



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월21일

(11) 등록번호 10-2558941

(24) 등록일자 2023년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/74 (2015.01) A61L 2/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2023.01) A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/24 (2006.01) C07K 14/33 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/74 (2013.01)

A61L 2/0035 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7006127

(22) 출원일자(국제) 2016년08월03일

심사청구일자 2021년06월03일

(85) 번역문제출일자 2018년03월02일

(65) 공개번호 10-2018-0056642

(43) 공개일자 2018년05월29일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/045400

(87) 국제공개번호 WO 2017/024059

국제공개일자 2017년02월09일

(30) 우선권주장

62/200,903 2015년08월04일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP06502649 A

JP2014506893 A

W02012112696 A1

W02014055682 A1

(73) 특허권자

백선 테라퓨틱스 엘엘씨

미국, 92121 캘리포니아, 샌디에고, 슈트 105, 소렌토 밸리 로드 11585

(72) 발명자

지아칼론, 매튜, 제이.

미국 캘리포니아주 92104, 샌디에고 오하이오 스트리트 4032

워드, 개리, 에이치.

미국 캘리포니아주 92129, 샌디에고 셀럼 라인 12139 워드 컨설팅, 엘엘씨 내

(74) 대리인

특허법인이룸리온

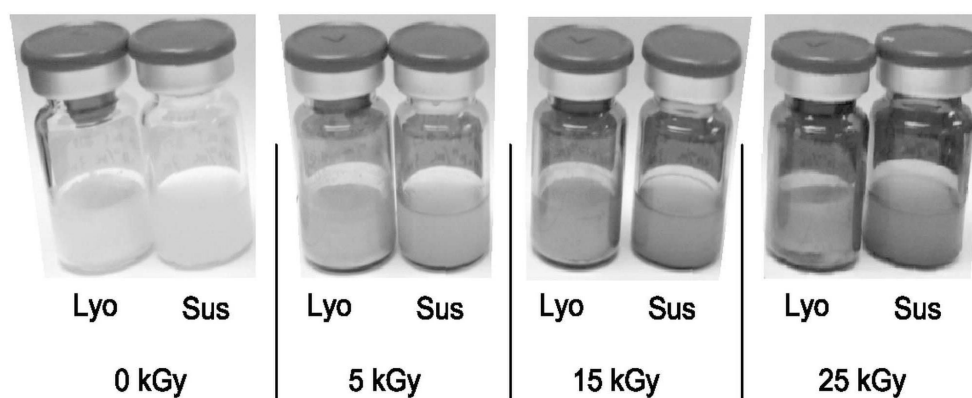
전체 청구항 수 : 총 36 항

심사관 : 양용철

(54) 발명의 명칭 박테리아 미니세포 기반 생물 약제의 이온화 방사선 조사 멸균 및 그 사용방법

**(57) 요약**

본 발명은 이온화 방사선에 노출시켜 박테리아 미니세포를 포함하는 조성물 또는 박테리아 미니세포를 최종적으로 멸균시키는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 최종적으로 멸균된 박테리아 미니세포, 박테리아 미니세포를 포함하는 약제학적 조성물 및 상기 박테리아 미니세포와 약제학적 조성물의 사용방법에 관한 것이다.

**대표도**

(52) CPC특허분류

*A61P 29/00* (2023.02)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C07K 14/24* (2013.01)

*C07K 14/33* (2013.01)

*A61L 2202/21* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

약제학적 용도를 위해 최종적으로 멸균된 박테리아 미니세포를 생산하는 방법으로서,  
감마선에 복수 개의 박테리아 미니세포를 포함하는 조성물을 노출시키는 것을 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제1항에 있어서,  
상기 감마선 선량이 약 5 kGy 내지 약 40 kGy인, 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,  
상기 감마선 선량이 약 25 kGy인, 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,  
상기 감마선 선량은 상기 조성물이 USP 38 NF 33 버전의 USP <71> 표준을 준수하도록 상기 조성물을 멸균시키기에 충분한 것인, 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,  
상기 조성물은 상기 박테리아 미니세포와 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물인, 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,  
상기 약제학적으로 허용 가능한 부형제가 트레할로스(trehalose)인, 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,  
상기 조성물은 상기 박테리아 미니세포 및 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 암, 유전적 장애, 또는 감염질환 치료용 약학 조성물인, 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,  
상기 약제학적으로 허용 가능한 희석제가 멸균수인, 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,  
상기 조성물은 냉동 현탁(frozen suspension) 형태인, 방법.

**청구항 11**

제1항에 있어서,  
상기 조성물은 냉동 동결 건조(frozen lyophile) 형태인, 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서,  
상기 박테리아 미니세포는 인바신(invasion)을 제시하는 것인, 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서,  
상기 인바신은 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*) 유래 인바신인, 방법.

**청구항 14**

제12항에 있어서,  
상기 박테리아 미니세포는 페르프린고리신 O(perfringolysin O, PFO)를 포함하는 것인, 방법.

**청구항 15**

제1항의 방법에 의하여 생산된 박테리아 미니세포 조성물.

**청구항 16**

암, 유전적 장애, 또는 감염질환 치료용 약제학적 조성물로서,  
복수 개의 박테리아 미니세포를 포함하되,  
상기 박테리아 미니세포는 감마선에 노출된 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 17**

제16항에 있어서,  
상기 약제학적 조성물은 멸균된 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 18**

제16항 또는 제17항에 있어서,  
상기 박테리아 미니세포는 최종적으로 멸균된 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 19**

제16항 또는 제17항에 있어서,  
상기 약제학적 조성물은 감마선에 노출된 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 20**

제16항 또는 제17항에 있어서,  
상기 박테리아 미니세포는 표적화된 치료용 미니세포를 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 21**

제16항 또는 제17항에 있어서,  
상기 박테리아 미니세포는 면역조절 미니세포를 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

## 청구항 22

제16항 또는 제17항에 있어서,

상기 박테리아 미니세포는 면역원성 미니세포를 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

## 청구항 23

제16항 또는 제17항에 있어서,

상기 박테리아 미니세포는 대장균 속(*Escherichia* spp.), 살모넬라 속(*Salmonella* spp.), 리스테리아 속(*Listeria* spp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* spp.), 아시네토박터 속(*Acinetobacter* spp.), 나이세리아 속(*Neisseria* spp.), 시겔라 속(*Shigella* spp.), 바실러스 속(*Bacillus* spp.), 또는 헤모필루스 속(*Haemophilus* spp.)에서 선택된 박테리아에서 유래된 것인, 약제학적 조성물.

## 청구항 24

제16항 또는 제17항에 있어서,

약제학적으로 허용 가능한 부형제를 더 포함하는, 약제학적 조성물.

## 청구항 25

제24항에 있어서,

상기 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 트레할로스인, 약제학적 조성물.

## 청구항 26

제16항 또는 제17항에 있어서,

약제학적으로 허용 가능한 희석제를 더 포함하는, 약제학적 조성물.

## 청구항 27

제26항에 있어서,

상기 약제학적으로 허용 가능한 희석제는 멸균수인, 약제학적 조성물.

## 청구항 28

제16항 또는 제17항에 있어서,

상기 약제학적 조성물이 USP 38 NF 33 버전의 USP <71> 표준을 준수하는, 약제학적 조성물.

## 청구항 29

제16항 또는 제17항에 있어서,

상기 박테리아 미니세포는 인바신을 제시하는 것인, 약제학적 조성물.

## 청구항 30

제29항에 있어서,

상기 인바신은 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*) 유래 인바신인, 약제학적 조성물.

## 청구항 31

제29항에 있어서,

상기 박테리아 미니세포는 페르프린고리신 0(perfringolysin 0, PF0)를 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

## 청구항 32

제16항 또는 제17항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 냉동 현탁(frozen suspension) 형태인, 약제학적 조성물.

### 청구항 33

제16항 또는 제17항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 냉동 동결 건조(frozen lyophile) 형태인, 약제학적 조성물.

### 청구항 34

암, 유전적 장애, 또는 감염질환 치료용 생물의약(biopharmaceutical) 조성물로서,

이온화 감마선의 멸균 선량에 노출된 복수 개의 박테리아 미니세포를 포함하되,

상기 생물의약 조성물은 USP <71>을 준수하고,

상기 박테리아 미니세포는

(i) 상기 박테리아 미니세포 표면 상에 인바신을 제시하며,

(ii) 생체활성 페이로드(bioactive payload)로서 페르프린고리신 0(perfringolysin 0)를 포함하고,

상기 페르프린고리신 0의 활성이 감마선 조사에 대한 노출에 의해 영향을 받지 않는, 생물의약 조성물.

### 청구항 35

제34항에 있어서,

상기 인바신은 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*) 유래 인바신인, 생물의약 조성물.

### 청구항 36

제34항에 있어서,

상기 감마선 조사 선량이 약 5 kGy 내지 약 40 kGy인, 생물의약 조성물.

### 청구항 37

제34항에 있어서,

상기 감마선 조사 선량이 약 25 kGy인, 생물의약 조성물.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)의 규정에 의해 2012년 10월 02일자로 출원된 미국 가출원 제 61/709102 호에 대한 우선권을 주장하며, 이는 명백히 본원에서 그 전체가 참고로 인용된다.

[0003] 본 출원은 암, 유전적 장애, 감염병 그리고 기타 질병의 검출, 치료 및 예방을 위한 분석용, 치료용, 예방용 생물 약제 제품과 생물 약제 물질로의 사용을 위한 진정세균미니세포(eubacterialminicells)의 생산, 정제, 제제, 최종 멸균을 위한 조성물과 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0004] 본 발명의 배경기술에 대한 하기 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공되지만, 본 발명에 대한 선행기술을 설명하거나 구성하기 위해 허용되는 것은 아니다. 논문, 특허, 특허 출원 및 기타 모든 문서의 내용, 및 본 출원에서 언급되거나 인용된 모든 기타 문헌 및 전자적으로 이용 가능한 정보는 개개의 공개된 문헌 각각이 참고로 인용되도록 구체적이고 개별적으로 표시되는 경우에 동일한 정도로 본원에서 그 전체가 참고로 인용된다. 본

출원인들은 이같은 논문, 특허, 특허 출원서 또는 기타 문헌으로부터의 임의의 모든 자료 및 정보를 본원에 물리적으로 결합할 수 있는 권리를 갖는다.

[0005] 저분자 약물과 거대분자 약물전달 운반체로써 박테리아 미니세포와 기타 생체적합한 마이크로입자와 나노입자의 사용은 암을 선택적으로 표적화 및 치료하고 /하거나 백신으로 작용하도록 고안된 새로운 생물 의약품 개발에 있어서 관심의 대상이 되어져 왔다. 박테리아 미니세포는 재조합 미니 셀을 생산하는 박테리아 균주에서 형성 될 수 있는 구형의 나노 크기 (약 400nm) 입자이다. 미니세포는 박테리아 염색체를 제외하고 부모 세균의 모든 구성 요소와 분자 구성 요소를 가지고 있다. 따라서, 미니세포는 살아 있는 것이 아니며, 복제 할 수 없으며 감염성이 없어 생체 내 전달 운반체와 감염 위험이 없는 백신으로 매우 적합하다. 본 명세서에서 보다 상세히 기술 된 바와 같이, 미니세포는 재조합 공학, 재조합 발현 기술, 및 용이한 분자 생물학적 기술 적용이 가능한 박테리아 균주로부터 유래하기 때문에, 재조합 공학에 매우 적합하고 다른 나노 전달 기술과 비교하여 표적 약물 전달 및 백신 운송 수단으로 매우 쉽게 전환된다.

[0006] 사람에게 사용되는 재조합 박테리아 미니세포 기반 바이오의약품의 개발에 있어 주요 장애물 중 하나는 종종 기존의 표준화 된 필터 기반 방법론을 사용하여 이들 제품을 안정적으로 살균하는 능력이었으며, 종종 미니세포는 재 보온액에 남아 있고, 표준 0.22 마이크론 필터 멤브레인을 쉽게 통과하지 못한다는 것이다. US 2004/0265994 에 기술 된 바와 같이, 바이오 의약품으로서 정제하기 위해 사용되는 다른 여과에 기초한 방법은 ICH 가이드 라인을 고려하여 유효성이 입증 된 멸균 방법을 사용하여 일정한 무균성을 보장하지 못한다. 또한, 이 방법은 항생제 및 높은 염농도가 있는 상태에서 장기간의 항온처리를 포함한 미니세포의 다운스트림 처리에 여러 추가 단계를 도입한다.

[0007] 따라서, 박테리아 미니세포 기반 바이오의약품을 멸균하기 위한 효과적이고 신뢰할 수 있는 방법이 요구된다.

## 발명의 내용

[0008] 발명의 개요

[0009] 본 발명은 다수의 박테리아 미니세포를 포함하는 조성물을 이온화 방사선에 노출시키는 단계를 포함하는, 약제학적 용도를 위한 최종 살균 박테리아 미니세포의 제조방법을 개시한다. 이온화 방사선 조사는, 예를 들면, 감마선 조사, E- 빔 (전자선, 베타선 조사), X- 선 (광자) 조사 및 UV 조사 일 수 있다. 이온화 방사선 조사의 바람직한 유형 중 하나는 감마선 조사이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 이온화 방사선 조사선량은 약 5 kGy 내지 약 40 kGy이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 이온화 방사선 조사선량은 약 25 kGy 이다. 일부 구현예에서, 감마선 조사량은 USP 38 NF 33 버전에 따른 USP <71> 표준에 부합하는 수준으로 조성물을 멸균하는데 충분할 수 있다.

[0010] 일부 구현예에서, 조성물은 상기 박테리아 미니세포 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 상기 박테리아 미니세포 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제조하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 트레할로오스이다. 일부 구현예에서, 조성물은 상기 박테리아 미니세포 및 약학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 약학 조성물이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 상기 박테리아 미니세포 및 약학적으로 허용 가능한 희석제를 포함하는 약학 조성물을 생산하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적으로 허용되는 희석제는 멸균수(sterile water)이다.

[0011] 일부 구현예에서, 박테리아 미니세포는 냉동 현탁액(frozen suspension)으로서 최종 살균량의 이온화 방사선에 노출된다. 일부 구현예에서, 박테리아 미니세포는 냉동 현탁액(frozen suspension)으로서 최종 살균량의 이온화 방사선에 노출된다. 일부 구현예에서, 조성물은 냉동 동결 건조액(frozen lyophile)으로서 최종 살균량의 이온화 방사선에 노출된다. 일부 구현예에서, 조성물은 냉동 동결 건조액(frozen lyophile)으로서 최종 살균량의 이온화 방사선에 노출된다.

[0012] 일부 구현예에서, 박테리아 미니세포는 인바신(invasin) 또는 그 기능적 동등물을 발현 및/또는 전지한다. 인바신은, 예를 들어, 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*)에서 유래한 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 박테리아 미니세포는 페르프린고리신 O(perfringolysin O, PF0)를 포함한다.

[0013] 또한, 본 발명은 박테리아 미니세포가 이온화 방사선 조사에 노출된 다수의 박테리아 미니세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 무균이다. 일부 구현예에서, 박테리아 미니세포 또는 약학 조성물은 최종적으로 멸균되었다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 이온화 방사선 조사에 노출되었다.

- [0014] 일부 구현예에서, 상기 박테리아 미니세포는 표적 치료용 미니세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 박테리아 미니세포는 면역 조절 미니세포를 포함한다. 일부 구현예에서 박테리아 미니세포는 면역원성 미니세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 박테리아 미니세포는 대장균 속 (*Escherichia* spp.), 살모넬라 속 (*Salmonella* spp.), 리스테리아 속 (*Listeria* spp.), 슈도모나스 속 (*Pseudomonas* spp.), 아시네토박터 속 (*Acinetobacter* spp.), 나이세리아 속 (*Neisseria* spp.), 시겔라 속 (*Shigella* spp.), 바실러스 속 (*Bacillus* spp.), 또는 헤모필루스 속 (*Haemophilus* spp.)에서 선택된 박테리아에서 유래된 것이다.
- [0015] 일부 구현예에서, 상기 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 더 포함한다. 상기 약제학적으로 허용되는 부형제는, 예를 들어, 트레할로스일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 희석제를 더 포함한다. 상기 약제학적으로 허용 가능한 희석제는, 예를 들어, 멸균수 일 수 있다.
- [0016] 일부 구현예에서, 상기 약학 조성물 중에 생존 가능한 미생물 오염물은 USP 38 NF 33 버전에서 USP <71> 표준에 부합하는 수준이다.
- [0017] 일부 구현예에서, 상기 박테리아 미니세포는 인바신(invasin) 또는 그 기능적 동등물을 발현 및/또는 전시한다. 예를 들어, 상기 인바신은 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*)로부터 유래된 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 박테리아 미니세포는 페르프린고리신 0 (perfringolysin 0, PFO)을 포함한다.
- [0018] 일부 구현예에서, 상기 약학 조성물은 냉동 현탁액 상태에 있다. 일부 구현예에서, 상기 약학 조성물은 냉동 동결 건조 상태에 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 멸균 용량의 이온화 감마선 조사에 노출된 다수의 박테리아 미니세포를 포함하는 생물 약제 (biopharmaceutical) 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 생물 약제 조성물은 미국약전 <71>에 따라 멸균되었으며, 상기 박테리아 세포(1)는 미니세포 표면에 인바신을 발현 및/또는 전시하고, (ii) 생체활성 페이로드(bioactive payload)로서 페르프린고리신 0 (perfringolysin 0, PFG) 를 포함하며, 상기 페르프린고리신 0의 활성이 이온화 감마선의 멸균 선량에 의해 영향을 받지 않는 생물 약제 조성물.

### 도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 명세서에 기재된 실시예에서 사용하기에 적합한 이중 특이적 항체 와 그 유도체의 비제한적인 예시적 유형의 개략도이다.
- 도 2A-B는 증가하는 감마선 조사에 노출된 VAX014 미니세포 함유 바이알 (냉동 현탁액 또는 냉동 동결 건조형태)을 나타낸다.
- 도 3은 육안검사를 위해 용기로부터 꺼낸 후, 증가하는 감마선 조사 선량에 노출된 용해된 동결건조 VAX014 미니세포와 해동된 냉동 현탁액의 VAX014 미니세포를 타낸다.
- 도 4는 증가하는 이온화 감마선량에 노출된 후의 VAX014 미니세포 냉동 현탁액 및 냉동 동결건조 형태의 용혈 활성도(페르프린고리신 0 (perfringolysin 0, PFG) 활성도)를 나타낸다.
- 도 5A-B는 증가하는 이온화 감마선량에 노출된 후의 VAX014 미니세포 냉동 현탁액 및 냉동 동결건조 형태의 VAX014 미니세포를 매개로 한 세포 살상 능력 (효능)에 관한 그래프이다.
- 도 6은 사전 멸균 처리 된 비조사 VAX014와 비교하여, 종양 보유 마우스의 정맥내 투여(intravesical administration.)후의 방광암 MB49 정위 동점의 마우스 모델에 대해 25kGy로 멸균 후에도 VAX014 항-종양 활성의 손실이 없음을 보여주는 카플란 - 마이어 생존 곡선(Kaplan-Meier survivalcurve)을나타낸다.
- 도 7A-F는 25kGy선량으로 감마선 조사 후에도 미니세포의 안정성, 무결성 또는 효능에 있어서 어떤 손실도 없음을 나타낸다. 상기 미니세포는 독소루비신(doxorubicin)을 포함하고 상기 세포 표면에 인간 표피 성장인자 수용체-1 (humanEpidermal Growth Factor Receptor 1, EGFR-1)에 대한 항체를 가지고 있다.
- 도 8A-B는 25kGy선량으로 감마선 조사 후에도 미니세포의 안정성, 무결성에 있어서 어떤 손실도 없음을 나타낸다. 상기 미니세포는 재조합 발현 플라스미드를 포함하고 상기 세포 표면에 인간 표피 성장인자 수용체-1 (humanEpidermal Growth Factor Receptor 1, EGFR-1)에 대한 항체를 가지고 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 다음의 상세한 설명에서, 본원의 일부를 형성하는 첨부된 도면에 만들어진다. 상세한 설명, 도면 및 청구 범위



에 설명된 예시적인 실시예는 제한하려는 것이 아니다. 여기에 제시된 요지의 정신 또는 범위를 벗어나지 않고 다른 실시예가 이용될 수 있고 다른 변경이 이루어질 수 있다. 본 명세서에 일반적으로 기술된 바와 같은 본 개시의 양상들은 다양한 다른 구성으로 배열, 대체, 조합 및 설계될 수 있으며, 이들 모두는 명백하게 고려되고 본 개시의 일부가 된다는 것을 쉽게 이해할 것이다.

- [0022] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 일반적으로 당업자에 의해 이해되는 동일한 의미를 갖는다. 본 출원이 실시예 및 예를 참조하여 설명되었지만, 본 발명의 사상을 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 본원에 인용된 모든 문헌은 그 전체가 본원에 참고로 인용되어 있다.
- [0023] 본 출원의 구현예는 하기 실시예에서 더욱 상세히 개시되며, 이는 본원의 출원의 범위를 어떤 식으로든 제한하려는 것은 아니다.
- [0024] 정의
- [0025] 본 명세서에서 용어 "면역조절성 미니세포(immunomodulatory minicells)"는 질병을 앓고 있는 포유류 수혜자(mammalian recipient)에게 유익하거나 치료용인 방식으로 면역계를 활성화, 비활성화 또는 영향을 미칠 수 있는 미니세포를 의미한다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 "면역원성 미니세포(immunogenic minicells)"는 특정 항원, 항원들, 병원성 유기체, 기회생물체(opportunistic organism), 기생 생물체(parasitic organism) 또는 암세포에 대한 적응 면역 반응을 자극할 수 있는 미니 세포를 의미한다(즉, 백신).
- [0027] 본 명세서에서, 용어 "면역 요법(immunotherapy)"은 면역 반응을 생성, 증진, 방해 또는 면역 반응에 영향을 미치는 면역조절 화합물, 바람직하게는 면역조절 미니세포의 사용을 의미하며, 그 결과로서 질병, 특히 암의 진행을 늦추거나 제거하는 것과 관련하여 유익한 효과를 갖는다.
- [0028] 본 명세서에서, 용어 "부착성 미니세포(adherent minicell)"는 상기 미니세포의 상당한 양의 엔도시토시스를 자극하지 않고 비-구성적 식세포성 진핵 세포(non-constitutively phagocytic eukaryotic cell)의 표면에 결합 및 부착할 수 있는 미니세포를 의미한다.
- [0029] 본 명세서에서, 용어 "점막-부착성 미니세포(muco-adherent minicell)"은 점막 표면에 결합 및 부착할 수 있는 미니세포를 의미한다.
- [0030] 본 명세서에서, 용어 "표적화 된 미니세포(targeted minicells)"는 재조합 공학 및/또는 외생성 표적 부분(예를 들어 항체 및 항체 유도체)의 첨가를 통해 변형되어 특정 조직, 기관 및/또는 세포를 선택적으로 표적화하는 미니세포를 의미한다.
- [0031] 본 명세서에서, 용어 "표적화 된 치료용 미니세포(targeted therapeutic minicells)"는, 예를 들어, 재조합 공학 및/또는 외생성 표적 부분(예를 들어, 항체 및 항체 유도체)의 첨가를 통해 변형되어 특정 조직, 장기 및/또는 세포를 선택적으로 표적화하고, 저분자 약물, 치료용 핵산, 치료용 폴리펩티드 및 이들의 임의의 조합을 더 포함하는 미니 세포를 의미한다.
- [0032] 본 명세서에서, 용어 "표적 미니세포 백신(targeted minicell vaccine)"은 감염성 질병 인자 또는 선택되는 종양 세포로부터 유래된 단백질 항원 및/또는 핵산 기재 백신(예 : DNA 또는 RNA-기재 백신)을 캡슐화하는 박테리아 미니세포를 지칭하며, 상기 미니세포는 면역 시스템의 항원제시세포가 특이적으로 결합할 수 있는 미니세포의 표면(예를 들어, 외부 표면)상에 면역 시스템의 항원제시세포에 대한 특이성을 부여하는 표적 부위를 추가 및/또는 표시한다. 또는 숙주 면역 반응의 기원, 진행 및/또는 유지에 관여하는 항원제시세포, 기관 또는 조직 유형을 특이적으로 인식하여 전달하고, 국소화 시키거나 또는 응집시켜, 항원에 미니세포의 항원성 내용물을 전달할 수 있다. 시험 관내 또는 생체 내에서 표적 세포, 조직 및 기관 유형을 제시한다. 이러한 표적화 된 소형 백신은 재조합 케모카인, 사이토 카인 또는 인터류킨 단백질 및 이를 코딩하는 기능성 핵산을 더 포함할 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서, 용어 "동형 미니세포 백신(homotypic minicell vaccine)"은 병원성 박테리아에 의해 생성된 박테리아 미니세포를 의미하며, 이에 미니세포 백신은 상기 병원성 박테리아에 대해 방어적이다. 동형 미니세포 백신은 동일한 감염성 질병 인자로부터 유래된 단백질 항원 및/또는 핵산 기반 백신(예를 들어, DNA 또는 RNA-기재 백신)을 추가로 제조할 수 있다. 이러한 동형 미니세포백신은 재조합 케모카인, 사이토 카인 또는 인터류킨 단백질 및 이를 암호화하는 기능적 핵산을 함께 포함할 수 있다. 상기 동형 미니세포 백신은 표적 미니세포

백신 일 수 있다.

- [0034] 본 명세서에서, 용어 "인테그린 표적 미니세포(Integrin-targeted minicells)"는 인바신(예를 들어, 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스에서 유래된 pan-BETA 1-인테그린 타겟 세포의 표면 분자인 인바신) 및 그 기능적 동등물을 발현 및/또는 전시하는 미니세포를 의미한다.
- [0035] 본 명세서에서, 용어 "인테그린 표적 치료 미니세포(Integrin-targeted therapeutic minicells)"은 인바신(예를 들어, 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스에서 유래된 pan-BETA 1-인테그린 타겟 세포의 표면 분자인 인바신) 및 그 기능적 동등물을 발현 및/또는 전시하는 미니세포로서, 상기 미니세포는 치료용 폴리펩티드, 저분자 약물, 치료용 핵산 및 이들의 임의의 조합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는 하나 이상의 생물활성 분자를 더 포함한다.
- [0036] 본 명세서에서, 용어 "인테그린 표적화 면역조절 미니세포(Integrin-targeted immunomodulatory minicells)"는 인바신(예를 들어, 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스에서 유래된 pan-BETA 1-인테그린 타겟 세포의 표면 분자인 인바신) 및 그 기능적 동등물을 발현 및/또는 전시하는 미니세포로서, 상기 미니세포는 면역조절 폴리 펩티드, 저분자 약물, 면역조절 핵산 및 이들의 임의의 조합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는 하나 이상의 생물활성 분자를 더 포함한다.
- [0037] 본 명세서에서, 용어 "VAX-IP 미니세포"는 인바신(예를 들어, 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스에서 유래된 pan-BETA 1-인테그린 타겟 세포의 표면 분자인 인바신) 및 그 기능적 동등물을 발현 및/또는 전시하는 미니세포로서, 상기 미니세포는 페르프린고리신 0 (PEO)를 더 포함한다.
- [0038] 본 명세서에서, 용어 "VAX014 미니세포"는 부형제로서 멸균 D-트레 할로스를 포함하는 약학 조성물로 제제화 된 VAX-IP 미니세포를 의미한다.
- [0039] 본 명세서에서, 용어 "VAX-IPT 미니세포"는 인바신(예를 들어, 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스에서 유래된 pan-BETA 1-인테그린 타겟 세포의 표면 분자인 인바신) 및 그 기능적 동등물을 발현 및/또는 전시하는 미니세포로서, 상기 미니세포가 페르프린고리신 0 (PFO) 및 단백질 독소를 더 포함한다.
- [0040] 본 명세서에서, 용어 "VAX-IPP 미니세포"는 인바신(예를 들어, 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스에서 유래된 pan-BETA 1-인테그린 타겟 세포의 표면 분자인 인바신) 및 그 기능적 동등물을 발현 및/또는 전시하는 미니세포로서, 상기 미니세포가 페르프린고리신 0 (PFO)와 단백질 독소 이외의 외생성 폴리펩티드를 포함한다.
- [0041] 본 명세서에서, 용어 "VAX-IPD 미니세포"는 인바신(예를 들어, 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스에서 유래된 pan-BETA 1-인테그린 타겟 세포의 표면 분자인 인바신) 및 그 기능적 동등물을 발현 및/또는 전시하는 미니세포로서, 상기 미니세포는 페르프린고리신 0 (PFO) 및 디프테리아 독소(diphtheria toxin)의 촉매 단편을 포함한다.
- [0042] 본 명세서에서, 용어 "원핵세포 분열 유전자"는 원핵세포 분열과정에 참여하는 유전자 산물을 코딩하는 유전자를 의미한다. 많은 세포 분열 유전자가 당 업계에서 발견되고 특성이 규명되었다. 예를 들어, 세포 분열 유전자는 *zipA*, *sulA*, *secA*, *dicA*, *dicB*, *dicC*, *dicF*, *ftsA*, *ftsI*, *ftsN*, *ftsK*, *ftsL*, *ftsQ*, *ftsW*, *ftsZ*, *minC*, *minD*, *minE*, *seqA*, *ccdB*, *sfiC* 및 *ddlB*를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 명세서에서, 용어 "도입 유전자"는 자연적으로 또는 임의의 유전 공학 기술에 의해 한 생물체에서 다른 생물체로 전달된 유전자 또는 유전 물질을 의미한다. 일부 구현예에서, 형질 전환 유전자는 한 유기체로부터 분리되어 다른 유기체로 도입된 유전자 서열을 함유하는 DNA의 단편이다. DNA의 이러한 비 - 고유 분절은 형질 전환 생물체에서 RNA 및/또는 단백질을 생성하는 능력을 보유할 수 있거나 형질 전환 생물체의 유전자 코드의 정상 기능을 변경시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 도입 유전자는 이전에 도입 유전자가 발견되지 않은 유기체 내로 도입되는 유전자 코딩 서열을 포함하는지 여부에 관계없이 인위적으로 구축된 DNA 서열이다.
- [0044] 본 명세서에서, 약제가 정제된 조성물과 비교하여 조성물 내에서 약제의 농도가 증가되고 및/또는 하나 이상의 바람직하지 않은 오염물의 농도가 감소되는 경우, 약제는 "정제(purified)"되었다고 한다. 일부 구현예에서, 상기 정제는 조성물 중의 약제의 농축 및/또는 그로부터 약제의 분리를 포함한다.
- [0045] 본 명세서에서, "생존 가능한 잔류 세포가 충분히 존재하지 않는(sufficiently devoid of viable parental cells)"이라는 용어는 "충분히 부족함"과 동의어로, 표적 치료용 미니세포의 독성 프로파일 및/또는 치료 효과에 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않는 생존 가능한 모세포 오염 수준을 갖는 정제된 미니 세포의 조성물을 의

미한다.

