



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0135567
(43) 공개일자 2021년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2014.01) A61K 38/42 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/805 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2013.01)
A61K 38/42 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7031982
(22) 출원일자(국제) 2020년03월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년10월05일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2020/050537
(87) 국제공개번호 WO 2020/178598
국제공개일자 2020년09월10일
(30) 우선권주장
1902992.5 2019년03월06일 영국(GB)

(71) 출원인
사이토시크 리미티드
영국 브리스톨 비에스2 0엑스제이 브리스톨 세인
트 필립스 알버트 로드 유닛 디엑스
(72) 발명자
페리만, 아담 윌리스
영국 브리스톨 비에스1 5디디 브리스톨 원 커썬드
럴 스쿼어 유니버시티 오브 브리스톨 씨/오 리썬
치 앤드 엔터프라이즈 디벨롭먼트
카터, 벤자민 마이클
영국 브리스톨 비에스1 5디디 브리스톨 원 커썬드
럴 스쿼어 유니버시티 오브 브리스톨 씨/오 리썬
치 앤드 엔터프라이즈 디벨롭먼트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 전하 변형 글로빈을 포함하는 항종양 세포

(57) 요약

세포, 리포솜 또는 미셀의 막과 회합된 적어도 하나의 전하 변형 글로빈을 포함하는 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀과, 이의 제조 및 사용 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 9/1075 (2013.01)

A61K 9/127 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/805 (2013.01)

(72) 발명자

그린, 토마스 레인 필립

영국 브리스톨 비에스1 5디디 브리스톨 원 커씨드
릴 스퀘어 유니버시티 오브 브리스톨 씨/오 리써치
앤드 앤터프라이즈 디벨롭먼트

코이, 데이비드

영국 브리스톨 비에스1 5디디 브리스톨 원 커씨드
릴 스퀘어 유니버시티 오브 브리스톨 씨/오 리써치
앤드 앤터프라이즈 디벨롭먼트

장, 윌리엄 홍유

영국 브리스톨 비에스1 5디디 브리스톨 원 커씨드
릴 스퀘어 유니버시티 오브 브리스톨 씨/오 리써치
앤드 앤터프라이즈 디벨롭먼트

명세서

청구범위

청구항 1

세포, 리포솜 또는 미셀의 막과 회합된 적어도 하나의 전하 변형 글로빈(charge-modified globin)을 포함하는, 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포는 면역 세포, 바람직하게 종양-침윤 면역 세포, 더욱 바람직하게 림프구, 호중구, 수지상 세포 또는 대식세포인 것인 세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포는 세포 독성 T 세포, 자연 살해 T 세포 또는 자연 살해 세포인 것인 세포.

청구항 4

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 T 세포인 것인 세포.

청구항 5

제1항에 있어서, 리포솜 또는 미셀은 치료제를 포함하며, 바람직하게 여기서 치료제는 체크포인트 억제제, 면역 억제제 또는 화학요법제인 것인 리포솜 또는 미셀.

청구항 6

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 글로빈은 헤모글로빈, 미오글로빈, 뉴로글로빈, 또는 사이토글로빈, 바람직하게 미오글로빈인 것인 세포, 리포솜 또는 미셀.

청구항 7

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 글로빈은 2차 항종양 분자, 또는 2차 항종양 분자에 연결하기 위한 반응성 작용기에 연결되며, 바람직하게 여기서 2차 항종양 분자는 항체, 렉틴, 인테그린 또는 접착 분자 중 어느 하나이고; 및/또는 바람직하게 2차 항종양 분자는 (1) 종양 세포 결합 분자; (2) 체크포인트 억제제; (3) 종양의 세포 외 기질을 리모델링하는 효소; 또는 (4) 종양-관련 화합물을 대사하는 효소 중 어느 하나인 것인 세포, 리포솜 또는 미셀.

청구항 8

제7항에 있어서, 글로빈 및 2차 항암 분자를 포함하는 융합 단백질을 포함하는 것인 세포, 리포솜 또는 미셀.

청구항 9

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 글로빈은 양이온화된 또는 음이온화된 글로빈인 것인 세포, 리포솜 또는 미셀.

청구항 10

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 글로빈은 중합체 계면 활성제 코팅을 포함하는 것인 세포, 리포솜 또는 미셀.

청구항 11

전술한 청구항 중 어느 한 항에 따른 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀을 포함하며, 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 비히클을 추가적으로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 12

암의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 세포, 리포솜 또는 미셀, 또는 제11항의 억제학적 조성물.

청구항 13

다음의 단계를 포함하는, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀을 제조하는 방법:

- a) 전하 변형 글로빈을 제공하는 단계; 및
- b) 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀을 상기 글로빈과 접촉시키는 단계.

청구항 14

제13항에 있어서, 단계 (a)는 중합체 계면 활성제가 글로빈과 정전기적 컨쥬게이션 할 수 있는 조건 하에서 전하 변형 글로빈 및 중합체 계면 활성제를 제공하는 것을 포함하는 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 글로빈은 다음의 단계를 포함하는 방법에 의해 전하 변형 글로빈으로 전환되는 것인 방법:

- i) 글로빈 용액을 N,N'-다이메틸-1,3-프로판다이아민 (DMPA) 또는 이의 유사체의 pH-중성화된 용액과 혼합하고, 선택적으로 혼합물을 pH 5-7로 조정하는 단계;
- ii) 후속적으로 또는 동시에 N-(3-다이메틸아미노프로필)-N'-에틸카보다이이미드 하이드로클로라이드 (EDC)와 같은 카보다이이미드를 첨가하고, 혼합물을 pH 4-7로 조정하는 단계;
- iii) (ii)로부터의 혼합물을 0-25℃의 온도에서 pH 4-7에서 1-30 시간 동안 교반하는 단계;
- iv) pH 6.5-8.5에서 적어도 4 시간 동안 물 또는 완충액에 대해 (iii)으로부터의 혼합물 중 단백질을 투석하는 단계;
- v) 필요한 경우, (iv)로부터의 혼합물의 pH를 pH 6.5-8.5로 조정하는 단계.

청구항 16

제13항 또는 제14항에 있어서, 전하 변형 글로빈은 전하 변형 글로빈을 인코딩하는 재조합 DNA 서열의 발현을 포함하는 방법에 의해 수득되는 것인 방법.

청구항 17

암의 치료를 필요로 하는 환자에게, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 세포, 리포솜 또는 미셀의 투여, 또는 제11항에 따른 억제학적 조성물의 투여를 포함하는, 암의 치료 방법.

청구항 18

암은 고형 종양 암인 것인, 제12항에 따른 용도, 또는 제17항에 따른 방법.

청구항 19

암은 유방암, 결장암, 전립선암, 폐암, 위암, 간암, 식도암, 자궁경부암, 또는 췌장암으로부터 선택되는 것인, 제12항 또는 제18항의 용도, 또는 제17항 또는 제18항의 방법.

청구항 20

서열 번호: 1-14 중 어느 하나의 전하 변형된 글로빈 서열 또는 비-변이 글로빈 서열과 적어도 약 60% 서열 상동성을 가지는 상기 중 어느 하나의 기능적 변이체를 포함하는 폴리펩타이드.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 세포, 리포솜 또는 미셀의 항종양 성질을 향상시키기 위해 세포, 리포솜 또는 미셀의 막과 회합된

(associated) 전하 변형 글로빈(charge-modified globin)을 포함하는 항종양 세포, 리포솜 및 미셀에 관한 것이다. 또한 이의 제조 방법 및 용도가 제공된다.

배경 기술

[0002] 다양한 항종양 요법이 세포, 리포솜 및 미셀의 사용을 포함한다. 최근의 예로는 종양 특이성을 가지는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 유전변형된 세포 독성 T 세포인, CAR-T 세포와 같은 조작된 면역 세포를 사용한 치료를 포함한다. CAR는 T 세포를 종양 세포에 결합시키며, 여기서 T 세포는 종양 세포를 사멸할 수 있다. 치료는 또한, 세포 독성 T 세포와 유사성을 가지는 방식으로, 종양에 결합하여 항종양 조성물을 전달하는 리포솜 및 미셀을 사용하여 수행될 수 있다.

[0003] 그러나, 이러한 노력은 면역 체계를 피하기 위한 종양의 능력에 의해 좌절된다. 고형 종양 미세 환경은 면역억제성이 높다: 종양 세포는 체크포인트 억제제를 발현하며 억제성 세포 집단을 모집하여, 국소 저산소증이 면역억제성 유전자 발현의 캐스케이드를 유발한다. 이의 한 가지 효과는 세포 독성 T 세포와 같은 암 사멸 세포가 '꺼진다(turned off)는 것인데', 즉, 종양 세포를 식별하고 사멸하는 능력을 잃는 것이다.

[0004] 이러한 면역 억제를 극복하기 위한 현재 접근법은 세포 독성 T-세포를 비활성화 하는 단백질을 차단하는 항체 (예컨대 PD-1, PD-L1 및 CTLA4)를 전신 투여하고, 면역억제성 조절 T-세포 (일종의 면역억제성 T-세포)를 고갈시키고, 산소가 풍부한 공기 또는 에리트로포이에틴(erythropoietin)을 사용하여 산소 수준을 증가시키는 것이다. 또한 암 세포의 저산소증은 글로빈의 투여에 의해 감소될 수 있으며, 이는 화학요법 약물의 유효성을 시도하고 향상시키기 위해 투여될 수 있는 것으로 보고되어 있다 (예를 들어, US2015/0374796 기재).

[0005] 본 발명은 특히 항종양 세포, 리포솜 및 미셀의 항종양 효과를 회피하는 종양의 능력을 감소시키고, 뿐만 아니라 면역 반응을 회피하는 종양의 능력을 감소시킴으로써, 세포, 리포솜 및 미셀의 항종양 활성이 향상된, 항종양 세포, 리포솜 및 미셀을 제공한다.

발명의 내용

[0006] 제1 양태에 따르면, 본 발명은 세포, 리포솜 또는 미셀의 막(membrane)과 회합된 적어도 하나의 전하 변형 글로빈을 포함하는 항종양 세포, 항종양 리포솜 또는 항종양 미셀을 제공한다.

[0007] 본 발명자들은 종양, 특히 고형 종양의 치료를 위한 개선된 치료 조성물을 확인하였다. 놀랍게도, 전하 변형 글로빈은 세포, 리포솜 및 미셀의 막과 성공적으로 회합하며, 뿐만 아니라 전하가 변형되고 세포, 리포솜 또는 미셀과 회합되었음에도 불구하고 산소 수송 및 전달 기능을 성공적으로 유지하는 것으로 밝혀졌다. 게다가, 이러한 결합은 안정성, 생존력 및 활성과 같은 세포, 리포솜 또는 미셀의 주요 특성을 잃지 않으면서 발생하는 것으로 밝혀졌다. 구체적으로, T 세포에서의 실험에서 생존력, 증식 능력 및, 결정적으로, 활성이 손실되지 않음을 보여주었다. 전하 변형 글로빈과 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀의 막의 결합의 중요한 양태는 전하 변형 글로빈이 세포, 리포솜 또는 미셀에 및 종양 세포에 유익한 효과를 동시에 제공할 수 있다는 점이다. 예를 들어, 하기에 상세히 논의되는 바와 같이, 전하 변형 글로빈은 저산소 고형 종양 세포에 대한 항종양 세포의 활성을 조정 및/또는 개선할 수 있다. 게다가, 전하 변형 글로빈은 또한 저산소 고형 종양에서 저산소증을 감소시켜, 저산소 상태의 영향을 완화시킬 수 있다. 예를 들어, 저산소증의 감소는 리포솜 또는 미셀에 의해 전달될 수 있는 항종양 세포 및/또는 화학요법 치료의 효과에 대해 종양 세포를 민감하게 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 세포, 리포솜 또는 미셀은 세포, 리포솜 및 미셀의 항종양 효과를 회피하려는 종양의 능력을 극복하고, 뿐만 아니라 본 발명의 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀의 효과와 동시에 임의의 면역 반응을 회피하는 종양의 능력을 감소시키는 고유의 능력을 갖는다. 전하 변형 글로빈과 세포, 리포솜 또는 미셀의 막의 회합은, 세포, 리포솜 또는 미셀의 영역에서 글로빈의 국소 농도가 과량의 글로빈의 전신 투여에 의해 비연관 시스템에만 일치될 수 있음을 의미한다. 세포, 리포솜 또는 미셀이 저산소 고형 종양을 표적으로 하는 경우, 이는 저산소 고형 종양 영역에서 글로빈의 국소 농도에도 적용된다. 게다가, 전하 변형 글로빈이 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀과 결합함으로써, 글로빈이 고형 종양에 대해 작용함과 동시에, 고형 종양에 대한 세포, 리포솜 또는 미셀의 항종양 효과가 본질적으로 발생한다. 또한, 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀 고형 종양 내의 특정 섹션과 회합하고 이에 대해 작용하는 경우, 회합된 전하 변형 글로빈은 본질적으로 고형 종양의 동일한 섹션에 대해 또한 작용한다.

[0008] 글로빈은 전하가 변형된다. 이것은 글로빈의 순 표면 전하가 네이티브 (또는 “변형되지 않은” 또는 “야생형”) 글로빈에 대해 변형된 것을 의미한다. 즉, 네이티브 단백질에서 음으로 하전된 또는 중성이었던 적어도 하

나의 잔기가 양전하를 보유하도록 변형되거나, 또는 네이티브 단백질에서 양으로 하전된 또는 중성이었던 적어도 하나의 잔기가 음전하를 보유하도록 변형되었다. “전하를 보유하는 잔기”는 본질적으로 하전된 잔기 (예를 들어, 단백질 생성 아미노산 글루타메이트, 아스파테이트, 아르기닌, 라이신 및 히스티딘), 및 하나 이상의 전하를 보유하는 적어도 하나의 작용기를 삽입하여 변형을 거쳐 하전된 잔기를 포함하는 것으로 이해될 수 있다.

[0009] 일반적으로, 전하는 생리학적 pH, 예를 들어 약 pH 6-9에서, 예를 들어 약 pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 또는 약 9에서 평가된다.

[0010] 글로빈의 전하 변형은 다양한 수단에 의해 야기될 수 있다. 예를 들어, 네이티브 글로빈 단백질이 제공된 다음, 단백질이 화학적으로 변형되어 하나 이상의 잔기의 전하 상태를 변경할 수 있다. 택일적으로, 전하 변형 글로빈은 전하 변형 글로빈을 인코딩하는 서열의 재조합 발현에 의해 생성될 수 있다. 전하 변형 글로빈은 또한 전하 변형 글로빈을 발현, 및 화학적 변형의 조합에 의해 생성될 수 있다.

[0011] 상기 기재된 바와 같이, 전하 변형 글로빈은 네이티브 단백질에 대해 하나 이상의 전하 변형을 가진다. 예를 들어, 하나 이상의 양전하를 보유하도록 변형된 잔기 수는 1 내지 100, 예를 들어, 1 내지 80, 10 내지 70, 20 내지 60, 또는 30 내지 50, 예컨대 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 또는 55 개 일 수 있다. 또한, 또는 택일적으로, 하나 이상의 음전하를 보유하도록 변형된 잔기 수는 1 내지 100, 예를 들어, 1 내지 80, 10 내지 70, 20 내지 60, 또는 30 내지 50, 예컨대 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 또는 55 개 일 수 있다.

[0012] 전하 변형 글로빈은 전체적으로 표면 양전하가 증가하도록 변형된 경우 양이온화된 글로빈으로, 또는 전체적으로 표면 음전하가 증가하도록 변형된 경우 음이온화된 글로빈으로 지칭될 수 있다. 양이온화된 글로빈의 경우 표면 양전하의 전체 변화는 +1 내지 +100, 예를 들어, +1 내지 +80, +10 내지 +70, +20 내지 +60, 또는 +30 내지 +50, 예컨대 약 +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18, +19, +20, +21, +22, +23, +24, +25, +26, +27, +28, +29, +30, +31, +32, +33, +34, +35, +36, +37, +38, +39, +40, +41, +42, +43, +44, +45, +46, +47, +48, +49, +50, +51, +52, +53, +54, 또는 +55일 수 있다. 양이온화된 글로빈의 전체 표면 양전하는 +1 내지 +100, 예를 들어, +1 내지 +80, +10 내지 +70, +20 내지 +60, 또는 +30 내지 +50, 예컨대 적어도 약 +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18, +19, +20, +21, +22, +23, +24, +25, +26, +27, +28, +29, +30, +31, +32, +33, +34, +35, +36, +37, +38, +39, +40, +41, +42, +43, +44, +45, +46, +47, +48, +49, +50, +51, +52, +53, +54, 또는 +55일 수 있다.

[0013] 음이온화된 글로빈의 경우 표면 음전하의 전체 변화는 -1 내지 -100, 예를 들어, -1 내지 -80, -10 내지 -70, -20 내지 -60, 또는 -30 내지 -50, 예컨대 약 -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -36, -37, -38, -39, -40, -41, -42, -43, -44, -45, -46, -47, -48, -49, -50, -51, -52, -53, -54 또는 -55일 수 있다. 음이온화된 글로빈의 전체 표면 음전하는 -1 내지 -100, 예를 들어, -1 내지 -80, -10 내지 -70, -20 내지 -60, 또는 -30 내지 -50, 예컨대 적어도 약 -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -36, -37, -38, -39, -40, -41, -42, -43, -44, -45, -46, -47, -48, -49, -50, -51, -52, -53, -54 또는 -55일 수 있다.

[0014] 일반적으로, 전하 변형 글로빈은 단백질 내 아미노산 잔기의 전체 수로 결정되는 양전하 또는 음전하를 보유하는 잔기의 백분율을 포함한다. 양전하 또는 음전하의 백분율은 상응하는 네이티브 글로빈에서 양전하 또는 음전하의 백분율을 초과한다. 예를 들어, 네이티브 글로빈은 양으로 하전된 잔기로서 전체 아미노산 잔기의 5.0-40%를 가질 수 있고, 전하 변형 글로빈은 상응하는 네이티브 글로빈에서 더욱 높은 백분율을 가질 수 있다. 예를 들어, 네이티브 인간 미오글로빈은 양으로 하전된 잔기로서 전체 아미노산 잔기의 14%를 가진다. 마찬가지로, 인간 헤모글로빈은 양으로 하전된 잔기로서 전체 아미노산 잔기의 10%를 가지는 반면, 말 심장 미오글로빈 및 침팬지 미오글로빈은 모두 14%를 가진다. 전하 변형 글로빈은 양으로 하전된 잔기로서 전체 아미노산 잔기의 적어도 약 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% 또는 적어도 약 30%를 가질 수 있다. 음으로 하전된 잔기에 대해 동일하게 적용된다.

[0015] 전하 변형 글로빈은 또한 초하전된 글로빈로서 지칭될 수 있다. 그러므로, 본 명세서에서 용어 “초하전된 글로

빈(supercharged globin)”은, 이미 기술된 바와 같이, 네이티브 단백질에 대해 하나 이상의 전하 변형을 가지는 임의의 글로빈을 지칭할 수 있다. 초하전된 단백질의 생성은 기술 분야 내 공지되어 있다. 이러한 초하전된 단백질 제조의 예로는, 녹색 형광 단백질 (Green Fluorescent Protein, GFP)의 맥락에서, 문헌 [Lawrence et al. (*J. Am. Chem. Soc.* (2007) vol. 129 p.10110-10112)]에 기재되어 있다. 이러한 소위 “초하전된” 단백질은 이전에 인지질 이중층 세포막을 통해 세포 내부로 분자 전달을 용이하게 하도록 사용되었다 (Zang et al. (2017) *PLoS One* 12(6):e0180138; W02009/134808; W02010/129023; W02016/069910; Thompson et al. (2012) *Methods Enzymol.* vol. 503 p. 293-319; McNaughton et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 106 p. 6111-6116). 그러므로, 전하 변형 글로빈 및 본 명세서에 기재된 중합체 계면 활성제 코팅을 포함하는 전하 변형 글로빈에 사용되는 경우, 세포, 리포솜 또는 미셀의 막과 회합된 적어도 하나의 전하 변형 글로빈을 포함하는 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀이 수득될 수 있다는 것은 완전히 놀라운 것이다.

[0016] 전하 변형 글로빈은 세포, 리포솜 또는 미셀의 막과 회합한다. 하나의 구체예에서, 전하 변형 글로빈은 막에 결합됨으로써 막과 회합된다. 이러한 결합은 하나 이상의 공유 결합 및/또는 하나 이상의 분자간 힘, 예컨대 정전기력, 수소 결합 및/또는 소수성 상호 작용에 의해 매개될 수 있다. 전하 변형 글로빈은 또한, 또는 택일적으로, 자리에 입체적으로 고정됨으로써 막과 회합될 수 있다. 막과의 회합의 이점은 글로빈이 표적 종양 세포 및 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀 모두에 산소를 용이하게 전달할 수 있다는 점이다. 추가적인 이점은 글로빈이 막과 회합하면 2차 항종양 분자에 대한 앵커로서 역할을 추가로 할 수 있다는 점이다.

