

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0092938

(43) 공개일자 2023년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-7015229

(22) 출원일자(국제) 2021년10월21일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2023년05월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/055979

(87) 국제공개번호 WO 2022/087221

국제공개일자 2022년04월28일

(30) 우선권주장

63/094,766 2020년10월21일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

더 리전츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아

미국 캘리포니아주 94607 오클랜드 프랭클린 스트리트 1111 12층

(72) 발명자

이주미야 요시히로

미국 캘리포니아 95817 새크라멘토 세컨드 애비뉴

4645 유씨디엠퍼 리서치 3 룸 3100에이

시모다 미치코

미국 캘리포니아 95817 새크라멘토 세컨드 애비뉴

4645 유씨디엠퍼 리서치 3 룸 3100에이

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 33 항

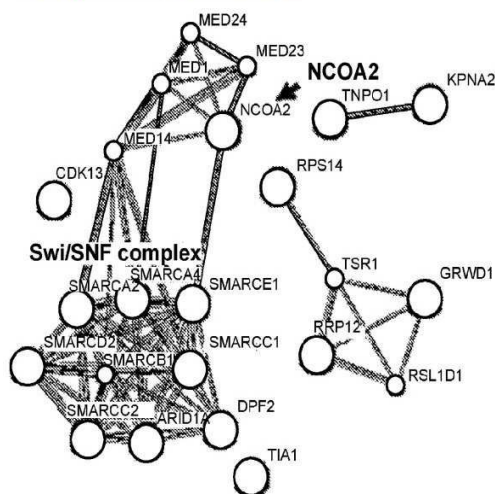
(54) 발명의 명칭 바이러스 단백질 서열로부터의 전사 활성 복합체 표적화 암 약물

(57) 요약

본 발명은 MYC-의존성 암 세포와 같은 세포에서 MYC 활성을 억제함으로써 부적절하거나 과도한 세포 증식을 수반하는 질병을 치료하거나 염증 질환 또는 자가면역 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

대표도 - 도1c

크로마틴에서 KSHV 재활성화에 의해 유도된
RNA pol II 단백질 상호작용



(52) CPC특허분류

C07K 16/30 (2013.01)

C07K 7/08 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2319/09 (2013.01)

C07K 2319/10 (2013.01)

C07K 2319/50 (2013.01)

C12N 2710/16422 (2013.01)

C12N 2710/16433 (2013.01)

(30) 우선권주장

63/152,959 2021년02월24일 미국(US)

63/222,697 2021년07월16일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

MYC-억제 펩티드 및 이중 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로서, 상기 MYC-억제 펩티드는 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 길이가 약 100개 이하의 아미노산이며, 세포에서 MYC 활성을 억제하는 것인 폴리펩티드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 MYC-억제 펩티드는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 MYC-억제 펩티드는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것인 폴리펩티드.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 D-아미노산을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 MYC-억제 펩티드는 하나 이상의 D-아미노산을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 이중 아미노산 서열은 TAT 서열인 것인 폴리펩티드.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 TAT 펩티드는 서열번호 2 또는 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 8

청구항 6 또는 7에 있어서, 상기 TAT 펩티드는 하나 이상의 D-아미노산을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 이중 펩티드는 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 폴리펩티드.

청구항 10

청구항 9에 있어서, TAT 펩티드, MYC-억제 펩티드, 및 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 11

청구항 9 또는 10에 있어서, 상기 항체는 단쇄 항체인 것인 폴리펩티드.

청구항 12

청구항 9 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 단편은 인간화된 것인 폴리펩티드.

청구항 13

청구항 9 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 단편은 MYC-의존성 종양 세포 상의 세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 것인 폴리펩티드.

청구항 14

청구항 9 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MYC-억제 펩티드 및 상기 항체 또는 단편은 하나 이상의 프로테아제 절단 부위를 포함하는 펩티드 링커에 의해 연결되는 것인 폴리펩티드.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 4의 3번 또는 13번 위치의 아미노산은 서열번호 1의 해당 아미노산과 다른 것인 폴리펩티드.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 서열번호 4의 3번 위치의 아미노산은 트레오닌인 것인 폴리펩티드.

청구항 17

청구항 15 또는 16에 있어서, 상기 서열번호 4의 13번 위치의 아미노산은 세린 또는 글루탐산인 것인 폴리펩티드.

청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 핵 국재화 신호(nuclear localization signal)를 더 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 19

청구항 1 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, C-말단에 시스테인 잔기를 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 20

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, N-말단에 신호 펩티드를 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 21

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 암세포인 것인 폴리펩티드.

청구항 22

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 B 세포 또는 T 세포인 것인 폴리펩티드.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 24

프로모터에 작동 가능하게 연결된 청구항 23의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트.

청구항 25

청구항 23의 폴리뉴클레오티드 또는 청구항 24의 발현 카세트를 포함하는 벡터.

청구항 26

청구항 23의 폴리뉴클레오티드 또는 청구항 24의 발현 벡터 또는 청구항 22의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 27

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항의 폴리펩티드, 청구항 23의 폴리뉴클레오티드, 청구항 24의 발현 카세트, 청구항 25의 벡터, 또는 청구항 26의 숙주 세포 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 28

세포를 유효량의 청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 폴리펩티드, 청구항 24의 발현 카세트, 또는 청구항 25의 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포에서 MYC 활성을 억제하는 방법.

청구항 29

청구항 25에 있어서, 상기 세포는 암세포인 것인 방법.

청구항 30

청구항 25에 있어서, 상기 세포는 B 세포 또는 T 세포인 것인 방법.

청구항 31

필요로 하는 환자에게 유효량의 청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 폴리펩티드, 청구항 23의 폴리뉴클레오티드, 청구항 24의 발현 카세트, 청구항 25의 벡터, 청구항 26의 숙주 세포, 또는 청구항 27의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법.

청구항 32

개체에게 유효량의 청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 폴리펩티드, 청구항 23의 폴리뉴클레오티드, 청구항 24의 발현 카세트, 청구항 25의 벡터, 청구항 26의 숙주 세포, 또는 청구항 27의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, MYC-의존성 암을 치료하는 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 암은 원발성 삼출성 림프종(PEL)인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 2020년 10월 21일에 출원된 미국 임시 특허 출원 제63/094,766호, 2020년 10월 21일 출원, 2021년 2월 24일에 출원된 미국 임시 특허 출원 제63/152,959호, 및 2021년 7월 16일에 출원된 미국 임시 특허 출원 제63/222,697호에 대한 우선권을 주장하고, 이 출원들 각각의 내용은 모든 목적을 위해 그 전체로 참조에 의해 본원에 포함된다.
- [0003] 연방 정부 지원 연구 및 개발에 따라
- [0004] 이루어진 발명에 대한 권리에 대한 진술
- [0005] 본 발명은 미국 국립 보건원(National Institutes of Health)이 수여한 승인 번호 CA232845 및 CA225266 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 일부 권리를 갖는다.
- [0006] 본 발명은 MYC-의존성 암 세포와 같은 세포에서 MYC 활성을 억제함으로써 부적절하거나 과도한 세포 증식을 수반하는 질병을 치료하거나 염증 질환 또는 자가면역 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

배경 기술

- [0007] 바이러스는 감염된 숙주 세포의 외부에서 복제하는 데 필요한 효소를 코딩하지 않기 때문에, 복제를 위해 숙주 세포 기구(host cell machinery)를 이용한다. 따라서, 그들은 세포 사멸, 세포 주기 진행 및 숙주 면역 반응을 포함한 세포 기능을 제어하는 분자 마법사이다. 바이러스 복제 세포에서, 숙주 전사 장치가 바이러스 유전자를 전사하도록 전환되기 때문에 숙주 세포 유전자 발현이 자주 중단된다(turn off). 특정 숙주 세포 기능을 제어하는 바이러스 단백질을 연구함으로써 주요 바이러스-숙주 단백질 상호 작용의 표면에 있는 바이러스 단백질 서열을 기반으로 고유한 펩티드 약물을 생성할 수 있다. 이러한 펩티드 및 그 변이체는 단백질 기능을 억제하기 위한 우성 음성(dominant negative)으로 사용될 수 있다.
- [0008] 세포 c-Myc 단백질(MYC)은 매우 중요한 전사 인자이다. 이 단백질은 원발성 삼출성 림프종(PEL) 및 다발성 골수종을 포함한 모든 암의 최대 75%에서 과발현된다. 암 발생 및 세포 증식에서 잘 확립된 기능에도 불구하고, MYC

는 상당한 노력에도 불구하고, 이 단백질이 오늘날까지 약리학적으로 작용할 수 없었다는 사실을 고려하여, "약물치료가 어려운(undruggable)" 표적으로 간주된다. 임상적으로 유의한 방식으로 MYC를 표적화하지 못하는 이유에는 큰 단백질-단백질 또는 단백질-DNA 상호작용 인터페이스, 및 일반적으로 전사 인자의 비구조화(unstructured) 속성이 포함된다. 결과적으로, MYC의 기능을 조절하는 분자를 구축하는 것은 암 연구의 주요 과제 중 하나이다(1). MYC 기능을 조절하여 암세포 증식을 억제하거나 심지어 MYC에 중독된 암세포를 사멸시킬 수 있는 가능한 약물을 찾는 것은 과학적으로나 임상적으로 중요한 영향을 미칠 것이다.

[0009] 대사 질환, 종양 및 심혈관 질환 분야에서 현재 약 70개의 승인된 펩티드와 활발히 개발 중인 150개 이상의 추가적인 펩티드가 있다(2). 그들 중 일부는 MYC를 표적으로 하는 임상시험 펩티드 약물(investigative peptide drugs)이다. 하나의 후보 MYC 표적 펩티드 약물은 Peptomyc의 OmoMyc(3)이다; 이는 현재 I/II상 임상시험 중이다. OmoMyc은 루이신 지퍼 영역에 4개의 점 돌연변이(E63T, E70I, R77Q, R78N)를 포함하는 것에 의해 MYC의 bHLH-Zip 도메인을 모방하고, 따라서, 우성 음성 방식으로 작용하고 특정한 표적 유전자의 전사 활성화를 억제한다. 펩티드 약물로 알려져 있으나, OmoMyc은 비교적 크고 92개의 아미노산으로 구성된다. 크기 때문에, OmoMyc 자체는 원하는 세포 구획에 대한 생리학적 장벽을 통한 빈약한 전달을 보이고, 따라서, OmoMyc의 치료적 용도는 인 비보 종양 세포 침투의 부족으로 인해 약화되었다.

[0010] 따라서, 세포, 특히 암 세포, 및 B 및 T 세포와 같은 림프구 세포의 증식 또는 활성화를 조절하기 위해 MYC를 표적으로 하는 새롭고 안전하며 효과적인 치료에 대한 요구가 존재한다. 본 발명은 이러한 요구를 충족시키고, 기타 장점도 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 발명의 간단한 요약

[0012] 제1 양태에서, 본 발명은 MYC-억제 펩티드(MYC-inhibiting peptide) 및 하나 이상의 이중 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 상기 MYC-억제 펩티드는 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 길이가 약 100개 이하의 아미노산이며, 세포, 특히 암 세포에서 MYC 활성을 억제한다. 예를 들어, 상기 MYC-억제 펩티드는 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 또는 90개 아미노산 이하의 길이일 수 있다. 또한, 상기 MYC-억제 펩티드는 NCoA2 단백질에 결합하고 및/또는 SWI/SNF 복합체에 결합하는 능력에 기초하여 식별되고 스크리닝될 수 있다.

[0013] 일부 구체예에서, 상기 MYC-억제 펩티드는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 및 추가 펩티드, 바람직하게는 TAT 서열과 같은 이중(heterologous) 펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 MYC-억제 펩티드는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 구성된다. 일부 경우에, 본 발명의 폴리펩티드는 하나 이상의 D-아미노산을 포함하고, 이들은 상기 MYC-억제 펩티드 또는 상기 이중 펩티드(들)에 위치할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 이중 펩티드는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 예를 들면, 특정 목적 세포 유형(예를 들면, 암 세포)에 자연적으로 존재하는 세포 표면 항원과 같은 항원을 특이적으로 인식할 수 있는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 단쇄 항체(single chain antibody)이고 및/또는 인간화된다. 일부 구체예에서, 상기 항체에 의해 인식되는 MYC-의존성 종양 세포의 표면에 위치한 것과 같은 세포 표면 항원이다. 일부 구체예에서, 상기 MYC-억제 펩티드 및 상기 항체 또는 단편은 펩티드 링커에 의해 연결되고, 일부 경우에, 상기 링커는 하나 이상의 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 N-말단에 핵 국재화 신호(nuclear localization signal) 및/또는 신호 펩티드를 더 포함한다.

[0014] 일부 구체예에서, 상기 MYC-억제 펩티드는 세포, 특히 암 세포에서 MYC 활성을 억제하는 활성을 갖는 13개-아미노산 펩티드(13-amino-acid peptide)이다. 상기 펩티드는 보존된 서열 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 예시적인 MYC-억제 펩티드 서열번호 1은 하기 가능성 중 적어도 하나, 가능하게는 둘 이상에 따라 변형될 수 있다: (a) 13개 아미노산 중 적어도 하나는 D-아미노산이거나; (b) 상기 펩티드의 아미노산 서열은 3번 또는 13번 위치에서, 치환, 첨가 및/또는 결실과 같은 가능한 변형으로 서열번호 1과 상이하거나; 또는 (c) 상기 펩티드가 상기 펩티드 내의 하나 이상의 아미노산에 부착된 이중 모이어티와 접합된다.

[0015] 일부 구체예에서, 상기 펩티드는 서열번호 1의 위치 12번 및/또는 13번 위치에 D-아미노산(들)을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 이중 모이어티는 TAT 펩티드이다. 예를 들어, 상기 TAT 펩티드 및 상기 MYC-억제 펩티드는 동일한 폴리펩티드 사슬 내에, 예를 들어 융합 단백질의 형태로 존재한다. 예시적인 TAT 펩티드는 서열번호 2 또

는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 구성된다.

- [0016] 일부 구체예에서, 상기 펩티드는 항체 또는 항체 단편과 접합된다. 예를 들어, 상기 항체 단편은 ScFv와 같은 단쇄 항체이다. 일부 구체예에서, 상기 펩티드 및 상기 항체(예를 들어, 단쇄 항체) 또는 항체 단편은 융합 단백질로서 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 일부 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 인간화된다. 일부 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 MYC-의존성 종양 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하거나 그에 대한 결합 친화도를 갖는다.
- [0017] 일부 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 서열번호 1의 3번 위치에 트레오닌을 갖는다. 일부 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 서열번호 1의 13번 위치에 세린 또는 글루탐산을 갖는다. 일부 구체예에서, 서열번호 1의 펩티드 또는 서열번호 1로부터 유래된 펩티드는 화학적 링커에 의해 이중 모이어티와 연결된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 핵 국제화 신호를 더 포함한다. 일부 구체예에서, 서열번호 1의 펩티드 또는 서열번호 1로부터 유래된 펩티드는 하나 이상의 세린 프로테아제 절단 부위를 포함하는 링커와 같은 절단 가능한 펩티드 링커에 의해 폴리펩티드 이중 모이어티와 연결된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 C-말단에 시스테인 잔기를 갖는다. 일부 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 N-말단에 신호 펩티드를 갖는다.
- [0018] 일부 구체예에서, 상기 이중 모이어티는 바이러스 기원의 단백질, 예를 들면, 바이러스 캡시드 단백질(예를 들어, 아데노바이러스 또는 아데노-연관 바이러스(AAV) 또는 E형 간염 바이러스(HEV) 캡시드 단백질) 또는 바이러스 유사 입자(VLP)의 형성을 허용하는 그의 부분을 포함한다. 예를 들어, Buning and Srivastava, *Mol Ther Methods Clin Dev.* 12: 248-265 (2019); Le, *et al.*, *Sci Rep* 9, 18631 (2019); U.S. Patent No. 8,906,862; WO2019/178288; WO2019/236870을 참조한다. 다른 구체예에서, 상기 이중 모이어티는 치료 DNA 분자, 치료 RNA 분자, 소분자 치료제 또는 이들의 조합을 포함하는 바이러스(예를 들어, 아데노 바이러스 또는 AAV) 또는 VLP를 포함한다.
- [0019] 제2 양태에서, 본 발명은 MYC-억제 펩티드의 형태 또는 융합 단백질, 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나 그로 구성되고, 선택적으로 하나 이상의 잔기가 변형(예를 들면, 치환, 결실 또는 추가)된 것인 서열번호 4의 컨센서스 서열에 합치하는(fitting) 펩티드의 형태, 또는 MYC-억제 펩티드와 이중 기원으로부터 유래된 제2 펩티드 간의 융합 단백질의 형태로 본 발명의 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.
- [0020] 제3 양태에서, 본 발명은 프로모터, 특히 이중 프로모터에 작동가능하게 연결된, 본원에서 전술된 MYC-억제 펩티드 또는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 제공한다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드 서열 또는 상기 발현 카세트를 포함하는 벡터가 제공된다. MYC-억제 펩티드 또는 그의 융합 단백질을 코딩하는 전술된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포, 상기 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터 또는 발현 카세트가 또한 제공된다. 일부 경우에, 상기 숙주 세포는 상기 MYC-억제 펩티드 또는 융합 단백질을 포함한다.
- [0021] 관련된 양태에서, 본 발명은 또한 본 발명의 융합 단백질과 같은 펩티드 또는 펩티드 접합체, 또는 상기 펩티드 또는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 상기 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트, 또는 벡터와 함께 생리학적 또는 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 본 발명의 융합 단백질을 포함하는 숙주 세포, 상기 펩티드 또는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 또는 상기 펩티드 또는 융합 단백질의 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트 또는 벡터를 포함한다.
- [0022] 제4 양태에서, 본 발명은 세포, 특히 MYC가 과발현되거나 달리 강화된 MYC 활성을 갖는 세포, 예를 들면, 암 세포에서 MYC 활성을 억제하거나, 또는 림프구증식성(lymphoproliferative), 면역 또는 염증성 반응, 예를 들면, 부적절하게 활성화된 B 또는 T 세포와 관련된 자가면역 질환을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 암에서 조절 T 세포(T regulatory cell)와 같은 바람직하지 않은 세포의 MYC-의존적 확장 또는 기능을 고갈시키는 수단을 제공한다. 상기 방법은 전술되고 본원에 기재된 융합 단백질 및 펩티드 접합체를 포함하는 본 발명의 펩티드의 유효량과 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 대안적으로, 상기 방법은 전술되고 본원에 기재된 융합 단백질을 포함하는 본 발명의 펩티드를 코딩하는 핵산(예를 들어, 발현 카세트 또는 벡터)의 유효량과 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 전술되고 본원에 기재된 융합 단백질 및 펩티드 접합체를 포함한 본 발명의 펩티드를 투여함으로써 개체에서 MYC-의존성 암을 치료하거나 림프구증식성, 염증성 또는 면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 암 환자에서 조절 T 세포와 같은 바람직하지 않은 억제 세포의 MYC-의존적 확장 또는 기능을 억제하는 수단을 제공한다

다. 일부 구체예에서, 특히 부적절하게 활성화된 B 또는 T 세포에 의해 매개되는 자가면역 질환과 같은 림프구 증식성, 염증성 또는 면역 질환이다. 대안적으로, 상기 방법은 전술되고 본원에 기재된 바와 같은 융합 단백질을 포함하는 본 발명의 펩티드를 코딩하는 핵산(예를 들어, 발현 카세트 또는 벡터)의 유효량 또는 전술되고 본원에 기재된 약학적 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 암은 원발성 삼출성 림프종(primary effusion lymphoma: PEL)이다.

과제의 해결 수단

1. 개요

본 개시는 증식 세포, 예를 들어 암세포 및 B 또는 T 세포와 같은 림프계 세포에서 MYC 활성을 억제하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 개시는 카포시 육종-연관 헤르페스바이러스(KSHV)로부터 유래된 변형된 펩티드가 암세포와 같은 세포에서 MYC 활성을 효과적으로 억제할 수 있다는 놀라운 발견에 기초한다. MYC 의존성-암세포에서 MYC 활성을 억제하면 세포의 성장을 억제할 수 있고, 일부 경우에, 세포를 사멸시킬 수 있다. 임의의 특정 이론에 한정되지 않으면서, 상기 펩티드는 핵 수용체 보조 활성인자 2(Nuclear receptor coactivator 2: NCOA2), p300 및 SWI/SNF 단백질로 이루어진 보조 활성인자 복합체의 MYC 발현 및 전사촉진(transactivation)을 위한 MYC 프로모터로의 동원(recruitment)을 차단하는 데코이(decoy)로 작용함으로써 MYC 활성을 억제하는 것으로 여겨진다.

본 발명의 다른 구체예에서, 증식 세포(예를 들면, 암세포 및 림프계 세포)에서 MYC 활성을 억제하기 위해 사용되는 펩티드는 임의의 다양한 방식으로 변형된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 펩티드는 펩티드의 하나 이상의 아미노산의 D-아미노산으로의 치환을 포함한다. 일부 구체예에서, 펩티드는 서열번호 1 대비 하나 이상의 아미노산 차이를 포함한다. 일부 구체예에서, 펩티드는 검출가능한 모이어티, 기관(예를 들어, 고체 지지체로서 작용함), 다른 기원의 펩티드(서열번호 1과 동일한 단백질로부터 유래되지 않음), 예를 들면, 세포 침투 펩티드(cell penetrating peptide: CPP) 또는 펩티드에 연결된 항체를 포함하나, 이에 한정되지 않는 이중 모이어티(heterologous moiety)를 포함한다. 또한, 펩티드는 효과 및/또는 적용 범위를 향상시키기 위해 용해도, 안정성 및 생체 이용률과 같은 펩티드의 특성을 최적화하기 위해 하나 이상의 아미노산 잔기에서 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 글리코실화 및 폐길화에 의해 변형될 수 있다. 세포에서 MYC 활성을 억제하기 위해 펩티드를 사용하는 방법, MYC-발현 암세포 또는 림프구 세포의 성장을 억제하는 방법 및 MYC-연관 암 또는 염증성 장애, 예컨대 자가 면역 질환을 가진 개체를 치료하는 방법이 제공된다.

2. 정의

본 명세서에서 사용된, 하기 용어는 달리 명시되지 않는 한 그에 해당하는 의미를 갖는다.

본원에서 사용되는 용어 "a", "an" 또는 "the"는 하나의 일원을 갖는 양태를 포함할 뿐만 아니라 하나 이상의 일원을 갖는 양태도 포함한다. 예를 들어, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한, 복수 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "세포"에 대한 언급은 복수의 이러한 세포를 포함하고 "작용제(agent)"에 대한 언급은 당업자에게 공지된 하나 이상의 작용제에 대한 언급을 포함하는 식이다.

본원에서 사용되는 용어 "약(about)" 및 "대략(approximately)"은 일반적으로, 주어진 측정의 특성 또는 정밀도를 고려할 때 측정된 양에 대한 오차의 허용가능한 정도를 의미할 것이다. 전형적으로, 예시적인 오류의 정도는 주어진 값 또는 값의 범위의 20 퍼센트(%) 이내, 바람직하게는 10% 이내, 보다 바람직하게는 5% 이내이다.

"약 X"에 대한 모든 언급은 구체적으로 적어도 값 X, 0.8X, 0.81X, 0.82X, 0.83X, 0.84X, 0.85X, 0.86X, 0.87X, 0.88X, 0.89X, 0.9X, 0.91X, 0.92X, 0.93X, 0.94X, 0.95X, 0.96X, 0.97X, 0.98X, 0.99X, 1.01X, 1.02X, 1.03X, 1.04X, 1.05X, 1.06X, 1.07X, 1.08X, 1.09 X, 1.1X, 1.11X, 1.12X, 1.13X, 1.14X, 1.15X, 1.16X, 1.17X, 1.18X, 1.19X 및 1.2X를 나타낸다. 따라서, "약 X"는 예를 들어 "0.98X"의 청구 한정에 대한 발명의 설명에 의한 뒷받침을 교시하고 제공하도록 의도된다.

용어 "펩티드를 코딩하는 핵산 서열(nucleic acid sequence encoding a peptide)"은, 펩티드 사슬(예를 들어, 항원 또는 융합 단백질을 생산하는 데 관련된, DNA의 세그먼트, 일부 구체예에서, 유전자 또는 그의 일부일 수 있는 DNA의 세그먼트를 의미한다. 유전자는 일반적으로 유전자 산물의 전사/번역 및 전사/번역의 조절에 관여하는 코딩 영역(리더 및 트레일러(trailer))에 선행하는 영역 및 후행하는 영역을 포함한다. 유전자는 또한 개별 코딩 세그먼트(엑손) 사이에 개재(intervening) 서열(인트론)을 포함할 수 있다. 리더, 트레일러 및 인트론은

유전자의 전사 및 번역 동안 필요한 조절 요소를 포함할 수 있다(예를 들면, 프로모터, 터미네이터, 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site)와 같은 번역 조절 서열, 인핸서, 사일런서(silencer), 인슐레이터(insulator), 경계 요소(boundary element), 복제원점, 매트릭스 부착 부위(matrix attachment site) 및 로커스 제어 영역(locus control region) 등). "유전자 산물(gene product)"은 특정 유전자로부터 발현된 mRNA 또는 단백질을 의미할 수 있다.

[0032] 용어 "발현" 및 "발현된"은 예를 들어, 단백질(예를 들어, 항원 또는 융합 단백질)을 코딩하는 핵산 서열의 전사 및/또는 번역 산물의 생성을 의미한다. 일부 구체예에서, 이 용어는 유전자(예를 들어, 항원을 코딩하는 유전자) 또는 그의 일부에 의해 코딩되는 전사 및/또는 번역 산물의 생성을 의미한다. 세포에서 DNA 분자의 발현 수준은 세포 내에 존재하는 상응하는 mRNA의 양 또는 세포에 의해 생성된 해당 DNA에 의해 코딩된 단백질의 양을 기준으로 평가될 수 있다.

