(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월29일
(11) 등록번호 10-2514910
(24) 등록일자 2023년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/245 (2006.01) *C07K 14/25* (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01) *C07K 16/32* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/245 (2013.01)
C07K 14/25 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7001124(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년01월26일
심사청구일자 2022년01월12일
(85) 번역문제출일자 2022년01월12일
(65) 공개번호 10-2022-0011790
(43) 공개일자 2022년01월28일
(62) 원출원 특허 10-2016-7022316
원출원일자(국제) 2015년01월26일
심사청구일자 2019년11월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/012968
(87) 국제공개번호 WO 2015/113005
국제공개일자 2015년07월30일
(30) 우선권주장
61/932,000 2014년01월27일 미국(US)
62/049,325 2014년09월11일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Johnson N. et al. FEMS Microbiology Letters (1997) 146: 91-96

(73) 특허권자
몰레큘러 템플레이츠, 인코퍼레이션.
미국, 텍사스 78729, 오스틴, 슈트 100, 앰버글렌 블러바드 9301
(72) 발명자
포마, 에릭
미국, 뉴욕 10014, 뉴욕, 크리스토퍼 스트리트 165
윌렛, 에린
미국, 텍사스 78681, 라운드 록, 모킹버드 드라이브 2230
(74) 대리인
최덕규

전체 청구항 수 : 총 18 항 심사관 : 문명순

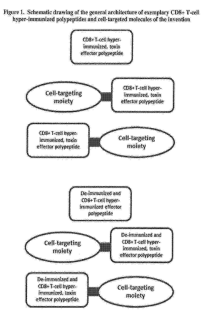
(54) 발명의 명칭 **폴리펩티드를 전달하는 MHC 클래스 I 항원결정기**

(57) 요 약

본 발명은 임베딩된 T-세포 항원결정기를 포함하고 탈-면역화 독소-유도된 폴리펩티드를 포함하는, 하나 이상의 CD 8+ T-세포 항원결정기를 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로에 전달하는 T-세포 항원결정기 전달 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명은 특정 세포, 예를 들면, 감염되거나 악성인 세포로 세포독성의 표적화된 전달, 특이적인 세

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



포형의 표적화된 사멸, 및 암, 면역 질환, 및 미생물 감염을 포함하는 다양한 질병, 질환, 및 증상의 치료를 위해 세포-표적화된, CD8+ T-세포 항원결정기 전달 분자를 제공한다. 본 발명은 또한 1) B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 탈-면역화되고/되거나, 2) 임베딩된 T-세포 항원결정기를 포함하고/하거나, 3) 독소 작용을 보유하는 독소 작동체를 포함하고, 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기를 MHC 클래스 I 제시 경로에 전달할 수 있는 폴리펩티드를 생성하는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류
C07K 16/085 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)
C07K 2317/22 (2013.01)
C07K 2319/33 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO:1의 아미노산 1 내지 251에 대해 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드로서,

상기 아미노산 서열이 SEQ ID NO:1의 아미노산 잔기 위치 53-61에 임베디드된(embedded) 이형 CD8+ T-세포 항원 결정기인 DILGFDFTL(F2-3)를 포함하는 것으로, 상기 항원결정기는 아미노산 치환체 V54I, R55L, I57F, P59F, E60T, 및 E61L을 갖고; 그리고

상기 아미노산 서열이 SEQ ID NO:1의 위치 75에 상응하는 아미노산 잔기의 아스파라긴, SEQ ID NO:1의 위치 77에 상응하는 아미노산 잔기의 티로신, SEQ ID NO:1의 위치 114에 상응하는 아미노산 잔기의 티로신, SEQ ID NO:1의 위치 167에 상응하는 아미노산 잔기의 글루타메이트, SEQ ID NO:1의 위치 170에 상응하는 아미노산 잔기의 아르기닌, SEQ ID NO:1의 위치 176에 상응하는 아미노산 잔기의 아르기닌, 및 SEQ ID NO:1의 위치 203에 상응하는 아미노산 잔기의 트립토판을 포함하는 것을 특징으로 하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드.

청구항 2

i) 세포의 세포 표면에 물리적으로 결합된 세포 외 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 결합 영역; 및

ii) 제1항의 시가 독소 작동체 폴리펩티드;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 결합 영역이 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 카복시 말단에 융합되어 단일 연속 폴리펩티드를 형성하는 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 결합 영역이 면역글로불린-형 결합 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 면역글로불린-형 결합 영역이 단일-도메인 항체 단편(single-domain antibody fragment), 단쇄 가변 단편(single-chain variable fragment), 항체 가변 단편(antibody variable fragment), 상보성 결정 영역 3 단편(complementary determining region 3 fragment), 제한된 FR3-CDR3-FR4 폴리펩티드, Fd 단편(Fd fragment), 항원-결합 단편(antigen-binding fragment), 10번째 피브로넥틴 유형 III에서 유래된 피브로넥틴 도메인, 테나신 유형 III 도메인, 안키린 반복체 모티프 도메인, 저밀도-지질단백질-수용체-유래된 A-도메인, 리포칼린, 쿠니츠 도메인, 단백질-A-유래된 Z 도메인, 감마-B 크리스탈린-유래된 도메인, 유비퀴틴-유래된 도메인, Sac7d-유래된 폴리펩티드, Fyn-유래된 SH2 도메인, 미니프로테인, C-유형 렉틴 유사 도메인 스캐폴드, 낙타과로부터 유래된 중쇄 항체 도메인 V_HH 단편(a heavy-chain antibody domain derived from a camelid V_HH fragment), 연골 어류로부터 유래된 중쇄 항체 도메인, 면역글로불린 신규 항원 수용체(IgNAR), V_{NAR} 단편(V_{NAR} fragment), 다량체화 scFv 단편(multimerizing scFv fragment), 2가 나노바디, 이특이적 탄뎀

scFv, 또는 이특이적 미니바디로부터 선택된 폴리펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 다량체화 scFv 단편은 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 또는 테트라바디(tetrabody)인 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 7

제2항에 있어서, 링커 펩티드 (GxS)n(x는 1 내지 6, n은 1 내지 30)을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 x가 4이고 n이 1인 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 9

제2항의 세포-표적화 분자 및 약학적으로 허용가능한 첨가제 또는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 암, 종양, 면역 장애, 또는 미생물 감염의 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항의 세포-표적화 분자 및 약학적으로 허용가능한 첨가제 또는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 암, 종양, 면역 장애, 또는 미생물 감염의 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제2항의 세포-표적화 분자를 암호화하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보체(complement).

청구항 12

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항의 세포-표적화 분자를 암호화하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보체(complement).

청구항 13

제11항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 14

제12항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 15

제11항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 16

제12항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 17

제13항의 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 18

제14항의 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] [1] 본 발명은 척색동물 세포에 의한 MHC 클래스 I 발현용 이형 T-세포 항원결정기를 전달하기 위한 폴리펩티드의 능력을 제공하기 위하여 변형한 폴리펩티드의 제조방법과 상기 제조방법으로 제조된 폴리펩티드에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 MHC 클래스 I 분자에 의해 인식될 수 있고 척색동물 세포의 MHC 클래스 I 시스템에 의한 세포 표면에서 발현될 수 있는 하나 이상의 T 세포 항원결정기-펩티드의 부가에 의해 부모 분자와 면역 성질이 달라진 폴리펩티드를 이형 T-세포 항원결정기 내부로 전달하는 단백질분해효소복합체(프로테아좀) 전달 작동체 기능으로 이루어진 변형 폴리펩티드의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 어떤 제조방법은 하나 이상의 T-세포 항원결정기의 도입에 의하여 항원성 및/또는 면역원성을 감소시키는 변형 폴리펩티드의 제조방법에 관한 것이다. 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 제조방법을 사용하여 제조된 폴리펩티드와 본 발명에 따른 제조방법을 사용하여 제조된 폴리펩티드로 이루어진 세포-표적화 분자에 관한 것이다. 본 발명에 따른 세포-표적화 분자는 많은 분야에 응용, 예를 들어 다양한 질병, 장애, 그리고 증상(예를 들어 암, 종양, 기타 성장 장애, 면역 장애, 및 미생물 감염 등의 진단과 치료)에 사용된다.

배 경 기 술

[0002] [2] 양서류, 조류, 어류, 포유류, 파충류, 및 상어류와 같은 척색동물의 면역 시스템은 특별히 위협적인 외래 분자, 세포 및 병원균의 존재를 감별하고자 하는 목적으로 외인성 분자를 세포내외 환경에서 끊임없이 탐지한다. 척색동물에서 주요 조직-적합성(MHC) 시스템 기능은 적응 면역 시스템의 일부이다(Janeway 's Immunobiology (Murphy K, ed., Garland Science, 8th ed., 2011)). 척색동물에서, 세포외 항원은 MHC 클래스 II 시스템에 의해 발현되며, 세포내 항원은 MHC 클래스 I 시스템에 의해 발현된다.

[0003] [3] 일반적으로, 세포에 이형 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질의 투여는 상기 분자들이 세포막의 물리적 장벽에 따라 상기 세포로 들어가지 못하게 하는 결과를 야기시킨다. 나아가 상기 분자들은 종종 세포외 효소 활성에 의해 세포 표면 및/또는 세포외 환경에서 더 작은 분자들로 분해된다. 엔도시토시스에 의해 세포외 환경으로부터 내재된 폴리펩티드 및 단백질은 흔히 초기 엔도솜, 후기 엔도솜 및 리소조옴이 관여하는 세포내흡수 경로의 일부로 리소좀 가수분해에 의해 분해된다. 식균작용에 의해 세포외 환경으로부터 내재된 폴리펩티드 및 단백질

은 일반적으로 포식 리소조옴과 유사한 경로 엔딩에 의해 분해된다.

[0004] [4] 상기 MHC 클래스 II 경로는 흔히 특이적 항원 발현세포에 의한 과정과 식균작용을 거친 후에, 세포외 공간에서 분자들로부터 유래된 항원성 펩티드를 발현하는데; 상기 특이적 항원 발현세포는 전문적인 항원 발현세포 또는 기타 항원 발현세포가 될 수 있고, 상기 기타 항원 발현세포의 예를 들자면, 수상돌기세포(DCs), 단핵 포식세포(M PCs), 내피세포 및 B-림포사이트(B-세포)를 들 수 있다. 이러한 항원 발현세포는 CD4 파지티브 (CD4+) T-림포사이트(T-세포)에 의한 인식용으로 그들의 세포 표면 위에서 MHC 클래스 II 분자로 복합체를 형성한 펩티드를 나타낸다. 이에 반하여, MHC 클래스 I 시스템은 척색동물의 대부분 세포 내에서 세포내 공간, 흔히 세포질에서, CD8+ T-세포에 의한 인식용 항원 펩티드로서 기능한다.

[0005] [5] 상기 MHC 클래스 I 시스템은 면역 시스템에서 세포내 항원의 항원 발현을 제공함에 의해 핵심 역할을 담당한다(cellular and Molecular Immunology (Abbas A, ed., Saunders, 8th ed., 2014)). 이러한 과정은 초기 척색동물에 있어서의 신생세포 및 세포내 병원균이 관여하는 미생물 감염에 대항하며 세포를 보호하기 위하여 진화된 적용 면역 시스템의 중요한 부분으로 고려된다; 그러나, 어떤 손상된 세포는 이러한 과정에 의해 제거될 수도 있다. MHC 클래스 I 분자와 복합 형성된 항원 펩티드의 발현은 세포독성 T-세포 (CTLs)에 의해 세포용해, 세포소멸, 및/또는 괴사 과정을 경유해서 표적화된 킬링에 발현하는 세포를 민감하게 감지한다. MHC 클래스 I 분자와 복합체를 형성한 특정한 펩티드 항원결정기의 발현은 암, 종양, 및 세포내 병원균에 대한 면역 반응을 자극하고 유지하는데 있어서 중요한 역할을 담당한다.

[0006] [6] MHC 클래스 I 시스템은 계속적으로 세포 표면에서 다양한 세포 내 항원결정기, 자기 또는 비-자기(외래)의 양자, 그리고 펩티드 또는 지질 항원의 양자를 진행하고 나타내는 역할을 담당한다. MHC 클래스 I 는 보호하는 T-세포 면역 반응을 증가시키기 위해 세포 내 병원균 또는 형질 전환 세포 신호로부터 CD8+ 작동체 T-세포까지 외래 항원을 나타낸다. 나아가, 상기 MHC 클래스 I 시스템은 면역학적 내성을 만들고 유지하기 위하여 계속적으로 자기 펩티드 항원결정기를 발현하는 기능을 한다.

[0007] MHC 클래스 I 시스템에 의한 펩티드 항원결정기 발현은 다음의 5가지 주요 단계에 참여한다: 1) 세포질 펩티드의 발생, 2) 소포체(ER)의 루멘에 펩티드 운반, 3) 펩티드에 결합하여 MHC 클래스 I 분자의 안정한 복합체 형성, 4) 세포 표면에 상기 안정한 펩티드- MHC 클래스 I 분자 복합체 (펩티드-MHC 클래스 I 복합체) 디스플레이, 및 5) 특정한 CTLs을 포함한 특정 CD8+ T-세포에 의해 펩티드-MHC 클래스 I 복합체 발현.

[0008] CD8+ T-세포에 의해 발현된 항원-MHC 클래스 I 복합체의 인식은 CD8+ T-세포 활성, 클론 확장, 그리고 CD8+작동체 세포와의 차별, 특정 항원결정기-MHC 클래스 I 복합체를 발현하는 파괴 세포를 표적하는 CTLs를 포함한다. 이것은 특정 CD8+작동체 세포의 군집의 생성을 유도하는데, 그들 중 어떤 것들은 특정 항원결정기-MHC 클래스 I 복합체를 나타내는 세포를 찾아서 파괴하기 위해 생명체를 통해 지나다닐 수 있다.

[0009] 상기 MHC 클래스 I 시스템은 세포질 펩티드로 개시된다. 세포질에서 펩티드의 존재는 다양한 경로에서 발생할 수 있다. 일반적으로, MHC 클래스 I 분자에 의하여 발현된 펩티드는 세포내 단백질과 폴리펩티드의 프로테아좀 분해로부터 유래된다. 상기 MHC 클래스 I 경로는 ER막과 연관된 항원 진행 단백질(TAPs)에 관련된 전달자로 시작될 수 있다. TAPs는 세포질로부터 ER의 루멘까지 펩티드를 이동시키는데, 거기에서 그것들은 빈 MHC 클래스 I 분자들과 연관될 수 있다. TAPs는 가장 흔히 약 8-12 아미노산 잔여기 사이즈 또한 6-40 아미노산 잔여기를 포함하는 사이즈의 펩티드를 이동시킨다(Koopmann J et al, Eur J Immunol 26: 1720-8 (1996)).

[0010] 상기 MHC 클래스 I 경로는 또한 진행을 위하여 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 세포질로 이동시키는 경로에 의해 루멘에서 개시될 수 있고 다시 TAP-매개 이동을 경유해서 ER로 재진입시킬 수도 있다.

[0011] TAP에 의해 세포질에서 ER의 루멘으로 이동된 펩티드는 다른 MHC 클래스 I 분자에 의해 결합되어 이용될 수 있다. ER의 루멘에서, TAPs가 참여하는 멀티-성분 펩티드 증강 장치는 안정한 펩티드-MHC 클래스 I 분자 복합체를 조합하는 것을 돕고 더 나아가 어떤 경우에는, 특별히 트리밍으로 불리우는 과정에서 최적 사이즈 펩티드로 절단하기도 한다(Mayerhofer P, Tampe R, JMol Biol pii S0022-2835 (2014)). ER에서, 다른 MHC 클래스 I 분자는 고 특정 면역글로불린-유형, 상기 MHC class I molecule이 강한 친밀도를 가지는 특정 펩티드에 대한 항원-결합 도메인을 사용하여 타이트하게 결합한다. 그리고 나서 상기 펩티드-MHC 클래스 I 복합체는 세포외 환경에 대한 발현과 CD8+ T-세포에 의한 인식을 위하여 비밀 경로를 통해 원형질 막으로 이동된다.

[0012] 항원결정기-MHC 클래스 I 복합체의 CD8+ T-cell에 의한 인식은 보호 면역 반응을 개시하는데, 이것은 궁극적으로 하나 이상의 CTLs의 세포 독성에 기인한 발현세포의 사멸로 종결된다. CTLs는 차별적인 특성으로 다른 T-세포 리셉터(TCRs)를 발현한다. 상기 MHC 형질은 매우 가변적이고 두가지 경로(펩티드 항원의 결합에 영향을 미치

거나, MHC 분자와 TCRs 사이에서 컨택 영역에 영향을 미침에 의해)에서 T-세포에 의한 인식에 영향을 받은 폴리몰피즘에 의해 제공된 다양성을 가진다. 특정 세포 표면 TCR을 경유한 CTL에 의한 항원-MHC 클래스 I 분자 복합체 인식에 대한 반응에서, 상기 CTL은 발현세포 속으로 퍼포린 및/또는 그랜자임을 전달함으로써 매개된 세포독성 활성화를 경유하여 초기에 항원-MHC 클래스 I 복합체 발현세포를 킬할 것이다. 나아가, 상기 CTL은 면역-자극 시토킨(예를 들어, 인터페론 감마(IFN-gamma), 종양 괴사 인자 알파(TNF), 대식세포 염증 단백질-1 베타(MIP-1beta), 그리고 IL-17, IL-4, 및 IL-22과 같은 인터류킨)을 방출할 것이다. 더 나아가, 활성화된 CTLs은 근접세포의 항원결정기-MHC 클래스 I 복합체 발현 여부와 상관없이 항원결정기-MHC 클래스 I 복합체 발현세포에 근접한 세포를 분별없이 킬 할 수도 있다(Wiedemann A et al, Proc Natl Acad Sci USA 103 : 10985-90 (2006)). 이러한 면역 반응을 유도한 항원결정기-MHC 클래스 I 복합체는 특정 세포-유형을 킬하기 위한 치료 및 다른 근접 세포에 대한 면역 시스템을 민감하게 하는 것에 고려될 수 있다.

[0013] 상기 MHC 클래스 I 발현 경로는 바람직한 면역 반응을 유도하기 위하여 다양한 치료에 이용될 수 있다. 그러나, 그러한 기술을 개발하는 데는 하기와 같은 몇가지 장벽이 존재한다; 세포 원형질 막을 통한 전달; 엔도시토틱 경로 탈출 및 리소좀에서 파괴; 및 일반적으로 표적화된 세포에 의한 외래 폴리펩티드의 격리, 변형 및/또는 파괴(Sahay G et al, J Control Release 145: 182-195 (2010); Fuchs H et al, Antibodies 2: 209-35 (2013)).

[0014] 나아가, 생물학 및 바이오약학에 기초한 폴리펩티드-포함 치료의 효과는 종종 치료과정에서 수용자에게 발생되는 바람직하지 않은 면역 반응을 제거하기도 한다. 실제적으로 모든 폴리펩티드-기초 치료는 포유류 개체에 투여 후 상당한 수준의 면역 반응을 이끌어 낸다. 면역 반응의 차별적 수준은 저-수준, 저-친밀도의 생산을 포함하고 단기 면역글로불린-M 항체를 고-수준, 고-친밀도 면역글로불린-G 항체로 한다. 상기 치료의 면역원성은 치료 효과를 감소시키고, 약의 효과를 변경시키고, 그리고/또는 과민성 반응, 아나필라시스, 아아필라토이드 반응을 야기시키고, 다른 결과 가운데 인퓨젼 반응을 나타나게 하는 등, 수용자에게 원치않는 면역 반응을 유도하기도 한다(Buttel I et al, Biologicals 39: 100-9 (2011)).

[0015] 예를 들어, 폴리펩티드에 기초한 치료는 치료과정에서 항원 부위에 대항한 항체(때때로 중화 항체 또는 항-약물 항체로 불리우는)를 생성시키기도 한다. 치료를 인식한 항체를 생성하는 면역 반응은 치료의 효과에 면역 저항을 결과적으로 유도한다. 나아가, 내생 인자와 함께 안티-치료 항체 사이의 크로스-반응은 바람직하지 않은 임상 결과물을 낳게 한다.

[0016] 먼 종으로부터 유래된 폴리펩티드 서열을 가진 폴리펩티드에 기초한 치료는 수용체와 관련되어 있는데, 상기 수용체가 포유류이고 상기 폴리펩티드 서열이 식물 또는 미생물로부터 유래되었을 때, 상기 수용체의 면역 반응에 공격적으로 표적화되는 경향이 있다(Sauerborn M et al, Trends Pharmacol Sci 31 : 53-9 (2010)). 척추동물 면역 반응은 선천적 및 후천적 면역 시스템과 함께 외래 폴리펩티드 서열을 인식하는데 적용된다. 예를 들어 두 이형 인간 폴리펩티드 서열의 재조합 연결을 포함한 폴리펩티드를 인간에 투여하는 경우와 같이, 척추동물의 동일한 종으로부터 폴리펩티드의 투여는 비-자기로서 인식되고 면역 반응을 이끌어 낼 수 있다.

[0017] 그러므로, 조합 폴리펩티드를 포함한 치료는 종종 치료과정 하의 개체에 있어서 바람직하지 않은 면역 반응의 발생을 방지하고/또는 감소시키기 위하여 치료의 면역원성을 최소화하려는 시도로 바람직하다. 특별히 치료에 있어서 B-세포 및/또는 T-세포 항원성 및/또는 면역원성을 생산할 가능성이 있는 폴리펩티드 영역은 제거, 억제 및 최소화를 위하여 표적화된다.

[0018] B-세포 및 T-세포 항원결정기는 소프트웨어를 사용한 인실리코로 주어진 폴리펩티드 서열에서 예측할 수 있다(Bryson C et al., BioDrugs 24: 1-8 (2010)). 예를 들어 EpiMatrix로 명명된 소프트웨어(EpiVax, Inc., Providence, RI, U.S.)는 재조합 단백질에서 T-세포 면역원성을 예측하는데 성공적으로 사용되었다(De Groot A et al., Dev Biol (Basel) 122: 171-94 (2005); Koren E et al, Clin Immunol 124: 26-32 (2007)).

[0019] 절단과 변이에 의한 항원 및/또는 면역원성 항원결정기의 제거와 같은, 수많은 시도들이 폴리펩티드를 포함한 치료의 면역원성 제거를 위하여 기술되었다(Tangri S et al, J Immunol 174: 3187-96 (2005); Mazor R et al, Proc Natl Acad Sci USA 109: E3597-603 (2012); Yumura K et al, Protein Sci 22: 213-21 (2012)). 외래 폴리펩티드는 면역 항원결정기를 경유한 후천적 면역 시스템에 의해 강력한 특이성으로 인식될 수 있으며 종종 폴리펩티드의 표면에 별개의 사이트의 작은 수로 발현될 수 있다. 그러나, 항체-결합 친밀도는 항원결정기내의 특정 아미노산의 작은 숫자와의 상호작용에 의해 지배될 수 있다. 그리하여, 면역 항원결정기를 방해하는 폴리펩티드내 핵심 아미노산의 변형은 면역원성을 감소시킬 수 있다(Laroche Y et al, Blood 96: 1425-32 (2000)). 항원결정기 인식을 방해하는 변형은 아미노산 제거, 대체, 그리고 비-면역 결합을 만드는 항원결정기를 포함한다.

[0020] 폴리펩티드에 기초한 치료법의 발전을 위해서는, 치료효과를 감소시키는 B-세포 매개 면역 반응 그리고 환자에 대한 중성화 항체의 생성의 유도를 피하고, 용량-효과 프로파일을 변경시키고, 그리고 환자가 수용 가능한 복용의 횟수로 제한하는 것이 바람직하다(Lui W et al, Proc Natl Acad Sci USA 109: 1 1782-7 (2012)).

[0021] 그리고, 세포의 MHC 클래스 I 발현 경로에 대하여 하나 이상의 T-세포 항원결정기를 전달할 수 있는 새로운 T-세포 항원결정기 전달 폴리펩티드 제조방법을 제공하는 것이 바람직하다. 세포외 공간에서 억제 항체를 생성하는 바람직하지 않은 면역 반응을 유도하는 것이 아니라, 생리적 조건하에서 바람직한 T-세포 매개 면역 반응을 개시하기 위해 표적 세포 내부로 T-세포를 전달할 수 있는 폴리펩티드를 제공하는 것이 또한 바람직하다. 그리고 하나 이상의 CD8+ T-세포 항원결정기가 부가되도 하나 이상의 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포가 제거된 T-세포 항원결정기 전달 폴리펩티드를 제공하는 것이 바람직하다.

[0022] *감염되거나 악성세포 등과 같은 특정 세포 유형에 세포독성의 표적화된 전달을 위하여, 세포-표적, CD8+ T-세포 항원결정기 전달 분자를 제공하는 것이 또한 바람직하다. 나아가, 간소된 B-세포 면역원성을 나타내는 세포-표적, CD8+ T-세포 항원결정기 전달 분자를 제공하는 것이 바람직하다. 일단 상기 세퍼-표적 분자에 의해 전달된 T-세포 면역성 폴리펩티드는 표적 세포의 표면에서 발현되고, 상기 T-세포 항원결정기는 CD8+ T-세포를 모으기 위하여 수용체 자신의 면역 시스템을 활성화함에 의해서 발현세포의 제거에 대한 시그널이 될 수 있다. 나아가 표적 세포의 디스플레이된 T-세포 항원결정기-MHC 클래스 I 복합체에 의해 활성화된 CD8+ T- 세포는 더 넓은 면역 반응을 자극할 수 있고, 미세-환경(예를 들어, 종양 또는 감염된 조직 중심지에서 사이토킨을 방출함에 의해)을 변화시키고, 다른 면역 세포(예를 들어, 작동체 T-세포)가 로컬 영역에서 모일 수 있게 한다.

[0023] 나아가, 세포간 내면화 촉진, 세포이하 루팅의 디렉팅, 및/또는 독소 효소 활성과 같이, 아직 부모 독소 폴리펩티드의 어떤 생물학의 작동체 기능이 보존되고 있는 독소로부터 유래된 새로운 T-세포 항원결정기 전달 폴리펩티드를 제조하는 제조방법을 제공하는 것은 바람직하다. 나아가, 바람직하지 않은 면역 반응을 생산하는 폴리펩티드의 가능성을 감소시키고, 분자를 포함한 독소 폴리펩티드를 내면화하는 표적 세포를 직접 규제하는 바람직한 T-세포 반응을 유도하는 가능성을 증가시키는 수단으로서 B-세포 항원결정기를 T-세포 항원결정기로 대체함에 의해 독소-유래된 폴리펩티드를 제조하는 제조방법을 제공하는 것은 바람직하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

발명의 효과

도면의 간단한 설명

[0024] **[발명의 요약]**

본 발명은 폴리펩티드("CD8+ T-세포 초과-면역된"으로서 언급된)를 전달하는 T-세포 항원결정기의 다양한 구체예를 제공하는데, 상기 폴리펩티드는 척색동물내에서 유핵의, 표적 세포에 의한 발현을 위하여 T-세포 항원결정기를 전달하는 능력을 가진 어떤 세포-표적화된 분자의 구성성분으로서 작용한다. 본 발명은 또한 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기("B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 탈면역화"로 언급된)에 관한 포유류의 항원성 및/또는 잠재적 면역원성을 감소시키는 다양한 탈면역화된 CD8+ T-세포 초과-면역 폴리펩티드의 구체예를 제공한다. 본 발명은 또한 특정 세포 유형(예를 들어, 척색동물에서의 감염 또는 악성세포)에 세포독성의 표적화된 전달을 위하여 분자를 전달하는 세포-표적화, CD8+ T-세포 항원결정기의 다양한 구체예를 제공한다.

나아가, 본 발명은 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기를 세포의 MHC 클래스 I 발현 경로까지 전달할 능력이 있는 신규한 폴리펩티드를 제조하는 제조방법의 구체예를 제공한다. 본 발명은 또한 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 면역원성의 개연성을 감소시키면서 동시에 CD8+ T-세포 면역원성의 개연성을 증가시킴에 의해 폴리펩티드의 변종을 제조하는 제조방법의 다양한 구체예를 제공한다. 본 발명은 또한 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기를

세포의 MHC 클래스 I 발현 경로에 전달할 능력이 있는 신규한 폴리펩티드를 제조하는 제조방법의 구체예를 제공한다. 상기의 방법에서 시작하는 폴리펩티드는 독소 작동체 영역을 포함하고 따라서 결과적으로 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 폴리펩티드는 독소 작동체 기능(예를 들어, 효소 활성과 세포독성)을 유지하는 폴리펩티드를 제공하게 되는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명에 따른 폴리펩티드는 CD8+ T-세포 초과-면역 또는 탈면역화 또는 양자 모두일 수 있다. 본 발명에 따른 상기 탈면역화된 폴리펩티드는 탈면역화된 B-세포 항원결정기 또는 탈면역화된 T-세포 또는 양자 모두일 수 있다. 본 발명의 탈면역화된 T-세포 폴리펩티드는 탈면역화된 CD4+ T-세포 또는 탈면역화된 CD 8+ T-세포 또는 양자 모두일 수 있다. 본 발명에 따른 폴리펩티드의 어떤 구체예는 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기를 포함한다. 본 발명에 따른 폴리펩티드의 다른 구체예에서 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기는 CD8+ T-세포 항원 결정기이다.

[0026] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 내장되거나(임베디드) 끼워넣어진(인설티드) 이형 T-세포 항원결정기를 포함하는데, 상기 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드가 현존하는 초기 엔도솜 구간으로부터 세포의 프로토좀까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달 능력이 있다. 보다 구체적인 예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 세포이하 조직에서 루팅할 수 있는 독소-유래된 폴리펩티드를 포함하는데, 상기 독소-유래된 폴리펩티드는 다음 그룹으로부터 선택하여 존재한다: 시토졸, 소포체, 그리고 리소조옴. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 독소-유래 폴리펩티드에서 내재되거나 끼워넣어진 이형 T-세포 항원결정기를 포함한다.

[0027] [28] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 하나 이상 독소 작동체 기능을 나타내는 능력을 가진 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진 독소-유래 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 독소로부터 유래된다: ABx 독소, 리보소옴 불활성 단백질 독소, 아브린(abrin), 탄저균 독소, Aspf1, 보우가닌(bouganin), 브리오딘(bryodin), 클로릭스(cholix)독소, 클라우딘(claudin), 디프테리아 독소, 겔로닌(gelonin), 이열성엔테로톡신, 미토길린(mitogillin), 백일해 독소, 포키위드 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 푸첼린(pulchellin), 슈도모나스 균체외 독소 A(Pseudomonas exotoxin A), 리스트릭토신(restrictocin), 리신(ricin), 사포린(saporin), 사르신(sarcin), 시가 독소, 그리고 서브틸레이즈 세포독소(subtilase cytotoxin).

[0028] [29] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 75-251, 또는 SEQ ID NO:45의 아미노산 2-389로부터 유래된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진 아미노산 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-241로 유래된 시가(Shiga) 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-251에서 유래된다. 다른 구체예예서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-261로부터 유래된다.

[0029] [30] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 내재되거나 끼워넣어진 이형 CD 8+ T-세포 형질결정기로 이루어지는데, 상기 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도소말 구획으로부터 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포 형질결정기의 세포내 전달을 가능하게 한다. 어떤 다른 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 세포이하 조직에 루팅할 수 있는 독소-유래 폴리펩티드를 포함하는데, 상기 폴리펩티드가 다음과 같이 구성된 그룹으로부터 선택되어 존재하는 경우이다: 시토졸, 소포체 및 리보조옴. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 독소-유래 폴리펩티드에서 이형 CD 8+ T-세포 형질결정기로 이루어진다. 다른 구체예에서는, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능을 나타낼 수 있는 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한 독소-유래 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 독소로부터 유래된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다: ABx 독소, 리보소옴 불활성 단백질 독소, 아브린(abrin), 탄저균 독소, Aspf1, 보우가닌(bouganin), 브리오딘(bryodin), 클로릭스(cholix) 독소, 클라우딘(claudin), 디프테리아 독소, 겔로닌(gelonin), 이열성엔테로톡신, 미토길린(mitogillin), 백일해 독소, 포키위드 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 푸첼린(pulchellin), 슈도모나스 균체외 독소 A(Pseudomonas exotoxin A), 리스트릭토신(restrictocin), 리신(ricin), 사포린(saporin), 사르신(sarcin), 시가 독소, 그리고 서브틸레이즈 세포독소(subtilase cytotoxin). 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 75-251, 또는 SEQ ID NO:45의 아미노산 2-389로부터 유래된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID

NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-241로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-251로부터 유래된다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-261로부터 유래된다.

[0030] [31] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 이형 CD8+ T-세포 형질결정기를 포함하는데, 상기 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드가 존재하는 세포 표면에서 MHC 클래스 I 분자에 의해서 발현을 위한 T-세포 형질결정기의 세포내 전달이 가능하다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 세포의 세포 이하 조직에 루팅할 수 있는 독소-유래 폴리펩티드로 이루어지는데, 상기 독소-유래 폴리펩티드는 다음과 같은 그룹으로부터 선택되어 존재한다: 시토졸, 소포체 및 리보소옴. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 독소-유래 폴리펩티드에서 이형 CD 8+ T-세포 형질결정기로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능을 나타낼 수 있는 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진 독소-유래 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 독소로부터 유래된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다: ABx 독소, 리보소옴 불활성 단백질 독소, 아브린(abrin), 탄저균 독소, Aspf1, 보우가닌(bouganin), 브리오딘(bryodin), 클로릭스(cholix) 독소, 클라우딘(claudin), 디프테리아 독소, 겔로닌(gelonin), 이열성엔테로톡신, 미토길린(mitogillin), 백일해 독소, 포키위드 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 푸첼린(pulchellin), 슈도모나스 균체외 독소 A(Pseudomonas exotoxin A), 리스트릭토신(restrictocin), 리신(ricin), 사포린(saporin), 사르신(sarcin), 시가 독소, 그리고 서브틸레이즈 세포독소(subtilase cytotoxin). 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 75-251 또는 SEQ ID NO:45의 아미노산 2-389로 유래된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-241로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-251로부터 유래된다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-261로부터 유래된다.

[0031] [32] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 이형 CD8+ T-세포 형질결정기와 연관되고 상기 폴리펩티드가 존재하는 세포 표면에서 MHC 클래스 I 분자에 의한 발현용 T-세포 형질결정기의 세포내 전달 가능한 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀으로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어지는데, 이형 CD 8+ T-세포 형질결정기는 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 아미노기-말단에 직접적으로 융합되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 나아가 B-세포 형질결정기 속으로 매립되거나 삽입된 두 번째 T-세포 형질결정기로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 독소-유래 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 작동기 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀과 두 번째 T-세포 형질결정기로 이루어진 독소-유래 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능을 나타낼 수 있는 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진 독소-유래 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서 본 발명에 따른 폴리펩티드는 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 독소로부터 유래된 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다: ABx 독소, 리보소옴 불활성 단백질 독소, 아브린(abrin), 탄저균 독소, Aspf1, 보우가닌(bouganin), 브리오딘(bryodin), 클로릭스(cholix) 독소, 클라우딘(claudin), 디프테리아 독소, 겔로닌(gelonin), 이열성엔테로톡신, 미토길린(mitogillin), 백일해 독소, 포키위드 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 푸첼린(pulchellin), 슈도모나스 균체외 독소 A(Pseudomonas exotoxin A), 리스트릭토신(restrictocin), 리신(ricin), 사포린(saporin), 사르신(sarcin), 시가 독소, 그리고 서브틸레이즈 세포독소(subtilase cytotoxin). 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 75-251 또는 SEQ ID NO:45의 아미노산 2-389에서 유래된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO :3의 아미노산 1-241로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO :3의 아미노산 1-251로부터 유래된다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO :3의 아미노산 1-261로부터 유래된다.

[0032] [33] 본 발명에 따른 제조방법의 어떤 구체예는, 세포의 세포이하 조직에 세포내 루팅할 수 있는 폴리펩티드의 CD8+ T-세포 면역원성을 증가시키는 제조방법인데, 상기 폴리펩티드는 다음과 같이 구성된 그룹으로부터 선택되어 존재한다: 시토졸, 소포체 및 리보소옴; 상기 제조방법은 다음의 단계로 이루어진다: 상기 폴리펩티드에서

이형 CD8+ T-세포 형질결정기를 내재시키거나 끼워넣는 단계. 다른 구체예에서, 상기 제조방법은 상기 폴리 펩티드의 내생 B-세포 형질결정기, 내생 CD4+ T-세포 형질결정기, 및/또는 촉매 도메인에서의 임베딩 또는 인서팅 단계로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 제조방법은 내생의 CD4+ T-세포 항원결정기 및/또는 폴리펩티드의 촉매 영역에서 임베딩 또는 인서팅 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 제조방법의 폴리펩티드는 독소로부터 유래된다. 제조방법의 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 독소 작동 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도조말 구획에서부터 프로토좀까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달 가능한 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어지고, 상기 제조방법은 상기 독소 작동체 폴리펩티드에서 이형 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 방법을 포함한다. 제조방법의 다른 구체예에서, 상기 임베딩 또는 인서팅 단계는 하나 이상의 독소 작동체 기능을 나타낼 수 있고 나아가 상기 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도조말 구획에서 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달까지 가능한 독소 작동체 폴리펩티드를 산출한다.

[0033] [34] 본 발명에 따른 제조방법의 어떤 구체예는 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도조말 영역에서부터 프로토좀까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능한 폴리펩티드의 CD8+ T-세포 면역원성을 증가시키는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 상기 폴리펩티드에서 이형 CD8+ T-세포 항원결정기를 임베딩 또는 인서팅. 제조방법의 다른 구체예에서, 제조방법에 따른 폴리펩티드는 독소로부터 유래된다. 제조방법의 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도조말 영역으로부터 프로토좀까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능한 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어지고, 상기 제조방법은 상기 독소 작동체 폴리펩티드내에서 이형 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 방법을 포함한다. 제조방법의 다른 구체예에서, 임베딩하거나 인서팅 단계는 결과적으로, 하나 이상의 독소 작동체 폴리펩티드를 나타낼 수 있고 나아가 상기 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도조말 영역으로부터 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달을 가능하게 하는 독소 작동체 폴리펩티드를 산출한다.

[0034] [35] 본 발명에 따른 제조방법의 어떤 구체예는 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도조말 영역에서부터 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능한 폴리펩티드의 CD8+ T-세포 면역원성을 증가시키는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 상기 폴리펩티드에서 이형 CD8+ T-세포 항원결정기를 임베딩 또는 인서팅. 제조방법에 따른 폴리펩티드는 독소로부터 유래된다. 제조방법의 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도조말 영역으로부터 프로토좀까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능한 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어지고, 상기 제조방법은 상기 독소 작동체 폴리펩티드내에서 이형 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 방법을 포함한다. 제조방법의 다른 구체예에서, 임베딩하거나 인서팅 단계는 결과적으로, 하나 이상의 독소 작동체 기능을 나타낼 수 있고 나아가 상기 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도조말 영역으로부터 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달을 가능하게 하는 독소 작동체 폴리펩티드를 산출한다.

[0035] [36]본 발명에 따른 제조방법의 구체예는 초기 엔도조말 영역에서 분자가 존재하는 세포의 시토졸, 소포체 및/또는 리소조옴까지 T-세포 항원결정기의 세초내 전달 가능한 T-세포 항원결정기 전달 분자를 생성하는 방법을 제공하며, 상기 제조방법은 다음과 같은 과정을 포함한다: 세포의 세포이하 조직(폴리펩티드는 시토졸, 소포체, 리소조옴으로 구성된 그룹에서 선택되어 존재한다.)에서 루팅 가능한 이형 T-세포 항원결정기와 연관되는 단계. 제조방법의 다른 구체예는 내생 B-세포 항원결정기, 내생 CD4+ T-세포 항원결정기, 및/또는 분자의 촉매 영역에서 이형 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 방법으로 이루어진다. 제조방법의 다른 구체예에서, 제조방법에 따른 폴리펩티드는 독소로부터 유래된다. 제조방법의 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 초기 엔도조말 영역에서 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 시토졸, 소포체 및/또는 리소조옴까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달을 가능하게 하는 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어지고 상기 제조방법은 독소 작동체 폴리펩티드내에 이형 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 방법을 포함한다. 제조방법의 구체예에서, 상기 임베딩 또는 인서팅 단계는 하나 이상의 독소 작동체 기능을 발현할 수 있고 나아가 초기 엔도조말 영역에서 독소 작동에 폴리펩티드가 존재하는 시토졸, 소포체 및/또는 리보조옴까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능한 독소 작동체 폴리펩티드를 산출한다.

[0036] [37] 본 발명에 따른 제조방법의 어떤 구체예는 초기 엔도조말 영역에서 전달 분자가 존재하는 세포의 프로테아좀까지 T-세포의 세포내 전달을 가능하게 하는 D8+ T-세포 항원결정기 전달 분자를 생성하는 방법을 제공하며, 상기 제조방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 초기 초기 엔도조말 영역에서 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀이 존재하는 세포의 프로테아좀까지 T-세포의 세포내 전달을 가능하게 하는 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀 내에 D8+ T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 단계. 본 발명에 따른 제조방법의 다른 구체예는 내생 B-세포 항원결정기, 내생 CD4+ T-세포 항원결정기, 및/또는 분자의 촉매 영역에 이형 T-세포

항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 단계를 포함한다. 제조방법의 다른 구체예에서, 상기 제조방법에 따른 폴리펩티드는 독소로부터 유래한다. 제조방법의 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능을 발현할 수 있고 나아가 초기 엔도조말 영역에서 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 프로테아좀까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능한 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다.

[0037] [38] 본 발명에 따른 제조방법의 어떤 구체예는 초기 엔도조말 영역에서 전달 분자가 존재하는 세포의 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포의 세포내 전달을 가능하게 하는 CD8+ T-세포 항원결정기 전달 분자를 생성하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 초기 엔도조말 영역에서 상기 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀이 존재하는 세포의 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달을 가능하게 하는 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀 내에 이형 CD8+ T-세포 항원결정기 임베딩 또는 인서팅 단계. 제조방법의 다른 구체예는 내생 B-세포 항원결정기, 내생 CD4+ T-세포 항원결정기, 및/또는 분자의 촉매 영역에 이형 T-세포 항원결정기을 임베딩하거나 인서팅하는 단계로 이루어진다. 제조방법의 다른 구체예에서 상기 제조방법에 따른 폴리펩티든 독소로부터 유래된다. 상기 제조방법에 따른 폴리펩티드는 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀을 포함하는 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어지며, 상기 제조방법은 독소 작동체 폴리펩티드에 이형 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 방법을 포함한다. 제조방법의 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능 발현이 가능하고 나아가 초기 엔도조말 영역에서 상기 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능하게 한다.

[0038] [39]본 발명에 따른 제조방법의 구체예는, MHC 클래스 I 분자에 의한 발현용 T-세포 항원결정기를 전달하는 세포에서 존재할 때 가능한 CD8+ T-세포 항원결정기 전달 분자 생성 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 초기 엔도조말 영역에서 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀이 존재하는 세포의 프로테아좀까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능한 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀내에 이형 CD8+ T-세포를 임베딩하거나 인서팅하는 단계. 제조방법의 다른 구체예는 내생 B-세포 항원결정기, 내생 CD4+ T-세포 항원결정기, 및/또는 분자의 촉매 영역에 이형 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 단계로 이루어진다. 제조방법의 다른 구체예에서, 상기 제조방법에 따른 폴리펩티드는 독소로부터 유래된다. 제조방법에 따른 다른 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 자동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀을 포함하는 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어지며, 상기 제조방법은 독소 작동체 폴리펩티드내에 이형 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 방법을 포함한다. 상기 제조방법의 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능 발현이 가능하고 나아가 초기 엔도조말 영역에서 상기 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포의 세포내 전달이 가능하다.

[0039] [40] 본 발명에 따른 제조방법의 구체예는 세포내에 존재할 때 MHC 클래스 I 분자에 의한 발현용 T-세포 항원결정기를 전달하는 CD8+ T-세포 항원결정기 전달 분자를 생성하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다: 초기 엔도조말 영역에서 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀이 존재하는 세포의 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능한 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀내로 이형 CD 8+ T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 단계. 제조방법의 다른 구체예는, 내생 B-세포 항원결정기, 내생 CD4+ T-세포 항원결정기, 및/또는 분자의 촉매 영역에 이형 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 방법을 제공한다. 제조방법의 다른 구체예에서, 상기 제조방법에 따른 폴리펩티드는 독소로부터 유래된다. 상기 제조방법에 따른 폴리펩티드는 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀으로 이루어진 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하며, 상기 제조방법은 상기 독소 작동체 폴리펩티드내에 이형 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나 인서팅하는 방법으로 이루어진다. 제조방법의 다른 구체예에서 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능 발현이 가능하고, 나아가 초기 엔도조말 영역에서 상기 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 MHC 클래스 I 분자까지 T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능하게 한다.

[0040] [41] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 탈면역화된 폴리펩티드는 내생 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기를 방해하는 이형 T-세포 항원결정기로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 독소-유래 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 이형 CD8+ T-세포 항원결정기는 상기 독소-유래 폴리펩티드에 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 독소-유래 폴리펩티드는 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 이형 CD8+ T-세포 항원결정기는 상기 독소 작동체 폴리펩티드내에 있다. 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능 발현이 가능하다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드는 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 독소로부터 유래된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다: ABx 독소, 리보소옴 불활성 단백질 독소, 아브린(abrin), 탄저균 독소, Aspf1, 보우가닌(bouganin), 브리오딘(bryodin), 클로릭스(cholix) 독소, 클라우딘(claudin), 디프테리아 독소, 겔로닌

(gelonin), 이열성엔테로톡신, 미토길린(mitogillin), 백일해 독소, 포키위드 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 푸첼린(pulchellin), 슈도모나스 균체외 독소 A(Pseudomonas exotoxin A), 리스트릭토신(restrictocin), 리신(ricin), 사포린(saporin), 사르신(sarcin), 시가 독소, 그리고 서브틸레이즈 세포독소(subtilase cytotoxin). 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 적어도 하나의 디프테리아 독소 군의 한 인자인 A 및 B 서브유닛으로부터 유래된 아미노산 염기배열을 포함하고 있는데, 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는, 다음과 같이 선천적으로 배치된 아미노산 염기서열:(SEQ ID NO:39의 3-10, SEQ ID NO:39의 33-43, SEQ ID NO:39의 71-77, SEQ ID NO:39의 125-131, SEQ ID NO:39의 138-146, SEQ ID NO: 39의 165-175, 그리고 SEQ ID NO: 39의 185-191)로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 염기서열의 적어도 하나의 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 파괴에 관여한다. 상기에서 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세질 영역까지 루팅할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:45의 아미노산 2-389로부터 유래된 디프테리아 독소 작동기 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 시가 독소 군의 적어도 하나의 인자의 A 서브유닛으로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 선천적으로 배치된 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 염기 서열의 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서의 적어도 하나의 파괴로 이루어지며, 상기 아미노산 염기 서열은 다음과 같은 그룹에서 선택된다: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 B-세포 항원결정기 영역 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 그리고 SEQ ID NO:3의 210-218; SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293, 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 4-33, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 34-78, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 77-103, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 128-168, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 160-183, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 236-258, 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 274-293; 그리고 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세포질 영역까지 루팅할 수 있다. 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 75-251로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-241로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-251로부터 유래된다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-261로부터 유래된다.

[0041] [42] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 내생 B-세포 항원결정기 및/또는 내생 CD4+ T-세포 항원결정기를 파괴하는 이형 CD4+ T-세포 항원결정기로 이루어지며, 상기 폴리펩티드는 초기 엔도조말 영역에서 폴리펩티드가 존재하는 세포의 프로테아좀까지 CD8+ T-세포 항원결정기를 세포내 전달가능하다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 독소-유래된 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 CD8+ T-세포 항원결정기는 상기 독소-유래된 폴리펩티드 내에 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 독소-유래된 폴리펩티드는 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 이형 CD8+ T-세포 항원결정기는 독소 작동체 폴리펩티드 내에 있다. 다른 구체예에서, 독소 작동체 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능을 발현할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다: ABx 독소, 리보소옴 불활성 단백질 독소, 아브린(abrin), 탄저균 독소, Aspf1, 보우가닌(bouganin), 브리오딘(bryodin), 클로릭스(cholix)독소, 클라우딘(claudin), 디프테리아 독소, 겔로닌(gelonin), 이열성엔테로톡신, 미토길린(mitogillin), 백일해 독소, 포키위드 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 푸첼린(pulchellin), 슈도모나스 균체외 독소 A(Pseudomonas exotoxin A), 리스트릭토신(restrictocin), 리신(ricin), 사포린(saporin), 사르신(sarcin), 시가 독소, 그리고 서브틸레이즈 세포독소(subtilase cytotoxin). 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 적어도 하나의 디프테리아 독소 군의 한 인자인 A 및 B 서브유닛으로부터 유래된 아미노산 염기배열로 이루어진 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드이다. 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 적어도 하나의 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 파괴에 관여하는데, 이들의 선천적으로 배치된 염기서열은 다음과 같이 구성된 그룹에서 선택된다: SEQ ID NO:39의 3-10, SEQ ID NO:39의 33-43, SEQ ID NO:39의 71-77, SEQ ID NO:39의 125-131, SEQ ID NO:39

의 138-146, SEQ ID NO:39의 165-175, 그리고 SEQ ID NO:39의 185-191. 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세포질 영역까지 루팅할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:45의 아미노산 2-389로부터 유래된 디프테리아 독소 작동기 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 시가 독소 군의 적어도 하나의 인자의 A 서브유닛으로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 선천적으로 배치된 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 염기 서열의 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서의 적어도 하나의 파괴로 이루어지며, 상기 아미노산 염기 서열은 다음과 같은 그룹에서 선택된다: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 B-세포 항원결정기 영역 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 그리고 SEQ ID NO:3의 210-218; SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293, 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 4-33, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 34-78, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 77-103, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 128-168, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 160-183, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 236-258, 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 274-293; 그리고 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세포질 영역까지 루팅할 수 있다. 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 75-251로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-241로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-251로부터 유래된다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-261로부터 유래된다.

[0042] [43] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 탈면역화 폴리펩티드는 내생 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기를 방해하는 이형 CD8+ T-세포 항원결정기로 이루어지며, 상기 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도조말 영역에서 MHC 클래스 I 분자까지 CD8+ T-세포 항원결정기의 세포내 전달가능하다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 독소-유래된 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 CD8+ T-세포 항원결정기는 상기 독소-유래된 폴리펩티드내에 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 독소-유래된 폴리펩티드는 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 이형 CD8+ T-세포 항원결정기는 독소 작동체 폴리펩티드내에 있다. 다른 구체예에서, 독소 작동체 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능을 발현할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다: ABx 독소, 리보소옴 불활성 단백질 독소, 아브린(abrin), 탄저균 독소, Aspf1, 보우가닌(bouganin), 브리오딘(bryodin), 클로릭스(cholix) 독소, 클라우딘(claudin), 디프테리아 독소, 겔로닌(gelonin), 이열성엔테로톡신, 미토길린(mitogillin), 백일해 독소, 포키위드 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 푸첼린(pulchellin), 슈도모나스 균체외 독소 A(Pseudomonas exotoxin A), 리스트릭토신(restrictocin), 리신(ricin), 사포린(saporin), 사르신(sarcin), 시가 독소, 그리고 서브틸레이즈 세포독소(subtilase cytotoxin). 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 적어도 하나의 디프테리아 독소 군의 한 인자인 A 및 B 서브유닛으로부터 유래된 아미노산 염기배열로 이루어진 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드이다. 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 적어도 하나의 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 파괴에 관여하는데, 이들의 선척적으로 배치된 염기서열은 다음과 같이 구성된 그룹에서 선택된다: SEQ ID NO:39의 3-10, SEQ ID NO:39의 33-43, SEQ ID NO:39의 71-77, SEQ ID NO:39의 125-131, SEQ ID NO:39의 138-146, SEQ ID NO:39의 165-175, 그리고 SEQ ID NO:39의 185-191. 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세포질 영역까지 루팅할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:45의 아미노산 2-389로부터 유래된 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 시가 독소 군의 적어도 하나의 인자의 A 서브유닛으로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 선천적으로 배치된 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 염기 서열의 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서의 적어도 하나의 파괴로 이루어지며, 상기 아미노산 염기 서열은 다음과 같은 그룹에서 선택된다: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 B-세포 항원결정기 영역 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID

NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 그리고 SEQ ID NO:3의 210-218; SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293, 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 4-33, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 34-78, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 77-103, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 128-168, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 160-183, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 236-258, 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 274-293; 그리고 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세포질 영역까지 루팅할 수 있다. 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 75-251로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-241로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-251로부터 유래된다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-261로부터 유래된다.

[0043] [44] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 탈면역화된 폴리펩티드는 내생 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기를 파괴하는 이형 CD8+ T-세포 항원결정기로 이루어지며, 상기 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드가 존재하는 세포의 표면에서 MHC 클래스 I 분자에 의한 발현용 CD8+ T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능하다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 독소-유래된 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 CD8+ T-세포 항원결정기는 독소-유래된 폴리펩티드 내에 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 독소-유래된 폴리펩티드는 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 이형 CD8+ T-세포 항원결정기는 독소 작동체 폴리펩티드 내에 있다. 다른 구체예에서, 독소 작동체 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능을 발현할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다: ABx 독소, 리보소옴 불활성 단백질 독소, 아브린(abrin), 탄저균 독소, Aspf1, 보우가닌(bouganin), 브리오딘(bryodin), 클로릭스(cholix)독소, 클라우딘(claudin), 디프테리아 독소, 겔로닌(gelonin), 이열성엔테로톡신, 미토길린(mitogillin), 백일해 독소, 포키위드 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 푸첼린(pulchellin), 슈도모나스 균체외 독소 A(Pseudomonas exotoxin A), 리스트릭토신(restrictocin), 리신(ricin), 사포린(saporin), 사르신(sarcin), 시가 독소, 그리고 서브틸레이즈 세포독소(subtilase cytotoxin). 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 적어도 하나의 디프테리아 독소 군의 한 인자인 A 및 B 서브유닛으로부터 유래된 아미노산 염기배열로 이루어진 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드이다. 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 적어도 하나의 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 파괴에 관여하는데, 이들의 선척적으로 배치된 염기서열은 다음과 같이 구성된 그룹에서 선택된다: SEQ ID NO:39의 3-10, SEQ ID NO:39의 33-43, SEQ ID NO:39의 71-77, SEQ ID NO:39의 125-131, SEQ ID NO:39의 138-146, SEQ ID NO:39의 165-175, 그리고 SEQ ID NO:39의 185-191. 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세포질 영역까지 루팅할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:45의 아미노산 2-389로부터 유래된 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 시가 독소 군의 적어도 하나의 인자의 A 서브유닛으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 선천적으로 배치된 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 염기 서열의 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서의 적어도 하나의 파괴로 이루어지며, 상기 아미노산 염기 서열은 다음과 같은 그룹에서 선택된다: SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 B-세포 항원결정기 영역 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 그리고 SEQ ID NO:3의 210-218; SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293, 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 4-33, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 34-78, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 77-103, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2

의 128-168, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 160-183, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 236-258, 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 274-293; 그리고 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세포질 영역까지 루팅할 수 있다. 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 75-251로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-241로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-251로부터 유래된다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-261로부터 유래된다.

[0044] [45] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 탈면역화 폴리펩티드는 내생 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기를 방해하는 첫 번째 이형 CD8+ T-세포 항원결정기를 포함하는 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀으로 이루어지며, 상기 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테이좀은 두 번째 CD8+ T-세포 항원결정기와 링크되어있다; 그리고 상기 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드가 존재하는 세포 표면위의 MHC 클래스 I 분자에 의한 발현용 두 번째 CD8+ T-세포 항원결정기의 세포내 전달이 가능하다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 독소-유래된 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 이형 CD 8+ T-세포 항원결정기는 독소-유래된 폴리펩티드 내에 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 독소-유래된 폴리펩티드는 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 CD8+ T-세포 항원결정기는 상기 독소 작동체 폴리펩티드 내에 있다. 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 하나 이상의 독소 작동체 기능을 나타낼 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 독소로부터 유래된 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다: ABx 독소, 리보소옴 불활성 단백질 독소, 아브린(abrin), 탄저균 독소, Aspfl, 보우가닌(bouganin), 브리오딘(bryodin), 클로릭스(cholix)독소, 클라우딘(claudin), 디프테리아 독소, 겔로닌(gelonin), 이열성엔테로톡신, 미토길린(mitogillin), 백일해 독소, 포키위드 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 푸첼린(pulchellin), 슈도모나스 균체외 독소 A(Pseudomonas exotoxin A), 리스트릭토신(restrictocin), 리신(ricin), 사포린(saporin), 사르신(sarcin), 시가 독소, 그리고 서브틸레이즈 세포독소(subtilase cytotoxin). 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 적어도 하나의 디프테리아 독소 군의 한 인자인 A 및 B 서브유닛으로부터 유래된 아미노산 염기배열로 이루어진 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드이다. 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 적어도 하나의 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 파괴에 관여하는데, 이들의 선천적으로 배치된 염기서열은 다음과 같이 구성된 그룹에서 선택된다: SEQ ID NO:39의 3-10, SEQ ID NO:39의 33-43, SEQ ID NO:39의 71-77, SEQ ID NO:39의 125-131, SEQ ID NO:39의 138-146, SEQ ID NO:39의 165-175, 그리고 SEQ ID NO:39의 185-191. 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 상기 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세포질 영역까지 루팅할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:45의 아미노산 2-389로부터 유래된 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 독소 작동체 폴리펩티드는 시가 독소 군의 적어도 하나의 인자의 A 서브유닛으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 선천적으로 배치된 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 염기 서열의 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서의 적어도 하나의 파괴로 이루어지며, 상기 아미노산 염기 서열은 다음과 같은 그룹에서 선택되는데, B-세포 항원결정기 영역은: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 그리고 SEQ ID NO:3의 210-218; SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293:에서 선택되고, CD4+ T-세포 항원결정기 영역은: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 4-33, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 34-78, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 77-103, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 128-168, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 160-183, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 236-258, 그리고 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 274-293;에서 선택되며, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세포질 영역까지 루팅할 수 있다. 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 75-251로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ

ID NO:3의 아미노산 1-241로부터 유래된 시가 독소 작동체 폴리펩티드로 이루어진다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-251로부터 유래된다. 다른 구체예에서, 상기 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1-261로부터 유래된다.

[0045] [46] 본 발명에 따른 제조방법의 구체예는, 폴리펩티드내에 있는 B-세포 면역원성을 감소시키기 위한 제조방법으로서, 상기 제조방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 상기 폴리펩티드에 부가된 T-세포 항원결정기의 하나 이상의 아미노산 잔기로 B-세포 항원결정기를 파괴시키는 단계. 다른 구체예에서, 상기 파괴 단계는 상기 B-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 삽입을 만드는 단계 또는 복수의 단계들로 더 구성된다.

[0046] [47] 본 발명의 제조방법에 따른 구체예는 폴리펩티드에서 B-세포 면역원성 감소에 대한 방법으로서, 상기 제조방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 폴리펩티드 내에서 B-세포 항원결정기 식별 단계; 및 폴리펩티드에 부가된 T-세포 항원결정기 내에 있는 하나 이상의 아미노산 잔기로 상기 식별된 B-세포 항원결정기를 파괴시키는 단계. 다른 구체예에서, 상기 파괴 단계는 상기 B-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 삽입을 만드는 단일 단계 또는 복수의 단계들을 더 포함한다.

[0047] [48] 본 발명에 따른 제조방법의 구체예는 폴리펩티드의 CD8+ T-세포 면역원성을 증가시키면서 동시에 폴리펩티드 내에 있는 B-세포 면역원성을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 다음과 같은 단계로 이루어진다: 상기 폴리펩티드에 부가된 이형 CD8+ T-세포 항원결정기에서 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 B-세포 항원결정기를 파괴시키는 단계. 다른 구체예에서, 상기 파괴 단계는 상기 B-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산이 치환되는 단일 단계 또는 복수의 단계를 더 포함한다. 다른 구체예는 상기 B-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 삽입이 이루어지는 단일 단계 또는 복수 단계를 더 포함한다.

[0048] [49] 본 발명에 따른 제조방법의 어떤 구체예는 폴리펩티드의 CD8+ T-세포 면역원성을 증가시키면서 동시에 폴리펩티드 내에 있는 B-세포 항원결정기를 감소시키기 위한 방법으로서, 상기 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 상기 폴리펩티드 내에서 CD4+ T-세포 항원결정기 식별단계; 및 상기 폴리펩티드에 부가된 CD8+ T-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 상기 식별된 CD4+ T-세포 항원결정기를 파괴시키는 단계. 다른 구체예에서, 상기 파괴 단계는 상기 B-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 치환단계(들)를 더 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 파괴단계는 상기 B-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 삽입단계(들)를 더 포함한다.

[0049] [50] 본 발명에 따는 제조방법의 어떤 구체예는 폴리펩티드 내에서 CD4+ T-세포 면역원성을 감소시키기 위한 방법으로서, 상기 방법은 다음과 같은 단계로 이루어진다: 상기 폴리펩티드에 부가된 CD8+ T-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 CD4+ T-세포 항원결정기를 파괴시키는 단계. 다른 구체예에서, 상기 파괴 단계는 상기 CD4+ T-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어지는 단계(들)를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 파괴 단계는 상기 CD4+ T-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 삽입이 이루어지는 단계(들)를 포함한다.

[0050] [51] 본 발명에 따른 제조방법의 어떤 구체예는 폴리 펩티드 내에서 CD4+ T-세포 면역원성을 감소시키기 위한 방법으로서, 상기 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 폴리펩티드 내에서 CD4+ T-세포 항원결정기 식별단계; 및 상기 폴리펩티드에 부가된 CD8+ T-세포 항원결정기 내에 있는 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 식별된 CD4+ T-세포 항원결정기를 파괴시키는 단계. 다른 구체예는 CD4+ T-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산을 치환시키는 단계(들)를 더 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 파괴단계는 CD4+ T-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 삽입이 이루어지는 단계(들)를 더 포함한다.

[0051] [52] 본 발명에 따른 제조방법의 어떤 구체예는 폴리펩티드의 CD8+ T-세포 면역원성을 증가시키면서 동시에 폴리펩티드 내에 있는 CD4+ T-세포 면역원성을 감소시키기 위한 방법으로서, 상기 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 상기 폴리펩티드에 부가된 이형 CD8+ T-세포 항원결정기 내에 있는 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 CD4+ T-세포 항원결정기를 파괴시키는 단계. 다른 구체예에서, 상기 파괴 단계는 상기 CD4+ T-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 치환단계(들)를 더 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 파괴단계는 상기 CD4+ T-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 삽입단계(들)를 더 포함한다.

[0052] [53] 본 발명에 따른 제조방법의 어떤 구체예는 폴리펩티드의 CD8+ T-세포 면역원성을 증가시키면서 동시에 폴리펩티드 내에 있는 CD4+ T-세포 면역원성을 감소시키기 위한 방법으로서, 상기 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 폴리펩티드 내에서 CD4+ T-세포 항원결정기 식별단계; 및 상기 폴리펩티드에 부가된 CD8+ T-세포 항원

결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 상기 식별된 CD4+ T-세포 항원결정기를 파괴시키는 단계. 다른 구체예에서, 상기 파괴 단계는 상기 CD4+ T-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 치환단계(들)를 더 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 파괴단계는 상기 CD4+ T-세포 항원결정기 내에서 하나 이상의 아미노산 삽입 단계(들)를 더 포함한다.

[0053] [54] 본 발명에 따른 어떤 구체예는 본 발명에 따른 제조방법에 의해 제조된 폴리펩티드를 제공한다.

[0054] [55] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NOs: 1 1-43 or 46-48 중 어느 하나를 필수적으로 포함한다.

[0055] [56] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 세포-표적화된 분자는 세포-표적화 성분 또는 에이전트(agent), 그리고 본 발명에 따른 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 세포-표적화된 분자는 하나 이상의 폴리펩티드로 이루어지면서 적어도 하나의 세포외 표적 생체 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역을 더 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 결합 영역은 다음과 같이 구성된 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드를 포함한다: 상보성 결정 영역 3(CDR3) 단편, 제한된 FR3-CDR3-FR4 (FR3 -CDR3 -FR4) 폴리펩티드, 단일-도메인 항체 단편(sdAb), 나노바디(nanobod), 낙타과로부터 유래된 중쇄 항체 도메인(VHH 단편), 연골 어류로부터 유래된 중쇄 항체 도메인, 면역글로불린 신규 항원 수용체들(IgNARs), VNAR 단편, 단쇄 가변 단편(scFv), 항체 가변 단편(Fv), 항원-결합 단편(Fab), Fd 단편, 소형 모듈 면역약제(SMIP) 도메인, 10번째 피브로넥틴 유형 III에서 유래된 피브로넥션 도메인(10Fn3)(예를 들어, 모노바디), 테타신 유형 III 도메인(예를 들어, TNfn3), 안키린 반복체 모티프 도메인(ARD), 저밀도-지질단백질-수용체-유래된 A-도메인(LDLR의 A 도메인 또는 LDLR-A), 리포칼린(anticalin), 쿠니츠 도메인, 단백질-A-유래된 Z 도메인, 감마-B 크리스탈린-유래된 도메인(Affilin), 유비퀴틴-유래된 도메인, Sac7d-유래된 폴리펩티드, Fyn-유래된 SH2 도메인(affitin), 미니프로테인, C-유형 렉틴 유사 도메인 스캐폴드, 조작된 모방 항체, 그리고 결합 기능을 보유한 상기 언급된 것의 일반적인 가공 유사체. 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자의 다른 구체예는, 세포에 상기 세포-표적화 분자의 투여에 있어서 상기 결합 영역의 세포 외 표적 생체 분자와 물리적으로 결합되어 있으며,상기 세포-표적화 분자는 상기 세포의 사멸을 야기시킬 수 있다. 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자의 다른 구체예는, 세포에 상기 세포-표적화 분자를 투여함에 있어서, 첫번째 세포 군집의 인자들은 상기 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 결합되어 있고, 두번째 세포 군집의 인자들은 상기 결합 영역의 어떠한 세포 외 표적 생체분자와도 물리적으로 결합되어 있지 않은 경우, 상기에서 언급한 첫번째 세포들의 군집 인자에 대한 세포 독성 효과는 상기에서 언급한 두번째 세포의 군집의 인자와 비교해서 적어도 3배 이상 크다는 것을 제공한다. 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자의 다른 구체예는 상기 결합 영역이 다음과 같이 구성된 그룹으로부터 선택된 세포 외 표적 생체 분자에 결합할 수 있다: CD20, CD22, CD40, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAM, EphB2, 전립선-특이 막 항원, 크립토(Cripto), 엔도글린(endoglin), 섬유아세포 활성 단백질, 루이스-Y, CD19, CD21, CS1/ SLAMF7, CD33, CD52, EpCAM, CEA, gpA33, 뮤신(Mucins), TAG-72, 탄산 탈수 효소 IX, 엽산 결합 단백질, 갱글리오사이드 GD2, 갱글리오사이드 GD3, 갱글리오사이드 GM2, 갱글리오사이드 루이스-Y2, VEGFR, 알파 V베타3, Alpha5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, FAP, 테나신, CD64, mesothelin, BRCA1, MART- 1/MelanA, gp100, 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE- 1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, 베타-카테닌, MUM- 1, 카스페이스-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, 암태아성 항원, 전립선 특이 항원, 전립선 줄기 세포 항원, 인간 아스파틸(asparaginyl) 베타-수산화효소, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, MART- 1/MelanA, gp100, 티로시나아제 관련 항원, HPV-E7, Epstein-Barr 바이러스 항원, Bcr-Abl, 알파-태아단백질 항원, 17-A1, 방광 종양 항원, CD38, CD15, CD23, CD52, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FceRIa, 갈락틴-9, mrp-14, siglec-8, siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, CD193, TLR4, FceRIa, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD15, CD33, CD64, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, 갈락틴-3, CD1 1a-c, GITRL, MHC 클래스 II, CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282- TLR2, CD1 1c, CD123, 그리고 상기에서 언급한 어떠한 면역성 단편. 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자의 구체예에서, 상기 세포-표적화 분자는 KDEL 패밀리의 카르복시-말단 소포체 보유/회수 시그널 모티프를 더 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 카르복시-말단 소포체 보유/회수 시그널 모티프는 다음과 같이 구성된 그룹으로부터 선택된다: KDEL (SEQ ID NO:61), HDEF (SEQ ID NO:62), HDEL (SEQ ID NO:63), RDEF (SEQ ID NO:64), RDEL (SEQ ID NO:65), WDEL (SEQ ID NO:66), YDEL (SEQ ID NO:67), HEEF (SEQ ID NO:68), HEEL (SEQ ID NO:69), KEEL (SEQ ID NO:70), REEL (SEQ ID NO:71), KAEL (SEQ ID NO:72), KCEL (SEQ ID NO:73), KFEL (SEQ ID NO:74), KGEL (SEQ ID NO:75), KHEL (SEQ ID NO:76), KLEL (SEQ ID NO:77), KNEL (SEQ ID NO:78), KQEL (SEQ ID NO:79), KREL (SEQ ID NO:80), KSEL (SEQ ID NO:81), KVEL (SEQ ID NO:82), KWEL (SEQ ID NO:83), KYEL (SEQ ID NO:84), KEDL (SEQ ID NO:85), KIEL (SEQ ID NO:86), DKEL (SEQ

ID NO:87), FDEL (SEQ ID NO:88), KDEF (SEQ ID NO:89), KKEL (SEQ ID NO:90), HADL (SEQ ID NO:91), HAEL (SEQ ID NO:92), HIEL (SEQ ID NO:93), HNEL (SEQ ID NO:94), HTEL (SEQ ID NO:95), KTEL (SEQ ID NO:96), HVEL (SEQ ID NO:97), NDEL (SEQ ID NO:98), QDEL (SEQ ID NO:99), REDL (SEQ ID NO:100), RNEL (SEQ ID NO:101), RTDL (SEQ ID NO:102), RTEL (SEQ ID NO:103), SDEL (SEQ ID NO:104), TDEL (SEQ ID NO:105), 및 SKEL (SEQ ID NO:106).