[0017] “막”은, 세포, 리포솜 또는 미셀의 내부를 외부 환경으로부터 분리하는 구조를 지칭한다. 천연 유기체에 의해 생성된 세포에서, 막은 인지질 이중층이거나, 또한 세포막, 원형질막 또는 세포질 막으로서 알려져 있다. 전하 변형 글로빈은 인지질 이중층 (즉, 막의 소수성 지질 영역에)에 포매됨으로써 회합될 수 있거나, 또는 인지질 이중층 중 용매에 노출된 외부 표면과 회합될 수 있다. 인지질 이중층 중 용매에 노출된 표면과의 이러한 회합은 친수성 인지질 헤드와 직접적으로 결합함으로써 및/또는 세포-표면 단백질과 결합함으로써 매개될 수 있다. 리포솜에서, 막은 세포막과 유사한 구조이다. 즉, 막은 리포솜의 외부 막이다. 리포솜 막은 인지질 이중층을 포함할 수 있다. 그러나, 기술 분야에 공지된 바와 같이 리포솜 막은 상이한 양친매성 분자로 형성된 이중층을 포함할 수 있음에 유의한다. 미셀에서, 막은 양친매성 분자, 예컨대 인지질의 소수성 헤드로 형성된 미셀의 외부 둘레이다.

[0018] 바람직한 구체예에서, 전하 변형 글로빈은 막에 포매되거나 또는 막의 외부 (즉, 용매에 노출된) 표면에 회합 (예를 들어, 결합)된다.

[0019] 세포의 막은 바람직하게 인지질 이중층을 포함한다. 리포솜의 막은 인지질 이중층을 포함할 수 있다. 미셀은 인지질 막을 포함할 수 있다. 이러한 구체예에서, 전하 변형 글로빈은 인지질 막에 결합됨으로써 인지질 막과 회합된다. 막은 인지질 이외의 지질, 예를 들어, 콜레스테롤을 포함할 수 있다. 막은 또한 다른 성분, 예컨대 통합 막 단백질을 포함할 수 있다. 이것은 특히 막이 세포막인 경우일 수 있다.

[0020] 하나의 구체예에서, 전하 변형 글로빈은 인지질 막 중 용매에 노출된 외부 표면에 결합한다. 이러한 결합은 바람직하게 정전기력에 의해 매개된다. 일반적으로, 인지질 막 중 용매에 노출된 외부 표면은, 특히 세포의 경우에, 음전하를 포함한다. 그러나, 양전하를 포함하는 용매에 노출된 표면을 포함할 수 있는 것이 또한 가능하다. 이러한 막과 정전기적 상호작용을 매개하기 위해, 전하 변형 글로빈은 증가된 전체 표면 양전하 (즉, 양이온화된 글로빈) 또는 증가된 전체 표면 음전하 (즉, 음이온화된 글로빈)를 포함할 수 있다.

[0021] 세포, 리포솜 또는 미셀은 전하 변형 글로빈에 대한 결합 부위로 작용하는 분자를 추가적으로 포함하는 막을 가질 수 있다. 예를 들어, 세포는 외부 표면에 다양한 단백질, 지질 및 글리칸을 표시한다. 리포솜 및 미셀은 표면에 다양한 라벨을 표시하도록 구성될 수 있다. 하나의 구체예에서, 전하 변형 글로빈은 세포, 리포솜 또는 미셀의 외부 표면에 표시된 분자와 회합된다.

[0022] 하나의 구체예에서, 전하 변형 글로빈은 막에 포매된다. 세포막, 및 리포솜은 일반적으로 친수성 작용기에 의해 각 표면에 결합된 소수성 내부를 가지는 적어도 하나의 지질 이중층을 포함한다. 전하 변형 글로빈은 소수성 코팅으로 코팅될 수 있으며, 하기에 더욱 상세히 논의되는 바와 같이, 지질 이중층 내부에 포매될 수 있는 소수성 전하 변형 글로빈을 제공한다. 용어 “포매”는 소수성 전하 변형 글로빈이 적어도 부분적으로 인지질 이중층 내에, 또는 미셀의 경우 층 내에 위치한 것을 나타낸다. 즉, 소수성 전하 변형 글로빈은 인지질 이중층 또는 층의 표면과 단순히 상호작용하기 보다는, 인지질 이중층 또는 층과 적어도 부분적으로 교차한다.

[0023] 바람직한 구체예에서, 전하 변형 글로빈은 내재화되지 않는다. 즉, 전하 변형 글로빈은 막과 접촉한 채로 남아

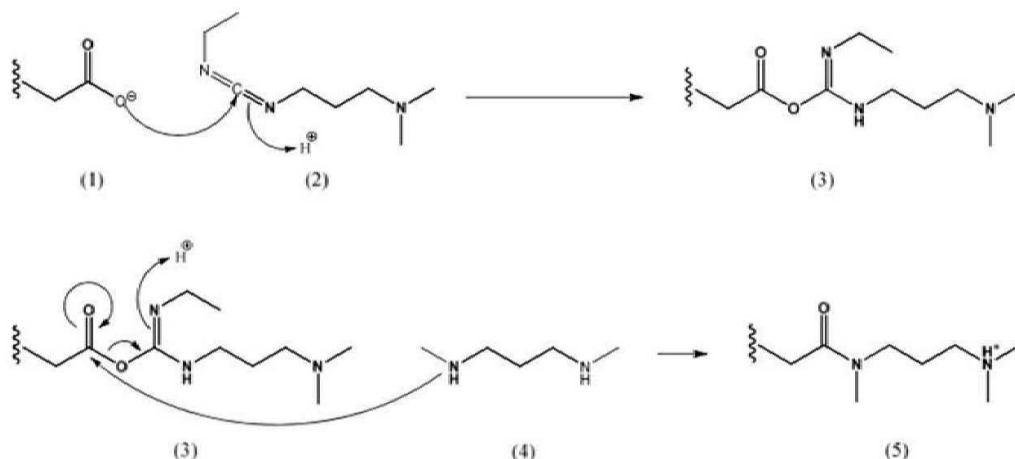
있고 세포 또는 리포솜 내부로 방출되지 않는다.

- [0024] 바람직한 구현예에서, 항종양 세포, 항종양 리포솜 또는 항종양 미셀은 항종양 세포이다. '항종양 세포'는 항종양 성질을 가지는 임의의 세포를 의미할 수 있다. 이와 같이, 세포는 네이티브 세포, 인공 세포, 변형된 세포 또는 세포 소기관일 수 있다. 용어 '변형된 세포'는 시험관 내 변형된 세포, 및 생체 내, 예를 들어 생체 내 유전자 편집에 의해 변형된 세포를 포함한다. 본 명세서에서, 용어 "세포"는 원형질체(protoplast) 또는 스페로플라스트(spheroplast), 즉, 일반적으로 세포막을 포함하지만, 상기 막의 적어도 일부는, 예를 들어, 기계적 또는 효소적 공정에 의해, 제거 또는 파괴된 세포를 포괄한다. 이것은, 예를 들어, 상기 막의 적어도 일부가, 예를 들어 세포의 형질전환에 의한 세포의 추가적인 변형을 돕기 위해, 제거 또는 파괴된 세포를 포함하는 키트를 포함할 수 있다.
- [0025] 일반적으로, 세포는 동물 세포, 예컨대 포유동물 세포이다. 포유동물 세포는 인간, 쥐, 개, 고양이 또는 말 세포, 또는 소, 돼지 또는 양 세포일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 세포는 인간 세포이다. 태원적으로, 세포는 인간화된 동물, 예컨대 인간화된 쥐로부터 유래할 수 있다. 인간 또는 인간화된 세포가 면역원성이 더 낮아야 하므로 선호되기 때문에 특히 바람직하다.
- [0026] 일반적으로, 세포는 종양 세포를 사멸시키는 세포 독성 특성을 가지는 면역 세포이다. 바람직하게, 면역 세포는 종양-침윤 세포, 예컨대 림프구, 호중구, 수지상 세포 또는 대식세포이다. 더욱 바람직하게, 세포는 림프구, 예컨대 세포 독성 T 세포, 자연 살해 T 세포 또는 자연 살해 세포이다. 세포가 T 세포, 예컨대 CD3+ T 세포인 것이 특히 바람직하다. CD3+ T 세포는 바람직하게 CD4+ 또는 CD8+ 하위유형, 바람직하게 CD8+ 하위유형이다. 하나의 구체예에서, T 세포는 키메라 항원 수용체 T (CAR-T) 세포이다.
- [0027] 중요한 것은, 특정 단백질 (즉, 전하 변형 GFP)과 T 세포막의 회합이 T 세포에 독성 영향을 미친다는 것이 입증되었다 (도 2). 대조적으로, 대표적인 전하 변형 글로빈 (미오글로빈)은 GFP 비교하여 예상치 못한 감소된 독성으로 쥐 T 세포막과 회합하며 (도 2b), 더욱 더 놀랍게도, 인간 Jurkat T 세포에 대한 독성은 발견할 수 없었다 (도 2a).
- [0028] 게다가, T 세포의 활성화는 T 세포막의 용매에 노출된 외부 표면의 구조 및 구성에 의존하며, 여기서 면역 반응을 매개하는 리간드의 인식을 위해 일련의 단백질이 요구된다. 본 발명의 글로빈은 이러한 T 세포막과 회합하지만, T 세포 기능을 방해하지 않으면서 회합해야 한다. 결정적으로 중요한 놀라운 결과는, 글로빈이 눈에 띄는 T 세포 활성화의 손실 없이 인간 Jurkat T 세포막과 회합할 수 있다는 것이다 (도 3). 이것은 T 세포 수용체와 이의 리간드 사이 상호 작용에 글로빈에 의해 야기되는, 입체적인 또는 입체적이지 않은, 간섭이 없다는 것을 시사한다.
- [0029] 고형 종양 환경의 대표적인 모델로서 사용되는 저산소 환경에서의 거동과 비교하여 정상 환경에서 T 세포 거동에서 더욱 놀라운 효과가 나타났다. 쥐 T 세포의 CD4+ 및 CD8+ 하위유형 모두 실험하였다. 정상 산소 환경에 노출된 경우 미오글로빈과 T 세포막이 회합하면 T 세포 증식이 감소되지만, 증식은 저산소 환경에서 회복되었다 (도 4a 및 도 b). CD4+ 하위유형의 경우, 활성화에 대한 유사한 패턴이 나타났다. 정상 산소 환경에서 T 세포/미오글로빈 복합체에 대한 T 세포 활성화는 감소되었지만, T 세포/미오글로빈 복합체의 활성화는 저산소 환경에서 회복되었다 (도 4c). 이러한 예상치 못한 결과는, 이러한 T 세포/미오글로빈 복합체가 특히 저산소 고형 종양 환경에 맞춰져 있음을 암시한다. 즉, 정상 산소 조건에서 T 세포/미오글로빈 복합체의 증식 감소는 글로빈 농도가 감소된 T 세포 자손을 생성하는 T 세포가 증식할 때마다 (즉, T 세포 자손 사이에 증식하는 동안 회합에 의해) 글로빈이 회합되지 않도록 하는데 도움이 될 수 있다. 마찬가지로, 도 4c에서 T 세포/미오글로빈 복합체의 활성화는 세포가 저산소 환경에 있을 때 까지 억제되어, 세포가 저산소 고형 종양을 표적으로 하고 이에 작용하도록 특별히 조정된다. 더욱 더 놀라운 효과가 CD8+ 세포/미오글로빈 복합체 활성화에서 발견되었다. 저산소 환경에서, T 세포 활성화는 실제로 크게 향상되어, 이를 항종양 요법에 있어서 특히 흥미로운 복합체로 만든다.
- [0030] 전하 변형 글로빈은 세포를 전하 변형 글로빈과 접촉시켜 본 발명에 따른 세포가 형성된 후, 세포의 막과 1-30 일, 또는 1-15 또는 1-10 또는 1-5 일 동안 회합될 수 있다. 예를 들어, 전하 변형 글로빈은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 약 10 일 동안 회합될 수 있다.
- [0031] 하나의 구체예에서, 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀은 항종양 리포솜 또는 미셀이다. 리포솜 또는 미셀은 일반적으로 수용성 리포솜 또는 미셀이다. 리포솜 또는 미셀은 종양-사멸 성질을 리포솜 또는 미셀에 부여하는 구성요소를 포함할 것이다. 바람직한 구현예에서, 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀은 체크포인트 억제제, 면역요법제 또는 화학요법제와 같은 치료제를 포함한다. 체크포인트 억제제로는 PD-1, PDL-1, 및/또는 CTLA-4에 결합하고 이를 차단하는 펩타이드 또는 단백질, 예를 들어 PD-1, PDL-1 및/또는 CTLA-4에 대해 높은 친화성을 가지며 억

제하는 파지 디스플레이 기술에 의해 생성된 펩타이드, 또는 PD-1, PDL-1 및/또는 CTLA-4에 대해 높은 친화성을 가지며 억제하도록 생성 또는 설계된 항체 또는 항체 단편을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 다양한 체크포인트 억제제가 기술 분야 내에 공지되어 있다.

- [0032] 리포솜 또는 미셀은 또한 리포솜 또는 미셀이 종양 세포를 특이적으로 표적화하도록 하는 표적화 성분, 예컨대 항체 또는 다른 표적화 단백질을 포함할 수 있다.
- [0033] 글로빈은 헤모글로빈, 미오글로빈, 뉴로글로빈, 또는 사이토글로빈일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 글로빈은 미오글로빈이다. 글로빈은 가역적으로 산소에 결합하고 이를 운반한다. 이와 같이, 글로빈은 산소에 결합하고 산소 요구량이 산소를 방출할 때까지 산소를 운반한다. 미오글로빈은, 특히, 약한 과산화효소 및 라디칼 스캐빈저로서 작용하는 것으로 또한 알려져 있다.
- [0034] 글로빈은 2차 항암 분자에 연결될 수 있다. 택일적으로, 글로빈 2차 항종양 분자에 연결하기 위한 반응성 작용기들에 연결될 수 있다. 예를 들어, 반응성 작용기는 생체접합 시스템, 예컨대 SpyCatcher/SpyTag 시스템 (Reddington & Howarth (2015) *Curr. Op. Chem. Biol.* vol. 29 p94-99; W02014/176311), 또는 스트렙타비딘/비오틴의 절반일 수 있다.
- [0035] 이와 같이, 글로빈은 2차 항종양 분자를 세포, 리포솜 또는 미셀에 고정시키는 “고정 단백질”로 작용한다. 이것은 세포, 리포솜 또는 미셀의 막과 회합된 전하 변형 글로빈이 적어도 두 가지 이점을 제공한다는 것을 의미한다. 첫 번째 이점은 종양 세포 및 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀에 산소를 용이하게 전달하는 능력이다. 두 번째 이점은 2차 항종양 분자를 막에 고정시키는 능력이다. 전하 변형 글로빈이 막과 회합됨으로써, 유리하게는 2차 분자가 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀의 외부 표면에 존재한다.
- [0036] 2차 분자는 양이온화된 또는 음이온화된 단백질이 아닌 단백질일 수 있다. 전하 변형 글로빈이 막에 포매되는 경우, 2차 항종양 분자는 PCT/GB2018/052534에 기재된 바와 같이, 포매되지 않도록 위치될 수 있다.
- [0037] 2차 항종양 분자는 기술 분야 내 공지된 임의의 항종양 분자로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 2차 항종양 분자는 항체, 펩티드, 인테그린 또는 접착 분자 중 어느 하나일 수 있다. 구체적으로, 항종양 분자는 다음 중 어느 하나일 수 있다:
- [0038] (1) 종양 세포 결합 분자. 종양 세포의 표적화 및 지속적인 결합을 돕는 종양 세포 결합 분자 지속적인 결합은 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀이 일정 기간 동안 종양 세포의 영역에서 유지되도록 하여, 세포, 리포솜 또는 미셀 및 글로빈 모두가 종양 세포에 향상된 효과를 가지도록 하는데 도움을 줄 수 있다.
- [0039] (2) 체크포인트 억제제. 체크포인트 억제제는 종양의 저산소증 감소에 대한 글로빈의 효과를 보완하여 면역 체계를 회피하는 종양의 능력을 감소시키는데 도움이 되며, 이는 항종양 세포, 리포솜 및 미셀과 같은 항종양 요법을 회피하는 종양의 능력을 또한 감소시킨다.
- [0040] (3) 종양의 세포 외 기질을 리모델링하여 면역 세포가 종양 덩어리 내로 침투할 수 있도록 향상시킬 수 있는 효소.
- [0041] (4) 종양 관련 화합물을 대사하는 효소. 예를 들어, 종양은 아데노신 트라이포스페이트 대사 속도가 증가하여, 종양 미세환경에서 과량의 아데노신을 유발한다. 이는 면역 억제 효과를 야기하는 아데노신 수용체를 자극한다. 면역 세포 표면에 효소, 예컨대 아데노신 디아미나제가 존재하면 이러한 면역 억제 신호를 감소할 것이다.
- [0042] 하나의 구현예에서, 글로빈 및 2차 항암 분자는 융합 단백질 내에 포함된다.
- [0043] 글로빈은 전하 변형 글로빈이다. 글로빈은 양이온화된 또는 음이온화된 글로빈일 수 있다.
- [0044] 양이온화된 글로빈은 양이온성 또는 다가양이온성 링커를 모체 글로빈의 산성 아미노산 결사슬에 공유 결합하여 수득될 수 있다. 예를 들어, 이는 카보다이어미드 예컨대 *N*-(3-다이메틸아미노프로필)-*N'*-에틸카보다이어미드 하이드로클로라이드 (EDC) 또는 다이사이클로헥실 카보다이어미드 (DCC)의 존재하에, 상기 단백질을 *N,N'*-다이메틸-1,3-프로판다이아민 (DMPA) 또는 이의 유사체와 혼합함으로써 달성될 수 있다. 반응은 하기에 도시되어 있으며, 이는 길이가 0인 가교제 EDC (2)를 첨가하여 활성화된 *o*-아실아이스오우레아 기 (3)를 형성함으로써 산 잔기 (1)가 친핵성 공격에 대해 활성화됨을 도시한다. 친핵체 DMPA (4)는 그 다음 활성화된 카보닐을 공격하고 아이스오우레아를 제거하여 양이온화된 잔기 (5)를 형성한다. 따라서, 양이온화된 글로빈은 링커 -CH₂C(O)NCH₃(CH₂)₃N(CH₃)₂H⁺를 포함할 수 있다. DMPA 또는 이의 유사체는 EDC와 혼합하기 전 단백질에 첨가되어,

과량의 DMPA 또는 이의 유사체의 존재를 보장하고, 단백질이 서로 가교하는 것을 방지할 수 있다.



[0045]

[0046]

양이온성 링커가 단백질의 산성 아미노산 결사슬에 공유 결합하는 단계는 정전기적 커플링의 안전성을 개선하기 위해 *N*-하이드록시석신이미드 (NHS) 또는 이의 수용성 유사체 설폰-NHS의 존재하에 수행될 수 있다.

[0047]

본 발명에서, 카보다이이미드의 존재하에 단백질과 DMPA 또는 이의 유사체의 혼합 단계는 단백질 변성 및/또는 응집을 피하기 위해 제한된 시간 동안 지속될 수 있다. 이러한 제한 시간은, 예를 들어, 최대 또는 약 2 시간, 또는 최대 또는 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 또는 약 90 분일 수 있다. 택일적으로 또는 추가적으로, 카보다이이미드의 존재하에 DMPA와의 혼합 단계는 후속의 크기 배제 크로마토그래피를 거칠 수 있으며, 이 때 크로마토그래피로부터 생성물이 양이온화된 단백질로서 이용된다. 당업자는, 예를 들어 보정된 크로마토그래피 컬럼을 사용하여, 수집하기에 적절한 크로마토그래피 용출물을 결정하기 위해 바람직한 전하 변형 글로빈의 이론적인 크기를 결정할 수 있다.

[0048]

DMPA의 유사체는 *N,N'*-다이메틸헥산-1,6-다이아민 (DMHA), *N,N'*-다이메틸에틸렌다이아민 (DMEA), 3-다이메틸아미노 프로필아민 (DMPA), 에틸렌다이아민 (EN), 1,3-다이아미노프로판 (DAP), 1,4-다이아미노뷰탄 (DAB), 1,5-다이아미노프로판 (DAP), 1,6-다이아미노헥산 (DAH), 헥사메틸렌다이아민 (HMA), 1,7-다이아민헵탄 (DAH) 1,8-다이아미노옥탄 (DAO) 및 2-(2-아미노에틸)구아니딘 (AEG)일 수 있다. 다른 적합한 친핵체, 예를 들어, 하전된 친핵체가 당업자에 의해 고려될 수 있다. 예를 들어, 친핵체로는 또한 다른 1차, 2차 및 3차 알킬 다이아민과, 그리고 반대쪽 말단이 1차, 2차 또는 3차 아민을 포함하는 경우 4차 아민으로 말단화된 알킬 다이아민을 포함할 수 있다. 선형 사슬 또는 분지형 구조로서 폴리에틸렌이민과 같은 폴리알킬아민이 또한 고려된다.

