



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월06일
(11) 등록번호 10-2692200
(24) 등록일자 2024년08월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/245 (2006.01) A61K 39/108 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/25 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/245 (2013.01)
A61K 39/0258 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7005041(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년01월26일
심사청구일자 2023년02월13일
(85) 번역문제출일자 2023년02월13일
(62) 원출원 특허 10-2022-7001129
원출원일자(국제) 2015년01월26일
심사청구일자 2022년01월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/012970
(87) 국제공개번호 WO 2015/113007
국제공개일자 2015년07월30일
(30) 우선권주장
61/932,000 2014년01월27일 미국(US)
62/049,325 2014년09월11일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W01996030043 A1
W02001070945 A1
- (73) 특허권자
몰레쿨러 템플레이츠, 인코퍼레이션.
미국, 텍사스 78729, 오스틴, 슈트 100, 앰버그렌
블러바드 9301
(72) 발명자
포마, 에릭
미국, 뉴욕 10014, 뉴욕, 크리스토퍼 스트리트
165
윌렛, 에린
미국, 텍사스 78681, 라운드 록, 모킹버드 درا이
브 2230
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
최덕규

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 포유류에 적용하기 위한 탈면역된 시가 독소 A 서브유닛 작동체 폴리펩티드

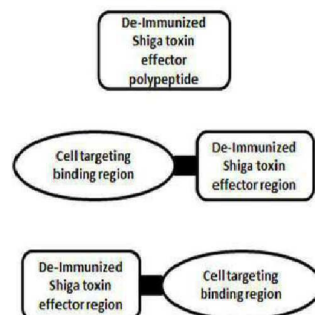
(57) 요약

본 발명은 항원성 및/또는 면역성 잠재력이 감소된 시가 독소 작동체 폴리펩티드에 대해 언급한다. 면역원성은 포유 동물에 시가 독소로부터 유도된 단백질 및 폴리펩티드를 반복 투여하는데 제한을 지을 수 있다. 본 발명의 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 치료적, 진단적, 및 면역조치 조성물의 구성요소로 사용할 수 있다. 본 발명의

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1

Figure 1. Schematic Drawing of the General Architecture of Exemplary Polypeptides and Cytotoxic Proteins



세포독성 단백질은 특정 세포종을 특이적으로 사멸할 수 있으며, 암, 면역질환, 및 세균감염을 포함한 각종 질병의 치료에 사용할 수 있다. 본 발명의 단백질은 특정 세포종을 검출, 진단 정보 수집, 및 암, 면역질환, 및 세균 감염과 같은 각종 질병의 치료를 모니터링 하는데에도 사용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/0283 (2013.01)

A61P 31/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/25 (2013.01)

C07K 16/085 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

C07K 2317/22 (2013.01)

C07K 2319/33 (2013.01)

(72) 발명자

로빈슨, 가렛 리

미국, 텍사스 78729, #913, 어스틴, 앤더슨 밀 로드 8601

라자고팔란, 생기타

미국, 텍사스 78665, 라운드 록, 웨스트매도우 트레일 1524

브리스키, 브리지페

미국, 텍사스 78702, 어스틴, 굿윈 애비뉴 3307

명세서

청구범위

청구항 1

i) 세포 표면에 물리적으로 결합된 세포 외 표적 생체분자인 HER2/neu/ErbB2, CD38, CD20, CTLA-4, BCMA, 또는 SLAMF7에 특이적으로 결합하는 결합 영역; 및

ii) SEQ ID NO:1의 아미노산 1 내지 251에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드;

를 포함하는 세포-표적화 분자로서, 상기 아미노산 서열은:

(i) SEQ ID NO:1의 S45에서 I로, SEQ ID NO:1의 P59에서 F로, SEQ ID NO:1의 E60에서 T로, SEQ ID NO:1의 E61에서 L로, SEQ ID NO:1의 G110에서 A로, SEQ ID NO:1의 R188에서 A로, SEQ ID NO:1의 R248에서 A로, 그리고 SEQ ID NO:1의 R251에서 A로의 아미노산 치환체들로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 치환체; 및

(ii) SEQ ID NO:1의 C242에서 S로의 아미노산 치환체;

를 포함하고, 그리고

상기 아미노산 서열은 SEQ ID NO:1의 위치 75에 상응하는 아미노산 잔기에 아스파라긴, SEQ ID NO:1의 위치 77에 상응하는 아미노산 잔기에 티로신, SEQ ID NO:1의 위치 114에 상응하는 아미노산 잔기에 티로신, SEQ ID NO:1의 위치 167에 상응하는 아미노산 잔기에 글루타메이트, SEQ ID NO:1의 위치 170에 상응하는 아미노산 잔기에 아르기닌, SEQ ID NO:1의 위치 176에 상응하는 아미노산 잔기에 아르기닌, 및 SEQ ID NO:1의 위치 203에 상응하는 아미노산 잔기에 트립토판;

을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 결합 영역은 단일 연속 폴리펩티드를 형성하도록 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 카르복시 말단에 융합되는 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 결합 영역은 면역글로불린형 결합 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 면역글로불린형 결합 영역은 하기에 기재된 것으로부터 선택된 폴리펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자:

단일-도메인 항체 단편, 단쇄 가변 단편, 항체 가변 단편, 상보성 결정 영역 3 단편, 제한된 FR3-CDR3-FR4 폴리펩티드, Fd 단편, 항원-결합 단편, 피브로넥틴-유래 제10 피브로넥틴 유형 III 도메인, 테나신 유형 III 도메인, 안키린 반복 모티프 도메인, 저밀도-지질단백질-수용체 유래 A 도메인, 리포칼린, 쿠니츠 도메인, 단백질-A-유래 Z 도메인, 감마-B 결정체-유래 도메인, 유비퀴틴-유래 도메인, Sac7d-유래 폴리펩티드, Fyn-유래 SH2 도메인, 미니단백질, C형 핵틴-유사 도메인 스캐폴드, 카멜리드로부터 유도된 중쇄 항원 도메인(V_HH fragment), 연골 어류로부터 유도된 중쇄 항원 도메인, 면역글로블린 신규 항원 수용체(IgNAR), V_{NAR} 단편, 다합체화 단사슬

항체(scFv) 단편, 2가 나노바디(nanobody), 이중특이성 탠덤 단사슬항체(scFv), 또는 이중특이성 미니바디(minibody).

청구항 5

제1항에 있어서, 링커 펩티드(GxS)_n(x는 1 내지 6, n은 1 내지 30)을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 x는 4이고 n은 1인 것을 특징으로 하는 세포-표적화 분자.

청구항 7

제1항의 세포-표적화 분자 및 약학적으로 허용되는 부형제 또는 운반체를 포함하는 것을 특징으로 하는 환자의 암 또는 종양의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물.

청구항 8

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항의 세포-표적화 분자 및 약학적으로 허용되는 부형제 또는 운반체를 포함하는 것을 특징으로 하는 환자의 암 또는 종양의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물.

청구항 9

제1항의 세포-표적화 분자를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보체.

청구항 10

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항의 세포-표적화 분자를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보체.

청구항 11

제9항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 12

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 13

제9항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 14

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 15

제11항의 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 16

제12항의 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자연적으로 발생하는 시가 독소(shiga toxin)의 A 서브유닛(subunit)으로부터 유도된 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩티드는 관련되는 면역반응을 감소시킬 필요가 있는 경우에 포유류에 투여하는데 독립적으로 또는 치료제와 같은 물질의 성분으로서 이롭다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는, 특정 세포를 표적 사멸(targeted killing)하기 위하여, 항체독소 및 리간드-독소 결합체와 같은 특정 표적 물질의 성분으로 사용될 수 있다. 본 발명의 단백질은 암, 종양, 면역질환, 및 세균감염을 포함하는 다양한 형태의 질병, 및 이상 증상의 진단, 예측 및 치료용으로서의 치료제 및 진단제와 같은 용도를 갖는다.

배경 기술

[0002] 시가 독소는 독소 구조, 특성, 및 생물학적 활성을 합리적으로 변화시킴으로써 의학적 적용을 위하여 종합적으로 연구되었다(US7713915, EP1051482, EP1727827, EP1945660; 특허출원: US2009/0156417 A1, EP2228383 B1, EP2402367 A1, US2013/0196928 A1, WO 2014/164680, WO 2014/164693, US61/951,110; US61/951,121 참조, 이들 특허는 본 특허출원에서 참고자료로 인용된다). 시가 독소 A 서브유닛은 다른 단백질 영역에 결합되거나 융해되더라도 안정적이고, 효소에 활성적이며, 세포독성이 있다(Haddad J et al, J Bacteriol 175:4970-8 (1993); Al-Jauby A et al, Infect Immun 62: 956-60 (1994); Al-Jauby A et al, Infect Immun 63: 3073-8 (1995); LaPointe P et al., J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); DiR et al, Toxicon 57: 535-39 (2011) 참조). 이들 시가 독소 A 서브유닛-유도된 폴리펩티드는 세포-표적 치료 물질을 생성하기 위하여 화학적 접합(chemical conjugation)이나 재조합형 단백질 제조(recombinant protein engineering)를 통하여 면역글로불린 영역 또는 수용체 리간드에 결합되거나 융해된다. 이러한 기술의 목표중의 하나는 1) 독소를 특정 세포에 전달하여 개체 투여 후에 유기체 내에 유지시키고, 2) 진핵세포 내에서 효과적인 강력한 세포독성 메커니즘을 이용하여 특정세포에 표적화된 세포독성을 유발하는 이중(dual) 기능을 갖는 키메라 분자(chimeric molecules)를 설계하기 위한 것이다.

[0003] 비인적 자원(non-human sources)으로부터 종합적으로 조작된 단백질에 관여하는 치료제 적용의 주된 제한 중 하나는 면역을 생기게 하는 면역원성(immunogenicity)이다. 항원성 및/또는 면역원성은 물질이 생체내에서 투여될 때 항체 및/또는 면역반응을 유발하기 위하여 물질(분자)의 항원결정기 성능에 기인한다. 대부분의 치료 단백질은 어느 정도의 면역반응을 유발하는 것으로 생각되는데, 그것은 IgM과 같은 낮은 레벨의, 낮은 친화도 및 일시적인 항체의 생성에서부터 높은 레벨의, 높은 친화도를 가진 IgG 항체까지 망라한다(Schellekens H, Clin Ther 24: 1720-30 (2002); Schellekens H, Nat Rev Drug Discov 1: 457-62 (2002) 참조). 치료제 생성물의 원하지 않는 면역원성은 효능감소, 약리역학 변화, 일반면역 및 과민반응, 과민증, 및 과민증 반응과 같은 바람직하지 못한 결과를 초래할 수 있다(Buttel I et al, Biologicals 39: 100-9 (2011) 참조). 예를 들어, 환자에게서 중화항체 또는 항의약(anti-drug)항체가 생성되면, 치료제의 반복되는 투약 또는 만성적인 투여에 대한 장기간 효과를 제한할 수 있다.

[0004] 원하지 않는 면역반응은 치료제에 대한 심각한 안전성 및/또는 효능 문제를 제기하기 때문에, 치료용 단백질을 개발하는 경우 항원성 및/또는 면역원성을 종종 제한할 필요가 있다. 그러나, 불행히도, 많은 연구와 임상 실험에도 불구하고 현재까지 환자에게 투여하기 전에 신규 치료용 단백질이 어느 정도 면역성이 있게 될 것인지를 예측하는 것은 불가능하다(Descotes J, Gouraud A, Expert Opin Drug Metab Toxicol 4: 1537-49 (2008) 참조). 이는 척추동물의 적응할 수 있는 면역체계에 의한 항체 메커니즘의 이질성과 그에 대한 이해부족에 기인한다.

예를 들어, 항원-항체 복합체 분석은, 높은 용매접근성 표면적을 갖는 노출된 친수성 벌키 아미노산의 높은 유사성을 제외하고는, 일반 항원결정기(epitope)의 어떤 결정적인 구조적 특성도 밝혀내지 못하였다.

[0005] 이러한 어려움에도 불구하고, 여러 가지 전략들이 단백질의 잠재 면역성을 감소하기 위하여 현재 이용되고 있다(Onda M et al, Proc Natl Acad Sci USA 105: 1 131 1-6 (2008); Vallera D et al, Mol Cancer Ther 9: 1872-83 (2010) 참조). 단백질의 잠재 면역성은 적용가능한 면역체계에 의하여 인식되도록 항원결정기(epitope)를 제거하거나 방해함으로써 감소될 수 있다. 항원결정기 방해 또는 제거는 절단, 삭제, 아미노산치환, 또는 인간화(humanization)와 같은 돌연변이 과정에 의해 달성될 수 있다(Nagata S, Pastan I, Adv Drug Deliv Rev 61 : 977-85 (2009); Baker M et al., Self Nonself 1 : 314-22 (2010) 참조).

[0006] 치료용 물질의 탈면역을 위하여, 친화력 성숙에 의한 높은 친화력 항체를 생성하도록 우선적으로 B-림프사이트(B-세포) 항원 항원결정기를 식별하거나 교란시킨다. 항원 활성화 후에, B-세포는 플라즈마세포 또는 메모리세포 속으로 분화한다. 활성화된 B-세포는 낮은 친화력의 IgM 및 IgD를 발현하여 단일의 Ig이소타입(isotype), IgG, IgE, IgA, 또는 IgD를 발현시키는 클래스-스위칭(class-switching) 변화를 행하고, 이는 별개의 항원 항원결정기를 인식한다(Klein U et al, Nat Rev Immunol 8: 22-33 (2008) 참조). 단일의 Ig이소타입을 발현하는 활성화된 B-세포는 특정의 항원 항원결정기에 높은 친화력을 갖는 항체를 생성하는 B-세포를 선택한다. 그래서, 치료제에서 항원결정기의 교란은, 치료 주체에 투여될 때, 그 항원결정기를 표적하는 장기간 살아있는 메모리 B-세포들의 형성뿐만 아니라, 그 항원결정기를 특정적으로 결합하는 높은 친화력 항체의 생성을 방지한다.

[0007] 최근까지도 단백질 내에서 정확하고 종합적인 B-세포 예측에 대한 표준기술이 없다(Klein U et al, Nat Rev Immunol 8: 22-33 (2008) 참조). B-세포 항원결정기는 돌연변이 생성 및 항체의 조합, 면역법, 면역글로불린 라이브러리의 파지 디스플레이(phage display)여과와 같은 다양한 실험방법에 의하여 식별될 수 있다. 추정되는 B-세포 항원결정기는 교란되는 주어진 폴리펩티드 서열 내에서 예측되는 선형 및 비연속 항원결정기에 대하여 스캔하는 연산법을 이용하여 예측될 수 있다(Larsen et al, Immunome Res 2: 2 (2006); El-Manzalawy et al, J Mol Recognit 21 : 243-55 (2008); Sollner J et al, Immunome Res 4: 1 (2008); Bryson C et al, BioDrugs 24: 1-8 (2010); Yao B et al., PLoS One 8: e62249 (2013) 참조). 이들 연산법에 의한 B-세포 항원결정기 예측은 정확하지 못하기 때문에 실험적으로 입증되어야 한다(Nagata, Adv Drug Deliv Rev 61 : 977-85 (2009) 참조). 항원결정기 교란은 종종 추정되는 B-세포 항원결정기 내의 하전된 및/또는 방향성 잔기를 알려진 잔기로 돌연변이 시킴으로써 시도되었다(Onda M et al, J Immunol 177: 8822-34 (2006); Lui W et al, Proc Natl Acad Sci USA 109: 11782-7 (2012); Yumura K et al, Protein Sci 22: 213-21 (2012) 참조). 나아가 모든 잠재적 항원결정기의 정확한 매핑(mapping) 및 교란은, 생화학치료 활성을 유지하면서, 더 큰 단백질을 향한 힘든 목표이다(Brauer F et al, Antimicrob Agents Chemother 57: 678-88 (2013) 참조).

[0008] 시가 독소는 치료 및 진단 적용을 위한 유용한 생성물에 관한 기술을 보증하지만, 그들의 잠재 면역원성은 의약적 적용에 있어서 사용상 방해가 될 수 있다. 시가 독소는 인간의 면역체계와는 매우 이질적인 박테리아 단백질이다. 하지만, 시가 독소의 A 서브유닛 내에서 항원 및/또는 면역원성 사이트(site)는 체계적으로 매핑(mapping)되지 않았다. 따라서, 특정세포에 대하여 세포독성의 표적전달에 관여하는 다양한 치료제의 성분으로서, 의약적 적용을 위한 충분한 시가 독소 작동체 성능을 보유하는 감소된 항원성 및/또는 면역원성을 갖는 개선된 시가 독소 A 서브유닛-유도 폴리펩티드를 개발하는 것은 바람직한 일일 것이다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 포유 동물 내에서 감소된 항원 및/또는 면역원성 잠재력을 갖는 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 면역원성 잠재력을 갖는 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 제공한다(이하 '탈면역(de-immunized)'라 한다). 또한 본 발명은 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 세포독성 단백질 및 치료용 단백질을 제공한다. 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 탈면역된 폴리펩티드는 세포 내재화(cellular internalization) 및 시가 독소 세포독성을 표적하는 특정 세포에 대하여 개선된 치료제 조합을 가능케 하도록 특정의 세포간 결합작용을 통하여 세포 표적을 중재하는 하나 이상의 폴리펩티드에 결합된다. 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드에 감지 증진제를 결합시키면 특정 세포의 존재를 감지하는 개선된 치료용 물질을 조합할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질은 표적 세포를 사멸하고, 특정 세포에 외인성 물질을 전달하고, 치료정보를 취득하며, 암, 면역질환, 및 미생물 감염을 포함하여 다양한 질병 및 이상질환을 치료하는 치료제로 사용된다.

[0010] 본 발명의 폴리펩티드는 최소한 하나의 시가 독소 작동체 성능이 유지되는 방식으로 돌연변이에 의하여 제거되거나 교란된 최소한 하나의 예측 B-세포 항원결정기를 갖는 최소한 한 멤버의 시가 독소군 A 서브유닛의 아미노

산 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함하는 시가 독소 작동체 영역을 포함한다.

[0011] 본 발명의 폴리펩티드의 몇몇 구체예는 최소한 하나의 시가 독소 작동체 성능이 유지되고, 이소성(ectopic) MHC 클래스 I-제한, T-세포 항원결정기가 어떤 B-세포 항원결정기 교란에 의해 도입되지 않는 방식으로 돌연변이에 의해 제거되거나 교란된 최소한 하나의 예측 B-세포 항원결정기를 갖는 최소한 한 멤버의 시가 독소 패밀리의 A 서브유닛의 아미노산 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함하는 시가 독소 작동체 영역을 포함한다. MHC 클래스 I-제한, T-세포 항원결정기는 숙련자라면 알거나 예측할 수 있다. 이소성이란 탈면역 되기 전의 폴리펩티드에 존재하지 않은 MHC 클래스 I-제한, T-세포 항원결정기, 즉 하나 혹은 복수의 B-세포 항원결정기가 제거 및/또는 교란되기 전의 폴리펩티드를 말한다.

[0012] 본 발명의 몇몇 구체예는 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열에 포함되는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함되는 폴리펩티드와, 시가 독소 작동체 영역이 포함되는 최소 한군데의 항원결정기 영역을 교란시키는 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 서열 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 또는 SEQ ID NO:3의 210-218로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산 잔기(amino acid residue)를 포함한다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 시가 독소 작동체의 기능을 가졌다.

[0013] 본 발명의 몇몇 구체예는 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열에 포함되는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함되는 폴리펩티드와, 시가 독소 작동체 영역이 포함되는 최소 한군데의 항원결정기 영역을 교란시키는 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 서열 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 또는 SEQ ID NO:3의 210-218로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산 잔기를 포함한다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 상당한 수준의 시가 독소 작동체의 기능을 가졌다.

[0014] 본 발명의 몇몇 구체예는 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열에 포함되는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함되는 폴리펩티드와, 시가 독소 작동체 영역이 포함되는 최소 한군데의 항원결정기 영역을 교란시키는 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 서열 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 또는 SEQ ID NO:3의 210-218로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산 잔기를 포함한다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 시가 독소 작동체의 기능을 가졌다. 여기서의 교란은 단 하나의 항원결정기 영역에서가 아니며 S96Y의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; Y114S의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; R179A의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; R179H의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; L185A의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; R188A의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; R205A의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; R179A/R188A의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; 및 A188V의 SEQ ID NO:3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산잔기 치환체로만 구성되어있지 않다.

[0015] 본 발명의 몇몇 구체예는 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열에 포함되는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함되는 폴리펩티드와, 시가 독소 작동체 영역이 포함되는 최소 한군데의 항원결정기 영역을 교란시키는 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 서열 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 또는 SEQ ID NO:3의 210-218로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산 잔기를 포함한다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 상당한 수준의 시가 독소 작동체의 기능을 가졌다. 여기서의 교란은 단 하나의 항원결정기 영역에서가 아니며 S96Y의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; Y114S의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; R179A의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; R179H의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; L185A의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; R188A의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; R205A의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; R179A/R188A의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2; 및 A188V의 SEQ ID NO:3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산잔기 치환체로만 구성되어있지 않다.

[0016] 본 발명의 몇몇 구체예는 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열에 포함되는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함되는 폴리펩티드와, 시가 독소 작동체 영역이 포함되는 최소 한군데의 항원결정기 영역을 교란시키는 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 서열 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14;

SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산 잔기를 포함한다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 시가 독소 작동체의 기능을 가졌다. 시가 독소 작동체 영역은 아미노 말단 절단(amino terminus truncation)과 교란된 항원결정기 영역과 겹쳐진 시가 독소 A 서브유닛에서 유도된 교란된 항원결정기 영역이 겹쳐져있지 않다.

[0017] 본 발명의 몇몇 구체예는 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열에 포함되는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함되는 폴리펩티드와, 시가 독소 작동체 영역이 포함되는 최소 한군데의 항원결정기 영역을 교란시키는 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 서열 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산 잔기를 포함한다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 상당한 수준의 시가 독소 작동체의 기능을 가졌다. 시가 독소 작동체 영역은 아미노 말단 절단(amino terminus truncation)과 교란된 항원결정기 영역과 겹쳐진 시가 독소 A 서브유닛에서 유도된 교란된 항원결정기 영역이 겹쳐져있지 않다.

[0018] 본 발명의 몇몇 구체예는 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열에 포함되는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함되는 폴리펩티드와, 시가 독소 작동체 영역이 포함되는 최소 한군데의 항원결정기 영역을 교란시키는 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 서열 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산 잔기를 포함한다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 시가 독소 작동체의 기능을 가졌다. 여기서의 교란은 단 하나의 항원결정기 영역의 것이 아니며 아미노산 잔기 치환체 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 R36W만으로 이루어져 있지 않다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 아미노 말단 절단(amino terminus truncation)과 교란된 항원결정기 영역과 겹쳐진 시가 독소 A 서브유닛에서 유도된 교란된 항원결정기 영역이 겹쳐져 있지 않다.

[0019] 본 발명의 몇몇 구체예는 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열에 포함되는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함되는 폴리펩티드와, 시가 독소 작동체 영역이 포함되는 최소 한군데의 항원결정기 영역을 교란시키는 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 서열 SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산 잔기를 포함한다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 시가 독소 작동체의 기능을 가졌다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 카복시 말단 절단(carboxy terminus truncation)과 교란된 항원결정기 영역과 겹쳐진 시가 독소 A 서브유닛에서 유도된 교란된 항원결정기 영역이 겹쳐져 있지 않다.

[0020] 본 발명의 몇몇 구체예는 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열에 포함되는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함되는 폴리펩티드와, 시가 독소 작동체 영역이 포함되는 최소 한군데의 항원결정기 영역을 교란시키는 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 서열 SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산 잔기를 포함한다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 시가 독소 작동체의 기능을 가졌다. 여기서의 교란은 단 하나의 항원결정기 영역의 것이 아니며, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 R248H; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 A250V; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 R251H; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 A253G; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 S254T; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 C261A; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 R289K; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 R248H와 R251H; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 A253G와 S254T로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 치환체, 및 SEQ ID NO:1의 S247-M252; SEQ ID NO:3의 S246F; SEQ ID NO:3의 A282V; SEQ ID NO:3의 129 IV; SEQ ID NO:3의 S246F/I291V로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 제거만으로 이루어져 있지 않다. 여기서의 시가 독소 작동체 영역은 카복시 말단 절단(carboxy terminus truncation)과 교란된 항원결정기 영역과 겹쳐진 시가 독소 A 서브유닛에서 유도된 교란된 항원결정기 영역이 겹쳐져 있지 않다.

[0021] 본 발명의 더 나아간 몇몇 구체예는, 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 명시된 항원결정기 영역에서 최소 하나의 아미노산을 제거함으로써 항원결정기 교란을 시키는 것을 포함한다. 본 발명의 더 나아간 몇몇 구체예는, 본 발명의 폴리펩티드는 명시된 항원결정기 영역에서 최소 하나의 아미노산을 더함으로써 항원결정기 교란을 시키는 것을 포함한다. 본 발명의 더 나아간 몇몇 구체예는, 본 발명의 폴리펩티드가 아미노

산을 도치하거나 재배열하여 여기서 명시된 항원결정기 영역의 최소 하나의 아미노산을 도취함으로서 항원결정기 교란을 시키는 것을 포함한다. 본 발명의 더 나아가 몇몇 구체예는, 본 발명의 폴리펩티드가 비표준의 아미노산을 치환하는 표준 아미노산, 또는 화학적으로 변형된 결사슬(side chain)이 있는 아미노산과 같은 아미노산 잔기 돌연변이로 항원결정기 교란을 시키는 것을 포함한다.

[0022] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역이 여기서 명시된 항원결정기 영역 안에서 아미노산 잔기 대체로 항원결정기 교란을 시키는 것을 포함한다. 더 나아가 구체예에서는, 폴리펩티드가 A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, 및 K로 이루어지는 군으로부터 선택되는 최소 하나의 아미노산이 치환되는 것을 포함한다. 더 나아가 구체예에서는, 폴리펩티드는 D에서 A, D에서 G, D에서 V, D에서 L, D에서 I, D에서 F, D에서 S, D에서 Q, E에서 A, E에서 G, E에서 V, E에서 L, E에서 I, E에서 F, E에서 S, E에서 Q, E에서 N, E에서 D, E에서 M, E에서 R, G에서 A, H에서 A, H에서 G, H에서 V, H에서 L, H에서 I, H에서 F, H에서 M, K에서 A, K에서 G, K에서 V, K에서 L, K에서 I, K에서 M, K에서 H, L에서 A, L에서 G, N에서 A, N에서 G, N에서 V, N에서 L, N에서 I, N에서 F, P에서 A, P에서 G, P에서 F, R에서 A, R에서 G, R에서 V, R에서 L, R에서 I, R에서 F, R에서 M, R에서 Q, R에서 S, R에서 K, R에서 H, S에서 A, S에서 G, S에서 V, S에서 L, S에서 I, S에서 F, S에서 M, T에서 A, T에서 G, T에서 V, T에서 L, T에서 I, T에서 F, T에서 M, T에서 S, Y에서 A, Y에서 G, Y에서 V, Y에서 L, Y에서 I, Y에서 F, 및 Y에서 M으로 이루어진 군으로부터 선택된 치환을 포함한다.

[0023] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역이 항원결정기 영역 안에서 아미노산 잔기 치환으로 교란하는 것을 포함한다. 여기서의 치환은 선천적으로 배치된 아미노산 잔기와 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 187; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 286로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산으로 이루어진다. 본 발명의 더 나아가 몇몇 구체예에서는, 폴리펩티드는 항원결정기 영역 안에서 아미노산 잔기 치환으로 인한 항원결정기 교란을 포함한다. 여기서의 치환은 비보존성 아미노산에 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 187; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 286로 이루어진 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산으로 이루어진다.

NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO:2의 286로 이루어지는 군으로부터 선택되는 선천적으로 배치된 아미노산 잔기가 치환되는 것을 포함한다. 비보존성 아미노산 치환이란 한 아미노산에서 하나 혹은 그 이상의 뚜렷하게 다른 생화학적인 성질을 가진 다른 아미노산으로 치환되는 것을 말한다(예: 대전에서 비대전, 극(polar)에서 소수성(hydrophobic), 그리고 벌키(bulky)에서 작은 크기). 본 발명의 더 나아가 몇몇 구체예에서는, 폴리펩티드는 항원결정기 영역 안에서 아미노산 잔기 치환으로 인한 항원결정기 교란을 포함한다. 여기서의 치환은 선천적으로 배치된 아미노산 잔기에서 일어나며 K1에서 A, G, V, L, I, F, M 및 H; T4에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; S8에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T9에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; S9에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; K11에서 A, G, V, L, I, F, M 및 H; S33에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; S45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; T45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; D47에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; N48 에서 A, G, V, L, 및 M; L49 에서 A 또는 G; D53에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; R55에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; D58에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; P59에서 A, G, 및 F; E60에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; E61에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; G62에서 A; D94에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; S96에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; S109 에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T109에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; G110에서 A; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G147에서 A; R179에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; T180에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; T181에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D183 에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; D184에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; S186에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; G187에서 A; R188에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S189에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; R204에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R205에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K 및 H; S247에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; Y247에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; R248에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R250에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R251에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; D264에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G264에서 A; 및 T286 에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산으로 치환된다.

[0024] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 폴리펩티드는 아미노산 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 75 내지 251에서 유도된 탈면역된 시가 독소 작동제 영역을 포함한다. 본 발명의 또 다른 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 폴리펩티드는 아미노산 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 1 내지 251, 및/또는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 1 내지 261에서 유도된 탈면역된 시가 독소 작동제 영역을 포함한다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 폴리펩티드는 아미노산 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 1 내지 241에서 유도된 탈면역된 시가 독소 작동제 영역을 포함한다.

[0025] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 폴리펩티드는 SEQ ID NO 4 내지 52 중의 하나로 구성, 혹은 하나를 포함하는 탈면역된 시가 독소 작동제 영역을 포함한다.

[0026] 본 발명의 몇몇 구체예의 단백질은 세포독성과 같이 시가 독소 작동제의 기능 하나, 혹은 다수의 기능을 가진 탈면역된 시가 독소 A 서브유닛에서 유도된 영역과 연계된 세포 표적을 위한 결합 영역을 포함한다. 본 발명의 단백질은 탈면역된 시가 독소 작동제 영역에 포함된 본 발명의 폴리펩티드와, 결합 영역을 구성하는 최소 하나의 특정 세포의 생체분자 표적과 결합이 가능한 하나 혹은 다수의 폴리펩티드를 포함한다.

[0027] 본 발명의 단백질의 몇몇 구체예에서는, 결합 영역이 상보성 결정 영역 3(CDR3) 단편 제한 FR3-CDR3-FR4(FR3-CDR3-FR4) 폴리펩티드, 단일-도메인 항원 단편(sdAb), 나노바디(nanobody), 카멜리드로부터 유도된 중쇄 항원 도메인(V_HH fragment), 연결 어류로부터 유도된 중쇄 항원 도메인, 면역 글로불린 새로운 항원 항체(IgNARs), V_{NAR} 단편, 단쇄 가변영역(scFv), 항체 가변영역(Fv), 항원 결합 부위(Fab), Fd 단편, 작은 조절 면역 약물(SMIP) 도메인, 파이프브로넥틴유래 10번째 파이프브로넥틴 타입 III (fibronectin-derived 10th fibronectin type III) 도메인 (10Fn3) (예: 모노바디(monobody)), 테나신 타입 III(tenascin type III) 도메인 (예: TNfn3), 안키린 리피트 모티프(ankyrin repeat motif) 도메인 (ARD), 저밀도 지질단백질 수용체로부터 유도된 A 도메인 (low-density-lipoprotein-receptor 또는-derived A-domain) (A domain of LDLR 또는 LDLR-A), 리포칼린 (안티칼린(anticalin)), 쿠니츠(Kunitz) 도메인, 단백질 A에서 유도된 Z 도메인, 감마 B 결정체로부터 유도된 도메인 (Affilin), 유비퀴틴으로부터 유도된 도메인, Sac7d로부터 유도된 폴리펩티드, Fyn으로부터 유도된 SH2 도메인 (아피틴(affitin)), 소형단백질(miniprotein), C-타입 렉틴 유사 도메인 매개체(C-type lectin-like domain scaffold), 가공된 항체 모방체(engineered antibody mimic), 및 결합 기능을 보유한 상기 기술한 것들의 유전

자 조작 대응물로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 포함한다.

- [0028] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 세포독성 단백질의 결합 영역의 세포의 표적 생체분자와 결합된 세포에 본 발명의 탈면역된 세포독성 단백질을 투여할 때, 세포독성 단백질이 세포 사멸 기능을 갖는다.
- [0029] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 세포의 표적 생체분자가 존재하는 두 가지 세포 종류에 본 발명의 탈면역된 세포독성 단백질을 투여했을 때, 세포독성 단백질이 세포의 표적 생체분자와 세포독성 단백질의 결합 영역에 물리적 연결이 되어있지 않은 세포 종류에 비하여 세포의 표적 생체분자와 세포독성 단백질의 결합 영역에 물리적 연결된 세포종류는 최소 세 배의 CD₅₀으로 세포를 사멸시켰다.
- [0030] 본 발명의 단백질의 몇몇 구체예에서는 결합 영역은 CD20, CD22, CD40, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAM, EphB2, 전립선 특이적 막항원(prostate-specific membrane antigen), 크립토(Cripto), CDCP 1, 엔도글린, 섬유아세포 활성화 단백질, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/ SLAMF7, CD33, CD52, EpCAM, CEA, gpA33, 뮤신, TAG-72, 탄산탈수효소 IX, 엽산 구축 단백질, 강글리오사이드 GD2, 강글리오사이드 GD3, 강글리오사이드 GM2, 강글리오사이드 Lewis-Y2, VEGFR, Alpha Vbeta3, Alpha5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, FAP, 테나신, CD64, 메소텔린, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, 베타-카테닌, MUM-1, 카스파제-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, 암태아성 항원, 전립선 특이 항원, 전립선 줄기 세포 항원, 휴먼 아스파르틸 베타-수산화효소(human aspartyl(asparaginyl) beta-hydroxylase), EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, MART-1/MelanA, gp100, 티로시나아제 관련 항원, HPV-E7, 엡스타인바 바이러스 항원, Bcr-Ab1, 알파태아단백질 항원, 17-A1, 방광 종양 항원, CD38, CD15, CD23, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FcεRIa, 갈렉틴-9, mrp-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, FcεRIa, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, 갈렉틴-3, CD11a-c, GITRL, MHC 클래스 II, CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282-TLR2, CD11c, 및 상기 기술한 것들의 면역원성 단편(immunogenic fragment)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 세포의 표적 생체분자와의 결합 능력에 따라 설계 또는 선택된다.
- [0031] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 단백질은 KDEL군의 하나의 개체의 카복시말단(carboxy-terminal) 소포체 잔류신호 모티프를 포함한다. 본 발명의 또다른 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 단백질은 KDEL(SEQ ID NO:60), HDEF(SEQ ID NO:61), HDEL(SEQ ID NO:62), RDEF(SEQ ID NO:63), RDEL(SEQ ID NO:64), WDEL(SEQ ID NO:65), YDEL(SEQ ID NO:66), HEEF(SEQ ID NO:67), HEEL(SEQ ID NO:68), KEEL(SEQ ID NO:69), REEL(SEQ ID NO:70), KAEL(SEQ ID NO:71), KCEL(SEQ ID NO:72), KFEL(SEQ ID NO:73), KGEL(SEQ ID NO:74), KHEL(SEQ ID NO:75), KLEL(SEQ ID NO:76), KNEL(SEQ ID NO:77), KQEL(SEQ ID NO:78), KREL(SEQ ID NO:79), KSEL(SEQ ID NO:80), KVEL(SEQ ID NO:81), KWEL(SEQ ID NO:82), KYEL(SEQ ID NO:83), KEDL(SEQ ID NO:84), KIEL(SEQ ID NO:85), DKEL(SEQ ID NO:86), FDEL(SEQ ID NO:87), KDEF(SEQ ID NO:88), KKEL(SEQ ID NO:89), HADL(SEQ ID NO:90), HAEL(SEQ ID NO:91), HIEL(SEQ ID NO:92), HNEL(SEQ ID NO:93), HTEL(SEQ ID NO:94), KTEL(SEQ ID NO:95), HVEL(SEQ ID NO:96), NDEL(SEQ ID NO:97), QDEL(SEQ ID NO:98), REDL(SEQ ID NO:99), RNEL(SEQ ID NO:100), RTDL(SEQ ID NO:101), RTELEL(SEQ ID NO:102), SDEL(SEQ ID NO:103), TDEL(SEQ ID NO:104), 및 SKEL(SEQ ID NO:105)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 카복시말단 소포체 잔류신호 모티프를 포함한다.
- [0032] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 단백질은 결합영역과 명시된 결합 영역이 시가 독소 작동체 영역의 아미노 말단의 옆에 위치하지 않게 단백질 내에 물리적으로 배열된 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 포함한다.
- [0033] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 단백질은 아미노산 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 75 내지 251로부터 유도된 시가 독소 작동체 영역이 포함되어있다. 본 발명의 또 다른 몇몇 구체예는 아미노산 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 1 내지 251; 및/또는 아미노산 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 1 내지 261로부터 유도된 시가 독소 작동체 영역의 단백질을 포함한다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 단백질은 아미노산 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 1 내지 241로부터 유도된 시가 독소 작동체 영역을 포함한다.
- [0034] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 단백질은 SEQ ID NO:4 내지 52의 하나로 구성된, 혹은 포함된 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 포함한다.
- [0035] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 단백질은 SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, 또는 SEQ ID NO:59로 구성되거나, 또는 포함하고 있다.

- [0036] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 단백질은 시가 독소 작동체 영역의 효소 활동을 바꾸는 시가 독소군에서 자연적으로 발생하는 A 서브유닛에 나타나는 돌연변이를 포함한 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 포함한다. 여기서의 돌연변이는 최소 하나의 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 A231E, R75A, Y77S, Y114S, E167D, R170A, R176K 및/또는 W203A와 같은 아미노산 잔기 제거 또는 치환에 의하여 발생한다. 본 발명의 또 다른 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 단백질은 촉매 활성을 감소 또는 제거 하지만 최소 하나의 시가 독소 작동체 기능은 유지하는 돌연변이를 포함한다.
- [0037] 본 발명은 폴리펩티드 및/또는 본 발명의 단백질, 및 제약학적으로 허용되는 최소한 하나의 첨가제 또는 매개체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 뒤에서 서술할 본 발명의 방법에서 상기 단백질 또는 조성물의 새로운 용도를 제공한다.
- [0038] 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 및 조성물 외에도 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 포함한 본 발명의 단백질을 포함한 폴리펩티드 부호화가 가능한 폴리뉴클레오티드와 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 포함된 발현백터, 그리고 본 발명의 발현백터에 포함된 숙주 세포 또한 본 발명의 범위 이내에 포함된다. 발현백터에 포함된 숙주 세포는 재조합 발현으로 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 단백질, 또는 폴리펩티드 부분 또는 단편을 생산하는 데에 사용될 수 있다.
- [0039] 더불어, 본 발명은 세포와 본 발명의 단백질 또는 본 발명의 단백질을 포함한 제약 조성물을 접촉시키는 단계를 포함한 특정 세포 사멸 방법을 포함한다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는 세포와 접촉하는 단계가 시험관 내에서 진행된다. 본 발명의 다른 몇몇 구체예에서는 세포와 접촉하는 단계가 생체 내에서 진행된다.
- [0040] 본 발명은 질병, 장애, 및/또는 치료가 필요한 환자의 질환들의 치료방법은 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드, 그를 구성하는 폴리펩티드 및/또는 단백질, 또는 앞서 명시된 제약 조성물과 같은 조성물을 포함한 조성물을 치료가 필요한 환자에게 치료목적으로 효과적인 양을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 방법으로 치료할 질병, 장애, 또는 질환은 암, 종양, 면역질환, 또는 세균감염 중에서 선택된다. 본 발명의 방법의 몇몇 구체예에서는, 치료할 암은 골암(골육종), 유방암, 중추/말초 신경계의 암(central/peripheral nervous system cancer), 소화기암, 생식세포 암, 선(腺) 암(glandular cancer), 두경부암, 혈액암, 간-요로 암(kidney-urinary tract cancer), 간암, 폐/흉막 암, 전립선암, 육종, 피부암, 및 자궁암으로 이루어지는 군으로부터 선택한다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 방법으로 치료할 면역질환은 아밀로이드증, 강직성척추염, 천식, 크론병, 당뇨병, 이식 거부반응, 이식편대숙주병, 하시모토 갑상선염, 용혈성 요독 증후군, HIV 관련 질병들, 홍반성 루푸스(lupus erythematosus), 다발성 경화증, 다발동맥염, 건선, 건선성 관절염, 류마티스 관절염, 피부경화증, 폐혈증, 쇼그렌 증후군, 궤양성 대장염, 및 혈관염으로 이루어지는 군과 관련된 질환을 선택한다.
- [0041] 본 발명의 몇몇 구체예는 암, 종양, 면역질환, 또는 세균감염 치료를 위한 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드, 그를 구성하는 폴리펩티드 및/또는 단백질, 또는 앞서 명시된 것들을 포함한 조성물을 포함한다. 본 발명의 몇몇 구체예는 암, 종양, 면역질환, 또는 세균감염의 치료 또는 예방을 위한 치료제 제조를 위한 본 발명의 화합물 및/또는 본 발명의 조성물의 용도를 포함한다.
- [0042] 본 발명의 단백질의 몇몇 구체예는 본 발명의 단백질의 세포외 표적 생체분자와 물리적으로 연결된 세포 안으로 하나 혹은 다수의 외인성 물질을 전달하는데에 쓰일 수 있다. 더불어, 본 발명은 생체내, 시험관내 어느 쪽에서든 세포(들)와 단백질, 제약 조성물, 및/또는 본 발명의 진단용 조성물을 접촉시키는 것을 포함한, 세포 안으로 하나 혹은 다수의 외인성 물질을 전달하는 방법을 제시한다. 본 발명은 표적 세포(들)가 본 발명의 단백질의 세포 표적 생체분자와 물리적으로 연결된 본 발명의 단백질을 환자에게 투여하는 것을 포함한 치료가 필요한 환자의 세포(들) 안으로 외인성 물질을 전달하는 방법도 제시한다.
- [0043] 본 발명의 몇몇 구체예는 본 발명의 폴리펩티드나 단백질과 같은 화합물 및/또는 본 발명의 제약 조성물 또는 진단용 조성물과 같은 조성물을 진단, 예후 예상, 또는 질병, 장애, 또는 질환의 특성 분석을 위해 사용하는 것을 포함한다.
- [0044] 본 발명의 몇몇 구체예는 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 이를 구성하는 폴리펩티드 및/또는 단백질, 또는 앞서 명시된 것들을 포함한 조성물, 그리고 세포 종류, (세포)조직, 장기, 질병, 장애, 질환, 또는 환자나 같은 정보수집을 위한 검출 촉진제(detection promoting agent)를 포함한 진단용 조성물이다.
- [0045] 본 발명의 몇몇 구체예의 본 발명의 단백질 및/또는 진단용 조성물을 사용한 세포 탐지 방법은 명시된 단백질

및/또는 진단용 조성물과 세포와 접촉, 그리고 명시된 단백질 및/또는 진단용 조성물을 탐지하는 단계를 포함한다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는 세포와의 접촉이 시험관 내에서 이루어진다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는 세포와의 접촉이 생체내에서 이루어진다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는 세포 탐지가 시험관 내에서 진행된다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는 세포 탐지가 생체내에서 진행된다.

[0046] 예를 들자면, 생체내의 세포 탐지를 위해 본 발명의 진단용 조성물을 포유동물 실험대상에 검출 촉진제를 포함한 본 발명의 단백질 포함한 조성물을 투여하고 시험관 내에서는 생체 내에서는 본 발명의 단백질을 탐지한다. 수집된 정보는 본 발명의 단백질의 결합 영역의 세포의 표적과 물리적으로 연결된 세포 존재 여부에 관련된 것일 수 있으며 진단, 예후 예측, 특성 분석, 및/또는 질병, 장애, 혹은 질환의 치료에 도움이 될 수 있다. 폴리펩티드와 단백질과 같은 본 발명의 특정 화합물, 제약용 조성물과 진단용 조성물과 같은 본 발명의 조성물, 그리고 발명 방법은 환자가 본 발명의 화합물에 반응을 보이는 측에 속하는지 알아내는 데에 사용할 수 있다.

[0047] 본 발명의 폴리펩티드의 몇몇 구체예는 포유동물의 면역조치(immunization) 및/또는 예방 접종을 위한 면역원 또는 면역원의 일부로 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명의 몇몇 구체예는 본 발명의 물질의 구성, 그리고 선택적으로, 사용설명서, 여분의 시약(들), 및/또는 약물전달 장치(들)를 포함한 키트(kit)이다.

[0049] 본 발명의 이와 같은 특성과 다른 특성들, 측면과 장점은 이어지는 설명, 청구항, 그리고 첨부된 도면들이 본 발명의 이해를 도울 것이다. 본 발명의 앞서 명시된 요소들은 이하에 결합 또는 제거에 반대하는 성명 없이 그 외의 발명의 구체예를 만들기 위하여 개별적으로 결합하거나 자유롭게 제거할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 일반적으로 배치된 모범적인 탈면역된 폴리펩티드와 세포독성 단백질을 도시한다.

도 2는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역의 D58A 치환이 변성하는 상태에서 pAb2가 인식한 항원결정기를 효과적으로 교란시키고 시가 독소 작동체 영역을 구성하는 폴리펩티드의 항원성을 감소시킨 모습을 도시한다.

도 3은 탈면역된 시가 독소 작동체 영역의 복수의 항원결정기 영역 교란 변이(variant)에 D58A 치환이 변성하는 상태에서 pAb2가 인식한 항원결정기를 효과적으로 교란시키고 시가 독소 작동체 영역을 구성하는 폴리펩티드의 항원성을 감소시킨 모습을 도시한다.

도 4는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역의 복수 항원결정기 영역 교란 변이(multiple-epitope-region-disruption)가 변성하는 상태에서 pAb2와 mAb1이 인식한 항원결정기를 교란하는 모습을 도시한다. 이 복수 항원결정기 영역 교란 변이는 모체, 야생형 시가 독소 작동체 영역에 비해 항원성을 감소시켰다.

도 5는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역의 복수 결정기 영역 교란 변이(multiple-epitope-region-disruption)가 변성하는 상태에서 pAb2와 mAb1이 인식한 항원결정기를 효과적으로 교란하는 모습을 도시한다. 이 복수 항원결정기 영역 교란 변이는 모체, 야생형 시가 독소 작동체 영역에 비해 항원성을 감소시켰다.

도 6은 복수 항원결정기 영역 교란을 포함한 탈면역된 시가 독소 작동체 영역이 선천적인 단백질 접힘 상태에서 mAb1이 인식한 항원결정기를 굉장히 효과적으로 교란 시킨 결과를 도시한다. 이 복수 항원결정기 영역 교란 변이는 모체, 야생형 시가 독소 작동체 영역에 비해 항원성을 감소시켰다.

도 7은 복수 항원결정기 영역 교란을 포함한 탈면역된 시가 독소 작동체 영역이 생체내에서 포유 동물 면역 체계의 항체 반응을 감소시킨 결과를 도시한다. 이 복수 항원결정기 영역 교란 변이는 모체, 야생형 시가 독소 작동체 영역에 비해 항원성을 감소시켰다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 본 발명은 예시로서 제시되지만 본 발명을 제한하지 않는 구체예들 그리고 첨부된 도면들을 참고로 아래에서 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 많은 형태로 나타날 수 있으며, 아래에서 제시한 구체예들에 제한된 것으로 해석되어서는 안 된다. 오히려, 이 구체예들은 본 발명의 설명에 빈틈없고 숙련자들에게 발명의 범위를 전달하기 위해 제시되었다.

[0053] 본 발명의 이해를 돕기 위해 몇몇 용어들을 아래에 정의하였다. 그 외의 정의는 본 발명의 구체적인 설명에서 찾을 수 있다.

[0054] 명세서와 청구항에 A와 B, 두 종(species)에 관해 쓰인 "및/또는"은 최소 A와 B중의 하나를 뜻한다. 명세서와 청구항에 A, B, 및 C와 같이 두 종 이상에 관해 쓰인 "및/또는"은 최소 A, B, 또는 C, 또는 A, B, 또는 C의 어느 조합이든(각각의 종이 단수 또는 복수의 가능성을 가짐) 그중 최소 하나를 뜻한다.

[0055] 이 명세서 내의 "포함"은 명시된 요소 또는 요소들을 포함하지만, 그 외의 요소 또는 요소들을 배제하는 것은 아니다.

[0056] 이 명세서 내의 "포함"은 "포함하지만 이에 제한되지 않는"의 의미로 사용된다. "포함"과 "포함하지만 이에 제한되지 않는"은 같은 의미로 사용된다. "아미노산 잔기" 또는 "아미노산"은 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드에 속한 아미노산이란 정의를 포함한다. "폴리펩티드"는 아미노산 또는 아미노산 잔기의 모든 중합체를 포함한다. "폴리펩티드 서열"은 폴리펩티드를 물리적으로 구성하는 아미노산 계열 또는 아미노산 잔기 계열(series)을 뜻한다. "단백질"은 하나 또는 다수의 폴리펩티드 사슬을 포함한 고분자이다. "펩티드"는 총 15-20의 아미노산 잔기보다 작은 소형 폴리펩티드이다. "아미노산 서열"은 길이에 따라 펩티드 또는 폴리펩티드를 물리적으로 구성하는 아미노산 계열 또는 아미노산 잔기 계열을 뜻한다. 별도의 명시가 없는 경우, 이 명세서에 제시된 폴리펩티드 및 단백질 서열은 왼쪽에서 오른쪽방향으로 아미노 말단에서 카복시 말단까지의 순서를 나타내도록 표기되었다.

[0057] "아미노산", "아미노산 잔기", "아미노산 서열", 또는 "폴리펩티드 서열"은 자연적으로 발생하는 아미노산 그리고, 달리 제한이 없을시, 셀레노시스테인, 피롤라이신, N-포르밀메티오닌, 감마-카복시글루탐산, 하이드록시프롤린 하이푸신(hydroxyprolinehypusine), 피로클루탐산, 및 셀레노메티오닌과 같은 자연적으로 발생하는 아미노산과 유사한 기능을 가진 천연 아미노산의 유사체도 포함한다. 이 명세서에 제시된 아미노산은 표 A에 알파벳 약칭과 함께 명시되어있다.

[0058] 표 A.

이름	3글자	1글자
알라닌	Ala	A
아르지닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르트산 또는 아스파르트산염	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루탐산 또는 글루탐산염	Glu	E
글루타민	Gln	Q
글라이신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소류신	Ile	I
류신	Leu	L
라이신	Lys	K
메티오닌	Met	M
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
트립토판	Trp	W
타이로신	Tyr	Y
발린	Val	V

[0059] *

[0060] 아미노산 표기

[0062] 폴리펩티드에 관련한 "보존성 치환"은 폴리펩티드의 아미노산의 구성요소의 변화가 폴리펩티드의 전체적인 기능과 구조를 크게 바꾸지 않는 것을 뜻한다 (Creighton, Proteins: Structures 및 Molecular Properties (W. H.

Freeman 및 Company, New York (2nd ed., 1992) 참조).