- [0046] 본 명세서에서, 용어 "멸균 된(sterilized)"은 미국 약전 버전 USP 38 NF 33의 표준 무균 시험 <71>, 그에 상응하는 외국 대응 파트 및 기타 승인된 국제 의약품 표준의 요건을 충족시키기 위한 미생물 오염도(bioburden)를 충분히 배제하는 것을 의미한다 .
- [0047] 본 명세서에서, 용어 "최종적으로 멸균된(terminally sterilized)"은 최종 약물이 미국 약전 버전 USP 38 NF 33의 표준 무균 시험 <71>, 그에 상응하는 외국 대응 파트 및 기타 승인된 국제 의약품 표준의 요건을 충족시키기 위해 충분한 정도로 미생물 오염도가 존재하지 않는 것으로 밝혀진 약물 제조 공정의 최종 단계를 의미한다. 최종적으로 멸균 된 약물은 환자에게 투여 할 준비가 될 수 있다.
- [0048] 본 명세서에서, 용어 "도메인" 또는 "단백질 도메인"은 공통의 물리적 및/또는 화학적 특징을 공유하는 분자 또는 구조의 영역을 의미한다. 단백질 도메인의 비제한적인 예는 소수성 막 투과 또는 말초 막 결합 영역, 구형 효소 또는 수용체 영역, 단백질-단백질 상호 작용 도메인 및/또는 핵산 결합 도메인을 포함한다.
- [0049] 용어 "진정세균(eubacteria)" 및 "원핵생물(prokaryote)"은 당해 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 사용되는 용어로 본 명세서에서 사용된다. 본 명세서에서, 용어 "원핵생물"은 예를 들어, 그람 음성 및 그람 양성 박테리아를 모두 포함하는 진정세균, 원핵 바이러스(예: 박테리오파지) 및 세포 내 기생충 (예: 리세티아, 클라미디아 등)을 포함한다.
- [0050] 본 명세서에서, 용어 "면역조절성 폴리펩티드"는 진핵 생물 또는 진핵 세포(예 : 인간과 같은 포유 동물)에 도입 될 때 면역 조절 효과를 갖는 다양한 단백질 분자 유형의 임의의 집합체를 의미한다. 면역조절성 폴리펩티드는 사이토카인, 케모카인, 콜레스테롤-의존성 세포 용해소, 기능성 효소, 항체 또는 항체 모방물, 활성화 된 카스파제, 프로-카스파제, 사이토카인, 케모카인, 세포 침투성 펩티드 또는 임의의 조합물 및/또는 이들 복수개를 포함 할 수 있다. 상기 용어는 "면역원" 또는 "항원"이라는 단어와 혼동되어서는 안되며, 아래에 각각 설명되어 있다.
- [0051] 본 명세서에서, 용어 "면역원" 및 "항원"은 상호 교환 가능하며 항원 특이적 항체, 세포 및/또는 알레르기 반응 이 항체에 부착 될 수 있는 폴리펩티드, 탄수화물, 지질, 핵산 및 기타 분자를 의미한다. 항원 특이적 면역 반응은 항원/면역원의 존재에 의존해야하며 여기에 사용된 면역 조절 반응의 정의에 포함되어서는 안된다.
- [0052] 본 명세서에서, 용어 "과발현"은 숙주 세포에서 DNA에 의해 코딩되는 기능성 핵산, 폴리펩티드 또는 단백질의 발현을 의미하며, 핵산, 폴리펩티드 또는 단백질은 숙주 세포에서 정상적으로 존재하지 않거나 또는 핵산, 폴리펩티드 또는 단백질 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하는 내인성 유전자로부터 정상적으로 발현 된 것보다 높은 수준으로 숙주 세포에 존재한다.
- [0053] 본 명세서에서, 용어 "조절(modulate)"는 생물학적 과정을 조절하기 위해 표적의 활성을 변화시키기 위해 표적과 직접 또는 간접적으로 상호 작용하는 것을 의미한다. "조절"의 방식은 표적의 활성을 증강 시키거나, 표적의 활성을 억제하거나, 표적의 활동을 제한하거나, 표적의 활성을 연장시키고, 표적의 활동을 약화시키는 것을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0054] 본 명세서에서, 용어 "이종성(heterologous)"은 미니세포 또는 미니세포 생산 박테리아 균주에서 자연적으로는 발견되지 않는 단백질, 유전자, 핵산, 영상 시약(imaging agent), 완충제 성분 또는 임의의 다른 생물학적 활성 물질을 지칭하는 것으로(예를 들어, 재조합적으로 도입되거나 미니세포를 생성하는 모세포로 변형 됨), 이들 물질은 상기 이종성 물질을 암호화하거나 상기 이종성 물질(예를 들어, 모세포에 대해 고유한 것이 아닌 생물활성 대사산물)을 생산할 수 있는 유전자들을 암호화하는 재조합 유전 물질을 함유하고 있는 미니세포 생산 박테리아 균주에 의해 발현, 전사, 번역 또는 증폭되거나, 다르게 생성된다.
- [0055] 본 명세서에서, 용어 "외생성(exogenous)"이란 세포에 대해 고유한 것이 아니거나, 미니세포의 경우에 상기 미니세포의 모세포의 태생에 대해 고유한 것이 아닌 단백질(항체를 포함함), 유전자, 핵산, 저분자 약물, 영상 시약, 완충제, 방사성 핵종(radionuclide), 또는 임의의 기타 생물학적 활성 또는 불활성 물질을 의미한다. 외생성 물질은 별도로 생성, 정제 및 부가된다는 측면에서 이종성 물질과는 다르다.
- [0056] 본 명세서에서, 용어 "치료용(therapeutic)"이란 용어는 동물(사람을 포함)에서 질병의 진행, 또는 기타 비정상적인 생물학적 과정들을 예방, 억제, 제거 및 방지하는 생물학적 효과, 또는 생물학적 효과들의 조합을 갖는 것을 의미한다.
- [0057] 본 명세서에서, 용어 "예방용(prophylactic)"이란 동물(사람을 포함)에서 질환, 질병 상태 또는 기타 이상 생물

학적 과정의 진행 또는 형성을 방지하거나 지연시키는 생물학적 효과 또는 생물학적 효과의 조합을 갖는 것을 의미한다.

- [0058] 본 명세서에서, 용어 "진단용(diagnostic)"이란 동물 (사람을 포함) 또는 생물학적 시료에서 질환 또는 상태를 검출, 모니터링, 추적 및/또는 확인하기 위한 능력을 갖는다는 것을 의미하며, 상기 생물학적 시료로는 혈액, 소변, 타액, 땀 및 대변을 들 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 명세서에서, "치료 진단용(theranostic)"이란 치료용 및 진단용 조성물의 조합된 효과를 갖는다는 것을 의미한다.
- [0060] 본 명세서에서, 용어 "재조합적 발현"이란 첨단 유전 공학 기법들을 이용하여 구축된 핵산 분자로 부터 하나 이상의 핵산(들) 및/또는 단백질(들)의 발현을 의미하되, 상기 구축된 핵산 분자는 인공적인 핵산 분자가 에피솜(episome)성 핵산 분자, 또는 미니세포 생산 박테리아 염색체의 일부로서 존재하는 미니세포 및/또는 미니세포 생산 박테리아 균주에서 자연적으로 존재하지 않는다.
- [0061] 본 명세서에서, 용어 "에피솜성(episomal)"은 주어진 유기체 또는 세포의 염색체(들)와는 독립적인 핵산 분자를 의미한다.
- [0062] 본 명세서에서, 용어 "해독(detoxified)"이란 개질된 조성물 또는 이의 성분에 대해 이루어진 변형을 의미하며, 이때 상기 변형은 조성물 또는 이의 성분에 대한 독성의 원인이 되는 생물학적 기반이 되는 것이 무엇인지와는 무관하게 변형된 조성물 또는 이의 성분에 대한 급성 독성의 유의한 감소를 초래한다.
- [0063] 본 명세서에서, 용어 "생물활성 분자(bioactive molecule)"란 인간 유기체 또는 세포에 도입되는 경우에 진핵생물 또는 세포(예를 들어, 인간과 같은 포유동물)에 대해 생물학적 효과를 갖는 분자를 지칭한다. 생물활성 분자로는 치료용 핵산, 치료용 폴리펩티드(단백질 독소를 포함함) 및 치료용 저분자 약물을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 본 발명은 목적하는 용도로 저분자 약물, 핵산, 폴리펩티드, 및 이미징 제제를 상이한 조직, 기관 및 세포 유형으로 표적화 된 전달을 위한 시험관내 및 생체 내에서 최종 멸균 세균 미니세포 기반 조성물의 생성 및 사용에 관한 것이다. 전염병, 자가면역질환, 유전질환 및 기타 생물학적 질병의 치료 및 예방에 있어 약제로서 척삭동물문에서 발견 된 것에 제한되지 않는 고등 동물을 대상으로 한다.
- [0065] 본 발명은 이온화 방사선 조사, 예를 들어 고선량 이온화 방사선 조사가 제품을 살균하는데 사용되는, 박테리아 미니세포 기반의 약학, 진단 및 백신 제품의 제조를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 멸균 박테리아 미니세포 기반의 생물 약제를 생산하는 것과 관련하여, 본 명세서에 개시된 방법은 살균력을 보장하면서 보다 적은 단계를 사용하고, 추가 항생제 또는 과도한 조건을 추가 할 필요가 없고, 미니세포의 무결성, 안정성 및 제품 기능을 유지하면서 생존 가능한 오염 모세포 및 기타 우발적인 세균을 제거한다.
- [0066] 박테리아 미니세포(bacterial minicells)는 박테리아 세포의 정상적인 분열 장치에서 파열된 박테리아에 의해 형성되는 색소 침착성의 막-봉입된(membrane-encapsulated) 생물학적 나노입자 (약 250-500 nm 직경)이다. 본질적으로, 미니세포는 작고, 대사적으로 활성인 정상 세균 세포의 복제물로서 염색체 DNA를 제외하고 비분열성, 비 생존성 및 비 감염성이다. 박테리아 미니세포는 다양한 그람 음성균 및 그람 양성균 및 박테리아 균주로부터 생성 될 수 있으며, 상기 박테리아 균주는 대장균 속(*Escherichia spp.*), 살모넬라 속(*Salmonella spp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas spp.*), 리스테리아 속(*Listeria spp.*), 버크홀데리아 속(*Burkholderia, spp.*), 시겔라 속(*Shigella spp.*), 바실러스 속(*Bacillus spp.*), 아시네토박터 속(*Acinetobacter spp.*), 프란시셀라 속(*Franciscella spp.*), 레지오넬라 속(*Legionella spp.*), 락토바실러스 속(*Lactobacillus spp.*), 클로스트리움 속(*Clostridium spp.*), 캄필로박터 속(*Campylobacter spp.*), 나이세리아 속(*Neisseria spp.*), 클라미디아 속(*Chlamydia spp.*)을 포함하되, 이에 제한되지는 않는다. 미니세포는 박테리아 염색체를 포함하지 않지만 플라스미드 DNA 분자(염색체보다 작음), RNA 분자(모든 아형과 구조체), 천연 및/또는 재조합 단백질, 핵산 및 기타 대사 산물이 모두 미니 세포에 분리되어 있는 것으로 나타났다. 미니세포는 단일 입자에서 하나 이상의 상이한 자연 발생, 이종성 또는 외생성 치료제와 조합하여 항체 또는 박테리아 결합체 및 인바신과 같은 표면 국소화 된 세포 특이적 표적 리간드를 발현 및/또는 표시하도록 조작될 수 있기 때문에 생체 내 표적 약물 전달체에 독특하게 적합하다. 간단히 말해서, 미니세포는 생물학적 활성 분자를 우선적으로 캡슐화, 결합 또는 흡수하도록 "조작" 될 수 있고, 상기 생물학적 활성 분자는 핵산, 단백질, 저분자 약물 및 이들의 임의의 조합을 포함하되 이에 제한되지 않으며, 이는 질병의 예방, 유지 및/또는 역제가 바람직한 예방적 및 치료용 의학적 적용 모두에서 후속적인 전달 및 반응의 생성을 위한 것이다.



- [0067] 유전 공학적으로 제조된 박테리아 미니세포는 미국특허 제 7,183,105 호에 기술된 바와 같이 항암제로서 직접 사용되어 왔으며, 상기 특허는 본원에 참고로 인용되어 있다. 예를 들어, 미국특허 제 7,183,105 호는 저분자 약물, 펩티드, 단백질 및 다양한 핵산을 표적화 및 전달하기 위하여 미니세포 표면 특이적 항체를 사용하여 직접 또는 암세포와 직접적으로 협력하여 직접 표적된 항암 효과를 발휘하도록 미니세포를 조작 할 수 있다고 기술하고 있다. 다른 연구자들은 또한, 본원에서 전체가 참고로 인용된 미국특허공보 제 20070298056 호 및 제 20080051469 호 및 미국특허 제 9,169,495 호에 예시된 바와 같이, 목표 전달 비히클로서의 미니세포의 사용과 관련하여 미국특허 제 7,183,105 호에서 교시 된 것과 동일한 결과를 보고했다. 초기 연구에서는 박테리아 미니 세포를 이중 폴리펩티드 항원 보균자로서, 그리고 나중에는 핵산 기반 백신 캐리어로서 잠재적인 백신 및 백신 캐리어로 사용하는 방법을 기술했다. 최근의 연구는 박테리아 미니세포 기반 요법의 레퍼토리를 면역조절성 조성물 및 방법을 포함하도록 확장시켰다.
- [0068] 최종 박테리아 미니세포 기반 제품 유형과 관계없이 비경구 또는 국소 의약 또는 진단 용도로 사용하려는 경우, 최종 활성 약제 성분 (API) 또는 최종 의약품 (DP)으로부터의 생존 가능한 오염 모세포 및 기타 우발적인 미생물의 확실한 제거는 신뢰성 있는 제품 안전성 및 사용을 위한 출시에 있어 매우 중요합니다. 많은 접근법들이 과거에 박테리아 미니세포를 생성하는 살아있는 모세포로부터 박테리아 미니세포를 정제하기 위해 사용되어 왔다. 박테리아 미니세포를 정제하기 위해 연구자들이 사용하는 가장 보편적인 접근법은 분별원심분리와 선형 또는 단계 밀도구배를 사용하는 1회 이상의 추가 정제 단계의 조합이다. 다른 접근법으로는 여과 기반의 계획, 용균 파지 유도 및 삼투압 쇼크 및/또는 초음파 처리와 조합된 항생제 선택 치료가 포함되지만 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 방법을 사용하는 일반적인 순도 수준은  $10^5 \sim 10^8$  개의 미니세포에서 1 개의 생존 가능한 오염 모세포 범위이다. 예를 들어, 미국특허 제 7,611,885 호는 (i) 분별원심분리, (ii) 2 번의 밀도구배정제, (iii) 0.45  $\mu\text{M}$  필터를 통한 크로스플로우 여과, (iv) 모세포 필라멘트화를 초래하는 삼투압 쇼크를 유도하기 위한 고농도의 염 처리 (v) 0.2  $\mu\text{M}$  필터를 통한 크로스플로우 여과, (vii) 두 번째 0.45  $\mu\text{M}$ 을 통한 크로스플로우 여과, (viii) 100kDa 필터를 통한 미니세포 농도 (x) 비드에 결합 된 내 독소의 자기 분리, (xi) 미니 세포의 수집, 그리고 아마도 (xii) 최종 API 생성을 위한 부형제 또는 다른 비히클로 제제화 될 수 있다. 미국 특허 제 7,611,885 호에 기재된 방법은 예기치 않게 생존 가능한 오염 모세포를  $10^{11}$ 개의 미니 세포에서 1 만큼 낮은 수준으로 감소시키는 것을 목표로 하고 있지만, 상기 방법은 또한 미니 셀의 상당한 손실, 외생 항생제 및/또는 염의 첨가 및 다중 여과 단계를 초래하며, 공정 중에 우발적인 미생물이 도입될 수 있다. 가장 중요한 것은, 최종 여과 단계는 막 다른 여과 (즉, 미니세포의 보유)에 의존하기 때문에, FDA, ICH 지침에 따라 운영되는 다른 규제 기관 및 기타 승인 된 국제 의약품 표준에 의한 최종 멸균 사건으로 간주되지 않는다.
- [0069] 본 발명은 박테리아 미니세포가 효력, 표적화 능력 또는 안정성의 손실없이 이온화 방사선 조사, 예를 들어, 고 선량 이온화 방사선 조사에 노출됨으로써 최종 멸균 될 수 있음을 예기치 않게 발견함과 동시에 생존 가능한 오염 모세포를 완전히 제거하는 이점을 얻는다. 이 결과는 더 확장성이 있고 기존의 GMP-호환/호환 미니세포 정제 방법의 사용을 가능하게 하면서 동시에 박테리아 미니세포 기반 생물 약제 제품을 USP 71 버전 USP 38 NF 33 및 그와 상응하는 외국 무균 시험 표준을 충족시키기에 충분한 수준으로 최종 소독하는 것이다.
- [0070] 이온화 방사선 조사는 의료 기기 및 외과용 기기 제품에 적합한 멸균 방법론이므로 멸균을 달성 할 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. 살균의 맥락에서, 이온화 방사선 조사는 유리 산소 라디칼을 발생시킴으로써 작동한다. 자유 산소 라디칼은 세포 및/또는 미생물을 죽음으로 이끄는, 핵산 및 단백질의 공유 결합을 신속하게 중단시키는 매우 반응성이 큰 분자 종이다. 멸균 적용에서 일반적으로 25kGy의 고농도가 무균 및 생존 가능한 미생물 증식의 완전한 부재를 보장하기 위해 사용되지만 최종 살균을 위해서는 5kGy의 용량이 충분하다는 것이 일반적이다. 이러한 선량 수준에서 이온화 방사선 조사에 의한 멸균은 미생물을 살멸하기 위한 강력하고 비 선택적 방법론이기 때문에 박테리아 미니세포의 안정성과 활성에 부정적인 영향을 미친다는 논리가 뒤따른다. 이온화 방사선 조사의 살균 용량에 대한 노출이 박테리아 미니세포에 영향을 미치지 않으면서 오염된 모든 모세포가 손상되지 않는다는 사실은 예상할 수 없다. 특정 이론에 구속되지 않고 하나의 가능성은 이온화 방사선 조사가 단백질 성분이 아닌 핵산에만 영향을 미치고, 박테리아 세포는 염색체가 있고 미니세포에는 존재하지 않기 때문에 선택적으로 제거된다는 것이다. 그러나 단백질에 영향을 주지 않으면 모든 수준에서 이온화 방사선 조사에 노출 된 박테리아 세포는 이러한 단백질 기반 DNA 복구 시스템을 활용하여 회복 할 수 있다. 박테리아는  $\sim 3\text{kGy}$ 를 초과하는 이온화 방사선 조사 수준에 대한 노출로부터 회복되지 않으며 단백질은 또한 상기 조사선량에 영향을 받는다는 개념을 강력하게 뒷받침한다. 다른 연구자들은 6-8kGy의 감마선 조사에 노출되었을 때 박테리아의 단백질 기능이 10 % 수준까지 감소한다고 기술했지만, 단백질 기능 박테리아가 감마선 조사에 의해 부정적으로 영향을 받는다는 개념을 뒷받침한다(Kato et al., Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 2014,

Volume 7, pp.568-71 참조). 또한, 이온화 방사선 조사에 노출된 단리된 단백질 또는 단백질 혼합물은 또한 신속하게 비활성으로 된다. 본 명세서에서 기술된 방법은 이온성 조사가 기능성 단백질을 함유하는 생체 재료 및 박테리아에 미치는 영향에 대해 알려지며, 박테리아 미니세포 및 박테리아 미니세포 기반 생물 약제 제품은, 무결성, 특이성, 안정성, 역가 및 생체 내 활성을 손상시키지 않으면서 생존 가능한 모든 오염 모세포 및/또는 외래 미생물을 제거한다.

[0071] 오염된 모세포의 생존력 또는 리포폴리사카라이드(내 독소)의 존재로 안전성을 극대화하고 독성을 제한하기 위해, 일부 구현예에서, 본원에 개시된 미니세포는 하기 개시된 세 가지 안전 특징 중 하나 이상을 포함하는 미니세포-생산 균주로부터 유도된다. 일부 구현예에서, 미니세포 생산 균주는 이들 3 가지 상충 안전 특징 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어, 미니세포 생산 균주는 이들 3 가지 안전성 특징 중 하나, 둘 또는 모두를 포함할 수 있다. 첫 번째는 미니세포 형성 단계가 완료된 후 잔류하는 생존 모세포를 용해시키지 않고 죽이는(그리고 자유 리포폴리사카라이드를 제거하지 않고) 유전 자살 메커니즘이다. 본 발명은 적절한 유도제에 노출시 본원에 참고로 인용된 US2010-0112670 호에 기재된 바와 같이 미니세포를 생산하는 모세포의 염색체에 치유 할 수 없는 손상을 초래하는 조절된 유전 자살 메커니즘의 사용을 포함한다. 자살 기작은 부모 세포의 염색체에 돌이킬 수 없는 이중 가닥 절단을 도입하기 위해 작동하며 미니세포 정제를 개선하기 위해 재래식 분리 기술의 보조물로 사용될 수 있습니다. 두 번째 안전성 특징은 정의된 영양 요법으로서, 바람직하게는 디아미노피멜산(diaminopimelic acid, DAP) 생합성 경로에서 필수적으로 결함하지 않으며, 가장 바람직하게는 대장균 미니세포 생산 균주의 *dapA* 유전자에서 선택된다. DAP auxotrophy(*dapA*<sup>-</sup>)를 나타내는 미니세포 생성 대장균 균주는 DAP를 보충하지 않고 실험실 외부에서 생존할 수 없다. 또한 DAP는 인간을 포함한 포유류에서는 발견되지 않으며 미니세포 제품에 존재하는 미니세포 생산용 모세포는 실험실이나 생산 시설 또는 생체 내에서 생존 할 수 없다. 이 주제에 대한 많은 변형이 다른 그람 음성균과 그람 양성균에 존재한다. 예를 들어, 살모넬라 균종에서 영양요구성 방향족 아미노산 생합성 경로 (*aro* 유전자)는 사실상 동일한 결과를 만들어 낸다. 시겔라 속(*Shigella spp.*) 균주의 경우, 구아닌 생합성 경로의 영양 요구는 결과적으로 동일한 결과를 생성할 것이다. 세 번째 안전성 특징은 대장균 미니세포-생성용 균주에서 *lpxM* 유전자가 결실됨을 의미한다. *lpxM* 유전자의 결실은 독성 제거된 리포폴리사카라이드(LPS) 분자의 생성을 초래할 수 있다. *lpxM* 유전자(*msbB* 유전자라고도 함)는 LPS 분자의 지질 A 부분에 말단의 미리스톨레익산(myristolic acid) 그룹을 추가하고 이 그룹을 제거하면(*lpxM* 유전자를 제거함으로써) LPS가 현저히 해독된다. 특히, 해독은 LPS에 대한 노출에 대한 반응으로 전 염증성 사이토카인 생성의 감소를 특징으로 한다. 야생형 LPS와 동일한 수준은 아니지만 LPS의 해독된 형태에 반응하는 사이토카인 생산이 여전히 발생할 수 있기 때문에, 면역조절 미니세포 조성물에 관해서 본 조절이 본 발명으로부터 벗어남을 교시하는 것은 아니다. 해독은 생성된 사이토카인의 수준만을 제어하여 급성 패혈증과 유사한 전 염증 반응을 억제하고 보다 강력한 Th1 및/또는 Th2 면역 반응을 명백한 독성없이 달성할 수 있게 한다. 이러한 결실은 동일한 효과를 얻기 위해 그램 음성 또는 그람 양성 미니세포 생산 균주의 기능적으로 동등한 유전자에 도입 될 수 있다. 강화된 안전 프로파일은 패혈증 발병의 위험과 잠재력을 감소시킬 수 있다. 규제 및 제조 관점에서, 항생제 내성 마커가 미니세포-생성 모세포 변형의 박테리아 염색체로부터 제거되는 것이 또한 바람직하다. 하나 이상의 안전 기능을 선택적으로 사용할 수 있다.

[0072] 본원에 개시된 일부 구현예는 본원에 개시된 면역조절 미니세포-생성 박테리아를 배양하고 미니세포-생성 모세포로부터 면역조절 미니세포를 실질적으로 분리시킴으로써 면역조절 미니세포를 포함하는 조성물을 생성시키는 것을 포함하는 면역조절 미니세포의 제조 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 미니세포-생성 모세포 배양물로부터 면역조절 미니세포를 유도하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 유전 자살(genetic suicide)엔도뉴클레아제를 코딩하는 유전자의 발현을 유도하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 미니세포 형성은 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG), 람노오스(rhamnose), 아라비노스(arabinose), 크실로스(xylose), 프룩토스(fructose), 멜리비오스(melibiose) 및 테트라사이클린(tetracycline)으로부터 선택된 하나 이상의 화합물의 존재에 의해 유도된다. 일부 구현예에서, 유전 자살 엔도뉴클레아제를 코딩하는 유전자의 발현은 온도 변화에 의해 유도된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 조성물로부터 면역조절 미니세포를 정제하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 면역조절 미니세포는 원심분리, 여과, 한외여과, 초원심분리, 밀도구배, 면역친화성, 면역침전 및 선행 정제 방법의 임의의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택된 방법에 의해 모세포로부터 실질적으로 분리된다. 일부 실시 양태에서, 면역조절 미니세포는 동결 건조된다. 일부 구현예에서, 면역조절 미니세포는 동결된다. 일부 구현예에서, 면역조절 미니세포는 동결 건조된 후 동결된다. 일부 구현예에서, 면역조절 미니세포는 동결 현탁액(frozen suspensionin), 동결 방지제(cryoprotectant excipient) 또는 다른 약제학적으로 허용되는 담체 또는 GRAS 물질로서 제형화된다. 일부 구현예에서, 면역조절 미니 세포는 이온화 방사선 조사에 노출된다. 일부 구현예에서,

면역조절 미니세포는 이온화 방사선 조사에 노출시킴으로써 최종 멸균된다. 일부 구현예에서, 면역조절 미니세포는 이온화 감마선 조사에 노출시킴으로써 최종적으로 멸균된다.

[0073]

일부 구현예는 본원에 개시된 적절한 면역원성 미니세포-생성 박테리아를 배양하고 미니세포-생성 모세포로부터 면역원성 미니세포를 실질적으로 분리시킴으로써 면역원성 미니세포를 포함하는 조성물을 생성시키는 것을 포함하는 면역원성 미니세포, 예를 들면, 백신을 제조하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 미니세포-생성 모세포의 배양물로부터 면역원성 미니세포 형성을 유도하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 유전 자살 엔도뉴클레아제를 코딩하는 유전자의 발현을 유도하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 미니세포 형성은 이소프로필 b-D-1-티오갈락토포라노시드(IPTG), 람노오스(rhamnose), 아라비노스(arabinose), 크실로스(xylose), 프룩토스(fructose), 멜리비오스(melibiose) 및 테트라사이클린(tetracycline)으로부터 선택된 하나 이상의 화합물의 존재에 의해 유도된다. 일부 구현예에서, 유전 자살 엔도뉴클레아제를 코딩하는 유전자의 발현은 온도 변화에 의해 유도된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 조성물로부터 면역원성 미니세포를 정제하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 면역원성 미니세포는 원심분리, 여과, 한외여과, 초원심분리, 밀도구배, 면역친화성, 면역침전 및 선행 정제 방법의 임의의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택된 방법에 의해 모세포로부터 실질적으로 분리된다. 일부 구현예에서, 면역원성 미니세포는 동결된다. 일부 구현예에서, 면역원성 미니세포는 동결 건조된 후 동결된다. 일부 구현예에서, 면역원성 미니세포는 동결 현탁액(frozen suspensionin), 동결 방지제(cryoprotectant excipient) 또는 다른 약제학적으로 허용되는 담체 또는 GRAS 물질로서 제형화된다. 일부 구현예에서, 면역원성 미니세포는 이온화 방사선 조사에 노출된다. 일부 구현예에서, 면역원성 미니세포는 이온화 방사선 조사에 노출시킴으로써 최종 멸균된다. 일부 구현예에서, 면역원성 미니세포는 이온화 감마선 조사에 노출시킴으로써 최종적으로 멸균된다.

