

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 12월 5일 (05.12.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/248286 A1

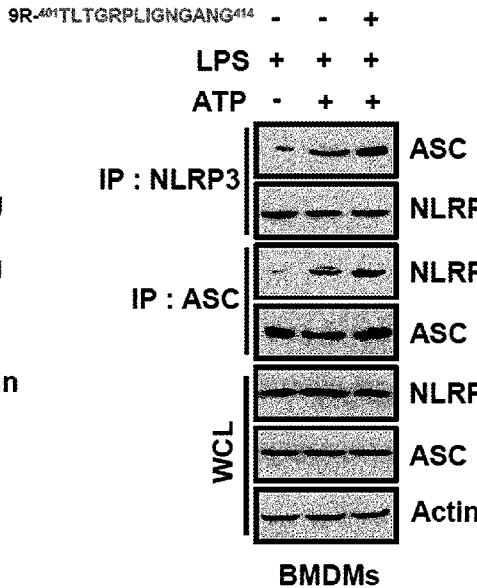
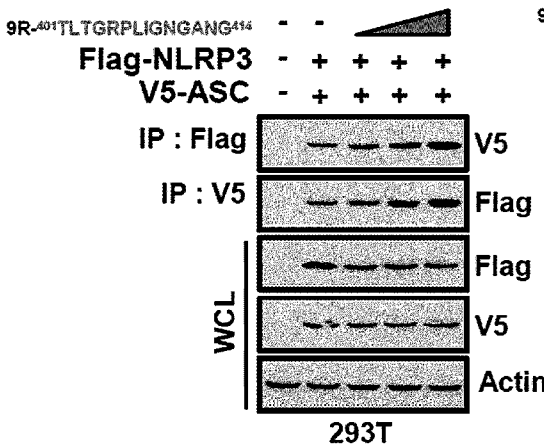
- (51) 국제특허분류: *C07K 14/35* (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/003333
- (22) 국제출원일: 2024년 3월 18일 (18.03.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2023-0070608 2023년 6월 1일 (01.06.2023) KR
10-2023-0103350 2023년 8월 8일 (08.08.2023) KR
- (71) 출원인: 한양대학교 에리카산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS) [KR/KR]; 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학로 55, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 양철수 (YANG, Chul Su); 15483 경기도 안산시 단원구 광덕동로 26 116-1102, Gyeonggi-do (KR). 김효근 (KIM, Hyo Keun); 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학로 55, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 인큐브 (INCUBE PATENT AND LAW FIRM); 06174 서울특별시 강남구 테헤란로104길 12, 301호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING CANCER COMPRISING POLYPEPTIDE DERIVED FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

(54) 발명의 명칭: 결핵균 유래 폴리펩타이드를 포함하는 암 치료용 약학 조성물

Rv0747-ASC peptide

R9(RRRRRRRRRR)-Rv0747⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴



(57) Abstract: The present invention relates to a polypeptide derived from Mycobacterium tuberculosis, or a variant thereof, and a pharmaceutical composition for treating cancer, the composition comprising same. The pharmaceutical composition according to the present invention specifically binds to ASC to induce multimerization of the ASC, thereby activating NLRP3 inflammasome, and thus can be applied as an anticancer agent.

(57) 요약서: 본 발명은 결핵균 유래의 폴리펩타이드 또는 이의 변이체 및 이를 포함하는 암 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 약학 조성물은 ASC에 특이적으로 결합하여 ASC의 다량체화를 유도하고, 이에 따라 NLRP3 인플라마솜을 활성화시킴으로써 항암제로서 적용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2024/248286 A1

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 결핵균 유래 폴리펩타이드를 포함하는 암 치료용 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 ASC에 특이적으로 결합하는 결핵균 유래의 폴리펩타이드, 및 이를 포함하는 암 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 인간에서 200가지 이상의 암이 발견된 것으로 알려져 있다. 암으로 인해 전 세계적으로 매년 수백만명이 사망하며, 인구 노령화에 의해 암 발생률도 증가하는 추세이다. 항암제는 기술의 발전에 따라 그 형태가 변화되어 왔으며, 흔히 화학 항암제를 1세대 항암제로, 표적 항암제를 2세대 항암제로, 면역 항암제를 3세대 항암제로, 대사 항암제를 4세대 항암제 구분한다. 1세대 항암제는 세포 독성을 나타내는 물질 또는 생체 신호에 작용하는 물질을 투여함으로써 암 세포 또는 암 조직을 사멸시키는 원리로 작동하며, 대사저해제, 알킬화제, 백금화제, 항생제, 호르몬 요법제 등이 사용되는데, 정상 조직에도 작용할 수 있기 때문에 다양한 부작용이 발생하는 문제가 존재한다. 표적 항암제는 암세포에만 특이적으로 작용하게 함으로써 부작용을 최소화하고자 개발되었으나, 표적이 제한적이고, 치료제 내성이 발생하는 문제가 존재하였다. 이에 따라, 타고난 면역 작용을 개선 시킴으로써 암세포를 제거하는 면역 항암제, 및 암세포에 영양 공급을 차단하는 등으로 암세포를 제거하는 대사 항암제 등이 제안되었다.
- [4] ASC 또는 PYCARD 단백질은 화학 항암제가 처리된 인간 백혈병 세포에서 응집체 형태로 발견되었다. 많은 종양 환자에서 ASC가 메틸레이션되어 세포 사멸 및 종양 억제자로서의 ASC의 역할이 억제되는 것으로 알려졌다. 결과적으로, ASC는 염증성 사이토카인인 IL-1 β 및 IL-18의 분비를 매개하는 NLRP3 인플라마솜 복합체 형성에 중요한 단백질인 것으로 확인된 바 있다.
- [5] 한편, 인간의 NLRP3 인플라마솜 신호는 유전자 발현에 영향을 미치며 궁극적으로 활성화로 이어질 수 있는 유전적 다형성 및 돌연변이와 같은 다양한 요인에 의해 제어된다. 이러한 효과는 염증성 질환 환자에서 발견되었다 (erma D, Saerndahl E, Andersson H, Eriksson P, Fredrikson M, Joensson JI, et al. The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1 β and IL-18 production. *LoS one*. 2012) :e34977.; Touitou I, Lesage S, McDermott M, Cuisset L, Hoffman H, Dode C, et al. Infefers: an evolving mutation database for auto-inflammatory syndromes. *Hum Mutat*. (2004) 24:194-8.; Levy R, Geerard L, Kuemmerle-Deschner J, Lachmann HJ, Konee-Paut I, Cantarini L, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of cryopyrin-associated periodic

syndrome: a series of 136 patients from the Eurofever Registry. *Ann Rheum Dis.* (2015) 74:2043-9.; Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet.* (2001) 29:301-5.). 유사하게, NLRP3 인플라마솜과 관련된 유전적 다형성도 암과 관련이 있다. 예를 들어, NLRP3 유전자의 SNP(single-nucleotide polymorphism), Q705K(rs35829419)는 침윤성 결장직장암 환자의 생존율 저하와 관련이 있고 (Ungerbaeck J, Belenki D, Jawad ul-Hassan A, Fredrikson M, Franseen K, Elander N, et al. Genetic variation and alterations of genes involved in NFκB/TNFAIP3- and LRP3-inflammasome signaling affect susceptibility and outcome of colorectal cancer. *carcinogenesis.* 2012) 3:2126-34), 스웨덴 남성의 산발성 전이성 흑색종의 위험 대립 유전자로 추정되었으며 (Verma D, Bivik C, Farahani E, Synnerstad I, Fredrikson M, Enerbaeck C, et al. Inflammasome polymorphisms confer susceptibility to sporadic malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* (2012) 25:506-13), 췌장암 환자에서도 높은 빈도로 발생하였다 (Miskiewicz A, Szparecki G, Durlik M, Rydzewska G, Ziobrowski I, Goerska R. The Q705K and F359L single-nucleotide polymorphisms of NOD-like receptor signaling pathway: association with chronic pancreatitis, pancreatic cancer, and periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* (2015) 63:485-94). 또한 NLRP3 다형성(rs10754558 및 rs4612666)을 가진 사람들은 *Helicobacter pylori*에 감염되었을 때 위암에 더 취약한 것으로 나타났다 (Castano-Rodriguez N, Kaakoush NO, Goh KL, Fock KM, Mitchell HM. The NOD-like receptor signalling pathway in *Helicobacter pylori* infection and related gastric cancer: a case-control study and gene expression analyses. *PLoS One.* (2014) 9:e98899). 혈액 악성 종양에서 IL-1β 및 IL-18에만 국한된 다형성은 AML 및 만성 골수성 백혈병(CML)의 임상 및 병태생리학적 특성과 관련이 있는 것으로 나타났다 (Zhang A, Yu J, Yan S, Zhao X, Chen C, Zhou Y, et al. The genetic polymorphism and expression profiles of NLRP3 inflammasome in patients with chronic myeloid leukemia. *Hum Immunol.* (2018) 79:57-62; Wang H, Hua M, Wang S, Yu J, Chen C, Zhao X, et al. Genetic polymorphisms of IL-18 rs1946518 and IL-1β rs16944 are associated with prognosis and survival of acute myeloid leukemia. *Inflamm Res.* (2017) 66:249-58). 또한, 유전자 발현 프로파일링을 활용한 연구에서는 여러 암에서 NLRP3 인플라마솜의 상향 조절을 보고하였다. 예를 들어, NLRP3는 정상 조직에 비해 HNSCC, LSCC 및 편평 세포 암종 조직에서 과발현되며 종종 불량한 예후 및 병리와 관련이 있고 (Chen L, Huang CF, Li YC, Deng WW, Mao L, Wu L, et al. Blockage of the NLRP3 inflammasome by MCC950 improves anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Mol Life Sci.* (2018) 75:2045-58; Xue Y, Du H-D, Tang D, Zhang D, Zhou J, Zhai C-W, et al. Correlation between the NLRP3 inflammasome and the prognosis of patients

with LSCC. *Front Oncol.* (2019) 9:588; Wu CS, Chang KP, OuYang CN, Kao HK, Hsueh C, Chen LC, et al. ASC contributes to metastasis of oral cavity squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* (2016) 7:50074-85), 방광암에서는 NLRP3 인플라마솜의 높은 발현도 발견되어 진단을 위한 잠재적인 바이오마커가 될 수 있음을 확인하였다(Poli G, Brancorsini S, Cochetti G, Barillaro F, Egidi MG, Mearini E. Expression of inflammasome-related genes in bladder cancer and their association with cytokeratin 20 messenger RNA. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* (2015) 33:505.e1-e7).

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명은 NLRP3 인플라마솜을 활성화시킴으로써 암을 치료할 수 있는 폴리펩타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 발명은 ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD)에 특이적으로 결합하는, 서열번호 1로 표시되는 서열을 포함하는 폴리펩타이드 또는 이의 변이체를 제공한다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 서열로 구성되고, 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 변이체는 서열번호 1의 2번째, 7번째, 10번째, 및 13번째 아미노산을 제외한 위치에서 보존적 치환을 포함할 수 있으며, 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2로 표시되는 서열을 포함하고, 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 보존적 치환은 T1S, T3S, G4A, R5K, I8V, G9A, G11A, A12G, 및 G14A로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나, 또는 T1S, T3S, G4A, R5K, I8L, G9A, G11A, A12G, 및 G14A로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나이다.

[10] 본 발명에서는 상기의 폴리펩타이드 또는 이의 변이체를 포함하는, ASC 특이적 결합 분자를 제공한다.

[11] 본 발명에서 상기의 폴리펩타이드 또는 변이체를 포함하는, 암 치료용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 암은 염증성 대장암, 결장직장암, 흑색종, 또는 간세포암일 수 있다.

[12] 본 발명에서 상기의 폴리펩타이드 또는 변이체를 발현하는 핵산 분자를 제공한다.

[13] 본 발명에서는 상기의 핵산 분자를 포함하는, 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[14] 본 발명에서는 상기의 핵산 분자를 포함하는, 재조합 벡터를 제공한다.

[15] 본 발명에서는 상기의 핵산 분자를 포함하는, 숙주 세포를 제공한다.

[16]

발명의 효과

- [17] 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 ASC 단백질에 특이적으로 결합함으로써 ASC의 다량체화를 유도하고, 이를 통해 NLRP3 인플라마솜을 활성화한다. 따라서 본 발명에 따른 폴리펩타이드, 또는 이의 변이체, 또는 이를 발현하는 핵산 분자는 항암제로서 이용 가능하다.

[18]

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1a는 Rv0747/PE_PGRS10 단백질이 ASC와 상호작용함을 확인한 결과이고, 도 1b는 Rv0747/PE_PGRS10 단백질과 ASC의 상호작용하는 도메인을 확인한 결과, 도 1c는 ASC와 상호작용하는 Rv0747/PE_PGRS10 단백질의 서열을 확인한 결과, 및 도 1d는 ASC와 상호작용하는 14개의 아미노산으로 구성된 펩타이드의 서열을 나타낸 것이다.
- [20] 도 2a는 본 발명에 따른 펩타이드를 처리함으로써 NLRP3와 ASC의 결합이 증가함을 확인한 결과, 도 2b는 본 발명에 따른 펩타이드를 처리함으로써 IL-1 β 및 IL-18의 분비를 증가시킴을 확인한 결과, 도 2c는 본 발명에 따른 펩타이드를 처리함으로써 caspase-1 분비를 증가시킴을 확인한 결과, 도 2d는 본 발명에 따른 펩타이드를 처리함으로써 ASC의 올리고머화가 증가된 결과, 및 E는 본 발명에 따른 펩타이드를 처리함으로써 세포 내 올리고머화된 ASC의 비율이 증가함을 확인한 결과이다.
- [21] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드와 ASC의 결합에 관여하는 아미노산을 확인한 결과이다.

[22]

발명의 실시를 위한 형태

- [23] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [24] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [25] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다.

또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.

[26]

[27] NLRP3 인플라마솜(inflammasome)은 선천적 면역 체계와 염증 신호를 조절하는 데에 중추적인 역할을 하는 다중 단백질 복합체이다. PAMP (pathogen-associated molecular pattern) 및 DAMP (damage-associated molecular pattern)에 의해 활성화되면, NLRP3는 올리고머화되어 전 염증성 사이토카인인 IL-1 β 및 IL-18의 처리 및 방출을 시작시키는 caspase-1을 활성화시킨다.

[28] NLRP3 인플라마솜은 항-종양 활성을 갖는다. NLRP3 인플라마솜이 종양 세포에 대한 IFN- γ 생성 T 림프구의 수치상 세포 매개 프라이밍에 필요하다고 보고하였다 (Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* (2009) 15:1170-8.). NLRP3 inflammasome은 대장염 관련 암에서 종양 형성의 음성 조절자 역할을 하는 것으로 보이며(Allen IC, TeKippe EM, Woodford R-MT, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med.* (2010) 207:1045-56.), 이는 장의 항상성 조절 및 결과적으로 대장염에 대한 보호에서 NLRP3 inflammasome이 중요한 역할을 한다는 사실이 보고되었다 (Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity.* (2010) 32:379-91). 또한, NLRP3 인플라마솜이 결핍된 경우, 결장직장암에서 종양을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, NLRP3 inflammasome 매개 IL-18 생성이 간에서 결장직장암 전이 성장을 억제한다고 보고된 바 있다 (Dupaul-Chicoine J, Arabzadeh A, Dagenais M, Douglas T, Champagne C, Morizot A, et al. The Nlrp3 inflammasome suppresses colorectal cancer metastatic growth in the liver by promoting natural killer cell tumoricidal activity. *Immunity.* (2015) 43:751-63.). NLRP3/IL-18 매개 IL-22BP의 하향 조절은 염증 피크 동안 장 조직 손상에 대한 보호 역할을 제공한다 (Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, Huber FJ, Bosurgi L, Hu B, et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature.* (2012) 491:259-63.). 흑색종에서 TME의 NLRP3는 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 이동을 지원하여 T 세포 반응을 억제함으로써 암 백신에 대한 항종양 면역 반응을 약화시키는 것으로 나타났다(Van Deventer HW, Burgents JE, Wu QP, Woodford RMT, Brickey WJ, Allen IC, et al. The inflammasome component Nlrp3 impairs antitumor vaccine by enhancing the accumulation of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* (2010) 70:10161-9.).

