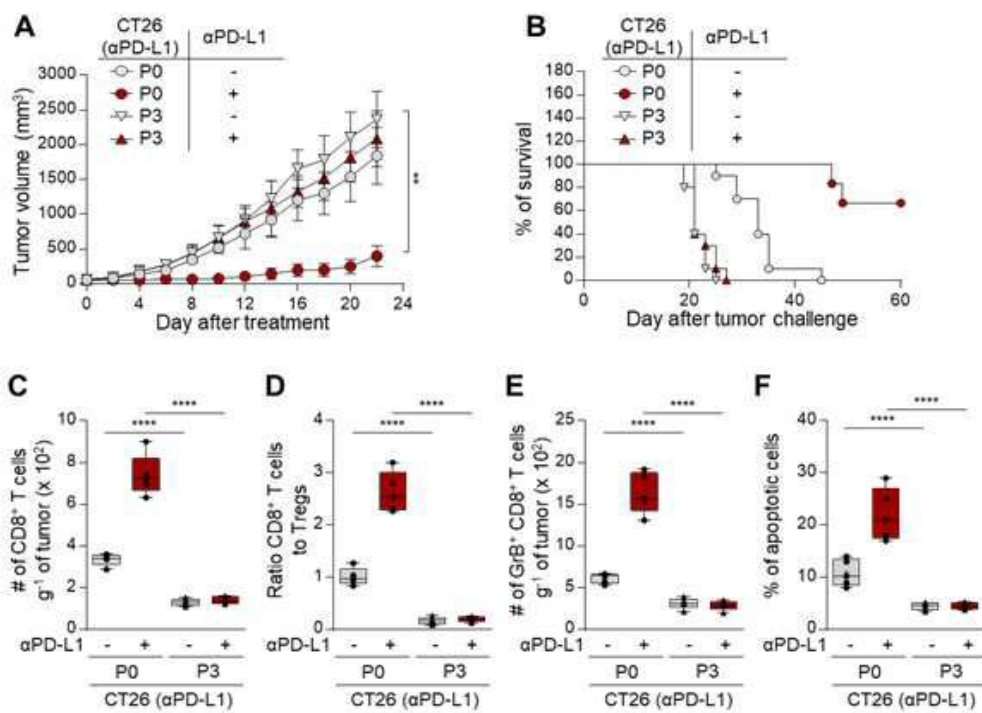
도면1c



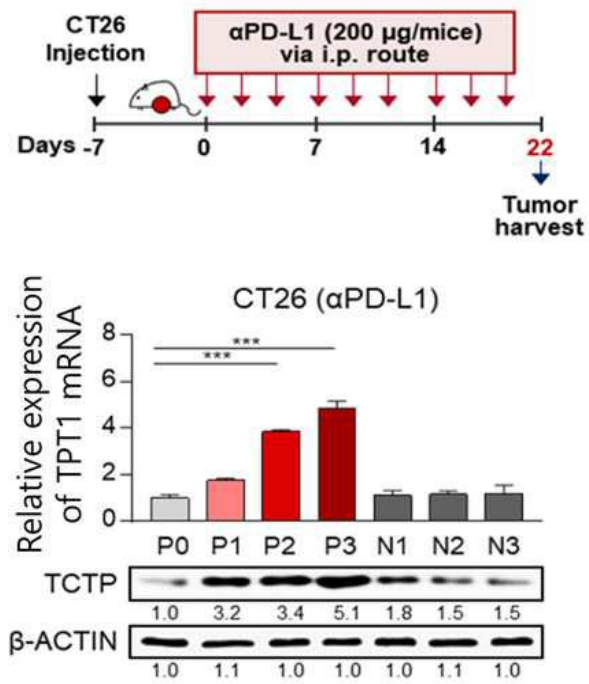
도면1d



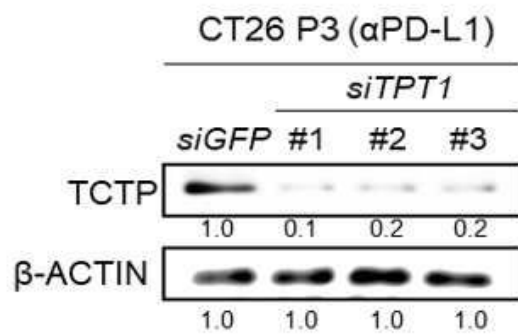
도면2a



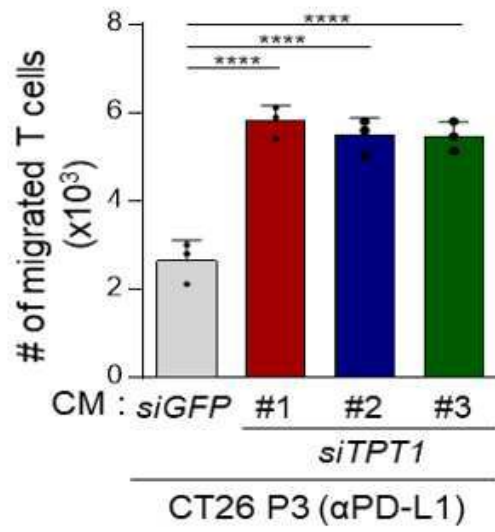
도면2b



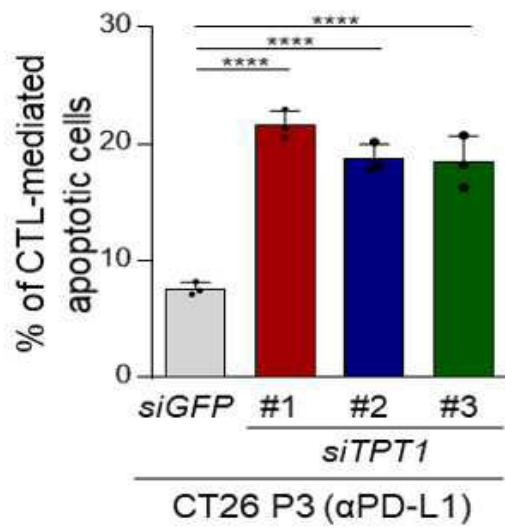
도면2c



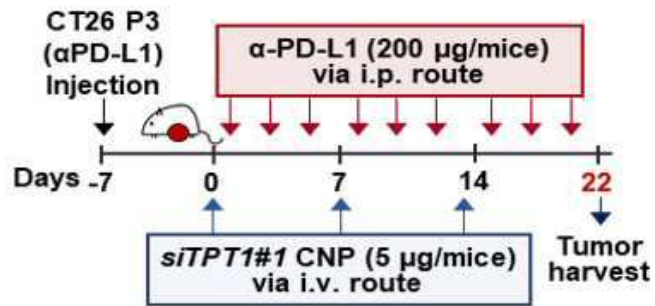
도면2d



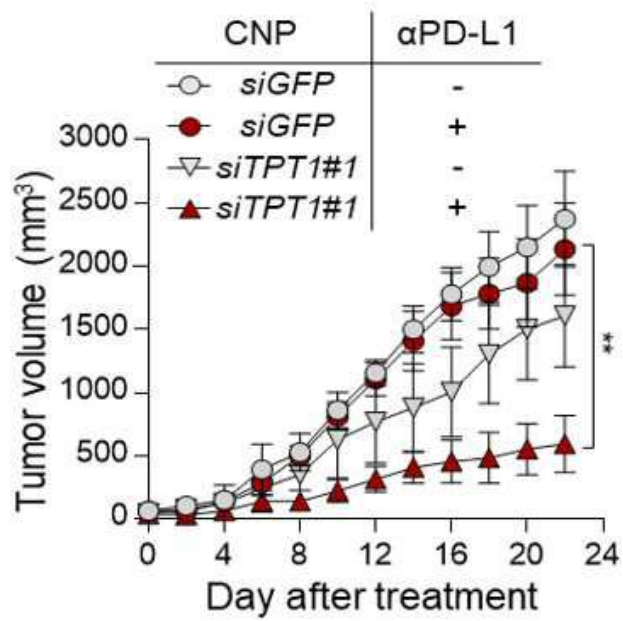
도면2e



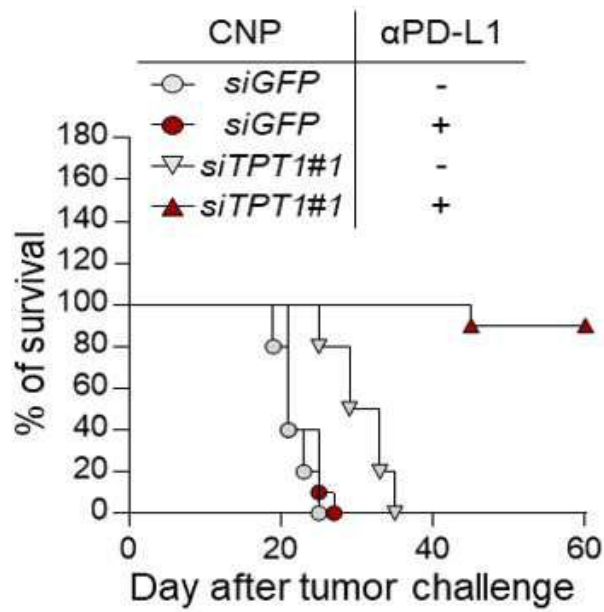
도면2f



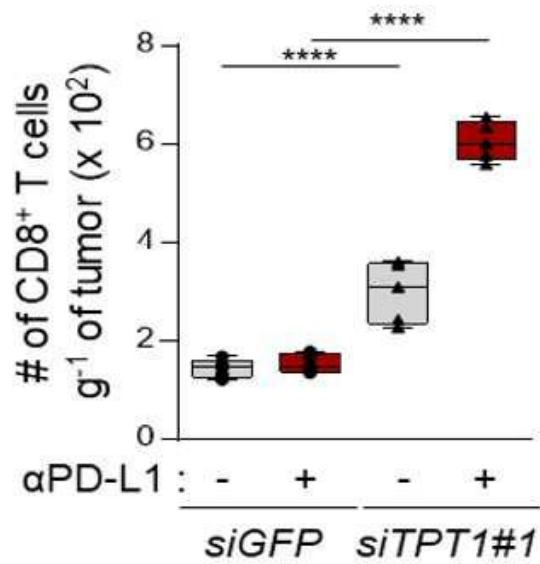
도면2g



