(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월25일
(11) 등록번호 10-2771920
(24) 등록일자 2025년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) *A61K 49/22* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7025930
(22) 출원일자(국제) 2017년02월09일
심사청구일자 2022년01월26일
(85) 번역문제출일자 2018년09월06일
(65) 공개번호 10-2018-0104166
(43) 공개일자 2018년09월19일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/052821
(87) 국제공개번호 WO 2017/137477
국제공개일자 2017년08월17일
(30) 우선권주장
16154868.0 2016년02월09일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
JP2010524969 A
WO2008131217 A1

(73) 특허권자
브라코 스위스 에스.에이.
스위스 6814 카뎀피노 비아 폰테기아 23
(72) 발명자
베팅거 티에리
스위스 1228 플랑-레-와스 루트 드 라 갈레즈 31
체르카위 사미르
스위스 1228 플랑-레-와스 루트 드 라 갈레즈 31
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 22 항 심사관 : 강덕희

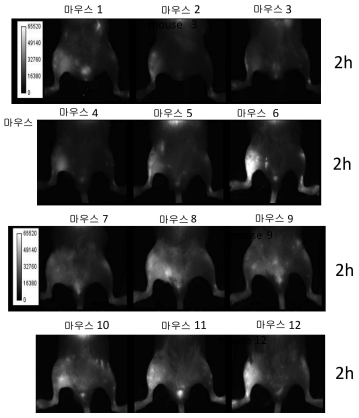
(54) 발명의 명칭 **셀렉틴 표적화를 위한 재조합 키메라 단백질**

(57) 요 약

본 발명은 셀렉틴 결합 도메인 및 비-공유 다이머화 도메인을 포함하는 재조합 단백질(P-셀렉틴 당단백질 리간드-1 및 신경 망막-특이적 로이신 지퍼) PSGL-1-NRL 키메라 단백질을 개시하며, 비공유 다이머화 도메인은 로이신 지퍼이고, 더 바람직하게는 인간 또는 마우스 신경 망막-특이적 로이신 지퍼의 로이신 지퍼 도메인이다. 이 키

(뒷면에 계속)

대 표 도



메라 단백질은 다른 키메라 단백질과 이황화물 브릿지를 형성함으로써 호모다이머를 형성하기에 적합한 적어도 하나의 시스테인을 가진 공유 다이머화 도메인을 더 포함한다. 이 키메라 단백질에서, PSGL-1 도메인은 인간 PSGL-1의 세포외 영역에 상응하고, 더 바람직하게는 성숙한 단백질의 셀렉틴 결합 영역이다. 이 키메라 단백질은 정확히 번역 후 변형되며, 포유류 시스템에서 효과적으로 발현된다. 그것은 설페이트화되고, O-결합 글리코실화되며, 시알릴화되고, P, E 및 L 셀렉틴과 결합하여, 진단 또는 치료 목적을 위한 생체내 및 시험관내 표적화를 허용한다.

(52) CPC특허분류

A61K 49/0032 (2013.01)
A61K 49/0056 (2013.01)
A61K 49/0084 (2013.01)
A61K 49/221 (2013.01)
A61K 49/223 (2013.01)
C12N 9/1051 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/50 (2013.01)
G01N 2333/70564 (2013.01)

(72) 발명자

콜러 크리스티안

스위스 1228 플랑-레-와스 루트 드 라 갈레즈 31

로비토 아드리안

미국 캘리포니아 94002 벨몬트 하버 불러바드 530

크리벨린 페데리코

이탈리아 10010 콜레레토 지아코사(티오) 씨알비 비아 리베스 넘버 5 브라코 이미징 에스.피.에이.

부사트 필리페

스위스 1228 플랑-레-와스 루트 드 라 갈레즈 31 브라코 스위스 에스에이

마이사노 페데리코

이탈리아 10010 콜레레토 지아코사(티오) 씨알비 비아 리베스 넘버 5 브라코 이미징 에스.피.에이.

명 세 서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO:11(성숙한 PSGL-1 서열)의 위치 5 내지 16의 연속되는 아미노산 잔기의 서열을 적어도 포함하는 셀렉틴 결합 도메인, SEQ ID NO:12(신경 망막-특이적 로이신 지퍼)의 위치 187 내지 208의 연속되는 아미노산 잔기의 서열과 적어도 90% 상동성이거나 동일한 아미노산 잔기의 서열을 포함하는 로이신 지퍼 도메인 및 이황화물 결합 촉진 영역을 적어도 포함하는 재조합 키메라 P-셀렉틴 당단백질 리간드-1(PSGL-1) 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 셀렉틴 결합 도메인은 SEQ ID NO:11(PSGL-1 서열)의 위치 1 내지 47의 연속되는 아미노산 잔기의 서열을 적어도 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 키메라 PSGL-1 단백질.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 로이신 지퍼는 SEQ ID NO:12의 위치 181 내지 215의 연속되는 아미노산 잔기의 서열과 적어도 90% 상동성이거나 동일한 아미노산 잔기의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 키메라 PSGL-1 단백질.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 이황화물 결합 촉진 영역은 IgG1 힌지 영역(SEQ ID NO:20)인 것을 특징으로 하는 재조합 키메라 PSGL-1 단백질.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 적어도 리신(Lys 또는 K) 또는 시스테인(Cys 또는 C)을 포함하는 폴리-글리신 스페이서를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 키메라 PSGL-1 단백질.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 스페이서는 SEQ ID NO:17인 것을 특징으로 하는 재조합 키메라 PSGL-1 단백질.

청구항 7

적어도 이황화물 결합에 의해 서로 공유 연결된 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 2개의 재조합 키메라 PSGL-1 단백질을 포함하는 다이머 단백질.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 호모다이머인 것을 특징으로 하는 다이머 단백질.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 분비 및 분비 전 절단에 적합한 신호 펩타이드 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 키메라 PSGL-1 단백질.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 신호 펩타이드는 SEQ ID NO:18 및 SEQ ID NOs: 21-34로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 키메라 PSGL-1 단백질.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 신호 펩타이드는 마우스 IgH 신호 펩타이드(SEQ ID NO:18)인 것을 특징으로 하는 재조합 키메라 PSGL-1 단백질.

청구항 12

제 1 항 내지 제 6 항 및 제 9 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 재조합 키메라 단백질을 암호화하는 DNA 분자.

청구항 13

제 12 항에 따른 DNA 분자를 포함하는 진핵생물 발현 벡터.

청구항 14

제 12 항에 따른 DNA 분자로 형질전환된 포유류 세포.

청구항 15

제 1 항 내지 제 6 항 및 제 9 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 분리된 단백질.

청구항 16

제 15 항에 있어서, SEQ ID NO:11의 적어도 위치 16의 Thr에서 O-결합 글리코실화되고 적어도 위치 5, 7 및 10의 Tyr에서 설페이트화된, 호모다이머인 것을 특징으로 하는 분리된 단백질.

청구항 17

제 1 항 내지 제 6 항 및 제 9 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 재조합 단백질 및 진단 또는 치료 부분을 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 진단적으로 유용한 부분은 방사성 표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 금속 킬레이트화 화합물, 가스-충전된 지질 미세소포 및 진단 활성 부분들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 콘쥬게이트.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 가스-충전된 미세소포의 지질은 인지질인 것을 특징으로 하는 콘쥬게이트.

청구항 20

제 17 항에 있어서, 초음파, 자기공명, 광음향, 섬광조영술, 단일광자 단층촬영(SPECT), 양전자방출 단층촬영(PET), 엑스선, 무선주파수 음향 및 광학으로 구성되는 군에서 선택된 영상화 방법에서 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 콘쥬게이트.

청구항 21

셀렉틴의 과발현을 특징으로 하는 병리학적 상태의 진단 영상화를 위한 방법에 사용하기 위한 제 1 항 내지 제 6 항 및 제 9 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 재조합 키메라 단백질을 포함하는 조성물로서, 방법은 제 1 항 내지 제 6 항 및 제 9 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 재조합 키메라 단백질을 대상에게 사전투여하는 단계 및 초음파, 자기공명, 광음향, 섬광조영술, 단일광자 단층촬영(SPECT), 양전자방출 단층촬영(PET), 엑스선, 무선주파수 음향 및 광학으로 구성되는 군에서 선택된 영상화 방법에 의해 영상을 기록하는 단계를 포함하는, 조성물.

청구항 22

셀렉틴의 과발현을 특징으로 하는 병리학적 상태의 진단 영상화를 위한 방법에 사용하기 위한 제 17 항에 따른 콘쥬게이트를 포함하는 조성물로서, 방법은 제 17 항에 따른 콘쥬게이트를 대상에게 사전투여하는 단계 및 초음파, 자기공명, 광음향, 섬광조영술, 단일광자 단층촬영(SPECT), 양전자방출 단층촬영(PET), 엑스선, 무선주파수 음향 및 광학으로 구성되는 군에서 선택된 영상화 방법에 의해 영상을 기록하는 단계를 포함하는, 조성물.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 진단 및 치료적 사용을 위한 새로운 셀렉틴 표적화 단백질의 제조에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] P-셀렉틴 당단백질 리간드-1(PSGL-1)는 생리학적 혈류하에 활성화된 내피 세포에 매달려 롤링(rolling)하는 세포를 매개하는 백혈구 유착 분자이다. 이 활성은 백혈구 혈관외유출(extravasation)에서 중요한 초기

단계이다. PSGL-1은 처음에 P-셀렉틴에 대한 리간드로서 확인되었고, 후속 연구에서 PSGL-1은 또한 E-셀렉틴과 L-셀렉틴에 대한 리간드임이 밝혀졌다(예를 들어, 미국특허 No. 6,277,975 참조).

[0003] 셀렉틴 패밀리의 두 멤버인 P-셀렉틴과 E-셀렉틴은 분자 영상화의 측면에서 특히 관련성이 있다. 혈관 내피에서 P- 및 E-셀렉틴의 상향조절이나 발현은 염증 상태하에 발생하는 것으로 알려져 있고, 휴지 상태하에 내피 셀렉틴의 존재는 일반적으로 무의 값까지 낮아진다. 셀렉틴이 유용한 분자 영상화 표적인 질환 상태는 허혈 후 손상, 급성 관상동맥 증후군, 관절염, 회장염 및 대장염을 포함하는 염증성 장 질환, 심근염, 혈전증 및 다발성 경화증을 포함한다. 그러나, 셀렉틴 분자 영상화는 피부 미세혈관과 같은 정상 상태하에 셀렉틴 발현이 발생하는 조직을 파악하고 확인하는데 유용할 수 있다.

[0004] P-셀렉틴(CD62P라고도 한다)의 상향조절은 매우 빠르게 일어나는 것으로 알려져 있으며(수분 이내), P-셀렉틴을 염증 질환의 조기 단계의 잠재적인 마커로 만든다. P-셀렉틴은 또한 활성화된 혈소판의 표면에서도 발견되며, 혈전증의 마커가 된다. 또한, E-셀렉틴(CD62E)은 염증성 혈관에서 발현되지만, 일반적으로 P-셀렉틴보다 염증 반응이 늦다. 따라서, E-셀렉틴은 질환의 후기 단계에서 염증의 유용한 마커이다.

[0005] 셀렉틴의 리간드들 중 PSGL-1은 백혈구를 염증성 조직에 동원하는데 중요한 역할을 한다. 백혈구는 보통 혈관의 내피와는 상호작용하지 않는다. 그러나, 염증은 혈관벽의 표면에서 P-셀렉틴과 같은 세포 유착 분자(CAM)의 발현을 야기한다. 흐르는 혈액에 존재하는 백혈구는 CAM과 상호작용할 수 있다. 이 상호작용 과정에서 제1 단계는 내피 세포 및 유착 혈소판 상의 P-셀렉틴 및/또는 E-셀렉틴과 상호작용하는 PSGL-1에 의해 수행된다. 이 상호작용은 내피 세포 표면에서 백혈구의 "롤링"을 가져오고, 이후 염증성 조직에 백혈구의 안정한 유착 및 이주가 이루어진다.

[0006] 인간 PSGL-1(GenBank Acc. No. Q14242.1; GI 2498904)은, 예를 들어 호중구, 단구, 림프구, 수지상 세포, 및 혈소판을 포함하는, 대부분의 조혈 세포의 표면에서 발현되는 뮤신-유사, 호모다이머, 이황화물-결합된, 당단백질이다.

[0007] 인간 PSGL-1의 아미노산 서열은 쌍을 이룬 염기성 아미노산 전환 효소(PACE)에 대한 컨센서스 절단 부위를 가진 아미노 말단 신호 펩타이드(아미노산 잔기 1-17) 및 프로펩타이드(아미노산 잔기 18-41)를 나타낸다. 성숙한 단백질의 N-말단 세포외 영역은 잔기 42에서 시작한다. PSGL-1 분자의 세포외 도메인은 다수의 O-글리코실화 연결 부위와 또한 일부 N-글리코실화 연결 부위를 함유하는 몇 개의 세린/트레오닌 부화 데카머 반복부를 함유한다. 분자의 이 영역은 막대형(rod-like) 구조로 접히며, PSGL-1의 뮤신-유사 특징을 담당한다. 호중구에서 이 막대형 구조 및 미세융모의 끝에 PSGL-1의 편재화는 셀렉틴-발현 세포에 PSGL-1의 결합을 촉진한다. PSGL-1의 데카머 반복부 영역에 이어서 경막 영역(잔기 268-292)와 세포질 도메인(잔기 293-361)가 뒤따른다.

[0008] Sako et al.(Cell, 1993, 75(6), 1179-1186)에 의해 최초로 달성된 재조합 PSGL-1의 발현은 셀렉틴 결합에 관련된 영역 및 변형을 정의하도록 허용했고, 이것은 다음의 문헌에 일부 언급되어 보고되었다: Liu et al., J. Biol. Chem. 1998, 12:7078-7087, Cummings R.D., Brazilian Journal of Medical 및 Biological research, 1999, 32:519-528, Sako et al. Cell, 1995, 83:323-331 등, 앞서 인용. PSGL-1에 대한 전반적인 연구로부터 셀렉틴 결합에 중요한 영역이 성숙한 PSGL-1의 N-말단 부분에서 맵핑되었으며, 이것은 3개의 티로신 황산화 부위와 Thr 16에 위치된 sLe^x를 지닌 O-결합 다당류를 가진 잔기 5-16을 포함한다.

[0009] PSGL-1의 복잡한 번역 후 번역 패턴은(이 단백질은 P-셀렉틴의 렉틴 도메인에 의한 Ca^{2+}-의존성 인식을 위해 두 독립된 번역 후 변형: 티로신 황산화 및 푸코오스 및 시알산에 의한 특이적 코어 2 O-결합 글리코실화를 필요로 한다) 이 분자가 재조합 진핵생물 시스템에서 발현되는 것을 요구한다. Fugang Li. et al. J. Biol. Chem, 1996, 271:3255-3264은 rPSGL-1의 정확하게 글리코실화된 형태의 재조합 발현에 대한 요건을 설명한다. US 5,827,817 및 US 6,277,975는 PSGL-1 단백질의 몇몇 변이체를 설명하며, 이들 중 PSGL-1-Fc IgG1 융합 단백질, 및 푸코실-트랜스페라아제 유전자(FT)와 조합하여 CHO 및 COS 세포에서 이들의 발현을 설명한다. 따라서, 면역글로불린 Fc 단편의 일부와 PSGL-1 키메라가 정확한 글리코실화를 위한 적합한 효소(들)를 지닌 CHO 또는 COS에서 이미 발현되었다.

[0010] 동일한 출원인은, 초음파 영상화 미세소포의 인지질에 공유 결합된, 이러한 PSGL-1 IgG1 Fc 융합 단백질의 더 짧은 변이체가 표적에 대한 개선된 결합을 나타내고 미세기포 안정성을 증가시킨다는 것을 이미 밝혔다. 이들 발견은 본 발명의 동일한 출원인에 의한 WO 2012/020030에 개시된다.

발명의 내용

[0011] 본 출원은 PSGL-1 융합 단백질의 호모다이머 형태의 생성을 위해 비-공유 다이머화 도메인에 의존하는 PSGL-1 키메라 단백질의 재조합 발현을 개시하며, 이로써 항체 Fc 단편의 사용 및 이러한 단편의 존재로 인한 단점이 회피된다. 실제로, 본 발명의 재조합 구성물은, 단백질-단백질 상호작용 및 호모- 또는 헤테로-다이머/멀티머를 촉진하는 "로이신 지퍼"인, DNA 조절성 단백질의 기능적 단편의 사용을 활용하며, 이러한 형태에서 이들은 전사 인자로서 작용하고, DNA와 상호작용할 수 있고, 그것의 발현을 조절한다.

[0012] 로이신 지퍼는 7번째(때로 4번째) 아미노산 위치마다 로이신 반복을 가진 단백질 도메인이며, 오른손 α 헬릭스를 형성할 수 있고, 이로써 이들은 동일하거나 상이한 상대방(들)과의 올리고머화를 촉진하며, 따라서 호모- 또는 헤테로-다이머/멀티머와 DNA 발현 조절 특성을 생성한다.

[0013] 이콜리(E. coli)에서 다이머화 도메인으로서 로이신 지퍼의 사용은 다이머 항체나 그것의 기능적 단편들, ScFv, $F(ab')_2$를 생성하기 위해 활용되었다. De Kruif, J. 및 Logtenberg T., J. Biol. Chem., 1996, 271:7630-7634에서 이중기능 ScFv의 제조.

[0014] 효모 로이신 지퍼인 GCN4는, 이콜리에서 M13 시스템에서 $F(ab')_2$ 단편의 파지 디스플레이를 위해, Chingwei V. Lee et al., J. Immunological Methods, 2004, 284: 119-132에서 사용되었다.

[0015] 재조합 CD40을 다루고 있는 WO 2005/105840은 진핵생물 세포에서 CD40 변이체의 올리고머화를 유도하기 위해 소위 말하는 "융합 파트너"의 사용을 제안한다. 만노오스 결합 단백질, 테트라넥틴의 콜라겐 결합 도메인 및 신경 망막-특이적 로이신 지퍼 NRL(GenBank Acc. N. M81840)을 포함하는 로이신 지퍼가 가능한 융합 파트너로서 나열된다.

[0016] 본 출원인은 이제 PSGL-1 기능적 단편이 NRL 서열의 상류에서 클로닝되었을 때, 이들이 기능적 호모다이머로서 정확히 가공되고 발현될 뿐만 아니라, 발현 및 분비가, PSGL-1 호모다이머 발현의 참조 표준이 되는, 다이머 단백질 발현에 통상 사용되는, 힌지 영역 및 Fc를 지닌 표준 IgG 백본을 가진 PSGL-1 Fc-유래 구성물에 대해 관찰된 것보다 훨씬 더 매우 효과적으로 일어난다는 것을 밝혀냈다.

[0017] 본 발명은 이제 치료 또는 진단 용도에서 생체내 사용하기 위한 적합한 양 및 표준 품질의 P/E 셀렉틴 특이적 시약의 제조를 허용한다. 이 키메라 단백질은 CHO 세포 시스템에서 높은 수준으로 발현될 수 있고, 재조합 단백질의 생성을 위한 안전한 사용 특성을 가진다고 인정되며, 이것은 셀렉틴 결합에 필요한 글리코실화 및 번역 후 가공을 제공할 수 있다. 높은 발현 수준 및 기능적 번역 후 가공은 이제 이 시약의 산업적 스케일업을 허용한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 환원 및 비-환원 조건하에 변이체 1-5로부터의 컨디션드 배지의 웨스턴-블롯이다. 레인 1 및 6: 변이체 5, 각각 환원 및 비-환원 조건; 레인 2 및 7: 변이체 1, 각각 환원 및 비-환원 조건; 레인 3 및 8: 변이체 2, 각각 환원 및 비-환원 조건; 레인 4 및 9: 변이체 3, 각각 환원 및 비-환원 조건; 레인 5 및 10: 변이체 2, 각각 환원 및 비-환원 조건. MW 마커는 왼쪽에 있다.

도 2는 각각 125nM에서 단편 1(Fr-1, 실선)과 본 발명의 키메라 단백질(변이체 1A, 해치선)의 SPR Biacore(P-셀렉틴에 대한 단백질 결합 반응) 비교이다. Y 축: X 축 상의 시간(초)의 함수로서 회합/해리/재생을 포함하는 공명 단위(RU) 반응.

도 3은 래트의 염증성 뒷다리의 초음파 영상화이다. 이미지는 단편-1 또는 변이체 1A 미세기포 주사 10분 후에, 픽스드 버블 이미징(FBI)에 의해 관찰되었다.

도 4는 변이체 1A-리포솜-DIR(마우스 1 내지 6) 또는 Fr-1-리포솜-DIR(마우스 7 내지 12)로 로딩된 리포솜의 주사 후 마우스 뒷다리 염증성 LPS 모델의 광학 영상화이다. 형광 이미지는 리포솜 주사 2시간 후에 얻어졌다(왼발: 염증성 발; 오른발: 반대측 발).

도 5는 실시예 13에 설명된 HA 정제 후 분획들의 최종 풀의 RP-HPLC 분석이다(음성). 표적 단백질의 체류 시간(Rt)은 약 9.7분이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 적어도 셀렉틴 결합 도메인, 로이신 지퍼 도메인 및 이황화물 결합 촉진 영역을 포함하는 재조합 키

메라 P-셀렉틴 당단백질 리간드-1(PSGL-1) 단백질을 개시하며, 여기서 셀렉틴 결합 영역은 바람직하게 SEQ ID NO:11의 적어도 aa 5-16을 포함한다.

[0020] 로이신 지퍼 도메인은 SEQ ID NO:12(신경 망막-특이적 로이신 지퍼)의 aa 187-208과 적어도 90% 상동성이거나 동일한, 또는 더 바람직하게 SEQ ID NO:12의 aa 181-215와 적어도 90% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0021] 본 발명의 재조합 키메라 PSGL-1 단백질에서, 이황화물 결합 촉진 영역(공유 다이머화 도메인)은 아래 일반식에 의해 정의된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 바람직하게 (SEQ ID NO:20)이다:

[0022] $(X_1)n-C(X_2)m-(X_3)$

[0023] 여기서:

[0024] - X_1, X_2는 시스테인(Cys)을 배제한 임의의 아미노산 또는 아미노산 서열을 나타내며,

[0025] - C는 Cys이고,

[0026] - X_3은 임의의 아미노산이고, 및

[0027] - n, m은 1-6의 정수이다.

[0028] 재조합 키메라 단백질은 적어도 이황화물 결합에 의해 서로 공유 연결된, 상기 정의된 바와 같은 2개의 재조합 키메라 PSGL-1 모노머를 포함하는 다이머 단백질이며, 바람직하게는 호모다이머이다.

[0029] 그것은 포유류 시스템에서 발현되고, 이 경우 그것은 정확히 번역 후 변형되고 가용성 다이머로서 높은 수준으로 배양 배지에 분비된다.

[0030] 더 나아가, 본 발명은 상기 정의된 재조합 키메라 단백질을 암호화하는 DNA 서열 및 포유류 시스템, 바람직하게 CHO 세포에서 그것의 발현을 유도하는 진핵생물 발현 벡터를 포함한다. 포유류 발현 시스템은 적절한 글리코실화를 위해 상이하거나 동일한 발현 벡터 상에 글리코실화 효소 베타 1,6 N-아세틸글루코사민일트랜스페라아제(C2GnT) 및 푸코실-트랜스페라아제 VII(FTVII)를 더 포함한다.

[0031] 따라서, 본 발명은 키메라 재조합 PSGL-1 단백질을 암호화하는 DNA 또는 상기 정의된 바와 같은 벡터로 형질전환된 포유류 세포 및 포유류 세포에 의해 분비된 분리되고 정제된 단백질을 더 포함한다.

[0032] 분리된 키메라 단백질은 SEQ ID NO:11의 적어도 위치 16의 Thr에서 O-결합 글리코실화되고 적어도 위치 5, 7 및 10의 Tyr에서 설페이트화된 호모다이머이다.

[0033] 이 단백질은 바람직하게 C-말단에 존재하고 위치된, 아미노산 Cys 또는 리신을 포함하는 링커 또는 스페이서에 의해 그것이 콘쥬게이션될 수 있는 진단 또는 치료 부분에 대한 유용한 표적화제이다.

[0034] 진단적으로 유용한 부분은 바람직하게 방사성표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 금속 킬레이트화 화합물, 기체-충전된 지질 미세소포 및 진단 활성 부분들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되고, 더 바람직하게는 금속 킬레이트화 화합물 또는 기체-충전 미세소포이다. 이들 콘쥬게이트는 초음파, 자기공명, 광음향, 섬광조영술, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT), 양전자 방출 단층촬영(PET), 엑스선, 무선주파수 음향 및 광학에 의한 영상화에 유용하며, 병리학적 상태는 셀렉틴의 과발현을 특징으로 하며, 예컨대 급성 관상동맥 증후군(ACS), 염증성 장 질환(IBD), 궤양성 대장염, 크론병, 종양과 관련된 신생-혈관형성, 류마티스성 관절염, 허혈성 재관류 손상, 이식 거부 또는 더 일반적으로 P-셀렉틴 및/또는 E-셀렉틴을 생리학적 수준 이상으로 발현하는 임의의 기관 또는 조직이다. 더 바람직하게, 병리학적 상태는 IBD, ACS, 종양 검출 또는 이식 거부이다.

[0035] 더 바람직하게, 본 발명의 키메라 단백질은 IBD, ACS, 종양 검출 또는 이식 거부에 대한 유용한 표적화제이다.

[0036] 치료 활성 부분은 바람직하게 사이토카인, 세포성장억제제, 독소, 항염제, 면역조절제, 항혈소판제, 코르티코스테로이드, 단클론 항체, 성장인자 또는 방사성핵종을 운반할 수 있는 금속 킬레이트화 부분을 포함하는 방사선요법제로 구성되는 군에서 선택된다.

[0037] 상기 정의된 바와 같은, 진단 또는 치료 목적을 위한 재조합 키메라 단백질 또는 그것의 콘쥬게이트를 포함하는 제약학적 조성물이 본 발명에 더 포함된다.

[0038] 본 발명의 추가의 구체예는 본 발명의 재조합 키메라 단백질을 제조하는 방법이며, 이것은 진핵생물 세포를 그

것을 암호화하는 DNA 서열 또는 상기 DNA 서열을 포함하는 진핵생물 발현 벡터로 형질전환함으로써 키메라 단백질을 안정적으로 발현하는 재조합 시스템을 달성하는 단계, 배양 배지를 수거하는 단계 및 상기 배양 배지로부터 재조합 단백질을 정제하는 단계를 포함한다.

[0039] 더 나아가, 본 발명은 마지막 크로마토그래피 단계로서 하이드록시아파타이트를 포함하는, 재조합 가용성 단백질의 정제 과정에 관한 것이다. 하이드록시아파타이트, 바람직하게 세라믹 하이드록시아파타이트는 바람직하게 강한 음이온 교환 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 후에 수행된다.

[0040] 본 발명의 추가의 구체예는, 본 발명에 따른 재조합 가용성 키메라 단백질을 포함하는 표적화 콘쥬게이트를 사용하여 셀렉틴의 과발현을 특징으로 하는 병리학적 상태를 치료하기 위한 방법 및 셀렉틴의 과발현을 특징으로 하는 병리학적 상태의 진단 영상화이며, 이것은 진단 콘쥬게이트 또는 제약학적 조성물을 대상에게 사전 투여하는 단계 및 영상화 방법에 의해 영상을 기록하는 단계를 포함한다. 이러한 영상화 방법은 바람직하게 초음파, 자기공명, 광음향, 섬광조영술, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT), 양전자 방출 단층촬영(PET), 엑스선, 무선주파수 음향 및 광학으로 구성되는 군에서 선택된다.

[0041] 셀렉틴의 과발현을 특징으로 하는 병리학적 상태는 바람직하게 급성 관상동맥 증후군(ACS), 염증성 장 질환(IBD), 궤양성 대장염, 크론병, 종양과 관련된 신생-혈관형성, 류마티스성 관절염, 허혈성 재관류 손상, 이식 거부 또는 더 일반적으로 P-셀렉틴 및/또는 E-셀렉틴을 생리학적 수준 이상으로 발현하는 임의의 기관 또는 조직으로 구성되는 군에서 선택된다. 더 바람직하게, 병리학적 상태는 IBD, ACS, 암 또는 이식 거부이다.

[0042] 발명의 상세한 설명

[0043] *정의*

[0044] 달리 제공되지 않는다면, 본 발명에서 말하는 인간 PSGL-1의 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열은 GenBank Acc. N° Q14242.1에 의해 확인된다. 이 Acc. 넘버는 또한 기능적 도메인, 예컨대 aa 1-17로 이루어진 PSGL-1의 신호 펩타이드 영역, aa 42(SEQ ID NO:11의 aa 1에 상응한다)에서 성숙한 단백질의 시작을 확인하는 aa 18-41로 이루어진 프로-펩타이드 영역, N- 및 O-글리코실화 부위 및 황산화 부위를 확인한다.

[0045] 신경 망막-특이적 로이신 지퍼(NRL) 아미노산 서열은 NCBI Acc. N° NP_006168.1에 의해 확인된다(GI:1709348, 인간). 본 발명에서, 신경 망막-특이적 로이신 지퍼 도메인(NRL)에 대한 언급은 마우스 NRL(P54846)를 포함하여 NRL의 로이신 지퍼 영역에서 적어도 90% 상동성인 모든 아미노산 서열을 포함한다.

[0046] Swaroop et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1992, 89: 266-270에 의해 최초로 분리되고 특성화된 NRL, 단일 뉴클레오타이드 다형성이 확인되었다: 이들은 본 발명에서 기능적이라면 the NP_006168.1 서열에 포함되며, 로이신 지퍼 도메인이 아미노산 187-208 사이에서 확인되었다. NRL 서열로부터 유래된 이 영역의 N-말단 또는 C-말단에 있는 측면 아미노산이 또한 기능적 도메인(비-공유 다이머화 모티프)의 일부일 수 있다.

[0047] 여기 사용된 용어 "재조합"은 비-자연 변경 또는 조작된 핵산, 외인성 핵산으로 형질주입된 숙주 세포, 또는 분리된 DNA의 조작 및 숙주 세포의 형질전환을 통해서 비-자연 발현된 폴리펩타이드를 설명하기 위해 사용된다. 재조합은 유전자 조작 기술을 사용하여 시험관내 구성된 DNA 분자를 특이적으로 포함하는 용어이며, 분자, 구성물, 벡터, 형질주입된 세포, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 설명하기 위한 목적으로서 용어 "재조합"의 사용은 이들이 자연 발생 분자와 동일한 부분 서열을 가진다 해도 이러한 분자, 구성물, 벡터, 세포, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0048] 용어 "폴리펩타이드"는 펩타이드 아미드 결합(-C(:O)NH-)에 의해 주 사슬(측쇄와 다른)을 통해서 연결된 둘 이상의 아미노산의 화합물을 말한다. 용어 "펩타이드"는 "폴리펩타이드"와 상호 교환하여 사용되지만, 일반적으로 40개 미만, 바람직하게 25개 아미노산 미만의 폴리펩타이드를 말한다.