- [29] 본 발명은 ASC(Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD)에 특이적으로 결합하며, NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) 인플라마좀(inflammasome)을 활성화시킴으로써 항암제로서 사용 가능한 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*) 유래의 펩타이드를 제공한다. 더욱 구체적으로, 본 발명에 따른 펩타이드는 결핵균의 Rv0747/PE_PGRS10 (서열번호 2)에서 유래된 것이다. 야생형 Rv0747/PE_PGRS10은 801개의 아미노산으로 구성되어 있다. 본 발명에서는 ASC에 특이적으로 결합하는, Rv0747/PE_PGRS10의 401번째 아미노산부터 414번째 아미노산으로 구성된, TLTGRLIGNGANG 서열(서열번호 1)의 펩타이드를 제공한다. 전장 Rv0747/PE_PGRS10을 인코딩하는 DNA 서열은 서열번호 4로, 서열번호 2를 인코딩하는 DNA 서열은 서열번호 3으로 표시한다.
- [30] ASC(NP_037390)는 PYCARD로도 명명되며, N-말단의 PYD (PYRIN-PAAD-DAPIN) 도메인 및 C-말단의 CARD (caspase-recruitment domain) 도메인으로 구성된다. PYD 및 CARD 도메인은 caspase의 활성화를 통해 염증 및 세포사멸 신호 경로에서 거대한 신호 전달 복합체의 조립을 매개하는 6-나선 번들 사멸 도메인 접힘 슈퍼패밀리의 구성원이다. 정상 세포에서 이 단백질은 세포질에 위치되어 있으나, 세포 사멸을 겪는 세포에서는 핵 주변 근처에서 공 모양의 응집체를 형성한다. ASC 단백질은 195개의 아미노산으로 구성되어 있다.
- [31] 본 발명에 따른 상기의 펩타이드가 ASC에 결합되면, ASC는 다량체화 또는 폴리머화되고, 이는 NLRP3 인플라마좀의 활성화를 유도하고, IL-1 β 및/또는 IL-18, 및 caspase-1의 분비를 특이적으로 증가시킴으로써 암 세포의 사멸을 유도한다.
- [32] 아미노산 서열 (펩타이드 또는 단백질)과 관련하여, "단편"은 아미노산 서열의 일부를 의미하며, 즉 N-말단 및/또는 C-말단에서 잘려진 아미노산 서열을 나타내는 서열을 의미한다. C-말단에서 잘려진 단편 (N-말단 단편)은, 예를 들어, 오픈 리딩 프레임의 3'-말단이 결핍된 절단된 오픈 리딩 프레임을 번역함으로써, 수득 가능하다. N-말단에서 잘려진 단편 (C-말단 단편)은, 절단된 오픈 리딩 프레임이 번역을 개시하는 역할을 하는 개시 코돈을 포함하는 한, 예를 들어, 오픈 리딩 프레임의 5'-말단이 결핍된 절단된 오픈 리딩 프레임을 번역함으로써, 수득 가능하다. 아미노산 서열의 단편은, 예를 들어, 아미노산 서열로부터 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%의 아미노산 잔기들을 포함한다. 아미노산 서열의 단편은 바람직하게는 아미노산 서열로부터 적어도 6개, 특히 적어도 8개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 50개 또는 적어도 100개의 연속적인 아미노산을 포함한다.
- [33] 폴리펩타이드 또는 단백질의 "변형체(variant)", "변이체" 또는 "변이체 단백질" 또는 "변이체 폴리펩타이드"는 폴리펩타이드 또는 단백질로부터 유래하고 상기 폴리펩타이드 또는 단백질의 적어도 하나의 생물학적 특성을 유지하고 있는 임의의 유사체, 단편, 유도체 또는 돌연변이를 지칭한다. 상기 폴리펩타이드 또는 단백질의 상이한 변형체들이 자연 내에 존재할 수 있다. 이들 변형체들은 단백질을 암호화하는 구조 유전자의 뉴클레오타이드 서열이 다른 것에 특징

이 있는 대립 유전자의 변이일 수 있거나, 차별적 스플라이싱 또는 번역 후 수식(modification)을 포함할 수 있다. 숙련된 당업자는 하나 또는 복수의 아미노산 치환, 결손, 부가 또는 대체를 갖는 변이체를 생성할 수 있다. 이들 변이체들은 그중에서도: (a) 하나 이상의 아미노산 잔기들이 보존적 또는 비보존적 아미노산들로 치환된 변이체, (b) 하나 이상의 아미노산이 폴리펩타이드 또는 단백질에 부가된 변이체, (c) 아미노산 중 하나 이상이 치환기를 포함하는 변이체, 및 (d) 폴리펩타이드 또는 단백질이 혈청 알부민과 같은 또 다른 폴리펩타이드와 융합된 변이체를 포함할 수 있다.

- [34] 또한 보존적 변이체는 단백질의 생물학적 기능에 불리한 영향을 미치지 않는 서열 변경을 가진 아미노산 서열을 의미한다. 변경된 서열이 단백질과 관련된 생물학적 기능을 방해하거나 파괴하는 경우, 치환, 삽입 또는 결실이 단백질에 불리한 영향을 미친다고 기재된다. 예를 들어, 단백질의 총 전하, 구조 또는 소수성-친수성은 생물학적 활성에 불리한 영향을 미치지 않으면서 변경될 수 있다. 따라서, 아미노산 서열은 예를 들어, 단백질의 생물학적 활성에 불리한 영향을 미치지 않으면서 펩타이드가 보다 높은 소수성 또는 친수성을 나타내도록 변경될 수 있다. 유전적(억제, 결손, 돌연변이 등), 화학적 및 효소적 기술들을 포함하는, 이러한 변형체를 수득하는 기술들이 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 알려져 있다.
- [35] 본원에서 사용된 것과 같은 "모 폴리펩타이드", "모 단백질", "전구체 폴리펩타이드" 또는 "전구체 단백질"은 향후 변형되어 변이체를 만드는, 변형되지 않은 폴리펩타이드를 의미한다. 모 폴리펩타이드는 야생형 폴리펩타이드, 또는 야생형 폴리펩타이드의 변이체 또는 조작된 버전일 수 있다.
- [36] 본원에서 "야생형" 또는 "WT" 또는 "천연 (native)"은 대립유전자 변형을 비롯하여, 자연계에서 발견되는 아미노산 서열을 의미한다. 야생형 단백질 또는 폴리펩타이드는 의도적으로 변형되지 않은 아미노산 서열을 가진다.
- [37] 본 명세서의 목적에서, 아미노산 서열 (펩타이드, 단백질 또는 폴리펩타이드)의 "변이체"는 아미노산 삽입 변이체, 아미노산 부가 변이체, 아미노산 결손 변이체 및/또는 아미노산 치환 변이체를 포함한다. 용어 "변이체"는 모든 스플라이스 변이체, 번역 후 변형된 변이체, 입체구조 (conformations), 이소형 및 종 상동체 (species homolog), 특히 세포에 의해 천연적으로 발현되는 것을 포함한다. 용어 "변이체"는, 특히, 아미노산 서열의 단편을 포함한다.
- [38] 아미노산 삽입 변이체는 특정 아미노산 서열에 하나 또는 2 이상의 아미노산의 삽입을 포함한다. 삽입을 갖는 아미노산 서열 변이체의 경우, 수득되는 산물에 대한 적절한 스크리닝을 이용한 무작위 삽입도 가능하지만, 아미노산 서열에서 특정 부위에 하나 이상의 아미노산 잔기가 삽입된다. 아미노산 부가 변이체는, 예를 들어 아미노산 1개, 2개, 3개, 5개, 10개, 20개, 30개, 50개 또는 그 초과와 같은 하나 이상의 아미노산의 아미노- 및/또는 카르복시-말단 융합을 포함한다. 아미노산 결손 변이체는 1개, 2개, 3개, 5개, 10개, 20개, 30개, 50개 또는 그 이상의

아미노산의 제거와 같이, 서열로부터 하나 이상의 아미노산의 제거를 특징으로 한다. 결손은 단백질의 임의의 위치일 수 있다. 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 결손을 포함하는 아미노산 결손 변이체는 N-말단 및/또는 C-말단 절단 변이체(truncation variant)로도 지칭된다. 아미노산 치환 변이체는 서열에서 하나 이상의 잔기를 제거하고 그 위치에 다른 잔기를 삽입하는 것을 특징으로 한다. 상동적인 단백질들 또는 펩타이드들 간에 보존되지 않은 아미노산 서열에서 변형이 위치하는 것 및/또는 아미노산을 유사한 특성의 다른 아미노산으로 치환하는 것이 선호된다.

- [39] 특히 본 발명에 따른 폴리펩타이드에서 서열번호 1의 2번째, 7번째, 10번째, 및 13번째 아미노산을 제외한 위치에서 보존적 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 포함되는 변이체는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열과 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질이며, 이는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는 단백질과 기능적 동일성을 유지한다.
- [40] 바람직하게는, 펩타이드 및 단백질 변이체에서 아미노산 변화는 보존적 아미노산 변화, 즉 유사하게 하전되거나 비-하전된 아미노산의 치환이다. 보존적 아미노산 변화는 측쇄와 비슷한 아미노산 계열 중 하나의 치환과 관련된다. 자연 발생 아미노산은 일반적으로 4가지 계열로 나뉜다: 산성 (아스파테이트, 글루타메이트), 염기성 (라이신, 아르기닌, 히스티딘), 비-극성 아미노산 (알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 및 비-하전된 극성 아미노산 (글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신). 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 때때로 방향족 아미노산으로 같이 분류된다. 일 구현예에서, 보존적인 아미노산 치환은 다음과 같은 군 내에서 치환을 포함한다:
- [41] 글리신, 알라닌;
- [42] 발린, 이소루신, 루신;
- [43] 아스파르테이트, 글루타메이트;
- [44] 아스파라긴, 글루타민;
- [45] 세린, 트레오닌;
- [46] 라이신, 아르기닌; 및
- [47] 페닐알라닌, 티로신.
- [48] 본 발명의 일 실시예에서, 서열번호 1에서 1번 위치의 트레오닌이 세린으로 치환(T1S)되고/거나; 3번 위치의 트레오닌이 세린으로 치환(T3S)되고/거나; 4번 위치의 글리신이 알라닌으로 치환(G4A)되고/거나; 5번 위치의 아르기닌이 라이신으로 치환(R5K)되고/거나; 8번 위치의 이소루신이 발린(I8V) 또는 루신(I8L)으로 치환되고/거나; 9번 위치의 글리신이 알라닌으로 치환(G9A)되고/거나; 11번 위치의 글리신이 알라닌으로 치환(G11A)되고/거나; 12번 위치의 알라닌이 글리신

으로 치환(A12G)되고 거나; 14번 위치의 글리신이 알라닌으로 치환(G14A)된, 보존적 치환을 포함하는 변이체를 제공한다.

[49]

[50] 용어 “산성 아미노산 잔기”는 바람직하게 글루탐산 (글루타메이트, Glu) 또는 아스파르트산 (아스파르테이트, Asp), 특히 글루탐산과 관련된다. 용어 “염기성 아미노산 잔기”는 라이신 (Lys) 또는 아르기닌 (Arg), 특히 라이신과 관련된다.

[51] 바람직하게는, 주어진 아미노산 서열과, 상기 주어진 아미노산 서열의 변이체인 아미노산 서열 간의 유사성, 바람직하게는 동일성 정도는 적어도 약 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%일 것이다. 유사성 또는 동일성 정도는 바람직하게는 참조 아미노산 서열의 전장의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 100%인 아미노산 영역에 대해 제공된다. 예를 들어, 참조 아미노산 서열이 200 아미노산으로 구성된다면, 유사성 또는 동일성 정도는 바람직하게는 적어도 약 20개, 적어도 약 40개, 적어도 약 60개, 적어도 약 80개, 적어도 약 100개, 적어도 약 120개, 적어도 약 140개, 적어도 약 160개, 적어도 약 180개 또는 약 200개 아미노산, 바람직하게는 연속적인 아미노산들에 대해 제공된다. 바람직한 구현예에서, 유사성 또는 동일성 정도는 참조 아미노산 서열의 전장에 대해 제공된다. 서열 유사성, 바람직하게는 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 당해 기술 분야에 공지된 도구를 사용해, 바람직하게는 최상의 서열 정렬, 예를 들어, Align을 사용해, 표준 설정 조건으로, 바람직하게는 EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5 하에 수행할 수 있다.

[52] “서열 유사성”은 동일하거나 보존적 아미노산 치환을 나타내는 아미노산의 백분율을 나타낸다. 2개의 아미노산 서열 간의 “서열 동일성”은 서열 간에 동일한 아미노산의 백분율을 나타낸다.

[53] 용어 “동일성 %”는 최상으로 정렬하여 획득되는, 비교되는 2개의 서열 간에 동일한 아미노산 잔기의 백분율을 나타내는 것으로 의도되며, 이 백분율은 순전히 통계적이며, 두 서열 간의 차이는 무작위로, 그리고 전장에 걸쳐 분포된다. 2개의 아미노산 서열 간의 서열 비교는 통상적으로 이들 서열을 최적으로 정렬한 후 비교함으로써 수행되며, 상기 비교는 서열 유사성의 국소 영역을 식별 및 비교하기 위해 세그먼트 또는 “비교 창”에 의해 수행된다. 비교하기 위한 서열의 최적 정렬은 수동 외에도 Smith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482의 국소 상동성 알고리즘 수단을 이용하거나, Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443의 국소 상동성 알고리즘의 수단을 이용하거나, Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444의 유사성 검색 방법의 수단을 이용하거나, 또는 이들 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 프로그램 (위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지

지의 GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N 및 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)을 이용하여, 생성할 수 있다.

- [54] 동일성 %는 2개의 서열 간의 동일성 %를 구하기 위해 비교되는 2개의 서열 간에 동일한 위치의 수를 결정한 다음 이 숫자를 비교한 위치의 수로 나눈 후 수득된 결과에 100을 곱하여 계산한다.
- [55] 상동성 아미노산 서열은 본 명세서에 따르면 아미노산 잔기들에 대해 적어도 40%, 특히 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 및 바람직하게는 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 나타낸다.
- [56] 본원에 기술된 아미노산 서열 변이체는 당해 기술 분야의 당업자에 의해, 예를 들어, 재조합 DNA 조작에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 치환, 부가, 삽입 또는 결손을 가진 펩타이드 또는 단백질을 제조하기 위한 DNA 서열의 조작은 예를 들어 Sambrook et al. (1989)에 상세하게 기술되어 있다. 또한, 본원에 기술된 펩타이드 및 아미노산 변이체는, 예를 들어 고상 합성 및 유사 방법과 같은, 공지된 펩타이드 합성 기법의 도움을 받아 쉽게 제조할 수 있다.
- [57] 일 구현예에서, 아미노산 서열 (펩타이드 또는 단백질)의 단편 또는 변이체는 바람직하게는 "기능성 단편" 또는 "기능성 변이체"이다. 아미노산 서열의 "기능성 단편" 또는 "기능성 변이체"라는 용어는 이것이 유래되는 아미노산 서열과 동일한 또는 비슷한 하나 이상의 기능적 특성을 나타내는 임의의 단편 또는 변이체에 관한 것이고, 즉 기능적 등가체이다.
- [58] 용어 "기능성 단편" 또는 "기능성 변이체"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 특히 모 분자 또는 서열의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 변경된 아미노산 서열을 포함하고 모 분자 또는 서열의 하나 이상의 기능들, 예를 들어, 표적 분자에 결합 또는 표적 분자에 결합에 기여를 여전히 수행할 수 있는 변이체 분자 또는 서열을 의미한다. 일 구현예에서, 모 분자 또는 서열의 아미노산 서열에서 변형은 분자 또는 서열의 결합 특징에 유의미하게 영향을 미치거나 변경하지 않는다. 다른 구현예에서, 기능성 단편 또는 기능성 변이체의 결합은 감소될 수 있지만 여전히 유의미하게 존재하고, 예를 들어, 기능성 변이체의 결합은 모 분자 또는 서열의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%일 수 있다. 그러나, 다른 구현예에서, 기능성 단편 또는 기능성 변이체의 결합은 모 분자 또는 서열에 비하여 증가될 수 있다.
- [59]
- [60] 지정된 아미노산 서열 (펩타이드, 단백질 또는 폴리펩타이드)"로부터 유래되는" 아미노산 서열 (펩타이드, 단백질 또는 폴리펩타이드)은 제1 아미노산 서열의 기원을 의미한다. 바람직하게는, 특정 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열은 이 특정 서열 또는 이의 단편과 동일한, 본질적으로 동일한 또는 상동성인 아미노산 서열을 가진다. 특정 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열은 이 특정 서열 또는 이의 단편의 변이체일 수 있다. 예를 들어, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본원에서 사용하기에 적합한 Rv0747/PE_PGRS10이 이

들로부터 유래된 자연적으로 발생되거나 천연의 서열로부터 서열에서는 변형되지만 천연 서열의 요망되는 활성은 유지되도록 변경될 수 있음을 이해할 것이다.