[0033] 예를 들어, 폴리뉴클레오티드, 단백질, 벡터 또는 세포와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은 폴리뉴클레오티드, 단백질, 벡터 또는 세포가 이중 핵산 또는 단백질의 도입에 의해, 또는 원형(native) 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 재조합 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 원형(재조합이 아닌) 형태 내에서 발견되지 않는 핵산 서열을 포함한다.

[0034] 본원에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"은 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA) 및 이들의 폴리머를 의미한다. 이 용어는 단일 가닥, 이중 가닥 또는 다중 가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA 및 DNA-RNA 하이브리드, 및 퓨린 및/또는 피리미딘 염기 또는 기타 천연, 화학적으로 변형된, 생화학적으로 변형된, 비천연, 합성 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 폴리머를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 이 용어는 참조(reference) 핵산과 유사한 결합 특성을 갖는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 포함하는 핵산을 포함한다. 달리 표시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 보존적으로 변형된 그의 변이체(예를 들어, 축퇴(degenerate) 코돈 치환), 상동체(homologs) 및 상보적 서열, 및 명시적으로 표시된 서열을 암시적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합-염기(mixed-base) 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다 (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); and Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

[0035] 용어 "벡터" 및 "발현 벡터"는 숙주 세포 또는 조작된(engineered) 세포에서 특정 핵산 서열(예를 들어, 본 발명의 항원 및/또는 또는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열)의 전사를 허용하는 일련의 특정된 핵산 요소를 갖는, 재조합에 의해 또는 합성에 의해 생성된, 핵산 구조체(nucleic acid construct)를 의미한다. 일부 구체예에서, 벡터는 프로모터에 작동가능하게 연결된, 전사될 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 벡터에 존재할 수 있는 기타 요소는 전사를 증진시키는 요소(예를 들면, 인핸서), 전사를 종결시키는 요소(예를 들면, 터미네이터), 벡터로부터 생성된 단백질(예를 들면, 재조합 단백질)에 대한 특정한 결합 친화도 또는 항원성을 부여하는 요소, 및 벡터의 복제 및 그의 패키징(예를 들어, 바이러스 입자로의 패키징))을 가능하게 하는 요소를 포함한다. 일부 구체예에서, 벡터는 바이러스 벡터(즉, 바이러스 게놈 또는 이의 일부)이다. 벡터는 예를 들어 향성(tropism)을 증가시키고 및/또는 면역 기능을 조절하는 핵산 서열 또는 돌연변이를 포함할 수 있다. "발현 카세트"는 프로모터, 및 선택적으로, 폴리아데닐화 서열에 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 포함한다.

[0036] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 호환적으로 사용된다. 세 가지 용어 모두는 천연 아미노산 중합체 및 비-천연 아미노산 중합체 뿐 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 아미노산의 인공적인 화학적 모사체(artificial chemical mimetic)인 아미노산 중합체에 적용된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 이 용어들은 아미노산 잔기가 공유 펩티드 결합에 의해 연결된 것인 전장 단백질을 포함한, 임의의 길이의 아미노산 사슬을 포함한다.

[0037] 용어 "대상", "개체" 및 "환자"는 본원에서 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간을 지칭하기 위해 호환적으로 사용된다. 포유류는 설치류(생쥐, 쥐 등), 고양이, 소, 유인원, 영장류(인간 포함), 가축, 스포츠 동물 및 애완동물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 인 비보에서 수득되거나 인 비트로에서 배양된 생물학적 개체(biological entity)의 조직, 세포, 및 그들의 자손도 포함된다.

[0038] 본원에서 사용되는, 용어 "투여"는 개체에 대한 경구 투여, 국소 접촉, 좌약으로서의 투여, 정맥내, 복강내, 근육내, 병소내, 종양내, 경막내, 비강내, 골내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 비경구 및 경점막(예를 들어, 협측(buccal), 설하, 구개측(palatal), 치은, 비강, 질, 직장 또는 경피)을 포함한, 임의의 경로에 의해 이루어

진다. 비경구 투여는 예를 들어, 정맥내, 근육내, 동맥내, 피내, 피하, 복강내, 심실내, 골내 및 두개내를 포함한다. 다른 전달 방식은 리포솜 제형, 정맥내 주입, 경피 패치 등의 사용을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 용어 "치료"는 치료적 이점 및/또는 예방적 이점을 포함하나, 이에 한정되지 않는 유익한 또는 원하는 결과를 얻기 위한 접근법을 의미한다. "치료적 이점(therapeutic benefit)"은 치료 중인 하나 이상의 질병, 질환, 또는 증상에 대한 치료적으로 유의한 개선 또는 효과를 의미한다. 치료적 이점은 또한 치료 중인 하나 이상의 질병, 질환, 또는 증상을 치유하는 것을 의미할 수 있다. 또한, 치료적 이점은 생존율 증가를 의미할 수도 있다. 예방적 이점(prophylactic benefit)을 위해, 조성물은 특정 질병, 질환, 또는 증상을 발병할 위험이 있는 개체에게 또는 질병, 질환, 또는 증상이 존재하지 않더라도, 질병의 하나 이상의 생리학적 증상을 보고하는 개체에게 투여될 수 있다.

[0040] 용어 "치료적 유효량(therapeutically effective amount)" 또는 "충분한 양"은 유익한 또는 원하는 결과를 달성하기에 충분한 본원에 기술된 시스템, 제조법 폴리뉴클레오티드 또는 조성물의 양을 의미한다. 치료적 유효량은 치료대상 개체 및 질병 상태, 개체의 체중 및 연령, 질병 상태의 중증도, 개체의 면역 상태, 투여 방식 등 중 하나 이상에 의해 달라질 수 있고, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 구체적인 양은 선택된 특정한 작용제, 표적 세포 유형, 개체 중 표적 세포의 위치, 적용될 투여 요법(dosing regimen), 다른 화합물과의 병용 투여 여부, 투여 시기, 및 운반하는 물리적 전달 시스템(physical delivery system) 주 d하나 이상에 따라 달라질 것이다.

[0041] 본원의 목적을 위해, 유효량은 당업계에 공지될 수 있는 고려사항에 의해 결정된다. 유효량은 감염성 질환 또는 암과 같은 질병을 앓고 있는 개체에서 원하는 치료 효과를 달성하기에 효과적이어야 한다. 원하는 치료 효과는 예를 들어, 질병과 관련된 바람직하지 않은 증상의 완화, 그러한 증상이 발생하기 전에 그러한 증상의 징후(manifestation)의 예방, 질병과 관련된 증상의 진행 둔화, 질병에 의해 유발된 회복 불가능한 손상의 둔화 또는 제한, 질병의 중증도 완화, 또는 생존율 개선, 또는 질병으로부터 보다 빠른 회복의 제공을 포함할 수 있다. 또한, 예방적 치료의 맥락에서, 유효량은 또한 질병의 발병을 예방하는 데 효과적일 수 있다.

[0042] 용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 세포, 유기체, 또는 개체에 대한 활성제의 투여를 돕는 물질을 의미한다. "약학적으로 허용되는 담체"는 또한 본 발명의 조성물에 포함될 수 있고, 환자에게 유의한 유해 독성 효과를 유발하지 않는 담체 또는 부형제를 의미한다. 약학적으로 허용되는 담체의 비-한정적 예는 물, 염화나트륨(NaCl), 생리 식염수(normal saline solution), 젖산화 링거(lactated Ringer's), 정상 자당(normal sucrose), 정상 포도당(normal glucose), 결합제, 충전제, 붕해제, 윤활제, 코팅제, 감미제, 향료 및 착색제, 리포솜, 분산 매체(dispersion media), 마이크로캡슐, 양이온성 지질 담체, 등장성 흡수 지연제(isotonic and absorption delaying agent) 등을 포함한다. 담체는 또한 제형에 안정성, 무균성 및 등장성을 제공하기 위한 물질(예를 들어, 항미생물 보존제, 항산화제, 킬레이트제 및 완충제), 미생물의 작용을 방지하기 위한 물질(예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등과 같은 항미생물제 및 항진균제), 또는 제형에 식용 풍미 등을 제공하기 위한 물질을 포함하거나, 또는 그로 구성될 수 있다. 일부 경우에, 담체는 표적 세포 또는 조직으로의 폴리펩티드, 융합 단백질 또는 폴리뉴클레오티드의 전달을 촉진하는 작용제이다. 당업자는 기타 약학적 담체가 본 발명에 유용하다는 것을 인식할 것이다.

[0043] 표현(phrase) "특이적으로 결합한다"는 비-표적 화합물에 결합하는 것보다 샘플 중 표적에 더 높은 친화도, 결합력(avidity)으로, 더 쉽게 및/또는 더 긴 지속 시간으로 표적에 결합하는 분자(예를 들어, 암 세포 항원에 대한 항체 또는 항체 단편)를 의미한다. 일부 구체예에서, 표적에 특이적으로 결합하는 분자는 비-표적 화합물보다 적어도 2배 더 높은 친화도로, 예를 들어, 적어도 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 25배, 50배 또는 그 이상의 친화도로 그 표적에 결합한다.

[0044] 본원에서 사용되는 용어 "동일한(identical)" 또는 퍼센트 "동일성(identity)"은 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열을 기술하는 맥락에서, 동일한 2개 이상의 서열 또는 특정된 하위서열(specified subsequence)을 지칭한다. "실질적으로 동일한(substantially identical)" 2개의 서열은 서열 비교 알고리즘을 사용하여 측정되는 바와 같이, 비교 창(comparison window) 또는 지정된 영역에 걸쳐 최대 일치치를 위해 비교되고 정렬되거나, 특정 영역이 지정되지 않은 경우, 수동 정렬 및 육안 검사에 의해, 적어도 60% 동일성, 바람직하게는 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는다. 폴리뉴클레오티드 서열과 관련하여, 이 정의는 또한 테스트 서열의 상보체를 지칭한다. 아미노산 서열과 관련하여, 일부 경우에, 동일성은 적어도 약 50개 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이인 영역에 걸쳐, 또는 보다 바람직하게는 75-100개 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이인 영역에 걸쳐 존재한다.

- [0045] 서열 비교를 위해, 일반적으로, 하나의 서열이 테스트 서열이 비교되는 참조 서열(reference sequence)로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 테스트 서열 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요에 따라 서브서열 좌표(subsequence coordinates)를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 디폴트 프로그램 파라미터를 사용하거나, 대안적인 파라미터를 지정할 수 있다. 그 후, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 파라미터에 기초하여, 참조 서열에 대한 테스트 서열의 퍼센트 서열 동일성을 계산한다. 핵산 및 단백질의 서열 비교를 위해, BLAST 2.0 알고리즘 및 디폴트 파라미터가 이용된다.
- [0046] 두 요소의 상대적 위치를 기술하는 맥락에서 사용되는 용어 "이종(heterologous)"은 동일한 상대적 위치에서 자연적으로 발견되지 않는, 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 프로모터 또는 단백질/폴리펩티드-코딩 서열) 또는 폴리펩티드 서열(예를 들어, 서열번호 1 및 융합 폴리펩티드 형태의 접합체에서 서열번호 1과의 융합 파트너로 작용하는 또 다른 펩티드 서열)과 같은 두 요소를 의미한다. 따라서, 유전자의 "이종 프로모터(heterologous promoter)"는 그 유전자에 자연적으로 작동 가능하게 연결되지 않은 프로모터를 의미한다. 유사하게, 서열번호 1 또는 그의 코딩 서열에 대한 "이종 폴리펩티드" 또는 "이종 폴리뉴클레오타이드"는 서열번호 1이 천연 단편으로 유래된 단백질과 상이한 기원으로부터 유래된 것이다. 서열번호 1(또는 그의 코딩 서열)과 이종 폴리펩티드(또는 폴리뉴클레오타이드 서열)의 융합은 온전한 단백질(또는 그의 코딩 서열) 또는 그의 세그먼트로서 자연에서 발견될 수 있는 것보다 더 긴 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열을 초래하지 않는다.
- [0047] 서열번호 1의 MYC-억제 펩티드 또는 그의 유도체를 포함하는 접합체를 기술하는 맥락에서 사용될 때, 용어 "이종 모이어티(heterologous moiety)"는 KSHV(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)의 ORF50 단백질 이외의 소스(source)로부터 기원한 것인 MYC-억제 펩티드의 접합 파트너를 의미한다. MYC-억제 펩티드와 이종 모이어티의 접합체가 융합 단백질인, 즉 이종 모이어티가 또 다른 폴리펩티드이고 펩티드 결합을 통해 MYC-억제 펩티드에 융합된 것인 구체예에서, 두 펩티드 파트너의 융합은 전장 KSHV ORF50 단백질을 초래하지 않아야 하고, 바람직하게는 서열번호 1보다 상당히 더 긴 KSHV ORF50 단백질의 세그먼트, 예를 들어, 길이가 13, 14, 15, 16 또는 17개 아미노산 길이보다 더 긴 세그먼트를 초래하지 않아야 한다. 일부 구체예에서, 이종 모이어티는 치료 효능, 예를 들어, 직접적인 사멸에 의해 또는 프로그래밍된 세포 사멸(아포토시스)을 촉발시키는 것에 의해 표적 세포의 사멸을 유발하는 능력을 갖는 것일 수 있다. 이러한 치료 모이어티는 속성장 폴리펩티드(예를 들어, 항-CD3 항체, 특히 단쇄 항체 ScFv와 같은 항체) 또는 비-폴리펩티드(예를 들어, 탄수화물 또는 올리고뉴클레오타이드 형태의 세포독성제)일 수 있다. 다른 구체예에서, 이종 모이어티는 속성장 비-치료적일 수 있으나, 친화성 모이어티, 표적화 모이어티, 검출가능한/신호 모이어티, 또는 고체 지지체로서 작용하거나 서열번호 1의 펩티드 또는 그의 유도체를 포함하는 접합체의 검출, 분리, 정제, 조직/세포-표적화 전달, 및/또는 고정화를 촉진시키기 위한 기타 유용성을 제공한다.
- [0048] 용어 "염증"은 자극, 독성 물질, 병원체 또는 다른 자극에 대한 유기체(예를 들어, 포유동물)의 면역 반응을 의미한다. 반응에는 선천적 면역 요소 및/또는 적응 면역이 포함될 수 있다. 염증은 일반적으로 만성 또는 급성으로 특징지어진다. 급성 염증은 비-한정적 예로서, 발적, 통증, 열, 부종, 및/또는 환부(affected area)로의 혈장 단백질 및 백혈구 침윤으로 인한 기능 상실을 특징으로 할 수 있다. 만성 염증은 비-한정적 예로서, 지속적인 염증, 조직 파괴 및/또는 복구 시도(attempts at repair)를 특징으로 할 수 있다. 단핵구, 대식세포, 형질 B 세포 및 기타 림프구가 일반적으로 환부로 동원되고, 혈관신생 및 섬유화가 일어날 수 있으며, 경우에 따라 만성 조직을 초래한다.
- [0049] 용어 "염증성 질환(inflammatory condition)" 또는 "염증성 장애"는 전술된 바와 같은 염증 반응을 특징으로 하거나 염증 반응을 수반하는 질환 또는 장애를 의미한다. 예시적인 염증성 질환의 목록은 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 당뇨병, 만성 신장 질환, 천식, 자가면역 질환, 만성 염증, 만성 전립선염, 사구체신염, 과민증 및 알레르기, 습진과 같은 피부 질환, 염증성 장 질환, 골반 염증성 질환, 재관류 손상, 류마티스성 관절염, 이식 거부(예를 들면, 이식편대숙주병), 사이토카인 폭풍 증후군, 이차성 혈구포식성 림프조직구성증(secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis), 패혈증, 대식세포 활성화 증후군 및 혈관염을 포함한다.
- [0050] "자가면역질환"은 환자의 면역계가 자신의 조직을 이물질로 인식하고 비정상적인 면역반응을 일으켜 조직을 공격하는 질환이다. 환부 조직의 지속적이고 낮은 등급의 염증의 일반적인 증상과 함께, 다수의 자가면역 질환이 파악되었고, 하기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 이완불능증, 애디슨병, 성인 스틸병, 무감마글로불린혈증, 원형 탈모증, 아밀로이드증, 강직성 척추염, 항-GBM/항-TBM 신염, 항인지질 증후군, 자가면역 혈관부종, 자가면역 자율신경실조증, 자가면역 뇌척수염, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환(AIED), 자가면역 심근염, 자가면역 난소염, 자가면역 고환염, 자가면역 췌장염, 자가면역 망막병증, 자가면역 두드러기, 축삭 및 신경 신경병증(AMAN), 발로병, 베체트병, 양성 점막 유착포창, 수포성 유착포창, 캐슬만병(CD),

셀리악병, 샤가스병, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 만성 재발성 다발성 골수염(CRMO), 처그-스트라우스 증후군(CSS) 또는 호산구성 육아종증(EGPA), 간질성 유전포창, 코간 증후군, 한랭 응집소 질환, 선천성 심장 차단, 콕사키 심근염, CREST 증후군, 크론병, 포진성 피부염, 피부근염, 데빅병(신신경척수염), 원판상 루푸스, 드레슬러 증후군, 자궁내막증, 호산구성 식도염(EoE), 호산구성 근막염, 결절성 홍반, 본태성 혼합 한랭 글로불린혈증, 에반스 증후군, 섬유근육통, 섬유성 폐포염, 거대 세포 동맥염(측두 동맥염), 거대 세포 심근염, 사구체신염, 굿파스처(Goodpasture) 증후군, 다발혈관염을 동반한 육아종증, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 용혈성 빈혈, 헤노흐-쑤렌 라인 자반병(HSP), 임신포진 또는 임신천포창양(PG), 화농성 땀샘염(HS)(역여드름), 저감마글로불린혈증, IgA 신병증, IgG4 관련 경화성 질환, 면역 혈소판감소성 자반증(ITP), 봉입체 근염(IBM), 간질성 방광염(IC), 소아 관절염, 소아 당뇨병(제1형 당뇨병), 소아 근염(JM), 가와사키병, 램버트-이튼 증후군, 백혈구과괴성 혈관염, 편평태선, 경화태선, 결막염, 선형 IgA 질환(LAD), 루푸스, 만성 라임병, 메니에르병, 현미경적 다발혈관염(MPA), 혼합 결합 조직 질환(MCTD), 무런 케양, 무하-하버만 질병, 다초점 운동 신경병증(MMN) 또는 MMNCB, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 근염, 기면증, 신생아 루푸스, 시신경 척수염, 호중구 감소증, 안 반흔 유전포창, 시신경염, 회문성 류머티즘(PR), PANDAS, 부종양 소뇌 변성(Paraneoplastic Cerebellar Degeneration: PCD), 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 패리 롬버그 증후군, 평면부염(말초 포도막염), 파소니지-터너 증후군, 천포창, 말초 신경병증, 정맥주위 뇌척수염, 악성 빈혈(PA), POEMS 증후군, 결절성 다발동맥염, 다선성 증후군 타입 I, II, III, 류마티스성 다발근통, 다발성근염, 심근경색후 증후군, 심낭절개후 증후군, 원발성 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 프로게스테론 피부염, 건선, 건선성 관절염, 순수적혈구무형성증(PRCA), 괴저성 농피증, 레이노 현상, 반응성 관절염, 교감 반사성 이영양증, 재발성 다발 연골염, 하지 불안 증후군(RLS), 후복막 섬유증, 류마티스 열, 류마티스 관절염, 유육종증, 슈미트 증후군, 공막염, 경피증, 쇼그렌 증후군, 정자 및 고환 자가면역, 정자 및 고환 자가면역, 강직인 증후군(UPS), 아급성 세균성 심내막염(SBE), 수삭 증후군, 교감신경 안염(SO), 타카야수 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 혈소판 감소성 자반증(TTP), 갑상선 안 질환(TED), 톨로사-헌트 증후군(THS), 횡단 척수염, 1형 당뇨병, 케양성 대장염(UC), 미분화 결합 조직 질환(UCTD), 포도막염, 맥관염, 백반증, 및 보그트-코야니기-하라다(Vogt-Koyanagi-Harada) 병.

[0051] 용어 "암"은 주변 조직을 침범하고 새로운 신체 부위로 전이하는 경향이 있는 역형성 세포의 증식을 특징으로 하는 다양한 악성 신생물을 의미한다. 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 치료하기에 적합한 상이한 유형의 암의 비-한정적 예는 결장직장암, 결장암, 항문암, 간암, 난소암, 유방암, 폐암, 방광암, 갑상선암, 흉막암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 고환암, 담관암, 위장 카르시노이드 종양, 식도암, 담낭암, 직장암, 맹장암, 소장암, 위암, 신장암(예를 들면, 신세포 암종), 중추 신경계의 암, 피부암, 구강 편평 세포 암종, 융모막암종, 두경부암, 골암, 골육종, 섬유육종, 신경모세포종, 신경아교종, 흑색종, 백혈병(예를 들면, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 또는 모발상 세포 백혈병), 림프종(예를 들면, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, B 세포 림프종 또는 버킷 림프종), 및 다발성 골수종을 포함한다.

[0052] 용어 "림프증식성 장애(lymphoproliferative disorder)"는 림프구가 단클론성 림프구증가증으로 비정상적으로 증식하는 것을 특징으로 하는 장애를 의미한다. 상기 기재된 바와 같은 백혈병 외에 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 치료하기에 적합한 상이한 유형의 림프증식성 장애의 비-한정적 예는 발렌스트룀 마크로글로불린혈증, 비스킷-알드리치 증후군, 랑게르한스 세포 조직구증, 림프구-변이 과호산구증가증, 리체노이드 피티리아증, 이식 림프증식성 장애(post-transplant lymphoproliferative disorder), 자가면역 림프증식성 증후군, 림프성 간질성 폐렴, 엡스타인-바 바이러스 관련 림프증식성 질환, 캐슬만병, X-연관 림프증식성 질환을 포함한다.

[0053] 용어 "억제 세포(suppressor cell)"는 세포-세포 접촉, 사이토카인 및 사멸을 포함한 다양한 메커니즘을 통해 항체 생성 또는 T 세포 증식과 같은 생산적 면역 반응을 억제할 수 있는 림프구를 의미한다. 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 치료하기에 적합한 상이한 유형의 억제성 면역 세포의 비-한정적 예는 조절 T 세포, Tr1 세포, 조절 B 세포 및 골수-유래 억제 세포를 포함한다.

[0054] 3. 세포에서 MYC 활성을 억제하는 펩티드

[0055] 서열

[0056] 본 개시는 카포시 육종-연관 헤르페스바이러스(KSHV), 특히 세포 보조 활성인자인 NCoA2와의 상호작용에 중요하고, MYC의 활성화를 억제하고 핵 수용체 보조 활성인자 2(NCOA2), p300 및 SWI/SNF 단백질로 구성된 보조 활성인자 복합체가 MYC 프로모터로 동원되는 것을 차단하는 바이러스 KSHV 단백질인 ORF50의 보존된 13개-아미노산 영역으로부터 유래된 펩티드를 제공한다. ORF50으로부터의 13개 아미노산 펩티드는 본원에서 MBK50 또는 VGN50

펩티드로 지칭된다. 본원에 기재된 MBK50 펩티드 또는 MBK50에 기초한/으로부터 유래된 펩티드를 세포 내로 도입함으로써, 예를 들어 MYC가 과발현된 암세포에서 MYC 유전자 발현이 억제될 수 있고, 그에 의해 MYC-유도 유전자 전사 및 세포 성장을 억제하고, 일부 경우에 세포를 사멸시킨다.

[0057] 특정 구체예에서, 상기 펩티드는 길이가 13개 이상의 아미노산이고 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나 (또는 그로 구성되거나), 1, 2, 3 또는 4번 위치를 제외하고는 서열번호 1과 동일한 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 1과 약 70%, 80%, 85%, 90%, 92% 또는 그 이상 동일하다. 특정 구체예에서, 상기 펩티드는 3번 위치 및/또는 13번 위치를 제외한 모든 아미노산 위치에서 서열번호 1과 동일하다. 상기 펩티드는 3번 위치 및/또는 13번 위치에 임의의 다른 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 펩티드의 3번 위치에 있는 아미노산은 트레오닌이다. 일부 구체예에서, 상기 펩티드의 13번 위치에 있는 아미노산은 세린 또는 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 펩티드는 13개 아미노산보다 짧고, 예를 들어, 10, 11, 또는 12개 아미노산이고, 일부 구체예에서, 상기 펩티드는 13개 아미노산보다 길고, 예를 들어, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 아미노산의 길이이다. 일부 구체예에서, 예를 들어 MBK50 펩티드가 항체 또는 세포-투과 단백질과 같은 또 다른 모이어티와의 융합 단백질 내에 존재할 때, 상기 펩티드를 포함하는 전체 폴리펩티드는 임의의 길이, 예를 들어 약 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500개 이상의 아미노산, 또는 약 10-20개의 아미노산, 15-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-150, 150-200, 200-300, 300-400, 400-500 또는 그 이상의 아미노산의 길이일 수 있다.

[0058] 비-표준 아미노산(Non-standard amino acids)

[0059] 일부 구체예에서, 상기 펩티드는 D-아미노산, β -알라닌 또는 오르니틴과 같은 하나 이상의 비-표준 아미노산을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 펩티드 내의 하나 이상의 아미노산은 D-아미노산이다. D-아미노산은 상기 펩티드의 임의의 위치, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13번 위치, 또는 이들의 임의의 조합에 존재할 수 있다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 D-아미노산은 상기 펩티드의 C-말단 아미노산, 예를 들어 13번 위치, 또는 12 및 13번 위치, 또는 11, 12 및 13번 위치에 존재한다. 특정 구체예에서, 상기 펩티드의 2개의 C-말단 아미노산은 D-아미노산이다. 특정 구체예에서, 2개의 C-말단 아미노산은 아스파르트산 및 트레오닌, 세린 또는 글루탐산(즉, -DT, -DS, -DE)이다. D-아미노산은 또한 13개-아미노산 MBK50 펩티드를 포함하는 융합 단백질과 같은 더 큰 펩티드 또는 폴리펩티드에 혼입(incorporate)될 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, MBK50 펩티드에 연결된 변형된 TAT 펩티드를 포함하는 펩티드가 사용되며, 여기서 전체 펩티드의 N-말단 아미노산(예를 들면, TAT 펩티드 내의 아르기닌) 및 2개의 C-말단 아미노산(예를 들면, MBK50 펩티드 내의 아스파르트산 + 트레오닌/세린/글루탐산)은 D-아미노산이다. 예를 들어, 도 2를 참조한다.

