



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월07일

(11) 등록번호 10-2714709

(24) 등록일자 2024년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/00 (2006.01) A61K 38/43 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/00 (2013.01)

A61K 38/43 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7014104

(22) 출원일자(국제) 2016년08월31일

심사청구일자 2021년08월30일

(85) 번역문제출일자 2018년05월17일

(65) 공개번호 10-2018-0064534

(43) 공개일자 2018년06월14일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/049715

(87) 국제공개번호 WO 2017/078839

국제공개일자 2017년05월11일

(30) 우선권주장

62/249,907 2015년11월02일 미국(US)

PCT/US2016/019242 2016년02월24일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110136825 A*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 12 항

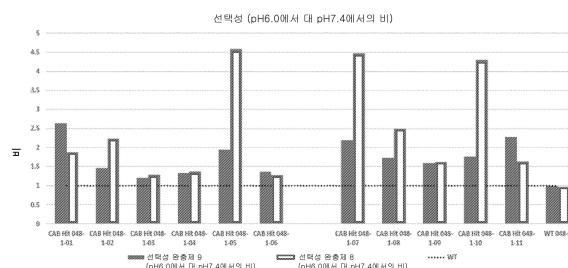
심사관 : 김수진

(54) 발명의 명칭 조건부 활성 폴리펩티드

(57) 요약

분자량이 900 a.m.u. 미만이고, pKa가 제1 pH로부터 4 pH 유닛 이하 떨어져 있는 중 적어도 하나의 존재 하에 제1 pH에서 행하여진 검정에서의 활성 대 상기 종과 동일한 중 적어도 하나의 존재 하에 제2 pH에서 행하여진 검정에서의 활성의 비가 적어도 1.3인, 비 자연 발생 폴리펩티드 또는 단리된 폴리펩티드가 개시되어 있다. 이 종의 pKa는 상기 제1 pH와 상기 제2 pH의 사이에 있으며, 소분자일 수 있다. 또한 이 폴리펩티드를 포함하는 약학 제형과 이의 용도도 개시되어 있다, 조건부 활성 폴리펩티드를 제조하는 방법도 또한 개시되어 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 16/468 (2013.01)

C12N 9/00 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130096731 A

KR1020190039292 A

WO2003105757 A2

JP2010068746 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

항원과 결합하는 모 항체 또는 모 항체 단편으로부터 이 항원에 결합하는 조건부 활성 항체 또는 항체 단편을 제조하는 방법으로서, 이 방법은

(i) 아미노산 적어도 하나를 돌연 변이시켜 하나 이상의 돌연변이 항체 또는 항체 단편을 제조함으로써 모 항체 또는 항체 단편을 진화시키는 단계;

(ii) 하나 이상의 돌연변이 항체 또는 항체 단편을 대상으로,

6.0 내지 6.8 범위의 제1 pH 값에서 분자량 100 a.m.u 미만이며 제1 pH 값으로부터 1 유닛 이하의 차를 갖는 pKa를 가지는 작은 분자 또는 이온이 존재할 때의 하나 이상의 돌연변이 항체 또는 항체 단편의 항원에 대한 결합 활성에 대한 제1 검정과, 7.2 내지 7.6 범위의 제2 pH 값에서 상기와 동일한 분자 또는 이온이 존재할 때의 하나 이상의 돌연변이 항체 또는 항체 단편의 항원에 대한 결합 활성에 대한 제2 검정을 수행하는 단계;

(iii) 하나 이상의 돌연변이 항체 또는 항체 단편을 대상으로, 6.0 내지 6.8 범위의 제1 pH 값에서 상기 분자 또는 이온이 부재할 때의 하나 이상의 돌연변이 항체 또는 항체 단편의 항원에 대한 결합 활성에 대한 제3 검정과, 7.2 내지 7.6 범위의 제2 pH 값에서 상기 분자 또는 이온이 부재할 때의 하나 이상의 돌연변이 항체 또는 항체 단편의 항원에 대한 결합 활성에 대한 제4 검정을 수행하는 단계;

(iv) 6.0 내지 6.8 범위의 제1 pH 값에서의 제1 검정에서의 항원에 대한 결합 활성 대 7.2 내지 7.6 범위의 제2 pH 값에서의 상기 제2 검정에서의 항원에 대한 결합 활성의 비가 적어도 3.0이고, 6.0 내지 6.8 범위의 제1 pH 값에서의 상기 제3 검정에서의 항원에 대한 결합 활성 대 7.2 내지 7.6 범위의 제2 pH 값에서의 상기 제4 검정에서의 항원에 대한 결합 활성의 비가 3.0 미만인 돌연변이 항체 또는 항체 단편을 선택하는 단계; 및

(v) 상기 단계 (iv)에서 선택된 돌연변이 항체들 또는 항체 단편들에서 작은 분자 또는 이온이 부재할 때 항원에 대한 결합 활성이 pH-의존적이지 않은 것을 선택함으로써 조건부 활성 항체 또는 항체 단편을 수득하는 단계;

를 포함하고 여기서, 상기 돌연변이 항체 또는 항체 단편은 모 항체 또는 항체 단편에 비하여 높은 비율의 하전된 아미노산 잔기를 가지는 것을 특징으로 하며, 그리고

상기 작은 분자 또는 이온과 그 농도는 3 mM 내지 200 mM의 중탄산염 이온(bicarbonate ion), 10 mM 내지 100 mM의 이황화물 이온(bisulfide ion), 및 100 μ M 내지 100 mM의 황화수소(hydrogen sulfide)에서 선택되는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 6.0 내지 6.8 범위의 제1 pH 값에서의 상기 제1 검정에서의 항원에 대한 결합 활성 대 7.2 내지 7.6 범위의 제2 pH 값에서의 상기 제2 검정에서의 항원에 대한 결합 활성의 비는 적어도 4.0인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 분자 또는 이온은 중탄산염 및 황화수소로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분자 또는 이온의 pKa는 제1 pH로부터 0.5 pH 유닛 이하 떨어져 있는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 분자 또는 이온의 pKa는 제1 pH와 제2 pH의 사이인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 분자의 pKa는 6.2 이상 및 7.2 미만인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항원에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 모 항체 또는 항체 단편으로부터 진화된 비 천연 발생 항원에 결합하는 돌연변이 항체 또는 항체 단편인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 제1 pH 값은 6.2-6.8 범위인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 제1 pH 값은 6.0인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 제2 pH 값은 7.4인 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 제2 pH 값은 7.4인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 제2 pH 값은 7.4인 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 원하는 활성을 보이는, 개선된 폴리펩티드를 제공하는 분야에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 특정 화합물이나 이온 종이 존재할 때 어떤 조건에서보다 다른 조건에서 더 큰 활성을 보이는 조건부 활성 폴리펩티드를 모 폴리펩티드로부터 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 단백질, 특히 효소 또는 항체가 상이한 조건하에서 활성을 보이거나 안정화되도록 이 단백질을 다양한 특징에 대해 진화시키기 위한 방법을 기술한 많은 문헌이 있다. 예를 들어 효소는 더 높은 온도에서 안정화되도록 진화되어 왔다. 고온에서 효소 활성 개선이 있는 경우에, 개선의 실질적 부분은 Q10 룰에 의해 공통적으로 기술되는 더 높은 온도 활성의 결과이며, 효소의 경우에 매 10℃의 증가에 대해 산출량이 배가되는 것으로 평가된다.
- [0003] 더욱이, 단백질의 정상 작동 조건 하에서 이 단백질을 탈 안정화함으로써, 정상 작동 조건 하에서 해당 단백질 활성을 감소시키는 자연 돌연변이가 존재한다. 예를 들어 낮은 온도에서는 활성이긴 하지만, 통상적으로 돌연변이체의 기원이 되는 야생형 단백질의 활성에 비하여 감소한 수준으로 활성인, 공지의 온도 돌연변이체가 존재한다.
- [0004] 조건부로 활성인 폴리펩티드, 예를 들어 어떤 조건에서는 실질적으로 활성이 더 작거나 비활성이지만, 다른 조건에서는 활성인 폴리펩티드를 제조하는 것이 요망된다. 또한 임의의 환경에서 활성 또는 비활성이거나, 아니면 시간이 경과 함에 따라서 활성화되거나 비활성화되는 폴리펩티드를 제조하는 것도 요망된다. 온도 이외에, 단백질이 진화되거나 최적화될 수 있는 다른 조건은 pH, 삼투압, 삼투질 농도, 산화 스트레스 및 전해질 농도를 포함한다. 진화 동안 다른 특성, 예를 들어 화학적 저항성 및 단백 분해 저항성을 개선하는 것이 종종 요망된다.
- [0005] 단백질을 진화시키기 위한 다수의 전략들이 이전에 기술된 바 있다. 예를 들어 US 2005/0100985는, 주형 폴리뉴클레오티드 내 각각의 기원 코돈 자리를 자연 발생 아미노산 20개를 암호화하는 코돈으로 치환함으로써 모 주형 폴리뉴클레오티드로부터 돌연변이 폴리뉴클레오티드 세트를 제조하는, 신속하고 가속화된 방법을 개시한다. 이 방법은 단순히 포화 돌연변이유발법이라 칭하여지는데, 다른 돌연변이유발 방법, 예를 들어 2개 이상의 관련된 폴리뉴클레오티드가 적합한 숙주 세포에 도입되어, 재조합 및 환원 재편성을 통해 잡종 폴리뉴클레오티드가 생성되는 방법과 병행하여 사용될 수 있다.
- [0006] Giver와 다수("Directed evolution of a thermostable esterase," Proc. USA, vol. 95, pp. 12809-12813 (1998))는, 중온성(mesophilic) 에스테라아제의 안정성과 활성 간 관계를 프로빙하기 위해 시험관 내 진화를 이용하였다. 무작위 돌연변이유발, 재조합 및 스크리닝이 6회차 실시되었을 때, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) p-니트로벤질 에스테라아제는 낮은 온도에서 자체의 촉매 활성이 저하되는 일 없이 유의적으로 (14℃ 초과 T_m 상승을 보이며) 안정화되었다. 본 연구는, 저온 활성을 유지하면서 열 안정성을 증가시키는 돌연변이가 일어나는 일은 매우 드물다는 것을 발견하였다. 아미노산 치환의 축적에 의한 개선 하나는, 통상적으로 이들 두 가지 특성들이 역의 상관관계에 있는지 아니면 전혀 상관성이 없는지 여부에 관계없이, 다른 하나를 대가로 달성되었다.
- [0007] 비정상 조건에서의 활성과 동일하거나 더 우수한 활성을 유지하면서, 보통의 작업 조건에서 모 폴리펩티드를 비활성 또는 사실상 비활성(50%, 30% 또는 10% 미만의 활성, 특히 1%의 활성)이 되도록 진화시키는 것은, 탈안정화 돌연변이(들)가, 탈안정화 효과에 반대작용을 하지 않는 활성 증가 돌연변이와 공존할 것을 필요로 한다. 탈안정화 돌연변이(들)는 Q10과 같은 표준 룰에 의해 예측되는 효과보다 큰 폴리펩티드의 활성을 감소시키므로, 예를 들어 정상 작업 조건 하에 덜 활성화되거나 비활성화되면서 비정상 조건에서 효율적으로 작업하는 단백질을 진화시키는 능력은, 조건부 활성 폴리펩티드를 제조해 낼 것으로 예측된다.
- [0008] 그러므로 조건부 활성 폴리펩티드는 비정상 조건에서 모 단백질과 비교되었을 때 활성 증가를 보이고, 정상 생리학적 조건에서는 모 단백질과 비교되었을 때 활성 감소를 보인다. 이 조건부 활성 폴리펩티드는, 치료용 단백질로 사용될 때, 바람직하게 비정상 조건이 조성된 병소, 예컨대 종양 미세환경에서 작용한다. 이와 같은 우선적인 작용의 결과로서, 조건부 활성 폴리펩티드는, 정상 생리학적 조건이 조성된 정상 조직/장기에 잠재적으로 덜 유해할 것이므로, 부작용도 덜 일으킬 것이다. 이는, 조건부 활성 폴리펩티드가 사용되는 치료가 더욱 오랜 시간 동안 수행될 수 있도록 허용하거나, 또는 조건부 활성 폴리펩티드의 사용 용량을 더 늘리는 것을 허용함으로써, 치료 효능을 더 높이는 결과를 초래한다.
- [0009] WO 2010/104821 및 WO 2011/009058은, 조건부 활성 단백질을 진화 및 스크리닝하기 위한 방법을 개시한다.
- [0010] 특정 환경 및/또는 특정 조건 하에서 더 높은 활성 및/또는 선택성을 보이는 조건부 활성 폴리펩티드는 여전히 필요한 실정이다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0011] 하나의 구현예에서, 본 발명은 분자량이 900 a.m.u. 미만이고, pKa가 제1 pH로부터 0.5, 1, 2 또는 4 유닛 이하 떨어져 있는 중 적어도 하나의 존재 하에 제1 pH에서 행하여진 검정에서의 활성 대 상기 종과 동일한 중 적어도 하나의 존재 하에 제2 pH에서 행하여진 검정에서의 활성의 비가 적어도 1.3인, 비 자연 발생 폴리펩티드 또는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다.
- [0012] 하나의 구현예에서, 본 발명은 분자량이 900 a.m.u. 미만인 중 적어도 하나의 존재 하에 제1 pH에서 행하여진 검정에서의 활성 대 상기 종과 동일한 중 적어도 하나의 존재 하에 제2 pH에서 행하여진 검정에서의 활성의 비가 적어도 1.3인, 비 자연 발생 폴리펩티드 또는 단리된 폴리펩티드로서, 상기 종의 pKa는 상기 제1 pH와 상기 제2 pH 사이인 비 자연발생 폴리펩티드 또는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다.
- [0013] 하나의 구현예에서, 본 발명은 히스티딘, 히스타민, 수소화 아데노신 이인산염, 수소화 아데노신 삼인산염, 시트르산염, 중탄산염, 아세트산염, 젖산염, 이황화물, 황화수소, 암모늄, 인산이수소 및 이것들의 임의의 조합으로부터 선택되는 종의 존재 하에 제1 pH에서 행하여진 검정에서의 활성 대 상기 종과 동일한 종의 존재 하에 제2 pH에서 행하여진 검정에서의 활성의 비가 적어도 1.3인, 비 자연 발생 폴리펩티드 또는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다.
- [0014] 상기 구현예들 중 임의의 것의 폴리펩티드의, 제1 pH에서 행하여진 검정에서의 활성 대 제2 pH에서 행하여진 검정에서의 활성의 비는 적어도 1.5, 또는 적어도 1.7, 또는 적어도 2.0, 또는 적어도 3.0, 또는 적어도 4.0, 또는 적어도 6.0, 또는 적어도 8.0, 또는 적어도 10.0, 또는 적어도 20.0, 또는 적어도 40.0, 또는 적어도 60.0, 또는 적어도 100.0일 수 있다. 상기 구현예들 중 임의의 것의 폴리펩티드는 제1 pH, 즉 산성인 pH와 제2 pH, 즉 알칼리성 또는 중성인 pH에서 검정될 수 있다. 제2 pH는, 피험체에 폴리펩티드가 투여되는 위치 또는 대상 폴리펩티드의 작용 위치가 있는 조직 또는 장기의 생리학적 조건의 정상 범위 안에 포함되는 정상 생리학적 pH일 수 있고, 제1 pH는 폴리펩티드 투여 위치 또는 폴리펩티드의 작용 위치가 있는 조직 또는 장기의 생리학적 조건의 정상 범위에서 벗어난 비정상 pH일 수 있다.
- [0015] 제1 pH는 5.5 ~ 7.2의 범위, 또는 6.2 ~ 6.8의 범위일 수 있다. 제2 pH는 7.2 ~ 7.6의 범위일 수 있다. 제1 pH는 약 6.0일 수 있으며, 제2 pH는 약 7.4일 수 있다.
- [0016] 상기 구현예들 중 임의의 것의 폴리펩티드는 모 폴리펩티드로부터 진화된 비 자연 발생 돌연변이 폴리펩티드일 수 있다. 상기 구현예들 중 임의의 것의 돌연변이 폴리펩티드는 비 자연 발생 폴리펩티드를 비롯하여 야생형 모 폴리펩티드로부터 유래할 수 있다. 상기 구현예들 중 임의의 것의 돌연변이 폴리펩티드는 모 폴리펩티드에 비하여 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 상기 구현예들 중 임의의 것의 돌연변이 폴리펩티드는 하전된 아미노산 잔기의 비율이 모 폴리펩티드보다 더 높을 수 있다.
- [0017] 상기 구현예들 중 임의의 것의 폴리펩티드 또는 돌연변이 폴리펩티드는 단백질 또는 단백질 단편일 수 있다. 상기 구현예들 중 임의의 것의 폴리펩티드 또는 돌연변이 폴리펩티드는 항체, 단일 사슬 항체 및 항체 단편으로부터 선택될 수 있고, 활성은 항원에 대한 결합 활성이다. 폴리펩티드 또는 돌연변이 폴리펩티드는 항체의 Fc 영역일 수 있다. 폴리펩티드 또는 돌연변이 폴리펩티드는 효소일 수 있고, 활성은 효소 활성일 수 있다. 폴리펩티드 또는 돌연변이 폴리펩티드는 수용체, 조절 단백질, 가용성 단백질, 시토카인, 그리고 이 수용체, 조절 단백질, 가용성 단백질 또는 시토카인의 단편으로부터 선택될 수 있다.
- [0018] 상기 구현예들 중 임의의 것의 종은 황화수소, 중탄산염 또는 이황화물일 수 있다. 상기 구현예들 중 임의의 것의 종의 pKa는 6.2보다 클 수 있다.
- [0019] 상기 구현예들 중 임의의 것의 폴리펩티드는 2개의 작용성 도메인을 가질 수 있고, 그 활성은 이 2개의 작용성 도메인 중 어느 하나의 활성이다. 작용성 도메인 2개 모두는 pH 의존적 활성을 가질 수 있다. 폴리펩티드는 이중 특이적 항체일 수 있다.
- [0020] 다른 구현예에서, 상기 구현예들 중 임의의 것의 폴리펩티드는 고형 종양, 염증성 관절, 또는 뇌 질환이나 장애의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0021] 다른 구현예에서, 본 발명은, 상기 구현예들 중 임의의 것의 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함하는, 고형 종양, 염증성 관절, 또는 뇌 질환이나 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 폴리펩티드는 이 폴리펩티드를 포함하는, T 세포에 대한 키메라 항원 수용체의 일부로서, 또는 나노입자에 결합되어, 또는 이 폴리펩티드를 포함

하는 항체-약물 접합체로서 투여될 수 있다.

- [0022] 다른 구현예에서, 본 발명은 본 폴리펩티드를 포함하는, T 세포에 대한 키메라 항원 수용체에 관한 것이다. 상기 구현예들 각각에 있어서, 폴리펩티드는 나노 입자에 결합될 수 있다.
- [0023] 다른 구현예에서, 본 발명은 본 폴리펩티드를 포함하는, 항체-약물 접합체에 관한 것이다.
- [0024] 다른 구현예에서, 본 발명은 조건부 활성 생체 단백질과 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0025] 다른 양상에서, 본 발명은
- [0026] (i) 모 폴리펩티드의 활성 위치의 외부 영역 적어도 하나를 돌연변이시켜 하나 이상의 돌연변이 폴리펩티드를 제조함으로써 모 폴리펩티드를 진화시키는 단계;
- [0027] (ii) 하나 이상의 폴리펩티드와 모 폴리펩티드를 대상으로 정상 생리학적 조건 하에서 제1 검정을 실시하여, 정상 생리학적 조건 하에서의 활성 위치의 활성을 측정하고, 비정상 조건 하에서 제2 검정을 실시하여 비정상 조건 하에서의 활성 위치의 활성을 측정하는 단계[다만 상기 정상 생리학적 조건과 비정상 조건은 동일한 조건이 되 변수의 값이 상이함]; 및
- [0028] (iii) (a) 제1 검정에서 모 폴리펩티드의 활성에 비하여 그 활성의 감소와, (b) 제2 검정에서 모 폴리펩티드의 활성에 비하여 그 활성의 증가 둘 다를 보이는 조건부 활성 폴리펩티드를 돌연변이 폴리펩티드 하나 이상으로부터 선택하는 단계
- [0029] 를 포함하는, 모 폴리펩티드로부터 조건부 활성 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은, 실시예 9에서 제조된 조건부 활성 항체와, 이 항체의 pH 7.4에서의 선택성에 비한 pH 6.0에서의 선택성을 보여준다.
- 도 2는, 상이한 완충 용액 중에서 검정된, 조건부 활성 항체의 항원에 대한 결합 활성을 보여준다.
- 도 3은, 크랩스 완충제 조성을 바꾸어주었을 때 조건부 활성 항체의 결합 활성에 미치는 영향을 보여준다.
- 도 4는, 실시예 12에 기술된 바와 같이, 3개의 상이한 조건부 활성 항체의 결합 활성이 pH 7.4에서 중탄산염의 농도와 그 존재에 의존하였음을 보여준다.
- 도 5는, 키메라 항원 수용체(CAR)의 구조를 보여주는 도해이다.
- 도 6은, 3개의 아미노산 잔기가 2개의 염 다리를 형성하여, 탈산소헤모글로빈의 T 4차 구조를 안정화함으로써, 산소에 대한 친화성 저하를 초래하는, 탈산소헤모글로빈 내 염 다리 형성을 보여주는 도해이다.
- 도 7은, 상이한 완충제 용액 중 Ror2에 대한 조건부 활성 항체의 활성을 보여준다.
- 도 8은, 상이한 완충제 용액 중 Ax1에 대한 조건부 활성 항체의 활성을 보여준다.
- 도 9는, 이황화물 이온 10 mM을 포함하는 검정 용액이 사용되었을 때 발견된, Ax1에 대한 조건부 활성 항체의 활성을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본원에 제공된 실시예들의 이해를 돕기 위하여, 자주 등장하는 임의의 방법들 및/또는 용어들이 본원에 정의될 것이다. 하기 용어들의 정의들은 미국 특허 제8,709,755 B2를 참조로 내려진다: "제제(agent)", "보호한 염기 요구조건", "아미노산", "증폭(amplification)", "키메라 특성(chimeric property)", "동족체(cognate)", "비교 윈도우(comparison window)", "보존적 아미노산 치환(conservative amino acid substitution)", "~에 상응하다", "분해 유효량", "한정된 서열 구조 틀", "한정된 서열 커널", "분해", "지향성 결찰(directional ligation)", "DNA 서플링", "약물(drug)" 또는 "약물 분자", "유효량", "에피토프(epitope)", "효소", "진화(evolution)" 또는 "진화시키는 것(evolving)", "단편(fragment)" 또는 "유도체(derivative)" 또는 "유사체(analog)", "단일 아미노산 치환의 완전 범위", "유전자(gene)", "유전적 불안정성", "비 상동성(heterologous)", "상동성(homologous)" 또는 "부분 상동성(homeologous)", "산업적 응용", "동일한" 또는 "동일성", "동일성의 구역", "단리된(isolated)", "단리된 핵산", "리간드", "결찰(ligation)", "링커(linker)"

또는 "스페이스(spacer)", "미세환경", "진화된 분자 특성", "돌연변이(mutation)", "N,N,G/T", "정상 생리학적 조건" 또는 "야생형 작동 조건", "핵산 분자", "핵산 분자", "~를 암호화하는 핵산 서열" 또는 "~의 DNA 암호화 서열" 또는 "~를 암호화하는 뉴클레오타이드", "효소(단백질)를 암호화하는 핵산" 또는 "효소(단백질)를 암호화하는 DNA" 또는 "효소(단백질)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드", "특이적 핵산 분자 중", "작업 핵산 샘플을 핵산 라이브러리로 조립하는 것", "핵산 라이브러리", "구성물", "올리고뉴클레오타이드"(또는 동의어로서 "올리고"), "상동성", "작동 가능하게 결합된", "모 폴리뉴클레오타이드 세트", "환자(patient)" 또는 "피험체(subject)", "생리학적 조건", "군집(population)", "프로폼(pro-form)", "의사랜덤(pseudorandom)", "유사 반복 단위(quasi-repeated unit)", "랜덤 펩티드 라이브러리", "랜덤 펩티드 서열", "수용체", "재조합(recombinant)" 효소, "합성" 효소, "관련된 폴리뉴클레오타이드", "환원 재편성(reductive reassortment)", "기준 서열", "반복 지수(RI)", "제한 위치", "선별성 폴리뉴클레오타이드", "서열 동일성", "유사성", "특이적으로 결합하다", "특이적 잡종화(specific hybridization)", "특이적 폴리뉴클레오타이드", "엄격한 잡종화 조건", "실질적으로 동일한", "실질적으로 순수한 효소", "실질적으로 순수한", "치료하는 것(treating)", "가변성 분절(variable segment)" 및 "변이체".

[0032] 측정된 양과 관련하여 본원에 사용되는 바와 같이, "약"이라는 용어는 측정을 이루고 측정의 대상 및 사용되는 측정 기기의 정밀도에 상응하여 일정 수준의 주의를 기울이는 당업자에 의해 예측될, 측정된 양의 정상적인 변차를 지칭한다. 다른 식으로 나타내지 않은 한, "약"은 제공되는 값의 $\pm 10\%$ 의 변차를 지칭한다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같은 "활성"이라는 용어는, 반응을 촉매화하는 것 및 파트너와 결합하는 것을 비롯하여 단백질이 수행할 수 있는 임의의 기능을 지칭한다. 효소에 있어서 그 활성은 해당 효소의 효소적 활성일 수 있다. 항체에 있어서 그 활성은 항체와 이의 항원(들) 사이의 결합 활성(즉 결합 친화성)일 수 있다. 수용체 또는 리간드에 있어서 그 활성은 수용체와 이의 리간드 사이의 결합 친화성일 수 있다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같은 "항체"라는 용어는, 항원의 에피토프에 결합할 수 있는, 비변형 면역글로불린 분자뿐만 아니라, 이 면역글로불린 분자의 단편들, 예컨대 Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, 및 SCA 단편들을 지칭한다. 이러한 단편의 기원인 항체의, 항원(예컨대 폴리펩티드 항원)에 선택적으로 결합하는 능력을 약간 가지고 있는 이들 항체 단편은 당 분야에 널리 공지된 방법들을 이용하여 제조될 수 있고(예컨대 문헌(Harlow and Lane, 상동) 참조), 이에 관하여는 이하에 더 기술되어 있다. 항체는 면역친화성 크로마토그래피에 의해 예비량만큼의 항원을 분리하는데에 사용될 수 있다. 이러한 항체의 기타 다양한 용도로서는, 질환(예컨대 종양형성)을 진단하고/진단하거나 병기를 확인하는 것과, 예를 들어 종양형성, 자가면역성 질환, AIDS, 심혈관 질환 및 감염 등과 같은 질환을 치료하는 치료적 적용을 위한 것이 있다. 키메라, 인간 유사, 인간화 또는 완전 인간의 것인 항체가 인간인 환자에 투여되는데에 특히 유용하다.

[0035] Fab 단편은 항체 분자의 1가 항원 결합 단편으로 이루어져 있고, 전 항체 분자를 파페인 효소로 분해하여, 비변형 경쇄와 중쇄의 일부로 이루어진 단편을 생성함으로써 제조될 수 있다.

[0036] 항체 분자의 Fab'단편은, 전 항체 분자를 펩신으로 처리한 후, 환원시켜, 비변형 경쇄와 중쇄의 일부로 이루어진 분자를 만듦으로써 수득될 수 있다. 2개의 Fab'단편은 이러한 방식으로 처리된 항체 분자당 수득된다.

[0037] 항체의 (Fab')₂ 단편은, 전 항체 분자를 펩신 효소로 처리하되, 이에 후속하여 환원은 진행시키지 않음으로써 수득될 수 있다. (Fab')₂ 단편은 Fab' 단편 2개가 이황화 결합 2개로 서로 결합된 이량체이다.

[0038] Fv 단편은 2개의 사슬로서 발현된 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역을 함유하도록 유전자 조작된 단편으로서 정의된다.

[0039] 단일 사슬 항체("SCA" 또는 scFv)는 적합하고 가요성인 폴리펩티드 라이너에 의해 결합된, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 함유하도록 유전자 조작되었고, 아미노 말단 및/또는 카르복시 말단에 부가의 아미노산 서열들을 포함할 수 있는 단일 사슬 분자이다. 예를 들어 단일 사슬 항체는, 암호화 폴리뉴클레오타이드와의 결합을 위한 테더 절편(tether segment)을 포함할 수 있다. 작용성 단일 사슬 항체는, 일반적으로 경쇄 가변 영역의 충분한 부분과, 중쇄 가변 영역의 충분한 부분을 함유하므로, 특이 표적 분자 또는 에피토프에의 결합을 위한 전장 항체의 특성을 보유한다.

[0040] "항체 의존적 세포 매개 세포 독성" 또는 "ADCC"라는 용어는, 분비된 면역글로불린이, 임의의 세포 독성 세포(예를 들어 자연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 제시된 Fc 수용체(FcR)들과 결합될 때 나타나는 것으로서, 세포 독성 효과기 세포가 항원 보유 표적 세포와 특이적으로 결합될 수 있도록 만들어, 추후 세포 독소

로 표적 세포를 사멸할 수 있는 세포 독성의 한 형태를 지칭한다. 표적 세포의 표면에 대하여 유도된 리간드 특이적 고 친화성 IgG 항체는 세포 독성 세포를 자극하고, 이와 같은 사멸에 요구된다. 표적 세포의 용해는 세포 외에서 일어나는데, 이에선 직접적인 세포 대 세포의 접촉이 필요하되 보체는 관여하지 않는다.

[0041] 어떤 특정 항체가 ADCC에 의한 표적 세포의 용해를 매개하는 능력이 검증될 수 있다. ADCC 활성을 평가하기 위해, 관심 있는 항체는, 항원-항체 복합체에 의해 활성화되어 표적 세포의 세포 용해를 초래할 수 있는 면역 효과기 세포와 함께, 표적 리간드를 전시하는 표적 세포에 가하여진다. 세포 용해는 보통 표지(예를 들어 방사성 기질, 형광 염료 또는 자연 세포 내 단백질)의 용해된 세포로부터의 방출에 의해 검출된다. 이러한 검정에 유용한 효과기 세포는 말초혈액 단핵구 세포(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포를 포함한다. 시험관 내 ADCC 검정의 구체 예는 문헌[Bruggemann et al, 1987, J. Exp. Med., vol. 166, page 1351 ; Wilkinson et al, 2001, J. Immunol. Methods, vol. 258, page 183; Patel et al, 1995 J. Immunol. Methods, vol. 184, page 29(상기 문헌 각각은 참고문헌으로 인용됨)]에 기술되어 있다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 관심 있는 항체의 ADCC 활성은 문헌[Clynes et al, 1998, PNAS USA, vol. 95, page 652]에 개시된 바와 같이, 생체 내에서, 예를 들어 동물 모델 내에서 평가될 수 있다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같은 "항원" 또는 "Ag"란 용어는, 면역 반응을 촉발할 수 있는 분자로서 정의된다. 이 면역 반응은 항체 생성, 또는 면역학적으로 유능한 특이 세포의 활성화를 수반할 수 있거나, 아니면 이 둘 다를 수반할 수 있다. 당 업자는 임의의 거대 분자, 예컨대 실질적으로 모든 단백질 또는 펩티드가 항원으로 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 항원은 생체 샘플로부터 생성, 합성 또는 유래할 수 있음을 용이하게 알 수 있다. 이러한 생체 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생체 유체를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같은 "안티센스 RNA"라는 용어는, 제2 RNA 분자와의 상보성 또는 부분 상보성으로 말미암아 이 제2 RNA 분자와 이중체를 형성할 수 있는 RNA 분자를 지칭한다. 안티센스 RNA 분자는 제2 RNA 분자의 번역 또는 비번역 영역과 상보성일 수 있다. 인티센스 RNA는 제2 RNA 분자와 완벽하게 상보성일 필요는 없다. 안티센스 RNA의 길이는 제2 RNA 분자의 길이와 동일할 수 있거나 그렇지 않을 수 있는데; 안티센스 RNA 분자는 제2 RNA 분자보다 더 길거나 더 짧을 수 있다. 만일 제2 RNA 분자가 mRNA이면, 안티센스 RNA의 결합은, mRNA가 기능성 단백질 생성물로 번역되는 것을 막을 것이다.

[0044] "바이오시밀러(biosimilar)" 또는 "팔로우-온 바이오로직(follow-on biologic)"이라는 용어는, (임상적으로 비활성인 성분들과 별로 크지 않은 차이에도 불구하고) 기준 제품과 "매우 유사한" 제품인 것으로서 바이오시밀러를 정의하는, 미국 식품의약국(FDA)에 의해 공포된 작업적 정의와 일관된 양상으로 사용된다. 실제로, 기준 제품과 바이오시밀러 제품 간에는 안전성, 순도 및 효능의 관점에서 임상적으로 유의미한 차이가 없을 수 있다(Public Health Service (PHS) Act § 262). 바이오시밀러는 또한 유럽 의약청 산하 약물사용자문위원회(CHMP)에 의해 2012년 5월 30일 채택되고, 유럽 연합에 의해 공포된 가이드라인("Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues" (서류 참조번호 EMA/CHMP/BMWP/403543/2010)) 중 하나 이상을 만족시키는 것일 수도 있다. 예를 들어 "바이오시밀러 항체"란, 통상 상이한 회사들에 의해 제조된, 처음 개발된 항체(기준 항체)의 후발 항체를 지칭한다. 바이오시밀러 항체와 기준 항체 간 차이들로서는, 예컨대 항체에 다른 생화학적 기, 예컨대 인산염, 다양한 지질 및 탄수화물을 부착하거나; 번역 후 단백질 분해 절단에 의하거나; 아미노산의 화학적 성질을 바꾸거나(예컨대 포름일화); 또는 기타 다수의 기구에 의해 이루어진 번역 후 변형을 포함할 수 있다. 또 다른 번역 후 변형은 제조 공정 수행의 결과일 수 있는데, 예를 들어 당화 반응은 환원제에 생성물이 노출될 때 이루어질 수 있다. 몇몇 경우들에 있어서, 저장 조건은 임의의 분해 경로, 예컨대 산화, 탈아미드화 또는 응집이 일어나는 것을 허용할 수 있다. 이와 같은 생성물 유관 변이체 모두만큼은 바이오시밀러 항체에 포함될 수 있다.

[0045] "암" 및 "암성의"라는 용어는, 통상적으로 비 조절성 세포 성장/증식에 의해 특징지어지는, 포유동물 내 생리학 적 병태를 지칭하거나 기술한다. "종양"은 하나 이상의 암성 세포를 포함한다. 암의 예는 암종, 림프종, 아세포종, 육종 및 백혈병이나 악성 림프종을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 암의 더욱 구체적인 예는 편평세포 암(예를 들어 상피 편평세포 암), 폐암, 예를 들어 소세포 폐암, 비소세포 폐암("NSCLC"), 폐의 선암종, 그리고 폐의 편평상피암, 복막 암, 간세포 암, 위장 또는 위 암, 예를 들어 위장관 암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 콩팥 또는 신장의 암, 전립선암, 외음부 암, 갑상샘 암, 간암종, 항문 암, 음경암, 그리고 두경부암을 포함한다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같은 "키메라 항원 수용체"또는 "CAR" 또는 "CARs"란 용어는, 항원 특이성을 세포 독성 세

포, 예컨대 T 세포, NK 세포 및 대식세포에 접목하도록 조작된 수용체를 지칭한다. 본 발명의 CAR은 적어도 하나의 항원 특이적 표적화 영역(ASTR), 세포 외 스페이스 도메인(ESD), 경막 도메인(TM), 하나 이상의 보조 자극 도메인(CSD), 그리고 세포 내 신호전달 도메인(ISD)을 포함할 수 있다. 몇몇 구현예들에서, ESD 및/또는 CSD는 선택적이다. 하나의 구현예에서, ASTR은 이중 특이적으로서, 2개의 상이한 항원 또는 에피토프를 인지할 수 있다. ASTR이 표적 항원에 특이적으로 결합한 후, ISD는 세포독성 세포의 세포 내 신호전달을 활성화한다. 예를 들어 ISD는, CAR의 항원 결합 특성에 의지하면서, T 세포 특이성과 세포독성을 선택된 표적을 향하여 비 MHC 제한 방식으로 재유도할 수 있다. 비 MHC 제한 항원 인지는, 항원 가공과는 독립적으로, CAR을 발현하는 세포독성 세포에게 항원을 인지하는 능력을 제공하여, 종양이 자신의 주요 도피 기구를 우회하도록 만든다. 더욱이 CAR이 T 세포 내에서 발현되면, 이 CAR은 내인성 T 세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 사슬과 이량체를 형성하지 않는 것이 유리하다.

[0047] "조건부 활성 폴리펩티드"라는 용어는, 적어도 하나의 조건 하에서 모 폴리펩티드보다 활성이 더 크고, 제2의 조건 하에서는 모 폴리펩티드보다 활성이 더 작은, 모 폴리펩티드의 변이체 또는 돌연변이체를 지칭하거나, 또는 제1 조건 하에서는 제2 조건 하에서보다 적어도 1.3배 더 활성인, 모 폴리펩티드의 변이체 또는 돌연변이체를 지칭한다. 이 조건부 활성 폴리펩티드는 몸의 1군데 이상의 병소에서 활성을 보일 수 있고/있거나 몸의 다른 병소에서 증가 또는 감소한 활성을 보일 수 있다. 예를 들어 하나의 양상에서, 진화된 조건부 활성 생체 단백질은 실질적으로 체온에서는 비활성이지만, 체온보다 더 낮은 온도에서는 활성이다. 조건부 활성 폴리펩티드는 조건부 활성 단백질, 단백질 단편, 항체, 항체 단편, 효소, 효소 단편, 수용체 및 수용체 단편, 시토카인 및 이의 단편, 호르몬 및 이의 단편, 리간드 및 이의 단편, 조절 단백질 및 이의 단편, 성장 인자 및 이의 단편, 그리고 스트레스 단백질, 볼트(vault) 관련 단백질, 뉴런 단백질, 소화관 단백질, 성장 인자, 미토콘드리아 단백질, 세포기질 단백질, 동물 단백질, 구조 단백질, 식물 단백질, 그리고 이러한 단백질들 중 임의의 것의 단편을 비롯한 단백질을 포함한다. 본원에 기술된 조건부 활성 폴리펩티드 각각은, 바람직하게 조건부 활성 생체 폴리펩티드이다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같이 "시토카인" 또는 "시토카인들"이란 용어는, 면역 계 세포를 작동시키는/면역 계 세포에 영향을 미치는 생체 분자의 일반 군을 지칭한다. 이 정의는 개체의 면역 반응을 조절 또는 조정하기 위해, 혈행을 통하여 분비 위치로부터 떨어져 있는 다른 병소들에서 작용하거나 국소 작용하는 생체 분자들을 포함하되, 이에 한정되는 것은 아닌 의미이다. 예시적 시토카인은 인터페론-알파(IFN- α), 인터페론-베타(IFN- β) 및 인터페론 감마(IFN- γ), 인터루킨(예컨대 IL-1 내지 IL-29, 구체적으로 IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15 및 IL-18), 종양 괴사 인자(예컨대 TNF-알파 및 TNF-베타), 적혈구 생성 촉진 인자(EPO), MIP3a, 단핵구 주화성 단백질(MCP)-1, 세포 내 부착 분자(ICAM), 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF) 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같이, "전해질"이란 용어는 전하를 운반하는, 혈액 또는 기타 체액 중 무기물을 정의하는데 사용된다. 예를 들어 하나의 양상에서, 정상 생리학적 조건과 비정상 조건은 "전해질 농도" 값이 상이할 수 있다. 예시적 전해질로서는 이온화된 칼슘, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 염화물, 시트르산염, 젖산염, 중탄산염 및 인산염을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] "전장 항체"란 용어는, 항원 결합 가변 영역(VH 또는 VL)과 경쇄 불변 도메인(CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 항체를 지칭한다. 불변 도메인들은 원산 서열 불변 도메인(예를 들어 인간 원산 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 전장 항체 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서, 이 전장 항체는 상이한 "군들"로 할당될 수 있다. 전장 항체에는 5개의 주요 군(IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)이 있으며, 이것들 중 몇몇은 "하위 군"(동 기준 표본), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가로 구분될 수 있다. 항체의 상이한 군들에 상응하는 중쇄 불변 도메인들은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 칭하여진다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같은 "성장 인자"라는 용어는, 세포의 분화를 유발할 수 있는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 성장 인자의 예들로서는 상피 성장 인자(EGF), 형질전환 성장 인자-알파(TGF- α), 형질전환 성장 인자-베타(TGF- β), 인간 내피 세포 성장 인자(ECGF), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 골 형성 단백질(BMP), 신경 성장 인자(NGF), 혈관 내피 성장 인자(NEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 인슐린 유사 성장 인자(IGF), 연골 유래 골 형성 단백질(CDMP), 그리고 혈소판 유래 성장 인자(PDGF)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같은 "호르몬"이란 용어는, 통상적으로 유기체의 일 부분의 세포나 샘에 의해 방출되어 유

기체의 다른 부분에 대한 전령으로서 작용하는 매개체로서 종종 정의되는 물질을 지칭한다. 예시적 호르몬으로서, 직접 혈류로 방출되는 내분비 호르몬과, 직접 관으로 분비되었다가, 이 관으로부터 혈류로 흘러가거나, 아니면 측분비 신호전달(paracrine signaling)이라고 공지된 과정 중에 확산에 의해 세포에서 세포로 흘러가는 외분비 호르몬(또는 엑토히르몬(ectohormone))을 포함한다. 척추동물의 호르몬은 3개의 화학 군, 즉 펩티드 호르몬, 지질 및 인지질 유래 호르몬, 그리고 모노아민으로 범주화될 수 있다. 펩티드 호르몬은 폴리펩티드 사슬들로 이루어져 있다. 펩티드 호르몬의 예들로서는 인슐린과 성장 호르몬을 포함한다. 지질 및 인지질 유래 호르몬은 지질, 예컨대 리놀레산 및 아라키돈산, 그리고 인지질로부터 유래한다. 주요 군은 콜레스테롤과 에이코사노이드로부터 유래하는 스테로이드 호르몬이다. 스테로이드 호르몬의 예들로서는 테스토스테론과 코르티솔이 있다. 모노아민은 방향족 아미노산 탈 카르복실화 효소의 작용에 의해 방향족 아미노산, 예컨대 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판으로부터 유래한다. 모노아민의 예들로서는 티록신과 아드레날린이 있다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같이, "면역 조절제"란 용어는, 자체의 면역 계에 대한 작용이, 면역 반응에 수반되는 경로 적어도 하나의 작동의 즉시 또는 지연 항진 또는 감소를 유도하는 제제를 지칭한다. 이러한 반응은 선천성 면역 계 또는 적응성 면역 계, 아니면 이 둘 다의 일환으로서 자연 발생될 수 있거나 또는 인공적으로 촉발될 수 있다. 면역 조절제의 예들은 시토키인, 줄기 세포 성장 인자, 림프독소, 예컨대 종양 괴사 인자(TNF) 및 조혈 인자, 예컨대 인터루킨(예컨대 인터루킨-1(IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 및 IL-21), 콜로니 자극 인자(예컨대 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF) 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)), 인터페론(예컨대 인터페론- α , - β 및 - γ), "S1 인자"라 지칭되는 줄기 세포 성장 인자, 적혈구 생성 촉진 인자 및 혈소판 생성 촉진 인자를 포함한다. 적합한 면역 조절제 기의 예들로서는 IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, 인터페론 및 TNF(예컨대 TNF- α) 등을 포함한다.

[0054] "개체" 또는 "피험체"는 포유동물이다. 포유동물은 가축(예를 들어 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어 인간 및 인간 이외의 영장류, 예를 들어 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들어 마우스 및 랫트)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 임의의 구현예들에서, 개체 또는 피험체는 인간이다.

[0055] 본원에 사용된 바와 같은 "라이브러리"란 용어는, 단일 풀 내 단백질들의 무리를 지칭한다. 예를 들어 cDNA들 또는 임의의 기타 단백질 암호화 DNA들의 무리는 발현 벡터에 삽입될 수 있으며, 그 결과 단백질 라이브러리가 제조된다. 발현 벡터는 플라스미드, 코스미드, 인공 염색체 및 바이러스 발현 벡터로부터 선택될 수 있다. cDNA 또는 단백질 암호화 DNA의 무리는 또한 파지 게놈에 삽입될 수 있으며, 그 결과 야생형 단백질의 박테리오파지 전사 라이브러리가 제조된다. cDNA의 무리는 선택된 세포 군집 또는 조직 샘플로부터, 예를 들어 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989]에 개시된 방법들에 의하여 제조될 수 있다. 선택된 세포 유형들로부터 유래한 cDNA 무리는 또한 Stratagene®과 같은 업체로부터 시판되고 있다. 본원에 사용된 바와 같은 야생형 단백질의 라이브러리는 생체 샘플의 무리가 아니다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "리간드"란, 특정 수용체에 의해 인지되어, 하나 이상의 결합 위치에서 수용체와 특이적으로 결합하는 분자를 지칭한다. 리간드의 예들로서는 세포 막 수용체에 대한 효현제 및 길항제, 독소 및 독, 바이러스 에피토프, 호르몬, 호르몬 수용체 펩티드, 효소, 효소 기질, 보조 인자, 약물(예컨대 아편, 스테로이드 등), 렉틴, 당, 폴리뉴클레오타이드, 핵산, 올리고당체, 단백질 및 모노클로날 항체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 통상적으로 리간드는 2개의 구조 부, 즉 리간드와 이 리간드의 수용체와의 결합에 수반되는 제1 부, 그리고 이러한 결합에 수반되지 않는 제2 부를 포함한다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같은 "수용체"라는 용어는, 소정의 리간드에 대한 친화성을 갖는 분자를 지칭한다. 수용체는 자연발생 또는 합성 분자일 수 있다. 수용체는 비 변경 상태로 또는 다른 종과의 응집체로서 사용될 수 있다. 수용체는 직접 또는 특이적 결합 성분을 통해 결합 원에 공유 또는 비 공유 결합될 수 있다. 수용체의 예는 특이적 항원결정기(예를 들어 바이러스, 세포 또는 다른 물질에 대한 항원결정기)와 반응성인 모노클로날 항체 및 항혈청을 포함하는 항체, 세포막 수용체, 복합 탄수화물 및 당단백, 효소 및 호르몬 수용체를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 리간드와 이 리간드의 수용체의 결합이란, 리간드 및 이 리간드의 수용체 분자의 조합이 특이적 분자 인지를 통하여 이루어져, 당 업자에게 공지된 다양한 리간드 수용체 결합 검정에 의해 검출될 수 있는 복합체를 형성하는 것을 말한다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같은 "마이크로RNA" 또는 "miRNA"란 용어는, miRNA 유전자로부터 유래하는 미가공 또는 가공 RNA 전사체를 지칭한다. 미가공 마이크로RNA 유전자 전사체는, 통상적으로 길이 약 70개 내지 약 100개 뉴클레오타이드인 RNA 전사체를 포함한다. 전사된 마이크로RNA는 RNase(예컨대 Dicer, Argonaut 또는 RNase III)에 의한 분해에 의해 활성 RNA 분자(19개 ~ 25개 뉴클레오타이드)로 가공될 수 있다. 이 19개 ~ 25개 뉴클레오타이드의

활성 RNA 분자는 또한 "가공된" 마이크로RNA 유전자 전사체 또는 "성숙한" 마이크로RNA라고 칭하여지기도 한다.