[0049] 용어 "단백질"은 펩타이드 아미드 결합(-C(:O)NH-)에 의해 주 사슬(측쇄와 다른)을 통해서 연결된 40개 초과 아미노산의 화합물을 말한다.

[0050] 본 발명에서 사용된 용어 "키메라 단백질" 또는 "융합 단백질" 또는 "키메라"는 적어도 하나의 비-PSGL-1 폴리펩타이드와 작동가능하게 연결된 PSGL-1 폴리펩타이드를 포함한다. "PSGL-1 폴리펩타이드"는 PSGL-1, 바람직하게 인간 PSGL-1의 아미노산 서열을 공유하지만, "비-PSGL-1 폴리펩타이드"는 PSGL-1에 실질적으로 상동성이 아니며 동일하거나 상이한 유기체로부터 유래된 아미노산 서열을 가진다. 바람직한 구체예에서, "PSGL-1 폴리펩타이드"는 PSGL-1의 세포외 부분, 또는 여전히 셀렉틴(특히 P 및 E 셀렉틴)과 결합하는 그것의 더 짧은 단편, 예컨대 셀렉틴 결합 영역을 한정하는 aa 5-16 영역을 포함하는 PSGL-1(SEQ ID NO:11)의 1-47 단편을 포함한다.

셀렉틴 결합 영역은 선택적으로 PSGL-1 서열로부터 유래된 aa 5-16의 N- 또는 C- 말단에 측면 아미노산(들)을 포함할 수 있다.

[0051] "융합체" 또는 "키메라 단백질"은 프로모터 또는 폴리아데닐화 부위와 같은, 진핵생물 발현의 조절성 영역의 제어하에 서로 프레임 내 융합된 비-PSGL-1 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열에 PSGL-1 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 작동가능하게 연결함으로써 재조합 시스템에서 발현되고 생성된다.

[0052] 용어 "결합"은 결합한 폴리펩타이드가 주어진 표적을 인식하고 가역적으로 결합하는 여기 설명된 것들을 포함하는 표준 분석에 의한 결정을 말한다. 이러한 표준 분석은, 제한은 아니지만 평형 투석, 겔 여과, 표면 플라스몬 공명, 면역 친화성 분석, 예컨대 경쟁 면역분석 및 결합으로 인한 분광학적 변화의 모니터링을 포함한다.

[0053] 여기 사용된 "표지화 기" 또는 "검출가능한 표지"는 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 기 또는 부분이다. 영상 진단에 유용한 표지는 자기공명, 방사능 검출, 초음파, 엑스선, 방사선(자외선, 적외선, 형광 등)에 의해 검출 가능한 표지 또는 방사성 금속 또는 다른 방사선 요법 또는 다른 형태의 요법에 사용될 수있다. 구체적인 표지는 다음과 같다.

[0054] 용어 "특이성"은 다른 표적에 대해 하나의 표적에 대해 더 높은 결합 친화도를 갖는 결합 폴리펩티드를 지칭한다. 결합 특이성은 두 개의 시험 된 표적 물질에 대한 해리 평형 상수(KD) 또는 결합 평형 상수 (Ka)를 특징으로 할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 약 10μM 미만, 보다 바람직하게는 약 1μM 미만, 가장 바람직하게는 약 0.5μM 미만 또는 보다 낮은 바람직한 표적에 대한 해리 상수를 갖는다. "세포 선택 특이성"이란 용어는 무관한 표적보다 P, L, E 세포 중 적어도 하나의 셀렉틴에 대해 더 높은 친 화성을 갖는 PSGL-1 결합 부분을 의미한다.

[0055] 본원에 사용된 용어 "환자"는 임의의 포유류, 특히 인간을 지칭한다.

[0056] 용어 "제약상 허용되는" 담체 또는 부형제는 본 발명의 화합물과 함께 환자에게 투여될 수 있고 그의 약리학적 활성을 파괴시키지 않는 비독성 담체 또는 부형제를 지칭한다.

[0057] "표적" 또는 "표적 분자"라는 용어는 단백질 또는 폴리펩타이드, 세포, 수용체, 탄수화물, 지질 등과 같이 결합 펩티드 또는 결합 폴리펩타이드가 결합할 수있는 임의의 물질을 지칭한다. 여기 사용된 "표적"은 세포, 조직 또는 기관의 표면에 표출된 또는 격리된 형태의 셀렉틴 계열을 포함한다. 따라서, 본원에서 사용된 "표적화" 부분은 PSGL-1 단백질 또는 셀렉틴, 바람직하게는 P 및 E- 셀렉틴에 결합 할 수 있는 그것의 기능적 단편을 의미한다.

[0058] 용어 "치료제" 또는 "치료"는 생체 내 악성 세포에 대해 유익한, 치료적 또는 세포 독성 효과를 갖는 화합물 또는 제제를 의미한다. 치료제는 예를 들어 생체 활성제, 세포독성제, 약물, 화학요법제, 방사선요법제, 유전 물질 등으로 언급 된 조성물을 포함한다.

[0059] "양으로 하전된" 아미노산 용어는 아르기닌, 히스티딘, 리신과 같은 그룹 내의 아미노산을 의미한다. 이들 아미노산은 일반적으로 "상호교환가능한" 것으로서 간주되며, 이것은 동일한 그룹 내에서 서로에 의한 잔기의 치환이 일반적으로 단백질 또는 폴리펩타이드 내에서 잘 관용된다는 것을 의미하며, 이것은 잔기가 단백질의 중요 도메인에 포함되었을 때는 적용되지 않을 수 있다(예컨대 알파 헬릭스, 결합 포켓, 입체구조 의존적 제약 등).

[0060] "음으로 하전된" 아미노산이란 용어는 아스파르트산과 글루탐산의 군에 속하는 아미노산을 말한다. 이들 아미노산은 일반적으로 "상호교환가능한" 것으로서 간주되며, 이것은 동일한 그룹 내에서 서로에 의한 잔기의 치환이 일반적으로 단백질 또는 폴리펩타이드 내에서 잘 관용된다는 것을 의미하며, 이것은 잔기가 단백질의 중요 도메인에 포함되었을 때는 적용되지 않을 수 있다(예컨대 결합 포켓, 입체구조 의존적 제약 등).

[0061] "극성 비하전 측쇄"를 지닌 아미노산이라는 용어는 세린, 트레오닌, 아스파라긴 및 글루타민의 군에 속하는 아미노산을 말한다. 이러한 아미노산은 일반적으로 "상호교환가능한" 것으로서 간주되며, 이것은 동일한 그룹 내에서 서로에 의한 잔기의 치환이 일반적으로 단백질 또는 폴리펩타이드 내에서 잘 관용된다는 것을 의미한다.

[0062] "소수성 측쇄"를 지닌 아미노산이란 용어는 알라닌, 발린, 이소로이신, 로이신, 메티오닌, 페닐 알라닌, 티로신 및 트립토판의 군에 속하는 아미노산을 말한다. 이들 아미노산은 일반적으로 "상호교환가능한" 것으로서 간주되며, 이것은 동일한 그룹 내에서 서로에 의한 잔기의 치환이 일반적으로 단백질 또는 폴리펩타이드 내에서 잘 관용된다는 것을 의미하며, 이것은 잔기가 단백질의 중요 도메인에 포함되었을 때는 적용되지 않을 수 있다(예컨대 알파 헬릭스, 결합 포켓, 입체구조 의존적 제약 등).

[0063] 단백질에서 특정 기능을 가진 아미노산은 시스테인, 글리신 및 프롤린과 같은 기에 포함된 것이다. 기능이 잔기의 크기로 인해 수행되는지 여부에 따라, 글리신은 세린 또는 알라닌과 같은 다른 작은 크기의 잔기로 대체될 수 있다. 시스테인은 이황화물 브릿지에 수반되었을 때는 치환될 수 없을 수 있다.

[0064] 공유 다이머화 도메인이란 세포외 환경에서 안정한, 상이한 폴리펩타이드 사슬(사슬외 이황화물 브릿지) 상의 다른 시스테인과 이황화물 브릿지에서 맞물릴 수 있는 시스테인을 포함하는 아미노산의 서열을 말한다.

[0065] 비-공유 다이머화 도메인이란 단백질-단백질 상호작용을 결정하고 및/또는 우선할 수 있는 아미노산의 서열을 말한다. 바람직한 비-공유 다이머화 도메인은 로이신 잔기의 주기적 반복에 의해 결정된 구조적 알파-헬릭스이며, 일반적으로 "로이신 지퍼"라고 본 분야에서 언급된다.

[0066] 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 로이신 지퍼 아미노산 영역은 바람직하게 임의의 리신(K 또는 Lys)을 결여하고 있다. 로이신 지퍼 도메인은 일반적으로 aa 로이신의 주기적 반복에 의해, 진핵세포 "조절성" 단백질에서 쉽게 확인된다. 이들 중, aa 236-250에 상응하는 Q9Y2D1의 로이신 지퍼, 또는 활성화 전사 인자 5의 로이신 지퍼(GI:114678546)가 있다.

[0067] 그러나, 본 발명에 따른 바람직한 로이신 지퍼는 다음의 군에서 선택된다:

[0068] - 포유류에서 분리되고 인간 NRL 단백질의 단편 187-208과 90%의 상동성을 공유하는, 신경 망막-특이적 로이신 지퍼 단백질 단편, 더욱더 바람직하게는 마우스 NRL(Q543Y0) 또는 인간 NRL, 동형 2(P54845-2) 또는 소 단백질 F1N4J1의 로이신 지퍼 도메인.

[0069] *상세한 설명*

[0070] 본 발명은 셀렉틴 결합 도메인 및 비-공유 다이머화 도메인을 포함하는 재조합 PSGL-1 키메라 단백질을 말하며, 여기서 비-공유 다이머화 도메인은 로이신 지퍼이고, 더 바람직하게는 인간 또는 마우스 신경 망막-특이적 로이신 지퍼의 로이신 지퍼 도메인이며, 이것은 바람직하게 적어도 NP_006168.1(SEQ ID NO: 12)의 영역 187-208, 또는 바람직하게 적어도 SEQ ID NO:12의 영역 181-215에 상응한다. 또는 달리, 비-공유 다이머화 도메인은 인간 NRL 단백질의 단편 187-208과 90%의 상동성을 공유하며, 더욱더 바람직하게는 마우스 NRL(Q543Y0) 또는 인간 NRL, 동형 2(P54845-2) 또는 소 단백질 F1N4J1의 로이신 지퍼 도메인이다.

[0071] P-셀렉틴 결합 도메인이란 셀렉틴("활성 서열"), 특히 P-셀렉틴에 대해 결합 친화성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 말한다; 상기 활성 서열은 SEQ ID NO:11의 적어도 아미노산 5-16을 포함하거나(Cummings RD, Brazilian Journal of Medical 및 Biological research, 1999, 32:519-528), 또는 바람직하게 SEQ ID NO:11의 단편 1-19, 5-41 및 1-47 중에서 선택되며, 여기서 아미노산 1은 성숙한 PSGL-1 단백질의 첫 번째 아미노산을 나타내고, GenBank record Acc. N. Q14242.1.의 aa 42에 상응한다.

[0072] PSGL-1 단백질은 GenBank에 정의된 대로, 경막 도메인에 근접한, Cys320에서 이황화물 결합에 의해 연결된 경막 호모다이머이다.

[0073] 현재까지 재조합 PSGL01의 다이머화는 PSGL-1 셀렉틴-결합 도메인의 하류에 IgG1 Fc 도메인을 도입함으로써 달성되었다. 이 Fc 도메인은 이황화물 브릿지에서 맞물려 호모다이머의 키메라 단백질을 공유 회합시킬 수 있는, 적어도 2개의 시스테인을 지닌 힌지 영역을 포함한다. 셀렉틴 결합에 필수적인 다이머화를 개선하거나 촉진하기 위해 면역글로불린 Fc 영역이 몇몇 재조합 시스템에서 사용되었다.

[0074] 그러나, Fc 도메인의 존재는 일부 단점을 가진다. 먼저, Fc 도메인에 융합된 PSGL-1은 기체 미세소포의 표면에 결합되었을 때 응집체의 형성을 유도한다(WO 2012/020030). 더욱이, Fc 도메인은 또한 대식세포에 의해 발현된 Fc-수용체의 특이적 인식에도 불구하고 면역 반응을 촉발시킬 수 있다. 이것은 혈액 순환으로부터 Fc 단백질 단편을 지닌 분자의 청소를 초래할 수 있거나, 또는 알러지 반응과 같은 면역반응을 촉발시킬 수 있다.

[0075] 실제로, 본 발명의 동일한 출원인은 더 짧은 Fc 영역이 미소기포 제조에 사용된 유도체에 개선된 특성을 제공한다는 것을 발견했다. 이러한 단점은, 인간 NRL의 로이신 지퍼 도메인이 Fc 영역을 치환한 본 발명에 의해 극복되었다. 이 영역은 바람직하게 NP_006168.1의 적어도 aa 187-208, 또는 바람직하게 aa 186-209, 185-210, 184-211, 183-212, 182-213, 181-214, 181-215, 186-208, 186-210, 187-208 또는 적어도 aa 187-208과 추가로 N 또는 C-말단에 또는 서열 NP_006168.1(SEQ ID NO:12)의 영역 181-215로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 측면 아미노산을 포함하는 임의의 단편을 포함하는, 신경 망막-특이적 로이신 지퍼의 로이신 지퍼 도메인이다.

[0076] 출원인은 DNA 조절성 단백질 NRL의 로이신 지퍼 도메인이 이황화물 브릿지 형성을 선호함으로써 키메라 모노머

의 효과적인 공유 다이머화를 허용할 뿐만 아니라 포유류 재조합 시스템에서 다이머 작용 단백질의 매우 효과적인 발현 및 분비를 제공한다는 것을 발견했다.

[0077] 더욱더 놀랍게도, 이 새로운 키메라 단백질은 정확하게 번역 후 변형되며, 즉 예상된 PSGL-1 영역에서 정확하게 O-글리코실화되고 Tyr에서 설페이트화되며, 이황화물 브릿지(들)에 의해 다이머 및 공유 결합되고, WO 2012/020030에 설명된 최적화된 단편 1(Fr-1)과 적어도 동등하거나 더 뛰어난 친화성으로 셀렉틴 표적과 결합한다. 이들 결론은 실험 부분에 더 잘 설명된 많은 데이터에 의해 얻어졌다.

[0078] sPSGL-1-NRL으로 칭해진 본 발명의 키메라 단백질(P-셀렉틴 당단백질 리간드-1 및 신경 망막-특이적 로이신 지퍼)이 관련 없는 단백질로부터의 도메인들의 조합이기 때문에 상기 발견은 매우 놀라우며, IgG1 Fc 단편과 같은 본 분야에서 통상 사용되는 다른 다이머화 도메인과 프레임 내 융합된, N-말단 영역으로서 PSGL-1 셀렉틴 결합 도메인을 지니도록 조작된 다른 키메라 단백질의 발현 수준과 비교했을 때 더욱더 특별하다.

[0079] 구체적으로, 본 발명의 바람직한 구체예 중 하나에서, SEQ ID NO:11의 PSGL-1 도메인 1-47은 아래의 성분과 프레임 내 융합되었다:

[0080] - 아래 정의된 것과 같은 적어도 시스테인을 포함하는 공유 다이머화 도메인, 바람직하게 뒤따라서 또는 선행해서 비-공유 다이머화 도메인(또는 안정화 도메인), 예컨대 NRL 로이신 지퍼와 프레임 내 융합되며, 이것은 인간 IgG1의 Fc 또는 CH3 도메인을 대신한다;

[0081] - 선택적으로 그리고 바람직하게 C-말단에 있는 스페이서, C-말단에 연결될 수 있는 기들이나 부분들에 의한 입체장해를 피할 수 있다;

[0082] - 키메라 단백질의 N-말단에 있는 분비를 위한 신호 펩타이드, 이것은 성숙한 키메라 단백질에서 절단되기에 적합하며 바람직하게는 내인성 PSGL-1 신호 및 프로-펩타이드 서열이 아니다.

[0083] 포유류 시스템에서 제조되고 발현에 대해 시험된 몇몇 변이체 중, 변이체 1 및 1A가 본 발명의 PSGL-1-NRL 키메라 단백질의 바람직한 구체예이다(SEQ ID NO:2 및 SEQ ID NO:37). 변이체 2(SEQ ID NO:4)는 각각 공유 및 비-공유 다이머화(또는 안정화) 도메인으로서 사용된 인간 IgG1 힌지 및 CH3 도메인과 프레임 내 융합된 PSGL-1에 상응한다. 또는, 변이체 5(SEQ ID NO:10)는 비교 목적을 위해 제조된 WO 2012/020030에 설명된 최적화된 단편 1의 동일한 기능적 도메인을 포함한다. 관심의 단백질 변이체에서, 상기 언급된 서열목록은 발현된 성숙한 형태에서 절단되는 신호 펩타이드를 확인한다.

[0084] 특히, 단지 NRL 로이신 지퍼 함유 변이체 1만 제약학적 제제의 생성에 적합한 발현 수준을 제공한다. 동일한 세포 시스템에서 발현된, 변이체 1-5의 상대적 발현에 대한 비교 데이터가 도 1에 제공되며, 여기서 태그된 키메라 단백질의 발현 수준은 일시적 발현, 변성 및 비-변성 조건에서의 SDS-PAGE 및 C-말단에 위치된 공통 태그(즉, FLAG 옥타펩타이드)에 지정된 항체를 사용한 웨스턴 블롯에 의해 평가되었다.

[0085] 따라서, 특정 이론에 결부되지는 않지만, 생리학적으로 다이머(PSGL-1)인 단백질에서 단백질-단백질 상호작용을 선호하는 로이신 지퍼 및 더 바람직하게 NRL의 로이신 지퍼와 같은 비-공유 다이머화 도메인의 존재는, 본 발명의 최종 키메라 단백질의 유리한 폴딩 또는 안정화 효과에 의해, 개선된 발현 수준을 가져오며, 이것은 배양물에서 단일 클론 분리 및 안정화에 의해 더 최적화될 수 있다. 예비 클론 선택 후 제공된 역가는 0.1 g/L를 꽤 상회한다.

[0086] 본 발명의 키메라 단백질에서, 이황화물 결합(들) 촉진 영역이라고도 하는 공유 다이머화 도메인은 모노머 키메라 단백질 상대방에 있는 다른 Cys와 이황화물 결합을 형성하는데 이용할 수 있는 적어도 하나의 Cys를 포함하며, 이로써 2개의 키메라 단백질 모노머가 적어도 하나의 이황화물 브릿지를 통해서 공유 결합된다.

[0087] 공유 다이머화 도메인을 포함하는 일반식은 다음과 같다:

[0088] $(X_1)n-C(X_2)m-(X_3)$,

[0089] 여기서, X_1 및 X_2는 Cys를 제외한 임의의 아미노산 또는 아미노산 서열이고; C는 시스테인이고, X_3은 임의의 아미노산이고, n 및 m은 1-6의 정수이다. X_1은 바람직하게 프롤린, 히스티딘 또는 트레오닌을 포함하며, 더욱더 바람직하게 프롤린 및 히스티딘 또는 히스티딘 및 프롤린 또는 프롤린 및 트레오닌을 포함한다. 바람직한 구체예에 따라서, X_1은 프롤린, 히스티딘 및 트레오닌을, 바람직하게는 이 순서로 포함하고, n은 최대 5이다. X_2는 Cys를 제외한 임의의 아미노산 또는 아미노산 서열이며, 바람직하게 프롤린을 포함한다. 바람직하게, X_2는

Pro-Pro이고; X_3은 바람직하게 시스테인이며, 적어도 프롤린을 포함한다. 더 바람직하게, 시스테인 보유 영역은 IgG1 힌지 영역, 또는 그것의 기능적 단편이다. 바람직한 이황화물 결합 촉진 영역은 PHTCPPCP(SEQ ID NO:20)이다.

[0090] 바람직한 구체예에 따라서, 키메라 단백질은 C-말단에 스페이서를 더 포함하며, 이것은 다른 펩타이드 또는 영상화 및/또는 치료 부분과 같은 화학 부분과의 공유 바이오-콘쥬게이션에 적합한 잔기를 포함한다. 바이오-콘쥬게이션을 위한 예시적인 아미노산은 시스테인 및 리신이다. 스페이서는 약 4-20 아미노산 길이이고, Gly, Ser, Pro, Ala, Val, Leu로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함한다; 그것은 C-말단에, 바람직하게는 끝에서 두 번째 위치에 시스테인 또는 리신을 지닌다. 스페이서는 바람직하게 알라닌 또는 다른 중성 아미노산, 예컨대 발린이나 유사한 것을 매립하고 있는 폴리글리신이며, 그것은 시스테인 또는 리신, 바람직하게는 리신을 포함하고, 여기서 상기 콘쥬게이션 아미노산에 뒤따라 Gly, Ser, Pro, Ala, Val, Leu, 바람직하게는 적어도 하나의 Gly가 존재한다. 스페이서는 바람직하게 서열 G_4AG_4KG(SEQ ID NO:17)을 가진다. 또는 달리, 키메라 단백질은 식별 및 정제 목적을 위해 그것의 C-말단에 Flag 서열을 포함한다. Flag 서열은 당업자에 의해 통상 사용되며 본 분야에 알려져 있다. 한 예는 DYDDDDK 서열(SEQ ID NO:35)이며, 이것은 적합한 항체와의 면역-친화성에 의한 단백질 인식 및/또는 정제를 허용한다.

[0091] 바람직한 구체예에 따라서, 모노머 단백질은 신호 펩타이드를 가진 전구체로서 번역된 다음 가공되며, 최종적으로 신호 펩타이드의 절단 후 호모다이머로서 배양 배지(컨디션드 배지)에 분비된다.

[0092] 분비를 위한 신호 펩타이드는 키메라 단백질의 전구체의 N-말단에 존재한다. 바람직하게, 신호 펩타이드는 서열 MEWSWWVFLFFLSVTTGVHS(SEQ ID NO:18)을 가진 마우스 IgH 신호 펩타이드이다. 재조합 단백질 발현 분야에서 통상 사용되는 PSGL-1 내인성 신호 펩타이드 서열 또는 다른 이종성 신호 펩타이드 서열과 같은 다른 신호 펩타이드(또는 리더 펩타이드)가 사용될 수 있으며, 이것은 번역 후 가공된 재조합 단백질의 분비를 허용한다. 본 분야에 공지된 일부 신호(또는 리더) 펩타이드의 예가 표 1에 제공되었다.

표 1

[0093] 리더 신호 펩타이드 서열

Acc. N	명칭	유전자	종	서열
P01728	LV2A_MOUSE	Ig 람다-2 사슬 V 영역	생쥐	MAWTSLILSLLALCSGASS SEQ ID NO:21
P01758	HVM14_MOUSE	Ig 중쇄 V 영역 108A	생쥐	MGWSWIFLFLLSGTAGVHSSEQ ID NO:22
P01750	HVM06_MOUSE	Ig 중쇄 V 영역 102	생쥐	MGWSCIILFLVATATGVHSSEQ ID NO:23
P01749	HVM05_MOUSE	Ig 중쇄 V 영역 3	생쥐	MGWSCIILFLVATATGVHSSEQ ID NO:24
P01821	HVM45_MOUSE	Ig 중쇄 V 영역 MC101	생쥐	MAVLGLLFCLVTFPSCVLSSEQ ID NO:25
P01748	HVM04_MOUSE	Ig 중쇄 V 영역 23	생쥐	MGWSCIILFLVAAANGVHS SEQ ID NO:26
Q61508	ECM1_MOUSE	세포외 바탕질 단백질 1	생쥐	MGTVSRAALILACLALASASEQ ID NO:27
P01751	HVM07_MOUSE	Ig 중쇄 V 영역 B1-8/186-2	생쥐	MGWSCIMLFLAATATGVHSSEQ ID NO:28
P01831	THY1_MOUSE	Thy-1 막 당단백질	생쥐	MNPAISVALLLSVLQVSRGSEQ ID NO:29
Q03402	CRIS3_MOUSE	시스테인-부화 분비 단백질 3	생쥐	MALMLVLFFLAAVLPPSLLSEQ ID NO:30
P01746	HVM02_MOUSE	Ig 중쇄 V 영역 93G7	생쥐	MGWSFIFLFLLSVTAGVHSSEQ ID NO:31
P26262	KLKB1_MOUSE	혈장 칼리클레인	생쥐	MILFNRVGYFVSLFATVSCSEQ ID NO:32
P11627	L1CAM_MOUSE	신경 세포 유착 ㅂ부분자 L1	생쥐	MVVMLRYVWPLLLCSPCLLSEQ ID NO:33
P06327	HVM52_MOUSE	Ig 중쇄 V 영역 VH558 A1/A4	생쥐	MGWRWIFLFLLSGTAGVHCSEQ ID NO:34

[0094] SEQ ID NO:18에 대한 대안으로서, 재조합 단백질의 분비를 달성하기 위해 SEQ ID NO:24 내지 SEQ ID NO:34로부터의 상기 신호 펩타이드 중 어느 것이 사용될 수 있다. 본 발명의 PSGL-1-NRL 키메라 재조합 단백질은 다이머 형태로 P/E 셀렉틴과 효과적으로 결합하며, 여기서 각 모노머는 상기 정의된 재조합 PSGL-1이고, 적절히 글리코실화되고 설페이트화된 형태로 생성된다. 지금까지 공개된 몇몇 연구는 P/E/L 셀렉틴 결합에 대한 PSGL-1 번역후 요건, 즉 글리코실화, 황산화를 검토했고, 이 가공 및 셀렉틴 결합에 중요한 잔기를 맵핑했다(R.D., Cumming, Braz. J. Biol. Res., 1999, 32(5):520-528 및 D. Sako Cell, 1995, 83:323-331). 본 발명에 따른 키메라 단백질의 바람직한 구체예에서, 시알릴화(시알산의 존재)가 온건한 산성 처리 후 질량분광법과 결합된 액체 크로마토그래피(LC-MS)에 의해 평가되었다. 본 발명의 재조합 단백질의 시알릴 잔기의 함량은 약 5% 내지

30% w/w, 10% 내지 28% w/w, 15% 내지 25% w/w, 더 바람직하게 15% 내지 25%일 수 있다.

[0095] 재조합 키메라 단백질을 특성화하기 위해, Asp-N 및 키모트립신 효소 분해에 의한 펩타이드 맵핑이 수행되었다. 피로글루타민(pGlu)로의 N-말단 글루타민(Gln) 고리화, Tyr 황산화, Thr O-글리코실화(코어 2 SLe^X의 존재) 및 다이머 구조가 실험 부분에서 또한 평가되었고 더 상세히 설명되었다.

[0096] 단백질의 다이머 구조는 키모트립신 절단에 의해 확인되었으며, 이것은 재조합 단백질의 바람직한 구체예에 따라서 $(TCPPCPL)_2$ 단편을 제공한다.

[0097] N-말단 티로신(Y) 잔기 5, 7 및 10의 황산화는 Asp-N 분해에 의해 확인되었다. SLe^X 사당류 모티프에 의한 O-글리코실화는 키모트립신 절단에 의해 트레오닌 16 상에서 확인되었다.

[0098] 상기 모두로부터 키메라 단백질에서 셀렉틴 결합에 중요한 PSGL-1의 N-말단 도메인은 성숙한 PSGL-1 단백질의 위치 5, 7 및 10에 상응하는 Tyr 잔기에서 적절히 설페이트화되고 위치 16의 트레오닌 잔기에서 글리코실화, 특히 O-결합 글리코실화된다는 결론을 내릴 수 있다; O-결합 글리칸은 전형적으로 N-아세틸갈락토사민(GalNac), N-아세틸글루코사민(GlcNAc), 푸코오스, 글루코오스, 갈락토오스, 만노오스(Man), 헥소오스, 자일로오스, 시알산 또는 이들의 혼합물과 같은 당 잔기를 포함한다. 이들 번역 후 변형(PTM)은 SEQ ID NO:38에 요약되었다.

[0099] 바람직하게 본 발명의 키메라 단백질의 PSGL-1 부분에 존재하는 O-결합된 글리칸은 바람직하게 GalNac, GlcNAc, 푸코오스, 시알산 및 갈락토오스이다. PSGL-1 상의 O-결하된 글리칸은 바람직하게 시알릴화되고 푸코실화되며, 바람직하게는 트레오닌 잔기에 결합된 시알릴 루이스 X 글리칸 구조(sLe^x, 시알산-갈락토피라노실-푸코오스-N-아세틸글루코사민)로 구성된다.

[0100] 이 종류의 번역 후 변형은 P-셀렉틴 결합에 필수적인 것으로서 설명되었다(R. D. Cumming, Braz. J. Biol. Res., 1999, 32(5):520-528 및 D. Sako Cell, 1995, 83:323-331).

[0101] 다이머가 형성되고, 각 모노머는 적어도 하나의 이황화물 브릿지에 의해 서로 공유 연결된다.

[0102] 키메라 단백질의 정확한 번역 후 과정은 PSGL-1 발현을 위해 과거에 사용되었던 HEK-293, COS-1 또는 CHO 세포와 같은 포유류 세포에서의 발현에 의해 달성되었다. 어느 경우에든, PSGL-1은 바람직하게 C2GnT(코어 2 β1-6-*N* 아세틸글루코사민일트랜스페라아제) 및 푸코실-트랜스페라아제 효소, 예컨대 다음 중 하나: Fuc-TIII(Fuc-T: 푸코실트랜스페라아제), Fuc-IV 또는 Fuc TVII(Fugang Li. et al., J. Biol. Chem, 1996, 271:3255-3264) 또는 이들의 기능적 단편과 함께 포유류 세포에서 공-발현된다. 바람직하게, Fuc TVII 또는 그것의 기능적 단편이 사용된다. 부유배양 성장에 적응된 세포, 바람직하게 CHO는 적어도 7일, 일반적으로 최대 14일 동안 OptiCHO™(LifeTechnology) 배지(다른 혈청-무함유 화학 한정 배지도 성공적으로 사용될 수 있다, 예를 들어 ActiCHO™(GE/PAA), FortiCHO™, CellVento™ CHO 200 및 CellVento™ CHO 220(Millipore), 83836C(SAFC), BalanCD™(Irvine), EX-CELL®(Sigma-Aldrich) 등)를 사용하여 선택 압력의 부재하에 성장된다. 글루타민(또는 유사체 GlutMax™)이 1-10mM, 바람직하게 4-8mM로 보충되었다. OptiCHO™ 및 ActiCHO™(LifeTechnology)가 발현 목적을 위해 바람직하다.