[0049]

택일적으로, 정전기적으로 변형된 단백질은 단백질의 음이온화에 의해 수득될 수 있다. 이것은, 예를 들어, 다이카복시산 ($HOOC-R-COOH$)을 네이티브 단백질의 라이신 결사슬에 친핵성 첨가함으로써 달성될 수 있다.

[0050]

또 다른 대안으로, 전하 변형 글로빈은 네이티브 글로빈에 대해 변경된 전하, 특히 네이티브 글로빈과 비교하여 더욱 양의 또는 더욱 음의 전체 전하를 가지는 서열의 재조합 발현에 의해 수득될 수 있다. 재조합 변형은 재조합 발현 전하 변형 글로빈을 포함할 수 있으며, 이는 비돌연변이체 글로빈의 서열과 비교하여 전체 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 돌연변이체로서, 상기 아미노산 치환은 상이한 아미노산 전하를 네이티브 아미노산에 또는 각각의 치환 위치에 제공함으로써 네이티브 글로빈과 비교하여 전하 변형 글로빈에 상이한 표면 전하 분포를 도입한 것이다.

[0051]

예를 들어, 단백질의 3차 구조 및/또는 생물학적 활성이 크게 변경되지 않는 한, 하전되지 않은 측기를 가지는 아미노산은 (각각 전체 전하 변화가 +1 또는 -1가 되도록) 양으로 또는 음으로 하전된 측기를 가지는 아미노산으로 대체될 수 있고, 또는 음으로 하전된 측기를 가지는 아미노산은 (전체 전하 변화가 +2가 되도록) 양으로 하전된 측기를 가지는 아미노산으로 대체될 수 있고, 또는 양으로 하전된 측기를 가지는 아미노산은 (전체 전하 변화가 -2가 되도록) 음으로 하전된 측기를 가지는 아미노산으로 대체될 수 있다. 이러한 합리적인 설계 접근법은 단백질의 기능/활성이 특정 아미노산, 예를 들어 하전된 측기를 가지는 아미노산의 관여에 의존하는 경우, 사용자가 글로빈 표면 전하 변경을 중요하지 않은 아미노산 위치로 지시할 수 있기 때문에, 특히 유리할 수 있으며; 이것은 본 명세서 이외에 기재된 화학적 변형 방법으로는 항상 가능하지 않을 수 있다.

[0052]

일반적으로, 전역적(global) 수준 (또는 “전역적 서열 상동성”으로 알려짐)에서 결정된, 네이티브 글로빈과

재조합 변형된 전하 변형 글로빈 사이의 아미노산 서열 상동성은 적어도 약 60%, 예를 들어 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 약 99%이다. 전역적 수준의 서열 상동성 결정은, 예를 들어, NCBI Blast[®] 인터넷 사이트(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)를 통해 인터넷에서 이용 가능한 Needleman-Wunsch의 전역적 서열 정렬 도구(Global Sequence Alignment Tool)를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 도구로 사용자는 두 서열을 전체 범위에 걸쳐 비교할 수 있다. 글로빈이 융합 단백질의 일부인 경우, 융합 단백질의 글로빈 부분과 비교한다.

[0053] 일반적으로, 네이티브 글로빈은 자연 발생 아미노산, 예를 들어 단백질 생성 아미노산 (정규 아미노산 포함)으로부터 선택된 아미노산으로 구성된다. 단백질 생성 아미노산은 자연적인 번역 과정에 의해 단백질 내로 통합되는 아미노산이다. 전하 변형 글로빈 내에 포함될 수 있는 아미노산의 비제한적인 예시가 하기 표 1 및 표 2에 제공된다:

표 1

[0054]

알라닌	페닐알라닌	글루타민	아르기닌	셀레노시스테인
아이소류신	트립토판	세린	히스티딘	피롤라이신
류신	티로신	트레오닌	라이신	
메티오닌	아스파라긴	<i>아스파르트산</i>	글리신	
발린	시스테인	<i>글루탐산</i>	프롤린	

[0055] 표 1: 단백질 생성 아미노산의 예; 볼드체는 양으로 하전된 아미노산을 나타내고, 이탤릭체는 음으로 하전된 아미노산을 나타낸다.

[0056] 비-단백질 생성 아미노산을 포함하는 변형이 또한 고려된다. 비-자연 발생 아미노산이 또한 포함될 수 있다 (예컨대 독특한 코돈 및 상응하는 아미노아실-tRNA 시스템을 사용하여 단백질로 도입될 수 있는 아미노산).

표 2

[0057]

β 알라닌	γ 아미노뷰티르산	δ 아미노레불린산	4-아미노벤조산	아미노아이소뷰티르산
디하이드로알라닌	시스타티온	란티오닌	드젠콜산	다이아미노피멜산
α-아미노-n-뷰티르산	노르발린	노르류신	알로아이소류신	t-류신
α-아미노-n-헵탄산	피페콜산	α, β 다이아미노프로피온산	α, γ 다이아미노뷰티르산	오르니틴
알로트레오닌	호모시스테인	호모세린	β 아미노-n-뷰티르산	β 아미노아이소뷰티르산
γ 아미노-γ-뷰티르산	α-아미노아이소뷰티르산	아이소발린	사르코신	N-에틸 글리신
N-프로필 글리신	N-아이소프로필 글리신	N-메틸 글리신	N-에틸 글리신	N-에틸 알라닌
N-메틸 β 알라닌	N-에틸 β 알라닌	아이소세린	α-하이드록시-γ 아미노뷰티르산	호모노르류신
텔루로시스테인	텔루로메티오닌	시트룰린	γ 카복시글루타메이트	
하이드록시프로필	하이퓨신	파이로글루탐산		

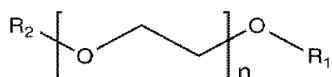
[0058] 표 2: 비-단백질 생성 아미노산의 예하나의 구체예에서, 화학적 양이온화 또는 음이온화는 추가적으로 전하를 변형시키기 위해, 재조합 발현된 전하 변형 글로빈에서 수행될 수 있다.

[0059] 재조합 기법을 사용하는 경우, 재조합 DNA 서열은 상기 기재된 바와 같이 전하 변형 글로빈 및 단백질 생성 2차 항중양 분자를 포함하는 융합 단백질을 인코딩할 수 있다.

[0060] 전하 변형 글로빈은 중합체 계면 활성제 코팅을 포함하여, 중합체-코팅된 전하 변형 글로빈을 제공할 수 있다. 이러한 작제물은 단백질의 표면에서 하전된 아미노산 잔기에 정전기적으로 복합체화된 하나 이상의 계면 활성제 분자를 가지는 전하 변형 글로빈을 포함할 수 있다. 유사한 작제물의 제조는, 예를 들어, 문헌 [Perriman et al. (2010; *Nature Chem.* vol. 2, 622-626), Brogan et al. (2013; *J. Phys. Chem. B* vol. 117, 8400-8407)]

및 Sharma *et al.* (2013; *Adv. Mater.* vol. 25, 2005-2010)]에 기재되어 있다. 컨쥬게이트는 전체 구조의 적어도 일부에, 본 명세서에 기재된 바와 같은, 양친매성 계면 활성제 코로나를 가지는 단백질이다. 이러한 코로나의 존재는 컨쥬게이트와 상응하는 네이티브 글로빈을 비교하여, 전하 및/또는 크기에서 변화를 감지할 수 있다. 질량 분석법, 제타 전위차법, 소각 X선 산란 및/또는 동적 광산란, 특히 상기 둘 이상의 조합과 같은 기법을 사용하여 이러한 변화를 감지할 수 있다.

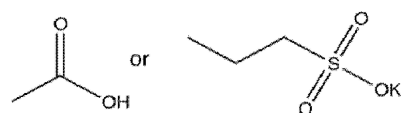
중합체-코팅된 전하 변형 글로빈은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 함유 계면 활성제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 계면 활성제는 하기 화학식 I의 일반적인 구조를 가질 수 있다:



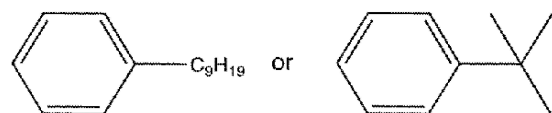
화학식 I

화학식 I에서, n은 5 내지 150을 포함하거나 그 사이의 임의의 정수, 예를 들어 8 내지 110을 포함하거나 그 사이의 임의의 정수일 수 있다. 예를 들어, n은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 또는 110일 수 있다.

R_1 은 다음일 수 있다:

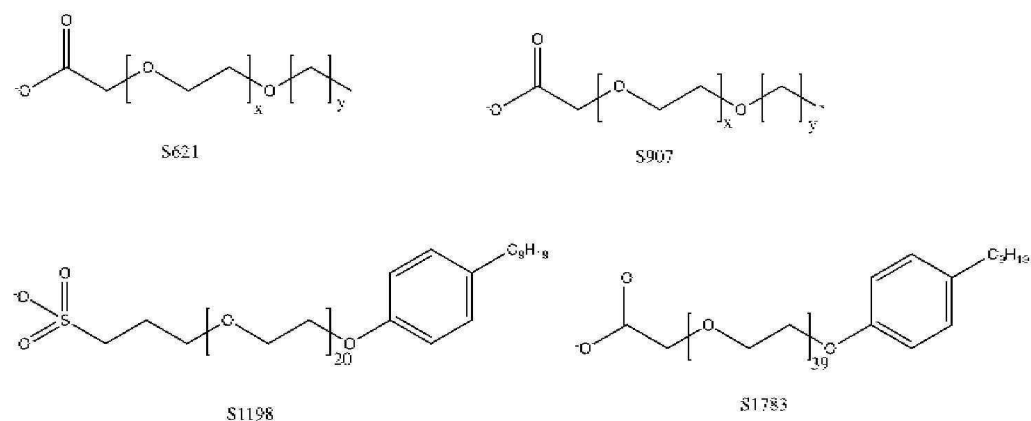


R_2 는 $C_xH_{2(x+1)}$ 일 수 있되, 여기서 x 는 8-18을 포함하거나 그 사이의 임의의 정수이고; 예를 들어, $x = 11, 12$ 또는 13일 수 있다. R_2 는 또한 8-18 개의 탄소 원자, 예를 들어 11, 12 또는 13 개의 탄소 원자를 가지는 불포화 탄화수소일 수 있다. 추가적인 대안으로, R_2 는 다음일 수 있다:



계면 활성제는 본 명세서에 기재된 것 중 하나, 예컨대 S621 (Sigma-Aldrich 카탈로그 번호 463221), S907 (Sigma-Aldrich 카탈로그 번호 463256), S1198 (Sigma-Aldrich 카탈로그 번호 473197), 또는 S1783 (글리콜산 에톡실레이트 4-노닐페닐 에터의 산화된 형태, Sigma-Aldrich 카탈로그 번호 238678)일 수 있다.

이러한 음이온성 계면 활성제는 다음의 구조를 가진다:



S621 및 S907의 경우 $x = 11-13$

S621의 경우, $y=7-9$

S907의 경우, $v=14-15$

[0075] 분자량 및 다분산도는 질량 분석법에 의해 측정되었으며 다음과 같은 것으로 나타났다:

[0076] 표 3 - 계면 활성제의 분자량 및 다분산도

표 3

[0077]

명칭	MWt	PDi (D_M)
S621	621	1.05
S907	907	1.06
S1198	1198	1.03
S1783	1997	1.12

[0078] “다분산도”는 반응으로부터 생성된 합성 중합체가 본질적으로 엔트로피적인 중합 공정으로부터 발생하는 분자량 분포를 가진다는 사실을 반영한다. 분산의 정도는 반응 메커니즘 및 반응 조건 모두에 의존한다. 이러한 분산의 정도는 다분산성 (D)으로 정의되며, 현재까지 “다분산도”로서 알려져 있다. 이는 다음의 식에 의해 정의된다:

[0079] $D_M = M_w/M_n$

[0080] 여기서 M_w 는 중량-평균 몰 질량이고 M_n 은 수평균 몰 질량이다.

[0081] 중합체의 다분산성은 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 비행 시간형 질량분석법 (MALDI-TOF)을 사용하여 추정될 수 있다.

[0082] 단백질-중합체 계면 활성제 컨쥬게이트는 분자량이 적어도 약 500 Da, 예를 들어, 적어도 약 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, 3000, 3200, 3400, 3600, 3800 또는 적어도 약 4000 Da인 계면 활성제를 포함할 수 있다

[0083] 단백질-중합체 계면 활성제 컨쥬게이트는 S1783 (즉, 산화된 글리콜산 에톡실레이트 4-노닐페닐 에터)인 계면 활성제를 포함할 수 있다. 택일적으로 또는 추가적으로, 단백질-중합체 계면 활성제 컨쥬게이트는 양이온성 계면 활성제, 예를 들어, PEG-15 수소화 탈로우메틸알루미늄 클로라이드 (Ethoquad[®] HT25로 판매)를 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 세포, 리포솜 또는 미셀은 적어도 하나의 추가적인 성분, 예를 들어, 물, 완충액, 하기 기재된 바와 같이 약제학적 조성물을 형성하기 위해 요구되는 하나 이상의 성분을 포함하는 복합 조성물 내에 존재할 수 있다.

[0085] 제2 양태에 따르면, 본 발명은 제1 양태에 따른 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀을 포함하며, 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 비히클을 추가로 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0086] 제3 양태에 따르면, 본 발명은 암의 치료에 사용하기 위한, 제1 양태에 따른 세포, 리포솜 또는 미셀, 또는 제2 양태에 따른 약제학적 조성물을 제공한다.

[0087] 본 명세서 전반에 걸쳐 언급되는 용어 “약제학적 조성물”은 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 비히클을 포함하는 조성물일 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 언급되는 약제학적 조성물은 수성 또는 유지성 현탁액, 또는 비독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 현탁액일 수 있는, 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 수성 현탁액은, 예를 들어, 만니톨, 물, 링거 용액 또는 등장성 소듐 클로라이드 용액에서 제조될 수 있다. 택일적으로, 포스페이트 완충 식염수에서 제조될 수 있다. 유지성 현탁액은 합성 모노글리세라이드, 합성 다이글리세라이드, 지방산 또는 네이티브의 약제학적으로 허용되는 오일에서 제조될 수 있다. 지방산은 올레산 또는 올레산 글리세라이드 유도체일 수 있다. 네이티브의 약제학적으로 허용되는 오일은 올리브 오일, 캐스터 오일, 또는 폴리옥실에틸화 올리브 오일 또는 캐스터 오일일 수 있다. 유지성 현탁액은 예를 들어, Ph. Eur. 및/또는 Ph. Helv에 따른 장쇄 알코올 희석제 또는 분산제를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 본 발명의 인지질 조성물 이외에도 하나 이상의 약제학적 또는 생물학적 활성제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 종래의 약물, 항체 또는 다른 단백질 성분과 같은 치료제를 포함할 수 있다.

[0088] 제4 양태에 따르면, 본 발명은 제1 양태에 따른 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 a) 전하 변형 글로빈을 제공하는 단계; 및 b) 항종양 세포, 리포솜 또는 미셀을 상기 글로빈과 접촉시키

는 단계를 포함한다.

- [0089] 본 발명의 제4 양태에 따른 방법에서 세포가 사용되는 경우, 단계 (b)는 적어도 약 1 °C의 온도에서 적어도 약 2 분 동안, 예를 들어 적어도 약 10 °C의 온도에서 적어도 약 2 분 동안 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 온도는 일반적으로 약 30-40 °C, 예를 들어 약 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 약 40 °C, 예를 들어 약 37 °C ± 약 1 °C일 수 있다. 택일적으로, 특정 세포, 리포솜 또는 미셀은 저온, 예컨대 1-8 °C, 2-7 °C 또는 3-6 °C, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 약 8 °C에서 처리하는 것이 유리하다. 기간은 일반적으로 2-60 분, 예를 들어 약 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 또는 약 60 분, 예를 들어 약 15, 약 20 또는 약 30 분일 수 있다. 단계는 약 0-10% CO₂, 예를 들어, 약 5% CO₂의 대기에서 수행될 수 있다. 리포솜 또는 미셀이 사용되는 경우, 단계 (b)는 <1% CO₂, 예를 들어, 공기 중의 실온 (예를 들어, 약 15 °C 내지 약 25 °C)에서 수행될 수 있다.
- [0090] 본 발명의 제4 양태에 따른 방법의 단계 (b)는 선택적으로 예를 들어 포스페이트 완충 염수 (PBS)와 같은 완충액을 사용하는 (c) 세포, 리포솜 또는 미셀의 세척 단계, 예를 들어 2 개 이상의 세척 단계가 뒤따를 수 있다. 당업자는 필요에 따라 이러한 단계를 적용하고, 세척 단계가 바람직한 경우를 결정할 수 있다.
- [0091] 단계 (a)는 중합체 계면 활성제가 글로빈과 정전기적 컨쥬게이션 할 수 있는 조건 하에서 전하 변형 글로빈 및 중합체 계면 활성제를 제공하는 것을 포함할 수 있다. 계면 활성제는 고체 또는 액체 형태로 첨가되어 글로빈 용액을 형성할 수 있다. 계면 활성제는 단백질 상의 양이온성 부위당 0.5-5 몰의 계면 활성제와 양으로, 예를 들어, 단백질 상의 양이온성 부위당 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 약 3.0 몰 계면 활성제와 동일한 양으로 첨가될 수 있다. 단백질은 CoCl₂의 존재 여부와 관계 없이 HEPES 완충액과 같은 적합한 완충액이 있는 용액, 또는 Tris-HCl 완충액에 있을 수 있다. 적절한 완충액의 선택은 당업자의 일상적인 능력 내에 있다. 조건은 pH 5 내지 8, 예를 들어 약 5, 6, 7 또는 약 8 (5.1 내지 5.9, 6.1 내지 6.9, 및 7.1 내지 7.9 사이의 임의의 개별적인 중간 pH 값 포괄)을 포함할 수 있으며, 0-30 시간 동안, 예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 약 12 시간 동안, 0-25 °C의 온도, 예를 들어 약 4 °C에서 또는 약 실온에서 혼합물의 교반을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Armstrong et al. (*Nat. Commun.* (2015) Jun 17;6:7405)]에 기재된 컨쥬게이션 조건이 적합할 수 있다.
- [0092] “양이온성 부위”는 양으로 하전된 결사슬을 갖거나 또는 양이온성 (즉, 양으로 하전된) 링커를 포함하는 아미노산을 가지는, 단백질의 아미노산 서열 내의 위치이다. 글로빈 내의 양이온성 부위의 수는 당업자에 의해 본 발명의 기술을 사용하지 않고 결정될 수 있다.
- [0093] 계면 활성제는 폴리에틸렌 글리콜을 포함할 수 있으며, 이는, 예를 들어, 분자량이 적어도 약 500 Da, 예를 들어, 적어도 약 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, 3000, 3200, 3400, 3600, 3800 또는 적어도 약 4000 Da일 수 있다. 계면 활성제는 완충액에 5-50 mg/mL의 농도, 예를 들어, 약 10, 15, 20, 25, 또는 약 30 mg/mL의 농도로 존재할 수 있다.
- [0094] 계면 활성제는 S1783 (즉, 산화된 글리콜산 에톡실레이트 4-노닐페닐 에터)일 수 있다. 택일적으로, 계면 활성제 컨쥬게이트 양이온성 계면 활성제, 예를 들어, PEG-15 수소화 탈로우모뎀 클로라이드 (Ethoquad[®] HT25로 판매)를 포함할 수 있다.
- [0095] 전하 변형 글로빈은, 상기 기재된 바와 같이, 계면 활성제와 접촉하기 전에, 2차 항중량 분자에 연결될 수 있다.
- [0096] 단계 (a)는 세포, 리포솜 또는 미셀이 글로빈과 접촉하는 단계 이전에, 완충액 교환 단계를 또한 포함할 수 있다. 완충액 교환 단계는 양이온화된 또는 음이온화된 단백질이 계면 활성제와 접촉하는 단계의 생성물의 스핀 농축을 포함할 수 있다. 택일적으로, 완충액 교환 단계는 투석 단계를 포함할 수 있다. 이러한 방법은 당업자의 일상적인 능력 내에 있다.
- [0097] 전하 변형 글로빈 네이티브 글로빈에서 전하를 화학적으로 변형시킴으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, 적어도 하나의 산성 아미노산 결사슬은 -CH₂C(O)NCH₃(CH₂)₃N(CH₃)₂H⁺ 링커를 포함할 수 있다. 이것은 N-(3-다이메틸아미노프로필)-N'-에틸카보다이이미드 하이드로클로라이드 (EDC)의 존재하에, N,N'-다이메틸-1,3-프로판다이아민 (DMPA) 또는 이의 유사체의 용액이 네이티브 글로빈 (상기 정의)과 혼합되는 방법에 의해 달성될 수 있다. DMPA의 유사체는 N,N'-다이메틸헥산-1,6-다이아민 (DMHA), N,N'-다이메틸에틸렌다이아민 (DMEA), 3-다이메틸아미노

프로필아민 (DMPA), 에틸렌다이아민 (EN), 1,3-다이아미노프로판 (DAP), 1,4-다이아미노бут란 (DAB), 1,5-다이아미노프로판 (DAP), 1,6-다이아미노헥산 (DAH), 헥사메틸렌다이아민 (HMA), 1,7-다이아미노헵탄 (DAH) 1,8-다이아미노옥탄 (DAO) 및 2-(2-아미노에틸)구아니딘 (AEG)일 수 있다. 다른 적합한 친핵체, 예를 들어, 하전된 친핵체가 당업자에 의해 고려될 수 있다. 예를 들어, 친핵체로는 또한 다른 1차, 2차 및 3차 알킬 다이아민과, 그리고 반대쪽 말단이 1차, 2차 또는 3차 아민을 포함하는 경우 4차 아민으로 말단화된 알킬 다이아민을 포함할 수 있다. 선형 사슬 또는 분지형 구조로서 폴리에틸렌아민과 같은 폴리알킬아민이 또한 고려된다.