- [61] “분리된”은 자연적 상태에서부터 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에서 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩타이드는 “분리된”이 아니지만, 이의 자연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩타이드는 “분리된”이다. 분리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들어, 숙주 세포와 같은 비-자연적 환경에 존재할 수 있다.
- [62]
- [63] 본 발명의 맥락에서 용어 “재조합”은 “유전적 조작을 통해 만들어진”을 의미한다. 바람직하게, 본 발명의 맥락에서 재조합 세포와 같은 “재조합 대상”은 자연적으로 발생되지 않는다.
- [64] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 “자연적으로 발생한”은 대상이 자연계에서 발견될 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들어, 유기체 (바이러스 포함) 내에 존재하고 자연계 내 공급원으로부터 분리될 수 있고 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 펩타이드 또는 핵산은 자연적으로 발생한 것이다.
- [65] 용어 “유전적 변형”은 핵산으로 세포를 형질감염시키는 것을 포함한다. 용어 “형질감염”은 핵산, 특히 RNA의 세포로의 도입에 관한 것이다. 본 발명의 모든 목적을 위하여, 용어 “형질감염”은 또한 핵산의 세포에의 도입 또는 이러한 세포에 의해 핵산의 섭취를 포함한다. 형질감염의 일부 적용의 경우, 만약 형질감염된 유전 물질이 일시적으로만 발현된다면 충분하다. RNA는 세포에 형질감염되어 이의 암호화된 단백질을 일시적으로 발현할 수 있다. 형질감염 과정에서 도입된 핵산은 일반적으로 핵 유전체에 삽입되지 않기 때문에, 외래 핵산은 유사 분열을 통해 희석되거나 분해될 것이다. 핵산의 에피솜성 증폭이 가능한 세포는 희석 비율을 현저하게 감소시킨다. 만약 형질감염된 핵산이 사실상 세포 및 이의 자세포에 잔존한다면, 안정한 형질감염이 반드시 일어나야 한다. 이러한 안정한 형질감염은 형질감염을 위한 바이러스-기반 시스템 또는 트랜스포존-기반 시스템을 사용함으로써 달성할 수 있다. 일반적으로, 유전적으로 변형되어 수용체 폴리펩타이드 및/또는 항원 수용체를 발현하는 세포는 수용체 폴리펩타이드를 엔코딩하는 핵산 및/또는 항원 수용체를 엔코딩하는 핵산으로 안정적으로 형질감염되는 반면, 일반적으로 리간드 폴리펩타이드를 엔코딩하는 핵산 및/또는 항원을 엔코딩하는 핵산은 일시적으로 세포 내로 형질감염 된다.
- [66] “핵산”, “핵산 분자”, “올리고뉴클레오타이드” 및 “폴리뉴클레오타이드”는 상호교환적으로 사용되고, 단일 가닥 형태나 이중 가닥 나선(helix)으로의 리보뉴클레오사이드(아데노신, 구아노신, 우리딘 또는 시티딘; “RNA 분자”) 또는 데옥시리보뉴클레오사이드(데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시티민 또는 데옥시시티딘; “DNA 분자”)의 인산 에스테르의 중합체 형태 또는 포스포로티오에이트

(phosphorothioate) 및 티오에스테르와 같은 이의 임의의 인산 에스테르 유사체를 지칭한다. 이중 나선 DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 나선이 가능하다. 용어 핵산 분자, 및 특히 DNA 또는 RNA 분자는 상기 분자의 일차 및 이차 구조만을 지칭하며 어느 특정 삼차 형태에 제한하지는 않는다. 따라서, 이 용어는 그 중에서도 선형 또는 환형 DNA 분자(예컨대, 제한효소 단편), 플라스미드, 초나선형(supercoiled) DNA 및 염색체로 발견되는 이중 가닥 DNA를 포함한다. 특정 이중 가닥 DNA 분자의 구조를 논할 때, 서열을 전사되지 않은 DNA 가닥(즉, mRNA에 일치하는 서열을 갖는 가닥)을 따라 5'에서 3' 방향으로만 제시하는 일반적인 규약에 따라 본 명세서에 서열이 기술될 수 있다. "재조합 DNA 분자"는 분자 생물학적 조작을 거친 DNA 분자이다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 합성 DNA 및 반합성 DNA를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [67] 핵산은 벡터 내에 포함될 수 있다. 용어 "벡터"는 본원에서 사용된 바와 같이, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 람다 파아지와 같은 파아지 벡터, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 배큘로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터, 또는 박테리아 인공 염색체 (BAC), 효모 인공 염색체 (YAC) 또는 P1 인공 염색체 (PAC)와 같은 인공적 염색체 벡터를 포함하는, 당업자에게 공지된 임의의 벡터를 포함한다. 상기 벡터는 발현뿐 아니라 클로닝 벡터를 포함한다. 발현 벡터는 플라스미드뿐 아니라 바이러스 벡터를 포함하고, 일반적으로 특정 숙주 유기체 (예를 들어, 박테리아, 효모, 식물, 곤충, 또는 포유류) 또는 *in vitro* 발현 시스템에서 작동적으로 연결된 암호 서열의 발현에 필요한 요망되는 암호 서열 및 적당한 DNA 서열을 포함한다. 클로닝 벡터는 일반적으로 특정 요망되는 DNA 단편을 조작하고 증폭하기 위해 사용되고 요망되는 DNA 단편의 발현에 필요한 기능성 서열이 없을 수 있다.
- [68] 바이러스 벡터는 살아있는 동물 대상뿐만 아니라 세포에서의 광범위한 유전자 전달 적용 분야에 사용되어 왔다. 사용될 수 있는 바이러스 벡터들은 아데노바이러스, 레트로바이러스, 백시나(vaccinia) 바이러스, 수두바이러스(poxvirus), 아데노 관련 바이러스, 단순포진바이러스(herpes simplex virus), 렌티바이러스(lentivirus), 배큘로바이러스(baculovirus), 센다이 바이러스(sendai virus), 홍역 바이러스(measles virus), 시미안 바이러스(simian virus) 40 및 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 비-바이러스성 벡터는 플라스미드, 리포플렉스(lipoplex)(양이온 리포좀-DNA 복합체), 폴리플렉스(polyplex)(양이온 중합체-DNA 복합체) 및 단백질-DNA 복합체를 포함한다. 핵산 이외에, 벡터는 핵산 전달 결과(조직으로의 전달, 발현 지속성 등)를 선별, 측정 및 추적관찰하는데 유용한 하나 이상의 조절 영역 및/또는 선별 마커를 포함할 수 있다.
- [69] 용어 "발현 벡터"는 삽입된 핵산 서열을 발현한 후 숙주를 형질전환시킬 수 있도록 고안된 벡터, 플라스미드 또는 운반체를 지칭한다. 클론된 유전자, 즉, 삽입된 핵산 서열은 일반적으로 프로모터, 최소 프로모터, 인핸서 등과 같은 조절

요소의 통제 하에 놓여진다. 원하는 숙주 세포에서의 핵산의 발현을 유도하는데 유용한 개시 조절 영역 또는 프로모터들은 무수히 많으며 본 기술분야의 숙련자들에게 잘 알려져 있다. 실질적으로 이들 유전자들의 발현을 유도할 수 있는 임의의 프로모터는 바이러스 프로모터, 박테리아 프로모터, 동물 프로모터, 포유동물 프로모터, 합성 프로모터, 구성 프로모터, 조직 특이적 프로모터, 발병(pathogenesis) 또는 질병 관련 프로모터, 발생 특이적 프로모터(developmental specific promoter), 유도성 프로모터(inducible promoter), 약하게 조절된 프로모터(light regulated promoter)를 포함하나, 이에 제한되지는 않으며; SV40 초기(SV40) 프로모터 영역, 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus, RSV)의 3' 긴 말단 반복(LTR)에 함유된 프로모터, 아데노바이러스(Ad)의 E1A 또는 주요 후기 프로모터(major late promoter, MLP), 인간 사이토메갈로바이러스(human cytomegalovirus, HCMV) 즉시 초기 프로모터(immediate early promoter), 단순 포진 바이러스(HSV) 티미딘 키나아제(TK) 프로모터, 배칼로바이러스 IE1 프로모터, 신장 인자(elongation factor) 1 알파(EF1) 프로모터, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소(GSPDH) 프로모터, 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터, 유비퀴틴 C(Ubc) 프로모터, 알부민 프로모터, 마우스 메탈로티오네인(metallothionein)-L 프로모터 및 전사 조절 영역의 조절 서열, 유비퀴틴스 프로모터(HPRT, 비멘틴(vimentin), β 액틴, 튜블린 등), 중간필라멘트(intermediate filament)(데스민(desmin), 신경미세섬유, 케라틴, GFAP 등), 치료 유전자의 프로모터(MDR, CFTR 또는 인자 VIII 형태 등의), 발병 또는 질병 관련 프로모터, 및 췌장 선방세포(pancreatic acinar cell)에서 활성인 엘라스타제(elastase) I 유전자 조절 영역과 같은, 조직 특이성을 나타내며 형질전환 동물에서 이용되어 온 프로모터; 췌장 베타 세포에서 활성인 인슐린 유전자 조절 영역, 림프계(lymphoid) 세포에서 활성인 면역글로불린 유전자 조절 영역, 고환, 유방, 림프계 및 대식 세포에서 활성인 마우스 유방암 바이러스 조절 영역; 간에서 활성인 알부민 유전자, Apo AI 및 Apo AII 조절 영역, 간에서 활성인 알파-태아단백질(fetoprotein) 유전자 조절 영역, 간에서 활성인 알파1-안티트립신 유전자 조절 영역, 골수 세포에서 활성인 베타-글로빈 유전자 조절 영역, 뇌에서의 희소돌기아교세포(oligodendrocyte cell)에서 활성인 마이엘린 염기성 단백질(myelin basic protein) 조절 영역, 골격근에서 활성인 미오신 경쇄-2 유전자 조절 영역 및 시상하부에서 활성인 생식선 자극호르몬 방출 호르몬(gonadotropic releasing hormone), 피루브산 키나아제 프로모터, 빌린(villin) 프로모터, 지방산 결합 장내 단백질의 프로모터, 평활근 세포 β 액틴의 프로모터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [70] 벡터는 본 기술분야에서 알려진 방법, 예컨대, 주사, 형질감염, 전기천공법, 미세주사(microinjection), 형질도입, 세포 융합, 리포펙션(lipofection), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973); 및 Chen과 Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752(1987)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980); Nicolau 및 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190(1982);

및 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)), DEAE-텍스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 방법, 유전자 총의 사용 또는 DNA 벡터 전달체(DNA vector transporter)에 의하여, 원하는 숙주 세포로 도입될 수 있다(e.g., Wu et al., *J. Biol. Chem.* 267:963 (1992); Wu et al., *J. Biol. Chem.* 263:14621 (1988); and Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, 참조).

- [71] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드는 리포펙션에 의해 생체 내에서 도입될 수 있다. 과거 수십년 동안, 시험관 내(in vitro) 핵산의 캡슐화 및 형질감염을 위해 리포솜의 사용이 증가해왔다. 리포솜-매개 형질감염이 맞닥뜨린 어려움과 위험을 제한하고자 고안된 합성 양이온성 지질(synthetic cationic lipid)이 유전자의 생체 내 (in vivo) 형질감염을 위한 리포솜을 제조하는데 사용될 수 있다(Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:7413 (1987); Mackey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8027 (1988); 및 Ulmer et al., *Science* 259:1745 (1993)). 양이온성 지질의 사용은 음성 전하를 띠는 핵산의 캡슐화를 촉진할 수 있고, 또한 음성 전하를 띠는 세포막과의 융합을 촉진할 수 있다(Felgner et al., *Science* 337:387 (1989)). 핵산의 전달을 위한 특히 유용한 지질 화합물 및 조성물이 WO95/18863, WO96/17823 및 U.S. 5,459,127에 기술되어 있다. 외인성(exogenous) 유전자를 생체 내(in vivo) 특정 조직 내로 도입하기 위한 리포펙션의 사용은 몇 가지 실용적인 장점이 있다. 리포솜의 특정 세포로의 분자 표적화는 한가지 영역의 이점을 제시한다. 특정 세포형으로의 직접적인 형질감염이, 체장, 간, 신장 및 뇌와 같이 세포 이질성을 갖는 조직에 특히 바람직할 것임이 분명하다. 지질은 표적화를 위해 다른 분자들과 화학적으로 결합할 수 있다(Mackey et al. 1988). 표적화된 펩타이드, 예컨대, 호르몬 또는 신경전달물질, 및 항체와 같은 단백질, 또는 비-펩타이드성 분자가 화학적으로 리포솜에 결합될 수 있다.
- [72] 양이온성 올리고펩타이드(예컨대, WO95/21931), DNA 결합 단백질로부터 유래된 펩타이드(예컨대, WO96/25508), 또는 양이온성 중합체(예컨대, WO95/21931)와 같은, 다른 분자들이 또한 생체 내 핵산의 형질감염을 용이하게 하는데 유용하다.
- [73] 생체 내(in vivo) 벡터를 순수한(naked) DNA 플라스미드로서 도입하는 것 또한 가능하다(미국 특허번호 제5,693,622호, 제5,589,466호 및 제5,580,859호 참조). 수용체-매개 DNA 전달법이 사용될 수도 있다(Curiel et al., *Hum. Gene Ther.* 3:147 (1992); and Wu et al., *J. Biol. Chem.* 262:4429 (1987)).
- [74] 본원에 기술된 핵산은 재조합 및/또는 분리된 분자일 수 있다.
- [75] 본 명세서의 맥락에서, 용어 "전사"는 DNA 서열에서 유전적 암호가 RNA로 전사되는 과정을 지칭한다. 이후 RNA는 펩타이드 또는 단백질로 번역될 수 있다.
- [76] "엔코딩"은 뉴클레오타이드의 정의된 서열 (즉, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 아미노산의 정의된 서열 및 이로부터 유래된 생물학적 특성을 가지는, 생물학적 과정에서 다른 폴리머 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서의 역할을 하도록 하

는, 유전자, cDNA 또는 mRNA와 같은, 폴리뉴클레오티드에서 뉴클레오티드의 특정 서열의 내재적 성질을 의미한다. 따라서, 만약 이 유전에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생산한다면, 유전자는 단백질을 엔코딩한다. mRNA 서열과 동일하고 일반적으로 서열 목록으로 제공되는 암호화 가닥 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위해 주형으로 사용되는 비-암호화 가닥 모두는 단백질 또는 이 유전자 또는 cDNA의 다른 산물을 엔코딩하는 것으로 언급될 수 있다.

- [77] 본 발명은 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 원핵(예를 들어, 박테리아) 및 진핵(예를 들어, 곰팡이, 효모, 동물, 곤충, 식물) 세포를 포함하며 본 발명에 따른 폴리펩타이드의 발현에 적절한 임의의 세포일 수 있다. 적절한 원핵 숙주 세포는 이.콜라이(예를 들어, DH5, HB101, JM109 또는 W3110 계통), 바실루스(*Bacillus*), 스트렙토마이시스(*Streptomyces*), 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*) 및 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 적절한 진핵 숙주 세포는 COS, CHO, HepG-2, CV-1, LLCMK2, 3T3, HeLa, RPMI8226, 293, BHK-21, Sf9, 사카로마이세스, 피치아(*Pichia*), 한센울라(*Hansenula*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 아스페르길루스(*Aspergillus*) 또는 트리코데르마(*Trichoderma*) 종을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [78] 본원에서 사용된 것과 같이 “내인성”은 유기체, 세포, 조직, 또는 시스템 내부에서 유래되거나 생산된 임의의 물질을 의미한다.
- [79] 본원에서 사용된 것과 같이 “외인성”은 유기체, 세포, 조직, 또는 시스템 외부에서 유래되거나 생산된 임의의 물질을 의미한다.
- [80] 본원에서 사용된 것과 같이 용어 “발현”은 코딩 서열에 의해 코딩된 생성물의 생물학적 생산을 지칭하는 것으로, 특정 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역으로 정의할 수 있다. 대부분의 경우에서, 코딩 서열을 포함하는 DNA 서열은 전사되어 메신저-RNA(mRNA)를 형성한다. 이어서, 상기 메신저 RNA는 번역되어 관련 생물학적 활성을 갖는 폴리펩타이드 생성물을 형성한다. 또한, 발현 과정은 RNA 전사 생성물에 대한 추가 가공 단계(예를 들면, 인트론을 제거하기 위한 스플라이싱), 및/또는 폴리펩타이드 생성물의 번역-후 가공을 포함할 수 있다.
- [81] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 “연결된”, “융합된” 또는 “융합”은 상호교환적으로 사용된다. 이들 용어는 2 이상의 요소 또는 구성성분 또는 도메인들이 함께 연결되는 것을 의미한다.
- [82]
- [83] 본원에 기술된 펩타이드, 단백질, 폴리펩타이드, RNA, RNA 입자 및 추가적인 물질, 예를 들어, 면역 체크포인트 저해제는 치료학적 또는 예방학적 치료를 위한 약학 조성물 또는 약제로 투여될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있고, 선택적으로 하나 이상의 보강제, 안정화제 등을 포함할 수 있는 임의의 적합한 약학적 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 약학 조성

물은 치료학적 또는 예방학적 치료, 예를 들어 본원에 기술된 것들과 같은 암 질환과 같은 항원이 연관된 질환을 치료 또는 예방하는 데에 사용하기 위한 것이다.

