(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0032610
(43) 공개일자 2022년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/21 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/21 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7004798
(22) 출원일자(국제) 2020년06월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년02월11일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/067785
(87) 국제공개번호 WO 2021/008840
국제공개일자 2021년01월21일
(30) 우선권주장
19186000.6 2019년07월12일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
쾨벤하운스 유니버시테트
덴마크, 1165 코펜하겐 케이, 뇌레가데 10
덴마크스 텍니스케 유니버시테트
덴마크 2800 콘겐스 링비 앵커 엥겔운트 베즈 101 에이
(72) 발명자
크레달, 토마스, 닛슈케
에실게이드 7A 2088 케이쥐에스. 링비 덴마크
로센킬데, 메테, 마리에
올레 울슨스 알레 30 2900 헬레루프 덴마크
(74) 대리인
윤대웅

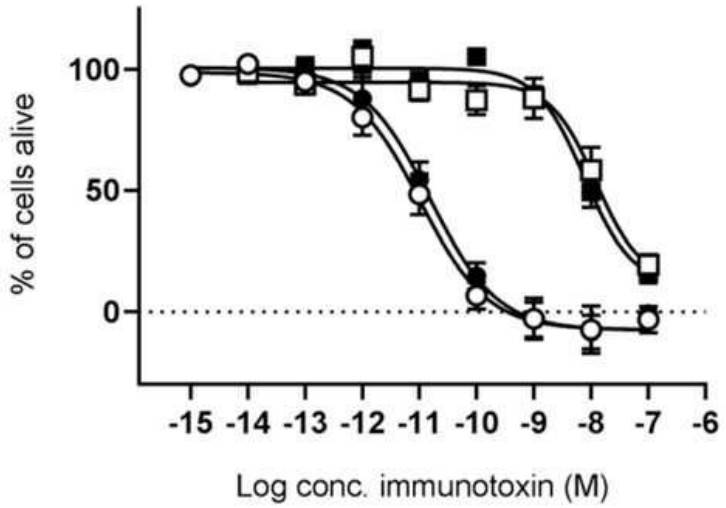
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **CMV 감염과 관련된 질병 치료를 위한 융합 독소 단백질**

(57) 요 약

본 발명은 CMV 감염과 관련된 질병을 치료하는데 유용한 면역독소에 관한 것이다. 본 발명은 또한 약제로서의 면역독소 및 면역독소를 포함하는 약제학적 조성물, 및 면역독소를 포함하는 CMV 감염의 치료 또는 예방용 키트에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61P 31/12 (2018.01)
C07K 2319/33 (2013.01)
C07K 2319/55 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 면역독소 (Immunotoxin):

i) 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 표적화 모이어티 (targeting moiety):

a) 서열번호 1, 또는

b) 서열번호 1에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및

ii) 독소,

상기 아미노산 잔기의 위치 49는 알라닌 (A) 잔기로 대체되고 아미노산 잔기의 위치 1 내지 6은 N-말단에서 아미노산 서열 ILDNGVS로 대체됨.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 b)의 아미노산 서열은 서열번호 1에 대해 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 것인, 면역독소.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 US28 수용체에 결합하는 것인, 면역독소.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 US28 수용체는 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 면역독소:

i) 서열번호 3, 또는

ii) 서열번호 3에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 상동 수용체 CX3CR1에 대한 면역독소의 친화도는 CX3CR1에 대한 CX3CL1 (서열번호 1)의 친화도와 비교하여 감소되며, 적어도 100 배, 적어도 150 배, 200배, 또는 적어도 250 배 감소되는 것인, 면역독소.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역독소는 CX3CR1에 대한 친화도와 비교하여 US28에 대한 친화도가 증가하고, 적어도 75 배, 적어도 100 배, 적어도 150 배, 200 배, 또는 적어도 250 배 증가된 친화도를 갖는 것인, 면역독소.

청구항 7

제5항 또는 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CX3CR1 수용체는 서열번호 4에 따른 아미노산 서열을 포함하는 것인, 면역독소.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 독소는 슈도모나스 외독소 A (Pseudomonas exotoxin A), 젤로닌 (gelonin), 부가닌 (bouganin), 사포린 (Saporin), 리신 (Ricin), 리신 A (Ricin A) 사슬, 브리오딘 (Bryodin), 디프테리아 (Diphtheria), 리스트릭톡신 (Restrictocin), 디프테리아 독소 (Diphtheria toxin), 및 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 군 중 하나 이상으로부터 선택된 것인, 면역독소.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 독소는 슈도모나스 외독소 A (서열번호 5) 또는 이의 단편인 것인, 면역독소.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역독소는 서열번호 10을 포함하는 것인, 면역독소.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역독소는 CX3CR1을 발현하는 세포에 대한 효능과 비교하여 US28을 발현하는 세포에 대한 효능이 증가되었으며, 적어도 150 배, 175 배, 적어도 200 배, 적어도 225 배, 적어도 250 배 효능이 증가된 것인, 면역독소.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서 면역독소 또는 이의 제약상 허용되는 염을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 11항 중 어느 한 항에 있어서 면역독소 또는 제12항에 있어서 약학적 조성물의 의학적 용도.

청구항 14

제1항 내지 11항 중 어느 한 항에 있어서 면역독소 또는 제12항에 있어서 약학적 조성물의 CMV 감염 또는 CMV 관련 질병의 치료 또는 예방 용도.

청구항 15

다음을 포함하는 키트:

i) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서 면역독소 또는 제12항에 있어서 약학적 조성물,

ii) 하나 이상의 추가 치료제, 및

iii) 선택적으로, 사용을 위한 지침,

상기 i) 및 ii)는 동시, 개별 또는 순차 투여를 위한 것임.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CMV 감염과 관련된 질병을 치료하는데 유용한 면역독소 (Immunotoxin)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 약제로서의 면역독소 및 면역독소를 포함하는 약제학적 조성물, 및 면역독소를 포함하는 CMV 감염의 치료 또는 예방용 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] *세포바이러스 (Cytomegalovirus)*

[0003] 거대세포바이러스 (CMV)는 중요한 인간 병원체 및 주요 오퍼튜니스트 (Oppertunist)로, 면역이 저하된 객체 (Subjec), 예를 들어, AIDS 환자, 신생아, 및 이식 요법 (Transplantation regimen)의 일부로 면역 억제제를 투여 받은 개인에게 질병을 일으키는 것으로 나타났다. 이러한 개인에서, 재발성 (Re-emerging) 및/또는 급성 감염 (acute infection)에서 CMV의 결과는 망막염, 뇌염 및 기포낭염을 비롯한 다른 병리학을 포함하여 심각할 수 있다. 또한, 면역 능력이 있는 숙주에서, CMV는 심장 이식 후 관상 동맥 폐색 및 혈관 성형술 후 죽상 동맥 절제술 및 재협착을 비롯한 다양한 염증 상태와 관련되어 있는 지속적인 평생 감염을 확립한다. CMV는 숙주의 급성 감염 동안 뿐만 아니라 평생 잠복기 동안 백혈구와 상호 작용한다. 이와 같이 백혈구는 CMV 유발 질병에서 중요한 역할을 하며, 바이러스 전파를 위한 매개체 및 평생 잠복기 동안 거주 장소로서 감염의 급성기에 연루되어 있다.

[0004] 현재 CMV 감염에 대한 치료법은 없다. 바이러스 억제제 (Viral suppressant)는 CMV 복제를 억제하는데 사용되어 왔지만, 강력한 부작용이 있고 감염을 억제하는 역할만 한다. 이식 환자와 HIV/AIDS 환자의 CMV 감염 치료를 위한 가장 일반적인 약물은 원래 단순 포진 바이러스 (Herpes Simplex Virus; HSV)용으로 개발된 제네릭 약물 글랜시클로비르 (Ganciclovir)와 아시클로비르 (Acyclovir)이다. 글랜시클로비르와 아시클로비르는 HSV뿐만 아니라 CMV에도 억제 효과가 있다. 포스카비르 (Foscavir)는 또한 CMV 감염을 억제하는 데 사용되었지만 참을 수 없는 메스꺼움 (nausea)을 유발하는 것으로 나타났다. 프레비미스 (Prevymis), 소분자 터미네이즈 억제제 (Small molecule terminase inhibitor)는 또한 바이러스 복제를 억제한다. 레터모비르 (Letermovir)는 바이러스 DNA 처리 및 패키징에 필요한 CMV DNA 터미네이즈 복합체 (pUL51, pUL56, 및 pUL89)를 억제한다.

[0005] 결론적으로, 기존의 어떤 약물도 감염을 근절할 수 없고, 단지 면역이 저하되거나 면역이 억제된 환자에서 CMV 질병의 진행을 멈추게 할 뿐이다. 따라서, 효능과 독성 수준 모두에서 개선의 여지가 있다.

[0006] *면역독소 (Immunotoxin)*

[0007] 면역독소는 리간드에 대한 수용체를 발현하는 세포를 죽이는데 사용할 수 있는 독소와 결합된 리간드이다. 면역독소 치료는 리간드 표적 치료제로도 알려져 있다. 따라서, 면역독소는 전달을 위한 표적 부분 (리간드)과 세포독성을 위한 독성 부분을 포함한다. 현재 사용되는 리간드는 모노클로날 항체 (Monoclonal antibodies), 사이토카인/성장 인자 (cytokines/growth factor) 및 가용성 수용체 (soluble receptor)이다. 예를 들어, 전통적인 화학 요법 약물을 넘어선 면역독소의 이점은, 세포를 죽이기 위해 분열할 필요가 없다는 것이다. 또한, 면역독소가 효율적이고 선택적으로 내재화되면 항원 음성 세포에서 부작용이 발생하지 않는다.

[0008] 그러나, 일반적으로, 면역독성은 인상적인 수준의 효능을 나타내지 않는다. 일반적인 문제는 이들이 병든 세포에 대해 충분히 특이적이지 않고, 더 나아가 종종 병든 세포에 효율적으로 들어가 세포독성 효과를 발휘할 수 없다는 것이다. 면역독성은 또한 아마도 면역독성의 비특이적 흡수로 인해 다른 치료법보다 높은 수준의 전신 독성을 초래한다.

[0009] 현재, 항원 발현의 독성, 면역원성 및 이질성 문제를 극복하기 위해 면역독소에 대한 새로운 접근법이 탐구되고 있다. 이러한 접근 방식에는 유전 공학을 사용하여 독소의 전위 및 촉매 도메인을 인간 단일 사슬 항체에 융합하고 파지 디스플레이를 사용하여 친화도가 높은 종양 선택적 리간드를 선택하는 것을 포함한다. 다른 접근법은 종양 혈관 내피를 표적으로 하는 리간드의 선택과 종양 유전자 생성물 또는 분화 항원의 표적화를 중심으로 한다. 면역독소에 대한 연구가 지난 30년 동안 진행되었음에도 불구하고 바이러스 관련 질병에 대한 면역독소는 시장에서 사용할 수 없다.

[0010] *면역독소 내재화 (Immunotoxin internalization)*

[0011] 대부분의 면역독소는 악성 형질전환을 겪은 세포에 대해 증가하며 이러한 형질전환의 일부로 특정 항원 또는 특정 항원 그룹을 과발현한다. 이들 항원은 형질전환된 세포에서 과발현 되지만 형질전환된 세포에 대해 특이적이지는 않지만 종종 정상 세포에서도 발현된다. 따라서, 형질전환된 세포에서 소수의 세포 항원만이 과발현된다. 따라서, 표적 항원을 발현하는 정상 세포를 사멸시켜 원치 않는 독성을 피하기 위해, 약물 개발자는 매우 적은 수의 후보 질병 항원을 표적으로 하도록 제한되어 있으며, 따라서, 약물 개발자는 전통적으로 세포 유형 분포에만 기반하여 표적 항원을 선택하도록 제한되었다. 결과적으로, 많은 면역독소가 표적 항원에 높은 친화도로 결합함에도 불구하고 표적 세포에 효율적으로 들어갈 수 없어 효능이 불충분하다.

[0012] *CMV 감염과 관련된 질병의 치료를 위한 면역독소*

[0013] 면역독소 전략을 사용하여 CMV 감염과 관련된 질병을 치료하려는 이전의 시도는 성공적이지 못하였다.

[0014] 다클론 및 단클론 항체에 연결된 독소는 모두 CMV에 감염된 세포를 표적으로 삼는데 사용되었다. 그러나, 항체는 GPCRs에 대해 개발하기 쉽지 않으며, 일반적으로 인식 부위가 다양한 GPCR을 인식하지 못한다. 따라서, 항체 결합은 수용체 기능과 연관되지 않은 수용체 변이에 매우 민감하여 탈출 변이 (저항성 발달)의 위험을 증가시킨다. 결과적으로, 항체에 기반한 전략은 불충분한 (선택적) 표적화 및/또는 면역독소의 내재화로 인해 설득력 있는 생체 내 데이터를 생성하지 못하였다.

[0015] 대안적으로, 면역독소의 표적화 모이어티는 항체 대신에 펩티드일 수 있다. WO 2008/003327에서, CMV-감염된 세포는 구성적으로 CMV 코딩된 수용체를 표적화 하도록 설계된 펩티드를 포함하는 면역독소를 사용하여 표적화되었다. 선택된 수용체 중 하나는 US28로 명명된 CMV 특이적 수용체였으며, 이는 인간 거대세포바이러스 오픈 리딩 프레임 US28에 의해 암호화된 G 단백질 결합 수용체 (G protein coupled receptor)이다. US28 수용체를 표

적으로 하는 효율적인 면역독소의 설계에 대한 도전은 CX3CR1이라는 인간 상동 수용체의 존재이다. 따라서, CX3CR1에 대한 US28의 선택성은 표적을 벗어난 문제를 최소화하면서 안전한 면역독소를 얻기 위한 핵심 특성이다. WO 2008/003327에서, 케모카인 (chemokine) CX3CL1 (프랙트알킨; fractalkine)의 돌연변이된 버전, 즉, CX3CR1의 천연 리간드가 표적화 모이어티 (targeting moiety)로 사용되었다. 면역독소를 임상에 적용하려면 부작용을 제한하고 생산 비용을 줄이기 위해 US28 선택성 및 사멸 특이성을 향상시키는 것이 중요하다.

[0016] 오프-타겟 인간 상동 수용체인 CX3CR1의 존재로 인해, US28을 발현하는 세포에 대해 높은 친화도 및 효능을 갖는 면역독소를 개발하는 것만으로는 충분하지 않다. 대신, 면역독소는 (i) 높은 특이성, 즉 경쟁적 결합 환경에서 CX3CR1 발현 세포와 비교하여 US28 발현 세포에 대한 높은 친화도 및 (ii) 높은 사멸 특이성, 즉 CX3CR1 발현 세포와 비교하여 US28 발현 세포에 대한 높은 효능을 가져야 한다.