[0060] 일부 구체예에서, 펩티드는 오르니틴, b-알라닌 등과 같은 다른 비표준 아미노산을 포함한다. 이러한 아미노산은 13개-아미노산 MBK50 펩티드 내의 임의의 위치에서 또는 MBK50 펩티드 및 항체 또는 세포 투과 단백질과 같은 하나 이상의 추가 모이어티를 포함하는 더 큰 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 융합 단백질의 임의의 위치에서 혼입될 수 있다.

[0061] D-아미노산 및 기타 비표준 아미노산은 임의의 적합한 방법을 이용하여 펩티드에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 이들은 공지된 방법을 이용한 펩티드의 화학적 합성 동안 또는 유전자 코드 재프로그래밍을 이용한 무세포 시스템에서의 재조합 펩티드의 생산 동안 혼입될 수 있다(예를 들어, Katoh *et al.*, *Cell Chem Biol* 24:46-64 참조).

[0062] 접합체 (Conjugates)

[0063] 일부 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 이중 모이어티, 예를 들면, 펩티드의 용이한 분리/식별을 허용하거나, 펩티드의 안정성/생체이용률을 향상시키거나, 펩티드를 특정 세포 유형으로 표적화하고, 및/또는 세포로의 진입을 촉진하도록 설계된 모이어티에 접합된다. 상기 모이어티는 화학적 링커를 이용하여 펩티드에 부착될 수 있거나, 상기 모이어티도 폴리펩티드인 경우, 펩티드 결합을 통해 부착될 수 있고, 즉, 두 개의 펩티드 또는 폴리펩티드가 융합 단백질로서 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일부 경우에, 링커는 적절한 프로테아제의 존재 하에 펩티드와 그의 접합 파트너의 용이한 분리를 허용하도록 절단가능한 펩티드 링커이다.

[0064] 일부 구체예에서, 상기 모이어티는 세포 투과 펩티드(cell penetrating peptide: CPP)이다(예를 들어, 그의 전체 개시가 참조에 의해 본원에 포함된, Patel *et al.* (2019) *Scientific Reports* 9: article no. 298 참조). 특정 구체예에서, CPP는 TAT 펩티드(HIV의 TAT(transactivator of transcription)로부터 유래된

GRKKRRQRRRPQ), 또는 그의 변이체 또는 유도체이다. 일부 구체예에서, CPP는 하나 이상의 비-표준 아미노산, 예를 들어 D-아미노산, β -알라닌 및/또는 오르니틴을 포함한다. 특정 구체예에서, TAT 펩티드는 D-아미노산, β -알라닌 또는 오르니틴, 예를 들어 서열: 도 2에 표시된, d-Arg-KKRR-오르니틴-RRR- β -알라닌을 포함한다. 특정 구체예에서, TAT 펩티드(또는 다른 CPP)는 13개-아미노산 MYC 억제 펩티드를 갖는 단일 폴리펩티드 사슬에, 예를 들어 MYC-억제 펩티드에 대한 N-말단에 존재한다. 일부 구체예에서, TAT 펩티드가 MYC-억제 펩티드의 바로 N-말단이다(예를 들어, 도 2 참조). 다른 구체예에서, TAT와 MYC-억제 펩티드 사이에 링커 및/또는 다른 요소가 존재한다. 일 구체예에서, 펩티드는 예를 들어 하기와 같이 변형된 TAT 단백질과의 접합체로서 투여된다: d-Arg - KKRR - 오르니틴 - RRR - β -알라닌 - LSSILQGLYQLDT, 또는 d-Arg - KKRR - 오르니틴 - RRR - β -알라닌 - LSSILQGLYQL - d-Asp - d Thr 또는 d-Arg - KKRR - 오르니틴 - RRR - β -알라닌 - LSSILQGLYQL-- d-Asp - d Ser 또는 d-Arg - KKRR - 오르니틴 - RRR - β -알라닌 - LSSILQGLYQL-- d-Asp - d Glu 또는 d-Arg - KKRR - 오르니틴 - RRR - β -알라닌 - LSTILQGLYQL-- d-Asp - d Thr. 예를 들어, 도 2를 참조한다.

[0065] 일부 구체예에서, MYC-억제 펩티드의 접합 파트너는 MYC-억제 펩티드와 유사하거나 상이한 치료 이점을 제공할 수 있는 치료 모이어티이다. 두 파트너의 접합은 치료 적용에서 접합체의 별개의 양태를 추가할 수 있을 뿐만 아니라 각 파트너 단독의 효능을 증진시킬 수 있다. 예를 들어, 치료 모이어티의 존재는 MYC-억제 펩티드의 항 증식 또는 항염증 효능을 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상, 예컨대 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 5, 10, 20, 25, 50, 80, 100, 또는 500, 또는 1000배의 증가를 가져올 수 있다. 또한, 물리적으로 근접한 두 파트너의 존재는 두 파트너의 합쳐진 치료 효능의 시너지 효과를 생성할 수 있다. 예를 들어, 결과적으로 수득된 접합체의 항암 효과는 두 파트너의 부가적 효과로부터 적어도 50%, 100%, 150%, 200% 이상, 예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10배 이상의 증가를 나타낼 수 있다.

[0066] 일부 구체예에서, 이중 모이어티는 접합체를 미리 결정된(pre-determined) 표적 기관, 조직 또는 세포 유형, 예를 들어 암세포, T 또는 B 세포와 같은 면역 세포에 전달하는 역할을 하며, 이는 유방암, 폐암, 및 백혈병, 림프종(예를 들면, B세포 림프종)을 포함한 다양한 유형의 림프종식성 질환과 같은 악성 종양 및 자가 반응성 T 세포를 표적으로 하는 것에 의한 전신성 홍반성 루푸스, 또는 자가 반응성 B 세포를 표적으로 하는 것에 의한 당뇨병 및 다발성 경화증 등의 자가면역질환을 포함한 염증성 질환의 표적화 치료를 가능하게 할 것이다. 이식 거부에서 이식편대숙주병의 경우, 숙주 조직을 공격하는 T 세포가 완화될 수 있다. 또 다른 예는 아토피성 피부염과 같은 알레르기 질환에서 피부 또는 전신에서 IgE 생성 B 세포를 표적으로 하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 종양을 직접적으로 표적화하는 것 외에, 종양에서 Foxp3⁺ 조절 T 세포 또는 골수 유래 억제 세포와 같은 억제 세포를 부수적으로 표적화하여 전체 항종양 효능을 증가시킬 수 있다.

[0067] *항체 접합체*

[0068] 일부 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 항체 또는 그의 단편, 예를 들어 MYC가 과발현된 암세포(즉, "MYC-연관 암(MYC-associated cancer)", 또는 "MYC-의존성 암") 또는 염증성 질환에 관여하는 B 또는 T 세포와 같은 림프구 세포에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체에 접합된다. 이러한 구체예에서, 항체 또는 항체 단편은 펩티드가 세포에 의해 내재화되어 MYC 활성을 억제할 수 있는 MYC-의존성 암세포로 인 비보에서 펩티드를 지향시킬 수 있다. 이러한 구체예에서, 항체는 단일 폴리펩티드 사슬에 단쇄 항체 및 펩티드 모두를 포함함으로써 펩티드에 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 펩티드 및 항체는 표적 세포 부근에서 펩티드를 유리시킬 수 있도록, 링커, 예를 들어 프로테아제(예를 들어, 매트릭스 메탈로프로테아제) 절단 부위를 갖는 링커에 의해 분리된다. 다른 구체예에서, 항체 또는 항체 단편은 펩티드에 화학적으로 연결될 수 있다.

[0069] 항체 및 항체 단편 외에, MYC-의존성 암세포 또는 표적 림프계 세포(예를 들면, B 또는 T 세포)에 특이적으로 결합하는 임의의 분자가 본 발명의 펩티드에 연결될 수 있다. 예를 들어, MYC 의존성 암세포 표면의 수용체에 대한 리간드를 이용할 수 있다. MYC-의존성 암세포 또는 림프계 세포의 표면에 있는 임의의 분자가 임의의 종류의 MYC-연관 암이 가능한 것처럼 표적화될 수 있다(예를 들어, Dang (2012) Cell 149(1):22-35; Gabay et al. (2014) Cold Spr. Harb. Persp. Med. 4(6):a014241 참조). 일부 구체예에서, 암은 원발성 삼출성 림프종(PEL) 또는 다발성 골수종이다. 일부 구체예에서, 항체에 의해 인식되는 항원은, T-세포 림프종과 같은 암을 치료하기 위한 MYC-억제 펩티드 접합체의 사용을 허용하는, CD3이다. 일부 구체예에서, 항체에 의해 인식되는 항원은, 유방암과 같은 암을 치료하기 위한 MYC-억제 펩티드 접합체의 사용을 허용하는, EGFR이다. 많은 경우, 이러한 항체 자체가 항암 효능을 갖고 있어 시너지 효과를 예상한다. 동일한 세포를 표적으로 하는 펩티드 접합 및 비-접합 형태의 조합은 ADCC에 의한 면역 효과의 활성화 및 MYC 인히비틴(inhibitin)에 의한 암세포 성장 억제에 더 도움이 될 것이다. 따라서, 펩티드는 EGFR 또는 VEGF를 표적으로 하는 것과 같은 치료 항체, 예를 들면, VEGF를

표적으로 하는 베바시주맵, 라무시루맵, EGFR 수용체를 표적으로 하는 세특시맵 및 트라스투주맵, 및 HER2에 대한 허셉틴을 포함한, FDA-허가 항암 항체 약물의 효능을 향상시킬 수 있다. 종종 이러한 항체는 바람직하지 않은 면역 반응을 최소화하기 위해 인간화된다. 경우에 따라, 본 발명의 펩티드는 원하는 항체와 연결되고 매트릭스 메탈로프로테아제와 같은 프로테아제와 함께 절단가능한 링커를 이용하여 사용된다.

[0070] 예시적인 면역글로불린(항체) 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각 사량체는 두 개의 동일한 폴리펩티드 사슬의 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25 kDa)와 하나의 "중쇄"(약 50-70 kDa)를 갖는다. 각 사슬의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 정의한다. 따라서, 용어 "가변 중쇄", "V_H" 또는 "VH"는 Fv, scFv, dsFv 또는 Fab를 포함하는 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭하고; 용어 "가변 경쇄", "V_L" 또는 "VL"은 Fv, scFv, dsFv 또는 Fab를 포함하는 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭한다. 등가 분자는 예를 들어 항체 단편을 변형시키거나 과아지 디스플레이 라이브러리로부터 선택하는 것에 의해 유래된 원하는 항원 특이성을 갖는 항원 결합 단백질을 포함한다.

[0071] 일부 구체예에서, 항체는 단일클론 항체이다. 일부 구체예에서, 항체는 다중클론 항체이다. 일부 구체예에서, 항체는 키메라 항체이다. 일부 구체예에서, 항체는 인간화 항체이다. 일부 구체예에서, 항체는 인간 항체이다. 일부 구체예에서, 항체는 F(ab')₂, Fab', Fab, scFv 등과 같은 항원-결합 단편이다. 용어 "항체 또는 항원-결합 단편"은 또한 이중 또는 다중 항원 또는 에피토프 특이성을 갖는 다중-특이적 하이브리드 항체를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 항체는 단쇄 항체이다.

[0072] 일부 구체예에서, 항체는 본원에 개시된 항체 서열의 중쇄 서열 또는 그의 일부, 및/또는 경쇄 서열 또는 그의 일부를 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 본원에 개시된 항체의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 단일 단량체 가변 항체 도메인, 예를 들어 단일 VHH 도메인을 포함하는 나노바디(nanobody) 또는 단일 도메인 항체(sdAb)이다.

[0073] 기타 요소

[0074] MBK50 펩티드 및 CPP 또는 항체 또는 항체 단편과 같은 선택적 모이어티에 더하여, 본 발명에서 사용되는 펩티드는 펩티드 내에서 상이한 요소들을 분리하는 링커, 신호 서열 및 핵 국제화 신호와 같은 기타 요소를 포함할 수 있다.

[0075] 일부 구체예에서, 본 발명의 펩티드 내에서 2개 이상의 요소는 유연한 링커에 의해 분리된다. 단백질 도메인을 분리하기 위한 적합한 링커는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 글리신 및 세린 잔기, 예를 들어 2-20개의 글리신 및/또는 세린 잔기를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 링커는 프로테아제 절단 부위, 예를 들어 세린 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있어, 예를 들어 펩티드가 MYC-의존성 세포로 지향된 후 항체로부터 분리될 수 있다. 일부 구체예에서, 펩티드는 핵 국제화 신호를 포함하여, 펩티드가 핵으로 들어갈 수 있게 하고, 핵에서, 상기 펩티드는 NCoA2에 결합하고 MYC 활성을 억제할 수 있다. 일부 구체예에서, 펩티드는 C-말단에 시스테인 잔기를 포함하여 추가적인 화학적 접합을 허용한다. 특정 구체예에서, 펩티드(또는 폴리펩티드)는 본 발명의 13개-아미노산 MBK50 펩티드, 특정한 목적 세포 또는 조직 유형을 표적으로 하는 인간화 항체, 및 MYC-억제 펩티드로부터 상기 항체를 분리하는 링커를 포함하고, 상기 링커는 프로테아제 절단 부위 및 선택적으로 핵 국제화 신호(NLS)를 포함한다.

[0076] 항체 제조

[0077] MYC-연관 암세포, 또는 B 또는 T 세포와 같은 표적 림프계 세포에 결합하는 항체를 제조하기 위해, 당업계에 공지된 많은 기술이 이용될 수 있다. 예를 들어 Kohler & Milstein, Nature 256:495-497(1975); Kozbor 등, *Immunology Today* 4:72(1983); Cole et al., pp. 77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc.(1985); Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*(1988); 및 Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2nd ed. 1986) 참조. 일부 구체예에서, 항체는 항체 반응의 유도를 위해 동물 또는 동물들(예를 들어, 마우스, 토끼 또는 랫트)을 항원으로 면역화함으로써 제조된다. 일부 구체예에서, 항원은 아쥬반트(예를 들어, 프로인트 애쥬반트)와 함께 투여된다. 일부 구체예에서, 초기 면역화 후, 항원의 1회 이상의 후속 부스터 주사를 투여하여 항체 생산을 개선할 수 있다. 면역화 후, 예를 들어 비장 및/또는 림프 조직으로부터 항원-특이적 B 세포를 수집한다. 단일클론 항체를 생성하기 위해, B 세포를 골수종 세포와 융합하고, 후속적으로 항원 특이성에 대해 스크리닝한다.

- [0078] 목적 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자를 세포로부터 클로닝할 수 있고, 예를 들어, 단일클론 항체를 코딩하는 유전자를 하이브리도마로부터 클로닝하고, 재조합 단일클론 항체를 생산하기 위해 사용할 수 있다. 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자 라이브러리는 또한 하이브리도마 또는 형질 세포로부터 제조될 수 있다. 추가로, 파아지 또는 효모 디스플레이 기술이 선택된 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 이형중합체(heteromeric) Fab 단편을 확인하기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Marks et al., *Biotechnology* 10 참조). :779-783 (1992); Lou et al. *m PEDS* 23:311 (2010); 및 Chao et al., *Nature Protocols*, 1:755-768 (2006) 참조). 대안적으로, 항체 및 항체 서열은 예를 들어, Xu et al., *Protein Eng Des Sel*, 2013, 26:663-670; WO 2009/036379; WO 2010/105256; 및 WO 2012/009568에 개시된 것과 같은, 효모-기반 α c체 제시 시스템을 이용하여 단리 및/또는 확인될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 유전자 산물의 무작위 조합은 상이한 항원 특이성을 갖는 항체의 큰 풀을 생성한다(예를 들어, Kuby, *Immunology*(3rd ed. 1997) 참조). 단쇄 항체 또는 재조합 항체의 생산을 위한 기술(미국 특허 4,946,778, 미국 특허번호 4,816,567)도 항체를 생산하도록 개조될 수 있다.
- [0079] 항체는 원핵 및 진핵 발현 시스템을 포함한 다수의 발현 시스템을 사용하여 생산될 수 있다. 일부 구체예에서, 발현 시스템은 하이브리도마 또는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포이다. 다수의 이러한 시스템은 상업적 공급자로부터 널리 구할 수 있다. 항체가 VH 및 VL 영역을 모두 포함하는 것인 구체예에서, VH 및 VL 영역은 예를 들어 다-시스트론(di-cistronic) 발현 유닛에서 단일 벡터를 사용하여 발현될 수 있거나, 상이한 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 다른 구체예에서, VH 및 VL 영역은 별도의 벡터를 사용하여 발현될 수 있다.
- [0080] 일부 구체예에서, 항체는 친화도 성숙된(affinity-matured) 하나 이상의 CDR, 중쇄 및/또는 경쇄 서열을 포함한다. 키메라 항체의 경우, 키메라 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 마우스와 같은 하나의 종의 항원 결합 영역(중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역)이 인간과 같은 또 다른 종의 이펙터(effector) 영역(불변 영역)에 융합된 것인 키메라 항체를 제조할 수 있다 인간. 또 다른 예로서, 항체의 이펙터 영역이 상이한 면역글로불린 클래스 또는 서브클래스의 이펙터 영역으로 치환된 것인 "클래스 스위칭(class switched)" 키메라 항체가 제조될 수 있다.
- [0081] 일부 구체예에서, 항체는 인간화된 하나 이상의 CDR, 중쇄 및/또는 경쇄 서열을 포함한다. 인간화 항체의 경우, 인간화 항체를 제조하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, US 8,095,890을 참조한다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 소스로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 인간화의 대안으로서, 인간 항체를 생성할 수 있다. 비-한정적 예로서, 면역화 시 내인성 면역글로불린의 생산 없이 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 형질전환(transgenic) 동물(예를 들면, 마우스)을 작제할 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열(germ-line) 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 결합 영역(heavy-chain joining region: JH) 유전자의 동형 접합체 결실(homozygous deletion)은 내인성 항체 생산의 완전한 억제를 초래한다고 기술되었다. 이러한 생식계열 돌연변이 마우스에서 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 어레이의 전달은 항원 접종(antigen challeng) 시 인간 항체의 생산을 초래할 것이다. 예를 들어, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immun.*, 7:33 (1993); 및 미국특허 5,591,669, 5,589,369, 및 5,545,807을 참조한다.
- [0082] 일부 구체예에서, 항체 단편(예를 들면, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 나노바디 또는 디아바디)이 생성된다. 온전한 항체의 단백질분해 처리(예를 들어, Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 24:107-117 (1992); 및 Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985) 참조) 및 단편을 생산하기 위한 재조합 숙주 세포의 이용과 같은 항체 단편의 생산을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 예를 들어, 항체 단편은 항체 파아지 라이브러리에서 분리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편이 대장균 세포로부터 직접 회수되고, 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다(예를 들어, Carter et al., *BioTechnology*, 10:163-167 (1992) 참조). 또다른 접근법에 따라, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 분리될 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 기타 기술이 당업자에게 명백할 것이다.
- [0083] 결합 친화도 및 결합 동역학을 측정하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법은 고체상 결합 분석(예를 들면, ELISA 분석), 면역 침전, 표면 플라즈몬 공명(예를 들면, Biacore™(GE Healthcare, Piscataway, NJ)), 동역학적 배제 분석(kinetic exclusion assay)(예를 들면, KinExA®), 유세포 분석법(flow cytometry), FACS(fluorescence-activated cell sorting), BioLayer 간섭법(예를 들면, Octet™(ForteBio, Inc., Menlo Park, CA)), 및 웨스턴 블롯 분석을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0084] 4. 재조합 펩티드의 제조

- [0085] 본 발명의 펩티드, 즉 단리된 MBK50 펩티드 및/또는 MBK50 펩티드뿐만 아니라 항체 또는 CPP와 같은 다른 모이 어티를 포함하는 융합 단백질 또는 폴리펩티드는 화학적 펩티드 합성 또는 재조합 방법을 통해 제조될 수 있다.
- [0086] 화학 합성
- [0087] 일부 구체예에서, 펩티드는 Merrifield *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2156 (1963); Barany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis, in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* Gross and Meienhofer (eds.), Academic Press, N.Y., vol. 2, pp. 3-284 (1980); 및 Stewart *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis* 2nd ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984)에 기재된 것들과 유사한 절차를 이용한 고상 펩티드 합성 방법에 의해 합성될 수 있다. 합성 동안, 보호된 측쇄를 갖는 N- α -보호된 아미노산이 C-말단에 의해 연결된 성장 폴리펩티드 사슬 및 고체 지지체, 즉 폴리스티렌 비드에 단계적으로 첨가된다. N- α -탈보호된 아미노산의 아미노기를 디시클로헥실카르보디이미드와 같은 시약과 반응시켜 활성화된 N- α -보호된 아미노산의 α -카르복시기와 연결함으로써 펩티드가 합성된다. 유리 아미노기의 활성화된 카르복실기로의 부착이 펩티드 결합 형성을 초래한다. 가장 일반적으로 사용되는 N- α 보호기는 산에 불안정한 Boc와 염기에 불안정한 Fmoc를 포함한다.
- [0088] 펩티드는 또한 Merrifield *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2156 (1963); Barany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis, in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* Gross and Meienhofer (eds.), Academic Press, N.Y., vol. 2, pp. 3-284 (1980); 및 Stewart *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis* 2nd ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984)에 기재된 것들과 유사한 절차를 이용한 고상 펩티드 합성 방법에 의해 합성될 수 있다. 합성 동안, 보호된 측쇄를 갖는 N- α -보호된 아미노산이 C-말단에 의해 연결된 성장 폴리펩티드 사슬 및 고체 지지체, 즉 폴리스티렌 비드에 단계적으로 첨가된다. N- α -탈보호된 아미노산의 아미노기를 디시클로헥실카르보디이미드와 같은 시약과 반응시켜 활성화된 N- α -보호된 아미노산의 α -카르복시기와 연결함으로써 펩티드가 합성된다. 유리 아미노기의 활성화된 카르복실기로의 부착이 펩티드 결합 형성을 초래한다. 가장 일반적으로 사용되는 N- α 보호기는 산에 불안정한 Boc와 염기에 불안정한 Fmoc를 포함한다.
- [0089] 재조합 생산
- [0090] 일부 구체예에서, 펩티드 또는 융합 단백질은 표준 분자 생물학 방법을 이용하여 재조합적으로 생산된다. 예를 들어, MBK50 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 선택적으로, 단일 사슬 항체 또는 TAT 펩티드와 같은 추가 서열을 표준 방법을 이용하여 합성하고, 적절한 발현 벡터, 예를 들어 His-태그 발현 벡터 pET30(a)에 클로닝할 수 있다. 그 후, 재조합 TnC 및 FABP를 적합한 세포, 예를 들어 대장균에서 발현시키고, 정제하고, 단백질 농도 및 순도는 각각 예를 들어 BCA 분석 및 SDS-PAGE에 의해 결정할 수 있다.
- [0091] 재조합 유전학 분야의 일반적인 방법 및 기술을 개시하는 기본 문헌은 Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); and Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (1994)를 포함한다.
- [0092] 핵산의 경우, 크기는 킬로베이스(kb) 또는 bp(base pairs)로 제공된다. 이들은 아가로스 또는 아크릴아미드 겔 전기영동으로부터, 시퀀싱된 핵산 또는 공개된 DNA 서열로부터 유래된 추정치이다. 단백질의 경우, 크기는 킬로달톤(kDa) 또는 아미노산 잔기 개수로 표시된다. 단백질 크기는 겔 전기영동으로부터, 시퀀싱된 단백질, 유도된 아미노산 서열 또는 공개된 단백질 서열로부터 추정된다.
- [0093] 시판되지 않는 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 Beaucage & Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862 (1981)에 의해 최초로 기술된 고상 포스포라미데이트 트리에스테르 방법에 따라, Van Devanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168(1984)에 기술된 자동 합성기를 이용하여 화학적으로 합성된다. 올리고뉴클레오티드의 정제는 Pearson & Reanier, *J. Chrom.* 255: 137-149 (1983).
- [0094] 본 발명의 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열은 예를 들어 Wallace *et al.*, *Gene* 16: 21-26 (1981)의 이중 가닥 주형 시퀀싱을 위한 사슬 종결 방법을 이용하여 클로닝 또는 서브클로닝 후에 검증될 수 있다.
- [0095] 본 발명의 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 그들의 아미노산 서열에 기초하여 결정될 수 있다. 이들은 예를 들어 KSHV 게놈 라이브러리로부터 분리될 수 있거나, 상업적 공급자에 의해 합성될 수 있다. 본 발명의 펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 중합효소 연쇄 반응(PCR)과 같은 표준 클로닝 기술을 사용하여 분리될 수 있다. 이 목적을 위한 대부분의 일반적으로 사용되는 기술은 표준 교과서, 예를 들어, 전술된(*supra*) Sambrook and Russell에 설명된다.