- [0059] 본원에 사용되는 바와 같이, "다중 특이적 항체(multispecific antibody)"라는 용어는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 가지는 항체이다. 예시적 다중 특이 항체는 BBB-R과 뇌 항원 둘다와 결합할 수 있다. 다중 특이적 항체(예를 들어 F(ab')₂ 이중 특이적 항체)는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다. 2개, 3개 또는 그 이상의(예를 들어 4개의) 작용성 항원 결합 위치를 가지도록 조작된 항체도 고려된다(예를 들어 미국 특허 공고 2002/0004587 A1 참조). 다중 특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.
- [0060] 본원에 사용된 바와 같은 "나노 입자"란 용어는, 그 크기가 나노미터(nm) 규모이되, 최장 선형 차원이 약 1000 nm 미만, 또는 약 500 nm 미만, 또는 약 200 nm 미만, 또는 약 100 nm 미만, 또는 약 50 nm 미만인 현미경적 입자를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "선형 차원"이란, 나노 입자상 직선으로 측정되는 임의의 두 지점 간 거리를 지칭한다. 본 발명의 나노 입자의 형태는, 이 나노 입자의 형태와 크기가 결합 상호작용을 허용하는 한, 울퉁불퉁할 수 있거나, 장방형, 방추형, 막대형, 원반형, 팬케이크형, 원통형, 적혈구 유사형, 구형 또는 실질적으로 구형일 수 있다. 본 발명의 나노 입자는, 바람직하게 생체 적합성 재료(중합체 또는 지질)로 제조된다.
- [0061] 대상물에 응용되는 것과 같이 본원에 사용되는 "자연 발생"이라는 용어는, 대상물이 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 지칭한다. 예를 들어 자연에서 공급원으로부터 단리될 수 있는 유기체(바이러스 포함) 중에 존재하고, 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연 발생의 것이다. 절단된 폴리펩티드의 말단 기들은 더 이상 인접 폴리펩티드에 결합하지 않을 것이기 때문에, 이 절단된 폴리펩티드의 말단 기들은 절단된 형태로서, 크기가 더 큰 자연 발생 폴리펩티드의 말단 기들과는 상이할 것이므로, 크기가 더 큰 폴리펩티드로부터 절단된 폴리펩티드는 자연 발생 폴리펩티드가 아니다. 일반적으로, 자연 발생이라는 용어는, 종에 대해 대표적인 바와 같이 비 병리학적(비 질병) 개체 중에 대상물이 존재함을 의미한다.
- [0062] 본원에 사용된 바와 같은 "모 폴리펩티드" 및 "모 단백질"이란 용어는, 본 발명의 방법이 사용되어 진화되는 결과, 조건부 활성 폴리펩티드 또는 단백질로 제조될 수 있는 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다. 모 폴리펩티드 단백질은 비 자연 발생 단백질을 비롯하여 야생형 단백질일 수 있다. 예를 들어 치료용 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 돌연변이 또는 변이 폴리펩티드 또는 단백질은 모 폴리펩티드 또는 단백질로서 사용될 수 있다. 모 폴리펩티드 및 단백질의 예들로서는 항체, 항체 단편, 효소, 효소 단편, 시토키인 및 이의 단편, 호르몬 및 이의 단편, 리간드 및 이의 단편, 수용체 및 이의 단편, 조절 단백질 및 이의 단편, 그리고 성장 인자 및 이의 단편을 포함한다.
- [0063] 본원에 사용된 바와 같은 "pH-의존적"이란 용어는, 어떤 폴리펩티드가 상이한 값의 pH에서 상이한 특성 또는 활성을 가지게 되는 경향을 의미한다.
- [0064] 본원에 사용된 바와 같은 "폴리펩티드"란 용어는, 아미노산인 단량체들이 펩티드 또는 이황화물 결합을 통해 서로 연결된 중합체를 지칭한다. "폴리펩티드"란, 전장 자연 발생 아미노산 사슬 또는 이의 단편, 돌연변이체 또는 이의 변이체, 예를 들어 결합 상호작용에서 관심 있는 아미노산 사슬의 선택된 영역을 지칭한다. 폴리펩티드는 또한 합성 아미노산 사슬 또는 자연 발생 아미노산 사슬이나 이의 단편의 조합, 그리고 합성 아미노산 사슬일 수도 있다. 단편이란, 전장 단백질의 일부분으로서, 통상적으로 길이가 약 8개 아미노산 내지 약 500개 아미노산, 바람직하게 약 8개 아미노산 내지 약 300개 아미노산, 더욱 바람직하게 약 8개 아미노산 내지 약 200개 아미노산, 그리고 더욱더 바람직하게 약 10개 아미노산 내지 약 50개 또는 100개 아미노산인 아미노산 서열일 것이다. 추가로, 자연 발생 아미노산 이외의 아미노산, 예를 들어 β-알라닌, 페닐 글리신 및 호모아르기닌도 본 폴리펩티드에 포함될 수 있다. (유전자에 의해 암호화되는 것이 아닌) 보통 마주치는 아미노산도 또한 이 폴리펩티드에 포함될 수 있다. 아미노산은 D-광학 이성체 또는 L-광학 이성체 중 어느 하나일 수 있다. D-이성체는 이하에 추가로 기술된 구체적인 내용 중에 사용되기에 바람직하다. 추가로, 예를 들어 폴리펩티드 링커 서열들 중 기타 펩티도모의체도 또한 유용하다[Spatola, 1983, in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Weinstein, ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 참조]. 일반적으로 "단백질"이란 용어는, 공유 또는 비 공유 결합에 의해 서로 결합된 폴리펩티드 사슬 2개 또는 수개 포함하는 구조를 포함하는 이외에, 용어 "폴리펩티드"와 임의의 유의적인 차이를 전달하도록 의도되지는 않는다.
- [0065] 본원에 사용되는 바와 같은 "재조합 항체"라는 용어는, 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 숙주 세포에 의해 발현되는 항체(예를 들어 키메라, 인간화 또는 인간 항체, 또는 이의 항원 결합 단편)를 지칭한다. 재조합 항체를 제조하기 위한 "숙주 세포"의 예들은, (1) 포유동물 세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO), COS, 골수종 세포(Y0 및 NS0 세포 포함), 햄스터 새끼 신장(BHK), Hela 및 Vero 세포; (2) 곤충 세포, 예를 들어 sf9,

sf21 및 Tn5; (3) 식물 세포, 예를 들어 니코티아나(*Nicotiana*) 속에 속하는 식물(예를 들어 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*)); (4) 효모 세포, 예를 들어 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속에 속하는 세포(예를 들어 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)) 또는 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속에 속하는 세포(예를 들어 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)); (5) 박테리아 세포, 예를 들어 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 세포 등을 포함한다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같은 "조절 단백질"이란 용어는, 다른 폴리펩티드 또는 RNA 분자의 활성을 증가 또는 감소 시키고; 다른 폴리펩티드 또는 RNA 분자의 존재비를 증가 또는 감소시키며; 다른 폴리펩티드 또는 RNA 분자와 또 다른 폴리펩티드, DNA 또는 RNA 분자, 또는 또 다른 임의의 결합 기질과의 상호작용을 변경하고/변경하거나; 다른 폴리펩티드 또는 RNA 분자의 세포 내 지점을 변경하는 임의의 단백질을 지칭한다. 조절 단백질이 유전자의 전사 속도를 증가 또는 감소시킬 때, 이 조절 단백질은 종종 유전자의 프로모터 또는 인핸서 영역에 영향을 미치는 전사 인자라고 지칭된다. 전사 인자의 예들로서는 포유동물 전사 인자, 예컨대 NFκB, NF1, 환형 AMP 반응성 요소 결합 단백질(CREB), MyoD1, 호메오박스(homeobox) 전사 인자, Sp1, 발암유전자 및 jun, Mep-1, GATA-1, Isl-1, LFB 1, NFAT, Pit- 1, OCA-B, Oct-1 및 Oct-2, 효모 A/α, cErb-A, myc, mad 및 max, p53, mdm1, 그리고 문헌[Latchman, 1998, Eukaryotic Transcription Factors, 3rd. Ed., Academic Press: New York]에 제시된 기타의 것들을 포함한다. 이러한 전사 인자 또는 기타 전사 인자들의 융합 단백질 유도체도 또한 사용될 수 있는데, 다만 이 경우 결합 특이성을 제공하는, 융합 단백질의 최소한의 DNA 결합 모티프는 소 분자 조절 인자 결합 위치에 융합된다.

[0067] 본원에 사용된 바와 같은 "소형 간섭 RNA" 또는 "siRNA"란, 이 siRNA와 서열 상동성을 공유하는 mRNA 분자와 상호 작용하여 이의 파괴를 초래할 수 있는, RNA 또는 RNA 유사 분자를 지칭한다(Elbashir et al., Genes Dev, vol. 15, pp.188-200, 2001). siRNA는 RNA 유도성 침묵 복합체(RISC)로 공지된 리보핵단백질 복합체에 통합될 수 있는 것으로 생각된다. 이 RISC는 siRNA 서열을 사용하여, 통합된 siRNA 가닥과 적어도 부분적으로 상보적인 mRNA 분자를 찾아낸 다음, 표적 mRNA 분자를 절단하거나 이 mRNA 분자의 번역을 억제한다. 통상적인 siRNA는 이중 가닥의 핵산 분자로서, 각각의 가닥은 약 19개 내지 약 28개의 뉴클레오티드(즉 약 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28개의 뉴클레오티드)를 가진다. siRNA는 단일 가닥 RNA일 수도 있는데, 다만 이 단일 가닥 siRNA는 이중 가닥 siRNA보다는 덜 효율적이다. 단일 가닥 siRNA의 길이는 약 19개 내지 약 49개 뉴클레오티드이다. 단일 가닥 siRNA는 5'에 인산염을 가지거나, 5'자리가 현장에서 또는 생체 내에서 인산화된다. 단일 가닥 siRNA는 화학적으로 합성될 수 있거나, 또는 시험관 내 전사에 의해 합성될 수 있거나, 또는 발현 벡터나 발현 카세트로부터 내부 발현될 수 있다. 5' 인산염기는 키나아제를 통하여 부가될 수 있거나, 또는 RNA의 뉴클레아제 절단의 결과물일 수 있다.

[0068] "소 분자"란 용어는, 통상적으로 분자량이 900 a.m.u. 미만이거나, 더욱 바람직하게는 분자량이 500 a.m.u. 미만이거나, 또는 더욱 바람직하게는 분자량이 200 a.m.u. 미만이거나, 또는 더욱더 바람직하게는 분자량이 100 a.m.u. 미만인 분자나 이온을 지칭한다. 본 발명의 검정 및 환경에 있어 소 분자는, 주로 검정 또는 환경의 pH에 따라, 종종 분자와 이 분자의 탈양성자화된 이온의 혼합체로서 존재할 수 있다.

[0069] 본원에 사용된 바와 같이 "치료용 단백질"이란 용어는, 예를 들어 연구자나 임상의에 의해 구하여지고 있는 인간, 동물, 계 또는 조직의 생체 반응 또는 의학 반응을 유도하기 위하여 포유동물에 투여될 수 있는 임의의 단백질 및/또는 폴리펩티드를 지칭한다. 치료용 단백질은 1가지를 초과하는 생체 반응 또는 의학 반응을 유도할 수 있다. 치료용 단백질의 예들로서는, 항체, 효소, 호르몬, 시토카인, 조절 단백질 및 이의 단편들을 포함한다.

[0070] 본원에 사용된 바와 같이 "치료적 유효량"이란 용어는, 임의의 양이 투여되지 않은 피험체와 비교되었을 때 그 만큼의 양이 투여된 피험체에서 질환, 장애 또는 부작용의 치유, 예방 또는 완화, 질환 또는 장애의 진행 속도의 감소를 초래하는 임의의 양을 의미한다. 상기 용어는, 또한 정상 생리학적 기능을 향상시키는데 유효한 양의 범위를 포함할 뿐만 아니라, 환자에서 제2 약학 제제의 치료 효과를 향상시키거나 도와주는 생리학적 기능을 달성하는데에 유효한 양도 포함한다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같이 "종양 미세환경"이란 용어는, 종양 세포의 성장과 전이를 지원하는, 고형 종양 내부 및 고형 종양 주변의 미세환경을 지칭한다. 종양 미세환경은 주변 혈관, 면역 세포, 섬유아세포, 기타 세포, 가용성 인자, 신호전달 분자, 세포 외 기질, 그리고 종양형성 변형을 촉진하고, 종양의 성장과 침습을 지원하며, 종양을 숙주의 면역성으로부터 보호하고, 치료적 내성을 조장하며, 중단되었던 전이를 다시 재개하는 니치를 제공할 수 있는 기계적 큐(cue)를 포함한다. 종양 및 이의 주변 미세환경은 밀접하게 관련되어 있으며, 꾸준히 상

호작용한다. 종양은 세포 외 신호를 방출하고, 종양의 혈관신생을 촉진하며, 말초 면역 내성을 유도함으로써 자체의 미세환경에 영향을 미칠 수 있는 한편, 미세환경 내 면역 세포는 암성 세포의 성장과 진화에 영향을 줄 수 있다. 문헌(Swartz et al. "Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy," Cancer Res, vol., 72, pages 2473-2480, 2012; Weber et al., "The tumor microenvironment," Surgical Oncology, vol. 21, pages 172-177, 2012; Blagosklonny, "Antiangiogenic therapy and tumor progression," Cancer Cell, vol. 5, pages 13-17, 2004; Siemann, "Tumor microenvironment," Wiley, 2010; 및 Bagley, "The tumor microenvironment," Springer, 2010)을 참조한다.

[0072] 본원에 사용된 바와 같이 "야생형"이란 용어는, 어떠한 돌연변이도 포함하지 않는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. "야생형 단백질", "야생-형 단백질", "야생-형 생체 단백질" 또는 "야생형 생체 단백질"은 자연으로부터 단리될 수 있는 단백질로서, 자연에서 발견되는 활성 수준으로 활성이고 자연에서 발견되는 아미노산 서열을 포함할 단백질을 지칭할 수 있다. "모 분자" 및 "표적 단백질"이란 용어는 또한 야생형 단백질을 포함한다.

[0073] 상세한 설명

[0074] A. pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드

[0075] 하나의 양상에서, 본 발명은 활성이 요망되는 pH의 0.5, 1, 2 또는 4 유닛 이내의 pKa를 보이는 종의 존재하에서 pH 의존적 활성을 보이는 조건부 활성 폴리펩티드에 관한 것이다. 다른 양상에서, 본 발명은 pKa가 약 4 내지 약 10이거나, 또는 약 4.5 내지 약 9.5이거나, 또는 약 5 내지 약 9이거나, 또는 약 5.5 내지 약 8이거나, 또는 약 6.0 내지 약 7.0인 종의 존재 하에서 pH 의존적 활성을 보이는 조건부 활성 폴리펩티드에 관한 것이다. 다른 양상에서, 본 발명은 히스티딘, 히스타민, 수소화 아데노신 이인산염, 수소화 아데노신 삼인산염, 시트르산염, 중탄산염, 아세트산염, 젖산염, 이황화물, 황화수소, 암모늄, 인산이수소 및 이것들의 임의의 조합으로부터 선택되는 종의 존재 하에서 pH 의존적 활성을 보이는 조건부 활성 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0076] 조건부 활성 폴리펩티드의 활성에 유의적 영향을 미치는, 검정 배지 중에 존재하는 종은 적어도 2가지 이온화 상태, 즉 비하전 또는 저 하전된(less charged) 상태와, 하전 또는 고 하전된(more charged) 상태를 가지는 종인 경향이 있다. 결과적으로 조건부 활성 폴리펩티드의 활성에 영향을 미치는 종의 pKa는, 해당 종이 특정 pH에서 폴리펩티드의 특정 활성에 영향을 미치는 정도를 측정하는데에 역할을 할 수 있다.

[0077] pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드는 제1 pH와 상이한 제2 pH에서보다 제1 pH에서 더 큰 활성을 보이는데, 여기서 상기 제1 pH에서의 활성과 제2 pH에서의 활성 둘 다는 상기 나열된 종들 중 하나 이상의 존재 하에 이루어지는 검정에서 측정된다. 조건부 활성 폴리펩티드의 pH 의존성을 측정하기 위해, 폴리펩티드의 동일한 활성이 동일한 검정 배지 중에서도 상이한 값의 pH에서 검정된다.

[0078] 동일한 검정 배지 중 제1 pH에서의 활성 대 제2 pH에서의 이 활성의 비는 pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드의 선택성이라 칭하여질 수 있다. pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드의 선택성은 적어도 약 1.3, 또는 적어도 약 1.5, 또는 적어도 약 1.7, 또는 적어도 약 2.0, 또는 적어도 약 3.0, 또는 적어도 약 4.0, 또는 적어도 약 6.0, 또는 적어도 약 8.0, 또는 적어도 약 10.0, 또는 적어도 약 20.0, 또는 적어도 약 40.0, 또는 적어도 약 60.0, 또는 적어도 약 100.0이다.

[0079] pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드는 하전된 아미노산 잔기들을, 이 조건부 활성 폴리펩티드의 기원인 모 폴리펩티드의 아미노산 잔기들에 비하여 증가한 수(또는 비율)만큼 함유한다는 것이 관찰되었다. 양으로 하전된 아미노산 잔기들이 3개 존재하고(즉 리신, 아르기닌 및 히스티딘); 음으로 하전된 아미노산 잔기들은 2개 존재한다(즉 아스파르트산염 및 글루타메이트). 이처럼 하전된 아미노산 잔기들은, pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드의 기원인 모 폴리펩티드에 비하여 이 pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드 중에 과도하게 제시된다. 결과적으로 pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드는 하전된 아미노산 잔기의 수가 증가하였으므로, 하전된 종들과 검정 배지에서 더 잘 상호작용할 것이다. 이는 결국 조건부 활성 폴리펩티드의 활성에 영향을 미친다.

[0080] 검정 배지 중 상이한 종들이 존재할 때 pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드는 통상적으로 상이한 활성을 가짐도 또한 관찰되었다. 적어도 2가지 이온화 상태, 즉 비하전 또는 저 하전된 상태와, 하전 또는 고 하전된 상태를 가지는 종은 pKa 값에 따라서 특정 pH에서 더욱 큰 정도로 해리될 수 있으므로, 조건부 활성 폴리펩티드 중에 존재하는 하전 아미노산 잔기들과의 상호작용 확률이 증가하게 된다. 이 요인은 조건부 활성 폴리펩티드의 선택성 및/또는 pH 의존적 활성을 향상시키는데에 사용될 수 있다.

[0081] 조건부 활성 폴리펩티드상 전하(들)의 성질은, 이 조건부 활성 폴리펩티드의 활성에 영향을 미치기에 적합한 종을 확인하는데에 사용되는 하나의 요인일 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 본 조건부 활성 폴리펩티드는 모 폴리펩

티드에 비하여 양으로 하전된 아미노산 잔기들(리신, 아르기닌 및 히스티딘)을 더 많이 가질 수 있다. 그러므로 본 조건부 활성 폴리펩티드는, 활성이 요망되는 환경에 존재하는 특정 종과의 상호작용을 요망되는 수준으로 보이고/보이거나, 감소한 활성이 요망되는 환경에 존재하는 특정 종과의 상호작용을 요망되는 수준으로 보이는 것으로 선택될 수 있다. 이와 유사하게 본 조건부 활성 폴리펩티드는 모 폴리펩티드에 비하여 음으로 하전된 아미노산 잔기들(아스파르트산염 및 글루타메이트)을 더 많이 가질 수 있다.

[0082] pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드상 하전된 아미노산 잔기의 지점은 또한 활성에 영향을 미칠 수도 있다. 예를 들어 조건부 활성 폴리펩티드의 결합 위치에 대한 하전 아미노산 잔기의 근위성(proximity)은, 하전된 아미노산 잔기가 폴리펩티드의 활성에 영향을 미치는 데에 사용될 수 있다.

[0083] 몇몇 구현예들에서, 본 조건부 활성 폴리펩티드에 대한, 하전된 환경 종의 상호작용은 pH 의존적 조건부 활성 폴리펩티드의 활성을 차단하거나 방해할 수 있다. 예를 들어 하전된 환경 종과 상호작용하는, 하전된 아미노산은 조건부 활성 폴리펩티드의 결합 위치에 대해 알로스테릭 효과(allosteric effect)를 나타낼 수 있다.

[0084] 다른 구현예들에서, 하전된 환경 종과 조건부 활성 폴리펩티드의 상호작용은 폴리펩티드 상 상이한 기들, 특히 하전되었거나 분극된 기들 사이에 염 다리를 형성할 수 있을 것 같기도 하다. 염 다리의 형성은 폴리펩티드 구조를 안정화하는 것으로 공지되어 있다(Donald, et al., "Salt Bridges: Geometrically Specific, Designable Interactions," Proteins, 79(3): 898-915, 2011; Hendsch, et al., "Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis," Protein Science, 3:211-226, 1994). 염 다리는, "호흡(breathing)"이라 칭하여지는, 거듭되는 작은 구조적 변형을 보통 수행하는 단백질 구조를 안정화하거나 고정할 수 있다(Parak, "Proteins in action: the physics of structural fluctuations and conformational changes," Curr Opin Struct Biol., 13(5):552-557, 2003). 구조의 변동은 조건부 활성 단백질이 자체의 파트너를 효율적으로 인지하여 결합하는 것을 허용하기 때문에, 단백질 구조의 "호흡"은 단백질 기능과 이의 파트너와의 결합에 중요하다(Karplus, et al., "Molecular dynamics and protein functions," PNAS, vol. 102, pp. 6679-6685, 2015). 염 다리가 형성됨으로써, 조건부 활성 폴리펩티드 상 결합 위치, 특히 결합 포켓(binding pocket)은 이 폴리펩티드 자체의 파트너에 대해 감소한 접근 가능성을 보일 수 있는데, 이는 아마도 염 다리가, 상기 파트너가 결합 위치에 접근하는 것을 직접 차단할 수 있기 때문일 것이다. 심지어 염 다리가 결합 위치로부터 멀리 떨어져 존재할 지라도, 알로스테릭 효과는 결합 위치의 입체구조를 바꾸어 결합을 억제할 수 있다. 그러므로 염 다리가 조건부 활성 폴리펩티드의 구조를 안정화(고정)한 후, 이 폴리펩티드는 자체의 파트너와의 결합에 있어서 감소한 활성을 보이게될 수 있으며, 이로써 활성 감소가 초래된다.

[0085] 폴리펩티드로서, 해당 폴리펩티드의 구조가 염 다리에 의해 어떻게 안정화되는지에 관하여 공지되어 있는 예의 하나로서는 헤모글로빈이 있다. 구조 연구와 화학 연구는, 화학기 세트 적어도 2개(pKa 값이 pH 7 근처인 히스티딘 β 146 및 α 122의 측쇄와 아미노 말단)가 염 다리 형성에 관여함을 규명하였다. 데옥시헤모글로빈에 있어서, β 146의 말단 카르복실레이트기는 또 다른 $\alpha\beta$ 이량체의 α 서브유닛 중 리신 잔기와 염 다리를 형성한다. 이러한 상호작용은 히스티딘 β 146의 측쇄를, 이 측쇄가 동일 사슬 내 음으로 하전된 94번 위치의 아스파르트산염과 염 다리를 형성하는데에 참여할 수 있는 자리에 고정시키되, 다만 이때 히스티딘 잔기의 이미다졸기는 양성자화된다(도 6). 높은 pH에서, 히스티딘 β 146의 측쇄는 양성자화되지 않으며, 염다리로 형성되지 않는다. 그러나 pH가 강하됨에 따라서, 히스티딘 β 146의 측쇄는 양성자화되고, 히스티딘 β 146과 아스파르트산염 β 94 사이에는 염 다리가 형성되어 데옥시헤모글로빈의 4차 구조는 안정화되고, 이로 말미암아 (낮은 pH일 때) 능동적으로 대사를 수행하는 조직에서 산소가 방출되는 경향이 더 커진다. 헤모글로빈은 산소에 대해 pH 의존적 결합 활성을 보이는데, 즉 낮은 pH에서는 염 다리가 형성됨으로 말미암아 산소에 대한 결합 활성이 감소하게 된다. 다른 한편으로, 높은 pH에서는 염 다리가 형성되지 않음으로 말미암아 산소에 대한 결합 활성은 증가하게 된다.

[0086] 이와 유사하게 소 분자, 예컨대 중탄산염은 조건부 활성 폴리펩티드 내부에 염 다리를 형성함으로써, 조건부 활성 폴리펩티드의 이의 파트너에 대한 결합 활성을 감소시킬 수 있다. 예를 들어 중탄산염의 pKa값인 6.4보다 더 낮은 pH에서 이 중탄산염은 양성자화되므로, 하전되지 않는다. 하전되지 않은 중탄산염은 염 다리를 형성할 수 없으므로, 조건부 활성 폴리펩티드와 이의 파트너의 결합에 영향을 거의 미치지 않는다. 그러므로 조건부 활성 폴리펩티드는 낮은 pH에서 자체의 파트너와의 결합 활성이 크다. 다른 한편, 중탄산염의 pKa보다 높은 pH에서 이 중탄산염은 양성자를 잃음으로써 이온화되고, 이로 말미암아 음으로 하전된다. 음으로 하전된 중탄산염은 조건부 활성 폴리펩티드 상 양으로 하전된 기들 또는 분극된 기들 간에 염 다리를 형성할 것이고, 그 결과 조건부 활성 폴리펩티드의 구조는 안정화될 것이다. 이는, 조건부 활성 폴리펩티드와 이의 파트너의 결합을 차단하거나 감소시킬 것이다. 그러므로 본 조건부 활성 폴리펩티드는 높은 pH에서 낮은 활성을 보인다. 그러므로 본 조건부 활성 폴리펩티드는 중탄산염이 존재할 때 조건부로 활성인 활성을 보인다(즉 높은 pH에서보다 낮은 pH에서 더

큰 결합 활성을 보인다).

- [0087] 어떤 종, 예컨대 중탄산염이 검정 배지 중에 존재하지 않을 때, 조건부 활성 폴리펩티드는 자체의 조건부 활성을 잃을 수 있다. 이는 아마도 조건부 활성 폴리펩티드상에 있던, 폴리펩티드 구조를 안정화(고정)하는 염 다리들이 없어지기 때문일 것이다. 그러므로 파트너는 어떤 pH에서도 조건부 활성 폴리펩티드상 결합 위치에 대해 유사한 접근 경로를 가지게 되어, 제1 pH와 제2 pH에서 유사한 활성을 보이게 될 것이다.
- [0088] 다른 구현예들에서, 소 분자 또는 이온과 조건부 활성 폴리펩티드 간 상호작용은, 이 폴리펩티드의 활성을 증가시키는 방식으로 폴리펩티드의 구조를 변경할 수 있다. 예를 들어 구조의 변경은, 결합 친화성에 필요한 결합 위치가 존재하는 지점, 이 결합 위치의 입체 장애 또는 결합 에너지를 변경함으로써 조건부 활성 폴리펩티드의 결합 친화성을 개선할 수 있다. 이러한 경우들에 있어서, 활성이 요망되는 pH에서 조건부 활성 폴리펩티드와 결합하는 소 분자를 선택하는 것이 요망될 수 있다.
- [0089] 비록 염 다리(이온 결합)들이 가장 강하고 가장 통상적인 방식으로 화합물과 이온으로 하여금 조건부 활성 폴리펩티드의 활성에 영향을 주도록 만들지만, 이러한 화합물 및 이온과, 조건부 활성 폴리펩티드 간 기타 상호작용들도 또한 이 조건부 활성 폴리펩티드의 구조를 안정화(고정)하는데에 기여할 수 있음이 이해되어야 할 것이다. 상기 기타 상호작용들로서는 수소 결합, 소수성 상호작용 및 반 데르 발스 상호작용을 포함한다.
- [0090] 몇몇 구현예들에서, 적합한 화합물이나 이온을 선택하기 위하여 조건부 활성 폴리펩티드는, 이것의 진화 기원인 모 폴리펩티드와 비교되고, 이로부터 조건부 활성 폴리펩티드 중 음으로 하전된 아미노산 잔기의 비율이 더 높은지, 아니면 양으로 하전된 아미노산 잔기의 비율이 더 높은지가 확인된다. 그 다음, 제2 pH에서 적합한 전하를 가지고, 조건부 활성 폴리펩티드의 활성에 영향을 미치는 화합물 각각이 선택될 수 있다. 예를 들어 조건부 활성 폴리펩티드가 모 폴리펩티드보다 양으로 하전된 아미노산 잔기를 더 높은 비율로 가질 때, 적합한 소 분자는 통상적으로 제2 pH에서 음으로 하전되어, 이 조건부 활성 폴리펩티드와 상호작용을 하여야 한다. 다른 한편, 조건부 활성 폴리펩티드가 모 폴리펩티드보다 음으로 하전된 아미노산 잔기를 더 높은 비율로 가질 때, 적합한 소 분자는 통상적으로 제2 pH에서 양으로 하전되어, 이 조건부 활성 폴리펩티드와 상호작용을 하여야 한다.
- [0091] 다른 구현예들에서, 조건부 활성 폴리펩티드의 활성은 소 분자 또는 이온과, 이 조건부 활성 폴리펩티드의 결합 파트너인 표적 폴리펩티드의 상호작용에 의해 제어된다. 이러한 경우, 상기 논의된 바와 동일한 원리들이 또한 적용될 수 있되, 다만 그 목표는 소 분자 또는 이온과 표적 폴리펩티드 간 상호작용을 일으키는 것이다. 표적 폴리펩티드는, 예를 들어 조건부 활성 항체에 대한 항원, 또는 조건부 활성 수용체에 대한 리간드일 수 있다.
- [0092] 적합한 소 분자는 제1 pH에서의 비하전 또는 저 하전 상태에서부터 제2 pH에서의 하전 또는 고 하전 상태로 전환되는 임의의 무기 또는 유기 분자일 수 있다. 그러므로 소 분자는 통상 제1 pH와 제2 pH 사이의 pKa를 가져야 할 것이다. 예를 들어 중탄산염의 pKa는 6.4이다. 그러므로 더 높은 pH, 예컨대 pH 7.4에서, 음으로 하전된 중탄산염은 조건부 활성 폴리펩티드 내 하전된 아미노산 잔기들에 결합하여 이 폴리펩티드의 활성을 감소시킬 것이다. 다른 한편, 낮은 pH, 예컨대 pH 6.0에서 저 하전 중탄산염은 조건부 활성 폴리펩티드에 동일한 양으로 결합할 것이므로, 조건부 활성 폴리펩티드의 활성을 더 높일 수 있다.
- [0093] 이황화물의 pKa는 7.05이다. 그러므로 더 높은 pH, 예컨대 pH 7.4에서 더 많이 음으로 하전된 이황화물은 조건부 활성 폴리펩티드 내 양으로 하전된 아미노산 잔기들과 결합하여 이 폴리펩티드의 활성을 낮출 것이다. 다른 한편, 낮은 pH, 예컨대 pH 6.2 ~ 6.8에서 저 하전 황화수소/이황화물은 조건부 활성 폴리펩티드에 동일한 수준으로 결합하지 않을 것이므로, 조건부 활성 폴리펩티드의 활성을 더 높일 수 있다.
- [0094] pKa가 제1 pH와 제2 pH 사이인 소 분자가 본 발명에 사용되기 바람직하다. 바람직한 종은 이황화물, 황화수소, 히스티딘, 히스타민, 시트르산염, 중탄산염, 아세트산염 및 젖산염으로부터 선택된다. 이러한 소 분자 각각의 pKa는 6.2 내지 7.0이다. 또한, 기타 소 분자, 예컨대 트리신(pKa 8.05) 및 비신(pKa 8.26)도 사용될 수 있다. 기타 적합한 소 분자를, 본 출원의 원리들을 이용하는 문헌 (예컨대 CRC Handbook of Chemistry and Physics, 96th Edition, by CRC press, 2015; Chemical Properties Handbook, McGraw-Hill Education, 1998)에서 살펴볼 수 있다.
- [0095] 검정 배지 또는 환경에 있어서 소 분자의 농도는, 바람직하게 피험체 내 소 분자의 생리학적 농도이거나 이와 거의 비슷한 농도이다. 예를 들어 (인간 혈청 중) 중탄산염의 생리학적 농도는 15 mM 내지 30 mM이다. 그러므로 검정 배지 중 중탄산염의 농도는 10 mM 내지 40 mM, 또는 15 mM 내지 30 mM, 또는 20 mM 내지 25 mM, 또는 약 20 mM일 수 있다. 이황화물의 생리학적 농도도 또한 낮다. 검정 배지 중 이황화물의 농도는 3 nM 내지 500 nM, 또는 5 nM 내지 200 nM, 또는 10 nM 내지 100 nM, 또는 10 nM 내지 50 nM일 수 있다.

- [0096] 본 발명에서, 조건부 활성 폴리펩티드는 선택되어 어떤 농도로 사용되고, 이로써 환경 중 특정 종의 생리학적 정상 농도는 관심 pH 범위에서의 조건부 활성 폴리펩티드 활성화에 유의적인 영향을 미칠 것이다. 그러므로 다수의 치료적 처치에 있어서, 혈액이나 인간 혈청의 pH와 거의 동일한 pH인 pH7.2 ~ 7.4에서 조건부 활성 폴리펩티드에 대해 낮은 활성을 보여서, 조건부 활성 폴리펩티드의 활성화가 최소화 또는 억제된 상태로 혈류를 통해 치료적 처치에 전달될 수 있는 것이 유리할 수 있다. 결과적으로 이러한 처치를 위해 pKa가 pH 7.2 ~ 7.4 이하인 소 분자를 선택하여, 혈류 pH에서 소 분자의 이온화가 조건부 활성 폴리펩티드 활성화에 유의적 영향을 미치기에 충분한 정도로 보장되는 것이 유리할 것이다. 이와 동시에 소 분자의 pKa는, 조건부 활성 폴리펩티드 상 결합 위치들을 해방시키는, 소 분자의 양성자화에 의해 조건부 활성 폴리펩티드의 활성화가 보장되도록, 조건부 활성 폴리펩티드의 활성화에 요망되는 pH와 같거나 그 이상이어야 한다.
- [0097] 소 분자는, 입체 장애를 최소화하여 표적 폴리펩티드 또는 조건부 활성 폴리펩티드 상 작은 포켓들에의 최대 접근 경로가 보장되도록, 바람직하게 분자량이 작고/작거나 그 형태가 비교적 작다. 이러한 이유로, 소 분자는 통상 분자량이 900 a.m.u. 미만이거나, 더욱 바람직하게는 500 a.m.u. 미만이거나, 더욱 바람직하게는 200 a.m.u. 미만이거나, 더욱더 바람직하게는 100 a.m.u. 미만이다. 예를 들어 이하 실시예 13과 실시예 14에 보인 바와 같이, 황화수소, 이황화물 및 중탄산염은 모두 분자량이 작고, 표적 폴리펩티드 또는 조건부 활성 폴리펩티드 상 포켓들에 대한 접근 경로를 제공하는 작은 구조를 가진다.
- [0098] 소 분자는 검정 또는 환경 중에 실질적으로 동일한 농도(예컨대 중탄산염의 경우 약 20 μ M)로 존재할 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 소 분자는 상이한 환경에서 상이한 농도로 존재할 수 있으므로, 이를 검정에서 모의하는 것이 요망될 수 있다. 예를 들어 이황화물은 인간 혈청 중예보다 중앙 미세환경 중에 더 높은 농도로 존재한다. 그러므로 하나의 검정은 산성 pH를 조성하고, 이황화물의 농도를 높임으로써 중앙의 미세환경을 모의할 수 있는 한편, 또 다른 검정은 중성 또는 약 염기성 pH를 조성하고 이황화물의 농도를 낮춤으로써 인간 혈청을 모의할 수 있다. 산성 pH는 6.0 내지 6.8의 범위일 수 있는 한편, 중성 또는 약 염기성 pH는 약 7.4일 수 있다. 제1 검정의 경우 이황화물 농도는 30 μ M로 더 높을 수 있는 한편, 제2 완충제의 이황화물 농도는 10 μ M 이하, 또는 5 μ M로 더 낮을 수 있다.
- [0099] 몇몇 구현예들에서, 본 조건부 활성 폴리펩티드는, 2개 이상의 상이한 소 분자가 존재할 때(예컨대 중탄산염과 히스티딘이 함께 존재할 때), pH 의존적이다.
- [0100] 소 분자가 존재하지 않으면, 본 조건부 활성 폴리펩티드는 자체의 pH 의존성을 잃을 수 있다. 그러므로 소 분자가 존재하지 않으면, 본 조건부 활성 폴리펩티드는 소 분자가 존재하지 않을 때의 제1 pH에서와 제2 pH에서 유사한 활성을 보일 수 있다.
- [0101] 몇몇 구현예들에서, 제1 pH는 산성 pH인 반면, 제2 pH는 염기성 또는 중성 pH이다. 다른 구현예들에서, 제1 pH는 염기성 pH인 반면, 제2 pH는 산성 또는 중성 pH이다. 예를 들어 제1 pH는 약 5.5 내지 약 7.2의 범위, 또는 약 6.0 내지 약 7.0의 범위, 또는 약 6.2 내지 약 6.8의 범위의 pH일 수 있다. 제2 pH는 약 7.0 내지 약 7.8의 범위, 또는 약 7.2 내지 약 7.6의 범위의 pH일 수 있다.
- [0102] 산성 pH에서 활성이 더 크고, 염기성이나 중성 pH에서는 활성이 더 작은 조건부 활성 폴리펩티드는, pH가 약 5.5 내지 7.2, 또는 약 6.2 내지 6.8로 산성인 중앙 미세환경을 표적화할 수 있다.
- [0103] 다른 구현예들에서, pH 의존적 폴리펩티드가 더 큰 활성을 보이는 제1 pH는, 예컨대 7.6 ~ 7.9로 염기성 pH(예컨대 활액막 액)일 수 있다(Jebens et al., "On the viscosity and pH of synovial fluid and pH of blood," Journal of Bone and Joint Surgery, vol. 41 B, pp. 388-400, 1959 참조). 제2 pH는 혈액의 pH, 즉 조건부 활성 폴리펩티드가 작은 활성을 보이는 pH인 pH 약 7.2 ~ 7.6일 수 있다. 이러한 조건부 활성 폴리펩티드는 관절 질환, 특히 관절의 염증을 표적화하는데에 적합할 수 있다.
- [0104] 다른 구현예들에서, 본 조건부 활성 폴리펩티드는 뇌를 표적화하도록 디자인될 수 있다. 혈액 뇌 장벽의 안팎 pH에는 차이가 있는데, 뇌쪽의 pH는 혈액의 pH보다 약 0.2 pH 단위만큼이 낮다. 그러므로 조건부 활성 폴리펩티드의 활성이 더 큰 뇌의 제1 pH(뇌 pH)는 약 7.0 내지 약 7.2일 수 있는 한편, 제2 pH(혈액 pH)는 약 7.4일 수 있다.
- [0105] 조건부 활성 폴리펩티드는 효소, 시토카인, 수용체, 특히 세포 수용체, 조절 폴리펩티드, 가용성 폴리펩티드, 항체 또는 호르몬일 수 있다.
- [0106] 조건부 활성 폴리펩티드는 모 폴리펩티드의 단편일 수 있다. 예를 들어 조건부 활성 폴리펩티드는 항체 단편,

단일 사슬 항체, 효소의 단편, 수용체의 단편, 시토카인의 단편 또는 호르몬의 단편일 수 있다. 항체 단편은 항체의 Fc 단편일 수 있다.

[0107] Fc 단편은, 제2 pH에서의 어떠한 보체와의 결합 활성보다 제1 pH에서의 동일 보체와의 결합 활성이 더 큰 조건부 활성 Fc 단편을 제조하기 위한 모 폴리펩티드로서 사용될 수 있다. Fc 단편과 보체의 결합은 항체 의존적 세포 매개 세포독성을 제공하는데 이용될 수 있다. 제1 pH(예컨대 종양 미세환경의 pH)는 5.5 내지 7.2, 또는 6.2 내지 6.8 범위로 산성일 수 있는 반면, 제2 pH는 7.2 내지 7.6 범위이다. 제1 pH는 라이소좀의 pH(통상적으로 pH 약 4.0)와 상이하다. 또한, 라이소좀은 Fc 단편이 임의의 다른 폴리펩티드처럼 분해되는 것을 목표로 하는 지점이다. 라이소좀에는 보체가 존재하지 않으며, 라이소좀을 통해 세포 매개 세포독성도 유도되지 않는다.

[0108] 본 조건부 활성 폴리펩티드는 2개의 기능성 도메인들을 가질 수 있는데, 이 기능성 도메인 적어도 하나, 바람직하게 둘 다는 pH 의존적 활성을 가진다. 이와 같은 2개의 기능성 도메인은 동시에 진화될 수 있고, 동일한 돌연변이가 폴리펩티드 중 기능성 도메인 둘 다를 동정하기 위한 선택이 이루어질 수 있다. 대안적으로, 이들 2개의 기능성 도메인은 독립적으로 진화 및 선택될 수 있으며, 이로써 pH 의존적 활성이 별도로 확인될 수 있다. 만일 2개의 기능성 도메인이 동일한 돌연변이가 폴리펩티드 내에 존재하지 않으면, 이 도메인들은 별도로 확인된 기능성 도메인 둘 다를 가지는 키메라 폴리펩티드에 융합될 수 있다.

[0109] 하나의 양상에서, 조건부 활성 폴리펩티드는 모 폴리펩티드에 비하여 제1 pH에서 증가한 활성을 보이고, 모 폴리펩티드에 비하여 제2 pH에서 감소한 활성을 보이는데, 이 두 가지 경우는 모두 인자, 예컨대 단백질이 존재할 때의 일이다. 단백질은 혈액, 인간의 혈청 또는 체내 미세환경, 예컨대 종양 미세환경, 염증 발생 구역등에 존재하는 단백질일 수 있다. 하나의 적합한 단백질은 알부민, 구체적으로 포유동물 알부민, 예컨대 소 알부민 또는 인간 알부민일 수 있다.

[0110] 하나의 양상에서, 단백질, 예컨대 알부민은 진화 단계에 의해 생산된 돌연변이가 폴리펩티드로부터 조건부 활성 폴리펩티드를 스크리닝 및 선택하기 위해 사용되는 검정 용액 중에 존재한다. 다른 양상에서, 단백질, 예컨대 알부민을 함유하는 검정 용액도 또한 동일하거나 상이한 조건 하에서 선택된 조건부 활성 폴리펩티드의 활성을 시험하는데 사용된다.

[0111] B. 조건부 활성 폴리펩티드의 조작

[0112] 조건부 활성 폴리펩티드는 본원에 기술된 하나 이상의 단백질 조작 기술에 의해 조작될 수 있다. 단백질 조작 기술의 비 제한적 예로서는, 조건부 활성 폴리펩티드를 핵산에 접합하는 것, 조건부 활성 폴리펩티드를 나노입자에 접합하는 것, 조건부 활성 폴리펩티드를 키메라 항원 수용체에 접합하는 것, 그리고 마스킹(masking)된 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하는 것을 포함한다.

[0113] 본 발명의 조건부 활성 폴리펩티드는 링커를 통하여 핵산 분자, 예컨대 DNA 또는 RNA 분자에 접합될 수 있다. 본 조건부 활성 폴리펩티드는 핵산 분자를, 이 조건부 활성 폴리펩티드가 더 큰 활성을 보이는 조건이 조성되지 않은 다른 병소보다 표적병소의 목표 병소, 즉 조건부 활성 폴리펩티드가 더 큰 활성을 보이는 조건이 조성된 병소에 전달하는 것을 도울 수 있다. 예를 들어 조건부 활성 폴리펩티드는 다른 병소, 예컨대 인간 혈청에서의 조건보다 종양 미세환경에서의 조건에서 자체의 항원에 대한 결합 활성이 더 큰 조건부 활성 항체일 수 있다. 이러한 효과는, 핵산 분자를 조건부 활성 폴리펩티드에 접합하고, 이 접합체를 표적병소에 투여함으로써 핵산 분자를 종양 미세환경에 전달하는데 이용될 수 있다.

[0114] 몇몇 구현예들에서, 핵산 분자는 목표 지점에서 유전자 발현을 조정하기 위한 제제일 수 있다. 비정상 유전자 발현은 다수의 질환과 연관되어 있다. 그러므로 비정상 유전자 발현을 바로잡는 것은 이러한 질환의 억제, 심지어는 치유에 기여할 수 있다. 예를 들어 비정상 유전자 발현은 다수의 암 세포의 특징을 이루는데, 이때 몇몇 유전자들은 암 세포, 예컨대 다수의 발암유전자에서 발현 수준이 상승한다(예컨대 상피 성장 인자 수용체 2(HER2)는 유방암 세포에서 과발현된다). 구성적으로 증가한 발암유전자 발현의 선택적 억제는 암 세포 증식을 억제할 기회를 제공한다.

[0115] 유전자 발현을 억제할 수 있는 핵산 분자는 핵염기들이 결합된 비 하전 비키랄 폴리아미드 주쇄를 가지는 올리고뉴클레오타이드 모의체, 올리고DNA, 마이크로RNA, 소형 간섭 RNA(siRNA) 및 안티센스 RNA를 포함한다(Pooga et al., Curr Cancer Drug Targets, 1(3):231-9, 2001 ; Pandey et al., Expert Opin Biol Ther., 9(8):975-89, 2009).

[0116] 안티센스 RNA는 염기 쌍형성에 의해 mRNA의 특이적인 상보성 영역에 결합하여, mRNA의 발현을 서열 특이적 방식으로 억제할 수 있는 짧은 RNA 분자이다. 안티센스 RNA는, 안티센스 RNA와의 결합 위치에서 mRNA를 절단하는

RNaseH를 유도할 수 있거나, 또는 mRNA 가공 및 단백질 합성 중 번역 또는 기타 단계들을 물리적으로 차단할 수 있다.

- [0117] 소형 간섭 RNA(siRNA)는 통상적으로 번역이 차단될 mRNA 서열에 상보성인 서열의 적어도 일부를 자체 내에 가지는, 짧은 이중 가닥 RNA 분절이다. siRNA는 또는 (진핵생물 세포 내에서는 비일 비제한) 직접 mRNA 분해, 단백질 번역 억제 또는 염색질 리모델링이 이용되는 번역후 유전자 침묵 기구를 통해 작용을 한다(Caplen, "Gene therapy progress and prospects. Downregulating gene expression: the impact of RNA interference," Gene Ther., 11 (16) : 1241 - 1248 , 2004) 및 Bertrand et al., "Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo," Biochem Biophys Res Commun., 296(4): 1000-1004, 2002).
- [0118] 특히 siRNA는 RISC를 통해 이 siRNA에 대한 상동성을 보유하는 mRNA의 서열 특이적 분해에 관한 강력한 캐스케이드를 개시할 수 있다(Fire et al., "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*," Nature 391 :806-811, 1998). siRNA가 세포 내에 도입될 때, 이는 Dicer라고 칭하여지는 RNaseIII 효소(길이가 긴 siRNA를, 21개 내지 23개 뉴클레오티드로 이루어져 짧고, 2개 내지 3개 뉴클레오티드로 이루어진 대칭적 3'돌출말단(overhang)과 5'인산염, 그리고 3'하이드록실기를 가지는 이중체로 절단하는 효소)에 의해 가공된다(Tuschl et al., "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro," Genes Dev. 13:3191-3197, 1999; Hamilton and Baulcombe, "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants," Science, 286:950-952, 1999). 그러므로 유효 siRNA는 오로지, siRNA 매개 침묵을 촉발하도록 mRNA와 쌍을 형성할 연속 상보성 서열의 소 분절만을 필요로 한다(Jackson and Linsley, "Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs?" Trends Genet., 20:521-524, 2004). siRNA는 게놈에 통합되지 않으므로, 플라스미드나 바이러스 비이클보다 더 큰 안전성을 제공한다.
- [0119] 마이크로RNA(miRNA)는 길이 21개 ~ 25개 뉴클레오티드인 자연 발생 소형 비암호화 RNA 분자 군이다. 마이크로RNA는, 이 마이크로RNA가 작용을 하는 mRNA 분자와 부분적으로 상동성이다. 마이크로RNA의 주요 기능은 번역 억제, mRNA 절단 및 탈아데닐화를 통한 유전자 발현의 감소이다. mRNA 중, 서열 데이터, 주석 및 표적 예측에 대한 중앙 온라인 저장소는 miRBase라 칭하여진다(영국 생어 연구소에 의해 운영). 마이크로RNA 유전자는 RNA 중합효소 II에 의해 전사되고, 그 결과 5' 말단 캡과 폴리-A 미부를 가지는 pri-miRNA가 제조된다. 핵 내에서 이 pri-miRNA는 가공되고, 그 결과 RNase III 효소 Drosha와 이중 가닥 RNA Pasha/DGCR8로 이루어진 마이크로프로세서 복합체(microprocessor complex)에 의해 pre-miRNA가 제조된다. 이러한 pre-miRNA는 캐리오펜 엑스포틴(karyopherin expotin)(Exp5) 및 Ran-GTP 복합체에 의해 운송되어 세포질로 이동하게 되는데, 여기에서 Ran GTPase는 Exp5 및 pre-miRNA와 결합하여 핵 내 이중삼량체를 형성한다. 이러한 pre-miRNA는 RNase III 효소 Dicer에 의해 추가로 가공되고, 그 결과 성숙한 마이크로RNA가 생성된다.
- [0120] 조건부 활성 폴리펩티드에 의해 전달될 수 있는 핵산의 또 다른 군은, 뉴클레옴이 결합된 비하전 비키랄 폴리아미드 주쇄를 포함하는 올리고뉴클레오티드 모의체들이다. 올리고뉴클레오티드 모의체는 종종 펩티드 핵산(PNA)이라고 칭하여지기도 한다. 더욱 구체적으로 PNA는, N-(2-아미노에틸)글리신 폴리아미드가 인산염-리보스 고리 주쇄를 대신하고, 메틸렌-카르보닐 링커가 자연 및 비 자연 핵 염기를 N-(2-아미노에틸)글리신의 중심 아민에 연결시켜 주고있는 DNA 유사체이다. 주쇄 구조에 대한 라디칼 변화에도 불구하고, PNA는 Watson-Crick 염기 쌍 형성 규칙에 따라 DNA 및 mRNA와 서열 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0121] PNA는, 부분적으로 주쇄상에 음 전하가 없어서 결국에는 전하-전하 반발력이 감소할 뿐만 아니라, 유리한 기하학적 요인들도 없음으로 말미암아, 자연 핵산이 자체의 상보성 DNA/RNA와 결합할 때보다 더 큰 친화성으로 자체의 상보성 DNA/RNA와 결합한다. PNA와 DNA/mRNA의 복합체는 생물학적 유체 중에서 매우 안정하므로, DNA 또는 mRNA에의 특이적 잡종화에 의하여 표적 유전자의 전사 및 번역의 억제가 초래된다. 일반적으로 PNA는 널리 공지된 고체상 펩티드 합성 프로토콜이 사용되어 합성된다. 문헌(Kim et al., Am. Chem. Soc, 115, 6477-6481, 1993; Hyrup et al., J. Am. Chem. Soc, 116, 7964-7970, 1994; Egholm et al., Nature, 365, 566-568, 1993; Dueholm et al., New J. Chem., 21, 19-31, 1997; Wittung et al., J. Am. Chem. Soc, 118, 7049-7054, 1996; Leijon et al., Biochemistry, 33, 9820-9825, 1994, Orum et al., BioTechniques, 19, 472-480, 1995; Tomac et al., J. Am. Chem. Soc, 118, 5544-5552, 1996)을 참조한다. 강산 처리 및 알칼리 수산화물 중 가수분해시 탈퓨린화되는 DNA와는 대조적으로, PNA는 완전히 산에 안정적이며 약 염기에도 충분히 안정적이다.
- [0122] 조건부 활성 폴리펩티드에 의해 전달될 수 있는 핵산의 또 다른 군은 올리고DNA이다. 올리고DNA는, 세포내 원형질에 도입될 때 이 올리고DNA와 상보성인 서열을 가지는 유전자의 발현을 선택적으로 억제할 수 있는 짧은 단일 가닥 분절이다. 안티센스 적용예에 있어서, 올리고DNA는 표적 mRNA 또는 pre-mRNA와 상호작용하여 이중체를 형

성하고, 이의 번역 또는 가공을 억제하며, 결국에는 단백질의 생합성을 억제한다. 항원 적용예에 있어서, 올리고DNA는 세포 핵에 도입되어 이중 가닥 게놈 DNA와 삼중체를 형성하고, 이로써 유전자의 전사는 억제되어 mRNA 생성의 감소가 초래되고, 종국에는 단백질의 유전자 생성물의 생성 감소가 초래된다.

[0123] 조건부 활성 폴리펩티드에 의해 전달될 수 있는 핵산의 또 다른 군은 구형 핵산(SNA)이다(Zhang, J Am Chem Soc, 134(40): 16488-16491, 2012 참조). SNA는 금속, 반도체, 또는 절연 무기 또는 중합체 코어 재료의 표면에 공유 부착된, 조밀 작용기화 및 고 배향 핵산을 포함한다. 이 SNA는 또한 거의 전체가 핵산 분자로 이루어진 공동의(core-less) 속이 빈(hollow) 구조를 가질 수도 있다. 이러한 구형 핵산은 피험체의 외래 핵산에 대한 자연 방어기구를 우회할 수 있다. 구형 핵산은, 자체의 조밀하게 팩킹(packing)된, 고 배향 핵산 외피로부터 기인하는 독특한 특성들을 이용하여 핵산의 보호와 효율적인 전달을 달성한다. 이러한 외피는 염의 국소 농도가 높은 구역을 만드는데, 이것이 입체 장애가 조성됨과 아울러 존재하게 되면, 이 외피는 뉴클레아제 활성을 감소시키고 핵산을 효소 분해로부터 보호하는 역할을 하게 된다. 뿐만 아니라, 이러한 구형 핵산은 자연의 스캐빈저 단백질(scavenger protein)들을 세포 외 환경으로부터 자체의 표면에 보충하는데, 이는 엔도시토시스를 가속화한다.

[0124] 구형 핵산은 세포질에 도입된 후 안티센스 경로 또는 siRNA 경로 중 어느 하나를 통해 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 결과적으로 구형 핵산은 바이러스 벡터 및 기타 다수의 합성 계에 비하여 몇 가지 이점들, 예컨대 작은 독성, 작은 면역원성, 효소 분해에 대한 내성 및 더욱 지속적인 유전자 녹다운(gene knockdown)을 제공한다. 조건부 활성 폴리펩티드, 특히 조건부 활성 항체는 구형 핵산을 목표 병소, 예컨대 발병하였거나 염증이 발생한 조직(예컨대 종양 및 염증성 관절)에 전달할 수 있다.

