



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0050961
(43) 공개일자 2020년05월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/48 (2006.01) C07K 14/745 (2006.01)
C12N 5/0789 (2010.01) C12N 5/095 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/4833 (2013.01)
A61K 38/4846 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7005896
- (22) 출원일자(국제) 2018년09월05일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년02월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/049618
- (87) 국제공개번호 WO 2019/050997
국제공개일자 2019년03월14일
- (30) 우선권주장
62/554,533 2017년09월05일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
글래디에이터 바이오사이언시스 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 94941 밀밸리 305 이스트 스트
로베리 드라이브
- (72) 발명자
허미스틴 테리
미국 캘리포니아주 94941 밀밸리 305 이스트 스트
로베리 드라이브
바우존 맥신
미국 캘리포니아주 94547 헤르쿨레스 1033 파크
스트리트
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **줄기세포로의 페이로드의 전달**

(57) 요약

본 개시내용은, 표면 노출된 포스파티딜 세린에 결합할 수 있는 GLA 도메인을 이용하여, 줄기세포, 구체적으로 비-세포사멸 줄기세포를 표적화하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1e



(52) CPC특허분류

A61K 38/4866 (2013.01)
C07K 14/745 (2013.01)
C12N 5/0647 (2013.01)
C12N 5/0695 (2013.01)
C07K 2319/035 (2013.01)
C12N 2502/30 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/593,014	2017년11월30일	미국(US)
62/584,565	2017년11월10일	미국(US)
62/569,411	2017년10월06일	미국(US)
62/569,403	2017년10월06일	미국(US)
62/554,530	2017년09월05일	미국(US)

(72) 발명자

콘타그 크리스토퍼 에이치.

미국 캘리포니아주 95129 산호세 6110 볼린저 로드

하디 조나단

미국 미시간주 48823 이스트랜싱 2843 이 그랜드
리버 애비뉴 스위트 249

블랑켄버그 프랜시스 제라드

미국 캘리포니아주 94028 포르톨라 벨리 15 베이
굴치 드라이브

명세서

청구범위

청구항 1

줄기세포를 표적화하는 방법으로서,

세포를 감마-카복시글루탐산 성분(GLA-성분)에 연결된 페이로드를 포함하는 분자와 접촉시키는 단계를 포함하되,

상기 GLA-성분은 GLA 도메인 또는 이의 활성 단편을 포함하고, 상기 분자는 GLA 단백질 유래의 활성 촉매 도메인을 포함하지 않는, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, GLA 도메인 또는 이의 활성 단편은 트롬빈, 인자 VII, 인자 IX, 인자 X, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 오스테오칼신, 매트릭스 GLA 단백질(mgP), GAS6, 트랜스티레틴(TTR), 인터-알파-트립신-억제제(inter-alpha-trypsin-inhibitor), 페리오스틴, 프롤린 풍부 gla 1(PRRG1), 프롤린 풍부 gla 2(PRRG2), 프롤린 풍부 gla 3(PRRG3), 및 프롤린 풍부 gla 4(PRRG4)로부터 독립적으로 선택되는, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 GLA 도메인 또는 이의 활성 단편은 단백질 S 유래인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GLA-성분은 EGF 도메인, 예를 들어 칼슘 결합 EGF 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 작제물은 트롬빈, 인자 VII, 인자 IX, 인자 X, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 오스테오칼신, 매트릭스 GLA 단백질, GAS6, 트랜스티레틴, 페리오스틴, 프롤린 풍부 GLA 1, 프롤린 풍부 GLA 2, 프롤린 풍부 GLA 3 및 프롤린 풍부 GLA 4로부터 선택되는 EGF 도메인을 포함하는, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 EGF 도메인은 단백질 S 유래인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GLA-도메인 성분은 크링글 도메인을 추가로 포함하는, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 8

제10항에 있어서, 상기 크링글 도메인은 전사 활성 인자 2(Activating transcription factor 2; ATF); 인자 XII(F12); 트롬빈(F2); 히알루로난-결합 단백질 2(Hyaluronan-binding protein 2; HABP2); 간세포 성장 인자(Hepatocyte growth factor; HGF); 간세포 성장 인자 활성체(Hepatocyte growth factor activator; HGFAC); 크레멘 단백질 1(Kremen protein 1; KREMEN1); KREMEN2; 지질단백질(a)(Lipoprotein(a); LPA); LPAL2; 대식세포-자극 단백질(Macrophage-stimulating protein; MSP 또는 MST1); 포스포이노시타이드-3-키나제-상호작용 단백질 1(Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1; PIK3IP1); 조직 플라스미노겐 활성체(Tissue plasminogen activator; PLAT); 우로키나제(Urokinase; PLAU); 플라스민(Plasmin; PLG); PRSS12; 타이로신-단백질 키나제 막관통 수용체 ROR1(Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1; ROR1); 및 타이로신-단백질 키나제 막관통 수용체(Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2; ROR2)를 포함하는 군으

로부터 선택되는 단백질 유래인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GLA-성분은 서열번호 6에 나타낸 서열을 포함하는, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 시험관 내에서 수행되는, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 전달은 생체 내에서 세포로의 것이되, 예를 들어 GLA 성분 및 페이로드를 포함하는 분자는 환자에게 투여되는, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자는 줄기세포의 외부 표적으로 하는, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자는 줄기세포에 내재화된, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 비-세포사멸인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 세포사멸, 예를 들어 이환된 줄기세포인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포, 또는 예를 들어 전구 세포, 및 조혈 줄기세포, 근원성(myogenic) 줄기세포, 골전구 줄기세포, 신경 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 예컨대, 위성 세포, 방사신경 아교 세포, 골수 기질 세포, 골막, 채장 전구 세포, 혈관내피 전구 세포, 아세포 및 세포영양막 줄기세포를 포함한 성체 줄기세포인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포는 표면 마커 CD34를 발현하는, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포는 계통 양성 표면 마커에 대하여 음성(즉, Lin^{-ve})인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포는 CD90⁺ve, CD133⁺ve, CD105⁺ve, CD45⁺, Lin^{-ve}, CD48^{-ve}, 및 CD244^{-ve}인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포는 Lin^{-ve}, CD34⁺ve, CD38^{-ve}, CD45RA^{-ve}, CD90⁺ve 및 CD49f₊ve인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포는 비-암성인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포는 암 줄기세포인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 23

제23항에 있어서, 상기 암 줄기세포는 상피 기원인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 24

제44항 또는 제45항에 있어서, 암 줄기세포는 CD44(이는 적어도 유방암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 편평암, 및 방광암에서 과발현됨), CD133(이는 적어도 뇌암, 결정암, 폐암, 전립선암 및 수모세포종에서 과발현됨), CD24, CD90, CD271, CD4f, CD13으로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합을 발현하는, 줄기세포를 표적화하는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포는 조혈 기원인, 줄기세포를 표적화하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2017년 9월 5일자로 출원된 미국 가출원 62/554,530, 2017년 9월 5일자로 출원된 미국 가출원 62/554,533, 2017년 10월 6일자로 출원된 미국 가출원 62/569,403, 2017년 10월 6일자로 출원된 미국 가출원 62/569,411, 2017년 11월 10일자로 출원된 미국 가출원 62/584,565, 및 2017년 11월 30일자로 출원된 미국 가출원 62/593,014의 이익을 주장하며, 이들 출원 각각은 본 명세서에 전문이 참조에 의해 포함된다.

[0003] **서열목록의 포함**

[0004] 본 출원은 EFS-웹을 통해 전자적으로 제출된 서열목록을 포함하며, 상기 서열목록은 종이 사본과 컴퓨터 판독 가능 양식(CRF) 둘 다로서의 역할을 하며, 2018년 9월 5일에 생성되고 크기가 9,831 바이트인 명칭이 "ST-CT1-PCT_sequence.txt"인 파일로 구성되며, 이는 본 명세서에 전문이 참조에 의해 포함된다.

[0005] 본 개시내용은 줄기세포, 구체적으로 비-세포사멸(non-apoptotic) 줄기세포를 표적화하고, GLA 도메인을 이용하여, 예를 들어 세포 내로의 진입을 용이하게 하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] GLA 도메인은 다수의 GLA 단백질, 예컨대, 트롬빈, 인자 VII, 인자 IX, 인자 X, 단백질 C, 단백질 S(PrS), 단백질 Z, 오스테오칼신, 매트릭스(Matrix) GLA 단백질, GAS6, 트랜스티레틴, 페리오스틴, 프롤린 풍부(Proline rich) GLA 1, 프롤린 풍부 GLA 2, 프롤린 풍부 GLA 3 및 프롤린 풍부 GLA 4에 포함되어 있다.

[0007] 소위 GLA 단백질의 GLA 도메인은 사멸 세포, 예컨대, 암세포 및 병원체 감염 세포의 표면 상에서 포스파티딜세린(PtdS, PS로도 지칭됨)에 결합할 수 있다. 포스파티딜 세린에 특이적으로 결합하는, 측매 도메인을 제외한 분자는 본 명세서에 참고로 포함된 W02014/151535 및 W02014/151683에 개시되어 있다.

[0008] GLA 도메인(비타민 K-의존성 카복실화/감마-카복시글루탐산)은 아미노 서열에서 글루타메이트 잔기의 비타민 K 의존성 번역 후 카복실화에 의해 변형되어 감마-카복시글루타메이트(Gla)를 제공하는 단백질 도메인이다.

[0009] GLA 도메인은 2개의 카복실산 잔기 사이의 칼슘 이온을 킬레이팅시킴으로써 칼슘 이온에 결합한다. 이들 잔기는 GLA 단백질의 성숙한 형태의 N-말단 맨 끝에서 시작하고, 보존된 방향족 잔기로 끝나는 영역의 일부이다. 이는 도메인의 중간에서 발견되는 보존된 Gla-x(3)-Gla-x-Cys 모티프를 생성하는데, 이는 카복실라체에 의한 기질 인식에 중요한 것으로 보인다.

- [0010] 포스포타티딜 세린은 사멸 세포, 및 이화된 세포가 면역 제거 또는 유도된 면역 관용을 감소시키는 메커니즘의 일부를 위한 보존된 마커인 것으로 생각되었다. 따라서, GLA 도메인은 사멸 세포에만 결합한다는 가설을 세웠다. 그러나, 놀랍게도 본 발명자들은 본 개시내용의 GLA 도메인이 줄기세포, 예컨대, 비-세포사멸 줄기세포 및/또는 암 줄기세포를 표적화하는 데 이용될 수 있다는 것을 확립하였다. 본 발명자들은 정상적으로 건강하게 분화된 세포가 본 개시내용에서 이용된 GLA 도메인에 의해 결합되지 않는다는 것을 시사하는 증거를 가지고 있으므로, 훨씬 더 놀라운 것이다.
- [0011] 이는, 예를 들어 병태, 예컨대, 백혈병과 같은 혈액암을 치료하는 데 사용되는 줄기 요법에 중요한 영향을 미친다. 줄기세포 요법은, 일단 환자 자신의 골수/줄기세포/면역계가 깨끗하게 제거된 후에만 제공될 수 있다.
- [0012] 이러한 와이핑 클린(wiping clean) 공정은 "소멸 요법(obliteration therapy)", 예를 들어 고용량의 화학 요법, 방사선 요법, 및/또는 B 세포 고갈 요법을 필요로 한다.
- [0013] 이러한 "소멸 요법"은 많은 부작용, 예를 들어 구강 및 목 통증(환자가 먹는 것을 어렵게 할 수 있음), 구역 및 구토, 페렴 및 cmV 감염과 같은 감염에 대한 민감성, 빈혈, 출혈, 불임, 인지 기능 장애 등을 갖는다. 이들 부작용은 매우 심하며, 환자, 특히 어린이가 대처하기 어렵다. 이들 부작용을 최소화하거나 제거할 수 있다면, 환자의 삶의 질을 크게 개선시킬 것이다.
- [0014] 면역계를 제거하고 이를 재부팅하여, 공격적인 형태의 MS가 완화되는 것이 발견되었다. 그러나, 치료와 연관된 위험이 상당히 때문에 치료는 가장 심한 경우에 대해서만 이루어진다. 그러나, 본 개시내용은 GLA-성분을 이용함으로써 화학 요법이 줄기를 특이적으로 표적화할 수 있게 한다.
- [0015] 본 발명은 줄기세포, 구체적으로 비-세포사멸 줄기세포를 "특이적으로" 표적화하기 위한 메커니즘을 제공한다. 상기 방법에 의해 표적화된 줄기세포는, 예를 들어 단리, 치료(유전자 교정, 증강, 첨가를 포함함), 표지화, 형질전환 및/또는 제거될 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 방법은 줄기세포에 치료적 개입, 예를 들어 유전 물질 및/또는 단백질 물질 및/또는 화학 요법을 전달하는 데 이용될 수 있다.
- [0016] 본 개시내용의 GLA 도메인을 검출가능한 표지, 예컨대, 형광 표지, his-태그 또는 자성 비드에 연결함으로써, 그 다음에 줄기세포는 단리, 분류 등이 될 수 있다. 이는 치료 적용에서 줄기세포를 유용하게 하는 추가 조작을 위하여 진단 또는 단리 줄기세포에서 유용할 수 있다.

발명의 내용

- [0017] 본 개시 내용은 이제 하기 "번호"의 단락에 요약될 것이다:
- [0018] 1a. 줄기세포를 표적화하는 방법으로서, 상기 방법은 세포를 감마-카복시글루탐산 성분(GLA-성분)에 연결된 페이로드를 포함하는 분자와 접촉시키는 단계를 포함하되,
- [0019] 상기 GLA-성분은 GLA 도메인 또는 이의 활성 단편을 포함하고, GLA 단백질 유래의 활성 촉매 도메인을 포함하지 않는 것인 방법.
- [0020] 1b. 감마-카복시글루탐산 성분(GLA-성분)에 연결된 페이로드를 포함하는 분자이되,
- [0021] 상기 GLA-성분은 GLA 도메인 또는 이의 활성 단편을 포함하고, 줄기세포의 치료 또는 진단에서 사용하기 위한 GLA 단백질 유래의 활성 촉매 도메인을 포함하는 않는 것인 분자.
- [0022] 1c. 감마-카복시글루탐산 성분(GLA-성분)에 연결된 페이로드를 포함하는 분자이되,
- [0023] 상기 GLA-성분은 GLA 도메인 또는 이의 활성 단편을 포함하고, 줄기세포의 치료 또는 진단을 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 GLA 단백질 유래의 활성 촉매 도메인을 포함하지 않는 것인 분자.
- [0024] 2. GLA 도메인 또는 이의 활성 단편은 트롬빈, 인자 VII, 인자 IX, 인자 X, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 오스테오칼신, 매트릭스 GLA 단백질(MGP), GAS6, 트랜스티레틴(TTR), 인터-알파-트립신-억제제(inter-alpha-trypsin-inhibitor), 페리오스틴, 프롤린 풍부 gla 1(PRRG1), 프롤린 풍부 gla 2(PRRG2), 프롤린 풍부 gla 3(PRRG3), 및 프롤린 풍부 gla 4(PRRG4)로부터 독립적으로 선택되는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0025] 3. GLA 도메인 또는 이의 활성 단편은 트롬빈, 인자 VII, 인자 IX, 인자 X, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z 및 GAS6으로부터 독립적으로 선택되고, 예를 들어 단백질 S 유래의 GLA 도메인, 구체적으로 서열번호 1에 나타낸

서열인, 단락 2에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.

- [0026] 4. GLA-성분은 EGF 도메인, 예를 들어 칼슘 결합 EGF 도메인을 추가로 포함하는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 3에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0027] 5. 작제물은 트롬빈, 인자 VII, 인자 IX, 인자 X, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 오스테오칼신, 매트릭스 GLA 단백질, GAS6, 트랜스티레틴, 페리오스틴, 프롤린 풍부 GLA 1, 프롤린 풍부 GLA 2, 프롤린 풍부 GLA 3 및 프롤린 풍부 GLA 4로부터 선택되는 EGF 도메인을 포함하는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 4에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0028] 6. EGF 도메인은 트롬빈, 인자 VII, 인자 IX, 인자 X, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z 및 GAS6로부터 선택되고, 예를 들어 단백질 S 유래의 EGF 도메인인, 단락 5에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0029] 7. GLA-성분은 서열번호 6에 나타난 서열 또는 his-태그를 제외한 이의 유도체를 포함하는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 6 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0030] 8. GLA-도메인 성분은 크링글(Kringle) 도메인을 추가로 포함하는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 7 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0031] 9. 크링글 도메인은 전사 활성 인자 2(Activating transcription factor 2; ATF); 인자 XII(F12); 트롬빈(F2); 히알루로난-결합 단백질 2(Hyaluronan-binding protein 2; HABP2); 간세포 성장 인자(Hepatocyte growth factor; HGF); 간세포 성장 인자 활성체(Hepatocyte growth factor activator; HGFAC); 크레멘 단백질 1(Kremen protein 1; KREMEN1); KREMEN2; 지질단백질(a)(Lipoprotein(a); LPA); LPAL2; 대식세포-자극 단백질(Macrophage-stimulating protein; MSP 또는 MST1); 포스포이노시타이드-3-키나제-상호작용 단백질 1(Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1; PIK3IP1); 조직 플라스미노겐 활성체(Tissue plasminogen activator; PLAT); 우로키나제(Urokinase; PLAU); 플라스민(Plasmin; PLG); PRSS12; 타이로신-단백질 키나제 막관통 수용체 ROR1(Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1; ROR1); 및 타이로신-단백질 키나제 막관통 수용체 ROR2(Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2; ROR2)를 포함하는 군으로부터 선택되는 단백질 유래인 것인, 단락 8에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0032] 10. 방법은 시험관 내에서 수행되는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 9 중 어느 하나에 따른 방법.
- [0033] 11. 전달은 생체 내에서 세포로의 것이되, 예를 들어 GLA 성분 및 페이로드를 포함하는 분자는 환자, 예를 들어 인간 환자에게 투여되는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 10 중 어느 하나에 따른 방법.
- [0034] 12. 분자는 줄기세포의 외부를 표적으로 하는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 11 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0035] 13. 분자는 줄기세포에 내재화된 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 12 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0036] 14. 세포는 비-세포사멸(즉, 건강한 줄기세포)인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 13 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0037] 15. 세포는 세포사멸, 예를 들어 이환된 줄기세포인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 13 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0038] 16. 상기 줄기세포는, 예를 들어 전구 세포, 및 조혈 줄기세포, 근원성(myogenic) 줄기세포, 골전구 줄기세포, 신경 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 예컨대, 위성 세포, 방사신경 아교 세포, 골수 기질 세포, 골막, 횡장 전구 세포, 혈관내피 전구 세포, 아세포 및 세포영양막 줄기세포를 포함한 성체 줄기세포인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 15 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0039] 17. 줄기세포는 표면 마커 CD34를 발현하는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 16 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0040] 18. 줄기세포는 계통 양성 표면 마커에 대해 음성(즉, Lin^{-ve})인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 17 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0041] 19. 줄기세포는 Lin^{-ve}, CD34^{+ve}, CD38^{-ve}, CD45RA^{-ve}, CD90 양성 및 CD49f^{+ve}인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 18에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.

- [0042] 20. 줄기세포는 조혈 줄기세포인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 17에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0043] 21. 줄기세포는 CD48, CD150, CD244, CD34, CD38, SCA-1, Thy1.1, C-키트, lin, CD135, slamf1/CD150, Mac-1(CD11b), CD4, 줄기세포 인자(SCF) 유래의 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합을 발현하는 것인, 단락 20에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0044] 22. 줄기세포는 골전구 세포인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 19에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0045] 23. 줄기세포는 그렘린(Gremelin)-1, TGF-베타, bFGF, BMP-2, ALPP, MCAM, 콜라겐 I, 콜라겐 1 알파 1, 콜라겐 II, RUNX2, 데코린(Decorin)으로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합(예컨대, 상기 모든 마커)을 발현하는 것인, 단락 22에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0046] 24. 줄기세포는 조골세포 또는 이의 전구체인, 단락 22 또는 23에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0047] 25. 줄기세포는 Runx2, 알칼리 포스파타제/ALPP/ALPI, 오스테오칼신, BAP1, OPN, BAP31, 콜라겐 I, SCUBE3, 피브로넥틴, SPARC, IGFBP-3으로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합(예컨대, 상기 모든 마커)을 발현하는 것인, 단락 24에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0048] 26. 줄기세포는 골세포 또는 이의 전구체인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 16에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0049] 27. 줄기세포는 TGF 베타, RANKL, MCSF, 스크레로스틴(Sclerostin), DKK로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합(예컨대, 상기 모든 마커)을 발현하는 것인, 단락 26에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0050] 28. 줄기세포는 오스테릭스(Osterix) +ve, CD90 +ve, 오스테오칼신 +ve, 콜라겐 I +ve, 뼈 시알로단백질 +ve로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합(예컨대, 상기 모든 마커)을 발현하는 것인, 단락 26에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0051] 29. 줄기세포는 알칼리 포스파타제/ALPP(알칼리 포스파타제 태반)/ALPI +ve, 콜라겐 I +ve, 콜라겐 II +ve, 데코린 +ve, MCAM/CD146 +ve, MEPE/OF45 +ve, 오스테릭스 +ve, CD90 +ve, 오스테릭스/Sp7 +ve, RUNX2/CBFA1 +ve, 트롬보포이에틴/Tpo +ve로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합(예컨대, 상기 모든 마커)을 발현하는 것인, 단락 26에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0052] 30. 줄기세포는 근원성 줄기세포인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 19에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0053] 31. 줄기세포는 CD56, CD146, VE-카드헤린, 알파-평활근 액틴, FABP3, 인테그린 알파 7, 데스민, 미오신 중쇄, UEA-1 수용체로부터 선택되는 마커, 및 이들 둘 이상의 조합(예컨대, 상기 모든 마커)을 발현하는 것인, 단락 30에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0054] 32. 줄기세포는 신경 줄기세포인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 19에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0055] 33. 줄기세포는 CD133, CD15, CD24 저 또는 -ve, GCTM-2, CD45, CD34, 네스틴(Nestin), Sox-2, ABCG2, FGF R4, 프리즐드(Frizzled)-9로부터 선택되는 마커, 및 이들 둘 이상의 조합(예컨대, 상기 모든 마커)을 발현하는 것인, 단락 32에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0056] 34. CD24 마커는 저 또는 -ve인, 단락 33에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0057] 35. 줄기세포는 CD133 +ve, 5E12 +ve, CD34 -ve, CD45 -ve, 및 CD24 저 또는 -ve의 마커 조합을 발현하는 것인, 단락 33 또는 34에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0058] 36. 줄기세포는 중간엽 줄기세포인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 19에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0059] 37. 줄기세포는 CD10, CD13, CD73, CD105, CD271, CD140b, CD240, 프리즐드-9, CD29, CD90, CD146, oct4, SSEA4, STRO-1, 줄기세포 인자(SCF)로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합을 발현하는 것인, 단락 36에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0060] 38. 줄기세포는 지방(adipose) 유래인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 19에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0061] 39. 줄기세포는 K15, CD34, 네스틀린(Nestlin), 폴리스타틴(follistatin), p63, 인테그린 알파 6, 테아신(teacin) C, EGFR, IGF1R, 프리즐드 인자로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합을 발현하는 것인, 단락 38에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0062] 40. 줄기세포는 CD44, ICAM/CD54, CD34, 인테그린 패밀리 구성원으로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상

의 조합을 발현하는 것인, 단락 38 또는 39에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.