- [0063] 이 명세서에서 "발현"은 폴리뉴클레오티드 또는 핵산이 폴리펩티드 또는 단백질로 변형하는 것을 뜻한다. 발현한 폴리펩티드 또는 단백질은 세포내에 남아 세포 표면막(cell surface membrane)의 일부가 되거나 세포외로 배출된다.
- [0064] 이 명세서에 쓰인 "α" 기호는 기호 다음에 명시된 생체분자와 결합 가능한 면역글로불린형(immunoglobulin-type) 결합 영역의 약칭이다. "α" 기호는 기호 다음에 명시된 생체분자와 결합하는 능력에 근거하여 면역글로불린형 결합 영역의 기능적인 특징을 나타낸다.
- [0065] ":" 기호는 기호 앞뒤에 명시된 폴리펩티드 영역이 길게 이어진 폴리펩티드를 형성하기 위해 물리적으로 연결되어있다는 뜻이다.
- [0066] 이 명세서에서 "/" 기호가 두 아미노산 잔기 치환체 사이에 있으면 "/" 양옆의 아미노산 잔기 치환체들이 같은 분자안에 포함되어있다는 뜻이다.
- [0067] 본 발명을 위하여, "유도된"은 폴리펩티드 영역이 원래는 단백질에 있는 아미노산 서열 포함하며, 원래의 서열의 추가, 제거, 절단, 또는 다른 변경까지 포함하여 종합적인 기능과 구조가 대체로 보존하는 것을 뜻한다.
- [0068] 본 발명을 위하여, "작동체"는 세포독성, 생체신호, 효소촉매(enzymatic catalyst), 세포소기관 경로화(subcellular routing), 그리고/또는 분자간 결합과 같은 생물학적 활동을 제공하여 결과적으로 인자(들) 및/또는 알로스테리 효과(들)를 구성하는 것을 뜻한다.
- [0069] 본 발명을 위하여, 시가 독소 작동체의 생물학적 활동 기능은 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 폴리펩티드 영역에 의하여 주어진 것이다. 시가 독소 작동체 기능의 비제한적인 예로는 세포 내재화, 세포소기관 경로화, 촉매 활동, 그리고 세포독성이 있다. 시가 독소 촉매 활동의 비제한적인 예로는 리보솜 비활성화, 단백질 합성 저해, N-글리코시다아제 활동(N-glycosidase activity), 폴리뉴클레오티드:아데노신 글리코시다아제 활동(polynucleotide:adenosine glycosidase activity), 리보핵산 가수 분해(RNAase activity), 그리고 DNA 분해가 있다. 리보솜 비활성화 단백질(RIP)은 핵산, 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, rRNA, ssDNA, dsDNA, mRNA (및 다중 A(poly A)), 및 바이러스성 핵산의 퓨린을 제거(depurinate)할 수 있다(Barbieri L et al, Biochem J286: 1-4 (1992); Barbieri L et al, Nature 372: 624 (1994); Ling J et al, FEBS Lett 345: 143-6 (1994); Barbieri L et al, Biochem J 319: 507-13 (1996); Roncuzzi L, Gasperi-Campani A, FEBS Lett 392: 16-20 (1996); Stirpe F et al, FEBS Lett 382: 309-12 (1996); Barbieri L et al, Nucleic Acids Res 25: 518-22 (1997); Wang P, Turner N, Nucleic Acids Res 27: 1900-5 (1999); Barbieri L et al, Biochim Biophys Acta 1480: 258-66 (2000); Barbieri L et al, J Biochem 128: 883-9 (2000); Bagga S et al, J Biol Chem 278: 4813-20 (2003); Picard D et al., J Biol Chem 280: 20069-75 (2005) 참조). 어떤 리보솜 비활성화 단백질은 항바이러스 활동 및 초과산화물디스무타아제 활동을 보인다(Erice A et al, Antimicrob Agents Chemother 37: 835-8 (1993); Au T et al, FEBS Lett 481: 169-72 (2000); Parikh B, Turner N, Mini Rev Med Chem 4: 523-43 (2004); Sharma N et al, Plant Physiol 134: 171-81 (2004) 참조). 시가 독소 촉매활동은 시험관내, 생체내 모두에서 관찰되었다. 시가 독소 작동체 활동의 분석(assay)은 단백질 합성 저해, 퓨린제거, 세포 성장 억제, 세포독성, 초나선 DNA 이완(supercoiled DNA relaxation activity), 그리고/또는 핵산분해 (nuclease activity)와 같은 여러 활동을 측정할 수 있다.
- [0070] 세포독성 단백질의 세포독성 활동에 관련된 "특정 세포독성(selective cytotoxicity)"은 표적 세포군과 표적 외의 세포군의 상대적 수준의 세포독성을 말하며, 표적 외의 세포종의 반 최고치 세포독성 농도(half-maximal cytotoxic concentration(CD₅₀))를 표적 세포종의 CD₅₀으로 나눈 비율로 표시할 수 있고 이는 표적 세포종 사멸의 우선 정도를 나타낸다.
- [0071] 이 명세서에 명시된, 시가 독소 작동체 기능 유지란 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드 대조군과 비교 가능한 시가 독소 기능 활동성 수준을 말하며 재현 가능한 적절한 정량 분석으로 측정한다. 리보솜 비활성화에는, 유지된 시가 독소 작동체 기능이 10,000 pM 혹은 이하의 IC₅₀을 보인다. 표적 세포 사멸 분석의 세포독성에는, 유지된 시가 독소 작동체 기능이 세포 종류와 세포의 표적 생체분자를 상대로 발현하는 정도에 따라, 1,000 nM 혹은 이하의 CD₅₀을 보인다.
- [0072] 이 명세서에 명시된, "탈면역된"은 포유 동물에 투여 후 감소된 항원성 및/또는 면역원성의 잠재력을 뜻한다. 이것은 하나 혹은 복수의 새로운 항원결정기 투입에 불구하고 전체적으로 감소된 항원성 및/또는 면역원성의 감

재력도 포함한다.

[0074] 서론

[0075] 본 발명은 면역성의 잠재력이 감소된 시가 독소균의 A 서브유닛으로부터 유도된 향상된 폴리펩티드를 제공한다. 이 향상된 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 세포독성 치료제(cytotoxic therapeutics), 치료제 전달제(therapeutic delivery agents), 진단용 분자(diagnostic molecules), 및 면역조치 물질과 같은 조성물로 사용할 수 있다.

[0076] 시가 독소를 치료 목적으로 사용하는 것은 매력적이지만, 세균독소는 포유동물에는 면역성인 경향이 있다. 단백질 치료제의 원하지 않는 면역원성은 정량(dosage)과 반복 투여를 제한하는 효험 감소, 예측 불가능한 약동학(pharmacokinetics), 그리고 원치 않는 면역 반응을 보였다. 원치 않는 면역반응을 피하기 위하여 면역성의 잠재력을 감소시키는 탈면역된 시가 독소로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한 분자가 필요하지만, 시가 독소 작동체의 기능을 유지하며 성공적으로 내부의(internal) B-세포 항원결정기를 확인 그리고 제거하는 확실한 방법이 존재하지 않는다.

[0077] 일부 항원성 및/또는 면역원성 항원결정기는 절단으로 제거할 수도 있지만, 주요 과제는 강한 리보솜 억제와 세포소기관 경로화 지휘와 같은 시가 독소 작동체의 필요로 하는 기능을 유지하며, 효소의 도메인과 같은 시가 독소 폴리펩티드의 작동체 도메인의 항원결정기 침묵화이다. 이러한 항원결정기들은 돌연변이 및/또는 화학적 변형으로 줄어들거나 제거할 수 있지만, 주요 과제는 그와 동시에 시가 독소 작동체의 기능들을 보존하는 것이다. 기능적으로 제약된 잔여물(residues)과 구조물을 유지해야하는데, 특정 위치들은 특정 아미노산 치환체들의 단백질 구조, 안정성, 및/또는 기능에 영향 없이 용인(tolerate)하지 않기 때문에 단백질의 기능을 보존하면서 단백질 안의 아미노산 치환으로 교란하는 것은 중요한 과제이다(Cantor J et al, Methods in Enzymology 502: Ch. 12 pp. 291-301 (2012) 참조).

[0078] 본 발명에 도달하기 위해 시가 독소로부터 유도된 폴리펩티드 영역에 많은 실증실험이 실행되었다. 구체예에서 상세히 설명한 대로, 아미노산 치환체를 예상된 B-세포 항원결정기에 만들고, 결과로 초래된 폴리펩티드에 목표로 하는 시가 독소 작동체 기능 보유 여부를 테스트했다. 각각의 항원결정기의 항원성 및/또는 면역원성은 명시된 아미노산 치환체에 의하여 감소하거나 제거될 것으로 예상되고, 이는 결과적으로 최소 하나의 명시된 항원결정기 교란을 포함한 모든 조성물의 전체적인 항원성 및/또는 면역원성을 감소시킨다. 시가 독소 기능(들)을 유지하며 면역원성의 잠재력이 감소됨을 확인한 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드는, 녹농균 독소 A(Pseudomonas exotoxin A)와 같은 유사성이 있는 세균 단백질 독소(bacterial proteointoxins)를 탈면역하려는 시도가 있었음에도 불구하고, 선형적으로 예측할 수 없었다.

[0079] 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 포함한 폴리펩티드는 특정 표적 세포 사멸과 암, 면역질환, 그리고 세균간염과 같은 질병들의 치료를 위한 재조합된 항체 독소와 리간드-독소 융합체의 구성 요소로 사용할 수 있다. 더불어, 본 발명의 폴리펩티드는 진단 정보 수집을 위한 검출 촉진제와 같은 외인성 물질을 정확하게 전달하기 위한 특정 세포종류에 침투하는 분자의 구성요소로 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드는 단독으로 또는 시가 완전독소(holotoxin)의 구성요소로 시가 독소를 향한 면역 반응을 끌어내는 동안 항체 생성을 방지하도록 설계된 면역조치 물질에 사용할 수 있다.

[0081] I. 본 발명의 시가 독소 작동체 폴리펩티드와 단백질의 일반적인 구조

[0082] 본 발명은 면역원성 잠재력이 감소되었지만 세포 내재화, 세포소기관 경로화, 촉매 활동, 그리고 세포독성과 같은 시가 독소 작동체 기능(들)을 유지한 시가 독소 작동체 영역을 포함한 여러 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명의 폴리펩티드는 이곳에 명시된 최소 하나의 항원결정기 영역 교란을 포함한 시가 독소 작동체 영역을 포함한다. 본 발명의 단백질은 최소 하나의 특정 세포의 표적 생체분자와 결합 가능한 하나 또는 여러 폴리펩티드를 포함한 탈면역된 시가 독소 작동체 영역과 결합 영역을 포함한다.

[0083] 단백질 독소(proteintoxin)의 시가 독소균은 시가 독소, 시가양 독소 1, 및 시가양 독소 2와 같은 구조적으로 그리고 기능적으로 연관된 천연적으로 발생하는 독소들로 구성되었다(Johannes L, Romer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010) 참조). 시가 독소 균의 개체들은 전체적으로 동일한 구조와 활동 기전을 가졌다 (Engedal, N et al, Microbial Biotech 4: 32-46 (2011) 참조). 예를들어, Stx, SLT-1 및 SLT-2는 무세포 시스템(cell free systems)에서 구분이 안 되는 효소 활성을 보인다(Head S et al, J Biol Chem 266: 3617-21 (1991); Tesh V et al, Infect Immun 61 : 3392-402 (1993); Brigotti M et al, toxin 35: 1431-1437 (1997) 참조).

[0085] A. 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드

[0086] 본 발명을 위하여, "시가 독소 작동체 영역"은 최소 하나의 시가 독소 기능을 보이는 시가 독소군의 한 개체의 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유도된 폴리펩티드 영역을 말한다. 시가 독소 기능은 세포 침투(cell entry), 지질막 변형, 세포소기관 경로화 지휘, 분해 방지(avoiding degradation), 촉매 반응으로 리보솜 억제(catalytically inactivating ribosomes), 세포독성 유발, 그리고 세포 증식 억제 효과 유발을 포함한다.

[0087] 이 명세서에 쓰인 "주요" 시가 독소 작동체 기능 유지란 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드 대조군과 비교 가능한 시가 독소 기능 활동성 수준을 말하며 재현 가능한 적절한 정량 분석으로 측정한다. 시험관내 리보솜 억제에서는, 주요 시가 독소 작동체 기능은 박테리아, 고세균(archaea), 또는 진핵 생물 (조류(藻類), 곰팡이류, 식물, 또는 동물)과 같은 리보솜의 자원에 따라 300pM 혹은 이하의 IC₅₀을 보인다. 이는 촉매 반응으로 비활성화한 SLT-1A 1-251 이중변이(double mutant)(Y77S, E167D)의 약 100,000 pM IC₅₀에 비해 확연한 차이가 나는 억제이다. 실험의 세포 배양의 세포 표적 사멸의 세포독성 분석에서는, 세포주(cell line)와 목표로 하는 그의 세포의 표적 생체분자 발현에 따라, 주요 시가 독소 작동체 기능은 100, 50, 또는 30 nM 혹은 그 이하의 CD₅₀을 보였다. 이는 세포 표적 결합 영역이 없는 SLT-1A만의 100 - 10,000 nM CD₅₀에 비해 확연한 차이가 나는 표적 세포주에 세포독성이다.

[0088] 어떠한 예에서는, 정확한 곡선 적합에 필요한 측정점 수집에 실패할 경우 IC₅₀ 또는 CD₅₀의 정확한 값은 얻을 수 없을 수도 있다. 주요 시가 독소 기능 활동성을 측정할 때에는 부정확한 IC₅₀ 및/또는 CD₅₀ 값은 배제해야한다. 하기에 명시된 예와 같이 시가 독소 작동체 기능 분석의 데이터 분석에서 곡선에 정확히 맞추기에 부족한 데이터는 실제 시가 독소 작동체 기능으로 보서는 안 된다. 예를 들어, 이론적으로는 실험 샘플에서 50% 이상의 리보솜 억제 또는 세포 사멸이 일어나지 않으면 각각 IC₅₀과 CD₅₀을 알 수가 없다.

[0089] 시가 독소 작동체 기능에서 활동을 측정하는 데에 실패한다면 세포 침투, 세포소기관 경로화, 그리고/또는 효소 활성의 부재보다는 잘못된 발현, 폴리펩티드 접힘(folding), 그리고/또는 폴리펩티드 안정성 때문일 수 있다. 시가 독소 작동체 기능 분석은 필요한 양의 시가 독소 작동체 기능 활성도를 측정하기 위해 많은 양의 본 발명의 폴리펩티드를 필요로 하지 않을 수 있다. 작동체 기능이 낮거나 아예 없는 것의 근본원인이 실증적으로 단백질 발현 또는 안정성에 의한 것으로 확인된다면, 당업계의 숙련자라면 그러한 요소들을 단백질 화학과 분자공학 기술로 보완하여 시가 독소 기능 작동체 활동을 회복시키고 측정하는 것도 가능하다. 예를 들어: 부적절한 세포 기반 발현은 다른 발현 조절 서열을 사용하여 보완; 부적절한 폴리펩티드 접힘 및/또는 안정성을 말단 서열(terminal sequence) 또는 작동체 외의 영역의 보상변이를 안정시켜 단백질의 입체적인 구성구조를 안정시키는 것으로 해결, 등. 시가 독소 기능들 각각의 새로운 분석들이 생긴다면, 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 1000배 또는 100배 또는 그 이하의 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 활동, 또는 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 기능적인 녹아웃(knockout)에 비해 3배 내지 30배 또는 그 이상의 활동과 같은 그 어떤 기능으로도 분석될 수 있을 것이다.

[0090] 세포소기관 경로화 같은 특정 시가 독소 작동체 기능은 간단하게 측정할 수 없다. 현재로서는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 세포독성을 가지는 데에 실패하는 요인이 부적절한 세포소기관 경로화 때문인지 밝힐 수 있는 통상적인 정량분석이 없지만, 그를 위한 테스트가 생긴다면, 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 야생형 시가 독소 작동체 영역과 비교할 세포소기관 경로화 수준을 위해 분석될 수 있을 것이다.

[0091] 주의할 점은, 만약 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 세포독성이 야생정보다 감소한다 하여도, 감소된 항원성 및/또는 면역성이 높은 정량 또는 더 많은 반복 투여를 허용한다거나 하여 감소된 세포독성을 상쇄할 수 있기 때문에, 실제로는 희석한 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 사용한 경우, 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 사용한 경우에 비해 비슷하거나 더 효과적이다. 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 세포액(cytosol)에 도달하는 단 하나의 분자만으로, 또는 흡수되고 있는 40개의 분자로 사멸할 정도로 굉장히 강력하다. 세포소기관 경로화 또는 세포독성과 같은 시가 독소 작동체 기능이 크게 감소한 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드에 비했을 때, 표적 세포 사멸 및/또는 특정 세포 탐지에 실제로 응용하였을 때 충분히 강력하지 않을 수 있다.

[0092] 시가 독소군은 이질균 혈청형 1, 장출혈성 대장균 혈청형으로부터 분리된 시가양 독소 1 변형(SLT1 또는 Stx1 또는 SLT-1 또는 Slt-I), 및 장출혈성 대장균 혈청형으로부터 분리된 시가양 독소 2 변형(SLT2 또는 Stx2 또는 SLT-2)으로부터 분리된 시가 독소 (Stx)를 포함한다. SLT1는 Stx와 잔류물 하나 차이뿐이며, 둘 다 베로사이트

독신(Verocytotoxins) 또는 베로 독소(VTs)로 불렸다(O'Brien, Currtop Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992) 참조). SLT1과 SLT2 변형은 아미노산 서열에서 서로 53-60%정도밖에 유사하지 않지만, 시가 독소군의 개체들과 유사한 효소 활동과 세포독성의 메커니즘을 가졌다(Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010) 참조). 정의된 아형 Stx1a, Stx1c, Stx1d, 및 Stx2a-g와 같은 39개 이상의 시가 독소들이 묘사되었다(Scheutz F et al, J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012) 참조). 시가 독소 군의 개체들은 시가 독소 부호화 유전자가 수평적 유전자전달로 세균종간에 확산 될 수 있기 때문에 특정 세균종에 자연적으로 한정되어 있지 않다(Strauch E et al., Infect Immun 69: 7588-95 (2001); Zhaxybayeva O, Doolittle W, Curr Biol 21 : R242-6 (2011) 참조). 이중간 전달의 예로, 시가 독소는 환자에게서 추출된 아시네토박테르 용혈(A. haemolyticus) 균주에서 발견되었다(Grotiuz G et al, J Clin Microbiol 44: 3838-41 (2006) 참조). 시가 독소를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 새로운 아종 또는 종에 들어가면, 시가 독소 아미노산 서열은 시가 독소군의 개체에 공통된 세포독성의 메커니즘을 유지하는 동시에 유전변이 및/또는 선택압에 의하여 경미한 서열 변형을 할 수 있는 것으로 추정된다(Scheutz, J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012) 참조).

[0093] 본 발명의 폴리펩티드는 포유 동물에 투여 후 폴리펩티드의 항원성의 그리고/또는 면역원성의 잠재력을 감소하기 위해 최소 하나의 추정상의 항원결정기 영역의 교란이 있는 시가 독소군의 개체의 A 서브유닛으로부터 유도된 시가 독소 작동체 영역을 포함한다. 여기서의 항원결정기에 관련된 "교란"은 항원결정기 영역의 최소 하나의 아미노산 제거, (최소 하나의 아미노산은 항원결정기에 있는) 두 개 또는 그 이상의 아미노산의 도치(inversion), 항원결정기 영역에 최소 하나의 아미노산 주입, 그리고 항원결정기 영역의 최소 하나의 아미노산 돌연변이를 말한다. 돌연변이에 의한 항원결정기 교란은 비표준의 아미노산(nonstandard amino acids) 및/또는 비천연 아미노산과의 아미노산 치환을 포함한다. 돌연변이에 의한 항원결정기 영역 교란은 최소 하나의 항원결정기 영역의 아미노산과 작은 분자 보조제(small molecule adjuvant)를 가리는(masks) 공유 결합된(covalently-linked) 화학 구조를 더한 아미노산 변화/변형을 포함한 방법으로도 일어날 수 있다(예: PEGylation)(Zhang C et al, BioDrugs 26: 209-15 (2012); Flower D, Expert Opin Drug Discov 7: 807-17 (2012) 참조).

[0094] 특정 항원결정기 영역과 교란은 이 명세서의 서열 목록(Sequence Listing)에서 주어진 천연(native) 시가 독소 A 서브유닛의 특정 아미노산 배치에 관련하여 명시되었고, 덧붙여 자연적으로 발생하는 시가 독소 A 서브유닛은 성숙(mature) 시가 독소 A 서브유닛을 생산하기 위해 제거되고 기술자라면 식별할 수 있는 아미노 말단에 약 22개의 아미노산의 신호순서(signal sequence)를 가진 전구체(precursor forms)를 포함할 수도 있다. 덧붙여, 특정 항원결정기 영역 교란은 이 명세서에서 천연 시가 독소 A 서브유닛(예: 아미노 말단으로부터 배치 33에 있는 세린 잔기 S33) 내의 특정 배치에 선천적으로 있는 특정 아미노산(예: 세린 잔기(serine residue)의 S)에 잇달아 거론된 특정 돌연변이로 잔기가 치환된 아미노산 (예: S33I는 아미노산 절단의 아미노산 잔기 33의 세린과 이소류신의 아미노산 치환을 나타낸다)과 관련하여 명시되었다.

[0095] 본 발명의 몇몇 구체에는 시가 독소군의 개체의 A 서브유닛으로부터 유도된 아미노산 서열을 포함하는 시가 독소 작동체 영역과 이 명세서에 명시된 최소 하나의 항원결정기 영역(표 1, 2, 및 3 참조)의 교란을 포함하는 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 선천적으로 배치된 아미노산의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:3의 210-218; SEQ ID NO:3의 240-258; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293, 또는 보존된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및/또는 비천연 시가 독소 작동체 폴리펩티드 서열 안의 동등한 배치로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 최소 하나의 교란을 포함한 시가 독소 A 서브유닛 전체(예: SLT-1A(SEQ ID NO: 1), StxA(SEQ ID NO:2), 또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3))만을 포함하거나 또는 이들을 포함하여 구성된다.

[0096] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 절단된 시가 독소 A 서브유닛만을 포함하거나 또는 이들을 포함하여 구성될 수 있다. 시가 독소 A 서브유닛 절단은 독소 작동체의 촉매 활성과 세포독성에 영향을 주지않고 항원결정기 영역 전체를 제거할 수도 있다. 두드러진 효소 활성을 보이는 제일 작은 시가 독소 A 서브유닛 단편은 StxA의 75-247 잔기로 구성된 폴리펩티드이다 (Al- Jaufy, Infect Immun 62:

956-60 (1994) 참조). SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 카복시 말단을 아미노산 1-251로 절단하면 두 개의 예상된 (predicted) B-세포 항원결정기, 두 개의 예상된 CD4+ T-세포 항원결정기, 및 하나의 예상된 불연속 B-세포 항원결정기가 제거된다. SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 아미노 말단을 75-293으로 절단하면 적어도 세 개의 예상된 B-세포 항원결정기 영역 및 세 개의 예상된 CD4+ T-세포 항원결정기를 제거한다. SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 아미노와 카복시 말단 둘 다 75-251로 절단하면 적어도 다섯 개의 예상된 B-세포 항원결정기, 네 개의 추정상의 CD4+ T-세포 항원결정기, 및 하나의 예상된 불연속 B-세포 항원결정기가 제거된다.

[0097] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 주어진 항원결정기 영역에서 제거, 삽입, 도치, 또는 치환과 같은 최소 하나의 돌연변이를 가진 전체 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛만을 포함하거나 또는 이들을 포함하여 구성된다. 본 발명의 다른 몇몇 구체예에서는, 폴리펩티드는 항원결정기 영역에 아미노산 최소 하나를 제거한 교란을 포함한다. 본 발명의 다른 몇몇 구체예에서는, 폴리펩티드는 항원결정기 영역에 아미노산 최소 하나를 삽입하는 교란을 포함한다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 폴리펩티드는 항원결정기 영역에 아미노산 최소 하나를 도치시킨 교란을 포함한다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 폴리펩티드는 비표준 아미노산 또는 화학적으로 변형된 결사슬을 가진 아미노산의 아미노산 치환과 같은 돌연변이를 포함한 교란을 포함한다. 더 많은 단일 아미노산 치환 예는 본 명세서의 실시예에서 제공된다.

[0098] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 천연 서열에 비해 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 최소 하나의 아미노산 치환을 포함한 전체 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 폴리펩티드는 천연 서열에 비해 하나의 돌연변이가 있고, D에서 A, D에서 G, D에서 V, D에서 L, D에서 I, D에서 F, D에서 S, D에서 Q, E에서 A, E에서 G, E에서 V, E에서 L, E에서 I, E에서 F, E에서 S, E에서 Q, E에서 N, E에서 D, E에서 M, E에서 R, G에서 A, H에서 A, H에서 G, H에서 V, H에서 L, H에서 I, H에서 F, H에서 M, K에서 A, K에서 G, K에서 V, K에서 L, K에서 I, K에서 M, K에서 H, L에서 A, L에서 G, N에서 A, N에서 G, N에서 V, N에서 L, N에서 I, N에서 F, P에서 A, P에서 G, P에서 F, R에서 A, R에서 G, R에서 V, R에서 L, R에서 I, R에서 F, R에서 M, R에서 Q, R에서 S, R에서 K, R에서 H, S에서 A, S에서 G, S에서 V, S에서 L, S에서 I, S에서 F, S에서 M, T에서 A, T에서 G, T에서 V, T에서 L, T에서 I, T에서 F, T에서 M, T에서 S, Y에서 A, Y에서 G, Y에서 V, Y에서 L, Y에서 I, Y에서 F, 및 Y에서 M으로 이루어진 군으로부터 선택된 치환을 포함한 전체 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다.

[0099] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 천연 아미노산 잔기 서열에 비해 항원결정기 영역안에서 최소 하나의 치환을 포함한 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, 최소 하나의 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 ; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 247 of SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 286으로 이루어진 군으로부터 선택된 선천적으로 배치된 아미노산 치환을 포함한 전체 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다.

[0100] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 항원결정기 영역 안에서 최소 하나의 치환을 포함하며, 최소 하나의 아미노산 치환은 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID

NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 ; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 247 of SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 286으로 이루어진 군으로부터 선택된 선천적 배치에 위치한 자연적으로 발생하는 아미노산과 비본존성 아미노산(예: 표 B 참조)의 치환을 포함한 전체 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다.

[0101] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 K1에서 A, G, V, L, I, F, M 및 H로; T4에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로; S8에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; T9에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S로; S9에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; K1 1에서 A, G, V, L, I, F, M 및 H로; S33에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; S45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; T45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; D47에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; N48에서 A, G, V, L, 및 M으로; L49에서 A 또는 G로; D53에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; R55에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; D58에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; P59에서 A, G, 및 F로; E60에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R으로; E61에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R으로; G62에서 A로; D94에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; S96에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; S109에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; T109에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S로; G110에서 A로; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; G147에서 A로; R179에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; T180에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로; T181에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로; D183에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; D184에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; S186에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; G에서 A로; R188에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; S189에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; R204에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; R205에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; S247에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; Y247에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; R248에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; R250에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; R251에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; D264에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; G264에서 A로; 및 T286에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 최소 하나의 아미노산 치환을 포함한 전체 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다.

[0102] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 K1M, T4I, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, S33I, S45I, T45I, D47G, N48V, N48F, L49A, D53A, D53G, D53N, R55A, R55V, R55L, D58A, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, S109V, T109V, G110A, S112V, G147A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, R204A, R205A, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, D264A, G264A, T286A 및/또는 T286I로 이루어진 군으로부터 선택된 최소 하나의 아미노산 잔기를 포함한 전체 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다. 이러한 항원결정기 교란 치환들은 합하여 각 항원결정기 영역의 다수의 치환 및/또는 다수의 항원결정기 영역 교란으로 시가 독소 작동체 기능을 유지한 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 형성할 수 있다. 예를 들어, 선천적으로 배치된 잔기 K1, T4, S8, T8, T9, S9, K11, K11, S33, S45, T45, D47, N48, L49, D53, R55, D58, P59, E60, E61, G62, D94, S96I, S109, T109, G110, S112, G147, R179, T180, T181I, D183, D184, L185, S186, S186, G187, R188, S189, R204A, R205, S247, Y247, R248, R250, R251, D264, G264, T286 및/또는 T286에서의 치환은, 가능할 때에, 선천적으로 배치된 잔기 K1, T4, S8, T8, T9, S9, K11, K11, S33, S45, T45, D47, N48, L49, D53, R55, D58, P59, E60, E61, G62, D94, S96I, S109, T109, G110, S112,

G147, R179, T180, T181I, D183, D184, L185, S186, S186, G187, R188, S189, R204A, R205, S247, Y247, R248, R250, R251, D264, G264, T286 및/또는 T286에서의 치환과 함께 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 형성할 수 있다.

[0103] 본 발명의 다른 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 전체 시가 독소 A 서브유닛보다 짧고 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 제공하는 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 최소 하나의 아미노산이 교란된 절단된 시가 독소 A 서브유닛만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다. 시가양 독소 1 A 서브유닛 절단은 촉매 반응이 왕성하고, 시험관 내에서 리보솜을 효소로 비활성화시킬 수 있고, 세포 내에서 발현하면 세포독성을 가진다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005) 참조). 완전한 효소 활성을 보이는 제일 작은 시가 독소 A 서브유닛 단편은 SLT1A의 잔기 1-239로 구성된 폴리펩티드(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005) 참고). StxA의 잔기 75-247의 제일 작은 시가 독소 A 서브유닛 단편이 상당한 촉매 활성을 유지한다고 보고되지만(Al-Jaoufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)참조), 진핵세포 내에서 새로이 발현한 StxA 절단(truncation)은 세포액에 도달하고 리보솜을 촉매로 비활성화하는데에 잔기 240까지만 필요하다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005) 참조).

[0104] 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 보통 A 서브유닛의 전체길이보다 짧으나, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역이 아미노산 위치 77 내지 239(SLT-1A(SEQ ID NO:1) 또는 StxA(SEQ ID NO:2)), 또는 시가 독소 군의 다른 동등한 A 서브유닛(예: SEQ ID NO:3의 77 내지 238)의 폴리펩티드 영역을 유지하는 것을 선호한다. 예를 들어, 본 발명의 몇몇 구체예에서는, SLT-1A로부터 유도된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 최소 하나의 아미노산이 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 주어진 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 교란되고, 아미노산 SEQ ID NO:1의 75 내지 251, SEQ ID NO:1의 1 내지 241, SEQ ID NO:1의 1 내지 251, 또는 SEQ ID NO:1의 1 내지 261만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다. 마찬가지로, StxA로부터 유도된 탈면역된 시가 독소 작동체 영역은 최소 하나의 아미노산이 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 주어진 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 교란되고, 아미노산 SEQ ID NO:2의 75 내지 251, SEQ ID NO:2의 1 내지 241, SEQ ID NO:2의 1 내지 251, 또는 SEQ ID NO:2의 1 내지 261만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다. 또한, SLT-2로부터 유도된 탈면역된 시가 독소 작동체 영역은 최소 하나의 아미노산이 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 주어진 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 교란되고, 아미노산 SEQ ID NO:3의 75 내지 251, SEQ ID NO:3의 1 내지 241, SEQ ID NO:3의 1 내지 251, 또는 SEQ ID NO:3의 1 내지 261만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다.

[0105] 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드의 여러 이형(variants)을 제공하고, 시가 독소 작동체 영역은 자연적으로 발생하는 시가 독소 A 서브유닛과 단지 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 또는 그 이상까지의 아미노산 잔기 차이(하지만 이 이상의 최소 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 이상의 아미노산 서열의 독자성(sequence identity)을 유지한 것은 없이)가 난다. 이와 같이, 시가 독소 군의 개체로부터 유도된 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 추가, 제거, 절단, 또는 자연적으로 발생하는 시가 독소 A 서브유닛의 적어도 85%, 90%, 95%, 99% 또는 이상의 아미노산 서열의 독자성을 유지하고 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 제공된 최소 하나의 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 최소 하나의 아미노산이 교란되지만 한다면 원래의 서열의 다른 변경도 포함한다.

[0106] 따라서, 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 제공된 최소 하나의 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 최소 하나의 아미노산 교란이 있고, SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)와 같은 자연적으로 발생하는 시가 독소 A 서브유닛의 전체 서열의 독자성의 최소 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.7%를 가진 아미노산만을 포함하거나 이들을 포함하여 구성된다.

[0107] 전체 길이의 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛 둘 다 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 제공된 최소 하나의 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 최소 하나의 아미노산 교란이 있다면 하나 또는 그 이상의 돌연변이(예: 치환, 제거, 삽입 또는 도치)를 포함할 수 있다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 흔히 알려진 방법인 숙주 세포 변형, 핵산전달감염, 감염 또는 유도, 또는 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 연결된 세포 표적 결합 영역 매개 내재화로 세포에 침투했을 때 세포독성을 유지하기 위하여 자연적으로 발생하는 시가 독소 A 서브유닛의 충분한 서열 독자성을 가지는 것을 선호한다. 시가 독소 A 서브유닛의 효소활성 및/또는 세포독성에 가장 중요한 잔기의 잔기 위치는(residue-positions) 여러 가지 중에서도 아스파라긴-75, 타이로신-77, 글루탐산염-167, 아르지닌(arginine)-170, 및 아르지닌-176인 것으로 발견되었다(Di, Toxicon 57: 535-39 (2011) 참조). 본 발명의 어떤 구체예에서든, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩

티드는 반드시 필수는 아니지만 일반적으로 세포독성 활성화에 필요한 StxA, SLT-1A의 위치 77, 167, 170, 및 176, 또는 다른 시가 독소 군의 동등한 보존위치(conserved position) 같은 위치에 있는 하나 또는 그 이상의 보존된 아미노산을 가급적이면 유지하는 것이 좋다. 본 발명의 세포독성의 단백질의 세포독성과 같은 세포 사멸 능력은 당업계에 알려진 분석 한 가지 또는 여러 가지로 측정할 수 있다.

[0109] B. 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 포함한 단백질

[0110] 본 발명의 단백질은 세포의 표적 생체분자 특정 결합 영역과 연결된 본 발명의 폴리펩티드를 포함한 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 포함한다. 본 발명의 단백질의 결합 영역은 선택적으로 그리고 명확하게 세포의 표적 생체분자와 결합할 수 있는 폴리펩티드를 하나 또는 그 이상 포함한다. 결합 영역은 합성이든 자연적으로 발생하든 또는 그로부터 유도된 리간드, 면역글로불린으로부터 유도된 도메인, 면역글로불린 도메인 대용의 인위적으로 가공된 매개체(synthetically engineered scaffolds) 등의 한가지 또는 여러 가지의 폴리펩티드 일부(moieties)를 포함할 수 있다.

[0111] 당업계에는 리간드, 단일클론항체, 가공된(engineered) 항체 유도체, 및 가공된 항체 대체물질과 같은 것들의 결합 특성을 이용해 폴리펩티드로 특정 세포종을 표적하는(targeting) 데에 유용한 여러가지 결합 영역이 있다.

[0112] 비제한적인 한 측면에 의하면, 본 발명의 단백질의 결합 영역은 세포의 표적 생체분자에, 보통 세포표면수용체, 결합하는 기능성을 유지한 자역적으로 발생하는 리간드 또는 그의 유도체를 포함한다. 예를 들어, 당업계에 알려진 여러 시토카인(cytokines), 성장인자, 및 호르몬은 세포독성의 단백질로 유사한 시토카인 수용체, 성장인자 수용체, 또는 호르몬 수용체를 발현하는 특정 세포종의 세포표면을 표적으로 하는데에 사용할 수 있다. 리간드의 특정 비제한 예시는 B-세포 활성화 인자(BAFFs, APRIL), 집락자극인자(CSFs), 표피성장인자(EGFs), 섬유모세포성장인자(FGFs), 혈관내피성장인자(VEGFs), 인슐린유사성장인자(IGFs), 인터페론, (IL-2, IL-6, 및 IL-23과 같은)인터류킨, 신경성장인자(NGFs), 혈소판유래성장인자, 전환성장인자(TGFs), 및 종양괴사인자(TNFs)를 포함한다.

[0113] 다른 특정 구체예에 의하면, 결합 영역은 세포의 표적 생체분자와 결합할 수 있는 합성 리간드를 포함한다. 비제한적인 예시 하나는 세포독성의 T-림프구 항원4(T-lymphocyte antigen 4(CTLA-4)의 대항체이다.

[0114] 비제한적인 하나의 특정 측면에 의하면, 결합 영역은 면역글로불린형 결합 영역을 포함할 수 있다. 이 명세서에 명시된 "면역글로불린형 결합 영역"은 항원 또는 항원결정기와 같은 표적 생체분자 하나 또는 그 이상과 결합할 수 있는 폴리펩티드 영역을 말한다. 결합 영역은 표적 분자에 결합하는 능력으로 기능적으로 정의할 수 있다. 면역글로불린형 결합 영역은 주로 항체 또는 항체유사구조물(antibody-like structure)으로부터 유도된다; 그러나, 다른 자원의 대체 매개체는 용어의 범위에 포함되는 것으로 고려된다.

[0115] 면역글로불린(Ig) 단백질은 Ig 도메인으로 알려진 구조 도메인(structural domain)을 가지고 있다. Ig 도메인의 길이는 70-110 아미노산 잔기내이며 7 내지 9개의 역평행 베타 가닥이 두 베타 판(sheet)으로 배열되어 샌드위치 같은 구조를 형성하는 특유의 Ig-폴드(fold)를 가지고 있다. Ig 폴드는 샌드위치의 안쪽 면의 소수성의 아미노산 상호작용과 가닥 안의 시스테인 잔기 사이의 고보존 이황화 결합(highly conserved disulfide bond)에 의하여 안정된다(stabilized). Ig 도메인은 변수(IgV 또는 V-세트), 상수(IgC 또는 C-세트) 또는 중간물(IgI 또는 I-세트)일 수 있다. 몇몇 Ig 도메인은 항원결정기와 결합하는 항체의 특이성(specificity)에 중요한 상보성 결정 영역(CDR)과 연관이 있을 수 있다. Ig유사 도메인은 비면역글로불린 단백질에서도 발견되며 이에 근거하여 단백질의 Ig 상과(superfamily)의 개체로 구분된다. 인간유전자 명명법 위원회(The HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC))는 Ig유사 도메인을 가진 군의 개체 목록을 제공한다.

[0116] 면역글로불린형 결합 영역은 항체 또는 항원결합 조각의 폴리펩티드 서열일 수 있으며, 이는 분자공학 또는 라이브러리 선별(library screening)에 의한 선택과 같은 천연 항체 또는 비면역글로불린의 Ig유사 도메인에서 벗어난 아미노산 서열이다. 재조합 DNA 기술과 면역글로불린형 결합 영역 생성중 시험관내 라이브러리 선별의 관련성이 있기 때문에, 더 작은 크기, 세포 침투, 또는 그 외 치료를 위한 개선을 얻기 위하여 항체를 재설계(redesign)할 수 있다. 가능한 변형의 폭은 많고 넓으며 단 하나의 아미노산을 변형하는 것에서부터 가변부위와 같은 것을 완전히 재설계하는 것까지 포함한다. 보통은, 항원결합의 특성 향상, 가변부위 안정성 향상, 또는 면역원성 반응의 잠재력 감소를 위해 가변부위에 변화를 가한다.

[0117] 본 발명의 요소로 고려되는 면역글로불린형 결합 영역이 여러 가지 있다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 세포의 표적 생체분자에 결합 가능한 항체 파라토프(paratope)와 같이, 면역글로불린형 결합 영역은 면역글로불린 결합 영역으로부터 유도되었다. 본 발명의 다른 몇몇 구체예에서는, 면역글로불린형 결합 영역은 그 어떤 면역글로불

린 도메인으로부터 유도되지 않았지만 세포의 표적 생체분자와 고친화성 결합을 제공하여 면역글로불린 결합 영역의 기능을 하는 가공된 폴리펩티드를 포함한다. 이 가공된 폴리펩티드는 선택적으로 여기에 명시된 면역글로불린의 상보성 결정 영역만을 포함하거나 이것들도 포함하여 구성된 폴리펩티드 매개체를 포함할 수도 있다.

[0118] 선행기술에도 고친화성 결합 특성을 이용하여 특정 세포종을 폴리펩티드가 v표적하는데에 유용한 여러 결합 영역이 있다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 단백질의 결합 영역은 단일-도메인 항원 도메인(single-domain antibody domains(sdAbs)), 나노바디, 카멜리드로부터 유도된 중쇄 항원 도메인(V_{H} fragment), 이가나노바디(bivalent nanobodies), 연골 어류로부터 유도된 중쇄 항원 도메인, 면역 글로불린 새로운 항원 항체(IgNARs), V_{NAR} 단편, 단일쇄 가변영역(scFv), scFv 단편 다합체화(multimerizing scFv fragments)(다이어바디, 트라이어바디, 테트라바디(diabodies, triabodies, tetrabodies)), 양특이성 직열(bispecific tandem) scFv 단편, 이황안정화 항원결합(disulfide stabilized antibody variable(Fv)) 단편, V_L , V_H , C_L 및 C_H1 도메인을 포함한 이황안정화 항원결합(Fab) 단편, 이가의 $F(ab')_2$ 단편, 중쇄와 C_H1 도메인으로 구성된 Fd 단편, 단쇄 Fv- C_H3 미니바디(minibodies), 양특이성 미니바디, 이합체형(dimeric) C_H2 도메인 단편(C_H2D),Fc 항원결합 도메인(Fcabs), 분리된 상보성 결정 영역 3(CDR3) 단편, 제한된 기본틀부위 3(constrained framework region 3), CDR3, 기본틀부위 4(FR3-CDR3-FR4) 폴리펩티드, 작은 조절 면역 약물(SMIP) 도메인, 및 파라토프와 결합 기능을 유지한 상기 전술한 것들의 유전자 조작 대응물을 포함한 군으로부터 선택된다(Saerens D et al, Curr. Opin. Pharmacol 8: 600-8 (2008); Dimitrov D, MAbs 1 : 26-8 (2009); Weiner L, Cell 148: 1081-4 (2012); Ahmad Z et al, Clin Dev Immunol 2012: 980250 (2012) 참조).

[0119] 본 발명의 다른 특정 구체예에 따라, 결합 영역은 가공된, 고친화성 및 표적 생체분자 특이 결합과 같은 유사한 기능적인 특성을 보이는 면역글로불린 도메인의 대체 매개체를 포함하고, 더욱 높은 안정도 또는 감소된 면역원성과 같은 향상된 특성을 위한 가공을 가능하게 한다. 본 발명의 단백질의 특정 구체예에서는, 결합 영역은 가공된, 파이프록틴과의 결합에서 유도된(fibronectin-derived), 10번째 파이프록틴 타입 III(10^{th} fibronectin type III(10Fn3)) 도메인(모노바디, AdNectinsTM, 또는 AdNexinsTM); 가공된, 테나신에서 유도된, 테나신 타입 III 도메인(CentrynsTM); 가공된, 안키린 리피트 모티프(ankyrin repeat motif)를 포함한 폴리펩티드(DARPinsTM); 가공된, 저밀도 지질단백질 수용체로부터 유도된 A 도메인(LDLR-A)(AvimersTM); 리포칼린(안티칼린); 가공된, 단백질분해효소억제제로부터 유도된, 쿠니츠 도메인; 가공된, 단백질 A에서 유도된 Z 도메인(AffibodiesTM); 가공된, 감마 B 결정체로부터 유도된 매개체 또는 가공된, 유비퀴틴으로부터 유도된 매개체(Affilins); Sac7d로부터 유도된 폴리펩티드(Nanofitins 또는 affitins); 가공된, Fyn으로부터 유도된 SH2 도메인(Fynomers); 소형단백질; C-타입 렉틴 유사 도메인 매개체; 가공된 항체 모방체; 및 결합 능력을 유지한 상기 전술한 것들의 유전자 조작 대응물을 포함하는 군으로부터 선택된다(Worn A, Pluckthun A, J Mol Biol 305: 989-1010 (2001); Xu L et al, Chem Biol 9: 933-42 (2002); Wikman M et al, Protein Eng Des Sel 17: 455-62 (2004); Binz H et al, Nat Biotechnol 23: 1257-68 (2005); Hey T et al, Trends Biotechnol 23: 514-522 (2005); Holliger P, Hudson P, Nat Biotechnol 23: 1 126-36 (2005); Gill D, Damle N, Curr Opin Biotech 17: 653-8 (2006); Koide A, Koide S, Methods Mol Biol 352: 95-109 (2007); Byla P et al, J Biol Chem 285: 12096 (2010); Zoller F et al, Molecules 16: 2467-85 (2011) 참조).

[0120] 상기 명시된 결합 영역 모두 결합 영역의 요소가 세포의 표적 생체분자에 대하여 해리상수(dissociation constant)가 리터당 10^{-5} 내지 10^{-12} 몰(mole), 가급적이면 200 나노몰라(nanomolar(nM))이하라면 본 발명의 구성요소로서 사용될 수 있다.

[0122] 세포 외 표적 생체분자

[0123] 본 발명의 단백질의 결합 영역은 세포의 표적 생체분자에 특이적으로 결합 가능한, 가급적이면 암 세포, 종양세포, 형질세포, 감염세포, 또는 세포내병원체를 품고있는 숙주세포와 같은 목표 세포의 표면에 물리적으로 연결하는 폴리펩티드 영역을 포함한다.

[0124] "표적 생체분자"는 흔히 단백질 또는 당화물 같은 번역 후 수식 변형(post-translational)으로 변형된 단백질을 말하며, 단백질을 특정 세포종 또는 생물체 내의 위치로 보내기 위해 결합 영역에 결합 가능한 생물학적 분자이다. 세포의 표적 생체분자는 변형하지 않은(unmodified) 폴리펩티드, 생화학적인 기능기(functional groups) 추가로 변형된 폴리펩티드, 그리고 중성 당지질을 포함한 여러 항원결정기를 포함할 수 있다(U.S. Patent 5,091, 178; EP 2431743 참조). 세포의 표적 생체분자가 내생적으로 내재화하거나 본 발명의 단백질과 상호 작용을 할

때 내재화될 수 있는것이 좋다.

- [0125] 본 발명의 목적을 위하여, 표적 생체분자 변형에 관해서는 "세포외"는 구조의 일부분이 세포외 환경에 노출되어 있는 생체분자. 세포외 표적 생체분자는 세포막 요소, 막횡단 단백질(transmembrane spanning proteins), 세포막에 고정된(anchored) 생체분자, 세포표면에 결합된(cell-surface-bound) 생체분자, 및 배출된(secreted) 생체분자를 포함한다.
- [0126] 본 발명에 관해서, 표적 생체분자를 설명할 때 쓰이는 "물리적 연결"은 표적 생체분자와, 또는 그 일부를, 세포의 외부에 연결하는, 공유 및/또는 비공유 분자간 상호작용 둘 다 뜻한다. 예를 들어 표적 생체분자와 세포사이의 복수성 비공유 상호작용의 각 상호작용은 대략 1-5 킬로칼로리이다(예: 정전결합, 수소 결합, 반 데르 발스 상호작용(Van der Waals interactions), 소수성 힘(hydrophobic forces), 등). 모든 필수 막 단백질(membrane protein)은 부수적인 막 단백질과 함께 세포 막에 물리적으로 연결되어있다. 예를 들어, 세포외 표적 생체분자는 막횡단 영역(transmembrane spanning region), 지질 앵커(lipid anchor), 당지질 앵커, 및/또는 상기 전술된 것들에 포함된 요소와 비공유 연결(예: 비특정 소수성 상호작용(non-specific hydrophobic interactions) 및/또는 지질 결합 상호작용(lipid binding interactions)을 통해)되는 것을 포함할 수도 있다.
- [0127] 본 발명의 단백질의 결합 영역은 표적 생체분자의 세포종 특이 발현 및/또는 특정 세포종에 관한 표적 생체분자의 물리적 국소화 같은 여러 기준에 따라 설계 또는 선택될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 특정 단백질은 오직 하나의 세포종만이 세포면에 발현하는 표적 세포면에 결합할 수 있는 결합 도메인을 포함한다. 이는 세포외 표적 생체분자를 발현하지 않는 "방관자(bystander)" 세포종에 대한 높은 선호도(prefentiality)(최소 3배의 세포독성 효과)를 가진 특정 세포종의 표적 세포 사멸을 가능하게 한다. 또는, 결합 영역의 표적 생체분자의 발현은 세포외 표적 생체분자가 충분히 적은 양으로 발현 및/또는 표적이 아닌 세포종과 적은 양으로 물리적으로 결합한다면 한 세포종에 한정되지 않을 수도 있다. 이 또한 많은 양의 세포 표적 생체분자를 발현하지 않거나 많은 양의 세포 표적 생체분자와 물리적으로 결합하지 않는 "방관자(bystander)" 세포종에 대한 높은 선호도(prefentiality)(최소 3배의 세포독성 효과)를 가진 특정 세포종의 표적 세포 사멸을 가능하게 한다. 본 발명의 단백질의 세포독성은 다세포 생물 안에서의 선천적 위치에 그대로 자리하고 있는 세포를 포함한, 생체외, 시험관 배양, 또는 생체내와 같은 다양한 환경에서 표적 세포를 사멸하는데에 사용할 수 있다.
- [0128] 본 발명의 단백질의 결합 영역의 세포외 표적 생체분자는 암세포, 면역세포, 및 바이러스, 세포, 곰팡이류, 프리온, 또는 원충(protozoans)과 같은 세포내병원체에 감염된 세포에 비례 이상으로(over-proportionately) 또는 배타적으로 존재하는 생물 표지자(biomarkers)를 포함할 수 있다.
- [0130] 탈면역된 시가 독소 작동체 영역
- [0131] 본 발명의 단백질의 몇몇 구체예에서는, 하나 또는 여러 개의 아미노산 잔기가 탈면역된 시가 독소 작동체 영역의 효소 활동을 높이기 위하여 돌연변이, 삽입, 또는 제거될 수 있다. 예를 들어, Stx1A의 잔기위치(residue-position) 알라닌-231을 글루탐산염으로 변이시키자 시험관내의 효소 활동이 높아졌다(Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998) 참조).
- [0132] 본 발명의 단백질의 몇몇 구체예에서는, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역의 촉매 및/또는 세포독성 활동을 감소 또는 제거하기 위해 하나 또는 여러 개의 아미노산 잔기가 돌연변이 또는 제거될 수 있다. 시가 독소군의 개체의 A 서브유닛의 촉매 및/또는 세포독성 활동은 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 제공하는 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 최소 하나의 아미노산이 교란된다면, 돌연변이 또는 절단에 의해 감소 또는 제거될 수 있다. 타이로신-77, 글루탐산염-167, 아르지닌-170, 타이로신-114, 및 트립토판-203으로 분류된 위치는 Stx, Stx1, 및 Stx2의 촉매활동에 중요한 것으로 나타났다(Hovde C et al, Proc Natl Acad Sci USA 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al, Biochemistry 31 : 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al, Mol Gen Genet 241 : 467-73 (1993); Ohmura M et al, Microb Pathog 15: 169-76 (1993); Cao C et al., Microbiol Immunol 38: 441-7 (1994); Suhan, Infect Immun 66: 5252-9 (1998) 참조). 무세포 리보솜 비활성화 분석에서 글루탐산염-167과 아르지닌-170 둘 다 변이를 시키자 Slt-I A1의 효소활동이 제거되었다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005) 참조). 세포질그물 안의 Slt-I A1의 새로운 발현을 사용한 다른 접근에서는, 글루탐산염-167과 아르지닌-170 둘 다 변이를 시키거나 Slt-I A1을 잔기 1-239로 절단하자 그 발현 레벨(expression level)에서의 Slt-I A1 단편 세포독성이 제거되었다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005) 참조).
- [0133] 본 발명의 단백질은 각자 세포독성의 부모분자(parental molecule)로부터 세포 증식 억제(cytostasis) 유발, 외인성 물질 전달, 및/또는 세포종 탐지와 같은 비세포독성의 기능에서 효소 활동에 중요한 하나 또는 여러 개의

주요 잔기를 변이시켜 세포독성을 감소 또는 제거한 단백질로 가공할 수 있는, 최소 하나의 시가 독소 작동체 기능을 유지한 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 포함한다. 이 일반적인 구조는 본 발명의 폴리펩티드를 여기에 설명된 여러 사용법을 위해 결합 영역 및/또는 검출 촉진제와 같은 다양한 물질의 구성에 연결가능한 모듈러식(modular)이다.

[0134] 분자의 면역원성(항체 및/또는 세포 매개(mediated) 면역반응을 유도시키는 능력)은 척삭동물과 같은 생체에 투여 후 분자에 대한 아무 면역반응(항체 및/또는 세포 매개의)을 관찰하여 측정할 수 있다. 투여 경과 투여된 분자를 특이 표적하는 항체의 형성(formation) 및 양(amount)과 같은 특정 면역 반응을 측정할 수 있다. 투여된 분자와 특이 결합하는 항체의 존재는 다음을 나타낸다: 1) 투여된 분자를 인식하는 하나 또는 여러 개의 항체가 이전부터 존재함(pre-existence) 그리고/또는 2) 투여된 분자를 인식하는 하나 또는 여러 개의 항체의 새로운(de novo) 형성 유발.

[0135] 이미 형성된(pre-formed) 반(反)분자(anti-molecule) 항체가 있는지는 사전투여(pre-administration) 혈청에 반분자 항체가 있는지 조사하여 알 수 있다. 새로운 반-"투여분자"(anti-"administered molecule") 항체 형성 유발은 투여 후(post-administration) 혈청의 반분자 항체 생성량을 모니터링하여 알 수 있다.

[0136] 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 같은 분자 투여 후 척삭동물 안에서 유발된 항체량은 사전투여-반분자 항체량과 투여후-반분자 항체량을 비교하여 측정할 수 있다. 투여 후 척삭동물 안에서 유발된 반-"투여분자" 항체량은 분자의 일반적인 면역원성 및 여러 척삭동물의 반분자 항체 생성을 다각화(diversified) 및 증가 유발, 면역세포 매개 면역반응, 분자 중화 활동, 과민반응, 아나필락시스, 유사아나필락시스반응, 및 다른 면역 반응과 같은 여러 면역 반응을 유발시킬 수 있는 분자의 능력을 나타낸다.

