



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101835800 A

(43) 申请公布日 2010.09.15

(21) 申请号 200880113405.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.10.23

C07K 14/52 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006.01)

07450189.1 2007.10.24 EP

A61K 38/19 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.04.26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/008960 2008.10.23

(87) PCT申请的公布数据

W02009/053064 EN 2009.04.30

(71) 申请人 普罗塔芬生物技术股份公司

地址 奥地利格拉茨

(72) 发明人 安德烈亚斯·孔格尔 艾萨·沃纳

贾森·斯林斯比 西米·阿利

约翰·A·柯比

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

权利要求书 1 页 说明书 7 页 序列表 5 页

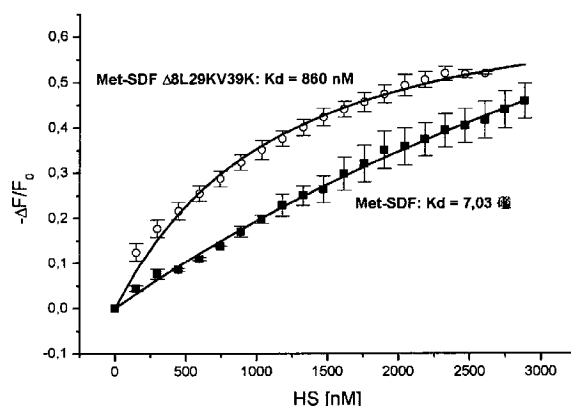
附图 3 页

(54) 发明名称

基于 SDF-1 的糖胺聚糖拮抗物及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及人基质细胞衍生因子-1 的新突变体,与野生型 SDF-1 相比,该突变体体现出增强的糖胺聚糖 (GAG) 结合亲和力和被抑制或下调的 GPCR 活性,本发明还涉及制备这些突变体的方法和其用于制备治疗癌症的药物的用途。



1. SDF-1 突变蛋白,其与野生型 SDF-1 蛋白相比,具有增强的 GAG 结合亲和力和降低的 GPCR 活性,其中通过插入至少两个碱性和 / 或供电子氨基酸、或者用至少两个碱性和 / 或供电子氨基酸取代至少两个非碱性氨基酸而以结构 - 保守方式修饰 SDF-1 蛋白,并且通过添加、缺失和 / 或取代至少一个氨基酸来修饰野生型 SDF-1 蛋白的 N- 末端区域的前 1 ~ 10 个氨基酸中的至少 1 个氨基酸。

2. 权利要求 1 所述的 SDF-1 突变蛋白,其中,通过远 -UV-CD 光谱检测显示,结构保守形式的修饰是,修饰后的结构比野生型 SDF-1 的结构偏差小于 30%,优选小于 20%。

3. 权利要求 1 或 2 所述的 SDF-1 突变蛋白,其中,所述碱性氨基酸选自 Arg、Lys、His。

4. 权利要求 1 或 2 所述的 SDF-1 突变蛋白,其中,所述供电子氨基酸选自 Asn 或者 Gln。

5. 权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的 SDF-1 突变蛋白,其中,所述 SDF-1 蛋白的 N- 末端区域通过截去 8 个氨基酸来修饰。

6. 权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的 SDF-1 突变蛋白,其中,所述 SDF-1 蛋白的 N- 末端区域通过取代和 / 或缺失前 2 个氨基酸来修饰。

7. 权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的 SDF-1 突变蛋白,其中,所述前两个 N- 末端氨基酸被选自赖氨酸、精氨酸、脯氨酸或甘氨酸的氨基酸所取代。

8. 权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的 SDF-1 突变蛋白,其中,所述 SDF-1 突变蛋白含有 N- 末端 Met。

9. 权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的 SDF-1 突变蛋白,其中,所述 SDF-1 突变蛋白在第 29 位或者第 39 位有至少一个氨基酸被修饰。

10. SDF-1 突变蛋白,其中,所述经修饰的 SDF-1 分子的氨基酸序列由以下通式表示:

(M)_n(X1)_m(X2)_pVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKI(X3)NTPNCALQI(X4)ARLKNNNRQVCIDPKLK
WIQEYLEKALNK(GRREEKVGKKEKIGKKKRQKKRKAQKRKN),

其中 X1 为 K 或者 R 残基,

其中 X2 为 P 或者 G 残基,

其中 X3 选自 Y 或 A 残基,优选为 A,

其中 X4 选自 S、R、K、H、N 或 Q 残基,优选为 K,

以及,其中 n 和 / 或 m 和 / 或 p 和 / 或 o 可以为 0 或 1,其中 X1、X2、X3 或 X4 中的至少两个位置被修饰。

11. SDF-1 突变蛋白,其结构为 Met-SDF-1A8L29K V39K。

12. 分离的多核苷酸分子,其编码权利要求 1 ~ 11 中任一项所述的蛋白质。

13. 载体,其包含权利要求 12 所述的分离的 DNA 分子。

14. 重组细胞,其转染有权利要求 13 所述的载体。

15. 药物组合物,其中,所述药物组合物包含:权利要求 1 ~ 11 中任一项所述的蛋白质,或者权利要求 12 或 13 所述的多核苷酸,或者权利要求 14 所述的载体,以及药学上可接受的载体。

16. 权利要求 1 ~ 11 中任一项所述的 SDF-1 突变蛋白,或者权利要求 12 所述的多核苷酸,或者权利要求 13 所述的载体用于制备治疗癌症的药物的用途。