[0056] [57] 본 발명에 따른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자의 세포 투여에 있어서, 상기 세포독성 단백질은 상기 세포-표적화 부분의 세포 외 표적 생체 분자와 물리적으로 결합되고, 상기 세포독성 단백질은 상기 세포의 사멸을 야기시킬 수 있다.

[0057] [58] 본 발명에 따른 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 두 가지 다른 세포 유형의 군집에 대한 상기 세포-표적화 분자의 투여는 세포 외 생체 분자의 존재와 관련하여 볼 때, CD50 결합 영역에서 세포 외 표적 생체 분자와 물리적으로 결합된 상기 세포-표적화 분자는 세포를 사멸케 할 수 있는데, 상기 세포-표적화 분자의 세포 표적 부위와 물리적으로 결합되지 않은 세포 유형에 CD50 결합 영역에서는 상기 물리적으로 결합된 집단보다 적어도 3배 이하로 세포가 사멸되는 것을 제공한다.

[0058] [59] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자는 SEQ ID NOs:49-60의 아미노산 서열 중 어느 하나의 폴리펩티드를 필수적으로 구성성분으로 하거나 포함한다.

[0059] [60] 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드는 적어도 하나의 독소 작동체 기능을 보유하면서 독소-유래된 폴리펩티드의 촉매 활성을 감소시키거나 제거하는 돌연변이를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자는 효소 활성을 가진 독소 작동체 폴리펩티드로부터 유래된 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는데, 이것은 독소 작동체 폴리펩티드의 효소 활성을 변화시켜 자연 발생적으로 독소를 생성시키는 돌연변이를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 돌연변이는 상기 독소 작동체 폴리펩티드의 세포독성을 감소시키거나 제거하는 적어도 하나의 아미노산 작기의 제거, 삽입, 또는 치환으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 세포-활성화 분자는 시가 독소 작동체 영역을 포함하는데, 이것은 디프테리아 독소 작동체 영역의 효소 활성을 변화시켜 디프테리아 독소 군집의 한 인자의 A 서브유닛을 자연적으로 생성시키는 것과 관련된 돌연변이를 더 포함하며, 상기 돌연변이는 아미노산 잔기의 적어도 하나의 제거 또는 치환으로부터 선택되어 이루어진다(예를 들어, H21A, Y27A, W50A, Y54A, Y65A, E148A, 및 W153A). 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자는 시가 독소 작동체 영역을 포함하며, 이것은 상기 시가 작동체 영역의 효소 활성을 변화시켜 시가 독소 패밀리의 한 인자의 A 서브유닛을 자연발생적으로 생성시키는 것과 관련된 돌연변이를 더 포함하는데, 상기 돌연변이는 적어도 하나의 아미노산 잔기 제거 또는 치환으로부터 선택된다(예를 들어, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3에서 A231E, R75A, Y77S, Y114S, E167D, R170A, R176K 및/또는 W203A).

[0060] [61] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화 분자 그리고 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 첨가제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다; 그리고 그러한 폴리펩티드, 세포-표적화 분자, 또는 상기에서 언급된 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자를 포함하는 조성물의 사용은 여기에 더 기재된 바와 같이 본 발명의 제조방법에 포함된다. 본 발명에 따른 어떤 구체예는 본 발명에 따른 폴리펩티드 및/또는 본 발명에 따른 세포-표적화 분자; 그리고 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 첨가제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물이다.

[0061] [62] 상기의 폴리펩티드, 세포-표적화 분자, 단백질, 그리고 본 발명에 따른 조성물이외에 본 발명에 따른 폴리펩티드를 포함하는 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 세포-표적화 분자 또는 단백질을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩할 수 있는 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 범위 내에 있으며, 마찬가지로 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 그리고 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포는 예를 들어, 재조합 발현에 있어서, 폴리펩티드를 생산하기 위한 제조방법에서 및/또는 본 발명에 따른 단백질의 제조방법에서, 또는 폴리펩티드 구성성분 또는 그에 따른 단편 제조방법 등에서 사용된다.

[0062] [63] 나아가, 본 발명은 본 발명에 따른 세포-표적화 분자 또는 본 발명에 따른 그러한 단백질을 포함하는 약학적 조성물로 세포를 접촉하는 단계를 포함하여 선택적으로 세포를 킬링하는 방법을 제공한다. 어떤 구체예에서, 상기 세포를 접촉하는 단계는 체외에서 발생된다. 어떤 구체예에서는 상기 세포 접촉단계가 체내에서 발생된다.

[0063] [64] 본 발명은 환자의 필요에 따른 질병, 장애, 및/또는 증상을 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 환

자에 필요에 따라 투약하는 단계를 포함하며, 상기 투약은 환자의 필요에 따라 본 발명에 따른 폴리펩티드를 포함하는 조성물, 폴리펩티드 및/또는 단백질, 상기에 언급한 폴리펩티드를 포함하는 또는 상기에 언급한(예를 들어, 약학적 조성물) 것들을 포함하는 조성물을 치료에 효과적인 분량으로 투여하는 것을 포함한다. 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 방법을 사용하여 치료되는 질병, 장애, 또는 증상은 다음과 같은 대상으로부터 선택된다: 암, 종양, 면역 장애, 또는 미생물 감염. 본 발명에 따른 어떤 구체예에서, 상기의 암은 다음과 같은 그룹으로 부터 선택되어 치료된다: 골암, 유방암, 중추/말초 신경계 암, 위암, 생식세포암, 선암, 두경부암, 혈액암, 신장-요로 암, 간암, 폐/늑막암, 전립선암, 육종, 피부암, 그리고 자궁암. 이 방법에 따른 어떤 구체예에서, 상기 면역 장애는 다음과 같이 구성된 그룹으로부터 선택된 질병과 관련된 면역 장애이다: 아밀로이드증, 강직성 척추염, 천식, 크론병, 당뇨병, 이식편 거부반응, 대숙주성 이식편병, 만성 임파구성 갑산선염, 용혈성 요독 증후군, 에이즈 바이러스 관련 질병, 홍반성 낭창, 다발성 경화증, 다발 동맥염, 건선, 건선성 관절염, 류마티스성 관절염, 경피증, 패혈증성 쇼크, Sjorgren의 증후군, 궤양성 대장염, 및 맥관염.

[0064] [65] 본 발명에 따른 구체예는 암, 종양, 면역 장애, 또는 미생물 감염의 치료와 예방을 위하여 본 발명에 따른 폴리펩티드를 포함하는 조성물, 폴리펩티드 및/또는 상기에 언급한 폴리펩티드를 포함하는 세포-표적화 분자, 또는 상기 언급한 것을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 구체예는 암, 종양, 면역 장애, 또는 미생물 감염의 치료와 예방을 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명에 따른 물질의 조성물 사용을 제공한다.

[0065] [66] 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자의 어떤 구체예는 하나 이상의 부가적인 외인성 물질을 본 발명에 따른 단백질의 세포외 표적 생체 분자와 물리적으로 결합된 세포(들) 내부로 전달하는데 사용된다. 나아가, 본 발명은 생체외 또는 생체내에서, 본 발명에 따른 세포-표적화 분자, 약학적 조성물, 및/또는 진단 조성물로 상기 세포와 접촉하는 것을 포함한 세포(들) 내부로 외인성 물질을 전달하기 위한 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 환자의 필요에 따라 세포(들) 내부로 외인성 물질을 전달하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 환자에게 본 발명에 따른 세포-표적화 분자를 투여하는 단계를 포함하고, 상기에서 언급된 표적 세포(들)는 물리적으로 본 발명에 따른 단백질의 생체 외 표적 생체 분자와 결합 되어있다.

[0066] [67] 본 발명에 따른 어떤 구체예는 질병, 장애 또는 증상에 관한 상기의 진단, 예측, 또는 특징화를 위하여 본 발명에 따른 복합체(예를 들어, 폴리펩티드 또는 세포-표적화 분자) 및/또는 본 발명에 따른 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)의 사용을 제공한다.

[0067] [68] 본 발명의 어떤 구체예는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 포함하는 진단 조성물 및/또는 상기에 언급한 폴리펩티드를 포함하는 세포-표적화 분자, 또는 상기에 언급된 것을 포함하는 조성물을 제공하고 세포 유형, 조직, 기관, 질병, 장애, 증상, 또는 환자에 관한 진단학적으로 유용한 정보와 같은 정보 수집을 위한 감별 촉진 시약을 제공한다.

[0068] [69] 본 발명에 따른 어떤 구체예는 본 발명에 따른 세포-표적화 분자 및/또는 진단 조성물을 사용하여 세포를 감별하는 방법을 제공하는데, 상기 언급된 세포-표적화 분자 및/또는 진단 조성물과 접촉하여 상기 언급한 세포-표적화 분자 및/또는 진당 조성물의 존재를 감별하는 단계를 포함한다. 어떤 구체예는 상기 세포(들)과 접촉하는 단계가 생체 외에서 발생한다. 어떤 구체예에서는, 상기 세포(들)와 접촉하는 단계가 생체 내에서 발생한다. 어떤 구체예에서는, 상기 세포(들)를 감별하는 단계가 생체 외에서 발생한다. 어떤 구체예에서는, 상기 세포(들)를 감별하는 단계가 생체 내에서 발생한다.

[0069] [70] 예를 들어서, 본 발명에 따른 진단 조성물은 어떤 포유류 개체에 본 발명에 따른 단백질을 포함한 조성물을 투여함으로써 생체 내에서 세포를 감별하는데 사용되는데, 그것은 감별 촉진 시약으로 이루어지고 생체 외 또는 생체 내에서 본 발명에 따른 단백질의 존재를 감별한다. 상기에서 수집된 정보는 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자의 결합 영역의 세포 외 표적과 물리적으로 결합된 세포의 존재로 간주되며, 질병, 장애 또는 증상에 관한 상기의 진단, 예측, 특성화, 및/또는 치료에 유용하다. 본 발명에 따른 어떤 복합체(예를 들어, 폴리펩티드 및 세포-표적화 분자), 본 발명에 따른 조성물(예를 들어, 약학적 조성물 및 진단 조성물), 그리고 본 발명에 따른 제조방법은 만약 환자가 본 발명에 따른 약학적 조성물에 반응하는 그룹에 속한 경우에 사용이 결정된다.

[0070] [71] 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드 및 본 발명에 따른 상기 세포-표적화 분자의 어떤 구체예들은 척색동물의 면역 및/또는 예방 접종을 위하여 면역원 또는 면역원의 한 구성성분으로서 활용될 수 있다.

[0071] *[72] 어떤 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 방법은 척색동물 내에서 조직 중심부 "파종(seeding)"을 제공하기 위함이며, 다음과 같은 단계로 이루어진 방법이다: 본 발명에 따른 세포-표적화 분자, 본 발명에 따른 약학적

조성물, 본 발명에 따른 진단 조성물을 상기 척색동물에 투여하는 단계. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 조직 중심부에 "파종(seeding)"을 제공하기 위한 방법은 악성의, 질병에 걸린, 또는 감염된 조직으로 이루어진 조직 중심부 "파종(seeding)"을 제공하기 위한 방법이다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 조직 중심부에 "파종(seeding)"을 제공하기 위한 방법은 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 조직으로 이루어진 조직 중심부에 "파종(seeding)"을 제공하기 위한 방법이다: 질병에 걸린 조직, 종양 덩어리, 암 종양, 종양, 감염된 조직, 또는 비정상 세포 종양. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 조직 중심부 "파종(seeding)"을 제공하기 위한 방법은 본 발명에 따른 상기 세포-표적화된 분자, 본 발명에 따른 약학적 조성물, 또는 본 발명에 따른 진단 조성물을 상기 척색동물에 투여하는 단계를 포함하는데, 상기 투여제들은 다음과 같은 그룹으로부터 선택된 이형 T-세포 항원결정기를 포함한다: MHC 클래스 I 복합체에서 상기 세포-표적화 분자의 표적 세포에 의해 선천적으로 존재하지 않은 폴리펩티드, 상기 표적 세포에 의해 발현된 어떠한 단백질 내에 선천적으로 존재하지 않은 폴리펩티드, 상기 표적 세포의 프로토좀 내에 선천적으로 존재하지 않은 폴리펩티드, 파종되기 위한 사이트의 상기 세포 외 미소서식환경에서 선천적으로 존재하지 않은 폴리펩티드, 및 표적화되기 위한 종양 덩어리 또는 감염된 세포 사이트에서 선천적으로 존재하지 않은 폴리펩티드.

[0072] [73] 본 발명에 따른 어떤 구체예들은 본 발명에 따른 물질의 조성물을 포함하는 키트(kit)들이며, 선택적으로, 사용을 위한 설명, 부가적인 시약(들), 및/또는 약학적 전달 장치(들)을 포함한다.

[0073] [74] 본 발명에 따른 특징, 관점 및 바람직한 점은 하기에 기재되는 발명의 상세한 설명, 특허청구범위, 및 참고 도면을 통하여 더욱 명확히 이해될 수 있다. 본 발명의 구성요소들은 상기에서 언급한 이러한 구성요소들의 결합 또는 제거에 대한 구체적인 설명없이도 본 발명의 다른 구체적인 실시예에서 개별적으로 결합되거나 자유롭게 제거될 수 있다.

[0074] **[도면의 간단한 설명]**

[0075] [75] 도 1은 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 변이체를 포함하는 작동체 폴리펩티드, 및 이를 포함하는 세포-표적화 분자를 나타내는 예시적인 T-세포 항원결정기의 일반적인 정렬을 나타낸다.

[0076] [76] 도 2는 독소 작동체 폴리펩티드의 B-세포 항원결정기 영역내로 T-세포 항원결정기의 임베딩이 촉매 활성을 유의적으로 손상시키지 않았음을 나타낸다. B-세포 항원결정기 영역내로 임베딩된 T-세포 항원결정기를 포함하는 2개의 예시적인 디프테리아 독소-기원한 폴리펩티드는 야생형 디프테리아 독소와 비교가능한 리보소옴 불활성화의 수준을 나타내었다.

[0077] [77] 도 3은, T-세포 항원결정기의 B-세포 항원결정기 영역 내로의 임베딩 또는 인서팅이 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)에 의해 다양한 항-SLT-1A 항체에 의해 인식된 항원결정기(들)를 파괴하였음을 나타낸다.

[0078] [78] 도 4는, T-세포 항원결정기의 다양한 B-세포 항원결정기 영역내로의 임베딩이 웨스턴 분석에 의해 다양한 항-SLT-1A 항체에 의해 인식된 항원결정기(들)를 파괴하였음을 나타낸다.

[0079] [79] 도 5는, 상이한 처리를 제공받은: 처리되지 않거나, 본 발명의 예시적인 세포-표적화된 단백질로 처리된, 외인성 항원결정기-펩티드 및 PLE로 처리된, 및 외인성 항원결정기-펩티드 만으로 처리된, 세포의 세트의 유동세포분석법 분석의 결과의 오버레이(overlay)를 나타낸다. B-세포 항원결정기 영역을 파괴하는 임베딩된 T-세포 항원결정기를 포함하는 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 각각 포함하는, 본 발명의 3개의 예시적인 세포-표적화 단백질로 처리된 세포는 이들의 세포 표면에서 MHC 분자에 복합화된 임베딩된 항원결정기-펩티드를 나타내었다.

[0080] **[발명의 상세한 설명]**

[0081] [80] 본 발명은 예증적인, 비-제한적인 구체예, 및 첨부된 도면에 대한 참조를 사용하여 이후에 보다 충분히 기술된다. 그러나, 본 발명은 많은 상이한 형태로 구현될 수 있으며 하기 설정된 구체예에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이 보다는, 이러한 양태는, 본 개시내용이 완전하도록 하고 당해 분야의 숙련가에게 본 발명의 범위를 전달하도록 제공된다.

[0082] [81] 본 발명이 보다 용이하게 이해되도록 하기 위하여, 특정의 용어들이 하기 정의된다. 추가의 정의가 본 발명의 상세한 설명 내에서 발견될 수 있다.

[0083] [82] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 것으로서, 용어 하나("a," "an") 및 그것("the")은, 내용에서

달리 명확하게 나타내지 않는 한, 단수 및 복수 참조들 둘 다를 포함한다.

[0084] *[83] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 것으로서, 용어 "및/또는"은, 2개의 종, A 및 B를 언급하는 경우, A 및 B 중의 적어도 하나를 의미한다. 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 것으로서, 용어 "및/또는"은, A, B, 및 C와 같은 2개 이상의 종을 언급하는 경우, A, B, 또는 C 중의 적어도 하나, 또는 A, B, 또는 C의 어떠한 조합(단수 또는 복수 가능성과 함께 각각의 종과의) 중의 적어도 하나를 의미한다.

[0085] [84] 당해 명세서 전체에서, 용어 "포함하다(comprise)" 또는 "포함하다 (comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 단어는 기술된 정수(또는 성분) 또는 정수(또는 성분)의 그룹을 포함하지만, 어떠한 다른 정수(또는 성분) 또는 정수(또는 성분)의 그룹의 배제도 내포하는 것으로 이해될 것이다.

[0086] [85] 당해 명세서 전체에서, 용어 "포함하는(including)"은 "포함하지만 이에 제한되지 않는"을 의미하는데 사용된다. "포함하는" 및 "포함하지만 이에 한정되지 않는"은 상호교환적으로 사용된다.

[0087] [86] 용어 "아미노산 잔기" 또는 "아미노산"은 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드내로 혼입된 아미노산에 대한 참조를 포함한다. 용어 "폴리펩티드"는 아미노산 또는 아미노산 잔기의 어떠한 중합체도 포함한다. 용어 "폴리펩티드 서열"은 폴리펩티드를 물리적으로 포함하는 일련의 아미노산 또는 아미노산 잔기를 말한다. "단백질"은 하나 이상의 폴리펩티드 쇄를 포함하는 거대 분자이다. "펩티드"는 크기가 총 15 내지 20의 아미노산 잔기인 소 폴리펩티드이다. 용어 "아미노산 서열"은 길이에 따른 펩티드 또는 폴리펩티드를 물리적으로 포함하는 일련의 아미노산 또는 아미노산 잔기를 말한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 기재된 폴리펩티드 및 단백질 서열은 아미노 말단으로부터 카복시 말단까지의 이들의 순서를 나타내는 왼쪽으로부터 오른쪽으로 기재된다.

[0088] [87] 용어 "아미노산," "아미노산 잔기," "아미노산 서열," 또는 폴리펩티드 서열은 천연적으로 존재하는 아미노산을 포함하며, 달리 나타내지 않는 한, 셀레노사이토신, 피롤라이신, N-포르밀메티오닌, 감마-카복시글루타메이트, 하이드록시프롤린하이푸신, 피로글루탐산, 및 셀레노메티오닌과 같은, 천연적으로 존재하는 아미노산과 유사한 방식으로 작용할 수 있는 천연 아미노산의 공지된 유사체를 또한 포함한다. 본원에 언급된 아미노산은 다음 표 A에서와 같이 약칭 명칭으로 기술되어 있다.

[0089] 표 A: 아미노산 명명법

명칭	3-문자	1-문자
알라닌	Ala	A
아르기닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르트산 또는 아스파르테이트	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루탐산 또는 글루타메이트	Glu	E
글루타민	Gln	Q
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소루이신	Ile	I
루이신	Leu	L
라이신	Lys	K
메티오닌	Met	M
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
트립토판	Trp	W
타이로신	Tyr	Y
발린	Val	V

[0090]

[0091] 폴리펩티드와 관련하여 어구 "보존적 치환"은 전체 폴리펩티드의 작용 및 구조를 실질적으로 변경시키지 않는 폴리펩티드의 아미노산 조성에 있어서의 변화를 말한다(참고: Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, New York (2nd ed., 1992)).

[0092] [89] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "발현된," "발현하는", 또는 "발현하다"는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산의 폴리펩티드 또는 단백질로의 해독을 말한다. 발현된 폴리펩티드 또는 단백질은 세포내에 잔존할 수 있거나, 세

포 표면 막의 성분이 되거나 세포외 공간으로 분비될 수 있다.

[0093] [90] 본원에 사용된 것으로서, 부호 "α"는 부호 다음의 생물분자에 결합할 수 있는 면역글로불린-형 결합 영역의 약어이다. 부호 "α"는 부호 다음의 생물분자에 결합하는 이의 능력을 기준으로 한 면역글로불린-형 결합 영역의 작용적 특성을 말하는데 사용된다.

[0094] [91] 부호 "::"는, 이의 전 및 후의 폴리펩티드 영역이 함께 물리적으로 연결되어 연속된 폴리펩티드를 형성함을 의미한다.

[0095] [92] 본 발명의 목적을 위해, 어구, "로부터 기원한"은, 상기 폴리펩티드 영역이 단백질에서 원래 발견되며 원래의 서열과 비교하여 현재 첨가, 결실, 트렁케이션(truncation), 또는 다른 변경을 포함할 수 있음으로써 전체 작용 및 구조가 실질적으로 보존된 아미노산 서열을 포함한다.

[0096] [93] 본 발명의 목적으로 위해, 용어 "작동체"는 세포독성, 생물학적 시그날링, 효소적 촉매작용, 세포 이하 루팅(subcellular routing), 및/또는 분자간 결합과 같은 생물학적 활성을 제공하여 새로운 하나 이상의 인자 및/또는 다른자리입체성 효과(allosteric effect)를 생성하는 것을 의미한다.

[0097] [94] 본원에 사용된 것으로서, 예를 들면, ABx 독소와 같은 다량체성 독소와 관련하여 용어 "소단위" 및 "쇄"는 상호교환적으로 사용된다.

[0098] [95] 본 발명의 목적을 위해, 어구 "CD8+ T-세포 초-면역화 (hyper- immunized)"는, 분자가 살아있는 척색 동물(chordate) 내에서 핵화된, 척색 세포 내부에 존재하는 경우, CD8+ T-세포 항원성 또는 면역원성과 관련하여 증가된 항원성 및/또는 면역원성 잠재능을 가짐을 의미한다. 일반적으로, CD8+ T-세포 면역화 분자는 고유의 특징(들)으로 인하여 또는 세포-표적화된 분자의 성분으로서 핵화된 척색 세포의 조기 엔도조말 구획으로 세포 내재화할 수 있다.

[0099] [96] 본 발명의 목적을 위해, 어구 "B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 탈면역화"는 B-세포 항원성 또는 면역원성 및/또는 CD4+ T-세포 항원성 또는 면역원성과 관련하여 포유동물에게 투여 후 감소된 항원성 및/또는 면역원성 잠재능을 가짐을 의미한다.

[0100] [97] 본 발명의 목적을 위해, 용어 "프로테아좀 전달 작동체"는 프로테아좀 전달 작동체 분자의 프로테아좀 분해를 생성하는데 능숙한 소세포 구획에 세포내에 국한하는 생물학적 활성을 제공하는 분자를 의미한다. 일반적으로, 이러한 프로테아좀 전달 생물학적 활성은 조기 엔도조옴 구획내에서 효과기 분자를 전달하는 프로테아좀의 초기 세포 이하 위치(sub-cellular location)로부터 측정될 수 있으나; 이는 또한 조기에, 예를 들면, 세포내로 및 예를 들면, 이러한 세포내로의 세포내이입성 도입(endocytotic entry) 후와 같이, 세포의 엔도조말 구획을 통과함을 포함하는 세포외 출발 위치로부터, 조기에 측정될 수 있다. 달리는, 프로네아좀 전달 작동체 생물학적 활성은, 특정의 구체예에서, 작동체 폴리펩티드를 전달하는 프로테아좀이 내재화하여 이의 프로테아좀 분해를 생성하기에 능숙한 구획에 도달하기 전에 세포의 어떠한 엔도조말 구획을 통한 통과를 포함하지 않을 수 있다. 프로테아좀 전달 작동체 작용(들)을 제공하는 제공된 분자의 능력은, 숙련가가 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 검정할 수 있다.

[0101] [98] 본 발명의 폴리펩티드의 T-세포 항원결정기 또는 T-세포 항원결정기 펩티드 성분과 관련하여 용어 "이형"은, 변형될 폴리펩티드내에 초기에 발생되지 않았지만, 본원에 기술된 바와 같은 임베딩, 융합, 인서팅, 및/또는 아미노산 치환의 과정을 통해, 또는 어떠한 다른 가공 수단에 의해 첨가되는 것과 상관없이, 본 발명의 방법을 사용하여 폴리펩티드에 첨가된 항원결정기 또는 펩티드 서열을 말한다. 그 결과는 원래의 변형되지 않은 폴리펩티드에 대해 외부의 T-세포 항원결정기를 포함하는 변형된 폴리펩티드인데, 즉, T-세포 항원결정기는 원래의 폴리펩티드내에 존재하지 않았다.

[0102] [99] 폴리펩티드내 B-세포 항원결정기 또는 CD4+ T-세포 항원결정기와 관련하여 용어 "내인성"은 본 발명의 방법에 의해 변형되기 전에 폴리펩티드내에 이미 존재한 항원결정기를 말한다.

[0103] [100] 본원에 사용된 것으로서, 폴리펩티드 영역 또는 폴리펩티드내 특징과 관련하여 용어 "파괴된" 또는 "파괴" 또는 "파괴하는"은 영역내 적어도 하나의 아미노산의 변경 또는 특징을 구성하는 것을 말한다. 아미노산 변경은 예를 들면, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경하는 결실, 역전, 인서팅, 또는 치환과 같은 다양한 돌연변이를 포함한다. 아미노산 변경은 또한 예를 들면, 아미노산 작용 그룹내 하나 이상의 원자의 변경 또는 아미노산 작용 그룹에 대한 하나 이상의 원자의 첨가와 같은, 화학적 변화를 포함한다.

[0104] [101] 본 발명의 폴리펩티드의 T-세포 항원결정기 또는 T-세포 항원결정기 펩티드 성분과 관련하여 어구 "와 관

련하여" 또는 "와 관련된"은, T-세포 항원결정기 및 폴리펩티드가 공유결합 또는 비-공유결합성 연결과는 상관없이, 예를 들면, 폴리펩티드내에서 임베딩 또는 인서팅, 폴리펩티드에 대한 융합, 및/또는 폴리펩티드에 대한 화학적 접합과 같이, 서로 물리적으로 연결되어 있음을 의미한다.

[0105] [102] 청구된 발명과 관련하여 용어 "와 관련된"은 서로 관련된 2개의 분자 또는 서로 연합된 2개의 분자를 만드는 작용을 의미한다.

[0106] [103] 본 발명의 폴리펩티드의 T-세포 항원결정기 또는 T-세포 항원결정기 펩티드 성분과 관련하여, 용어 "임베딩된" 및 이의 문법적 변형은, 폴리펩티드 영역내 하나 이상의 아미노산이 상이한 아미노산으로 내부 대체되어 동일한 총 수의 아미노산 잔기를 공유하는 새로운 폴리펩티드 서열을 생성하는 것을 말한다. 따라서, 용어 임베딩된은 출발하는 폴리펩티드에 대한 어떠한 추가의 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드 성분의 어떠한 외부의, 말단 융합 또는 어떠한 추가의 아미노산 잔기의 어떠한 추가의 내부 인서팅을 포함하는 것이 아니라 존재하는 아미노산에 대한 치환만을 포함한다. 상기 내부 대체는 아미노산 잔기 치환에 의해 또는 일련의 치환, 결실, 인서팅, 및/또는 역전에 의해 단지 달성될 수 있다. 하나 이상의 아미노산의 인서팅이 사용된 경우, 동등한 수의 근접한 아미노산은 인서팅 옆에서 결실되어 임베딩된 T-세포 항원결정기를 생성하여야만 한다. 이는 대신 전체 T-세포 항원결정기의 길이와 동등한 첨가를 증가시키는 폴리펩티드 서열 길이를 말하는 본 발명의 폴리펩티드내 T-세포 항원결정기와 관련하여 용어 "인서팅된"의 사용과는 대조적이다. 인서팅은, 상기 인서팅에 근접하지 않은 폴리펩티드의 다른 영역이 결실되어 이후 최종의 폴리펩티드의 총 길이를 감소시키는 경우에 조차 앞서의 것을 포함한다.

[0107] *[104] 본 발명의 폴리펩티드의 T-세포 항원결정기 또는 T-세포 항원결정기 펩티드 성분과 관련하여, 용어 "융합된" 및 이의 문법적 변형은 원래의 것보다 더 큰 수의 아미노산 잔기를 갖는 새로운 폴리펩티드를 생성하기 위한 폴리펩티드의 아미노-말단 또는 카복시 말단에 4개, 5개, 6개 이상의 아미노산의 외부 첨가를 말한다. 융합된 T-세포 항원결정기는, 폴리펩티드의 다른 영역이 결실되어 최종 폴리펩티드의 총 길이를 감소시키는 경우에 조차 새로운 폴리펩티드가 예를 들면, 프로테아좀 전달 작동체 작용과 같이, 원래의 폴리펩티드의 작동체 작용을 보유하는 한, 아미노-말단 또는 카복시 말단에 4개, 5개, 6개 이상의 아미노산의 첨가를 포함한다.

[0108] [105] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "독소 작동체 폴리펩티드"는, 폴리펩티드가 기원하는 독소내에 존재하는 하나 이상의 생물학적 활성을 제공하기에 충분한 독소-기원 작동체 영역을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

[0109] [106] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "T-세포 항원결정기 전달"은, 분자가 세포내에 국한된 생물학적 활성을 T-세포 항원결정기 수반 폴리펩티드 영역의 프로테아좀 분해를 생성하는데 능숙한 소세포 구획에 제공함을 의미한다. 일반적으로, 이러한 프로테아좀 전달 생물학적 활성은 조기 엔도조말 구획내 T-세포 항원결정기 전달 분자의 초기 소세포 위치로부터 측정될 수 있지만; 이는 또한 예를 들면, 이러한 세포내로의 세포내이입성 도입 후와 같이, 예를 들면, 세포내로 및 세포의 엔도조말 구획을 통한 통과를 포함하는 세포외 출발 위치로부터 조기에 측정될 수 있다. 달리는, T-세포 항원결정기 전달 활성은, 특정 구체예에서, T-세포 항원결정기 전달 분자가 내재화되어 구획 성분에 도달함으로써 T-세포 항원결정기를 T-세포 항원결정기 펩티드내로의 분해를 위해 프로테아좀에 전달하기 전에 세포의 어떠한 엔도조말 구획을 통한 통과를 포함하지 않을 수 있다. 효과적인 T-세포 항원결정기 전달 작용은, T-세포 항원결정기 전달 분자가 내재화되는 세포의 세포 표면 상에서 전달된 T-세포 항원결정기의 MHC 제시(presentation)를 관찰함으로써 평가할 수 있다.

[0110] [107] 본원에 사용된 것으로서, 독소 작동체 작용 또는 활성은 특히 세포 내재화를 증진시키고, 엔도조옴 탈출(endosome escape)을 증진시키며, 소세포 구획에 대한 세포내 경로화(intracellular routing), 촉매 작용, 기질 결합을 지시하며, 세포의 세포자멸사(apoptosis), 사이토스타시스(cytostasis), 및 세포독성을 유도함을 포함할 수 있다.

[0111] [108] 본원에 사용된 것으로서, 독소-기원한 폴리펩티드 작동체 작용의 보유는 야생형 폴리펩티드 대조군과 비교하여, 적절한 정량적 검정을 재현하여 측정한 것으로서, 독소 효과기 작용 활성의 수준을 말한다. 예를 들면, 숙련가에게 공지된 다양한 검정을 사용하여 독소 작동체 폴리펩티드의 효소 활성 및/또는 세포내 경로화를 측정할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 효소적 폴리펩티드 작동체 독소 작용은, 이의 효소 활성이 동일한 조건하에서 동일한 검정에서 야생형 폴리펩티드에 대해 비교가능한 경우 보유된다.

[0112] [109] 세포독성 단백질의 세포독성 활성과 관련하여 용어 "선택적인 세포독성"은 표적화된 세포 집단과 표적화되지 않은 방관자 세포 집단(bystander cell population) 사이에 세포독성의 상대적인 수준을 말하며, 이는 표적화되지 않은 세포 집단에 대한 CD_{50} 보다 큰 표적화된 세포 유형에 대한 최대 세포독성 농도(CD_{50})의 1/2의 비

로서 나타내어 표적화된 세포 형의 세포 사멸의 우선권을 나타낸다.

[0113] 서론

[0114] [110] 본 발명은 T-세포 항원결정기 펩티드를 세포 표면 제시를 위해 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템으로 전달할 수 있는 폴리펩티드 및 세포-표적화 분자의 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법을 사용하에 제조된 예시적인 T-세포 항원결정기 전달 폴리펩티드를 제공하며, 이는 세포 표면 제시를 위해 이형의 T-세포 항원결정기를 표적 세포의 MHC 클래스 1 시스템으로 전달할 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여 생성된 폴리펩티드, 예를 들어, T-세포 항원결정기 전달 폴리펩티드 및 CD8+ T-세포 하이퍼-면역화 폴리펩티드는 다양한방법 및 조성물의 성분, 예를 들면, 세포독성 치료제, 치료학적 전달제, 및 진단 분자로서 이용될 수 있다.

[0115] [111] 또한, 본 발명은 B-세포 항원성 및/또는 면역원성을 동시에 감소시키면서, MHC 클래스 I 제시를 통해 T-세포 면역원성의 가능성을 증가시키기 위한 이형 T-세포 항원결정기를 폴리펩티드내 오버랩핑 위치(overlapping position)에 제공함으로서 폴리펩티드의 변이체를 생성하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법을 사용하여 제조된 예시적인 B-세포 항원결정기 탈면역화, T-세포 항원결정기 전달 폴리펩티드를 제공하며, 이는 세포 표면 제시를 위해 이형의 T-세포 항원결정기를 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템으로 전달할 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여 생성된 폴리펩티드, 예를 들어, B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 T-세포 항원결정기 전달 폴리펩티드, CD8+ T-세포 초-면역화 및 CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드는 다양한 분자 및 조성물의 성분, 예를 들면, 세포독성 치료제, 치료학적 전달제, 및 진단 분자로서 이용할 수 있다.

[0116] I. CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드의 일반적인 구조

[0117] [112] 본 발명은 다양한 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드 영역을 포함하는 폴리펩티드를, 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기를 포함하도록 가공함을 포함하며; 여기서 폴리펩티드의 진핵 세포의 조기 엔도조말 구획(early endosomal compartment)으로 전달 시, 상기 폴리펩티드는 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기를 분해 및 세포의 MHC 클래스 I 시스템내로 도입시키기 위한 프로테오좀에 전달하기에 충분한 소세포 구획으로 세포내에서 국재화할 수 있다. 특정의 구체예에서 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드는 어떠한 공급원으로부터도 올 수 있지만, 본 발명의 폴리펩티드는 천연적으로 존재하는 단백질 독소로부터 기원한 다양한 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드로부터 기원한다.

[0118] A. 하나 이상의 이형의, T-세포 항원결정기 및 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드를 포함하도록 가공된 폴리펩티드

[0119] [113] 본 발명은 하나 이상의 이형의 T-세포 항원결정기의 임베딩, 융합, 및/또는 인서팅을 통해 본 발명의 폴리펩티드내로 변형시키기 위한 출발점으로서 다양한 폴리펩티드의 용도를 고려한다. 이들 공급원 폴리펩티드는 프로테오좀 전달 작동체 능력을 나타내거나, 나타내는 것으로 예측되어야 한다.

[0120] [114] MHC 클래스 I 경로로 도입되는 펩티드 항원결정기의 우세한 공급원은 세포질 분자의 프로테오좀 분해로부터 생성된 폴리펩티드이다. 그러나, 바이러스 당단백질과 같은 ER-국재화된 분자 및 형질전환된 세포 당단백질은 또한 상이한 경로에 의해 MHC 클래스 I 시스템에 의해 나타날 수 있다. MHC 클래스 I 제시에 대한 이러한 변경 경로가 ER내에서 시작한다고 해도, 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 단백질 공급원은 MHC 클래스 I 분자 상에 펩티드를 로딩하기 위해 ER의 관강으로 TAP에 의해 수송되기 전에 프로테오좀에 의한 단백질분해성 프로세싱(processing)을 위해 세포질로 수송된다. 이러한 대안적 경로에 놓여있는 정확한 메카니즘은 명확하지 않지만 미스폴딩된(misfolded) 단백질, "결함이 있는 리보소옴 생성물", 및 언급된 것을 모사하는 구조를 검출하기 위한 ER-관련된 분해(ER-associated degradation: ERAD)-형 감시 시스템을 포함할 수 있다. 당해 ERAD-형 시스템은 특정의 폴리펩티드 및 단백질을 분해를 위해 세포질내에서 프로테오좀으로 수송할 수 있으며, 이는 세포질성 항원 펩티드의 생산을 생성할 수 있다. 또한, 다양한 독소의 세포내 경로에 있어서의 조사는, 세포질 또는 소포체에 도달하는 것이 T-세포 항원결정기를 MHC 클래스 I 경로로 전달하는데 충분함을 제안한다.

[0121] [115] 따라서, 세포질 및/또는 소포체로 국재화하고/하거나 이들 자체의 세포내 수송을 지시하는 것으로 알려져 있거나 발견된 폴리펩티드 및 단백질은 프로테오좀 전달 작용(들)을 나타내는 하나 이상의 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드 영역을 포함하는 것으로 예측된 클래스를 나타낸다. 예를 들면, 특정의 독소와 같은 특정의 단백질 및 폴리펩티드는 엔도조말 구획으로부터 세포질내로 탈출함으로써 라이소좀 분해를 피하는 능력을 나타낸다. 따라서, 엔도조말 구획을 탈출하여 세포질에 도달하는 것으로 알려져 있거나 발견된 폴리펩티드 및 단백질은 위에서 언급한 분자의 클래스내에 포함된다. 폴리펩티드 또는 단백질이 세포질 또는 ER에 대해 취하는 정확한 경로는 궁극적으로 프로테오좀으로의 접근을 허용하는 소세포 위치에 도달한다.

[0122] [116] 또한, 특정의 분자는 라이소좀으로 국재화된 후 세포의 프로테오좀에 도달할 수 있다. 예를 들면, 리스테리오리신과 같이 세포의 세포질내로 직접 도입된 외부 단백질 및 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)에 의해 분비된 다른 단백질은 MHC 클래스 I 경로에 도입되어 작동체 T-세포에 의한 인식을 위해 MHC 클래스 I 복합체내에 제시될 수 있다(참고: Villanueva M et al, J Immunol 155: 5227-33 (1995)). 또한, 파고리소좀 단백질분해(phagolysosome proteolysis)를 포함하는 리소좀 단백질분해는, 세포질내로 전좌되어 기본 ERAD 시스템으로부터 발달될 수 있는, 교차-제시로 불리는 과정에서 세포 표면 제시를 위한, MHC 클래스 I 경로로 들어갈 수 있다(참고: Gagnon E et al, Cell 1 10: 119-31 (2002)). 따라서, 라이소좀에 국재화하는 것으로 알려지거나 발견된 특정의 폴리펩티드 및 단백질은 프로테오좀 전달 작용(들)을 나타내는 프로테오좀 전달 작동체를 지닌 폴리펩티드에 대한 적합한 공급원일 수 있다.

[0123] [117] 조기 엔도조말 구획의 출발 위치로부터 세포의 세포질, ER, 및/또는 라이소좀 구획으로의 세포내적 경로에 대한 단백질성 분자의 능력은 당해 분야에 공지된 검정을 사용하여 숙련가에 의해 측정될 수 있다. 이후에, 예를 들면, 독소와 같은 공급원 폴리펩티드 또는 단백질의 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드 영역을 맵핑하여 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 숙련가가 분리할 수 있다.

[0124] 1. 독소로부터 유도된 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드

[0125] [118] 본 발명은 프로테오좀 전달 작동체 영역으로서 독소로부터 유도된 다양한 폴리펩티드의 용도를 고려한다. 많은 독소는 이들의 세포내 경로 거동에 대한 풍부한 지식으로 인하여 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드의 최적의 공급원을 나타낸다.

[0126] [119] 많은 천연적으로 존재하는 단백질성 독소는 엔도조말 탈출 및 역행하는 수송 경로를 통하는 것을 포함하는 척추동물 숙주 세포내 세포내 경로를 지시하기 위해 최적화된 고도로 진화된 구조를 갖는다.

[0127] [120] 다수의 독소가 일반적으로 공극 형성을 통해 엔도조옴 탈출 특성을 나타낸다(참고: Mandal M et al, Biochim Biophys Acta 1563 : 7-17 (2002)). 예를 들면, 디프테리아 독소 및 리신(ricin)과 같은 식물 II형 리보솜 불활성화 단백질은 엔도조옴으로부터 탈출할 수 있다(참고: Murphy S et al., *Biochim Biophys Acta* 1824: 34-43 (2006); Slominska-Wojewodzka M, Sandvig K, *Antibodies* 2: 236-269 (2013); Walsh M et al, *Virulence* 4: 774-84 (2013)). 라이소솜을 포함하는 엔도조말 구획은 예를 들면, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 소혈청 알부민, Alexa 488과 같은 형광단, 및 독소 유도된 폴리펩티드를 사용한 리포터 검정을 사용하는 것과 같이, 당해 분야에 공지된 검정을 사용하여 직접 측정하거나 정량화할 수 있다(참고: 예를 들면, Bartz R et al, *Biochem J* 435: 475-87 (2011); Gilabert-Oriol R et al, *Toxins* 6: 1644-66 (2014)).

[0128] [121] 많은 독소가 척추동물 숙주 세포내에서 이들 자체의 세포내 경로를 지시한다. 예를 들면, 많은 독소의 독소화 경로는 1) 독소의 숙주 세포내로의 세포 내재화, 2) 하나 이상의 소-세포 구획을 통한 독소의 세포내 경로화, 및 3) 숙주 인자 기질이 효소적으로 변형된 세포질에 대한 독소의 촉매 부위의 후속적인 국재화를 포함하는 다단계 공정으로서 기술될 수 있다. 예를 들어, 당해 공정은 탄저병 치사 인자, 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 백일해 독소, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소, 및 리신 및 시가 독소와 같은 II형 리보소옴 불활성화 단백질의 중독 경로(intoxication pathway)를 기술한다.

[0129] [122] 유사하게, 재조합 독소, 변형된 독소 구조, 및 독소로부터 유래한 가공된 폴리펩티드는 이들 동일한 특성을 보존할 수 있다. 예를 들어, 디프테리아 독소(DT), 탄저병 치사 인자(LF) 독소, 및 슈도모나스 외독소(A)(PE)로부터 유도된 가공된 재조합체 폴리펩티드는 세포외 공간으로부터 세포질로 폴리펩티드를 이동시키기 위한 전달 비히클로서 사용되어 왔다. 조기 엔도조말 구획으로부터 세포질 또는 ER까지의 세포내 경로에 대한 고유의 능력을 지닌 어떠한 단백질 독소도 변형을 위한 출발 성분으로서 또는 여기에서 보다 작은 프로테오좀 전달 작동체 영역을 맵핑하기 위한 공급원으로서, 본 발명의 목적을 위해 탐색될 수 있는 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드에 대한 공급원을 나타낸다.

[0130] [123] 진핵 세포를 표적화하는 많은 독소의 경우, 독성은 세포질내 기질(들)을 포함하는 효소 메카니즘의 결과이다(참고: 표 I). 이들 독소는 이들의 홀로독소 (holotoxin)의 효소적으로 활성인 폴리펩티드 영역을 세포질로 전달하는 능력을 지닌 독소 구조를 발달시켜왔다. 이들 독소의 효소 영역은 본 발명의 폴리펩티드를 생성시키기 위한 출발 성분으로서 사용될 수 있다.

[0131] 표 I. 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드의 예시적인 단백질 독소 공급원

단백질 독소	기질-소세포 위치
아브린	사르신-리신 루프-세포질
탄저병 치사 인자	MAPKK-세포질
Aspfl	사르신-리신 루프-세포질
보우가닌	사르신-리신 루프-세포질
브리오딘스	사르신-리신 루프-세포질
콜릭스 독소	이형삼량체 G 단백질-세포질
신나모민	사르신-리신 루프-세포질
클라우딘	사르신-리신 루프-세포질
씨. 디피실(C. difficile) TcdA	Ras GTPase-세포질
씨. 디피실 TcdA	Rho GTPase-세포질
씨. 퍼르프링겐스(C. perfringens) 이오타	Rho GTPase-세포질
디아틴스	사르신-리신 루프-세포질
디프테리아 독소	연장 인자-2(EF2)-세포질
에불린스	사르신-리신 루프-세포질
겔로딘	사르신-리신 루프-세포질
기간틴	사르신-리신 루프-세포질
열-분해성 내독소	이형삼량체성 G 단백질-세포질
옥수수 RIP	사르신-리신 루프-세포질
미토길린	사르신-리신 루프-세포질
니그린	사르신-리신 루프-세포질
백일해 독소	이형삼량체 G 단백질-세포질
PD-Ls	사르신-리신 루프-세포질
PAP	사르신-리신 루프-세포질
슈도모나스(Pseudomoas toxin)	연장 인자-2(EF2)-세포질
풀첼린(Pulchellin)	사르신-리신 루프-세포질
레스트릭토신	사르신-리신 루프-세포질
리신	사르닌-리신 루프-세포질
사포린	사르닌-리신 루프-세포질
사르신	사르닌-리신 루프-세포질
시가 독소	사르닌-리신 루프-세포질
서브틸라제 세포 독소	내형질성 차폐론-ER
트리초산틴	사르닌-리신 루프-세포질

[0132]

[0133] [124] 오버랩핑 구성원이 있는 2개의 독소 상과내 독소는 본 발명에서 사용하도록 매우 잘 처리된다: ABx 및 리보독소.

[0134] [125] ABx 독소는 진핵 세포로 도입하여 세포질로 경로화함으로써 이들의 분자 표적을 공격할 수 있다. 유사하게, 리보독소는 진핵 세포로 도입되어 세포질로 경로화할 수 있다. Abx 독소 및 리보독소 상과 둘다의 구성원은 본 발명에서 사용하기 위한 독소-유도된 폴리펩티드 및 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드를 확인하기에 적절한 공급원이다.

[0135] [126] 이원 독소로서 또한 언급되는, ABx 독소는 세균, 진균, 및 식물에서 발견된다. ABx 독소는 A 및 B 소단위로 언급된, 명백한 작용을 지닌 2개 이상의 폴리펩티드 쇄의 구조적 유기화를 공유하는 독소의 상과를 형성한다. x는 예를 들면, 디프테리아 독소에 대한 AB_1 및 시가 독소에 대한 AB_5와 같은, ABx 계열의 구성원의 홀로독소내 B 소단위를 나타낸다. AB5 독소 상과는 4개의 주요 구성원으로 구성된다: 콜릭스 독소(Ct 또는

Ctx), 백일해 독소(Ptx), 시가 독소(Stx), 및 서브틸라제 세포독소(SubAB). AB5 독소의 세포독성 메카니즘은 유독화된, 진핵세포성 숙주 세포내에서 이들의 A 소단위를 촉매성 A 소단위가, 이들의 효소성 기질이 다양한 숙주 세포 단백질을 제시할 때 작용하는 세포질 또는 ER로의 소세포 경로화를 포함한다(참고: 표 I).

[0136] [127] 디프테리아 독소는 진핵 세포 연장 인자(eukaryotic elongation factor-2: EF2)를 통해 단백질 합성을 파괴한다. 디프테리아 독소는 촉매 A 소단위 및 B 소단위로 이루어지며, 이는 인지질 이층 전좌 작동체 도메인 및 세포-표적화 결합 도메인을 함유한다. 이의 중독 과정 동안에, 디프테리아 독소는 아마도 엔도조말 탈출을 통해, 진핵 세포의 세포질에 대한 이들의 촉매 도메인을 세포내적으로 경로를 선정할 수 있다(참고: Murphy J, *Toxins* (Basel) 3 : 294-308 (201 1)). 당해 엔도조말 탈출 메카니즘은 예를 들면, 탄저병 치사 및 부종 인자와 같은 다른 독소와 공유될 수 있으며, 엔도조말 탈출의 일반적인 능력은 예를 들면, 특정의 씨. 디피실(*C. difficile*) 독소, 겔로닌, 리스테리오리신, PE, 리신, 및 사포린(참고: 예를 들면, Varkouhi A et al, J *Control Release* 151 : 220-8 (2010); Murphy J, *Toxins* (Basel) 3 : 294-308 (2011))을 포함하는 많은 다양한 독소에 의해 억제된다.

[0137] [128] 특히, 세포질에서 리보솜을 불활성화시키는 독소는 본 발명에서 사용하기 위한 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드를 확인하는데 유용하다. 이들 독소는 세포질 표적화 작동체 작용(들) 및 세포독성 리보독성 독소 작동체 작용(들)을 동시에 제공하는 폴리펩티드 영역을 포함한다.

[0138] [129] 특허청구된 본 발명과 관련하여, 어구 "리보독성 독소 작동체 폴리펩티드"는 천연적으로 존재하는 리보독소 및 합성 리보독소를 포함하는, 단백질로부터 유도된 폴리펩티드를 말하며, 이는 시험관내(*in vitro*)에서 리보소옴 불활성화, 시험관내 및/또는 생체내(*in vivo*)에서 단백질 합성 억제, 세포독성, 및/또는 사이토스타시스(cytostasis)를 유발할 수 있다. 일반적으로, 리보독성 독소 작동체 폴리펩티드는 사람 개입에 의해 변경되거나 가공된 천연적으로 존재하는 단백질 독소 또는 독소-유사 구조로부터 유도된다. 그러나, 예를 들면, 독소 또는 합성 폴리펩티드 속에 천연적으로 존재하지 않는 자연적으로 존재하는 효소적 도메인과 같은 다른 폴리펩티드는 본원에 사용된 것으로서 이러한 용어의 영역내에 있다(참고: 예를 들면, Newton D et al., *Blood* 97: 528-35 (2001); De Lorenzo C et al, FEBS Lett 581 : 296-300 (2007); De Lorenzo C, D'Alessio G, *Curr Pharm Biotechnol* 9: 210-4 (2008); Menzel C et al, Blood 1 1 1 : 3830-7 (2008)). 따라서, 리보독성 독소 작동체 폴리펩티드는, 리보독성이 증가되거나 감소된 합성 또는 가공된 단백질 작제물, 및/또는 비-천연의 특징을 가지도록 또한 변경된 천연적으로 존재하는 단백질로부터 유도될 수 있다.

[0139] [130] 리보독성 독소 작동체 폴리펩티드는 예를 들면, 조류, 세균, 진균, 식물, 및 동물과 같은 다양한 종족으로부터의 단백질의 리보독성 도메인으로부터 유도될 수 있다. 예를 들면, 다양한 리보독소로부터 유도된 폴리펩티드는 세포-형-특이적인 세포독성 치료제의 희망으로 화학적 접합 또는 재조합체 단백질 가공을 통해 면역글로불린 도메인 또는 수용체 리간드에 연결되거나 융합된다(참고: Pastan I et al, *Annu Rev Biochem* 61 : 331-54 (1992); Foss F et al, *Curr Top Microbiol Immunol* 234: 63-81 (1998); Olsnes *S, Toxicon* 44: 361-70 (2004); Pastan I, et al, *Nat Rev Cancer* 6: 559-65 (2006); Lacadena J et al, FEMS *Microbiol Rev* 31 : 212-37 (2007); de Virgilio M et al, *Toxins* 2: 2699-737 (201 1); Walsh M, *Virulence* 4: 774-84 (2013); Weidle U et al., 암 *Genomics Proteomics* 11 : 25-38 (2014)).

[0140] [131] 리보독성 독소 작동체 폴리펩티드는 단백질 리보독소의 리보소옴 불활성화 단백질(RIP) 상과의 구성원의 촉매 영역으로부터 유도될 수 있다(참고: de Virgilio M et al, Toxins 2: 2699-737 (2011); Lapadula W et al, PLoS ONE 8: e72825 (2013); Walsh M, Virulence 4: 774-84 (2013)). RIP는 흔히 부화학량론적 농도(sub-stoichiometric concentration)에서 진핵 및 원핵 세포 단백질 합성의 강력한 억제제인, 조류, 세균, 진균, 및 식물에서 발현된 리보독성 단백질이다(참고: Stirpe, F, Biochem J202: 279-80 (1982)). 다양한 RIP가 암을 치료하기 위한 치료제에서 사용하기 위한 독소 작동체 폴리펩티드 서열의 촉망되는 공급원으로 고려된다(참고: Pastan I, et al, Nat Rev 암 6: 559-65 (2006); Fracasso G et al, *Ribosome-inactivating Protein-containing conjugates for therapeutic use*, Toxic Plant Proteins 18, pp. 225-63 (Eds. Lord J, Hartley, M. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010); de Virgilio M et al, Toxins 2: 2699-737 (2011); Puri M et al., Drug Discov Today 17: 774-83 (2012); Walsh M, Virulence 4: 774-84 (2013)).

[0141] [132] 재조합체 세포독성 폴리펩티드에서 가장 일반적으로 사용된 리보독소는 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소 A, 리신, α사르신, 사포닌, 및 겔로닌을 포함한다(참고: Shapira A, Benhar I, *Toxins* 2: 2519-83 (2010); Yu C et al, 암 *Res* 69: 8987-95 (2009); Fuenmayor J, Montano R, *Cancers* 3: 3370-93 (2011); Weldon, *FEBS* J278: 4683-700 (2011); Carreras-Sangra N et al, *Protein Eng Des Sel* 25: 425-35 (2012);

Lyu M at al, *Methods Enzymol* 502: 167-214 (2012); Antignani, *Toxins* 5: 1486-502 (2013); Lin H et al, *Anti암 Agents Med Chem* 13: 1259-66 (2013); Polito L et al, *Toxins* 5: 1698-722 (2013); Walsh M, *Virulence* 4: 774-84 (2013)). 이들 리보독소는 일반적으로 리보소옴 불활성화 단백질(RIP)로서 일반적으로 분류되며 사르신-리신 루프(SRL) 또는 SRL에 결합하는 리보소옴 작용에 요구되는 단백질을 공격함으로써 진핵세포 리보소옴을 불활성화시키는 일반적인 세포독성 메카니즘을 공유한다.

[0142] [133] SRL 구조는 3개의 계통발생적 그룹, 고세균(Archea), 세균과 진핵생물류 사이에서 고도로 보존됨으로써, 원핵세포 및 진핵세포 리보소옴 둘 다가 SRL 리보소옴 구조를 공유하도록 한다(참고: Gutell R et al, *Nucleic acids Res* 21 : 3055-74 (1993); Szewczak A, Moore P, *J Mol Biol* 247: 81-98 (1995); Gluck A, Wool I, *J Mol Biol* 256: 838-48 (1996); Seggerson K, Moore P, *RNA* 4: 1203-15 (1998); Correll C et al, *J Mol Biol* 292: 275-87 (1999)). 다양한 고세균으로부터의 다양한 종의 SRL은 고도로 정밀한 결정 구조 전자 밀도 맵 상에 겹쳐질 수 있다(참고: Ban N et al, Science 11 : 905-20 (2000); Gabashvili I et al, *Cell* 100: 537-49 (2000)). SRL은 EF-Tu, EF-G, EF1, 및 EF2와 같은 연장 인자의 협동을 통해 전좌의 리보소옴 작용에 대해 필수적인 보존된 2차 구조를 형성하는 최대의 공통적으로 보존된 리보소옴 서열이다(참고: Voorhees R et al, *Science* 330: 835-8 (2010); Shi X et al, *J Mol Biol* 419: 125-38 (2012); Chen K et al., *PLoS One* 8: e66446 (2013)). SRL(사르신-리신 루프)는 진균 리보독소 사르신 및 식물형 II RIP 리신의 공유된 표적인 것에 이름을 따서 붙였다.

[0143] [134] RIP 상과는 리보소옴 전좌 작용을 파괴하는 RIP, 진균 리보독소, 및 세균 리보독소를 포함한다(참고: Table B; Brigotti M et al, Biochem J257: 723-7 (1989)). 아브린, 겔로닌, 리신, 및 사포린과 같은 대부분의 RIP는 리보소옴의 거대 rRNA의 공통적으로 보존된 특이적인 아데닌(예를 들면, 동물에서 A4324, 진균에서 A3027, 및 원핵 세포에서 A2660)을 비가역적으로 탈퓨린화한다. α-사르신과 같은 대부분의 진균 리보독소는 SRL내 특이적인 결합(예를 들면, 동물에서 G4325와 A4326, 진균에서 G3028와 A3029, 및 원핵 세포에서 G2661와 A2662 사이의 결합)을 비가역적으로 분해하여 리보소옴을 손상시킴으로써 단백질 합성을 촉매적으로 억제한다(참고: Martinez-Ruiz A et al, *Toxicon* 37: 1549-63 (1999); Lacadena J et al, *FEMS Microbiol Rev* 31 : 212-37 (2007); Tan Q et al, *J Biotechnol* 139: 156-62 (2009)). 세균 단백질 리보독소 Ct, DT, 및 PE는 리보소옴 작용을 촉매적으로 손상시킴으로써 단백질 합성을 억제하여 약간의 독소 분자만으로 세포사멸사를 효율적으로 유도할 수 있기 때문에 RIP 상과에 속한 것으로 분류된다.

[0144] [135] RIP는 하나의 공통적인 특징, 즉, 리보소옴 RNA(rRNA) N-글리코시다제 활성을 통해 리보소옴을 손상시킴으로써 시험관내에서 해독을 억제하는 능력에 의해 정의된다. 2013년도까지, 백여개에 걸친 RIP가 기술되어 왔다(참고: Walsh M, Virulence 4: 774-84 (2013)). 대부분의 RIP는 진핵 세포 및 원핵 세포 리보소옴의 거대 rRNA의 공통적으로 보존된 사르신/리신 루프(SRL)내에서 특이적인 아데닌 잔기를 탈퓨린화시킨다. RIP의 최대 분자 수는 다음 계열에서 발견되어 왔다: 카리오필라세아에 (Caryophyllaceae), 삼부카세아에(Sambucaceae), 쿠쿠르비타세아에 (Cucurbitaceae), 유포르비아세아에(Euphorbiaceae), 피톨라카세아에 (Phytolaccaceae), 및 포아세아에(Poaceae).

[0145] [136] RIP 계열의 구성원은 이들의 구조를 기준으로 적어도 3개의 클래스로 분류된다. I형 RIP, 예를 들어, 겔로닌, 루핀, PAP, 사포린 및 트리코산틴은 효소 도메인을 포함하고 관련된 표적화 도메인을 결여하고 있는 단량체성 단백질이다. II형 RIP, 예를 들어, 아브린, 리신, 시가 독소는 효소 A 소단위 및 ABx 독소의 대표적인 표적화 B 소단위(들)를 지닌 다중-소단위의, 이량체성 단백질이다(참고: Ho M, et al, Proc Natl Acad Sci USA 106: 20276-81 (2009)). III형 RIP, 예를 들어, 보리 JIP60 RIP 및 옥수수 b-32 RIP는 활성화를 위한 단백질분해 프로세싱을 필요로 하는 전구효소(proenzyme)로서 합성된다(참고: Peumans W et al, FASEB J 15: 1493-1506 (2001); Mak A et al., *Nucleic Acids Res* 35: 6259-67 (2007)).

[0146] [137] RIP 계열의 구성원들 사이에 서열 상동성이 낮다고 해도(< 50% 유사성), 이들의 촉매 영역은 겹쳐질 수 있는(superimposable) 보존된 3차 구조를 공유함으로써 리보소옴의 탈퓨린화에 관여된 주요 잔기가 확인될 수 있다(참고: de Virgilio M et al, *Toxins* 2: 2699-737 (201 1); Walsh M, *Virulence* 4: 774-84 (2013)). 예를 들어, 리신 및 시가 독소의 촉매 영역은, 이들의 A-쇄 소 단위의 18% 서열 유사성에도 불구하고 결정학적 데이타를 사용하여 겹쳐질 수 있다(참고: Fraser M et al, Nat Struct Biol 1 : 59-64 (1994)).

[0147] [138] 많은 효소 및 폴리펩티드 작동체 영역을 사용하여 예를 들면, 겔로닌, 사포린, 포크위드(pokeweed) 항바이러스 단백질(PAP), 브리오딘, 보우가닌, 모모르딘, 디안틴, 모모르코친, 트리초키린, 루핀, 레스트릭토신, 미토길린, 알파-사르신, Onconase®, 췌장 뉴클레아제, 박스(Bax), 호산구-유도된 신경독소, 및 안지오게닌과 같은

면역독소의 세포독성 성분을 생성하여 왔다(참고: Pasqualucci L et al, Haematologica 80: 546-56 (1995)).

[0148] [139] 이들 각각의 중독 공정 동안, 콜레라 독소, 리신, 및 시가 독소는 모두, 이들의 촉매 영역이 이후에 방출되어 세포질로 전좌되는 ER로 소세포 경로를 선정한다. 이들 독소는 숙주 세포의 폴딩되지 않은 단백질 기구 및 시그날에 대한 ERAD 시스템의 장점을 취하여 이들의 촉매 영역을 세포질내로 배출한다(참고: Spooner R, Lord J, Curr Top Microbiol Immunol 357: 190-40 (2012)).

[0149] [140] 특이적인 소-세포 구획으로 세포내적으로 경로를 선정하는 제공된 분자의 능력은 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 숙련가에 의해 평가될 수 있다. 이는 다음의 소-세포 구획: 세포질, ER, 및 라이소좀 중 어느 하나에 목적한 분자를 국재화할 수 있는 당해 분야의 일반적인 기술을 포함한다.

[0150] [141] 특허 청구된 발명과 관련하여, 어구 "세포질 표적화 독소 작동체 폴리펩티드"는 세포 내재화 후에 세포질로 세포내적으로 경로화할 수 있는, 천연적으로 존재하는 리보독소 및 합성 리보독소를 포함하는, 단백질로부터 유도된 폴리펩티드를 말한다. 일반적으로, 세포질성 표적화 독소 작동체 영역은 사람 개입에 의해 변경되거나 가공된 천연적으로 존재하는 단백질 독소 또는 독소-유사 구조로부터 유도되지만, 예를 들면, 컴퓨터 설계된 폴리펩티드와 같은 다른 폴리펩티드도 본원에 사용된 용어의 영역내에 있다(참고: 예를 들면, Newton D et al, Blood 97: 528-35 (2001); De Lorenzo C et al, FEBS Lett 581 : 296-300 (2007); De Lorenzo C, D'Alessio G, Curr Pharm Biotechnol 9: 210-4 (2008); Menzel C et al, Blood 1 11 : 3830-7 (2008)). 따라서, 세포질성 표적화 독소 작동체 영역은 리보독성이 증가되거나 감소된 합성 또는 가공된 단백질 작제물, 및/또는 비-천연 특징을 가지도록 또한 변경된 천연적으로 존재하는 단백질로부터 유도될 수 있다. 세포질 표적화 독소 작동체 작용(들)을 제공하는 제공된 분자의 능력은 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 숙련가에 의해 검정될 수 있다.

[0151] [142] 본 발명의 세포질성 표적화 독소 작동체 영역은 리보독성 독소 작동체 폴리펩티드로부터 유도되며 리보독성 독소 작동체 폴리펩티드와 흔히 오버랩되거나 이를 완전히 포함한다.

[0152] 2. 다른 폴리펩티드 영역 또는 비-단백질성 물질로부터 유도된 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드

[0153] [143] 독소-유도된 분자 외에, 다수의 단백질성 분자들이 존재하며, 이는 세포내에 국재화되고/되거나 이들 자체의 세포내 경로를 프로테오좀으로 전달하기에 적합한 세포질, ER, 또는 어떠한 다른 소세포 구획을 지시하는 고유의 능력을 갖는다. 이들 폴리펩티드 중 어느 것도, 고유의 소세포 국재화 작동체 작용이 보존되는 한, 본 발명에서 사용하기 위한 프로테오좀 전달 작동체 폴리펩티드내로 직접 사용될 수 있거나 유도체화될 수 있다.

[0154] [144] 예를 들면, 공극 형성, 지질 이층 융합, 및 양자 스폰지 효과(proton sponge effect)를 포함하는 다수의 메카니즘을 통해, 다수의 천연적으로 존재하는 단백질 및 폴리펩티드를 포함하는 다수의 분자가 세포내로 세포내이입된 후, 엔조조말 구획으로부터 탈출할 수 있음이 공지되어 있다(참고: 예를 들면, Varkouhi A et al, *J Control Release* 151 : 220-8 (2010)). 엔도조말 탈출 작용을 지닌 비-독소 유도된 분자의 비-제한적 예는: 헤모글루티닌 HA2와 같은 바이러스 제제; 사람 칼시토닌 유도된 펩티드, 소 프리온 단백질, 및 스위트 애로우 펩티드(sweet arrow peptide)와 같은 척추동물 유도된 폴리펩티드 및 펩티드; 합성 생물모사체 펩티드; 및 엔도조말 파괴 능력을 지닌 중합체(참고: 예를 들면, Varkouhi A et al, J Control Release 151 : 220-8 (2010))를 포함한다. 라이소자임을 포함하는, 엔도조말 구획으로부터의 탈출은 예를 들면, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 소 혈청 알부민, 형광단 유사 알렉사(Alexa) 488, 및 독소 유도된 폴리펩티드를 사용한 리포터 검정(reporter assay)을 사용하는 것과 같이, 당해 분야에 공지된 검정을 사용하여 직접 직접 측정하거나 정량화할 수 있다(참고: 예를 들면, Bartz R et al, *Biochem J* 435: 475-87 (2011); Gilabert-Oriol, R et al, 독소s 6: 1644-66 (2014)).

[0155] [145] 다른 예는 특이적인 세포내 구획에 국재화하는 분자이다. 소포체 보유/인출 시그날 모티프(retrieval signal motif)(예를 들면, KDEL(SEQ ID NO:61))를 포함하는 대부분의 폴리펩티드는 세포내에서 상이한 구획으로부터 진핵 세포의 ER에 국재화할 수 있다.

[0156] [146] 조기 엔도조말 구획의 출발 위치로부터 세포의 세포질, ER, 및/또는 라이소좀 구획으로의 세포내적으로 경로화하는 폴리펩티드의 능력은 당해 분야에 공지된 검정을 사용하여 숙련가에 의해 측정될 수 있다. 이후에, 예를 들면, 독소와 같은 공급원 폴리펩티드 또는 단백질의 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드 영역을 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 숙련가가 맵핑하여 분리할 수 있다.

[0157] 3. 하나 이상의 이형의, T-세포 항원결정기 및 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드를 포함하도록 가공된 폴리펩

티드

[0158] [147] 일단 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드가 수득되면, 이를 본 발명의 방법을 사용하여 본 발명의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드로 가공할 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여, 하나 이상의 T-세포 항원결정기를 임베딩하거나, 융합하거나, 예를 들면, 세포질로 경로화하는 독소 작동체 폴리펩티드(이는 리보독성 독소 작동체 폴리펩티드를 포함할 수 있다)와 같은, 어떠한 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드에도 인서팅하여, 본 발명의 폴리펩티드를 생성할 수 있으며, 이는 조기 엔도조말 구획으로부터 출발하여 T-세포 항원결정기를 MHC 클래스 I 경로 및 후속적인 MHC 클래스 I 제시를 위해 프로테아좀으로 전달할 수 있다.

[0159] [148] MHC 클래스 I 경로로 도입하기 위해 T-세포 항원결정기를 프로테아좀으로 전달하는 제공된 분자의 능력은 본원에 기술된 방법 및/또는 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 숙련가가 평가할 수 있다(참고: 하기 실시예). 유사하게, 조기 엔도좀 구획으로부터 프로테아좀으로 T-세포 항원결정기를 전달하는 제공된 분자의 능력은 본원에 기술된 방법 및/또는 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 숙련가가 평가할 수 있다.