[0137] 다른, 더 강한 면역원성의 면역원성 분자와 같은 참고 기준(reference point) 없이 약한 면역원성의 분자의 면역원성을 측정하는 것은 어려울 수 있다. 두 분자(예: 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드) 사이의 상대적인 면역원성은 각 분자를 다른 생물체에 개별적으로 투여한 후 각 분자의 반분자 항체 생성량의 상대적 차이를 관찰하여 측정할 수 있다. 상대적 새 반-"투여분자" 항체 생성 유발은 투여 경과 각 분자 항체들의 반분자 항체 생성량의 상대적 차이를 측정하여 알 수 있다.

[0138] 여러 분자(예: 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드)로 치료된 쥐와 같은 척삭동물에 유발된 항체량은 표준 ELISA-기반 분석으로 측정할 수 있고 여러 분자의 상대적 면역원성을 비교하는데에 사용될 수 있다.

[0140] KDEL군의 개체의 세포질그물 잔류/회복 신호 모티프(Endoplasmic Reticulum Retention/Retrieval Signal Motif)

[0141] 본 발명의 목적을 위하여, "세포질그물 잔류/회복 신호 모티프", KDEL형 시그널 모티프, 또는 시그널 모티프는 진핵세포 안에서 KDEL 수용체를 통해서 세포질그물로 단백질의 세포소기관 국소화를 촉진하기 위해 기능하는 KDEL군의 개체를 말한다.

[0142] 카복시말단 라이신-아스파라긴-글루탐산염-류신(lysine-asparagine-glutamate-leucine)(SEQ ID NO:60으로 명시된 "KDEL") 서열은 진핵세포의 용해성 단백질(soluble proteins)의 정식(canonical), 세포질그물 잔류 및 회복 신호 모티프이며 KDEL 수용체에 인식된다(Capitani M, Sallese M, FEBS Lett 583: 3863-71 (2009) 참조). 신호 모티프의 KDEL군은 HDEL(SEQ ID NO:62), RDEL(SEQ ID NO:64), WDEL(SEQ ID NO:65), YDEL(SEQ ID NO:66), HEEL(SEQ ID NO:68), KEEL(SEQ ID NO:69), REEL(SEQ ID NO:70), KFEL(SEQ ID NO:73), KIEL(SEQ ID NO:85), DKEL(SEQ ID NO:86), KKEL(SEQ ID NO:89), HNEL(SEQ ID NO:93), HTEL(SEQ ID NO:94), KTEL(SEQ ID NO:95), 및 HVEL(SEQ ID NO:96)과 같은 KDEL-유사 모티프를 포함하며, 이는 모두 다수의 계통 발생계(phylogenetic kingdoms)의 세포질그물의 루멘(lumen)에 자리하고 있는 단백질의 카복시말단에서 발견된다(Munro S, Pelham H, Cell 48: 899-907 (1987); Raykhel I et al, J Cell Biol 179: 1193-204 (2007) 참조). KDEL 신호 모티프군은 합성 구성(synthetic construct) 사용을 보인 최소 46가지 폴리펩티드 변형을 포함한다(Raykhel, J Cell Biol 179: 1193-204 (2007) 참조). 추가의 KDEL 신호 모티프는 ALEDEL(SEQ ID NO:106), HAEDEL(SEQ ID NO:107), HLEDEL(SEQ ID NO:108), KLEDEL(SEQ ID NO:109), IRSDEL(SEQ ID NO:110), ERSTEL(SEQ ID NO:111), 및 RPSTEL(SEQ ID NO:112)을 포함한다(Alanen H et al, J Mol Biol 409: 291-7 (2011) 참조). KDEL 신호 모티프의 대부분을 대표하는 일반적으로 합의된(generalized consensus) 모티프는 [KRHQSA]-[DENQ]-E-L이라고도 한다(Hulo N et al, Nucleic Acids Res 34: D227-30 (2006)참조).

[0143] KDEL군의 신호 모티프를 가진 단백질은 골지복합체 전체에 널리 분포된 KDEL 수용체에 결합되어 세포질그물의

루멘 안에 방출되기 위하여 미세관의존 메커니즘(microtubule-dependent mechanism)으로 세포질그물까지 수송된다(Griffiths G et al, J Cell Biol 127: 1557- 74 (1994); Miesenbock G, Rothman J, J Cell Biol 129: 309-19 (1995) 참조). KDEL 수용체는 골지복합체와 세포질그물 사이를 활발하게 순환한다(Jackson M et al, EMBO J 9: 3153-62 (1990); Schutze M et al, EMBO J 13: 1696-1705 (1994) 참조).

[0144] 본 발명의 목적을 위하여, KDEL군의 개체는 진핵세포 안에서 KDEL 수용체를 통해서 세포질그물로 단백질의 세포 소기관 국소화를 촉진하기 위해 기능하는 합성 신호 모티프를 포함한다. 다시 말해, KDEL군의 몇 개체는 자연적으로 발생하지 않거나 아직 자연에서 발견되지 않았지만 당업계에서 알려진 방법을 사용해 만들어졌거나 만들 수 있고, 실증적으로 입증할 수 있다(Raykhel I et al, J Cell Biol 179: 1193-204 (2007) 참조).

[0145] 본 발명의 특정 구체예의 구성요소로서, KDEL형 시그널 모티프는 카복시말단에 있도록 단백질 내에서 물리적으로 배치, 배향(oriented), 또는 배열되어있다.

[0146] 본 발명의 목적을 위하여, 시가 독소 작동체 영역 및 결합 영역 서로에 관하여, 또는 단백질 전체의 N-말단(N-terminal(s)) 및 C-말단(C-terminal(s))에 있어 특정순서 또는 방향(orientation)은 고정되어있지 않다(도1 참조). 본 발명의 단백질 안에서는, 결합 영역과 시가 독소 작동체 영역은 서로 직접적으로 연결되었거나 당업계에 널리 알려진 하나 또는 여러 개의 링커(linkers)와 같은 두 영역 사이에 오는 하나 또는 여러 개의 폴리펩티드 서열을 통해 연결되었을 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 단백질은 KDEL(SEQ ID NO:60)과 같은 카복시말단 엔도플라스믹(endoplasmic) 잔류/회복 신호 모티프도 포함할 수 있다.

[0147] 본 발명의 단백질의 일반적인 구조는 모듈러식으로, 하나의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 다양한 결합 영역을 사용할 수 있어 다양한 세포의 표적 생체분자를 표적할 수 있게 제공하며, 이는 세포독성, 세포증식억제, 및/또는 다양한 세포종에 외인성 물질 전달을 표적할 수 있게 한다. 잘못된 세포소기관 경로화로 인해 세포독성이 없는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역도 외인성 물질을 전달하는데 쓰일 수도 있다.

[0149] II. 본 발명의 폴리펩티드 구성요소 및/또는 그의 서브컴포넌트(subcomponents)를 연결하는 연쇄(linkages)

[0150] 결합 영역과 시가 독소 작동체 영역(세포독성이거나 그리고/또는 촉매 활성 및/또는 세포독성을 변형하고, 감소 또는 제거하는 하나 또는 여러 개의 돌연변이를 가질 수 있는)과 같은 본 발명의 각각의 폴리펩티드 및/또는 단백질 구성요소는 당업계에 널리 알려진 그리고/또는 여기에 명시된 하나 또는 여러 개의 링커를 통해 서로에게 연결될 수 있다. 중쇄 가변부위(VH), 경쇄 가변부위(VL), CDR, 및/또는 ABR 영역과 같은 결합 영역의 각각의 폴리펩티드 서브컴포넌트는 당업계에 널리 알려진 그리고/또는 여기에 명시된 하나 또는 여러 개의 링커를 통해 서로에게 연쇄될 수 있다(Weisser N, Hall J, Biotechnol Adv 27: 502-20 (2009); Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013) 참조). 다연쇄 결합영역과 같은 본 발명의 단백질 구성요소는 당업계에 널리 알려진 그리고/또는 여기에 명시된 하나 또는 여러 개의 링커를 통해 서로에게 또는 본 발명의 다른 폴리펩티드 구성요소에 연결될 수 있다. KDEL군의 세포질그물 잔류/회복 시그널 모티프와 같은 본 발명의 펩티드 구성요소는 당업계에 널리 알려진 하나 또는 여러 개의 단백질성 링커(proteinaceous linker)와 같은 링커를 통해 본 발명의 다른 구성요소에 연결될 수 있다.

[0151] 적합한 링커는 보통 각각의 본 발명의 폴리펩티드 구성요소가 링커나 다른 요소 없이 개별적으로 생산된 폴리펩티드 구성요소와 아주 유사한 3차원 구조와 결합시키는 것이다. 적합한 링커는 단일 아미노산, 펩티드, 폴리펩티드, 및 측쇄나 고리형의 여러 비-단백질성 탄소사슬(non-proteinaceous carbon chains)와 같은 상기 기술한 것들이 없는 링커를 포함한다(Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013) 참조).

[0152] 접합한 링커는 단백질성일 수도 있으며 하나 또는 여러 개의 아미노산, 펩티드, 및/또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 단백질성 링커는 재조합 융합단백질(recombinant fusion proteins) 및 화학적으로 연결된 결합체 모두에 적합하다. 단백질성 링커는 보통 약 2 내지 50개의 아미노산 잔기를 가지고 있다(예: 약 5 내지 30개 또는 약 6 내지 25개의 아미노산 잔기). 선택된 링커의 길이는 선택한 링커에서 얻고자하는 성질 또는 성질들과 같은 다양한 요인에 의해 결정된다(Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013) 참조).

[0153] 적합한 링커는 화학적 링커와 같이 비단백질성일 수 있다(Dosio F et al, Toxins 3: 848-83 (2011); Feld J et al, Oncotarget 4: 397- 412 (2013) 참조). 당업계에 알려진 여러 비단백질성 링커는 면역글로불린 항체에서 유도된 폴리펩티드를 이종폴리펩티드(heterologous polypeptides)를 연결하는데에 흔히 사용되는 링커와 같이 결합 영역을 시가 독소 작동체 영역에 결합시키는데에 사용할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 영역은 카복시, 아민, 설프하이드릴기(sulfhydryl), 카르복실산, 카르보닐기, 히드록실기, 및/또는 고리형 군(cyclic ring group)과 같은 해당 영역의 아미노산 잔기 및 탄수화물 부분의 기능성 결사슬을 이용하여 연결할 수 있다. 예를 들

어, 이황결합과 티오에테르결합 모두 두 개 혹은 그 이상의 폴리펩티드를 연결하는데에 사용할 수 있다 (Fitzgerald D et al, Bioconjugate Chem 1 : 264-8 (1990); Pasqualucci L et al, Haematologica 80: 546-56 (1995) 참조). 덧붙여, 비천연 아미노산 잔기는 케톤계(ketone group)와 같은 다른 기능성 결사슬과 함께 사용할 수 있다(Sun S et al, Chembiochem Jul 18 (2014); Tian F et al, Proc Natl Acad Sci USA 111 : 1766-71 (2014) 참조). 비단백질성 화학적 링커의 예는 N-석신이미딜(4-아이오택틸)-아미노벤조에이트(N-succinimidyl(4-iodoacetyl)-aminobenzoate), S-(N-석신이미딜)티오아세테이트(S-(N-succinimidyl)thioacetate(SATA)), N-석신이미딜-옥시카보닐- α -메틸- α -(2-파이리딜디티오)톨루엔(N-succinimidyl-oxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluene(SMPT)), N-석신이미딜 4-(2-파이리딜디티오)-펜타노에이트(N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)-pentanoate (SPP)), 석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산 카르복시산염(succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane carboxylate(SMCC 또는 MCC)), 설포석신이미딜(4-아이오택틸)-아미노벤조에이트(sulfosuccinimidyl(4-iodoacetyl)-aminobenzoate), 4-석신이미딜-옥시카보닐- α -(2-파이리딜디티오) 톨루엔(4-succinimidyl-oxycarbonyl- α -(2-pyridyldithio) toluene), 설포석신이미딜-6-(α -메틸- α -(파이리딜디티올)-톨루미도) 헥사노에이트(sulfosuccinimidyl-6-(α -methyl- α -(pyridyldithiol)-toluamido) hexanoate), N-석신이미딜-3-(2-파이리딜디티오)-프로프리오네이트(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate(SPDP)), 석신이미딜 6(3-(2-파이리딜디티오)-프로프리오나미도) 헥사노에이트(succinimidyl 6(3-(2-pyridyldithio)-propionamido) hexanoate), 설포석신이미딜 6(3-(2-파이리딜디티오)-프로피오나미도) 헥사노에이트(sulfosuccinimidyl 6(3-(2-pyridyldithio)-propionamido) hexanoate), 말레이미도카프로일(maleimidocaproyl(MC)), 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카보닐(maleimidocaproyl-valine-citrulline-p-aminobenzyloxycarbonyl(MC-vc-PAB)), 3-말레이미도벤조익산 N-하이드록시석시미드 에스테르(3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester(MBS)), 알파-알킬 유도체(alpha-alkyl derivatives), 설포NHS-ATMBA(설포석신이미딜 N-[3-(아세틸티오)-3-메틸부티릴-베타-알라닌(sulfoNHS-ATMBA(sulfosuccinimidyl N-[3-(acetylthio)-3-methylbutyryl-beta-alanine])), 설포다이콜로르페놀(sulfodichlorophenol), 2-이미노티올레인(2-iminothiolane), 3-(2-파이리딜디티오)-프로피오닐 하이드라지드(3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide), 엘만 시약(Ellman's reagent), 다이클로로트리아지닉산(dichlorotriazinic acid), 및 S-(2-티오피리딜)-L-시스테인(S-(2-thiopyridyl)-L-cysteine)을 포함하지만 이에 제한되어있지 않다(Thorpe P et al, Eur J Biochem 147: 197-206 (1985); Thorpe P et al, Cancer Res 47: 5924-31 (1987); Thorpe P et al, Cancer Res 48: 6396-403 (1988); Grossbard M et al., Blood 79: 576-85 (1992); Lui C et al, Proc Natl Acad Sci USA 93: 8618-23 (1996); Doronina S et al, Nat Biotechnol 21: 778-84 (2003); Feld J et al, Oncotarget 4: 397-412 (2013) 참조).

[0154] 적합한 링커는, 단백질성이든 비단백질성이든, 단백질분해효소 민감성(sensitive), 환경 산화환원전위(environmental redox potential) 민감성, pH 민감성, 산으로 절개 가능(acid cleavable), 빛으로 절개 가능(photocleavable), 및/또는 열 민감성 링커를 포함할 수 있다(Dosio F et al, Toxins 3 : 848-83 (2011); Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013); Feld J et al, Oncotarget 4: 397-412 (2013) 참조).

[0155] 단백질성 링커는 본 발명의 제조합 융합단백질과 혼합하기 위해 선택될 수 있다. 본 발명의 제조합 융합단백질에서는, 링커는 일반적으로 약 2 내지 50개의 아미노산 잔기, 가급적이면 약 5 내지 30개의 아미노산 잔기로 이루어져있다(Argos P, J Mol Biol 211: 943-58 (1990); Williamson M, Biochem J 297: 240-60 (1994); George R, Heringa J, Protein Eng 15: 871-9 (2002); Kreitman R, AAPS J S: E532-51 (2006)). 일반적으로, 단백질성 링커는 트레오닌, 프롤린, 글루타민, 글라이신, 및 알라닌과 같은 극성(polar), 무전하(uncharged), 및/또는 하전 잔기로 아미노산 잔기 대부분을 구성한다(Huston J et al. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 85: 5879-83 (1988); Pastan I et al, Annu Rev Med 58: 221-37 (2007); Li J et al, Cell Immunol 118: 85-99 (1989); Cumber A et al. Bioconj Chem 3: 397-401 (1992); Friedman P et al, Cancer Res 53: 334-9 (1993); Whitlow M et al, Protein Engineering 6: 989-95 (1993); Siegall C et al, J Immunol 152: 2377-84 (1994); Newton et al. Biochemistry 35: 545-53 (1996); Ladurner et al. J Mol Biol 273: 330-7 (1997); Kreitman R et al., Leuk Lymphoma 52: 82-6 (2011); U.S. 4,894,443). 단백질성 링커의 비제한적인 예는 알라닌-세린-글라이신-글라이신-프롤린-글루탐산염(ASGGPE(SEQ ID NO:113)), 발린-메티오닌(VM), 알라닌-메티오닌(AM), AM(G₂에서 S)_xAM(SEQ ID NO:114)(G는 글라이신, S는 세린, 그리고 x는 1에서 10까지의 정수)을 포함한다.

[0156] 단백질성 링커는 얻고자하는 성질에 따라 선택할 수 있다. 단백질성 링커는 하나 또는 여러 개의 융합분자의 폴딩(folding), 안정도, 발현, 용해도, 약동학적인 성질, 약역학적인 성질, 및/또는 융합되지 않은 같은 도메인의 활동과 비교했을 때의 융합된 도메인의 활동을 최적화하는 것과 같은, 특정 기능을 원하는 기술자에게 선택될

수 있다. 예를 들어, 단백질성 링커는 유연성, 경직성, 및/또는 절개할 수 있는가(cleavability)에 따라 선택할 수 있다(Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013) 참조). 기술자는 링커를 선택할 때 데이터베이스 및 링커 디자인 소프트웨어 도구를 사용할 수 있다. 특정 링커는 발현을 최적화하기 위해 선택될 수 있다(Turner D et al, J Immunol Methods 205: 43-54 (1997) 참조). 특정 링커는 동질다합체를 형성하기 위해 동일한 폴리펩티드 또는 단백질 사이의, 또는 이질다합체를 형성하기 위해 다른 폴리펩티드 또는 단백질 사이의 상호작용을 촉진하기 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 단백질성 링커는 이합체(dimer) 및 더 고차(higher order)의 중합체 형성에 관련된 상호작용과 같이 의도하는 본 발명의 단백질의 폴리펩티드 구성요소 사이의 비공유 상호작용(non-covalent interactions)을 감안하여 선택될 수 있다(U.S. 4,946,778 참조).

[0157] 유연한 단백질성 링커는 보통 12 아미노산 잔기보다 더 길며, 글라이신, 세린, 및 트레오닌과 같은 작은, 비극성 아미노산 잔기, 극성 아미노산 잔기, 및/또는 친수성 아미노산 잔기가 풍부하다(Bird R et al, Science 242: 423-6 (1988); Friedman P et al, Cancer Res 53: 334-9 (1993); Siegall C et al, J Immunol 152: 2377-84 (1994) 참조). 유연한 단백질성 링커는 구성요소들 사이의 공간 분리(spatial separation)를 증가를 위해 그리고/또는 구성요소 사이에 분자내(intramolecular) 상호작용을 감안하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 여러 "GS" 링커는 숙련된 기술자에게 알려져 있으며 다수의 글라이신 및/또는 하나 또는 그 이상의 세린, 때로는 $(G_xS)_n$ (SEQ ID NO:115), $(S_xG)_n$ (SEQ ID NO:116), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:117), and $(G)_n$ (SEQ ID NO:118) (여기서 x는 1에서 6, n은 1 내지 30)와 같은 반복된 유닛으로 구성되어있다(WO 96/06641 참조). 유연한 단백질성의 링커의 비제한적인 예로는 GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:119), GSTSGSGKSSEGGK (SEQ ID NO:120), GSTSGSGKSSEGGSTKG (SEQ ID NO:121), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:122), EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO:123), SRSSG (SEQ ID NO:124), 및 SGSSC (SEQ ID NO:125)가 있다.

[0158] 경직된(rigid) 단백질성 링커는 보통 뺏뺏한 알파-나선형(alpha-helical) 구조물이며 프롤린 잔기 및/또는 하나 또는 그 이상의 전략적으로 배치된(strategically placed) 프롤린이 풍부하다(Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013) 참조). 경직된 링커는 연결된 구성요소 사이에 분자내 상호작용을 방지하기 위해 선택될 수 있다.

[0159] 적합한 링커는 예를 들어, 절개 및/또는 환경 특정(environment-specific) 불안정과 같은 이유의 생체내에서 구성요소 분리(in vivo separation)를 감안하여 선택될 수 있다(Dosio F et al, Toxins 3: 848-83 (2011); Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013) 참조). 생체내에서 절개 가능한(in vivo cleavable) 단백질성 링커는 생물체 내의 특정 위치 또는 특정 세포 내에서 단백질분해 과정(proteolytic processing)을 통해서 그리고/또는 주변에 환원 반응(reducing environment)을 일으켜 결합을 푸는 것이 가능하다(Doronina S et al, Bioconjug Chem 17: 144-24 (2006); Erickson H et al, Cancer Res 66: 4426-33 (2006) 참조). 생체내에서 절개 가능한 단백질형 링커는 보통 단백질분해효소 민감성 모티프 및/또는 하나 또는 그 이상의 시스테인 쌍(pair)이 형성한 이황결합을 포함한다(Pietersz G et al., Cancer Res 48: 4469-76 (1998); The J et al, J Immunol Methods 110: 101-9 (1998); Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013) 참조). 생체내에서 절개 가능한 단백질형 링커는 생물체 내의, 세포 내 구간의 특정 위치에만 존재하는 단백질분해효소에 반응하게, 그리고/또는 특정 생리적인 또는 병리학적인 상태에서만 활성화 되도록(예를 들어, 비정상적으로 높은 수치를 가진 단백질분해효소(proteases with abnormally high levels), 특정 질병 위치에서 이상발현한(overexpressed) 단백질분해효소, 및 병원성 미생물에 특이 발현한 단백질분해효소) 디자인할 수 있다. 예를 들어, 당업계에 알려진 단백질성 링커중에는 R-x-x-R 모티프 및 AMGRSGGGCAGNRVGSSLSGGLNLQAM (SEQ ID NO:126)와 같이 세포내에만 존재하는 단백질분해효소, 특정 세포종에만 존재하는 단백질분해효소, 및 암 또는 염증과 같은 병리학적인 상태에만 존재하는 단백질분해효소에 의해 절개된 링커도 있다.

[0160] 본 발명의 단백질의 몇몇 구체예에서는, 단백질분해효소에 반응하는 부분 하나 또는 여러 개를 포함한 링커는 표적 세포 내에 단백질분해효소에 의한 절개를 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 단백질의 몇몇 구체예에서는, 절개되지 않는 링커는 척추 동물에게 투여 후 원치않는 독성효과를 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[0161] 적합한 링커는 단백질성이든 비단백질성이든, 단백질분해효소 민감성, 환경 산화환원전위 민감성, pH 민감성, 산으로 절개 가능, 빛으로 절개 가능, 및/또는 열 민감성 링커를 포함할 수 있다(Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013) 포함).

[0162] 적합한 절개가능 링커는 다음과 같은 당업계에 알려진 절개 가능한 군을 포함한 링커를 포함한다(Zarling D et al, J Immunol 124: 913-20 (1980); Jung S, Moroi M, Biochem Biophys Acta 761 : 152-62 (1983); Bouizar Z et al, Eur J Biochem 155: 141-7 (1986); Park L et al, J Biol Chem 261: 205-10 (1986); Browning J,

Ribolini A, J Immunol 143: 1859-67 (1989); Joshi S, Burrows R, J Biol Chem 265: 14518-25 (1990)).

- [0163] 적합한 링커는 pH 민감성 링커를 포함할 수 있다. 예를 들어, 적합한 특정 링커는, 표적 세포의 세포소기관 내 구간(subcellular compartment) 안에서 분리(dissociation)를 위해 낮은 pH 상태에서의 그의 불안정성(instability) 때문에 선택될 수 있다. 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 트리틸기, 유도된(derivatized) 트리틸기, 비스말레이미디오탁시 프로판기(bismaleimideothoxy propane groups), 아디픽산 디하이드라자이드기(adipic acid dihydrazide groups), 및/또는 산 분해성 트랜스페린기(acid labile transferrin groups)를 포함하는 링커는 본 발명의 단백질의 구성요소(예: 특정 pH 범위 안에 있는 폴리펩티드 요소) 분리(release)가 가능하게 할 수도 있다(Weltoner H et al, J Biol Chem 266: 4309-14 (1991); Fattom A et al, Infect Immun 60: 584-9 (1992) 참조). 선택된 특정 링커는 종양 조직의 pH는 건강한 조직의 pH보다 낮은 것과 같이 세포조직 간의 생리학적인 pH 차이와 일치하는 pH 범위에서 절개된 것 일수도 있다(U.S. 5,612,474 참조).
- [0164] 빛으로 절개가능한 링커는 가시거리 내의 빛과 같이 특정 파장 범위 내의 전자기 방사선 노출에 의하여 절개된 링커이다(Goldmacher V et al, Bioconj Chem 3: 104-7 (1992) 참조). 빛으로 절개가능한 링커는 특정 파장 범위 내의 빛에 노출시켜 폴리펩티드 요소와 같은 본 발명의 단백질의 구성요소 분리에 사용될 수 있다. 빛으로 절개가능한 링커의 비제한적인 예는 시스테인을 위한 빛 절개가능 보호원자단(photocleavable protective group)으로서의 나이트로벤질기(nitrobenzyl group), 나이트로벤질옥시카보닐 염화물 교차연계자(nitrobenzyloxycarbonyl chloride cross-linkers), 하이드록시프로필메타크릴아마이드 공중합체(hydroxypropylmethacrylamide copolymer), 글라이신 공중합체, 플루오레세인 공중합체, 및 메틸로다민 공중합체(methylrhodamine copolymer)를 포함한다(Hazum E et al, Pept Proc Eur Pept Symp, 16th, Brunfeldt K, ed., 105-110 (1981); Senter et al, Photochem Photobiol 42: 231-7 (1985); Yen et al, Makromol Chem 190: 69-82 (1989); Goldmacher V et al, Bioconj Chem 3: 104- 7 (1992) 참조). 빛으로 절개가능한 링커는 광섬유를 사용해 빛에 노출시킬 수 있는 질병, 장애, 및 질환을 치료하기 위해 설계된 본 발명의 단백질을 형성하기 위해 구성요소를 연결하는 특정한 사용법을 가지고 있을 수 있다.
- [0165] 본 발명의 단백질의 몇몇 구체예에서는, 결합 영역은 공유 및 비공유 연쇄(covalent and noncovalent linkages)를 포함한 기술자에게 알려진 많은 방법으로 시가 독소 작동체 영역에 연결되어있다(Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013); Behrens C, Liu B, MAbs 6: 46-53 (2014) 참조).
- [0166] 본 발명의 단백질의 몇몇 구체예에서는, 단백질은 중쇄 가변(heavy chain variable (VH)) 도메인 및 경쇄 가변(light chain variable (VL)) 도메인이 링커로 연결된 scFv인 결합 영역을 포함한다. 당업계에는 15-잔기(residue) (Gly4Ser)₃ 펩티드(SEQ ID NO:127)와 같은 이 용도를 위한 여러 링커가 알려져 있다. 비공유 다가 구조(non-covalent multivalent structures)를 생성하는데에 적합한 scFv 링커는 GGS, GGGs(SEQ ID NO:128), GGGGS(SEQ ID NO:129), GGGSGGG(SEQ ID NO:130), GSGGGG(SEQ ID NO:131), GSTSGGGSGGGSGGGSS(SEQ ID NO:132), 및 GSTSGSGKPGSSEGSTKG(SEQ ID NO:133)를 포함한다(Pluckthun A, Pack P, Immunotechnology 3: 83-105 (1997); Atwell J et al, Protein Eng 12: 597-604 (1999); Wu A et al, Protein Eng 14: 1025-33 (2001); Yazaki P et al, J Immunol Methods 253 : 195- 208 (2001); Carmichael J et al, J Mol Biol 326: 341-51 (2003); Arndt M et al, FEBS Lett 578: 257-61 (2004); Bie C et al, World J Hepatol 2: 185-91 (2010)).
- [0167] 본 발명의 단백질의 구성요소 연쇄에 적합한 방법은 연결이 여기에 설명된 분석을 포함한 적절한 분석으로 측정된 결합 영역의 결합 기능, 단백질의 세포 내재화, 및/또는 얻고자하는 시가 독소 작동체 영역의 독소 작동체 기능을 크게 저해하지 않는다면, 현재 당업계에 알려진 방법 어느 것이라도 사용할 수 있다.
- [0168] 본 발명의 목적을 위하여, 시가 독소 작동체 영역과 세포 표적 결합 영역은 서로에게, 또는 단백질 전체에 관하여 특정순서 또는 방향이 고정되어있지 않다(도1 참조). 본 발명의 폴리펩티드와 단백질의 구성요소는 얻고자하는 결합 영역과 시가 독소 작동체 영역의 활동이 제거되지 않는다면 아무 순서로든 배열할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드와 단백질의 상기 구체예에서는, 결합 영역, 시가 독소 작동체 영역(세포독성의 그리고/또는 촉매활성 및/또는 세포독성을 감소 또는 제거하는 돌연변이 하나 혹은 그 이상 가지고 있을 수 있는), 및 세포표지물질 잔류/회복 신호 모티프는 서로와 직접적으로 연쇄되었거나, 당업계에 널리 알려진 그리고/또는 여기에 명시된 하나 또는 여러 개의 링커와 같은, 그들 사이에 오는 하나 또는 여러 개의 폴리펩티드 서열을 통하여 적절하게 연쇄되었을 수 있다.
- [0170] III. 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및 단백질의 특이 구조적 변화(Specific Structural

Variations) 실시예

- [0171] 원칙적으로는, 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 만들기 위해서는 제공된 항원결정기 영역 안의 아무 아미노산이 제거, 삽입, 도치, 재배열, 치환, 및 결사슬 화학적 변형과 같은 여러 방법으로 교란될 수 있다. 하지만, 특정 교란을 사용하여 특정 아미노산 및 폴리펩티드 영역을 교란시키는 편이 시가 독소 작동체 기능을 유지하면서 항원성 및/또는 면역원성을 감소시키는 것에 성공할 가능성이 더 크다. 예를 들어, 말단 절단 및 내부의 (internal) 아미노산 치환은 시가 독소 작동체 영역의 전체적인 아미노산 간격을 유지하기 때문에 시가 독소 작동체 기능이 유지될 가능성이 더 높아 선호하는 방법이다.
- [0172] 본 발명의 몇몇 구체예 중에서는, 폴리펩티드는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함되어있고, 최소 하나의 아미노산이 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 제공되는 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 교란된 SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)의 아미노산 75 내지 251만을 포함하거나 또는 이들을 포함하여 구성되어 있다. 본 발명의 다른 몇몇 구체예에서는, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함된 폴리펩티드는 최소 하나의 아미노산이 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 제공되는 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 교란된 SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)의 아미노산 1 내지 241로부터 유도되었다. 본 발명의 다른 구체예에서는, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함된 폴리펩티드는 최소 하나의 아미노산이 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 제공되는 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 교란된 SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)의 아미노산 1 내지 251로부터 유도되었다. 본 발명의 다른 구체예에서는, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에 포함된 폴리펩티드는 최소 하나의 아미노산이 실시예(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 제공되는 선천적으로 배치된 항원결정기 영역에서 교란된 SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)의 아미노산 1 내지 261로부터 유도되었다.
- [0173] 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 만드는데에 사용될 수 있는 내부의 아미노산 치환은 많고 다양하다.
- [0174] 항원결정기 영역 내에서 사용할 수 있는 아미노산 치환 중에서 다음의 아미노산 잔기 치환체는 항원결정기의 항원성 및/또는 면역원성을 감소시킬 가능성이 가장 크다: G, D, E, S, T, R, K, 및 H. 글라이신을 제외하고, 이 잔기들은 모두 극성 및/또는 하전된 잔기에 해당한다.
- [0175] 치환 가능한 모든 아미노산 중에서도 아미노산 A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, 및 K는 치환되는 아미노산에 따라 주요 시가 독소 작동체 기능을 유지하며 항원성 및/또는 면역원성을 감소시킬 가능성이 가장 큰 것으로 예측된다. 일반적으로, 치환은 극성 및/또는 하전된 아미노산 잔기를 비극성 및 무전하 잔기로 바꾼다. 덧붙여, 아미노산 잔기의 R기 결사슬의 작용기(R-group functional side chain)의 전체적인 크기 및/또는 길이를 줄이는 것이 항원결정기 교란에 이로울 수 있다. 예를 들어, 알라닌은 일반적으로 모든 아미노산 잔기 및 글라이신 잔기의 적당한 치환체이며, 선호되는 선택지이다. 세린은 일반적으로 글루탐산염 잔기의 치환체로서만 사용할 수 있다. 아스파라진산염은 일반적으로 글루탐산염 잔기의 치환체로서만 사용할 수 있다. 라이신은 일반적으로 아르지닌 잔기의 치환체로서만 사용할 수 있다. 글루타민은 일반적으로 글루탐산염, 라이신, 또는 아르지닌 잔기의 치환체로서만 사용할 수 있다. 히스티딘은 일반적으로 라이신 및 아르지닌 잔기의 치환체로서만 사용할 수 있다. 하지만 주요 시가 독소 작동체 기능(들)을 보존하는 것이 목표이기 때문에, 이러한 항원결정기 교란을 일으킬 가능성이 높은 치환 일반론에 불구하고, 극성 및/또는 하전된 잔기를 비슷한 크기의 비극성 및/또는 무전하 잔기로 치환하듯, 아미노산 치환체가 치환되는 아미노산과 유사하면 시가 독소 작동체 기능(들)이 보존될 확률이 높다.
- [0176] 실시예의 실증적인 증거(empirical evidence)에 의하면, 시가 독소의 A 서브유닛의 특정 아미노산 위치는 시가 독소 작동체 기능을 유지하며 항원결정기 교란을 용인하는 것으로 예측된다. 예를 들어, 다음의 자연적으로 발생하는 위치들은 세포 독성과 같은 시가 독소 작동체 기능(들)을 유지하며 단독으로 또는 결합하여 아미노산 치환을 용인했다: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또

는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 187; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 286.

[0177] 실시예의 실증적 데이터는 상기 명시된 절단 및 치환을 용인하는 위치의 새로운 조합, 관련된 시가 독소의 동일한 위치 또는 보존된 위치에서의 새로운 치환과 같은, 주요 시가 독소 작동체 기능을 유지하며 항원성 및/또는 면역원성을 감소시키는 다른 항원결정기 교란 치환 및 항원결정기 교란 치환 조합을 가리킨다.

[0178] 보존 작용기(conservative functional group)의 아미노산 잔기의 다른 아미노산 치환도 주요 시가 독소 작동체 기능을 유지하며 항원성 및/또는 면역원성을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, K1M, T4I, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, S33I, S45I, T45I, D47G, N48V, N48F, L49A, D53A, D53G, D53N, R55A, R55V, R55L, D58A, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, S109V, T109V, G110A, S112V, G147A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, R204A, R205A, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, D264A, G264A, T286A 및/또는 T286I와 유사한 기술자에게 알려진 다른 치환체도 시가 독소 작동체 기능을 유지하며 항원결정기를 교란할 수 있다. 특히, K1M, T4I, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, S33I, S45I, T45I, D47G, N48V, N48F, L49A, D53A, D53G, D53N, R55A, R55V, R55L, D58A, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, S109V, T109V, G110A, S112V, G147A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, R204A, R205A, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, D264A, G264A, T286A 및/또는 T286I와 유사한 보존성 아미노산 잔기의 아미노산 치환체도 동일한 또는 유사한 효과가 있을 수 있다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 K1에서 A, G, V, L, I, F, M 및 H로; T4에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로; S8에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; T9에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S로; S9에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; K1 1에서 A, G, V, L, I, F, M 및 H로; S33에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; S45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; T45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; D47에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; N48에서 A, G, V, L, 및 M으로; L49에서 A 또는 G로; D53에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; R55에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; D58에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; P59에서 A, G, 및 F로; E60에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R으로; E61에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R으로; G62에서 A로; D94에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; S96에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; S109에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; T109에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S로; G110에서 A로; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; G147에서 A로; R179에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; T180에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로; T181에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로; D183에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; D184에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; S186에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; G187에서 A로; R188에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; S189에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; R204에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; R205에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; S247에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; Y247에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; R248에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; R250에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; R251에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; D264에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; G264에서 A로; 및 T286에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S와 유사한 보존성 아미노산 치환체를 포함할 수 있다.

[0179] 유사하게는, 전하와 극성을 제거하거나, 그리고/또는 결사슬 길이를 줄이는 아미노산 치환은 최소 하나의 시가 독소 작동체 기능을 유지하고 항원결정기를 교란시킬 수 있다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, 또는 K군에서 선택된 적합한 아미노산을 아미노산 잔기 위치 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ

ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 187; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 286으로 치환하는 것과 같은, 결사슬 전하 제거, 극성 제거, 및/또는 결사슬 길이 축소와 같은 치환으로 교란된 하나 또는 다수의 항원결정기를 포함할 수 있다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 다음의 하나 또는 다수의 아미노산 치환체를 포함할 수 있다: K1에서 A, G, V, L, I, F, M 및 H로; T4에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로; S8에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; T9에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S로; S9에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; K1 1에서 A, G, V, L, I, F, M 및 H로; S33에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; S45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; T45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; D47에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; N48에서 A, G, V, L, 및 M으로; L49에서 A 또는 G로; D53에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; R55에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; D58에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; P59에서 A, G, 및 F로; E60에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R으로; E61에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R으로; G62에서 A로; D94에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; S96에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; S109에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; T109에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S로; G110에서 A로; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; G147에서 A로; R179에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; T180에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로; T181에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로; D183에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; D184에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; S186에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; G187에서 A로; R188에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; S189에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; R204에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; R205에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; S247에서 A, G, V, I, L, F, 및 M으로; Y247에서 A, G, V, L, I, F, 및 M으로; R248에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; R250에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; R251에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H로; D264에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q로; G264에서 A로; 및 T286에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S.

[0180] 추가로, 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 항원결정기 영역 하나 안에서 주요 시가 독소 작동체 기능을 유지하며 항원결정기를 교란하는 모든 아미노산 치환은 주요 시가 독소 작동체 기능을 유지하며 항원결정기를 교란하는 동일한 또는 다른 항원결정기 영역에서의 다른 아미노산 치환과 결합하여, 상당한 수준의 시가 독소 작동체 기능을 유지하며 다수의 항원결정기 영역이 교란된 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 다음의 조합을 하나 또는 다수 포함할 수 있다: K1M은 S8I, T9I, K11A, S33I, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G264A, G265A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; S8I는 K1M, T9I, K11A, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G264A, G265A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; T9I는 K1M, S8I, K11A, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G264A, G265A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; S9I는 K1M, S8I, T9I, K11A, S33I, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G264A, G265A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; K11A는 K1M, S8I, T9I, K11A, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A,

[illegible]

G264A, G265A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; R204A는 K1M, S8I, T9I, K11A, S33I, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R205A, S247I, D264A, G264A, G265A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; R205A는 K1M, S8I, T9I, K11A, S33I, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, S247I, D264A, G264A, G265A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; S247I는 K1M, S8I, T9I, K11A, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, D264A, G264A, G265A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; D264A는 K1M, S8I, T9I, K11A, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, G264A, G265A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; G264A는 K1M, S8I, T9I, K11A, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G265A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; G265A는 K1M, S8I, T9I, K11A, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G264A, 및/또는 T286I와 결합할 수 있다; 및/또는 T286I는 K1M, S8I, T9I, K11A, S45I, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G264A, 및/또는 G265A와 결합할 수 있다.

[0181] 실시예의 실증적인 증거에 의하면, 시가 독소의 A 서브유닛의 특정 아미노산 영역은 주요 시가 독소 작동체 기능을 유지하며 항원결정기 교란을 용인하는 것으로 예측된다. 예를 들어, 1-15, 53-66, 55-66, 94-115 및 180-190에 선천적으로 배치된 항원결정기 영역은 시가 독소의 효소 활동과 세포독성을 잃지 않고 그와 동시에 복수의 아미노산 치환 조합을 용인했다(실시예 참조).

[0182] 세포 표적 결합 영역과 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드의 연결은 포유 동물(예: 인체)에 투여했을 때 잠재적인(potential) 항원성 및/또는 면역원성에 의한 부작용을 줄이기 위한 강한 시가 독소 세포독성의 세포종 특이 표적 가공을 가능하게 한다. 본 발명의 단백질은 세포 표면에서 발현한 표적 생체분자와 같이 최소 하나의 세포의 표적 생체분자와 물리적으로 특이 결합을 할 수 있는 결합 영역과 연결된 시가 독소군의 개체의 A 서브유닛으로부터 유도된 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 포함한다. 이 일반적인 구조는 많은, 다양한 세포 표적 결합 영역이 본 발명의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 연결될 수 있는 모듈러식이다.

[0183] 본 발명의 몇몇 구체예 중에서는, 단백질은 암세포에 발현이 제한된, 암세포의 세포 표면에 있는 표면항원과의 특이 및 고친화성 결합을 위해 선택된 면역글로불린형 폴리펩티드로부터 유도된 결합영역을 포함한다(Glokler J et al, Molecules 15: 2478-90 (2010); Liu Y et al, Lab Chip 9: 1033-6 (2009) 참조). 본 발명의 다른 몇몇 구체예에 준거하여, 결합 영역은 암세포의 세포 표면에 있는, 비암세포(non-cancer cells)에 비해 암세포에 이상발현 또는 우선적으로 발현(preferentially expressed)한 표면항원과의 특이 및 고친화성 결합을 위해 선택된다. 대표적인 표적 생체분자 몇은 다음에 열거된 암 및/또는 특정 면역 세포종과 관련된 표적을 포함하지만 이에 제한되어 있지 않다.

[0184] 선행기술에는 암세포와 관련된 항원결정기를 인식하는 많은 면역글로불린형 결합 영역이 있는데, 예를 들어 아넥신 A1, B3 흑색종 항원, B4 흑색종 항원, CD2, CD3, CD4, CD20(B-림프구 항원 단백질 CD20), CD22, CD25(인터루킨-2 수용체(interleukin-2 receptor IL2R)), CD30(TNFRSF8), CD38(사이클릭 에디피 라이보스 하이드롤레이스(cyclic ADP ribose hydrolase)), CD44(히알루론산 수용체), ITGAV (CD51), CD66, CD71(트랜스페린 수용체), CD73, CD74(HLA-DR 항원관련 불변 사슬(antigens-associated invariant chain)), CD79, CD98, 엔도글린(END, CD105), CD106(VCAM-1), 케모카인 수용체 타입 4(CDCR-4, 퓨신(fusin), CD184), CD200, 인슐린유사성장인자 1 수용체(CD221), 뮤신 1(mucin 1)(MUC1, CD227), 기저세포 부착분자(B-CAM, CD239), CD248(엔도시알린(endosialin), TEM1), 종양괴사인자 수용체 10b(TNFRSF10B, CD262), 종양괴사인자 수용체 13B(TNFRSF13B, TACI, CD276), 혈관내피성장인자 수용체 2(KDR, CD309), 상피세포 부착분자(EpCAM, CD326), 인간 표피성장인자 수용체 2(HER2, Neu, ErbB2, CD340), 암 항원 15-3(CA15-3), 암 항원 19-9(CA 19-9), 암 항원 125(CA125, MUC16), CA242, 암배아항원-관련(carcinoembryonic antigen-related) 세포 부착분자(예: CEACAM3 (CD66d) and CEACAM5), 암배아항원 단백질(CEA), 콘드로이틴황산염 프로테오글리칸 4(CSP4, MCSP, NG2), CTLA4, DLL4, 표피성장인자(EGFR, ErbB1), 엽산염 수용체(FOLR), G-28, 강글리오시드 GD2, 강글리오시드 GD3, HLA-Dr10, HLA-

DRB, 인간 표피성장인자 수용체 1(HER1), 에프린(ephrlin) 타입-B 수용체 2(EphB2), 상피세포 부착분자(EpCAM), 섬유모세포 활성화 단백질(fibroblast activation protein)(FAP/세프라세(seprase)), 인슐린유사성장인자 1 수용체(IGF1R), 인터루킨 2 수용체(IL-2R), 인터루킨 6 수용체(IL-6R), 인테그린 알파-V 베타-3(integrins alpha-V beta-3)($\alpha v \beta_3$), 인테그린 알파-V 베타-5($\alpha v \beta_5$), 인테그린 알파-5 베타-1($\alpha_5 \beta_1$), L6, MPG, 흑색종관련 항원 1 단백질(melanoma-associated antigen 1 protein)(MAGE-1), 흑색종관련 항원 3(MAGE-3), 메소텔린(mesothelin)(MSLN), MPG, MS4A, p21, p97, 폴리오 바이러스 수용체 유사 4(polio virus receptor-like 4)(PVRL4), 단백질분해효소 활성화 수용체(protease-activated-receptors)(예: PAR1), 전립선 특이 막 항원 단백질(prostate-specific membrane antigen protein)(PSMA), 영양막 당단백질(TPGB), 및 종양-관련 칼슘 신호 변환기(tumor-associated calcium signal transducers)(TACSTDs)를 표적하는 결합 영역이 있다(Lui B et al., Cancer Res 64: 704-10 (2004); Novellino L et al, Cancer Immunol Immunother 54: 187-207 (2005); Bagley R et al, Int J Oncol 34: 619-27 (2009); Gerber H et al, mAbs 1: 247-53 (2009); Beck A et al, Nat Rev Immunol 10: 345-52 (2010); Andersen J et al, J Biol Chem 287: 22927-37 (2012); Nolan-Stevaux O et al, PLoS One 7: e50920 (2012); Rust S et al., Mol Cancer 12: 11 (2013) 참조). 이 표적 생체분자 목록은 비제한적이다. 숙련자라면 어떤 암세포 혹은 다른 특정 세포종과 관련된 표적 생체분자라도 본 발명의 단백질을 생성하기 위해 시가 독소 작동체 영역과 결합할 결합 영역을 설계 또는 선택하는데에 사용할 수 있다.

[0185] 암세포 및 그들을 결합하는 것으로 알려진 면역글로불린형 결합 영역과 강하게 연관된(associated) 다른 표적 생체분자의 예로는 BAGE 단백질(B 흑색종 항원), 기저세포 부착분자(BCAM 또는 루터란 혈액군 당단백질(Lutheran blood group glycoproteins)), 방광 종양 항원(BTA), 암 테스트스(cancer-testis) 항원 NY-ESO-1, 암 테스트스 항원 LAGE 단백질, CD19(B-림프구 항원 단백질 CD19), CD21(보체 수용체-2 또는 보체 3d 수용체(complement receptor-2 or complement 3d receptor)), CD26(디펩티딜펩티드가수분해효소-4(dipeptidyl peptidase-4)), DPP4, 또는 아데노신탈아미노효소 복합단백질 2(adenosine deaminase complexing protein 2)), CD33(시알산-결합 면역글로불린형 력틴-3(sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin-3)), CD52(CAMPATH-1 항원), CD56, CS1(SLAM군 7번(SLAM family number 7) 또는 SLAMF7), 세포 표면 A33 항원 단백질(gpA33), 엡스테인-바 바이러스 항원 단백질, GAGE/PAGE 단백질(흑색종 관련 암/테스티스 항원), 간세포성장인자 수용체(HGFR 또는 c-Met), MAGE 단백질, T-세포 1 단백질이 인식하는 흑색종 항원(melanoma antigen recognized by T-cells 1 protein)(MART-1/MelanA, MARTI), 뮤신(mucins), 흑색종의 특이 발현된 항원(Preferentially Expressed Antigen of Melanoma)(PRAME) 단백질, 전립선특이항원 단백질(PSA), 전립선 줄기세포 항원 단백질(PSCA), 최종당화산물의 수용체(Receptor for Advanced Glycation Endproducts(RAGE)), 종양-관련 당단백질 72(TAG-72), 혈관내피성장인자 수용체(VEGFRs), 및 윌름스종양 항원이 있다.

[0186] 암세포와 강하게 연관된 다른 표적 생체분자의 예로는 탄산탈수효소 IX(CA9/CAIX), 클라우딘(Claudin) 단백질(CLDN3, CLDN4), 에프린 A형 수용체3(ephrlin type-A receptor 3(EphA3)), 엽산 결합(folate binding) 단백질(FBP), 강글리오시드 GM2, 인슐린유사성장인자 수용체, 인테그린(예: CD11a-c), 핵인자 카파 B 수용체 활성화제(receptor activator of nuclear factor kappa B(RANK)), 타이로신-단백질 인산화효소 수용체(receptor tyrosine-protein kinase) erB-3, 종양괴사인자 수용체 10A(TRAIL-R1/DR4), 종양괴사인자 수용체 10B(TRAIL-R2), 테나신 C, 및 CD64(Fc γ RI)가 있다(Hough C et al, Cancer Res 60: 6281-7 (2000); Thepen T et al, Nat Biotechnol 18: 48-51 (2000); Pastan I et al, Nat Rev Cancer 6: 559-65 (2006); Pastan, Annu Rev Med 58: 221-37 (2007); Fitzgerald D et al, Cancer Res 71: 6300-9 (2011); Scott A et al, Cancer Immun 12: 14-22 (2012) 참조). 이 표적 생체분자 목록은 비제한적이다.

[0187] 그리고 또한, 다음과 같은 다른 표적 생체분자 예가 많다: ADAM 금속단백분해효소(ADAM metalloproteinases)(예: ADAM-9, ADAM-10, ADAM-12, ADAM-15, ADAM-17), ADP-리보실전달효소(ribosyltransferases)(ART1, ART4), 항원 F4/80, 골수 간질(stroma) 항원(BST1, BST2), 줄단점군영역-c-abl 종양유전자(break point cluster region-c-abl oncogene(BCR-ABL)) 단백질, C3aR(보체 성분 3a 수용체), CD7, CD13, CD14, CD15(루이스 X(Lewis X) 또는 단계특이 배아 항원 1(stage-specific embryonic antigen 1)), CD23(FC 엡실론 RII), CD49d, CD53, CD54(세포내 부착분자 1), CD63(테트라스팬닌(tetraspanin)), CD69, CD80, CD86, CD88(보체 성분 5a 수용체 1), CD115(집락자극인자 1 수용체), CD123(인터루킨-3 수용체), CD129(인터루킨 9 수용체), CD183(케모카인 수용체 CXCR3), CD191(CCR1), CD193(CCR3), CD195(케모카인 수용체 CCR5), CD203c, CD225(인터페론-유도 막관통단백질 1(interferon-induced transmembrane protein 1)), CD244(자연살해세포 수용체 2B4), CD282(톨-유사(toll-like) 수용체 2), CD284(톨-유사 수용체 4), CD294 (GPR44), CD305(백혈구-관련 면역글로불린-유사(leukocyte-associated immunoglobulin-like) 수용체 1), 에프린(ephrlin) 타입-A

수용체 2(EphA2), FcεRIa, 갈렉틴-9(galectin-9), 알파태아단백질(alpha-fetoprotein) 항원 17-A1 단백질, 인간 아스파르틸(아스파라지닐(asparaginyl)) 베타-수산화효소(human aspartyl beta-hydroxylase(HAAH)), 면역글로불린유사 전사(immunoglobulin-like transcript) ILT-3, 라이소포스페이트글리세롤 아실기전이효소 1(lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1)(LPGAT1/IAA0205), 용해소체-관련(lysosome-associated) 막 단백질(CD107과 같은 LAMP), 멜라닌세포 단백질 PMEL(gp100), 골수성-관련(myeloid-related) 단백질-14(mrp-14), 타이로신-단백질 인산화효소 수용체 erbB-3, SART 단백질, 청소제수용체(예를 들어 CD64 및 CD68), 시글렉(시알산-결합 면역글로불린형 렉틴(sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins)), 신데칸(syndecans)(예를 들어 SDC1 또는 CD138), 티로시나제, 티로시나제-관련 단백질 1(tyrosinase-related protein 1(TRP-1)), 티로시나제-관련 단백질 2(TRP-2), 티로시나제 연관 항원(tyrosinase associated antigen(TAA)), APO-3, BCMA, CD2, CD3, CD4, CD8, CD18, CD27, CD28, CD29, CD41, CD49, CD90, CD95(Fas), CD103, CD104, CD134(OX40), CD137(4-1BB), CD152(CTLA-4), 케모카인 수용체, 보체 단백질, 시토카인 수용체, 조직적합성 단백질, ICOS, 인터페론-알파(interferon-alpha), 인터페론-베타(interferon-beta), c-myc, 오스테오프로테그린(osteoprotegerin), PD-1, RANK, TACI, TNF 수용체 상과의 개체(superfamily member)(TNF-R1, TNFR-2), Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, 및 TRAIL-R4(표적 생체분자는 Scott A et al, Cancer Immunity 12: 14 (2012); Cheever M et al, Clin Cancer Res 15: 5323-37 (2009) 참조), 그리고 여기에 명시된 표적 생체분자는 비제한적인 예임을 주의할 것). 숙련자라면 원하는 어떤 표적 생체분자라도 본 발명의 단백질을 생성하기 위해 시가 독소 작동체 영역과 결합할 결합 영역을 설계 또는 선택하는데에 사용할 수 있다.