[84]

[85] 용어 "약학 조성물"은 치료학적으로 유효한 물질을, 바람직하게는 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제와 함께, 포함하는 제형에 관한 것이다. 상기 약학 조성물은, 상기 약학 조성물을 개체에 투여함으로써 질환 또는 장애의 중증도를 낮추거나, 예방하거나 또는 치료하는 데에 유용하다. 약학 조성물은 또한 약학적 제형으로서 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 본 발명의 맥락에서, 약학 조성물은 본원에 기술된 바와 같이 펩타이드, 단백질, 폴리펩타이드, RNA, RNA 입자, 면역 효과기 세포 및/또는 추가적인 물질을 포함한다.

[86]

[87] 본 명세서의 약학 조성물은 하나 이상의 보강제를 포함할 수 있거나, 하나 이상의 보강제와 함께 투여될 수 있다. 용어 "보강제"는 면역 반응을 연장, 강화 또는 가속화하는 화합물을 지칭한다. 보강제는 오일 에멀전 (예, 프로인드 보강제), 미네랄 화합물 (예, 알룸), 박테리아 생산물 (예, 백일해균 독소) 또는 면역-자극 복합체와 같은 이중적인 화합물 군을 포함한다. 보강제의 예로는, 비-제한적으로, LPS, GP96, CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드, 성장인자 및 모노카인, 림포카인, 인터루킨, 케모카인과 같은 사이토카인을 포함한다. 사이토카인은 IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL12, IFN α , IFN γ , GM-CSF, LT-a일 수 있다. 추가적으로 알려진 보강제는 알루미늄 하이드록사이드, 프로인드 보강제 또는 Montanide@ISA51과 같은 오일이다. 본 명세서에서 사용하기 위한 적합한 다른 보강제는 Pam3Cys과 같은 리포펩타이드를 포함한다.

[88]

[89] 본 명세서에 따른 약학 조성물은 일반적으로 "약제학적 유효량"으로, "약제학적으로 허용가능한 제제"로 적용된다.

[90]

[91] 용어 "약제학적으로 허용가능한"은 약학 조성물의 활성 성분의 작용과 상호작용하지 않는 물질의 무독성을 의미한다.

[92]

[93] 용어 "약제학적 유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 단독으로 또는 추가적인 투여와 더불어 원하는 반응 또는 원하는 효과를 달성하는 양을 의미한다. 특정 질환을 치료하는 경우에, 원하는 반응은 바람직하게는 질환의 진행 저해를 의미한다. 이는 질환의 진척 속도를 늦추는 것을 포함하며, 특히 질환의 진척을 중단시키거나 또는 역전시키는 것을 포함한다. 질환의 치료에서 원하는 반응은 또한 상기 질환 또는 상기 병태의 개시 지연 또는 개시 예방일 수 있다. 본원에 기술된 조성물의 유효량은 치료할 병태, 질환의 중증도, 나이, 신체 상태, 키 및 체중을 포함하는 환자의 개별 특성, 치료 기간, (존재하는 경우) 동반되는 요법의 유형, 구

체적인 투여 경로 및 유사 인자에 따라 결정될 것이다. 따라서, 본원에 기술된 조성물의 투여 용량은 이러한 다양한 특성에 따라 결정될 수 있다. 환자에서 반응이 1차 투여로 충분하지 않을 경우, 이 보다 고 용량 (또는 효과적으로는 다른, 보다 국지적인 투여 경로에 의해 달성되는 더 높은 용량)이 사용될 수 있다.

[94]

[95] 본 명세서의 약학적 조성물은 염, 완충제, 보존제, 그리고 선택적으로 다른 치료학적 물질을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 본 명세서의 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함한다.

[96]

[97] 본 명세서의 약학 조성물에 사용하기 적합한 보존제는, 비-제한적으로, 벤즈알코늄 클로라이드, 클로로부탄올, 파라벤 및 티메로살을 포함한다.

[98]

[99] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "부형제"는 본 명세서의 약학 조성물에 존재할 수 있지만 활성 성분이 아닌 물질을 지칭한다. 부형제에 대한 예로는, 비-제한적으로, 담체, 결합제, 희석제, 윤활제, 증점제, 계면활성제, 보존제, 안정화제, 유화제, 완충제, 착향제 또는 착색제를 포함한다.

[100]

[101] 용어 "희석제"는 희석 및/또는 묽게 하는 물질을 의미한다. 또한, 용어 "희석제"는 유체, 액체 또는 고체 현탁물 및/또는 혼합 매질 중 어느 하나 이상을 포함한다. 적합한 희석제의 예는 에탄올, 글리세롤 및 물을 포함한다.

[102]

[103] 용어 "담체"는 약학 조성물의 투여를 쉽게 만들거나, 강화하거나 또는 투여를 수행할 수 있게 하기 위해 활성 성분과 조합되는 천연, 합성, 유기, 무기일 수 있는 성분을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 담체는, 개체에 투여하기 적합한, 하나 이상의 혼용가능한 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질일 수 있다. 적합한 담체로는, 비-제한적으로, 멸균수, 링거, 링거 락테이트, 멸균 소듐 클로라이드 용액, 등장성 식염수, 폴리알킬렌 글리콜, 수소화 나프탈렌, 및, 특히, 생체적합성 락티드 폴리머, 락티드/글리콜라이드 코폴리머 또는 폴리옥시에틸렌/폴리옥시-프로필렌 코폴리머를 포함한다. 일 구현예에서, 본 명세서의 약학 조성물은 등장성 식염수를 포함한다.

[104]

[105] 치료학적 용도를 위한 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제는 약학 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985)에 기술되어 있다.

[106]

[107] 약학적 담체, 부형제 또는 희석제는 의도한 투여 경로 및 표준 약학 실무에 따라 선택될 수 있다.

[108]

[109] 일 구현예에서, 본원에 기술된 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 피하, 진피내 또는 근육내로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 약학 조성물은 국소 투여 또는 전신 투여를 위해 제형화된다. 전신 투여는 위장관을 통한 흡수를 수반하는 장 투여 또는 비경구 투여를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "비경구 투여"는 정맥내 주사와 같이, 위장관을 통해 이루어지는 것 이외의 다른 임의의 방식으로 투여하는 것을 의미한다. 바람직한 구현예에서, 약학 조성물은 전신 투여용으로 제형화된다. 다른 바람직한 구현예에서, 전신 투여는 정맥내 투여에 의한 것이다. 본 발명의 모든 측면의 일 구현예에서, 본원에서 설명된 폴리펩타이드 또는 이의 변이체, 또는 이를 엔코딩하는 핵산 분자는 전신으로 투여된다.

[110]

[111] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "공동-투여"는 여러가지 화합물 또는 조성물 (예를 들어, 면역 효과기 세포, 본원에서 설명된 폴리펩타이드 또는 이의 변이체 또는 이를 엔코딩하는 핵산 분자, 및 선택적으로 백신 항원을 엔코딩하는 RNA) 을 동일한 환자에게 투여하는 것을 의미한다. 여러가지 화합물 또는 조성물은 동시에, 본질적으로 동시에, 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[112]

[113] 본원에 기술된 물질, 조성물 및 방법은 질환, 예를 들어, 항원을 발현하는 질환에 걸린 세포의 존재를 특징으로 하는 질환을 가진 개체를 치료하는 데에 사용될 수 있다. 특히 바람직한 질환은 암 질환이다. 예를 들어, 만약 항원이 바이러스에서 유래되었다면, 물질, 조성물 및 방법은 상기 바이러스에 의해 야기되는 바이러스 질환의 치료에 유용할 수 있다. 만약 항원이 종양 항원이라면, 물질, 조성물 및 방법은 암 질환의 치료에 유용하고, 여기서 암 세포는 상기 종양 항원을 발현한다.

[114]

[115] 본원에 기술된 물질, 조성물 및 방법은 다양한 질환의 치료학적 또는 예방학적 치료에 사용될 수 있고, 여기서 본원에 기술된 바와 같이 면역 효과기 세포의 지원 및/또는 면역 효과기 세포의 활성화는 암 및 감염성 질환과 같은 환자에 유리하다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 물질, 조성물 및 방법은 항원과 연관된 질환의 예방학적 및/또는 치료학적 치료에 유용하다.

[116]

[117] 용어 "질환"은 개체의 신체에 영향을 미치는 비정상적인 병태를 지칭한다. 질환은 종종 특정 증상 및 신호와 관련있는 의학적인 상태로서 해석된다. 질환은 감염성 질환과 같은 외부 원인으로부터 기원한 인자에 의해 유발될 수 있거나, 또는 자가면역 질환과 같은 내부 기능부전에 의해 유발될 수 있다. 인간에서, "질환"은 보다 넓은 의미에서 개체와 접촉 시 질병이 병을 앓고 있는 개체에게 통증, 기능부전, 괴로움, 사회적 문제 또는 사망 또는 비슷한 문제를 유발하는 임의의 병태를 지칭하기 위해 사용된다. 보다 넓은 의미에서, 이는 때때로 상해, 불능, 장애, 증후군, 감염, 단독 증상, 일탈 행위 및 구조적 및 기능적인 비정형성 변형을

포함하며, 다른 맥락 및 다른 목적에서, 이는 구별할 수 있는 범주로 간주될 수 있다. 질환은, 여러가지 질환에 걸려 생활하면 개체의 삶에 대한 관점과 성격을 바꿀 수 있으므로, 일반적으로 개체에게 신체적으로뿐만 아니라 감정적으로 영향을 미친다.

[118]

[119] 본 맥락에서, 용어 "치료", "치료하는" 또는 "치료학적 개입"은 질환 또는 장애와 같은 병태를 퇴치할 목적으로 개체를 관리 및 돌보는 것을 의미한다. 이 용어는 증상 또는 합병증을 완화하고/거나, 질환, 장애 또는 병태의 진행을 지연하고/거나, 증상 및 합병증을 완화 또는 경감하고/거나, 질환, 장애 또는 병태를 치유 또는 제거하는 것뿐 아니라 병태를 예방하기 위해, 치료학적으로 효과적인 화합물의 투여와 같이, 개체가 고통받는 소정의 병태에 대한 전 범위 치료를 포함하는 것으로 의도되며, 여기서 예방은 질환, 병태 또는 장애를 퇴치하기 위한 목적으로 개체를 관리 및 돌보는 것으로서 이해될 것이고, 증상 또는 합병증의 개시를 방지하기 위한 활성 화합물의 투여를 포함한다.

[120]

[121] 용어 "치료학적 치료"는 개체의 건강 상태를 개선하고/거나 개체의 수명을 연장(증가)하는 임의의 치료를 의미한다. 상기 치료는 개체에서 질환의 소거, 개체에서 질환 진행의 정지 또는 서행, 개체에서 질환 진행의 저해 또는 서행, 개체에서 증상의 빈도 또는 중증도 감소, 및/또는 질환을 현재 앓고 있거나 예전에 걸린 적 있는 개체에서 재발 감소일 수 있다.

[122]

[123] 용어 "예방학적 치료" 또는 "예방적 치료"는 개체에서 질환이 발생하는 것을 방지하기 위해 의도되는 임의의 치료를 의미한다. 용어 "예방학적 치료" 또는 "예방적 치료"는 본원에서 상호 호환적으로 사용된다.

[124]

[125] 용어 "개인" 및 "개체"는 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 이들 용어는, 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)에 걸릴 수 있거나 또는 취약할 수 있는 인간 또는 기타 포유류 (예, 마우스, 랫, 토끼, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말 또는 영장류)를 지칭하지만, 질환 또는 장애에 걸렸을 수 있거나 또는 걸리지 않았을 수 있다. 다수 구현예들에서, 개체는 인간이다. 달리 명시되지 않은 한, 용어 "개인" 및 "개체"는 특정 연령을 의미하지 않으며, 따라서 성인, 노인, 어린이 및 신생아를 포괄한다. 본 명세서의 구현예에서, "개체" 또는 "개인"은 "환자"이다.

[126]

[127] 용어 "환자"는 치료가 필요한 개인 또는 개체, 구체적으로 질환에 걸린 개인 또는 개체를 의미한다.

[128]

- [129] 본 명세서의 일 구현예에서, 목표는 종양 항원을 발현하는 암 세포와 같은 항원을 발현하는 질환에 걸린 세포에 대해 면역 반응을 제공하는 것 및 종양 항원과 같은 항원을 발현하는 세포를 수반하는 암 질환과 같은 질환을 치료하는 것이다.
- [130] 본원에서 사용된 바와 같이, "면역 반응"은 항원 또는 항원을 발현하는 세포에 대한 일체화된 신체 반응을 지칭하며, 세포성 면역 반응 및/또는 체액성 면역 반응을 지칭한다.
- [131] "세포-매개 면역", "세포성 면역", "세포성 면역 반응", 또는 유사 용어는 항원의 발현을 특징으로 하는, 특히 클래스 I 또는 클래스 II MHC로 항원을 제시하는 것을 특징으로 하는 세포에 대한 세포성 반응을 포함하는 것을 의미한다. 세포성 반응은 "헬퍼" 또는 "살상" 중 하나로서 작동하는 T 세포 또는 T 림프구로 불리는 세포에 관한 것이다. 헬퍼 T 세포 (CD4⁺ T 세포로도 지칭됨)는 면역 반응을 조절함으로써 중추적인 역할을 하고, 살상 세포 (세포독성 T 세포, 세포용해성 T 세포, CD8⁺ T 세포 또는 CTL로도 지칭됨)는 암 세포와 같은 질환에 걸린 세포를 죽여 더 많은 질환에 걸린 세포의 발생을 예방한다.
- [132] 본 명세서는 보호적, 예방적, 예방학적 및/또는 치료학적일 수 있는 면역 반응을 고려한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "면역 반응을 유도하다 [또는 유도하는]"는 유도하기 전 특정 항원에 대한 면역 반응이 없다는 것을 의미할 수 있거나, 또는 유도하기 전 특정 항원에 대한 면역 반응이 기저 수준으로 존재하고 유도 후 강화되는 것을 의미할 수 있다. 따라서, "면역 반응을 유도하다 [또는 유도하는]"는 "면역 반응을 강화하다 [또는 강화하는]"를 포함한다.
- [133] 용어 "면역요법"은 면역 반응의 유도 또는 강화에 의한 질환 또는 병태의 치료를 의미한다. 용어 "면역요법"은 항원 면역화 또는 항원 백신 접종을 포함한다.
- [134] 용어 "면역화" 또는 "백신 접종"은 예를 들어, 치료학적 또는 예방학적 이유로, 면역 반응을 유도하기 위한 목적으로 항원을 개체에 투여하는 과정을 의미한다.
- [135] 용어 "대식 세포"는 단핵구의 분화에 의해 만들어진 식세포의 하위군을 지칭한다. 염증, 면역 사이토카인 또는 미생물 산물에 의해 활성화된 대식 세포는 비특이적으로 탐식 작용을 수행하여, 수소분해성 및 산화성 공격에 의해 대식 세포 내 외인성 병원체를 사멸시켜 병원체를 분해한다. 분해된 단백질로부터 유래된 펩타이드는 대식 세포의 세포 표면 상에 제시되고, 이는 T 세포에 의해 인지될 수 있으며, B 세포 표면 상의 항체와 직접 상호작용하여, T 및 B 세포를 활성화하고 면역 반응을 추가적으로 자극할 수 있다. 대식 세포는 항원 제시 세포 클래스에 속한다. 일 구현예에서, 대식 세포는 비장 대식 세포이다.
- [136] 용어 "수지상 세포" (DC)는 항원 제시 세포 클래스에 속하는 식세포의 다른 하위종을 지칭한다. 일 구현예에서, 수지상 세포는 조혈 골수 전구 세포로부터 유래된다. 이들 전구 세포는 먼저 미성숙 수지상 세포로 변환된다. 이들 미성숙 세포는 높은 탐식 활성과 낮은 T 세포 활성화 가능성을 특징으로 한다. 미성숙 수지상 세포는 바이러스 및 박테리아와 같은 병원체에 대해 주변 환경을 계속적으로 샘플링한다. 일단 이들이 제시가능한 항원과 접촉하게 되면, 그 세포는 성숙한

수지상 세포로 활성화되어, 비장 또는 림프절로의 이동하기 시작한다. 미성숙 수지상 세포는 병원체를 탐식하여, 이의 단백질을 작은 조각으로 분해하고, 성숙화 되면 이들 조각들을 MHC 분자를 이용해 세포 표면에 제시한다. 동시에, 이들 세포는 CD80, CD86 및 CD40과 같은 T 세포 활성화에서 공동-수용체로서 작용하는 세포-표면 수용체를 상향 조절하여, 이의 T 세포 활성화 능력을 크게 강화한다. 이들은 또한 수지상 세포가 혈류를 통해 비장으로 이동하거나 또는 림프 시스템을 통해 림프절로 이동하게 유도하는 주화성 수용체인 CCR7을 상향 조절한다. 여기서, 이들은 항원-제시 세포로 작용하며, 비-항원 특이적인 공동-자극 신호와 동시에, 헬퍼 T 세포 및 살상 T 세포뿐 아니라 항원 제시에 의해 B 세포를 활성화한다. 따라서, 수지상 세포는 T 세포- 또는 B 세포-관련 면역 반응을 적극적으로 유도할 수 있다. 일 구현예에서, 수지상 세포는 비장의 수지상 세포이다.