17. 权利要求 16 所述的用途,其至少部分地抑制了肿瘤的生长和扩散过程。

基于 SDF-1 的糖胺聚糖拮抗物及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及人基质细胞衍生因子-1(human stromal cell-derived factor-1), 即 SDF-1 α 、SDF-1 β 、SDF-1 γ 或者它们任意变体的新突变体,与野生型 SDF-1 相比,所述新突变体显示有如下特性:(i) 糖胺聚糖(GAG)结合亲和力增强和(ii)GPCR 活性受到抑制或下调,本发明还涉及使用所述新突变体治疗癌症的用途。

背景技术

[0002] 趋化因子是小型的(8-11kD)、可溶的趋化细胞因子(chemoattractant cytokine)。根据其半胱氨酸残基的相对位置,将趋化因子分成四类。 α 趋化因子有一个非保守氨基酸将前两个半胱氨酸残基分开(CXC-基序),而 β -趋化因子的前两个半胱氨酸是彼此相邻的(CC-基序)。Fractalkine(CX₃C 趋化因子)是有三个非保守氨基酸将前两个半胱氨酸残基分开(CX₃C-基序)的趋化因子家族中唯一的代表,淋巴细胞趋化蛋白(lymphotactin)是总共仅具有两个半胱氨酸(C-基序)的趋化因子家族中唯一的成员,而其他三个家族的趋化因子具有 4 个半胱氨酸(Baggiolini 等人,Adv. Immunol., 55, 97-179(1994))。基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1, CXCL12)属于 α -趋化因子,尽管其不是该类趋化因子的典型代表。该趋化因子与其他的人 CXC-和 CC-趋化因子仅分别具有 27%和 21%的序列同一性。尽管与两个趋化因子大家族有同样疏远的关系,但不同物种之间的成熟 SDF-1 显示出极高的相似性。人与鼠的序列同一性约 99%,而人与猫 SDF-1 氨基酸序列的同一性为 100%,SDF-1 是目前已知的最为保守的细胞因子(Shirozu 等人,Genomics, 28, 495-500(1995))。在脊椎动物的最原始分支,即无颌类动物中实际上已经发现了直系同源物(orthologues)。SDF-1 的另一特征是其基因 SCYB12 位于染色体 10 上,而其他所有 CXC 趋化因子和大部分 CC 趋化因子聚集于染色体 4 和染色体 17 上。

[0003] SCYB12 含有四个外显子。SDF-1 α 最常见的剪接同工型(splice isoform)是从外显子 1-3 衍生出来的,而 SDF-1 β 也含有其他来自外显子 4 的序列,从而使其 C-末端上具有 4 个额外的氨基酸。SDF-1 的三级结构显示出由三个反-平行 β -链(β -strand)和一个 C-末端 α -螺旋构成的核心区(Crump 等人,EMBO J., 16, 6996-7007(1997))。

[0004] 与三级结构特性不同,对其四级构一直存有争议。曾有一个争议表现在,NMR-研究显示其为单体形式,而结晶学检测显示其为二聚体,或者根据超速离心的沉降速度以及动态光散射其可能处于单体-二聚体的平衡状态。随后的研究显示,SDF-1 α 实际上是处于单体-二聚体的平衡状态,并且其二聚体的形成很大程度上取决于稳定性平衡离子(stabilizing counterion)的存在和溶液的 pH 值。还发现糖胺聚糖(GAG)促进 SDF-1 α 二聚体的形成(Veldkamp 等人,Protein Sci., 14, 1071-1081(2005))。

[0005] GAG 为线性多糖,其含有在连接、组成以及 N-和 O-硫酸化形式上存在差异的重复二糖单元(Capila & Linhardt, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 41, 391-412(2002))。大部分 GAG 经蛋白质核心(protein core)相连接从而形成所谓的蛋白聚糖。GAG 的实例有硫酸乙酰肝素(HS)、肝素、硫酸角质素(keratinsulfate)、硫酸软骨素、硫酸皮肤素和透明质

酸。由于硫酸盐和羧化物基团的存在,因此 GAG 为高度负电性的。这将驱使带正电的趋化因子与可溶性的糖胺聚糖结合,并且会使 GAG 附着到细胞表面或者细胞外基质上。硫酸乙酰肝素与肝素类似,但是所带的电荷较少,它被认为对于趋化因子的生物活性较为重要。它由大多数细胞类型和数种携带 HS 链的核心蛋白质产生。例如,位于细胞表面的多配体聚糖 (syndecan) 和磷脂酰肌醇聚糖 (glypican) 以及在细胞外基质中的聚集蛋白 (agrin) 和基底膜聚糖 (perlecan)。值得注意的是 SDF-1 α 与多配体聚糖 -4 结合,但不与多配体聚糖 -1、多配体聚糖 -2、CD44 或者 β -聚糖结合。研究显示对于 SDF-1 与 HS 的结合, Lys24、Lys27 是必需的而 Arg41 和 Lys43 的作用相对不那么重要 (Sadir 等人, *J. Biol. Chem.*, 276, 8288-8296 (2001))。这些碱性氨基酸位于 SDF-1 α 二聚体的 β -链之间的小开口中 (Lortat-Jacob 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 1229-1234 (2002))。

