



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0087061  
(43) 공개일자 2009년08월14일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) Int. Cl.<br/><i>A61K 38/00</i> (2006.01) <i>C07K 17/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-7012163</p> <p>(22) 출원일자 2007년11월08일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2009년06월12일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2007/023527</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2008/063424<br/>국제공개일자 2008년05월29일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>11/979,708 2007년11월07일 미국(US)<br/>60/858,406 2006년11월13일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>더 브리검 앤드 우먼즈 하스피탈, 인크.<br/>미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75</p> <p>(72) 발명자<br/>리, 리차드<br/>미국 02493 메사추세츠주 웨스턴 컨트리 드라이브 4</p> <p>(74) 대리인<br/>김영, 양영준</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 26 항

**(54) 헤파린 결합 서열에 융합된 성장 인자를 사용하여 심장 수복을 촉진시키는 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 헤파린 결합 펩티드가 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진시키는 성장 인자에 융합되어 있는 단백질에 관한 것이다. 그렇게 형성된 화합물은 세포 표면에 결합하게 되고, 이어서, 손상된 조직으로 투여되어 진다. 그로 인해 성장 인자는 그가 수복을 촉진시키는 투여 부위에서 유지된다.

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

식:  $B-(J)_n-(Z)_q$ , 또는  $(Z)_q-(J)_n-B$

(여기서, B는 심근세포의 성장 및/또는 생존을 촉진시키는 펩티드이고,

J는 단백질생성 아미노산 또는 링커이며;

Z는 헵타린 결합 펩티드이고;

n은 정수 0-10이며; q는 정수 1-5이다)를 갖는 화합물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 화합물이 J는 단백질생성 아미노산이고, B는 인슐린 유래 성장 인자-1(IGF-1) 또는 혈소판 유래 성장 인자(PDGF)인 융합 단백질인 화합물.

**청구항 3**

제2항에 있어서, Z가

**KKKRRGKGLGKKRDPCLKKYKG (서열 번호: 3);**

**RIQNLLKITNLRIKFKV (서열 번호: 4);**

**PYVVLP RPVCFEKG MNYTVR (서열 번호: 5);**

**KQNCLSSRASFRGCVRNLRLSR (서열 번호: 6);**

**KDGRKICLDLQAPLYKKI KKLLES (서열 번호: 7);**

**CKNGGFFLR IAPDGRVDGVREK (서열 번호: 8);**

**YSSWYVALKRTGQYKLGPKTGP GQKAILFLP (서열 번호: 9);**

**AKLNCRLYRKANKSSKLV SANR LFGDK (서열 번호: 10);**

**LRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQ (서열 번호: 11);**

**PLQERAQAAWQERLRARMEEMGSRTDR LDEVKEQVAERAKL (서열 번호: 12);**

**KGKMHKTCYY (서열 번호: 13);**

**MGKMHKTCYN (서열 번호: 14);**

**PPTIWKHKGRDVILK KDVR FIVLSNNY (서열 번호: 15);**

**KKHEAKNWFVGLKKN GSKRGP (서열 번호: 16);**

**KGGRGTPGKPGPRGQRGPTGR GERGPRGITGK (서열 번호: 17);**

**GEFYDLRLKGDK (서열 번호: 18);**

**HRHHPREMKKRVEDL (서열 번호: 19);**

**EKTLRKWLKMFKKR (서열 번호: 20); 및**

**AEAAARAAARRAARRAAR (서열 번호: 21)**

로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 융합 단백질.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, n=0인 융합 단백질.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, q=1인 융합 단백질.

**청구항 6**

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 분자.

**청구항 7**

- a) 제1항의 화합물이 심근세포에 결합할 수 있도록 하는데 충분한 시간 동안 그러한 조건하에서 상기 심근세포를 상기 화합물과 함께 인큐베이션시키고;
- b) 단계 a)의 인큐베이션된 심근세포를 환자의 심장 조직 내로 주사하거나 삽입시키는 것을 포함하는, 손상된 심장 조직을 갖는 환자를 치료하는 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 화합물이 J는 단백질생성 아미노산이고, B는 인슐린 유래 성장 인자-1(IGF-1) 또는 혈소판 유래 성장 인자(PDGF)인 융합 단백질인 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 융합 단백질 중 Z가

- KKKRKGKGLGKKRDPCLKKYKG (서열 번호: 3);
- RIQNLLKITNLRIFVK (서열 번호: 4);
- PYVVLPVPVCFEKGMYTVR (서열 번호: 5);
- KQNCLSSRASFRGCVRNLRSLR (서열 번호: 6);
- KDGRKICLDLQAPLYKKIHKLLS (서열 번호: 7);
- CKNGGFFLRIPDGRVDGVREK (서열 번호: 8);
- YSSWYVALKRTGQYKLGPKTGGQKAILFLP (서열 번호: 9);
- AKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFGDK (서열 번호: 10);
  
- LRKLRKRLRDADDLQKRLAVYQ (서열 번호: 11);
- PLQERAQAAWQERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAERAKL (서열 번호: 12);
- KGKMHKTCYY (서열 번호: 13);
- MGKMHKTCYN (서열 번호: 14);
- PPTIWKHKGRDVILKKDVRFIVLSNNY (서열 번호: 15);
- KKHEAKNWFVGLKKNKSGCRGP (서열 번호: 16);
- KGGRGTPGKPGPRGQRGPTGRGERGPRGITGK (서열 번호: 17);
- GEFYDLRLKGDK (서열 번호: 18);
- HRHHPREMKKRVEDL (서열 번호: 19);
- EKTLRKWLKMFKKR (서열 번호: 20); 및
- AEAAARAAARRAARRAAAR (서열 번호: 21)

로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 융합 단백질 중 n=0인 방법.