[0125] 조건부 활성 폴리펩티드는 또한 나노입자의 목표 병소(조건부 활성 폴리펩티드가 더 큰 활성을 보이는 조건이 조성된 병소)에의 전달을 돕는 링커를 통하여 나노입자에 접합될 수 있다. 나노입자는, 이 나노입자에 캡슐화되는 독소, 방사성 제제 또는 기타 치료제용으로 공지된 비이클이다.

[0126] 나노입자에 캡슐화된 치료제는 종양 세포를 탈분화할 수 있는 단백질일 수 있으므로, 아마도 종양 세포를 정상 세포로 역전시킬 수 있을 것이다(Friedmann-Morvinski and Verma, "Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells," EMBO Reports, 15(3):244-253, 2014). 나노입자는 조건부 활성 항체에 결합되어, 이 항체와 결합된 나노 입자 및 캡슐화된 치료제는 환경, 즉 조건부 활성 항체의 활성이 가장 큰 환경에 선택적으로 전달될 수 있다.

[0127] 상이한 입체구조를 가지는 몇 가지 유형의 나노입자가 본 발명에 사용될 수 있다. 나노입자는 다양한 생체 적합성 재료, 예컨대 생체 안정성 중합체, 생분해성 중합체, 폴리렌, 지질 또는 이것들의 조합으로 제조될 수 있다. 생체 안정성 중합체란, 생체 내에서 분해되지 않는 중합체를 지칭한다. 생분해성 중합체란, 환자에게 전달된 이후에 분해될 수 있는 중합체를 지칭한다. 예를 들어 중합체가 체액, 예컨대 혈액에 노출될 때, 이 중합체는 체내 효소에 의해 점진적으로 흡수 및/또는 제거될 수 있다. 다양한 분해속도를 보이는 나노입자를 제조하는 방법은 당 업자에게 공지되어 있는데, 예를 들어 미국특허 제6,451,338호, 동 제6,168,804호 및 동 제6,258,378호를 참조한다.

[0128] 본 발명의 예시적 나노입자는 리포솜, 중합체 주머니(polymersome) 및 중합체 입자를 포함한다. 리포솜이란, 통상 인지질로 이루어진 이중층에 의해 완전히 내포된 어떤 구획을 지칭한다. 리포솜은 당 업자들에게 공지된 표준적 기술에 따라서 제조될 수 있다. 한 가지 기술은, 적합한 지질, 예컨대 포스파티딜 콜린을 수성 매질 중에 현탁하고 나서, 이 혼합물을 대상으로 초음파 처리를 실시하는 것이다. 또 다른 기술은, 예를 들어 바늘(needle)을 이용하여 지질을 교반된 에탄올-물 용액에 주사함으로써 에탄올-물 중 지질 용액을 빨리 혼합하는 것이 있다. 몇몇 구현예들에서, 리포솜은 또한 부가적으로나 대안적으로 다른 양친매성 물질, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 함유 지질이나 스펅고미엘린을 포함할 수도 있다.

[0129] 중합체 주머니는 리포솜과 유사한 이중층 구조를 형성하도록 변형된 2 블록 또는 3 블록 공중합체를 포함한다. 블록 공중합체의 길이와 조성에 따라서, 중합체 주머니는 실질적으로 리포솜보다 더 견고할 수 있다. 뿐만 아니라, 블록 공중합체의 각 블록의 화학적 성질을 제어할 수 있는 능력은, 이 중합체 주머니의 조성이 요망되는 적용예에 부합하도록 변조하는 것을 허용한다. 예를 들어 중합체 주머니의 막 두께, 즉 이중층 구조의 두께는 블록 공중합체 중 각 블록들의 사슬 길이에 변화를 줌으로써 제어될 수 있다. 공중합체 중 각 블록의 유리 전이 온도의 조절은 유동성에 영향을 미칠 것이므로, 중합체 주머니의 막 투과성에도 영향을 미칠 것이다. 심지어 캡슐화된 제제의 방출 기구는 공중합체의 특징들을 변경함으로써 변화할 수 있다.

- [0130] 중합체 주머니는, (i) 블록 공중합체를 유기 용매 중에 용해하는 단계, (ii) 이로부터 생성된 용액을 용기(vessel) 표면에 적용하는 단계, 그리고 (iii) 용매를 제거하는 단계(이로부터 용기 벽에 공중합체 막이 형성됨)을 수반하는 공정에 의해 제조될 수 있다. 그 다음, 막은 수화되고, 그 결과 중합체 주머니가 형성된다. 대안적으로 용매 중에 블록 공중합체를 용해하고 나서, 여기에 공중합체의 블록들 중 하나에 대한 약 용매를 첨가하는 것 또한 중합체 주머니를 만들 것이다.
- [0131] 치료제는 몇 가지 기술이 사용되어 중합체 주머니 중에 캡슐화될 수 있다. 예를 들어 치료제는, 추후 공중합체 막을 재수화하는데 사용되는 물에서 혼합될 수 있다. 또 다른 예로서는, 치료제를 삼투하여 예비 형성된 중합체 주머니 코어에 옮기는 방법(강제 부하(force loading)라고 공지된 방법)이 있다. 또 다른 한 가지 예로서는 이중 에멀전 기술을 이용하는 방법이 있는데, 이는 비교적 단순 분산성을 보이고 부하 효율이 높은 중합체 주머니를 만들 수 있다. 이중 에멀전 기술은, 미소유체 기술을 이용하여, 물 소적이 유기 용매 층으로 둘러싸여 포함된 이중 에멀전을 제조하는 단계를 수반한다. 이처럼 점적당 소적 구조(droplet-in-a-drop structure)는 이후 연속 수상 중에 분산된다. 블록 공중합체는 유기 용매 중에 용해되었다가, 이중 에멀전의 동심성 계면상에서 원천 중합체 주머니로 자가 조립된다. 최종 중합체 주머니는 이 원천 중합체 주머니 외피로부터 유기 용매가 완전히 증발된 후에 생성된다. 이 기술은, 중합체 주머니 크기의 미세한 제어를 허용한다. 또한, 본 방법 전반에 걸쳐 내부 유체가 외부 유체로부터 완전히 분리되는 것을 유지할 수 있는 능력은, 치료제의 극도로 효율적인 캡슐화를 허용한다.
- [0132] 중합체 입자란, 리포솜 및 중합체 주머니의 외피 구조와는 대조적인 고체 또는 다공성 입자를 지칭한다. 치료제를 중합체 입자 표면에 부착하거나, 또는 생체 활성 제제를 중합체 입자 구조에 통합하기 위한 방법은 당 업자들에게 공지되어 있다.
- [0133] 본 발명의 나노입자를 제조하는데에 사용될 수 있는 중합체는 폴리(N-아세틸글루코사민)(키틴), 키토산, 폴리(3-하이드록시발레르산염), 폴리(락타이드-코-글리콜라이드), 폴리(3-하이드록시부티르산염), 폴리(4-하이드록시부티르산염), 폴리(3-하이드록시부티르산염-코-3-하이드록시발레르산염), 폴리오르토에스테르, 폴리무수물, 폴리(글리콜산), 폴리(글리콜라이드), 폴리(L-젯산), 폴리(L-락타이드), 폴리(D,L-젯산), 폴리(D,L-락타이드), 폴리(L-락타이드-코-D,L-락타이드), 폴리(카프로락톤), 폴리(L-락타이드-코-카프로락톤), 폴리(D,L-락타이드-코-카프로락톤), 폴리(글리콜라이드-코-카프로락톤), 폴리(트리메틸렌 탄산염), 폴리에스테르 아마이드, 폴리(글리콜산-코-트리메틸렌 탄산염), 코-폴리(에테르-에스테르)(예컨대 PEO/PLA), 폴리포스파젠, 생체분자(예컨대 피브린, 피브린 글루, 피브리노겐, 셀룰로스, 전분, 콜라겐 및 히알루론산, 엘라스틴 및 히알루론산), 폴리우레탄, 실리콘, 폴리에스테르, 폴리올레핀, 폴리이소부틸렌 및 에틸렌-알파올레핀 공중합체, 아크릴계 중합체 및 폴리 아크릴산염 이외의 공중합체, 비닐 할로겐화물 중합체 및 공중합체(예컨대 폴리염화비닐), 폴리비닐 에테르(예컨대 폴리비닐 메틸 에테르), 폴리비닐리덴 할로겐화물(예컨대 폴리염화비닐리덴), 폴리아크릴로니트릴, 폴리비닐 케톤, 방향족 폴리비닐(예컨대 폴리스티렌), 폴리비닐 에스테르(예컨대 폴리아세트산비닐), 아크릴로니트릴-스티렌 공중합체, 아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌(ABS) 수지, 폴리아미드(예컨대 나일론 66 및 폴리카프로락탐), 폴리탄산염, 예컨대 티로신 기반 폴리탄산염, 폴리옥시메틸렌, 폴리이미드, 폴리에테르, 폴리우레탄, 레이온, 레이온-트리아세트산염, 셀룰로스, 셀룰로스 아세트산염, 셀룰로스 부티르산염, 셀룰로스 아세트산염 부티르산염, 셀로판, 셀룰로스 질산염, 셀룰로스 프로피온산염, 셀룰로스 에테르 및 카르복시메틸 셀룰로스를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0134] 몇몇 구현예들에서, 나노입자는 또한 조건부 활성 폴리펩티드로부터 기원하는 선택성에 더하여, 코팅을 통해 조직 선택성을 제공할 수도 있다. 예를 들어 나노입자는 정전기적으로 흡착된 폴리(글루탐산) 기반 펩티드 코팅에 의해 코팅될 수 있으며, 이를 통하여 코어 입자의 외부 조성이 변경될 수 있다. 음으로 하전되었으며, 아르기닌-글리신-아스파르트산(RGD) 리간드를 함유하는 폴리글루탐산 기반 펩티드는 RGD 대신 RDG를 함유하였던 뒤죽박죽의 서열 코팅 입자에 비하여, 내피 세포로의 시험관 내 유전자 전달을 증가시킬 수 있다. 이러한 펩티드는 3개의 성분, 즉 음 전하를 제공하는 폴리(글루탐산) 확장부, 폴리글리신 링커, 그리고 전하가 가변적이고 입자의 생체 물리학적 특성과 조직의 선택성을 변경할 잠재성을 가지는 말단 서열로 이루어져 있다. 코팅뿐만 아니라 입자 자체도 이것들의 아마이드 및 에스테르 결합 각각을 통해 생분해될 수 있다. 문헌(Harris et al., "Tissue-Specific Gene Delivery via Nanoparticle Coating", Biomaterials, vol. 31, pp.998-1006, 2010)을 참조한다.
- [0135] T 세포는 외래 항원을 가지는 세포 또는 물질과 싸우기 위해 포유동물 면역계에 의해 사용된다. 고형 종양과 우연히 마주할 때, T 세포는 종종 유효 반응을 개시하여 점진적으로 상승시키는데에 실패한다. 심지어 T 세포가 종양 위치에 도달하였을 때에도, T 세포는 암세포가 면역계를 회피할 수 있도록 만드는, 면역 억제 인자의 암호

와 맞닥뜨리게 된다. CAR-T 기술은, 키메라 항원 수용체(CAR)를 T 세포에 삽입하여, 매우 특이적인 CAR-T 세포 (여기서 CAR은, 표적 조직 표면상에 있는 항원과의 특이적 결합에 의해, 조작된 CAR-T 세포를 표적 조직으로 유도함)를 제조함으로써, 자연 순환 T 세포를 다시 프로그래밍하는 유전자 조작 방법을 사용한다. 그러므로 CAR-T 세포는 종양 세포를 특이적으로 표적화할 수 있으며, 이를 통하여 CAR-T 세포는 자연 순환 T 세포보다 훨씬 더 효과적으로 만들어질 수 있다. CAR-T 세포는 또한 기타 표적 조직, 예컨대 염증 발생 관절과 뇌 조직을 표적화 하도록 조작될 수도 있다.

[0136] 본 발명의 CAR은 적어도 하나의 항원 특이적 표적화 영역(ASTR), 세포 외 스페이스 도메인(ESD), 경막 도메인(TM), 하나 이상의 보조 자극 도메인(CSD), 그리고 세포 내 신호전달 도메인(ISD)을 포함한다. 도 5와 문헌 (Jensen et al., "Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells," Immunol Rev., vol. 257, pp. 127-144, 2014)을 참조한다. ASTR이 종양 또는 기타 표적화된 조직상 표적 항원에 특이적으로 결합한 후, ISD는 CAR-T 세포 내에서 세포 내 신호전달을 활성화한다. 예를 들어 ISD는, 항체의 항원 결합 특성을 이용하면서, 비 MHC 제한 방식으로 선택된 표적(예컨대 종양 세포 또는 기타 표적화된 세포)에 대한 CAR-T 세포의 특이성과 반응성을 재유도할 수 있다. 비 MHC 제한 항원 인지는, 종양 세포를 인지하여 항원 가공을 개시할 수 있는 능력을 CAR-T 세포에 제공하고, 이로써 종양이 면역계의 감시로부터 도피할 때의 주요 기구는 우회된다. 하나의 구현예에서, EDS 및/또는 CSD는 선택적이다. 다른 구현예에서, ASTR 은 이중 특이성을 가지므로, 2개의 상이한 항원 또는 에피토프와 ASTR의 특이적 결합이 허용된다.

[0137] 본 발명의 조건부 활성 폴리펩티드는 ASTR 또는 이의 일부로서 조작될 수 있으며, 그 결과 CAR은 상이한 환경이 조성된 체내 다른 부위 또는 혈액 중에서보다, 특정의 환경, 예컨대 종양 미세환경 또는 활액막 액에서 표적 항 원과의 결합에 대해 그 활성이 더 커질 수 있게 된다. 이러한 CAR은 T 세포를 우선적으로 발병 위치로 운반하여, 정상 조직에서 T 세포 공격에 의해 발생하는 부작용들을 극적으로 줄인다. 이는, 치료 효능을 증가시 키기 위해 더 많은 용량의 T 세포가 사용되는 것을 허용하고, 치료에 대한 피험체의 내성을 줄여준다.

[0138] 이러한 CAR은 피험체 내 단기간 또는 제한된 기간 동안에만 요구되는 신규 치료제를 개발하는데에 특히 그 가치 가 있다. 유리한 적용예의 예들로서는, 고 투여량으로 행하여지는 전신 치료법과, 고 농도로 행하여지는 국소 치료법을 포함한다. 문헌(Maher, "Immunotherapy of Malignant Disease Using Chimeric Antigen Receptor Engrafted T Cells," ISRN Oncology, vol. 2012, article ID 278093, 2012)을 참조한다.

[0139] ASTR은 조건부 활성 폴리펩티드, 예컨대 종양이나 기타 표적 조직상 항원과 특이적으로 결합하는 항체, 특히 단 일 사슬 항체, 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. ASTR에 적합한 폴리펩티드의 몇몇 예들로서는, (시토카인 수 용체를 보유하는 세포의 인지를 초래하는) 결합형 시토카인, 애피바디, 자연 발생 수용체 유래 리간드 결합 도 메인, 그리고 수용체, 예컨대 종양 세포상 수용체에 대한 가용성 단백질/펩티드 리간드를 포함한다. 사실, 주여 진 항원과 높은 친화도로 결합할 수 있는 임의의 분자들 대부분이 ASTR 내에 사용될 수 있다.

[0140] 몇몇 구현예들에서, 본 발명의 CAR은 적어도 2개의 상이한 항원 또는 동일 항원 상 적어도 2개의 에피토프를 표 적화하는 ASTR을 적어도 2개 포함한다. 하나의 구현예에서, CAR은 적어도 3개 또는 그 이상의 상이한 항원 또는 에피토프를 표적화하는, 적어도 3개 이상의 ASTR을 포함한다. 다수개의 ASTR이 CAR 내에 존재할 때, 이 ASTR은 탠덤 형태로 정렬될 수 있으며, 링커 펩티드에 의해 격리될 수 있다(도 5).

[0141] 또 다른 구현예에서, ASTR은 다이아바디를 포함한다. 다이아바디에서, scFv는 링커 펩티드, 즉 지나치게 짧아서 2개의 가변 영역이 맞닿지 못하게 하고, scFv들의 이량체화를 유도하는 링커 펩티드가 사용되어 생성된다. (1 개 또는 2개의 아미노산으로 이루어진) 훨씬 짧은 링커들은, 소위 "트리아바디" 또는 "트리바디"라 칭하여지는 삼량체 형성을 초래한다. 테트라바디도 또한 ASTR 중에 사용될 수 있다.

[0142] CAR에 의해 표적화된 항원은, 제거가 의도되는 조직, 예컨대 종양, 샘종(예컨대 전립선) 증식, 사마귀 및 원치 않는 지방 조직 내 세포의 표면이나 내부에 존재한다. 표면 항원이 CAR의 ASTR에 의해 더욱 효율적으로 인지되 어 결합될 때, 세포 내 항원도 또한 CAR에 의해 표적화될 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 표적 항원은, 바람직하 게 암, 염증성 질환, 신경 장애, 당뇨병, 심혈관 질환 또는 감염성 질환에 특이적이다. 표적 항원의 예들로서는 다양한 면역 세포, 암종, 육종, 림프종, 백혈병, 생식 세포 종양, 아세포종 및 다양한 혈액학적 질환, 자가면역 성 질환 및/또는 염증성 질환과 연관된 세포들에 의해 발현되는 항원을 포함한다.

[0143] ASTR에 의해 표적화될 수 있는 암에 특이적인 항원으로서는, 4-IBB, 5T4, 선암 항원, 알파-태아 단백질, BAFF, B-림프종 세포, C242 항원, CA-125, 탄산무수화효소 9(CA-IX), C-MET, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23(IgE 수용체), CD28, CD30(TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80,

CEA, CTLA-4, DR5, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, 피브로넥틴 여분 도메인-B, 엽산염 수용체 1, GD2, GD3 강글리오사이드, 당단백 75, GPNMB, HER2/neu, HGF, 인간 산란 인자(human scatter factor) 수용체 키나아제, IGF-1 수용체, IGF-I, IgG1, LI-CAM, IL-13, IL-6, 인슐린 유사 성장 인자 I 수용체, 인테그린 $\alpha 5\beta 1$, 인테그린 $\alpha v\beta 3$, MORAb-009, MS4A1, MUC1, 뮤신 CanAg, N-글리코실뉴라민산, NPC-1C, PDGF-Ra, PDL192, 포스파티딜세린, 전립선 암종 세포, RANKL, RON, ROR1, SCH900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, 테나신 C, TGF 베타 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2 또는 비멘틴 중 하나 이상을 포함한다.

[0144] ASTR에 의해 표적화될 수 있는 염증성 질환에 특이적인 항원은 AOC3(VAP-1), CAM-3001, CCL11(에오타신-1), CD125, CD147(바시긴), CD154(CD40L), CD2, CD20, CD23(IgE 수용체), CD25(IL-2 수용체의 사슬), CD3, CD4, CD5, IFN- α , IFN- γ , IgE, IgE Fc 영역, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-22, IL-4, IL-5, IL-5, IL-6, IL-6 수용체, 인테그린 $\alpha 4$, 인테그린 $\alpha 4\beta 7$, 람다 글라마, LFA-1(CD11a), MEDI-528, 미오스타틴, OX-40, rhuMab $\beta 7$, 스크레로신, SOST, TGF 베타 1, TNF- α 또는 VEGF-A 중 하나 이상을 포함한다.

[0145] 본 발명의 ASTR에 의해 표적화될 수 있으며, 신경 장애에 특이적인 항원은 베타 아밀로이드 또는 MABT5102A 중 하나 이상을 포함한다. 본 발명의 ASTR에 의해 표적화될 수 있는 당뇨병에 특이적인 항원은 IL-I β 또는 CD3 중 하나 이상을 포함한다. 본 발명의 ASTR에 의해 표적화될 수 있는 심혈관 질환에 특이적인 항원은 C5, 심장 미오신, CD41(인테그린 알파-lib), 피브린 II, 베타 사슬, ITGB2(CD18) 및 스펅고신-1-인산염 중 하나 이상을 포함한다.

[0146] 본 발명의 ASTR에 의해 표적화될 수 있으며, 감염성 질환에 특이적인 항원은 탄저균 독소, CCR5, CD4, 응고 인자 A(clumping factor A), 거대세포바이러스, 거대세포바이러스 당단백 B, 내독소, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), B형 간염 표면 항원, B형 간염 바이러스, HIV-1, Hsp90, 인플루엔자 A 혈구응집소, 리포테이코산, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 광견병 바이러스 당단백, 호흡기 세포 융합 바이러스 및 TNF- α 중 하나 이상을 포함한다.

[0147] 표적 항원의 추가 예들로서는 특이적이거나 증폭된 형태로 암 세포 상에서 발견되는 표면 단백질, 예를 들어 B-세포 림프종에 대한 IL-14 수용체, CD19, CD20 및 CD40, 다양한 암종에 대한 루이스 Y 및 CEA 항원, 유방암 및 대장암에 대한 Tag72 항원, 폐암에 대한 EGF-R, 종종 인간 유방암 및 난소암에서 증폭되는 엽산염 결합 단백질 및 HER-2 단백질, 또는 바이러스 단백질, 예를 들어 HIV의 gp120 및 gp41 외피 단백질, B형 및 C형 간염 바이러스로부터 유래하는 외피 단백질, 인간 거대세포바이러스의 당단백 B 및 기타 외피 당단백, 그리고 발암 바이러스, 예를 들어 카포시 육종 연관 헤르페스 바이러스로부터 유래하는 외피 단백질을 포함한다. 기타 잠재적 표적 항원은 CD4(리간드가 HIV gp120 외피 당단백인 경우) 및 다른 바이러스 수용체, 예를 들어 ICAM(인간 리노바이러스에 대한 수용체), 그리고 소아마비 바이러스에 대한 관련 수용체 분자를 포함한다.

[0148] 또 다른 구현예에서, CAR은, 암 치료 세포, 예컨대 NK 세포가 면역 효과기 세포로서 작용하도록 면역 반응에 참여시킴으로써, 이 암 치료 세포를 활성화하는 항원을 표적화할 수 있다. 이에 관한 일례로서는, CD16A 항원을 표적화하여, NK 세포가 CD30 발현 악성종양과 싸우는데에 쓰이도록 하는 CAR이 있다. 이중 특이적 4가 AFM13 항체는, 이 효과를 전달할 수 있는 항체의 일례이다. 이러한 유형의 구현예에 관한 추가의 세부사항은, 예를 들어 문헌(Rothe, A., et al., "A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma," Blood, 25 June 2015, VI. 125, no. 26, pp. 4024-4031)에서 살펴볼 수 있다.

[0149] 몇몇 구현예들에서, 세포 외 스페이스 도메인과 경막 도메인은 유비퀴틴화(ubiquitylation)에 저항성일 수 있어서, CAR-T 세포 신호전달을 증진시킬 수 있고, 이로써 항 종양 활성화도 향상시킬 수 있다(Kunii et al., "Enhanced function of redirected human t cells expressing linker for activation of t cells that is resistant to ubiquitylation," Human Gene Therapy, vol. 24, pp. 27-37, 2013). 이 영역 내에서 세포 외 스페이스 도메인은 CAR-T 세포의 외부에 있으므로, 이 도메인은 상이한 조건들에 노출되어, 잠재적으로 조건부 유비퀴틴화 저항성으로 만들어질 수 있다.

[0150] C. 마스킹된 조건부 활성 폴리펩티드의 조작

[0151] 본 발명의 조건부 활성 폴리펩티드, 특히 조건부 활성 항체는, 이 항체 자체의 조건부 활성이 마스킹되도록 할 수 있고/있거나, 이 항체 자체에 접합된 제제의 활성이 마스킹기에 의해 마스킹되도록 할 수 있다. 일단 마스킹기가 조건부 활성 폴리펩티드로부터 제거되거나 절단되면, 마스킹되었던 활성은 다시 회복될 것이다. 적합한 마스킹 기술은, 예를 들어 문헌[Desnoyers et al., "Tumor-Specific Activation of an EGFR-Targeting Probody

Enhances Therapeutic Index," Sci. Transl. Med. 5, 207ra144, 2013]에 기술되어 있다.

- [0152] 몇몇 구현예들에서, 조건부 활성 항체는, 조건부 활성 및/또는 이 항체와 결합된 제제의 활성을 마스킹하는 마스킹 기와 결합한다. 예를 들어 조건부 활성 항체가 마스킹 기와 커플링되면, 이 커플링 또는 변형은 조건부 활성 항체가 자체의 항원과 특이적으로 결합하는 능력을 감소 또는 억제하는 구조적 변화를 초래할 수 있다. 일단 조건부 활성 항체가 표적 조직 또는 미세환경에 도달하면, 마스킹 기는 표적 조직 또는 미세환경에 존재하는 효소에 의해 절단되고, 이로써 마스킹되었던 활성이 발휘된다. 예를 들어 효소는 종양 미세환경에서 보통 활성을 가지는 프로테아제일 수 있는데, 이때 이 프로테아제 효소는 마스킹 기를 절단하여, 종양 조직 내에서 활성을 보이는 조건부 활성 항체를 방출시킨다.
- [0153] 몇몇 구현예들에서, 활성은 원래 활성의 약 50% 미만, 또는 원래 활성의 약 30% 미만, 또는 원래 활성의 약 10% 미만, 또는 원래 활성의 약 5% 미만, 또는 원래 활성의 약 2% 미만, 또는 원래 활성의 약 1% 미만, 또는 원래 활성의 약 0.1% 미만, 또는 원래 활성의 약 0.01% 미만까지 마스킹된다. 몇몇 구현예들에서, 예를 들어 전달에 적당한 시간을 보장하기 위해 마스킹 효과는, 생체 내 또는 표적 치환 시험관 내 면역흡착 검정에서 측정될 때 적어도 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96 시간, 또는 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180일, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 개월 이상 동안 지속되도록 디자인된다.
- [0154] 임의의 구현예에서, 마스킹 기는 조건부 활성 항체의 자연 결합 파트너(항원)와 구조가 유사하다. 마스킹 기는 조건부 활성 항체의 변형된 자연 결합 파트너로서, 조건부 활성 항체와의 결합에 대한 친화성 및/또는 결합활성을 적어도 약간 감소시키는 아미노산 변이들을 포함할 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 마스킹 기는 조건부 활성 항체의 자연 결합 파트너와 상동성을 가지지 않거나 실질적으로 가지지 않는다. 다른 구현예들에서, 마스킹 기는 조건부 활성 항체의 자연 결합 파트너와 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 80% 이하의 서열 동일성을 가진다.
- [0155] 마스킹 기는 다수의 상이한 형태로 제공될 수 있다. 임의의 구현예들에서, 마스킹 기는 조건부 활성 항체의 공지된 결합 파트너일 수 있으나, 다만 마스킹 기는, 이 마스킹 기 표적과의 원하는 결합을 방해하는 것을 감소시키기 위해 마스킹 기 절단 후 조건부 활성 항체가 표적화하는 표적 단백질보다는, 작은 친화성 및/또는 결합활성으로 조건부 활성 항체와 결합한다. 그러므로 마스킹 기는, 이 마스킹 기가 절단되기 전 조건부 활성 항체가 표적과 결합하게 되는 것을 마스킹하되, 이 마스킹 기가 항체로부터 절단되었을 때 활성 분자와 표적의 결합을 실질적으로나 유의적으로 방해하지 않거나 이와 같은 결합과 경쟁하지 않는 것이 바람직하다. 구체적인 구현예에서, 조건부 활성 항체와 마스킹 기는 자연 발생 결합 파트너 쌍의 아미노산 서열들을 함유하지 않으므로, 조건부 활성 항체와 마스킹 기 중 적어도 하나는 자연 발생 결합 파트너 일원의 아미노산 서열을 가지지 않는다.
- [0156] 대안적으로, 마스킹 기는 조건부 활성 항체와 특이적으로 결합할 수는 없고, 오히려 비 특이적 상호작용을 통한 조건부 활성 항체-표적 결합을 방해한다(예를 들어 입체 장애). 예를 들어 마스킹 기는, 항체의 구조 또는 형태가, 마스킹 기가, 예를 들어 전하 기반 상호작용을 통해 조건부 활성 항체를 마스킹하여, 표적이 조건부 활성 항체로 접근하는 것을 방해하는 것을 허용하도록 위치할 수 있다.
- [0157] 몇몇 구현예들에서, 마스킹 기는 공유 결합에 의해 조건부 활성 항체와 커플링된다. 다른 구현예에서, 조건부 활성 항체는, 이 조건부 활성 항체의 N-말단부에 마스킹 기를 결합시킴으로써 표적과의 결합이 억제된다. 또 다른 구현예에서, 조건부 활성 항체는 마스킹 기와 조건부 활성 항체 사이의 시스테인-시스테인 이황화물 가교에 의해 마스킹 기와 커플링된다.
- [0158] 몇몇 구현예들에서, 조건부 활성 항체는 절단 가능 기(Cleavable Moiety; CM)와 추가로 커플링된다. 이 CM은 효소에 의해 절단될 수 있거나, 또는 이 CM은 환원제에 의해 환원될 수 있거나, 아니면 이 CM은 광 분해될 수 있다. 하나의 구현예에서, CM의 아미노산 서열은 마스킹 기와 중첩될 수 있거나 이에 포함될 수 있다. 다른 구현예에서, CM은 조건부 활성 항체와 마스킹 기 사이에 존재한다. CM의 전부 또는 일부는 절단되기 전에 조건부 활성 항체의 마스킹을 촉진할 수 있음을 주목하여야 한다. CM이 절단될 때, 조건부 활성 항체는 자체의 항원과의 결합에 있어서 더욱 큰 활성을 가지게 된다.
- [0159] CM은 피험체 내 치료 위치에서 표적 항원과 공동 편재되는 효소의 기질일 수 있다. 대안적으로, 또는 부가적으로 CM은 이황화물 결합의 환원에 의해 절단될 수 있는 시스테인-시스테인 이황화물 결합을 가질 수 있다. CM은 또한 광원에 의해 활성화될 수 있는 광 불안정 기질일 수도 있다.
- [0160] CM을 절단하는 효소는 조건부 활성 항체의 원하는 표적 조직 내에 우선적으로 편재되어야 하고, 이때 조건부 활성 항체는 표적 조직(비정상 조건), 예를 들어 발병된 조직 또는 종양 조직에 제시된 조건에서 더욱 활성이다.

예를 들어 다수의 암, 예를 들어 증가한 수준을 보이는 공지의 프로테아제가 고형 종양 내에 존재한다. 예를 들어 문헌[La Rocca et al, (2004) British J. of Cancer 90(7): 1414-1421]을 참조한다. 이러한 질환의 비 제한적 예들은 모든 유형의 암(유방암, 폐암, 결장직장암, 전립선암, 두경부암, 췌장암 등), 류머티즘성 관절염, 크론병, 흑색종, SLE, 심혈관 피해, 허혈 등을 포함한다. 그러므로, 종양 조직에 존재하는 프로테아제, 특히 비암성 조직에서보다 종양 조직에서 상승한 수준으로 존재하는 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 펩티드 기질을 포함하는 적합한 CM이 선택될 수 있다.

[0161] 몇몇 구현예들에서, CM은 레구마인, 플라스민, TMPRSS-3/4, MMP-9, MTI-MMP, 카텝신, 카스파아제, 인간 호중구 엘라스타아제, 베타-세크라타아제, uPA 및 PSA로부터 선택된 효소에 대한 기질일 수 있다. CM을 절단하는 효소는 비 치료 위치의 조직(예를 들어 건강한 조직)보다 치료 위치의 표적 조직(예를 들어 치료적 처치 또는 진단적 처치가 행하여진 발병된 조직 또는 종양 조직) 중에 비교적 높은 수준으로 존재한다. 그러므로 발병된 조직 또는 종양 조직에서 활성이 더 클 수 있는 항체의 조건부 활성 이외에, 발병된 조직이나 종양 조직에 제시된 효소는 CM을 절단할 수 있으며, 이로써 조건부 활성 항체의 활성 또는 접합된 제제의 활성이 더 향상된다. 비 변형 또는 비 절단 CM은 조건부 활성 항체의 활성을 효율적으로 억제 또는 마스킹할 수 있으므로, 조건부 활성 항체는 정상 조직(정상 생리학적 조건)에서 활성이 더 작다. 정상 조직에서 조건부 활성 항체의 활성을 억제하는 이중 기구(조건부 활성 및 마스킹 기)는 유의적 부작용을 일으키지 않고 더 많은 용량의 조건부 활성 항체가 사용될 수 있도록 허용한다.

[0162] 몇몇 구현예들에서, CM은 이하 표 1에 나열된 효소들로부터 선택된 효소의 기질일 수 있다.

표 1

예시적 효소/프로테아제

ADAM10	카스파아제8	카텝신S	MMP 8
ADAM12	카스파아제9	FAP	MMP 9
ADAM17	카스파아제10	그란자임 B	MMP-13
ADAMTS	카스파아제11	구아니디노벤조아타아제(GB)	MMP 14
ADAMTS5	카스파아제12	헤파신	MT-SP1
BACE	카스파아제13	인간 호중구 엘라스타아제(HNE)	네프릴리신
카스파아제	카스파아제14	레구마인	NS3/4A
카스파아제1	카텝신	마트립타아제 2	플라스민
카스파아제2	카텝신A	메프린	PSA
카스파아제3	카텝신B	MMP 1	PSMA
카스파아제4	카텝신D	MMP 2	YACE
카스파아제5	카텝신E	MMP 3	IMPRSS 3 / 4
카스파아제6	카텝신K	MMP 7	uPA
카스파아제7	MTI-MMP		

[0163]

[0164] 대안적으로, 또는 부가로, CM은 고형 종양의 조직 또는 주변부에 다량으로 존재할 수 있는, 글루타치온(GSH), 티오레독신, NADPH, 플라빈, 아스코르브산염 등을 비롯한 세포성 환원제와 같은 환원제에 의해 절단될 수 있는, 시스테인 쌍의 이황화물 결합을 포함할 수 있다.

[0165] 몇몇 구현예들에서, 조건부 활성 항체는 CM과 마스킹 기 둘 다를 함유한다. 조건부 활성 항체의 활성은 효소에 의해 CM이 절단될 때 마스킹되지 않는다. 몇몇 구현예들에서, 하나 이상의 링커, 예를 들어 가요성 링커가 항체, 마스킹 기 및 CM 사이에 삽입되어 가요성이 제공될 것이 요망될 수 있다. 예를 들어 마스킹 기 및/또는 CM은 원하던 가요성을 제공하기에 충분한 수의 잔기들(예를 들어 Gly, Ser, Asp, Asn, 구체적으로 Gly 및 Ser, 특히 Gly)을 함유할 수 없다. 이처럼 가요성 링커를 제공하기 위해 하나 이상의 아미노산을 도입하는 것이 유리할 수 있다. 예를 들어 마스킹된 조건부 활성 항체는 하기 구조를 가질 수 있다[여기서, 이하 화학식은 N-말단부 → C-말단부 방향 또는 C-말단부 → N-말단부 방향 중 어느 한 방향으로 아미노산 서열을 나타낸 것임]:

[0166] (MM)-L₁-(CM)-(AB)

[0167] (MM)-(CM)-L₁-(AB)

[0168] (MM)-L₁-(CM)-L₂-(AB)

[0169] 사이클로[L₁-(MM)-L₂-(CM)-L₃-(AB)]

- [0170] [상기 식 중,
- [0171] MM은 마스킹 기가고, AB는 조건부 활성 항체이며; L_1 , L_2 및 L_3 은 각각 독립적으로 적어도 1개의 가요성 아미노산(예를 들어 Gly)을 포함하는 동일하거나 상이한 가요성 링커를 나타내는 것으로서, 이는 선택적으로 존재하거나 존재하지 않으며; "사이클로"가 존재할 경우, 전체 구조는 구조의 N-말단부와 C-말단부 둘 다 또는 이것들 둘 다의 근처에 있는 시스테인들 쌍 사이에 이황화물 결합의 존재로 말미암아 사이클릭 구조의 형태를 가지게 됨]
- [0172] 본 발명에 사용되기 적합한 링커는 일반적으로 조건부 활성 항체의 활성 억제를 촉진하는 마스킹 기에 가요성을 제공하는 것이다. 이러한 링커는 일반적으로 가요성 링커라고 칭하여진다. 적합한 링커는 용이하게 선택될 수 있으며, 상이하되 적합한 길이, 예를 들어 1개 아미노산(예를 들어 Gly) 내지 20개 아미노산, 2개 아미노산 내지 15개 아미노산, 3개 아미노산 내지 12개 아미노산, 예를 들어 4개 아미노산 내지 10개 아미노산, 5개 아미노산 내지 9개 아미노산, 6개 아미노산 내지 8개 아미노산, 또는 7개 아미노산 내지 8개 아미노산을 가지는 임의의 것일 수 있는데, 이 링커의 길이는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 아미노산일 수 있다.
- [0173] 예시적 가요성 링커는 글리신 중합체 $(G)_n$, 글리신-세린 중합체(예를 들어 $(GS)_n$, $(GSGGS)_n$ 및 $(GGGS)_n$ 포함(다만 n 은 적어도 1인 정수임)), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 그리고 당 업계에 공지된 기타 가요성 링커를 포함한다. 예시적 가요성 링커는 Gly-Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly-Ser-Gly, Gly-Ser-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Ser-Gly, Gly-Ser-Ser-Ser-Gly 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0174] 조건부 활성 항체의 활성을 마스킹하기 위하여 사용되는 기술들 일부는 WO 2010/081173 A2에 기술되어 있다.
- [0175] 본 발명은 모 폴리펩티드, 예컨대 야생형 폴리펩티드 또는 치료용 폴리펩티드로부터 조건부 활성 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다. 본 방법은, 돌연변이 DNA를 제조하기 위한 진화 기술 하나 이상을 사용하여 모 폴리펩티드를 암호화하는 DNA를 진화시키는 단계; 돌연변이 DNA를 발현시켜 돌연변이 폴리펩티드를 수득하는 단계; 이 돌연변이 폴리펩티드와 모 폴리펩티드를 대상으로 제1 조건 하에서의 검정과 제2 조건 하에서의 검정을 실시하는 단계; 그리고 돌연변이 폴리펩티드로부터 (a) 모 폴리펩티드와 비교되었을 때 제1 조건에서의 검정에서 감소한 활성 및 (b) 모 폴리펩티드와 비교되었을 때 제2 조건에서의 검정에서 증가한 활성 둘 다를 보이는 조건부 활성 폴리펩티드를 선택하는 단계를 포함한다. 제1 조건하에서의 검정과 제2 조건 하에서의 검정은 무기 화합물, 이온 및 유기 분자로부터 선택되는 성분 적어도 하나를 함유하는 검정 용액 중에서 수행된다. 몇몇 구현예들에서, 제1 조건은 정상 생리학적 조건이고, 제2 조건은 비정상 조건이다.
- [0176] 본 조건부 활성 폴리펩티드는, 제1 조건 또는 정상 생리학적 조건에서 가역적으로 또는 비가역적으로 비활성화되지만, 제2 조건 또는 비정상 조건에서는 제1 조건 또는 정상 생리학적 조건에서의 활성과 동일하거나 동등한 수준으로 활성이다. 이들 조건부 활성 폴리펩티드 및 이러한 폴리펩티드를 제조하는 방법은 미국 특허 제 8,709,755 B2호에 기술되었다. 조건부 활성 폴리펩티드는 숙주 내에서 짧거나 제한된 기간 동안에 활성인 신규 치료제의 개발에 특히 유용하다. 이는 주어진 용량에서 치료제의 연장된 작용이 숙주에 유해하지만, 요망되는 치료를 수행하기 위해 제한된 활성이 필요한 경우에 특히 유용하다. 유익한 적용의 예는 고 용량에서의 국소 또는 전신 치료뿐만 아니라, 고 농도에서의 국소 치료를 포함한다. 제1 조건 또는 정상 생리학적 조건하의 비활성화는 폴리펩티드의 용량 및 비활성화 속도의 조합에 의해 결정될 수 있다. 상기 조건에 근거한 비활성화는, 촉매 활성이 비교적 단기간 내에 실질적 네거티브 효과를 유발하는 경우 효소 치료제에 있어 특히 중요하다.
- [0177] 본 발명은 또한, 시간에 따라 가역적으로 또는 비가역적으로 활성화 또는 비활성화되거나, 아니면 체내의 특정 장기(예를 들어 중앙 미세환경, 혈액막 액, 방광 또는 신장)를 포함하는 체내 임의의 미세환경에 있는 경우에만 활성화되거나 비활성화되는 조건부 활성 폴리펩티드를 제조하기 위해서, 모 폴리펩티드를 조작하거나 진화시키는 방법에 관한 것이다. 몇몇 구현예들에서, 조건부 활성 폴리펩티드는 본원에 기술된 바와 같은, 하나 이상의 표적 단백질(항원)에 대한 항체 또는 항체 단편이다.
- [0178] 본 조건부 활성 폴리펩티드는 pH 의존적 활성을 보이는 단리된 폴리펩티드일 수 있는데, 여기서 제1 pH에서의 활성은, 히스티딘, 히스타민, 수소화 아데노신 이인산염, 수소화 아데노신 삼인산염, 시트르산염, 중탄산염, 아세트산염, 젖산염, 이황화물, 황화수소, 암모늄, 인산이수소 및 이것들의 임의의 조합으로부터 선택되는 종의 존재하에 제2 pH에서의 활성의 적어도 약 1.3배이다. 이와 동일한 활성은 소 분자의 부재 하에서는 pH 의존적이지 않다. 몇몇 구현예들에서, 제1 pH에서의 활성은 제2 pH에서의 이와 동일한 활성의 적어도 약 1.5배, 또는 적어도 약 1.7배, 또는 적어도 약 2.0배, 또는 적어도 약 3.0배, 또는 적어도 약 4.0배, 또는 적어도 약 6.0배, 또는 적어도 약 8.0배, 또는 적어도 약 10.0배, 또는 적어도 약 20.0배, 또는 적어도 약 40.0배, 또는 적어도

약 60.0배, 또는 적어도 약 100.0배이다. 제1 pH는 약 5.5 ~ 약 7.2, 또는 약 6.2 ~ 약 6.8 범위의 비정상 pH 인 반면, 제2 pH는 약 7.2 ~ 약 7.6 범위의 정상 생리학적 pH일 수 있다.

[0179] D. 모 폴리펩티드

[0180] 모 폴리펩티드는 야생형 폴리펩티드, 예컨대 비 자연 발생 폴리펩티드, 야생형 폴리펩티드 유래 돌연변이 폴리펩티드, 예컨대 치료용 폴리펩티드, 상이한 야생형 폴리펩티드들 유래 키메라 폴리펩티드, 또는 심지어 합성 폴리펩티드일 수 있다. 모 폴리펩티드는 항체, 효소, 시토키인, 조절 단백질, 호르몬, 수용체, 리간드, 바이오시밀러, 면역 조절제, 성장 인자 및 이러한 폴리펩티드들의 단편들로부터 선택될 수 있다.

[0181] 적합한 야생형 폴리펩티드와, 이를 진화시킨 후 선택하여 조건부 활성 폴리펩티드를 제조할 수 있는 방법에 관한 설명은 미국특허 제8,709,755 B2호에 기술되어 있다.

[0182] 몇몇 구현예들에서, 모 폴리펩티드는 야생형 폴리펩티드 또는 돌연변이 폴리펩티드의 라이브러리, 예컨대 박테리오파지 전사 라이브러리로부터 선택될 수 있다. 이러한 구현예들에서, 다수의 후보 폴리펩티드는, 구체적으로 표면 전시 기술에 의해 박테리오파지 라이브러리에서 발현된다. 라이브러리로부터 유래한 후보 폴리펩티드는 적합한 모 폴리펩티드에 대해 스크리닝된다. 통상의 박테리오파지 라이브러리는 박테리아 숙주에서 수천 개 또는 심지어 수백만 개의 후보 폴리펩티드를 발현하는 박테리오파지를 함유할 수 있다. 하나의 구현예에서, 박테리오파지 라이브러리는 다수의 박테리오파지를 포함할 수 있다.

[0183] 통상적으로 사상 박테리오파지인 박테리오파지 라이브러리를 구성하기 위하여, 예를 들어 사상 콜라이파지 M13 은, 후보 폴리펩티드들을 암호화하는 올리고뉴클레오타이드들이 박테리오파지 외피 단백질을 중 하나의 암호화 서열에 삽입됨으로써 유전자 변형된다. 박테리오파지 입자의 외피 단백질은 추후 후보 폴리펩티드들과 함께 발현되고, 그 결과 후보 폴리펩티드들은 박테리오파지 입자 표면에 전시된다. 그 다음, 전시된 후보 폴리펩티드들은 적합한 모 폴리펩티드에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0184] 적합한 모 폴리펩티드에 대해 스크리닝하기 위한 하나의 통상적인 기술은, 지지체 상에 원하는 후보를 폴리펩티드를 가지는 박테리오파지 입자를 고정하는 것이다. 이 지지체는 원하는 후보 폴리펩티드와 결합할 수 있는 "미끼(bait)"로 코팅된 플라스틱 플레이트일 수 있다. 미결합 박테리오파지 입자들은 플레이트로부터 씻겨져 나갈 수 있다. (원하는 후보들을 가지는) 플레이트와 박테리오파지 입자의 결합은 세정에 의해 용리되고, 용리된 박테리오파지 입자들은 박테리아 내에서 증식된다. 그 다음, 선택된 박테리오파지 입자들 내 후보 폴리펩티드들을 암호화하는 서열(들)은 서열결정에 의해 결정될 수 있다. 후보와 미끼 간 관계는, 예를 들어 리간드-수용체 또는 항원-항체의 관계일 수 있다.

[0185] 적합한 모 폴리펩티드를 스크리닝하는 또 다른 통상의 기술은, 후보 폴리펩티드에 의해 발휘되는 원하는 효소 활성에 대해 개별 박테리오파지 클론들의 효소에 의한 검정을 이용하는 기술이다. 특이적 효소 활성에 따라서, 당 업계의 숙련자는 효소 활성을 원하는 수준만큼 보이는 모 폴리펩티드를 스크리닝하기에 적당한 검정을 디자인할 수 있다.

[0186] 몇몇 구현예들에서, 박테리오파지 라이브러리는 어레이(array)로서 제공되는데, 그 결과 각각의 박테리오파지 클론은 어레이 상 특이 병소를 차지하게 된다. 이러한 어레이는 고체 지지체, 예를 들어 막, 아가 플레이트 또는 미세 적정 플레이트 상에 제공될 수 있는데, 이 경우 라이브러리의 각각의 박테리오파지 클론은 고체 지지체의 특이적인 소정 위치에 부착 또는 고착된다. 아가 플레이트의 경우, 이러한 플레이트는 바람직하게 박테리아 성장을 지지하기 위해 박테리아 성장 배지를 포함한다. 어레이가 막, 예를 들어 니트로셀룰로스 또는 나일론 막 상에 제공될 때, 박테리아 배양액은 막에 적용되고, 이 막은 영양 성장 배지로 침지된다. 또한, 박테리오파지 클론은 또한 비드 상에 제공될 수 있는데, 이 경우 하나의 박테리오파지 클론은 하나의 비드에 고착될 수 있다. 대안적으로, 박테리오파지 클론 각각은 광 섬유 말단 상에 제공될 수 있는데, 이 경우 상기 섬유는 광원으로부터 발하여지는 자외 복사선과 광학적으로 소통하는데에 사용된다.

[0187] 통상의 박테리오파지 라이브러리는 10^6 개 내지 10^{10} 개의 재조합 박테리오파지를 함유할 수 있으며, 이 재조합 박테리오파지 각각은 상이한 후보 폴리펩티드를 보유하는 외피 단백질(예를 들어 M13 파지의 경우 gp3 또는 gp8)에 의해 구별된다. 박테리오파지 라이브러리에 대한 박테리아 숙주는, 예를 들어 살모넬라(*Salmonella*), 스탕필로코커스(*Staphylococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 쉬겔라(*Shigella*), 리스테리아(*Listeria*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 크렙시엘라(*Klebsiella*), 예시니아(*Yersinia*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 및 에스케리치아(*Escherichia*)를 포함하는 박테리아 속으로부터 선택될 수 있다.