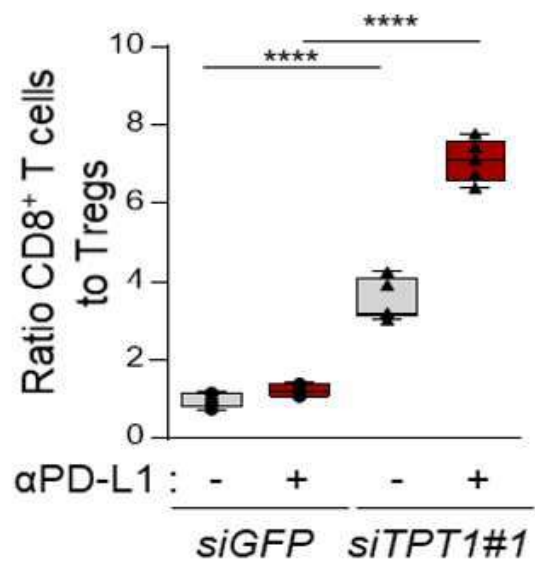
도면2h



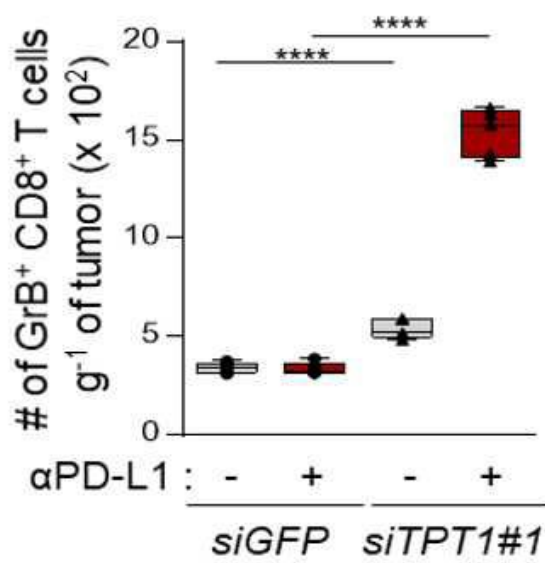
도면2i



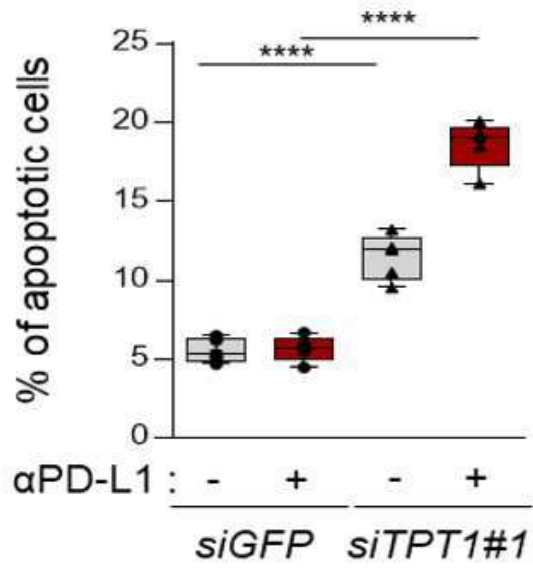
도면2j



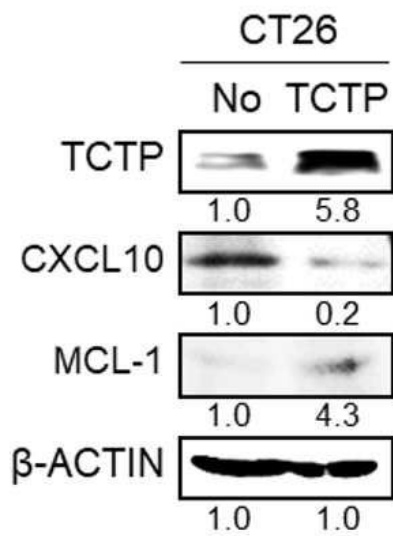
도면2k



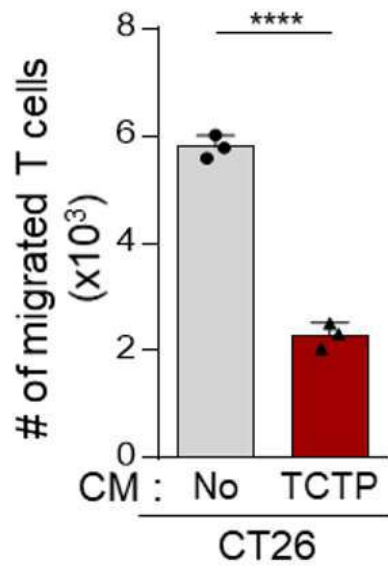
도면21



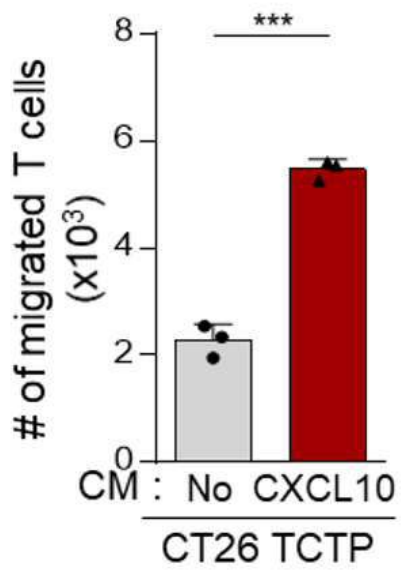
도면3a



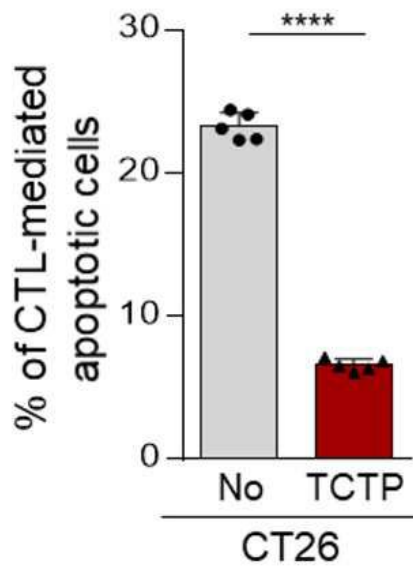
도면3b



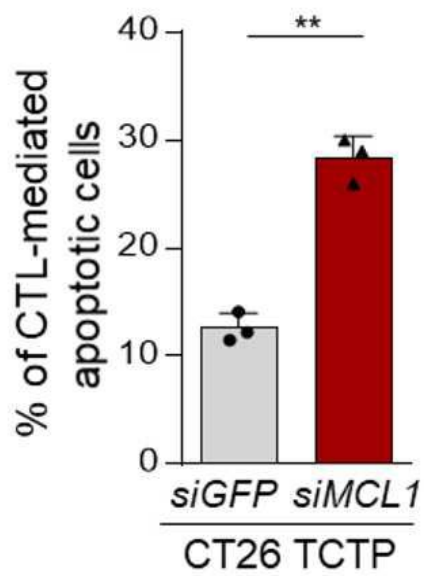
도면3c



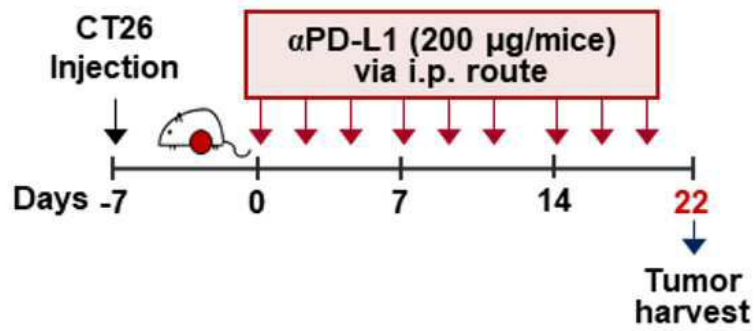