**청구항 11**

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 융합 단백질 중 q=1인 방법.

**청구항 12**

제7항에 있어서, 상기 심근세포가 배아 줄기 세포로부터 유래된 것인 방법.

**청구항 13**

제7항에 있어서, 상기 심장 조직 손상이 심근경색증의 결과인 것인 방법.

**청구항 14**

- a) 제1항의 화합물이 연골세포에 결합할 수 있도록 하는데 충분한 시간 동안 그러한 조건하에서 상기 연골세포를 상기 화합물과 함께 인큐베이션시키고;
- b) 단계 a)의 인큐베이션된 연골세포를 연골 손상 부위에 주사하거나 삽입시키는 것을 포함하는, 손상된 연골을 수복시키기 위해 환자를 치료하는 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 화합물이 J는 단백질생성 아미노산이고, B는 인슐린 유래 성장 인자-1(IGF-1) 또는 혈소판 유래 성장 인자(PDGF)인 융합 단백질인 것인 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 융합 단백질 중 Z가

- KKKRKGKGLGKKRDPCLKKYKG (서열 번호: 3);
- RIQNLLKITNLRIFVK (서열 번호: 4);
- PYVVLPVPVCFEKGMYTVR (서열 번호: 5);
- KQNCLSSRASFRGCVRNLRSLR (서열 번호: 6);
- KDGRKICLDLQAPLYKKIHKLLS (서열 번호: 7);
- CKNGGFFLRIAPDGRVDGVREK (서열 번호: 8);
- YSSWYVALKRTGQYKLGPKTGPQKAILFLP (서열 번호: 9);
- AKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFGDK (서열 번호: 10);
  
- LRKLRKRLRDADDLQKRLAVYQ (서열 번호: 11);
- PLQERAQAAWQERLRARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAERAKL (서열 번호: 12);
- KGKMHKTCYY (서열 번호: 13);
- MGKMHKTCYN (서열 번호: 14);
- PPTIWKHKGRDVILKKDVRFIVLSNNY (서열 번호: 15);
- KKHEAKNWFVGLKKNKSGCRGP (서열 번호: 16);
- KGGRGTPGKPGPRGQRGPTGRGERGPRGITGK (서열 번호: 17);
- GEFYDLRLKGDGK (서열 번호: 18);
- HRHHPREMKKRVEDL (서열 번호: 19);
- EKTLRKWLKMFKKR (서열 번호: 20); 및
- AEAAARAAARRAARRAAAR (서열 번호: 21)

로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 융합 단백질 중 n=0인 방법.

**청구항 18**

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 융합 단백질 중 q=1인 방법.

**청구항 19**

- a) 제1항의 화합물이 뉴런에 결합할 수 있도록 하는데 충분한 시간 동안 그러한 조건하에서 상기 뉴런을 상기 화합물과 함께 인큐베이션시키고;
- b) 단계 a)의 인큐베이션된 뉴런을 신경 조직 손상 부위에 주사하거나 삽입시키는 것을 포함하는, 손상된 신경 조직을 수복시키기 위해 환자를 치료하는 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 화합물이 J는 단백질생성 아미노산이고, B는 인슐린 유래 성장 인자-1(IGF-1) 또는 혈소

판 유래 성장 인자(PDGF)인 융합 단백질인 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 융합 단백질 중 Z가

- KKKRKGGKGLGKKRDPCLKKYKG (서열 번호: 3);
- RIQNLLKITNLRKIFVK (서열 번호: 4);
- PYVVLPVPVCFEKGMYTVR (서열 번호: 5);
- KQNCLSSRASFRGCVRNLRSLR (서열 번호: 6);
- KDGRKICLDLQAPLYKKIHKLLS (서열 번호: 7);
- CKNGGFFLRIAPDGRVDGVREK (서열 번호: 8);
- YSSWYVALKRTGQYKLGPKTGPQKAILFLP (서열 번호: 9);
- AKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFQDK (서열 번호: 10);
  
- LRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQ (서열 번호: 11);
- PLQERAQAAWQERLRARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAERAKL (서열 번호: 12);
- KGKMHKTCYY (서열 번호: 13);
- MGKMHKTCYN (서열 번호: 14);
- PPTIWKHKGRDVILKKDVRFIVLSNNY (서열 번호: 15);
- KKHEAKNWFVGLKKNKSGCKRGP (서열 번호: 16);
- KGGRGTPGKPGPRGQRGPTGRGERGPRGITGK (서열 번호: 17);
- GEFYDLRLKGDGK (서열 번호: 18);
- HRHHPREMKKRVEDL (서열 번호: 19);
- EKTLRKWLKMFKKR (서열 번호: 20); 및
- AEAAARAAARRAARRAAAR (서열 번호: 21)

로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 융합 단백질 중 n=0인 방법.

**청구항 23**

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 융합 단백질 중 q=1인 방법.

**청구항 24**

제19항에 있어서, 상기 손상된 신경 조직이 신경퇴행성 질환, 뇌졸중 또는 상해의 결과인 방법.