- [0063] 41. 줄기세포는 난소 및 난관 상피 줄기세포인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 19에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0064] 42. 줄기세포는 그렙린 1, Lrig1, Lgr5, Bmi1, Tert, HopX로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합을 발현하는 것인, 단락 41에 따른 방법.
- [0065] 43. 줄기세포는 배아 줄기세포인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 15에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0066] 44. 줄기세포는 CD24, CD29, CD31, CD59, CD90, CD117, CD133, CD324, CD326, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, 프리즐드5, 줄기세포 인자, 크립토(crypto)(TDGF-1)로부터 선택되는 하나 이상의 표면 마커에 기초하여 식별될 수 있는 것인, 단락 43에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0067] 45. 줄기세포는 비-암성인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 44에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0068] 46. 줄기세포는 암 줄기세포인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 44에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0069] 47. 암 줄기세포는 상피 기원의 것인, 단락 46에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0070] 48. 암 줄기세포는 CD44(이는 적어도 유방암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 편평암, 및 방광암에서 과발현됨), CD133(이는 적어도 뇌암, 결정암, 폐암, 전립선암 및 수모세포종에서 과발현됨), CD24, CD90, CD271, CD4f, CD13으로부터 선택되는 표면 마커, 및 이들 둘 이상의 조합(다른 마커는 ABCB5⁺, CD44⁺/CD24, CD34⁺/CD38⁻, 및 CD44⁺/ESA⁺을 포함함)을 발현하는 것인, 단락 46 또는 47에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0071] 49. 줄기세포는 조혈 기원의 것인, 단락 46에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0072] 50. 세포는 CD19, WT-1로부터 선택되는 마커 및 이들의 조합을 갖는 것인, 단락 49에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0073] 51. GLA-성분은 페이로드에 컨쥬게이션된 것인 단락 1 내지 50 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0074] 52. 페이로드는 치료제, 표적화제 및/또는 표지를 포함하는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 51에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0075] 53. 치료제는 화학 물질((chemical entity), 또는 생물학적 분자(예컨대, 단백질), 예를 들어 항암 약물, 항암 요법, 화학 요법제, 바이러스 또는 바이러스 벡터, 예컨대, 중앙용해성 바이러스인, 단락 52에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0076] 54. 페이로드는 독소, 중합체(예를 들어, 합성 또는 천연 발생 중합체), 생물학적 활성 단백질(예를 들어, 효소, 다른 항체 또는 항체 단편), 약물(예를 들어, 소분자(화학 물질) 또는 화학 요법제), 핵산 및 이의 단편(예를 들어, DNA, RNA, 예컨대, shRNA 및 siRNA 및 이의 단편, 예를 들어 CRISPRCas9 및 CRISPRa/i에 대한 gRNA), 방사성핵종(특히, 방사성요오드화물, 방사성동위원소), 금속 킬레이트제, 나노입자 및 리포터 그룹(예컨대, NMR 또는 ESR 분광법에 의해 검출될 수 있는 형광 또는 발광 표지 또는 화합물)로부터 선택되는 것인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 53에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0077] 55. 독소는 아우리스타틴(예를 들어, mmAE(모노메틸 아우리스타틴 E), mmAF(모노메틸 아우리스타틴 F)), 피롤로 벤조디아아제핀(PBD), 독소루비신, 듀오카르마이신, 메이탄시노이드(예를 들어, N 2'-데아세틸-N 2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)-메이탄신(DM1), N 2'-데아세틸-N2'-(4-머캅토-1-옥소펜틸)-메이탄신(DM3) 및 N 2'-데아세틸-N 2'-(4-메틸-4-머캅토-1-옥소펜틸)-메이탄신(DM4)), 칼리키아마이신, 돌라스타틴, 메이탄신, α-아마니틴, 슈도모나스(Pseudomonas) 외독소(PE38), 리신 A 사슬, 디프테리아 독소, 미국자리공(Pokeweed) 항바이러스 단백질(PAP), 사포린, 겔로닌 및 튜블리신으로부터 선택되는 것인, 단락 54에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0078] 56. 화학요법제는 테모졸로마이드, 에포틸론, 멜팔란, 카무스틴, 부셀판, 로무스틴, 사이클로포스파미드, 다카바진, 폴리페프록산, 이포스파미드, 클로람부실, 메클로레타민, 부셀판, 사이클로포스파미드, 카보플라틴, 시스플라틴, 티오테파, 카페시타빈, 스트렙토조신, 비칼루타마이드, 플루타마이드, 닐루타마이드, 류프로라이드 아세테이트, 독소루비신 하이드로클로라이드, 블레오마이신 설페이트, 다우노루비신 하이드로클로라이드, 닥티노마이신, 리포소말(liposomal) 다우노루비신 시트레이트, 리포소말 독소루비신 하이드로클로라이드, 에피루비신

하이드로클로라이드, 이다루비신 하이드로클로라이드, 미토마이신, 독소루비신, 발루비신, 아나스트로졸, 토레미펜 시트레이트, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다라빈, 플록스우리딘, 인터페론 α -2b, 플라카마이신, 머캅토피린, 메토티렉세이트, 인터페론 α -2a, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 에스트라무스틴 포스페이트 소듐, 에스트라디올, 류프로라이드 아세테이트, 메게스트롤 아세테이트, 옥트레오타이드 아세테이트, 디에틸stil베스테롤 디포스페이트, 테스토락톤, 고세렐린 아세테이트, 에토포사이드 포스페이트, 빈크리스틴 설페이트, 에토포사이드, 빈블라스틴, 에토포사이드, 빈크리스틴 설페이트, 테니포사이드, 트라스투주맙, 켐투주맙 오조가마이신, 리툽시맙, 엑스메스탄, 이리노테칸 하이드로클로라이드, 아스파라기나제, 켄시타빈 하이드로클로라이드, 알트레타민, 토포테칸 하이드로클로라이드, 하이드록시유레아, 클라리빈, 미토탄, 프로카바진 하이드로클로라이드, 비노렐빈 타르트레이트, 펜토스타틴 소듐, 미토산트론, 페그아스파가제, 데니류킨 디프티톡스, 알리트레티노인, 포르피머, 백사로텐, 파클리탁셀, 도세탁셀, 삼산화비스, 트레티노인 및 이들 둘 이상의 조합으로부터 선택되는 것인, 단락 53에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.

- [0079] 57. 화학요법제는 알킬화제, 대사길항물질(티미딜산 합성효소 억제제를 포함함), 탁산, 안트라사이클린, 항-미세관제(식물 알칼로이드를 포함함), 및 이들 둘 이상의 조합으로부터 선택되는 것인, 단락 52 내지 54 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0080] 58. 화학요법제는 파클리탁셀, 도세탁셀, 아브락산, 카바지탁셀, 이들 중 어느 하나의 유도체, 및 상기 언급한 것 중 임의의 둘 이상의 조합으로부터 선택되는 것인, 단락 57에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0081] 59. 알킬화제는 질소 머스터드, 나이트로소유레아(예컨대, 카무스틴), 테트라진, 아지리딘, 플라틴 및 이의 유도체, 비-고전적 알킬화제 및 이들 둘 이상의 조합으로부터 선택되는 것인, 단락 57 또는 58에 따른 방법.
- [0082] 60. 플라틴은 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 사트라플라틴, 피코플라틴, 네다플라틴, 트리플라틴, 리포플라틴 및 이들 둘 이상의 조합으로부터 선택되는 것인, 단락 59에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0083] 61. 알킬화제는 항-플레이트(예를 들어, 메토티렉세이트 및 페메트렉시드), 퓨린 유사체(예를 들어, 싸이오퓨린, 예컨대 아자싸이오퓨린, 머캅토피린, 싸이오퓨린, 플루다라빈(포스페이트 형태를 포함함), 펜토스타틴 및 클라리빈), 피리미딘 유사체(예를 들어, 플루오로피리미딘, 예컨대, 5-플루오로우라실 및 이의 전구 약물, 예컨대, 카페시타빈[젤로다(Xeloda)(등록상표)], 플록스우리딘, 켄시타빈, 시타라빈, 데시타빈, 랄티트렉시드(토무텍스) 하이드로클로라이드, 클라리빈 및 6-아자우라실로부터 선택되는 대사길항물질 및 이들 둘 이상의 조합인, 단락 57 또는 58에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0084] 62. 안트라사이클린은 다우노루비신(다우노마이신), 다우노루비신(리포소말), 독소루비신(아드리아마이신), 독소루비신(리포소말), 에피루비신, 이다루비신, 미토산트론 및 이의 둘 이상의 조합으로부터 선택되고, 구체적으로 독소루비신인, 단락 56 내지 60 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0085] 63. 약물은, 예를 들어 토포이소머라제 억제제, PARP 억제제 및 이들 이상의 조합으로부터 선택되는 항암 약물인, 단락 53 내지 62 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0086] 64. 항암 요법은, 예를 들어 Y-90, P-32, I-131, In-111, Sr-89, Re-186, Sm-153, Sn-117m 및 이들 둘 이상의 조합으로부터 선택되는 방사성핵종인, 단락 53 내지 64 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0087] 65. GLA 성분 및 페이로드를 포함하는 분자를 암 환자에게 투여하는 것을 포함하되, 예를 들어 여기서 암은 난치성인, 단락 1a, 1b 또는 1c 내지 64 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0088] 66. 암은 상피암, 예를 들어 직결장암, 고환암, 간암, 담도암, 교모세포종, 흑색종, 전립선암, 췌장암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁암, 위암, 식도암, 갑상선암, 신장암, 방광암, 뇌암, 두경부암 또는 폐암이거나, 대안적으로 암은 혈액암, 예를 들어 백혈병, 림프종, 골수종 및 만성 골수 증식 질환, 예컨대, AML, CML, ALL 및 CLL일 수 있는 것인, 단락 65에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0089] 67. 상기 페이로드는 세포 내부에서 활성 형태로 전환되는 것인, 단락 1 내지 66 중 어느 하나에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0090] 68. 상기 활성 형태로의 전환은 효소에 의해 수행되는 것인, 단락 67에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.
- [0091] 69. 상기 효소는 카복실에스테라제, 아세틸콜린에스테라제, 파라옥소나제(예컨대, 파라옥소나제 2), 매트릭스 메탈로프로테아제, 알칼리 포스파타제, β -글루쿠로니다제, 퓨린-뉴클레오사이드 포스포릴라제, 베타-락타마제(예를 들어, 마이코박테리움 튜베르쿨로시스(*mycobacterium tuberculosis*) 및 마이코박테리움 칸사시

(*Mycobacterium kansasii*)에 의해 생성됨) 및 사이토신 데아미나제로부터 선택되는 것인, 단락 68에 따른 방법 또는 사용을 위한 분자.

- [0092] 70. GLA-성분은 서열번호 6에 나타난 서열 또는 His-태그를 제외한 동등한 서열을 갖는 것인, 청구항 1 내지 69 중 어느 하나에 따른 방법 또는 분자.
- [0093] 일 실시형태에서, GLA-성분은 내재화 전에, 세포 상에서 표면 노출된 포스파티딜세린에 결합한다.
- [0094] 이론에 의해 구속되기를 원하지는 않지만, 본 발명자들은 모든 포스파티딜세린이 생물학적 관점에서 동등한 것이 아니라고 생각한다. 본 발명자들은 효소 TMEM16F에 의한 포스파티딜세린 노출이 면역 억제에 관여하며, 본 개시내용의 분자에 의해 "보여진" 것이라고 생각한다.
- [0095] 일 실시형태에서, 줄기세포는 성체 줄기세포 또는 이로부터 유래된 세포, 예를 들어 체세포 줄기세포, 예컨대, 조혈 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 또는 기질 줄기세포이다.
- [0096] 일 실시형태에서, 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 이로부터 유래된 세포이다. 일 실시형태에서, 세포는 배아 줄기세포가 아니다.
- [0097] 일 실시형태에서, 방법은 포유동물 줄기세포, 예를 들어 인간 줄기세포에 관한 것이다. 본 명세서에서 논의된 줄기세포는 주로 인간 줄기세포이다. 그러나, 당업자는 필요에 따라 다른 포유동물에 대한 관련 또는 상응하는 줄기세포 집단을 확인할 수 있다. 예를 들어, SSEA-1은 무린 배아 줄기세포, 인간 생식계열 세포 및 배아 암종 세포에 대한 마커이고; SSEA-3은 영장류 배아 줄기세포, 인간 배아 생식계열 세포, 인간 배아 줄기세포 및 배아 암종 세포에 대한 마커이며; SSEA-4는 영장류 배아 줄기세포, 인간 배아 생식 세포, 인간 줄기세포, 배아 암종 세포에 대한 마커이고; CD324는 인간 및 무린 배아 줄기세포, 배아 암 세포에 대한 마커이며; CD90은 인간 및 무린 배아 줄기세포, 조혈 줄기세포, 배아 암종 세포에 대한 마커이고; CD117은 인간 및 무린 배아 줄기세포, 조혈 줄기 전구 세포, 신경 능선-유래 멜라노사이트, 원시 생식 세포, 배아 암종 세포에 대한 마커이며; CD326은 인간 및 무린 배아 줄기세포, 배아 암종 세포에 대한 마커이고; CD9는 인간 및 무린 배아 줄기에 대한 마커이며; CD24는 인간 및 무린 배아 줄기에 대한 마커이고; CD29는 인간 및 무린 배아 줄기에 대한 마커이며; CD59는 인간 및 무린 배아 줄기에 대한 마커이고; CD133은 인간 및 무린 배아 줄기, 배아 암종 세포, 조혈 줄기세포에 대한 마커이며; CD31은 인간 및 무린 배아 줄기에 대한 마커이고; TRA-1-60은 인간 배아 줄기세포, 기형암종, 배아 생식 세포, 배아 암종 세포에 대한 마커이며; TRA-1-81은 인간 배아 줄기세포, 기형암종, 배아 생식 세포, 배아 암종 세포에 대한 마커이고; 프리즐드5는 인간 및 무린 배아 줄기세포에 대한 마커이며; 줄기세포 인자(SCF)는 인간 및 배아 줄기세포, 조혈 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 배아 암종 세포에 대한 마커이고; 크립토는 인간 및 무린 배아 줄기세포, 심근세포 및 배아 암종 세포에 대한 마커이다.
- [0098] 일 실시형태에서, 페이로드는 치료제를 포함한다.
- [0099] 일 실시형태에서, 페이로드는 검출가능한 표지를 포함한다.
- [0100] 일 실시형태에서, 페이로드는 DNA 또는 RNA 서열, 예를 들어 이식유전자 또는 RNAi 서열(예컨대, miRNA, siRNA(shRNA를 포함함))을 포함하는 cDNA를 포함한다. 이식유전자를 인코딩하는 DNA는 일시적 또는 안정적인 발현을 위해 전사적으로 활성인 DNA 또는 플라스미드로 전달될 수 있다.
- [0101] 일 실시형태에서, 페이로드는, 예를 들어 세포를 특정 계통으로 활성화 및/또는 성숙시키기 위해, 줄기세포의 분화를 유도하는 데 적합하다.
- [0102] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은, 예를 들어 줄기세포 상에서 PS의 발현을 유도 또는 증강시키기 위한 환자의 전처리를 포함하고, 예를 들어 전처리 단계는 방사선 요법, 구체적으로 골수 세포의 조사를 이용한 치료일 수 있다.
- [0103] 본 개시내용은 또한 본 개시내용에 따라 사용하기 위한, 구체적으로 본 명세서에 기재된 바와 같은 사용하기 위한 분자를 포함하는 약학 조성물로 확장된다. 따라서, 일 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 분자는 세포내 표적의 치료에 이용된다.
- [0104] 본 개시내용은 또한 GLA 도메인 또는 이의 활성 단편을 포함하는 GLA-성분의 용도로 확장되되, 여기서 상기 GLA-성분은, 세포내 표적화 및 전달(페이로드의 세포내 전달을 포함함)을 위해, GLA 단백질 유래의 활성 촉매 도메인을 포함하지 않는다.
- [0105] 본 개시내용은 또한 GLA 도메인 또는 이의 활성 단편을 포함하는 GLA-성분의 용도로 확장되되, 여기서 상기

GLA-성분은, 세포내 표적화 및 전달(페이로드의 세포내 전달을 포함하며, 구체적으로 페이로드는 치료 물질/분자를 포함함)을 위한 의약의 제조를 위해, GLA 단백질 유래의 활성 촉매 도메인을 포함하지 않는다.

- [0106] 본 기술은 줄기세포 이식 전에 환자의 면역 세포를 제거하는 데 사용될 수 있으며, 예를 들어 페이로드는 일반적으로, 예를 들어 카무스틴을 포함하는 화학요법일 것이다.
- [0107] 면역 세포 절제(ablation)를 위한 현재의 요법은 제-6일에 (BCNU) 300 mg/m², 제-5일로부터 제-2일까지 매일 에토포사이드 200 mg/m² 및 시타라빈 200 mg/m², 그리고 제-1일에 멜팔란 140 mg/m²(BEAM)이다. 토끼 항흉선세포 글로불린(2.5 mg/kg/d)을 제-2일 및 제-1일에 투여하였다. 이러한 요법은 각각의 작용제를 본 개시내용의 GLA 분자에 컨쥬게이션시킴으로써 조정될 수 있다.
- [0108] 일 실시형태에서, 면역 소멸은 암, 혈액암(예를 들어, 골수종, 림프종, 백혈병, 예컨대, 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수 증식 질환, 미결정의 단클론 감마 병증(monoclonal gammopathy of uncertain significance), 골수이형성 증후군 및 아미로이드증으로부터 선택됨, 예컨대, AML, CML, CLL 또는 ALL)에 대한 것이다.
- [0109] 일 실시형태에서, 골수종은 다발성 골수종, 아미로이드증 및 형질세포종으로부터 선택된다.
- [0110] 일 실시형태에서, 골수종은 미결정의 단클론 감마 병증, 무증상 골수종, 증상성 골수종 및 칼러병(Kahler's disease)으로부터 선택된다.
- [0111] 일 실시형태에서, 림프종은 역형성큰세포림프종, 버킷림프종, 버킷-유사 림프종, 피부 T-세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 림프아구성 림프종, MALT 림프종, 외투세포림프종, 종격동 거대 B-세포 림프종, 림프절 변연부 B-세포 림프종, 소림프구 림프종, 갑상선 림프종, 및 왈렌스트림 마크로글로불린혈증으로부터 선택된다.
- [0112] 일 실시형태에서, 만성 골수 증식 질환은 본태성 혈소판증가증, 만성 특발성 골수섬유증, 및 적혈구 과다증으로부터 선택된다.
- [0113] 일 실시형태에서, 백혈병은 급성 골수성 백혈병(AML), 모발 세포 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 및 만성 림프아구성 백혈병, 예컨대, AML로부터 선택된다.
- [0114] 최근, 중증 자가면역 질환, 예컨대, 중증 다발성 경화증 및 중증 관절염에 있어서 면역 세포의 소멸 이후 줄기 이식이 질환을 완화시킬 수 있다는 것이 명백해졌다. 따라서, 본 개시내용의 절제 요법은 자가면역 질환, 예컨대, 다발성 경화증 및 관절염에서 이용될 수 있다.
- [0115] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 GLA 분자는 검출가능한 표지를 포함하는 페이로드에 연결, 예를 들어 컨쥬게이션된다. 검출가능한 표지의 예는 하기에 제공되어 있다. 검출가능한 표지는, 예를 들어 FACs 분류, 자기 분류 또는 이와 유사한 것을 이용하여, 줄기세포를 분류 또는 단리하는 데 이용될 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 본 개시내용의 GLA-분자를 이용하여 줄기세포를 단리 또는 농축하는 방법이 제공된다. 역사적으로 특정 줄기세포 집단, 예컨대, 암 줄기세포의 단리는 매우 어려웠기 때문에, 이러한 방법은 이점이 있다.
- [0116] 표지된 GLA 분자는 또한 생체 내에서, 예를 들어 원발성 종양 또는 전이에서 암 줄기세포를 확인하기 위해, 영상화제, 구체적으로 진단 도구로서 이용될 수 있다. 이는 수술 및/또는 화학요법 후 암이 완화되는 것을 보장하기 위해 환자를 모니터링하는 데 중요할 수 있다.
- [0117] GLA 분자에 대한 DNA 이식유전자 페이로드 및/또는 RNA 페이로드 링커는 바이러스 벡터 전달(형질도입) 또는 전통적인 형질감염에 대한 대안적인 세포내 전달로서 이용될 수 있다. 이는 세포에서 외인성 또는 내인성 단백질을 발현시키기 위해 시험관 내에서 이용될 수 있거나(예를 들어, 변형된 줄기세포가 환자에게로의 재주입용인 경우) 생체 내에서 이행될 수 있다. 유전자는 일시적으로 발현될 수 있거나 줄기세포 내로 안정적으로 통합되도록 설계될 수 있다.
- [0118] 놀랍게도, 본 발명자들은 본 개시내용에 따른 분자가 줄기세포에 결합할 뿐만 아니라, 이에 부착된 페이로드와 함께 빠르게 내재화된다는 것을 나타내었다.
- 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**
- [0119] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 세포내 전달은, 예를 들어 세포 내부로 페이로드를 전달하는 것을 말한다.
- [0120] 일 실시형태에서, 페이로드는 내재화되지 않는다.