[0017] 따라서, 개선된 면역독소가 유리할 것이며, 특히, CX3CR1 발현 세포에 비해 US28 발현 세포에 대한 높은 선택성 및 사멸 특이성을 갖는 안전한 면역독소가 유리할 것이다. 또한, 본 발명의 면역독소는 높은 정확도로 CMV에 감염된 세포만을 표적으로 하고, CMV 감염 또는 CMV 관련 질병의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0018] (특허문헌 0001) WO 2008003327 A2

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 구성적 내재화 CMV 코딩 수용체에 대해 높은 친화성을 갖는 면역독소를 설계함으로써, 감염된 세포에 의한 면역독소의 효율적인 흡수 및 이에 의해 감염된 세포의 사멸이 달성된다. 면역독소의 내재화는 면역독소 매개 세포독성의 속도 제한단계로 간주되기 때문에 구성적 내재화 수용체를 표적으로 하는 것은 면역독소 기반 약물 사용의 핵심 문제를 해결할 것이다. 또한, 여기에 제시된 면역독소는 건강한 세포와 감염된 세포를 구별하도록 설계되었다.

[0020] 따라서, 본 발명의 목적은 면역독소가 그 기능을 발휘할 수 있는, 즉 세포를 죽일 수 있는 표적 세포 내로 수송될 것을 보장하는 구성적 내재화 수용체를 표적으로 하는 면역독소에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 면역독소는 높은 정확도로 CMV에 감염된 세포만을 표적으로 하고, CMV 감염 또는 CMV 관련 질병의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.

[0021] 특히, 본 발명의 목적은 높은 효능을 갖는 안전한 약물로 사용될 수 있는 선택성 및 사멸 특이성이 개선된 면역독소를 제공하는 것이다.

[0022] 따라서, 본 발명의 일 측면은 다음을 포함하는 면역독소에 관한 것이다:

[0023] i) 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 표적화 모이어티 (targeting moiety):

[0024] a) 서열번호 1, 또는

[0025] b) 서열번호 1에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및

[0026] ii) 독소,

[0027] 상기 아미노산 잔기의 위치 49는 알라닌 (A) 잔기로 대체되고 아미노산 잔기의 위치 1 내지 6은 아미노산 서열 ILCNGVS로 대체됨.

[0028] 본 발명의 다른 일 측면은 본 발명에 따른 면역독소 또는 이의 제약상 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명의 또 다른 일 측면은 의약적으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 면역독소 또는 약학적 조성물의 의학적 용도를 제공하는 것이다.

[0030] 본 발명의 또 다른 일 측면은 CMV 감염 또는 CMV 관련 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 따른

면역독소 또는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0031] 본 발명의 또 다른 일 측면은 다음을 포함하는 키트를 제공하는 것이다:

[0032] i) 본 발명에 따른 면역독소 또는 약제학적 조성물,

[0033] ii) 하나 이상의 추가 치료제, 및

[0034] iii) 선택적으로, 사용 지침,

[0035] 상기 i) 및 ii)는 동시, 개별 또는 순차 투여를 위한 것임.

[0036] 본 발명의 또 다른 일 측면은 본 발명에 따른 면역독소를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 서열을 제공하는 것이다.

[0037] 본 발명의 추가적인 일 측면은 적합한 숙주에서 면역독소의 생산을 지시하는데 적합한 하나 이상의 제어 서열에 작동가능하게 연결 된 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0038] 본 발명의 또 다른 일 측면은 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공하는 것이다.

[0039] 본 발명의 또 다른 일 측면은 하기의 단계를 포함하는 본 발명에 따른 면역독소의 제조방법에 관한 것이다:

[0040] a) 본 발명에 따른 숙주 세포 제공,

[0041] b) 면역독소의 발현을 위해 적합한 조건 하에 숙주 세포를 배양; 및

[0042] c) 면역독소 분리.

과제의 해결 수단

[0043] 정의

[0044] 본 발명을 상세히 논의하기 전에, 다음 용어 및 관례를 먼저 정의할 것이다:

[0045] *면역독소 (Immunotoxin)*

[0046] 본 명세서 상, 용어 "면역독소"는 전달을 위한 표적화 부분 (리간드) 및 세포독성을 위한 독성 부분 (독소)을 포함하는 이기능성 분자를 지칭한다. 면역독소는 리간드에 대한 수용체를 발현하는 세포를 죽이는데 사용될 수 있다.

[0047] 면역독소는 융합 독소 단백질 (FTP)이라고도 한다. 따라서, 용어 "면역독소" 및 "융합 독소 단백질 (FTP)"은 본 명세서 상 상호 교환적으로 사용된다.

[0048] *리간드 또는 표적화 모이어티 (Ligand or targeting moiety)*

[0049] 본 명세서 상, 용어 "리간드 (ligand)"는 임의의 아미노산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질, 예를 들어, 바이러스에서 유래하는 수용체 또는 항원에 대한 특이적 결합 친화도를 갖는 것을 의미한다.

[0050] 본 발명에 있어서 리간드는 면역독소를 원하는 위치로 특이적으로 표적화하는데 사용된다. 따라서, 리간드는 "표적화 모이어티 (Targeting moiety)"라고도 한다.

[0051] 결과적으로, 용어 "리간드" 및 "표적화 모이어티 (targeting moiety)"는 본 발명에 있어서 상호교환적으로 사용된다.

[0052] 본 발명에 있어서 기재된 면역독소의 표적화 모이어티는 바람직하게는 펩티드 또는 폴리펩티드의 형태이다.

[0053] *펩티드 또는 폴리펩티드 (Peptide or polypeptide)*

[0054] 본 명세서 상, 용어 "펩티드" 또는 "폴리펩티드"는 아미노산 잔기, 관련된 자연 발생 구조 변이체, 및 펩티드 결합을 통해 연결된 이의 합성 비-자연 발생 유사체로 구성된 중합체를 지칭한다.

[0055] 본 발명에 있어서 용어 "펩티드" 및 "폴리펩티드"는 상호교환 가능하게 사용된다.

[0056] 폴리펩티드는 재조합 또는 합성으로 생산될 수 있다. 폴리펩티드의 재조합 생산은 당업자에게 공지된 바와 같이 공지된 발현 시스템에서 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 도입함으로써 달성될 수 있다. 합성 폴리펩타이드는 예를 들어 자동화 폴리펩타이드 합성기를 사용하여 합성할 수 있다.

[0057] 통상적인 표기법은 본 발명에 있어서 폴리펩타이드 서열을 묘사하는데 사용된다: 폴리펩타이드 서열의 좌측 말단은 아미노산 말단 (N 말단)이고; 폴리펩타이드 서열의 오른쪽 끝은 카르복실 말단 (C 말단)이다.

[0058] *독소 (Toxin)*

[0059] 본 명세서 상, 용어 "독소"는 세포독성 또는 세포증식억제성 또는 세포자멸사 또는 괴사를 유도하거나 병원체의 복제, 성장 또는 전파를 직접 억제하는 단백질 또는 비-펩티드인 임의의 물질, 또는 감염된 세포를 감염된 숙주의 면역 반응에 취약하게 만든다.

[0060] 독소의 예는 외독소, 내독소, 효소 독소, 기공 형성 독소, 초항원 및 리보솜 불활성화 단백질 (RIP)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 효소 독소의 예는 슈도모나스 외독소 A (*Pseudomonas* exotoxin A), 콜레라 독소 (Cholera toxin), 디프테리아 독소 (Diphtheria toxin), 백일해 독소 (Pertussis toxin), 시가 독소 (Shiga toxin), 보툴리눔 독소 (Botulinum toxin), 파상풍 독소 (Tetanus toxin), 탄저균 독소 (Anthrax toxin) 및 포도상구균 엑스폴리아틴 B (*Staphylococcus aureus* exfoliatin B)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 기공 형성 독소 (Pore-forming toxin)의 예는 헤모리신 (Hemolysin), 리스테리오리신 (Listeriolysin), 탄저균 EF (Anthrax EF), 알파 독소 (Alpha toxin), 뉴몰리신 (Pneumolysin), 스트렙톨리신 O (Streptolysin O), 류코시딘 (Leukocidin) 및 퍼프린지오라이신 O (Perfringiolysin O)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 리보솜 불활성화 단백질 (RIP)의 예는 슈도모나스 외독소 A (Pseudomonas exotoxin A), 젤로닌 (gelonin), 부가닌 (bouganin), 사포린 (Saporin), 리신 (Ricin), 리신 A (Ricin A) 사슬, 브리오딘 (Bryodin), 디프테리아 (Diphtheria), 리스트릭톡신 (Restrictocin) 및 디프테리아 독소 (Diphtheria toxin)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] *CX3CL1 및 CX3CR1*

[0065] 본 명세서 상, 용어 "CX3CL1"는 CX3C 케모카인 계열의 구성원인 케모카인을 나타낸다. 케모카인은 세포 이동을 조절하는 저분자량 단백질이다. 많은 케모카인은 또한 면역계 세포의 성숙, 활성화, 증식 및 분화를 유도하는 능력을 가지고 있다. CX3CL1은 프랙트알킨 및 뉴로택틴으로도 알려져 있으며, 따라서 용어 "CX3CL1", "프랙트알킨" 및 "뉴로택틴"은 본 발명에 있어서 상호 교환적으로 사용된다.

[0066] CX3CL1은 해당 케모카인 수용체와의 상호작용을 담당하는 케모카인 도메인을 포함한다. 케모카인 도메인은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열에 의해 정의된다. 이 아미노산 서열은 항목 (Entry) P78423하에 UniProt 데이터베이스에 제공된 천연 인간 CX3CL1의 위치 25에서 위치 99에 해당한다.

[0067] CX3CL1은 본 발명에 따라 변형 (즉, 결실, 삽입 및/또는 치환, 접합 등에 의해 돌연변이 됨)될 수 있다.

[0068] CX3CL1은 "CX3CR1"이라는 해당 수용체와의 상호작용을 통해 기능을 발휘한다. 따라서, 본 명세서 상, 용어 "CX3CR1"은 프랙트알킨 (Fractalkine) 수용체를 지칭하고 서열번호 4로 열거된 아미노산 서열을 갖는다. 이 아미노산 서열은 P49238 항목으로 UniProt 데이터베이스에 제공된 천연 인간 프랙트알킨 수용체에 해당한다.

[0069] *내면화 (Internalization)*

[0070] 본 명세서 상, 용어 "내재화"는 세포의 세포외 환경에서 세포의 세포내 구획으로 개체의 이동을 의미한다. 따라서, 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소의 내재화는 면역독소의 표적화 부분과 상호작용하는 항원을 발현하는 세포와 같은 표적 세포의 세포내 구획 내로의 면역독소의 진입을 지칭한다.

[0071] 면역독소의 내재화는 IS28과 같은 구성적 내재화 수용체를 통해 매개될 수 있다. 구성적 내재화는 원형지막에서 발현되고 사전 자극 없이 세포 원형질막으로부터 세포 세포질 또는 세포내 구획으로 내재화되는 임의의 항원을 지칭한다. 항원 내재화는 리간드에 의해 조절될 수 있고, 내재화된 항원은 원형질막으로 재순환되거나 내재화 후에 분해될 수 있다.

[0072] *US28*

[0073] 본 명세서 상, 용어 "US28"은 인간 거대세포바이러스 (Cytomegalovirus) 오픈 리딩 프레임 US28에 의해 코딩되는 G 단백질 결합 수용체를 지칭한다. US28은 구성적으로 내재화하는 수용체이므로 US28에 결합하는 케모카인 또는 기타 화합물은 수용체를 발현하는 세포 내로 내재화 된다. 본 명세서 상, US28은 서열번호 3으로 열거된 아미노산 서열을 갖는다. 이 아미노산 서열은 Q9IP69 항목으로 UniProt 데이터베이스에 제공된 CX3CR1 상동체에

해당한다. 그러나, US28은 다른 변이체에 존재하며 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소의 표적화는 US28의 하나의 특정 변이체, 즉 아미노산 서열에 한정 되는 것은 아니다.

[0074] *친화도 (Affinity)*

[0075] 본 명세서 상, 용어 "친화도"는 결합 친화도, 즉 면역독소와 수용체 사이의 결합 상호작용의 강도를 의미한다. 친화도를 측정하고 이종 결합 실험에서 평형 해리 상수 (Ki)로 보고한다. Ki 값이 작을수록 표적에 대한 리간드의 결합 친화도가 커진다. Ki 값이 클수록 표적 분자와 리간드가 서로 약하게 끌어당겨 결합된다.

[0076] Ki는 등온 적정 열량계 (ITC), ELISA, 겔-이동 분석, 풀다운 분석, 평형 투석, 분석 초원심분리, SPR 및 분광 분석, 포화 결합 실험, 동종 및 이종 경쟁 결합 시험을 포함하는 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0077] *선택성 (Selectivity)*

[0078] 본 명세서 상, 용어 "선택성"은 US28에 대한 면역독소의 친화도 대 CX3CR1에 대한 면역독소의 친화도를 지칭한다. 이것은 Ki(US28)/Ki (CX3CR1) 방정식으로 나타낼 수 있다. 해리 상수의 인덱스는 이종 결합의 경우이기 때문에 "i"로 표시된다.

[0079] *힘 (Potency)*

[0080] 본 명세서 상, 용어 "효능"은 면역독소 투여 시 세포 생존율의 감소를 의미한다. 따라서 효능은 억제 효능으로 정의되며 IC50 값으로 정량화 된다. 따라서, US28을 발현하는 세포에 대한 효능은 본 발명에 있어서 IC50 (US28)으로 표시되는 반면, CX3CR1을 발현하는 세포에 대한 효능은 IC50 (CX3CR1)으로 표시된다. 일반적으로, IC50 값은 nM 단위로 보고되며 낮은 농도의 면역독소는 높은 효능에 해당하고 높은 농도의 면역독소는 낮은 효능에 해당한다.

[0081] *사멸 특이성 (Killing specificity)*

[0082] 본 명세서 상, 용어 "사멸 특이성"은 CX3CR1을 발현하는 세포보다 US28을 발현하는 세포를 특이적으로 사멸시키는 면역독소의 능력을 지칭한다. 사멸 특이성은 CX3CR1을 발현하는 세포에 대한 (억제) 효능과 US28을 발현하는 세포에 대한 (억제) 효능 사이의 비율로 정량화 된다. 따라서, 사멸 특이성은 IC50 (CX3CR1)/IC50 (US28)으로 계산될 수 있으며, 높은 값은 US28 발현 세포에 대한 높은 사멸 특이성을 나타낸다.