- [0096] 서열 상동성에 기초하여, 축퇴 올리고뉴클레오타이드가 프라이머 세트로서 설계될 수 있고, cDNA 또는 게놈 라이브러리에서 뉴클레오타이드 서열의 세그먼트를 증폭하기 위해 적합한 조건 하에서 PCR이 수행될 수 있다(예를 들어, White et al., *PCR Protocols: Current Methods and Applications*, 1993; Griffin and Griffin, *PCR Technology*, CRC Press Inc. 1994 참조). 증폭된 세그먼트를 프로브로 사용하여, 본 발명의 펩티드를 코딩하는 더 긴 길이의 핵산을 수득한다.
- [0097] 본 발명의 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 획득하면, 코딩 서열을 적절하게 변형(예를 들어, 친화성 태그, 예를 들어, 6 x His 태그 또는 GST 태그와 같은 이종 태그(heterologous tag)에 대한 코딩 서열 추가)하고, 그 후, 벡터, 예를 들어 발현 벡터에 서브클로닝하여, 예를 들어, 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터에 의해 지시되는 재조합 단백질 발현을 허용하는 조건 하에서 숙주 세포의 형질감염 및 배양 후, 결과적으로 수득된 구조체(construct)로부터 재조합 펩티드를 생산할 수 있다.
- [0098] 일부 구체예에서, 본 발명의 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 특정 숙주의 바람직한 코돈 사용(codon usage)과 일치하도록 추가로 변경될 수 있다. 예를 들어, 하나의 균주의 박테리아 세포의 바람직한 코돈 사용이 본 발명의 펩티드를 코딩하고 이 균주에 의해 선호되는 코돈을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 유도하기 위해 이용될 수 있다. 숙주 세포가 보이는 선호 코돈 사용의 빈도는 숙주 세포에 의해 발현되는 다수의 유전자에서 선호 코돈 사용의 빈도를 평균함으로써 계산될 수 있다(예를 들어, 계산 서비스는 일본의 Kazusa DNA Research Institute의 웹사이트에서 이용 가능하다). 이 분석은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 고도로 발현되는 유전자로 제한된다.
- [0099] 본 발명의 펩티드를 코딩하는 핵산의 높은 수준의 발현을 얻기 위해, 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 전사를 지시하는 강력한 프로모터(일반적으로 이종), 전사/번역 터미네이터, 및 번역 개시를 위한 리보솜 결합 부위를 포함하는 발현 벡터로 서브클로닝될 수 있다. 적합한 박테리아 프로모터는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 Sambrook 및 Russell, *supra* 및 Ausubel et al., *supra*에 기술되어 있다. 재조합 폴리펩티드를 발현하기 위한 박테리아 발현 시스템이 예를 들어, 대장균(*E. coli*), 바실러스(*Bacillus* sp.), 살모넬라(*Salmonella*) 및 카울로박터(*Caulobacter*)에서 이용 가능하다. 이러한 발현 시스템용 키트는 상업적으로 이용 가능하다. 포유동물 세포, 효모 및 곤충 세포를 위한 진핵생물 발현 시스템이 당업계에 잘 알려져 있으며 또한 시판되고 있다. 일 구체예에서, 진핵생물 발현 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 벡터(AAV) 또는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0100] 이종 핵산의 발현을 지시하는 데 사용되는 프로모터는 특정 적용에 따라 다르다. 프로모터는 선택적으로, 이종 전사 개시 부위로부터, 자연 환경에서 전사 개시 부위로부터의 거리와 거의 동일한 거리에 위치된다. 그러나, 당업계에 공지된 바와 같이, 프로모터 기능의 손실 없이 이 거리의 일부 변동이 수용될 수 있다. 일 구체예에서, 프로모터는 IPTG-유도성 프로모터이다.
- [0101] 프로모터 이외에, 발현 벡터는 전형적으로 숙주 세포에서 펩티드의 발현에 필요한 모든 추가 요소를 포함하는 전사 유닛 또는 발현 카세트를 포함한다. 따라서 전형적인 발현 카세트는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 및 전사체의 효율적인 폴리아데닐화, 리보솜 결합 부위 및 번역 종결에 필요한 신호를 포함한다. 펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 전형적으로 절단 가능한 신호 펩티드 서열에 연결되어 형질전환된 세포에 의한 재조합 폴리펩티드의 분비를 촉진한다. 그러한 신호 펩티드는 무엇보다도 조직 플라스미노겐 활성 인자(tissue plasminogen activator), 인슐린 및 신경 성장 인자, 및 헬리오티스 비레센스(*Heliothis virescens*)의 유충 호르몬 에스테라제로부터의 신호 펩티드를 포함한다. 카세트의 추가적인 요소에는 인헨서, 및, 게놈 DNA가 구조 유전자로 사용되는 경우, 기능적 스플라이스 도너(donor) 및 억셉터(acceptor) 부위를 갖는 인트론이 포함될 수 있다.
- [0102] 프로모터 서열에 더하여, 발현 카세트는 또한 효율적인 종결을 제공하기 위해 구조 유전자의 하류에 전사 종결 영역을 포함해야 한다. 종결 영역은 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 수득될 수 있거나 또는 상이한 유전자로부터 수득될 수 있다.
- [0103] 유전 정보를 세포로 수송하기 위해 사용되는 특정 발현 벡터는 특별히 중요하지 않다. 진핵 또는 원핵 세포에서의 발현에 사용되는 임의의 통상적인 벡터가 사용될 수 있다. 표준 박테리아 발현 벡터는 pBR322 기반 플라스미드, pSKF, pET23D, pET30(a)+와 같은 플라스미드 및 GST 및 LacZ와 같은 융합 발현 시스템을 포함한다. 또한, 에피토프 태그, 예를 들면, c-myc가 편리한 분리 방법을 제공하기 위해 재조합 단백질에 추가될 수 있다.
- [0104] 진핵 바이러스의 조절 요소를 포함하는 발현 벡터가 전형적으로 진핵 발현 벡터, 예를 들어 SV40 벡터, 파필로

마 바이러스 벡터 및 EB(Epstein-Barr) 바이러스로부터 유래된 벡터에 사용된다. 기타 예시적인 진핵 벡터는 pMSG, pAV009/A⁺, pMT010/A+, pMAMneo-5, 바칼로바이러스 pDSVE, 및 SV40 초기 프로모터(SV40 early promoter), SV40 후기 프로모터(SV40 later promoter), 메탈로티오네인 프로모터, MMTV(murine mammary tumor virus) 프로모터, RSV(Rous Sarcoma Virus) 프로모터, 폴리헤드린(polyhedrin) 프로모터, 또는 진핵 세포에서의 발현에 효과적인 것으로 확인된 기타 프로모터의 지시 하에 단백질의 발현을 가능하게 하는 벡터를 포함한다.

[0105] 일부 발현 시스템은 티미딘 키나아제, 히그로마이신 B 포스포트랜스퍼라아제 및 디하이드로폴레이트 리덕타아제와 같은 유전자 증폭을 제공하는 마커를 갖는다. 대안적으로, 폴리헤드린 프로모터 또는 기타 강력한 바칼로바이러스 프로모터의 지시 하에 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 곤충 세포 내의 바칼로바이러스 벡터와 같이 유전자 증폭을 포함하지 않는 고수율 발현 시스템도 적합하다.

[0106] 발현 벡터에 전형적으로 포함되는 요소는 또한 대장균에서 기능하는 레플리콘(replicon), 제조합 플라스미드를 보유하는 박테리아의 선택을 허용하는 항생제 내성을 제공하는 단백질을 코딩하는 유전자, 및 진핵생물 서열의 삽입을 허용하는 플라스미드의 비필수 영역의 독특한 제한 부위를 포함한다. 선택된 특정 항생제 내성 유전자는 중요하지 않으며, 당업계에 공지된 많은 내성 유전자 중 어느 것이나 적합하다. 원핵생물 서열은 선택적으로, 필요한 경우, 진핵생물 세포에서 DNA의 복제를 방해하지 않도록 선택된다. 항생제 내성 선택 마커와 유사하게, 공지된 대사 경로에 기초한 대사적 선별 마커(metabolic selection marker)도 형질전환된 숙주 세포를 선별하는 수단으로 사용될 수 있다.

[0107] 제조합 단백질(예를 들어, 본 발명의 MBK50 펩티드 또는 융합 단백질)의 주변 세포질(periplasmic) 발현이 요구되는 경우, 발현 벡터는 대장균 OppA(Periplasmic Oligopeptide Binding Protein) 분비 신호 또는 그의 변형된 버전과 같은 분비 신호를 코딩하는 서열을 더 포함하고, 이는 발현될 단백질의 코딩 서열의 5'에 직접 연결된다. 이 신호 서열은 세포질에서 생산된 제조합 단백질을 세포막을 통해 주변 세포질 공간으로 안내한다. 발현 벡터는 제조합 단백질이 주변 세포질 공간에 들어갈 때 신호 서열을 효소적으로 절단할 수 있는 신호 펩티다아제 1에 대한 코딩 서열을 더 포함할 수 있다. 제조합 단백질의 주변 세포질 생산에 대한 보다 상세한 설명은 예를 들어, Gray *et al.*, *Gene* **39**: 247-254 (1985), 미국특허 6,160,089 및 6,436,674에서 찾을 수 있다.

[0108] 형질감염 (Transfection)

[0109] 표준 형질감염 방법이 다량의 제조합 폴리펩티드를 발현하는 박테리아, 포유동물, 효모, 곤충 또는 식물 세포주를 생산하기 위해 사용되며, 그 후 제조합 폴리펩티드는 표준 기술을 사용하여 정제된다(예를 들어, Colley *et al.*, *J. Biol. Chem.* **264**: 17619-17622 (1989); *Guide to Protein Purification*, in *Methods in Enzymology*, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990) 참조). 진핵 및 원핵 세포의 형질전환은 표준 기술에 따라 수행된다(예를 들어, Morrison, *J. Bact.* **132**: 349-351 (1977); Clark-Curtiss & Curtiss, *Methods in Enzymology* **101**: 347-362 (Wu *et al.*, eds, 1983) 참조).

[0110] 외래 뉴클레오티드 서열을 숙주 세포에 도입하기 위한 공지된 임의의 절차를 이용할 수 있다. 이들은 인산칼슘 형질감염, 폴리브렌, 원형질체 융합, 전기천공, 리포좀, 미세주입, 혈장 벡터(plasma vector), 바이러스 벡터 및 클로닝된 게놈 DNA, cDNA, 합성 DNA 또는 기타 외래 유전 물질을 숙주 세포로 도입하기 위한 기타 잘 알려진 방법의 이용을 포함한다(예를 들어, 전술된 Sambrook 및 Russell 참조). 제조합 폴리펩티드를 발현할 수 있는 숙주 세포에 적어도 하나의 유전자를 성공적으로 도입할 수 있는 특정한 유전 공학 절차를 이용하는 것이 단지 필요하다.

[0111] 숙주 세포에서의 발현 검출

[0112] 발현 벡터가 적절한 숙주 세포에 도입된 후, 형질감염된 세포를 펩티드의 발현에 유리한 조건 하에서 배양한다. 그 후, 제조합 폴리펩티드의 발현에 대해 세포를 스크리닝하고, 이어서 표준 기술을 이용하여 배양물로부터 회수한다(예를 들어, Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); 미국특허 4,673,641; Ausubel *et al.*, *supra*; 및 Sambrook and Russell, *supra* 참조).

[0113] 유전자 발현을 스크리닝하기 위한 여러 일반적인 방법이 당업자에게 잘 알려져 있다. 첫째, 유전자 발현은 핵산 수준에서 검출될 수 있다. 핵산 혼성화 기술을 이용한, 다양한 특정 DNA 및 RNA 측정 방법이 일반적으로 이용된다(예를 들면, Sambrook and Russell, *supra*). 일부 방법은 전기영동 분리(예를 들면, DNA 검출을 위한 서던 블롯 및 RNA 검출을 위한 노던 블롯)를 포함하나, DNA 또는 RNA의 검출은 전기영동 없이도 수행할 수 있다(예를 들면, 도트 블롯). 형질감염된 세포에서 펩티드를 코딩하는 핵산의 존재는 또한 서열-특이적 프라이머를 사용하

는 PCR 또는 RT-PCR에 의해 검출될 수 있다.

- [0114] 둘째, 유전자 발현은 폴리펩티드 수준에서 검출될 수 있다. 유전자 산물의 수준을 측정하기 위해, 구체적으로, 본 발명의 펩티드와 특이적으로 반응하는 다중클론 또는 단일클론 항체를 사용하여 유전자 산물의 수준을 측정하기 위해 다양한 면역학적 분석이 당업자에 의해 일상적으로 사용된다(예를 들어, Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Chapter 14, Cold Spring Harbor, 1988; Kohler 및 Milstein, *Nature*, 256: 495-497(1975)). 이러한 기술은 펩티드에 대한 높은 특이성을 갖는 항체를 선택하는 것에 의한 항체의 준비를 필요로 한다. 다중클론 및 단일클론 항체를 생성하는 방법은 잘 확립되어 있고 이들의 설명은 문헌에서 찾을 수 있다. 예를 들어, Harlow and Lane, *supra*; Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511-519 (1976) 참조.
- [0115] *재조합적으로 생성된 펩티드의 정제*
- [0116] 형질감염된 숙주 세포에서 본 발명의 재조합 펩티드의 발현이 확인되면, 숙주 세포는 재조합 폴리펩티드를 정제할 목적으로 적절한 규모로 배양된다.
- [0117] 발현이 항시적일 수 있으나, 일반적으로 프로모터 유도 후에, 본 발명의 펩티드가 형질전환된 박테리아에 의해 대량으로 재조합적으로 생산될 때, 폴리펩티드는 불용성 응집체를 형성할 수 있다. 단백질 봉입체(inclusion body)의 정제에 적합한 여러 프로토콜이 있다. 예를 들어, 응집체 단백질(이하 봉입체라고 함)의 정제는 전형적으로 박테리아 세포의 파괴에 의한, 예를 들어 약 100-150 $\mu\text{g/ml}$ 라이소자임 및 비이온성 디터전트인 0.1% Nonidet P40의 완충액에서의 인큐베이션에 의한 봉입체의 추출, 분리 및/또는 정제를 포함한다. 세포 현탁액은 Polytron 그라인더(Brinkman Instruments, Westbury, NY)를 사용하여 분쇄할 수 있다. 대안적으로, 세포를 얼음 위에서 초음파 처리할 수 있다. 박테리아를 용해시키는 다른 방법은 전술된 Ausubel et al. 및 Sambrook 및 Russell에 기재되고, 당업자에게 명백할 것이다.
- [0118] 세포 현탁액은 일반적으로 원심분리되고, 봉입체를 함유하는 펠렛은, 봉입체는 용해되지 않지만 봉입체를 세척하는 완충액, 예를 들어 20 mM Tris-HCl(pH 7.2), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl 및 2% Triton-X 100, 비이온성 디터전트에 재현탁된다. 가능한 한 많은 세포 파편을 제거하기 위해 세척 단계를 반복해야 할 수도 있다. 남은 봉입체의 펠렛은 적절한 완충액(예를 들면, 20 mM 인산나트륨, pH 6.8, 150mM NaCl)에 재현탁될 수 있다. 기타 적절한 버퍼는 당업자에게 자명할 것이다.
- [0119] 세척 단계 후, 봉입체를 강한 수소 수용체이자 강한 수소 공여체인 용매(또는 각각 이러한 특성 중 하나를 갖는 용매의 조합)의 첨가에 의해 가용화시킨다. 봉입체를 형성한 단백질을 적합한(compatible) 완충액으로 희석 또는 투석하여 재생시킬 수 있다. 적합한 용매는 우레아(약 4 M 내지 약 8 M), 포름아미드(적어도 약 80%, 부피/부피 기준) 및 구아니딘 염산염(약 4 M 내지 약 8 M)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. SDS(sodium dodesyl sulfate) 및 70% 포름산과 같은 응집체 형성 단백질을 용해할 수 있는 일부 용매는 면역원성 및/또는 활성의 부재를 수반하는, 단백질의 비가역적 변성 가능성으로 인해 이 절차에 사용하기에 부적절할 수 있다. 구아니딘 히드로클로라이드 및 유사한 작용제가 변성제이나, 이 변성은 비가역적이지 않고, 변성제의 제거(예를 들면, 투석) 또는 희석 시 재생이 발생할 수 있어 목적 면역학적 및/또는 생물학적 활성 단백질의 재형성이 가능하다. 가용화 후, 단백질은 표준 분리 기술에 의해 다른 박테리아 단백질과 분리될 수 있다. 박테리아 봉입체로부터 재조합 폴리펩티드를 정제하는 것에 대한 추가 설명을 위해, 예를 들어, Patra et al., *Protein Expression and Purification* 18: 182-190 (2000)을 참조한다.
- [0120] 대안적으로, 박테리아 주변 세포질로부터 재조합 폴리펩티드를 정제하는 것이 가능하다. 재조합 단백질이 박테리아의 주변 세포질로 수송되는 경우, 박테리아의 주변 세포질 분획은 당업자에게 공지된 기타 방법 외에, 저온 삼투 충격에 의해 분리될 수 있다(예를 들어, Ausubel et al., *supra* 참조). 주변 세포질에서 재조합 단백질을 분리하기 위해, 박테리아 세포를 원심분리하여 펠렛을 형성한다. 펠렛을 20% 수크로오스를 함유하는 완충액에 재현탁시킨다. 세포를 용해하기 위해, 박테리아를 원심분리하고 펠렛을 얼음처럼 차가운 5mM MgSO_4 에 재현탁하고 약 10분 동안 얼음 수조에 보관한다. 세포 현탁액을 원심분리하고 상층액을 따라내어 보관한다. 상층액에 존재하는 재조합 단백질을 당업자에게 잘 알려진 표준 분리 기술에 의해 숙주 단백질로부터 분리할 수 있다.
- [0121] *정제를 위한 단백질 분리 기술*
- [0122] 재조합 폴리펩티드가 가용성 형태로 숙주 세포에서 발현되는 경우, 그의 정제는 본원에 기술된 바와 같은 표준 단백질 정제 절차를 따를 수 있다. 이러한 표준 정제 절차는 화학 합성에서 얻은 폴리펩티드를 정제하는 데에도

적합한다.

[0123] 용해도 분별 (Solubility Fractionation)

[0124] 종종 초기 단계로서, 및 단백질 혼합물이 복잡한 경우, 초기 염 분별은 많은 원치 않는 숙주 세포 단백질(또는 세포 배양 배지로부터 유래된 단백질)을 목적 재조합 단백질로부터 분리할 수 있다. 바람직한 염은 황산암모늄이다. 황산암모늄은 단백질 혼합물에서 물의 양을 효과적으로 감소시켜 단백질을 침전시킨다. 그 후, 단백질은 그의 용해도에 따라 침전된다. 단백질이 소수성일수록 더 낮은 황산암모늄 농도에서 침전될 가능성이 더 크다. 일반적인 프로토콜은 결과적으로 수득되는 황산암모늄 농도가 20 내지 30%가 되도록 포화 황산암모늄을 단백질 용액에 첨가하는 것이다. 이것은 대부분의 소수성 단백질을 침전시킬 것이다. (목적 단백질이 소수성이 아닌 경우) 침전물을 버리고 황산암모늄을 목적 단백질을 침전시키는 것으로 알려진 농도까지 상층액에 첨가한다. 그 후, 침전물을 완충액에 가용화하고, 필요한 경우 투석 또는 정용여과(diafiltration)를 통해 과량의 염을 제거한다. 차가운 에탄올 침전과 같은 단백질의 용해도에 의존하는 기타 방법이 당업자에게 잘 알려져 있으며 복잡한 단백질 혼합물을 분획화하는 데 사용될 수 있다.

[0125] 크기 차등 여과 (Size Differential Filtration)

[0126] 계산된 분자량에 기초하여, 크기가 더 큰 단백질과 더 작은 단백질은 다양한 포어 크기의 막(예를 들면, Amicon 또는 Millipore 막)을 통한 한외여과를 이용하여 분리할 수 있다. 첫 번째 단계로, 단백질 혼합물을 MYC-억제 펩티드와 같은 목적 단백질의 분자량보다 더 낮은 분자량 컷-오프를 갖는 포어 크기를 갖는 막을 통해 한외여과시킨다. 그런 다음 한외여과의 잔류물을 목적 단백질의 분자량보다 큰 분자 컷-오프를 갖는 막에 대해 한외여과시킨다. 재조합 단백질은 막을 통해 여과액으로 통과할 것이다. 그 후, 여과액을 하기에 기술된 바와 같이 크로마토그래피할 수 있다.

[0127] 컬럼 크로마토그래피

[0128] 목적 단백질(예를 들면, 본 발명의 펩티드)은 또한, 크기, 순 표면 전하, 소수성 또는 리간드에 대한 친화도에 근거하여 다른 단백질과 분리될 수 있다. 또한, 펩티드에 대해 생성된 항체를 컬럼 매트릭스에 접합시키고, 해당 펩티드를 면역정제할 수 있다. 이러한 모든 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 크로마토그래피 기술이 다수의 상이한 제조업체(예를 들면, Pharmacia Biotech)로부터의 장비를 사용하여 임의의 규모로 수행될 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다.

[0129] 5. MYC 활성의 억제 평가

[0130] 세포, 예를 들어 MYC-의존성 암세포에서 MYC 활성의 수준을 평가하기 위해 다수의 방법이 사용될 수 있다. 모든 MYC 발현 세포를 사용할 수 있다. 특정 구체예에서, BC-1, BC-3, BCBL-1 또는 BJAB 세포와 같은 원발성 삼출성 림프종(PEL) 세포가 사용된다.

[0131] 일부 구체예에서, 방법은 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, 반정량적 RT-PCR, 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR), 정량적 RT-PCR(qRT-PCR), 멀티플렉스 분지형(multiplexed branched) DNA (bDNA) 분석, 마이크로어레이 혼성화 또는 서열 분석(예를 들면, RNA 시퀀싱("RNA-Seq"))과 같은 일상적인 기술을 사용하여 분석될 수 있는, MYC(예를 들어, mRNA) 발현의 검출을 포함한다. 폴리뉴클레오티드 발현을 정량화하는 방법은 예를 들어 Fassbinder-Orth, Integrative and Comparative Biology, 2014, 54:396-406; Thellin 등, Biotechnology Advances, 2009, 27:323-333; 및 Zheng et al., Clinical Chemistry, 2006, 52:7 (doi: 10/1373/clinchem.2005.065078)에 기술된다. 일부 구체예에서, 실시간 또는 정량적 PCR 또는 RT-PCR을 사용하여 생물학적 샘플에서 폴리뉴클레오티드(예: mRNA)의 수준을 측정한다. 예를 들어, Nolan et al., Nat. Protoc, 2006, 1:1559-1582; Wong et al., BioTechniques, 2005, 39:75-75를 참조한다. 유전자 발현을 측정하기 위한 정량적 PCR 및 RT-PCR 분석도 상업적으로 이용 가능하다(예를 들면, TaqMan® Gene Expression Assays, ThermoFisher Scientific).

[0132] 일부 구체예에서, 방법은 예를 들어, 당업자에게 공지된 면역분석법, 2차원 겔 전기영동 및 정량적 질량 분석법과 같은 일상적인 기술을 사용하여 MYC 단백질 수준을 검출하는 것을 포함한다. 단백질 정량 기술은 일반적으로 "Strategies for Protein Quantitation," Principles of Proteomics, 2nd Edition, R. Twyman, ed., Garland Science, 2013에 기술된다. 일부 구체예에서, 단백질 발현 또는 안정성은 효소 면역분석법(EIA), 예컨대 EMIT(enzyme multiplied immunoassay technique), 효소-결합 면역흡착 분석법(ELISA), IgM 항체 포획 ELISA(MAC ELISA) 및 미립자 효소 면역분석법(MEIA); 모세관 전기영동 면역분석(CEIA); 방사면역측정법(RIA); 면역방사측정법(IRMA); 면역형광(IF); 형광 편광 면역분석법(FPIA); 및 화학발광 분석(CL)을 포함하나, 그에 한정되지 않는 면역분석법에 의해 검출된다. 원하는 경우 이러한 면역 분석을 자동화할 수 있다. 면역분석은 또한

레이저 유도 형광(laser induced fluorescence)과 함께 이용될 수 있다(예를 들어, Schmalzing *et al.*, *Electrophoresis*, 18:2184-93 (1997); Bao, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci.*, 699:463-80 (1997) 참조).

[0133] 일부 구체예에서, 펩티드는 인 비트로에서 MYC-의존성 암세포 증식을 억제하는 능력을 결정함으로써 평가된다. 예를 들어, 배양 중 BC3 세포와 같은 PEL 세포의 증식 및/또는 생존은 예를 들어 MTS 분석을 이용하여 측정될 수 있다. 일부 구체예에서, NU-DUL-1과 같은 인간 악성 림프종 세포와 같은 세포의 증식, 예를 들어 소프트 아가(soft agar)에서의 증식을 평가할 수 있다.

[0134] 펩티드는 또한 동물 모델을 이용하여 인 비보로, 예를 들어 PEL 세포 이종이식 모델과 같은 이종이식 모델에서 종양 증식 분석에서, 평가될 수 있다.

[0135] 분리된 MBK50 펩티드뿐만 아니라 더 큰 펩티드 또는 MBK50 펩티드 및 항체 또는 기타 요소를 포함하는 폴리펩티드를 포함한 펩티드는 또한 그의 약동학적 및/또는 약역학적 특성에 대해 평가될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 펩티드 및/또는 융합 단백질의 안정성이 평가되고, 예를 들어 인 비보로 평가된다. 일부 구체예에서, 상기 펩티드 및/또는 융합 단백질의 국재화가 평가되고, 예를 들어 융합 단백질 내의 항체에 의해 표적화된 세포 부근을 포함한, 국재화가 인 비보로 평가된다. 특정 구체예에서, 펩티드는 PK/PD 모델링을 이용하여 평가된다(예를 들어, Danhof *et al.*, (2008) *Trends in Pharm. Sci.* 29(4):186-191; Standing (2017) *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83:247-254 참조).

[0136] 일부 구체예에서, 서열번호 1의, 또는 서열번호 1로부터 유래된 MBK50 펩티드 또는 그의 융합 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 바이러스 벡터를 이용하여 의도된 수용자에게 전달된다. 적합한 바이러스 벡터는 인간 또는 동물 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), MVM(minus virus of mice), HIV, 신드비스 바이러스 및 레트로바이러스(RSV(Rous sarcoma virus) 및 렌티바이러스를 포함하나, 이에 한정되지 않음), MoMLV(Malony Murine Leukemia Virus), 등의 계통으로부터 유래될 수 있다. 전형적으로, 목적 코딩 서열(예를 들어, 본원에 기재된 서열번호 1 또는 그의 유도체 또는 그의 융합 단백질을 코딩하는 서열)은 일반적으로 수반되는 바이러스 DNA와 함께 유전자 구조체의 패키징, 및 뒤이은 민감한 숙주 세포의 감염 및 목적 코딩 서열의 발현을 허용하도록 그러한 벡터 내에 삽입된다. 다른 구체예에서, 서열번호 1의 MBK50 펩티드 또는 서열번호 1로부터 유래된 MBK50 펩티드 또는 그의 융합 펩티드, 상기 펩티드 또는 융합 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트와 같은 벡터를 포함하는 세포가 본원에 기술된 약학적 조성물로 의도된 수용자에게 전달된다.