[0006] 尽管存在由血液流动而引起的剪切力, GAG 仍可以使趋化因子滞留在细胞表面上并因此增加局部趋化因子的浓度。如果没有上述这样的相互作用,趋化因子会被冲走从而无法形成趋化白细胞或者干细胞的趋化性梯度 (chemotactic gradient)。GAG 结合是体内活性的前提。在 GAG 结合位点上具有突变的趋化因子无法在体内募集细胞。与 GAG 结合会引起趋化因子的结构变化从而导致例如寡聚反应。与 HS 或者肝素结合也可以保护在体外 SDF-1 不发生由二肽基肽酶 IV (DPP IV)/CD26 所引起的蛋白水解性裂解。

[0007] 目前已知的 SDF-1 的唯一受体是 CXCR4 趋化因子受体 4 (CXCR4) (Y. R. Zou, A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, D. R. Littman, *Nature*, 393, 595-599 (1998))。相应地, SDF-1 是 CXCR4 的唯一已知的内源配体 (M. K. Schwarz, T. N. Wells, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, 407-417 (1999))。CXCR4 属于百日咳毒素敏感性 G-蛋白偶联受体 (GPCR), 其特征在于 7 个跨膜区。已有人提出 SDF-1 和 CXCR4 的两步结合模型 (M. K. Schwarz, T. N. Wells, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, 407-417 (1999))。

[0008] 分子动力学模拟进一步确认了 SDF-1 结合到 CXCR4 时的两步结合机理。SDF-1 是一个高效力的趋化因子并且吸引淋巴细胞和单核细胞, 以及造血干细胞和祖细胞 (progenitor cell) (K. Hattori, B. Heissig, K. Tashiro, T. Honio, M. Tateno et al., *Blood*, 97, 3354-3360 (2001))。

[0009] 由于 SDF-1 在吸引趋化因子和吸引淋巴细胞以及单核细胞方面所起的作用, 以及对于治疗癌症的新药物的持续需求, 因此本发明的一个目的在于提供用于改变趋化因子受体相互作用的新蛋白质。

[0010] 本发明基于改造人 SDF-1 (可以为 SDF-1 α 、SDF-1 β 或者 SDF-1 γ 或者它们的任意变体), 使其具有较高 GAG 结合亲和力, 同时敲除或下调 GPCR 活性, 特别是趋化因子的 CXCR4 活性。这通过向 SDF-1 的 GAG 结合位点引入碱性氨基酸从而增加 GAG 亲和力, 以及通过截去 8 个氨基酸或者取代 / 缺失前两个氨基酸来修饰趋化因子的 N-末端而实现。所述 SDF-1 突变体对标准 GAG (肝素或者硫酸乙酰肝素) 的 K_d 至少提高 5 倍, 并且其在标准的单核细胞博伊登室 (Boyden chamber) 中表现出趋化活性的降低。对于上述这些特征已经获得了生物物理学和细胞生物学上的证据。

[0011] 本发明主要涉及抑制 CXCR4-阳性细胞, 更具体地是指干细胞和移动性细胞的移动, 通过在肿瘤生长和扩散过程中利用基于 SDF-1 的突变体来拮抗 GAG 相互作用。在异种移植了人类乳癌细胞的鼠模型中体现其抗肿瘤特性。

附图说明

[0012] 图 1 示出了 SDF-1 突变体的序列,下划线表示与野生型趋化因子相比发生突变的地方。

[0013] 图 2 示出了野生型 SDF-1 (wtSDF-1) 和 Met-SDF-1 Δ 8L29KV39K 与 HS 结合的等温荧光滴定曲线。

[0014] 图 3 示出了由 wtSDF-1、Met-SDF-1 以及 Met-SDF-1 Δ 8L29KV39K 诱导的单核细胞 (Thp-1) 的趋化性。

[0015] 图 4 示出了在鼠类异种移植模型中测定的 Met-SDF-1 Δ 8L29KV39K (称为“突变体”) 抑制人类乳腺癌细胞向肝脏的转移。

发明内容

[0016] 研究显示通过增加在 GAG 结合区域的碱性氨基酸的相对数量,可以增强 GAG 结合亲和力 (WO 05/054285,将其整体并入本文作为参考),从而得到经修饰的蛋白质作为天然 GAG 结合蛋白的竞争者。这尤其可见于白细胞介素 -8。此前对于 SDF-1 (CXCL12) 蛋白质没有公开 GAG 结合区域的具体位置以及通过有选择性地引入碱性氨基酸对其所进行的修饰。

[0017] 虽然 WO 01/85196 公开了 CXCR4 拮抗物和其用于治疗造血细胞的可能用途,但是没有提及提高 SDF-1 分子的 GAG 结合亲和力。WO 01/85196 公开了 SDF-1 衍生肽,其中该衍生肽的部分可以通过接头序列共价地结合到 SDF-1 的 C-末端片段上,包括 SDF-1 与 GAG 结合的那些区域,从而应当增强所述肽的拮抗效应。在上述文献中没有提及关于增加 SDF-1 的 GAG 结合亲和力的任何方法。就像引述该文献中提及的其他 GAG 结合蛋白的实例一样,以同样的方式引述该文献提及的蛋白质 -GAG 结合的一般原则,但该文献没有具体指出向 SDF-1 引入更高的 GAG- 结合亲和力的方法。