[0083] 본 발명에 있어서 정의된 바와 같은 특이성은 또한 일부 경우에 선택성 지수로 지칭된다. 결과적으로, 용어 "사멸 특이성" 및 "선택성 지수"는 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용된다.

[0084] *거대세포바이러스 (CMV)*

[0085] 본 명세서 상, 용어 "거대세포바이러스" 또는 "CMV"는 헤르페스바이러스과 (Herpesvirdae)에 속하는 바이러스를 말한다. "인간 헤르페스바이러스 5" 또는 "HHV-5"라고도 하는 인간 CMV (HCMV)는 인간을 감염시킬 수 있는 CMV를 나타낸다.

[0086] *CMV 감염 및 CMV 관련 질병*

[0087] 본 명세서 상, 용어 "CMV 감염" 또는 "CMV-관련 질병"은 질병에 걸린 개체에서 CMV의 존재로 인해 야기되거나 관련되거나 질병에 걸린 개체의 혈청학적 조사에서 명백한 질병, 증후군, 질병 또는 사망을 의미한다.

[0088] CMV는 급성 및 만성 질환을 유발한다. 대부분 높은 수준의 바이러스 복제와 관련되거나 여러 기관에 영향을 미치는 것이 특징인 급성질환은 증후군과 같은 단핵구증, 미숙아의 주산기 감염, 동종 이식 수용자의 CMV 증후군 및 AIDS 환자와 같은 면역 저하 환자의 전파 감염 (Disseminated infection)이다. 낮은 수준의 바이러스 복제와 가장 흔히 관련되는 만성 감염은 선척적 감염, 이식 환자의 혈관 질환, 정상 숙주의 혈관 질환 및 염증성 질환, 특히 위장관 질환이다.

[0089] 또한, 분자 또는 혈청학적 방법에 의해 결정된 CMV의 존재는 이식 수혜자의 이환율 및 사망률 증가와 관련이 있다. 실제로, CMV의 예방은 이식 후 모든 원인으로 인한 사망률을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, CMV 감염은 고정 장기 이식 수용자의 장기 거부 및 조혈 줄기 세포 수용자의 이식편대 숙주 질환과 관련 이 있다.

[0090] *아미노산 서열 (Amino acid sequence)*

[0091] 본 명세서 상, 용어 "아미노산 서열"은 천연 발생 아미노산 및/또는 인공 아미노산 유사체를 포함하는 일련의

연속적인 아미노산을 지칭한다. 아미노산 서열은 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드 등과 같은 아미노산의 중합체일 수 있다. 유전 코드의 축퇴성을 감안할 때, 특정 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 하나 이상의 핵산 또는 이의 상보적 핵산 폴리펩티드 서열로부터 결정할 수 있다.

[0092] *변이체 (Variants)*

[0093] 본 명세서 상, 용어 "변이체"는 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭하고, 이것은 천연 폴리펩타이드 서열의 아미노산 위치와 하나 이상의 아미노산 위치에서 (아미노산의 결실, 아미노산의 삽입, 및/또는 아미노산의 상이한 아미노산의 치환에 의해) 상이하다. 변이체 서열은 비-천연 발생 서열, 즉 자연에서 발견되지 않는 서열일 수 있다. 바람직하게는, "변이체"는 천연 폴리펩티드와 동일한 기능을 유지한다. 따라서, "변이체"는 천연 폴리펩타이드와 동일하거나 향상된 친화성, 선택성, 효능 또는 사멸 특이성을 갖는 면역독소를 생성한다.

[0094] *단편 (Fragment)*

[0095] 본 명세서 상, 용어 "단편"은 더 큰 모 (Parent) 폴리펩타이드의 일부 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 따라서, 단편 서열은 모 서열과 연속적인 아미노산의 스크레치를 공유하지만 길이는 감소한다. 바람직하게는, "단편"은 모 폴리펩타이드와 동일한 기능을 유지한다. 따라서 "단편"은 천연 폴리펩타이드와 동일하거나 향상된 친화도, 효능 또는 사멸 특이성을 갖는 면역독소를 생성한다.

[0096] *약학적 조성물 (Pharmaceutical composition)*

[0097] 본 명세서 상, 용어 "약학적 조성물"은 개인의 약학적 사용에 적합한 조성물을 의미한다. 약학적 조성물은 일반적으로 유효량의 활성제, 예컨대 면역독소, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0098] *유효량 (Effective amount)*

[0099] 본 명세서 상, 용어 "유효량"은 원하는 효과를 생성하기에 충분한 투여량 또는 양을 지칭한다. 원하는 효과는 개인의 예방적 또는 치료적 치료와 같은 투여량 또는 양의 수용자의 객관적 또는 주관적 개선을 포함할 수 있다.

[0100] *예방/예방 치료 (Prophylactic/preventive treatment)*

[0101] 본 명세서 상, 용어 "예방적 치료"는 질병, 병리 또는 의학적 장애의 징후 또는 증상을 나타내지 않거나 질병, 병리 또는 장애의 초기 징후 또는 증상만을 나타내는 개인에게 투여되는 치료로서, 질병, 병리학 또는 의학적 장애의 발병 위험을 감소, 예방 또는 감소시킬 목적으로 투여된다. 예방적 치료는 질병 또는 장애에 대한 예방적 치료의 기능을 하므로, 본 발명에 있어서 용어 "예방적 치료" 및 "예방적 치료"는 혼용된다.

[0102] *치료적 치료 (Therapeutic treatment)*

[0103] 본 명세서 상, 용어 "치료적 치료"는 병리, 질병 또는 장애의 증상 또는 징후를 나타내는 개인에게 투여되는 치료를 지칭하며, 병리, 질병 또는 장애의 징후 또는 증상을 감소 또는 제거하기 위한 목적으로 개인에게 치료가 투여되는 것을 지칭한다.

[0104] *뉴클레오티드 산 서열 (Nucleotide acid sequence)*

[0105] 본 명세서 상, 용어 "뉴클레오티드 산 서열" (예를 들어, 핵산, 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드)은 뉴클레오티드 A,C,T,U,G 또는 기타 자연 발생 뉴클레오티드 또는 인공 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 뉴클레오티드의 중합체를 의미한다. 주어진 핵산 또는 상보적 핵산은 임의이 특정 폴리뉴클레오티드 서열로부터 결정 될 수 있다. 달리 표시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 축퇴 코돈 치환) 및 상보적 서열 및 명시적으로 표시된 서열을 암시적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합된 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다. 현재 맥락에서, 용어 "핵산"은 "유전자" " cDNA" 및 "유전자에 의해 암호화된 mRNA"와 상호교환적으로 사용된다.

[0106] *유전자 유래의 핵산 (Nucleic acid derived from a gene)*

[0107] 본 명세서 상, 어구 "유전자로부터 유래된 핵산"은 합성을 위한 유전자 또는 이의 하위서열이 궁극적으로 주형으로 작용한 핵산을 의미한다. 따라서, mRNA, mRNA에서 역전사된 cDNA, 그 cDNA에서 전사된 RNA, cDNA에서 증폭된 DNA, 증폭된 DNA에서 전사된 RNA 등은 모두 유전자에서 파생된다.

[0108] 면역독소의 단백질 표적은 일부 실시양태에서 아미노산 서열 대신 유전적 기원 (즉, 핵산 서열)에 의해 기술될 수 있다.

[0109] *작동 가능하게 연결됨 (Operably linked)*

[0110] 본 명세서 상, 용어 "작동가능하게 연결된"은 서열의 정상적인 기능이 수행될 수 있도록 서로에 대한 구성으로 효소적 결찰 또는 다른 방법에 의한 2개 이상의 뉴클레오티드 서열의 공유 결합을 지칭한다. 예를 들어, 프리-서열 또는 분비 리더를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 폴리펩티드의 분비에 참여하는 프리-단백질로서 발현되는 경우 폴리펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다: 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고; 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 위치하는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0111] 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결되는 뉴클레오티드 서열이 인접하고, 분비 리더의 경우 인접하고 판독 단계에 있음을 의미한다. 연결은 편리한 제한 부위에서 결찰함으로써 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 표준 재조합 DNA 방법과 함께 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커가 사용된다.

[0112] *제어 서열 (Control sequences)*

[0113] 본 명세서 상, 용어 "제어 서열"은 본 발명에 있어서 폴리펩타이드의 발현에 필요하거나 유리한 모든 성분을 포함하는 서열을 지칭한다. 각각의 제어 서열은 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 대해 고유하거나 외래일 수 있다. 이러한 제어 서열은 리더, 폴리아데닐화 서열, 프로-펩티드 서열, 프로모터, 신호 펩티드 서열 및 전사 종결자를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 전형적으로, 제어 서열은 적어도 프로모터, 및 전사 및 번역 정지 신호를 포함한다. 제어 서열은 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 코딩 영역과 제어 서열의 결찰을 용이하게 하는 특정 제한 부위를 도입할 목적으로 링커와 함께 제공될 수 있다.

[0114] *발현 벡터 (Expression vector)*

[0115] 본 명세서 상, 용어 "발현 벡터"는 폴리펩타이드를 암호화하는 세그먼트를 포함하고 이의 전사를 제공하는 추가 세그먼트에 작동 가능하게 연결된 선형 또는 원형의 DNA 분자를 나타낸다.

[0116] *숙주 세포 (Host cell)*

[0117] 본 명세서 상, 용어 "숙주 세포"는 핵산 구조로 형질전환되기 쉬운 모든 세포 유형을 의미한다. 숙주 세포는 진핵 생물 또는 원핵 생물일 수 있다.

[0118] *재조합 (Recombinant)*

[0119] 본 명세서 상, 용어 "재조합"은 이종 (또는 외래) 핵산의 도입 또는 천연 핵산의 변경에 의해 변형된 세포, 바이러스, 뉴클레오타이드 또는 벡터 또는 단백질 또는 폴리펩타이드가 변형된 것을 의미한다. 이종 아미노산의 도입에 의해, 또는 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래된다는 것이다. 재조합 세포는 세포의 천연 (비재조합) 형태에서 발견되지 않는 핵산 서열 (예를 들어, 유전자)을 발현하거나 과소발현되거나 전혀 발현되지 않는 비정상적으로 발현되는 천연 핵산 서열 (예를 들어, 유전자)을 발현한다.

[0120] *시퀀스 동일성 (Sequence identity)*

[0121] 본 명세서 상, 용어 "시퀀스 동일성"은 본 발명에 있어서 각각 뉴클레오티드, 염기 또는 아미노산 수준에서 유전자 또는 단백질 간의 서열 동일성으로 정의된다. 구체적으로, DNA 서열의 전사체가 동일한 DNA 서열의 전사체가 동일한 RNA 서열로 전사될 수 있는 경우, DNA 및 RNA 서열은 동일한 것으로 간주된다.

[0122] 따라서, 본 명세서 상에서 "서열 동일성"은 아미노산 수준에서 단백질 간의 동일성의 척도이고 뉴클레오티드 수준에서 핵산간의 동일성의 척도이다. 단백질 서열 동일성은 서열이 정렬될 때 각 서열의 주어진 위치에서 아미노산 서열을 비교함으로써 결정될 수 있다. 유사하게, 핵산 서열 동일성은 서열이 정렬될 때 각 서열의 주어진 위치에서 뉴클레오티드 서열을 비교함으로써 결정될 수 있다.

[0123] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산의 동일성 퍼센트를 결정하기 위해, 서열은 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다 (예를 들어, 제2 아미노 또는 핵산 서열과의 최적 정렬을 위해 제1 아미노산 또는 핵산 서열의 서열에 갭이 도입될 수 있다). 상응하는 아미노산 이치 또는 뉴클레오타이드 위치에서 아미노산 잔기 또는 큐늘레오타이드를 비교한다. 첫 번째 서열의 위치가 두 번째 서열의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유될 때, 분자는 그 위치에서 동일하다. 두 서열 사이의 퍼센트 동일성은 서열이 공유하는 동일한

위치의 수의 함수이다 (즉,% 동일성 = 동일한 위치의 #/위치의 총 # (예를 들어, 겹치는 위치) X 100). 일 실시예에서, 2개의 서열은 동일한 길이이다.

[0124] 다른 일 양태에 있어서, 2개의 서열은 상이한 길이를 갖고 갭은 상이한 위치로서 보여진다. 수동으로 서열을 정렬하고 동일한 아미노산의 수를 계산할 수 있다. 대안적으로, 퍼센트 동일성의 결정을 위한 2개의 서열의 정렬은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 이러한 알고리즘은 (Altschul et al. 1990)의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 통합된다. BLAST 뉴클레오티드 검색은 NBLAST 프로그램, 점수 = 100, 단어 길이 = 12로 수행되어 본 발명의 핵산 분자와 상동성인 뉴클레오티드 서열을 얻을 수 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 점수 = 50, 단어 길이 = 3으로 수행되어 본 발명의 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 얻을 수 있다.

[0125] 비교 목적으로 갭 정렬을 얻기 위해 Gapped BLAST를 사용할 수 있다. 또는 PSI-Blast를 사용하여 분자 간의 먼 관계를 감지하는 반복 검색을 수행할 수 있다. NBLAST, XBLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용할 때 각 프로그램의 기본 매개변수를 사용할 수 있다. http://www.ncbi.nlm.nih.gov를 참조하라. 대안적으로, 서열 동일성은 예를 들어, EMBL 데이터베이스의 BLAST 프로그램 (www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST)에 의해 서열이 정렬된 후에 계산될 수 있다.

[0126] 일반적으로, “점수 매트릭스 (scoring matrix)” 및 “갭 패널티 (gap penalty)”의 예에 대한 기본 설정이 정렬에 사용될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, BLASTN 및 PSI BLAST 디폴트 설정이 유리할 수 있다.

[0127] 2개의 서열 사이의 퍼센트 동일성은 갭을 허용하거나 허용하지 않고 상기 기재된 것과 유사한 기술을 사용하여 결정될 수 있다. 퍼센트 동일성을 계산할 때 정확히 일치하는 항목만 계산된다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 어느 정도의 서열 변이를 갖는 본 발명의 서열에 관한 것이다.

[0128] *실질적으로 동종/동일 (Substantially homologous/identical)*

[0129] 본 명세서 상, 용어 “실질적으로 상동성” 또는 “실질적으로 동일한”은 2개의 핵산 또는 폴리펩타이드의 맥락에서 일반적으로 2개 이상의 서열을 지칭하거나 비교 알고리즘을 사용하거나 육안 검사에 의해 측정된 최대 일치를 위해 비교되고 정렬될 때 적어도 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 동일성을 갖는 하위 서열을 지칭한다.