[137] 용어 "항원 제시 세포" (APC)는 세포의 표면 상에 (또는 에) 적어도 하나의 항원 또는 항원 단편을 나열, 획득 및/또는 제시할 수 있는 다양한 세포이다. 항원-제시 세포는 전문적 항원 제시 세포 및 비-전문적 항원 제시 세포로 구분될 수 있다.

[138] 용어 "전문적 항원 제시 세포"는 나이브 T 세포와의 상호작용에 필요한 주 조직 적합성 복합체 클래스 II (MHC 클래스 II) 분자를 구성적으로 발현하는 항원 제시 세포이다. 만약 T 세포가 항원 제시 세포의 막 상에 MHC 클래스 II 분자 복합체와 상호작용하면, 항원 제시 세포는 T 세포의 활성화를 유도하는 공동-자극성 분자를 생산한다. 전문적 항원 제시 세포는 수지상 세포 및 대식 세포를 포함한다.

[139] 용어 "비-전문적 항원 제시 세포"는 인터페론-감마와 같은 특정 사이토카인에 의한 자극시 MHC 클래스 II 분자를 구성적으로 발현하지 않는 항원 제시 세포를 지칭한다. 예를 들어, 비-전문적 항원 제시 세포는 섬유모세포, 흉선 상피 세포, 갑상선 상피 세포, 신경교 세포, 췌장 베타 세포 또는 혈관 내피 세포를 포함한다.

[140] "항원 가공 처리"는 항원을 처리 산물로 분해하는 것을 의미하며, 처리 산물은 상기 항원의 단편 (예, 단백질의 펩타이드로의 분해) 및 특정 T 세포에 대한 항원 제시 세포와 같이 세포에 의해 제시하기 위한 MHC 분자와 하나 이상의 이들 단편의 (예, 결합을 통한) 조합이다.

[141] 용어 "항원을 수반하는 질환"은 항원이 관련된 임의의 질환, 예를 들어 항원의 존재를 특징으로 하는 질환을 의미한다. 항원을 수반한 질환은 감염성 질환 또는 암 질환 또는 단순 암일 수 있다. 전술한 바와 같이, 항원은 종양-관련 항원, 바이러스 항원 또는 박테리아 항원과 같은 질환-관련 항원일 수 있다. 일 구현예에서, 항원을 수반하는 질환은, 바람직하게는 세포의 표면에, 항원을 발현하는 세포를 수반하는 질환이다.

[142] 용어 "감염성 질환"은 개체에서 개체로 또는 유기체에서 유기체로 전파될 수 있으며, 미생물 물질 (예, 감기)에 의해 유발되는 임의의 질환을 지칭한다. 감염성 질환은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 바이러스, 박테리아 및 기생충에 의해 각각 유발되는 바이러스성 질환, 박테리아성 질환 또는 기생충성 질

환을 포함한다. 이런 점에서, 감염성 질환은, 예를 들어, 간염, 성적으로 전파되는 질환 (예, 클라미디아 또는 임질), 결핵, HIV/후천성 면역결핍 증후군 (AIDS), 디프테리아, B형 간염, C형 간염, 콜레라, 중증 급성 호흡 증후군 (SARS), 조류 독감 및 인플루엔자일 수 있다.

[143] 용어 "암 질환" 또는 "암"은 개체에서 전형적으로 통제되지 않은 세포 증식을 특징으로 하는 병리학적 병태를 지칭하거나 또는 이를 의미한다. 암의 예로는, 비-제한적으로, 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함한다. 보다 상세하게는, 이러한 암의 예로는 골암, 혈액암, 폐암, 간암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문 부위의 암, 위암, 대장암, 유방암, 전립선암, 자궁암, 성 및 생식 기관의 암종, 호지킨 질환, 식도암, 소장암, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 방광암, 신장암, 신장 세포암종, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 신경외배엽 암, 척추 종양, 신경교종, 수막종 및 뇌하수체 선종을 포함한다. 본 명세서에 따를 때, 용어 "암"은 암 전이를 또한 포함한다.

[144] 암 치료에서 병용 전략 (combination strategy)은, 단일요법 방식의 효과 보다 더 높은 것으로 간주될 수 있는, 달성되는 상승 효과로 인해 적합할 수 있다. 일 구현예에서, 약학 조성물은 면역요법제와 함께 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "면역요법제"는 특이적인 면역 반응 및/또는 면역 효과기 기능(들)을 활성화 하는데 관여할 수 있는 임의 물질을 의미한다. 본 명세서는 면역요법제로서 항체의 사용을 고려한다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 항체는, 세포 자살 유도, 신호 전달 경로의 구성성분의 차단 또는 종양 세포의 증식 저해를 포함하는, 다양한 기전을 통해 암 세포에 대해 치료학적 효과를 달성할 수 있다. 특정 구현예에서, 항체는 단일클론 항체이다. 단일클론 항체는 항체-의존적인 세포 매개 세포독성 (ADCC)을 통해 세포 사멸을 유도할 수 있거나, 보체 단백질에 결합하여, 보체 의존적인 세포독성 (CDC)으로 알려진 직접적인 세포 독성을 유도할 수 있다. 본 발명과 조합하여 사용될 수 있는 항-암 항체 및 잠재적인 항체 표적(팔호 안)에 대한 비-제한적인 예로는, 아바고보맵 (Abagovomab) (CA-125), 압시시맵 (Apciximab) (CD41), 아데카투무맵 (Adecatumumab)(atumumab) (EpCAM), 아프투주맵 (Afutuzumab) (CD20), 알라시주맵 (Alacizumab pegol) (VEGFR2), 알투모맵 펜테테이트 (Altumomab pentetate) (CEA), 아마투시맵 (Amatuximab) (MORAb-009), 아나투모맵 마페나톡스 (Anatumomab mafenatox) (TAG-72), 아폴리주맵 (Apolizumab) (HLA-DR), 아르시투모맵 (Arcitumomab) (CEA), 아테졸리주맵 (Atezolizumab) (PD-L1), 바비투시맵 (Bavituximab) (포스파티딜세린), 벡투모맵 (Bectumomab) (CD22), 벨리무맵 (Belimumab) (BAFF), 베바시주맵 (Bevacizumab) (VEGF-A), 비바투주맵 메르탄신 (Bivatuzumab mertansine)(CD44 v6), 빌리나투모맵 (Blinatumomab) (CD19), 브렌투시맵 베도틴 (Brentuximab vedotin) (CD30 TNFRSF8), 칸투주맵 메르탄신 (Cantuzumab mertansin) (mucin CanAg), 칸투주맵 라브탄신 (Cantuzumab ravtansine) (MUC1), 카프로맵 펜테티

드 (Capromab pendetide) (전립선 암종 세포), 카를루맵 (Carlumab) (CNT0888), 카
 투맥소맵 (Catumaxomab) (EpCAM, CD3), 세투스맵 (Cetuximab) (EGFR), 시타
 투주맵 보가톡스 (Citatumab bogatox) (EpCAM), 시수투무맵 (Cixutumumab)
 (IGF-1 수용체), 클라우디시맵 (Claudiximab) (Claudin), 클리바투주맵 테트라세
 탄 (Clivatuzumab tetraxetan) (MUC1), 코나투무맵 (Conatumumab) (TRAIL-R2),
 다세투주맵 (Dacetuzumab) (CD40), 달로투주맵 (Dalotuzumab) (인슐린-유사 성
 장인자 I 수용체), 데노수맵 (Denosumab) (RANKL), 데투모맵 (Detumomab) (B-
 림프종 세포), 드로지투맵 (Drozitumab) (DR5), 에크로멕시맵 (Ecromeximab)
 (GD3 강글리오시드), 에드레콜로맵 (Edrecolomab) (EpCAM), 엘로투주맵
 (Elotuzumab) (SLAMF7), 에나바투주맵 (Enavatuzumab) (PDL192), 엔시투시
 맵 (Ensituximab) (NPC-1C), 에프라투주맵 (Epratuzumab) (CD22), 에르투막소
 맵 (Ertumaxomab) (HER2/neu, CD3), 에타라시주맵 (Etaracizumab) (인테그린
 $\alpha\gamma\beta3$), 파를레투주맵 (Farletuzumab) (폴레이트 수용체 1), FBTA05 (CD20), 피
 클라투주맵 (Ficlatuzumab) (SCH 900105), 피기투무맵 (Figitumumab) (IGF-1 수
 용체), 플란보투맵 (Flanvotumab) (당단백질 75), 프레솔리무맵 (Fresolimumab)
 (TGF- β), 갈리시맵 (Galiximab) (CD80), 가니투맵 (Ganitumab) (IGF-I), 겐투주
 맵 오조가미신 (Gemtuzumab ozogamicin) (CD33), 게보키주맵 (Gevokizumab)
 (IL1 β), 기렌투시맵 (Girentuximab) (카보닉 안하이드라제 9 (CA-IX)), 글렘바
 투무맵 베도틴 (Glembatumumab vedotin) (GPNMB), 이브리투모맵 티우세탄
 (Ibritumomab tiuxetan) (CD20), 이크루쿠맵 (Icrucumab) (VEGFR-1), 이고보마
 (Igovoma) (CA-125), 인다투시맵 라브탄신 (Indatuximab ravtansine) (SDC1), 인테
 투무맵 (Intetumumab) (CD51), 이노투주맵 오조가미신 (Inotuzumab ozogamicin)
 (CD22), 이필리무맵 (Ipilimumab) (CD 152), 이라투무맵 (Iratumumab) (CD30), 라
 베투주맵 (Labetuzumab) (CEA), 렉사투무맵 (Lexatumumab) (TRAIL-R2), 리비비
 루맵 (Libivirumab) (B형 간염 표면 항원), 린투주맵 (Lintuzumab) (CD33), 로르보
 투주맵 메르탄신 (Lorvotuzumab mertansine) (CD56), 루카투무맵 (Lucatumumab)
 (CD40), 루밀리시맵 (Lumiliximab) (CD23), 마파투무맵 (Mapatumumab) (TRAIL-
 R1), 마투주맵 (Matuzumab) (EGFR), 메폴리주맵 (Mepolizumab) (IL5), 밀라투
 주맵 (Milatuzumab) (CD74), 미투모맵 (Mitumomab) (GD3 강글리오시드), 모가
 물리주맵 (Mogamulizumab) (CCR4), 모세투모맵 파수도톡스 (Moxetumomab
 pasudotox) (CD22), 나콜로맵 타페나톡스 (Nacolomab tafenatox) (C242 항
 원), 나프투모맵 에스타페나톡스 (Naptumomab estafenatox) (5T4), 나마투
 맵 (Namatumab) (RON), 넥시투무맵 (Necitumumab) (EGFR), 니모투주맵
 (Nimotuzumab) (EGFR), 니볼루맵 (Nivolumab) (IgG4), 오파투무맵 (Ofatumumab)
 (CD20), 올라라투맵 (Olaratumab) (PDGF-R a), 오나르투주맵 (Onartuzumab) (인
 간 스캐터 인자 수용체 키나제 (human scatter factor receptor kinase)), 오포르투
 주맵 모나톡스 (Oportuzumab monatox) (EpCAM), 오레고보맵 (Oregovomab)
 (CA-125), 옥셀루맵 (Oxelumab) (OX-40), 파니투무맵 (Panitumumab) (EGFR),

파트리투맵 (Patritumab) (HER3), 펨투모마 (Pemtumoma) (MUC1), 페르투주마 (Pertuzuma) (HER2/neu), 핀투모맵 (Pintumomab) (선암종 항원), 프리투무맵 (Pritumumab) (비멘틴 (vimentin)), 라코투모맵 (Racotumomab) (N-글리콜릴 뉴라민산), 라드레투맵 (Radretumab) (파이브로넥틴 엑스트라 도메인-B), 라피비루맵 (Rafivirumab) (광견병 바이러스 당단백질), 라무시루맵 (Ramucirumab) (VEGFR2), 릴로투무맵 (Rilotumumab) (HGF), 리투시맵 (Rituximab) (CD20), 로바투무맵 (Robatumumab) (IGF-1 수용체), 살말리주맵 (Samalizumab) (CD200), 시브로투주맵 (Sibrotuzumab) (FAP), 실투시맵 (Siltuximab) (IL6), 타발루맵 (Tabalumab) (BAFF), 타카투주맵 테트라세탄 (Tacatuzumab tetraxetan)(α -페토프로테인), 타플리투모맵 파프톡스 (Taplutumomab paptox) (CD 19), 테나투모맵 (Tenatumomab) (테나신 C), 테프로투무맵 (Teprotumumab) (CD221), 티실리무맵 (Ticilimumab) (CTLA- 4), 티가투주맵 (Tigatuzumab) (TRAIL-R2), TNX-650 (IL13), 토시투모맵 (Tositumomab) (CD20), 트라스투주맵 (Trastuzumab) (HER2/neu), TRBS07 (GD2), 트레멜리무맵 (Tremelimumab) (CTLA-4), 투코투주맵 셀모루킨 (Tucotuzumab celmoleukin) (EpCAM), 우블리투시맵 (Ublituximab) (MS4A1), 우레루맵 (Urelumab) (4-1 BB), 볼로시시맵 (Volociximab) (인테그린 $\alpha 5 \beta 1$), 보투무맵 (Votumumab) (종양 항원 CTAA 16.88), 잘루투무맵 (Zalutumumab) (EGFR) 및 자놀리무맵 (Zanolimumab) (CD4)을 포함한다.

[145]

[146] 본원에 참조된 문헌 및 연구에 대한 언급은 임의의 전술한 내용이 선행 기술 분야와 관련 있다는 인정으로서 의도되진 않는다. 이들 문헌의 내용에 대한 모든 언급은 출원인에게 이용가능한 정보를 기반으로 하며, 이들 문헌의 내용에 대한 정확성에 관한 어떠한 인정으로도 간주되지 않는다.

[147]

[148] 후술한 내용은 당해 기술 분야의 당업자가 다양한 구현예들을 만들고 이용할 수 있게 하기 위해 제공된다. 구체적인 장치, 기법 및 이용에 관한 설명은 단지 예로서 제공된다. 본원에 기술된 예에 대한 다양한 변형들이 당해 기술 분야의 당업자들에게 용이하게 자명할 것이며, 본원에 정의된 일반적인 원리는 다양한 구현예들의 사상 및 범위로부터 이탈하지 않으면서 다른 예 및 활용에 적용될 수 있다. 따라서, 다양한 구현예들은 본원에 기술되고 보여진 예들로 한정하고자 하는 것은 아니며, 청구항과 일치하는 범위에 부합되는 것으로 의도된다.

[149]

[150] 실시에

[151] 1. 재료 및 방법

[152] 1.1 쥐와 조직 배양

[153] 야생형 C57BL/6 마우스는 Samtako Bio Korea (오산, 한국)에서 공급하였다. 1차 골수 유래 대식세포(BMDM)는 생쥐에서 채취하여 M-CSF(R&D Systems, 416-ML)의 존재 하에 DMEM에서 3-5일 동안 배양하였다. HEK293T 세포

(ATCC-11268; American Type Culture Collection)는 10% FBS(Gibco), 비필수 아미노산, 피루브산 나트륨, 스트렙토마이신(100 μ g/mL) 및 페니실린(100IU/mL)을 포함하는 DMEM(Gibco)에서 배양하였다.

[154]

[155] 1.2 시약 및 항체

[156] LPS(*Escherichia coli* O111:B4, tlr1-ebmps), Adenosine 5'-triphosphate(ATP, tlr1-atpl), Nigericin 및 DSS(Dextran Sulfate Sodium)는 Invivogen에서 구입하였다. Actin (I-19), ASC (N-15-R), IL-18 (H-173-Y), caspase-1 p10 (M-20), HA (12CA5), Flag (D-8), GST(B-14), His (H-3) 및 V5 (C-9)는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다. IL-1 β 와 NLRP3(AG-20B-0014)는 각각 R&D system과 Adipogen의 제품이었다.