[0074]

일부 구현예는 본원에 개시된 표적치료 미니세포-생성 박테리아를 배양하고 미니세포-생성 모세포로부터 표적치료 미니세포를 실질적으로 분리하여 표적치료 미니세포를 포함하는 조성물을 생성시키는 것을 포함하는, 표적치료 미니 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 미니세포-생성 모세포 배양물로부터 표적치료 미니세포 형성을 유도하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 유전 자살 엔도뉴클레아제를 코딩하는 유전자의 발현을 유도하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 표적치료 미니세포 형성은 이소프로필 b-D-1-티오갈락토포라노시드(IPTG), 람노오스(rhamnose), 아라비노스(arabinose), 크실로스(xylose), 프룩토스(fructose), 멜리비오스(melibiose) 및 테트라사이클린(tetracycline)으로부터 선택된 하나 이상의 화합물의 존재에 의해 유도된다. 일부 구현예에서, 유전 자살 엔도뉴클레아제를 코딩하는 유전자의 발현은 온도 변화에 의해 유도된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 조성물로부터 표적치료 미니세포를 정제하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화 치료용 미니세포는 원심분리, 여과, 한외여과, 초원심분리, 밀도구배, 면역친화성, 면역침전 및 선행 정제 방법의 임의의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택된 방법에 의해 모세포로부터 실질적으로 분리된다. 일부 구현예에서, 표적화된 치료용 미니세포는 동결된다. 일부 구현예에서, 표적화된 치료용 미니세포는 동결 건조된 후 동결된다. 일부 구현예에서, 표적화된 치료용 미니세포는 동결 현탁액(frozen suspensionin), 동결방지제(cryoprotectant excipient) 또는 다른 약제학적으로 허용되는 담체 또는 GRAS 물질로서 제형화된다. 일부 구현예에서, 표적화된 치료용 미니세포는 이온화 방사선 조사에 노출된다. 일부 구현예에서, 표적화된 치료용 미니세포는 이온화 방사선 조사에 노출시킴으로써 최종 멸균된다. 일부 구현예에서, 표적화된 치료용 미니세포는 이온화 감마선 조사에 노출시킴으로써 최종적으로 멸균된다.

[0075]

추가 구현예는 외막을 포함하는 면역조절성, 면역원성 및 표적 치료용 미니세포를 제공하며, 여기서 외막의 리포폴리사카라이드 성분은 미리스토일 부위(myristoyl moiety)를 갖지 않는 지질 A 분자 ("해독된 리포폴리사카라이드" 또는 "해독된 LPS")를 포함한다. 해독된 LPS는 해당 야생형 박테리아에서 유래한 진균박테리아 미니세포의 외막에 의해 유도된 염증 반응과 비교하여 포유동물 숙주에서의 염증성 면역반응의 감소를 가져온다.

[0076]

## 1. 미니세포 생산

[0077]

미니세포는 염색체가 없고(achromosomal), 막-캡슐화된 생물학적 나노입자(대략 직경이 250-500nm로 사용된 성장조건과 균주 종류에 따라 다름)로서, 정상 세포 분열 기구에서 분열되는 박테리아에 의해 형성된다. 미니세포는 염색체 DNA를 포함하고 있지 않아 분열 및 독자생존이 불가능한 점을 제외하고는 본질적으로 정상 박테리아 세포의 작고, 대사작용으로 활성화된 복제물이다. 비록 미니세포가 염색체 DNA, 플라스미드 DNA 분자, 자생 및/또는 재조합적으로 발현된 단백질을 함유하지 않을지라도, 기타 대사 산물은 모두 미니세포로 분리된 것으로 보여졌다. 미니세포는 다양한, 예를 들어 대장균 속(*Escherichia spp.*), 살모넬라 속(*Salmonella spp.*), 시겔라 속(*Shigella spp.*), 비브리오 속(*Vibrio spp.*), 나이세리아 속(*Neisseria spp.*), 캄필로박터 속(*Campylobacter*



*spp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas spp.*), 예르시니아 속(*Yersinia spp.*), 클라미도모나스 속(*Chlamydomonas spp.*), 아시네토박터 속(*Acinetobacter spp.*), 리스테리아 속(*Listeria spp.*), 바실러스 속(*Bacillus spp.*), 헤모필루스 속(*Haemophilus spp.*), 클로스트리듐 속(*Clostridium spp.*), 프란시셀라 속(*Francisella spp.*), 리케차 속(*Rickettsia spp.*) 등을 포함하나 여기에 제한되지 않는, 박테리아 종과 균주로부터 만들어진다.

[0078] 염색체 복제 및 세포 분열 사이의 조화의 파괴는 대부분의 막대모양 원핵생물의 극성 지역으로부터 미니세포가 형성되게 한다. 염색체 복제 및 세포 분열 사이의 조화의 파괴는 격막 형성 및 2분열에 관련된 몇몇 유전자의 과발현을 통해 가능하게 된다. 미니세포 생산의 다른 방법으로는 격막 형성 및 2분열을 조절하는 유전자에 돌연변이를 갖는 세포 균주에서 생산될 수 있다. 많은 다른 원핵생물에서 보여진 바와 같이, 손상된 염색체 분리 메커니즘도 미니세포를 형성되게 한다.

[0079] 유사하게, 미니세포 생산은 과발현 또는 딸세포로의 초기 염색체 분리에 관련된 유전자의 돌연변이에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 대장균(*E.coli*)의 *parC* 또는 *mukB* 좌위(loci)에서의 돌연변이가 미니세포를 생산하는 것으로 입증되었다. 두 가지의 돌연변이 모두 장내세균(*Enterobacteriaceae*)의 염색체 분리 과정의 각각의 필수 단계에 영향을 미친다. 위에서 언급 한 세포 분열 유전자와 마찬가지로, 염색체 분리 과정과 관련된 특정 유전자의 야생형(wild type) 수준을 조작하면 미니세포 생산을 하게되어 다른 집단 구성원에서도 유사한 효과를 나타낼 것으로 추정 할 수 있다.

[0080] 세포 분열과 염색체 복제 과정은 생존에 매우 중요하기 때문에, 상기 과정에 관여(responsible)하는 유전자에 대해 원핵생물 집합 구성원 사이에서 높은 수준의 유전적 및 기능적 보호(conservation)가 존재한다. 따라서, 하나의 집합 구성원에서 미니세포를 생산하는 세포 분열 유전자의 과발현 또는 돌연변이는 다른 집합 구성원에서 미니세포를 생산하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 슈도모나스 속(*Pseudomonas spp.*)과 같은 다른 종류 구성원 아니라 살모넬라 속(*Salmonella spp.*) 및 시겔라 속(*Shigella spp.*)과 같은 다른 장내 세균 집합 구성에서 대장균의 *ftsZ* 유전자 과발현은 비슷한 수준의 미니세포 생산 결과를 가져올 것이다.

[0081] 동일한 내용은 장내 세균(*Enterobacteriaceae*) 집합의 돌연변이-기반 미니세포 생산 균주에서 설명될 수 있다. 예컨대, 임의의 장내 세균 집합에서 *min* 자리(locus)의 결실은 미니세포 생산을 일으킨다. 돌연변이가 미니세포 형성을 일으킬 수 있는 장내 세균에서의 세포 분열 유전자는 *min* 유전자(*MinCDE*)를 포함하지만 이것으로 한정되지 않는다. *min* 돌연변이 균주로 부터 미니세포 생산이 가능한 반면, 이 균주는 미니세포 기반의 생물 약제의 생산 균주라는 측면에서는 제한된 상업적 가치를 가진다. *min* 유전자 내 결실 또는 돌연변이를 갖는 균주는 본질적으로 낮은 수준에서 미니세포를 만들기 때문이다. 이는 전달을 위한 생물활성 물질을 생성하기위한 재조합 발현 기술의 사용을 매우 제한할 뿐 만 아니라, 상업화 및 규모의 경제 관점에서 문제점들을 나타낸다. *min* 유전자 돌연변이 균주로부터의 미니세포 수율은 상대적으로 낮아서, 이것은 주어진 생물 약제에 대한 시장 수요를 지원하기에 충분한 수의 미니세포를 생성하는데 필요한 생산 비용 및/ 또는 규모를 증가시킬 수 있다. 더욱이, *min* 좌위 에서의 결실은 이들 균주에 일정한 선택적 압력을 부여하게 되고, 보상억제 돌연변이(compensatory suppressor mutations)의 자발적 생성은 미니세포-생산 표현형의 손실을 초래할 수 있다. 이러한 결과는 미니세포 수율에 잠재적으로 부정적인 영향을 줄 수 있다. 또한, 세포 분열 돌연변이 균주를 사용하여 미니세포-생성 모세포에 의해 재조합적으로 발현되는 생물학적 활성 분자(진단, 치료 전달을 위한 단백질, RNA, DNA 및 기타 다른 대사 산물)를 캡슐화하는 미니세포를 생산하는 것은 문제가 될 수 있다. 돌연변이 균주에서 미니세포 생산을 개시가 통제될 수가 없고, 낮은 단계에서 발생하므로, 결국에는 어떤 미니세포는 아무런 활성 분자도 포함하고 있지 않은 반면, 어떤 미니세포는 광대한 양의 다양한 생물학적 활성 분자를 포함하게 된다. 돌연변이 균주에서 미니세포 생산의 개시가 통제될 수 없고 구성적으로 낮은 수준에서 발생하기 때문에, 전달을 목적으로하는 생물활성 분자를 재조합적으로 생성하기 위해 모세포를 사용하는 접근법을 취하면 결국에는 어떤 미니세포는 아무런 활성 분자도 포함하고 있지 않은 반면(즉, 미니세포는 재조합 발현 전에 만들어졌다), 어떤 미니세포는 광대한 양의 다양한 생물학적 활성 분자를 포함하게 된다. 요약하면, 돌연변이 기반 미니세포 생산 균주의 단점은 상업적 목적을 위한 미니세포 생산에 있어서 유용성을 제한할 수 있는 제조상의 문제점을 유발할 수 있다.

[0082] 세포분열유전자(overexpressers)를 과발현하는 미니세포 생산 균주는 돌연변이에 기초한 유전자보다 선호된다. 이는 과발현되는 세포분열 유전자가 유도성 또는 다른 조건적으로 활성인 진정세균 프로모터 시스템의 조절하에 놓여있는 한 미니세포-생산 표현형이 조절 가능하기 때문이다. 세포분열유전자 *ftsZ*를 과발현하는 균주에서의 미니세포 생산은 플라스미드 기반 보완 연구를 이용하여 대장균에서 필수 세포 분열 유전자를 확인하는 연구자에 의해 발견되었다. 이 연구에서 *ftsZ* 유전자는 세포 당 10 개 이상의 사본에 존재했다. *ftsZ*의 다중 유전자 복제물의 존재는 미니세포 및 극히 긴 필라멘트 세포를 생성하는 것으로 입증되었다. 궁극적으로 돌이킬 수 없는 섬유 모양의 표현형으로의 전환은 다중 복사 유전자로부터 *ftsZ*를 과발현하는 균주에서 미니세포 수확량에



부정적인 영향을 미치지만 생산되는 미니세포의 수는 돌연변이 균주의 수보다 여전히 높다. *ftsZ* 유전자 사본을 하나의 염색체 복제로 줄이면 *ftsZ*가 다중 복사체에 위치하고 섬유성 표현형이 덜 심해지는 균주보다 작은 세포 수가 증가한다는 것이 입증되었다. 따라서, 바람직한 조성물(들) 중 하나는 *ftsZ*의 복제된, 염색체적으로 통합된 카피로부터 *ftsZ* 유전자를 유도성있게 과발현시키는 미니세포-생산 균주를 포함한다. 복제된 *ftsZ* 유전자는 미니세포 생산 표현형이 조작되는 박테리아의 중에서 직접 유도될 수 있으며 다른 박테리아 종의 *ftsZ* 유전자 서열에서도 유도될 수 있다. 비제한적인 예로, 대장균의 *ftsZ* 유전자의 과발현은 대장균 및 살모넬라 티피마우스(*Salmonella typhimurium*)로부터 미니세포를 생성 시키는데 사용될 수 있다. 수득된 균주는 야생형 *ftsZ* 유전자 및 염색체상의 *ftsZ* 유전자의 분리되고 중복되고 유도성인 카피 및 본원에서 전체적으로 참고되고 인용된 미국특허공개 제 2010/0112670 호에 기술된 유도 성 유전자 자살 메카니즘(들)을 포함한다. 비제한적 예로서, 장내세균 계통에서 최소 세포를 생산하기 위해 과발현 될 수 있는 분열 유전자는 *ftsZ*, *minE*, *sulA*, *ccdB* 및 *sfic*를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 바람직한 조성물은 주어진 균주의 염색체에 안정적으로 통합된 유도성 프로모터의 제어 하에 세포 분열 유전자(들)의 복제본(들)을 갖는 것이다. 유도 가능한 세포 분열 유전자 카세트가 플라스미드, 코즈미드, 박테리아 인공 염색체(BAC), 재조합 박테리오파지 또는 세포 내에 존재하는 다른 에피솜 DNA 분자 상에 존재한다면 동일한 전략이 부여될 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0083] 미니세포 생산에 대한 이러한 유도성 표현형 접근법은 돌연변이 체 시스템에 비해 몇몇 명백한 이점을 갖는다. 첫 번째는 이들 균주에 구성적이고 유전적인 돌연변이가 존재하지 않기 때문에 정상적인 성장 도중에 어떠한 선택적인 압력도 존재하지 않으며, 상기 미니세포 표현형이 유도될 때까지 배양 세포는 매우 안정되고 정상적인 생리현상을 유지한다는 것이다. 최종 결과는 유도성 미니세포 생산 균주가 보다 건강하고, 더욱 안정하다는 것이며, 이는 궁극적으로 더욱 높은 수율의 미니세포를 초래한다. 상기 미니세포의 생산에 대한 유도성 표현형 접근법을 이용하는 또 다른 명백한 이점은 미니세포가 단백질, 치료용 RNA, 플라스미드 DNA 및 기타 생물활성 이산화물과 같은 생물학적 활성 분자를 전달하기 위해 사용되어야 하는 경우이며, 이 분자들은 생산된 미니세포가 이들 재조합 생물학적 활성 분자를 캡슐화하도록 미니세포- 생성 표현형의 유도 전(pre-induction) 또는 유도하는 동안(co-induction) 미니세포-생산 모세포에 의해 재조합적으로 발현된다. 이러한 경우, 바람직한 방법은 미니세포 표현형을 유도하기 전에 모세포 내에서 생물학적 활성 분자(들)의 형성을 유도하여, 생산된 모든 미니세포가 원하는 양의 생물학적 활성 분자(들)를 함유할 수 있게 한다. 대안적으로는, 상기 미니세포 자체는 상기 모세포로부터 분리된 이후에 생물활성 분자를 생성 할 수 있다. 이는 상기 미니세포 내에 위치하는 에피솜성 핵산 또는 RNA로부터 생물활성 물질을 형성하거나 상기 모세포로부터 분리된 이후에 미니세포의 기존 단백질 구성성분에 의해 생물활성 분자를 형성하는 단계를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이들 발현 전략 중 어느 것이나 미니세포의 표면에 결합 모이어티를 발현 및/또는 표시하기 위해 이용될 수 있다. 이들 전략은 함께 사용되는 경우에 보다 높은 품질 및 양의 미니세포를 얻을 수 있다. 부가적으로, 이들 미니세포는 하기에서 상세하게 개시하는 바와 같이 미니세포 내로 적재될 수 있는 저분자 약물을 더 포함하여 제조할 수 있다.

## [0084] 2. 미니세포 정제

[0085] 미니세포는 병원성이거나 기회주의적으로 병원성인 몇몇 박테리아로부터 유래되기 때문에, 생물 의약품으로 투여하기 전에 오염된 모세포를 특정 개체군으로부터 기능적으로 제거하는 것이 중요하다. 본원에 개시된 방법은 이온성 방사선 조사에 의한 마지막 멸균 전에 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다.

[0086] 통상적으로, 살아있는 모세포는 물리적 수단 또는 생물학적 수단 또는 둘 모두를 통해 제거되었다. 물리적 수단은 원심분리 기반 분리 과정, 여과 방법, 크로마토그래피 방법 또는 이들 임의의 조합의 이용을 포함한다. 생물학적 제거는 모세포의 특이적 용해, 영양요구성 모균주의 사용, 항생제 처리, 자외선 조사, 필수아미노산 결핍, 디아미노피멜산(diaminopimelic acid, DAP) 박탈, 모세포의 선택적 흡수, 기타 DNA 손상제 처리, 및 자살 유전자의 유도에 의해 달성되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0087] 모세포의 우선적(Preferential) 용해는 전형적으로 용원성 프로파지의 용해 주기를 유도함으로써 매개된다. 미니세포 생산 균주의 경우, 미니세포가 용해성 표현형의 활성화 도중에 후속적으로 감염되어 용해되지 않도록 용해능을 갖지만 재감염에 결함이 있는 프로파지를 사용하는 것이 가장 유용하다. 대안적이고 비제한적인 예로서, 홀인(holin) 유전자 패밀리의 멤버로서 분류된 유전자와 같은 개개의 유전자는 용원성 프로파지의 사용에 고유한 재감염에 대한 우려 없이 유사한 수준의 용해를 달성하기 위해 발현될 수 있다. 상기 접근법 둘 모두는 이를 달성하기 위해 사용된 방법과는 무관하게 용해 사건이 예상치 못한 양이 유리 내독소를 매질로 방출한다는 사실에 의해 제한된다. 이 같이 많은 양의 유리 내독소의 제거는 시간 소모적이며, 로트간 변이성으로 어려움에 처하게 되며, 궁극적으로 막대한 비용이 든다.

- [0088] 영양 요구성 균주의 사용은 복귀에 대한 관심을 불러일으키며, 그로 인해 미니세포가 공생 또는 비병원성 박테리아 균주로부터 생산되어야 하는 경우에만 사용될 수 있다. 따라서 이들 적용은 미니세포의 생산에 사용되는 살아있는 비병원성 모세포의 제거 방법으로서 사용된다는 측면에서 제한된다.
- [0089] 자외선 처리는 자외선 조사가 핵산에 대한 이의 효과에 대해 무작위적이며, 결과가 로트 간 매우 변이성이라는 사실을 제외한 상태에서 이루어진 미니세포의 생산 시에 살아있는 모세포의 제거에 유용할 수 있다. 부가적으로, 이러한 방법은 자외선 조사가 모든 핵산을 무작위로 손상시킴에 따라 치료 또는 예방용 핵산을 전달하기 위해 미니세포를 사용하는 경우에는 바람직하지 않다. 예를 들어, 플라스미드 DNA는 또한 자외선 조사에 의한 DNA 손상에 매우 민감할 수 있으며, 미니세포에 의해 여전히 효과적으로 전달될지라도 비효율적으로 될 수 있다.
- [0090] 디아미노피멜산(DAP) 박탈은 이러한 접근법이 이를 위해 사용될 수 있는 종의 개수에 의해 제한된다는 것을 제외하고는 살아있는 모세포의 제거에 유용할 수 있다. 반면, 미니세포를 생산할 수 있는 모든 모세포 종이 생존을 위해 DAP를 필요로 하는 것은 아니다. 대장균 미니세포 생산 균주 중 DAP 돌연변이체는 커다란 이점이 있으며, 몇몇의 경우에 야생형보다 선호된다. DAP를 이용하는 이점은 이러한 화합물(대장균 세포벽 구성성분인 디아미노피멜산)이 대장균의 성장에 중요하며, 동물에 존재하지 않으며, 이에 의해 생산되지 않는다. 따라서 "생존 가능한" 대장균 미니세포 생산 모세포가 표적화된 미니세포와 함께 투여되어야 하는 경우, 상기 모세포는 성장할 수 없을 것이고, 따라서 동물에 있어서 불활성이고, 또한 미니세포 활성화에 대해 불활성일 것이다. 유사한 접근법은, 이 같은 경우에 *aro* 유전자, 바람직하게는 *aroB*가 제거된다는 것 이외에, 살모넬라 속 기반 미니세포 생산 모균주와 함께 사용될 수 있다.
- [0091] 선택적 흡수 방법론은 생존 가능한 모세포로부터 미니세포를 정제한다는 측면에서 여전히 탐구되어야 한다. 선택적 흡수는 모세포 또는 미니세포가 기질에 대한 이들의 친화도로 인해 우선적으로 기질에 흡수되는 임의의 과정으로서 한정된다. 비제한적인 예로, 높은 친화도의 단백질-단백질 상호작용은 이러한 사용을 위해 활용될 수 있다. 비제한적인 예로, 신규한 미니세포 외막 단백질 Lpp-OmpA::단백질 A는 대부분의 항체의 Fc 영역에 대해 높은 친화도를 갖는다. Lpp-OmpA::단백질 A를 암호화하는 유전자는 유도성 프로모터의 제어 하에 있으며, 면역 조절성 미니세포 생산 균주의 염색체 상에 용이하게 도입될 수 있다. 면역 조절성 미니세포는 상기 생산된 미니세포가 이들의 세포 표면 상에 Lpp-OmpA::단백질 A를 발현하거나 표시하지 못하도록 인바인 유전자의 발현의 활성화 이전에 이러한 균주로부터 생산될 수 있다. 일단 목적하는 양의 면역 조절성 미니세포가 상기 균주로부터 생산되며, Lpp-OmpA::단백질 A만이 발현되어 생존 가능한 세포 상에 표시되도록 Lpp-OmpA::단백질 A 단백질을 생산하는 위해 배양액 내의 생존 가능한 세포에는 신호가 제공될 수 있다. 일단 Lpp-OmpA::단백질 A가 우선적으로 생존 가능한 모세포의 표면 상에 발현되면, 이들은 항체 또는 기타 Fc-영역 함유 단백질로 코팅된 기질에 용이하게 흡수될 수 있다. 일단 흡수되면, 미니세포는 사용된 기질 유형에 의존하는 다수의 상이한 수단에 의해 생존 가능한 모세포로부터 선택적으로 정제될 수 있다. 기질로는 중력식 여과 용도로 사용된 고상 크로마토그래피 칼럼, 자성 비드, 이온 교환 칼럼 또는 HPLC 칼럼을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0092] 일부 구현예에서, 미니세포는 미니세포를 포함하는 조성물 중의 미니세포 생산 모세포로부터 실질적으로 분리된다. 예를 들어, 분리 이후에 상기 미니세포를 포함하는 조성물에는 약 99.9%, 99.5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35% 또는 30% 이상 미니세포 생산 모세포가 존재하지 않는다. 몇몇 실시예에서, 상기 조성물은 약 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 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% 또는 30% 미만의 미니세포 생산 모세포를 함유한다.
- [0093] 일부 구현예에서, 바람직하게는, 상기 최종 조성물은 치료 목적으로 생체 내에 투여되는 경우에 지나치게 독성을 나타내지 않거나 표적화된 미니세포의 활성을 간섭하지 않도록 생존 가능하거나 또는 그렇지 않을지라도 충분한 오염 모세포를 함유하지 않는다.
- [0094] **3. 특정 세포, 조직 및 기관을 위한 표적 미니세포의 제작**
- [0095] 이온화 방사선 조사에 의해 최종적으로 멸균된 미니세포 기반 생물 의약품은 다양한 접근 방법을 사용하여 생물 활성 분자를 표적으로 전달하거나 특정 수용체, 단백질, 핵산, 세포, 조직 및 기관에 면역조절성, 면역원성 및 치료성을 발휘할 수 있다. 미니세포 표적화 전략에는 두 가지 범주가 있지만 제한되지 않는다. 첫 번째는 관심 있는 특정 세포, 조직 또는 장기에 대한 자연 친화력 또는 방향성(tropism)을 가지는 박테리아 중에서 추출한 미니 세포를 사용하는 것이다. 두 번째 접근법은 특정 수용체, 단백질, 핵산, 세포, 조직 및 장기를 목표로 미

니세포를 조작하는 것이다. 이러한 두 번째 접근법은 예를 들어, (i) 외생성 폴리펩티드 표적화 단백질의 재조합 발현 및 표면 표식화, 또는 (ii) 외생성으로 부가된 표적 부분의 미니세포 표면으로의 결합 중 어느 하나를 포함하는 2 개의 넓은 범주로 더 나누어 질 수 있다. 이러한 접근법의 비제한적 응용 및 유용성은 본 명세서에서 보다 상세하게 설명된다.

[0096] 당업자라면 알 수 있듯이, 미니세포는 다양한 박테리아 종 및 균주로부터 제조 될 수 있으며, 이는 대장균 속, 살모넬라 속, 시겔라 속, 비브리오 속, 나이세리아 속, 캄필로박터 속, 슈도모나스속, 예르시니아 속, 클라미디아 속, 아시네토박터 속, 리스테리아 속, 바실러스 속, 헤모필러스 속, 클로스트리디움 속, 프란시셀라 속, 리케차 속(*Rickettsia spp.*)을 포함하되, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 종 및 박테리아의 많은 균주는 독특한 수용체, 단백질, 핵산, 세포, 조직 및 기관 유형에 대해 자연적인 방향성(tropism)을 가지고 있다.

[0097] 상기 박테리아 종으로부터 유래된 미니세포와 독특한 수용체, 단백질, 핵산, 세포, 조직 및 기관 유형에 대한 자연 방향성을 갖는 균주는 동일한 방향성을 가지며 그들이 유래된 모세포를 포함하는 살아있는 염색체로서 동일한 수용체, 단백질, 핵산, 세포, 조직 및 기관을 표적화한다.

[0098] 미니세포는 예를 들어, 재조합 발현 및 세포-특이적 표적 모이어티를 미니세포-표면에 전시함으로서 특정 세포 유형을 우선적으로 표적화하도록 조작될 수 있다. 이러한 접근법은 박테리아 막 단백질 융합과 디스플레이 기술 뿐만 아니라 이중 박테리아 부착물(adhesin) 및 기타 박테리아 세포 부착 또는 인바신(invasin) 분자의 발현을 포함한다. 전자의 경우, 미니세포는 세포-표적 폴리펩티드가 세포 특이적 표적 성질을 상기 미니세포에 부여하기에 충분한 양으로 미니세포 표면에 표시되도록 세포 표적화 폴리펩티드에 융합된 외막 단백질을 발현 및/또는 전시하도록 조작된다. 상기 외막 단백질은 세포 표적 폴리펩티드가 융합되어 미니세포 표면에 전시될 수 있고, 이러한 외막 단백질은 Lpp-OmpA, LamB, TraA, OmpC, OmpF, FliC, FliD, IgAP, fimbriae 단백질 및 pilus 단백질을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 융합되고 전시될 표적화 폴리펩티드는 진핵세포 막 단백질, 진핵세포 수용체 리간드(EGF, VEGF, PDGF 등)에 특이적인 단쇄 항체 단편(scFv), 및 파지 디스플레이와 같은 직교(orthogonal) 스크리닝 기술에 의한 비-자연발생 표적 폴리펩티드를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 박테리아 세포-표면 부착물 및 인바신(invasin) 단백질의 재조합 발현은 또한 세포 특이적 표적 성질을 미니세포에 부여하는데 이용된다. 이러한 경우, 진핵세포 막 단백질에 대해 자연 특이성을 갖는 박테리아 부착체가 재조합적으로 발현되고 미니세포 표면에 전시되며, 상기 막 단백질을 발현하는 진핵세포에 대한 미니세포의 특이적 표적화를 부여하기에 충분한 양으로 전시된다. 상기 박테리아 부착체와 인바신(invasin) 분자의 예로는, 예르시니아 슈도튜베큘로시스 유래의 인바신(invasin), 대장균의 FimH, Internalin A, Internalin B 및 Type IV Pilus를 포함한다.

[0099] 미니세포는 비공유 결합 또는 공유 결합 기술을 이용하여 세포 특이적 표적 모이어티를 미니세포 표면에 결합시킴으로써 특정 세포 유형을 우선적으로 표적화하도록 설계 될 수 있다. 공유 결합 기술은 화학적 가교 결합체를 사용하여 다양한 표적 모이어티를 미니세포 표면에 부착시킨다. 이러한 잔기는 폴리펩티드, 핵산, 및 각각에 적합한 저분자 및 가교 결합 시약을 당업자가 용이하게 각 잔기 유형에 대해 선택하는 것을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 가교 결합 시약은 하기 표 1에 열거된 것들로 제한되지는 않는다. 미니세포 표면에 공유 결합되는 바람직한 표적 모이어티는 항체 및 항체 유도체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 항체 유도체는 Fc, Fab, 단일 중쇄 또는 경쇄 및 가변 영역 및 상보성 결정 영역이 특정 에피토프에 대한 특이성을 부여하는 것과 관련하여 기능적인 임의의 다른 항체 유도체를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 사용되는 다른 유형의 표적 모이어티는 수용체-특이적 폴리펩티드 리간드(예 : 성장 인자), 수용체 - 특이적 호르몬 리간드 및 앵타머를 포함한다.