도면3d



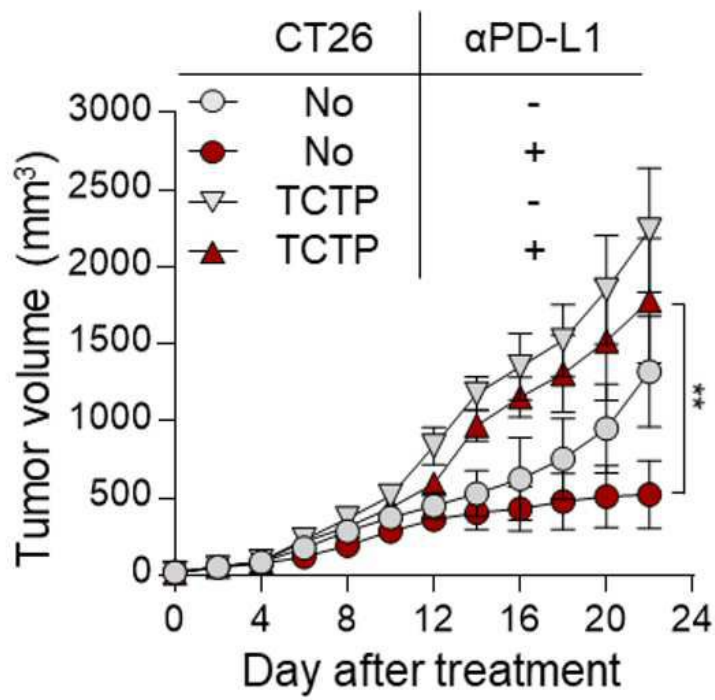
도면3e



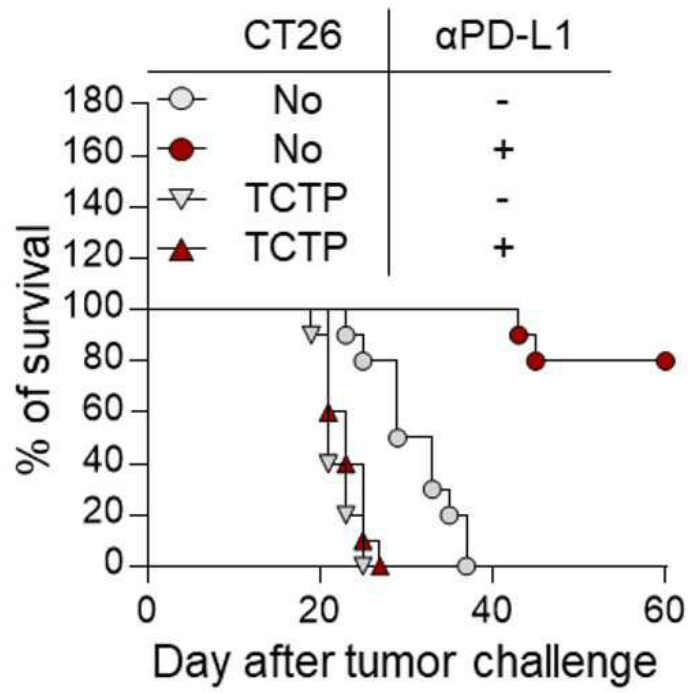
도면3f



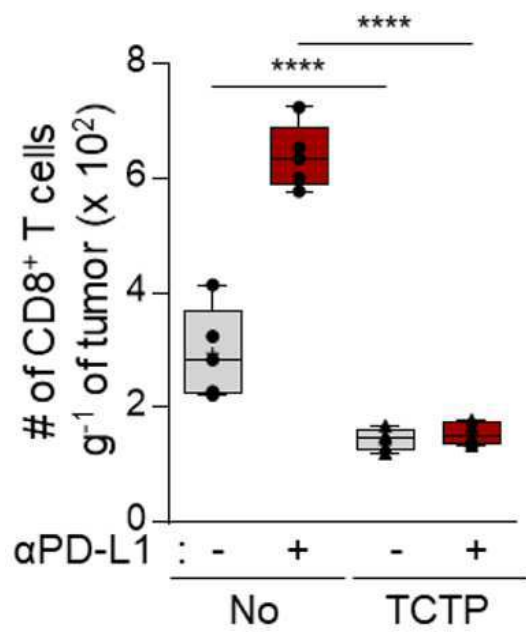
도면3g



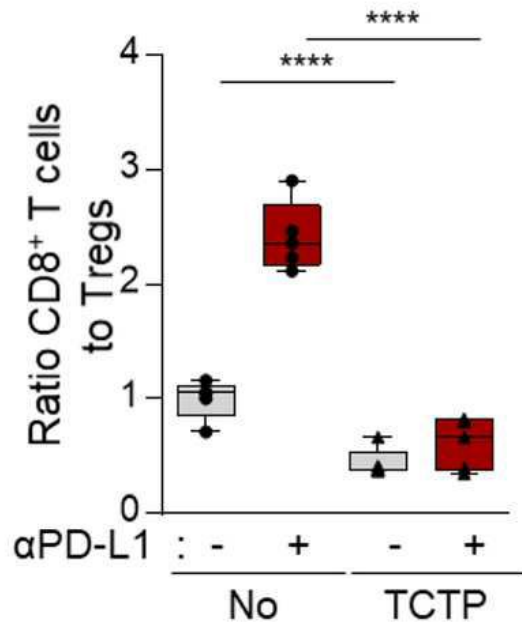
도면3h



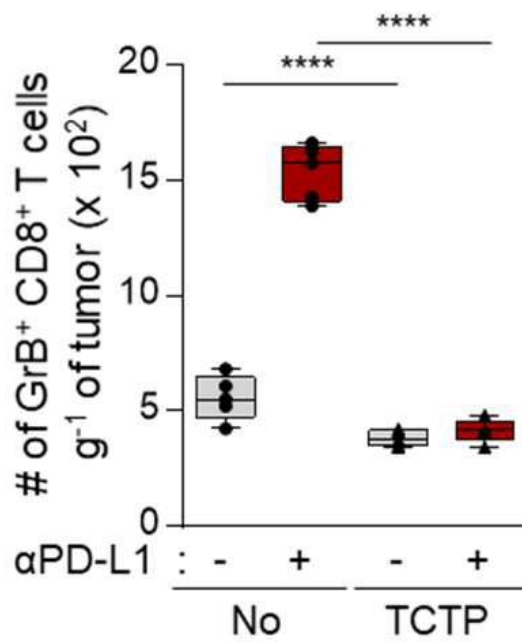
도면3i



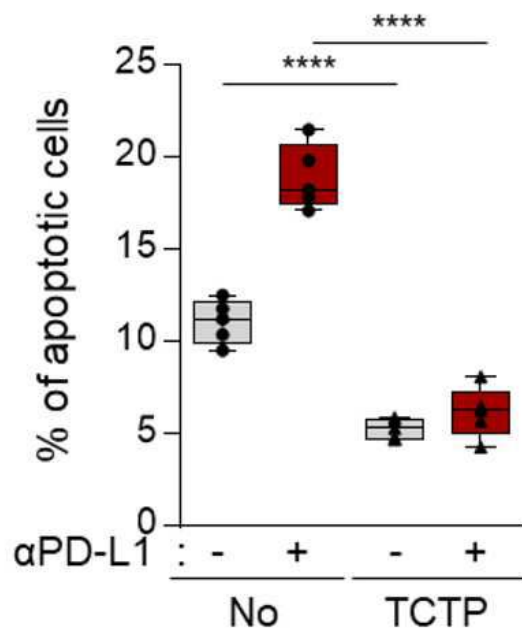
도면3j



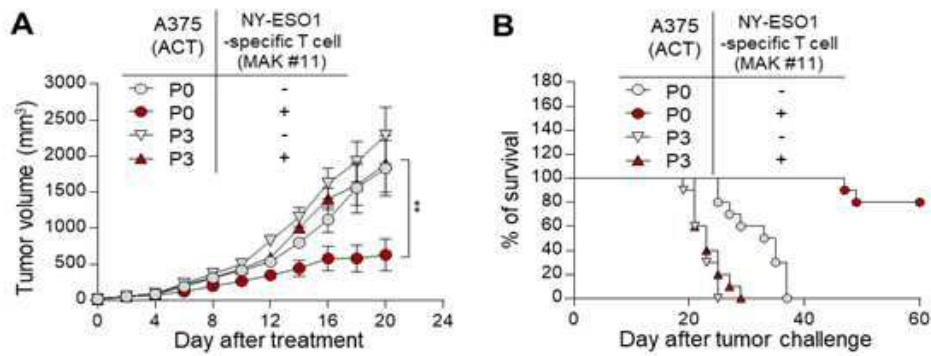
도면3k



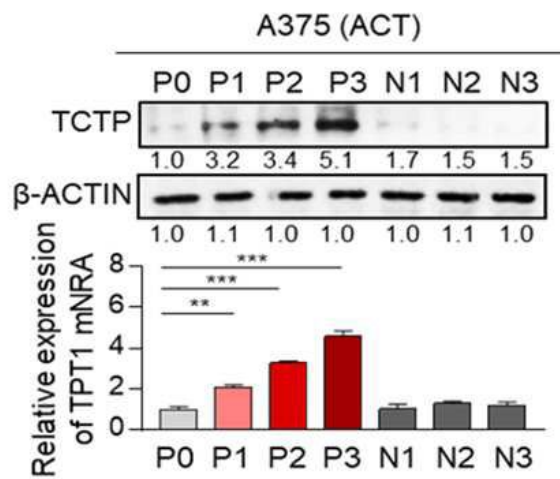
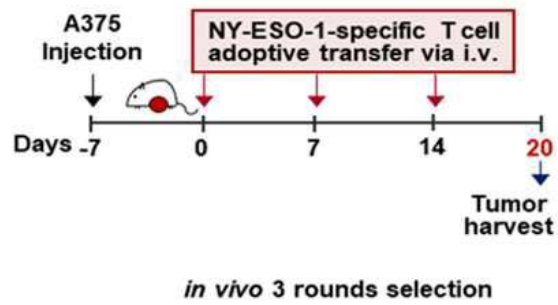
도면31