- [0121] 일 실시형태에서, GLA-성분 및 페이로드는 내재화되지 않는다.
- [0122] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 페이로드는, 구체적으로 세포내 전달을 목적으로, GLA 도메인에 연결된 분자를 말한다. 연결은, 예를 들어 말레이미드 화학 또는 클릭 화학을 사용하여 용매에 노출된 리신에 대한 모이어티에 고정하는 화학적 건주게이션을 통한 연결일 수 있다. 대안적으로, 연결은 융합, 예를 들어 연결된 물질이 GLA 성분과의 융합 단백질로서 발현되는 펩티드 결합일 수 있으며, 예를 들어 이는 특정 검출가능한 표지, 예컨대, 형광 단백질 또는 항체에 적합할 수 있다. 링커는 GLA-성분 및 페이로드 사이에서 이용될 수 있다. 페이로드는 약물, 독소, 중합체, 생물학적 활성 단백질, 치료용 바이러스, 종양용해성 바이러스, 바이러스 벡터, 방사성핵종, 금속 킬레이트제 및/또는 리포터 그룹(예컨대, 표지)을 포함할 수 있다.
- [0123] 일 실시형태에서, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 페이로드가 GLA-성분마다 연결된다.
- [0124] GLA-성분(또한 본 명세서에서 감마-카복시글루탐산 성분으로도 지칭됨)은 GLA 단백질, 예컨대, 단백질 S 유래의 촉매 도메인의 부재 하에서 GLA-도메인을 포함하는 폴리펩티드를 말한다. 폴리펩티드는, 예를 들어 단백질 S 유래의, EGF 도메인 및/또는 크링글 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, GLA-성분은 30 내지 300 개 아미노산 잔기, 예를 들어 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 또는 300개의 잔기를 포함한다. 일 실시형태에서, GLA 성분은 4.5 내지 30 kDa의 범위에 있다. 일 실시형태에서, GLA-성분은 서열번호 1에 나타낸 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, GLA-성분은 서열번호 6에 나타낸 서열 또는 his-태그를 제외한 이의 유도체를 포함한다.
- [0125] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 GLA 도메인(비타민 K-의존성 카복실화/감마-카복시글루탐산)은 아미노 서열에서 글루타메이트 잔기의 비타민 K 의존성 번역 후 카복실화에 의해 변형되어 감마-카복시글루타메이트(Gla)를 제공하는 단백질 도메인이다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 분자에서 이용된 GLA 도메인은 천연(야생형) GLA 도메인 유래의 30 내지 45개의 연속된 잔기를 포함한다. 일 실시형태에서, GLA 도메인은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 GLA 잔기를 포함한다.
- [0126] 일 실시형태에서, GLA-성분의 30% 이하는 GLA 잔기이다.
- [0127] 일 실시형태에서, GLA-성분은 1 내지 5개의 이황화 결합, 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 이황화 결합을 포함한다.
- [0128] GLA 도메인은 2개의 카복실산 잔기 사이의 칼슘 이온을 킬레이팅시킴으로써 칼슘 이온에 결합한다. 이들 잔기는 Gla 단백질의 성숙한 형태의 N-말단 맨 끝에서 시작하고, 보존된 방향족 잔기로 끝나는 영역의 일부이다. 이는 도메인의 중간에서 발견되는 보존된 Gla-x(3)-Gla-x-Cys 모티프를 생성하는데, 이는 카복실라제에 의한 기질 인식에 중요한 것으로 보인다.
- [0129] GLA 도메인은 다수의 단백질, 예컨대, 트롬빈, 인자 VII, 인자 IX, 인자 X, 단백질 C, 단백질 S(PrS), 단백질 Z, 오스테오칼신, 매트릭스 GLA 단백질, GAS6, 트랜스티레틴, 페리오스틴, 프롤린 풍부 GLA 1, 프롤린 풍부 GLA 2, 프롤린 풍부 GLA 3 및 프롤린 풍부 GLA 4에 포함되어 있다.
- [0130] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 GLA 도메인은, 변형된 도메인이 적합한 시험관 내 분석에서 천연물(변형되지 않은 GLA 도메인)의 천연 활성의 적어도 70%(예컨대, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%)를 유지한다면, 천연 GLA 도메인에서 아미노산의 1 내지 10%(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10%)가 대체되고 결실될 수 있는 단백질로 확장된다.
- [0131] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 EGF 도메인은 보존된 단백질 도메인을 말한다. 이는 약 30 내지 40개의 아미노산 잔기를 포함하며, 다수의 대부분의 동물 단백질에서 발견되었다. EGF-유사 도메인의 대부분의 존재는 막-결합 단백질의 세포의 도메인 또는 분비되는 것으로 알려진 단백질에서 발견된다. EGF-유사 도메인은 6개의 시스테인 잔기를 포함한다. EGF-유사 도메인의 주요 구조는 2개 가닥의 B-시트, 그 다음 짧은 C-말단으로의 루프, 2개 가닥의 β -시트이다. 이들 2개의 β -시트는 보통 주 시트(N-말단) 및 부 시트(C-말단)로 표시된다. EGF-유사 도메인은 종종 단백질의 수많은 연쇄 복제물에서 발생하며: 이들 반복은 전형적으로 함께 접히어서 기능성 단위로서 단일의 선형 슬레노이드 도메인 블록을 형성한다. 일 실시형태에서, 이용된 도메인은 전장의 천연 도메인이다.
- [0132] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 EGF 도메인은 또한, 변형된 도메인이 적합한 시험관 내 분석에서 천연물(변형되지 않은 EGF 도메인)의 천연 활성의 적어도 70%(예컨대, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%)를 유지한다면, 천연 EGF 도메인에서 아미노산의 1 내지 10%(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

또는 10%)가 대체되고 결실될 수 있는 단백질로 확장된다. 일 실시형태에서, 단백질은 전장의 천연 도메인이다.

- [0133] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 크링글 도메인은 3개의 이황화 결합에 의해 안정화되는 큰 루프를 접히는 자율적인 단백질 도메인을 말한다. 이는 3중 루프인, 3-이황화 브릿지 구조를 특징으로 하며, 이의 입체구조는 다수의 수소 결합 및 역-평행 베타-시트의 작은 조각으로 정의된다. 이는 혈액 응고 및 피브린용해성 단백질 전체에서, MEROPS 펩티다제 패밀리 S1A에 속하는 세린 프로테아제인, 프로트롬빈 및 우로키나제-유형 플라스미노겐 활성체를 포함한 일부 혈장 단백질에서 다양한 수의 복제물로 발견된다.
- [0134] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 크링글 도메인은 또한, 변형된 도메인이 적합한 시험관 내 분석에서 천연물(변형되지 않은 크링글 도메인)의 천연 활성의 적어도 70%(예컨대, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%)를 유지한다면, 천연 크링글 도메인에서 아미노산의 1 내지 10%(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10%)가 대체되고 결실될 수 있는 단백질로 확장된다. 일 실시형태에서, 이용되는 도메인은 전장의 천연 도메인이다.
- [0135] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 단백질의 활성 단편은 전체 천연 단백질(또는 관련 도메인)보다 적으며, 이는 관련 시험관 내 분석에서 천연 전장 도메인 또는 단백질의 활성의 적어도 50%(예컨대, 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%)를 유지한다.
- [0136] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 촉매 도메인은, 예를 들어 도 1a에 도시된 바와 같은, C-말단 방향으로 EGF 도메인의 하류 도메인(또는 단편)이다.
- [0137] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 시험관 내는 인간 또는 동물 신체에서 수행되지 않은 실험실 작업을 말한다.
- [0138] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 생체 내는 살아있는 유기체, 구체적으로 인간 또는 동물에서의 작업/시험/처치를 포함한다.
- [0139] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 줄기세포는 분화할 수 있고 배아 줄기세포 및 성체 줄기세포, 구체적으로 성체 줄기세포를 포함하는 미분화된 세포를 말한다.
- [0140] 조혈 줄기세포(HSC) 또는 혈구모세포는 혈액생성 과정을 통해 다른 혈액 세포 모두를 생성하는 줄기세포이다. 이는 증배업으로부터 유래하며, 대부분 뼈의 중심부에 포함되어 있는 적골수에 위치한다.
- [0141] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 암 줄기세포는 정상 줄기세포와 연관된 특징, 특히 구체적으로 암 샘플에서 발견되는 모든 세포 유형이 생기게 하는 능력을 가지는 종양형성 세포(즉, 종양 또는 혈액암에서 발견되는 암 세포)를 말한다. 예를 들어, 문헌[Identification and Targeting of Cancer Stem Cells, Bioessays 2009 Oct; 31(10) 1038-1049]을 참조한다. 암 줄기세포는 3가지 구분된 특성으로 정의된다: i) 종양을 개시하고 신생물 증식을 유도하는 선택적인 능력; ii) 자기 재생을 통해 자신을 무한 복제하는 능력; 및 iii) 분화를 통해 보다 성숙한 비-줄기세포 암 자손이 생기게 하는 가능성. 암 줄기세포는 반드시 건강한 줄기세포로부터 유래하지는 않지만, 분화된 세포에서 기원한 것일 수 있다.
- [0142] CD34는 또한 조혈 전구 세포 항원 CD34로 알려져 있으며, 세포-세포 부착 인자로서의 기능을 갖는다. 이는 줄기 집단을 풍부하게 하는 마커로서 이용될 수 있다.
- [0143] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 분자는 가장 넓은 의미로 사용되며, 합성 화학 분자뿐만 아니라, 고분자, 예컨대, 단백질, 중합체(천연 또는 다른 것), 리보핵산 분자, 표지 등을 포함한다.
- [0144] 페이로드르는 약물, 독소, 중합체, 생물학적 활성 단백질, 방사성핵종, 금속 킬레이트제 및/또는 리포터 그룹을 포함할 수 있다.
- [0145] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 약물은, 문맥이 달리 나타내지 않는다면, 예를 들어 유기 화학 방법에 의해 합성된 소형 화학 물질, 구체적으로, 특히 인간에서, 치료 용도를 위해 승인 또는 허가된 또는 허가된 공정에서의 분자를 말하고자 한다. 본 명세서에서 이용된 바와 같은 약물은 또한 항바이러스 화합물, 항생제, 및 항암 요법을 포함한다.
- [0146] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 항바이러스 화합물(항바이러스제)은 구체적으로, 넓은 범위의 항바이러스제 및 또한 특정 바이러스 또는 특정 바이러스 패밀리에 특이적인 "좁은" 범위를 포함하여, 바이러스 감염을 치료하는데 특이적으로 사용되는 약제의 부류를 말한다.
- [0147] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 항생제는 박테리아의 성장을 억제하거나 박테리아를 파괴하는 의약 또는 작

용제를 말한다. 항균성 및 항생제는 문맥이 달리 나타내지 않는다면, 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다.

- [0148] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 항-기생충제는 기생충의 성장을 억제하거나, 기생충을 파괴하거나 숙주로부터 기생충을 제거하는 의약 또는 작용제를 말한다.
- [0149] 항암 요법은 항암 약물, 화학 요법, 방사선 요법, 면역 종양학 요법 등을 포함하는 광범위한 용어이다.
- [0150] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 항암 약물은 일반적으로 소분자 암 요법을 말한다.
- [0151] 본 명세서에서와 같은 화학 요법은 세포독성제를 말하며, 항신생물제를 포함한다.
- [0152] 생물학적 치료제(생물약제학적, 생물학적 또는 생물학상으로도 지칭됨)는 생물학적 공급원, 예를 들어, 항체, 항체 결합 단편 및 다중특이적 항체 분자 및 이러한 물질의 복합 조합을 포함한 항체 분자를 포함한, 재조합 단백질 및 단편으로부터 "유래된" 치료 생성물이다. 생물학적 특성 단백질은 생물학적 치료제의 하위그룹이며, 재조합 단백질 및 이의 활성 단편(항체 분자를 포함함)을 포함한다.
- [0153] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 항체 분자는 전장 중쇄 및 경쇄 또는 이의 단편을 갖는 완전한 항체, 및 이들 중 임의의 하나를 포함하는 분자, 예를 들어 Fab, 변형된 Fab, Fab', 변형된 Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, 단일 도메인 항체(예를 들어, VH 또는 VL 또는 VHH), scFv, 2가, 3가 또는 4가 항체, 비스-scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 상기한 것 중 임의의 에피토프-결합 단편을 포함한다(예를 들어, 문헌[Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136]; [Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217] 참조). 이들 항체 단편을 생성하고 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181] 참조). 본 발명에서 사용하기 위한 다른 항체 단편은 국제 특허 출원 WO2005/003169, WO2005/003170 및 WO2005/003171에 기재된 Fab 및 Fab' 단편을 포함한다. 다가 항체는 다중 특이성, 예를 들어 이중 특이성을 포함할 수 있거나, 단일 특이성일 수 있다(예를 들어, WO 92/22853 및 WO05/113605 참조). 본 실시예에서 이중 특이성 및 다중 특이성 항체 변이체가 특히 고려되는데, 목적이 2개의 독립적인 표적 단백질을 중화시키는 것이기 때문이다. 본 명세서에 개시된 항체로부터의 가변 영역은 2개 표적 항원에 결합하여 이를 중화시킬 수 있는 단일 항체 변이체를 생성하도록 하는 방식으로 구성될 수 있다.
- [0154] 항체 및 이의 결합 단편, 구체적으로 소형 항체 단편, 예컨대, 도메인 항체, VHH, 단일 사슬 Fv(scFv), ds-scFv 및 dsFv는 본 기술을 사용하여 세포내로 전달될 수 있다.
- [0155] 일 실시형태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 체크포인트 억제제(checkpoint inhibitor), 예를 들어 항-PD-1 또는 항-PD-L1 억제제이다.
- [0156] 일 실시형태에서, 항체 분자는 인간 또는 인간화된 것이다.
- [0157] 독소는 특히 천연 공급원, 구체적으로 단백질로부터 유래된 유독성 물질이다. 다수의 독소, 예컨대, 칼리키아마 이신이 암 요법에서 사용된다. 추가적으로, 화학 요법제는 독성(또는 독소)으로 고려될 수 있다. 따라서, 독소의 정의는 본 명세서에서 다른 정의와 중첩된다. 그러나, 뱀독과 같은 신경독소는 독소이지만 화학 요법제는 아니다. 그러나, 당업자는 이러한 기술적 정의에 익숙하며, 본 개시내용의 내용의 의미를 이해할 수 있다.
- [0158] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 진단제는 질환 상태를 진단, 표지 또는 모니터링 또는 이해하기 위해 분석 또는 영상화에 사용되는 작용제이다. 진단제는 일반적으로 리포터 분자, 예컨대, 어떤 방식으로 시각화, 측정 또는 모니터링될 수 있는 표지 또는 이와 유사한 것을 포함할 것이다.
- [0159] 본 개시내용에서의 사용에 적합한 방사성핵종은 탈륨-201, 테크네튬-99m, 요오드-123, 요오드-131, 요오드-125, 플루오린-18 및 산소-15를 포함한다.
- [0160] 또한, 특히 관심이 있는 것은, 예를 들어 인트라바디가 GLA-성분의 N 또는 C 말단에 융합된 경우, 예를 들어 GLA-융합체를 통해 인트라바디를 전달하기 위해 GLA-성분을 사용하는 것이다. 인트라바디는 세포내 항원을 표적 화할 수 있다.
- [0161] 일 실시형태에서, RAS 신호전달 경로에서 RAS 또는 단백질과 상호작용하고 이를 억제하는 항체가 페이로드에서 이용된다. RAS 유전자는 *HRAS*, *NRAS*, 및 *KRAS*를 포함하는 다중 유전자 패밀리를 구성한다. RAS 단백질은 세포 내에서 중요한 신호전달 허브로서 기능하는 소형 구아노신 뉴클레오티드-결합 GTPase이다. RAS/MAPK 경로는, 이의 체세포 조절장애가 암의 주요 원인 중 하나이기 때문에, 종양형성의 맥락에서 광범위하게 연구되어 왔다.

RAS는 악성 종양의 대략 20%에서 체세포 돌연변이된다(Bos JL, Cancer Res. 49: 4682-4689, 1989). 이러한 특정 경우에, 예를 들어 GLA-성분은 RAS 인트라다이에 융합된다고 예상된다(문헌[Cetin M et al., J Mol Biol. 429:562-573, 2017]에 기재되어 있음).

- [0162] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 세포사멸은 유기체 성장의 정상 및 제어된 부분으로서 발생하는 세포사 경로이다. 세포사멸에 의한 세포사는 세포사 메커니즘, 예컨대, 괴사보다 주변 조직에 덜 해롭다.
- [0163] 본 명세서에서 이용된 바와 같은 괴사는 질환 또는 상해로 인한 세포사이다. 이는 주변 조직으로 사이토카인 및 인자를 방출하여, 주변 세포를 손상시킬 수 있다. 괴사는 괴사성 세포사의 일 예이다.
- [0164] **화학요법제**
- [0165] 화학요법제 및 화학요법 또는 세포독성제는 문맥이 달리 나타내지 않는다면, 본 명세서에서 상호교환가능하게 이용된다.
- [0166] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 화학요법은 악성 세포 및 조직에 대하여 "선택적으로" 파괴적인 특이적 항신 생물제 화학제 또는 약물, 예를 들어 알킬화제, 티미딜레이트 합성효소 억제제를 포함하는 대사길항물질, 안트라사이클린, 식물 알칼로이드를 포함하는 항-미세관제, 토포이소머라제 억제제, parp 억제제 및 다른 항종양제를 말하고자 한다. 물론 이들 작용제들 중 다수는 심각한 부작용을 갖기 때문에, 이러한 맥락에서 "선택적으로"는 엄밀하지 않게 사용된다.
- [0167] 바람직한 용량은 치료되는 암의 본질에 기초하여, 진료의에 의해 선택될 수 있다.
- [0168] 본 개시내용의 방법에서 이용될 수 있는 알킬화제의 예는 알킬화제 질소 머스터드, 나이트로소유레아, 테트라진, 아지리딘, 플라틴 및 유도체, 및 비-고전적 알킬화제를 포함한다.
- [0169] 백금을 함유하는 화학요법제(플라틴으로도 지칭됨)의 예는, 예컨대, 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 사트라플라틴, 피코플라틴, 네다플라틴, 트리플라틴 및 리포플라틴(시스플라틴의 리포소말 형태), 구체적으로 시스플라틴, 카보플라틴 및 옥살리플라틴이 있다.
- [0170] 시스플라틴의 용량은 정확한 암에 따라 약 20 내지 약 270 mg/m²의 범위이다. 종종 용량은 약 70 내지 약 100 mg/m²의 범위에 있다.
- [0171] 질소 머스터드는 메클로레타민, 사이클로포스파미드, 멜팔란, 클로람부실, 이포스파미드 및 부설판을 포함한다.
- [0172] 나이트로소유레아는 N-나이트로소-N-메틸유레아(MNU), 카무스틴(BCNU), 로무스틴(CCNU) 및 세무스틴(MeCCNU), 포테무스틴 및 스트렙토조토신을 포함한다. 테트라진은 다카바진, 미토졸로마이드 및 테모졸로마이드를 포함한다.
- [0173] 아지리딘은 티오테파, 미토마이신 및 디아지쿠온(AZQ)을 포함한다.
- [0174] 본 개시내용의 방법에서 이용될 수 있는 대사길항물질의 예는, 항-플레이트(예를 들어, 메토틱렉세이트 및 페메트렉시드), 퓨린 유사체(예를 들어, 싸이오퓨린, 예컨대 아자싸이오퓨린, 머캅토피린, 싸이오퓨린, 플루다라빈(포스페이트 형태를 포함함), 펜토스타틴 및 클라드리빈), 피리미딘 유사체(예를 들어, 플루오로피리미딘, 예컨대, 5-플루오로우라실 및 이의 전구약물, 예컨대, 카페시타빈[젤로다(Xeloda)(등록상표)]), 플록스우리딘, 켄시타빈, 시타라빈, 데시타빈, 칼티트렉시드(토무텍스) 하이드로클로라이드, 클라드리빈 및 6-아자우라실을 포함한다.
- [0175] 본 개시내용의 방법에서 이용될 수 있는 안트라사이클린의 예는, 다우노루비신(다우노마이신), 다우노루비신(리포소말), 독소루비신(아드리아마이신), 독소루비신(리포소말), 에피루비신, 이다루비신, 현재 방광암의 치료에만 사용되는 발루비신 및 미토산트론, 안트라사이클린 유사체, 구체적으로 독소루비신을 포함한다.
- [0176] 본 개시내용의 방법에서 이용될 수 있는 항-미세관제의 예는, 빈카 알칼로이드 및 탁산을 포함한다.
- [0177] 빈카 알칼로이드는 완전한 천연 화학물질, 예를 들어 빈크리스틴 및 빈블라스틴, 및 또한 반합성 빈카 알칼로이드, 예를 들어 비노렐빈, 빈데신, 및 빈플루닌을 포함한다.
- [0178] 탁산은 파클리탁셀, 도세탁셀, 아브락산, 카바지탁셀 및 이의 유도체를 포함한다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 탁산의 유도체는, 예를 들어 미셀 제형으로, 탁솔과 같은 탁산의 제처방물질을 포함하며, 유도체는 또한 화학적 유도체를 포함하되, 합성 화학물질은 탁산인 출발 물질을 변형시키기 위해 이용된다.