[157]

[158] 1.3 플라스미드 구성

[159] GST-Rv0747, Flag-NLRP3, V5-ASC 및 HA-Ub 플라스미드는 Addgene에서 구입하였다. 야생형 NLRP3 (Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 8437)는 1036개의 아미노산 길이이며, Δ PYD는 wtNLRP3 중 93-1036, Δ NACHT는 wtNLRP3 중 1-219, 및 537-1036, Δ LRR은 wtNLRP3 중 1-741을 사용하여, 전체 길이(FL) NLRP3는 및 돌연변이 (Δ PYD, Δ NACHT, 및 Δ LRR)를 발현하기 위한 플라스미드를 pcDNA3 벡터에 삽입하여 사용하였다. Rv0747 (1-801, 1-93, 94-200, 201-300, 301-400, 401-500, 501-600, 601-700, 701-800)의 다른 영역을 암호화하는 플라스미드는 FL Rv0747 cDNA로부터 PCR을 통해 증폭하고 BamHI과 NotI 부분에서 측면에 N-말단 GST 에피토프 태그를 암호화하는 pEBG 파생물에 하위 복제하였다. ASC(1-195, 1-91, 107-195)의 다른 영역을 다른 영역을 암호화하는 플라스미드는 FL ASC cDNA에서 PCR 증폭을 통해 생성하였고 BamHI과 NotI 부분 사이에 C-말단 Flag 태그를 암호화하는 pEF 파생물에 하위 복제하였다. pEBG-GST 포유류 융합 벡터와 pEF-IRES-Puro 발현 벡터를 사용하여 포유류 세포에서 플라스미드에 암호화된 모든 일시적인 단백질들을 생성하였다. 모든 구조는 ABI PRISM 377 자동 DNA 염기서열 분석기를 사용하여 원래 염기서열과 100% 동일함을 보장했다.

[160]

[161] 1.4 펩타이드

[162] 9R와 결합된 NLRP3 또는 ASC 펩타이드는 Peptron(대전, 대한민국)에서 세포 내 바람직하지 않은 반응을 피하기 위해 초산염 형태로 제조 및 정제하여 제공받았다. 내독소 수치는 Limulus ameobocyte lysate test (Charles River Endosafe ®Endochrome-K™USA)으로 측정하였으며 실험에서 사용된 펩타이드의 농도는 3-5pg/mL 미만이었다.

[163]

[164] 1.5 GST 풀다운, 면역 블롯 및 면역 침강 분석

[165] 293T와 BMDM 세포로 GST 풀다운, 웨스턴 블롯, 공동 면역 침강 분석을 실시하였다. GST 풀다운을 하기 위해 293T 세포를 모으고 단백질 분해 효소 억제

제 각테일(Roche, Basal, CH)가 추가된 NP40 완충액으로 용해시켰다. 원심분리 후, 상층액은 단백질 A/G 비즈를 사용하여 4°C에서 2시간 동안 전처리하였고, 전처리된 용해액은 glutathione이 결합된 Sepharose 비즈(Amersham Biosciences, Amersham, UK)의 슬러리 50%와 결합하여 4°C에서 4시간동안 결합 반응을 배양하였다. 침전물은 용해 완충액으로 완전히 행구었다. Glutathione 비즈에 결합된 단백질은 sodium dodecyl sulfate (SDS) 로딩 완충액에서 5분동안 끓임으로써 용출하였다. 면역침강 분석을 하기 위해 세포를 채취하여 단백질 분해 효소 억제제 각테일(Roche, Basal, CH)가 추가된 NP40 완충액으로 용해시켰다. 전세포 용해제는 단백질 A/G agarose 비즈로 4°C에서 1시간 동안 전처리한 후 처리된 항체들로 면역 침전시켰다. 일반적으로 1mL의 세포 용해액은 4°C에서 8~12시간 동안 1-4 μ g의 항체로 처리하였다. 단백질 A/G agarose 비즈로 6시간 동안 배양 후, 면역침전물은 용해 완충액으로 충분히 세척하고 SDS 로딩 완충액으로 5분간 끓여서 용출하였다. 폴리펩타이드는 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 의해 분리된 후 면역블롯팅 (IB) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 위해 PVDF 막으로 전달시켰다. 면역 검출을 하기 위해서는 특정 항체가 필요하고 표적에 결합된 항체를 시각화 하기 위해서 Chemiluminescence (ECL; Millipore, MA, USA)를 사용하였다. 그리고 이를 검출하기 위해 Vilber chemiluminescence analyzer를 사용하였다(Fusion SL3; Vilber Lourmat, Coleegien, France).

[166]

[167] 1.6 효소면역측정법

[168] BD OptEIA ELISA 시스템(BD Pharmingen)을 사용하여 세포배양 상등액과 마우스 혈청에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 IL-18 수준을 측정하였다. 모든 검사는 제조업체가 지시한 대로 수행하였다.

[169]

[170] 1.7 NLRP3, ASC의 결합 파트너와의 상호작용 운동 분석

[171] NLRP3- ASC의 상호작용은 플루오로막스-4 분광분화도계 (HORIBA Scientific)를 사용하여 모니터링 하였으며 앞에서 설명한 바와 같이 수행하였다. 제조사의 지침에 따라 NLRP3에 BODIPY FL Iodoacetamide (ThermoFisher Scientific)라는 레이블이 붙었다. NLRP3라벨은 350nm에서 들뜨고 512nm에서 차단 필터를 통해 검출하였다. NLRP3는 운동 분석을 위해 레이블이 지정되지 않은 NLRP3 또는 ASC로 지정되었다. 사용된 자극 파장과 방출 파장은 각각 498nm와 518nm였다. 획득한 데이터는 Grafit 프로그램을 사용하여 확인하였으며, 모든 형광 측정은 30 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl 및 1 mM dithiothryitol에서 25 °C에서 수행하였다.

[172]

[173] 2. 결과

[174] 2.1 ASC의 PYD 도메인과 Rv0747⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴은 서로 상호 작용한다.

- [175] NLRP3 인플라마솜 복합체 형성을 위해 필요한 어댑터 단백질인 ASC와 상호 작용하는 결핵균의 항원 단백질을 찾기 위해, 재조합 ASC(rASC-His)를 결핵균 H37Rv 용해물과 공동 면역침전을 하고 His-아가로스 구슬로 정제하였다. 정제된 rASC-His 복합체를 은 염색법과 액체 크로마토그래피 질량분석법으로 확인하였고 흥미롭게도, 결핵균의 Rv0747/PE_PGRS10 단백질이 ASC 단백질과 결합하였다(도 1a). ASC는 NLRP3와 결합하는 PYD 도메인과 이펙터 단백질인 caspase-1과 결합하는 CARD 도메인으로 구성되어 있다. ASC 단백질과 Rv0747 단백질이 서로 상호 작용하는 도메인을 확인하기 위해, 293T세포에 GST로 표지된 Rv0747(GST-Rv0747)과 V5로 표지된 ASC WT, ASC의 PYD도메인, 그리고 ASC의 CARD 도메인을 형질감염하고 GST 폴다운 분석을 수행하였다. V5 항체로 면역 검출하였을 때, V5-ASC WT과 PYD 도메인은 검출되었지만, CARD 도메인은 검출되지 않은 것을 확인할 수 있다(도 1b). 또, GST-Rv0747 전체 도메인 (1-801), PE 도메인(1-93), 그리고 약 100개의 아미노산씩 나눈 도메인들과 V5-ASC를 사용하였고 Rv0747의 전체 도메인과 401-500번 펩타이드가 ASC 단백질과 상호 작용하는 것을 확인하였다 (도 1c). PredictProtein 도구를 사용하여 Rv0747의 401-500번 펩타이드 중에서 401번부터 414번의 14개 아미노산 서열이 ASC 단백질과의 상호 작용에서 중요할 것이라는 것을 확인하였다(도 1d).
- [176]
- [177] 2.2 Rv0747 ⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴는 NLRP3 인플라마솜 활성화를 증가시킨다.
- [178] ASC와 Rv0747간의 상호 작용의 역할을 확인하기 위해, 세포 관통 펩타이드 R9(RRRRRRRRRR)와 결합한 ASC와 상호 작용하는 Rv0747유래 펩타이드 (Rv0747 ⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴)를 제작하였다. 293T 세포에 Flag-NLRP3와 V5-ASC를 형질감염하고 펩타이드를 농도 의존적으로 처리한 후 NLRP3와 ASC간의 결합을 관찰하였다. 그 결과 Rv0747 ⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴의 농도에 비례하여 NLRP3와 ASC간의 결합은 증가되었다. 또한, 골수 유래 대식세포 (BMDMs)에 LPS와 ATP로 자극하여 NLRP3 인플라마솜을 활성화시키고 Rv0747 ⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴를 처리하였을 때, NLRP3와 ASC의 결합이 증가하는 것을 확인하였다(도 2a). 다음, LPS에 의해 자극된 BMDMs에 여러 인플라마솜 활성제와 Rv0747 ⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴를 처리한 후 IL-1 β /18를 효소면역측정법과 면역블롯을 통해 확인하였다. Rv0747 ⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴는 NLRP3 인플라마솜 활성화에 의한 IL-1 β /18 분비만을 특이적으로 증가시켰고, 면역 블롯 결과에서도 NLRP3 인플라마솜 활성화에서만 IL-1 β /18과 인플라마솜의 이펙터 단백질인 caspase-1의 분비를 증가시켰다 (도 2b 및 도 2c). NLRP3 인플라마솜이 활성화하면 ASC 단량체가 여러 개로 이루어진 올리고머화를 하며 ASC 스펙이라고 불리는 마이크로미터 크기의 핵주위 구조물을 형성한다. LPS로 자극받은 BMDMs에서 Rv0747 ⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴를 농도 의존적으로 처

리하였을 때, 농도에 비례하여 ASC의 올리고머화가 증가하였고, 또한 Rv0747⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴의 농도가 증가함에 따라 세포 내부의 ASC 다량체의 비율도 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 2d). 종합하면, 이 결과들은 ASC와 Rv0747⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴의 상호작용이 NLRP3와 ASC의 결합을 증가시켜 NLRP3 인플라마솜을 특이적으로 활성화한다는 것을 나타낸다.

[179]

[180] 2.3 Rv0747⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴의 서열에서 T와 N 아미노산이 ASC와의 결합에 영향을 미친다.

[181] Rv0747⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴에서 어떤 아미노산의 점 돌연변이가 ASC와의 상호작용에 영향을 미칠 수 있는지 확인하고자 하였다. Rv0747⁴⁰¹TLTGRPLIGNGANG⁴¹⁴의 아미노산 서열 중 일정한 간격에서 대칭적으로 두 개씩 존재하는 아미노산을 각각 402번 L을 F로, 407번 L을 F로, 410번 N을 T로, 그리고 413번 N을 T로 점 돌연변이 시켰다. 그 결과 V5-ASC와 점 돌연변이를 시킨 GST-Rv0747가 서로 결합하지 못하는 것을 관찰하였고 (도 3), 이는 각각의 아미노산이 ASC와의 결합에 중요한 역할을 할 수도 있다는 것을 나타낸다.

[182]

[183] 예를 들어, 청구항 구성 목적을 위해, 이하 기재되는 청구항은 어떤 식으로든 이의 문자 그대로의 언어보다 좁게 해석되어선 안 되고, 따라서 명세서로부터의 예시적 구현예가 청구항으로 읽혀서는 안 된다. 따라서, 본 발명은 예시로서 기재되었고, 청구항의 범위에 대한 제한이 아님이 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 하기 청구항에 의해서만 제한된다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 발행된 특허, 특허 출원, 서적 및 저널 논문은 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 각각 포함된다.

[184]

서열목록 Free Text

[185] SEQ ID NO: 1

[186] TLTGRPLIGN GANG

[187]

[188] SEQ ID NO: 2

[189] MSWVMVSP EL VVAAAADLAG IGSAISSANA AAVNTTG LL
TAGADEVSTA IAALFGAQQQ AYQAASAQAA AFYAQFVQAL
SAGGGAYAAA EAAAVSPLLA PINAQFVAAT GRPLIGNGAN GAPGTGANGG
PGGWLIGNGG AGGSGAPGAG AGGNGGAGGL FGSGGAGGAS
TDVAGGAGGA GGAGGNAGML FGAAGVGGVG GFSNGGATGG
AGGAGGAGGL FGAGRERGS GSGNLTGGAG GAGGNAGTLA
TGDGGAGGTG GASRSGGFGG AGGAGGDAGM FFGSGGSGGA GGISKSVGDS
AAGGAGGAPG LIGNGGNGGN GGASTGGGDG GPGGAGGTGV

LIGNGGNGGS GGTGATLGKA GIGGTGGVLL GLDGFTAPAS TSPLHTLQQD
VINMVNDPFQ TLTGRPLIGN GANGTPGTGA DGGAGGWLFNG NGGNGGQGTI
GGVNGGAGGA GGAGGILFGT GGTGGSGGPG ATGLGGIGGA GGAALLFGSG
GAGGSGGAGA VGGNGGAGGN AGALLGAAGA GGAGGAGAVG
GNGGAGGNGG LFANGGAGGP GGFGSPAGAG GIGGAGGNGG
LFGAGGTGGA GGGSTLAGGA GGAGGNGGLF GAGGTGGAGS
HSTAAGVSGG AGGAGGDAGL LSLGASGGAG GSGGSSLTAA GVVGGIGGAG
GLLFGSGGAG GSGGFSNSGN GGAGGAGGDA GLLVSGGAG
GAGASATGAA TGGDGGAGGK SGAFLGGDG GAGGATGLSG
AFHIGGKGGV GGS AVLIGN GNGGNGGNSG NAGKSGGAPG PSGAGGAGGL
LLGENGLNGL M

[190]

[191] SEQ ID NO: 3

[192] acgtcaccg ggcgtccgct gatcggcaac ggcgccaacg gc

[193]

[194] SEQ ID NO: 4

[195] atgtcatggg tgatggttc gccggagctg gtggtggcgg cggcagcggg ttggcgggg atcgggtcgg
cgattagctc ggctaagcgg ggcggcgccg tcaaacgac gggattgttg accgcgggtg ccgatgaggt
gtcgacagcg attgcggcgt tgttcgggtc ccaaggccag gcctaccagg cggcgagcgc acaggcggcg
gcgttttacg cccagtctgt gcaggccctg agcggcgcg gaggcgcgta tgcggccgcc gaggcgcgcg
ccgtgtcgcc gctgtcgcc ccgatcaacg cgcaattcgt ggcggccacc gggcgccgcg tgatcgcaa
cggcgccaac ggcgccccg ggaccggagc caacggcggg cccggcgggg ggttgatcgg caacggcggc
gccggcgggg ctggcgcccc cggcgctggg gccggcggtg acggcggggc cggcgggctg ttcggcagcg
gcggggcgcg cggggcctcc accgacgtcg cggcggggc cgtggggcc ggcggggcg gcggaacgc
cggcatgtg ttcggcgcc cgggggtcgg cggcgctggc ggattctga acggcggtgc caccggcgcg
gcaggcgggg cggcggggc gggcgggctg ttggcgccg gaagggaacg cggcagcggc gggtcgggca
acctactgg cggggccggc ggggcggcg gcaacgccgg gacactcgcc actggtgatg gcggggccgg
cgggaccggc ggcgctagtc gcagcgcgcg atcgcgggg gccggcgag cggcgggcga cggcgcatg
ttctcggtc cggcggtc cggcgcgcc ggcggcatta gtaaaagcgt cggggacagc gcccgggcg
ggcgcgcg ggcggcgcc ctgatcgga acggcgga cggcggaac ggcggcgga gcaccggcg
cggggacggg gggccggcg gggcgggcg caccggcgtg ttgatcgga acggcgga cggcgcgagc
ggcgggaccg gcgcgacct gggcaaggcc ggcacggcg gtaccgggg ggtgtgttg ggctggagc
gctttacggc ccccgccagc acctcgccc tgcacacct gcagcaggac gtgatcaata tggtaacga
cccttcag acgtcaccg ggcgtccgt gatcggaac ggcgccaac gactccggg gaccggggt
gacggcgag cggcggtg gttgttcggc aacggcgga acggcgga ggaacgatc ggcggcgta
acggcgggc cggcgggcc ggcggggcg gcgggatctt gtcggcacc ggcggcacc gggcgagcg
cggggccggc gccaccggc tggcgggat tggcgggcc ggcggagcc cttgtctt cggctccgc
ggggcgcg gaagcggtg tccggcgcg gtcggtgga atggcgggc cggcggaac gccggtcgc

tcttgggcgc cgccggggcc ggccggggccg gtggtgccgg cgcggtcggg ggcaatggcg gggccggcgg
taacggcggg ctgttcgcca acggggggagc cggcggggccc ggtgggtttg gcagccccgc tggggctggc
gggatcggcg gggcaggtgg gaacggcggg ctgttcggcg ccggcgggac cggcggggcc ggccgggggaa
gcacctcgc cggcggcgcc ggccggggcg gcggcaacgg cgggctgttc ggccggcgcg gcaccggcgg
cgccggcagc catagcaccg ccgccggagt ttccggaggg gccggcgggg ccggcggcga cgccggcttg
ctctccctcg gcgcctccgg cggggccggc ggccagcgcg gttccagcct gaccgccgc ggcttggtcg
gcggcatcgg cggcgccgga ggcttgctct tcggctccgg cggcgccggc gggagcggcg ggttcagcaa
ctctggcaac ggccggcgcc ggccggggcg cggcgacgcg ggtttgctcg tcggctccgg cggggccggc
ggggccggcg cctccgccac cggcgccgcc accggcgggg acggcggggc cggcggaag tccggagcgt
tcggtctcgg aggtgacggc ggccggcgcg gccaccggg ttgtccggg gctttccaca tcggcgcaaa
ggcgggcgtc ggccggcagcg ccgtgctgat cggcaacggc ggcaacggcg gcaacggcgg taacagcggg
aacgccggga aatccggggg tgcaccggc ccagcggcg ccggcggcg cggcgggctg ctgctcggtg
agaacgggct gaacggcttg atgtag