[0018] 本发明提供 SDF-1 突变蛋白,与野生型 SDF-1 蛋白相比,其具有增强的 GAG 结合亲和力和降低的 GPCR 活性,其中,所述 SDF-1 蛋白通过插入至少两个碱性和 / 或供电子氨基酸,或者优选使处于 GAG 结合位点的或者与天然 GAG 结合位点在结构上接近的至少两个非碱性氨基酸被至少两个碱性和 / 或供电子氨基酸所取代而以结构 - 保守方式 (structure-conserving way) 修饰,并且通过添加、缺失和 / 或取代至少一个氨基酸来修饰野生型 SDF-1 蛋白的 N-末端区域中的前 1 ~ 10 个氨基酸中的至少一个氨基酸。

[0019] 本发明定义的术语“接近”包括与 GAG 结合位点在构象上邻近,但并非直接位于 GAG 结合位点的氨基酸残基。在构象上邻近可以定义为在蛋白质氨基酸序列中靠近与 GAG 结合的氨基酸残基的那些氨基酸残基,或者是在蛋白质三维结构 (或者折叠) 中靠近与 GAG 结合的氨基酸残基的那些氨基酸残基。

[0020] 为了发挥生物学功能,蛋白质折叠成一种,或者多种特定的空间构象,称为结构域 (domain),其由多种非共价相互作用,例如氢键结合、离子相互作用、范德华力以及疏水包装作用 (hydrophobic packing) 驱动。可以通过已知的方法例如 X-射线晶体分析法或者 NMR 波谱学来测定三维结构。

[0021] 可以通过例如突变实验来确认天然的 GAG 结合位点。蛋白质的 GAG 结合位点是主要位于蛋白质表面的碱性残基。为了验证这些区域是否定义出一个 GAG 结合位点,可以使

这些碱性氨基酸发生突变,例如用丙氨酸残基(一个或多个)来取代,并测定肝素结合亲和力的减少。这可以通过本领域中已知的任何测定亲和力的技术进行测定。

[0022] 通过插入或者取代碱性或者供电子氨基酸来合理设计突变,可以向天然 GAG 结合位点附近引入外源氨基酸,从而使得 GAG 结合位点增大并且 GAG 结合亲和力增强。

[0023] 通过 US 61/07565 中详细描述的方法可以确定 GAG 结合位点或者所述位点的附近位置,在此将其并入作为参考,包括:

[0024] (a) 提供复合体,其包含所述蛋白质和与所述蛋白质结合的 GAG 配体分子,例如硫酸乙酰肝素(HS)、肝素、硫酸角质素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素和透明质酸等;

[0025] (b) 使所述复合体与裂解试剂例如蛋白酶(例如,能裂解所述蛋白质的胰蛋白酶)接触,其中所述 GAG 配体分子在其结合区域阻止蛋白质的裂解,而在没有结合所述 GAG 配体分子的区域,所述蛋白质被裂解;和

[0026] (c) 分离并检测裂解的肽,其中所述蛋白质未裂解的区域说明所述 GAG 配体分子结合在该区域上。可以通过例如 LC-MS、nanoHPLC-MS/MS 或者质谱分析方法进行检测。

[0027] 引入或改进 GAG 结合位点的方法在,例如 WO 05/054285 中有部分描述,如下所述:

[0028] - 确定参与 GAG 结合的蛋白质区域

[0029] - 设计新的 GAG 结合位点,即,在任意位置处引入(取代或者插入)碱性或者供电子氨基酸,优选 Arg、Lys、His、Asp 和 Gln 残基,或者缺失妨碍 GAG 结合的氨基酸

[0030] - 在计算机中检验所得突变蛋白质的构象稳定性

[0031] - 克隆野生型蛋白质的 cDNA(任选:购买该 cDNA)

[0032] - 使用该 cDNA 作为 PCR-辅助诱变的模板,从而向氨基酸序列引入如上所述的变化

[0033] - 将突变基因亚克隆到合适的表达系统中(原核或者真核,取决于生物学所需的翻译后修饰)

[0034] - 在体外表达、纯化并鉴定该突变蛋白质

[0035] GAG 结合亲和力提高的标准: $K_d^{GAG}(\text{突变体}) \leq 10\mu\text{M}$

[0036] - 通过远-UV CD 光谱或者 1-D NMR 波谱来检查结构保守性。

[0037] 通过远-UV CD 光谱检测出修饰后的结构比野生型结构偏差小于 30%,优选小于 20%时,认定为本发明的结构保守修饰。

[0038] 供电子氨基酸是那些提供电子或者氢原子的氨基酸(Droenstedt 定义)。优选的这些氨基酸可以为 Asn 或者 Gln。碱性氨基酸可以选自 Arg、Lys 或者 His。

[0039] 如果被所述碱性或者供电子氨基酸取代的天然氨基酸为碱性氨基酸,该取代氨基酸优选更为碱性的氨基酸或者向天然蛋白质结构中引入更多或更少的结构柔性(structural flexibility)的氨基酸。

[0040] 根据本发明结构柔性是指对 GAG 配体结合所导致的变化适应程度。

[0041] 在本发明具体的实施方式中,被碱性和/或供电子氨基酸取代的天然氨基酸为非碱性或者碱性较小的氨基酸。

[0042] 本发明的 SDF-1 突变蛋白可以包含结构保守形式的修饰,其中,通过远-UV CD 光谱检测显示修饰后的结构与野生型 SDF-1 结构相比差异小于 30%,优选小于 20%,优选小于 10%。

[0043] 在本发明可供选择的实施方式中,结构保守修饰的位点不在 SDF-1 蛋白的 N- 末端。

[0044] 本发明包括具有增强的 GAG 结合亲和力和减少的 GPCR 活性的 SDF-1 突变蛋白,其中,通过插入或者取代至少两个碱性氨基酸来对 SDF-1 蛋白的非结构区域进行修饰,并且在所述 SDF-1 蛋白的 N- 末端区域截去 8 个氨基酸或者取代 / 缺失前两个氨基酸。

