(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0082356
(43) 공개일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/495 (2024.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/495 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7012779
(22) 출원일자(국제) 2022년10월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/077879
(87) 국제공개번호 WO 2023/064747
국제공개일자 2023년04월20일
(30) 우선권주장
63/254,249 2021년10월11일 미국(US)

(71) 출원인
유니버시티 오브 피츠버그 - 오브 더 커먼웰쓰 시스템 오브 하이어 에듀케이션
미국 펜실베니아 15260, 피츠버그, 130 새커리 애비뉴, 퍼스트 플로어 가드너 스틸 컨퍼런스 센터
(72) 발명자
힌크, 앤드류 피.
미국, 펜실베이니아 15208, 피츠버그, 요크셔 드라이브,123
드포, 크리스틴
미국, 펜실베이니아 15232, 피츠버그, 리하이 애비뉴 에이피티. 2, 375
델고페, 그렉 엠.
미국, 펜실베이니아 15217, 피츠버그, 유닛 14, 비치우드불바르, 2747
(74) 대리인
이원희

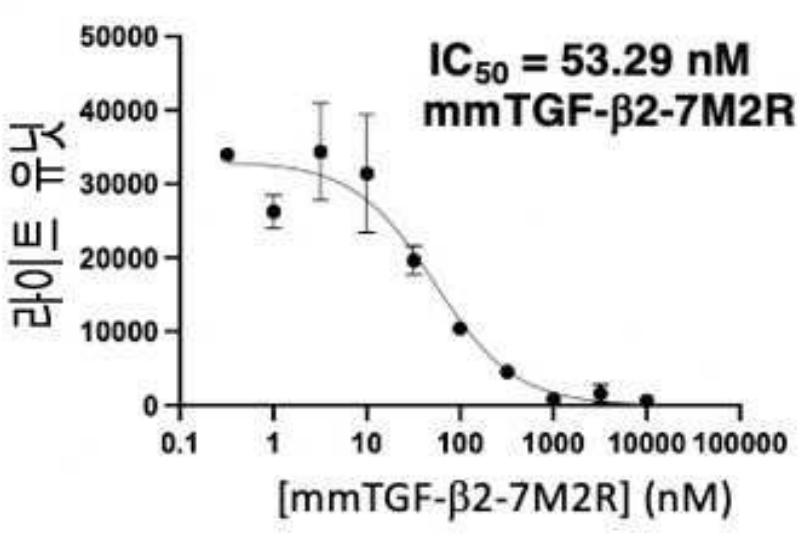
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **조작된 TGF-베타 단량체 및 사용 방법**

(57) 요 약

이량체화를 방지하고 TGF-β 신호 전달을 차단하도록 조작된 재조합 TGF-β2 단량체가 설명된다. 조작된 단량체에는 TGF-β I형 수용체(TβRI)에 결합하고 모집하는 능력이 부족하지만, 고친화도 TGF-β II형 수용체(TβRII)에 결합하는 능력은 유지한다. TGF-β2 단량체에는 또한 TβRII에 대한 친화도를 증가시키고, 응집을 감소시키며 및/또는 접힘을 개선하는 추가 변형도 포함된다. 재조합 TGF-β2 단량체를 코딩하는 핵산 분자 및 벡터도 설명되어 있다. T 세포와 같은 분리된 세포는 TGF-β2 단량체를 코딩하는 핵산 또는 벡터로 재프로그래밍(re-programming)하여 단량체를 분비할 수 있다. 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질환을 치료하는 것과 같이 TGF-β 신호전달을 억제하기 위한 재조합 TGF-β2 단량체 및/또는 재조합 TGF-β2 단량체를 생성하는 세포의 용도도 설명되어 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
C07K 2319/60 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는, 재조합 전환성장인자(TGF)-β2 단량체:

서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 세린으로의 치환, 또는 시스테인에서 아르기닌으로의 치환;

서열번호 1의 아미노산 잔기 52-71번에 해당하는 α3 나선의 결실;

서열번호 1의 잔기 25번에 해당하는 아미노산 잔기에서 라이신에서 아르기닌으로의 치환;

서열번호 1의 잔기 51번에 해당하는 아미노산 잔기에서 류신에서 아르기닌으로의 치환;

서열번호 1의 잔기 74번에 해당하는 아미노산 잔기에서 알라닌에서 라이신으로의 치환;

서열번호 1의 잔기 94번에 해당하는 아미노산 잔기에서 라이신에서 아르기닌으로의 치환; 및

(i) 서열번호 1의 잔기 26번에 해당하는 아미노산 잔기에서 아르기닌에서 라이신으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 79번에 해당하는 아미노산 잔기에서 발린에서 아르기닌으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 89번에 해당하는 아미노산 잔기에서 류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 92번에 해당하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 95번에 해당하는 아미노산 잔기에서 트레오닌에서 라이신으로의 치환; 및 서열번호 1의 잔기 98번에 상응하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환;

(ii) 서열번호 1의 잔기 7번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 발린으로의 치환; 및 서열번호 1의 잔기 16번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 알라닌으로의 치환; 또는

(iii) 서열번호 1의 잔기 7번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 16번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 알라닌으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 26번에 해당하는 아미노산 잔기에서 아르기닌에서 라이신으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 79번에 해당하는 아미노산 잔기에서 발린에서 아르기닌으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 89번에 해당하는 아미노산 잔기에서 류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 92번에 해당하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 95번에 해당하는 아미노산 잔기에서 트레오닌에서 라이신으로의 치환; 및 서열번호 1의 잔기 98번에 해당하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환.

청구항 2

제 1항에 있어서, 서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 아르기닌으로의 치환을 포함하는, 재조합 TGF-β2 단량체.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 4를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 재조합 TGF-β2 단량체.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 6을 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 재조합 TGF-β2 단량체.

청구항 5

제 1항에 있어서, 서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 세린으로의 치환을 포함하는, 재조합 TGF-β2 단량체.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 5를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 재조합 TGF-β2 단량체.

청구항 7

상기 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열이 서열번호 7을 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 재조합 전환 성장 인자(TGF)-β2 단량체.

청구항 8

제 1항에 있어서, 페길화된(PEGylated), 재조합 TGF-β2 단량체.

청구항 9

제 1항에 있어서, 글리코실화되거나(glycosylated) 또는 과당화된(hyper-glycosylated), 재조합 TGF-β2 단량체.

청구항 10

제 1항에 있어서, 방사선치료제, 화학요법을 위한 세포독성제, 약물, 영상화제, 형광 염료 또는 형광 단백질 태그를 추가로 포함하는, 재조합 TGF-β2 단량체.

청구항 11

제 1항의 재조합 TGF-β2 단량체와 이종 단백질을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 이종 단백질이 단백질 태그, Fc 도메인, 알부민, 알부민-결합 폴리펩티드, 항체, 항체의 항원-결합 단편 또는 표적화 부분(moiety)을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 융합 단백질이 단일-사슬 폴리펩티드인, 융합 단백질.

청구항 14

제 11항에 있어서, 상기 융합 단백질이 이량체 폴리펩티드를 형성하는, 융합 단백질.

청구항 15

제 11항에 있어서, 상기 융합 단백질이 이종이량체인, 융합 단백질.

청구항 16

제 11항에 있어서, 상기 융합 단백질이 다량체인, 융합 단백질.

청구항 17

제 1항의 재조합-β2 단량체를 코딩하는, 분리된 핵산 분자.

청구항 18

제 17항에 있어서, 프로모터에 작동가능하게 연결된, 핵산 분자.

청구항 19

제 18항의 핵산 분자를 포함하는, 벡터.

청구항 20

제 19항의 벡터를 포함하는, 분리된 세포.

청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 세포는 T림프구인, 분리된 세포.

청구항 22

다음을 포함하는, 조성물:

제 1항의 재조합 TGF-β2 단량체; 및

약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제.

청구항 23

유효량의 제 1항의 재조합 TGF-β2 단량체와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포에서 TGF-β 신호전달을 억제하는 방법.

청구항 24

유효량의 제 1항의 재조합 TGF-β2 단량체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환을 가지고 있는 대상체에서 TGF-β 신호전달을 억제하는 방법.

청구항 25

유효량의 제 1항의 재조합 TGF-β2 단량체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환을 치료하는 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환이 섬유성 질환인, 방법.

청구항 27

제 25항에 있어서, 상기 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환이 유방암, 뇌암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 방광암, 간암, 난소암, 신장암, 자궁내막암, 대장암, 위암, 피부암 또는 갑상선암인, 방법.

청구항 28

제 25항에 있어서, 상기 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환이 안구 질병(ocular disease)인, 방법.

청구항 29

제 25항에 있어서, 상기 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환이 결합 조직의 유전적 질환인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시내용은 개선된 특성을 갖는 전환 성장 인자(TGF)-β 단량체, 및 TGF-β 신호전달을 억제하고 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질환을 치료하기 위한 이들의 용도에 관한 것이다.

[0002] [관련 출원에 대한 상호 참조]

[0003] 본 출원은 2021년 10월 11일에 출원된 미국 가출원 번호 63/254,249의 이익을 주장하며, 이 출원은 그 전체 내용이 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0004] [정부 지원 사사]

[0005] 본 발명은 미국 국립보건원(National Institutes of Health)이 부여한 승인 번호 CA247129 하에 정부 지원을 받아 만들어졌다. 정부는 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0006] TGF-β 매개 면역억제는 세포독성 결핍 환경을 유발하고 T 조절 세포(T_{reg})는 면역억제성 사이토카인의 분비와 효과기 T 세포의 직접적인 억제를 통해 항종양 면역을 억제하기 때문에 TGF-β 는 암 면역치료의 중요한 표적이다. 종양 미세환경(TME)에서 TGF-β의 과발현은 높은 종양 부담(burden) 및 좋지 않은 임상 결과와 상관관계가 있다. 더욱이, 체크포인트 요법 비반응 환자는 TGF-β 매개 면역 배제로 인해 T 세포 고갈 표현형을 갖는다. PD-1 및 PD-L1 요법의 보조제인 TGF-β 억제제는 생체 내 체크포인트 단독요법을 능가하는 것으로 추가로 밝혀졌으며 이러한 접근법은 임상 시험에서 추구되고 있다. TGF-β 아형(isoform)은 또한 콜라겐 및 피브로넥틴과 같은 기질 단백질의 축적을 강력하게 자극하고 특발성 폐섬유증(IPF), 신장 섬유증, 심장 섬유증 및 관상 동맥 재협착증과 같은 섬유성 질환을 유발할 수 있다. 노년층에서 발생하는 점진적인 폐 기능 상실을 특징으로 하는 IPF는 진단 후 평균 생존율이 5년이다. 다양한 형태의 섬유증을 유발하는 메커니즘은 다양하지만 TGF-β 단백질의 증가된 수준의 공통된 유도를 공유한다. IPF 및 신장 섬유증에서 TGF-β 단백질의 증가된 수준은 섬유아세포의 활성화 및 근섬유아세포로의 분화를 자극하여 세포외 기질(ECM)의 비정상적인 침착을 유발하여 흉터를 남기고 기관 기능을 저하시킨다.

[0007] 중화항체를 이용한 암과 섬유증 모두에서 TGF-β의 억제는 효과가 제한적인데, 이는 대부분의 TGF-β가 ECM에 잠재 단백질로 저장되어 억제에 접근할 수 없기 때문일 수 있다. TGF-β 수용체 키나아제 억제제는 표적인 TGF-β I형 및 II형 수용체의 키나아제 도메인에 대한 접근성이 더 높지만 특이성이 부족하고 다른 TGF-β 계열 I형 수용체뿐만 아니라 비-TGF-β 수용체 키나아제도 억제한다. 키나아제 억제제는 임상 시험에서 2상을 지나 진행되지 않았으며 현재 FDA 승인 TGF-β 억제제는 없다. 따라서, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질환을 치료하기 위한 개선된 치료법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0008] 이량체화를 방지하고 TGF-β 신호전달을 차단하도록 조작된 TGF-β2 단량체가 본 명세서에 설명되어 있다. 조작된 단량체는 TGF-β I형 수용체(TβRI)에 결합하고 모집하는 능력이 부족하지만, 고친화도 TGF-β II형 수용체(TβRII)에 결합하는 능력은 유지한다. 개시된 TGF-β2 단량체는 또한 TβRII에 대한 친화도를 증가시키고, 응집을 감소시키고 및/또는 접힘을 개선하는 추가 변형을 포함한다. 개시된 TGF-β2 단량체 및 이의 조성물은 예를 들어, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질환, 예를 들어 섬유성 질환 및 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0009] 본 명세서에는 야생형 인간 TGF-β2(서열번호 1로 기재)의 아미노산 잔기 52-71번에 해당하는 α3(힐(heel)) 나선의 결실, 및 서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인의 아르기닌 또는 세린으로의 치환을 포함하는 재조합 TGF-β2 단량체가 제공되며; 이러한 변형은 단량체의 이량체화를 방지한다. TGF-β2 단량체는 서열번호 1의 잔기 51번에 해당하는 아미노산 잔기에서 류신에서 아르기닌으로의 치환, 및 서열번호 1의 잔기 74번에 해당하는 아미노산 잔기에서 알라닌에서 리신으로의 치환을 추가로 포함하며; 이러한 변형은 단량체의 순 전하를 증가시킨다. TGF-β2 단량체는 또한 서열번호 1의 잔기 25번에 해당하는 아미노산 잔기에서 리신에서 아르기닌으로의 치환, 및 서열번호 1의 잔기 94번에 해당하는 아미노산 잔기에서 리신에서 아르기닌으로의 치환을 포함하며, 이는 TβRII에 대한 단량체의 친화도를 증가시킨다. 일부 구현예에서, TGF-β2 단량체는 TβRII에 대한 단량체의 친화도를 증가시키고, 응집을 감소시키거나 및/또는 접힘을 개선시키는 하나 이상의 추가 변형을 추가로 포함한다.