[0130] 융합 독소 단백질 (Fusion toxin proteins)

[0131] 거대세포바이러스 (CMV)는 미성숙하거나 손상된 면역 기능을 가진 개인에서 임상적으로 중요한 기회주의적 바이러스 병원체이다. HCMV 감염 또는 질병의 예방, 예방 또는 치료에 사용되는 인간 CMV (HCMV)에 대해 승인된 모든 약물 요법은 바이러스 복제 기계를 표적으로 한다. 이 전략이 일부 환경에서 효과적이기는 했지만 현재 승인된 뉴클레오사이드 유사 약물은 다른 환경 (예를 들어, 폐, 심장-폐, 췌장 및 동종 조혈모세포 이식)에서 HCMV 질병을 예방하는데 실패하였다. 소분자 터미네이즈 억제제인 프레비미스 (Prevymis)도 바이러스 복제를 억제한다. 레터모비어는 바이러스 DNA 처리 및 패키징에 필요한 CMV DNA 터미네이즈 복합체(pUL51, pUL56, pUL89)를 억제한다. Prevymis 예방은 조혈 줄기 세포 수용자의 CMV 감염 및 질병을 억제한다. 중요하게도, 승인된 뉴클레오사이드 유사 약물은 심각한 신독성, 신경 독성 및 혈액학적 독성을 포함한 치료 제한 부작용이 있으며, 단일 돌연변이가 일반적으로 클래스 전체에 걸쳐 여러 약물에 대한 내성을 부여하는 약물 내성 균주의 빈번한 개발에 취약하다. 프레비미스는 일반적으로 사용하기에 안전한 것으로 간주되지만 프레비미스 예방은 여전히 고주파 (약 30%) 돌파 재활성화와 관련이 있다. 함께, 이러한 제한은 기존 치료법을 개선하거나 보완하고 내성 때문에 DNA 중합효소 억제제에 불응성인 질병을 치료하기 위한 새로운 작용 기전에 기반한 더 나은 전략의 필요성을 강조한다.

[0132] 본 발명에 있어서 바이러스로 인코딩된 7개 막횡단 (7TM) 케모카인 수용체의 발현을 통한 HCMV 감염 세포의 표적화를 기반으로 하는 HCMV 항바이러스 전략, US28을 제시한다. HCMV 항바이러스 전략은 독소 및 표적화 모이어티를 포함하는 키메라 분자인 면역독소에 의해 영향을 받는다.

[0133] CMV에 의해 세포가 감염되면, US28은 감염된 세포의 표면에 발현되어 주변 환경의 케모카인에 반응할 수 있게 된다. US28 수용체는 다양한 인간, 쥐 및 바이러스 암호화 CC 케모카인에 결합한다. 흥미롭게도, CX3C 케모카인인 프랙트알킨 (CX3CL1이라고도 함)은 US28에 매우 높은 친화력으로 결합하는 반면, 하나의 추가 수용체, 즉 동족 수용체인 CX3CR1만을 표적으로 삼아 CX3CL1 기반 면역독소 전략의 원치 않는 표적 외 효과의 가능성을 감소시킨다.

[0134] 또한, US28 수용체의 대부분의 세포 표면에서 멀리 떨어진 엔도솜 내에 국한되어 있다. 이 분포는 빠르고 구성

적이며, 리간드 독립적인 수용체 내재화의 결과이다. 따라서, US28에 결합하는 케모카인 또는 기타 화합물은 수용체를 발현하는 세포로 내재화 된다. 이론에 얽매이지 않고, 본 발명에 있어서 기술된 면역독소는 이러한 특징으로부터 이익을 얻고 US28에 결합하면 독소가 그의 세포독성 기능을 발휘할 수 있는 CMV 감염된 세포로 수송되는 것으로 고려된다.

[0135] 표적을 벗어난 인간 상동 수용체인 CX3CR1의 존재 때문에, 면역독소는 CX3CR1 발현 세포와 비교하여 US28 발현 세포에 대해 높은 친화도 및 효능을 갖는 것이 중요하다. 본 발명에 있어서, US28에 대한 표적화 모이어티는 천연 리간드 프랙트알킨에 기초하지만 아미노산 서열이 수정되고 개선되어 CMV 감염 또는 CMV 관련 질병의 치료 또는 예방을 위한 강력한 면역독소를 생성하는 펩티드인 면역독소가 제시된다.

[0136] 따라서, 본 발명의 일 측면은 다음을 포함하는 면역독소에 관한 것이다:

[0137] i) 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 표적화 모이어티 (targeting moiety):

[0138] a) 서열번호 1, 또는

[0139] b) 서열번호 1에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및

[0140] ii) 독소,

[0141] 상기 아미노산 잔기의 위치 49는 알라닌 (A) 잔기로 대체되고 아미노산 잔기의 위치 1 내지 6은 N-말단에서 아미노산 서열 ILDNGVS로 대체됨.

[0142] US28의 천연 리간드인 CX3CL1 (프랙트알킨)은 케모카인 도메인, 뮤신 줄기 및 CX3CL1을 세포막에 고정시키는 막횡단 도메인으로 구성된다. CX3CL1의 케모카인 도메인은 US28에 대해 높은 친화성을 가지고 있다. 본 발명에 있어서, 케모카인 도메인은 천연 인간 CX3CL1의 25번 내지 99번 위치에 해당하는 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열로 정의된다. 서열번호 1에 대한 핵심 돌연변이는 놀랍게도 강력한 면역독소를 생성하였다. 이론에 얽매이지 않고, 페닐알라닌에서 알라닌으로의 치환 및 표적화 모이어티 (ILDNGVS, 서열번호 13)의 변형된 N-말단 말단이 본 발명에 있어서 기재된 바와 같이 개선된 면역독소를 유발하는 것으로 여겨진다. 따라서, 유사한 기능적 특성을 갖는 많은 상이한 면역독소는 표적화 모이어티의 비-임계 단일 아미노산 또는 아미노산의 비-임계 영역을 변경함으로써 구성될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이고, 상기 b)의 아미노산 서열은 서열번호 1에 대해 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성, 적어도 99%의 서열동일성을 갖는 것이다. 본 발명의 다른 일 양태는 표적화 모이어티의 N-말단 서열이 QHHGVT (서열번호 14)가 아닌 본 발명에 있어서 기재된 면역독소에 관한 것이다.

[0143] 다른 경우에, 표적화 모이어티는 코어 돌연변이로만 변형된 프랙트알킨의 케모카인 도메인과 매우 유사한 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 표적화 모이어티가 서열번호 1이고, 상기 아미노산 잔기의 위치 49는 알라닌 (A) 잔기로 대체되고 아미노산 잔기의 위치 1 내지 6은 N-말단에서 아미노산 서열 ILDNGVS로 대체된다. 2개의 코어 돌연변이를 포함하는 이 표적화 모이어티는 또한 서열번호 2로 표시된다. 따라서, 본 발명에 있어서 바람직한 일 양태는 표적화 모이어티가 서열번호 2를 포함하는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다.

[0144] 면역독소는 재조합 또는 합성에 의해 생성될 수 있다. 재조합 생산의 경우, 번역은 개시제 tRNA에 결합된 메티오닌으로 시작된다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 같은 면역독소에 관한 것으로, 상기 표적화 모이어티의 아미노산은 N-말단 말단으로부터의 첫 번째 아미노산으로서 메티오닌(M) 잔기를 추가로 포함한다. 개시제 메티오닌(M)을 갖는 표적화 모이어티를 포함하는 면역독소는 서열번호 11로 표시된다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 표적화 모이어티가 서열번호 11을 포함하는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다.

[0145] 본 발명에 있어서 기재된 면역독소는 US28 수용체를 표적화함으로써 HCMV 감염된 세포에 특이적으로 세포독성 효과를 발휘한다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 표적화 모이어티가 US28 수용체에 결합하는 본 발명에 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 일 양태는 US28에 결합한 후에 면역독소가 내재화되는 본 발명에 있어서 기재된 면역독소에 관한 것이다.

[0146] US28 수용체는 인간 거대세포바이러스 오픈 리딩 프레임 US28에 의해 암호화된 G 단백질 결합 수용체이다. 본 명세서 상, US28 수용체는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는다. 그러나, US28은 상이한 변이체에 존재하고 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소의 표적화는 하나의 특정 변이체에 제한되지 않고 실질적

으로 상동성 또는 실질적으로 동일한 변이체까지 확장된다.

[0147] 따라서, 본 발명의 일 양태는 US28 수용체가 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다:

[0148] i) 서열번호 3, 또는

[0149] ii) 서열번호 3에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열.

[0150] 본 발명의 또 다른 일 양태는 US28 수용체가 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 본 발명에 있어서 기재된 면역독소에 관한 것이다:

[0151] i) 서열번호 3, 또는

[0152] ii) 서열번호 3에 대해 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열.

[0153] US28 수용체는 또한 유전적 수준에서 정의될 수 있다. 따라서, 본 명세서 상, US28 수용체는 서열번호 12로 표시되는 핵산서열에 의해 암호화된다. US28 수용체는 상이한 변이체에 존재하고 유전자 코드는 축퇴되기 쉬우므로, 그의 유전자 코드에 의해 정의된 US28 수용체는 하나의 단일 핵산에 제한되지 않고 실질적으로 상동성 또는 실질적으로 동일한 변이체까지 확장된다.

[0154] 따라서, 본 발명의 일 양태는 US28 수용체가 하기로부터 선택된 핵산 서열에 의해 코딩되는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다:

[0155] i) 서열번호 12, 또는

[0156] ii) 서열번호 12에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열.

[0157] 본 발명의 다른 일 양태는 US28 수용체가 하기로부터 선택된 핵산 서열에 의해 코딩되는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다:

[0158] i) 서열번호 12, 또는

[0159] ii) 서열번호 12에 대해 적어도 90%, 적어도 95%의 서열 동일성, 적어도 96%의 서열 동일성, 적어도 97%의 서열 동일성, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열.

[0160] 본 발명에 있어서 면역독소는 US28에 대해 강한 친화도 (Ki)로 결합하도록 설계되었다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 면역독소에 관한 것으로, 상기 면역독소는 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-11} M 이하로 US28에 결합한다. 결합 친화도 (Binding affinity)는 방사성 리간드로서 ^{125}I-CCL2 또는 ^{125}I-CX3CL1과 경쟁하여 분석된다. 정확한 분석은 실시예에서 추가로 설명된다.

[0161] 인간 상동 수용체인 CX3CR1은 바람직하지 않은 표적외를 나타내므로 면역독소가 CX3CR1에 대해 상대적으로 낮은 친화성을 갖는 것이 유리하다. 이것은 면역독소의 효능을 증가시킬 뿐만 아니라 건강한 세포가 면역독소 투여에 의해 영향을 덜 받기 때문에 부작용을 감소시킬 것이다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이고, 상기 인간 상동 수용체 CX3CR1에 대한 면역독소의 친화도는 CX3CR1에 대한 CX3CL1 (서열번호 1)의 친화도와 비교하여 적어도 100 배, 적어도 150 배, 200 배, 또는 적어도 250 배 감소된다. 본 발명의 또 다른 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이고, 상기 면역독소는 10^{-6} 이상의 Ki로 CX3CR1에 결합한다. 본 발명의 추가 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것으로, 상기 면역독소는 CX3CR1에 대한 친화도와 비교하여 US28에 대해 증가된 친화도를 가지며, 적어도 75 배, 적어도 100 배, 적어도 150 배, 200 배, 또는 적어도 250 배 증가되었다.

[0162] 이론에 얽매이지 않고, US28 수용체에 대한 결합을 담당하는 것은 주로 면역독소의 표적 부분인 것으로 추정된다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 표적화 모이어티가 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-11} M 이하의 Ki로 US28에 결합하는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 일 양태는 인간 상동 수용체 CX3CR1에 대한 표적화 모이어티의 친화도가 CX3CR1에 대한 CX3CL1 (서열번호 1)의 친화도와 비교하여 적어도 100 배, 적어도 150 배, 200 배, 또는 적어도 250 배 감소된, 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다. 본 발명의 추가 일 양태는 표적화 모이어티가 10^{-6} 이상의 Ki로

CX3CR1에 결합하는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것으로, 상기 표적화 모이어티는 CX3CR1에 대한 친화도와 비교하여 US28에 대한 증가된 친화도를 가지며, 적어도 75 배, 적어도 100 배, 150 배, 200 배, 또는 친화력이 250 배 증가하였다.

[0163] 인간 상동 수용체인 CX3CR1은 본 명세서 상, 서열번호 4에 따른 아미노산 서열로 표시될 수 있다. 그러나, 본 발명에 있어서 기재된 바와 같이 CX3CR1은 하나의 특정 변이체로 한정되지 않고, 실질질적으로 상동성 또는 실질적으로 동일한 변이체로도 확장된다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 CX3CR1 수용체가 서열번호 4에 따른 아미노산 서열을 포함하는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다.

[0164] 본 발명의 또 다른 일 양태는 CX3CR1 수용체가 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다:

[0165] i) 서열번호 4, 또는

[0166] ii) 서열번호 4에 대해 적어도 80% 서열 동일성, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열.

[0167] 이론에 얽매이지 않고, 면역독소의 독소는 CMV 감염된 세포에 대한 면여독소의 결합 및 내재화에 기여하지 않는다. 따라서, 면역독소는 광범위한 독소를 이용하여 기능적이다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것으로, 상기 독소는 외독소, 내독소, 효소 독소, 기공 형성 독소, 초항원 및 리보솜 불활성화 단백질 (RIP)로 이루어진 군 중에서 하나 이상으로부터 선택된다. 본 발명의 다른 일 양태는 독소가 리보솜 불활성화 단백질 (RIP)인 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다. 본 발명의 추가 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이고, 상기 독소는 슈도모나스 외독소 A (Pseudomonas exotoxin A), 젤로닌 (gelonin), 부가닌 (bouganin), 사포린 (saporin), 리신 (ricin), 리신 A 사슬 (ricin A chain), 브리오딘 (bryodin), 디프테리아 (diphtheria), 리스트릭톡신 (restrictocin), 디프테리아 독소 (diphtheria toxin), 및 이들의 단편 또는 변이체로 이루어진 군 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0168] 슈도모나스 외독소 A는 신장인자 2 (Elongation factor 2)를 수정하는 아데노신 디포스페이트-리보실화 도메인을 통해 세포를 죽일 수 있는 매우 강력한 독소로, 이는 단백질 합성의 정지 및 세포자멸사의 개시를 유도한다. 따라서, 본 발명의 실시양태는 독소가 슈도모나스 외독소 A (서열번호 5) 또는 이의 단편인 본원에 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다.