- [0188] 후보 폴리펩티드들을 암호화하는 올리고뉴클레오티드들은 야생형 폴리펩티드를 암호화하는 cDNA들의 무리일 수 있다. 생체 샘플로부터 cDNA를 합성하기 위한 방법들이 공지되어 있으며, 이로써 적합한 야생형 단백질이 발견될 수 있다. 전사체를 통하여 생리학적 활성을 나타내는 임의의 유전 정보가 cDNA로서 수집될 수 있다. cDNA가 제조될 때, 전장 cDNA를 합성하는 것은 필수이다. 전장 cDNA를 합성하기 위하여 사용될 수 있는 방법이 몇 가지 존재한다. 예를 들어 적합한 방법은, 5' Cap 위치를 표지화하기 위해 효모 또는 Hela 세포의 Cap 결합 단백질을 이용하는 방법[I. Edery et al., "An Efficient Strategy To Isolate Full-length cDNAs Based on a mRNA Cap Retention Procedure (CAPture)", Mol. Cell. Biol., vol. 15, pages 3363-3371, 1995]; 알칼리성 인산화 효소가 사용되어 5' Cap을 가지지 않는 불완전 cDNA의 인산염이 제거된 다음, 전체 cDNA가 담배 모자이크 바이러스의 탈 캡핑 효소(de-capping enzyme)로 처리되어, 오로지 전장인 cDNA만이 인산염을 가지도록 만드는 방법[K. Maruyama et al., "Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides", Gene, vol. 138, pages 171-174, 1995 and S. Kato et al., "Construction of a human full-length cDNA bank", Gene, vol. 150, pages 243-250, 1995]을 포함한다.
- [0189] 모 폴리펩티드가 항체인 구현예들에 있어서, 후보 항체의 라이브러리는 또한 유기체의 완전 항체 레파토리로부터 유래하는 제조합 항체가 사용되어 제조될 수도 있다. 이 레파토리를 나타내는 유전 정보는, 원하는 항원 결합 활성 및/또는 하나 이상의 기타 작용 특징을 가지는 적합한 모 항체를 스크리닝할 수 있는 전 항체의 큰 무리로 조립된다. 몇몇 구현예들에서, 항원으로 면역화된 동물로부터 유래하는 B 세포, 예를 들어 면역화된 인간, 마우스 또는 토끼 B 세포가 단리된다. 단리된 B 세포로부터 유래하는 mRNA는 수집된 후(cDNA로 전환된 후) 서열 결정된다. 경쇄를 암호화하는 것으로서 가장 빈번하게 출현하는 cDNA 단편과, 중쇄를 암호화하는 것으로서 가장 빈번하게 출현하는 cDNA 단편이 항체로 조립된다. 하나의 구현예에서, 경쇄를 암호화하는 것으로서 가장 빈번하게 출현하는 cDNA 단편 100개와, 중쇄를 암호화하는 것으로서 가장 빈번하게 출현하는 cDNA 단편 100개는 조립되어 후보 항체를 이룬다. 다른 구현예에서, 가장 빈번하게 출현하는 cDNA 단편은 오로지 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역만을 암호화하고, 항체 단편을 생산하도록 조립된 항체는 오로지 가변 영역들만을 함유하되, 불변 영역들은 함유하지 않는다.
- [0190] 몇몇 구현예들에서, IgG 중쇄의 가변 영역들을 암호화하는 cDNA 단편들은 가장 빈번히 출현하는 IgK의 가변 영역 또는 IgK 경쇄 함께 조립된다. 조립된 항체들은 IgG로부터 유래하는 중쇄 가변 영역과, IgK로부터 유래하는 경쇄 가변 영역 또는 IgK를 함유하게 된다.
- [0191] 그 다음, 조립된 항체를 암호화하는 cDNA들은 바람직하게 플레이트 기반 체제로 클로닝 및 발현된다. 발현된 항체의 결합 활성은 비드 기반 ELISA 검정으로 검정될 수 있고, 적합한 모 항체는 ELISA 검정을 기반으로 선택될 수 있다. 조립된 항체를 암호화하는 cDNA는 또한 박테리오파지 전사 라이브러리에서 발현될 수 있고, 이후에는 본원에 개시된 기술들 중 임의의 것 하나에 의해 원하는 모 항체 하나 이상에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0192] 모 폴리펩티드가 항체인 구현예들에서, 이 모 폴리펩티드는 바람직하게 모 항체가 조건부 활성인 항체로 진화되는 것을 더 용이하게 만드는 구체적인 특징을 적어도 하나 가진다. 임의의 구현예들에서, 모 항체는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에서 유사한 결합 활성 및/또는 특징들을 가질 수 있다. 이와 같은 구현예들에서, 모 항체는, 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에서 1가지 이상의 특징의 가장 유사한 조합 및/또는 가장 유사한 결합 활성을 가지는지를 기반으로 선택된다. 예를 들어 만일 정상 생리학적 조건과 비정상 조건이 각각 pH 7.4 및 pH 6.0이면, pH 7.4 및 6.0에서 가장 유사한 결합 활성을 가지는 야생형 항체는 pH 7.4 및 6.0에서 덜 유사한 결합 활성을 가지는 항체에 대해 선택될 수 있다.
- [0193] E. 조건부 활성 폴리펩티드의 동정
- [0194] 모 폴리펩티드가 선택된 후, 이 모 폴리펩티드를 암호화하는 DNA는 돌연변이 DNA를 생산하는데 적합한 돌연변이 유발 기술이 사용되어 진화되고, 이후 이 돌연변이 DNA는 돌연변이 폴리펩티드를 생성하도록 발현된 후, 조건부 활성 폴리펩티드를 동정하기 위해 스크리닝된다. 몇몇 구현예들에서, 진화는 최소일 수 있는데, 예를 들어 오로지 소수의 돌연변이만이 모 폴리펩티드에 도입되어, 원하는 조건부 활성을 가지는 돌연변이 폴리펩티드가 생산된다. 예를 들어 포괄적 자리 진화(comprehensive positional evolution)(CPE)에 의해 각각의 위치에 도입된 변이 약 20개 미만, 가능하게는 약 18개 미만은 적합한 조건부 활성 폴리펩티드를 생산하기에 충분하다. 포괄적 자리 합성(comprehensive positional synthesis)(CPS)에 있어서, 모 폴리펩티드 내 약 6개 미만의 상향 돌연변이 또는 약 5개 미만의 상향 돌연변이 또는 약 4개 미만의 상향 돌연변이 또는 약 3개 미만의 상향 돌연변이 또는 약 2개 미만의 상향 돌연변이의 조합은 원하는 조건부 활성 폴리펩티드를 생산하기에 충분할 수 있다.
- [0195] 몇몇 구현예들에서, 후보 폴리펩티드의 라이브러리(예를 들어 박테리오파지 라이브러리 및/또는 제조합 항체 라

이브러리)가 충분히 크면 진화 및 발현 단계는 불필요할 수 있다. 이처럼 큰 라이브러리는 조건부 활성 특징들을 보이는(정상 생리학적 조건 하에서의 검정에서는 낮은 활성을 보임과 동시에, 비정상 조건 하에서의 검정에서는 높은 활성을 보이거나(다만 이 두 경우는 기준 폴리펩티드와 비교되었을 때임), 또는 비정상 조건 하에서의 검정에서보다 정상 생리학적 조건 하에서의 검정에서가 활성이 더 낮은) 후보 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 이러한 구현예들에서, 라이브러리 내 후보 폴리펩티드는 정상 생리학적 조건 하에서의 검정에서 비정상 조건 하에서의 검정에서의 동일 폴리펩티드보다 작은 활성을 보이는 조건부 활성 폴리펩티드를 발견하기 위한 선택 단계의 대상이 된다. 하나의 구현예에서, 라이브러리 내 후보 폴리펩티드는 별개로 기준 폴리펩티드와 함께, 정상 생리학적 조건 하에서의 검정과 비정상 조건 하에서의 검정의 대상이 된다. 라이브러리로부터 선택된 조건부 활성 폴리펩티드는 비정상 조건 하에서 동일 폴리펩티드의 더 큰 활성 및 정상 생리학적 조건 하에서 더 낮은 활성을 보이는(다만, 이 경우 둘 다 기준 폴리펩티드와 비교됨) 폴리펩티드이다. 이 구현예에서, 라이브러리는 충분히 크고, 조건부 활성 특징들을 보이는 후보 폴리펩티드는 이미 라이브러리 내에 존재한다. 조건부 활성 폴리펩티드를 발견하기 위해서 모 폴리펩티드의 진화는 필요하지 않다.

[0196] 몇몇 구현예들에서, 기준 폴리펩티드는, 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에서 유사하거나 동일한 활성을 가진다는 점에서 조건부 활성일 수 없다. 기준 폴리펩티드는 라이브러리 내 후보 폴리펩티드와 동일한 유형의 폴리펩티드, 예를 들어 동일한 유형의 효소, 시토키인, 조절 단백질, 항체, 호르몬 또는 작용성 펩티드이다. 기준 폴리펩티드는 또한 조직 플라스미노겐 활성 인자, 스트렙토키나제, 우로키나제, 레닌, 히알루로니다제, 칼시토닌 유전자 관련 펩티드(CGRP), 성분 P(SP), 뉴로펩티드 Y(NPY), 혈관 작용성 장 펩티드(VTP), 바소프레신 및 안지오테신과 동일한 유형의 것일 수도 있다. 예를 들어 라이브러리가 항원에 대한 다수의 후보 항체를 함유하면, 기준 폴리펩티드는 정상 생리학적 조건 및 비정상 조건 둘 다에서 동일하거나 유사한 항원과의 결합 활성을 보이는, 동일 항원에 대한 항체이다.

[0197] 그러므로 하나의 구현예에서, 기준 폴리펩티드와 함께, 라이브러리 내 후보 폴리펩티드는 개별적으로 정상 생리학적 조건 하에서의 검정과 비정상 조건 하에서의 검정의 대상이 된다. 조건부 활성 폴리펩티드는 (a) 정상 생리학적 조건 하에서 기준 폴리펩티드에 비교되었을 때 감소한 활성을 보임과 동시에, (b) 비정상 조건 하에서 기준 폴리펩티드에 비교되었을 때 증가한 활성을 보이는 라이브러리로부터 선택된다.

[0198] F. 조건부 활성 폴리펩티드를 제조하는 방법

[0199] 모 폴리펩티드를 암호화하는 DNA를 진화시켜 돌연변이 DNA를 제조하기 위해 하나 이상의 돌연변이 유발 기술이 사용되는데; 이 돌연변이 DNA는 발현되어 돌연변이 폴리펩티드가 되고; 돌연변이 폴리펩티드는 정상 생리학적 조건일 수 있는 제1 조건하에서의 스크리닝 검정과, 비정상 조건일 수 있는 제2 조건 하에서의 스크리닝 검정의 대상이 된다. 조건부 활성 폴리펩티드는 (a) 모 폴리펩티드와 비교되었을 때 제1 조건하에서 검정시 활성의 감소, 및 (b) 모 폴리펩티드와 비교되었을 때 제2 조건하에서 검정시 활성의 증가 둘 다를 보이는 돌연변이 폴리펩티드로부터 선택된다. 제1 조건 또는 정상 생리학적 조건에서의 조건부 활성 폴리펩티드의 활성 감소는 가역적이거나 비가역적일 수 있다.

[0200] 몇몇 구현예들에서, 진화된 폴리펩티드는 야생형 폴리펩티드의 단편, 치료용 폴리펩티드의 단편, 또는 항체 단편일 수 있다. 다른 몇몇 구현예들에서, 모 폴리펩티드는, 원하는 특성, 예컨대 큰 결합 활성, 큰 발현 수준 또는 인간화를 보이는 폴리펩티드가 선택되는 돌연변이유발 방법에 의해 제조된 돌연변이 폴리펩티드들로부터 선택되는 폴리펩티드일 수 있다. 선택된 폴리펩티드는 본원에 개시된 방법에서 진화된 모 폴리펩티드로서 사용될 수 있다.

[0201] 모 폴리펩티드를 암호화하는 DNA로부터 돌연변이 DNA를 제조하는 방법들은 미국 특허 제8,709,755 B2호에 기술되었다.

[0202] 돌연변이 DNA를 제조하기 위해 모 폴리펩티드를 암호화하는 DNA를 진화시키는 것은, 점 돌연변이(치환, 삽입 및/또는 결실), 또는 DNA 내부 큰 분절의 돌연변이가 이용되어 수행될 수 있다. 몇몇 양상들에서, 진화 단계는 모 폴리펩티드의 활성 위치를 바꾸지 않지만, 그 대신 오로지 활성 위치 주변의 영역들 중 한 군데 이상 및/또는 활성 위치로부터 멀리 떨어진 영역들 중 한 군데 이상만을 바꾼다.

[0203] 하나의 양상에서, 진화 단계는 모 전장 항체를 단일 사슬 항체로 전환하는 단계를 수반한다. 이 경우에 있어서, 활성 위치, 즉 가변 영역, 특히 CDR이 모 항체에 비하여 어떠한 돌연변이도 가질 수 없을 때조차도, 활성 위치가 존재하는 상황은 불변 영역들을 제거함으로써 바뀌었다. 하나의 예에서, 모 전장 항체는 IgG 항체이고, 돌연변이 항체는 이로부터 유래하는 단일 사슬 항체이다.

- [0204] 몇몇 양상들에서, 단일 사슬 항체는 각각이 상이한 에피토프와 결합하는 팔을 2개 가지는 이중 특이적 항체이다. 하나의 팔에 발생한 돌연변이는 다른 팔의 활성화에 영향을 줄 수 있다. 그러므로 진화 단계는 이중 특이적 항체인 모 폴리펩티드의 오로지 하나의 팔만을 돌연변이시키는 것을 수반할 수 있다. 하나의 예에서, 한 팔의 길이는 결실을 통해 단축되거나, 삽입을 통해 연장됨으로써 진화될 수 있다. 대안적으로 진화 단계는 동일 진화 단계 또는 순차적 진화 단계들(선택적으로는 각 단계 후 스크리닝이 진행됨)에 있어서 이중 특이적 항체의 두 팔을 진화시킬 수 있다.
- [0205] 또 다른 양상에서, 모 폴리펩티드는 항체 또는 항체의 단편이다. 진화 단계는 Fc 영역을 돌연변이시킬 수 있다. Fc 영역의 돌연변이는 치환, 삽입 및/또는 결실일 수 있다. Fc 영역은, 이 Fc 영역의 단편을 결실시켜 단축될 수 있거나, 또는 어떤 단편을 이 Fc 영역에 삽입함으로써 연장될 수 있다.
- [0206] 또 다른 양상에서, 모 폴리펩티드는 구조 틀 영역들에 의해 격리된 상보성 결정 영역 다수 개를 포함한다. 이러한 모 폴리펩티드는 항체의 가변 영역, 예컨대 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역일 수 있다. 임의의 구현예들에서, 진화 단계는 오로지 구조 틀 영역만을 돌연변이시킬 수 있거나, 아니면 상보성 결정 영역과 구조 틀 영역의 조합을 돌연변이시킬 수 있다. 구조틀 영역과 상보성 결정 영역의 진화는 하나의 단계에서, 또는 다수의 순차적 단계들(선택적으로는 각 단계 후 스크리닝이 진행됨)에서 수행될 수 있다.
- [0207] 또 다른 양상에서, 모 폴리펩티드는 자체의 활성화 위치 외부에 몇 개의 영역들을 가진다. 이와 같은 몇 개의 영역은 다수 개의 진화 단계들을 거쳐 순차적으로 돌연변이될 수 있는데, 이때 선택적으로는 진화 단계들 중 하나 이상의 단계 후에 스크리닝이 수행될 수 있다. 예를 들어 진화 단계는, 폴리펩티드 영역들 중 하나를 진화시킨 후에 조건부 활성화 폴리펩티드에 대해 스크리닝하는 단계; 및 이 폴리펩티드의 영역들 중 다른 영역을 진화시킨 후에 조건부 활성화 폴리펩티드를 스크리닝하는 단계가 수반된 다음; 폴리펩티드의 또 다른 영역을 진화시키고 나서, 조건부 활성화 폴리펩티드를 스크리닝하는 또 다른 단계가 후속될 수 있다.
- [0208] 몇몇 경우들에 있어서, 모 폴리펩티드 및/또는 돌연변이 조건부 활성화 폴리펩티드의, 활성화 위치를 제외한 영역(예컨대 주변 영역 또는 멀리 떨어져 있는 영역)들 하나 이상의 진화는 활성화 위치의 활성을 바꿀 수 있다. 몇몇 경우들에 있어서, 활성화 위치가 아닌, 주변 영역 또는 멀리 떨어져 존재하는 영역을 돌연변이시키는 것은, 특정 조건에서 돌연변이 폴리펩티드의 활성화 위치를 모 폴리펩티드의 활성화 위치보다 더 활성화되거나 덜 활성화 되도록 만들 수 있다. 다른 구현예들에서, 요망되는 조건부 활성화 또는 (만일 향상되었다면) 선택성은, 모 폴리펩티드나 돌연변이 폴리펩티드의 하나 이상의 영역(다만 활성화 위치를 포함하는 영역 제외)을 진화시킴으로써 달성된다.
- [0209] 몇몇 양상들에서, 모 폴리펩티드의 영역(활성화 위치를 포함하는 영역 제외)을 진화하여 얻어진 조건부 활성화 폴리펩티드는 적어도 2, 또는 적어도 3, 또는 적어도 5의 선택성을 보일 수 있다.
- [0210] 돌연변이 폴리펩티드를 제조하기 위해 제조된 돌연변이 DNA를 발현시키는 적합한 방법은 미국 특허 제8,709,755 B2호에 기술되어 있다.
- [0211] 조건부 활성화 폴리펩티드를 선택하기 위하여 돌연변이 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법은 미국 특허 제8,709,755 B2호에 기술되어 있다.
- [0212] 조건부 활성화 폴리펩티드를 스크리닝 및 선택하기 위한 검정 조건
- [0213] 제1 조건과 제2 조건, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건은, 스크리닝 단계에 있어서의 검정은, 온도, pH, 삼투압, 삼투질 농도, 산화 스트레스, 전해질 농도, 그리고 이러한 조건들 2가지 이상의 조합으로부터 선택되는 조건을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어 온도에 관한 정상 생리학적 조건은 정상 인간 체온인 37.0℃일 수 있는 반면, 온도에 관한 비정상 조건은 상기 온도 37.0℃와는 상이한 온도, 예컨대 종양 미세환경 온도(정상 생리학적 온도보다 1℃ 내지 2℃ 높을 수 있는 온도)일 수 있다. 다른 예에서, 정상 생리학적 조건과 비정상 조건은 또한 7.2 ~ 7.8, 또는 7.2 ~ 7.6 범위의 정상 생리학적 pH와, 종양 미세환경에 조성되는 비정상 pH, 예컨대 5.5 ~ 7.2, 6 ~ 7, 또는 6.2 ~ 6.8 범위의 pH일 수도 있다.
- [0214] 제1 조건과 제2 조건 둘 다, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에서의 검정은 검정 배지 중에서 수행될 수 있다. 검정 배지는, 예를 들어 완충제 뿐만 아니라, 기타 성분들을 함유할 수 있는 용액일 수 있다. 검정 배지 중에 사용될 수 있는 통상의 완충제는 시트르산염 완충제, 예를 들어 시트르산나트륨, 인산염 완충제, 중탄산염 완충제, 예를 들어 Krebs 완충제, 인산염 완충 염수(PBS) 완충제, Hank 완충제, Tris 완충제, HEPES 완충제 등을 포함한다. 기타 검정에 적합한 것으로서, 당 업계의 숙련자에게 공지된 완충제들이 사용될 수 있다. 이러한 완충제는 인간 또는 동물의 체액, 예를 들어 혈장 또는 림프액의 조성을 가지는 성분 또는 이것의

특징을 모의하기 위해 사용될 수 있다.

- [0215] 본 발명의 방법에 유용한 검정 용액은 무기 화합물, 이온 및 유기 분자, 바람직하게는 포유동물, 예를 들어 인간이나 동물의 체액 중에서 통상 발견되는 것들로부터 선택된 성분 적어도 1개를 함유할 수 있다. 이러한 성분의 예들은 영양 성분과 대사물질뿐만 아니라, 체액에서 발견될 수 있는 기타 임의의 성분들을 포함한다. 본 발명은, 이 성분이 완충제의 일부일 수 있거나 그렇지 않음을 고려한다. 예를 들어 검정 용액은 중탄산염 이온이 첨가되어 있되, 이 중탄산염이 PBS 완충제의 일부가 아닌, PBS 완충제일 수 있다. 대안적으로 중탄산염 이온은 크랩스 완충제의 한 성분이다.
- [0216] 성분은 (제1 조건과 제2 조건에 대한) 두 가지 검정 용액 중에 실질적으로 동일한 농도로 존재할 수 있는 한편, 이 두 가지 검정 용액은 다른 측면, 예컨대 pH, 온도, 전해질 농도 또는 삼투압에 있어서 상이하다. 그러므로 성분은, 제1 조건과 제2 조건, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건과 같은 두 가지 조건들 사이에 차이가 있는 것보다는 차이가 없는 것이 사용된다.
- [0217] 몇몇 구현예들에서, 성분은 포유동물, 특히 인간에 있어서 해당 성분의 정상 생리학적 농도와 매우 유사하거나 동일한 농도로 두 가지 검정 용액 중에 존재한다.
- [0218] 무기 화합물 또는 이온은 붕산, 염화칼슘, 질산칼슘, 인산 디-암모늄, 황산망간, 인산 모노-암모늄, 인산 모노-칼륨, 염화칼륨, 황산칼륨, 황산구리, 황산철, 황산망간, 황산아연, 황산마그네슘, 질산칼슘, 칼슘, 구리, 철, 망간 및 아연의 킬레이트, 몰리브덴산암모늄, 황산암모늄, 탄산칼슘, 인산마그네슘, 중탄산칼륨, 질산칼륨, 염화수소산, 이산화탄소, 황산, 인산, 탄산, 요산, 염화수소, 우레아, 인 이온, 황 이온, 염화물 이온, 마그네슘 이온, 나트륨 이온, 칼륨 이온, 암모늄 이온, 철 이온, 아연 이온 및 구리 이온 중 하나 이상으로부터 선택될 수 있다.
- [0219] 무기 화합물 중 일부의 정상 생리학적 농도의 예들은 다음과 같은 경우들을 포함한다: 요산은 농도 범위 2 mg/dL ~ 7.0 mg/dL, 칼슘 이온은 농도 범위 8.2 mg/dL ~ 11.6 mg/dL, 염화물 이온은 농도 범위 355 mg/dL ~ 381 mg/dL, 철 이온은 농도 범위 0.028 mg/dL ~ 0.210 mg/dL, 칼륨 이온은 농도 범위 12.1 mg/dL ~ 25.4 mg/dL, 나트륨 이온은 농도 범위 300 mg/dL ~ 330 mg/dL 및 탄산은 농도 범위 15 mM ~ 30 mM, 시트르산염 이온은 약 80 μ M, 히스티딘 이온은 0.05 mM ~ 2.6 mM, 히스타민은 0.3 μ M ~ 1 μ M, HAPT 이온(수소화된 아테노신 트리포스페이트) 1 μ M ~ 20 μ M, 그리고 HADP 이온은 1 μ M ~ 20 μ M.
- [0220] 몇몇 구현예들에서, 제1 조건과 제2 조건 둘 다, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액 중에 존재하는 이온은 수산화물 이온, 할로겐화물 이온(염화물, 브롬화물, 요오드화물), 옥시할로겐화물 이온, 황산염 이온, 마그네슘 이온, 칼슘 이온, 중황산염 이온, 탄산염 이온, 중탄산염 이온, 설펡산염 이온, 옥시할로겐화물 이온, 질산염 이온, 아질산염 이온, 인산염 이온, 인산수소 이온, 인산중수소 이온, 과황산염 이온, 모노 과황산염 이온, 붕산염 이온, 암모늄 이온, 또는 유기 이온, 예를 들어 카르복실산염 이온, 페놀산염 이온, 설펡산염 이온(오르가노황산염, 예를 들어 황산메틸), 바나듐산염 이온, 텅스텐산염 이온, 붕산염 이온, 오르가노보론산염 이온, 시트르산염 이온, 옥살산염 이온, 아세트산염 이온, 펜타붕산염 이온, 히스티딘 이온 및 페놀산염 이온으로부터 선택된다.
- [0221] 제1 조건과 제2 조건 둘 다, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액 중에 존재하는 유기 화합물은 예를 들어 아미노산, 예를 들어 히스티딘, 알라닌, 이소루신, 아르기닌, 루신, 아스파라긴, 리신, 아스파르트산, 메티오닌, 시스테인, 페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌, 글루타민, 트립토판, 글리신, 발린, 피롤리신, 프롤린, 셀레노시스테인, 세린, 티로신 및 이것들의 혼합물들로부터 선택될 수 있다.
- [0222] 아미노산들 중 몇몇의 정상 생리학적 농도의 예들은, 알라닌 3.97 ± 0.70 mg/dL, 아르기닌 2.34 ± 0.62 mg/dL, 글루탐산 3.41 ± 1.39 mg/dL, 글루타민 5.78 ± 1.55 mg/dL, 글리신 1.77 ± 0.26 mg/dL, 히스티딘 1.42 ± 0.18 mg/dL, 이소루신 1.60 ± 0.31 mg/dL, 루신 1.91 ± 0.34 mg/dL, 리신 2.95 ± 0.42 mg/dL, 메티오닌 0.85 ± 0.46 mg/dL, 페닐알라닌 1.38 ± 0.32 mg/dL, 트레오닌 2.02 ± 6.45 mg/dL, 트립토판 1.08 ± 0.21 mg/dL, 티로신 1.48 ± 0.37 mg/dL 그리고 발린 2.83 ± 0.34 mg/dL을 포함한다.
- [0223] 제1 조건과 제2 조건 둘 다, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액 중에 존재하는 유기 화합물은 비 단백질, 질소 함유 화합물, 예를 들어 크레아틴, 크레아티닌, 구아니디노 아세트산, 요산, 알란토인, 아테노신, 우레아, 암모니아 및 콜린으로부터 선택될 수 있다. 이러한 화합물들 중 일부의 정상 생리학적 조건의 예들은 다음과 같은 경우들을 포함한다: 크레아틴 1.07 ± 0.76 mg/dL, 크레아티닌 0.9 ~ 1.65 mg/dL, 구아니디노 아세트산 0.26 ± 0.24 mg/dL, 요산 4.0 ± 2.9 mg/dL, 알란토인 0.3 ~ 0.6 mg/dL, 아테노신 1.09 ± 0.385

mg/dL, 우레아 27.1 ± 4.5 mg/dL, 그리고 콜린 $0.3 \sim 1.5$ mg/dL.

- [0224] 제1 조건과 제2 조건 둘 다, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액 중에 존재하는 유기 화합물은 유기산, 예를 들어 시트르산, α -케토글루타르산, 숙신산, 말산, 푸마르산, 아세트아세트산, β -하이드록시부티르산, 젖산, 피루브산, α -케톤산, 아세트산 및 휘발성 지방산으로부터 선택될 수 있다. 이러한 유기산들 중 일부의 정상 생리학적 농도의 예들은 다음과 같은 경우들을 포함한다: 시트르산 2.5 ± 1.9 mg/dL, α -케토글루타르산 0.8 mg/dL, 숙신산 0.5 mg/dL, 말산 0.46 ± 0.24 mg/dL, 아세트아세트산 $0.8 \sim 2.8$ mg/dL, β -하이드록시부티르산 0.5 ± 0.3 mg/dL, 젖산 $8 \sim 17$ mg/dL, 피루브산 1.0 ± 0.77 mg/dL, α -케톤산 $0.6 \sim 2.1$ mg/dL, 휘발성 지방산 1.8 mg/dL.
- [0225] 제1 조건과 제2 조건 둘 다, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액 중에 존재하는 유기 화합물은 당(탄수화물), 예를 들어 글루코스, 펜토스, 헥소스, 자일로스, 리보스, 만노스 및 갈락토스뿐만 아니라, 이당체, 예를 들어 락토스, GlcNAc β 1-3Gal, Gal α 1-4Gal, Man α 1-2Man, GalNAc β 1-3Gal 및 O-, N-, C- 또는 S-글리코시드로부터 선택될 수 있다. 이러한 당들 중 일부의 정상 생리학적 농도의 예들은 다음과 같은 경우들을 포함한다: 글루코스 83 ± 4 mg/dL, 다당체 102 ± 73 mg/dL(헥소스로서), 글루코사민 77 ± 63 mg/dL, 헥스로네이트 $0.4 \sim 1.4$ mg/dL(글루쿠론산으로서) 및 펜토스 2.55 ± 0.37 mg/dL.
- [0226] 제1 조건과 제2 조건 둘 다, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액 중에 존재하는 유기 화합물은 지방 또는 이의 유도체, 예컨대 콜레스테롤, 레시틴, 세팔린, 스펅고미엘린 및 담즙산으로부터 선택될 수 있다. 이러한 화합물들 중 일부의 정상 생리학적 농도의 예들은 다음과 같은 경우들을 포함한다: 유리 콜레스테롤 $40 \sim 70$ mg/dL, 레시틴 $100 \sim 200$ mg/dL, 세팔린 $0 \sim 30$ mg/dL, 스펅고미엘린 $10 \sim 30$ mg/dL 및 담즙산 $0.2 \sim 0.3$ mg/dL(콜산으로서).
- [0227] 제1 조건과 제2 조건 둘 다, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액 중에 존재하는 유기 화합물은 단백질, 예를 들어 피브리노겐, 항 혈우병 글로불린, 면역 γ 글로불린, 면역 유글로불린, 동종응집소, β -슈도글로불린, 당단백, 지단백 및 알부민으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어 포유동물 혈청 알부민의 정상 생리학적 농도는 $3.5 \sim 5.0$ mg/dL이다. 하나의 구현예에서, 알부민은 소 혈청 알부민이다.
- [0228] 제1 조건과 제2 조건 둘 다, 또는 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액 중에 존재하는 유기 화합물은 비타민, 예컨대 비타민 A, 카로틴, 비타민 E, 아스코르브산, 티아민, 이노시톨, 엽산, 바이오틴, 판토텐산, 리보플라빈으로부터 선택될 수 있다. 이러한 비타민들 중 일부의 정상 생리학적 농도의 예들은 다음과 같은 경우들을 포함한다: 비타민 A $0.019 \sim 0.036$ mg/dL, 비타민 E $0.90 \sim 1.59$ mg/dL, 이노시톨 $0.42 \sim 0.76$ mg/dL, 엽산 $0.00162 \sim 0.00195$ mg/dL 및 바이오틴 $0.00095 \sim 0.00166$ mg/dL.
- [0229] 무기 화합물, 이온 또는 유기 분자의 (제1 조건 하에서의 검정과 제2 조건 하에서의 검정, 또는 정상 생리학적 조건 하에서의 검정과 비정상 조건 하에서의 검정 둘 다에 대한) 검정 용액 중 무기 화합물, 이온 또는 유기 분자의 농도는, 인간 또는 동물의 혈청 중 무기 화합물, 이온 또는 유기 분자의 생리학적 농도의 정상 범위 내 일 수 있다. 그러나, 정상 생리학적 범위를 벗어난 농도도 또한 적용될 수 있다. 예를 들어 인간 혈청 중 마그네슘의 정상 범위는 $1.7 \sim 2.2$ mg/dL이고, 칼슘의 정상 범위는 $8.5 \sim 10.2$ mg/dL이다. 검정 용액 중 마그네슘 이온의 농도는 약 $0.17 \sim$ 약 11 mg/dL일 수 있다. 검정 용액 중 칼슘 이온의 농도는 약 0.85 mg/dL 내지 약 51 mg/dL일 수 있다. 일반적인 규칙으로서, 검정 용액 중 무기 화합물, 이온 또는 유기 분자의 농도는, 인간 혈청 중 무기 화합물, 이온 또는 유기 분자의 정상 생리학적 농도의 5%, 또는 10%, 또는 20%, 또는 30%, 또는 40%, 또는 50%, 또는 60%, 또는 70%, 또는 80%만큼 낮을 수 있거나, 또는 인간 혈청 중 무기 화합물, 이온 또는 유기 분자의 정상 생리학적 농도의 1.5배, 또는 2배, 또는 3배, 또는 4배, 또는 5 배, 또는 7배, 또는 9배, 또는 10배, 또는 심지어 20배만큼 높을 수 있다. 검정 용액의 상이한 성분들은 자체의 각 정상 생리학적 농도와는 상이한 농도 수준으로 사용될 수 있다.
- [0230] 제1 조건 하에서의 검정과 제2 조건 하에서의 검정, 또는 정상 생리학적 조건 하에서의 검정과 비정상 조건 하에서의 검정은 돌연변이 폴리펩티드의 활성을 측정하는데에 사용된다. 검정 동안 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 둘 다는 검정 용액 중에 존재한다. 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 관계는, 예를 들어 항체-항원, 리간드-수용체, 효소-기질 또는 호르몬-수용체일 수 있다. 돌연변이 폴리펩티드가 자체의 활성을 발휘하기 위해서, 돌연변이 폴리펩티드는 이의 결합 파트너와 접촉하여 결합할 수 있어야 한다. 그 다음, 돌연변이 폴리펩티드의 이의 결합 파트너에 대한 활성이 발휘되고, 이 활성은 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 간에 결합이 일어난 후 측정된다.

- [0231] 몇몇 구현예들에서, 검정에 사용된 이온은 스크리닝되는 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너, 구체적으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하는 것 사이에 가교를 형성하는 역할을 할 수 있다. 그러므로 이온은 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 둘 다의 수소 결합 및/또는 이온 결합을 통한 결합을 가능하게 할 수 있다. 이는 큰 분자(돌연변이 폴리펩티드나 이의 결합 파트너)가 도달하기 어려울 수 있는 위치에 이온이 도달하도록 허용함으로써, 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 결합을 도울 수 있다. 몇몇 경우들에서, 검정 용액 중 이온은 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너가 서로 결합할 확률을 높일 수 있다. 또한 이온은, 큰 분자(돌연변이 폴리펩티드나 이의 결합 파트너)와의 결합에 의해 부가적으로나 대안적으로 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 결합을 도울 수 있다. 이러한 결합은, 큰 분자의 입체구조를 변경할 수 있고/있거나 더 큰 분자가, 자체의 결합 파트너와의 결합을 촉진하는 특정 입체구조로 유지되도록 만들 수 있다.
- [0232] 이온들은, 가능하게는 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너와 이온 결합을 형성함으로써 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 결합을 도울 수 있음이 관찰되었다. 그러므로 스크리닝은 더욱더 효율적일 수 있고, 이온 없이 진행되는 동일 검정에 비교되었을 때 더 많은 히트(hit)(후보 조건부 활성 폴리펩티드)가 동정될 수 있다. 적합한 이온은 마그네슘 이온, 황산염 이온, 중황산염 이온, 탄산염 이온, 시트르산염 이온, HAPT 이온, HADP 이온, 중탄산염 이온, 질산염 이온, 아질산염 이온, 인산염 이온, 인산수소 이온, 인산이수소 이온, 과황산염 이온, 모노 과황산염 이온, 붕산염 이온, 젖산염 이온, 스트르산염 이온, 히스티딘 이온, 히스타민 이온 및 암모늄 이온으로부터 선택될 수 있다.
- [0233] 이온들은 이온의 pKa와 가까운 pH에서 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 결합을 돕는 기능을 함이 발견되었다. 이러한 이온은 돌연변이 폴리펩티드의 크기에 비하여는 비교적 작은 것이 바람직하다.
- [0234] 하나의 구현예에서, 비정상 조건이 정상 생리학적 조건 하에서의 정상 생리학적 pH와 상이한 pH이면, 후보 조건부 활성 폴리펩티드에 대한 히트 수를 증가시키는데에 적합한 이온은, 검정에서 시험될 비정상 pH에 가까운 pKa를 가지는 이온들로부터 선택될 수 있다. 예를 들어 이온의 pKa는 비정상 pH로부터 2 pH 단위(pH unit) 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 1 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.8 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.6 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.5 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.4 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.3 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.2 pH 단위 이하 떨어져 있거나 또는 비정상 pH로부터 0.1 pH 단위 이하 떨어져 있을 수 있다.
- [0235] pKa가 상이한 온도에서 약간 달라질 수 있는, 본 발명에 유용한 이온의 예시적 pKa는 다음과 같다: 암모늄 이온 pKa 약 9.24, 인산 이수소 pKa 약 7.2, 아세트산 pKa 약 4.76, 히스티딘 pKa 약 6.04, 중탄산염 이온 pKa 약 6.4, 시트르산염 pKa 약 6.4, 젖산염 이온 pKa 약 3.86, 히스타민 pKa 약 6.9, HAPT pKa 6.95($\text{HATP}^{3-} \rightleftharpoons \text{ATP}^{4-} + \text{H}^+$) 및 HADP pKa 약 6.88($\text{HADP}^{3-} \rightleftharpoons \text{ADP}^{4-} + \text{H}^+$).
- [0236] 하나의 구현예에서, 조건부 활성 폴리펩티드는 이황화물의 존재 하에 검정 및 선택된다. 이황화물의 pKa는 7.05이다. 몇몇 구현예들에서, 상이한 농도의 이황화물이 정상 및 비정상 조건에서 이루어지는 검정에 사용될 수 있다. 대안적으로 정상 생리학적 조건 및 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 배지의 이황화물 농도는 대략 동일하고, 또한 특정 조건에 대한 값에서는 약간의 차이가 있는데, 예를 들어 본 검정은 상이한 pH들에서 수행될 수 있다. 검정에 사용될 이황화물의 농도는 1 mM ~ 100 mM일 수 있다. 바람직하게 검정 배지의 이황화물 농도는 2 ~ 500 nM, 또는 3 ~ 200 nM, 또는 5 ~ 100 nM이다. 몇몇 양상에서, 이황화물 농도는 1 mM ~ 20 mM, 또는 2 mM ~ 10 mM일 수 있다. 이황화물의 존재 하에 수행되는 검정은 공지되어 있다.
- [0237] 임의의 구현예들에서, 일단 비정상 조건에 대한 pH(즉 비정상 pH)가 공지되면, 후보 조건부 활성 폴리펩티드에 대한 히트를 증가시키는데에 적합한 이온은, 비정상 pH이거나 이와 가까운 pH에서의 pKa를 가지는 이온들로부터 선택될 수 있는데, 예를 들어 후보 이온의 pKa는 비정상 pH로부터 4 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 3 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 2 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 1 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.8 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.6 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.5 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.4 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.3 pH 단위 이하 떨어져 있거나, 비정상 pH로부터 0.2 pH 단위 이하 떨어져 있거나 또는 비정상 pH로부터 0.1 pH 단위 이하 떨어져 있을 수 있다.
- [0238] 상기 진술된 바와 같이, 이온은, 자체의 pKa이거나 이와 가까운 pKa에서의 pH에서 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 결합을 돕는데에 가장 효과적이다. 예를 들어 pH 7.2 ~ 7.6인 검정 용액 중 (pKa 약 6.4인) 중탄산염 이온은 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 결합을 돕는데에 있어서 그다지 효과적인 것

으로 확인되지 않았다. 검정 용액의 pH가 6.7로 감소하였다가 다시 약 6.0으로 더 감소함에 따라서, 중탄산염 이온은 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 간 결합을 돕는데에 점차 더 효과적이게 되었다. 결과적으로, pH 7.2 ~ 7.6에서의 검정에서보다 pH 6.0에서의 검정에서 더 많은 히트들이 동정될 수 있었다. 유사하게, 히스티딘은 pH 7.4에서 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 간 결합을 돕는데에 그다지 효과적이지 못하였다. 검정 용액의 pH가 6.7로 감소하였다가 다시 약 6.0으로 더 감소함에 따라서, 히스티딘은 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 결합을 돕는데에 있어서 점차 더 효과적이게 되었고, 이러한 특징은 또한, 예를 들어 약 6.2 ~ 6.4 범위의 pH에서 더 많은 히트들이 동정될 수 있게 해준다.

[0239] 놀랍게도 본 발명은, 정상 생리학적 조건에 대한 검정 용액의 pH(즉 정상 생리학적 pH) 및 비정상 조건에 대한 검정 용액의 pH(즉 비정상 pH)가 상이할 때, 정상 생리학적 pH와 비정상 pH의 거의 중간 지점으로부터 거의 비정상 pH에 이르기까지의 범위에 pKa를 보이는 이온은, 스크리닝되는 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 결합에 큰 도움이 될 수 있음을 발견하였다. 결과적으로, 스크리닝 검정은 비정상 조건에서 큰 활성을 보이는 히트 또는 후보 조건부 폴리펩티드를 더 많이 확인함에 있어서 훨씬 더 효율적이다.

[0240] 몇몇 구현예들에서, pKa는 비정상 pH로부터 떨어져 있는 pH 단위 적어도 1개일 수 있다. 비정상 pH가 산성 pH일 때, 적합한 이온의 pKa는 (비정상 pH - 1)로부터, 비정상 pH와 정상 생리학적 pH 사이 중간 지점에 이르기까지의 범위 내에 있을 수 있다. 비정상 pH가 염기성 pH일 때, 적합한 이온의 pKa는 (비정상 pH + 1)로부터, 비정상 pH와 정상 생리학적 pH 사이 중간 지점에 이르기까지의 범위 내에 있을 수 있다. 이온은 본 출원에 기술된 것들로부터 선택될 수 있다. 그러나, 본 출원에 명시되어 있지 않은 더 많은 이온들도 사용될 수 있다. 일단 비정상 pH 및 정상 생리학적 pH가 스크리닝 검정을 위해 선택되면, 당 업계의 숙련자는 비정상 조건에서 높은 활성을 보이는 더 많은 히트를 동정함에 있어서 스크리닝의 효율을 증가시키기에 적합한 pKa를 보이는 임의의 이온을 선택하기 위해 본 발명의 지도 원리를 이용할 수 있음이 이해된다.

[0241] 예를 들어 예시적 스크리닝에 있어서 비정상 pH가 8.4이고, 정상 생리학적 pH가 7.4일 때, 약 7.9(중간 지점) 내지 9.4(즉 8.4 + 1)의 범위에 있는 pKa를 보이는 임의의 이온이 스크리닝에 사용될 수 있다. 상기 범위에 있는 pKa를 보이는 몇몇 이온들은, 트린신(pKa 8.05), 히드라진(pKa 8.1), 비신(pKa 8.26), N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-(4-부탄설폰산)(pKa 8.3), N-트리스[하이드록시에틸]메틸-3-아미노프로판설폰산(pKa 8.4), 타우린(pKa 9.06)으로부터 유래하는 이온들을 포함한다. 다른 예로서, 예시적 스크리닝에 대해 비정상 pH가 6이고, 정상 생리학적 pH가 7.4일 때, 약 5(즉 6 - 1) 내지 6.7(중간 지점)의 범위에 있는 pKa를 보이는 임의의 이온이 스크리닝에 사용될 수 있다. 상기 범위에 있는 pKa를 보이는 몇몇 이온들은, 말레이트(pKa 5.13), 피리딘(pKa 5.23), 피페라진(pKa 5.33), 카코딜산염(pKa 6.27), 숙신산염(pKa 5.64), 2-(N-모폴리노)에탄설폰산(pKa 6.10), 시트르산염(pKa 6.4), 히스티딘(pKa 6.04) 및 비스-트리스(pKa 6.46)로부터 유래하는 이온들을 포함한다. 당 업계의 숙련자는 이 범위에 속하는 pKa를 보이는 이온으로 전환될 수 있는 것으로 공지된 화합물(무기 화합물 및 유기 화합물 둘 다 포함)을 확인하기 위해 다수의 화학 매뉴얼과 교과서를 참고할 수 있을 것이다. 적합한 pKa를 보이는 화합물들 가운데, 분자량이 더 작은 화합물이 바람직할 수 있다.

[0242] 결론적으로 본 발명은, 조건부 활성 폴리펩티드의 제조는 결국 야생형 단백질로부터 딱 맞는 폴리펩티드 돌연변이체를 생산하는 것뿐만 아니라, 검정 용액 중 적합한 pKa를 보이는 이온을 사용하는 것에 의존적임을 예기치 않게 발견하였다. 본 발명은, 이온이 큰 라이브러리로부터 큰 활성을 보이는 돌연변이체들을 효율적으로 선택하는 것을 촉진할 수 있기 때문에, (예를 들어 CPE 및 CPS를 통해) 돌연변이 폴리펩티드의 큰 라이브러리를 제조하는 것 이외에도 적합한 이온(적절한 pKa를 보이는 이온)을 발견하고자 하는 노력들도 또한 행하여져야 할 것으로 생각한다. 또한 적합한 이온이 없이 행하여지는 스크리닝은 그 효율이 떨어지고, 큰 활성을 보이는 돌연변이체가 발견될 확률 또한 감소되는 것으로 생각한다. 결과적으로 큰 활성을 보이는 동일한 수만큼의 돌연변이체를 적합한 이온이 없이 얻기 위해서는 스크리닝의 라운드가 다수 회 행하여질 필요가 있을 수 있는 것이다.

[0243] 검정 용액 중 이온은 검정 용액 성분으로부터 현장에서 생성될 수 있거나, 또는 검정 용액 중에 직접 포함될 수 있다. 예를 들어 공기로부터 유래하는 CO₂는 검정 용액 중에 용해되어, 탄산염 이온과 중탄산염 이온을 제공할 수 있다. 추가의 예를 들어, 인산 이수소 나트륨이 검정 용액에 첨가되면, 인산이수소 이온이 제공될 수 있다.

[0244] 이 성분의 (정상 생리학적 조건 하에서의 검정 및 비정상 조건 하에서의 검정 둘 다에 대한) 검정 용액 중 농도는, 포유동물, 예를 들어 인간의 자연 발생 체액 중에서 통상 발견되는 성분과 동일한 성분의 농도와 동일하거나 실질적으로 동일할 수 있다. 다른 구현예들에서, 특히 어떤 성분이 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 결합을 돕는 기능을 할 수 있는 이온일 때, 해당 성분의 농도는 더 높을 수 있는데, 그 이유는 이와 같은 이온 더 높은 농도만큼은 돌연변이 폴리펩티드 및 이의 결합 파트너와 이온 결합을 형성할 수 있어서, 실질

적으로 결합을 촉진하고, 더 많은 히트 또는 후보 조건부 활성 폴리펩티드가 발견될 확률을 증가시키기 때문이다.

- [0245] 몇몇 구현예들에서, 검정 용액 중 이온 농도는, 특히 정상 생리학적 농도를 초과하는 농도가 사용될 때, 검정이 이용되어 더 많은 히트가 발견될 확률과 양의 상관관계에 있을 수 있다. 예를 들어 인간 혈청 중 중탄산염 이온의 농도는 약 15 ~ 30 mM이다. 하나의 예에서, 검정 용액 중 중탄산염 이온의 농도가 3 mM로부터 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM 및 100 mM로 증가함에 따라서, 중탄산염 농도가 각각 증가함과 아울러 검정 중 히트의 수도 또한 증가하게 된다. 이를 살펴보았을 때, 검정 용액에는 농도 약 3 mM 내지 약 200 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 150 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 10 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 25 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 30 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 35 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 40 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 50 mM 내지 약 100 mM의 중탄산염이 사용될 수 있다.
- [0246] 다른 구현예에서, 검정 용액 중 시트르산염의 농도는 약 30 μ M 내지 약 120 μ M, 또는 약 40 μ M 내지 약 110 μ M, 또는 약 50 μ M 내지 약 110 μ M, 또는 약 60 μ M 내지 약 100 μ M, 또는 약 μ M 내지 약 90 μ M, 또는 약 μ M일 수 있다.
- [0247] 하나의 구현예에서, 정상 생리학적 조건은 7.2 ~ 7.6 범위의 정상 생리학적 pH이고, 비정상 조건은 5.5 ~ 7.2, 6 ~ 7, 또는 6.2 ~ 6.8 범위의 비정상 pH이다. 정상 생리학적 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액은 정상 생리학적 pH를 보이고, 중탄산염 이온은 50 mM 함유한다. 비정상 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액은 비정상 pH를 보이고, 중탄산염 이온은 50 mM 함유한다. 중탄산염 이온의 pKa는 약 6.4이므로, 중탄산염 이온은 비정상 pH 6.0 ~ 6.4, 예를 들어 pH 6.0 또는 6.2에서 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 간 결합을 도울 수 있다.
- [0248] 또 다른 구현예에서, 정상 생리학적 조건은 7.2 ~ 7.6 범위의 정상 생리학적 pH이고, 비정상 조건은 5.5 ~ 7.2, 6 ~ 7, 또는 6.2 ~ 6.8 범위의 비정상 pH이다. 정상 생리학적 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액은 정상 생리학적 pH를 보이고, 시트르산염 이온은 80 μ M 함유한다. 비정상 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액은 비정상 pH를 보이고, 시트르산염 이온은 80 μ M 함유한다. 시트르산염 이온의 pKa는 6.4이므로, 시트르산염 이온은 비정상 조건 pH 6.0 ~ 6.4에서의 검정 용액 중 돌연변이 폴리펩티드와 결합 파트너 간 결합을 효과적으로 도울 수 있다. 그러므로, pH 6.0 ~ 6.4의 조건 하에서 더 큰 결합 활성을 보이고, pH 7.2 ~ 7.8의 조건 하에서는 더 작은 활성을 보이는 후보 조건부 활성 폴리펩티드가 더 많이 동정될 수 있다. 다른 이온, 예를 들어 아세트산염, 히스티딘, 중탄산염, HATP 및 HADP는 유사한 방법으로 작용을 하여, 해당 이온을 함유하는 검정 용액이 해당 이온의 pKa와 거의 동일한 pH에서 더 큰 결합 활성을 보이고, 해당 이온의 pKa와 상이한 pH(예를 들어 정상 생리학적 pH)에서 더 작은 결합 활성을 보이는 돌연변이 폴리펩티드를 효과적으로 스크리닝할 수 있도록 만들 수 있다.
- [0249] 또 다른 구현예에서, 정상 생리학적 조건은 37 $^{\circ}$ C의 정상 생리학적 온도이고, 비정상 조건은 38 ~ 39 $^{\circ}$ C(몇몇 종양 미세환경의 온도)의 비정상 온도이다. 정상 생리학적 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액은 정상 생리학적 온도를 보이고, 중탄산염 이온을 20 mM 함유한다. 비정상 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액은 비정상 온도를 보이고, 중탄산염 이온을 20 mM 함유한다.
- [0250] 또 다른 구현예에서, 정상 생리학적 조건은 정상 인간 혈청 중 전해질의 구체적인 농도이고, 비정상 조건은, 동물 또는 인간의 체내 상이한 병소에 존재할 수 있거나, 또는 인간 혈청 중 전해질의 정상 생리학적 농도를 변경하는, 동물 또는 인간의 조건으로부터 말미암을 수 있는 동일 전해질의 농도(상이하고 비정상적인 농도)이다.
- [0251] 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너 간 결합은 또한 다수의 기타 방식으로 영향받을 수 있다. 통상적으로, 이 영향력은 하나 이상의 추가 성분이 검정 배지에 포함됨으로써 발휘될 것이다. 이와 같은 추가의 성분들은 돌연변이 폴리펩티드, 이의 결합 파트너 중 어느 하나, 또는 둘 다와 상호작용하도록 디자인될 수 있다. 또한, 이 같은 추가의 성분들은 2개 이상의 상호작용의 조합뿐만 아니라, 결합에 영향을 주는 상호작용들 중 2개 이상의 유형의 조합을 이용할 수 있다.
- [0252] 하나의 구현예에서, 관심 있는 결합 상호작용은 항체와 항원 사이의 상호작용이다. 이 구현예에서, 하나 이상의 추가 성분들은 검정 용액에 포함되어, 항체 또는 항원, 아니면 이 둘 다에 영향력을 발휘할 수 있다. 이러한 방식으로, 원하는 결합 상호작용은 향상될 수 있다.
- [0253] 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너와 이온 결합을 형성하여, 돌연변이 폴리펩티드와 결합 파트너 간 결합을 도울 수 있는 이온 이외에, 본 발명은 또한 돌연변이 폴리펩티드 및 이의 결합 파트너 사이의 결합을

답는데에 사용될 수 있는 기타 성분들도 포함한다. 하나의 구현예에서, 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너와 수소 결합을 형성할 수 있는 분자들이 사용된다. 다른 구현예에서, 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너와 소수성 상호작용을 할 수 있는 분자들이 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너와 반 데르 발스 상호작용을 할 수 있는 분자들이 고려된다.

[0254] 본원에 사용된 바와 같이 "수소 결합"이란 용어는, 음전기 원자, 예를 들어 탄소, 질소, 산소, 황, 염소 또는 플루오르(수소 결합 공여체)와, 전자 공여 원자, 예를 들어 질소, 산소, 황, 염소 또는 플루오르(수소 결합 수용체)의 비 공유 전자쌍 사이의 비교적 약한 비 공유성 상호작용을 지칭한다.

[0255] 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너와 수소 결합을 형성할 수 있는 성분들은 유기 분자뿐만 아니라, 극성 결합을 가지는 무기 분자를 포함한다. 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이 돌연변이 폴리펩티드에 대한 결합 파트너는 통상 수소 결합을 형성할 수 있는 아미노산을 함유한다. 적합한 아미노산은 수소 결합을 형성할 수 있는 극성기를 기는 측쇄를 가진다. 적합한 아미노산의 비 제한적 예들로서는 글루타민(Gln), 글루탐산(Glu), 아르기닌(Arg), 아스파라긴(Asn), 아스파르트산(Asp), 리신(Lys), 히스티딘(His), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 티로신(Tyr), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met) 및 트립토판(Trp)을 포함한다.