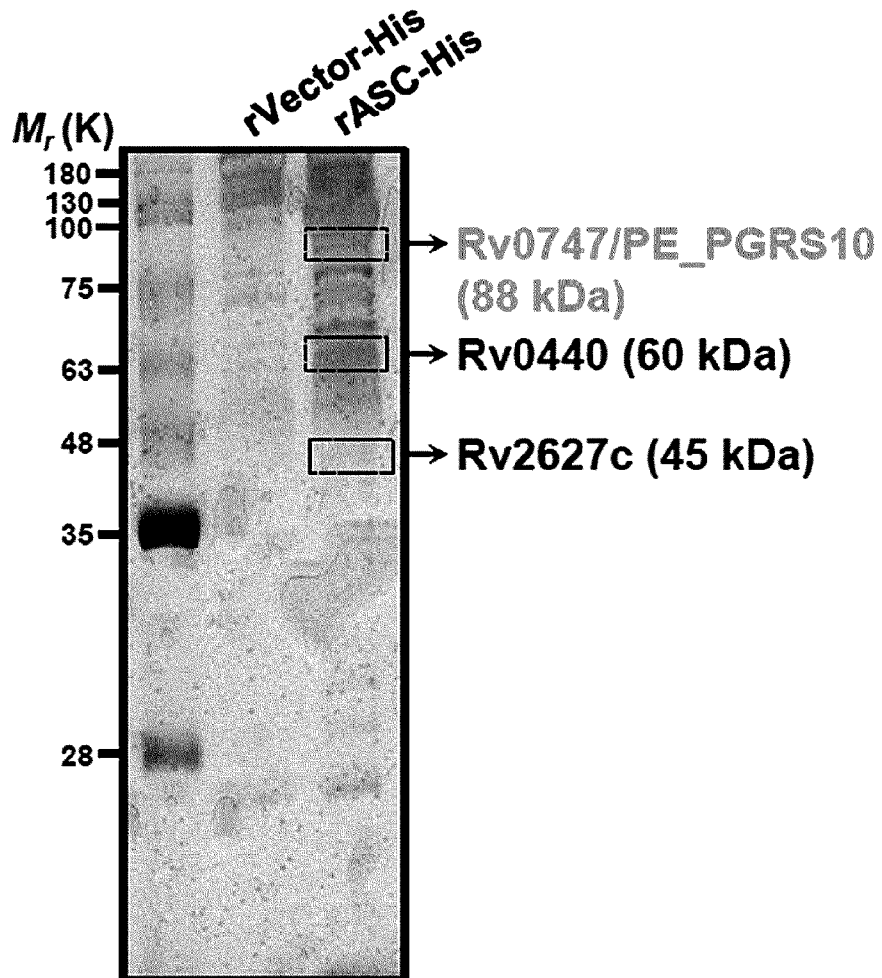
청구범위

- [청구항 1] ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD)에 특이적으로 결합하는, 서열번호 1로 표시되는 서열을 포함하는 폴리펩타이드 또는 이의 변이체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 서열로 구성되는, 폴리펩타이드 또는 이의 변이체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2로 표시되는 서열을 포함하는, 폴리펩타이드 또는 이의 변이체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 변이체는 서열번호 1의 2번째, 7번째, 10번째, 및 13번째 아미노산을 제외한 위치에서 보존적 치환을 포함하는, 폴리펩타이드 또는 이의 변이체.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 보존적 치환은 T1S, T3S, G4A, R5K, I8V, G9A, G11A, A12G, 및 G14A로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나, 또는 T1S, T3S, G4A, R5K, I8L, G9A, G11A, A12G, 및 G14A로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나인, 폴리펩타이드 또는 이의 변이체.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 이의 변이체를 포함하는, ASC 특이적 결합 분자.
- [청구항 7] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 변이체를 포함하는, 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 암은 염증성 대장암, 결장직장암, 흑색종, 또는 간세포암인, 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 변이체를 발현하는 핵산 분자.
- [청구항 10] 제9항의 핵산 분자를 포함하는, 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 암은 염증성 대장암, 결장직장암, 흑색종, 또는 간세포암인, 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 12] 제9항의 핵산 분자를 포함하는, 재조합 벡터.
- [청구항 13] 제9항의 핵산 분자를 포함하는, 숙주 세포.
- [청구항 14] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 변이체를 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법.
- [청구항 15] 제9항의 핵산 분자를 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법.

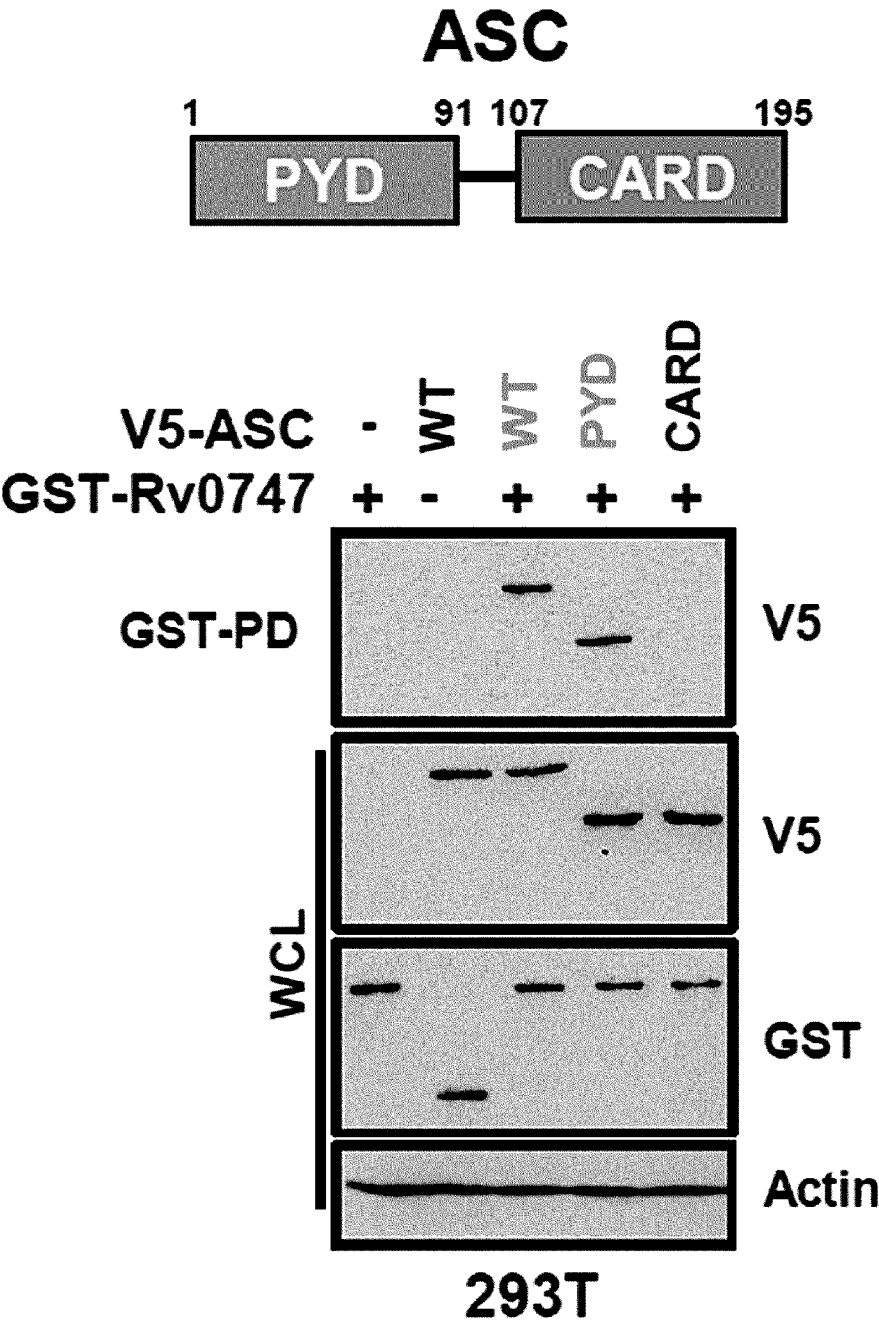
[도 1a]

ASC

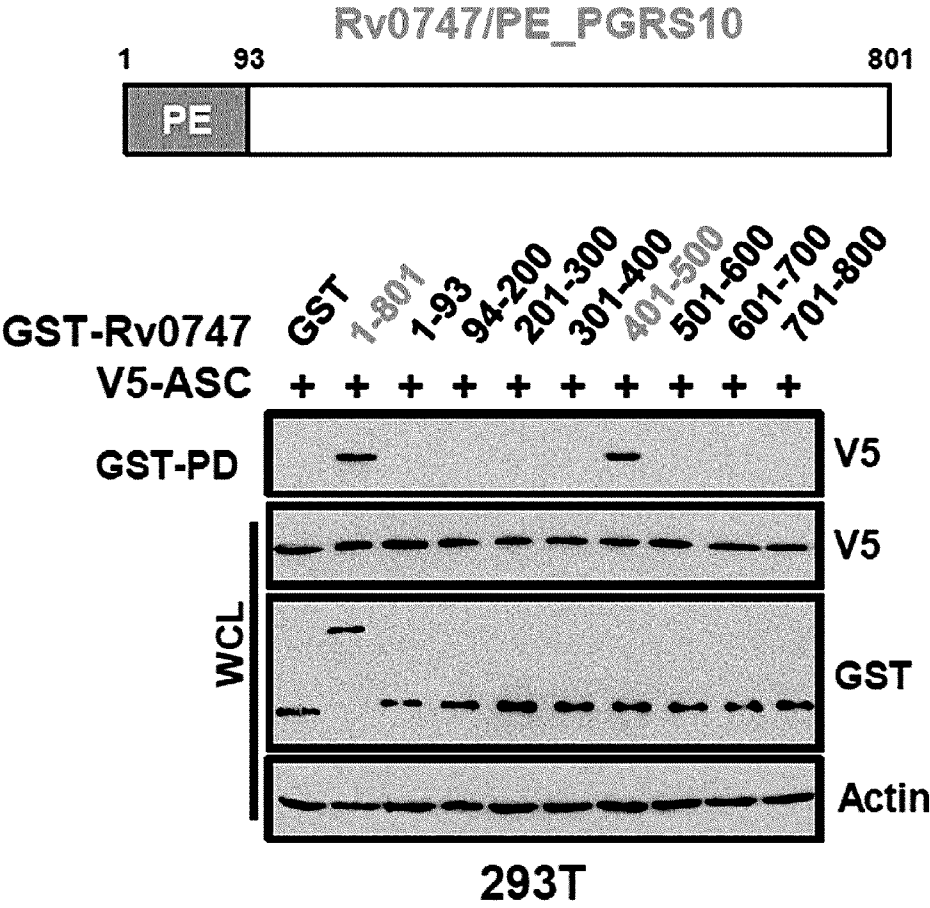
(NLRP3 inflammasome)



[도 1b]



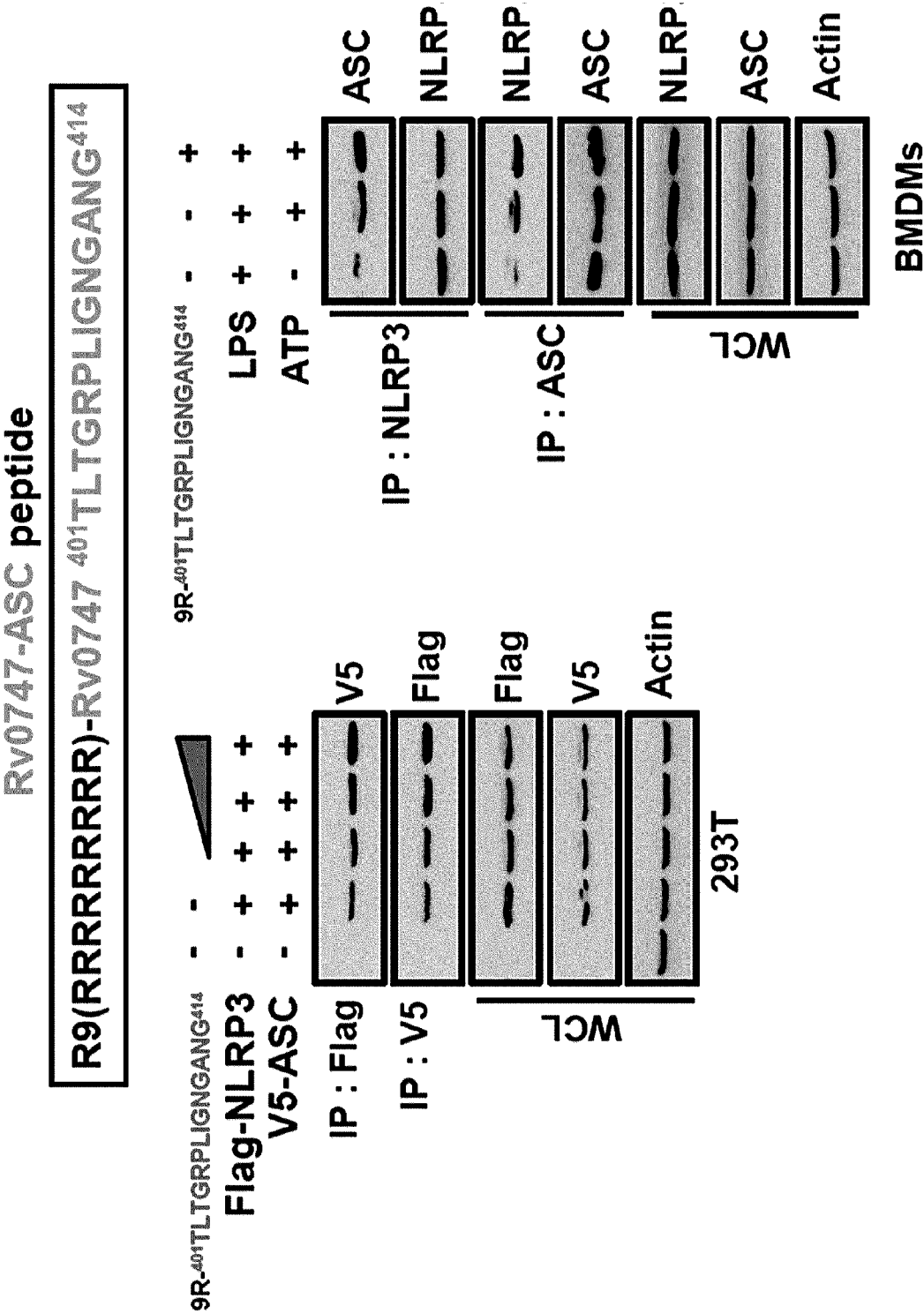
[도1c]