[0188] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 결합 영역은 면역체계의 세포종의 세포 표면과의 특이 및 고친화성 결합을 위해 선택된 면역글로불린형 폴리펩티드만을 포함하거나 또는 이들을 포함하여 구성된다. 예를 들어, 면역글로불린형 결합 도메인은 CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11, CD12, CD13, CD14, CD15, CD16, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD40, CD41, CD56, CD61, CD62, CD66, CD95, CD117, CD123, CD235, CD146, CD326, 인터루킨-2 수용체(IL-2R), 핵인자 카파 B 수용체 활성화제(RANKL), SLAM-관련 단백질(SAP), 및 TNFSF18(종양 괴사인자 리간드 18 또는 GITRL)과 결합하는 것으로 알려져 있다.

[0189] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 탈면역된 세포독성 단백질은 아미노산 SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, 또는 SEQ ID NO:56만을 포함하거나 또는 이들을 포함하여 구성된다. 이러한 탈면역된 CD20-결합(binding) 세포독성 단백질의 구체예는 골암(골육종), 백혈병, 림프종, 흑색종, 골수종, 아밀로이드증, 강직척추염, 천식, 크론병, 당뇨병, 이식편거부반응, 이식편대숙주병, 하시모토 갑상선염, 용혈요독증후군, HIV-관련 질병들, 전신성홍반성 루푸스(lupus erythematosus), 다발경화증, 다발동맥염, 건선, 건선성 관절염, 류마티스 관절염, 피부경화증, 폐혈쇼크, 쇼그렌 증후군, 췌장대장염, 및/또는 현관염을 치료 및/또는 진단하기 위해 사용할 수 있다.

[0190] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 탈면역된 세포독성 단백질은 아미노산 SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, 또는 SEQ ID NO:59만을 포함하거나 또는 이들을 포함하여 구성된다. 이러한 탈면역된 HER-2-결합 세포독성 단백질의 구체예는 유방암, 자궁경부암, 두경부암(예: 입인두), 위장암(예: 식도 및 결장), 간-요로 암(예: 방광), 폐/흉막 암, 및 난소암을 치료 및/또는 진단하기 위해 사용할 수 있다.

[0191] 본 발명의 몇몇 구체예에서는, 결합 영역은 세포의 수용체를 표적하기 위해 선택된 리간드만을 포함하거나 또는 이들을 포함하여 구성된다. 대표적인 리간드의 비제한적인 예로는, 다음의 뼈 형성 단백질 및 액티빈 막-결합성 억제제(activin membrane-bound inhibitor) BAMBI(TGFBR으로도 알려짐), CD137L(4-1BB로도 알려짐), 디코이(decoy) 수용체 3 DcR3(TR6 및 TNFRSF6B로도 알려짐), 및 종양괴사인자 TWEAK(TNFSF12 및 AP03L으로도 알려짐)가 있다. 더 많은 비제한적인 리간드 예시는 실시예의 표 12에서 찾을 수 있다.

[0192] 항원결정기 교란 후 무독성이 된 탈면역된 시가 독소 작동체 영역은, 예를 들어 R179A를 포함하는 시가 독소 작동체 영역과 같은, 외인성 물질을 전달하는데에 사용될 수 있다. 상당한 수준만의 시가 독소 기능의 촉매 활성을 유지한 탈면역된 시가 독소 작동체 영역은 효소적으로 활성인 분자의 탈면역된 구성요소로서 유용하다.

[0193] 사용 가능한 세포의 표적 생체분자 결합 부위를, 가급적이면 고친화적인 표적 생체분자와 결합 가능한 결합 부위를(예: K_d 참조), 포함한 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질의 단편, 변형, 및/또는 유도체의 사용은 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들어, 가급적이면 세포 표면에 발현된, 해리상수 리터당 10⁻⁵ 내지 10⁻¹² 몰의, 가급적이면 200nM 이하의, 표적 생체분자와 결합하는 폴리펩티드를 포함한 아무 결합 영역은 본 발명의 분자(탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 세포독성 단백질)를 생성하는 것과 본 발명의 방법에 사용하기 위해 치환될 수

있다.

[0195] IV. 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및 단백질의 일반적인 기능

[0196] 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질은 포유동물에게서 원하지 않는 면역 반응을 감소시켜 포유 동물에게 투여하는 치료제 및/또는 진단시약으로서의 유용성을 향상시켰다. 중요한 것은, 본 발명의 폴리펩티드에서는, B-세포 항원결정기(들)이 교란된 후에도 본래의 시가 독소 작동체 영역의 원하는 생물학적 기능이 보존되었다. 또한, B-세포 항원결정기는 흔히 성숙한 CD4+ T-세포의 항원결정기와 같은 공간을 차지하거나 겹쳐져, B-세포의 항원결정기 교란은 보통 CD4+ T-세포의 항원결정기까지 동시에 교란시킨다.

[0197] 본 발명의 다양한 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 다양한 포유 동물에 투여될 때 그들의 항원성 프로파일이 변할 수 있지만, 항원성 및/또는 면역원성은 감소될 것으로 기대된다. 포유 동물에 투여하는 것을 포함하는 의료적 적용에 있어서 그 용도를 개선하기 위하여 시가 독소 유도 폴리펩티드로부터 모든 면역원성을 완전히 제거하는 것은 불필요하다(Nagata, Adv Drug Deliv Rev 61:977-85(2009)). 치료 단백질 내에서 단지 소수의 우성 아미노산을 변형하면 단백질의 안정성, 구조 및 기능을 교란하지 않고 항원성 및/또는 면역원성을 현저히 감소시킬 수 있다. 그러나 더 많은 면역원성 B-세포 항원결정기 내에서 교란을 갖는 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역은 원하지 않는 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 면역 응답을 회피하고자 할 때 포유 동물에 투여에 대해 더 이점이 있는 것으로 기대된다.

[0198] 본 발명은 세포-표적 세포독성 단백질 및 진단 조성물과 같은 다양한 조성물의 성분으로 사용될 수 있는 다양한 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 제공한다. 특히 상기 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 암, 면역장애, 및 세균감염을 포함한 다양한 질병 치료를 위한 특이 세포의 표적 사멸을 위한, 면역독소 및 리간드-독소 융합물과 같은 다양한 단백질 치료제의 성분으로 사용된다.

[0199] 본 발명은 또한 세포독성 단백질이 특이 세포를 선택적으로 사멸하고, 특이 세포의 성장을 억제하고, 특이세포에 외인성 물질을 전달하고, 및/또는 특이세포를 검출하도록 세포 표적을 유발하기 위한 결합 영역과 기능적으로 연관된 탈면역 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 다양한 세포독성 단백질을 제공한다. 본 발명의 단백질의 결합 영역은 세포의 표면에 발현된 표적 생체분자와 같은 세포와 물리적 연관을 갖는 최소한 하나의 세포의 표적 생체분자에 특이적으로 결합할 수 있다. 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 갖는 세포 표적 결합 영역의 결합은 강력한 시가 독소 세포독성 및/또는 세포분열 억제제의 세포종 특이 표적화의 가공성을 가능하게 한다.

[0200] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 단백질은 특정 세포의 표면과 연관된 세포의 표적 생체분자와 결합할 수 있고, 그들 세포 내부로 들어갈 수 있다. 표적화된 세포 내에서 내재화되면, 본 발명의 몇몇 구체예의 단백질은 효소활성적이고 세포독성인 시가독소 작동체 폴리펩티드 단편을 표적세포의 세포액 속으로 경로화(routing) 할 수 있다. 표적 세포의 세포액 내에서 일단 경로화되면, 본 발명의 몇몇 구체예의 세포독성 단백질은 리보솜을 효소적으로 비활성시킬 수 있고, 결국에는 그 세포를 사멸시킬 수 있다. 또한 본 발명의 비독성 변형 단백질은 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 폴리뉴클레오티드, 및 검출증진제와 같은 표적 세포 속으로 부수적인 외인성 물질을 전달하는데 사용될 수 있다. 이 시스템은 다양한 결합영역들이 다양한 형태의 세포에 이 강력한 세포독성을 표적화하는데 사용될 수 있다는 점에 있어서 규격화된 시스템이다.

[0202] A. 표적화된 시가 독소 세포독성을 통한 세포 사멸

[0203] 시가 독소군의 개체는 진핵세포 사멸을 위해 개조(adapted)되었기 때문에, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 사용하여 디자인된 세포독성 단백질은 강한 세포 사멸 활동을 보일 수 있다. 시가 독소군의 A 서브유닛 개체는 세포의 세포액에 진입하면 진핵세포를 사멸할 수 있는 효소의 도메인을 포함한다. B-세포 항원결정기 교란은 본 발명의 특정 시가 독소 작동체 영역의 세포독성 메커니즘을 크게 변형시키지 않았다. 그러므로, 본 발명의 탈면역된 세포독성 단백질은 포유동물에 투여하였을 때 특정 면역 반응이 일어날 가능성을 감소시키고 동시에 강한 세포독성을 유지한다.

[0204] 본 발명의 탈면역된 세포독성의 단백질의 몇몇 구체예에서는, 본 발명의 세포독성 단백질의 결합영역의 세포외 표적 생체분자와 물리적으로 결합된 세포(표적+세포)와 접촉했을 때, 세포독성 단백질은 세포를 사멸할 수 있다. 세포 사멸은 생체외에서 조작된(ex vivo manipulated) 표적 세포, 시험관내에서 배양된 표적 세포, 시험관내에서 배양된 조직 샘플안의 표적 세포, 또는 생체내 표적 세포와 같은 표적 세포의 다양한 상태(conditions)에 본 발명의 세포독성 단백질을 사용하여 실행할 수 있다.

- [0206] B. 세포 유형 가운데 선택적인 세포독성
- [0207] 특이적 세포 유형에 고친화성 결합영역을 사용한, 효소적으로 활성화되고, 탈면역된 시가 독소 영역의 전달을 약물 표적화 함에 의해, 이 강력한 세포 사멸 활성은 선택된 세포 유형을 우선적으로 사멸하게 제한될 수 있다.
- [0208] 몇몇 구체예에서, 세포 유형의 혼합물에 대한 본 발명에 따른 단백질의 투여에 있어서, 상기 단백질은, 물리적으로 세포 외 표적 생체분자와 결합 되지 않은 세포 타입들과 비교하여 볼 때, 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 결합된 세포들을 선택적으로 사멸하게 할 수 있다. 시가 독소 군의 인자들은 진행 세포 사멸용으로 적용되기 때문에, 시가 독소 작동체 영역들을 사용하도록 고안된 세포독성 단백질은 강력한 세포독성 활성을 보여줄 수 있다. 고-친화성 결합 영역들을 사용하는 특이적 세포 유형에 효소적으로 활성화된 시가 독소 영역들의 전달을 약물 표적화함에 의해 이 강력한 세포 사멸 활성은 선택된 결합 영역들의 표적 생체분자와 물리적 연계에 의해 표적화 되어서 고안된 세포 유형만을 사멸하도록 제한될 수 있다.
- [0209] 몇몇 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 세포독성 단백질은 두 가지 이상 다른 세포 유형의 혼합물 내에서 선택적으로 또는 우선적으로 특정 세포 유형의 사멸을 야기할 수 있다. 이것은 높은 우선권으로 특정 세포 유형에 표적화된 세포독성 활성을 가능하게 하고, 표적 생체분자를 발현하지 않는 "방관자(bystander)" 세포 유형에 비해 3배의 세포독성 효과를 가능하게 할 수 있다. 만약 상기 표적 생체분자가 충분히 낮은 양에서 발현되고/또는 표적화 되지 않은 세포 유형과 충분히 낮은 양에서 물리적으로 결합되는 경우, 선택적으로, 상기 결합 영역에 대한 상기 표적 생체분자의 발현은 하나의 세포 유형에 비배타적일 수 있다. 이것은 높은 우선권으로 특정한 세포 유형의 표적화된 세포- 사멸을 가능하게 할 수 있고, 표적 생체분자에 대해 유효한 양을 발현하지 않거나 상기 표적 생체분자에 대해 유효한 양으로 물리적으로 결합되지 않은 "방관자" 세포 유형에 비해 3배의 세포독성 효과를 가진다.
- [0210] 다른 몇몇 구체예에서, 두 가지 다른 세포 유형의 군에 대한 상기 세포독성 단백질의 투여에 있어서, 상기 세포독성 단백질은 표적 세포군에 대해 반 최고치 세포독성 농도(CD₅₀) 값으로 정의된 세포 사멸 결과를 얻을 수 있는데, 상기 표적 세포 군의 인자들은 세포독성 단백질의 결합 영역의 세포외 표적 생체분자를 발현하며, 한 번 투여량에서 세포독성 단백질의 결합 영역의 세포외 표적 생체분자를 발현하지 않는 세포군 인자에 동일한 세포독성 단백질의 상기 CD₅₀ 투여량보다 적어도 3배 이하 낮은값을 얻을 수 있다.
- [0211] 어떤 구체예에서는, 세포외 표적 생체분자와 물리적으로 결합된 세포 유형 군에 대한 상기 세포독성 활성은 상기 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 결합되지 않는 세포 유형 군에 대한 상기 세포독성 활성보다 적어도 3배 이상 높다. 본 발명에 따른, 선택적인 세포독성은 (a/b)의 비로 수량화될 수 있는데, (a)는 결합 영역의 표적 생체분자와 물리적으로 결합된 특정한 세포 유형의 세포 군에 대한 세포독성을 (b)는 상기 결합 영역의 표적 생체분자와 물리적으로 결합되지 않은 세포종의 세포군에 대한 세포독성을 의미한다. 구체적인 실시예에서, 세포독성 비율은 선택적인 세포독성을 나타내는데, 이것은 결합 영역의 표적 생체분자와 물리적으로 결합되지 않은 세포 또는 세포 유형의 군에 비교하여 결합 영역의 표적 생체분자와 물리적으로 결합된 세포 또는 세포 유형 군이 적어도 3배, 5배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 50배, 75배, 100배, 25배, 500배, 750배, 또는 1000배 이상 높다는 것을 나타낸다.
- [0212] 이러한 우선적인 세포 사멸 기능은, 세포 유형의 체외 가공 혼합물, 세포 유형의 혼합물로 체내 배양된 조직, 다양한 세포 유형의 체내 존재(예를 들어, 다세포 생물 내에서의 환경 또는 그 발생적 장소에서)에서와 같은, 다양한 조건과 비표적화된 방관자 세포들의 존재 하에서, 본 발명에 따른 어떤 세포독성 단백질에 의해 표적화된 세포가 사멸되는 것을 허용한다.
- [0214] C. 표적화된 세포의 내부 속으로 부가적인 외인성 물질의 전달
- [0215] 세포독성 및 세포분열을 억제하는 적용 외에, 본 발명에 따른 단백질은 선택적으로 정보 수집용 및 진단 기능용으로 사용된다. 나아가 본 발명에 따른 상기 독성 단백질의 비-독성 변종, 또는 선택적인 독성 변종은 상기 세포독성 단백질의 세포외 표적 생체분자와 물리적으로 결합된 세포의 내부를 라벨링하고/또는 부가적인 외인성 물질을 전달한다. 적어도 하나의 세포 표면에 대해 표적 생체분자를 발현하는 다양한 세포 유형 및/또는 세포군은 외인성 물질 수용을 위하여 본 발명에 따른 단백질에 의해 표적화된다. 본 발명에 따른 상기 기능적인 구성요소들은 모듈식이며, 다양한 시가 독소 작동체 영역과 부가적인 외인성 물질은, 종양 세포의 비침습적인 체내 영상과 같은, 다양한 적용을 제공하기 위하여 다양한 결합영역에 연결되어 있다.
- [0216] 비독성 유형을 포함하는, 본 발명에 따른 상기 단백질은 결합 영역에 의해 세포외 표적 생체분자와 물리적으로

결합된 세포에 들어갈 수 있는데, 본 발명에 따른 단백질의 어떤 구체에는 표적화된 세포 유형의 내부 속으로 부가적인 외인성 물질을 전달한다. 어떤 의미에서, 본 발명에 따른 상기 전체 단백질은 상기 세포로 들어가는 외인성 물질이다: 이와 같이, 상기 "부가적인" 외인성 물질은 핵심 세포독성 단백질 자신보다는 다른 것에 연결된 이형 물질들이다. 항원결정기 파괴 이후에 비독성화된 탈면역된 시가 독소 작동체 영역은 세포(예를 들어, R179A) 속으로 외인성 물질을 전달함에 있어서 여전히 유용하다.

[0217] 상기에서 사용된 "부가적인 외인성 물질"은 하나 이상의 분자와 관련되어 있으며, 원래의 표적 세포 내에 보통 일반적으로 존재하지 않고, 본 발명에 따른 상기 단백질은 세포의 내부 속에 그러한 물질을 특이적으로 전달하는 데 사용될 수 있다. 부가적인 외인성 물질의 비제한적인 구체에는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 소분자 화학요법제, 및 검출 촉진제들이다.

[0218] 어떤 구체예에서, 상기 부가적인 외인성 물질은 효소를 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드로 이루어진다. 어떤 다른 구체예에서, 상기 부가적인 외인성 물질은 핵산, 예를 들어 소형 억제 RNA (siRNA) 또는 마이크로RNA (miRNA)로서 기능을 하는 RNA와 같은 핵산이다. 어떤 구체예에서, 상기 부가적인 외인성 물질은 박테리아 단백질, 바이러스성 단백질, 암에서 돌연변이된 단백질, 암에서 비정상적으로 발현된 단백질, 또는 T-세포 상보성 결정 영역로부터 유도된 항원과 같은 항원이다. 예를 들어, 외인성 물질은 외인성 항원으로서 기능할 수 있는 박테리아, 및 T-세포 상보성 결정 영역에 의해 감염된 항원제시세포의 특성화와 같은 항원을 포함한다. 외인성 물질의 부가적인 구체에는 효소와 같은 항원 펩티드보다 더 큰 폴리펩티드 및 단백질을 포함한다. 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하는 외인성 물질은 선택적으로 당업자에게 자명하거나 자명하지 않은 하나 이상의 항원을 포함할 수 있다.

[0220] D. 진단 기능을 위한 정보 수집

[0221] 본 발명에 따른 어떤 단백질은 특정 세포, 세포 유형, 및/또는 세포군의 체외 및/또는 체내 감별에서 사용된다. 어떤 구체예에서는, 상기 단백질은 진단 및 치료용 모두, 또는 독자적인 진단용으로 사용된다. 상기 동일한 세포독성 단백질이 진단용 및 치료용 모두에 사용되는 경우, 진단용 감별 촉진 시약을 포함한 상기 세포독성 단백질 변종은 상기에 언급된 구체적인 치환을 포함한 하나 이상의 아미노산 치환을 통해 시가 독성 작동체 영역의 촉매 불활성에 의해 무독성을 제공한다. 감별 촉진 시약에 결합된 본 발명에 따른 상기 세포독성 단백질의 무독성 유형은 동일한 또는 관련된 결합 영역을 포함하는 최적 투약 방식과 결합된 동반 진단법과 같은, 진단 기능용으로 선택적으로 사용된다.

[0222] 본 발명에 따른 다양한 단백질에 대해 종래 기술에서 알려진 검출 촉진제를 결합하는 능력은 암, 종양, 면역, 및 감염된 세포의 감별을 위한 유용한 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 단백질의 이러한 진단 구체예는 종래 기술에서 알려진 다양한 영상 기술 및 분석법을 통하여 정보 수집용으로 사용된다. 예를 들어, 본 발명에 따른 상기 단백질의 진단 구체예는 환자 또는 생체 조직 검사 샘플에 있어서 개별 암세포, 면역 세포, 또는 감염된 세포의 세포 내 세포소기관(예를 들어, 세포 내 이입, 골지체, 소포체, 및 세포액 영역)의 영상을 통한 정보 수집용으로 사용된다.

[0223] 정보의 다양한 유형은 상기 단백질의 진단적 용도 및 기타 용도를 위해 본 발명의 단백질의 진단 구체예를 사용함으로써 수집된다. 이러한 정보는 예를 들어, 종양 세포 유형 진단, 환자 질병의 치료 민감성 결정, 시간에 대한 항종양 치료의 진행 분석, 시간에 대한 항균성 치료의 진행 분석, 시간에 대한 면역조절 치료의 진행 분석, 이식 물질에서 감염된 세포 측정, 이식 물질에서 원치 않는 세포 측정, 및/또는 종양 덩어리의 외과적 절제 후 잔여 종양 세포의 측정에서 유용할 수 있다.

[0224] 예를 들어, 환자의 부분 모(母)집단은 본 발명에 따른 상기 단백질의 진단적 변종을 사용하여 수집된 정보를 사용하는 것이 확인되었으며, 개별 환자는 그러한 진단 구체예를 사용하여 밝혀진 독특한 특성에 기반한 부분 모 집단으로 분류될 수 있었다. 예를 들어, 특정한 의약 또는 치료의 효과는 환자 부분 모(母)집단을 정의하기 위하여 사용된 기준의 한 유형일 수 있었다. 예를 들어, 본 발명에 따른 특정한 세포독성 단백질의 무독성 진단 변종은 환자가 본 발명에 따른 동일한 단백질의 세포독성 변종에 적극적으로 반응하게 예측된 환자의 한 집단 또는 부분 모집단에 속하는지를 구별하는데 사용된다. 따라서, 본 발명에 따른 세포독성 단백질의 무-독성 변종을 포함한, 본 발명에 따른 탈-면역화된 단백질을 사용한, 환자 식별, 환자 계층화, 및 진단을 위하여 관련된 방법은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다.

[0226] E. 면역/백신 접종 물질 및 항독성

[0227] 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드는 본 발명에 따른 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드의 존재 내에 특

정한 항원결정기에 대한 면역 반응의 유발을 유도하기 위한 편향된 면역 및/또는 백신 접종 물질로서의 용도를 가진다. 미생물을 생산하는 시가 독소에 의한 감염은 병적상태 및 사멸에 책임이 있다(Johannes, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010)). 박테리아를 생산하는 시가 독소는 출혈성 대장염 및 설사와 같이 연관된 증상들과 마찬가지로 용혈성 요독성 증후군(HUS) 및 적리의 주된 원인이다(Karmali M, *Mol Biotechnol* 26: 1 17-22 (2004)). 나아가, 시가 독소는 질병 통제 및 예방을 위한 미국 U.S. 센터(CDC)에 의해 생물무기로서 사용되기 위한 가능성 있는 카테고리 B 생물위협 제제로서 분류된다.

[0228] 시가 완전독소 또는 시가 독소 서브유닛에 대한 면역 반응 동안 유발된 포유동물 항체는 상기 항원결정기에 따라 중화 또는 비중화될 수 있다. 나아가, 시가 독소를 인식하는 항체는 상기 항체의 항원결정기를 포함하는 시가 독소 서브유닛에 따라 다른 중화 효과를 가진다(Krautz-Peterson G et al, *Infect Immun* 76: 1931-9 (2008)). 본 발명에 따른 어떤 폴리펩티드는 어떤 항원결정기 영역(예를 들어, 바람직하지 않은 비중화 항체 및 다른 항원결정기(예: 바람직한 중화 및/또는 방어하는 항체를 유도)를 유도하는)으로부터 인위적인 포유동물 면역 반응을 유도하는 방법에 유용하다.

[0229] 본 발명에 따른 어떤 폴리펩티드는 교란되지 않은, 선천적인 항원결정기에 대한 면역 반응의 유도가 허용되는 동안 상기 항원성 및/또는 면역원성을 감소하고/하거나 제거하기 위한 방법에서 편향된 면역 및/또는 백신 접종 물질로서의 용도를 가진다. 포유동물에 대한 면역 기술은 시가 독소 A 서브유닛의 선택된 항원결정기 영역으로부터 편향된 항-시가 독소 항체를 생성시키기 위하여 사용된다.

[0230] 나아가, 본 발명에 따른 어떤 폴리펩티드는, 면역글로불린-유형 도메인과 같은 다양한 결합 도메인의 생성, 인식, 및 친화도 성숙을 위하여, 단백질 발현 스크리닝 및 생체 외 선별과 같은 다양한 스크리닝 방법에서 사용되며, 선별을 스크리닝하는 시가 독소와 결합된 상기 도메인은 시가 독소 A 서브유닛의 선택된 항원결정기 영역으로부터 편향되어 있다(Glockler J et al, *Molecules* 15: 2478- 90 (2010); Bradbury A et al, *Nat Biotechnol* 29: 245-54 (2011); Chen T, Keating A, *Protein Sci* 21 : 949-63 (2012); Geyer C et al, *Methods Mol Biol* 901 : 11-32 (2012)). 이러한 방법은 다른 표적화 되지 않은 항원결정기의 부재에서 표적화 될 수 없는 불연속적인 항원결정기를 표적화 하기 위하여 유용하다. 이러한 방법은 신규의 중화 항체 및 시가 독소 독성을 억제하는 비-면역글로불린 유형 도메인을 생성하는데 유용하다(Perera L et al, *J Clin Microbiol* 26: 2127-31 (1988); Mukherjee J et al, *Infect Immun* 70: 5896-9 (2002); Smith M et al, *Infect Immun* 77: 2730-40 (2009); Rocha L et al, *Toxins* 4: 729-47 (2012); Tremblay J et al, *Infect Immun* 81: 4592-603 (2013); Skinner C et al, *PLoS One* 9: e99854 (2014)).

[0231] 본 발명에 따른 어떤 폴리펩티드는 편향된 항-시가 독소 항체 또는 항-독소의 생성 및/또는 생산을 위한 방법에서 면역 물질로서 사용될 수 있다. 포유동물을 위한 면역 기술은 시가 독소 A 서브유닛의 선택된 항원결정기 영역으로부터 편향된 항-시가 독소 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 어떤 폴리펩티드는 시가 독소 A 서브유닛의 선택된 항원결정기로부터 편향된 항-시가 독소 A 서브유닛 항체를 생성하기 위한 면역 물질로서 사용된다. 나아가, 시가 독소 B 서브유닛과 본 발명에 따른 탈면역된 시가 독소 A 서브유닛의 결합에 의해, 면역 기술은 선천적인 시가 독소 B 서브유닛에 존재하는 항원결정기 및/또는 상기 완전독소에 존재하는 상기 시가 독소 서브유닛 사이의 인터페이스에 대해 편향된 항-시가 독소 항체를 생성하는데 사용된다. 이러한 항-시가 독소 항체는 면역감별 분석에 참여하는 방법 및 시가 독소 중화 항체 또는 항-독소의 생성용으로 사용된다(Mukherjee J et al, *Infect Immun* 70: 5896-9 (2002); Sheoran A et al, *Infect Immun* 71 : 3125-30 (2003); Cheng L et al, *Toxins* 5: 1845-58 (2013); He X et al., *J Immunol Methods* 389: 18-28 (2013); Tremblay J et al, *Infect Immun* 81 : 4592-603 (2013)). 그러므로, 본 발명에 따른 어떤 폴리펩티드는 미생물을 생산하는 시가 독소 또는 시가 독소에 노출됨에 의한 감염의 치료를 위한 방어제, 치료제, 또는 가공된 방어제 및/또는 치료제로서 투여되는 항체를 중화시키는 시가 독소를 더 잘 생성하는데 사용된다(Fujii J et al, *Microb Pathog* 25: 139-46 (1998); Mukherjee J et al, *Infect Immun* 70: 5896-9 (2002); Sheoran A et al., *Infect Immun* 71: 3125-30 (2003); Gao X et al, *Vaccine* 29: 6656-63 (2011); Cheng L et al, *Toxins* 5: 1845-58 (2013); He X et al, *J Immunol Methods* 389: 18-28 (2013); Tremblay J et al, *Infect Immun* 81: 4592-603 (2013); Vance D et al, *J Biol Chem* 288: 36538-47 (2013)).

[0232] 본 발명에 따른 어떤 폴리펩티드는 항-시가 독소 항체의 생성 및/또는 생산을 위한 방법에서 백신 접종 물질로서 사용된다. 백신 접종 기술은 미생물을 생산하는 시가 독소 또는 시가 독소에 노출됨에 의한 미래 감염에 대한 능동 면역으로 포유동물에 투여하기 위하여 본 발명에 따른 어떤 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 함께 사용된다(Bosworth B et al., *Infect Immun* 64: 55-60 (1996); Rabinovitz B et al., *J Dairy Sci* 95: 3318-26 (2012)). 백신 설계는 피험자에서 방어, 중화 항체로 간섭하는 비중화 항체의 가능성을 가지고 비중화 항체 대

중화 항체를 유도하는 항원결정기 사이의 차이점을 고려한다.

[0233] 예를 들어서, 시가 완전독소에 대한 다섯 가지 항체의 연구에 있어서, 단 하나만이 상기 A 및 B 서브유닛 양자 모두 중화 활성과 하나의 바운드를 보여주었다(He X et al, J Immunol Methods 389: 18-28 (2013)). 상기 AB 독소 리신과 유사하게, 중화 항체는 A 및 B 서브유닛 사이의 인터페이스를 인식하고 A 서브유닛 단편의 분리를 예방한다(O'Hara J, Mantis N, J Immunol Methods 395: 71-8 (2013)).

[0234] 백신 접종 목적을 위하여, 외부의 항원결정기 및/또는 완전독소 구조에서 B 서브유닛을 가진 상기 A 서브유닛의 인터페이스를 회전하는 항원결정기에 주로 항체 반응을 유도하기 위하여 백신 물질을 편향하는데 더욱 호의적일 수 있다(O'Hara J, Mantis N, J Immunol Methods 395: 71-8 (2013); O'Hara J et al., Curr Top Microbiol Immunol 357: 209-41 (2012)). 예를 들어서, 리신에 대한 백신 접종은 유일한 비방어, 비중화 항체를 유도하는 선천적 면역성 영역의 제거로부터 이익을 얻게 된다(Olsnes S, Toxicon 44: 361-70 (2004)). 유사하게, 리신의 면역우성 영역의 제거는 어떤 항원결정기에 대한 비중화 항체를 생산하는 것으로부터 편향된 항체 반응을 가지거나(O'Hara J et al, Vaccine 28: 7035-46 (2010)) 또는 심지어 독소-항상 항체를 생산하는 것으로부터 편향된 항체 반응을 가진다(Maddaloni M et al, J Immunol 172: 6221-8 (2004)). 그 목적을 달성하기 위하여, 시가 독소 A의 고립된 영역 내에서 어떤 항원결정기의 제거는 바람직하지 않은 항원결정기를 제거할 수 있었고 시가 독소 서브유닛 인터페이스를 회전하는 항원결정기와 같은 더욱 바람직한 항원결정기의 항체 생성을 유도할 수 있었다.

[0235] 편향된 면역 및/또는 백신 접종 물질로서 유용한 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드는, 효소적 활성 및/또는 세포 독성과 같은, 시가 독소 작동체 기능의 감소 및/또는 제거로부터 이익을 얻는다(He X et al, J Immunol Methods 389: 18-28 (2013); Skinner C et al, PLoS One 9: e99854 (2014)). 시가 독소 작동체 기능의 감소 또는 제거는 당업자들에게 자명하거나 자명한 방법으로 발견된 하나 이상의 절단 및/또는 아미노산 치환을 사용함으로써 완성된다. 나아가, 시가 독소 작동체 기능의 감소 또는 제거는, 리보솜 억제 및 표적화된 세포독성과 같은 시가 독소 작동체 분석에서 약화되고, 심하게 감소되고, 그리고/또는 활성이 손실됨을 보여주는 상기 실시예에서 기재된 바와 같은 치환을 사용함에 의해 완성된다.

[0237] V. 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및 단백질의 폴리펩티드 서열에서의 변이

[0238] 숙련자는 변이가, 항원성 및/또는 잠재적 면역원성을 감소시키는 하나 이상의 항원결정기 파괴와 연관된 상기 독소 작동체 영역의 전체 구조와 기능을 유지하는 것과 같이, 그들의 생물학적 활성 감소 없이, 본 발명에 따른 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및 단백질, 및 상기 전자 중 어떤 것을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 형성하는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 어떤 변형은 발현, 정제, 및/또는 약동학적 특성, 및/또는 면역원성을 용이하게 한다. 그러한 변형은 숙련자에게 자명하며, 예를 들어, 개시 부위를 제공하기 위하여 아미노산 말단에 부가된 메티오닌, 편리하게 자리잡은 제한 부위 또는 종말 코돈을 생성하기 위해 각 말단에 위치한 부가적인 아미노산, 및 편리한 감별 및/또는 정제를 제공하기 위하여 각 말단에 퓨즈를 단 생화학 친화성 태그를 포함한다.

[0239] 또한, 항원결정기 태그 또는 성분을 위한 서열과 같은 상기 아미노 및/또는 카르복시 말단에서 부가적인 아미노산 잔기의 내용물도 여기에서 고려된다. 상기 부가적인 아미노산 잔기는, 클로닝 용이, 발현 용이, 번역후변형, 합성 용이, 정제, 감별 용이, 및 투약 등과 같은 다양한 목적을 위하여 사용된다. 항원결정기 태그 및 부분들의 비제한적인 예시로서는 키틴질 결합 단백질 도메인, 엔테로펩티다아제 절단 부위, 인자 Xa 절단 부위, FIAsh 태그, FLAG 태그, 녹색 형광 단백질 (GFP), 글루타치온-S-트랜스퍼라제 부위, HA 태그, 말토즈 결합 단백질 도메인, myc 태그, 폴리히스티딘 태그, ReAsH 태그, 연쇄상 구균-태그, 연쇄상 구균-태그 II, TEV 프로테아제 부위, 티레오독신 도메인, 트롬빈 절단 부위, 및 V5 항원결정기 태그들을 들 수 있다.

[0240] 상기 구체예 중 어떤 것에서, 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질의 상기 폴리펩티드 서열은, 적어도 하나의 아미노산이 여기에서 제공된 적어도 하나의 선천적으로 배치된 항원결정기 영역 내에서 교란되는 동안, 상기 폴리펩티드 내로 유도된 하나 이상 보존적 아미노산 치환에 의해 변형된다. 여기에 사용된 바와 같이, "보존적 치환"이라는 용어는 하나 이상의 아미노산이 다른, 생물학적으로 유사한 아미노산 잔기에 의해서 대체되는 것을 나타낸다. 실시예들은, 예를 들어, 작은 아미노산, 산성 아미노산, 극성 아미노산, 염기성 아미노산, 소수성 아미노산 및 방향족 아미노산(Table B) 등과 같이 유사한 특성을 가진 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 정상적인 잔기를 가진 보존적 치환의 실시예는 내인성 포유류 펩티드 및 단백질에서 발견되지 않으며, 예를 들어, 오르니틴, 카나바닌, 아미노에틸시스테인, 또는 다른 염기성 아미노산을 가진 아르기닌 또는 리신 잔기의 보존적 치환이다. 펩티드 및 단백질에서의 표현형적으로 잠재적인 치환에

관한 더 나은 정보는 Bowie J et al, Science 247: 1306-10 (1990)에서 얻을 수 있다.

표 B.

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

보존적 아미노산 치환의 예들

표 B에서의 상기 보존적 치환에서, 아미노산의 모범적인 보존적 치환은 다음과 같은 물리화학적 성질에 의해 분류된다 - I: 중성, 친수성; II: 산성 및 아미드; III: 염기성; IV: 소수성; V: 방향족, 벌키 아미노산, VI: 비전하성 친수성, VII: 비전하성 지방족, VIII: 비전하성 비극성, IX: 싸이클로알케닐-연관, X: 소수성, XI: 극성, XII 작은, XIII: 회전-허용되는, 및 XIV: 신축성. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 다음과 같은 것을 포함한다: 1)S는 C를 대체한다; 2) M 또는 L은 F를 대체한다; 3) Y는 M을 대체한다; 4) Q 또는 E는 K를 대체한다; 5) N 또는 Q는 H를 대체한다; 및 6) H는 N을 대체한다.

부가적인 보존적 아미노산 치환은 다음과 같은 것을 포함한다: 1)S는 C를 대체한다; 2) M 또는 L은 F를 대체한다; 3) Y는 M을 대체한다; 4) Q 또는 E는 K를 대체한다; 5) N 또는 Q는 H를 대체한다; 및 6) H는 N을 대체한다.

어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질은, 상기 실시예들(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5)에서 제공하는 선천적으로 배치된 항원결정기 영역 내에서 적어도 하나의 아미노산의 파괴가 유지되는 동안, 그리고 단독으로 및/또는 치료 및/또는 진단 조성물의 성분으로서 시가 독소 작동체 기능의 상위 레벨을 나타내는 한, 여기에서 나열된 폴리펩티드 서열과 비교해서 많아야 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 아미노산이 치환된, 본 발명에 따른 폴리펩티드 영역의 기능적인 단편과 변형을 포함한다. 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질의 변형은, 상기 결합 영역 또는 상기 시가 독소 작동체 영역 내에서, 변화된 세포독성, 변화된 세포분열억제 효과, 변화된 면역원성, 및/또는 변화된 혈청 반감기와 같은, 바람직한 성질을 얻기 위해, 하나 이상의 아미노산의 변형 또는 하나 이상의 아미노산의 제거 또는 삽입에 의해, 본 발명에 따른 상기 단백질의 폴리펩티드를 변화하는 결과로서 본 발명의 범위 내에 있다. 나아가, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 본 발명에 따른 단백질의 폴리펩티드는, 신호 서열과 함께 또는 신호 서열 없이 존재한다.

어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질은, 상기 실시예들(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5) 내에서 제공하는 선천적으로 배치된 항원결정기 영역 내에서 적어도 하나의 아미노산 파괴가 유지되는 동안, 그리고 세포독성, 세포 외 표적 생체분자 결합, 효소 촉매작용, 세포이해 조직 경로화, 또는 촉매반응으로 비활성된 리보솜과 같은 생물학적 활성도를 측정할 수 있는 동안, 여기에서 언급된 단백질의 아미노산 서열 중 어느 하나에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진다.

어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질은, 상기 실시예들(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5) 내에서 제공하는 선천적으로 배치된 항원결정기 영역 내에서 적어도 하나의 아미노산 교환이 있다면, 상기 시가 독소 작동체 영역의 효소적 활성 및/또는 세포독성을 변화시키기 위하여 변형된다. 이러한 변화는, 결과적으로, 개조된 시가 독소 작동체 영역이 구성성분인 상기 시가 독소 작동체 영

역 폴리펩티드 또는 세포독성 단백질의 상기 세포독성 내에서의 변화를 야기하거나 또는 야기하지 않을 수도 있다. 가능한 변형은, 상기 실시예들(표 1, 2, 3, 4, 및/또는 5) 내에서 제공되는 선천적으로 배치된 항원결정기 영역 내에서 적어도 하나의 아미노산 파괴가 유지되는 동안, 절단, 제거, 도치, 삽입 및 치환으로 이루어진 군 으로부터 선택된 상기 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드에 대한 돌연변이를 포함한다.

[0250] 상기 시가 독소군 개체의 상기 A 서브유닛의 세포독성은 돌연변이 또는 절단에 의해 감소되거나 제거된다. 티로 신-77, 글루탐산염-167, 아르기닌-170, 티로신- 114, 및 트립토판-203으로 라벨된 위치는 Stx, Stx1, 및 Stx2 의 촉매 활성을 위하여 중요하게 보여졌었다(Hovde C et al, Proc Natl Acad Sci USA 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al, Biochemistry 31 : 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al, Mol Gen Genet 241 : 467-73 (1993); Ohmura M et al, Microb Pathog 15: 169-76 (1993); Cao C et al, Microbiol Immunol 38: 441-7 (1994); Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)). 글루탐산염-167 및 아르기닌-170 양자의 돌연변 이는 무세포 리보솜 비활성 분석 내에서 Slt-I A1의 상기 효소적 활성을 제거하였다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). 소포체 내에서 Slt-I A1의 드 노보(de novo) 발현을 사용한 다른 접근에서, 글루탐산 염-167 및 아르기닌-170 양자의 돌연변이는 그 발현 레벨에서 Slt-I A1 단편 세포독성을 제거하였다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). 절단 분석은 75-268의 StxA 잔기 단편이 생체 외에서 높은 효소 활성을 여전히 보유한다는 것을 보여주고 있었다(Haddad, J Bacteriol 175: 4970-8 (1993)). 잔기 1-239를 포함하는 Slt-I A1의 절단 단편은 생체 외에서 현저한 효소 활성과 세포액 내에서 드 노보 발현에 의한 세포독성을 보여 주었다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). 소포체 내에서 잔기 1-239에 대하여 절단된 Slt-I A1 단편의 발현은 그것이 세포액까지 복귀해서 이동할 수 없기 때문에 세포독성이 아니었다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

[0251] 상기 시가 독소 A 서브유닛 내에서 효소 활성 및/또는 세포독성에 대한 상기 대부분의 중요 잔기들은 다음과 같 은 잔기 위치에 대해 맵핑 되었다: 아스파라긴-75, 티로신-77, 티로신-114, 글루탐산염-167, 아르기닌-170, 아 르기닌-176, 및 특히 트립토판-203(Di, Toxicon 57: 535-39 (2011)). 특별히, 글루탐산염-E167에서 리신 및 아 르기닌-176에서 리신 돌연변이를 포함하는 Stx2A의 이중-돌연변이 구조는 완벽히 비활성화되었다: 반면, Stx1 및 Stx2 내에서 많은 단일 돌연변이는 세포독성에 있어서 10배 감소를 보여주었다. 나아가, 1-239 또는 1-240에 대한 Stx1A의 절단은 그것의 세포독성을 감소시켰으며, 유사하게, 보존된 소수성 잔기에 대한 Stx2A의 절단은 그의 세포독성을 감소시켰다. 시가 독소 A 서브유닛 내에서 진핵세포 리보솜 결합 및/또는 진핵세포 리보솜 역 체에 대한 대부분의 중요 잔기는 다음 잔기 위치에 맵핑되었다: 아르기닌-172, 아르기닌-176, 아르기닌-179, 아 르기닌-188, 티로신-189, 발린-191, 및 특히 류신- 233 (McCluskey A et al, PLoS One 7: e31 191 (2012)).

[0252] 시가양 독소 1 A 서브유닛 절단은 세포 내에서 발현될 때 촉매적으로 활성화되며, 생체 외에서 효소적으로 비활 성 리보솜 및 세포독성을 가능하게 한다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). 효소 활성을 가득 나 타내는 가장 작은 시가 독소 A 서브유닛 단편은 Slt1A의 잔기 1-239로 이루어진 폴리펩티드이다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). 비록 실제적 촉매 활성을 보유한 것으로 보고된 가장 작은 시가 독소 A 서 브유닛의 단편은 StxA의 75-247 잔기(Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994))인데, 진핵세포 내에서 드 누 보로 발현된 StxA 절단은 상기 세포액까지 도달하기 위하여 잔기 240까지를 필요로 하고 리보솜의 촉매 비활성 화를 행사한다(LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

[0253] 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질의 어떤 구체에는 SLT-1A(SEQ ID NO:1) 또는 StxA (SEQ ID NO:2)로부터 유도되었으며, 이러한 변화는 위치 75에서 아스파라긴, 위치 77에서 티로신, 위치 114에서 티로신, 위치 167에서 글루탐산염, 위치 170에서 아르기닌, 위치 176에서 아르기닌, 및/ 또는 위치 203에서 상기 트립토판의 치환을 포함한다. 그러한 치환의 실시예들은 위치 75에서의 아스파라긴을 알라닌으로, 위치 77에서의 티로신을 세린으로, 위치 167에서의 글루탐산염에서 글루탐산염으로, 위치 170에서 의 아르기닌을 알라닌으로, 위치 176에서의 아르기닌을 리신으로, 및/또는 위치 204에서의 트립토판을 알라닌으 로 하는 것과 같은 선행기술에 기초한 것으로 본 발명이 속한 기술 분야의 숙련자들에게는 자명하게 알려진 사 실이다. 시가 독소 효소적 활성 및 세포독성을 강화시키거나 감소시키는 다른 돌연변이는 본 발명의 범위 내에 있으며, 잘 알려진 기술 및 여기에서 개시된 분석을 사용하여 결정할 수 있다.

[0254] 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질은 선택적으로 본 발명에 속한 기술 분야에서 치료 및/또는 진단적 물질로 알려진 하나 이상의 부가적인 물질과 결합할 수 있다.

[0256] VI. 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 또는 단백질의 생산, 제조, 및 정제

[0257] 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및 단백질은 본 발명이 속한 기술 분야에서

잘 알려진 생화학적 제조 기술을 사용하여 생산된다. 예를 들어, 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및 단백질은 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템의 사용, 또는 다른 적절한 방법에 의해 제조된다. 따라서, 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및 단백질은 다음과 같은 과정을 포함한 다양한 경로로 합성될 수 있다: (1) 표준 고상 또는 액상 방법론, 단계적 또는 단편 조합, 및 최종 펩티드 화합물 격리 및 정제를 사용한 폴리펩티드 또는 단백질의 폴리펩티드 구성성분 합성; (2) 숙주 세포 내에서 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 단백질의 폴리펩티드 성분을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 발현 및 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 배지로부터 상기 발현 산물 재생; 또는 (3) 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 단백질의 폴리펩티드 성분을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 무세포 생체 외 발현, 및 상기 발현 산물의 재생; 또는 상기 펩티드 성분의 단편을 얻기 위하여 (1), (2) or (3)의 방법의 조합에 의해, 상기 펩티드 성분을 얻기 위해 단편들을 보충적으로 조이닝(예를 들어, 결합), 및 상기 펩티드 성분 재생.

[0258] 고체상 또는 액체상 펩티드 합성 방법에 의하여 본 발명에 따른 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 또는 단백질의 폴리펩티드 성분을 합성하는 것이 더 바람직하다. 본 발명에 따른 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및 단백질은 표준 합성 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하다. 따라서, 펩티드는 고체상 또는 액체상 방법론, 단계적 또는 단편 조합, 및 최종 펩티드 산물 격리 및 정제에 의해 상기 펩티드를 합성하는 것을 포함한 방법 등에 의해 합성된다. 이러한 맥락에서, 참고문헌은 WO 1998/1 1125 또는, 그 중에서도, Fields G et al, 고상 펩티드 합성의 원리 및 실습(Synthetic Peptides, Grant G, ed., Oxford University Press, U.K., 2nd ed., 2002) 및 그에 따른 상기 합성 실시예들로 이루어졌다.

[0259] 본 발명에 따른 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 또는 단백질은 당업계에서 잘 알려진 재조합 기술을 사용하여 제조(생산 및 정제)된다. 일반적으로, 숙주 세포 배양에 의해 폴리펩티드를 제조하는 방법 또는 상기 인코딩 폴리뉴클레오타이드를 포함한 벡터 형질감염 및 세포 배지로부터 폴리펩티드를 재생하는 것은 Sambrook J 등이 서술한 "분자 클로닝: 실험실 메뉴얼"(Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, U.S., 1989)과 Dieffenbach C 등의 "PCR 프라이머: 실험실 메뉴얼"(Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S., 1995) 등에 기재되어 있다. 바람직한 숙주 세포가 본 발명에 따른 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질을 생산하기 위해 사용된다. 숙주 세포는 안정적이거나 일시적으로 세포들을 본 발명에 따른 폴리펩티드를 발현을 유도하는 하나 이상의 벡터로 형질감염, 형질전환, 형질도입 또는 감염시킨다. 나아가, 본 발명에 따른 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질은, 변화된 세포독성, 변화된 세포분열억제 효과, 변화된 면역원성, 및/또는 변화된 혈청 반감기와 같은, 바람직한 성질을 얻기 위해서 하나 이상의 아미노산 변형 또는 하나 이상 아미노산의 제거 또는 삽입 결과를 야기하는 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 상기 폴리뉴클레오타이드 변형에 의해 생산된다.

[0260] 본 발명에 따른 단백질을 생산하기 위해 선택될 수 있는 광범위하고 다양한 발현 시스템이 존재한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 단백질의 발현을 위한 숙주 기관은 대장균 및 B 서브틸리스와 같은 원핵생물 및 효모, 곰팡이(*S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *A. awamori*, 및 *K. lactis*)같은 진핵세포, 조류(*C. reinhardtii*), 곤충 세포주, 포유류 세포 (CHO 세포), 식물 세포주, 및 형질전환 식물(*A. thaliana* and *N. benthamiana*)과 같은 진핵세포 기관을 포함한다.

[0261] 따라서, 본 발명은 또한, 상기 언급된 방법 및 본 발명에 따른 폴리펩티드의 부분 또는 전부 또는 본 발명에 따른 단백질의 폴리펩티드 성분을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 사용함에 따라서, 본 발명에 따른 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질 생산을 위한 방법을 제공한다. 이 경우, 발현벡터는 숙주 세포 속으로 도입될 때, 본 발명에 따른 폴리펩티드 부분 또는 전부를 인코딩할 수 있는 적어도 하나의 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 그리고/또는 숙주 세포는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 발현 벡터를 포함한다.

[0262] 폴리펩티드 또는 단백질이 숙주 세포 또는 무세포 시스템에서 재조합 기술을 사용하여 발현되는 경우에 있어서, 그것은 숙주 세포 인자와 같은, 숙주 세포 다른 구성성분으로부터, 고순도 또는 실질적으로 균질한 제제를 얻기 위하여 바람직한 폴리펩티드 또는 단백질을 분리(또는 정제)함에 있어서 유리하다. 정제는 원심분리 기술, 추출 기술, 크로마토그래피 및 분별 기술(예를 들어, 겔 여과에 의한 크기 분리, 이온-교환 컬럼에 의한 전하 분리, 실리카 및 DEAE 등과 같은 양이온-교환 수지 상 크로마토그래피, 크로마토포커싱, 및 오염물질 제거를 위한 단백질 A 세파로오스 크로마토그래피), 및 침전 기술(예를 들어, 에탄올 침전 또는 황산 암모늄 침전)과 같은 본 발명에 속한 기술 분야에서 잘 알려진 방법에 의해 실행될 수 있다. 수많은 생화학적 정제 기술은 본 발명에 따른 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및 단백질의 순도를 증가시키기 위해 사용된다. 어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드 및 단백질은 선택적으로 호모-다중결합 형식(즉, 본 발명에 따른 두가지 이상의

동일한 폴리펩티드 또는 단백질의 단백질 복합체)에서 정제된다.

[0263] 하기의 실시예는 본 발명에 따른 모범적인 단백질을 위한 비제한적인 측면에서의 생산뿐만이 아니라 본 발명에 따른 단백질을 생산하기 위한 방법의 비제한적인 실시예의 기재이다.

[0265] VII. 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하는 약학적 및 진단적 조성물

[0266] 본 발명은 약학적 조성물 내에서, 단독으로 또는 하나 이상의 부가적인 치료 제제와 결합해서, 증상, 질병, 장애, 또는 하기에 상세히 기재된 증상(예를 들어, 암, 악성 종양, 비-악성 종양, 성장 이상, 면역 장애, 및 미생물 감염)의 치료 또는 예방을 위한 용도로 사용되는 폴리펩티드 및 단백질은 제공한다. 나아가 본 발명은, 본 발명에 따른 폴리펩티드 및 단백질, 또는 약학적으로 적용 가능한 염 또는 그에 따른 용매화합물, 또는 본 발명에 따른 적어도 하나의 약학적으로 적용 가능한 운반체, 부형제, 또는 매개체 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드 또는 단백질의 호모-다중결합 및/또는 헤테로-다중결합 형식을 포함한다. 상기 약학적 조성물은 질병, 증상, 장애, 또는 하기에 상세히 기재된 이상징후에 대한 치료, 개선, 또는 예방의 방법에 유용하게 사용될 수 있다. 그러한 질병, 증상, 장애, 또는 징후 각각은 본 발명에 따른 약학적 조성물 용도의 관점에서 분리된 구체예로 구상된다. 나아가, 본 발명은 하기에 더욱 상세히 기재되는, 본 발명에 따른 적어도 하나의 치료 방법에서의 사용을 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0267] 여기에서 사용되는, "환자(patient)" 및 "피험자(subject)" 라는 용어는, 적어도 하나의 질병, 장애, 또는 증상의 징후, 신호, 및/또는 조짐을 나타내는, 인간 및 동물과 같은 보통의 척추동물인 어느 유기체와 관련하여 대체되어 사용된다. 이러한 용어는 영장류, 가축(예를 들어, 소, 말, 돼지, 양, 염소 등), 애완동물(예를 들어, 고양이, 개 등) 및 실험 동물(예를 들어, 생쥐, 토끼, 쥐 등)의 비제한적 실시예로서 포유류를 포함한다.