**청구항 25**

제19항에 있어서, 상기 손상된 신경 조직이 ALS의 결과물인 방법.

**청구항 26**

제19항에 있어서, 상기 뉴런이 피질척수 운동 뉴런인 방법.

**명세서**

**기술분야**

<1> 관련 출원에 관한 상호 참조

<2> 본 출원은 2006년 11월 13일 출원된 미국 가출원 제60/858,406호 (그의 전문이 본원에서 참고로 인용된다)의 우선권, 및 잇점을 주장한다.

<3> 본 발명은 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진시키는 폴리펩티드가, 헤파린에 결합하는 펩티드에 융합된 단백질에 관한 것이다. 이러한 단백질은 심근세포에 결합할 수 있고, 손상된 심장 조직에 투여되어 수복을 촉진시키는데 도움을 줄 수 있다.

**배경 기술**

<4> 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1)은 심근세포의 성장 및 생존을 촉진시키는 단백질이다. IGF-1이 부족한 마우스에서는 심근경색증 이후에 아포프토시스가 증가하는 것으로 나타난 반면 (문헌 [Palmen, et al., *Cardiovasc. Res.* 50:516-524 (2001)]), 심장-특이 IGF-1 과다발현은 경색증 이후의 근육세포의 아포프토시스 및 심실의 팽창에 대해서 보호한다 (문헌 ([Li, et al., *J. Clin. Invest.* 700:1991-1999 (1997)]; [Torella, et al., *Circ. Res.* 94:514-524 (2004)]). IGF-1 과다발현은 또한 심장 줄기 세포의 수 및 성장을 증가시켜 노화 심장에서의 근육세포 전환 및 기능을 증가시킨다. 경색증 이후 IGF-1은 심근에 삽입된 배아 줄기 세포의 생착, 분화, 및 기능적 개선을 촉진시킨다 (문헌 [Kofidis, et al., *Stem Cells* 22:1239-1245 (2004)]). 또한, IGF-1의 혈청 수준은 노인 환자 아집단에서 선천성 심장 부전의 위험과 역상관관계에 있다 (문헌 [Vasan, et al., *Ann. Intern. Med.* 139:642-648 (2003)]).

<5> 상기 기술된 특징들을 통해 IGF-1은, 심장 조직이 손상된 경험이 있는 환자, 예로서, 심근경색증 수술을 받은 바 있는 환자용으로서 관심이 대상이 되는 치료제가 된다. 그러나, IGF-1은 조직을 통해 쉽게 확산되는 작은 단백질이다. 그 결과, 고농도의 이러한 인자를 손상된 조직 부위에 장기간 동안 유지시키는 것은 어렵다. 고농도로 국소 위치에 유지시키기 위해 채택된 하나의 접근법은 IGF-1을 자가-조립 생물학적 막에 부착시키는 것이다 (US20060088510 참조). 심근경색증을 앓는 래트 모델을 사용하여 이러한 막을 신생아 심근세포를 따라 삽입시켰을 때 삽입시킨 세포의 성장과 성장은 비결합 IGF-1로 삽입받은 세포와 비교하여 개선되었다는 것이 발견되었다. 따라서, 손상된 심장의 집락을 형성할 수 있고, 기능을 개선시킬 수 있는 세포의 능력은 증가된다. 유사한 접근법 사용시, PDGF를 사용함으로써 양성 결과를 또한 얻었다 (US20060148703). 이러한 결과가 장래성이 있기는 하지만, 막을 작제하고 삽입시킬 필요성이 없는 대체 방법이 바람직할 수 있다.

**발명의 상세한 설명**

<6> **본 발명의 요약**

<7> 본 발명은 심근세포를 손상된 심장 조직 내로 삽입시키기 전에 IGF-1을 심근세포에 결합시키는 방법의 개발에 기초한다. IGF-1이 헤파린 결합 펩티드(HBP)에 결합할 수 있고, 배양된 세포의 생존에 유익한 효과를 유지시키는 융합 단백질을 수득할 수 있다는 것을 발견하게 되었다. 단독의 IGF-1보다는 융합 단백질이 심근세포에 (가정컨대, 세포 표면 헤파린에) 더욱 잘 결합한다. 많은 다른 세포 유형이 세포 표면 헤파린을 갖고 있는 바, 단순히 IGF-1/HBP 단백질을 전신 주사하는 것이 심장 환자에 많은 이익이 될 수 있을 것이라고는 예측할 수 없다. 그러나, 삽입에 앞서 심근세포를 IGF-1/HBP와 함께 인큐베이션시킴으로써 표적화를 달성할 수 있다. 다소 작은 범위에서, 국소화 또한 상기 단백질을 심장 조직 내로 직접 주사함으로써 달성될 수 있다. 유사한 접근법이 (세포가 이식되어 있거나, 없던 간에) 성장 인자에 반응하는 기타 병태 (예로서, 상처)를 치료하는데 유용할 것이다.