[0137] 6. 용량 및 투여

[0138] 개체(Subject)

[0139] 개체는 과도한 MYC 활성화와 관련된 질환 상태를 가진 임의의 개체, 예를 들어 인간 또는 다른 포유동물일 수 있다. 특정 구체예에서, 개체는 원발성 삼출성 림프종(PEL) 또는 다발성 골수종과 같은 MYC-의존성 암을 갖는다. 일부 구체예에서, 개체는 B 또는 T 세포와 같은 부적절하게 활성화된 림프계 세포와 관련된 염증성 질환을 갖는다. 일부 구체예에서, 개체는 인간이다. 일부 구체예에서, 개체는 성인이다. 일부 구체예에서, 개체는 아동(예를 들어, 조로증이 있는 아동)이다. 일부 구체예에서, 개체는 여성(예를 들어, 성인 여성)이다. 일부 구체예에서, 개체는 남성(예를 들어, 성인 남성)이다.

[0140] 약학적 조성물

[0141] 본 개시는 NCoA2 및 SWI/SNF 복합체 성분 펩티드에 결합할 수 있고 따라서 세포에서 MYC 활성을 억제할 수 있는 단리 및/또는 정제된 MBK50 펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 따라서, 본 개시는 개체의 세포에서 MYC 활성을 억제하고, 개체에서 MYC-의존성 암세포 또는 B 또는 T 세포와 같은 부적절하게 활성화된 림프계 세포를 사멸시키고, 개체에서 MYC-의존성 암 또는 자가면역 질환과 같은 염증성 장애를 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0142] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 특정한 양태에서, 약학적으로 허용되는 담체는 투여되는 특정 조성물뿐만 아니라 조성물을 투여하는 데 사용되는 특정 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물의 매우 다양한 적합한 제형이 있다(예를 들어, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA(1990) 참조).

[0143] 약학적 조성물은 종종 적합하게 하나 이상의 완충제(예를 들어, 중성 완충 식염수 또는 인산염 완충 식염수), 탄수화물(예를 들어, 글루코오스, 만노오스, 수크로오스 또는 텍스트란), 만니톨, 단백질, 폴리펩티드 또는 글

리신과 같은 아미노산, 항산화제(예를 들면, 아스코르브산, 소듐 메타비술피트, 부틸화 히드록시톨루엔, 부틸화 히드록시아니솔 등), 정균제(bacteriostat), EDTA 또는 글루타티온과 같은 킬레이트제, 제형을 수용자의 혈액과 등장성, 저장성 또는 약한 고장성으로 만드는 용질, 현탁제, 증점제, 보존제, 향미제, 감미제 및 착색 화합물을 더 포함할 것이다.

[0144] 본 발명의 약학적 조성물은 투여 제형과 조화되는 방식으로, 및 치료적 또는 예방적 유효량으로 투여된다. 투여되는 양은 예를 들면, 개체의 연령, 체중, 신체 활성, 유전적 특징, 전반적인 건강, 성별 및 식이, 치료 또는 예방할 질환 또는 질병, 및 질환 또는 질병의 병기 또는 중증도를 포함한 다양한 인자들에 의존적이다. 특정 구체예에서, 투여량의 크기는 또한 특정 개체에서 치료제 또는 예방제(들)의 투여에 수반되는 임의의 불리한 부작용의 존재, 속성 및 정도에 의해 결정될 수 있다. 특정 환자에 대한 특정 용량 수준 및 투여 빈도에 영향을 미칠 수 있는 기타 인자들은 사용된 특정 화합물의 활성, 해당 화합물의 대사 안정성 및 작용 기간, 투여 방식 및 시간, 배설 속도를 포함한다.

[0145] 일반적으로, 치료 또는 예방 목적으로 화합물(예를 들어, MBK50 펩티드 또는 그의 변이체 및 이중 모이어티를 포함하는 접합체, 또는 MBK50 펩티드 또는 그의 변이체 및 이중 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 리포좀 형태)을 투여하기 위해, 상기 화합물은 치료적 또는 예방적 유효량으로 주어진다. 특히, 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 개체의 하나 이상의 세포에서 MYC 활성을 억제하거나, 또는 개체에서 MYC-의 종성 암세포의 성장을 늦추거나, 예방하거나, 역전시키기에 충분한 양이다.

[0146] 특정 구체예에서, 용량은 고체, 반고체, 동결건조 분말 또는 액체 투여 형태, 예를 들어, 정제, 환제, 펠렛, 캡슐, 산제, 용액, 현탁액, 에멀전, 좌약, 정제 관장제(retention enema), 크림, 연고, 로션, 젤, 에어로졸, 폼 등의 형태를 취할 수 있고, 바람직하게는 정확한 용량의 간단한 투여에 적합한 단위 투여 형태의 형태를 취할 수 있다.

[0147] 본원에서 사용되는, 용어 "단위 투여 형태(unit dosage form)"는 인간 및 다른 포유동물에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위(예를 들어, 앰플)를 의미하고, 각각의 단위는 적합한 약학적 부형제와 함께 원하는 발병(onset), 내약성 및/또는 치료 또는 예방 효과를 생성하도록 계산된 치료제 또는 예방제의 소정량(predetermined quantity)을 함유한다. 또한, 보다 농축된 투여 형태가 제조될 수 있으며, 이로부터 보다 희석된 단위 투여 형태가 생성될 수 있다. 따라서, 보다 농축된 투여 형태는 실질적으로 치료 또는 예방 화합물의 양의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10배 이상을 함유할 것이다.

[0148] 이러한 투여 형태를 제조하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다(예를 들어, 전술된 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES 참조). 투여 형태는 전형적으로 통상적인 약학적 담체 또는 부형제를 포함하고, 추가로 기타 약제(medicinal agent), 담체, 아췌반트, 희석제, 조직 투과 증진제, 가용화제 등을 포함할 수 있다. 적절한 부형제는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 특정 투여 형태 및 투여 경로에 맞춰질 수 있다(예를 들어, 전술된 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES 참조).

[0149] 투여

[0150] 일부 구체예에서, 예방 및/또는 치료는 본 발명의 조성물을 개체에게 직접 투여하는 것을 포함한다. 비-한정적 예로서, 본 발명의 약학적 조성물(예를 들어, 본 발명의 MYC-억제 펩티드 접합체, MYC-억제 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 본원에 기술된 바와 같은 MYC-억제 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 발현 카세트)를 포함하는 이러한 핵산을 포함하는 조작된 세포 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함함)은(예를 들어, 국소 적용 또는 전신 투여에 의해) 개체에게 직접 전달될 수 있다.

[0151] 본 발명의 조성물은 단일 용량 또는 복수 용량으로 투여될 수 있고, 예를 들어, 2회 용량이 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 6개월 또는 약 12개월의 간격으로 투여될 수 있다. 기타 적절한 투여 일정은 의사가 결정할 수 있다.

[0152] 일부 구체예에서, 추가적인 화합물 또는 약제가 개체에게 병용-투여될 수 있다. 이러한 화합물 또는 약제는 치료대상 질병의 징후 또는 증상을 완화하고, 펩티드에 의한 치료에 의해 유발되는 부작용을 감소시키고, 상이한 메커니즘을 통해 암 성장을 감소시키거나 암세포를 사멸시키는 등의 목적으로 병용-투여될 수 있다.

[0153] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 국소적으로 또는 전신적으로, 예를 들어 복강내로, 근육내로, 동맥내로, 경구로, 정맥내로, 두개내로, 척수강내로, 척수내로, 병변내로, 비강내로, 피하로, 뇌실내로, 국소적으로, 및 / 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다.

[0154] 7. 키트

[0155] 또 다른 양태에서, 키트가 본원에서 제공된다. 일부 구체예에서, 키트는 본 발명의 MBK50 펩티드 및/또는 융합 단백질을 포함한다. 일부 구체예에서, 키트는 개체에서 MYC-의존성 암세포 또는 B 또는 T 세포와 같은 림프계 세포의 증식을 감소, 둔화, 중단 또는 역전시키기 위한 것이다. 일부 구체예에서, 키트는 질병, 예를 들어 PEL 과 같은 암 또는 자가면역 질환을 예방 또는 치료하기 위한 것이다.

[0156] 본 발명의 키트는 안전하거나 편리한 보관 또는 사용을 허용하는 방식으로(예를 들어, 상자 또는 뚜껑이 있는 다른 용기에) 패키징될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 하나 이상의 용기를 포함하고, 각각의 용기는 시약, 대조군 샘플 등과 같은 특정 키트 성분을 담는다. 용기의 선택은 내용물의 특정 형태, 예를 들면, 액체 형태, 산제 형태 등인 키트 구성 요소에 따라 달라질 것이다. 또한, 용기는 키트의 유효 기간을 최대화하도록 설계된 재료로 제조될 수 있다. 비-한정적 예로서, 빛에 민감한 키트 구성 요소는 불투명한 용기에 보관할 수 있다.

[0157] 일부 구체예에서, 키트는 개체에게 조성물(즉, 본 발명의 약학적 조성물)을 투여하는 데 유용한 하나 이상의 요소, 예를 들어 주사기를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 키트는 사용 설명서, 예를 들어, 본 발명의 방법을 실시하기 위한 지침(즉, 프로토콜)을 포함하는 사용 설명서(예를 들어, 세포에서 MYC 활성을 억제하기 위해 또는 MYC 의존성 암 또는 자가면역 질환과 같은 염증성 질환을 가진 개체를 치료하기 위해 키트를 사용하기 위한 설명서)를 추가로 포함한다. 설명 자료는 일반적으로 서면 또는 인쇄 자료를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그러한 설명서를 저장하고 이를 최종 사용자에게 전달할 수 있는 임의의 매체가 본 발명에 의해 고려된다. 이러한 매체는 전자 저장 매체(예를 들면, 자기 디스크, 테이프, 카트리지, 칩), 광학 매체(예를 들면, CD ROM) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 매체는 설명서 자료를 제공하는 인터넷 사이트 주소를 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0158] **도 1a 내지 1i.** 바이러스 단백질 염기서열 기반 항암제. (**도 1a**) KSHV 재활성화 세포에서 하이재킹 전사 기구(hijacking transcription machinery)의 발견(Chen et al., *J. Virol* 2017). IFA와 함께 초기(nascent) RNA-FISH는 바이러스 유전자 전사의 부위에서 세포 RNA 폴리머라아제 II의 축적을 보여준다. (**도 1b**) 리포터 분석. KSHV ORF50 과발현은 MYC 활성화를 억제한다. (**도 1c**) 질량 분석법을 이용한 크로마틴 면역침전. ORF50 및 RNA polII 모두와 유도적으로 상호 작용하는 단백질이 도출된다. (**도 1d**) 개별적인 상호작용 분자의 녹다운은 NCoA2가 KSHV 유전자 발현에 중요한 분자라는 것을 보여주었다. (**도 1e**) 상호작용 도메인의 맵핑. NCoA2 결합 도메인을 확인하기 위해 GST 풀다운(pull down)을 수행했다. 정제된 NCoA2는 재조합 바큇로바이러스 감염 세포로부터 제조하고, KSHV ORF50 결실 단백질은 대장균에서 제조했다. 그 후, 세포 침투를 위한 TAT-융합체(TAT-fusion)로 펩티드를 생성한다. (**도 1f**) ChIP-seq 및 RNA-seq. 원발성 삼출성 림프종 세포에서 NCoA2 표적 유전자를 확인하기 위해 ChIP-seq를 수행하였다. NCoA2 국재화(localization)는 활성 유전자와 고도로 연관되고, 인핸서 영역에서 RNA pol II와 국재화된다. (**도 1g**) 야생형 펩티드에 의한 MYC 발현의 하향 조절. 특이적 프라이머로 qRT-PCR을 수행했다. (**도 1h**) 유전자 세트 농축 분석(Gene set enrichment analyses: GSEA). RNA 시퀀싱은 펩티드 처리된 PEL 세포를 이용하여 수행하였다. GSEA 분석은 위발견율(false discovery rate)이 0인 MYC 표적 유전자의 상당한 농축을 보여주었다. 3개의 PEL 세포주(BCBL-1, BC3 및 BC1)는 유사한 농축 점수를 보였고, MYC 표적 유전자 세트가 최고 점수였다. (**도 1i**) 펩티드 약물. Wt 펩티드 또는 돌연변이 펩티드를 배양 배지에서 인큐베이션시켰다. 48시간 후, MTS를 적용하여 살아있는 세포를 측정하였다. 세포 생존력을 미처리(no-treated) 샘플과 비교했다. 미처리 샘플을 1로 설정하였다.

도 2. 아미노산 치환의 비한정적 예. 주요 단백질 요소는 다른 감마-헤르페스바이러스 상동체(gamma-herpesviral homologs)에서 보존되었다. 본 발명자들의 현재의 펩티드가 중간에 표시되고 아미노산의 제안된 치환은 적색으로 표시된다. 인 비트로 및 인 비보 실험을 새로운 펩티드로 반복하고 안정성(PK/PD) 및 종양 사멸 효과(PEL 이중억제 모델)의 변화로 인한 개선을 검사한다.

도 3. sCD40L 자극 시 CD19+ B 세포 반응에 대한 효과.

도 4. 자극에 대해 반응한 CD19+ B 세포 확장에 대한 효과.

도 5a 내지 5e. 항-CD3 자극에 반응한 CD3+ T 세포 증식에 대한 효과.

도 6. K-Rta 펩티드에 대한 바이러스 및 세포 반응; VGN50의 확인. (a) 단백질 서열 정렬. 도 6a. 다양한 암 세

포 유형에 대한 VGN50의 효과. MTT 분석은 다양한 VGN50 농도로 처리된 표시된 세포주를 이용하여 수행하였다. 모의-처리(mock-treated) 샘플의 O.D.는 100%로 설정되었고, 디터전트-처리 세포의 O.D.는 0%로 설정되었다. 각 처리에 대해 백분율 생존율(percentage viability) $\pm$ SD를 계산하였다(N=3개 샘플/처리). **도 6b. 유세포 측정법을 이용한 생존력 분석.** 세포 생존력은 Live/Dead 염색으로 3회 측정하였고, 암세포에 대한 세포 사멸 효과를 3명의 건강한 공여자로부터의 정상적인 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)와 비교했다. 결과는 백분율 생존율 $\pm$ SD 편차(N=3개 샘플/그룹)로 표시된다.

도 7. 결실 펩티드를 사용한 세포 성장 억제는 핵심 아미노산 잔기를 확인했다.

도 8. 다양한 감마-헤르페스바이러스 트랜스활성인자(transactivator) 단백질 사이의 아미노산 보존. 암 억제 기능을 갖는 상이한 돌연변이 펩티드가 확인되었다. 필수 단백질 모티프 및 변경가능한(switchable) 잔기는 적색으로 표시된다 (**8a**). 비-천연 돌연변이 펩티드의 암 성장에 대한 효과 (**8b**) d-3: 3개의 L-아미노산을 D-아미노산으로 대체함; DE: D가 글루탐산으로 치환됨, DS: D가 세린으로 치환됨, _ST: 세린이 트레오닌으로 치환됨함 (적색으로 표시됨).

도 9. RNA의 대사 시퀀싱을 위한 티올(SH)-연결 알킬화에 의한 펩티드 표적 프로파일링(SH-linked alkylation for the metabolic sequencing of RNA: SLAM seq). _펩티드 약물의 존재 시 활성 전사의 차이를 조사했다. 펩티드 약물은 BCBL-1과 BC1 모두에서 활성 전사를 강력하게 억제했다. Myc 전사는 펩티드 약물의 존재 하에서 강력하게 하향 조절되었다. 총 RNA-서열 시퀀싱은 약물 인큐베이션 후 24시간차에 수행했다. GSEA(Gene Set Enrichment Analyses)는 MYC 경로의 하향 조절을 입증했다.

도 10. 펩티드 장기 처리는 B 세포 표현형을 변화시킨다. RNA-seq은 펩티드-약물 내성 세포 집단을 생성한 후에 수행하였다. RC 세포는 부모세포와 구별되는 유전자 발현 패턴을 보였고 잠복-감염된 감마-헤르페스바이러스 유전자 발현은 세포에서 유의하게 소멸되었다.

도 11. 활성화된 T 세포에 의한 염증성 사이토카인 생산에 대한 효과.

도 12a 내지 12c. PEL 세포의 사이토카인 프로파일에 대한 효과.

도 13. CD14+ 단핵구에 대한 MBK50의 효과. 도 13a. 실험 절차의 도식. CD14+ 단핵구는 건강한 기증자의 PBMC로부터 자기 비드를 이용하여 준비하였다. 세포를 세척하고 MBK(16 또는 32 μ M) 또는 돌연변이 펩티드(32 μ M)의 존재 하에 LPS(100 ng/ml) 또는 폴리 I:C(10 μ g/ml)를 포함하거나 포함하지 않은 96 웰 플레이트(200 μ l/웰로 3세트)에서 1×10^6 /ml로 2일 동안 배양했다. Live/Dead 염색 및 뒤이은 유세포 분석을 이용하여 살아있는 세포를 측정했다. **도 13b.** 살아있는 세포에 대한 게이팅(gating) 전략을 사용한 대표적인 유동 프로파일이 도시된다. **도 13c.** 각 배양 조건에 대한 살아있는 세포의 평균 백분율을 나타낸다. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

도 14. CD14+ 단핵구에 대한 MBK50의 효과. 도 14a. 실험 절차의 도식. 단핵구 유래 수지상 세포는 GM-CSF + IL-4(각각 50ng/ml)의 존재 하에 4일 동안 배양한 후 자기 비드 분류된(magnetic beads sorted) (건강한 공여자의 PBMC로부터)CD14+ 세포로부터 준비하였다. 세포를 세척하고 MBK50(16 또는 32 μ M) 또는 돌연변이 펩티드(32 μ M)의 존재 하에 LPS(100 ng/ml), 폴리 I:C(10 μ g/ml) 또는 sCD40L(1 μ g/ml)를 포함하거나 또는 포함하지 않은 96 웰 플레이트(200 μ l/웰로 3세트)에서 1×10^6 /ml로 2일 동안 배양했다. Live/Dead 염색 및 뒤이은 유세포 분석을 이용하여 살아있는 세포를 측정했다. **도 14b.** 살아있는 세포에 대한 게이팅 전략을 사용한 대표적인 유동 프로파일이 도시된다. **도 14c.** 각 배양 조건에 대한 살아있는 세포의 평균 백분율이 표시된다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

도 15. U자형-바닥 96 웰 배양에서 2일 동안 MBK50, 돌연변이 펩티드 또는 PBS로 처리한 후 두 명의 건강한 기증자로부터 얻은 단핵구 유래 수지상 세포(MDC)의 대표 이미지. 고리(ring)의 직경은 대략 각 웰의 세포 부피/개수에 해당한다. MBK50 처리된 세포는 대조군 대비 응집되지 않고 더 확산되고 부착성이어서, MBK50에 의한 MYC 유도 증식의 억제로 인한 세포 사멸 및/또는 세포 분화를 시사한다는 것을 주목한다.

도 16. LPS-활성화 단핵구 백혈병 세포주 THP-1 세포에서 MYC 및 IRF4 발현에 대한 MBK50의 효과. THP-1 세포를 8 μ M의 MBK50, 돌연변이 대조군 또는 PBS의 존재 하에 LPS(100 ng/ml)와 함께 24시간 동안 배양하였다. MYC 및 IRF4 발현 수준은 MYC 및 IRF4의 세포내 염색과 이소형 대조군(isotype control) 염색에 이은 유동 세포 측정법에 의해 조사하였다. **도 16a.** 실험 절차의 도식. **도 16b.** 이소형 대조군과, MBK50, 돌연변이 대조군 펩티드 또는 PBS로 처리된 THP-1 세포에서의 MYC 발현에 대한 대표적인 히스토그램 오버레이(histogram overlay).

각 처리에 대한 MYC 발현(n=3)의 평균 MFI (mean fluorescent intensity)가 우측 패널에 표시된다. **도 16c.** 이 소형 대조군(청색)과, MBK50, 돌연변이 대조군 펩티드 또는 PBS로 처리된 THP-1 세포에서 IRF4 발현(적색)에 대한 대표적인 히스토그램 오버레이. 각 처리에 대한 IRF4 발현의 평균 MFI가 우측 패널에 표시된다.

도 17a. 바콜로바이러스 감염 Sf9 세포로부터 개별적으로 준비된 5개의 SWI/SNF 성분의 SDS-PAGE 분석. **도 17b.** VGN50 및 SWI/SNF 상호작용을 평가하기 위한 ELISA 분석의 개략도. **도 17c.** ELISA에 의한 VGN50의 SWI/SNF 성분으로의 결합의 분석. 450 nm에서 OD 값으로 측정된 펩티드 결합이 표시된다. 독립 t-검정(unpaired t-test)을 이용하여 각 농도에서 VGN50과 Mut-P 간에 평균 OD 값을 비교했다. ** p<0.01, * p<0.05, NS: 유의하지 않음. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0159] 본 발명을 구체적인 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 예시 목적으로만 제공되며 어떠한 방식으로든 본 발명을 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 당업자는 본질적으로 동일한 결과를 산출하도록 변경 또는 수정될 수 있는 다양한 중요하지 않은 파라미터를 쉽게 인식할 것이다.

[0160] **실시예 1. 바이러스 단백질 서열로부터 암 약물을 표적으로 하는 전사 활성 복합체**

[0161] 본 발명자들은 최근에 KSHV(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)에 의해 코딩된 바이러스 단백질이 MYC 전사 기능을 하이재킹(hijack)하는 것을 발견했다. 본 발명자들은 담당(responsible) 도메인 및 분자 메커니즘을 생화학적 및 유전적 접근 방식으로 맵핑했다(도 1). 역학적으로(mechanistically), 바이러스 단백질은 MYC 발현 및 MYC 전사촉진(transactivation)에 중요한 기능을 하는 세포 보조 활성인자(coactivator)인 NCoA2와 물리적으로 상호 작용한다. 본 발명자들의 연구는 MYC로부터 보조 활성인자 복합체를 인수함으로써, 바이러스는 감염된 세포에서 자신의 +80 유전자 전사를 강력하게 활성화한다는 것을 나타냈다. 후속 연구에서는 다른 감마-헤르페스바이러스에서 보존되는(도 2), 13개-아미노산 서열 스트레치가 보조 활성인자와의 상호작용에 중요하다는 것을 확인했다. 놀랍게도, 상기 펩티드를 MYC-의존성 암인 PEL로 전달하면 암세포를 사멸시켰고, 돌연변이(대조군) 펩티드는 그렇지 않았다(도 1j). 전사체(transcriptome) 연구는 상기 펩티드가 0의 위발견율(false discovery rate)의 가장 높은 농축(enrichment) 점수로 MYC 경로를 표적으로 한다는 것을 명확하게 보여주었다. 따라서, MBK50(MYC Buster KSHV ORF50)로 명명된 본 발명자들의 펩티드는 MYC를 특이적이고 효과적으로 표적화하고, 이는 약물치료가 어려운 표적(undruggable)에 마침내 약물을 투여할 수 있는 고유한 접근 방식을 나타낸다. 또한, 최근의 이중이식 연구는 숙주(NRG) 마우스에 대한 측정가능한 독성 없이 PEL을 표적으로 하는 MBK50의 효능을 입증했다.

[0162] **접근방법:**

[0163] 개요: 최근의 유전체학 연구는 다른 세포 단백질과 NCoA2 융합이 상이한 암 유형에서 자주 발생한다는 것을 확인했다. 이것은 NCoA2가 동원된 게놈 부위에서 유전자 인헨서를 확립할 수 있는 능력을 갖는다는 본 발명자들의 모델과 일치한다(도 1). 펩티드가 실제로 다른 보조활성화 효소(coactivator enzyme)와 함께 NCoA2 단백질 복합체 형성의 억제를 통해 인헨서 형성을 표적으로 한다면(도 1c), 이 펩티드 약물은 MYC-중독(MYC-addicted) 암세포 외에, NCoA2 유전자 재배열을 갖는 암세포에 대해 훨씬 더 효과적이어야 한다. 따라서, 본원의 다른 곳에서 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 아미노산 서열을 변형함으로써 펩티드의 안정성을 증가시킨다. 둘째, 그의 작은 크기의 장점을 이용하여, 본 발명자들은 상기 펩티드를 FDA-승인 항체 기반 약물과의 융합 단백질 또는 화학적 접합체로 준비하고 발현한다. 본 발명자들은 기존의 항체 기반 약물에 본 발명자들의 펩티드를 접합하면 암세포 사멸 효과의 효능 및 특이성을 증가시킬 것이라고 가정한다. 본 발명자들의 펩티드와 (ADC에서와 같은) 독소 접합 사이의 중요한 차이점은 본 발명자들의 펩티드가 MYC 경로를 표적으로 하는 것이고, 이 경로는 대부분의 암세포에서 상승하지만 정상 세포에서는 상승하지 않는다. 따라서, MYC 활성화가 정상 세포에서 엄격하게 조절되기 때문에 본 발명자들의 펩티드는 정상 휴지 세포(normal resting cell)에 해를 끼치지 않는다: 이것은 본 발명자들이 이중 이식 연구에서 본 독성 부재와 일치한다.