[0160] [149] 세포의 표면에 제시를 위해 조기 엔도좀 구획으로부터 MHC 클래스 I 분자로 T-세포 항원결정기를 전달하는 제공된 분자의 능력은 본원에 기술된 방법 및/또는 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 숙련가가 평가할 수 있다(참고: 하기 실시예). 유사하게, 조기 엔도좀 구획으로부터 MHC 클래스 I 분자로 T-세포 항원결정기를 전달하는 제공된 분자의 능력은 본원에 기술된 방법 및/또는 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 숙련가가 평가할 수 있다.

[0161] [150] 본 발명의 방법을 사용하여 변형된 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드는 본 발명의 방법에 의한 변형 전 또는 후에 세포 내재화를 유도하거나 촉진할 수 있는데 요구되지 않는다. 본 발명의 세포-표적화 분자를 제조하기 위하여, 본 발명의 폴리펩티드를 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여, 숙련가에게 공지된 다른 성분에 연결시켜, 요구되는 세포-표적화 및/또는 세포 내재화 작용(들)을 제공할 수 있다.

[0162] B. 이형 T-세포 항원결정기

[0163] [151] 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화 분자는 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기를 각각 포함한다. T-세포 항원결정기는 항원에 의해 포함되고 펩티드 또는 선형 아미노산 서열에 의해 제시될 수 있다. 이형 T-세포 항원결정기는 본 발명의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드를 생성하기 위해 본 발명의 방법을 사용하여 변형된 출발하는 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드이다.

[0164] [152] 이형 T-세포 항원결정기 펩티드는 예를 들면, 공급원 폴리펩티드내에서 하나 이상의 아미노산 치환을 생성하고/하거나, 하나 이상의 아미노산을 공급원 폴리펩티드에 융합시키고/시키거나, 하나 이상의 아미노산을 공급원 폴리펩티드내로 인서팅하고/하거나, 펩티드를 공급원 폴리펩티드에 연결시키는 공정, 및/또는 전술한 공정들의 조합을 포함하는, 숙련가에게 공지된 다수의 방법을 통해 공급원 폴리펩티드내로 혼입시킬 수 있다. 당해 결과는 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기를 포함하는 공급원 폴리펩티드의 변형된 변이체이다.

[0165] [153] 어떠한 T-세포 항원결정기도 본 발명의 이형 T-세포 항원결정기로서 사용되는 것으로 고려되지만, 특정의 항원결정기를 바람직한 특징을 기준으로 선택할 수 있다. 하나의 목적은 CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드를 생성하는 것이며, 이는, 이형 T-세포 항원결정기가 고도로 면역원성이고 나타나는 경우 세포의 표면에서 MHC 클래스 I 분자와 복합되어 생체내에서 풍부한 면역 반응을 유발할 수 있음을 의미한다. 본 발명의 폴리펩티드의 특정 구체예에서, 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기는 CD8+ T-세포 항원결정기이다.

[0166] [154] T-세포 항원결정기는 단백질의 펩티드 성분 및 포유동물 면역 반응을 유발시킬 수 있는 것으로 이미 공지되어 있거나 밝혀진 단백질로부터 유도된 펩티드를 포함하는, 다수의 구성원으로부터 유도될 수 있다. T-세포 항원결정기는 다양한 천연적으로 존재하는 단백질로부터 생성되거나 기원할 수 있다. T-세포 항원결정기는 예를 들면, 미생물의 단백질과 같이, 포유동물에 대해 외부인 다양한 천연적으로 존재하는 단백질로부터 유도될 수 있다. 특히, 감염성 미생물은 공지된 항원성 및/또는 면역원성 특성 또는 소-영역 또는 항원결정기를 지닌 특정의 다수 단백질을 함유할 수 있다. T-세포 항원결정기는 악성 사람 세포에 의해 돌연변이된 사람 단백질 및/또는 비정상적으로 발현된 사람 단백질로부터 유도될 수 있다.

[0167] [155] T-세포 항원결정기는 펩티드, 단백질의 펩티드 성분, 및 단백질로부터 유도된 펩티드를 포함하는, 포유동물 면역 반응을 유발할 수 있는 것으로 이미 공지된 다수의 공급원 분자로부터 선택되거나 유도될 수 있다. 예를 들어, 포유동물 숙주를 지닌 세포내 병원체의 단백질은 T-세포 항원결정기에 대한 공급원이다. 잘 연구된 항원성 단백질 또는 펩티드와 같은, 바이러스, 세균, 진균, 및 단일-세포 진핵세포와 같은 다수의 세포내 병원체

가 존재한다. T-세포 항원결정기는 사람 바이러스 또는 예를 들면, 마이코박테리움과 같은 세균, 톡소플라스마(toxoplasmae)와 같은 진균, 및 트리파노좀과 같은 원생생물과 같은 사람 병원체로부터 선택되거나 확인될 수 있다.

[0168] [156] 예를 들면, 사람 바이러스로부터의 바이러스 단백질의 부터 많은 공지된 면역원성 바이러스 펩티드 성분이 존재한다. 다수의 사람 T-세포 항원결정기를 단백질 HA 당단백질 FE17, S 139/1, CH65, C05, 해마글루틴 1(HA1), 헤마글루티닌 2(HA2), 비구조 단백질 1 및 2(NS1 및 NS 2), 매트릭스 단백질 1 및 2(M1 및 M2), 핵단백질(NP), 뉴라미다제(NA)내 펩티드와 같은 인플루엔자 A 바이러스로부터의 단백질내 펩티드내 펩티드에 맵핑하여 왔으며, 이들 많은 펩티드는 생체외 검정(ex vivo assay)을 사용함에 의해서와 같이, 사람 면역 반응을 유발하는 것으로 입증되어 왔다(참고: 예를 들면, Assarsson E et al, *J Virol* 82: 12241-51 (2008); Alexander J et al, *Hum Immunol* 71 : 468-74 (2010); Wang M et al, *PLoS One* 5: e10533 (2010); Wu J et al., Clin Infect Dis 51 : 1184-91 (2010); Tan P et al, *Human Vaccin* 7: 402-9 (2011); Grant E et al, *Immunol Cell Biol* 91: 184-94 (2013); Terajima M et al, *Virol J* 10: 244 (2013)). 유사하게, 다수의 사람 T-세포 항원결정기를 단백질 pp65(UL83), UL128-131, 이미디어트-얼리(immediate-early) 1(IE-1; UL123), 당단백질 B, 외피 단백질과 같은, 사람 사이토메갈로바이러스(HCMV)로부터의 단백질의 펩티드 성분에 맵핑하여 왔으며, 많은 이들 펩티드는 생체외 검정을 사용함에 의해서와 같이, 사람 면역 반응을 유발하는 것으로 입증되어 왔다(참고: Schoppel K et al, *J Infect* Dis 175: 533-44 (1997); Elkington R et al, *J Virol* 77: 5226-40 (2003); Gibson L et al, *J Immunol* 172: 2256-64 (2004); Ryckman B et al, *J Virol* 82: 60-70 (2008); Sacre K et al, *J Virol* 82: 10143-52 (2008)).

[0169] [157] 어떠한 T-세포 항원결정기도 본 발명의 조성물 및 방법에 사용될 수 있지만, 특정의 T-세포 항원결정기가 이들의 공지된 및/또는 실험적으로 측정된 특성을 기준으로 바람직할 수 있다.

[0170] [158] 많은 종에서, MHC 유전자는 다중 MHC-I 분자 변이체를 암호화한다. MHC 클래스 I 단백질 다형체는 CD 8+ T-세포에 의한 항원-MHC 클래스 I 복합체 인식에 영향을 미칠 수 있으므로, 이형 T-세포 항원결정기를 특정의 MHC 클래스 I 다형성에 대한 지식 및/또는 상이한 유전형의 T-세포에 의해 인식될 특정의 항원-MHC 클래스 I 복합체의 능력을 기준으로 사용하여 선택할 수 있다.

[0171] [159] 면역원성, MHC 클래스 I 제한되고/되거나 특이적인 사람 백혈구 항원(HLA) 변이체(들)와 조화되는 것으로 공지된 잘 정의된 펩티드-항원결정기가 존재한다. 사람에 적용시키거나 사람 표적 세포에 포함시키기 위해, 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 HLA-클래스 I-제한된 항원결정기를 선택하거나 확인할 수 있다. 사람 MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩티드의 능력을 사용하여 T-세포 항원결정기의 면역원성 잠재능을 예측할 수 있다. 사람 MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩티드의 능력은 소프트웨어 도구(software tool)를 사용하여 점수매길 수 있다. T-세포 항원결정기는 특정의 사람 집단에서 보다 우세한 대립형질에 의해 암호화된 HLA 변이체의 펩티드 선택성을 기준으로 본 발명의 이형 T-세포 항원결정기 성분으로서 사용하기 위해 선택할 수 있다. 예를 들면, 사람 집단은 MHC 클래스 I 분자의 알파 쇄에 대해 다형성이며, 가변성 대립형질은 HLA 유전자에 의해 암호화된다. 특정의 T-세포 항원결정기는 예를 들면, HLA-A 대립형질 그룹 HLA-A2 및 HLA-A3에 의해 암호화된 일반적으로 존재하는 HLA 변이체와 같은, 특이적인 HLA 분자에 의해 보다 효율적으로 제시될 수 있다.

[0172] [160] 본 발명의 이형 T-세포 항원결정기로서 사용하기 위해 T-세포 항원결정기를 선택하는 경우, 예를 들면, 표적 세포내에서 다음의 인자: 프로테아좀, ERAAP/ERAP 1, 타파신, 및 TAPs 캔의 항원결정기 특이성과 같이, 항원결정기 생성에 영향을 미쳐 각각의 MHC 클래스 I 분자로 수송할 수 있는 MHC 클래스 I 분자에 의한 항원결정기 선택의 공정에서의 다수의 인자를 고려할 수 있다(참고: 예를 들면, Akram A, Inman R, *Clin Immunol* 143 : 99-1 15 (2012)).

[0173] [161] 본 발명의 이형 T-세포 항원결정기 성분으로서 사용하기 위해 T-세포 항원결정기를 선택하는 경우, 표적화될 세포-형 또는 세포 집단에 존재하는 MHC 클래스 I 분자와 가장 잘 조화하는 항원결정기-펩티드를 선택할 수 있다. 상이한 MHC 클래스 I 분자는 특수한 펩티드 서열에 대한 우선적인 결합을 나타내며, 특수한 펩티드-MHC 클래스 I 변이체 복합체가 작동체 T-세포의 TCR에 의해 특이적으로 인식된다. 숙련가는 MHC 클래스 I 분자 특이성 및 TCR 특이성에 대한 지식을 사용하여 본 발명에서 사용된 이형 T-세포 항원결정기의 선택을 최적화할 수 있다.

[0174] [162] 또한, MHC 클래스 I 제시에 대한 다수의 면역원성 T-세포 항원결정기는 동시에 T-세포 항원결정기의 표적화된 전달에 사용하기 위한 동일한 폴리펩티드 성분(들) 속에 임베딩될 수 있다.

[0175] C. 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역을 파괴하기 위해 임베딩되거나 인서팅된 하나 이상의 이형 T-세포 항원결정기를 포함하는 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드

[0176] [163] 치료제의 성분으로서 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드를 사용하는 매력에도 불구하고, 많은 폴리펩티드는 척추동물에 투여되는 경우 세포외 종내에서 면역원성이다. 단백질 치료제에서 원치않는 면역원성은 용량 및 반복된 투여를 제한하는 감소된 효능, 예측불가능한 약동학, 및 바람직하지 않는 면역 반응을 생성하여 왔다. 치료제를 탈-면역화하기 위한 노력에서, 한 가지 주요 시도(challenge)는 폴리펩티드 작동체 영역내 면역원성 항원결정기, 예를 들면, 이의 세포질성 표적화 영역내 면역원성 항원결정기를 사일런싱(silencing)시키거나 파괴하는 한편, 예를 들면, 프로테아좀 전달과 같은 바람직한 폴리펩티드 작동체 작용(들)은 유지하는 것이다. 또한, 이는 폴리펩티드 구조내에서 아미노산 치환에 의해 면역 항원결정기를 파괴하지만 세포 내재화, 프로세싱, 및 표적 세포에 의한 세포-표면 제시 후에 까지 면역 시스템에 의해 인식되지 않을 하나 이상의 T-세포 항원결정기를 동시에 가하는 동안 이의 작용을 보존하는 유의적인 시도이다. 이러한 시도를 해결하는 것은 본원에서 "CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화" 분자 또는 "T-세포 항원결정기 전달 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화" 분자로서 언급된-바람직하지 않은 B-세포 및 CD4+ T-세포 면역원성을 감소시키면서 바람직한 CD8+ T-세포 면역원성을 나타내는 폴리펩티드를 생성하는 것을 가능하도록 한다.

[0177] II. 본 발명의 T-세포 항원결정기 전달, CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드를 포함하는 세포-표적화된 분자의 일반적인 구조

[0178] [164] 본 발명의 폴리펩티드는 다수의 다른 폴리펩티드, 제제, 및 잔사(moiety)에 커플링되어 예를 들면, 본 발명의 세포독성, 세포-표적화 단백질과 같은, 세포-표적화된 분자를 생성한다. 세포독성 폴리펩티드 및 단백질은 본 발명의 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드를 포함하는 T-세포 항원결정기를 사용하고 예를 들면, 특이적인 세포형(들)에 물리적으로 커플링된 생물분자를 세포외적으로 표적화하는 고 친화성 결합을 나타낼 수 있는 결합 영역과 같은 세포-표적화 성분을 첨가하여 작제할 수 있다. 또한, 본 발명의 B-세포 항원결정기 탈면역화 폴리펩티드는, 독성이거나 무-독성인 것에 상관없이, 포유동물에게 투여하기위한 다수의 유동한 분자의 성분으로서 사용될 수 있다.

[0179] A. 이형 T-세포 항원결정기를 포함하는 프로테아좀 작동체 폴리펩티드를 포함하는 세포-표적화 분자

[0180] [165] 본 발명은 1) 세포-표적화 결합 영역 및 2) 이형 T-세포 항원결정기를 포함하는 본 발명의 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드를 각각 포함하는, 세포-표적화 분자를 포함한다.

[0181] 세포-표적화 잔사

[0182] [166] 본 발명의 특정의 분자는 세포외 표적 생물분자에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 세포-표적화 잔사에 연결된 본 발명의 T-세포 초-면역화 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드를 포함한다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 분자는 단일 폴리펩티드 또는 단백질을 포함함으로써 T-세포 초-면역화 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드 및 세포-표적화 결합 영역은 함께 융합되어 연속된 폴리펩티드 쇄 또는 세포-표적화 융합 단백질을 형성한다.

[0183] [167] 본 발명의 세포-표적화 분자의 세포-표적화 잔사는, 본 발명의 폴리펩티드에 연결되는 경우, 이들 특이적인 세포의 표면에서 분자 상호작용을 기준으로 특이적인 세포에 대해 매우 근접하에 세포-표적화 분자를 각각 가져올 수 있다. 세포-표적화 잔사는 세포-표면 표적에 결합하는 리간드 및 폴리펩티드를 포함한다.

[0184] [168] 한가지 유형의 세포-표적화 잔사는 단백질성 결합 영역이다. 본 발명의 세포-표적화 분자의 결합 영역은 세포외 표적 생물 분자에 선택적으로 및 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함한다. 결합 영역은, 합성 또는 천연적으로 존재하는 리간드 및 이의 유도체, 면역글로불린 유도된 도메인, 면역글로불린 도메인에 대한 대체물로서 합성적으로 가공된 스캐폴드(scaffold)와 상관없이, 리간드와 같은 하나 이상의 다양한 폴리펩티드 잔사를 포함할 수 있다. 본 발명의 세포-표적화 분자내 단백질성 결합 영역의 사용은 일본쇄, 세포-표적화 단백질인 세포-표적화 분자의 생성을 허용한다.

[0185] [169] 리간드, 모노클로날 항체, 가공된 항체 유도체, 및 항체에 대한 가공된 대체물과 같이, 이들의 결합 특징을 통해 특이적인 세포형에 폴리펩티드를 표적화하는데 유용한 당해 분야에 공지된 다수의 결합 영역이 존재한다.

[0186] [170] 하나의 특이적이지만, 제한되지 않는 국면에 따라서, 본 발명의 세포-표적화 분자의 결합 영역은 세포외 표적 생물 분자, 일반적으로 세포 표면 수용체에 대한 결합 작용성을 보유하는 천연적으로 존재하는 리간드 또

는 이의 유도체를 포함한다. 예를 들면, 당해 분야에 공지된 다양한 사이토킨, 성장 인자, 및 호르몬을 사용하여 본 발명의 세포-표적화 분자를 유사한 사이토킨 수용체, 성장 인자 수용체, 또는 호르몬 수용체를 발현하는 특이적인 세포형의 세포-표면에 표적화시킬 수 있다. 리간드의 특정의 비-제한적인 예(대체물의 명칭이 괄호안에 나타나 있다)는 B-세포 활성화 인자(BAFF, APRIL), 콜로니 자극 인자(CSF), 상피 성장 인자(EGF), 섬유모세포 성장 인자(FGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 인터페론, 인터루킨(예를 들면, IL-2, IL-6, 및 IL-23), 신경 성장 인자(NGF), 혈소판 기원 성장 인자, 형질전환 성장 인자(TGF), 및 종양 괴사 인자(TNF)를 포함한다.

[0187] [171] 특정의 다른 구체예에 따라서, 결합 영역은 세포외 표적 생물분자를 결합시킬 수 있는 합성 리간드를 포함한다. 하나의 비-제한적 예는 세포독성 T-림프구 항원 4(CTLA-4)에 대한 길항제이다.

[0188] [172] 하나의 특이적이지만, 비제한적인 국면에 따라서, 결합 영역은 면역글로불린-형 결합 영역을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 것으로서 용어 "면역글로불린-형 결합 영역"은 항원 또는 항원결정기와 같은, 하나 이상의 표적 생물분자에 결합할 수 있는 폴리펩티드 영역을 말한다. 결합 영역은 표적 분자에 결합하는 이들의 능력에 의해 작용적으로 정의될 수 있다. 면역글로불린-형 결합 영역은 항체 또는 항체-유사 구조로부터 일반적을 유도되지만; 다른 공급원으로부터의 대안적인 스캐폴드(scaffold)가 당해 용어의 영역내에 고려된다.

[0189] [173] 면역글로불린(Ig) 단백질은 Ig 도메인으로 공지된 구조적 도메인을 갖는다. Ig 도메인은, 길이가 약 70 내지 110개 아미노산 잔기의 범위이고, 전형적으로 7 내지 9개의 평행하지 않은 베타 쇄가 샌드위치-형 구조를 형성하는 2개의 베타 쉬트(sheet)내로 정렬된, 특징적인 Ig-폴드(fold)를 지닌다. Ig 폴드는 샌드위치의 내부 표면 상의 소수성 아미노산 상호작용 및 쇄내 시스테인 잔기들 사이의 고도로 보조된 이황화물 결합에 의해 안정화된다. Ig 도메인은 가변성(IgV 또는 V-세트)이거나, 불변이거나(IgC 또는 C-세트) 중간체(Igl 또는 I-세트)이다. 일부 Ig 도메인은 이들의 항원결정기에 대한 항체 결합의 특이성에 중요한 상보성 결정 영역(CDR)과 관련되어 있다. Ig-유사 도메인은 비-면역글로불린 단백질에서 또한 발견되며 단백질의 Ig 상과의 구성원으로서 이러한 기준으로 분류된다. HUGO 유전자 명명법 위원회(Gene Nomenclature Committee (HGNC))는 Ig-유사 도메인 함유 계열의 구성원의 목록을 제공한다.

[0190] [174] 면역글로불린-형 결합 영역은, 아미노산 서열이 천연의 항체 또는 비-면역글로불린 단백질의 Ig-형 도메인의 것으로부터, 예를 들면, 분자 가공 또는 라이브러리 스크리닝에 의한 선별에 의해 변화되어 온 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 폴리펩티드 서열일 수 있다. 면역글로불린-형 결합 영역의 생성시 재조합체 DNA 기술 및 시험관내 라이브러리 스크리닝의 관련성으로 인하여, 항체는 보다 작은 크기, 세포 도입, 또는 다른 치료학적 증진과 같은, 바람직한 특징을 수득하도록 재설계될 수 있다. 가능한 변이는 많으며 단지 하나의 아미노산의 변화로부터 예를 들면, 가변 영역의 완전한 재설계까지의 범위일 수 있다. 전형적으로, 가변 영역에서의 변화는 항원-결합 특징을 증진시키거나, 가변 영역 안전성을 증진시키거나, 면역원성 반응에 대한 잠재능을 감소시키기 위해 이루어질 것이다.

[0191] [175] 본 발명의 성분으로서 고려된 다수의 면역글로불린-형 결합 영역이 존재한다. 특정의 구체예에서, 면역글로불린-형 결합 영역은 세포외 표적 생물분자를 결합시킬 수 있는 항체 파라토프(paratope)와 같은, 면역글로불린 결합 영역으로부터 유도된다. 특정의 다른 구체예에서, 면역글로불린-형 결합 영역은 면역글로불린 도메인으로부터 기원하지 않지만 세포외 표적 생물분자에 대해 고-친화성 결합을 제공함으로써 면역글로불린 결합 영역과 같이 작용하는 가공된 폴리펩티드를 포함한다. 당해 가공된 폴리펩티드는 본 명세서에 기술된 바와 같이 면역글로불린으로부터의 상보성 결정 영역을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어진 폴리펩티드 스캐폴드(scaffold)를 선택적으로 포함할 수 있다.

[0192] [176] 폴리펩티드를 이들의 고-친화성 결합 특징을 통해 특이적인 세포-형에 대해 표적화시키는데 유용한 다수의 결합 영역이 선행 기술에 또한 존재한다. 특정의 구체예에서, 본 단백질의 결합 영역은 단일-도메인 항체 도메인(sdAb), 나노바디(nanobody), 낙타과(camelids)로부터 유도된 중쇄 항체 도메인(V_HH 단편), 2가 나노바디, 연골 어류로부터 유도된 중쇄 항체 도메인, 면역글로불린 신규 항원 수용체(IgNAR), VNAR 단편, 일본쇄 가변(scFv) 단편, 다량체화 scFv 단편(디아보디, 트리아보디, 테트라보디), 이특이적인 탄뎀 scFv 단편, 이황화물 안정화된 항체 가변(Fv) 단편, V_L, V_H, C_L 및 C_H1 도메인으로 이루어진 이황화물 안정화된 항원-결합(Fab) 단편, 2가 F(ab')2 단편, 중쇄 및 CHI 도메인으로 이루어진 Fd 단편, 일본쇄 FV-CH3 미니바디, 이특이적인 미니바디, 이량체성 CH2 도메인 단편(C_H2D), Fc 항원 결합 도메인(Fcab), 분리된 상보성 결정 영역 3(CDR3) 단편, 구속된 골격 영역 3, CDR3, 골격 영역 4(FR3-CDR3-FR4) 폴리펩티드, 소 모듈러 면역약제(SMIP) 도메인, 및 이의 파라토

프 및 결합 작용을 보유한 앞서의 어떠한 유전적으로 조작된 대응물을 포함하는 그룹으로부터 선택된다(참고: Saerens D et al, *Curr. Opin. Pharmacol* 8: 600-8 (2008); Dimitrov D, *MAbs* 1 : 26-8 (2009); Weiner L, *Cell* 148: 1081-4 (2012); Ahmad Z et al, *Clin Dev Immunol* 2012: 980250 (2012)).

[0193] [177] 특정의 다른 구체예에 따라서, 결합 영역은 고-친화성 및 표적 생물분자의 특이적인 결합과 같은 유사한 작용적 특성을 나타내는 면역글로불린 도메인에 대한 가공된, 대안의 스캐폴드를 포함하며, 보다 큰 안전성 또는 감소된 면역원성과 같은 증진된 특징의 가공을 가능하도록 한다. 본 발명의 세포-표적화 단백질의 특정의 구체예에서, 결합 영역은 가공된, 피브로넥션-유도된, 10^{th} 피브로넥틴 III형(10Fn3) 도메인(모노바디, AdNectins™, 또는 AdNexins™); 가공된 테나신-유도된, 테나신 III형 도메인(Centryns™); 폴리펩티드를 포함하는 가공된, 앤키린 반복 모티프(DARPins™); 가공된, 저-밀도 지단백질-수용체-유도된, A 도메인(LDLR-A)(Avimers™); 리포칼린(안티칼린); 가공된, 프로테아제 억제제-유도된 쿠니츠(Kunitz) 도메인; 가공된, 단백질-A-유도된, Z 도메인(Affibodies™); 가공된, 감마-B 결정-유도된 스캐폴드 또는 가공된, 우비퀴틴-유도된 스캐폴드(애필린); Sac7d-유도된 폴리펩티드(Nanoffitins® 또는 아피틴); 가공된, Fyn-유도된, SH2 도메인(Fynomers®); 미니단백질; C-형 렉틴-형 도메인 스캐폴드; 가공된 항체 모사체; 및 이의 결합 작용성을 보유하는 앞서의 어떠한 유전적으로 조작된 대응물을 포함하는 그룹으로부터 선택된다(참고: Worn A, Pluckthun A, *J Mol* Biol 305: 989-1010 (2001); Xu L et al, *Chem Biol* 9: 933-42 (2002); Wikman M et al, *Protein Eng* Des Sel 17: 455-62 (2004); Binz H et al, *Nat Biotechnol* 23 : 1257-68 (2005); Hey T et al, *Trends Biotechnol* 23 :514-522 (2005); Holliger P, Hudson P, *Nat Biotechnol* 23:1126-36 (2005); Gill D, Damle N, *Curr Opin Biotech* 17: 653-8 (2006); Koide A, Koide S, *Methods Mol Biol* 352: 95-109 (2007); Byla P et al, *J Biol Chem* 285: 12096 (2010); Zoller F et al, *Molecules* 16: 2467-85 (2011)).

[0194] [178] 상기 결합 영역 중의 어느 것도, 결합 영역 성분이 세포외 표적 생물분자에 대해, 리터당 10^{-5} 내지 10^{-12}몰, 바람직하게는 200 나노미터(nM) 미만의 해리 상수를 갖는 한 본 발명의 성분으로서 사용될 수 있다.

[0195] [179] 본 발명의 특정의 세포-표적화 분자는 세포외 표적 생물분자에 선택적으로 및 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 세포외 표적 생물분자 특이적인 결합 영역에 연결된 본 발명의 폴리펩티드를 포함한다. 세포외 표적 생물분자는 다수의 기준을 기준으로 선택될 수 있다.

[0196] 세포-표적화 잔사의 세포외 표적 생물분자

[0197] [180] 본 발명의 세포-표적화 분자의 특정 결합 영역은 암 세포, 종양 세포, 혈장 세포, 감염된 세포, 또는 세포내 병원체를 지닌 숙주 세포와 같은, 목적한 세포형에 물리적으로 커플링된, 세포외 표적 생물분자에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드 영역을 포함한다.

[0198] [181] 용어 "표적 생물분자"는 생물 분자, 일반적으로 단백질 또는 글리코실화와 같은, 해독-후 변형에 의해 변형된 단백질을 말하며, 이는 결합 영역에 의해 결합하여 단백질을 유기체내에서 특이적인 세포형 또는 위치에 표적화할 수 있다. 세포외 표적 생물분자는 변형되지 않은 폴리펩티드, 생화학적 작용 그룹의 첨가에 의해 변형된 폴리펩티드, 및 당지질에 의해 변형된 폴리펩티드를 포함하는 다양한 항원결정기를 포함할 수 있다(참고: 예를 들면, 미국 특허 제5,091,178호; EP 2431743). 세포외 표적 생물분자가 내생적으로 내부화되거나 본 발명의 세포-표적화된 분자와 상호작용시 용이하게 내재화되도록 되는 것이 바람직할 수 있다.

[0199] [182] 본 발명의 목적을 위해, 표적 생물분자를 변형시키는 것과 관련하여 용어 "세포외"는 세포외 환경에 노출시 이의 구조의 적어도 일부를 갖는 생물분자를 말한다. 세포외 표적 생물분자는 세포 막 성분, 전이막 스패닝 단백질, 세포 막-앵커된(anchored) 생물분자, 세포-표면-결합된 생물분자, 및 분비된 생물분자를 포함한다.

[0200] [183] 본 발명과 관련하여, 어구 "생리학적으로 커플링된"은, 표적 생물분자를 기술하는데 사용되는 경우, 표적 생물분자, 또는 이의 일부를 세포의 외부에 커플링시키는 공유결합성 및/또는 비-공유결합성 분자간 상호작용, 예를 들면, 각각의 단일 상호작용의 에너지가 약 1 내지 5 킬로칼로리의 순서인 표적 생물분자와 세포 사이의 다수의 비-공유결합성 상호작용(예를 들면, 정전기적 결합, 수소 결합, 반데르발스 상호작용(Van der Walls interaction), 소수성 작용, 등) 둘 다를 포함한다. 모든 필수적인 막 단백질은 세포막, 및 말초 막 단백질에 물리적으로 커플링되어 발견된다. 예를 들면, 세포외 표적 생물분자는 전이막 스패닝 영역, 지질 앵커, 당지질 앵커를 포함할 수 있고/있거나 앞서의 어느 하나를 포함하는 인자와 비-공유결합적으로 연합(예를 들면, 비-특이적인 소수성 상호작용 및/또는 지질 결합 상호작용을 통해)될 수 있다.

[0201] [184] 본 발명의 세포-표적화된 분자의 결합 영역은 특이적인 세포형과 관련하여 이들의 표적 생물분자의 세포-

형 특이적인 발현 및/또는 이들의 표적 생물분자의 물리적인 국재화와 같은, 다수의 기준을 기본으로 하여 설계되거나 선택될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 특정의 세포독성 단백질은 세포 표면에 대한 단지 하나의 세포-형에 의해 전적으로 발현된 세포-표면 표적에 결합할 수 있는 결합 도메인을 포함한다.

[0202] [185] 모든 핵화된 척추동물 세포는 MHC 클래스 I 시스템을 사용하여 세포내 펩티드 항원결정기를 제시할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 본 발명의 세포-표적화된 분자의 세포외 표적 생물분자는 원칙적으로 MHC 클래스 I 제시 경로내로의 T-세포 항원결정기 전달을 위한 어떠한 핵화된 척추동물 세포도 표적화할 수 있다.

[0203] [186] 본 발명의 세포-표적화된 분자의 결합 영역의 세포외 표적 생물분자는 암 세포, 면역 세포, 및 바이러스, 세균, 진균, 프리온, 또는 원생생물과 같은 세포내 병원체로 감염된 세포상에 과-비율적으로 또는 전적으로 존재하는 생물마커를 포함할 수 있다.

[0204] [187] 숙련가는, 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여, 본 발명의 T-세포 초- 면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드를 다양한 다른 분자에 연결시켜 세포에 물리적으로 커플링된 특이적인 세포외 표적 생물분자를 표적화하고 표적 세포 내재화를 증진시킬 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드는 예를 들면, 수용체 매개된 세포내이입과 같이 보다 용이하게 흡수된 세포-표면 수용체 표적화 분자에, 또는 예를 들면, 촉진된 클라트린 피복된 핏 어셈블리(promoting clathrin coated pit assembly), 인지질 층 변형, 및/또는 관 함입(tubular invagination)과 같이, 세포 표면에서의 메카니즘을 통해 세포 내재화를 증진시키는 분자에 연결시킬 수 있다.

[0205] KDEL 계열의 구성원의 소포체 보유/회수 시그날 모티프

[0206] [188] 본 발명의 목적을 위해, 어구 "소포체 보유/회수 시그날 모티프", " KDEL-형 시그날 모티프, 또는 시그날 모티프는 KDEL 수용체를 통해 단백질의 소포체로의 소세포 국재화를 증진시키기 위한 진핵 세포내에서 작용할 수 있는 KDEL 계열의 어떠한 구성원을 말한다.

[0207] [189] 카복시-말단 라이신-아스파라긴-글루타메이트-루이신(KDEL(SEQ ID NO:61)) 서열은 진핵 세포내에서 가용성 단백질에 대한 표준, 소포체 보유 및 회수 시그날 모티프이며 KDEL 수용체에 의해 인식된다(참고: 고찰을 위해, Capitani M, Sallese M, FEBS Lett 583: 3863-71 (2009)). 시그날 모티프의 KDEL 계열은 HDEL (SEQ ID NO:63), RDEL (SEQ ID NO:65), WDEL (SEQ ID NO:66), YDEL (SEQ ID NO:67), HEEL (SEQ ID NO:69), KEEL (SEQ ID NO:70), REEL (SEQ ID NO:71), KFEL (SEQ ID NO:74), KIEL (SEQ ID NO:86), DKEL (SEQ ID NO:87), KKEL (SEQ ID NO:90), HNEL (SEQ ID NO:94), HTEL (SEQ ID NO:95), KTEL (SEQ ID NO:96), 및 HVEL (SEQ ID NO:97)과 같은 많은 KDEL (SEQ ID NO:61로서 공개된 KDEL)-유사 모티프를 포함하며, 이들 모두는 다수의 계통발생적 세계 전체에서의 소포체의 관강에 체류하는 것으로 공지된 단백질의 카복시-말단에서 발견된다(참고: Munro S, Pelham H, Cell 48: 899-907 (1987); Raykhel I et al, J Cell Biol 179: 1193-204 (2007)). KDEL 시그날 모티프 계열은 합성 구조물을 사용하여 밝혀진 적어도 46개의 폴리펩티드 변이체를 포함한다(참고: Raykhel, J Cell Biol 179: 1193-204 (2007)). 추가의 KDEL 시그날 모티프는 ALEDEL (SEQ ID NO:107), HAEDEL (SEQ ID NO:108), HLEDEL (SEQ ID NO:109), KLEDEL (SEQ ID NO:110), IRSDEL (SEQ ID NO:111), ERSTEL (SEQ ID NO:112), 및 RPSTEL (SEQ ID NO:113)를 포함한다(참고: Alanen H et al, J Mol Biol 409: 291-7 (2011)). KDEL 시그날 모티프의 대부분을 제시하는 일반화된 컨센서스 모티프(consensus motif)는 [KRHQSA]-[DENQ]-E-L로 기술되어 왔다(참고: Hulo N et al, *Nucleic Acids Res* 34: D227-30 (2006)).

[0208] [190] KDEL 계열 시그날 모티프를 함유하는 단백질은 골지 복합체 전체에 분포된 KDEL 수용체에 의해 결합되어 소포체의 관강으로 방출하기 위한 다중튜브-의존성 메카니즘에 의해 소포체로 수송된다(참고: Griffiths G et al, *J Cell Biol* 127: 1557-74 (1994); Miesenbock G, Rothman J, *J Cell Biol* 129: 309-19 (1995)). KDEL 수용체는 골지 복합체와 소포체 사이에서 놀랄만하게 순환한다(참고: Jackson M et al, *EMBO J.* 9: 3153-62 (1990); Schutze M et al, *EMBO J.* 13: 1696-1705 (1994)).

[0209] [191] 본 발명의 목적을 위해, KDEL 계열의 구성원은 진핵 세포내에서 작용할 수 있는 합성 시그날 모티프를 포함함으로써 KDEL 수용체를 통해 단백질의 소포체로의 소세포 국재화를 촉진한다. 다시 말해서, KDEL 계열의 일부 구성원은 천연적으로 존재하지 않거나 천연에서 여전히 관측되지만 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 작제되거나 실험적으로 입증될 수 있다; 참고: 예를 들면, Raykhel I et al, *J Cell Biol* 179: 1193-204 (2007).

[0210] [192] 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화 분자의 특정의 구체예의 성분으로서, KDEL-형 시그날 모티프는 폴리펩티드 또는 세포-표적화 단백질내에 물리적으로 위치하거나, 배향되거나, 정렬됨으로써 이것은 카복시-말단 위에 존재하게 된다.

[0211] [193] 본 발명의 목적을 위해서, 특이적인 순서 또는 배향은 각각의 다른 또는 전체의, 세포-표적화, 융합 단백질의 N-말단(들) 및 C-말단(들)과 관련하여 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및 세포-표적화 결합 영역에 대해 고정되지 않는다(참고: 예를 들면, 도 1).

[0212] [194] 본 발명의 세포-표적화 분자의 일반적인 구조는, 여러가지 다양한 세포-표적화 결합 영역이 다양한 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드와 함께 사용되어 세포독성, 사이토스타시스, 및/또는 여러가지 다양한 세포형으로 외인성 물질 전달을 표적화하기 위해 제공될 수 있다는 점에서, 모듈러식(modular)이다. T-세포 항원결정기 제시를 생성하지 않고/않거나 부적절한 소세포 경로화에 기인한 세포독성이 아닌 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드가 여전히 예를 들면 T-세포 항원결정기 또는 항원과 같은, 세포내로 외인성 물질을 전달하기 위한 세포 표적화된 분자의 성분으로서 유동할 수 있다.

[0213] III. 본 발명의 폴리펩티드 성분 및/또는 이들의 소성분을 연결하는 연결

[0214] [195] 본 발명의 개개의 세포-표적화 잔사, 폴리펩티드, 및/또는 단백질 성분, 예를 들어, 세포-표적화 결합 영역 및 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드는 당해 분야에 잘 공지되고/되거나 본원에 기술된 하나 이상의 링커를 통해 서로 적합하게 연결될 수 있다. 결합 영역, 예를 들면, 중쇄 가변 영역(V_H), 경쇄 가변 영역(V_L), CDR, 및/또는 ABR 영역의 개개 폴리펩티드 소성분은 당해 분야에 잘 공지되고/되거나 본원에 기술된 하나 이상의 링커를 통해 서로 적합하게 연결될 수 있다(참고: 예를 들면, Weisser N, Hall *J, Biotechnol Adv* il: 502-20 (2009); Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-69 (2013)). 본 발명의 단백질 성분, 예를 들어, 다중-쇄 결합 영역은 당해 분야에 잘 공지된 하나 이상의 링커를 통해 본 발명의 다른 폴리펩티드에 또는 서로 적합하게 연결될 수 있다. 본 발명의 펩티드 성분, 예를 들면, KDEL 계열 소포체 보유/회수 시그날 모티프는 당해 분야에 잘 공지된, 단백질성 링커와 같은 하나 이상의 링커를 통해 본 발명의 다른 성분에 적합하게 연결될 수 있다.

[0215] [196] 적합한 링커는 일반적으로 본 발명의 각각의 폴리펩티드 성분이 어떠한 링커 또는 다른 성분 없이 개별적으로 생산된 폴리펩티드 성분과 배우 유사한 3차원 구조로 폴딩하도록 하는 것들이다. 적합한 링커는, 측쇄되거나 환형인 것에 상관없이, 단일 아미노산, 펩티드, 폴리펩티드, 및 다양한 비-단백질성 탄소 쇄와 같은 전술된 어느 것도 결여한 링커를 포함한다(참고: 예를 들면, Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-69 (2013)).

[0216] [197] 적합한 링커는 단백질성일 수 있으며 하나 이상의 아미노산, 펩티드, 및/또는 폴리펩티드를 포함한다. 단백질성 링커는 재조합체 융합 단백질 및 화학적으로 연결된 접합체 둘 다에 적합하다. 단백질성 링커는 전형적으로, 예를 들면, 약 5 내지 약 30개 또는 약 6 내지 약 25개의 아미노산 잔기와 같은, 약 2 내지 약 50개 아미노산 잔기를 갖는다. 선택된 링커의 길이는 예를 들면, 이에 대해 링커가 선택되는 바람직한 특성 또는 특성들과 같은, 다양한 인자에 의존할 것이다(참고: 예를 들면, Chen X et al, *Adv Drug Deliv* Rev 65: 1357-69 (2013)).

[0217] [198] 적합한 링커는 예를 들면, 화학적 링커(참고: 예를 들면, Dosio F et al, *Toxins* 3: 848-83 (2011); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013))와 같은 비-단백질성일 수 있다. 당해 분야에 공지된 다양한 비-단백질성 링커는 세포-표적화 잔사를 면역글로불린-유도된 폴리펩티드를 이형 폴리펩티드에 접합시키는데 일반적으로 사용된 링커와 같은, CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 성분에 연결하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 영역은 예를 들면, 카복시, 아민, 설프하이드릴, 카복실산, 카보닐, 하이드록실, 및/또는 사이클릭 환 그룹과 같은 이들의 아미노산 잔기 또는 탄수화물 잔사의 작용성 측쇄를 사용하여 연결될 수 있다. 예를 들어, 이황화물 결합 및 티오에테르 결합을 사용하여 2개 이상의 폴리펩티드를 연결시킬 수 있다(참고: 예를 들면, Fitzgerald D et al, *Bioconjugate Chem* 1 : 264-8 (1990); Pasqualucci L et al, *Haematologica* 80: 546-56 (1995)). 또한, 비-천연 아미노산 잔기를 케톤 그룹(참고: 예를 들면, Sun S et al, *Chembiochem Jul* 18 (2014); Tian F et al, *Proc Natl Acad Sci* USA 111: 1766-71 (2014))과 같은, 다른 작용성 측쇄와 함께 사용할 수 있다. 비-단백질성 화학적 링커의 예는 N-석신이미딜(4-요도아세틸)-아미노벤조에이트, S-(N-석신이미딜)티오아세테이트(SATA), N-석신이미딜-옥시카보닐-쿠-메틸-a-(2-피리딜디티오)톨루엔(SMPT), N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-펜타노에이트(SPP), 석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산 카복실레이트(SMCC 또는 MCC), 설포석신이미딜(4-요오도아세틸)-아미노벤조에이트, 4-석신이미딜-옥시카보닐-a-(2-피리딜디티오)톨루엔, 설포석신이미딜-6-(a-메틸-a-(피리딜디티오)-톨루아미도)헥사노에이트, N-석신이미딜-3-(-2-피리딜디티오)-프로피오네이트(SPDP), 석신이미딜 6(3(-(-2-피리딜디티오)-프로피온아미도)헥사노에이트, 설포석신이미딜 6(3(-(-2-피리딜디티오)-프로피온아미도)헥사노에이트, 말레이미도카

프로일(MC), 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카보닐(MC-vc-PAB), 3-말레이미도벤조산 N-하이드록시석신이미드 에스테르(MBS), 알파-알킬 유도체, 설포NHS-ATMBA(설포석신이미딜 N-[3-(아세틸티오)-3-메틸부티릴-베타-알라닌]), 설포디클로로페놀, 2-이미노티올란, 3-(2-피리딜디티오)-프로피오닐 하이드라지드, 엘만스 시약(Ellman's reagent), 디클로로트리아진산, 및 S-(2-티오피리딜)-L-시스테인을 포함하나, 이에 한정되지 않는다(참고: 예를 들면, Thorpe P et al, *Eur J Biochem* 147: 197-206 (1985); Thorpe P et al, *Cancer Res* 47: 5924-31 (1987); Thorpe P et al, *Cancer Res* 48: 6396-403 (1988); Grossbard M et al., *Blood* 79: 576-85 (1992); Lui C et al, *Proc Natl Acad Sci* USA 93: 8618-23 (1996); Doronina S et al, *Nat Biotechnol* 21: 778-84 (2003); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)).

[0218] [199] 적합한 링커는, 단백질성 또는 비-단백질성에 상관없이, 예를 들면, 프로테아제 민감성, 환경 산화환원 전위 민감성, pH 민감성, 산 분해가능한, 광분해가능한, 및/또는 열 민감성 링커를 포함할 수 있다(참고: 예를 들면, Dosio F et al, *Toxins* 3 : 848-83 (2011); Chen X et al., *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-69 (2013); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)).

[0219] [200] 단백질성 링커는 본 발명의 재조합체 융합 세포-표적화된 분자내로의 혼입을 위해 선택될 수 있다. 본 발명의 재조합체 융합 세포-표적화된 단백질의 경우, 링커는 전형적으로 약 2 내지 50개 아미노산 잔기, 바람직하게는 약 5 내지 30개의 아미노산 잔기를 포함한다(참고: Argos P, *J Mol Biol* 211 : 943-58 (1990); Williamson M, *Biochem J* 297: 240-60 (1994); George R, Heringa J, *Protein Eng* 15: 871-9 (2002); Kreitman R, *AAPS J* 8 E532-51 (2006)). 일반적으로, 단백질성 링커는 예를 들면, 트레오닌, 프롤린, 글루타민, 글리신, 및 알라닌과 같은, 극성의, 하전되지 않은 및/또는 하전된 잔기를 지닌 아미노산 잔기의 대부분을 포함한다(참고: 예를 들면, Huston J et al. *Proc Natl Acad Sci* U.S.A. 85: 5879-83 (1988); Pastan I et al, *Annu Rev Med* 58: 221-37 (2007); Li J et al, *Cell Immunol* 118: 85-99 (1989); Cumber A et al. *Bioconj Chem* 3: 397-401 (1992); Friedman P et al, *Cancer Res* 53: 334-9 (1993); Whitlow M et al, *Protein Engineering* 6: 989-95 (1993); Siegall C et al, *J Immunol* 152: 2377-84 (1994); Newton et al. *Biochemistry* 35: 545-53 (1996); Ladurner et al. *J Mol Biol* 273: 330-7 (1997); Kreitman R et al, *Leuk Lymphoma* 52: 82-6 (2011); 미국 특허 제4,894,443호). 단백질성 링커의 비-제한적 예는 알라닌-세린-글리신-글리신-프롤린-글루타메이트(ASGGPE(SEQ ID NO:114)), 발린-메티오닌(VM), 알라닌-메티오닌(AM), AM(G2 내지 4S)XAM(여기서, G는 글리신이고, S는 세린이며, x는 1 내지 10의 정수이다(SEQ ID NO:115)을 포함한다.

[0220] [201] 단백질성 링커는 바람직한 특성을 기준으로 선택될 수 있다. 단백질성 링커는, 예를 들면, 동일한 도메인 자체의 활성과 비교하여 융합 작제물과 관련한 융합 분자의 폴딩, 안전성, 발현, 가용성, 약동학적 특성, 약력학적 특성, 및/또는 융합된 도메인의 활성 중 하나 이상을 최적화하기 위해, 구체적인 특징을 기억하는 숙련가에 의해 선택될 수 있다. 예를 들면, 단백질성 링커는 굴곡성, 강성, 및/또는 분해능을 기준으로 선택될 수 있다(참고: 예를 들면, Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-69 (2013)). 숙련가는 링커를 선택하는 경우 데이타베이스 및 링커 설계 소프트웨어 도구를 사용할 수 있다. 특정의 링커를 선택하여 발현을 최적화할 수 있다(참고: 예를 들면, Turner D et al, *J Immunl Methods* 205: 43-54 (1997)). 특정의 링커를 선택하여 동일한 폴리펩티드 또는 단백질 사이의 분자간 상호작용을 촉진함으로써 동종다량체를 형성하거나 상이한 폴리펩티드 또는 단백질 사이의 분자간 상호작용을 촉진시켜 이형다량체(heteromultimer)를 형성할 수 있다. 예를 들면, 형성 이량체 및 다른 보다 고차원의 다량체와 관련된 상호작용과 같은, 본 발명의 세포-표적화 단백질의 폴리펩티드 성분들 사이의 바람직한 비-공유결합성 상호작용을 허용하는 단백질성 링커를 선택할 수 있다(참고: 예를 들면, 미국 특허 제4,946,778호).

[0221] *[202] 굴곡성 단백질성 링커는, 길이가 흔히 12개 아미노산 잔기 이상이고 예를 들면, 글리신, 세린, 및 트레오닌과 같은 작은, 비-극성 아미노산 잔기, 극성 아미노산 잔기, 및/또는 친수성 아미노산 잔기가 풍부하다(참고: 예를 들면, Bird R et al, *Science* 242: 423-6 (1988); Friedman P et al, *Cancer Res* 53: 334-9 (1993); Siegall C et al, *J Immunol* 152: 2377-84 (1994)). 굴곡성 단백질성 링커를 선택하여 성분들 사이의 공간 분리를 증가시키고/시키거나 성분들 사이의 분자간 상호작용을 허용할 수 있다. 예를 들어, 다양한 "GS" 링커는 기술자에게 공지되어 있으며 다수의 글리신 및/또는 하나 이상의 세린의, 때때로 예를 들면, (GxS)n(SEQ ID NO:116), (SxG)n(SEQ ID NO:117), (GGGGS)n(SEQ ID NO:118), 및 (G)n(SEQ ID NO:119)(여기서, x는 1 내지 6이고 n은 1 내지 30이다)(참고: 예를 들면, WO 96/06641)와 같은, 반복 단위로 구성된다. 굴곡성 단백질성 링커의 비-제한적 예는 GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:120), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:121), GSTSGSGKSSEGSGSTKG (SEQ ID NO:122), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:123), EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO:124), SRSSG (SEQ ID NO:125), 및 SGSSC (SEQ ID NO:126)를 포함한다.

[0222] [203] 강직성 단백질성 링커는 흔히 뻣뻣한 알파-나선형 구조이며 프롤린 잔기 및/또는 하나 이상의 전략적으로 위치한 프롤린이 풍부하다(참고: Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-69 (2013)). 강직성 링커는 연결된 성분들 사이에 분자간 상호작용을 방지하도록 선택될 수 있다.

[0223] [204] 적합한 링커를 선택하여, 예를 들면, 절단 및/또는 환경-특이적인 불안전성에 기인한 것과 같은 성분의 생체내 분리를 허용할 수 있다(참고: Dosio F et al, *Toxins* 3: 848-83 (2011); Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-69 (2013)). 생체내 절단가능한 단백질성 링커는 유기체내 또는 특정의 세포 유형 내부에서 흔히 단백질분해성 프로세싱 및/또는 환원 환경에 의해 연결되지 않을 수 있다(참고: 예를 들면, Doronina S et al, *Bioconjug Chem* 17: 144-24 (2006); Erickson H et al, 암 *Res* 66: 4426-33 (2006)). 생체내 분해가능한 단백질성 링커는 흔히 하나 이상의 시스테인 쌍에 의해 형성된 프로테아제 민감성 모티프 및/또는 이황화물 결합을 포함한다(참고: 예를 들면, Pietersz G et al., *Cancer Res* 48: 4469-76 (1998); The J et al, *J Immunol Methods* 1 10: 101-9 (1998); 참고: Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-69 (2013)). 생체내 절단가능한 단백질성 링커를 설계하여 유기체내 특정의 위치, 세포내 구획에서만 존재하는 프로테아제에 대해 민감성이 되도록 하고/하거나 특정의 생리학적 또는 병리학적 조건(예를 들면, 비정상적으로 높은 수준의 프로테아제, 특정의 질병 부위에서 과발현된 프로테아제, 및 병원성 미생물에 의해 특이적으로 발현된 프로테아제)하에서만 활성이 되도록 할 수 있다. 예를 들면, 세포내적으로만 존재하는 프로테아제, 특이적인 세포형내에서만 존재하는 프로테아제, 및 예를 들면, R-x-x-R 모티프 및 AMGRSGGGCAGNRVGSSLSCGGLNLQAM(SEQ ID NO:127)과 같은 암 또는 염증과 유사한 병리학적 상태하에서만 존재하는 프로테아제에 의해 절단된 당해 분야에 공지된 단백질성 링커가 존재한다.

[0224] [205] 본 발명의 세포-표적화 분자의 특정의 구체예에서, 하나 이상의 프로테아제 민감성 부위를 포함하는 링커를 사용하여 표적 세포내에서 존재하는 프로테아제에 의한 절단을 제공할 수 있다. 본 발명의 세포-표적화 분자의 특정의 구체예에서, 척추동물 유기체에 투여된 후 원치않는 독성을 감소시키기 위해 절단되지 않는 링커를 사용할 수 있다.

[0225] [206] 적합한 링커는, 단백질성 또는 비-단백질성에 상관없이, 예를 들면, 프로테아제 민감성, 환경 산화환원 전위 민감성, pH 민감성, 산 분해성, 광분해성, 및/또는 열 민감성 링커를 포함할 수 있다(참고: Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-69 (2013)).

[0226] [207] 적합한 절단가능한 링커는 예를 들면, 문헌(참고: Zarling D et al, *J* Immunol 124: 913-20 (1980); Jung S, Moroi M, *Biochem Biophys Acta* 761 : 152-62 (1983); Bouizar Z et al, *Eur J Biochem* 155: 141-7 (1986); Park L et al, *J Biol Chem* 261: 205-10 (1986); Browning J, *Ribolini A, J Immunol* 143: 1859-67 (1989); Joshi S, Burrows R, *J Biol Chem* 265: 14518-25 (1990))과 같은 당해 분야에 공지된 절단가능한 그룹을 포함하는 링커를 포함할 수 있다.

[0227] [208] 적합한 링커는 pH 민감성 링커를 포함할 수 있다. 예를 들면, 특정의 적합한 링커는 보다 낮은 pH 환경에서 이들의 불안전성에 대해 선택되어 표적 세포의 소세포 구획내에서 해리를 위해 제공될 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 트리틸 그룹, 유도체화된 트리틸 그룹, 비스말레이미데옥톡시 프로판 그룹, 아디프산 디하이드라지드 그룹 및/또는 산 불안전성 트랜스페린 그룹을 포함하는 링커가 본 발명의 세포-표적화된 분자, 예를 들면, 특이적인 pH 범위를 지닌 환경 속에서 폴리펩티드 성분의 방출을 위해 제공될 수 있다(참고: 예를 들면, Welhoner H et al, *J Biol Chem* 266: 4309-14 (1991); Fattom A et al, *Infect Immun* 60: 584-9 (1992)). 예를 들면, 종양 조직의 pH가 건강한 조직의 pH보다 낮는 것과 같이, 조직 사이의 생리학적 pH 차이에 상응하는 pH 범위내에서 분해되는 특정의 링커를 선택할 수 있다(참고: 예를 들면, 미국 특허 제5,612,474호).

[0228] [209] 광분해가능한 링커는 가시적인 범위에서의 광과 같이, 특정의 파장의 전자기 조사에 노출시 분해되는 링커이다(참고: 예를 들면, Goldmacher V et al, *Bioconj Chem* 3: 104-7 (1992)). 광분해가능한 링커를 사용하여 특정 파장의 광에 노출시, 본 발명의 세포-표적화된 분자의 성분, 예를 들면, 폴리펩티드 성분을 방출할 수 있다. 광분해가능한 링커의 비-제한적인 예는 시스테인의 경우 광분해가능한 보호성 그룹과 같은 니트로벤질 그룹, 니트로벤질옥시카보닐 클로라이드 교차-링커, 하이드록시프로필메타크릴아미드 공중합체, 글리신 공중합체, 플루오레세인 공중합체, 및 메틸로다민 공중합체를 포함한다(참고: Hazum E et al, *Pept Proc Eur Pept Symp*, 16th, Brunfeldt K, ed., 105-110 (1981); Senter et al, *Photochem Photobiol* 42: 231-7 (1985); Yen et al, *Makromol Chem* 190: 69-82 (1989); Goldmacher V et al, *Bioconj Chem* 3: 104-7 (1992)). 광분해가능한 링커는 연결 성분에서 특수한 용도를 가짐으로써 질병, 질환, 및 상태를 치료하기 위해 설계된 본 발명의 세포-표적화된 분자를 형성할 수 있다.

[0229] [210] 본 발명의 세포-표적화 분자의 특정의 구체예에서, 세포-표적화 결합 영역은 공유결합성 및 비공유결합성 연결 둘 다를 포함하는, 기술자에게 공지된 어떠한 수의 수단도 사용하여 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드에 연결시킨다(참고: 예를 들면, Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-69 (2013); Behrens C, *Liu B, MAbs* 6: 46-53 (2014).

[0230] [211] 본 발명의 세포-표적화된 단백질의 특정의 구체예에서, 단백질은 중쇄 가변(V_H) 도메인 및 경쇄 가변(V_L) 도메인을 연결시키는 링커를 지닌 scFv인 결합 영역을 포함한다. 예를 들면, 15-잔기(Gly4Ser)3 펩티드(SEQ ID NO:128)와 같이 당해 목적에 적합한 당해 분야에 공지된 다수의 링커가 존재한다. 비-공유결합성 다가의 구조를 형성하는데 사용될 수 있는 적합한 scFv 링커는 GGS, GGGS (SEQ ID NO:129), GGGGS (SEQ ID NO:130), GGGGSGGG (SEQ ID NO:131), GGSGGGG (SEQ ID NO:132), GSTSGGGSGGGSGGGGSS (SEQ ID NO:133), 및 GSTSGSGKPGSSEGSTKG (SEQ ID NO:134) (참고: Pluckthun A, Pack P, Immunotechnology 3: 83-105 (1997); Atwell J et al, *Protein Eng* 12: 597-604 (1999); Wu A et al, *Protein Eng* 14: 1025-33 (2001); Yazaki P et al, *J Immunol Methods* 253 : 195-208 (2001); Carmichael J et al, *J Mol Biol* 326: 341-51 (2003); Arndt M et al, *FEBS Lett* 578: 257-61 (2004); Bie C et al, *World J Hepatol* 2: 185-91 (2010))을 포함한다.

[0231] [212] 본 발명의 세포-표적화 분자의 성분의 연결을 위한 적합한 방법은, 이러한 부착이 세포-표적화 잔사의 결합능, CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 성분의 세포 내재화, 및/또는 적절한 경우, 본원에 기술된 검정을 포함하는, 적절한 검정에 의해 측정된 것으로서 바람직한 독소 작동체 작용(들)을 실질적으로 파괴하지 않는다.

[0232] [213] 본 발명의 세포-표적화 분자의 목적을 위해, 특이적인 순서 또는 배향은 각각의 다른 또는 전체 세포-표적화 분자와 관련하여 세포-표적화 결합 영역 및 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 영역에 대해 고정되지 않는다(참고: 예를 들면, 도 1). 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자의 성분은, 세포-표적화 잔사 및 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 작동체 폴리펩티드 영역이 제거되지 않는 한 어떠한 순서로도 정렬될 수 있다. 본 발명의 세포-표적화 분자의 특정의 구체예에서, 세포-표적화 잔사, CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드, 및/또는 소포체 보유/회수 시그날 모티프는 서로에 직접 연결될 수 있고/있거나 당해 분야에 공지되고/되거나 본원에 기술된 하나 이상의 링커를 사용하는 것과 같은 하나 이상의 개입 폴리펩티드 서열에 적합하게 연결될 수 있다.

[0233] IV. T-세포 항원결정기를 전달하는, CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드의 특이적인 구조적 변이 및 이를 포함하는 세포-표적화된 융합 단백질의 예

[0234] [214] 표적 세포에 의한 MHC 클래스 I 제시를 위해 T-세포 항원결정기를 전달하는 능력을 지닌 T-세포 초-면역화 폴리펩티드는 원칙적으로 T-세포 항원결정기를 어떠한 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드에 가함으로써 생성시킬 수 있다. 본 발명의 T-세포 초-면역화 폴리펩티드의 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 소-변이체는 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드내에서 어떠한 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내 하나 이상의 아미노산 잔기를 오버랩핑 이형 T-세포 항원결정기로 대체함으로써 생성시킬 수 있다. 표적 세포에 의한 세포-표적화된 MHC 클래스 I 제시를 위해 CD8+ T-세포 항원결정기를 전달하는 능력을 지닌 세포-표적화 분자는 원칙적으로 본 발명의 어떠한 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드도, 수득되는 분자가 적어도 본 발명의 폴리펩티드, 세포-표적화 잔사, 또는 이들의 구조적 조합에 의해 제공된 세포 내재화 능력을 가지는 한, 적어도 세포-표적화 잔사에 연결시킴으로써 생성시킬 수 있다.

[0235] [215] 표적 세포에 의해 MHC 클래스 I 제시를 위한 CD8+ T-세포 항원결정기의 전달 능력을 지닌 CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드는 독소-유도된, 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드를 사용함으로써 생성시킬 수 있다. 유사하게, 본 발명의 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화, CD8+ T-세포 초- 면역화 폴리펩티드는 독소-유도된, 프로테아좀-전달 작동체 폴리펩티드내 어떠한 B-세포 항원결정기 영역내 하나 이상의 아미노산 잔기도 오버랩핑된 이형 CD8+ T-세포 항원결정기로 치환함으로써 생성시킬 수 있다.

[0236] [216] 본 발명의 특정의 T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드는 포유동물에게 투여 후 폴리펩티드의 항원성 및/또는 면역원성 잠재능을 감소시키기 위하여 이형 T-세포 항원결정기를 첨가함으로써 적어도 하나의 추정된 B-세포 항원결정기 영역을 파괴함을 포함한다. B-세포 항원결정기 영역과 관련하여 본원에 사용된 것으로서 용어 "파괴된" 또는 "파괴" 또는 "파괴하는"은 B-세포 항원결정기 영역내 적어도 하나의 아미노산의 결실, 역전된 아미노산의 적어도 하나가 B-세포 항원결정기 영역내에, 적어도 하나의 아미노산의 인서팅이 B-세포 항원결정기 영역내에, 또는 적어도 하나의 아미노산의 돌연변이가 B-세포 항원결정기 영역내에 있는

2개 이상의 아미노산의 역전을 말한다. 돌연변이에 의한 B-세포 항원결정기 영역의 파괴는 비표준 아미노산 및/또는 비-천연 아미노산과의 아미노산 치환을 포함한다. 파괴에 의해 영향받는 영역내 아미노산 잔기의 수는 바람직하게는 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상 내지 8, 9, 10, 11, 12개 이상의 아미노산 잔기까지이다.

[0237] [217] 특정의 B-세포 항원결정기 영역 및 파괴는, 천연적으로 존재하는 독소 A 소단위가 제거되어 성숙한 독소 A 소단위를 생산하고 숙련가에게 인식될 수 있는 이들의 아미노-말단에서 약 22개의 아미노산의 시그날 서열을 함유하는 전구체 형태를 포함할 수 있는 것이 아니라면, 서열 목록에 제공된 천연의 시가 독소 A 소단위 또는 원형의 디프테리아 독소 A 소단위의 특이적인 아미노산 위치에 대한 참조로 본원에 나타낸다.

[0238] [218] 본 발명의 특정의 T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드는 포유동물에게 투여된 후 폴리펩티드의 CD4+ T-세포 항원성 및/또는 면역원성 잠재능을 감소시키기 위하여 이형 T-세포 항원결정기를 첨가함으로써 적어도 하나의 추정된 CD4+ T-세포 항원결정기 영역의 파괴를 포함한다. CD4+ T-세포 항원결정기 영역과 관련하여 본원에 사용된 것으로서 용어 "파괴된" 또는 "파괴" 또는 "파괴하는"은 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내 적어도 하나의 아미노산의 결실, 역전된 아미노산의 적어도 하나가 CD4+ T-세포 항원결정기내에 있는 2개 이상의 아미노산의 역전, CD4+ T-세포 항원결정기 영역내 적어도 하나의 아미노산의 인서팅, 또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내 적어도 하나의 아미노산의 돌연변이를 말한다. 돌연변이에 의한 CD4+ T-세포 항원결정기 영역의 파괴는 비-표준 아미노산 및/또는 비-천연 아미노산과의 아미노산 치환을 포함한다. 파괴에 의해 영향받은 영역내 아미노산 잔기의 수는 바람직하게는 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상 등 내지 8, 9, 10, 11, 12개 이상까지의 아미노산 잔기이다.

[0239] [219] 특정의 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 및 파괴는, 천연적으로 존재하는 독소 A 소단위가 제거되어 성숙한 독소 A 소단위를 생산하고 숙련가에게 인식가능한 이들의 아미노-말단에서 약 22개의 아미노산의 시그날 서열을 함유하는 전구체 형태를 포함할 수 있지 않다고 해도, 서열 목록에 제공된 천연의 시가 독소 A 소단위 또는 원형 디프테리아 독소 A 소단위의 특이적인 아미노산 위치를 참조로 본원에 나타낸다.

[0240] 1. 시가 독소 유도되고, CD8+ T-세포 항원결정기를 제시하는, 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드

[0241] *[220] 단백질 독소의 시가 독소 계열은 구조적으로 및 작용적으로 관련된 다양한 천연적으로 존재하는 독소, 예를 들면, 시가 독소, 시가-유사 독소 1, 및 시가-유사 독소 2(Johannes L, Romer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010))로 구성된다. 시가 독소 계열의 구성원은 동일한 전체 구조 및 작동 메카니즘을 공유한다(참고: Engedal, N et al, Microbial Biotech 4: 32-46 (2011)). 예를 들면, Stx, SLT-1 및 SLT-2는 세포 유리 시스템에서 구별할 수 없는 효소 활성을 나타낸다(참고: Head S et al, *J Biol Chem* 266: 3617-21 (1991); Tesh V et al, *Infect Immun* 61 : 3392-402 (1993); Brigotti M et al, *Toxicon* 35: 1431-1437 (1997)).

[0242] [221] 시가 독소 계열은 에스. 다이센테리아에(*S. dysenteriae*) 혈청형 1으로부터 분리된 실제 시가 독소(Stx), 장출혈성 이. 콜라이(E. coli)의 혈청형으로부터 분리된 시가-유사 독소 1 변이체(SLT1 또는 Stxl 또는 SLT-1 또는 Slt-I), 및 장출혈성 이. 콜라이의 혈청형으로부터 분리된 시가-유사 독소 2 변이체(SLT2 또는 Stx2 또는 SLT-2)를 포함한다. SLT1은 Stx로부터의 단지 하나의 잔기에 의해 상이하며, 둘 다는 베로세포독소(Verocytotoxin) 또는 베로독소(VT)로 언급되어 왔다(참고: O'Brien, *Curr Top Microbiol Immunol* 180: 65-94 (1992)). SLT1 및 SLT2 변이체가 아미노산 서열 수준에서 서로에 대해 단지 약 53 내지 60% 유사하다고 해도, 이들은 시가 독소 계열의 구성원에 대해 일반적인 효소 활성 및 세포독성의 메카니즘을 공유한다(참고: Johannes, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010)). 정의된 아형 Stxla, Stxlc, Stxld, 및 Stx2a-g과 같은 39개 이상의 상이한 시가 독소가 기술되어 왔다(참고: Scheutz F et al, *J Clin Microbiol* 50: 2951-63 (2012)). 시가 독소 계열의 구성원은, 시가-독소-암호화 유전자가 수평적 유전자 이동(horizontal gene transfer)을 통해 세균 종 중에서 확산될 수 있으므로 어떠한 세균 종으로 천연적으로 한정되지 않는다(참고: Strauch E et al., Infect Immun 69: 7588-95 (2001); Zhaxybayeva O, Doolittle W, Curr Biol 21 : R242-6 (2011)). 종간 전달의 예로서, 시가 독소는 환자로부터 분리된 에이. 해모라이티쿠스(*A. haemolyticus*)의 균주에서 발견되었다(참고: Grotiuz G et al, *J Clin Microbiol* 44: 3838-41 (2006)). 일단 시가 독소 암호화 폴리뉴클레오티드가 새로운 아종 또는 종내로 들어가면, 시가 독소 아미노산 서열은 시가 독소 계열의 구성원에 대해 일반적인 세포독성의 메카니즘을 여전히 유지하면서 유전적이동 및/또는 선택적인 압력으로 인해 경미한 서열 변이를 발달시킬 수 있는 것으로 여겨진다(참고: Scheutz, *J Clin Microbiol* 50: 2951-63 (2012)).

[0243] [222] 본 발명의 목적을 위해, 어구 "시가 독소 작동체 영역"은 적어도 하나의 시가 독소 작용을 나타낼 수 있는 시가 독소 계열의 구성원의 시가 독소 A 소단위로부터 유도된 폴리펩티드 영역을 말한다. 시가 독소 작용은

예를 들면, 세포 도입, 지질 막 변형, 소세포 경로화 지시, 리보소옴의 촉매적 불활성화, 세포독성의 유발, 및 사이토스태틱 효과의 유발을 포함한다.