- [0098] 그러므로, 글로빈 (즉, 전하 변형 글로빈 전구체)는 다음의 단계를 포함하는 방법에 의해 전하 변형 글로빈으로 전환될 수 있다:
- [0099] i) 글로빈 용액을 N,N'-다이메틸-1,3-프로판다이아민 (DMPA) 또는 이의 유사체의 pH-중성화된 용액과 혼합하고, 선택적으로 혼합물을 pH 5-7로 조정하는 단계;
- [0100] ii) 후속적으로 또는 동시에 N-(3-다이메틸아미노프로필)-N'-에틸카보다이이미드 하이드로클로라이드 (EDC)와 같은 카보다이이미드를 첨가하고, 혼합물을 pH 4-7로 조정하는 단계;
- [0101] iii) (ii)로부터의 혼합물을 0-25 °C의 온도에서 pH 4-7에서 1-30 시간 동안 교반하는 단계;
- [0102] iv) pH 6.5-8.5에서 적어도 4 시간 동안 물 또는 완충액에 대해 (iii)으로부터의 혼합물 중 단백질을 투석하는 단계;
- [0103] v) 필요한 경우, (iv)로부터의 혼합물의 pH를 pH 6.5-8.5로 조정하는 단계.
- [0104] 상기 방법에서, 단계 (iii)가 약 120 분 이하, 예를 들어, 약 90 분 이하 동안 지속되고; 및/또는 상기 방법이 단계 (iv)로부터의, 또는 존재하는 경우 단계 (v)로부터의 혼합물에서 크기 배제 크로마토그래피를 수행하고, 요구되는 분자량의 전하 변형 글로빈을 포함하는 용리액을 수득하는 단계 (vi)를 추가적으로 포함한다. 이러한 제한 중 하나 또는 둘 모두는 상기 방법이 단백질 변성 및/또는 응집을 감소시키거나 또는 방지하도록 제어되는 것을 보장한다.
- [0105] 단계 (i)에서 사용되는 네이티브 글로빈 용액은 임의의 종래의 완충액, 예를 들어, HEPES으로 제조될 수 있다. 네이티브 글로빈은 DMPA와 DMPA의 몰 : 단백질의 음이온 부위의 수의 비율이 100:1 - 400:1으로, 예를 들어, 약 100:1, 150:1, 200:1, 250:1, 또는 약 300:1으로 혼합된다. EDC는 EDC의 몰 : 단백질의 음이온 부위의 수의 비율이 30:1 - 60:1, 예를 들어, 약 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 40:1, 45:1 또는 약 50:1의 비율로 첨가된다.
- [0106] “음이온성 부위”는 음으로 하전된 결사슬을 가지는 아미노산을 가지는 단백질의 아미노산 서열 내의 위치이다. 글로빈 내의 음이온성 부위의 수는 당업자의 일상적인 능력을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0107] 단계 (ii)는 단계 (i)와 동시에 완료될 수 있으며, 즉, 단백질 용액, DMPA 및 EDC가 동시에 혼합될 수 있다. 단계 (ii)가 단계 (i) 이후에 완료되는 경우, 단계 (ii)는 상기 정의된 바와 같은 단일 단계이고 단계 (iii)가 바로 이어질 수 있거나, 또는 2 단계로 세분화 될 수 있는데, 단계 (iia)에서 EDC의 일부가 단계 (i)로부터의 혼합물에 첨가되고 혼합물을 0-25 °C의 온도에서 약 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 약 8 시간 동안 교반하고, 이어서 단계 (iib)에서 추가적인 EDC가 (iia)로부터의 혼합물에 첨가되고 교반을 지속하고; 단계 (iib) 다음에 단계 (iii)가 이어진다.
- [0108] 단계 (iii)에서 요구되는 교반은 교반(stirring)과 같은 임의의 종래의 수단에 의해 달성될 수 있으며, 예를 들어, pH는 약 4, 약 5, 약 6 또는 약 7 (pH 4.1 내지 4.9, 및 5.1 내지 5.9, 및 6.1 내지 6.9 사이의 임의의 중간 값 포함)일 수 있다. 단계 (iii)의 기간이 120 분을 초과하는 경우, 약 20-30 시간, 예를 들어, 약 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 약 30 시간, 예를 들어 약 24 시간 동안 지속될 수 있다. 모든 단계는, 예를 들어, 약 실온, 예를 들어, 18-23 °C에서 수행될 수 있거나, 또는 약 4 °C에서 수행될 수 있다.
- [0109] 당업자는 후속의 크기 배제 크로마토그래피 단계 존재 여부와 관계없이, 일정 시간 범위 동안 단계 (iii)를 수행하고 글로빈 활성 보유를 테스트함으로써 단계 (iii)에 대한 적절한 기간을 결정하여, 단계 (iii)에 대한 최적의 기간을 결정할 수 있다.
- [0110] 대안의 일반적인 방법에서, 중합체 계면 활성제-코팅된 전하 변형 글로빈은 기재된 바와 같은 음이온화된 글로빈인 전하 변형 글로빈을 양이온성 계면 활성제인 계면 활성제와 접촉시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 글로빈은 다이카복시산 (HOOC-R-COOH)을 네이티브 단백질의 라이신 결사슬에 친핵성 첨가함으로써 음이온화된

수 있다.

- [0111] 상기 변형에 대해 택일적으로 또는 추가적으로, 전하 변형 글로빈은 전하 변형 글로빈을 인코딩하는 재조합 DNA 서열의 발현을 포함하는 방법에 의해 획득될 수 있다. 예를 들어, 전하 변형 글로빈은 전하 변형 단백질을 인코딩하는 재조합 DNA 서열의 발현을 포함하는 방법에 의해 획득될 수 있다. 생성된 단백질은, 전하 변형 글로빈이며, 이는 후속적으로 분리될 수 있다.
- [0112] 예를 들어, 전하 변형 글로빈의 제조는, 단백질의 3차 구조 및/또는 생물학적 활성이 크게 변경되지 않는 한, 하전되지 않은 측기를 가지는 아미노산을 하전된 측기를 가지는 아미노산으로 치환, 또는 하전된 측기를 가지는 아미노산을 반대 전하를 가지는 측기로 치환을 포함할 수 있다. 이러한 단백질의 기능/활성이 아미노산, 예를 들어 하전된 측기를 가지는 아미노산의 관여에 의존하는 경우, 사용자가 단백질 표면 전하 변경을 중요하지 않은 아미노산 위치로 지시할 수 있기 때문에, 특히 유리할 수 있다.
- [0113] 일반적으로, 전역적 수준 (또는 “전역적 서열 상동성”으로 알려짐)에서 결정된, 재조합 변형된 단백질 (즉, 전하 변형 글로빈)과 네이티브 단백질 사이의 아미노산 서열 상동성은 적어도 약 60%, 예를 들어 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 약 99%이다. 전역적 수준의 서열 상동성 결정은, 예를 들어, NCBI Blast[®] 인터넷 사이트(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 통해 인터넷에서 이용 가능한 Needleman-Wunsch의 전역적 서열 정렬 도구를 사용하여 수행될 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 기능적으로 중요한 도메인의 서열 상동성은 전하 변형 글로빈과 네이티브 글로빈 사이에서 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 약 99% 동일할 수 있다.
- [0114] 재조합 DNA 서열은 당업자의 일상적인 능력에 따라, 예를 들어, E. coli에서의 발현과 같은 임의의 발현 시스템을 사용하여 임의의 일상적인 방법에 따라 발현될 수 있다. 발현 시스템으로부터 발현된 고정 단백질의 분리는 또한 당업자의 일상적인 능력 내에 있다.
- [0115] 제5 양태에 따르면, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게, 제1 양태에 따른 세포, 리포솜 또는 미셀의 투여, 또는 제2 양태에 따른 약제학적 조성물의 투여를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0116] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 제3 또는 제5 양태의 암은 고형 종양 암이다. 특히, 암은 다음으로부터 선택될 수 있다: 유방암, 결장암, 전립선암, 폐암, 위암, 간암, 식도암, 자궁경부암, 또는 췌장암. 이것이 가장 자주 발생하는 고형 종양 암이다. 보다 구체적으로, 암은 ICD-10 버전:2016 (국제 질병 분류, 10차 개정판, 세계 보건 기구 발행, icd.who.int/browse10/2016/en) 코드 C00-C75.9로부터 선택될 수 있다.
- [0117] 제6 양태에 따르면, 본 발명은 서열 번호: 1-12 중 어느 하나 또는 서열 번호: 1-12 중 어느 하나와 적어도 약 60% 서열 상동성을 가지는 어느 하나의 기능적 변이체를 포함하는 전하 변형 글로빈을 제공한다. 예를 들어, 전하 변형 글로빈은 서열 번호: 1-12 중 어느 하나와 적어도 약 65%, 예를 들어 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 약 99% 서열 상동성을 가질 수 있다. 전하 변형 글로빈은 선택적으로 더 큰 작제물, 예컨대 용해 단백질의 일부를 형성할 수 있다.
- [0118] 본 명세서 및 청구범위 전반에 걸쳐, “포함하다(comprise 및 contain)” 용어의 변이체, 예를 들어 “포함하는(comprising)” 및 “포함하다(comprises)”는, “포함하지만 이에 제한되지 않는다”는 것을 의미하며, 다른 성분, 정수 또는 단계를 제외하는 것이 아니다. 더욱이 문맥에서 달리 요구하지 않는 한 단수는 복수를 포함한다; 특히 부정 관사가 사용되는 경우, 명세서는 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 단수뿐만 아니라 복수도 고려하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0119] 본 발명의 각 양태의 바람직한 특징은 임의의 다른 양태와 관련하여 기재된 바와 같을 수 있다. 본 출원의 범위 내에서, 선행하는 문단, 청구범위 및/또는 다음의 명세서 및 도면에 설명된 다양한 양태, 구현예, 실시예 및 대안, 그리고 특히 이의 개별적인 특징이 독립적으로 또는 임의의 조합으로 취해질 수 있는 것으로 명백하게 의도된다. 즉, 모든 구현예 및/또는 임의의 구현예의 특징은 이러한 특징이 양립할 수 없는 경우가 아니면 임의의 방식으로 및/또는 조합으로 조합될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0120] 본 발명의 특정 구현예는, 오직 예시를 위해, 첨부하는 도면을 참조하여 설명될 것이며, 여기서:
- 도 1은 단백질 없이, 네이티브 미오글로빈 (nMyo)으로, 양이온화된 미오글로빈 (Cat Myo)으로, 컨쥬게이션된 양이온화된 미오글로빈 (Con Myo)으로, 초하전 GFP (scGFP) 및 컨쥬게이션 초하전 GFP (Con scGFP)으로 라벨링

절차를 거친, 인간 Jurkat T 세포 (a 및 c) 또는 쥐 T 세포 (b 및 d)에 적용된 형광 활성화된 세포 분류 (FACS) 분석의 결과를 도시한다. Jurkat T 세포를 CD3의 발현에 대해 게이팅한 다음, 미오글로빈 및 GFP (a) 또는 GFP 형광 (c)에 존재하는His-Tag 표면 제시를 위해 염색한 세포 백분율에 대해 게이팅하였다. 쥐 T 세포를 CD8의 발현에 대해 게이팅한 다음, 미오글로빈 및 GFP (b) 또는 GFP 형광 (d)에 존재하는His-Tag 표면 제시를 위해 염색한 세포 백분율에 대해 게이팅하였다. 모든 데이터는 대표적인 데이터 플롯 (삽입) 및 차트 (평균 % $\pm$ SD 표시, n=4)로 나타낸다.

도 2는 Aqua 세포 생존력 염료로 염색된 (도 1에 기재된 라벨링 절차를 거친) 인간 Jurkat T 세포 (a) 및 쥐 T 세포 (b)에 적용된 FACS 분석의 결과를 도시하며, 이는 CD3 (a) 또는 CD8 (b)의 발현에 대해 게이팅하였고, Aqua 생세포의 백분율은 평균 % $\pm$ SD, n=4로 계산하였다; 삽입된 대표적인 데이터 플롯, 차트로 나타낸 처리된 데이터.

도 3은 (a) 단백질 없이, 네이티브 미오글로빈으로, 양이온화된 미오글로빈으로, 및 컨쥬게이션된 양이온화된 미오글로빈으로, 또는 (b) 단백질 없이, scGFP으로, 및 컨쥬게이션된 scGFP으로 라벨링 절차를 거쳐, 0 μ M, 1 μ M 또는 10 μ M 동축 펄타이드로 펄스된 CIR 항원 제시 세포에 대한 반응으로 CD69의 상향 조절에 대해 분석된, T 세포 수용체 형질전환 인간 Jurkat T 세포 (a 및 b)에 적용된 FACS 분석이 결과를 도시한다.

도 4는 CTV으로 염색한 다음, 정상 산소 (정사각형) 또는 저산소 (원형) 조건하에서 항-CD3, 항-CD28 및 IL-2의 존재하에 4 일 동안 활성화된 (도 1에 기재된 라벨링 절차를 거친) 쥐 T 세포의 결과 (a 및 b), 및 CD4 발현 하위 유형 (a 및 c) 및 CD8 발현 하위 유형 (b 및 d)의 T 세포에 의해 분리된, 높은 CD44 발현 수준에 대해 테스트된 (c 및 d) 정상 산소 (정사각형) 또는 저산소 (원형) 조건하에서 활성화된 쥐 T 세포의 결과를 도시하며, 결과는 대표적인 플롯 (삽입) 및 차트 (평균 % $\pm$ SD, n=4)으로 나타낸다.

도 5는 (a) Jurkat T-세포 상의 계면 활성화제-컨쥬게이션 초하전 미오글로빈 (Myo14[S])의 라벨링 효율, Myo14[S]-코팅된 (b) Jurkat T-세포 및 (c) 활성화된 CD8+ 쥐 T-세포의 생존력, (d) 코팅 후 제3일 및 제5일에 쥐 T-세포의 세포 계수 대 코팅되지 않은 대조군 (U/T), (e) 코팅 후 제3일 및 제5일에 분열된 CD8+ 쥐 T-세포의 백분율, 및 (f) 코팅된 Jurkat T-세포 대 코팅되지 않은 대조군 (처리되지 않음)의 CD69 활성화 수준을 도시한다.

도 6은 (a) 계면 활성화제-컨쥬게이션 초하전 미오글로빈 (Myo14[S])-코팅된 CD8+ 쥐 T-세포 대 코팅되지 않은 대조군 (U/T) 상의 소진 마커의 수준, (b) 0.5% O₂에서 Myo14[S]-코팅된 및 코팅되지 않은 Jurkat T-세포 (처리되지 않음)에 대한 저산소증-감응성 염료의 시간에 따른 형광 변화, 및 (c) Myo14[S] 및 인터페론 감마를 가지거나 가지지 않는 인간 중간엽 줄기 세포의 염증 마커의 생존력 및 수준을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0121]

실시에 - 재료 및 방법

[0122]

Myo14 발현

[0123]

Myo14는 일상적인 방법을 사용하여 전기천공법에 의해 적절한 Myo14 유전자를 포함하는 플라스미드로 형질전환된 BL21(DE3) *E. coli* 세포에서의 발현에 의하여 획득하였다. 요약하여, 단일 콜로니를 선택하고 스타터 배양을 위해 10mL의 LB 배지에 넣고 37 °C에서 밤새 인큐베이션하고 180 RPM에서 진탕하였다. 스타터 배양물을 사용하여 2.5 L 배양 플라스크에서 0.02% 글루코스 및 50 mg $\cdot$ L⁻¹ 카바니실린이 보충된 1 L의 TB 배지를 접종하였다. 그 후 배양 플라스크를 37 °C, 200 RPM에서 인큐베이션한다. TB가 600 nm에서 0.7-1.0의 최적의 밀도에 도달하면, 1 mM IPTG으로 단백질 발현을 유도한다. 4 시간 후, 발현 배양물을 4 °C에서 20 분 동안 4500 $\times$ g에서 원심 분리하여 세포를 펠릿화한다. 상등액은 버리고 펠릿은 냉동 보관하거나 즉시 사용할 수 있다.

[0124]

Myo14 정제

[0125]

pH 7.0에서 20 mM HEPES, 1 M NaCl을 포함하는 용해 완충액을 Myo14 펠릿에 첨가하고, 펄스 초음파 처리를 사용하여 용해하고, 일상적인 방법을 사용하여 원심분리기에서 정화하였다. 그 다음, Myo14 말토스 결합 단백질 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제하고, 완전히 무산소 환경의 실온에서 밤새 TEV 프로테아제로 말토스 결합 단백질을 절단한다. 최종적으로 생성된 절단 생성물을 일상적인 방법을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피로 연마한다.

- [0126] 작제물의 제조
- [0127] 화학적으로 전하 변형된 미오글로빈, 즉 양이온화된 미오글로빈을 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)카보다이이미드 하이드로클로라이드 (EDC) 매개 반응을 통해, 산 잔기를 N,N-다이메틸-1,3-프로판다디아민 (DMPA)로 공유적 변형함으로써 제조하였다. 2-(N-모폴리노)에탄설포산 (MES) 완충액 중의 미오글로빈 용액을 DMPA의 pH-중성화 용액에 미오글로빈의 산성 잔기 몰당 300 몰 DMPA 비율로 첨가하였다. 용액의 pH를 pH 5.5-6.0로 조정하였다. EDC를 미오글로빈의 산성 잔기 몰당 50 몰 EDC의 비율로 첨가하고, 4 °C에서 밤새 교반하도록 두었다. 생성된 용액을 탈염 컬럼을 통해 탈염하여 부생성물을 제거하고, 스핀 농축하고 새로운 완충액으로 희석하여 최소 100 만배 희석을 달성하거나, 또는 새로운 완충액에 대해 투석하였다.
- [0128] 계면 활성제-컨쥬게이션된 양이온화된-미오글로빈, 즉 컨쥬게이션된 미오글로빈을 음이온성 계면 활성제를 양이온화된 미오글로빈의 용액에 첨가하여 제조하였다. 계면 활성제는 글리콜산 에톡실레이트 4-노닐페닐 에터의 산화된 형태 (S1783, 상기 기재된 바와 같음)이었고, 계면 활성제 미오글로빈의 양으로 하전된 잔기 몰당 1 몰의 계면 활성제의 비율로 첨가하였다. 계면 활성제는 고체 형태로, 또는 적절한 완충액에 사전-용해된 형태로 첨가될 수 있다.
- [0129] 제조합 전하 변형 ("초하전") 미오글로빈은 상업적인 공급원으로부터 상응하는 DNA를 주문하기 전, 미오글로빈의 아미노산 서열을 변경하여 제조하였다. 제1 돌연변이체 (서열 번호 1)는 양이온화된 미오글로빈에 DMPA를 첨가하여 변형되는 단백질체 분석에 의해 발견된 위치에 라이신 잔기를 혼입하도록 변형하였다. Max 돌연변이체 (서열 번호 2)는 모든 산 잔기를 라이신 잔기로 교환하도록 변형하였다. 극성화된 돌연변이체 (서열 번호 3)는 양의 잔기가 글루탐산으로 변형된 C-말단의 10 Å 반경 내를 제외하고, 미오글로빈의 표면에 라이신 잔기를 혼입하도록 변형하였다. ROSETTA 돌연변이체 (서열 번호 4)는 ROSIE 웹 서비스 (rosie.graylab.jhu.edu)에서 ROSETTA 알고리즘에 의해 제안된 돌연변이를 혼입하도록 변형하였다. AVNAPSA 돌연변이체 (서열 번호 5)는 ROSIE 웹 서비스에서 AVNAPSA 알고리즘에 의해 제안된 돌연변이를 혼입하도록 변형하였다. TaB 돌연변이체 (서열 번호 6)는 수소 결합 또는 정전기적 상호 작용이 없이 표면 접근 가능한 위치에 라이신 또는 아르기닌 잔기를 혼입하고, 평균 B-인자보다 B-인자에 높은 PDBID 3RKG의 결정 구조로부터 표준 편차 1을 더한 것으로 변형하였다. 컨센서스 B 모델 (서열 번호 7)은 TaB 돌연변이체에서 설계하였지만, 임의의 상동체에서 돌연변이가 발견되지 않은 잔기에 대한 돌연변이를 제외하였다. Myo7 (서열 번호 8)는 밀접하게 관련된 종의 여러 상동체에서 발견되는 양으로 하전된 잔기를 포함하도록 변형하였고, 나머지 서열의 염기로서 사용하였다. Myo14 (서열 번호 9)는 구조 검사에 의해 표면 접근 가능한 것으로 결정된 잔기를 포함하도록 변형하였다. cMyo9 (서열 번호 10), cMyo14 (서열 번호 11) 및 cMyo15 (서열 번호 12)는 더욱 낮은 빈도 및/또는 더욱 먼 관련 (distantly related) 종으로부터 유래한 Myo7 (서열 번호 8)보다 연속적으로 더 많은 돌연변이를 포함하도록 변형하였다.
- [0130] 쥐의 비장 및 림프절 (mTc)로부터 정제된 TCR 형질전환 Jurkat T 세포 (jTc) 또는 CD3+ T 세포를 양이온화, 컨쥬게이션 또는 네이티브 미오글로빈 또는 GFP 또는 컨쥬게이션 초하전 GFP와 함께 20 분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 3 회 세척하고, 3 가지의 상이한 실험에서 생존력, 활성화 및 증식에 대해 분석하였다.
- [0131] Myo14[S]으로 T 세포를 테스트하기 위해, TCR 형질전환 Jurkat T 세포 (jTc) 또는 CD3+ T 세포를 사용하고, 쥐의 비장 및 림프절 (mTc)로부터 정제하였다. T 세포를 Myo14[S]으로 또는 미처리하여 (U/T) 37 °C에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 2 회 세척하고 Myo14[S]에 대해 코팅, 생존력, 표현형, 활성화, 저산소증에 대한 저항성 및 증식을 분석하였다.
- [0132] 컨쥬게이트 코팅 및 생존력 분석
- [0133] jTc를 배양물에서 수확하고 PBS으로 1 회 세척한 다음, 37 °C에서 20 분 동안 PBS에서 단백질 미함유 또는 3 μM 컨쥬게이션 초하전 GFP (con-scGFP), 3 μM 초하전 GFP (scGFP), 10 μM의 네이티브 미오글로빈 (nMyo), 10 μM의 양이온화된 미오글로빈 (Cat Myo) 또는 10 μM 컨쥬게이션된 미오글로빈 (Con Myo)과 함께 인큐베이션하였다. 코팅된 jTc를 PBS에서 3회 세척하고, 웰당 100 μl에서 1×10^6 jTc으로 PBS에 재현탁하고, 4 °C에서 30 분 동안 αCD3-AF594 (Biolegend, Cat No. 300446), αHIS-TAG-APC (Biolegend, Cat No. 362605) 및 Aqua (Invitrogen, Cat No. L34957)으로 염색하였다. 염색된 세포를 PBS로 2 회 세척하고 Fortessa X20 세포측정기를 사용하여 분석하였다.
- [0134] 제조업체의 지침에 따라 Dyna-비드 음성 선별 키트 (ThermoFisher, Cat No. 11413D)를 사용하여 전체 T 세포 (mTc)를 정제 1 마리의 Balb-c 암컷 쥐의 비장 및 림프절로부터 정제하였다. mTc를 PBS으로 1 회 세척한 다음,