[0169] 슈도모나스 외독소 A는 각각 전위 (도메인 II) 및 세포독성(도메인 Ib 및 III)과 관련된 도메인을 포함한다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이고, 상기 독소는 결합 도메인 (도메인 II, 서열번호 6), 중간 도메인 (도메인 Ib, 서열번호 7) 및 ADP-리보실화 도메인 (도메인 III, 서열번호 8)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단편을 포함한다. 본 발명의 바람직한 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이고, 상기 독소는 슈도모나스 외독소 A의 결합 도메인(도메인 II, 서열 번호 6) 및 ADP-리보실화 도메인(도메인 III, 서열 번호 8)을 포함한다.

[0170] 슈도모나스 외독소 A의 변형체에서, C-말단 끝은 세포독성을 증가시키도록 변형된다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이고, 상기 ADP-리보실화 도메인의 C-말단 아미노산 서열 REDLK (서열번호 15)는 아미노산 서열 KDEL (서열번호 16)로 대체된다. 본 발명의 바람직한 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이고, 상기 독소는 PE38KDEL (서열번호 9)이다.

[0171] 본 발명의 또 다른 바람직한 일 양태는 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이고, 상기 면역독소는 서열번호 9 및 서열번호 2를 포함한다. (i) 위치 49의 아미노산 잔기가 알라닌(A) 잔기 및 위치 1 내지 6의 아미노산 잔기로 대체된 서열번호 1인 표적화 모이어티의 조합을 포함하는 면역독소는 N-말단에서 아미노산 서열 ILDNGVS로 대체되고, (ii) PE38KDEL인 독소는 서열번호 10으로 표시된다. 따라서, 본 발명의 추가적인 바람직한 일 양태는 면역독소가 서열번호 10을 포함하는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이다.

[0172] 본 명세서 상 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명에 있어서 기재된 면역독소는 CX3CR1 발현 세포와 비교하여 US28 발현 세포에 대해 놀랍게도 높은 효능을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소에 관한 것이고, 상기 면역독소는 CX3CR1을 발현하는 세포에 대한 효능과 비교하여 US28을 발현하는 세포에 대해 증가된 효능, 적어도 150 배, 예를 들어, 175 배, 또는 적어도 200 배, 적어도 225 배,

적어도 250 배 효능이 증가된 것이다.

[0173] 본 발명에 있어서 기재된 면역독소는 의학적 용도를 위한 것이며, 따라서 약제학적 조성물의 일부를 형성할 수 있다. 의학적 용도를 위해, 면역독소는 약학적으로 허용가능한 염으로 제형화 될 수 있다. 약학적 조성물은 의학적 사용을 위한 표준이고 당업자에게 공지되어 있는 요소를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 측면은 본 발명에 있어서 기재된 면역독소 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0174] 본 발명의 또 다른 일 양태는 제약상 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 본 발명에 있어서 기재된 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0175] 본 발명의 일 측면은 의약적 용도로 사용하기 위한 본 발명에 있어서 기재된 면역독소 또는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0176] 바람직하게는, 본 발명에 있어서 기재된 면역독소는 CMV 감염의 치료 또는 예방을 위한 것이다. 면역독소는 이를 필요로 하는 개체에게 유효량으로 투여된다. 개인은 CMV이 감염된 사람 또는 CMV에 감염될 위험이 있는 사람이다.

[0177] 따라서, 본 발명의 추가적인 일 측면은 CMV 감염 또는 CMV 관련 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소 또는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 일 양태는 CMV 감염 또는 CMV 관련 질병의 치료 또는 예방이 (i) 환자의 생체내 또는 (ii) 세포 또는 기관의 생체외인 본 발명에 있어서 기재된 면역독소의 용도에 관한 것이다.

[0178] 면역독소는 또한 의약 제조의 구성 성분일 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 CMV 감염 또는 CMV 관련 질병의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조를 위한 본 발명에 있어서 기재된 면역독소의 용도에 관한 것이다.

[0179] CMV 감염은 신체 내 다양한 위치에서 발생할 수 있으며, 두 가지 전체 그룹은 조직과 체액이다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 CMV 감염이 다음과 같이 본 발명에 있어서 기재된 바와 같이 사용하기 위한 면역독소 또는 제약 조성물에 관한 것이다:

[0180] i) 망막, 각막, 심장, 간, 신장, 폐, 위장 조직, 흉선, 비장,피부 및 근육으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 조직, 및/또는

[0181] ii) 타액, 혈액, 소변, 정액 및 모유로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 체액.

[0182] CMV는 대부분의 개인이 일생 동안 감염되는 매우 흔한 바이러스이다. 따라서, 세계 인구의 대다수는 바이러스에 대한 항체를 생산했을 가능성이 가장 높으며 1차 감염 이후의 증상은 대부분의 경우에 없다. 그러나 바이러스는 숙주에 잠복해 있어 면역체계가 약화되는 즉시 잠복기에서 깨어날 수 있다. 따라서 CMV는 면역체계가 약화된 개인에게 큰 위험을 초래하는 바이러스이다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같이 사용하기 위한 면역독소 또는 제약 조성물에 관한 것이고, 상기 CMV 감염은 면역 저하 환자의 감염 (immuno-compromised patient)이다. 본 발명의 또 다른 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같이 사용하기 위한 면역독소 또는 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 CMV 감염은 HIV환자, 신생아 및 면역억제환자, 골수이식환자, 고형장기이식환자, 면역치료환자, 암환자, 중환자실환자, 외상환자, 줄기세포환자, 유전자치료환자, 세포치료환자, 노인환자 및 복합상병환자로 이루어진 군에서 선택된 면역저하 환자의 감염이다. 본 발명의 추가적인 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같이 사용하기 위한 면역독소 또는 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 CMV 감염은 면역이 손상될 위험이 있거나/또는 계획된 개체의 감염이다. 본 발명의 또 다른 일 양태는 CMV 감염이 관상 질환 및/또는 혈관 질환을 앓고 있는 환자의 감염인 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 사용을 위한 면역독소 또는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 일 양태는 CMV 감염이 잠복 CMV 감염인 본 발명에 기재된 발명과 같은 사용을 위한 면역독소 또는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0183] 면역독소는 임의의 통상적인 경로로 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같이 사용하기 위한 면역독소 또는 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 면역독소 또는 약학적 조성물은 경구, 비경구, 정맥내, 피내 및 국소 투여로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 경로를 통해 투여된다. 본 발명의 또 다른 일 양태는 면역독소 또는 약학적 조성물이 생체외 (*ex vivo*)에서 세포 또는 기관에 투여되는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 사용을 위한 면역독소 또는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0184] 면역독소는 하나 이상의 추가 치료제가 투여되는 조합 치료의 일부일 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 사용을 위한 면역독소 또는 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 면역독소 또는 약학적 조성물은 하나 이상의 추가 치료제와 동시, 개별 또는 순차적 투여를 위한 것이다. 본 발명의 또 다른

일 양태는 치료제가 항바이러스제, 면역억제제 및 조절제로 이루어진 군으로부터 선택되는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 사용을 위한 면역독소 또는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0185] 면역독소는 병용 요법으로 용이한 투여를 위해 다른 치료제와 함께 포장될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 측면은 다음을 포함하는 키트에 관한 것이다:

[0186] i) 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소 또는 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 약학적 조성물,

[0187] ii) 하나 또는 이상의 추가 치료제, 및

[0188] iii) 선택적으로, 사용을 위한 지침

[0189] 상기 i) 및 ii)는 동시, 개별 또는 순차 투여를 위한 것임.

[0190] 면역독소는 바람직하게는 재조합 발현 시스템을 사용하여 생산된다. 적합한 재조합 발현 시스템은 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 재조합 발현을 위해서는; 관심 펩티드 서열을 코딩하는 핵산, 발현 벡터 및 발현 시스템(재조합 발현을 위한 세포주)를 필요로 한다. 따라서, 본 발명의 일 측면은 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 면역독소를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 서열에 관한 것이다. 본 발명의 일 구체예는 핵산에 관한 것으로, 상기 핵산 서열은 다음으로부터 선택된다:

[0191] i) 서열번호 20, 또는

[0192] ii) 서열번호 20에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열.

[0193] 면역독소의 개별 부분을 암호화하는 핵산은 발현 시스템, 즉 세포에 도입하기 위해 발현 벡터에서 조립된다. 따라서, 본 발명의 또 다른 일 측면은 적합한 숙주에서 면역독소의 생산을 지시하기에 적합한 하나 이상의 제어 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명에 있어서 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.

[0194] 발현벡터는 임의의 통상적인 방법을 사용하여 숙주 세포에 도입되고 조건은 관심 펩티드 서열의 재조합 발현을 선호하도록 조성된다. 따라서, 본 발명의 일 측면은 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 발현벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포에 관한 것이다. 본발명의 다른 일 측면은 다음의 단계를 포함하는 본 발명에 있어서 기재된 면역독소의 생산 방법에 관한 것이다:

[0195] i) 본 발명에 있어서 기재된 바와 같은 숙주 세포의 제공,

[0196] ii) 면역독소의 발현을 위해 적합한 조건 하에 숙주 세포를 배양; 및

[0197] iii) 면역독소 분리.

[0198] 본 발명의 일 양태는 숙주 세포가 진핵 (eukaryotic) 또는 원핵 (prokaryotic) 생물인 본 발명에 있어서 기재된 방법에 관한 것이다.

[0199] 본 발명의 일 측면 중 하나와 관련하여 설명된 일 실시예 및 특징은 본 발명의 다른 일 측면에도 적용된다는 점에 유의해야 한다. 본 발명의 일 실시예 및 특징인 또한 다음 항목에 요약되어 있다.

[0200] 아이템

[0201] 1. 다음을 포함하는 면역독소:

[0202] i) 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 표적화 모이어티 (targeting moiety)

[0203] a) 서열번호 1, 또는

[0204] b) 서열번호 1에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및

[0205] ii) 독소,

[0206] 상기 아미노산 잔기의 위치 49는 알라닌 (A) 잔기로 대체되고 아미노산 잔기의 위치 1 내지 6은 N-말단에서 아미노산 서열 ILDNGVS로 대체됨.

[0207] 2. 항목 1에 따른 면역독소에 있어서, 상기 b)의 아미노산 서열은 서열번호 1에 대해 적어도 90%의 서열 동일성, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 것이다.

[0208] 3. 전술한 항목 중 어느 하나의 면역독소에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 서열 2를 포함한다.

[0209] 4. 전술한 항목 중 어느 하나의 면역독소에 있어서, 상기 표적화 모이어티의 아미노산은 N-말단 끝으로부터의 첫 번째 아미노산으로서 메티오닌 (M) 잔기를 추가로 포함한다.

[0210] 5. 전술한 항목 중 어느 하나의 면역독소에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 US28 수용체에 결합한다.

[0211] 6. 항목 5에 따른 면역독소에 있어서, 상기 US28 수용체는 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0212] i) 서열번호 3, 또는

[0213] ii) 서열번호 3에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열.

[0214] 7. 전술한 항목 중 어느 한 아이템에 기재된 면역독소에 있어서, 상기 면역독소는 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-11} M 이하의 Ki로 US28에 결합한다.

[0215] 8. 전술한 항목 중 어느 하나의 면역독소에 있어서, 상기 인간 상동 수용체 CX3CR1에 대한 면역독소의 친화도는 CX3CR1에 대한 CX3CL1 (서열번호 1)의 친화도와 비교하여 적어도 100 배, 적어도 150 배, 적어도 200 배, 적어도 250 배 감소된다.

[0216] 9. 전술한 항목 중 어느 하나의 면역독소에 있어서, 상기 면역독소는 10^{-6} 이상의 Ki로 CX3CR1에 결합한다.

[0217] 10. 전술한 항목 중 어느 하나의 면역독소에 있어서, 상기 면역독소는 CX3CR1에 대한 친화도와 비교하여 US28에 대한 친화도가 증가하며, 적어도 75 배, 적어도 100 배, 적어도 150 배, 적어도 200 배, 또는 적어도 250 배 친화도가 증가하였다.

[0218] 11. 전술한 항목 중 8 내지 10 중 어느 하나에 따른 면역독소에 있어서, 상기 CX3CR1 수용체는 서열번호 4에 따른 아미노산 서열을 포함한다.

[0219] 12. 전술한 항목 중 어느 한 항에 기재된 면역독소에 있어서, 상기 면역독소는 US28에 결합한 후에 내재화된다.

[0220] 13. 전술한 항목 중 어느 한 항에 기재된 면역독소에 있어서, 상기 독소는 슈도모나스 외독소 A (Pseudomonas exotoxin A), 젤로닌 (gelonin), 부가닌 (bouganin), 사포린 (Saporin), 리신 (Ricin), 리신 A (Ricin A) 사슬, 브리오딘 (Bryodin), 디프테리아 (Diphtheria), 리스트릭톡신 (Restrictocin), 디프테리아 독소 (Diphtheria toxin), 및 이의 단편 또는 변이체로 이루어진 군 중 하나 이상으로부터 선택된 것이다.

[0221] 14. 전술한 항목 중 어느 한 항에 기재된 면역독소에 있어서, 상기 독소는 슈도모나스 외독소 A (서열번호 5) 또는 이의 단편이다.

[0222] 15. 14항에 기재된 면역독소에 있어서, 상기 독소는 결합 도메인 (도메인 II, 서열번호 6), 중간 도메인 (도메인 Ib, 서열번호 7) 및 ADP-리보실화 도메인 (도메인 III, 슈도모나스 외독소A의 서열 8)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함한다.

[0223] 16. 15항에 기재된 면역독소에 있어서, 상기 ADP-리보실화 도메인의 C-말단 아미노산 서열 REDLK (서열번호 15)는 아미노산 서열 KDEL(서열번호 16)로 대체된다.

[0224] 17. 16항에 기재된 면역독소에 있어서, 상기 독소는 PE38KDEL (서열번호 9)이다.

[0225] 18. 전술한 항목 중 어느 한 항에 기재된 면역독소에 있어서, 상기 면역독소는 서열번호 9 및 서열번호 2를 포함한다.

[0226] 19. 전술한 항목 중 어느 한 항에 기재된 면역독소에 있어서, 상기 면역독소는 서열번호 10을 포함한다.

[0227] 20. 전술한 항목 중 어느 한 항에 기재된 면역독소에 있어서, 상기 면역독소는 CX3CR1을 발현하는 세포에 대한 효능과 비교하여 US28을 발현하는 세포에 대해 적어도 150 배, 예를 들어, 175 배, 또는 적어도 200 배, 적어도 225 배, 적어도 250 배 증가된 효능을 가진다.

[0228] 21. 전술한 항목 중 어느 한 항에 기재된 면역독소 또는 이의 제약상 허용되는 염을 포함하는 약학적 조성물.