[0244] [223] 본 발명의 목적을 위해, 시가 독소 작동체 작용은 시가 독소 A 소단위로부터 유도된 폴리펩티드 영역에 의해 부여된 생물학적 활성이다. 시가 독소 작동체 작용의 비-제한적 예는 세포 내재화, 소세포 경로화, 촉매 활성, 및 세포독성을 포함한다. 시가 독소 촉매 활성의 비-제한적 예는 리보소옴 불활성화, 단백질 합성 억제, N-글리코시다제 활성, 폴리뉴클레오티드:아데노신 글리코시다제 활성, RNAase 활성, 및 DNAase 활성을 포함한다. RIP는 핵산, 폴리뉴클레오사이드, 폴리뉴클레오사이드, rRNA, ssDNA, dsDNA, mRNA(및 폴리 A), 및 바이러스 핵산을 탈퓨린화시킬 수 있다(참고: Barbieri L et al, *Biochem* J286: 1-4 (1992); Barbieri L et al, *Nature* 372: 624 (1994); Ling J et al, *FEBS Lett* 345: 143-6 (1994); Barbieri L et al, *Biochem J* 319: 507-13 (1996); Roncuzzi L, Gasperi-Campani A, *FEBS Lett* 392: 16-20 (1996); Stirpe F et al, *FEBS Lett* 382: 309-12 (1996); Barbieri L et al, *Nucleic Acids* Res 25: 518-22 (1997); Wang P, Turner N, *Nucleic Acids Res* 27: 1900-5 (1999); Barbieri L et al, *Biochim Biophys Acta* 1480: 258-66 (2000); Barbieri L et al, *J Biochem* 128: 883-9 (2000); Bagga S et al, *J Biol Chem* 278: 4813-20 (2003); Picard D et al., *J Biol Chem* 280: 20069-75 (2005)). 일부 RIP는 항바이러스 활성 및 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 활성을 나타낸다(참고: Erice A et al, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 835-8 (1993); Au T et al, *FEBS Lett* A71: 169-72 (2000); Parikh B, Turner N, *Mini Rev Med Chem* 4: 523-43 (2004); Sharma N et al, *Plant Physiol* 134: 171-81 (2004)). 시가 독소 촉매 활성은 시험관내 및 생체내에서 관찰되어 왔다. 시가 독소 작동체 활성에 대한 검정은 예를 들면, 단백질 합성 억제 활성, 탈퓨린화 활성, 세포 성장의 억제, 세포독성, 슈퍼코일드 DNA 완화 활성, 및/또는 뉴클레아제 활성과 같은 다양한 활성을 측정할 수 있다.

[0245] [224] 본원에 사용된 것으로서, 시가 독소 작동체 작용의 보유는 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드 대조군과 비교가능한 재생능을 사용한 적절한 정량적 검정으로 측정되는 바와 같은, 시가 독소 작용 활성의 수준을 말한다. 리보소옴 억제의 경우, 시가 독소 작동체 작용은, 10,000 pM 이하의 IC_{50}을 나타내는 것이다. 표적 양성 세포 사멸 검정에서 세포독성의 경우, 시가 독소 작동체 작용은 세포 형 및 적절한 세포외 표적 생물 분자의 이의 발현에 의존한, 1,000 nM 이하의 IC_{50}을 나타낸다.

[0246] [225] 본원에 사용된 것으로서, "유의적인" 시가 독소 작동체 작용의 보유는 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드 대조군에 대해 비교가능한 재생능을 사용한 적절한 정량적 검정으로 측정된 것으로서, 시가 독소 작용 활성의 수준을 말한다. 시험관내 리보소옴 억제의 경우, 유의적인 시가 독소 작동체 작용은 리보소옴의 공급원(예를 들면, 세균, 고세균류, 또는 진핵세포(조류, 진균, 식물, 또는 동물)에 따라 300 pM 이하의 IC_{50}을 나타내는 것이다. 이는 촉매적으로 불활성인 SLT-1A 1-251 이중 돌연변이체(Y77S, E167D)에 대한 100,000pM의 근사치 IC_{50}과 비교한 것으로서 유의적으로 보다 큰 억제이다. 실험실적 세포 배양에서 표적 양성 세포 사멸 검정에서의 세포독성을 위해, 유의적인 시가 독소 작동체 작용은 세포주 및 적절한 세포외 표적 생물분자의 이의 발현에 의존하여 100, 50, 또는 30 nM 이하의 IC_{50}을 나타내는 것이다. 이는 세포-표적화 결합 영역의 부재하에서, 세포주에 따라 100 내지 100,000nM의 IC_{50}을 갖는, SLT-1A 성분 단독과 비교하여 적절한 표적 세포주에 대해 유의적으로 보다 큰 세포독성이다.

[0247] [226] 일부 샘플에 있어서, IC_{50} 또는 CD_{50} 중의 어느 하나에 대한 정확한 값은 정확한 곡선 맞춤을 위해 필요한 데이타 점을 수집하기 위한 무능력으로 인하여 수득할 수 없을 수 있다. 부정확한 IC_{50} 및/또는 CD_{50} 값은, 시가 독소 작동체 작용 활성을 결정하는 경우 고려되지 않아야 한다. 예를 들어, 실시예들에 기술된 검정과 같은, 예시적인 시가 톡소 작동체 작용 검정으로부터의 데이타의 분석에 기재된 바와 같은 곡선을 정확하게 맞추기에 불충분한 데이타는 실제 시가 독소 작동체 작용의 대표로서 고려되지 않아야 한다. 예를 들면, 50% 이상의 리보솜 억제 또는 세포 사멸 각각이 주어진 샘플에 대한 농도 시리즈에서 발생하지 않으면, 이론적으로 어떠한 IC_{50} 또는 CD_{50}도 측정될 수 없다.

[0248] [227] 시가 독소 작동체 작용에서의 활성을 검출하는 데 실패하는 것은, 세포 도입의 결핍, 아세포 경로화, 및/또는 효소 활성보다는 부적절한 발현, 펩티드 폴딩, 및/또는 폴리펩티드 안정성으로 인한 것일 수 있다. 시가 독소 작동체 작용에 대한 검정은 상당량의 시가 독소 작동체 작용 활성을 측정하기 위하여 본 발명의 많은 폴리펩티드를 필요로 하지 않을 수 있다. 낮은 효과기 작용 또는 무 효과기 작용의 잠재적인 원인이 단백질 발현 또는 안정성과 관련시키기 위하여 경험적으로 측정되는 정도로, 당해 분야의 숙련가는, 시가 독소 작용 작동체 활

성이 회복되고 측정될 수 있도록, 단백질질 화학 및 분자 공학 기술을 이용하는 이러한 인자를 보상할 수 있다. 예로서, 부적절한 세포계 발현은 상이한 발현 조절 서열을 이용함으로써 보상될 수 있다; 부적적한 폴리펩티드 폴딩 및/또는 불안정성은, 단백질의 3차원 구조 등을 안정화하는 비-작동체 영역에서 말단 서열, 또는 보상적 돌연변이를 안정화시키는 이점이 있을 수 있다. 개개의 시가 독소 작용을 위한 새로운 검정이 이용가능한 경우, CD8+ T-세포-부동화 및/또는 B-세포/D4+ T-세포 탈-면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드는, 작동적 녹아웃 시가 독소 작동체 폴리펩티드와 비교하여 3배 내지 300배 이상의 활성을 나타내거나 야생형 시가 독소 작동체의 활성의 1000배 또는 100배 이하인 것과 같은, 시가 독소 작동체 작용의 어떠한 수준을 위해 분석될 수 있다.

[0249] [228] 충분한 소세포 경로화는 세포독성 검정에서의 세포독성, 예를 들면, T-세포 항원결정기 제시 또는 세포질성 및/또는 ER 표적 기질을 포함하는 독소 작동체 작용을 기본으로 한 세포독성 검정을 관찰함으로써 단순히 유추할 수 있다.

[0250] [229] 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 세포독성이 실제로 야생형에 비하여 감소하는 경우에도, 약화된 CD8+ T-세포 고-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 사용하는 것과 동일하거나 이보다 더 효과적일 수 있음을 주목해야 하는데, 그 이유는 감소된 항원성 및/또는 면역원성이, 예를 들면, 고 투여량의, 보다 반복된 투여, 또는 만성 투여를 허용함으로써와 같은 감소된 세포독성을 상쇄시킬 수 있기 때문이다. 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 매우 강력하고, 세포질에 도달하는 단지 하나의 분자 또는 내부화되는 약 40개의 분자를 사멸시킬 수 있다. 상당히 감소된 시가 독소 작동체 작용도 가진 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드, 예를 들면, 아세포 경로화 또는 세포독성은, 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드에 비하여, 여전히 표적화된 세포 사멸 및/또는 특수한 세포 검출을 기본으로 한 적용을 위해 충분히 강력할 수 있다.

[0251] [230] 본 발명의 특정한 구체예는 시가 독소 계열의 구성원의 A 소단위로부터 유도된 아미노산 서열을 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 제공하며, 이러한 시가 독소 작동체 영역은 본원에 제공된 적어도 하나의 천연적으로 위치한 B-세포 항원결정기 영역의 파괴를 포함한다(참조: 예를 들면, 표 2, 3 및 4). 특정의 구체예에서, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 B-세포 항원결정기 영역 1-15; 서열 번호: 3의 3-14; 서열 번호: 3의 26-37; 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 39-48; 또는 서열 번호: 3의 42-48; 서열 번호: 1, 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 2의 53-66; 서열 번호: 1, 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 3의 94-115; 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 141-153; 서열 번호: 3의 140-156; 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 179-190; 서열 번호: 3의 179-191; 서열 번호: 3의 204; 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 205; 및 서열 번호: 3의 210-218; 서열 번호: 3의 240-260; 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 243-257; 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 254-268; 서열 번호: 3의 262-278; 서열 번호: 3의 281-297; 및 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 285-293, 및 서열 번호: 1 또는 서열 번호 2의 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 4-33; 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 34-78, 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 77-103, 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 128-168, 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 160-183, 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 236-258, 및 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2의 274-293; 또는 보존된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및/또는 비-천연 시가 독소 작동체 폴리펩티드 서열에서의 등가 위치로 이루어진 천연적으로 위치된 아미노산의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 하나의 파괴를 포함하는 전-장(full-length) 시가 독소 A 소단위(예를 들면, SLT-1A (서열 번호: 1), StxA (서열 번호:2), 또는 SLT-2A (서열 번호:3))를 포함할 수 있거나 이로 필수적으로 이루어질 수 있다.

[0252] [231] 본 발명의 특정한 구체예는 시가 독소 계열의 구성원의 A 소단위로부터 유도된 아미노산 서열을 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 시가 독소 작동체 영역은 적어도 하나의 천연적으로 위치한 본원에 제공된 CD4+ T-세포 항원결정기 영역의 파괴를 포함한다(참조: 예를 들면, 표 2, 3 및 4). 특정한 구체예에서, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 4-33, 34-78, 77-103, 128-168, 160-183, 236-258, 및 274-293; 또는 보존된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및/또는 비-천연 시가 독소 작동체 폴리펩티드 서열 내의 등가의 위치로 이루어진 천연적으로 위치된 아미노산의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 하나의 파괴를 포함하는 전-장 시가 독소 A 소단위(예: SLT-1A(서열 번호: 1)), StxA (서열 번호: 2), 또는 SLT-2A(서열 번호: 3))를 포함하거나 이로 필수적으로 이루어질 수 있다.

[0253] [232] 특정한 구체예에서, 본 발명의 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 트렁케이트된(truncated) 시가 독소 소단위를 포함할 수 있거나 이로 필수적으로 이루어질 수 있다. 시가 독소 A 소단위를 절단하면 독소 효과기 촉매적 활성 및 세포독성에 영향을 미치지 않고 전체 B-세포 항원결정기 영역의 결실을 초래할 수 있다. 상당한 촉매

활성을 나타내는 최소의 시가 독소 A 소단위 단편은 StxA의 잔기 750247로 구성된 폴리펩티드이다[참고: Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994]. SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 카복시-말단의 아미노산 1-251로의 트렁케이트는 2개의 예측된 B-세포 항원결정기 영역, 즉, 2개의 예측된 CD4 양성 (CD4+) T-세포 항원결정기, 및 예측된 불연속 B-세포 항원결정기를 제거한다. SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 아미노- 및 카복시-말단 둘 다의 75-251로의 트렁케이트는 적어도 5개의 예측된 B-세포 항원결정기 영역, 4개의 추정되는 CD4+ T-세포 항원결정기, 및 1개의 예측된 불연속 B-세포 항원결정기를 결실시킨다.

[0254] [233] 특정한 구체예에서, 본 발명의 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 적어도 하나의 돌연변이, 예를 들면, 제공된 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서, 결실, 삽입, 역위 또는 치환을 갖는 전-장 또는 트렁케이트된 시가 독소 A 소단위를 포함할 수 있거나 이로 필수적으로 이루어질 수 있다. 특정한 추가의 구체예에서, 폴리펩티드는 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 내의 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 파괴를 포함한다. 특정한 추가의 구체예에서, 폴리펩티드는 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 내의 적어도 하나의 아미노산의 삽입을 포함하는 분열을 포함한다. 특정한 추가의 구체예에서, 폴리펩티드는 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 내의 적어도 하나의 아미노산의 역위을 포함하는 분열을 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 폴리펩티드는 돌연변이, 예를 들면, 화학적으로 변형된 측쇄를 갖는 아미노산 또는 비표준 아미노산에 대한 아미노산 치환을 포함하는 파괴를 포함한다. 아미노산 치환의 수많은 예들이 실시예에 제공되어 있다.

[0255] [234] 다른 구체예에서, 본 발명의 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 전-장 시가 독소 A 소단위보다 더 짧은 절단된 시가 독소 A 소단위를 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지며, 여기서 적어도 하나의 아미노산은 실시예에 제공된 천연적으로 위치된 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서 파괴된다[참조: 표 2, 3 및/또는 4].

[0256] [235] 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드는, 예를 들면, 아미노산 위치 77 내지 239(SLT-1A (서열 번호: 1) 또는 StxA (서열 번호: 2))로부터의 폴리펩티드 영역 또는 시가 독소 군의 구성원의 기타 A 소단위 내의 등가물(예를 들면, (서열 번호: 3의 77 내지 238)과 같은 전장 A 소단위보다 더 작을 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 특정한 구체예에서, SLT-1A로부터 유도된 시가 톡소 작동체 폴리펩티드는 서열 번호 1의 아미노산 75 내지 251, 서열 번호 1의 1 내지 241, 서열 번호 1의 1 내지 251, 또는 서열 번호 1의 아미노산 1 내지 261로부터 유도될 수 있으며, 여기서 적어도 하나의 아미노산은 실시예에 제공된 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서 파괴된다(표 2, 3 및/또는 4). 유사하게, StxA로부터 유도된 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 영역은 서열 번호: 2의 아미노산 75-251, 서열 번호: 2의 1-241, 서열 번호: 2의 1-251, 또는 서열 번호: 2의 1-261을 포함할 수 있거나 이로 필수적으로 이루어질 수 있으며, 여기서 적어도 하나의 아미노산은 실시예에 제공된 적어도 하나의 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서 파괴된다(표 2, 3, 및/또는 4). 추가로, SLT-2로부터 유도된 시가 독소 작동체에 영역은 서열 번호: 3의 아미노산 75-251, 서열 번호: 3의 1-241, 서열 번호: 3의 1-251, 또는 서열 번호: 3의 아미노산 1-261을 포함할 수 있거나 이로 필수적으로 이루어질 수 있으며, 여기서 적어도 하나의 아미노산은 실시예에 제공된 적어도 하나의 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서 분열된다(표 2, 3, 및/또는 4).

[0257] [236] 본 발명의 세포-표적화 분자의 특정한 구체예는, 예를 들면, 효소 활성을 위한 하나 이상의 주요한 잔기를 돌연변이시킴으로써, 사이토스타시스의 작동화, 외인성 물질의 전달, 및/또는 세포 유형의 결실을 포함하는 비-세포독성 작용을 줄이거나 제거한 폴리펩티드에 대한 세포독성 모 분자로부터 가공될 수 있지만 시가 독소 작동체를 보유하는 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 각각 포함한다.

[0258] [237] 특정한 구체예에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드는 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다. 특정한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 서열 번호: 11-43의 폴리펩티드 중의 하나를 포함하거나 이로 필수적으로 이루어진다.

[0259] [238] 특정한 구체예에서, 본 발명의 세포-표적화된 분자는 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 세포독성 단백질이다. 특정한 구체예에 있어서, 본 발명의 세포-표적화된 분자는 서열 번호 49-54의 폴리펩티드 중의 하나를 포함하거나 이로 필수적으로 이루어진다.

[0260] 2. 디프테리아 독소 유도된, CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드

[0261] [239] 본 발명의 목적에 있어서, 어구 "디프테리아 독소 작동체 영역"은, 적어도 하나의 디프테리아 독소 작용을 나타낼 수 있는 디프테리아 독소 계열의 구성원의 디프테리아 독소로부터 유도된 폴리펩티드 영역을 나타낸다. 디프테리아 독소 작용은, 예를 들면, 세포 도입, 엔도솜 탈출, 소세포 경로화 지향, 촉매적으로 불활성화하는 리보소옴, 세포독성의 작동화 및 세포정지 효과의 작동화를 포함한다.

[0262] [240] 본 발명의 목적에 있어서, 디프테리아 독소 작동체 작용은 디프테리아 독소로부터 유도된 폴리펩티드 영역에 의해 부여된 생물학적 활성이다. 디프테리아 독소 작동체 작용의 비-제한적인 예는 세포 내부화, 소세포 경로화, 촉매 활성 및 세포독성을 포함한다. 디프테리아 독소 촉매 활성의 비-제한적인 예는 리보소옴 불활성화, 단백질 합성 억제, 및 ADP-리보실화를 포함한다. 디프테리아독소 촉매 활성은 시험관내 및 생체내 둘 다에서 관찰되었다. 디프테리아 독소 작동체 활성을 위한 검정은 각종 활성, 예를 들면, 단백질 합성 억제 활성, ADP-리보실화, 세포 성장의 억제, 및/또는 세포독성을 측정할 수 있다. 충분한 소세포 경로화는, 예를 들면, T-세포 항원결정기 제시를 기본으로 한 또는 세포질 및/또는 ER 표적 기질을 기본으로 한 세포독성 검정과 같은 세포독성 검정에서 세포독성을 관찰함으로써 단순히 유추할 수 있다.

[0263] [241] 디프테리아 독소 작동기 폴리펩티드의 독소 작동체 활성이 실제로 야생형에 비하여 감소되는 경우에도, 약화된 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 사용하는 적용은 야생형 수준의 활성을 갖는 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 사용하는 것과 동등하거나 더 효과적일 수 있음을 주목해야 하는데, 그 이유는 감소된 항원성 및/또는 면역원성이, 예를 들면, 고 투여량, 보다 반복된 투여, 또는 만성 투여를 허용함으로써, 감소된 세포독성을 상쇄시킬 수 있기 때문이다. 소세포 경로화의 작동체 활성만을 나타내는 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 표적화된 세포 CD8+ T-세포 항원결정기 전달을 기본으로 한 적용에서 사용하기에 적합하다.

[0264] [242] 본 발명의 특정한 구체예는 디프테리아 독소 계열의 구성원의 A 소단위로부터 유도된 아미노산 서열을 포함하는 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 디프테리아 독소 작동체 영역은 본원에 제공된 적어도 하나의 천연적으로 위치된 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역의 파괴를 포함한다(참조: 예를 들면, 표 5). 특정한 구체예에서, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 서열 번호: 44의 3-10, 서열 번호: 44의 15-31, 서열 번호: 44의 32-54; 서열 번호: 44의 33-43, 서열 번호: 44의 71-77. 서열 번호: 44의 93-113, 서열 번호: 44의 125-131, 서열 번호: 44의 138-146, 서열 번호: 44의 141-167, 서열 번호: 44의 165-175, 서열 번호: 45의 182-201, 서열 번호: 44의 185-191, 및 서열 번호 45의 225-238; 또는 보존된 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 및/또는 비-천연 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 서열 내의 등가의 위치로 이루어진 천연적으로 위치된 아미노산의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 하나의 파괴를 포함하는 서열 번호: 45의 아미노산 2-389의 폴리펩티드를 포함할 수 있거나 이로 필수적으로 이루어질 수 있다.

[0265] [243] 임의로, 본 발명의 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는, 적어도 하나의 아미노산이 실시예에 제공된 적어도 나나의 천연적으로 위치된 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서 파괴되는 한, 야생형과 비교해서 하나 이상의 돌연변이(예를 들면, 치환, 결실, 삽입 또는 역위)를 포함할 수 있다(참조: 표 5). 본 발명의 특정한 구체예에서, CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 천연 생성 디프테리아 독소 A 소단위에 대한 충분한 서열 동질성을 가져서, 공지된 방법의 세포 변환, 형질주입, 감염 또는 유도에 의해, 또는 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드와 연결된 세포-표적화 결합 영역에 의해 매개된 내부화에 의해, 세포 내로 도입된 후에 세포독성을 보유한다.

[0266] [244] 디프테리아 독소 A 소단위에서의 효소적 활성 및/또는 세포독성을 위한 가장 중요한 잔기는 다음의 잔기-위치로 맵핑(mapping)되었다: 히스티딘-21, 타이로신-27, 글리신-52, 트립토판-50, 타이로신-54, 타이로신-65, 글루타메이트-148, 및 트립토판-153 [참조: Tweten R et al., *J Biol Chem* 260: 10392-4 (1985); Wilson B et al, *J Biol Chem* 269: 23296-301 (1994); Bell C, Eisenberg D, *Biochemistry* 36: 481-8 (1997); Cummings M et al, *Proteins* 31 : 282-98 (1998); Keyvani K et al, *Life Sci* 64: 1719-24 (1999); Dolan K et al, *Biochemistry* 39: 8266-75 (2000); Zdanovskaia M et al, *Res Micrbiol* 151 : 557- 62 (2000); Kahn K, Bruice T, *J Am Chem Soc* 123: 11960-9 (2001); Malito E et al, *Proc Natl Acad Sci* USA 109: 5229-34 (2012)]. 세포사멸, 예를 들면, 이의 세포독성을 유발하기 위한 본 발명의 세포독성, 세포-표적화 분자의 능력은 당해 분야에 익히 공지된 다수의 검정들 중의 어느 하나 이상을 사용하여 측정할 수 있다.

[0267] [245] 본 발명의 특정한 구체예 중에서, 폴리펩티드는 서열 번호: 45의 아미노산 2 또는 아미노산 2-389를 포함하거나 이로 필수적으로 이루어진 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 디프테리아 독소 작

동체를 포함하며, 여기서 적어도 하나의 아미노산은 실시예에 제공된 천연적으로 위치된 B-세포 항원결정기 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서 분열된다.

[0268] [246] 특정한 구체예에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드는 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다. 특정한 구체예에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드는 서열 번호: 46-48의 폴리펩티드 중의 하나를 포함하거나 이로 필수적으로 이루어진다.

[0269] [247] 특정한 구체예에 있어서, 본 발명의 세포-표적화 분자는 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 세포독성 단백질이다. 특정한 구체예에 있어서, 본 발명의 세포-표적화된 분자는 서열 번호: 55-60의 폴리펩티드 중의 하나를 포함하거나 이로 필수적으로 이루어진다.

[0270] [248] 특정한 구체예에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드는 서열 번호: 11-43 또는 46-48의 폴리펩티드 중의 어느 하나를 포함하거나 이로 필수적으로 이루어진다.

[0271] [249] 본 발명의 세포-표적화 분자는, 세포의 표면 위에 발현된 표적 생물분자와 같은, 세포와 물리적으로 연합된 적어도 하나의 세포외 표적 생물분자에 특이적으로 결합할 수 있는 세포-표적화 잔기에 연결된 적어도 하나의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드를 각각 포함한다. 이러한 일반 구조식은 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드에 연결될 수 있다는 점에서 모듈러식(modular)이다.

[0272] [250] 표적 생물분자의 어떠한 세포외 부분에 대한 작용적 결합 부위를 포함하고, 훨씬 더 바람직하게는 고 친화성(예를 들면, K_D로 나타낸 바와 같음)을 갖는 표적 생물분자를 결합할 수 있는 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자의 단편, 변이체, 및/또는 유도체를 사용하는 것은 본 발명의 영역 내에 있다. 10^{-5} 내지 10^{-12} 몰/리터, 바람직하게는 200 nM 미만의 해리 상수(K_D)를 갖는 표적 생물분자의 세포외 부분을 결합하는 어떠한 세포-표적화 잔기도 본 발명의 세포-표적화 분자의 제조 및 본 발명의 방법에 사용하기 위해 치환시킬 수 있다.

[0273] VI. 본 발명의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드의 폴리펩티드 서열 및 동일한 것을 포함하는 세포-표적화 분자에서의 변이

[0274] [251] 당해 분야의 숙련가는, 예를 들면, 항원성 및/또는 면역원성 잠재력을 감소시키는 하나 이상의 항원결정기 파괴와 관련한 독소 작동체의 전체 구조 및 작용을 유지시킴으로써, 이의 생물학적 활성을 감소시키지 않고, 본 발명의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및 세포-표적화 분자, 및 상기한 것들 중의 어느 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 변이가 이루어질 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들면, 일부 변형은 발현, 정제, 및/또는 약력학적 특성, 및/또는 면역원성을 촉진시킬 수 있다. 이러한 변형은 당해 분야의 숙련가에게 익히 공지되어 있으며, 예를 들면, 아미노 말단에 가해진 메티오닌을 포함하여 편리한 검출 및/또는 정제를 위해 제공되는 말단에 융합된 편리하게 위치한 제한 부위 또는 말단 코돈 및 생화학적 친화성 태그에 대한 한쪽 말단에 위치한 개시 부위, 추가 아미노산을 제공한다.

[0275] [252] 본원에는 항원결정기 태그 또는 기타 잔기를 위한 서열과 같은, 아미노 및/또는 카복시 말단에서의 추가의 아미노산이 포함된다. 추가의 아미노산 잔사는, 예를 들면, 클로닝 촉진, 발현 촉진, 후-전사 변형, 합성 촉진, 정제, 검출 촉진, 및 투여를 포함하는 각종 목적에 사용될 수 있다. 항원결정기 태그 및 잔기의 비-제한적인 예는 키틴 결합 단백질 도메인, 엔테로펩티다제 절단 부위, 인자 Xa 절단 부위, FIAsH 태그, FLAG 태그, 녹색 형광 단백질(GFP), 글루타티온-S-트랜스퍼라제 잔기, HA 태그, 말토즈 결합 단백질 도메인, myc 태그, 폴리히스티딘 태그, ReAsH 태그, 스트렙-태그, 스트렙-태그 II, TEV 프로테아제 부위, 티오레독신 도메인, 트롬빈 분리 부위, 및 V5 항원결정기 태그이다.

[0276] [253] 상기한 양태의 특정한 것에서, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화 단백질은, 적어도 하나의 아미노산이 본원에 제공된 적어도 하나의 천연적으로 위치한 B-세포 항원결정기 영역에서 분열되는 한, 폴리펩티드 영역 내로 도입된 하나 이상의 보존적 아미노산 치환에 의해 변한다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "보존적 치환"은, 하나 이상의 아미노산이 또 다른 생물학적으로 유사한 아미노산 잔기에 의해 대체됨을 나타낸다. 예는 유사한 특성을 가진 아미노산 잔기, 예를 들면, 작은 아미노산, 산성 아미노산, 극성 아미노산, 염기성 아미노산, 소수성 아미노산 및 방향족 아미노산의 치환을 포함한다[참조: 예를 들면, 하기한 표 C]. 잔기를 가진 보존적 치환의 예는 일반적으로 내인성, 표유동물 펩티드에서 발견되지 않으며 단백질은, 아르기닌 또는 라이신 잔기의, 예를 들면, 오르니틴, 카나바닌, 아미노에틸시스테인, 또는 또 다른 염기성 아미노산의 보존적 치환이다. 펩티드 및 단백질에서 표현형적으로 침묵하는

치환에 관한 추가의 정보에 대해서는, 예를 들면, 문헌[참조: Bowie J et al., Science 247: 1306-10 (1990)]을 참조한다.

[0277] 표 C. 보존적 아미노산 치환의 예

[0278]

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
A G P S T	D E Q N	H K R	C I L M V	F W Y	N Q S T	A G I L V	C M P	F H W Y	A C F G H I L M R T V W Y	C D E H K N Q R S T	A C D G N P S T V	A C D E G H K N Q R S P T	D E G K P Q R S T

[0279] [254] 표 C에서의 보존적 치환 도식에서, 아미노산의 예시적인 보존적 치환은 생화학적 특성 - I: 중성, 친수성; II: 산 및 아미드; III: 염기성; IV: 소수성; V: 방향족, 벌키 아미노산, VI: 하전되지 않은 친수성, VII: 하전되지 않은 지방족, VIII: 하전되지 않은 비-극성, IX: 사이클로알케닐-결합됨, X: 소수성, XI: 극성, XII: 작음, XIII: 회전-허락, 및 XIV: 가요성. 예를 들면, 보존적 아미노산 치환은 다음을 포함한다: 1) S는 C를 대체할 수 있다; 2) M 또는 L은 F를 대체할 수 있다; 3) Y는 M을 대체할 수 있다; 4) Q 또는 E는 K를 대체할 수 있다; 5) N 또는 Q는 H를 대체할 수 있다; 및 6) H는 N을 대체할 수 있다.

[0280] [255] 추가의 보존적 아미노산 치환은 다음을 포함한다: 1) S는 C를 대체할 수 있다; 2) M 또는 L은 F를 대체할 수 있다; 3) Y는 M을 대체할 수 있다; 4) Q 또는 E는 K를 대체할 수 있다; 5) N 또는 Q는 H를 대체할 수 있다; 및 6) H는 N을 대체할 수 있다.

[0281] [256] 특정한 구체예에서, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 분자(예: 세포-표적화된 단백질)는, 최대 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환을 갖는 본 발명의 폴리펩티드 영역의 작용적 단편 또는 변이체를 포함할 수 있다.

[0282] [257] 특정한 구체예에서, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화 분자는, 실시예에 제공된 천연적으로 위치된 B-세포 및/또는 CD4+ T-T세포 항원결정기 영역 내에 적어도 하나의 아미노산의 파괴를 보유하는 한 및 폴리펩티드 또는 단백질이 단독으로 및/또는 치료학적 및/또는 진단학적 조성물의 성분으로서 T-세포 항원결정기 전달 작용성을 보유하는 한, 본원에 언급된 폴리펩티드와 비교하여, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 본 발명의 폴리펩티드 영역의 작용성 단편 또는 변이체를 포함할 수 있다. 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화 단백질은, 변화된 세포독성, 변화된 세포정지 효과, 변화된 면역원성, 및/또는 변화된 혈청 반감기와 같은 목적하는 특성을 성취하기 위하여, CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드 영역 또는 결합 영역 내에서와 같은, 하나 이상의 아미노산을 변경시키거나 하나 이상의 아미노산을 인서팅함으로써, 본 발명의 세포-표적화된 단백질의 폴리펩티드를 변화시킨 결과로서 본 발명의 영역 내에 존재한다. 본 발명의 B-세포 항원결정기 탈-면역화 및 CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 단백질은 시그날 서열과 함께 또는 시그날 서열 없이 추가로 존재할 수 있다.

[0283] [258] 따라서, 특정한 양태에서, 본 발명의 시가 독소 작동체 또는 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는, 예를 들면, 본 발명의 시가 독소 A 소단위, 예를 들면, SLT-IA (서열 번호: 1), StxA (서열 번호: 2), 및/또는 SLT-2A (서열 번호: 3), 또는 디프테리아 독소 촉매 도메인(서열 번호: 44)와 같은 천연 생성 독소에 대하여 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.7% 전체 서열 동질성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 필수적으로 이루어진다. 특정한 구체예에서, 본 발명의 탈-면역화 시가 독소 작동체 또는 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 천연 생성 독소에 대하여 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.7% 전체 서열 동질성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로

필수적으로 이루어지는데, 여기서 적어도 하나의 아미노산은 실시예에 제공된 적어도 하나의 천연적으로 위치된 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서 파괴된다(표 2, 3, 4, 및/또는 5).

[0284] [259] 본 발명의 세포-표적화 분자의 특정한 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 돌연변이, 인서팅 또는 결실되어 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 독소 작동체 폴리펩티드 영역의 효소적 활성을 증가시킬 수 있다. 예를 들면, StxlA 내의 잔기-위치 알라닌-231을 글루타메이트로 돌연변이시키면 시험관내에서 이의 효소 활성을 증가시켰다(참조: Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)).

[0285] [260] 본 발명의 세포-표적화 분자의 특정한 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 돌연변이되거나 결실되어 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 독소 작동체 폴리펩티드 영역의 촉매 및/또는 세포독성 활성을 감소시키거나 제거시킬 수 있다. 예를 들면, 시가 독소 계열 또는 디프테리아 독소 계열의 구성원의 A 소단위의 촉매 및/또는 세포독성 활성은 돌연변이 또는 트렁케이션(truncation)에 의해 감소되거나 제거될 수 있다.

[0286] [261] 본 발명의 특정한 구체예에서, 리보독소 작동체 영역은 변경되어 이것이 시험관내에서 리보소옴의 촉매적 불활성화를 더 이상 지지하지 않도록 한다. 그러나, 리보독성을 감소시키거나 제거하기 위해 리보독성 작동체 영역을 변형시키는 기타 수단은 또한 본 발명의 영역 내에 있는 것으로 상상된다. 예를 들면, 특정한 돌연변이는, 리보독성 영역이 시험관내 검정에 의해 관찰가능한 촉매적 능력을 유지함에도 불구하고 이의 리보소옴 기질을 결합할 수 없도록 할 수 있는 반면에 시험관내 네이키드 핵산(naked nucleic acid)에 대한 촉매적 능력을 유지시킴에도 불구하고 리보소옴 내에서 특정한 리보핵산 서열을 표적화할 수 없도록 한다(참조: 예를 들면, Alford S et al, BMC Biochem 10: 9 (2009); Alvarez-Garcia E et al, Biochim Biophys Act 1814: 1377-82 (2011); Wong Y et al, PLoS One 7: e49608 (2012)).

[0287] [262] DT에서, 예를 들면, 히스티딘-21 , 타이로신-27, 글리신-52, 트립토판-50, 타이로신-54, 타이로신-65, 글루타메이트-148, 및 트립토판-153과 같은 촉매 활성을 위해 중요한 것으로 공지된 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Tweten R et al, J Biol Chem 260: 10392-4 (1985); Wilson B et al., J Biol Chem 269: 23296-301 (1994); Bell C, Eisenberg D, Biochemistry 36: 481-8 (1997); Cummings M et al, Proteins 31 : 282-98 (1998); Keyvani K et al, Life Sci 64: 1719-24 (1999); Dolan K et al, Biochemistry 39: 8266-75 (2000); Zdanovskaia M et al., Res Micrbiol 151: 557-62 (2000); Kahn K, Bruice T, J Am Chem Soc 123: 11960-9 (2001); Malito E et al, Proc Natl Acad Sci USA 109: 5229-34 (2012)). 콜릭스 독소에서의 글루타메이트-581은 DT에서 글루타메이트-148과 함께 보존되고(Jørgensen R et al., EMBO Rep 9: 802-9 (2008)), 이에 따라 콜릭스 독소 내의 글루타메이트-581의 돌연변이는 콜릭스 독소의 효소 활성을 감소시키는 것으로 예측된다.

[0288] [263] PE에는, 예를 들면, 트립토판-417, 히스티딘-426, 히스티딘-440, 글리신-441, 아르기닌-485, 트립토판-458, 트립토판-466, 타이로신-470, 타이로신-481, 글루타메이트-546, 아르기닌-551, 글루타메이트-553, 및 트립토판-558과 같은 촉매 활성에 중요한 것으로 공지된 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Douglas C, Collier R, *J Bacteriol* 169: 4967-71 (1987); Wilson B, Colliver R, *Curr Top Microbiol Immunol* 175: 27-41 (1992)); Beattie B et al, *Biochemistry* 35: 15134-42 (1996); Roberts T, Merrill A, *Biochem* J 367: 601-8 (2002); Yates S et al, *Biochem J* 385: 667-75 (2005); Jørgensen R et al, *EMBO Rep* 9: 802-9 (2008)). 콜린 독소 내의 글루타메이트-574 및 글루타메이트-581은 PE 내에서 각각 글루타메이트-546 및 글루타메이트-553와 함께 보존되며(Jørgensen R et al, EMBO Rep 9: 802-9 (2008)), 이에 따라 콜릭스 독소 내의 글루타메이트-574 및/또는 글루타메이트-581은 콜릭스 독소의 효소 활성을 감소시키는 것으로 예측된다.

[0289] [264] 콜릭스 독소, DT, PE, 및 기타 관련 효소의 촉매 도메인은 겹쳐질 수 있기 때문에(Jørgensen R, et al, J Biol Chem 283: 10671-8 (2008)), 촉매 활성을 위해 필요한 아미노산 잔기는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 서열 정렬에 의해 관련된 폴리펩티드 서열에서 예측될 수 있다.

[0290] [265] RIP 계열의 수 개의 구성원은 촉매 잔기와 관련하여 잘 연구되어 왔다. 예를 들면, 대부분의 RIP 계열 구성원은 촉매 분해를 위해 5개의 주요 아미노산 잔기, 예를 들면, 촉매 도메인의 아미노 말단 부근의 2개의 타이로신, 촉매 도메인 중앙 부근의 글루타메이트 및 아르기닌, 및 촉매 도메인의 카복시 말단 부근의 트립토판을 공유한다(참조: Lebeda F, Olson M, *Int J Biol Macromol* 24: 19-26 (1999); Mlsna D et al, *Protein Sci* 2: 429-35 (1993); de Virgilio M et al, *Toxins* 2: 2699-737 (2011); Walsh M, *Virulence* 4: 774-84 (2013))). RIP 계열의 구성원의 촉매 도메인이 겹쳐질 수 있기 때문에, 촉매 활성에 필요한 아미노산 잔기는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 서열 정렬 방법에 의해 RIP 계열의 연구되지 않고/않거나 새로운 구성원에서 예측될 수 있다 [참조: 예를 들면, Husain J et al, *FEBS Lett* 342: 154-8 (1994); Ren J et al, *Structure* 2: 7-16 (1994);

Lebeda F, Olson M, *Int J Biol Macromol* 24: 19-26 (1999); Ma Q et al, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56: 185-6 (2000); Savino C et al, *FEBS Lett* 470: 239-43 (2000); Robertas J, Monzingo A, *Mini Rev Med Chem* 4: 477-86 (2004); Mishra V et al., *J Biol Chem* 280: 20712-21 (2005); Zhou C et al, *Bioinformatics* 21: 3089-96 (2005); Lubelli C et al, *AnalBiochem* 355: 102-9 (2006); Touloupakis E et al., *FEBS J* 213: 2684-92 (2006); Hou X et al, *BMC Struct Biol* 7: 29 (2007); Meyer A et al, *Biochem Biophys Res Commun* 364: 195-200 (2007); Ruggiero A et al, *Protein Pept Lett* 14: 97-100 (2007); Wang T et al, *Amino Acids* 34: 239-43 (2008)].

[0291] [266] 아브린의 A 소단위에는, 예를 들면, 타이로신-74, 타이로신-113, 글루타메이트-164, 아르기닌-167, 및트립토판-198과 같은, 촉매 활성을 위해 중요한 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Hung C et al, Eur J Biochem 219: 83-7 (1994); Chen J et al, Protein Eng 10: 827-33 (1997); Xie L et al, Eur JBiochem 268: 5723-33 (2001)).

[0292] [267] 차리브딘에는, 예를 들면, 발린-79, 타이로신-117, 글루타메이트-167, 및 아르기닌-170과 같은, 촉매 활성을 위해 중요한 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Touloupakis E et al, FEBS J 213: 2684-92 (2006)).

[0293] [268] 신나모민의 A 소단위는, 예를 들면, 타이로신-75, 타이로신-115, 글루타메이트-167, 아르기닌-170, 및 트립토판-201과 같은, 촉매 활성에 중요한 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Hung C et al, Eur J Biochem 219: 83-7 (1994); Chen J et al, Protein Eng 10: 827-33 (1997)).

[0294] [269] 루파쿨린에는, 예를 들면, 타이로신-70, 글루타메이트-85, 타이로신-110, 글루타메이트-159, 및 아르기닌-162와 같은, 촉매 활성에 중요한 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Hou X et al, BMC Struct Biol 7: 29 (2007)).

[0295] [270] 루핀에는, 예를 들면, 타이로신-71, 글루타메이트-86, 타이로신-111, 글루타메이트-160, 및 아르기닌-163과 같은, 촉매 활성에 중요한 수 개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Ma Q et al, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56: 185-6 (2000))

[0296] [271] 옥수수 RIP에는, 예를 들면, 타이로신-79, 타이로신-115, 글루타메이트-167, 아르기닌-170, 및 트립토판-201과 같은, 촉매 활성에 중요한 수 개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Robertus J, Monzingo A, *Mini Rev Med Chem* 4: 477-86 (2004); Yang Y et al, *J Mol Biol* 395: 897-907 (2009)).

[0297] [272] PD-L에는, 예를 들면, PDL-1에서 타이로신-72, 타이로신-122, 글루타메이트-175, 아르기닌-178, 및 트립토판-207과 같은, 촉매 활성에 중용한 수 개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Ruggiero A et al., Biopolymers 91: 1135-42 (2009)).

[0298] [273] 겨우살이 RIP의 소 단위에는, 예를 들면, 타이로신-66, 페닐알라닌-75, 타이로신-110, 글루타메이트-159, 아르기닌-162, 글루타메이트- 166, 아르기닌-169, 및 트립토판-193과 같은, 촉매 활성에 중요한 수 개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Langer M et al, *Biochem Biophys Res Commun* 264: 944-8 (1999); Mishra V et al, *Act Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 2295-2304 (2004); Mishra V et al, *J Biol Chem* 280: 20712-21 (2005); Wacker R et al, *J Pept Sci* 11: 289-302 (2005)).

[0299] [274] 미국자리공 항바이러스 단백질(PAP)에는, 예를 들면, 라이신-48, 타이로신-49, 아르기닌-67, 아르기닌-68, 아스파라긴-69, 아스파라긴-70, 타이로신-72, 페닐알라닌-90, 아스파라긴-91, 아스파르테이트-92, 아르기닌-122, 타이로신-123, 글루타메이트- 176, 아르기닌-179, 트립토판-208, 및 라이신-210과 같은, 촉매 활성에 중요한 수 개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Rajamohan F et al, *J Biol Chem* 275: 3382-90 (2000); Rajamohan F et al., *Biochemistry* 40: 9104-14 (2001)).

[0300] [275] 리신의 A 쇄에는, 예를 들면, 아르기닌-48, 타이로신-80, 아스파라긴-122, 타이로신-123, 글루타메이트-177, 아르기닌- 180, 세린-203, 아스파라긴-209, 트립토판-211, 글리신-212, 아르기닌-213, 세린-215, 및 이소루이신-252와 같은, 촉매 활성에 중요한 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Frankel A et al, *Mol CellBiol* 9: 415-20 (1989); Schlossman D et al, *Mol CellBiol* 9: 5012-21 (1989); Gould J et al, *Mol Gen Genet* 230: 91-90 (1991); Ready M et al, *Proteins* 10: 270-8 (1991); Rutenber E et al, *Proteins* 10: 240-50 (1991); Monzingo A, Robertas, *J, J Mol Biol* 227: 1136-45 (1992); Day P et al, *Biochemistry* 35: 11098-103 (1996); Marsden C et al, *Eur J Biochem* 11: 153-62 (2004); Pang Y et al, *PLoS One* 6: e17883 (2011)). 리신에는, 결실되는 경우, 예를 들면, N24, F25, A28, V29, Y81, V82, V83, G84, E146, E147, A148,

1149, S168, F169, 1170, 1171, C172, 1173, Q174, M175, 1176, S177, E178, A179, A180, R181, F182, Q183, Y184, D202, P203, 1206, T207, N210, S211, W212, 및 G213과 같은 리신의 촉매 활성을 손상시키는 것으로 공지된 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(Munishkin A, Wool I, *J Biol Chem* 270: 30581-7 (1995); Berrondo M, Gray J, *Proteins* 79: 2844-60 (2011)).

[0301] [276] 사포린에는, 예를 들면, 타이로신-16, 타이로신-72, 타이로신-120, 글루타메이트-176, 아르기닌- 179, 및 트립토판-208과 같은, 촉매 활성에 중요한 것으로 공지된 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Bagga S et al, J Biol Chem 278: 4813-20 (2003); Zarovni N et al, Cane Gene Ther 14: 165-73 (2007); Lombardi A et al, FASEB J 24: 253-65 (2010)). In addition, a signal peptide may be included to reduce catalytic activity (Marshall R et al, Plant J 65: 218-29 (2011)).

[0302] [277] 트리코산틴에는, 예를 들면, 타이로신-70, 타이로신- 111, 글루타메이트-160, 아르기닌-163, 라이신-173, 아르기닌-174, 라이신-177, 및 트립토판-192와 같은, 촉매 활성에 중요한 것으로 공지된 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Wong et al, Eur JBiochem 221: 787-91 (1994); Li et al., Protein Eng 12: 999-1004 (1999); Yan et al, Toxicon 37: 961-72 (1999); Ding et al, Protein Eng 16: 351-6 (2003); Guo Q et al, Protein Eng 16: 391-6 (2003); Chan D et al, Nucleic Acid Res 35 : 1660-72 (2007)).

[0303] [278] 진균성 리보독소는 RIP 계열의 구성원으로서 동일한 보편적으로 보존된 SRL 리보소옴 구조를 효소적으로 표적화하며, 대부분의 진균 리보독소는 RNase T1 형 촉매 도메인 서열 및 2차 구조를 공유한다(참조: Lacadena J et al, FEMS Microbiol Rev 31: 212-37 (2007)). 대부분의 진균 리보독소 및 관련된 효소는 촉매분해를 위한 3개의 고도로 보존된 아미노산 잔기, 2개의 히스티딘 잔기 및 글루타메이트 잔기를 공유한다(예를 들면, RNase T1에서 히스티딘-40, 글루타메이트-58, 및 히스티딘-92). DSKKP 모티프(motif)(SEQ ID NO:135)는 종종 진균 리보독소에 존재하여 SRL을 특이적으로 결합한다(Kao R, Davies J, J Biol Chem 21 A: 12576-82 (1999)). 진균 리보독소 촉매 도메인은 겹쳐질 수 있기 때문에, 촉매 활성에 필요한 아미노산 잔기는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 하나 이상의 서열 정렬 방법을 이용하는 연구되지 않거고/않거나 새로운 진균 리보독소에서 예측될 수 있다.

[0304] [279] Aspf1에 있어서, 16개의 아미노산 잔기(위치 7-22)의 내부 결실은 이의 리보핵산분해 활성 및 세포독성을 심각하게 손상시켰다(참조: Garcia-Ortega L et al, FEBS J212: 2536-44 (2005)).

[0305] [280] 미토길린에는, 예를 들면, 아스파라긴-7, 히스티딘-49, 글루타메이트-95, 라이신-111, 아르기닌-120, 및 히스티딘-136과 같은, 촉매 활성에 중요한 것으로 공지된 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: Kao R et al, Mol Microbiol 29: 1019-27 (1998); Kao R, Davies J, FEBS Lett 466: 87-90 (2000)).

[0306] [281] 레스트릭토신에는, 예를 들면, 타이로신-47, 히스티딘-49, 글루타메이트-95, 라이신-110, 라이신-111, 라이신-113, 아르기닌-120, 및 히스티딘-136과 같은, 촉매 활성에 중요한 것으로 공지된 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참조: ayak S, Batra J, Biochemistry 36: 13693-9 (1997); Nayak S et al, Biochemistry 40: 9115-24 (2001); Plantinga M et al, Biochemistry 50: 3004-13 (2011)).

[0307] [282] α-사르신에는, 예를 들면, 트립토판-48, 히스티딘-49, 히스티딘-50, 트립토판-51, 아스파라긴-54, 이소루이신-69, 글루타메이트-95, 글루타메이트-96, 라이신-11, 라이신-112, 라이신-114, 아르기닌-121, 히스티딘-136, 히스티딘-137, 라이신-145과 같은, 촉매 활성에 중요한 것으로 공지된 수개의 아미노산 잔기가 존재한다(참고: Lacadena J et al, *Biochem* J309: 581-6 (1995); Lacadena J et al, *Proteins* 37: 474-84 (1999); Martinez-Ruiz A et al, *Toxicon* 37: 1549-63 (1999); de Antonio C et al, *Proteins* 41 : 350-61 (2000); Masip M et al, *Eur J Biochem* 268: 6190-6 (2001)).

[0308] [283] 시가 독소 계열의 구성원의 A 소단위의 세포독성은 돌연변이 또는 트렁케이션에 의해 변경, 감소 또는 제거될 수 있다. 위치 표지된 타이로신-77, 글루타메이트- 167, 아르기닌-170, 타이로신- 114, 및 트립토판-203은 Stx, Stxl, 및 Stx2의 촉매 활성에 중요한 것으로 공지되었다(참고: Hovde C et al, *Proc Natl Acad Sci* USA 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al., *Biochemistry* 31 : 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al, *Mol Gen Genet* 241 : 467-73 (1993); Ohmura M et al, *Microb Pathog* 15: 169-76 (1993); Cao C et al, *Microbiol Immunol* 38: 441-7 (1994); Suhan M, Hovde C, *Infect Immun* 66: 5252-9 (1998)). 글루타메이트-167 및 아르기닌-170 둘 다를 돌연변이시키면 세포-유리 리보소옴 불활성화 검정에서 Slt-I Al의 촉매 활성을 제거시켰다(참조: LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). 소포체 내의 Slt-I Al의 새로운 발현을 사용하는 또 다른 접근법에서, 글루타메이트-167 및 아르기닌-170 둘 다를 돌연변이시키면 이러한 발현 수준에서 Slt-I Al 단

편 세포독성을 제거시켰다(참조: LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). 트렁케이션 분석은, 잔기 75 내지 268로부터의 StxA의 단편은 여전히 시험관내에서 상당한 효소 활성을 보유하는 것으로 입증되었다(참조: Haddad, *J Bacteriol* 175: 4970-8 (1993)). Slt-I A1 함유 잔기 1-239의 트렁케이트된 단편은 세포질에서의 신규한 발현에 의해 시험관내 및 세포독성에서 유의적인 효소 활성을 나타내었다(참조: LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). 소포체에서 잔기 1-139로 트렁케이트된 Slt-I A1 단편의 발현은 세포독성이 아니었는데, 그 이유는 이것이 세포질에 역으로 이동시킬 수 없었기 때문이다(참조: LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)).

[0309] [284] 시가 독소 A 소단위 내의 효소 활성 및/또는 세포독성을 위한 가장 중요한 잔기는 다음과 같은 잔기-위치로 맵핑되었다: 특히, 아스파라긴-75, 타이로신-77, 타이로신-114, 글루타메이트-167, 아르기닌-170, 아르기닌-176, 및 트립토판-203(참조: Di, Toxicon 57: 535-39 (2011)). 특히, Stx2A 함유 글루타메이트-E167-대-라이신 및 아르기닌-176-대-라이신 돌연변이의 이중-돌연변이체 작제물은 완전히 불활성화되지 않은 반면에; Stx1 및 Stx2 내의 많은 단일 돌연변이는 세포독성이 10배 감소하는 것으로 나타났다. 추가로, Stx1 A의 1-239 또는 1-240으로의 트렁케이션은 이의 세포독성을 감소시켰고, 유사하게 Stx2A의 보존된 소수성 잔기로의 트렁케이션은 이의 세포독성을 감소시켰다. 시가 독소 A 소단위에서 진핵 리보소옴 및/또는 진핵 리보소옴 억제를 결합하기 위한 가장 중요한 잔기는 특히, 다음의 잔사 위치, 아르기닌-172, 아르기닌-176, 아르기닌-179, 아르기닌-188, 타이로신-189, 발린-191, 및 루이신-233에 맵핑되었다(참조: McCluskey A et al, PLoS One 7: e31 191 (2012).

[0310] [285] 시가형 독소 1A 소단위 트렁케이션은 촉매적으로 불활성이며 시험관내에서 리보소옴을 효소적으로 불활성화할 수 있고, 세포 내에서 발현되는 경우에는 세포독성이다(참고: LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). 완전한 효소 활성을 나타내는 최소의 시가 독소 A 소단위 단편은 Slt1A의 잔기 1-239로 구성된 폴리펩티드이다(참고: LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). 실질적 촉매 활성을 보유하는 것으로 보고된 시가 독소 A 소단위의 최소 단편은 StxA의 잔기 75-247이었지만(Al-Jaufy, *Infect Immun* 62: 956-60 (1994)), 진핵 세포 내에서 새롭게 발현된 StxA 트렁케이션은 세포질에 도달하고 리보소옴의 촉매 불활성화를 발휘하기 위해 단지 잔기 240까지를 필요로 한다(참고: LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)).

[0311] [286] SLT-1A (서열 번호: 1) 또는 StxA (서열 번호:2)로부터 유도된, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화 분자의 특정한 구체예에서, 이들 변화는 위치 75에서 아스파라긴의 치환, 위치 77에서 타이로신, 위치 114에서 타이로신, 위치 167에서 글루타메이트, 위치 170에서 아르기닌, 위치 176에서 아르기닌, 및/또는 위치 203에서 트립토판의 치환을 포함한다. 이러한 치환의 예는 위치 75에서 아스파라긴, 위치 77에서 타이로신, 위치 114에서 타이로신의 세린으로의 치환, 글루타메이트 위치 167의 글루타메이트로의 치환, 위치 170에서 아르기닌의 알라닌으로의 치환, 위치 176에서 아르기닌의 라이신으로의 치환, 및/또는 위치 203에서 트립토판의 알라닌으로의 치환과 같은, 선행기술을 기본으로 한 당업자에게 공지될 것이다. 시가 독소 효소 활성 및/또는 세포독성을 증진시키거나 감소시키는 다른 돌연변이는 본 발명의 영역 내에 있으며 본원에 개시된 익히 공지된 기술 및 검정을 이용하여 측정할 수 있다.

[0312] [287] 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화 분자는 하나 이상의 추가의 제제에 임의로 접합될 수 있으며, 이는 본원에 기재된 바와 같은 제제를 포함하여, 당해 분야에 공지된 치료학적 및/또는 진단학적 제제를 포함할 수 있다.

[0313] <u>V. 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드 및 이를 포함하는 세포-표적화된 분자의 일반적인 작용</u>

[0314] [288] 본 발명은 물질의 다양한 조성물의 성분으로서 사용될 수 있는 각종의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드, 예를 들면, 세포-표적화된 세포독성 분자 및 진단학적 조성물을 기술한다. 특히, CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드는 각종 단백질 치료제의 성분, 예를 들면, 암, 면역 질환 및 미생물 감염을 포함하는, 다양한 질환의 치료를 위한 특이적인 세포 유형의 표적화된 사멸을 위한, 면역독소 및 리간드-독소 융합체로서의 용도를 갖는다.

[0315] [289] 본 발명의 어떠한 CD8+ T-세포 초-면역화된, 폴리펩티드도, 예를 들면, 양서류, 조류, 어류, 포유류, 파충류 또는 상어와 같은, 척색 동물 내의 특이적 세포형에 대한 세포 내재화를 표적화하는 세포-표적화 잔기가 추가된 잠재적으로 유용한, 치료학적, 세포-표적화된 분자로 가공될 수 있다. 유사하게, 본 발명의 어떠한 B-세포 항원결정기 탈-면역화 폴리펩티드도 척색 동물 내의 특이적인 세포형으로의 세포 내재화를 표적화하는 세포-표적화의 추가로 잠재적으로 유용한, 치료학적, 세포-표적화된 분자로 가공될 수 있다. 본 발명은 세포 표적화

를 작용시키기 위해 결합 영역과 작동적으로 연합된 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드를 포함하는 각종의 세포독성 세포-표적화된 분자를 제공하여 세포독성 세포-표적화 분자가 T-세포 항원결정기를 선택적으로 전달하고, 내인성 물질을 사멸시키고, 이의 성장 억제시키고/시키거나 특이적 세포 유형을 검출하도록 한다. 이러한 시스템은, 특정한 수의 다양한 결합 영역이 본 발명의 어떠한 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드를 다양화하기 위해 표적화하는 데 사용될 수 있다는 점에서 모듈러식이다.

[0316] [290] MHC 클래스 I 복합체에 의한 T-세포 면역원성 항원결정기 펩티드의 제시는 CTL-매개된 세포분해에 의해 사멸시키기 위한 제시 세포를 표적화한다. MHC 클래스 I 펩티드를 표적-세포-내재화 치료제의 작동체 폴리펩티드 성분을 전달하는 프로테아좀으로 가공함으로써, 면역-자극성 항원의 표적화된 전달 및 제시는 척추동물 표적 세포의 내인성 MHC 클래스 I 경로를 활용함으로써 달성할 수 있다. 예를 들면, 고 면역원성을 갖는 공지된 바이러스 항원결정기-펩티드와 같은 면역-자극성 비-자체 항원의 표적화된 세포에 의한 제시는 다른 면역 세포로 시그날링하여 표적 세포를 파괴하고 기관 내의 표적 세포 부위에 대하여 보다 면역성인 세포를 수집하도록 할 수 있다.

[0317] [291] 따라서, 예를 들면, 세포독성 독소 작동체 영역을 포함하는 잠재적 치료제와 같은, 이미 세포독성인 분자는 본 발명의 방법을 사용하여 보다 세포독성인 분자로 가공되고/되거나 작동체 T-세포를 통해 작동하는 추가의 세포독성 메카니즘을 가질 수 있다. 이들 다수의 세포독성 메카니즘은 서로 보완(예를 들면, 직접 표적 세포 사멸 및 간접(CTL-매개된) 세포사멸 둘 다를 제공함으로써)하고, 서로 과다하게 백업(예를 들면, 서로의 부재하에 세포 사멸의 한가지 메카니즘을 제공함으로써)하고/하거나, 치료학적 내성의 발달에 대하여 보호(2개의 상이한 세포-사멸 메카니즘을 동시에 차단하기 위해 진화하는 악성 또는 감염된 세포의 개연성이 적은 상황에 대한 내성을 제한함으로써)할 수 있다.

[0318] [292] 또한, 세포독성을 위한 독소 및/또는 효소 영역에 의존하는 모 세포독성 분자는, 임베딩된 T-세포 항원결정기를 사용하거나 돌연변이 또는 독립적으로 트렁케이션과 같은 다른 수단에 의해, T-세포 항원결정기의 임베딩 및 모 분자의 효소 활성의 불활성화 둘 다에 의한 T-세포 항원결정기 세포질성 전달 및 제시를 통해서만 세포독성으로 가공될 수 있다. 이러한 접근법은 하나의 세포독성 메카니즘을 제거하면서 다른 것을 가하며 국소 영역에 대한 면역-자극의 능력을 추가한다. 더욱이, 세포독성을 위한 독소 및/또는 효소 영역에 의존하는 모 세포독성 분자는 모 분자의 효소 도메인에서 T-세포 항원결정기를 임베딩함으로써 T-세포 항원결정기 세포질성 전달 및 제시를 통해서만 세포독성이 되도록 가공하여 효소 활성이 이형 T-세포 항원결정기를 생성하는 서열 변화에 의해 감소되거나 제거되도록 한다. 이는, 세포내로 내재화하고, 세포질로, 세포독성 및 국소 면역-자극을 위한 T-세포 항원결정기 프로테아좀 전달 및 제시에 의존하는, 효소적으로 불활성인 세포독성 분자 내로, 경로화하는 능력을 갖는, 효소적으로-세포독성인 분자의 1단계 변형을 허용한다.

[0319] A. 세포 표면에서 MHC 클래스 I 제시를 위한 T-세포 항원결정기의 전달

[0320] [293] 본 발명의 특정의 CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드 및 세포-표적화 분자의 한가지 작용은 세포에 의한 MHC 클래스 I 제시를 위한 하나 이상의 T-세포 항원결정기의 전달이다. 외인성 T-세포 항원결정기 펩티드의 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템으로의 전달을 사용하여 표적 세포를 유도함으로써 세포 표면 상에서 MHC 클래스 I 분자와 관련된 T-세포 항원결정기 펩티드를 나타낼 수 있으며, 이는 후속적으로 CD8+ 작동체 T-세포의 활성화를 초래하여 표적 세포를 공격하도록 한다.

[0321] [294] 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드 및 세포-표적화 분자의 특정 구체예는 하나 이상의 T-세포 항원결정기를 표적 세포의 프로테아좀으로 전달할 수 있다. 이후에, 활성화된 T-세포 항원결정기는 단백질분해적으로 프로세싱되어 표적 세포의 외부 표면에서 MHC 클래스 I 경로에 의해 제시된다.

[0322] [295] 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드 및 세포-표적화 분자의 이들 T-세포 항원결정기의 적용은 방대하다. 포유동물 유기체에서 매 핵화된 세포는 MHC 클래스 I 분자에 복합된 이들의 세포 외부 표면 상에서 면역원성 T-세포 항원결정기 펩티드의 MHC 클래스 I 경로를 제시할 수 있다. 또한, T-세포 항원결정기 인식의 민감성은 정교하여 소수의 MHC-I 펩티드 복합체만이 제시되기 위해 요구되며-심지어 단일 복합체의 제시는 작동체 T-세포에 의한 인식의 경우 충분할 수 있다(참고: Sykulev Y et al, Immunity 4: 565-71 (1996)).

[0323] [296] 이형 T-세포 항원결정기가 표적 세포 표면에 제시되도록 하기 위하여, 이형 T-세포 항원결정기-펩티드를 전달하는 폴리펩티드는 표적 세포내에서 프로테아좀에 의해 분해되어 T-세포 항원결정기를 포함하는 펩티드 단편이 생성되어 MHC 클래스 I 분자상에 로딩하기 위한 ER의 관강내로 수송되어야 한다.

[0324] [297] 또한, CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드는 우선 표적 세포의 내부에 도달한 후 표적 세포내에서 프로테아좀과 접촉한다. 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드를 표적 세포의 내부로 전달하기 위하여, 본 발명의 세포-표적화 분자는 표적 세포 내재화를 할 수 있어야 한다. 일단 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드가 세포-표적화 분자의 성분으로서 내재화되면, CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드는 예를 들면, 세포내 이입 소낭과 같은 조기 엔조조말 성분내에 전형적으로 잔류할 것이다. 이후에, CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드는 적어도 하나의 완전한, 이형 T-세포 항원결정기를 지닌 표적 세포의 프로테아좀에 도달하여야 한다.

[0325] [298] 이들 작용은 숙련가에게 당해 분야에 공지된 다양한 표준 기술에 의해 검출하고 모니터링할 수 있다. 예를 들면, T-세포 항원결정기 펩티드를 전달하고 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템에 의해 항원결정기 펩티드의 제시를 구동시키는 본 발명의 세포-표적화된 분자의 능력은 예를 들면, MHC 클래스 I/펩티드 복합체의 직접적인 검출/가시화, MHC 클래스 I 분자에 대한 이형 T-세포 항원결정기 펩티드의 결합 친화성의 측정, 및/또는 CTL 반응을 모니터링함으로써 표적 세포에서 MHC 클래스 I-항원결정기 펩티드 복합체 제시의 작용적 결과의 측정을 포함하는, 다양한 시험관내 및 생체내 검정을 사용하여 시험할 수 있다.

[0326] [299] 본 발명의 폴리펩티드 및 분자의 이러한 작용을 모니터링하기 위한 특정의 검정은 시험관내 또는 생체외에서 특이적인 MHC 클래스 I/펩티드 항원 복합체의 직접적인 검출을 포함한다. 펩티드-MHC 클래스 I 복합체의 직접적인 가시화 및 정량화를 위한 일반적인 방법은 숙련가에게 공지된 다양한 면역-검출 시약을 포함한다. 예를 들면, 특이적인 모노클로날 항체를 개발하여 특수한 MHC/클래스 I/펩티드 항원 복합체를 인식할 수 있다(참고: Porgador A et al, *Immunity* 6: 715-26 (1997)). 유사하게, TCR-STAR 시약(Altor, Mirmar, FL, U.S.)과 같은 가용성의, 다량체성 T 세포 수용체를 사용하여 특이적인 MHC I/항원 복합체를 직접 가시화하거나 정량화할 수 있다(참고: Zhu X et al, *J Immunol* 176: 3223-32 (2006)). 이들 특이적인 mAb 또는 가용성의, 다량체성 T-세포 수용체를 사용하여 예를 들면, 면역조직화학, 유동 세포분석법, 및 효소-연결된 면역 검정(ELISA)을 포함하는 다양한 검출 방법과 함께 사용할 수 있다.

[0327] [300] MHC I/펩티드 복합체의 직접적인 확인 및 정량화를 위한 대안의 방법은 예를 들면, 프로프레즌트 항원 제시 검정(ProPresent Antigen Presentation Assay)(Prolmmune, Inc., Sarasota, FL, U.S.)과 같은 질량 분광분석 검정을 포함하며, 여기서 펩티드-MCH 클래스 I 복합체는 세포의 표면으로부터 추출된 후, 펩티드가 정제되어 서열분석 질량 분광법에 의해 확인된다(참고: Falk K et al, *Nature* 351 : 290-6 (1991)).

[0328] [301] 본 발명의 폴리펩티드 및 분자의 T-세포 항원결정기 전달 및 MHC 클래스 I 제시 작용을 모니터링하기 위한 특정의 검정은 MHC 클래스 I 및 펩티드 결합 및 안전성을 모니터하기 위한 컴퓨터처리되고/되거나 실험적인 방법을 포함한다. 수개의 소프트웨어 프로그램이 예를 들면, 면역 항원결정기 데이타베이스 및 분석 공급원(IEDB) 분석 공급원 MHC-I 결합 예측 컨센서스 도구(The Immune Epitope Database and Analysis Resource)(Kim Y et al., *Nucleic Acid Res* 40: W525-30 (2012)와 같은, MHC 클래스 I 대립형질에 대한 항원결정기 펩티드의 결합 반응을 예측하기 위해 숙련가가 사용하기 위해 이용가능하다. 예를 들면, 결합 운동에너지를 정량화하고/하거나 비교하기 위한 세포 표면 결합 검정 및/또는 표면 플라스몬 공명 검정과 같은 수개의 실험 검정을 통상적으로 적용하여 왔다(참고: Miles K et al, *Mol Immunol* 48: 728-32 (2011)). 또한, 공지된 대조군과 비교한 것으로서, 제공된 MHC 클래스 I 대립형질에 대한 3원 MHC-펩티드 복합체를 안정화시키는 펩티드의 능력의 척도를 기준으로 다른 MHC-펩티드 결합 검정을 개발시켜 왔다(예를 들면, Prolmmmune, Inc.로부터의 MHC-펩티드 결합 검정).

[0329] [302] 대안적으로, 세포 표면에서 MHC 클래스 I/펩티드 항원 복합체의 결과의 측정은 특이적인 복합체에 대한 세포독성 T 세포(CTL) 반응을 모니터함으로써 수행할 수 있다. 이들 측정은 MHC 클래스 I 사량체 또는 오량체 시약을 사용한 CTL의 직접적인 표지를 포함한다. 사량체 또는 오량체는 주요 조직적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex: MHC) 대립형질 및 펩티드 조합에 의해 측정된, 특수한 특이성의 T 세포 수용체에 직접 결합한다. 또한, ELISA 또는 효소-연결된 면역스폿((enzyme-linked immunospot)(ELIspot)에 의한 인터페론 감마 또는 인터루킨과 같은 방출된 사이토킨의 정량화는 일반적으로 특이적인 CTL 반응을 확인하기 위해 검정된다. CTL의 세포독성 능력은 전통적인 51 크롬(Cr) 방출 검정 또는 대안의 비-방사성 세포독성 검정(예를 들면, 미국 위스콘신주 매디슨 소재의 Promega Corp.에서 시판되는 CytoTox96® 비-방사활성 키트 및 CellTox™ CellTiter-GLO® kits), Granzyme B ELISpot, 카스파제 검정 또는 LAMP-1 전좌 유동 세포분석 검정(translocation flow cytometric assay)을 포함하는 다수의 검정을 사용하여 측정할 수 있다. 표적 세포의 사멸을 특이적으로 모니터하기 위하여, 카복시플루오로레세인 디아세테이트 석신이미딜 에스테르(CFSE)를 사용하여 시험관내 또는 생체내 시험을 위해 목적한 세포 집단을 용이하고 신속하게 표지함으로써 항원결정기 특이적

인 CSFE 표지된 표적 세포의 사멸을 모니터링한다(참조: Durward M et al, J Vis Exp 45 pii 2250 (2010)).

[0330] [303] MHC 클래스 I 제시에 대한 생체내 반응은 MHC 클래스 I/항원 증진제(예를 들면, 펩티드, 단백질 또는 불활성화/약화된 바이러스 백신)을 투여한 후 활성제(예를 들면, 바이러스)로 챌린지하고 예방접종되지 않은 대조군과 비교하여, 당해 제제에 대한 반응을 모니터링할 수 있다. 생체외 샘플은 앞서 기술된 것과 유사한 방법(예를 들면, CTL 세포독성 검정 및 사이토킨 방출의 정량화)을 사용하여 CTL 활성을 모니터링할 수 있다.