[0045] 在具体的实施方式中, N- 末端氨基酸可以选自赖氨酸、精氨酸、脯氨酸或者甘氨酸。

[0046] 另外,在本发明的 SDF-1 突变蛋白的第 29 或者第 39 位上的至少一个氨基酸可以被修饰。可以选择的是,氨基酸的缺失、取代或者插入也可以发生在第 24、25、26、27 和 / 或 41、42、43 位处。

[0047] 可以选择的是,本发明的 SDF-1 突变蛋白的氨基酸序列可以用下述通式表示:

[0048] $(M)_n(X1)_m(X2)_pVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKI(X3)NTPNCALQI(X4)ARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK(GRREEKVGKKEKIGKKRQKK\ RAAAQKRKN)$ 。

[0049] 其中 X1 为 K 或者 R 残基,

[0050] 其中 X2 为 P 或者 G 残基,

[0051] 其中 X3 选自 Y 和 / 或 A 残基,优选为 A,

[0052] 其中 X4 选自 S、R、K、H、N 和 / 或 Q 残基,优选为 K,

[0053] 以及,其中 n 和 / 或 m 和 / 或 p 和 / 或 o 可以为 0 或 1,其中 X1、X2、X3 或 X4 中至少两个位置被修饰。

[0054] 在本发明备选的实施方式中, SDF-1 突变蛋白可以含有 N- 末端 Met。

[0055] 本发明的另一个方面是编码上述本发明所述蛋白质的分离的多核苷酸分子。该多核苷酸可以为 DNA 或者 RNA。因此所述形成本发明 SDF-1 突变蛋白的修饰是在 DNA 或者 RNA 水平上实现的。本发明分离的多核苷酸分子适合用于诊断方法以及基因治疗,以及大规模制备本发明的 SDF-1 突变蛋白。

[0056] 此外还优选,在严格条件下使分离的多核苷酸分子与上述本发明的多核苷酸分子杂交。根据杂交的条件,在两个 DNA 或者 RNA 分子形成互补双链体时,即可以为完全匹配也可以包含错配的碱基(参考 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)。超过 50 个碱基的探针可以引起达 25 ~ 30% 的错配碱基。较短的探针会引起较少的错配。靶基因和探针形成的双链体中包含有错配碱基的趋势可以通过杂交条件的严格程度来控制,该严格杂交条件本身即是诸多因素,例如杂交缓冲液中的盐或甲酰胺的浓度,杂交的温度以及杂交后的洗涤条件的函数。通过适用在形成杂交双链体中已经熟知的原理,本领域技术人员可以在多种不同的杂交缓冲液、温度和洗涤条件中进行选择从而获得所期望的严格条件。因此,可以选择能检测完全匹配或者部分匹配的杂交双链体的条件。双链体的解链温度 (T_m) 对于选择合适的杂交条件是较为有用的。长度上超过 200 个核苷酸的多核苷酸分子的严格杂交条件通常包括在比预期的双链体的解链温度低 15 ~ 25°C 的条件下杂交。对于超过 30 个碱基的寡核苷酸探针,其形成的双链体的稳定性比较长的寡核苷酸形成的双链体差,严格杂交通常通过在比 T_m 温度低 5 ~ 10°C 的条件下进行杂交来实现。可以通过下述公式来计算核酸双链体的 T_m , 该公式基于核酸中含有的 G+C 含量同时还考虑了链长,所述公式为:

[0057] $T_m = 81.5 - 16.6(\log[NA^+]) + 0.41(\% G+C) - (600/N)$

[0058] 其中 N = 链长。

[0059] 另一个方面还涉及含有上述本发明的分离的 DNA 分子的载体。该载体包含蛋白质有效转染以及有效表达必需的所有调控因子。这类载体在本领域中是为人们所熟知的,可以选择任何适合的载体用于本发明目的。

[0060] 本发明的另一个方面涉及转染有上述本发明的载体的重组细胞。根据本领域技术人员已知的方法可以进行细胞的转染以及重组细胞的培养。所述重组细胞以及它们的任意子代细胞含有所述载体。因此,本发明提供一种细胞系,根据载体的不同,该细胞系连续表达或者通过活化而表达 SDF-1 α 突变蛋白。

[0061] 本发明的另一个方面涉及药物组合物,该药物组合物包含本发明的 SDF-1 α 突变蛋白、多核苷酸或者载体以及药学上可接受的载体。该药物组合物当然还可以包含其他通常存在于药物组合物中的物质,例如盐、缓冲液、乳化剂(emulgator)、着色剂等。

[0062] 本发明的另一个方面涉及上述本发明的 SDF-1 蛋白、多核苷酸或者载体用于抑制或压制各自野生型蛋白质的生物活性的用途。如上所述,本发明的 SDF-1 突变蛋白可以作为一种特异性的拮抗物,并且本发明的 SDF-1 突变蛋白不会出现使用现有重组蛋白质时出现的副作用。由于增加了 GAG 结合亲和力,改性的 SDF-1 蛋白可以作为特异性的拮抗物,与野生型的 GAG 结合蛋白竞争与 GAG 结合。