[0103] 키메라 단백질은 음이온-교환, 소수성 상호작용 및 크기 배제 또는 하이드록시아파타이트(HA) 크로마토그래피를 포함하는 3-단계 크로마토그래피에 의해 필요한 순도 수준으로 정제될 수 있다. 마지막 정제 단계에서 HA 칼럼을 포함하는 정제가 바람직하며, 치료 등급의 순수한 키메라 단백질을 제공한다. 따라서, 추가의 구체예에 따라서, 본 발명은 최종 단계로서 하이드록시아파타이트(HA) 크로마토그래피를 포함하는, 상기 정의된 키메라 단백질에 대한 정제 과정을 포함한다. 더 바람직하게, 정제 과정은 강한 음이온 교환(AE)에서 수행되는 1차 크로마토그래피, 소수성 상호작용(HI) 고체상에서 수행되는 2차 크로마토그래피 및 HA, 바람직하게 세라믹 하이드록시아파타이트에서 수행되는 3차 단계를 포함한다.

[0104] 더 일반적으로, 본 발명은 임의의 가용성 PSGL-1-함유 융합체 또는 키메라 단백질의 정제를 위한 과정을 말하며, 여기서 상기 PSGL-1은 성숙한 PSGL-1(SEQ ID NO:11)의 적어도 aa 5-16을 포함하고, 이러한 5-16 단편의 N- 또는 C-말단에 하나 이상의 측면 아미노산을 더 포함한다.

[0105] 더 바람직하게, 키메라 단백질에서 PSGL-1 단편은 모든 측면 아미노산 성숙한 PSGL-1의 최대 적어도 aa 1-47을 포함한다. 더욱더 바람직하게, 키메라 단백질은 SEQ ID NO:12(신경 망막-특이적 로이신 지퍼)의 적어도 aa 187-208 또는 상기 187-208 영역과 적어도 90% 상동성이거나 동일한 아미노산 서열 및 일반식에 의해 상기 정의된 공유 다이머화 도메인을 더 포함한다. 키메라 단백질의 일반적인 구체예는 SEQ ID NO:39를 가진다.

[0106] 그러나, 마지막 단계로서 HA를 포함하는 본 발명의 정제 과정은 PSGL-1의 적어도 aa 5-16 또는 1-47을 포함하는 성숙한 PSGL-1의 N-말단 영역을 N-말단에 지닌 임의의 키메라 또는 재조합 단백질에 성공적으로 적용될 수 있다.

[0107] 마지막 정제 단계로서 HA를 포함하는 과정은 상업용 DNA 정량 분석, 예컨대 DNA 정량 키트, 형광 분석(Sigma)에 의해 측정되었을 때, 오염 DNA가 실질적으로 없는 다른 단백질들로부터 95% 초과, 바람직하게 96%, 97%, 98% 또는 99%의 PSGL-1의 순도를 달성할 수 있다.

[0108] 최종 수율에 대해, 표적 단백질은 전체 키메라 표적 단백질 함량의 50%를 넘는 수율, 전형적으로 60%를 넘는 수율 및 일반적으로 약 또는 70%를 넘는 수율로 상기 설명된 과정에 의해 회수된다. 이들 수율은 상업적 과정에서 가장 중요한 우수한 결과를 제시하며, 이들은 잘 표준화되어 있고 매우 낮은 변동으로 재현가능하다.

[0109] 이들 특징을 가진 표준 상업용 수지 또는 칼럼이 제조자의 지시에 따라서 사용될 수 있다. 세라믹 HA는 BIORAD로부터 상업적으로 이용가능하다. 정제 및 용리 조건은 당업자에게 알려진 대로 조정될 수 있다.

[0110] 스케일업의 용이성을 위해, 구배 용리가 독립 단계 용리로 유익하게 치환될 수 있으며, 이로써 과정 내 분석의 수를 제한하고 전체 과정 시간을 줄일 수 있다. 아래 설명된 변이체 1 및 1A의 바람직한 구체예에서, 정제된 단백질(순도 = 90%)이 특성화되었으며 다음과 같다:

[0111] - 리더 펩타이드의 정확한 제거가 확인되었다;

[0112] - PSGL 변이체 1A 당단백질의 N-말단 구조는 주로 pQATEYEYL의 피로글루탐산 형태이다. 실제로, Asp N 분해 효소의 사용은 N-말단 Gln 고리화의 검출을 허용했으며, 이 과정에 의해 N-말단에 존재하는 Gln 잔기는 자발적 고리화를 겪음으로써 피로글루탐산을 형성하는 경향이 있다;

[0113] - PSGL 변이체 1A의 다이머 성격이 환원 및 비-환원 조건에서의 겔 전기영동과 효소 분해에 이어진 LC-MS를 이용한 단편 특성화에 의해 확인되었다. 실험 데이터는 PSGL 변이체 1A가 완전히 그것의 다이머 형태로 있을 수 있다는 것을 나타낸다;

[0114] - Thr16 상에 O-글리칸 부분의 존재가 확인되었고 그것의 구조가 식별되었다. 예상된 시알릴-루이스-X 모티프, N-아세틸글루코사민, N-아세틸글루코사민, 갈락토오스, 푸코오스 및 시알산을 포함하는 코어 2 구조가 입증되었으며, 실험 부분에서 더 상세히 설명된다;

[0115] - L- 및 P-셀렉틴에 대한 결합에 중요한 성숙한 단백질의 잔기 Y5, Y7 및 Y10의 황산화가 또한 확인되었다. 당단백질 황산화의 모니터링은 질량분광법에 의해 수행되었다. 당업자에게 알려진 대로, 본 발명의 표적 키메라 단백질에서 증명된, 티로신 5, 7 및 10의 황산화는 PSGL-1 및 변이체 1A 생물활성에 극히 중요하다.

[0116] 추가의 단백질 특성화 데이터가 본 출원에서 보고되었으며 실험 부분에서 더 상세히 설명된다.

[0117] 따라서, 주 양태에 따라서, 본 발명은 P, L 및 E 셀렉틴, 바람직하게 P 셀렉틴에 결합할 수 있는, 상기 정의된 바와 같은, 분리되고 정제된 PSGL-1 키메라 단백질을 말한다.

[0118] 분리된 재조합 단백질은 호모다이머이고, 여기서 각 호모다이머는 다음의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 바람직하게는 그것으로 구성되는 주 서열을, 더 바람직하게는 이 순서로 가진다:

[0119] - N-말단에 성숙한 PSGL-1 단백질(SEQ ID NO:11)의 아미노산 1-47;

[0120] - 적어도 상기 정의된 바와 같은, 식: $(X_1)n-C(X_2)m-(X_3)$을 가진 이황화물 브릿지에 적합한 시스테인을 포함하거나 또는 그것으로 구성되는 아미노산 서열, 더 바람직하게는 SEQ ID NO:20;

[0121] - NRL(SEQ ID NO:12)의 적어도 aa 181-215;

[0122] - 선택적으로, 최대 15 aa 길이의 아미노산 스페이서, 이것은 적어도 하나 이상의 Gly 및/또는 Ala 및 바람직하게 Lys 또는 Cys와 같은 아미노산을 C-말단에, 또는 더 바람직하게 끝에서 두 번째 위치에 지닌다. 더 바람직하게, 이러한 스페이서는 바람직하게 적어도 알라닌을 포함하고 매립하고 있고, 더 바람직하게는 추가의 화학 콘쥬게이션을 위해 끝에서 두 번째 위치에 리신을 더 포함하는 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 글리신으로 이루어진 폴리글리신이다. 더욱더 바람직하게, 아미노산 스페이서는 SEQ ID NO:17이다. 따라서, 특히 바람직한 구체예에서, 키메라 단백질은 서열 SEQ ID NO:37을 가지며, 여기에는 성숙한 단백질에서 절단되는, 신호 펩타이드가 여전히 표시된다. 번역 후 변형된, 키메라 표적 단백질 모노머는 바람직한 구체예로서 SEQ ID NO:38에 표시

된다.

[0123] 바람직하게 맨 끝 또는 끝에서 두 번째 위치(즉, Lys 또는 Cys)에 바람직하게 키메라 단백질을 콘쥬게이팅하기 위한 잔기(들)를 포함하는, 아래 특성에 필수적인 모티프 또는 영역을 가진 키메라 변이체 단백질의 일반식은 SEQ ID NO:39에 또한 보고되었다.

[0124] 분리되고 정제된 PSGL-1 키메라 단백질의 순도는 UPLC-UV 또는 표면 슬라스몬 공명에 의해, 즉 실험 부분에 더 상세히 설명된 Biacore 장치에서 결정될 수 있다.

[0125] 또한, 본 발명은 바람직하게 상기 정의된 키메라 단백질의 SEQ ID NO:2의 아미노산 1-118을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 모노머 형태의 상기 단백질을 암호화하는 임의의 DNA 서열을 말한다. 특히 바람직한 구체예에 따라서, 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO:36의 nt 1-354를 포함하고, 바람직하게는 뉴클레오타이드 1-360으로 구성된다.

[0126] 또는 달리, 본 발명의 키메라 단백질을 암호화하는 DNA 서열은 적어도 PSGL-1의 P-셀렉틴 결합 도메인, 바람직하게는 SEQ ID NO:11의 aa 1-47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 선택적으로 N- 또는 C-말단에 1, 2, 3, 4, 5, 6개의 측면 아미노산을 포함하는, 신경 망막-특이적 로이신 지퍼 도메인(SEQ ID NO:12)의 적어도 aa 187-208을 암호화하거나, 또는 더 바람직하게는 NRL(SEQ ID NO:12)의 적어도 aa 181-215를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0127] 유전자 코드의 과잉은 단일 아미노산에 사용될 수 있는 상이한 코돈을 허용하며, 따라서 상이한 코돈 조합, 즉 상이한 DNA 서열이 동일한 주 아미노산 서열을 가진 단백질을 발현하고 동일한 재조합 단백질을 생성할 수 있다. 따라서, 각 유기체에 대해 우선적인 코돈을 사용함으로써 선택된 재조합 시스템에서 발현을 최적화하도록 설계될 수 있는, 이러한 상이한 DNA 서열이 본 발명의 범위 내에 모두 포함된다.

[0128] 특히 바람직한 재조합 키메라 단백질은 SEQ ID NO:1의 nt 1-354에 의해 암호화된, SEQ ID NO:2의 aa 1-118을 포함한다. SEQ ID NO:2의 아미노산 1-118은 선택적으로 적어도 표지화 부분이나 치료 부분의 반응성 기와의 화학 콘쥬게이션에 적합한 아미노산을 C-말단에 더 포함하며, 여기서 상기 아미노산은 리신 또는 시스테인이다. 더 바람직하게, 이러한 반응성 아미노산 뒤에는 적어도 다른 비-하전된 아미노산, 바람직하게는 글리신이 존재한다. 더욱더 바람직하게, 콘쥬게이션에 적합한 아미노산은 최대 15 aa의 아미노산 서열의 C-말단에 위치되며, 적어도 하나의 중성 또는 비-하전된 아미노산, 예컨대 글리신이 뒤따라 있다.

[0129] 더 나아가, 본 발명은 상기 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터 및 게놈에 일시적으로 또는 안정적으로 통합된 재조합 서열을 지닌 형질주입된 셀라인을 포함한다. 바람직한 세포 클론은 상업적으로 이용가능한, 즉 Lifescience(ThermoFisher Scientific)에 의한 Freedom™ CHO-S™ 키트에서 이용가능한, CHO 세포, 더 바람직하게 부유배양-성장 적응된 CHO 세포에서 얻어진 것들과 같은 벡터의 안정적으로 통합된 DNA 카피를 포유류 세포 발현에 표준 사용되는 발현 벡터와 함께 지닌 것들이다.

[0130] 부유배양-적응된 CHO 세포는 약 2.10^7 세포/L의 밀도로 증폭되고 성장될 수 있으며, 이로써 재조합 단백질의 고효율 분비를 달성할 수 있다.

[0131] 다른 양태에 따라서, 본 발명은 상기 정의된 재조합 키메라 단백질을 제조하기 위한 과정을 포함하며, 이것은 진핵생물 세포를 그것을 암호화하는 DNA 서열이나 그것을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 벡터로 형질전환함으로써 키메라 단백질을 안정적으로 발현하는 재조합 진핵생물 시스템, 바람직하게는 CHO 세포 시스템을 달성하고, 여기서 상기 키메라 단백질은 바람직하게 배지에 분비되는 단계, 배양 배지를 수거하는 단계 및 정제에 의해 상기 배양 배지로부터 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다.

[0132] 다음에, 정제된 재조합 키메라 단백질은 진단 및/또는 치료 부분에 C-말단 잔기를 통해서 성공적으로 콘쥬게이션될 수 있거나, 또는 제약학적 조성물에서 적합한 성분 또는 부형제와 조합하여 그대로 사용될 수 있다.

[0133] *진단 및 치료 용도를 위한 키메라 단백질의 콘쥬게이트*

[0134] 본 발명의 키메라 단백질은 거기에 결합된 진단 및 치료 활성 부분을 셀렉틴-발현 조직, 세포 또는 기관에 표적화하기 위해 사용된다. PSGL-1 영역 또는 그것의 단편에 의해 제공되는 키메라 단백질의 특이성은 적절히 번역 후 변형된 셀렉틴을 표적화한다(Liu et al. J. Biol. Chem., 1998, 273:7078-7087). 이 발현 시스템에서 표적에 대한 결합 강도는 매우 특이한 2차 구조에 의해 부여되는 로이신 지퍼와 같은 비-공유 다이머화 도메인의 존재에 의해 변경되지 않는다.

[0135] 따라서, 주요 구체예 중 하나에 따라서, 본 발명은 셀렉틴 발현 세포, 조직, 기관 등에 대한 영상화 부분의 표적화제로서 키메라 단백질을 포함하는 콘쥬게이트에 관한 것이다.

[0136] "영상화 부분"이란 진단 영상화 과정에 의해 검출될 수 있는 임의의 부분, 즉 초음파(US), 컴퓨터 단층촬영(CT), 자기공명 영상화(MRI), 양전자 방출 단층촬영(PET), 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT), 엑스선 영상화, 광음향 영상화, 형광 및 광학 영상화를 포함하는, 현재 사용중인 영상 진단 기술에 의해 검출된 신호를 제공하거나 개선하거나 또는 임의의 방식으로 유익하게 변형할 수 있는 임의의 진단적으로 유효한 부분을 말하며, 본 발명에서는 수술중 영상화, 즉 진단적으로 유용한, 바람직하게는 대비되는 영상의 등록을 가능하게 하는 임의의 기술을 포함한다. 또한, 하이브리드 영상화 방법이 본 발명에서 고려되며, 이 경우 키메라 단백질은 상이한 영상화 방법으로 검출가능한 적어도 2개의 부분에 연결된다. 하이브리드 영상화의 예는 PET/CT, SPECT/CT, MR/PET, MR/SPECT; 초음파 및 MR, 초음파 및 CT; MR 및 CT이다.

[0137] 영상화 부분은 이중 검출, 예를 들어 MRI/PET를 위한 영상화 부분의 임의의 가능한 조합을 포함할 수 있으며, 그것은 상자성 금속 킬레이트화 유닛 및 방사성핵종 킬레이트화 유닛을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 진단적으로 유효한 부분의 예들은, 예를 들어 킬레이트화된 감마선 또는 양전자 방출 방사성핵종; 킬레이트화 또는 폴리킬레이트화된 복합체 형태의 상자성 금속 이온, 20을 초과하는 원자 번호를 가진 원자를 포함하는 엑스선 흡수제; 염료 분자; 형광 분자; 인광 분자; UV 스펙트럼에서 흡수하는 분자; 퀀텀 도트; 근적외선 또는 원적외선 내에서 흡수할 수 있는 분자 및 일반적으로 검출가능한 신호를 발생시키거나 또는 검출 시스템과 특이적으로 상호작용하는 모든 부분을 포함한다.

[0138] 상기 모두로부터 사용될 수 있는 영상화 양식은 본 발명의 진단 화합물이 결합된 영상 검출가능한 부분에 따라서 선택되어야 한다는 것을 당업자는 알게 된다. 이로써, 예를 들어 키메라 단백질에 연결된 CyC5와 같은 형광 영상화 부분의 경우, 형광 광 검출 시스템이 적절할 것이다.

[0139] 아래 표는 일부 예시적인 대비생성제 및 바람직한 영상화 양식을 제공한다.

표 2

[0140] 예시적인 대비생성제 및 바람직한 영상화 양식

양식	대비생성제
초음파	미세기포, 음향 활성 리포솜
CT/엑스선	금 나노입자, 요오드화 나노입자
MRI	과분극화 네온/제논/헬륨, 가돌리늄, 산화철
PET	^{18}F, ^{11}C
SPECT	^{99m}Tc, ^{123}I, ^{111}In
광학 영상화	메틸렌-블루, 형광 염료, 예컨대 시아닌-염료(Cy7, CyC5, 인도시아닌 그린) NIR 염료, IRDye800®CW, GFP, AlexaFluor® 염료, 미세기포, 나노입자, 예컨대 형광 염료DiR, NIR 염료, IRDye800®CW, GFP, AlexaFluor® 염료를 포함하는 리포솜
광음향 영상화	탄소 단일-벽 나노튜브(SWINT), 인도시아닌 그린, 금 나노입자, 아연 프탈로시아닌

[0141] *분자 표적화를 위한 진단 및 치료 부분에 키메라 단백질의 콘쥬게이션*

[0142] 본 발명의 키메라 단백질의 콘쥬게이트의 제조는 일반적으로 화학적 수단에 의해 수행된다. 콘쥬게이션 파트너, 즉 키메라 단백질의 반응성 기와 그것에 콘쥬게이트될 수 있는 기(들)가 "보호된" 형태로 존재하거나 제조된다. 본 설명에서, 달리 나타내지 않는다면, 용어 "보호기"는 그것이 결합되는 작용기의 특징적인 화학적 작용을 보존하도록 적합하게 된 보호기를 지정한다. 구체적으로, 본 맥락에서, 보호기는 아미노 또는 카복시 작용을 보존하기 위해 사용된다. 따라서, 적절한 보호기는, 예를 들어 Fmoc, 벤질, 벤질옥시카보닐 또는 알킬 에스테르 또는 이러한 작용의 보호를 통상 의도하며 당업자에게 알려진 다른 기들을 포함할 수 있다.

[0143] 이러한 기를 화학 반응을 통해서 셀렉틴을 향한 상응하는 폴리펩타이드/단백질의 특이성을 유지한 적합한 유도체로 변형하는 본 발명의 키메라 단백질과 같은, 폴리펩타이드 유닛의 N-말단($-NH_2$) 또는 C-말단(-COOH) 기와 화학적으로 반응할 수 있지만, 상이한 부분 상의 카복실 또는 아미노 작용성과는 각각 화학적으로 반응할 수 없는, 다른 화학 기들은 "불활성화 기"라고 불린다. 불활성화 기는 카복사미도 가교 반응에 수반되지 않아야 한

다. 한 가지 예는, 그것을 상응하는 비반응성 아세틸화 AcHN 기로 전환함으로써 펩타이드 사슬의 아미노 말단을 불활성화하는데 사용된, 아세틸 기[또한 $CH_3(CO)$- 또는 심지어 Ac라고도 한다]이다. 한편, 아미노 기 자체 또는 그것의 유도체, 예컨대 예를 들어 $-NH_2$, $-NH(CH_3)$ 또는 $H_2NOC-CH_2-NH-$는, 각각 상응하는 $-CONH_2$, $-CONH(CH_3)$ 또는 $-CONH-CH_2-CONH_2$ 비반응성 아미드를 제공함으로써, 자유 카복실 기에 대한 "불활성화 기"로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 키메라 단백질이 반응성 아미노 기(예를 들어 리신의 일차 아미노 기)를 포함한다면, 그것은 적합한 상응하는 반응성 부분, 예컨대 이소티오시아네이트 기(티오유레아 결합 형성), 반응성 에스테르(아미드 결합 형성), 카보닐 기(이민 결합 형성, 이것은 아민 결합으로 환원될 수 있다), 활성화된 하이드록실 기, 예를 들어 토실레이트, 트레실레이트 또는 시아네이트 형태, 비닐 설폰 또는 에폭사이드를 함유하는 미세소포의 성분과 같은 진단 부분과 반응될 수 있다.

[0144] 또는 달리, 본 발명의 표적화 리간드가 반응성 티올 기를 포함할 때, 진단 또는 치료 부분, 즉 미세소포의 성분 상의 적합한 상보성 반응성 부분은 할로아세틸 유도체, 말레이미드(티오에테르 결합 형성) 또는 2-피리딜티오(PDT) 기 형태의 설파이드를 포함하는 혼합된 다이설파이드(이것은 표적화 리간드로부터 유래된 티올과 반응시 안정한 다이설파이드 결합의 형성을 가져온다), 활성화된 하이드록실 기, 예를 들어 토실레이트, 트레실레이트 또는 시아네이트의 형태, 비닐 설폰 또는 에폭사이드를 포함할 수 있다.

[0145] 또는 달리, 본 발명의 구체예에 따라서, 아미노 반응성 부분(예를 들어, 일차 아미노 기, 특히 말단 $-NH_2$ 기)을 함유하는 표적화 리간드가 황-함유 화합물과 먼저 반응될 수 있고, 이로써 표적화 리간드에 반응성 티올 부분을 도입할 수 있으며, 이것은 이어서 진단 성분, 즉 상기 예시된 미세소포의 성분 상의 상응하는 상보성 부분과 반응될 수 있다. 반응성 아미노 부분을 함유하는 표적화 리간드에 반응성 티올 부분을 도입하는데 유용한 적합한 황-함유 화합물의 예들은, 예를 들어 티오이미데이트(예컨대 Traut's시약) N-석신이미딜-S-아세틸티오아세테이트(SATA), N-석신이미딜-S-아세틸티오프로피오네이트(SATP) 또는 N-석신이미딜 3-(2-피리딜다이티오)프로피오네이트(SPDP)를 포함한다.

[0146] S-함유 제제 및 각각의 티올화 반응에 대한 상세한 설명은, 예를 들어 Greg T. Hermanson: "Bioconjugate Techniques", Elsevier ed., 2nd ed.(Apr. 2008), chapter 1, section 4-1에서 찾을 수 있다. 예를 들어, 말레이미드-유도체화된 인지질(예를 들어 포스파티딜에탄올아민 - PE - 또는 페그화 PE)를 제조할 수 있고, 그것을 일차 아미노 기(예를 들어 리신 측쇄의 $-NH_2$)가 황-함유 화합물(예컨대 앞서 예시된 것들)과 이미 반응된 표적화 리간드(예를 들어 SEQ ID NO:3)와 반응시킬 수 있으며, 이로써 반응성 티올 부분을 도입할 수 있다; 다음에, 얻어진 화합물은 표적화된 기체-충전된 미세소포의 제조에 사용될 수 있다.

[0147] 추가의 대안에 따라서, 표적화 리간드가 반응성 카복실 기를 포함할 때, 진단 또는 치료 기, 즉 미세소포의 성분 상의 적합한 반응성 부분은 아민 및 하이드라지드(아미드 또는 N-아실 형성, N'-알킬하이드라지드 작용)일 수 있다.

[0148] 상기 바람직한 구체예에 따라서, 아미노 반응성 부분(예를 들어, 리신 잔기 상에)을 함유하는 표적화 리간드는 말레이미드-함유 화합물과 먼저 반응될 수 있고, 이로써 표적화 리간드에 반응성 말레이미드 부분을 도입할 수 있으며, 이것은 이어서 미세소포의 성분 상의 상응하는 상보성 부분과 반응된다. 반응성 아미노 부분을 함유하는 표적화 리간드에 반응성 말레이미드 부분을 도입하는데 유용한 말레이미드-함유 제제 및 말레이미드 기의 첨가의 각각의 반으은 본 분야에 잘 알려져 있다. 적합한 말레이미드-함유 화합물의 예들은, 예를 들어 AMAS(N-(α-말레이미도아세톡시)석신이미드 에스테르), BMPS(N-(b-말레이미도프로폭실)석신이미드 에스테르), EMCS(N-(ε-말레이미도카프로일옥시)석신이미드 에스테르), GMBS(N-(g-말레이미도부티릴옥시)석신이미드 에스테르), LC-SMCC(석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복시-(6-아미노카프로에이트)), MBS(m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석시미드에스테르), SMCC(석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트), SMPB(석신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트), SM(PEG)n 시약 (석신이미딜-(N-말레이미도프로피온아미도)-에틸렌글리콜)에스테르), SMPH(석신이미딜-6-((b-말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트)), 설포-EMCS(N-(ε-말레이미도카프로일옥시)설포석신이미드 에스테르), 설포-GMBS(N-(g-말레이미도부티로일옥시)설포석신이미드 에스테르), 설포-KMUS(N-(κ-말레이미도운데칸오일옥시)-설포석신이미드 에스테르), 설포-MBS(m-말레이미도벤조일-N-하이드록시설포-석신이미드 에스테르), 설포-SMCC(설포석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트), 설포-SMPB(설포석신이미딜 4-(p-말레이미도페닐(부티레이트))를 포함한다.

[0149] 다른 유사한 시약은 말레이미드와 상이한 설프하이드릴 반응성 기를 함유할 수 있으며, 예를 들어 LC-SPDP(석신이미딜 6-[3-2-피리딜다이티오)프로피온아미드]헥사노에이트, NHS-브로모아세테이트(N-하이드록시석신이미딜 브

로모아세테이트), NHS-아이오도아세테이트(N-하이드록시석신이미딜 아이오도아세테이트), SPDP(N-석신이미딜-3-(2-피리딜다이티오)프로피오네이트), 설포-LC-SPDP(설포석신이미딜-6-[3-(2-피리딜다이티오)프로피온아미도]헥사노에이트)이다.

[0150] 초음파 진단 영상화를 위한 미세소포 구체예에 따라서, 티올-함유 인지질(예를 들어 티올화 포스파티딜에탄올아민 - PE - 또는 페그화 PE)과 일차 아미노 기(예를 들어, 리신 측쇄의 NH_2)가 티올 반응성 화합물(예를 들어 앞서 예시된 것들과 같은 말레이미드)와 이미 반응된 표적화 리간드를 반응시킬 수 있고, 이로써 티올 반응성 부분을 거기에 도입할 수 있다; 다음에, 얻어진 화합물은 미세소포 또는 다른 진단 또는 치료 콘쥬게이트의 제조에 사용될 수 있다.

[0151] 본 발명의 키메라 단백질에서, 콘쥬게이트는 바람직하게 키메라 단백질의 C-말단에서 제조되며, 셀렉틴 표적과의 결합에 이용가능한 N-말단은 남는다.

[0152] *초음파를 위한 진단적으로 유효한 부분*

[0153] *미세소포*

[0154] 특히 초음파 대비 영상화에 유용한 조영제의 부류는 수성 배지에 분산된 나노- 및/또는 마이크로 크기의 기체 거품의 현탁액을 포함한다. 특히 관심 있는 것은, 예를 들어 유화제, 오일, 증점제 또는 당을 사용함으로써, 또는 다양한 시스템에 기체 또는 그것의 전구체를 포착하거나 캡슐화함으로써 기체 거품이 안정화된 제제이다. 이들 안정화된 기체 거품은 일반적으로 본 분야에서 전형적으로 이들의 제조에 이용된 안정화 물질에 따라 다양한 기술과 함께 언급된다; 이들 용어는, 예를 들어 "마이크로스피어", "미세기포", "마이크로캡슐" 또는 "마이크로벌룬"을 포함한다. 여기 사용된 용어 "기체-충전된 미세소포" 또는 간단히 "미세소포"는 상기 용어 중 어느 것을 포함한다.

[0155] *기체-충전된 미세소포*

[0156] 본 발명의 바람직한 구체예에 따라서, 셀렉틴 표적화 리간드로서, 본 발명의 키메라 단백질에 공유 회합된 지질 또는 인지질을 가지고 기체-충전된 미세소포, 바람직하게는 미세기포가 제조된다. 미세기포란 수성 담체 중에 현탁된 기체의 거품을 말하며, 이것은 기체-액체 계면에서 안정화한 양친매성 물질의 얇은 피막(필름)을 지닌다. 기체 미세기포의 수성 현탁액의 예들은, 예를 들어 US 5,271,928, US 5,445,813, US 5,413,774, US 5,556,610, 5,597,549, US 5,827,504 및 WO 04/069284에 개시된다. 또한, 이 용어는, 바람직하게 인지질 분산물을 포함하는, 동결-건조 또는 분무-건조된 성분의 형태인 미세기포의 전구체를 포함한다. 상기 정의에 따른 미세기포의 변형에서, 용어 "마이크로벌룬" 또는 "마이크로캡슐"은 기체의 거품이 지질 또는 천연 또는 합성 중합체의 고체 물질 피막에 의해 둘러싸인 현탁액을 포함한다. 마이크로벌룬 및 그것의 제조에 대한 예들은, 예를 들어 US 5,711,933 및 US 6,333,021에 개시된다.