[0331] [304] HLA-A, HLA-B, 및/또는 HLA-C 분자는 면역 친화성(예를 들면, 항-MHC 항체 "풀다운(pulldown)" 정제)을 사용한 용해(lysis) 후 중독된 세포로부터 분리하고 관련된 펩티드(즉, 분리된 MHC 분자에 의해 제시된 펩티드)는 정제된 관련된 펩티드로부터 회수한다. 회수된 펩티드는 서열분석 질량 분광법으로 분석한다. 질량 분광법 데이타는 외인성(비-자가) 펩티드(T-세포 항원결정기 X)의 서열 및 사람용의 국제 단백질 지표("자가" 또는 비-면역원성 펩티드를 나타냄)로 이루어진 단백질 데이타베이스 라이브러리에 대해 비교한다. 펩티드를 가능성 데이타베이스에 따라 유의성으로 순위를 매긴다. 모든 검출된 항원성(비-자가) 펩티드 서열을 목록화한다. 데이타는 스크램블드 데코이 데이타베이스(scrambled decoy database)에 대해 조사함으로써 거짓 히트(false hit)를 감소시켜 입증한다(참고: 예를 들면, Ma B, Johnson R, *Mol Cell Proteomics* 11: 01 11.014902 (2012)). 결과는, T-세포 항원결정기 X로부터의 펩티드가 중독된 표적 세포의 표면에서 MHC 복합체로 제시됨을 입증할 것이다.

[0332] [305] 제시된 펩티드-항원-MHC 복합체는 발현된 항원-특이적인 HLA 분자로 인해 세포 사이에서 변할 수 있다. 이후에, T-세포는 상이한 항원-특이성을 지닌 상이한 TCR 분자를 사용하여 세포 표면에 나타난 특이적인 펩티드-항원-MHC 복합체를 인식할 수 있다.

[0333] [306] 다수의 T-세포 항원결정기가 예를 들면, 단일의 프로테아좀 전달 작동체 폴리펩티드내 2개 이상의 상이한 T-세포 항원결정기를 임베딩함에 의한 것과 같이, 본 발명의 세포-표적화된 분자에 의해 전달될 수 있으므로, 본 발명의 단일의 세포-표적화된 분자는 예를 들면, 상이한 HLA 대립형질을 지닌 사람에서와 같이 상이한 MHC 클래스 변이체를 가진 동일한 종의 척색동물 내에서 효과적일 수 있다. 이는 MHC 복합체 단백질 다양성 및 다형성을 기준으로 대상체의 상이한 소-집단에서 상이한 효능을 갖는 상이한 T-세포 항원결정기를 동시 결합시키는 것을 허용할 수 있다(참고: 예를 들면, Yuhki N et al, *J Hered* 98: 390-9 (2007)). 예를 들면, 사람 MHC 복합체 단백질, HLA 단백질은 유전 혈통, 예를 들면, 아프리카인(사하라 사막 이남), 아메리카 원주민, 백인, 몽고인, 뉴기니인 및 오스트레일리아인, 또는 태평양 섬인(Pacific islander)을 기준으로 한 사람 중에서 변한다(참고: 예를 들면, Wang M, Claesson *M, Methods Mol Biol* 1 184: 309-17 (2014)).

[0334] [307] T-세포 반응의 활성화는 표적화된 세포에 대해 환자 자신의 면역계를 자극시키기 위한 특정의 항-암, 항-신생물, 항-종양, 및/또는 항-미생물성 생물학적 약물의 바람직한 특징이다. 풍부하고 강력한 T-세포 반응의 활성화는 또한 많은 백신의 바람직한 특징이다(참고: Aly HA, *J Immunol Methods* 382: 1-23 (2012)). 유기체내에서 표적 세포에 의한 T-세포 항원결정기의 제시는 표적 세포 및/또는 유기체내 이의 일반적인 장소에 대한 풍부한 면역 반응의 활성화를 가져올 수 있다. 따라서, 제시를 위한 T-세포 항원결정기의 표적화된 전달은 치료학적 요법 동안에 T-세포 반응을 가공하기 위해 이용될 수 있다.

[0335] B. 표적화된 세포독성 및/또는 CTL의 보충을 통한 세포 사멸

[0336] [308] 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈- 면역화 폴리펩티드를 포함하는 본 발명의 세포-표적화 분자는: 1) MHC 클래스 I 제시를 위한 세포형 특이적인 T-세포-항원결정기 전달 및 2) 강력한 세포독성 둘 다를 제공할 수 있다. 또한, 본 발명의 세포-표적화 분자의 특정 구체예는 포유동물에게 투여시 특정의 면역 반응의 경향성을 감소시키는, 탈-면역화를 제공한다.

[0337] [309] 본 발명의 세포-표적화 분자의 특정 구체예에서, 물리적으로 커플링된 세포를 세포-표적화 잔사(예를 들면, 세포-표적화 결합 영역)의 세포외 표적 생물분자와 접촉시, 본 발명의 세포-표적화된 분자는 세포의 사멸을 유발할 수 있다. 세포 사멸의 메카니즘은 예를 들면, 독소 작동체 영역의 효소적 활성을 통해 직접적으로, 또는 CTL-매개된 세포분해를 통해 간접적으로 존재할 수 있으며, 생체외 조작된 표적 세포, 시험관내에서 배양된 표적 세포, 시험관내에서 배양된 조직 샘플 내 표적 세포, 또는 생체내 표적 세포와 같이, 표적 세포의 다양한 조건하에서 존재할 수 있다.

[0338] 1. T-세포 항원결정기 전달 및 MHC 클래스 I 제시를 통한 간접적인 세포 사멸

[0339] [310] B-세포 항원결정기 탈-면역화의 존재 또는 부재하에서, 본 발명의 T-세포 항원결정기를 전달하는, CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드를 간접적인 세포 사멸을 위한 세포-표적화 분자의 성분으로서 사용할 수 있다. 본

발명의 세포-표적화된 분자의 특정 구체예는, 이들이 세포-표적화 분자의 표적 내재화시 표적 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로에 하나 이상의 T-세포 항원결정기를 전달하는 본 발명의 CD8+ T-세포 항원결정기 제시 폴리펩티드를 포함하므로 세포독성이다.

[0340] [311] 본 발명의 세포-표적화된 분자의 특정 구체예에서, 물리적으로 커플링된 세포와 세포-표적화 잔사(즉, 세포-표적화 결합 영역)의 세포외 표적 생물분자의 접촉시, 본 발명의 세포-표적화 분자는 예를 들면, 표적 세포 및 CTL의 후속적인 보충에 의한 하나 이상의 T-세포 항원결정기의 제시를 통해서와 같이, 세포의 사멸을 간접적으로 유발할 수 있다.

[0341] 2. 세포-표적화된 독소 세포독성을 통한 직접적인 세포 사멸

[0342] [312] 본 발명의 T-세포 항원결정기를 전달하는, CD8+ T-세포 초-면역화, 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드는 직접적인 세포 사멸을 위한 세포-표적화 분자의 성분으로서 사용될 수 있다.

[0343] [313] 많은 천연적으로 존재하는 독소는 진핵 세포를 사멸시키기 위해 적응되어 있으므로, 독소-유도된, 프로테아좀 전달 작동체 영역을 사용하여 설계된 세포독성 단백질은 강력한 세포-사멸 활성을 나타낼 수 있다. 특히, 프로테아좀 전달 작동체 영역은 또한 리보독성 독소 작동체 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 그러나, 예를 들면, 리보소옴을 촉매적으로 불활성화시키지 않지만 다른 메카니즘으로 인해 세포독성인 폴리펩티드와 같은 다른 독소 작동체 영역도 본 발명의 세포-표적화 분자에 사용하기 위해 고려된다. 예를 들면, Gs알파 소단위를 공격함에 의한 콜릭스 독소, 열-불안정성 장독소, 및 백일해 독소 이형삼량체 G 단백질.

[0344] [314] ABx 독소 상과의 많은 구성원의 A 소단위는, 세포의 세포질내에서 진핵 세포를 사멸시킬 수 있는 효소 도메인을 포함한다. 독소 효소 도메인을 포함하는 다수의 ABx 독소-유도된, 폴리펩티드내에서 B-세포 항원결정기의 T-세포 항원결정기를 사용한 대체는 이들의 효소 활성을 유의적으로 변경시키지 않는다. 따라서, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드는 세포 사멸의 2개의 메카니즘을 잠재적으로 제공할 수 있다.

[0345] [315] 본 발명의 세포-표적화된 분자의 특정 구체예는, 이들이 활성 독소 성분을 포함하는 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드이므로 세포독성이다.

[0346] [316] 본 발명의 세포-표적화된 분자의 특정의 구체예에서, 물리적으로 커플링된 세포의 세포-표적화 잔사(예를 들면, 세포-표적화된 결합 영역)와 접촉시, 본 발명의 세포-표적화된 분자는 예를 들면, 독소 작동체 영역의 효소 활성을 통해서와 같이, 세포의 사멸을 직접 유발할 수 있다.

[0347] C. 포유동물에 대한 투여를 포함한 적용을 증진시키는 탈-면역화

[0348] [317] 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자는, 포유동물에서 바람직하지 않은 면역 반응의 경향성이 감소되어 있는 한편 포유동물에서 바람직한 면역 반응을 생산하는 가능성이 증가되어 있으므로 치료제 및/또는 진단제로서 포유동물 종에게 투여하기 위한 증진된 유용성을 갖는다.

[0349] [318] 본 발명의 특정의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 독소-유도된 폴리펩티드는 다양한 포유동물에게 투여시 이들의 항원성 프로파일에 있어서 상이할 수 있지만 감소된 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 항원성 및/또는 면역원성을 갖는 것으로 예측될 수 있다. 특정의 구체예에서, 탈면역화 CD 8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드가 유도되었던 원래의 독소 폴리펩티드의 바람직한 생물학적 작용은, B-세포 항원결정기(들)가 파괴되어 CD8+ T-세포 항원결정기가 첨가된 후 본 발명의 폴리펩티드에서 제시된다. 또한, B-세포 항원결정기는 성숙한 CD4+ T-세포의 항원결정기와 흔히 일치하거나 오버랩되므로, B-세포 항원결정기의 파괴는 흔히 CD4+ T-세포 항원결정기를 동시에 파괴한다.

[0350] D. 세포형 중의 선택적인 세포독성

[0351] [319] 본 발명의 특정의 세포-표적화된 분자는 표적화된, 바이스탠더 세포(bystander cell)의 선택적인 사멸에 있어서의 용도를 갖는다. 면역원성 T-세포 항원결정기의 표적 세포의 MHC 클래스 I 경로로의 전달을 표적화함으로써, T-세포 항원결정기의 후속적인 제시 및 본 발명의 세포-표적화된 분자에 의해 유도된 표적 세포의 CTL-매개된 세포독성이 제한되어 표적화되지 않은 세포의 존재하에서 선택된 세포형을 우선적으로 사멸시킬 수 있다. 또한, 다양한 독소 독소 작동체 영역의 강력한 세포독성 활성으로 인한 표적 세포의 사멸은 면역원성 T-세포 항원결정기 및 세포독성 독소 작동체 폴리펩티드의 동시 전달과 함께 표적 세포를 우선적으로 사멸시키는 것으로 한정될 수 있다.

[0352] [320] 특정의 구체예에서, 본 발명의 세포-표적화된 분자를 세포형의 혼합물에 투여하는 경우, 세포-표적화된 분자는 세포외 표적 생물분자와 물리적으로 커플링되지 않은 세포형과 비교하여 세포외 표적 생물분자와 물리적으로 커플링된 이들 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 예를 들면, ABx 및 리보독소 계열의 구성원과 같은 많은 독소들 진핵 세포를 사멸시키기 위해 적응되므로, 독소 작동체 영역을 사용하여 설계된 세포독성 단백질은 강력한 세포독성 활성을 나타낼 수 있다. 효소적으로 활성인 독소 작동체 영역을 고-친화성 결합 영역을 사용하여 특이적인 세포형으로 전달하는 것을 표적화함으로써, 당해 강력한 세포 사멸 활성은 선택된 결합 영역의 표적 생물분자와 이들의 물리적 연합에 의해 표적화되기를 원하는 세포형만을 사멸시키는 것으로 한정될 수 있다.

[0353] [321] 특정의 구체예에서, 본 발명의 세포독성, 세포-표적화된 분자는 2개 이상의 상이한 세포형의 혼합물내에서 특이적인 세포형의 사멸을 선택적으로 또는 우선적으로 유발할 수 있다. 이는, 표적 분자를 발현하지 않는 "바이스탠더" 세포형보다 3-배의 세포독성 효과와 같이 특이적인 세포형에 대한 표적화된 세포독성 활성을 고우선적으로 되도록 한다. 대안적으로, 결합 영역의 표적 생물분자의 발현은, 표적 생물분자가 충분히 적은 양으로 발현되고/되거나 표적화되지 않아야 하는 세포형과 적은 양으로 물리적으로 커플링되는 경우 하나의 세포형에 대해 비-배타성일 수 있다. 이는, 유의적인 양의 표적 생물 분자를 발현하거나 유의적인 양의 표적 생물분자와 물리적으로 커플링되지 않는 "바이스탠더" 세포형보다 3-배의 세포독성 효과와 같이, 특이적인 세포형의 표적화된 세포-사멸을 고 우선적으로 가능하도록 한다.

[0354] [322] 특정의 추가의 구체예에서, 세포독성 세포-표적화된 분자를 세포형의 2개의 상이한 집단에 투여하는 경우, 세포독성 세포-표적화된 분자는 표적 세포의 집단에서 최대 세포독성 농도의 1/2(CD_{50})로서 세포 사멸을 유발할 수 있으며, 상기 집단의 구성원은, 세포독성 단백질의 결합 영역의 세포외 표적 생물분자를 발현하지 않는 집단에 동일한 세포독성 단백질의 CD_{50} 보다 적어도 3-배 적은 투여량에서 세포독성 단백질의 결합 영역의 세포외 표적 생물분자를 발현한다.

[0355] *[323] 특정의 구체예에서, 세포외 표적 생물분자에 물리적으로 커플링된 세포형의 집단에 대한 세포독성 활성은 결합 영역의 세포외 표적 생물분자와 물리적으로 커플링되지 않은 세포형의 집단에 대한 세포독성 활성보다 적어도 3-배 더 높다. 본 발명에 따라서, 선택적인 세포독성은 (a) 결합 영역의 표적 생물분자에 물리적으로 커플링된 특이적인 세포형의 세포의 집단에 대한 세포독성 대 (b) 결합 영역의 표적 생물분자와 물리적으로 커플링되지 않은 세포의 집단에 대한 세포독성의 비(a/b)의 측면에서 정량화될 수 있다. 특정의 구체예에서, 세포독성 비는 선택적인 세포독성의 지표이며, 이는 결합 영역의 표적 생물분자와 물리적으로 커플링되지 않은 세포 또는 세포형의 잡단과 비교하여 결합 영역의 표적 생물분자와 물리적으로 커플링된 세포 또는 세포형의 집단 보다 적어도 3-배, 5-배, 10-배, 15-배, 20-배, 25-배, 30-배, 40-배, 50-배, 75-배, 100-배, 250-배, 500-배, 750-배, 또는 1000-배 더 높다.

[0356] [324] 이러한 우선적인 세포-사멸 작용은, 세포-표적화된 분자가 세포형의 생체외 조작된 혼합물, 세포형의 혼합물을 지닌 시험관내 배양된 조직, 또는 다수의 세포형의 존재하에서 생체내(예를 들면, 동일계내(in situ) 또는 다중세포 유기체내의 이의 천연 위치)에서와 같이 다양한 조건 및 표적화되지 않은 방관자 세포의 존재하에서 본 발명의 특정의 세포독성, 세포-표적화된 분자에 의해 사멸되도록 한다.

[0357] <u>E. 표적화된 세포의 내부로 추가의 외인성 물질의 전달</u>

[0358] [325] 세포독성 및 사이토스태틱 적용 외에도, 본 발명의 세포-표적화된 분자가 정보 수집 및 진단 작용에 임의로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 세포독성, 세포-표적화된 분자의 비-독성 변이체, 또는 임의로 독성 변이체를 사용하여 추가의 외인성 물질을 전달하고/하거나 세포독성 단백질의 세포외 표적 생물분자와 물리적으로 커플링된 세포의 내부를 표지할 수 있다. 적어도 하나의 세포 표면에 표적 생물분자를 발현하는 다양한 형태의 세포 및/또는 세포 집단을 외인성 물질을 수용하기 위해 본 발명의 세포-표적화된 분자에 의해 표적화할 수 있다. 본 발명의 작용 성분은, 다양한 독소 작동체 영역 및 추가의 외인성 물질이 다양한 결합 영역에 연결되어 종양 세포의 비-침입성 생체내 영상과 같은 다양한 적용을 제공한다는 점에서, 모듈러식이다.

[0359] [326] 이의 비독성형을 포함하는, 본 발명의 세포-표적화된 분자는 이의 결합 영역에 의해 인식된 세포외 표적 생물분자에 물리적으로 커플링된 세포에 도입될 수 있으므로, 본 발명의 세포-표적화된 분자의 특정 구체예를 사용하여 추가의 외인성 물질을 표적화된 세포형의 내부로 전달할 수 있다. 하나의 의미로, 본 발명의 전체 세포-표적화된 분자는 세포내로 도입될 외인성 물질이므로; "추가의" 외인성 물질은 중심 세포-표적화된 분자 자체외에 다른 것에 연결된 이형 물질이다. T-세포 항원결정기 첨가 후 무-독성이 되는 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드는 여전히 외인성 물질을 세포내로 전달(예를 들면, 독소 작동체

영역의 촉매 작용에 중요한 오버랩핑 아미노산 잔기의 T-세포 항원결정기 대체)하는데 여전히 유용할 수 있다.

[0360] [327] 본원에 사용된 것으로서 "추가의 외인성 물질"은 천연의 표적 세포내에 일반적으로 흔히 존재하지 않는 하나 이상의 분자를 말하며, 여기서, 본 발명의 단백질은 이러한 물질을 세포의 내부로 수송하는데 사용될 수 있다. 추가의 외인성 물질의 비-제한적 예는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 폴리뉴클레오티드, 소 분자 화학치료제, 및 검출 증진제이다.

[0361] [328] 특정의 구체예에서, 추가의 외인성 물질은 효소를 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함한다. 특정의 다른 구체예에서, 추가의 외인성 물질은 예를 들면, 작은 억제 RNA(siRNA) 또는 마이크로RNA(miRNA)로서 작용하는 리보핵산과 같은 핵산이다. 특정의 구체예에서, 추가의 외인성 물질은 세균 단백질, 바이러스 단백질, 암에서 돌연변이된 단백질, 암에서 비정상적으로 발현된 단백질, 또는 T-세포 상보성 결정 영역으로부터 유도된 항원과 같은, 항원이다. 예를 들면, 외인성 물질은 세균에 감염된 항원-제시 세포의 특징적인 것들, 및 외인성 항원으로 작용할 수 있는 T-세포 상보성 결정 영역과 같은, 항원을 포함한다. 외인성 물질의 추가의 예는 효소와 같은 항원성 펩티드보다 큰 폴리펩티드 및 단백질을 포함한다. 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하는 외인성 물질은 숙련가에게 공지되어 있거나 공지되어 있지 않은 하나 이상의 항원을 임의로 포함할 수 있다.

[0362] F. 진단 작용에 대한 정보 수집

[0363] [329] 본 발명의 특정의 세포-표적화된 분자는 특이적인 세포, 세포형, 및/또는 세포 집단의 시험관내 및/또는 생체내 검출에서 용도를 갖는다. 특정의 구체예에서, 본원에 기술된 단백질은 진단 및 치료 둘 다, 또는 진단만으로 사용된다. 동일한 세포독성 단백질이 진단 및 치료 둘 다에 사용되는 경우, 진단용 검출 촉진제를 혼입한 세포독성 단백질은 본원에 기술된 예시적인 치환을 포함하는 하나 이상의 아미노산 치환을 통해 독소 작동체의 촉매적 불활성화에 의해 비독성이 되도록 할 수 있다. 검출 촉진제와 접합된 본 발명의 세포독성, 세포-표적화된 분자의 비독성형은 임의로 동일하거나 관련된 결합 영역을 포함하는 치료학적 요법과 함께 사용된 동반 진단제(companion diagnostics)와 같은, 진단 작용에 사용될 수 있다.

[0364] [330] 본 발명의 다양한 세포-표적화된 분자에 대해 당해 분야에 공지된 검출 촉진제를 접합시키는 능력은 암, 종양, 면역, 및 감염된 세포의 검출에 유용한 조성물을 제공한다. 본 발명의 세포-표적화된 분자의 이들 진단 구체예는 당해 분야에 공지된 다양한 영상 기술 및 검정을 통한 정보 수집을 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 세포-표적화된 분자의 진단 구체예는 환자 또는 생검 샘플내의 개개 암 세포, 면역 세포, 또는 감염된 세포의 세포내 기관(예를 들면, 세포내이입, 골지, 소포체, 및 세포질성 구획)을 통한 정보 수집에 사용될 수 있다.

[0365] [331] 다양한 형태의 정보를, 진단 용도 또는 다른 용도에 상관없이 본 발명의 세포-표적화된 분자의 진단 구체예를 사용하여 수집할 수 있다. 당해 정보는 예를 들면, 신생물 세포형을 진단하고/하거나, 환자의 질병의 치료학적 민감성을 측정하고/하거나, 시간에 따른 항신생물 치료제의 진행을 검정하며/하거나, 시간에 걸쳐 면역조절 치료요법의 진행을 검정하고/하거나, 시간에 걸쳐 항미생물 치료제의 진행을 검정하며/하거나, 이식 물질에서 감염된 세포의 존재를 평가하고/하거나 이식 물질 속에서 원치않은 세포형의 존재를 평가하고/하거나 종양 덩어리의 외과적 절개 후 나머지 종양 세포의 존재를 평가하는데 유용할 수 있다.

[0366] [332] 예를 들면, 환자의 소집단은 본 발명의 세포-표적화된 분자의 진단 변이체를 사용하여 수집된 정보를 사용하여 추정한 후 개개 환자를 이들 진단 구체예를 사용하여 나타낸 이들의 독특한 특징(들)을 기준으로 소집단으로 분류할 수 있다. 예를 들면, 특이적인 약제 또는 치료요법의 효능은 환자 소집단을 정의하는데 사용된 기준의 하나의 형태일 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 특수한 세포독성, 세포-표적화된 분자의 비독성 진단 변이체를 사용하여 어느 환자가 본 발명의 동일한 세포-표적화된 분자의 세포독성 변이체에 양성으로 반응하는지를 구별할 수 있다. 따라서, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 세포-표적화된 분자를 사용한 환자 확인, 환자 차등화, 및 진단을 위한 관련 방법은 본 발명의 영역내에 있는 것으로 고려된다.

[0367] VII. 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및 이를 포함하는 세포-표적화된 분자의 생산, 제조, 및 정제

[0368] [333] 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자는 당해 분야의 숙련가에게 잘 공지된 생화학적 가공 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자는 재조합체 발현 시스템의 사용에 의해, 또는 어떠한 다른 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 단백질은 예를 들면, (1) 표준 고체-상 또

는 액체-상 방법을 단계식으로 또는 분획 조립식으로 사용하여 단백질의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 성분을 합성하는 단계; (2) 본 발명의 세포-표적화된 단백질의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 성분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포내에서 발현하여 숙주 세포 또는 숙주 세포 배양물로부터 발현 생성물을 회수하는 단계; 또는 (3) 본 발명의 세포-표적화된 단백질의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 성분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포-유리된 시험관내 발현시키고, 발현 생성물을 회수하는 단계; 또는 (1), (2) 또는 (3) 중의 어떠한 조합에 의해 펩티드 성분의 단편을 수득하고, 후속적으로 단편들을 결합(예를 들면, 연결)시켜 펩티드 성분을 수득하고, 펩티드 성분을 회수하는 단계를 포함하는 방법을 포함하는, 다수의 방식으로 합성할 수 있다.

[0369] [334] 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 또는 단백질 또는 세포-표적화된 단백질의 폴리펩티드 성분을 고체-상 또는 액체-상 펩티드의 수단으로 합성하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자는 표준 합성 방법으로 적합하게 제조될 수 있다. 따라서, 펩티드는, 예를 들면, 표준 고체-상 또는 액체-상 벙법에 의해 단계식 또는 분획 조립식으로 펩티드를 합성하는 단계, 및 최종 펩티드 생성물을 분리하고 정제하는 단계에 의해 합성될 수 있다. 이와 관련하여, WO 1998/11125 또는, 특히 문헌(참고: Fields G et al, *Principles and Practice of Soiid-Phase Peptide Synthesis* (Synthetic Peptides, Grant G, ed., Oxford University Press, U.K., 2nd ed., 2002) 및 이의 합성 실시예를 참조할 수 있다.

[0370] [335] 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및 세포독성, 세포-표적화된 단백질은 당해 분야에 잘 공지된 재조합체 기술을 사용하여 제조(생산 및 정제)할 수 있다. 일반적으로, 암호화된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 사용하여 형질전환되거나 형질감염된 세포를 배양하고 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수함으로써 폴리펩티드를 제조하는 방법은 예를 들면, 문헌(참고: Sambrook J et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, U.S., 1989); Dieffenbach C et al, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S., 1995)에 기술되어 있다. 어떠한 적합한 숙주 세포도 사용하여 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 단백질을 생산할 수 있다. 숙주 세포는 본 발명의 폴리펩티드의 발현을 구동하는 하나 이상의 발현 벡터로 안정하게 또는 일시적으로 형질감염되거나, 형질유도되거나 형질감염된 세포일 수 있다. 또한, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 단백질은 변화된 세포독성, 변화된 사이토스태틱 효과, 및/또는 변화된 혈청 반감기와 같은 바람직한 특성을 달성하기 위하여, 하나 이상의 아미노산의 변경 또는 하나 이상의 아미노산의 결실 또는 인서팅을 생성하는 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 변형시켜 생산할 수 있다.

[0371] [336] 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 단백질을 생산하기 위해 선택될 수 있는 광범위한 발현 시스템이 존재한다. 예를 들면, 본 발명의 세포-표적화된 단백질을 발현시키기 위한 숙주 유기체는 이. 콜라이 및 비. 서브틸리스(*B. subtilis*), 효모 및 섬유성 진균(예를 들면, 에스. 세레비지아에(*S. cerevisiae*), 피. 파스토리스(*P. pastoris*), 에이. 아와모리(*A. awamori*), 및 케이. 락티스(*K. lactis*))과 같은 진핵세포성 세포, 조류(예: 씨 레인하르드티이(*C. reinhardtii*)), 곤충 세포주, 포유동물 세포(예: CHO 세포), 식물 세포주, 및 유전자이식 식물(예: 에이. 탈리아나(*A. thaliana*) 및 엔. 벤타미아나(*N. benthamiana*))와 같은 진핵 유기체를 포함한다.

[0372] [337] 따라서, 본 발명은 또한 상기 인용된 방법에 따라 본 발명의 폴리펩티드의 일부 또는 모두 또는 본 발명의 세포-표적화된 단백질의 폴리펩티드 성분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 숙주 세포내로 도입되는 경우 본 발명의 폴리펩티드의 일부 또는 모두를 암호화할 수 있는 본 발명의 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 사용하여 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[0373] [338] 폴리펩티드 또는 단백질이 숙주 세포 또는 세포-유리된 시스템에서 재조합체 기술을 사용하여 발현되는 경우, 숙주 세포 인자와 같은 다른 성분으로부터 바람직한 폴리펩티드 또는 단백질을 분리(또는 정제)하여, 고도로 순수한 또는 실질적으로 상동성인 제제를 수득하는 것이 유리할 수 있다. 정제는 원심분리 기술, 추출 기술, 크로마토그래피 및 분획 기술(예를 들면, 겔 여과에 의한 크기 분리, 이온 교환 컬럼에 의한 전하 분리, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 실리카 또는 DEAE 등과 같은 양이온-교환 수지상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing) 및 오염을 제거하기 위한 단백질 A 세파로즈 크로마토그래피), 및 침전 기술(예를 들면, 에탄올 침전 또는 황산암모늄 침전)과 같이, 당해 분야에 잘 공지된 방법에 의해 달성될 수 있다. 어떠한 수의 생화학적 정제 기술도 사용하여 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포

/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 분자의 순도를 증가시킬 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자는 동종-다량체형(즉, 2개 이상의 동일한 폴리펩티드의 단백질 복합체 또는 세포-표적화된 분자)으로 임의 정제될 수 있다.

[0374] [339] 하기 실시예에서 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자를 생산하는 방법의 비-제한적인 예, 및 본 발명의 예시적인 세포-표적화된 분자에 대한 생산의 비-제한적인 국면을 설명한다.

[0375] VIII. 본 발명의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 세포-표적화된 분자를 포함하는 약제 및 진단 조성물

[0376] [340] 본 발명은 하기 추가로 상세히 기술된 상태, 질병, 질환, 또는 증상(예를 들면, 암, 악성 종양, 비-악성 종양, 성장 이상, 면역 질환, 및 미생물 감염)의 치료 또는 예방을 위해, 약제학적 조성물 속에서 단독으로 또는 하나 이상의 추가의 치료제와 함께 사용하기 위한 폴리펩티드 및 단백질을 제공한다. 본 발명은 또한 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 비히클과 함께, 본 발명에 따르는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자의 동종-다량체 및/또는 이형-다량체형을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 하기의 추가의 상세한 설명에 기재된 질병, 상태, 질환 또는 증상의 치료, 완화 또는 예방 방법에서 유용할 것이다. 각각의 이러한 질병, 상태, 질환, 또는 증상은 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 용도과 관련하여 별도의 구체예인 것으로 고려된다. 본 발명은 또한 하기에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 본 발명에 따른 적어도 하나의 치료 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0377] [341] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "환자" 및 "대상체"는 상호교환적으로 사용되어 적어도 하나의 질병, 질환, 또는 상태의 증상, 시그날, 및/또는 지표를 나타내는 어떠한 유기체, 일반적으로 사람 및 동물을 말한다. 이들 용어는 영장류, 가축 동물(예를 들면, 소, 말, 돼지, 양, 염소 등), 반려 동물(예를 들면, 고양이, 개, 등) 및 실험 동물(예를 들면, 마우스, 토끼, 랫트 등)의 비-제한된 실시예와 같은 포유동물을 포함한다.

[0378] [342] 본원에 사용된 것으로서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료" 및 이의 문법적 변형은 유리하거나 바람직한 임상 결과를 수득하기 위한 시도를 말한다. 당해 용어는 상태, 질환 또는 질병의 발병 또는 발달 속도를 늦추는 것, 이와 관련된 증상을 감소시키거나 완화시키는 것, 상태의 완전한 또는 부분적인 퇴화를 생성하는 것, 이들 중 어느 것의 일부 조합을 말한다. 본 발명의 목적을 위해, 유리하거나 바람직한 임상 결과는, 검출가능하거나 검출가능하지 않은 것에 상관없이, 증상의 감소 또는 완화, 질병의 정도의 소멸, 질병 상태의 안정화(예를 들면, 악화가 아님), 질병 진행의 지연 또는 늦춤, 질병 상태의 완화 또는 일시적 완화, 및 차도(부분적이거나 전체적인)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 용어 "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는 치료를 제공받지 않는 경우 예측된 생존 시간과 비교하여 연장된 생존을 또한 의미할 수 있다. 따라서, 치료가 필요한 대상체(예를 들면, 사람)는 문제의 질병 또는 질환으로 이미 영향받은 대상체일 수 있다. 용어 "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는 치료의 부재와 관련하여 병리학적 상태 또는 증상의 중증도에 있어서의 증가의 억제 또는 감소를 포함하며, 관련된 질병, 질환, 또는 상태의 완전한 소멸을 필수적으로 의미하지는 않는다. 종양 및/또는 암과 관련하여, 치료는 전체적인 종양 크기 및/또는 개개의 종양 크기에 있어서의 감소를 포함한다.

[0379] [343] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "방지하다", "방지하는", "방지" 및 이의 문법적 변형은 상태, 질병, 또는 질환의 병리학의 발달을 예방하거나, 또는 변경시키기 위한 시도를 말한다. 따라서, "예방"은 예방을 위한 또는 예방적 조치를 나타낸다. 본 발명의 목적을 위하여, 유리하거나 바람직한 임상 결과는, 검출가능하거나 검출불가능한 것에 상관없이, 증상, 질병의 진행 또는 발달을 예방하거나 지연시킴을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 예방이 요구되는 대상체(예를 들면, 사람)는 문제의 질병 또는 질환에 아직 영향받지 않는 대상체일 수 있다. 용어 "예방"은 치료의 부재와 관련하여 질병의 발병을 지연시키는 것을 포함하며, 필수적으로 관련 질병, 질환 또는 상태의 영구적인 예방을 내포함을 의미하지 않는다. 따라서, 특정 내용에서 상태의 "예방하는" 또는 "예방"은 상태의 발달 위험을 감소시키거나, 상태와 관련된 증상의 발달을 예방하거나 지연시키는 것을 말한다.

[0380] [344] 본원에 사용된 것으로서, "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 표적 상태를 예방하거나 치료하거나, 상태와 관련된 증상을 유리하게 완화시키는 것과 같이, 대상체에서 적어도 하나의 바람직한 치료학적 효과를 생산하는 조성물(예를 들면, 치료학적 조성물 또는 제제의 양이다. 가장 바람직한 치료학적 유효량은 이를 필요로 하는 제공된 대상체에 대해 당해 분야의 숙련가가 선택한 특수 치료의 바람직한 효능을 생산할 양이다. 당해 양은 치료학적 화합물의 특징(활성, 약력학, 약동학, 및 생물이용능 포함), 대상체의 생리학적 상태(연령, 성별, 질

병형, 질병 단계, 일반적인 육체적 상태, 제공된 용량에 대한 반응성, 및 의약의 유형 포함), 제형 속의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 담체들의 특성, 및 투여 경로를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 숙련가가 이해하는 다양한 인자에 따라 변할 것이다. 임상 및 약리학적 분야에서 숙련가는 화합물의 투여에 대한 대상체의 반응을 모니터링하고 용량을 상응하게 조절함으로써, 정규적인 실험을 통해 치료학적 유효량을 측정할 수 있을 것이다(참고: 예를 들면, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (Gennaro A, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, U.S., 19th ed., 1995)).

[0381] [345] 진단 조성물은 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자 및 하나 이상의 검출 촉진제를 포함한다. 동위원소, 염료, 비색제, 조영 향상제, 형광성 제제, 생물발광제, 및 자기 제제와 같은 다양한 검출 촉진제가 당해 분야에 알려져 있다. 이들 제제는 어떠한 위치에서도 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자내로 혼입될 수 있다. 제제의 혼입은 링커 및/또는 킬레이트제를 경유하는 것을 포함하는, 당해 분야에 공지된 일부 형태의 연결을 경유하거나 단백질의 아미노산 잔기(들)를 경유할 수 있다. 제제의 혼입은, 스크린, 검정, 진단 과정, 및/또는 영상 기술에서 진단 조성물의 존재의 검출을 가능하도록 하는 방식이다.

[0382] [346] 본 발명의 진단 조성물을 생산하거나 제조하는 경우, 본 발명의 세포-표적화된 분자를 하나 이상의 검출 촉진제에 직접 또는 간접적으로 연결할 수 있다. 유기체의 질병, 질환, 또는 상태에 대한 진단 및/또는 예후 적용과 같은, 정보 수집 방법을 위해 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자에 작동적으로 연결할 수 있는 숙련가에게 공지된 다수의 검출 촉진제가 존재한다(참고: 예를 들면, Cai W et al, *J Nucl Med* 48: 304-10 (2007); Nayak T, Brechbiel M, *Bioconjug Chem* 20: 825-41 (2009); Paudyal P et al, *Oncol Rep* 22: 1 15-9 (2009); Qiao J et al, *PLoS ONE* 6: e18103 (2011); Sano K et al, *Breast Cancer Res* 14: R61 (2012)). 예를 들면, 검출 촉진제는 형광성 염료(예를 들면, Alexa680, 인도시아닌 그린, 및 Cy5.5)와 같은 영상 향상 조영제, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F, ^{32}P, ^{51}Mn, ^{52}mMn, ^{52}Fe, ^{55}Co, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{72}As, ^{73}Se, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{82}mRb, ^{83}Sr, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{89}Zr, ^{94}mTc, ^{94}Tc, ^{99}mTc, ^{110}In, ^{111}In, ^{120}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{154}Gd, ^{155}Gd, ^{156}Gd, ^{157}Gd, ^{158}Gd, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, 및 ^{223}R과 같은 동위원소 및 방사핵; 크롬(III), 망간(II), 철(III), 철(II), 코발트(II), 니켈(II), 구리(II), 네오디늄(III), 사마륨(III), 이테르븀(III), 가돌리늄(III), 바나듐(II), 테르븀(III), 디스프로슘(III), 홀뮴(III) 또는 에르븀(III)과 같은 상자성 이온; 란탄(III), 금(III), 납(II), 및 비스무쓰(III)와 같은 금속; 리포좀과 같은 초음파-조영 향상제; 바륨, 갈륨, 및 탈륨 화합물과 같은 방사선불투과성 제제를 포함한다. 검출 촉진제는 2-벤질 DTPA, PAMAM, NOTA, DOTA, TETA, 이의 유사체와 같은 킬레이터(chelator), 및 앞서의 어느 것의 작용성 등가물과 같은 중재 작용 그룹을 사용하여 직접 또는 간접적으로 혼입시킬 수 있다(참고: Leyton J et al, *Clin 암 Res* 14: 7488-96 (2008)).

[0383] [347] 단백질, 특히 면역글로불린 및 면역글로불린-기원한 도메인에 다양한 검출 촉진제를 혼입시키고/시키거나, 고정하고/하거나 접합시키기 위한 숙련가에게 공지된 다수의 표준 기술이 존재한다(참고: Wu A, *Methods* 65: 139-47 (2014)). 유사하게, 의학 분야에서 일반적으로 사용된 비-침입성 생체내 영상 기술, 예를 들면, 컴퓨터 단층 촬영법(CT 스캐닝), 광학적 영상(직접적인, 형광성, 및 생물발광성 영상 포함), 자기 공명 영상(MRI), 양전자 방사 단층촬영(PET), 단일-광자 방출 단층촬영(SPECT), 초음파, 및 x-선 컴퓨터 단층촬영과 같이 숙련가에게 공지된 다수의 영상화 접근법이 존재한다(참고: 참고를 위해 Kaur S et al, 암 *Lett* 315: 97-1 1 1 (2012)).

[0384] <u>IX. 본 발명의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자를 포함하는 약제 및/또는 진단 조성물의 생산 또는 제조</u>

[0385] [348] 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자 중의 어느 것을 포함하는 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물은 또한 본 발명의 영역내에 있다.

[0386] [349] 본 발명 의 내용에서 용어 "용매화물"은 용질(경우에 따라, 본 발명에 따른 폴리펩티드 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염)과 용매 사이에서 형성된 정의된 입체화학의 복합체를 말한다. 이와 관련하여, 용매는 예를 들면, 물, 에탄올 또는 다른 약제학적으로 허용되는, 아세트산 또는 락트산과 같이, 전형적으로는 소-분자 유기 종일 수 있다. 문제의 용매가 물인 경우, 이러한 용매화물은 수화물로서 일반적으로 언급된다.

[0387] [350] 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질, 또는 이의 염은, 치료학적 유효량의 본 발명의 화합물, 또는 이의 염을, 약제학적으로 허용되는 담체 속에 전형적으로 포함하는, 저장 또는 투여용으로 제조된 약제학적 조성물로서 제형화될 수 있다. 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 어떠한 표준 약제학적 담체도 포함한다. 치료 용도를 위한 약제학적으로 허용되는 담체는 약제 분야에 잘 공지되어 있으며 예를 들면, 문헌: *Remington's*

Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. (A. Gennaro, ed., 1985)에 기술되어 있다. 본원에 사용된 것으로서, "약제학적으로 허용되는 담체"는 어떠한 및 모든 생리학적으로 허용되는, 즉, 혼용성의, 용매, 분산 매질, 코팅, 항미생물제, 등장성, 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제는 경구, 직장, 비강 또는 비경구(피하, 근육내, 정맥내, 피내, 및 경피 포함) 투여에 적합한 제형으로 사용된 것들을 포함한다. 예시적인 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 주사가능한 액제 또는 분산제의 일시적인 제제를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 적합한 이의 혼합물, 올리브 오일과 같은 야채 오일, 및 에틸올레에이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들면, 레시틴과 같은 피복 물질을 사용하거나, 분산제의 경우에 요구되는 입자 크기를 유지하거나, 표면활성제를 사용함으로서 유지시킬 수 있다. 특정의 구체예에서, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 상피 투여(예를 들면, 주사 또는 주입에 의해)에 적합하다. 선택된 투여 경로에 따라, 단백질 또는 다른 약제학적 성분을 낮은 pH의 작용 및 특수한 투여 경로에 의해 환자에게 투여된 경우 활성 단백질이 직면할 수 있는 다른 천연의 불활성화 조건으로부터 화합물을 보호하도록 의도된 물질 속에 피복시킬 수 있다.

[0388] [351] 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 단일 용량형으로 편리하게 제시될 수 있으며 약제 분야에 잘 공지된 어떠한 방법으로도 제조할 수 있다. 이러한 형태에서, 조성물은 적절한 양의 활성 성분을 함유하는 단위 투여량으로 분할된다. 단위 용량형은 포장된 제제, 정밀한 양의 제제를 함유하는 포장, 예를 들면, 포장된 정제, 및 바이알 또는 앰플 속의 산제일 수 있다. 단위 용량형은 또한 캅셀제, 카쉐제(cachet), 또는 정제 자체일 수 있거나, 이는 이들 포장된 형태의 어느 것의 적절한 구성원일 수 있다. 이는 예를 들면, 펜(pen)의 형태의 단일 투여량의 주사가능한 형태로 제공될 수 있다. 조성물은 어떠한 적합한 투여 경로 및 수단을 위해 제형화될 수 있다. 피하 또는 경피 투여 방식이 본원에 기술된 치료학적 단백질에 특히 적합하다.

[0389] [352] 본 발명의 약제학적으로 조성물은 또한, 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재를 방지하는 것은 멸균 과정, 및 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 혼입 둘 다에 의해 보증할 수 있다. 당, 염화나트륨 등과 같은 등장성 제제가 또한 바람직하다. 또한, 주사가능한 약제학적 형태의 연장된 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같이, 흡수를 지연시키는 제제의 혼입에 의해 이루어질 수 있다.

[0390] [353] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 약제학적으로 허용되는 항산화제를 임의로 포함한다. 예시적인 약제학적으로 허용되는 항산화제는 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 황산수소나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등과 같은 수용성 항산화제; 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 지용성 항산화제; 및 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트제이다.

[0391] [354] 다른 국면에서, 본 발명은 본 발명의 상이한 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 분자 중 하나 또는 조합, 또는 앞서의 것들 중 어느 것의 에스테르, 염 또는 아미드, 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0392] *[355] 치료학적 조성물은 제조 및 저장 조건하에서 전형적으로 멸균성이고 안정하다. 조성물은 액제, 미세유액, 리포좀, 또는 고 약물 농도에 적합한 다른 주문된 구조로 제형화될 수 있다. 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜)과 같은 용매 또는 분산 매질, 또는 어떠한 적합한 혼합물일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들면, 레시틴과 같은 피복물을 사용하거나, 분산제의 경우에 요구되는 입자 크기를 유지하거나 당해 분야에 잘 공지된 제형 화학에 따라 표면활성제를 사용함으로써 유지시킬 수 있다. 특정의 구체예에서, 등장성 제제, 예를 들면, 당, 만니톨, 소르비톨과 같은 다알코올, 또는 염화나트륨이 조성물에 바람직할 수 있다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물 속에 포함시킴으로써 가져올 수 있다.

[0393] [356] 경피 또는 피하 적용에 사용된 액제 또는 현탁제는 전형적으로 주사용 수, 염수 용액, 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 항세균제; 아스코르브산 또는 중아황산나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이팅제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 완충제; 및 예를 들면, 염화나트륨 또는 덱스트로즈와 같은 강직 조절제 중 하나 이상을 포함한다. pH는 염산 또는 수산화나트륨과 같은 산 또는 염기, 또는

시트레이트, 포스페이트, 아세테이트 등과 같은 완충제로 조절할 수 있다. 이러한 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 1회용 주사기 또는 다중 투여량 바이알 속에 봉입시킬 수 있다.

[0394] [357] 멸균 주사가능한 액제는 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자를 경우에 따라, 위에서 기술한 성분들 중 하나 또는 조합으로 적절한 용매 속에 혼입시킨 후, 멸균 미세여과시켜 제조할 수 있다. 분산제는 활성 화합물을 분산 매질 및 위에서 기술한 것과 같은, 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클내로 혼입시켜 제조할 수 있다. 멸균 주사가능한 액제의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 이의 멸균-여과된 용액으로부터 어떠한 추가의 바람직한 성분 외에 활성 성분의 분말을 수득하는 진공 건조 및 동결-건조(freeze-drying)(동결건조: lyophilization)이다.

[0395] [358] 치료학적 유효량의 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자가 예를 들면, 정맥내, 피하 또는 피하 주사에 의해 투여되는 것으로 설계되는 경우, 결합제는 발열질-유리된, 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태일 수 있다. 비경구적으로 허용되는 단백질 용액의 제조 방법은 적절한 pH, 등장성, 안전성 등을 고려하여, 당해 분야의 기술내에 있다. 정맥내, 피하, 또는 피내 주사용의 바람직한 약제학적 조성물은, 결합제 외에, 염화나트륨 주사, 링거 주사(Ringer's injection), 덱스트로즈 주사, 덱스트로즈 및 염화나트륨 주사, 락테이트화된 링거 주사, 또는 당해 분야에 공지된 다른 비히클를 함유할 것이다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 안정화제, 방부제, 완충제, 항산화제, 또는 당해 분야의 숙련가에게 잘 공지된 다른 첨가제를 함유할 수 있다.

[0396] [359] 본원의 어딘가에 기술된 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자는 이식체, 경피 패취, 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 조절된 방출 제형과 같은 신속한 방출에 대해 화합물을 보호할 담체로 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 다가무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산과 같은, 생분해가능한, 생물적합성 중합체도 사용할 수 있다. 이러한 제형의 많은 제조 방법은 특허되어 있거나 일반적으로 당해 분야의 기술자에게 공지되어 있다(참고: 예를 들면, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (Robinson J, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, U.S., 1978)).

[0397] [360] 특정의 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 생체내에서 바람직한 분포를 보증하도록 제형화될 수 있다. 예를 들면, 혈액-뇌 장벽은 많은 큰 및/또는 친수성 화합물을 제외시킨다. 본 발명의 치료학적 화합물 또는 조성물을 특수한 생체내 위치에 표적화하기 위해, 이들을 예를 들면,특수한 세포 또는 기관에 선택적으로 수송되어, 표적 약물 전달을 향상시키는 하나 이상의 잔사를 포함할 수 있는 리포좀 속에 제형화시킬 수 있다. 예시적인 표적화 잔사는 폴레이트 또는 바이오틴; 만노시드; 항체; 표면활성제 단백질 A 수용체; p120 카테닌 등을 포함한다.

[0398] [361] 약제학적 조성물은 이식체 또는 미립자 시스템으로서 사용되도록 설계된 비경구 제형을 포함한다. 이식체의 예는 유제, 이온 교환 수지, 및 가용성 및 가용성 염 용액과 같은 중합체성 또는 소수성 성분으로 구성된 데포트 제형(depot formulation)이다. 미립자 시스템의 예는 미세구, 미세입자, 나노캅셀, 나노구, 및 나노입자이다(참고: 예를 들면, Honda M et al, *Int J Nanomedicine* 8: 495-503 (2013); Sharma A et al, *Biomed Res Int* 2013 : 960821 (2013); Ramishetti S, Huang L, *Ther Deliv* 3 : 1429-45 (2012)). 조절된 방출 제형은 예를 들면, 리포좀, 폴록사머 407, 및 하이드록시아파타이트와 같이, 이온에 민감한 중합체를 사용하여 제조할 수 있다.

[0399] *X. 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터, 및 숙주 세포

[0400] [362] 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질 외에, 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자, 또는 이의 작용성 부위를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명의 영역내에 포함된다. 용어 "폴리뉴클레오티드"는 용어 "핵산"과 동일하며, 이들 각각은 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA)의 중합체, 뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 생성시킨 이들 DNA 또는 RNA의 유사체 중 하나 이상을 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 일본쇄, 이본쇄, 또는 삼본쇄일 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, RNA 코돈의 제3 위치내에서 내성인 것으로 공지된 워블(wobble)을 고려하지만, 상이한 RNA 코돈으로서 동일한 아미노산을 여전히 암호화하는, 예시적인 단백질을 암호화할 수 있는 모든 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 구체적으로 개재되어 있다(참고: Stothard P, *Biotechniques* 28: 1 102-4 (2000)).

[0401] [363] 하나의 국면에서, 본 발명은 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 단백질, 또는 이의 단편 또는 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 단백질의 폴리펩티드에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 이상 동일한 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명은 또한 본 발

명의 CD 8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 단백질, 또는 이의 단편 또는 유도체, 또는 어떠한 이러한 서열의 안티센스 또는 상보체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 엄격한 조건(stringent condition)에서 하이브리드화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0402] [364] 본 발명의 분자(예를 들면, CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 이를 포함하는 세포-표적화된 단백질)의 유도체 또는 유사체는 특히 본 발명의 폴리뉴클레오티드, CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드, 또는 세포-표적화된 단백질에 대해 실질적으로 동종인, 예를 들면, 동일한 크기의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열에 대해 또는 정렬이 당해 분야에 공지된 컴퓨터 상동성 프로그램에 의해 수행된 정렬된 서열과 비교하는 경우 적어도 약 45%, 50%, 70%, 80%, 95%, 98%, 또는 심지어 99% 까지 유사성(80 내지 99%의 바람직한 유사성을 갖는)인 영역을 갖는 폴리뉴클레오티드(또는 폴리펩티드) 분자를 포함한다. 예시적인 프로그램은 문헌(참고: Smith T, Waterman M, *Adv. Appl. Math.* 2: 482-9 (1981))의 알고리즘을 이용하는, GAP 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, 미국 위스콘신주 매디슨 유니버시티 리서치 파크 소재)이다. 또한 엄격한 조건, 및 하기에서 본 발명의 세포-표적화된 단백질을 암호화하는 서열의 상보체(complement)에 하이브리드화할 수 있는 폴리뉴클레오티드가 포함된다(참고: 예를 들면, Ausubel F et al, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, New York, NY, U.S., 1993)). 엄격한 조건은 당해 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있으며 예를 들면, 문헌(참고: *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, NY, U.S., Ch. Sec. 6.3.1-6.3.6 (1989))에서 찾을 수 있다.

[0403] [365] 본 발명은 또한 본 발명의 영역내의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 추가로 제공한다. 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 단백질을 암호화할 수 있는 폴리뉴클레오티드는 세균 플라스미드, 바이러스 벡터 및 파아지 벡터를 포함하는 공지된 벡터내로, 발현 벡터를 생산하기 위해 당해 분야에 잘 공지된 물질 및 방법을 사용하여 공지된 벡터내로 인서팅할 수 있다. 이러한 발현 벡터는 본 발명의 고려된 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 단백질의 선택된 어떠한 숙주 세포 또는 세포-유리된 발현 시스템(예를 들면, 하기 실시예에 기술된 pTxbl 및 pIVEX2.3)내에서의 생산을 지지하는데 필요한 폴리뉴클레오티드를 포함할 것이다. 특수한 유형의 숙주 세포 또는 세포-유리된 발현 시스템과 함께 사용하기 위한 발현 벡터를 포함하는 특이적인 폴리뉴클레오티드는 통상의 실험을 사용하여 측정하거나, 시판될 수 있다.

[0404] [366] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "발현 벡터"는 하나 이상의 발현 단위를 포함하는, 선형 또는 환형의 폴리뉴클레오티드를 말한다. 용어 "발현 단위"는 목적한 폴리펩티드를 암호화하고 숙주 세포내에서 핵산 분절의 발현을 제공할 수 있는 폴리뉴클레오티드 분절을 나타낸다. 발현 단위는 전형적으로 모두 작동가능한 구조의 전사 프로모터, 목적한 폴리펩티드를 포함하는 개방 판독 단위, 및 전사 터미네이터를 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 발현 단위를 포함한다. 따라서, 본 발명 의 내용에서, 단일의 폴리펩티드 쇄(예를 들면, CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 영역과 유전적으로 재조합된 scFv)를 포함하는 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 단백질을 암호화하는 발현 벡터는 단일의 폴리펩티드 쇄에 대한 적어도 하나의 발현 단위를 포함하지만, 예를 들어, 2개 이상의 폴리펩티드 쇄(예를 들면, V_L 도메인을 포함하는 하나의 쇄 및 독소 작동체 영역에 연결된 V_H 도메인을 포함하는 제2의 쇄)를 포함하는 단백질은 이들 2개의 폴리펩티드 쇄 각각에 대해 하나씩인, 적어도 2개의 발현 단위를 포함한다. 본 발명의 다중-쇄 세포-표적화된 단백질의 발현을 위해, 각각의 폴리펩티드에 대한 발현 단위는 상이한 발현 벡터에 별도로 또한 함유될 수 있다(예를 들면, 발현은, 각각의 폴리펩티드 쇄에 대한 발현 벡터가 도입된 단일의 숙주 세포로 달성될 수 있다).

[0405] [367] 폴리펩티드 및 단백질의 일시적인 또는 안정한 발현을 지시할 수 있는 발현 벡터는 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 발현 벡터는 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 이형 시그날 서열 또는 펩티드, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 성분, 프로모터, 및 전사 종결 서열, 이들 각각은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 사용될 수 있는 임의의 조절 제어 서열, 통합 서열, 및 유용한 마커는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0406] [368] 용어 "숙주 세포"는 발현 벡터의 복제 또는 발현을 지지할 수 있는 세포를 말한다. 숙주 세포는 이. 콜라이와 같은 원핵 세포 또는 진핵 세포(예를 들면, 효모, 곤충, 양서류, 조류, 또는 포유동물 세포)일 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화된 단백질을 생산할 수 있

는 숙주 세포주의 생성 및 분리는 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 달성할 수 있다.

[0407] [369] 본 발명의 영역내에서 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드 및/또는 단백질은, 이를 숙주 세포에 의해 보다 최적의 발현과 같은 바람직한 특성을 달성하도록 할 수 있는 하나 이상의 아미노산을 변경시키거나 하나 이상의 아미노산을 결실 또는 인서팅시킴으로써 폴리펩티드 및/또는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 변형시켜 생산된 본원에 기술된 폴리펩티드 및 단백질의 변이체 또는 유도체일 수 있다.

[0408] XL 전달 장치 및 키트

[0410] [370] 특정의 구체예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하기 위한, 약제학적 조성물과 같이, 본 발명의 물질의 하나 이상의 조성물을 포함하는 장치에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 하나 이상의 화합물을 포함하는 전달 장치를 사용하여 정맥내, 피하, 근육내 또는 복강내 투여; 경구 투여; 경피 투여; 폐 또는 경점막 투여; 이식체, 삼투압 펌프, 카트리지 또는 미세 펌프에 의한 투여; 또는 당해 분야의 숙련가에게 인식된 다른 수단을 포함하는 다양한 전달 방법으로 본 발명의 물질을 조성물을 환자에게 투여할 수 있다.

[0411] [371] 본 발명의 물질의 적어도 하나의 조성물, 및 임의로 사용을 위한 포장 및 지시사항을 포함하는 키트도 또한 본 발명의 영역내에 있다. 키트는 약물 투여 및/또는 진단 정보 수집에 유용할 수 있다. 본 발명의 키트는 적어도 하나의 추가의 시약(예를 들면, 표준물, 마커 등)을 임의로 포함할 수 있다. 키트는 키트의 성분의 의도된 사용을 나타내는 표지를 전형적으로 포함한다. 키트는 또한 샘플 또는 대상체에서 세포형(예를 들면, 종양 세포)을 검출하거나, 환자가 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 화합물, 조성물 또는 관련 방법을 사용하도록 하는 치료학적 전략에 반응하는 그룹에 속하는지를 진단하기 위한 시약 및 다른 도구를 포함한다.

[0412] XII. 본 발명의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드를 생성하는 방법

[0413] [372] 본 발명은 세포의 엔도조말 구획으로부터 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀에 세포내적으로 이미 경로화할 수 있는 폴리펩티드를 변형시킴으로써 본 발명의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드를 생성하는 방법을 제공하며; 당해 방법은 이형 T-세포 항원결정기를 폴리펩티드에 가하는 단계를 포함한다. 본 발명의 특정의 추가의 방법에서, 이형 T-세포 항원결정기는 세포의 엔조조말 구획으로부터 세포질, ER, 또는 라이소자임에 세포내적으로 경로화할 수 있는 폴리펩티드내에 임베딩되거나 인서팅된다.

[0414] [373] 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드는 세포의 엔조조말 구획으로부터의 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀으로 세포내적으로 이미 경로화할 수 있는 폴리펩티드를 변형시킴으로써 생성되며; 당해 방법은 이형 T-세포 항원결정기를 폴리펩티드에 가하는 단계를 포함한다. 본 발명의 특정의 추가의 방법에서, 이형 T-세포 항원결정기는 세포의 엔도조말 구획으로부터의 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀에 세포내적으로 경로화할 수 있는 폴리펩티드내에 임베딩되거나 인서팅된다.

[0415] [374] 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, 세포의 엔도조말 구획으로부터의 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀에 세포내적으로 경로화할 수 있는 폴리펩티드가 본 발명의 T-세포 초-면역화 폴리펩티드내로 생성되며; 당해 방법은 이형 T-세포 항원결정기를 폴리펩티드에 가하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법의 특정의 추가의 구체예에서, 세포의 엔도조말 구획으로부터의 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀에 세포내적으로 경로화할 수 있는 폴리펩티드가 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드내로 생성되며; 당해 방법은 이형 T-세포 항원결정기를 폴리펩티드에 가함을 포함한다. 본 발명의 특정의 추가의 방법에서, 이형 T-세포 항원결정기는 세포의 엔도조말 구획으로부터의 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀에 세포내적으로 경로화할 수 있는 폴리펩티드내에 임베딩되거나 인서팅된다.

[0416] [375] 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, MHC 클래스 I 분자에 의한 제시를 위해 T-세포 항원결정기를 전달할 수 있는 폴리펩티드가 생성되며; 당해 방법은 이형 T-세포 항원결정기를 세포의 엔도조말 구획으로부터의 T-세포 항원결정기를 세포의 프로테아좀으로세포내 전달할 수 있는 폴리펩티드에 대한 이형 T-세포 항원결정기를 가하는 단계를 포함한다. 본 발명의 특정의 추가의 방법에서, 이형 T-세포 항원결정기는 세포의 엔도조말 구획으로부터의 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀에 세포내적으로 경로화할 수 있는 폴리펩티드내에 임베딩되거나 인서팅된다.

[0417] [376] 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드가 생성되며; 당해 방법은 이형 T-세포 항원결정기를 세포의 엔도조말 구획으로부터의 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀에 이미 세포내적으로 경로화할 수 있는 폴리펩티드의 내인성 B-세포 항원결정기 영역내에 인서팅하

거나 임베딩하는 단계를 포함한다.

[0418] [377] 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드가 생성되며; 당해 방법은 이형 T-세포 항원결정기를 세포의 엔도조말 구획으로부터의 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀에 이미 세포내적으로 경로화할 수 있는 폴리펩티드의 내인성 B-세포 항원결정기 영역내에 인서팅하거나 임베딩하는 단계를 포함한다.

[0419] [378] 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, 세포의 엔도조말 구획으로부터의 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀에 이미 세포내적으로 경로화할 수 있는 폴리펩티드가 본 발명의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드내로 생성되며; 당해 방법은 이형 T-세포 항원결정기를 폴리펩티드의 내인성 B-세포 항원결정기 영역내로 임베딩하거나 인서팅하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법의 특정의 추가의 구체예에서, 세포의 엔도조말 구획으로부터의 세포의 세포질, ER, 또는 라이소좀에 이미 세포내적으로 경로화할 수 있는 폴리펩티드가 본 발명의 CD8+ T-세포 초-면역화 폴리펩티드내로 생성되며; 당해 방법은 이형 T-세포 항원결정기를 폴리펩티드의 내인성 B-세포 항원결정기 영역내로 임베딩하거나 인서팅하는 단계를 포함한다.

[0420] [379] 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, MHC 클래스 I 분자에 의한 제시를 위해 T-세포 항원결정기를 전달할 수 있는 탈면역화 폴리펩티드가 생성되며; 당해 방법은 이형 T-세포 항원결정기를 세포의 엔도조말 구획으로부터의 T-세포 항원결정기를 세포의 프로테아좀으로 세포내 전달할 수 있는 폴리펩티드의 내인성 B-세포 항원결정기 영역내로 임베딩하거나 인서팅하는 단계를 포함한다.

[0421] [380] 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, 척색동물에게 투여되는 경우 B-세포 면역원성을 감소시키는 탈면역화 폴리펩티드가 생성된다. 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, 폴리펩티드내에서 B-세포 면역원성을 감소시키는 방법이 제공되며, 당해 방법은 폴리펩티드에 가해진 이형 T-세포 항원결정기가 포함하는 하나 이상의 아미노산 잔기(들)를 사용하여 폴리펩티드내 B-세포 항원결정기 영역을 파괴하는 단계를 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴하는 단계는 B-세포 항원결정기 영역내에 하나 이상의 아미노산 치환을 생성시킴을 추가로 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 B-세포 항원결정기 영역내에서 하나 이상의 아미노산 삽입을 생성시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0422] [381] 본 발명의 방법의 특정 구체예는 폴리펩티드내에서 B-세포 면역원성을 감소시키는 한편 척색동물에게 투여 후 CD8+ T-세포 면역원성을 동시에 증가시키는 방법이며, 당해 방법은 폴리펩티드에 가해진 이형 CD 8+ T-세포 항원결정기가 포함하는 하나 이상의 아미노산 잔기(들)를 사용하여 폴리펩티드내 B-세포 항원결정기 영역을 파괴하는 단계를 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 B-세포 항원결정기 영역내 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 B-세포 항원결정기 영역에 하나 이상의 아미노산 삽입을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0423] [382] 본 발명의 방법의 특정의 구체예는 폴리펩티드내 B-세포 면역원성을 감소시키면서 척색 동물에게 투여 후 CD8+ T-세포 면역원성을 동시에 증가시키는 방법이며, 당해 방법은: 1) 폴리펩티드내 B-세포 항원결정기를 확인하는 단계; 및 2) 확인된 B-세포 항원결정기를 폴리펩티드에 가해진 이형 CD8+ T-세포 항원결정기가 포함한 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 파괴하는 단계를 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 B-세포 항원결정기 영역에 하나 이상의 아미노산 삽입을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0424] [383] 본 발명의 방법의 특정의 구체예는 폴리펩티드내 B-세포 면역원성을 감소시키면서 척색 동물에게 투여 후 CD8+ T-세포 면역원성을 동시에 증가시키는 방법이며, 당해 방법은: 1) 폴리펩티드내 B-세포 항원결정기를 확인하는 단계; 및 2) 확인된 B-세포 항원결정기를 폴리펩티드에 가해진 이형 CD8+ T-세포 항원결정기가 포함한 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 파괴하는 단계를 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 B-세포 항원결정기 영역에 하나 이상의 아미노산 삽입을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 B-세포 항원결정기 영역에 하나 이상의 아미노산 삽입을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0425] [384] 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, 척색 동물에게 투여하는 경우 CD4+ T-세포 면역원성이 감소된 CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드가 생성된다. 본 발명의 방법의 특정의 구체예에서, 폴리펩티드내 CD4+ T-세포 면역원성을 감소시키는 방법이 제공되며, 당해 방법은 폴리펩티드내 CD4+ T-세포 항원결정기 영역을 폴리펩티드에 가해진 이형 CD8+ T-세포 항원결정기가 포함한 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 파괴하는 단계를 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 B-세포 항원결정기 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 B-세포 항원결정기 영역에 하나 이상의 아미노산 삽입을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0426] [385] 본 발명의 방법의 특정의 구체예는 폴리펩티드내 CD4+ T-세포 면역원성을 감소시키면서 척색 동물에게 투여 후 CD8+ T-세포 면역원성을 동시에 증가시키는 방법이며, 당해 방법은 폴리펩티드내 CD4+ T-세포 항원결정기 영역을 폴리펩티드에 가해진 이형 CD8+ T-세포 항원결정기가 포함한 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 파괴하는 단계를 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내에 하나 이상의 아미노산 치환을 생성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내에서 하나 이상의 아미노산 삽입을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0427] [386] 본 발명의 방법의 특정의 구체예는 폴리펩티드내 CD4+ T-세포 면역원성을 감소시키면서 척색 동물에게 투여 후 CD8+ T-세포 면역원성을 동시에 증가시키는 방법이며, 당해 방법은 1) 폴리펩티드내 CD4+ T-세포 항원결정기를 확인하는 단계; 및 2) 확인된 CD4+ T-세포 항원결정기를 폴리펩티드에 가해진 이형 CD8+ T-세포 항원결정기가 포함한 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 파괴하는 단계를 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내에 하나 이상의 아미노산 치환을 생성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내에서 하나 이상의 아미노산 삽입을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0428] [387] 본 발명의 방법의 특정의 구체예는 폴리펩티드내 CD4+ T-세포 면역원성을 감소시키면서 척색 동물에게 투여 후 CD8+ T-세포 면역원성을 동시에 증가시키는 방법이며, 당해 방법은 1) 폴리펩티드내 CD4+ T-세포 항원결정기를 확인하는 단계; 및 2) 확인된 CD4+ T-세포 항원결정기를 폴리펩티드에 가해진 이형 CD8+ T-세포 항원결정기가 포함한 하나 이상의 아미노산 잔기(들)로 파괴하는 단계를 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내에 하나 이상의 아미노산 치환을 생성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정의 추가의 구체예에서, 파괴 단계는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내에서 하나 이상의 아미노산 삽입을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0429] XIII. 본 발명의 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 폴리펩티드, 이를 포함하는 세포-표적화된 분자, 또는 이의 약제 및/또는 진단 조성물을 사용하는 방법

[0430] [388] 일반적으로, 본 발명의 목적은 본 명세서에 언급된 바와 같은 특정 암, 종양, 성장 이상, 면역 질환, 또는 추가의 병리학적 상태와 같은, 질병, 질환, 및 상태의 예방 및/또는 치료시 사용할 수 있는, 약제학적으로 활성인 제제, 및 이를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다. 따라서, 본 발명은 T-세포 항원결정기를 표적 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로로의 전달, 세포의 표적화된 사멸, 표적화된 세포내로 추가의 내인성 물질의 전달, 표적화된 세포의 내부의 표지, 진단 정보의 수집, 및 본 명세서에 기술된 바와 같은 질병, 질환, 및 상태의 치료를 위해, 본 발명의 폴리펩티드, 세포-표적화된 분자, 및 약제학적으로 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

[0431] [389] 예를 들면, 세포독성 독소 영역 폴리펩티드를 포함하는 강력한 치료제와 같은 이미 세포독성인 분자는 완전히 상이한 메카니즘을 통해 보다 세포독성이 되고/되거나 풍부한, 예비 세포독성을 가지도록 가동될 수 있다. 이들 다수의 세포독성 메카니즘은 서로에 대해 보완적(예를 들면, 직접 및 간접적인 세포 사멸의 메카니즘, 및 국소 부위에 면역-자극의 메카니즘 둘 다를 제공함으로써)이고/이거나, 서로에 대해 풍부하게 서로 예비적(예를 들면, 다른 것의 부재하에서 세포 사멸을 제공함으로써)이고/이거나, 개발된 내성에 대해 보호(2개의 상이한 메카니즘을 동시 차단하는 악성 또는 감염된 세포의 거의 불가능한 상황에 대한 내성을 제한함으로써)할 수 있다.

[0432] [390] 또한, 세포독성에 대한 독소 작동체 및/또는 효소 영역에 의존한 잠재적인 세포독성 분자는 모 분자를 효소적으로 불활성이도록 하지만 표적 세포의 MHC 클래스 I으로 T-세포 항원결정기 전달을 통해 세포독성이 되도록 한 후 표적 세포의 표면에 후속적으로 제시함으로써 가공시킬 수 있다. 이러한 접근법은 하나의 세포독성 메카니즘을 제거하면서 다른 것을 가하고 T-세포 항원결정기 제시에 의해 표적 세포의 국소 영역에 면역-자극의 능력을 가한다. 또한, 세포독성에 대한 효소 영역에 의존한 모 세포독성 분자를 모 분자의 효소 도메인내 T-세포 항원결정기를 임베딩함으로써 MHC 클래스 I 시스템에 T-세포 항원결정기 전달을 통해서만 세포독성이 되도록 함으로서 효소 활성이 감소되거나 제거되도록 가공할 수 있다. 이는 엔도조말 구획내에서 한번 세포질 및/또는 ER로 경로화하는 능력을 갖는 효소적으로 세포독성인 분자의, 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템으로 T-세포 항원결정기 전달에 의존하는 효소적으로 불활성인, 세포독성 분자로의 1-단계 변형 및 세포독성을 위해 표적 세포의 표면에서 후속적인 제시를 허용한다. 본 발명의 폴리펩티드 중의 어느 것도 예를 들면, 유기체내에서와 같이, 2개 이상의 세포형의 혼합물내에서 특이적인 세포-형(들)을 표적화하는 다양한 세포-표적화 결합 영역을 연결시킴으로써 치료제로서의 잠재능을 지닌 세포-표적화된 세포독성 분자로 가공할 수 있다.