[0229] 22. 21항에 기재된 약학적 조성물에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형

제를 포함한다.

[0230] 23. 의약적 용도로 사용하기 위한 항목 1 내지 20 중 어느 한 항에 기재된 면역독소 또는 항목 21 또는 22 중 어느 한 항에 기재된 약학적 조성물.

[0231] 24. CMV 감염 또는 CMV 관련 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 항목 1 내지 20 중 어느 한 항에 기재된 면역독소 또는 항목 21 또는 22 중 어느 한 항에 기재된 약학적 조성물.

[0232] 25. 항목 24에 기재된 면역독소에 있어서, CMV 감염이 다음에 존재하는 면역독소 또는 약학 조성물:

[0233] i) 망막, 각막, 심장, 간, 신장, 폐, 위장관 조직, 흉선, 비장, 피부 및 근육으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 조직, 및/또는

[0234] ii) 타액, 혈액, 소변, 정액 및 모유로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 체액.

[0235] 26. 항목 24 또는 25 중 어느 하나에 따른 면역독소 또는 약학적 조성물의 사용 용도에 있어서, 상기 CMV 감염은 HIV-환자, 신생아 및 면역 억제 환자, 골수 이식 환자, 고형 장기 이식 환자, 면역 요법 환자, 암 환자, 집중 치료 환자, 외상환자, 줄기세포 환자, 유전자치료 환자, 세포치료 환자, 노인환자 및 복합상병 환자로 이루어진 군에서 선택된 면역 저하 환자의 감염이다.

[0236] 27. 항목 24 또는 25 중 어느 하나에 따른 면역독소 또는 약학적 조성물의 사용 용도에 있어서, 상기 CMV 감염은 관상 동맥 질환 및/또는 혈관 질환을 앓고 있는 환자의 감염이다.

[0237] 28. 항목 24 내지 27 중 어느 하나에 따른 면역독소 또는 약학적 조성물의 사용 용도에 있어서, 상기 CMV 감염은 잠복 CMV 감염이다.

[0238] 29. 항목 24 내지 28 중 어느 하나에 따른 면역독소 또는 약학적 조성물의 사용 용도에 있어서, 상기 면역독소 또는 약학적 조성물은 경구, 비경구, 정맥내, 피내, 피하 및 국소 투여로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 경로를 통해 투여된다.

[0239] 30. 항목 23 내지 29 중 어느 하나에 따른 면역독소 또는 약학적 조성물의 사용 용도에 있어서, 상기 면역독소 또는 약학적 조성물은 하나 이상의 추가 치료제와 동시, 개별 또는 순차적 투여를 위한 것이다.

[0240] 31. 항목 30에 따른 면역독소 또는 약학적 조성물의 사용 용도에 있어서, 상기 치료제는 항바이러스제, 면역억제제 및 조절제로 이루어진 군에서부터 선택된다.

[0241] 32. 다음을 포함하는 키트:

[0242] i) 항목 1 내지 20에 따른 면역독소 또는 항목 21 또는 22에 따른 약학적 조성물,

[0243] ii) 하나 이상의 추가 치료제, 및

[0244] iii) 선택적으로, 사용을 위한 지침,

[0245] 상기 i) 및 ii)는 동시, 개별 또는 순차 투여를 위한 것임.

[0246] 33. 항목 1 내지 20 중 어느 하나에 따른 면역독소를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산서열.

[0247] 34. 적합한 숙주에서 면역독소의 생산을 지시하기에 적합한 하나 이상의 제어 서열에 작동가능하게 연결된 항목 33에 따른 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 발현벡터.

[0248] 35. 항목 34에 따른 발현벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포.

[0249] 36. 하기 단계를 포함하는 항목 1 내지 20 중 어느 하나에 따른 면역독소의 생산 방법:

[0250] i) 항목 35에 따른 숙주 세포를 제공하는 단계,

[0251] ii) 면역독소의 발현에 적합한 조건하에서 숙주 세포를 배양; 및

[0252] iii) 면역독소를 분리.

[0253] 본 출원에 인용된 모든 특허 및 비특허 참고 문헌은 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0254] 본 발명은 이제 다음의 비제한적인 실시예에서 더욱 상세하게 설명될 것이다.

발명의 효과

[0255] 본 발명은 CMV 감염과 관련된 질병을 치료하는데 유용한 면역독소에 관한 것이다. 본 발명은 또한 약제로서의 면역독소 및 면역독소를 포함하는 약제학적 조성물, 및 면역독소를 포함하는 CMV 감염의 치료 또는 예방용 키트에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0256] 도 1은 SYN001 (검은색 기호) 및 SYN004 (흰색 기호)를 비교하는 방사성 리간드로 ^{125}I-CCL2를 사용하는 US28-발현 HEK293 세포(원)의 안정한 유도성 클론에서 경쟁 결합 실험을 보여준다.

도 2는 ^{125}I-CX3CL1을 방사선 리간드로 사용하는 CX3CR1 발현 HEK293 세포 (사각형)의 안정한 유도성 클론에서 SYN001 (검은색 기호)과 SYN004 (흰색 기호)를 비교한 경쟁 결합 실험을 보여준다.

도 3은 SYN000 (검은색 기호) 및 SYN003 (흰색 기호)을 비교하는 방사성 리간드로 ^{125}I-CCL3를 사용하는 US28-발현 HEK293 세포(원)의 안정한 유도성 클론에서 경쟁 결합 실험을 보여준다.

도 4는 ^{125}I-CX3CL1을 방사성 리간드로 사용하여 CX3CR1을 발현하는 HEK293 세포 (사각형)의 안정한 유동성 클론에서 경쟁 결합 실험을 SYN000 (검은색 기호) 및 SYN003 (흰색 기호)과 비교한 결과를 보여준다.

도 5는 US28-발현 HEK293 세포 (원) 및 CX3CR1-발현 HEK293 세포 (사각형)의 안정한 유도성 클론에서 SYN001 (검정색 기호)과 SYN004 (흰색 기호)를 비교한 사멸 실험을 보여준다.

도 6은 US28-발현-HEK293 세포 (원) 및 CX3CR1-발현 HEK293 세포 (사각형)의 안정한 유도성 클론에서 SYN000 (검정색 기호)과 SYN003 (흰색 기호)을 비교한 사멸 실험을 보여준다.

도 7은 도메인 구조 (Domain structure)의 개략도를 보여주며; (i) 인간 CX3CL1 (SS = 신호 서열, CX3CL1 = 케모카인 (chemokine) 도메인, 줄기 = 뮤신 유사 줄기 (Mucin-like stalk), M = 막 스패닝 부분 및 C = 세포질 도메인 (cytoplasmic domain)), 및 (ii) 녹농균 외독소 A (SS = 신호 서열, 도메인 I = 수용체 결합 도메인, 도메인 II = 전위 도메인, Ib = 미지의 기능을 갖는 도메인 Ib 및 도메인 III = 효소 활성 도메인). 전구체 단백질의 아미노산 번호는 각 단백질 위에 표시된다. 디설피드 브리지 (Disulphide bridge)는 관련된 아미노산의 번호와 함께 대괄호로 각 단백질 아래 표시된다. 푸린 (Furin)은 외독소 A의 도메인 II의 아미노산 304 및 305 사이를 절단한다.

도 8은 원료 의약품 후보의 개략도를 보여준다. 주어진 도메인의 돌연변이는 면역독소의 기반이 되는 천연 단백질 (즉, 인간 CX3CL1 또는 녹농균 외독소 A)의 아미노산 위치에 해당하는 번호와 함께 관련된 아미노산의 단일 문자 코드로 작성된다. 예를 들어, C312S는 312번 위치의 시스테인 (Cysteine)이 세린 (Serine)으로 치환되었음을 의미한다. 단일 문자 코드는 구조의 N 및 C 말단과 도메인 사이에서도 사용된다. 두 도메인 사이의 점선은 아미노산이 연결되어 있음을 보여준다.

본 발명은 이제 하기에서 더 상세히 설명될 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0257] 실시예 1. 융합 단백질 SYN000, SYN001, SYN003 및 SYN004의 제조

[0258] *면역독소의 구조*

[0259] 본 발명에 있어서 US28을 특이적으로 표적화하도록 설계된 일련의 면역독소를 개시한다. 이들은 케모카인 CX3CL1 (프랙트알카인) 및 슈도모나스 에어러지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)의 외독소 A를 기반으로 한다 (둘 다 도 7에 표시함). 약물 물질 후보 SYN000 (서열번호 17), SYN001 (서열번호 18), SYN003 (서열번호 19) 및 SYN004 (서열번호 10)는 Ca로 구성된 단일 폴리펩티드 사슬이다. 도 8과 같은 도메인 구조를 가진 400개 아미노산.

[0260] *면역독소의 생산*

[0261] 면역독소는 대장균 (E.coli)에서 불용성 단백질 응집체 (봉입체, IB's)로 생성된다. 원료의약품 제조 공정은 3단계의 가공으로 구성된다: 세포 배양 및 수확, 회수 및 정제. E.coli 배양 단계는 높은 수준의 약물 물질

(Drug substance)을 포함하는 IB가 생산되는 곳이다. IB는 일련의 세척 및 원심분리를 통해 회수된다. 정제과정은 IB 가용화, 산화환원 커플을 포함하는 인산염 완충액에 대한 투석에 의한 재접힘, AEX 및 GF-크로마토그래피 방법으로 구성되어 순수한 약물 물질을 얻는다.

[0262] 실시예 2. US28 및 CX3CR1에 대한 SYN000, SYN001, SYN003 및 SYN004의 친화도 (Ki 값)

[0263] *수용체 경쟁 바인딩*

[0264] US28-HEK293 세포 및 CX3CR1-HEK293 세포의 안정적인 유도성 클론은 10% 소태아 혈청과 180 units/mL 페니실린 및 45 ug/mL 스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) GlutaMAX (GIBCOR)에서 10% CO_2 및 37 ℃의 가습 인큐베이터로 성장시켰다. 세포를 100 uL 성장 배지의 폴리-D-리신 (Invitrogen) 코팅 96 웰 조직 배양 플레이트 (Nunc)에 웰당 10,000개 세포로 시딩하였다. 파종 하루 후, US28 및 CX3CR1 발현은 테트라사이클린 (5ng/mL)에 의해 유도되어 5 내지 10% 특이적 결합을 얻었다. 경쟁 결합 연구는 유도 후 1일에 이중으로 수행되었다. 간단히 말해서, 세포를 4-(2-하이드록시에틸 (2-hydroxyethyl))-1-피페라진에탄설폰산 (HEPES; piperazineethanesulfonic acid) 완충액 (50 mM HEPES, 5mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, pH 7.2) 및 0.5% 소 혈청 알부민으로 이루어진 결합 완충액에서 2회 세척하였다. 그 후 세포를 100 uL 결합 완충액에서 ~25 pM의 ^{125}I-CX3CL1 (또는 ^{125}I-CCL2)과 5 uL의 표지되지 않은 리간드, 즉, 면역독소 또는 상동 케모카인과 함께 4 ℃에서 3시간 동안 인큐베이션 하였다. 그 후 세포를 0.5 M NaCl이 보충된 4 ℃ 결합 완충액으로 두 번 세척하였다. 마지막 단계로서 세포를 180 uL의 200 mM NaOH 및 1% 나트륨 도데실설페이트 용해 완충액으로 용해시켰다. 데이터는 감마 계수기 (1470 Wizard)를 사용하여 수집되었다. Ki 값은 IC50(특이하게 결합된 방사성 리간드의 50% 변위를 나타내는 비표지 리간드의 농도), [L](방사성 리간드 농도), Cheng-Prusoff 방정식을 사용한 Kd(방사선 리간드의 해리 상수), 식 (I)으로 계산되었다:

[0265] [계산식 1]

[0266] $$Formula(I): K_{i=IC50/(1}+([L]/K_d))$$

[0267] *결과*

[0268] 방사성 리간드로서의 ^{125}I-CCL2: SYN000은 도 1 및 3 및 표 1에 나타낸 바와 같이 US28에 대해 각각 -8.67의 친화도 (Log Ki), -7.96의 SYN001, -8.36의 SYN003 및 -7.36의 SYN004로 결합한다.

[0269] 방사성 리간드로서의 ^{125}I-CX3CL1: SYN000은 도 2 및 4, 표 1에 나타낸 바와 같이 각각 -6.86의 친화도(Log Ki), -5.00의 SYN001, -7.72의 SYN003 및 -5.22의 SYN004로 CX3CR1에 결합한다.

[0270] 수용체 경쟁 바인딩

표 1

[0271]

	SYN000 US28	SYN000 CX3CR1	SYN003 US28	SYN003 CX3CR1	SYN001 US28	SYN001 CX3CR1	SYN004 US28	SYN004 CX3CR1
Log K_i	-8.67 ± 0.16	-6.86 ± 0.07	-8.36 ± 0.12	-7.72 ± 0.08	-7.96 ± 0.09	-5.00 ± 0.19	-7.36 ± 0.13	-5.22 ± 0.13
Ratio US28/ CX3CR1	64.6		4.37		912		138	
Ratio F1-alone F1-F49A	0.07				0.15			

[0272] 도입된 N-말단 아미노산 서열은 US28에 대한 친화력을 2 배 정도 낮추는 것으로 보인다; SYN000 (log Ki -8.67)에 비해 SYN003 (log Ki -8.36), 및 4 배; SYN001 (log Ki -7.96)에 비해 SYN004 (log Ki -7.36).

[0273] 대조적으로 N-말단 아미노산 서열은 CX3CR1에 대한 친화도를 7 배 약간 증가시킨다; SYN000 (log Ki -6.86)에 비해 SYN003 (log Ki -7.72), 및 1.7 배; SYN001 (log Ki -5.00)에 비해 SYN004 (log Ki -5.22).

[0274] *결론*

[0275] 전반적으로, 면역독소에서 N-말단 아미노산 서열 (F1 돌연변이)의 도입은 US28에 대한 친화도를 감소시키고 CX3CR1에 대한 친화도를 증가시킨다. 결과적으로, SYN003 및 SYN004는 각각 SYN000 및 SYN001보다 CX3CR1보다 US28에 대한 선호도가 낮다 (폴드 변경은 1 미만, 표 1 참조).