37 °C에서 20 분 동안 PBS에서 단백질 미함유 또는 3 μM 컨쥬게이션 초하전 GFP (Con scGFP), 3 μM 초하전 GFP (scGFP), 10 μM의 네이티브 미오글로빈 (nMyo), 10 μM의 양이온화된 미오글로빈 (Cat Myo) 또는 10 μM 컨쥬게이션된 미오글로빈 (Con Myo)과 함께 인큐베이션하였다. 코팅된 mTc를 PBS으로 3 회 세척하고, 웰당 100 μl에서 1×10^6 mTc으로 PBS에서 재현탁하고, 4 °C에서 30 분 동안 αCD3-AF700 (Biolegend, Cat No. 152316), αCD4-BV785 (Biolegend, Cat No. 100552), αCD8-APCef780 (Invitrogen, Cat No. 47008182), αHIS-TAG-APC (Biolegend, Cat No. 362605) 및 Aqua (Invitrogen, Cat No. L34957)으로 염색하였다. 염색된 세포를 PBS로 2 회 세척하고 Fortessa X20 세포측정기를 사용하여 분석하였다.

[0135] Jurkat T 세포 활성화 분석

[0136] TCR 형질전환 Jurkat T 세포 (jTc)는 MHC 클래스 I HLA-A2로 제시되는 경우 동족 펩타이드를 인식하는 T 세포 수용체 (TCR)로 형질 도입된 Jurkat T 세포이다. 이의 동족 펩타이드에 의해 자극되는 경우 CD69의 발현이 증가하고 T 세포 활성화를 위한 대리 마커로서 FACS에 의해 검출될 수 있다.

[0137] jTc 및 C1R는 37 °C에서 10% v/v FCS, 2 μM 글루타민, 50IU/ml 페니실린, 50 μg/ml 스트렙토마이신, 50 μM 2-β머캅토에탄올 및 10mM HEPES (R10)으로 보충된 RPMI 1640에서 유지하였다.

[0138] C1R-HLA-A2를 PBS으로 2 회 세척한 후, 37 °C에서 50 분 동안 0 μM, 1 μM 또는 10 μM 동족 펩타이드가 포함된 PBS에서 재현탁시켰다. 세포를 R10에서 2 회 세척하고 96 U-바닥 플레이트에서 웰당 100 μl의 1×10^5 개 세포로 플레이트하였다.

[0139] jTc를 배양물에서 수확하고 PBS으로 1 회 세척한 다음, 37 °C에서 20 분 동안 PBS에서 단백질 미함유 또는 3 μM 컨쥬게이션 초하전 GFP (con-scGFP), 3 μM 초하전 GFP (scGFP), 10 μM의 네이티브 미오글로빈 (nMyo), 10 μM의 양이온화된 미오글로빈 (Cat Myo) 또는 10 μM 컨쥬게이션된 미오글로빈 (Con Myo)과 함께 인큐베이션하였다. 코팅된 jTc를 PBS에서 1 회 세척하고 웰당 100 μl에서 5×10^4 jTc으로 R10에 재현탁하고 C1R 세포와 혼합하였다.

[0140] 코팅된 jTc 및 펩타이드 펄스 C1R 세포를 포함하는 동일한 플레이트를 환경 산소 (21%) 수준 또는 저산소 산소 수준 (5%)의 인큐베이터에서 37 °C에서 6 시간 동안 공동 배양하였다.

[0141] 6 시간 후 플레이트를 PBS로 1 회 세척한 다음, 30 분 동안 4 °C에서 세포를 αCD69-APC (Biolegend, Cat No. 310910), αCD3-AF594 (Biolegend, Cat No. 300446) 및 생세포 염색제, Aqua (Invitrogen, Cat No. L34957)와 함께 인큐베이션하였다. 그 다음 세포를 PBS으로 2 회 세척하고 밤새 2% 파라폼알데하이드 (PFA)으로 고정하였다. 세포를 PBS에서 2 회 세척하여 고정제를 제거하고 Fortessa X20 세포측정기의 고출력 모듈에서 실행하였다.

[0142] 쥐 T 세포 증식 분석

[0143] 96 U 바닥 플레이트 37 °C에서 1 시간 동안 PBS에서 희석된 1 μg/ml αCD3 및 5 μg/ml αCD28으로 코팅하였다. PBS를 제거하였다.

[0144] 제조업체의 지침에 따라 Dyna-비드 음성 선별 키트 (ThermoFisher, Cat No. 11413D)를 사용하여 전체 T 세포 (Tc)를 정제 1 마리의 Balb-c 암컷 쥐의 비장 및 림프절로부터 정제하였다.

[0145] 정제된 Tc를 PBS으로 1 회 세척한 다음, 37 °C에서 20 분 동안 PBS에서 단백질 미함유 또는 3 μM 컨쥬게이션 초하전 GFP (Con scGFP), 3 μM 초하전 GFP (scGFP), 10 μM의 네이티브 미오글로빈 (nMyo), 10 μM의 양이온화된 미오글로빈 (Cat Myo) 또는 10 μM 컨쥬게이션된 미오글로빈 (Con Myo)과 함께 인큐베이션하였다.

[0146] 코팅된 Tc를 PBS에서 2 회 세척하고 10 μM Cell Trace Violet (ThermoFisher, Cat No. C34557)를 포함하는 PBS에서 20 분 동안 실온에서 재현탁시켰다. CTV 염색된 세포를 R10에서 세척하고 20U/ml IL-2을 포함하는 200 μl R10에 웰당 4×10^5 Tc에서 αCD3 및 αCD28이 사전-코팅된 플레이트로 옮겼다.

[0147] 코팅된 Tc를 포함하는 동일한 플레이트를 환경 산소 (21%) 수준 또는 저산소 산소 수준 (5%)의 인큐베이터에서 37 °C에서 4 일 동안 배양하였다.

[0148] 4일 후, 플레이트를 500×g에서 5 분 동안 원심분리하고 PBS로 1회 세척한 다음, 세포를 4 °C에서 45분 동안 2 개의 항체 조합과 함께 인큐베이션하였다.

[0149] 조합 1: αCD3-AF700 (Biolegend, Cat No. 152316), αCD4-BV785 (Biolegend, Cat No. 100552), αCD8-

APCef780 (Invitrogen, Cat No. 47008182), α CD44-BV605 (Biolegend, Cat No. 103047), α HIS-TAG-APC (Biolegend, Cat No. 362605) 및 Aqua (Invitrogen, Cat No. L34957).

[0150] 조합 2: α CD3-AF700, α CD4-BV785, α CD8-APCef780, α PDL-1-PE (Invitrogen, Cat No. 125982-82), 동형 대조군-BV605 (Biolegend, Cat No. 400434), 동형 대조군-APC (Invitrogen, Cat No. 17432181) 및 Aqua.

[0151] 그 다음 세포를 PBS으로 2 회 세척하고 4 °C에서 1 시간 동안 2% 파라폼알데하이드 (PFA; FisherScientific, Cat No. 11586711)으로 고정하였다. 세포를 PBS에서 2 회 세척하여 고정제를 제거하고 Fortessa X20 세포측정기의 고출력 모듈에서 실행하였다.

[0152] Tc를 37 °C에서 10% v/v FCS, 2 μ M 글루타민, 50 IU/ml 페니실린, 50 μ g/ml 스트렙토마이신, 50 μ M 2- β 머캅토에탄올 및 10 mM HEPES (R10)이 보충된 RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific, Cat No. 21875-034)에서 유지하였다

[0153] 라벨링 효율

[0154] Myo14는 컨쥬게이션 전에 제조업체의 지침에 따라 FITC으로 라벨링하였다. jTc는 처리하지 않거나, 또는 14 μ M Myo14[S]-FITC으로 코팅하고 α CD3-AF594으로 염색한 후, 유세포 분석에 의해 분석하였다. FITC+ CD3+ Tc의 평균 비율은 FACS 플롯 (+/- SD, n=3)으로 나타낸다.

[0155] FACS-기반 세포 생존력 분석

[0156] 다양한 농도의 Myo14[S]로 코팅된 살아있는 jTc를 Aqua 생세포/사세포 염색(Live/dead cell stain) 및 CD3-AF594에 대해 염색하였다. Tc를 단일항 및 CD3+ Tc에 대해 게이팅한 다음, 살아있는 세포의 평균 백분율을 계산하였다. 네이티브 쥐 Tc를 정제하고 1 일 동안 α CD3/CD28 및 IL-2와 함께 험관 내에서 활성화하였다. 제1일에, 활성화된 Tc를 수확하고 다양한 농도의 Myo14[S]으로 코팅하였다. 코팅되고, 활성화된 Tc를 1 일 동안 α CD3/CD28 및 IL-2를 포함하는 배양물에 다시 첨가하였다. 세포를 수확하고 항-CD8 및 Aqua 생세포 사세포 염색으로 염색하였다. 세포를 단일항 및 CD8+ 세포에 대해 게이팅한 다음, 살아있는 세포의 평균 백분율을 계산하였다.

[0157] FACS-기반 세포 증식 분석

[0158] 한 마리의 Balb-c 마우스의 비장 및 림프절로부터 전체 Tc를 정제하였다. Tc를 처리하지 않거나 또는 2.5 μ M Myo14[S]으로 코팅하였다. Tc를 α CD3/CD28으로 활성화하였다. 활성화된 Tc를 제3일 및 제5일에 수확하고 트리판 블루(trypan blue)로 염색하여 죽은 세포를 배제한 다음 계수하였다. 평균 세포 수 (+/-SD, n=3)를 나타낸다.

[0159] 정제된 전체 Tc를 Cell Trace Violet으로 염색한 다음 처리하지 않고 두거나 (U/T) 또는 2.5 μ M Myo14[S]으로 코팅하였다. Tc를 α CD3/CD28 및 IL2으로 활성화하였다. 활성화된 mTc를 제3일 및 제5일에 수확하고 α CD4 및 α CD8으로 염색하였다. 세포를 유세포 분석으로 분석하였다. 세포를 CD8 세포에 게이팅하고 전체 CTV 희석된 세포의 평균을 '분열된 CD8 Tc' (+/-SD, n=3)로서 포함하였다.

[0160] 항원-특이적 활성화

[0161] TCR 형질전환 jTc를 처리하지 않거나 (U/T) 또는 10 μ M [Myo14-MBP][S]으로 코팅하였다 jTc를 명시된 농도의 동족 펩타이드로 펄스된 C1R-HLA-A2+ 세포 펩타이드와 함께 6시간 동안 배양하였다. jTc를 α CD3-AF594, α CD69-APC 및 Aqua 생세포/사세포 염색으로 염색하고, 활성화 마커 CD69의 평균 MFI를 살아있는, CD3+ jTc에서 계산하였다 (+/-SD, n=3).

[0162] 저산소증-염료 분석

[0163] Image-iT Green 저산소증 시약 (Thermo Fisher)은 DMSO를 첨가하고 잘 혼합하여 5 mM로 희석하였다. 상기 스톱을 R10 배지에서 101 μ M의 최종 농도가 되도록 jTc에 첨가하고, 40 분 동안 37 °C, 20% O₂, 5% CO₂ 에서 인큐베이션하였다. 세포를 5 분 동안 500 $\times$ g에서 원심분리하고, 상등액을 붓고 새로운 성장 배지로 교체하였다. 이어서, 세포를 웰당 5 $\times$ 10⁵ 개 세포로 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 원하는 값, 예를 들어 0.5% O₂로 고정된 산소 농도로 시간 경과에 따라 형광 플레이트 판독기에서 판독한다.

[0164] hMSC 염증 분석

- [0165] 4명의 환자로부터 분리한 인간 중간엽 줄기 세포를 처리하지 않거나 2.5 μ M Myo14[S]로 코팅하고 7일 동안 배양하였다. 양성 대조군으로서, 세포를 IFN γ 와 함께 배양하였다. 제7일에 세포를 수확하고, 계수하고 Aqua 생세포/사세포 염색 및 계통 마커, CD105 및 CD73 및 염증성 마커HLA-DR, HLA-ABC 및 PDL1에 대한 염색하였다. 세포를 단일항, 생세포 및 CD105+ CD73+ 세포에 게이팅한 다음, 각 마커를 발현하는 세포의 평균 백분율을 계산하였다.
- [0166] 2D 시험관 내 종양 사멸 분석
- [0167] 종양 세포, 예컨대 IGR-Heu lung 암종 세포, SKBR3, BT20, MCF7 유방암 세포, SKOV3 난소암 세포 또는 HeLa-CD19 세포의 항원-특이적 사멸은 PBMC 또는 종양-침윤 림프구의 단리로부터 유래된 인간 세포 독성 T 세포, 또는 CAR-T 세포를 사용하여 수행한다.
- [0168] PBMC로부터 분리되면, T 세포는 조사된 자가 종양 세포, HLA-A2-결합 HER-2/neu p369-377 펩타이드 또는 CD3/CD28 Dynabead, 및 IL-2와 같은 성장 인자와 같은 자극제를 사용하여 활성화된다.
- [0169] 종양 표적 세포와 공동 배양하기 전, T 세포를 Myo14 또는 Myo14[S]으로 코팅한다. 코팅되지 않은 T 세포를 베이스라인 사멸 활성화에 대한 대조군으로서 사용한다. 종양 세포주는 리포터 유전자의 발현을 위해 형질 감염시키거나, 형광 표지될 CFSE와 같은 염료와 함께 배양한다. 활성화된 T 세포와 종양 표적 세포의 공동 배양 동안, 형광의 감소는 이미징, FACS를 통해 또는 종양 사멸 속도를 결정하기 위한 플레이트 판독기를 사용하여 모니터링한다.
- [0170] 종양 사멸에 대한 양성 대조군으로서 항암제 (즉, 스타우로스포린)를 종양 세포 단독의 배양 배지에 첨가한다.
- [0171] 3D 시험관 내 종양 사멸 분석
- [0172] 표적 종양 세포는 GFP를 발현하도록 형질감염시키고 3D 스페로이드로 성장시켰다. 단리된 T 세포는 Myo14 또는 Myo14[S]으로 코팅되기 전 종양 스페로이드에 첨가하였다. 코팅되지 않은 T 세포를 베이스라인 사멸 활성화에 대한 대조군으로서 사용한다. 공동 배양 동안, 형광의 감소는 이미징을 통해 모니터링하여 종양 스페로이드 세포 사멸 속도를 결정한다.
- [0173] 종양 스페로이드에서 T 세포 침윤을 모니터링하기 위해, T 세포는 다른 염료로 형광 표지하고 공동 배양은 이미징한다.
- [0174] 종양 사멸에 대한 양성 대조군으로서 항암제 (즉, 스타우로스포린)를 종양 세포 단독의 배양 배지에 첨가한다.
- [0175] 생체 내 종양 사멸 분석
- [0176] Myo14 기반 작제물은 기능과 효능을 추가로 입증하기 위해 여러 모델에서 시험관 내 및 생체 내에서 테스트한다. 생체 내 효능을 위해, 그리고 Myo14 기반 작제물이 여러 종양학적 적용에 적합하다는 것을 입증하기 위해, Myo14[S] 및 [Myo14-PD1][S]를 키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR-T) 또는 형질전환 클론 4 T 세포 상에 코팅하고, 각각 MDA-MB-231 인간 유방암 종양 또는 RencaHA 종양을 보유한 마우스에 이양전달한다. 각 실험은 하기에 더욱 상세히 기재된다.
- [0177] CAR-T/MDA-MB-231 실험에 있어서, 32 마리의 NSG 마우스에 피하로 MDA-MB-231를 접종한다. 종양이 미리 결정된 시점에 도달하면 마우스를 4개의 그룹으로 나눈다. 그룹 1은 처리하지 않은 채로 두고, 그룹 2는 CAR-T로 i.v로 처리하고, 그룹 3은 Myo14[S] 코팅된 CAR-T로 i.v로 처리하고, 그룹 4는 [Myo14-PD1][S] 코팅된 CAR-T로 i.v로 처리한다. 실험은 적어도 1 회 반복한다.
- [0178] 종양 크기는 캘리퍼스(callipers) 뿐만 아니라, 루시페라제 형질도입된 MDA-MB-231 종양 세포의 생물발광 영상을 사용하여 정기적으로 측정한다. 주입된 Tc의 지속성과 확장을 결정하기 위해 연속 꼬리 출혈의 유세포 분석을 수행한다.
- [0179] 처리된 종양 조직의 섹션은 Cancer Research UK Birmingham Cancer Center를 통해 사용할 수 있는 다중 염색 (다색 Vectra 자동 정량 병리 분석 시스템 (Automated Quantitative Pathology Imaging System) 및 Definiens 소프트웨어를 사용하여 정량적으로 분석)에 의해 분석한다. 종양은 다음의 항체 패널로 염색한다:
- [0180] 항-인간 CD3, 판-사이토케라틴(pan-cytokeratin) (종양 마커), CD34 (CAR 마커), 탄산 무수화효소 IX (저산소증 마커), 인간 아렉신 V (세포자살 마커) 및 인간 IFN 감마 (기능적 마커) 인간 PD1 및 인간 PDL1 (플러스 DAPI 핵 염색). 이를 통해 단일 종양 조직 섹션 내에서 면역 세포의 시각화, 분석, 정량화 및 표현형 및 세포

간 상호 작용 식별이 가능하다.