[0100] 하기 표 1은 서로 다른 목적에 가장 적합한 크로스 링커의 설명과 함께, 상이한 표적 분자를 미니세포 표면에 접합 시키는데 사용되는 화학적 가교 결합 시약의 비 제한적 유형을 열거한 것이다. 표에 열거된 바와 같이, 다수의 화학적 가교제를 사용하여 특정 세포, 조직 또는 기관 유형을 표적화 할 수 있는 상기 미니세포를 렌더링하는 목적으로 미니세포 표면에 배치될 수 있는 이중 특이성 항체-기재(bispecific antibody-based) 표적 분자를 생성시킬 수 있다. 크로스 링커가 표적 분자를 미니세포 표면에 직접 공유 결합 시키는데 사용되는 경우, 표적화 분자, 바람직하게는 항체 또는 항체 유도체는 하나의 반응으로 가교제 제조자의 제품 삽입물에 제공된 지시에 따라 기능화되며, 별도의 반응(전형적으로 디티 오프레이틀, 2-β 메르캅토에탄올 또는 트리스(2-카르복시에틸)포스핀과 같은 환원제로 처리)에서 제조자의 추가 사양에 따라 기능화 된다. 예를 들어, 관능화된 표적화 모이어티 및 관능화된 미니세포를, 바람직하게는 표적화 모이어티 1 개 이상을 1개의 미니세포의 물비로 함께 혼합하고 가교시켜 가교제 제조사의 지시에 따라 커플링 반응을 완결시킨다. 일부 구현예에서, 한 쌍의 간단한 세척 단계를 따른(예를 들어, 펠릿화 미니세포 및 완충된 용액, 바람직하게는 인산염 완충 식염수 중에 현탁

된 재조합 표적 미니세포) 표적화된 미니세포는 실온 또는 4 °C에서 2-24 시간 동안 또는 둘 모두와 함께 항온 배양하여 저분자 약물 또는 작은 핵산 페이로드로 추가로 적재될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 후, 과량의 약물 및 소량의 핵산을 씻어 내고 (다시 펠렛화하고 재현탁 시킴으로써), 페이로드 함유 미니세포를 약제학적 용도로 허용되는 부형제, 바람직하게는 약제학적 희석제인 GRAS 물질로 제형화한다. 일부 구현예에서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제(예를 들어, 주사용 멸균 수 중 D-트레할로스)에서 재현탁 시킨 후, 미니세포를 개별적으로 밀폐된 마개가 있는 바이알에 넣고 동결된 현탁액으로서 저장되고, 나아가 동결 건조되고, 동결 건조된 상태로 저장된다. 동결 건조 또는 현탁액처럼 미니세포를 함유한 바이알을 이온화 방사선에 노출시켜 최종적으로 멸균하고 사용하기 전까지 냉동 보관할 수 있다.

표 1

[0101]

박테리아 미니세포에 표적 모이어티를 부착시키기 위해 사용할 수 있는 비제한적인 화학적 가교제의 유형

가교 결합 표적	가교 결합제	목적
Amine to amine (homobifunctional)	disuccinimidyl glutarate (DSG), disuccinimidyl suberate (DSS), bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3), tris(succinimidyl)aminotriacetate (TSAT), BS(PEG)5, BS(PEG)9, Lomant's reagent (DSP), 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate) (DTSSP), disuccinimidyl tartrate (DST), Bis[2-(succinimidooxycarbonyloxy)ethyl]sulfone (BSOCOES), ethylene glycol bis[succinimidylsuccinate] (EGS), ethylene glycol bis[sulfosuccinimidylsuccinate] (Sulfo-EGS), dimethyl adipimidate (DMA), dimethyl pimelimidate (DMP), dimethyl suberimidate(DMS), dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate (DTBP), 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene (DFDNB)	폴리펩티드, 펩티드, DARPins 및 아민기를 함유하는 기타 아민-함유 표적 분자를 아민 함유 미니세포 외막 단백질의 노출된 외부 영역에 가교 결합 시키는 데 사용됨
Sulfhydryl to sulfhydryl (homobifunctional)	Maleimides (BMOE, BMB, BMH, TMEA, BM[PEG]2, BM[PEG]3, BMBD, and DTME), Pyridyldithiols (DPDPB), vinylsulfone	시스테인 잔기 (설프하이드릴 포함)를 포함하는 미니세포 외막 단백질의 노출된 외부 영역에 미니세포에 있는 자연 발생 또는 재조합 조작된 시스테인 잔기(설프하이드릴 포함)를 함유한 폴리펩티드, 펩티드, DARPins 및 기타 아민 함유 표적 분자를 가교 결합하는 데 사용됨
Non-selective (homobifunctional)	Bis-[b-(4-Azidosalicylamido)ethyl]disulfide (BASED)	폴리펩티드, 펩티드, DARPins, 아민 함유 접합체, 탄수화물, 앵타머, 핵산 및 호르몬을 비선택적 방식으로 미니세포에 가교 결합시키는 데 사용됨
Amine to sulfhydryl (heterobifunctional)	N-(α-Maleimidoacetoxy)succinimide ester (AMAS), BMPS, GMBS, Sulfo-GMBS, MBS, Sulfo-MBS, Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC), EMCS, Sulfo-EMCS, SMPB, Sulfo-SMPB, SMPH, LC-SMCC, Sulfo-KMUS, SM(PEG)2, SM(PEG)4, SM(PEG)6, SM(PEG)8, SM(PEG)12, SM(PEG)24, SPDP, LC-SPDP, Sulfo-LC-SPDP, SMPT, Sulfo-SMPT, SIA, SBAP, SIAB, Sulfo-SIAB,	아민 함유 미니세포 외막 단백질의 노출된 외부 영역에 자연 발생 또는 재조합 조작된 시스테인 잔기 (설프하이드릴 포함)를 통해 폴리펩티드, 펩티드, DARPins 및 기타 아민 함유 표적 분자를 가교 결합 시키는 데 사용됨  반대로, 폴리펩티드, 펩티드, DARPins 및 기타 시스테인-함유 아민을 시스테인(설프하이드릴을 함유함)을 함유하는 미니세포 외막 단백질의 노출된 외부 영역에 가교 결합 시키는 데 사용됨



Amine to non-selective	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylic acid (NHS-ASA), ANB-NOS, Sulfo-HSAB, Sulfo-NHS-LC-ASA, SANPAH, Sulfo-SANPAH, Sulfo-SFAD, Sulfo-SAND, Sulfo-SAED, succinimidyl-diazirine(SDA), Sulfo-SDA, LC-SDA, Sulfo-LC-SDA	폴리펩티드, 펩티드, DARPins 및 기타 아민 함유 표적 분자를 자연 발생 또는 조작된 아민 그룹을 통해 미니세포 표면 국부막 단백질에 가교 결합 시키는데 사용됨
Amine to carboxyl	Carbodiimides (dicyclohexylcarbodiimide [DCC], 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride [EDC or EDAC])	폴리펩티드, 펩티드, DARPins 및 기타 아민 함유 표적 분자를 노출된 자연 발생 또는 재조합 조작된 카복실 말단을 함유한 미니세포 외막 단백질의 노출된 외부 영역에 가교 결합 시키는데 사용됨  반대로, 폴리펩티드, 펩티드, DARPins 및 다른 표적 분자를 그들의 카복실 말단을 통해 아민을 함유한 미니세포 외막 단백질의 노출된 외부 영역에 가교 결합 시키는데 사용됨
Sulphydryl to non-selective	Pyridyldithiol / Aryl Azide (ADPD)	폴리펩티드, 펩티드, DARPins 및 기타 설프하이드릴 포함 표적 분자를 미니세포에 가교 결합 시키는데 사용됨  반대로, 폴리펩티드, 펩티드, DARPins 및 기타 표적화 분자를 시스테인(설프하이드릴을 함유함)을 함유한 미니세포 외막 단백질의 노출된 영역에 가교 결합 시키는데 사용됨
Sulphydryl to carbohydrate	Maleimide/Hydrazide, BMPH, 3,3'-N-[ε-Maleimidocaproic acid] hydrazide, trifluoroacetic acid salt (EMCH), MPBH, KNUH	미니세포 표면에서 설프 하이드릴 함유 표적 분자와 탄수화물을 교차 결합시키는 데 사용됨  반대로, 글리코실화 (탄수화물 함유) 표적 분자를 시스테인 잔기를 함유하는 미니세포 외막 단백질의 노출된 영역(사슬 하이드릴을 함유함)에 가교 결합 시키는데 사용됨
Hydroxyl to sulfhydryl	Isocyanate/Maleimide (PMPI)	설프하이드릴 함유 표적 분자를 자유 수산화물을 함유한 미니세포 표면에 가교 결합 시키는데 사용됨

[0102] 항체는 원인, 진행, 유지 또는 증상 발현과 관련된 특정 조직, 기관 및 세포 유형에 대한 미니세포의 표적화를 돕기 위해 사용될 수 있으며, 상기 항체는 면역 글로블린 또는 면역 글로블린 하위 클래스에서 유래하거나 면역 글로블린 하위 클래스의 일부 일 수 있고, IgA, IgM, IgD, IgG 및 IgE를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 동일한 목적을 달성하기 위해 적응성 면역을 통해 항체 반응을 일으키는 것으로 알려진 모든 동물에서 세포 특이 항원에 대한 하위 항체의 모든 항체를 키울 수 있지만, 미니세포의 표적화 기능을 촉진시키는 하위 용도의 항체는 "인간화" 될 수 있다. 본질적으로, 항체는 두 개의 분리된 팔 (Fab ')을 포함하며, 각각은 특정 항원의 동일한 에피토프를 인식한다. 그러나 분자 생물학의 진보는 분자 생물학의 진보로 인해 연구자는 동일하거나 다른 항원에서 발생할 수 있는 뚜렷하게 다른 항원 결정기를 인식할 수 있도록 각 암(또는 경우에 따라 분자의 Fc 영역)의 특이성을 수정할 수 있었다. 이러한 항체 유도체는 '이중특이적' 항체 또는 '이중특이적' 표적 부분으로 불린다.

[0103] 실험실에서 항체는 하나의 항체가 두 개의 개별 항원을 동시에 표적으로 하는 것과 같이 서로 다른 항원에 대해 독립적이고 특이적으로 설계 될 수 있다. 비제한적인 예로서, 항체는 하나의 Fab '상에 주어진 진핵박테리아 (eubacteria) 미니세포(예를 들어, LPS 0-항원 또는 포린 단백질)의 추정 표면성분을 인식하도록 재조합적으로 조작될 수 있고, 이중 특이성 항체의 다른 Fab' 진핵세포 특이적 표면 항원을 인식한다. 또 다른 비제한적 변형

에서, 항체의 중쇄의 Fc 영역은 주어진 항원(예를 들어, LPS) 내의 특정 에피토프에 특이적으로 결합하도록 유전적으로 조작될 수 있는 반면, 분자의 Fab '부분은 별개의 진행세포 특이적 표면 항원에 다른 에피토프 또는 그 반대로 존재한다. 재조합 수단에 의한 이중 특이성 항체 생성에 대한 이와 같은 접근법은 디아바디(diabody), 트리아아보바디(triabodies), 테트라바디(tetrabody), Bis-scFv, Fab2 및 미니 바디로 취할 수 있으며, 각각 미니세포의 표면 분자에 특이적인 하나의 팔을 함유하도록 조작될 수 있고, 항원 또는 수용체를 포함한다.

[0104] 추가로, 당업자는 분리된 특이성을 갖는 2 개의 분리된 항체가 이들을 가용성 단백질 A, 단백질 G 또는 단백질 A/G(두 개 이상의 항체를 인식하고 결합 시킴) 또는 임의의 다른 결합 분자에 커플링 시킴으로써 비공유 결합될 수 있음을 쉽게 인식할 것이다. 여기서, 복합체 내의 하나의 항체는 특이적으로 미니세포의 표면에 부착되고 다른 항체는 생체내에서 진행 세포-특이적 표면 항원을 발현하는 특정 세포, 조직 또는 기관 유형을 특이적으로 인식하여 "표적화"하도록 전이된다. 유사하게, 당업자는 별도의 특이성을 갖는 2 개의 분리된 항체가 무수한 가교 결합 기술을 사용하여 공유 결합되어 동일한 효과를 달성할 수 있음을 인식할 것이다.

[0105] 표적 부위의 비공유 결합에는 이중 특이적 리간드 및 이중 특이적 항체의 사용이 포함되며 상기 이중 특이적 리간드 또는 이중 특이적 항체의 한 부분이 미니세포 표면을 인식하고 이중 특이적 리간드의 다른 부분은 진행세포 막 단백질을 인식한다. 상기 이중 특이성 항체 및 항체 유도체는 미니세포 표면 분자에 특이적인 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 진행 세포에 특이적인 하나 이상의 CDR을 함유하는 것으로 정의된다. 본원에 개시된 방법 및 조성물에 사용하기에 적합한 이중 특이적 항체 및 이중 특이적 항체 유도체의 비제한적인 예가 도 1에 도시되어 있다. 상기 이중 특이적 리간드는, 일부의 구현예에 있어서, 미니세포 표면에 특이적인 하나 이상의 부위 및 진행 세포에 특이적인 부위를 함유할 수 있다. 미니세포에 대한 항체 및 다른 리간드의 비공유 결합의 바람직한 방법 중 하나는 WO/2012/112,696에 기재되어 있으며, 이는 본원에서 참고로 인용된다. WO/2012/112,696에 기술된 기술은 융합 단백질의 미니세포 표면에 단백질 A 또는 단백질 G의 Fc 결합 영역을 표시하고 이들 미니세포를 Fc 영역 함유 항체 또는 다른 폴리펩티드 배위자에 커플링시켜 상기 미니세포에 대한 특성을 표적으로 한다.

[0106] 도 1에 도시된 바와 같이, 당해 기술 분야에서 널리 인식되는 다양한 유형의 다가 항체 유도체 서브 타입이 표적 미니세포를 생성하는데 사용될 수 있다. 실시예 1에 예시된 각각의 비제한적인 예에서 사용된 항체 유도체의 적어도 하나의 팔(arm)은 하나 이상의 미니세포 표면 구조에 특이적이고, 이는 포린 단백질, 편모, 필라스 및 O-항원을 포함하나 이에 제한되지 않으며, 하나 또는 그 이상의 추가적인 팔(arm)은 하나 이상의 진행 세포에 특이적이다. 가교 결합제(이중 특이성(mab) 2 및 이중 특이성 F(ab')<sub>2</sub>)를 이용하여 제조된 이중 특이성 항체들도 도 1에 열거된 이들 중 적절한 구성원, 특히 SPDP 또는 이의 유도체 중 임의의 것을 이용하여 생성된다. 제시된 다른 다가 항체 유형은 숙련된 당업자에게 일반적으로 공지된 확립된 재조합, 선별, 정제 및 특성화 기술을 사용하여 제조된다. 가교 결합제(이중 특이성(mab)<sub>2</sub> 및 이중 특이성 F(ab')<sub>2</sub>)를 이용하여 제조된 이중 특이성 항체들도 도 1에 열거된 항체들 중 적절한 구성원, 특히 SPDP 또는 이의 유도체 중 임의의 것을 이용하여 생성된다. 제시된 다른 다가 항체 유형은 당업자에게 통상적으로 공지되고 확립된 재조합, 선별, 정제 및 특성화 기술을 이용하여 제조된다.

[0107] 항원 또는 다른 표적 모이어티의 공유 결합 및 비공유 결합이 사용되는 적용에서, 표적 부분의 커플링 전에 모세포로부터 미니세포를 먼저 정제하는 것이 바람직하지만 반드시 필수는 아니다. 하기에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 정제된 미니세포는 정제 시에 각각의 치료용, 면역조절용 및 면역원성의 유효량을 이미 함유하고 있거나, 또는 정제된 후에 유효량을 미니세포에 첨가한다. 경우에 따라서는 상기 두 가지 방법을 함께 사용하는 것이 바람직하다. 후자의 2 가지 시나리오와 관련하여, 표적 모이어티는 숙련된 기술자의 재량에 따라 외장성 페이로드(들)를 미니세포에 첨가하기 전 또는 후에 부가될 수 있다. 최종 미니세포 조성물은 이온화 방사선 조사에 의한 말단 멸균을 위해 추가 처리 및 준비된다.

[0108] 표적화된 치료용 미니세포의 표면상의 항체, 항체 유도체 또는 다른 표적화 분자는 바람직하게는 세포-특이적 표면항원을 인식하고, 상기 세포-특이적 표면항원은 α3β1 인테그린, α4β1 인테그린, α5β1 인테그린, αvβ3 인테그린, αvβ1 인테그린, β1 인테그린, 5T4, CAIX, CD4, CD13, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD31, CD33, CD34, CD40, CD44v6, CD45, CD51, CD52, CD54, CD56, CD64, CD70, CD74, CD79, CD105, CD123, CD340, Cripto, ED-B, GD2, TMEFF2, VEGFR1, VEGFR2, FGFR, PDGFR, ANGPT1, TIE1, TIE2, , TEK (CD202B), TGFβR, 사상 수용체 5 (트레일-R2), DLL4, EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHA9, EPHA10, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB5, HER-2/neu, IL-13R α2, MUC-1, MUC16, EGFR1 (HER-1), EGFR2 (HER-2/neu), EGFR3 (HER-3, IGF-1R, IGF-2R, c-Met (HGFR), 메스토린, PDGFR, EDGR, TAG-72 TRAIL-R1, TRAIL-R2,

CA-125, GPNMB, CA-IX, GD3 강글리오시드, RANKL, BAFF, IL -6R, TAG-72, HAMA, CD166 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0109]

일부 구현예에서, 항원에 특이적인 미니세포 표면 항체 표적 모이어티, 항체 유도체 및/또는 다른 표적 분자의 결합이 표적 미니세포의 내부화를 유도하여 세포 내 페이로드 전달을 촉진하기 때문에 부분적으로 표적 모이어티가 선택된다. 일부 구현예에서, 표적화 성분으로 사용되는 앞서 기술된 표적 특이적 항체는 mAb 3F8, mAb CSL362, mAb CSL360, mAb J591, Abagovomab, Abciximab, Adalimumab, Afelimomab, Afutuzumab, Alacizumab, ALD518, Alemtuzumab, Altumomab, Anatumomab, Anrukinzumab, Apolizumab, Arcitumomab, Aselizumab, Atlizumab, Atorolimumab, Bapineuzumab, Basiliximab, Bavituximab, Bectumomab, Belimumab, Benralizumab, Bertilimumab, Besilesomab, Bevacizumab, Biciromab, Bivatuzumab, Blinatumomab, Brentuximab, Briakinumab, Canakinumab, Cantuzumab, Capromab, Catumaxomab, CC49, Cedelizumab, Certolizumab, Cetuximab, mAb528, Citatuzumab, Cixutumumab, Clenoliximab, Clivatuzumab, Conatumumab, CR6261, Dacetuzumab, Daclizumab, Daratumumab, Denosumab, Detumomab, Dorlimomab, Dorlixizumab, Echromeximab, Eculizumab, Edobacomab, Edrecolomab, Efalizumab, Efungumab, Elotuzumab, Elsilibimomab, Enlimomab, Eptumomab, Epratuzumab, Erlizumab, Ertumaxomab, Etaracizumab, Exbivirumab, Fanolesomab, Faralimumab, Farletuzumab, Felvizumab, Fezakinumab, Figitumumab, Fontolizumab, Foravirumab, Fresolimumab, Galiximab, Gantenerumab, Gavilimumab, Gemtuzumab, Girentuximab, Glembatumumab, Golimumab, Gomiliximab, Ibalizumab, Irbatumomab, Igovomab, Imciromab, Infliximab, Intetumumab, Inolimomab, Inotuzumab, Ipilimumab, Iratumumab, J591, Keliximab, Labetuzumab, Lebrikizumab, Lemaesomab, Lerdelimomab, Lexatumumab, Libivirumab, Lintuzumab, Lorvotuzumab, Lucatumumab, Lumiliximab, Mapatumumab, Maslimomab, Matuzumab, Mepolizumab, Metelimomab, Milatuzumab, Minretumomab, Mitumomab, Morolimumab, Motavizumab, Muromonab, Nacolumab, Naptumomab, Natalizumab, Nebacumab, Necitutumab, Nerelimomab, Nimotuzumab, Nofetumomab, Ocrelizumab, Odulimumab, Ofatumumab, Olaratumab, Omalizumab, Oportuzumab, Oregovomab, Otelixizumab, Pagibaximab, Palivizumab, Panitumumab, Panobacumab, Pascolizumab, Pentumomab, Pertuzumab, Pexelizumab, Pintumomab, Priliximab, Pritumumab, PRO140, Rafivirumab, Ramucirumab, Ranibizumab, Raxibacumab, Regavirumab, Resilizumab, Rilotumumab, Rituximab, Robatumumab, Rontalizumab, Rovelizumab, Ruplizumab, Satumomab, Sevirumab, Sibrotuzumab, Sifalimumab, Siltuximab, Siplizumab, Solanezumab, Sonepcizumab, Sontuzumab, Stamulumab, Sulesomab, Tacatuzumab, Tadocizumab, Talizumab, Tanezumab, Taplitumomab, Tefibazumab, Telimomab, Tenatumomab, Teplizumab, TGN1412, Ticilimumab, Tigatuzumab, TNX-650, Tocilizumab, Toralizumab, Tositumomab, Trastuzumab, Tremelimomab, Tucotuzumab, Tuvirumab, Urtoxazumab, Ustekinumab, Vapaliximab, Vedolizumab, Veltuzumab, Vepalimumab, Visilizumab, Volociximab, Votumumab, Zalutumumab, Zanolimumab, Ziralimumab, Zolimomab 및 앞의 모든 조합을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0110]

#### 4. 미니세포 내로의 페이로드의 적재

[0111]

진균세균 미니세포는 동물, 예를 들어 포유동물(예: 인간)에 대해 치료, 면역조절, 면역원성 및/또는 진단 이점을 갖는 생물학적 활성 화합물의 몇몇 부류를 캡슐화하고 전달할 수 있다. 미니세포에 의해 전달될 수 있는 생물학적 활성 화합물(payloads)의 유형으로는 저분자(저분자 약물을 포함), 핵산, 폴리펩티드, 방사성 동위원소, 지질, 리포폴리사카라이드 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 생체 활성 페이로드로 미니세포를 로딩하는 방법에는 두 가지 범주의 접근법이 포함되며 이 두 범주의 접근법을 결합 할 수 있다. 접근법의 첫 번째 카테고리는 물리적 또는 화학적 수단을 통해 외행성 페이로드를 미니세포 에 로드하는 것입니다. 접근법의 두 번째 카테고리는 미니세포에서 생체 활성 페이로드의 재조합 생산 또는 발현이다.

[0112]

미니세포를 페이로드를 적재하는 첫 번째 방법은 외생성 저분자 의약품의 적재에만 제한되지 않는다. 본원에 사용된 용어 "저분자"는 생물학적 효과를 가지며 5000 달톤 미만의 분자량을 갖는 분자를 의미한다. 일부 구현예에서, 저분자는 2500 달톤 미만의 분자량을 갖는다. 일부 구현예에서, 저분자는 1000 달톤 미만의 분자량을 갖는다. 일부 구현예에서, 저분자는 800 달톤 미만의 분자량을 갖는다. 일부 구현예에서, 저분자는 500 달톤 미만의 분자량을 갖는다. 저분자 의약품에는 동물(인간 포함)에게 약리학적 치료 효과를 가져 오는 저분자가 포함된다.

[0113]

일부 구현예에서, 저분자는 상기 저분자의 고농축에서 미니세포를 배양함으로써 미니세포에 로딩된다. 시간이 지남에 따라 저분자는 수동적으로 미니 세포로 확산되어 미니세포의 다양한 분자 구성 요소와 상호 작용하여 미니세포에 포획되게 된다. 일부 구현예에서, 저분자는 미니세포가 엔도솜 내로 내재화되고 분해/방출 과정이 진

행되면 미니세포에 의해 표적 세포로 방출 될 수 있다.

[0114] 미니세포에서 사용하기에 적합한 저분자 약물의 종류는 항생제(항 감염제(anti-infectives), 항신 생물(anti-neoplastics) 및 항 바이러스제(anti-virals)), 항히스타민 및 항염증 약학 저분자 제제로 제한되지 않는다. 여기서 사용할 수 있는 항생제(항 감염제, 항신 생물 및 항 바이러스제)에는 다음이 포함되며 이에 제한되지 않는다: (1) DNA 손상제 및 DNA 합성을 저해하는 안트라사이클린(독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신), 알킬화제(벤다무스틴(bendamustine), 부숴판(busulfan), 카보플라틴(carboplatin), 카르무스틴(carmustine), 시스플라틴(cisplatin), 클로람부실(chlorambucil), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 다카르바진(dacarbazine), 헥사메틸멜라민(hexamethylmelamine), 이포포스아마이드(ifosfamide), 로머스틴(lomustine), 메클로레타민(mechlorethamine) 멜팔란(melphalan), 미토탄인(mitotane), 마이토마이신(mytomycin), 피포브롬(pipobroman), 프로카바진(procarbazine), 스트렙토조신(streptozocin), 티오테파(thiotepa), 및 트리에틸렌멜라민(triethylenemelamine)), 백금 유도제(시스플라틴, 카보플라틴, cis-디아민에디클로플라티늄), 텔로머라제 및 토포아이스머라제 억제제(Camptosar<sup>®</sup>), (2) 탁산 및 탁산 유도제(파클리탁셀, 도세탁셀, BAY 59-8862)를 포함하나, 이에 제한되지 않는 미세소관 및 튜블린 결합제, (3) 항 대사제, 예를 들어, 카페시타빈(capecitabine), 클로로데옥시아데노신(chlorodeoxyadenosine), 시타라빈(cytarabine 및 그 활성화된 형태, ara-CMP), 시토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside), 다카르바진(dacarbazine), 플록스루리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 5-DFUR, 겐시타빈(gemcitabine), 히드록시우레아(hydroxyurea), 6-메르캅토티딘(6-mercaptopurine), 메토포렉세이트(methotrexate), 펜토스타틴(pentostatin), 트리메트렉세이트(trimetrexate) 및 6-티오구아닌(6-thioguanine), (4) 탈리도미드(thalidomide), 스니티닙(sunitinib), 레날리도마이드(lenalidomide)와 같은 항 혈관 신생제, 플라보노이드/플라본, DMXAA 및 CA4DP, ZD6126, AVE8062A 등의 콤벤타스타틴 유도제(combretastatin derivatives) 등의 혈관 파괴제, (5) 내분비치료제 및 아로마타제(aromatase) 억제제, 예를 들어, 4-하이드로안드로스텐디온(4-hydroandrostendione), 엑세메스탄(exemestane), 아미노글루테티미드(aminoglutethimide), 아나스트로졸(anastrozole), 레트로졸(letrozole), (6) 항 에스트로겐 (타모시펜(Tamoxifen), 토레미펜(Toremifene), 랄록시펜(Raloxifene), 파스로텍스(Faslodex)), 예를 들어, 텍사메타손과 같은 스테로이드, (7) Toll-유사 수용체 작용제, 길항제 같은 면역 조절제 (8) 인테그린에 대한 억제제, 다른 접착 단백질 및 매트릭스 메탈로프로티나 제) (9) 히스톤 데아세틸라제 억제제 (10) imatinib (글리벡)와 같은 티로신 키나아제의 억제제와 같은 신호 전달 억제제, (11) 열충격 단백질의 억제제, (12) 레티노이드, 예컨대 모든 트랜스 레티노산, (13) 성장 인자 수용체의 저해제 또는 성장 인자 그 자체, (14) 항-유사분열 화합물, 예컨대 노벨바인(navelbine), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 및 비노렐빈(vinorelbine), (15) COX 억제제와 같은 항 염증제, (16) 세포주기 조절제, 예를 들어, 체크포인트 조절제 및 텔로머라제 억제제, (17) 전사 인자 억제제 및 Bcl-2, Bcl-x 및 XIAP의 억제제와 같은 세포 자멸사 유도제, 및 상기 1-17의 조합.

[0115] 미니세포에 치료용, 면역조절용 및 면역원성의 페이로드를 적재하는 두 번째 방법은 재조합 발현 또는 페이로드의 생산을 통한 방법 일 수 있다. 미니세포를 생성하는 모세포는 미니세포가 생산되기 전에 또는 동시에 생산되는 하나 이상의 치료, 면역조절 및/또는 면역원성 핵산 분자 및/또는 폴리펩티드를 재조합 적으로 발현/생산하는데 사용될 수 있다. 재조합 핵산 및/또는 폴리펩티드는 미니세포에 의해 발현, 분리 및 캡슐화 된 다음 생체 내 또는 시험 관내에서 표적화 된 미니세포에 의해 진핵세포로 전달된다.