[0256] 이와 같은 아미노산은 수소 공여체 및 수소 수용체 둘 다로서의 역할을 할 수 있다. 예를 들어 -OH기(Ser, Thr 및 Tyr에서 살펴볼 수 있음)에서의 산소 원자, -C=O기(Glu 및 Asp에서 살펴볼 수 있음)에서의 산소 원자, -SH기 또는 -SC기(Cys 및 Met에서 살펴볼 수 있음)에서의 황 원자, -NH₃⁺기(Lys 및 Arg에서 살펴볼 수 있음)에서의 질소 원자, 그리고 -NH-기(Trp, His 및 Arg에서 살펴볼 수 있음)에서의 질소 원자는 모두 수소 수용체로서의 역할을 할 수 있다. 또한 본 목록 중 수소 원자를 포함하는 기들(예를 들어 -OH, -SH, NH₃⁺ 및 -NH-)은 수소 공여체로서의 역할을 할 수 있다.

[0257] 몇몇 구현예들에서, 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너의 주쇄는 또한 하나 이상의 수소 결합을 형성하는데에 참여할 수도 있다. 예를 들어 주쇄는, 예를 들어 펩티드 결합에서와 같이 -(C=O)-NH-의 반복 구조를 가질 수 있다. 이 구조 내 산소 및 질소 원자는 수소 수용체로서의 역할을 할 수 있는 한편, 수소 원자는 수소 결합에 참여할 수 있다.

[0258] 수소 결합에 사용될 수 있는 수소 또는 산소 원자를 수반하는 극성 결합 적어도 1개를 가지는 무기 화합물은, 예를 들어 H₂O, NH₃, H₂O₂, 히드라진, 탄산염, 황산염 및 인산염을 포함할 수 있다. 유기 화합물, 예를 들어 알코올; 페놀; 티올; 지방족, 아민, 아마이드; 에폭시화물, 카복실산; 케톤, 알데히드, 에테르, 에스테르, 유기염 화물 및 유기 플루오르화물을 포함한다. 수소 결합을 형성할 수 있는 화합물은 화학 문헌, 예를 들어 그 개시내용이 전체로서 참조로 본원에 첨부되어 있는 "The Nature of the Chemical Bond," by Linus Pauling, Cornell University Press, 1940, pages 284 ~ 334(수소 결합 상호작용을 할 수 있는 화합물 목록에 관함)에 널리 공지되어 있다.

[0259] 몇몇 구현예들에서, 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 펜탄올, 1-헥산올, 2-옥탄올, 1-데칸올, 사이클로헥산올, 그리고 고급 알코올; 디올, 예를 들어 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 글리세롤, 디에틸렌 글리콜 및 폴리알킬렌 글리콜을 포함할 수 있다. 적합한 페놀은 하이드로퀴논, 레소르시놀, 카테콜, 페놀, o-, m- 및 p-크레솔, 티몰, 알파 및 베타-나프톨, 피로갈롤, 구라리아콜 및 플로로글루신올을 포함한다. 적합한 티올은 메탄티올, 에탄티올, 1-프로판티올, 2-프로판티올, 부탄티올, tert-부틸 머캅탄, 펜탄티올, 헥산티올, 티오펜올, 디머캅토숙신산, 2-머캅토에탄올 및 2-머캅토인도를 포함한다. 적합한 아민은 메틸아민, 에틸아민, 프로필아민, 이소프로필아민, 아닐린, 디메틸아민 및 메틸에틸아민, 트리메틸아민, 아지리딘, 피페리딘, N-메틸피페리딘, 벤지딘, 사이클로헥실 아민, 에틸렌 디아민, 헥사메틸렌 디아민, o-, m- 및 p-톨루이딘 및 N-페닐피페리딘을 포함한다. 적합한 아마이드는 에탄아מיד, N,N-디메틸아세트아מיד, N,N-디메틸 포름아מיד, N,N-디메틸 메톡시 아세트아מיד 및 N-메틸-N-p-시아노에틸 포름아미드를 포함한다. 에폭시화물은 산화에틸렌, 산화프로필렌, tert-부틸 하이드로퍼옥사이드, 산화스티렌, 에폭시화물 글리시돌, 산화사이클로헥센, 과산화 디-tert-부틸, 큐멘 하이드로퍼옥사이드, 에틸벤젠 하이드로퍼옥사이드, 산화이소부틸렌 및 1,2-에폭시옥탄을 포함할 수 있다. 카복실산은 테레프탈산, 이소프탈산, 프탈산, 살리실산, 벤조산, 아세트산, 라우르산, 아디프산, 젖산, 시트르산, 아크릴산, 글리신, 헥사-하이드로벤조산, o-, m- 및 p-톨루산, 니코틴산, 이소니코틴산 및 파라-아미노벤조산을 포함할 수 있다. 케톤은 아세톤, 3-프로판논, 부타논, 펜타논, 메틸에틸 케톤, 디이소부틸 케톤, 에틸 부틸 케톤, 메틸 이소부틸 케톤, 메틸 tert-부틸 케톤, 사이클로헥사논, 아세톤, 메틸 에틸 케톤, 메틸 프로필 케톤, 메틸 부틸 케톤, 메틸 아밀 케톤, 메틸 헥실 케톤, 디에틸 케톤, 에틸 부틸 케톤, 디프로필

케톤, 디이소부틸 케톤, 디아세톤 알코올, 포론, 이소포론, 사이클로헥사논, 메틸 사이클로헥사논 및 아세토펜을 포함할 수 있다. 알데히드는 포름알데히드, 아세트알데히드, 프로피온알데히드, 부티르알데히드, 벤잘데히드, 신남알데히드, 소부티르알데히드, 발레르알데히드, 옥탈데히드, 벤잘데히드, 신남알데히드, 사이클로헥사논, 살리실알데히드 및 퍼푸랄을 포함할 수 있다. 에스테르는 아세트산에틸, 아세트산메틸, 포름산에틸, 아세트산부틸, 젖산에틸, 부티르산에틸, 아세트산프로필, 포름산에틸, 포름산프로필, 포름산부틸, 포름산아밀, 아세트산메틸, 아세트산에틸, 아세트산프로필, 아세트산부틸, 아세트산아밀, 아세트산메틸이소아밀, 아세트산메톡시부틸, 아세트산헥실, 아세트산사이클로헥실, 아세트산벤질, 프로피온산메틸, 프로피온산에틸, 프로피온산부틸, 프로피온산아밀, 부티르산메틸, 부티르산에틸, 부티르산부틸, 부티르산아밀, 아세트아세트산메틸 및 아세트아세트산에틸을 포함한다. 본 발명에 사용될 수 있는 에테르는 디메틸 에테르, 메틸 에틸 에테르, 디에틸 에테르, 메틸 프로필 에테르 및 디메톡시에탄을 포함한다. 에테르는 사이클릭일 수 있는데, 예를 들어 산화에틸렌, 테트라하이드로푸란 및 디옥산일 수 있다.

[0260] 유기 염화물은 클로로포름, 펜타클로로에탄, 디클로로메탄, 트리클로로메탄, 사염화탄소, 테트라클로로메탄, 테트라클로로에탄, 펜타클로로에탄, 트리클로로에틸렌, 테트라클로로에틸렌 및 이염화에틸렌을 포함한다. 유기 플루오르화물은 플루오로메탄, 디플루오로메탄, 트리플루오로메탄, 트리플루오로에탄, 테트라플루오로에탄, 펜타플루오로에탄, 디플루오로프로판, 트리플루오로프로판, 테트라플루오로프로판, 펜타플루오로프로판, 헥사플루오로프로판 및 헵타플루오로프로판을 포함할 수 있다.

[0261] 수소 결합은 결합의 세기에 의해 강한 수소 결합, 중간 수소 결합 또는 약한 수소 결합으로 구분될 수 있다 (Jeffrey, George A.: An introduction to hydrogen bonding, Oxford University Press, 1997). 강한 수소 결합은 공여체-수용체 간 거리가 2.2 ~ 2.5 Å이고, 에너지는 14 ~ 40 kcal/mol이다. 중간 수소 결합은 공여체-수용체 간 거리가 2.5 ~ 3.2 Å이고, 에너지는 4 ~ 15 kcal/mol이다. 약한 수소 결합은 공여체-수용체 간 거리가 3.2 ~ 4.0 Å이고, 에너지는 4 kcal/mol 미만이다. 에너지 준위를 가지는 수소 결합의 몇몇 예들은 다음과 같다: $F-H \cdots F$ (38.6 kcal/mol), $O-H \cdots N$ (6.9 kcal/mol), $O-H \cdots O$ (5.0 kcal/mol), $N-H \cdots N$ (3.1 kcal/mol) 및 $N-H \cdots O$ (1.9 kcal/mol). 추가로 문헌[Perrin et al. "Strong" hydrogen bonds in chemistry and biology, Annual Review of Physical Chemistry, vol. 48, pages 511-544, 1997; Guthrie, "Short strong hydrogen bonds: can they explain enzymic catalysis?" Chemistry & Biology March 1996, 3: 163-170]을 참조한다.

[0262] 몇몇 구현예들에서, 본 발명에 사용된 성분들은 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너와 강한 수소 결합을 형성할 수 있다. 이러한 성분들은 강한 전기 음성도를 보이는 원자를 가지는 경향이 있다. 가장 강한 전기 음성도를 가지는 것으로 알려진 원자들 및 그 순서는 $F > O > Cl > N$ 와 같다. 그러므로, 바람직하게 본 발명은 수소 결합을 형성함에 있어서 플루오르, 하이드록실기 또는 카르보닐기를 포함하는 유기 화합물을 사용한다. 하나의 구현예에서, 유기플루오르는 강한 수소 결합을 형성하기 위해 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0263] 다른 구현예에서, 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너와 소수성 상호작용을 할 수 있는 성분들이 사용된다. 이러한 성분들은 소수성 기를 가지는 유기 화합물을 포함한다.

[0264] 본원에 사용된 바와 같이 "소수성 상호작용"이란 용어는, 소수성 화합물 또는 어느 화합물의 소수성 영역과, 또 다른 소수성 화합물 또는 또 다른 화합물의 소수성 영역 간에 가역적으로 유인하는 상호작용을 지칭한다. 이러한 상호작용 유형은 소수성 상호작용의 설명을 위해 그 개시내용이 본원에 참조로서 첨부되어 있는 문헌["Hydrophobic Interactions," A. Ben-Nairn (1980), Plenum Press, New York]에 기술되어 있다.

[0265] 소수성 물질은 자체의 무극성으로 말미암아 물 분자에 의해 반발된다. 수용액 중 비교적 무극성인 분자 또는 기가 물보다는 다른 무극성 분자와 회합될 때, "소수성 상호작용"이라 지칭된다.

[0266] 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너는 통상적으로 소수성 상호작용을 할 수 있는 아미노산을 포함한다. 이와 같은 아미노산은 통상적으로 소수성 상호작용을 할 수 있는 무극성 기와 함께 적어도 1개의 측쇄를 가지는 것으로 특징지어질 것이다. 소수성 아미노산은, 예를 들어 알라닌(Ala), 이소루신(Ile), 루신(Leu), 페닐알라닌(Phe), 발린(Val), 프롤린(Pro), 글리신(Gly)을 포함하며, 드물게는 메티오닌(Met) 및 트립토판(Trp)도 포함한다.

[0267] 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너와 소수성 상호작용을 할 수 있는 성분들은 소수성 분자, 또는 소수성 기를 적어도 1개 함유하는 분자인 유기 화합물들을 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 이 같은 소수성 성분들은 방향족 탄화수소, 치환된 방향족 탄화수소, 다 방향족 탄화수소, 방향족 또는 비 방향족 헤테로사이클, 사

이클로알칸, 알칸, 알켄 및 알킨으로부터 선택된 탄화수소일 수 있다. 소수성 기는 방향족 기, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐 및 알키닐 기를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "알킬", "알케닐" 및 "알키닐"이란 용어는, 1개 내지 30개의 탄소 원자를 가지는 불포화 지방족 기, 예를 들어 직쇄 알케닐/알키닐 기, 분지쇄 알케닐/알키닐 기, 사이클로알케닐(비 사이클릭) 기, 알킬 치환 사이클로알킬 기 및 사이클로알킬 치환 알케닐/알키닐 기를 지칭한다. 이러한 탄화수소 기들은 또한 하나 이상의 탄소 원자 상에서 치환될 수도 있다.

[0268] 소수성 상호작용의 세기는 서로 상호작용할 수 있는 "소수성 물질(hydrophobe)"의 가용 양을 기반으로 결정됨이 이해될 수 있다. 그러므로 소수성 상호작용은, 예를 들어 소수성 상호작용에 수반되는 분자들 내 소수성 기의 "소수"성 및/또는 이 "소수"성의 정도를 증가시킴으로써 조정될 수 있다. 예를 들어 원래 형태가 소수성인 기는 탄화수소 사슬을 포함할 수 있고, 탄소 주쇄를 이루는 탄소들 중 하나에 소수성 측쇄를 결합시킴으로써 소수성(소수성기가 수반되는 소수성 상호작용의 세기를 증가시키는 능력)이 증가하도록 변형될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 이는 다양한 폴리사이클릭 화합물, 예를 들어 다양한 스테로이드 화합물 및/또는 이의 유도체, 예를 들어 스테롤 류 화합물, 더욱 구체적으로는 콜레스테롤의 결합을 포함할 수 있다. 일반적으로 측쇄는 선형 사슬, 방향족, 지방족, 사이클릭, 폴리사이클릭일 수 있거나, 또는 당 업계의 숙련자들에 의해 고려되는 바와 같은 소수성 측쇄의 기타 임의의 다양한 유형일 수 있다.

[0269] 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너와 반 데르 발스 상호작용을 할 수 있는 성분의 유형은 일반적으로 극성기를 가지는 화합물이지만, 항상 그러한 것은 아니다. 본원에 사용된 바와 같은 "반 데르 발스 상호작용"이란, 쌍극자-쌍극자 간 상호작용에 의해 유발되는 원자들, 기들, 분자들 및 표면들 사이의 인력 및/또는 근처 원자들, 기들 또는 분자들의 양자 역학으로 말미암은 유동적 분극 시 상관관계를 지칭한다.

[0270] 본 발명에 있어서의 반 데르 발스 상호작용은 돌연변이 폴리펩티드 또는 결합 파트너 및 성분 사이의 인력이다. 반 데르 발스 상호작용은 3가지 발생원으로부터 발생한다. 첫 번째, 일부 분자들/기들은 전기적으로 중성일지라도 영구 전기 쌍극자일 수 있다. 일부 분자들/기들의 구조에 있어서 전자 전하 분포의 고정된 왜곡으로 말미암아, 분자/기의 한쪽은 항상 어느 정도 "+"이고, 반대쪽은 어느 정도 "-"이게 된다. 이와 같은 영구 쌍극자가 서로 정렬되는 경향은 순 인력(net attractive force)을 초래한다. 이는 2개의 영구 쌍극자들 간의 상호작용이다(Keesom 힘).

[0271] 두 번째, 영구 쌍극자인 분자들의 존재는 일시적으로 또 다른 근처 극성 또는 무극성 분자의 전자 전하를 왜곡시킬 수 있고, 이로 말미암아 추가의 분극이 유도된다. 추가의 인력이 영구 쌍극자와 이웃하는 유도 쌍극자의 상호작용으로부터 기인하게 된다. 이는 영구 쌍극자와 상응하는 유도 쌍극자 사이의 상호작용으로서, Debye 힘이라 칭하여질 수 있다. 세 번째, 수반된 어떠한 분자들도 영구 쌍극자가 아니지만(예를 들어 유기 액체 벤젠), 분자들 내에 일시적으로 유도된 쌍극자 2개를 가지는 분자들 사이에 인력이 존재한다. 이는, 일시적 유도 쌍극자 2개 사이의 상호작용으로서, London 분산 력이라 칭하여질 수 있다.

[0272] 반 데르 발스 상호작용을 할 수 있는 결합 파트너 및/또는 돌연변이 폴리펩티드 내에 다수의 아미노산이 존재한다. 이러한 아미노산, 예를 들어 글루타민(Gln), 아스파라긴(Asn), 히스티딘(His), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 티로신(Tyr), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 트립토판(Trp)은 극성 측쇄를 가질 수 있다. 이러한 아미노산들, 예를 들어 알라닌(Ala), 이소루신(Ile), 루신(Leu), 페닐알라닌(Phe), 발린(Val), 프롤린(Pro), 글리신(Gly)은 또한 무 극성기를 가지는 측쇄를 가질 수도 있다.

[0273] 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너와 반 데르 발스 상호작용을 할 수 있는 성분들은, 검정 용액에 가용성인 극성 또는 무극성 무기 화합물을 포함한다. 검정 용액은 일반적으로 수용액이므로, 이 같은 극성 또는 무극성 무기 화합물은 물에 가용성인 것이 바람직하다. 반 데르 발스 상호작용에 바람직한 물질들은 극성이어서, 쌍극자-쌍극자 상호작용을 할 수 있는 것들이다. 예를 들어 AlF_3 는 극성 Al-F 결합들을 가지고, 물에 가용성(20 °C에서 물 100 ml 중 약 0.67 g 용해)이다. $HgCl_2$ 는 극성 Hg-Cl 결합을 가지고, 20 °C에서 물 100 ml 중 약 7.4 g 용해된다. $PrCl_2$ 는 극성 Pr-Cl 결합을 가지고, 20 °C에서 물 100 ml 중 약 1 g 용해된다.

[0274] 반 데르 발스 상호작용을 할 수 있는 적합한 극성 화합물은 알코올, 티올, 케톤, 아민, 아마이드, 에스테르, 에테르 및 알데히드를 포함한다. 이와 같은 화합물의 적합한 예들은 수소 결합과 관련하여 전술되어 있다. 반 데르 발스 상호작용을 할 수 있는 적합한 무극성 화합물은 방향족 탄화수소, 치환된 방향족 탄화수소, 폴리방향족 탄화수소, 방향족 또는 비 방향족 헤테로사이클, 사이클로알칸, 알칸, 알켄, 알킨을 포함한다.

[0275] 수소 결합 성분, 소수성 성분 및 반 데르 발스 성분은 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너의 결합에 다수의 방식으로 영향을 주기 위해 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 수소 결합, 소수성 상호작용 및/또는 반 데

르 발스 상호작용은 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 간에 가교를 형성할 수 있다. 이러한 가교는 돌연변이 폴리펩티드와 결합 파트너가 서로 더 근위에 위치하도록 하여, 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 결합 파트너가 서로에 대해 결합을 촉진하는 형태로서 결합하고/결합하거나 자리 잡도록 촉진한다.

[0276] 다른 구현예에서, 수소 결합 및/또는 소수성 상호작용은, 예를 들어 돌연변이 폴리펩티드와 결합 파트너가, 결합 확률을 높이는 형태로서 서로 모이거나 회합하도록 유도하여, 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너의 결합 확률을 높일 수 있다. 그러므로 이러한 상호작용들 중 하나 이상은, 돌연변이 폴리펩티드 및 결합 파트너가 더 가까이 모이도록 만들거나, 또는 이 돌연변이 폴리펩티드와 결합 파트너가, 예를 들어 결합 위치들이 서로 더 가까이에 유인되도록 유도하거나, 분자들의 비 결합 부분들이 서로 더 멀리 떨어지도록 정렬시켜 결합 위치가 서로 더욱 가까이 위치하도록 만듦으로써 결합을 촉진하는 형태로 정렬되도록 만들기 위해 단독으로 또는 조합되어 사용될 수 있다.

[0277] 또 다른 구현예에서, 수소 결합 및/또는 소수성 상호작용은 돌연변이 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 파트너의 입체구조에 영향을 미쳐, 이 입체구조가, 돌연변이 폴리펩티드 및 이의 결합 파트너의 결합에 더욱 유연하도록 만들 수 있다. 구체적으로 돌연변이 폴리펩티드의 아미노산들 중 하나 이상 및/또는 결합 파트너의 결합 또는 상호작용은, 돌연변이 폴리펩티드/결합 파트너 결합 반응에 유리한 돌연변이 폴리펩티드 또는 결합 파트너 내에서 입체구조 변형 하나 이상을 유발시킬 수 있다.

[0278] 본 발명은 검정들 2쌍을 수행하는데, 하나의 검정은, 정상 생리학적 조건에서 돌연변이 폴리펩티드의 기원이 된 모 폴리펩티드 활성과 비교되었을 때, 이러한 정상 생리학적 조건에서의 검정에서 돌연변이 폴리펩티드 활성의 감소를 추구하는 것이고, 다른 하나의 검정은, 비정상 조건에서 돌연변이 폴리펩티드의 기원이 된 모 폴리펩티드 활성과 비교되었을 때, 이러한 비정상 조건에서의 검정에서 돌연변이 폴리펩티드 활성의 증가를 추구하는 것이다.

[0279] 본 발명의 검정들의 쌍들에 사용된 조건은 검정 용액 또는 매질의 온도, pH, 삼투압, 삼투질 농도, 산화 스트레스, 전해질 농도, 그리고 기타 임의의 성분의 농도로부터 선택될 수 있다. 그러므로, 검정 배지의 특정 성분은 검정들의 쌍 둘 다에서와 실질적으로 동일한 농도로 사용될 수 있다. 이러한 경우, 성분은 통상 인간이나 동물의 특정 환경, 예를 들어 혈청, 종양 미세환경, 혈액막 환경, 신경 환경 또는 투여 점에서 우연히 마주할 수 있거나, 투여된 치료제가 횡단할 수 있거나, 또는 치료지점에서 우연히 마주할 수 있는 임의의 기타 환경을 모의하기 위한 목적으로 존재한다. 이 같은 환경들을 모의하는 성분 하나 이상을 선택함에 있어서 한 가지 중요한 양상은, 검정들의 쌍들이 사용되어 수행된 선택 공정의 결과들을 이러한 성분이 개선할 수 있다는 점이다. 예를 들어 특정 환경을 모의하는 것은, 해당 환경 중 특정 성분의 돌연변이 폴리펩티드에 대한 다양한 효과들이 선택 공정에서 평가될 수 있도록 허용한다. 특정 환경의 성분들은, 예를 들어 돌연변이 폴리펩티드를 변경할 수 있거나 이와 결합할 수 있거나, 돌연변이 폴리펩티드의 활성을 억제할 수 있거나, 돌연변이 폴리펩티드를 비활성화할 수 있는 식일 수 있다.

[0280] 몇몇 구현예들에서, 검정 용액의 성분 하나 이상은 바람직하게 소분자, 예를 들어 이황화물, 황화수소, 히스티딘, 히스타민, 시트르산염, 중탄산염, 젖산염 및 아세트산염이다. 하나의 구현예에서, 소 분자 성분은 바람직하게 검정 용액 중 약 100 μ M 내지 약 100 mM, 더욱 바람직하게 약 0.5 mM 내지 약 50 mM, 또는 약 1 mM 내지 약 10 mM의 농도로 존재한다.

[0281] 검정 용액 중 성분의 농도는, 포유동물, 예를 들어 인간의 자연 발생 체액 중에서 통상 발견되는 동일 성분의 농도와 동일하거나 실질적으로 동일할 수 있다. 이는, 체액 중 성분의 정상 생리학적 농도라고 칭하여질 수 있다. 다른 구현예들에서, 검정 용액 중 특정 성분의 농도는, 포유동물, 예를 들어 인간의 자연 발생 체액 중에서 통상 발견되는 동일 성분의 농도에 못 미치거나 이보다 더 높을 수 있다.

[0282] 다른 구현예에서, 성분은 검정들의 쌍들 각각에 실질적으로 상이한 농도로 존재할 수 있다. 이러한 경우, 성분의 존재, 부재 또는 농도는 검정 대상 조건이 되는데, 그 이유는 성분의 농도가, 정상 생리학적 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액과, 비정상 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액 사이에 차이가 나는 조건이기 때문이다. 그러므로, 본 발명의 방법에 관한 이 구현예에 의해 생산되는 조건부 활성 폴리펩티드는 적어도 부분적으로 성분의 농도에 의존적인 활성에 대해 선택될 것이다.

[0283] 몇몇 구현예들에서, 성분은 검정 용액들 한 쌍에 존재할 수 있지만, 검정 용액들 다른 쌍에는 전혀 존재하지 않을 수 있다. 예를 들어 비정상 조건에 대한 검정 용액 중 젖산염의 농도는 종양 미세환경 내 젖산염의 농도를 모의하는 수준으로 설정될 수 있다. 젖산염은 정상 생리학적 조건에 대한 검정 용액들의 쌍에는 존재하지 않을

수 있다.

- [0284] 하나의 구현예에서, 정상 생리학적 조건은 정상 생리학적 조건을 나타내는 제1 젖산염 농도이고, 비정상 조건은 체내 특정 병소에 존재하는 비정상 조건을 나타내는 제2 젖산염 농도이다.
- [0285] 다른 예에서, 글루코스는 종양 미세환경에서 발견될 수 있는 글루코스의 부재를 모의하기 위해 비정상 조건에 대한 검정 용액 중에 존재할 수 없는 한편, 글루코스는 정상 생리학적 조건에 대한 검정 용액들 쌍에서 혈장 글루코스 농도를 모의하는 수준으로 설정될 수 있다. 이 특징은, 수송 중 활성이 없어진다거나 최소화되지 않고, 또한 조건부 활성 폴리펩티드가 비정상 조건에 대한 검정 용액의 성분 농도가 조성된 환경에 도달할 때 이 조건부 활성 폴리펩티드가 활성화되지 않으면서, 조건부 활성 폴리펩티드를 병소 또는 환경에 우선적으로 전달하기 위해 이용될 수 있다.
- [0286] 예를 들어 종양 미세환경은 인간 혈청과 비교되었을 때, 통상 더 낮은 글루코스 농도와 더 높은 젖산염 농도를 보인다. 글루코스의 정상 생리학적 농도는 혈청 중 약 2.5 mM 내지 약 10 mM의 범위에 있다. 다른 한편, 글루코스 농도는 통상 종양 미세환경에서 0.05 mM 내지 0.5 mM의 범위로 매우 낮다. 하나의 구현예에서, 정상 생리학적 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액의 글루코스 농도는 약 2.5 mM 내지 약 10 mM의 범위이고, 비정상 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액의 글루코스 농도는 약 0.05 mM 내지 약 0.5 mM의 범위에 있다. 이와 같이 제조된 조건부 활성 폴리펩티드는 저 글루코스 환경(종양 미세환경)에서의 활성이 고 글루코스 환경(정상 조직 또는 혈액)에서의 활성보다 더 크다. 이 조건부 활성 폴리펩티드는 종양 미세환경에서는 기능성일 것이지만, 수송시에는 혈류 중 낮은 활성을 보일 것이다.
- [0287] 혈청 중 젖산염의 정상 생리학적 농도는 약 1 mM 내지 약 2 mM의 범위에 있다. 다른 한편, 젖산염 농도는 통상 종양 미세환경에서 10 mM 내지 20 mM의 범위에 있다. 하나의 구현예에서, 정상 생리학적 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액의 젖산염 농도는 약 1 mM 내지 약 2 mM의 범위에 있고, 비정상 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액의 젖산염 농도는 약 10 mM 내지 약 20 mM의 범위에 있다. 이와 같이 제조된 조건부 활성 폴리펩티드는 고 젖산염 농도 환경(종양 미세환경)에서의 활성이 저 젖산염 농도 환경(정상 조직 또는 혈액)에서의 활성보다 더 크다. 그러므로 이 조건부 활성 폴리펩티드는 종양 미세환경에서는 기능성일 것이지만, 수송시에는 혈류 중 낮은 활성을 보일 것이다.
- [0288] 유사하게, 근육통의 젖산염 농도는 정상보다 더 높다(비정상이다). 그러므로 근육통 환경에서 활성을 보이게 될 돌연변이 폴리펩티드를 찾을 때, 비정상 조건에서의 검정들의 쌍은 근육통 환경을 모의하도록 더 높은 농도의 젖산염 존재 하에서 수행될 수 있는 한편, 정상 생리학적 조건에서의 검정들의 쌍은 더 낮은 농도의 젖산염 존재 하에서, 또는 젖산염 부재 하에서 수행될 수 있다. 이러한 방식으로, 돌연변이 폴리펩티드는 젖산염 농도가 증가한 근육통 환경에서 향상된 활성에 대해 선택될 수 있다. 이러한 조건부 활성 폴리펩티드는, 예를 들어 소염제로서 유용할 수 있다.
- [0289] 다른 구현예에서, 2개 이상의 성분은 검정 용액들의 쌍 둘 다에서 사용될 수 있다. 이와 같은 유형의 검정에 있어서, 조건부 활성 폴리펩티드는 전술된 2가지 유형의 검정 둘 다의 특징들이 이용되어 선택될 수 있다. 대안적으로, 조건부 활성 폴리펩티드의 선택성은 2개 이상의 성분이 사용될 때 증가할 수 있다. 예를 들어 종양 미세환경으로 되돌아가는 것(비정상 조건에서의 검정들의 쌍)은 높은 젖산염 농도와 낮은 글루코스 농도 둘 다가 조성된 검정 배지 중에서 수행될 수 있는 한편, 정상 생리학적 조건에서의 검정들의 대응하는 쌍은 비교적 더 낮은 젖산염 농도와 비교적 더 높은 글루코스 농도 둘 다가 조성된 검정 배지 중에서 수행될 수 있다.
- [0290] 본 발명은, 무기 화합물, 이온 및 유기 분자로부터 선택된 각각의 성분은, 해당 성분의 상이한 농도에서보다 이 성분의 어느 한 농도에서 더욱 활성인 조건부 활성 폴리펩티드를 선택하기 위해, 단독으로 또는 조합되어 사용될 수 있음을 고려한다.
- [0291] 정상 환경(정상 생리학적 조건) 및 비정상 환경(비정상 조건) 사이의 조건(들)을 차별화하는 것으로서 대사물질 하나 이상의 농도를 상이하게 조성하는 것을 바탕으로 하는 검정은, 특히 혈장 중에서보다 종양 미세환경에서 더욱 활성인 조건부 활성 폴리펩티드의 선택에 적합할 수 있는데, 그 이유는 종양 미세환경은 통상 혈장 중 대사물질의 농도와 비교되었을 때, 상이한 농도의 동일 대사물질을 유의적 수만큼 가지기 때문이다.
- [0292] Kinoshita와 다수는 정상 뇌 및 뇌 종양에서의 대사물질들을 비교하였다["Absolute Concentrations of Metabolites in Human Brain Tumors Using In Vitro Proton Magnetic Resonance Spectroscopy," NMR IN BIOMEDICINE, vol. 10, pp.2-12, 1997]. 이 연구팀은, 정상 뇌 내 N-아세틸 아스파르트산염 농도는 5000 ~ 6000 μ M이지만, 교모세포종의 경우에는 300 ~ 400 μ M에 불과하고, 성상세포종의 경우에는 1500 ~ 2000 μ M이

며, 악성 정상세포종의 경우에는 600 ~ 1500 μM 임을 발견하였다. 또한, 정상 뇌 내 이노시톨 농도는 1500 ~ 2000 μM 이지만, 교모세포종의 경우에는 2500 ~ 4000 μM 이고, 정상세포종의 경우에는 2700 ~ 4500 μM 이며, 악성 정상세포종의 경우에는 3800 ~ 5800 μM 이다. 정상 뇌 내 포스포릴에탄올아민의 농도는 900 ~ 1200 μM 이지만, 교모세포종의 경우에는 2000 ~ 2800 μM 이고, 정상세포종의 경우에는 1170 ~ 1370 μM 이며, 악성 정상세포종의 경우에는 1500 ~ 2500 μM 이다. 정상 뇌 내 글리신 농도는 600 ~ 1100 μM 이지만, 교모세포종의 경우에는 4500 ~ 5500 μM 이고, 정상세포종의 경우에는 750 ~ 1100 μM 이며, 악성 정상세포종의 경우에는 1900 ~ 3500 μM 이다. 정상 뇌 내 알라닌 농도는 700 ~ 1150 μM 이지만, 교모세포종의 경우에는 2900 ~ 3600 μM 이고, 정상세포종의 경우에는 800 ~ 1200 μM 이며, 악성 정상세포종의 경우에는 300 ~ 700 μM 이다. 이러한 대사물질들은 또한 혈중 농도가 상이할 수 있는데, 예를 들어 N-아세틸 아스파르트산염의 혈중 농도는 약 85000 μM 이고; 이노시톨의 혈중 농도는 약 21700 μM 이며; 글리신의 혈중 농도는 약 220 ~ 400 μM 이고; 알라닌의 혈중 농도는 약 220 ~ 300 μM 이다.

[0293] 그러므로 적어도 N-아세틸 아스파르트산염, 이노시톨, 글리신 및 알라닌을 비롯한 이러한 대사물질들은 뇌 종양에서는 활성이지만, 혈액 또는 정상 뇌 조직에서는 활성이 아닌 조건부 활성 폴리펩티드를 선택하기 위해 검정 용액 중에 상이한 농도로 사용될 수 있다. 예를 들어 교모세포종의 종양 미세환경에서는 활성이지만, 혈액 또는 정상 뇌 조직에서는 활성이 아니거나 적어도 활성이 작은 조건부 활성 폴리펩티드를 선택하기 위해서, N-아세틸 아스파르트산염 농도가 85000 μM 인 검정 용액은 정상 생리학적 조건 하에서의 검정들 쌍에 사용될 수 있고, N-아세틸 아스파르트산염 농도가 350 μM 인 검정 용액은 비정상 조건 하에서의 검정들 쌍에 사용될 수 있다.

[0294] Mayers와 다수는, 췌장 환자의 예비 진단 혈장 중 분지쇄 아미노산을 비롯한 다수의 상이한 대사물질들의 농도를 연구하였다["Elevated circulating branched chain amino acids are an early event in pancreatic adenocarcinoma development," *Nature Medicine*, vol. 20, pp. 1193-1198, 2014]. 췌장암 환자에는 몇 가지 대사물질이, 췌장암이 발병하지 않은 인간의 혈액 중 해당 대사물질의 농도와는 상이한 농도로 혈류 중에 존재함이 발견되었다. Mayers와 다수는 또한, 췌장암 환자는 자신의 혈장 중에 정상 피험체의 혈장 중과는 비교되게 유의적으로 증가한 분지형 아미노산을 가진다는 것을 발견하였다. 증가한 농도로 존재하는 분지형 아미노산은 이소루신, 루신 및 발린을 포함한다(Mayers의 표 1). Mayers의 도 1에 보인 다른 대사물질들도 췌장암 환자의 혈장 중에, 정상의 건강한 인간의 혈류 중 농도와 유의적으로 상이한 농도로 존재한다. 이러한 대사물질들은 적어도 아세틸글리신, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 2-아미노아디프산염, 타우로데옥시콜산염/타우로케노데옥시콜산염, 아코니트산염, 이소시트르산염, 젖산염, α -글리세로인산염 및 요산염을 포함한다. 그러므로 임의의 대사물질들은 췌장암 환자와 정상의 건강한 환자의 혈류 중에 상이한 농도로 존재한다는 발견을 바탕으로 하였을 때, 췌장암 환자의 종양 미세환경은 또한, 건강한 환자의 췌장 미세환경에 존재할 대사물질의 농도와 상이한 농도로 이 같은 대사물질들 가질 것임이 예상될 수 있다.

[0295] 그러므로 하나의 구현예에서, 이러한 대사물질 중 하나 이상은 정상 생리학적 조건에 대한 검정 용액 중에, 건강한 개체의 혈장 중 해당 대사물질의 농도(즉 대사물질의 정상 생리학적 농도)와 근사한 양만큼 사용될 수 있다. 예를 들어 건강 개체의 혈장 중 정상 생리학적 농도로서 공지된 농도는, 이소루신의 경우 약 1.60 ± 0.31 mg/dL이고, 루신의 경우 약 1.91 ± 0.34 mg/dL이며, 발린의 경우 약 2.83 ± 0.34 mg/dL이다. 정상 생리학적 조건용인 검정 용액은 이와 같은 분지형 아미노산들 중 하나 이상을 상기와 같은 범위 내에 속하는 정상적인 생리학적 농도만큼 가질 수 있다. 비정상 조건용인 검정 용액은 동일한 분지형 아미노산을, 건강한 개체 중 이와 대응하는 분지형 아미노산의 정상 생리학적 농도보다 약 5배, 또는 약 10배, 또는 약 20배, 또는 약 50배, 또는 약 70배, 또는 약 100배, 또는 약 150배, 또는 약 200배, 또는 약 500배 높은 농도로 가질 수 있다. 이는, Mayer와 다수가 발견한 것을 바탕으로 하였을 때 췌장암 미세환경이 이러한 분지형 아미노산을 유의적으로 증가한 농도만큼 가질 것으로 예상된다는 사실을 반영할 것인데, 그 이유는 Mayers와 다수에 의해 검출된, 혈장에서 발견되는 더 높은 농도의 분지형 아미노산들은 종양 미세환경으로부터 기인하여 혈류 중에 희석되기 때문이다. 유사하게 비정상 조건 하에서의 검정은 특정 대사물질의 농도가 정상 개체에서보다 췌장암 환자에서 유의적으로 낮더라도, 이 췌장암 환자의 혈액 중 다른 대사물질의 농도를 반영할 수 있다. 이러한 방식으로, 스크리닝은 실제 환경을 모의할 수 있으며, 이로써 해당 특정 환경에 대하여 최고의 활성을 보이는 돌연변이체가 선택되는 것이 보장된다.

[0296] 다른 몇몇 구현예들에서, 췌장암 환자의 실제 혈장 환경을 모의하기 위해서, 정상 생리학적 조건용인 검정 용액은 하나 이상의 분지형 아미노산을 췌장암 환자의 혈장 중 농도를 모의하는 농도로 포함할 수 있다. 이러한 구현예들에서, 비정상 조건용 검정 용액은 동일한 분지형 아미노산을, 췌장암 환자의 혈장 중 대응 분지형 아미노산의 농도보다 약 2배, 또는 약 3배, 또는 약 4배, 또는 약 5배, 또는 약 7배, 또는 약 8배, 또는 약 10배, 또

는 약 15배, 또는 약 20배 또는 약 50배 높은 농도로 가질 수 있으며, 이는, 이처럼 높은 농도가 종양 미세환경 으로부터 기인하고, 혈류 중 농도는 종양의 미세환경 중 실제 농도의 희석된 만큼을 나타낸다는 사실을 반영한다. 유사하게, 기타 대사물질은 또한 정상 생리학적 조건용 및 비정상 조건용 검정 용액 중 상이한 농도로 존재 할 수 있으며, 이는, 혈류에 대해 수집된 데이터로부터 예상되는 실제 차이들을 반영한다. 몇몇 경우에서, 특정 대사물질의 결핍은 채장 환자의 혈류 중에서 주목될 수 있는데, 이 경우, 혈류 중 측정된 농도를 반영하는 농도 는 정상 생리학적 조건에 대한 검정에 사용될 수 있고, 더욱더 낮은 농도는 비정상 조건에 대한 검정에 사용될 수 있으며, 이로부터 상기 대사물질이 종양 미세환경에서 소모될 것 같다는 예상이 뒷받침된다. 검정 용액이 사 용되어 이처럼 선택된 조건부 활성 폴리펩티드는 채장암 환자의 혈장 중에서보다 채장암 미세환경에서 활성이 더욱 클 것이다.

[0297] 몇몇 구현예들에서, 채장암 환자의 전체 혈장이 본 발명에 사용될 수 있다. 예를 들어 하나의 구현예에서, 채장 암 환자의 혈장 성분 하나 이상의 모의는 정상 생리학적 조건 및 비정상 조건 하에서의 검정들 중 어느 하나 또 는 둘 다를 위한 검정 용액에 적용될 수 있다. 예시적 구현예에서, 정상 생리학적 조건에 대한 검정 용액의 pH 는 채장암 환자의 혈장이 30 wt.% 첨가되어 7.2 내지 7.6이고, 비정상 조건에 대한 검정 용액의 pH는 채장암 환 자의 혈장이 30 wt.% 첨가되어 6.2 내지 6.8이다. 이 구현예에서, 채장암 환자의 혈장은 (1) 조건부 활성 폴리 펩티드가 pH 7.2 ~ 7.6의 혈액 중에서 활성화되지 않도록 보장하고, 또한 (2) 채장암 환자의 혈액 중에서 발견 되는 대사물질의 이러한 조성물의 존재 하에서조차도 종양 미세환경 내 pH 5.5 ~ 7.2, 6 ~ 7, 또는 6.2 ~ 6.8에 서 조건부 활성 폴리펩티드가 활성화될 수 있도록 보장하기 위해 제시된다. 이는, 채장암 환자를 위한 치료를 조정할 것이다.

[0298] 또 다른 예시적 구현예에서, 정상 생리학적 조건에 대한 검정 용액의 pH는 채장암 환자의 혈장이 30 wt.% 첨가 되어 7.2 내지 7.6이고, 비정상 조건에 대한 검정 용액의 pH는 채장암 환자의 임의의 혈장이 첨가되지 않고 5.5 내지 7.2 또는 6.2 내지 6.8이다.

[0299] 무기 화합물, 이온 및 유기 분자로부터 선택된 동일 성분은 상기 논의된 몇 가지 유형의 검정 각각에서 사용될 수 있다. 예를 들어 젖산염의 경우, 이 젖산염은 정상 생리학적 조건 및 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액들 의 쌍들 중 실질적으로 동일한 농도로 사용될 수 있다. 그 다음, 정상 생리학적 조건 및 비정상 조건은 하나 이 상의 양상, 예를 들어 온도, pH, 다른 성분의 농도 등에서 차이가 날 것이다. 상이한 구현예에서, 젖산염은 정 상 생리학적 조건 및 비정상 조건 간 차별화 요인들 중 하나로서 사용될 수 있는데, 이는 젖산염이 정상 생리학 적 조건(비 종양 미세환경)에서보다 비정상 종양 미세환경에서 더 높은 농도로 존재하는 사실을 반영한다.

[0300] 몇몇 구현예들에서, 2개 이상의 성분은 정상 생리학적 조건 및 비정상 조건에 대한 검정 용액 둘 다에 실질적으 로 동일한 농도로 첨가된다. 예를 들어 시트르산염 및 소 혈청 알부민(BSA) 둘 다가 검정 용액에 첨가된다. 시 트르산염 농도는 약 80 μ M일 수 있으며, BSA 농도는 두 검정 용액들 중 약 10% ~ 약 20%로 존재할 수 있다. 더 욱 구체적으로, 정상 생리학적 조건 하에서의 검정들의 쌍을 위한 검정 용액의 pH는 농도 약 80 μ M의 시트르산 염과, 농도 약 10% ~ 약 20%의 BSA가 포함될 때 7.2 ~ 7.6의 범위에 있을 수 있다. 비정상 조건 하에서의 검정 들의 쌍을 위한 검정 용액의 pH는 농도 약 80 μ M의 시트르산염과, 농도 약 10% ~ 약 20%의 BSA가 포함될 때 6.2 ~ 6.8의 범위에 있을 수 있다.

[0301] 하나의 구현예에서, 혈청은 정상 생리학적 조건과 비정상 조건에 대한 두 검정 용액들에 실질적으로 동일한 농 도로 첨가될 수 있다. 혈청은 다수의 무기 화합물, 이온, 유기 분자(예를 들어 폴리펩티드)를 가지므로, 검정 용액은 두 검정 용액들 간에 실질적으로 동일한 농도로 제시되는, 무기 화합물, 이온, 유기 분자로부터 선택되 는 성분들 다수개 및 다수 개를 함유할 수 있다. 검정 용액은 혈청을 5 ~ 30 vol.%, 또는 7 ~ 25 vol.%, 또는 10 ~ 20 vol.%, 또는 10 ~ 15 vol.% 함유할 수 있다. 다른 몇몇 구현예들에서, 정상 생리학적 조건과 비정상 조 건 둘 다에 대한 검정 용액들은 혈청을 함유하지 않는다. 혈청은 인간의 혈청, 소 혈청, 또는 임의의 다른 포유 동물 유래 혈청일 수 있다. 다른 몇몇 구현예들에서, 검정 용액은 혈청을 함유하지 않는다.

[0302] 정상 생리학적 조건과 비정상 조건에 대한 검정 용액들은 pH가 상이할 수 있다. 이러한 검정 용액의 pH는 중탄 산염을 사용하는 것을 통하여 완충제 중 CO₂ 및 O₂ 수준을 이용해 조정될 수 있다.

[0303] 몇몇 다른 구현예들에서, 2개 이상의 성분들 중 적어도 1개가 정상 생리학적 조건 및 비정상 조건에 대한 검정 용액에 상이한 농도로 첨가된다. 예를 들어 젖산염 및 소 혈청 알부민(BSA) 둘 다가 검정 용액에 첨가된다. 젖 산염 농도는 정상 생리학적 조건에 대한 검정 용액과 비정상 조건에 대한 검정 용액 간에 상이할 수 있는 한편, BSA는 상기 두 검정 용액 중에 동일한 농도로 존재할 수 있다. 비정상 조건에 대한 검정 용액 중 젖산염의 농도 는 30 mg/dL 내지 50 mg/dL일 수 있고, 정상 생리학적 조건에 대한 검정 용액 중 젖산염의 농도는 8 mg/dL 내지

15 mg/dL일 수 있다. 다른 한편, BSA는 상기 두 검정 용액 중에 동일한 농도, 예를 들어 약 10% ~ 20%로 존재한다. 이러한 검정 용액들이 사용되어 선택된 조건부 활성 폴리펩티드는 BSA의 존재 하에 젖산염이 낮은 농도, 즉 8 mg/dL ~ 15 mg/dL로 존재할 때보다 젖산염이 높은 농도, 즉 30 mg/dL ~ 50 mg/dL로 존재할 때 활성이 더 크다.

[0304] 몇몇 구현예들에서, 검정 용액은 활성이 2개 이상의 조건에 의존적인 조건부 활성 폴리펩티드의 선택을 위해 디자인될 수 있다. 하나의 예시적 구현예에서, 조건부 활성 폴리펩티드의 활성은 pH 및 젖산염 둘 다에 의존적일 수 있다. 이러한 조건부 활성 폴리펩티드의 선택을 위한 검정 용액은, pH 7.2 ~ 7.6이고, 젖산염 농도는 8 mg/dL 내지 15 mg/dL인, 정상 생리학적 조건에 대한 검정 용액일 수 있다. 비정상 조건에 대한 검정 용액의 pH는 6.2 ~ 6.8이고, 젖산염 농도는 30 mg/dL ~ 50 mg/dL일 수 있다. 선택적으로, 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액은 또한 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 간 결합을 도와주는 이온을 포함할 수 있어서, 후보 생체 활성 폴리펩티드에 대한 히트의 수가 증가할 수 있다.

[0305] 또 다른 예시적 구현예에서, 조건부 활성 폴리펩티드는 pH, 글루코스 및 젖산염에 의존적인 활성을 가질 수 있다. 이러한 조건부 활성 폴리펩티드를 선택하기 위한 검정 용액은 pH 7.2 ~ 7.6이고, 글루코스 농도가 2.5 mM ~ 10 mM의 범위이며, 젖산염 농도가 8 mg/dL ~ 15 mg/dL의 범위인, 정상 생리학적 조건에 대한 검정 용액일 수 있다. 비정상 조건에 대한 검정 용액은 pH 6.2 ~ 6.8이고, 글루코스 농도가 0.05 mM ~ 0.5 mM의 범위이며, 젖산염 농도가 30 mg/dL ~ 50 mg/dL의 범위일 수 있다. 선택적으로 정상 생리학적 조건과 비정상 조건 둘 다에 대한 검정 용액은 또한 돌연변이 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 사이의 결합을 도와서, pH 6.2 ~ 6.8에서 결합 파트너와 결합하는 후보 생체 활성 폴리펩티드의 수를 증가시키기 위한 이온을 포함할 수도 있다. 이러한 검정 용액이 사용되어 선택된 조건부 활성 폴리펩티드는, pH 7.2 ~ 7.6, 글루코스 농도 2.5 mM ~ 10 mM, 그리고 젖산염 농도 8 mg/dL 내지 15 mg/dL의 환경에서보다 pH 6.2 ~ 6.8, 글루코스 농도 0.05 mM ~ 0.5 mM, 그리고 젖산염 농도 30 mg/dL 내지 50 mg/dL의 환경에서 더욱 활성이 크다.

[0306] 무기 화합물, 이온 및 유기 분자로부터 선택되는 성분 2개 이상은, 선택된 조건부 활성 폴리펩티드가 전달될 병소/위치(즉 표적화된 위치)에서의 환경을 모의하는 비정상 조건에 대한 검정 용액을 제조하기 위한 것이다. 몇몇 구현예들에서, 표적화된 위치에서의 환경에 제시된 성분 적어도 3개가 검정 용액에 첨가될 수 있거나, 또는 표적화된 위치에서의 환경에 제시된 성분 적어도 4개가 검정 용액에 첨가될 수 있거나, 또는 표적화된 위치에서의 환경에 제시된 성분 적어도 5개가 검정 용액에 첨가될 수 있거나, 또는 표적화된 위치에서의 환경에 제시된 성분 적어도 6개가 검정 용액에 첨가될 수 있다.

[0307] 하나의 구현예에서, 표적화된 위치(즉 조건부 활성 폴리펩티드가 더 큰 활성을 보일 위치)에서 채취된 유체가 비정상 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액으로서 직접 사용될 수 있다. 예를 들어 활액막 액은 피험체, 바람직하게는 관절 질환을 앓고 있어서 그의 치료를 필요로 하는 피험체로부터 채취될 수 있다. 채취된 활액막 액(선택적으로는 희석액)은 조건부 활성 폴리펩티드를 선택하기 위하여 비정상 조건에서의 검정들 쌍에서 검정 용액으로서 사용될 수 있다. 채취된 활액막 액(선택적으로는 희석된 활액막 액)이 비정상 조건 하에서의 검정을 위한 검정 용액, 그리고 정상 생리학적 조건 하에서의 검정을 위한 인간 혈장을 모의하는 검정 용액으로 사용되면, 이 선택된 조건부 활성 폴리펩티드(예를 들어 TNF-알파)는 다른 병소나 장기에서보다 관절에서 더욱 활성이 클 것이다. 예를 들어 염증성 관절을 가지는 피험체(예를 들어 관절염이 발병한 피험체)는 TNF-알파로 치료될 수 있다. 그러나 TNF-알파는 통상 다른 조직과 장기에 피해를 주는 심각한 부작용을 보인다. 활액막 액 중에서 더욱 활성이 크지만 혈액 중에서는 활성이 없거나 활성이 작은 조건부 활성 TNF-알파는, 몸의 나머지 부분에 대한 TNF-알파의 부작용을 줄이거나 잠재적으로는 억제하면서, 관절에 대한 TNF-알파의 활성을 발휘시킬 것이다.