- [0181] 2차 림프 조직 및 종양은 CAR-T 세포의 존재에 대해 FACS에 의해 분석한다. 입양 전달된 CAR-T 세포의 표현형은 PD-1, CD45 및 CD62L의 표면 발현 및 IFN γ 및 TNF α 에 대한 세포 내 사이토카인 염색에 대해 분석한다. 처리된 종양 세포의 표현형은 PDL-1, MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II의 표면 발현에 의해 분석한다.
- [0182] 추가적인 생체 내 종양 모델에서, Myo14[S] 및 [Myo14-PD1][S]를 6-8주령 CL4 TCR-형질전환 Thy1.1+ BALB/c 마우스로부터 정제된 형질전환 클론 4 T 세포에 코팅한다. 이전에 1×10^6 RencaHa 종양 세포로 피하 주사된 8 마리의 무작위로 선택된 암컷 Balb-c 마우스에게 20×10^6 CL4 TCR-형질전환 Tc를 i.v. 주사한다. 처리되지 않은, 코팅되지 않은 Tc로 처리된, Myo14[S] 코팅된 Tc로 처리된 및 [Myo14-PD1][S] 코팅된 Tc로 처리된 4 가지 그룹에서 RencaHa 종양의 성장을 측정한다. 과학적이고 인간적인 실험의 중점은 이전 작업을 기준으로 27일로 설정한다. 2차원의 종양 직경은 캘리퍼스를 사용하여 격일로 측정하고 종양 진행 속도와 최종 종양 부피를 계산한다. 주입된 Tc의 지속성과 확장을 결정하기 위해 연속 꼬리 출혈의 유세포 분석을 수행한다.
- [0183] Thy1.1 유전자형 마커를 가지는 입양 전달된 Tc는 형광 면역-조직화학에 의해 종양, 비장, 종양 배액 및 종양 비-배액 림프절, 폐, 뇌 및 간에서 식별되어, 처리 및 처리되지 않은 Tc의 분포 및 종양 특이적 이동 및 보유를 열거한다. 게다가, 종양 샘플로부터의 섹션은 혈관계 (CD31/MECA-32) 및 저산소증 (탄산 무수화효소 IX8)에 대한 마커로 염색하여 저산소 영역을 식별한다. Tc 식별과 함께 이러한 염색을 통해, Myo[S] 처리된 Tc가 저산소 영역으로 이동하며, 상기 영역에서의 지속성을 식별할 수 있다.
- [0184] 종양의 일부, 비장, 종양 비-배액 및 종양 배액 림프절을 수확하고 FACS 분석을 실시한다. 종양으로부터 정제된 Tc를 생존력, 시험관 내 종양 세포 사멸 능력 및 CD44, CD62L, PD1, Annexin V, IFN γ 및 TNF α 의 발현에 대해 분석한다. 추가적으로, 종양 세포의 표현형은 MHC 클래스 I 및 클래스 II 뿐만 아니라 PDL1에 대해 분석한다.
- [0185] 실시예 - 결과 및 토론
- [0186] 작제물로 라벨링된 세포의 백분율
- [0187] 상기 기술한 바와 같이 형광 접합된 항체 및 생존력 염료로 코팅된 살아있는 세포를 즉시 염색한 다음, 작제물의 생존력 및 존재에 대해 유세포 측정법으로 분석하였다. GFP와 HIS-TAG는 모두 3 회 세척 후 Tc의 표면에서 감지할 수 있었으며, 이는 세포 표면에 단단히 결합되었음을 시사한다 (도 1a-d). 양이온화된 미오글로빈에 결합된 jTc의 백분율 (83.5% +/-0.4) 및 컨쥬게이션된 미오글로빈에 결합된 jTc의 백분율 (79.4% +/- 0.8)은 동일했으나 (도 1a), 양이온화된 미오글로빈에 결합된 mTc의 백분율 (47.7% +/- 1.4)과 비교하여, 컨쥬게이션된 미오글로빈에 결합된 mTc의 백분율 (6.7% +/- 0.8)은 현저히 감소하였다 (도 1c). jTc 및 mTc에 대해 양이온화된 및 컨쥬게이션된 미오글로빈의 차등적으로 결합하는 이유는 세포막에서의 다양한 글리코실화 또는 HIS-Tag 라벨링된 단백질 검출하는 능력에 있어서의 차이 때문일 수 있으나, 이러한 이론에 제한되고자 하는 것은 아니다. 후자의 가설을 뒷받침하기 위해, jTc 및 mTc 모두의 GFP 라벨링은 초하전된 및 컨쥬게이션된 GFP 모두로 87%를 초과하지만 (도 1b 및 d) 동일한 HIS-Tag 라벨링은 20% 내지 91%로 다양하며, 이는 HIS-Tag 라벨링이 모든 GFP 라벨링을 검출하지 못하며 추가적인 고려 사항이 필요하다는 것을 뒷받침한다. 낮은 HIS-Tag 관독값과 높은 GFP 신호는 구조의 내재화로 인해 또는 HIS-Tag를 마스킹하는 방향으로 mTc 세포에 결합하여 발생할 수 있으며, 둘 다 GFP 신호에 영향을 미치지 않지만 항-HIS-Tag 항체 결합을 방지할 것이지만, 이러한 이론에 제한되고자 하는 것은 아니다.
- [0188] 세포 생존력
- [0189] 미오글로빈 없이 또는 네이티브의, 양이온화된 또는 컨쥬게이션된 미오글로빈과 함께 인큐베이션된 jTc의 생존력은 94% 초과였지만, scGFP 및 컨쥬게이션된 GFP를 가지는 jTc의 생존력은 각각 47.75% 및 63.95%이었으며 (도 2a), 이는 테스트된 농도에서 미오글로빈이 아닌 GFP는 jTc에 독성이 있음을 뒷받침한다. 미오글로빈을 가지지 않는 mTc의 생존력 (92.3% +/- 1.14) 및 네이티브 미오글로빈을 가지는 mTc의 생존력 (94.65% +/- 0.31)은 양이온화된 미오글로빈으로 코팅된 mTc의 생존력 (76.78% +/- 0.50) 및 컨쥬게이션된 미오글로빈으로 코팅된 mTc의 생존력 (79.7% +/- 0.4)보다 현저히 높았으며, 이는 양이온화된 및 컨쥬게이션된 미오글로빈이 테스트된 농도에서 이롭 세포 사멸을 야기하였음을 뒷받침한다. scGFP으로 코팅된 mTc (63.0% +/- 1.9) 및 컨쥬게이션된 GFP으로 코팅된 mTc (41.1% +/- 1.12)에서 더욱 더 많은 세포 사멸이 있었다 (도 2b).
- [0190] 종합하여, 이러한 결과는 양이온화된 미오글로빈이 jTc와 mTc 모두에 우수한 세포 표면 결합을 보여주며, 특히 jTc에 대한 세포 독성을 최소화한다. 세포 생존력을 개선하면서 컨쥬게이션된 미오글로빈의 결합을 최적화하기

위해 mTc로 추가적인 실험이 요구된다. 동일한 농도의 양이온화된 및 컨쥬게이션된 미오글로빈에 대한 반응으로 mTc 및 jTc의 차별적인 생존력은 jTc 세포주가 1차 나이트 뮤린 Tc보다 더 강력하기 때문에, 세포의 고유한 견고성 때문일 가능성이 있다.

[0191] T 세포 처리를 위한 계면 활성제-컨쥬게이션 초하전 미오글로빈 (Myo14[S])의 최적의 농도를 확인하기 위해, 다양한 농도의 Myo14[S]으로 코팅한 후 jTc의 생존력 및 1차 mTc를 테스트하였다. jTc의 생존력은 최대 40 μ M까지 테스트되는 모든 농도에서 90% 초과였다(도 5b). Myo14[S]으로 코팅 1 일 후 1차 쥐 T 세포의 생존력은 10 μ M까지 테스트되는 모든 농도에서 90% 이상이었다 (도 5c).

[0192] 동족 펩타이드에 대한 활성

[0193] jTc를 구성물로 코팅하는 것이 주요 조직적합성 복합체(MHC)에 의해 제시된 동족 펩타이드와 T 세포 수용체(TCR)의 결합을 억제하는지 여부를 테스트하기 위해, C1R-HLA-A2(C1R) B 세포에 의해 제시되는 동족 펩티드를 인식할 때 CD69를 상향 조절하는 TCR 형질전환 Jurkat T 세포를 사용하였다. jTc를 미오글로빈 또는 GFP 작제물로 코팅하고, 0 μ M, 1 μ M 또는 10 μ M의 동족 펩타이드로 이전에 펄스된 C1R 세포와 함께 6 시간 동안 인큐베이션하였다. 활성화 마커인, CD69의 상향 조절을 유세포 분석으로 분석하였다. 1 μ M 또는 10 μ M의 펩타이드의 첨가는 CD69를 발현하는 세포의 백분율을 처리되지 않은 jTc에 대해 0.92% (+/- 0.06)로, 1 μ M의 펩타이드에 대해 9.32% (+/-1.16)로 및 10 μ M의 펩타이드에 대해 20.97% (+/- 1.80)로 증가시켰다 (도 3a 및 b). 양이온화된 또는 컨쥬게이션된 미오글로빈으로 (도 3a) 또는 초하전된 또는 컨쥬게이션된 GFP으로 (도 3b) 코팅 후 CD69 발현의 증가에 현저한 차이는 없었다. 결과는 TCR 형질전환 jTc와 작제물의 결합이 T 세포 활성화를 억제하지 않는다는 것을 보여주며, 이는 TCR-MHC 활성화 복합체 사이의 작제물에 의해 야기되는 입체 간섭이 없음을 뒷받침한다.

[0194] 증식 및 활성 - 저산소 조건

[0195] 미오글로빈 작제물로 코팅한 후 mTc를 정상 산소 (22% 산소) 및 저산소 (5% 산소) 조건 하에서 활성화하였다. 항-CD3 및 항-CD28 항체의 존재하에 mTc를 4 일 동안 인큐베이션하였다. 종합적으로, 항-CD3 및 항-CD28는 TCR, 및 공동 자극 분자, CD28에 결합하며, Tc의 다클론 활성화를 야기한다. 제4일에, mTc를 수확하고 유세포 분석으로 분석하였다. mTc를 CD4 또는 CD8에 게이팅하여, T 세포의 상기 두 하위 유형으로 분석하였다. 각 하위유형을 CTV (cell trace violet)의 희석, 증식 마커, 및 높은 CD44 발현, 활성화 마커에 대해 분석하였다.

[0196] 처리되지 않은 세포에서, 저산소증은 분열된 CD4 mTc의 백분율을 66.23% (+/-2.54)에서 72.1% (+/- 3.54)으로 및 CD8 mTc의 백분율을 70.75% (+/-2.63)에서 78.2% (+/- 5.15)으로 증가시켜, 저산소 환경이 Tc 증식을 증가시키는 것을 뒷받침한다 (도 4a 및 b). 정상 산소 조건하에서, 양이온화된 또는 컨쥬게이션된 미오글로빈으로 코팅된 CD4 및 CD8 mTc 모두 처리되지 않은 또는 네이티브 미오글로빈 처리된 대응물보다 분열된 세포의 백분율이 현저히 낮았다. 이러한 관찰은 활성화 전에 미오글로빈 작제물 (도 2b)로 코팅한 후 이러한 세포의 생존력 감소로 합리적으로 설명될 수 있다. 그러나, 코팅된 CD4 및 CD8 Tc를 저산소 조건하에서 배양하는 경우 정상 산소 조건보다 분열된 mTc의 백분율이 더 높았으며 이는 미오글로빈 및/또는 저산소증의 존재가 이러한 세포의 증식성 결합을 구하고 있음을 뒷받침한다.

[0197] 처리되지 않은 CD4 Tc에서, 정상 산소와 비교할 경우, 저산소증은 활성화된 CD4 CD44hi Tc의 백분율을 45.9% (+/-2.86)에서 50.83% (+/-2.16)으로 증가시켰다. 양이온화된 또는 컨쥬게이션된 미오글로빈으로 코팅되고 정상 산소 조건 하에서 활성화된 CD4 Tc는 처리되지 않은 또는 네이티브 미오글로빈 처리된 Tc보다 CD4 CD44hi Tc의 백분율이 현저히 낮았으나, 그러나 저산소 조건하에서 활성화된 동일한 세포는 처리되지 않은 및 네이티브 미오글로빈 처리된 mTc와 비교하여 동일한 CD4 CD44hi Tc 백분율을 가졌다 (도 4c).

[0198] 처리되지 않은 CD8 Tc에서, 정상 산소와 비교할 경우, 저산소증은 CD8 CD44hi Tc의 백분율을 61.25% (+/-1.93)에서 52.33% (+/- 2.27)으로 현저히 (p=0.001) 감소시켰다. 컨쥬게이션된 미오글로빈의 첨가는 (49.83% +/- 2.21) 처리되지 않은 대조군과 비교하여 (61.25% +/- 1.93) 정상 산소 조건하에서 CD8 CD44hi Tc의 백분율의 감소를 초래했으나 양이온화된 미오글로빈의 첨가는 (58.08% +/-1.34) 그렇지 않았다. 그러나, 저산소 조건하에서 양이온화된 또는 컨쥬게이션된 미오글로빈의 첨가는 CD8 Tc 활성화에서 저산소증 유도 감소를 역전시켰다. 사실상, 미오글로빈의 두 형태 모두의 첨가는 처리되지 않은 CD8 Tc에 대한 CD8 CD44hi Tc의 백분율을 52.33% (+/- 2.27)으로부터, 양이온화된 미오글로빈 코팅된 CD8 Tc에 대해 71.5% (+/- 2.50), 및 컨쥬게이션된 미오글로빈 코팅된 CD8 Tc에 대해 63.88% (+/- 3.67)으로 크게 증가시켰다 (도 4d). 미오글로빈 작제물이 정상 산소 조건에서는 CD44hi Tc를 감소시키지만 저산소 조건에서는 감소시키지 않는 이유는 불분명하다. Tc의 생존

력이 원래 감소했을 가능성이 있을 수 있다. 작제물이 정상 산소 조건에서만 중요한 방식으로 TCR 또는 CD28을 통해 T 세포 신호전달을 어느 정도 방해할 수도 있다. 그러나 미오글로빈을 사용하는 처리가 정상 산소 조건에서 활성화된 CD8 Tc의 표현형을 구한다는 입증은 CD8 Tc가 CAR-T 세포 및 TIL 요법 모두에서 추가 개발의 중요한 표적이기 때문에 매우 고무적이다.

[0199] 증식

[0200] Cell Trace Violet으로 염색하고 2.5 μ M Myo14[S]으로 코팅한 후 제3일 및 제5일에 시험관 내 활성화된 mTc의 증식 및 생존력을 평가하였다. 처리되지 않은 (U/T) 대조군과 비교하여, 2.5 μ M Myo14[S]으로 코팅 후 제일 또는 제5일에, 살아있는, 활성화된 T 세포 수에서 유의한 차이는 없었다 (도 5d). 게다가, 동일한 실험에서, 하나 이상의 분열을 거친 mTc의 백분율은 Myo14[S] 처리된 및 처리되지 않은 대조군에서 크게 다르지 않았다 (도 5e).

[0201] 항원-특이적 활성화

[0202] T 세포 수용체 (TCR) 형질전환 Jurkat T 세포가 동족 MHC-펩타이드 복합체를 인식할 때 활성화되는 능력을 CD69 활성화 분석에서 테스트하였다 말토스 결합 단백질 (MBP)이 Myo14에 연결될 수 있는 임의의 다른 단백질, 예를 들어, 비제한적으로, 사이토카인 예컨대 IL-2, IL-15 및 IL-17, T 세포 수용체 예컨대 PD-1, CTLA-4, TIM-3 또는 효소 예컨대 금속단백질분해효소(metalloproteinase)에 대한 대리물로 사용되었기 때문에 상기 분석에서 [Myo14-MBP][S]를 사용하였다. 펩타이드 농도 증가에 대한 반응으로 [Myo14-MBP][S]으로 코팅된 jTc에서 CD69의 상향 조절은 처리되지 않은 대조군과 크게 다르지 않았다. 이러한 결과는 또 다른 단백질 (상기 경우에 MBP)에 연결된 Myo14[S]으로의 코팅이 표적 세포 단백질 상호 작용에 대한 정상적인 jTc를 방해하지 않으므로, 정상적인 T 세포 신호 전달을 방해해서는 안된다는 것을 입증한다 (도 5f).

[0203] 소진-마커 프로파일링

[0204] 네이티브 mTc가 계면 활성화제-컨쥬게이션 초하전 미오글로빈 (Myo14[S])의 존재하에 스트레스를 받지않음을 입증하기 위해, 정제된 mTc를 2.5 μ M Myo14[S]으로 코팅하고 3 일 동안 α CD3/CD28 및 IL-2으로 자극하였다. 제3일에, 활성화된 mTc를 수확하고 활성화 마커 CD44 및 소진/활성화 마커 LAG3, PD1 및 TIGIT의 발현에 대해 분석하였다. 테스트된 임의의 마커에 대해 처리되지 않은 및 Myo14[S] 처리된 세포 사이에 유의한 차이는 없었다 (도 6a).

[0205] 저산소증 염료 분석

[0206] 계면 활성화제-컨쥬게이션 초하전 미오글로빈 (Myo14[S])이 산소 운반 분자이므로, 본 발명자들은 Myo14[S]에 의해 운반된 산소가 Tc에 공급될 수 있는지 여부를 결정하고자 하였다. jTc를 Image-iT Green 저산소증 시약으로 염색한 다음 처리하지 않고 두거나, 또는 10 μ M Myo14[S]으로 처리하였다. 염색 및 코팅된 jTc를 Cytation 플레이트 판독기로 옮기고 5% 이산화탄소 및 0.5% 산소에서 22 시간 동안 형광을 모니터링하였다. 처리되지 않은 jTc의 상대적인 형광 및 이에 따른 내부 저산소 상태는 Myo14[S] 처리된 jTc 보다 더 빠른 속도로 증가하고 더 높은 수준에 도달하여, Myo14[S]가 jTc에 산소를 공급한다는 것을 뒷받침한다 (도 6b).

[0207] hMSC 염증 분석

[0208] 본 명세서에 기재된 기술은 수 많은 세포 유형 및 질병 지표에 적용될 수 있다. 본 발명자들은 계면 활성화제-컨쥬게이션 초하전 미오글로빈 (Myo14[S])이 인간 중간엽 줄기 세포 (hMSC)에 코팅될 수 있음을 입증하였다. hMSC를 5 μ M Myo14[S]으로 코팅한 다음, 7 일 동안 시험관 내에서 성장시켰다. 제7일에 hMSC를 수확하고, 생세포를 계수한 다음, 세포를 계통 마커 CD73 및 CD105 및 염증성 마커 HLA-ABC, HLA-DR 및 PD-L1에 대한 항체로 염색하였다. 염증성 마커의 상향 조절에 대한 대조군으로서 세포를 또한 염증성 사이토카인 IFN γ 과 함께 배양하였다. 처리되지 않은 및 Myo14[S] 처리된 hMSC 사이에 HLA-ABC, HLA-DR 및 PD-L1를 발현하는 세포의 수 또는 세포의 백분율에는 유의한 차이가 없었다 (도 6c).