[0063] 在这种情况下,这特指癌症进展中涉及到的生物活性。

[0064] 因此,上述本发明的 SDF-1 蛋白、多核苷酸或者载体的另一用途是用于制造治疗癌症的药物。特别地,其可以作为无副作用的拮抗物,并且特别适合于癌症的治疗。因此,本发明的另一个方面还是治疗癌症的方法,其中向患者给药本发明的 SDF-1 突变蛋白、本发明分离的多核苷酸分子或者载体、或者本发明的药物组合物。

[0065] 此外,通过下述实施例来说明本发明,但本发明并不限于下述实施例。

实施例

[0066] 实施例 1:提高 GAG 结合亲和力

[0067] 通过等温荧光滴定法测定,与野生型 SDF-1a 相比,SDF-1a 突变体的 GAG 结合亲和力经改造后提高(参见图 2)。利用 Perkin Elmer(Baconsfield,UK)LS50B 荧光计进行稳态荧光测量。在 PBS(pH 7.2,125mM NaCl)中的 SDF-1a 野生型或者突变体的 180nM 预平衡溶液的发射峰范围在 300-390nm(激发波长 282nm)。将比色皿固定器放入恒温箱中,加入等分(aliquot)的硫酸乙酰肝素平衡 2min 后,可以得到结合等温线。将激发和发射的狭缝宽度均设定为 12nm,并以 200nm/min 的速度记录光谱数据。设定 290nm 的波长阈值从而避免散射光。荧光光谱参照背景值进行校正,对 300 ~ 390nm 范围内的各个区域进行积分。将由三个独立实验得出的荧光强度($-\Delta F/F_0$)的规范均值变化对配体浓度作图。所得结合等温线用 Origin(Microcal Inc., Northampton, USA) 程序通过非线性回归分析进行调整,使之符合之前已经发表的描述双分子结合反应的方程式(Falsone 等人,(2001)Biochem Biophys Res Commun 285,1180-5)。观察结果显示,与野生型 SDF-1a 相比,Met-SDF-1 Δ 8L29K V39K 突变体的 HS 亲和力明显提高了约 10 倍。

[0068] 实施例 2:敲低 GPCR 活性

[0069] 使用配有 5 μ m 经 PVP- 包覆的聚碳酸酯膜的 48- 孔博伊登室系统 (Neuroprobe) 研究 SDF-1 α 野生型和突变体指导的细胞迁移。将野生型 SDF-1 α 和突变体在含有 20mM HEPES pH 7.3 和 1mg/ml BSA 的 RPMI 1640 中的 5nM ~ 20nM 稀释液一式三份放入所述室的下排孔中, 包括仅含有缓冲液的孔。将 50 μ l 在同样培养基中的 2×10^6 细胞 /ml THP-1 细胞悬浮液 (European collection of cell cultures) 放入上排孔中。在 37°C 和 5% CO₂ 温育 2h, 用 Hank's 平衡盐溶液清洗滤膜的上表面。迁移的细胞被固定于甲醇中并用 Hemacolor® (Merck) 进行染色。每孔计数 5 个 400 倍放大视野中的迁移的细胞, 将三个独立实验的均值参照背景校正后, 对趋化因子浓度作图 (参见图 3; PA517 = Met-SDF-1 Δ 8L29K V39K)。结果显示, Met-SDF-1 Δ 8L29KV39K 突变体在体外的趋化性明显降低。

[0070] 实施例 3: 抑制乳癌的转移

[0071] 使用鼠类异种移植模型研究 SDF-1 α 突变体对于癌症转移的抑制活性。在体内实验中使用了 10 周龄的雌性免疫缺陷性 SCID 小鼠。在整个实验过程中将它们分开喂养。将动物们运输并安顿下来后, 在实验开始之前, 让动物休息数日。

[0072] 在该异种移植模型中使用 LMD-231 细胞。这些细胞是从接种了 MDA-MB-231 的小鼠的肺转移 (lung metastasis) 中获得的。已知这些细胞表达高水平的 CXCR4, 并且通常用于异种移植的实验。在下述培养基中培养这些贴壁细胞, 所述培养基为完全极限必须培养基和完全 RPMI 培养基按照 50 : 50 的比例配制的培养基, 并且按照 1 : 3 的比例将细胞分瓶。在 37°C 和 5% CO₂ 的湿润气氛下培养上述细胞。

[0073] 在体内实验中, 将 120000 个 LMD-231 细胞注射到每一只小鼠的尾静脉中。在即将开始注射前, 将细胞与 PBS 混合作为对照组, 或者将细胞与所需浓度的突变体趋化因子混合。(细胞和趋化因子未按通常作法温育, 它们在注射之前的混合时间平均为 5 ~ 10 分钟。) 每只小鼠总注射量为 100 μ l。

[0074] 在第 28 天, 人道地杀死上述动物并获得其器官。将每只小鼠一半的肝脏和一个肺迅速地冷冻用于将来的实验。将另外一半肝脏和一个肺固定于福尔马林溶液中, 并随后包埋于石蜡中。从肝脏 (和肺) 制作切片。将每只小鼠的 2 个切片在细胞角蛋白标记混合物中染色, 该标记特异的染色人上皮细胞 (乳癌)。

[0075] 使用 LCM 激光捕获显微镜和同名集成软件来计算每个切片的总面积来完成对于肝转移 (liver metastase) 的评价。然后计数每个切片中转移的总数并计算出在每平方毫米的平均命中数 (Mets) (图 4)。20 μ g/ 剂 Met-SDF-1 Δ 8L29K V39K 突变体显示出明显抑制细胞向肝脏转移。