[0157] 미세기포의 안정화한 피막을 형성하기에 적합한 성분은, 예를 들어 인지질; 리포인지질; 지방산, 예컨대 팔미트산, 스테아르산, 아라키돈산 또는 올레산; 지질 보유 중합체, 예컨대 키틴, 히알루론산, 폴리비닐피롤리돈 또는 "페그화 지질"이라고도 하는 폴리에틸렌 글리콜(PEG); 지질 보유 설폰화 단당류, 이당류, 올리고당류 또는 다당류; 콜레스테롤, 콜레스테롤 설페이트 또는 콜레스테롤 헤미석시네이트; 토코페롤 헤미석시네이트; 에테르 또는 에스테르-결합된 지방산; 중합된 지질; 다이아세틸 포스페이트; 다이세틸 포스페이트; 세라마이드; 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르(예컨대 폴리옥시에틸렌 지방산 스테아레이트), 폴리옥시에틸렌 지방 알코올, 폴리옥시에틸렌 지방 알코올 에테르, 폴리옥시에틸화 소르비탄 지방산 에스테르, 글리세롤 폴리에틸렌 글리콜 리신올레에이트, 에톡시화 대두 스테롤, 에톡시화 피마자유 또는 에틸렌 옥사이드(EO) 및 프로필렌 옥사이드(PO) 블록 공중합체; 콜레스테롤 부티레이트, 콜레스테롤 이소부티레이트, 콜레스테롤 팔미테이트, 콜레스테롤 스테아레이트, 라노스테롤 아세테이트, 에르고스테롤 팔미테이트 또는 피토스테롤 n-부티레이트를 포함하는 스테롤 지방족 산 에스테르; 콜레스테롤 글루쿠로나이드, 라노스테롤 글루쿠로나이드, 7-데하이드로콜레스테롤 글루쿠로나이드, 에르고스테롤 글루쿠로나이드, 콜레스테롤 글루코네이트, 라노스테롤 글루코네이트, 또는 에르고스테롤 글루코네이트를 포함하는 당 산의 스테롤 에스테르; 라우릴 글루쿠로나이드, 스테아로일 글루쿠로나이드, 미리스토일 글루쿠로나이드, 라우릴 글루코네이트, 미리스토일 글루코네이트, 또는 스테아로일 글루코네이트를 포함하는 당 산 및 알코올의 에스테르; 수크로오스라우레이트, 프럭토오스 라우레이트, 수크로오스팔미테이트, 수크로오스스테아레이트, 글루쿠론산, 글루콘산 또는 폴리우론산을 포함하는 지방족 산을 가진 당의 에스테르; 사르사사포게닌, 스밀라게닌, 헤데라게닌, 올레아놀산, 또는 다이기톡시게닌을 포함하는 사포닌류; 글리세롤 트라이팔미테이트, 글리세롤 다이스테아레이트, 글리세롤 트라이스테아레이트, 글리세롤 다이미리

스테이트, 글리세롤 트라이미리스테이트, 글리세롤 다이라우레이트, 글리세롤 트라이라우레이트, 글리세롤 다이팔미테이트를 포함하는 글리세롤 또는 글리세롤 에스테르; n-데실 알코올, 라우릴 알코올, 미리스틸 알코올, 세틸 알코올, 또는 n-옥타데실 알코올을 포함하는 장쇄 알코올; 6-(5-콜레스텐-3β-일옥시)-1-티오-β-D-갈락토피라노사이드; 다이갈락토실-다이글리세라이드; 6-(5-콜레스텐-3β-일옥시)헥실-6-아미노-6-데옥시-1-티오-β-D-갈락토피라노사이드; 6-(5-콜레스텐-3β-일옥시)헥실-6-아미노-6-데옥실-1-티오-β-D-만노피라노사이드; 12-(((7'-다이에틸아미노-쿠마린-3-일)카보닐)-메틸-아미노)옥타데칸산; N-[12-(((7'-다이에틸아미노-쿠마린-3-일)카보닐)-메틸-아미노)-옥타데칸오일]-2-아미노팔미트산; N-석신일-다이올레일포스파티딜-에탄올-아민; 1,2-다이올레일-*sn*-글리세롤; 1,2-다이팔미토일-*sn*-3-석신일글리세롤; 1,3-다이팔미토일-2-석신일-글리세롤; 1-헥사데실-2-팔미토일글리세로-포스포에탄올아민 또는 팔미토일-호모시스테인; 적어도 하나(C_{10}-C_{20}), 바람직하게는 (C_{14}-C_{18}) 알킬 사슬을 포함하는 알킬아민 또는 알킬암모늄 염, 예컨대 예를 들어 N-스테아릴아민, N,N'-다이스테아릴아민, N-헥사데실아민, N,N'-다이헥사데실아민, N-스테아릴암모늄 클로라이드, N,N'-다이스테아릴암모늄 클로라이드, N-헥사데실암모늄 클로라이드, N,N'-다이헥사데실암모늄 클로라이드, 다이메틸다이옥타데실암모늄 브로마이드(DDAB), 헥사데실트라이메틸암모늄 브로마이드(CTAB); (C_3-C_6) 알킬렌 브릿지를 통해서 N-원자에 연결된 하나 또는 바람직하게 둘(C_{10}-C_{20}), 바람직하게 (C_{14}-C_{18}) 아실 사슬을 포함하는 3차 또는 4차 암모늄 염, 예컨대 예를 들어 1,2-다이스테아로일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DSTAP), 1,2-다이팔미토일-3-트라이메틸암모늄프로판(DPTAP), 1,2-올레오일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DOTAP), 1,2-다이스테아로일-3-다이메틸암모늄-프로판(DSDAP); 및 이들의 혼합물 또는 조합을 포함한다.

[0158] 성분들의 조합 및 미세기포의 제조 과정에 따라, 상기 열거된 예시적인 화합물들이 미세기포 피막을 형성하기 위한 메인 화합물로서 또는 소량으로만 존재하는 단순한 첨가제로서 이용될 수 있다.

[0159] 바람직한 구체예에 따라서, 미세기포 피막을 형성하기 위한 화합물들 중 적어도 하나는, 선택적으로 나머지 상기 인용된 물질들 중 어느 것과의 혼합물로서, 양친매성 화합물(즉, 친수성 및 친지질성 부분 모두를 포함하는 유기 분자), 바람직하게 인지질이다. 본 설명에 따라서, 용어 인지질은 임의의 양친매성 인지질 화합물을 포함하는 것으로 의도되며, 이들의 분자는 최종 미세기포 현탁액에서 기체-물 경계 계면에서 물질의 안정화한 필름(전형적으로 일분자층의 형태로)을 형성할 수 있다. 따라서, 이들 물질은 또한 본 분야에서 "필름-형성 인지질"이라고도 언급된다.

[0160] 양친매성 인지질 화합물은 전형적으로 적어도 하나의 포스페이트 기 및 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 친지질성 장쇄 탄화수소 기를 함유한다.

[0161] 적합한 인지질의 예들은 하나 또는 바람직하게 2개(동일하거나 상이한)의 지방산 잔기 및 인산을 가진 글리세롤의 에스테르를 포함하며, 여기서 인산 잔기는 차례로 친수성 기, 예컨대 예를 들어 콜린(포스파티딜콜린 - PC), 세린(포스파티딜세린 - PS), 글리세롤(포스파티딜-글리세롤 - PG), 에탄올아민(포스파티딜에탄올아민 - PE), 이노시톨(포스파티딜이노시톨 - PI)에 결합된다. 단지 하나의 지방산 잔기를 가진 인지질의 에스테르는 일반적으로 본 분야에서 인지질의 "리소" 형태 또는 "리소인지질"이라고 언급된다. 인지질에 존재하는 지방산 잔기는 일반적으로 장쇄 지방족 산이며, 전형적으로 12 내지 24 탄소 원자, 바람직하게 14 내지 22 탄소 원자를 함유한다; 지방족 사슬은 하나 이상의 불포화 부분을 함유할 수 있으며, 바람직하게는 완전히 포화된다. 인지질에 포함되는 적합한 지방산의 예들은, 예를 들어 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산, 올레산, 리놀레산, 및 리놀렌산이다. 바람직하게, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산 및 아라키드산과 같은 포화 지방산이 이용된다.

[0162] 인지질의 추가의 예들은 포스파티드산, 즉 지방산을 가진 글리세롤-인산의 다이에스테르; 스핑고미엘린과 같은 스핑고리피드, 즉 지방산을 가진 글리세롤 다이에스테르의 잔기가 세라마이드 사슬로 치환된 포스파티딜콜린 유사체; 카디오리핀, 즉 지방산을 가진 1,3-다이포스파티딜글리세롤의 에스테르; 강글리오사이드 GM1(또는 GM2) 또는 세레브로사이드와 같은 글리코리피드; 글루코리피드; 설페타이드 및 글리코스핑고리피드이다.

[0163] 여기 사용된 용어 인지질은 단수로서 또는 혼합물로서 이용될 수 있는 자연 발생, 반합성 또는 합성 제조된 생성물을 포함한다.

[0164] 자연 발생 인지질의 예들은 천연 레시틴(포스파티딜콜린(PC) 유도체), 예컨대 전형적으로 대두 또는 난황 레시틴이다.

[0165] 반합성 인지질의 예들은 자연 발생 레시틴의 부분적으로 또는 완전히 수소화된 유도체이다. 바람직한 인지질은

포스파티딜콜린, 에틸포스파티딜콜린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티드산, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨 또는 스핑고미엘린의 지방산 다이에스테르이다.

[0166] 바람직한 인지질의 예들은, 예를 들어 다이라우로일-포스파티딜콜린(DLPC), 다이미리스토일-포스파티딜콜린(DMPC), 다이팔미토일-포스파티딜콜린(DPPC), 다이아라키도일-포스파티딜콜린(DAPC), 다이스테아로일-포스파티딜콜린(DSPC), 다이올레오일-포스파티딜콜린(DOPC), 1,2 다이스테아로일-*sn*-글리세로-3-에틸포스포콜린(에틸-DSPC), 다이펜타데칸오일-포스파티딜콜린(DPDPC), 1-미리스토일-2-팔미토일-포스파티딜콜린(MPPC), 1-팔미토일-2-미리스토일-포스파티딜콜린(PMPC), 1-팔미토일-2-스테아로일-포스파티딜콜린(PSPC), 1-스테아로일-2-팔미토일-포스파티딜콜린(SPPC), 1-팔미토일-2-올레일포스파티딜콜린(POPC), 1-올레일-2-팔미토일-포스파티딜콜린(OPPC), 다이라우로일-포스파티딜글리세롤(DLPG) 및 그것의 알칼리 금속염, 다이아라키도일포스파티딜-글리세롤(DAPG) 및 그것의 알칼리 금속염, 다이미리스토일포스파티딜글리세롤(DMPG) 및 그것의 알칼리 금속염, 다이팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG) 및 그것의 알칼리 금속염, 다이스테아로일포스파티딜글리세롤(DSPG) 및 그것의 알칼리 금속염, 다이올레오일-포스파티딜글리세롤(DOPG) 및 그것의 알칼리 금속염, 다이미리스토일 포스파티드산(DMPA) 및 그것의 알칼리 금속염, 다이팔미토일 포스파티드산(DPPA) 및 그것의 알칼리 금속염, 다이스테아로일 포스파티드산(DSPA), 다이아라키도일포스파티드산(DAPA) 및 그것의 알칼리 금속염, 다이미리스토일-포스파티딜에탄올아민(DMPE), 다이팔미토일포스파티딜에탄올아민(DPPE), 다이스테아로일 포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 다이올레일포스파티딜-에탄올아민(DOPE), 다이아라키도일-포스파티딜-에탄올아민(DAPE), 다이리놀레일포스파티딜-에탄올아민(DLPE), 다이미리스토일 포스파티딜세린(DMPS), 다이아라키도일 포스파티딜세린(DAPS), 다이팔미토일 포스파티딜세린(DPPS), 다이스테아로일포스파티딜세린(DSPS), 다이올레오일포스파티딜세린(DOPS), 다이팔미토일 스핑고미엘린(DPSP), 및 다이스테아로일스핑고미엘린(DSSP), 다이라우로일-포스파티딜이노시톨(DLPI), 다이아라키도일포스파티딜이노시톨(DAPI), 다이미리스토일포스파티딜이노시톨(DMPI), 다이팔미토일포스파티딜이노시톨(DPPI), 다이스테아로일포스파티딜이노시톨(DSPI), 다이올레오일-포스파티딜이노시톨(DOPI)이다.

[0167] 적합한 인지질은 그것에 친수성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌글리콜(PEG) 또는 폴리프로필렌글리콜(PPG)을 연결함으로써 변형된 인지질을 더 포함한다. 바람직한 중합체-변형된 인지질은 "페그화 인지질", 즉 PEG 중합체에 결합된 인지질을 포함한다. 페그화 인지질의 예들은 페그화 포스파티딜에탄올아민(간단히 "PE-PEGs"), 즉 친수성 에탄올아민 부분이 다양한 분자량(예를 들어 300 내지 20000 달톤, 바람직하게 500 내지 5000 달톤)의 PEG 분자에 연결된 포스파티딜에탄올아민, 예컨대 DPPE-PEG(또는 DSPE-PEG, DMPE-PEG, DAPE-PEG 또는 DOPE-PEG)이다. 예를 들어, DPPE-PEG2000은 약 2000의 평균 분자량을 가진 PEG 중합체가 그것에 부착된 DPPE를 말한다.

[0168] 특히 바람직한 인지질은 DAPC, DSPC, DSPG, DPPA, DSPA, DMPS, DPPS, DSPS 및 에틸-DSPC이다. 가장 바람직한 것은 DSPG 또는 DSPC이다.

[0169] 또한, 인지질들의 혼합물, 예컨대 예를 들어 DSPE, DPPE, DPPC, DSPC 및/또는 DAPC와 DSPS, DPPS, DSPA, DPPA, DSPG, DPPG, 에틸-DSPC 및/또는 에틸-DPPC의 혼합물이 사용될 수 있다.

[0170] 바람직한 구체예에서, 인지질은 미세기포의 안정화한 피막의 메인 성분이며, 기체-충전된 미세기포의 피막을 형성하는 성분들의 총량의 적어도 50%(w/w)를 차지한다. 바람직한 구체예의 일부에서, 실질적으로 외피 전체(즉, 중량 기준으로 적어도 80% 및 최대 100%)가 인지질로 형성될 수 있다.

[0171] 인지질은 상기 열거된 화합물 중 어느 것과의 혼합물로서 편리하게 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어 콜레스테롤, 에르고스테롤, 피토스테롤, 시토스테롤, 라노스테롤, 토코페롤, 프로필 갈레이트 또는 아스코르빌 팔미테이트와 같은 물질, 지방산, 예컨대 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산 및 이들의 유도체 또는 부틸화 하이드록시톨루엔 및/또는 다른 비-인지질 화합물이 0 내지 50 중량%, 바람직하게 최대 25%의 범위의 비율로 전술한 인지질 중 하나 이상에 선택적으로 첨가될 수 있다. 특히 바람직한 것은 양친매성 화합물, 예컨대 C_{10}-C_{20} 카복실산, 바람직하게 팔미트산이다.

[0172] 바람직한 구체예에 따라서, 본 발명에 따른 미세기포의 피막은 전체 (양 또는 음) 알짜 전하를 지닌 화합물을 포함한다. 상기 화합물은 하전된 양친매성 물질, 바람직하게 지질 또는 인지질일 수 있다.

[0173] 전체 음전하를 지닌 인지질의 예들은 포스파티딜세린의 유도체, 특히 지방산 다이에스테르 유도체, 예컨대 DMPS, DPPS, DSPS; 포스파티드산의 유도체, 예컨대 DMPA, DPPA, DSPA; 포스파티딜글리세롤의 유도체, 예컨대 DMPG, DPPG 및 DSPG 또는 포스파티딜이노시톨의 유도체, 예컨대 DMPI, DPPI 또는 DPPI이다. 또한, 변형된 인지질, 특히 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, 예컨대 DPPE-PEG 또는 DSPE-PEG가 음으로 하전된 분자로서 사용될 수 있다. 또한, 상기 인용된 인지질의 리소-형태, 예컨대 리소포스파티딜세린 유도체(예를 들어 리소-DMPS,

-DPPS 또는 -DSPS), 리소포스파티드산 유도체(예를 들어 리소-DMPA, -DPPA 또는 -DSPA) 및 리소포스파티딜글리세롤 유도체(예를 들어 리소-DMPG, -DPPG 또는 -DSPG)가 음으로 하전된 화합물로서 유익하게 사용될 수 있다. 음으로 하전된 화합물의 다른 예들은 담즙산 염, 예컨대 콜산 염, 데옥시콜산 염 또는 글리코콜산 염; 및 (C_{12}-C_{24}), 바람직하게 (C_{14}-C_{22}) 지방산 염, 예컨대 예를 들어 팔미트산 염, 스테아르산 염, 1,2-다이팔미토일-*sn*-3-석신일글리세롤 염 또는 1,3-다이팔미토일-2-석신일-글리세롤 염이다.

[0174] 바람직하게, 음으로 하전된 화합물은 DPPA, DPPS, DSPG, DPPG, DSPE-PEG-2000, DSPE-PEG5000 또는 이들의 혼합물 중에서 선택된다.

[0175] 음으로 하전된 성분은 전형적으로 상응하는 양성 반대이온과 회합되며, 이것은 1가(예를 들어 알칼리 금속 또는 암모늄), 2가(예를 들어 알칼리 토금속) 또는 3가(예를 들어 알루미늄)일 수 있다. 바람직하게, 반대이온은 알칼리 금속 양이온, 예컨대 Na^+ 또는 K^+, 더 바람직하게 Na^+ 중에서 선택된다.

[0176] 전체 양전하를 지닌 인지질의 예들은 에틸포스파티딜콜린의 유도체, 특히 지방산을 가진 에틸포스파티딜콜린의 다이에스테르, 예컨대 1,2-다이스테아로일-*sn*-글리세로-3-에틸포스포콜린(에틸-DSPC 또는 DSEPC), 1,2-다이팔미토일-*sn*-글리세로-3-에틸포스포콜린(에틸-DPPC 또는 DPEPC)이다. 음성 반대이온은 바람직하게 할로겐화 이온, 특히 염화 이온 또는 브롬화 이온이다. 미세기포의 피막에 포함될 수 있는 양으로 하전된 화합물의 예들은 적어도 하나(C_{10}-C_{20}), 바람직하게 (C_{14}-C_{18}) 알킬 사슬을 포함하는 할로겐화 반대이온(예를 들어 염화 또는 브롬화)을 가진 1가, 2가, 3가 또는 4가-알킬암모늄 염, 예컨대 예를 들어 모노- 또는 다이-스테아릴암모늄 클로라이드, 모노- 또는 다이-헥사데실암모늄 클로라이드, 다이메틸다이옥타데실암모늄 브로마이드(DDAB) 또는 헥사데실트라이메틸암모늄 브로마이드(CTAB)이다. 미세기포의 피막에 포함될 수 있는 양으로 하전된 화합물의 추가의 예들은 (C_3-C_6) 알킬렌 브릿지를 통해서 N-원자에 연결된 하나 또는 바람직하게 둘(C_{10}-C_{20}), 바람직하게 (C_{14}-C_{18}) 아실 사슬을 포함하는 할로겐화 반대이온(예를 들어 염화 또는 브롬화)을 가진 3차 또는 4차 암모늄 염, 예컨대 예를 들어 1,2-다이스테아로일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DSTAP),1,2-다이팔미토일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DPTAP), 1,2-올레오일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DOTAP) 또는 1,2-다이스테아로일-3-다이메틸암모늄-프로판(DSDAP)이다.

[0177] DSEPC, DPEPC 및/또는 DSTAP가 바람직하게 미세기포 피막에서 양으로 하전된 화합물로서 이용된다.

[0178] 양으로 하전된 성분은 전형적으로 상응하는 음성 반대이온과 회합되며, 이것은 1가(예를 들어 할로겐화물), 2가(예를 들어 설페이트) 또는 3가(예를 들어 포스페이트)일 수 있다. 바람직하게, 반대이온은 할로겐화 이온, 예컨대 F^-(불소), Cl^-(염소) 또는 Br^-(브롬) 중에서 선택된다.

[0179] 중성 화합물과 하전된 화합물의 혼합물, 특히 인지질 및/또는 지질의 혼합물이 미세기포 피막을 형성하기 위해 만족스럽게 이용될 수 있다. 하전된 지질 또는 인지질의 양은 지질 및 인지질의 총량에 대하여 약 95 mol% 내지 약 0.1 mol%에서, 바람직하게 80 mol% 내지 0.5 mol%에서 변할 수 있다.

[0180] 중성 인지질과 하전된 지질 또는 인지질의 바람직한 혼합물은, 예를 들어 DPPG/DSPC, DSTAP/DAPC, DPPS/DSPC, DPPS/DAPC, DPPE/DPPG, DSPA/DAPC, DSPA/DSPC, DSPC/PA(다이스테아로일포스파티딜콜린/팔미트산) 및 DSPG/DSPC이다.

[0181] 기체-충전된 미세소포의 안정화한 피막을 형성하는데 유용한 상기 예시된 성분들 중 어느 것, 특히 인지질, 바람직하게 페그화 인지질은 그 안에 적합한 반응성 부분을 삽입함으로써 변형될 수 있으며, 이로써 적합한 화합물, 예컨대 SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 포함하는 표적화 리간드, 또는 더 바람직하게 SEQ ID NO:1의 아미노산 1-118을 포함하는 서열의 결합을 허용할 수 있다. 예를 들어, 페그화 인지질(예를 들어 DSPE-PEG2000)은 상기 서열을 포함하는 화합물 상의 상응하는 반응성 부분과 (공유) 반응할 수 있는 말단 반응성 부분(예를 들어 말레이미드, 간단히 "mal", 따라서 DSPE-PEG-mal 성분이 형성된다)을 포함할 수 있다. 추가의 적합한 반응성 부분의 예들은 본 명세서의 아래에 예시된다.

[0182] 대안의 구체예에 따라서, 표적화 리간드 성분이 기체-충전된 마이크로캡슐과 회합될 수 있다. 마이크로캡슐의 바람직한 예들은, 선택적으로 생분해성 중합체와의 혼합물로서, 중합체, 바람직하게 생분해성 중합체, 또는 생분해성 수불용성 지질(예컨대 트라이팔미테이트)를 포함하는 안정화한 피막을 가진 것들이다. 적합한 마이크로캡슐 및 그것의 제조에 대한 예들은, 예를 들어 여기 그 전체가 참고로 포함된 US 5,711,933 및 US 6,333,021에 개시된다. 단백질성 피막을 가진 마이크로캡슐, 즉 US-A-4,276,885 또는 EP-A-0 324 938(여기 참고로

포함된다)에 설명된 것들과 같은 천연 단백질(알부민, 헤모글로빈)로 이루어진 마이크로캡슐이 또한 이용될 수 있다. 표적화 리간드가, 예를 들어 상기 예시된 제조 방법에 따라서 그것을 마이크로캡슐의 피막-형성 성분과 결합시킴으로써, 또는 표적화 리간드에 공유 결합된, 앞서 예시된 것들과 같은, 양친매성 성분을 마이크로캡슐 피막 형성 성분에 혼합함으로써 마이크로캡슐에 통합될 수 있다.

[0183] 다른 부형제 또는 첨가제가 미세소포의 건조 제제에 존재할 수 있거나, 또는 그것의 복원에 사용되는 수성 담체와 함께 첨가될 수 있으며, 반드시 미세소포의 안정화한 피막의 형성시에 포함될 필요는 없다(또는 단지 부분적으로 포함된다). 이들은 pH 조절제(예컨대 히스티딘), 삼투농도 조정제, 점도 증진제, 유화제, 벌크화제 등을 포함하며, 종래의 양으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리옥시프로필렌 글리콜 및 폴리옥시에틸렌 글리콜뿐만 아니라 이들의 공중합체와 같은 화합물이 사용될 수 있다. 점도 증진제 또는 안정제의 예들은 선형 및 가교된 다당류 및 올리고당류, 당 및 친수성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된 화합물이다.

[0184] 기체-충전된 미세소포의 제조가 동결 건조 또는 분무 건조 단계를 수반할 수 있기 때문에, 동결건조 첨가제, 예컨대 저온보호 및/또는 동결보호 효과를 가진 제제 및/또는 벌크화제, 예를 들어 글리신과 같은 아미노산; 탄수화물, 예를 들어 수크로오스, 만니톨, 말토오스, 트레할로오스, 글루코오스, 락토오스 또는 사이클로덱스트린과 같은 당, 또는 덱스트란과 같은 다당; 또는 폴리옥시알킬렌글리콜, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 제제에 포함시키는 것이 유익할 수 있다. 전형적으로, 동결건조 첨가제는 미세포소-형성 성분들의 양의 약 10 내지 약 1000배(w/w)의 범위일 수 있다.

[0185] 임의의 생체적합성 기체, 기체 전구체 또는 이들의 혼합물이 상기 미세소포를 충전시키기 위해 이용될 수 있다(이후, 또한 "미세소포-형성 기체"로서 식별된다).

[0186] 기체는, 예를 들어 공기; 질소; 산소; 이산화탄소; 수소; 아산화질소; 희가스 또는 비활성 기체, 예컨대 헬륨, 아르곤, 제논 또는 크립톤; 방사성 활성 기체, 예컨대 Xe^{133} 또는 Kr^{81}; 과분극화 희가스, 예컨대 과분극화 헬륨, 과분극화 제논 또는 과분극화 네온; 저분자량 탄화수소(예를 들어 최대 7 탄소 원자를 함유하는), 예를 들어 알칸, 예컨대 메탄, 에탄, 프로판, 부탄, 이소부탄, 펜탄 또는 이소펜탄, 사이클로알칸, 예컨대 사이클로부탄 또는 사이클로펜탄, 알켄, 예컨대 프로펜, 부텐 또는 이소부텐, 또는 알킨, 예컨대 아세틸렌; 에테르; 케톤; 에스테르; 할로겐화 기체, 바람직하게 불화 기체, 예컨대 또는 할로겐화, 불화 또는 과불화 저분자량 탄화수소(예를 들어 최대 7 탄소 원자를 함유하는); 또는 전술한 것들 중 어느 것의 혼합물을 포함할 수 있다. 할로겐화 탄화수소가 사용되는 경우, 상기 화합물 중 할로겐 원자의 바람직하게 적어도 일부, 더 바람직하게 전부는 불소 원자이다.

[0187] 특히 초음파 영상화 분야에서는 불화 기체, 특히 과불화 기체가 바람직하다. 불화 기체는, 예를 들어 불화 탄화수소(하나 이상의 탄소 원자 및 불소를 함유하는 유기 화합물); 6불화황; 불화, 바람직하게 과불화 케톤, 예컨대 퍼플루오로아세톤; 및 불화, 바람직하게 과불화 에테르, 예컨대 퍼플루오로다이에틸 에테르와 같은 적어도 하나의 불소 원자를 함유하는 물질을 포함한다. 바람직한 화합물은 과불화 기체, 예컨대 SF_6 또는 퍼플루오로카본(과불화 탄화수소), 즉 모든 수소 원자가 불소 원자로 치환된 탄화수소이며, 이것은 예를 들어 여기 참고로 포함된 EP 0554213에 개시된 대로, 특히 안정한 미세기포를 형성하는 것으로 알려져 있다.

[0188] 용어 퍼플루오로카본은 포화, 불포화, 및 고리형 퍼플루오로카본을 포함한다. 생체적합성, 생리학적으로 허용가능한 퍼플루오로카본의 예들은 퍼플루오로알칸, 예컨대 퍼플루오로메탄, 퍼플루오로에탄, 퍼플루오로프로판, 퍼플루오로부탄(예를 들어 퍼플루오로-n-부탄, 선택적으로 퍼플루오로-이소부탄과 같은 다른 이성질체와의 혼합물로서), 퍼플루오로펜탄, 퍼플루오로헥산 또는 퍼플루오로헵탄; 퍼플루오로알켄, 예컨대 퍼플루오로프로펜, 퍼플루오로부텐(예를 들어 퍼플루오로부트-2-엔) 또는 퍼플루오로부타디엔; 퍼플루오로알킨(예를 들어 퍼플루오로부트-2-인); 및 퍼플루오로사이클로알칸(예를 들어 퍼플루오로사이클로부탄, 퍼플루오로메틸사이클로부탄, 퍼플루오로다이메틸사이클로부탄, 퍼플루오로트라이메틸사이클로부탄, 퍼플루오로사이클로펜탄, 퍼플루오로메틸사이클로펜탄, 퍼플루오로다이메틸사이클로펜탄, 퍼플루오로사이클로헥산, 퍼플루오로메틸사이클로헥산 및 퍼플루오로사이클로헵탄)을 포함한다. 바람직한 포화 퍼플루오로카본은, 예를 들어 CF_4, C_2F_6, C_3F_8, C_4F_8, C_4F_{10}, C_5F_{12} 및 C_6F_{12}를 포함한다.

[0189] 또한, 임의의 비율의 상기 기체들 중 어느 것의 혼합물을 사용하는 것이 유익할 수 있다. 예를 들어, 혼합물은 종래의 기체, 예컨대 질소, 공기 또는 이산화탄소와 안정한 미세기포 현탁액, 예컨대 상기 나타낸 것과 같은 6불화황 또는 퍼플루오로카본을 형성하는 기체를 포함할 수 있다. 적합한 기체 혼합물의 예들은, 예를 들어 여기 참고로 포함된 WO 94/09829에서 찾을 수 있다. 다음의 조합이 특히 바람직하다: 기체 (A)와 (B)의 혼합물

로서, 여기서 기체 (B)는 혼합물을 포함하여 앞서 예시된 것들 중에서 선택된 불화 기체이고, 기체 (A)는 공기, 산소, 질소, 이산화탄소 또는 이들의 혼합물로부터 선택된다. 기체 (B)의 양은 전체 혼합물의 약 0.5% 내지 약 95% v/v, 바람직하게 약 5% 내지 80%일 수 있다.

[0190] 특히, 바람직한 기체는, 선택적으로 공기, 산소, 질소, 이산화탄소 또는 이들의 혼합물과의 혼합물로서, SF_6, C_3F_8, C_4F_{10} 또는 이들의 혼합물이다.

[0191] 특정 환경에서, 기체상 물질에 대한 전구체를 포함하는 것이 바람직할 수 있다(즉, 생체내에서 기체로 전환될 수 있는 물질). 바람직하게, 기체상 전구체 및 그로부터 유래된 기체는 생리학적으로 허용될 수 있다. 기체상 전구체는 pH-활성화되거나, 광-활성화되거나, 온도-활성화되거나 할 수 있다. 예를 들어, 특정 퍼플루오로카본은 온도 활성화 기체상 전구체로서 사용될 수 있다. 퍼플루오로펜탄 또는 퍼플루오로헥산과 같은 이들 퍼플루오로카본은 실온(또는 이 제제가 제조되고 및/또는 저장되는 온도)을 넘지만 체온 아래인 액체/기체 상 전이 온도를 가진다; 따라서, 이들은 인체 내에서 액체/기체 상 전이를 경험하고 기체로 전환된다.

[0192] MRI에서 사용하기 위해, 미세소포는 바람직하게 과분극화된 네온, 과분극화된 헬륨, 과분극화된 제논, 또는 이들의 혼합물을, 선택적으로 공기, 이산화탄소, 산소, 질소, 헬륨, 제논, 또는 상기 정의된 것과 같은 할로겐화된 탄화수소 중 어느 것과의 혼합물로서 함유할 것이다.

[0193] 신티그래피에서 사용하기 위해, 미세소포는 바람직하게 Xe^{133} 또는 Kr^{81} 또는 이들의 혼합물과 같은 방사성 활성 기체를, 선택적으로 공기, 이산화탄소, 산소, 질소, 헬륨, 크립톤 또는 상기 정의된 것과 같은 할로겐화된 탄화수소 중 어느 것과의 혼합물로서 함유할 것이다.

[0194] *NMR 영상화 및 치료법을 위한 금속 킬레이트화제*

[0195] 본 발명의 키메라 단백질과 같은 생물분자에 영상화 프로브 또는 방사선요법 작용제일 수 있는 금속 이온을 연결하는 가장 신뢰할만한 그리고 가장 자주 적용되는 방법은 금속 킬레이트화 케이지 및 생물분자를 공유 결합시키기 위한 반응성 기를 운반하는 2작용성 킬레이트화제에 의한 것이다.

[0196] 금속 배위 케이지는 DOTA(1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산) 또는 TETA(1,4,8,11-테트라아자사이클로도데칸-1,4,8,11-테트라아세트산)와 같은 고리형, 또는 EDTA(에틸렌다이아미노테트라아세트산) 또는 DTPA(다이에틸렌트라이아미노펜타아세트산)과 같은 선형으로 나눠질 수 있다.

[0197] 일단 가장 적합한 금속 킬레이트화 케이지, 또는 "킬레이트화 리간드"가 선택되면, 반응성 기를 통한 관심의 생물분자에 대한 콘쥬게이션이 고체상 합성에 의해 또는 용액 중에서 수행될 수 있다. Lattuada L. et al. reviews in Chem Soc. Rev, 2011, 40, 3019-3049, 표적화된 금속 킬레이트화제를 제조하기 위한, 다른 부분, 특히 생물분자에 금속 킬레이트화 리간드의 콘쥬게이션을 위한 합성적 접근법.