[0010] 또한 단량체의 접힘을 향상시키는 Dan 및 Cerubus(PRDC)와 관련된 단백질의 시스틴-매듭(cystine-knot) 영역을 포함하도록 변형된 조작된 TGF-β2 단량체가 본 명세서에 제공된다.

[0011] TGF-β2 단량체 및 이종 단백질을 포함하는 융합 단백질도 제공된다. 일부 구현예에서, 이종 단백질은 단백질 태그, Fc 도메인, 알부민, 알부민-결합 폴리펩티드, 항체, 항체의 항원-결합 단편 또는 표적화 부분(moiety)을 포함한다.

[0012] 또한 본 명세서에 개시된 재조합 TGF-β2 단량체 또는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자 및 벡터가 제공된다. 재조합 TGF-β2 단량체 또는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 분리된 T 세포와 같은 분리된 세포가 추가로 제공된다.

[0013] 또한, 본 명세서에 개시된 재조합 TGF-β2 단량체, 융합 단백질, 핵산 분자, 벡터 또는 분리된 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0014] 또한, 세포를 본 명세서에 개시된 재조합 TGF-β2 단량체, 융합 단백질, 핵산 분자, 벡터 또는 조성물과 접촉시킴으로써 세포에서 TGF-β 신호전달을 억제하는 방법이 제공된다.

[0015] 또한, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환이 있는 대상체에서 TGF-β 신호전달을 억제하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 본 명세서에 개시된 재조합 TGF-β2 단량체, 융합 단백질, 핵산 분자, 벡터, 분리된 세포(T 세포와 같은) 또는 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 대상체에서 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환을 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 본 명세서에 개시된 재조합 TGF-β2 단량체, 융합 단백질, 핵산 분자, 벡터, 분리된 세포(T 세포와 같은) 또는 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 개시된 방법의 일부 실시예에서, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환은 섬유성 질환, 암, 안구 질환 또는 결합 조직의 유전적 질환이다.

[0016] 본 개시 내용의 전술한 내용과 다른 목적 및 특징은 첨부 도면을 참조하여 진행되는 하기의 상세한 설명으로부터 더욱 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0017] **도 1a-1e:** 조작된 TGF-β2 단량체 mmTGF-β2-7M (서열번호 3)과 TGF-β2 (서열번호 1) (도 1a), mmTGF-β2-7M2R (서열번호 4) (도 1b), mmTGF-β2-2M-Del7_16 (서열번호 5) (도 1c), mmTGF-β2-7M-PRDC (서열번호 7) (도 1d), 및 mmTGF-β2-7M2R-Del7-16 (서열번호 6) (도 1e)의 서열 비교. 서열 차이는 정렬된 두 서열 아래에 숫자로 표시되며, 숫자의 동일성은 차이의 특성을 나타낸다. 서열 동일성은 별표로 표시된다. 도 1a의 서열 하기에 나타낸 것은 TGF-β3-$(T\beta RII)_2$-$(T\beta RI)_2$ 복합체 (PDB 2PJY) (왼쪽) 및 mmTGF-β2-7M-TβRII 복합체 (PDB 5TX4) (오른쪽)의 구조이며, 일부 주요 구조적 특징이 강조되어 있다.

도 2a-2f: 모(parent) 단백질 mmTGF-β2-7M (도 2d-2f)과 비교한 mmTGF-β2-7M2R (도 2a-2c)의 아미드 ^{1}H-^{15}N 한결합 이동 상관(one-bond shift correlation) 핵자기공명(NMR) 스펙트럼. 스펙트럼은 pH 4.6의 10mM 인산염 완충액(도 2a 및 2d) 또는 완충액에 CHAPS가 없거나(도 2b 및 2e) 최종 농도가 10mM이 되도록 CHAPS가 첨가된 상태(도 2c 및 2f)에서 pH 7.2의 10mM 인산염 완충액에서 37℃에서 기록되었다.

도 3a-3c: mmTGF-β2-2M-Del7-16의 아미드 ^{1}H-^{15}N 한결합 이동 상관 NMR 스펙트럼. 스펙트럼은 pH 6.0의 10mM 인산염 완충액(도 3b) 또는 완충액에 CHAPS가 없거나(도 3a) 최종 농도가 10mM이 되도록 CHAPS가 첨가된 상태(도 3c)에서 pH 4.5의 10mM 인산염 완충액에서 37℃에서 기록되었다.

도 4a-4d: mmTGF-β2-7M-PRDC의 아미드 ^{1}H-^{15}N 한결합 이동 상관 NMR 스펙트럼(도 4a-4c) 및 천연상태(native) 겔 전기영동에 의해 검출된 TβRII에 대한 결합(도 4d). 스펙트럼은 pH 4.8(도 4a) 또는 pH 6.0(도 4b-4c)의 10 mM 인산염 완충액에서 37℃에서 기록되었다. 도 4b 및 도 4c는 신호가 표시(plot)되는 컨투어 레벨(contour level)에서만 다르다(도 4b는 도 4c 패널과 비교하여 노이즈(noise)에 가까운 컨투어 레벨으로 표시되어 있다). 도 4d에 도시된 천연상태 겔은 2μg의 TβRII 단독(가장 왼쪽 레인) 또는 지정된 몰비로 첨가한 조작된 TGF-β 단량체와 함께 러닝(running)함으로써 수행되었다(+A 및 +B는 각각 1:1 또는 2:1 몰비의 TβRII:조작된 TGF-β 단량체를 나타낸다).

도 5: 등온 적정 열량계(ITC)에 의해 검출된 TGF-β II형 수용체(TβRII)에 대한 조작된 TGF-베타 단량체(mmTGF-β2-7M, 왼쪽; mmTGF-β2-7M2R, 중간; 및 mmTGF-β2-2M-Del7-16, 오른쪽)의 결합. 상단 패널은 3번의 반복 적정에 대한 원시 온도 기록(raw thermogram)을 도시하고, 하단 패널은 1:1 결합 등온선(binding isotherm)(평활한 선(smooth line))에 전역적으로 적합한 3번의 반복 적정에 대한 통합 열(데이터 포인트)을 도시한다. 적합한 매개변수는 하단의 표에 제공된다.

도 6a-6d: 조작된 TGF-베타 단량체의 억제 효능을 서로 비교하여 평가하기 위한 HEK-293 세포 기반 CAGA-Luc TGF-β 리포터 분석. TGF-β CAGA-Luc 리포터로 안정적으로 형질 감염된 HEK-293 세포를 표시된 조작된 TGF-베타 단량체로 지정된 농도로 30분 동안 처리한 후 10pM TGF-β3을 첨가하여 자극했다. 14시간 후에 세포를 수확하고 루시퍼라제 활성에 대해 분석했다. (도 6a) mmTGF-β2-7M (서열번호 3), 58.23 nM 의 IC_{50}. (도

6b) mmTGF-β2-7M2R (서열번호 4), 53.29 nM 의 IC_{50}. (도 6c) mmTGF-β2-2M-Del7-16 (서열번호 5), 111.0 nM 의 IC_{50}. (도 6d) mmTGF-β2-7M-PRDC (서열번호 7), 282.5 nM 의 IC_{50}. 표시된 데이터 포인트와 오차 막대는 3중 측정의 평균 및 표준 편차에 해당한다. 매끄러운 곡선(smooth curve)은 표준 용량 반응 억제 등온선에 대한 적합도에 해당한다. 적합된 IC_{50} 값이 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 서열목록은 2022년 10월 3일에 작성된 8123-107062-03이라는 이름의 ST.26 서열목록 XML 파일로 제출되며, 크기는 7561바이트이며, 본 명세서에서 참조로 포함된다.

[0019] **서열번호 1**은 야생형 인간 TGF-β2의 아미노산 서열이다.

[0020] **서열번호 2**는 mmTGF-β2로 지정된 조작된 인간 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열이다.

[0021] **서열번호 3**은 mmTGF-β2-7M으로 지정된 조작된 인간 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열이다.

[0022] **서열번호 4**는 mmTGF-β2-7M2R로 지정된 조작된 인간 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열이다.

[0023] **서열번호 5**는 mmTGF-β2-2M-Del7-16으로 지정된 조작된 인간 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열이다.

[0024] **서열번호 6**은 mmTGF-β2-7M2R-Del7-16으로 지정된 조작된 인간 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열이다.

[0025] **서열번호 7**은 mmTGF-β2-7M-PRDC로 지정된 조작된 인간 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열이다.

[0026] **I. 약어**

[0027]	CKGF	시스틴 매듭 성장인자 접힘(cystine knot growth factor fold)
[0028]	ECM	세포외 기질
[0029]	ER	소포체
[0030]	GFD	성장인자 도메인
[0031]	IPF	특발성 폐섬유증
[0032]	ITC	등온 적정 열량계
[0033]	NGF	신경 성장인자
[0034]	NMR	핵 자기 공명
[0035]	PDGF	혈소판-유래 성장인자
[0036]	PRDC	Dan 및 Cerubus 관련 단백질
[0037]	TGF-β	전환 성장 인자 β
[0038]	TβRI	전환 성장 인자-β I형 수용체
[0039]	TβRII	전환 성장 인자-β II형 수용체
[0040]	TME	종양 미세환경
[0041]	VEGF	혈관-내피 성장인자

[0042] **II. 용어**

[0043] 별도의 언급이 없는 한 기술 용어는 관례에 따라 사용된다. 분자생물학의 일반적인 용어 정의는 2009, Jones & Bartlett 출판사에서 출판된 Benjamin Lewin, *Genes X*; 및 2008, Wiley-VCH에서 16권으로 출판된 Meyers *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Cell Biology and Molecular Medicine*; 및 기타 유사한 참조자료에서 찾을 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 단수 및 복수 모두를 의미한다. 예를 들어, "항원"이라는 용어는 단일 또는 복수 항원을 포함하며 "적어도 하나의 항원"이라는 문구와 동등한 것으로 간주될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "포함한다(comprise)"는 "포함한다(include)"를

의미한다. 또한, 핵산 또는 폴리펩티드에 대해 제공된 임의의 및 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기, 및 모든 분자량(molecular weight) 또는 분자량(molecular mass) 값은 대략적이며, 달리 표시되지 않는 한 설명 목적으로 제공된다는 것이 추가로 이해되어야 한다. 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 재료가 사용될 수 있지만, 특히 적합한 방법 및 재료가 본 명세서에 기술되어 있다. 상충되는 경우, 용어 설명을 포함한 본 명세서가 우선 적용된다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 예시일 뿐 제한하려는 의도는 아니다.

[0045] 다양한 구현예에 대한 검토를 용이하게 하기 위해 하기와 같은 용어 설명이 제공된다.

[0046] **비정상적인(TGF-β 신호)(Aberrant(TGF-β signaling))**: 비정상적이거나 조절되지 않는 TGF-β 신호전달. 본 개시 내용의 맥락에서, "비정상적인 TGF-β 신호전달"은 TGF-β 신호전달 경로의 과도한(병리학적) 활성화를 지칭한다.

[0047] **투여(Administration)**: 임의의 효과적인 경로를 통해 대상체에게 치료제(예를 들어, TGF-β 단량체)와 같은 제제를 제공(provide)하거나 제공(give)하는 것. 예시적인 투여 경로에는 주사 또는 주입(종양내, 피하, 근육내, 피내, 복강내, 척수강내, 정맥내, 전립선내, 뇌실내, 선조체내, 두개내 및 척수내와 같은), 경구, 관내, 설하, 직장, 경피, 비강내, 질 및 흡입 경로를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0048] **접촉(Contacting)**: 직접적인 물리적 결합에 배치; 고체와 액체 형태가 모두 포함된다. 생체내 방법의 맥락에서 사용되는 경우, "접촉"에는 투여도 포함된다.

[0049] **섬유증(Fibrosis)**: 회복적 또는 반응적 과정에서 기관 또는 조직에 과도한 섬유성 결합 조직의 형성. 섬유증은 일반적으로 염증 또는 손상의 결과로 신체의 다양한 조직(심장, 폐 및 간과 같은)에서 발생할 수 있다. **섬유성 질환**에는 폐섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐섬유증, 간질성 폐질환, 간경변증, 신장 섬유증(당뇨병으로 인한 손상과 같은), 심방 섬유증, 심내막 심근섬유증, 죽상경화증, 재협착증 및 피부경화증이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 섬유증은 수술 합병증, 화학요법 약물, 방사선, 부상 또는 화상의 결과로도 발생할 수 있다.

[0050] **융합 단백질(Fusion protein)**: 두 개의 서로 다른(이종) 단백질의 적어도 일부를 포함하는 단백질. 본 명세서의 일부 구현예에서, 융합 단백질은 단백질 태그, Fc 도메인(인간 Fc 도메인과 같은) 또는 알부민에 융합된 TGF-β 2 단량체를 포함한다.

[0051] **글리코실화(Glycosylation)**: 아스파라긴(N-글리코실화), 또는 세린이나 트레오닌 잔기(O-글리코실화)에 탄수화물 부분을 공유 부착하는 과정. 글리코실화의 수준 및 유형은 재조합 발현에 사용되는 다양한 숙주 유기체에 따라 달라질 수 있다. 새로운 글리코실화 부위는 단백질의 용매에 노출된 영역에 글리코실화 시퀀(sequon)을 도입함으로써 서열 조작될 수 있다. 예를 들어, N-글리코실화 시퀀 NX[S/T]는 본 명세서에 개시된 특정 구현예 서열 내의 하나 이상의 위치에 도입될 수 있다. 글리코실화의 유형 및 정도를 달리하면 용해도, 기능 및 반감기를 조절할 수 있을 뿐만 아니라 부위별 화학적 결합을 가능하게 하는 데 실용적으로 적용할 수 있다.

[0052] **이종성(Heterologous)**: 별도의 유전적 출처 또는 종에서 유래.