<8> 그의 한가지 측면에서, 본 발명은 식: B-(J)<sub>n</sub>-(Z)<sub>q</sub>, 또는 (Z)<sub>q</sub>-(J)<sub>n</sub>-B (여기서, n은 정수 0-10이고; q는 정수 1-5이며; B는 심근세포 (예로서, 측정된 바에 따르면, 혈청이 제거된 세포 사용)의 성장 및/또는 생존을 촉진시키는 펩티드이고, Z는 헤파린 결합 펩티드이다)를 갖는 화합물에 관한 것이다. 본원에 기술된 모든 펩티드를 비롯한 당업계에 공지된 임의의 헤파린 결합 펩티드가 사용될 수 있다. J는 펩티드들을 함께 결합시키는데 사용될 수 있는 단백질생성 아미노산 또는 화합물, 예를 들면, 비오틴/아비딘이다. 본 발명의 목적을 위해 모든 펩티드 서열은 달리 명시되지 않는 한, N 말단 (맨 왼쪽)에서부터 C 말단 (맨 오른쪽)으로 기재되고, 모든 펩티드는 "단백질생성" 아미노산들로 구성되며, 즉, 펩티드는 알라닌 (A); 아르기닌 (R); 아스파라긴 (N); 아스파르트산 (D); 시스테인 (C); 글루탐산 (E); 글루타민 (Q); 글리신 (G); 히스티딘 (H); 이소류신 (I); 류신 (L); 리신 (K); 메티오닌 (M); 페닐알라닌 (F); 프롤린 (P); 세린 (S); 트레오닌 (T); 트립토판 (W); 티로신 (Y); 또는 발린 (V)의 L-이성체이다.

<9> 바람직한 실시태양에서, 상기 제시된 식의 화합물은 J가 단백질생성 아미노산이고, B가 인슐린 유래 성장 인자-1(IGF-1) 또는 혈소판 유래 성장 인자(PDGF)인 융합 단백질이다. 인간 IGF-1 (진뱅크 수탁 번호 NM 00618)에 대한 전장의 서열은 하기와 같다:

**MGKISSLPTQLFKCCFCDFLKVKMHTMSSSHLFYLALCLLTFTSSATAGPETL**  
**CGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL**  
**EMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM**

<10> 서열 번호: 1 . 그러나, 밑줄로 표시된 서열은 본원에 기술된 방법에 따라 심근세포의 성장 및 생존 촉진에 충분하다. 따라서, 본 발명의 목적을 위해, IGF-1은 핵심 서열:

**PETLCGAELVDALQFVCGPRGFYFNKPTGYGSSIRRAPQTGIVD**  
**ECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPTKSA (서열 번호: 2)**

<11> 을 갖는 것으로서 정의되며, 이는 임의로 서열 번호: 1의 서열 중 임의의 추가 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, C 말단은 G, AG, TAG 등으로 시작될 수 있다. 유사하게, 서열 번호: 2의 N 말단은 서열 번호: 1에 따라 신장될 수 있다. 따라서, 펩티드는 R, RS, RSV 등으로 종결될 수 있다. PDGF의 전장 아미노산 서열 또한 당업계에 잘 공지되어 있으며 (문헌 [Rao, et al, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 53:2392-2396 (1986)]), 특히 진뱅크 수탁 번호 P01127로서 찾을 수 있다. 상기 제시된 식에서, n은 바람직하게 0이고, q는 바람직하게 1이다.

<13> 바람직한 헤페린 결합 펩티드는, 즉, 식에서, Z는:

**KKKRKGKGLGKKRDPCLKKYKG (서열 번호: 3);**  
**RIQNLLKITNLRIFVK (서열 번호: 4);**  
**PYVVLP RPVCFEKG MNYTVR (서열 번호: 5);**  
**KQNCLSSRASFRGCVRNLRSLR (서열 번호: 6);**  
**KDGRKICLDLQAPLYKKI KKLLES (서열 번호: 7);**  
**CKNGGFFLR IAPDGRVDGVREK (서열 번호: 8);**  
**YSSWYVALKRTGQYKLGPKTGP GQKAILFLP (서열 번호: 9);**  
**AKLNCRLYRKANKSSKLV SANRLFGDK (서열 번호: 10);**

<14> **LRKLRKRLRDADDLQKRLAVYQ (서열 번호: 11);**  
**PLQERAQA AWQERLRARMEEMGSRTDR LDEVKEQVAERAKL (서열 번호: 12);**  
**KGKMHKTCYY (서열 번호: 13);**  
**MGKMHKTCYN (서열 번호: 14);**  
**PPTIWKHKGRDVILKKDVR FIVLSNNY (서열 번호: 15);**  
**KKHEAKNWFVGLKKN GSKRGP (서열 번호: 16);**  
**KGGRGTPGKPGPRGQRGPTGRGERGPRGITGK (서열 번호: 17);**  
**GEFYDLRLKGDK (서열 번호: 18);**  
**HRHHPREMKKRVEDL (서열 번호: 19);**  
**EKTLRKWLKMFKKR (서열 번호: 20);** 및

<15> **A EAAAARAAARRAARRAAAR (서열 번호: 21)** 이다.

<16> 본 발명은 또한 상기 기술된 융합 단백질 중 임의의 것을 코딩하는 DNA 분자, 이들 DNA 분자를 함유하는 벡터, 및 상기 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 포함한다. 숙주 세포는 본원에 기술된 치료학적 방법에 사용하기 위한 융합 단백질을 생산하는데 사용될 수 있다. DNA는 또한 손상된 조직 부위에서 융합 단백질을 분비하는 세포를 형질전환시키는데 사용될 수 있다. 일단 분비되면, 단백질은 주변에 있는 다른 세포에 결합할 것이고, 이로써, 국소 부위의 농도는 상대적으로 고농도로 유지된다.