[0198] 이 단락에 개시된 구체예에 따라서, 금속은 영상화 기술에 의해 또는 치료법에 유용한 방사성핵종에 의해 검출될 수 있다. 영상화에 적합한 금속은 구체적으로 자기공명 영상화(MRI)에 의해 검출가능한 상자성 금속 이온, 또는 섬광조영술, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT) 및 양전자 방출 단층촬영(PET)와 같은 영상화 기술에 의해 검출가능한 방사성핵종이다.

[0199] 이 맥락에서, 용어 "킬레이터", "킬레이트화 리간드" 또는 "킬레이트화제"는 전이금속 또는 다른 금속과의 둘 이상의 배위 결합을 함유하는 복합체를 형성할 수 있는 극성 기의 존재를 특징으로 하는 화학 부분, 제제, 화합물 또는 분자를 포함한다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 상기 킬레이트화 리간드는 고리형 또는 선형 폴리아미노 폴리카복실산 또는 폴리포스폰산을 포함하고, 표적화 단백질 또는 적합한 2작용성 링커의 작용기를 콘쥬게이션하기에 적합한, 유리된 상태로 또는 선택적으로 활성화된 작용성으로서 존재하는 적어도 하나의 아미노, 티올 또는 카복실 기를 함유한다.

[0200] 링커는 스페이서로서 또는 전체 분자의 약동학적 특성을 개선하기 위해 사용될 수 있다. 가장 자주 사용되는 링커 일부가 Liu S. and Edwards S. Bioconjugate Chem. 2001, 12:7-34에 요약되며, WO 2008/071679에 펩타이드 콘쥬게이션에 대해 개시된다.

[0201] "금속으로 표지된 킬레이트화 리간드"의 문맥에서 여기 사용된 용어 "표지된" 또는 "복합체화된"은 금속과 복합체화된 리간드, 즉 금속 원소와의 킬레이트 또는 배위 착체의 형태인 리간드를 말한다.

[0202] 용어 "금속 존재" 또는 "금속 원소"는 영상화 기술에 의해 검출가능한 금속 이온, 또는 영상화 또는 치료법을

위한 방사성핵종을 말한다. 이 용어는 자기공명 영상화(MRI)에 의해 검출가능한 상자성 금속 이온 및 아래 정의된 대로 섬광조영 영상화, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT) 및 양전자 방출 단층촬영에 의해 검출가능하거나 또는 방사선요법에 적합한 방사성핵종과 같은 방사선 방출 금속을 포함한다.

[0203] 적합한 킬레이트화 리간드는 폴리아미노폴리카복실산 및 그것의 유도체, 예컨대 예를 들어 다이에틸렌트라이아민 펜타아세트산(DTPA) 및 그것의 유도체, 예컨대 벤조-DTPA, 다이벤조-DTPA, 페닐-DTPA, 다이페닐-DTPA, 벤질-DTPA 및 다이벤질 DTPA, *N,N-비스*[2-[(카복시메틸)[(메틸카바모일)메틸]에틸]-글리신(DTPA-BMA), N-[2-[비스(카복시메틸)아미노]-3-(4-에톡시페닐)프로필)]-N-[2-[비스(카복시메틸) 아미노]에틸]글리신(EOB-DTPA), 4-카복시-5,8,11-트리스(카복시메틸)-1-페닐-2-옥사-5,8,11-트라이아자트라이데칸-13-오익산(BOPTA), N,N-비스[2-[비스(카복시메틸)아미노]에틸]L-글루탐산(DTPA-GLU); DTPA-Lys(도 3a의 화합물 1 참조); 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA); 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸 1,4,7-트라이아세트산(DO3A) 및 그것의 유도체, 예컨대 예를 들어 [10-(2-하이드록시프로필)-1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸 1,4,7,-트라이아세트산(HPDO3A); 1,4,7-트라이아자사이클로노난 N,N',N"-트라이아세트산(NOTA); 6-[비스(카복시메틸)아미노]테트라하이드로-6-메틸-1H-1,4-다이아제핀-1,4(5H)-다이아세트산(AAZTA) 및 그것의 유도체, 예를 들어 여기 참고로 포함되는 WO 03/008390에 개시된 것들, 1,4,7,10-테트라-아자사이클로테트라데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA) 및 그것의 유도체, 예컨대 예를 들어 벤조-DOTA, 다이벤조-DOTA,(a,a',a'',a''')테트라메틸-1,4,7,10-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTMA); 또는 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(TETA); 또는 카복실 기 중 하나 이상이 포스폰 및/또는 포스핀 기로 치환된 상응하는 화합물, 예컨대 예를 들어 N,N'-비스-(피리독살-5-포스페이트)에틸렌다이아민-N.N'-다이아세트산(DPDP); 에틸렌디니트릴로테트라키스(메틸포스폰)산(EDTP), 1,4,7,10-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,7,10-테트라(메틸렌포스폰)산(DOTP), 포스포노알킬폴리아자 거대고리 화합물, 예를 들어 US 5,362,476 및 US 5,409,689에 개시된 것들 및 US 6,509,324에 개시된 선형 포스포노알킬 유도체; 또는 거대고리 킬란트, 예컨대 텍사피린, 포르피린, 프탈로시아닌으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0204] 상기 중, 특히 바람직한 것은 DTPA, DTPA-Glu, DTPA-Lys, DOTA 및 DOTA 유도체, 예컨대 Price EW and Orvig, Chem. Soc. Rev. 2014, 43:260에 개시된 것들 및 Hermann et al, Dalton Trans., 2008, 3027-3047에 개시된 피리딜-DO3A 또는 WO 03/008394 및 WO 2013/135750에 설명된 멀티덴테이트 리간드 AAZTA 및 그것의 유도체이다.

[0205] MRI를 위한 바람직한 상자성 금속 원소는 20 내지 31, 39, 42, 43, 44, 49 및 57 내지 83의 범위의 원자 번호를 가진 것들이다.

[0206] 더욱 바람직한 상자성 금속 이온은 $Fe(2^+)$, $Fe(3^+)$, $Cu(2^+)$, $Ni(2^+)$, $Rh(2^+)$, $Co(2^+)$, $Cr(3^+)$, $Gd(3^+)$, $Eu(3^+)$, $Dy(3^+)$, $Tb(3^+)$, $Pm(3^+)$, $Nd(3^+)$, $Tm(3^+)$, Ce(3+), Y(3+), Ho(3+), Er(3+), La(3+), Yb(3+), Mn(3+), Mn(2+)로부터 선택되며, Gd(3+)가 가장 바람직하다.

[0207] *핵 영상화(방사성핵종 영상화) 및 방사선요법*

[0208] 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 셀렉틴 표적화 키메라 단백질이 연결되는 부분은 방사선 영상화(진단) 또는 방사선요법(치료 용도)를 위한 방사성핵종이다.

[0209] 방사성 금속 킬레이트화 부분의 주요 특징은 nM 내지 pM 농도로 극도로 희석된 상태에서 생체내에서 그것의 사용과 관련된다; 그러나, 킬레이트화 부분과 방사성 금속 사이에 가장 적합한 일치 중 일부가 잘 알려져 있으며 Price EW and Orvig C Chem. Soc. Rev, 2014, 43, 260에 요약된다.

[0210] 방사선 영상화의 경우, 표적화제가 "방사선 영상화 검출가능한 부분", 즉 섬광조영 영상화, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT) 또는 양전자 방출 단층촬영(PET)과 같은 영상화 기술에 의해 검출가능한 부분에 연결될 수 있다.

[0211] 바람직하게, 상기 방사선 영상화 검출가능한 부분은 일반적으로 2작용성이며 금속 복합체화 특성을 가진 킬레이트화 부분 및 본 발명의 셀렉틴 표적화제와 같은 생물분자에 대한 부착을 위한 작용기를 포함하는 킬레이트화제에 킬레이트화된 방사성핵종을 포함하거나, 또는 생물분자(즉, 요오드)에 직접 연결된다.

[0212] 아미드, 티오유레아, 유레아, Schiff 염기 또는 단백질 상이 아민이나 티올과 티오에테르 결합을 형성하는 작용기는 상기 섬광조영술, SPECT 또는 PET 영상화 기술에 의해 검출가능한 방사성핵종으로 표지된, 킬레이트화제를 지니고 제조될 수 있다.

[0213] 어느 경우, 가장 바람직한 킬레이트화 리간드는 선형이거나, 또는 더 바람직하게는 거대고리 킬레이트화 리간드이며, 상기 논의된 것들, 예컨대 DTPA, 또는 더 바람직하게는 ^{111}In, ^{177}Lu, $^{86/90}$Y, ^{225}Ac 및 $^{44/47}$Sc를 포함하는 다수의 동위원소에 대한 금 표준인 DOTA이고, 이것은 광범위하게 $^{67/68}$Ga와 함께 사용되었으며, 더욱 최근에서 더 안정한 NOTA 및 DOTA 유도체로 대체되었다.

[0214] 방사성핵종을 위한 킬레이트화 리간드의 추가의 적합한 예들은 선형, 거대고리, 터피리딘, 및 N_3S, N_2S_2, N_2S_3, N_2S_4, N_3S_3 또는 N_4 킬레이터, 예컨대 예를 들어 US 5,367,080, US 5,364,613, US 5,021,556, US 5,075,099 및 US 5,886,142에 개시된 리간드, 및 본 분야에 공지된 다른 킬레이트화 리간드, 예컨대 제한은 아니지만 6-하이드라지노피리딘-3-카복실산(HYNIC) 또는 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(TETA); 및 비스-아미노 비스-티올(BAT) 킬레이터, 예컨대 예를 들어 US 5,720,934에 개시된 것들, 또는 폴리아자거대고리 화합물의 포스포 유도체, 예컨대 WO 2005/062828에 설명된 것들로부터 선택될 수 있다.

[0215] N_4 킬레이트화 리간드가 또한, 예를 들어 US 5,608,110, US 5,665,329, US 5,656,254 및 US 5,688,487에 설명된다. 특정한 N_3S 또는 N_2S_2 킬레이터는, 예를 들어 US 5,659,041, US 5,574,140, US 5,780,006, US 5,662,885 및 US 5,976,495에 설명된다. 킬레이터는 또한 킬레이트화 리간드 머캡토-아세틸-아세틸-글리실-글리신(MAG3)을 포함할 수 있으며, 이것은 N_3S 및 N_2S_2 시스템, 예컨대 MAMA(모노아미드모노아민다이티올), DADS(N_2S 다이아민다이티올), CODADS 등을 함유한다. 이들 리간드 시스템 및 여러 가지 것들은 Liu and Edwards, *Chem Rev*, 1999, 99, 2235-2268 및 거기 인용된 참고문헌에 개시된다.

[0216] 킬레이트화는 또한 테트라덴테이트 배열에서 금속에 공여되지 않는 리간드 원자를 함유하는 복합체를 포함할 수 있다. 이들은 테크네튬 및 레늄 다이옥심의 보론산 애덕트를 포함하며, 이들은 예를 들어 US 5,183,653, US 5,387,409 및 US 5,118,797에 설명된다.

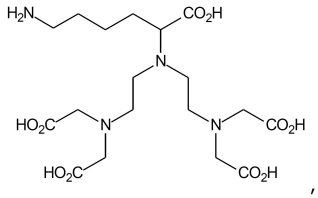
[0217] 다른 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 또는 폴리펩타이드의 이황화물 결합은 ^{99}mTc와 같은 방사성핵종의 킬레이션을 위한 리간드로서 사용된다. 이 방식에서, 펩타이드 루프는 Tc(펩타이드-S-Tc-S-펩타이드로 변화된 펩타이드-S-S-펩타이드)의 도입에 의해 확장된다.

[0218] 본 발명에 따른 바람직한 방사성핵종은, 예를 들어 ^{99m}Tc, ^{51}Cr, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{47}Sc, ^{167}Tm, ^{141}Ce, ^{111}In, ^{113}In, ^{168}Yb, ^{175}Yb, ^{140}La, ^{90}Y, ^{88}Y, ^{153}Sm, ^{166}Ho, ^{165}Dy, ^{166}Dy, ^{61}Cu, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{97}Ru, ^{103}Ru, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{203}Pb, ^{211}Bi, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{214}Bi, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{117m}Sn, ^{149}Pm, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{198}Au, ^{111}Ag, ^{199}Au, ^{51}Mn, ^{52m}Mn, ^{52}Fe, ^{60}Cu, ^{72}As, ^{94m}Tc, 또는 ^{110}In, ^{142}Pr, ^{159}Gd를 포함한다.

[0219] 방사성핵종의 선택은 원하는 치료 또는 진단 용도에 기초할 것이다. 예를 들어, 치료 목적을 위해(예를 들어, 원발성 종양 및 전이에 대해 방사선요법을 제공하기 위해), 바람직한 방사성핵종은 ^{64}Cu, ^{90}Y, ^{105}Rh, ^{111}In, ^{117m}Sn, ^{149}Pm, ^{153}Sm, ^{161}Tb, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{175}Yb, ^{177}Lu, $^{186/188}$Re, 및 ^{199}Au를 포함할 수 있고, $^{186/188}$Re , ^{177}Lu 및 ^{90}Y가 특히 바람직하다. 진단 목적을 위해(예를 들어, 염증의 위치를 밝히거나 치료 후 염증의 발생을 모니터링하기 위해), 바람직한 방사성핵종은 ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{99m}Tc, 및 ^{111}In을 포함할 수 있다. 저렴한 비용, 활용성, 영상화 특성 및 높은 특이적 활성 때문에 ^{99m}Tc가 진단 용도에 특히 바람직하다. 특히, ^{99m}Tc의 핵 및 방사성 활성 특성은 이 동위원소를 이상적인 섬광조영 영상화제로 만든다. 실제로, 이 동위원소는 140 keV의 단일 광자 에너지 및 약 6시간의 방사성 활성 반감기를 가지며, ^{99}Mo-^{99m}Tc 발생기로부터 쉽게 이용될 수 있다.

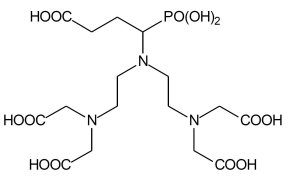
[0220] PET 영상화에 사용하기 위한 바람직한 금속 방사성핵종은 양전자 방출 금속 이온, 예컨대 예를 들어 ^{51}Mn, ^{52}Fe, ^{60}Cu, ^{68}Ga, ^{72}As, ^{94m}Tc 또는 ^{110}In이다.

[0221] 바람직한 킬레이트화 리간드는 ^{111}In에 대해, 방사성 활성 란탄족, 예컨대 예를 들어 ^{177}Lu, ^{90}Y, ^{153}Sm, 및 ^{166}Ho에 대해, 또는 ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{61}Cu, ^{62}Cu, ^{64}Cu 또는 ^{67}Cu에 대해, 다음의 군으로부터 선택된다:



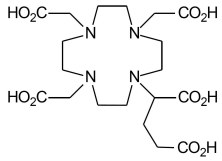
1

Bioconj. Chem (**1999**), *10*, 137



2

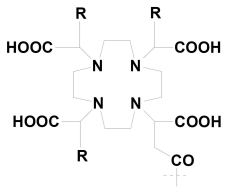
WO 01/46207



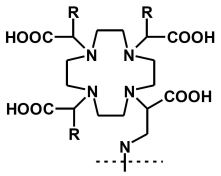
Bioorg Med Chem Lett (2000), 10: 2133

[0222]

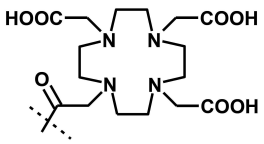
[0223] 특히, ^{111}In 및 방사성 활성 란탄족, 예컨대 예를 들어 ^{177}Lu, ^{90}Y, ^{153}Sm, 및 ^{166}Ho를 포함하는 금속 존재의 경우, 특히 바람직한 것은 다음의 리간드 잔기이다:



a)



b)

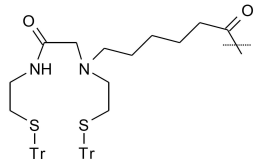


c)

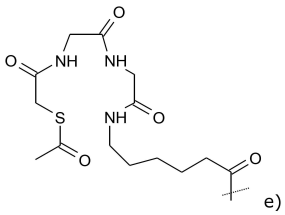
[0224]

[0225] 여기서, 상기 식 a) 및 b)에서, R은 알킬, 바람직하게 메틸이다.

[0226] 방사성 활성 ^{99m}Tc, ^{186}Re, ^{188}Re에 대해, 특히 바람직한 것은 아래 d) 내지 l)로부터의 킬레이트화 부분이다:

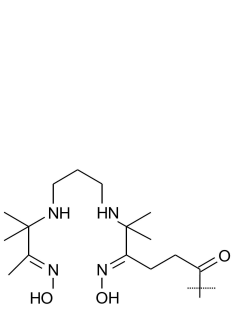


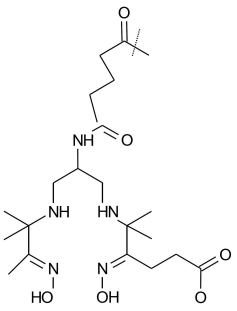
d)

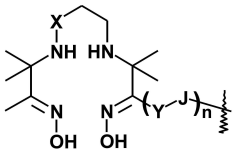


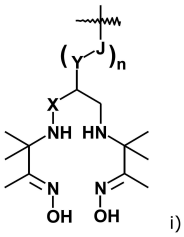
e)

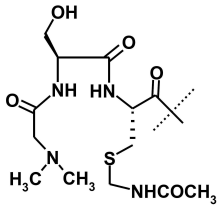
[0227]


f)


g)


h)


i)


l)

[0228]

[0229] 이들 및 다른 금속 킬레이트화 기는 예를 들어 US 5,608,110, US 6,143,274, US 5,627,286, US 5,662,885, US 5,780,006 및 US 5,976,495에 설명된다.

[0230] 추가로, 식 c)의 상기 킬레이트화 기는 US 6,143,274에 설명되고, 상기 식 h) 및 i)의 킬레이트화 기는 US 5,627,286 및 US 6,093,382에 설명되고, 식 l)의 킬레이트화 기는 US 5,662,885, US 5,780,006 및 US 5,976,495에 설명된다.

[0231] 식 h) 및 i)에서, X는 CH_2 또는 O이고, Y는 C_1-C_{10} 분지 또는 비분지 알킬이다; Y는 아릴, 아릴옥시, 아릴아미노, 아릴아미노아실이다; Y는 아릴 부분에 부착된 알킬기 또는 기들이 C_1-C_{10} 분지 또는 비분지 알킬기, C_1-C_{10} 분지 또는 비분지 하이드록시 또는 폴리하이드록시알킬 기 또는 폴리알콕시알킬 또는 폴리하이드록시-폴리알콕시알킬 기인 아릴킬이고, J는 J is >C(=O), -OC(=O)-, -SO_2-, >NC(=O)-, >NC(=S)-, -N(Y)-, -NC(=NCH_3)-, -NC(=NH)-, -N=N-, 합성 또는 천연 발생 아미노산으로부터 유도된 호모폴리아미드 또는 헤테로폴리아민이다; 모든 경우 n은 1-100이다. 이들 구조의 폴레이트 유도체가, 예를 들어 US 6,093,382에 설명된다.

[0232] 섬광조영술을 위한 가장 바람직한 것은 영상화 검출가능한 부분으로서 ^{99m}Tc로 표지된 상기 a) 내지 l)로부터의 상기 리간드 잔기 중 하나를 포함하는 방사성 영상화 조영제이다.

[0233] *표지된 당에 의한 PET 영상화*

[0234] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 융합 단백질은 PET 영상화에서 사용하기 위해 표지된 당 부분에 연결된다. 바람직하게, 당 부분은 방사성핵종, 예컨대 예를 들어 ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{77}Br, ^{76}Br 및 ^{18}F에 의한 할로겐화에 의해 표지되며, ^{18}F가 특히 바람직하다.

[0235] *광학 영상화*

[0236] 일부 구체예에서, 광학 영상화제가 본 발명의 키메라 단백질에 콘쥬게이션된다. 광학 영상화제 중, 생체내, 생체외 및 시험관내 영상화 용도를 위한 형광 염료는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 생체내 형광 영상화에 최적인

광범위한 형광색소가 개발되었고 상업적으로 이용가능하다. 이들 시약은 상이한 정도로 형광 발색단의 조직 투과 깊이, 광 산란 및 형광 방출 특성을 최대화함으로써 최적의 신호 대 바탕값 비율을 제공한다. 일반적으로, 광 흡수 및 산란은 파장이 증가함에 따라 감소한다; 약 700nm 아래에서 이들 효과는 수 밀리미터의 얕은 투과 깊이를 가져오고, 900nm 이상에서는 물 흡수가 신호 대 바탕값 비율을 방해할 수 있다. 따라서, 근적외선(NIR) 영역(700-900nm)에서 여기/방출을 가진 형광색소가 지금까지 작은 동물 및 잠재적으로 인간의 생체내 영상화에서 거의 활용되었다.

[0237] 이들 중, 가장 많이 사용되는 것은 인도시아닌 그린, 시아닌 유도체 Cy3, Cy3.5, Cy5 및 Cy5.5, Cy7(이 시아닌 염료 및 유도체는 GE Healthcare에서 이용가능), LS-287, LS-288, IRDye®800CW, IR-820, IR®-806, IR-786, IRDye® 800RS, IRDye®750, IRDye®650(IRDye®는 Li-Cor Bioscience에서 이용가능), Alexa Fluor®647, Alexa Fluor®350, Alexa Fluor®405, Alexa Fluor®430, Alexa Fluor®488, Alexa Fluor®514, Alexa Fluor®532, Alexa Fluor®546, Alexa Fluor®568, Alexa Fluor®594, Alexa Fluor®680, Alexa Fluor®750(Alexa Fluor® 염료는 Invitrogen에서 이용가능), 이들의 조합 및 화학 구조가 예를 들어 WO 2014/191467에 보고된 다른 것들이다.

[0238] 영상-가이드 수술을 위한 화합물 대부분의 구조 및 이들의 상업적 이용가능성이 Gibbs S.L. Quant Imaging Med Surg2012, 2(3):177-187에 설명되었다. 특히 바람직한 것은 NIR 영상화를 위해 개발된 시아닌 염료 및 이들의 화학적 유도체, 예컨대 Cy5.5, IRDye®800CW, IRDye® 800RS 및 IRDye®750이다.

[0239] *용도*

[0240] 상기 설명된 표적화된 진단제는 생체내 및 생체외 영상화를 위해 특히 유용하다. 본 발명의 키메라 표적화 단백질은 치료 목적을 위해 더 사용될 수 있으며, 이것은 본 발명의 키메라 표적화 단백질이, 치료 화합물, 즉 생물학적 효과를 발휘하거나 발휘하도록 담당할 수 있는 분자를 셀렉틴 발현 세포, 조직 또는 기관에 송달하기 위해, 선택적으로 영상화제와 함께 사용되는 경우의 환자에서 질환의 치료를 위한 임의의 방법을 포함한다.

[0241] 전형적으로, 이 용도는 본 발명의 키메라 단백질과 생물학적 활성을 부여하는 제제/부분/분자, 예컨대 사이토카인, 세포성장억제제(예컨대 독소루비신, 메토트렉세이트, 시스플라틴, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등), 독소, 항염제, 면역조절제, 예컨대 사이토카인 억제제, 항혈소판제, 코르티코스테로이드, 단클론 항체, 성장인자 및 방사성핵종을 운반하는 금속 킬레이트화 부분을 포함하는 상기 설명된 방사선요법제의 콘쥬게이션을 수반하며, 염증이 관찰되거나 검출되는 셀렉틴 발현 조직/세포/기관에 생물학적 활성 부분을 표적화하는 것이 행해진다.

[0242] 진단 및/또는 치료 목적을 위한, 병리학적 염증 상태는 생리학적 수준을 넘는 셀렉틴 발현 수준을 특징으로 한다; 셀렉틴은 바람직하게 E-셀렉틴 및/또는 P-셀렉틴, 더 바람직하게 P-셀렉틴이다. 특히, 본 발명의 영상화제는 아래 열거된 것과 같은 혈관 내피의 염증 상태를 검출하는데 유용하다.

[0243] 더 바람직하게, 병리학적 염증 상태는 생리학적 수준을 넘는 셀렉틴 발현 수준을 특징으로 하는 상태: 급성 관상동맥 증후군(ACS), 염증성 장 질환(IBD), 궤양성 대장염, 크론병, 종양과 관련된 신생-혈관형성, 류마티스성 관절염, 허혈성 재관류 손상, 이식 거부 또는 더 일반적으로 생리학적 수준 이상으로 P-셀렉틴 및/또는 E-셀렉틴을 발현하는 임의의 기관 또는 조직에서 선택된다.

[0244] 더 바람직하게, 본 발명의 키메라 단백질은 IBD, ACS, 종양 검출 및 이식 거부에 대한 유용한 표적화제이다.

[0245] 또한, 본 발명에 따른 표적화된 영상화제는 염증 질환 또는 병태를 앓고 있는 환자의 치료 동안 그것을 모니터링하고 평가하기 위한 효과적인 진단 도구로서 이용되며, 여기서 "동안"은 치료 시작 전 임의의 시간, 상기 치료 과정 중 및/또는 상기 치료가 종료된 때를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 표적화된 영상화제는, 예를 들어 질환 또는 병태에 대한 항염증 약물 또는 염증억제 약물의 투여 효과를 결정하거나 평가하기 위해, 항염증 치료의(예를 들어 상기 인용된 질환 또는 병태 중 어느 것의) 모니터링 및/또는 추적관찰에 유익하게 이용될 수 있다.

[0246] 예를 들어, IBD에서, 본 발명의 표적화된 영상화제는 메살라민, 코르티코스테로이드, 메토트렉세이트 또는 인플릭시맙에 의한 치료에 대한 반응을 추적관찰하고 치료에 대한 반응에 따라서 환자를 등급화하고 관해 유지 요법을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 바람직하게, 영상화 기술은 초음파 검출을 위한 키메라 가용성 단백질-표적화된 미세기포에 기초한다.

[0247] 바람직한 구체예에서, 치료 동안, 예를 들어 규칙적인 시간 간격으로, 각 약물 투여 또는 치료 개입 후 및/또는 선택된 횟수의 약물 투여 또는 치료 우 정해진 시간 간격으로 본 발명의 표적화된 영상화제의 투여시 환자의 관

심의 영역이 선택된 영상화 검출 시스템에 노출된다; 다음에, 관심의 영역의 최종 영상화는 바람직하게 치료 종료시 또는 완료시 수행된다.

[0248] 본 발명의 표적화된 영상화제는 초음파-관련 기술에서, 즉 치료-관련 영상화에서 더 사용될 수 있으며, 여기서 이들은 예를 들어 고 음향 압력(전형적으로 비-파괴 진단 영상화 방법에서 일반적으로 이용되는 것보다 높은)의 초음파에 의한, 기체-충전된 미세소포의 제어된 국소 파괴와 유익하게 관련된다. 이런 제어된 파괴는, 예를 들어 혈액 응괴의 치료를 위해, 선택적으로 조영제와 결합된 적합한 치료 화합물의 방출과 조합하여 사용될 수 있다(초음파 혈전용해술이라고 알려진 기술). 또는 달리, 상기 치료-관련 영상화는, 미세소포의 국소화된 분출 또는 활성화에 의해 유도된 세포 수준의 일시적 막 투과화의 결과로서, 세포에 치료제의 송달을 포함할 수 있다. 이 기술은, 예를 들어 세포에 유전자 물질의 효과적인 송달을 위해 사용될 수 있다; 또는 달리, 선택적으로 유전자 물질과 조합하여, 약물이 국소 송달될 수 있으며, 이로써 환자에게 조합된 제약/유전자 요법이 가능하다(예를 들어, 종양 치료의 경우). 치료제는 종래의 방법에 따라서 기체-충전된 미세소포와 결합될 수 있거나, 또는 조성물의 분리된 화합물로서 투여될 수 있다. 이에 더하여, 표적화제는 초음파에 노출 후 혈액 뇌 장벽의 일시적 개방에 의해 뇌 조직에 송달을 촉진하기 위해 사용될 수 있다.

[0249] 전형적으로, 표적화된 진단제의 유효량이 그것을 필요로 하는 환자에게 투여되고(예를 들어 주사에 의해), 영상화되거나 치료될 환자의 신체 부분 또는 조직("관심의 영역")이 원하는 영상화 방법에 노출된다. 바람직하게, 조영제는 정맥내 투여된다. 용어 환자는 진단/치료 목적을 위해 또는 실험 목적을 위해(예를 들어, 실험실 동물에게, 예를 들어 실험적 치료를 추적관찰하기 위한 조영제의 사용을 포함한다) 조영제의 투여를 받는 임의의 대상(인간 또는 동물)을 포함한다.

[0250] 바람직한 구체예에 따라서, 표적화된 미세소포의 유효량이, 전형적으로 그것의 현탁액의 주사에 의해 환자에게 투여된다. 따라서, 관심의 영역의 영상화가 관심의 영역에서 표적에 결합된 미세소포의 존재에 의해 증진될 것이다.

[0251] 다양한 영상화 기술이 초음파 용도에 이용될 수 있으며, 예를 들어 기본 및 비-선형(예를 들어 하모닉) B-모드 영상화, 펄스 인버전 또는 상 반전 영상화 및 기본 및 비-선형 도플러 영상화를 포함한다; 원한다면 3차원 또는 4차원 영상화 기술이 사용될 수 있다. 또한, 고도로 민감한 검출 방법인 기체-충전된 미세소포의 파괴를 동반하는 진단 기술(예를 들어 고 음향 압력의 초음파에 의한)도 고려된다.

[0252] 본 발명에 따른 미세소포는 전형적으로, 예를 들어 각각의 조성, 영상화되는 조직 또는 기관 및/또는 선택된 영상화 기술에 따라, 환자 kg 당 약 0.01 내지 약 5.0 μL 의 기체(미세소포 내부에 포착된) 농도로 투여될 수 있다. 이 일반적인 농도 범위는 물론 특정 영상화 용도에 따라, 예를 들어 컬러 도플러 또는 파워 펄스 인버전에서와 같이 매우 낮은 용량에서 신호가 관찰될 수 있을 때 변할 수 있다. 가능한 다른 진단 영상화 용도는 섬광조영술, 광학 영상화, 광음향 영상화, 자기공명 영상화 및 엑스선 상 대비 영상화를 포함하는 엑스선 영상화를 포함한다.

[0253] 또한, 초음파 영상화 방법은 침범된 병소의 더 나은 맵핑을 달성하기 위해 조합된-(또는 융합-) 영상화 방법에 대해 상기 언급된 대로 MRI와 결합되어 편리하게 사용될 수 있다.

[0254] *제약학적 조성물*

[0255] 더 나아가, 본 발명은 고려된 용도에 따라서 콘쥬게이트되거나 변형된 상기 개시된 키메라 단백질을 포함하는 제약학적 조성물을 포함하며, 이것은 국소적으로 또는 비내, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 관절내 또는 병소내 투여를 포함하는 비경구 방식으로 투여될 수 있다. 보통은 정맥내(i.v.), 동맥내, 관절내, 심장내 투여가 바람직하다.