[0164] **특허 문제를 피하기 위해 아미노산을 치환하고, 안정성을 증가시키고, 펩티드에서 PK/PD를 측정하는 것에 의한 새로운 펩티드의 설계.**

[0165] 천연 서열의 특허 제한을 피하기 위해, 본 발명자들은 (i) 비천연 서열을 갖고 (ii) 펩티드의 안정성을 증가시키도록 아미노산을 변형시킨다. MBK50의 13개 아미노산 내에서, 5개의 서로 다른 유형의 감마-헤르페스바이러스 간에 9개 아미노산이 완전히 보존되었다. 그러나 4개의 아미노산은 유사한 생화학적 특성을 가지고 있음에도 불구하고 약간 다르다(도 2). 여전히 이 유전자의 필수 기능을 유지하는, 감마-헤르페스바이러스의 진화는 이러한

아미노산 위치가 상호교환 가능하다는 것을 시사한다. 따라서, 생물학적 활성을 유지하는 "비-천연 펩티드 서열"을 생성하기 위해 MBK50 펩티드의 아미노산을 치환한다. 그 후, 도 1h 내지 1j에서와 같이, MYC 억제 효능을 테스트한다. 또한, C-말단에 있는 2개의 아미노산도 D-아미노산으로 변형된다. D-아미노산으로 변경하면 혈청에서 분해를 방지하여 안정성을 더욱 증가시킬 것으로 예상된다(4).

[0166] 인 비트로에서 펩티드의 세포 사멸 효능에 기초하여, 본 발명자들은 2개의 펩티드를 선택하고 이중이식 모델에서 종양 성장을 억제하는 효능을 조사한다. 본 발명자들은 PEL 세포 이중이식 모델을 이용한다. 이는 (i) PEL이 KSHV 감염에 의해 유발되고, 본 발명자들이 KSHV 단백질 서열에 기반하여 약물 펩티드를 개발하고 있으며, (ii) 이미 연구실에서 이중이식 모델을 확립했으며, (iii) PEL이 B 세포 림프종의 매우 공격적인 서브타입이고, 매우 희귀한 암으로 향후 더 적은 횟수의 임상 시험으로, 희귀 의약품으로서 FDA-심사 과정을 촉진할 것이기 때문이다. PEL에 대한 현재의 임상적 접근 방식은 잘 작동하지 않으며 새로운 방향이 시급히 필요하다. 표준화된 PK/PD 연구는 UCD 종합 암 센터 PK/PD 핵심 시설에서 랫트 모델에서 완료된다.

[0167] **실시예 2: MBK50 펩티드에 의한 블라스팅(blasting) B 세포 표적화**

[0168] CD19+ B 세포를 건강한 공여자(n=1)의 PBMC로부터 자기 비드에 의해 분리하였다. 세포를 세척하고, MBK50(16 또는 32 μ M) 또는 돌연변이 펩티드(32 μ M)의 존재 하에 sCD40L (1 μ g/ml)을 포함하지 않거나 또는 포함하는 96 웰 플레이트 (200 μ l/웰, 3회 반복(triplicates))에서 2일 동안 배양하였다. 생존(live) 세포는 라이브/데드(live/dead) 레드 염색을 이용하여 도 3의 좌측 패널에 표시된 바와 같이 측정하였다(생존 세포는 레드-염색 음성 모집단으로 게이팅됨). 생존 세포의 빈도(%)가 도 3 중간 패널에 표시된다. MBK50 32 μ M은 총 세포 수를 증가시켰지만 생존 세포 %는 감소시켰으며, 이는 B 세포에서 상기 펩티드에 의한 활성화 세포 사멸의 유도를 나타낸다. 펩티드 약물은 MYC를 표적으로 하는 MBK50과 일치하게, 능동적으로 복제하는 B 세포를 표적으로 한다.

[0169] B 세포는 건강한 공여자 PBMC(n=2)로부터 자성 비드를 이용하여 준비하였다. MBK50(16, 32 μ M) 또는 돌연변이 펩티드(32 μ M)의 부재 또는 존재 하에 표시된 농도에서 sCD40L(T 세포 의존적 자극) 또는 ODN 2006(TLR9 리간드)(T 세포 독립적 자극)의 존재 하에 96 웰 U-바닥 플레이트에서 B 세포 배양의 대표적 사진. 각 웰에서 세포 부피(cell volume)의 반경은 총 세포 수와 대략적으로 상관관계가 있다. 세포 부피는 공여자 #46의 경우 ODN 또는 sCD40L 자극시 MBK50 32 μ M에 의해 상당히 감소했으며 공여자 #47의 경우에는 그보다 덜 했다.

[0170] 이러한 결과는 이 펩티드가 활성화된 B 세포의 증식을 차단하는 데 사용될 수 있고, 따라서 루푸스와 같은 자가 면역 질환에서 병원성 B 세포 증식을 치료하는 데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0171] **실시예 3: MBK50 펩티드에 의한 블라스팅 T 세포 표적화**

[0172] 인간 CD3 T 세포에 대한 펩티드의 효과를 평가하기 위해, CD3 T 세포를 5명의 건강한 공여자로부터의 PBMC 샘플로부터 자기 비드(CD3 양성 선택 비드, Stemcell technology)로 농축(enrich)시키고 항-CD3/28 사량체(Stemcell technology)로 3회 반복물로 16시간 동안 자극하고, PBS, MBK50(32 μ M) 및 돌연변이 펩티드(32 μ M)로 24시간 처리했다. 배양물 중 활성화된 증식 IRF4⁺Ki67⁺ CD3 T 세포(도 5의 적색 정사각형)를 라이브/데드 염색(Invitrogen) 및 항-Ki67-FITC(Biolegend) 및 항-IRF4-APC(Biolegend) 항체에 의한 세포내 염색으로 분석했다. 도 5a에 생존 CD3 T 세포 집단 게이팅에 대한 대표적인 유세포 분석 프로파일도 도시되고, 도 5b에 게이팅된 생존 CD3 T 세포에 대한 Ki67 대 IRF4의 대표적인 유세포 분석 프로파일도 도시된다. 도 5c 내지 5e의 경우, 각 실험에서 생존 세포 %(c, n=5), 총 CD3 T 세포 수(d, n=5) 및 Ki67+ 세포 %(e, n=3)에 대한 3회 배양의 평균이 상단 패널에 표시된다. 하단 패널은 PBS 대조군 배양물에 대해 정규화된(normalized) 데이터이다. P 값은 대응 비교(paired comparison)에 의한 일원 ANOVA(F)를 이용하여 Prism으로 계산되었다. p<0.05 통계적으로 유의함.

[0173] 이러한 결과는 MBK 펩티드가 다시 활발하게 분열하는 세포를 우선적으로 표적화한다는 것을 나타낸다. 이 펩티드 약물은 자가 면역 질환 또는 급성 염증 질환의 사용에 대한 징후인, 강력한 림프계 세포 성장을 약화시켜 급성 염증 동안 T 세포 증식을 억제하는 데 사용할 수 있다.

[0174] **실시예 4: MBK50 펩티드는 상이한 효능으로 다른 세포 유형을 표적으로 한다**

[0175] 도 6a에 도시된 바와 같이, 상이한 농도에서 MBK50 펩티드의 암세포 사멸 효능을 평가하기 위한 MTT 분석을 위해 다수의 암 세포주를 사용하였다(세포 가변성(cell variability) 연구). 상이한 농도(0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 96 μ M)의 펩티드를 표시된 세포주와 함께 인큐베이션했다: BCBL-1(원발성 삼출성 림프종 세포주), Ramos(버킷 림프종 세포주), SU-DHL-10(거대 B 세포 림프종(large B cell lymphoma)), HH(T-세포 비호지킨 림프종),

Jurkat(급성 T 세포 백혈병 세포주), THP-1(단핵구), U937 세포주(단핵구) 및 A549(폐 상피 세포주)를 비교에 사용하였다. 결과는 이 펩티드 약물이 림프계 세포주에 더 효과적이라는 것을 나타낸다. 중요한 것은 라이브/테드 염색(도 6b) 후 유세포 분석에 의해 평가된 바와 같이, 건강한 공여자의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)가 골수 및 림프 암세포주(예를 들면, THP-1 및 BCBL-1)에 비해 MBK-매개 사멸에 약 10배 덜 민감했다는 것이다. 따라서 용량을 적절하게 선택하면, MBK50은 정상 세포와 조직을 손상시키지 않고 선택적으로 암을 사멸시킬 수 있다.

[0176] **실시예 5:** 펩티드 약물은 BCL2 돌연변이 비호지킨 B-세포 림프종을 표적으로 한다

[0177] BCL2 돌연변이는 B-세포 림프종에서 흔히 볼 수 있고 이 세포 유형은 종종 항-아포토시스 표현형으로 인해 화학 요법에 대해 불응성이다. 결과는 펩티드 약물이 BCL2 음성 림프종 세포주에서 여전히 작용하여, 이 펩티드 약물에 가치를 더한다는 것을 보여준다. 또한, 결실 펩티드를 이용하여 필수 루이신(Essential Leucine)가 확인된다. 펩티드 1과 3 모두 NU-DUL1 세포 성장을 억제했으나, 루이신의 결실(펩티드 2)은 기능을 감소시켰다. 도 7을 참조한다.

[0178] **실시예 6:** 비-천연 펩티드의 생성 및 그들의 인 비트로 세포 사멸 효능

[0179] 아미노산 서열 정렬은 다른 감마-헤르페스바이러스 단백질 서열에서 동종(homologous) 단백질 서열을 확인하였다(도 8a의 상단 표, 도 2에도 도시됨). 그들의 정렬에 기반하여, 특정 아미노산을 치환하는 것에 의해 "비-천연" 단백질 서열을 생성했다(펩티드는 도 8a의 하단 표에서 위에서 아래로, Wt d1-1, DS 3-1, DE 3-1 및 Mut d1-1 (대조군 펩티드)임). BCBL-1 말초 삼출성 림프종(peripheral effusion lymphoma: PEL) 세포주의 세포 성장에 대한 효과를 조사하기 위해 도 8b의 MTT 분석에서 이 4개의 펩티드를 사용했다. 또한 1개의 D-아미노산 펩티드(N-말단)(Wt d3-1)와 비교하여, 처음 2개의 아미노산 및 c-말단 아미노산(ST d3-1)의 3개의 D-아미노산 치환을 테스트하였다. 도 8b는 5개의 펩티드(Wt d1-1, DS 3-1, DE 3-1, ST d3-1 및 Wt d3-1)가 Mut d1-1 대조군 펩티드와 비교하여 유사한 효능으로 인 비트로에서 BCBL-1 세포를 사멸시켰다는 것을 보여준다. BCBL-1 PEL 세포주의 인 비로 이중익식 연구는 또한 펩티드 Wt d1-1 및 Wt d3-1(3개의 D-아미노산을 1개의 D-아미노산 야생 서열로 치환한 것을 의미함) 모두 유사한 항-종양 성장 효과를 갖는다는 것을 보여주었다.

[0180] **실시예 7:** SLAM-seq로 MBK50 표적의 확인

[0181] 직교-화학(orthogonal-chemistry)-기반 RNA 시퀀싱 기술인 RNA의 대사 시퀀싱을 위한 티올(SH)-결합 알킬화(Thiol(SH)-linked alkylation for the metabolic sequencing of RNA: SLAM seq)는 단일 뉴클레오타이드 해상도에서 RNA 중에서 4-티오우리딘(s4U) 혼입을 검출한다. SLAM-seq 방법을 이용하여, BC-1 세포를 펩티드 약물과 함께 인큐베이션하고, 알라닌으로의 3개의 아미노산 치환을 갖는 펩티드를 대조군 펩티드로 사용하였다. 펩티드 약물을 BC-1 세포 배양(24 μM)에서 인큐베이션하고, 30분 약물 인큐베이션 후, 4sU(최종 농도 300 μM)를 1시간 동안 배양 배지에 첨가했다. 1시간 4sU 인큐베이션의 종료시 총 RNA를 분리하고, 알킬화된 RNA 샘플을 SLAM-seq에 적용시켰다. 샘플을 중복시키고(duplicate) 변경된 유전자 발현 대 모의-처리된(mock-treated) 세포(P < 0.05)를 적색으로 표시했다. 돌연변이 펩티드가 아닌 Wt-펩티드는 복수 세포 유전자 발현을 억제했다(도 9 우측 패널, P<0.05로 적색 도트로 표시됨). IGV 뷰어를 이용하여 MYC 영역(Chr. 8)에서 서열 판독을 시각화했다. T->C 돌연변이를 포함하는 전사체 종은 MBK50 펩티드의 존재 시 유의하게 감소하였으나, 돌연변이 펩티드에서는 그렇지 않았다. BCBL-1 및 BC-1 세포 모두에서 MYC 하향 조절의 Log2 배수 변화(fold change) 및 조정된(adjusted) P-값이 패널 아래에 기재된다. 마지막으로, 약물 처리 후 24시간차에 총 RNA-서열의 Gene Set Enrichment 분석은 MYC-표적 유전자 하향 조절의 농축을 보여주었으며, 이는 Wt-펩티드(MBK50)의 존재 하에서 MYC 발현의 유의한 억제와 일치한다.

[0182] **실시예 8:** 카포시 육종-연관 헤르페스바이러스(KSHV) 복제의 억제

[0183] 펩티드 서열은 KSHV 트랜스활성인자(transactivator) 단백질 서열을 기반으로 하며, 펩티드가 세포 전사촉진(transactivation) 복합체의 동원을 위해 바이러스 트랜스활성인자 단백질과 경쟁할 것으로 예상된다. 본 발명자들은 KSHV에 자연적으로 감염된 B 세포에서 펩티드 약물과 지속적으로 인큐베이션하여, 내성 세포주(RC)를 생성했다. 그 후, 내성 세포를 사용하여 부모 세포를 전체 RNA 시퀀싱과 비교하여 추정되는 약물 표적을 확인했다. 도 10에 도시된 바와 같이, 가장 현저하게 변경된 유전자 발현을 식별하는 Z-점수(Z-score) 데이터는 잠복-감염(latently infected) KSHV 유전자 발현이 지속된 펩티드 인큐베이션에 의해 상당히 하향 조절되었다는 것을 입증한다. 결과는 이 펩티드 약물을 KSHV에 감염된 B 세포에 전달하면 Myc 하향 조절을 통해 원발성 삼출성 림프종을 사멸시킬 뿐만 아니라 잠복-감염 KSHV 복제를 억제한다는 것을 나타내어, KSHV-연관 악성 종양(예

를 들면, 카포시 육종, 다중심성 캐슬만병(multi-centric Castlman disease), 원발성 삼출액 림프종)에 사용하는 이중 이점을 입증한다.

[0184] **실시예 9: 인 비보 염증성 사이토카인 생성의 억제**

[0185] 인간 림프구에 의한 사이토카인 생성에 대한 펩티드의 효과를 인 비트로 배양 시스템에 의해 연구하였다. PBMC를 중복으로(duplicate) 48시간 동안 PBS, MBK50(32 μ M) 또는 돌연변이 펩티드(32 μ M)의 존재 하에 항-CD3 항체로 자극하였다. 상층액을 회수하고, 인간 10 플렉스 비드 분석 키트(human 10 plex beads assay kit)(Invitrogen)를 이용하여, Luminex로 10개의 일반적인 사이토카인(IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ , TNF α)에 대해 분석했다. 분석 조건으로, 7개의 사이토카인(도 11 참조)을 검출했다. 모든 사이토카인은 주로 활성화된 CD3 T 세포에 의해 생성되는, 항-CD3 항체(적색, CD3-PBS)로 자극된 배양에서, 무-자극(청색, CD3 불포함) 대비 실질적으로 증가했다. IL-1 β 및 TNF α 를 제외한 모든 사이토카인 수준은 미처리 대조군(적색, CD3-PBS) 및 대조군 펩티드-처리된 배양물(보라색, CD3-Mut32)과 비교하여 펩티드-처리된 배양물(녹색, CD3-MBK32)에서 유의하게 감소했다. 이러한 결과는 펩티드 MBK50이 T 세포의 사이토카인 생성을 차단하는 데 사용될 수 있고, 따라서, 염증성 질환 또는 자가면역 질환에서 병원성 T 세포 반응을 제어하는 데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0186] 또한, 이중이식 마우스 모델에서 BCBL-1 PEL 세포에 의한 사이토카인 생성에 대한 펩티드의 효과를 연구하였다. 20일 동안 야생형 MBK50 (Wt) 펩티드(n=3), 대조군 Mut 펩티드(n=3)로 처리되거나 처리되지 않은 상태(n=3)로 남겨진, BCBL-1 PEL을 갖는(baring) NRG 마우스로부터 복수(ascite)를 수집했다. 복수 중 사이토카인 수준은 92개의 염증성 단백질을 검출할 수 있는 염증 패널을 사용하는 Olink 기술로 측정하였다. 데이터는 Olink Insights Stat 분석 소프트웨어로 분석하였다. 92개 단백질 발현 프로파일의 PC 분석은 미처리 마우스와 Mut 펩티드-처리 마우스로부터의 샘플의 밀접한 클러스터링(close clustering)을 보여주고, 반면에 Wt 펩티드로 처리된 마우스의 샘플은 클러스터로부터 떨어져 있다는 것을 보여준다 (도 12a). 따라서, Wt 펩티드의 염증성 단백질 발현 프로파일은 다른 그룹의 프로파일과 구별된다. 패널의 92개 사이토카인 중, 15개 사이토카인은 히트-맵(heat-map)(도 12b)에 표시된 바와 같이, 야생형 펩티드로 처리된 마우스에서 유의하게 상향- 또는 하향-조절되었다(Annova에 의해 $p < 0.05$). (도 12c)의 우측 패널에서, log2 스케일로, Olink의 임의 단위(arbitrary unit)인 NPX 단위로 표현된 15개의 사이토카인 발현 수준을 미처리 그룹, 돌연변이 펩티드-처리 그룹, 및 Wt 펩티드-처리 그룹 간에 비교하였다. 대부분의 발현 변화는 약 2배인 반면, VEGFA, 혈관신생 인자(~4배) 및 CXCL10, 백혈구 동원 인자(leukocyte recruiting factor)(~200배)는 실질적으로 감소했다. 이러한 결과는 이 펩티드가 혈관신생 및 백혈구 동원을 효과적으로 차단할 수 있고, 염증 반응을 차단하는 데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0187] **실시예 10: 단핵구 세포에 대한 MBK 효과**

[0188] 단핵구 세포는 선천적 면역 반응과 항원 특이적 면역 반응을 연결하는 중요한 항원 제시 세포이다. 단핵구 세포에 대한 MBK의 효과를 평가하기 위해, 건강한 공여자의 PBMC로부터 자성 비드를 이용하여 CD14+ 단핵구를 준비했다. 세포를 세척하고, MBK(16 또는 32 μ M) 또는 돌연변이 펩티드(32 μ M)의 존재 하에 LPS(100 ng/ml) 또는 폴리 I:C(10 μ g/ml)를 포함하거나 포함하지 않는 96 웰 플레이트(200 μ l/웰, 3회 반복(triplicates))에서 1×10^6 /ml로 2일 동안 배양했다. 생존 세포를 라이브/데드 염색 및 뒤이은 유세포 분석을 이용하여 결정하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, 대조군 펩티드 또는 PBS 대조군과 비교하여 MBK50으로 처리한 후 무자극(PBS) 및 자극(LPS, polyIC) 조건 모두에서 생존 세포의 비율이 유의하게 감소하여, CD14+ 단핵구에 대한 MBK의 세포 사멸 효과를 입증하였다.

[0189] 인간 수지상 세포의 모델로서 단핵구-유래 수지상 세포를 이용하여 유사한 실험을 또한 수행하였다. 요약하면, GM-CSF + IL-4(각각 50ng/ml)의 존재 하에 4일 동안 배양한 후 자성 비드로 분류된 CD14+ 세포(건강한 공여자의 PBMC로부터 유래)로부터 단핵구 유래 수지상 세포를 제조하였다. 세포를 세척하고 MBK(16 또는 32 μ M) 또는 돌연변이 펩티드(32 μ M)의 존재 하에 LPS(100 ng/ml), 폴리 I:C(10 μ g/ml) 또는 sCD40L(1 μ g/ml)을 포함하거나 포함하지 않는 96 웰 플레이트(200 μ l/웰, 3회 반복)에서 1×10^6 /ml로 2일 동안 배양했다. 라이브/데드 염색을 이용하여 앞서 나타낸 바와 같이, 생존 세포를 결정하였다. 도 16에 도시된 바와 같이, 대조군 펩티드 또는 PBS 대조군과 비교하여 MBK50으로 처리한 후 무자극(PBS) 및 자극(LPS, sCD40L) 조건에서 생존 세포의 비율이 유의하게 감소하여, MDC에 대한 MBK의 세포 사멸 효과를 입증하였다.

[0190] 특히, 도 13에 표시된 바와 같이, MBK 처리된 MDC는 응집되지 않고, 대조군에 비해 퍼짐성 및 부착성이 더 높았

으며, 이는 MBK에 의한 MYC-유도 증식의 억제로 인한 잠재적인 세포 분화를 나타낸다.

[0191] 도 6에 표시된 바와 같이, 단핵구성 백혈병 세포주 THP-1 및 U937은 둘 다 MBK50-매개 세포 사멸에 민감했다. MYC는 특히 LPS 자극 시 단핵구 세포 증식에 중요하다. MBK50이 MYC 및 직접적인 MYC 표적 유전자인 IRF4를 하향 조절하여 단핵구 세포 증식을 차단한다는 것을 입증하기 위해, 단핵구성 백혈병 세포주 THP-1 세포를 16 μ M MBK, 돌연변이 대조군 또는 PBS의 존재 하에 LPS(100 ng/ml)와 함께 24시간 동안 배양하였다. MYC 및 IRF4 발현 수준은 이소형 대조군 염색을 포함한 MYC 및 IRF4의 세포내 염색 및 뒤이은 유세포 분석에 의해 조사하였다(도 16a). 도 16b에 표시된 바와 같이, THP-1 세포에서의 MYC 발현은 MYC의 현저하게 감소된 MFI에 의해 명백한 바와 같이 돌연변이 대조군 펩티드 또는 PBS와 비교하여 MBK 처리시 현저하게 감소되었다. 또한, IRF4 발현이 감소된 THP-1 세포의 백분율은 돌연변이 대조 펩티드 또는 PBS 처리와 비교하여 MBK50 처리에 의해 증가되었다. 이러한 결과는 MBK50이 단핵구성 백혈병 세포에서 MYC 및 IRF4 발현을 직접적으로 표적화하고 하향 조절하여, MYC 의존적 증식을 억제한다는 것을 나타낸다.

[0192] 종합적으로, 이러한 결과는 MBK50이 만성 염증 질환 및 자가면역 질환을 포함한 염증성 질환에서 단핵구 세포 증식 및 기능을 억제하는데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. 또한, 데이터는 MBK50이 급성 골수성 백혈병(AML)과 같은 단핵구성 백혈병 세포를 사멸시키는데 이용될 수 있다는 것을 보여준다.

[0193] **실시예 11: MBK의 SWI/SNF 복합체와의 상호작용**

[0194] VGN50(일명 MBK50) 작용 메커니즘의 근거를 확인하기 위해, VGN50과 SWI/SNF 단백질(즉, VGN50 표적 분자) 사이의 생화학적 상호작용을 바클로바이러스에 감염된 Sf9 세포로부터 제조된, 정제된 5개의 개별 SWI/SNF 성분을 이용한 ELISA-기반 결합 분석에 의해 검사했다(도 17a). 증가하는 농도의 비오틴-결합 VGN50 또는 Mut-P를 각각의 SWI/SNF 성분으로 코팅된 ELISA 플레이트에서 인큐베이션하고, 결합된 펩티드를 HRP-스트렙타비딘에 의해 검출하였다(도 17b). 결과는 VGN50이 50 nM만큼 낮은 농도에서 5개의 SWI/SNF 성분에 결합했다는 것을 보여주었다(도 17c). 이러한 결과는 VGN50이 SWI/SNF 복합체의 성분들과 상호작용할 수 있다는 것을 나타낸다. 이러한 분석은 동일한 분자 상호 작용 및 작용 메커니즘을 통해 MYC 활성을 억제하는 능력을 가진 MBK/VGN50 변이체를 확인하기 위해 이용될 수 있다.

[0195] 본 출원에서 인용된 GenBank 수탁 번호 또는 등가물을 포함한 모든 특허, 특허 출원 및 기타 간행물은 모든 목적을 위해 전체가 참조로 포함된다.

[0196] **참조문헌**

[0197] 1. Dang, C.V., Reddy, E.P., Shokat, K.M. & Soucek, L. Drugging the 'undruggable' cancer targets. Nat Rev Cancer 17, 502-508 (2017).

[0198] 2. Lau, J.L. & Dunn, M.K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. Bioorg Med Chem 26, 2700-2707 (2018).

[0199] 3. Beaulieu, M.E. et al. Intrinsic cell-penetrating activity propels Omomyc from proof of concept to viable anti-MYC therapy. Sci Transl Med 11 (2019).

[0200] 4. Tugyi, R. et al. Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 413-418 (2005).