[0308] 다수의 조건에 따라서 활성을 보이는 조건부 활성 폴리펩티드의 개발은, 피험체 몸속 표적 위치에 대한 조건부 활성 폴리펩티드의 개선된 선택성을 달성할 것이다. 조건들 중 오로지 몇 가지만이 조성되는 다른 병소에 조건부 활성 폴리펩티드가 제공되었을 때, 이 조건부 활성 폴리펩티드는 비활성이거나 적어도 유의적으로 활성이 작은 것이 이상적이다. 하나의 구현예에서, pH 6.2 ~ 6.8, 글루코스 농도 0.05 mM ~ 0.5 mM, 그리고 젖산염 농도 30 mg/dL ~ 50 mg/dL에서 활성인 조건부 활성 폴리펩티드는 중앙 미세환경에 특이적으로 전달될 수 있는데, 그 이유는 이 조건들이 모두 중앙 미세환경에서 보이기 때문이다. 다른 조직 또는 장기는 이와 같이 조성된 조건들 3개 전부는 아니고 이 조건들 중 1개 또는 2개를 보일 수 있으므로, 조건부 활성 폴리펩티드를 다른 조직 또는 장기 내에서 완전히 활성화하기에 충분치 않다. 예를 들어 운동을 마친 근육은 pH가 6.2 ~ 6.8의 범위로 낮을 수 있다. 그러나, 이 근육은 또 다른 검정 대상 조건을 보이지 않을 수도 있는 것이다. 그러므로, 조건부 활성 폴리펩티드는 운동을 마친 근육에서 비활성이거나 적어도 활성이 작다

- [0309] 몇몇 구현예들에서, 조건부 활성 폴리펩티드의 활성이, 이 조건부 활성 폴리펩티드를 선택하는데에 사용된 조건에 진정으로 의존하는지를 확인하기 위한 단계들이 수행될 수 있다. 예를 들어 조건부 활성 폴리펩티드는 3가지 조건, 즉 pH 6.2 ~ 6.8, 글루코스 농도 0.05 mM ~ 0.5 mM, 그리고 젖산염 농도 30 mg/dL ~ 50 mg/dL에 의존하는 것으로 선택된다. 선택된 조건부 활성 폴리펩티드는 이후 3가지 조건 각각에서 따로따로, 그리고 3가지 조건들의 쌍들이 조성된 환경들에서 시험될 수 있고, 그 결과 이 조건부 활성 폴리펩티드가 이와 같은 시험 조건들 또는 환경들에서 비활성인지 또는 활성이 작은지가 확인될 수 있다.
- [0310] 몇몇 구현예들에서, 혈청 중 임의의 성분들은 의도적으로 최소화될 수 있거나, 또는 검정 배지에서 제거될 수 있다. 예를 들어 항체가 스크리닝될 때, 항체와 결합하거나 이에 흡착하는 혈청의 성분들은 검정 배지 중에 최소로 포함될 수 있거나 이에서 제거될 수 있다. 조건부 활성이 아니고, 오히려 다수의 상이한 조건들 하에서 오로지 혈청 중에 존재하는 성분과만 결합하는 결합 돌연변이 항체를 포함하여, 이와 같이 결합한 항체는 위 양성(false positive)을 보일 수 있다. 그러므로, 검정에서 돌연변이체와 잠재적으로 결합할 수 있는 성분들을 최소화하거나 제거하기 위해서는 검정 성분의 조심스러운 선택이 이루어질 수 있고, 그 결과 검정에서 원하는 결합 파트너 이외의 성분과 결합함으로써 말미암는 조건부 활성에 대해 양성인 것으로 부주의하게 확인될 수 있는, 비 기능성 돌연변이체의 수가 감소할 수 있다. 예를 들어 인간 혈청 중 성분들과 결합하는 성향을 갖는 돌연변이 폴리펩티드가 스크리닝되는 몇몇 구현예에서, 인간 혈청 성분들에 결합하는 돌연변이 폴리펩티드에 의해 유발되는 위 양성 가능성을 줄이거나 없애기 위하여 BSA가 검정 용액 중에 사용될 수 있다. 기타 유사한 대체물도 동일한 목적을 달성하기 위해 구체적인 경우에 제조될 수 있다.
- [0311] 몇몇 구현예들에서, 검정 조건들은 세포 막 가까이, 예컨대 세포 막 내부, 세포 막 또는 세포 막 외부에 있는 환경, 또는 관절 내부 환경을 모의한다. 세포 막 환경에서 스크리닝될 때 결합 활성에 영향을 줄 수 있는 몇몇 요인들로서는 수용체 발현, 내부화, 항체 약물 복합체(ADC) 효능 등을 포함한다.
- [0312] 검정 포맷은 당 업자에게 공지된 임의의 적합한 검정일 수 있다. 그 예들로서는, ELISA, 효소 활성 검정, 시험관 내 실제 조직 스크리닝(장기 등), 조직 슬라이드, 전체 동물, 세포주 및 3D 시스템 사용을 포함한다. 예를 들어 적합한 세포 기반 검정은 WO 2013/040445에 기술되어 있고, 조직 기반 검정은 미국특허 제7,993,271호에 기술되어 있으며, 전체 동물 기반 스크리닝 방법은 미국특허출원 제2010/0263599호에 기술되어 있고, 3D 시스템 기반 스크리닝 방법은 미국특허출원 제2011/0143960호에 기술되어 있다.
- [0313] 몇몇 구현예들에서, 진화 단계는 상기 논의된 조건부 활성 특징들 이외에도 기타 원하는 특성들을 동시에 가질 수 있는 돌연변이 폴리펩티드를 제조해 낼 수 있다. 진화될 수 있는 기타 원하는 특성들로서 적합한 것들은 결합 활성, 발현, 인간화 등을 포함할 수 있다. 그러므로, 본 발명은 이 같은 기타 원하는 특성들 중 적어도 1개 또는 그 이상이 개선된 조건부 활성 폴리펩티드를 제조하는데에 사용될 수 있다.
- [0314] 몇몇 구현예들에서, 본 발명은 조건부 활성 폴리펩티드를 제조한다. 선택된 조건부 활성 폴리펩티드는, 예를 들어 선택된 조건부 활성 폴리펩티드의 다른 특성, 예를 들어 결합 활성, 발현, 인간화 등을 개선하기 위한 제2 진화 단계에서, 본원에 개시된 돌연변이유발 기술들 중 하나가 사용되어 추가로 돌연변이될 수 있다. 제2 진화 단계 후, 돌연변이 폴리펩티드는 조건부 활성과 개선된 특성 둘 다에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0315] 몇몇 구현예들에서, 모 폴리펩티드가 진화되어 돌연변이 폴리펩티드로 제조된 후에는, (a) 모 폴리펩티드와 비교되었을 때 정상 생리학적 조건하의 검정에서 감소한 제1 활성 및 (b) 모 폴리펩티드와 비교되었을 때 비정상 조건하의 검정에서 증가한 제1 활성 둘 다를 보이는 제1 조건부 활성 폴리펩티드가 선택된다. 그 다음, 상기 제1 조건부 활성 폴리펩티드는 추가로 하나 이상의 추가 진화, 발현 및 선택 단계의 대상이 될 수 있고, 그 결과 (1) (a) 모 폴리펩티드와 비교되었을 때 정상 생리학적 조건하의 검정에서 감소한 제2 활성 및 (b) 모 폴리펩티드와 비교되었을 때 비정상 조건하의 검정에서 증가한 제2 활성 둘 다를 보이거나, 또는 (2) 비정상 조건에서의 제1 활성과 정상 생리학적 조건에서의 제1 활성 간 비가, 제1 조건부 활성 폴리펩티드 및/또는 모 폴리펩티드에 서보다 더 큰, 적어도 제2 조건부 활성 폴리펩티드가 선택된다. 제2 조건부 활성 폴리펩티드는, 모 폴리펩티드에 비하여 비정상 조건 하에서 제1 활성과 제2 활성 둘 다가 더 클 수 있을 뿐만 아니라, 모 폴리펩티드에 비하여 정상 생리학적 조건 하에서 제1 활성과 제2 활성 둘 다가 더 작을 수 있음을 주목한다.
- [0316] 임의의 구현예들에서, 본 발명은 비정상 조건(또는 제2 조건)에서의 활성과 정상 생리학적 조건(또는 제1 조건)에서의 활성의 활성 비가 큰(예컨대 비정상 조건과 정상 생리학적 조건 간 선택성이 더 큰) 조건부 활성 폴리펩티드를 제조하는 것을 목표로 한다. 비정상 조건(또는 제2 조건)에서의 활성과 정상 생리학적 조건(또는 제1 조건)에서의 활성의 비 또는 선택성은 적어도 약 2:1, 또는 적어도 약 3:1, 또는 적어도 약 4:1, 또는 적어도 약 5:1, 또는 적어도 약 6:1, 또는 적어도 약 7:1, 또는 적어도 약 8:1, 또는 적어도 약 9:1, 또는 적어도 약

10:1, 또는 적어도 약 11:1, 또는 적어도 약 12:1, 또는 적어도 약 13:1, 또는 적어도 약 14:1, 또는 적어도 약 15:1, 또는 적어도 약 16:1, 또는 적어도 약 17:1, 또는 적어도 약 18:1, 또는 적어도 약 19:1, 또는 적어도 약 20:1, 또는 적어도 약 30:1, 또는 적어도 약 40:1, 또는 적어도 약 50:1, 또는 적어도 약 60:1, 또는 적어도 약 70:1, 또는 적어도 약 80:1, 또는 적어도 약 90:1, 또는 적어도 약 100:1일 수 있다.

[0317] 하나의 구현예에서, 조건부 활성 폴리펩티드는 비정상 조건에서의 활성과 정상 생리학적 조건에서의 활성 간 비가 적어도 약 5:1, 또는 적어도 약 6:1, 또는 적어도 약 7:1, 또는 적어도 약 8:1, 또는 적어도 약 9:1, 또는 적어도 약 10:1, 또는 적어도 약 15:1, 또는 적어도 약 20:1, 또는 적어도 약 40:1, 또는 적어도 약 80:1일 수 있는 항체이다. 하나의 구현예에서, 조건부 활성 폴리펩티드는 종양 위치를 표적화하는데에 사용되는데, 이 경우 조건부 활성 폴리펩티드는 종양 위치(종양 미세환경)에서 활성을 가지고, 종양 위치가 아닌 위치(정상 생리학적 조건)에서는 유의적으로 활성이 작거나 비활성이다.

[0318] 하나의 구현예에서, 본 조건부 활성 폴리펩티드는 다른 제제, 예컨대 본원의 어딘가에 개시되어 있는 제제와 접합되도록 의도되는 항체이다. 조건부 활성 항체는 비정상 조건에서의 활성과 정상 생리학적 조건에서의 활성의 비가 더 클 수 있다. 예를 들어 다른 제제와 접합될 조건부 활성 항체는 비정상 조건에서의 활성과 정상 생리학적 조건에서의 활성의 비가 적어도 약 10:1, 또는 적어도 약 11:1, 또는 적어도 약 12:1, 또는 적어도 약 13:1, 또는 적어도 약 14:1, 또는 적어도 약 15:1, 또는 적어도 약 16:1, 또는 적어도 약 17:1, 또는 적어도 약 18:1, 또는 적어도 약 19:1, 또는 적어도 약 20:1일 수 있다. 이는, 접합된 제제가, 예를 들어 독성이거나 방사성일 때 특히 중요할 수 있는데, 그 이유는 이처럼 접합된 제제는 발병 위치나 치료 위치(즉 비정상 조건이 조건된 위치)에서 농축될 것이 요망되기 때문이다.

[0319] G. 조건부 활성 폴리펩티드의 제조

[0320] 가역적이거나 비가역적 활성을 보이는, 선택된 조건부 활성 폴리펩티드는 치료, 진단, 연구 및 관련된 용도를 위해 사용될 수 있고/사용될 수 있거나 서플링 및/또는 선택에 관한 하나 이상의 추가 사이클의 대상이 될 수 있다.

[0321] 조건부 활성 폴리펩티드는 폴리펩티드 발현용 세포 생산 숙주 또는 유기체를 사용하여 제조될 수 있다. 이 생산 과정을 더 효율적으로 만들기 위해, 조건부 활성 폴리펩티드를 암호화하는 DNA는 세포 생산 숙주 또는 유기체에 대해 코돈 최적화를 수행할 수 있다. 코돈 최적화는, 예컨대 마우스 계에서의 코돈 최적화가 기술되어 있는 문헌(Narum et al., "Codon optimization of gene fragments encoding Plasmodium falciparum merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice". Infect. Immun. 2001 December, 69(12): 7250-3); 효모 계에서의 코돈 최적화가 기술되어 있는 문헌(Outchkourov et al., "Optimization of the expression of Equistatin in Pichia pastoris, protein expression and purification", Protein Expr. Purif. 2002 February; 24(1): 18-24); 이.콜라이에서의 코돈 최적화가 기술되어 있는 문헌(Feng et al., "High level expression and mutagenesis of recombinant human phosphatidylcholine transfer protein using a synthetic gene: evidence for a C-terminal membrane binding domain" Biochemistry 2000 Dec. 19, 39(50): 15399-409); 코돈 선호도가 이.콜라이에서 이루어지는 분비에 어떻게 영향을 주는지가 기술되어 있는 문헌(Humphreys et al., "High-level periplasmic expression in Escherichia coli using a eukaryotic signal peptide: importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence", Protein Expr. Purif. 2000 Nov. 20(2):252-64)에 이미 기술된 바 있다.

[0322] 세포 생산 숙주는 CHO, HEK293, IM9, DS-I, THP-I, Hep G2, COS, NIH 3T3, C33a, A549, A375, SK-MEL-28, DU 145, PC-3, HCT 116, Mia PACA-2, ACHN, Jurkat, MM1, Ovar 3, HT 1080, Panc-1, U266, 769P, BT-474, Caco-2, HCC 1954, MDA-MB-468, LnCAP, NRK-49F, 및 SP2/0 세포주; 그리고 마우스 비장세포 및 토끼 PBMC로 이루어진 군 중 하나로부터 선택되는 포유동물 계일 수 있다. 하나의 구현예에서, 포유동물 계는 CHO 또는 HEK293 세포주로부터 선택된다. 하나의 특정 양상에서, 포유동물 계는 CHO-S 세포주이다. 다른 구현예에서, 포유동물 계는 HEK293 세포주이다.

[0323] 몇몇 구현예들에서, 세포 생산 숙주는 효모 세포 계, 예컨대 에스.세레비지아에(*S.cerevisiae*) 효모 세포 또는 피치아(*picchia*) 효모 세포이다. 몇몇 구현예들에서, 세포 생산 숙주는 원핵생물 세포, 예컨대 이.콜라이이다(Owens RJ and Young RJ, J. Immunol. Meth., vol. 168, p.149, 1994; Johnson S and Bird RE, Methods Enzymol., vol. 203, p.88, 1991). 조건부 활성 폴리펩티드는 또한 식물 내에서 생산될 수도 있다(Firek et al. Plant Mol. Biol., vol. 23, p.861, 1993).

- [0324] 본 조건부 활성 폴리펩티드는 또한 당 분야에 널리 공지된 화학적 방법이 사용되는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어 문헌[Caruthers "New chemical methods for synthesizing polynucleotides", Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223, 1980; Horn, "Synthesis of oligonucleotides on cellulose. Part II: design and synthetic strategy to the synthesis of 22 oligodeoxynucleotides coding for Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP)", Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232, 1980; Banga, A. K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa, 1995]을 참조하시오. 예를 들어 펩티드 합성은 다양한 고체상 기술이 사용되어 수행될 수 있고[예를 들어 문헌(Roberge "A strategy for a convergent synthesis of Nlinked glycopeptides on a solid support", Science 269:202, 1995; Merrifield "Concept and early development of solid-phase peptide synthesis", Methods Enzymol. 289:3-13, 1997) 참조], 자동화된 합성은, 예를 들어 제조업자에 의해 제공되는 지침에 따라 ABI 431A 펩티드 합성기(Perkin Elmer)가 사용되어 달성될 수 있다.
- [0325] 고체상 화학적 펩티드 합성 방법은 1960년대 초부터 당 분야에 공지되어 있으며(Merrifield, R. B., "Solid-phase synthesis.I. The synthesis of a tetrapeptide", J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963) (문헌(Stewart, J. M. and Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 11-12)도 또한 참조함), 최근에는 시판용 실험실 펩티드 디자인 및 합성 키트(Cambridge Research Biochemicals)에 사용되고 있다. 이러한 시판용 실험실 키트는 일반적으로 문헌[H. M. Geysen et al., "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid," Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3998 (1984)]의 교시를 이용하였으며, 단일 플레이트에 모두 결합된 다수의 "봉" 또는 "핀"의 끝 부분 상에서 펩티드를 합성하는 것을 제공한다. 이러한 계가 이용될 때, 봉 또는 핀의 플레이트는 뒤집혀서, 핀 또는 로드 끝 부분에 적절한 아미노산을 결합 또는 고정하기 위한 용액이 담긴, 상응하는 웰 또는 저장기의 제2 플레이트 내에 끼워진다. 이러한 방법의 단계, 즉 봉 및 핀을 뒤집어서 적절한 용액 내에 봉 및 핀의 끝 부분을 담그는 것을 반복함으로써, 아미노산은 요망되는 펩티드로 구축된다. 또한, 다수의 이용 가능한 Fmoc 펩티드 합성 계가 이용될 수 있다. 예를 들어 폴리펩티드 또는 단편의 조립은 Applied Biosystems, Inc.의 Model 431ATM 자동화 펩티드 합성기가 사용되어 고체 지지체 상에서 수행될 수 있다. 이러한 장치는 직접 합성에 의하거나 다른 공지된 기술이 사용되어 커플링될 수 있는 일련의 단편의 합성에 의해 본 발명의 펩티드에 대한 준비된 접근 수단을 제공한다.
- [0326] 본 조건부 활성 폴리펩티드는 또한 글리코실화될 수 있다. 글리코실화는 화학적으로 또는 세포 생합성 기구에 의해 번역 후에 수행될 수 있는데, 여기서 세포 생합성 기구는 공지된 글리코실화 모티프들의 사용을 통합한다 [다만, 모티프는 서열에 원산인 것이거나, 펩티드로서 첨가될 수 있거나, 아니면 핵산 암호화 서열에 첨가될 수 있음]. 글리코실화는 O-결합되거나 N-결합될 수 있다.
- [0327] 조건부 활성 폴리펩티드는 "모의체" 및 "펩티도모의체" 형태 모두를 포함한다. "모의체" 및 "펩티도모의체"라는 용어는, 본 발명의 폴리펩티드 구조 및/또는 기능적 특징과 실질적으로 동일한 구조 및/또는 기능적 특징을 갖는 합성 화합물을 지칭한다. 모의체는 전체가 합성된 아미노산의 비 자연 유사체로 구성될 수 있거나, 일부는 자연 펩티드 아미노산이고 일부는 아미노산의 비 자연 유사체인 키메라 분자일 수 있다. 모의체는 또한 치환이 모의체의 구조 및/또는 활성을 실질적으로 변경시키지 않는 한, 임의의 양의 자연 아미노산 보존적 치환을 통합할 수도 있다. 보존적 변이체인 본 발명의 폴리펩티드가 사용되는 일상적 실험은 모의체가 본 발명의 범위 내에 있는지 여부, 즉 모의체의 구조 및/또는 기능이 실질적으로 변경되지 않았는지를 확인할 것이다.
- [0328] 본 발명의 폴리펩티드 모의체 조성물은 비 자연 구조적 성분의 임의의 조합을 함유할 수 있다. 대안적 양상에서, 본 발명의 모의체 조성물은 하기 3가지 군들 중 하나 또는 전부를 포함한다: a) 자연 아미드 결합("펩티드 결합")에 의한 결합 이외의 잔기 결합 기; b) 자연 발생 아미노산 잔기를 대신하는 비 자연 잔기; 또는 c) 이차 구조적 모방을 유도하는 잔기, 즉 이차 구조, 예를 들어 베타 터언, 감마 터언, 베타 시트, 알파 나선 입체구조 등을 유도하거나 안정화시키기 위한 잔기. 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드는 이의 잔기 전부 또는 일부가 자연 펩티드 결합 이외의 화학적 수단에 의해 결합될 때 모의체로서 특징지어질 수 있다. 개별적 펩티도모의체 잔기는, 예를 들어 글루타라데히드, N-하이드록시숙신이미드 에스테르, 이작용성 말레이미드, N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드(DCC) 또는 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)와 같은 펩티드 결합, 다른 화학적 결합 또는 커플링 수단에 의해 결합될 수 있다. 통상적 아미드 결합("펩티드 결합")에 대한 대안일 수 있는 결합 기는 예를 들어 케토메틸렌[예를 들어 $-C(=O)-NH-$ 에 대한 $-C(=O)-CH_2-$], 아미노메틸렌(CH_2-NH), 에틸렌, 올레핀($CH=CH$), 에테르(CH_2-O), 티오에테르(CH_2-S), 테트라졸(CN_4-), 티아졸, 레트로아미드, 티오아미

드 또는 에스테르를 포함한다[예를 들어 문헌(Spatola(1983), Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357, "Peptide backbone Modification," Marcell Dekker, N. Y.)을 참조하시오].

[0329] 본 발명의 폴리펩티드는 또한 자연 발생 아미노산 잔기 대신에 비 자연 잔기의 전부 또는 일부를 함유할 때 모의체로서 특징지어질 수 있다. 비 자연 잔기는 과학 및 특허 문헌에 잘 기술되어 있으며; 자연 아미노산 잔기의 모의체로서 유용한 대표적 비 자연 조성물 소수 개와 가이드라인이 아래 기술되어 있다. 방향족 아미노산의 모의체는, 예를 들어 D- 또는 L-나프틸알라닌; D- 또는 L-페닐글리신; D- 또는 L-2 티에네일알라닌; D- 또는 L-1, -2, 3- 또는 4-피레네일알라닌; D- 또는 L-3 티에네일알라닌; D- 또는 L-(2-피리디닐)-알라닌; D- 또는 L-(3-피리디닐)-알라닌; D- 또는 L-(2-피라지닐)-알라닌; D- 또는 L-(4-이소프로필)-페닐글리신; D-(트리플루오로메틸)-페닐글리신; D-(트리플루오로메틸)-페닐알라닌; D-p-플루오로-페닐알라닌; D- 또는 L-p- 비페닐페닐알라닌; D- 또는 L-p-메톡시-비페닐페닐알라닌; D- 또는 L-2-인돌(알킬)알라닌; 및 D- 또는 L-알킬알라닌에 의해 치환되어 제조될 수 있으며, 다만 알킬은 치환 또는 비치환 메틸, 에틸, 프로필, 헥실, 부틸, 펜틸, 이소프로필, 이소-부틸, sec-이소틸, 이소-펜틸 또는 비 산성 아미노산일 수 있다. 비 자연 아미노산의 방향족 고리는, 예를 들어 티아졸릴, 티오페닐, 피라졸릴, 벤즈이미다졸릴, 나프틸, 푸라닐, 피롤릴 및 피리딜 방향족 고리를 포함한다.

[0330] 산성 아미노산의 모의체는, 예를 들어 음전하를 유지하는 비 카르복실레이트 아미노산; (포스포노)알라닌; 황산화된 트레오닌에 의한 치환에 의해 제조될 수 있다. 카르복실 측기(예를 들어 아스파르틸 또는 글루타밀)는 또한 예를 들어 1-사이클로헥실-3(2-모폴리닐-(4-에틸) 카르보다이미드 또는 1-에틸-3(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸) 카르보다이미드와 같은 카르보다이미드(R'-N-C-N-R')와의 반응에 의해 선택적으로 변형될 수 있다. 아스파르틸 또는 글루타밀은 또한 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환될 수 있다. 염기성 아미노산의 모의체는, 예를 들어 (리신 및 아르기닌 이외에) 아미노산 오르니틴, 시트룰린, 또는 (구아니디노)-아세트산 또는 (구아니디노)알킬-아세트산과의 치환에 의해 제조될 수 있되, 여기에서 알킬은 상기 정의되어 있다. 아스파라긴 또는 글루타민에 대해 (예를 들어 COOH 대신에 CN-기를 함유하는) 니트릴 유도체가 치환될 수 있다. 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기는 상응하는 아스파르틸 또는 글루타밀 잔기로 탈아민화될 수 있다. 아르기닌 잔기 모의체는, 바람직하게 알칼리성 조건하에 아르기닐을, 예를 들어 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-사이클로-헥산디온 또는 닐히드린을 포함하는 하나 이상의 통상적인 시약과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 티로신 잔기 모의체는 티로실을, 예를 들어 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. N-아세틸이미디졸 및 테트라니트로메탄은 각각 O-아세틸 티로실 중 및 3-니트로 유도체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 시스테인 잔기 모의체는 시스테이닐 잔기를, 예를 들어 2-클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 같은 알파-할로아세테이트 및 상응하는 아민과 반응시킴으로써 제조될 수 있고; 그 결과 카르복시메틸 또는 카르복시아미도메틸 유도체가 제공된다. 시스테인 잔기 모의체는 또한 시스테이닐 잔기를, 예를 들어 브로모-트리플루오로아세톤, 알파-브로모-베타-(5-이미도조일)프로피온산; 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 이황화물; 메틸 2-피리딜 이황화물; p-클로로머큐리벤조에이트; 2-클로로머큐리-4-니트로페놀; 또는 클로로-7-니트로벤조-옥사-1,3-디아졸과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 리신 모의체는 리시닐을, 예를 들어 숙신산 또는 다른 카르복실산 무수물과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 리신 및 다른 알파-아미노 함유 잔기 모의체는 또한 메틸피콜리니미데이트와 같은 이미도에스테르, 피리독살 인산염, 피리독살, 클로로보로하이드라이드, 트리니트로-벤젠술포산, O-메틸이소우레아, 2,4-펜탄디온과의 반응, 그리고 글리옥살레이트와의 트랜스아미다아제-촉매 반응에 의해 제조될 수 있다. 메티오닌의 모의체는, 예를 들어 메티오닌 술폭시드와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 프롤린의 모의체는, 예를 들어 피페콜산, 티아졸리딘 카르복실산, 3- 또는 4-하이드록시 프롤린, 데히드로프롤린, 3- 또는 4-메틸프롤린, 또는 3,3-디메틸프롤린을 포함한다. 히스티딘 잔기 모의체는 히스티딜을, 예를 들어 디에틸프로카보네이트 또는 파라-브로모페나실 브로마이드와 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 다른 모의체는, 예를 들어 프롤린 및 리신의 하이드록실화; 세틸 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실기의 인산화; 리신, 아르기닌 및 히스티딘의 알파-아미노기의 메틸화; N-말단 아민의 아세틸화; 주 사슬 아미드 잔기의 메틸화 또는 N-메틸 아미노산과의 치환; 또는 C-말단 카르복실기의 아미드화에 의해 제조되는 것들을 포함한다.

[0331] 본 발명의 폴리펩티드의 잔기, 예를 들어 아미노산은 또한 반대 키랄성을 가지는 아미노산(또는 펩티도모의체 잔기)에 의해 치환될 수 있다. 따라서, (화학적 실체의 구조에 의존하여 R 또는 S로서 지칭될 수도 있는) L-입체구조로 자연 발생하는 임의의 아미노산은 D-아미노산으로서 지칭되는, 반대 키랄성을 가지되 동일한 화학 구조적 형태 또는 펩티도모의체의 아미노산으로 치환될 수 있을뿐더러, R- 또는 S-형으로서 지칭될 수 있다.

- [0332] 본 발명은 또한 번역 후 가공(post-translational processing)과 같은 자연 가공(예를 들어 인산화, 아실화 등)에 의하거나, 또는 화학적 변형 기술에 의해 본 조건부 활성 폴리펩티드를 변형시키기 위한 방법을 제공한다. 변형은 펩티드 골격, 아미노산 측쇄, 그리고 아미노 또는 카르복시 말단을 포함하여 폴리펩티드 중 어디에서나 일어날 수 있다. 동일한 유형의 변형이 소정의 폴리펩티드 내의 여러 개의 위치에서 동일한 정도 또는 다양한 정도로 존재할 수 있음이 인지될 것이다. 또한, 소정의 폴리펩티드는 많은 유형의 변형을 가질 수 있다. 변형은, 아세틸화, 아실화, PEG화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유결합, 헴 기의 공유결합, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유결합, 포스포타르티르노시톨의 공유결합, 가교 고리화, 이황화물 결합 생성, 탈메틸화, 공유 가교의 생성, 시스테인의 생성, 피로글루타메이트의 생성, 포르밀화, 감마-카르복시화, 글리코실화, GPI 앵커 생성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 폐길화, 단백질 분해 가공, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 및 아르기닐화와 같이 아미노산의 단백질로의 운반-RNA 매개 첨가를 포함한다[예를 들어 문헌(Creighton, T. E., Structure and Molecular Properties 2nd Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983)) 참조].
- [0333] H. 조건부 활성 항체의 조작
- [0334] 본 발명의 조건부 활성 항체는 본원에 기술된 항체 조작 기술 하나 이상에 의해 조작될 수 있다. 항체 조작 기술의 비 제한적 예들로서는 항체 접합, 다중 특이적 항체의 조작, 이중 특이적 조건부 활성 항체의 면역 효과기 세포 표면 항원 및 표적 항원에 대한 조작, 그리고 항체의 Fc 영역의 조작을 포함한다.
- [0335] 본 조건부 활성 항체를 접합하는데에 적합한 방법은 WO 2015/175375에 기술되어 있다. 하나의 구현예에서, 본원에 개시된 접합을 위하여 사용되는 조건부 활성 항체에 있어서, 비정상 조건에서의 활성 대 정상 생리학적 조건에서의 활성의 비는 적어도 약 10:1, 또는 적어도 약 12:1, 또는 적어도 약 14:1, 또는 적어도 약 16:1, 또는 적어도 약 18:1, 또는 적어도 약 20:1, 또는 적어도 약 22:1, 또는 적어도 약 24:1, 또는 적어도 약 26:1이다.
- [0336] 몇몇 구현예들에서, 조건부 활성 항체는 항체의 Fc 영역상에서 접합될 수 있다. 전술된 접합 분자, 화합물 또는 약물은 미국 특허 제8,362,210호에 기술된 바와 같이 Fc 영역에 접합될 수 있다. 예를 들어 Fc 영역은, 조건부 활성 항체가 우선적으로 활성을 보이는 위치에 전달될 시토킨 또는 독소에 접합될 수 있다. 항체의 Fc 영역에 폴리펩티드를 접합하기 위한 방법은 당 업계에 공지되어 있다. 예를 들어 미국 특허 제5,336,603호, 동 제5,622,929호, 동 제5,359,046호, 동 제5,349,053호, 동 제5,447,851호, 동 제5,723,125호, 동 제5,783,181호, 동 제5,908,626호, 동 제5,844,095호 및 동 제5,112,946호; 유럽특허 제307,434호; 유럽특허 제367,166호; 유럽특허 제394,827호; PCT 공개공보 WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 및 WO 99/04813; 문헌[Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, pages 10535-10539, 1991 ; Traunecker et al., Nature, vol. 331, pages 84-86, 1988; Zheng et al., J. Immunol., vol. 154, pages 5590-5600, 1995; 및 Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, pages 11337-11341, 1992]을 참조하시오.
- [0337] 몇몇 구현예들에서, 조건부 활성 항체는, 반응기 적어도 2개(이중 하나는 조건부 활성 항체와 반응하고, 다른 하나는 접합된 제제와 반응함)를 가지는 중간 링커(intermediate linker)를 통해 접합제에 공유 결합될 수 있다. 임의의 양립 가능한 유기 화합물을 포함할 수 있는 링커가 선택될 수 있고, 그 결과 조건부 활성 항체 또는 접합된 제제와의 반응은 조건부 활성 항체의 반응성 및/또는 선택성에 악 영향을 미치지 않는다. 더욱이, 접합된 제제와 링커의 결합은 이 접합된 제제의 활성을 억제하지 않을 것이다. 조건부 활성 폴리펩티드에 접합된 항암제 분자 대 조건부 활성 폴리펩티드 분자의 비는 3:1 이하, 또는 4:1 이하, 또는 5:1 이하, 또는 6:1 이하이다. 하나의 예에서, 항암제 대 조건부 활성 폴리펩티드의 비는 약 4:1이다.
- [0338] 산화된 조건부 활성 항체에 적합한 링커는 1차 아민, 2차 아민, 히드라진, 히드라지드, 하이드록실아민, 페닐히드라진, 세미카바지드 및 티오세미카바지드 기들로부터 선택된 기를 함유하는 것들을 포함한다. 감소한 조건부 활성 항체에 적합한 링커는 감소한 조건부 활성 항체의 설프히드릴기와 반응할 수 있는 임의의 반응기를 가지는 것들을 포함한다. 이러한 반응기는 반응성 할로알킬기(예를 들어 할로아세틸기), p-머큐리벤조산염기와, 마이클형 부가 반응을 할 수 있는 기(예를 들어 말레이미드 및 문헌(Mitra and Lawton, J. Amer. Chem. Soc. Vol. 101, pages 3097-3110, 1979)에 기술된 유형의 기)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0339] 다중 특이적 조건부 활성 항체를 조작하는데에 적합한 방법들은 WO 2015/175375에 기술되어 있다.
- [0340] 본 조건부 활성 항체는 면역 효과기-세포 표면 항원과 표적 항원에 대한 이중 특이적 조건부 활성 항체를 제조

하도록 조작될 수 있다. 본 발명의 이중 특이적 조건부 활성 항체는 표적 항원이 제공되는 질병 위치에 면역 효과기 세포를 유인할 수 있다. 이중 특이적 조건부 활성 항체는 2개의 상이한 항원, 즉 면역 효과기 세포 표면 항원 및 표적 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 항체이다. 이중 특이적 항체는 하나는 면역 효과기 세포 표면 항원과 결합하고, 다른 하나는 표적 항원과 결합하는, 2개의 팔(arm)을 포함하는 전장 항체일 수 있다. 이중 특이적 항체는 오로지 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 경쇄 가변 도메인(V_L)을 포함하는 항체 단편일 수 있다. 하나의 구현예에서, 항체 단편은 적어도 2개의 V_HV_L 유닛을 포함하는데; 이것들 중 하나는 면역 효과기 세포 표면 항원과 결합하기 위한 것이고, 다른 팔은 표적 항원과 결합하기 위한 것이다. 다른 구현예에서, 항체 단편은 적어도 2개의 단일 가변 도메인(V_H 또는 V_L)을 포함하는데; 이것들 중 하나는 면역 효과기 세포 표면 항원과 결합하기 위한 것이고, 다른 팔은 표적 항원과 결합하기 위한 것이다. 몇몇 구현예들에서, 이중 특이적 조건부 활성 항체는 2개의 scFv를 포함하는데; 이것들 중 하나는 면역 효과기 세포 표면 항원과 결합하고, 다른 하나는 표적 항원과 결합한다.

[0341] 발병 세포 또는 발병 조직에 면역 효과기 세포와 표적 항원 둘 다와의 결합 활성을 가지는, 유인된 면역 효과기 세포는 표적 항원을 함유하는 발병 세포 또는 발병 조직에 면역 효과기 세포를 유인할 수 있다. 유인된 면역 효과기 세포는 이후 발병 세포 또는 발병 조직에 유인되어 해당 질병을 치유하는데에 도움을 줄 것인데, 그 이유는 면역 효과기 세포가 발병 세포 또는 발병 조직을 억제하거나, 심지어 파괴할 수 있기 때문이다. 예를 들어 면역 효과기 세포는 종양 세포 또는 감염된 세포를 파괴할 수 있다. 면역 효과기 세포는 자연 살해 세포, 대식 세포, 림포카인 활성화 살해(LAK) 세포 및 T 세포들을 포함한다.

[0342] 이중 특이적 조건부 활성 항체는 결합 활성을 2개 가지는데, 이 결합 활성은 각각 면역 효과기 세포 표면 항원과 표적 항원에 대한 것이다. 하나의 구현예에서, 결합 활성은 둘 다 조건부인데, 이는 이중 특이적 조건부 활성 항체의 면역 효과기 세포 표면 항원 및 표적 항원의 결합 활성이, 정상 생리학적 조건 하에서의 모 항체의 결합 활성보다 더 작고, 비정상 조건 하에서의 모 항체의 결합 활성보다 더 큼을 의미한다. 하나의 구현예에서, 2개의 결합 활성 중 오로지 하나만이 조건부인데, 이는 이중 특이적 조건부 활성 항체의 면역 효과기 세포 표면 항원과의 결합 활성, 또는 이중 특이적 조건부 활성 항체의 표적 항원과의 결합 활성 중 어느 하나가 조건부임을 의미한다. 이러한 경우에, 이중 특이적 조건부 활성 항체의 면역 효과기 세포 표면 항원에 대한 결합 활성, 또는 이중 특이적 조건부 활성 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성 중 하나는, 정상 생리학적 조건 하에서의 모 항체의 상응하는 결합 활성보다 더 작고, 비정상 조건 하에서의 모 항체의 상응하는 결합 활성보다 더 큼을 의미한다.

[0343] 이중 특이적 조건부 활성 항체에 있어서 2개의 팔(예를 들어 2개의 V_HV_L 유닛 또는 2개의 scFv)은, 종래 방법에 의해 연결될 수 있다. 본 발명의 분야에 널리 알려진 바와 같이, 완전 항원 결합 위치를 함유하는 최소 항체 단편은 하나의 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 하나의 경쇄 가변 도메인(V_L)이 비 공유 결합하여 이루어진 이량체를 가진다. 이 입체구조는, 각각의 가변 도메인의 상보성 결정 영역(CDR) 3개가 상호작용하여, V_H-V_L 이량체 표면상에 항원 결합 위치를 한정하도록 원산 항체들에서 발견되는 것과 상응한다. 종합하면, 6개의 CDR이 항체에 항원 결합 특이성을 제공하는 것이다. CDR들에 축적하는 구조 틀(FR)들은 인간과 마우스처럼 다양한 종들의 원산 면역 글로불린에 본질적으로 보존되는 3차 구조를 가진다. 이러한 FR들은 CDR들을 자체의 적절한 배향으로 유지시키는 역할을 한다. 불변 도메인은 결합 기능에 요구되지는 않지만, V_H-V_L 상호작용을 안정화하는 것을 도울 수 있다. 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 CDR을 3개만 포함하는 가변 도메인 Fv의 절반)은 심지어 항원을 인식하여 결합하는 능력을 가지지만, 그 친화성은 보통 전체 결합 위치보다 작다[Painter et al., "Contributions of heavy and light chains of rabbit immunoglobulin G to antibody activity. I. Binding studies on isolated heavy and light chains," Biochemistry, vol. 11 pages 1327-1337, 1972]. 그러므로 상기 이중 특이적 조건부 활성 항체의 결합 위치의 상기 도메인은 상이한 면역글로불린의 V_H-V_L , V_H-V_H 또는 V_L-V_L 도메인들의 쌍으로서 구성될 수 있다.

[0344] 몇몇 구현예들에서, 이중 특이적 조건부 활성 항체는, 예를 들어 이중 특이적 조건부 활성 항체를 암호화하는 핵산 분자가 연속 폴리펩티드 사슬을 구성하도록 발현되는 방식으로, 재조합 DNA 기술에 의해 연속 폴리펩티드 사슬로서 구성될 수 있다[예를 들어 Mack et al., "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92, pages 7021-7025, 2005 참조]. 폴리펩티드 사슬 내 V_H 및 V_L 도메인들의 순서는, 면역 효과기 세포 표면 항원에 대한 결합 위치 하나와 표적 항원에 대한 결합 위치 하나가 형성되도록 항원 결합 위치들이 적절히 폴딩될

수 있게 V_H 및 V_L 도메인들이 정렬되는 한, 본 발명에 있어서 중요하지 않다.

- [0345] 다중 특이적 조건부 활성 항체를 조작하기 위한 것으로서 본원에 기술된 기술들 중 몇몇은 면역 효과기 세포 표면 항원 및 표적 항원에 대한 이중 특이적 조건부 활성 항체를 제조하는데에 사용될 수 있다.
- [0346] 단일 폴리펩티드 사슬로서 입체배치될 수 있는 이중 특이적 항체는 문헌[WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Loftier, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Bruhl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426]에 기술되어 있다. 이중 특이적 항체로서 특히 바람직한 입체구조는 V_H 및 V_L 영역들이 링커-도메인에 의해 서로 결합하고 있는 폴리펩티드 구성물이다. 단일 폴리펩티드 사슬 내 V_H 및 V_L 영역들의 순서는 중요하지 않다. 하나의 구현예에서, 단일 폴리펩티드 사슬은 V_{H1} -링커 도메인- V_{L1} -링커 도메인- V_{H2} -링커 도메인- V_{L2} 로서 입체배치된다. 다른 구현예에서, 단일 폴리펩티드 사슬은 V_{L1} -링커 도메인- V_{H1} -링커 도메인- V_{L2} -링커 도메인- V_{H2} 로서 입체배치된다. 다른 구현예에서, 단일 폴리펩티드 사슬은 V_{H1} -링커 도메인- V_{H2} -링커 도메인- V_{L1} -링커 도메인- V_{L2} 로서 입체배치된다. 다른 구현예에서, 단일 폴리펩티드 사슬은 V_{H1} -링커 도메인- V_{L2} -링커 도메인- V_{L1} -링커 도메인- V_{H2} 로서 입체배치된다. 단일 폴리펩티드 사슬은 2개의 팔로 폴딩될 수 있는데, 이 경우 각각의 팔은 면역 효과기 세포 표면 항원 또는 표적 항원과 결합할 수 있다.
- [0347] 이중 특이적 조건부 활성 항체의 링커 도메인은 V_H 및 V_L 도메인들간 분자 간 회합이 허용되도록 충분히 긴 펩티드 단편이다. 이 목적에 적합한 링커의 디자인은 선행 기술, 예를 들어 EP 623 679 B1 미국특허 제5,258,498호, EP 573 551 B1 및 미국특허 제5,525,491호에 기술되어 있다. 링커 도메인은 바람직하게 글리신, 세린 및/또는 글리신/세린으로부터 선택되는 아미노산 1개 내지 25개로 이루어진 친수 가요성 링커이다. 하나의 구현예에서, 링커 도메인은 서열 $(Gly_4Ser)_3$ 로 이루어진 15 아미노산 링커이다.
- [0348] 추가의 링커 도메인은 올리고머화 도메인을 포함한다. 올리고머화 도메인은, 각각이 면역 효과기 세포 표면 항원 또는 표적 항원과 결합할 수 있는 팔들 2개로 폴딩되는 V_H 및 V_L 도메인들 2개 또는 수 개의 조합을 촉진할 수 있다. 올리고머화 도메인의 비 제한적 예들은 루신 지퍼(예를 들어 jun-fos, GCN4, E/EBP; Kostelny, J. Immunol. 148 (1992), 1547-1553; Zeng, Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997), 3673-3678, Williams, Genes Dev. 5 (1991), 1553-1563; Suter, "Phage Display of Peptides and Proteins", Chapter 11, (1996), Academic Press), 항체 유래 올리고머화 도메인, 예를 들어 불변 도메인 CH1 및 CL(Mueller, FEBS Letters 422 (1998), 259-264), 및/또는 사랑채화 도메인, 예를 들어 GCN4-LI(Zerangue, Proc. Natl. Acad. Sci. 97 (2000), 3591-3595)를 포함한다.
- [0349] 몇몇 구현예들에서, 단일 폴리펩티드 사슬 이중 특이적 조건부 항체의 폴딩을 안정화하기 위하여 노브-인-홀(Knobs-into-hole) 기술이 사용될 수 있다. 노브-인-홀 기술은 문헌[Ridgway et al., "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization," Protein Eng. 1996 Jul;9(7):617-21]에 기술되어 있다. 이 접근법은 인접 α -나선체들 사이의 아미노산 측쇄들의 팩킹(packing)에 사용되어 오고 있는데, 여기서 α -나선체 내 잔기들의 측쇄들은 인접 α -나선체 노브들이 교합할 수 있는 홀과 교번하면서 실린더 표면에 일정 간격을 두고 떨어져 있는 노브들로서 보인다[O'Shea et al., (1991) Science, 254, 539-544].
- [0350] 면역 효과기 세포 표면 항원은 면역 효과기 세포 하나 또는 일군에 특이적이어야 한다. 면역 효과기 세포들 다수에 대한 표면 항원이 공지되어 있다. 자연 살해 세포는 CD56, CD8, CD16, KIR 군 수용체들, Nkp46, Nkp30, CD244(2B4), CD161, CD2, CD7, CD3, 그리고 살해 세포 면역글로불린 유사 수용체들을 비롯한 표면 항원을 가진다[Angelis et al., "Expansion of CD56-negative, CD16-positive, KIR-expressing natural killer cells after T cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation," Acta Haematol. 2011; 126(1): 13-20; Dalle et al., "Characterization of Cord Blood Natural Killer Cells: Implications for Transplantation and Neonatal Infections," Pediatric Research (2005) 57, 649-655; Agarwal et al., "Roles and Mechanism of Natural Killer Cells in Clinical and Experimental Transplantation," Expert Rev Clin Immunol. 2008;4(1):79-91].
- [0351] 대식세포는 CD11b, F4/80, CD68, CSF1R, MAC2, CD11c, LY6G, LY6C, IL-4Ra, CD163, CD14, CD11b, F4/80(마우스)/EMR1(인간), CD68 및 MAC-1/MAC-3, PECAM-1(CD31), CD62, CD64, CD45, Ym1, CD206, CD45RO, 25F9,

S100A8/A9 및 PM-2K를 비롯한 표면 항원을 가진다[Murray et al., "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets," Nature Reviews Immunology, 11, 723-737; Taylor et al., "Macrophage receptors and immune recognition," Annu Rev Immunol 2005; 23:901-44; Pilling, et al., "Identification of Markers that Distinguish Monocyte-Derived Fibrocytes from Monocytes, Macrophages, and Fibroblasts," PLoS ONE 4(10): e7475. doi: 10.1371/journal.pone.0007475, 2009].

[0352] 림포카인 활성화 살해(LAK) 세포는 T3, T4 T11, T8, TII, Leu7, Leu11을 비롯한 표면 항원을 가진다[Ferrini et al., "Surface markers of human lymphokine-activated killer cells and their precursors," Int J Cancer. 1987 Jan 15;39(1): 18-24; Bagnasco et al., "Glycoproteic nature of surface molecules of effector cells with lymphokine-activated killer (LAK) activity," Int J Cancer. 1987 Jun 15;39(6):703-7; Kaufmann et al., "Interleukin 2 induces human acute lymphocytic leukemia cells to manifest lymphokine-activated-killer (LAK) cytotoxicity," The Journal of Immunology, August 1, 1987, vol. 139 no. 3 977-982].

[0353] T 세포, 구체적으로 세포독성 T 세포는 CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28, T58, CD27, CD45, CD84, CD25, CD127, CD196(CCR6), CD197(CCR7), CD62L, CD69, TCR, T10, T11 및 CD45RO를 비롯한 표면 항원을 가진다 [Ledbetter et al., "Enhanced transmembrane signaling activity of monoclonal antibody heteroconjugates suggests molecular interactions between receptors on the T cell surface," Mol Immunol. 1989 Feb;26(2): 137-45; Jondal et al., "SURFACE MARKERS ON HUMAN T AND B LYMPHOCYTES," JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, VOLUME 136, 1972, 207-215; Mingari et al., "Surface markers of human T lymphocytes," Ric Clin Lab. 1982 Jul-Sep;12(3):439-448].

[0354] 이중 특이적 조건부 활성화 항체는 면역 효과기 세포와 결합한 후, 이 면역 효과기 세포를 표적 항원이 존재하는 세포 또는 조직, 바람직하게는 그 표면으로 운반할 수 있다. 일단 이중 특이적 조건부 활성화 항체가 (면역 효과기 세포와 함께) 표적 항원과 결합하면, 이 면역 효과기 세포는 발병 세포 또는 발병 조직을 공격할 수 있다. 면역 효과기 세포, 예를 들어 자연 살해 세포, 대식세포, LAK 세포, T 세포(세포독성)는 모두 발병 세포 또는 조직을 사멸 및/또는 파괴할 수 있는데, 예를 들어 종양 조직을 파괴할 수 있다.

[0355] 발병된 세포 또는 발병된 조직은 암, 염증성 질환, 신경 장애, 당뇨병, 심혈관질환 또는 감염성 질환으로부터 선택될 수 있다. 표적 항원의 예들은 다양한 면역 세포, 암종, 육종, 림프종, 백혈병, 생식세포 종양, 아세포종과, 다양한 혈액 질환, 자가면역질환 및/또는 염증성 질환과 연관된 세포에 의해 발현되는 항원을 포함한다.

[0356] 이중 특이적 조건부 활성화 항체에 의해 표적화될 수 있는 암에 특이적인 표적 항원은 4-IBB, 5T4, 선암종 항원, 알파-태아 단백질, BAFF, B 림프종 세포, C242 항원, CA-125, 탄산 탈수 효소 9(CA-IX), C-MET, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23(IgE 수용체), CD28, CD30(TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNT0888, CTLA-4, DR5, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, 피브로블라스트 표면 도메인-B, 엽산 수용체 1, GD2, GD3 ganglioside, 당단백 75, GPNMB, HER2/neu, HGF, 인간 산란 인자(human scatter factor) 수용체 키나아제, IGF-1 수용체, IGF-I, IgG1, LI -CAM, IL-13, IL-6, 인슐린 유사 성장 인자 I 수용체, 인테그린 $\alpha 5 \beta 1$, 인테그린 $\alpha v \beta 3$, MORAb-009, MS4A1, MUC1, 뮤신 CanAg, N-글리코실뉴라민산, NPC-1C, PDGF-Ra, PDL192, 포스포티딜세린, 전립선 암종 세포, RANKL, RON, ROR1, SCH900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, 테나신 C, TGF 베타 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2 또는 비멘틴 중 하나 이상을 포함한다.

[0357] 본 발명의 약학 조성물 또는 유전자 조작된 세포 독성 세포로 치료될 암의 종류는 암종, 아세포종 및 육종, 그리고 임의의 백혈병 또는 림프성 악성종양, 양성 및 악성 종양, 그리고 악성종양, 예를 들어 육종, 암종 및 흑색종을 포함한다. 암은 비 고형 종양(예를 들어 혈액학적 종양) 또는 고형 종양일 수 있다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암도 또한 포함된다.

[0358] 혈액학적 암은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액학적(또는 조혈) 암의 예들은 백혈병, 예를 들어 급성 백혈병(예를 들어 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 그리고 골수아구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성 백혈병 및 적 백혈병), 만성 백혈병(예를 들어 만성 골수구성(과립구성) 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병), 진성 적혈구증가증, 림프종, 호지킨병, 비 호지킨 림프종(무통성 및 고도 형태), 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄병, 골수이형성증후군, 모양 세포 백혈병 및 골수이형성증을 포함한다.