<17> 본 발명은 또한 하나 이상의 융합 단백질 또는 화합물을 사용하여 IGF-1 또는 PDGF에 대해 반응하는 임의의 병태에 대하여 환자를 치료하는 방법을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 화합물 또는 융합 단백질을 치료 부위에 직접 투여함으로써 내인성 세포 표면에 결합할 수 있게 한다. 더욱 바람직하게, 본 발명은 조직 성장 또는 수복이 필요하며 이러한 과정을 돕는데 사용될 수 있는 이용가능한 세포가 존재하는 병태를 치료하는데 사용된다. 이러한 경우, 상기 화합물 또는 융합 단백질은 삽입 이전에 화합물 또는 융합 단백질이 세포와 결합할 수 있도록 세포와 함께 사전 인큐베이션될 것이다. 특히 바람직한 방법에서 환자는 심근세포가 화합물 또는 용

합 단백질에 결합할 수 있도록 하는데 충분한 시간 동안 그리고 그러한 조건하에서 심근세포를 화합물 또는 융합 단백질과 함께 인큐베이션시킴으로써 (예로서, 심근색증에 의해 기인한) 손상된 심장 조직에 대해 치료받는다. 이어서, 세포는 환자의 심장 조직 내로 주사되거나, 삽입된다.

<18> 또한, 화합물 및 융합 단백질은 손상된 연결을 수복시키는데 사용될 수 있다. 보통, IGF-1은 연결 밖으로 확산되고, 따라서 IGF-1이 이식된 연결세포에 미치는 효과는 감소하거나 상실된다. 삽입 이전에 연결세포를 헤파린-결합 IGF-1과 함께 인큐베이션시킴으로써 성장 인자의 국소 농도는 증가하게 될 것이며, 그 결과 연결세포는 보다 많은 연결을 만들게 될 것이다.

<19> 헤파린에 결합하도록 공학처리된 성장 인자, 특히, IGF-1은 또한 예로서, 뇌졸중을 앓은 바 있거나, 또는 상해로 인해 신경 기능을 잃은 환자로서, 예를 들면, ALS와 같은 신경퇴행성 질환을 갖는 환자에서 뉴런을 수복시키고 재생시키기 위해서 삽입되는 세포에 결합될 수 있다. IGF-1은 ALS에서 임상 시험용 후보물질이며, 이는 피질척수 운동 뉴런에서 축삭 생성을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Ozdinler, et al., *Nature Neurosci.* 9:1371-1381 (2006)]). 삽입 이전에 IGF-1을 뉴런에 결합시킴으로써 생체내에서 그의 성장은 증진될 것이다.

<20> **본 발명의 설명**

<21> 본 발명은, 손상 이후의 조직 회복이, 국소 부위에서 성장 인자, 예를 들면, IGF-1 또는 PDGF의 농도를 고농도로 유지시킴으로써 촉진된다는 개념에 기초한다. 당업계에서 기술된 실험은 투여 부위에 치료제를 유지시키기 위해 생물학적으로 적합한 막을 사용한 이러한 접근법을 지지하였다 (US20060088510 및 US20060148703 참조). 본 발명에 이르러, 성장 인자는 헤파린 결합 펩티드에 융합될 수 있고, 심장 조직 내로 삽입되기 이전에 심근세포에 결합할 수 있다는 것이 발견되었다. 융합된 단백질은 세포 성장 및 생존을 촉진시키는 그의 능력을 유지하며, 생물학적으로 적합한 막을 제조하거나 사용할 필요없이 삽입 부위에서 유지된다.

<22> **펩티드 제조**

<23> 헤파린 결합 펩티드를 치료제에 결합시키는 한가지 방법은 비펩티드성 링커의 사용을 통해 이루어진다. 예를 들면, 분자를 연결시키기 위해 비오틴 및 아비딘을 사용하는 것은 당업계에 잘 알려져 있으며, 헤파린 결합 펩티드를 성장 인자, 예를 들면, IGF-1에 부착시키는데 표준 방법이 사용될 수 있다. 비오틴/아비딘 기와 펩티드 사이의 입체 간섭을 막기 위해 둘 사이에는 스페이서가 포함될 수 있다. 스페이서는 1-15개의 (바람직하게 1-10개) 지방산 또는 1-15개의 (바람직하게 1-10개) 아미노산의 형태를 취할 수 있다. 이러한 유형의 스페이서를 혼입시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

<24> 바람직하게, 헤파린 결합 펩티드 및 성장 인자, 예를 들면, IGF-1 및 PDGF는 융합 단백질의 형태로 함께 결합하게 된다. 융합 단백질은 화학적으로 합성될 수 있거나, 재조합 DNA 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 화학적 방법으로는 표준 N-t-부톡시카보닐 (t-Boc) 화학물질을 사용하는 고체상 펩티드 합성법 및 n-메틸피롤리돈 화학물질을 사용하는 사이클을 포함한다. 일단 펩티드가 합성되고 나면, 예를 들어, 역상 칼럼 상의 고압 액체 크로마토그래피와 같은 방법을 사용하여 펩티드를 정제할 수 있다. HPLC에 의해 순도 또한 평가할 수 있으며, 아미노산 분석에 의해 올바른 조성물의 존재를 측정할 수 있다.