[0116] 미니세포에 의해 전달되는 재조합적으로 발현/생산된 치료학적, 면역조절적 및/또는 면역원성 핵산의 예로는 RNA 간섭 분자(들), 또는 리보자임 (들), 이중가닥치료 RNA (예를 들어, dsRNA 또는 siRNA) 단일가닥 치료용 RNA (예 : shRNA), 마이크로 RNA, 긴 비암호화 RNA, CRISPR RNA, 앵타머, 리보자임, 치료 용 폴리펩티드 및/또는 치료용 핵산을 암호화하는 진핵 세포 발현 플라스미드 및 이들의 임의의 조합일 수 있다. 핵산(들)의 재조합 발현은 플라스미드, 코스미드, 파지미드 및 박테리아성 인공 염색체(BAC), 및 상기 예들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 당해 기술분야에 공지된 임의의 다양한 에피솜성 재조합 원핵성 발현 벡터로부터의 발현 결과일 수 있다. 유사한 방식에서, 재조합 발현은 염색체 상에 위치한 원핵성 발현 카세트에 의해 달성될 수 있으며, 이때 상기 원핵성 발현 카세트는 미니세포 생산 모세포 염색체의 하나 이상의 복제품 내에 존재한다. 전달될 핵산 분자가 "유전자 침묵" 작용 메커니즘을 통해 효과를 발휘하는 경우, 핵산은 하나 이상의 상이한 진핵 생물 mRNA 전사체에 특이적이다. 핵산은 동일한 미니세포에 의해 전달되어 하나 이상의 유전자가 단일 전달 사건에 의해 침묵 될 수 있다. 표적화 된 미니세포는 또한 이들 핵산을 조합하여 전달하는데 사용된다. 또한 표적 미니세포는 하나 이상의 핵산과 함께 하나 또는 그 이상의 저분자 약물을 전달하는 데 사용된다.



- [0117] 치료용 핵산 분자가 원핵 세포 발현 카세트 (염색체 또는 에피솜 위치)로부터의 재조합 발현에 의해 모세포에 의해 예비-형성되는 이중나선 RNA (예를 들어, siRNA) 또는 헤어핀 구조 (예 : shRNA)를 형성하기 위해 다시 폴딩 할 수 있는 단일가닥 RNA를 사용하는 경우, 미니세포 내에서의 치료용 RNA(들)의 반감기는 세포 내 이중가닥 및/또는 머리핀 RNA 분자의 분해를 담당하는 RNase 유전자 (예:원핵 생물 RNase III)에서 결실 또는 다른 비기능적 돌연변이를 가지고 있는 미니세포 생산 박테리아 균주의 사용에 의해 증가된다. RNase가 없으면 치료용 RNA 분자가 더 높은 수준으로 축적되어 치료용 핵산 분자를 전달하는 표적 미니세포의 효능이 증가한다. 대장균 미니세포 생산 균주의 경우, 이 중에서 유일하게 알려진 체세포 RNaseIII을 코딩하는 *rnc* 유전자에 돌연변이 또는 결실이 도입된다.
- [0118] 재조합적으로 발현되는 치료용, 면역조절 및 면역원성 폴리펩티드는 표적화된 미니세포에 의해 전달되며, 상기 표적화된 미니세포는 극성을 조절하고 및/또는 반감기를 연장하도록 고안된 분자(예를 들어, 지질 또는 폴리테렌글리콜)와의 접합체를 포함하고, 단백질 독소, 콜레스테롤-의존성 세포용해소, 기능성 효소, 활성화된 카스파제, 프로-카스파제, 사이토카인, 케모카인, 세포 침투성 펩티드, 백신 항원 및 기타 앞선 예들의 조합을 포함한다. 폴리펩티드의 재조합 발현은 플라스미드, 코스미드, 파지미드 및 박테리아 인공 염색체 (BAC) 및 앞선 예들의 임의의 조합을 포함하되, 이에 제한되지 않는 당업계에서 공지된 다양한 에피솜질 재조합 원핵 생물 발현 벡터의 발현 결과일 수 있다. 유사한 방식으로, 재조합 발현은 미니세포-생산 모세포 염색체의 하나 이상의 복사본에 존재하는 염색체에 위치한 원핵 발현 카세트에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 표적화된 미니세포를 이용한 단백질 독소의 전달은 생체 내에서 세포의 선택적 제거가 바람직한 경우에 유리한 접근법이다. 페이로드의 내행성 운반 및/또는 독성 페이로드로서의 기능을 촉진시킬 수 있는 단백질 독소로는 퍼프린폴리신 O, 겔로닌, 디프테리아 독소 단편 A, 디프테리아 독소 단편 A/B, 파상풍 독소, 대장균 이열성 독소(LTI 및/또는 LTII), 콜레라 독소, 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C. perfringens*) 아이오타 독소(iota toxin), 슈도모나스 외독소 A, 시가 독소, 탄저병 독소, MTX(바실루스 스파에리쿠스(*B.sphaericus*) 모기 살충 독소(mosquitocidal toxin), 스트렙토리신, 보리 독소, 펠리틴, 탄저병 독소 LF 및 EF, 아데닐레이트 시클라아제 독소, 보툴리노리신 B, 보툴리노리신 E3, 보툴리노리신 C, 보툴리눔 독소 A, 콜레라 독소, 클로스트리듐 독소 A, B 및 알파, 리신, 시가 A 독소, 시가 유사 A 독소, 콜레라 A 독소, 백일해 S1독소, 대장균 이열성 독소(LTB), 리스테리올리신 O의 pH 안정성 변이체(pH 독립성; L461T 아미노산 치환), 리스테리올리신 O의 열 안정성 변이체(E247M 및 D320K 아미노산 치환), 리스테리올리신 O의 pH 및 열 안정성 변이체(E247M, D320K 및 L461T 아미노산 치환), 스트렙토리신 O, 스트렙토리신 O c, 스트렙토리신 O e, 스파에리코리신, 안트로리신 O, 세레올리신, 튜린지엔시리신 O, 바이헨스 테파넬리신, 알베올리신, 브레빌리신, 부티리콜리신, 테타놀리신 O, 노비일리신, 렉터놀리신, 뉴몰리신, 미틸리신, 슈도뉴몰리신, 수일리신, 인터메딜리신, 이바놀리신, 세엘리제리올리신 O, 바기놀리신 및 피올리신을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 사이토카인은 재조합적으로 발현되어 치료 및 면역조절 효과를 주기 위해 미니세포에 의해 전달될 수 있고, 상기 사이토카인은 과립구 대식세포 자극인자 (GM-CSF), 종양괴사인자 알파 (TNF- $\alpha$ ), 인터페론 감마 (IFN- $\gamma$ ), 인터페론 알파 2b(IFN- $\alpha$ 2b), 인터루킨-2 (IL-2), 인터루킨 -1 (IL-1 $\alpha$ ), 인터루킨 -12 (IL-12) 및 TRAIL을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 재조합으로 발현되고 전달 될 수 있는 백신 항원은 박테리아, 바이러스 및 기생 생물의 게놈에서 암호화된 항원을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 상기 재조합으로 발현되고 전달될 수 있는 백신 항원에는 암세포에 존재하는 항원 및 새로운 항원이 포함되고, 상기 암세포에 존재하는 항원 및 새로운 항원은 발암성 태아항원 (CEA), 메소텔린, 뮤신-1 (MUC1), BAGE, GAGE, MAGE, SSX EGFRvIII, Her-2, Gp100, Melan-A /Mart-1, 티로시나제, PSA, Mannaglobin-A, p53, 리빈, 서바이빈, 베타-카테닌-m, HSP70-2/m, HLA-A2-R170J, WT1, PR1, E75, ras, AFP, URLC10, 돌연변이 p53 및 NY-ESO-1 등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0119] 폴리펩티드는 통상의 기술자의 재량에 따라 미니세포의 상이한 하위 세포 구획에 제한될 수 있다. 본원에 개시된 표적화된 미니세포가 그램 음성 미니세포 생산 모균주로부터 유래하는 경우, 이로부터 생산되는 재조합에 의해 발현된 치료용 폴리펩티드는 사이토졸, 내막의 내부 침판(inner leaflet), 내막의 외부 침판, 주변 세포질, 외막의 내부 침판, 미니세포의 외막, 및 상기 예들의 임의의 조합으로 국소화될 수 있다. 본원에 개시된 표적화된 미니세포가 그램 양성 미니세포 생산 모균주로부터 유래하는 경우, 이로부터 생산되는 재조합에 의해 발현된 치료용 폴리펩티드는 사이토졸, 세포벽, 멤브레인의 내부 침판, 미니세포의 멤브레인, 및 상기 예들의 임의의 조합으로 국소화될 수 있다.
- [0120] 폴리펩티드 페이로드가 원핵 세포 발현 카세트(염색체 또는 에피솜 위치)로부터의 재조합 발현에 의해 모세포에 의해 예비-형성되고, 그 다음 페이로드로서 미니세포의 내부에 포장되는 경우, 미니세포 내의 폴리펩티드 유효성의 수명은 단백질 분해에 관여하는 결실 또는 다른 비기능성 돌연변이 단백질 (예 : 대장균의 lon

protease) 유전자를 포함하는 미니세포 생산 박테리아 균주의 사용에 의해 증가된다. 프로테아제가 없는 경우, 폴리펩티드 페이로드 분자는 더 높은 수준으로 축적되어, 폴리펩티드 페이로드 분자를 전달하는 표적 미니세포의 효능을 증가시킨다. 대장균 미니세포 생산 균주의 경우, 돌연변이 또는 결실에 의해 하나 또는 그 이상의 *lon*, *tonB*, *abgA*, *ampA*, *ampM*, *pepP*, *clpP*, *dcp*, *ddpX/vanX*, *elaD*, *frvX*, *gcp/b3064*, *hslV*, *hchA/b1967*, *hyaD*, *hybD*, *hych*, *hycI*, *iadA*, *ldcA*, *ycbZ*, *pepD*, *pepE*, *pepQ*, *pepT*, *pmbA*, *pqqL*, *prlC*, *ptrB*, *sgcX*, *sprT*, *tldD*, *ycaL*, *yeaZ*, *yegQ*, *ygeY*, *yggG*, *yhbO*, *yibG*, *ydpF*, *degS*, *ftsH/hflB*, *glpG*, *hofD/hopD*, *lepB*, *lspA*, *pppA*, *sohB*, *spa*, *yaeL*, *yfbL*, *dacA*, *dacB*, *dacC*, *degP/htrA*, *degQ*, *iap*, *mepA*, *nlpC*, *pbpG*, *tsp*, *ptrA*, *teas*, *umuD*, *ydcP*, *ydgD*, *ydhO*, *yebA*, *yhbU*, *yhjJ*, and *nlpD* 유전자가 도입될 수 있다.

[0121]

수용체 매개된 엔도시토시스에 의한 치료용, 면역조절용 및 면역 원성 폴리펩티드 및 핵산 첨가물의 효과적인 전달은 전달된 폴리펩티드 및/또는 핵산이 너무 오래 전부터 엔도솜 구획의 프로테아제 및 핵산 염기 환경에 너무 오래동안 노출되면 제한될 수 있다. 표적화된 진핵세포의 세포질로 방출되기 전에 대부분의 폴리펩티드와 핵산은 엔도솜 구획을 빠져 나갈 본래의 능력을 갖지 않는다. 대부분의 폴리펩티드와 핵산은 엔도솜 구획을 빠져 나갈 본래의 능력을 가지고 있지 않다. 단백질 독소 계열의 몇 가지 예외 사항은 콜레스테롤 의존성 세포용해 독제 / 독소 (예 : LLO, 페어 프린 킨 신 O (perfringololinsin O, PFG) (PFO), 스트렙토 리신 O (SLO))를 포함하며, 뿐만 아니라 디프테리아 독소의 A / B 단편 (절편 B에 의해 중재 됨), 리신 및 슈도모나스 엑소톡신 A가 존재한다. 고유한 엔도솜 탈출 특성을 포함하는 단백질 독소는 반드시 표적 미니세포에서 분리된 엔도솜 분열 성분의 공존이 효과적일 것을 요구하지 않으며 엔도솜 분열제를 포함하는 결정은 숙련된 기술자의 재량에 맡긴다. 다른 폴리펩티드 및 핵산은 엔도솜 구획을 빠져 나가는 본래의 능력을 갖지 않기 때문에, 숙련된 기술자는 엔도솜 경로에 의해 전달되는 많은 상이한 치료용 폴리펩티드의 엔도솜 탈출이 바람직하다는 것이 인식될 것이다. 세포내 그람 양성 병원성 박테리아 리스테리아 모노사이토스젠 (*Listeria monocytogenes*)의 리스테리올린 O (LLO) 단백질은 폴리펩티드 또는 핵산 페이로드 성분 또는 최상의 활성을 부여하기 위해 엔도솜 탈출을 필요로 하는 다른 치료 적재물에 제한적으로 포함되는 본원의 구현예에 혼입 될 수 있다. 일부 구현예에서, 전체 길이 (신호 분비 서열을 함유 함)는 엔도솜 파쇄제로서 사용된다. 일부 구현예에서, LLO (cLLO 제조)의 신호 서열은 당업계에 공지된 재조합 기술을 사용하여 유전자 수준에서 제거되고, cLLO는 엔도솜 파쇄제로서 사용된다. 일부 구현예에서, LLO (항체 돌연변이 247M, D320K 및 / 또는 L461T, sLLOpH)의 열 안정성 및/또는 pH 비의존성 버전이 사용된다. 치료용 폴리 펩티드 및/또는 핵산을 또한 발현하는 박테리아 균주를 생산하는 미니세포에서 발현 될 때, LLO (또는 임의의 LLO 변이체 또는 다른 엔도솜 탈출 촉진제)는 치료용 폴리 펩티드와 함께 캡슐화 될 수 있으며, 및/또는 미니세포 내의 핵산 (들)을 포함 할 수 있다. 미니 세포를 표적으로 할 때, 수용체 매개 엔도시토시스는 미니세포를 엔도솜으로 운반한다. 엔도솜의 가혹한 환경은 엔도솜 분열제 (예 : LLO, 이의 변이체 또는 다른 엔도 솜 분열 제)와 함께 탐재물(들)을 공-방출하는, 삼투된 미니세포를 분해하기 시작한다. 그런 다음 방출된 엔도솜 분열제 성분은 엔도솜에서 생물학적 효과를 발휘할 수 있는 세포질로 페이로드의 방출을 촉진한다. LLO 이외에, 바람직한 엔도 솜 붕괴제는 PFO 및 SLO 및 이의 유도체와 같은 다른 세포용해소 및 PI-PLC 또는 PC-PLC와 같은 포스포리파아제를 포함한다.

[0122]

표적화된 치료용, 면역조절용 및 면역원성 미니세포로서 사용되는 것 이외에, 본원에 개시된 미니세포는 또한, 표적화된 면역원성 미니세포 백신으로서 사용될 수 있다. 단백질 항원 및 / 또는 DNA 백신 탑재 미니세포는 이러한 항원제시세포 서브 세트에 의해 형질 감염된 진핵세포 표면 표식자에 특이적인 항체 또는 다른 미니세포 표면 전사 분자를 사용함으로써 면역 시스템의 항원제시세포의 별개의 하위 세트에 직접 표적화된다. 일부 구현예에서, 세포성 면역을 자극하는 MHC 클래스-II 로딩을 촉진시키기 위해 항원 또는 DNA 백신의 진핵세포 세포질로의 전달을 용이하게 하기 위해 LLO 또는 그 변이체 중 하나 (상기 기재 됨)를 포함하는 것이 바람직할 수도 있지만 반드시 필요한 것은 아니다. 또한, MHC 클래스 II 결합의 대부분이 발생하는 엔도솜 구획 내부에 항원을 유지함으로써 체액성(항체 매개) 면역을 자극하기 위해 MHC 클래스 II 로딩을 촉진하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 표적으로 한 미니백신의 LLO 분대를 삭제하거나 감소함으로써 달성될 수 있다. 또한, 표적 백신 미니세포는 숙련된 기술자에 의해 적절하다고 판단되는 외생성 면역 보강제를 발현시키거나 또는 적재하도록 추가로 조작된다. 아췌반트는 일반적인 보조제 (Keyhole limpet hemocyanin 또는 complet Freud's adjuvants) 일 수도 있고 표적 분자 아췌반트 일 수도 있다. 표적화된 분자 아췌반트는 Toll-Like 수용체(Toll-Like Receptors)의 길항제 또는 작용제 뿐만 아니라 면역 조절 특성을 갖는 다른 세포 성분을 포함한다. 표적화 된 백신은 박테리아, 바이러스 및 기생충의 전염성 질병 인자를 포함하되 이에 제한되지 않는 전염성 질병 인자에 수혜자 면역력을 제공한다. 타겟 백신은 또한 종양 및 자가, 자연발생의 다른 비정상적인 질병에 대한 수혜자 면역을 제공한다.

[0123]

전술한 미니세포 조성물의 구성 및 임의 요구된 특징에 따라, 상기 미니세포 조성물을 약학 조성물로 제제화하

고, 멸균 약학 제제 용기에 충전하고, 마개를 만들고, 밀봉하고, 방사선 조사에 의한 최종 멸균 처리한다.

## [0124] 5. 약학 조성물

[0125] 본 발명은 또한, 약학 조성물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 조성물에 관한 것이다. 본원에 사용된 용어 "약학 조성물"은 하나 이상의 부형제, 바람직하게는 생리학적으로 허용되는 부형제 및 하나 이상의 미니세포 조성물을 포함하는 혼합물을 지칭한다. 약학 조성물은 하나 이상의 "희석제"또는 "담체"를 더 포함할 수 있다.

[0126] 본 명세서에서, 용어 "부형제"는 세포 또는 조직 내로의 생물활성 펩티드(들)의 혼입을 억제 또는 방지하지 않는 화합물 또는 화합물의 조합을 의미한다. 부형제는 적절한 특성, 예를 들어 활성, 적합한 농도, 안정성의 표적 농도를 부여하기 위해 조성물에 첨가될 수 있는 다소 불활성인 임의의 물질이며, 활성제의 표적이 촉진된다(예를 들어, 약물 제제). 적합한 부형제는 특히 락토오스, 수크로오스, 만니톨 또는 소르비톨을 포함하는 당류, 활택제(glidants), 봉해제, 결합제, 윤활제, 중합체(지속 방출), 예를 들어 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 한천, 펙틴, 크산탄 검(xanthan gum), 구아검, 메뚜기콩 검, 히알루론산, 카제인, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸트, 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필메틸-셀룰로오스, 폴리아크릴레이트, 소듐카르복시메틸셀룰로오스 및/또는 폴리비닐피롤리돈(PVP), 공용매, 에킨대 코발트 에탄올, 폴리에틸렌글리콜, 계면 활성제, 향산화제, 방부제, 향료, 착화제, 향균제 및 동결 방지제를 포함한다. 이온화 방사선 조사에 의한 최종 멸균처리를 받는 미니세포의 제형에 있어서 바람직한 부형제 중 하나는 멸균 수에서의 D-트레할로스이다. D-트레할로스 다른 농도 또는 다른 희석제의 대체 농도가 사용될 수 있지만, D-트레할로스의 바람직한 농도는 12 % (w/v)이며, 바람직한 희석제는 멸균 수이다.

[0127] "희석제"는 약학적으로 허용 가능한 조성물의 용매로, 예를 들어 용해를 촉진시키고, 조성물의 생물학적으로 활성 형태 또는 하나 이상의 이의 성분도 안정화하기 위해 사용할 수 있는 수용성 용매를 말한다. 완충용액에 용해된 염은 해당 기술 분야에서 희석제로 이용될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 희석제는 하나 이상의 다른 염을 함유하는 완충용액이다., 바람직한 완충용액은, 인간 혈액의 염 조건처럼 보이는, 인산염 완충 식염수(특히 약학적 투여의 목적으로 조성물과 함께)이다. 완충 용액을 준비해야하고, 투여 경로, 완충액 용량 및 투여 된 제품의 부피에 따라 pH가 급간에 이르게 되는 경우 사용될 수 있음에도 완충염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 조절할 수 있기 때문에, 완충 희석제는 생물학적으로 활성 펩티드의 생물학적 활성을 거의 변화시키지 않는다.

[0128] 명세서에 사용된 용어 "담체"는 활성 성분이 적당한 제형(예를 들어, 마이크로입자 (예를 들어, 마이크로스피어), 알약, 캡슐, 태블릿, 용액, 콜로이드, 서스펜션, 에멀션, 필름, 젤, 크림, 연고, 페이스트 등)으로 만들거나 또는 조제되도록 해주는 불활성 물질이다. "생리학적으로 허용가능한 담체"는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 폐지(감소, 저해, 또는 예방)하지 않는 생리학적 조건 하에서 사용에 적합한 담체이다. 바람직하게는, 담체는 생리학적으로 허용가능한 담체, 바람직하게는 미니세포 조성물을 처리하는 곳에서 약학적으로 또는 수의학적으로 허용 가능한 담체이다.

[0129] "약학 조성물"은 부형제가 약학적으로 허용가능한 부형제인 조성물을 나타내고, "수의학적 조성물"은 부형제가 수의학적으로 허용가능한 부형제인 조성물을 나타낸다. 명세서에 사용된 용어 "약학적으로 허용가능한 부형제" 또는 "수의학적으로 허용가능한 부형제"는 생물학적이거나 또는 그 반대라도 바람직하지 않은 것이 아닌 어떠한 배지 또는 물질을 포함한다. 즉, 부형제는 어떠한 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하지 않고 또는 복합체 또는 이의 성분 중 어느 것 또는 유기체와 함께 유해한 방법으로 반응시키지 않고 미니세포 조성물과 함께 유기체에 투여될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 시약의 예는 미국 약전, The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md. 1990에서 제공되며, 이에 의하여 본 출원에 참고문헌으로 포함되었다. 용어 "치료용 유효량" 과 "약학적 유효량"은 유기체의 표적 세포, 조직, 또는 신체에서 측적 가능한 반응을 유도 또는 유발하기에 충분한 양을 의미한다. 치료용 유효량을 구성하는 것은 여러 인자에 의해 결정될 것이고, 박식 한 의사는 바람직한 투약방법이 되도록 고려할 것이다.

[0130] 원한다면, 가교 결합 된 폴리비닐피롤리돈, 한천 또는 알긴산 또는 알긴산 나트륨과 같은 그 염과 같은 봉해제를 더 포함할 수 있다. 다른 적합한 부형제 및 담체는 하이드로겔, 젤화 가능한 하이드로 콜로이드 및 키토산을 포함한다. 키토산 마이크로스피어 및 마이크로 캡슐을 캐리어로 사용할 수 있다. 예를 들어, WO 98/52547(위를 표적으로 하기 위한 마이크로스피어 제형을 기술하고, 상기 제형은 하나 이상의 활성 성분을 함유하는 내부 코어(임의로 젤화 하이드로 콜로이드를 포함함), 활성 성분(들)의 방출 속도를 조절하기 위한 수 불용성 중합체(예를 들어, 에틸 셀룰로오스)로 구성된 막, 및 양이온성 다당류, 양이온 성 단백질 및 / 또는 합성 양이온성 중합체와 같은 생체 접착성 양이온성 중합체로 구성된 외층을 포함하는 조성물; 미국특허번호.4,895,724. 전형적으로, 키토산은 적합한 작용제, 예를 들어 글루타르알데하이드, 글리옥살, 에피클로로히드린 및 숙신알데하이드



를 사용하여 가교 결합된다. 담체로서 키토산을 사용하는 조성물은 활성 성분(들)의 제어된 방출을 제공하는 것들을 포함하여 알약, 정제, 미세입자 및 미소구를 포함하는 다양한 투여 형태로 제형화 될 수 있다. 상기 다른 적합한 생체 접착성 양이온성 중합체는 산성 젤라틴, 폴리갈락토사민, 폴리아미노산, 폴리술폰산, 폴리히스티딘, 폴리오르니틴, 폴리4급 화합물, 프로아민, 폴리아민, 디에틸아미노에틸텍스트란 (DEAE), DEAE-이민, DEAE-메타크릴레이트, DEAE-아크릴아미드, DEAE-텍스트란, DEAE-셀룰로스, 폴리-p-아미노스티렌, 폴리옥시 에탄, 코폴리메타크릴레이트, 폴리아미도아민, 양이온성 전분, 폴리비닐피리딘 및 폴리티오디에틸아미노메틸에틸렌을 포함한다.

[0131] 상기 조성물은 임의의 적합한 방식으로 제제화 될 수 있다. 예를 들어, 미니세포 조성물은 균일하게(균질하게) 또는 불균일하게 (불균질하게) 캐리어에 분산 될 수 있다. 미니세포 조성물의 적합한 제형은 콜로이드성 용액(colloidal solution), 건조 분말(dry powder), 냉동 현탁액(frozen suspension), 액체 현탁액(liquid suspension) 및 동결 건조 제형(lyophilized formulations)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 건조 제형은 동결 건조 및 동결 건조된 분말을 포함하며, 이는 부비동 또는 폐로의 에어로졸 전달에 특히 적합하거나 장기간 보관 후 투여 전에 적절한 희석제로 재구성된다. 다른 바람직한 건조 제형은 본원에 개시된 조성물이 경구 투여에 적합한 정제 또는 환제 형태로 압축되거나 서방형 제제로 배합된 것들을 포함한다. 상기 조성물을 경구 투여하여 장의 상피에 전달되도록 할 때, 일부 구현예에서, 제제는 장내 피막으로 캡슐화되어 제형을 보호하고 그 안에 포함된 미니세포 조성물의 조기 방출을 방지하는 것이 유리하다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 본원에 개시된 조성물은 임의의 적합한 투여 형태로 될 수 있다. 환약 및 정제는 이러한 투약 형태 중 일부를 나타낸다. 또한, 상기 조성물은 예를 들어, 압축, 침지, 펠 코팅, 분무 건조 등에 의해 임의의 적합한 캡슐 또는 다른 코팅 물질로 캡슐화 될 수 있다. 적합한 캡슐은 젤라틴 및 전분으로 제조된 캡슐을 포함한다. 이어서, 이러한 캡슐은 원한다면 하나 이상의 추가 물질, 예를 들어 장용성 코팅으로 코팅 될 수 있다. 액체 제제는 수성 제제, 겔 및 유화액을 포함한다.

[0132] 일부 바람직한 실시 태양은 생체 접착성(bioadhesive), 바람직하게는 점막 접착성 코팅을 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 "생체 접착성 코팅"은 물질 (예를 들어, 미니세포 조성물)이 코팅 부재에서 부착되는 것이라기 보다는 생물학적 표면 물질에 부착되도록 하는 코팅이다. 상기 "점막 접착성 코팅"은 물질, 예를 들어 조성물이 점막에 잘 부착하는 것을 코팅이 없는 경우에 발생시키는 바람직한 생체 접착 코팅이다. 예를 들어, 미니세포는 점막 부착 물질로 코팅 될 수 있다. 상기 코팅 된 입자는 유기체에 전달하기에 적합한 투약 형태로 조립 될 수 있다. 바람직하게는, 표적화 될 세포 표면 수송 모이어티가 발현되는 위치에 따라, 투약 형태는 원하는 위치에 도달 할 때까지 제제를 보호하기 위해 다른 피복물로 피복되며, 점막 부착제는 제제가 유지되도록하고, 조성물은 표적 세포 표면 수송 모이어티와 상호 작용한다.

[0133] 본원에 개시된 조성물은 임의의 유기체, 바람직하게는 동물, 바람직하게는 포유류, 조류, 어류, 곤충 또는 거미류에 투여 될 수 있다. 바람직한 포유류는 소, 개, 말, 고양이, 양 및 돼지와 같은 동물, 및 비인간 영장류(non-human primates)를 포함한다. 인간이 특히 더 바람직하다. 상기 화합물을 투여하거나 전달하는 여러가지 기술이 당업계에 존재하며, 이는 구강, 청각, 구강, 직장 (예를 들어, 관장 또는 좌제), 질, 경 요도, 비강, 폐, 비경구 및 국소 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 의도된 효과를 달성하기에 충분한 양의 생물학적 활성 펩티드가 전달된다. 상기 전달되어야 할 특정량의 조성물은 달성되어야 할 효과, 조성물이 전달되는 생물체의 유형, 전달 경로, 투여 방법, 그리고 생물체의 나이, 건강 및 성을 포함하여 많은 요소들에 달려있다. 이와 같이, 주어진 제제에 혼입된 조성물의 투여량은 당업자의 재량에 맡겨진다.

[0134] 당업자는 본원에 개시된 조성물이 치료, 진단 또는 예방 효과 (예방 접종 포함)를 포함하는, 바람직한 생물학적 결과를 얻기 위한 약제로서 투여될 때, 미니세포 조성물에 특정의 적합한 약제학적 담체를 더 포함할 수 있다. 약제학적 담체의 선택 및 치료제 또는 보호제로서의 미니세포의 제조는 의도된 용도 및 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 적절한 제형 및 치료제의 투여 방법은 경구, 폐, 비강, 구강(buccal), 안구, 진피, 직장, 정맥(intravenous), 방광(intravesical), 척수강(intrathecal), 두개(intracranial), 종양(intratatumoral), 늑막(pleural) 또는 질(vaginal) 전달 용으로 제한된다.

[0135] 사용된 전달 방법에 따라, 콘텍스트(context) 의존적인 기능적 개체(entity)는 다양한 약학적으로 허용가능한 형태로 전달될 수 있다..예를 들어, 콘텍스트 의존적인 기능적 개체는 알약, 캡슐, 정제, 좌약, 에어로졸, 물방울, 혹은 스프레이에 혼입된 고체, 서스펜션, 용액, 에멀전, 분산액, 등의 형태로 전달될 수 있다. 알약, 정제, 좌약, 에어로졸, 분말, 물방울 및 스프레이는 복잡하고 다층 구조 구조 및 커다란 크기를 가질 수 있다. 에어로졸, 분말, 물방울, 스프레이의 평균사이즈는 작은(서브마이크론) 크기부터 큰( $\geq 200$  micron) 크기의 범위일 수

있다.