- [0179] 본 개시내용의 방법에서 이용될 수 있는 토포이소머라제 억제제는 I형 토포이소머라제 억제제, II형 토포이소머라제 억제제 및 II형 토포이소머라제 독을 포함한다. I형 억제제는 토포테칸, 이리노테칸, 인도테칸 및 인디미테칸을 포함한다. II형 억제제는 제니스테인 및 하기 구조를 갖는 ICRF 193을 포함한다:
- [0180] II형 독은 암사크린, 에토포사이드, 에토포사이드 포스페이트, 테니포사이드 및 독소루비신 및 플루오로퀴놀론을 포함한다.
- [0181] 일 실시형태에서, 화학요법제는 PARP 억제제이다.
- [0182] 표지
- [0183] 일 실시형태에서, 페이로드는 형광 표지, 화학-발광 표지, 라디오 표지, 효소, 염료 또는 리간드를 포함한다.
- [0184] 본 개시내용에 따른 표지는 분석을 사용하여 검출될 수 있는 임의의 모이어티로서 정의된다. 리포터 분자의 비제한적인 예는 효소, 방사성표지, 합텐, 형광 표지, 인광 분자, 화학발광 분자, 발색단, 광친화성 분자, 착색 입자 또는 리간드, 예컨대, 비오틴을 포함한다.
- [0185] 표지 컨주게이트는 일반적으로 진단제로서 사용하기에 바람직하다. 진단제는 일반적으로 2가지 부류, 즉 시험관 내 진단에 사용하기 위한 것, 및 일반적으로 "유도된 영상화"로 알려진 생체 내 진단 프로토콜에 사용하기 위한 것에 포함된다. 펩티드 및 폴리펩티드에의 영상화제의 부착 방법과 같이, 다수의 적절한 영상화제가 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 5,021,236, 4,938,948, 및 4,472,509 참조). 사용되는 영상화 모이어티는 상자성 이온, 방사성동위원소, 형광색소, NMR-검출가능 물질, 및 X-선 영상화제일 수 있다.
- [0186] 상자성 이온의 경우, 크롬(III), 망간(II), 철(III), 철(II), 코발트(II), 니켈(II), 구리(II), 네오디뮴(III), 사마륨(III), 이테르븀(III), 가돌리늄(III), 바나듐(II), 테르븀(III), 디스프로슘(III), 홀뮴(III) 및/또는 에르븀(III)과 같은 이온이 예로서 언급될 수 있으며, 가돌리늄이 특히 바람직하다. X-선 영상화와 같은 다른 문맥에서 유용한 이온은 란타넘(III), 금(III), 납(II), 및 특히 비스무트(III)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.
- [0187] 치료 및/또는 진단 적용을 위한 방사성동위원소의 경우, 아스타틴²¹¹, ¹⁴탄소, ⁵¹크롬, ³⁶염소, ⁵⁷코발트, ⁵⁸코발트, 구리⁶⁷, ¹⁵²Eu, 갈륨⁶⁷, ³수소, 요오드¹²³, 요오드¹²⁵, 요오드¹³¹, 인듐¹¹¹, ⁵⁹철, ³²인, 레늄¹⁸⁶, 레늄¹⁸⁸, ⁷⁵셀레늄, ³⁵황, 테크네튬^{99m} 및/또는 이트륨⁹⁰이 언급될 수 있다. ¹²⁵I는 특정 실시형태에서 사용하기에 적합하고, 테크네튬^{99m} 및/또는 인듐¹¹¹은 이들의 낮은 에너지 및 장거리 검출에 대한 적합성으로 인해 특히 적합하다. 방사선으로 표지된 펩티드 및 폴리펩티드는 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 펩티드 및 폴리펩티드는 요오드화나트륨 및/또는 요오드화칼륨 및 화학적 산화제, 예컨대, 차아염소산나트륨, 또는 효소 산화제, 예컨대, 락토퍼옥시다제와의 접촉에 의해 요오드화될 수 있다. 펩티드는, 예를 들어 퍼테크네이트를 주석 용액으로 환원시키고, 환원된 네크네튬을 세파덱스(Sephadex) 컬럼 상으로 컬레이팅시킨 다음, 펩티드를 이 컬럼에 적용함으로써, 리간드 교환 공정에 의해 테크네튬^{99m}으로 표지화될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어 퍼테크네이트, 환원제, 예컨대, SNCl₂, 버퍼 용액, 예컨대, 소듐-갈륨 프탈레이트 용액, 및 펩티드를 항온처리함으로써, 직접 표지화 기법이 사용될 수 있다. 펩티드에 대한 금속 이온으로서 존재하는 방사성동위원소에 결합하기 위해 종종 사용되는 중간 작용기는 다이에틸렌트라이아민펜타아세트산(DTPA) 또는 에틸렌 다이아민테트라아세트산(EDTA)이다.
- [0188] 페이로드로서 사용하기에 적합한 형광 표지는 알렉사(Alexa) 350, 알렉사 430, AMCA, 보디피(BODIPY) 630/650, 보디피 650/665, 보디피-FL, 보디피-R6G, 보디피-TMR, 보디피-TRX, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), Cy3, Cy5, 6-FAM, 플루오레세인 이소싸이오시아네이트, HEX, 6-JOE, 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 오레곤 그린 500, 오레곤 그린 514, 퍼시픽 블루(Pacific Blue), REG, 로다민 그린(Rhodamine Green), 로다민 레드(Rhodamine Red), 레노그래핀(Renographin), ROX, 탐라(TAMRA), TET, 테트라메틸로다민, 및/또는 텍사스 레드(Texas Red)를 포함한다.
- [0189] 시험관 내에서 사용하기에 적합한 페이로드의 또 다른 유형은, 펩티드가 2차 결합 리간드 및/또는 색소생성 기질과 접촉시 착색 생성물을 생성할 효소(효소 태그)에 연결되는 경우이다. 적합한 효소의 예는 유레아제, 알칼리 포스파타제, (호스래디쉬) 수소 퍼옥시다제 또는 글루코스 옥시다제를 포함한다. 바람직한 2차 결합 리간드는 비오틴 및 아비딘 및 스트렙타비딘 화합물이다. 이와 같은 표지의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있으며,

예를 들어 미국 특허 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 및 4,366,241에 기재되어 있다.

[0190] 펩티드를 이의 컨주게이트 모이어티에 연결시키기 위한 부착에 대한 다른 방법이 당업계에 알려져 있다. 일부 부착 방법은, 예를 들어 유기 킬레이트제, 예컨대, 다이에틸렌트라이아민펜타아세트산 무수물(DTPA); 에틸렌트라이아민테트라아세트산; N-클로로-p-톨루엔설포나미드; 및/또는 항체에 부착된 테트라클로로-3 α -6 α -다이페틸 글리쿠릴-3(미국 특허 4,472,509 및 4,938,948)을 이용하는 금속 킬레이트 착체의 사용을 포함한다. 펩티드 또는 폴리펩티드는 또한 커플링제, 예컨대, 글루타르알데하이드 또는 페리오데이트의 존재 하에 효소와 반응할 수 있다. 플루오레세인 마커와의 컨주게이트는 이러한 커플링제의 존재 하에 또는 이소싸이오시아네이트와의 반응에 의해 제조된다.

[0191] 일 실시형태에서, 표지는 줄기세포의 핵을 염색 또는 표지화할 수 있다.

[0192] **본 개시내용에서 페이로드로서의 사용에 적합한 바이러스**

[0193] 일 실시형태에서, 본 개시내용에서 이용되는 바이러스는, 예를 들어 헤르페스바이러스(예컨대, 헤르페스 심플렉스 1), 폭스바이러스(예컨대, 백시니아 바이러스), 헤파드나바이러스, 플라비바이러스, 토가바이러스, 코로나바이러스, 간염 D, 오르토크소바이러스, 파라믹소바이러스(예컨대, 홍역 또는 뉴캐슬병 바이러스), 람도바이러스, 분야바이러스, 필로바이러스, 및 람도바이러스과(예컨대, 수포성구내염 인디아나 바이러스(VSV))로부터 선택되는, 외피보유 바이러스이다.

[0194] 일 실시형태에서, 본 개시내용에서 이용되는 바이러스는, 예를 들어 아데노바이러스과(예컨대, 아데노바이러스), 파필로마바이러스과, 피코르나바이러스과(예컨대, 콕사키 바이러스 또는 세네카밸리 바이러스(예를 들어, 세네카바이러스)), 레오바이러스로부터 선택되는, 외피 비보유 바이러스이다.

[0195] 일 실시형태에서, 바이러스는, 예컨대, 그룹 G 바이러스(구체적으로, Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 또는 이들의 키메라, 예컨대, 에나데노톡시레브), 그룹 C 바이러스(구체적으로, Ad1, 2, 5, 6 또는 이들의 키메라, 그룹 D 바이러스(구체적으로, Ad8, Ad10, Ad13, Ad15, Ad17, Ad19, Ad20, Ad22, Ad30, Ad32, Ad33, Ad36, Ad37, Ad38, Ad39, Ad42, Ad43, Ad44, Ad45, A46, Ad47, Ad48, Ad49, Ad50 또는 이들의 키메라), 그룹 E 바이러스(구체적으로, Ad4), 그룹 F 바이러스(구체적으로, Ad40, Ad41 또는 이들의 키메라) 및 그룹 B, C, D, E 또는 F 바이러스 중 둘 이상의 키메라로부터 선택되는, 아데노바이러스, 예를 들어 인간 아데노바이러스이다.

[0196] 대다수의 바이러스는 표적 세포 인식 및 흡수와 연관된 잘 설명된 단백질을 갖는다. 보다 선택적인 종양이 종양 용해성 바이러스로 표적화하는 것을 재유도하거나 가능하게 하는 바이러스의 트로피즘의 변형은 문헌[Verheije and Rottier, Adv. Virology 2012: 798526, 2012]의 개정판에 기재된 방법을 사용하여 도입될 수 있다.

[0197] 천연 바이러스 표적화에 관여하지 않는 추가적인 바이러스 세포 표면 단백질은 이들 단백질로 조작된 표적화 모티프를 가질 수 있다(예를 들어, 문헌[Ad virion minor coat protein IX Salisch et al., PLoS One 12: e0174728, 2017]).

[0198] 외피 바이러스는 바이러스 캡시드를 덮는 외부 막(외피)을 갖는다. 외피는 전형적으로 숙주 세포 막(인지질 및 단백질)의 일부로부터 유래될 뿐만 아니라, 일부 바이러스 단백질을 포함한다. 외피의 표면 상의 당단백질은 숙주 막 상의 수용체 부위를 식별하고 이에 결합하는 역할을 한다. 그 다음 바이러스 외피는 숙주의 막과 융합하여, 캡시드 및 바이러스 게놈이 숙주 내로 들어가 감염시킬 수 있게 한다.

[0199] 다양한 종양용해성 바이러스가 본 명세서에 참고로 포함된 W02014/13834에 개시되어 있다.

[0200] 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV)는, 이의 수용체인, 넥틴1 및 HVEM 중 하나에 결합하는 gD에 의해 캐스케이드 방식으로 활성화되는, 4가지 필수 당단백질, 즉 gD, gH/gL, gB에 의해 세포 내로 들어간다. HSV의 재표적화는 리간드 및 scFv의 gC 및/또는 gD 단백질 또는 gH로의 삽입에 의해 활성화되었다(Campadelli-Fiume, G et al., Rev in Med Virol 21: 213-226, 2011, Gatta, V PLoS Pathog 11: e1004907, 2015). 종양용해성 헤르페스 심플렉스 바이러스 1형 벡터는 임상 용도로 개발되었다. 이러한 바이러스는 복제 능력이 있고, 바이러스 복제, 신경병인성, 및 면역 회피에 영향을 미치는 유전자에 돌연변이를 가지며, 예를 들어 1세대 바이러스, 예컨대, NV1020(R7020), *d1sptk*, *d18.36tk*, *hrR3*, *R3616*, *1716*, 2세대 바이러스, 예컨대, G207(MGH-1), *3616UB*, *SUP*, NV1023, 3세대 바이러스, 예컨대, G47 Δ , 전사 발현 벡터, 예컨대, G92A, *d12.CALP*, *Myb34.5*, 이식유전자 발현 벡터, 예컨대, *rRP450*, 및 다른 바이러스, 예컨대, 탈리모진 라헤르파랩벡(T-Vec)을 포함한다. HSV-1 벡터는,

예를 들어 신경교종, 흑색종, 유방암, 전립선암, 결장암, 난소암, 및 췌장암을 포함하여, 광범위한 고휘 종양의 치료에 유용한 것으로 생각된다. HSV-1 바이러스는 광범위한 세포 유형 및 종을 감염시키고, 본질적으로 세포용해성이며, 바이러스의 복제 수명 주기는 숙주 세포 파괴를 초래하고, 이는 특성규명이 잘 되어 있는 거대한 게놈(152K)을 갖지만, 다수의 비필수적인 유전자를 함유하여 치료 유전자의 삽입을 위해 최대 30K의 공간을 제공한다. 일반적으로, HSV 바이러스는 안전상의 이유로 티미딘 키나제 유전자에서 돌연변이되지 않는다. 탈리모진 라헤르파렙백은 종양용해성 헤르페스 바이러스이며, 이는 흑색종의 치료에 사용하도록 승인되었다. 다른 헤르페스 기반 바이러스는 G207, SEPREHVIR(HSV-1716)(Virttu Biologics), HSV-1 R3616 돌연변이체, HSV-1 1716 돌연변이체, NV1020(R7020), R3616 돌연변이체(*RL1* 결실)를 포함하고, *UL48*(트랜스작용인자 외피 단백질 pUL48[VP16]을 인코딩함) 및 *RL2* 유전자에서 삽입을 갖는 KM100 돌연변이체, G92A, 돌연변이체, Myb34.5 및 rQNestin34.5를 포함한다.

[0201] **폭스바이러스**-백시니아 바이러스, 예컨대, 변형된 백시니아 양카라(MVA)가 이용될 수 있고(Galmiche MC et al., J Gen Virol 78: 3019-3027, 1997), MVA는 종양 연관 항원 MUC-1을 향해 유도되는 삽입된 scFv를 보유하는 p14 융합 분자로 대체될 수 있다(Paul, S et al., Viral Immunol 20: 664-671, 2007). 또한 문헌[Liang L et al., Viruses 6: 3787-3808, 2014]의 개정판, [Hsiao JC et al., J Virol 73: 8750-8761, 1999], [Chen TL and Roffler S, Med Res. Rev. 28: 885-928, 2008]의 개정판 및 [Kinoshita T et al., J Biochem 144: 287-294, 2008]을 참조한다. 제너렉스(Jennerex)에 의한 JX-594는 티미딘 키나제-결실 백시니아 바이러스 및 GM-CSF이다. GL-ONC1은 전임상 마우스 모델에서 광범위한 고휘 종양의 퇴행 및 제거를 야기하는 약독화된 백시니아 바이러스 (리스터(*Lister*) 균주)이다.

[0202] **파라믹소바이러스**(예컨대, 홍역 또는 뉴캐슬병 바이러스),

[0203] 홍역 바이러스(MeV)는 파라믹소바이러스과에 속하는 모빌리바이러스속의 단일 가닥, 네거티브-센스, 외피보유(비분절) RNA 바이러스이다. 홍역 바이러스는 2개의 외피 당단백질, 즉 헤마글루티닌(H) 부착 단백질 및 융합(F) 단백질을 갖는다. 부착, 진입 및 후속 세포-세포 융합은 2개의 홍역 수용체, 즉 CD46 및 신호전달 림프구 활성화 분자(SLAM)을 통해 매개된다. 예를 들어, 문헌[Msaouel P et al., Methods Mol Biol 797: 141-162, 2012, Robinson S. and Galanis, E. Expert Opin Biol Ther. 17: 353-363, 2017, Aref S et al., Viruses 8. Pii:E294, 2016]의 개정판; [Chen TL and Roffler S, Med Res. Rev. 28: 885-928, 2008 및 Kinoshita T et al., J Biochem 144: 287-294, 2008]의 개정판, 및 [Russell SJ and Peng KW, Curr Topic Microbiol. Immunol 330: 213-241, 2009, Robinson S and Galanis, E Expert Opin Biol. Ther 17: 353-363, 2017, Aref S et al., Viruses 8. Pii: E294, 2016]을 참조한다. 인간 갑상선 요오드화나트륨 공수송체를 인코딩하는 홍역 바이러스 즉 MV-NIS는 홍역 바이러스의 약독화된 종양용해성 에드몬스톤(Ed) 균주이다. 방사성 요오드 영상화는 NIS 유전자 발현 모니터링을 위한 새로운 기법을 제공한다.

[0204] 뉴캐슬병 바이러스가 또한 이용될 수 있다.

[0205] **아데노바이러스**과 아데노바이러스는 종양용해제로서 사용되는 가장 널리 연구된 바이러스 중 하나이다. 펩티드 및 단백질의 배열은 비리온 연관 바이러스 단백질로 조작되어 바이러스의 고유 트로피즘을 변경시켰다(문헌 [Verheije MH and Rottier PJM Adv Virol 2012: 798526, 2012]의 개정판). 그러나, 이들 모두는 핵에서의 바이러스 조립체에 의존적이며, 이는 중대한 과제를 제시한다.

[0206] 다른 외피 비보유 바이러스는 콕사키바이러스, 폴리오바이러스 및 레오바이러스를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Altan-Bonnet, N, Curr Opin Microbiol 32: 77-81, 2016 및 Chen YH et al., Cell 160: 619-630, 2015]의 개정판, [Chen TL and Roffler S, Med Res. Rev. 28: 885-928, 2008 및 Kinoshita T et al., J Biochem 144: 287-294, 2008]의 개정판, 및 [Verheije MH and Rottier PJM Adv Virol 2012: 798526, 2012]의 개정판을 참조한다.

[0207] 수많은 아데노바이러스, 예를 들어 전립선암의 치료를 개시하기 위한 것과 같은 Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12, 예를 들어 연조직육종의 치료를 위한, CGTG-102(Ad5/3-D24-GMCSF)(온코스 테라퓨틱스(Oncos Therapeutics)), 온코린(Oncorine(HI01)), CG0070, 에나데노톡시레브(EnAd) W02005/118825, W02008/080003에 개시된 OvAd1 및 OvAd2, 예를 들어 절제불가능한 악성 흉막 중피종을 위한 ONCOS-102, 및 예를 들어 신경교종을 위한 DNX-2401이 있다.

[0208] 카바탁(Cavatak)은 악성 흑색종의 치료에 유용한, 야생형 콕사키바이러스 A21의 제조에 대한 상표명이다. 예를 들어 소세포 폐암 및 신경모세포종을 위한, 세네카벨리 바이러스(NTX-010) 및 (SVV-001)

- [0209] **레오바이러스**-예를 들어 다양한 암 및 세포 증식성 장애의 치료를 위한, 레오리신(Reolysin)(등록상표)(펠라레 오렙(pelareorep); 야생형 레오바이러스; 혈청형 3 데어링(Serotype 3 Dearing); 온콜리틱스 바이오테크 (Oncolytics Biotech)).
- [0210] **수포성 구내염 바이러스(VSV)** VSV는 종양용해제에 대한 것으로 탐색되는 또 다른 외피 바이러스이다. 예를 들어, 문헌[Betancourt D et al., J Virol 89: 11786-11800, 2015] 및 [Hastie E and Grdzlishvili VZ J Gen Virol 93: 2529-2545, 2012]의 개정판을 참조한다.
- [0211] **바이러스에 의해 인코딩된 단백질**
- [0212] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 방법에서 이용되는 바이러스 또는 벡터는 이식 유전자를 포함하며, 예를 들어 여기서 이식유전자는 세포에서 결합이 있는 유전 물질을 대체하고, 세포에서 신규 또는 증강된 기능을 제공하며, 세포를 치료에 대해 감각시키고, 세포에서 기능을 차단하거나, 치료 단백질 또는 펩티드를 발현시키는 것이다.
- [0213] 일 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 페이로드로서 이용되는 바이러스는, 예를 들어 RNAi 서열, 단백질, 폴리 펩티드 또는 펩티드(예를 들어, 항체 분자 또는 이의 결합 단편, 케모카인, 사이토카인, 면역조절제, 형광 태그 또는 효소)로부터 독립적으로 선택되는 작용제를 인코딩하는, 이식유전자 또는 이식유전자들이다.
- [0214] 이는 전임상 가능성을 보였지만, 예를 들어 펩티드, 인트라바디 및 대안적인 스캐폴드의 전달을 위한 효과적이고 경제적인 수단이 없는 고유한 형태를 포함하지만, 이로 제한되지는 않으며(문헌[Boldicke T, Protein Sci 26: 925-945, 2017]의 개정판, [Marshall and Dubel, Comput Struct Biotechnol J 14: 304-308, 2016], [Miersch and Sidhu F1000Res 5.pii.F1000 Faculty Rev. 1947, 2016, Peptides, Tsomaia Eur J Med Chem 94:459-470, 2015], [Marshall ALJ et al, Mabs 7: 1010-1035, 2015], [AlDeghaither D et al., J Clin Pharmacol. 55: S4-S20, 2015]), 종양 세포 종양 줄기세포, 종양 연관 내피 및 종양 연관 기질에 대하여 치료 효과를 갖는 작용제를 포함한다. 특히 흥미로운 것은, 예를 들어 치료제, 바이오마커 및/또는 진단제와 같은 여러 기능을 할 수 있는 분자이다. 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(HSV-TK) 유전자는 임상적으로 승인된 전구약물(간시클로버-GCV)을 이용하는 잘 확립된 전구약물 전환 효소이다(예를 들어, 문헌[Holder et al., Cancer Res. 53: 3475-3485, 1993], [Touraine RL et al., Gene Therapy 5: 1705-1711, 1998]을 참조).
- [0215] 추가적으로, 티미딘 키나제 단백질 발현은 또한 치료 과정 동안 바이러스 요법의 활성을 영상화하고 추적하기 위해 활용될 수 있다. 양전자방출 단층촬영 및 단일광자 방출 연산 단층촬영은 둘 다 암 및 암 요법의 검출 및 모니터링에 일상적으로 사용되는 방법이며, 둘 다 적절한 티미딘 키나제 기질이 투여될 때 티미딘 키나제 단백질의 발현을 검출하는 수행가능한 수단이다(Wang JQ et al., Bioorg Med Chem 13: 549-556, 2005, Tjuvajev JG et al, J Nucl Med 43: 1072-1083, 2002). 대안적으로, NIS 유전자는 TK와 유사하게, 종양용해성 바이러스에서 진단 및 치료 목적을 위한 작용제로서 사용될 수 있고, 탐색되었다(Miller A and Russell S Expert Opin Biol Ther 16: 15-32, 2016, Ravera S et al., Annu Rev Physiol 79: 261-289, 2017, Portulano et al., Endocr Rev. 35: 106-149, 2014).
- [0216] 일 실시형태에서, RAS 신호전달 경로에서 RAS 또는 단백질과 상호작용하고 이를 억제하는 항체는, 예를 들어 GLA-성분을 갖는 융합 단백질로서 본 개시내용의 바이러스에서 인코딩된다. RAS 유전자는 HRAS, NRAS, 및 KRAS를 포함하는 다중 유전자 패밀리를 구성한다. 예를 들어, 문헌[Bos JL, Cancer Res. 49: 4682-4689, 1989]; 및 [Cetin M et al., J Mol Biol. 429:562-573, 2017]을 참조한다.
- [0217] **병용 요법**
- [0218] 일 실시형태에서, GLA-성분은 2차 요법, 예를 들어 항암 요법과 조합하여 이용된다. 이는 GLA-성분에 대하여 별도로 투여되는(즉, GLA-성분에 연결되지 않은) 요법이다.
- [0219] 일 실시형태에서, 이용되는 화학요법제의 병용은 본 명세서에 기재된 화학요법제, 예를 들어 플라틴 및 5-FU 또는 이의 전구약물, 예를 들어 시스플라틴 또는 옥사플라틴 및 카페시타빈 또는 젬시타빈, 예컨대, 폴폭스 (FOLFOX)이다.
- [0220] 일 실시형태에서, 화학요법은 화학요법제, 구체적으로 세포독성 화학요법제의 병용을 포함한다.
- [0221] 일 실시형태에서, 화학요법 병용은 플라틴, 예컨대, 시스플라틴 및 플루오로우라실 또는 카페시타빈을 포함한다.