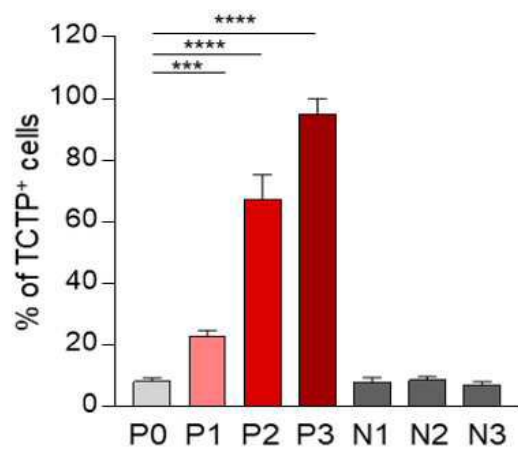
도면4a



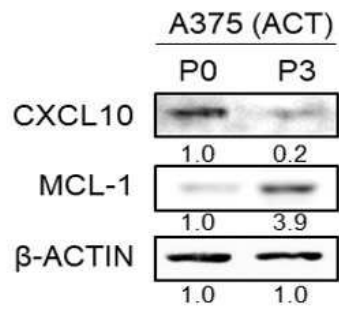
도면4b



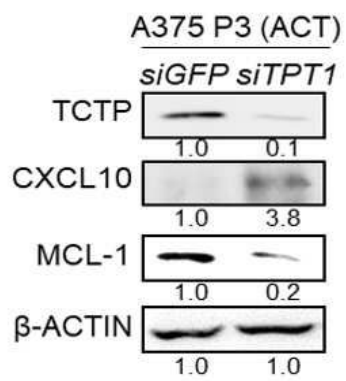
도면4c



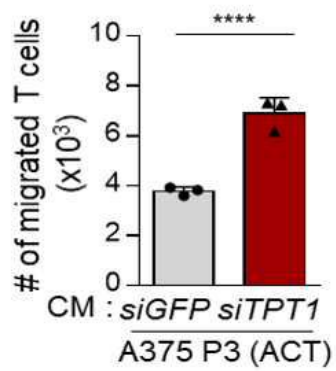
도면4d



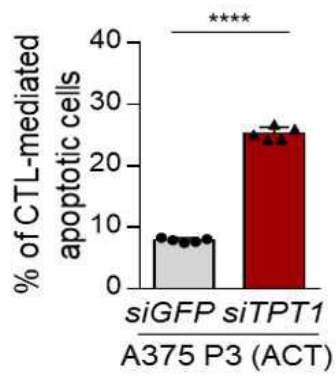
도면4e



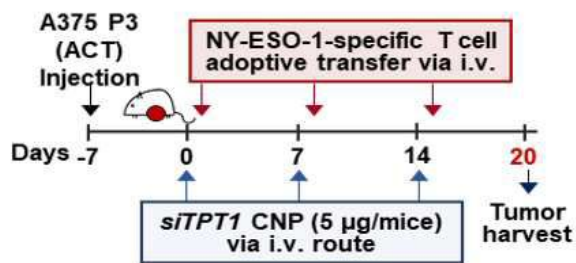
도면4f



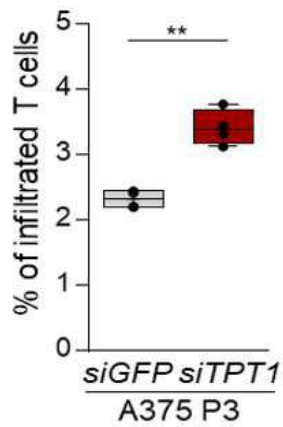
도면4g



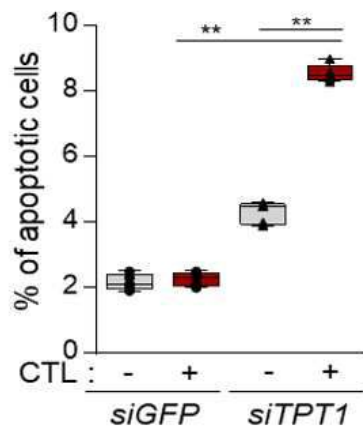
도면4h



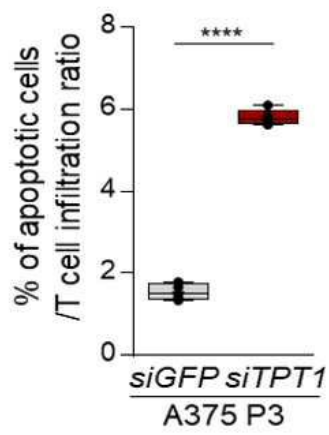
도면4i



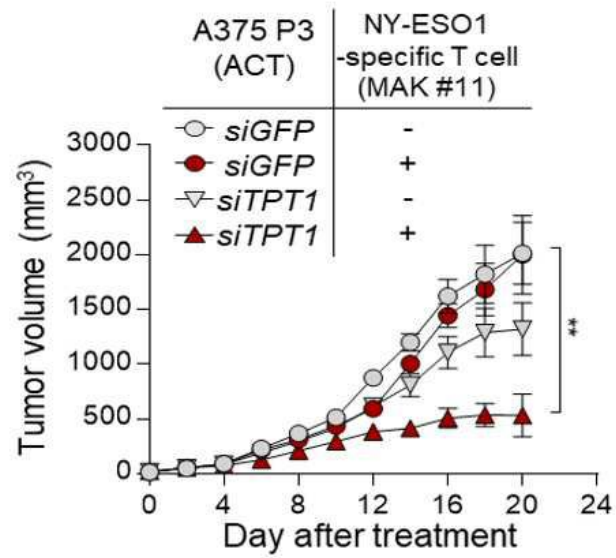
도면4j



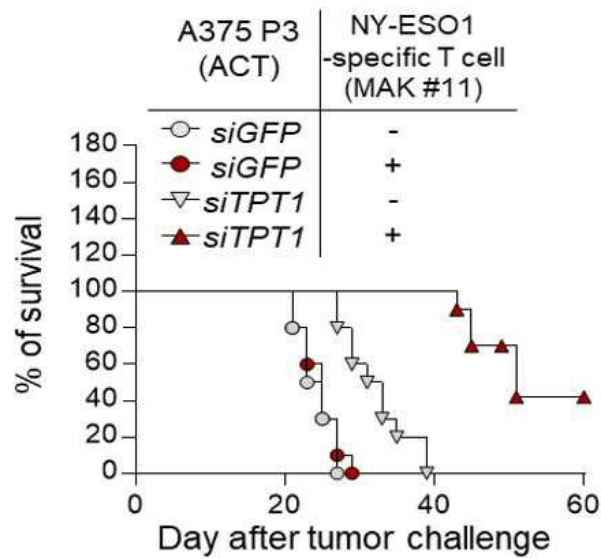
도면4k



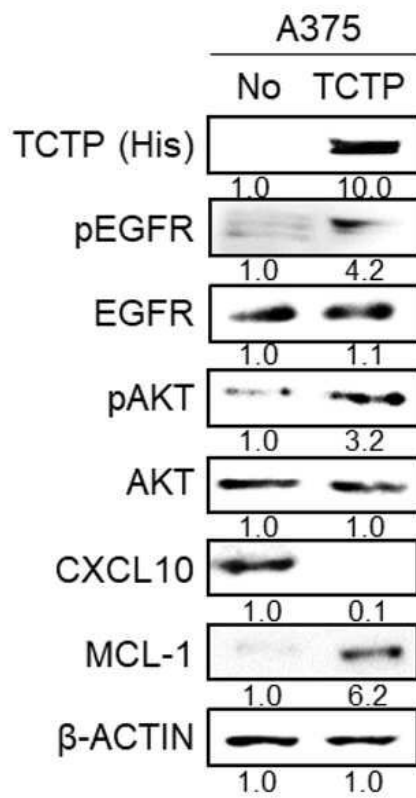
도면4l



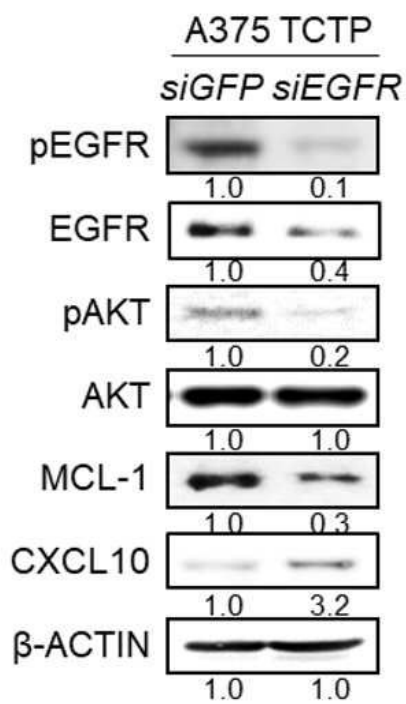
도면4m



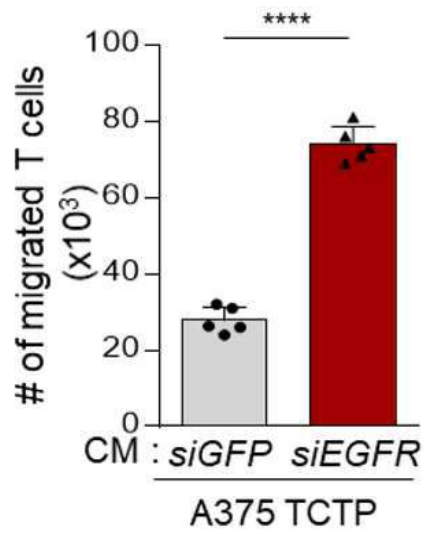
도면5a



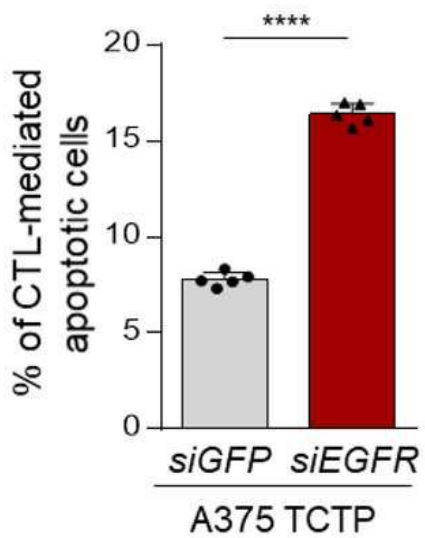
도면5b



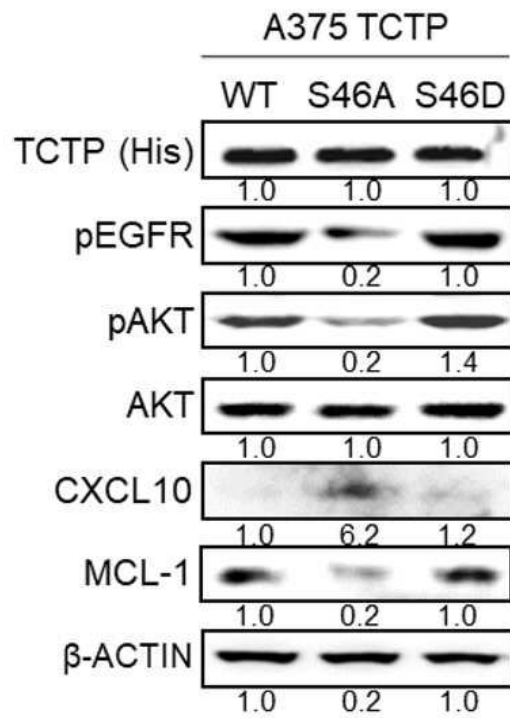
도면5c



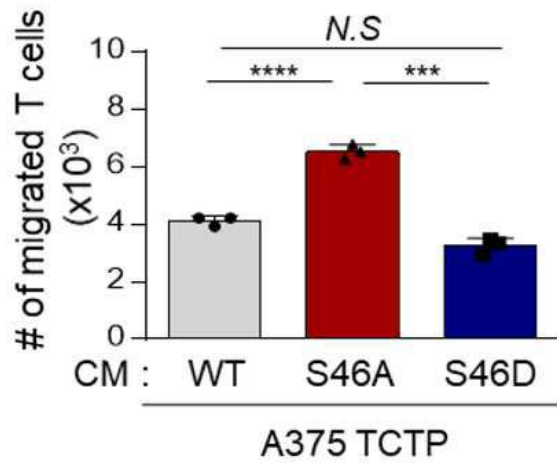
도면5d



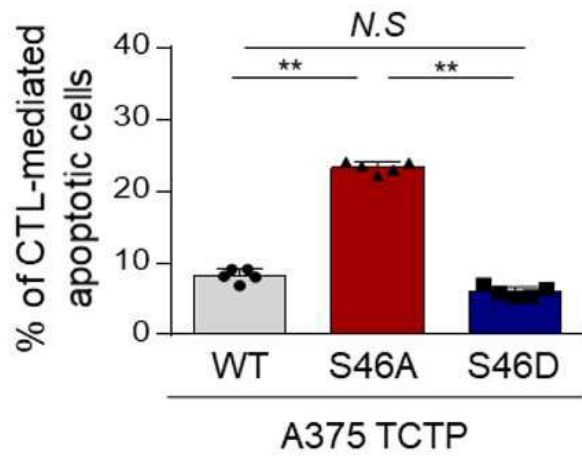
도면5e



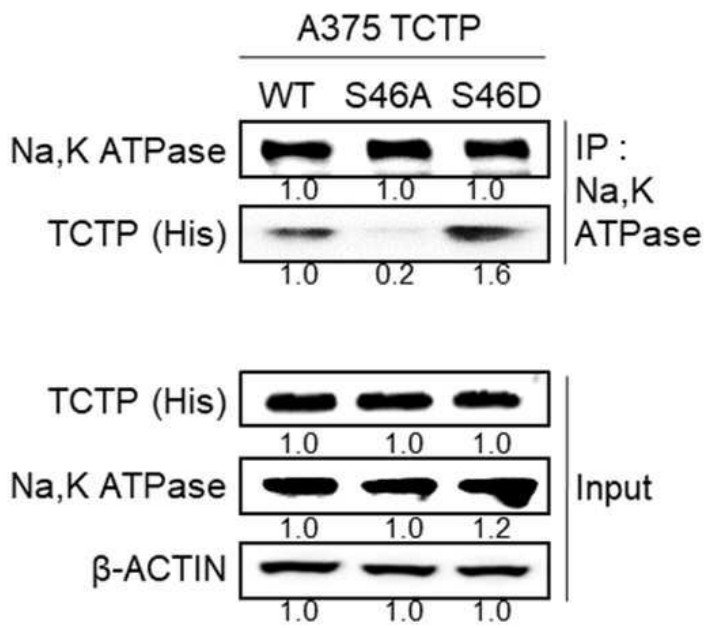
도면5f



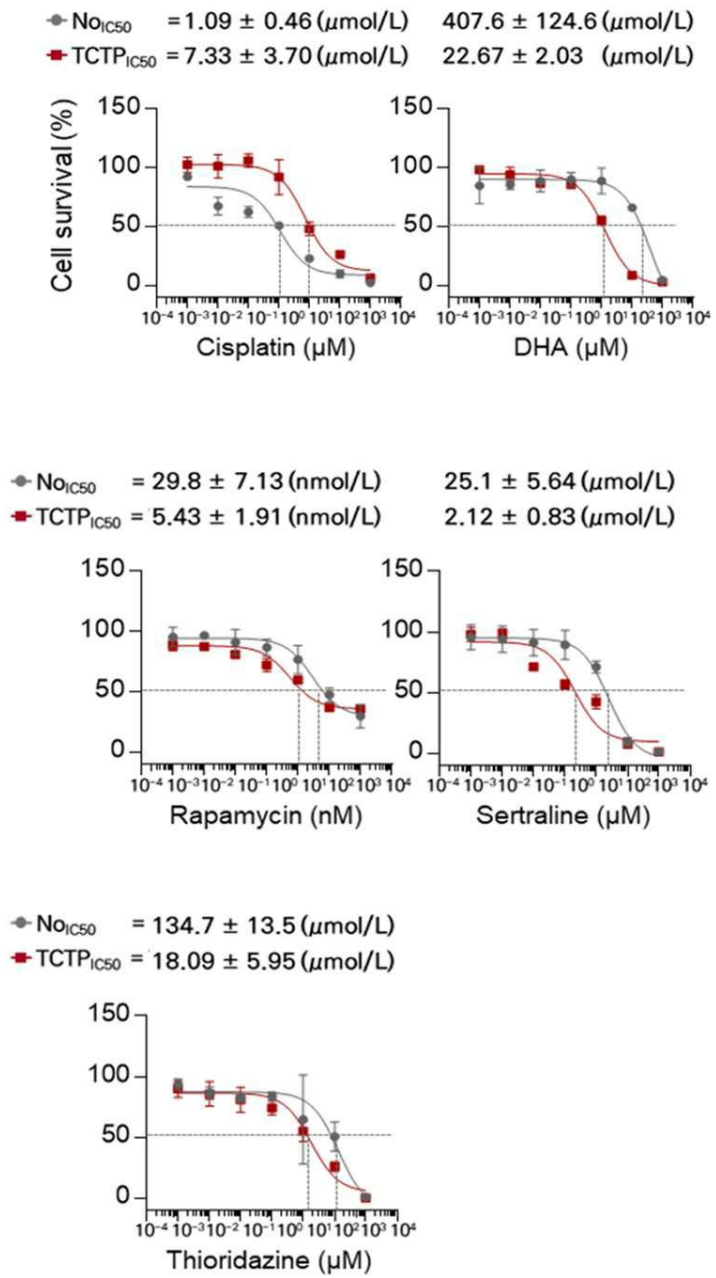
도면5g