[0276] 실시예 3. 유도된 US28 HEK293 세포 및 유도된 CX3CR1 HEK293 세포에 대한 SYN000, SYN001, SYN003 및 SYN004의 효능

[0277] *시험관내 효능 (In vitro potency)*

[0278] US28-HEK293 및 CX3CR1-HEK293 세포 및 순수 HEK293 세포의 안정한 유도성 클론은 10% 소태아 혈청과 180 units/mL 페니실린 및 45 ug/mL 스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco's GlutaMAX (GIBCOR)에서 10% CO_2 및 37 ℃의 가습 인큐베이터로 성장시켰다. 세포는 100μL 성장 배지에서 폴리-D-리신(Invitrogen) 코팅된 96웰 조직 배양 플레이트 (Nunc)에 웰당 11,000개의 세포로 시딩되었다. 수용체 발현은 0.125 μg/mL (US28) 및 0.5 μg/mL (CX3CR1) 테트라사이클린 (tetracycline)을 사용하여 접종 후 24시간 동안 유도되었다. 표시된 면역독소 (0.01 μM-0.1pM)와 완충액 (모의 처리)의 다른 농도를 100 μL 성장 배지의 최종 부피에서 수용체 유도 1일 후에 추가하고 37 ℃에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 생존력을 추정하기 위해 세포를 웰당 100 μL의 성장 배지와 1:10으로 혼합된 AlamarBlue (Invitrogen)와 함께 37 ℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. FlexStation 3 (Molecular Devices) 플레이트 판독기를 사용하여 데이터를 수집했으며, 여기서 형광은 540 nm 파장에서 여기 및 585 nm 파장에서 방출을 판독하여 측정되었다. 세포 생존율은 면역독소의 다른 농도에서 결정되었고 IC50 값은 50% 세포 생존율에서 추출되었다. 상응하는 참조값은 Cycloheximide의 존재 (0% 세포 생존) 및 면역독소 또는 Cycloheximide의 부재 (100% 세포 생존)에서 얻었다.

[0279] *결과*

[0280] 도 5 및 6, 그리고 표 2는 SYN000, SYN001, SYN003, SYN004의 효능을 보여준다. US28에서 효능은 SYN000, SYN003 및 SYN004가 SYN001보다 US28에서 약간 더 높은 효능을 갖는 경향과 유사하다. CX3CR1에서 SYN003 및 SYN000은 SYN001 및 SYN004보다 더 높은 효능을 갖고 SYN004는 CX3CR1에서 SYN001보다 약간 더 낮은 효능을 갖는 등 CX3CR1의 효능이 크게 다르다.

[0281] 역가는 각 면역독소의 사멸 특이성, 즉 CX3CR1을 발현하는 세포보다 US28을 발현하는 세포를 특이적으로 사멸시키는 면역독소의 능력을 계산하는 데 사용될 수 있다. 사멸 특이성은 표에서 배수 변화로 보고되며, SYN000에 대해 8.91 배 변화, SYN003에 대해 7.08 배 변화, SYN001에 대해 501 배 변화 및 SYN004에 대해 1175 배 변화를 보여준다.

[0282] 면역독소의 효능

표 2

[0283]

	SYN000 US28	SYN000 CX3CR1	SYN003 US28	SYN003 CX3CR1	SYN001 US28	SYN001 CX3CR1	SYN004 US28	SYN004 CX3CR1
Log IC50	-11.03 ± 0.15	-10.08 ± 0.10	-11.01 ± 0.11	-10.16 ± 0.12	-10.82 ± 0.15	-8.12 ± 0.15	-10.99 ± 0.17	-7.92 ± 0.18
Ratio US28/ CX3CR1	8.91		7.08		501		1175	
Ratio F1-alone F1-F49A	0.82				2.35			

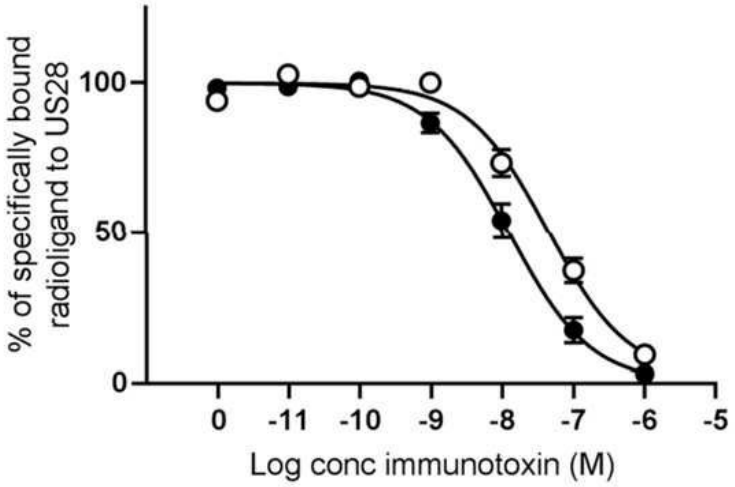
[0284] *결론*

[0285] SYN000에 F1 서열의 추가 (SYN003 생성)가 증가된 사멸 특이성에 기여하지 않는다는 것이 입증되었으나 (비율은 1 미만, 표 2 참조), 반면 SYN001에 F1 서열을 추가하면 (SYN004가 생성됨) 사멸 특이성이 2.35 배 증가한다. 결과적으로, 감소된 선택성에도 불구하고 (실시예 2 참조), SYN004는 놀랍게도 상당히 개선된 면역독소, 즉 증

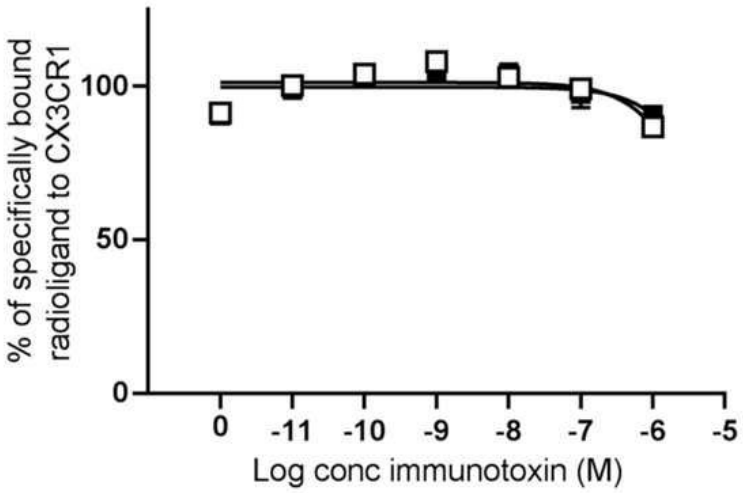
가된 사멸 특이성을 나타낸다.

도면

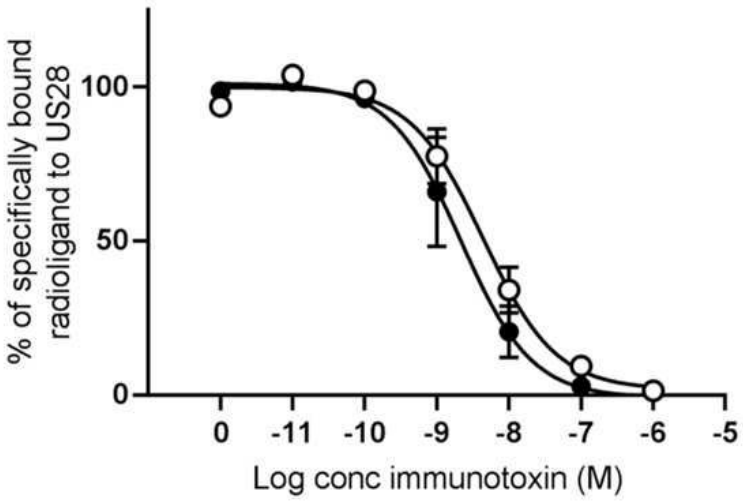
도면1



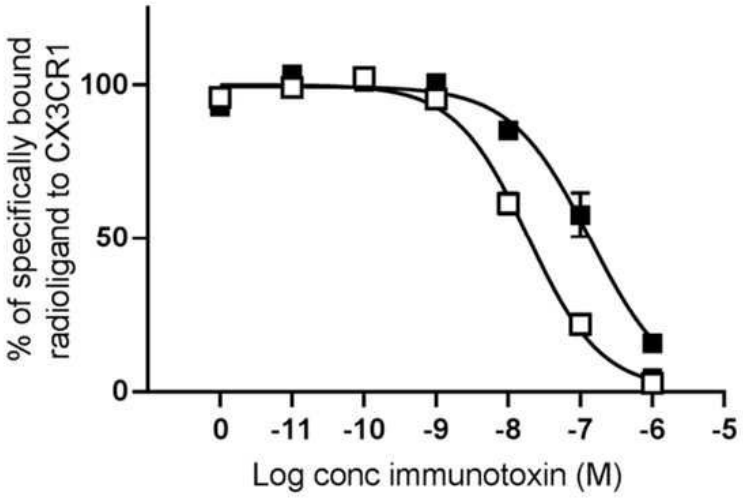
도면2



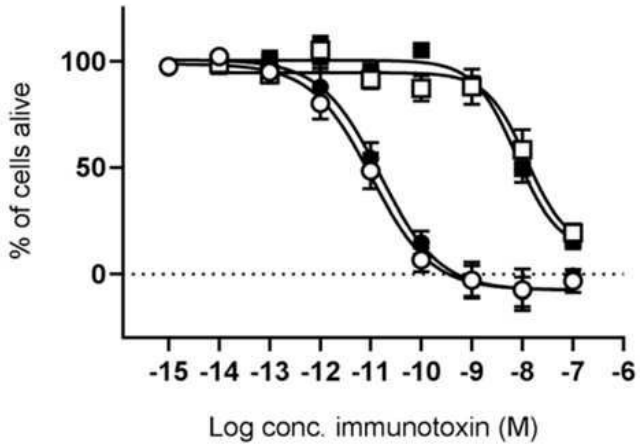
도면3


% of specifically bound radioligand to US28
100
50
0
0
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
Log conc immunotoxin (M)

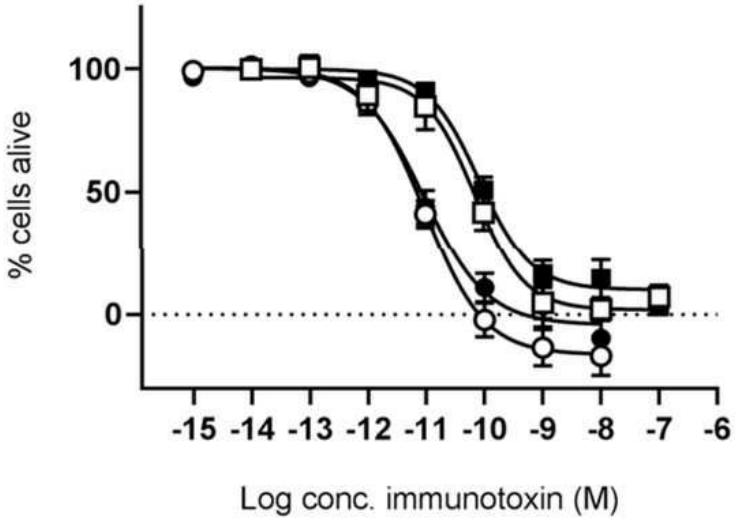
도면4


% of specifically bound radioligand to CX3CR1
100
50
0
0
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
Log conc immunotoxin (M)

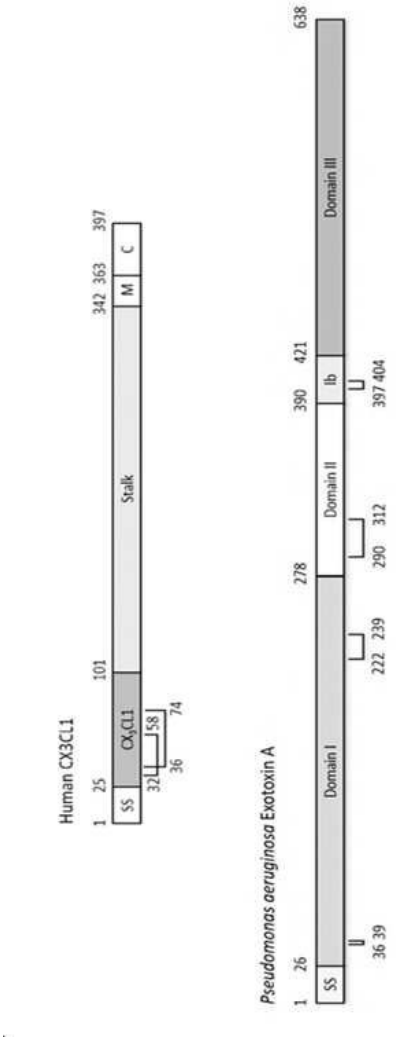
도면5


100
50
0
% of cells alive
-15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Log conc. immunotoxin (M)

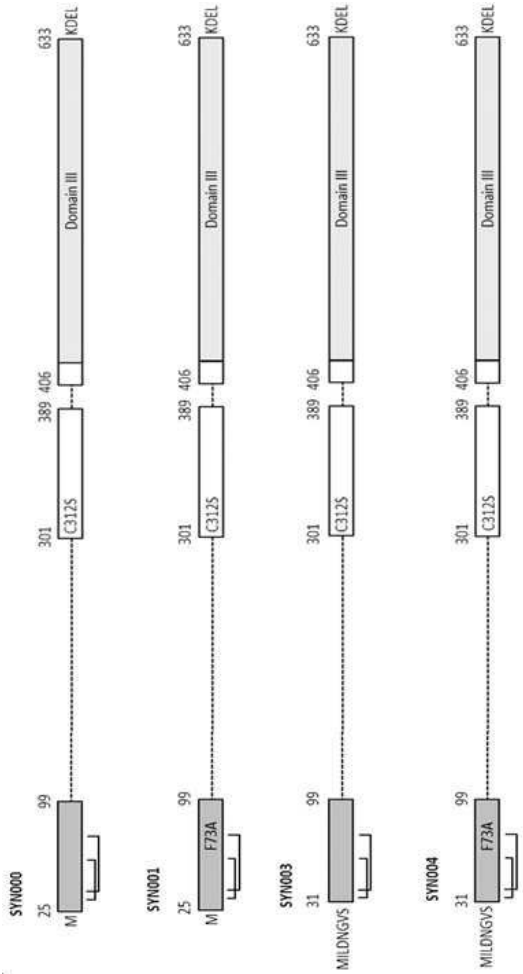
도면6


100
50
0
% cells alive
-15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Log conc. immunotoxin (M)

도면7


Human CX3CL1
1
25
101
342
363
397
SS
CX3CL1
Stalk
M
C
32
58
74
36
Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A
1
26
278
390
421
638
SS
Domain I
Domain II
Ib
Domain III
36
39
222
239
290
312
397
404

도면8



서 열 목 록

<110> KOEBENHAVNS UNIVERSITET

DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET

<120> Fusion toxin proteins for treatment of diseases related to CMV

<130> PI210047

<150> EP 19186000.6

<151> 2019-07-12

<160> 20

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 75

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens CX3CL1

<400> 1

Gln His His Gly Val Thr Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met Thr
1 5 10 15
Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala

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

<210> 2
<211> 76
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Homo sapiens CX3CL1 with F1 + F49A
<400>
> 2
Ile Leu Asp Asn Gly Val Ser Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met
1 5 10 15
Thr Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln
20 25 30
Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg
35 40 45
Leu Ala Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met Gln
50 55 60
His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu Thr Arg Asn

65 70 75
<210> 3
<211> 354
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Cytomegalovirus US28
<400> 3

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

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

115 120 125
Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala
130 135 140
Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile
145 150 155 160
Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asp Asn Gln Cys Met Thr Asp
165 170 175
Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu
180 185 190

Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr
195 200 205
Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly
210 215 220
Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe
225 230 235 240
Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu
245 250 255

Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Ala

260 265 270

Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro

275 280 285

Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys

290 295 300

Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp

305 310 315 320

Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu

325 330 335

Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile

340 345 350

Ile Pro

<210> 4

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens CX3CR1

<400> 4

Met Asp Gln Phe Pro Glu Ser Val Thr Glu Asn Phe Glu Tyr Asp Asp

1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Cys Tyr Ile Gly Asp Ile Val Val Phe Gly Thr Val

20 25 30

Phe Leu Ser Ile Phe Tyr Ser Val Ile Phe Ala Ile Gly Leu Val Gly

35 40 45

Asn Leu Leu Val Val Phe Ala Leu Thr Asn Ser Lys Lys Pro Lys Ser

50 55 60

Val Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Phe

65 70 75 80

Val Ala Thr Leu Pro Phe Trp Thr His Tyr Leu Ile Asn Glu Lys Gly

85 90 95

Leu His Asn Ala Met Cys Lys Phe Thr Thr Ala Phe Phe Phe Ile Gly

100 105 110

Phe Phe Gly Ser Ile Phe Phe Ile Thr Val Ile Ser Ile Asp Arg Tyr

115 120 125

Leu Ala Ile Val Leu Ala Ala Asn Ser Met Asn Asn Arg Thr Val Gln

130 135 140

His Gly Val Thr Ile Ser Leu Gly Val Trp Ala Ala Ala Ile Leu Val

145 150 155 160

Ala Ala Pro Gln Phe Met Phe Thr Lys Gln Lys Glu Asn Glu Cys Leu

165 170 175

Gly Asp Tyr Pro Glu Val Leu Gln Glu Ile Trp Pro Val Leu Arg Asn

180 185 190

Val Glu Thr Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Leu Ile Met Ser

195 200 205

Tyr Cys Tyr Phe Arg Ile Ile Gln Thr Leu Phe Ser Cys Lys Asn His

210 215 220

Lys Lys Ala Lys Ala Ile Lys Leu Ile Leu Leu Val Val Ile Val Phe

225 230 235 240

Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn Val Met Ile Phe Leu Glu Thr Leu

245 250 255

Lys Leu Tyr Asp Phe Phe Pro Ser Cys Asp Met Arg Lys Asp Leu Arg

260 265 270

Leu Ala Leu Ser Val Thr Glu Thr Val Ala Phe Ser His Cys Cys Leu

275 280 285

Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu

290 295 300

Tyr His Leu Tyr Gly Lys Cys Leu Ala Val Leu Cys Gly Arg Ser Val

305 310 315 320

His Val Asp Phe Ser Ser Ser Glu Ser Gln Arg Ser Arg His Gly Ser

325 330 335

Val Leu Ser Ser Asn Phe Thr Tyr His Thr Ser Asp Gly Asp Ala Leu

340 345 350

Leu Leu Leu

355

<210> 5

<211> 638

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas aeruginosa Full-length Pseudomonas exotoxin A

<400> 5

Met His Leu Thr Pro His Trp Ile Pro Leu Val Ala Ser Leu Gly Leu

1 5 10 15

Leu Ala Gly Gly Ser Phe Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu

20 25 30

Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val

35 40 45

Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly

50 55 60

Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu

85 90 95

Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr

100 105 110

Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val

115 120 125

Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu

130 135 140

Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile

145 150 155 160

Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe

165 170 175

Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile

180 185 190

Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg

195 200 205

Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu

210 215 220

Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn

225 230 235 240

Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn

245 250 255

Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg

260 265 270

Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln

275 280 285

Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg

290 295 300

Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val

305 310 315 320

Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val

325 330 335

Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu

340 345 350

Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala

355 360 365

Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu

370 375 380

Ala Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala

385 390 395 400

Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu

405 410 415

Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Ile

420 425 430

Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu

435 440 445

Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
450 455 460
His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
465 470 475 480
Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile
485 490 495
Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
500 505 510
Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val

515 520 525
Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala
530 535 540
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
545 550 555 560
Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg
565 570 575
Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile
580 585 590

Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp
595 600 605
Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp
610 615 620
Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
625 630 635

<210> 6
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas exotoxin A domain II
<400> 6

Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro

1 5 10 15

Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu

20 25 30

Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala

35 40 45

Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu

50 55 60

Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln

65 70 75 80

Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu

85 90 95

Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser

100 105 110

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas exotoxin A domain Ib

<400> 7

Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala

1 5 10 15

Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr

20 25 30

Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly

35 40

<210> 8

<211> 209

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas exotoxin A domain III

<400> 8

Gly Asp Ile Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu
1 5 10 15
Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe

20 25 30
Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe
35 40 45
Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly
50 55 60
Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp
65 70 75 80
Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg
85 90 95

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

165 170 175
Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala
180 185 190
Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu
195 200 205
Lys

<210> 9
<211> 344
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas aeruginosa PE38KDEL

<400> 9

Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro

1 5 10 15

Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu

20 25 30

Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala

35 40 45

Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu

50 55 60

Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln

65 70 75 80

Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu

85 90 95

Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser

100 105 110

Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr

115 120 125

Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Ile Ser Phe Ser Thr Arg

130 135 140

Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln

145 150 155 160

Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu

165 170 175

Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln

180 185 190

Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala

195 200 205

Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg

210 215 220

Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu

225 230 235 240

Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala

245 250 255

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

260 265 270

Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu

275 280 285

Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro

290 295 300

Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro

305 310 315 320

Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro

325 330 335

Gly Lys Pro Pro Lys Asp Glu Leu

340

<210> 10

<211> 398

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Immunotoxin SYN004 SYN004

<400> 10

Met Ile Leu Asp Asn Gly Val Ser Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys

1 5 10 15

Met Thr Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn

20 25 30

Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His

35 40 45

Arg Leu Ala Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met

50 55 60

Gln His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu Thr Arg Asn Arg Gln Pro

65 70 75 80

Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu

85 90 95

Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln

100 105 110

Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly

115 120 125

Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu

130 135 140

Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp

145 150 155 160

Glu Ala Gly Ala Ala Ser Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu

165 170 175

Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp

180 185 190

Ile Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu

195 200 205

Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly

210 215 220

Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly

225 230 235 240

Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr

245 250 255

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

260 265 270

Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr

275 280 285

Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu

290 295 300

Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro

305 310 315 320

Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly

325 330 335

Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val

340 345 350

Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu

355 360 365

Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro

370 375 380

Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Asp Glu Leu

385 390 395

<210> 11

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens CX3CL1 with F1 + F49A and N-terminal M

<400> 11

Met Ile Leu Asp Asn Gly Val Ser Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys

1 5 10 15

Met Thr Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn

20 25 30

Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His

35 40 45

Arg Leu Ala Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met

50 55 60

Gln His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu Thr Arg Asn

65 70 75

<210> 12

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytomegalovirus US28 gene sequence

<400> 12

atgacgccga cgacgacgac cgcggaactc acgacggagt ttgactacga tgaagccgcg 60

actccttgtg ttttcaccga cgtgcttaat caatcaaagc cggttacgtt gtttctgtac 120

ggcgttgtct ttctgttcgg ttccatcggc aacttcttgg tgatcttcac catcacctgg 180

cgacgtcgga ttcaatgctc cggcgatgtt tactttatca acctcgcggc cgccgatttg 240

cttttcgttt gtacactacc tctgtggatg caatacctcc tagatcacaa ctccctagcc 300

agcgtgccgt gtacgttact cactgcctgt ttctacgtgg ctatgtttgc cagtttgtgt 360

tttatcacgg agattgcact cgatcgctac tacgctattg tttacatgag atatcggcct 420

gtaaaacagg cctgcctttt cagtattttt tggtggatct ttgccgtgat catcgccatt 480

ccacacttta tggtggtgac caaaaaaaac aatcaatgta tgaccgacta cgactactta 540

gaggtcagtt acccgatcat cctcaacgta gaactcatgc tcggtgcttt cgtgatcccg 600

ctcagtgtta tcagctactg ctactaccgc atttccagaa tcgttgcggt gtctcagtcg 660

cgccacaaag gtcgcattgt acgggtactt atagcggtcg tgcttgtctt tatcatcttt 720

tggctgccgt accacctaac gctgtttgtg gacacgttaa aactcctcaa atggatctcc 780

agcagctgcg agttcgaaag atcgctcaaa cgtgcgctca tcttgaccga gtcgctcgcc 840

ttttgtcact gttgtctcaa tccgctgctg tacgtcttcg tgggcaccaa gtttcggcaa 900

gaactgcact gtctgctggc cgagtttcgc cagcgactct tttcccgcga tgtatcctgg 960

taccacagca tgagcttttc gcgtcggagc tcgccgagcc gaagagagac atcttccgac 1020

acgctgtccg acgaggtgtg tcgcgtctca caaattatac cgtaa 1065

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-terminal end of targeting moiety with F1

<400> 13

Ile Leu Asp Asn Gly Val Ser

1 5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-terminal end of targeting moiety without F1

<400> 14

Gln His His Gly Val Thr

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-terminal end of the ADP-ribosylating domain of PE

<400> 15

Arg Glu Asp Leu Lys
1 5

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified C-terminal end of the ADP-ribosylating domain of PE

<400> 16

Lys Asp Glu Leu
1

<210> 17

<211> 397

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Immunotoxin SYN000 SYN000

<400> 17

Met Gln His His Gly Val Thr Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met
1 5 10 15

Thr Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln
20 25 30

Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg
35 40 45

Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met Gln
50 55 60

His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu Thr Arg Asn Arg Gln Pro Arg
65 70 75 80

Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val
85 90 95

Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val

100 105 110

Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu

115 120 125

Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala

130 135 140

Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu

145 150 155 160

Ala Gly Ala Ala Ser Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu

165 170 175

Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Ile

180 185 190

Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu

195 200 205

Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr

210 215 220

His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val

225 230 235 240

Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile

245 250 255

Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro

260 265 270

Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val

275 280 285

Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala

290 295 300

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu

305 310 315 320

Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg

325 330 335

Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile

340 345 350

Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp

355 360 365

Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp

370 375 380

Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Asp Glu Leu

385 390 395

<210> 18

<211> 397

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Immunotoxin SYN001 SYN001

<400> 18

Met Gln His His Gly Val Thr Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg

35 40 45

Leu Ala Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met Gln

50 55 60

His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu Thr Arg Asn Arg Gln Pro Arg

65 70 75 80

Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val

85 90 95

Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val

100 105 110

Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu

115 120 125

Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala

130 135 140

Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu

145 150 155 160

Ala Gly Ala Ala Ser Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu

165 170 175

Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Ile

180 185 190

Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu

195 200 205

Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr

210 215 220

His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val

225 230 235 240

Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile

245 250 255

Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro

260 265 270

Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val

275 280 285

Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala

290 295 300

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu

305 310 315 320

Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg

325 330 335

Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile

340 345 350

Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp

355 360 365

Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp

370 375 380

Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Asp Glu Leu

385 390 395

<210> 19

<211> 398

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Immunotoxin SYN003 SYN003

<400> 19

Met Ile Leu Asp Asn Gly Val Ser Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys
1 5 10 15

Met Thr Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn
20 25 30

Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His
35 40 45

Arg Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met

50 55 60

Gln His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu Thr Arg Asn Arg Gln Pro
65 70 75 80

Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu
85 90 95

Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln
100 105 110

Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly
115 120 125

Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu
130 135 140

Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp
145 150 155 160

Glu Ala Gly Ala Ala Ser Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu
165 170 175

Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp
180 185 190

Ile Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu

195 200 205

Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly
210 215 220
Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly
225 230 235 240
Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr
245 250 255
Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu
260 265 270

Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr
275 280 285
Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu
290 295 300
Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro
305 310 315 320
Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly
325 330 335
Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val

340 345 350
Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu
355 360 365
Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro
370 375 380
Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Asp Glu Leu
385 390 395

<210> 20

<211> 1194

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid sequence of SYN004

<400> 20

atgatcctgg acaacggtgt gagcaagtgc aacattacct gcagcaagat gaccagcaaa 60

atcccggttg cgctgctgat tcactaccag caaaaccagg cgagctgcgg caaacgtgcg 120

atcattctgg aaacccgtca gcaccgtctg gcgtgcgcgg atccgaagga gcaatgggtg 180

aaagacgcga tgcagcatct ggatcgtcaa gcggcggcgc tgacccgtaa ccgtcagccg 240

cgtggttggg aacagctgga gcaaagcggc tacccggtgc aacgtctggt tgcgctgtat 300

ctggcggcgc gtctgagctg gaaccaggtg gaccaagtta tccgtaacgc gctggcgagc 360

ccgggtagcg gtggcgatct gggtgaagcg attcgtgaac agccggagca agcgcgtctg 420

gcgctgaccc tggcggcggc ggaaagcgag cgttttgttc gtcagggtac cggtaacgat 480

gaggcgggtg cggcgagcgg tccggcggac agcggtgatg cgctgctgga acgtaactat 540

ccgaccggtg cggagttcct gggtgacggt ggcgatatca gctttagcac ccgtggtacc 600

cagaactgga ccgttgaacg tctgctgcag gcgcaccgtc aactggagga acgtggctac 660

gtgttcgttg gttatcacgg cacctttctg gaggcggcgc agagcattgt gttcggtggc 720

gttcgtgcgc gtagccaaga cctggatgcg atctggcgtg gtttttatat tgcgggcgat 780

ccggcgctgg cgtacggtta tgcgcaggac caagaaccgg atgcgcgtgg tcgtatccgt 840

aacggtgcgc tgctgcgtgt gtatgttccg cgtagcagcc tgccgggttt ttatcgtacc 900

ggcctgaccc tggcggcgcc ggaggcggcg ggtgaagtgg aacgtctgat tggtcacccg 960

ctgccgctgc gtctggacgc gattaccggt ccggaggaag agggtggccg tctggaaacc 1020

attctgggtt ggccgctggc ggagcgtacc gtggttatcc cgagcgcgat tccgaccgat 1080

ccgcgtaacg ttggtggcga cctggatccg agcagcatcc cggacaagga acaggcgatt 1140

agcgcgctgc cggattatgc gagccaaccg ggcaagccgc cgaaagacga gctg 1194