[0433] [391] 특히, 본 발명의 목적은 당해 분야에 현재 공지된 제제, 조성물 및/또는 방법과 비교하여 특정의 장점을 갖는 이러한 약리학적으로 할성인 제제, 조성물, 및/또는 방법을 제공하는 것이다. 따라서, 본 발명은 폴리펩티

드 서열을 특징으로 하는 폴리펩티드 및 단백질 및 이의 약제학적 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 서열 번호; 1 내지 60의 폴리펩티드 서열 중 어느 것도 다음의 방법에서 사용된 세포-표적화된 분자의 성분으로서 특이적으로 사용될 수 있다.

[0434] [392] 본 발명은 시험관내 또는 생체내에서 세포를 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하여 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 및 약제학적으로 조성물은, 세포 또는 세포들을 물질의 특허청구된 조성물 중 하나와 접촉시 특이적인 세포형을 사멸시키는데 사용될 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 세포독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물은 암 세포, 감염된 세포, 및/또는 혈액 세포의 혼합물 속에서 특이적인 세포형을 사멸시키는데 사용될 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 세포독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물은 상이한 세포형의 혼합물 속에서 암 세포를 사멸시키는데 사용될 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 세포독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물은 이식-전 조직과 같은 상이한 세포형의 혼합물 속에서 특이적인 세포형을 사멸시키는데 사용될 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물은 치료 목적이 투여-전 조직 물질과 같은, 세포형의 혼합물 속에서 특이적인 세포형을 사멸시키는데 사용될 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물은 바이러스 또는 미생물을 선택적으로 사멸시키거나, 달리는 세포 표면 생물분자와 같은 특수한 세포외 표적 생물분자를 발현하는 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 및 약제학적으로 조성물은 예를 들면, 시험관내 또는 생체내에서 조직으로부터 원치않는 세포형을 고갈시키는데 있어서의 용도, 숙주에 대한 이식체를 치료하기 위한 면역 반응을 조절하는데 있어서의 용도, 항바이러스제로서의 용도, 항-기생충제로서의 용도, 및 원치않는 세포형의 이식 조직을 퍼징(purging)하는데 있어서의 용도를 포함하는 다양한 적용을 갖는다.

[0435] [393] 특정의 구체예에서, 본 발명의 세포독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물은 단독으로 또는 다른 화합물 또는 약제학적으로 조성물과 함께, 치료를 필요로 하는 환자에서와 같은, 대상체내에서 시험관내 또는 생체내에서 세포 집단에게 투여시 강력한 세포-사멸 활성을 나타낸다. 특이적인 세포형에 고-친화성 결합 영역을 사용하여 효소적으로 활성인 독소 영역 및 T-세포 항원결정기의 전달을 표적화함으로써, 이러한 강력한 세포-사멸 활성을 특정의 암 세포, 신생물 세포, 악성 세포, 비-악성 종양 세포, 또는 감염된 세포와 같은 유기체내에서 특정의 세포형으로 구체적으로 및 선택적으로 한정될 수 있다.

[0436] [394] 본 발명은 이를 필요로 하는 환자에서 세포를 사멸시키는 방법을 제공하며, 당해 방법은 환자에게 본 발명의 적어도 하나의 세포독성 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 이의 약제학적으로 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0437] [395] 세포독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 이의 약제학적으로 조성물의 특정 구체예를 사용하여 암 또는 종양 세포와 물리적으로 커플링되어 발견된 세포외 생물분자를 표적화함으로써 환자에서 암 세포를 사멸시킬 수 있다. 용어 "암 세포" 또는 "암성 세포"는 비정상적으로 가속화된 양식으로 성장하여 분열하는 다양한 신생물 세포를 말하며 숙련가에게 명백할 것이다. 용어 "종양 세포"는 악성 및 비-악성 세포 둘 다를 포함한다. 일반적으로, 암 및/또는 종양은 치료 및/또는 예방으로 수정될 수 있는 질병, 질환, 또는 상태로 정의될 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물로부터 유리할 수 있는 암 세포 및/또는 종양 세포를 포함하는 암 및 종양(악성 또는 비-악성)은 숙련가에게 명백할 것이다. 신생물 세포는 다음 중의 하나 이상과 흔히 관련되어 있다:

[0438] 조절되지 않은 성장, 분화의 결여, 국소 조직 침입, 혈관형성, 및 전이.

[0439] [396] 본 발명의 세포독성 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자 또는 이의 약제학적으로 조성물의 특정 구체예를 사용하여 면역 세포와 물리적으로 커플링되어 발견된 세포외 생물분자를 표적화함으로써 환자에서 면역 세포(건강하거나 악성에 상관없이)를 사멸시킬 수 있다.

[0440] [397] 본 발명의 세포독성 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자, 또는 이의 약제학적으로 조성물의 특정 구체예를 사용하여 감염된 세포와 물리적으로 커플링되어 발견된 세포외 생물분자를 표적화함으로써 환자에서 감염된 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0441] [398] 악성, 신생물의 환자 세포 집단(예를 들면, 골수), 또는 달리는 원치않는 T-세포 및/또는 B-세포를 퍼징한 다음 T-세포 및/또는 B-세포 고갈된 물질을 환자에게 재주입할 목적으로 본 발명의 세포-표적화된 분자 또는 이의 약제학적으로 조성물을 이용하는 것은 본 발명의 영역내에 있다(참고: 예를 들면, van Heeckeren W et al, *Br J Haematol* 132: 42-55 (2006); (참고: 예를 들면, Alpdogan O, van den Brink M, *Semin Oncol* 39: 629-42 (2012)).

[0442] [399] 환자로부터 제거된 분리된 세포 집단으로부터 T 세포 및/또는 B-세포를 생체외 고갈시킬 목적으로 본 발명의 세포-표적화된 분자 또는 이의 약제학적으로 조성물을 이용하는 것은 본 발명의 영역내에 있다. 하나의 비-제한적인 예에서, 본 발명의 세포-표적화된 분자는, 공여자 기관 또는 조직을 본 발명의 세포독성, 세포-표적화된 분자 또는 본 발명의 약제학적으로 조성물을 사용하여 이식하여 공여자 T-세포 및/또는 B-세포를 퍼징하기 전에 관류시키는 기관 및/또는 조직 이식 거부의 예방 방법에서 사용될 수 있다(참고: 예를 들면, Alpdogan O, van den Brink M, *Semin Oncol* 39: 629-42 (2012)).

[0443] [400] 이식편대숙주 질환에 대한 예방으로서 공여자 세포 집단으로부터 T-세포 및/또는 B-세포를 고갈시키고, 골수 및/또는 줄기 세포 이식을 겪는 환자에서 내성을 유도시킬 목적으로 본 발명의 세포-표적화된 분자 또는 이의 약제학적 조성물을 이용하는 것은 본 발명의 영역내에 있다(참고: 예를 들면, van Heeckeren W et al, *Br J Haematol* 132: 42-55 (2006); (참고: 예를 들면, Alpdogan O, van den Brink *M, Semin Oncol* 39: 629-42 (2012)).

[0444] [401] 본 발명의 세포독성 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자, 또는 이의 약제학적으로 조성물의 특정 구체예를 사용하여 감염된 세포와 물리적으로 커플링되어 발견된 세포외 생물분자를 표적화함으로써 환자에서 감염된 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0445] [402] 본 발명의 세포-표적화된 분자, 또는 이의 약제학적으로 조성물의 특정 구체예를 사용하여 비-자가, T-세포 항원결정기-펩티드 제시 세포를 지닌 유기체내에서 유전자자리를 "씨드(seed)"함으로써 면역 시스템을 활성화하여 유전자자리를 감시할 수 있다. 본 발명의 이러한 "씨딩" 방법의 특정의 추가의 구체예에서, 유전자자리는 종양 덩어리 또는 감염된 조직 부위이다. 본 발명의 이러한 "씨딩" 방법의 바람직한 구체예에서, 비-자가, T-세포 항원결정기-펩티드는 세포-표적화된 분자의 표적 세포에 의해 이미 제시되지 않은 펩티드, 표적 세포에 의해 발현된 어떠한 단백질내에도 존재하지 않는 펩티드, 표적 세포의 단백질체(proteome)내에 존재하지 않는 펩티드, 씨딩될 부위의 세포외 미세환경에 존재하지 않는 펩티드, 및 표적화될 종양 덩어리 또는 감염 조직내 존재하는 않는 펩티드로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0446] [403] 당해 "씨딩" 방법은 작동체 T-세포에 의한 인식 및 하부 면역 반응의 활성화를 위한 T-세포 항원결정기를 제시한 하나 이상의 MHC 클래스 I으로 하나 이상의 표적 세포를 표지하기 위해 작용한다. 본 발명의 세포-표적화된 분자의 세포 내재화, 세포내적으로 경로화, 및 T-세포 항원결정기 전달 작용을 발휘함으로써, 전달된 T-세포 항원결정기를 나타내는 표적 세포는 강화되어 숙주 T-세포에 의해 제시된 표적 세포의 인식 및 CTL에 의한 표적 세포 사멸을 포함하는 추가의 면역 반응의 유도를 유도한다. 본 발명의 세포-표적화된 분자를 사용하는 당해 "씨딩" 방법은, 세포-표적화된 분자-전달된 T-세포 항원결정기(들)를 제시하거나 제시하지 않음에도, 예를 들면, 종양 덩어리 또는 감염된 조직 부위와 같은 씨딩된 미세환경내에서 세포를 공격하기 위해 적응된 면역 반응을 유도함으로써 일시적인 예방접종-효과를 제공할 수 있다. 당해 "씨딩" 방법은 또한 표적 세포 집단, 종양 덩어리, 및/또는 유기체내 감염된 조직 부위에 대한 면역-내성의 파괴를 유도할 수 있다.

[0447] [404] 또한, 본 발명은 이를 필요로 하는 환자에게 적어도 하나의 본 발명의 세포독성 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자, 또는 이의 약제학적으로 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 환자에서 질병, 질환, 또는 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 당해 방법을 사용하여 치료될 수 있는 고려된 질병, 질환, 및 상태는 암, 악성 종양, 비-악성 종양, 성장 이상, 면역 질환, 및 미생물 감염을 포함한다. 본 발명의 화합물의 "치료학적 유효량"의 투여는 질병 증상의 중증도에 있어서의 감소, 질병 증상-유리된 기간의 빈도 및 경과 시간에 있어서의 증가, 또는 질병 고통으로 인한 손상 또는 불능의 예방을 생성할 수 있다.

[0448] [405] 치료학적 유효량의 본 발명의 화합물은 투여 경로, 치료되는 포유동물의 유형, 및 고려하의 특이적인 환자의 육체적 특징에 의존할 것이다. 당해 양을 측정하는 것에 대한 이들 인자 및 이들의 관계는 의학 분야의 숙련가에게 잘 공지되어 있다. 당해 양 및 투여 방법을 조절하여 최적의 효능을 달성할 수 있으며, 의학 분야의 숙련가에게 잘 공지된, 체중, 식이, 현재의 의약 및 다른 인자와 같은 인자에 의존할 것이다. 사람 사용을 위해 가장 적절한 용량 크기 및 투여 요법은 본 발명에 의해 수득된 결과에 의해 안내될 수 있으며, 적절히 설계된 임상 시도에서 확인될 수 있다. 유효 용량 및 치료 프로토콜은 실험 동물에서 작은 투여량으로 출발한 후 효과를 모니터링하면서 용량을 증가시키고, 용량 요법을 또한 전신적으로 변화시키면서 편리한 수단으로 측정할 수 있다. 제공된 대상체에 대해 최적의 용량을 결정하는 경우 임상의가 다수의 인자를 고려할 수 있다. 이러한 고려는 숙련가에게 알려져 있다.

[0449] [406] 허용되는 투여 경로는 에어로졸, 장내, 비강, 눈, 구강, 비경구, 직장, 질, 또는 경피(예를 들면, 크림, 겔, 또는 연고의 국소 투여, 또는 경피 패치(transdermal patch)의 수단에 의해)를 포함하나 이에 한정되지 않

는, 당해 분야에 공지된 어떠한 투여 경로를 말할 수 있다. "비경구 투여"는 눈아래, 주입, 동맥내, 관절내, 심내, 피내, 근육내, 복강내, 폐내, 척수내, 흉골내, 척추강내, 자궁내, 정맥내, 지주막내, 관절하, 피하, 경점막, 또는 경기관 투여를 포함하는, 전형적으로 의도된 작용 부위에서 또는 이와 관련하여 주사와 관련되어 있다.

[0450] [407] 본 발명의 약제학적으로 조성물을 투여하기 위해, 용량 범위는 일반적으로 킬로그램당 약 0.0001 내지 100 밀리그램(mg/kg)이고, 보다 일반적으로, 숙주 체중당 0.01 내지 5 mg/kg일 수 있다. 예시적인 용량은 0.25 mg/체중 kg, 1 mg/체중 kg, 3 mg/체중 kg, 5 mg/체중 kg 또는 10 mg/체중 kg이거나 1 내지 10 mg/kg의 범위내일 수 있다. 예시적인 치료 요법은 매일 1회 또는 2회 투여, 또는 매주 1회 또는 2회, 매 격주로 1회, 매 3주마다 1회, 매 4주마다 1회, 한달에 1회, 매 2 또는 3개월마다 1회 또는 매 3 내지 6개월마다 1회이다. 용량은 특수한 환자에 개해 치료학적 잇점을 최대화하기 위해 요구되는 것으로서 숙련된 건강 보호 전문가에 의해 선택되고 재조절될 수 있다.

[0451] [408] 본 발명의 약제학적으로 조성물은 다수의 경우로 동일한 환자에게 전형적으로 투여될 것이다. 단일 용량 사이의 간격은 예를 들면, 2 내지 5일, 매주, 매달, 매 2 또는 3개월, 매 6개월, 또는 매년일 것이다. 투여 사이의 간격은 또한 대상체 또는 환자에서 혈액 수준 또는 다른 마커의 조절을 기준으로 하여, 불규칙적일 수 있다. 본 발명의 화합물에 대한 용량 요법은 6회의 용량에 대해 매 2 내지 4주 동안 투여된 화합물을 사용한 투여된 후, 1 mg/체중 kg 또는 3 mg/체중 kg에 이어 3 mg/체중 kg 또는 1 mg/체중 kg에서 매 3주마다의 정맥내 투여를 포함한다.

[0452] [409] 본 발명의 약제학적으로 조성물은 당해 분야에 공지된 하나 이상의 다양한 방법을 사용하여, 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 숙련가가 인식하는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 바람직한 결과에 따라 변할 것이다. 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 및 약제학적으로 조성물에 대한 투여 경로는 예를 들면, 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 피하, 척추, 또는 예를 들면, 주사 또는 주입에 의한 다른 비경구 투여 경로를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물은 국소, 상피 또는 점막 투여 경로와 같은 비-비경구 경로로, 예를 들면, 비강내적으로, 경구적으로, 질내로, 직장으로, 설하로, 또는 국소로 투여될 수 있다.

[0453] [410] 본 발명의 치료학적 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물은 당해 분야에 공지된 다양한 의학 장치 중의 하나 이상을 사용하여 투여될 수 있다. 예를 들면, 하나의 구체예에서, 본 발명의 약제학적으로 조성물은 무침 피하 주사 장치(needleless hypodermic injection device)를 사용하여 투여될 수 있다. 예를 들면, 조절된 속도 전달을 위한 이식가능한 미세-주입 펌프; 피부를 통한 투여 장치; 정밀한 주입 속도에서 전달하기 위한 주입 펌프; 연속적인 약물 전달을 위한 다양한 유동 이식가능한 주입 장치; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 포함하는 본 발명에서 유용한 잘 공지된 이식체 및 모듈의 예는 당해 분야에 있다. 이들 및 다른 이러한 이식체, 전달 시스템, 및 모듈은 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있다.

[0454] [411] 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료제 또는 진단제와 함께 투여될 수 있다. 조합 치료요법은 특수한 환자, 치료될 질병 또는 상태를 기준으로 선택된 적어도 하나의 다른 치료제와 조합된 세포독성의, 본 발명의 세포-표적화된 분자 또는 이의 약제학적 조성물을 포함할 수 있다. 다른 이러한 제제의 예는 특히 세포독성, 항-암 또는 화학치료제, 소염 또는 항-증식제, 항미생물 또는 항바이러스제, 성장 인자, 사이토킨, 진통제, 치료학적으로 활성인 소 분자 또는 폴리펩티드, 단쇄 항체, 전통적인 항체 또는 이의 단편, 또는, 하나 이상의 시그날링 경로를 조절하는 핵산 분자, 및 치료학적 또는 예방학적 치료 요법을 보완하거나 또한 이에 유리할 수 있는 유사한 조절 치료제를 포함한다.

[0455] [412] 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적으로 조성물을 사용한 환자의 치료는 표적화된 세포의 세포 사멸 및/또는 표적화된 세포의 성장의 억제를 생성한다. 자체로서, 본 발명의 세포독성, 세포-표적화된 분자, 및 이들을 포함하는 약제학적 조성물은, 표적 세포의 사멸 또는 고갈이 유리할 수 있는 특히, 암, 종양, 다른 성장 이상, 면역 질환, 및 감염된 세포와 같은 다양한 병리학적 질환을 치료하는 방법에 유리할 것이다. 본 발명은 세포 증식을 억제하고, 신생물, 과활성 B-세포, 및 과활성 T-세포를 포함하는 세포 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0456] [413] 특정의 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 및 약제학적 조성물을 사용하여 암, 종양(악성 및 비-악성), 성장 이상, 면역 질환, 및 미생물 감염을 치료하거나 예방할 수 있다. 추가의 국면에서, 상기 생체외 방법은 생체내 방법과 조합시켜 골수 이식체 수용체에서 이식거부를 치료하거나 예방하고, 면역학적 내성을 달성하는 방법을 제공할 수 있다.

[0457] [414] 특정의 구체예에서, 본 발명은 사람과 같은 포유동물 대상체에서 악성 또는 신생물 및 다른 혈액 세포 관련된 암을 치료하는 방법을 제공하며, 당해 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 치료학적 유효량의 본 발명의 세포독성 단백질 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0458] [415] 본 발명의 세포독성 폴리펩티드, 단백질, 및 약제학적 조성물은 예를 들면, 원치않은 T-세포를 제거하는데 있어서의 용도, 숙주에 대한 이식체를 치료하기 위해 면역반응을 조절하는데 있어서의 용도, 항바이러스제로서의 용도, 항미생물제로서의 용도, 및 원치않은 세포형의 이식 조직을 퍼징(purging)하는데 있어서의 용도를 포함하는, 다양한 적용을 갖는다. 본 발명의 세포독성 폴리펩티드, 단백질, 및 약제학적 조성물은 일반적으로 항-신생물 제제이며 - 이는, 이들이 암 또는 종양 세포의 성장을 억제하고/하거나 이의 사멸을 유발시킴으로써 신생물 또는 악성 세포의 발달, 성숙, 또는 확산을 치료하고/하거나 예방할 수 있음을 의미한다.

[0459] [416] 특정 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적 조성물은, 예를 들면 백혈병, 림프종, 골수종, 인간 면역결핍 바이러스-관련 질환, 아밀로이드증, 용혈성 요독 증후군, 다발동맥염, 패혈성 쇼크, 크론 병(Crohn's disease), 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선 관절염, 궤양성 대장염, 건선, 천식, 쇼그렌 증후군(Sjorgren's syndrome), 이식편 대 숙주 병, 이식 거부, 당뇨병, 혈관염, 피부 경화증 및 전신 홍반 루푸스와 같은 B-세포-, 혈청 세포- 또는 항체-매개 질병 또는 질환을 치료하기 위해 사용된다.

[0460] [417] 다른 국면에서, 본 발명의 폴리펩티드, 단백질 및 약제학적 조성물의 특정한 구체예는 항미생물제이며, 이는 이들이, 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 프리온 또는 원생 동물과 같은, 미생물 병원체 감염의 습득, 발달, 또는 결과를 치료 및/또는 예방할 수 있음을 의미한다.

[0461] [418] 이것은 환자에서 T-세포 또는 B-세포를 사멸시킬 목적으로 환자에게, 세포 독성 단백질 또는 본 발명, 또는 이의 약제학적 조성물을 투여함으로써 T-세포 또는 B-세포에 의해 매개되는 질병 또는 상태에 대한 예방 또는 치료를 제공하기 위한 본 발명의 영역 내에 있다. 이러한 용법은 이식 물질의 공급원, 예를 들면, 사람 또는 비-사람 공급원에 무관하게, 골수 이식, 줄기 세포 이식, 조직 이식, 또는 기관 이식을 위해 환자의 준비 또는 컨디셔닝과 혼용될 수 있다.

[0462] [419] 이것은 본 발명의 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약제학적 조성물을 이용하여 숙주 T-세포의 표적화된 세포 사멸을 통한 숙주 대 이식편 질병의 예방 또는 치료를 위해 골수 수혜자에게 제공하기 위한 본 발명의 범위 영역내에 있다.

[0463] [420] 본 발명의 세포 독성 폴리펩티드, 단백질 및 약제학적 조성물은 이를 필요로 하는 환자에게 본 발명의 치료학적 유효량의 세포 독성 폴리펩티드, 단백질 또는 약제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 암의 치료방법에 이용될 수 있다. 본 발명의 방법의 특정한 구체예에서, 치료되는 암은 골 암(예를 들면, 다발성 골수종 또는 유잉 육종(Ewing's sarcoma), 유방암, 중추/말초 신경계 암(예: 뇌 암, 신경 섬유종증 또는아교모세포종), 소화기 암(예를 들면, 위암 또는 결장직장 암), 생식 세포 암(예를 들면, 난소 암 및 고환암, 선암(예: 췌장암, 부갑상선 암, 크롬 친화 세포종, 침샘 암 또는 갑상선암), 또는 두-경부암(예를 들어, 코 인두암, 구강암, 또는 인두암), 혈액 암(예를 들면, 백혈병, 림프종 또는 골수종), 신장-요로 암(예를 들어, 신장암 및 방광암), 간암, 폐/흉부 암(예를 들어, 중피종, 소세포 폐암 또는 비-소세포 폐 암종), 전립샘 암, 육종(예를 들어, 혈관 육종, 섬유 육종, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma) 또는 활막 육종), 피부암(예를 들어, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 또는 흑색종), 및 자궁암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0464] [421] 본 발명의 폴리펩티드, 단백질 및 약제학적 조성물은 이를 필요로 하는 환자에게 본 발명의 치료학적 유효량의 세포독성 단백질 또는 약제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 면역 질환을 치료하는 방법에서 사용할 수 있다. 본 발명의 방법의 특정한 구체예에서, 면역 질환은 아밀로이드증, 강직성 척추염, 천식, 크론 병, 당뇨병, 이식 거부, 이식편대숙주 질환, 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 용혈성 요독 증후군, HIV-관련 질환, 전신 홍반 루푸스, 다발 경화증, 다발동맥염, 건선, 건선성 관절염, 류마티스 관절염, 피부 경화증, 패혈성 쇼크, 쇼그렌 증후군(Sjorgren's syndrome), 궤양성 대장염 및 혈관염으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 질병과 관련된 염증과 관련이 있다.

[0465] [422] 본 발명의 특정 구체예 중에는 암, 종양, 기타 성장 이상, 면역 질환, 및/또는 미생물 감염의 치료 또는 예약을 위한 약제학적 조성물 또는 의약의 성분으로서 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자를 사용하는 것이 있다. 예를 들면, 환자의 피부에 제시되는 면역 질환은, 염증을 감소시키기 위한 노력에서 이러한 약제를 사용하여 치료될 수 있다. 또 다른 예에서, 피부 종양은 종양 크기를 감소시키거나 종양을 완전히 제거하기 위한 노력에서 이러한 약제를 사용하여 치료할 수 있다.

[0466] [423] 본 발명의 특정한 세포독성 폴리펩티드, 단백질 및 약제학적 조성물은 면역정신적 상해(immunolesioning) 및 신경 추적과 같은 분자 신경수술 적용에서 사용될 수 있다(검토를 위한 참고: Wiley R, Lappi D, *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1043-54 (2003)). 예를 들어, 표적화 도메인은 신경 회로 특정 G 단백질 커플링된 수용체와 같은, 신경 세포의 표면 수용체를 결합시켜 특정 신경 세포형을 표적화하는, 신경 전달 물질과 신경 펩티드와 같은, 다양한 리간드에서 선택 또는 유도될 수 있다. 마찬가지로, 표적화 도메인은 신경 표면 수용체에 결합하는 항체로부터 선택되거나 이로부터 유도될 수 있다. 특정 독소가 확실히 자신의 퇴행성 축삭 수송을 지시하기 때문에, 본 발명의 특정한 세포독성, 세포-표적화된 분자는 세포체에서 떨어진 세포 독성 단백질의 주사 부위에서 세포외 표적을 발현하는 뉴런을 죽이는 데 사용할 수 있다(참조: Llewellyn-Smith I et al, *J Neurosci Methods* 103: 83-90 (2000)). 세포 독성 폴리펩티드 및 단백질을 특이적으로 표적화 하는 이러한 신경세포 유형은 감각의 메커니즘을 유추하기 위한 것과 같은, 신경 과학 연구에서의 용도를 가지며(참조: 예를 들면, Mishra S, Hoon M, *Science* 340: 968-71 (2013)), 피킨슨병 및 알츠하이머병과 같은, 신경변성 질병의 모델 시스템을 생성하는 데 있어서의 용도를 갖는다(참조: 예를 들면, Hamlin A et al, *PLoS One* e53472 (2013)).

[0467] [424] 본 발명의 특정 구체예 중에는 신생물 세포 및/또는 면역 세포형의 내부를 표지 또는 검출하는 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 약제학적 조성물 및/또는 진단학적 조성물을 사용하는 방법이 있다. 퇴행성 세포 내 수송을 통해 세포 내 특정 세포형 및 경로로 도입되는 본 발명의 특정한 폴리펩티드, 단백질 및 약제학적 조성물의 능력을 기본으로 하여, 특정 세포형의 내부 구획을 검출을 위해 표지화한다. 이것은 유기체, 예를 들면 생검 재료로부터 제거된 세포 및 조직 상의 또는 환자 내의 동일계내 세포에서 수행할 수 있다.

[0468] [425] 본 발명의 특정 구체예 중에는 질병, 상태 및/또는 질환에 관한 정보 수집을 목적으로 세포형의 존재를 검출하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 약제학적 조성물 및/또는 진단 조성물을 사용하는 방법이 있다. 이러한 방법은 세포를 충분한 양의 세포독성 분자와 접촉시켜 검정 또는 진단 기술로 세포독성 분자를 검출함을 포함한다. 어구 "진단학적으로 충분한 양"은, 이용된 특별한 검정 또는 진단 기술에 의한 정보 수집의 목적을 위한 적절한 검출 및 정확한 측정을 제공하는 양을 말한다. 일반적으로, 생체내 진단학적 용도에서 전체 유기체를 위한 진단학적으로 충분한 양은 대상체당 대상체의 kg당 본 발명의 검출 촉진제 연결된 세포-표적화된 분자의 0.1 mg 내지 100 mg의 비-누적 투여량일 것이다. 전형적으로, 이러한 정보 수집 방법에 사용된 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자의 양은 가능한 한 낮게될 것이며, 단 이는 여전히 진단학적으로 충분한 양이다. 예를 들면, 유기체 내에서 생체내 검출을 위하여, 대상체로 투여된 본 발명의 폴리펩티드, 단백질 또는 약제학적 조성물의 양은 실행가능하게 가능한 한 낮게 될 것이다.

[0469] [426] 검출 촉진제와 조합된 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자의 세포-형 특이적 표적화는 본 발명의 분자의 결합 영역의 세포외 표적 생물 분자와 물리적으로 커플링된 세포를 검출하고 영상화하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자를 이용한 세포 영상화는 당해 분야에 공지된 어떠한 적합한 기술을 사용하여 시험관내 또는 생체내에서 수행할 수 있다. 진단 정보는 유기체의 전신 영상화를 포함하거나 유기체로부터 취한 생체외 샘플을 이용함을 포함하는, 당해 분야에 공지된 각종 방법을 이용하여 수집할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "샘플"은 임의의 수의 것을 나타내지만, 유체, 예를 들면, 혈액, 뇨, 혈청, 림프액, 침, 항문 분비물, 질 분비물, 및 정액, 및 생검 과정에 의해 얻어진 조직으로 제한되지 않는다. 예를 들어, 다양한 검출 촉진제를 자기 공명 영상(MRI), 광학적 방법(예를 들어, 직접. 형광성, 및 생물 발광 영상화), 양전자 방출 단층 촬영(PET), 단일-광자 방출 컴퓨터 단층 촬영(SPECT), 초음파, X-선 컴퓨터 단층 촬영, 및 이들의 조합과 같은 기술에 의한 비-침입적 생체내 종양 영상화를 위해 이용될 수 있다(참조: 검토를 위해, Kaur S et al, *Cancer Lett* 315: 97-111 (2012)).

[0470] [427] 본 발명의 특정 구체예 중에는 암, 종양 및/또는 면역 세포형의 내부를 표지 또는 검출하기 위한 진단용 조성물로서 본 발명의 폴리펩티드, 단백질 또는 약제학적 조성물을 사용하는 방법이 있다(참조: 예를 들어, Koyama Y et al, *Clin Cancer* Res 13 : 2936-45 (2007); Ogawa M et al, *Cancer Res* 69: 1268-72 (2009); Yang L et al, *Small* 5: 235-43 (2009)). 퇴행성 세포 내 수송을 통해 세포 내 특정 세포형 및 경로로 도입하기 위한 본 발명의 특정 폴리펩티드, 단백질 및 약제학적 조성물의 능력을 기본으로 하여, 특정 세포형의 내부 구획을 검출을 위해 표지화한다. 이것은 환자의 유기체, 예를 들어 생검 물질로부터 제거 된 세포 및 조직 상에서 또는 환자 내의 동일계내(in situ)의 세포 상에서 수행될 수 있다.

[0471] [428] 본 발명의 진단 조성물은 본 발명의 관련 약제학적 조성물에 의해 잠재적으로 치료 가능한 질병, 질환 또는 상태를 특성화하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 물질의 특정 조성물은, 환자가 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 화합물, 조성물 또는 관련 방법을 사용하게 하거나 본 발명의 전달 장치를 사용하기 위해 매우 적합

한 치료학적 전략에 반응하는 그룹에 속하는지 여부를 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0472] [429] 본 발명의 진단 조성물은, 질병, 예를 들면, 암이 검출된 후에 사용되어 이를 더 잘 특성화하도록, 예를 들면, 전이, 이질성 및 암의 진행 단계를 원격으로 모니터링하도록 한다. 질병, 질환 또는 감염의 표현형적 평가는 치료학적 결정시 예후 및 예측을 도울 수 있다. 질환의 재발에서, 본 발명의 특정 방법은 국소 또는 전신의 문제 여부를 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0473] [430] 본 발명의 진단학적 조성물은 치료제, 예를 들어, 소분자 약물, 생물학적 약물 또는 세포-계 치료요법의 유형에 무관하게, 치료제(들)에 대한 반응을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 진단의 특정 구체예는 종양 크기의 변화, 항수와 분포를 포함하는 항원 양성 세포 집단에서의 변화, 또는 환자에게 이미 투여되는 치료요법에 의해 표적화된 항원과 상이한 마커의 모니터링을 측정하기 위해 사용될 수 있다(참조: Smith- Jones P et al, *Nat. Biotechnol* 22: 701-6 (2004); Evans M et al, *Proc. Natl. Acad. Sci*. U.S.A. 108: 9578-82 (201 1)).

[0474] [431] 세포 형의 존재를 감지하는 데 사용되는 방법의 특정 구체예는, 예를 들어, 골 암(예를 들어, 다발성 골수종 또는 유잉 육종), 유방암, 중추/말초 신경계 암(예를 들어, 뇌 암, 신경 섬유종증, 또는 아교모세포증), 소화관 암(예를 들어, 위암 또는 직장결장 암), 생식 세포 암(예를 들어, 난소 암 및 고환암), 선암(예를 들어, 췌장암, 부갑상선 암, 갈색 세포종, 침샘 암 또는 갑상선암), 두-경부 암(head-neck cancer)(예를 들어, 위 인두 암, 구강암, 또는 인두암), 혈액 암(예를 들어, 백혈병, 림프종 또는 골수종), 신장-뇨관 암(예를 들어, 신장 암 및 방광암), 간암, 폐/흉부 암(예들 들어, 중피종, 소세포 폐 암종 또는 비-소세포 폐 암종), 전립샘 암, 육종(예를 들어, 혈관 육종, 섬유 육종, 카포시 육종 또는 활막 육종), 피부 암(예를 들어, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 또는 흑색 종), 자궁 암, AIDS, 아밀로이드증, 강직성 척추염, 천식, 자폐증, 심장발생, 크론 병(Crohn's disease), 당뇨병, 홍반(erythematosus), 위염, 이식 거부, 이식편대숙주 질환, 그레이브 병(Grave's disease), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis) 용혈성 요독 증후군, HIV-관련 질병, 홍반 루푸스, 림프증식성 질환, 다발 경화증, 중증 근무력증, 신경 염증, 다발성동맥염, 건선, 건선 관절염, 류마티스 관절염, 피부 경화증, 패혈성 쇼크, 쇼그렌 증후군(Sjorgren's syndrome), 전신 홍반 루푸스, 궤양 대장염, 혈관염, 세포 증식, 염증, 백혈구 활성화, 백혈구 접착, 백혈구 화학주성, 백혈구 성숙, 백혈구 이주, 신경 분화, 급성 림프모구 백혈병(ALL), T 급성 림프구성 백혈병/림프종(ALL), 급성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), B-세포 만성 림프성 백혈병(B-CLL), B-세포 전림프성 림프종, 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma: BL), 만성 림프모구 백혈병(CLL) 만성 골수성 백혈병(CML-BP), 만성 골수성 백혈병(CML), 확산 대형 B-세포 림프종, 여포성 림프종, 모발 세포 백혈병(HCL), 호지킨 림프종(HL), 혈관내 대형 B-세포 림프종, 림프종모양 육아종증, 림프 형질세포성 림프종, MALT 림프종, 맨틀 세포 림프종(mantle cell lymphoma), 다발 골수종(MM), 자연 킬러 세포 백혈병, 결절 변연 B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종(NHL), 혈장 세포 백혈병, 형장세포종, 원발성 삼출액 림프종, 전-림프구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 소 림프구성 림프종, 비장 주변 대역 림프종, T-세포 림프종(TCL), 중쇄 질환, 모노클로날 감마글로불린병증, 모노클로날 면역 글로불린 침착 질병, 골수형성이상 증후군(MDS), 그을린 다발성 골수종(smoldering multiple myeloma), 및 발덴스트롬 매크로 글로불린혈증(Waldenstrom macroglobulinemia)과 같은 질병, 질환 및 상태에 관한 정보를 수집하는 데 사용될 수 있다.

[0475] [432] 특정 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 및 세포-표적화된 분자 또는 이의 약제학적 조성물은 진단 및 치료 둘 다, 또는 진단 만을 위해 사용된다. 일부 상황에서는, 치료를 위해 본 발명의 폴리펩티드 또는 세포-표적화된 분자를 선택하기 전에, 예를 들면 치료를 필요로 하는 환자와 같은 대상체 및/또는 대상체로부터의 질병이 있는 조직에서 발현된 HLA 변이체(들) 및/또는 HLA 대립 유전자를 측정하거나 확인하기에 바람직할 수 있다.

[0476] [433] 본 발명은 또한 1) CD8+ T 세포의 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 폴리펩티드, 2) CD8+ T-세포 항원결정기 제시 독소-유도된 폴리펩티드, 및 3) 위에서 언급된 폴리펩티드를 포함하고 특정한 세포형을 특이적으로 표적화할 수 있는 선택적으로 세포독성인, 세포-표적화된 단백질의 다음의 비-제한적인 실시예에 의해 추가로 예증된다.

[0477] **[발명을 실시하기 위한 구체적인 내용]**

[0478] **실시예**

[0479] [434] 다음의 실시예는 본 발명의 특정 구체예를 입증한다. 그러나, 이들 실시예는 나열 목적으로만 제공되며 본 발명의 조건 및 영역에 대해 의도되거나 특정하게 구속되지 않으며, 전체적으로 규정되는 것으로 이해되어야 한다. 다음 실시예에서 실험은 표준 기술을 사용하여 수행되었으며, 이는, 달리 상세히 기술하지 않는 한, 당해

분야의 숙련가에게 잘 알려지고 통상적인, 표준 기술을 사용하여 수행하였다.

[0480] [435] MHC 클래스 I 시스템에 의한 T-세포 면역원성 항원결정기 펩티드의 제시는 CTL-매개된 분해에 의해 사멸에 대해 제시 세포를 표적화하며 또한 국소 미세환경내에서 면역 자극을 개시한다. 표적-세포-내재화 치료제의 독소 작동체 폴리펩티드 성분 내에서 면역원성 항원결정기 서열을 가공함으로써, 면역-자극성 항원의 표적화된 전달 및 제시가 달성될 수 있다. 예를 들면, 고 면역원성을 지닌 공지된 바이러스 항원과 같은, 면역-자극성 비-자가 항원의 제시는, 다른 면역 세포에 대한 표적 세포에 의해 표적 세포를 파괴하고 당해 부위에 면역 세포를 더 보충한다.

[0481] [436] 당해 실시예에서, T-세포 항원결정기를 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드에 임베딩하거나 인서팅하였으며, 이는 내부 영역을 하나 이상의 T-세포 항원결정기를 포함하도록 가공함으로써, 표적-세포-내재화 분자의 성분으로서 제공할 수 있다. 따라서, 출발하는 폴리펩티드에 대한 추가의 아미노산 잔기, 펩티드, 또는 폴리펩티드 성분의 말단 융합은 존재하지 않는다.

[0482] [437] 실시예에서, 대부분의 T-세포 항원결정기는, 다수의 아미노산 치환을 가공하지만 모 독소 작동체 폴리펩티드와 비교한 것으로서 예시적인 독소 작동체 폴리펩티드내 아미노산 잔기의 총 수를 변화시키지 않고 표적-세포-내재화 분자의 독소 작동체 폴리펩티드 성분내로 임베딩되었다. 따라서, 실시예에서 시험된 모든 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 및 대부분의 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 경우, 추가의 아미노산의 삽입은 존재하지 않았으며 기존 아미노산에 대한 치환만이 존재하여 모 폴리펩티드의 원래의 길이를 유지하였다.

[0483] [438] 세포 내재화, 세포질에 대한 소세포 경로화, 및 MHC I 클래스 경로에 의한 제시를 위해 세포질에 대한 T-세포 항원결정기를 표적 세포 표면에 전달하여 CTL로의 신호전달하는 것을 촉진할 수 있는, 세포-표적화된 분자(예를 들면, 면역독소 및 리간드-독소 융합체와 같은)의 성분으로서 작용할 수 있는, 신규한 독소-유도된 작동체 폴리펩티드를 생성하였다.

[0484] [439] 특정의 신규한 독소-유도된 작동체 폴리펩티드를 또한 본 발명의 하나 이상의 방법을 사용하여 B-세포 항원결정기내 T-세포 항원결정기를 임베딩 또는 인서팅함으로써 탈면역화하였다. 동일한 독소 폴리펩티드 영역내에서 표적 세포 표면에 T-세포 항원결정기 제시를 위해 동시에 탈-면역화하여 제공하기 위해, 예측된 B-세포 항원결정기 영역은, 이들을 MHC 클래스 I 분자에 결합하는 것으로 예측된 공지된 T-세포 항원결정기와 대체시켜 파괴하였다. 독소-유도된 폴리펩티드로부터의 아미노산 서열을 분석하여 항원성 및/또는 면역원성 B-세포 항원결정기를 인실리코(*in silico*) 상태에서 예측하였다. 임베딩된 다양한 T-세포 항원결정기, 독소-유도된 폴리펩티드를 독소 작동체 작용의 보유에 대해 실험적으로 시험하였다.

[0485] [440] 본 발명의 예시적인 T-세포 항원결정기를 제시하는 독소 작동체 폴리펩티드의 독소 작동체 작용의 보존을 시험하고 독소 작동체 영역에 대한 어떠한 내부 변형 또는 돌연변이도 포함하지 않았던 본원에서 "야생형" 또는 "WT"로서 언급된 야생형 독소 폴리펩티드 서열을 포함하는 독소 작동체 폴리펩티드와 비교하였다.

[0486] [441] 본 발명의 예시적인 CD8+ T-세포 항원결정기를 제시하는 시가 독소-유도된 폴리펩티드의 다음 실시예는 MHC 클래스 I 제시를 위한 T-세포 항원결정기 전달을 동시에 제공하면서 하나 이상의 시가 독소 작동체 작용을 보유하는 방법을 입증한다. 또한, 예시적인 CD8+ T-세포 항원결정기를 제시하고/하거나 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소-유도된 폴리펩티드의 다음의 실시예는 1) MHC 클래스 I 제시를 위한 T-세포 항원결정기 전달, 2) 하나 이상의 독소 작동체 작용의 보유, 및 3) 독소 작동체 영역의 탈-면역화를 동시 제공하는 방법을 입증한다.

[0487] [442] 표적 생물분자에 결합된 예시적인 본 발명의 세포-표적화된 분자는 표적화된 세포형에 의해 발현되어 표적화된 세포내로 도입하였다. 본 발명의 내재화된 예시적인 세포-표적화된 단백질은 이들의 탈면역화 독소 작동체 영역을 세포질내로 효과적으로 경로화하여 면역원성 T-세포 항원결정기를 표적 세포의 MHC 클래스 I 경로에 전달함으로써 표적 세포 영역의 표면에 T-세포 항원결정기 펩티드를 제시한다.

[0488] **실시예 1. 세포-표적화 분자의 폴리펩티드 성분내 임베딩 또는 인서팅 T-세포 항원결정기**

[0489] [443] 당해 실시예에서, T-세포 항원결정기 서열을 사람 바이러스 단백질로부터 선택하여 시가 독소 작동체 폴리펩티드내로 임베딩하거나 인서팅하였다. 일부 변이체에서, T-세포 항원결정기를 B-세포 항원결정기 영역내로 임베딩하거나 인서팅하여 천연적으로 존재하는 B-세포 항원결정기를 파괴하였다. 다른 변이체에서, T-세포 항원결정기는 어떠한 B-세포 항원결정기도 함유하는 것으로 예측되지 않은 영역내로 임베딩되므로, 이들 변형은 어떠한 우세한 B-세포 항원결정기도 파괴하는 것으로 예측되지 않는다. 상기 변이체의 일부에서, T-세포 항원결정

기는 예측된 영역내로 임베딩되어 촉매 활성을 파괴한다.

[0490] **A. 임베딩 또는 인서팅을 위한 T-세포 항원결정기 펩티드의 선택**

[0491] [444] 당해 실시예에서, 공지된 T-세포 항원결정기 펩티드를 세포질에 대해 세포내적으로 경로화하는 고유 능력을 지닌 시가 독소 작동체 영역내로 임베딩 및 인서팅하기 위해 선택하였다. 예를 들면, 사람 인플루엔자 A 바이러스 및 사람 CMV 바이러스와 같은 사람 바이러스로부터의 바이러스 단백질의 많은 공지된 면역원성 바이러스 단백질 및 펩티드 성분이 존재한다. 사람 MHC 클래스 I 분자에 결합하고/하거나 사람 CTL-매개된 반응을 유발할 수 있는 면역원성 바이러스 펩티드를 선택하였다.

[0492] [445] T-세포 항원결정기(서열 번호: 4 내지 10)인 것으로 예측된 7개의 펩티드를 면역 항원결정기 데이타베이스(IEDB) 분석원 MHC-I 결합 예측의 컨센서스 도구 및 추천된 매개변수(참고: Kim Y et al, *Nucleic Acids Res* 40: W252-30 (2012))를 사용하여 사람 집단에서 보다 우세한 대립형질에 의해 암호화된 일반적인 사람 MHC 클래스 I 사람 진핵세포 항원(HLA) 변이체에 결합하는 능력에 대해 점수를 매겼다. IEDB MHC-I 결합 예측 분석은 "ANN 친화성" - 도입 펩티드와 선택된 사람 HLA 변이체 사이의 평가된 결합 친화성(여기서 50 나노몰(nM) 미만인 IC_{50} 값은 고 친화성으로 고려되며, 50 내지 500 nM 사이의 IC_{50} 값은 중간 친화성으로 고려되고, 500 내지 5000 nM 사이의 IC_{50} 값은 저 친화성으로 고려된다)을 예측하였다. IEDB MHC-I 결합 예측 분석은, 최저 퍼센트 순위에 의한 가장 우수한 결합인자를 나타낸다. 표 1은 선택된 사람 LHA 변이체에 대한 7개의 시험된 T 세포 항원결정기-펩티드(서열 번호: 4 내지 10)의 IEDB MHC-I 결합 예측 퍼센트 순위 및 예측된 결합 친화성을 나타낸다.

표 1

[0493]

T-세포 항원결정기		IEDB MHC-I 결합 예측		
명칭	**서열**	**대립형질**	**퍼센트 순위**	**예측된 친화성**
F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	HLA-A*32:01	0.80	중간
		HLA-A*02:01	0.80	고
		HLA-A*02:06	0.20	고
F2-2	DILGFVFTL (SEQ ID NO:5)	HLA-A*32:01	1.40	중간
		HLA-A*02:01	4.60	저
		HLA-A*02:06	9.55	중간
F2-3	DILGFDFTL (SEQ ID NO:6)	HLA-A*32:01	2.80	저
		HLA-A*02:01	8.20	저
		HLA-A*02:06	11.25	저
F2-4	GILGDVFTL (SEQ ID NO:7)	1HLA-A*02:01	1.40	고
		HLA-A*02:06	2.40	고
		HLA-A*32:01	3.10	저
F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	HLA-A*03:01	0.25	고
		HLA-A*30:01	0.70	고
		HLA-A*31:01	4.25	중간
F3-4	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:9)	HLA-A*03:01	0.25	고
		HLA-A*30:01	0.80	고
		HLA-A*31:01	3.30	중간
C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	HLA-A*02:03	0.30	고
		HLA-A*02:01	1.00	고
		HLA-A*02:06	1.10	고

[0494] 표1: 다양한 사람 MHC 클래스 I 복합체에 결합하는 다양한 바이러스 단백질-유도된 T-세포 항원결정기에 대한 예측

[0495] [446] IEDB MHC-I 결합 예측 분석의 결과는, 일부 펩티드가 다수의 사람 MHC 클래스 I 분자에 고 친화성으로 결합하는 것으로 예측되지만, 다른 펩티드는 분석된 사람 MHC 클래스 I 분자에 대해 보다 온화한 친화성으로 결합하는 것으로 예측되었음을 나타낸다.

[0496] B. 독소 및 독소 작동체에서 B-세포 항원결정기 영역의 확인

[0497] [447] 프로테아좀 전달에 적합한 고유의 소세포 경로화 특징을 지닌 독소 유도된 폴리펩티드를 탈-면역화를 위해 선택하여 척색 동물에 투여 후, 예를 들면, 항-독소 항체의 생산과 같은, 바람직하지 않은 면역 반응의 가능성을 감소시켰다. 독소 및 독소-유도된 폴리펩티드로부터의 아미노산 서열을 분석하여 항원성 및/또는 면역원성 B-세포 항원결정기를 인 실리코(in silico) 상태로 예측하였다.

[0498] [448] 시가 독소 및 디프테리아 독소 둘 다로부터 유도된 폴리펩티드 작동체를 B-세포 항원결정기에 대해 분석하였다.

[0499] 시가 독소 유도된 작동체 폴리펩티드

[0500] [449] 우선, B-세포 항원결정기 영역을 시가 독소 A 소단위내에서 확인하였다. 컴퓨터 방법을 이용하여 투여 후 포유동물 면역계에 의한 반응을 유발하는 잠재능을 사용하여 시가 독소 A 소단위 서열내에서 항원성 및/또는 면역원성 B-세포 항원결정기를 예측하였다.

[0501] [450] 선형 B-세포 항원결정기가 Prolmmune, Inc.(미국 플로리다주 사라소타 소재)에 의해 제공된 시가-유사 독소 쇄 A(PDB ID: 1DMO_A) 및 REVEAL® 시스템의 폴리펩티드 서열 및 3D 구조 데이타를 사용하여 시가 독소의 A 소단위내에서 예측되었다. 동시에, B-세포 항원결정기가 BcePred 웹서버(참고: Saha S, Raghava G, Lecture Notes in Comput Sci 3239: 197-204 (2004)), Bepipred 선형 항원결정기 예측(Bepipred Linear Epitope Prediction)(Larsen J et al., *Immunome Res* 2: 2 (2006)), ElliPro 항체 항원결정기 예측(ElliPro Antibody epitope prediction)(참고: Haste Andersen P et al., *Protein Sci* 15: 2558-67 (2006); Ponomarenko J, Bourne P, BMC Struct Biol 7: 64 (2007)), 및/또는 Epitopia 서버(Epitopia server)(Rubinstein N et al, *BMC Bioinformatics* 10: 287 (2009))을 사용하여 시가 독소의 A 소단위의 아미노산 서열내에서 예측되었다. 에피토피아 서버 예측을 사용하여 에피토피아의 면역원성 규모가 "고"(4 또는 5로 점수매겨짐)로 예측된 대부분의 잔기를 포함하는 선형 아미노산 잔기의 특정 길이로서 면역원성 B-세포 항원결정기를 확인하였다. 다양한 컴퓨터 방법은 3개의 원형의 시가 독소 A 소단위에서 B-세포 항원결정기 영역에 대한 유사한 예측을 나타내었다(표 2 내지 4).

표 2

[0502]

항원결정기 영역	천연적으로 위치한 아미노산 위치				
	실제	BcePred	Bepipred	Ellipro	Epitopia
1					1-15
2		29-35	28-34	27-37	18-23
3	42-48	39-46	43-47		44-49
4	58-66	55-61	56-64	57-66	52-62
5	96-103	105-111	100-115	96-110	94-102,109-114
6	144-151	141-147	147-151	144-153	
7	183-189	181-187	147-151	180-190	179-188
8			183-185		211-220
9	234-251		211-219	243-257	245-259
10	257-268	261-267			
11	289-293	285-291	254-268	262-293	262-281

[0503] 표2: 시가-유사 독소 1의 성숙한, 천연의 A 소단위(서열 번호: 1)에 대한 B-세포 항원결정기 예측

표 3

[0504]

천연적으로 위치한 아미노산 위치			
실제	BcePred	Bepipred	ElliPro
	29-35	28-34	27-37
42-48	39-46	44-47	
58-66	55-61	56-64	57-66
96-103	105-111	100-115	96-110
144-151	141-147	147-151	144-153
183-189	181-187	183-185	180-190

		211-219	
243-251			243-257
257-268	261-267	254-268	
289-293	285-291		262-293

[0505] 표3: 시가 독소의 성숙한, 천연의 A 소단위(서열 번호: 2)에 대한 B-세포 항원결정기 예측

표 4

[0506]

천연적으로 위치한 아미노산 위치		
BcePred	Bepipred	ElliPro
3-11	8-14	
29-35	28-36	26-37
		42-48
	57-62	56-66
108-115	109-115	96-110
141-156		140-153
	179-188	180-191
	210-218	210-217
240-257	244-258	241-255
		262-278
		281-297

[0507] 표4: 시가-유사 독소 2의 성숙한, 천연의 A 소단위(서열 번호: 3)에 대한 B-세포 항원결정기 예측

[0508] [451] 세포성 및 내재화를 유도하고 세포질에 대한 이들 자체의 소세포 경로화를 수행할 수 있는, 시가 독소-유도된 독소 작동체 폴리펩티드 외에, 다른 단백질로부터의 세포질성 경로화 작동체 영역을 예를 들면, 다른 단백질 독소와 같은, 본 발명의 폴리펩티드로 변형시키기 위한 폴리펩티드의 공급원으로 선택할 수 있다.

[0509] 디프테리아 독소 유도된 작동체 폴리펩티드

[0510] [452] 디프테리아 독소를 사용하여 면역독소 및 리간드-독소 융합 분자를 설계하였으며, 여기서 디프테리아 유도된 성분은 세포 내재화 및 세포질성 경로화 작동체 작용을 제공할 수 있다. 컴퓨터 방법을 사용하여 포유동물 면역계내에서 반응을 유발하기 위한 잠재능을 지닌 디프테리아 독소 A 소단위내에서 항원성 및/또는 면역원성 B-세포 항원결정기 영역을 예측하였다. B-세포 항원결정기 영역은 BcePred 웹서버를 사용하여 디프테리아 독소의 A 소단위(서열 번호: 44)에서 7개의 추정의 B-세포 항원결정기를 나타내었다(참고: Saha S, Raghava *G, Lecture Notes in Comput Sci* 3239: 197-204 (2004)). 당해 컴퓨터 방법은 원형의 디프테리아 독소 A 소단위에서 7개의 추정의 B-세포 항원결정기 영역을 나타내었다(표 5). 또한, 미국 알러지 및 감염성 질병의 국립 기관(National Institutes of Allergy and Infectious Diseases of the U.S.)(AID)에 의해 선임된 면역 항원결정기 데이타베이스(IEDB)는 디프테리아 독소의 모든 실험적으로 특징화된 B-세포 및 T-세포 항원결정기를 제공하는 것으로 일컬어진다. 현재, IEDB는 실시예에 사용된 디프테리아 독소 A 소단위 및 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 서열 번호: 44와 관련된 펩티드성 항원결정기에 관한 적어도 하나의 양성 측정을 갖는 7개의 항원결정기를 제공한다(참고: 표 5 및 서열 번호: 44의 182 내지 201 및 225 내지 238).

표 5

[0511]

항원결정기 영역	천연적으로 위치한 아미노산	
	BcePred	IEDB
1	3-10	
2		15-31
3	33-43	32-54
4	71-77	
5		93-113
6	125-131	
7	138-146	141-167
8	165-175	141-167
9	185-191	181-193

[0512] 표5: 디프테리아 독소의 성숙한, 천연의 A 소단위에 대한 B-세포 항원결정기 예측(서열 번호: 44)C. 독소 및 독소 작동체 폴리펩티드에서 CD4+ T-세포 항원결정기 영역의 확인

[0513] [453] 시가 독소 A 소단위를 어떠한 CD4+ T-세포 항원결정기의 존재에 대해서 분석하였다. T-세포 항원결정기를 Prolmmune Inc.(미국 플로리다주 사라소타 소재)에 의해 수행된 REVEAL™ 면역원성 시스템(IS) T-세포 검정에 의해 시가-유사 독소 1의 성숙한 A 소단위(서열 번호: 1)에 대해 예측하였다. 당해 검정은 대상체 단백질로부터의 다수의 오버랩핑 펩티드 서열을 사용하여 CD8+ T-세포가 고갈된 건강한 공여체 세포로부터 CD4+ T-세포에 의한 어떠한 면역 반응의 유발에 대해 시험하였다. 아미노산 잔기의 다음의 천연적으로 위치한 그룹에서 당해 검정을 사용하여 확인된 7개의 T-세포 항원결정기 영역이 존재하였다: CD4+ T-세포 항원결정기 영역 #1: 4-33, CD4+ T-세포 항원결정기 영역 #2: 34-78, CD4+ T-세포 항원결정기 영역 #3 : 77-103, CD4+ T-세포 항원결정기 영역 #4: 128-168, CD4+ T-세포 항원결정기 영역 #5: 160-183, CD4+ T-세포 항원결정기 영역 #6: 236-258, 및 CD4+ T-세포 항원결정기 영역 #7: 274-293.

[0514] [454] 실시예에서 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 생성하기 위한 모 폴리펩티드로서 사용된 디프테리아 독소 A 소단위 및 야생-형, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 T-세포 항원결정기에 대해 NIAD의 IEDB에서 시험하였다. 현재, IEDB는 실시예에서 디프테리아 독소 A 소단위 및 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드와 관련된 T-세포 면역원성에 관한 적어도 하나의 양성 측정을 지닌 25개 걸친 펩티드성 항원결정기를 제공한다. 예를 들면, 아미노산 잔기 위치: 2-21, 22-41, 32-71, 72-91, 82-221, 212-231, 232-251, 및 251-301에서 서열 번호: 45의 폴리펩티드내 오버랩핑 면역원성 펩티드에 상응하는 다음의 영역과 같은, 디프테리아 독소내에 IEDB에 의해 확인된 수개의 T-세포 항원결정기 영역이 존재한다.

[0515] D. 임베딩되거나 인서팅된 T-세포 항원결정기를 파괴하는 내인성 B-세포 항원결정기 영역 및/또는 내인성 CD4+ T-세포 항원결정기 영역을 지닌 독소 작동체 폴리펩티드의 생성

[0516] [455] 본 발명의 예시적인 독소-유도된 작동체 폴리펩티드를 시가 독소 및 디프테리아 독소 둘 다를 사용하여 생성하였다.

[0517] 시가 독소 유도된 작동체 폴리펩티드

[0518] [456] 세포 표적화를 위한 시가 독소 작동체 영역 및 면역글로불린-형 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질을 암호화하는 핵산을 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 생산하였다. 당해 실시예의 모세포독성 단백질내 시가 독소 작동체 영역은 서열 번호: 1의 아미노산 1 내지 251를 포함하였다.

[0519] [457] 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여, 일련의 돌연변이를 모 세포독성 단백질을 암호화하는 핵산내로 가공하고 모 세포독성 단백질과 비교하여 다수의 아미노산 치환을 포함한 세포독성 단백질의 변이체를 생산하였다. 돌연변이를 선택하여 표 1에 기술된 적어도 하나의 T-세포 항원결정기 펩티드를 임베딩함으로써 표 2에 기술된 적어도 하나의 예측된 B-세포 항원결정기 영역을 파괴하였다. 실시예에 기술된 본 발명의 예시적인 폴리펩티드의 대부분에 대해, 각각의 T-세포 항원결정기에 대한 아미노산 서열을, 핵산을 조작하여 임베딩함으로써 변이체내 암호화된 아미노산 잔기의 총 수가 모 세포독성 단백질내 암호화된 아미노산 잔기의 총 수로부터 변하지 않고 남도록 하였다. 본 발명의 상이한 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드 성분을 포함하는 본 발명의 상이한 예시적인 세포독성의, 세포-표적화된 단백질에 대해 각각 암호화된 10개의 상이한 폴리뉴클레오티드를 생성하였다. 이들 예시적인 폴리뉴클레오티드를 사용하여 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 본 발명의 10개의 예시적인 세포독성, 세포-표적화된 단백질을 생산하였다. 특정의 실시예에서, 본 실시예의 세포독성 단백질의 완전한 길이의 암호화 서열은 Strep-tag® II를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 시작하거나 종결시켜 결실 및 정제를 촉진하였다. 단백질은 숙련가에게 공지된 방법을 사용하여 정제하였다.

[0520] [458] 11개의 세포독성 단백질을 모 세포독성 단백질로 부터 유도하였으며, 각각은 본 발명의 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드(서열 번호: 11-21로부터 선택됨) 및 표 1에 기술된 T-세포 항원결정기를 사용한 표 2에서 적어도 하나의 예측된 B-세포 항원결정기 영역의 파괴를 포함한다. 각각의 11개의 세포독성 단백질의 경우 모 시가 독소 작동체 폴리펩티드에 대한 정확한 변형은 표 6에 나타낸다. 표 6은 각각의 임베딩된 T-세포 항원결정기의 서열, 변형의 시가 독소 A 소단위내 천연 위치, 및 B-세포 항원결정기 영역내에서 아미노산이 파괴된 길이를 나열한다.

표 6

[0521]

위치 (천연 잔기위치)	T-세포 항원 결정기 명칭	임베딩된 T-세포 항원결정기	B-세포 항원 결정기 영역	치환된 B-세포 항원결정기 영역
4-12	F3-4	ILRFSVAHK (SEQ ID NO:9)	1	TLDFSTAKT (SEQ ID NO:136)
43-51	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	SGSGDNLFA (SEQ ID NO:137)
44-52	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	3	GSGDNLFAV (SEQ ID NO:138)
44-52	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	GSGDNLFAV (SEQ ID NO:138)
53-61	F2-2	DILGFVFTL (SEQ ID NO:5)	4	DVRGIDPEE (SEQ ID NO:139)
53-61	F2-3	DILGFDFTL (SEQ ID NO:6)	4	DVRGIDPEE (SEQ ID NO:139)
53-61	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	4	DVRGIDPEE (SEQ ID NO:139)
104-112	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	5	TAVTLSGDS (SEQ ID NO:140)
180-188	F2-4	GILGDVFTL (SEQ ID NO:7)	7	TTLDDLSGR (SEQ ID NO: 141)
53-61	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	4	DVRGIDPE (SEQ ID NO:142)
245/246	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	9	없음(246번에서 인서팅 됨)

[0522] 표 6: B-세포 항원결정기 영역 및/또는 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내로 임베딩되거나 인서팅된 T-세포 항원결정기를 지닌 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드

[0523] [459] 첫번째 9개의 세포독성 단백질 각각은 임베딩된 T-세포 항원결정기를 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하였고(참고: 표 6) - 이는, 모 세포독성 단백질의 시가 독소 작동체 폴리펩티드 성분내 아미노산 잔기의 천체적인 총 수에 대해 어떠한 변화도 없음을 의미한다. 표 6에 나열된 처음 9개의 변형 각각은 B-세포 항원결정기 영역을 파괴하는 임베딩된 T-세포 항원결정기를 예시한다. 이들 9개의 변형은 정확한 대체이므로, 파괴된 T-세포 항원결정기 서열 및 B-세포 항원결정기 영역 서열은, 길이가 동일하며 아미노-말단으로부터 카복시-말단의 순서로 나열된 것으로서 1개의 각각의 아미노산에 대해 1개씩 일치한다. 표 6에서 10번째 시가 독소 작동체 폴리펩티드, 53-61-F2는 나머지 카복시-말단, WT, 아미노산 잔기를 1개 위치까지 이동시키는 61번 위치에서 1개의 아미노산의 부분적인 대체 및 인서팅을 포함한다. 표 6에서 11번째 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 천연적으로 위치한 아미노산 잔기 245 및 246 사이에서 전체 T-세포 항원결정기의 완전한 인서팅이다. 이러한 인서팅은 SLT-1A의 아미노산 243 내지 259에 천연적으로 위치한 B-세포 항원결정기 영역 #9내에 놓인다.

[0524] [460] 인 실리코 상태로 컴퓨터 분석은, 야생-형 시가 독소에 존재하는 적어도 하나의 B-세포 항원결정기가 8개의 T-세포 항원결정기의 경우 임베딩되거나 인서팅된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 변이체를 제거하였으며, 새로운 B-세포 항원결정기가 표 6에서 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드 중 어느 것에서도 임베딩 또는 인서팅된 T-세포 항원결정기에 의해 생성되는 것으로 예측된 것은 없었다(참고: 또한 하기 실시예 3).

[0525] [461] 또한, 서열 번호: 11-17 및 19-21에 의해 나타낸 시가 독소 작동체 폴리펩티드 모두는 예측된 내인성 CD4+ T-세포 항원결정기(들)의 파괴를 포함한다.

[0526] 디프테리아 독소 유도된 작동체 폴리펩티드

[0527] [462] 상기 변형된, 시가 독소-유도된 폴리펩티드와 유사하게, T-세포 항원결정기를 프로테아좀 전달 작동체 작용을 지닌 디프테리아 독소-유도된 폴리펩티드내로 임베딩하여 본 발명의 예시적인 T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 생성하였다. T-세포 항원결정기를 표 1에서의 펩티드로부터 선

택하여 임베딩하여 표 5에 기술된 적어도 하나의 예측된 B-세포 항원결정기 영역을 파괴하였다.

[0528] [463] 당해 실시예의 모든 디프테리아 독소-유도된 폴리펩티드는 디프테리아 독소 B 소단위로부터의 전좌 도메인, 유도된 A 및 B 소단위 사이의 푸린 절단 포티프, 독소 작동체 폴리펩티드 영역과 함께 연속으로 디프테리아 독소 A 소단위로부터의 촉매 영역을 포함하였다. 따라서, 본 실시예에서 디프테리아 독소-유도된 폴리펩티드는 프로테아좀 전달 작동체 영역 및 리보독성 독소 작동체 폴리펩티드 둘 다를 포함한다. 본 발명의 예시적인, T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 서열 번호: 46, 47, 및 48로서 제공된다.

[0529] [464] 표준 기술을 사용하여, 일련의 돌연변이를 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드내에서 이루어서 예측된 B-세포 항원결정기 영역을 오버랩핑하는 위치내에 T-세포 항원결정기를 임베딩하였다(참고: 표 5). 표 7은 서열 번호: 44에서 천연의 디프테리아 독소 폴리펩티드 서열을 기준으로 임베딩된 T-세포 항원결정기의 위치, T-세포 항원결정기 명칭, T-세포 항원결정기 펩티드 서열, 파괴된 예측된 B-세포 항원결정기 영역, 및 천연의 디프테리아 독소 폴리펩티드 서열내 대체된 아미노산 서열을 나타냄으로써 T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드의 예를 나타낸다.

표 7

[0530]

위치(천연 위치)	T-세포 항원 결정기	임베딩된 T-세포 항원 결정기	B-세포 항원 결정기 영역	대체된 B-세포 항원결정기 영역	β-세포 항원결정기 예측	
					original epitope	neo-epitope
34-42	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	2	GIQKPKSGT (SEQ ID NO:143)	eliminated	none
69-77	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	NENPLSGKA (SEQ ID NO:144)	eliminated	none
168-176	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	6	ETRGKRGQD (SEQ ID NO:145)	eliminated	none

[0531] 표 7: B-세포 항원결정기 영역내로 임베딩된 T-세포 항원결정기를 지닌 예시적인 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드

[0532] [465] T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 변이체(서열 번호: 46, 47, 및 48)를 위에서 기술한 바와 같이 예측된 B 세포 항원결정기내 어떠한 변화에 대해서도 분석하였다. 모든 3개의 T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 변이체에서, 야생-형 디프테리아 독소 아미노산 서열내 예측된 B-세포 항원결정기는 제거되었고, 새로운 B-세포 항원결정기는 예측되지 않았다(표 7).

[0533] [466] 3개의 T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 변이체(서열 번호: 46, 47, 및 48), 및 야생-형 독소 아미노산 서열(서열 번호: 45)만을 포함하는 모 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 아미노-말단 메티오닌 및 카복시-말단 폴리히스티딘-태그(6xHis 태그(SEQ ID NO:146))를 사용하여 각각 설계함으로써 발현 및 정제를 촉진하였다. 본 발명의 예시적인 T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 변이체 및 야생-형 독소 아미노산 서열만을 포함하는 모 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 둘 다를 당해 분야에 공지된 세균 시스템으로 생산하고 예를 들면, 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA) 수지 크로마토그래피와 같은 당해 분야에 공지된 조건하에서 정제하였다.

[0534] E. 어떠한 B-세포 항원결정기 영역도 파괴하지 않는 임베딩된 T-세포 항원결정기를 지닌 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 생성

[0535] [467] 실시예에 기술된 모든 방법으로부터 모든 B-세포 항원결정기 영역 예측을 인식하여(표 2), 어떠한 B-세포 항원결정기도 함유하는 것으로 예측되지 않는 SLT-1A의 영역을 확인하였다. 표 1로부터의 T-세포 항원결정기 펩티드 서열을 천연 아미노산을 치환에 의해 대체함으로써 B-세포 항원결정기를 결여하는 것으로 확인된 이들 영역내에 임베딩하여 표 8에 나타낸 바와 같은 본 발명의 3개의 상이한 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 생성하였다. 표 8은 성숙한, 천연의 SLT-1A 폴리펩티드 서열내 확인된 영역 및 시가 독소 작동체 폴리펩티드내로 가공된 대체 T-세포 항원결정기 서열을 나타낸다(참고: 서열 번호: 22-39).