[0136] 명세서에 기재된 약학적 조성물은 고체, 동결건조된 분말, 용액, 에멀전, 분산, 미셀, 리포솜 등의 형태로 사용될 수 있고, 결과 조성물은 활성 성분으로 하나 이상의 본 발명의 화합물을 장 또는 비경구 적용에 적합한 유기 또는 무기 담체 또는 부형제와 함께 혼합물에 함유한다. 활성 성분은 보통 비-독성, 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 정제, 펠렛, 캡슐, 좌약, 용액, 에멀전, 현탁액, 및 사용하기에 적합한 기타 형태로 제조될 수 있다. 사용될 수 있는 담체는 글루코오스, 락토오스, 만노오스(mannose), 아카시아 검, 젤라틴, 만니톨, 트레할로스(trehalose), 전분 페이스트, 마그네슘 트리실리케이트(magnesium trisilicate), 탈크(talc), 옥수수 전분, 케라틴, 콜로이드 실리카(colloidal silica), 감자 전분, 우레아(urea), 중간 사슬 길이 트리글리세리드(medium chain length triglycerides), 텍스트란 및 고체, 반고체 또는 액체 형태의 제제의 제조에 사용하기 적합한 기타 담체를 포함한다. 이외에 보조제, 안정화제, 경화제, 착색제 및 향료가 사용될 수 있다. 안정화제의 예는 바람직하게는 0.1% 이상의 농도로 트레할로스(trehalose)를 포함한다 (미국특허 제 5,314,695호 참조). 활성 화합물은 질병의 경과 또는 상태에 원하는 효과를 생성하기에 충분한 양으로 약학 조성물에 포함된다.

## [0137] 6. 이온화 방사선 조사에 의한 박테리아 미니세포 조성물의 최종 멸균

[0138] 일단 치료용, 면역조절용 및/또는 면역원성 미니세포가 생성되고, 제형화되어, 바이알이나 주사기를 포함하는 그러나 여기에 한정되지 않는 약학적으로 허용가능한 용기에 충전되면, 상기 용기에 담겨 이온화 방사선 조사를 이용해 최종 멸균처리를 하게 된다. 이온화 방사선 조사의 예는 감마선 조사, 고주파수 전자기와 조사, E 빔(전자빔, 베타 조사) 조사, X 레이(포톤) 조사, UV조사등 수없이 많다. 본 명세서에서 개시된 방법과 조성물을 위해 바람직한 이온화 방사선 조사는 감마선 조사이다.

[0139] 본 명세서에 개시된 방법과 조성물에 사용하기 위해 적합한 이온화 방사선 조사의 선량은 달라질 수 있다. 일부 실시예에서는 이온화 방사선 조사의 선량은 부모 세포 및 우연한 미생물 바이오버든(들)을 허용 가능한 멸균 표준으로 감소시키는 데 필요한 이온화 조사량을 경험적으로 결정할 수 있다. 수많은 방사선 조사선량의 예시 범위는 5kGy 내지 40kGy 사이이며, 예를 들어, 조사는 약 5kGy, 8kGy, 10kGy, 11kGy, 12kGy, 13kGy, 14kGy, 15kGy, 16kGy, 17kGy, 18kGy, 19kGy, 20kGy, 21kGy, 22kGy, 23kGy, 24kGy, 25kGy, 28kGy, 30kGy, 35kGy, 40kGy, 또는 이 값들 사이의 범위일 수 있다. 일부 구체예에서, 조사 선량은 약 5 kGy 내지 약 30 kGy, 또는 약 10 kGy 내지 약 25 kGy이다. 일부 구체예에서, 방사선 조사선량은 25 kGy이다. 멸균을 위해 방사선 조사를 받는 데 적합한 미니세포를 포함하는 조성물은 액체상태의 현탁액, 냉동 현탁액, 냉동 동결 건조된 케이크 형태를 포함하며 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 미니세포를 포함하는 조성물을 위한 방사선 조사에 의한 멸균 제형에는 냉동 현탁액 또는 동결건조 형태이다. 일부 구체예에서, 이온화 조사에 의한 미니세포를 포함하는 조성물의 최종 멸균은 25kGy의 선량으로 이온화 감마 조사를 통해 최종적으로 멸균하는 단계를 포함한다.

[0140] USP 38 NF 33 USP 버전 하에서 <71>의 기준으로 설명된 바와 같이 미니세포 기반 바이오 제품의 멸균은 예를 들어 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 요약하자면, USP <71>에 따른 멸균은 14 일 동안 32.5 °C ±2.5 °C에서 배양한 액체 티오글리콜레이트 배지(Fluid Thioglycollate Medium, 검증된 공정으로 멸균 처리한 배지)에서 성장(탁도가 음성 대조군과 비교하여)이 없어야 하는 길로 정의한다. USP <71>에 따르면, 만약 상기 미니세포 바이오 제품이 1 mL 혹은 그 이하의 액상으로 제형화되는 경우, 전체 바이알은 무균 실험을 위해 성장 배지를 접종하는데 사용된다. 1 mL 보다 크나 40 mL 미만의 경우, 용기의 절반 이상 그러나 1mL 이상을 무균 시험 배지 접종에 사용해야 한다. 40 mL 초과 100 mL 미만인 경우 20 mL를 사용해야 한다. 100 mL를 초과하는 경우 용기 내용물의 10 % 이상, 20 mL 이상을 사용해야 한다. 동결 건조를 포함하여 고체로 제형화된 경우, 50 mg 미만이면 전체 용기 내용물을 사용해야 한다. 50mg 이상 300mg 미만인 경우에는 질량의 절반, 그러나 50mg 이상을 사용해야 한다. 300mg 이상 5g 미만이면 150mg을 사용한다. 5g보다 크면 500mg을 사용한다. USP <71> 하에서 주어진 생산 로트(Lot)에서 시험할 용기의 수는 100 개 미만의 용기, 10 % 또는 4 개의 용기 중 가장 큰 것이다. 용기가 100 개 이상 500 개 미만인 경우, 10 개의 용기가 사용되어야 한다. 500 개 이상의 용기, 2 % 또는 20 개의 용기 중 적은 쪽. 안과 및 기타 비 주사제의 생약 제품의 경우, 용기가 200 개 이하인 경우 5 % 또는 2 개의 용기 중 큰 것. 200 개 이상의 용기인 경우에는 10 개의 용기가 테스트 되어야 한다.

## [0141] 7. 치료 적용대상 및 투여 경로

[0142] 본 명세서는 암(들), 감염 질병(들), 유전적 장애(들), 자가면역조건(들) 및 기타 질병들에 대해 효과적으로 설계한 미니세포 기반의 생약제제에 관한 것이다.

- [0143] 암은 고형 종양, 전이성 종양 및 액체 종양을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 고형 종양 및 전이성 종양에는 상피 세포, 섬유 아세포 세포, 근육 및 뼈 기원이 포함되며 유방, 폐, 췌장, 전립선, 고환, 난소, 위, 장, 입, 혀, 인두, 간, 항문, 직장, 담낭, 식도, 방광, 담즙 방광, 피부, 자궁, 질, 음경 및 신장 암을 포함하나 여기에 한정되지는 않는다. 본원에 개시된 미니세포로 치료 될 수 있는 기타 고형 종양 유형은 선암, 육종, 섬유 육종 및 눈, 뇌 및 골 암을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본원에 개시된 미니세포에 의해 치료 될 수 있는 액체 종양은 비-호지킨(non-Hodgkin) 림프종, 골수종, 호지킨 림프종, 급성 림프구 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 기타 백혈병을 포함 하나 이에 한정되지 않는다.
- [0144] 감염 질병(들)은 면역원성(Immunogenic) 미니세포 혹은 표적 치료 미니세포 백신 조성을 사용하여 상기 백신이 예방하고자 하는 상기 감염원에 재차 노출되기 전 대상을 면역화시켜 예방적으로 치료할 수 있다. 다른 방법으로는 예방 백신을 상기 백신이 예방하려고 하는 감염원에 의해 유발된 질병을 현재 앓고있는 대상에게 투여할 수 있다. 감염 질병에는 박테리아, 바이러스, 곰팡이 및 기생충이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0145] 면역원성 미니세포 혹은 표적 치료 미니세포 백신이 예방하고자 하는 박테리아 병원체에는 대장균 속(*Escherichia spp.*), 살모넬라 속(*Salmonella spp.*), 시겔라 속(*Shigella spp.*), 비브리오 속(*Vibrio spp.*), 나이세리아 속(*Neisseria spp.*), 캄필로박터 속(*Campylobacter spp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas spp.*), 예르시니아 속(*Yersinia spp.*), 클라미디아 속(*Chlamydomonas spp.*), 아시네토박터 속(*Acinetobacter spp.*), 리스테리아 속(*Listeria spp.*), 바실러스 속(*Bacillus spp.*), 헤모필루스 속(*Haemophilus spp.*), 클로스트리듐 속(*Clostridium spp.*), 프란시셀라 속(*Francisella spp.*), 리케차 속(*Rickettsia spp.*) 등을 포함하나 여기에 제한되지 않는다. 이러한 병원균에 대한 면역원성 미니세포 혹은 표적 치료 백신 미니세포는 미니세포-생산 병원체 균주로부터 유도된 미니세포 혹은 비-병원체 균주 그러나 병원 균주에서 유래되는 이중 항원을 발현 혹은 생산하도록 재조합 설계된 비-병원체 균주로부터 생산된 미니세포로부터 생성될 수 있다.
- [0146] 면역원성 미니세포 혹은 표적 치료 미니세포 백신이 예방하고자 하는 바이러스 병원체에는 인플루엔자(influenza), 파라인플루엔자(parainfluenza), 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus), 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus), 호흡 증후군 바이러스(Respiratory Syncytial virus), 수두 대상 포진(Varicella zoster), 인간 유두종 바이러스(humanpapilloma virus), A 형 간염 바이러스(hepatitis A virus), B 형 간염 바이러스(hepatitis B virus), C 형 간염 바이러스(hepatitis C virus), 뎅기열 바이러스(dengue fever virus), 황열병 바이러스(yellow fever virus), 웨스트 나일 바이러스(west nile virus), 메르스(MERS) 바이러스, 사스(SARS) 바이러스, 코싸시(coxsackie)바이러스, 단순 포진 바이러스(herpes simplex virus), 사이토 메갈로 바이러스(cytomegalovirus), 광견병 바이러스등을 포함하나 여기에 제한되는 것은 아니다.
- [0147] 면역원성 미니세포 혹은 표적 치료 미니세포 백신이 예방하고자 하는 곰팡이 병원체에는 칸디다 속(*Candida spp.*), 아스페르길루스 속(*Aspergillus spp.*), 크립토코커스 속(*Cryptococcus spp.*), 히스토플라스마 속(*Histoplasma spp.*), 뉴모시스티스 속(*Pneumocystis spp.*), 스타키보트리스 속(*Stachybotrys spp.*), 등을 포함하나 여기에 제한되는 것은 아니다.
- [0148] 면역원성 미니세포 혹은 표적 치료 미니세포 백신이 예방하고자 하는 기생충 병원체에는 가시아메바속(*Acanthamoeba*), 회충(*Ascaris lumbricoides*), 대장섬모충(*Balantidium coli*), 코클리옴이아 호미니보락스(*Cochliomyia hominivorax*), 적리아메바(*Entamoeba histolytica*), 간질(*Fasciola hepatica*), 람블편모충(*Giardia lamblia*), 레이시마니아(*Leishmania*), 로아사상충(*Loa loa*), 열대열원충(*Plasmodium falciparum*), 주혈흡충속(*Schistosoma*), 분선충(*Strongyloides stercoralis*), 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*), 파동편모충속(*Trypanosoma*), 사상충(*Wuchereriabancrofti*) 등을 포함하나 여기에 제한되는 것은 아니다.
- [0149] 이온화 방사선 조사로 종국적으로 멸균시켜 질병유형과 위에서 언급된 감염성 병원체를 치료하거나 예방하기 위한 미니세포기반의 생물체제는 대상체에 비경구적 혹은 국소적으로 투여될 수 있다. 비경구적 투여 경로는 주사를 필요로 하며, 정맥내, 유리체강내, 척수강 내, 복강내, 종양내, 근육내 및 피하 투여 경로를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 국소 투여 경로로는 방광 내, 직장 내, 질, 점막, 청각, 구강, 비강, 폐, 복강 내 (흉막 카테터를 통한) 및 진피 투여 경로가 포함 되나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0150] **8. 미니세포 기반의 약제조성물**
- [0151] 본 발명의 몇몇 실시예는 장내세균 박테리아 과(family)로부터, 그러나 이것에 제한되지는 않는, 최적화된 균주를 만들고 표적 치료용, 면역조절용, 면역원성 미니세포를 준비하고, 상기 미니세포에서 약학 조성물을 제형화하여, 멸균된 바이알이나 주사기에 채워 넣고 밀봉하고 종국적으로 이온화 방사선에 노출시켜 미니세포 기반

의 약학 조성물을 멸균시키는 것에 관한 것이다.

- [0152] 또한 복수개의 박테리아 미니세포를 포함하는 약학 조성물에 대해 개시되어 있으며, 상기 박테리아 미니세포 및 /또는 상기 약학조성물은 이온화 감마선에 노출되어진다. 예컨대, 상기 약학조성물은 하나 혹은 그 이상의 제약상 허용되는 부형제 또는 제약상 허용되는 희석제를 포함 할 수 있다. 예컨대 상기 제약상 허용되는 부형제는 트레할로스(예를 들어 희석제 중의 트레할로스)일 수 있다. 예컨대 제약상 허용되는 희석제는 멸균된 물(예를 들어 주사용 멸균된 물) 일 수 있다. 몇몇 실시예에서는 약학 조성물 및 / 또는 그 안에 포함된 다수의 박테리아 세포는 최종적으로 멸균되었다. 몇몇의 실시예에서는 약학 조성물은 멸균상태이다. 예를들어 약학 조성물은 USP 38 NF 33 버전에 USP 71 표준에 부합하는 수준으로 생존 가능한 미생물 오염물을 포함 할 수 있다. 이온화 조사 (예를 들어, 감마선 조사)에 노출된 약학 조성물 중의 생존 가능한 미생물 오염물의 수준은 예컨대 mL당  $1 \times 10^8$  콜로니 형성 단위(CFU) 보다 작을 수 있고 예컨대 mL당  $1 \times 10^8$  콜로니 형성 단위(CFU) 보다 작을 수 있고, mL당  $1 \times 10^7$  CFU 보다 작을 수 있고, mL당  $1 \times 10^6$  CFU 보다 작을 수 있거나, mL당  $1 \times 10^6$  CFU 보다 작을 수 있거나, mL당  $1 \times 10^5$  CFU 보다 작을 수 있거나, mL당  $1 \times 10^4$  CFU 보다 작을 수 있거나, mL당  $1 \times 10^3$  CFU 보다 작을 수 있거나, mL당  $1 \times 10^2$  CFU 보다 작을 수 있거나, mL당 10 CFU 보다 작을 수 있거나, 또는 mL당 1 CFU 보다 작을 수 있다. 일부 실시예에서는, 이온화 조사 (예를 들어, 감마선 조사)에 노출된 약학 조성물 중의 생존 가능한 미생물 오염물의 수준은 mL당 약  $1 \times 10^8$  CFU, mL당 약  $5 \times 10^7$  CFU, mL당 약  $1 \times 10^7$  CFU, mL당 약  $5 \times 10^6$  CFU, mL당 약  $1 \times 10^6$  CFU, mL당 약  $5 \times 10^5$  CFU, mL당 약  $1 \times 10^5$  CFU, mL당 약  $5 \times 10^4$  CFU, mL당 약  $1 \times 10^4$  CFU, mL당 약  $5 \times 10^3$  CFU, mL당 약  $1 \times 10^3$  CFU, mL당 약  $5 \times 10^2$  CFU, mL당 약  $1 \times 10^2$  CFU, mL당 약 50 CFU, mL당 약 10 CFU, mL당 약 5 CFU, mL당 약 1 CFU 이거나 해당 숫자들 중 임의의 2개 사이의 값일 수 있다.
- [0153] 이온화 방사선 조사에 노출된 후 상기 약학 조성물에서 생존 가능한 미생물 오염물의 오염 수준은, 예컨대,  $10^2$  미니세포중 1미만,  $10^3$  미니세포중 1미만,  $10^4$  미니세포중 1미만,  $10^5$  미니세포중 1미만,  $10^6$  미니세포중 1미만,  $10^7$  미니세포중 1미만,  $10^8$  미니세포중 1미만,  $10^9$  미니세포중 1미만,  $10^{10}$  미니세포중 1미만,  $10^{11}$  미니세포중 1미만,  $10^{12}$  미니세포중 1미만,  $10^{13}$  미니세포중 1미만,  $10^{14}$  미니세포중 1미만,  $10^{15}$  미니세포중 1미만,  $10^{16}$  미니세포중 1미만일 수 있다.
- [0154] 상기 약학 조성물에 포함된 상기 미니세포의 종류,, 유전자형, 표현형은 다를 수 있다. 일부 실시예에서는 상기 박테리아 미니세포는 그 표면에 인바신 또는 이의 기능적 등가물을 발현 및 / 또는 표시한다. 예컨대, 상기 인바신은 예르시니아 슈도튜베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*)의 인바신일 수 있으나, 여기에 한정되지 않는다. 박테리아 미니세포는, 예를 들어, 페르프린고리신 0 (perfringolysin 0, PFO)를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 미니세포는, 예를 들어, 박테리아 미니세포는 그 표면에 인바신 또는 이의 기능적 등가물을 발현 및 / 또는 표시하며, PFO를 포함한다.
- [0155] 일부 구체예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^5$  미니세포 보다 작다.
- [0156] 일부 구체예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^6$  미니세포 보다 작다.
- [0157] 일부 구체예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^7$  미니세포 보다 작다.
- [0158] 일부 구체예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^8$  미니세포 보다 작다.
- [0159] 일부 구체예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^9$  미니세포 보다 작다.
- [0160] 일부 구체예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포



오염의 수준은  $10^{10}$  미니세포 보다 작다.

[0161] 바람직한 실시예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^{11}$  미니세포 보다 작다.

[0162] 일부 구현예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^{12}$  미니세포 보다 작다.

[0163] 일부 구현예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^{13}$  미니세포 보다 작다.

[0164] 일부 구현예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^{14}$  미니세포 보다 작다.

[0165] 일부 구현예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^{15}$  미니세포 보다 작다.

[0166] 일부 구현예에서, 이온화 방사선에 노출 된 후 약학 조성물에서 생존할 수 있는 미니세포를 생산하는 모세포 오염의 수준은  $10^{15}$  미니세포 보다 작다.

[0167] 이온화 방사선 조사에 노출 된 후, 상기 미니세포를 포함하는 상기 약학 조성물 (예컨대 미니세포 기반의 약학 제조품)은 액체 티오글리콜레이트 배지(in Liquid Thioglycollate Medium)에서 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 또는 상기 값들 중 임의의 두값 사이의 범위, 예컨대,  $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 에서, 이후 혹은 대략 그 이후에는 성장이 없다. 예를 들어 바람직한 구체예 중 하나에서, 이온화 조사에 노출 된 후, 미니세포 기반 생물 약제 제품은  $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 에서 14 일 후에 액체 티오글리콜레이트 배지에서 성장이 없어서 USP 38 NF 33의 USP <71> 표준의 정의에 따라 멸균이다.

#### [0168] 실시예

[0169] 상기 논의된 몇몇 구체적인 예에 대해 이하 상세히 개시되어 있으나, 이를 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하려고 하는 것은 아니다.

#### [0170] 실시예 1.

[0171] 5, 15 및 25kGy의 선량으로 이온화 감마선에 노출된 냉동 현탁액에서 VAX-IP (VAX014) 미니세포 특성 변화 없음

[0172] 본 실시예는 5, 15 그리고 25 kGy 선량으로 냉동 현탁액을 이온화 감마선에 노출시켜 조사한 후 VAX-IP (VAX014) 미니세포 특성에 변화가 없음을 나타낸다. VAX014 미니세포 (인바신 (invasin) 과 페르프린고리신 0 (perfringolysin 0, PFG)를 모두 포함)는 부모 균주 VAX20B9, 즉, L-람노스(L-rhamnose) 유도 박테리아 발현 플라스미드인 pVX-336 (pRHA<sub>BAD</sub> 프로모터의 제어하에 인바신 (invasin) 과 페르프린고리신 0 (perfringolysin 0, PFG)사이의 전사 융합(transcriptional fusion)을 갖음) 유전자를 갖는 미니세포 생산균주인 제조합 대장균 K-12로부터 만들어진다. 리서치 세포 은행의 VAX20B9 한 바이알 (vial)을 상온에서 해동시키고 카나마이신 (kanamycin,  $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), 디아미노피멜산 (diaminopimelic acid,  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), 라이신 (lysine,  $55 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) 및 0.2 % D- 포도당을 포함하는 소이톤(Soytone) 기반 MSB-NaCl 배지에서 1 L의 초기 배양(starter culture)에 접종하기 위해 전체 바이알 내용물을 사용했다. 초기 배양은  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 18 시간 동안 이루어진 후, 다음 날에는 D- 포도당이 없는 14 L의 동일한 미디어(media)에 접종하기 위해 200 mL를 사용하였다. OD<sub>600</sub>이 0.1에 도달 할 때까지 성장을 모니터링하였고, 이때 L- 람노스를 첨가하여 pVX-336으로부터의 인바신 및 페르프린고리신 0의 발현을 유도 하였다. OD<sub>600</sub>이 1.0에 도달 할 때까지 성장을 모니터링하였고, IPTG를 최종 농도  $20 \mu\text{M}$ 를 미니세포 -생산 표현형을 유도하기 위해 첨가하여 하룻밤 동안 배양하였다. 이렇게 배양된 것을 2번의 순차적 수크로스 선밀도 구배(sequential linear density sucrogradients)를 사용하여 추가 정제하기 전에 앞서서, 분별 원심 분리법 (2,000xg에서 15 분)에 의해 분리 후 및 형류여과법(TFF)에 의해 미니세포가 풍부한 상등액을 농축시켰다. 최종 미니 세포 분획을 형류여과법(TFF)으로 농축 한 다음, 고속 원심 분리 (11,000xg에서 20 분)하여 펠렛화하고 최종 VAX014 미니세포 펠렛(pellet)을 12 % 멸균 D- 트레할로스가 추가된 의약품 등급을 갖는 물



에서 벌크 약물 물질을 만들기 위해 1 밀리리터 당  $3.33 \times 10^{10}$  개의 VAX014 미니세포의 농도로 재현탁시켰다. 일단 목표 농도가 되면, 디아미노피멜산 ( $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ )과 라이신 ( $55 \mu\text{g} / \text{mL}$ )이 함유된 소이톤 기반의 MSB-NaCl 고체 한천 배지에 벌크 약물 물질  $100 \mu\text{L}$ 를 도말하고  $30^\circ\text{C}$ 에서 밤새 배양하여 감마선 조사에 의한 멸균 전의 오염된 VAX20B9 모세포 및 추가로 우발적인 세균의 수를 세었다. 이후 벌크 VAX014 약물 물질을 반자동화된 수동식 채움 방법으로 5mL 투명 세럼(serum) 바이알에 넣고 (바이알 당  $3\text{mL} - 1 \times 10^{11}$  VAX014 미니세포) 각각의 바이알을 스톱퍼로 막고 밀폐처리를 하였다. 이어서 각각의 나누어진 VAX014 약제를 3개의 조사 선량 (5, 15 또는 25 kGy, 각 선량 수준에서 총 25 개 바이알에 조사) 중 하나에 노출시켰다. 방사선 조사 후 7 일째에, 임의로 선택된 3 개의 바이알을 상온에서 해동시키고, 농도 균일성, 외양, 용기 밀폐 완전성, 육안 검사, pH 시험, 세균의 응집 및 입자상 물질의 존재를 현미경으로 평가, 인바신에 대한 단일 클론 항체를 사용하여 FACS를 통해 VAX014 미니세포 표면의 인바신의 양의 결정, 구연산 면양 전혈에 대한 Perfringolysin O의 용혈 활성도, HTB-9 인간 구상피암 세포에 대한 VAX014의 세포 살상 능력, 방사선이 조사되지 않은 바이오버든(bioburden) 감소의 척도로 최종 생존 가능한 세균수 계산을 포함하는 특성화 시험을 사용하여 VAX014 약물 제품을 분석하였다.

[0173] 실험 결과는 표 2에 요약되어 있다. 표 2에 나타난 바와 같이, 비조사된 물질과 비교하여, 5kGy, 15kGy 및 5kGy의 이온화 감마선 조사에 노출된 냉동 현탁액 형태의 VAX014 미니세포에 대해 제품 무결성, 안정성, 특성 및 효능의 변화는 관찰되지 않았다. 바이오버든은 각 선량 수준에서 0으로 감소하였다.

표 2

[0174] 감마선 조사 전후의 미니세포를 포함하는 조성물의 특성

제형 : 멸균 D- 트레할로스 12 %의 냉동 현탁액 3mL의 VAX014 ( $1 \times 10^{11}$ )				
특성	방사선량			
	0	5kGy	15kGy	25kGy
유리색(VI)	투명	갈색	약한 진한 갈색	매우 진한 갈색
스톱퍼 무결 유무(VI)	Y	Y	Y	Y
밀폐 유지 여부 (VI)	Y	Y	Y	Y
DS 모양 변경 (VI)	N	N	N	N
침전물 (MI)	N	N	N	N
응집 (MI)	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
OD <sub>600</sub>	1.86	2.06	1.99	2.02
인바신에 대한 FACS (% positive)	83.6	86.9	88.9	89.4
PFO 용혈 활성도 (PFO ng/ $10^8$ mcs)	34.6	32.6	36.1	40.6
효능 (세포 살상 - 즉각적) (VAX-IP::HTB-9 비율 @ IC50)	41.31	46.16	47.21	49.27
효능 (세포 살상 - 시험 전 실온에서 4 시간) (VAX-IP::HTB-9 비율 @ IC50)	42.3	48.3	43.0	47.9
CFU (VAX20B9) (CFU/ $10^{10}$ mcs)	5098	0	0	0
pH	5.54	5.20	5.53	5.45

VI = 육안 검사, MI = 현미경 검사

[0175] 실시예 2.

[0176] 5, 15 및 25kGy의 선량으로 이온화 감마선에 노출된 냉동 동결 건조된 VAX-IP (VAX014) 미니세포 특성 변화 없음

[0177] 본 실시 예는 냉동 동결 형태로 5, 15 그리고 25 kGy 선량으로 이온화 감마선에 노출시켜 조사한 후 VAX-IP (VAX014) 미니세포 특성에 변화가 없음을 나타낸다.