[0201] **비공식 서열 목록**

[0202] **서열번호 1 MBK50 펩티드 아미노산 서열**

[0203] LSSILQGLYQLDT

[0204] **서열번호 2 TAT 펩티드 아미노산 서열**

[0205] GRKKRRQRRRPQ

[0206] **서열번호 3 TAT 펩티드 아미노산 서열(변형)**

[0207] {d-Arg}KKRR{Ornithine}RRR{Beta-Ala}

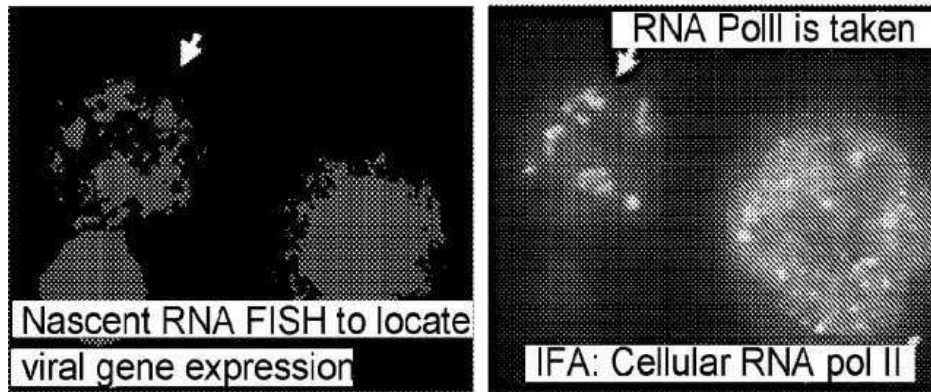
[0208] **서열번호 4 MYC-억제 펩티드 컨센서스 서열(x = 임의의 아미노산)**

[0209] LxxILQ(G/D)LYxLDx

도면

도면1a

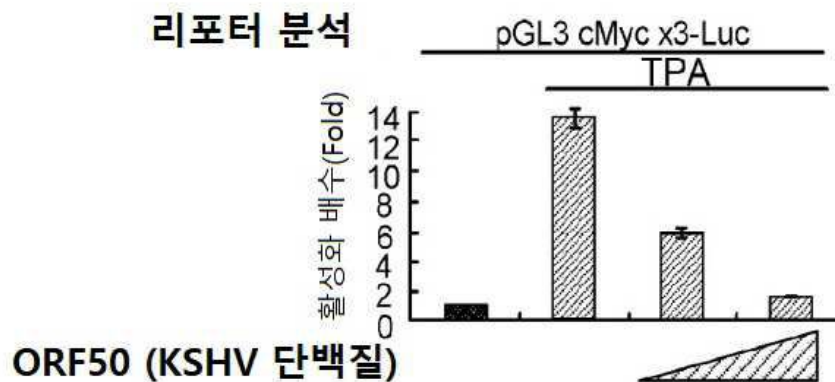
KSHV가 숙주 전사를 인수함



RNA pol II가 KSHV에 의해 하이재킹됨

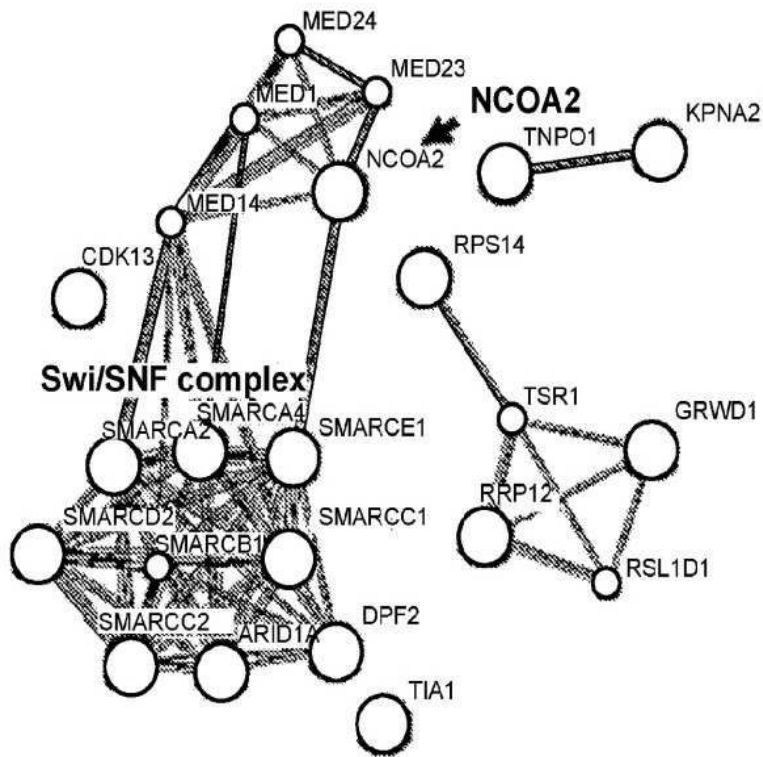
도면1b

ORF50 발현은 MYC 활성화를 억제함



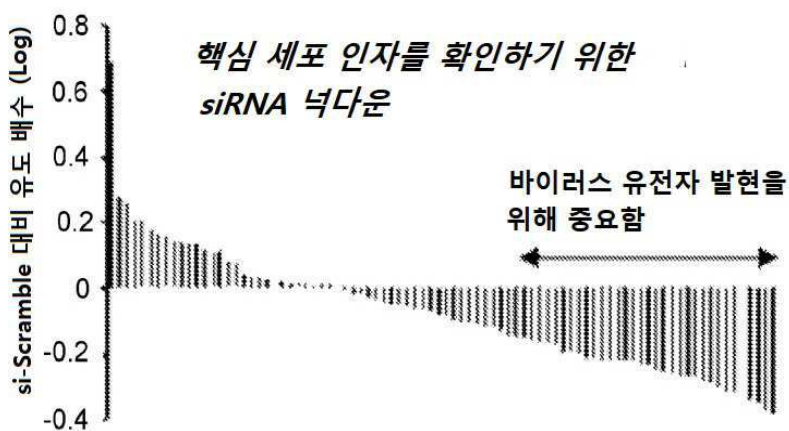
도면1c

크로마틴에서 KSHV 재활성화에 의해 유도된
RNA pol II 단백질 상호작용



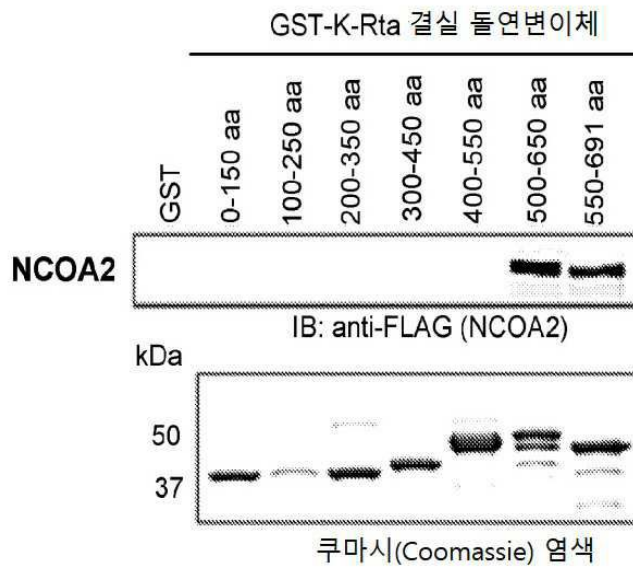
도면1d

판독(readout)으로서 바이러스 유전자 발현을 위한
핵심 세포 단백질의 스크리닝



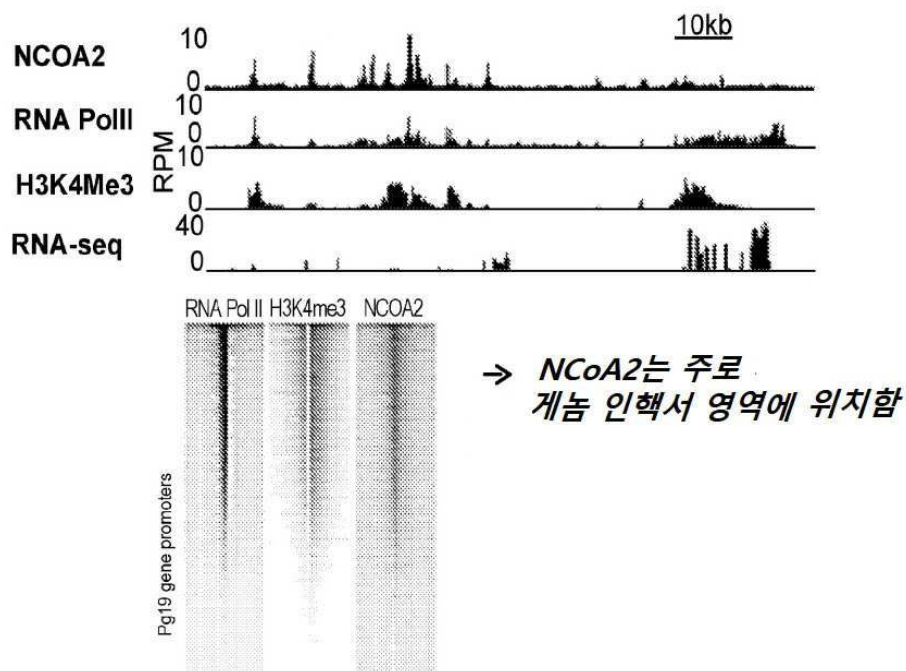
도면1e

상호작용 도메인의 맵핑

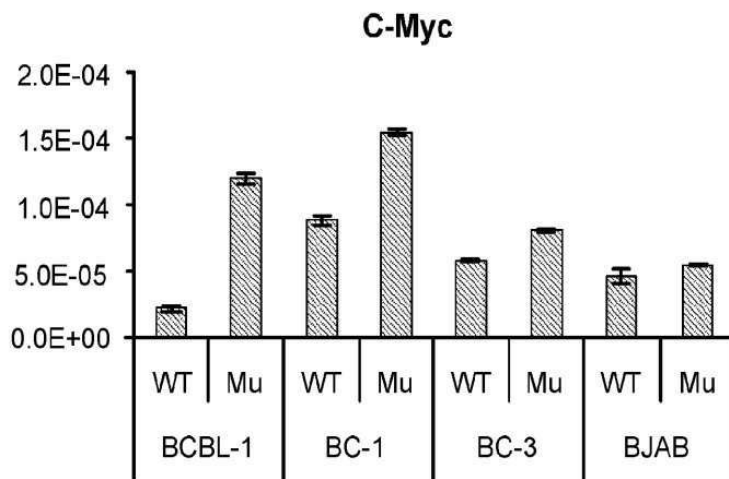


도면1f

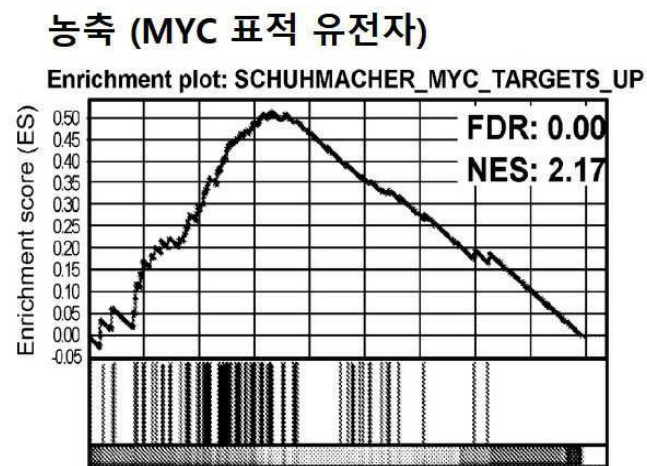
PEL 세포를 이용한 Chip-seq



도면 1g



도면 1h

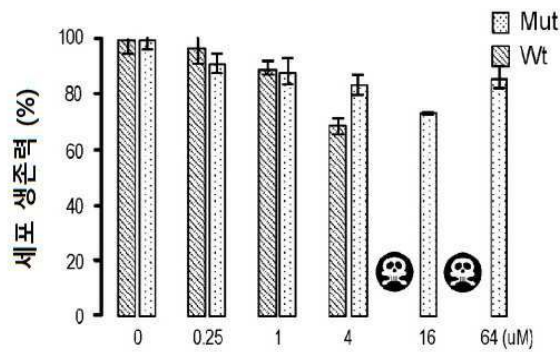


Mut 펩티드 vs Wt 펩티드

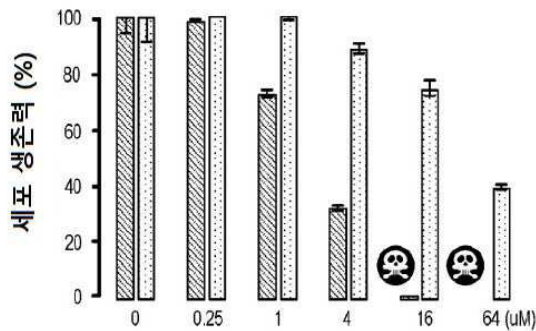
→ MYC 표적 유전자는 Wt 펩티드 처리된 세포에서 하향조절됨

도면1i

BCBL-1 세포 (원발성 삼출성 림프종)



BC-1 세포 (원발성 삼출성 림프종)



도면2

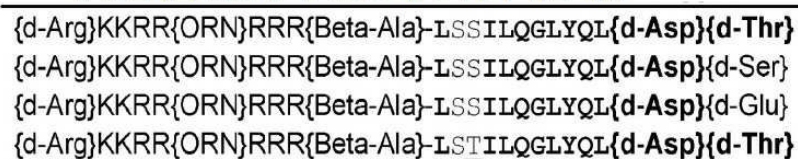
기타 헤르페스바이러스 & 박테리아	정렬/단백질 서열
KSHV ORF50 (K-Rta):	TDDALLSSILQGLYQLDTPPPL
LysR Bacteria TF:	LKAQ-LPTILSQGLYQL
Saimiriine GHV2:	TDDNILASILQDLYDLPAPP
Macaca Nemerha Virus:	TDDDMLAAILQDLYGLQSP
Bovine GHV4:	EDAYLELILQGLYHLDPP
Retrofibro.GHV:	DDELLSTILQGLYQLDPP
Colobine GHVI:	DEDLLSAILQGLYQLDPP

현재의 펩티드

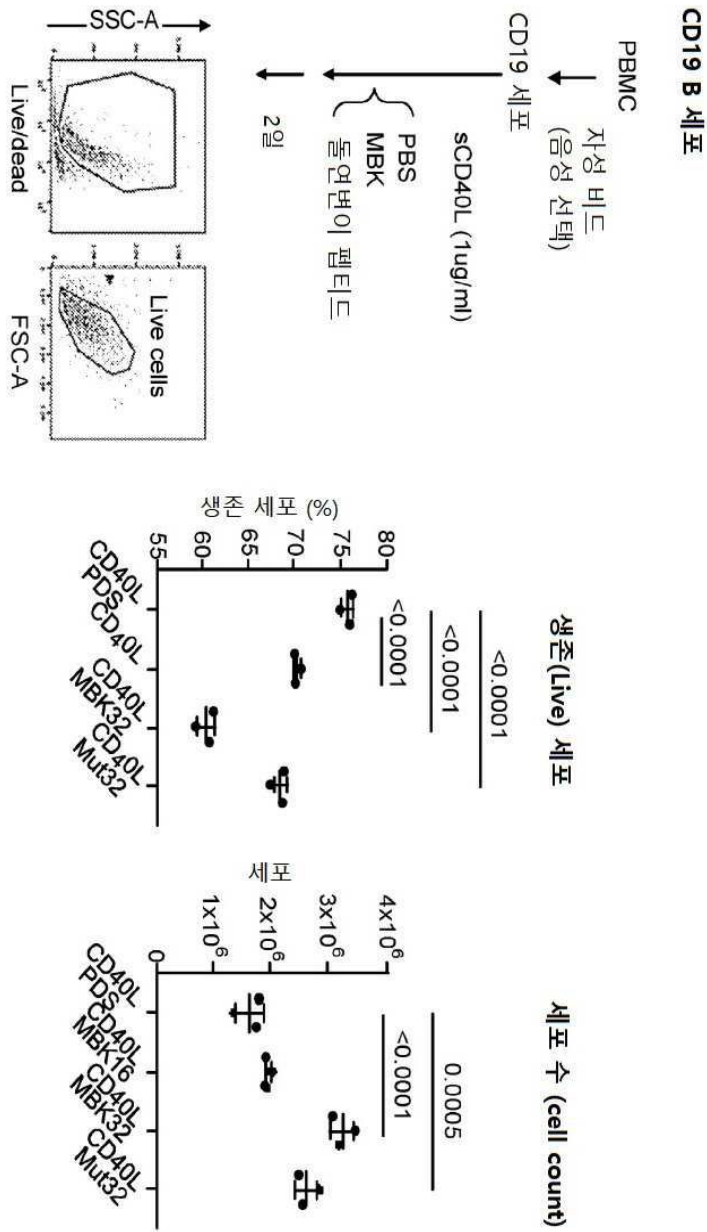


안정성을 증가시키기 위해 변형된 C-말단 및 "비-천연" 대응물을 제조하기 위해 치환된 아미노산

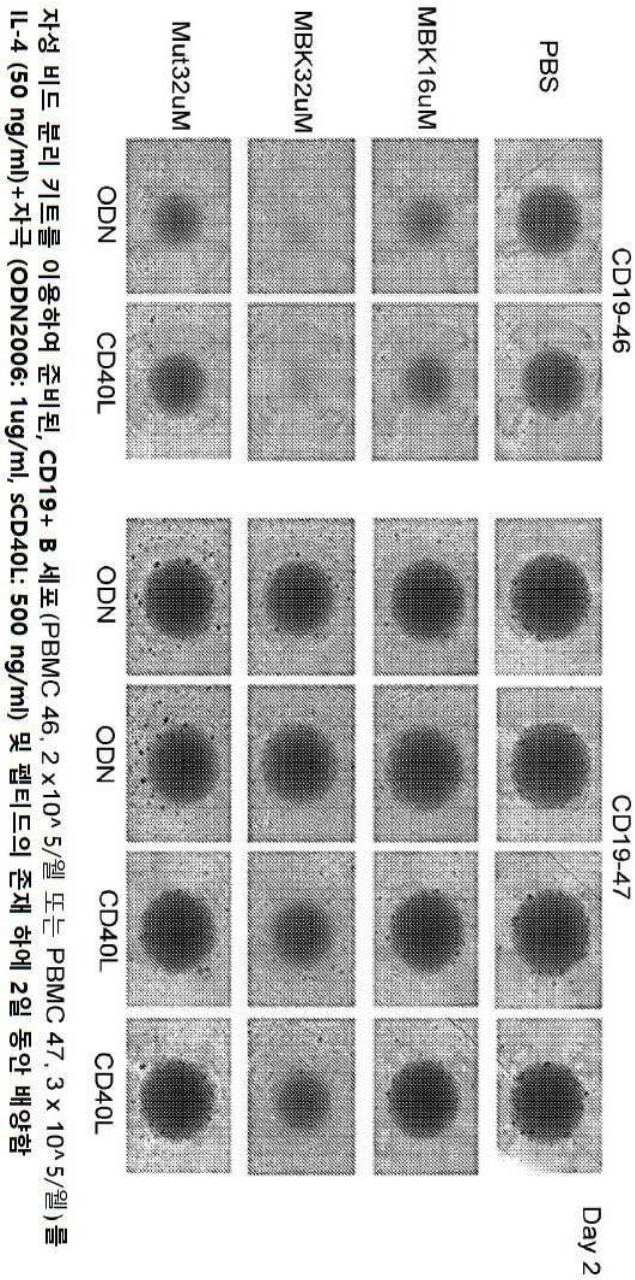
본 출원에서 합성하고 효능을 테스트하기 위한 제안



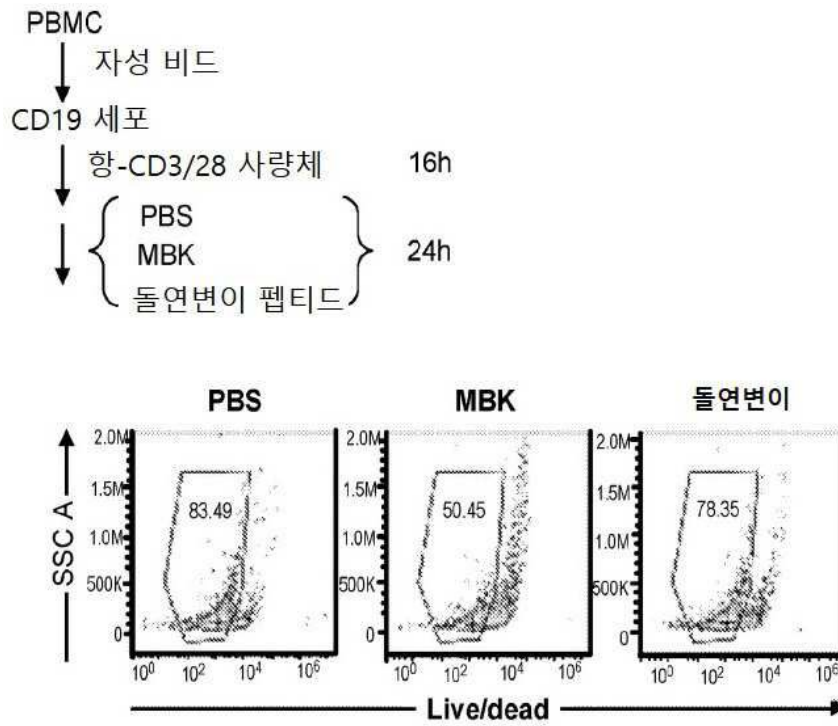
도면3



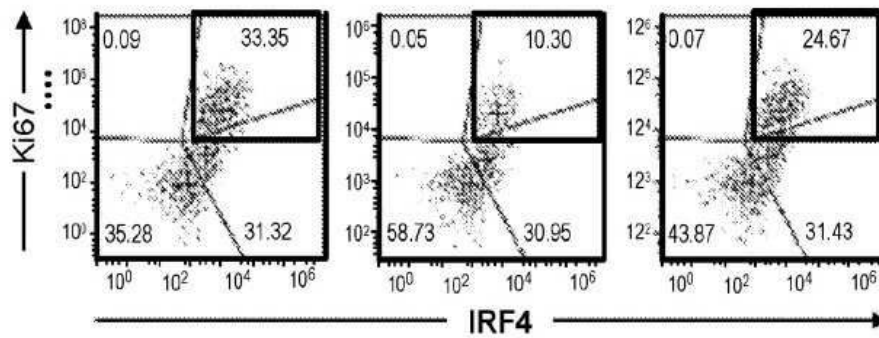
도면4



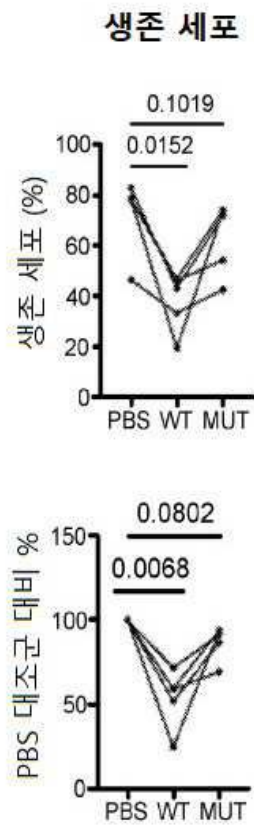
도면5a



도면5b



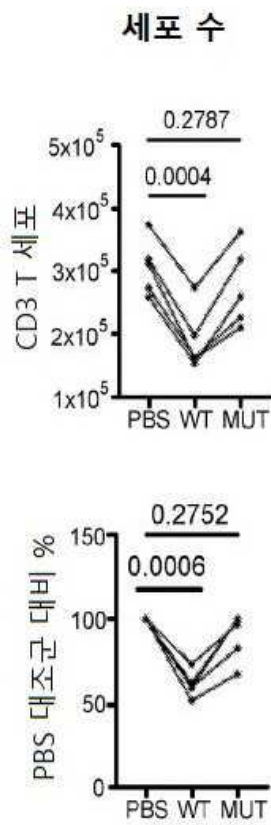
도면5c



5명의 건강한 공여자

WT = MBK50 펩티드

도면5d

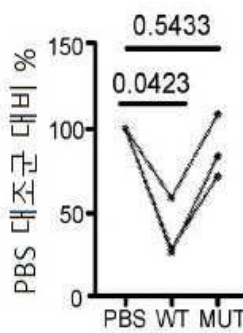
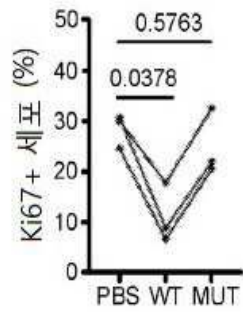