표 8

[0536]

위치 (천연의 잔기 위치)	T-세포 항원결정기 명칭	임베딩된 T-세포 항원결정기	대체된 WT 영역
66-74	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	NLRLIVERN (SEQ ID NO:147)
75-83	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	NLYVTGFVN (SEQ ID NO:148)
157-165	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	AMLRFVTVT (SEQ ID NO:149)
164-172	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	VTAEALRFR (SEQ ID NO:150)
221-229	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	VGRISFGSI (SEQ ID NO:151)
231-239	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	AILGSVALI (SEQ ID NO:152)
66-74	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	NLRLIVERN (SEQ ID NO:147)
75-83	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	NLTVTGFVN (SEQ ID NO:148)
157-165	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	AMLRFVTVT (SEQ ID NO:149)
164-172	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	VTAEALRFR (SEQ ID NO:150)
221-229	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	VGRISFGSI (SEQ ID NO:151)
231-239	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	AILGSVALI (SEQ ID NO:152)
66-74	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	NLRLIVERN (SEQ ID NO:147)
75-83	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	NLTVIGFVN (SEQ ID NO:148)
157-165	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	AMLRFVTVT (SEQ ID NO:149)
164-172	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	VTAEALRFR (SEQ ID NO:150)
221-229	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	VGRISFGSI (SEQ ID NO:151)
231-239	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	AILGSVALI (SEQ ID NO:152)

[0537] 표 8: 시가 독소 작동체 폴리펩티드내 T-세포 항원결정기 임베딩된 외부 B-세포 항원결정기 영역

[0538] [468] 표 8에서 정확한 대체제로서, 임베딩된 T-세포 항원결정기를 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드 서열을 BcePred 프로그램을 사용하여 분석하였다. 표 8내 임베딩된 T-세포 항원결정기 정확한 대체 중 어느 것도 상기 프로그램에 의해 예측된 6개의 항원결정기 영역중 어느 것도 파괴하지 않았다. 표 8에서 임베딩된 T-세포 항원결정기 대체 서열 중 1개, 변이체 75-83-F3는 새로운 B-세포 항원결정기의 예측을 생성하였다. 영역 (66-74) 및/또는 (157-165) 근처의 임베딩 T-세포 항원결정기는 SLT-IA 촉매 활성에 요구되는 것으로 알려진 적어도 하나의 아미노산(예를 들면, Y77 및 E167)에 대한 이들의 근접성으로 인하여 촉매 활성의 시가 독소 작동체 작용을 파괴할 수 있다.

[0539] [469] 또한, 서열 번호: 22-39로 나타낸 시가 독소 작동체 폴리펩티드 모두는 서열 번호: 26, 32, 및 38로 나타낸, 221 내지 229번 위치에서 임베딩된 이형 T-세포 항원결정기를 지닌 폴리펩티드를 제외하고는, 예측된 내인성 CD4+ T-세포 항원결정기(들)의 파괴를 포함한다.

[0540] F. 독소 촉매 작용을 파괴하는 임베딩된 T-세포 항원결정기를 지닌 독소 작동체 폴리펩티드의 생성

[0541] [470] 시가 독소 A 소단위의 효소 활성에 대해 대부분의 중요한 잔기는 타이로신-77(Y77) 및 글루타메이트-167(E167)을 포함한다(참고: Di, Toxicon 57: 535-39 (2011)). 표 1로부터의 T-세포 항원결정기 펩티드 서열을 시가 독소 작동체 폴리펩티드내로 임베딩함으로써 Y77 또는 E1 67을 돌연변이시켜 시가 독소 효소 활성을 감소시키거나 제거하였다. 이형 T-세포 항원결정기를 파괴하는 촉매성 아미노산 잔기를 포함하는 본 발명의 6개의 상이한 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 표 9에 나타낸다. 표 9는 성숙한, 천연의 SLT-IA 폴리펩티드 서열, 임베딩된 대체 T-세포 항원결정기 서열, 성숙한, 천연의 SLT-IA 폴리펩티드 서열내 대체 서열내에서 임베딩된 T-세포 항원결정기, 및 수득되는 촉매성 잔기 파괴를 나타낸다(또한 서열 번호: 23, 29, 40, 41, 42, 및 43 참고).

표 9

[0542]

위치 (천연의 잔기위치)	T-세포 항원 결정기 명칭	임베딩된 T-세포 항원결정기	대체된 WT 영역	촉매적 잔기 변화
75-83	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	NLYVTGFVN (SEQ ID NO:148)	Y77V
75-83	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	NLYVTGFVN (SEQ ID NO:148)	Y77R
77-85	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	YVTGFVNRT (SEQ ID NO:153)	Y77G
159-167	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	LRFVTVTAE (SEQ ID NO:154)	E167L
159-167	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	LRFVTVTAE (SEQ ID NO:154)	E167K
162-170	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	VTVTAEALR (SEQ ID NO:155)	E167V

[0543] 표 9: 시가 독소 촉매 작용을 불활성화시키기 위한 시가 독소 작동체 폴리펩티드내에 임베딩된 T-세포 항원결정기

[0544] [471] 서열 번호: 23, 29, 40, 42, 및 43로 나타낸 모든 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 예측된 내인성 CD4+ T-세포 항원결정기(들)의 파괴를 나타낸다. 또한, 표 8에 나타낸 어떠한 B-세포 항원결정기 영역도 파괴하지 않는 임베딩된 T-세포 항원결정기를 지닌 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드 중에서, 이들 중 적어도 8개는 시가 독소 작동체 영역의 촉매성 아미노산 잔기를 파괴한다(참고: 서열 번호: 23, 25, 29, 31 35, 및 37).

[0545] [472] 단일 부위에서 임베딩 및 인서팅 외에도, MHC 클래스 I 제시를 위한 다수의 면역원성 T-세포 항원결정기를 예를 들면, 제1의 임베딩된 T-세포 항원결정기를 지닌 B-세포 항원결정기 영역을 파괴하고 제2의 임베딩된 T-세포 항원결정기를 지닌 독소 촉매성 작용을 파괴하는 것과 같이, 다수의 T-세포 항원결정기의 동시 표적화된 전달시 사용하기 위해 동일한 시가 독소-유도된 폴리펩티드 또는 디프테리아 독소-유도된 폴리펩티드내에 임베딩 및/또는 인서팅한다. 그러나, 단일의 임베딩된 T-세포 항원결정기가 B-세포 항원결정기 영역 및 독소 촉매 작용을 동시에 파괴할 수 있음을 주목하여야 한다.

[0546] 실시예 2. 리보독성 독소 작동체 작용의 보유를 위한 독소-유도된 작동체 폴리펩티드의 시험

[0547] [473] 본 발명의 예시적인 독소-유도된 작동체 폴리펩티드를 리보독성 독소 작동체 작용의 보유에 대해 시험하였다.

[0548] 시가 독소 유도된 작동체 폴리펩티드의 리보독성의 보유

[0549] [474] 하나 이상의 T-세포 항원결정기를 임베딩 또는 인서팅한 후 모 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 효소 활성의 보유를 리보소옴 억제 검정을 사용하여 측정하였다. 당해 실시예에서 당해 검정의 결과는 세포독성 단백질의 성분으로서 각각의 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 사용한 검정을 수행하는 것을 기본으로 한다. 상이한 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 상이한 세포독성 단백질의 특이적인 세포독성을 조직 배양 세포-계 독성 검

정을 사용하여 측정하였다. 본 발명의 예시적인 세포독성, 세포-표적화된 단백질의 효소 및 세포독성 활성을 모시가 독소 작동체 폴리펩티드 단독(세포-표적화 결합 영역 없음) 및 동일한 세포-표적화 도메인(예를 들면, 고친화성을 지닌 세포외 표적 생물분자를 결합시킬 수 있는 면역글로불린-형 결합 영역을 포함하는 결합 영역)을 포함하지만 야생-형 시가 독소 작동체 영역이 없는 "WT" 세포독성 단백질과 비교하였다.

[0550] [475] 임베딩되거나 인서팅된 T-세포 항원결정기를 포함하는 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력을 TNT® Quick 커플링된 전사/해독 키트(L1 170 Promega Madison, 미국 위스콘신주 소재)를 사용한 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독 검정을 사용하여 측정하였다. 당해 키트는 루시퍼라제 T7 대조군 DNA(L4821 Promega Madison, 미국 위스콘신주 소재) 및 TNT® Quick 마스터 믹스(Master Mix)를 포함한다. 리보소옴 활성 반응은 제조업자의 지시에 따라 제조하였다. 돌연변이된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역 또는 WT 영역을 포함하는, 시험할 단백질의 일련의 10-배 희석물을 적절한 완충액 속에서 제조하고 일련의 동일한 TNT 반응 혼합물 성분을 각각의 희석을 위해 생성시켰다. 일련의 희석에서 각각의 샘플을 각각의 TNT 반응 혼합물과 루시퍼라제 T7 대조군 DNA을 함께 합하였다. 시험 샘플을 30 섭씨도(℃)에서 1.5 시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 루시퍼라제 검정 시약(E1483 Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)을 모든 시험 샘플에 가하고 루시퍼라제 단백질 해독을 제조업자의 지시에 따라 발광성으로 측정하였다. 해독 억제 수준은 상대적인 발광성 단위에 대한 총 단백질의 전환된 농도의 대수의 회귀 분석으로 측정하였다. 통계학적 소프트웨어(GraphPad Prism, 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)를 사용하여, 최대 억제 농도의 1/2(IC_{50}) 값을 가열하는 투여량-반응-억제하에서 각각의 샘플에 대해 log(억제제) 대 반응(3개의 매개변수) [Y = 하부 + ((상부-하부) / (1+10^(X-LogIC_{50})))]을 사용하여 각각의 샘플에 대해 계산하였다. IC_{50} 값은 B 세포 항원결정기 대체/파괴 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역을 포함하는 각각의 탈-면역화 단백질 및 야생-형 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 대조군 단백질에 대해 계산하였다.

[0551] [476] 본 발명의 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역은 표 10에 나타낸 바와 같이 야생-형 시가 독소 작동체 폴리펩티드와 비교가능한 리보소옴 억제를 나타내었다. 표 10에 보고된 바와 같이, 야생-형 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 양성 대조군 작제물의 10-배내에서의 IC_{50}을 나타낸 본 발명의 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 어떠한 작제물도 야생-형과 비교가능한 리보소옴 억제 활성을 나타내는 것으로 고려하였다.

표 10

[0552]

예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드	시가 독소 작용	
위치-T-세포-항원결정기	리보소옴 불활성화	특이적 세포독성
4-12-F3-4	WT에 대해 비교가능	WT에 대해 비교가능
43-51-C2	WT에 대해 비교가능	WT에 대해 비교가능
44-52-F2	WT에 대해 비교가능	WT에 대해 비교가능
53-61-F2	WT에 대해 비교가능	WT에 대해 비교가능
53-61-F2-2	WT에 대해 비교가능	WT에 대해 비교가능
53-61-F2-3	WT에 대해 비교가능	WT에 대해 비교가능
53-61-C2	WT에 대해 비교가능	WT에 대해 비교가능
104-112-C2	WT에 대해 비교가능	WT에 대해 비교가능
180-188-F2-4	WT에 대해 비교가능	WT에 대해 비교가능
245-F3	WT에 대해 비교가능	WT에 대해 비교가능

[0553] 표 10: 시가 독소 작용(들)의 보유: 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 생체 외 촉매 활성 및 생체 내 특이적인 세포독성

[0554] [477] T-세포 항원결정기 임베딩/인서팅 후 본 발명의 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드에 의한 세포독성의 보유를 세포독성 단백질이 성분으로서 시가 독소 작동체 폴리펩티드와 관련하여 세포-사멸 검정으로 측정하였다. 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하고, 임베딩되거나 인서팅된 T-세포 항원결정기를 포함하는 단백질의 세포독성 수준을 세포독성 단백질의 결합 영역의 표적 생물분자를 발현하지 않는 세포와 비교한 것으로서 세포외 표적을 발현하는 세포를 사용하여 측정하였다. 세포를 384 웰 플레이트 속에서 20 μL의 세포 배양물 속에 플레이팅하였다(부착성 세포에 대해 웰당 2 x 10^3개 세포, 현탁 세포의 경우 단백질 첨가 전일에 또는 웰당 7.5 x 10^3개 세포를 플레이팅, 단백질 첨가와 동일자로 플레이팅). 시험할 돌연변이된 시가 독소 작동체 폴리펩티드

영역을 포함하는 각각의 단백질의 일련의 10-배 희석물을 적절한 완충액 속에서 제조한 후, 5μL의 희석물 또는 완충액 대조군을 세포에 가하였다. 배지만을 함유하는 대조군 세포를 기준선 교정을 위해 사용하였다. 세포 샘플을 단백질과 함께 또는 완충액 만으로 37℃에서 및 5% 이산화탄소(CO_2)의 대기 속에서 3일 동안 항온처리하였다. 총 세포 생존 또는 생존능 퍼센트를 CellTiter-Glo® 발광성 세포 생존는 검정(G7573 Promega Madison, 미국 위스콘신주 소재)을 사용하여 제조업자의 지시에 따라발광성 판독물로 측정하였다.

[0555] [478] 실험 웰의 생존능 퍼센트는 다음 식을 사용하여 계산하였다: (시험 RLU - 평균 배지 RLU) / (평균 세포 RLU - 평균 배지 RLU) * 100. 로그 폴리펩티드 농도 대 생존능 퍼센트를 프리즘(GraphPad Prism, 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)에서 플롯팅하고 로그(억제제) 대 반응(3개의 매개변수) 분석을 사용하여 시험한 단백질에 대한 최대 세포독성 농도(CD_{50}) 값의 1/2을 측정하였다. CD_{50}은 표 10에서 본 발명의 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 각각의 단백질, 야생-형 시가 독소 작동체 영역, 및 SLT- 1 A 소단위 단독(표적화 도메인 없음)을 포함하는 양성-대조군 세포독성 단백질에 대해 계산하였다.

[0556] [479] 본 발명의 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 단백질은 표 10에 나타낸 것으로서 야생-형 시가 독소 작동체 폴리펩티드와 비교하여 세포-특이적인 세포독성을 나타내었다. 특이적인 세포독성과 관련하여 표 10에 보고된 바와 같이, "WT에 비교가능한"은, 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하고, 임베딩되거나 인서팅된 T-세포 항원결정기를 포함하는 단백질이 야생-형 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 단백질의 10-배 내에서 및/또는 SLT-1A 소단위 단독의 50-배 미만내에서 표적 양성 세포 집단에 대해 CD_{50}을 나타내었음을 의미한다.

[0557] [480] 또한, 본 발명의 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 동일한 단백질 작제물은 생물분자-표적-음성 세포(즉, 세포 표면에서 단백질 작제물의 세포-표적-결합 영역의 생물분자 표적을 발현하지 않은 세포)와 비교하여 생물분자-표적-발현 세포에 대해 특이적인 세포독성을 나타내었다. 따라서, 표 10에서 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 나타내는 모든 단백질은 야생-형과 비교가능한 시가 독소 작동체 작용을 나타내는 세포독성 단백질이었으며, 각각의 세포독성 단백질은 하나 이상의 예측된, B-세포 항원결정기 영역내에서 파괴를 포함하였다.

[0558] 디프테리아 독소 유도된 작동체 폴리펩티드의 리보독성의 보유

[0559] [481] 예시적인, T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티의 촉매 활성을 본원에서 "야생-형" 또는 "WT"로 언급된, 야생-형 아미노산 서열만을 포함하는 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드와 비교하였다. T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 변이체 둘 다는 리보소옴 불활성 활성을 보유하였다.

[0560] [482] 세포-표적화된 분자와 관련하여 임베딩된 T-세포 항원결정기를 지닌 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 변이체의 효소 활성의 보유를 리보소옴 억제 검정 및 양성 대조군으로서 야생-형 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 사용하여 비교하였다. 이들 독소 작동체 폴리펩티드의 리보소옴 불활성화 능력은 달리 나타내지 않는 한 위에서 기술한 바와 같은 TNT® 신속한 커플링된 전사/해독 키트(Quick Coupled Transcription/Translation kit)(LI 170 Promega Madison, 미국 위스콘신주 소재)를 사용한, 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독 검정을 사용하여 측정하였다. 우선, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 시험관내에서 푸린(New England Biolabs, 미국 매사추세츠주 입스위치 소재)으로 표준 조건하에 분해하였다. 이후에, 분해된 단백질을 완충액 속에서 희석하여 각각의 샘플에 대한 일련의 희석물을 제조하였다. 각각의 일련물 속에서 각각의 희석물을 각각의 TNT 반응 혼합물 각각과 루시퍼라제 T7 대조군 DNA와 함께 합하고 위에서 기술한 바와 같이 리보소옴 불활성화 활성에 대해 시험하였다.

[0561] [483] IC_{50}을 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드에 대해 위에서 기술한 바와 같이 계산하였다. 도 2 및 표 11은 본 발명의 예시적인 T-세포 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드에 의한 디프테리아 리보독성 독소 작동체의 보유를 위한 당해 생체내 검정의 결과를 나타낸다. T-세포 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드의 활성은, IC_{50} 값이 야생-형 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 대조군의 10-배이내이었으므로 야생-형 양성 대조군과 비교가능하였다(도 2; 표 1 1).

표 11

[0562]

디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드, WT로부터의 배 변화	IC_{50}(㎛)	FLD CHANGE FROM WT
야생형(WT)	1.80	1.0
T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 변이체 34-42-F2	4.94	2.8
T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 변이체 168-176-F3	13.3	7.5
예시적인 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드, 디프테리아 독소 작용	리보소옴 불활성화	
34-42-F2	WT와 비교가능	
168-176-F3	WT와 비교가능	

[0563] 표 11: 예시적인 T-세포 항원결정기 임베딩된, 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드에 의한 촉매 활성의 보유

[0564] 실시예 3. T-세포 항원결정기 임베딩된, 독소 작동체 폴리펩티드내에서 B-세포 항원결정기 영역 및 CD4+ T-세포 항원결정기 영역의 파괴의 탈-면역화 효과의 시험

[0565] [484] 임베딩되거나 인서팅된 T-세포 항원결정기를 사용하여 시가 독소 작동체 폴리펩티드내 B-세포 항원결정기 영역의 파괴를 야생-형 아미노산 서열만을 포함하는 야생-형 시가 독소 작동체 폴리펩티드와 비교한 항원성 및/또는 면역원성의 수준을 시험함으로써 탈-면역화에 대해 시험하였다.

[0566] 웨스턴 분석(Western Analysis)을 통한 탈-면역화의 시험

[0567] [485] 탈-면역화를 분석하기 위하여, 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 항원성 또는 면역원성을 인 실리코 및 웨스턴 블롯팅 둘 다로 야생-형 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 인식하는 예비-형성된 항체를 사용하여 시험하였다.

[0568] [486] 표 6에 기술된 각각의 시가 독소 작동체 폴리펩티드(서열 번호: 11-21)를 예측된 B-세포 항원결정기의 파괴에 대해 다음의 매개변수를 사용한 BcePred 웹서버를 사용하여 점검하였다: 친수성 2, 접근성 2, 노출된 표면 2.4, 항원 경향성 1.8, 굴곡성 1.9, 전환 1.9, 극성 2.3, 및 합한 1.9의 디폴트 셋팅을 사용한 굴곡성 판독물(참고: Saha S, Raghava G, Lecture Notes in Comput Sci 3239: 197-204 (2004)). 다른 프로그램(참고: 표 2)에 의해 야생-형 SLT-1 A 소단위에서 확인된 3개의 예측된 면역원성 항원결정기 영역은 데폴트 셋팅(default setting)을 사용한 BcePred 굴곡성 시도에서 예측되지 않았으므로, 분석될 수 없었다.

[0569] [487] 본 발명의 서열 번호: 11-21의 다음의 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드에서 T-세포 항원결정기 임베딩 또는 인서팅은 본 발명의 새로운 어떠한 항원결정기(신생-항원결정기)의 도입없이 파괴용으로 의도된 예측된 B-세포 항원결정기의 제거를 초래하였다(표 12). 시험한 본 발명의 이들 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드 중 어느 것도 디폴트 셋팅을 사용한 BcePred 굴곡성 시도를 사용하여 어떠한 새로운 예측된 B-세포 항원결정기의 생성도 초래하였다(표 12). 디폴트 셋팅을 사용한 BcePred 굴곡성 시도를 사용하여 예측되지 않은 어떠한 B-세포 항원결정기 영역은 "확인되지 않음"으로 나타내었으며, T-세포 항원결정기 임베딩 또는 인서팅 후 결과는 "N/A"로 나타내어 "적용되지 않음"을 나타내었다.

표 12

[0570]

T-세포 항원결정기 대체를 사용한 B-세포 항원결정기 영역 파괴			BcePred 굴곡성 B-세포 항원결정기 예측		
T-세포 항원결정기 위치	임베딩된 T-세포 항원결정기	파괴된 B-세포 항원결정기 영역	WT 시가 독소 서열(모)	변형된 시가 독소 서열	신생-시가독소 예측
4-12	ILRFSVAHK (SEQ ID NO:9)	1	확인되지 않음	N/A	없음
43-51	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	39-46	제거됨	없음

44-52	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	3	39-46	제거됨	없음
44-52	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	39-46	제거됨	없음
53-61	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	4	55-61	제거됨	없음
53-61	DILGFVFTL (SEQ ID NO:5)	4	55-61	제거됨	없음
53-61	DILGFDFTL (SEQ ID NO:6)	4	55-61	제거됨	없음
53-61	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	4	55-61	제거됨	없음
104-112	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	5	105-111	제거됨	없음
180-188	GILGDVFTL (SEQ ID NO:7)	7	181-187	제거됨	없음
245/246	ILRFSVAHK (SEQ ID NO:9)	9	확인되지 않음	N/A	없음

[0571] 표 12: 임베딩되거나 인서팅된 T-세포 항원결정기에 의한 B-세포 항원결정기 영역 파괴의 분석

[0572] [488] 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 상대적인 항원성 수준을 서열 번호; 1의 아미노산 1 내지 251을 포함하는 야생-형 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 인식하는, 야생-형 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 인식하는, 예비-형성된 항체, 폴리클로날 및 모노클로날 항체 둘 다를 사용사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 탈-면역화에 대해 시험하였다.

[0573] [489] 웨스턴 블롯팅은 야생-형 시가 독소 서열 만을 또는 T-세포 항원결정기(서열 번호: 11-19)와의 대체를 통해 B-세포 항원결정기 영역 파괴를 포함하는 다양한 변형된 시가 독소 서열중 하나를 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 세포독성 단백질 상에서 수행하였다. 이들 세포독성 단백질을 동일한 양으로 로딩하여 4-20% 나트륨 도데실 설페이트(SDS), 폴리아크릴아미드 겔(Lonza, 스위스 바젤 소재)을 복제하고 변성 조건하에서 전기영동하였다. 수득되는 겔을 꼬마지에 염색으로 분석하거나 iBlot® (Life Technologies, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) 시스템을 제조업자의 지시에 따라 사용하여 폴리비닐 디플루오라이드(PVDF) 막에 이전시켰다. 수득되는 막을 표준 조건 하에서 다음의 항체를 사용하여 프로브하였다: Streptag® II로서 또한 폴리펩티드 NWSHPQFEK(SEQ ID NO:156) 를 인식하는 토끼 폴리클로날 α-NWSHPQFEK(SEQ ID NO:156) (A00626, Genscript, 미국 ㄴ저지주 피츠카타웨이 소재), 마우스 모노클로날 α-Stx(mAbl 또는 항-SLT-ⅠA mAbl)(BEI NR-867 BEI Resources, 미국 버지니아주 마나사스 소재; 시가 독소 및 시가-유사 독소 1 A 소단위와의 교차 반응성), 토끼 폴리클로날 항체 α-SLT-lA (pAbl 또는 항-SLT-ⅠA pAbl)(Harlan Laboratories, Inc. 미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재, SLT-IA 아미노산 1-251에 대해 생성된 통상의 항체 생산), 및 펩티드 RGIDPEEGRFNN(SEQ ID NO:157) 및 HGQDSVRVGR(SEQ ID NO:158)에 대해 생성된 토끼 폴리클로날 항체 α-SLT-1A(pAb2 또는 항-SLT-ⅠA pAb2)(Genscript, 미국 뉴저지주 피츠카타웨이, 통상의 항체 생산). 펩티드 서열 RGIDPEEGRFNN(SEQ ID NO:157)을 SLT-IA 및 StxA내 아미노산 55-66내에 위치시키고, 예측된 B 세포 항원결정기를 스패닝(spanning)하고, 펩티드 서열 HGQDSVRVGR(SEQ ID NO:158)을 SLT-IA 및 StxA내 214-223에 위치시키고, 예측된 B-세포 항원결정기를 스패닝한다.

[0574] [490] 막 결합된 항체를 표준 조건, 및 적절한 경우, 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 접합된 제2 항체(염소 항-토끼-HRP 또는 염소 항-마우스-HRP, Thermo Scientific, 미국 일리노이주 록포드 소재)를 사용하여 검출하였다. 도 3 및 4는 번호매긴 겔 및/또는 막의 레인(lane)을 사용한 웨스턴 블롯의 영상을 나타내고 도 설명은, 어느 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 각각의 레인위에 로딩된 세포독성 단백질의 성분이었는지를 동일한 각각의 번호매김으로써 나타낸다. 각각의 겔의 경우, 꼬마지에 염색 및/또는 항-스트렙태그 II 웨스턴 블롯 시그날은 총 세포독성 단백질 로딩 대조군으로서 제공한다. 모든 변형된 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 야생-형 SLT- 1A를 인식하는 하나 이상의 항체에 의한 인식을 감소하거나 폐지하였으며, 이는, 감소된 항원성 및 성공적인 탈-면역화를 나타낸다. 도 3 및 4에 나타낸 웨스턴 블롯 분석의 결과는 표 13에 요약한다.

표 13

다음을 포함하는 세포독성 단백질			웨스턴 블롯 결과		
			anti-SLT-1A pAb1	anti-SLT-1A pAb2	anti-SLT-1A mAb1
영역 WT 시가 독소 작동체			존재	존재	존재
하기 T-세포 항원결정기로 파괴된 B-세포 항원결정기 영역을 포함하는 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드					
T-세포 항원결정기 위치	임베딩된 T-세포 항원결정기	파괴된 B-세포 항원 결정기 영역	웨스턴 블롯 결과		
			anti-SLT-1A pAb1	anti-SLT-1A pAb2	anti-SLT-1A mAb1
4-12	ILRFSVAHK (SEQ ID NO:9)	1	감소됨	존재	폐지됨
43-51	NLVPMVATV (SEQID NO:10)	3	감소됨	존재	폐지됨
44-52	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	3	강하게 감소됨	감소됨	폐지됨
53-61	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	4	감소됨	폐지됨	폐지됨
53-61	DILGFVFTL (SEQ ID NO:5)	4	감소됨	폐지됨	시험되지 않음
53-61	DILGFDFTL (SEQ ID NO:6)	4	감소됨	폐지됨	시험되지 않음
53-61	NLVPMVATV (SEQID NO:10)	4	강하게 감소됨	강하게 감소됨	폐지됨
104-112	NLVPMVATV (SEQID NO:10)	5	존재	존재	폐지됨
180-188	GILGDVFTL (SEQ ID NO:7)	7	존재	존재	폐지됨

[0575]

[0576] 표 13: 웨스턴에 의한 항원결정기 파괴 분석: 감소되거나 폐지된 항체 결합을 나타내는 시험된 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드

[0577] CD4+ T-세포 탈-면역화 시험

[0578] [491] 예측된 CD4+ T-세포 항원결정기 영역에서의 파괴를 외인성으로 투여된 폴리펩티드의 존재하에서 사람 CD4+ T-세포증식의 검정 및 투여된 폴리펩티드로 처리한 사람 단핵세포의 존재하에서 사람 CD4+ 수지 T-세포 자극의 검정을 사용하여 CD4+ T-세포 면역원성내 감소에 대해 시험한다.

[0579] [492] 숙련가에게 알려진 T-세포 증식 검정을 사용하여 예측된 CD4+ T-세포 항원결정기내로 임베딩되거나 인서팅된 T-세포 항원결정기를 포함하는 예시적인 독소 작동체 폴리펩티드내에서 CD4+ T-세포 항원결정기 탈-면역화의 효능을 시험한다. 당해 실시예의 T-세포 증식 검정은 CD4+ T-세포의 표지화에 이어서 이형 CD8+ T-세포 항원결정기(예를 들면, 서열 번호: 11-43)의 임베딩 또는 인서팅을 사용하여 탈면역화 폴리펩티드 또는 이와 관련된 어떠한 사람 이형 T-세포 항원결정기도 가지지 않은 참조 폴리펩티드로부터 유도된 상이한 펩티드의 투여에 대한 반응에서 유동 세포분석 방법을 사용하여 증식에서의 변화를 측정함을 포함한다.

[0580] [493] 폴리펩티드로부터 유도된 일련의 오버랩핑 펩티드를 합성하고 CFSE CD4+ T 세포 증식 검정(Prolmmune Inc., 미국 플로리다주 사라소타 소재)에서 시험하였다. 사람 CD8+ T-세포 고갈된, CFSE로 표지된 말초 세포 단핵 세포(PBMC)를 5 μM의 목적한 각각의 펩티드와 함께 7일 동안 6개의 반복 웰에서 배양하였다. 각각의 검정 플레이트는 처리되지 않은 대조군 웰의 세트를 포함한다. 검정은 또한 공지된 MHC 클래스 II 항원에 대한 합성 펩티드를 포함하는, 참조 항원 대조군을 혼입한다.

[0581] [494] 투여된 펩티드에 대한 반응시 증식하는, CD8+ T-세포 고갈된, PBMC는 유동 세포분석법에 의해 직접 측정한 것으로서 CFSE 형광성 강도에 있어서의 감소를 나타낼 것이다. 나이브(naive) T-세포 분석을 위해, 배경 초

과의 자극 퍼센트를 각각의 자극된 샘플에 대해 자극되지 않은 샘플로부터의 결과와의 비교를 통해, 음성, 약함(dim), 또는 높음과 같은 형광성 시그날과 관련하여 순위를 매김에 의해서와 같이 측정한다. 각각의 샘플에서 CD4+ CFSE T-세포 약함 집단에 대한 계수는 총 CD4+ T-세포 집단의 비율로 나타낸다. 반복된 값을 사용하여 배경을 초과하는 자극 퍼센트(항원 자극된 CD4+ T-세포 CFSE 약함 세포의 비율 - 항원 자극의 부재하에서 CD4+ T-세포 CFSE 약함 세포의 비율)를 계산한다. 평균 및 평균의 표준 오차를 반복된 값으로부터 계산한다. 결과는, 배경을 초과하는 자극 퍼센트가 0.5%보다 크고 배경을 초과하는 표준 오차의 2배보다 큰 경우 "양성"으로 고려한다. 펩티드의 비교를 허용하기 위하여, 반응 지수를 계산한다. 당해 지수는 각각의 펩티드에 대한 반응의 크기(배경을 초과한 자극 퍼센트)를 각각의 펩티드에 대해 반응하는 공여체의 수(항원성 퍼센트)의 곱을 기준으로 한다.

[0582] 상대적인 CD4+ T-세포 면역원성의 측정

[0583] [495] 본 발명의 예시적인 완전한 길이의 폴리펩티드의 상대적인 CD4+ T-세포 면역원성을 수지 세포(DC) T-세포 증식 검정을 사용하여 측정한다. 당해 DC T-세포 검정은 외인성으로 투여된 폴리펩티드 또는 단백질에 대한 CD4+ T-세포 반응을 측정한다. DC T-세포 검정은 Prolmmune의 DC-T 검정 장치를 사용하여 수행함으로써 모 어떠한 이형 T-세포 항원결정기의 첨가도 결여한 폴리펩티드, 단백질, 또는 세포-표적화된 분자와 비교한 것으로서, 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 및 세포-표적화된 분자 사이의 CD4+ T-세포 구동된 면역원성의 상대적인 수준을 측정한다. 당해 실시예의 DC T-세포 검정은 투여된 폴리펩티드, 단백질, 또는 세포-표적화된 분자로부터 유도된 펩티드의 항원 제시에 대한 사람 수지 세포를 시험하는 것을 포함한다.

[0584] [496] 요약하면, 건강한 사람 공여체 조직을 사용하여 고-해상 MHC 클래스 II 조직-유형화(tissue-typing)를 기준으로 유형별 샘플을 분리한다. 20, 40 또는 50명의 공여체 집단을 사용한다. 우선 사람 공여체 PBMC로부터 수득된 단핵세포를 규정된 배지 속에서 배양하여 미성숙 수지 세포를 생성한다. 이후에, 미성숙 수지 세포를 잘-정의된 대조군 항체로 자극하여 정의된 배지 속에서 추가의 배양으로 보다 성숙한 표현형으로 유도하였다. 다음에, 동일한 사람 공여체 샘플로부터의 CD8+ T-세포 고갈된 공여체 PBMC를 CFSE로 표지한다. CFSE-표지된, CD8+ T-세포 고갈된 PBMC를 이후 항원-프라이밍된, 수지 세포와 함께 7일 동안 배양하여 CD4+ 수지 세포를 자극한 후, 각각의 샘플에 대해 8개의 반복물을 시험한다. 음성 대조군으로서, 각각의 수지 세포 배양물 계열은 또한 처리되지 않은 수지 세포의 세트를 포함한다. 양성 대조군의 경우, 당해 검정은 완전한 길이의 단백질을 포함하는, 2개의 잘-정의된 참조 항원을 혼입한다.

[0585] [497] 수지 세포계 면역원성을 평가하기 위하여, 공여체 세포 반응의 빈도를 연구 집단에 따라 분석한다. 검정에서 양성 반응은 생체내 CD4+ T-세포 반응의 지표로 고려한다. 배경을 초과한 자극의 퍼센트로 측정된, 양성 반응을 2개 이상의 독립된 공여체 샘플에서 0.5 퍼센트 %보다 큰 퍼센트로 정의한다. 양성 공여체 세포 반응의 강도는 각각의 샘플에 대해 허용된 공여체를 따라 수득된 배경 초과의 평균 자극을 고려하여 측정한다. 반응 지수는 반응의 강도의 값을 반응하는 공여체의 빈도로 곱하여 각각의 샘플에 대한 CD4+ T-세포 면역원성의 수준을 측정함으로써 계산한다. 또한, 상대적인 CD4+ T-세포 면역원성을 나타내는 반응 지수는 예측된 CD4+ T-세포 항원결정기 영역내에 임베딩된 CD8+ T 세포 항원결정기를 포함하는 1개의 샘플 및 동일한 예측된 CD4+ T-세포 영역에 대한 어떠한 파괴도 결여한 제2의 변이체 샘플인, 2개의 샘플로부터의 결과를 비교하여 측정함으로써 파괴가 사람 공여체 세포의 CD4+ T-세포 반응을 감소시키는지를 측정한다.

[0586] 생체내에서 상대적인 면역원성을 통한 탈-면역화의 시험

[0587] [498] 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 상대적인 면역원성 수준을 사람 면역 시스템의 포유동물 모델을 사용하여 탈-면역화에 대해 시험한다. 마우스에게 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 야생-형 또는 탈면역화 형태를 포함하는 세포독성 단백질 또는 폴리펩티드를 주당 3회로 2주 이상 동안 정맥내 투여한다. 이후에, 혈액 샘플을 주사된 마우스로부터 취하고 효소-연결된 면역흡착성 검정(ELISA)을 세포독성 단백질 및/또는 시가 독소 작동체 폴리펩티드에 대한 반응성에 대해 시험한다. 감소된 면역원성 반응은 시가 독소 작동체 폴리펩티드, 또는 이를 포함하는 조성물의 야생형만을 주사한 마우스와 비교하여, 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드, 또는 이를 포함하는 조성물을 주사한 마우스내에서 유발될 것이다. 비교적 감소된 면역원성 반응은, 탈-면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 포유동물에 투여된 후 감소된 면역원성 잠재능을 가지고 포유동물의 면역 시스템이 반응하는 시간을 허용하는 것과 관련하여 탈-면역화됨을 나타낼 것이다.

[0588] [499] 또한, 본 발명의 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드(예를 들면, 서열 번호: 46-48)를 당해 실시예의 방법을 사용하여 탈-면역화에 대해 시험함으로써 임베딩되거나 인서팅된 T-세포 항원결정기를 포함하는 각각의 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드내에서 하나 이상의 B-세포 항원결정기 영역의 파괴를 입증한다.

[0589] **실시예 4. 본 발명의 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드에 의한 표적 세포의 표면에서 임베딩된 T-세포 항원결정기의 제시**

[0590] [500] 본 실시예에서, 본 발명의 예시적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 각각 포함하는 본 발명의 예시적인 세포-표적화된 단백질의 표적 세포 표면에 대한 제시를 위해 T-세포 항원결정기를 표적 세포의 MHC 클래스 I 경로로 전달하는 능력을 시험하였다. 또한, 본 발명의 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드(예를 들면, 서열 번호: 46-48)를 포함하는 세포-표적화된 단백질을 당해 실시예의 방법으로 시험하여 임베딩된 T-세포 항원결정기를 MHC 클래스 I 제시 시스템으로 전달하는 이들의 능력을 입증하였다.

[0591] [501] 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여, 본 발명의 다양한 예시적인 세포-표적화된 단백질을 제조하였으며, 이들 각각은 본 발명의 세포-형-표적화 영역 및 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다(참고: 예를 들면, WO2014164680 및 WO2014164693). 본 발명의 세포-표적화된 단백질은 본 발명의 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 특이적인 세포형(들)의 표면에 물리적으로-커플링된 세포외 표적 생물분자에 대한 고-친화성을 나타낼 수 있는 세포-표적화 결합 영역 둘 다를 포함한다. 본 발명의 세포-표적화된 단백질은 이들의 세포-표적화 결합 영역을 발현하여 이들 표적 세포로 내재화하는 세포를 선택적으로 표적화할 수 있다.

[0592] [502] 유동 세포분석법을 사용하여 표적 세포의 표면에서 MHC 클래스 I 분자와 복합된 T-세포 항원결정기(시가 독소 작동체 영역에서 임베딩되거나 인서팅됨)의 전달 및 세포외 제시를 입증하였다. 당해 유동 세포분석법은 가용성의 사람 T-세포 수용체(TCR) 다량체 시약(가용성 T-세포 항원 수용체 STAR™ 다량체, Altor Bioscience Corp., 미국 플로리다주 미라마 소재)을 이용하며, 당해 시약 각각은 상이한 항원결정기-사람 HLA 복합체에 대해 고-친화성 결합을 갖는다.

[0593] [503] 각각의 STAR™ TCR 다량체 시약은 특이적인 T-세포 수용체로부터 유도되며 특수한 MHC 클래스 I 분자과 관련하여 제시된 특이적인 펩티드를 인식하기 위해 선택된 TCR의 능력을 기준으로 특이적인 펩티드-MHC 복합체의 검출을 허용한다. 이들 TCR 다량체는 바이오티닐화되고 스트렙타비딘으로 다량체화된 재조합체 사람 TCR로 구성된다. TCR 다량체는 피코에리트린(PE)으로 표지된다. 이들 TCR 다량체 시약은, 각각의 가용성 TCR 다량체 형이 다양한 조건 하에서 특이적인 펩티드-MHC 복합체를 인식하여 이에 안정하게 결합하므로 사람 세포의 표면에 제시된 특이적인 펩티드-MHC 클래스 I 복합체의 검출을 허용한다(참고: Zhu X et al., *J Immunol* 176: 3223-32 (2006)). 이들 TCR 다량체 시약은 세포의 표면에 나타난 펩티드-MHC 클래스 I 복합체의 유동 세포분석법에 의한 확인 및 정량화를 허용한다.

[0594] [504] TCR CMV-pp65-PE STAR™ 다량체 시약(Altor Bioscience Corp., 미국 플로리다주 미라마 소재)을 당해 실시예에서 사용하였다. HLA-A2를 발현하는 사람 세포에 의한 CMV C2 펩티드(NLVPMVATV(SEQ ID NO:10))의 MHC 클래스 I 제시를 사람 HLA-A2에 복합체화된 CMV-pp65 항원결정기-펩티드(잔기 495-503, NLVPMVATV(SEQ ID NO:10))의 고 친화성 인식을 나타내고 PE로 표지되는 TCR CMV-pp65-PE STAR™ 다량체 시약으로 검출할 수 있다.

[0595] [505] 당해 실시예에서 사용된 표적 세포는 ATCC(미국 버지니아주 마나사스 소재)로부터 이용가능한 불멸성 사람 암 세포였다. 당해 분야에 공지된 표준 유동 세포분석법을 사용하여, 표적 세포를 확인하여 당해 실시예에 사용된 단백질의 HLA-A2 MHC-클래스 I 분자 및 세포외 표적 생물분자 둘 다에서 이들의 세포 표면에 발현시켰다.

[0596] [506] 표적 세포를, 각각 예측된 B-세포 항원결정기 영역내로 임베딩된 T-세포 항원결정기를 포함하는 상이한 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는, 본 발명의 예시적인 세포-표적화된 단백질로 처리하였다. 당해 실시예에서 시험한 본 발명의 각각의 예시적인 세포-표적화된 단백질 중 하나는 다음의 시가 독소 작동체 폴리펩티드: 43-51-C2(서열 번호: 13), 53-61-C2(서열 번호: 17), 및 104-112-C2(서열 번호: 18) 중 하나를 포함하였다. 표적 세포의 세트를 본 발명의 상이한 예시적인 세포-표적화된 단백질의 외인성 투여에 의해 시가 독소에 대해 세포-형 특이적인 민감성을 고려하여 다른 이가 사용한 것과 유사한 농도에서 처리하였다(참고: 예를 들면, Noakes K et al., *FEBS Lett* 453 : 95-9 (1999)). 이후에 처리된 세포를 37℃ 및 5% 이산화탄소를 사용한 대기를 포함하는, 표준 조건에서 6시간 동안 항온처리하여, 시가 독소 작동체 영역에 의해 매개된 독성을 허용하였다. 이후에, 세포를 세포 배양 배지로 세척하고, 신선한 세포 배양 배지에 재-현탁시키고, TCR CMV-pp65-PE STAR™ 다량체 시약으로 염색하기 전 20시간 동안 항온처리하였다.

[0597] *[507] 대조군으로서, 표적 세포의 세트를 3개의 조건으로 처리하였다: 1) 어떠한 외인성 분자의 첨가가 없는 어떠한 처리의 부재("비처리"), 2) 외인성으로 투여된 CMV C2 펩티드(CMV-pp65, aa495-503: 서열 NLVPMVATV(SEQ ID NO:10), 미국 텍사스주 소재의 BioSynthesis, Lewisville에 의해 합성됨), 및 3) 펩티드 로

딩 향상제("PLE," 플로리다 미라마 소재의 Altor Biosicence Corp.)와 합해진 외인성으로 투여된 CMV C2 펩티드(NLVPMVATV(SEQ ID NO:10), 상기와 같음). PLE 처리와 합해진 C2 펩티드는 외인성 펩티드 로딩을 허용하여 양성 대조군으로서 제공된다. 적절한 MHC 클래스 I 반수체를 나타내는 세포는 세포외 공간(즉, 적용된 펩티드의 세포 내재화의 부재하에서)으로부터 또는, B2-미세글로불린 및 다른 성분의 혼합물인, PLE의 존재하에서 적절한 외인성으로 적용된 펩티드를 로딩시킬 수 있다.

[0598] [508] 처리 후, 세포의 모든 세트를 세척하고 TCR CMV-pp65-PE STAR 다량체 시약과 함께 1시간 동안 빙상에서 항온처리한다. 이들 세포를 세척하고 샘플의 형광성을 Accuri™ C6 유동 세포분석기(BD Biosciences, 미국 캘리포니아주 샌 조세 소재)로 측정하여 집단내 세포에 결합된 어떠한 TCR CMV-pp65-PE STAR™ 다량체의 존재를 검출하였다(때때로 본원에서 "염색"으로 언급함).

[0599] [509] 상이하게 처리된 세포의 세트의 유동 세포분석법 분석의 결과는 도 5 및 표 14에 나타낸다. 처리되지 않은 대조군을 사용하여 "양성" 게이트(배경 시그날을 나타냄)에서 처리되지 않은 대조군으로부터 1% 미만의 세포를 생성하는 게이트를 사용함으로써 양성 및 음성 세포 집단을 확인하였다. 이후에, 동일한 게이트를 다른 샘플에 적용하여 각각의 샘플에 대한 양성 집단을 특성화하였다. 도 5에서, 유동 세포분석법 막대그래프를 Y-축에서 계수(세포의 수) 및 X-축(log 규모)에서 상대적인 형광성 단위(RFU)로 제공한다. 모든 막대그래프에서 회색 선은 처리되지 않은 세포의 프로필을 나타내며 흑색 선은 나타낸 처리에 따른 처리된 세포의 프로필을 나타낸다. 표 14에서, C2-항원결정기-펩티드-HLA-A2 복합체에 대해 양성으로 염색된 처리 세트에서 세포의 퍼센트를 제공한다. C2-항원결정기-펩티드-HLA-A2 복합체에 대해 양성으로 염색된 당해 검정에서 양성 세포가 제공된다. 당해 검정에서 양성 세포는 TCR-CMV-pp65-PE STAR 시약에 의해 결합되어 상기 기술된 양성 게이트에서 계수된 세포였다. 표 14는 각각의 세트에 대해 RFU로 나타낸 상응하는 지수화된, 평균, 형광성 강도(양성 퍼센트를 곱한 양성 집단의 형광성, "iMFI,")를 나타낸다.

표 14

[0600]

	TCR CMV-pp65-PE 유동 세포분석법	
표적 세포 처리: 외인성으로 투여된 분자(들)	양성 세포의 퍼센트	iMIFI(RFU)
처리되지 않음	0.96%	20
시가 독소 작동체 영역 43-51-C2를 지닌 세포-표적화된 단백질	7.6%	113
시가 독소 작동체 영역 53-61-C2를 지닌 세포-표적화된 단백질	4.5%	64
시가 독소 작동체 영역 104-112-C2를 지닌 세포-표적화된 단백질	6.7%	89
C2 펩티드만	0.95%	19
C2 펩티드 및 PLE	36.7%	728

[0601] 표 14: 본 발명의 예시적인 세포-표적화된 단백질에 대한 유동 세포분석 결과: 중독된, 표적 세포의 표면에서 검출된 펩티드-항원결정기 C2-MHC 클래스 I 복합체

[0602] [510] 43-51-C2, 53-61- C2, 및 104-112-C2를 포함하는 외인성 단백질이 투여된 세포는 이들 집단 각각에서 세포의 7.6%, 4.5%, 및 6.7%에서 세포-표면, C2-펩티드-HLA-A2에 대한 양성 시그날을 나타내었다. 대조적으로, "처리되지 않은" 및 "C2 펩티드만"으로 처리된 세포 집단은 1% 미만의 양성 세포(각각 0.96 및 0.95 퍼센트)를 함유하였다. 측정되지 않았던, 프로세싱 효율 및 동력학으로 인하여, "세포-표적화된 단백질" 처리 샘플에서 단일 시점에서 검출된 제시된 C2-펩티드-HLA-A2 복합체의 퍼센트는 본 발명의 이들 예시적인 세포-표적화된 단백질에 의한 최대 제시를 가능한한 정확하게 반영하지 않을 수 있다.

[0603] [511] 양성 대조군 "C2 펩티드 및 PLE" 집단을 36.7%의 양성 세포를 함유하였지만; 펩티드는 세포외 공간("세포외적으로")으로부터 및 처리되지 않은 대조군과 같은 유사한 배경 염색 수준(0.95%)을 갖는 "C2 펩티드만"의 결과와 비교하여 나타낸 바와 같이 PLE의 존재하에서 표면에만 로딩할 수 있다.

[0604] [512] 중독된 표적 세포의 세포 표면에서 사람 MHC 클래스 I 분자 (C2 항원결정기-펩티드/HLA-A2)와 복합된 외인성으로 투여된, 임베딩된 T-세포 항원결정기 C2의 검출은, 예시적인 시가 독소 작동체 영역 43-51-C2, 53-61-C2, 또는 104-112-C2를 포함하는 세포-표적화된 단백질이 표적 세포로 도입되어, 충분한 소세포-경로화를 수행

하고, 표적 세포 상에서 표면 제시를 위해 충분히 임베딩된 T-세포 항원결정기를 MHC 클래스 I 경로로 전달할 수 있음을 입증한다.

[0605] **실시예 5. 중독된 표적 세포의 세포독성 T-세포 매개된 세포용해 및 본 발명의 단백질에 의해 전달된 T-세포 항원결정기의 MHC 클래스 I 제시에 의해 개시된 다른 면역 반응의 시험**

[0606] [513] 당해 실시예에서, 당해 분야에 공지된 표준 검정을 사용하여 본 발명의 예시적인 세포-표적화된 단백질에 의해 전달된 T-세포 항원결정기의 표적 세포의 MHC 클래스 I 제시의 작용 결과를 시험한다. 시험할 작용 결과는 CTL 활성화, CTL 매개된 표적 세포 사멸, 및 CTL에 의한 사이토킨 방출을 포함한다.

[0607] [514] CTL-계 세포독성 검정을 사용하여 항원결정기 제시의 결과를 평가한다. 당해 검정은 조직-배양된 표적 세포 및 T-세포를 포함한다. 표적 세포를 실시예 4에 기술된 바와 같이 중독시킨다. 요약하면, 표적 세포를 6시간 동안 상이한 외인성으로 투여된 단백질과 함께 표준 조건하에서 항온처리하며, 여기서 특정의 단백질은 본 발명의 시가 독소 작동체 폴리펩티드 또는 본 발명의 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다. 다음에, CTL을 중독된 표적 세포에 가하고 항온처리하여 T-세포가 항원결정기-펩티드/MHC 클래스 I 복합체를 나타내는 어떠한 표적-세포도 인식하여 결합하도록 한다. 이후에, 특정의 작용 결과를 표적 세포에 대한 CTL 결합, CTL-매개된 세포용해에 의한 표적 세포 사멸, 및 ELISA 또는 ELIspot에 의한 인터페론 감마 또는 인터루킨과 같은 사이토킨의 방출을 포함하는, 숙련가에게 공지된 표준 방법을 사용하여 시험한다.

[0608] [515] 항원결정기-펩티드/MHC 클래스 I 복합체를 나타내는 표적 세포에 의한 CTL의 활성화는 시판되는 CTL 반응 검정, 예를 들면, CytoTox96® 비-방사활성 검정(Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재), Granzyme B ELISpot 검정(Mabtech, Inc., 미국 오하이오주 신시내티 소재), 카스파제 활성 검정, 및 LAMP-1 전좌 유동 세포분석 검정을 사용하여 정량화한다. 표적 세포의 CTL-매개된 사멸을 특이적으로 모니터링하기 위하여, 카복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE)를 사용하여 문헌에 기술된 바와 같이 시험관내 및 생체내 시험을 위해 세포를 표적화한다(참고: 예를 들면, Durward M et al, *J Vis Exp* 45 pii 2250 (2010)).

[0609] **실시예 6. T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 CD20에 특이적인 결합 영역(SLT-1A에 융합된 αCD20)을 포함하는 세포독성 단백질**

[0610] [516] 본 실시예에서, T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 영역은 위에서 기술한 바와 같이 시가-유사 독소 1의 A 소단위(SLT-1A)로부터 유도된다. 면역글로불린-형 결합 영역 αCD20-항원은 사람 CD20을 인식하는 면역글로불린-형 도메인으로부터 유도되며(참고: 예를 들면, Haisma et al, *Blood* 92: 184-90 (1999); Geng S et al, *Cell Mol Immunol* 3: 439-43 (2006); Olafesn T et al, *Protein Eng Des Sel* 23 : 243-9 (2010)), 이는 CD20의 세포외 부분에 결합할 수 있는 면역글로불린-형 결합 영역을 포함한다. CD20은 예를 들면, B-세포 림프종 세포, 모발 세포 백혈병 세포, B-세포 만성 림프성 백혈병 세포, 및 흑색종 세포와 같은 다수의 암세포 형에서 발현된다. 또한, CD20은 과활성 B-세포를 포함하는 특정의 자가면역병, 질환 및 상태를 치료하기 위한 치료제용의 매력적인 표적이다.

[0611] 세포독성 단백질 SLT-1A::αCD20의 작제, 생산, 및 정제

[0612] [517] 면역글로불린-형 결합 영역 αCD20 및 시가 독소 작동체 영역(예를 들면, 서열 번호: 11-43)을 함께 연결한다. 예를 들면, 융합 단백질은 αCD20-항원-결합 단백질 SLT-1A::αCD20(참고:, 예를 들면, 서열 번호: 49, 50, 및 51)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 생산한다. SLT-1A::αCD20 세포독성 단백질의 발현은 앞서의 실시예에 기술된 바와 같이 세균 및/또는 세포-유리된, 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성한다.

[0613] 세포독성 단백질 SLT-1A::αCD20의 시험관내 특성의 측정

[0614] [518] CD20+ 세포 및 CD20-세포에 대한 당해 실시예의 결합 특징, 최대 특이적인 결합(Bmax) 및 평형 결합 상수(KD)를 형광성-계 유동-세포분석법으로 측정한다. CD20+ 세포에 대한 SLT-1A::αCD20의 B_{max}는 0.01-100 nM의 범위내 KD를 사용하여 대략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정된 반면, 당해 검정에서 CD20- 세포에 대한 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0615] [519] SLT-1A::αCD20 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력을 앞서의 실시예에서 위에 기술된 바와 같은, 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정한다. 세포-유리된 단백질 합성에서 당해 실시예의 세포독성 단백질의 억제 활성은 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성에 있어 SLT-1A::αCD20의 IC_{50}은 대략 0.1-100 pM이다.

[0616] CD20+ 세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αCD20의 세포독성의 측정

[0617] [520] SLT-1A::αCD20의 세포독성 특징을 CD20+ 세포를 사용하여 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같은 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 또한, SLT-1A::αCD20의 선택적인 세포독성 특성은 CD20+ 세포와 비교하여 CD20-세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 CD20+ 세포의 경우 대략 0.01-100 nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포 표면에서 CD20을 발현하는 세포와 비교하여 세포 표면에서 CD20을 발현하지 않는 세포의 경우 대략 10-10,000배 더 크다(세포독성 거의 없음). 또한, SLT-1A::αCD20의 세포독성을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시에 대해 시험한다.

[0618] 동물 모델을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αCD20의 생체내 효과의 측정

[0619] [521] 동물 모델을 사용하여 신생물 세포에서 세포독성 단백질 SLT-1A::αCD20의 생체내 효과를 측정한다. 다양한 마우스 균주를 사용하여 이들의 세포 표면 상에 CD20을 발현하는 사람 신생물 세포의 이들 마우스내로의 주입으로부터 생성되는 마우스내 이형이식체 종양에 있어서 정맥내 투여 후 세포독성 단백질의 효과를 시험한다. 세포 사멸을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0620] **실시예 7. T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 HER2에 대해 특이적인 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질("SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH")**

[0621] [522] 본 실시예에서, CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 영역은 위에서 기술된 바와 같이 시가-유사 독소 1의 A 소단위(SLT-1A)로부터 유도된다. 면역글로불린-형 결합 영역은 미국 특허 공보 제2011/0059090호에 기술된 바와 같은, 카멜리드 항체(V_HH) 단백질 5F7의 단일-도메인 가변 영역으로부터 유도된다.

[0622] "SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH"의 작제, 생산, 및 정제

[0623] [523] 면역글로불린-형 결합 영역 및 시가 독소 작동체 영역을 함께 연결하여 융합 단백질을 형성하였다(참고:, 예를 들면, 서열 번호: 52, 53, 및 54). 당해 실시예에서, 단백질 5F7로부터 유도된 αHER2-V_HH 가변 영역 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 당해 분야에 공지된 링커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 인 프레임(in frame)으로 및 서열 번호: 11-43의 아미노산을 포함하는 시가 독소 작동체 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 인 프레임으로 클로닝될 수 있다. "SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH" 세포독성 단백질의 변이체는 생성하여 결합 영역을 시가 독소 작동체 영역의 아미노 말단에 근접하게 임의로 위치되며 KDEL 계열의 카복시-말단 소포체 시그날 모티프를 임의로 포함한다. "SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH" 세포독성 단백질 변이체의 발현은 앞서의 실시예에 기술된 바와 같이 세균 및/또는 세포-유리된, 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성된다.

[0624] 세포독성 단백질 "SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH"의 시험관내 특징의 측정

[0625] [524] HER2+ 세포 및 HER2-세포에 대한 본 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특징은 형광성-계, 유동-세포분석법으로 측정한다. HER2+ 세포에 대한 "SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH"의 B_{max}는 0.01-100 nM의 KD로 대략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정되나, 당해 검정에서 HER2-세포에 대한 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0626] [525] "SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH" 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력은 앞서의 실시예에서 위에서 기술된 바와 같이 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정된다. 세포-유리된 단백질 합성에 있어서 당해 실시예의 세포독성 단백질의 억제 효과는 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성에 있어서 "SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH"의 IC_{50}은 대략 0.1-100pM이다.

[0627] HER2+ 세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 "SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH"의 세포독성의 측정

[0628] [526] "SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH" 변이체의 세포독성 특성은 HER2+ 세포를 사용하여 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같은 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 또한, "SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH"의 선택적인 세포독성 특성은 HER2+ 세포와 비교하여 HER2- 세포를 사용한 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당

해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 HER2+ 세포의 경우 대략 0.01-100nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포 표면에서 HER2를 발현하는 세포와 비교하여 세포 표면에서 HER2를 발현하지 않는 세포의 경우 대략 10-10,000배 더 크다(세포독성 거의 없음). 또한, SLT-1A와 융합된 αHER2-V_HH의 세포독성을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0629] 동물 모델을 사용하여 SLT-1A와 융합된 세포독성 단백질 αHER2-V_HH의 생체내 효과의 측정

[0630] [527] 동물 모델을 사용하여 신생물 세포에서 세포독성 단백질 LT-1A와 융합된 αHER2-V_HH의 생체내 효과를 측정한다. 다양한 마우스 균주를 사용하여 이들의 세포 표면에 HER2를 발현하는 사람 신생물 세포의 마우스내로의 주사로부터 초래되는 마우스내 이형이식체 종양에 정맥내 투여한 후 세포독성 단백질의 효과를 시험한다. 세포 사멸을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0631] **실시예 8. T-세포 초-면역화되고 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 항체 α엡슈타인-바르-항원(Epstein-Barr-Antigen)으로부터 유도된 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질**

[0632] [528] 본 실시예에서, CD8+ T-세포 초-면역화되고 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 영역은 위에서 기술된 바와 같이 시가-유사 독소 1의 A 소단위(SLT-IA)로부터 유도된 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-형 결합 영역 α엡슈타인-바르-항원은 엡슈타인 바르 항원에 대한 모노클로날 항체로부터 유도되며(참고: Fang C et al, *J Immunol Methods* 287: 21-30 (2004)), 이는 엡슈타인-바르 바이러스에 의해 감염된 사람 세포에 결합할 수 있는 면역글로불린-형 결합 영역 또는 엡슈타인-바르 항원을 발현하는 형질전환된 세포를 포함한다. 엡슈타인-바르 항원은 엡슈타인-바르 바이러스로 감염된 세포 및 암 세포(예를 들면, 림프종 및 코인두 암 세포)와 같은, 다수의 세포형에서 발현된다. 또한, 엡슈타인-바르 감염은 다른 질병, 예를 들면, 다발경화증과 관련된다.

[0633] 세포독성 단백질 SLT-IA::α엡슈타인바르::KDEL의 작제, 생산, 및 정제

[0634] [529] 면역글로불린-형 결합 영역 α엡슈타인-바르-항원 및 시가 독소 작동체 영역을 함께 연결하고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:61)을 가하여 단백질을 형성한다. 예를 들면, 융합 단백질은 α엡슈타인-바르-항원-결합 단백질 SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 생산된다. SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 앞서의 실시예에서 기술된 바와 같이 세균 및/또는 세포-유리된 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성된다.

[0635] <u>세포독성 단백질 SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL의 시험관내 특성의 측정</u>

[0636] [530] 엡슈타인-바르 항원 양성 세포 및 엡슈타인-바르 항원 음성 세포에 대한 당해 실시예의 세포독성 단백질의 세포독성 단백질의 결합 특성은 형광성-계, 유동-세포분석법으로 측정한다. 엡슈타인-바르 항원 양성 세포에 대한 SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL의 B_{max}는 0.01-100nM의 범위내의 K_D를 갖는 대략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정된 반면, 당해 검정에서 엡슈타인-바르 항원에 대해 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0637] [531] SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력을 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같이 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정한다. 세포-유리된 합성에서 당해 실시예의 세포독성 단백질의 억제 효과는 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성에 대한 SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL의 IC_{50}은 대략 0.1 내지 100pM이다.

[0638] *세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL의 세포독성의 측정

[0639] [532] SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL의 세포독성 특성을 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같이 일반적인 세포-사멸 검정에 의해 엡슈타인-바르 항원 양성 세포를 사용하여 측정한다. 또한, SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL의 선택적인 세포독성 특성은 엡슈타인-바르 항원 양성 세포와 비교한 것으로서 엡슈타인-바르 항원 음성 세포를 사용한 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 엡슈타인-바르 항원 양성 세포의 경우 대략 0.01 내지 100nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포 표면에 엡슈타인-바르 항원을 발현하는 세포와 비교한 것으로서 세포 표면에 엡슈타인-바르 항원을 발현하지 않는 세포에 대해 대략 10 내지 10,000배 더 크다(세포독성은 거의 없음). 또한, SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL의

세포독성을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0640] 동물 모델을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL의 생체내 효과의 측정

[0641] [533] 동물 모델을 사용하여 신생물 세포에서 세포독성 단백질 SLT-1A::α엡슈타인-바르::KDEL의 생체내 효과를 측정한다. 다양한 마우스 균주를 사용하여 이들의 세포 표면에서 엡슈타인-바르 항원을 발현하는 사람 신생물 세포의 마우스내로의 주사로부터 생성되는 마우스내 이형이식체 종양에 정맥내 투여 후 세포독성 단백질의 효과를 시험한다. 세포 사멸을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0642] **실시예 9. T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 α레이슈마니아(Leishmania)-항원으로부터 유도된 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질**

[0643] [534] 본 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 위에서 기술한 바와 같은 시가-유사 독소 1의 A 소단위(SLT-1A)로부터 유도된 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-형 결합 영역 α레이슈마니아-항원을 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 생성된 항체로부터 세포내 파동편모충류 원생동물을 지닌 사람 세포 상에 존재하는 세포-표면 레이슈마니아 항원으로 유도시킨다(참고: Silveira T et al, *Int J Parasitol* 31 : 1451-8 (2001); Kenner J et al., *J Cutan Pathol* 26: 130-6 (1999); Berman J and Dwyer, *Clin Exp Immunol* 44: 342-348 (1981)).

[0644] 세포독성 단백질 SLT-1A::α레이슈마니아::KDEL의 작제, 생산, 및 정제

[0645] [535] 면역글로불린-형 결합 영역 α-레이슈마니아-항원 및 시가 독소 작동체 영역을 함께 연결하고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:61)을 가하여 단백질을 형성한다. 예를 들면, 융합 단백질은 레이슈마니아-항원-결합 단백질 SLT-1A::α레이슈마니아::KDEL을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 생산한다. SLT-1A::α레이슈마니아::KDEL 세포독성 단백질은 앞서의 실시예에서 기술된 바와 같이, 세균 및/또는 세포-유리된, 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성한다.

[0646] 세포독성 단백질 SLT-1A::α레이슈마니아::KDEL의 시험관내 특성의 측정

[0647] [536] 레이슈마니아 항원 양성 세포 및 레이슈마니아 항원 음성 세포에 대한 당해 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광성계, 유동-세포분석법으로 측정한다. 레이슈마니아 항원 양성 세포에 대한 SLT-1A::α레이슈마니아::KDEL의 B_{max}는 0.01 내지 100nM의 범위내 K_D로 대략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정되나, 당해 검정에서 레이슈마니아 항원 음성 세포에 대한 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0648] [537] SLT-1A::α레이슈마니아::KDEL 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화를 앞서의 실시예에서 상기 기술한 바와 같이 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정한다. 세포-유리된 단백질 합성에 있어서 당해 실시예의 세포독성 단백질의 억제 효과는 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성시 SLT-1A: :α레이슈마니아::KDEL의 IC_{50}은 대략 0. 1 내지 100 pM이다.

[0649] 세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::α레이슈마니아::KDEL의 세포독성의 측정

[0650] [538] SLT-1A::α레이슈마니아::KDEL의 세포독성 특성을 레이슈마니아 항원 양성 세포를 사용하여 앞서의 실시예에서 위에 기술된 바와 같은 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 또한, SLT-1A::α레이슈마니아::KDEL의 선택적인 세포독성 특징을 레이슈마니아 항원 양성 세포와 비교한 것으로서 레이슈마니아 항원 음성 세포를 사용한 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 레이슈마니아 항원 양성 세포에 대해 대략 0.01 내지 100nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포 표면에 레이슈마니아 항원을 발현하는 세포와 비교한 것으로서 세포 표면에 레이슈마니아 항원을 발현하지 않는 세포에 대해 대략 10 내지 10,000배 더 크다(세포독성은 거의 없음). 또한, SLT-1A::α레이슈마니아::KDEL의 세포독성을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0651] **실시예 10. T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 면역글로불린-형 결합 영역 α뉴로텐신-수용체로부터 유도된 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질**

[0652] [539] 본 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 CD8+ T-세포 초-면역화 및 위에서 기술한 바와 같이 시가-유사

독소 1(SLT-1A)로부터 유도된 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-형 결합 영역 α뉴로텐신-수용체는 사람 뉴로텐신 수용체에 결합하는 DARPin™(진뱅크 수탁번호(GenBank Accession): 2P2C_R) 또는 모노클로날 항체(참고: Ovigne J et al, *Neuropeptides* 32: 247-56 (1998))로부터 유도된다. 뉴로텐신 수용체는 유방 암, 결장 암, 폐 암, 흑색종, 및 췌장 암 세포와 같은 다양한 암 세포에 의해 발현된다.

[0653] 세포독성 단백질 SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL의 작제, 생산, 및 정제

[0654] [540] 면역글로불린-형 결합 영역 α뉴로텐신R 및 시가 독소 작동체 영역을 함께 연결하고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:61)을 가하여 단백질을 형성시킨다. 예를 들면, 융합 단백질을, 뉴로텐신-수용체-결합 단백질 SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL을 발현시켜 생산한다. SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 앞서의 실시예에서 기술된 바와 같은 세균 및/또는 세포-유리된, 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성한다.

[0655] *

[0656] 세포독성 단백질 SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL의 시험관내 특성의 측정

[0657] [541] 뉴로텐신 수용체 양성 세포 및 뉴로텐신 수용체 음성 세포에 대한 당해 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광성-계, 유동-세포분석법으로 측정한다. 뉴로텐신 수용체 양성 세포에 대한 SLT-1A::α뉴로텐신::KDEL의 B_{max}는 0.01-100nM의 범위내의 K_D를 갖는 대략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정된 반면, 당해 검정에서 뉴로텐신 수용체 음성 세포에 대해 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0658] [542] SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력을 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같이 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정한다. 세포-유리된 단백질 합성에서 당해 실시예의 세포독성 단백질의 억제 효과는 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성에 대한 SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL의 IC_{50}은 대략 0.1 내지 100pM이다.

[0659] 세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL의 세포독성의 측정

[0660] [543] SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL의 세포독성 특성을 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같이 일반적인 세포-사멸 검정에 의해 뉴로텐신 수용체 항원 양성 세포를 사용하여 측정한다. 또한, SLT-1A::α뉴로텐신R-바르::KDEL의 선택적인 세포독성 특성은 뉴로텐신 수용체 항원 양성 세포와 비교한 것으로서 뉴로텐신 수용체 음성 세포를 사용한 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 뉴로텐신 수용체 양성 세포의 경우 대략 0.01 내지 100nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포 표면에 뉴로텐신 수용체를 발현하는 세포와 비교한 것으로서 세포 표면에 뉴로텐신 수용체를 발현하지 않는 세포에 대해 대략 10 내지 10,000배 더 크다(세포독성은 거의 없음). 또한, SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL의 세포독성을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0661] 동물 모델을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL의 생체내 효과의 측정

[0662] [544] 동물 모델을 사용하여 신생물 세포에서 세포독성 단백질 SLT-1A::α뉴로텐신R::KDEL의 생체내 효과를 측정한다. 다양한 마우스 균주를 사용하여 이들의 세포 표면에서 뉴로텐신 수용체를 발현하는 사람 신생물 세포의 마우스내로의 주사로부터 생성되는 마우스내 이형이식체 종양에 정맥내 투여 후 세포독성 단백질의 효과를 시험한다. 세포 사멸을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0663] **실시예 11. T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 αEGFR로부터 유도된 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질**

[0664] [545] 본 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 위에서 기술한 바와 같은 시가-유사 독소 1의 A 소단위(SLT-1A)로부터 유도된 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 결합 영역 αEGFR은 AdNectin™(진뱅크 수탁번호: 3QWQ_B), AffibodyTM(진뱅크 수탁번호: 2KZI_A; 미국 특허 제8,598,113호), 또는 항체로부터 유도되며, 이들 모두는 하나 이상의 사람 상피 성장 인자 수용체에 결합한다. 상피 성장 인자 수용체의 발현은 예를 들면, 폐 암 세포, 유방 암 세포, 및 결장 암 세포와 같은 사람 암 세포와 연관된다.