[0178] VAX014 미니세포 (인바신 (invasin) 과 페르프린고리신 0 (perfringolysin 0, PFG)를 모두 포함)는 부모 균주

VAX20B9, 즉, L-람노스(L-rhamnose) 유도 박테리아 발현 플라스미드인 pVX-336 (pRHA<sub>BAD</sub> 프로모터의 제어하에 인바신 (invasin) 과 페르프린고리신 O (perfringolysin O, PFG)사이의 전사 융합(transcriptional fusion)을 갖음) 유전자를 갖는 미니세포 생산균주인 재조합 대장균 K-12로 부터 만들어진다. 리서치 세포 은행의 VAX20B9 한 바이알 (vial)을 상온에서 해동시키고 카나마이신 (kanamycin, 50  $\mu\text{g}$  / mL), 디아미노피멜산 (diaminopimelic acid, 100  $\mu\text{g}$  / mL), 라이신 (lysine, 55  $\mu\text{g}$  / mL) 및 0.2 % D- 포도당을 포함하는 소이톤 (Soytone) 기반 MSB-NaCl 배지에서 1 L의 초기 배양(starter culture)에 접종하기 위해 전체 바이알 내용물을 사용했다. 초기 배양은 30 °C에서 18 시간 동안 이루어진 후, 다음 날에는 D- 포도당이 없는 14 L의 동일한 미디어(media)에 접종하기 위해 200 mL를 사용하였다. OD<sub>600</sub>이 0.1에 도달 할 때까지 성장을 모니터하였고, 이때 L- 람노스를 첨가하여 pVX-336으로부터의 인바신 및 페르프린고리신 O의 발현을 유도 하였다. OD<sub>600</sub>이 1.0에 도달 할 때까지 성장을 모니터하였고, IPTG를 최종 농도 20  $\mu\text{M}$ 를 미니세포 -생산 표현형을 유도하기 위해 첨가하여 하룻밤 동안 배양하였다. 이렇게 배양된 것을 2번의 순차적 슈크로스 선밀도 구배(sequential linear density sucrosegradients)를 사용하여 추가 정제하기 전에 앞서서, 분별 원심 분리법 (2,000xg에서 15 분)에 의해 분리 후 및 형류여과법(TFF)에 의해 미니세포가 풍부한 상등액을 농축시켰다. 최종 미니 세포 분획을 형류여과법(TFF)으로 농축 한 다음, 고속 원심 분리 (11,000xg에서 20 분)하여 펠렛화하고 최종 VAX014 미니세포 펠렛(pellet)을 12 % 멸균 D- 트레할로스가 추가된 의약품 등급을 갖는 물에서 벌크 약물 물질을 만들기 위해 1 밀리리터 당  $3.33 \times 10^{10}$  개의 VAX014 미니세포의 농도로 재현탁시켰다. 일단 목표 농도가 되면, 디아미노피멜산 (100  $\mu\text{g}$  / mL)과 라이신 (55  $\mu\text{g}$  / mL)이 함유 된 소이톤 기반의 MSB-NaCl 고체 한천 배지에 벌크 약물 물질 100  $\mu\text{L}$ 를 도말하고 30 °C 에서 밤새 배양하여 감마선 조사에 의한 멸균 전의 오염 된 VAX20B9 모세포 및 추가로 우발적인 세균의 수를 세었다. 이후 벌크 VAX014 약물 물질을 반자동화된 수동식 채움 방법으로 5mL 투명 세럼(serum) 바이알에 넣고 (바이알 당 3mL -  $1 \times 10^{11}$  VAX014 미니세포) 각각의 바이알을 노바퓨어(Nova Pure)사의 동결 건조용으로 사용가능한 스토퍼로 막았다. 이어서 바이알 내용물을 동결 건조시킨 후 봉인하였다. 각각의 동결 건조된 바이알에 담긴 VAX014 약제를 3개의 조사 선량 (5, 15 또는 25 kGy, 각 선량 수준에서 총 25 개 바이알에 조사) 중 하나에 노출시켰다. 방사선 조사 후 7 일째에, 임의로 선택된 3 개의 바이알을 상온에서 해동시키고, 농도 균일성, 외양, 용기 밀폐 완전성, 육안 검사, pH 시험, 세균의 응집 및 입자상 물질의 존재를 현미경으로 평가, 인바신에 대한 단일 클론 항체를 사용하여 FACS를 통해 VAX014 미니세포 표면의 인바신의 양의 결정, 구연산 면양 전혈에 대한 Perfringolysin O의 용혈 활성도, HTB-9 인간 구상피암 세포에 대한 VAX014의 세포 살상 능력, 방사선이 조사되지 않은 바이오버든(bioburden) 감소의 척도로 최종 생존 가능한 세균수 계산을 포함하는 특성화 시험을 사용하여 VAX014 약물 제품을 분석하였다. 제품 무결성, 안정성, 특성 및 효능에 어떠한 변화도 관찰되지 않은 반면, 바이오버든은 각 선량 수준에서 0으로 감소하였다.

[0179]

실험 결과는 표 3에 요약되어 있다. 표 3에 나타난 바와 같이, 비조사된 물질과 비교하여, 5kGy, 15kGy 및 5kGy의 이온화 감마선 조사에 노출된 동결건조 형태의 VAX014 미니세포에 특성 및 특징의 변화는 없었다.

### 표 3

[0180]

감마선 조사 전후의 미니세포를 포함하는 조성물의 특성

제형 : 멸균 D- 트레할로스 12 %의 내용 동결건조된 3 mL의 VAX014 ( $1 \times 10^{11}$ )				
특성	방사선량			
	0	5kGy	15kGy	25kGy
유리색(VI)	Clear	Brown	Slightly Darker Brown	Much Darker Brown
스토퍼 무결 유무(VI)	Y	Y	Y	Y
밀폐 유지 여부 (VI)	Y	Y	Y	Y
DS 모양 변경 (VI)	N	N	N	N
침전물 (MI)	N	N	N	N
응집 (MI)	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
OD <sub>600</sub>	1.60	1.62	1.73	1.71
인바신에 대한 FACS (% positive)	86.7	83.6	89.5	88.9
PFO 용혈 활성도 (PFO ng/10 mcs)	34.9	29.4	28.8	37.9

효능 (세포 살상 - 즉각적) (VAX-IP::HTB-9 비율 @ IC50)	50.87	56.55	49.7	51.56
효능 (세포 살상 - 시험 전 실온에서 4 시간) (VAX-IP::HTB-9 비율@ IC50)	51.9	54.4	41.4	47.2
CFU (VAX20B9) (CFU/10 <sup>10</sup> mcs)	250	0	0	0
pH	5.52	5.05	4.94	5.77
VI = 육안 검사, MI = 현미경 검사				

### [0181] 실시예 3.

[0182] 감마선 조사에 노출 후 미니세포 함유 조성물에 대한 연구

[0183] 이온화 감마선의 수준을 증가시키는 것을 수행하고 있다는 것을 보장하고, 보여주기 위해 투명한 바이알을 선택하였다. . 미니 세포를 포함한 바이알은 5 kGy, 15 kGy 또는 25 kGy의 감마 조사에 노출되었으며 비조사 대조군 (즉, 0 kGy) 과 비교하였다. 도. 2A-B는 바이알 레벨에서 행해진, 감마선 조사후의 초기 육안검사의 결과를 보여준다. 바이알은 조사 선량 수준이 증가함에 따라 어두워 졌지만 제품의 시각적 손실은 없었다 (부피 및 약물 성분 포함). 도. 2A는 밀봉된 바이알을 나타내며, 도.2B는 밀봉을 제거한 후 스토퍼가 육안 검사시 손상이 없음을 보여준다. 밀봉 및 스토퍼에 있어서 어떠한 거시적 이상은 관찰되지 않았다.

[0184] 도 3은 상기 비조사 대조군과 비교하여 바이알로부터 제거시 조사된 VAX014 약물 제품의 2차 육안 검사에서 외관상 (색깔, 농도(consistency), 그리고 불투명을 포함)의 변화가 없다는 것을 보여준다. 동결 건조된 형태는 육안 검사 전에 주사용 멸균수 3 mL에서 재용해하였다.

[0185] 감마선에 노출 된 후 미니세포 함유 조성물 용혈성 활동도를 조사하였다. 도 4에서 보듯이, VAX014 미니세포 용해물의 페르프린고리신 0 (perfringolysin 0, PFG) 단백질 독소의 구조-기능은 비조사 대조군과 비교해서 테스트한 모든 수준 (5kGy, 10kGy 및 25kGy 포함)에서 감마선 조사의 영향을 받지 않았다. 이 연구에서는 조사 및 비조사 미니세포를 EDTA 및 리소자임(lysozyme)으로 처리 한 다음 삼투압 쇼크(shock)로 전체 미니세포 용해물을 생성시켰으며 분 해물을 생성 시켰으며, 그 각각을 일정량의 면양 적혈구를 이용하여 37 °C에서 1 시간 동안 흔들어 주면서 적정하였다. 1시간의 공배양 후, 적혈구 (RBC)를 펠렛화하고 상등액(supernatants)을 제거하고 용혈 활성도를 측정하여 헤모글로빈 방출량을 평가하였다. 재조합 PFO를 사용한 표준 곡선을 병행 하여 만들고, 1x10<sup>8</sup> VAX014 미니세포에서 페르프린고리신 0 (perfringolysin 0, PFG) 의 농도를 계산하는 데 사용했다. 따라서 VAX014 미니세포의 동결 현탁액 또는 동결 건조 형태에서는 감마선 조사량을 증가시킴에 따라 페르프린고리신 0 (단백질 독소) 활성도가 감소하지 않았다.

[0186] 또한, 감마선 조사(5kGy, 10kGy 혹은25kGy)후, 미니세포의 효능을 인간 방광암 세포인 HTB-9에 대한 세포 살상 능력 분석 방법을 이용하여 비조사 대조군과 비교 평가하였다. . 조사 및 비조사 VAX014 미니 세포가 들어 있는 바이알을 상온에서 해동시키고, 바로 고정 된 개수의 HTB-9 세포에 대해 적정하여 EC<sub>50</sub> 곡선을 구했다. (0 시간, 도. 5A). 또한 해동된 바이알은 HTB-9 세포를 첨가하기 전 4시간동안 상온에 놓아 두었고 해당 온도에서 해당 시간 동안 활성도의 손실은 없었다. (상온에서 4 시간, 도. 5B). 도. 5A-B에 도시된 바와 같이, 모든 EC<sub>50</sub> 값은 중첩되어, 감마선 조사량을 증가시킨 후 VAX014미니세포의 냉동 현탁액 또는 동결건조된 형태에서 어떠한 효능의 손실을 나타내지 않았다

[0187] 또한, 감마선 조사(5kGy, 10kGy 혹은25kGy)후, 미니세포의 약리활성에 대해 비조사 대조군과 비교하여 마우스의 정위 동점(murinesyngeneic orthotopic)의 MB49 방광암 모델을 활용한 체내 연구를 수행하였다. 이 실험에서, 100,000개의 MB49 세포를 50 μL DMEM 세포 배양 액에 넣어 직접 요도 카테터를 통해 마취된 암컷 C57BL/6 마우스(그룹당 n = 8)의 방광에 주입 하였다. 주입 전, 방광을 Bovie사의 전기 소작기에 부착 된 백금 가이드 와이어를 사용하여 2초간 5W의 단일 극 펄스(monopolar pulse)를 가하여 2개의 서로 다른 방광 내 접촉지점 (종양 부착 부위를 제공)을 소작했다. 종양 세포를 부착 시킨 후, 방광을 100 μL의 멸균 식염수로 한번 씻어 낸 다음, 식염수 (운반체 대조군) 또는 조사된 (25 kGy) 또는 비조사된 VAX014 미니 세포의 등수를 50 μL 용량으로 단일 용량 요법으로 투여하였다. 카테터는 총 1 시간의 치료 노출 시간 동안 잠근 다음 이후 제거하여 동물을 회복시켰다. 동물들은 70 일 동안 매주 2 회 모니터링하고 비교 생존 곡선을 약리학적 효능의 척도로 평가 하였다. 결과는 도. 9에 정리되어 있으며, 생체 내 VAX014 약리 활성에 있어서 어떠한 손실도

없음을 나타낸다.

- [0188] 상기 결과는 도 9에 도시된 카플란 - 마이어 생존 곡선(Kaplan-Meier survival curve)에 정리되어 있다. 도 9에 도시된 바와 같이, 사전 멸균 처리된 비조사 VAX014와 비교하여, 종양 보유 마우스의 정맥내 투여(intravesical administration.)후의 방광암 MB49 정위 동점의 마우스 모델에 대해 25kGy로 멸균 후에도 VAX014 항-종양 활성의 손실이 없었다.
- [0189] 또한, EGFR-1을 타겟으로 한 독소루비신(doxorubicin)을 탑재한 미니세포의 무결성, 안정성 및 활성도를 감마선의 수준 증가에 따른 미니세포의 반응을 평가 하였다. 유도성 미니세포 표현형을 가진 대장균(*Escherichia coli*) K-12 균주 (VAX8I3 균주) 에서 생성되는 미니세포는 OD<sub>600</sub>이 0.1에 도달 할 때까지 30 °C 에서 해당 균주를 디아미노피멜산 (diaminopimelic acid, 100 µg / mL), 라이신 (lysine , 55 µg / mL)을 포함하는 소이톤(Soytone) 기반 MSB-NaCl 배지에서 성장시켜 생성된다. 그 시점에서, IPTG를 첨가하여 미니 세포 생산 표현형을 유도하고 밤새 계속 배양시킨다. 미니세포는 2번의 순차적인 수크로스 선밀도 구배법(sequential linear density sucrose gradients)을 사용하여 얻었다. 정제후, 상온에서 400 µg/mL/1.0x10<sup>10</sup> 미니세포의 농도로 밤새 흔들면서 독소루비신과 공배양시켜 독소루비신을 갖는 미니세포(3x10<sup>12</sup>) 를 얻는다. 다음날, 재조합 단백질 A/G (피어(Pierce), 써모-피셔(Thermo-Fisher))를 이용하여 인간 EGFR-1에 특이적인 마우스 단일클론 항체 mAb528을 단백질 A 에 - 정제된 다클론 토끼 항-미니 세포 항체 시약(purified polyclonal rabbit anti-minicell antibody reagent) - 1 : 1의 몰비로 섞어 이중 특이적 항체를 만든다. 항체는 단백질 A/G를 첨가하기에 앞서 동일한 물 수로 섞었다. 단백질 A/G를 첨가 한 후, 이중 특이적 항체를 만들기 위해 반응 혼합물을 1시간동안 부드럽게 교반시키면서 상온에 놓아두었다. 독소루비신을 탑재한 미니세포는 펠렛팅(pelleting)으로 두번 세척 후 1X PBS 980 µL 에 재현탁(resuspension)하고 이중 특이적 항체 복합체 20 µL를 첨가하고 부드럽게 흔들면서 4 °C에서 1 시간 동안 공배양했다. 미니세포에 항체를 부착시킨 이후, 독소루비신이 탑재된 항체가 부착된 미니세포를 3.33x10<sup>10</sup>/mL 의 농도로 12 % D-트레할로스에 재현탁하였다. 일단 목표 농도에서 제형화한 후, EGFR-1을 타겟으로한 미니세포는 반자동화된 과정에 의해 5mL 앰버 세럼 바이알(amber serum vial)에 무균적으로 손으로 채워 넣고, 스톱퍼로 막고 밀봉된 후 냉동되었다. 독소루비신이 탑재된 EGFR-1 표적 미니 세포의 바이알을 동결 상태에서 25 kGy의 감마선으로 조사하고 비조사 대조군과 비교하여 분석하였다. anti-EGFR-1 항체의 존재와 독소루비신의 유지(retention)는 독소루비신의 천연 적색 형광 (대조군 셋업의 좌상단 사분면)과 mAb528 (대조군 셋업의 우하단 사분면)을 검출을 위한 알렉사-플루오(Alexa-Fluor) 388-접합(conjugate) 염소 다클론 항 마우스를 이용한 이중 색상 유동 세포 계측법(dualcolor flow cytometry)에 의해 확인 되었다. 이중 신호 (우상단 사분면)는 미니세포 표면에 독소루비신과 mAb528을 모두 포함하는 미니세포 로부터 나오는 신호(즉, 이중 양성)를 뜻한다. 대조군 세팅을 확립한 후, 25 kGy 의 감마선 조사 후 미니세포의 표면의 mAb528 보존 및 독소루비신의 유지를 이방법을 사용하여 분석 하였다. 또한, 독소루비신의 유지는 25 kGy 의 감마선 조사 전,후 형광현미경과 미니세포 펠렛의 거시 관찰을 통해 모니터링되었다. EGFR-1을 표적으로 한 독소루비신을 탑재한 미니 세포의 효능을 A549 인간 비소 세포 암종 세포(non-small cell carcinoma cells) (EGFR-1을 과발현)에 대한 적정에 의해 감마선 조사 전, 후에 평가하였다. 도. 7A-F에 도시된 바와 같이, 감마선 조사 수준 증가에 따른 반응에 있어서 EC<sub>50</sub> 곡선에 의해 결정된 효능의 차이는 관찰되지 않았다.
- [0190] 냉동 현탁액에 감마선 조사후 기능성 핵산 (플라스미드 DNA)을 포함하는 EGFR-1 을 표적으로한 미니세포의 안정성을 연구하였다. 플라스미드 무결성은 미니세포내 플라스미드 구조물에 대해 특이적인 프라이머를 이용한 PCR과 네이키드 플라스미드(naked plasmid) 대조군 (동등한 수의 미니 세포로부터 직접 정제된 플라스미드 대조군)과 비교하여 평가하였다. 도 7A-F와 관련하여 앞서 기술된 동일한 단백질 A/G 접근법을 사용하여, 항-EGFR-1 항체인 mAb528을 미니 세포의 표면에 부착시키고 동일한 유동 세포 계측법 및 보조적으로 Alexa Fluor 388 접합 염소 항 마우스 다클론 항체 시약을 사용하여 감마선 조사 후 미니세포 표면의 mAb528 존재에 대해 분석하였다. 도. 8 A-B에 도시된 바와 같이, 미니세포를 함유한 냉동 현탁액이 감마선 조사에 노출된 후에도 플라스미드 무결성 또는 안정성의 손실은 관찰되지 않았다.
- [0191] 적어도 전술한 실시예 중 일부에서, 하나의 실시예에서 사용한 하나 또는 그 이상의 구성요소들은, 그러한 교체한 기술적으로 가능하지 않은 것이 아닌 경우, 교환적으로 다른 실시예에서 사용될 수 있다. 해당 분야 통상의 기술자는 청구된 대상(subject matter)의 범위를 벗어나지 않고 상술 한 방법 및 구조에 대해 다양한 다른 생략, 추가 및 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 모든 수정 및 변경은 첨부된 청구 범위에 의해 정의된 본 대상의 범위 내에 속한다.

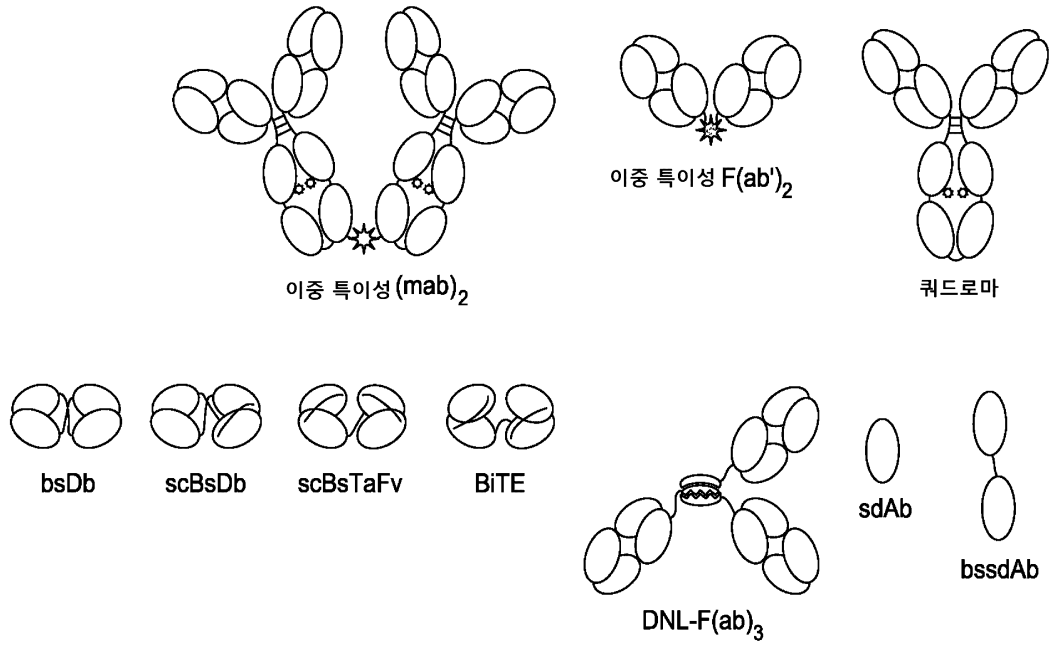


- [0192] 본원에서 실질적으로 임의의 다수 및 / 또는 단수 용어의 사용과 관련하여, 해당 분야 통상의 기술자는 문맥 및 / 또는 응용에 적절함에 따라, 복수에서 단수로 및 / 또는 단수에서 복수로 번역 할 수 있다. 다양한 단수 / 복수의 조합은 명료성을 위해 본원에서 명시적으로 설명 될 수 있다.
- [0193] 해당 분야 통상의 기술자인 경우, 전체적으로 여기에, 그리고 특히 첨부된 청구항(예컨대, 첨부된 청구항의 본문)에서 사용된 용어가 일반적으로 "개방형" 용어로서 의도된 것(예를 들면, "포함하는"이라는 용어는 "포함하되 제한되지는 않는"으로 해석되어야 하고, "가지는"이라는 용어는 "적어도 가지는"으로 해석되어야 하며, "포함한다"는 용어는 "포함하지만 제한되지는 않는다"로 해석되어야 하는 것 등)임을 이해할 것이다. 나아가 해당 분야 통상의 기술자는 만약 특정한 수의 도입된 청구항 기재사항이 의도된 것이라면 그러한 의도는 해당 청구항에서 명시적으로 기재되어 있을 것이며, 그와 같은 기재가 부재하는 경우에는 그러한 의도가 없다는 점을 이해할 것이다. 이해를 돕기 위한 예를 들면, 이하의 첨부된 청구항은 청구항 기재사항을 도입하기 위하여 "적어도 하나의" 및 "하나 이상의"이라는 도입 어구의 용법을 포함할 수 있다. 그러나, 동일한 청구항이 "하나 이상의"이나 "적어도 하나의"라는 도입 어구 및 "a"나 "an"과 같은 부정관사를 포함하는 경우에도, 그러한 어구의 용법은 부정관사 "a"나 "an"에 의한 청구항 기재사항의 도입이 그와 같이 도입된 청구항 기재사항을 포함하는 어떤 특정한 청구항이라도 그러한 단 하나의 기재사항만을 포함하는 실시형태로 제한한다는 의미로 해석되어서는 안 되며(예컨대, "a" 및/또는 "an"은 "적어도 하나의" 혹은 "하나 이상의"를 의미하는 것으로 해석되어야 함); 청구항 기재사항을 도입하기 위하여 사용된 정 관사의 용법에 대해서도 마찬가지로 적용된다. 또한, 특정한 수의 도입된 청구항 기재사항이 명시적으로 기재되어 있다고 하더라도, 해당 분야 통상의 기술자라면 그러한 기재가 적어도 그 기재된 수를 의미하는 것으로 해석되어야 함을 인지 할 것이다(예컨대, 다른 수식어가 없는 "2개의 기재사항"의 비수식 기재는 적어도 2개의 기재사항이나 2 이상의 기재사항을 의미함). 나아가, "A, B 및 C 중 적어도 하나 등"에 유사한 관례가 사용되는 경우에, 일반적으로 그와 같은 구조는 해당 분야 통상의 기술자라면 그러한 관례를 이해할 것이라는 의미에서 의도된 것이다(예컨대, "A, B 및 C 중 적어도 하나를 가지는 시스템"은 단독으로 A를, 단독으로 B를, 단독으로 C를, A와 B를 함께, A와 C를 함께, B와 C를 함께 및/또는 A, B와 C를 함께 가지는 시스템들을 포함할 것이지만 여기에 한정되지는 않는 것 등). "A, B 혹은 C 중 적어도 하나 등"에 유사한 관례가 사용되는 경우, 일반적으로 그와 같은 구조는 해당 분야 통상의 기술자라면 그러한 관례를 이해할 것이라는 의미에서 의도된 것이다(예컨대, "A, B 혹은 C 중 적어도 하나를 가지는 시스템"은 단독으로 A를, 단독으로 B를, 단독으로 C를, A와 B를 함께, A와 C를 함께, B와 C를 함께 및/또는 A, B와 C를 함께 가지는 시스템들을 포함할 것이지만 여기에 한정되지는 않는 것 등). 나아가 해당 분야 통상의 기술자라면, 사실상 설명, 청구항 혹은 도면 중 어디에든 2 이상의 선택적인 용어를 제시하는 모든 선언적인 단어 및/또는 어구가 그 용어들 중 하나, 그 용어들 중 어느 하나 혹은 그 용어들 양자를 포함할 가능성을 고려하도록 이해되어야 한다는 점을 이해할 것이다. 예컨대, "A 혹은 B"라는 어구는 "A" 혹은 "B" 혹은 "A 및 B"의 가능성들을 포함하도록 이해될 것이다.
- [0194] 또한, 본 명세서의 특징 또는 양태가 마쿠쉬 (Markush) 그룹의 용어로 기재되어 있는 경우, 해당 분야 통상의 기술자는 개시된 내용이 마쿠쉬 그룹의 모든 개별적인 멤버나 멤버들의 하위 그룹의 항목들로 기술된 것으로 인지할 것이다.
- [0195] 해당 분야 통상의 기술자에 의하여 이해되는 바와 같이, 서술된 설명을 제공하는 측면에서처럼 어떠한 그리고 모든 목적을 위해서라도, 여기에 개시된 모든 범위는 어떠한 그리고 모든 가능한 하위 범위와 그 하위 범위들의 조합이라도 포괄한다. 어떤 나열된 범위라도 그 동일한 범위를 적어도 균등한 절반, 1/3, 1/4, 1/5, 1/10 등으로 분할될 수 있도록 충분히 기술하는 것으로 쉽게 인지될 수 있다. 제한적이지 않은 예로서, 여기에서 논의된 각 범위는 하위 1/3, 중위 1/3 및 상위 1/3 등으로 쉽게 나누어질 수 있다. 또한 해당 분야 통상의 기술자에 의해서 이해되는 바와 같이, "까지", "적어도" 등과 같은 모든 표현은 기재된 수를 포함하고, 전술한 바와 같은 하위 범위들로 뒤이어 분할될 수 있는 범위들을 나타낸다. 끝으로, 해당 분야 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 범위는 각각의 개별적인 멤버를 포함한다. 따라서, 예컨대 1 내지 3개 물품을 갖는 그룹은 1개, 2개 혹은 3개 물품을 갖는 그룹들을 지칭한다. 마찬가지로, 1 내지 5개 물품을 갖는 그룹은 1개, 2개, 3개, 4개 혹은 5개 물품을 갖는 그룹들을 지칭하는 식이다.
- [0196] 전술한 바로부터, 본 개시의 다양한 실시형태가 예시적인 목적으로 여기에 기술되었고, 다양한 변형이 본 개시의 사상과 범위를 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 여기에 개시된 다양한 실시형태는 제한하려는 의도가 아니며, 진정한 범위와 사상은 이하의 청구 범위에 의해 나타난다.
- [0197] 특히, 특허 출원서, 논문, 교과서 등을 포함하여 여기에 인용 된 모든 참고 문헌 및 본원에서 인용된 참고 문헌은 아직까지 인용되지 않은 한도 내에서 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 포함된 문헌 및 유사한 자료 중 하

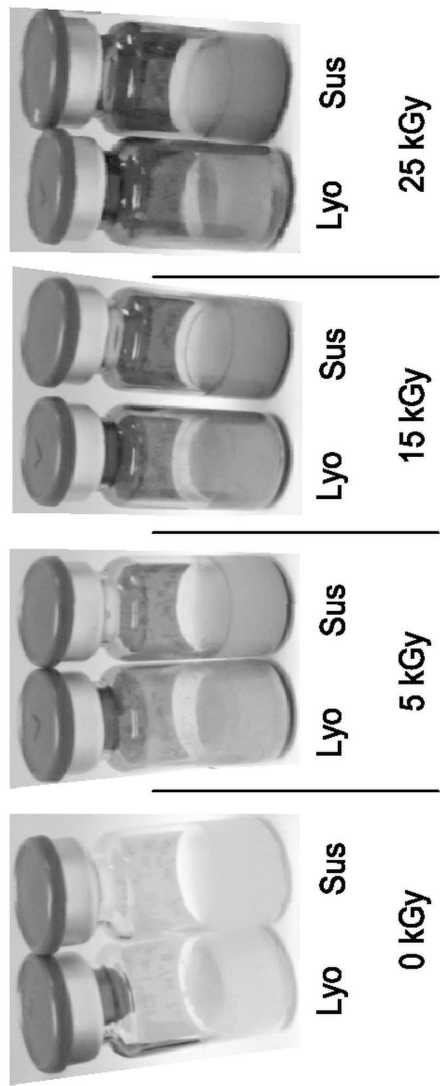
나 이상이 정의된 용어, 용어 사용법, 설명된 기술 등을 포함하되 이에 국한되지 않는 이 응용 프로그램과 다르거나 모순되는 경우이 본 명세서를 따른다.