- [0222] 일 실시형태에서, 화학요법 병용은 카페시타빈 및 옥살리플라틴(젤록스(Xelox))이다.
- [0223] 일 실시형태에서, 화학요법은, 선택적으로 옥살리플라틴과 조합하는, 폴리닉산 및 5-FU의 병용이다.
- [0224] 일 실시형태에서, 화학요법은, 선택적으로 옥살리플라틴(폴피리녹스(FOLFIRINOX))과 조합하는, 폴리닉산, 5-FU 및 이리노테칸(폴피리(FOLFIRI))의 병용이다. 요법은 다음으로 이루어진다: 폴리닉산(120분에 걸쳐 400mg/m²[또는 2 × 250 mg/m²] IV)과 동시에 이리노테칸(90분에 걸쳐 180 mg/m² IV); 그 다음 플루오로우라실(400 내지 500 mg/m² IV 볼러스) 후 플루오로우라실(46시간에 걸쳐 2400 내지 3000 mg/m² 정맥 주입). 이 주기는 전형적으로 2주마다 반복된다. 상기 나타난 투약량은 주기마다 달라질 수 있다.
- [0225] 일 실시형태에서, 화학요법 병용은 미세관 억제제, 예를 들어 빈크리스틴 설페이트, 에포틸론 A, N-[2-[(4-하이드록시페닐)아미노]-3-피리디닐]-4-메톡시벤젠설포나미드(ABT-751), 탁솔 유래 화학요법제, 예를 들어 파클리탁셀, 아브락산, 또는 도세탁셀, 또는 이들의 조합을 이용한다.
- [0226] 일 실시형태에서, 병용 요법은 mTor 억제제를 이용한다. mTor 억제제의 예는, 에베로리무스(RAD001), WYE-354, KU-0063794, 파파마이신(시롤리무스), 템시로리무스, 데포로리무스(MK-8669), AZD8055 및 BEZ235(NVP-BEZ235)를 포함한다.
- [0227] 일 실시형태에서, 병용 요법은 MEK 억제제를 이용한다. MEK 억제제의 예는 AS703026, CI-1040(PD184352), AZD6244(셀루메티닙), PD318088, PD0325901, AZD8330, PD98059, U0126-EtOH, BIX 02189 또는 BIX 02188을 포함한다.
- [0228] 일 실시형태에서, 병용 요법은 AKT 억제제를 이용한다. AKT 억제제의 예는 MK-2206 및 AT7867을 포함한다.
- [0229] 일 실시형태에서, 병용은 오로라 키나제 억제제를 이용한다. 오로라 키나제 억제제의 예는 오로라 A 억제제 I, VX-680, AZD1152-HQPA(바라셀팁(Barasertib)), SNS-314 메실레이트, PHA-680632, ZM-447439, CCT129202 및 헤스페라딘을 포함한다.
- [0230] 일 실시형태에서, 병용 요법은, 예를 들어 W02010/038086에 개시된 바와 같은 p38 억제제, 예컨대, N-[4-({4-[3-(3-tert-부틸-1-p-톨릴-1H-피라졸-5-일)우레이도]나프탈렌-1-일옥시}메틸)피리딘-2-일]-2-메톡시아세트아미드를 이용한다.
- [0231] 일 실시형태에서, 병용은 Bcl-2 억제제를 이용한다. Bcl-2 억제제의 예는 오바토클락스 메실레이트, ABT-737, ABT-263(나비토클락스) 및 TW-37을 포함한다.
- [0232] 일 실시형태에서, 병용 요법은, 항-PD-1 억제제 또는 항-PD-L1 억제제에 대한 체크포인트 억제제를 포함한다.
- [0233] 일 실시형태에서, 화학요법 병용은 대사길항물질, 예컨대, 카페시타빈(젤로다), 플루다라빈 포스페이트, 플루다라빈(플루다라), 데시타빈, 랄티텍시드(토무텍스), 켈시타빈 하이드로클로라이드 및 클라드리빈을 포함한다.
- [0234] 일 실시형태에서, 화학요법 병용은 간시클로버를 포함하며, 이는 면역 반응 및/또는 종양 혈관형성(vasculature)을 제어하는 것을 도울 수 있다.
- [0235] 일 실시형태에서, 화학요법은 PARP 억제제를 포함한다.
- [0236] 일 실시형태에서, 병용 요법은 DHODH 효소의 활성을 특이적으로 억제하는 암 대사의 억제제를 포함한다.
- [0237] 일 실시형태에서, 본 명세서의 방법에서 이용되는 하나 이상의 요법은 메트로노믹(metronomic)이며, 이는 종종 다른 요법 방법에 부수적으로 제공되는 저용량의 항암제를 이용한 연속적이거나 빈번한 치료이다.
- [0238] 일 실시형태에서, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8회의 다수의 치료(예컨대, 화학요법) 주기의 사용이 제공된다.
- [0239] 일 실시형태에서, 화학요법은 28일 주기로 이용된다.
- [0240] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 분자는 부형제, 희석제 및/또는 담체를 포함하는 약학 조성물로 제공된다. 일 실시형태에서, 조성물은 비경구 제형이다.
- [0241] 비경구 제형은 위장관(GI tract)을 통해 전달되지 않는 것으로 설계된 제형을 의미한다. 전형적인 비경구 전달 경로는 주사, 이식 또는 주입을 포함한다.
- [0242] 일 실시형태에서, 비경구 제형은 주사의 형태이다. 주사는 정맥내, 피하, 두개내, 척추강내, 종양내 또는 근육내 주사를 포함한다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 주사는 주사기를 통해 체내로 액체를 삽입하는 것을 의

미한다.

- [0243] 일 실시형태에서, 비경구 제형은 주입의 형태이다.
- [0244] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 주입은 적하, 주입 펌프, 시린지 드라이버 또는 동등한 장치에 의해 보다 느린 속도로 유체를 투여하는 것을 의미한다. 일 실시형태에서, 주입은 1.5분 내지 120분의 범위의 기간, 예컨대, 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 또는 115분에 걸쳐 투여된다.
- [0245] 일 실시형태에서, 제형은 정맥내(i.v.) 투여용이다. 이 경로는, 대부분의 기관 및 조직에 빠르게 접근할 수 있게 하고 전이, 예를 들어 확립된 전이, 특히 간 및 폐와 같은 고도로 혈관이 형성된 영역에 위치하는 전이의 치료에 특히 유용하기 때문에 특히 효과적이다.
- [0246] 치료 제형은 전형적으로 제조 및 저장 조건 하에서 멸균되고 안정적일 것이다. 조성물은 인간에게 투여하기에 적합한 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 다른 비경구 제형으로 제형화될 수 있고, 프리필드(pre-filled) 장치, 예컨대, 시린지 또는 바이알로서, 특히 단일 용량으로 제형화될 수 있다.
- [0247] 상기 논의된 바와 같이, 제형은 일반적으로 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체, 예를 들어 바이러스와 상용성인 무독성의 등장성 담체를 포함할 것이며, 여기서 바이러스는 필요한 시간 동안 안정적이다.
- [0248] 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들어 분산제 또는 계면활성제, 예컨대, 레시틴 또는 비이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리소르베이트 80 또는 40의 사용에 의해 적절한 유동성이 유지될 수 있다. 분산액에서, 필요한 입자 크기의 유지는 계면활성제의 존재에 의해 도움을 받을 수 있다. 등장화제의 예는 조성물 중 당, 폴리알코올, 예컨대, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함한다.
- [0249] 일 실시형태에서, 본 개시내용에 따라 GLA-성분 및 페이로드를 포함하는 부품의 키트가 제공되며, 여기서 페이로드는 상기 GLA-성분에 연결되거나 연결되지 않는다.
- [0250] 본 명세서의 문맥에서 "포함하는(comprising)"은 "포함하는(including)"을 의미하고자 한다.
- [0251] 기술적으로 적절한 경우, 본 발명의 실시형태는 조합될 수 있다.
- [0252] 실시형태는 특정 특징/요소를 포함하는 것으로 본 명세서에 기재되어 있다. 본 개시내용은 또한 상기 특징/요소로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어지는 별개의 실시예로 확장된다.
- [0253] 특허 및 출원과 같은 기술 참고문헌은 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0254] 기술적 배경은 본 명세서의 기술적 개시내용의 일부이며, 기술적 배경에서의 논의는 또한 본 기술의 분야 및 적용에서 직면하는 기술적 문제의 논의를 포함하므로 선행 기술을 논의하는 것으로 제한되지 않기 때문에, 보정의 기초로서 사용될 수 있다.
- [0255] 본 명세서에 구체적이고 명백하게 언급된 임의의 실시형태는 단독으로 또는 하나 이상의 추가 실시형태와 조합하여 권리포기(disclaimer)의 기초를 형성할 수 있다.
- [0256] 본 출원은 미국 일련 번호 62/554530, 62/569,403, 62/554533, 62/569,411, 62/584,565 및 62/593,014로부터의 우선권을 주장한다. 이들 출원 각각은 참조에 의해 포함되어 있다. 이들 출원은 본 명세서의 정정을 위한 기초로서 이용될 수 있다.
- [0257] 이제 본 발명은 하기 실시예를 참고로 하여 기재될 것이며, 하기 실시예는 단지 예시적이며, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0258] **실시예**
- [0259] **도 1a 내지 1d** GLA 단백질 구조의 다양한 표현.
- [0260] **도 1e** 본 개시내용에 따른 GLA-성분의 실시형태.
- [0261] **도 2** 세포사멸을 유도하기 위해 과산화물로 처리된 유방암 세포주의 단백질 S(PrS) 및 아넥신 염색. **A**, 과산화물로 처리하고 FITC-PrS로 염색한 인간 MDA-231 세포. **B**, A에서와 같이 염색한 미처리 MDA-231 세포. **C**, 아넥신으로 염색한 처리 MDA-231 세포. **D**, 과산화물로 처리하고 PrS로 염색한 인간 MCF-7 세포. **E**, D에서와 같은 뮤린 MET-1 세포. **F**, D에서와 같은 뮤린 4T1 세포.

- [0262] **도 3** PrS 및 아넥신의 중복되지만 별개의 세포 국소화. **A**, 과산화물로 처리하고 Cy5 PrS(적색) 및 FITC 아넥신(녹색)으로 염색한 무린 4T1 세포. 밝은 화살표, 공동국소화 신호; 적색 화살표, PrS로 염색하고 아넥신으로 염색하지 않은 세포; 녹색 화살표, 아넥신으로 상대적으로 더 밝게 염색하고 PrS로 덜 밝게 염색한 세포, 이는 별개의 결합 패턴을 나타냄(삽입물은 Prs 및 아넥신 염색을 개별적으로 나타냄). **B**, FITC PrS 및 Cy5 아넥신으로 염색한 처리된 4T1 세포. 녹색 화살표, PrS로 염색하고 아넥신으로 염색하지 않은 세포. **C**, 1,000배 과량의 차가운 아넥신과 함께 사전배양한 처리된 4T1 세포의 Cy5 아넥신 염색.
- [0263] **도 4** PrS 및 아넥신을 이용한 세포사멸 COS-1 세포의 염색. 세포를 기재한 바와 같이 t-BHP로 처리하고 FITC 아넥신(왼쪽) 및 Cy5 PrS(오른쪽)로 염색하였다. 화살표는 세포사멸체인 것으로 추정되는 세포이하 구조를 나타낸다.
- [0264] **도 5** PrS 및 아넥신을 이용한 세포의 소포의 차별적 염색. 세포의 소포를 4T1 세포로부터 준비하고 FITC PrS(녹색) 및 Cy5 아넥신(적색)으로 염색하였다. 화살표는 아넥신 단독(적색 화살표), PrS 단독(녹색 화살표) 및 두가지 단백질(밝은 화살표)로 염색한 소포를 나타낸다.
- [0265] **도 6** PrS 및 아넥신의 세포이하 국소화. **A**, **B**, 세포사멸 4T1 세포를 FITC PrS(녹색 화살표) 및 Cy5 아넥신(적색 화살표)으로 염색하였고; 밝은 화살표는 공동국소화. **C**, 가능한 세포사멸체.
- [0266] **도 7** 5분 이내 PrS의 국소화. 세포사멸 4T1 세포를 FITC PrS(녹색) 및 Cy5 아넥신(적색)으로 염색하고 단백질 첨가 후 10분 이내에 영상화하였다. **A**, 병합한 이미지. **B**, 웨스트(Hoescht) 핵 염색 단독.
- [0267] **도 8** 마우스에서 4T1 종양의 BLI 이미지.
- [0268] **도 9** 방사성표지된 PrS 및 아넥신을 사용한, 4T1 종양에 대한 독소루비신의 영향의 SPECT 영상화. 4T1 유방암 종양을 갖는 마우스를 99mTc PrS(A 및 B), 또는 아넥신(C 또는 D)을 이용하여, 독소루비신 처리 전(A 및 C) 및 24시간 후(B 및 D)에 영상화하였다.
- [0269] **도 10** 사이클로헥사미드-처리 마우스의 SPECT 영상화, 패널당 5마리의 마우스를 처리 전(A 및 C) 및 24시간 후(B 및 D)에 나타낸다. 마우스를 ^{99m}Tc PrS(A 및 B), 또는 아넥신(C 및 D)으로 영상화하였고, 화살표는 간 신호의 증가를 나타낸다.
- [0270] **도 11** 감염된 비장에 대한 Cy5 PrS의 국소화. CD1 마우스를 생물발광 리스테리아(*Listeria*)로 감염시키고, 감염 후 제2일에 영상화하였다. 마우스에 Cy5 PrS를 주사하고 30분 후에 희생시켰으며, 비장을 제거한 다음 동결시켰다. 적당히 감염된 마우스(A) 및 감염되지 않은 대조군 마우스(C)를 나타낸다. Cy5 채널에서 각각의 마우스의 감염된 비장(B) 및 감염되지 않은 비장(D)의 절편을 위상차 이미지와 병합하여 나타낸다.
- [0271] **도 12** 독소루비신으로 처리한 종양에 대한 Cy5 PrS의 국소화. 4T1 유방암 종양을 이식한 마우스를 독소루비신으로 처리하거나(오른쪽 패널) 또는 처리하지 않은 상태로 두었다(왼쪽 패널). 24시간 후 마우스에 Cy5 PrS를 정맥내 주사하고 30분 후에 희생시켰다. 종양을 제거하고, 동결시킨 다음, 형광 현미경 검사를 위해 절편화하였다. 4마리의 상이한 마우스로부터의 병합된 Cy5/위상차 이미지를 나타낸다.
- [0272] **도 13** TSC의 분화. TSC를 성장 인자의 존재(왼쪽) 또는 부재(오른쪽) 하에서 배양하였다. 오른쪽 패널의 화살표는 분화의 거대 세포 특징을 나타낸다.
- [0273] **도 14** 세포영양막 줄기세포 및 분화된 세포영양막의 PrS 염색. 성장 인자의 회수에 의해 세포영양막 줄기세포(왼쪽)를 세포영양막 거대 세포(오른쪽)로 분화시켰다. 세포를 Cy5 PrS로 염색하고 영상화하였다.
- [0274] **도 15** MSC 분화. 지방세포(상부 패널) 또는 조골세포(하부 패널)로의 분화를 위해, 본문에 기재된 바와 같이 MSC를 처리하였다. 분화된 세포는 각각의 경우에 예상되는 형태를 나타냈다.
- [0275] **도 16** PrS(녹색), 아넥신(적색), 및 웨스트(청색)로 염색한 MSC. 염색 혼합물을 첨가한 후 10분 이내에 세포를 영상화하였다.
- [0276] **도 17** PrS(녹색, 가장 밝은 영역), 아넥신(적색, 세포막 주위 밝은 영역), 및 웨스트(청색)로 염색한 TSC. 염색 혼합물을 첨가한 후 5분 이내에 세포를 영상화하였다.
- [0277] **도 18** TSC 소포의 차별적 염색. TSC를 **도 17**에서와 같이 염색하였다. 세포의 그룹은 PrS(녹색)가 아닌 아넥신(적색)으로 염색한 분비성 거대 소포이다.
- [0278] **도 19** C17.2 신경 전구 세포의 PrS 염색. 세포를 PrS-FITC로 염색하고 표준(비-공초점) 현미경으로 영상화하였

다.

- [0279] **도 20** 4C에서 TSC로 PrS의 내재화. FITC PrS(녹색) 및 Cy5 아넥신(적색)을 4C에서 TSC에 첨가하고 공초점 현미경으로 영상화하였다.
- [0280] **도 21** 마우스 골수 유래의 계통-음성, SCA-1/c-키트 염색 세포. 분석의 이 지점에서 PI(프로피디움 요오다이드; 죽은 세포를 검출함) 또는 PrS로 세포를 염색하지 않았다. 조혈 계통(왼쪽 패널)에 대한 염색 및 c-키트 및 SCA1(오른쪽 패널)의 염색의 부재는 녹색(가장 밝은 영역)으로 나타낸, HSC의 집단을 정의한다.
- [0281] **도 22** 장기 HSC의 PrS 염색. HSC를 도 1에서와 같이 단리하고, FITC PrS로 염색하였다. SLAM 패턴을 Cy7(x-축)로 결정하였다.
- [0282] **도 23** 단기 HSC의 PrS 염색. HSC를 도 1에서와 같이 단리하고, FITC PrS로 염색하였다. SLAM 패턴을 Cy7(x-축)로 결정하였다.
- [0283] **도 24** 장기 HSC에서 PrS의 내재화. HSC를 기재한 바와 같이 준비하고, PrS에 대하여 염색하였으며, 공초점 현미경으로 검사하였다. 녹색(가장 밝은 영역), FITC PrS; 청색, 웨스트 핵 염색; 적색, PI. PI 염색은 핵에서 배제되었으며, 이는 세포가 살아있음을 나타낸다.
- [0284] **도 25** 핵 PI를 나타내는 죽은 HSC의 예.
- [0285] **도 26** GLA-매개 전달은 세포에 대하여 무독성임.
- [0286] 본 명세서에는 또한 관련 서열 목록에 서열 1 내지 6을 포함한다.
- [0287] 본 연구과제는 SPECT(Single Photon Computed Tomography; 단일광자 연산 단층촬영)를 위해 생체 내 영상화제로서 표지된 재조합 PrS의 시험을 개시하였다. 놀랍게도, 상기 분자는 사멸 세포 내로 빠르게 내재화하였음을 발견하였다. 이러한 예상치 못한 발견으로 본 발명자들은 이 현상을 더 탐구하게 되었고, 그 결과 본 발명자들은 PrS가 또한 여러 유형의 비-세포사멸 줄기세포의 하위세트로 내재화됨을 발견하였다.
- [0288] PrS는 서열번호 6에 나타낸 바와 같은 단백질 S GLA 도메인 및 단백질 S EGF 도메인이다.

방법

- [0290] 형광의 경우, Cy5 및 FITC의 컨쥬게이션은 각각 아머샴(Amersham; GE 헬스케어(GE Healthcare)) 및 모레큘러 프로브즈(Molecular Probes; 인비트로젠(Invitrogen)) 표지화 키트를 사용하여, 제조사의 지침에 따라 획득하였다. 두 가지 키트 모두 컨쥬게이션되지 않은 형광단의 제거를 위한 컬럼을 제공한다. 처음에, 1 ml 중 0.77 mg의 PrS(분획 2) 및 1 ml 중 0.77 mg의 아넥신을 FITC로 표지화하여 사멸 세포에 대한 결합 특이성에 대하여 시험하였다. 공동국소화 및 경쟁 연구를 위하여, 1 ml 중 0.68 mg의 PrS(분획 3) 및 0.68 mg의 아넥신을 Cy5로 표지화하였다. 공초점 현미경 검사의 경우, 두번째 적하물로부터의 0.76 mg의 PrS를 FITC로 표지화하고, 사전 표지화한 Cy5-컨쥬게이트 아넥신을 사용하였다. 표지화 키트 제조사의 지침에 따라, 표지화의 정확한 효율성은 결정되지 않았으며, 컬럼으로부터의 회수율은 85%인 것으로 가정하였음을 주목하여야 한다. 따라서, 임의의 경우에 2가지 단백질의 상대적인 염색 강도는 이러한 우발사태를 반영할 수 있다. 처음에 세포를 30분 동안 염색하였으나, 이후 5분 미만이면 충분하다고 결정하였다. 사멸 세포-특이성에 대한 PrS를 시험하기 위해, 처음에 4가지 유방암 세포주, 즉 인간 MDA-231과 MCF7 및 무린 4T1과 MET-1을 이용하였다. 이후, COS-1 원숭이 신장 세포를 또한 사용하였다. 과산화수소 또는 3급-부틸 하이드로퍼옥사이드(t-BHP)를 이용하여 세포사멸을 유도하였다. 웰당 6×10^4 개의 세포로 24-웰 플레이트에 또는 웰당 1×10^4 개의 세포로 에펜도르프(Eppendorf) 챔버 슬라이드에 세포를 도말하고, 다음날 30분 내지 2시간의 시점 동안 2 mM H₂O₂, 또는 t-BHP를 사용하여 세포사멸을 유도하였다. 유도 후, 웰을 아넥신 결합 버퍼(AB; 산타 크루즈 바이오테크(Santa Cruz Biotech))로 세척하고, 표지화된 단백질로 염색하였다. 과거 경험 및 문헌으로부터, 5.5 µg/ml의 아넥신 단백질을 염색에 사용하였다. 이 양은 제공된 겔 이미지를 기초로 하여, 아넥신의 분자량이 36 kD이고 재조합 PrS의 분자량이 30 kD인 것으로 가정함으로써 PrS의 등몰 첨가를 위해 조정되었다. 세포를 15분 동안 염색하였다. 웨스트 33342 염료를 핵산을 시각화하기 위해 사용하였다. 그 다음, 웰을 AB로 세척하고, 여전히 생존하는 동안 EVOS 형광 현미경을 사용하여 관찰하였다. 공초점 현미경 검사를 위해, 스탠포드 셀 사이언시스 이미징 퍼실리티(Stanford Cell Sciences Imaging Facility)에서 라이카(Leica) SP8 현미경을 이용하였다. 그 다음, 웰을 AB로 세척하고, 라이카 sp8 현미경을 사용하여 관찰하였다. 웨스트 33342 염료를 핵을 시각화하는 데 사용하였다. 독성 연구를 위해, PrS를 세포영양막 줄기세포(TSC)에 첨가하고, 넥셀롬 셀로미터(Nexcelom Cellometer)를 사용하여 트립판 블루로 생

존력을 시험하였다.

[0291] 종양을 검출하는 능력에 대해 표지화된 단백질을 시험하기 위해, 5마리의 수컷 BALB/c 마우스 그룹으로 좌측 액와 지방체에 5×10^4 개의 4T1-luc 세포를 이식하였다. 이식 후 제1주일에 시작하여, 마우스를 생체 내 생물발광 영상(BLI)으로 매일 영상화하여 종양 성장을 모니터링하였다. 그 다음, 이식 후 제11일에 13 mg/kg 체중의 복강내(IP) 독소루비신으로 마우스를 처리하고, 다음날 BLI를 수행하였다. 종양을 보유한 대조군 마우스를 독소루비신으로 처리하지 않은 채로 두었다. 처리 48시간 후, 단일 헤드 A-SPECT 감마 카메라(감마 메디카(Gamma Medica)); 1 mm 핀 홀 콜리메이터, 128×128 영상화 매트릭스로 128 단계, 단계당 15초, 2.7 cm ROR; FOV = 상부 흉부/목을 이용하여 정맥내 추적자 주사(마취 1.3 g/우레탄 IP의 kg) 1시간 후 마우스를 영상화하였다. 각각의 단백질의 주사 용량은 $160 \mu\text{l}$ (800 μCi)였다. 그 다음 동물을 희생시키고, 생물분류를 수행하였다. 사이클로헥시미드 처리 실험을 위해, 5마리의 젊은(7주령) 수컷 스위스 웹스터 마우스 그룹을 마취시키고(1.3 g/우레탄 IP의 kg) 50 mg/kg의 사이클로헥시미드를 정맥내 주사하였다. 사이클로헥시미드 주사 1시간 45분 후에, 추적자를 주사하였다(PrS = 용량당 $180 \mu\text{l}/1.2 \text{ mCi}$; 아넥신 V = 용량당 $170 \mu\text{l}/1.05 \text{ mCi}$). 추적자 주사 45분 후, A-SPECT 감마 카메라 상에서 단일 헤드 평행 홀 콜리메이터(128×128 매트릭스)를 사용하여 10분 고정된 전신 이미지로 영상화하였다.