[0053] **분리된(Isolated)**: 핵산, 단백질(항체를 포함한), 소기관 또는 재조합 바이러스와 같은 "분리된" 생물학적 구성 요소는 다른 염색체 및 염색체 외 DNA 및 RNA, 단백질 및 소기관과 같이 해당 구성 요소가 발생하는 환경(세포와 같은)의 다른 생물학적 구성 요소로부터 실질적으로 분리되거나 정제되었다. "분리된" 핵산과 단백질에는 표준 정제 방법으로 정제된 핵산과 단백질이 포함된다. 이 용어는 또한 숙주 세포에서 재조합 발현에 의해 제조된 핵산 및 단백질뿐만 아니라 화학적으로 합성된 핵산 또는 단백질도 포함한다. 분리된에는 절대적인 순도가 필요하지 않으며 적어도 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 심지어 99.9%와 같은 적어도 50% 이상 분리된 단백질, 펩티드, 핵산 분자 또는 바이러스가 포함될 수 있다.

[0054] **변형(Modification)**: 핵산 또는 단백질 서열의 서열 변화. 예를 들어, 아미노산 서열 변형에는 예를 들어, 치환, 삽입(insertion) 및 결실, 또는 이들의 조합이 포함된다. 삽입에는 아미노 및/또는 카르복실 말단 융합뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된다. 결실은 단백질 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기를 제거하는 것을 특징으로 한다. 본 명세서의 일부 구현예에서, 변형(치환, 삽입 또는 결실과 같은)은 단백질의 특정 활성의 감소 또는 향상(예를 들어, 응집 감소, 접힘 개선 또는 표적 단백질에 대한 친화도 증가)과 같은 기능 변화를 초래한다. 치환 변형은 적어도 하나의 잔기가 제거되고 그 자리에 다른 잔기가 삽입되는 변형이다. 아미노산 치환은 일반적으로 단일 잔기이지만 동시에 여러 위치에서 발생할 수 있다. 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 임의의 조합을 조합하여 최종 돌연변이 서열에 도달할 수 있다. 이러한 변형은 단백질을 코딩하는 DNA의 뉴클레오티드를 변형하여 변형을 코딩하는 DNA를 생성함으로써 제조될 수 있다. 알려진 서열을 갖는 DNA의 미리 결정된 부위에 삽입, 결실 및 치환 돌연변이를 만드는 기술은 알려져 있다. "변형된" 단백질 또는

핵산은 상기에 설명된 바와 같이 하나 이상의 변형을 갖는 것이다.

[0055] **단량체:** 다른 분자 단위와 결합하여 이량체 또는 중합체를 형성할 수 있는 단일 분자 단위(단백질과 같은). 본 개시내용의 맥락에서, "TGF-β2 단량체"는 단일 TGF-β2 폴리펩티드 사슬이며, 이의 야생형 버전(version)은 다른 TGF-β2 단량체와 결합하여 이량체를 형성할 수 있다. 본 명세서의 일부 구현예에서, 재조합 TGF-β2 단량체는 이량체화를 방지하도록 조작되었다. 본 명세서의 다른 구현예에서, 직접적인 이량체화를 방지하도록 조작된 재조합 TGF-β2 단량체는 그 자체로 이량체화할 수 있는 이종 단백질(예를 들어, IgG의 Fc 도메인)에 융합될 수 있다.

[0056] **신생물, 악성 종양, 암 또는 종양(Neoplasia, malignancy, cancer or tumor):** 신생물은 과도한 세포 분열로 인한 조직 또는 세포의 비정상적인 성장이다. 종양성 성장(Neoplastic growth)은 종양(tumor)을 생성할 수 있다. 개인의 종양의 양은 종양의 수, 부피 또는 무게로 측정할 수 있는 "종양 부담"이다. 전이되지 않는 종양을 "양성"이라고 한다. 주변 조직을 침범하거나 및/또는 전이할 수 있는 종양을 "악성"이라고 한다.

[0057] 혈액학적 종양의 예로는 급성 백혈병(11q23 양성 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(acute myelocytic leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia) 및 골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성 백혈병 및 적백혈병과 같은), 만성 백혈병(만성 골수성(과립구) 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 및 만성 림프구성 백혈병과 같은), 진성적혈구증가증, 림프종, 호지킨병, 비호지킨 림프종(무통성(indolent) 및 고등급 형태(high grade form)), 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄질환, 골수형성이상증후군, 털세포 백혈병 및 골수이형성증(myelodysplasia)을 포함하는 백혈병이 포함된다.

[0058] 육종 및 암종과 같은 고형 종양의 예로는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종 및 기타 육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 결장암종, 림프성 악성종양, 췌장암, 유방암(기저유방암종, 유관암 및 소엽유방암종 포함하는), 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포암종, 편평세포암종, 기저세포암종, 선암종, 땀샘암종, 갑상선수질암종, 갑상선 유두암종, 갈색세포종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 수질 암종, 기관지성 암종, 신장 세포 암종, 간종양, 담관 암종, 융모막암종, 윌름즈 종양(Wilms' tumor), 자궁경부암, 고환 종양, 정상피종, 방광 암종, 및 중추신경계 종양(CNS tumor)(교모세포종(glioma), 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희돌기교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종 및 망막모세포종과 같은)이 포함된다.

[0059] **페길화(PEGylation):** 약물, 치료 단백질 또는 소포와 같은 분자 및 거대구조에 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체 사슬을 공유 및 비공유 부착 또는 융합시키는 과정, 이를 **페길화(PEGylated)**(또는 페길화(pegtlated))라고 한다. 페길화는 PEG의 반응성 유도체를 표적 분자와 함께 배양함으로써 일상적으로 달성된다. 약물 또는 치료 단백질에 대한 PEG의 공유 부착은 숙주의 면역 체계에서 해당 물질(agent)을 가릴 수 있으며(면역원성 및 항원성 감소), 물질의 유체역학적 크기(용액 내 크기)를 증가시켜 신장 청소율을 감소시켜 순환 시간을 연장시킨다. 페길화는 소수성 약물과 단백질에 수용성을 제공할 수도 있다.

[0060] **펩티드 또는 폴리펩티드(Peptide or Polypeptide):** 단량체가 아미드 결합을 통해 함께 연결된 아미노산 잔기인 중합체. 아미노산이 알파-아미노산인 경우, L-광학 이성질체 또는 D-광학 이성질체가 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 임의의 아미노산 서열을 포함하고 변형된 서열을 포함하도록 의도된다. "펩티드" 및 "폴리펩티드"라는 용어는 특히 자연 발생 단백질뿐만 아니라 재조합 또는 합성으로 생산된 단백질도 포함하도록 의도되었다.

[0061] 보존적 아미노산 치환은 만들어질 때 원래 단백질의 특성을 최소한으로 방해하는 치환이며, 즉, 단백질의 구조와 특히 기능이 보존되고 이러한 치환에 의해 크게 변경되지 않는다. 보존적 치환의 예는 하기에 나타냈다.

원래 잔기	보존적 치환
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0062]

[0063] 보존적 치환은 일반적으로 (a) 치환 영역에서 폴리펩티드 백본(backbone)의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선형 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 대부분의 측쇄(side chain)를 유지한다.

[0064] 일반적으로 단백질 특성에 가장 큰 변화를 가져올 것으로 예상되는 치환은 비보존적일 것이며, 예를 들어, (a) 친수성 잔기, 예를 들어 세린 또는 트레오닌은 소수성 잔기, 예를 들어 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 발린 또는 알라닌으로(또는 의해) 치환되거나; (b) 시스테인 또는 프롤린이 다른 잔기로(또는 의해) 치환되거나; 양전성(electropositive)의 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 리신, 아르기닌 또는 히스티딘이 음전성(electronegative)의 잔기, 예를 들어 글루타민 또는 아스파르트산으로(또는 의해) 치환 되거나; 또는 (d) 부피가 큰 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 페닐알라닌이 측쇄를 갖지 않는 잔기, 예를 들어 글리신으로 치환되는 변화이다.

[0065] **약제학적으로 허용되는 담체(Pharmaceutically acceptable carrier)**: 본 개시내용에 유용한 약학적으로 허용되는 담체(운반체(vehicle))는 통상적인 것이다. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st Edition (2005)은 하나 이상의 치료 화합물, 분자 또는 제제(예: 재조합 TGF-β2 단량체)의 약제학적 전달에 적합한 조성물 및 제제를 설명한다.

[0066] 일반적으로, 담체의 성격은 사용되는 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 비경구 제제는 일반적으로 물, 생리 식염수, 평형 염류액(balanced salt solution), 수성 덱스트로스, 글리세롤 등과 같은 약제학적 및 생리학적으로 허용되는 유체를 운송수단으로서 포함하는 주사 가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물(예를 들어, 분말, 알약, 정제 또는 캡슐 형태)의 경우, 통상적인 무독성 고체 담체는 예를 들어 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 스테아린산 마그네슘을 포함할 수 있다. 생물학적으로 중성인 담체 이외에, 투여될 약제학적 조성물은 습윤제 또는 유화제, 보존제, 및 pH 완충제 등과 같은 소량의 무독성 보조 물질, 예를 들어 아세트산나트륨 또는 소르비탄 모노라우레이트(sorbitan monolaurate)를 포함할 수 있다.

[0067] **질병 예방, 치료 또는 개선(Preventing, treating or ameliorating a disease)**: 질병 "예방(preventing)"은 질병의 완전한 발달을 억제하는 것을 의미한다. "치료(treating)"는 종양 부담의 감소(종양의 부피 또는 크기 감소와 같은) 또는 전이 크기의 감소와 같이 질병이 발병이 시작된 질병 또는 병리학적 상태의 징후 또는 증상을 개선하는 치료적 개입을 의미한다. "개선(ameliorating)"은 질병의 징후 또는 증상의 수 또는 중증도의 감소를 의미한다.

[0068] **재조합(Reconbinant)**: 재조합 핵산, 단백질 또는 바이러스는 자연적으로 발생하지 않는 서열을 갖거나 그렇지 않으면 분리된 두개의 서열 세그먼트(segment)를 인공적으로 조합하여 만들어진 서열을 갖는 것이다. 이러한 인공적인 결합은 종종 화학적 합성 또는 분리된 핵산 세그먼트의 인공 조작, 예를 들어 유전공학 기술에 의해 달

성된다. 재조합이라는 용어에는 천연 핵산 분자 또는 단백질 일부의 첨가(addition), 치환 또는 결실에 의해 변경된 핵산, 단백질 및 바이러스가 포함된다.

[0069] **서열 동일성/유사성(Sequence identity/similarity)**: 2개 이상의 핵산 서열, 또는 2개 이상의 아미노산 서열 간의 동일성은 서열 간의 동일성 또는 유사성으로 표현된다. 서열 동일성은 백분율 동일성으로 측정할 수 있으며; 백분율이 높을수록 서열이 더 동일하다. 서열 유사성은 백분율 유사성(보존적 아미노산 치환을 고려함)으로 측정할 수 있으며; 백분율이 높을수록 서열이 더 유사하다. 핵산 또는 아미노산 서열의 상동체(Homolog) 또는 오솔로그(ortholog)는 표준 방법을 사용하여 정렬할 때 상대적으로 높은 수준의 서열 동일성/유사성을 보유한다. 이러한 상동성은 이종 단백질(orthologous protein) 또는 cDNA가 더 멀리 관련된 종(인간 및 예쁜꼬마선충(*C. elegans*) 서열)에 비해 더 밀접하게 관련된 종(인간 및 마우스 서열과 같은)에서 파생될 때 더욱 중요하다.

[0070] 비교를 위한 서열 정렬 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 다양한 프로그램 및 정렬 알고리즘은 설명되어 있다: Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang *et al. Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992; 및 Pearson *et al.*, *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990은 서열 정렬 방법 및 상동성 계산에 대한 상세한 고려사항을 제시한다.

[0071] NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990)은 서열 분석 프로그램인 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 관련하여 사용할 수 있도록 국립생물정보센터(NCBI) 및 인터넷을 포함한 여러 출처에서 사용할 수 있다. 추가 정보는 NCBI 웹사이트에서 확인할 수 있다.

[0072] **대상체(Subject)**: 척추동물을 포함한 살아있는 다세포 유기체, 인간과 인간이 아닌 포유동물을 모두 포함하는 범주.

[0073] **태그(Tag)**: 표지(labeling), 검출 또는 정제 목적과 같이 단백질 또는 핵산에 부착될 수 있는 분자. 일부 구현예에서 태그는 단백질 태그이다. 일부 구현예에서, 단백질 태그는 친화성 태그(예를 들어, Avitag, 헥사히스티딘(hexahistidine), 키틴 결합 단백질, 말토스 결합 단백질 또는 글루타티온-S-전달효소), 에피토프 태그(예를 들어, V5, c-myc, HA 또는 FLAG) 또는 형광 태그(예를 들어, GFP 또는 다른 잘 알려진 형광 단백질)이다.

[0074] **치료 유효량(Therapeutically effective amount)**: 치료 대상체에서 원하는 효과를 달성하기에 충분한 양의 화합물 또는 조성물, 예를 들어, 재조합 TGF-β2 단량체. 예를 들어, 이는 세포에서 TGF-β 신호 전달을 억제하거나 차단하는 데 필요한 양일 수 있다. 다른 경우에는 이는 종양의 성장을 억제하거나(inhibit) 억제하는 데(suppress) 필요한 양일 수 있다. 한 구현예에서, 치료 유효량은 예를 들어, 치료 전의 크기/부피/수와 비교하여, 종양 크기 및/또는 부피를 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 심지어 100% 감소시키고, 및/또는 전이의 수 및/또는 크기/부피를 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 심지어 100% 감소시키는 것과 같은 종양의 제거, 크기 감소 또는 전이를 방지하기 위해 필요한 양이다. 한 구현예에서, 치료 유효량은 예를 들어, 재조합 TGF-β2 단량체로 치료하지 않은 동일한 암에 걸린 대상체의 생존 시간과 비교하여, 대상체의 생존 시간을 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 1년, 적어도 1.5년, 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 또는 적어도 5년 증가시키는데 필요한 양이다. 다른 경우에, 치료 유효량은 치료 전과 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 심지어 100% 감소시키는 것과 같은 섬유증을 억제하거나 감소시키는 데 필요한 효과이다. 대상체에게 투여할 때, 원하는 시험관 내 효과를 달성하는 것으로 밝혀진 표적 조직 농도(예를 들어, 종양)를 달성하는 용량이 일반적으로 사용될 것이다.