[0665] 세포독성 단백질 SLT-1A::αEGFR::KDEL의 작제, 생산, 및 정제

[0666] [546] 면역글로불린-형 결합 영역 αEGFR 및 시가 독소 작동체 영역을 함께 연결하고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:61)을 가하여 단백질을 형성한다. 예를 들면, 융합 단백질은 EGFR 결합 단백질 SLT-1A::αEGFR::KDEL을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 생산한다. SLT-1A::αEGFR::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 앞서의 실시예에서 기술된 바와 같이, 세균 및/또는 세포-유리된, 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성한다.

[0667] 세포독성 단백질 SLT-1A::αEGFR::KDEL의 시험관내 특성의 측정

[0668] [547] EGFR+ 세포 및 αEGFR- 세포에 대한 당해 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광성계, 유동-세포분석법으로 측정한다. EGFR+ 세포에 대한 SLT-1A::αEGFR::KDEL의 B_{max}는 0.01 내지 100nM의 범위내 KD로 대략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정되나, 당해 검정에서 EGFR- 세포에 대한 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0669] [548] SLT-1A::αEGFR::KDEL 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력을 앞서의 실시예에서 상기 기술한 바와 같이 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정한다. 세포-유리된 단백질 합성에 있어서 당해 실시예의 세포독성 단백질의 억제 효과는 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성시 SLT-1A::αEGFR::KDEL의 IC_{50}은 대략 0.1 내지 100 pM이다.

[0670] 세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αEGFR::KDEL의 세포독성의 측정

[0671] [549] SLT-1A::αEGFR::KDEL의 세포독성 특성을 EGFR+ 세포를 사용하여 앞서의 실시예에서 위에 기술된 바와 같은 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 또한, SLT-1A::αEGFR::KDEL의 선택적인 세포독성 특성을 레이슈마니아 항원 양성 세포와 비교해서 EGFR- 세포를 사용한 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 EGFR+ 세포에 대해 대략 0.01 내지 100nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 EGFR을 발현하는 세포와 비교해서 세포 표면에 EGFR을 발현하지 않는 세포에 대해 대략 10 내지 10,000배 더 크다(세포독성은 거의 없음). 또한, SLT-1A::αEGFR::KDEL의 세포독성을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0672] 동물 모델을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αEGFR::KDEL의 생체내 효과의 측정

[0673] [550] 동물 모델을 사용하여 신생물 세포에서 세포독성 단백질 SLT-1A::αEGFR::KDEL의 생체내 효과를 측정한다. 다양한 마우스 균주를 사용하여 이들의 세포 표면 상에 EGFR(들)을 발현하는 사람 신생물 세포의 이들 마우스내로의 주입으로부터 생성되는 마우스내 이형이식체 종양에 있어서 정맥내 투여 후 세포독성 단백질의 효과를 시험한다. 세포 사멸을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0674] **실시예 12. T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 항체 αCCR5로부터 유도된 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질**

[0675] [551] 본 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가-유사 독소 1의 A 소단위(SLT-1A)로부터 유도된 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-형 결합 영역 αCCR5는 사람 CCR5(CD195)에 대한 모노클로날 항체로부터 유도된다(참고: Bernstone L et al., *Hybridoma* 31: 7-19(2012)). CCR5는 T-세포, 대식구, 수지 세포, 및 미세아교세포에서 주로 발현된다. 또한, CCR5는 사람 면역결핍성 바이러스(HIV)의 발병 및 확산에 있어서 중요한 역활을 한다.

[0676] 세포독성 단백질 SLT-1A::αCCR5의 작제, 생산, 및 정제

[0677] [552] 면역글로불린-형 결합 영역 αCCR5 및 시가 독소 작동체 영역을 함께 연결하고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:61)을 가하여 단백질을 형성한다. 예를 들면, 융합 단백질은 αCCR5-결합 단백질 SLT-1A::αCCR5::KDEL을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 생산한다. SLT-1A::αCCR5::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 앞서의 실시예에 기술된 바와 같이 세균 및/또는 세포-유리된, 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성한다.

[0678] 세포독성 단백질 SLT-1A::αCCR5의 시험관내 특성의 측정

[0679] [553] CCR5+ 세포 및 CCR5- 세포에 대한 당해 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광성-계 유동-세포분석법으로 측정한다. CCR5+ 세포에 대한 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 B_{max}는 0.01-100nM의 범위내 KD를 사용하여 대

략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정된 반면, 당해 검정에서 CD20-세포에 대한 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0680] [554] SLT-1A::αCCR5::KDEL 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력을 앞서의 실시예에서 위에 기술된 바와 같은, 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정한다. 세포-유리된 단백질 합성에서 당해 실시예의 세포독성 단백질의 억제 활성은 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성에 있어 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 IC_{50}은 대략 0.1-100pM이다.

[0681] 세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 세포독성의 측정

[0682] [555] SLT-1A::αCCR5::KDEL의 세포독성 특성을 CCR5+ 세포를 사용하여 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같은 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 또한, SLT-1A::αCCR5::KDEL의 선택적인 세포독성 특성은 CCR5+ 세포와 비교하여 CCR5- 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 CCR5+ 세포의 경우 대략 0.01-100nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포 표면에서 CCR5를 발현하는 세포와 비교하여 세포 표면에서 CCR5를 발현하지 않는 세포의 경우 대략 10-10,000배 더 크다(세포독성 거의 없음). 또한, SLT-1A::αCCR5::KDEL의 세포독성을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시에 대해 시험한다.

[0683] 동물 모델을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 생체내 효과의 측정

[0684] [556] 동물 모델을 사용하여 공여체 물질로부터 T-세포 고갈에 있어 세포독성 단백질 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 생체내 효과를 측정한다(참고: Tsirigotis P et., *Immunotherapy* 4: 407-24 (2012)). 비-사람 영장류를 사용하여 SLT-1A::αCCR5의 생체내 효과를 측정한다. 이식체 대 숙주병을, 기증된 기관을 SLT-1A::αCCR5::KDEL로 예비처리한 경우 신장 이식 후 레서스 마카퀴(rhesus macaque)에서 분석한다(참고: Weaver T et al., *Nat Med* 15: 746-9(2009)). 시노몰구스 영장류에서 말초 혈액 T 림프세포의 생체내 고갈을 상이한 투여량의 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 상이한 투여량의 비경구 투여후 관찰한다. 세포 사멸을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다. HIV 감염을 차단시키기 위한 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 용도는 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 급성 투여량을 제공함으로써 시미안 면역결핍성 바이러스(SIV)에 노출시 순환하는 T-세포를 고갈시켜 시험한다(참고: Sellier P et al., *PLoS One* 5: e10570(2010)).

[0685] **실시예 13. T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 항-Env 면역글로불린 도메인으로부터 유도된 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질**

[0686] [557] 본 실시예에서, 시가 독소의 A 소단위(StxA)로부터 유도된 시가 독소 작동체 영역은 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-형 결합 영역 αEnv는 GP41, GP120, GP140, 또는 GP160과 같은 HIV 엔벨로프 당단백질(Env)에 결합하는 기존의 항체(참고: 예를 들면, Chen W et al, *J Mol Bio* 382: 779-89 (2008); Chen W et al, *Expert Opin Biol Ther* 13: 657-71 (2013); van den Kerkhof T et al., *Retrovirology* 10: 102 (2013)) 또는 표준 기술을 사용하여 생성된 항체(참고: Prabakaran et al, *Front Microbiol* 3: 277 (2012))로부터 유도된다. Env는 HIV 복제 동안에 HIV-감염된 세포의 세포 표면에 또한 나타나는 HIV 표면 단백질이다. Env는 엔도조말 구획내에서 감염된 세포에서 주로 발현되나, 충분한 양의 Env는 본 발명의 매우 강력한 세포독성, 세포-표적화된 단백질에 의해 표적화될 세포 표면에서 존재할 수 있다. 또한, Env-표적화 세포독성 단백질은 HIV 비리온을 감염시키고 바이러스와 숙주 세포의 융합 동안에 새로이 감염된 세포에 도입된다.

[0687] [558] HIV는 높은 돌연변이율을 나타내므로, HIV의 다수의 균주로부터 Env에 결합하는 광범위하게 중화시키는 항체에 의해 밝혀진 바와 같이, Env의 작용성 제한된 부위에 결합하는 면역글로불린 도메인을 사용하는 것이 바람직하다(참고: van den Kerkhof T et al, *Retrovirology* 10: 102 (2013)). 감염된 세포의 표면에 존재하는 Env는 입체적으로 제한된 항원결정기를 나타내는 것으로 여겨지므로(참고: Chen W et al, *J Virol* 88: 1 125-39 (2014)), 1sdAbs 또는 V_HH 도메인과 같이, 100kD 보다 작고 이상적으로는 25kD보다 작은 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0688] 세포독성 단백질 SLT-1A::αEnv::KDEL의 작제, 생산, 및 정제

[0689] [559] 면역글로불린-형 결합 영역 αEnv 및 시가 독소 작동체 영역을 함께 연결하고, 카복시-말단 KDEL을 가하여 단백질을 형성한다. 예를 들면, 융합 단백질은 αEnv-결합 단백질 SLT-1A::αEnv::KDEL을 암호화하는 폴리뉴

클레오티드를 발현시킴으로써 생산한다. SLT-1A::αEnv::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 앞서의 실시예에 기술된 바와 같이 세균 및/또는 세포-유리된, 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성한다.

[0690] 세포독성 단백질 SLT-1A::αEnv::KDEL의 시험관내 특성의 측정

[0691] [560] Env+ 세포 및 Env- 세포에 대한 당해 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광성-계 유동-세포분석법 검정으로 측정한다. Env+ 양성 세포에 대한 SLT-1A::αEnv::KDEL의 B_{max}는 0.01-100nM의 범위내 KD를 사용하여 대략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정된 반면, 당해 검정에서 Env- 세포에 대한 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0692] [561] SLT-1A::αEnv::KDEL 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력을 앞서의 실시예에서 위에 기술된 바와 같은, 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정한다. 세포-유리된 단백질 합성에서 당해 실시예의 세포독성 단백질의 억제 효과는 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성에 있어 SLT-1A::αEnv::KDEL의 IC_{50}은 대략 0.1-100pM이다.

[0693] 세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αEnv::KDEL의 세포독성의 측정

[0694] [562] SLT-1A::αEnv::KDEL의 세포독성 특징을 Env+ 세포를 사용하여 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같은 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 또한, SLT-1A::αEnv::KDEL의 선택적인 세포독성 특성은 Env+ 세포와 비교하여 Env-세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 Env+ 세포의 경우 대략 0.01-100nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포 표면에서 Env를 발현하는 세포와 비교하여 세포 표면에서 Env를 발현하지 않는 세포의 경우 대략 10-10,000배 더 크다(세포독성 거의 없음). 또한, SLT-1A::αEnv::KDEL의 세포독성을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시에 대해 시험한다.

[0695] 동물 모델을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αEnv::KDEL의 생체내 효과의 측정

[0696] [563] HIV 감염을 억제하는 SLT-1A::αEnv::KDEL의 용도는 시미안 면역결핍성 바이러스(SIV) 감염된 비-사람 영장류에게 SLT-1A::αEnv::KDEL을 투여함으로써 시험한다(참고: Sellier P et al, *PLoS One* 5: e10570 (2010)). 세포 사멸은 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0697] **실시예 14. T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 항체 αUL18로부터 유도된 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질**

[0698] [564] 당해 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가-유사 독소 1의 A 소단위(SLT-1A)로부터 유도된 CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-형 결합 영역 αUL18은 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 세포-표면 사이토메갈로바이러스 단백질 UL18에 대해 생성된 항체로부터 유도되며, 이는 사이토메갈로바이러스로 감염된 사람 세포에 존재한다(참고: Yang Z, Bjorkman P, *Proc Natl Acad Sci* USA 105: 10095-100 (2008)). 사람 사이토메갈로바이러스 감염은 다양한 암 및 염증 질환과 관련되어 있다.

[0699] *세포독성 단백질 SLT-1A::αUL18::KDEL의 작제, 생산, 및 정제

[0700] [565] 면역글로불린-형 결합 영역 αUL18 및 시가 독소 작동체 영역을 함께 연결하고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:61)을 가하여 단백질을 형성한다. 예를 들면, 융합 단백질은 αUL18-결합 단백질 SLT-1A::αUL18::KDEL을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 생산한다. SLT-1A::αUL18::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 앞서의 실시예에 기술된 바와 같이 세균 및/또는 세포-유리된, 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성한다.

[0701] 세포독성 단백질 SLT-1A::αUL18::KDEL의 시험관내 특성의 측정

[0702] [566] UL18 양성 세포 및 UL18 음성 세포에 대한 당해 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광성-계 유동-세포분석법으로 측정한다. 사이토메갈로바이러스 단백질 UL18 양성 세포에 대한 SLT-1A::αUL18::KDEL의 B_{max}는 0.01-100nM의 범위내 KD를 사용하여 대략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정된 반면, 당해 검정에서 UL18 음성 세포에 대한 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0703] [567] SLT-1A::αUL18::KDEL 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력을 앞서의 실시예에서 위에 기술된 바와 같은, 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정한다. 세포-유리된 단백질 합성에서 당해 실시예의 세포독성

단백질의 억제 활성은 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성에 있어 SLT-1A::αUL18::KDEL의 IC_{50}은 대략 0.1-100pM이다.

[0704] 세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αUL18::KDEL의 세포독성의 측정

[0705] [568] SLT-1A::αUL18::KDEL의 세포독성 특성을 UL18 양성 세포를 사용하여 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같은 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 또한, SLT-1A::αUL18::KDEL의 선택적인 세포독성 특성은 UL18 양성 세포와 비교하여 UL18 음성 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 UL18 양성 세포의 경우 대략 0.01-100nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포 표면에서 UL18을 발현하는 세포와 비교하여 세포 표면에서 UL18을 발현하지 않는 세포의 경우 대략 10-10,000배 더 크다(세포독성 거의 없음). 또한, SLT-1A::αUL18::KDEL의 세포독성을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시에 대해 시험한다.

[0706] **실시예 15.**

[0707] T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 및 CD20에 대해 특이적인 결합 영역(디프테리아 독소와 융합된 αCD20)을 포함하는 세포독성 단백질

[0708] [569] 본 실시예에서, CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드는 위에서 기술된 바와 같이 디프테리아 독소 1의 A 소단위로부터 유도된다. 면역글로불린-형 결합 영역 αCD20-항원은 면역글로불린-형 도메인 인식 사람 CD20으로부터 유도되며(참고: 예를 들면, Haisma et al., *Blood* 92: 184-90(1999); Geng S et al., *Cell Mol Immunol* 3: 439-43 (2006); Olafesn T et al., *Protein Eng Des Sel* 23:243-9 (2010)), 이는 CD20의 세포외 부위에 결합할 수 있는 면역글로불린-형 결합 영역을 포함한다. CD20은 예를 들면, B-세포 림프종 세포, 모발 세포 백혈병 세포, B-세포 만성 림프성 백혈병 세포, 및 흑색종 세포와 같은 다수의 암세포 형에서 발현된다. 또한, CD20은 과활성 B-세포를 포함하는 특정의 자가면역병, 질환 및 상태를 치료하기 위한 치료제용의 매력적인 표적이다.

[0709] 세포독성 단백질 디프테리아 독소::αCD20의 작제, 생산, 및 정제

[0710] [570] 면역글로불린-형 결합 영역 αCD20 및 디프테리아 독소 작동체 영역(예를 들면, 서열 번호: 46, 47, 및 48)을 함께 연결한다. 예를 들면, 융합 단백질은 αCD20-항원-결합 단백질 디프테리아 독소::αCD20(참고: 예를 들면, 서열 번호: 55, 56, 및 57)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 생산한다. SLT 디프테리아 독소::αCD20 세포독성 단백질의 발현은 앞서의 실시예에 기술된 바와 같이 세균 및/또는 세포-유리된, 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성한다.

[0711] <u>세포독성 단백질 디프테리아 독소::αCD20의 시험관내 특성의 측정</u>

[0712] [571] CD20+ 세포 및 CD20-세포에 대한 본 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 앞서의 특허에 기술된 바와 같이 형광성-계 유동-세포분석법으로 측정한다. CD20+ 세포에 대한 디프테리아 독소::αCD20의 B_{max}는 0.01-100nM의 범위내 K_D를 사용하여 대략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정된 반면, 당해 검정에서 CD20-세포에 대한 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0713] [572] 디프테리아 독소::αCD20 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력을 앞서의 실시예에서 위에 기술된 바와 같은, 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정한다. 세포-유리된 단백질 합성에서 당해 실시예의 세포독성 단백질의 억제 활성은 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성에 있어 디프테리아 독소::αCD20의 IC_{50}은 대략 0.1-100pM이다.

[0714] CD20+ 세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 디프테리아 독소::αCD20의 세포독성의 측정

[0715] [573] 디프테리아 독소::αCD20의 세포독성 특징을 CD20+ 세포를 사용하여 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같은 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 또한, 디프테리아 독소::αCD20의 선택적인 세포독성 특성은 CD20+ 세포와 비교하여 CD20-세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 CD20+ 세포의 경우 대략 0.01-100nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포 표면에서 CD20을 발현하는 세포와 비교하여 세포 표면에서 CD20을 발현하지 않는 세포의 경우 대략 10-10,000배 더 크다(세포독성 거의 없음). 또한, 디프테리아 독소::αCD20의 세포독성을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시에 대해 시험한다.

[0716] 동물 모델을 사용한 세포독성 단백질 디프테리아 독소::αCD20의 생체내 효과의 측정

[0717] [574] 동물 모델을 사용하여 신생물 세포에서 세포독성 단백질 디프테리아 독소::αCD20의 생체내 효과를 측정한다. 다양한 마우스 균주를 사용하여 이들의 세포 표면 상에 CD20을 발현하는 사람 신생물 세포의 이들 마우스내로의 주입으로부터 생성되는 마우스내 이형이식체 종양에 있어서 정맥내 투여 후 세포독성 단백질의 효과를 시험한다. 세포 사멸을 T-세포 항원결정기 전달에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시 둘 다에 대해 시험한다.

[0718] **실시예 16. T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 디프테리아 독소 작동체 폴리펩티드 및 HER2에 대해 특이적인 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질("디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH")**

[0719] [575] 본 실시예에서, CD8+ T-세포 초-면역화 및 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 작동체 영역은 위에서 기술된 바와 같이 디프테리아 독소의 A 소단위로부터 유도된다. 면역글로불린-형 결합 영역은 미국 특허 공보 제2011/0059090호에 기술된 바와 같은, 카멜리드 항체(V_HH) 단백질 5F7의 단일-도메인 가변 영역으로부터 유도된다.

[0720] <u>"디프테리아 독소와 융합된 세포독성 단백질 "αHER2-V_HH"의 작제, 생산, 및 정제</u>

[0721] [576] 면역글로불린-형 결합 영역 및 디프테리아 독소 작동체 영역을 함께 연결하여 융합 단백질을 형성하였다(참고: 예를 들면, 서열 번호: 58, 59, 및 60). 당해 실시예에서, 단백질 5F7로부터 유도된 αHER2-V_HH 가변 영역 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 당해 분야에 공지된 링커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 인 프레임(in frame)으로 및 서열 번호: 46, 47, 또는 48의 아미노산을 포함하는 디프테리아 독소 작동체 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 인 프레임으로 클로닝될 수 있다. "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH" 세포독성 단백질의 변이체는 생성되어 결합 영역을 시가 독소 작동체 영역의 아미노 말단에 근접하게 임의로 위치하며 KDEL 계열의 카복시-말단 소포체 시그날 모티프를 임의로 포함한다. "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH" 세포독성 단백질 변이체의 발현은 앞서의 실시예에 기술된 바와 같이 세균 및/또는 세포-유리된, 단백질 해독 시스템을 사용하여 달성된다.

[0722] 세포독성 단백질 "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH"의 시험관내 특성의 측정

[0723] [577] HER2+ 세포 및 HER2-세포에 대한 당해 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성은 앞서의 특허에 기술된 바와 같이 형광성-계, 유동-세포분석법으로 측정한다. HER2+ 세포에 대한 "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH"의 B_{max}는 0.01-100nM의 KD로 대략 50,000-200,000 MFI인 것으로 측정되나, 당해 검정에서 HER2-세포에 대한 유의적인 결합은 존재하지 않는다.

[0724] [578] "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH" 세포독성 단백질의 리보소옴 불활성화 능력은 앞서의 실시예에서 위에서 기술된 바와 같이 세포-유리된, 시험관내 단백질 해독으로 측정된다. 세포-유리된 단백질 합성에 있어서 당해 실시예의 세포독성 단백질의 억제 효과는 유의적이다. 당해 세포-유리된 검정에서 단백질 합성에 있어서 "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH"의 IC_{50}은 대략 0.1-100pM이다.

[0725] HER2+ 세포-사멸 검정을 사용한 세포독성 단백질 "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH"의 세포독성의 측정

[0726] [579] "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH" 변이체의 세포독성의 측정은 HER2+ 세포를 사용하여 앞서의 실시예에서 상기 기술된 바와 같은 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 또한, "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH"의 선택적인 세포독성 특성은 HER2+ 세포와 비교하여 HER2- 세포를 사용한 동일한 일반적인 세포-사멸 검정으로 측정한다. 당해 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포주에 따라 HER2+ 세포의 경우 대략 0.01-100nM이다. 세포독성 단백질의 CD_{50}은 세포 표면에서 HER2를 발현하는 세포와 비교하여 세포 표면에서 HER2를 발현하지 않는 세포의 경우 대략 10-10,000배 더 크다(세포독성 거의 없음). 또한, "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH"의 세포독성을 T-세포 항원결정기 전달 및 CTL-매개된 세포독성을 가져오는 제시에 의해 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 둘 다에 대해 시험한다.

[0727] 동물 모델을 사용하는 세포독성 단백질 "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH"의 생체내 효과의 측정

[0728] [580] 동물 모델을 사용하여 신생물 세포에서 세포독성 단백질 "디프테리아 독소와 융합된 αHER2-V_HH"의 생체내 효과를 측정한다. 다양한 마우스 균주를 사용하여 이들의 세포 표면에 HER2를 발현하는 사람 신생물 세포의 마우스내로의 주사로부터 초래되는 마우스내 이형이식체 종양에 정맥내 투여한 후 세포독성 단백질의 효과를 시험한다. 세포 사멸을 T-세포 항원결정기 전달 및 CTL-매개된 세포독성을 초래하는 제시에 의한 직접적인 세포독성 및 간접적인 세포독성 둘 다에 대해 시험한다.

[0729] 실시예 17. 다양한 세포형을 표적화하는 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈면역화 시가 독소 유도된 세포독성 단백질

[0730] [581] 본 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 하나 이상의 임베딩되거나 인서팅된 T-세포 항원결정기를 통해 파괴된 전술한 B-세포 항원결정기 영역 중의 어느 하나를 지닌 시가-유사 독소 1의 A 단위(SLT-1A), 시가 독소(StxA), 및/또는 시가-유사 독소 2(SLT-2A)로 부터 유도된 T-세포 초-면역화 및/또는 B-세포/CD4+ T-세포 탈-면역화 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한다. 결합 영역은 표 15의 컬럼 1로부터 선택된 분자로부터의 면역글로불린 도메인으로부터 유도되며 표 15의 컬럼 2에 나타낸 세포외 표적 생물분자에 결합한다. 당해 실시예의 예시적인 세포독성 단백질은 당해 분야에 공지된 시약 및 기술을 사용하여 카복시-말단 KDEL-형 시그날 모티프 및/또는 검출 증진제(들)를 사용하여 임의로 생성시킨다. 당해 실시예의 예시적인 세포독성 단백질은 적절한 세포외 표적 생물분자를 발현시키는 세포를 사용하여 앞서의 실시예에서 기술된 바와 같이 시험한다. 당해 실시예의 예시적인 단백질을 사용하여, 예를 들면, 표 15의 컬럼 3에 나타낸 질병, 상태, 및/또는 질환을 진단하고 치료할 수 있다.

표 15

[0731]

결합 영역의 공급원	세포외 표적	적용(들)
알렘투주마브	CD52	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
바실릭시마브	CD25	기관 이식 거부와 같은 T-세포 질환, 및 일부 B-세포 계통 암
브렌툭시마브	CD30	혈액암, B-세포 관련 면역 질환, 및 T-세포 관련 면역 질환
카투막소마브	EpCAM	난소 암, 악성 복수암, 위암과 같은 다양한 암
세툭시마브	EGFR	결장직장암 및 두경부 암과 같은 다양한 암
다클리주마브	CD25	기관 이식의 거부와 같은 B-세포 계통 암 및 T-세포 질환
다라투무마브	CD38	혈액 암, B-세포 관련 면역 질환, 및 T-세포 관련 면역 질환
디누툭시마브	강글리오사이드 GD2	유방 암, 골수 암, 및 신경모세포종과 같은 다양한 암
에팔리주마브	LFA-1(CD11a)	건선과 같은 자가면역 질환
에르투막소마브	HER2/neu	유방 암 및 결장직장 암과 같은 다양한 암 및 종양
겜투주마브	CD33	골수암 또는 면역 질환
이브리투모마브	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
이필리무마브	CD152	T-세포 관련 질환 및 백혈병, 흑색종과 같은 다양한 암
무로모나브	CD3	기관 이식 거부의 예방
나탈리주마브	인테그린 α4	다발경화증 및 크론병과 같은 자가면역 질환
오비누투주마브	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
오카라투주마브	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
오크렐리주마브	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
오파투무마브	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
팔리비주마브	호흡성 합포체 바이러스의 F 단백질	호흡성 합포체 바이러스의 치료
파니투무마브	EGFR	결장직장 암 및 두경부 암과 같은 다양한 암

페르투주마브	HER2/neu	유방 암 및 결장직장 암과 같은 다양한 암
pro 140	CCR5	HIV 감염 및 T-세포 질환
라무키루마브	VEGFR2	고형 종양과 같은 다양한 암 및 암 관련된 질환
리툭시마브	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
토킬리주마브 또는 아틀리주마브	IL-6 수용체	류마티스 관절염과 같은 자가면역 질환
토시투모마브	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
트라스투주마브	HER2/neu	유방 암 및 결장직장 암과 같은 다양한 암 및 종양
우블리툭시마브	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
베돌리주마브	인테그린 α4β7	크론병 및 궤양성 대장염과 같은 자가면역 질환
CD20 결합 scFv(들) Geng S et al., *Cell Mol Immunol* 3: 439-43(2006); Olafesn T et al., *Protein Eng Des Sel* 23:243-9(2010)	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
CD20 결합 scFv(들) Kawas S et al., *MAbs* 3: 479-86(2011)	CD22	B-세포 암 또는 B-세포 관련 면역 질환
CD25 결합 scFv(들) Muramatsu H et al., *Cancer Lett* 225:225-36(2005)	CD25	B-세포계통의 다양한 암 및 T-세포와 관련된 면역 질환
CD30 결합 모노클로날 항체(들) Klimka A et al., *Br J Cancer* 83:252-60 (2000)	CD30	B-세포 암 또는 B-세포/T-세포 관련 면역 질환
CD33 결합 모노클로날 항체(들) Benedict C et al., *J Immunol Methods* 201:223-31 (1997)	CD33	골수 암 또는 면역 질환
CD38 결합 면역글로불린 도메인 미국 특허 제8,153,765호	CD38	혈액 암, B-세포 관련 면역 질환, 및 T-세포 관련 면역 질환
CD40 결합 scFv(들) Ellmark P et al., *Immunology* 106:456-63(2002)	CD40	다양한 암 및 면역 질환
CD52 결합 모노클로날 항체(들) 미국 특허 제7,910,104호	CD52	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자가면역 질환과 같은 B-세포 관련 면역 질환
CD56 결합 모노클로날 항체(들) Shin J et al., *Hybridoma* 18:521-7 (1999)	CD56	면역 질환 및 폐 암, 마켈 세포 암종, 흑색종과 같은 다양한 암
CD79 결합 모노클로날 항체(들) Zhang L et al., *Ther Immunol* 2: 191-202 (1995)	CD79	B-세포 암 또는 B-세포 관련 면역 질환
CD248 결합 scFv(들) Ahao A et al., *J Immunol Methods* 363: 221-32(2011)	CD248	혈관형성 억제와 같은 다양한 암
EpCAM 결합 모노클로날 항체(들) Schanzer J et al., *J Immunother* 29:477-88 (2006)	EpCAM	난소 암, 악성 복수암, 위 암과 같은 다양한 암
PSMA 결합 모노클로날 항체(들) Frigerio B et al., *Eur J Cancer* 49:2223-32 (2013)	PSMA	전립샘 암
Eph-B2 결합 모노클로날 항체(들) Abengozar M et al., *Blood* 119:4565-76 (2012)	Eph-B2	결장직장 암 및 전립샘 암과 같은 다양한 암
엔도글린 결합 모노클로날 항체(들) Volkel T et al., *Biochim Biophys Res Acta* 1663: 158-66(2004)	엔도글린	유방 암 및 결장직장암과 같은 다양한 암

FAP 결합 모노클로날 항체(들) Zhang J et al., *FASEB J* 27:581-9(2013)	FAP	육종 및 골 암과 같은 다양한 암
CEA 결합 항체(들) 및 scFv(들) Neumaier M et al., *Cancer Res* 50:2128-34(1990); Pavoni E et al., *BMC Cancer* 6:4(2006); Yazaki P et al., *Nucl Med Biol* 35:151-8(2008); Ahao J et al., *Oncol Res* 17:217-22(2008)	CEA	소화기 암, 췌장 암, 폐 암, 및 유방 암과 같은 다양한 암
CD24 결합 모노클로날 항체(들) Kristiansen G et al., *Lab Invest* 90:1102-16(2010)	CD24	방광 암과 같은 다양한 암
루이스Y 항원 결합 scFv(들) Power B et al., *Protein Sci* 12: 734-47 (2003); 모노클로날 항체 BR96 Feridani A et al., *Cytometry* 71: 361-70 (2007)	루이스Y 항원	경부 암 및 자궁 암과 같은 다양한 암
아달리무마브	TNF-α	다양한 암 및 류마티스 관절염, 크론병, 플라크 건선, 건선 관절염, 강직성 척추염, 소아 특발성 관절염, 신생아의 용혈병과 같은 면역 질환
아펠리모마브	TNF-α	다양한 암 및 면역 질환
ald518	IL-6	다양한 암 및 류마티스 관절염과 같은 면역 질환
안루킨주마브 또는 이마-638	IL-13	다양한 암 및 건선, 류마티스 관절염, 염증성 창자병, 다발경화증과 같은 면역 질환
브리아키누마브	IL-12, IL-23	다양한 암 및 염증병과 같은 면역 질환
브로달루마브	IL-17	다양한 암 및 크론병과 같은 면역 질환
카나키누마브	IL-1	다양한 암 및 류마티스 관절염과 같은 면역 질환
세르톨리주마브	TNF-α	다양한 암
페자키누마브	IL-22	다양한 암 및 류마티스 간절염과 같은 면역 질환
가니투마브	IGF-I	다양한 암
골리무마브	TNF-α	다양한 암 및 류마티스 관절염, 건선 관절염, 강직성 척추염과 같은 면역 질환
인플릭시마브	TNF-α	다양한 암 및 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선 간절염, 건선, 크론병, 궤양성 대장염과 같은 면역 질환
익세키주마브	IL-17A	다양한 암 및 자가면역병과 같은 면역 질환
메폴리주마브	IL-5	다양한 면역 질환 및 B-세포 암과 같은 암
네렐리모마브	TNF-α	다양한 암 및 면역 질환
올로키주마브	IL6	다양한 암 및 면역 질환
오조랄리주마브	TNF-α	염증
페라키주마브	IL17A	다양한 암 및 건선과 같은 염증 질환
플라쿨루마브	사람 TNF	다양한 면역 질환 및 암
사릴루마브	IL6	다양한 암 및 류마티스 관절염, 강직성 척추염과 같은 면역 질환
실툭시마브	IL-6	다양한 암 및 면역 질환
시루쿠마브	IL-6	다양한 암 및 류마티스 관절염과 같은 면역 질환
타발루마브	BAFF	B-세포 암
티킬리무바브 또는 트레멜리무바브	CTLA-4	다양한 암
틸드라키주마브	IL23	면역학적으로 매개된 염증 질환
tnx-650	IL-13	B-세포 암과 같은 다양한 암 및 면역 질환
토킬리주마브 또는 아클리주마브	IL-6 수용체	다양한 암 및 류마티스 관절염과 같은 면역 질환
우스테키누마브	IL-12, IL-23	다양한 암 및 다발경화증, 건선, 건선 관절염과 같은 면역 질환
다양한 성장 인자: VEGFR, EFG1, EGF2, FGF	VEGFR, EGFR, FGFR,	유방 암 및 결장 암과 같은 다양한 암, 및 혈관화 억제

다양한 사이토킨: IL-2, IL-6, IL-23, CCL2, BAFF, TNF, RANKL	IL-2R, IL-6R, IL-23R, CD80/CD86, TNFRSF13/TNFRSF17, TNFR	다양한 면역 질환 및 암
환자 샘플로부터 확인된 광범위하게 중화시키는 항체 Prabakaran et al., *Front Microbiol* 3: 277 (2012)	인플루엔자 표면 항원, 예를 들면, 헤마글루티닌 및 인플루엔자 매트릭스 단백질 2	바이러스 감염
환자 샘플로부터 확인된 광범위하게 중화시키는 항체 Prabakaran et al., *Front Microbiol* 3: 277 (2012)	코로나바이러스 표면 항원	바이러스 감염
환자 샘플로부터 확인된 광범위하게 중화시키는 항체 Prabakaran et al., *Front Microbiol* 3: 277 (2012)	헨니파바이러스 표면 항원	바이러스 감염

[0732] 표 15: 세포독성 단백질의 세포 표적화를 위한 각종의 결합 영역

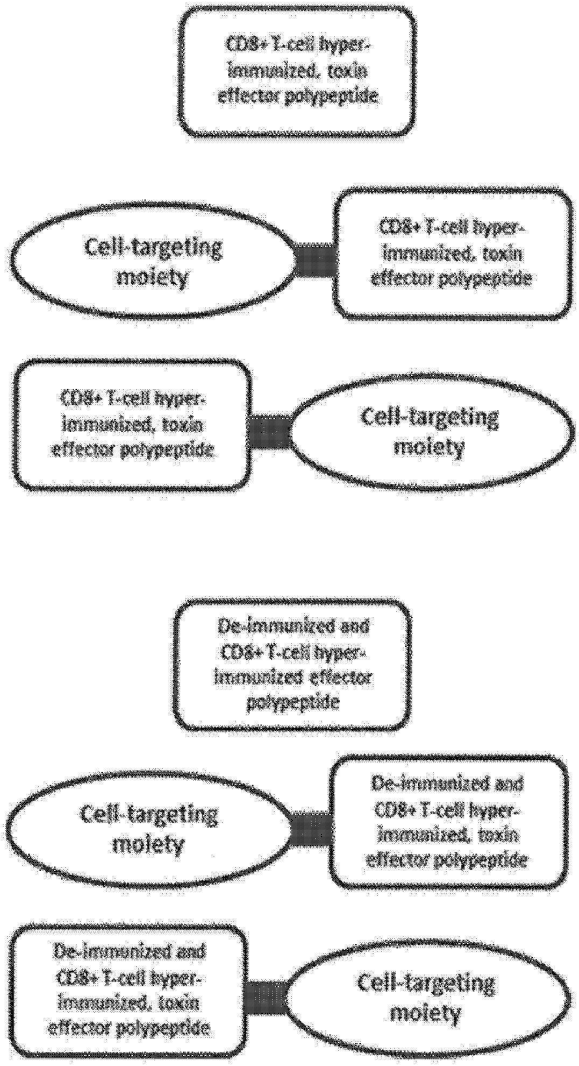
[0733] [582] 본 발명의 일부 구체예가 예증의 방식으로 기술되었지만, 본 발명이 본 발명의 취지로부터 벗어나거나 특허청구범위의 영역을 초과하지 않으면서, 많은 변형, 변화 및 개정, 및 당해 분야의 숙련가의 영역내에 있는 다수의 등가물 또는 대안적 해결을 사용하여 실시할 수 있음이 명백할 것이다.

[0734] [583] 모든 공보, 특허, 및 특허원은, 각각의 개개 공보, 특허 또는 특허원이 이의 전문을 참조로 포함하는 것으로 나타낸 경우와 동일한 정도로 이의 전문이 참조로 본원에 포함된다. 미국 가특허원 일련 번호 제61/777,130호, 제61/932,000호, 제61/951,110호, 제61/951,121호, 제62/010,918호, 및 제62/049,325호는, 각각 이의 전문이 참조로 본원에 포함된다. 미국 특허원 제US 2007/0298434 A1호, 제US 2009/0156417 A1호, 및 제US 2013/0196928 A1호의 개시내용은 각각, 이의 전문이 참조로 본원에 포함된다. 국제 PCT 특허원 일련 번호 제WO 2014/164693호 및 제WO 2014/ 164680호의 개시내용은, 이의 전문이 참조로 본원에 포함된다. 본원에 인용된 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열에 대한 진뱅크(National Center for Biotechnology Information, 미국)로부터의 모든 전자적으로 이용가능한 생물학적 서열 정보의 완전한 개시내용은, 이의 전문이 참조로 본원에 포함된다.

도면

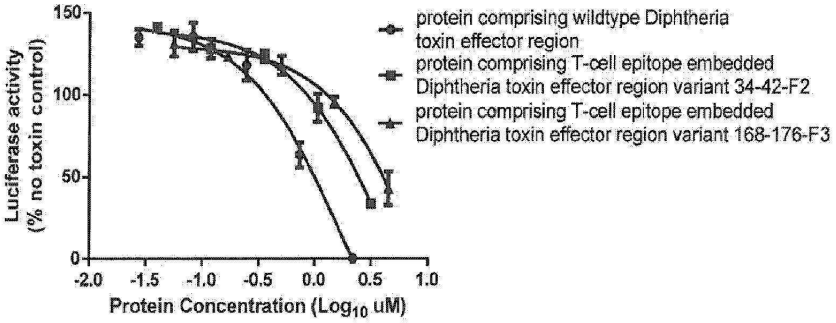
도면1

Figure 1. Schematic drawing of the general architecture of exemplary CD8+ T-cell hyper-immunized polypeptides and cell-targeted molecules of the invention



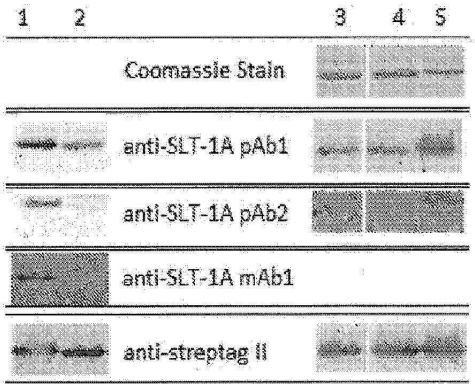
도면2

Figure 2. Retention of ribosome inactivation, catalytic activity by T-cell hyper-immunized, toxin effector polypeptides



도면3

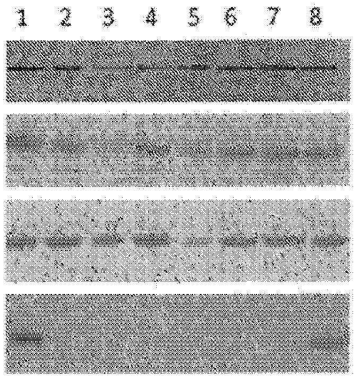
Figure 3. Western blot analysis of cell-targeted, cytotoxic proteins comprising T-cell hyper-immunized toxin effector polypeptides with a B-cell epitope region disrupted by different T-cell epitopes



1. cytotoxic protein with a WT Shiga toxin effector region
2. cytotoxic protein comprising 53-61-F2
3. cytotoxic protein comprising 53-61-F2-3
4. cytotoxic protein comprising 53-61-F2-2
5. cytotoxic protein with a WT Shiga toxin effector region

도면4

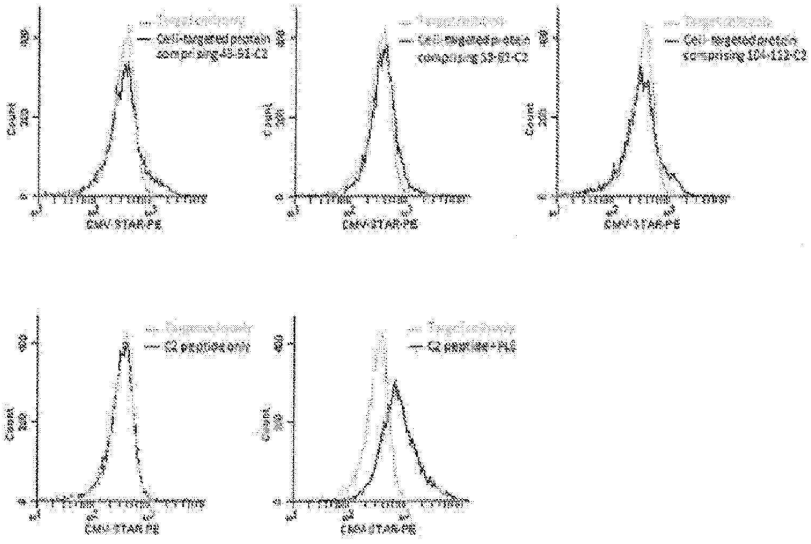
Figure 4. Western blot analysis of cell-targeted, cytotoxic proteins comprising T-cell hyper-immunized toxin effector polypeptides with different B-cell epitope regions disrupted by different T-cell epitopes



1. cytotoxic protein with a WT Shiga toxin effector region
2. cytotoxic protein comprising 4-12-F3
3. cytotoxic protein comprising 44-52-F2
4. cytotoxic protein comprising 43-51-C2
5. cytotoxic protein comprising 53-61-C2
6. cytotoxic protein comprising 104-112-C2
7. cytotoxic protein comprising 180-188-F2-4
8. cytotoxic protein with a WT Shiga toxin effector region

도면5

Figure 5. Flow cytometry overlays of results for cell-surface presentation of T-cell epitope-peptide/MHC class I complexes: Cells treated with cell-targeted proteins (each comprising a toxin effector polypeptide comprising an embedded T-cell epitope disrupting a B-cell epitope region) displayed the embedded epitope.



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MOLECULAR TEMPLATES, INC.

<120> MHC CLASS I EPITOPE DELIVERING POLYPEPTIDES

<130> 14-05PCT

<140><141><150> PCT/US15/12968

<151> 2015-01-26

<150> 62/049,325

<151> 2014-09-11

<150> 61/932,000

<151> 2014-01-27

<160> 158

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 293

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220><223> Shiga-like toxin 1 Subunit A (SLT-1A)

<400> 1

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu

245 250 255

Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His

260 265 270

Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg

275 280 285

Arg Thr Ile Ser Ser

290

<210> 2

<211> 293

<212> PRT

<213> Shigella dysenteriae

<220><223> Shiga toxin Subunit A (StxA)

<400> 2

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu

245 250 255

Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His
260 265 270
Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg
275 280 285

Arg Thr Ile Ser Ser
290

<210> 3
<211> 297
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<220><223> Shiga-like toxin 2 Subunit A (SLT-2A)
<400> 3

Asp Glu Phe Thr Val Asp Phe Ser Ser Gln Lys Ser Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Ser Ile Arg Ser Ala Ile Ser Thr Pro Leu Gly Asn Ile Ser
20 25 30
Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn
35 40 45

Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe
50 55 60
Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly
65 70 75 80
Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser
85 90 95
His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp Leu Glu Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser Tyr Leu Asp Leu Met Glu
130 135 140
Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser Ser Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr
180 185 190
Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val
195 200 205
Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser
210 215 220
Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn
225 230 235 240

Cys His Ser Thr Gly Ser Tyr Ser Val Arg Ser Val Ser Gln Lys Gln
245 250 255
Lys Thr Glu Cys Gln Ile Val Gly Asp Arg Ala Ala Ile Lys Val Asn
260 265 270
Asn Val Leu Trp Glu Ala Asn Thr Ile Ala Ala Leu Leu Asn Arg Lys
275 280 285
Pro Gln Asp Leu Thr Glu Pro Asn Gln
290 295

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213>
Influenza A virus
<220><223> T-cell epitope-peptide F2
<400> 4
Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Influenza A virus
<220><223> T-cell epitope-peptide F2-2
<400> 5

Asp Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<220><223> T-cell epitope-peptide F2-3

<400> 6

Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<220><223> T-cell epitope-peptide F2-4

<400> 7

Gly Ile Leu Gly Asp Val Phe Thr Leu

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<220><223> T-cell epitope-peptide F3

<400> 8

Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<220><223> T-cell epitope-peptide F3-4

<400> 9

Ile Leu Arg Phe Ser Val Ala His Lys

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Human cytomegalovirus

<220><223> T-cell epitope-peptide C2

<400> 10

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5

<210> 11

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 4-12-F3-4

<400> 11

Lys Glu Phe Ile Leu Arg Phe Ser Val Ala His Lys Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 12

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector

polypeptide variant 44-52-F2

<400> 12

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Leu Gly Phe

35 40 45

Val Phe Thr Leu Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60
Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80
Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160
Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 13

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 43-51-C2

<400> 13

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Asn Leu Val Pro Met Val
35 40 45

Ala Thr Val Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 14

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope partially embedded and inserted Shiga toxin effector polypeptide variant 53-61-F2

<400> 14

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Glu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140
Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160
Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175
Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val
180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205
Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220
Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225 230 235 240
Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 15

<211

> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector
polypeptide variant 53-61-F2-2

<400> 15

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45
Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 16

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector

polypeptide variant 53-61-F2-3

<400> 16

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 17

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector

polypeptide variant 53-61-C2

<400> 17

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 18
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 104-112-C2
<400> 18
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45
Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60
Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80
Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 19
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 180-188-F2-4
<400> 19
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Gly Ile Leu Gly Asp Val Phe Thr Leu Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 20

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><223> T-cell epitope inserted Shiga toxin effector

polypeptide variant 245/246-F3

<400> 20

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Cys Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys Ala Ser

245 250 255

Arg Val Ala Arg

260

<210> 21

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 44-52-C2

<400> 21

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Asn Leu Val Pro Met

35 40 45

Val Ala Thr Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160
Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 22
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector

polypeptide variant 66-74-F2
<400> 22
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 23

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 75-83-F2

<400> 23

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Gly Ile Leu Gly Phe Val
65 70 75 80

Phe Thr Leu Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 24

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 157-165-F2

<400> 24

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Gly Ile Leu Gly

145 150 155 160

Phe Val Phe Thr Leu Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 25

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector

polypeptide variant 164-172-F2

<400> 25

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60
Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80
Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160
Phe Val Thr Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 26
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector
polypeptide variant 221-229-F2

<400> 26

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Gly Ile Leu Gly
210 215 220

Phe Val Phe Thr Leu Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 27

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 231-239-F2

<400> 27

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45
Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80
Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 28

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 66-74-F3

<400> 28

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160
Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 29
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector
polypeptide variant 75-83-F3
<400> 29
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45
Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60
Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Val
65 70 75 80

Ala His Lys Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160
Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 30

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 157-165-F3

<400> 30

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ile Leu Arg Gly
145 150 155 160

Ser Val Ala His Lys Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 31

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 164-172-F3

<400> 31

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 32
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector
polypeptide variant 221-229-F3
<400> 32
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Ile Leu Arg Gly

210 215 220

Ser Val Ala His Lys Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 33

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector

polypeptide variant 231-239-F3

<400> 33

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 34

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 66-74-C2

<400> 34

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160
Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 35

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 75-83-C2

<400> 35

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45
Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Val Pro Met Val
65 70 75 80
Ala Thr Val Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160
Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 36

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector
polypeptide variant 157-165-C2

<400> 36

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Asn Leu Val Pro
145 150 155 160

Met Val Ala Thr Val Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 37

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 164-172-C2

<400> 37

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160
Phe Val Thr Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 38
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector

polypeptide variant 221-229-C2
<400> 38
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45
Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60
Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Asn Leu Val Pro

210 215 220

Met Val Ala Thr Val Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 39

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 231-239-C2

<400> 39

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45
Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60
Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80
Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 40

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 77-85-F2

<400> 40

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Gly Ile Leu Gly

65 70 75 80

Phe Val Phe Thr Leu Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 41
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide
<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector
polypeptide variant 159-167-F2
<400> 41
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60
Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80
Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Gly Ile
145 150 155 160
Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 42
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 159-167-F3
<400> 42
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Ile Leu

145 150 155 160

Arg Gly Ser Val Ala His Lys Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 43

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded Shiga toxin effector polypeptide variant 162-170-C2

<400> 43

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 44

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Diphtheria Toxin A Subunit

<400> 44

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn

1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln

20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp

35 40 45

Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly

50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val

65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val

85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu

100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly

115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser

130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160
Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
180 185 190
Arg

<210> 45
<211> 398
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><223> Diphtheria toxin effector polypeptide comprising wild-type diphtheria toxin sequences
<400> 45
Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu
1 5 10 15

Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile
20 25 30
Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp
35 40 45
Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala
50 55 60
Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly
65 70 75 80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys
85 90 95
Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr
100 105 110

Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe
115 120 125
Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly
130 135 140

Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
145 150 155 160
Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln
165 170 175
Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val
180 185 190
Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp
195 200 205

Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
210 215 220
Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
225 230 235 240
Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
245 250 255
Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
260 265 270

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
275 280 285
Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
290 295 300
Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
305 310 315 320
Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
325 330 335

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
340 345 350
Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu

355 360 365

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly

370 375 380

His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser His His His His His His

385 390 395

<210> 46

<211> 398

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded diphtheria toxin effector polypeptide variant 34-42-F2

<400> 46

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu

1 5 10 15

Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile

20 25 30

Gln Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Gln Gly Asn Tyr Asp

35 40 45

Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala

50 55 60

Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly

65 70 75 80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys

85 90 95

Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr

100 105 110

Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe

115 120 125

Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly

130 135 140

Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
145 150 155 160

Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln
165 170 175
Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val
180 185 190
Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp
195 200 205
Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
210 215 220

Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
225 230 235 240
Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
245 250 255
Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
260 265 270
Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
275 280 285

Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
290 295 300
Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
305 310 315 320
Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
325 330 335
Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
340 345 350

Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
355 360 365
Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
370 375 380
His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser His His His His His His

385 390 395

<210> 47

<211> 398

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded diphtheria toxin effector polypeptide variant 168-176-F3

<400> 47

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu
1 5 10 15

Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile
20 25 30

Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp
35 40 45

Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala

50 55 60

Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly
65 70 75 80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys
85 90 95

Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr
100 105 110

Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe

115 120 125

Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly
130 135 140

Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
145 150 155 160

Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
165 170 175

Lys Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val

180 185 190

Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp

195 200 205

Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His

210 215 220

Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser

225 230 235 240

Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu

245 250 255

Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro

260 265 270

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln

275 280 285

Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala

290 295 300

Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly

305 310 315 320

Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu

325 330 335

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val

340 345 350

Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu

355 360 365

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly

370 375 380

His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser His His His His His His

385 390 395

<210> 48

<211> 398

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> T-cell epitope embedded diphtheria toxin effector polypeptide variant 69-77-C2

<400> 48

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu
1 5 10 15

Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile
20 25 30

Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp
35 40 45

Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala
50 55 60

Gly Tyr Ser Val Asp Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gly Gly
65 70 75 80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys
85 90 95

Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr
100 105 110

Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe
115 120 125

Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly
130 135 140

Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
145 150 155 160

Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln
165 170 175

Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val
180 185 190

Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp

195 200 205

Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
210 215 220
Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
225 230 235 240
Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
245 250 255
Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
260 265 270

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
275 280 285
Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
290 295 300
Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
305 310 315 320
Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
325 330 335

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
340 345 350
Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
355 360 365
Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
370 375 380
His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser His His His His His His
385 390 395

<210> 49
<211> 512
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220><223> Cytotoxic Protein: alpha-CD20 fused with
de-immunized SLT-1A variant #1

<400> 49

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
20 25 30

Tyr Asn Val His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Phe Asn Gln Lys
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val
65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Val Trp Phe Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser
115 120 125

Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Gln Ile Val Leu Ser
130 135 140

Gln Ser Pro Thr Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
145 150 155 160

Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu
180 185 190

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
195 200 205

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
210 215 220

Tyr Cys Gln Gln Trp Ile Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr

225 230 235 240

Lys Leu Glu Leu Lys Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser

245 250 255

Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys

260 265 270

Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro

275 280 285

Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser

290 295 300

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro

305 310 315 320

Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn

325 330 335

Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg

340 345 350

Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr

355 360 365

Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile

370 375 380

Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr

385 390 395 400

Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala

405 410 415

Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe

420 425 430

Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly

435 440 445

Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp

450 455 460

Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val

465 470 475 480

Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser

485 490 495

Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

500 505 510

<210> 50

<211> 511

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Cytotoxic Protein: alpha-CD20 fused with de-immunized SLT-1A variant #2

<400> 50

Met Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

20 25 30

Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys

50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ala Gln Leu Arg Pro Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala
145 150 155 160
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
165 170 175
Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
180 185 190
Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val
210 215 220
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ile Ser Asn
225 230 235 240
Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly
245 250 255
Gly Ser Gly Gly Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr
260 265 270

Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu
275 280 285
Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly
290 295 300
Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr
305 310 315 320
Val Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu
325 330 335

Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe
340 345 350
Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu
355 360 365
Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser
370 375 380

Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu
385 390 395 400

Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg
405 410 415
Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg
420 425 430
Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg
435 440 445
Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly
450 455 460

Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg
465 470 475 480
Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val
485 490 495
Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
500 505 510

<210> 51
<211> 513
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Cytotoxic Protein: alpha-CD20 fused with de-immunized SLT-1A variant #3

<400> 51
Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
20 25 30
Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys

50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp
100 105 110
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Ser Thr Ser Gly Ser

115 120 125

Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Val Leu
130 135 140
Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
145 150 155 160
Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln
165 170 175
Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn

180 185 190

Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205
Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
210 215 220
Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly

245 250 255

Ser Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala
260 265 270
Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr
275 280 285
Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp

290 295 300

Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp

305 310 315 320

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn

325 330 335

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr

340 345 350

Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Asn Leu Val

355 360 365

Pro Met Val Ala Thr Val Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly

370 375 380

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser

385 390 395 400

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val

405 410 415

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg

420 425 430

Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser

435 440 445

Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn

450 455 460

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser

465 470 475 480

Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly

485 490 495

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala

500 505 510

Arg

<210> 52

<211> 385

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Cytotoxic Protein: anti-HER2-VHH fused with de-immunized SLT-1A variant #1

<400> 52

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile
20 25 30

Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
35 40 45

Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala His His Ser Glu Asp Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ala Pro Lys Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala
130 135 140

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr
145 150 155 160

Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp
165 170 175

Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Asp Val Arg Gly Ile Asp
180 185 190

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn

195 200 205

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr

210 215 220

Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val

225 230 235 240

Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser

260 265 270

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val

275 280 285

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg

290 295 300

Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser

305 310 315 320

Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn

325 330 335

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser

340 345 350

Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly

355 360 365

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala

370 375 380

Arg

385

<210> 53

<211> 387

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><223> Cytotoxic Protein: anti-HER2-VHH fused with

de-immunized SLT-1A variant #2

<400> 53

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gly Arg
50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp
100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175

Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val
180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225 230 235 240
Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Glu Phe Pro Lys

245 250 255
Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Met Glu Val Gln
260 265 270
Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg
275 280 285
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile Asn Thr Met Gly
290 295 300
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Leu Ile

305 310 315 320
Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
325 330 335
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
340 345 350
Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Arg Phe Arg
355 360 365
Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

370 375 380
Val Ser Ser
385

<210> 54
<211> 390
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<220><223> Cytotoxic Protein: anti-HER2-VHH fused with
de-immunized SLT-1A variant #3 (alpha-HER2-VHH::SLT-1A::KDEL)
<400> 54
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile

20 25 30

Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu

35 40 45

Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro

115 120 125

Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr

130 135 140

Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly

145 150 155 160

Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile

165 170 175

Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile

180 185 190

Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg

195 200 205

Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe

210 215 220

Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Asn Leu

225 230 235 240

Val Pro Met Val Ala Thr Val Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala

245 250 255

Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr
260 265 270
Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser

275 280 285
Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu
290 295 300
Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu
305 310 315 320
Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu
325 330 335
Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp

340 345 350
Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu
355 360 365
Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val
370 375 380
Ala Arg Lys Asp Glu Leu
385 390

<210> 55

<211> 652

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Cytotoxic Protein: alpha-CD20 fused with de-immunized diphtheria toxin variant #1

<400> 55

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
20 25 30
Tyr Asn Val His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Phe Asn Gln Lys
50 55 60
Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val
65 70 75 80
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Val Trp Phe Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser
115 120 125
Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Gln Ile Val Leu Ser
130 135 140
Gln Ser Pro Thr Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
145 150 155 160
Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu
180 185 190
Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
195 200 205
Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
210 215 220
Tyr Cys Gln Gln Trp Ile Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr
225 230 235 240

Lys Leu Glu Leu Lys Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser
245 250 255
Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser
260 265 270
Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr
275 280 285

Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Gln
290 295 300

Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys
305 310 315 320
Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly
325 330 335
Lys Ala Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val
340 345 350
Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly
355 360 365

Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe
370 375 380
Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro
385 390 395 400
Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln
405 410 415
Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly
420 425 430

Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala
435 440 445
Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn
450 455 460
Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser
465 470 475 480
Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn
485 490 495

Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His
500 505 510
Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr
515 520 525
Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val

530 535 540

Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys
545 550 555 560

Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly
565 570 575

Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln
580 585 590

Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val
595 600 605

Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser
610 615 620

Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala
625 630 635 640

Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser
645 650

<210> 56

<211> 651

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Cytotoxic Protein: alpha-CD20 fused with de-immunized diphtheria toxin variant #2

<400> 56

Met Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
20 25 30

Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ala Gln Leu Arg Pro Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala

145 150 155 160

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val

165 170 175

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro

180 185 190

Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe

195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val

210 215 220

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ile Ser Asn

225 230 235 240

Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly

245 250 255

Gly Ser Gly Gly Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe

260 265 270

Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val

275 280 285

Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly

290 295 300

Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr

305 310 315 320

Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys

325 330 335

Ala Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu

340 345 350

Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu

355 360 365

Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile

370 375 380

Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe

385 390 395 400

Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala

405 410 415

Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Ile Leu Arg Gly Ser

420 425 430

Val Ala His Lys Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly

435 440 445

Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu

450 455 460

Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu

465 470 475 480

Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys

485 490 495

Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln

500 505 510

Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly

515 520 525

Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn

530 535 540

Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr

545 550 555 560

Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile
565 570 575
Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser

580 585 590
Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly
595 600 605
Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile
610 615 620
Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr
625 630 635 640
Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser
645 650

<210> 57
<211> 653
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><223> Cytotoxic Protein: alpha-CD20 fused with de-immunized diphtheria toxin variant #3
<400> 57
Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
20 25 30

Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys
50 55 60
Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp
100 105 110
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Ser Thr Ser Gly Ser
115 120 125
Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Val Leu
130 135 140
Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
145 150 155 160

Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln
165 170 175
Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn
180 185 190
Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205
Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly
245 250 255
Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys
260 265 270
Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly
275 280 285

Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr
290 295 300
Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn
305 310 315 320
Lys Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Leu Val Pro Met Val
325 330 335

Ala Thr Val Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys
340 345 350

Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu
355 360 365
Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu
370 375 380
Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu
385 390 395 400
Pro Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu
405 410 415

Gln Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg
420 425 430
Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys
435 440 445
Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile
450 455 460
Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu
465 470 475 480

Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro
485 490 495
Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe
500 505 510
His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val
515 520 525
Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala
530 535 540

Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu
545 550 555 560
Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met
565 570 575
Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala

580 585 590

Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu
595 600 605

Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu
610 615 620

Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro
625 630 635 640

Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser
645 650

<210> 58

<211> 525

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Cytotoxic Protein: anti-HER2-VHH fused with de-immunized diphtheria toxin variant #1

<400> 58

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile
20 25 30

Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
35 40 45

Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala His His Ser Glu Asp Pro Ser Ser
115 120 125
Lys Ala Pro Lys Ala Pro Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys
130 135 140
Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly
145 150 155 160
Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
165 170 175

Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn
180 185 190
Lys Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser
195 200 205
Gly Lys Ala Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys
210 215 220
Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu
225 230 235 240

Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu
245 250 255
Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu
260 265 270
Pro Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu
275 280 285
Gln Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg
290 295 300

Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys
305 310 315 320
Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile
325 330 335
Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu
340 345 350

Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro
355 360 365

Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe
370 375 380
His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val
385 390 395 400
Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala
405 410 415
Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu
420 425 430

Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met
435 440 445
Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala
450 455 460
Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu
465 470 475 480
Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu
485 490 495

Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro
500 505 510
Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser
515 520 525

<210> 59
<211> 527
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<220><223> Cytotoxic Protein: anti-HER2-VHH fused with de-immunized diphtheria toxin variant #2
<400> 59

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu

1 5 10 15

Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile

20 25 30

Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp

35 40 45

Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala

50 55 60

Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly

65 70 75 80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys

85 90 95

Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr

100 105 110

Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe

115 120 125

Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly

130 135 140

Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu

145 150 155 160

Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His

165 170 175

Lys Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val

180 185 190

Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp

195 200 205

Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His

210 215 220

Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser

225 230 235 240

Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu

245 250 255

Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro

260 265 270

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln

275 280 285

Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala

290 295 300

Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly

305 310 315 320

Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu

325 330 335

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val

340 345 350

Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu

355 360 365

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly

370 375 380

His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro

385 390 395 400

Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser

405 410 415

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala

420 425 430

Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln

435 440 445

Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly

450 455 460

Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg

465 470 475 480

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro

485 490 495

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln
500 505 510
Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

515 520 525

<210> 60

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Cytotoxic Protein: anti-HER2-VHH fused with de-immunized diphtheria toxin variant #3 (alpha-HER2-VHH::diphtheria Toxin:KDEL)

<400> 60

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile

20 25 30
Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
35 40 45
Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro
115 120 125
Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser
130 135 140

Lys Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro

145 150 155 160

Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly

165 170 175

Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp

180 185 190

Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Leu Val Pro Met

195 200 205

Val Ala Thr Val Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr

210 215 220

Lys Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu

225 230 235 240

Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu

245 250 255

Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser

260 265 270

Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp

275 280 285

Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr

290 295 300

Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala

305 310 315 320

Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys

325 330 335

Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile

340 345 350

Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser

355 360 365

Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu

370 375 380

Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr

385 390 395 400

Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp

405 410 415

Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu

420 425 430

Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val

435 440 445

Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val

450 455 460

Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro

465 470 475 480

Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val

485 490 495

Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg

500 505 510

Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser Lys Asp

515 520 525

Glu Leu

530

<210> 61

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 61

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 62

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 62

His Asp Glu Phe

1

<210> 63

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 63

His Asp Glu Leu

1

<210> 64

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 64

Arg Asp Glu Phe

1

<210> 65

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 65

Arg Asp Glu Leu

1

<210> 66

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 66

Trp Asp Glu Leu

1

<210> 67

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 67

Tyr Asp Glu Leu

1

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 68

His Glu Glu Phe

1

<210> 69

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 69

His Glu Glu Leu

1

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 70

Lys Glu Glu Leu

1

<210> 71

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 71

Arg Glu Glu Leu

1

<210> 72

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 72

Lys Ala Glu Leu

1

<210> 73

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 73

Lys Cys Glu Leu

1

<210> 74

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 74

Lys Phe Glu Leu

1

<210> 75

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 75

Lys Gly Glu Leu

1

<210> 76

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 76

Lys His Glu Leu

1

<210> 77

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 77

Lys Leu Glu Leu

1

<210> 78

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 78

Lys Asn Glu Leu

1

<210> 79

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 79

Lys Gln Glu Leu

1

<210> 80

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 80

Lys Arg Glu Leu

1

<210> 81

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 81

Lys Ser Glu Leu

1

<210> 82

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 82

Lys Val Glu Leu

1

<210> 83

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 83

Lys Trp Glu Leu

1

<210> 84

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 84

Lys Tyr Glu Leu

1

<210> 85

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 85

Lys Glu Asp Leu

1

<210> 86

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 86

Lys Ile Glu Leu

1

<210> 87

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 87

Asp Lys Glu Leu

1

<210> 88

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 88

Phe Asp Glu Leu

1

<210> 89

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 89

Lys Asp Glu Phe

1

<210> 90

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 90

Lys Lys Glu Leu

1

<210> 91

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 91

His Ala Asp Leu

1

<210> 92

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 92

His Ala Glu Leu

1

<210> 93

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 93

His Ile Glu Leu

1

<210> 94

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 94

His Asn Glu Leu

1

<210> 95

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 95

His Thr Glu Leu

1

<210> 96

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 96

Lys Thr Glu Leu

1

<210> 97

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 97

His Val Glu Leu

1

<210> 98

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 98

Asn Asp Glu Leu

1

<210> 99

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 99

Gln Asp Glu Leu

1

<210> 100

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 100

Arg Glu Asp Leu

1

<210> 101

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 101

Arg Asn Glu Leu

1

<210> 102

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 102

Arg Thr Asp Leu

1

<210> 103

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 103

Arg Thr Glu Leu

1

<210> 104

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 104

Ser Asp Glu Leu

1

<210> 105

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 105

Thr Asp Glu Leu

1

<210> 106

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 106

Ser Lys Glu Leu

1

<210> 107

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 107

Ala Leu Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 108

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 108

His Ala Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 109

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 109

His Leu Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 110

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 110

Lys Leu Glu Asp Glu Leu

1 5

<210> 111

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 111

Ile Arg Ser Asp Glu Leu

1 5

<210> 112

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 112

Glu Arg Ser Thr Glu Leu

1 5

<210> 113

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 113

Arg Pro Ser Thr Glu Leu

1 5

<210> 114

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 114

Ala Ser Gly Gly Pro Glu

1 5

<210> 115

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(6)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(11)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(16)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(21)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(26)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(31)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(36)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(41)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (45)..(46)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(51)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(52)

<223> This region may encompass 1-10 'Gly(2-4)Ser'
repeating units wherein some positions may be
absent

<400> 115

Ala Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Ala Met
50

<210> 116

<211> 210

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(6)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(13)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(27)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(34)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(41)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(48)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(55)

<223> May or may not be present

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(62)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (65)..(69)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (72)..(76)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (79)..(83)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (86)..(90)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (93)..(97)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (100)..(104)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (107)..(111)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (114)..(118)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (121)..(125)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (128)..(132)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (135)..(139)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (142)..(146)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (149)..(153)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (156)..(160)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(167)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (170)..(174)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (177)..(181)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (184)..(188)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (191)..(195)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (198)..(202)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (205)..(209)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(210)

<223> This sequence may encompass 1-30 '(Gly)X-Ser'
repeating units, wherein X represents 1-6 and wherein some
positions may be absent

<400> 116

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly
165 170 175
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
195 200 205

Gly Ser
210

<210> 117

<211> 210

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(6)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(13)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(27)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(34)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(41)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(48)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(55)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(62)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (65)..(69)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (72)..(76)

<223> May or may not be present

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (79)..(83)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (86)..(90)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (93)..(97)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (100)..(104)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (107)..(111)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (114)..(118)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (121)..(125)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (128)..(132)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (135)..(139)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (142)..(146)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (149)..(153)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (156)..(160)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(167)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (170)..(174)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (177)..(181)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (184)..(188)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (191)..(195)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (198)..(202)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (205)..(209)

<223> May or may not be present

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (1)..(210)

<223> This sequence may encompass 1-30 '(Ser)X-Gly'
repeating units, wherein X represents 1-6 and wherein some
positions may be absent

<400> 117

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser

35 40 45

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser
65 70 75 80

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly

100 105 110

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser

115 120 125

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser

130 135 140

Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser

145 150 155 160

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser

165 170 175

Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser

180 185 190

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser

195 200 205

Ser Gly

210

<210> 118

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(150)

<223> This sequence may encompass 1-30 'Gly-Gly-Gly-Gly-Ser' repeating units wherein some positions may be absent

<400> 118

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150

<210> 119
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(30)
<223> May or may not be present wherein some positions may be

absent
<400> 119
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30
<210> 120
<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 120

Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser

1 5 10

<210> 121

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 121

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly

1 5 10

<210> 122

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 122

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 123

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 123

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 124

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 124

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe

1 5 10

<210> 125

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 125

Ser Arg Ser Ser Gly

1 5

<210> 126

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 126

Ser Gly Ser Ser Cys

1 5

<210> 127

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 127

Ala Met Gly Arg Ser Gly Gly Gly Cys Ala Gly Asn Arg Val Gly Ser

1 5 10 15

Ser Leu Ser Cys Gly Gly Leu Asn Leu Gln Ala Met

20 25

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 128

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 129

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 129

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 130

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 130

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 131

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 131

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 132

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 133

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 133

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 134

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 134

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 135

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 135

Asp Ser Lys Lys Pro

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 136

Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr

1 5

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 137

Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala

1 5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 138

Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val

1 5

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 139

Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu

1 5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 140

Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

1 5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 141

Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg

1 5

<210> 142

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 142

Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu

1 5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 143

Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr

1 5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 144

Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 145

Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp

1 5

<210> 146

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 146

His His His His His His

1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 147

Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn

1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 148

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn

1 5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 149

Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr

1 5

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 150

Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg

1 5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 151

Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile

1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 152

Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

1 5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 153

Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr

1 5

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 154

Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu

1 5

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 155

Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg

1 5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 156

Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 157

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 157

Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn

1 5 10

<210> 158

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 158

His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

1 5 10