[0256] 역시 본 분야에 알려진 대로, 본 발명의 분자는, 활성 성분으로서, 제약학적으로 허용되며 활성 성분과 양립가능한 희석제 또는 부형제에 용해, 분산 또는 혼합된다. 적합한 부형제는, 예를 들어 물, 식염수, 포스페이트 완충 식염수(PBS), 덱스트로오스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합이다. 다른 적합한 담체도 본 분야에 잘 알려져 있다. 이에 더하여, 원한다면, 조성물은 소량의 보조 물질, 예컨대 습윤 또는 유화제, 안정제 및/또는 pH 완충제를 함유할 수 있다.

[0257] 본 발명에 따른 제약학적 조성물은 종래의 혼합, 용해, 과립화, 분쇄, 무화, 드라지 제조, 분말화, 유화, 캡슐화, 포착화 또는 동결건조 과정에 의해 제조될 수 있다.

[0258] 따라서, 본 발명에 따라서 사용하기 위한 제약학적 조성물은 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리학

적으로 허용가능한 담체를 사용하여 제제화될 수 있으며, 이것은 활성 성분의 제약학적으로 사용될 수 있는 제조물로의 가공을 용이하게 한다. 적절한 제제는 선택된 투여 경로에 의존한다.

[0259] 주사의 경우, 본 발명의 화합물은 바람직하게는 Hank's 버퍼, Ringer's 용액, 또는 적합한 부형제 또는 안정화 화합물을 더 포함하는 생리학적 식염수 버퍼와 같은 생리학적으로 양립가능한 버퍼에 수성 용액으로 제제화될 수 있다.

[0260] 경구 투여는 액체 또는 고체 조성물에 의해 달성될 수 있다. 후자 중, 드라지 코어에는 적합한 코팅이 제공된다. 이를 위해, 농축 당 용액이 사용될 수 있으며, 이것은 선택적으로 아라비아 검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카보폴 겔, 폴리에틸렌 글리콜, 이산화티타늄, 래커 용액 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유할 수 있다. 식별을 위해서 또는 활성 화합물 용량의 상이한 조합을 특정하기 위해서 정제 또는 드라지 코팅에 염료 또는 안료가 첨가될 수 있다.

[0261] 경구 투여되는 고체 조성물은 젤라틴으로 이루어진 푸시-핏 캡슐, 및 젤라틴과 글리세롤 또는 소르비톨과 같은 가소제로 이루어진 연질 밀봉 캡슐을 포함한다. 푸시-핏 캡슐은 필러, 예컨대 락토오스, 바인더, 예컨대 녹말, 윤활제, 예컨대 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트 및 선택적으로 안정제와의 혼합물로서 활성 성분을 함유할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 화합물은 적합한 액체, 예컨대 지방 오일, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜에 용해되거나 현탁될 수 있다. 이에 더하여, 안정제가 첨가될 수 있다. 경구 투여를 위한 모든 제제는 선택된 투여 경로에 적합한 제형으로 있어야 한다. 협측 투여의 경우, 조성물은 종래의 방식으로 제조된 정제 또는 로젠지 형태를 취할 수 있다.

[0262] 본 발명에 따른 한 구체예에서, 펩타이드는 경구 투여된다(예를 들어 시럽, 캡슐 또는 정제로서). 특정 구체예에서, 펩타이드 송달은 보호 부형제의 사용에 의해 증진될 수 있다. 이것은 전형적으로 펩타이드를 조성물과 복합체화하여 그것을 산성 및 효소 가수분해에 저항성으로 만들거나, 또는 펩타이드를 리포솜과 같은 적절한 저항성인 담체에 포장함으로써 달성된다. 경구 송달을 위해 펩타이드를 보호하는 수단은 본 분야에 잘 알려져 있다.

[0263] 압축 정제는, 선택적으로 바인더(예를 들어 포비돈, 젤라틴, 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스), 윤활제, 비활성 희석제, 보존제, 붕해제(예를 들어 소듐 녹말 글리콜레이트, 가교된 포비돈, 가교된 소듐 카복시메틸 셀룰로오스), 표면활성제 또는 분산제와 혼합된, 분말이나 과립과 같은 자유-유동 형태의 활성 펩타이드(들)를 적합한 기계에서 압축함으로써 제조될 수 있다.

[0264] 몰딩 정제는 비활성 액체 희석제로 적신 분말 펩타이드(들)를 혼합물을 적합한 기계에서 몰딩함으로써 제조될 수 있다.

[0265] 정제는 선택적으로 코팅되거나 표식이 새겨질 수 있고, 예를 들어 원하는 방출 프로파일을 제공하도록 다양한 비율로 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스를 사용함으로써 그 안의 활성 성분의 느린 또는 제어된 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.

[0266] 시럽은 당, 예를 들어 수크로오스의 농축된 수성 용액에 활성 펩타이드(들)를 첨가함으로써 제조될 수 있으며, 거기에 또한 임의의 필요한 성분들이 첨가될 수 있다. 이러한 부속 성분들은 향료, 당의 결정화를 지연시키는 제제 또는 임의의 다른 성분의 용해도를 증가시키는 제제, 예컨대 다가 알코올, 예를 들어 글리세롤 또는 소르비톨을 포함할 수 있다.

[0267] 흡입에 의한 투여의 경우, 본 발명에 따라서 사용하기 위한 변이체는 적합한 추진체, 예를 들어 다이클로로다이플루오로메탄, 트라이클로로플루오로메탄, 다이클로로-테트라플루오로에탄 또는 이산화탄소의 사용하에 가압 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 편리하게 송달된다. 가압 에어로졸의 경우, 용량 단위는 계량된 양을 송달할 수 있는 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한, 예를 들어 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 펩타이드와 락토오스 또는 녹말과 같은 적합한 분말 베이스의 분말 믹스를 함유하여 제제화될 수 있다.

[0268] 비경구 투여를 위한 제약학적 조성물은 수용성 형태의 활성 성분의 수성 용액을 포함한다. 추가로, 활성 화합물의 현탁액이 적절한 오일상 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친연 또는 합성 담체들이 본 분야에 잘 알려져 있다. 현탁액은 또한 적합한 안정제 또는 화합물의 용해도 또는 키메라 단백질 또는 콘쥬게이트된 기의 안정성을 증가시키는 제제를 함유할 수 있으며, 이로써 농축 용액의 제조가 가능하다. 또는 달리, 활성 성분은 사용하기 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균, 발열원-무함유 물에 의해 복원되는 분말 형태일 수

있다.

[0269] 본 발명의 화합물은 또한, 예를 들어 종래의 좌약 베이스, 예컨대 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드를 사용하여 좌약 또는 정체 관장과 같은 직장 조성물로 제제화될 수 있다.

[0270] "패키징" 시스템으로서 지속-방출 단백질 또는 지질의 사용에 의해 상승된 혈청 반감기가 유지될 수 있다. 이러한 지속 방출 시스템은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 키메라 단백질 그대로의 제제 또는 나노스피어, 나노소포 또는 리포솜에 콘쥬게이트된 형태의 제제를 포함할 수 있다.

[0271] 전술한 제제 및 투여 방법은 예시이며 제한이 아니다. 여기 제공된 교시에 의해서 다른 적합한 제제 및 투여 방식도 쉽게 고안될 수 있다는 것이 인정될 것이다.

[0272] 본 발명의 맥락에서 사용하기에 적합한 제약학적 조성물은 활성 성분이 의도된 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 함유된 조성물을 포함한다. 더 구체적으로, 치료적 유효량은 치료중인 대상의 질환의 증상을 예방, 지연, 완화 또는 경감시키기에 효과적인 화합물의 양을 의미한다. 치료적 유효량의 결정은 당업자의 능력 범위 내이며, Goodman & Gilman, 9th ed, JG Hardman, A. Gilman, LE Limbird, Chapter I "Pharmacokinetics", pp 3-27에 따른다.

[0273] 따라서, 본 발명은 치료 또는 바람직하게는 진단 목적을 위해, 상기 개시된 키메라 단백질을 그대로 또는 바람직하게는 콘쥬게이트로서 그것을 필요로 하는 사람에게 투여하기 위한 방법을 더 포함한다.

[0274] 진단 목적의 경우, 본 발명의 제약학적 조성물은 투여 경로 및 진단 방법의 감도, 및 가장 적합한 기술에 의해 수행된 영상화에 따라, 적합한 용량으로 사전-투여될 수 있다.

[0275] 실험 부분

[0276] 실시예 1: FLAG를 가진 재조합 융합 단백질의 제조 및 발현

[0277] 다수의 DNA 구성물을 제조했다:

[0278] PSGL 변이체 1: 이 서열은 성숙한 PSGL-1 단백질의 아미노산 1-47, IgG1 힌지 영역, NRL의 로이신 지퍼, 글리신(G_4SG_4) 스페이서 및 친화성 인식을 위한 FLAG 서열을 암호화한다. 마우스 IgH 신호 펩타이드가 분비를 위해 사용되었다. 변이체 1 키메라 단백질은 아미노산 서열 SEQ ID NO:2를 가진다.

[0279] PSGL 변이체 2: 이것은 성숙한 PSGL-1 단백질의 아미노산 1-47, IgG1 힌지 영역, K->A 서열 치환을 가진 IgG1CH3 영역을 암호화한다. 마우스 IgH 신호 펩타이드가 분비를 위해 사용되었다. C-말단에 FLAG 서열(SEQ ID NO:35)이 정제 목적을 위해 사용되었다. 이 키메라 단백질은 SEQ ID NO:4를 가진다.

[0280] PSGL 변이체 3: 이것은 IgG1 힌지 영역에 공유 연결된 성숙한 PSGL-1 단백질의 아미노산 1-47, 성숙한 PSGL-1 단백질의 영역 275-290 및 확인 및 정제 목적을 위해 사용된 C-말단의 FLAG 서열(SEQ ID NO:35)을 암호화한다. 마우스 IgH 신호 펩타이드가 분비를 위해 사용되었다. 이 키메라 단백질은 SEQ ID NO:6을 가진다.

[0281] PSGL 변이체 4: 이것은 IgG1 힌지 영역에 공유 연결된 성숙한 PSGL-1 단백질의 아미노산 1-47 및 인간 IgG1 Fc 영역의 aa 1-15를 암호화한다. 마우스 IgH 신호 펩타이드가 분비를 위해 사용되었다. C-말단에 FLAG 서열(SEQ ID NO:35)이 정제 목적을 위해 사용되었다. 이 키메라 단백질은 SEQ ID NO:8을 가진다.

[0282] PSGL 변이체 5: 이것은 IgG1 힌지 영역에 공유 연결된 프로펩타이드 및 내인성 신호를 가진 PSGL-1 단백질(GI:2498904에 따른)의 아미노산 1-88 및 인간 IgG1 Fc 영역의 aa 1-15를 암호화한다. 친화성 인식을 위한 C-말단의 FLAG 서열(SEQ ID NO:35)이 정제 목적을 위해 사용되었다. 이 키메라 단백질은 SEQ ID NO:10을 가진다.

[0283] 소규모 일시적 형질주입

[0284] 부유배양 적응된 중국 햄스터 난소 셀라인, CHO-S(Freedom™, CHO-S™ 키트, GIBCO ThermoFisher Scientific)를 L-글루타민(Cellgro, Catalog# 61-030-RO, Lot# 61030158)으로 보충된 화학적으로 한정된 배지 CD-CHO(Invitrogen, Carlsbad CA, Catalog# 12490-025, Lot# 1149771)에서 37℃에서 가습된 5% CO_2 인큐베이터에서 제조자의 지시(2015년 7월)에 따라서 배양했다. 혈청이나 다른 동물-유래 제품은 이 CHO-S 세포를 배양하는 데 사용되지 않았다. 형질주입 24시간 전에 세포를 쉐이크 플라스크에 파종하고 혈청-무함유 화학적 한정 배지에서 성장시켰다. 변이체 1-5 발현 구성물(각 플라스미드 250μg)을 전기천공에 의해 0.05 리터 부유배양 CHO 세포에 일시적으로 형질주입했다. 간단히 말해서, 250 x 10^6 CHO 세포가 50% EP 버퍼 및 QC400 큐벳을 사용하

고 Maxcyte 전기천공장치를 사용하여 형질주입되었다. 수거 전 7일 동안 혈청-무함유 배지를 사용하여 세포를 성장시켰다.

[0285] 수거시 수행된 웨스턴 블롯은 PSGL-1 변이체의 상대적 발현을 증명했다. 비-환원 조건에서 컨디션드 배지 상에서 FLAG 택에 특이적인 웨스턴 블롯 분석은 단백질 다이머화를 확인했다. 컨디션드 배지에서 변이체 1은 환원 조건하에 ~22 kDa의 예상된 분자량을 나타냈다(도 1, 레인 2). 그것은 비-환원 조건하에 정확하게 다이머를 형성했다(도 1, 레인 7). 밴드 1-5에서 발견된 고분자량 밴드는 항-FLAG 항체(항-FLAG 항체, 단클론 마우스 IgG1, Sigma-Aldrich, catalog # F1804)에 비-특이적으로 결합된 분자일 가능성이 크다. 레인 3(변이체 2)의 경우, 더 낮은 분자량 밴드는 분해 산물일 수 있다. 컨디션드 배지 상의 웨스턴 블롯은 모든 변이체의 C-말단에 위치된 Flag 에피토프를 인식하는 항체를 가지고 수행되었으며, 따라서 배지에 분비된 키메라 단백질의 상이한 구성물들의 상대적 양을 표시한다.

[0286] FLAG를 가진 변이체의 정제

[0287] 이온 교환 및 항-FLAG 친화성 정제에 의해 정제를 수행했다. 5개 변이체 각각에 대해, 0.2μM에 의한 정화 후, 컨디션드 배지를 1M HCl을 첨가하여 pH 6으로 조정하고 증류수로 2배 부피로 만들었다. 다음에, CM을 1mL 음이온 교환 크로마토그래피 칼럼(Q 칼럼, GE) 위에 로딩하고 20mM TRIS pH 7.5, 1M HCl에서 용리했다. 용리 분획을 항-FLAG 친화성 M2 수지 0.5mL에 적용하고 5시간 동안 실온에서 진동시켰다. 수지를 TRIS 완충된 식염수 10mL로 세척했다. TRIS 완충된 식염수 중의 100 μg/mL FLAG 펩타이드의 5 칼럼 부피를 사용하여 단백질을 용리했다. PSGL 변이체 1의 경우, 관류액을 4℃에서 하룻밤 항-FLAG M2 수지와 함께 재인큐베이션하고, 0.25% 아세트산 pH 3.5를 사용하여 용리를 달성했다.

[0288] 정제된 PSGL 변이체 1-5의 은 염색 SDS-PAGE 및 OD_{220} 분석은 변이체 1이 5개 구성물 중 가장 높은 순도와 발현 수준을 가진다는 것을 시사한다.

[0289] 소 혈청 알부민의 연속 희석의 표준 곡선을 생성하고 이 곡선에 PSGL 변이체로부터의 데이터를 핏팅함으로써 계산된, OD_{220}에서의 단백질 농도가 아래 표 3에 제공된다.

표 3

[0290] 이온 교환 및 친화성 정제 후 단백질 변이체 1-5의 회수

	변이체 1	변이체 2	변이체 3	변이체 4	변이체 5
양(mg)	0.41	0.07	0.02	0.02	0.03

[0291] 5개 구성물 중 PSGL 변이체 1이 더 나은 수율을 가졌다: 다른 변이체와 비교된 적어도 하나의 log에 의한 가장 높은 발현 수준 및 결과의 순도. 환원 조건 및 비-환원 조건하에 은 염색 SDS-PAGE와 웨스턴 블롯은 모두 PSGL 변이체 1이 정확히 다이머화되었다는 것을 시사했다.실시예 2: 변이체 1A(FLAG가 없는)의 발현 및 정제

[0292] 다음에, 코어 2 베타-1,6-N-아세틸글루코사민일트랜스페라아제(C2GnT-M)를 암호화하는 DNA 서열, FTVII(푸코실-트랜스페라아제 VII)(Fugang Li., et al., J. Biol. Chem, 1996, 271:3255-3264) 및 FLAG 서열이 없는 SEQ ID NO:1의 aa 1-118을 포함하는 키메라 단백질을 공-발현하는, 안정한 CHO-S 세포 형질전환체를 Freedom™ CHO-S™ 키트 매뉴얼(Cat.N A13696-01 Lifescience Thermofisher Scientific, July 2015)에 따라서 생성했다.

[0293] CHO-S 클론을 OptiCHO™ 배지(다른 혈청-무함유 화학 한정 배지도 성공적으로 사용되었음, 예를 들어 ActiCHO™, CD FortiCHO™ 등)를 사용하여 선택 압력의 부재하에 적어도 7일 동안, 일반적으로 최대 14일 동안 성장시켰다. 글루타민(또는 유사체 GlutMax)을 1-10mM, 바람직하게 4-8mM를 보충했다. 6개의 안정한 CHO 클론의 풀로부터 상청액 100mL를 수집하고, 0.2μm PES 멤브레인에서 여과하고, 20mM TRIS-HCl pH 7.5로 미리 평형화된 강한 음이온 교환 CaptoQ 칼럼(GE 17-5316-02, 1.6 x 6cm, 12mL) 위에 로딩했다.

[0294] 결합된 단백질을 8 칼럼 부피에 걸쳐서 최대 1M NaCl의 선형 구배에서 용리했다. SDS-PAGE 분석에 의해 나타난 대로 표적 단백질을 함유한 용리된 분획은 두 번째 페닐 소수성 상호작용 크로마토그래피 정제 단계에서 사용되었다.

[0295] 칼럼을 1M NaOH로 세척한 다음 20% EtOH 중에 4℃에서 평형화하고 보관했다.

[0296] 모아진 분획에 NaCl을 4M의 농도로 용해했다. 다음에, 이 풀을, 소수성 상호작용 크로마토그래피에 대한 제조

자의 지시에 따라서, 20mM TRIS-HCl pH 7.5, 4M NaCl로 미리 평형화된 1mL HIC 칼럼(HiTrap 페닐 HP™, GE Healthcare Life Sciences, Catalog # 17-1351-01)에 로딩했다. 10 칼럼 부피에서 0까지 염화나트륨 농도를 선형 감소시켜 용리를 달성했다. SDS-PAGE 분석에 의해 나타난 대로 표적 단백질을 함유한 분획을 함께 모아 세 번째 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 단계에 사용했다. SEC 칼럼(HiLoad 16/600 Superdex 200™ pg, GE Healthcare Life Sciences, Catalog # 28-9893-35)을 20mM TRIS-HCl pH 7.5, 150mM NaCl로 미리 평형화하고, 이것을 이동상으로 사용했다. SDS-PAGE 분석에 의해 나타난 대로 키메라 PSGL 변이체 1을 함유한 분획을 모으고 농축했다(Amicon 초원심분리 필터 유닛, EMD Millipore).

[0297] SDS-PAGE에 대한 더 민감한 대용물로서, 웨스턴 블롯 분석을 지시 매뉴얼에 설명된 대로 Phast-System(GE)를 사용하여 수행했다. 니트로셀룰로오스 멤브레인을 PBS + 1% BSA로 포화시켰다(실온에서 1h). 이 멤브레인을 항-P-셀렉틴 당단백질 리간드-1 항체 1:1000(항-P-셀렉틴 당단백질 리간드-1 항체, 클론 KPL-1, EMD Millipore, cod. MAB4092)를 함유하는 PBS + 0.5% Triton X-100 + 1% BSA와 함께 실온에서 1시간 인큐베이션했다.

[0298] PBS + 0.5% Triton X-100로 3번 세척 후 멤브레인을 2차 항체로서 항-마우스 IgG-HRP와 함께 인큐베이션했다.

[0299] 3번 세척 후, HRP 신호가 ECL과 함께 발생했으며, 이는 양성 항-PSGL-1 항체 인식을 나타낸다.

[0300] 상이한 서브클론으로부터의 키메라 PSGL 변이체 1A는 대략 60 kDa에서 단일 밴드로서 출현했으며, 이것은 예상된 대로 환원 조건하에 약 30 kDa로 이동되었다. 정제된 생성물의 Coomassie 염색된 SDS-PAGE 겔에서는 추가의 밴드도 분해 산물도 보이지 않았다. 추가 서브클로닝, 배지 규모 성장 및 2L 배양 배지 규모 상의 정제를 위해 하나의 클론을 선택했다.

[0301] 실시예 3: 정제된 변이체 1A의 특성화

[0302] PSGL 변이체 1A 재조합 단백질은 황산화 및 N 및 O-글리코실화를 포함하는 상이한 번역 후 변형으로 인해 고도로 이종성이다. 그것의 완전한 특성화 및 정확한 정량을 위해, HPLC, MS 및 특정 효소에 의한 펩타이드 맵핑 과정을 포함하는 일련의 분석 방법이 사용되었다. 그것의 생물활성에 필수적인 PSGL 변이체 1A 구조 특징이 또한 주의깊게 모니터링되었다.

[0303] 3.1. UPLC-UV

[0304] 역상 크로마토그래피를 사용하여 표적 단백질 함량을 결정하고 가능한 불순물이나 분해 산물을 정량했다. 역상 크로마토그래피 실험을 위해, Acquity UPLC BEH300 칼럼(2.1 x 100mm, 1.7㎛)을 구배 모드에서 50℃에서 사용했다. 이동상은 (A) 0.1% TFA 수용액 및 (B) 아세토니트릴 중의 0.1% TFA였다. UV 검출을 216nm에서 수행했다. 전용 서브 2㎛ 칼럼과 조합된 UPLC 기술의 사용은 개선된 분해능, 더 높은 감도, 뛰어난 피크 모양 및 분석 시간의 현저한 감소를 허용했다. UPLC-UV 방법은 정제 과정에 의해 달성된 PSGL 변이체 1A 순도가 90%를 초과했음을 보여주었다.

[0305] 3.2. SEC-UV

[0306] 그것의 유효 크기 또는 모양(수력학적 반경)에 기초하여 단백질의 분리를 허용하는, UV 검출과 결합된 겔 투과 크로마토그래피(GPC)라고도 하는 크기 배제 크로마토그래피(SEC)가 사용되었다. 이 경우, 이 방법을 사용하여 가능한 응집체 및 다른 크기 변이체들을 측정했다. 크기 배제 크로마토그래피 실험을 위해, TSK 겔 수퍼 SW mAb HTP 4.6 x 150mm(Tosoh), 4㎛ 칼럼이 등용매 모드에서 30℃에서 사용되었다. 이동상은 50mM NaH_2PO_4, 50mM Na_2HPO_4, 100mM Na2SO_4였고, UV 검출은 216nm에서 수행되었다. 칼럼-외 밴드 브로드닝을 감소시키기에 최적화된 UPLC 기기의 사용은 높은 칼럼 효능 및 증가된 감도를 허용했다. 이 SEC-UV 방법을 PSGL 변이체 A-1의 분석에 적용했고, 응집은 관찰되지 않았다.

[0307] 3.3. 시알산 함량

[0308] 시알릴화는 생물의약 제품의 생체이용률, 안정성, 대사 및 면역원성에 대한 중요한 특징으로서 잘 알려져 있다. 이를 위해, 키메라 단백질 변이체 1A의 시알산 결정을 위한 HPLC MS 방법이 개발되었다.

[0309] 이 분석은 전기분무 이온화 탠덤 질량분광법(LC-MS/MS)과 접목된 유도체화가 없는 액체 크로마토그래피와 결합된 화학적 가수분해 방법의 조합에 기초했다. 시알산(N-아세틸 뉴라민산 NANA)은 온건한 산성 조건에서 산 가수분해에 의해 PSGL 변이체 1A로부터 먼저 방출되었다. 일단 시알산이 방출되었다면, LC-MS/MS 방법을 사용하여 그것의 정량을 수행했다. 샘플에서의 반응과 기준 표준 캘리브레이션 곡선을 비교하여 시알산 양을 결정했다. 다른 CHO 서브클론으로부터 정제된 단백질로 수행된 실험에서, 시알릴화는 전형적으로 9.6 내지 17.9% w/w

인 것으로 판명되었다.

[0310] 3.4. MALDI-TOF-MS

[0311] 또한, PSGL 변이체 1A 분자량을 결정하기 위해 비행 질량분광법의 바탕질 보조 레이저 탈착 이온화-시간(MALDI-TOF-MS) 분석을 수행했다. 이 기술은 바탕질과 샘플을 혼합하는 단계를 수반하고, 이것은 다음에 플레이트나 프로브 위에 코팅되며, 시준 촛점 레이저 빔에 노출되어 이온화 및 탈착이 일어난다. MALDI는 높은 감도 및 적은 단편화와 함께 큰 질량 이온을 생성한다는 이점을 가진다. MALDI-TOF 실험을 무손상 및 환원된 형태하의, PSGL 변이체 1A에 대해 수행했다. MALDI 실험에 의해 결정된 대로, PSGL 변이체 1A의 평균 분자량은 35.4 kDa 부근에서 측정되었다. DTT에 의한 환원은 PSGL 변이체 1A 질량의 2배 감소를 가져왔으며, 이는 정제된 단백질의 다이머 성질을 나타낸다.

[0312] 3.5. 펩타이드 맵핑(효소 분해)

[0313] 황산화 및 N- 및 O-글리코실화를 포함하는 키메라 당단백질의 번역 후 변형(PTM)을 설명하기 위해 펩타이드 맵핑(PMAP)을 사용했다. 이를 위해, 키모트립신 및 Asp-N을 단백질 분해를 위해 적용했고, 이어서 LC-MS 액체 크로마토그래피-질량분광법을 수행했다.

[0314] 3.5.1. 키모트립신에 의한 단편화

[0315] 제조자에 의해 제공된 프로토콜에 따라서 키모트립신 단편화를 수행했다(키모트립신 엔도프로테이나아제 MS 등급, Cat.N. 90056, Thermo Scientific). 건조 키모트립신의 1개 바이알을 HCl 0.1M 25㎕에서 복원하고 -18℃에 보관한 뒤 500㎕ 에펜드로프 튜브에서 2㎕ 알리쿼트로서 사용했다. 분해 버퍼를 제조하기 위해, 100mM Tris-HCl pH 8, 10mM $CaCl_2$, 3.03g Tris Base(M 121.4 g/mol) 및 368mg $CaCl_2$(M 147.02 g/mol)를 물에 용해했다. 1.2M HCl을 사용하여 pH를 8.0으로 조정하고 부피를 250mL로 맞춰 완성했다.

[0316] PSGL-1 변이체 1A 스톡 용액(0.5-1.0 mg/mL) 50㎕를 키모트립신 2㎕와 분해 버퍼 48㎕에 첨가했다. LC-MS에 주사하기 전에 이 용액을 37℃에서 18시간 동안 인큐베이션했다.

[0317] 3.5.2. 엔도프로테이나아제 Asp-N에 의한 단편화

[0318] 제조자(Asp N 서열화 등급 Roche, Cat. N. 11054589001)에 의해 제공된 프로토콜에 따라서 엔도프로테이나아제 Asp-N 단편화를 수행했다. 건조 Asp-N의 1개 바이알을 물 50㎕에서 복원하고 -18℃에 보관한 뒤 500㎕ 에펜드로프 튜브에서 5㎕ 알리쿼트로서 사용했다. 분해 버퍼를 제조하기 위해, 50mM 소듐 포스페이트, 1.5g Na_2HPO_4(M 119.98 g/mol)를 물에 용해했다. 1M NaOH을 사용하여 pH를 8.0으로 조정하고 부피를 250mL로 맞춰 완성했다.

[0319] PSGL-1 변이체 1A 스톡 용액(0.5-1.0 mg/mL) 10㎕를 키모트립신 2㎕와 분해 버퍼 35㎕에 첨가했다. LC-MS에 주사하기 전에 이 용액을 37℃에서 18시간 동안 인큐베이션했다.

[0320] Asp-N 및 키모트립신 분해물의 특성화를 위해 유사한 LC-MS 분석을 사용했다. 온도 제어 샘플 매니저, 2-원 용매 매니저 및 가열된 칼럼 구획으로 구성된 Waters Acquity® UPLC 시스템을 사용하여 이들 실험을 수행했다. 칼럼 출구를 질량분광기에 직접 연결했다. 분석 칼럼은 40℃에서 Poroshell® 120 EC-C18 2.1 x 150mm 내경, 입자 크기 2.7㎛, Agilent®였다. 칼럼으로부터 화합물의 용리는0.1% TFA를 첨가한 초순수 및 0.1% TFA를 첨가한 아세토니트릴로 구성된 이동상을 사용하여 구배 모드에서 수행되었다. 유속 및 주사 부피는 0.3 mL/min 및 10㎕로 설정했다. 검출은 화합물에 따라서 양성 및 음성 이온화 모드에서 작동하는 전기분무 이온화 공급원이 장착된 Waters Xevo TQ-S 탠덤 쿼드로폴 질량분광기에서 수행되었다. 질소 및 아르곤을 각각 분무 및 충돌 기체로서 사용했다. 분석은 스캔 모드에서 수행했다. 데이터 획득 및 가공은 MassLynx 소프트웨어 패키지의 도움을 받아 수행했다. 상기 분석은 모두 다음의 결론을 허용했다:

[0321] - PSGL-1 변이체 1A 당단백질의 N-말단 구조는 피로글루탐산 형태 pQATEYEYL가 우세하다.

[0322] - PSGL 변이체 1A의 다이머 성격은 $(^{50}TCPPCPL^{56})_2$ 서열의 속성인 $(M+2H)^{+2}$ = 728.5의 존재에 의해 확인되었다. 이 펩타이드의 모노머 형태에 상응하는 이온은 검출되지 않았으며, 이는 PSGL 변이체 1A가 완전히 다이머 형태임을 시사한다.

[0323] - Thr^{16} 상의 O-글리칸 잔기의 구조가 확인되었다: 실제로, 예상된 시알릴-루이스-X 모티프,

N-아세틸갈락토사민, N-아세틸글루코사민, 갈락토오스, 푸코오스 및 시알산을 포함하는 코어 2 구조가 확인되었다.

[0324] - 티로신 5, 7 및 10의 황산화가 음성 스캔 모드에서 질량분광법에 의해 또한 증명되었다.

[0325] 번역 후 변형(PTM)의 대부분이 SEQ ID NO:38에서 보고되었다.

[0326] 실시예 4: 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의한 P-셀렉틴 상에서의 친화성 결합

[0327] WO 2012/020030의 실시예 2에 설명된 정제된 단백질 Fr1 및 상기 실시예 2에 설명된 변이체 1A를 가지고 실험을 수행했다. PSGL 변이체 1A의 결합 강도를 GE Healthcare Bio-Sciences AB(General Electric, Piscataway, 뉴저지)의 Biacore X100을 사용하여 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 평가했다. SPR 기술은 생물분자들 간 결합 과정을 실시간으로 표지 없이 모니터링할 수 있다. P-셀렉틴(표적 리간드)이 센서 칩 표면에 부착되었고, 미소유동 시스템을 사용하여 관심의 단백질을 표면 위에 용액 상태로 유동시켜 재생가능한 샘플 송달 및 적은 샘플 소비를 보장했다. SPR은 칩 표면에서 질량의 변화로서 결합 사건을 검출한다. 결과적으로, 시간에 대해 SPR 반응을 플롯팅함으로써 센서그램이 생성된다.