[0209] 표 4는 상기 기재된 기법을 사용하여 생성된 일련의 전하 변형 (초하전된) 미오글로빈의 아미노산 서열을 제공한다:

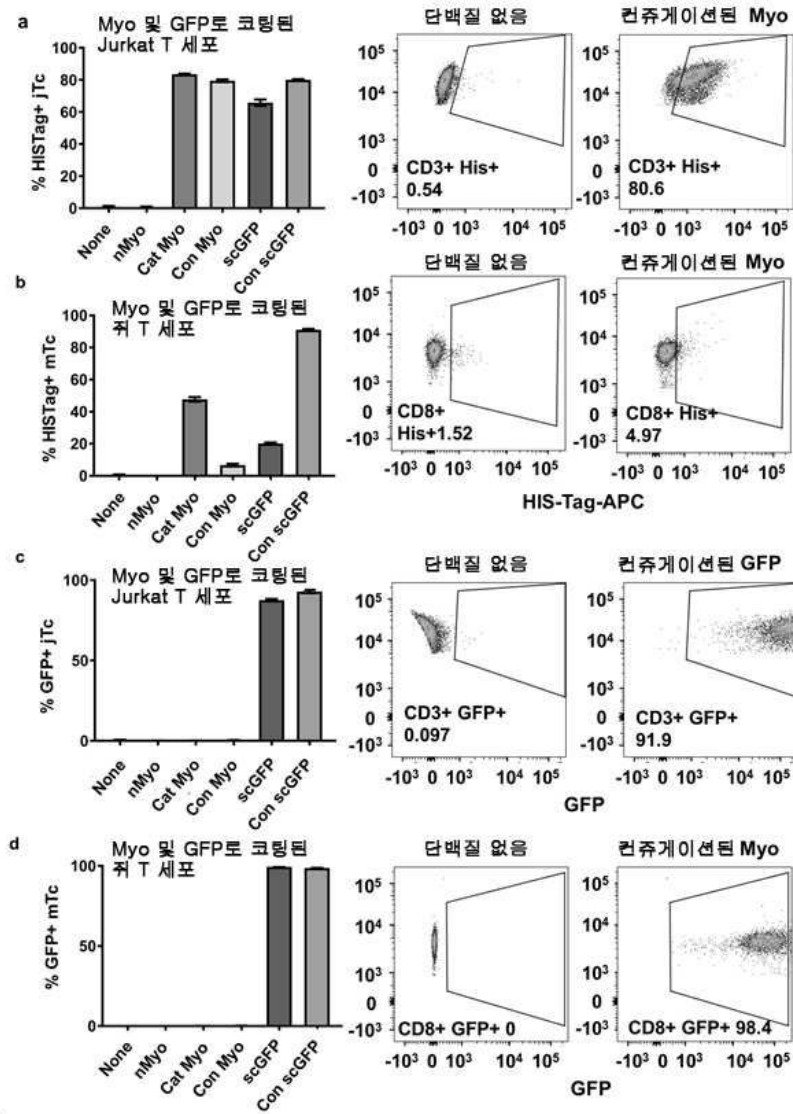
[0210] **표 4 - 전하 변형 미오글로빈 및 전하 변형 GFP의 아미노산 서열**

표 4

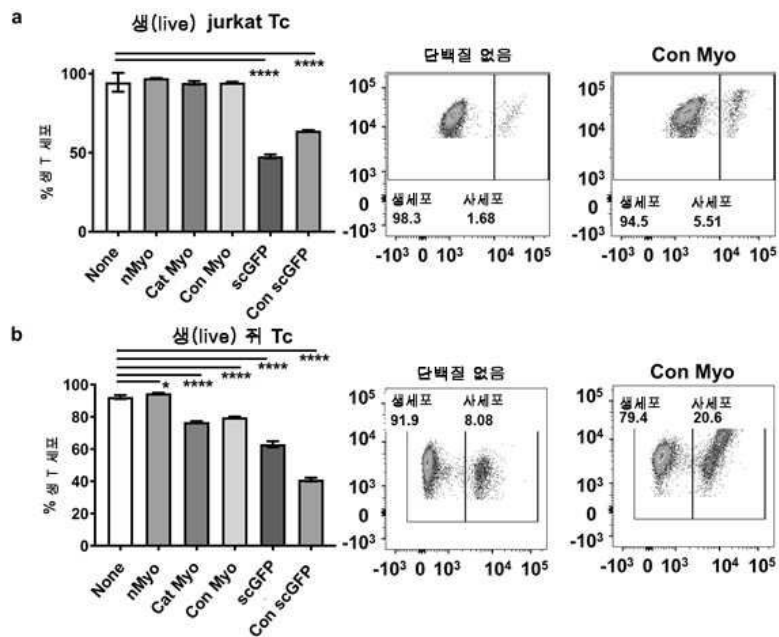
서열 번호	설명	서열
1	첫 번째 돌연변이체—화학적 양이온화에 의한 돌연변이	MHHHHHHGSSGENLYFQGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEV LIRLFKGHPKTLKKFDRFKHLKSKKKMKASEKLKKHGATVLTALGGILKKKGHHEAKIKPLAQSHATKHKIPVKYLFISEAI IKVLQSKHPGDFGKAQAGAMNKALKLFRKKMASNYKEL
2	Max—모든 산 잔기를 라이신으로 변형	MHHHHHHGSSGENLYFQGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEV LIRLFKGHPKTLKKFDRFKHLKSKKKMKASKLKKHGATVLTALGGILKKKGHHKAKIKPLAQSHATKHKIPVKYLFISEAI IQVLQSKHPGKGAKAAGAMNKALKLFRKKMASNYKEL
3	극성화—C-말단 주위 10 Å 반경을 제외하고 산에 대한 돌연변이	MHHHHHHGSSGENLYFQGLSKGWQLVLNVWGKVAKIPGHGQKVLIRLFKGHPKTLKEFKRFKHLKSKKKMKASKLKKHGATVLTALGGILKKKGHHEAKIEPLAQSHATEHEIPVEYLEFISEAI IQVLQSKHPGKGAKAAGAMNKALKLFRKDMASNYEEL
4	Rosetta	MHHHHHHGGGSENLYFQGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEV LIRLFKGHPETLKKFDRFKKLKSEDKMKKSEDLKKHGATVLTALGGILKKKGHHEAKIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFRSEAI IRVLRSKHPGDFGADAQAGAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG
5	AVNAPSA	MHHHHHHGGGSENLYFQGLSKGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEV LIRLFKGHPKTLKKFDRFKHLKSEKKMKASKDLKKHGATVLTALGGILKKKGHHKAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISEAI IQVLQSKHPGKGAKAAGAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG
6	TaB	MHHHHHHGGGSENLYFQGLSDGEWQLVLNVWGKVERDIPGHGQEV LIRLFKGHPETLKKFDRFKHLKSEREMKASKDLKKHGATVLTALGGILKKKGHHEAEIKPLAKSHATKHKIPVKYLFISEAI IQVLQSKHPGDFGARAQAGAMNKALELFRKDMARNYKELGFQG
7	컨센서스 B—TaB와 동일하지만, 보존된 도메인을 제외하도록 조정	MHHHHHHGGGSENLYGLSDGEWQLVLNVWGKVERDIPGHGQEV LIRLFKGHPETLKKFDRFKHLKSRDEMKASEKLKKHGATVLTALGGILKKKGHHEAEIKPLAKSHATKHKIPVKYLFISEAI IQVLQSKHPGDFGADAQAGAMNKALELFRKDMASKYKELGFQG
8	Myo7	MHHHHHHGSGGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEV LIRLFKGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMKASEDLKKHGATVLTALGKILKKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLFISEAI IKVLQSKHPGDFGADAQAGAMKALELFRKDMASKYKELGFQG
9	Myo14	MHHHHHHGSGGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEV LIRLFKGHPETLKKFDRFKHLKSEDEMKASEDLKKHGATVLTALGKILKKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLFISEAI IKVLQSKHPGDFGADAQAGAMKALKLFRKDMASKYKELGFQG
10	cMyo9	MHHHHHHGSGGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEV LIRLFKGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMKRSEDLKKHGATVLTALGKILKKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLFISEAI IKVLQSKHPGDFGADAQAGAMKALELFRKDMASKYKELGFQG
11	cMyo14	MHHHHHHGSGGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEV LIRLFKGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMKRSEDLKKHGATVLTALGKILKKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLFISEAI IKVLQSKHPGDFGADAQAGAMKALKLFRKDMASKYKELGFQG
12	cMyo15	MHHHHHHGSGGLRDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEV LIRLFKGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMKRSEDLKKHGATVLTALGKILKKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLFISEAI IKVLQSKHPGDFGADAQAGAMKALKLFRKDMASKYKELGFQG
13	His_MBP_PD1_Myo14	MHHHHHHKIEEGKLV I W I N G D K G Y N G L A E V G K K F E K D T G I K V T V E H P D K L E E K F P Q V A A T G D G P D I I F W A H D R F G G Y A Q S G L L A E I T P D K A F Q D K L Y P F T W D A V R Y N G K L I A Y P I A V E A L S L I Y N K D L L P N P P K T W E E I P A L D K E L K A K G S A L M F N L Q E P Y F T W P L I A A D G G Y A F K Y E N G K Y D I K D V G V D N A G A K A G L T F L V D L I K N K H M N A D T D Y S I A E A A F N K G E T A M T I N G P W A W S N I D T S K V N Y G V T V L P T F K G Q P S K P F V G V L S A G I N A A S P N K E L A K E F L E N Y L L T D E G L E A V N K D P L G A V A L K S Y E E L V K D P R I A A T M E N A Q K G E I M P N I P Q M S A F W Y A V R T A V I N A A S G R Q T V D E A L K D A Q T N S S S N N N N N N N N L G E N L Y F Q G S G W N P P T F S P A L L V V T E G D N A T F T C S F S N T S E S F V L N W Y R M S P S N Q T V K L A A F P E D R S Q P G Q D S R F R V T Q L P N G R D F H M S V V R A R R N D S G T Y L C S A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V T E R R A E V P T A H P S P G G G S G G G S G G G S G L S D G E W Q L V L K V W G K V E A D I P G H G Q E V L I R L F K G H P E T L K K F D R F K H L K S E D E M K A S E D L K K H G A T V L K K L G K I L K K K G K H E A E I K P L A Q S H A T K H K I P V K Y L F I S E A I I K V L Q S K H P G D F G A D A Q A G A M K K A L K L F R K D M A S K Y K E L G F Q G
14	MBP_PD1_Myo14	MKIEEGKLV I W I N G D K G Y N G L A E V G K K F E K D T G I K V T V E H P D K L E E K F P Q V A A T G D G P D I I F W A H D R F G G Y A Q S G L L A E I T P D K A F Q D K L Y P F T W D A V R Y N G K L I A Y P I A V E A L S L I Y N K D L L P N P P K T W E E I P A L D K E L K A K G S A L M F N L Q E P Y F T W P L I A A D G G Y A F K Y E N G K Y D I K D V G V D N A G A K A G L T F L V D L I K N K H M N A D T D Y S I A E A A F N K G E T A M T I N G P W A W S N I D T S K V N Y G V T V L P T F K G Q P S K P F V G V L S A G I N A A S P N K E L A K E F L E N Y L L T D E G L E A V N K D P L G A V A L K S Y E E L V K D P R I A A T M E N A Q K G E I M P N I P Q M S A F W Y A V R T A V I N A A S G R Q T V D E A L K D A Q T N S S S N N N N N N N N L G E N L Y F Q G S G W N P P T F S P A L L V V T E G D N A T F T C S F S N T S E S F V L N W Y R M S P S N Q T V K L A A F P E D R S Q P G Q D S R F R V T Q L P N G R D F H M S V V R A R R N D S G T Y L C S A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V T E R R A E V P T A H P S P G G G S G G G S G G G S G L S D G E W Q L V L K V W G K V E A D I P G H G Q E V L I R L F K G H P E T L K K F D R F K H L K S E D E M K A S E D L K K H G A T V L K K L G K I L K K K G K H E A E I K P L A Q S H A T K H K I P V K Y L F I S E A I I K V L Q S K H P G D F G A D A Q A G A M K K A L K L F R K D M A S K Y K E L G F Q G
15	scGFP	MASKGERLFRGKVPILVELKGDVNGHKFSVRGKGKGDATRGKLT L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P K H M K R H D F F K S A M P K G Y V Q E R T I S F K K D G K Y K T R A E V K F E G R T L V N R I K L K G R D F K E K G N I L G H K L R Y N F N S H K V Y I T A D K R K N G I K A K F K I R H N V K D G S V Q L A D H Y Q N T P I G R G P V L L P R N H Y L S T R S K L S K D P K E K R D H M V L L E F V T A A G I K H G R D E R Y K

도면

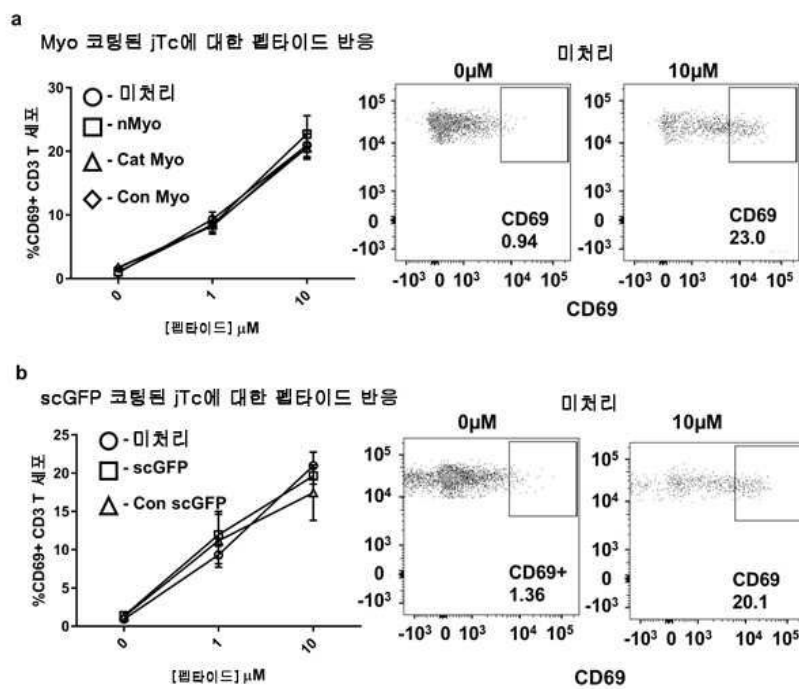
도면1



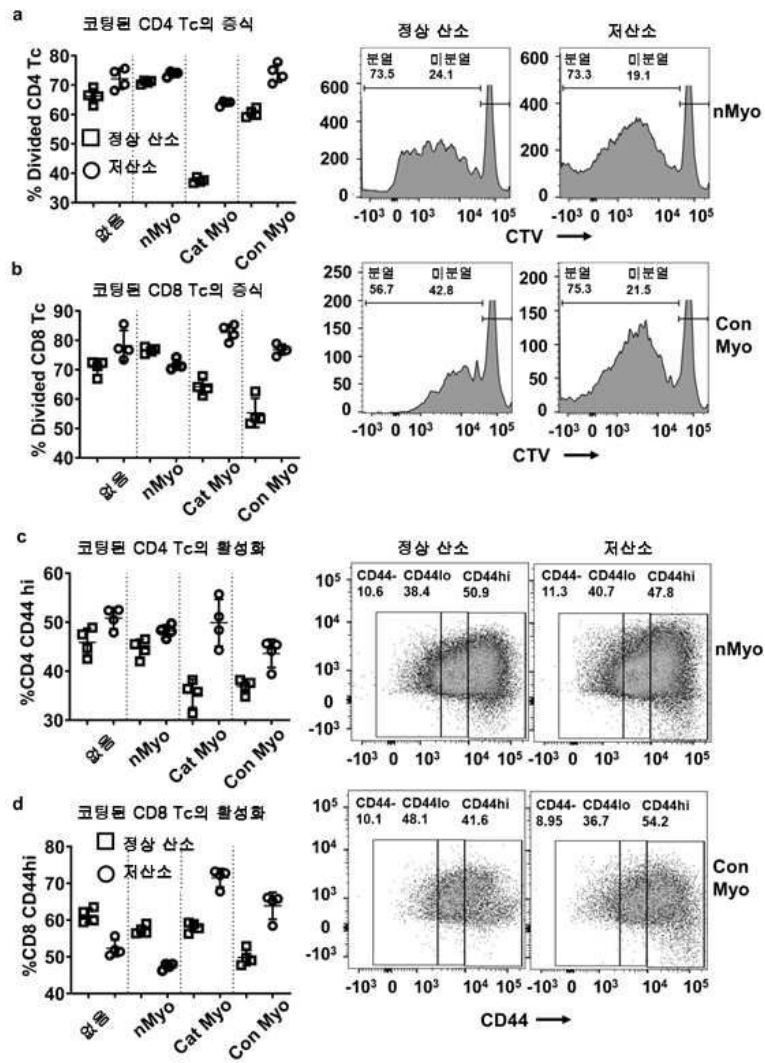
도면2



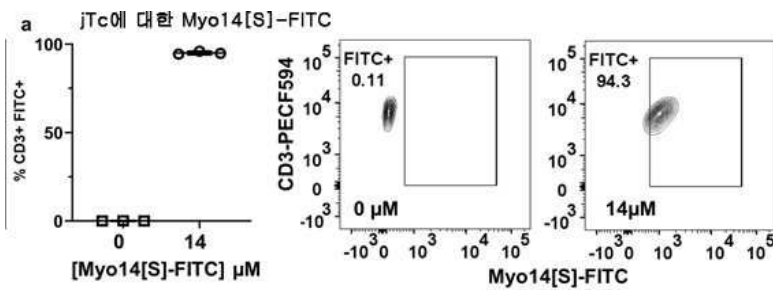
도면3



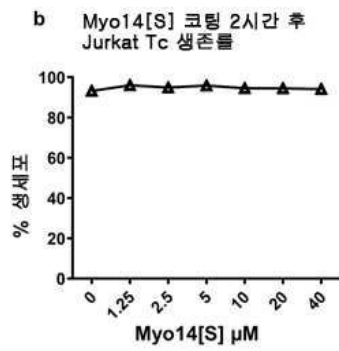
도면4



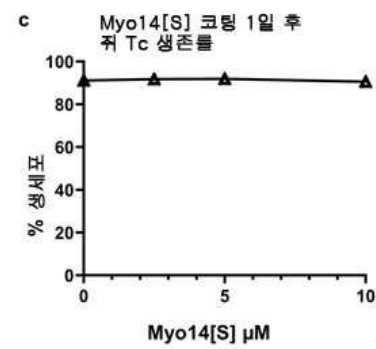
도면5a



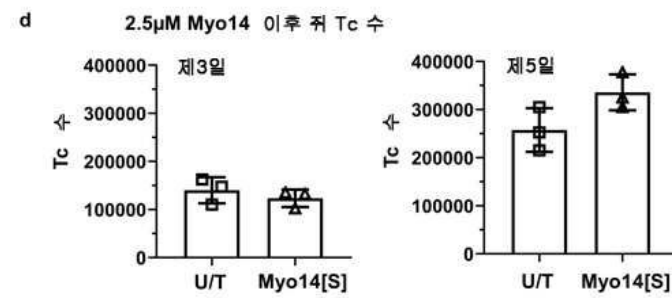
도면5b



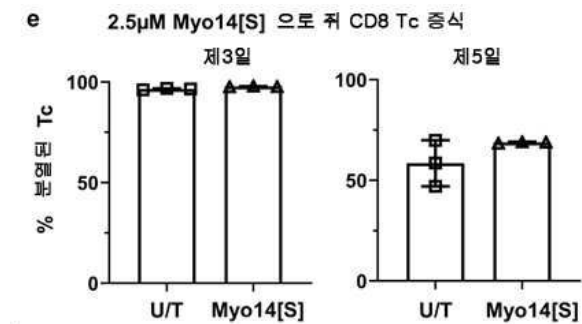
도면5c



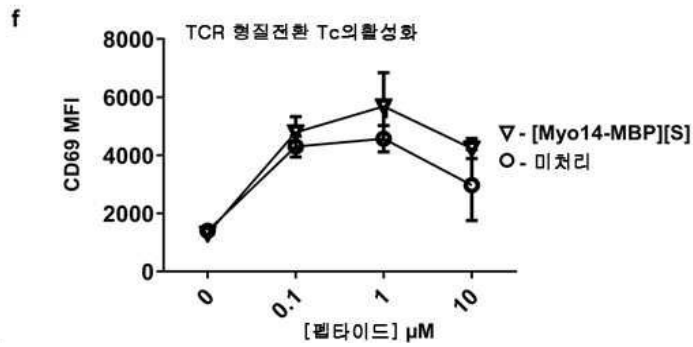
도면5d



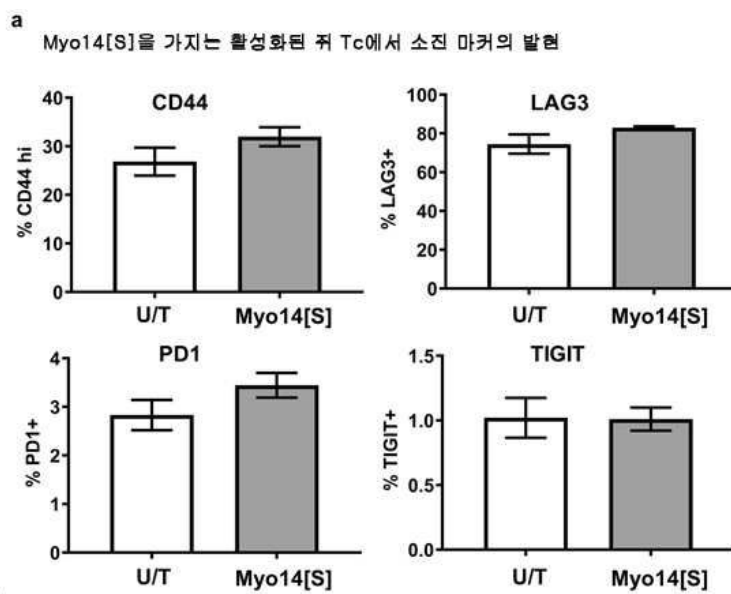
도면5e



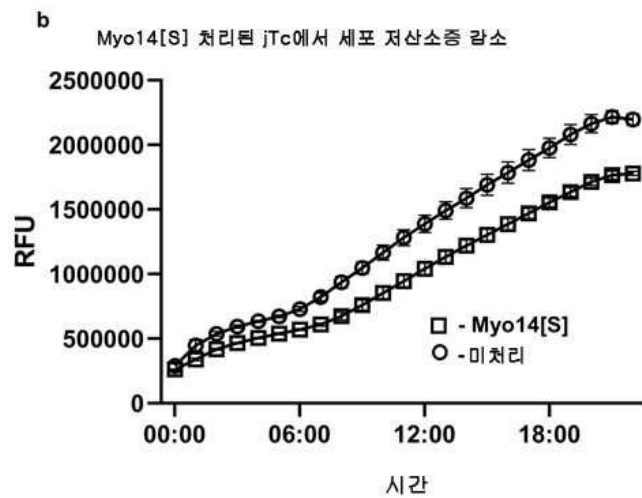
도면5f



도면6a



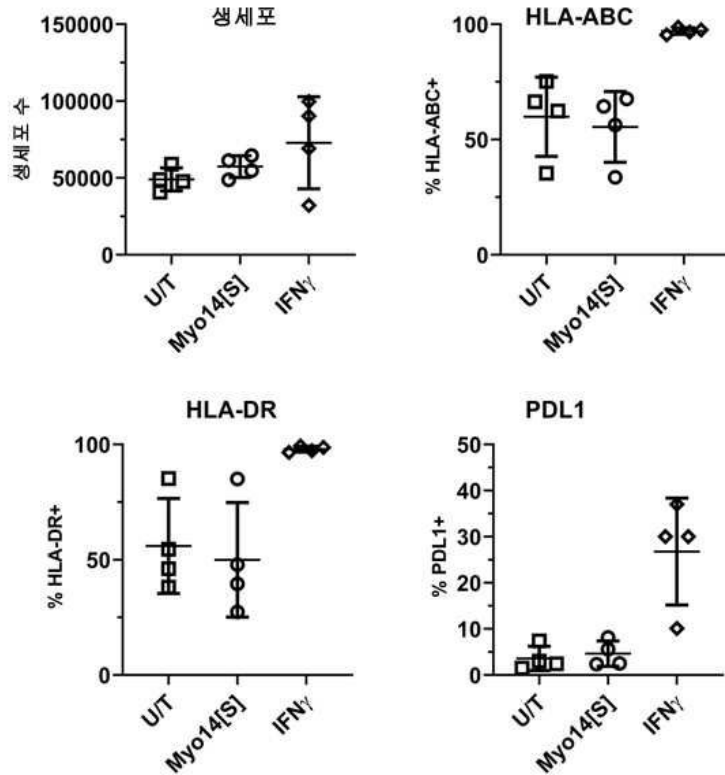
도면6b



도면6c

c

Myo14[S]로 코팅 7일 후 인간 MSC에서 염색성 마커의 생존력 및 발현



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> CytoSeek Ltd

<120> Product and method

<130> P3479PC00

<150> GB1902992.5

<151> 2019-03-06

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 1

Met His His His His His His Gly Ser Ser Gly Glu Asn Leu Tyr Phe

1 5 10 15

Gln Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Gln Leu Val Leu Asn Val Trp Gly