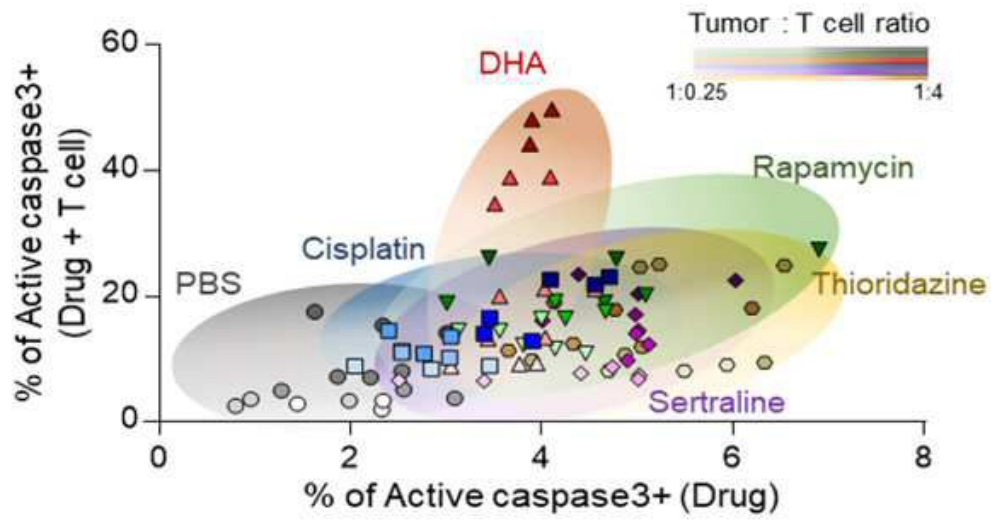
도면5h



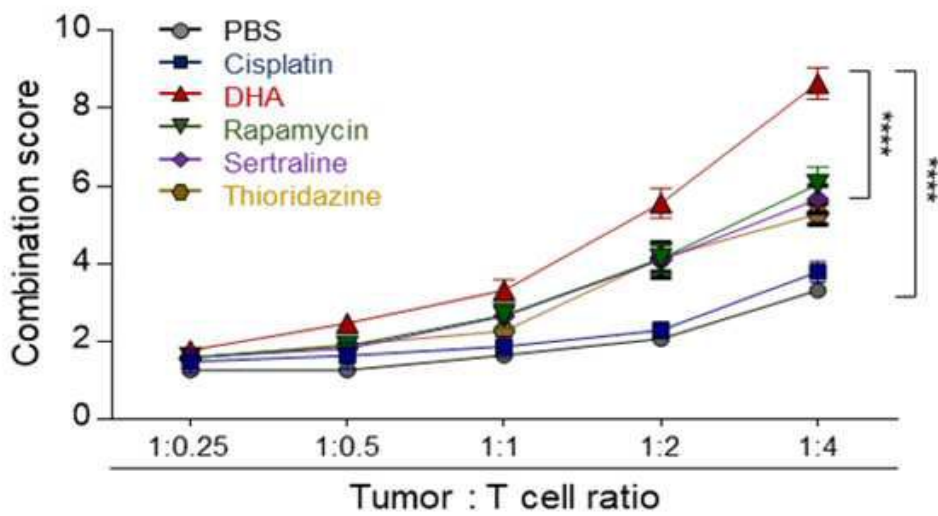
도면6a



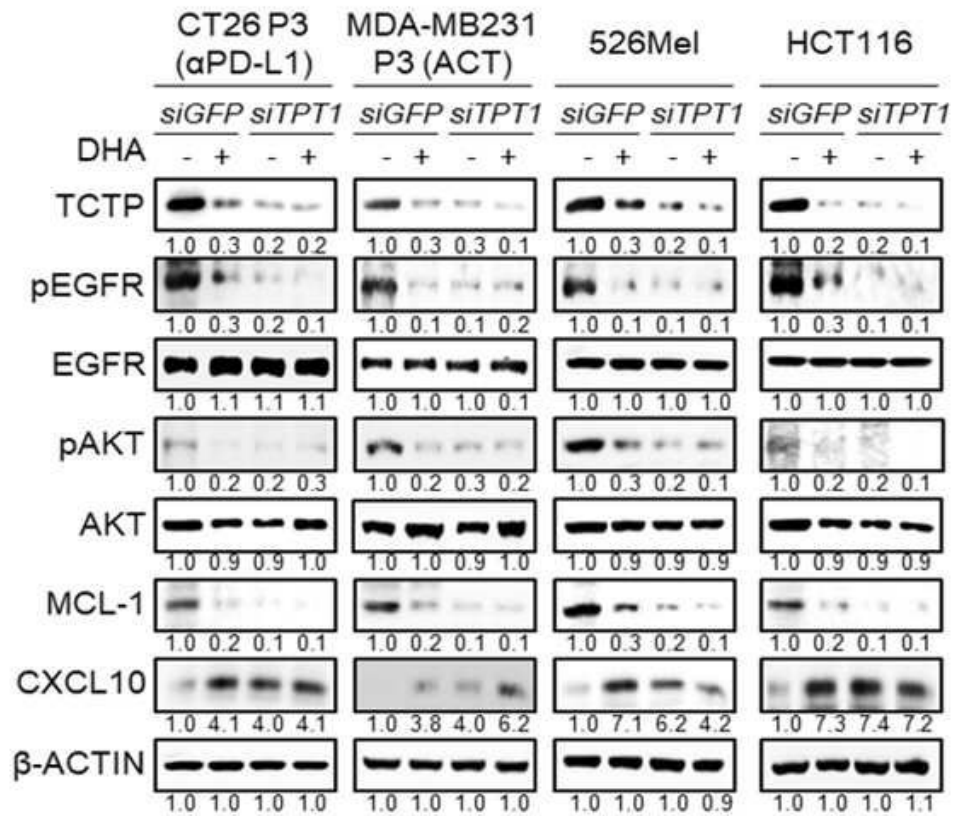
도면6b



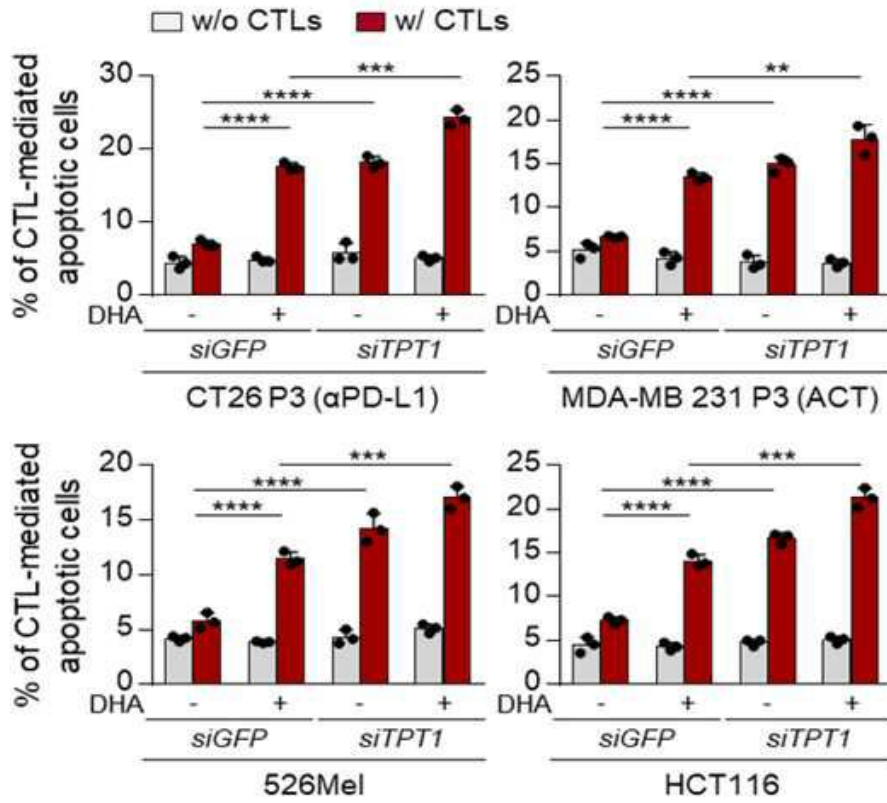
도면6c



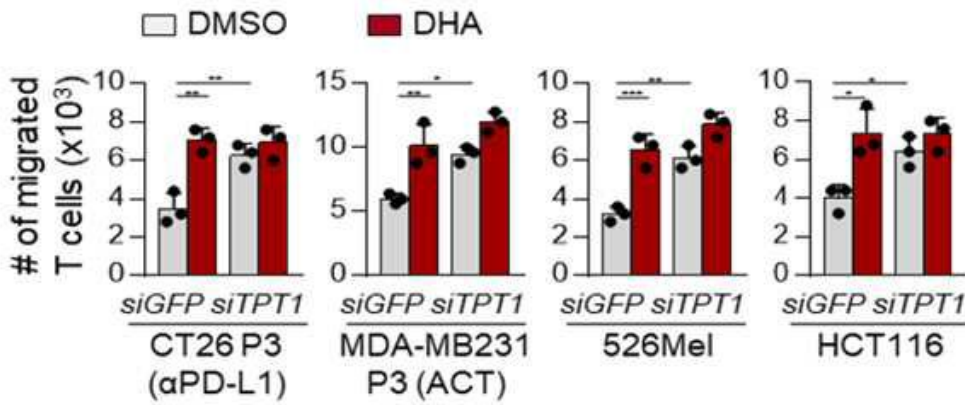
도면6d



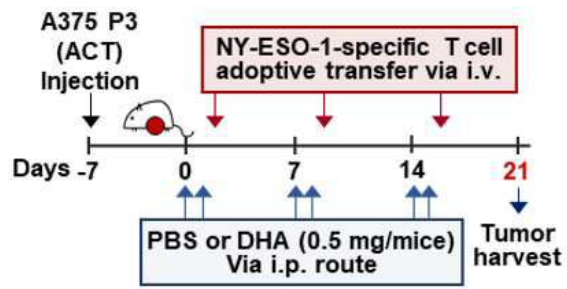
도면6e



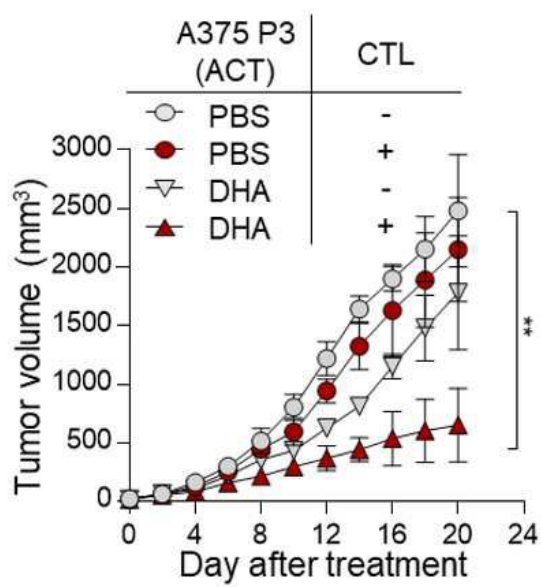
도면6f



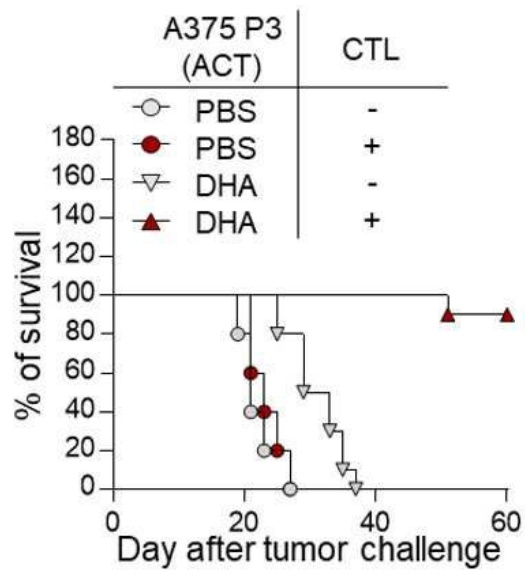
도면7a



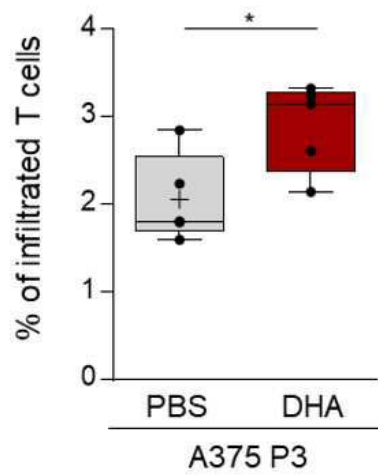
도면7b



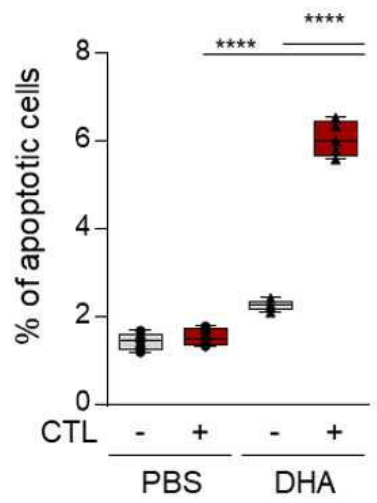
도면7c



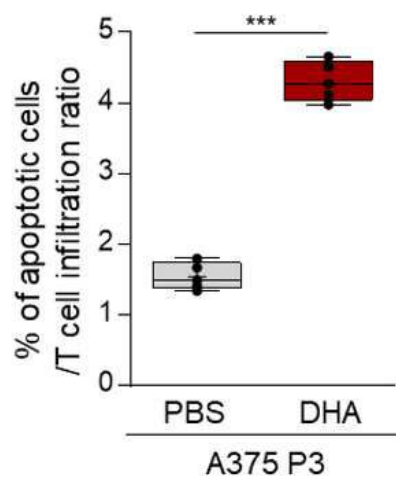
도면7d



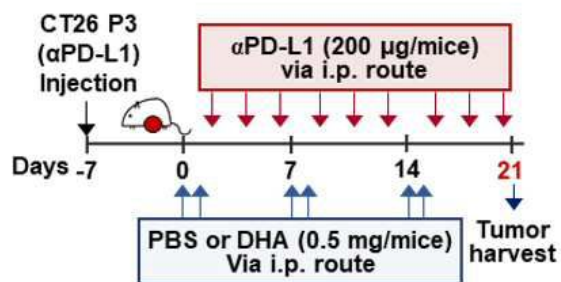
도면7e



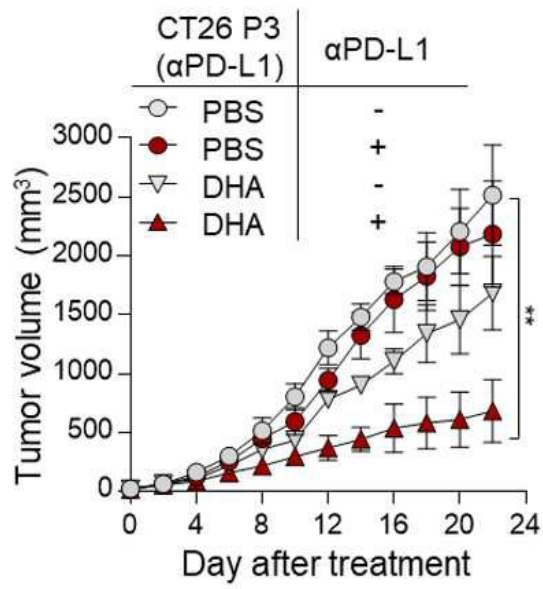
도면7f



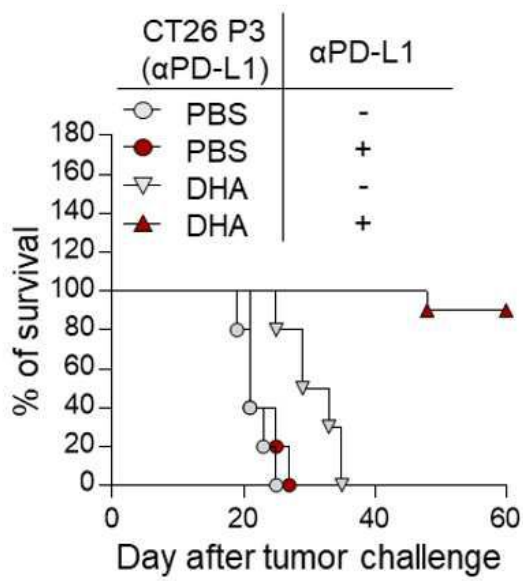
도면7g



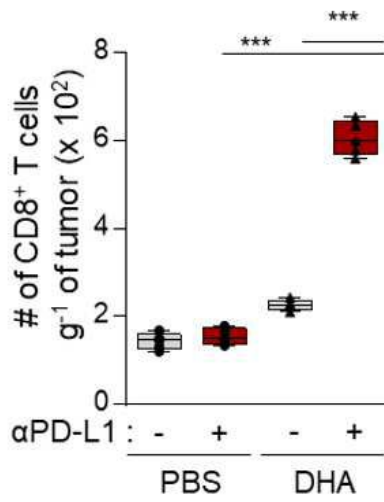
도면7h



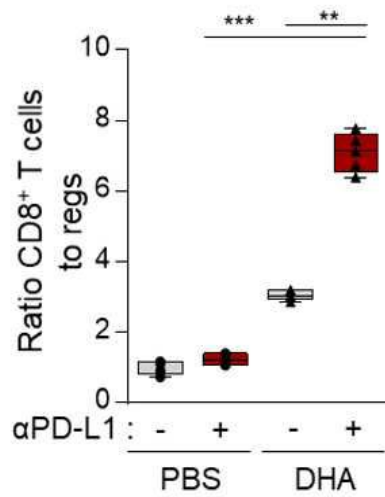
도면7i



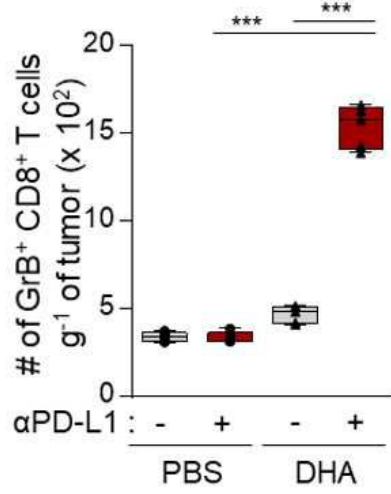
도면7j



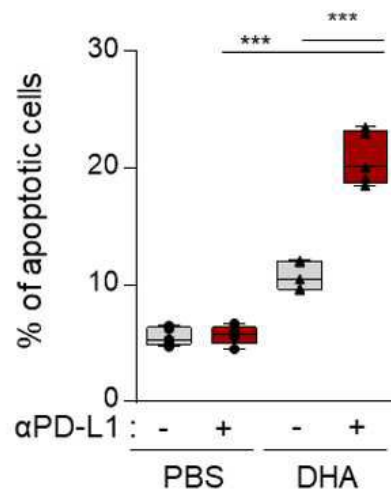
도면7k



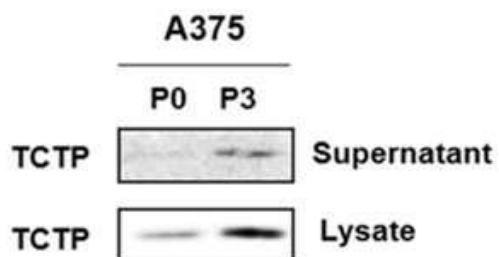
도면7l



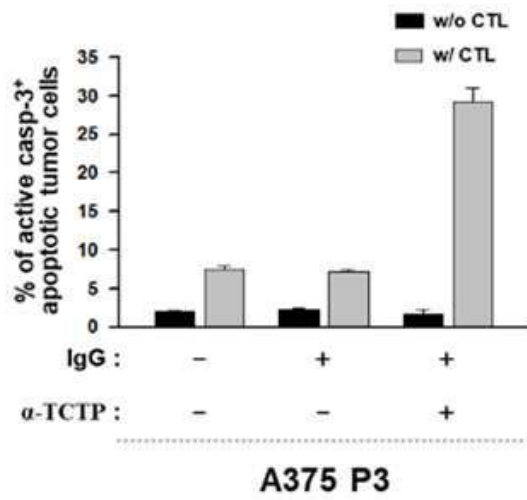
도면7m