[0075] **전환 성장 인자-β(Transforming growth factor-β)(TGF-β)**: 증식, 세포 분화 및 기타 여러 세포 기능을 조절하는 분비된 다기능 단백질. 많은 세포가 TGF-β를 합성하고 거의 모든 세포가 TGF-β 수용체를 발현한다. "TGF-β"라는 용어는 각각 TGFB1, TGFB2, TGFB3 유전자에 의해 코딩되는 세 가지 다른 단백질 아형인 TGF-β1, TGF-β2 및 TGF-β3을 나타낸다.

[0076] **TGF-β 신호 전달 경로(TGF-β signaling pathway)**: 세포 증식, 분화, 및 세포사멸과 같은 다양한 세

포 과정에 관여하는 신호 전달 경로. TGF-β 경로의 구성원에는 TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β I형 수용체 및 TGF-β II형 수용체가 포함되지만 이에 국한되지는 않는다.

[0077] **TGF-β 수용체(TGF-β receptor):** "TGF-β 수용체"라는 용어에는 TGF-β I형 수용체(TβRI, TGFBR1에 의해 코딩된) 및 TGF-β II형 수용체(TβRII, TGFBR2에 의해 코딩된)가 포함된다. TGF-β 수용체는 세린/트레오닌 단백질 키나아제이다. I형 및 II형 TGF-β 수용체는 TGF-β에 결합하면 이종이량체 복합체를 형성하여 TGF-β 신호를 세포 표면에서 세포질로 전달한다.

[0078] **III. 재조합 TGF-β2 단량체**

[0079] 본 명세서에는 이량체화를 방지하고 TGF-β 신호전달을 차단하도록 조작된 TGF-β2 단량체가 개시되어 있다. 조작된 단량체는 TGF-β I형 수용체(TβRI)에 결합하고 모집하는 능력이 부족하지만, 고친화도 TGF-β II형 수용체(TβRII)에 결합하는 능력은 유지한다. 개시된 TGF-β2 단량체는 또한 TβRII에 대한 친화도를 증가시키고, 응집을 감소시키며 및/또는 접힘을 개선하는 추가 변형을 포함한다. 개시된 TGF-β2 단량체 및 이의 조성물은, 예를 들어, 세포 또는 대상체에서 TGF-β 신호를 억제하거나 또는 비정상적인 TGF-β 신호와 관련된 질환, 예를 들어 섬유성 질환, 암, 안구 질병 또는 결합 조직의 유전적 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0080] 야생형 인간 TGF-β2(서열번호 1로 기재)의 아미노산 잔기 52-71번에 해당하는 α3 나선의 결실 및 서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 아르기닌(또는 세린)으로의 치환을 포함하는 재조합 TGF-β2 단량체가 본 명세서에서 제공되며; 이러한 변형은 단량체의 이량체화를 방지한다. TGF-β2 단량체는 서열번호 1의 잔기 51번에 해당하는 아미노산 잔기에서 류신에서 아르기닌으로의 치환, 및 서열번호 1의 잔기 74번에 해당하는 아미노산 잔기에서 알라닌에서 라이신으로의 치환을 추가로 포함하며; 이러한 변형은 단량체의 순 전하를 증가시킨다. TGF-β2 단량체는 또한 서열번호 1의 잔기 25번에 해당하는 아미노산 잔기에서 리신에서 아르기닌으로의 치환, 및 서열번호 1의 잔기 94번에 해당하는 아미노산 잔기에서 리신에서 아르기닌으로의 치환을 포함하며, 이는 TβRII에 대한 친화도를 향상시킨다. TGF-β2 단량체는 선택적으로 TβRII에 대한 단량체의 친화도를 증가시키고, 응집을 감소시키고 및/또는 접힘을 개선시키는 하나 이상의 추가적인 변형을 추가로 포함한다.

[0081] 일부 구현예에서, TGF-β2 단량체는 서열번호 1의 잔기 26번에 해당하는 아미노산 잔기에서 아르기닌에서 라이신으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 79번에 해당하는 아미노산 잔기에서 발린에서 아르기닌으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 89번에 해당하는 아미노산 잔기에서 류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 92번에 해당하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 95번에 해당하는 아미노산 잔기에서 트레오닌에서 라이신으로의 치환; 및 서열번호 1의 잔기 98번에 해당하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TGF-β2 단량체는 서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 아르기닌으로의 치환을 갖는다. 특정 실시예에서, TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 4와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일하다(상기에 나열된 아미노산 치환을 유지하면서). 특정한 비제한적 실시예에서, TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 본 명세서에 서열번호 4로 기재된 mmTGF-β2-7M2R의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0082] 다른 구현예에서, TGF-β2 단량체는 서열번호 1의 잔기 7번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 발린으로의 치환; 및 서열번호 1의 잔기 16번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 알라닌으로의 치환을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TGF- β2 단량체는 서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 세린으로의 치환을 갖는다. 특정 실시예에서, TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 5와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일하다(상기에 나열된 아미노산 치환을 유지하면서). 특정한 비제한적 실시예에서, TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 본 명세서에 서열번호 5로 기재된 mmTGF-β2-2M-Del7-16의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0083] 다른 구현예에서, TGF-β2 단량체는 서열번호 1의 잔기 7번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 16번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 알라닌으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 26번에 해당하는 아미노산 잔기에서 아르기닌에서 라이신으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 79번에 해당하는 아미노산 잔기에서 발린에서 아르기닌으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 89번에 해당하는 아미노산 잔기에서 류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 92번에 해당하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 95번에 해당하는 아미노산 잔기에서 트레오닌에서 라이신으로의 치환; 및 서열번호 1의 잔기 98번에 해당하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서,

TGF-β2 단량체는 서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 아르기닌으로의 치환을 갖는다. 특정 실시예에서, TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 6과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일하다(상기에 나열된 아미노산 치환을 유지하면서). 특정한 비제한적 실시예에서, TGF-β2단량체의 아미노산 서열은 본 명세서에 서열번호 6으로 기재된 mmTGF-β2-7M2R-Del7-16("변이체 1(variant 1)" 또는 "var1")의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0084] 또한 Dan 및 Cerubus(PRDC)와 관련된 단백질의 시스틴-매듭 영역을 포함하도록 변형되어 단량체의 접힘을 향상시키는 재조합 TGF-β2 단량체가 본 명세서에 제공된다. 일부 구현예에서, TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 7과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일하다. 특정 실시예에서, TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 본 명세서에 서열번호 7로 기재된 mmTGF-β2-7M-PRDC의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0085] 본 명세서의 일부 구현예에서, 재조합 TGF-β2 단량체는 페길화, 글리코실화, 과당화(hyper-glycosylated)되거나, 또는 순환 시간을 연장시키는 또 다른 변형을 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, 재조합 TGF-β2 단량체는 방사선치료제, 화학요법을 위한 세포독성제, 약물, 영상화제, 형광 염료 또는 형광 단백질 태그를 추가로 포함한다.

[0087] 또한 TGF-β2 단량체와 이종 단백질을 포함하는 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 일부 구현예에서, 이종 단백질은 단백질 태그이다. 일부 예에서, 단백질 태그는 친화성 태그(예를 들어, Avitag, 헥사히스티딘, 키틴 결합 단백질, 말토스 결합 단백질 또는 글루타티온-S-전달효소), 에피토프 태그(예를 들어, V5, c-myc, HA 또는 FLAG) 또는 형광 태그(예를 들어, GFP 또는 다른 잘 알려진 형광 단백질)이다.

[0088] 다른 구현예에서, 이종 단백질은 마우스 또는 인간 Fc 도메인과 같은 Fc 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 이종 단백질은 융합 단백질의 동종이량체(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3의 Fc 도메인), 이종이량체(예를 들어, 조작된 Fc 도메인, E/K 코일드-코일(E/K coiled-coil)), 또는 다량체(예를 들어, 펜타바디, 나노입자)상태로의 분자간 결합을 촉진한다. 따라서, 일부 실시예에서, 융합 단백질은 단일-사슬 폴리펩티드이다. 다른 실시예에서, 융합 단백질은 이량체 또는 다량체 폴리펩티드를 형성한다. 특정 실시예에서, 융합 단백질은 이종이량체이다.

[0089] 다른 구현예에서, 이종 단백질은 알부민, 알부민-결합 단백질 또는 제제, 또는 생체 내에서 TGF-β 단량체의 순환 시간을 증가시키는 또 다른 단백질이다.

[0090] 본 명세서에는 본 명세서에 개시된 재조합 TGF-β2 단량체 또는 융합 단백질을 코딩하는 분리된 핵산 분자가 추가로 제공된다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 T 세포 특이적 프로모터와 같은 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0091] 개시된 핵산 분자를 포함하는 벡터도 제공된다. 일부 실시예에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터이다. 본 명세서에 개시된 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 분리된 세포가 추가로 제공된다. 일부 실시예에서, 세포는 T 세포이다. 세포는 대상체에 대해 자가 유래일 수도 있고, 또는 이종(동종이형(allogeneic))일 수도 있다.

[0092] 또한 본 명세서에 개시된 재조합 TGF-β2 단량체, 융합 단백질, 핵산 분자, 벡터 또는 분리된 세포, 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0093] 또한 세포에서 TGF-β 신호전달을 억제하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 유효량의 재조합 TGF-β2 단량체, 융합 단백질, 핵산 분자, 벡터, 분리된 세포 또는 본 명세서에 개시된 조성물과 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 방법은 시험관내 방법이다. 다른 실시예에서, 방법은 생체외 방법이다. 또 다른 실시예에서, 방법은 생체내 방법이다.

[0094] 또한, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환이 있는 대상체에서 TGF-β 신호전달을 억제하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 유효량의 재조합 TGF-β2 단량체, 융합 단백질, 핵산 분자, 벡터, 분리된 세포 또는 본 명세서에 개시된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환은 폐섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐섬유증, 간질성 폐질환, 간경변증, 신장 섬유증(당뇨병으로 인한 손상과 같은), 심방 섬유증, 심내막 심근섬유증, 죽상경화증, 재협착증, 피부경화증 또는 수술 합병증, 화학요법 약물, 방사선, 부상 또는 화상으로 인한 섬유증을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 다른 실시예에서, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환은 유방암,

뇌암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 방광암, 간암, 난소암, 신장암, 자궁내막암, 대장암, 위암, 피부암(악성 흑색종과 같은), 또는 갑상선암이다. 다른 실시예에서, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환은 안구 질병이다. 또 다른 실시예에서, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환은 결합 조직의 유전적 질환이다.

[0095] 대상체에서 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환을 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 치료 유효량의 재조합 TGF-β2 단량체, 융합 단백질, 핵산 분자, 벡터, 분리된 세포 또는 본 명세서에 개시된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환은 폐섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐섬유증, 간질성 폐질환, 간경변증, 신장 섬유증(당뇨병으로 인한 손상과 같은), 심방 섬유증, 심내막 심근섬유증, 죽상경화증, 재협착증, 피부경화증 또는 수술 합병증, 화학요법 약물, 방사선, 부상 또는 화상으로 인한 섬유증을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 다른 실시예에서, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환은 유방암, 뇌암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 방광암, 간암, 난소암, 신장암, 자궁내막암, 대장암, 위암, 피부암(악성 흑색종과 같은), 또는 갑상선암이다. 다른 실시예에서, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환은 안구 질병이다. 또 다른 실시예에서, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환은 결합 조직의 유전적 질환이다.

[0096] **IV. 조작된 TGF-β 단량체의 투여**

[0097] 재조합 인간 TGF-β2 단량체, 융합 단백질, 또는 TGF-β2 단량체 또는 융합 단백질을 코딩하는, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 약제학적 조성물과 같은 조성물이 본 명세서에서 제공된다. 또한 재조합 인간 TGF-β2 단량체(또는 이의 융합 단백질)를 코딩하는 벡터를 포함하는, T 세포와 같은, 분리된 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.

[0098] 본 개시내용에 유용한 약제학적으로 허용되는 담체 및 부형제는 통상적이다. 예를 들어, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st Edition (2005)를 참조하라. 예를 들어, 비경구 제제는 일반적으로 물, 생리 식염수, 평형 염류액, 수성 덱스트로스, 글리세롤 등과 같은 약제학적 및 생리학적으로 허용되는 유체를 운송수단인 주사 가능한 유체가 포함된다. 고체 조성물(예를 들어, 분말, 알약, 정제 또는 캡슐 형태)의 경우, 통상적인 무독성 고체 담체는 예를 들어 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 스테아린산 마그네슘을 포함할 수 있다. 생물학적으로 중립적인 담체 이외에, 투여될 약제학적 조성물은 습윤제 또는 유화제, 보존제, pH 완충제 등과 같은 소량의 무독성 보조 물질, 예를 들어 아세트산나트륨 또는 소르비탄 모노라우레이트를 포함할 수 있다. 포함될 수 있는 부형제는, 예를 들어, 인간 혈청 알부민 또는 혈장 제제와 같은 다른 단백질이다.

[0099] 세포 투여와 관련하여, 세포 도입을 위해 다양한 수성 담체, 예를 들어 완충 식염수 등을 사용할 수 있다. 이러한 용액은 멸균되어 있으며 일반적으로 바람직하지 않은 물질이 없다. 이들 조성물은 통상적이고 잘 알려진 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제 등과 같은 생리학적 조건을 근사화하는데 필요한 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들어 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 젖산나트륨 등을 포함할 수 있다. 이들 제제의 농도는 광범위하게 다양할 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식 및 대상체의 필요에 따라 주로 체액량, 점도, 체중 등에 기초하여 선택될 것이다.