5명의 건강한 공여자

WT = MBK50 펩티드

도면5e

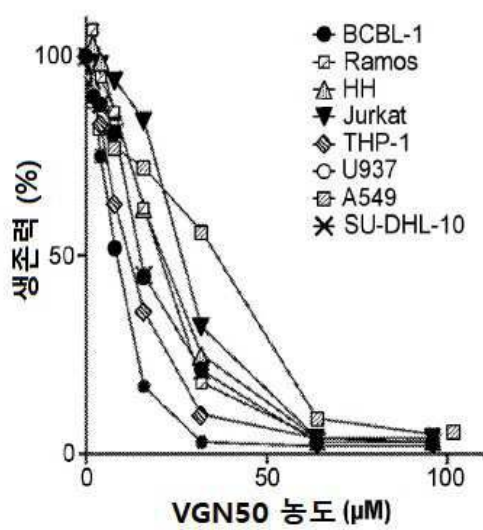
Ki67+ 세포



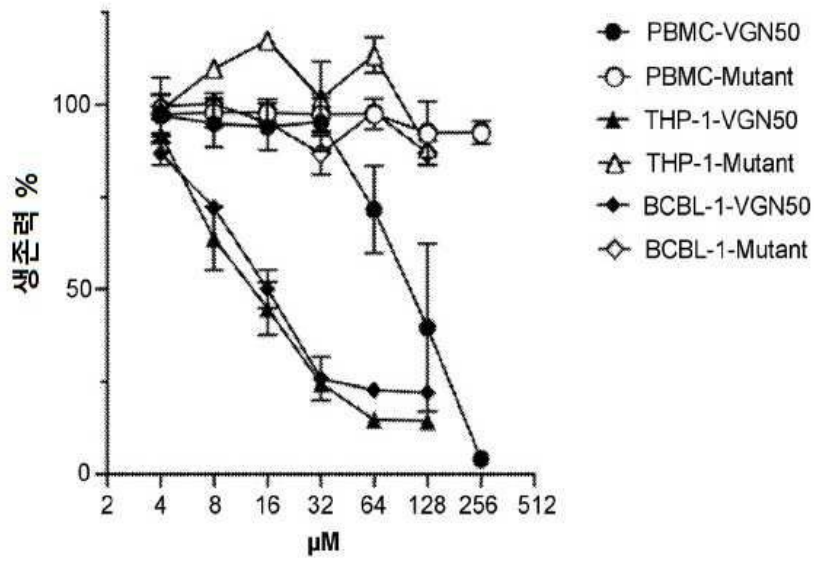
3명의 건강한 공여자

WT = MBK50 펩티드

도면6a

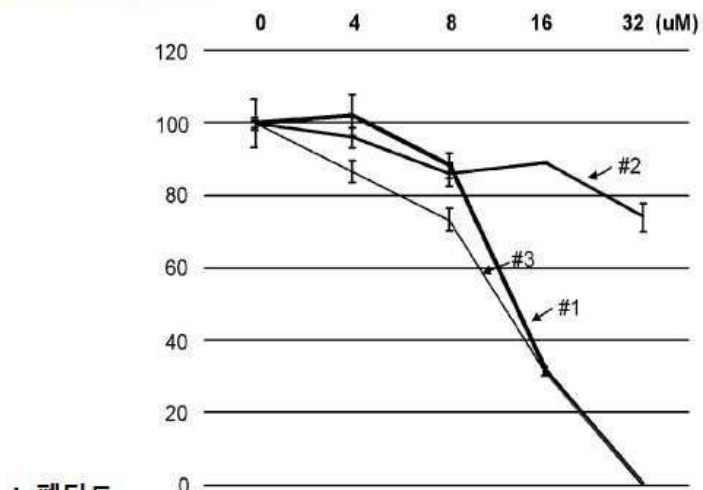


도면6b



도면7

NU-DUL1 세포주



L-펩티드

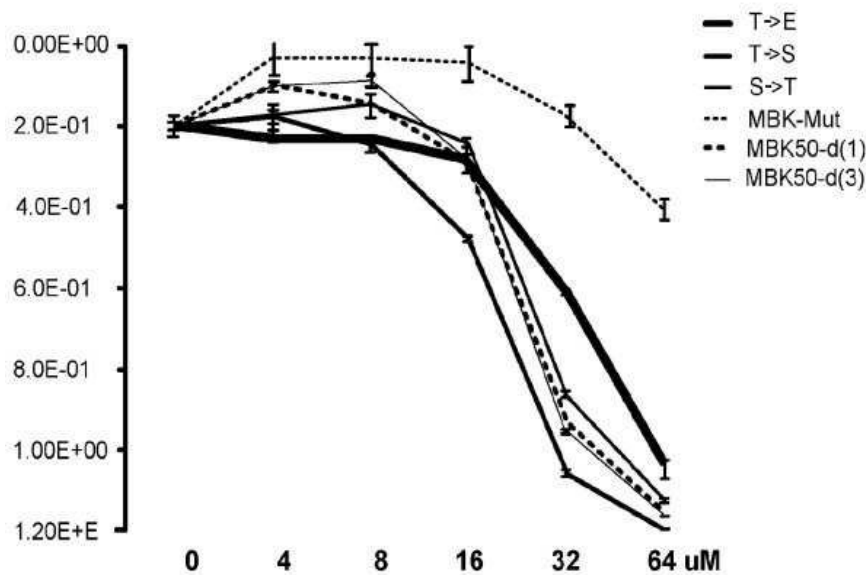
Peptide 1: {d-Arg}KKRR{ORN}RRR{Beta-Ala}-----LSSILQGLYQLDT
 Peptide 2: {d-Arg}KKRR{ORN}RRR{Beta-Ala}-----SSILQGLYQLDT
 Peptide 3: {d-Arg}KKRR{ORN}RRR{Beta-Ala}--DALLSSILQGLYQLDT

도면8a

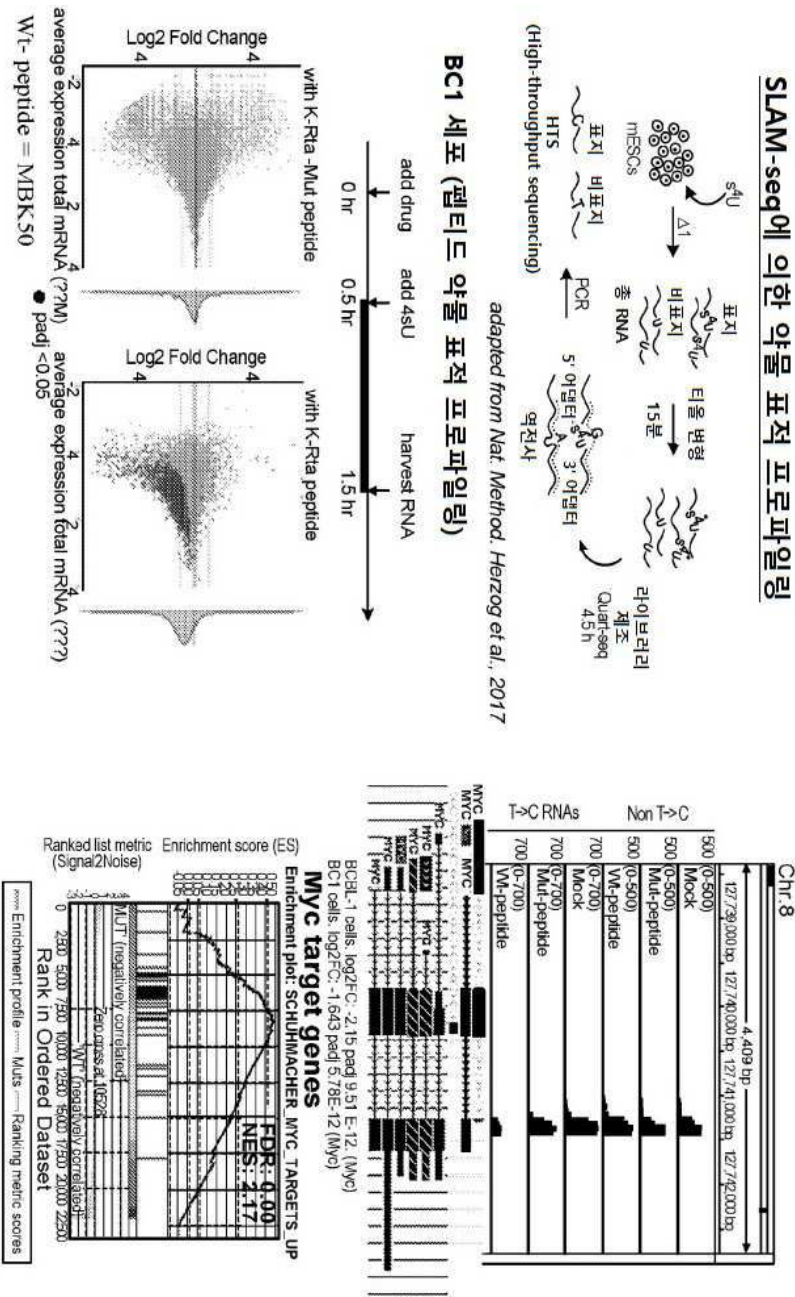
기타 헤르페스바이러스 & 박테리아 정렬/단백질 서열	
KSHV ORF50 (K-Rta):	TDDALLSSILQGLYQLDTPPPL
LysR Bacteria TF:	LKAQ-LPTILSQGLYQL
Saimiriine GHV2:	TDDNILASILQDLYDLPPAP
Macaca Nemerha Virus:	TDDMLAAILQDLYGLQSP
Bovine GHV4:	EDAYLELILQGLYHLDPP
Retrofibro.GHV:	DDELLSTILQGLYQLDPP
Colobine GHVI:	DELLSAILQGLYQLDPP

현재의 펩티드	
{d-Arg}KKRR{ORN}RRR{Beta-Ala}-LSSILQGLYQLDT	
← → ← →	
세포 투과를 위한 변형된 TAT 펩티드 KSHV-K-Rta	
안정성을 증가시키기 위해 변형된 C-말단 및 "비-천연" 대응물을 제조하기 위해 치환된 아미노산	
본 출원에서 합성하고 효능을 테스트하기 위한 제안	
{d-Arg}KKRR{ORN}RRR{Beta-Ala}-LSSILQGLYQL{d-Asp}{d-Thr}	
{d-Arg}KKRR{ORN}RRR{Beta-Ala}-LSSILQGLYQL{d-Asp}{d-Ser}	
{d-Arg}KKRR{ORN}RRR{Beta-Ala}-LSSILQGLYQL{d-Asp}{d-Glu}	
{d-Arg}KKRR{ORN}RRR{Beta-Ala}-LSTILQGLYQL{d-Asp}{d-Thr}	

도면8b

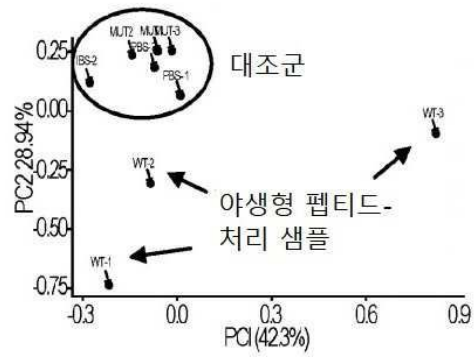


도면9



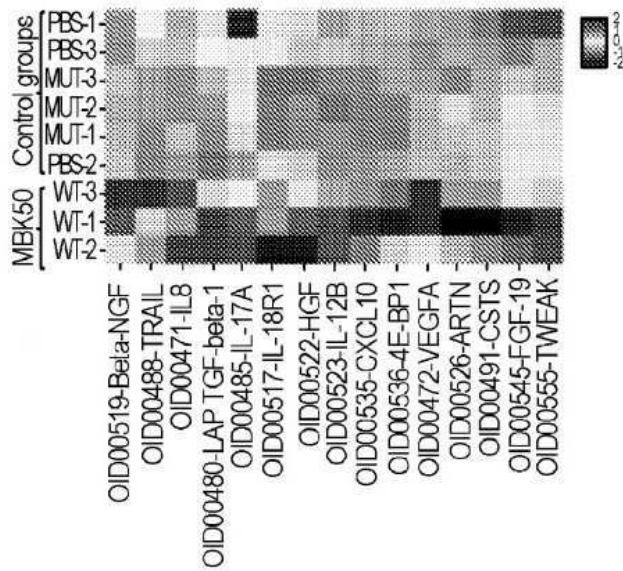
도면12a

92개 염증성 단백질 발현의 PCA 분석

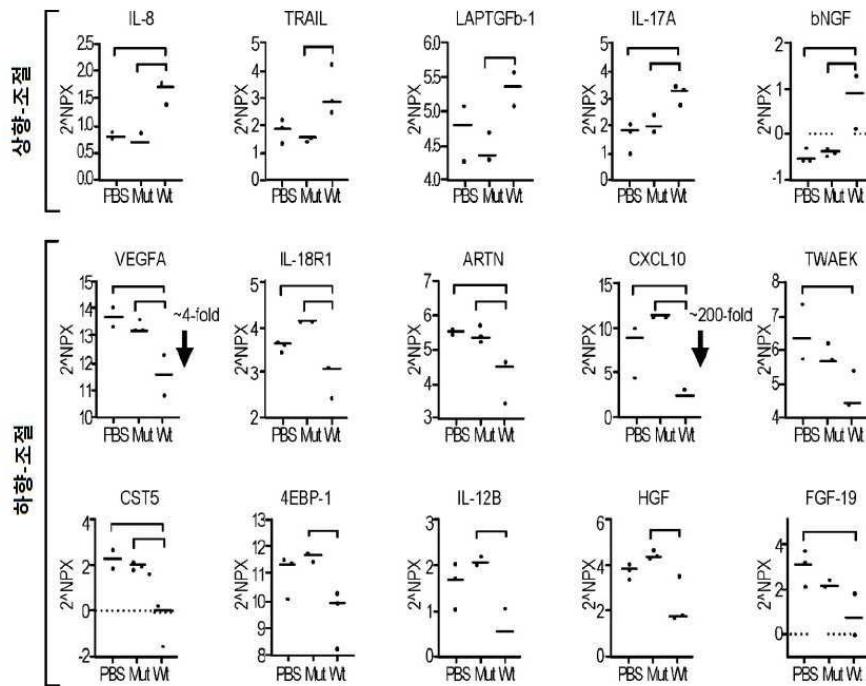


도면12b

15개 염증성 단백질 발현의 히트 맵



도면12c



도면13a

CD14+ 세포

PBMC

↓ 자성 비드

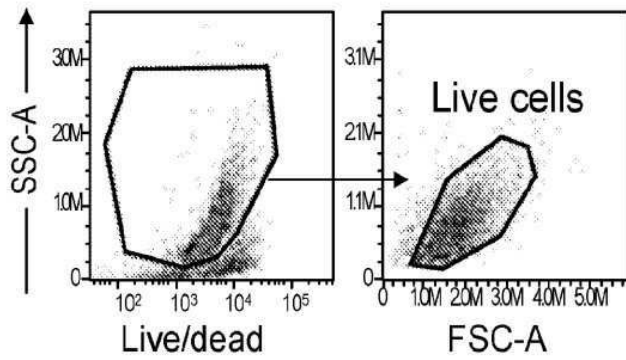
CD14+ 세포

↓ { GM-CSF (1ng/ml)
LPS (100ng/ml)
Poly I:C (10ug/ml)

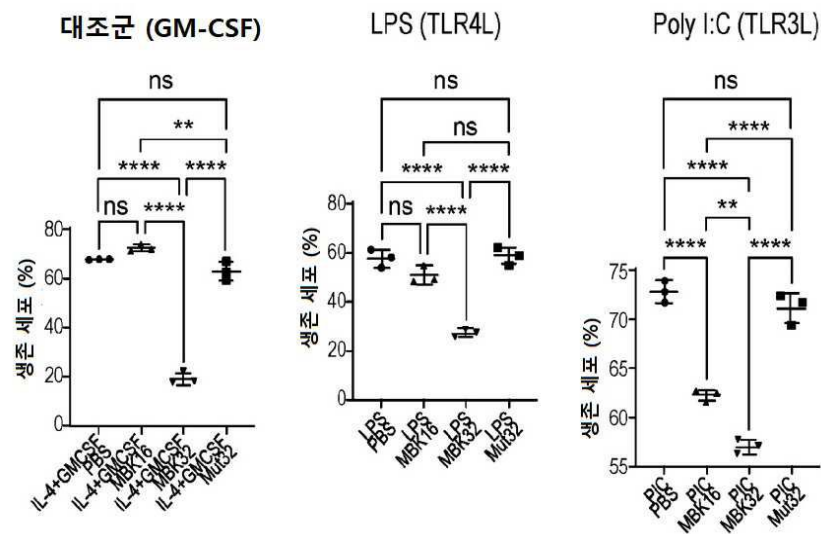
↓ { PBS
MBK
돌연변이 펩티드

↓ 2일

도면13b



도면13c



도면14a

단핵구 유래 DC (MDC)

CD14+ 세포

↓ GM-CSF + IL-4 (50ng/ml),
↓ 4일

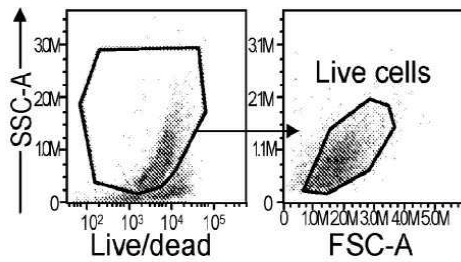
MDCs

↓ { PBS
LPS (100ng/ml)
Poly I:C (10ug/ml)
sCD40L (1ug/ml)

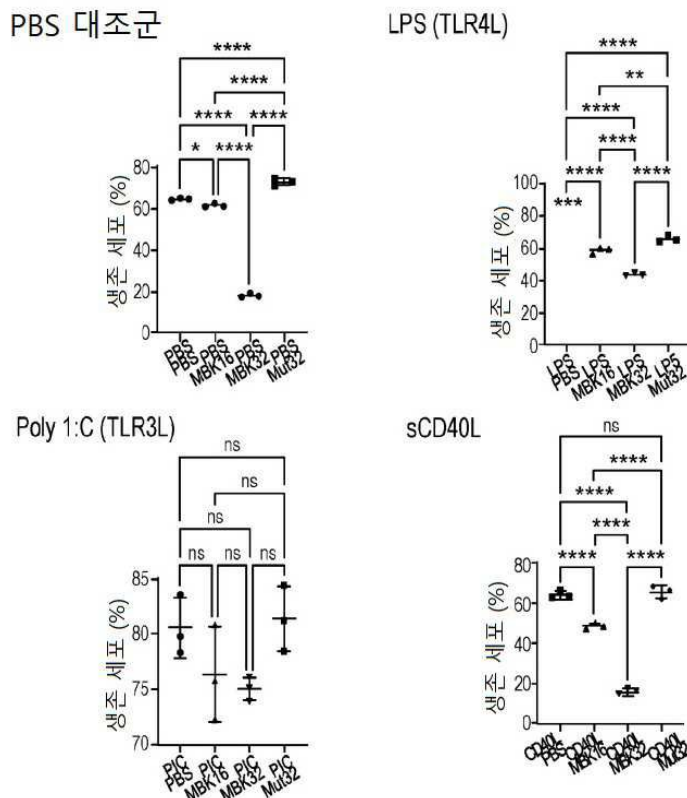
↓ { PBS
MBK
돌연변이 펩티드

↓ 2일

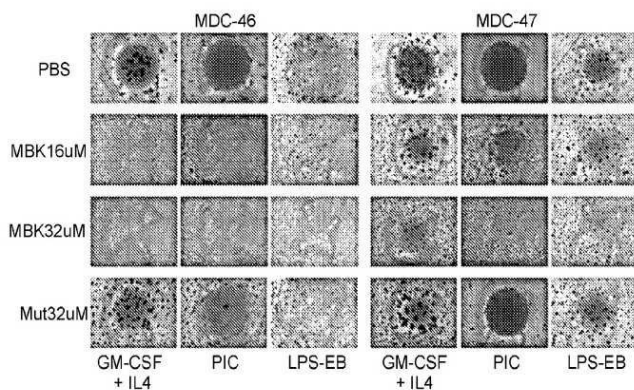
도면14b



도면14c

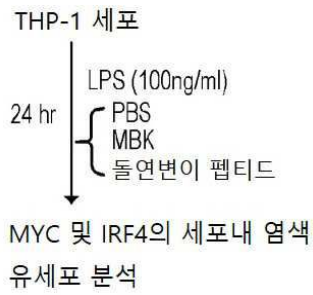


도면15

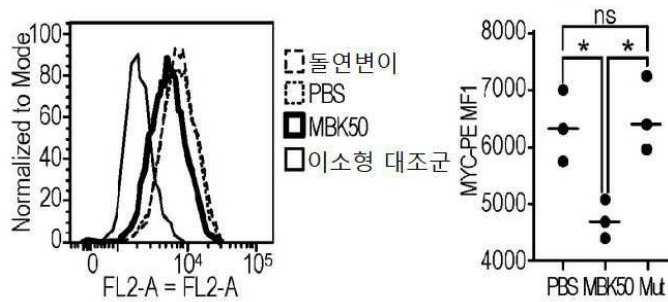


자성 비드 단리 키트를 이용하여 준비된 CD14⁺ 단핵구 (PBMC 46, 2×10^5 /웰 또는 PBMC 47, 2×10^5 /웰)를 자극 (GMCSF + IL4: 각각 50 ng/ml, PIC-LMW: 2 ug/ml, LPS-EB: 100 ng/ml) 및 펩티드의 존재 하에 2일 동안 96 웰 U자형-바닥 플레이트에서 배양함. Keyence 현미경에 의해 촬영된 대표적인 세포 이미지 (10X)

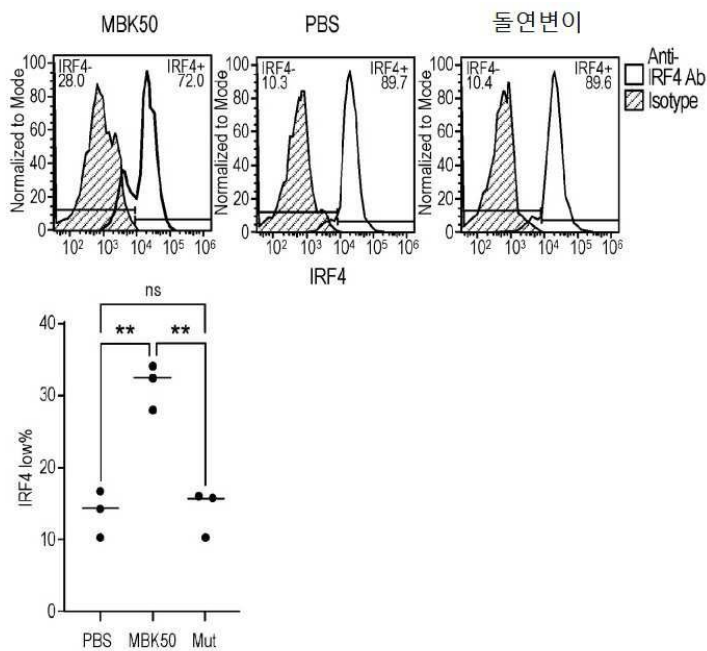
도면16a



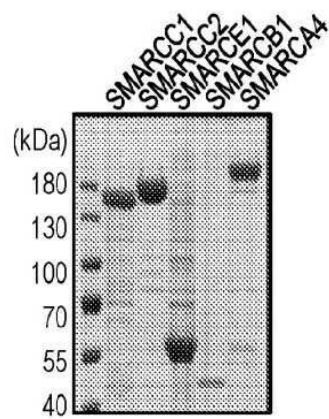
도면16b



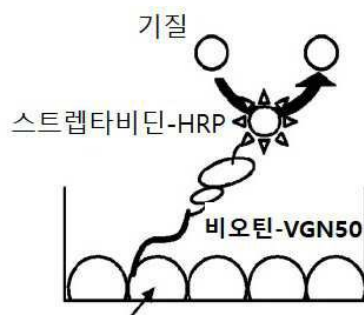
도면16c



도면17a

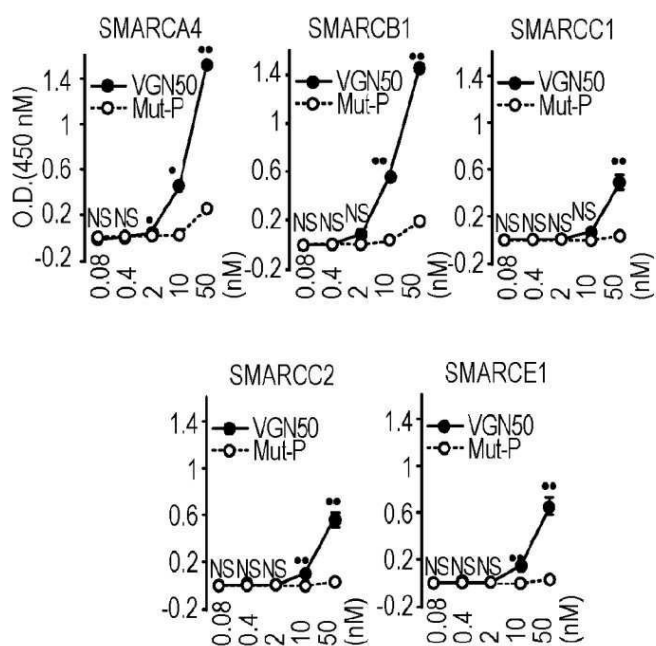


도면17b



정제된 단백질 (100 nM/100 μ L/웰 코팅)

도면17c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> TRANSCRIPTION ACTIVE COMPLEX TARGETING CANCER DRUG FROM VIRAL
PROTEIN SEQUENCE

<130> 081906-1271119-240630PC

<140> PCT/US2021/055979

<141> 2021-10-21

<150> 63/222,697

<151> 2021-07-16

<150> 63/152,959

<151> 2021-02-24

<150> 63/094,766

<151> 2020-10-21

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Human gammaherpesvirus 8

<400> 1

Leu Ser Ser Ile Leu Gln Gly Leu Tyr Gln Leu Asp Thr

1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 2

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Ornithine

<220><221> MOD_RES

<222>

(10)..(10)

<223> Beta-Ala

<400> 3

Arg Lys Lys Arg Arg Xaa Arg Arg Arg Ala

1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(3)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> G or D

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Any amino acid

<400> 4

Leu Xaa Xaa Ile Leu Gln Xaa Leu Tyr Xaa Leu Asp Xaa

1 5 10

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 5

His His His His His His

1 5

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> Human gammaherpesvirus 8

<400> 6

Thr Asp Asp Ala Leu Leu Ser Ser Ile Leu Gln Gly Leu Tyr Gln Leu

1 5 10 15

Asp Thr Pro Pro Pro Leu

20

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

LysR Bacteria TF sequence

<400> 7

Leu Lys Ala Gln Leu Pro Thr Ile Leu Gln Gly Leu Tyr Gln Leu

1 5 10 15

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Saimiriine gammaherpesvirus 2

<400> 8

Thr Asp Asp Asn Ile Leu Ala Ser Ile Leu Gln Asp Leu Tyr Asp Leu

1 5 10 15

Pro Ala Pro Pro

20

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> Macacine gammaherpesvirus 12

<400> 9

Thr Asp Asp Asp Met Leu Ala Ala Ile Leu Gln Asp Leu Tyr Gly Leu

1 5 10 15

Gln Ser Pro

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Bovine gammaherpesvirus 4

<400> 10

Glu Asp Ala Tyr Leu Glu Leu Ile Leu Gln Gly Leu Tyr His Leu Asp

1 5 10 15

Glu Pro

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Macacine gammaherpesvirus 8

<400> 11

Asp Asp Glu Leu Leu Ser Thr Ile Leu Gln Gly Leu Tyr Gln Leu Asp

1 5 10 15

Glu Pro Pro

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Colobine gammaherpesvirus 1 sequence

<400> 12

Asp Glu Asp Leu Leu Ser Ala Ile Leu Gln Gly Leu Tyr Gln Leu Asp

1 5 10 15

Glu Pro Pro