[0268] 본문에 기재된 "치료" "처치" 또는 "치료법" 및 그와 유사한 단어는 유용하거나 바람직한 클리닉 결과를 얻기 위한 접근과 관련되어 있다. 상기 용어는 증상, 질병 또는 장애의 시작 또는 발달 속도를 지연시키고, 그것과 관련된 증상을 감소시키거나 약화시키고, 상기 증상의 완벽하거나 부분적인 퇴행을 생성하거나, 상기 언급된 방법의 조합을 하는 것과 관련되어 있다. 본 발명의 목적을 위해서, 유용하거나 바람직한 클리닉 결과들은, 감지되거나 감지되지 않는, 증상의 감소 또는 약화, 질병 규모의 감소, 질병 상태의 안정화(예를 들어, 악화가 아닌), 질병 진행의 지연 또는 속도 감소, 상기 질병 상태의 개선 또는 완화, 및 차도(부분적 또는 전체)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. "치료" "처치" 또는 "치료법"은 또한 만약 치료법이 수용되지 않는 경우, 기대되는 생존에 관련된 생명연장의 생존을 의미할 수도 있다. 따라서 치료가 필요한 피험자(예를 들어, 인간)는 이미 논의되고 있는 상기 질병 또는 장애로 고통받는 피험자이다. 상기 "치료" "처치" 또는 "치료법"은 병적 상태 또는 치료의 부재와 관련된 증상의 강도를 억제하거나 감소하는 것을 포함하며, 필수적으로 상기 관련된 질병, 장애, 또는 증상의 완벽한 중단을 암시하는 것을 의미하는 것은 아니다. 종양 및/또는 암과 관련하여, 치료는 전체 종양 덩어리 및/또는 개개 종양 사이즈에서의 감소를 포함한다.

[0269] 본문에 기재된, "방지" 또는 "예방" 및 그와 유사한 용어는 증상, 질병, 또는 장애의 발달을 예방하거나 병리학적으로 변형시키기 위한 접근과 관련된다. 따라서, "예방"은 예방적인 조치와 관련된다. 본 발명의 목적을 위해서, 유용하거나 바람직한 클리닉 결과들은, 감지되거나 감지되지 않는, 질병 진행 또는 발전, 증상의 예방 또는 속도 감소를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서 증상의 "방지" 또는 "예방"은 어떤 문맥에서는 발전하는 상기 증상의 위험도를 감소시키거나, 상기 증상과 연관된 징후의 발전을 방지하거나 지연하는 것과 관련된다.

[0270] 여기에서 사용된, "효과적인 용량" 또는 "치료적으로 효과적인 용량"은, 표적 증상을 예방하거나 치료하고 또한 상기 증상과 연관된 징후를 유익하게 완화시키는 것과 같이, 개체에 적어도 하나의 바람직한 치료 효과를 생산하는 조성물(예를 들어, 치료적 조성물 또는 제제)의 용량 또는 복용량이다. 가장 바람직한 치료적으로 효과적인 용량은 주어진 개체의 필요에 따라서 본 발명에 속한 기술 분야에서 숙련된 자에 의하여 선택된 특정한 치료의 바람직한 효험을 생산하는 용량이 될 것이다. 이러한 용량은, 치료 화합물(활성, 약리성, 약리학, 및 생물학적 이용가능성을 포함한)의 특성, 상기 개체의 생리학적 조건(연령, 성별, 질병 유형, 질병 단계, 일반적인 물리적 조건, 주어진 복용량에 반응정도, 및 약물 유형), 혼합제에서 상기 약학적으로 적용가능한 캐리어, 및 투약 경로에 의해 정해지는 것을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 숙련된 자에 의해 이해된 다양한 요인에 다양하게 의존될 것이다. 임상 및 약학 분야에서 숙련된 자는 일정한 실험, 즉 화합물의 적용과 복용량의 적정에 대한 개체의 반응을 모니터링하여 치료적으로 효과적인 용량을 결정할 수 있을 것이다.(Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro A, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, U.S., 19th ed.,

1995)).

- [0271] 진단 조성물은 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 단백질 및 하나 이상의 검출 촉진제를 포함한다. 동위원소, 염료, 비색 제제, 조영 강화 제제, 형광 제제, 생물발광제, 및 자기 제제와 같은 다양한 검출 촉진제가 당업계에 알려져 있다. 이러한 제제들은 어떠한 위치에서도 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드 또는 단백질 내부 속으로 합체될 수 있다. 상기 제제의 합체는 상기 세포액 단백질의 아미노산 잔기를 경유하거나 링커 및/또는 킬레이터(chelator) 경유를 포함한 본 발명이 속한 기술분야에서 알려진 결합의 어떤 유형을 경유한다. 상기 제제의 합체는 스크린, 분석, 진단 과정, 및/또는 영상 기술 내에서 상기 진단 조성물의 존재의 감별을 가능하게 하는 방법이다.
- [0272] 기관의 질병, 장애, 또는 증상에 대한 진단 및/또는 예측 적용과 같은, 정보를 수집하는 방법에 대하여, 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 단백질에 사용 가능하게 연결될 수 있는, 수많은 검출 촉진제들이 숙련자들에게 알려져 있다(예: Cai W et al, JNucl Med 48: 304-10 (2007); Nayak T, Brechbiel M, Bioconjug Chem 20: 825-41 (2009); Paudyal P et al, Oncol Rep 22: 115-9 (2009); Qiao J et al., PLoS ONE 6: e18103 (2011); Sano K et al, Breast Cancer Res 14: R61 (2012)). 예를 들어, 형광 색소와 같은 영상 조영제(예: Alexa680, indocyanine green, and Cy5.5); ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{32}P , ^{51}Mn , ^{52}Mn , ^{52}Fe , ^{55}Co , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{73}Se , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{82}mRb , ^{83}Sr , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{94}mTc , ^{94}Tc , ^{99}mTc , ^{110}In , ^{111}In , ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{154}Gd , ^{155}Gd , ^{156}Gd , ^{157}Gd , ^{158}Gd , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , 및 ^{223}Rn 과 같은 방사성 동위원소; 크롬(III), 망간(II), 철(III), 철(II), 코발트(II), 니켈(II), 구리(II), 네오디뮴(III), 사마륨(III), 이테르븀(III), 가돌리늄(III), 바나듐(II), 테르븀(III), 디스프로슘(III), 홀뮴(III) 또는 에르븀(III)과 같은 상자성 이온; 라타늄(III), 금(III), 납(II), 및 창연(III)과 같은 금속; 리포솜과 같은 초음파-조영제; 바리움, 갈리움 및 탈리움 화합물과 같은 방사선 불투과성 제제; 등을 들 수 있다. 검출 촉진제는 2-벤질 DTPA, PAMAM, NOTA, DOTA, TETA, 그에 따른 유사체와 같은 킬레이터, 및 상기 언급한 것들과 기능적 균등체와 같은 매개체 기능 그룹을 사용함에 의해 직간접적으로 합체되어 있다(Leyton J et al, Clin Cancer Res 14: 7488-96 (2008)).
- [0273] 다양한 감별 촉진 제제를 단백질에 합체, 접착, 및/또는 결합(conjugate)함에 대하여, 특히 면역글로불린 및 면역글로불린-유도 도메인에 대해서는, 본 발명에 속한 기술 분야의 숙련자들에게 알려진 수많은 표준 기술들이 있다(Wu A, Methods 65: 139-47 (2014)). 유사하게, 의학 분야에 흔히 사용되는 비침습적인 생체 내 영상 기술과 같은, 수많은 영상 접근법이 당업자들에게 알려져 있으며, 예로는: 토모그래피 화상 분석기(CT 스캐닝), 광학 촬영(직접 촬영, 형광 촬영, 및 생물발광 촬영 포함), 자기 공명 촬영(MRI), 양전자 방사 단층 촬영(PET), 단일-광자 방출 단층 촬영(SPECT), 초음파, 및 x-선 전산화 단층 촬영이 있다(Kaur S et al, Cancer Lett 315: 97-111 (2012)).
- [0275] 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한 약학적 및/또는 진단 조성물의 생산 또는 제조
- [0276] 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드 및 단백질 중 어느 것에 대한 약학적으로 적용가능한 염 또는 용매화합물은 본 발명의 범위 내에 있는 것과 마찬가지로이다.
- [0277] 본 발명의 내용 중 "용매 화합물"이라는 용어는 용질(본 발명에 따른 펩티드 화합물 또는 약학적으로 적용가능한 염) 및 용매 사이에 형성된 화학량론으로 정의되는 복합체에 관한 것이다. 이러한 연결에서 상기 용매는, 아세트산 또는 젖산에 제한되지 않으며, 예컨대, 물, 에탄올 또는 다른 약학적으로 적용가능한, 전형적으로 소형-분자의 유기 종류가 가능하다. 논의가 되는 상기 용매가 물인 경우, 그러한 용매 화합물은 일반적으로 수화물로서 언급된다.
- [0278] 본 발명에 따른 폴리펩티드 및 단백질, 또는 그에 따른 염들은 보존 및 투약을 위하여, 약학적으로 허용가능한 운반체 내에서 본 발명의 화합물 또는 그에 따른 염의 치료적으로 효과적인 용량을 전형적으로 포함하여 제조된 약학적 조성물로서 형성된다. 상기 "약학적으로 허용가능한 운반체"는 상기 표준 약학적 운반체들 중 어느 것을 포함한다. 치료용으로 약학적으로 허용가능한 운반체는 약학 기술 분야에서 널리 알려져 있으며, 예를 들어, 레밍톤의 '제약학'에 기재되어 있다(A. Gennaro, ed., 1985). 상기 "약학적으로 허용가능한 운반체"는 예컨대, 호환제, 용매, 분산매, 코팅제, 향미생물제, 등장제성, 및 흡수지연제, 및 그와 유사한 제제와 같은 모든 생리학적으로 허용가능한 운반체를 포함한다. 약학적으로 허용가능한 운반체 또는 희석제는 경구용, 항문용, 비강용 또는 비경구용(피하조직, 근육, 정맥, 피부 내, 및 경피를 포함) 투약을 위하여 적절한 형식으로 그것을 사용하는 것을 포함한다. 모범적인 약학적으로 허용가능한 운반체는 멸균 주사액 또는 분산제의 즉석 제조를 위하여

멸균 수용액 또는 분산제 및 멸균 분말을 포함한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물 성분인 모범적인 적정 수성 및 비수성 운반체는 물, 에탄올, 폴리올스(글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 그와 유사체와 같은), 및 그에 따른 적정 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 및 에틸올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르를 포함한다. 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함에 의해 적절한 유동성이, 분산제 및 계면 활성제를 사용함에 의해서는 필요한 입자 크기가 유지될 수 있다. 어떤 구체예에서, 상기 운반체는 정맥, 근육 내, 피하, 비경구용, 척추용 또는 표피 투약에 적정하다(예를 들어, 주사 또는 수액에 의해). 투약의 경로 선택에 따라서, 상기 세포독성 단백질 또는 다른 약학적 성분은, 상기 활성적 세포독성 단백질이 특정한 투약의 경로에 의해 환자에 적용될 때 마주치게 되는, 낮은 pH 및 다른 자연적 불활성 증상으로부터 상기 화합물을 방어하기 위한 목적 물질로 코팅될 수 있다.

[0279] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 형성은 편리하게 단위 투약 제제 형식으로 제시되며, 약학 분야에서 널리 알려진 방법에 의해 제조된다. 그러한 형식에서, 상기 조성물은 활성 성분의 적정 함량을 포함한 단위 투약 제제로 나뉜다. 상기 단위 투약 제제는, 예를 들어, 포장된 타블렛형, 캡슐형, 및 병 또는 앰플 분말형과 같이 개별 포장을 포함한 패키지형으로 제조될 수 있다. 상기 단위 투약 제제는 캡슐형, 카시에형, 또는 자체 타블렛형으로 될 수 있으며, 그것은 적절한 수의 포장 형식 중 어느 것이 될 수 있다. 그것은 펜 형식과 같이 단일 투약 주사 형식으로 제공될 수 있다. 조성물은 투약의 적정 경로 및 수단을 위하여 형성될 수 있다. 투약의 피하 또는 경피 모델은 여기에 기술된 치료 단백질을 위하여 특정하게 적합하다.

[0280] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 포함할 수 있다. 상기 미생물 존재의 보존은 멸균 과정 및 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산, 및 기타 같은 다양한 항균제, 및 항진균제의 함유에 의해서도 보장될 수 있다. 설탕, 염화나트륨 등과 같은 등장액 또한 바람직하다. 나아가, 주사 가능한 약제 형식의 장기 지속형 흡수는 알루미늄 스테아린산염 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 제제를 포함함으로써 유발할 수 있다.

[0281] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 또한 선택적으로 약학적으로 허용가능한 산화방지제를 포함한다. 모범적인 약학적으로 허용가능한 산화방지제는 아스코르브산, 염화수소 시스테인, 황산수소나트륨, 메티중아황산 나트륨 등과 같은 수용성 산화방지제; 아스코르빌 팔미트산염, 뷰틸하이드록시아니솔(BHA), 부틸 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 지용성 산화방지제; 및 시트르산, 에틸렌디아민 티트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 주석산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트제 등이 있다.

[0282] 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 다른 폴리펩티드 및/또는 단백질, 또는 그에 따른 에스테르, 염 또는 아미드, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 운반체 또는 그의 조합을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0283] 치료 조성물은 전형적으로 멸균상태이며 제조 및 보존의 환경하에서 안정적이다. 상기 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 정돈된 구조로서 형성된다. 상기 운반체는 예를 들어, 물 또는 알코올 또는 적절한 혼합물을 포함한 용매 또는 분산제가 될 수 있으며, 상기 알코올은 에탄올, 폴리올(예를 들어, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜) 등이 될 수 있다. 예를 들어, 레시틴 등으로 코팅함에 의해서, 상기 적절한 유동성이 유지될 수 있으며, 계면활성제의 사용 및 분산제의 사용에 의해서 필요한 입자 크기를 유지할 수 있는데, 이러한 것은 본 기술이 속한 화학물 제조에 따라서 널리 알려져 있다. 어떤 구체예에서, 등장액은 설탕, 폴리알코올, 또는 염화 나트륨과 같은 등장액이 상기 조성물로서 바람직할 수 있으며 이 경우, 폴리알코올은 마니톨, 소르비톨 등이 될 수 있다. 주사 가능한 조성물의 지속적인 흡수는 조성물 내에서 흡수를 지연시키는 제제를 포함시킴에 의해 발생시킬 수 있는데, 이러한 제제로는 스테아린산 염 및 젤라틴을 들 수 있다.

[0284] 피내 또는 피하 적용을 위하여 사용된 용액 또는 현탁액은 전형적으로 하나 이상의 다음과 같은 물질을 포함한다: 주사용 증류수, 염분이 포함된 용액, 불 휘발유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤과 같은 항균제; 아스코르빅산 또는 황산수소나트륨과 같은 산화방지제; 에틸렌디아민티트라아세트산과 같은 킬레이트제; 아세테이트, 시트르산염, 또는 인산염과 같은 완충제; 및 염화나트륨 또는 텍스트로즈와 같은 긴장성 조절제. 상기 pH는 염산, 수산화 나트륨 또는 시트르산, 인산, 아세트산 및 그와 유사한 염을 가진 완충제로 산성 또는 염기성으로 조절될 수 있다. 그러한 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 일회용 주사기 또는 주사액병 내에 밀봉될 수 있다.

[0285] 멸균된 주사 가능한 용액은, 상기에 언급된 성분 또는 그 성분들의 조합을 함유한 적절한 용매 내에서 필요한 용량으로 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 단백질 합체에 의해 제조될 수 있으며, 상기 언급된 성분은 멸균 여과 과정을 수반하여야 한다. 분산제는 상기 활성 화합물을, 상기에 언급한 것과 같은 분산매 및 다른 성분을 포

합한 멸균 전파체 속으로 합체하기 위하여 제조될 수 있다. 무균 주사 가능액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 상기 제조 방법은, 멸균-여과 용액으로부터 바람직한 첨가 성분에 활성 성분의 분말을 생산하는, 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조) 방법이다.

[0286] 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 단백질의 치료적으로 효과적인 용량이 예컨대, 정맥, 피부 또는 피하 주사에 의해 투여되는 것이 설계되는 경우, 상기 결합제체는 발열-프리, 비경구적으로 허용가능한 수용성 용액의 형식 내에서 존재할 것이다. 비경구적으로 허용가능한 단백질 용액 제조 방법은 적정 pH, 등장액, 안정성 등 본 기술이 속한 분야에서 유사한 조건을 고려하여 진행된다. 정맥, 피부 또는 피하 주사를 위한 바람직한 약학적 조성물은 나아가, 결합제, 염화 나트륨 주사와 같은 등장성 전파체, 결합제, 링거 주사, 텍스트로즈 주사, 텍스트로즈 및 염화 나트륨 주사, 락트산 링거 주사, 또는 본 기술 분야에서 알려진 다른 전파체를 포함할 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 안정제, 보존제, 완충제, 산화방지제, 또는 본 기술 분야에서 널리 알려진 다른 첨가제 또한 포함한다.

[0287] 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 단백질은, 임플란트, 경피 패치, 및 미립캡슐화된 전달 시스템을 포함한, 조절된 방출 제제와 같은 급속제 방출에 대항해, 상기 화합물을 보호할 운반체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 폴라겐, 폴리옥소에스테르, 및 폴리 유산과 같은 생분해성이거나 생체적합성이 있는 폴리머가 사용된다. 그러한 제제의 수많은 제조 방법은 특허를 받거나 본 기술 분야의 전문가들에게 일반적으로 널리 알려져 있다(Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (Robinson J, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, U.S., 1978)).

[0288] 어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 생체 내에서 바람직한 분산을 보장받기 위해 형성된다. 예를 들어, 상기 혈액 너판문은 많은 커다란 및/또는 소수성 화합물을 배제한다. 생체 내 위치에서 본 발명에 따른 치료적 화합물 또는 조성물을 표적화하기 위하여, 그것들은 예를 들어, 하나 이상의 모이티드(moieties)를 포함한 리포솜 내에서, 선택적으로 특정한 세포 또는 기관 속으로 전달하여, 표적 약물 전달을 강화하게 형성될 수 있다. 모범적인 표적 모이티드는 염산 또는 비오틴; 메노사이드; 항체; 계면활성제 단백질 A 수용체; p120 카테닌 및 그와 유사체를 포함한다.

[0289] 약학적 조성물은 임플란트 또는 미립자 시스템으로 사용되기 위하여 설계된 비경구적인 제제를 포함한다. 임플란트의 예는 현탁액, 이온 교환 수지, 및 용해성 염 용액과 같은 고분자 또는 소수성 성분으로 이루어진 데포 제제이다. 미립자 시스템의 예는 마이크로스피어, 극미립자, 나노캡슐, 나노스피어, 및 나노미립자이다(Honda M et al, Int J Nanomedicine 8: 495-503 (2013); Sharma A et al, Biomed Res Int 2013 : 960821 (2013); Ramishetti S, Huang L, Ther Deliv 3 : 1429-45 (2012)). 방출 조절형 제제는 리포솜, 폴락사머 407, 및 수산화인회석과 같은 이온에 민감한 폴리머를 사용하여 제조될 수 있다.

[0291] VIII. 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터, 및 숙주 세포

[0292] 본 발명에 따른 폴리펩티드 및 단백질 외에, 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질을 인코딩하는 상기 폴리뉴클레오티드 또는 그에 따른 기능기들도 본 발명의 범위 내에 있다. 상기 "폴리뉴클레오티드" 라는 용어는 DNA, RNA, 뉴클레오티드 유사체를 사용하여 생성된 이러한 DNA, RNA의 유사체, 및 유도체, 단편 및 그에 따른 상동체를 포함하는 핵산이라는 용어와 동등하다. 본 발명에 따른 상기 폴리뉴클레오티드는 단일-, 이중-, 또는 삼중-나선일 수 있다. 공개된 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 아직 다른 RNA 코돈으로서 동일한 아미노산을 코딩하는, RNA 코돈의 세번째 위치에서는 용인되는 것으로 알려진 흔들림(wobble)을 고려하여, 표본적인 세포 독성 단백질을 인코딩할 수 있는 모든 폴리뉴클레오티드를 포함하여 명확하게 개시되어 있다(Stothard P, Biotechniques 28: 1 102-4 (2000)).

[0293] 하나의 관점에서, 본 발명은 본 발명에 따른 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 단편 또는 그에 따른 유도체를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예컨대, 상기 단백질의 아미노산 서열 중 하나를 포함하는 폴리펩티드와 동일하거나, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 이상 동일한 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 또한, 본 발명은 엄격한 조건하에서 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 단백질 또는 그의 단편 또는 유도체 또는 임의의 그러한 서열에 대한 안티센스 또는 상보체를 포함한다.

[0294] 본 발명에 따른 상기 폴리뉴클레오티드의 유도체 또는 유사체는 그 중에서도 상기 폴리뉴클레오티드(또는 폴리펩티드), 예를 들어, 본 기술 분야에서 전산화 상동성 프로그램으로 알려진 방법에 의해 실행된 정렬에서 정렬

된 서열과 비교해볼 때, 또는 상기 동일 사이즈의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열에 대해 적어도 약 45%, 50%, 70%, 80%, 95%, 98%, 또는 심지어 99%의 동일성을 가진, 본 발명에 따른 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및/또는 단백질을 주로 상동하는 영역을 가진 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다. 모범적인 프로그램은 스미스 T, 워터맨 M의 상기 알고리즘Adv. Appl. Math. 2: 482-9 (1981)을 사용하고, 디폴트 세팅을 사용하는, GAP 프로그램이다(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI, U.S.). 또한 엄격한 조건하에서 본 발명에 따른 단백질을 인코딩하는 서열에 대한 상보체와 혼성화 할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 포함한다(Ausubel F et al, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York, NY, U.S., 1993)). 엄격한 조건은 본 발명에 속한 기술 분야에서 널리 알려져 있으며 분자 생물학에서 현재의 규약을 발견할 수도 있다(John Wiley & Sons, NY, U.S., Ch. Sec. 6.3.1-6.3.6 (1989)).

[0295] 나아가 본 발명은 본 발명의 범위 내에 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본 발명에 따른 상기 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질을 인코딩할 수 있는 상기 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터를 생산하는 기술 분야에서 널리 알려진 물질과 방법을 사용하여, 박테리아 플라스미드, 바이러스 벡터 및 파지 벡터를 포함한 알려진 벡터 속으로 삽입될 수 있다. 그러한 발현 벡터는 어떠한 선택된 숙주 세포 또는 무균 발현 시스템 내에서 본 발명에 따른 고려된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질의 생산을 지지하기 위해 필요한 상기 폴리뉴클레오티드를 포함할 것이다(하기 실시예에서 설명된 pTxb1 및 pIVEX2.3). 숙주 세포의 특정한 유형 또는 무균 발현 시스템에 사용되는 발현 벡터를 포함한 상기 특정한 폴리뉴클레오티드는 본 기술 분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져 있으며, 규칙적인 실험을 사용하게 결정될 수 있고, 구매될 수 있다.

[0296] 여기에서 사용되는, 상기 "발현 벡터"라는 용어는 하나 이상의 발현 단위를 포함하는, 선형 또는 원형, 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 상기 "발현 단위"는 관심 있는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 조각에 신호를 주고, 숙주 세포 내에서 핵산 부분의 발현을 제공할 수 있다. 발현 단위는, 작동되는 형식에서, 전형적으로 전사 프로모터, 대상 폴리펩티드를 인코딩하는 개시 리딩 프레임, 및 전사 종결 인자로 이루어진다. 발현 벡터는 하나 이상의 발현 단위를 포함한다. 따라서, 본 발명에서, 단일 폴리펩티드 사슬(예를 들어, 시가 독소 작동체 영역으로 유전적으로 재조합된 scFv)을 포함하는 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질을 인코딩하는 발현 벡터는 적어도 하나의 단일 폴리펩티드 사슬용 발현 단위를 포함하는데 반면, 두 가지 이상의 폴리펩티드 사슬(예를 들어, 독소 작동체 영역에 연결된 V_L 도메인을 포함하는 한 사슬 및 V_H 도메인을 포함한 두 번째 사슬)을 포함하는 단백질은, 단백질의 두가지 폴리펩티드 사슬의 각각을 위한 하나씩의 적어도 두 가지 이상의 발현 단위를 포함한다. 본 발명에 따른 다중-사슬 단백질의 발현을 위하여, 각 폴리펩티드 사슬용 발현 단위는 다른 발현 벡터 상에 분리되어 포함될 수 있다(예를 들어, 발현은 각 폴리펩티드 사슬을 위한 발현 벡터가 유도된 숙주 세포와 함께 이루어질 수 있다).

[0297] 폴리펩티드 또는 단백질의 직접적으로 일시적이거나 안정적인 발현을 가능하게 하는 발현 벡터는 본 기술 분야에 널리 알려져 있다. 상기 발현 벡터는 일반적으로 하나 이상의 다음에 나오는 것들을 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다: 이중신호순서(heterologous signal sequence) 또는 펩티드, 복제 원형, 하나 이상의 마커 유전자, 개선제, 프로모터, 및 전사 종결 시퀀스, 이들 각각은 본 기술 분야에 널리 알려져 있다. 선택적으로 본 발명이 속한 기술 분야에서 알려진 조절 제어 시퀀스, 통합 시퀀스 및 유용한 마커들이 사용될 수 있다.

[0298] 상기의 "숙주 세포"란 용어는 상기 발현 벡터의 복제 또는 발현을 지지할 수 있는 세포와 관련되어 있다. 숙주 세포는 대장균과 같은 원핵세포일 수도 있고, 진핵세포(예를 들어, 효모, 곤충, 양서류, 조류, 또는 포유류 세포)일 수도 있다. 본 발명에 따른 폴리펩티드 및/또는 단백질을 생산할 수 있거나 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포주의 생성 및 분리는 본 기술 분야에서 표준적인 기술을 사용함으로써 완성될 수 있다.

[0299] 본 발명의 범위 내에 있는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 및/또는 단백질은 여기에 기술된 상기 폴리펩티드 및 단백질의 변종 또는 유도체일 수 있으며, 그것은 제공되는 하나 이상의 아미노산을 제거 또는 삽입 또는 하나 이상의 아미노산을 변경하여 폴리펩티드 및/또는 단백질을 인코딩하는 상기 폴리뉴클레오티드를 변형함에 의해 생산되는데, 숙주 세포에 의해 더욱 선택적인 발현을 나타내는 것과 같이, 바람직한 성질을 달성하기 위해서 더욱 적합하다.

[0301] IX. 전달 장치 및 키트

[0302] 어떤 구체예에서는, 본 발명은 개체에 전달을 위한 약학적 조성물과 같은, 본 발명에 따른 하나 이상의 구성 성분을 포함하는 장치와 관련된다. 따라서, 본 발명에 따른 하나 이상의 화합물을 포함하는 전달 장치는 다음과

같은 다양한 전달 방법에 의해 본 발명의 조성물을 환자에 투여하는데 사용될 수 있다: 정맥, 피하, 근육 또는 복강 주사; 경구 투약; 경피 투약; 폐 또는 점막 투약; 임플란트, 삼투압 펌프, 카트리지 또는 미세 펌프; 또는 본 기술 분야의 숙련자에게 알려진 다른 수단에 의한 방법.

[0303] 또한 적어도 하나의 본 발명에 따른 조성물을 포함한 키트도 본 발명의 범위 내에 있으며, 선택적으로 사용을 위한 포장 및 설명서도 본 발명의 범위 내에 있다. 키트는 투약 및 진단정보 수집용으로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 키트는 선택적으로 적어도 하나의 부가적인 시약을 포함할 수 있다(예를 들어, 표준 시약, 마커 등과 같은) 키트는 전형적으로 상기 키트의 성분의 확장된 사용을 설명하는 설명서를 포함한다. 나아가 상기 키트는 여기에 기재된 바와 같은 본 발명에 따른 화합물, 조성물 또는 관련된 방법을 사용하는 치료적인 전략에 반응하는 군에 환자가 속하는지 여부를 진단하거나, 샘플 또는 개체 내에서, 세포 유형(예를 들어, 종양 세포)을 감별하기 위한 시약 및 다른 수단을 포함한다.

[0305] X. 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 또는 단백질 또는 그에 따른 약학적 및/또는 진단 조성물을 사용하기 위한 방법

[0306] 일반적으로, 본 발명의 목적은 약리적인 활성제를 제공하며 동시에 그것을 포함한 조성물을 제공하는데, 이것은 질병, 장애, 및 어떠한 암, 종양, 성장 이상, 면역 장애, 또는 여기에서 언급된 병리적인 증상과 같은 증상의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은, 상기 표적화된 세포의 사멸, 표적화된 세포 속으로 부가적인 외인성 물질 전달, 표적화된 세포 내부의 라벨링, 진단 정보 수집, 및 질병, 장애, 및 여기에서 언급된 증상의 치료를 위하여 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드, 단백질, 및 약학적 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

[0307] 특별히, 본 발명의 목적은 본 기술 분야에서 현재 알려진 제제, 조성물, 및/또는 방법과 비교할 경우 이점이 있는, 그러한 약리적인 활성화제, 조성물, 및/또는 방법을 제공하기 위함이다. 따라서, 본 발명은 특정한 폴리펩티드 서열을 가진 폴리펩티드 및 단백질 및 그에 따른 약학적 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. 예를 들어, SEQ ID NOs: 4-59 내에서 상기 폴리펩티드 서열 중 어떤 것은 다음 방법에서 사용된 단백질 성분으로서 특정하게 사용될 수 있다.

[0308] 본 발명은 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물로서, 세포 내 또는 세포외에서, 세포 접촉 단계를 포함하여 세포를 사멸하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 상기 폴리펩티드, 단백질 및 약학적 조성물은 상기 청구된 문제의 조성물로서 세포를 접촉하여 특정 세포 유형을 사멸시키는데 사용될 수 있다. 어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은 암 세포, 감염된 세포, 및/또는 이형 세포와 같은, 다른 세포 유형의 혼합물 내에서 특정한 세포 유형을 사멸시키는데 사용될 수 있다. 어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은 다른 세포 유형의 혼합물 내에서 암 세포를 사멸시키는데 사용될 수 있다. 어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은, 이식 전 조직과 같은 다른 세포 유형의 혼합물 내에서 특정한 세포 유형을 사멸시키는데 사용될 수 있다. 어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은, 치료 목적을 위하여 투약 전 조직과 같은, 세포 유형의 혼합물 내에서 특정한 세포 유형을 사멸시키는데 사용될 수 있다. 어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은, 바이러스 또는 미생물에 의해 감염된 세포를 선택적으로 사멸시키거나, 세포 표면 생체분자와 같은, 특별한 세포 외 표적 생체분자를 발현하는 세포를 선택적으로 사멸시키는데 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은, 예를 들어, 생체 내외 조직으로부터 원하지 않는 세포 유형의 제거 용도, 숙주 질병에 대한 치료 면역 반응 조절 용도, 항균제 용도, 항기생충제 용도, 및 원치 않는 세포 유형의 이식 조직 제거 용도를 포함한 다양한 적용을 가진다.

[0309] 어떤 구체예에서, 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은, 단독으로 또는 다른 화합물 또는 약학적 조성물과 결합하여, 환자 치료를 위한 필요 등에 의해, 생체 내외에서, 세포군에 적용될 때 강한 세포 사멸 활성을 나타낼 수 있다. 특정 세포 유형에 고친화성 결합 영역을 사용한 효소적으로 활성화된 시가 독소 영역의 전달을 표적화함에 의해서, 이러한 강력한 세포 사멸 활성은 기관 내에서 특이적이면서도 선택적으로, 암세포, 신생 종양 세포, 악성 세포, 비악성(non-malignant) 종양 세포, 또는 감염된 세포와 같은 특정 세포 유형의 사멸을 제한시킬 수 있다.

[0310] 본 발명은 환자의 필요에 따라서, 본 발명에 따른 적어도 하나의 세포 독성 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 그에 따른 약학적 조성물을 환자에 투약하는 단계를 포함하여, 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다.

- [0311] 상기의 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 그에 따른 약학적 조성물의 구체적인 실시예들은 암 또는 종양 세포와 물리적으로 결합되어 발견되는 세포 외 생체분자를 표적화함에 의해 환자 내에 있는 암세포를 사멸시키는 데 사용될 수 있다. 상기의 "암 세포" 또는 "암의 세포" 라는 용어는 비정상적인 속도로 성장하고 분열하는 다양한 종양 세포에 적용될 수 있으며, 당업자들에게는 자명하게 알려져 있을 것이다. 상기의 "종양 세포"라는 용어는 악성 및 비악성 세포 모두를 포함한다. 일반적으로, 암 및/또는 종양은 치료 및/또는 예방에 적용되는 질병, 장애, 또는 증상으로서 정의될 수 있다. 암 세포 및/또는 종양 세포에 의해 이루어지는 상기의 암 및 종양 (악성 또는 비악성)들은 당업자들에게는 자명하게 알려져 있을 것이다. 종양 세포는 종종 하나 이상의 다음과 같은 성질과 관련이 있다: 비규칙적인 성장, 분화의 결여, 국소 조직 침윤, 혈관형성, 및 전이.
- [0312] 본 발명에 따른 상기의 세포 독성 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 그에 따른 약학적 조성물의 어떠한 구체적인 예는 면역 세포와 물리적으로 결합 되어 발견되는 세포 외 생체분자를 표적화 함에 의해서 환자 내에서 면역 세포(건강하거나 악성이거나)를 사멸시키는 데 사용될 수 있다.
- [0313] 본 발명에 따른 상기의 세포 독성 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 그에 따른 약학적 조성물의 어떠한 구체적인 예는, 감염된 세포와 물리적으로 결합 되어 발견되는 세포 외 생체분자를 표적화 함에 의해서 환자 내에서 감염된 세포를 사멸시키는 데 사용될 수 있다.
- [0314] 악성, 종양, 또는 다른 원치않는 T-세포 및/또는 B-세포의 환자 세포 군(예를 들어, 골수) 제거 그리고 이후 상기 환자 내부로 상기의 제거된 물질 T-세포 및/또는 B-세포를 재주입하기 위한 목적을 위하여 본 발명에 따른 단백질 또는 그에 따른 약학적 조성물을 이용하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다(van Heeckeren W et al, Br J Haematol 132: 42-55 (2006); (Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).
- [0315] 환자로부터 제거된 분리된 세포군으로부터 T-세포 및/또는 B-세포의 생체 외 제거를 목적으로, 본 발명에 따른 단백질 또는 그에 따른 약학적 조성물을 이용하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다. 하나의 비제한적인 실시예에서, 본 발명에 따른 상기의 단백질은 기관 및/또는 조직 이식 거부 예방을 위한 방법에서 사용될 수 있는데, 상기의 공여 T-세포 및/또는 B-세포를 제거하기 위하여 공여 기관 또는 조직 내에서 본 발명에 따른 세포 독성 단백질 또는 그에 따른 약학적 조성물로 이식하기 앞서 분산된다(Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).
- [0316] 골수 및 줄기 세포 이식을 받기 위한 환자 내에서, 이식편대숙주 질환에 대한 예방, 및 내성의 유도로서, 공여 세포군으로부터 T-세포 및/또는 B-세포를 제거하기 위한 목적을 위하여, 본 발명에 따른 세포 독성 단백질 또는 그에 따른 약학적 조성물을 이용하는 것은 또한 본 발명의 범위 내에 있다(van Heeckeren W et al, Br J Haematol 132: 42-55 (2006); (Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).
- [0317] 본 발명에 따른 세포 독성 단백질 또는 그에 따른 약학적 조성물의 어떤 실시예는 감염된 세포와 물리적으로 결합 되어 발견되는 세포 외 생체분자를 표적화 함에 의해서 환자 내에서 감염된 세포를 사멸시키는 데 사용될 수 있다.
- [0318] 나아가, 본 발명은 환자의 필요에 따라 본 발명에 따른 적어도 하나의 상기의 세포 독성 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 그에 따른 약학적 조성물을 치료적으로 효과적인 용량만큼 투여하는 단계를 포함하여, 질병, 장애, 또는 증상을 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법을 사용하여 치료될 수 있는 고려되는 질병, 장애, 및 증상은 암, 악성 종양, 비악성 종양, 성장 이상, 면역 장애, 및 미생물 감염을 포함한다. 본 발명에 따른 화합물의 "치료적으로 효과적인 복용"의 투약은 질병 증상의 심각성을 감소시킬 수 있으며, 질병의 증상이 없는 기간 및 빈도를 증가시키거나, 상기 질병의 영향에 기인한 손상 또는 장애를 예방할 수 있다.
- [0319] 본 발명에 따른 화합물의 상기의 치료적으로 효과적인 용량은 투약의 경로, 치료받는 포유 동물의 유형, 및 고려되는 특정 환자의 물리적인 성질에 의존할 것이다. 이러한 복용량을 결정하기 위한 이러한 인자 및 그들의 관계는 의학 분야에서 숙련된 종사자들에게는 널리 알려져 있는 사실이다. 이러한 용량 및 투약 방법은 선택적인 효율성을 달성하기 위하여 맞추어질 수 있는데, 무게, 식습관, 동시 복용하는 약물 및 기타 요소와 같은 요소들에 의해서 결정되며, 의학 분야 종사자들에게 이러한 사실은 널리 알려져 있다. 인간을 위한 사용을 위해서는 가장 적당한 복용량 및 복용 형태가 본 발명에 의해서 얻어진 결과에 의해 안내될 수 있고, 적절하게 계획된 임상적 시도들에서 확정될 수 있다. 효과적인 복용 및 치료 분석은 관련적인 수단에 의해 결정될 수 있는데, 실험실의 동물에게 소량을 적용하고 효과를 모니터링하면서 그 복용량을 증가시키고, 복용 방법 역시 조직적으로 다양하게 변화시킬 수 있다. 주어진 개체를 위한 선택적인 복용량을 결정함에 있어서, 다양한 요소들이 임상에서 고려될 수 있다. 그러한 고려들은 숙련자들에 있어서는 자명한 사실이다.

- [0320] 본 기술 분야에서 알려진, 투약의 허용가능한 경로는 분무, 장내, 비강, 눈, 경구, 비경구, 직장, 질내, 또는 경피(예를 들어, 크림, 젤 또는 연고의 국소 투약, 또는 경피 패치 수단에 의한)를 통한 투약을 포함하지만 이에 한정되는 것을 아니다. "비경구 투약"은 전형적으로 주사, 눈 아래, 수액, 동맥 내, 심장 내, 피내, 근육 내, 복강 내, 폐 내, 척수 내, 흉골 내, 척추 강내, 자궁 내, 정맥 내, 지주막 내, 피막 내, 피하, 경점막, 또는 경기관 투약을 포함한, 확장된 활동 영역을 통하거나 그 장소에서 주사로 주입되는 것과 연관되어 있다.
- [0321] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투약을 위하여, 복용 범위는 일반적으로 약 1 키로그램 당 0.0001에서 100 (mg/kg)까지, 및 이상, 보통으로는 숙주의 무게 1 키로그램 당 0.01에서 5 밀리그램 (mg/kg)을 적용할 것이다. 표본적인 복용량은 무게 1 키로그램 당 0.25 밀리그램, 1 밀리그램, 3 밀리그램, 5 밀리그램, 또는 1-10 밀리그램(mg/kg)이 될 수 있다. 표본적인 치료 체계는 하루 또는 이틀의 투약 또는 일주 또는 2주 투약, 2주에 한번, 3주에 한번, 4주에 한번, 한달에 한번, 2 또는 3달에 한번 또는 3달에서 6달에 한번으로 투약될 수 있다. 복용량은 특별한 환자를 위하여 치료적인 효과를 극대화하기 위해서 필수적으로 건강관리 전문가에 의해 선택되고 재적용될 수 있다.
- [0322] 본 발명의 약학적 조성물은 전형적으로 다양한 경우에서 동일한 환자에 투여될 수 있을 것이다. 단일 복용 사이의 간격은, 2-5일, 주, 달, 2 또는 3달, 6달, 또는 1년을 예로 들 수 있다. 투약 사이의 간격은, 또한 상기의 개체나 환자 내에서 규칙적인 혈중 농도 또는 마커에 근거하여 불규칙적일 수 있다. 본 발명에 따른 화합물의 복용 방식은 2주에서 4주간 6회 복용을 위하여 투약된 화합물로 개체 1 키로그램 당 1 밀리그램 또는 3 밀리그램의 정맥 투여 방식을 포함하며, 이후 3달마다 개체 1 키로그램당 3 밀리그램 또는 1 밀리그램을 투여하는 것을 포함한다.
- [0323] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 본 기술 분야에서 잘 알려진 하나 이상의 다양한 방법을 사용하면서, 하나 이상의 투약 경로를 경유하면서 투약될 수 있다. 상기의 투약 경로 및/또는 방식은, 전문가에게 인정받을 수 있으며, 상기의 바람직한 결과에 다양하게 의존할 것이다. 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 및 약학적 조성물을 위한 투약 경로는 정맥 내, 근육 내, 피내, 복강 내, 피하, 척추, 또는 주사 또는 주입과 같은 다른 투약의 비경구 경로를 예로써 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 및 약학적 조성물은 국소, 상피 또는 비강 내, 경구로, 질 동맥으로, 직장으로, 혀 밑으로, 또는 국소적인 점막 경로와 같은 비-비경구 경로에 의해 투약될 수 있다.
- [0324] 본 발명에 따른 치료적 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은 본 기술 분야에서 알려진 하나 이상의 다양한 의료가기로 투여될 수 있다. 예를 들어, 하나의 구체적인 예에서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 비침습적인 피하 주사 장치로 투여할 수 있다. 본 발명이 속한 기술 분야에서 널리 알려진 임플란트 및 모듈의 예들은, 전달 속도 제어를 위한 매물식 미세-주입 펌프; 피부를 통한 투약 수단; 정확한 주입 속도에서의 전달을 위한 주입 펌프; 연속적인 약물 전달을 위한 가변 유량 임플란트 주입; 및 삼투 약물 전달 시스템; 등을 포함한다. 상기 및 기타 다른 임플란트, 전달 시스템, 및 모듈은 본 기술 분야의 숙련자들에게 널리 알려져 있다.
- [0325] 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은 하나 이상의 치료적 또는 진단 체제와 결합하거나 단독으로 투여할 수 있다. 결합 치료는, 특별한 환자, 질병 또는 치료를 요하는 증상에 근거하여 선택된 적어도 하나의 다른 치료 체제와 결합된 본 발명에 따른 세포 독성 단백질 또는 그에 따른 약학적 조성물을 포함한다. 기타 체제의 예로는 치료적 또는 예방적 처치 방식에서 보완하거나 이로움을 주는 치료를 조절하고 하나 이상의 신호를 주는 경로를 조절하는, 그 중에서도 특히 세포 독성제, 항암제 또는 화학요법제, 소염제 또는 항증식제, 항균제 또는 항바이러스제, 성장 인자, 시토카인, 진통제, 치료적인 활성 소분자 또는 폴리펩티드, 단일 사슬 항체, 고전적 항체 또는 그에 따른 단편, 또는 핵산 분자를 포함한다.
- [0326] 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물로 환자를 치료하는 것은 표적화된 세포의 세포 사멸 및/또는 표적화된 세포의 성장 억제를 유도하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 세포 독성 단백질, 및 그것을 포함하는 약학적 조성물은, 특히 암, 종양, 기타 성장 이상, 면역 장애, 및 감염된 세포와 같은, 표적 세포를 사멸시키거나 제거하면서, 다양한 병리적 장애를 치료하는데 유용한 방법일 수 있다. 본 발명은, 종양 형성, 과활동 B-세포, 및 과활동 T-세포를 포함한 장애 세포 치료 및 세포 증식 억제를 위한 방법을 제공한다.
- [0327] 어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은 암, 종양(악성 및 비악성), 성장 이상, 면역 장애, 및 미생물 감염을 치료하거나 예방하는데 사용될 수 있다. 나아가, 상기의 생체 외 방법은, 골수 이식 수용자 내에서 거부현상을 치료하거나 예방하는 방법을 제공하기 위하여, 그리고 면역글로불린 내성을 달성하기위하여, 상기의 생체 내 방법과 결합될 수 있다.

- [0328] 어떤 구체예에서는, 본 발명은 악성 종양 또는 신생 종양 및 인간과 같은 포유 동물 개체 내에서 암과 관련된 기타 혈액 세포를 치료하는 방법을 제공하는데, 상기의 방법은 개체의 필요에 따라 본 발명에 따른 세포독성 단백질, 또는 약학적 조성물의 치료적으로 효과적인 용량을 투약하는 단계를 포함한다.
- [0329] 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 및 약학적 조성물은, 원치 않는 T-세포의 제거 용도, 이식편대숙주 질환을 치료하기 위한 면역 반응을 조절하는 용도, 항바이러스제로서의 용도, 항균제로서의 용도, 및 원치 않는 세포 유형을 이식 조직으로부터 제거하는 용도 등을 포함한 다양한 용도에 적용될 수 있다. 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 및 약학적 조성물은, 흔히 항 종양제를 의미하며, 그것들은 암 또는 종양 세포의 성장을 저해 및/또는 사멸을 유도함에 의하여 종양 또는 악성 세포의 성장, 변이, 또는 증식을 치료하고/하거나 예방할 수 있다.
- [0330] 어떤 구체예에서는, 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물은, B-세포, 원형질 세포- 또는 항체- 매개 질환 또는 장애, 백혈병, 림프종, 골수종, 인간 면역결핍 바이러스-관련 질병, 아밀로이드증, 용혈성 요독증후군, 다발동맥염, 패혈증성 쇼크, 크론병, 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 궤양성 대장염, 건선, 쇼그렌 증후군, 이식편대숙주, 이식 거부, 당뇨병, 맥관염, 경피증, 및 전신 홍반성 루프스와 같은 질병을 치료하는데 사용된다.
- [0331] 다른 관점에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 및 약학적 조성물의 어떤 구체예는 항균제를 의미하는데 그것은 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 프리온, 또는 원생동물에 의해 야기되는 미생물학적 병원성 감염의 시작, 성장, 또는 결과를 치료하고/하거나 예방할 수 있다.
- [0332] 상기의 환자 내에서 T-세포 또는 B-세포를 사멸시킬 목적으로, 환자에게 본 발명에 따른 상기의 세포 독성 단백질, 또는 그에 따른 약학적 조성물을 투여하여 T-세포 또는 B-세포에 의해 매개된 질병 또는 증상의 예방 또는 치료를 제공하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다. 이러한 사용은, 예를 들어, 인간 또는 비인적자원과 같이 이식된 물질의 원천에 상관없이, 골수 이식, 줄기 세포 이식, 조직 이식, 또는 기관 이식을 위하여 환자를 준비시키거나 조절시키는 데 적합하다.
- [0333] 이식편대숙주 질환을 예방하거나 치료하기 위하여, 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물을 사용하여 숙주 세포의 표적화된 세포 사멸을 통하여 골수 수용자에게 제공하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0334] 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 및 약학적 조성물은 환자의 필요에 따라, 환자에게 본 발명에 따른 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물의 치료적으로 효과적인 용량을 투약하는 과정을 포함해서 암을 치료하는 방법에 유용될 수 있다. 본 발명에서 제공하는 어떤 구체예는, 다음과 같이 이루어진 군으로부터 선택된 암을 치료하는 방법을 제공한다: 골수암(다발성 골수종 또는 유방 육종), 유방암, 중앙/말초 신경계 암(뇌암, 신경섬유종증, 또는 교아종), 위장암(위암 또는 대장암), 생식 세포암(난소암 및 고환암), 선암(췌장암, 부갑상선암, 침샘암, 또는 갑상선암), 두경부암(비인두암, 구강암, 또는 인두암), 혈액암(백혈병, 림프종, 또는 골수종), 신장-요로암(신장암 및 방광암), 간암, 폐/흉막암(흉막중피증, 폐소세포암종, 또는 비소세포성폐암), 전립선암, 육종(혈관 육종, 섬유 육종, 또는 활막 육종), 피부암(기저 세포암, 편평세포암종, 또는 흑색종), 및 자궁암.
- [0335] 본 발명의 폴리펩티드, 단백질, 및 약학적 조성물은 환자의 필요에 따라, 환자에게 치료적으로 효과적인 용량의 본 발명의 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물을 투약하는 과정을 포함한 면역 장애를 치료하는 방법에 유용될 수 있다. 본 발명에서 제공하는 어떤 구체예에서는, 다음과 같이 이루어진 군으로부터 선택된 질병과 연관된 염증과 관련된 면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다: 아밀로이드증, 강직성 척추염, 천식, 크론병, 당뇨병, 이식편대숙주 질환, 하시모토 갑상선염, 용혈성요독증후군, HIV-관련 질환, 홍반성 낭창, 다발성 경화증, 다발동맥염, 건선, 건선성 관절염, 류마티스성 관절염, 경피증, 패혈증성 쇼크, 쇼그렌 증후군, 궤양성 대장염, 및 맥관염.
- [0336] 본 발명에 따른 어떤 구체예 중에는 암, 종양, 기타 성장 이상, 면역 장애, 및/또는 미생물 감염의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 또는 약제의 구성 성분으로서 본 발명에 따른 상기의 폴리펩티드 또는 단백질을 사용하고 있다. 예를 들어, 환자의 피부 위에서 나타나는 면역 장애는 염증을 감소시키기 위하여 그러한 약제로 치료할 수 있다. 다른 예에서는, 피부 종양은 종양의 크기를 감소시키거나 완전하게 상기의 종양을 제거하기 위하여 그러한 약제가 사용될 수 있다.
- [0337] 유익한 임상적 효과는, 상기의 동일한 개체에 대하여 본 발명에 따른 다중 세포 독성 단백질의 순차적인 투약을

통한 치료 방식에 의해 얻어질 수 있는데, 동일한 치료의 순차적 투약을 하는 치료 방식으로 단일한 세포 독성 단백질에 대한 각각의 세포 독성 단백질은 지속적인 면역 반응의 성장을 피하거나 감소시키기 위하여 다른 영역에서 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 포함한다.

[0338] 본 발명에 따른 특정 세포 독성 폴리펩티드, 단백질, 및 약학적 조성물은, 분자 내에서, 면역 정신적 상해 및 신경 추적과 같은, 신경 외과적 적용에 사용할 수 있다(Wiley R, Lappi D, Adv Drug Deliv Rev 55: 1043-54 (2003)). 예를 들어, 상기의 표적 도메인은 신경 전달 물질 및 신경 펩티드와 같은 다양한 리간드로부터 선택되어 지거나 유도될 수 있는데, 수용체에 결합된 뉴런 순환 특이적 G-단백질과 같은, 뉴런 표면 수용체를 결합함에 의해서, 특이적인 뉴런 세포 유형을 표적화 한다. 유사하게, 상기의 표적 도메인은 뉴런 표면 수용체를 결합하는 항체로부터 선택되거나 유도될 수 있다. 시가 독소가 그들 자신의 역행성 축삭 수송을 강하게 지시하고, 본 발명에 따른 어떤 세포 독성 단백질은, 세포체로부터 멀리 주입된 세포 독성 단백질의 사이트에서 세포 외 표적을 발현하는 뉴런을 사멸시키는데 사용될 수 있다(Llewellyn-Smith I et al, JNeurosci Methods 103: 83-90 (2000)). 이러한 신경 세포-유형-특이적-표적 세포 독성 폴리펩티드 및 단백질은 감각 메커니즘(Mishra S, Hoon M, Science 340: 968-71 (2013)) 및 파킨슨병 및 알츠하이머와 같은 퇴행성 질환의 생성 모델 시스템(Hamlin A et al, PLoS One e53472 (2013))을 설명하기 위함과 같은 신경과학 연구에 있어서 사용된다.

[0339] 본 발명에 따른 어떤 구체에는, 신생 세포 및/또는 면역 세포 유형을 라벨링(label)하거나 검출하기 위하여 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 약학적 조성물, 및/또는 진단 조성물을 사용하는 방법이다. 세포 간 이동을 역행하여 특정 세포종 및 경로에 들어가는 본 발명의 폴리펩티드, 단백질 및 약학적 조성물의 능력에 근거하여, 특정 세포종의 내부적 구획은 검출을 위하여 라벨링 되어있다. 이것은, 환자 내에 제자리(in situ)에 있는 세포 상 또는 생체 조직 물질과 같은 기관으로부터 제거된 세포 및 조직 상에서 형성될 수 있다.

[0340] [295] 본 발명에 따른 어떤 구체적인 예는, 질병, 증상 및/또는 장애에 관한 정보를 수집 목적으로 세포 유형의 존재를 감별하기 위하여, 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 약학적 조성물, 및/또는 진단 조성물을 사용하는 방법이다. 상기의 방법은 분석 또는 진단 기술에 의해 세포 독성 분자를 검출하기 위하여 진단학적으로 충분한 양의 세포 독성 분자로 세포를 접촉하는 것을 포함한다. 상기의 "진단학적으로 충분한 양"은 이용되는 특별한 분석법 또는 진단 기술에 의해 정보를 수집하는 목적을 위하여 적합한 검출과 정확한 측정을 제공하는 양을 의미한다. 일반적으로, 생체 내 진단적 사용에서 전체 기관을 위한 상기의 진단학적으로 충분한 양은 개체 당 개체 1kg 당 발명에 따른 단백질에 연결돼 상기의 감별 촉진제 0.1 mg 에서 100 mg 사이의 비누적 복용이 될 것이다. 전형적으로, 이러한 정보 수집 방법에서 사용되는 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 단백질의 양은 가능한 적게 제공될 것이지만 진단학적으로는 여전히 충분한 양이 될 것이다. 예를 들어, 피험자에 투여되는 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물의 양은, 기관 내에서 생체 내 감별을 위하여 실행 가능한 적게 투여될 것이다.