[0100] 조성물의 제형(dosage form)은 선택된 투여 방식에 따라 결정될 것이다. 예를 들어, 주사 가능한 유체 외에도 국소, 흡입, 경구 및 좌약 제제를 사용할 수 있다. 국소 제제에는 점안액, 연고, 스프레이, 패치 등이 포함될 수 있다. 흡입 제제는 액체(예를 들어, 용액 또는 현탁액)일 수 있으며 미스트, 스프레이 등을 포함할 수 있다. 경구 제제는 액체(예를 들어, 시럽, 용액 또는 현탁액)일 수도 있고 고체(예를 들어, 분말, 알약, 정제 또는 캡슐)일 수도 있다. 좌약 제제는 고체, 젤 또는 현탁액 형태일 수도 있다. 고체 조성물의 경우, 기존의 무독성 고체 담체에는 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 스테아린산 마그네슘이 포함될 수 있다. 이러한 제형을 제조하는 실제 방법은 당업자에게 공지되어 있거나 명백할 것이다.

[0101] 재조합 인간 TGF-β2 단량체 또는 융합 단백질(또는 TGF-β2 단량체 또는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자/벡터)을 포함하는 약제학적 조성물과 같은 조성물은 정확한 용량의 개별 투여에 적합한 단위 제형으로 제형화될 수 있다. 투여되는 TGF-β2 단량체, 융합 단백질, 핵산 분자 또는 벡터의 양은 치료 대상체, 고통의 심각성, 투여 방식에 따라 달라지며, 처방하는 임상의의 판단에 맡기는 것이 가장 좋다. 이러한 범위 내에서, 투여될 제제는 치료 대상체에서 원하는 효과를 달성하는데 효과적인 양의 활성 성분(들)을 포함할 것이다.

[0102] TGF-β2 단량체, 또는 이의 조성물은 국소, 경구, 정맥내, 근육내, 복강내, 비강내, 피내, 척수강내, 피하, 흡입을 통해 또는 좌약을 통해 다양한 방식으로 효과적인 조직을 가진 인간 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 특정 투여 방식 및 용량 용법(dosage regimen)은 사례의 세부 사항(예를 들어, 대상체, 질병, 관련된 질병 상태 및 치료 예방 여부)을 고려하여 담당 임상의가 선택한다. 치료에는 며칠에서 몇 달, 또는 심지어 몇 년에 걸쳐 매일 또는 여러 날에 걸쳐 화합물(들)을 투여하는 단계가 포함될 수 있다.

[0103] **V. 예시 조항**

[0104] 조항 1. 다음을 포함하는, 재조합 전환성장인자(TGF)- β2 단량체:

[0105] 서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 세린으로의 치환, 또는 시스테인에서 아르기닌으로의 치환;

[0106] 서열번호 1의 아미노산 잔기 52-71번에 해당하는 α3 나선의 결실;

[0107] 서열번호 1의 잔기 25번에 해당하는 아미노산 잔기에서 라이신에서 아르기닌으로의 치환;

[0108] 서열번호 1의 잔기 51번에 해당하는 아미노산 잔기에서 류신에서 아르기닌으로의 치환;

[0109] 서열번호 1의 잔기 74번에 해당하는 아미노산 잔기에서 알라닌에서 라이신으로의 치환;

[0110] 서열번호 1의 잔기 94번에 해당하는 아미노산 잔기에서 라이신에서 아르기닌으로의 치환; 및

[0111] (i) 서열번호 1의 잔기 26번에 해당하는 아미노산 잔기에서 아르기닌에서 라이신으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 79번에 해당하는 아미노산 잔기에서 발린에서 아르기닌으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 89번에 해당하는 아미노산 잔기에서 류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 92번에 해당하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 95번에 해당하는 아미노산 잔기에서 트레오닌에서 라이신으로의 치환; 및 서열번호 1의 잔기 98번에 상응하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환;

[0112] (ii) 서열번호 1의 잔기 7번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 발린으로의 치환; 및 서열번호 1의 잔기 16번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 알라닌으로의 치환; 또는

[0113] (iii) 서열번호 1의 잔기 7번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 16번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 알라닌으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 26번에 해당하는 아미노산 잔기에서 아르기닌에서 라이신으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 79번에 해당하는 아미노산 잔기에서 발린에서 아르기닌으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 89번에 해당하는 아미노산 잔기에서 류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 92번에 해당하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환; 서열번호 1의 잔기 95번에 해당하는 아미노산 잔기에서 트레오닌에서 라이신으로의 치환; 및 서열번호 1의 잔기 98번에 해당하는 아미노산 잔기에서 이소류신에서 발린으로의 치환.

[0114] 조항 2. 조항 1에 있어서, 서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 아르기닌으로의 치환을 포함하는, 재조합 TGF-β2 단량체.

[0115] 조항 3. 조항 2에 있어서, 상기 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 4를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 재조합 TGF-β2 단량체.

[0116] 조항 4. 조항 2에 있어서, 상기 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 6을 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 재조합 TGF-β2 단량체.

[0117] 조항 5. 조항 1에 있어서, 서열번호 1의 잔기 77번에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인에서 세린으로의 치환을 포함하는, 재조합 TGF-β2 단량체.

[0118] 조항 6. 조항 5에 있어서, 상기 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 5를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 재조합 TGF-β2 단량체.

[0119] 조항 7. 상기 TGF-β2 단량체의 아미노산 서열이 서열번호 7을 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 재조합 전환 성장 인자(TGF)-β2 단량체.

[0120] 조항 8. 조항 1 내지 조항7 중 어느 한 조항에 있어서, 페길화된, 재조합 TGF-β2 단량체.

[0121] 조항 9. 조항 1 내지 조항 7 중 어느 한 조항에 있어서, 글리코실화되거나 또는 과당화된, 재조합 TGF-

β2 단량체.

[0122] 조항 10. 조항 1 내지 조항 9 중 어느 한 조항에 있어서, 방사선치료제, 화학요법을 위한 세포독성제, 약물, 영상화제, 형광 염료 또는 형광 단백질 태그를 추가로 포함하는, 재조합 TGF-β2 단량체.

[0123] 조항 11. 조항 1 내지 조항 10 중 어느 한 조항의 재조합 TGF-β2 단량체와 이종 단백질을 포함하는, 융합 단백질.

[0124] 조항 12. 조항 11에 있어서, 상기 이종 단백질이 단백질 태그, Fc 도메인, 알부민, 알부민-결합 폴리펩티드, 항체, 항체의 항원-결합 단편 또는 표적화 부분을 포함하는, 융합 단백질.

[0125] 조항 13. 조항 11 또는 조항 12에 있어서, 상기 융합 단백질이 단일-사슬 폴리펩티드인, 융합 단백질.

[0126] 조항 14. 조항 11 또는 조항 12에 있어서, 상기 융합 단백질이 이량체 폴리펩티드를 형성하는, 융합 단백질.

[0127] 조항 15. 조항 11 또는 조항 12에 있어서, 상기 융합 단백질이 이종이량체인, 융합 단백질.

[0128] 조항 16. 조항 11 또는 조항 12에 있어서, 상기 융합 단백질이 다량체인, 융합 단백질.

[0129] 조항 17. 조항 1 내지 조항 10 중 어느 한 조항의 TGF-β2 단량체 또는 조항 11 내지 조항 16 중 어느 한 조항의 융합 단백질을 코딩하는, 분리된 핵산 분자.

[0130] 조항 18. 조항 17에 있어서, 프로모터에 작동가능하게 연결된, 핵산 분자.

[0131] 조항 19. 조항 17 또는 조항 18의 핵산 분자를 포함하는, 벡터.

[0132] 조항 20. 조항 17 또는 조항 18의 핵산 분자, 또는 조항 19의 벡터를 포함하는, 분리된 세포.

[0133] 조항 21. 조항 20에 있어서, 상기 세포는 T림프구인, 분리된 세포.

[0134] 조항 22. 다음을 포함하는, 조성물:

[0135] 조항 1 내지 조항 10 중 어느 한 조항의 재조합 TGF-β2 단량체, 조항 11 내지 조항 16 중 어느 한 조항의 융합 단백질, 조항 17 또는 조항 18의 핵산 분자, 조항 19의 벡터, 또는 조항 20 또는 조항 21의 분리된 세포; 및

[0136] 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제.

[0137] 조항 23. 유효량의 조항 1 내지 조항 10 중 어느 한 조항의 재조합 TGF-β2 단량체, 조항 11 내지 조항 16 중 어느 한 조항의 융합 단백질, 조항 17 또는 조항 18의 핵산 분자, 조항 19의 벡터, 조항 20 또는 조항 21의 분리된 세포, 또는 조항 22의 조성물과 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포에서 TGF-β 신호전달을 억제하는 방법.

[0138] 조항 24. 유효량의 조항 1 내지 조항 10 중 어느 한 조항의 재조합 TGF-β2 단량체, 조항 11 내지 조항 16 중 어느 한 조항의 융합 단백질, 조항 17 또는 조항 18의 핵산 분자, 조항 19의 벡터, 조항 20 또는 조항 21의 분리된 세포, 또는 조항 22의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환을 가지고 있는 대상체에서 TGF-β 신호전달을 억제하는 방법.

[0139] 조항 25. 유효량의 조항 1 내지 조항 10 중 어느 한 조항의 재조합 TGF-β2 단량체, 조항 11 내지 조항 16 중 어느 한 조항의 융합 단백질, 조항 17 또는 조항 18의 핵산 분자, 조항 19의 벡터, 조항 20 또는 조항 21의 분리된 세포, 또는 조항 22의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환을 치료하는 방법.

[0140] 조항 26. 조항 24 또는 조항 25에 있어서, 상기 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환이 섬유성 질환인, 방법.

[0141] 조항 27. 조항 24 또는 조항 25에 있어서, 상기 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환이 유방암, 뇌암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 방광암, 간암, 난소암, 신장암, 자궁내막암, 대장암, 위암, 피부암 또는 갑상선암인, 방법.

[0142] 조항 28. 조항 24 또는 조항 25에 있어서, 상기 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환이 안구 질병인, 방법.

[0143] 조항 29. 조항 24 또는 조항 25에 있어서, 상기 비정상적인 TGF-β 신호전달과 관련된 질병 또는 질환이

결합 조직의 유전적 질환인, 방법.

[0144] [실시예]

[0145] **실시예 1: 생체 내 투여를 위한 변형된 TGF-β2 단량체**

[0146] 이 실시예에서는 TGF-β2 단량체의 생체 내 전달을 향상시키기 위한 변형을 평가하는 연구를 설명한다.

[0147] WO 2018/094173에는 이량체화를 방지하여 TGF-β I형 수용체(TβRI)에 대한 결합 및 모집을 방지하도록 조작된 TGF-β 단량체가 기재되어 있으며, 이는 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함된다. TGF-β2 단량체 mmTGF-β2-7M은 이량체화를 방지하기 위해 C77S 치환 및 α3 나선의 결실을 포함하며, 높은 친화도 TβRII 결합을 가능하게 하는 7개의 아미노산 치환과 전하를 증가시켜 용해도를 증가시키는 2개의 치환된 염기성 잔기를 추가로 포함한다(도 1a). 이 단량체의 특성을 개선하기 위해, mmTGF-β2-7M의 4가지 변이체가 생성되었으며(서열번호 4-7), 이는 표 1 및 도 1b-1e에 기재되어 있다. 단일 아미노산 치환 및 결실의 위치는 서열번호 1에 기재된 인간 TGF-β2에 대해 상대적이다.

표 1

TGF-β 단량체 변이체

[0148]

변이체 명명	서열번호	변이체 설명	단량체의 길이	단일 아미노산 치환	결실
mmTGF-β2	2	인간 TGF-β2 단량체	112 a.a.	C77S	없음
mmTGF-β2-7M	3	루프로 대체된 α3을 갖는 인간 TGF-β2 단량체	92 a.a.	K25R, R26K, L51R, A74K, C77S, L89V, I92V, K94R T95K, I98V	잔기 52-71
mmTGF-β2-7M2R	4	TβRII 에 대한 친화도가 증가하고 응집이 감소된 인간 TGF-β2 미니-단량체	92 a.a.	K25R, R26K, L51R, A74K, C77R, V79R, L89V, I92V, K94R, T95K, I98V	잔기 52-71
mmTGF-β2-2M-Del7-16	5	TβRII 에 대한 친화도가 증가하고 접힘이 개선된 인간 TGF-β2 미니-단량체	92 a.a.	C7V, C16A, K25R, L51R, A74K, C77S, K94R	잔기 52-71
mmTGF-β2-7M2R-Del7-16 ("var1"이라고도 함)	6	TβRII 에 대한 친화도가 증가하고 응집이 감소하며 접힘이 개선된 TGF-β2 미니-단량체	92 a.a.	C7V, C16A, K25R, R26K, L51R, A74K, C77R, V79R, L89V, I92V, K94R, T95K, I98V	잔기 52-71
mmTGF-β2-7M-PRDC	7	PRDC 의 시스틴 매듭 영역이 접목된 핑거(finger) 1-2 및 핑거 3-4 를 포함하는 인간 TGF-β2 미니-단량체	115 a.a.	K25R, R26K, L89V, I92V, K94R, T95K, I98V	도 1d 참조

[0149] 하기에 더 자세히 설명된 바와 같이, mmTGF-β2-7M에서처럼 세린 대신 아르기닌으로 C77을 치환하고 V79를 아르기닌으로 치환하면 단량체 형성이 가능해지고 mmTGF-β2-7M2R의 응집이 감소된다(도 1b). 잘못된 접힘의 감소는 C7V 및 C16A 치환(mmTGF-β2-2M-Del7-16; 도 1c)에 의한 C7-C16 이황화물의 제거 또는 시스틴 매듭 영역을 PRDC(mmTGF-β2-7M-PRDC; 도 1d)의 시스틴 매듭 영역으로 대체함으로써 달성되었다. 단량체 mmTGF-β2-7M2R-Del7-16(도 1e)에는 응집을 줄이고 접힘을 개선하기 위한 변형이 포함되어 있다.