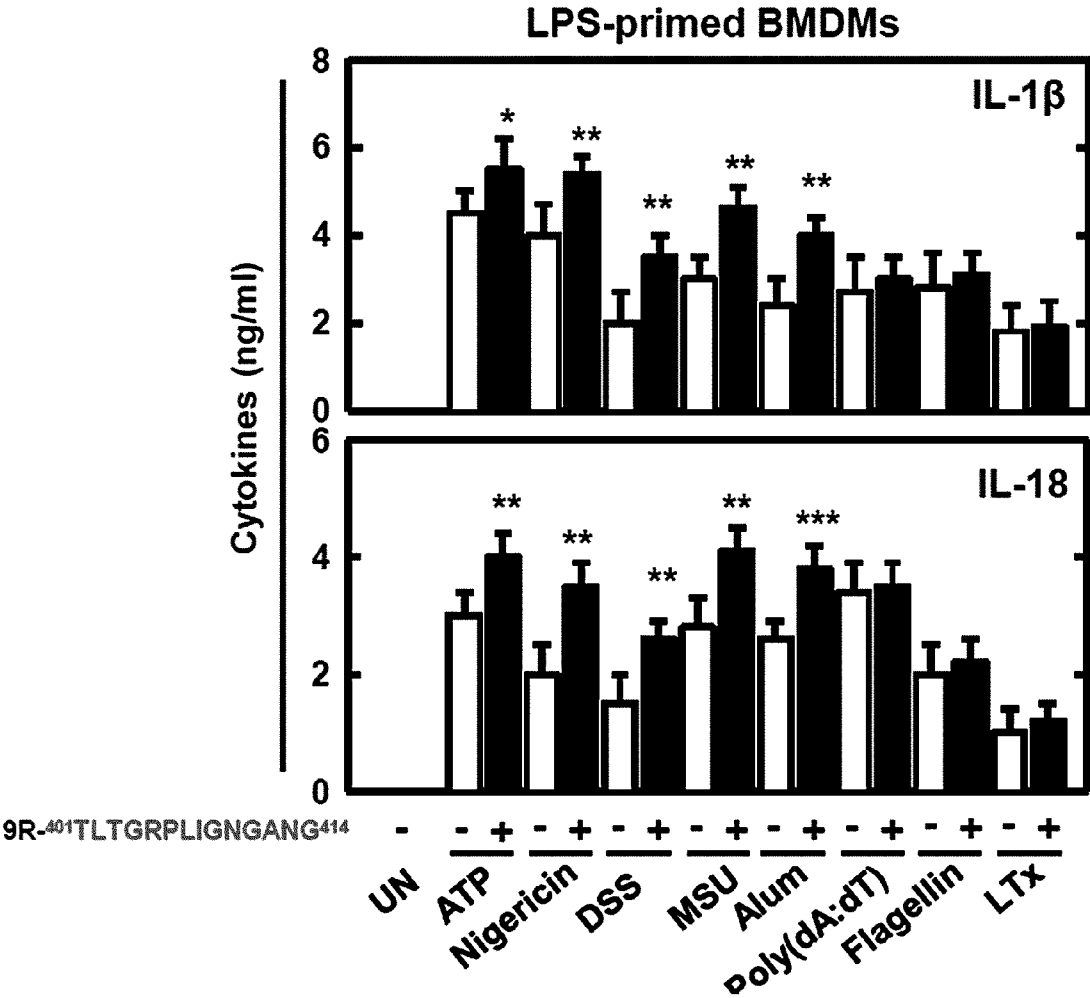
[도 1d]

PredictProtein – Protein Sequence Analysis 401TLTGRPLIGNGANG414

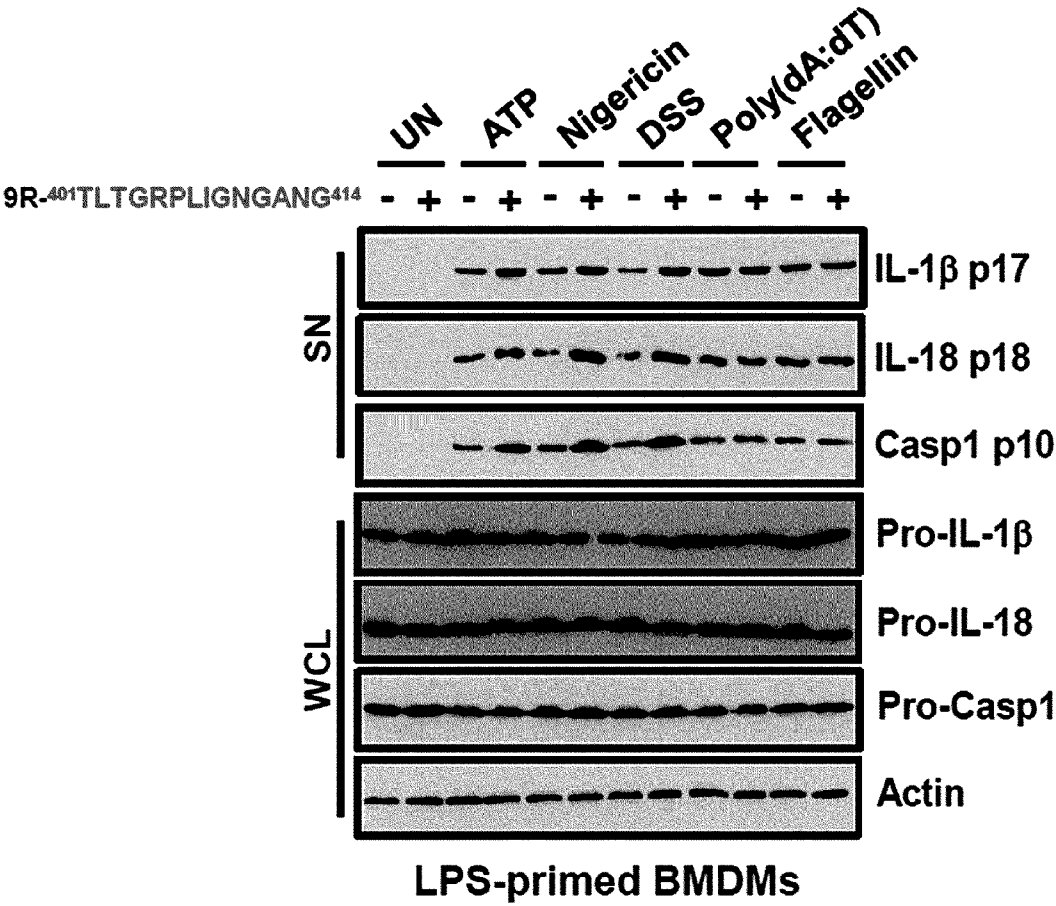
[도2a]



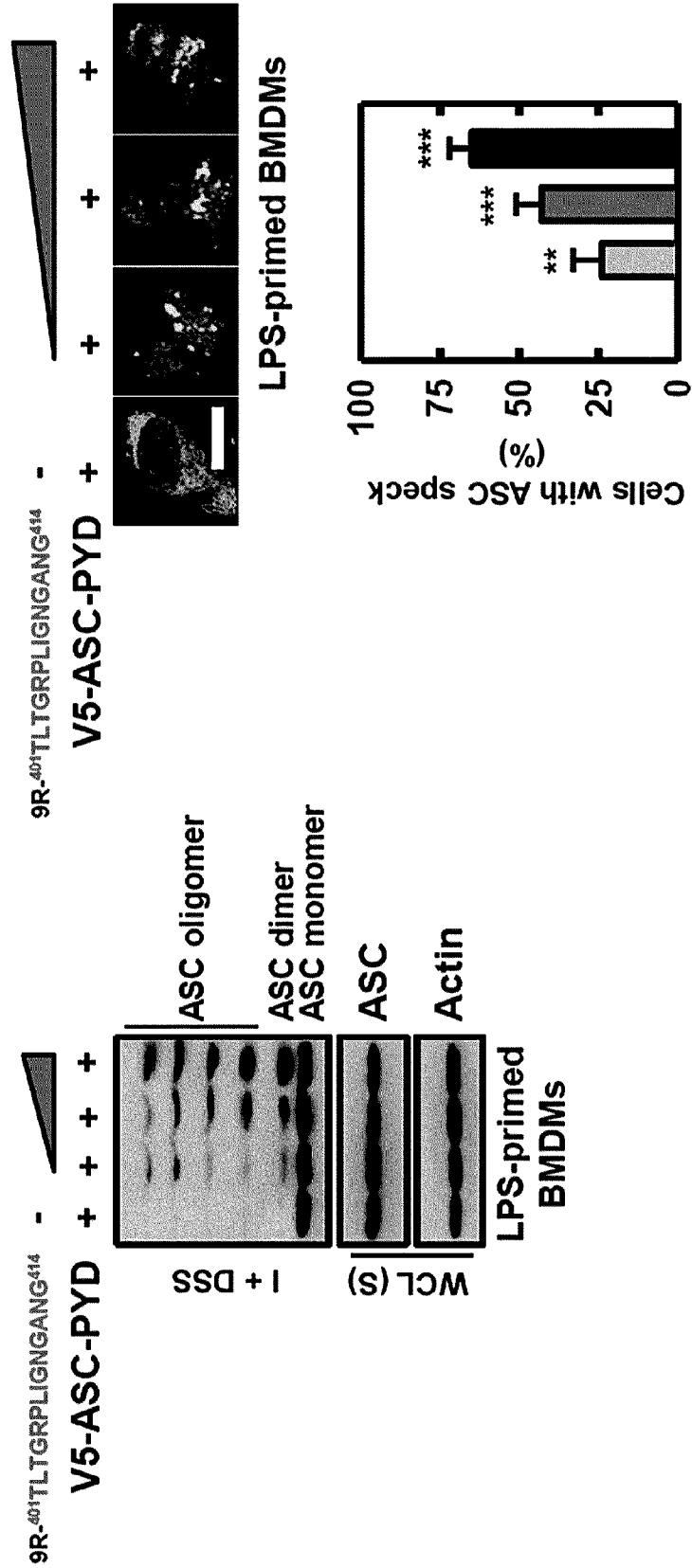
[도2b]



[도2c]



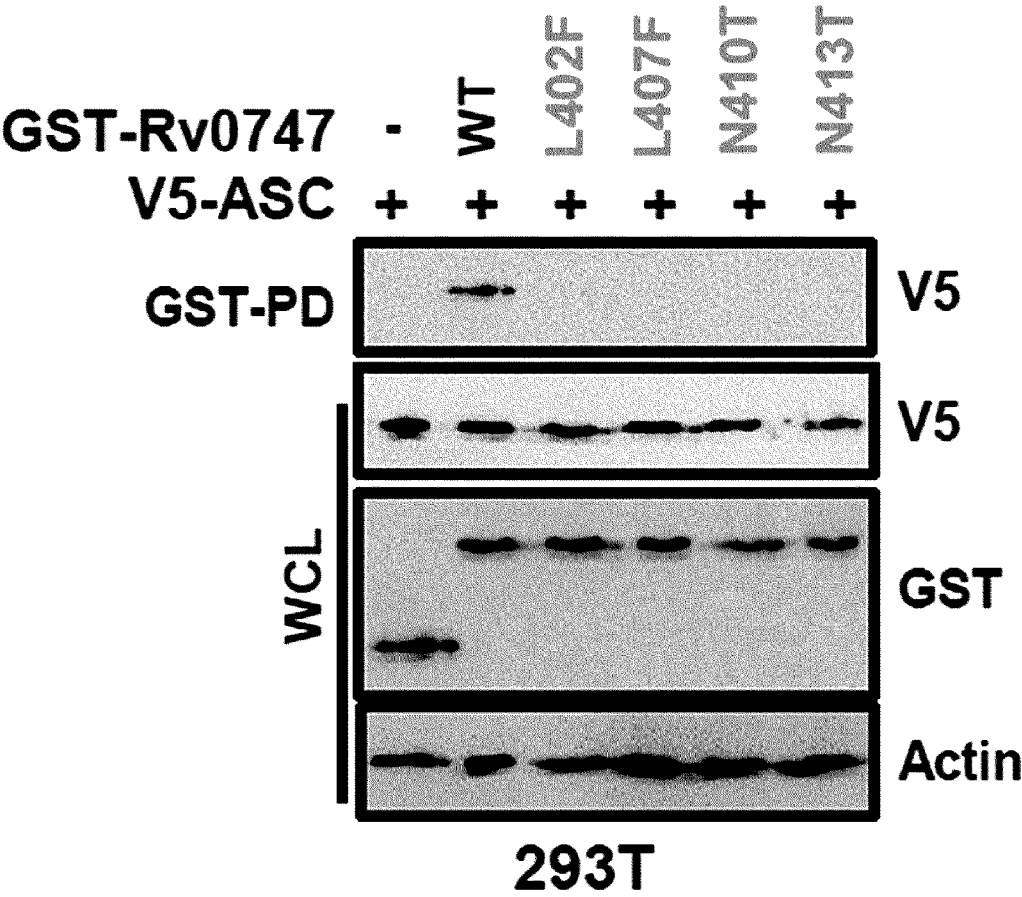
[도2d]



[도3]

401**TLTGRPLIGNGANG**414

GST-Rv0747 WT
GST-Rv0747 L402F
GST-Rv0747 L407F
GST-Rv0747 N410T
GST-Rv0747 N413T



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003333

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/35(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/35(2006.01); A61K 31/64(2006.01); A61P 29/00(2006.01); C07K 16/24(2006.01); G01N 33/53(2006.01); G01N 33/68(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: ASC(Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD), 결합(binding), 폴리펩타이드(polypeptide), 암(cancer), 치료(treatment)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1178776 B1 (COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH) 07 September 2012 (2012-09-07) See SEQ ID NO: 166.	1,3,9,12-13
A		2,4-8,10-11
A	KR 10-2022-0061482 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 13 May 2022 (2022-05-13) See entire document.	1-13
A	HAMARSHEH, Shaima'a et al. NLRP3 inflammasome activation in cancer: a double-edged sword. Frontiers in Immunology. 08 July 2020, vol. 11, article no. 1444, pp. 1-11. See entire document.	1-13
A	SU, Jia-Qi et al. The inflammasomes adaptor protein PYCARD is a potential pyroptosis biomarker related to immune response and prognosis in clear cell renal cell carcinoma. Cancers. 12 October 2022, vol. 14, article no. 4992, pp. 1-21. See entire document.	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 June 2024

Date of mailing of the international search report

26 June 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003333

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2022-0339169 A1 (NOVARTIS AG) 27 October 2022 (2022-10-27) See entire document.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003333

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003333

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **14-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 14-15 pertain to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/003333

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
KR	10-1178776	B1	07 September 2012	CN	101019123	A		15 August 2007	
				EP	1721283	A2		15 November 2006	
				EP	1721283	B1		30 November 2022	
				JP	2007-520718	A		26 July 2007	
				KR	10-2007-0020215	A		20 February 2007	
				US	2005-0288866	A1		29 December 2005	
				US	7424370	B2		09 September 2008	
				WO	2005-076010	A2		18 August 2005	
KR	10-2022-0061482	A	13 May 2022	KR	10-2582417	B1		26 September 2023	
				WO	2022-098220	A1		12 May 2022	
US	2022-0339169	A1	27 October 2022	CN	112654350	A		13 April 2021	
				EP	3817737	A1		12 May 2021	
				JP	2021-529780	A		04 November 2021	
				KR	10-2021-0030947	A		18 March 2021	
				WO	2020-010118	A1		09 January 2020	
				WO	2021-002887	A1		07 January 2021	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/35(2006.01); A61P 35/00(2006.01); A61K 38/00(2006.01)

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/35(2006.01); A61K 31/64(2006.01); A61P 29/00(2006.01); C07K 16/24(2006.01); G01N 33/53(2006.01); G01N 33/68(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: ASC(Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD), 결합(binding), 폴리펩타이드(polypeptide), 암(cancer), 치료(treatment)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	KR 10-1178776 B1 (카운슬 오브 사이언티픽 앤드 인더스트리얼 리서치) 2012.09.07 서열번호 166 참조.	1,3,9,12-13 2,4-8,10-11
A	KR 10-2022-0061482 A (한국과학기술원) 2022.05.13 전체 문헌 참조.	1-13
A	HAMARSHEH, SHAIMA'A 등, 'NLRP3 inflammasome activation in cancer: a double-edged sword', Frontiers in Immunology, 2020.07.08, 11권, article no. 1444, 페이지 1-11 전체 문헌 참조.	1-13
A	SU, JIA-QI 등, 'The inflammasomes adaptor protein PYCARD is a potential pyroptosis biomarker related to immune response and prognosis in clear cell renal cell carcinoma', Cancers, 2022.10.12, 14권, article no. 4992, 페이지 1-21 전체 문헌 참조.	1-13
A	US 2022-0339169 A1 (NOVARTIS AG) 2022.10.27 전체 문헌 참조.	1-13



추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.



대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을
정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일
이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의
공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여
인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과
상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기
위해 인용된 문헌“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의
신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른
문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우
청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2024년06월25일(25.06.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년06월26일(26.06.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동,
정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

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

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

- ☒ 청구항: **14-15**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 14-15는 치료에 의한 사람의 치치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
- ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1178776 B1	2012/09/07	CN 101019123 A	2007/08/15
		EP 1721283 A2	2006/11/15
		EP 1721283 B1	2022/11/30
		JP 2007-520718 A	2007/07/26
		KR 10-2007-0020215 A	2007/02/20
		US 2005-0288866 A1	2005/12/29
		US 7424370 B2	2008/09/09
		WO 2005-076010 A2	2005/08/18
KR 10-2022-0061482 A	2022/05/13	KR 10-2582417 B1	2023/09/26
		WO 2022-098220 A1	2022/05/12
US 2022-0339169 A1	2022/10/27	CN 112654350 A	2021/04/13
		EP 3817737 A1	2021/05/12
		JP 2021-529780 A	2021/11/04
		KR 10-2021-0030947 A	2021/03/18
		WO 2020-010118 A1	2020/01/09
		WO 2021-002887 A1	2021/01/07