序列表

<110> 普罗塔芬生物技术股份公司 (Protaffin Biotechnologie AG)

<120> 基于 SDF-1 的糖胺聚糖拮抗物及其使用方法

<130>R 52397

<150>EP 07450189.1

<151>20071024

<160>6

<170>PatentIn version 3.4

<210>1

<211>99

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>SDF-1 突变蛋白

<220>

<221>M = 甲硫氨酸或无氨基酸残基

<222>(1).. (1)

<220>

<221>X = 赖氨酸,精氨酸或无氨基酸残基

<222>(2).. (2)

<220>

<221>X = 脯氨酸,甘氨酸或无氨基酸残基

<222>(3).. (3)

<220>

<221>X = 酪氨酸或丙氨酸

<222>(30).. (30)

<220>

<221>X = 丝氨酸, 精氨酸, 赖氨酸, 组氨酸, 天冬酰胺或谷氨酰胺

<222>(40).. (40)

<220>

<221>X = GRREEKVGKKEKIGKKKRQKKRKAQKRKN 或无氨基酸

<222>(70).. (99)

<400>1

```

Met Xaa Xaa Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu
1           5           10           15
Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Xaa Asn Thr
           20           25           30
Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Xaa Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg
           35           40           45
Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu
           50           55           60
Lys Ala Leu Asn Lys Gly Arg Arg Glu Glu Lys Val Gly Lys Lys Glu
65           70           75           80
Lys Ile Gly Lys Lys Lys Arg Gln Lys Lys Arg Lys Ala Ala Gln Lys
           85           90           95
Arg Lys Asn

```

<210>2

<211>68

<212>PRT

<213> 人 (Homo Sapiens)

<400>2

```

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

```

Ala Leu Asn Lys

65

<210>3

<211>69

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>SDF-1 突变

<400>3

Met Arg Gly Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu

1 5 10 15

Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Lys Asn Thr

20 25 30

Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg

35 40 45

Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu

50 55 60

Lys Ala Leu Asn Lys

65

<210>4

<211>69

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>SDF-1 突变

<400>4

Met Arg Gly Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu

1 5 10 15

Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Lys Asn Thr

20 25 30

Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Lys Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg

35 40 45

Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu
50 55 60

Lys Ala Leu Asn Lys
65

<210>5

<211>61

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>SDF-1 突变

<400>5

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

<210>6

<211>61

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>SDF-1 突变

<400>6

Met Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val
1 5 10 15
Lys His Leu Lys Ile Lys Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Lys
20 25 30
Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu

	35		40		45							
Lys	Trp	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Glu	Lys	Ala	Leu	Asn	Lys
50						55					60	

SDF-1a (1-68):	KPVSLSYRCPCRRFFESHVARANVKHLKIILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK
Met-SDF-1 K1R P2G L29K:	<u>MRGV</u> SLSYRCPCRRFFESHVARANVKHLKI <u>KNT</u> PNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK
Met-SDF-1 K1R P2G V39K:	<u>MRGV</u> SLSYRCPCRRFFESHVARANVKHLKI <u>KNT</u> PNCALQI <u>KARL</u> KNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK
Met-SDF-1 Δ8 L29K:	<u>MCPC</u> RRFFESHVARANVKHLKI <u>KNT</u> PNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK
Met-SDF-1 Δ8 L29K V39K:	<u>MCPC</u> RRFFESHVARANVKHLKI <u>KNT</u> PNCALQI <u>KARL</u> KNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK

图 1

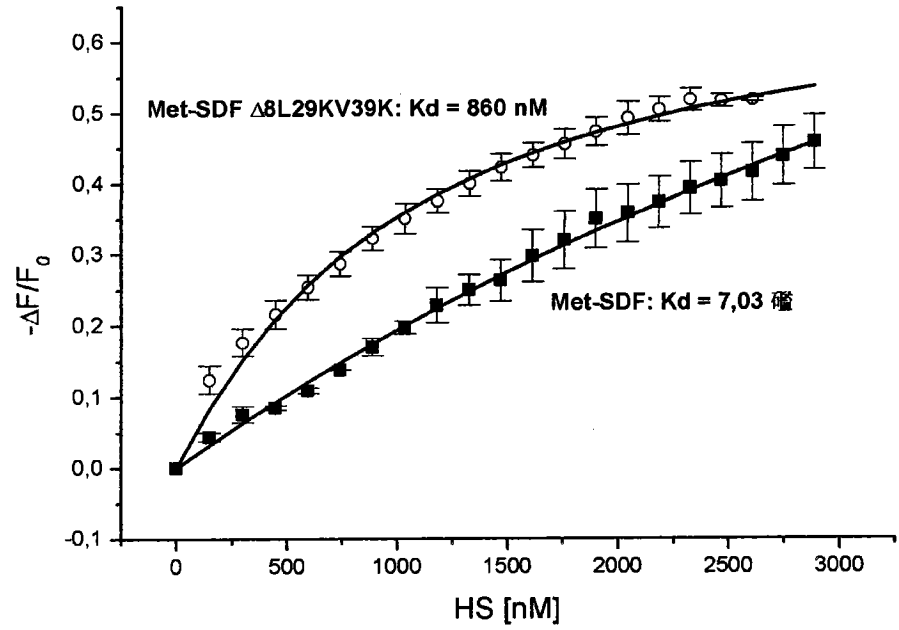


图 2

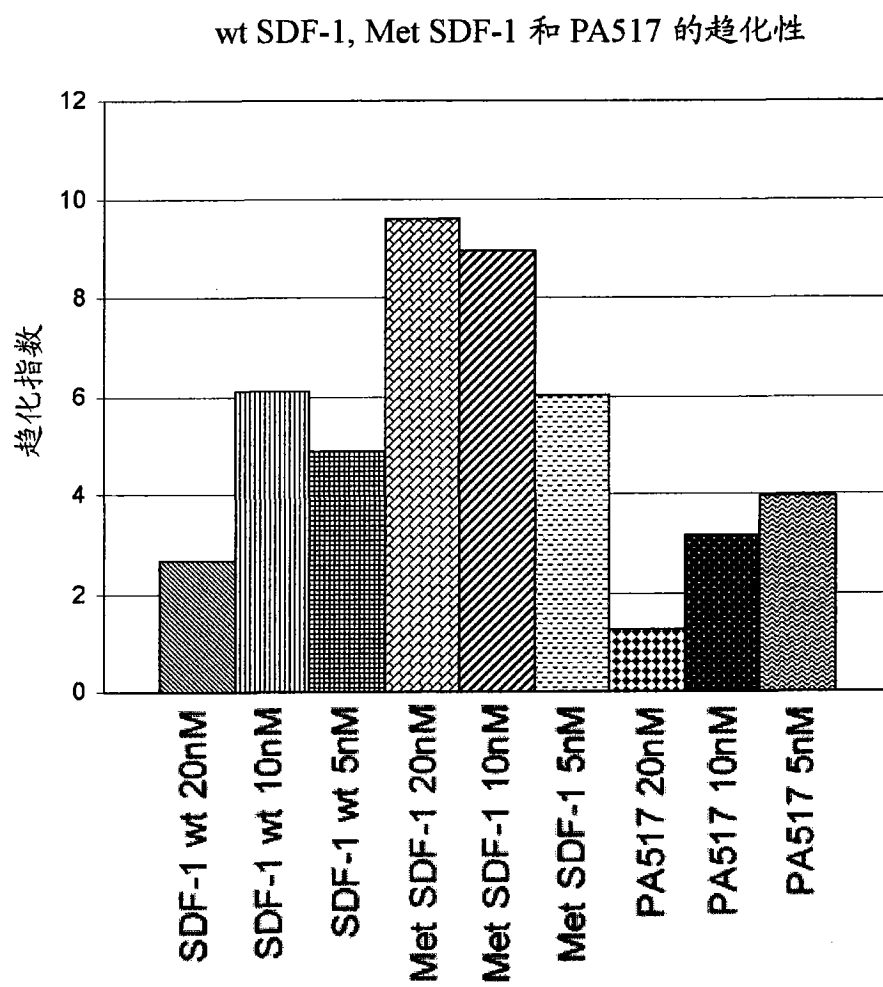


图 3

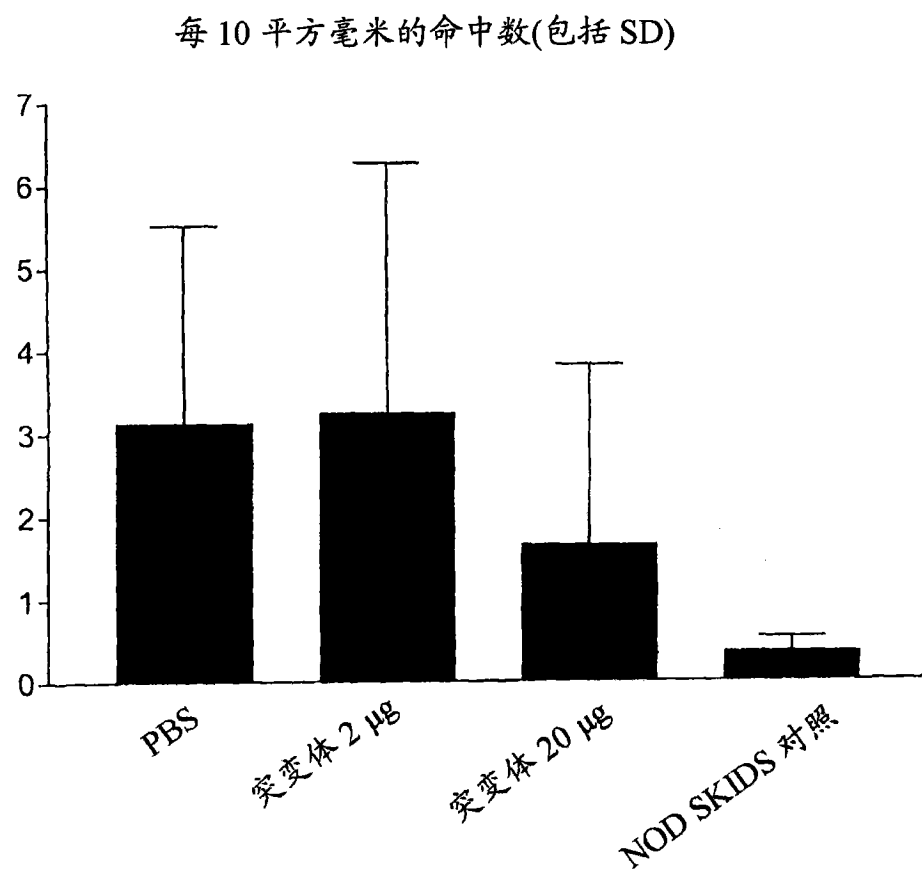


图 4