[0328] 먼저, P-셀렉틴/Fc(R&D Systems Europe Ltd)의 바이오틴화를 사내 수행했다. 다음에, SA 칩(스트렙타비딘 칩, GE Healthcare Bio-Sciences0의 작동 센서(Fc2) 상에 P-셀렉틴/Fc의 고정을 다음과 같이 수행했다: 10x HBS-N 버퍼(GE Healthcare Bio-Sciences AB)(50mL) 1 부피를 Milli-Q 물(450mL) 9 부피로 희석했다. $CaCl_2$ 1.5M(Fluka)(pH 약 5.6) 500μL를 희석된 버퍼(1.5mM 최종)에 첨가하고 0.2μm PES 필터를 통해서 여과했다. 50mL 팔콘 튜브에서 48.75mL HBS-N, $CaCl_2$ 1.5mM 버퍼 및 1.250mL 계면활성제 P20(GE Healthcare Bio-Sciences AB)로 러닝 버퍼를 제조했다. 바로 사용되지 않은 HBS-N 버퍼 및 $CaCl_2$ 1.5mM은 4℃에 보관했다.

[0329] 시험하는 각 샘플을 러닝 버퍼에 희석하여 125nM의 지시된 농도를 달성했다. 기준 센서(Fc1) 및 Fc2에서 30 μL/min의 유속으로 수동 회차를 시작했다. 기준 감법 2-1이 선택되었다. 베이스라인이 안정되는 대로 분석물질을 30초 동안 또는 결합 평형에 도달하지 않는다면 그 이상 동안 주사했다. 상이한 분석물질 또는 동일한 분석물질의 상이한 농도의 결합을 직접 비교하기 위해, 각 샘플에 대해 동일한 사이클 변수를 프로그래밍하는 것이 필요했으며, 예를 들어 다음과 같았다:

[0330] - 대기 120초

[0331] - 주사 30초

[0332] - 대기 300초

[0333] 수동 회차가 완료되었을 때, Biacore X100 평가 소프트웨어 버전 1.0을 열고 각 사이클의 오버레이를 생성했다. 이 SPR 실험에 기초하여, P-셀렉틴을 향한 결합 친화성을 측정했으며, 키메라 단백질과 표적의 결합 강도는 Fr1 결합과 동등하거나 또는 그보다 좋은 것으로 판명되었다. 도 2는 Biacore 회차의 결과를 도시하며, 여기서 본 발명의 키메라 단백질(해치선)은 Fr-1에 비하여 P-셀렉틴 리간드에 대한 개선된 결합을 나타냈다.

[0334] 또한, SPR은 Chou T-H., et al., Cytokine 51, 2010, 107-111에 설명된 방법에 따라서 세포 상청액에서 변이체 1A 적정에도 사용되었다. 센서 칩을 스트렙타비딘 및 Bracco에서 바이오틴화된 마우스 α-PSGL-1 항체와 함께 오버레이하고, 이것을 사용하여 상청액에서 변이체 1A를 정량했다.

[0335] 실시예 5: 인지질 콘쥬게이션을 위한 변이체 1A-SMCC의 제조

[0336] 이 과정은 WO 2012/020030의 실시예 9에 따라서 수행되었다. 간단히 말해서, 실시예 2로부터의 변이체 1(65nmole)을 1mM EDTA를 첨가한 포스페이트 버퍼 0.2M pH 7.5 1mL에 용해했다. Sulfo-SMCC(Sulfo-SMCC: 설포석신이미딜 4-[N-말레이미도메틸]사이클로헥산-1-카복실레이트)(Pierce)의 용액(55 mg/mL - 125mM)을 무수 다이메틸설폭사이드(DMSO, Fluka)에서 제조했고, 이 용액 52μL를 변이체 1 용액에 첨가했다. 용액을 45' 동안 실온에서 인큐베이션했다. 다음에, 이 용액을 포스페이트 버퍼 20mM pH 6으로 평형화된 스핀-칼럼(Zeba 스핀-칼럼 5mL, Pierce #89890)을 통해서 회전시켰다. 이소프로판올을 용액에 첨가하여 35% 이소프로판올을 함유하는 용액을 얻었다.

[0337] 실시예 6: 콘쥬게이트 DSPE-PEG-SH의 제조

[0338] WO 2012/020030의 실시예 10에 따라서 DSPE-PEG2000-PDP(1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[3-(2-피리딜다이티오)프로피오네이트(폴리에틸렌 글리콜)-2000]암모늄 염)으로부터 DSPE-PEG2000-SH(DSPE:

PEG2000으로 변형된 다이스테아로일 포스파티딜-에탄올아민)를 제조했다. DSPE-PEG2000-SH의 최종 용액을 이소프로판올로 희석하여 35% 이소프로판올을 함유하는 용액을 얻었다.

[0339] 실시예 7: DSPE-PEG-SH/변이체 1A-SMCC 콘쥬게이트의 제조

[0340] 실시예 5에서 얻어진 변이체 1A-SMCC(65nmole) 용액 1.7mL를 실시예 6에서 얻어진 DSPE-PEG2000-SH의 용액(325nmole - 5 당량)에 첨가했다. 이 용액을 교반하면서(회전 휠) 실온에서 3시간 동안 인큐베이션했다.

[0341] 다음에, 용액을 ANX Sepharose 겔(GE Healthcare)을 가진 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제했다. 정제된 변이체 1 콘쥬게이트를 함유하는 용액을 TRIS 버퍼 20mM pH 7.5로 평형화된 스핀-칼럼(Zeba 스핀-칼럼 10mL, Pierce #89893)을 통해서 회전시켰다.

[0342] 실시예 8: 실시예 7의 콘쥬게이트를 사용한 미세소포의 제조

[0343] DSPC(DSPC: 다이스테아로일포스파티딜콜린)과 팔미트산(80/20 몰비)의 혼합물 10mg을 70℃에서 사이클로옥탄(0.8mL)에 용해했다. 별도로, 실시예 7에 따라서 제조된 DSPE-PEG-SH/변이체 1-SMCC 콘쥬게이트 용액(28nmole - 1.3mL)을 증류수 중의 PEG4000 10% 용액 8.7mL에 첨가했다. DPPE-PEG5000(DPPE: 디팔미토일포스파티딜에탄올아민)의 용액(물 85μL 중에 0.85)을 이 수성상에 첨가했다.

[0344] 상기 제조된 유기상과 수성상을 고속 균질화기(Polytron PT3000)를 사용해서 혼합하여 에멀젼을 얻었다. 결과의 에멀젼을 60℃에서 1시간 동인 교반하면서 가열한 다음 실온으로(약 22℃) 냉각시켰다.

[0345] 얻어진 에멀젼을 증류수 중의 PEG4000 10% 용액으로 2배 희석하고 DIN8R 바이알(0.5mL 에멀젼/바이알)에 샘플링했다. 바이알을 1시간 동안 -50℃에서 냉동한 다음(Lyobeta 35 동결건조기 - TELSTAR), -20℃ 및 0.2 mbar에서 12시간 동안 동결건조했다. 다음에, 동결건조된 생성물을 퍼플루오로-n-부탄과 질소(35/65 v/v) 혼합물의 분위기에 노출하고 바이알을 밀봉했다. 이 생성물을 부드럽게 손으로 혼합하여 식염수 150mM(1 mL/바이알) 부피에 분산시켰다.

[0346] 실시예 9: 유동-챔버 셋팅에서 표적화된 미세소포의 시험관내 결합 활성

[0347] 효과적인 결합을 시험하기 위해, WO 2012/020030(실시예 6)에 설명된 대로 제조된 표적화된 미세소포와 본 발명(실시예 8)에 따라서 제조된 것들을 4μg/mL으로 마우스 Fc P-셀렉틴(카탈록 No. 737-PS, R&D Systems, Minneapolis, 미국 미네아폴리스) 또는 인간 Fc P 및 E 셀렉틴(R&D 카탈록 No. 137-PS 50 및 724 ES 100)의 코팅을 포함하는 유동 챔버 셋업에 주사했다. 미세소포($80x10^6$/400μL TBS++의 등가로)를 볼루스 방식으로 유동 챔버(FCS2, Bioptech, 미국)를 통해 주사하고, 마우스 P-셀렉틴(또는 인간 P 또는 E-셀렉틴) 코팅층 위의 유착을 TBS 중의 50%(v:v) 인간 혈장(Stehelin & Cie AG)의 존재하에 10 mL/min의 유속($714\ s^{-1}$의 전단 속도)에서 10분의 기간에 걸쳐서 평가했다. 영상 가공 프로그램 Analysis FIVE(SIS, 독일)을 사용하여, 총 10분에 걸쳐서 2분 간격으로 관찰된 영역에서 유착한 미세소포의 수를 계수하여 미세소포 축적의 정량 분석을 수행했다. 10분 후, 5개의 사진을 무작위로 찍고 결합된 미세소포의 수를 측정하고 10분째 결합된 거품의 수(NBB)로서 표시했다. 각 관찰된 영역은 스테이지 마이크로미터의 도움을 받아 측정했을 때 183 x 137μm였다. 측정은 챔버 중간과 출구에서 수행했다.

[0348] 유사하게, 실시예 8에 따라서 제조된 표적화된 미세소포(표적화 리간드로서 변이체 1A)의 현탁액을 상기 설명된 대로 유동 챔버에 주사하고, 상기 과정에 따라서 이들의 결합 활성을 결정했다.

[0349] 상기와 동일한 농도(4 μg/ml)의 인간 E-셀렉틴 및 마우스 P-셀렉틴의 코팅에 대해 이 실험을 반복했다. 결과는 표 4에 나타낸다.

표 4

[0350] 10분째에 결합된 미세소포의 수(NBM 10분)

	NBM 10분		
제조물	마우스 P 셀렉틴	인간 E 셀렉틴	인간 P 셀렉틴
미세기포 Fr-1	74.30 ± 4.27	54.1 ± 7.23	77.0 ± 4.83
미세기포 변이체 1A	73.60 ± 5.87	53.00 ± 4.37	65.40 ± 4.93

[0351] 상기 결과로부터 유추되는 바, 새로 제조된 MB-PSGL-1 변이체 1A의 결합 거동은 Fr-1을 지닌 미세기포와 유사하

다: 이들은 혈장에서 응집이 없는 확실한 결합을 나타내며 인간 및 마우스 P-셀렉틴뿐만 아니라 인간 E-셀렉틴에도 결합한다.

[0352] 실시예 10: 단편 1(비교용) 및 변이체 1A를 가진 미세소포의 생체내 실험

[0353] 실시예 8에 따라서 제조된 변이체 1A를 가진 미세소포 및 WO 2012/020030, 실시예 6에 따라서 제조된 단편 1(Fr-1)을 지닌 미세소포를 염증 래트 모델에서 비교했다. 리포다당(LPS, 0.26:B6 Sigma L-8274, 2.1 mg/kg)의 주사에 의해 래트 뒷다리에 염증을 유도했다. 염증 과정 유도 24시간 후, 초음파 대비 영상화에 의해 표적화된 미세소포의 효과적인 결합을 평가했다. 대비 모드에서 작동하는 9L 선형 변환기(투과 주파수, 4.0 MHz(Res); 동적 범위, 48 dB; 깊이, 20mm; 시간-이득 보상(TGC), 선형)가 장착된 Logiq E9 초음파 스캐너(General Electric Healthcare, Fairfield, 미국 코네티컷)를 사용하여 대비 강화 초음파 영상화를 수행했다. 30초 동안 낮은 기계지수(MI = 0.06)에서 매 초마다 하나의 영상을 기록했고, 이어서 최대 10분 15초마다 하나의 영상을 기록했다. 단일 용량 주사 10분 후, 4 Hz의 프레임 속도에서 10초 동안 대비 강화 신호를 획득했다. 대비 강화 영상을 Dicom 파일로서 기록하고 사내 개발된 전용 소프트웨어(VueBox, Bracco Suisse SA, 스위스 제네바)를 사용하여 분석했다. 이 소프트웨어는 픽셀 수준에서 로그 압축 비디오 시퀀스의 선형화 후 에코그래픽 신호의 정량적 분석을 허용하고, 관심 영역(AOI) 내에서 대비된 에코-파워 진폭(임의의 단위로서 표시, A.U.)을 제공한다. Bracco에서 개발된 소프트웨어(VueBox 상업용 키트)에 통합된 결합된 버블을 검출하는 것을 돕는 픽스드 버블 이미징(FBI) 알고리즘이 10분에 기록된 프레임에 적용되었다. FBI 과정은 윈도위 길이(40 프레임)에 의존하는 영상들의 하위셋에 적용된 최소 강도 투시 기능에 의존한다. 결과의 영상(도 3)은 변이체 1A를 지닌 미세기포가 래트의 염증성 발에서 염증을 시각화할 수 있다는 것과 관찰된 신호는 Fr-1을 지닌 미세기포에서 관찰된 것과 매우 유사하다는 것을 보여주었다.

[0354] 실시예 11: 실시예 7의 콘쥬게이트를 사용한 형광 리포솜의 제조

[0355] 콜레스테롤(28.25mg - Merck #3672)을 클로로폼 1mL에 용해했다. DSPE-PEG 2000(13.9mg - Genzyme #LP-R4-039)을 클로로폼 1mL에 용해했다. DiR(1,1'-다이옥타데실-3,3,3',3'-테트라메틸인도트라이카보시아닌 아이오다이드 - 분자 프로브 #D12731)을 에탄올에 용해하여 10 mg/mL 용액을 얻었다.

[0356] DSPC(79.7mg - 101μmole - Genzyme #LP-04-013)을 100mL-라운드 벌룬에서 칭량하고 클로로포름/메탄올 혼합물(2/1 v/v) 30mL에 용해했다. 콜레스테롤 용액(575μL - 42μmole), DSPEPEG2000 용액(290μL - 1.5μmole) 및 DiR 용액(100μL - 1μmole) 의 샘플을 DSPC 용액에 첨가했다. 얻어진 용액을 10분간 65℃에서 교반하고 감압하에 용매를 제거하여 지질 블렌드를 얻었다. 이 블렌드를 20 mmHg에서 65℃에서 건조시킨 다음 0.2 mBar에서 25℃에서 하룻밤 건조시켰다.

[0357] 건조된 지질 블렌드를 20분간 교반하면서(rotavapor) 70℃에서 20mM TRIS 버퍼(pH 7.4) 10mL에 재분산시켰다. 다음에, 얻어진 현탁액을 70℃에서 Nuclepore 필터(1 x 1μm , 1 x 0.6μm 및 4 x 0.4μm) 상에서 몇 번 압출했다. 이 압출 단계는 다양한 리포솜 크기를 얻을 수 있도록 개조될 수 있었다. 다음에, 리포솜 현탁액을 실온으로 냉각하고 암소에서 4℃에서 보관했다.

[0358] 변이체 콘쥬게이트의 통합은 후삽입(postinsertion) 과정에 의해 수행되었다. 간단히 말해서, 리포솜 현탁액 500μL를 암소에서 16시간 동안 실온에서 실시예 7에서 제조된 변이체 1A 콘쥬게이트 용액 1mL(22nmole)와 혼합했다. 얻어진 리포솜 현탁액은 정제 없이 생체내 실험을 위해 사용되었다.

[0359] 변이체 1A 콘쥬게이트를 Fr-1 콘쥬게이트(WO 2012/020030, 실시예 6에 설명된 대로 제조된)로 대체하고 상기 설명된 동일한 과정을 사용하여 Fr-1 리포솜이 얻어졌다. 이 두 리포솜 현탁액의 특징이 표 6에 비교되었다.

[0360] 리포솜의 크기 및 제타 전위를 Nanosizer ZetaZSP(Malvern instruments)를 사용하여 결정했다. 시알산 결정(실시예 3.3에 따라서)에 의해 리포솜 세척(원심분리 20000g/30분) 후 리포솜 당 리간드의 밀도를 결정했다.

표 5

[0361] 대조군, 변이체 1A 및 Fr-1 리포솜의 특징

리포솜	크기(nm)	제타 전위(mV)	리간드 분자/리포솜
후삽입 없음	268	-6.4	-
변이체 1A 콘쥬게이트 후삽입	278	-39.1	780
Fr-1 콘쥬게이트 후삽입	291	-34.7	700

[0362] 실시예 12: 마우스 LPS 모델에서 단편 1(비교용) 및 변이체 1A를 가진 리포솜을 사용한 광학 영상화 실험뒷다리 염증이 있는 두 그룹의 동물에서 변이체 1A를 지닌 리포솜을 단편 1을 지닌 리포솜과 비교했다. 리포다당(LPS, 0.26:B6 Sigma L-8274)의 근육내 주사에 의해 마우스 뒷다리에 염증을 유도했다. 전임상 Fluobeam 700 시스템을 사용하여 광학 영상화를 수행했다. 광학 헤드를 동물 위에 위치시키고 동물의 뒷다리를 카메라 시야의 중앙에 위치시켰다(마우스와 카메라 사이의 거리 15cm). 염증 과정 유도 24시간 후, 표적화된 리포솜을 주사하고 형광 신호를 경시적으로 추적했다(최대 24h). 주사 및 초기 단계를 16분(고정된 노출 시간으로) 동안 5초마다 하나의 영상으로서 순서대로 기록했고, 이후 20, 30, 45분, 1, 2, 및 4시간에 개별 영상을 기록했다. Image J 소프트웨어를 사용하여 영상을 분석했다. 모든 캡처 프레임에서 동일한 관심 영역(AOI)을 추출하여 염증성 발 및 대측성 발의 윤곽을 드러냈다. 밀리세컨드 당 평균 형광 강도를 각 영상의 AOI에서 계산했다. 형광 영상이도 4에 도시되며, 비율(대측성 발로 나눠진 염증성 발)로서 표시된 정량 결과가 표 7에 제시된다. 변이체 1A-리포솜-DIR 주사 2시간 후 기록된 형광 영상은 대측성 발에서의 신호와 비교하여 염증성 발에서 더 높은 신호를 나타냈다. 동물 3의 경우, 염증성 발에서 관찰된 신호기 낮은데, 아마도 이 마우스에서 LPS에 의해 유도된 낮은 염증으로 인한 것일 수 있다. 반면, 동물 6은 높은 염증을 표시하는 높은 신호를 나타낸다. 계산된 염증성 발/대측성 발 비율은 단편-1(Fr-1)과 비교하여 변이체 1A에 대해 더 높으며, 이는 제제의 우수한 특이성을 나타낸다.

표 6

[0363] 변이체 1A-리포솜-DIR 또는 Fr-1-리포솜-DIR 주사 2시간 후, LPS 염증 마우스 모델에서 염증성 발 대 대측성 발 비율

	염증성/대측성 발 비율(2h)		
마우스 N.	**변이체 1A**	**마우스 N.**	**Fr-1**
1	13.2	7	4.3
2	23.0	8	6.0
3	3.9	9	3.5
4	18.0	10	4.1
5	6.6	11	4.7
6	12.8	12	5.3
평균	**12.9**		4.7
S.D.	5.4		7.9

[0364] 실시예 13: HA 크로마토그래피(음성 또는 양성)에 의한 정제 조건의 최적화*AE/HI 및 HA에 의한 정제(음성)*

[0365] 컨디션드 배지 600mL를 0.22μm 멤브레인에서 여과하고 20mM TRIS pH 7.5로 평형화된 AEX 칼럼(Capto Q™, GE, 2.6 x 7cm, 37mL)에 로딩했다. 결합된 단백질을 20mM TRIS, 1M NaCl, pH 7.5 30% 및 100%의 2-단계 용리에 의해 용리했다. 표적 단백질은 100% 분획에 용리되었다. 칼럼을 1M NaOH로 세척하고 20% EtOH 중에 4℃에서 보관했다. 컨디션드 배지의 전도도는 10 mS/cm 아래였다.

[0366] AEX 정제의 100% 용리 단계로부터의 풀에 고체 NaCl을 4M의 최종 농도로 첨가했다. 칼럼에 오버로드되지 않도록 샘플을 두 부분으로 나누었다. 다음에, 그것을 20mM TRIS, 4M NaCl, pH 7.5로 미리 평형화된 소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼(페닐 Sepharose™, GE, 1.6 x 9cm, 18mL 부피)에 로딩했다. 결합된 단백질을 20mM TRIS pH 7.5 50% 및 100%의 2-단계로 용리했다. 표적 단백질은 50% 분획에 용리되었다.

[0367] 두 번째 회차 후, 칼럼을 0.2M NaOH로 세척하고 20% EtOH 중에 4℃에서 보관했다.

[0368] 두 번의 HIC 회차 중 일차 용리 단계로부터의 풀을 합치고 각각 500mM 포스페이트 pH 6.8 및 1M $CaCl_2$의 첨가에 의해 포스페이트/$CaCl_2$ 농도를 10 및 0.3mM로 조정했다. 다음에, 이 풀을 Amicon™ 한외여과 교반 셀(Merck, 멤브레인 YM10과 함께 조립, 10 kDa 공칭 분자량 컷오프)에서 10mM 포스페이트, 0.3mM $CaCl_2$, pH 6.8에 대해 정용여과했다.

[0369] 다음에, 정용여과된 풀을 10mM 포스페이트, 0.3mM $CaCl_2$, pH 6.8로 미리 평형화된 하이드록시아파타이트 칼럼(BioRad, 2.2 x 5cm, 19mL 부피) 위에 로딩했다. PSGL 변이체 1A는 FT 분획에 용리되었다(음성 크로마토그래

피). FT 분획을 제조자의 지시에 따라서 Amicon™ 원심분리 필터 유닛에서 농축했다. 정제된 단백질을 -40℃에서 냉동했다. 최종 농도는 0.89mg/mL, 전체 수율은 38.7mg(73%), 순도는 99.7%였다(도 5). 각각 DNA 정량 분석(DNA 정량 키트, 형광 분석, Sigma, 검출 한계 2 mg/L) 및 RP-HPLC(다른 단백질에 대한 순도)에 의해, 각 크로마토그래피 단계 후 잔류 DNA 및 단백질 오염물을 측정했다.

표 7

[0370] 3-단계 크로마토그래피 후 순도 및 잔류 DNA 함량

정제 단계	**PSGL 변이체 1A RP-HPLC에 의한 순도**	**잔류 DNA 함량**
음이온 교환(AE)	<58%	97%
소수성 상호작용(HI)	72.6%	2%
하이드록시아파타이트(HA)	99.3%	검출 한계 아래

[0371] *AE/HI 및 HA에 의한 정제(양성)*컨디션드 배지 1000mL를 0.22μm 멤브레인에서 여과하고 20mM TRIS pH 7.5로 평형화된 AE 칼럼(Capto Q™, GE, 2.6 x 7cm, 37mL)에 로딩했다. 결합된 단백질을 20mM TRIS, 1M NaCl, pH 7.5 30% 및 100%의 2-단계 용리에 의해 용리했다. 표적 단백질은 100% 분획에 용리되었다. 칼럼을 1M NaOH로 세척하고 20% EtOH 중에 4℃에서 보관했다.

[0372] AE 정제의 100% 용리 단계로부터의 풀에 고체 NaCl을 4M의 최종 농도로 첨가했다. 칼럼에 오버로드되지 않도록 샘플을 두 부분으로 나누었다. 다음에, 그것을 20mM TRIS, 4M NaCl, pH 7.5로 미리 평형화된 소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼(페닐 Sepharose™, GE, 1.6 x 9cm, 18mL 부피)에 로딩했다. 결합된 단백질을 20mM TRIS pH 7.5 50% 및 100%의 2-단계로 용리했다. 표적 단백질은 50% 분획에 용리되었다.

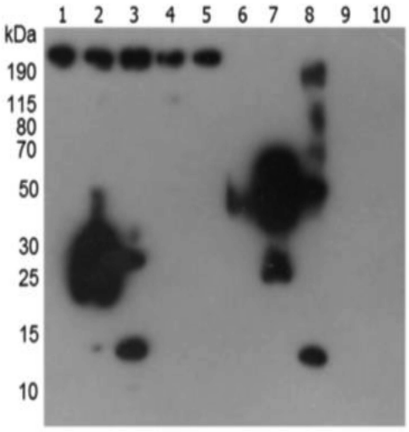
[0373] 세 번째 회차 후, 칼럼을 0.2M NaOH로 세척하고 20% EtOH 중에 4℃에서 보관했다.

[0374] 각 HIC 회차의 일차 용리 단계로부터의 풀을 합치고 물로 4배 희석했다. 다음에, 희석된 풀을 5mM 포스페이트, 1mM $MgCl_2$, pH 6.8로 미리 평형화된 하이드록시아파타이트 칼럼(BioRad, 2.2 x 5cm, 19mL 부피) 위에 로딩했다. 결합된 단백질을 500mM 포스페이트 버퍼 0-12.5% 구배로 용리했다. PSGL 변이체 1A는 첫 번째 피크로서 용리되었다.

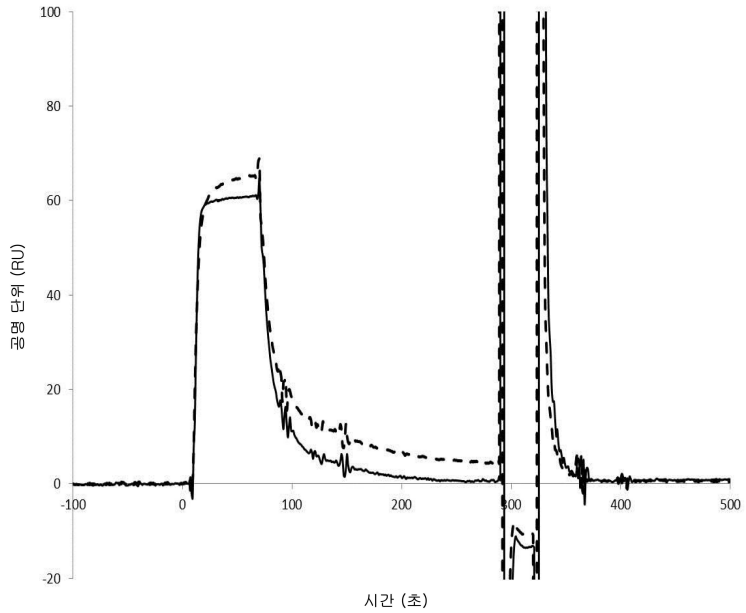
[0375] 표적 단백질을 함유하는 분획을 제조자의 지시에 따라서 Amicon 원심분리 필터 유닛(Ultracel-10 멤브레인, 10 kDa MWCO)에서 농축했다. 정제된 단백질을 -40℃에서 냉동했다. 최종 농도는 1.09mg/mL, 전체 수율은 25mg였고, 이것은 총 표적 단백질 함량의 약 70%와 98.7%의 순도에 상응한다.