[0341] 검출 촉진제와 결합된 본 발명에 따른 폴리펩티드 및 단백질의 세포-유형 특이적 표적화는 본 발명에 따른 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 결합된 세포를 검출하고 촬영하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 상기의 폴리펩티드 또는 단백질을 사용하는 세포를 영상화하는 것은 본 기술 분야에서 널리 알려진 기술에 의해 생체 내에서 시행될 수 있다. 진단 정보는 본 기술 분야에서 널리 알려진 다양한 방법, 즉 기관 전체 영상을 포함하거나 기관으로 부터 얻어진 체외 샘플을 사용하여 수집될 수 있다. 상기의 "샘플"이라는 용어는 혈액, 소변, 혈청, 림프, 타액, 항문 분비물, 질 분비물, 및 정액, 및 생체 조직 검사에 의해 얻어진 조직과 같은 수많은 것들을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 다양한 감별 촉진제는 자기 공명 촬영(MRI), 광학적 방법(직접, 형광, 및 생물 발광 촬영과 같은), 양전자 방사 단층 촬영(PET), 단일광자방출단층촬영(SPECT), 초음파, x-선 컴퓨터 단층 촬영, 및 상기 언급한 것들의 조합과 같은 기술에 의해 비침습적 생체 내 종양 촬영을 위하여 유용될 수 있다(Kaur S et al, Cancer Lett 315: 97-111 (2012)).

[0342] 본 발명의 어떤 구체에는, 암, 종양, 및/또는 면역 세포 유형의 내부를 라벨링하거나 감별하기 위한 진단 조성물로서, 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단백질, 또는 약학적 조성물을 사용하는 방법이다(Koyama Y et al, Clin Cancer Res 13 : 2936-45 (2007); Ogawa M et al, Cancer Res 69: 1268-72 (2009); Yang L et al, Small 5: 235-43 (2009)). 특이적 세포종을 들어가게 하고 세포 내 역행 세포 이송을 경유하기 위해, 본 발명에 따른 어떤 폴리펩티드, 단백질, 및 약학적 조성물의 능력에 근거하여, 특이적 세포 유형의 내부 구획은 검출을 위하여 라벨링 된다. 이것은 환자 내부 장소에 있는 세포 상 또는 생체 조직 검사 물질과 같은 기관으로부터 제거된 세포 및 조직 상에서 시행될 수 있다.

[0343] 본 발명에 따른 진단적 조성물은, 본 발명에 따른 관련된 약학적 조성물에 의해 강력하게 치료가능한 질병, 장

에, 또는 증상을 특성화하는데 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 물질의 어떤 조성물은, 환자가 치료 전략에 반응하는 그룹에 속하는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있는데, 그것은 여기에서 언급된 본 발명에 따른 화합물, 조성물 또는 관련 방법을 만들거나 본 발명에 따른 전달 장치를 사용하는데 매우 적합하다.

[0344] 본 발명에 따른 진단적 조성물은 암과 같은 질병이 검출된 후에 사용될 수 있는데, 원격 전이, 이종성, 및 암 진행 단계를 모니터링하는 것과 같이 질병을 더욱 특성화하기 위하여 조사된다. 질병, 장애 또는 감염에 대한 표현형 평가는 치료적 결정이 이루어지는 동안 진단 및 예측에 도움을 줄 수 있다. 질병 재발에 있어서, 본 발명의 어떤 방법은 시스템적인 문제에 대해 국지적인 부분을 차별화하는데 사용될 수 있다.

[0345] 본 발명에 따른 진단적 조성물은, 소분자 약물, 생물학적 약물, 또는 세포기반 치료와 같은 치료 유형에 무관하게 치료에 대한 반응을 평가하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 진단법의 어떤 구체예는 종양 크기 변화, 항원 양성 세포군 변화를 측정하는데 사용될 수 있는데, 숫자와 분포를 포함하거나, 환자에게 이미 투약되고 있는 치료에 의해 표적화된 항원보다 다른 마커를 모니터링하는 데에 사용할 수 있다(Smith-Jones P et al, Nat. Biotechnol 22: 701-6 (2004); Evans M et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108: 9578-82 (2011)).

[0346] 세포 유형의 존재를 감별하는데 사용되는 상기 방법의 어떤 구체예는 다음과 같은 질병, 장애, 및 증상에 관한 정보를 수집하는데 사용된다: 골수암(다발성 골수증 또는 유령 육종), 유방암, 중앙/말초 신경계 암(뇌암, 신경섬유종증, 또는 교아종), 위장암(위암 또는 대장암), 생식 세포암(난소암 및 고환암), 선암(췌장암, 부갑상선암, 침샘암, 또는 갑상선암), 두경부암(비인두암, 구강암, 또는 인두암), 혈액암(백혈병, 림프종, 또는 골수증), 신장-요로암(신장암 및 방광암), 간암, 폐/흉막암(흉막중피증, 폐소세포암종, 또는 비소세포성폐암), 전립선암, 육종(혈관 육종, 섬유 육종, 또는 활막 육종), 피부암(기저 세포암, 편평세포암종, 또는 흑색종), 자궁암, AIDS, 아밀로이드증, 강직성 척추염, 천식, 자폐증, 심장발생, 크론병, 당뇨병, 홍반성, 위염, 이식편거부반응, 이식편대숙주 질환, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 용혈성요독증후군, HIV-관련 질환, 홍반성 낭창, 림프증식성 질환, 다발성 경화증, 중증근무력증, 신경세포염증, 다발동맥염, 건선, 건선성 관절염, 류마티스 관절염, 경피증, 패혈증성 쇼크, 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루푸스, 폐양성 대장염, 맥관염, 세포 증식, 염증, 백혈구 활성화, 백혈구 집합, 백혈구 주화성, 백혈구 성숙, 백혈구 이동, 신경분화, 급성 림프구성 백혈병(ALL), T 급성 림프구성 백혈병/림프종(ALL), 급성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), B-세포 만성 림프구 백혈병(B-CLL), B-세포 전립선구성 림프종, 버키트 림프종(BL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML-BP), 만성 골수성 백혈병(CML), 대세포성 B-세포 림프종, 여포성 림프종, 모발상세포 백혈병(HCL), 호지킨스 림프종(HL), 혈관 대형 B-세포 림프종, 림프종양육아종증, 림프구 형질세포의 림프종, MALT 림프종, 외투세포 림프종, 다발성 골수증(MM), 자연살해세포백혈병, 노드 가장자리 영역 B-세포 림프종, 비-호지킨스 림프종(NHL), 형질 세포성 백혈병, 형질세포종, 원발성 삼출액 림프종, 전립선구성 백혈병, 전골수성 백혈병, 소림프구성 림프종, 비성의 주변영역 림프종, T-세포 림프종(TCL), 중쇄병, 단세포군감마글로불린병증, 단세포군 면역글로불린 퇴적 병, 골수형성이상증후군(MDS), 연쇄 다발성 골수증, 및 발덴스트롬 고대글로불린혈증.

[0347] 어떤 구체예에서는, 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질, 또는 그에 따른 약학적 조성물은, 진단만을 위하여 진단 및 치료 모두를 위하여 사용된다.

[0348] 본 발명에 따른 상기의 폴리펩티드는 선택된 항원결정기 영역에서 교란 여부에 근거한 특이적 항원결정기에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 면역 물질로서의 용도를 가진다. 본 발명에 따른 폴리펩티드는 포유동물에 대한 투약을 위한 면역 물질로서 사용되고/또는 시가 독소를 인식하는 면역글로불린 도메인을 발생시키기 위한 표시 화면에서 사용될 수 있다.

[0349] 나아가 본 발명은, 시가 독소균 개체의 A 서브유닛으로부터 유도된 탈면역된 시가 독소 작동체 영역과 특이적 세포 유형에 물리적으로 결합된 세포 외 표적 생체분자를 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 선택적인 세포 독성 단백질의 하기 비제한적인 실시예에 의해서 설명 되어질 수 있다.

[0351] [실시예]

[0352] 하기 실시예는 본 발명의 몇몇 특정의 구체예를 설명한다. 그러나 이들 실시예는 단지 예시적인 목적으로 제시되는 것이며, 본 발명의 범위나 조건을 한정하는 것으로 이해되어서는 안 된다. 하기 실시예에서의 실험은 표준 기술을 사용하여 행해졌으며, 다른 설명이 없는 한, 모두 당업자에게 공지되고 통상적인 방법에 의해 행해졌다.

[0353] 포유류의 치료 및 진단에 적용하기 위한 시가 독소-유래 폴리펩티드 영역을 개선하기 위하여, 전체 독소 작동체

영역을 통한 예측된 B-세포 항원결정기를 포유류 B-세포 매개(mediated) 면역 반응을 약화시킬 목적으로 체계적으로 교란시켰다. 복수 시가 독소의 A 서브유닛을 나타내는 아미노산 서열을 추정되는 항원성 및/또는 면역원성 항원결정기를 식별하기 위하여 분석하였다. B-세포 및 T-세포 항원결정기를 예측하기 위하여 이용가능한 단백질 데이터베이스 구조 데이터를 고려한 연산도구를 사용하였다. 항원결정기 예측은 경험적으로 입증되었다. 다양한 탈면역된 시가 독소 작용기 폴리펩티드를 천연의 시가 독소 A 서브유닛 내에 존재하는 항원결정기를 손실 및 시가 독소 작동체 기능의 보유에 대하여 실험적으로 시험하였다. 다양한 세포독성 단백질의 대표적인 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 생물학적 활성을 비-탈면역(non-de-immunized) 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 세포독성 단백질(여기서는 "야생형(wild-type)" 또는 "WT"라 칭함)과 비교하였다.

[0354] 하기 실시예의 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드는 다양한 세포독성 단백질 성분으로서 시가 독소 작동체 기능을 보유함을 입증한다. 대표적인 세포독성 단백질은 표적세포에 의해 발현되고 표적 세포로 주입된 표적 생체 분자에 결합한다. 내재된 세포독성 단백질은 리보솜을 비활성 시키기 위하여 그들의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 세포액(cytosol)까지 효과적으로 안내하고, 이어서 야생형 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 세포독성 단백질과 유사한 표적 세포의 세포고사를 유발하였다. 나아가 하기의 실시예는 본 발명의 세포독성 단백질의 전체적인 항원성 및/또는 면역원성을 감소하는 반면 강력한 세포독성을 유지하도록 복수 항원결정기 교란이 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 내에서 결합될 수 있음을 보여준다.

[0356] **실시예 1. 시가독소 A 서브유닛에서 면역원성 및 항원성 항원결정기 예측**

[0357] 시가 독소의 A 서브유닛 내에서의 항원성 및/또는 면역원성 사이트(sites)는 체계적으로 맵핑(mapped)된 적이 없었다. 다양한 시가 독소 A 서브유닛 내에서 항원 및/또는 면역원성 항원결정기를 예측하기 위하여 연상법을 이용하였다. 포유류 면역체계에서 반응을 잠정적으로 유발하는 B-세포 항원결정기와 CD4+ T-세포 항원결정기를 가상 환경에서 예측하였다.

[0358] ProImmune Inc.(Sarasota, FL, U.S.)의 REVEAL 시스템을 이용하여 시가양 독소 체인 A(PDB ID: 1DMD_A)의 폴리펩티드 서열 및 3D 구조 데이터로부터 시가양 독소 1(SLT-1A; SAQ ID No:1)의 성숙 A 서브유닛에 대하여 선형의 B-세포를 예측하였다.

[0359] 병행하여, BcePred 웹서버(Sahas, Raghav G, Lecture Notes in Comput SC: 3239;197-204(2004)), Bepipred Linear 항원결정기 예측(LarsenJetal., Immunome Res 2; 2(2006)), 및 ElliPro 항체 항원결정기 예측(Haste Andersen P et al., Protein Sci 15: 2558-67(2006); Ponomarenko J, Bourne P, BMC Struct Biol 7: 64(2007))을 사용하여 시가 독소(StxA; SEQ ID NO:2), 시가양 독소 1(SLT-1A; SEQ ID NO:1) 및 시가양 독소 2(Stx 2A; SEQ ID NO:3)의 A서브유닛의 아미노산 서열로부터 B-세포 항원결정기를 예측하였다. 다양한 연산 방법은 3개의 원형의(Prototypical) 시가 독소 A 서브유닛 내에서 B-세포 항원결정기 영역에 대하여 유사한 예측을 나타냈다.

표 1

선천적으로 배치된 아미노산 위치			
REVEAL	BcePred	Bepipred	ElliPro
	29-35	28-34	27-37
42-48	39-46	43-47	
58-66	55-61	56-64	57-66
96-103	105-111	100-115	96-110
144-151	141-147	147-151	144-153
183-189	181-187	183-185	180-190
		211-219	
243-251			243-257
257-268	261-267	254-268	
289-293	285-291		262-293

[0360]

[0361] 시가양 독소 1(SEQ ID NO:1)의 성숙한, 선천적인 A 서브유닛에 대한 B-세포 항원결정기 예측

표 2

선천적으로 배치된 아미노산 위치			
REVEAL	BcePred	Bepipred	Ellipro
	29-35	28-34	27-37
42-48	39-46	44-47	
58-66	55-61	56-64	57-66
96-103	105-111	100-115	96-110
144-151	141-147	147-151	144-153
183-189	181-187	183-185	180-190
		211-219	
243-251			243-257
257-268	261-267	254-268	
289-293	285-291		262-293

[0362]

[0363] 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙한, 선천적인 A 서브유닛에 대한 B-세포 항원결정기 예측

표 3

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

[0364]

[0365] 시가양 독소 2(SEQ ID NO:3)의 성숙한, 선천적인 A 서브유닛에 대한 B-세포 항원결정기 예측

[0367] 종전의 서열 정렬 연구는 중화 항체에 의하여 결합된 리신(ricin) 내에서 항원결정기에 기초하여 항원성 및/또는 면역원성인 시가 독소 A 서브유닛 내에서 면역 항원결정기 영역을 예측하였다.(Lebeda F, Olson M, Int J Biol Macromol 24: 19-26(1999); Zemel A, Ecale Zhou C, Bioinform Biol Insights 2: 5-13(2008)). 잔기 90-107 주위의 StxA 및 잔기 112-129 주위의 Stx2A 내에서 보존된 면역원성 항원결정기가 존재할 가능성이 있음을 예측하였다(Fraser M et al, Nature Struct Biol 1: 59 (1994); Lebeda F, Olson M, Int J Biol Macromol

24: 19-26 (1999); Zemla A, Ecale Zhou C, Bioinform Biol Insights 2: 5-13 (2008)). 그러나, 이 예측은 리신과 시가 독소 사이의 대량의 서열 변이성, 시가 독소의 A 서브유닛에 N-말단 알파나선 부재(lack), 및 리신에 비하여 시가 독소에서는 예측된 영역이 더 짧고 용매에 더 적게 노출됨과 같은 식물독소 리신과 시가 독소 사이의 큰 차이점으로 인해 인정하건대 신뢰할 수 없었다((Fraser M et al, Nature Struct Biol 1 : 59 (1994); Lebeda F, Olson M, Int J Biol Macromol 24: 19-26 (1999); Zemla A, Ecale Zhou C, Bioinform Biol Insights 2: 5-13 (2008)).

[0368] 미국국립 알러지 및 감염병 연구소(NIAID)에 의해 업로드된 면역 항원결정기 데이터베이스(IEDB)는 시가 독소의 모든 실험 특성화된 B-세포 및 T-세포 항원결정기를 제공한다. 최근에는, IEDB는 단일 시가 독소 A 서브유닛(Stx2dA)에 대해서만 단일 항원결정기만을 제공한다: IEDB 식별번호 110493, 실험적으로 결정되고, 아미노산 42-49, 96-100 및 245-260을 포함하는 하나의 불연속 B-세포 항원결정기((Smith M et al, Infect Immun 77: 2730-40 (2009))).

[0369] SLT-1A 내에서 둘 이상의 방법에 의해 식별된 9개의 예측 B-세포 항원결정기 영역이(표4) 하기 실시예에서 교란되었다.

표 4

에피토프 영역	선형적으로 배치된 아미노산 위치		
	SLT-1A	StxA	SLT-2A
			3-14
1	27-37	27-37	26-37
2	39-48	39-48	42-49
3	55-66	55-66	56-66
4	96-115	96-115	96-115
5	141-153	141-153	140-156
6	180-190	180-190	179-191
			210-218
7	243-257	243-257	240-260
8	254-268	254-268	262-278
9	285-293	285-293	281-297

[0370]

[0371] 원형의 시가 독소 A 서브유닛에 의해 공유된 9개의 추정되는 B-세포 항원결정기 영역

[0373] 또한, B-세포 항원결정기 및 면역원성 잔기(residues)를 예측하기 위하여 에피토포피아 웹서버를 이용하여 시가 독소 A 서브유닛을 분석하였다(Rubinstein N et al, BMC Bioinformatics 10: 287 (2009)). 선형의 아미노산 잔유물 스트레치(stretch) 내에서 대부분의 아미노산 잔유물에 대하여 에피토포피아 스코어 4 또는 5("high")에 기초한 SLT-1A에서 면역원성으로 예측된 선형의 아미노산 잔기 영역을 식별하기 위하여 에피토포피아(Epitopia)를 사용하였다(Epitope Region 0 아래로 표시됨, 하기 표 5 참조). 에피토포피아 분석에 기초하면, SLT-1A 내의 면역원성 항원결정기 영역 2(표 4 참조)는 위치 49를 포함할 수 있다. 항원결정기 분석에 기초하면, SLT-1A 내의 면역원성 항원결정기 영역 3은(표 4 참조) 위치 53을 포함하고 위치 62-66 주변까지 연장되고(Epitope Region 3* 아래로 표시됨, 아래 표 5 참조), SLT-1A 내의 항원결정기 영역은(표 4 참조) 위치 94를 포함하고(Epitope Region 4* 아래로 표시됨, 아래 표 5 참조), SLT-1A 내의 항원결정기 영역 6은(표 4 참조) 위치 179에서 시작하여 위치 188-190 주변까지 연장할 수 있다(Epitope Region 6* 아래로 표시됨, 아래 표 5 참조). 별표 표시된 B-세포 항원결정기 영역은 동일한 숫자의 식별자를 갖는 각각의 중복 영역을 모두 망라한다.

[0374] 이들 10개의 항원결정기 영역(#0-9)은 예측된 CD4+ T-세포 항원결정기와 비교되었다. T-세포 항원결정기는 ProImmune Inc.(Sarasota, FL, U.S.)에 의해 실행된 REVEAL™ Immunogenicity System(IS) T-세포 분석법

(assay)에 의해 시가양 독소 1(SEQ ID NO:1)의 성숙 A 서브유닛에 대해 예측되었다. 이 분석법은 CD8+ F세포가 고갈된 건강한 도너(donor) 세포 시료로부터 CD4+ T-세포에 의한 어떤 면역응답의 유발을 시험하기 위하여 단백질로부터 다중 중복 펩티드 서열을 사용한다. 13개의 예측된 B-세포 항원결정기 영역에서, 그들 모두는 최소한 하나의 예측된 CD4+ T-세포 항원결정기와 중복되었다(표 5). 표 5의 모든 예측된 B-세포 항원결정기 영역은 하기 실시예에서 개별적으로 또는 조합하여 교란되거나 제거되었다.

표 5

에피토프 영역	선천적으로 배치된 아미노산 위치	
	B-Cell Epitope Region	T-Cell Epitope (ProlImmune)
0	1-15	4-33
1	27-37	4-33; 34-78
2	39-48	34-78
3*	53-66	34-78
3	55-66	34-78
4*	94-115	77-103
4	96-115	77-103
5	141-153	128-168
6*	179-190	160-183
6	180-190	160-183
7	243-257	236-258
8	254-268	236-258
9	285-293	274-293

[0375]

[0376]

중복예측된 CD4+ T-세포 항원결정기를 갖는 예측된 B-세포 항원결정기 영역

[0378]

실시예 2. 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 탈면역

[0379]

시가양 독소 1의 A 서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도된 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 추정되는 B-세포 및 T-세포 내에서 삭제 및/또는 아미노산 치환이 행해졌다. 예측된 항원결정기를 교란하는 상기 설명한 점돌연변이 외에, 몇몇 구성체는 SLT-1A 내의 R223A, SLT-1A 내의 C242S, 및/또는 SLT-1A 내의 C261S와 같이, 시가 독소 작동체 효소 활성 또는 세포독성에 분류효과를 가지지 않는 하나 이상의 점돌연변이를 포함하였다.

[0380]

이 실시예에서, 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역은 시가-형 독소 1의 A 서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도되었다. SLT-1A의 아미노산 1-251을 부호화하는 폴리뉴클레오티드를 예측된 B-세포의 하나 이상의 교란을 갖는 다양한 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 부호화하는 다양한 폴리뉴클레오티드를 생성하는 건본(template)으로 사용하였다. 하나 이상의 교란을 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 본 발명의 세포독성 단백질 범위 내에서 다양한 하나 이상의 교란을 갖는 다양한 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 효과적으로 탈면역하는 교란을 탐지하도록 이들 폴리뉴클레오티드로부터 발현되었다.

[0381]

SLT-1A의 카복시말단을 SEQ ID NO:1의 아미노산 1-251까지 절단하여 마지막 2개의 B-세포 항원결정기 영역(표 5, #8 및 #9), 마지막 2개의 CD4+ T-세포 항원결정기 영역(표 5, #8 및 #9), 및 Ellipro(289-293)에 의해 예측된 가장 높은 스코어의 불연속 B-세포 항원결정기를 제거하였다. 또한 위치 251에서의 절단은 가상의 B-세포 및 T-세포 항원결정기를 포함하는 제7 항원결정기 영역을 교란시킬 수 있다.(표 5)

[0382]

당업계에서 알려진 방법을 사용하여, 합리적으로 선별된 아미노 치환체가(표 6) SEQ ID NO:1의 아미노산 1-251를 포함하는 절단된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 내에서 생성되었다. 항원결정기 영역 #0에서(표 5), 최소한 7개의 다른 아미노산 치환체가 합성되어 시험되었다(표6). 항원결정기 영역 #0에서, 라이신은 시가양 독소 1(SEQ ID NO:1)의 성숙A 서브유닛 내에서 위치 1에 선천적으로 위치하고, 시가 독소(SEQ ID NO:2)는 메티오닌

(K1M)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #0에서, 트레오닌(threonine)은 시가양 독소 1(SEQ ID NO:1)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 4에 선천적으로 위치하고, 시가 독소(SEQ ID NO:2)는 이소류신(isoleucine)(T4I)로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #0에서, 세린(serine)은 시가양 독소 1(SEQ ID NO:1)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 8에 선천적으로 위치하고, 시가 독소(SEQ ID NO:2)는 이소류신(S8I)로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #0에서, 트레오닌은 시가양 독소 1(SEQ ID NO:1)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 9에 선천적으로 위치하고, 시가 독소(SEQ ID NO:2)는 이소류신(T9I) 및 발린(valine)(T9V)에 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #0에서, 라이신은 시가양 독소 1(SEQ ID NO:1)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 11에 선천적으로 위치하고, 시가 독소(SEQ ID NO: 2)는 알라닌(K11A) 및 히스티딘(K11H)에 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #0, K1, T4, S8, T9 및 K11 돌연변이된 하기 아미노산 잔류물은 용매 노출되도록 에피토포아 웹서버에 의해 예측되었다.

[0383] 항원결정기 영역 #1에서(표 5), 세린은 시가양 독소 1(SEQ ID NO:1)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 33에 선천적으로 위치하고, 시가 독소(SEQ ID NO:2)는 이소류신(S33I)에 돌연변이 되었다.

[0384] 항원결정기 영역 #2에서(표 5), 시가양 독소(SED ID NO:1)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 45에 선천적으로 배치된 세린은 발린(S45V) 및 이소류신(S45I)로 돌연변이 되었고, 시가양 독소 1(SEQ ID NO:1)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 47에 선천적으로 배치된 아스파르테이트(aspartate)는 글라이신(D47G)으로 돌연변이 되었다.

[0385] 항원결정기 영역 #3*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SED ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 53에 선천적으로 배치된 아스파라진산염은 알라닌(D53A), 글리신(D53G) 및 아스파라긴(D53N)으로 돌연변이 되었다. D53 잔기는 용매 노출되도록 에피토포아 웹서버에 의해 예측되었고, 5 또는 'high'의 면역원성 값을 나타냈다. 항원결정기 영역 #3 및 #3*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 55에 선천적으로 배치된 아르기닌은 알라닌(R55A), 발린(R55V) 및 류신(R55L)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #3 및 #3*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 58에 선천적으로 배치된 아스파라진산염은 알라닌(D58A), 발린(D58V) 및 페닐알라닌(D58F)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #3 및 #3*에서, 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 59에 선천적으로 배치된 아스파라진산염은 알라닌(P59A)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #3 및 #3*에서, 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 60에 선천적으로 배치된 글루탐산염은 이소류신(E60I), 트레오닌(E60T), 및 아르기닌(E60R)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #3 및 #3*에서, 시가-형 독소(SED ID NO:1) 및 시가 독소(SED ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 61에 선천적으로 배치된 글루탐산염은 알라닌(E61A), 발린(E61V), 및 류신(E61L)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #3 및 #3*에서, 시가양 독소(SED ID NO:1) 및 시가 독소(SED ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 62에 선천적으로 배치된 글라이신은 알라닌(G62A)으로 돌연변이 되었다.

[0386] 항원결정기 영역 #4*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 94에 선천적으로 배치된 아스파라진산염은 알라닌(D94A)으로 돌연변이 되었다. 이 D94 잔기는 용매 노출되도록 에피토포아 웹서버에 의해 예측되었고, 5 또는 'high'의 면역원성 값을 나타냈다. 항원결정기 영역 #4 및 #4*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 96에 선천적으로 배치된 세린은 이소류신(S96I)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #4 및 #4*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 109에 선천적으로 배치된 세린은 발린(S109V)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #4 및 #4*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 110에 선천적으로 배치된 글라이신은 알라닌(G110A)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #4 및 #4*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 112에 선천적으로 배치된 세린은 발린(S112V)으로 돌연변이 되었다.

[0387] 항원결정기 영역 #5에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 147에 선천적으로 배치된 글라이신은 알라닌(G147A)으로 돌연변이 되었다.

[0388] 항원결정기 영역 #6*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 179에 선천적으로 배치된 아르기닌은 알라닌(R179A)으로 돌연변이 되었다. 이 R179 잔기는 용매 노출되도록 에피토포아 웹서버에 의해 예측되었고, 5 또는 'high'의 면역원성 값을 나타냈다. 항원결정기 영역 #6 및 #6*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 180에 선천적으로 배치된 트레오닌은 글라이신(T180G)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #6 및 #6*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 181에 선천적으로

배치된 트레오닌은 이소류신(T181I)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #6 및 #6*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 183에 선천적으로 배치된 아스파라진산염은 알라닌(D183A) 및 글라이신(D183G)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #6 및 #6*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 184에 선천적으로 배치된 아스파라진산염은 알라닌(D184A) 및 페닐알라닌(D184F)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #6 및 #6*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 185에 선천적으로 배치된 류신은 발린(L185V)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #6 및 #6*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 186에 선천적으로 배치된 세린은 알라닌(S186A) 및 페닐알라닌(S186F)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #6 및 #6*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 187에 선천적으로 배치된 글라이신은 알라닌(G187A)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #6 및 #6*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 188에 선천적으로 배치된 세린은 알라닌(R188A) 및 류신(R188L)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #6 및 #6*에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 189에 선천적으로 배치된 세린은 알라닌(S189A)으로 돌연변이 되었다.

[0389] 항원결정기 영역 #7에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 248에 선천적으로 배치된 아르기닌은 알라닌(R248A)으로 돌연변이 되었다. 항원결정기 영역 #7에서(표 5), 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 251에 선천적으로 배치된 아르기닌은 알라닌(R251A)으로 돌연변이 되었다.

[0390] 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 49에 선천적으로 배치된 류신은 알라닌(L49A)으로 돌연변이 되었다. 이 L49 잔기는 용매 노출되도록 에피토포아 웹서버에 의해 예측되었고, 4의 면역원성 값을 나타냈다. 시가양 독소(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에서 위치 205에 선천적으로 배치된 아르기닌은 알라닌(R205A)으로 돌연변이 되었다. 이 R205 잔기는 용매 노출되도록 에피토포아 웹서버에 의해 예측되었고, 5 또는 'high'의 면역원성 값을 나타냈다.

표 6

항원결정기 영역 교환	선천적으로 배치된 아미노산 위치		
	치환체	B-Cell Epitope Region	T-Cell Epitope Region
0	K1M	1-15	4-33
0	T4I	1-15	4-33
0	S8I	1-15	4-33
0	T9V	1-15	4-33
0	T9I	1-15	4-33
0	K11A	1-15	4-33
0	K11H	1-15	4-33
1	S33I	27-37	4-33, 34-78
2	S45V	39-48	34-78
2	S45I	39-48	34-78
2	D47G	39-48	34-78
2	N48V	39-48	34-78
2	N48F	39-48	34-78
-	L49A	immunogenic residue	34-78
3*	D53A	53-66	34-78
3*	D53G	53-66	34-78
3*	D53N	53-66	34-78
3 & 3*	R55A	55-66	34-78
3 & 3*	R55V	55-66	34-78
3 & 3*	R55L	55-66	34-78
3 & 3*	I57F	55-66	34-78
3 & 3*	D58A	55-66	34-78
3 & 3*	D58F	55-66	34-78
3 & 3*	P59A	55-66	34-78
3 & 3*	P59F	55-66	34-78
3 & 3*	E60I	55-66	34-78
3 & 3*	E60T	55-66	34-78
3 & 3*	E60R	55-66	34-78
3 & 3*	E61A	55-66	34-78
3 & 3*	E61V	55-66	34-78
3 & 3*	E61L	55-66	34-78
3 & 3*	G62A	55-66	34-78

[0391]

4*	D94A	94-115	77-103
4 & 4*	S96I	96-115	77-103
4 & 4*	S109V	96-115	
4 & 4*	G110A	96-115	
4 & 4*	S112V	96-115	
5	G147A	141-153	128-168
6*	R179A	179-190	160-183
6 & 6*	T180G	180-190	160-183
6 & 6*	T181I	180-190	160-183
6 & 6*	D183A	180-190	160-183
6 & 6*	D183G	180-190	160-183
6 & 6*	D184A	180-190	
6 & 6*	D184F	180-190	
6 & 6*	L185V	180-190	
6 & 6*	S186A	180-190	
6 & 6*	S186F	180-190	
6 & 6*	G187A	180-190	
6 & 6*	R188A	180-190	
6 & 6*	R188L	180-190	
6 & 6*	S189A	180-190	
-	R205A	immunogenic residue	
7	R248A	243-257	236-258
7	R251A	243-257	236-258

[0392]

[0393] 대표적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드 내에서의 아미노산 치환체

[0395] 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 아미노산 치환은 세포-표적 결합 영역을 갖는 추정되는 세포독성 단백질의 성분으로 시험하였다. 상기 세포독성 단백질은 융합단백질을 형성하기 위하여 함께 결합된 면역글로불린-형 결합영역 및 시가 독소 작동체 영역을 포함하였다. 이들 추정되는 세포독성 융합단백질은 이미 공지된 박테리아 시스템을 사용하여 그들을 부호화하는 폴리뉴클레오티드로부터 발현에 의해 제조되었다.

[0397] **실시예 3. 하나 이상의 시가독소 작동체 기능을 보유하기 위한 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 실험적 시험**

[0398] 다양한 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 효소활성 및 세포독성을 보유하기 위하여 실험적으로 시험되었다.

[0399] 탈면역 후의 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 효소활성의 보유는 세포독성 단백질의 한 성분으로서 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 관점에서 리보솜 억제 분석법을 사용하여 시험하였다. 몇몇 실험에서, 이 실시예의 세포독성 단백질의 전체길이 코딩서열은 탐지 및 정화를 용이하게 하기 위하여 Streptag II를 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 함께 시작하거나 종료된다.

[0400] 탈면역된 세포독성 단백질의 리보솜 불활성 성능은 TNT Quick Coupled Transcription/Translation Kit(L1170 Promega Madison, WI, U.S)를 사용하는 무세포 시험관내 단백질 번역 분석법을 이용하여 측정되었다. 이 키트는 Luciferase T7 Control DNA(L4821 Promega Maddison, WI, U.S) 및 TNT Quick Master Mix를 포함한다. 이 리보솜 활성반응은 제조업자의 교본에 따라 제조되었다. 시험되는 돌연변이된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역을 포함하는 단백질의 일련의 10-배 희석물은 적절한 버퍼 내에서 제조되었고, 일련의 동일한 TNT 반응혼합물 성분들이 각각의 희석물에 대해 생성되었다. 이 희석물의 각각의 시료를 Luciferase T7 Control DNA 와 함께 각각의 TNT 반응 혼합물과 결합시켰다. 이 시험 시료를 30℃에서 1.5시간 배양시켰다. 배양후에, Luciferase Assay Reagent(E1483 Promega, Madison, WI, U.S)를 모든 시험시료에 부가하였고 루시페라제 단백질 번역 양을 제조업자의 교본에 따라 발광에 의해 측정하였다. 번역 억제 수준을 전체 단백질의 로그변형 농도 대 상대 발광단위

의 비선형 회귀 분석에 의해 측정하였다. 통계 소프트웨어(Graph Pad Prism, San Diego, CA, U.S.)를 사용하여, 최대 억제 반값 농도 (IC_{50})를 헤딩 투여량 응답-억제(heading dose-response-inhibition) 하에서 로그(억제제)의 Prism 소프트웨어 기능 대 응답(3파라미터)[$Y=Bottom + ((Top-Bottom)/(1+10^{-(X-LogIC50))})$]을 사용하여 각 시료에 대하여 계산하였다. 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역을 포함하는 각각의 단백질 및 내부 항원결정기 교란을 갖지 않은 야생형 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 제어 단백질에 대한 IC_{50} 을 계산하였다.

[0401] 리보솜 억제를 나타냈던 시가독소 작동체 폴리펩티드 영역의 예가 표 7에 나타난다. 표 7에 나타난 바와 같이, 야생형 SLT-1A 제어 구조물의 10-배 내에서 IC_{50} 을 나타내는 치환체-함유 구조물은 야생형에 상응하는 리보솜 억제 활성을 나타내는 것으로 생각되고, 야생형 SLT-1A제어의 10-배와 100-배 사이에서 IC_{50} 을 나타내는 구조물은 야생형에 비교하여 약화된 활성을 나타내는 것으로 생각되며, 야생형 SLT-1A 제어의 100-배보다 큰 IC_{50} 을 나타내는 구조물은 심하게 손상되거나 및/또는 불활성인 것으로 생각된다.

표 7

[0402]

항원결정기 영역	치환체	체내 리보솜 억제(IC_{50})
0	K1M, K11A	야생형 상당
0	S8I	야생형 상당
0	T9I	야생형 상당
1	S33I	야생형 상당
2	S45I	야생형 상당
3*	D53A	야생형 상당
3 & 3*	R55A	야생형 상당
3 & 3*	D58A	야생형 상당
3 & 3*	D58F	야생형 상당
3 & 3*	P59A	야생형 상당
3 & 3*	E60I	야생형 상당
3 & 3*	E60R	야생형 상당
3 & 3*	E61A	야생형 상당
3 & 3*	G62A	야생형 상당
4 & 4*	D94A, S96I	야생형 상당
6*	R179A	심하게 손상 또는 불활성
6 & 6*	D183A	야생형 상당
6 & 6*	D184A	야생형 상당
6 & 6*	D184F	야생형 상당
6 & 6*	R188A	야생형 상당
6 & 6*	D183A, D184A, R188A	야생형 상당
-	R205A	야생형 상당

[0403] 대표적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 리보솜 억제 활성

[0405] 탈면역 후에 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 다양한 예에 대한 세포독성 활성을 보유에 대하여 표적세포의 세포 표면에 발현되고 물리적으로 결합된 세포간 표적 생체분자(즉 "표적-발현세포" 또는 "표적 생체분자 양성세포")에 특이적으로 고친화도 결합가능한 결합영역을 갖는 세포독성 단백질의 성분으로서 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 의미에서 표적-세포-시별 분석법을 이용하여 시험하였다. 탈면역된 세포독성 단백질의 세포독성 수준을 세포독성 단백질의 결합영역의 표적 생체분자를 발현하지 않는 세포와 대비하여 표적-발현 세포를 사용하여 측정하였다.

[0406] 표적-발현세포는 384홈 플레이트(well plate)의 20 μ L 세포 배양기에 담겼다(단백질 추가 하루 전 담긴 부착 세포는 한 홈당 2×10^3 세포, 또는 단백질 추가와 같은 날에 담긴 부유 세포는 한 홈당 7.5×10^3 세포). 시험할 돌연변이된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함한 각 단백질의 일련의 10-배 희석액이 적절한 완충제에 준비되었고, 희석액 또는 완충제 대조(buffer control)의 5 μ L가 세포에 더해졌다. 미디어(media)만 담긴 대조 홈은 기준선 보정을 위해 사용되었다. 세포 샘플은 단백질과 또는 완충제만 같이 37°C로 3일간 그리고 5% 이산화탄소(CO_2)의 공기(atmosphere)에서 배양시켰다. 전체 세포 생존율을 제조업자의 교본에 따라 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(G7573 Promega Madison, WI, U.S.)를 사용하는 발광 판독을 사용하여 측정

하였다.

[0407] 실험 홈(Wells)의 퍼센트 생존율을 하기식으로 계산하였다: $(\text{Test RLU} - \text{Average Media RLU}) / (\text{Average Cells RLU} - \text{Average Media RLU}) \times 100$. 로그 폴리펩티드 농도 대 퍼센트 생존율을 Prism(Graph Pad Prism, SanDiego, CA, U.S.)으로 나타냈고, 로그(억제제)대 응답(3 파라미터) 분석법을 사용하여 시험 된 단백질에 대한 최대 세포독성 반값 농도(CD₅₀)를 측정하였다. 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 각각의 단백질 및 내부 항원결정기 교란을 갖지 않은 야생형 제어 단백질에 대한 CD₅₀을 계산하였다.

[0408] 대표적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역의 세포독성이 표 8에 나타났다. 표 8에 나타난 바와 같이, 야생형 SLT-1A 제어 구조물의 10-배 내에서 CD₅₀을 나타내는 치환체-함유 구조물은 야생형에 상응하는 리보솜 억제 활성을 나타내는 것으로 생각되고, 야생형 SLT-1A 제어의 10-배와 100-배 사이에서 IC₅₀을 나타내는 구조물은 야생형에 비교하여 약화된 활성을 나타내는 것으로 생각되며, 야생형 SLT-1A 제어의 100-배보다 큰 IC₅₀을 나타내는 구조물은 심하게 손상되거나 불활성인 것으로 생각된다.

표 8

[0409]

항원결정기 영역	치환체	세포독성(CD ₅₀)
0	K1M, K11A	야생형 상당
0	S8I	야생형 상당
0	T9I	감소됨
1	S33I	야생형 상당
2	S45I	야생형 상당
3*	D53A	야생형 상당
3 & 3*	R55A	야생형 상당
3 & 3*	D58A	야생형 상당
3 & 3*	D58F	야생형 상당
3 & 3*	P59A	야생형 상당
3 & 3*	E60I	야생형 상당
3 & 3*	E60R	야생형 상당
3 & 3*	E61A	야생형 상당
3 & 3*	G62A	야생형 상당
4 & 4*	D94A, S96I	감소됨
6*	R179A	심하게 손상 또는 불활성
6 & 6*	D183A	야생형 상당
6 & 6*	D184A	야생형 상당
6 & 6*	D184F	감소됨
6 & 6*	R188A	야생형 상당
6 & 6*	D183A, D184A, R188A	야생형 상당
-	R205A	야생형 상당

[0410] 대표적인 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 세포독성 활성

[0412] "성공적(successful)"이란 용어는 하나 이상의 시가 독소 작동체 기능을 보유했던 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 초래했던 예측된 항원결정기 영역 내에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 의미하는데 사용된다. 동일한 항원결정기 영역(#6 및 #6*) 내에서 개별적으로 성공적이었던 3개의 치환체(D183A, D184A 및 R188A)는 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드(D183A/D184A/R188A)를 생성하도록 결합되고, 이는 야생형에 상응하는 시가 독소 작동체기능을 보유했다.(표 7 및 표 8). 이들 결과는 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 동일한 항원결정기 내에서 몇몇의 성공적인 아미노산 치환체가 하나 이상의 시가 독소 작동체 기능의 상당한 수준을 여전히 보유하면서 더 큰 전체적인 항원결정기 교란을 갖는 항원결정기 교란을 생성하도록 결합된다. 유사하게, 항원결정기 영역 #0 및 #4 및 #4*는 각각의 영역 내에서 다중 아미노산 치환을 성공적으로 용인하였다(표 7 및 표 8: K1M/K11A 및 D94A/S96I). 동일한 항원결정기 영역 내에서 다양한 예의 치환체가 하나 이상의 시가 독소 작동체 기능을 여전히 유지하면서 더 큰 전체적인 항원결정기 교란을 갖는 항원결정기 교란을 생성하도록 결합된다.

[0413] 또한, 다른 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 본 실시예에 설명된 바와 같은 방법을 사용하는 시가 독소 작동체 기능 및 항원결정기 교란에 대해서 시험하였고, 이때 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 단일 예측된 B-

세포 항원결정기 영역 내에서 다중 아미노산 치환체를 포함하였다. 시험된 영역들은 시가양 독소 1(SEQ ID NO:1) 및 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 성숙 A 서브유닛 내에 존재하는 하기 선천적으로 배치된 영역들이다: 4-12, 43-52, 53-61, 104-112 및 180-188. 이들 단일-영역, 다중-치환 구조물은 SLT-1A의 잔기 1-251(SEQ ID NO:1)을 포함하는 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 세포독성 단백질 의미에서 다양한 조합으로 생성되었다. 이들 구조물은 야생형 SLT-1A 작동체 구조물에 상응하는 리보솜 억제제를 보유하고, 표적 세포에 선택적으로 세포독성을 갖는다. 이들 구조물은 단일 영역 내에서 다른 아미노산 치환체를 갖는 다양한 조합 내에 하나 이상의 하기 아미노산 치환체를 포함한다: 영역(region) 4-12: T4I, T9V, 및 K11H; 영역 43-52: S45V, D47G, N48V, N48F, 및 L49A; 영역 53-61: D53G, D53N, R55V, R55L, D58V, E60T, E61V 및 E61L; 영역 104-112: S109V, G110A, 및 S112V; 영역 180-188: T180G, T181I, D183G, L185V, S186F 및 R188L. 또한 이들 구조물의 서양의 분석은 야생형 SLT-1A를 인식할 수 있는 하나 이상의 항원에 의한 각 구조물의 감소된 또는 폐기된 인식을 나타내었다.(mAb1, pAb1 및 pAb2, 실시예 4).

[0414] 또한, 항원결정기 영역 #7은 리보솜 억제 활성 또는 세포독성에 상당한 영향을 미치지 않고 치환 R248A 또는 R251에 의해 교란된다. R248A 또는 R251A는 리보솜 억제 또는 세포독성을 변경하지 않고 상기 설명된 대표적인 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 속으로 성공적으로 도입된다.

[0415] 새로운 교란뿐 아니라 상기 언급된 개개의 항원결정기 교란이 결합되어 둘 이상의 항원결정기 영역의 교란을 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드(표9)의 다양한 조합을 생성하고, 이 실시예에 설명된 바와 같이 시가 독소 작동체 기능의 보유에 대해서 실험적으로 조사되었다. 표9는 단일의 항원결정기 영역 또는 5개의 다른 항원결정기 내에서, 아미노산 치환체의 조합을 갖는 구조물에 의해 나타나는 활성을 정리한 것이다.

표 9

[0416]

항원결정기 영역 교란	치환체	리보솜 억제	세포독성
3/3*, 4/4*	E60I, G110A	야생형 상당	야생형 상당
3/3*, 5	E60I, G147A	야생형 상당	야생형 상당
2, 6/6*	S45I, R188A	야생형 상당	야생형 상당
1, 4/4*, 5	S33I, G110A, G147A	야생형 상당	야생형 상당
2, 4/4*, 5	S45I, G110A, G147A	야생형 상당	야생형 상당
3/3*, 4/*4, 5	D58A, G110A, G147A	야생형 상당	야생형 상당
3/3*, 4/*4, 5	E60I, G110A, G147A	야생형 상당	야생형 상당
2, 3/3*, 4/*4, 5	S45I, D58A, E60I, G110A, G147A	야생형 상당	야생형 상당
2, 3/3*, 4/*4, 5	S45I, D58A, E60I, G62A, G110A, G147A	야생형 상당	감소됨
2, 4/4*, 5, 6/6*	S45I, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A	야생형 상당	야생형 상당
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, S186A	야생형 상당	야생형 상당
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, G187A	야생형 상당	야생형 상당
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, R188A	야생형 상당	야생형 상당
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, S189A	야생형 상당	야생형 상당
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, S186A, R188A	야생형 상당	감소됨
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, G187A, R188A	야생형 상당	감소됨
1, 2, 3/3*, 4/*4, 5	S33I, S45I, D58A, G110A, G147	야생형 상당	야생형 상당
2, 3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	S45I, D58A, E60I, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A	야생형 상당	감소됨
2, 3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	S45I, D58A, E60I, G62A, G110A, G147A, D183A, R188A	야생형 상당	감소됨

[0417] 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 세포독성 단백질 내에서의 다중 항원결정기 영역 아미노산 치환체 조합

[0419] 이들 결과는 시가 독소 작동체 기능을 보유하고 항원결정기를 교란하도록 실험적으로 예측된 치환을 의미하는,

시가 독소 작동체 폴리펩티드의 하나의 항원결정기 영역 내에서 모든 성공적인 아미노산 치환은 아니지만 대부분이 다른 항원결정기 영역 내에서 모든 다른 성공적인 아미노산 치환은 아니지만 대부분의 영역과 결합하여, 최소한 하나의 시가 독소 작동체 기능을 여전히 보유하면서 다중 항원결정기 영역 교란을 갖는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 형성한다는 것을 일반적으로 제시한다.

- [0421] 실시예 4. 항원성 및/또는 면역원성 항원결정기 교란에 대한 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 실험적 시험
- [0422] 공지된 항체에 의해 식별되는 경험적으로 입증할 수 있는 항원결정기에 기초한 B-세포 항원결정기의 교란을 확인할 수 있도록 실험적 시험을 행하였다. 변성화 조건 하에서 항원결정기 교란을 측정하기 위하여 서양의 분석법을 행하였다. 더 선천적인 단백질 접합 조건 하에서(즉 비변성화 조건 하에서) 항원결정기 교란을 측정하기 위하여 효소-결합 면역흡착제 분석법(ELISA)를 행하였다.
- [0423] Streptag II 및 야생형 시가독소 작동체 폴리펩티드 영역 또는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역을 포함하는 세포독성 단백질을 동형 4-20% 소듐도데실설페이트(SDS) 폴리아크릴아미드 겔(Lonza, Basel, CH)과 동일한 양으로 적재하고, 변성화 조건에서 전기이동을 작동시켰다. 생성된 겔을 제조업자의 교본에 따른 iBlot (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.) 시스템을 이용하여 폴리비닐 디플루오라이드(PVDF) 멤브레인으로 이동시키거나 Coomassie staining에 의하여 분석하였다. 생성된 멤브레인을 하기 항체를 사용하여 표준 조건에서 조사하였다: 토끼 다중클론 α -NWSHPQFEK(SEQ ID NO:134)(A00626, Genscript, Piscataway, NJ, U.S.) 이는 폴리펩티드 NWSHPQFEK(SEQ ID NO:134)를 Streptag II, 쥐 단일클론 α -StxA로 인식함(anti-SLT-1A mAb1 또는 mAb1)(BEI R-867 BEI Resources, Manassas, VA, U.S.), 토끼 다중클론 항체 α -SLT-1A(anti-SLT-1A pAb1 또는 pAb1)(Harlan Laboratories, Inc. Indianapolis, IN, U.S., custom antibody production, raised against SLT-1A amino acids 1-251), 및 토끼 다중클론 항체 α -SLT-1A(anti-SLT-1A pAb2 또는 pAb2)(Genscript, Piscataway, NJ, U.S., custom antibody production), 이는 폴리펩티드 RGIDPEEGRFN(SEQ ID NO:135) 및 HGQDSVRVGR(SEQ ID NO:136)에 대하여 상승함. 이 펩티드 서열 RGIDPEEGRFNN(SEQ ID NO:135)은 추정되는 B-세포 항원결정기 영역 #3(표 5)을 커버하고, 펩티드 서열 HGQDSVRVGR(SEQ ID NO:136)은 SLT-1A 및 StxA 내의 214-223에 위치한다. 멤브레인 결합 항체는 표준조건을 사용하여, 그리고 필요하다면 horseradish peroxidase(HRP) 결합 2차 항체(goat anti-rabbit-HRP 또는 goat anti-mouse-HRP, Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.)를 사용하여 검출하였다. 도 2-5는 숫자 표기된 겔 및/또는 멤브레인 레인(lanes)을 갖는 웨스턴 블롯(Western blots)을 나타내고, 숫자는 각 레인 속에 적재된 단백질 내에 시가 독소 작동체 영역이 포함되는 각각의 동일한 수를 표시한다.
- [0424] D58A 치환은 다중클론 α -SLT-1A, pAb2에 의해 식별되는 항원결정기의 하나를 성공적으로 교란시켰다(도 2). 유사하게 B58A/G110A/G147A의 3중 치환과 S33I/S45I/D58A/G110A/G147A 5중 치환 돌연변이는 α -SLT-1A pAb2(도 3; 도 4)에 의해 식별되는 항원결정기의 최소한 하나의 강한 교란 및 α -SLT-1A pAb1(도 3)에 의해 식별되는 항원결정기의 최소한 하나의 부분적인 교란을 나타낸다.
- [0425] S45I/G110A/G147A 및 S33I/G110A/G147A의 3중 치환 돌연변이는 α -SLT-1A pAb1에 의해 식별되는 최소한 하나의 항원결정기의 부분적인 교란을 나타낸다(도 3). S45I/G110A/G147A 3중 돌연변이는 단일클론 항체 mAb1에 의해 식별되는 항원결정기를 강하게 교란시키고, 다중클론 α -SLT-1A pAb2에 의해 식별되는 항원결정기를 부분적으로 교란시켰다(도 3; 도 4). D58A/G110A/G147A 3중 돌연변이는 단일클론 항체 mAb1에 의해 식별되는 항원결정기 및 다중클론 α -SLT-1A pAb2에 의해 식별되는 최소한 하나의 항원결정기를 매우 효과적으로 교란시켰다(도 3; 도 4).
- [0426] D183A/D184A/R188A 3중 돌연변이는 단일클론 항체 mAb1에 의해 식별되는 항원결정기의 매우 효과적인 교란을 나타낸다(도 5). D58A/G110A/G147A/R188A 4중 돌연변이는 단일클론 항체 mAb1에 의해 식별되는 항원결정기 및 α -SLT-1A pAb2에 의해 식별되는 최소한 하나의 항원결정기를 매우 효과적으로 교란시키고, α -SLT-1A pAb1에 의해 식별되는 최소한 하나의 항원결정기를 부분적으로 교란시켰다(도 5).
- [0427] D58A/G110A/G147A 3중, S45I/G110A/G147A 3중, 및 D58A/G110A/G147A/R188A 4중 돌연변이 내에서(하나의 mAb1에 의해 식별되고, 나머지는 pAb2에 의해 식별되는) 교란된 항원결정기는 두개의 비연속 영역 내에 잔류하는 것 같다. 그래서 D58A/G110A/G147A 3중, S45I/G110A/G147A 3중, 및 D58A/G110A/G147A/R188A 4중 돌연변이 각각은 동시에 교란되는 최소한 두 개의 다른 항원결정기를 갖도록 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 포함하였다.