- [0359] 고형 종양은 일반적으로 낭종 또는 액체 구역을 함유하지 않는 조직의 비정상 덩어리이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 고형 종양의 상이한 유형들은 이 상이한 종류의 고형 종양을 형성하는 세포 유형에 대해 명명된다(예를 들어 육종, 암종 및 림프종). 치료될 수 있는 고형 종양의 예들은 육종 및 암종, 예를 들어 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종 및 기타 육종, 활막종, 중피종, 유잉(Ewing) 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 림프성 악성종양, 췌장암, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포 암종, 편평세포암종, 기저세포암종, 선암종, 한선 암종, 거대종격동암종, 유두갑상샘암종, 갈색세포종, 피지선 암종, 유두암종, 유두선암종, 수질암종, 기관지원성암종, 신세포암종, 간세포암, 담관암종, 용모암, 빌름(Wilms) 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 정상피종, 방광암종, 흑색종 및 CNS 종양(예를 들어 신경교종(예를 들어 뇌간 신경교종 및 혼합 신경교종), 교모세포종(다형성 교모세포종이라고도 알려짐), 성상세포종, CNS 림프종, 배아세포종, 수모세포종, 신경초종 두개인두종, 상의세포종, 송과체부종양, 혈관모세포종, 청신경종, 피지교종, 수막종, 신경아세포종, 망막아세포종 및 뇌 전이)를 포함한다.
- [0360] 본 이중 특이적 조건부 활성 항체에 의해 표적화될 수 있으며, 염증성 질환에 특이적인 표적 항원은 AOC3(VAP-1), CAM-3001, CCL11(에오타신-1), CD125, CD147(바시긴), CD154(CD40L), CD2, CD20, CD23(IgE 수용체), CD25(IL-2 수용체의 사슬), CD3, CD4, CD5, IFN- α , IFN- γ , IgE, IgE Fc 영역, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-22, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6 수용체, 인테그린 $\alpha 4$, 인테그린 $\alpha 4\beta 7$, 람다 글라마, LFA-1(CD11a), MEDI-528, 미오스타틴, OX-40, rhuMAB $\beta 7$, 스크레로신, SOST, TGF 베타 1, TNF- α 또는 VEGF-A 중 하나 이상을 포함한다.
- [0361] 본 발명의 이중 특이적 조건부 활성 항체에 의해 표적화될 수 있으며, 신경 장애에 특이적인 표적 항원은 베타 아밀로이드 또는 MABT5102A 중 하나 이상을 포함한다. 본 발명의 이중 특이적 조건부 활성 항체에 의해 표적화될 수 있는 당뇨병에 특이적인 항원은 IL-1 β 또는 CD3 중 하나 이상을 포함한다. 본 발명의 이중 특이적 조건부 활성 항체에 의해 표적화될 수 있는 심혈관 질환에 특이적인 항원은 C5, 심장 미오신, CD41(인테그린 α IIb β), 피브리노겐 II, 베타 사슬, ITGB2(CD18) 및 스펅고신-1-인산염 중 하나 이상을 포함한다.
- [0362] 본 발명의 이중 특이적 조건부 활성 항체에 의해 표적화될 수 있으며, 감염성 질환에 특이적인 표적 항원은 탄저균 독소, CCR5, CD4, 응고 인자 A(clumping factor A), 거대세포바이러스, 거대세포바이러스 당단백 B, 내독소, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), B형 간염 표면 항원, B형 간염 바이러스, HIV-1, Hsp90, 인플루엔자 A 핵구조단백, 리포테이코산, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 광견병 바이러스 당단백, 호흡기 세포 융합 바이러스 및 TNF- α 중 하나 이상을 포함한다.
- [0363] 표적 항원의 추가 예들로서는 특이적이거나 증폭된 형태로 암 세포 상에서 발견되는 표면 단백질, 예를 들어 B-세포 림프종에 대한 IL-14 수용체, CD19, CD20 및 CD40, 다양한 암종에 대한 루이스 Y 및 CEA 항원, 유방암 및 대장암에 대한 Tag72 항원, 폐암에 대한 EGF-R, 종종 인간 유방암 및 난소암에서 증폭되는 엽산염 결합 단백질 및 HER-2 단백질, 또는 바이러스 단백질, 예를 들어 HIV의 gp120 및 gp41 외피 단백질, B형 및 C형 간염 바이러스로부터 유래하는 외피 단백질, 인간 거대세포바이러스의 당단백 B 및 기타 외피 당단백, 그리고 발암 바이러스, 예를 들어 카포시 육종 연관 헤르페스 바이러스로부터 유래하는 외피 단백질을 포함한다. 기타 잠재적 표적 항원은 CD4(리간드가 HIV gp120 외피 당단백인 경우) 및 다른 바이러스 수용체, 예를 들어 ICAM(인간 리노바이러스에 대한 수용체), 그리고 소아마비 바이러스에 대한 관련 수용체 분자를 포함한다.
- [0364] 인간 면역결핍증 바이러스(HIV)는, 그것이 처음에 세포 표면상 핵심 분자 2개, 즉 CD4 및 보조 수용체와 결합하지 않는다면, 인간 세포에 도입될 수 없다. 처음에 인식되는 보조 수용체는 CCR5이고, 바이러스의 생애 주기 후반부에 또 다른 케모카인 수용체 CXCR4는 HIV-1에 대한 보조 수용체가 된다[D'Souza, Nature Med. 2, 1293 (1996); Premack, Nature Med. 2, 1174; Fauci, Nature 384, 529 (1996)]. 성적 접촉에 의한 바이러스 전파 대부분을 일으키는 HIV-1 균주는 M-속성 바이러스(M-tropic virus)라 칭하여진다. 이러한 HIV-1 균주(비 융합체 유도(NSI) 1차 바이러스로도 공지되어 있음)는 1차 CD4+ T 세포 및 대식세포 내에서 복제될 수 있고, 이때 보조 수용체로서 케모카인 수용체 CCR5(가끔은 CCR3)를 사용한다. T-속성 바이러스(T-tropic virus)(종종 융합체 유도(SI) 1차 바이러스라고도 칭하여짐)는 또한 1차 CD4+ T 세포 내에서 복제될 수도 있지만, 부가적으로는 확립된 CD4+ T 세포주를 시험관 내 감염시킬 수도 있는데, 이는 케모카인 수용체 CXCR4(푸신)를 통해 이루어진다. 이러한 T-속성 균주 다수는 CXCR4 이외에도 CCR5를 사용할 수 있는데, 적어도 시험관 내 임의의 조건에서 일부는 CCR5를 통해 대식세포에 침입한다[D'Souza, Nature Med. 2, 1293 (1996); Premack, Nature Med. 2, 111 A; Fauci, Nature 384, 529 (1996)]. M-속성 HIV-1 균주는 HIV의 성 매개 전파의 약 90%에 관여하므로, CCR5는 환자 내 바이러스에 대하여 우점하는 보조 수용체이다.

- [0365] 표적 세포 상 보조 수용체 분자의 수와 일체성, 그리고 HIV-1 균주가 상이한 보조 수용체를 통해 세포에 도입될 수 있는 능력은 질병 진행에 있어서 중요한 결정 요인인 것으로 보인다. CCR3 및 CCR5의 고 발현 또한 호지킨병 환자로부터 유래한 림프 소절의 T 세포와 B 세포에서 관찰되었다. 제I형 당뇨병은 T 세포 매개 자가면역질환으로 간주된다. 췌장에서의 CCR5 수용체 발현은 관련 동물 모델에서 제I형 당뇨병의 진행과 연관되었다[Cameron (2000) J. Immunol. 165, 1102-1110]. 하나의 구현예에서, 이중 특이적 조건부 활성화 항체는 표적 항원 CCR5와 결합하여, 숙주 세포의 HIV 감염 억제 및 기타 질환 진행의 지연을 달성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0366] (인간) CCR5와 특이적으로 결합하는 몇몇 항체가 당 업계에 공지되어 있으며, MC-1[Mack (1998) J. Exp. Med. 187, 1215-1224] 또는 MC-5[Blanpain (2002) Mol Biol Cell. 13:723-37, Segerer (1999) Kidney Int. 56:52-64, Kraft (2001) Biol. Chem. 14; 276:34408-18]. 그러므로, 이중 특이적 조건부 활성화 항체는, 예를 들어 CCR5, 바람직하게는 인간 CCR5에 특이적인 항체의 V_L 및 V_H 도메인들(즉 Ig 유래 제2 도메인), 그리고 T 세포 상 CD3 항원에 특이적인 항체의 V_H 및 V_L 도메인들을 포함한다.
- [0367] 다른 구현예에서, 본 발명은 표적 항원 CD19 및 T 세포상 CD3에 대하여 생성된 이중 특이적 조건부 활성화 항체를 제공한다. CD19는 매우 유용한 의학 표적인 것으로 판명되었다. CD19는, 전 B 세포로부터 성숙 B 세포에 이르기까지 전체 B 세포 계통에서 발현될 뿐만 아니라, 모든 림프종 세포 상에 균일하게 발현되고, 줄기 세포에는 존재하지 않는다[Haagen, Clin Exp Immunol 90 (1992), 368-75; Uckun, Proc. Natl. Acad. Set USA 85 (1988), 8603-7]. CD19에 대해 유도된 항체와 추가의 면역조절 항체 둘 다를 사용하는 병용 요법이 B 세포 악성종양 치료(WO 02/04021, 미국특허출원 제2002006404호, 미국특허출원 제2002028178호) 및 자가면역질환 치료(WO 02/22212, 미국특허출원 제2002058029호)를 위한 것으로 개시되어 있다. WO 00/67795는, B 세포 림프종의 서행형 및 공격형뿐만 아니라, 림프구성 백혈병의 급성형 및 만성형을 치료하기 위하여 CD19에 대해 생성된 항체를 사용하는 것을 개시하고 있다. WO 02/80987은, B 세포 비 호지킨 림프종, 호지킨 림프종 또는 B 세포 백혈병(예를 들어 B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), (예를 들어 모양 세포 림프종) B 세포 전구체 급성 림프구성 백혈병(pre-B-ALL), B 세포 만성 림프구성 백혈병(B-CLL)과 같은 질환을 치료하기 위해서, 항원 CD19에 대해 생성된 항체를 기반으로 한 면역독소의 치료적 용도를 개시하고 있다.
- [0368] 추가의 구현예에서, 본 발명은 표적 항원인 CD20과 T 세포상 CD3에 대해 생성된 이중 특이적 조건부 활성화 항체를 제공한다. CD20은 B 림프구 상에 존재하는 세포 표면 단백질들 중 하나이다. (예를 들어 B 세포 비 호지킨 림프종(NHL)의 90% 이상에서 발견되는 것들 포함하여) CD20 항원은 정상 및 악성 전 B 림프구 및 성숙 B 림프구에서 발견된다. 항원은 조혈 줄기세포, 활성화된 B 림프구(혈장 세포) 및 정상 조직에는 존재하지 않는다. 대부분이 쥐와 동물로부터 기원하는 몇몇 항체가 기술되어 있다: 1F5(Press et al., 1987, Blood 69/2, 584-591), 2B8/C2B8, 2H7, 1H4(Liu et al., 1987, J. Immunol 139, 3521-3526; Anderson et al., 1998, 미국특허 제 5,736,137호; Haisma et al., 1998, Blood 92, 184-190; Shan et al., 1999, J. Immunol. 162, 6589-6595).
- [0369] CD20은 운반 단백질에 결합되는 scFv 암호화 DNA가 사용되는 백신화를 통하여 혈장 세포 악성종양을 치료하기 위한 면역요법상 전략에 기술되었으며(Treon et al., 2000, Semin Oncol 27(5), 598), CD20 항체가 사용되는 면역요법상 치료법(IDEC-C2B8)은 비 호지킨 B 세포 림프종 치료에 효과적인 것으로 보였다.
- [0370] 몇몇 구현예들에서, 이중 특이적 조건부 활성화 항체는 폴리뉴클레오티드 분자에 의해 암호화되는 단일 폴리펩티드 사슬이다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 DNA, cDNA, RNA, 또는 합성에 의해 생산된 DNA 또는 RNA, 또는 이 같은 폴리뉴클레오티드들 중 임의의 것을 단독으로 또는 조합하여 포함하는 재조합 생산 키메라 핵산 분자일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 벡터, 예를 들어 발현 벡터, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지, 또는 유전 공학에서 종래에 사용되던 임의의 발현계의 일부일 수 있다. 벡터는 적합한 조건 하에 적합한 숙주 세포 내에서 벡터의 선택을 허용하는 추가의 유전자, 예를 들어 마커 유전자를 포함할 수 있다.
- [0371] 하나의 양상에서, 폴리뉴클레오티드는 원핵생물 세포 또는 진핵생물 세포 내 발현을 허용하는 발현 제어 서열에 작동 가능하도록 결합되어 있다. 바이러스, 예를 들어 레트로바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노 연관 바이러스, 헤르페스 바이러스 또는 소 유두종 바이러스로부터 유래하는 발현 벡터들은 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 포유동물 세포로의 전달에 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 함유하는 벡터는, 세포성 숙주의 유형에 따라 달라지며 널리 공지되어 있는 방법에 의해 숙주 세포로 운반될 수 있다. 예를 들어 칼슘 염화물 형질감염은 통상적으로 원핵생물 세포에 대해 사용되는 반면에, 칼슘 인산염 처리법 또는 전기천공법은 기타 세포성 숙주에 대해 사용될 수 있다.
- [0372] 다른 양상에서, 조건부 활성화 폴리펩티드는 이중 특이적 조건부 활성화 폴리펩티드를 제조하도록 조작될 수 있다.

이중 특이적 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하기 위한 방법은, WO 2015/175375에 기술된 바와 같은 이중 특이적 조건부 활성 항체를 조작하기 위한 방법과 유사하다. 예를 들어 이중 특이적 조건부 활성 폴리펩티드는 2개의 활성 위치를 가질 수 있되, 여기서 활성 위치는 각각 조건부 활성을 보이는데, 즉 정상 생리학적 조건 하에서는 모 위치보다 작은 활성을 보이고, 비정상 조건 하에서는 모 위치보다 큰 활성을 보인다. 이러한 조건부 활성 위치 2개는 독립적으로 진화 및 스크리닝될 수 있고, 이후에는 이 2개의 활성 위치들은 링커를 통해 동일한 이중 특이적 조건부 활성 폴리펩티드에 결합될 수 있다. 하나의 양상에서, 이중 특이적 조건부 활성 항체에 사용될 수 있는 링커는, 조건부 활성 폴리펩티드 내 2개의 조건부 활성 위치들을 결합시켜 이중 특이적 조건부 활성 폴리펩티드를 제조하는데에 적합한 공지의 링커들이다.

[0373] 조건부 활성 항체의 Fc 영역을 조작하는데에 적합한 방법들은 WO 2015/175375에 기술되어 있다.

[0374] 조건부 활성 바이러스 입자를 조작하는데에 적합한 방법들은 WO 2015/175375에 기술되어 있다.

[0375] 몇몇 양상들에서, 조건부 활성 폴리펩티드는 WO 2015/175375에 기술된 방법을 사용하여 암 살상 바이러스인 바이러스 입자에 삽입될 수 있다. 암 살상 바이러스는, 종양 세포와 접촉하게될 때 이러한 종양 세포를 사멸시킬 수 있는 바이러스이다. 암 살상 바이러스에 삽입된 조건부 활성 폴리펩티드는 종양 미세환경에서 그 활성이 더 크지만, 피험체의 다른 위치에서는 활성이 더 작다. 예를 들어 조건부 활성 폴리펩티드는 종양 미세환경에 조성되는 pH(예를 들어 pH 6.2 ~ 6.8) 또는 다른 조건에서 그 활성이 더 클 수 있지만, 피험체의 다른 병소에 조성되는 pH(예를 들어 pH 7.2 ~ 7.6) 또는 다른 조건, 예컨대 정상 생리학적 조건에서는 그 활성이 더 작다. 암 살상 바이러스에 삽입된 조건부 활성 폴리펩티드는 암 살상 바이러스를 종양에 전달하는 것을 가속화하는데에 사용될 수 있으며, 이때 암 살상 바이러스는 종양 세포를 표적화하여 사멸시킬 수 있다.

[0376] 관심이 가는 암 살상 바이러스는 아데노바이러스; 헤르페스 심플렉스 바이러스-1; 백시니아 바이러스; 파르보바이러스; 레오바이러스; 뉴캐슬병 바이러스 등을 포함한다. 백시니아 바이러스가 특히 관심이 간다.

[0377] 하나의 양상에서, 암 살상 바이러스는 파라믹소바이러스, 레오바이러스, 헤르페스바이러스, 아데노바이러스 및 셈리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 양상에서, 파라믹소바이러스는 뉴캐슬병 바이러스(NDV), 홍역 바이러스 및 볼거리 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 양상에서, NDV는 MTH68/H, PV-701 및 73-T로 이루어진 군으로부터 선택되는 균주이다.

[0378] 다른 양상에서, 암 살상 바이러스는 헤르페스바이러스, 레오바이러스, E1B 결실 아데노바이러스, 수포성 구내염 바이러스 및 폭스 바이러스로부터 선택된다. 이러한 암 살상 바이러스는 종양 세포를 파괴할 뿐만 아니라, 파괴된 종양 세포로부터 항원을 방출시켜 면역 반응을 촉발하는 잠재성을 가진다.

[0379] 암 살상 바이러스의 구체 예들로서는 아데노바이러스(예컨대 Delta-24, Delta-24-RGD, ICOVIR-5, ICOVIR-7, Onyx-015, ColoAd1, H101, AD5/3-D24-GMCSF), 레오바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV; OncoVEX GMCSF), 뉴캐슬병 바이러스, 홍역 바이러스, 레트로바이러스(예컨대 인플루엔자 바이러스), 폭스바이러스(예컨대 백시니아 바이러스, 예를 들어 코펜하겐(Copenhagen), 웨스턴 리저브(Western Reserve), 와이어쓰(Wyeth) 균주), 믹소마 바이러스, 램도바이러스(예컨대 수포성 구내염 바이러스(VSV)), 피코나바이러스(예를 들어 세네카 밸리(Seneca Valley) 바이러스; SW-001), 콕사키바이러스 및 파르보바이러스를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0380] 하나의 양상에서, 암 살상 바이러스는, 예컨대 아데노바이러스의 57개의 인간 혈청형 중 임의의 것인 일원을 포함하는 아데노바이러스(HAdV-1 내지 57)이다. 하나의 구현예에서, 아데노바이러스는 Ad5 혈청형이다. 대안적으로 아데노바이러스는 Ad5 성분을 포함할 수 있거나 포함할 수 없는 하이브리드 혈청형일 수 있다. 적합한 아데노바이러스의 비 제한적 예들로서는 Delta-24, Delta-24-RGD, ICOVIR-5, ICOVIR-7, ONYX-015, ColoAd1, H101 및 AD5/3-D24-GMCSF를 포함한다. ONYX-015는, 바이러스 혈청형 Ad2 및 Ad5의 하이브리드이되, E1B-55K 및 E3B 영역이 결실되어 암 선택성이 향상된 하이브리드이다. HI 01은 Onyx-015의 변이체이다. ICOVIR-5 및 ICOVIR-7은 E1A가 결실되었고, E1A 프로모터가 E2F 프로모터로 치환된 Rb-결합 위치를 포함한다. Colo Ad 1은 키메라 Add1 1p/Ad3 혈청형이다. AD5/3-D24-GMCSF(CGTG-102)는, GM-CSF를 암호화하는 혈청형 5/3 캡시드 변형 아데노바이러스이다(Ad5 캡시드 단백질 노브는 혈청형 3 유래 노브 도메인으로 치환되어 있음).

[0381] 하나의 바람직한 특정 구현예에서, 암 살상 바이러스는 Delta-24 또는 Delta-24-RGD 아데노바이러스이다. Delta-24는 미국 특허출원 제2003/0138405 A1호 및 동 제2006/0147420 A1호에 기술되어 있다. Delta-24 아데노바이러스는 제5형 아데노바이러스(Ad-5)로부터 유래하고, E1 A 유전자의 CR2 부 내부에 24개 염기쌍이 결실되어 있다. Delta-24-RGD는 (α v β 3 및 α v β 5 인테그린과 강하게 결합하는) RGD-4C 서열이 섬유 노브 단백질의 HI

루프에 추가로 삽입되어 있다(Pasqualini R. et al., Nat Biotechnol., 15:542-546, 1997).

- [0382] 암 살상 아데노바이러스는 또한, 이 암 살상 아데노바이러스가 암을 치료하는 능력이 향상되도록 추가로 변형될 수 있다. 이와 같은 암 살상 아데노바이러스의 변형은 문헌(Jiang et al. (Curr. Gene Ther. 2009 Oct 9(5):422-427))에 기술되어 있으며, 미국 특허출원 제2006/0147420 A1도 참조한다.
- [0383] 조건부 활성 폴리펩티드를 포함하는 암 살상 바이러스는 국소 투여 또는 전신 투여될 수 있다. 예를 들어 제한되지 않을 때, 암 살상 바이러스는 혈관 내(동맥 내 또는 정맥 내), 종양 내, 근육 내, 피 내, 복막 내, 피하, 경구, 비 경구, 비강 내, 기관 내, 경피, 척추 내, 안 내 또는 두개 내 투여될 수 있다.
- [0384] 암 살상 바이러스는 1회 투여 또는 다수 회 투여로서 투여될 수 있다. 이 바이러스는 적어도 1×10^5 플라크 형성 단위(Plaque Forming Unit; PFU), 적어도 5×10^5 PFU, 적어도 1×10^6 PFU, 적어도 5×10^6 또는 적어도 5×10^6 PFU, 1×10^7 , 적어도 1×10^7 PFU, 적어도 1×10^8 또는 적어도 1×10^8 PFU, 적어도 1×10^8 PFU, 적어도 5×10^8 PFU, 적어도 1×10^9 또는 적어도 1×10^9 PFU, 적어도 5×10^9 또는 적어도 5×10^9 PFU, 적어도 1×10^{10} PFU 또는 적어도 1×10^{10} PFU, 적어도 5×10^{10} 또는 적어도 5×10^{10} PFU, 적어도 1×10^{11} PFU 또는 적어도 1×10^{11} PFU, 적어도 1×10^{12} PFU, 또는 적어도 1×10^{13} PFU의 용량으로 투여될 수 있다. 예를 들어 암 살상 바이러스는 약 $10^7 \sim 10^{13}$ PFU, 약 $10^8 \sim 10^{13}$ PFU, 약 $10^9 \sim 10^{12}$ PFU, 또는 약 $10^8 \sim 10^{12}$ PFU의 용량으로 투여될 수 있다.
- [0385] 임의의 양상들에서, 암 살상 바이러스로 치료될 암은 임의의 고형 종양, 예컨대 폐, 난소, 유방, 자궁경부, 췌장, 위, 결장, 피부, 후두, 방광 및 전립선 암을 포함한다. 하나의 양상에서, 암은 중추신경계의 암이다. 암은 신경상피 종양, 예컨대 성상 세포의 종양(예컨대 성상세포종, 역형성 성상세포종, 교모세포종, 신경교육종, 텔모양성상세포종, 거대세포 성상세포종, 다형성황색성상세포종), 핍지교종, 상의세포종, 희돌기성상세포종, 해면모세포종, 성상모세포종, 맥락총유두종, 맥락총암종, 신경절세포종, 신경절신경아교종, 신경세포종, 신경상피종, 신경아세포종, 송과체부 종양(예컨대 송과체종, 송과체모세포종 또는 혼합 송과체종/송과체모세포종), 수질피종, 수질아세포종, 신경아세포종 또는 신경절신경아세포종, 망막아세포종 또는 뇌실상의아세포종일 수 있다. 암은 중추 신경계 신생물, 예컨대 안장 영역(sellar region)의 종양(예컨대 뇌하수체 선종, 뇌하수체암종 또는 두개인두종), 조혈세포 종양(예컨대 원발성 악성 림프종, 형질세포종 또는 과립구 육종), 생식세포 종양(예컨대 배아세포종, 배아암종, 난황낭종양, 융모암, 기형종 또는 혼합 생식세포 종양), 뇌수막종, 중간엽 종양, 멜라닌세포종, 또는 뇌 신경 및 척수 신경 종양(예컨대 슈반종 또는 신경섬유종)일 수 있다. 암은 저등급 교종(예컨대 상의세포종, 성상세포종, 핍지교종 또는 혼합 교종) 또는 고등급(악성) 교종(예컨대 다형성교모세포종)일 수 있다. 암은 원발성이거나 전이성 뇌 종양일 수 있다. 조건부 활성 폴리펩티드 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물이 약학 조성물 중에 사용될 수 있다. 몇몇 적합한 약학 조성물은 미국 특허 제8,709,755 B2호에 기술되어 있다.
- [0386] 본 약학 조성물은 다양한 유형의 암, 예를 들어 암종, 아세포종 및 육종, 그리고 임의의 백혈병 또는 림프성 악성종양, 양성 및 악성 종양, 그리고 악성종양, 예를 들어 육종, 암종 및 흑색종을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 암은 비 고형 종양(예를 들어 혈액학적 종양) 또는 고형 종양일 수 있다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암도 또한 포함된다.
- [0387] 혈액학적 암은 혈액 암이나 골수암이다. 혈액학적(또는 조혈) 암의 예들은 백혈병, 예를 들어 급성 백혈병(예를 들어 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 그리고 골수아구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성 백혈병 및 적 백혈병), 만성 백혈병(예를 들어 만성 골수구성(과립구성) 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병), 진성 적혈구증가증, 림프종, 호지킨병, 비 호지킨 림프종(무통성 및 고도 형태), 다발성 골수종, 발렌스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄병, 골수이형성증후군, 모양 세포 백혈병 및 골수이형성증을 포함한다.
- [0388] 고형 종양은 일반적으로 낭종 또는 액체 구역을 함유하지 않는 조직의 비정상 덩어리이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 고형 종양의 상이한 유형들은 이 상이한 종류의 고형 종양을 형성하는 세포 유형에 대해 명명된다(예를 들어 육종, 암종 및 림프종). 치료될 수 있는 고형 종양의 예들은 육종 및 암종, 예를 들어 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종 및 기타 육종, 활막종, 증피종, 유잉(Ewing) 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 림프성 악성종양, 췌장암, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포 암종, 편평세포암종,

기저세포암종, 선암종, 한선 암종, 거대종격동암종, 유두갑상샘암종, 갈색세포종, 피지선 암종, 유두암종, 유두선암종, 수질암종, 기관지원성암종, 신세포암종, 간세포암, 담관암종, 용모암, 빌름(Wilms) 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 정상피종, 방광암종, 흑색종 및 CNS 종양(예를 들어 신경교종(예를 들어 뇌간 신경교종 및 혼합 신경교종), 교모세포종(다형성 교모세포종이라고도 알려짐), 성상세포종, CNS 림프종, 배아세포종, 수모세포종, 신경초종 두개인두종, 상의세포종, 송과체부종양, 혈관모세포종, 청신경종, 뿔지교종, 수막종, 신경아세포종, 망막아세포종 및 뇌 전이)를 포함한다.

[0389] 조건부 활성 폴리펩티드, 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물을 포함하는 약학 조성물은, 약학 조성물을 제조하기 위한 공지의 방법에 따라서 제형화될 수 있다. 이러한 방법에 있어서, 조건부 활성 폴리펩티드는 통상 약학적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 혼합물, 용액 또는 조성물과 합하여진다.

[0390] 약학적으로 허용 가능한 담체는 수용체인 환자에 의해 관용될 수 있는 물질이다. 멸균 인산염 완충 염수는 약학적으로 허용 가능한 담체의 일례이다. 기타 약학적으로 허용 가능한 담체로서 적합한 것은 당업자들에게 널리 공지되어 있다. (예를 들어 문헌(Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995))을 참조한다). 제형은 하나 이상의 부형제, 보존제, 가용화제, 완충제, 바이알 표면상 단백질 손실을 막기 위한 알부민 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0391] 본 약학 조성물의 형태, 투여 경로, 투여량 및 투여계획은 원래 치료될 병태, 병의 심각성, 환자의 연령, 체중 및 성별 등에 의존한다. 이러한 고려사항들은 적합한 약학 조성물을 제형화함에 있어서 숙련자에 의해 고려될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 국소, 경구, 비 경구, 비강 내, 정맥 내, 근육 내, 피하 또는 안 내 투여 등의 목적으로 제형화될 수 있다.

[0392] 바람직하게 약학 조성물은 주사될 수 있는 제형에 대해 약학적으로 허용 가능한 비이클을 함유한다. 이 비이클은, 구체적으로 등장성, 멸균성, 염수 용액(인산일나트륨 또는 인산이나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 또는 염화마그네슘 등, 또는 이러한 염의 혼합물)일 수 있거나, 아니면, 예를 들어 멸균수나 생리 식염수가 첨가될 때 주사 용액의 구성이 허용되는 건조 조성물, 특히 동결 건조 조성물일 수 있다.

[0393] 몇몇 구현예들에서, 때때로 "안정화제"로도 공지된 긴장제는 조성물 중 액체의 긴장성을 조정하거나 유지하기 위해 존재한다. 긴장제가 크기가 큰 하전 생체 분자, 예컨대 단백질 및 항체와 함께 사용될 때, 이는 종종 "안정화제"라고 칭하여지는데, 그 이유는 이 긴장제가 아미노산 측쇄의 하전된 기와 상호작용하여, 분자내 상호작용과 분자간 상호작용의 잠재성을 줄여주기 때문이다. 긴장제는 약학 조성물의 0.1 중량% 내지 25 중량%, 바람직하게는 1 중량% 내지 5 중량%의 양으로 존재할 수 있다. 바람직한 긴장제는 다가 당 알코올, 바람직하게 삼가 또는 이 이상의 당 알코올, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 자일리톨, 솔비톨 및 만니톨을 포함한다.

[0394] 추가의 부형제들로서는 다음, 즉 (1) 중량제, (2) 가용성 증진제(solubility enhancer), (3) 안정화제 및 (4) 변성 또는 용기벽에의 접착을 막아주는 제제 중 하나 이상으로서 사용될 수 있는 제제들을 포함한다. 이러한 부형제들로서는 다가 당 알코올(상기 나열됨); 아미노산, 예컨대 알라닌, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 오르니틴, 루신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대 수크로스, 락토스, 락티톨, 트레할로스, 스타키오스, 만노스, 소르보스, 자일로스, 리보스, 리비톨, 미오이니시토스, 미오이노시톨, 갈락토스, 갈락티톨, 글리세롤, 사이클리톨(예컨대 이노시톨), 폴리에틸렌 글리콜; 황 함유 환원제, 예컨대 우레아, 글루타치온, 티옥산, 티오글리콜산나트륨, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 티오황산나트륨; 저분자량 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 기타 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 단당체(예컨대 자일로스, 만노스, 프럭토스, 글루코스); 이당체(예컨대 락토스, 말토스, 수크로스); 삼당체, 예컨대 라피노스; 그리고 다당체, 예컨대 텍스트린 또는 텍스트란을 포함할 수 있다.

[0395] 비이온성 계면활성제 또는 세제("습윤제"라고도 공지됨)가 치료제의 용해를 돕고, 또한 치료용 단백질을 교반 유도성 응집으로부터 보호하기 위해 사용될 수 있다(이는 또한 활성의 치료용 단백질 또는 항체의 변성이 일어나지 않으면서 제형이 전단 표면 스트레스에 노출되는 것을 허용하기도 함). 비이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 바람직하게 약 0.07 mg/ml 내지 약 0.2 mg/ml 범위의 농도로 존재할 수 있다.

[0396] 적합한 비이온성 계면활성제로서는 폴리솔베이트(20, 40, 60, 65, 80 등), 폴리옥사머(184, 188 등), PLURONIC® 폴리올, TRITON®, 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노에테르(TWEEN®-20, TWEEN®-80 등), 라우로마크로골 400, 폴리옥실 40 스테아르산염, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자 오일 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아르산염, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스를 포함한다. 사용될 수 있는 음이온성 세제로

서는 라우릴황산나트륨, 설포숙신산디옥틸나트륨 및 설폰산디옥틸나트륨을 포함한다. 양이온성 세제로서는 염화벤잘코늄 또는 염화벤제토늄을 포함한다.

- [0397] 투여에 적용되는 용량은 다양한 매개변수들, 구체적으로 사용된 투여 방식, 관련 병상, 아니면 원하는 치료 지속기간에 따라서 맞추어질 수 있다. 약학 조성물을 제조하기 위해 조건부 활성 폴리펩티드, 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 추가로 조작하여 제조된 생성물 유효량만큼이 약학적으로 허용 가능한 담체나 수성 매질 중에 용해 또는 분산될 수 있다.
- [0398] 주사용으로 적합한 약학 제형은 멸균 수용액 또는 수분산액; 담체, 예컨대 참깨 오일, 땅콩 오일 또는 수성 프로필렌 글리콜; 그리고 멸균 주사 용액이나 분산액을 즉석 제조하기 위한 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에 있어서, 제형은 멸균되어야 하고, 쉽게 주사될 수 있을 정도로 유동성이어야 한다. 이는, 제조 및 보관 조건 하에서 안정적이어야 하고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다.
- [0399] 유리 염기 또는 약리학적으로 허용 가능한 염으로서의 조건부 활성 폴리펩티드 용액은 계면활성제와 적절하게 혼합된 물 중에 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이것들의 혼합물 중에 제조될 수도 있다. 보통의 보관 및 사용 조건 하에서 이러한 제조물은 미생물의 성장을 막기 위한 보존제를 함유한다.
- [0400] 조건부 활성 폴리펩티드와, 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물은 염 형태의 조성물로 제형될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 (단백질의 유리 아미노기로 생성되고), 무기산, 예컨대 염화수소산 또는 인산, 또는 유기산, 예컨대 아세트산, 옥살산, 주석산, 만델산 등으로 생성된 산 부가 염을 포함한다. 유리 카르복실기로 생성된 염은 또한 무기 염기, 예컨대 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘 또는 수산화철과, 유기 염기, 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘 및 프로카인 등으로부터 유래할 수도 있다.
- [0401] 담체는 또한, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이것들의 적합한 혼합물, 그리고 식물성 오일을 함유하는 분산 매질이나 용매일 수도 있다. 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴을 적용시키고, 분산액의 경우 요구되는 입도를 유지시키며, 계면활성제를 사용함으로써 적절한 유동성이 유지될 수 있다. 미생물의 활동 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예컨대 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 및 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 다수의 경우, 등장제, 예컨대 설탕이나 염화나트륨이 포함되는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 지속적 흡수는 이 조성물 중에 흡수 지연제, 예컨대 모노스테아르산알루미늄 및 젤라틴을 사용함으로써 달성될 수 있다.
- [0402] 멸균 주사용 용액은, 요구될 수 있는 바에 따라, 상기 나열된 기타 성분들 중 하나 이상과 함께 조건부 활성 폴리펩티드를 필요량만큼 적당한 용매에 혼합한 후 멸균 여과함으로써 제조된다. 일반적으로 분산액은, 다양한 멸균 활성 성분들을, 기본 분산 매질과 상기 나열된 것들로부터 선택된 기타 필요 성분들을 함유하는 멸균 비이클에 혼합함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법으로서, 앞서 멸균 여과한 활성 성분과 임의의 원하는 부가 성분의 용액으로부터 이 활성 성분과 임의의 원하는 부가 성분의 분말을 만들어내는 진공 건조 기술과 동결 건조 기술이 있다.
- [0403] 더 농축되었거나 고도로 농축된 직접 주사용 용액의 제조도 또한 고려되는데, 이 경우 용매인 설폭시화디메틸(DMSO)은 매우 신속한 침투, 고 농도 활성 제제의 중앙 소 구역으로의 전달을 달성할 것으로 예상된다.
- [0404] 제형시, 용액은 투여 제형과 양립 가능한 방식, 그리고 치료적으로 유효한 양만큼 투여될 것이다. 제형은 다양한 투여형, 예컨대 전술된 주사용 용액의 유형으로서 용이하게 투여되지만, 약물 방출 캡슐 등도 또한 사용될 수 있다.
- [0405] 수용액으로서의 비 경구 투여에 있어서, 예를 들어 용액은 필요하다면 적절히 완충되어야 하고, 액체 희석제는 제일 먼저 충분한 염수나 글루코스와 등장성이 되어야 한다. 이와 같은 특징의 수용액은 정맥 내, 근육 내, 피하 및 복막 내 투여에 특히 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 발명에 비추어 보았을 때 당 업자들에게 공지될 것이다. 예를 들어 1회 투여량은 등장성 NaCl 용액 1 ml 중에 용해된 다음, 피하주입용 유체 1000 ml에 첨가되거나, 또는 주입 위치로 제안된 위치에 주사될 수 있었다(예를 들어 문헌("Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580)을 참조한다). 치료 중인 피험체의 상태에 따라서 투여량에 약간의 변화가 반드시 생길 것이다. 투여를 책임지는 인력은 어떠한 경우에도 개인 피험체에 적당한 용량을 결정할 것이다.
- [0406] 본 조건부 활성 폴리펩티드와, 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물은, 용량당 약 0.0001 내지 약

10.0 밀리그램, 또는 약 0.001 sowl dir 5 밀리그램, 또는 약 0.001 내지 약 1 밀리그램, 또는 약 0.001 내지 약 0.1 밀리그램, 또는 약 0.1 내지 약 1.0 밀리그램, 또는 심지어 약 10 밀리그램을 전달하기 위해 치료용 혼합물 중에 제형화될 수 있다. 다수 회분의 용량들은 또한 선택된 시간 간격을 두고 투여될 수 있다.

[0407] 비 경구 투여, 예컨대 정맥 내 또는 근육 내 주사용으로 제형화된 화합물 이외에, 기타 약학적으로 허용 가능한 제형으로서는, 예컨대 정제 또는 기타 경구 투여용 고체; 경시 방출형 캡슐; 그리고 현재 사용되고 있는 기타 임의의 제형을 포함한다.

[0408] 임의의 구현예들에서, 조건부 활성 폴리펩티드, 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 추가로 조작하여 제조된 생성물의 숙주 세포로의 도입을 위해 리포좀 및/또는 나노입자의 사용이 고려된다. 제형과, 리포좀 및/또는 나노입자의 용도는 당업자들에게 공지되어 있다.

[0409] 나노입자는, 일반적으로 화합물을 안정하고 재현 가능한 방식으로 포집할 수 있다. 세포 내 중합체 과부하로 인한 부작용들을 피하기 위해, 생체 내 분해될 수 있는 중합체가 사용되어, 보통 (크기 약 0.1 μm 의) 초미세 입자가 디자인된다. 이러한 요구조건들을 충족하는 생분해성 폴리알킬시아노아크릴산염 나노입자가 본 발명에 사용되는 것이 고려된다.

[0410] 리포좀은 수성 매질에 분산된 인지질들이 자발적으로 다층의 동심 이중층 소포(다층판형 소포(MultiLamellar Vesicle; MLV)라고도 지칭됨)를 형성함으로써 만들어진다. MLV의 직경은, 일반적으로 25 nm 내지 4 μm 이다. MLV의 초음파 처리는 직경이 200 Å 내지 500 Å의 범위이고, 코어(core)부에 수용액을 함유하는 소형의 단일층판형 소포(Small Unilamellar Vesicle; SUV)의 생성을 초래한다. 리포좀의 물리적 특징은 pH, 이온 세기 및 이가 양이온의 존재에 의존적이다.

[0411] 본원에 기술된 바와 같이, 조건부 활성 폴리펩티드, 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물을 함유하는 약학 제형은, 이 조건부 활성 폴리펩티드, 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물과, 약학적으로 허용 가능한 담체(선택적) 하나 이상이 혼합됨으로써 동결건조 제형 또는 수용액의 형태로 제조된다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 약학적으로 허용 가능한 담체들로서는 완충제, 예컨대 인산염, 시트르산염 및 기타 유기산; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제(예컨대 염화 옥타데실디메틸벤질암모늄; 염화헥사메토늄; 염화벤잘코늄; 염화벤제토늄; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 그리고 m-크레솔); 저 분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당체, 이당체 및 기타 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 칼레이트 화제, 예컨대 EDTA; 당류, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염 형성 짝 이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체(예컨대 Zn-단백질 착체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0412] 본원에서 약학적으로 허용 가능한 예시적 담체로서는, 개재성 약물(interstitial drug), 분산제, 예컨대 가용성 중성 활성화 히알루로니다아제 당단백(sHASEGP), 예컨대 인간 가용성 PH-20 히알루로니다아제 당단백, 예컨대 rHuPH20(HYLENEX®, Baxter International, Inc.)를 추가로 포함한다. rHuPH20을 비롯하여 임의의 예시적 sHASEGP와, 이의 사용 방법은 미국 특허공보 제2005/0260186호 및 동 제2006/0104968호에 기술되어 있다. 하나의 양상에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가 글리코사미노글리카나아제, 예컨대 콘드로이티나아제와 합하여진다.

[0413] 예시적 동결건조 항체 제형은 미국 특허 제6,267,958호에 기술되어 있다. 수성 항체 제형은 미국 특허 제6,171,586호 및 WO 2006/044908에 기술된 것들을 포함하는데, 이것들 중 WO 2006/044908에 기술된 제형은 히스티딘-아세트산염 완충제를 포함한다.

[0414] 본원의 제형은 또한 치료중인 특성의 징후에 필요한 활성 성분을 하나 초과하여 함유할 수도 있다. 바람직하게 서로 악영향을 미치지 않고, 상보적 활성을 가지는 성분들은 하나의 제형안에 합하여질 수 있다. 예를 들어 본 발명의 조건부 활성 항체, 항체 단편 또는 면역접합체 이외에, EGFR 길항제(예컨대 에를로티닙), 항 혈관신생제(예컨대 항 VEGF 항체일 수 있는 VEGF 길항제) 또는 화학요법제(예컨대 탁소이드 또는 백금 제제)를 제공하는 것이 요망될 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 효과적인 양으로 합하여져 적합하게 제공된다.

[0415] 활성 성분은, 예를 들어 코아세르베이트화 기술 또는 계면 중합에 의하여 제조된 마이크로캡슐 안에 캡슐화될 수 있다. 예를 들어 콜로이드 약물 전달 계(예컨대 리포좀, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노 입자 및 나노 캡슐) 또는 마크로에멀전 내 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴산

염) 마이크로캡슐 각각이 사용될 수 있다. 이러한 기술은 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))에 개시되어 있다.

[0416] 지속 방출 제제도 또한 제조될 수 있다. 이러한 지속 방출 제제의 적합한 예들로서는, 항체나 항체 단편을 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하는데, 다만 이 매트릭스는 성형품, 예컨대 막 또는 마이크로캡슐의 형태를 가질 수 있다.

[0417] 몇몇 구현예들에서, 조건부 활성 폴리펩티드, 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물은 기술된 질환들의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 재료를 함유하는 제조품을 제조하는데에 사용될 수 있다. 제조품은 용기, 용기상에 있거나 용기와 합체되는 표지 또는 패키징 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는, 예컨대 병, 바이알, 시린지, IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 다양한 재료, 예컨대 유리나 플라스틱으로 제조될 수 있다. 용기는 본 조성물 자체, 또는 어떤 병태를 치료, 예방 및/또는 진단하는데 유효한 또 다른 조성물과 합하여진 조성물을 담으며, 멸균된 접근 포트(access port)를 가질 수 있다(예를 들어 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫릴 수 있는 마개를 가지는 정맥 내 투여 용액 백(bag) 또는 바이알(vial)일 수 있다). 조성물 중 적어도 하나의 활성 제제는 본 발명의 조건부 활성 폴리펩티드이거나, 또는 본 발명의 조건부 활성 폴리펩티드를 추가로 조작하여 제조된 생성물이다. 표지나 패키징 삽입물에는, 조성물이 특정의 병태를 치료하기 위해 사용됨이 기재되어 있다. 더욱이, 제조품은 (a) 내부에 조성물이 담긴 제1 용기(다만 이 조성물은 조건부 활성 폴리펩티드 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물을 포함함)와; (b) 내부에 조성물이 담긴 제2 용기(다만 이 조성물은 추가의 세포독성 또는 치료제를 포함함)를 포함할 수 있다. 본 발명의 이와 같은 구현예에서 제조품은, 조성물이 특정의 병태를 치료하는데에 사용될 수 있음이 기재되어 있는 패키징 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조품은 약학적으로 허용 가능한 완충제, 예컨대 주사용 정균수(BWFI), 인산염 완충 염수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기(또는 제3 용기)를 추가로 포함할 수 있다. 이는, 상업적으로나 사용자의 입장에서 요망되는 기타 물질/부재들, 예컨대 기타 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 추가로 포함할 수 있다.

[0418] 제조품은 비 경구, 피하, 근육 내, 정맥 내, 관절강 내, 기관지 내, 복부 내, 낭 내, 연골 내, 강 내, 복강 내, 소뇌 내, 대뇌저실 내, 결장 내, 자궁경부 내, 위 내, 간 내, 심근 내, 골질 내, 골반 내, 심막 내, 복막 내, 흉막 내, 전립선 내, 폐 내, 직장 내, 신장 내, 망막 내, 척추 내, 활막 내, 흉 내, 자궁 내, 방광 내, 볼루스, 질, 직장, 협측, 설하, 비강 내 또는 경피 전달 장치 또는 계의 부품으로서 용기를 선택적으로 포함할 수 있다.

[0419] 본 조건부 활성 폴리펩티드, 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물은, 이 조건부 활성 폴리펩티드 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 추가로 조작하여 제조된 생성물의 접촉, 또는 비 경구, 피하, 근육 내, 정맥 내, 관절강 내, 기관지 내, 복부 내, 낭 내, 연골 내, 강 내, 복강 내, 소뇌 내, 대뇌저실 내, 결장 내, 자궁경부 내, 위 내, 간 내, 심근 내, 골질 내, 골반 내, 심막 내, 복막 내, 흉막 내, 전립선 내, 폐 내, 직장 내, 신장 내, 망막 내, 척추 내, 활막 내, 흉 내, 자궁 내, 방광 내, 볼루스, 질, 직장, 협측, 설하, 비강 내 또는 경피 투여로부터 선택되는 방식 적어도 하나에 의한 투여에 적합한 의료용 장치에 포함될 수 있다.

[0420] 몇몇 추가 구현예들에서, 본 조건부 활성 폴리펩티드, 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물을 동결 건조 형태로 제1 용기에 포함하고, 선택적으로는 무균 수, 무균 완충 수, 또는 수성 희석제 중 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 페닐수는 아질산염, 페녹시에탄올, 포름알데히드, 클로로부탄올, 마그네슘 염화물, 알킬과라벤, 펜잘코늄 염화물, 벤제토늄 염화물, 나트륨 데히드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이것들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 보존제 적어도 하나를 제2 용기에 포함하는, 제1 용기와 제2 용기를 포함하는 키트에 포함될 수 있다. 하나의 양상에서, 키트 내 제1 용기 중의 조건부 활성 폴리펩티드 또는 조건부 활성 폴리펩티드를 조작하여 제조된 생성물의 농도는 제2 용기의 함유물이 사용되어 약 0.1mg/ml 내지 약 500mg/ml의 농도로 재구성된다. 또 다른 양상에서, 제2 용기는 등장제를 더 포함한다. 또 다른 양상에서, 제2 용기는 생리학적으로 허용 가능한 완충제를 더 포함한다. 하나의 양상에서, 본 발명은 적어도 하나의 모 단백질 매개 병태를 치료하는 방법으로서, 키트에 제공되었다가 투여 전 재구성되는 제형용 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0421] 이하 실시예들은 본 발명을 예시하는 것이지 제한하는 것은 아니다. 보통 당 분야에서 우연히 마주할 수 있으며 당 업자들에게 명백한, 다양한 조건과 매개변수에 관한 기타 적합한 수정과 적응은 본 발명의 범위에 포함된다.

[0422] 실시예

[0423] 조건부 활성 폴리펩티드를 제조하기 위한 실시예 1 ~ 5는, 본원에 참조로서 인용되어 있는 미국 특허 제

8,709,755 B2호에 기술되어 있다.

[0424] **실시예 6: 항체의 경쇄 또는 중쇄 진화**

[0425] 항체 F1-10F10의 중쇄 및 경쇄를 CPE를 사용하여 별도로 진화시켰다. 경쇄 돌연변이체를 스크리닝하여 조건부 활성을 가지는 경쇄 돌연변이체 26개를 발견하였는데, 이 경우 돌연변이체는 pH 6.0에서 야생형보다 더 활성이었고, 돌연변이체는 pH 7.4에서 야생형보다 덜 활성이었다. 26개의 경쇄 돌연변이체는 경쇄 내 8개의 상이한 위치에서 자체의 돌연변이가 발생하였다. 8개 위치 중 3개는 26개 경쇄 돌연변이체 중 5개 초과에서 나타났다. 이러한 3개의 위치는 경쇄 내 핫 스팟(hot spot)인 것으로 간주하였다. 중쇄 돌연변이체를 스크리닝하여 조건부 활성을 가지는 중쇄 돌연변이체 28개를 발견하였다. 28개의 중쇄 돌연변이체는 중쇄 내 8개의 상이한 위치에서 자체의 돌연변이가 발생하였다. 8개의 위치들 중 3개는 28개 중쇄 돌연변이체 중 5개 초과에서 나타났다. 이러한 3개의 위치는 중쇄 내 핫 스팟인 것으로 간주하였다. 경쇄 돌연변이체 및 중쇄 돌연변이체의 조건부 활성을 ELISA 검정으로 확인하였다.

[0426] 본 실시예에서 생성된 최선의 조건부 활성 항체는 pH 7.4에서의 활성에 대한 pH 6.0에서의 활성 차이가 17 배였다. 또한, 조건부 활성 항체 다수는 정상 생리학적 pH인 pH 7.4 및 비정상 pH인 pH 6.0 사이의 pH에서 가역성이었던 활성을 가졌다. 흥미롭게도, 이 실시예로부터 생성된 조건부 활성 항체의 대부분은, 조건부 활성 항체의 활성이 ELISA 분석에 의해 pH 범위 5.0 내지 7.4에서 시험되었을 때, pH 약 5.5 내지 약 6.5에서 최적의 결합 활성을 보였다.

[0427] 본 실시예에 의해 생성된 조건부 활성 항체의 활성을 또한 전세포가 사용되는 FACS(형광 활성화된 세포 분류) 검정에 의해 확인하였는데, 이 경우 pH 6.0 및 pH 7.4에서 항체의 항원을 발현하기 위해 CHO 세포가 사용되었다. 결합 활성을 측정하기 위해 조건부 활성 항체를 CHO 세포에 첨가하였다. FACS 검정은, pH 7.4에서의 조건부 활성 항체의 선택성에 비한 pH 6.0에서의 조건부 활성 항체의 선택성에 대한 ELISA 분석 결과에 있어서의 일반적인 경향을 확인하였다.

[0428] **실시예 7: 특수 완충제 중 조건부 활성 항체의 선택**

[0429] 본 발명에 따라 진화 단계에서 제조된 돌연변이체 항체를 대상으로 정상 생리학적 pH인 pH 7.4에서, 그리고 비정상 pH인 pH 6.0에서 검정을 수행하였다. 상기 두 검정은, 인간 혈청 중에서 발견되는 중탄산염을 포함하는 완충 완충 염수(PBS) 용액이 사용되어 수행되었다. 용액 중 중탄산염의 농도는 인간 혈청 중 중탄산염의 통상적인 농도(즉 생리적 농도)였다. 동일하되 중탄산염은 함유하지 않는 PBS 용액을 사용하여 비교 시험을 수행하였다.

[0430] 본 실시예에서 돌연변이 항체 또는 조건부 활성 항체에 대한 결합 활성을 측정하기 위한 검정은 다음과 같이 수행되었던 ELISA 분석이었다:

[0431] 1. ELISA 수행 전날, 웰을 PBS와 함께 항체 Ab-A ECO his 태그(2.08 mg/ml) 항원 100 ul(1 ug/ml)로 코팅하였다.

[0432] 3. 완충 용액을 항체 Ab-A-His 항원으로 코팅된 96웰 플레이트로부터 털어내어 제거하였으며, 이 평판을 페이퍼 타올로 눌러 건조하였다.