## 도면

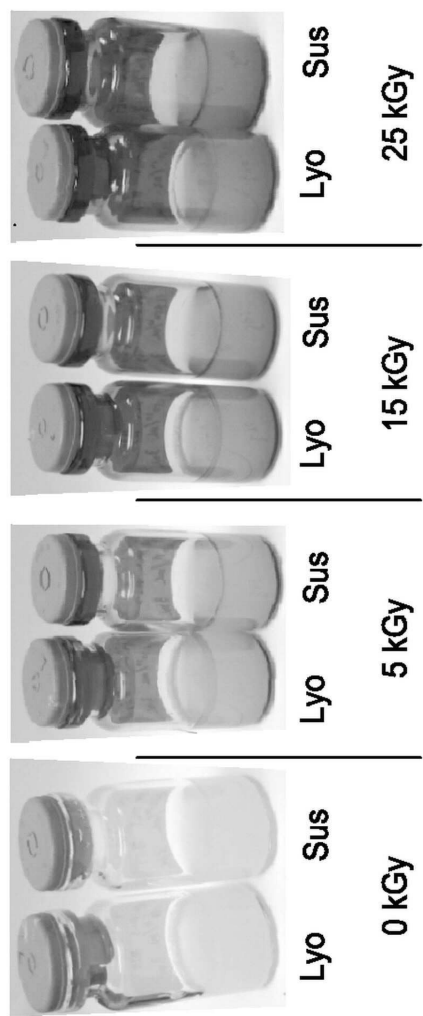
### 도면1



도면2a

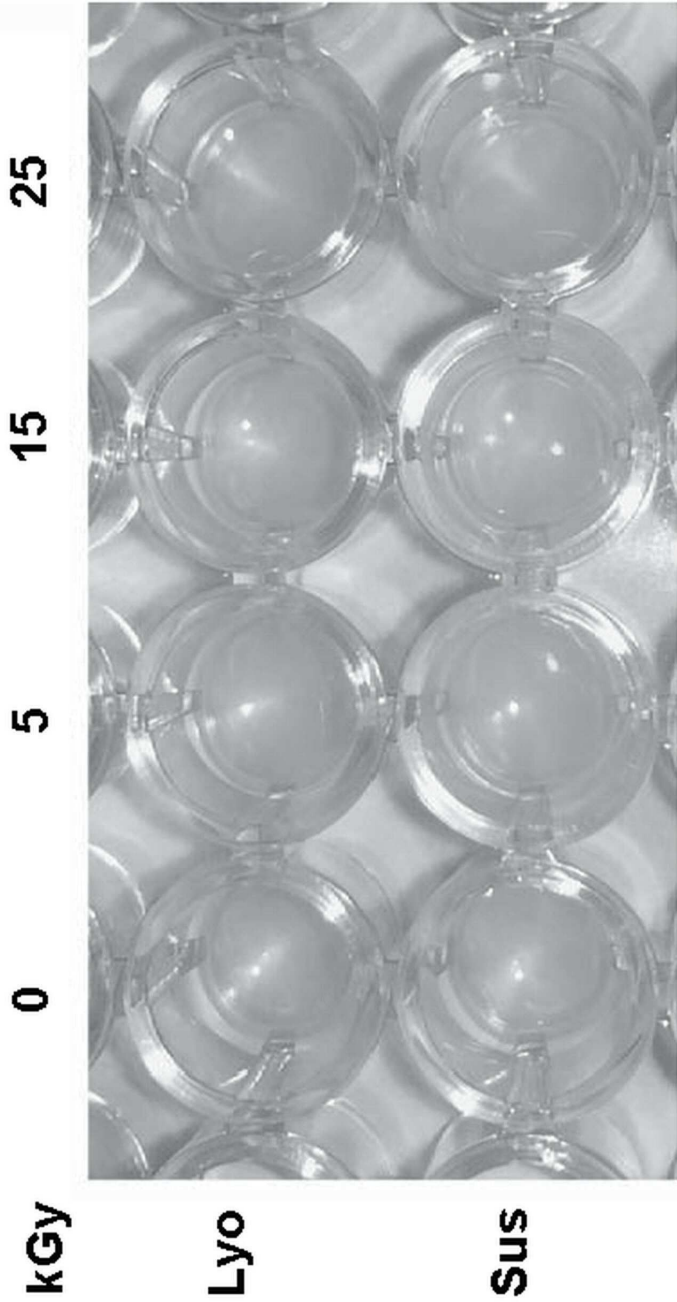


도면2b

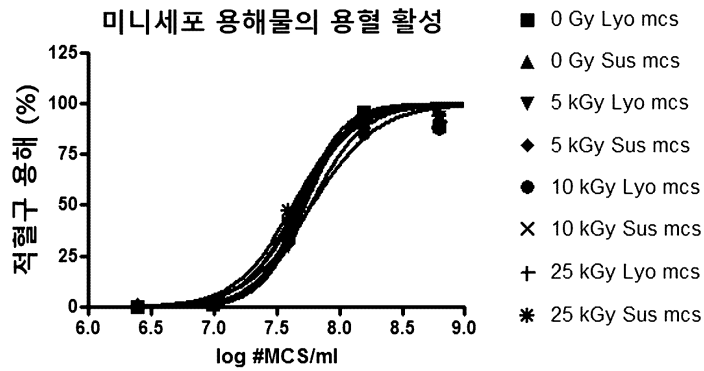




도면3

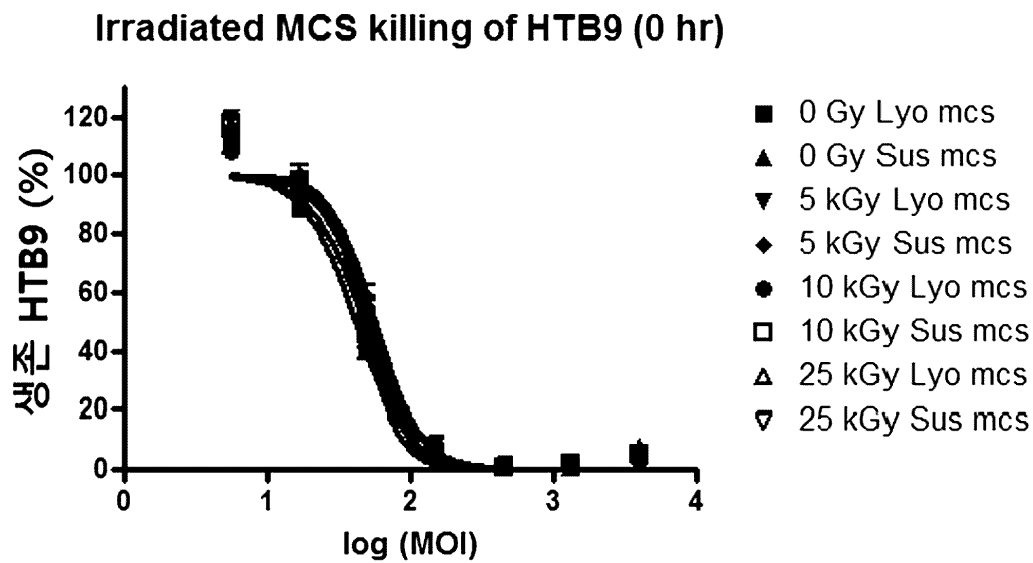


도면4



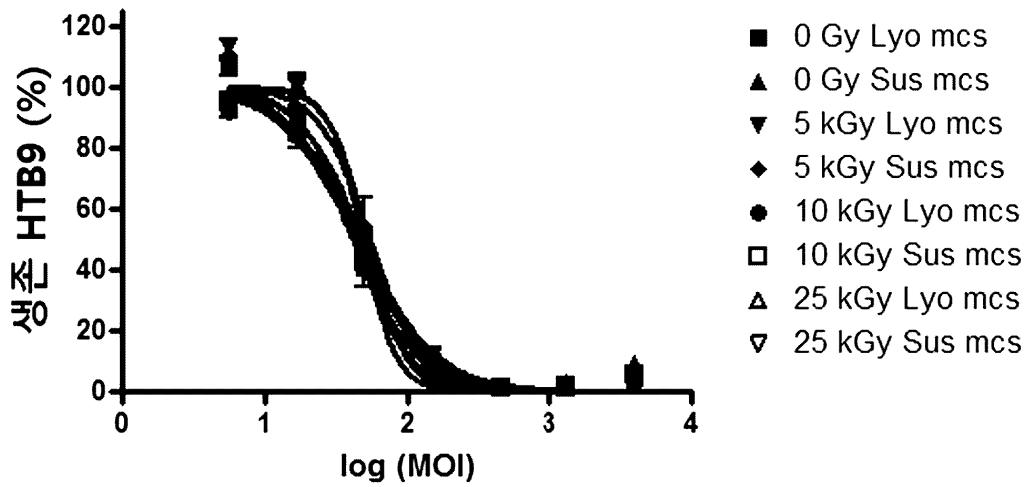
	0 Gy Lyo mcs	0 Gy Sus mcs	5 kGy Lyo mcs	5 kGy Sus mcs	10 kGy Lyo mcs	10 kGy Sus mcs	25 kGy Lyo mcs	25 kGy Sus mcs
#MCS/ml @ 50% RBC lysis	4.93E+07	4.98E+07	5.86E+07	5.29E+07	5.99E+07	4.77E+07	4.55E+07	4.25E+07
g rPFO/ MC	3.49E-16	3.46E-16	2.94E-16	3.26E-16	2.88E-16	3.61E-16	3.79E-16	4.06E-16
PFO ng/1x10 <sup>8</sup> mcs	34.9	34.6	29.4	32.6	28.8	36.1	37.9	40.6

도면5a

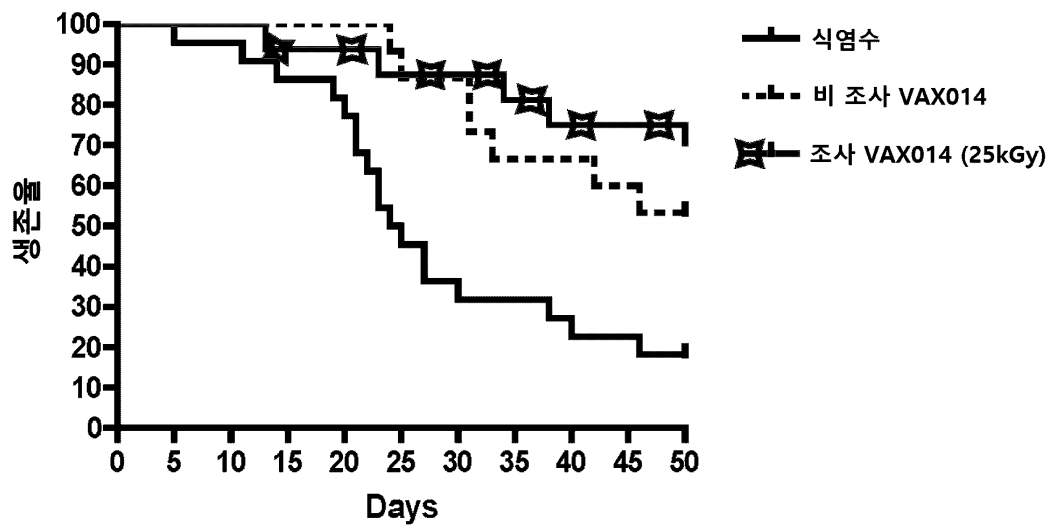


도면5b

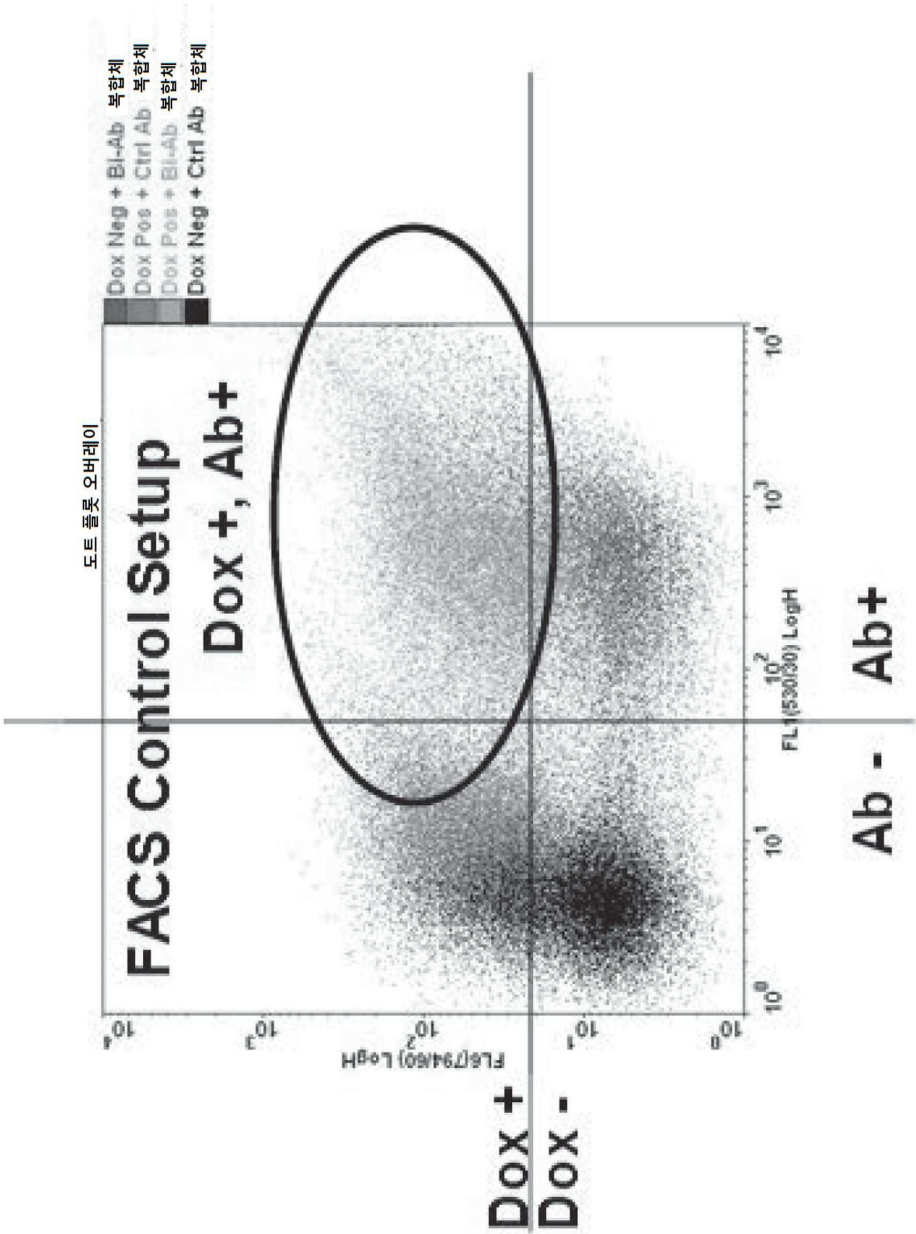
### Irradiated MCS killing of HTB9 (4 hr in RT)



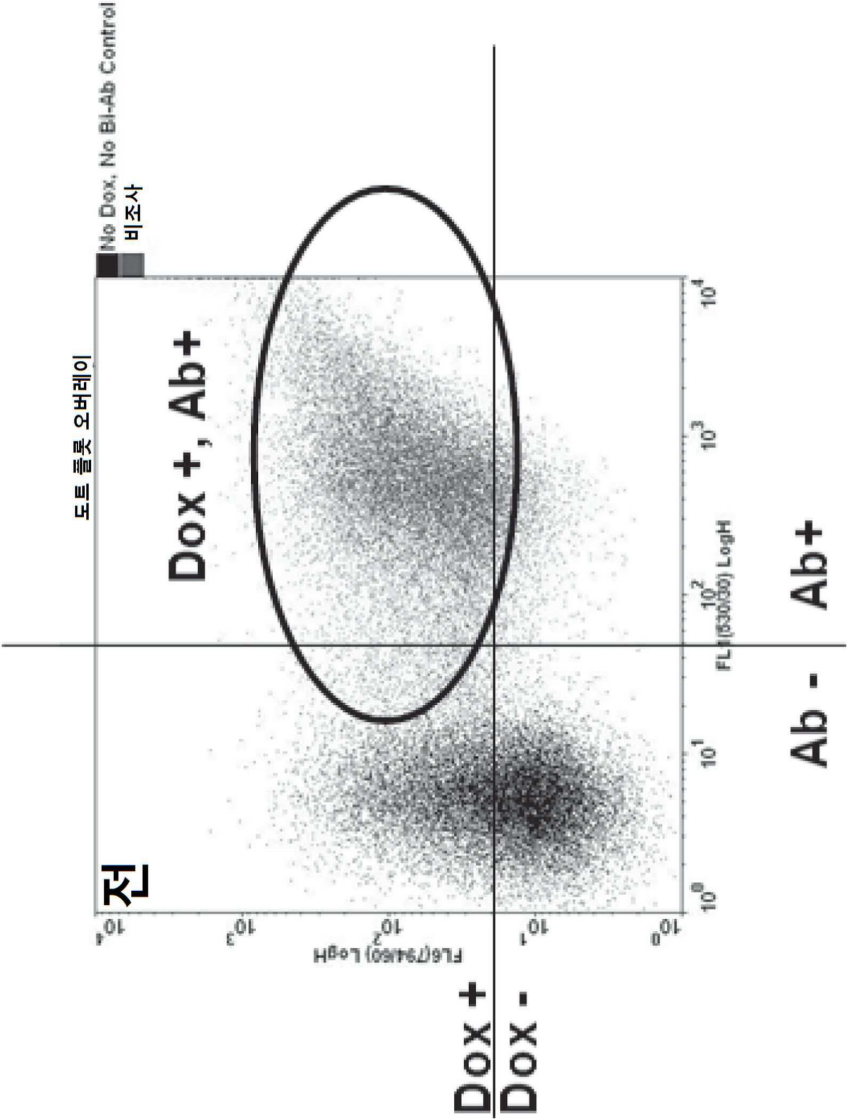
도면6



도면7a

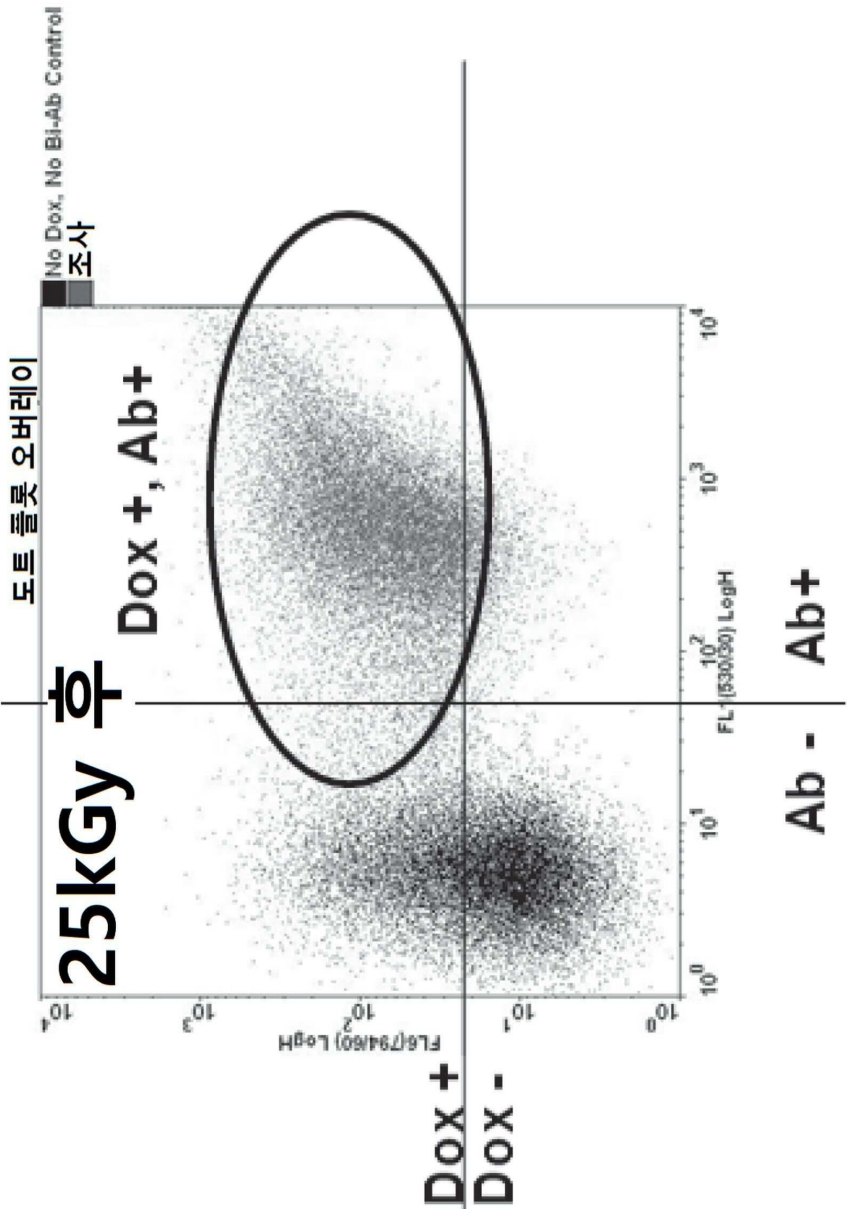


도면7b



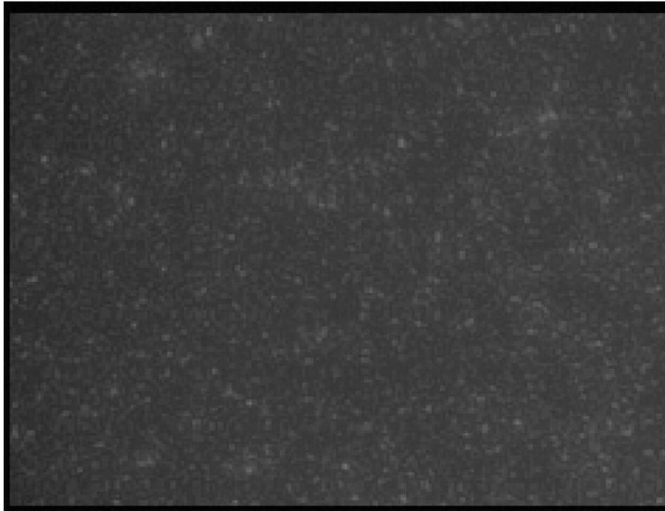


도면7c

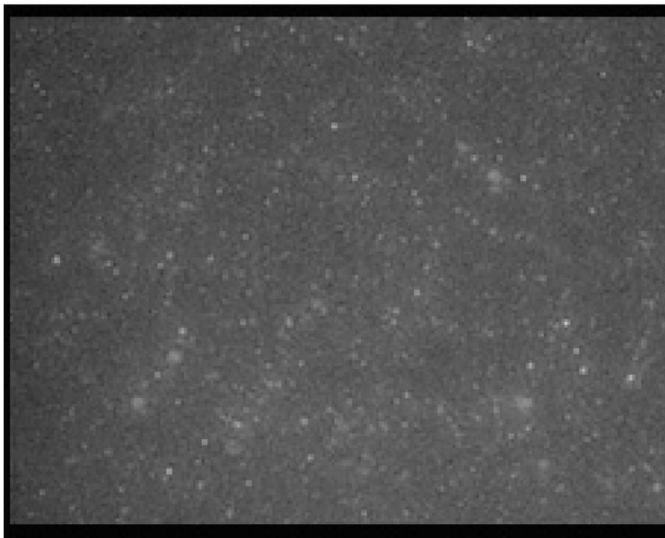


도면7d

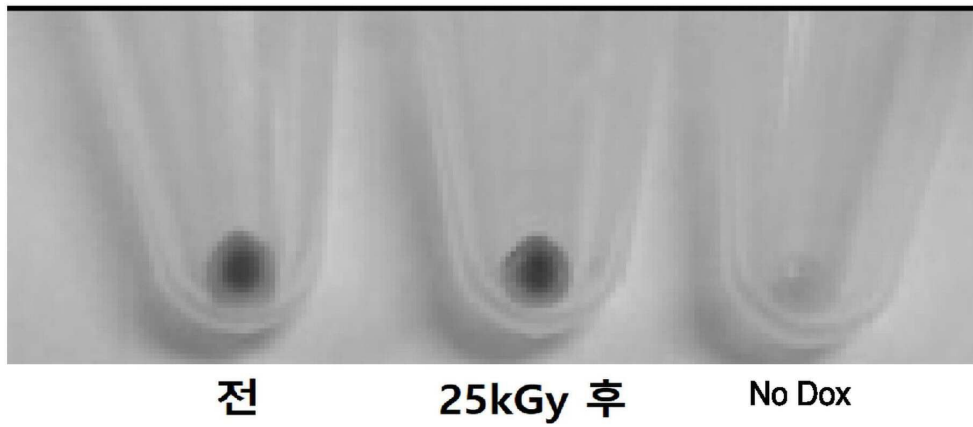
전



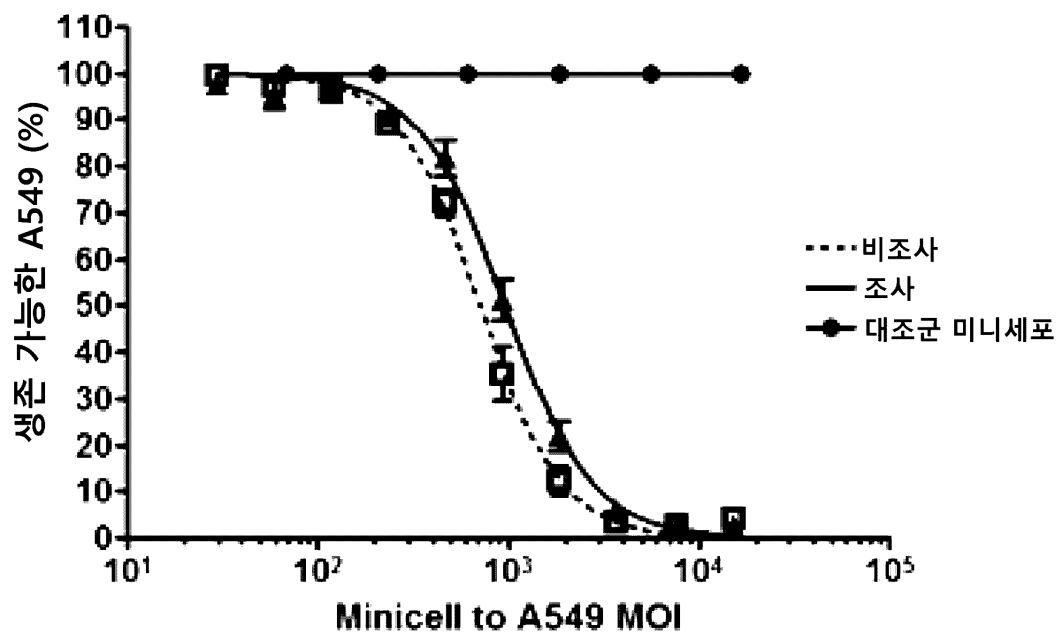
25kGy 후



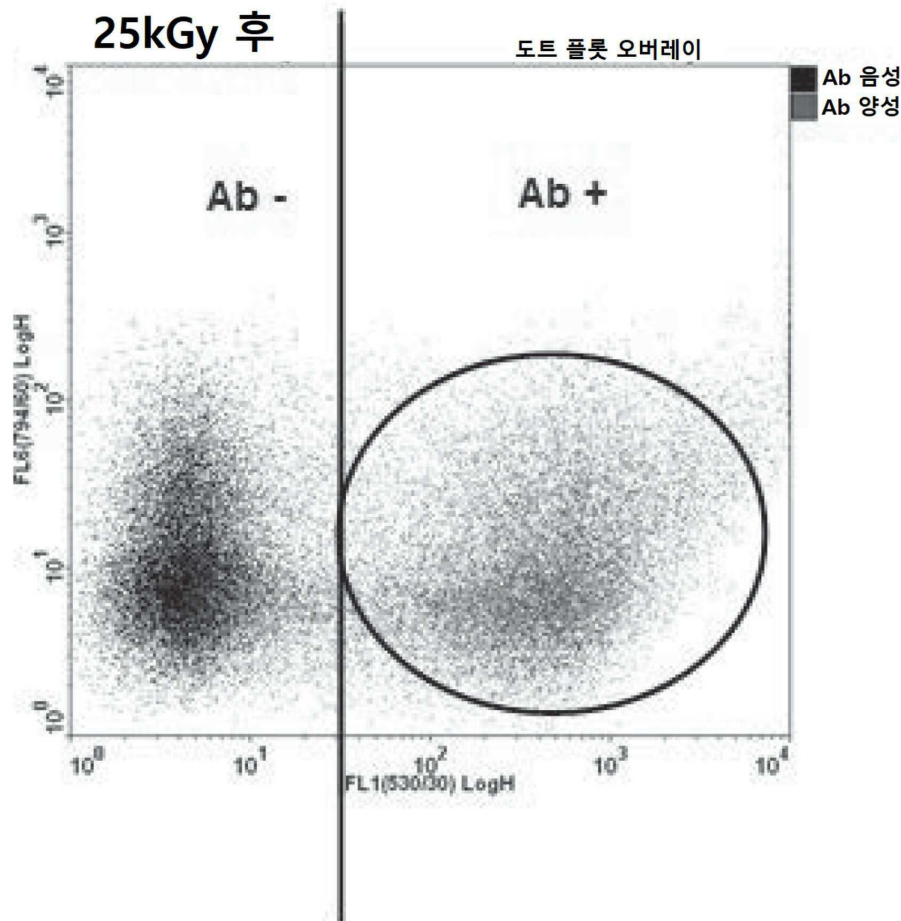
도면7e



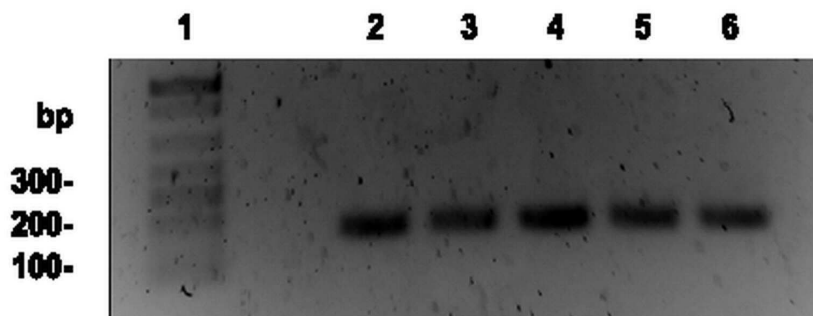
도면7f



도면8a



도면8b



레인	샘플
1	1kb Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific, 10787018)
2	비 조사-미니세포로 코팅된 Bi-Ab 복합체( $1.7 \times 10^7$ 미니세포/rxn)
3	조사(25kGy)-미니세포로 코팅된 Bi-Ab 복합체( $1.7 \times 10^7$ 미니세포/rxn)
4	비 조사-미니세포( $1.7 \times 10^7$ 미니세포/rxn)
5	조사-미니세포( $1.7 \times 10^7$ 미니세포/rxn)
6	정제된 플라스미드(186 ng/rxn)