- [0428] 유사하게, D58A/G110A/G147A 3중, S45I/G110A/G147A 3중, S33I/G110A/G147A 3중 및 D58A/G110A/G147A/R188A 4중 돌연변이 내에서(pAb1 및 pAb2에 의해 식별되는 항원결정기) 교란된 항원결정기는 두 개의 비연속 영역 내에 잔류하는 것 같다. 그래서 D58A/G110A/G147A 3중, S45I/G110A/G147A 3중, S33I/G110A/G147A 3중 및 D58A/G110A/G147A/R188A 4중 돌연변이 각각은 동시에 교란되는 최소한 두 개의 다른 항원결정기를 갖도록 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 포함하였다.
- [0429] 세포독성 단백질 관점에서 교란된 다중 항원결정기 영역을 갖는 탈면역 시가 독소 작동체 영역을 식별하는 mAb1의 성능을 측정하기 위하여 표준 ELISA를 사용하였다. 인산염완충식염수(1xPBS)(Hyclone Brand, Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S) 내의 Nune MaxiSorp 플레이트의 홈(wells)을 세포독성 단백질의 결합 영역의 제조합 인간 표적단백질로 코팅하였다. 상기 플레이트를 4℃에서 밤새 배양하였다. 홈을 1 x PBS 0.05% Tween-20(PBS-T)으로 세척하고, 실온에서 1시간 동안 PBS-T내에서 3% 우유로써 홈을 배양함으로써 비특이적 결합을 봉쇄하였다. Streptag II 및 탈면역된 시가 독소 작동체 영역(D58A/G110A/G147A/R188A)을 포함하는 세포독성 단백질을 결합 해리 상수(K_D)가 되도록 예정된 농도로 상기 홈에 부가시켰다. 야생형 활성화에 대한 하나의 비교 및 양성 제어로서, 야생형 시가 독소 작동체 영역 및 Streptag II를 포함하는 세포독성 단백질을 상기 같은 농도로 홈에 부가시켰다.
- [0430] 플레이트를 실온에서 1시간 동안 배양하여 비변성화 조건에서 세포독성 단백질 결합을 허용하였다. 홈을 PBS-T로 세척하고 PBS-T 또는 쥐 단일클론 항체 anti-SLT-1A mAb1으로 실온에서 1시간 배양시켰다. 홈을 PBS-T로 세척하고, 하기 감지 항체로써 배양시켰다: Streptag II에 유도된 HRP-결합 항체 또는 anti-mouse-HRP-결합 항체. 홈을 PBS-T 내에서 세척하고, Pierce TMB Ultra (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, U.S)로써 배양시켰다. 250mM 염산(HCl)으로 반응을 정지시켰다. HRP 활성 생성물을 450 나노미터(nm) 파장에 고정된 빛의 흡수도(Abs)를 측정하는 플레이트 판독장치에 의해 검출하였다. 측정된 흡수도 값을 어떤 시가 독소 구조물 대신 PBS로 배양한 코팅되고 봉쇄된 홈에 대하여 흡수도 값을 뺀으로써 보정하였다.
- [0431] Streptag II 항체에 대한 높은 흡수도 값에 의해 측정된 바와 같이, 두 세포독성 단백질이 scFv의 인간, 제조합 단백질, 표적 생체분자에 결합되었다(도 6). 탈면역된 시가독소 작동체 영역(D58A/G110A/G147A/R188A)을 포함하는 세포독성 단백질은 단일클론 항체 anti-SLT-mAb1에 의해 식별되지 않았다(도 6). 야생형 시가독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 양성제어 세포독성 단백질은 항체 anti-SLT-1A mAb1에 의해 결합되었다(도 6). 이러한 결과는 anti-SLT-1A mAb에 의해 식별되는 항원결정기가 선천적으로 접혀진, 야생형 시가 독소 작동체 영역 내에 존재하지만, 항원결정기가 선천적으로 접혀진, 탈면역된 시가 독소 작동체 영역에서 돌연변이 조합 D58A/G110A/G147A/R188A에 의해 교란된다는 것을 나타낸다.
- [0433] **실시예 5. 시가독소 작동체 폴리펩티드 내에서 항원성 및/또는 면역원성 항원결정기의 교란 예측**
- [0434] 시가 독소 작동체 기능을 보유하는 한편 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 탈면역할 목적으로 실시예 4에서 행해진 각각의 치환체가 하기 특성을 갖는 BcePred 웹서버를 사용하여 치환체를 포함하는 항원결정기 영역 내에서 예측된 B-세포 항원결정기의 폐지에 대하여 점검되었다:(Saha S, Raghava G, Lecture Notes in Comput Sci 3239: 197-204 (2004)). 표 10은 분석에서 존재하는 치환체 및 마지막 칼럼에서 B-세포 항원결정기의 결과를 나타낸다. 항원결정기 영역 #0(1-15) 및 #7(243-257)은 디폴트 세팅을 갖는 BcePred flexibility approach에 의해 야생형 SLT-1A 내에서 예측되지 않았다. 항원결정기 영역 #0에서 K1M, S8I, T9I, K11A, 항원결정기 영역 #4*에서 D94A, 및 항원결정기 영역 #4&4*DP0서 S96I를 포함하여, 시험된 치환체(표 6)는 BcePred flexibility approach에 의하여 처음부터 어떤 예측된 B-세포 항원결정기를 생성하지 않았다. 부수적으로, BcePred 계산법을 사용하여 분석한 나머지 치환체에 대한 결과를 표 10에 나타냈고, 경험적으로 시험하지는 않았다.

표 10

Epitope Region #	선천적으로 배치된 아미노산 위치		
	B-Cell Epitope Region	Substitution	B-Cell Epitope by BcePred
0	1-15	K1M	no change
0	1-15	T4I	no change
0	1-15	S8I	no change
0	1-15	T9V	no change
0	1-15	T9I	no change
0	1-15	K11A	no change
0	1-15	K11H	no change
1	27-37	S33I	eliminated
1	27-37	S45V	eliminated
2	39-48	S45I	eliminated
2	39-48 (StxA)	T45I	eliminated
2	39-48	D47G	no change
2	39-48	N48V	no change
2	39-48	N48F	no change
3*	53-66	D53A	no change
3*	53-66	D53G	no change
3*	53-66	D53N	no change
3 & 3*	55-66	R55A	no change
3 & 3*	55-66	R55V	no change
3 & 3*	55-66	R55L	no change

[0435]

3 & 3*	55-66	D58A	eliminated
3 & 3*	55-66	D58F	eliminated
3 & 3*	55-66	P59A	eliminated
3 & 3*	55-66	P59F	eliminated
3 & 3*	55-66	E60I	eliminated
3 & 3*	55-66	E60T	eliminated
3 & 3*	55-66	E60R	no change
3 & 3*	55-66	E61A	eliminated
3 & 3*	55-66	E61V	eliminated
3 & 3*	55-66	E61L	eliminated
3 & 3*	55-66	G62A	eliminated
4*	94-115	D94A	no change
4 & 4*	96-115	S96I	no change
4 & 4*	96-115	S109V	eliminated
4 & 4*	96-115	G110A	eliminated
4 & 4*	96-115	S112V	eliminated
5	141-153	G147A	eliminated
6*	179-190	R179A	no change
6 & 6*	180-190	T180G	no change
6 & 6*	180-190	T181I	no change
6 & 6*	180-190	D183A	no change
6 & 6*	180-190	D183Q	no change
6 & 6*	180-190	D184A	eliminated
6 & 6*	180-190	D184F	eliminated
6 & 6*	180-190	L185V	eliminated
6 & 6*	180-190	S186A	eliminated
6 & 6*	180-190	S186F	eliminated
6 & 6*	180-190	G187A	eliminated
6 & 6*	180-190	R188A	eliminated
6 & 6*	180-190	R188L	eliminated
6 & 6*	180-190	S189A	eliminated
7	243-257	S247I	eliminated
7	243-257	R248A	eliminated
7	243-257	R251A	eliminated
8	254-268	D264A	eliminated
8	254-268	G265A	eliminated
8	262-278 (SLT-2A)	G264A	eliminated
9	285-293	T286A	eliminated
9	285-293	T286I	eliminated

[0436]

[0437]

아미노산 치환 후에 B-세포 항원결정기 예측

[0439]

SLT-1A D58A와 비교한 야생형 SLT-1A 의 서양분석(도 2)은 BcePred 계산법이 SLT-1A의 위치 55-66에 B-세포 항원결정기의 존재를 정확히 예측하고(표 1), D58A 치환에 의한 항원결정기 영역의 교란도 또한 정확히 예측된다는 것을 보여준다(표 10).

[0441]

실시예 6. 포유류 모델(Mammalian Model)을 사용한, 와일드타입 시가 독소 작동체 폴리펩티드와 비교한 탈면역 시가독소 작동체 폴리펩티드의 상대 면역원성 실험적 시험

[0443]

*이 실시예에서, 인간 면역체계의 포유류 모델을 이용하여, 비탈면역 세포독성 단백질과 비교하여 본 발명의 탈면역된 세포독성 단백질의 상대 면역원성을 측정하였다. 하나의 대표적인 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 포함하는 대표적인 세포독성 단백질의 상대 면역원성을 야생형 서열만을 갖는 하나의 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 부모 세포독성 단백질과 비교하기 위하여 포유류 면역체계의 쥐 모델을 이용하였다. 박테리아-유도 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 포유류에 다른(또는 비자기(non-self)) 분자구조이기 때문에, 그 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드가 상당한 수준의 면역성을 나타낼 것이라고 예측되었다. 쥐를 사용하여 측정된 비포유류 단백질의 상대 면역원성은 일반적으로 모든 포유류에 대한 상대 면역원성을 나타낸다.

- [0444] 다른 세포독성 단백질 시료(야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드(SLT-1A의 아미노산 1-251)또는 대표적인 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 특성의 아미노산 치환체를 갖는 SLT-1A의 아미노산 1-251)를 포함하는 세포독성 단백질에 특이적인 생쥐 혈청 항체의 상대량을 측정하기 위하여 용액내 ELISA 분석법을 사용하였다. 암컷 BALB/C 쥐를 각각 6마리씩 그룹을 형성하도록 임의로 할당하였다. 우선 혈청 시료를 세포독성 단백질에 노출시키기 전에 각각의 쥐로부터 채집하였다. 다음에, 한 그룹 내의 각각의 쥐에 12일 이상 1주에 3회씩 2주에 걸쳐 전체 6회 복강 내 주사로 야생형(SLT-1A의 아미노산 1-251) 또는 대표적인 탈면역된 시가 독소 작동체 영역(D58A/G110A/G147A/R188A를 포함하는 SLT-1A의 아미노산 1-251)을 포함하는 1회 투여량당 세포독성 단백질 0.25mg/kg을 투여하였다. 세포독성 단백질 투여 중에 그리고 그 후에, 용액 내 ELISA 분석법을 이용하여 anti-"투여 단백질(administered protein)"수준을 관찰하기 위하여 모든 그룹의 쥐로부터 생쥐 혈청을 채집하였다.
- [0445] 용액 내 anti-"세포독성 단백질" ELISA 분석법은 다음과 같이 실행되었다. 한 그룹의 쥐를 주사하는데 사용된 동일한 세포독성 단백질을 그 그룹 쥐의 혈청을 갖는 용액 내에서 4℃로 밤새 배양시키고, 혈청 내에 유도된 항체에 결합된 세포독성 단백질로 이루어진 면역복합체를 적절한 표적 단백질로 코팅된 ELISA 플레이트 홈을 사용하여 포획하였다. 혈청 IgGs를 포함하는 포획된 면역 복합체를 홍당무과산화효소(horseradish peroxidase)-결합, anti-mouse IgG, 2차 항체를 이용하여 검출하였다. ELISA 플레이트를 홍당무과산화효소 활성을 검출하도록 현상하였고, 그 활성 또는 "ELISA signal"을 플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서 측정하였다. 이 "ELISA Signal"또는 "ELISA 값" DMS "no serum" 음성 제어로서 측정된 배경 신호를 뺀 후에 흡수도 값으로 계산되었다. 이 용액 내 ELISA 분석법에 대해, 더 큰 ELISA 값은 더 강한 면역응답(항체유도)을 가리킨다.
- [0446] 주사를 통하여 세포독성 단백질에 노출시키기 전에 세포독성 단백질을 인식하는 예비형성된 혈청 항체를 얻기 위하여 어떤 그룹 내의 쥐는 이 용액 내 ELISA 분석법에 의해 측정되지 않았다. 그래서 용액 내 ELISA 분석법을 사용한 이들 쥐에서 anti-"세포 독성 단백질"을 주사 후에 검출하면 주사 후에 일어났던 처음부터 유도된 항체 형성을 나타낸다.
- [0447] 이 실시예의 상대 면역원성 연구를 위하여, 한 그룹의 쥐에 주사한 동일한 세포독성 단백질을 ELISA 분석법에서 사용하여 그 그룹의 쥐로부터 혈청 항체를 포획하였다. 다른 말로, "야생형 시가 독소 작동체 영역"내에서 쥐로부터 혈청 내에 존재하는 항체를 야생형 시가독소 작동체 영역을 포함하는 세포독성 단백질을 갖는 ELISA 분석법 내에서 포획하였고, "탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드" 내에서 쥐로부터 혈청 내에 존재하는 항체를 대표적인 탈면역 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드(D58/G110A/G147A/R188A)를 포함하는 대표적인 세포독성 단백질을 갖는 ELISA 분석법 내에서 포획하였다.
- [0448] 제15일(제6투여량 투여 후 3일째) 및 제22일(제6 투여량 투여 후 10일째)에, anti-"세포독성 단백질" IgG를 상기 설명한 용액 내 ELISA 분석법에 의해 측정하였다(도 7). 도 7에서, 기호들은 개개의 쥐를 나타낸다: 검정색 기호는 야생형 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 세포독성 단백질을 주사한 쥐를 나타내고, 흰색 기호는 탈면역 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 포함하는 대표적인 세포독성 단백질을 주사한 쥐를 나타낸다. 도 7에서, 수직선은 각각의 그룹에 대한 평균 IgG 응답신호를 가리킨다.
- [0449] 야생형 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 세포독성 단백질을 투여한 그룹의 쥐는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 세포독성 단백질(D58A/G110A/G147A/R188A)을 투여한 그룹의 쥐보다 ELISA 신호에 의해 나타나는 바와 같이 제15일 및 제22일에 더 높은 크기의 항체 응답을 갖는다(도 7). "탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드"에 대한 평균 ELISA 신호(정량화 항체 응답)은 "야생형 시가 독소 작동체 영역"그룹의 25%(제15일) 및 39%(제22일)이었다. "탈면역 시가독소 작동체 영역 폴리펩티드" 및 "야생형 시가독소 작동체 영역" 그룹 사이의 이러한 ELISA 신호 차이는 t-테스트에 기초하여 통계적으로 중요하다 (p값은 0.005 미만이었다). "강한(strong)" 항체 응답을 나타내는 0.9 Abs 단위의 명목상 흡수도 컷오프를 이용하면, "야생형 시가 독소 작동체 영역"그룹 내에서 6/6(100%) 쥐는 제15일 또는 제22일에 강한 항체 응답을 갖는 반면, "탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드" 그룹 내에서 3/6(50%) 쥐가 강한 항체 응답을 갖는다.
- [0450] 탈면역된 시가 독소 영역 폴리펩티드(D58A/G110A/G147A/R188A)을 포함하는 대표적인 세포독성 단백질은 포유류 모델에서 감소된 면역원성을 나타냈다(도 7). "야생형 시가 독소 작동체 영역"그룹에 비교되듯이, 강한 항체 응답을 유도하였던 이 그룹 내의 쥐 숫자의 감소뿐만 아니라, "탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드" 내에서 쥐의 항체 유도의 전체 크기 감소는 탈면역된 독소 작동체 영역 폴리펩티드(D58A/G110A/G147A/R188A)가 성공적으로 탈면역되고(즉, 포유류에서 면역원성 능력을 감소시킴), 그것을 포함하는 대표적인 세포독성 단백질이 탈면역된 세포독성 단백질임을 보여준다(즉, 포유류에서 면역원성 능력을 감소시킴).
- [0451] 이 대표적인 탈면역된 세포독성 단백질은 4개의 다른 B-세포 항원결정기 영역 교란을 포함하는 시가독소 작동체

영역 폴리펩티드를 포함하는 한편, 3개 이상의 시가 독소 작동체 기능(촉매 리보솜 억제, 세포내 경로화, 및 세포독성)을 보유한다(표 9). 또한, 이 세포독성 단백질의 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드는 ELISA 분석법(도 6)에 의한 mAb1 및 western blot(도 5)에 의한 mAb1, pAb2, 및 pAb1에 의해 식별되는 항원결정기를 교란하는 것으로 나타났다. 따라서, 이 대표적인 세포독성 단백질은 포유류 면역체계에 항원성 및 면역원성을 감소시킨 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 포함하는 탈면역된 세포독성 단백질이다. 이 대표적인 세포독성 단백질의 항원성 및/또는 면역원성은 동일한 또는 부가적인 예측된 B-세포 항원결정기 영역에서 부가적인 돌연변이를 도입함으로써 더 감소될 수 있다. 부수적으로, 이미 교란된 B-세포 항원결정기 영역에서 동일한 또는 다른 위치에서의 선택적인 치환체는 감소된 상대 면역원성을 유발할 것이다.

[0452] 다양한 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역을 포함하는 대표적인 세포독성 단백질 또는 다양한 대표적인 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드의 상대 면역원성을 유사한 방법으로 시험하였다. 1. (1-251 : K1M/ K11A/ S33I/ S45V D58A/ G110A/ G147A/ R188A), 2. (1-251 : K1M/ K11A/ S33I/ S45I/ D58A/ G110A/ G147A/ D183A/ D184A/ R188A), 3. (1-251 : K1M/ K11A/ S33I/ S45I/ D58A/ E60I/ G110A/ G147A/ D183A/ D184/ R188A), 4. (1-251 : K1M/ K11A/ S33I/ S45I/ R55A/ D58A/ P59A/ E60I/ E61A/ G62A/ G110A/ G147A/ D183A/ D184A/ R188A), 5. (1-251 : K1M/ K11A/ S33I/ S45I/ D58A/ G110A/ G147A/ D183A/ D184A/ S189A), and 6. (1-251 : K1M/ K11A/ S33I/ S45I/ R55A/ D58A/ P59A/ E60I/ E61A/ G62A/ G110A/ G147A/ D183A/ D184/ R188A/ R205A), and SEQ ID NOs:4-52를 포함하는 몇몇의 대표적인 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 여기서 설명하거나 당업자에게 공지된 동물 모델 및 분석법을 이용하여 야생형 아미노산 서열만을 포함하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및/또는 야생형 시가 독소 작동체 폴리펩티드 영역을 포함하는 부모 세포독성 단백질과 비교하였다.

[0453] 이 실시예에서, 쥐들은 7일 간격으로 4회 탈면역된 또는 야생형 폼(forms)을 정맥 투여하였다. 혈액 시료를 주사한 쥐로부터 채취해서 세포독성 단백질 및/또는 시가 독소 작동체 폴리펩티드에 대한 반응성을 ELISA 분석법으로 시험하였다. 야생형 아미노산 서열만을 포함하는 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 포함하는 분자와 비교하는 것과 같이, 동일물을 포함하는 세포독성 단백질 또는 몇몇의 대표적인 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드와 함께 주사된 주에서 상대적으로 감소된 면역원성 응답을 측정할 것이다.

[0454] 다중 B-세포 항원결정기 영역 교란을 포함하는 대표적인 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 포함하는 몇몇의 대표적인 탈면역된 세포독성 단백질은 하나 이상의 시가 독소 작동체 기능(촉매 리보솜 억제, 세포내 경로화, 및 세포독성), Western blot 및/또는 ELISA 분석법에 의한 항-시가양 독소 A 서브유닛 항체를 인식하는 예비형성된 항체에 의한 감소된 인식을 상상한 수준으로 유지한다. 다중 B-세포 항원결정기 영역 교란을 갖는 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드이다.

[0456] 요약

[0457] 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드 내에서 B-세포 항원결정기 영역이 아미노산 치환체에 의해 교란될 수 있고, 항원성 및 면역원성을 감소시키는 결과를 가져온다는 것이 앞으로 실시예에서 입증되었다. 최소한 하나의 시가 독소 기능을 보유했던 세포독성 단백질 관점에서 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드의 예측된 항원결정기 영역 내에서의 아미노산 잔기 치환체를 표 11에 요약한다. 이 모든 치환체가 둘 이상의 시가 독소 작동체 기능으로 간섭되는 치환체 R179A를 제외하고 하나 이상의 B-세포 항원결정기의 수반되는 교란을 갖는 기능적으로 높은 세포독성을 보유하는 시가 독소 작동체 영역을 초래한다.

표 11

선천적으로 위치한 아미노산 위치				
단-세포 병원성 정기 영역	치환체	병원성정기 영역	세포독성 영역	세포독성
0: 1-15	K1M/K11A	no change	YES	YES
0: 1-15	S8I	no change	YES	YES
0: 1-15	T9I	no change	YES	YES
1: 27-37	S33I	eliminated	YES	YES
2: 39-48	S45I	eliminated	YES	YES
3*: 53-66	D53A	no change	YES	YES
3/3*: 55-66	R55A	no change	YES	YES
3/3*: 55-66	D58A	eliminated	YES	YES
3/3*: 55-66	D58F	eliminated	YES	YES
3/3*: 55-66	P59A	eliminated	YES	YES
3/3*: 55-66	E60I	eliminated	YES	YES
3/3*: 55-66	E60R	no change	YES	YES
3/3*: 55-66	E61A	eliminated	YES	YES
3/3*: 55-66	G62A	eliminated	YES	YES
4*: 94-115	D94A/S96I	no change	YES	YES
6: 180-190	D183A	no change	YES	YES
6: 180-190	D184A	eliminated	YES	YES
6: 180-190	D184F	eliminated	YES	YES
6: 180-190	R188A	eliminated	YES	YES
6: 180-190	D183A/ D184A/ R188A	eliminated	YES	YES
immunogenic residue	R205A	eliminated	YES	YES
3/3*, 4/4*	E60I/ G110A	eliminated	YES	YES
3/3*, 5	E60I/ G147A	eliminated	YES	YES
2, 6/6*	S45I/R188A	eliminated	YES	YES
1, 4/4*, 5	S33I/ G110A/ G147A	eliminated	YES	YES
2, 4/4*, 5	S45I/ G110A/G147A	eliminated	YES	YES
3/3*, 4/4*, 5	D58A/ G110A/ G147A	eliminated	YES	YES
3/3*, 4/4*, 5	E60I/ G110A/ G147A	eliminated	YES	YES
2, 3/3*, 4/4*, 5	S45I/ D58A/ E60I/ G110A/ G147A	eliminated	YES	YES
2, 3/3*, 4/4*, 5	S45I/ D58A/ E60I/ G62A/ G110A/	eliminated	YES	YES

[0458]

	G147A			
2, 4/4*, 5, 6/6*	S45I/ G110A/ G147A/ D183A/ D184A/ R188A	eliminated	YES	YES
3/3*, 4/4*, 5, 6	D58A/ G110A/ G147A/ S186A	eliminated	YES	YES
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/ G110A/ G147A/ G187A	eliminated	YES	YES
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/ G110A/ G147A/ R188A	eliminated	YES	YES
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/ G110A/ G147A/ S189A	eliminated	YES	YES
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/ G110A/ G147A/ S186A/ R188A	eliminated	YES	YES
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/ G110A/ G147A/ G187A/ R188A	eliminated	YES	YES
1, 2, 3/3*, 4/4*, 5	S33I/ S45I/ D58A/ G110A/ G147A	eliminated	YES	YES
2, 3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	S45I/ D58A/ E60I/ G110A/ G147A/ D183A/ D184A/ R188A	eliminated	YES	YES
2, 3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	S45I/ D58A/ E60I/ G62A/ G110A/ G147A/ D183A/ D184A/ R188A	eliminated	YES	YES

[0459]

[0460]

시가독소 작동체 기능을 보유하는 B-세포-항원결정기 영역 내의 치환체 요약

[0462]

성공적인 치환을 예측하는데에 난관에도 불구하고, 본 발명 실시예에서 제시된 데이터는 특정의 아미노산 치환이 항원성 및/또는 면역원성을 성공적으로 감소시키지만, 한편 상당한 시가 독소 작동체 기능을 유지한다고 믿을 만한 이유를 제시한다. 예를 들어, 성공적으로 용인할 만한 치환으로(표 11) 보이는 특이 아미노산 위치에서의 치환이 특정의 다른 아미노산으로 치환될 때 최소한 하나의 시가 독소 작동체 기능을 보유하는데 가장 성공적인 것으로 보인다. 다중 단일 아미노산 치환(항원결정기 영역을 교란하고 세포독성을 보유하는 것으로 예측된)이 결합될 때(표 9; 표 11) 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 세포독성 단백질이 세포독성을 보유하는 설명은 성공적인 단일 아미노산 치환이 상당한 시가독소 작동체 기능을 보유하는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 생성하는 다른 항원결정기 영역에서 다른 성공적인 아미노산 치환과 함께 일반적으로 결합될 수 있음을 암시한다. 유사하게, 동일한 항원결정기 영역 내에서 다중 단일 아미노산 치환체를 갖는 시가 독소 작동체 영역을 포함하는 세포독성 단백질이 효소활성을 보유하는 것을 나타내는 설명은(표 9; 표 11) 동일한 항원결정기 영역에서 성공적인 단일 아미노산 치환이 상당한 시가독소 작동체 기능을 보유하는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 생성하는 다른 항원결정기 영역에서 다른 아미노산 치환과 함께 일반적으로 결합될 수 있음을 암시한다. 동일한 항원결정기 영역 내에서 다중 단일 아미노산 치환체를 갖는 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 포함하는 세포독성 단백질이 세포독성을 보유하는 것을 나타내는 설명은(표 9; 표 11) 하나의 항원결정기 영역에서 성공적인 단일 아미노산 치환이 상당한 시가독소 작동체 기능을 보유하는 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 생성하기 위하여 동일한 항원결정기 영역에서 다른 아미노산 치환과 함께 결합될 수 있음을 암시한다.

[0463]

실험 데이터는 특정의 치환체 (K1M, S8I, T9I, K11A, S33I, S45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, D183A, D184A, D184F, R188A, R205A, 및/또는 이들의 조합) 및 특정의 위치가 치환체(1, 4, 8, 9, 11, 33, 45, 48, 53, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 94, 96, 109, 110, 147, 180, 181, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 205, 248, 및 251)를 용인하는 한편 최소한 하나의 시가 독소 작동체 기능에 대하여 상당한 수준의 활성을 보유함을 나타낸다. 이 실험 데이터는 상당한 시가 독소 작동체 기능을 보유하는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 생성하기 위하여 사용되는 치환 교란하는 항원결정기의 조합 및 치환체를 교란하는 특정의 다른 항원 결정기를 암시한다. 보존성 작용기(functional group)의 아미노산 잔기

에 대한 다른 아미노산 치환이 또한 용인될 수 있다는 것도 예측가능하다. 예를 들어, K1M, T4I, S8I, T9V, T9I, K11A, S33I, S45V, S45I, D47G, N48V, N48F, L49A, D53A, D53G, D53N, R55A, R55L, I57F, D58A, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, S109V, G110A, S112V, G147A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, R205A, R248A, 또는 R251A의 어느 하나와 유사하다고 당업자에 알려진 다른 치환체도 또한 항원결정기를 교란할 수 있는 한편, 최소한 하나의 시가 독소 작동체 기능을 유지한다. 특히 K1M, T4I, S8I, T9V, T9I, K11A, S33I, S45V, S45I, D47G, N48V, N48F, L49A, D53A, D53G, D53N, R55A, R55L, I57F, D58A, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, S109V, G110A, S112V, G147A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, R205A, R248A, 또는 R251A와 유사한 보존성 아미노산 잔기에 대한 아미노산 치환체는 동일한 효과를 가질 것이다. 유사한 보존성 아미노산 치환체의 예로는 K1 내지 A, G, V, L, I, F, 및 H; T4I 내지 A, G, V, L, F, M, 및 S; S8 내지 A, G, V, L, F, 및 M; T9 내지 A, G, L, F, M, 및 S; K1 1 내지 G, V, L, I, F, 및 M; S33 내지 A, G, V, L, F, 및 M; S45 내지 A, G, L, F, 및 M; T45 내지 A, G, V, L, I, F, 및 M; D47 내지 A, V, L, I, F, S, 및 Q; N48 내지 A, G, L, I, 및 M; L49 내지 G; D53 내지 V, L, I, F, S, 및 Q; R55 내지 G, I, F, M, Q, S, K, 및 H; D58 내지 G, V, L, I, S, 및 Q; P59 내지 G; E60 내지 A, G, V, F, S, Q, N, D, 및 M; E61 내지 G, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; D94 내지 G, V, L, I, F, S, 및 Q; S96 내지 A, G, V, L, F, 및 M; S109 내지 A, G, I, L, F, 및 M; T109 내지 A, G, V, I, L, F, 및 M; S112 내지 A, G, L, I, F, 및 M; T180 내지 A, V, L, I, F, M, 및 S; T181 내지 A, G, V, L, F, M, 및 S; D183 내지 V, L, I, F, S, 및 Q; D184 내지 G, V, L, I, S, 및 Q; L1 85 내지 A 및 G; S186 내지 G, V, I, L, F, 및 M; R188 내지 G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S189 내지 G, V, I, L, F, 및 M; R204 내지 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R205 내지 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S247 내지 A, G, V, I, L, F, 및 M; Y247 내지 A, G, V, L, I, 및 F; R248 내지 G, V, L, 및 I; R250 내지 A, G, V, L, I, 및 F; 및 R251 내지 G, V, L, 및 I를 포함한다.

[0464] 전하와 극성을 제거하고 및/또는 측쇄길이를 감소시키는 아미노산 치환체는 항원결정기를 또한 교란시킬 수 있지만, 한편 최소한 하나의 시가 독소 작동체 기능을 유지한다. 예를 들어, A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, 및 K를 아미노산 잔기 K1, T4, S8, T9, K11, S33, S45, D47, N48, L49, D53, R55, I57, D58, P59, E60, E61, G62, D94, S96, S109, T109, G110, S112, G147, T180, T181, D183, D184, L185, S186, G187, R188, S189, R205, R248, 또는 R251로 치환하면, 측쇄 전하가 제거되고, 극성이 제거되고, 및/또는 측쇄 길이가 감소된다. 특히, 하기의 아미노산 치환체는 항원결정기를 교란시킬 수 있는 한편, 최소한 하나의 시가 독소 작동체 기능을 유지한다.: D47, D53, D58, D94, D183, D184, D264 내지 A, G, V, L, I, S, 및 N; E60 또는 E61 내지 A, G, L, V, I, S, N, Q, D, 및 M; G62, G110, G147, G187, 또는 G265 내지 A; K1 또는 K11 내지 A, G, L, V, I, F, C, M, P, S, T, N, H, 및 Q; L49 또는 L185 내지 A 및 G; N48 내지 A, G, V, L, 및 I; R55, R188, R205, R247, R248, R250, 또는 R251 내지 A, G, L, V, I, S, Q, K, M, F, 및 H; S33, S45, S96, S109, S112, S186, 또는 S189 내지 A, G, V, 및 L, 및 T4, T9, T45, T109, T180, T181, T286 내지 A, G, V, L, I, M 및 F.

[0465] 또한, 항원결정기를 교란하지만 한편 시가 독소 작동체의 상당한 기능을 보유하는 시가 독소 작동체 폴리펩티드의 하나의 항원결정기 영역에서의 아미노산 치환체는 시가 독소 작동체 기능의 상당한 수준을 한편으로 보유하지만 교란되는 다중 항원결정기 영역을 갖는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드를 형성하기 위하여 시가 독소 작동체의 상당한 기능을 보유하는 한편 항원결정기를 교란시키는 동일한 또는 다른 항원결정기 영역 내에서 다른 아미노산 치환체와 조합할 수 있다는 것을 일반적으로 예측할 수 있다. 예를 들어, K1M, S8I, T9I, S9I, K11A, S33I, S45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, 및/또는 R205A는 K1M, S8I, T9I, S9I, K11A, S33I, S45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, 및/또는 R205A과 결합하여 본 발명에 따른 탈면역된 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드를 생성한다.

[0467] 실시예 7. 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 CD20에 특이적인 결합(SLT-1A로 융합된 αCD20)을 포함하는 세포독성 단백질

[0468] 이 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가양 독소 1의 A 서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도되고, 앞의 실시예에서 설명한 하나 이상의 탈면역 아미노산 치환체를 포함하는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-타입 결합영역 αCD20-항원은 인간 CD20을 인식하는 면역글로불린-타입 도메인으로부터 유도되고 (Haisma et al, Blood 92: 184-90 (1999); Geng S et al, Cell Mol Immunol 3: 439-43 (2006); Olafsen T et

al., Protein Eng Des Sel 23: 243-9 (2010)), 이는 CD20의 세포의 부분을 결합할 수 있는 면역글로불린-타입 결합 영역을 포함한다. CD20은, 예를 들어, B-세포 림프종 세포, 모발상세포 백혈병세포, B-세포 만성 림프종 백혈병 세포, 및 흑색종 세포와 같은 다중 암 세포 타입에 발현된다. 또한, CD20은 과민성 B-세포에 관여하는 특성의 자가면역 질병, 장애 및 질환을 치료하는 치료제의 매력적인 표적이다.

[0470] 세포독성 단백질 SLT-1A:: α CD20의 구조, 제조 및 정제

[0471] 면역글로불린-타입 결합 영역 α CD20 및 시가 독소 작동체 영역(예, SEQ ID NOs:4-52)가 서로 결합하였다. 예를 들어, α CD20-항원-결합 단백질 SLT-1A:: α CD20(예, SEQ ID NOs: 53, 54, 55 및 56)을 부호화한 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 융합 단백질을 제조하였다. SLT-1A:: α CD20 세포독성 단백질의 발현은 상기 실시예에서 설명되거나 당업자에게 공지된 박테리아 및/또는 세포가 없는, 단백질 번역 시스템을 사용하여 달성되었다.

[0473] 세포독성 단백질 SLT-1A:: α CD20의 체외에서의 특성 측정

[0474] CD20+ 세포 및 CD20-세포에 대한 이 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성, 최대 특이결합(B_{max}), 및 평형 결합 상수(K_D)를 형광분성법에 기초한 유동세포 분석법에 의하여 측정하였다. SLT-1A:: α CD20 대 α CD20+ 세포의 B_{max} 는 0.01~100nM 범위의 K_D 에서 약 50,000~200,000 MFI로 측정되었고, 반면 이 분석법에서 CD20-세포에 대한 의미 있는 결합은 없었다.

[0475] SLT-1A:: α CD20 세포독성 단백질의 리보솜 비활성 성능은 상기 실시예에서 설명한 바와 같이, 세포가 없는 체외 단백질 번역에서 측정되었다. 세포 없는 단백질 합성에 이 실시예의 세포독성 단백질이 미치는 억제효과는 상당하다. 이 세포 없는 분석법에서 단백질 합성에 관한 SLT-1A:: α CD20의 IC_{50} 은 약 0.1~100pM이다.

[0477] CD20+ 세포-사멸 분석법을 사용한 세포독성 SLT-1A:: α CD20의 세포독성 측정

[0478] SLT-1A:: α CD20의 세포독성 특성을 CD20+ 세포를 이용하여 상기 실시예에서 설명한 바와 같은 일반적 세포-사멸 분석법에 의해 측정하였다. 또한 SLT-1A:: α CD20의 선택적 세포독성 특성은 CD20+ 세포와 대비한 CD20- 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 분석법에 의해 측정되었다. 이 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50} 은 세포라인(line)에 따라 변하지만 CD20+ 세포에 대하여 약 0.01~100 nM이었다. 세포독성 단백질의 CD_{50} 은 세포 표면에 CD20을 발현하는 세포와 대비하여 세포표면에서 CD20을 발현하지 않는 세포에 대하여 약 10~10,000배 더 크다(세포독성이 더 적다).

[0480] 항원성 및/또는 면역원성의 감소 측정

[0481] SLT-1A:: α CD20의 상대 탈면역성은 실시예 4 및 6에 설명한 것과 같이, 서양분석법, ELISA 분석법 및 생쥐 모델을 이용하여 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 관련하여 측정하였다.

[0483] 동물 모델을 이용한 세포독성 단백질 SLT-1A:: α CD20의 생체내 효과 측정

[0484] 신생세포 상에서 세포독성 단백질 SLT-1A:: α CD20의 생체내 효과를 측정하기 위하여 동물 모델을 사용하였다. 쥐들의 세포 표면에서 CD20을 발현하는 인간 신생세포의 쥐 속으로 이중이식 종양 위에 정맥 주사한 후 세포독성 단백질의 효과를 시험하기 위해 다양한 쥐 균주를 사용하였다.

[0486] **실시예 8. 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 HER2에 특이적인 결합(SLT-1A로 융합된 α HER2- V_{HH})을 포함하는 세포독성 단백질**

[0487] 이 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가양 독소 1의 A서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도되고, 앞의 실시예에서 설명한 하나 이상의 탈면역 아미노산 치환체를 포함한다. 면역글로불린-타입 결합영역은, 미국특허출원공개 2011/0059090에 기재된 바와 같이, 카멜리드 항체(V_{HH}) 단백질 5F7의 단일 도메인 가변성 영역으로부터 유도된 α $V_{HH}2$ 이다.

[0489] 세포독성 단백질 "SLT-1A로 융합된 α HER2- V_{HH} "의 구조, 제조 및 정제

[0490] 면역글로불린-타입 결합 영역 및 시가 독소 작동체 영역이 서로 결합하여 융합 단백질을 형성한다(예, SEQ ID NOs:57, 58, 59). 이 실시예에서, 단백질 5F7로부터 유도된 α HER2- V_{HH} 가변성 영역을 부호화하는 폴리뉴클레오티드는 공지된 가교제를 부호화하는 폴리뉴클레오티드 구조 내에서 그리고 SEQ ID NOs:4-52의 아미노산을 포함하는 시가 독소 작동체 영역을 부호화하는 폴리뉴클레오티드 구조 내에서 복제된다. SLT-1A로 융합된 " α HER2-

V_H " 세포독성 단백질 변형물은 생성되어 결합 영역이 시가 독소 작동체 영역의 아미노-말단에 선택적으로 인접하여 위치하도록 하고, KDEL 패밀리의 카복시-말단 내부원형질 망상조직 신호 모티프(motif)를 선택적으로 포함하도록 한다. "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H " 세포독성 단백질 변형물은 상기 기술한 실시예와 같이, 박테리아 및/또는 세포없는, 단백질 번역 시스템을 사용하여 달성된다.

[0492] 세포독성 단백질 "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H"의 체외에서의 특성 측정

[0493] HER2+ 세포 및 HER2-세포에 대한 이 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광분성법에 기초한 유동세포 분석법에 의하여 측정하였다. "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H" 변형물에 대한 B_{max}는 0.01~100nM 범위의 K_D에서 약 50,000~200,000 MFI로 측정되었고, 반면 이 분석법에서 HER2- 세포에 대한 의미있는 결합은 없었다.

[0494] "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H" 세포독성 단백질의 리보솜 비활성 성능은 상기 실시예에서 설명한 바와 같이, 세포가 없는 체외 단백질 번역에서 측정되었다. 무세포 단백질 합성에 이 실시예의 세포독성 단백질이 미치는 억제효과는 상당하다. 이 무세포 분석법에서 단백질 합성에 관한 "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H" 변형물의 IC₅₀은 약 0.1~100pM이다.

[0496] HER2+ 세포-사멸 분석법을 사용한 세포독성 "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H"의 세포독성 측정

[0497] "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H" 변형물의 세포독성 특성을 HER2+ 세포를 이용하여 상기 실시예에서 설명한 바와 같은 일반적 세포-사멸 분석법에 의해 측정하였다. 또한 "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H"의 선택적 세포독성 특성은 HER2+ 세포와 대비한 HER2- 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 분석법에 의해 측정되었다. 이 실시예의 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포라인(line)에 따라 변하지만 HER2+ 세포에 대하여 약 0.01~100 nM이었다. 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포 표면에서 HER2를 발현하는 세포와 대비하여 세포표면에서 HER2를 발현하지 않는 세포에 대하여 약 10~10,000배 더 크다(세포독성이 더 적다).

[0499] 항원성 및/또는 면역원성의 감소 측정

[0500] "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H"의 상대 탈면역성은 실시예 4 및 6에 설명한 것과 같이, 서양분석법, ELISA 분석법 및 생쥐 모델을 이용하여 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 관련하여 측정하였다.

[0502] 동물 모델을 이용한 세포독성 단백질 "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H"의 생체 내 효과 측정

[0503] 신생세포 상에서 세포독성 단백질 "SLT-1A로 용해된 αHER2-V_H"의 생체 내 효과를 측정하기 위하여 동물 모델을 사용하였다. 쥐들의 세포 표면에서 HER2를 발현하는 인간 신생세포를 쥐 체내의 이종이식 종양 위에 정맥 주사한 후 세포독성 단백질의 효과를 시험하기 위해 다양한 쥐 균주를 사용하였다.

[0505] **실시예 9. 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 항체 α엡스타인-바-항원으로부터 유도된 결합영역을 포함하는 세포독성 단백질**

[0506] 이 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가양 독소 1의 A 서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도되고, 앞의 실시예에서 설명한 하나 이상의 탈면역된 아미노산 치환체를 포함하는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-타입 결합영역 α엡스타인-바-항원은 α엡스타인-바-항원에 대항하는 단일복제 항체로부터 유래되고 (Fang C et al, J Immuno Methods 2827: 21-30 (2004)), 이는 α엡스타인-바 바이러스에 의해 감염된 인간 세포 또는 α엡스타인-바-항원을 발현하는 변형세포를 결합할 수 있는 면역글로불린-타입 결합 영역을 포함한다. α엡스타인-바-항원은 α엡스타인-바 바이러스에 의해 감염된 세포 또는 암 세포(예, 림프종 및 비인두암 세포)와 같은 감염된 세포와 같은 다중 암 세포 타입에 발현된다. 또한, α엡스타인-바 감염은 다른 질병, 즉 다중 경화증과 관계된다.

[0508] 세포독성 단백질 SLT-1A::α엡스타인바::KDEL의 구조, 제조 및 정제

[0509] 면역글로불린-타입 결합 영역 α엡스타인-바-항원 및 시가 독소 작동체 영역(예, SEQ ID NOs:4-52)가 서로 결합하였고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:60)을 부가하여 단백질을 형성하였다. 예를 들어, α엡스타인-바-항원 결합 단백질 SLT-1A::α엡스타인바::KDEL을 부호화한 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 융합 단백질을 제조하였다. SLT-1A::α엡스타인바::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 상기 실시예에서 설명되거나 당업자에게 공지된 박테리

아 및/또는 세포가 없는, 단백질 번역 시스템을 사용하여 달성되었다.

- [0511] 세포독성 단백질 SLT-1A::α엡스타인바::KDEL의 체외에서의 특성 측정
- [0512] α엡스타인-바-항원+ 세포 및 α엡스타인-바-항원- 세포에 대한 이 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광분석법에 기초한 유동세포 분석법에 의하여 측정하였다. α엡스타인-바-항원+ 세포에 대한 SLT-1A::α엡스타인바::KDEL의 B_{max}는 0.01~100nM 범위의 K_D에서 약 50,000~200,000 MFI로 측정되었고, 반면 이 분석법에서 α엡스타인-바-항원- 세포에 대한 의미있는 결합은 없었다.
- [0513] SLT-1A::α엡스타인바::KDEL 세포독성 단백질의 리보솜 비활성 성능은 상기 실시예에서 설명한 바와 같이, 무세포 체외 단백질 번역에서 측정되었다. 무세포 단백질 합성에 이 실시예의 세포독성 단백질이 미치는 억제효과는 상당하다. 이 무세포 분석법에서 단백질 합성에 관한 SLT-1A::α엡스타인바::KDEL의 IC₅₀은 약 0.1~100pM이다.
- [0515] 세포-사멸 분석법을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::α엡스타인바::KDEL의 세포독성 측정
- [0516] SLT-1A::α엡스타인바::KDEL의 세포독성 특성을 α엡스타인-바-항원+ 세포를 이용하여 상기 실시예에서 설명한 바와 같은 일반적 세포-사멸 분석법에 의해 측정하였다. 또한 α엡스타인-바-항원의 선택적 세포독성 특성은 α엡스타인-바-항원+ 세포와 대비한 α엡스타인-바-항원- 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 분석법에 의해 측정되었다. 이 실시예의 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포라인(line)에 따라 변하지만 α엡스타인-바-항원+ 세포에 대하여 약 0.01~100 nM이었다. 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포 표면에서 α엡스타인-바-항원을 발현하는 세포와 대비하여 세포표면에서 α엡스타인-바-항원을 발현하지 않는 세포에 대하여 약 10~10,000배 더 크다(세포독성이 더 적다).
- [0518] 항원성 및/또는 면역원성의 감소 측정
- [0519] SLT-1A::α엡스타인바::KDEL의 상대 탈면역성은 실시예 4 및 6에 설명한 것과 같이, 서양분석법, ELISA 분석법 및 생쥐 모델을 이용하여 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 관련하여 측정하였다.
- [0521] 동물 모델을 이용한 세포독성 단백질 SLT-1A::α엡스타인바::KDEL의 생체내 효과 측정
- [0522] 신생세포 상에서 세포독성 단백질 SLT-1A::α엡스타인바::KDEL의 생체내 효과를 측정하기 위하여 동물 모델을 사용하였다. 쥐들의 세포 표면에서 α엡스타인-바-항원을 발현하는 인간 신생세포의 쥐 속으로 이중이식 중앙 위에 정맥 주사한 후 세포독성 단백질의 효과를 시험하기 위해 다양한 쥐 균주를 사용하였다.
- [0524] **실시예 10. 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 항체 α리슈만편모충(Leishmania)-항원으로부터 유도된 결합영역을 포함하는 세포독성 단백질**
- [0525] 이 실시예에서는, 시가 독소 작동체 영역은 시가양 독소 1의 A 서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도되고, 앞의 실시예에서 설명한 하나 이상의 탈면역 아미노산 치환체를 포함하는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-타입 결합영역 α리슈만편모충-항원은 세포내 파동편모충류 원생동물을 번식하는 인간세포에 존재하는 세포 표면 α리슈만편모충-항원에 공지기술을 사용하여 생성된 항체로부터 유도된다.(Silveira T et al., Int J Parasitol 31: 1451-8 (2001); Kenner J et al. J Cutan Patol 26; 130-6 (1999); Berman J and Dwyer, Clin Exp Immunol 44: 342-348 (1981)).
- [0527] 세포독성 단백질 SLT-1A::α리슈만편모충::KDEL의 구조, 제조 및 정제
- [0528] 면역글로불린-타입 결합 영역 α리슈만편모충-항원 및 시가 독소 작동체 영역이 서로 결합하였고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:60)을 부가하여 단백질을 형성하였다. 예를 들어, α리슈만편모충-항원 결합 단백질 SLT-1A::α리슈만편모충::KDEL을 부호화한 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 융합 단백질을 제조하였다. SLT-1A::α리슈만편모충::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 상기 실시예에서 설명되거나 당업자에게 공지된 박테리아 및/또는 세포가 없는, 단백질 번역 시스템을 사용하여 달성되었다.
- [0530] 세포독성 단백질 SLT-1A::α리슈만편모충::KDEL의 체외에서의 특성 측정
- [0531] α리슈만편모충-항원+ 세포 및 α리슈만편모충-항원- 세포에 대한 이 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광분석법에 기초한 유동세포 분석법에 의하여 측정하였다. α리슈만편모충-항원+ 세포에 대한 SLT-1A::α리슈만편모충::KDEL의 B_{max}는 0.01~100nM 범위의 K_D에서 약 50,000~200,000 MFI로 측정되었고, 반면 이 분석법에서 α리슈만편모충-항원- 세포에 대한 의미있는 결합은 없었다.

- [0532] [395]SLT-1A:: α 리슈만편모충::KDEL 세포독성 단백질의 리보솜 비활성 성능은 상기 실시예에서 설명한 바와 같이, 세포가 없는 체외 단백질 번역에서 측정되었다. 세포 없는 단백질 합성에 이 실시예의 세포독성 단백질이 미치는 억제효과는 상당하다. 이 세포없는 분석법에서 단백질 합성에 관한 SLT-1A:: α 리슈만편모충::KDEL의 IC_{50} 은 약 0.1~100pM이다.
- [0534] 세포-사멸 분석법을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A:: α 리슈만편모충::KDEL의 세포독성 측정
- [0535] SLT-1A:: α 리슈만편모충::KDEL의 세포독성 특성을 α 리슈만편모충-항원+ 세포를 이용하여 상기 실시예에서 설명한 바와 같은 일반적 세포-사멸 분석법에 의해 측정하였다. 또한 α 리슈만편모충-항원의 선택적 세포독성 특성은 α 리슈만편모충-항원+ 세포와 대비한 α 리슈만편모충-항원- 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 분석법에 의해 측정되었다. 이 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50} 은 세포라인(line)에 따라 변하지만 α 리슈만편모충-항원+ 세포에 대하여 약 0.01~100 nM이었다. 세포독성 단백질의 CD_{50} 은 세포 표면에서 α 리슈만편모충-항원을 발현하는 세포와 대비하여 세포표면에서 α 리슈만편모충-항원을 발현하지 않는 세포에 대하여 약 10~10,000배 더 크다(세포독성이 더 적다).
- [0537] 항원성 및/또는 면역원성의 감소 측정
- [0538] SLT-1A:: α 리슈만편모충::KDEL의 상대 탈면역성은 실시예 4 및 6에 설명한 것과 같이, 서양분석법, ELISA 분석법 및 생쥐 모델을 이용하여 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 관련하여 측정하였다.
- [0540] 실시예 11. 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 면역글로불린-타입 결합 영역 α 뉴로텐신-수용체로부터 유도된 결합영역을 포함하는 세포독성 단백질
- [0541] 이 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가양 독소 1의 A 서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도되고, 앞의 실시예에서 설명한 하나 이상의 탈면역 아미노산 치환체를 포함하는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-타입 결합영역 α 뉴로텐신-수용체는 DARFinTM (Genbank Accession:2P2C_R) 또는 인간 뉴로텐신 수용체를 결합하는 단일클론 항체(Ovigne J et al, Neuropeptides 32: 247-56 (1998))로부터 유도된다. 이 α 뉴로텐신-수용체는 유방암, 대장암, 폐암, 흑색종, 및 췌장암 세포와 같은 다양한 암세포에 의해 발현된다.
- [0543] 세포독성 단백질 SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL의 구조, 제조 및 정제
- [0544] 면역글로불린-타입 결합 영역 α 뉴로텐신R 및 시가 독소 작동체 영역이 서로 결합하였고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:60)을 부가하여 단백질을 형성하였다. 예를 들어, α 뉴로텐신-수용체-결합 단백질 SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL을 부호화한 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 융합 단백질을 제조하였다. SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 상기 실시예에서 설명되거나 당업자에게 공지된 박테리아 및/또는 세포가 없는, 단백질 번역 시스템을 사용하여 달성되었다.
- [0546] 세포독성 단백질 SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL의 체외에서의 특성 측정
- [0547] α 뉴로텐신-수용체+ 세포 및 α 뉴로텐신-수용체- 세포에 대한 이 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광 분석법에 기초한 유동세포 분석법에 의하여 측정하였다. α 뉴로텐신-수용체+ 세포에 대한 SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL의 B_{max} 는 0.01~100nM 범위의 K_D 에서 약 50,000~200,000 MFI로 측정되었고, 반면 이 분석법에서 α 뉴로텐신-수용체- 세포에 대한 의미있는 결합은 없었다.
- [0548] SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL 세포독성 단백질의 리보솜 비활성 성능은 상기 실시예에서 설명한 바와 같이, 세포가 없는 체외 단백질 번역에서 측정되었다. 무세포 단백질 합성에 이 실시예의 세포독성 단백질이 미치는 억제효과는 상당하다. 이 무세포 분석법에서 단백질 합성에 관한 SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL의 IC_{50} 은 약 0.1~100pM이다.
- [0550] 세포-사멸 분석법을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL의 세포독성 측정
- [0551] SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL의 세포독성 특성을 α 뉴로텐신-수용체+ 세포를 이용하여 상기 실시예에서 설명한 바와 같은 일반적 세포-사멸 분석법에 의해 측정하였다. 또한 SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL의 선택적 세포독성 특성은 α 뉴로텐신-수용체+ 세포와 대비한 α 뉴로텐신-수용체- 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 분석법에 의해 측정되었다. 이 실시예의 세포독성 단백질의 CD_{50} 은 세포라인(line)에 따라 변하지만 α 뉴로텐신-수용체+ 세포에 대하여 약 0.01~100 nM이었다. 세포독성 단백질의 CD_{50} 은 세포 표면에서 α 뉴로텐신-수용체를 발현하는

세포와 대비하여 세포표면에서 α 뉴로텐신-수용체를 발현하지 않는 세포에 대하여 약 10~10,000배 더 크다(세포 독성이 더 적다).

[0553] 항원성 및/또는 면역원성의 감소 측정

[0554] SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL의 상대 탈면역성은 실시예 4 및 6에 설명한 것과 같이, 서양분석법, ELISA 분석법 및 생쥐 모델을 이용하여 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 관련하여 측정하였다.

[0556] 동물 모델을 이용한 세포독성 단백질 SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL의 생체 내 효과 측정

[0557] 신생세포 상에서 세포독성 단백질 SLT-1A:: α 뉴로텐신R::KDEL의 생체 내 효과를 측정하기 위하여 동물 모델을 사용하였다. 쥐들의 세포 표면에서 α 뉴로텐신-수용체를 발현하는 인간 신생세포의 쥐 속으로 이중이식 종양 위에 정맥 주사한 후 세포독성 단백질의 효과를 시험하기 위해 다양한 쥐 균주를 사용하였다.