[0433] 4. 플레이트를 완충제 N 또는 PBS로 3회 세정하여었다.

[0434] 5. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 소정의 완충제 200 ul로 차단하였다.

[0435] 6. 선택된 CPE/CPS 돌연변이체 및 야생형 단백질을 배치(layout)에 따라서 소정 완충 용액 75 ng/ml로 희석하였다. 완충 용액의 pH는 6.0 또는 7.4 중 어느 하나로 설정하였다(이하 "지정 완충 용액"이라 칭함)

[0436] 6. 완충제를 털어내어 제거하였으며, 플레이트 배치에 따라서 75 ng/ml의 샘플 100 ul를 각각의 웰에 첨가하였다.

[0437] 7. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다.

[0438] 8. 완충제를 96웰 플레이트로부터 털어내어 제거하였으며, 이 플레이트를 페이퍼 타올로 눌러 건조하였다.

[0439] 9. 플레이트를 배치에 따라서 지정 완충 용액 200 ul로 총 3회 세정하였다.

[0440] 10. 항-Flag HRP를 소정 완충 용액 중에 1:5000 희석물로 제조하였고, 항-Flag 호오스래디쉬 퍼옥시다아제(HRP)

100 μ l를 배치에 따라서 각각의 웰에 가하였다.

[0441]

11. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다.

[0442]

13. 플레이트를 소정 완충 용액 200 μ l로 총 3회 세정하였다.

[0443]

14. 플레이트를 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 50 μ l로 1.5분 동안 전개하였다.

[0444]

중탄산염을 함유하는 PBS 완충 용액 중에서의 검정 결과, 조건부 활성 항체 선택에 대한 성공률이 유의적으로 더 높았음이 발견되었다. 또한 중탄산염 함유 PBS 완충 용액이 사용되어 선택된 조건부 활성 항체는, pH 6.0에서 자체의 활성 대 pH 7.4에서 자체의 활성 비율이 훨씬 더 커서, 유의적으로 더 큰 선택성을 제공하는 경향을 보였다.

[0445]

또한, (중탄산염을 함유하는 PBS 완충 용액이 사용되어) 선택된 조건부 활성 항체가 중탄산염을 함유하지 않는 PBS 완충 용액 중에서 시험되었을 때, 조건부 활성 항체의 pH 7.0에서의 선택성에 비한 pH 6.0에서의 선택성은 유의적으로 감소하였음도 관찰되었다. 그러나, 중탄산염이 이 PBS 완충 용액에 생리학적 양으로 첨가되었을 때, 동일한 조건부 활성 항체의 선택성은 회복되었다.

[0446]

다른 검정에서는, 선택된 조건부 활성 항체를 중탄산염이 첨가된 크랩스 완충 용액 중에서 시험하였다. pH 6.0에서의 활성 대 pH 7.4에서의 활성의 더욱 큰 비율도 또한 중탄산염이 첨가된 크랩스 완충 용액 중에서 관찰되었다. 이는, 크랩스 완충 용액 중 중탄산염의 존재로 말미암아 적어도 부분적으로 달성될 수 있는 것으로 보인다.

[0447]

PBS 완충 용액 중 중탄산염의 농도가 중탄산염의 생리학적 농도 이하의 농도로 감소할 때, 정상 생리적 pH인 pH 7.4에서의 조건부 활성 항체의 활성은 증가하였음이 관찰되었다. pH 7.4에서 조건부 활성 항체의 활성 증가는 PBS 완충 용액 중 중탄산염의 농도 감소와 관련되는 것으로 관찰되었다.

[0448]

조건부 활성 항체에 대해 시험되었던, PBS 완충 용액 중 중탄산염의 농도와 동일한 중탄산염의 모든 농도에서 야생형 항체의 활성은 동일하게 유지되었음과 같이, 야생형 항체가 pH 7.4에서 검정되었을 때 이 야생형 항체는 PBS 완충 용액 중 중탄산염의 상이한 양에 의해 영향받지 않았다.

[0449]

실시예 8: 상이한 완충제 중 조건부 활성 항체의 선택

[0450]

본 발명에 따라 진화 단계에 의해 생성된 돌연변이체 항체를 대상으로 정상 생리적 pH인 pH 7.4에서, 그리고 비정상 pH인 pH 6.0에서 ELISA 분석을 수행하였다. 상기 두 ELISA 검정은, 소 혈청 알부민(BSA)을 포함하는 크랩스 완충제 기반 완충제, 그리고 중탄산염과 BSA를 포함하는 PBS 완충제 기반 완충제를 비롯하여 상이한 완충제를 사용하여 수행하였다.

[0451]

ELISA 검정은 다음과 같이 수행되었다:

[0452]

1. ELISA 수행 전날, 웰 코팅 완충제(탄산염-중탄산염 완충제)와 함께 항체 Ab-A ECO his 태그(2.08 mg/ml) 항원 100 μ l(1 μ g/ml)로 코팅하였다.

[0453]

2. 완충 용액을 항체 Ab-A-His 항원으로 코팅된 96웰 플레이트로부터 털어내어 제거하였으며, 이 플레이트를 페이퍼 타올로 눌러 건조하였다.

[0454]

3. 플레이트를 20개 완충제 200 μ l로 3회 세정하였다.

[0455]

4. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 20개 완충제 200 μ l로 차단하였다.

[0456]

5. 돌연변이체 및 키메라를 배치에 따라서 20개 완충제 중 75 ng/ml로 희석하였다.

[0457]

6. 완충제를 털어내어 제거하였으며, 희석된 샘플 100 μ l를 플레이트 배치에 따라서 각각의 웰에 첨가하였다.

[0458]

7. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다.

[0459]

8. 완충제를 96웰 플레이트로부터 털어내어 제거하였으며, 이 플레이트를 페이퍼 타올을 사용하여 눌러 건조하였다.

[0460]

9. 플레이트를 20개 완충 용액 200 μ l로 총 3회 세정하였다.

[0461]

10. 항-Flag IgG HRP를 20개 완충 용액 중에 1:5000 희석물로 제조하였고, 항-Flag IgG HRP 용액 100 μ l를 각각의 웰에 가하였다.

- [0462] 11. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다.
- [0463] 12. 플레이트를 20개 완충 용액 200 μ l로 총 3회 세정하였다.
- [0464] 13. 플레이트를 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 50 μ l로 30초 동안 전개하였다.
- [0465] 중탄산염을 함유하는 PBS 완충 용액 중 검정을 이용하여 선택된 조건부 활성 항체는, 중탄산염을 함유하지 않는 PBS 완충 용액 중 검정을 이용하여 선택된 조건부 활성 항체와 비교되었을 때, pH 6.0에서의 활성 대 pH7.4에서의 활성 비율이 더 컸다. 또한 중탄산염이 첨가된 크랩스 완충 용액도 또한 중탄산염을 함유하지 않는 PBS 완충 용액과 비교되었을 때, 검정시 pH 6.0에서의 활성 대 pH7.4에서의 활성 비율이 더 컸다. 중탄산염은 원하는 조건부 활성 항체의 선택에 중요한 것으로 보인다.
- [0466] **실시예 9: 상이한 완충제 중 조건부 활성 항체의 선택**
- [0467] 야생형 항체보다 pH 6.0에서 더 큰 활성을 보이고, 야생형 항체보다 pH 7.4에서 더 작은 활성을 보이는, 항원에 대한 조건부 활성 항체를 본 실시예에서 스크리닝하였다. 스크리닝 단계들을 이하 표 2 및 표 3의 완충제들을 사용하여 수행하였다. 표 2의 완충제들은 크랩스 완충제를 기반으로 하고, 표 2의 컬럼 1에 보인 바와 같은 추가의 성분들이 첨가된 것들이었다.

표 2

크렌스 완충제 기반 검정 완충제들

포함된 추가 성분들	완충제1			완충제2			완충제3			완충제4			완충제5			완충제6			완충제7			완충제8(KREB)		
	pH6.0	pH7.4	pH8.0	pH6.0	pH7.4	pH8.0	pH6.0	pH7.4	pH8.0	pH6.0	pH7.4	pH8.0	pH6.0	pH7.4	pH8.0	pH6.0	pH7.4	pH8.0	pH6.0	pH7.4	pH8.0	pH6.0	pH7.4	pH8.0
완충제들의 pH																								
D-글루코스	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
염화마그네슘	0.0468	0.0468	0.0468	0	0	0	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468	0.0468
염화칼륨	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0	0	0	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
염화나트륨	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0	0	0	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
이온가정 인산나트륨	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
이온가정 인산나트륨	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0	0	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
중탄산나트륨	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26	0	0	0	1.26	1.26	1.26
젖산	16mM	1mM	16mM	16mM	1mM	16mM	16mM	1mM	16mM	16mM	1mM	16mM	16mM	1mM	16mM	16mM	1mM	16mM	16mM	1mM	16mM	16mM	1mM	16mM
BSA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

[0468]

[0469]

추가 성분들이 포함되고, PBS 완충제를 기반으로 한 일부 검정 완충제들은 이하 표 3에 보였다. 표 2 및 표 3의 완충제들 중 성분들은 완충제 1 리터 중 첨가된 양(g)으로 제시되어 있다. 그러나, 인간 혈청 농도는 완충제의 10 wt.%이다.

표 3

PBS 완충제 기반 검정 완충제

추가 성분	완충제9(PBS, 시판)		완충제10 (PBS+NaHCO ₃)	
	pH6.0	pH7.4	pH6.0	pH7.4
KH ₂ PO ₄	0.144	0.144	0.144	0.144
NaCl	9	9	9	9
Na ₂ HPO ₄	0.795	0.795	0.795	0.795
젖산	16mM	1mM	16mM	1mM
중탄산나트륨	NA	NA	1.26	1.26
BSA	10	10	10	10

[0470]

[0471]

이러한 검정 완충제들을 함유하는 ELISA 분석을 사용하여 스크리닝을 수행하였다. ELISA 검정은 실시예 7~8에 기술된 바와 같이 수행하였다. 10개 검정 완충제 각각에 대하여 선택된 조건부 활성 항체를 이하 표 4에 제시하였다. OD450 흡광도는 ELISA 검정에서의 결합 활성과 역으로 상관되어 있다.

표 4

상이한 검정 완충제들이 사용되어 선택된 조건부 활성 항체(돌연변이체)

OD 450		선택된 돌연변이체들	야생형
완충제 1	pH 6.0	0.859	1.6414
	pH 7.4	0.0883	1.2474
완충제 2	pH 6.0	0.6599	1.1708
	pH 7.4	0.0717	1.1839
완충제 3	pH 6.0	0.4806	0.7765
	pH 7.4	0.0723	1.3497
완충제 4	pH 6.0	1.7364	1.7777
	pH 7.4	0.4457	1.6173
완충제 5	pH 6.0	0.6776	1.6905
	pH 7.4	0.0747	1.3987
완충제 6	pH 6.0	0.7244	1.4123
	pH 7.4	0.0731	1.3439
완충제 7	pH 6.0	0.6212	1.348
	pH 7.4	0.8044	1.7381
완충제 8	pH 6.0	0.7977	1.3893
	pH 7.4	0.1042	1.5535
완충제 9	pH 6.0	0.468	1.5087
	pH 7.4	0.4455	1.347
완충제 10	pH 6.0	0.5626	1.3439
	pH 7.4	0.0727	1.2547

[0472]

[0473]

선택된 조건부 활성 항체들 중 일부의 선택성은 완충제 8 및 9가 사용되어 확인되었으며, 항체들은 pH 7.4에서 보다 pH 6.0에서 원하는 선택성을 보였음이 발견되었다(도 1 참조). 상이한 완충제 사용은 조건부 활성 항체의 선택성에 영향을 미쳤음을 주목한다.

[0474]

실시예 10. 상이한 완충제들 중 조건부 활성 항체의 활성

[0475]

2개의 모노클로날 항체(모 항체로서 mAb 048-01 및 mAb 048-02)로부터 진화된 조건부 활성 항체의 활성을 상이한 완충제 2개 중에서 측정하였다(도 2). 2개의 완충제는 인산염 완충제(조건 IV)과 크랩스 완충제(조건 I)였다. 6개의 조건부 활성 항체를 mAb 048-01: CAB Hit 048-01, CAB Hit 048-02, CAB Hit 048-03, CAB Hit 048-04, CAB Hit 048-05 및 CAB Hit 048-06로부터 진화시켰다. 3개의 조건부 활성 항체를 mAb 048-02: CAB Hit

048-07, CAB Hit 048-08 및 CAB Hit 048-09로부터 진화시켰다.

[0476] 본 연구는, 조건부 활성 항체의 선택성(pH6.0에서의 검정에 있어 활성 대 pH7.4에서의 검정에 있어 활성의 비)은 검정에 사용된 완충제에 의해 영향을 받는다는 것을 보여주었다. 야생형 mAb 048-02로부터 진화된 조건부 활성 항체는, 인산염 완충제에서보다 크랩스 완충제에서 유의적으로 더 큰 선택성을 보였다(도 2).

[0477] **실시예 11. 조건부 활성 항체 및 중탄산염의 선택성**

[0478] 실시예 10에서는 조건부 활성 항체의 선택성이, 인산염 완충제(조건 IV)에서보다 크랩스 완충제(조건 I)에서가 더 컸음이 관찰되었다. 이는, 실시예 10에서 관찰된, 더 큰 선택성에 가장 유의적으로 기여하는 것이 크랩스 완충제 중 성분임을 확인하는 것에 관한 것이었다. 하나의 조건부 활성 항체의 선택성을, 크랩스 완충제로부터 유래하되, 이로부터 다양한 성분들을 차례로 하나씩 빼 버린 완충제 중에서 다시 시험하였다(도 3, 좌측 막대군). 완전 크랩스 완충제를 사용하였을 때, 조건부 활성 항체의 선택성은, pH 6.0/7.4에서의 활성비 약 8로서 컸다. 성분 A ~ F를 크랩스 완충제로부터 각각 배제하였을 때, 조건부 활성 항체의 선택성은 없어지진 않았지만, 조건부 활성 항체는 성분 C와 D 각각이 배제되었을 때 그 선택성이 줄어들었다. 그러나 성분 G(중탄산염)를 크랩스 완충제로부터 배제하였을 때, 조건부 활성 항체의 선택성은 완전히 없어졌다. 도 3을 참조한다. 이는, 중탄산염이 크랩스 완충제 중 조건부 활성 항체의 선택성을 높이는 데 적어도 부분적으로나마 관여함을 말해주는 것이다.

[0479] 그 다음, 상기 조건부 활성 항체의 선택성을, 중탄산염을 포함하지 않는 인산염 완충제(조건 IV) 중에서 측정하였는데, 이 인산염 완충제 중에서 조건부 활성 항체의 선택성은 완전히 없어지는 것이 관찰되었다. 중탄산염을 인산염 완충제에 첨가하였을 때, 조건부 활성 항체의 선택성 수준은, 크랩스 완충제 중에서 관찰되었던 수준으로 회복되었다. 이는, 중탄산염이 이 조건부 활성 항체의 선택성에 필요하다는 것을 확인시켜주는 것이다.

[0480] **실시예 12: 중탄산염은 pH7.4에서의 결합을 억제한다**

[0481] 본 실시예는, 중탄산염 농도가 0에서 생리학 적 농도(약 20 mM, 도 4)에 이르기까지 상이한 완충제 중에서, 3개의 조건부 활성 항체들(CAB Hit A, CAB Hit B 및 CAB Hit C)에 대한 pH 7.4에서의 결합 활성을 측정하는 것이다. 중탄산염 농도가 0에서 생리학 적 농도에 이르기까지 증가함에 따라, 조건부 활성 항체 3개 모두는 pH 7.4에서 용량 의존적 방식으로 결합 활성이 감소하는 것을 관찰하였다(도 4). 다른 한편, 야생형 항체의 결합 활성은 중탄산염에 의해 영향받지 않았다. 이 연구는, pH 7.4에서, 중탄산염 존재시 조건부 활성 항체의 선택성은, 이 조건부 활성 항체와 중탄산염과의 상호작용이 이 항체 자체의 결합 활성 상실에 적어도 부분적으로 기인하였음을 보여주었다.

[0482] **실시예 13: 상이한 완충제들 중 ROR2에 대한 조건부 활성 항체의 활성**

[0483] ROR2에 대한 조건부 활성 항체로서, (실시예 9에 기술된 바와 같이) 중탄산나트륨을 함유하는 검정 용액을 사용하여 선택된 항체를 상이한 완충제 중에서 시험하였다: CAB-P는 pH 6.0 또는 7.4에서 사용되는 표준 인산염 염수 완충제(PBS 완충제)였고; CAB-PSB는 이 중탄산나트륨 15 mM이 보충된, pH 6.0 또는 7.4을 벗어난 PBS 완충제였으며; CAB-PSS는 황화나트륨 9수화물 10 mM이 보충된, pH 6.0 또는 7.4을 벗어난 PBS 완충제였다.

[0484] 이러한 조건부 활성 항체의 활성을 하기 ELISA 프로토콜에 따라서 측정하였다:

[0485] 1. ELISA 하루 전: 평판을, 4°C에서 PBS 중에 밤새도록 1 ug/ml 항원 100 ul로 코팅.

[0486] 2. 이 평판을, 평판의 배치에 따라 CAB-P, CAB-PSB 또는 CAB-PSS 완충제 200 ul로 2회 세정.

[0487] 3. 실온에서 1시간 동안 평판의 배치에 따라 CAB-P, CAB-PSB 또는 CAB-PSS 완충제 200 ul로 평판 차단.

[0488] 4. 평판 배치에 명시된 바와 같이 CAB-P, CAB-PSB 또는 CAB-PSS 완충제로 항체 샘플과 양성 대조군 희석.

[0489] 5. 96웰 평판으로부터 차단 완충제를 털어내어 제거하고, 페이퍼 타올로 눌러 건조함.

[0490] 6. 평판 배치에 따라, 희석된 항체 샘플, 양성 대조군 또는 음성 대조군 100 ul를 각각의 웰에 첨가.

[0491] 6. 평판을 실온에서 1 시간 동안 항온처리함.

[0492] 7. 평판 배치에 따라서 CAB-P, CAB-PSB 또는 CAB-PSS 완충제 중 2차 항체 제조.

[0493] 8. 96웰 평판으로부터 털어내어 제거하고, 페이퍼 타올로 눌러 건조함.

[0494] 9. 평판 배치에 따라서 CAB-P, CAB-PSB, 또는 CAB-PSS 완충제 200 ul로 총 3회 평판 세정.

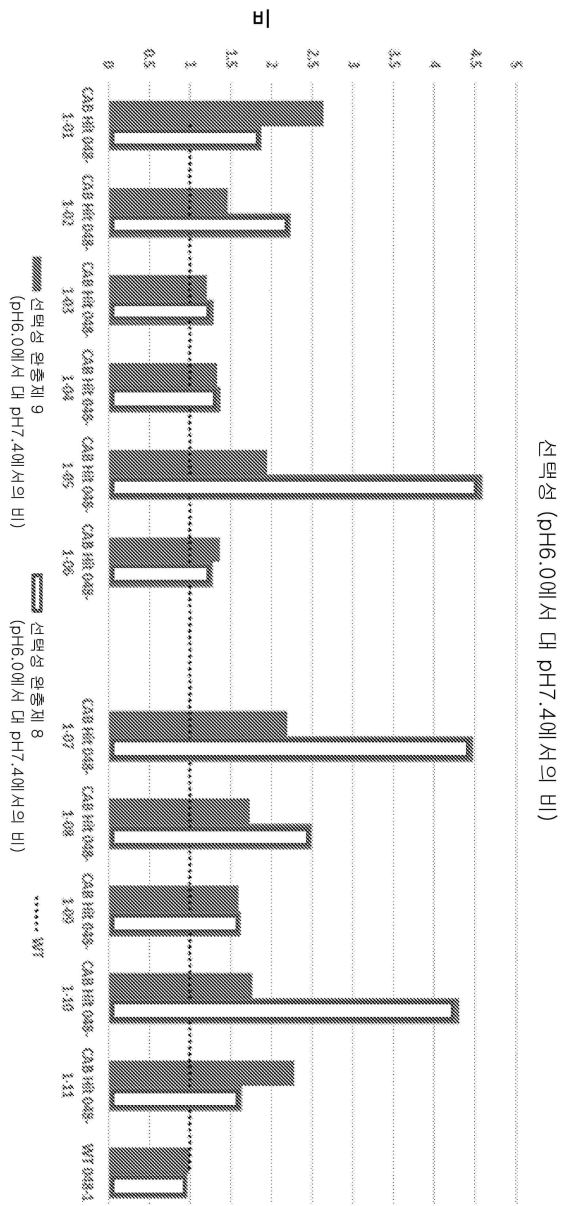
- [0495] 10. 평판 배치에 따라서 CAB-P, CAB-PSB 또는 CAB-PSS 완충제로 희석된 2차 항체를 각각의 웰에 첨가함.
- [0496] 11. 평판을 실온에서 1시간 동안 항온처리.
- [0497] 12. 96웰 평판으로부터 완충제를 털어내어 제거하고, 페이퍼 타올로 눌러 건조함.
- [0498] 13. CAB-P, CAB-PSB, 또는 CAB-PSS 완충제로 총 3회 평판 세정.
- [0499] 14. 3,3', 5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 기질의 온도를 실온으로 만듦.
- [0500] 15. 평판으로부터 완충제를 털어내어 제거하고, 페이퍼 타올로 눌러 건조함.
- [0501] 16. 여기에 TMB 기질 50 μ l 첨가.
- [0502] 17. 1N HCl 50 μ l로 전개를 중지시킴. 전개 시간은 3분으로 하였음
- [0503] 18. OD_{450 nm}에서 평판 판독기로 판독함.
- [0504] 이러한 조건부 활성 항체의 ROR2에 대한 활성을 도 7에 제시하였다. 조건부 활성 항체는 CAB-PSB 완충제 중 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 더 큰 활성을 보였는데, 즉 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 더 큰 선택성을 보였다. 몇몇 조건부 활성 항체들의 경우, 이러한 선택성은 CAB-P 완충제 중 없어졌거나 유의적으로 감소하였다. 그러나, 이 선택성은 또한 CAB-PSB 완충제 중 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 관찰되기도 하였다. 이와는 대조적으로, 야생형 항체는, 어떠한 완충제에서도 비교적 최소한의 선택성을 보였거나 아니면 아예 선택성을 보이지 않았다.
- [0505] 본 실시예는, 이황화물이 시험된, ROR2에 대한 조건부 활성 항체의 조건부 결합을 매개함에 있어서 중탄산염과 유사한 기능을 가짐을 입증하는 것이다.
- [0506] **실시예 14: 상이한 완충제 중 Ax1에 대한 조건부 활성 항체의 활성**
- [0507] (실시예 9에 기술된 바와 같이) 중탄산나트륨을 함유하는 검정 용액들을 사용하여 선택된, Ax1에 대한 조건부 활성 항체를, 실시예 13에 기술된 바와 같은 상이한 완충제, 즉 CAB-P, CAB-PSB 및 CAB-PSS 중에서 시험하였다. 이와 같이 Ax1에 대한 조건부 활성 항체의 활성을, 실시예 13에 기술된 바와 동일하게 ELISA 프로토콜을 이용하여 측정하여, 도 8에 제시하였다. CAB-PSB 완충제 중에서 본 조건부 활성 항체는 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 더 큰 활성을 보였는데, 즉 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 더 큰 선택성을 보였다. 이들 조건부 활성 항체에 대한 이러한 선택성은, CAB-P 완충제 중에서는 없어지거나 유의적으로 감소하였다. CAB-PSS 완충제 중 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 선택성이 관찰되었다. 이와는 대조적으로, 야생형 항체는 본질적으로 완충제 중 그 어떤 것에서도 선택성을 보이지 않았다.
- [0508] 본 실시예는 또한, Ax1에 대해 시험된 조건부 활성 항체의 조건부 결합을 매개함에 있어 이황화물이 중탄산염과 유사한 기능을 가짐을 입증하는 것이다.
- [0509] **실시예 15: 이황화물 이온을 함유하는 검정 용액 중 Ax1에 대한 조건부 활성 항체의 제조**
- [0510] 본 실시예에 사용된 검정 용액을 하기와 같이 제조하였다:
- [0511] CAB-PSB 완충제(pH 6.0, 1% BSA 함유)
- [0512] 1. 1.26 g/L의 중탄산나트륨(최종 농도15 mM)(Sigma S5761)을 PBS-Cellgro에 첨가.
- [0513] 2. 최종 농도 1%(1 리터 중)가 되도록 BSA(MP, CAT No0218054991) 첨가.
- [0514] 3. 1N HCl을 사용하여 pH를 6.0으로 맞추(이때 교반이 행하여짐).
- [0515] 4. 4 °C에 보관하여 둠. 사용 전 pH를 다시 확인함. 필요하다면 1N HCl로 pH를 맞추.
- [0516] CAB-PSB 완충제(pH 7.4, 1% BSA 함유)
- [0517] 1. 1.26 g/L의 중탄산나트륨(최종 농도15 mM)(Sigma S5761)을 PBS-Cellgro에 첨가.
- [0518] 2. 최종 농도 1%(1 리터 중)가 되도록 BSA(MP, CAT No0218054991) 첨가.
- [0519] 3. 1N HCl을 사용하여 pH를 7.4로 맞추(이때 교반이 행하여짐).
- [0520] 4. 4 °C에 보관하여 둠. 사용 전 pH를 다시 확인함. 필요하다면 1N HCl로 pH를 맞추.

- [0521] 이황화물 10 mM을 포함하는 CAB-PSS 완충제(pH 6.0, 1% BSA 함유)
- [0522] 1. 최종 농도 10 mM인 황화나트륨 9수화물($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (ACROS, #424425000) 2.4 g/L을 PBS-Cellgro에 첨가.
- [0523] 2. 최종 농도 1%(1 리터 중)가 되도록 BSA(MP, CAT No0218054991) 첨가.
- [0524] 3. 1N HCl을 사용하여 pH를 6.0으로 맞추(이때 교반이 행하여짐).
- [0525] 4. 4 °C에 보관하여 둠. 사용 전 pH를 다시 확인함. 필요하다면 1N HCl로 pH를 맞추.
- [0526] 이황화물 10 mM을 포함하는 CAB-PSS 완충제(pH 7.4, 1% BSA 함유)
- [0527] 1. 최종 농도 10 mM인 황화나트륨 9수화물($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (ACROS, #424425000) 2.4 g/L을 PBS-Cellgro에 첨가.
- [0528] 2. 최종 농도 1%(1 리터 중)가 되도록 BSA(MP, CAT No0218054991) 첨가.
- [0529] 3. 1N HCl을 사용하여 pH를 7.4로 맞추(이때 교반이 행하여짐).
- [0530] 4. 4 °C에 보관하여 둠. 사용 전 pH를 다시 확인함. 필요하다면 1N HCl로 pH를 맞추.
- [0531] 이황화물 1 mM을 포함하는 CAB-PSS 완충제(pH 6.0, 1% BSA 함유)
- [0532] 1. 최종 농도 1 mM인 BioAtla CAB-PSS 완충제(pH 6.0, 1% BSA 함유) 10M을 1/10 배 희석함.
- [0533] 2. 1N HCl을 사용하여 pH를 6.0로 맞추(이때 교반이 행하여짐).
- [0534] 3. 4 °C에 보관하여 둠. 사용 전 pH를 다시 확인함. 필요하다면 1N HCl로 pH를 맞추.
- [0535] 이황화물 1 mM을 포함하는 CAB-PSS 완충제(pH 7.4, 1% BSA 함유)
- [0536] 1. 최종 농도 1 mM인 BioAtla CAB-PSS 완충제(pH 7.4, 1% BSA 함유) 10M을 1/10 배 희석함.
- [0537] 2. 1N HCl을 사용하여 pH를 7.4로 맞추(이때 교반이 행하여짐).
- [0538] 3. 4 °C에 보관하여 둠. 사용 전 pH를 다시 확인함. 필요하다면 1N HCl로 pH를 맞추.
- [0539] CAB-P 완충제(pH 6.0, 1% BSA 함유)
- [0540] 1. 최종 농도 1 %(1리터 중)가 되도록 BSA를 PBS-Cellgro에 첨가.
- [0541] 2. 1N HCl을 사용하여 pH를 6.0으로 맞추(이때 교반이 행하여짐).
- [0542] 3. 4 °C에 보관하여 둠. 사용 전 pH를 다시 확인함. 필요하다면 1N HCl로 pH를 맞추.
- [0543] CAB-P 완충제(pH 7.4, 1% BSA 함유)
- [0544] 최종 농도 1 %(1리터 중)가 되도록 BSA를 PBS-Cellgro에 첨가.
- [0545] 2. 1N HCl을 사용하여 pH를 7.4로 맞추(이때 교반이 행하여짐).
- [0546] 3. 4 °C에 보관하여 둠. 사용 전 pH를 다시 확인함. 필요하다면 1N HCl로 pH를 맞추.
- [0547] 본 발명의 방법은, 앞선 실시예들에 기술된 프로토콜과 유사한 프로토콜을 사용하여 돌연변이 항체를 제조하기 위해, Ax1에 대한 야생형 항체를 대상으로 수행되었다. 10 mM 이황화물 이온을 함유하는 검정 용액들을 사용하여 pH 6.0에서 또는 pH 7.4에서 돌연변이 항체를 검정하여, 조건부 활성 항체를 선택하였다. 선택된 조건부 활성 항체(BAP063.1-CAB 1-8)를 도 9에 제시하였다.
- [0548] 이황화물을 농도 10 mM만큼 함유하는 검정 용액 중에서 검정하였을 때, 선택된 조건부 활성 항체의 Ax1에 대한 결합 활성은 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 더 컸다. 그러나, 이황화물을 단지 농도 1 mM만큼만 함유하는 검정 용액 중에서 pH 6.0에서의 활성과 pH 7.4에서의 활성 간 차이는, 선택된 조건부 활성 항체 하나를 제외한 모두에 대해 유의적으로 감소하였다. 도 9를 참조한다
- [0549] 본 명세서 및 첨부된 청구항들에서 사용되는 바와 같이, 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한, 단수 형태를 나타내는 "하나", "하나의", 그리고 "상기"는 복수의 인용대상들을 포함하는 것임이 주목되어야 할 것이다. 또한, "하나"(또는 "하나의"), "하나 이상의" 및 "적어도 하나"라는 용어는 본원에서 호환되어 사용될 수 있다. "~를 포함하는(comprising)", "~를 포함하는(including)", "~를 가지는" 및 "~로부터 구성된"이라는 용어도 또한 호환되어 사용될 수 있다.

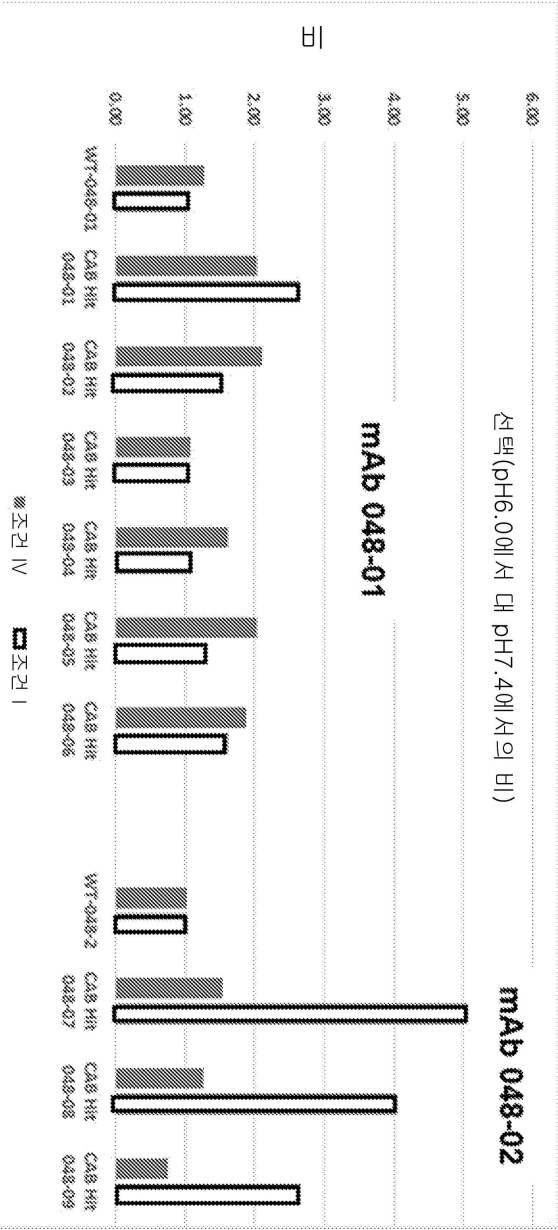
- [0550] 달리 명시되지 않으면, 명세서 및 청구의 범위에 사용된 성분의 양, 예컨대 분자량, 퍼센트, 비율, 반응 조건 등과 같은 특성 등을 표현하는 모든 수치는, 모든 경우 ("약"이라는 용어가 존재하건 존재하지 않건 간에) 이 "약"이라는 용어에 의해 변경되는 것으로 이해되어야 한다. 그러므로, 달리 지시되지 않는 한, 명세서 및 청구의 범위에 제시된 수치 매개 변수는 본 발명에 의해 얻고자 하는 원하는 특성에 따라서 달라질 수 있는 근사치이다. 적어도, 그리고 청구 범위에 균등론의 적용을 제한하려는 시도가 아닌 것으로서, 각각의 수치 매개변수는 적어도 보고된 유의적 숫자들의 수를 고려하고, 통상의 반올림 기법을 적용하여 해석되어야 할 것이다. 수치 범위와 본 발명의 넓은 범주를 제시하는 매개변수들이 근사치임에도 불구하고, 특정 예에 제시된 수치는 가능한 한 정확하게 보고된다. 그러나, 임의의 수치 값은 원래, 그 각각의 시험 측정치에서 발견되는 표준 편차로부터 필연적으로 기인하는 임의의 오차들을 포함한다.
- [0551] 본 명세서에 개시된 각 구성 요소, 화합물, 치환기 또는 매개변수는 단독 사용, 또는 본 명세서에 개시된 또 다른 구성 요소, 화합물, 치환기 또는 매개변수 각각 및 모두 중 하나 이상과의 조합 사용에 대해 개시되는 것으로 해석되어야 함이 이해될 것이다.
- [0552] 본 명세서에 개시된 각각의 구성 요소, 화합물, 치환기 또는 매개 변수에 대한 각각의 양/수치 또는 양/수치 범위는, 본 명세서에 개시된 임의의 기타 구성 요소(들), 화합물(들), 치환기(들) 또는 매개 변수(들)에 대해 개시된 각각의 양/수치 또는 양/수치 범위와 함께 개시되는 것으로 해석되어야 할 것임과, 본 명세서에 개시된 2개 이상의 구성 요소(들), 화합물(들), 치환기(들) 또는 매개 변수(들)에 대한 양/수치 또는 양/수치 범위의 임의의 조합도 또한 본 명세서의 목적을 위해 개시되기도 함도 또한 이해되어야 할 것이다.
- [0553] 또한 본 명세서에 개시된 각각의 범위는 유의적 숫자와 동일한 값을 가지는, 개시된 범위 내 각각의 특정 수치에 관한 개시로서 해석되어야 함도 추가로 이해된다. 그러므로 1 ~ 4의 범위는 수치 1, 2, 3 및 4의 분명한 개시로서 해석되어야 한다. 또한 본 명세서에 개시된 각각의 범위 중 각각의 하한은, 동일한 구성 성분, 화합물들, 치환기 또는 매개변수에 대해 본 명세서에 개시된 각각의 범위의 각각의 상한 및, 각각의 범위 내 각각의 특정 수치와 함께 개시되는 것으로 해석되어야 함도 추가로 이해된다. 따라서, 본 발명은 각각의 범위의 각각의 하한과, 각각의 범위의 각각의 상한 또는 각각의 범위 내 각각의 특정 수치를 조합하거나, 또는 각각의 범위의 각각의 상한과, 각각의 범위 내 각각의 특정 수치를 조합함으로써 도출되는 모든 범위의 개시로서 해석되어야 한다.
- [0554] 또한, 본 명세서 또는 실시예에 개시된 구성 성분, 화합물, 치환기 또는 매개변수의 특정 양/수치는 어떤 범위의 하한 또는 상한 중 어느 하나의 개시로서 해석되어야 하므로, 본 출원의 어느 곳에 개시된 동일 구성 성분, 화합물, 치환기 또는 매개변수에 대한 범위 또는 특정 양/수치의 기타 임의의 하한 또는 상한과 조합되어 이 구성 성분, 화합물, 치환기 또는 매개변수에 대한 어떤 범위를 이룰 수 있다.
- [0555] 본원에 인용된 모든 문서들은 전체로서 본원에 참조로서 첨부되어 있거나, 대안적으로는 문서들이 구체적으로 필요한 개시내용을 제공하기 위해 첨부되어 있다. 본 출원인(들)은 개시된 임의의 구현예들을 공중에게 한정할 의향이 없으며, 개시된 임의의 변형 또는 변경이 문자 그대로 청구항들의 범위 안에 포함될 수 없는 경우, 이 변형 또는 변경은 균등론 하에 균등물의 일부로서 간주된다.
- [0556] 그러나, 본 발명의 다수 특징 및 이점이 전술된 본 발명의 설명에 제시되어 있긴 하지만, 본 발명의 기능과 구조에 관한 세부 설명과 함께 본 발명은 오로지 예시를 위한 것으로서, 특히 본 발명의 원리에 속하는 부분들의 형태, 크기 및 정렬의 문제에 있어서의 변화는, 첨부된 청구항에 표현된 용어들의 일반적인 넓은 의미들에 의해 지정되는 최대한도로 세부적으로 이루어질 수 있음이 이해되어야 한다.

도면

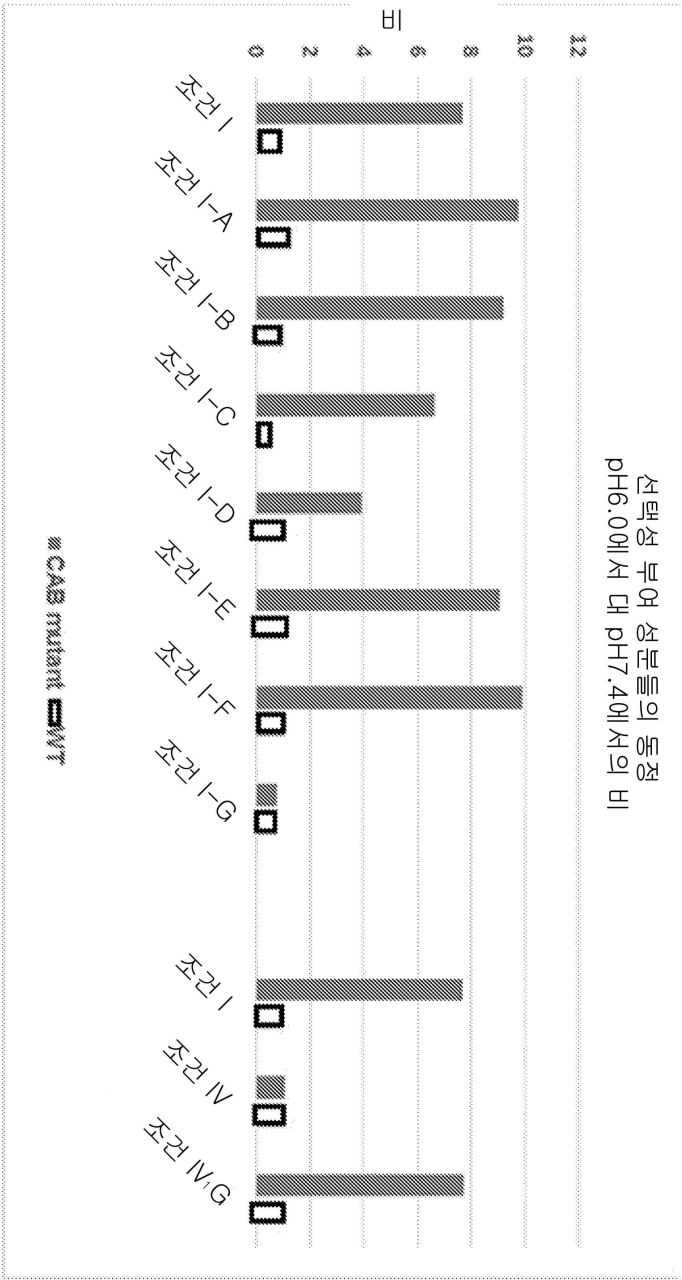
도면1



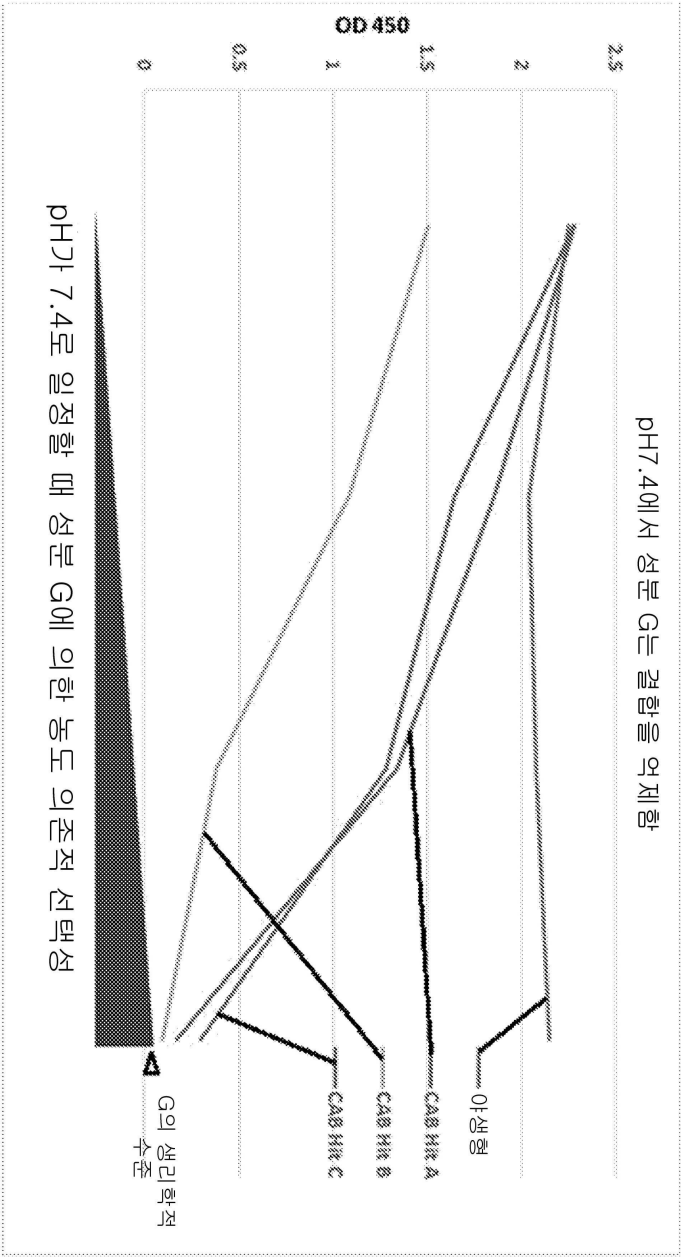
도면2



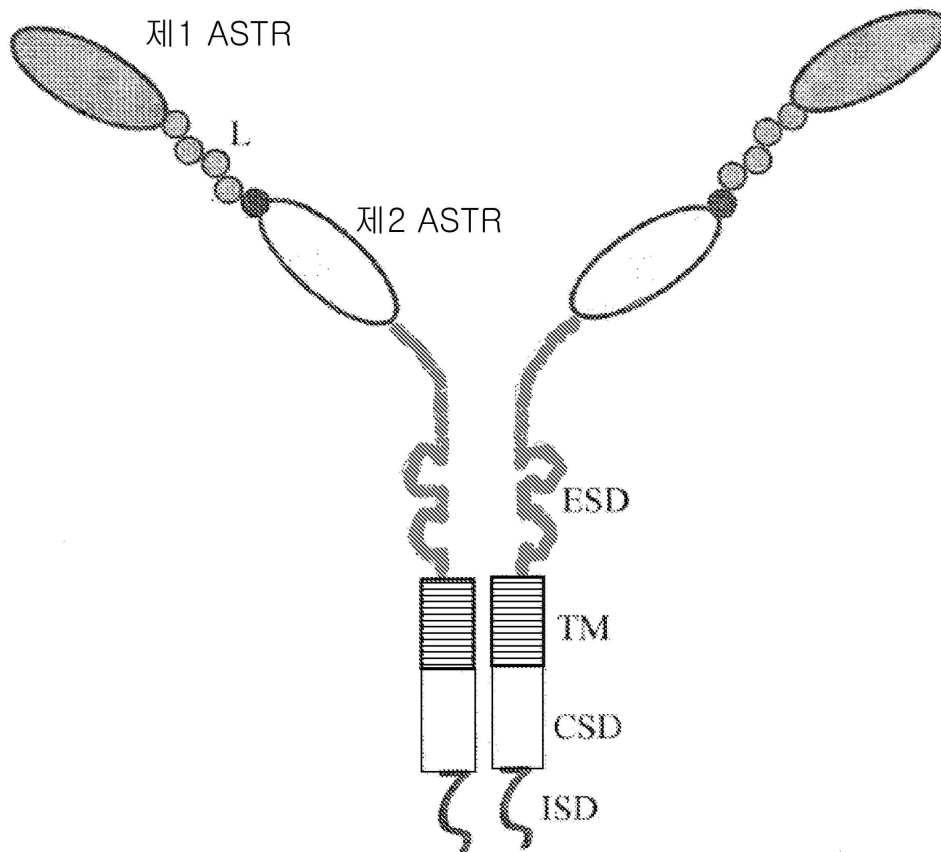
도면3



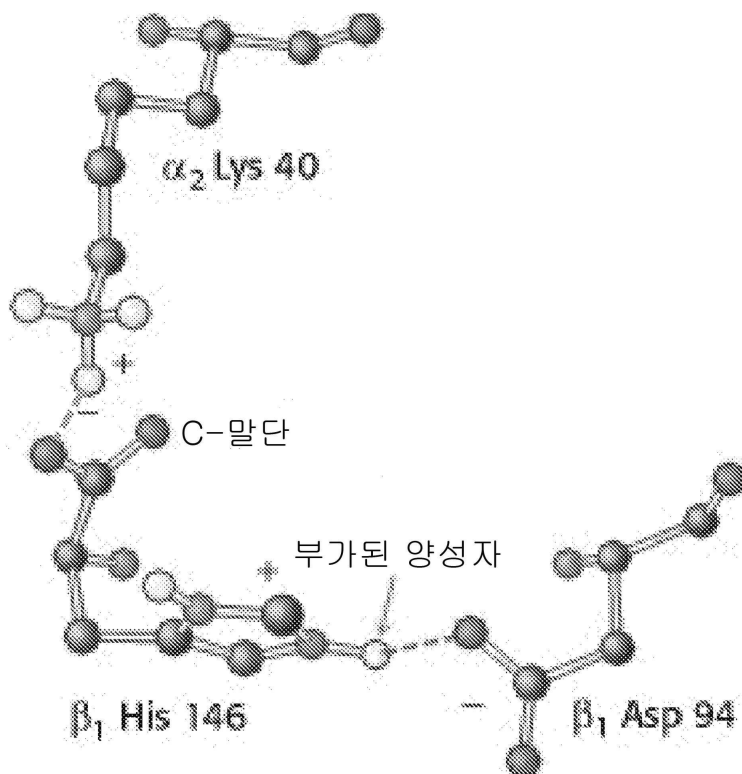
도면4



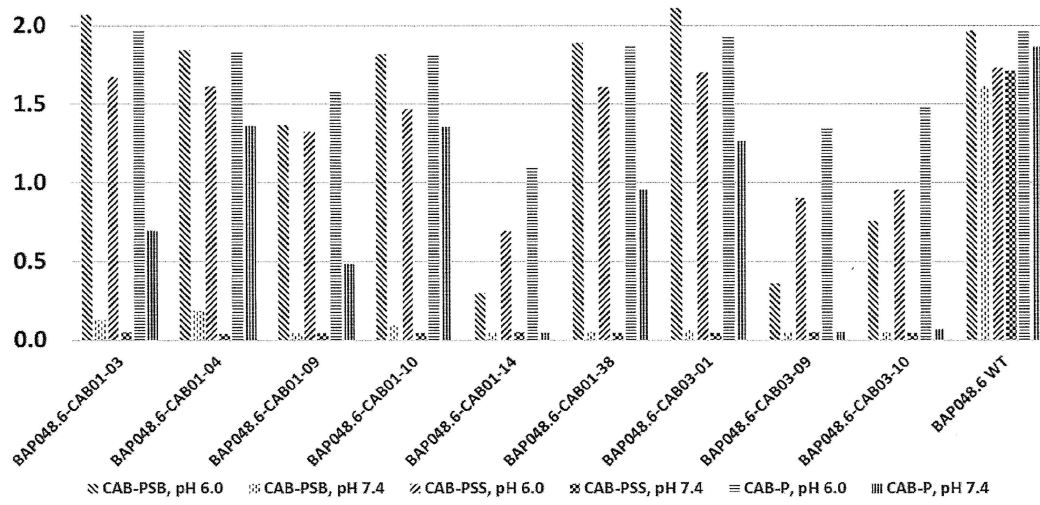
도면5



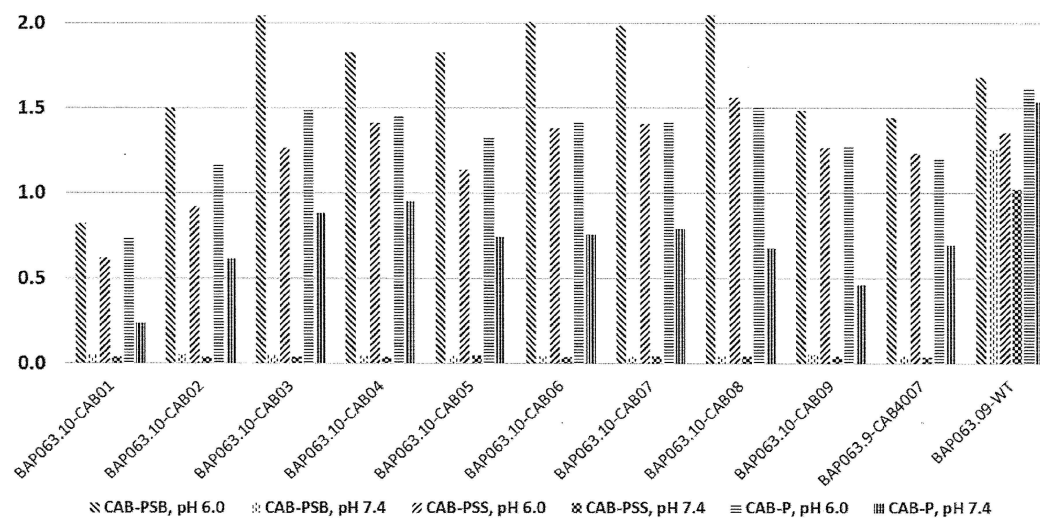
도면6



도면7



도면8



도면9