[0292] 살아있는 동물에서의 감염으로 인한 세포사멸 부위의 형광성 PrS의 특이적 국소화에 대하여 시험하기 위해, 생물발광 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)를 이용하여 CD1 마우스에 정맥내 주사하였다. 이 박테리아 병원체는 단핵구 및 과립구의 광범위한 세포사멸이 일어나는 비장을 포함한 많은 기관을 감염시킨다. 감염 후 특정 시점에서, 비장은 박테리아 복제의 주요 부위이므로, 박테리아 유래의 비장 BLI 신호는 세포사멸을 위한 프로브의 국소화와 상관될 수 있다. 마우스를 감염시키고 매일 영상화하였다. 비장 신호가 명백한 경우(8주령 CD1 암컷 마우스에서 박테리아의 2×10^5 개 콜로니 형성 단위에 대하여 감염 후 제2일), 체질량 kg 당 300 mg의 Cy5 PrS를 마우스에 주사하고, 동물을 30분 후에 희생시킨 다음, 비장을 제거하고, OCT에서 냉동시켰으며, 형광 현미경 검사를 위해 절편화하였다. 감염되지 않은 대조군 마우스를 이용하였다.

[0293] 유세포 분석을 수행하였다. 상기 기재된 바와 같이 제조한 새로 표지화된 FITC PrS를 이용하였다. 무린 조혈 줄기세포(HSC)를 본 실험실에서 일상적으로 정제하였다. c-키트+, 계통-음성 세포에 대해 염색함으로써 정상 마우스 골수로부터 세포를 단리하였다. 세포를 추가로 특성규명하기 위하여, SLAM 마커 염색을 또한 수행하였다. 이들 마커는 자기 재생하고(self-renew) 분화하는 세포를 염색하는 반면, 비-염색 HSC는 단지 분화만 할 수 있다. FITC PrS를 이용한 후속 염색은 결과에 나타난 바와 같이, SLAM-염색 세포에서 양의 백분율을 나타내었다. 그 다음 FITC에 대하여 세포를 분류하고, 핵 시각화를 위해 웨스트 33342를 사용하여 공초점 현미경으로 검사하였다.

[0294] **결과**

[0295] 세포 배양에서의 세포사멸 맥락에서 PrS 결합 특이성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 몇몇 인간 및 무린 유방암 세포주를 이용하였다. 상기 기재된 바와 같이, 과산화물을 이용하여 세포사멸을 유도하였고, FITC PrS 결합을 평가하였다. 이들 실험의 예는 도 2에 나타나져 있다. 미처리 세포는, 예컨대, 도 2의 패널 B에 나타난 바와 같이, 최소의 결합을 나타내었다. 농도가 더 높고/거나 배양 시간이 더 길수록 세포가 분리되고 염색 및 현미경 검사가 가능하지 않게 되므로, 소수의 세포만이 영향을 받도록 과산화물의 농도 및 배양 시간을 선택하였다. 추가적으로, 다수의 영향 받지 않은 세포의 존재는 각각의 영역 내에서 내부 음성 대조군으로서 작용하였다. FITC-아넥신은 PrS와 유사한 세포사멸에 대한 특이성을 나타내어, 내부 양성 대조군으로서 작용하였다. 그 다음, 본 발명자들은 공동국소화 및 경쟁 결합에 대해 2가지 단백질을 시험하였다. 공동국소화를 위해, FITC와 Cy5 표지화 PrS 및 아넥신을 준비하였다. 4T1 세포를 과산화물로 처리하고, 형광단의 2가지 조합을 사용하여 Cy5와 FITC 표지화 PrS 및 아넥신으로 염색하였다. 그 다음, 세포를 EVOS 형광 현미경으로 시각화하였다. 결과는 도 3에 도시되어 있다. 시험 조건 하에서, 밝게 염색된 세포 모두 2가지 단백질 모두에 의한 염색을 나타내었다. 그러나, Cy5를 사용하든 FITC를 사용하든, PrS는 약하더라도, 아넥신이 염색하지 않는 일부 세포를 염색하는 것으로 나타났다(도 3). 각각의 단백질에 의한 상이한 세포의 상대적인 염색 강도는 2가지 프로브 사이에서 때때로 상이하였고, 즉 때때로 아넥신은 2가지 세포를 동일한 강도로 염색하고 PrS는 그렇지 않았으며, 그 반대일 수도 있었다(도 3a, 녹색 화살표 및 삽입물). 따라서, 2가지 프로브는 일반적으로 동일한 세포를 염색하였지만, 이들 프로브는 미묘한 차이를 나타내는 것으로 보였다. 경쟁 분석에서, 과량의 비표지화 아넥신을 증가시키면서 15분 동안 세포사멸 4T1 세포와 사전 배양한 다음, 세포를 Cy5 PrS로 염색하였다. 놀랍게도, 이들 단백질이 동일한 표적 분자인 노출된 PS에 결합하는 것으로 생각되지만, PrS의 염색은 심지어 시험한

가장 높은 과량인 1,000배 과량의 아넥신에 의해서도 차단되지 않았다(도 3c). 아넥신 및 PrS의 공동 염색을 많은 세포 유형에서 관찰하였다. 2가지 단백질은 일반적으로 각각의 세포 유형에서 동일한 세포를 염색했지만, 다른 차이점이 명백해졌다. 구체적으로, 세포보다 더 작은 일부 물체가 차별적으로 염색되었다(도 4). 과산화물 처리 후 증가된 수로 존재하는 이들 물체는 세포사멸체, 즉 사멸 세포의 단편화 동안 생성된 막-결합 세포 단편으로 해석되었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 이들 물체 중 일부가 2가지 단백질 모두로 염색되었지만, PrS는 이들 물질을 염색한 반면, 아넥신은 그렇지 않았다. 이러한 관찰은 예상치 못한 것이었다. 세포이하 물질의 차별적인 염색을 추가로 탐구하기 위해, 세포의 소포(EV)를 표준 원심분리 프로토콜을 사용하여 4T1 무린 종양 세포로부터 준비하였다. 2가지 단백질은 또한 이들 소포를 차별적으로 염색하였으며(도 5), 이는 생물학적 및 치료적 영향을 미칠 수 있는 결과이다.

[0296] EV, 특히 엑소좀, 미세소포(MV) 및 세포사멸체(AB)는 세포 사이의 생체분자의 전달을 통해 세포-세포 통신에서 중요한 역할을 하는 것을 추정된다. EV의 이들 유형의 생물발생은 상이하며, 이는 엔도솜(엑소솜) 또는 원형질막(MV)에서 유래되거나 또는 프로그래밍된 세포 사멸(AB)의 산물이다. 모든 포유동물 세포는 EV를 분비하는 것으로 생각된다. EV의 각각의 유형은 분자 화물을 이웃 세포 및 먼 세포 모두로 전달하여, 세포 거동, 예컨대, 종양 발달 및 진행에 관련된 세포 거동에 영향을 미칠 수 있다. 실제로, EV는, 증식 신호전달의 유지, 성장 억제의 회피, 세포 사멸의 저항, 에너지 대사의 재프로그래밍, 게놈 불안정성의 획득, 및 종양 미세환경의 개발을 포함하여, 암의 거의 모든 특징에서 역할을 할 수 있다. EV는 또한 혈관신생의 유도, 침입의 제어, 전-전이 틈새의 개시, 염증의 지속, 및 면역 감시의 회피에 연루되었다. 면역 세포는 또한 EV를 통해 통신하는 것을 보이며, EV를 종양 세포, 감염된 조직 및 상처로부터의 신호로서 인식할 수 있다. EV의 생물학 및 암의 특징에 대한 이들의 기여에 대한 더 깊은 이해는 암의 진단 및 치료에 있어서 새로운 가능성으로 이어지고 있다. 추가적인 EV 표면 마커의 개발이 이 분야를 진전시키는 데 필수적이며, PrS는 그러한 결정 요인이 될 수 있다.

[0297] 형광 현미경 검사를 이용한 이러한 연구 후, 그 다음 PrS 및 아넥신에 의한 염색의 세포이하의 국소화를 공초점 현미경 검사를 통해 평가하였다. 무린 4T1 세포(Luc-GFP 수용체 결핍)를 챔버당 1×10^4 개의 세포로 8-부분 챔버 슬라이드 상에 도말하고, 다음 날 2 mM H₂O₂ 또는 t-BHP(2시간 노출)로 세포사멸을 유도하였다. 그 다음, 세포를 세척하고 PrS 및 아넥신으로 15분 동안 염색하였다. 웨스트 33342 염료를 핵산을 염색하는 데 사용하였다. 모든 경우에서, 가장 밝게 염색한 세포는 2가지 프로브로 염색되었다. 그러나, 많은 세포에서, 표지된 PrS는 세포질에서 관찰된 반면, 표지된 아넥신은 그렇지 않았다(도 6). 아넥신은 내재화되어 몇몇 세포의 소포에서 나타나지만, 동일한 세포에서 표면에 국소화된 PrS와 함께 내재화된 아넥신은 관찰되지 않았다. 2가지 단백질이 모두 PS에 결합하는 것으로 추정되기 때문에, 이러한 결과는 예상치 못한 것이었다. PrS의 내재화를 추가로 연구하기 위해, 시간 경과 실험을 수행하였다. 세포사멸 4T1 세포를 Cy5 아넥신 및 FITC PrS로 5분 동안 염색하고, 프로브 첨가 후 5분 이내에 관찰하였다. PrS는 이들 세포의 세포질에서 즉시 관찰되었으며, 이는 5분 이내에 내재화를 나타내는 것이다(도 7). 시간 경과 이미지는 또한 PrS 및 아넥신이 초기 시점에서 항상 동일한 세포를 동일하게 염색하지 않는다는 것을 나타내었다. 왼쪽의 세포는 명백히 온전한 핵막으로 둘러싸인 비응축 핵을 나타내는 반면, 오른쪽의 세포는 종종 세포 사멸 과정에서 후반에 발생하는 염색질 응축의 특징인 강한 염색을 나타내므로, 도 7의 세포는 세포사멸의 상이한 단계에 있는 것으로 보인다. 이와 같은 염색 패턴은, PrS가 세포사멸에서 아넥신보다 더 일찍 결합한다는 것을 나타낼 수 있다. 이 시점에서 순전히 추측하는 것이지만, 이와 같은 신호는 지금까지 관찰된 이들 단백질 사이의 많은 차이점을 설명할 것이다. 예를 들어, 도 3a 및 3b에서와 같이, 아넥신이 아닌 PrS에 의한 일부 세포의 염색은 세포사멸의 과정에서 보다 이른 PrS의 결합으로 인한 것일 수 있다. 살아있는 동물에서 PrS 국소화를 조사하기 위해, 몇 가지 실험을 수행하였다. 이들 연구는 생체 내 세포사멸의 화학적 및 감염성 유도뿐만 아니라, 세포사멸을 유도하는 것으로 알려진 독소루비신으로 처리한 종양에 대한 PrS의 국소화를 이용하였다. HYNIC-표지화 PrS 및 아넥신을 사용한 SPECT 영상화는 4T1Luc 유방 종양이 제공되고 독소루비신으로 처리한 동물에서 수행하였다. 4T1 종양은 루시페라제로 표지화되었으며, 이는 생체 내 생물발광 영상화(BLI)를 사용하여 마우스에서 영상화될 수 있다. 이 실험으로부터의 이미지 중 하나가 도 8에 도시되어 있다. 이 방법은 종양 이식을 평가하고 시간 경과에 따라 개별 동물에서의 진행을 추적하는 데 사용될 수 있다. 그 다음, ^{90m}Tc로 표지화한 PrS 및 아넥신을 독소루비신으로 처리한 동물 및 대조군의 SPECT 영상화에 이용하였다. 결과의 예가 도 9에 도시되어 있다. 2마리 동물의 머리 및 흉부의 이미지는 침샘에서 PrS 프로브의 비특이적 축적, 및 이 프로브를 사용한 낮은 신호대잡음비율을 나타낸다. 따라서, 나타난 PrS 이미지에서 디스플레이의 임계값이 낮아져서 더 많은 백그라운드를 나타내며, 이는 이미지의 더 밝은 가상색을 초래한다. 낮은 신호대잡음비율은 최적이지 아닌, 단지 1 mg의 단백질의 HYNIC 표지화에 의한 것, 및 또한 HYNIC:단백질 표지화 비율의 제어된 연구의 수행 불능에 의한 것일 수 있다.

[0298] 간에서 세포사멸을 유도하는 사이클로헥사미드로 처리한 마우스의 SPECT 영상화를 또한 수행하였다(도 10). 도 10에서, 5마리 마우스의 전신 이미지가 각각의 패널에 도시되어 있다. 많은 방사성표지된 프로브를 이용하는 것과 같이, 신장에서 백그라운드가 보인다. 사이클로헥사미드를 이용한 마우스의 처리는 간에서 아넥신 SPECT 신호를 증가시켰다. 다시, PrS는 아넥신에 비하여 낮은 신호를 나타내었다. 아넥신은 사이클로헥사미드 처리된 마우스의 세포사멸 간을 검출할 수 있었지만, PrS는 처리로 인해 간에서 약간의 신호 증가만을 나타내었다. 독립적으로 SPECT 영상화의 세포사멸 조직 및 처리된 종양에 대한 PrS의 국소화 및 HYNIC 표지화의 수반되는 합병증을 시험하기 위하여, 세포사멸 반응을 유도하는 박테리아로 감염된 마우스 및 종양 보유 마우스에 Cy5 PrS를 주사하였다. 감염을 위해, 본 발명자들은 루시페라제로 표지화되고 BLI에 대해 특성규명이 잘 된 박테리아 병원체인 리스테리아 모노사이토게네스를 이용하였다. 비장으로부터의 특징적인 BLI 신호는 우수한 공동 국소화 연구를 제공한다. CD1 마우스를 상기 기재한 바와 같이 감염시키고 감염 후 제2일에 BLI로 영상화하였다. 그 다음, 마우스에 Cy5 PrS를 주사하고 30분 후에 희생시키고, 비장을 절편화 및 형광 현미경 검사를 위해 제거하였다(도 11). 모든 경우에, 감염된 마우스로부터의 비장 절편은 대조군보다 훨씬 더 큰 Cy5 형광 신호를 나타내었다. 도 11에서, 나타낸 감염된 마우스는 낮은 광자 수를 보였으며, 이는 감염이 이 동물에서 아직 상당히 진행되지 않았음을 나타낸다. 많은 마우스가 이 날 비장으로부터의 이 신호 강도의 10배를 나타낸다. 그러나, Cy5 채널 형광은 나타낸 감염되지 않은 대조군에 비해 여전히 매우 강했다. 이러한 결과는, 과립구 및 대식세포가 이러한 동물에서 아넥신 신호의 주요 공급원인 것으로 나타났으므로, 감염에 대한 진행중인 선천적 면역 반응을 반영할 수 있다(이들 세포는 세포사멸이 조직 파괴를 제한하도록 프로그래밍된다).

[0299] 그 다음, 독소루비신으로 처리된 4T1 종양에 대한 형광 PrS의 국소화를 시험하였다. 종양이 이식된 마우스를 상기 기재한 바와 같이 독소루비신으로 처리하고 Cy5 PrS를 정맥 내 주사하고 30분 후에 희생시켰으며, 절편화 및 형광 현미경 검사를 위해 종양을 제거하였다. 결과는 도 12에 도시되어 있다. 강하게 염색된 영역이 처리된 동물에서 관찰된 반면, 더 약한 신호가 비처리 종양 절편에서 관찰되었다. 일부 비처리 종양이 백그라운드보다 더 높은 신호의 작은 영역을 나타내었지만, 처리된 종양과 유사한 강도의 신호는 비처리 절편 중 어느 것에서도 관찰되지 않았다.

[0300] 줄기세포는 분화된 세포와 표현형이 구별되며, 비-세포사멸적으로 PS를 발현하여 면역 반응의 유도를 피할 수 있다. 세포영양막 줄기세포(TSC)는 배양물에서 여러 유형의 세포영양막으로 분화된다. TSC는 섬유아세포 성장 인자, 액티빈, 및 헤파린의 존재 하에서 성장된 마우스 자궁 스크래핑(scraping)으로부터 준비된다. TSC는 이들 인자가 배지로부터 제거되면 거대 세포로 자발적으로 분화된다(도 13). TSC는 PrS로 염색된 반면, 배양물에서 이들 세포로부터 유래된 분화된 세포영양막은 염색되지 않았다(도 14). 본 발명자들은 또한 PrS가 세포사멸 유도 없이 줄기세포로 내재화되는 것을 밝혔다. 이러한 결과는 세포사멸이 유도된 종양 세포주에서 이루어진 관찰을 확인해준다. 세포사멸의 유도 없이, 종양 세포에서 최소한의 염색을 관찰하였다. 줄기세포에서 내재화에 대하여 시험하기 위해, 본 발명자들은 중간엽 줄기세포(MSC) 및 TSC를 이용하였다. MSC는 마우스 골수로부터 준비하였다. 마우스로부터 골수를 플러싱하고, 성장 인자의 부재 하에서 6일 동안 배양하였다. 이러한 배양 동안, MSC 및 조혈 줄기세포(HSC)가 복제된 반면, 섬유아세포는 부착하지만 몇 세대를 초과하여 증식하지는 않는다. 6일 후, 단층이 눈에 보인다. 트립신 처리에 의한 계대 배양시, 부착성 MSC는 유지되는 반면, 현탁액에서 성장한 HSC는 손실된다. 섬유아세포는 성장 인자의 부재로 인해 지속되지 않으며, 또한 유지되지 않는다. 따라서, 이러한 간단한 절차로 거의 균질한 MSC 집단이 생성된다. 이들 세포의 동일성을 확인하기 위해, 본 발명자들은 텍사메타손 및 글리세롤 포스페이트(조골세포로의 분화를 유도함) 또는 텍사메타손 및 인도메타신(지방세포로의 분화를 유도함)을 이용하여 배양물을 개별적으로 처리하였다. 결과는 도 15에 도시되어 있다. 상기 처리에 반응하여, 분화된 세포는 각각의 세포의 외관을 나타내었다. 지방세포는 큰 지방 소포를 함유하였고, 조골세포는 독특한 세포내 콜라겐 및 무기화작용으로 어두웠다.

[0301] 세포이하 염색 패턴을 평가하기 위해, 미분화된 MSC를 PrS 및 아넥신뿐만 아니라, 핵색 염색 시약으로 염색하고, 공초점 현미경 검사로 관찰하였다. 관찰 결과는 도 16에 도시되어 있다. PrS는 빠르게 내재화하였다. MSC의 경우, 20개의 세포 중 약 1개가 PrS로 염색되었으며, 이는 이전 데이터와 일치하지만, 염색된 정확한 백분율은 결정되지 않았다. MSC의 형태는 이질적이며, 상기 세포는 매질로 풍부한 물질을 분비하고, 이들 중 일부는 챔버 슬라이드의 표면에 부착하여, 이미지 중 일부에서 백그라운드를 생성하였다. 그럼에도 불구하고, 데이터는 첨가 후 5분 이내에 내재화된 PrS 및 표면 상의 아넥신을 명확하게 나타낸다. MSC로 행한 바와 같이, TSC를 또한 염색하고 영상화하였다. 관찰은 또한 이들 세포로의 내재화를 확인시켜주었고, 이는 또한 단백질 첨가 후 5분 이내에 발생한다. 결과는 도 17에 도시되어 있다. TSC는 형태적으로 상당히 가변적이며, 도면에서 볼 수 있는 바와 같이, 분화의 부재시 다핵일 수 있다. MSC와 같이, 이들 일차 세포는 풍부한 물질을 배지로 흘려 보

내며, 이들 중 일부는 세포의 소포로서 확립되었다(이전 데이터). 이러한 물질은 다시 영상화를 어렵게 만든다. 일부 EV는 아넥신으로 염색되고 PrS로 염색되지 않으며, 이러한 현상은 TSC에서 볼 수 있다(도 18). TSC 클러스터의 이러한 이미지는 세포에 의해 방출된 소포가 아넥신으로 염색되고, 내재화된 PrS로 염색되지 않는다. 이러한 패턴은 PrS 및 아넥신의 특이성 및 결합 표적에 대하여 흥미로운 질문을 제기한다. 2가지 단백질은 둘 다 PS에 결합하는 것으로 유명하다. 그러나, EV에 대한 자동적 결합뿐만 아니라 별개의 세포이하 국소화 패턴은, 이들이 정확히 동일한 방식으로 결합하지 않음을 시사한다. 이러한 구별의 근거를 확립하기 위해서 추가 연구가 필요할 것이며, 이는 중요한 것으로 입증될 수 있다. 본 발명자들은 또한 신경 전구 세포주 C17.2(도 19)의 PrS 염색을 관찰하였으며, 상기 세포주는 시험관 내에서 정상세포 및 다른 뉴런 세포로 분화될 후 있는 형질전환된 세포주이다. 이 백분율은 추정치이지만, 이들 형질전환된 세포의 대략 5%가 염색되었다. 놀랍게도, 세포가 4°C로 냉각된 경우조차도 TSC로의 진입이 발생하였다(도 20). 그러나, 챔버는 일단 현미경 상에 배치되면 연속적으로 냉각될 수 없다는 것을 주목해야 한다. 그럼에도 불구하고, 온도는 영상화 절차의 5분 시간 프레임 내에서 크게 상승할 수 없었다. 이러한 결과는 도발적이기는 하지만, 보다 제어된 조건 하에서 명확하게 반복되어야 한다. 결과가 입증된다면 메커니즘은 정말 매우 흥미로워야 할 것이다.