[0559] **실시예 12. 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 면역글로불린-타입 결합 영역 α EGFR로부터 유도된 결합 영역을 포함하는 세포독성 단백질**

[0560] 이 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가양 독소 1의 A 서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도되고, 앞의 실시예에서 설명한 하나 이상의 탈면역 아미노산 치환체를 포함하는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 결합 영역 α EGFR은 AdNectinTM(Genbank Accession:3QWQ_B), AffibodyTM(Genbank Accession:2KZI_A; U.S. patent 8,598,113), 또는 하나의 항체로부터 유도되고, 이들은 모두 하나 이상의 인간 상피 성장인자 수용체를 결합한다. 이 인간 상피 성장인자 수용체의 발현은 유방암, 대장암, 폐암 세포와 같은 다양한 인간 암세포와 관련이 있다.

[0562] 세포독성 단백질 SLT-1A:: α EGFR::KDEL의 구조, 제조 및 정제

[0563] 면역글로불린-타입 결합 영역 α EGFR 및 시가 독소 작동체 영역이 서로 결합하였고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:60)을 부가하여 단백질을 형성하였다. 예를 들어, EGFR 결합 단백질 SLT-1A:: α EGFR::KDEL을 부호화한 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 융합 단백질을 제조하였다. SLT-1A:: α EGFR::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 상기 실시예에서 설명되거나 당업자에게 공지된 박테리아 및/또는 세포가 없는, 단백질 번역 시스템을 사용하여 달성되었다.

[0565] 세포독성 단백질 SLT-1A:: α EGFR::KDEL의 체외에서의 특성 측정

[0566] EGFR+ 세포 및 EGFR- 세포에 대한 이 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광분석법에 기초한 유동세포 분석법에 의하여 측정하였다. EGFR+ 세포에 대한 SLT-1A:: α EGFR::KDEL의 Bmax는 0.01~100nM 범위의 K_D에서 약 50,000~200,000 MFI로 측정되었고, 반면 이 분석법에서 EGFR- 세포에 대한 의미있는 결합은 없었다.

[0567] SLT-1A:: α EGFR::KDEL 세포독성 단백질의 리보솜 비활성 성능은 상기 실시예에서 설명한 바와 같이, 세포가 없는 체외 단백질 번역에서 측정되었다. 무세포 단백질 합성에 이 실시예의 세포독성 단백질이 미치는 억제효과는 상당하다. 이 무세포 분석법에서 단백질 합성에 관한 SLT-1A:: α EGFR::KDEL의 IC₅₀은 약 0.1~100pM이다.

[0569] 세포-사멸 분석법을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A:: α EGFR::KDEL의 세포독성 측정

[0570] SLT-1A:: α EGFR::KDEL의 세포독성 특성을 EGFR+ 세포를 이용하여 상기 실시예에서 설명한 바와 같은 일반적 세포-사멸 분석법에 의해 측정하였다. 또한 SLT-1A:: α EGFR::KDEL의 선택적 세포독성 특성은 EGFR+ 세포와 대비한 EGFR- 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 분석법에 의해 측정되었다. 이 실시예의 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포라인(line)에 따라 변하지만 EGFR+ 세포에 대하여 약 0.01~100 nM이었다. 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포 표면에서 EGFR을 발현하는 세포와 대비하여 세포표면에서 EGFR을 발현하지 않는 세포에 대하여 약 10~10,000배 더 크다(세포독성이 더 적다).

[0572] 항원성 및/또는 면역원성의 감소 측정

[0573] SLT-1A:: α EGFR::KDEL의 상대 탈면역성은 실시예 4 및 6에 설명한 것과 같이, 서양분석법, ELISA 분석법 및 생쥐 모델을 이용하여 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 관련하여 측정하였다.

[0575] 동물 모델을 이용한 세포독성 단백질 SLT-1A:: α EGFR::KDEL의 생체 내 효과 측정

[0576] 신생세포 상에서 세포독성 단백질 SLT-1A:: α EGFR::KDEL의 생체내 효과를 측정하기 위하여 동물 모델을 사용하

였다. 쥐들의 세포 표면에서 EGFR을 발현하는 인간 신생세포를 쥐 체내의 이중이식 종양 위에 정맥 주사한 후 세포독성 단백질의 효과를 시험하기 위해 다양한 쥐 균주를 사용하였다.

[0578] **실시예 13. 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 항체 αCCR5로부터 유도된 결합영역을 포함하는 세포독성 단백질**

[0579] 이 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가양 독소 1의 A서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도되고, 앞의 실시예에서 설명한 하나 이상의 탈면역 아미노산 치환체를 포함하는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-타입 결합영역 αCCR5는 인간 CCR5(CD195)에 대항한 단일클론 항체로부터 유도된다(Bernstone L et al., Hybridoma 31: 7-19(2012)). CCR5는 T-세포, 대식세포, 수지상세포, 및 소교세포 상에서 우세하게 발현된다. 또한, CCR5는 발병 및 인간 면역결핍 바이러스(HIV)의 확산에 한 몫 한다.

[0581] 세포독성 단백질 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 구조, 제조 및 정제

[0582] 면역글로불린-타입 결합 영역 αCCR5 및 시가 독소 작동체 영역이 서로 결합하였고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:60)을 부가하여 단백질을 형성하였다. 예를 들어, αCCR5 결합 단백질 SLT-1A::αCCR5::KDEL을 부호화한 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 융합 단백질을 제조하였다. SLT-1A::αCCR5::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 상기 실시예에서 설명되거나 당업자에게 공지된 박테리아 및/또는 세포가 없는, 단백질 번역 시스템을 사용하여 달성되었다.

[0584] 세포독성 단백질 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 체외에서의 특성 측정

[0585] CCR5+ 세포 및 CCR5- 세포에 대한 이 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광분성법에 기초한 유동세포 분석법에 의하여 측정하였다. CCR5+ 세포에 대한 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 Bmax는 0.01~100nM 범위의 K_D에서 약 50,000~200,000 MFI로 측정되었고, 반면 이 분석법에서 CCR5- 세포에 대한 의미있는 결합은 없었다.

[0586] SLT-1A::αCCR5::KDEL 세포독성 단백질의 리보솜 비활성 성능은 상기 실시예에서 설명한 바와 같이, 무세포 체외 단백질 번역에서 측정되었다. 무세포 단백질 합성에 이 실시예의 세포독성 단백질이 미치는 억제효과는 상당하다. 이 무세포 분석법에서 단백질 합성에 관한 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 IC₅₀은 약 0.1~100pM이다.

[0588] 세포-사멸 분석법을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 세포독성 측정

[0589] SLT-1A::αCCR5::KDEL의 세포독성 특성을 CCR5+ 세포를 이용하여 상기 실시예에서 설명한 바와 같은 일반적 세포-사멸 분석법에 의해 측정하였다. 또한 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 선택적 세포독성 특성은 CCR5+ 세포와 대비한 CCR5- 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 분석법에 의해 측정되었다. 이 실시예의 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포라인(line)에 따라 변하지만 CCR5+ 세포에 대하여 약 0.01~100 nM이었다. 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포 표면에서 CCR5를 발현하는 세포와 대비하여 세포표면에서 CCR5를 발현하지 않는 세포에 대하여 약 10~10,000배 더 크다(세포독성이 더 적다).

[0591] 항원성 및/또는 면역원성의 감소 측정

[0592] SLT-1A::αCCR5::KDEL의 상대 탈면역성은 실시예 4 및 6에 설명한 것과 같이, 서양분석법, ELISA 분석법 및 생쥐 모델을 이용하여 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 관련하여 측정하였다.

[0594] 동물 모델을 이용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 생체 내 효과 측정

[0595] 신생세포 상에서 세포독성 단백질 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 생체내 효과를 측정하기 위하여 도너(donor) 물질로부터 고갈되는 T-세포 상에서 동물 모델을 사용하였다(Tsirigotis P et al., Immunotherapy 4: 407-24 (2012)). SLT-1A::αCCR5의 체내 효과를 측정하기 위하여 비인간 영장류를 사용하였다. 기증된 장기가 SLT-1A::αCCR5::KDEL로 예비처리될 때 신장 이식 후에 히말라야 원숭이에서 대숙주성 이식편병(graft versus host disease)을 분석하였다.(Weaver T et al., Nat Med 15: 746-9 (2009)). 게적이원숭이에서 말초혈액 T 림프구의 고갈이 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 다른 양의 비경구 투여 후에 관측되었다. HIV 감염을 차단하기 위한 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 사용을 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV)에 노출될 때 순환 T-세포를 심하게 고갈시키기 위하여 비인간 영장류에게 SLT-1A::αCCR5::KDEL의 치사량을 투여함으로써 시험하였다(Sellier P et al., PLoS One 5: e10570 (2010)).

[0597] **실시예 14. 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 Anti-Env 면역글루불린 도메인으로부터 유도된 결합영역을 포함하는 세포독성 단백질**

- [0598] 이 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가양 독소 1의 A 서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도되고, 앞의 실시예에서 설명한 하나 이상의 탈면역 아미노산 치환체를 포함하는 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-타입 결합영역 αEnv는 GP41, GP120, GP140, 또는 GP160과 같은 HIV 외피 당단백질(Env)을 결합하는 존재하는 항체로부터 유래되거나(Chen W et al, J Mol Bio 382: 779-89 (2008); Chen W et al, Expert Opin Biol Ther 13: 657-71 (2013); van den Kerkhof T et al, Retrovirology 10: 102 (2013)) 또는 표준기술을 사용하여 생성된 항체로부터 유도된다(Prabakaran et al., Front Microbiol 3:277 (2012)). Env는 HIV 복제 중에 HIV-감염세포의 세포표면에 나타나는 HIV 표면 단백질이다. Env가 엔도소말(endosomal) 구획 내에서 감염된 세포 내에서 우세하게 발현될지라도, 충분한 양의 Env가 본 발명의 매우 강력한 세포독성 단백질에 의해 표적되는 세포 표면에 존재할 수 있다. 또한 Env-표적 세포독성 단백질은 HIV 비리온(virion)을 결합하여 비리온의 용해 중에 호스트 세포와 함께 새롭게 감염된 세포 속으로 들어간다.
- [0599] HIV 높은 비율의 돌연변이를 나타내기 때문에, HIV의 다중 스트레인으로부터 Env를 결합하는 광범위하게 중화하는 항체에 의하여 나타난 바와 같이(van den Kerkhof T et al., Retrovirology 10:102(2013)), Env의 기능적 제한 부분을 결합하는 면역글로불린 도메인을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0601] 세포독성 단백질 SLT-1A::αEnv::KDEL의 구조, 제조 및 정제
- [0602] 면역글로불린-타입 결합 영역 αEnv 및 시가 독소 작동체 영역이 서로 결합하였고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:60)을 추가하여 단백질을 형성하였다. 예를 들어, αEnv 결합 단백질 SLT-1A::αEnv::KDEL을 부호화한 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 융합 단백질을 제조하였다. SLT-1A::αEnv::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 상기 실시예에서 설명되거나 당업자에게 공지된 박테리아 및/또는 세포가 없는, 단백질 번역 시스템을 사용하여 달성되었다.
- [0604] 세포독성 단백질 SLT-1A::αEnv::KDEL의 체외에서의 특성 측정
- [0605] Env+ 세포 및 Env- 세포에 대한 이 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광분성법에 기초한 유동세포 분석법에 의하여 측정하였다. Env+ 세포에 대한 SLT-1A::αEnv::KDEL의 B_{max}는 0.01~100nM 범위의 K_D에서 약 50,000~200,000 MFI로 측정되었고, 반면 이 분석법에서 Env- 세포에 대한 의미있는 결합은 없었다.
- [0606] SLT-1A::αEnv::KDEL 세포독성 단백질의 리보솜 불활성 성능은 상기 실시예에서 설명한 바와 같이, 세포가 없는 체외 단백질 번역에서 측정되었다. 무세포 단백질 합성에 이 실시예의 세포독성 단백질이 미치는 억제효과는 상당하다. 이 무세포 분석법에서 단백질 합성에 관한 SLT-1A::αEnv::KDEL의 IC₅₀은 약 0.1~100pM이다.
- [0608] 세포-사멸 분석법을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αEnv::KDEL의 세포독성 측정
- [0609] SLT-1A::αEnv::KDEL의 세포독성 특성을 Env+ 세포를 이용하여 상기 실시예에서 설명한 바와 같은 일반적 세포-사멸 분석법에 의해 측정하였다. 또한 SLT-1A::αEnv::KDEL의 선택적 세포독성 특성은 Env+ 세포와 대비한 Env- 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 분석법에 의해 측정되었다. 이 실시예의 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포라인(line) 및/또는 Env+를 만들도록 세포를 감염시키는데 사용된 HIV 스트레인에 따라 변하지만 Env+ 세포에 대하여 약 0.01~100 nM이었다. 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포 표면에서 Env를 발현하는 세포와 대비하여 세포표면에서 Env를 발현하지 않는 세포에 대하여 약 10~10,000배 더 크다(세포독성이 더 적다).
- [0611] 항원성 및/또는 면역원성의 감소 측정
- [0612] SLT-1A::αEnv::KDEL의 상대 탈면역성은 실시예 4 및 6에 설명한 것과 같이, 서양분석법, ELISA 분석법 및 생쥐 모델을 이용하여 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 관련하여 측정하였다.
- [0614] 동물 모델을 이용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αEnv::KDEL의 생체내 효과 측정
- [0615] 원숭이 면역결핍 감염 비인간 영장류에 SLT-1A::αEnv::KDEL를 주사함으로써 HIV 감염을 억제하기 위한 SLT-1A::αEnv::KDEL의 사용을 시험하였다(Sellier P et al., PloS One 5: e10570 (2010)).
- [0617] **실시예 15. 탈면역된 시가 독소 작동체 폴리펩티드 및 항체 αUL18로부터 유도된 결합영역을 포함하는 세포독성 단백질**
- [0618] 이 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가양 독소 1의 A 서브유닛(SLT-1A)으로부터 유도되고, 앞의 실시예에서 설명한 하나 이상의 탈면역 아미노산 치환체를 포함하는 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 면역글로불린-타입 결합영역 αUL18은 거대세포 바이러스로 감염된 인간세포 상에 존재하는 세포표면 거대세포 바이러스

스 단백질 αUL18에, 공지기술을 사용하여, 생성된 항체로부터 유도된다(Yang Z, Bjorkman P, Proc Natl Acad Sci USA 105: 10095-100 (2008)). 이 인간 거대세포 감염은 다양한 암 및 염증성 장애와 관련된다.

[0620] 세포독성 단백질 SLT-1A::αUL18::KDEL의 구조, 제조 및 정제

[0621] 면역글로불린-타입 결합 영역 αUL18 및 시가 독소 작동체 영역이 서로 결합하였고, 카복시-말단 KDEL(SEQ ID NO:60)을 부가하여 단백질을 형성하였다. 예를 들어, αUL18 결합 단백질 SLT-1A::αUL18::KDEL을 부호화한 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 융합 단백질을 제조하였다. SLT-1A::αUL18::KDEL 세포독성 단백질의 발현은 상기 실시예에서 설명되거나 당업자에게 공지된 박테리아 및/또는 세포가 없는, 단백질 번역 시스템을 사용하여 달성되었다.

[0623] 세포독성 단백질 SLT-1A::αUL18::KDEL의 체외에서의 특성 측정

[0624] UL18+ 세포 및 UL18- 세포에 대한 이 실시예의 세포독성 단백질의 결합 특성을 형광분성법에 기초한 유동세포 분석법에 의하여 측정하였다. UL18+ 세포에 대한 SLT-1A::αUL18::KDEL의 Bmax는 0.01~100nM 범위의 K_D에서 약 50,000~200,000 MFI로 측정되었고, 반면 이 분석법에서 UL18- 세포에 대한 의미있는 결합은 없었다.

[0625] SLT-1A::αUL18::KDEL 세포독성 단백질의 리보솜 비활성 성능은 상기 실시예에서 설명한 바와 같이, 세포가 없는 체외 단백질 번역에서 측정되었다. 세포 없는 단백질 합성에 이 실시예의 세포독성 단백질이 미치는 억제효과를 상당하다. 이 세포없는 분석법에서 단백질 합성에 관한 SLT-1A::αUL18::KDEL의 IC₅₀은 약 0.1~100pM이다.

[0627] 세포-사멸 분석법을 사용한 세포독성 단백질 SLT-1A::αUL18::KDEL의 세포독성 측정

[0628] SLT-1A::αUL18::KDEL의 세포독성 특성을 거대세포 단백질 UL18+ 세포를 이용하여 상기 실시예에서 설명한 바와 같은 일반적 세포-사멸 분석법에 의해 측정하였다. 또한 SLT-1A::αUL18::KDEL의 선택적 세포독성 특성은 거대세포 단백질 UL18+ 세포와 대비한 거대세포 단백질 UL18- 세포를 사용하여 동일한 일반적인 세포-사멸 분석법에 의해 측정되었다. 이 실시예의 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포라인(line)에 따라 변하지만 거대세포 단백질 UL18+ 세포에 대하여 약 0.01~100 nM이었다. 세포독성 단백질의 CD₅₀은 세포 표면에서 거대세포 단백질 UL18을 발현하는 세포와 대비하여 세포표면에서 거대세포 단백질 UL18을 발현하지 않는 세포에 대하여 약 10~10,000배 더 크다(세포독성이 더 적다).

[0630] 항원성 및/또는 면역원성의 감소 측정

[0631] SLT-1A::αUL18::KDEL의 상대 탈면역성은 실시예 4 및 6에 설명한 것과 같이, 서양분석법, ELISA 분석법 및 생쥐 모델을 이용하여 야생형 시가 독소 작동체 영역 폴리펩티드와 관련하여 측정하였다.

[0633] 실시예 16. 다양한 세포 타입을 표적하는 탈면역된 세포독성 단백질

[0634] 이 실시예에서, 시가 독소 작동체 영역은 시가양 독소 1의 A 서브유닛(SLT-1A), 시가 독소(StxA), 및/또는 시가양 독소 2(SLT-2A)로부터 교란된 B-세포 항원결정기 영역의 어떤 조합과 함께 유도된 탈면역 시가 독소 작동체 폴리펩티드이다. 결합영역은 표 12의 칼럼 1에서 선택된 분자로부터의 면역글로불린 도메인으로부터 유도되고, 이는 표 12의 칼럼 2에 표시된 세포의 표적 생체분자를 결합한다. 이 실시예의 세포독성 단백질은 공지의 시약과 기술을 사용하여 카복시-말단 KDEL-타입 선호 모티프(motif) 및/또는 감지 증진제로써 선택적으로 생성된다. 이 실시예의 대표적인 세포독성 단백질을 앞의 실시예에서 설명한 바와 같이 적절한 세포의 표적 생체분자를 발현하는 세포를 이용하여 시험하였다. 이 실시예의 대표적인 단백질은 표 12의 칼럼 3에 나타난 질병, 질환 및/또는 장애를 진단하거나 치료하는데 사용될 수 있다.

표 12

[0635]

결합영역의 원천	세포의 표적	적용
alemtuzumab	CD52	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포 관련 면역장애
basiliximab	CD25	장기이식 거부 예방과 같은 T-세포 장애, 및 몇 B-세포 혈통 암
brentuximab	CD30	혈액암, B-세포 관련 면역장애, 및 T-세포 관련 면역 장애
catumaxomab	EpCAM	난소암, 복수 종양, 위암과 같은 각종 암
cetuximab	EGFR	직장암 및 두경부암과 같은 각종 암

daclizumab	CD25	장기이식거부와 같은 B-세포 혈통 암 및 T-세포 장애
daratumumab	CD38C	혈액암, B-세포 관련 면역장애, 및 T-세포 관련 면역장애
dinutuximab	강글리오사이드 GD2	유방암, 골수암, 및 신경모세포종과 같은 각종암
efalizumab	LFA-1(CD11a)	건선과 같은 자동면역 장애
ertumaxomab	HER2/neu	유방암 및 직장암과 같은 각종 암 및 종양
gemtuzemab	CD33	골수암 또는 면역장애
ibritumomab	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포 암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포 관련 면역장애
ipilimumab	CD152	백혈병, 흑색종 같은T-세포 관련 장애 및 각종 암
muromonab	CD3	장기이식 거부 예방
natalizumab	인테그린 α4	다중 경화증 및 크론병과 같은 자동 면역 장애
obinutuzumab	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포관련 면역 장애
ocaratuzumab	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포관련 면역 장애
ocrelizumab	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포관련 면역 장애
ofatumumab	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포관련 면역 장애
palivizumab	호흡기세포융합바이러스의 F 단백질	호흡기세포융합바이러스 치료
panitumumab	EGFR	직장암 및 두경부암과 같은 각종 암
pertuzumab	HER2/neu	유방암 및 직장암과 같은 각종 암 및 종양
pro 140	CCR5	HIV 감염 및 T-세포 장애
ramucirumab	VEGFR2	고형종양과 같은 각종 암 및 암 관련 장애
rituximab	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포관련 면역 장애
tocilizumab 또는 atlizumab	IL-6 수용체	류마티스 관절염과 같은 자동면역 장애
tositumomab	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포관련 면역 장애
trastuzumab	HER2/neu	유방암 및 직장암과 같은 각종 암 및 종양
ublitzumab	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포관련 면역 장애
vedolizumab	인테그린 α4β7	크론병 및 궤양성 대장염과 같은 자동면역 장애
CD20 binding scFv(s) Geng S et al., <i>Cell Mol Immunol</i> 3: 439-43 (2006); Olafsen T et al., <i>Protein Eng Des Sel</i> 23: 243-9 (2010)	CD20	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포관련 면역 장애
CD22 binding scFv(s) Kawas S et al., <i>MAbs</i> 3: 479-86 (2011)	2CD20	B-세포 암 또는 B-세포 관련 면역 장애
CD25 binding scFv(s) Muramatsu H et al., <i>Cancer Lett</i> 225: 225-36 (2005)	5CD20	B-세포 혈통의 각종 암 및 T-세포 관련 면역장애
CD30 binding 단일클론 항체(들) Klimka A et al., <i>Br J Cancer</i> 83: 252-60 (2000)	CD30	B-세포 암 또는 B-세포/T-세포 관련 면역장애
CD33 binding 단일클론 항체(들) Benedict C et al., <i>J Immunol Methods</i> 201: 223-31 (1997)	CD33	혈액암 또는 면역장애

CD38 binding 면역글로불린 도메인 U.S. patent 8,153,765	CD38	혈액암, B-세포 관련 면역장애, 및 T-세포관련 면역 장애
CD40 binding scFv(s) Ellmark P et al., <i>Immunology</i> 106: 456-63 (2002)	CD40	각종 암 및 면역장애
CD52 binding 단일클론 항체(들) U.S. Patent 7,910,104 B2	CD52	림프종 및 백혈병과 같은 B-세포암, 및 자동면역 장애와 같은 B-세포관련 면역 장애
CD56 binding 단일클론 항체(들) Shin J et al., <i>Hybridoma</i> 18: 521-7 (1999)	CD56	폐암, 메르켈세포 상피성 암, 골수종과 같은 각종 암 및 면역장애
CD79 binding 단일클론 항체(들) Zhang L et al., <i>Ther Immunol</i> 2: 191-202 (1995)	79CD	B-세포 또는 B-세포 관련 면역장애
CD248 binding scFv(s) Zhao A et al., <i>J Immunol Methods</i> 363: 221-32 (2011)	CD248	억제 맥관 형성과 같은 각종 암
EpCAM binding 단일클론 항체(들) Schanzer J et al., <i>J Immunother</i> 29: 477-88 (2006)	EqCAM	난소암, 복수종양, 위암과 같은 각종 암
PSMA binding 단일클론 항체(들) Frigerio B et al., <i>Eur J Cancer</i> 49: 2223-32 (2013)	PSMA	전립선암
Eph-B2 binding 단일클론 항체(들) Abengozar M et al., <i>Blood</i> 119: 4565-76 (2012)	Eph-B2	직장암 및 전립선암과 같은 각종 암
Endoglin binding 단일클론 항체(들) Volkel T et al., <i>Biochim Biophys Res Acta</i> 1663: 158-66 (2004)	Endoglin	유방암 및 직장암과 같은 각종 암
FAP binding 단일클론 항체(들) Zhang J et al., <i>FASEB J</i> 27: 581-9 (2013)	FAP	육종 및 골암과 같은 각종 암
CEA binding 항체(들) and scFv(s) Neumaier M et al., <i>Cancer Res</i> 50: 2128-34 (1990); Pavoni E et al., <i>BMC Cancer</i> 6: 4 (2006); Yazaki P et al., <i>Nucl Med Biol</i> 35: 151-8 (2008); Zhao J et al., <i>Oncol Res</i> 17: 217-22 (2008)	CEA	위암, 췌장암, 폐암 및 유방암과 같은 각종 암
CD24 binding 단일클론 항체(들) Kristiansen G et al., <i>Lab Invest</i> 90: 1102-16 (2010)	CD24	방광암과 같은 각종 암

LewisY antigen binding scFv(s) Power B et al., <i>Protein Sci</i> 12: 734-47 (2003); monoclonal antibody BR96 Feridani A et al., <i>Cytometry</i> 71: 361-70 (2007)	LewisY 항원	자궁암과 같은 각종 암
adalimumab	TNF- α	류마티스관절염, 크론병, 관형건선, 건선 류마티스, 강직성 척추염, 소아 특발성 관절염, 신생아 용혈성 질환과 같은 각종 암 및 면역장애
afelimomab	TNF- α	각종 암 및 면역장애
ald518	IL-6	류마티스 관절염과 같은 각종 암 및 면역장애
anrukinzumab 또는 -ima638	IL-13	각종 암 및 면역장애
briakinumab	IL-12, IL-23	건선, 류마티스관절염, 염증성 장 질환, 다중 경화증과 같은 각종 암 및 면역장애
brodalumab	IL-17	염증성 질환과 같은 각종 암 및 면역장애
canakinumab	IL-1	염증성 질환과 같은 각종 암 및 면역장애
certolizumab	TNF- α	크론병과 같은 각종 암 및 면역장애
fezakinumab	IL-22	류마티스 관절염, 건선과 같은 각종 암 및 면역장애
ganitumab	IGF-I	각종 암
golimumab	TNF- α	류마티스 관절염, 건선성 관절염 강직성 척추염과 같은 각종 암 및 면역장애
infliximab	TNF- α	류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 건선, 크론병 고니 양성 대장염 같은 각종 암 및 면역장애
ixekizumab	IL-17A	자동면역 질환과 같은 각종 암 및 면역장애
mepolizumab	IL-5	B-세포 암과 같은 각종 면역장애 및 암
nerelimomab	TNF- α	각종 암 및 면역장애
olokizumab	IL6	각종 암 및 면역장애
ozoralizumab	TNF- α	염증
perakizumab	IL17A	관절염과 같은 각종 암 및 면역장애
placulumab	human TNF	각종 면역장애 및 암
sarilumab	IL6	류마티스 관절염, 강직성 척추염과 같은 각종 암 및 면역장애
siltuximab	IL-6	각종 암 및 면역장애
sirukumab	IL-6	류마티스 관절염과 같은 각종 암 및 면역장애
tabalumab	BAFF	B-세포 암
ticilimumab 또는 tremelimumab	CTLA-4	각종 암
tildrakizumab	IL-23	면역 중재 염증 장애
tnx-650	IL-13	B-세포 암과 같은 각종 암 및 면역장애
tocilizumab 또는 atlizumab	IL-6 수용체	류마티스 관절염과 같은 각종 암과 면역장애
ustekinumab	IL-12, IL-23	다중 경화증, 건선, 건선성 관절염과 같은 각종 암 및 면역장애
각종 성장인자: VEGF, EGF1, EGF2, FGF	VEGFR, EGFR, FGFR	유방암, 대장암과 같은 각종 암 및 혈관화 억제
각종 시토카인: IL-2, IL-6, IL-23, CCL2, BAFFs, TNFs, RANKL	IL-2R, IL-6R, IL-23R, CD80/CD86, TNFRSF13/TNFRSF17, TNFR	각종 면역장애 및 암
환자샘플로부터 식별된 광범위 중화항체 Prabakaran et al., <i>Front Microbiol</i> 3: 277 (2012)	인플루엔자 표면항원 예: 적혈구응집소 및 인플루엔자 마탄질단백질 2	바이러스 감염
환자샘플로부터 식별된 광범위 중화항체 Prabakaran et al., <i>Front Microbiol</i> 3: 277 (2012)	코로나바이러스 표면항원	바이러스 감염

환자샘플로부터 식별된 광범위 중화항체 Prabakaran et al., <i>Front Microbiol</i> 3: 277 (2012)	헤니파바이러스 표면항원	바이러스 감염
---	--------------	---------

[0636] 세포독성 단백질의 세포 표적화를 위한 다양한 결합 영역

[0638] 본 발명의 구체예는 예시 목적으로 기재될 뿐, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의하여 본 발명의 본질을 벗어나거나 보호범위를 벗어나지 않고서 다양한 변형, 변경, 응용, 균등물의 대체나 치환이 가능하다는 것은 분명한 것이다.

[0639] 본 명세서에서 언급한 모든 출판물, 특허, 및 특허출원들은 각각 개별적으로 본 발명의 참조용으로 설명되었듯이 전체적으로 본 발명의 참고문헌으로 관련된다. 미국특허출원번호 61/777,130, 61/932,000, 61/951,110, 61/951,120, 62/010,918 및 62/049,325 가 모두 본 발명과 관련된다. PCT WO 2014164680 및 WO 2014164693도 모두 본 발명과 관련된다. 여기서 인용된 아미노산 및 뉴클레오티드 서열에 대한 GenBank (National Center for Biotechnology Information, U.S.)로부터 모든 이용가능한 생화학 서열 전자 정보에 관한 모든 공개도 본 발명과 관련된다.

서열 목록		
ID 번호	텍스트 서술	생물학적 서열
SEQ ID NO:1	시카얌 독소 1 서브유닛 A (SLT-A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAYDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFHQIQRGFRTLLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSAVALILNCHHHA SRVARMASDEFTSMCPADGRVRGI THINKILWDSSTLGAILM RRTISS
SEQ ID NO:2	시카 독소 서브유닛 A (StxA)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGTGDNLFAYDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFHQIQRGFRTLLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSAVALILNCHHHA SRVARMASDEFTSMCPADGRVRGI THINKILWDSSTLGAILM RRTISS
SEQ ID NO:3	시카얌 독소 2 서브유닛 A (SLT-A)	DEFTLDFSSQKSYVDSLNSIRSAISTPLGNISSGGYSVSI NHVLGGNYISLNVRLDPYSERFNNRLIVERNNLYVAGFI NTEINIPYRPSDFSHISVPDYITVSMITDSSYSSLQRTADL ERTGMQIGRHSLVGSYLDLMEFRGRSMTRASSRAMLRFVTV TAEALRFHQIQRGFRPALSEASPLYTMTAQDVDLTLNWGR SMVLPEYRGEEGVRIGRISFNSLSAILGSAVALILNCHSTGS YSVRSVSKGKTECRIVGDRAAIKVNVLWEANTIAALLNR KPKDLTEPNQ
SEQ ID NO:4	발면역된 SLT-1A (K1M)	MEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAYDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFHQIQRGFRTLLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSAVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:5	발면역된 SLT-1A (S81)	KEFTLDFITAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAYDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFHQIQRGFRTLLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSAVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:6	발면역된 SLT-1A (T91)	KEFTLDFSIATKYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAYDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFHQIQRGFRTLLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSAVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:7	발면역된 SLT-1A (K11A)	KEFTLDFSTAATYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAYDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFV

[0640]

		NRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVL.PDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:8	탈염역원 SLT-1A (S331)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVL.PDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:9	탈염역원 SLT-1A (S451)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVL.PDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:10	탈염역원 SLT-1A (D53A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVAVRGIDPEEGRFNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVL.PDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:11	탈염역원 SLT-1A (R55A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVAGIDPEEGRFNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVL.PDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:12	탈염역원 SLT-1A (D58A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVL.PDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:13	탈염역원 SLT-1A (D58P)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIPPEEGRFNRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVL.PDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:14	탈염역원 SLT-1A (P59A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDAEGRFNRLIVERNNLYVTGFV

[0641]

		NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFQIQRGFRTTLDLSCRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:15	탈염역원 SLT-1A (E60I)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFQIQRGFRTTLDLSCRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:16	탈염역원 SLT-1A (E60R)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFQIQRGFRTTLDLSCRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:17	탈염역원 SLT-1A (E61A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEAGRNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFQIQRGFRTTLDLSCRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:18	탈염역원 SLT-1A (G62A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFQIQRGFRTTLDLSCRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:19	탈염역원 SLT-1A (D94A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFQIQRGFRTTLDLSCRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:20	탈염역원 SLT-1A (S96I)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFIHVTTPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFQIQRGFRTTLDLSCRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:21	탈염역원 SLT-1A (G110A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV

[0642]

		NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTL.SADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDL.SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:22	발면역원 SLT-1A (G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLLM1 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR.IVERNLYVTGPFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTL.SGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDL.SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:23	발면역원 SLT-1A (R179A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLLM1 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR.IVERNLYVTGPFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTL.SGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDL.SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:24	발면역원 SLT-1A (D183A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLLM1 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR.IVERNLYVTGPFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTL.SGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDL.SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:25	발면역원 SLT-1A (D184A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLLM1 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR.IVERNLYVTGPFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTL.SGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDL.SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:26	발면역원 SLT-1A (D184F)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLLM1 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR.IVERNLYVTGPFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTL.SGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDL.SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:27	발면역원 SLT-1A (S186A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLLM1 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR.IVERNLYVTGPFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTL.SGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDL.AGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:28	발면역원 SLT-1A (G187A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLLM1 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR.IVERNLYVTGPFV

[0643]

		NRITNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRPVTY TAEALRFRQIQRGFRITLDDLARSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:29	탈염역원 SLT-1A (R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFI NRITNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRPVTY TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSCASYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:30	탈염역원 SLT-1A (S189A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFI NRITNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRPVTY TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSCRAYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:31	탈염역원 SLT-1A (R205A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFI NRITNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRPVTY TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSCGRSYVMTAEDVDLTNLWGA LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:32	탈염역원 SLT-1A (K1M, K11A)	MEFTLDFSTAATYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFI NRITNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRPVTY TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSCGRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:33	탈염역원 SLT-1A (S45I, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLYVTGFI NRITNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRPVTY TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSCASYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:34	탈염역원 SLT-1A (E60I, G110A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPIBGRFNNRLIVERNNLYVTGFI NRITNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRPVTY TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSCGRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:35	탈염역원 SLT-1A (E60I, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPIBGRFNNRLIVERNNLYVTGFI

[0644]

		NRITNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLGRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:36	발면역원 SLT-1A (D94A, S96I)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGFV NRITNNVYRFAPFIHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLGRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:37	발면역원 SLT-1A (S33I, G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGFV NRITNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLGRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:38	발면역원 SLT-1A (S45I, G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGIGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGFV NRITNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLGRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:39	발면역원 SLT-1A (D58A, G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGFV NRITNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLGRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:40	발면역원 SLT-1A (E50I, G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPIEGRFNNLRIVERNNLYVTGFV NRITNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLGRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:41	발면역원 SLT-1A (D183A, D184A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGFV NRITNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLGRSYVMTAEDVDLTNLWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHIIHA SRVAR
SEQ ID NO:42	발면역원 SLT-1A (D58A, G110A, G147A, S186A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGFV

[0645]

		NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRPVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDLAGRSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:43	탈면역원 SLT-1A (D58A, G110A, G147A, G187A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGTV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRPVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDLAGRSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:44	탈면역원 SLT-1A (D58A, G110A, G147A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGTV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRPVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDLAGSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:45	탈면역원 SLT-1A (D58A, G110A, G147A, S189A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGTV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRPVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDLAGSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:46	탈면역원 SLT-1A (S45I, D58A, E60I, G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGIGDNLFAVDVRGIAPIEGRFNNLRIVERNNLYVTGTV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRPVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDLAGRSYVMTAEDVDLTINWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:47	탈면역원 SLT-1A (D58A, G110A, G147A, S186A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGTV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRPVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDLAGASYVMTAEDVDLTINWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:48	탈면역원 SLT-1A (D58A, G110A, G147A, G187A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGTV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRPVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDLAGASYVMTAEDVDLTINWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:49	탈면역원 SLT-1A (S33I, S45I, D58A, G110A,	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGIGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRIVERNNLYVTGTV

[0646]

	G147A)	NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATS LTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDL SGRSYVMTAEDVDLT LNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINA ILGSVAL ILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:50	탈면역원 SLT-1A (S33I, S45I, D58A, G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNRLIVERNNLYVTGFPV NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATS LTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITL AALSGASYVMTAEDVDLT LNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINA ILGSVAL ILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:51	탈면역원 SLT-1A (S33I, S45I, D58A, G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDVRGIAPIEGRFNRLIVERNNLYVTGFPV NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATS LTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITL AALSGASYVMTAEDVDLT LNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINA ILGSVAL ILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:52	탈면역원 SLT-1A (S33I, S45I, D58A, G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDVRGIAPIEGRFNRLIVERNNLYVTGFPV NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATS LTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITL AALSGASYVMTAEDVDLT LNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINA ILGSVAL ILNCHHHA SRVAR
SEQ ID NO:53	세포 특성 단백질: 탈면역원 SLT-1A 변종 #1과 융합한 α CD20	MQVQLQQPGAE LVKPGASVKMSCKTSGYTFTSYNHHWKQT PGQGLEWIGAIYPNGDTSFMQKFKGKATLADKSSSTVYM QLSSLTSEDSAVYYCARSNYGSSYVFPDVGAGTTVTVS SGSTSGSGKPGSGEGSQIVLSQSPITLSASPGKVTMTCSRA SSSVSYMDWYQQKPGSSPKPW IYATSNLASGVPARFSGSGS GTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWISNPPTFGACTKLELKE FPKPSTPPGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGT PLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNRL RLIVERNNLYVTGFPV NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATS LTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRITLDDL SGRSY VMTAEDVDLT LNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINA ILGSVAL ILNCHHHA SA VAR
SEQ ID NO:54	세포 특성 단백질: 탈면역원 SLT-1A 변종 #2와 융합한 α CD20	MQVQLVQSGAE LVKPGASVKMSCKASGYTPTSYNHHWKQT PGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLADKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARAQLRPNYVFDVGAGTTVTYSSG GGSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIVLSQSPAIL SASPGE KVMTCSRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPW IYATSNLASGV PARFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWISNPPTFGA GTKLELKGGGSGGKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTP LQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNRL RLIVERNNLYVTGFPV NRTNNVYRFADFSHVTTPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATS

[0647]

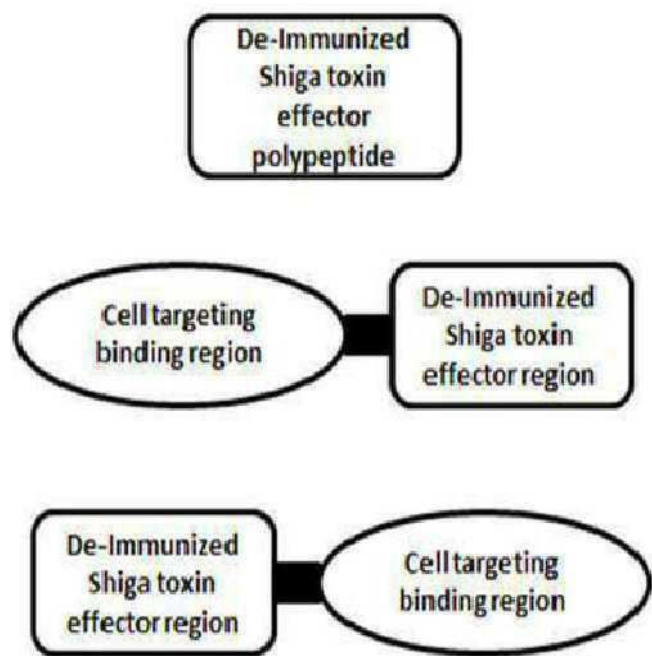
		TQSVARAMLRPVTVTAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYV MTAEDVDLTLNWGR.LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAIL LG.SVALILNCHHHASAVAR
SEQ ID NO:55	세포 독성 단백질: 발현억된 SLT-1A 변종 #3과 융합한 αCD20	MQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARSTVYGGDWYFNVWGAGTITVVSAG STSGSGKPGSGEGSTRGQIVLSQSPAILLASPGKVTMTCR ASSSVSYIHWFAQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPRFSGSG SGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGQKLEIK EPPKPSTPPGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTIISIGTSLLMIDSGIGDNLFAVDVRGIAPEEGRFN LRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVT LSADSSYITLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSAT SLTQSVARAMLRPVTVTAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRS YVMTAEDVDLTLNWGR.LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSIN AILG.SVALILNCHHHASAVAR
SEQ ID NO:56	세포 독성 단백질: 발현억된 SLT-1A 변종 #4와 융합한 αCD20	MQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFTSYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTVYM QLSSLTSEDSAVYYCARSNYYGSSVWFFDVGAGTITVVS SGSTSGSKPGSGEGSQIVLSQSPTILLASPGKVTMTCR ASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPRFSGSGS GTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWISNPPTFGAGTKLELKE FPKPSTPPGSSGGAPGILGFVFTLKEFTLDFSTAKTYVDSL NVIRSAIGTPLQTIISIGTSLLMIDSGIGDNLFAVDVRGIA PEEGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVT TPGTTAVTLSADSSYITLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYL DLMSHSATSLTQSVARAMLRPVTVTAEALRFRQIQRGFRIT LDDL.SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR.LSSVLPDYHGQDSVRV GRISFGSINAILG.SVALILNCHHHASAVAR
SEQ ID NO:57	세포 독성 단백질: 발현억된 SLT-1A 변종 #1과 융합한 항-HER2-V _H H	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSTINTMGWYRQA PGKQRELVALISSIGDTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCKRFRITAAQGTIDYWGQGTQVTVSSAHHS EDPSSKAPKAPKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQ TISIGTSLLMIDSGIGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNRLRLI VERNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVTLSADS SYITLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQ SVARAMLRPVTVTAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYVMTA EDVDLTLNWGR.LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILG SVALILNCHHHASAVAR
SEQ ID NO:58	세포 독성 단백질: 발현억된 SLT-1A 변종 #2와 융합한 항-HER2-V _H H	AKKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTIISIGTSLLM IDSGIGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNRLRLIVERNNLYVTGP VNRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVTLSADSSYITLQRVAG ISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRPVT VTAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYVMTAEDVDLTLNW GR.LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILG.SVALILNCHH ASAVAREFPKPSTPPGSSGGAPMEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGITFSTINTMGWYRQAPGKQRELVALISSIGDTYY ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQNMNSLKPEDTAVYYCKRFRIT AAQGTIDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:59	세포 독성 단백질: 발현억된 SLT-1A 변종 #3과 융합한 항-HER2-V _H H (αHER2-V _H H::SLT-1A::KDEL)	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSTINTMGWYRQA PGKQRELVALISSIGDTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCKRFRITAAQGTIDYWGQGTQVTVSSFPK PSTPPGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQ TISIGTSLLMIDSGIGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNRLRLI VERNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTTPGTTAVTLSAD SSYITLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQ SVARAMLRPVTVTAEALRFRQIQRGFRITLDDL.SGRSYVMT AEDVDLTLNWGR.LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILG SVALILNCHHHASAVARKDEL
--------------	---	---

도면

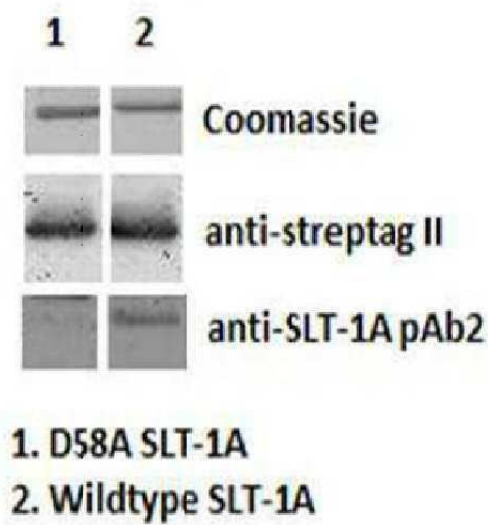
도면1

Figure 1. Schematic Drawing of the General Architecture of Exemplary Polypeptides and Cytotoxic Proteins



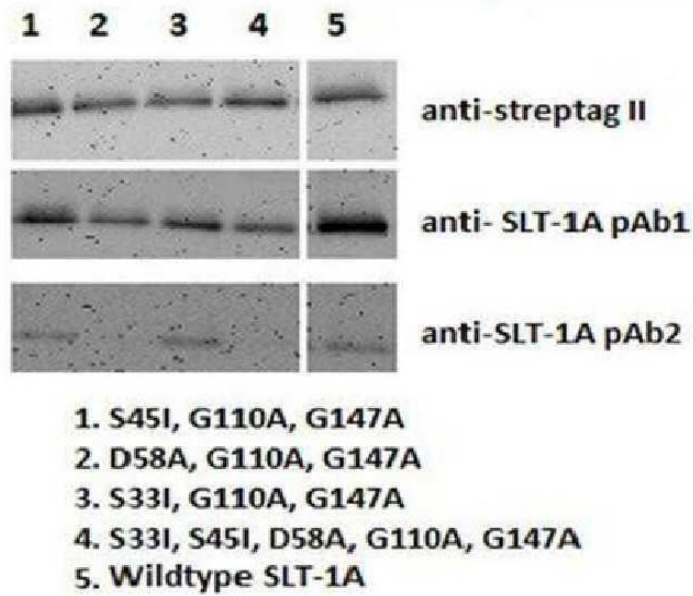
도면2

Figure 2. Western Blot Analysis of De-Immunized Shiga Toxin Effector Polypeptide: A protein comprising the D58A epitope disruption was not recognized by the antibody pAb2



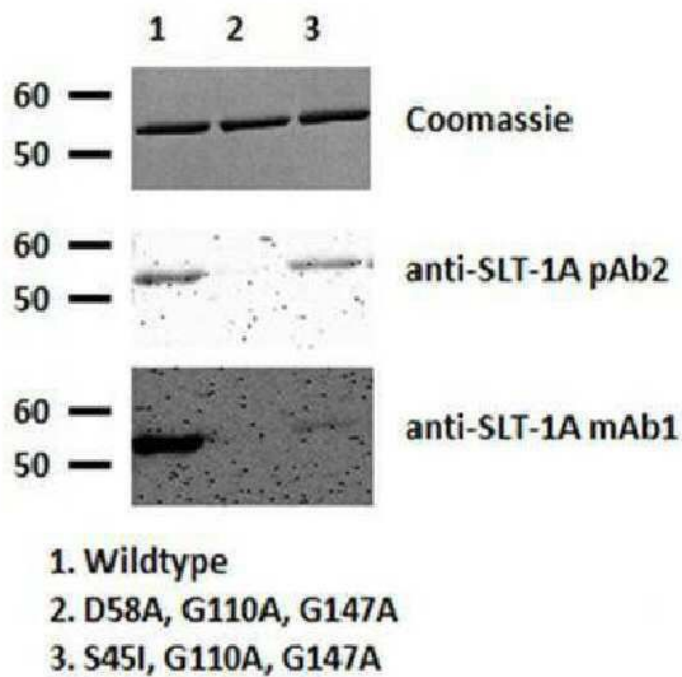
도면3

Figure 3. Western Blot Analysis of De-Immunized Shiga Toxin Effector Polypeptides



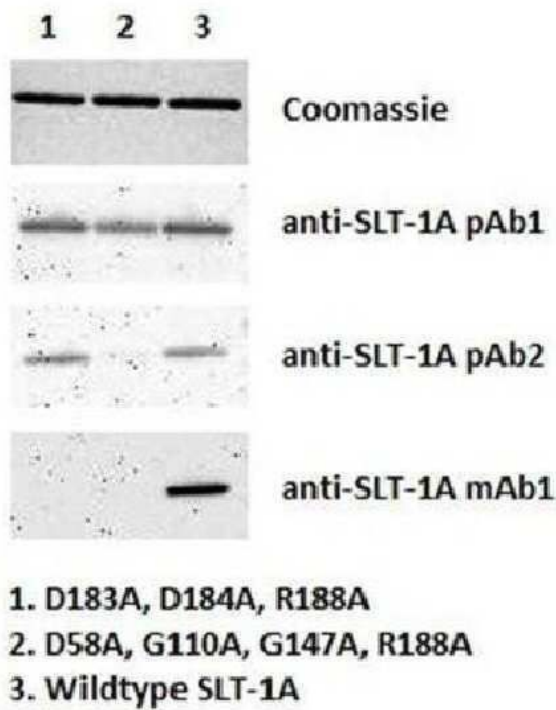
도면4

Figure 4. Western Blot Analysis of De-Immunized Shiga Toxin Effector Polypeptides



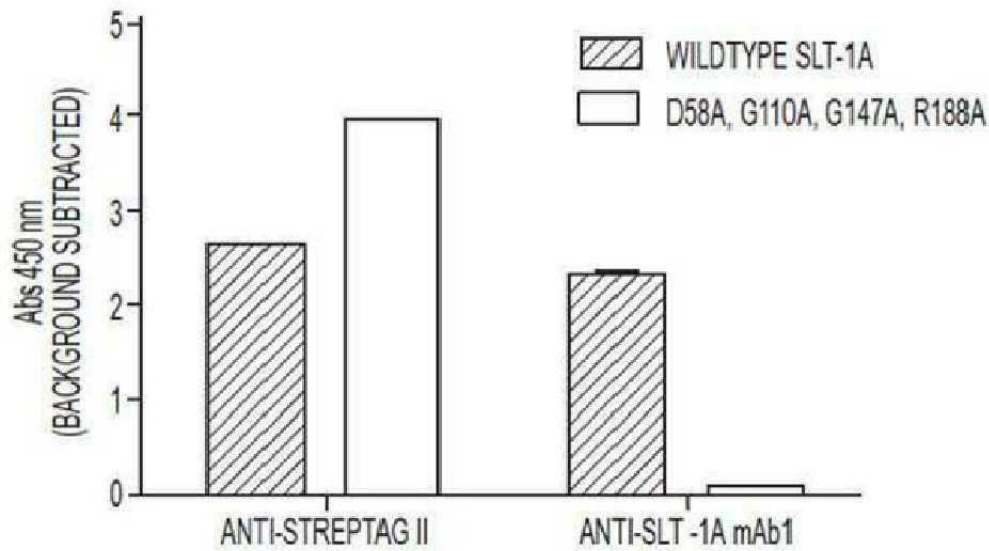
도면5

Figure 5. Western Blot Analysis of De-Immunized Shiga Toxin Effector Polypeptides



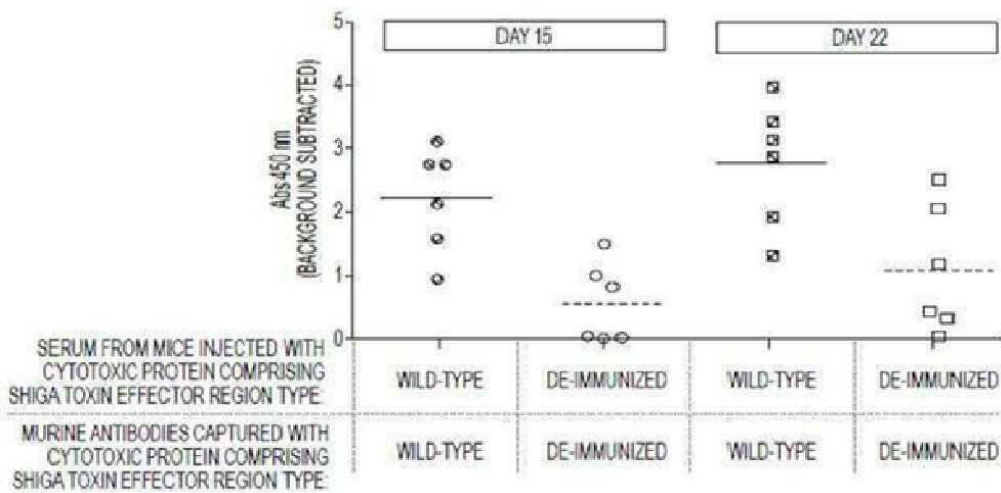
도면6

Figure 6. ELISA Analysis of De-Immunized Shiga Toxin Effector Polypeptides



도면7

Figure 7. Relative, *In Vivo*, Anti-Cytotoxic Protein, Antibody Responses: Comparing a cytotoxic protein of the invention comprising an exemplary de-immunized Shiga toxin effector polypeptide to a cytotoxic protein comprising a wild-type Shiga toxin effector region



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.