[0150] **서열번호 1 - WT 인간 TGF-β2**

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSKVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLS NMIVKSCKCS

[0151] **서열번호 2 - mmTGF-β2**

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS

[0152] **서열번호 3 - mmTGF-β2-7M**

[0153] ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS

[0154] **서열번호 4 - mmTGF-β2-7M2R**

[0155] ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPRCRSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS

[0156] **서열번호 5 - mmTGF-β2-2M-Del7-16**

[0157] ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCVSQDLEPLTILYYIGRTPKIEQLSNMIVKSCKCS

[0158] **서열번호 6 - mmTGF-β2-7M2R-Del7-16**

[0159] ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPRCRSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS

[0160] **서열번호 7 - mmTGF-β2-7M-PRDC**

[0161] KEVLASSQEALVVTERKYLKSDWCKLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCYGQCNSFYIPRHVKKEEDSFQSSAFCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQL SNMIVKSCRCMSV

[0162] 일부 구현예에서, 상기 서열 중 임의의 것은 N-말단 메티오닌(M) 잔기를 포함한다.

[0163] **응집 경향의 제거 또는 감소**

[0164] mmTGF-β2-7M의 응집 경향을 제거하거나 감소시키기 위한 변형이 먼저 조사되었다. 조작된 mmTGF-β2-7M 단량체가 야생형 TGF-β2보다 응집되는 경향이 훨씬 적다는 것이 이전에 밝혀졌지만 mmTGF-β2-7M은 그럼에도 불구하고 일부 응집 경향을 유지한다(Kim *et al.*, *J Biol Chem* 292(17):7173-7188, 2017). 이는 비변성 세제 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)(CHAPS)가 없거나(도 2d, 2e) 또는 존재(도 2f)하에서 기록할 때 2차원 ^{1}H-^{15}N NMR 이동 상관 스펙트럼(HSQC, 이종핵 단일-양자 상관)에 의해 검출되는 아미드 백본 ^{1}H-^{15}N 신호의 출현으로 분명해졌다. CHAPS가 없는 경우, 백본 아미드 신호는 강도가 매우 다양했으며, 일부는 거의 감지할 수 없었고, 특히 pH 7.2에서 pH 4.6에 비해 단백질의 용해도가 감소하는 것으로 알려져 있다. 이러한 유형의 신호 강도 변화는 고차 응집체의 일시적인 형성으로 인해 발생한다. 이러한 응집체의 형성은 단백질의 회전 상관 시간(rotational correlation time)(τ_c)을 연장시켜 NMR 신호를 확장시키고 신호 강도를 감소시킨다. pH 4.6 또는 7.2에서 증가하는 농도의 CHAPS를 첨가하면 많은 신호의 강도가 향상되고 따라서 관찰된 스펙트럼에서 신호의 균일성이 증가하는 것으로 관찰되었다(도 2f). 신호 강도의 개선은 CHAPS의 농도에 따라 달라지며, 약 10mM의 농도까지 상당한 개선이 이루어졌다.

[0165] CHAPS가 mmTGF-β2-7M의 응집을 감소시키는 역할을 하는 것은 야생 TGF-β2 동종이량체에서 이량체 경계면의 일부였던, 핑거의 기저부로 가장 잘 설명되는 분자 영역에 남아 있는 일부 소수성 잔기를 통한 응집체의 일시적으로 형성에 기인한다는 가설이 세워졌다(도 1a). 응집체 형성에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀진 여러 가지 치환이 테스트되었지만 서열번호 1의 야생형 인간 TGF-β2에 대한 C77S 및 V79R 치환에 상응하는, mmTGF-β2-7M의 2개 잔기의 아르기닌, S57R 및 V59R,로의 치환(도 1b)은 응집 경향을 유의하게 감소시켰다. 아르기닌으로 대체된 2개의 잔기를 갖는 mmTGF-β2-7M의 이 변이체는 mmTGF-β2-7M2R(서열번호 4)로 지정된다. 감소된 응집 경향에 대한 증거는 pH 또는 비변성 CHAPS 추가 여부에 관계없이 이 변이체에 대해 관찰된 훨씬 더 균일한 NMR 신호 강도였다(도 2a-2c).

[0166] **접힘을 개선하기 위한 변형**

[0167] TGF-β 단백질은 시스틴 매듭 성장 인자 접힘(CKGF)을 갖는 것으로 분류되는 단량체로부터 형성된다(Hinck *et al.*, *Cold Spring Harb Prospect Biol* 8(12):a022103, 2016). 이 접힘은 TGF-β 계열의 모든 단백질에 존재하지만 인간의 다른 많은 신호 단백질과 신호 단백질 길항제(antagonist)에서도 발견된다. 여기에는 신호 단백질인 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 혈관-내피 성장 인자(VEGF), 및 신경 성장 인자(NGF) 및 노긴(noggin), 스클레로스틴(sclerostin)과 같은 길항제, 및 Dan 및 Cerubus 관련 단백질(PRDC)이 포함된다. TGF-β 계열의 단백질은 모두 N-말단 프로-도메인(pro-domain)을 가지고 있다는 점에서 CKGF 단백질 중에서 독특하다. 프로-도메인의 역할은 아직 조사 중이지만, 해당 계열의 많은 단백질에 대해 조절 역할을 하는 것으로 알려

져 있다(Hinck *et al.*, *Cold Spring Harb Prospect Biol* 8(12):a022103, 2016). 이 조절은 프로-도메인이 성장 인자 도메인(GFD)에 결합하는 데서 발생하며, 때로는 I형 및 II형 수용체에 결합하는 GFD의 능력을 완전히 차단하기에 충분한(나노몰 내지 서브나노몰까지) 친화도를 갖는다. TGF-β1, TGF-β2 및 TGF-β3과 같은 일부 프로-도메인은 매우 높은 친화도로 GFD에 결합하여 활성화될 때까지 비활성(잠복) 형태로 유지할 뿐만 아니라 GFD의 적절한 접힘에도 필요하다. 다른 CKGF 단백질과 마찬가지로 TGF-β의 GFD는 3개의 이황화물에 의해 안정화된 구조적 모티프인 시스틴 매듭을 특징으로 한다(Schwarz, *Biol Chem* 398(12): 1295-1308, 2017). 3개의 이황화물은 공간적으로 서로 매우 가깝기 때문에 그 형성이 복잡하고 올바른 위상 배열(topological arrangement)외에도 가능한 대체 위상 배열이 많이 있다.

[0168] 이는 8-17 이황화물로 알려진 하나의 추가 이황화물뿐만 아니라 시스틴 매듭을 유지하므로 mmTGF-β2-7M과 관련이 있다(서열번호 1에 대한 잔기 7번 및 16번의 시스테인에 해당, 따라서 본 명세서에서는 "7-16"으로 지칭함). mmTGF-β2-7M 단백질을 생산하는 한 가지 방법은 이를 박테리아에서 불용성 봉입체(inclusion) 형태로 발현시키고 단백질을 재접힘하여 이황화물의 천연 쌍을 형성하는 것이다(Huang and Hinck, *Methods Mol Biol* 1344:63-92, 2016). 그럼에도 불구하고 전반적인 접힘 수율은 잘못된 접힘 및 8개 시스테인 잔기의 부적절한 쌍으로 인해 형성되는 응집체에 의해 제한된다. mmTGF-β2-7M 단백질은 진핵 숙주에서 단백질을 분비 단백질로 발현시켜 생산할 수도 있지만, 야생형 TGF-β 동종이량체와는 달리 프로-도메인이 없다. 그러나, mmTGF-β2-7M의 발현을 위해 이 방법을 사용하려는 시도로 인해 잘못 접힌 이황화 연결 응집체(disulfide linked aggregate)가 상당히 형성되었다.

[0169] 따라서, mmTGF-β2-7M의 접힘을 개선하기 위한 변형을 조사했다. 접힘을 개선하기 위해, mmTGF-β2-7M의 4가지 이황화물을 각각 한 번에 하나씩 제거했다. 이를 위해 각 이황화물을 형성하는 두 개의 시스테인을 발린-알라닌 쌍으로 대체한 다음 이전 절차에 따라 변형된 단백질을 발현, 재접힘 및 정제했다(Kim *et al.*, *J Biol Chem* 292(17):7173-7188, 2017). 자연적으로 접힌 단백질을 얻을 가능성을 높이기 위해, 치환은 조작된 TGF-β2 단량체의 맥락에서 생성되었지만, mmTGF-β2-7M에서와 같이 7개의 치환 대신 단지 두 개의 필수 잔기인 K25 및 K94가 TGF-β1의 잔기로 변경되었다. 이러한 변이체는 여전히 높은 친화도로 TβRII에 결합할 것으로 예상되었지만, TGF-β2는 TGF-β1보다 훨씬 더 높은 효율로 접히는 것으로 알려져 있으므로 개선된 효율로 접힌다(Huang and Hinck, *Methods Mol Biol* 1344:63-92, 2016). 결과는 이러한 배경에서 mmTGF-β2-2M-Del7-16(서열번호 5; 도 1c)으로 설계된 발린과 알라닌으로 치환된 7-16 이황화물을 형성하는 시스테인을 갖는 변이체가 자연적으로 접혀 있었지만(도 3a-3c), 제거된 다른 3개의 이황화물(15-78, 44-109 및 48-111)을 갖는 변이체는 비-자연적인것(non-native)으로 나타났다. CHAPS가 없는 경우 NMR 신호 강도에 현저하게 상당한 변화가 있었는데, 이는 응집을 시사하지만, 이러한 차이는 CHAPS를 첨가하면 감소된다(도 3a-3c). 단백질의 접힘을 방해하지 않고 7-16 이황화물을 제거할 수 있다는 사실은 단백질이 박테리아에서 생산되어 시험관 내에서 다시 접히든, 또는 단백질이 분비 단백질로 진핵 세포에서 생산되는 경우 접힘에 상당한 개선을 가져올 수 있음을 나타낸다.

[0170] 조사된 세 번째 유형의 변형도 mmTGF-β2-7M의 접힘을 개선하는 것을 목표로 했다. 선택된 전략은 골형성 단백질(BMP) 길항제 PRDC와 같은 일부 CKGF 단백질이 자연적으로 단량체로 생성되고 접힘을 위한 프로-도메인을 가지고 있지 않거나 또는 이에 의존하지 않는다는 사실을 활용하는 것이었다. PRDC 접힘의 잠재적인 개선을 활용하면서도 높은 친화도 TβRII 결합을 유지하기 위해, TβRII 결합을 담당하는 영역인 mmTGF-β2-7M의 핑거 1-2 및 3-4 영역을 PRDC의 시스틴 매듭 영역에 접목한 키메라 mmTGF-β2-7M:PRDC 구축물(construct)이 생성되었다. mmTGF-β2-7M-PRDC(서열번호 7; 도 1d)로 지정된 이 구축물은 E. coli에서 발현되었고, mmTGF-β27M에 사용된 것과 유사한 방식으로 재접힘되었으며(Kim *et al.*, *J Biol Chem* 292(17):7173-7188, 2017), 고-분해능 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 균질하게 정제되었다. NMR 분석을 통해, 이 단백질은 ^{1}H 차원에서 7.9-8.5ppm에 해당하는 랜덤 코일 영역 외부의 아미드 신호 분산에 의해 입증된 바와 같이 자연적으로 접혀 있는 것으로 나타났다(도 4a-4c). 이는 PRDC의 시스틴 매듭 영역이 mmTGF-β2-7M의 핑거 영역과 잘 통합되어 설계가 성공적이었음을 나타낸다.

[0171] **mmTGF-β2-7M 변이체의 결합 특성**

[0172] 세포와 생체 내에서 기능하기 위해, 설계된 mmTGF-β2-7M 변이체의 전제 조건은 높은 친화도로 TβRII에 결합한다는 것이다. 본 명세서에 기술된 mmTGF-β2-7M 변이체(mmTGF-β2-7M2R(서열번호 4), mmTGF-β2-2M-Del7-16(서열번호 5), 및 mmTGF-β2-7M-PRDC (서열번호 7))의 능력을 평가하기 위해, 등온 적정 열량계(ITC) 및 천연상태 겔을 사용하였다. ITC 결합 실험은 mmTGF-β2-7M2R(서열번호 4) 또는 mmTGF-β2-2M-Del7-16(서열번호 5)에 증가하는 양의 TβRII를 주입하고 mmTGF-β2-7M(서열번호 3)은 참조 대조군(reference control)를

사용하여 수행되었다. 이들 적정은 큰 음의 엔탈피와 거의 1:1 결합 화학량론을 갖는 쉽게 검출 가능한 등온선을 산출했다(도 5). 1:1 결합 모델에 대한 통합된 열의 적합성은 mmTGF-β2-7M2R 및 mmTGF-β2-2M-Del7-16에 대해 각각 75.1 nM 및 80.1 nM의 TβRII 결합에 대한 해리 상수(K_D)를 산출했다(도 5). 이러한 K_D는 mmTGF-β2-7M(60.5nM)에 대해 결정된 실험 오차 내에 있으며, 이는 응집을 감소시키거나 또는 접힘을 개선하기 위해 도입된 치환이 TβRII에 결합하는 단백질의 능력에 해로운 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

[0173] mmTGF-β2-7M-PRDC(서열번호 7)의 결합은 대안적으로 천연상태 겔을 사용하여 평가되었다. 이는 K_D의 정량적 측정을 제공하지 않지만 복합체를 검출하려면 두 단백질이 1시간 정도의 전기 영동과 비슷한 시간 단위에서 결합된 상태를 유지해야 하기 때문에 높은 친화도 결합을 나타낸다. 천연상태 겔은 mmTGF-β2-7M, mmTGF-β2-7M2R 및 mmTGF-β2-7M-PRDC가 모두 겔 길이의 약 4분의 1을 이동하는 밴드를 형성한 반면, TβRII는 겔의 거의 전체 길이에 걸쳐 러닝된다는 것을 보여주었다(도 4d). 이는 mmTGF-β2-7M, mmTGF-β2-7M2R 및 mmTGF-β2-7M-PRDC 단독으로 겔에 들어가지 않는다는 이전 발견과 함께, 이들 세 가지 단백질 모두 높은 친화도로 TβRII에 결합함을 시사한다. 이는 mmTGF-β2-7M 및 mmTGF-β2-7M2R 변이체에 대한 ITC 결과와 일치하며, 이는 mmTGF-β2-7M-PRDC에도 해당됨을 나타낸다.