[0302] 본 발명자들은 조혈 줄기세포(HSC)를 PrS로 염색하는 데 성공했다. 유세포 분석법을 사용하여, 본 발명자들은 HSC를 PrS로 염색함을 결정하고, 공초점 현미경 검사를 이용하여 이들 세포에서 PrS의 내재화를 관찰하였다. 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 사용하여 HSC를 식별하고 단리하였다. 골수에서 계통-음성, SCA/c-키트 양성 세포로서 세포를 확인하였다(도 21). 그 다음, 이들을 FITC-PrS로 염색하였다. HSC의 2개의 집단, 즉 단기 및 장기를 SLAM 마커 염색의 패턴으로 식별할 수 있다. SLAM(Signaling Lymphocyte Activation Molecule; 신호전달 림프구 활성화 분자) 마커 CD48, CD150, CD229 및 CD244는 별개의 패턴으로 HSC를 차별적으로 염색하여, SLAM 패턴-양성 염색은 자기 재생하고 분화하는 두가지 능력을 나타내는 반면, SLAM 패턴-음성 HSC는 단지 분화만 할 수 있다. PrS는 장기 HSC(도 22), 및 또한 단기 HSC(도 23)의 하위세트를 염색하였다. 나타난 세포는 프로피디움 요오다이드(PI)-음성이며, 이는 이들이 모두 살아있는 세포임을 의미한다. 이러한 결과는 줄기세포의 하위세트가 세포사멸의 유도 없이 PrS로 염색됨을 입증하는 이전 실험을 확인시켜준다.

[0303] 그 다음, 본 발명자들은 HSC로 PrS의 내재화에 대한 시험을 진행하였다. 이 실험은 많은 인자로 인해 복잡하였다. 아마도, 가장 어려운 것은 HSC의 배양에서의 생존이며, 이는 밤새 배지에서 대량의 세포가 죽기 때문이다. 따라서, 본 발명자들은 유세포 분석 및 공초점 현미경 검사가 동일한 날에 이루어지도록 실험 시간을 맞추어야 했다. 또한, 세포가 부착되지 않아서, 현미경 검사가 최적인 것보다 덜하다. 현미경 검사를 보다 효율적으로 만들기 위해, 세포를 배지의 작은 방울로 재현탁시켰다. 마지막으로, 본 발명자들은 현미경 검사에 의해 분석된 PrS-염색 세포가 여전히 살아있는지를 확인해야 했다. 분석 및 단리 과정 동안 많은 HSC가 죽었다. 따라서, 핵 스트 핵 염색에 추가적으로, PI를 추가하고 스캔했으며, 또 다른 채널을 이용했다. PI-밝은 핵의 존재는 죽은 세포를 나타냈다. 이러한 차이점 및 타이밍의 복잡성에도 불구하고, 본 발명자들은 실험을 수행할 수 있었으며, 살아있는 HSC로의 PrS의 내재화를 확인했다(도 24). 세포는 핵 PI 염색의 결핍에 의해 생존한 것으로 확인되었다. 그러나, 일부 세포는 도 25에 나타난 바와 같이 죽었거나 죽고 있었다. 나타난 실험의 복잡성 및 길이에도 불구하고, 결과는 내재화를 나타낸다.

[0304] 마지막으로, 도 26에서, 본 발명자들은 TSC에 대하여 예비 독성 연구를 수행하였고, 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 생존력이 30분 후 PBS에 비해 78%에서 74%로 매우 적은 정도만이 감소된 것을 결정하였다. 이 수준에서 배양 부피의 10%가 PrS-함유 용액이라는 것을 고려하면, 이러한 결과는 PrS가 기본적으로 줄기세포에 대하여 비-독성이라는 본 발명자들의 질적 관찰을 확인시켜 주었으며, 관찰된 경미한 독성은 준비물 그 자체의 내용물 오염으로 인한 것일 수 있었다. 보다 낮은 농도의 PrS는 생존력에 대하여 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 시험한 가장 높은 수준의 단백질은 염색에 사용한 농도의 1000배 초과였다. 공식적으로는 본 프로젝트의 일부가 아니었던 완전 독성 연구는 훨씬 더 광범위한 시험을 요구할 것이지만, 본 발명자들의 관리 하에 PrS는 독성을 거의 나타내지 않는다.

[0305] **요약**

[0306] 상기 결과는 PrS가 많은 유형의 줄기세포를 포함하여 PrS를 발현하는 다수의 세포 내로 빠르게 내재화됨을 나타내었으며, 이는 PrS가 치료제 개발의 목표를 향한 조작을 할 수 있는 적합한 독특한 특징을 가지고 있음을 시사한다. 추가적으로, 도 3 및 7에서 알 수 있는 바와 같이 PrS와 아넥신 사이의 특이성의 차이는 이들 두 단백질 간에 결합 그 자체가 상이하다는 것을 시사한다. 아넥신이 테트라머이고 PrS가 단량체라는 단순한 사실은 이러한 차이를 설명할 수 없으며, 이러한 데이터는 세포 표면 상의 일부 다른 성분이 PrS 결합에 관여할 수 있다는 것을 시사한다. PrS의 결합 메커니즘, 특이성, 및 내재화뿐만 아니라, 모듈식 조작 능력은 수많은 가능성을 제

공한다.

[0307] 실시예 2

[0308] 줄기세포는 분화된 세포와 표현형이 구별되며, 비-세포사멸적으로 PS를 발현하여 면역 반응을 회피할 수 있다. 줄기세포는 세포사멸의 유도 없이, 형광 표지의 페이로드를 포함하는 본 개시내용의 GLA 도메인 분자로 염색되었다.

[0309] 태반에서 여러 유형의 세포영양막으로 분화되는 세포영양막 줄기세포(도 14)는 단백질 S로 염색된 반면, 배양물에서 이들 세포로부터 유래된 분화된 세포영양막은 염색되지 않았다. 염색으로 생체 내에서 분화된 줄기세포와 시험관 내에서 분화된 세포를 구별할 수 있었다.

[0310] 본 데이터는 본 개시내용의 분자를 생체 내 또는 생체 외 샘플에서 세포를 표적화할 수 있음을 나타낸다.

[0311] 참고문헌

1. Thompson, W.W., et al., *Estimates of US influenza-associated deaths made using four different methods*. Influenza Other Respir Viruses, 2009. **3**(1): p. 37-49.
2. Osterholm, M.T., et al., *Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(1): p. 36-44.
3. Dixit, R., et al., *Emergence of oseltamivir resistance: control and management of influenza before, during and after the pandemic*. Infect Disord Drug Targets, 2013. **13**(1): p. 34-45.
4. Jefferson, T., et al., *Oseltamivir for influenza in adults and children: systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments*. BMJ, 2014. **348**: p. g2545.
5. Godfrey, C., et al., *Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies*. EMBO Mol Med, 2017. **9**(5): p. 545-557.
6. Kaczmarek, J.C., P.S. Kowalski, and D.G. Anderson, *Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality*. Genome Med, 2017. **9**(1): p. 60.
7. Ling, H., *Non-coding RNAs: Therapeutic Strategies and Delivery Systems*. Adv Exp Med Biol, 2016. **937**: p. 229-37.
8. Poon, I.K., et al., *Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 166-80.
9. Birge, R.B., et al., *Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer*. Cell Death Differ, 2016. **23**(6): p. 962-78.
10. Amara, A. and J. Mercer, *Viral apoptotic mimicry*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(8): p. 461-9.
11. Moller-Tank, S. and W. Maury, *Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection*. Virology, 2014. **468-470**: p. 565-80.
12. Ludwig, S., et al., *MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants*. FEBS Lett, 2004. **561**(1-3): p. 37-43.

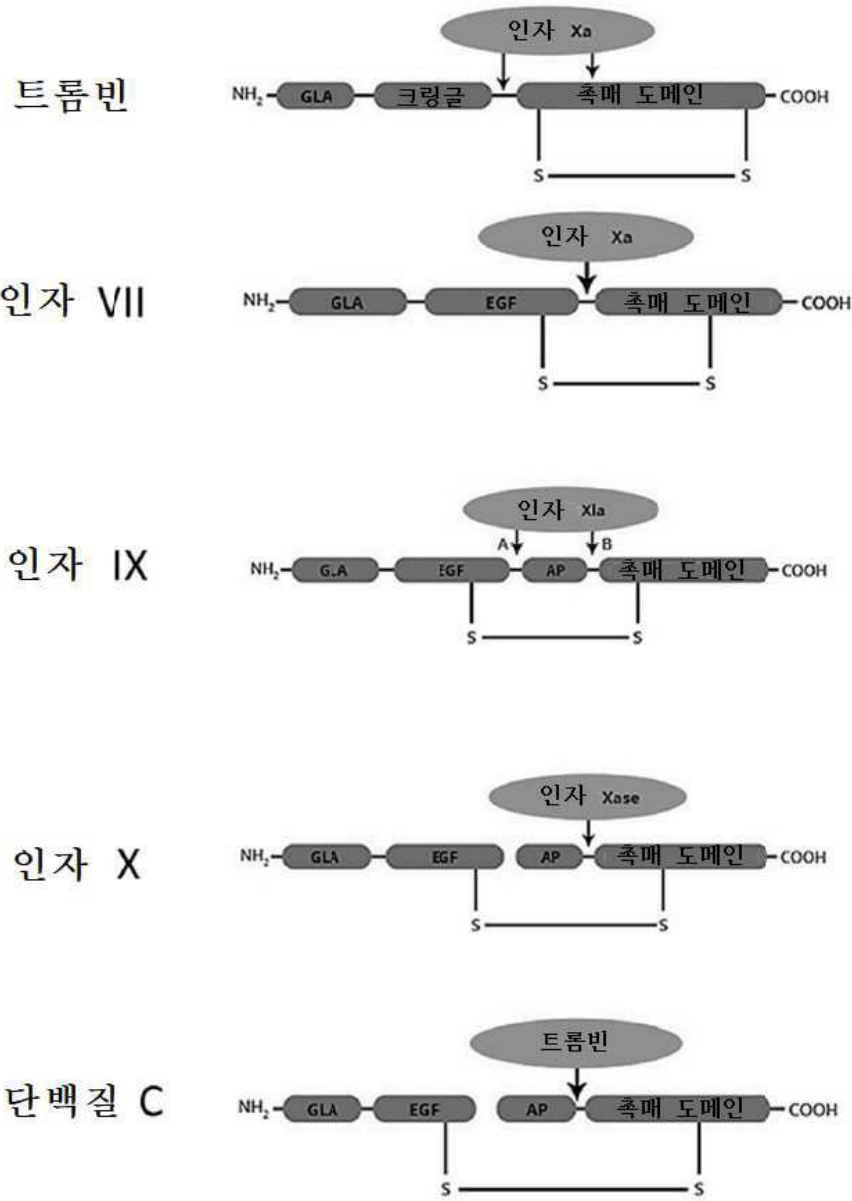
[0312]

13. Sharma, R., et al., *Detection of phosphatidylserine-positive exosomes for the diagnosis of early-stage malignancies*. Br J Cancer, 2017. **117**(4): p. 545-552.
14. Azuma, K., et al., *Liver-specific gamma-glutamyl carboxylase-deficient mice display bleeding diathesis and short life span*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88643.
15. Hjortoe, G., et al., *Factor VIIa binding and internalization in hepatocytes*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(10): p. 2264-73.
16. Meliopoulos, V.A., et al., *Host gene targets for novel influenza therapies elucidated by high-throughput RNA interference screens*. FASEB J, 2012. **26**(4): p. 1372-86.
17. Pleschka, S., et al., *Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 301-5.
18. Makkoch, J., et al., *Human microRNAs profiling in response to influenza A viruses (subtypes pH1N1, H3N2, and H5N1)*. Exp Biol Med (Maywood), 2016. **241**(4): p. 409-20.
19. Wolf, S., et al., *MicroRNA Regulation of Human Genes Essential for Influenza A (H7N9) Replication*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0155104.
20. Skalickova, S., et al., *Perspective of Use of Antiviral Peptides against Influenza Virus*. Viruses, 2015. **7**(10): p. 5428-42.
21. Matsubara, T., et al., *Sialic acid-mimic peptides as hemagglutinin inhibitors for anti-influenza therapy*. J Med Chem, 2010. **53**(11): p. 4441-9.
22. Wunderlich, K., et al., *Identification of a PA-binding peptide with inhibitory activity against influenza A and B virus replication*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7517.
23. Ozcan, G., et al., *Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **87**: p. 108-19.
24. Mack, S., et al., *Pseudo-Ligandless Click Chemistry for Oligonucleotide Conjugation*. Curr Protoc Chem Biol, 2016. **8**(2): p. 83-95.
25. Paredes, E. and S.R. Das, *Click chemistry for rapid labeling and ligation of RNA*. Chembiochem, 2011. **12**(1): p. 125-31.
26. Zheng, Y. and P.A. Beal, *Synthesis and evaluation of an alkyne-modified ATP analog for enzymatic incorporation into RNA*. Bioorg Med Chem Lett, 2016. **26**(7): p. 1799-802.
27. Jain, N., et al., *Current ADC Linker Chemistry*. Pharm Res, 2015. **32**(11): p. 3526-40.

[0313]