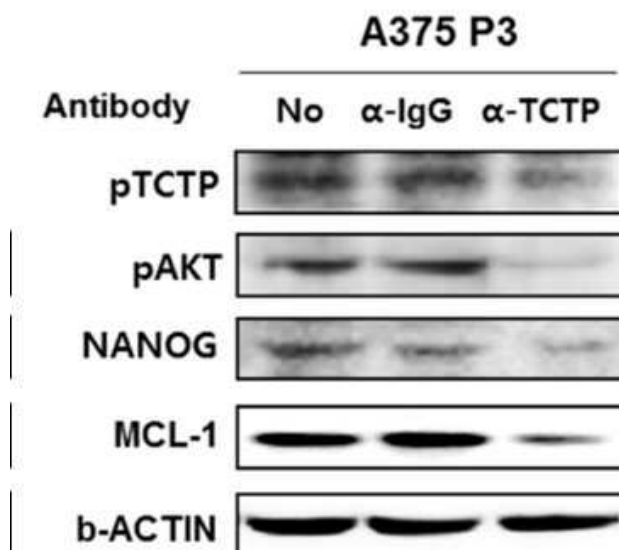
도면8a



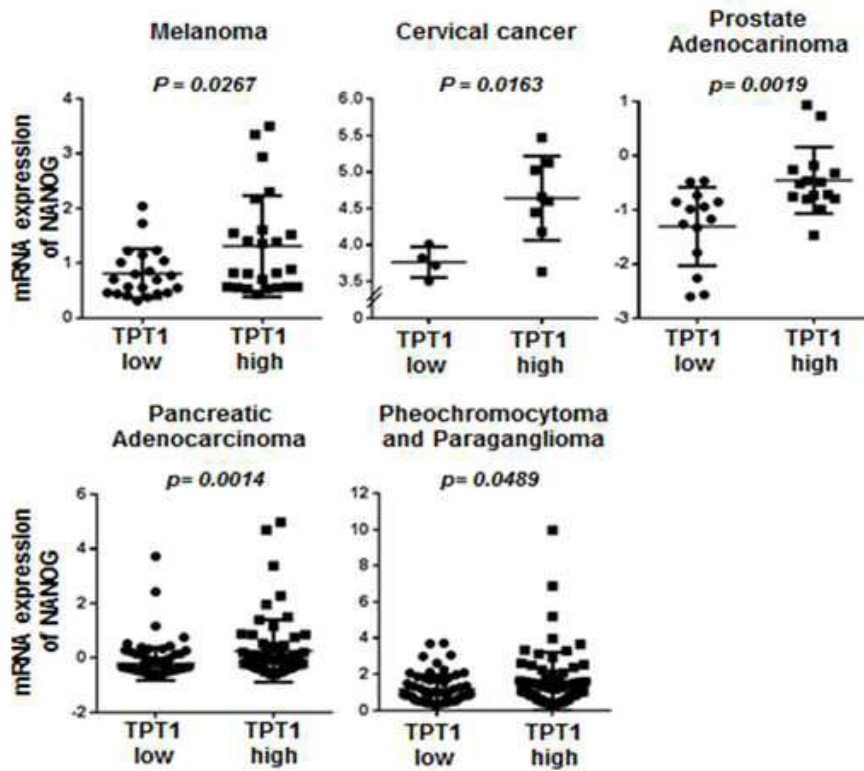
도면8b



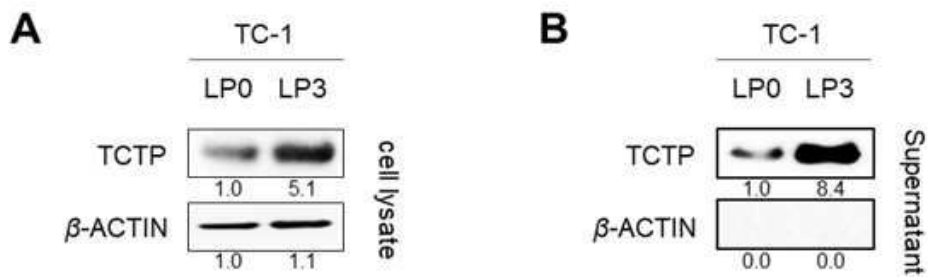
도면8c



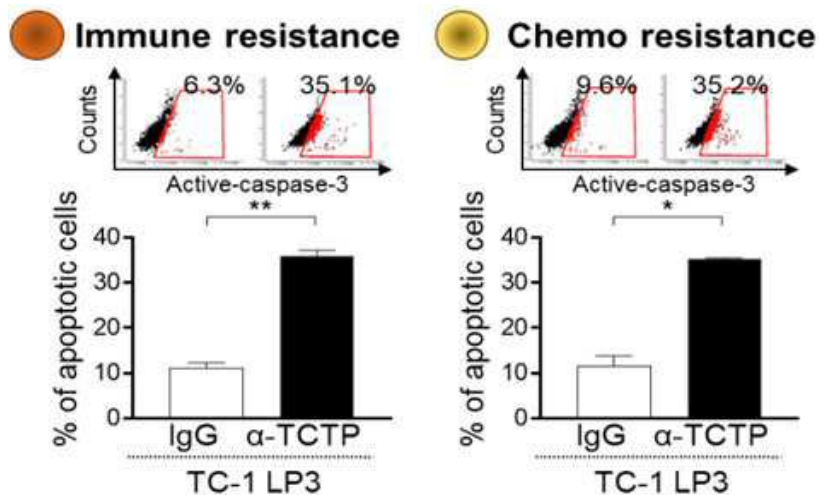
도면9



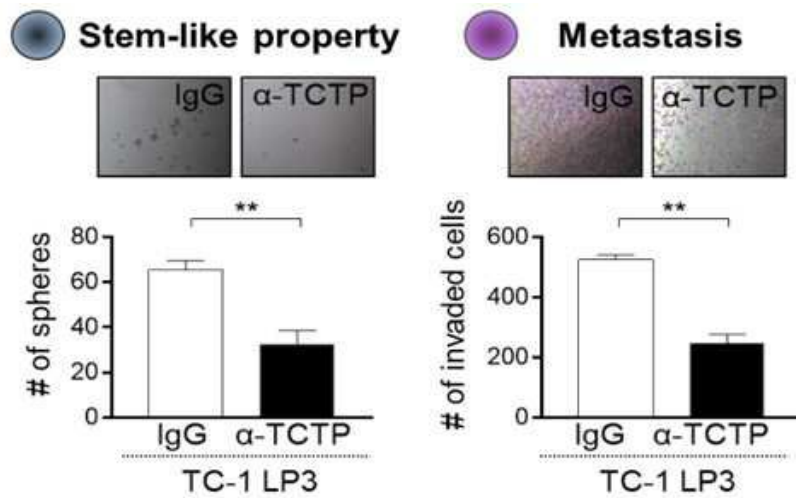
도면10



도면11a



도면11b



서열목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Use of TCTP as biomarker for predicting efficacy, prognosis of immunotherapy or resistance thereto, and target of immunotherapy for enhancing efficacy
- <130> PN200288
- <160> 20
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 41
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> TCTP S46D forward
- <400> 1
- ggtaacattg atgacgacct cattggtgga aatgcctccg c 41
- <210> 2
- <211> 41
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> TCTP S46D reverse
- <400> 2
- gcggaggcat ttccaccaat gaggtcgtca tcaatgttac c 41
- <210> 3

<211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TCTP S46A forward
 <400> 3
 cgaggcgcaa ggtaccgaag caacagtaat cactgggtgc g 41