도면

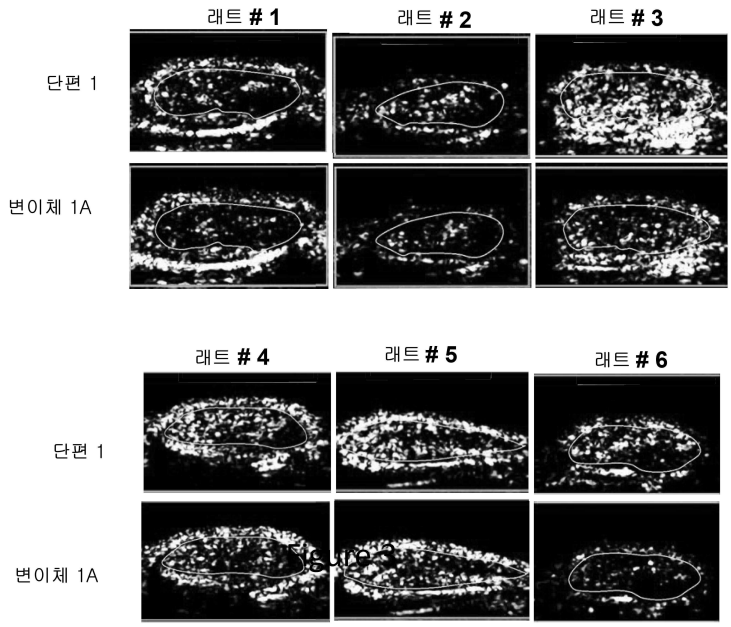
도면1



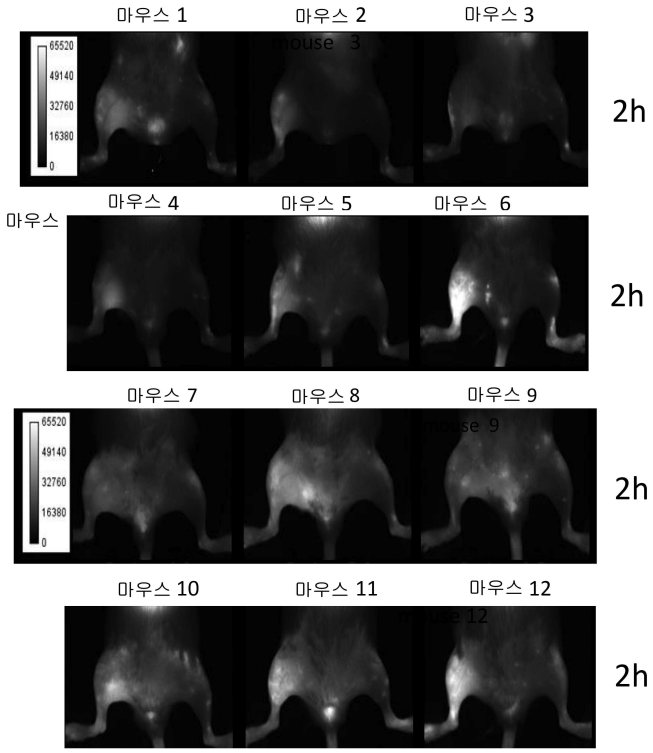
도면2


100
80
60
40
20
0
-20
공명 단위 (RU)
-100
0
100
200
300
400
500
시간 (초)

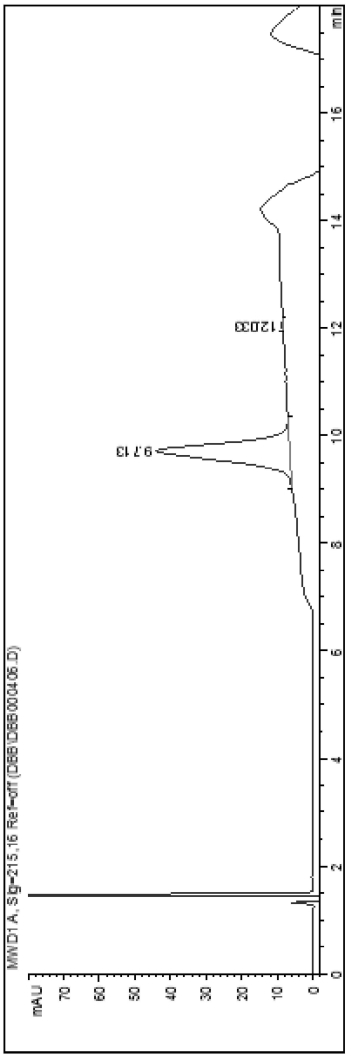
도면3


래트 # 1
래트 # 2
래트 # 3
단편 1
변이체 1A
래트 # 4
래트 # 5
래트 # 6
단편 1
변이체 1A

도면4


마우스 1
마우스 2
마우스 3
65520
49140
32760
16380
0
2h
마우스 4
마우스 5
마우스 6
마우스
2h
마우스 7
마우스 8
마우스 9
65520
49140
32760
16380
0
2h
마우스 10
마우스 11
마우스 12
2h

도면5



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bracco Suisse SA

<120> A RECOMBINANT CHIMERIC PROTEIN FOR SELECTINS TARGETING

<130> B0686

<150> EP16154868.0

<151> 2016-02-09

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein CDS

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<223> variant 1

<400> 1

atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ttc ctg tca gta acg act ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

gtc cac tcc cag gcc acc gaa tat gag tac cta gat tat gat ttc ctg 96

Val His Ser Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu

20 25 30

cca gaa acg gag cct cca gaa atg ctg agg aac agc act gac acc act 144

Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr

35 40 45

cct ctg act ggg cct gga acc cct gag tct acc act gtg gag cct gct 192

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

50 55 60

gcg cgg ccg cac aca tgc cca ccg tgc cca ctg cag cag aga aga ggc 240

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

65 70 75 80

ctg gaa gcc gag aga gcc aga ctg gcc gct cag ctg gat gcc ctg aga 288

Leu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Leu Ala Ala Gln Leu Asp Ala Leu Arg

85 90 95

gct gaa gtg gcc cgg ctg gcc aga gag aga gat ctg tac ggc gga ggc 336

Ala Glu Val Ala Arg Leu Ala Arg Glu Arg Asp Leu Tyr Gly Gly Gly

100 105 110

gga gct ggt ggc ggc gga gac tac aag gac gac gac gac aag tga 381

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

115 120 125

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu

20 25 30

Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Leu Ala Ala Gln Leu Asp Ala Leu Arg

85 90 95

Ala Glu Val Ala Arg Leu Ala Arg Glu Arg Asp Leu Tyr Gly Gly Gly

100 105 110

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

115 120 125

<210> 3

<211> 573

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein CDS

<220><221> CDS

<222> (1)..(573)

<223> variant 2

<400> 3

atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ttc ctg tca gta acg act ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

```
1               5                   10                  15

gtc cac tcc cag gcc acc gaa tat gag tac cta gat tat gat ttc ctg        96
Val His Ser Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu
            20                  25                  30
cca gaa acg gag cct cca gaa atg ctg agg aac agc act gac acc act       144
Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr
        35                  40                  45
cct ctg act ggg cct gga acc cct gag tct acc act gtg gag cct gct       192
Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser Thr Thr Val Glu Pro Ala
    50                  55                  60
gcg cgg ccg cac aca tgc cca ccg tgc cca ggg cag ccc cga gaa cca       240
Ala Arg Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg Glu Pro
65                  70                  75                  80
cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc gct aac cag       288
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Ala Asn Gln

                85                  90                  95
gtc agc ctg acc tgc ctg gtc gca ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc       336
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Ala Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
            100                 105                 110
gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac gct acc acg       384
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Ala Thr Thr
        115                 120                 125

cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc gca ctc       432
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Ala Leu
    130                 135                 140
acc gtg gac gct agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc       480
Thr Val Asp Ala Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
145                 150                 155                 160
gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag gca agc ctc tcc       528
```

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ala Ser Leu Ser

165 170 175

ctg tct ccg ggt ggc gga gac tac aag gac gac gac gac aag tga 573

Leu Ser Pro Gly Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

180 185 190

<210> 4

<211> 190

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu

20 25 30

Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr

35 40 45

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

50 55 60

Ala Arg Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg Glu Pro

65 70 75 80

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Ala Asn Gln

85 90 95

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Ala Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

100 105 110

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Ala Thr Thr

115 120 125

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Ala Leu

130 135 140

Thr Val Asp Ala Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

145 150 155 160

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ala Ser Leu Ser

165 170 175

Leu Ser Pro Gly Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

180 185 190

<210> 5

<211> 273

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein CDS

<220><221> CDS

<222> (1)..(273)

<223> variant 3

<400> 5

atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ttc ctg tca gta acg act ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

gtc cac tcc cag gcc acc gaa tat gag tac cta gat tat gat ttc ctg 96

Val His Ser Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu

20 25 30

cca gaa acg gag cct cca gaa atg ctg agg aac agc act gac acc act 144

Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr

35 40 45

cct ctg act ggg cct gga acc cct gag tct acc act gtg gag cct gct 192

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

50 55 60

gcg cgg tcc gtg gca cag tgc ctg ctg gcc atc ctg atc ctg gcc ctg 240

Ala Arg Ser Val Ala Gln Cys Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu

65 70 75 80

gtg gcc gac tac aag gac gac gac gac aag tga 273

Val Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

85 90

<210> 6

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu

20 25 30

Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr

35 40 45

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

50 55 60

Ala Arg Ser Val Ala Gln Cys Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu

65 70 75 80

Val Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

85 90

<210> 7

<211> 294

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein CDS

<220><221> CDS

<222> (1)..(294)

<223> variant 4

<400> 7

atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ttc ctg tca gta acg act ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

gtc cac tcc cag gcc acc gaa tat gag tac cta gat tat gat ttc ctg 96

Val His Ser Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu

20 25 30

cca gaa acg gag cct cca gaa atg ctg agg aac agc act gac acc act 144

Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr

35 40 45

cct ctg act ggg cct gga acc cct gag tct acc act gtg gag cct gct 192

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

50 55 60

gcg cgg ccg cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc ctg ggg 240

Ala Arg Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly

65 70 75 80

gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca gat tac aag gat gac gac gat 288

Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

85 90 95

aaa tga 294

Lys

<210> 8

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu

20 25 30

Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr

35 40 45

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

50 55 60

Ala Arg Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly

65 70 75 80

Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

85 90 95

Lys

<210> 9

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein CDS

<220><221> CDS

<222> (1)..(360)

<223> variant 5

<400> 9

atg cct ctg caa ctc ctc ctg ttg ctg atc cta ctg ggc cct ggc aac 48

Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn

1 5 10 15

agc ttg cag ctg tgg gac acc tgg gca gat gaa gcc gag aaa gcc ttg 96

Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu

20 25 30

ggt ccc ctg ctt gcc cgg gac cgg aga cag gcc acc gaa tat gag tac 144

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

35 40 45

cta gat tat gat ttc ctg cca gaa acg gag cct cca gaa atg ctg agg 192

Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg

50 55 60

aac agc act gac acc act cct ctg act ggg cct gga acc cct gag tct 240

Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser

65 70 75 80

acc act gtg gag cct gct gcg cgg ccg cac aca tgc cca ccg tgc cca 288

Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

85 90 95

gca cct gaa gcc ctg ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca gat 336

Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Asp

100 105 110

tac aag gat gac gac gat aaa tga 360

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

115

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn

1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu

20 25 30

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

35 40 45

Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg

50 55 60

Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser

65 70 75 80

Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

85 90 95

Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Asp

100 105 110

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

115

<210> 11

<211> 371

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> mat_peptide

<222> (1)..(371)

<223> PSGL-1 GI:2498904. Mature peptide 42-412

<400> 11

Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr
1 5 10 15

Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr
20 25 30

Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Leu Asp Ala Gly Gly Ala Val Thr Glu Leu Thr Thr Glu
50 55 60

Leu Ala Asn Met Gly Asn Leu Ser Thr Asp Ser Ala Ala Met Glu Ile
65 70 75 80

Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Val
85 90 95

Pro Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr
100 105 110

Thr Arg Leu Thr Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr
115 120 125

Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln
130 135 140

Pro Thr Gly Leu Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala
145 150 155 160

Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Gln Thr Thr Ala Met Glu Ala Gln Thr
180 185 190

Thr Ala Pro Glu Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Ala Thr
195 200 205

Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Glu
210 215 220

Pro Ser Ala Thr Glu Ala Leu Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly

225 230 235 240

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

Ser Arg Lys Gly His Met Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu
305 310 315 320
Met Val Cys Ile Ser Ser Leu Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser
325 330 335
Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr
340 345 350
Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser
355 360 365

Phe Leu Pro
370

<210> 12
<211> 237
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<223> NRL: GI:1709348. Leucine zipper 187-208
<400> 12
Met Ala Leu Pro Pro Ser Pro Leu Ala Met Glu Tyr Val Asn Asp Phe
1 5 10 15
Asp Leu Met Lys Phe Glu Val Lys Arg Glu Pro Ser Glu Gly Arg Pro
20 25 30
Gly Pro Pro Thr Ala Ser Leu Gly Ser Thr Pro Tyr Ser Ser Val Pro

35 40 45

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

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

Arg Ser Lys Arg Leu Gln Gln Arg Arg Gly Leu Glu Ala Glu Arg Ala
180 185 190
Arg Leu Ala Ala Gln Leu Asp Ala Leu Arg Ala Glu Val Ala Arg Leu
195 200 205
Ala Arg Glu Arg Asp Leu Tyr Lys Ala Arg Cys Asp Arg Leu Thr Ser
210 215 220
Ser Gly Pro Gly Ser Gly Asp Pro Ser His Leu Phe Leu
225 230 235

<210>
13
<211> 1029
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(1029)

<223> FTVII

<400> 13

atg aat aat gct ggg cac ggc ccc acc cgg agg ctg cga ggc ttg gga 48
Met Asn Asn Ala Gly His Gly Pro Thr Arg Arg Leu Arg Gly Leu Gly
1 5 10 15

gtc ctg gcc ggg gtg gct ctg ctc gct gcc ctc tgg ctt ctg tgg ctg 96
Val Leu Ala Gly Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu Trp Leu Leu Trp Leu
20 25 30

ctg gga tca gca cct cgg ggt act ccg gca cct cag ccc acg atc acc 144
Leu Gly Ser Ala Pro Arg Gly Thr Pro Ala Pro Gln Pro Thr Ile Thr
35 40 45

atc ctt gtc tgg cac tgg ccc ttc act gac cag cct cca gag ctg ccc 192
Ile Leu Val Trp His Trp Pro Phe Thr Asp Gln Pro Pro Glu Leu Pro
50 55 60

agc gac acc tgc acc cgc tac ggc atc gcc cgc tgc cac ctg agt gcc 240

Ser Asp Thr Cys Thr Arg Tyr Gly Ile Ala Arg Cys His Leu Ser Ala
65 70 75 80

aac cga agc ctg ctg gcc agc gcc gac gcc gtg gtc ttc cac cac cgc 288
Asn Arg Ser Leu Leu Ala Ser Ala Asp Ala Val Val Phe His His Arg
85 90 95

gag ctt cag acc cga cgg tcc cac ctg ccc ctg gcc cag cga ccg cga 336
Glu Leu Gln Thr Arg Arg Ser His Leu Pro Leu Ala Gln Arg Pro Arg

100 105 110

ggg cag ccc tgg gtg tgg gcc tcc atg gag tct cct agc cac acc cac 384
Gly Gln Pro Trp Val Trp Ala Ser Met Glu Ser Pro Ser His Thr His
115 120 125

ggc ctc agc cac ctc cga ggc atc ttc aac tgg gtg ctg agc tac cgg 432
Gly Leu Ser His Leu Arg Gly Ile Phe Asn Trp Val Leu Ser Tyr Arg
130 135 140

cgc gac tcg gac atc ttt gtg ccc tat ggc cgc ctg gag cct cac tgg 480
Arg Asp Ser Asp Ile Phe Val Pro Tyr Gly Arg Leu Glu Pro His Trp

```
145                 150                 155                 160
gga ccc tcg cca ccg ctg cca gcc aag agc agg gtg gcc gcc tgg gtg        528
Gly Pro Ser Pro Pro Leu Pro Ala Lys Ser Arg Val Ala Ala Trp Val
                165                 170                 175
gtc agc aac ttc cag gag cgg cag ctg cgt gcc agg ctg tac cgg cag        576

Val Ser Asn Phe Gln Glu Arg Gln Leu Arg Ala Arg Leu Tyr Arg Gln
            180                 185                 190
ctg gcg cct cat ctg cgg gtg gat gtc ttt ggc cgt gcc aat gga cgg        624
Leu Ala Pro His Leu Arg Val Asp Val Phe Gly Arg Ala Asn Gly Arg
        195                 200                 205
cca ctg tgc gcc agc tgc ctg gtg ccc acc gtg gcc cag tac cgc ttc        672
Pro Leu Cys Ala Ser Cys Leu Val Pro Thr Val Ala Gln Tyr Arg Phe

    210                 215                 220
tac ctg tcc ttt gag aac tct cag cac cgc gac tac att acg gag aaa        720
Tyr Leu Ser Phe Glu Asn Ser Gln His Arg Asp Tyr Ile Thr Glu Lys
225                 230                 235                 240
ttc tgg cgc aac gca ctg gtg gct ggc act gtg cca gtg gtg ctg gga        768
Phe Trp Arg Asn Ala Leu Val Ala Gly Thr Val Pro Val Val Leu Gly
                245                 250                 255

cct cca cgg gcc acc tat gag gcc ttc gtg ccg gct gac gcc ttc gtg        816
Pro Pro Arg Ala Thr Tyr Glu Ala Phe Val Pro Ala Asp Ala Phe Val
            260                 265                 270
cat gtg gat gac ttt ggc tca gcc cga gag ctg gcg gct ttc ctc act        864
His Val Asp Asp Phe Gly Ser Ala Arg Glu Leu Ala Ala Phe Leu Thr
        275                 280                 285
ggc atg aat gag agc cga tac caa cgc ttc ttt gcc tgg cgt gac agg        912

Gly Met Asn Glu Ser Arg Tyr Gln Arg Phe Phe Ala Trp Arg Asp Arg
    290                 295                 300
ctc cgc gtg cga ctg ttc acc gac tgg cgg gaa cgt ttc tgt gcc atc        960
Leu Arg Val Arg Leu Phe Thr Asp Trp Arg Glu Arg Phe Cys Ala Ile
305                 310                 315                 320
```

tgt gac cgc tac cca cac cta cct cgc agc caa gtc tat gag gac ctt 1008
Cys Asp Arg Tyr Pro His Leu Pro Arg Ser Gln Val Tyr Glu Asp Leu

325 330 335

gag ggt tgg ttt cag gcc tga 1029
Glu Gly Trp Phe Gln Ala

340

<210> 14

<211> 342

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Asn Asn Ala Gly His Gly Pro Thr Arg Arg Leu Arg Gly Leu Gly
1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu Trp Leu Leu Trp Leu
20 25 30

Leu Gly Ser Ala Pro Arg Gly Thr Pro Ala Pro Gln Pro Thr Ile Thr
35 40 45

Ile Leu Val Trp His Trp Pro Phe Thr Asp Gln Pro Pro Glu Leu Pro
50 55 60

Ser Asp Thr Cys Thr Arg Tyr Gly Ile Ala Arg Cys His Leu Ser Ala
65 70 75 80

Asn Arg Ser Leu Leu Ala Ser Ala Asp Ala Val Val Phe His His Arg
85 90 95

Glu Leu Gln Thr Arg Arg Ser His Leu Pro Leu Ala Gln Arg Pro Arg
100 105 110

Gly Gln Pro Trp Val Trp Ala Ser Met Glu Ser Pro Ser His Thr His
115 120 125

Gly Leu Ser His Leu Arg Gly Ile Phe Asn Trp Val Leu Ser Tyr Arg
130 135 140

Arg Asp Ser Asp Ile Phe Val Pro Tyr Gly Arg Leu Glu Pro His Trp
145 150 155 160

Gly Pro Ser Pro Pro Leu Pro Ala Lys Ser Arg Val Ala Ala Trp Val
165 170 175
Val Ser Asn Phe Gln Glu Arg Gln Leu Arg Ala Arg Leu Tyr Arg Gln
180 185 190
Leu Ala Pro His Leu Arg Val Asp Val Phe Gly Arg Ala Asn Gly Arg
195 200 205

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

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

Glu Gly Trp Phe Gln Ala
340

<210> 15
<211> 1287
<212> DNA
<213> homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(1287)
<223> C2GnT
<400> 15

atg ctg agg acg ttg ctg cga agg aga ctt ttt tct tat ccc acc aaa 48

Met Leu Arg Thr Leu Leu Arg Arg Arg Leu Phe Ser Tyr Pro Thr Lys

1 5 10 15

tac tac ttt atg gtt ctt gtt tta tcc cta atc acc ttc tcc gtt tta 96

Tyr Tyr Phe Met Val Leu Val Leu Ser Leu Ile Thr Phe Ser Val Leu

20 25 30

agg att cat caa aag cct gaa ttt gta agt gtc aga cac ttg gag ctt 144

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

35 40 45

gct ggg gag aat cct agt agt gat att aat tgc acc aaa gtt tta cag 192

Ala Gly Glu Asn Pro Ser Ser Asp Ile Asn Cys Thr Lys Val Leu Gln

50 55 60

ggt gat gta aat gaa atc caa aag gta aag ctt gag atc cta aca gtg 240

Gly Asp Val Asn Glu Ile Gln Lys Val Lys Leu Glu Ile Leu Thr Val

65 70 75 80

aaa ttt aaa aag cgc cct cgg tgg aca cct gac gac tat ata aac atg 288

Lys Phe Lys Lys Arg Pro Arg Trp Thr Pro Asp Asp Tyr Ile Asn Met

85 90 95

acc agt gac tgt tct tct ttc atc aag aga cgc aaa tat att gta gaa 336

Thr Ser Asp Cys Ser Ser Phe Ile Lys Arg Arg Lys Tyr Ile Val Glu

100 105 110

ccc ctt agt aaa gaa gag gcg gag ttt cca ata gca tat tct ata gtg 384

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

115 120 125

gtt cat cac aag att gaa atg ctt gac agg ctg ctg agg gcc atc tat 432

Val His His Lys Ile Glu Met Leu Asp Arg Leu Leu Arg Ala Ile Tyr

130 135 140

atg cct cag aat ttc tat tgc att cat gtg gac aca aaa tcc gag gat 480

Met Pro Gln Asn Phe Tyr Cys Ile His Val Asp Thr Lys Ser Glu Asp

145 150 155 160

tcc tat tta gct gca gtg atg ggc atc gct tcc tgt ttt agt aat gtc 528

```
Ser Tyr Leu Ala Ala Val Met Gly Ile Ala Ser Cys Phe Ser Asn Val
                165                 170                 175

ttt gtg gcc agc cga ttg gag agt gtg gtt tat gca tcg tgg agc cgg        576
Phe Val Ala Ser Arg Leu Glu Ser Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg
            180                 185                 190
gtt cag gct gac ctc aac tgc atg aag gat ctc tat gca atg agt gca        624
Val Gln Ala Asp Leu Asn Cys Met Lys Asp Leu Tyr Ala Met Ser Ala
        195                 200                 205
aac tgg aag tac ttg ata aat ctt tgt ggt atg gat ttt ccc att aaa        672

Asn Trp Lys Tyr Leu Ile Asn Leu Cys Gly Met Asp Phe Pro Ile Lys
    210                 215                 220
acc aac cta gaa att gtc agg aag ctc aag ttg tta atg gga gaa aac        720
Thr Asn Leu Glu Ile Val Arg Lys Leu Lys Leu Leu Met Gly Glu Asn
225                 230                 235                 240
aac ctg gaa acg gag agg atg cca tcc cat aaa gaa gaa agg tgg aag        768
Asn Leu Glu Thr Glu Arg Met Pro Ser His Lys Glu Glu Arg Trp Lys

                245                 250                 255
aag cgg tat gag gtc gtt aat gga aag ctg aca aac aca ggg act gtc        816
Lys Arg Tyr Glu Val Val Asn Gly Lys Leu Thr Asn Thr Gly Thr Val
            260                 265                 270
aaa atg ctt cct cca ctc gaa aca cct ctc ttt tct ggc agt gcc tac        864
Lys Met Leu Pro Pro Leu Glu Thr Pro Leu Phe Ser Gly Ser Ala Tyr
        275                 280                 285

ttc gtg gtc agt agg gag tat gtg ggg tat gta cta cag aat gaa aaa        912
Phe Val Val Ser Arg Glu Tyr Val Gly Tyr Val Leu Gln Asn Glu Lys
    290                 295                 300
atc caa aag ttg atg gag tgg gca caa gac aca tac agc cct gat gag        960
Ile Gln Lys Leu Met Glu Trp Ala Gln Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu
305                 310                 315                 320
```

tat ctc tgg gcc acc atc caa agg att cct gaa gtc ccg ggc tca ctc 1008

Tyr Leu Trp Ala Thr Ile Gln Arg Ile Pro Glu Val Pro Gly Ser Leu
325 330 335

cct gcc agc cat aag tat gat cta tct gac atg caa gca gtt gcc agg 1056

Pro Ala Ser His Lys Tyr Asp Leu Ser Asp Met Gln Ala Val Ala Arg
340 345 350

ttt gtc aag tgg cag tac ttt gag ggt gat gtt tcc aag ggt gct ccc 1104

Phe Val Lys Trp Gln Tyr Phe Glu Gly Asp Val Ser Lys Gly Ala Pro

355 360 365

tac ccg ccc tgc gat gga gtc cat gtg cgc tca gtg tgc att ttc gga 1152

Tyr Pro Pro Cys Asp Gly Val His Val Arg Ser Val Cys Ile Phe Gly
370 375 380

gct ggt gac ttg aac tgg atg ctg cgc aaa cac cac ttg ttt gcc aat 1200

Ala Gly Asp Leu Asn Trp Met Leu Arg Lys His His Leu Phe Ala Asn
385 390 395 400

aag ttt gac gtg gat gtt gac ctc ttt gcc atc cag tgt ttg gat gag 1248

Lys Phe Asp Val Asp Val Asp Leu Phe Ala Ile Gln Cys Leu Asp Glu
405 410 415

cat ttg aga cac aaa gct ttg gag aca tta aaa cac tga 1287

His Leu Arg His Lys Ala Leu Glu Thr Leu Lys His
420 425

<210> 16

<211> 428

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 16

Met Leu Arg Thr Leu Leu Arg Arg Arg Leu Phe Ser Tyr Pro Thr Lys
1 5 10 15

Tyr Tyr Phe Met Val Leu Val Leu Ser Leu Ile Thr Phe Ser Val Leu
20 25 30

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

35 40 45

Ala Gly Glu Asn Pro Ser Ser Asp Ile Asn Cys Thr Lys Val Leu Gln

50 55 60

Gly Asp Val Asn Glu Ile Gln Lys Val Lys Leu Glu Ile Leu Thr Val

65 70 75 80

Lys Phe Lys Lys Arg Pro Arg Trp Thr Pro Asp Asp Tyr Ile Asn Met

85 90 95

Thr Ser Asp Cys Ser Ser Phe Ile Lys Arg Arg Lys Tyr Ile Val Glu

100 105 110

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

115 120 125

Val His His Lys Ile Glu Met Leu Asp Arg Leu Leu Arg Ala Ile Tyr

130 135 140

Met Pro Gln Asn Phe Tyr Cys Ile His Val Asp Thr Lys Ser Glu Asp

145 150 155 160

Ser Tyr Leu Ala Ala Val Met Gly Ile Ala Ser Cys Phe Ser Asn Val

165 170 175

Phe Val Ala Ser Arg Leu Glu Ser Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg

180 185 190

Val Gln Ala Asp Leu Asn Cys Met Lys Asp Leu Tyr Ala Met Ser Ala

195 200 205

Asn Trp Lys Tyr Leu Ile Asn Leu Cys Gly Met Asp Phe Pro Ile Lys

210 215 220

Thr Asn Leu Glu Ile Val Arg Lys Leu Lys Leu Leu Met Gly Glu Asn

225 230 235 240

Asn Leu Glu Thr Glu Arg Met Pro Ser His Lys Glu Glu Arg Trp Lys

245 250 255

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

260 265 270

Lys Met Leu Pro Pro Leu Glu Thr Pro Leu Phe Ser Gly Ser Ala Tyr

275 280 285

Phe Val Val Ser Arg Glu Tyr Val Gly Tyr Val Leu Gln Asn Glu Lys
290 295 300
Ile Gln Lys Leu Met Glu Trp Ala Gln Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu
305 310 315 320

Tyr Leu Trp Ala Thr Ile Gln Arg Ile Pro Glu Val Pro Gly Ser Leu
325 330 335
Pro Ala Ser His Lys Tyr Asp Leu Ser Asp Met Gln Ala Val Ala Arg
340 345 350
Phe Val Lys Trp Gln Tyr Phe Glu Gly Asp Val Ser Lys Gly Ala Pro
355 360 365
Tyr Pro Pro Cys Asp Gly Val His Val Arg Ser Val Cys Ile Phe Gly
370 375 380

Ala Gly Asp Leu Asn Trp Met Leu Arg Lys His His Leu Phe Ala Asn
385 390 395 400
Lys Phe Asp Val Asp Val Asp Leu Phe Ala Ile Gln Cys Leu Asp Glu
405 410 415
His Leu Arg His Lys Ala Leu Glu Thr Leu Lys His
420 425

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> spacer
<220><221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)
<223> spacer
<400
> 17
Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Lys Gly
1 5 10
<210> 18
<211> 20
<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(20)

<400> 18

Met Glu Trp Ser Trp Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr

1 5 10 15

Gly Val His Ser

20

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(24)

<223> Hinge region

<400> 19

ccg cac aca tgc cca ccg tgc cca 24

Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 21

Met Ala Trp Thr Ser Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Cys Ser Gly

1 5 10 15

Ala Ser Ser

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 22

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 23

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 24

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 25

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 26

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Asn Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 27

Met Gly Thr Val Ser Arg Ala Ala Leu Ile Leu Ala Cys Leu Ala Leu

1 5 10 15

Ala Ser Ala

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 28

Met Gly Trp Ser Cys Ile Met Leu Phe Leu Ala Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 29

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 29

Met Asn Pro Ala Ile Ser Val Ala Leu Leu Leu Ser Val Leu Gln Val

1 5 10 15

Ser Arg Gly

<210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 30

Met Ala Leu Met Leu Val Leu Phe Phe Leu Ala Ala Val Leu Pro Pro

1 5 10 15

Ser Leu Leu

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 31

Met Gly Trp Ser Phe Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 32

Met Ile Leu Phe Asn Arg Val Gly Tyr Phe Val Ser Leu Phe Ala Thr

1 5 10 15

Val Ser Cys

<210> 33

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 33

Met Val Val Met Leu Arg Tyr Val Trp Pro Leu Leu Leu Cys Ser Pro

1 5 10 15

Cys Leu Leu

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 34

Met Gly Trp Arg Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Cys

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flag seq

<220><221> BINDING

<222> (1)..(7)

<400> 35

Asp Tyr Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 36

<211> 363

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> protein 1A

<220><221> CDS

<222> (1)..(363)

<223> Variant 1A

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(57)

<223> signal peptide

<220><221> misc_feature

<222> (58)..(360)

<223> Sequence encoding Variant 1A no signal

<220><221> misc_feature

<222> (58)..(198)

<223> sequence encoding PSGL-1 aa 1-47

<220><221> misc_feature

<222> (199)..(222)

<223> sequence encoding covalent dimerization domain comprising at

least one Cys

<220><221> misc_feature

<222> (223)..(327)

<223> Sequence encoding NRL leucine zipper comprising at least NRL aa 187-208

<220><221> misc_feature

<222> (328)..(360)

<223> sequence encoding a glycine spacer

<400> 36

atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ttc ctg tca gta acg act ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

gtc cac tcc cag gcc acc gaa tat gag tac cta gat tat gat ttc ctg 96

Val His Ser Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu

20 25 30

cca gaa acg gag cct cca gaa atg ctg agg aac agc act gac acc act 144

Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr

35 40 45

cct ctg act ggg cct gga acc cct gag tct acc act gtg gag cct gct 192

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

50 55 60

gcg cgg ccg cac aca tgc cca ccg tgc cca ctg cag cag aga aga ggc 240
Ala Arg Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Leu Gln Gln Arg Arg Gly
65 70 75 80
ctg gaa gcc gag aga gcc aga ctg gcc gct cag ctg gat gcc ctg aga 288
Leu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Leu Ala Ala Gln Leu Asp Ala Leu Arg
85 90 95

gct gaa gtg gcc cgg ctg gcc aga gag aga gat ctg tac ggc gga ggc 336
Ala Glu Val Ala Arg Leu Ala Arg Glu Arg Asp Leu Tyr Gly Gly Gly
100 105 110
gga gct ggt ggc ggc gga aag ggt tga 363
Gly Ala Gly Gly Gly Gly Lys Gly
115 120

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct
<400> 37
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu
20 25 30
Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr
35 40 45
Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser Thr Thr Val Glu Pro Ala
50 55 60

Ala Arg Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Leu Gln Gln Arg Arg Gly
65 70 75 80
Leu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Leu Ala Ala Gln Leu Asp Ala Leu Arg
85 90 95
Ala Glu Val Ala Arg Leu Ala Arg Glu Arg Asp Leu Tyr Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Lys Gly

115 120

<210> 38

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant 1A mature and processed

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> SULFATATION

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> SULFATATION

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> SULFATATION

<220><221> CARBOHYD

<222> (16)..(16)

<223> Sialyl-Lewis -X (O-Glycan)

<220><221> MOD_RES

<222> (90)..(90)

<223> SULFATATION

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (100)..(100)

<223> either Lys or Cys for conjugation

<400> 38

Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr

1 5 10 15

Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr

20 25 30

Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Pro

35 40 45

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

50 55 60

Glu Arg Ala Arg Leu Ala Ala Gln Leu Asp Ala Leu Arg Ala Glu Val

65 70 75 80

Ala Arg Leu Ala Arg Glu Arg Asp Leu Tyr Gly Gly Gly Gly Ala Gly

85 90 95

Gly Gly Gly Lys Gly

100

<210> 39

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric PSGL-1-NRL protein

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> any aa or aa sequence (PSGL-1 aa 1-4)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(13)

<223> PSGL-1 aa 5-16 (selectin binding region)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> any aa or aa sequence (PSGL-1 aa 17-47)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> covalent dimerization domain flanking region

<220><221> DISULFID

<222> (16)..(16)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> covalent dimerization domain flanking region

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> any aa or aa sequence (from NRL aa 181-186)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(40)

<223> NRL aa 187-208

<

220><221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> any aa or aa sequence (from NRL aa 209-215)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (42)..(42)

<223> spacer

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> Lys or Cys

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> any aa with exclusion of Cys or Lys, preferably Gly or Ala

<400> 39

Xaa Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Xaa Xaa Cys

1 5 10 15

Xaa Xaa Leu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Leu Ala Ala Gln Leu Asp Ala

20 25 30

Leu Arg Ala Glu Val Ala Arg Leu Xaa Xaa Xaa Xaa

35 40