<25> **세포에 대한 결합**

<26> 표준 방법을 사용하여 심근세포 또는 다른 세포를 수득할 수 있으며, 이어서, 융합 단백질이 세포 표면에 결합할 수 있도록 하는데 충분한 시간 동안 융합 조성물 또는 단백질과 함께 인큐베이션시킬 수 있다. 인큐베이션은 대략 약 1시간 내지 수일 동안 지속될 수 있고, 이는 세포가 생존할 수 있도록 하는 조건, 예로서, 약 37°C, 중성 pH, 및 세포 생존을 보장하는 배양 배지하에서 수행되어야 한다. 존재하는 단백질의 양은 일반적으로 세포를 코팅시키기에 충분하여야 하지만, 정확한 양은 중요하지 않다. 세포는 주사기 또는 카테터에 의해 심장 조직으로 투여될 수 있다. 정확한 세포 사용량은 중요하지 않지만, 일반적으로  $1 \times 10^5$ 개 내지  $1 \times 10^7$ 개가 사용될 것이다.

<27> **약제학적 조성물 및 투여량**

<28> 융합 단백질은 담체, 예를 들면, 염수, 물, 링거액 및 기타 제제 또는 부형제를 함유하는 약제학적 조성물로 혼입될 수 있고, 세포는 생육성을 유지시켜주는 표준 배지에서 유지될 수 있다. 제제는 일반적으로는 특히 심장 조직으로의 삽입, 주입 또는 주사용으로 디자인되지만, 예로서, 상처 치료와 같은 경우에는 국소 치료에서도 또한 유용할 것이다. 모든 약제학적 조성물은 당업계에서 표준인 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (예로서, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed. A. Oslo, ed., Easton, PA (1980)] 참조).

<29> 숙련된 당업자는 임상 의학에 잘 확립되어 있는 방법을 사용하여 사례별로 투여량을 조정할 수 있을 것으로 기대된다. 최적의 투여량은 당업계에 공지되어 있는 방법에 의해 결정될 것이며, 이는 예를 들면, 환자의 연령, 질환 상태 및 기타 임상적으로 관련이 있는 인자와 같은 인자에 의해 영향을 받게 될 것이다.

**실시예**

<30> **실시예 1: 심근세포의 생존**

<31> 본 실시예는 IGF-1이 ES-유래의 심근세포의 생존을 개선시킨다는 것을 입증하며, 주사된 세포의 생존을 개선시키기 위해 공학처리된 신규한 헤파린 결합(HB)-IGF-1 융합 단백질의 개발에 관해 기술한다.

<32> 방법 및 결과

<33> 기형종 형성을 최소화시키기 위하여 본 발명자들은 심근세포 계통에 수용된 ES 세포를 연구하였다. 현저법에 의해, α-심장 미오신 중쇄 프로모터-유도된 증강된 녹색 형광성 단백질(EGFP)로 안정적으로 형질감염된 마우스 ES 세포를 심근세포로 분화시키고, EGFP 양성 세포를 형광 세포 분류에 의해 정제하였다. 이들 ES-유래의 심근세포에서 IGF-1은 혈청 결핍에 의해 유도되는 세포 사멸을 감소시켰고 (13.6 +/- 1.9% 대 25.9 +/- 2.5% (대조군), p<0.05), 혈청 결핍에 의해 유도되는 아포프토시스를 감소시켰다 (각각 TUNEL-양성 세포 8.0 +/- 1.5% 대 4.3 +/- 0.5%, p<0.05). 추가로, IGF-1은 독소루비신 (1 μM, 24hr) 또는 켈레리트린 (3 μM, 1hr)-유도성 아포프토시스 (p<0.01)를 감소시켰다. 포스포이노시티드-3 키나제 저해제인 LY294002 (10 μM)는 IGF-1이 독소루비신-유도성 아포프토시스에 미치는 보호 효과를 저해하였다 (p<0.05). IGF-1은 주사 부위로부터 빠르게 확산되기 때문에, 본 발명자들은 N-말단 HB 도메인을 갖는 신규한 재조합 IGF-1 융합 단백질을 디자인하고 발현시켰다. 단백질은 니켈-친화성 크로마토그래피에 의해 정제한 후, 생물학적 활성을 회복시키기 위해 산화적으로 재폴딩시켰다. 세포 표면에 결합된 HB-IGF-1은 IGF-1보다 더 현저히 우수하였고, HB-IGF-1은 고유의 IGF-1만큼 강력하게 신생아 심장 근육세포 및 3T3 섬유모세포에서 Akt를 활성화시켰다.

<34> 결론

<35> IGF-1이 시험관내에서 ES-유래의 심근세포의 생존을 개선시키는 바, 이러한 신규의 헤파린-결합 IGF-1은 주사된 세포의 표면에 결합함으로써 세포 요법을 개선시킨다. 이는 국소적으로 전달된 치료학적 단백질을 통해 세포 미세환경을 변경시킬 수 있다는 잠재능을 입증한다.