20 25 30

Lys Val Glu Ala Asp Ile Pro Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg

35 40 45

Leu Phe Lys Gly His Pro Lys Thr Leu Lys Lys Phe Asp Arg Phe Lys

50 55 60

His Leu Lys Ser Lys Lys Lys Met Lys Ala Ser Glu Lys Leu Lys Lys

65 70 75 80

His Gly Ala Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys Lys

85 90 95

Gly His His Glu Ala Lys Ile Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr

100 105 110

Lys His Lys Ile Pro Val Lys Tyr Leu Lys Phe Ile Ser Lys Ala Ile

115 120 125

Ile Lys Val Leu Gln Ser Lys His Pro Gly Asp Phe Gly Lys Lys Ala

130 135 140

Gln Gly Ala Met Asn Lys Ala Leu Lys Leu Phe Arg Lys Lys Met Ala

145 150 155 160

Ser Asn Tyr Lys Glu Leu

165

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 2

Met His His His His His His Gly Ser Ser Gly Glu Asn Leu Tyr Phe

1 5 10 15

Gln Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Gln Leu Val Leu Asn Val Trp Gly

20 25 30
Lys Val Glu Ala Lys Ile Pro Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg
35 40 45

Leu Phe Lys Gly His Pro Lys Thr Leu Lys Lys Phe Asp Arg Phe Lys
50 55 60
His Leu Lys Ser Lys Lys Lys Met Lys Ala Ser Lys Lys Leu Lys Lys
65 70 75 80
His Gly Ala Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys Lys
85 90 95
Gly His His Lys Ala Lys Ile Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr
100 105 110

Lys His Lys Ile Pro Val Lys Tyr Leu Lys Phe Ile Ser Lys Ala Ile
115 120 125
Ile Gln Val Leu Gln Ser Lys His Pro Gly Lys Phe Gly Ala Lys Ala
130 135 140
Gln Gly Ala Met Asn Lys Ala Leu Lys Leu Phe Arg Lys Lys Met Ala
145 150 155 160
Ser Asn Tyr Lys Lys Leu
165

<210> 3

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 3

Met His His His His His His Gly Ser Ser Gly Glu Asn Leu Tyr Phe
1 5 10 15
Gln Gly Leu Ser Lys Gly Lys Trp Gln Leu Val Leu Asn Val Trp Gly
20 25 30
Lys Val Lys Ala Lys Ile Pro Gly His Gly Gln Lys Val Leu Ile Arg
35 40 45

Leu Phe Lys Gly His Pro Lys Thr Leu Lys Glu Phe Lys Arg Phe Lys

50 55 60

His Leu Lys Ser Lys Lys Lys Met Lys Ala Ser Lys Lys Leu Lys Lys

65 70 75 80

His Gly Ala Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys Lys

85 90 95

Gly His His Glu Ala Lys Ile Glu Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr

100 105 110

Glu His Glu Ile Pro Val Glu Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Lys Ala Ile

115 120 125

Ile Gln Val Leu Gln Ser Lys His Pro Gly Lys Phe Gly Ala Lys Ala

130 135 140

Gln Gly Ala Met Asn Lys Ala Leu Lys Leu Phe Arg Lys Asp Met Ala

145 150 155 160

Ser Asn Tyr Glu Glu Leu

165

<210> 4

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 4

Met His His His His His His Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr

1 5 10 15

Phe Gln Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Gln Leu Val Leu Asn Val Trp

20 25 30

Gly Lys Val Glu Ala Asp Ile Pro Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile

35 40 45

Arg Leu Phe Lys Gly His Pro Glu Thr Leu Lys Lys Phe Asp Arg Phe

50 55 60

Lys Lys Leu Lys Ser Glu Asp Lys Met Lys Lys Ser Glu Asp Leu Lys

65 70 75 80
 Lys His Gly Ala Thr Val Leu Lys Arg Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys
 85 90 95
 Lys Gly Arg His Glu Ala Lys Ile Lys Pro Leu Ala Gln Arg His Ala
 100 105 110
 Lys Lys His Lys Ile Pro Val Lys Tyr Leu Glu Phe Arg Ser Glu Ala
 115 120 125
 Ile Ile Arg Val Leu Arg Ser Lys His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp

 130 135 140
 Ala Gln Gly Ala Met Asn Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Lys Asp Met
 145 150 155 160
 Ala Ser Asn Tyr Lys Glu Leu Gly Phe Gln Gly
 165 170

 <210> 5
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Charge-modified myoglobin
 <400> 5
 Met His His His His His His Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr
 1 5 10 15

 Phe Gln Gly Leu Ser Lys Gly Glu Trp Lys Leu Val Leu Asn Val Trp
 20 25 30
 Gly Lys Val Glu Ala Asp Ile Pro Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile
 35 40 45
 Arg Leu Phe Lys Gly His Pro Lys Thr Leu Lys Lys Phe Lys Arg Phe
 50 55 60
 Lys His Leu Lys Ser Glu Lys Lys Met Lys Ala Ser Lys Asp Leu Lys
 65 70 75 80

 Lys His Gly Ala Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys
 85 90 95
 Lys Gly His His Lys Ala Glu Ile Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala

100 105 110
 Thr Lys His Lys Ile Pro Val Lys Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Glu Ala
 115 120 125
 Ile Ile Gln Val Leu Gln Ser Lys His Pro Gly Lys Phe Gly Ala Lys
 130 135 140

Ala Gln Gly Ala Met Asn Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Lys Asp Met
 145 150 155 160
 Ala Ser Asn Tyr Lys Lys Leu Gly Phe Gln Gly
 165 170

<210> 6

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 6

Met His His His His His His Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr
 1 5 10 15
 Phe Gln Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Arg Leu Val Leu Lys Val Trp

20 25 30
 Gly Lys Val Glu Arg Asp Ile Pro Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile
 35 40 45
 Arg Leu Phe Lys Gly His Pro Glu Thr Leu Lys Lys Phe Asp Arg Phe
 50 55 60
 Lys His Leu Lys Ser Glu Arg Glu Met Lys Ala Ser Lys Asp Leu Lys
 65 70 75 80
 Lys His Gly Ala Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys

85 90 95
 Lys Gly His His Glu Ala Glu Ile Lys Pro Leu Ala Lys Ser His Ala
 100 105 110
 Thr Lys His Lys Ile Pro Val Lys Tyr Leu Lys Phe Ile Ser Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Gln Val Leu Gln Ser Lys His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Arg

130 135 140
Ala Gln Gly Ala Met Asn Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Lys Asp Met

145 150 155 160
Ala Arg Asn Tyr Lys Lys Leu Gly Phe Gln Gly

165 170

<210> 7

<211> 169

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 7

Met His His His His His His Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr

1 5 10 15

Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Arg Leu Val Leu Lys Val Trp Gly Lys

20 25 30

Val Glu Arg Asp Ile Pro Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg Leu

35 40 45

Phe Lys Gly His Pro Glu Thr Leu Lys Lys Phe Asp Arg Phe Lys His

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Asp Glu Met Lys Ala Ser Glu Lys Leu Lys Lys His

65 70 75 80

Gly Ala Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys Lys Gly

85 90 95

His His Glu Ala Glu Ile Lys Pro Leu Ala Lys Ser His Ala Thr Lys

100 105 110

His Lys Ile Pro Val Lys Tyr Leu Lys Phe Ile Ser Lys Ala Ile Ile

115 120 125

Gln Val Leu Gln Ser Lys His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala Gln

130 135 140

Gly Ala Met Asn Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Lys Asp Met Ala Ser

145 150 155 160

Lys Tyr Lys Lys Leu Gly Phe Gln Gly

165

<210> 8

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 8

Met His His His His His His Gly Ser Gly Gly Leu Ser Asp Gly Glu

1 5 10 15

Trp Gln Leu Val Leu Lys Val Trp Gly Lys Val Glu Ala Asp Ile Pro

20 25 30

Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg Leu Phe Lys Gly His Pro Glu

35 40 45

Thr Leu Glu Lys Phe Asp Arg Phe Lys His Leu Lys Ser Glu Asp Glu

50 55 60

Met Lys Ala Ser Glu Asp Leu Lys Lys His Gly Ala Thr Val Leu Thr

65 70 75 80

Ala Leu Gly Lys Ile Leu Lys Lys Lys Gly His His Glu Ala Glu Ile

85 90 95

Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr Lys His Lys Ile Pro Val Lys

100 105 110

Tyr Leu Lys Phe Ile Ser Glu Ala Ile Ile Lys Val Leu Gln Ser Lys

115 120 125

His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala Gln Gly Ala Met Lys Lys Ala

130 135 140

Leu Glu Leu Phe Arg Lys Asp Met Ala Ser Lys Tyr Lys Glu Leu Gly

145 150 155 160

Phe Gln Gly

<210> 9

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 9

Met His His His His His His Gly Ser Gly Gly Leu Ser Asp Gly Glu

1 5 10 15

Trp Gln Leu Val Leu Lys Val Trp Gly Lys Val Glu Ala Asp Ile Pro

20 25 30

Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg Leu Phe Lys Gly His Pro Glu

35 40 45

Thr Leu Lys Lys Phe Asp Arg Phe Lys His Leu Lys Ser Glu Asp Glu

50 55 60

Met Lys Ala Ser Glu Asp Leu Lys Lys His Gly Ala Thr Val Leu Lys

65 70 75 80

Lys Leu Gly Lys Ile Leu Lys Lys Lys Gly Lys His Glu Ala Glu Ile

85 90 95

Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr Lys His Lys Ile Pro Val Lys

100 105 110

Tyr Leu Lys Phe Ile Ser Glu Ala Ile Ile Lys Val Leu Gln Ser Lys

115 120 125

His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala Gln Gly Ala Met Lys Lys Ala

130 135 140

Leu Lys Leu Phe Arg Lys Asp Met Ala Ser Lys Tyr Lys Glu Leu Gly

145 150 155 160

Phe Gln Gly

<210> 10

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 10

Met His His His His His His Gly Ser Gly Gly Leu Ser Asp Gly Glu

1 5 10 15
Trp Gln Leu Val Leu Lys Val Trp Gly Lys Val Glu Ala Asp Ile Pro
20 25 30
Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg Leu Phe Lys Gly His Pro Glu
35 40 45
Thr Leu Glu Lys Phe Asp Arg Phe Lys His Leu Lys Ser Glu Asp Glu
50 55 60
Met Lys Arg Ser Glu Asp Leu Lys Lys His Gly Ala Thr Val Leu Lys

65 70 75 80
Ala Leu Gly Lys Ile Leu Lys Lys Lys Gly His His Glu Ala Glu Ile
85 90 95
Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr Lys His Lys Ile Pro Val Lys
100 105 110
Tyr Leu Lys Phe Ile Ser Glu Ala Ile Ile Lys Val Leu Gln Ser Lys
115 120 125
His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala Gln Gly Ala Met Lys Lys Ala

130 135 140
Leu Glu Leu Phe Arg Lys Asp Met Ala Ser Lys Tyr Lys Glu Leu Gly
145 150 155 160
Phe Gln Gly

<210> 11

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 11

Met His His His His His His Gly Ser Gly Gly Leu Ser Asp Gly Glu
1 5 10 15
Trp Gln Leu Val Leu Lys Val Trp Gly Lys Val Glu Ala Asp Ile Pro

20 25 30
 Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg Leu Phe Lys Gly His Pro Glu
 35 40 45
 Thr Leu Glu Lys Phe Asp Arg Phe Lys Lys Leu Lys Ser Glu Asp Glu
 50 55 60
 Met Lys Arg Ser Glu Asp Leu Lys Lys His Gly Ala Thr Val Leu Lys
 65 70 75 80
 Lys Leu Gly Lys Ile Leu Lys Lys Lys Gly Lys His Glu Ala Glu Ile

85 90 95
 Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr Lys His Lys Ile Pro Val Lys
 100 105 110
 Tyr Leu Lys Phe Ile Ser Glu Ala Ile Ile Lys Val Leu Gln Ser Lys
 115 120 125
 His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala Gln Gly Ala Met Lys Lys Ala
 130 135 140
 Leu Lys Leu Phe Arg Lys Asp Met Ala Ser Lys Tyr Lys Glu Leu Gly

145 150 155 160
 Phe Gln Gly

<210> 12

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 12

Met His His His His His His Gly Ser Gly Gly Leu Arg Asp Gly Glu
 1 5 10 15
 Trp Gln Leu Val Leu Lys Val Trp Gly Lys Val Glu Ala Asp Ile Pro
 20 25 30
 Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg Leu Phe Lys Gly His Pro Glu
 35 40 45
 Thr Leu Glu Lys Phe Asp Arg Phe Lys Lys Leu Lys Ser Glu Asp Glu

50 55 60
 Met Lys Arg Ser Glu Asp Leu Lys Lys His Gly Ala Thr Val Leu Lys
 65 70 75 80
 Lys Leu Gly Lys Ile Leu Lys Lys Lys Gly Lys His Glu Ala Glu Ile
 85 90 95
 Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr Lys His Lys Ile Pro Val Lys

 100 105 110
 Tyr Leu Lys Phe Ile Ser Glu Ala Ile Ile Lys Val Leu Gln Ser Lys
 115 120 125
 His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala Gln Gly Ala Met Lys Lys Ala
 130 135 140
 Leu Lys Leu Phe Arg Lys Asp Met Ala Ser Lys Tyr Lys Glu Leu Gly
 145 150 155 160
 Phe Gln Gly

<210> 13

<211> 695

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 13

Met His His His His His His Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile
 1 5 10 15
 Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys
 20 25 30
 Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp
 35 40 45
 Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro

50 55 60
 Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser
 65 70 75 80
 Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu

85 90 95
 Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala
 100 105 110
 Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu

 115 120 125
 Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys
 130 135 140
 Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu
 145 150 155 160
 Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe
 165 170 175
 Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn

 180 185 190
 Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn
 195 200 205
 Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe
 210 215 220
 Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser
 225 230 235 240
 Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr

 245 250 255
 Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly
 260 265 270
 Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu
 275 280 285
 Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys
 290 295 300
 Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Val Lys

 305 310 315 320
 Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile
 325 330 335

Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr
340 345 350
Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu
355 360 365
Lys Asp Ala Gln Thr Asn Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn
370 375 380
Asn Asn Asn Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Trp Asn
385 390 395 400
Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn
405 410 415
Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu
420 425 430
Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Val Lys Leu Ala Ala
435 440 445
Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val
450 455 460
Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala
465 470 475 480
Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Ser Ala Ile Ser Leu Ala
485 490 495
Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr
500 505 510
Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Gly
515 520 525
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu
530 535 540
Ser Asp Gly Glu Trp Gln Leu Val Leu Lys Val Trp Gly Lys Val Glu
545 550 555 560
Ala Asp Ile Pro Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg Leu Phe Lys
565 570 575
Gly His Pro Glu Thr Leu Lys Lys Phe Asp Arg Phe Lys His Leu Lys

580 585 590
 Ser Glu Asp Glu Met Lys Ala Ser Glu Asp Leu Lys Lys His Gly Ala
 595 600 605
 Thr Val Leu Lys Lys Leu Gly Lys Ile Leu Lys Lys Lys Gly Lys His
 610 615 620
 Glu Ala Glu Ile Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr Lys His Lys

 625 630 635 640
 Ile Pro Val Lys Tyr Leu Lys Phe Ile Ser Glu Ala Ile Ile Lys Val
 645 650 655
 Leu Gln Ser Lys His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala Gln Gly Ala
 660 665 670
 Met Lys Lys Ala Leu Lys Leu Phe Arg Lys Asp Met Ala Ser Lys Tyr
 675 680 685
 Lys Glu Leu Gly Phe Gln Gly
 690 695

<210> 14

<211> 689

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified myoglobin

<400> 14

Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys
 1 5 10 15
 Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr
 20 25 30
 Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe
 35 40 45

Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala
 50 55 60
 His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile
 65 70 75 80
 Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp

	85	90	95
Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu			
	100	105	110
Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys			
	115	120	125
Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly			
	130	135	140
Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro			
145	150	155	160
Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys			
	165	170	175
Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly			
	180	185	190
Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp			
	195	200	205
Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala			
	210	215	220
Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys			
225	230	235	240
Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser			
	245	250	255
Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro			
	260	265	270
Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp			
	275	280	285
Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala			
	290	295	300
Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Val Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala			
305	310	315	320
Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln			
	325	330	335

Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala
340 345 350

Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn
355 360 365

Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Leu Gly Glu
370 375 380

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro
385 390 395 400

Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser
405 410 415

Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser
420 425 430

Pro Ser Asn Gln Thr Val Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser
435 440 445

Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly
450 455 460

Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly
465 470 475 480

Thr Tyr Leu Cys Ser Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys
485 490 495

Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val
500 505 510

Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
515 520 525

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Gln
530 535 540

Leu Val Leu Lys Val Trp Gly Lys Val Glu Ala Asp Ile Pro Gly His
545 550 555 560

Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg Leu Phe Lys Gly His Pro Glu Thr Leu
565 570 575

Lys Lys Phe Asp Arg Phe Lys His Leu Lys Ser Glu Asp Glu Met Lys

580 585 590
Ala Ser Glu Asp Leu Lys Lys His Gly Ala Thr Val Leu Lys Lys Leu
595 600 605
Gly Lys Ile Leu Lys Lys Lys Gly Lys His Glu Ala Glu Ile Lys Pro
610 615 620

Leu Ala Gln Ser His Ala Thr Lys His Lys Ile Pro Val Lys Tyr Leu
625 630 635 640
Lys Phe Ile Ser Glu Ala Ile Ile Lys Val Leu Gln Ser Lys His Pro
645 650 655
Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala Gln Gly Ala Met Lys Lys Ala Leu Lys
660 665 670
Leu Phe Arg Lys Asp Met Ala Ser Lys Tyr Lys Glu Leu Gly Phe Gln
675 680 685

Gly

<210> 15

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Charge-modified GFP

<400> 15

Met Ala Ser Lys Gly Glu Arg Leu Phe Arg Gly Lys Val Pro Ile Leu
1 5 10 15
Val Glu Leu Lys Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly
20 25 30
Lys Gly Lys Gly Asp Ala Thr Arg Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60
Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Lys His Met Lys
65 70 75 80
Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Lys Gly Tyr Val Gln Glu

	85	90	95
Arg Thr Ile Ser Phe Lys Lys Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Ala Glu			
100	105	110	
Val Lys Phe Glu Gly Arg Thr Leu Val Asn Arg Ile Lys Leu Lys Gly			
115	120	125	
Arg Asp Phe Lys Glu Lys Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Arg Tyr			
130	135	140	
Asn Phe Asn Ser His Lys Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Arg Lys Asn			
145	150	155	160
Gly Ile Lys Ala Lys Phe Lys Ile Arg His Asn Val Lys Asp Gly Ser			
165	170	175	
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Arg Gly			
180	185	190	
Pro Val Leu Leu Pro Arg Asn His Tyr Leu Ser Thr Arg Ser Lys Leu			
195	200	205	
Ser Lys Asp Pro Lys Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe			
210	215	220	
Val Thr Ala Ala Gly Ile Lys His Gly Arg Asp Glu Arg Tyr Lys			
225	230	235	