[0174] **mmTGF-β2-7M 변이체의 억제 특성**

[0175] 생체 내에서 기능하기 위해서는 설계된 모든 mmTGF-β2-7M 변이체가 세포에서 TGF-β 신호 전달을 억제해야 한다. 개시된 mmTGF-β2-7M 변이체, mmTGF-β2-7M2R(서열번호 4), mmTGF-β2-2M-Del7-16(서열번호 5) 및 mmTGF-β2-7M-PRDC(서열번호 7)에 대해 이를 평가하기 위해, 세포가 루시페라아제 리포터 유전자에 융합된 TGF-β CAGA 인핸서 요소로 안정적으로 형질감염된 HEK-293 TGF-β 루시페라아제 리포터 세포주를 사용했다. 이 분석으로 억제 가능성을 평가하기 위해, 세포를 96-웰 플레이트에 플레이팅하고 다양한 농도의 mmTGF-β2-7M2R, mmTGF-β2-2M-Del7-16 및 mmTGF-β2-7M-PRDC를 첨가했으며, mmTGF-β2-7M을 대조군으로 사용했다. 30분 후, TGF-β3을 최종 농도 10pM까지 첨가하여 TGF-β 신호 전달을 자극하고, 12시간 후에 세포를 용해시키고 루시퍼라제 활성을 평가했다. 얻은 결과는 mmTGF-β2-7M2R, mmTGF-β2-2M-Del7-16 및 mmTGF-β2-7M-PRDC는 각각 TGF-β3에 의해 유도된 신호 전달을 강력하게 억제하는 것으로 나타났으며, 적합 IC_{50} 값은 각각 53nM, 111nM 및 283nM이었다(도 6b-6d). mmTGF-β2-7M2R 및 mmTGF-β2-2M-Del7-16에 대한 값은 둘 다 mmTGF-β2-7M에 대해 측정된 값의 2배 이내였으며(도 6a), 이는 두 단백질 모두 mmTGF-β2-7M(IC_{50} 58 nM)만큼 거의 효과적이라는 것을 나타낸다. 여전히 강력하지만, mmTGF-β2-7M-PRDC의 IC_{50}은 283nM으로, 이는 mmTGF-β2-7M에 비해 약 5배 감소한다. 이는 mmTGF-β2-7M-PRDC가 기능적 TGF-β 억제제임에도 불구하고 두 핑거 영역 방향의 작은 변화로 인해 그 효능이 약간 손상될 수 있음을 나타낸다.

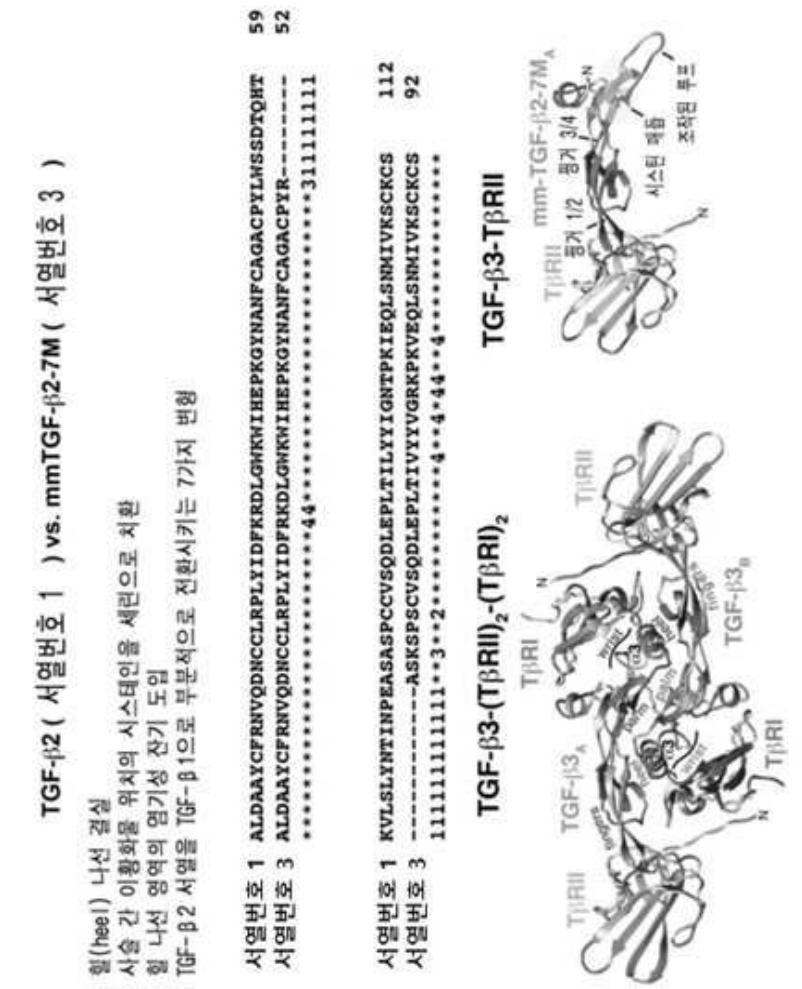
[0176] **요약**

[0177] 본 명세서에 개시된 mmTGF-β2-7M 변이체는 응집 경향을 감소시키고 접힘 경향을 증가시키는 치환을 보유한다. mmTGF-β2-7M 변이체는 각각 TβRII에 높은 친화도로 결합하는 능력을 유지하고 배양된 세포에서 TGF-β3 신호 전달을 강력하게 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 개시된 mmTGF-β2-7M 변이체는 생체 내 투여 능력을 향상시키는 특성을 가지며, 이에 따라 TGF-β 매개 질병 진행을 약화시키기 위해 치료적으로 개입하기 위한 새로운 길을 제공한다.

[0178] 개시된 발명의 원리가 적용될 수 있는 많은 가능한 구현예의 관점에서, 예시된 구현예는 단지 본 발명의 바람직한 예시일 뿐이며 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다는 것을 인식해야 한다. 오히려, 본 발명의 범위는 하기의 청구범위에 의해 정의된다. 따라서 우리는 이러한 청구범위의 범위와 정신 내에 속하는 모든 것을 우리의 발명이라고 주장한다.

도면

도면1a


TGF-β2 (서열번호 1) vs. mmTGF-β2-7M (서열번호 3)
1. 힐(heel) 나선 결실
2. 사슬 간 이황화물 위치의 시스테인을 세린으로 치환
3. 힐 나선 영역의 염기성 잔기 도입
4. TGF-β2 서열을 TGF-β1으로 부분적으로 전환시키는 7가지 변형
서열번호 1 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHT 59
서열번호 3 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYR-------- 52
서열번호 1 KVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGNTPKIEQLSNMIVKSCKCS 112
서열번호 3 ----------ASKSPSCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS 92
TGF-β3-(TβRII)2-(TβRI)2
TGF-β3-TβRII
TβRI
TβRII
TGF-β3A
TGF-β3B
mm-TGF-β2-7MA
핑거 1/2
핑거 3/4
시스틴 매듭
조작된 루프

도면1b

mmTGF-β2-7M (서열번호 3) vs mmTGF-β2-7M2R (서열번호 4)
5. 사슬간 이황화 위치를 아르기닌으로 치환
6. 이량체 경계면에 염기성 잔기 도입
57 59
서열번호 3 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCV 59
서열번호 4 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPrCr 59
5*6
서열번호 3 SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS 92
서열번호 4 SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS 92

도면1c

mmTGF-β2-7M (서열번호 3) vs mmTGF-β2-2M-Del7-16 (서열번호 5)
7. 7-16 이황화물을 형성하는 시스테인 제거
8. TGF-β1 서열을 TGF-β2로 되돌리는 변형
서열번호 3 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCV 59
서열번호 5 ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCV 59
서열번호 3 SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS 92
서열번호 5 SQDLEPLTILYYIGRTPKIEQLSNMIVKSCKCS 92

mmTGF-β2-7M (서열번호 3) vs mmTGF-β2-7M-PRDC (서열번호 7)

9. PRDC의 시스틴 매듭 영역과의 접목으로 인한 변형

핑거 1-2

```
서열번호 3  ---------ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPY  50
서열번호 7  KEVLASSQEALVVTERKYLKSDWCKLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCYGQCNS  59
            999999999**9999999999*9*9****************************9*9*99
```

핑거 3-4

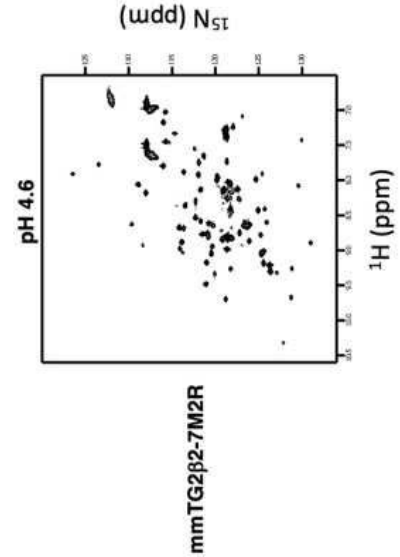
```
서열번호 3  R------------ASKSPSCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS--    92
서열번호 7  FYIPRHVKKEEDSFQSSAFCVSQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCRCMSV    115
            99999999999999999999**********************************9*999
```


공개특허 10-2024-0082356

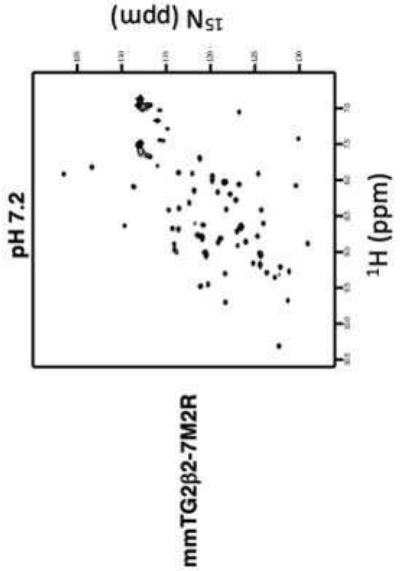
도면1e

mmTGF-β2-7M (서열번호 3) vs mmTGF-β2-7M2R-Del7-16 or var1 (서열번호 6)
5. 사슬간 이황화 위치를 아르기닌으로 치환
6. 이량체 경계면에 염기성 잔기 도입
7. 7-16 이황화물을 형성하는 시스테인 제거
서열번호 3 ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPSCV 59
서열번호 6 ALDAAYVFRNVQDNCALRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYRASKSPrCr 59
서열번호 3 SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS 92
서열번호 6 SQDLEPLTIVYYVGRKPKVEQLSNMIVKSCKCS 92

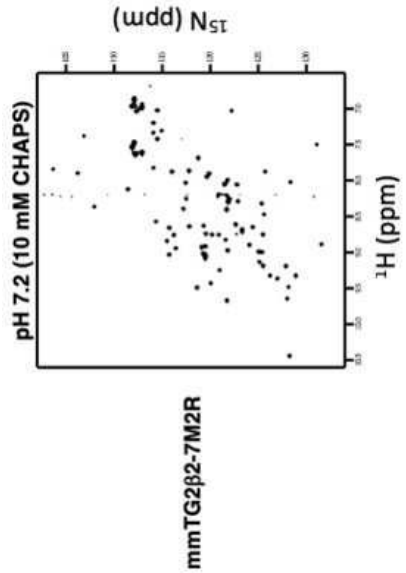
도면2a


(wdd) ^{15}N
pH 4.6
^{1}H (ppm)
mmTG2β2-7M2R

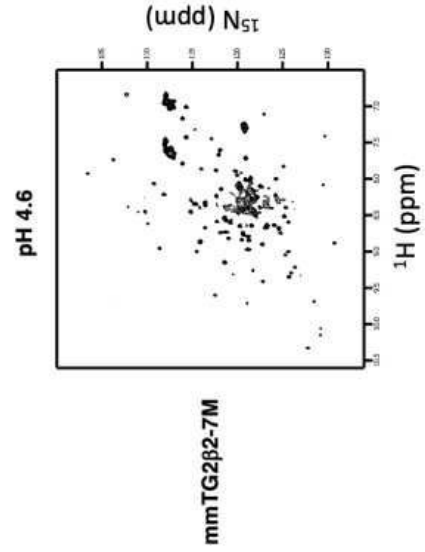
도면2b


(wdd) ^{15}N
pH 7.2
^{1}H (ppm)
mmTG2β2-7M2R

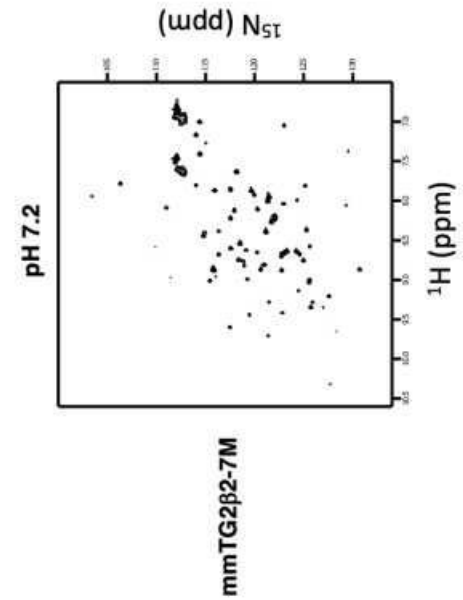
도면2c


mmTG2β2-7M2R
pH 7.2 (10 mM CHAPS)
^{15}N (ppm)
^{1}H (ppm)