<36> **실시예 2: 연골 수복**

<37> 본 실시예에서 본 발명자들은, 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자의 헤파린-결합 도메인과 천연 IGF-1의 융합 단백질인 신규한 헤파린-결합 IGF-1 (HB-IGF-1) 단백질을 디자인하고 정제하였다. HB-IGF-1은 헤파린 뿐만 아니라, 3T3 섬유모세포, 신생아 심장 근육세포 및 분화성 배아 줄기 세포의 세포 표면에 선택적으로 결합하였다. HB-IGF-1은 IGF-1과 동일한 동력학 및 용량-의존성으로 IGF-1 수용체 및 Akt를 활성화시켰는데, 이는 헤파린-결합 도메인에 기인한 생물학적 활성의 손상이 없음을 시사한다. 연골은 프로테오글리칸이 풍부한 환경이며, IGF-1은 연골세포 생합성을 위한 공지의 자극 물질이기 때문에 본 발명자들은 이어서 연골에서의 HB-IGF-1의 유효성을 연구하였다. HB-IGF-1은 연골 체외이식편에 의해 선택적으로 유지되었고, IGF-1과 비교하여 지속적으로 연골세포 프로테오글리칸의 생합성이 이루어지도록 하였다. 이러한 데이터는 국소 전달용으로 "장거리" 성장 인자 유사 IGF-1을 공학처리하는 전략법이 조직 수복에 유용하며, 전신 효과를 최소화시키는데 유용할 수 있다는 것을 보여준다.

<38> **물질 및 방법**

<39> 벡터 작제

<40> 래트의 IGF-1 cDNA는 프라미어 (5' → 3'), GGACCAGAGACCCTTTGCG (정방향, 서열 번호: 22) 및 AGCTGACTTTGTAGGCTTCAGC (역방향, 서열 번호: 23)를 사용하여 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭시켰다. 본 발명자들은 성숙한 펩티드 IGF-1 (70개의 아미노산)을 사용하였는데, 이는 엑손 3 및 4를 코딩하는 것이다 (문헌 ([Hameed, et al., *J. Physiol.* 547:247-254 (2003)]; [Shavlakadze, et al, *Growth Horm IGF Res* 75:4-18 (2005)]; [Musaro, et al, *Exp Gerontol.* 42:76-80 (2007)]). 생성물은, IGF-1의 C-말단에 종결 코돈 (TAG)을 첨가함으로써 Xpress-태깅된 IGF-1 (Xpress-IGF-1)을 코딩하는 pTrcHis-TOPO 벡터 (미국 캘리포니아주 캘즈배드 소재의 인비트로젠(Invitrogen))로 서브클로닝하였다. HB-IGF-1을 코딩하기 위해 래트 HB-EGF(AAAAAGAAGAGAAAGCAAGGGG TTAGAAAGAAGAGATCCATGCCT TAAGAAATACAAG (서열 번호: 24))의 헤파린 결합 서

열 (AA 93-113)을 돌연변이유발법을 통해 X-press 태그와 IGF-1 서열 사이로 삽입하였다.

<41> PfuUltra HF DNA 폴리머라제 (미국 텍사스주 시더 크릭에 소재하는 스트라테이진(Stratagene))를 사용하여 증폭을 실시하고, E. 콜라이(*E. coli*)에 형질전환시키기 전에 주형 플라스미드를 *DpnI* (미국 메사추세츠주 베벌리 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))로 분해시켰다. 모든 서열은 DNA 서열분석에 의해 확인하였다.

<42> 단백질 정제

<43> Xpress-IGF-1 및 HB-IGF-1은 E. 콜라이 BL21 세포에서 발현시키고, 4 ℓ 배취 중 LB 배지에서 성장시켰다. 4 시간 동안 1 mM 이소프로필 β-D-티오갈락토시드 를 사용하여 단백질 합성을 유도한 후, 원심분리에 의해 세포를 수거하고, 용해 완충액 (6 M 구아니딘 하이드로클로라이드, 20 mM 인산나트륨, 500 mM NaCl, pH 7.8) 중에 용해시키고, 균질화시켰다. 제1 정제 단계는 Ni-NTA (인비트로젠)를 사용한 용합 단백질 중의 폴리히스티딘 태그에 의한 친화성 정제로 구성되었다. Ni-NTA 수지를 세척 완충액 (8 M 우레아, 500 mM NaCl, 20 mM 인산염, pH 6.2)으로 세척하고, 결합한 단백질은 pH 4에서 용리시켰다. 이어서, 용리된 단백질은 생물학적 활성을 회복시키기 위해 산화적으로 재폴딩시켰다. 상기 단백질을 4℃에서 밤새도록 재폴딩 완충액 (50 mM Tris, 75 mM NaCl, 100 μM 산화된-글루타티온 및 100 μM 환원된-글루타티온, pH 7.8)과 함께 인큐베이션시켰다. 재폴딩 이후, 샘플을 0.1% 트리플루오로아세트산으로 조정하고, 최종 정제 단계로서 C18 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 칼럼 (델타-팩 C18(Delta-Pak C18); 미국 메사추세츠주 밀포드 소재의 워터스(Waters) 상에 로딩하였다. 칼럼은 0.1% 트리플루오로아세트산 중 25%에서 40%로의 아세토니트릴의 직선 구배로 하였다.