도면

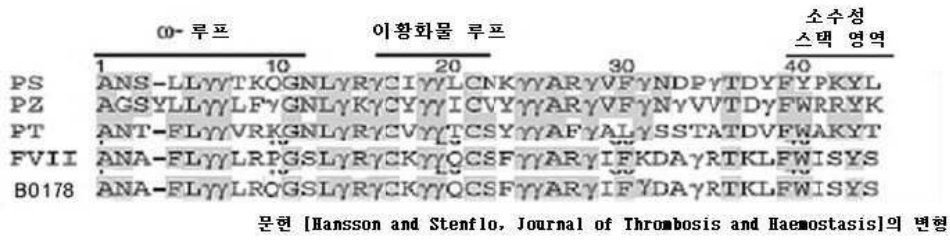
도면1a



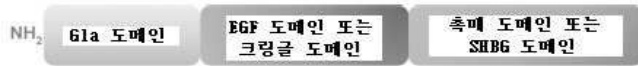
도면1b



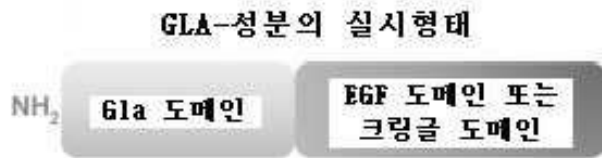
도면1c



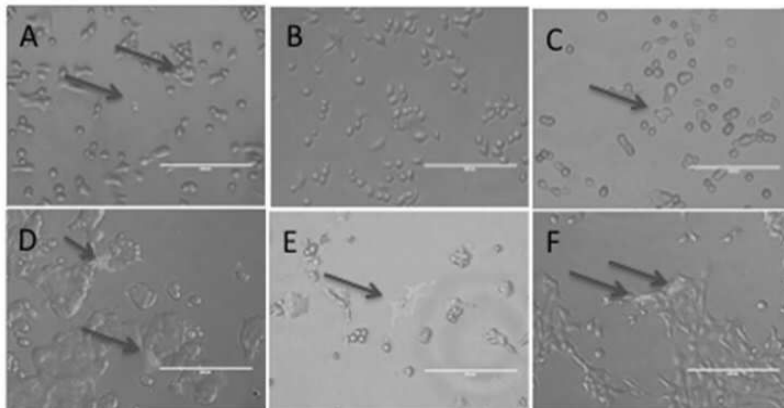
도면1d



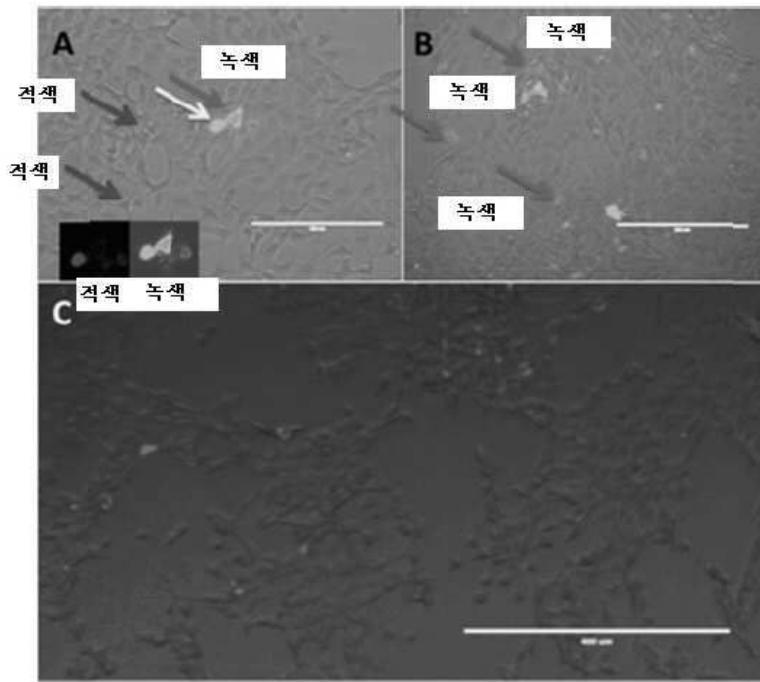
도면1e



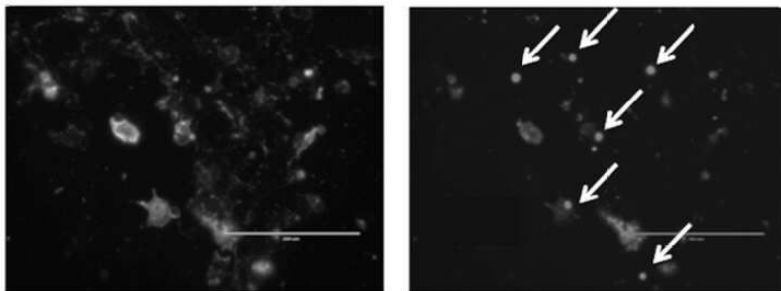
도면2



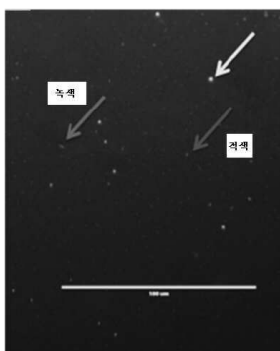
도면3



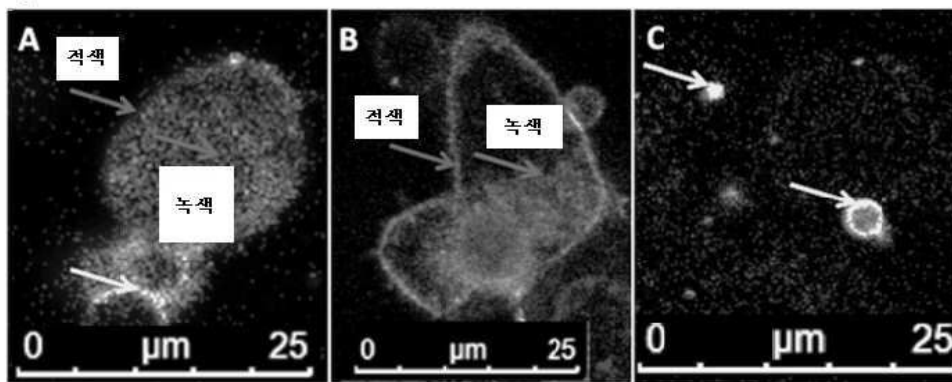
도면4



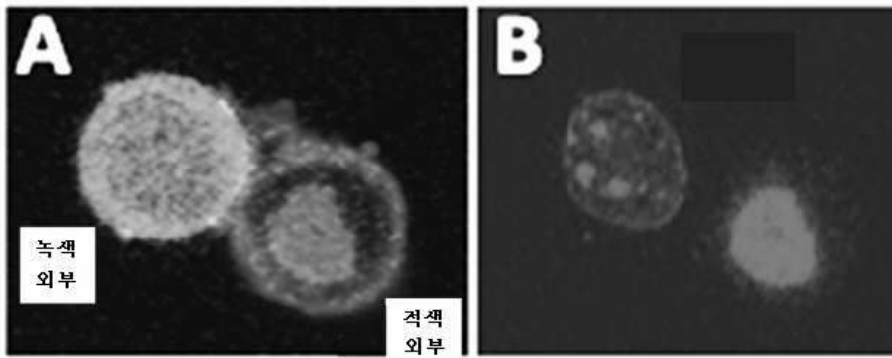
도면5



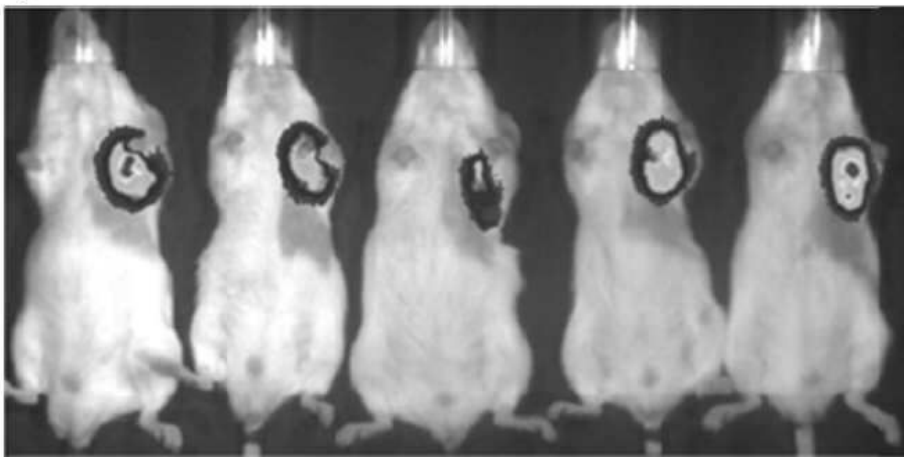
도면6



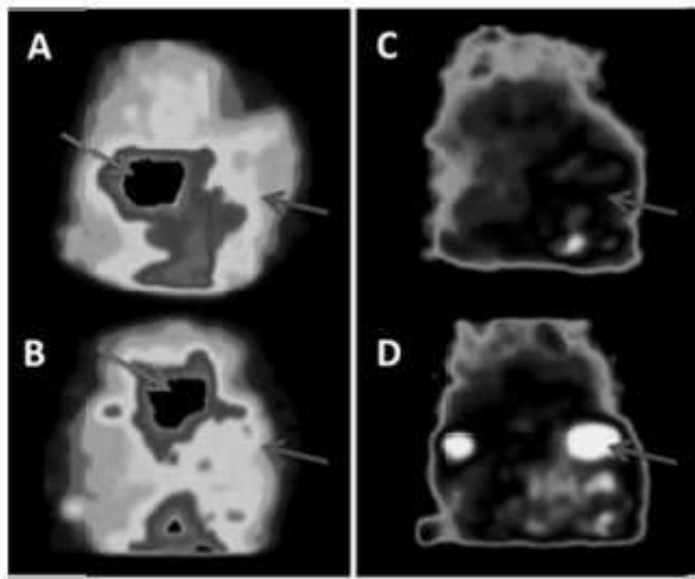
도면7



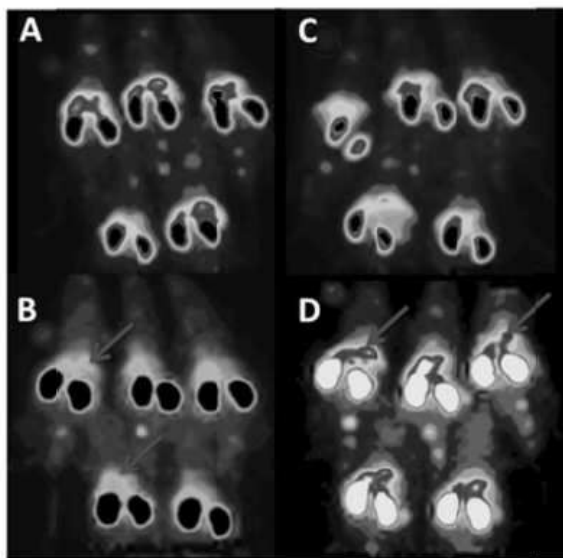
도면8



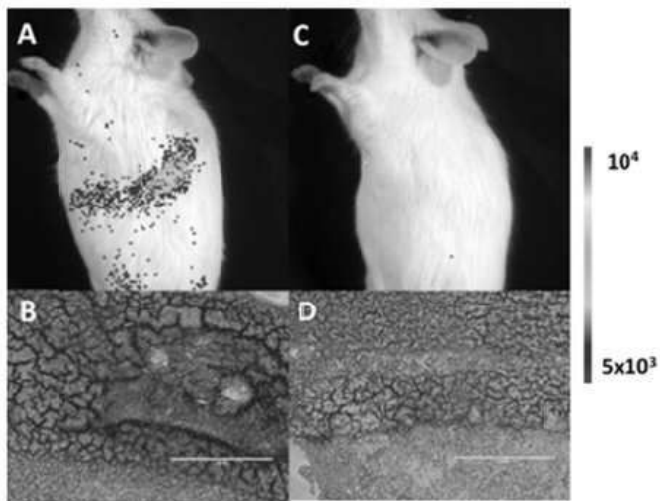
도면9



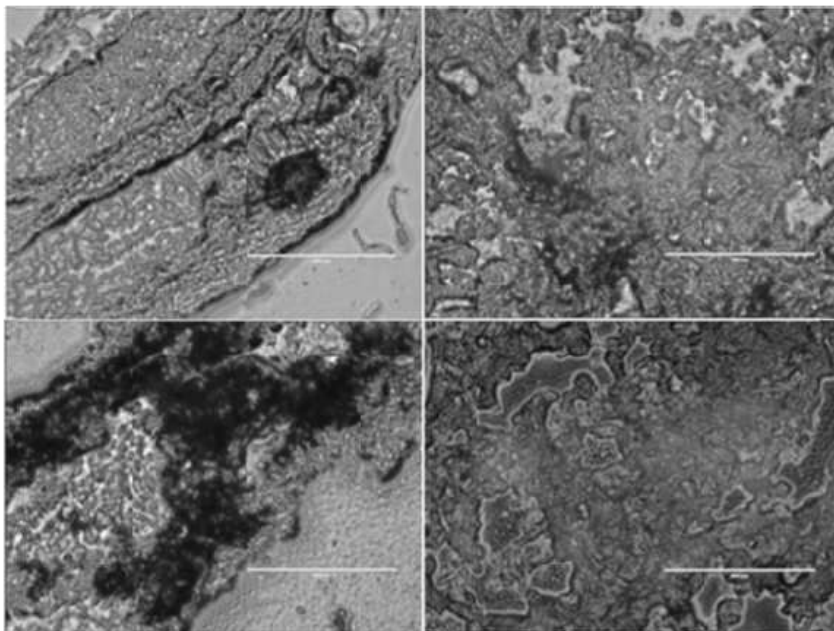
도면10



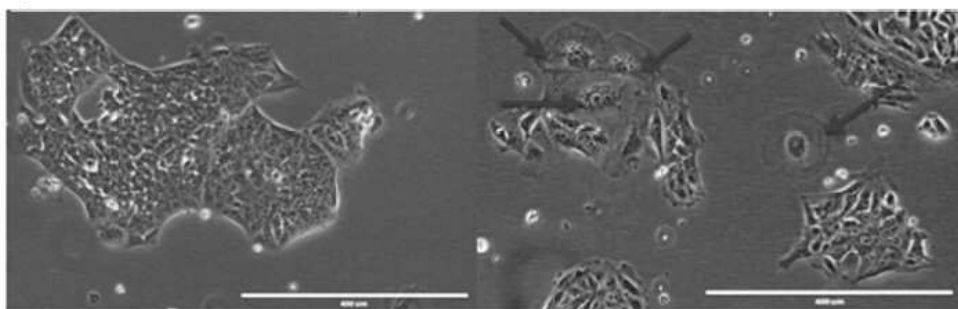
도면11



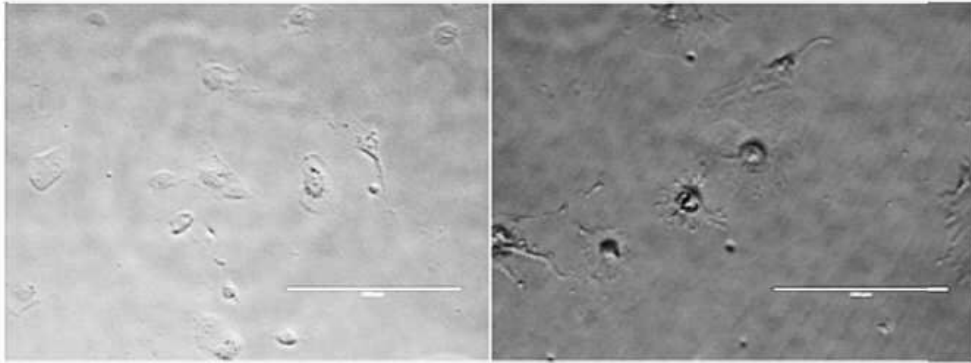
도면12



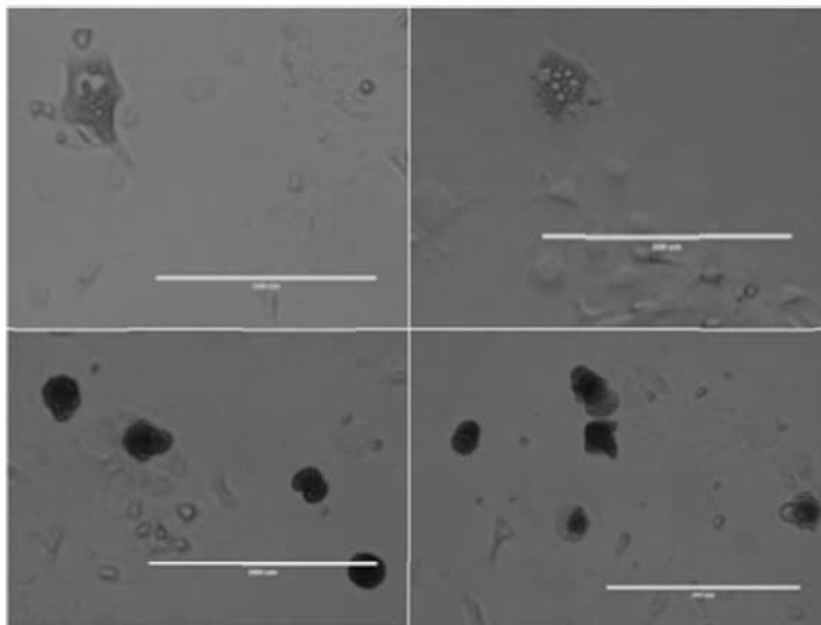
도면13



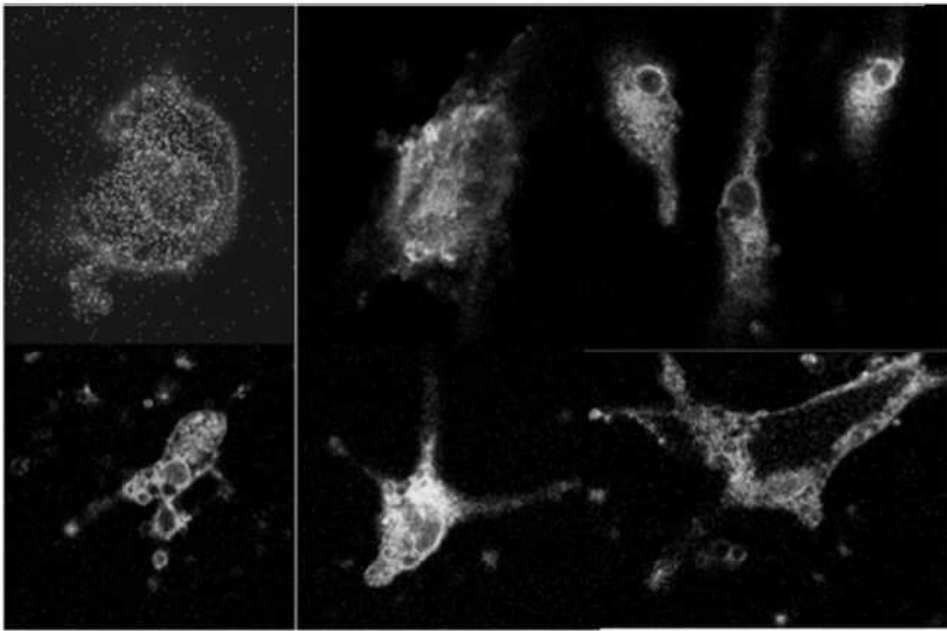
도면14



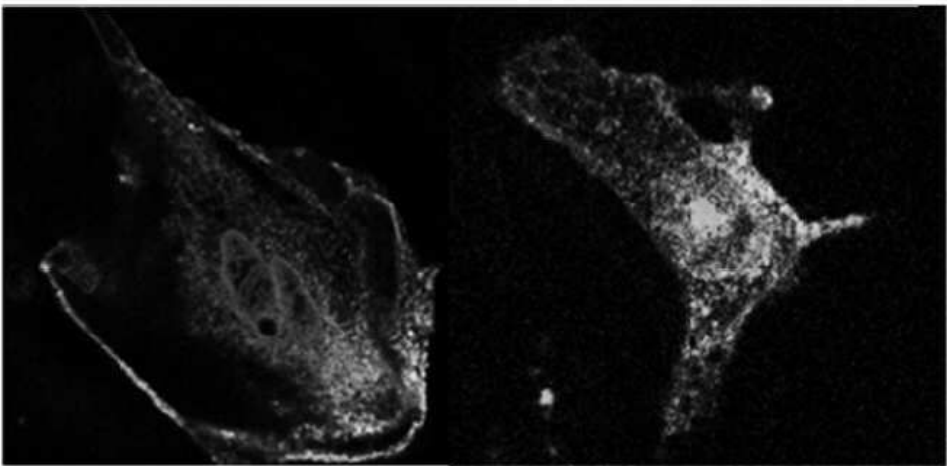
도면15



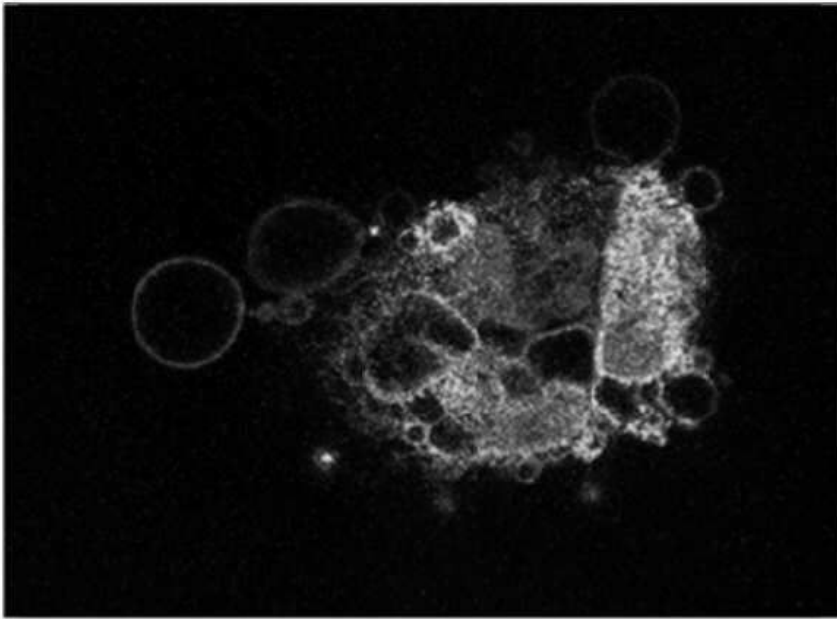
도면16



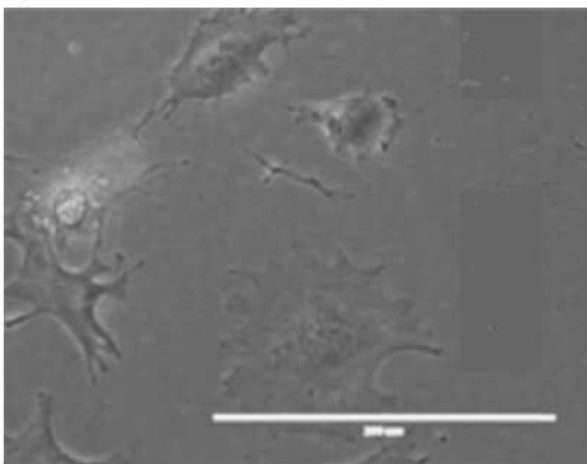
도면17



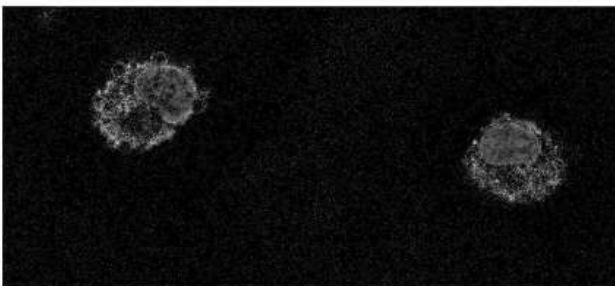
도면18



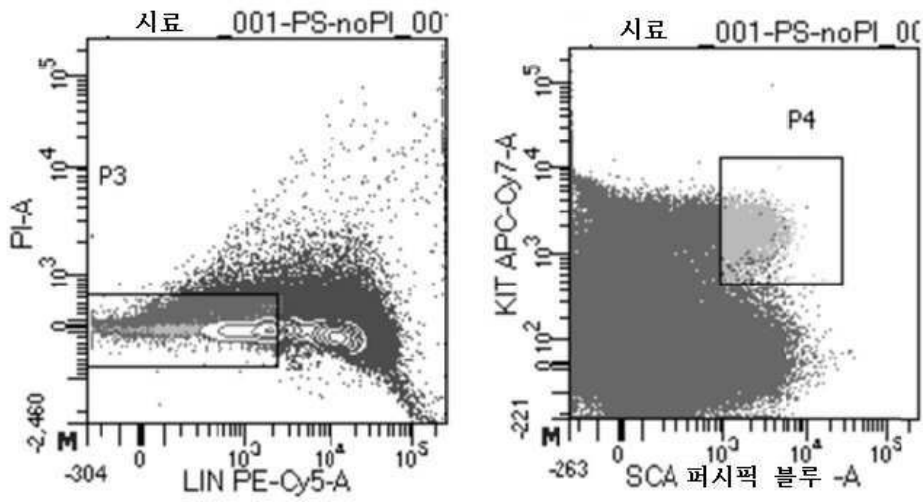
도면19



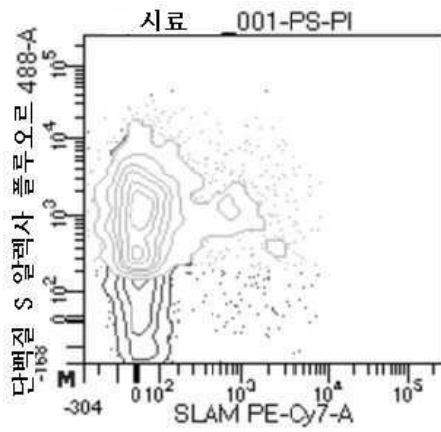
도면20



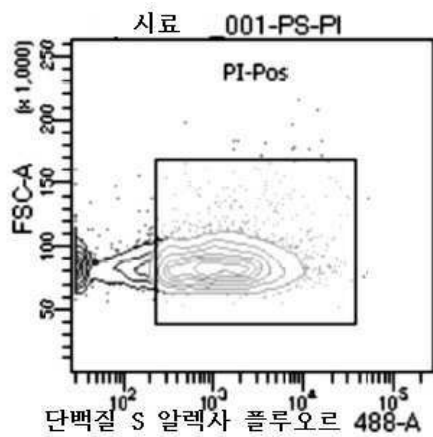
도면21



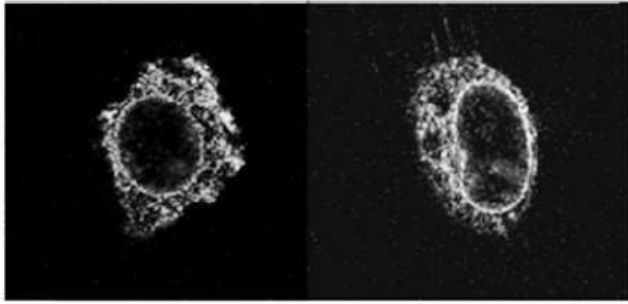
도면22



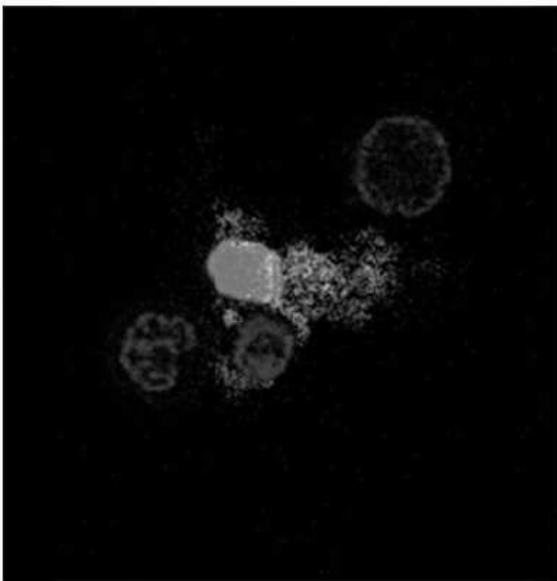
도면23



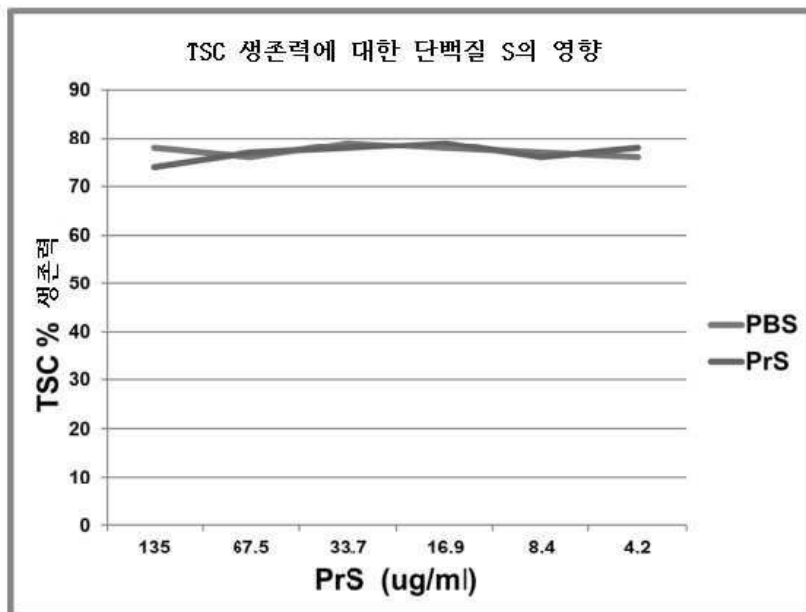
도면24



도면25



도면26



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GLADIATOR BIOSCIENCES, INC.

<120> DELIVERY OF PAYLOADS TO STEM CELLS

<130> WO 2019/050997

<140> PCT/US2018/049618

<141> 2018-09-05

<150> US 62/554,530

<151> 2017-09-05

<150> US 62/554,533

<151> 2017-09-05

<150> US 62/569,403

<151> 2017-10-06

<150> US 62/569,411

<151> 2017-10-06

<150> US 62/584,565

<151> 2017-11-10

<150> US 62/593,014

<151> 2017-11-30

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue

<220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(26)

<223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <400> 1

Ala Asn Ser Leu Leu Xaa Xaa Thr Lys Gln Gly Asn Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Ile Xaa Xaa Leu Cys Asn Lys Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe Xaa

 20 25 30
 Asn Asp Pro Xaa Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Lys Tyr Leu
 35 40 45

<210> 2
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue

<220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223>
 > X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue

 <220><221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <400> 2
 Ala Gly Ser Tyr Leu Leu Xaa Xaa Leu Phe Xaa Gly Asn Leu Xaa Lys
 1 5 10 15
 Xaa Cys Tyr Xaa Xaa Ile Cys Val Tyr Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe
 20 25 30
 Xaa Asn Xaa Val Val Thr Asp Xaa Phe Trp Arg Arg Tyr Lys
 35 40 45
 <210> 3

<211> 45
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue

<220><221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue

<400> 3

Ala Asn Thr Phe Leu Xaa Xaa Val Arg Lys Gly Asn Leu Xaa Arg Xaa

1 5 10 15

Cys Val Xaa Xaa Thr Cys Ser Tyr Xaa Xaa Ala Phe Xaa Ala Leu Xaa

20 25 30

Ser Ser Thr Ala Thr Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr

35 40 45

<210> 4

<211> 45
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue

<400> 4
 Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Pro Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Lys

 20 25 30
 Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser
 35 40 45

<210> 5

<211> 45
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223>
 > X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue

<400> 5

Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Gln Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa

1 5 10 15

Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Xaa

20 25 30

Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser
 35 40 45
 <210> 6
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic peptide
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (6)..(7)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <220><221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> X is gamma-carboxyglutamic acid residue
 <400> 6
 Ala Asn Ser Leu Leu Xaa Xaa Thr Lys Gln Gly Asn Leu Xaa Arg Xaa

1 5 10 15
 Cys Ile Xaa Xaa Leu Cys Asn Lys Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe Xaa
 20 25 30
 Asn Asp Pro Xaa Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Lys Tyr Leu Val Cys Leu

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

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

 165 170 175
 Lys Asn Ile Pro Gly Asp Phe Glu Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Arg
 180 185 190
 Tyr Asn Leu Lys Ser Lys Ser Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Ser Glu
 195 200 205
 Asn Met Cys Ala Gln Leu Cys Val Asn Tyr Pro Gly Gly Tyr Thr Cys
 210 215 220
 Tyr Cys Asp Gly Lys Lys Gly Phe Lys Leu Ala Gln Asp Gln Lys Ser

 225 230 235 240
 Cys Glu Ser Arg His His His His His His
 245 250