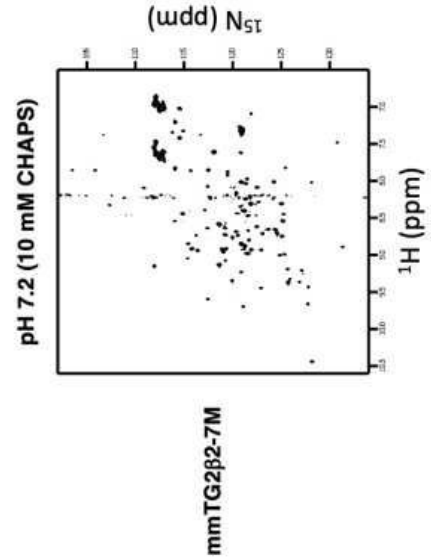
도면2d


mmTG2β2-7M
pH 4.6
^{15}N (ppm)
^{1}H (ppm)

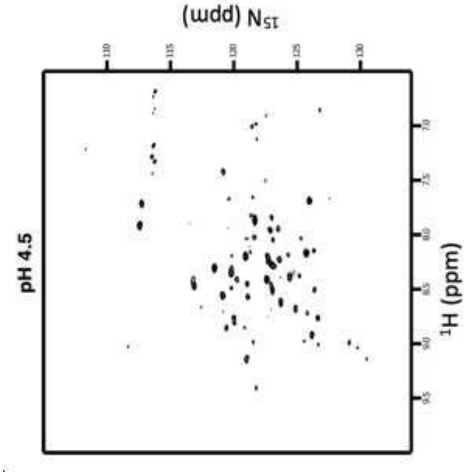
도면2e


(wdd) N_{51}
pH 7.2
^{1}H (ppm)
mmTG2β2-7M

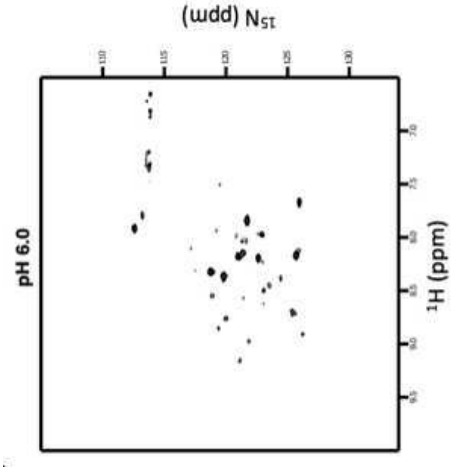
도면2f


(wdd) N_{51}
pH 7.2 (10 mM CHAPS)
^{1}H (ppm)
mmTG2β2-7M

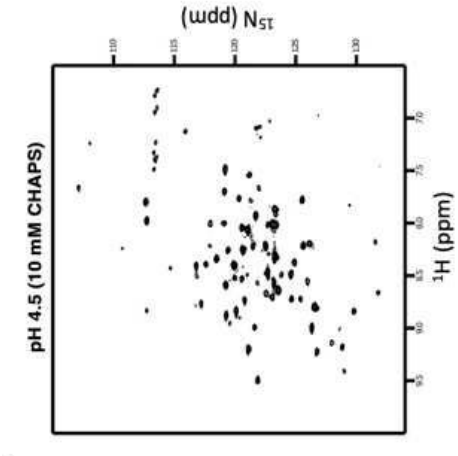
도면3a



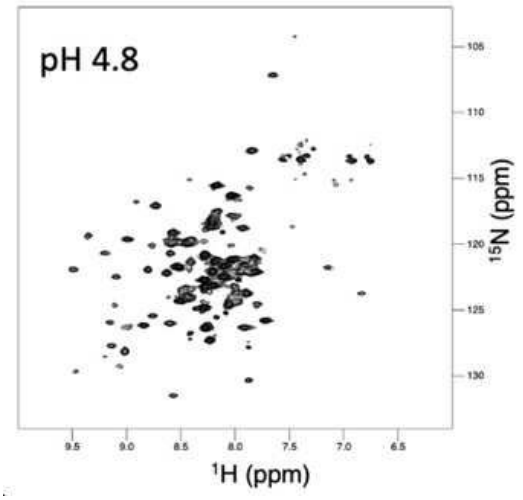
도면3b



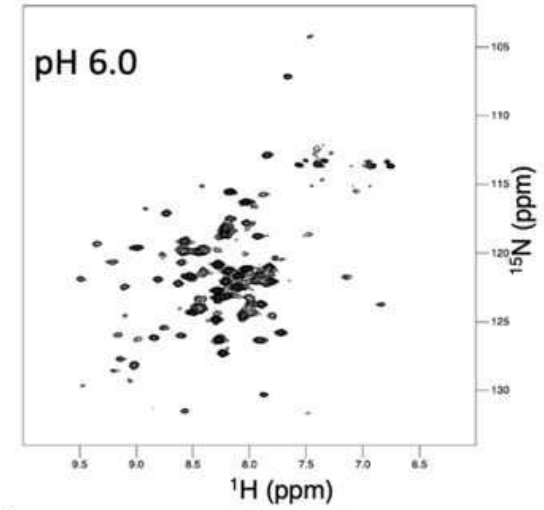
도면3c



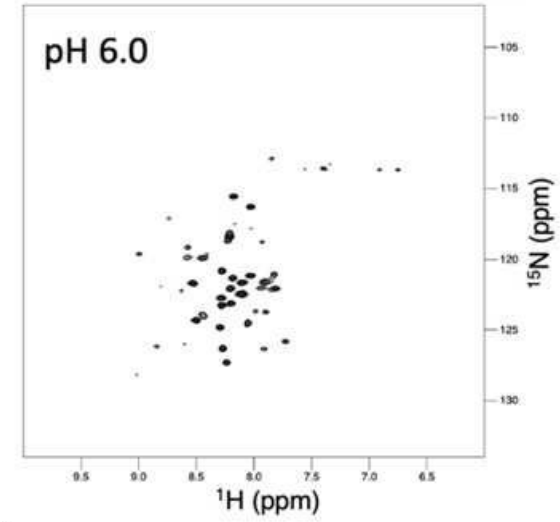
도면4a



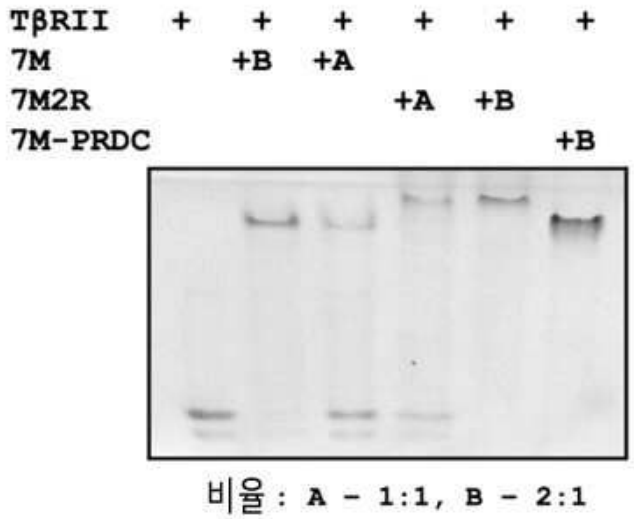
도면4b



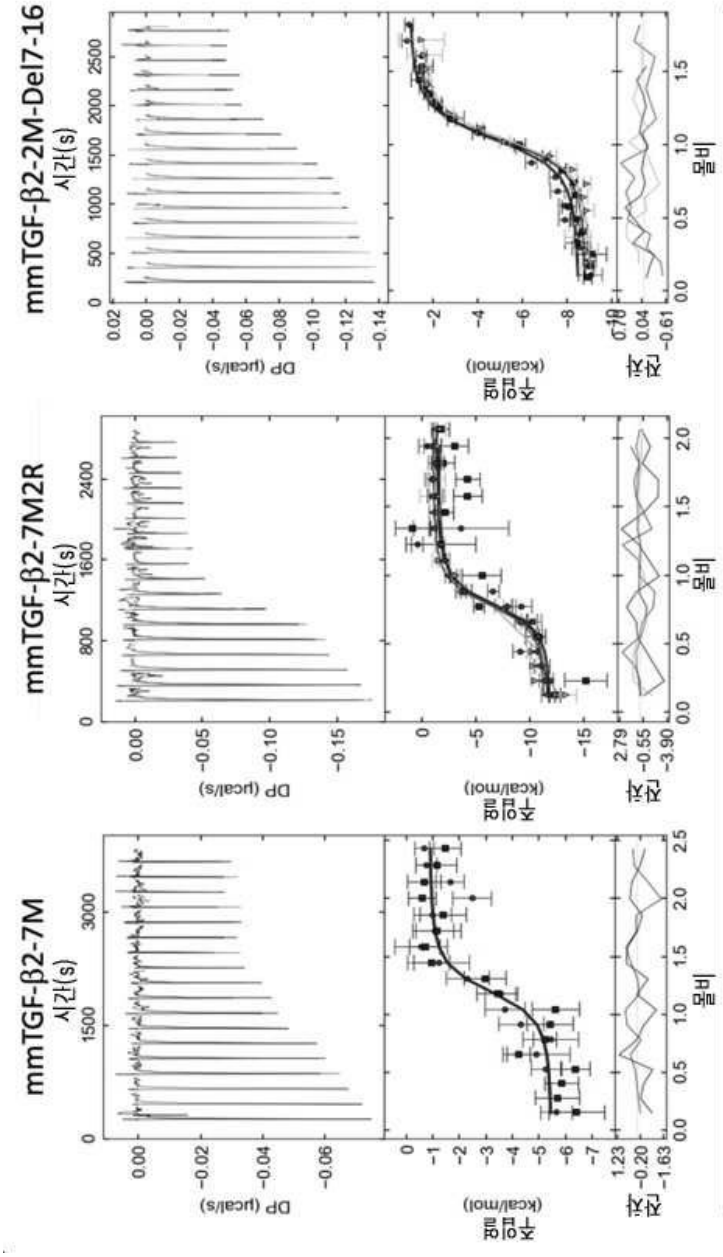
도면4c



도면4d

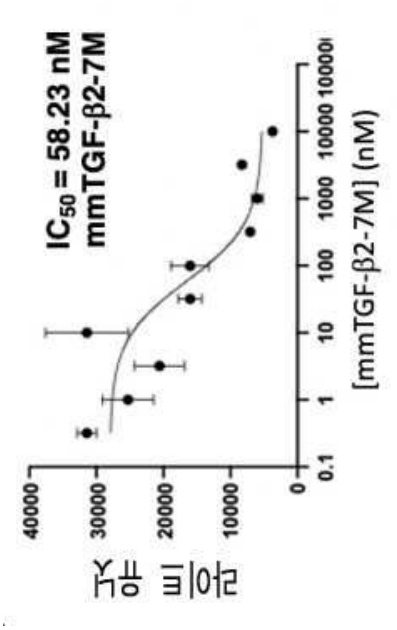


도면5

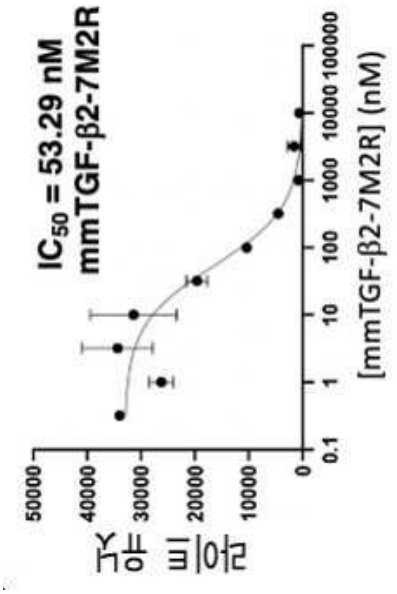


	ΔG [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/mol•K]	K_D [nM]	K_D (범위)
mmTGF-β2-7M	-9.846	-4.631	17.491	60.5	5.5 -413.3
mmTGF-β2-7M2R	-10.05	- 10.485	-1.44	75.1	38.7-132.1
mmTGF-β2-2M-Del8-17	-10.001	-7.670	-7.566	80.1	56.4-113.1

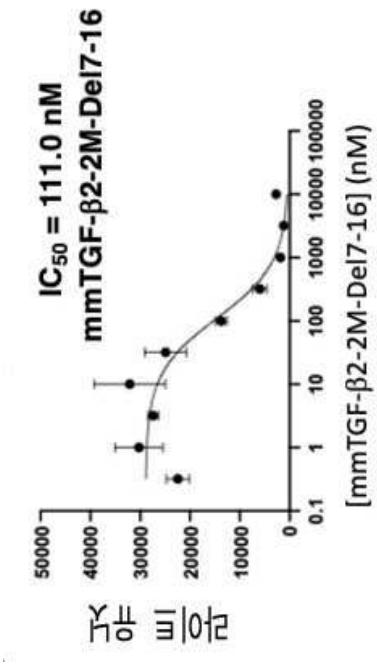
도면6a


IC50 = 58.23 nM
mmTGF-β2-7M
루미넥스
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
1000
10000
10000
[mmTGF-β2-7M] (nM)

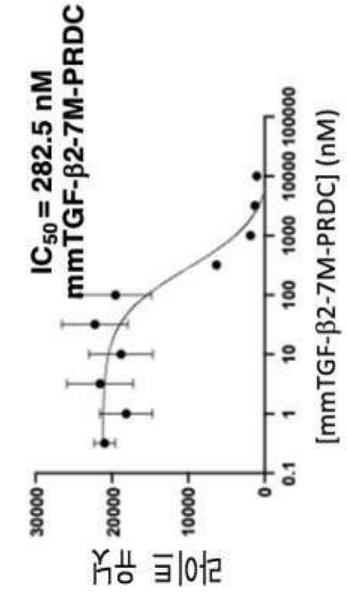
도면6b


IC50 = 53.29 nM
mmTGF-β2-7M2R
루미넥스
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
[mmTGF-β2-7M2R] (nM)

도면6c


IC50 = 111.0 nM
mmTGF-β2-2M-Del7-16
라이트 유닛
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
[mmTGF-β2-2M-Del7-16] (nM)

도면6d


IC50 = 282.5 nM
mmTGF-β2-7M-PRDC
라이트 유닛
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
[mmTGF-β2-7M-PRDC] (nM)

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.