 <210> 4
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TCTP S46A reverse
 <400> 4
 cgacaccagt gattactgtt gcttcggtac cttcgcctc g 41

 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TPT1 forward
 <400> 5
 atgacgagct gttctccgac 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TPT1 reverse
 <400> 6
 aacaccggtg actactgtgc 20
 <210> 7
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GFP sense
 <400> 7

gcaucaaggu gaacuucaa	19
<210> 8	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GFP antisense	
<400> 8	
uugaaguuca ccuugaugc	19
<210> 9	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse TPT1 No.1 sense	
<400> 9	
gaaaucaucuc aaaggcaaa	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse TPT1 No.1 antisense	
<400> 10	
uuugccuuug agugauuuc	19
<210> 11	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse TPT1 No.2 sense	
<400> 11	
cuguucuccg acaucuaca	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> mouse TPT1 No.2 antisense

<400> 12

uguagauguc ggagaacag 19

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse TPT1 No.3 sense

<400> 13

agcacauccu ugcuaauuut t 21

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse TPT1 No.3 antisense

<400> 14

aaaauagcaa ggaugugcut a 21

<210> 15

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human TPT1 sense

<400> 15

gcaugguugc ucuaugga 19

<210> 16

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human TPT1 antisense

<400> 16

uccaaauagag caaccaugc 19

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human EGFR sense

<400> 17

aggaauuaag agaagcaaca u 21

<210> 18

<211> 21

<212>

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human EGFR antisense

<400> 18

auguugcuuc ucuaauucc u 21

<210> 19

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse MCL-1 sense

<400> 19

gggcaggauu gugacucuua uuucu 25

<210> 20

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse MCL-1 antisense

<400> 20

agaaauaaga gucacaucc ugccc 25