<44> 세포 배양

<45> 심장 근육세포의 1차 배양물은 신생아 스프래그-돌리(Sprague-Dawley) 래트의 심실로부터 제조하고, 7% 우태아 혈청 (인비트로젠)이 함유된 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium) (DMEM, 인비트로젠)에서 배양하고; 24시간 후에 배지를 무혈청 배지로 교체하였다. 3T3 섬유모세포 세포를 10% 신생아우혈청 (인비트로젠)이 함유된 DMEM에서 배양하고, 배지를 실험 24시간 전에 무혈청 배지로 교체하였다. 마우스 배아 줄기(ES) 세포는 15% KNOCKOUT SR (인비트로젠) 및 백혈병 저해 인자 (미국 메사추세츠주 빌러리카 소재의 케미콘(Chemicon))로 보충된 글래스고(Glasgow) 최소 필수 배지 (인비트로젠) 중에서 공급자 세포없이 젤라틴으로 코팅된 디쉬에서 성장시켰다. 세포를 매 3일마다 계대접종하였다. 분화를 유도하기 위해 세포를 먼저 효소에 의해 분해시키고, 앞서 기술된 바와 같이 배상체(embryoid body) 형성을 위해 현적으로서 배양하였다 (문헌 [Takahashi, et al, *Circulation* 707:1912-1916 (2003)]). 백혈병 저해 인자없이 10% ES 세포-적합화 우태아 혈청 (인비트로젠)이 함유된 분화 배지를 가하였다. 이들 ES 세포는 심장 근육세포로 분화된 후 녹색 형광 단백질(GFP) 양성을 띠었는데, 이는 알파-미오신 중쇄 프로모터-유도된 증강된 GFP 벡터로 안정적으로 형질감염되었기 때문이었다. 배상체 형성 이후 (7일째), 세포를 젤라틴으로 코팅된 디쉬 상에 플레이팅시켰다.

<46> 연골의 수거 및 배양

<47> 소 관절 연골 체외이식편 (직경 3-mm, 두께 1-mm의 디스크)을 1-2주된 송아지의 대퇴골무릎구로부터 수거하고, 5% CO<sub>2</sub> 대기하에 37℃에서 10 mM HEPES, 0.1 mM 비필수 아미노산, 0.4 mM L-프롤린, 20 μg/ml 아스코르브산염, 100 U/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신이 함유된 저-글루코스 DMEM 중에서 배양하였다.

<48> 단백질 분석

<49> 신생아 심장 근육세포 및 3T3 섬유모세포는 1% 트리톤-X, 0.25% Na-데옥시콜레이트, 1 mM 에틸렌디아민-테트라아세트산(EDTA), 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF), 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 및 1:1000 프로테아제 저해제 카테일 (미국 메릴랜드주 세인트루이스 소재의 시그마(Sigma))이 함유된 인산염-완충 염수(PBS)를 사용하여 용해시켰다. 연골 디스크를 분쇄하고, 100 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.5% 트리톤-X, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF 및 1:1000 프로테이나제 저해제 카테일 (시그마)로 용해시켰다. 브래드포드 분석법에 의해 단백질 농도를 측정하고, 웨스턴 블롯 분석을 위해 각 웰에 10 μg 단백질을 로딩하였다. DMMB 염료 결합에 의해 측정하여 모든 샘플에서 유사한 GAG 함량이 관찰되었다. 항-Xpress 항체 (인비트로젠), 항-폴리클로날 IGF-1 항체 (미국 메사추세츠주 캠프릿지 소재의 에이빔(Abeam)), 항-포스포-IGF-1 수용체 항체 (미국 메사추세츠주 덴버스 소재의 셀 시그널링(Cell Signaling)), 항-포스포-Akt 항체 (셀 시그널링) 및 항-액틴 항체 (시그마)를 사용하였다. IGF-1은 대조군 단백질로서 시그마로부터 구입하였다.

<50> 효소-결합 면역흡착 분석법(ELISA)에 의해 용합 단백질을 검출하기 위해 96-웰 플레이트를 항-Xpress 항체 (10

μg/ml)로 밤새도록 코팅하였다. 연골 추출물로부터 얻은 동일한 양의 단백질을 각 웰에 첨가하였다. 폴리클로날 IGF-1 항체는 1차 항체로서 사용하고, 항-래빗-허스래디시 페록시다제 (미국 캘리포니아주 허큘리스 소재의 바이오-래드(Bio-Rad))를 2차 항체로서 사용하였다. ABTS 페록시다제 기질 (미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재의 KPL)을 첨가한 후, 플레이트를 405 nm에서 판독하였다.

<51> 결합 분석법

<52> 헤파린 아가로스 비드(시그마)를 300 pmol HB-IGF-1 또는 Xpress-IGF-1과 함께 2시간 동안 인큐베이션시키고, PBS로 3회에 걸쳐 세척하였다. 헤파린 아가로스 비드를 포함하는 결합된 용합 단백질은 SDS-PAGE 샘플 완충액 (인비트로젠)과 함께 비등시켜 추출하였다. 3T3 섬유모세포 세포 또는 신생아 래트 심근세포를 100 nM HB-IGF-1 또는 대조군 IGF-1 (시그마)과 함께 2시간 동안 인큐베이션시킨 후, PBS로 3회에 걸쳐 세척하였다. 세포를 용해 완충액으로 용해시킨 후, 항-IGF-1 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다. 배상체 (분화 유도 후 10일째)를 용합 단백질과 함께 2시간 동안 인큐베이션시키고, PBS로 3회에 걸쳐 세척하고, 항-Xpress 항체를 사용하여 면역조직화학화학을 실시하기 이전에 파라포름알데히드로 고정시켰다. 연골 디스크는 500 nM HB-IGF-1 또는 500 nM Xpress-IGF-1로 보충된 무혈청 DMEM 중에서 배양하였다 48시간 후 (0일째), 디스크를 PBS로 3회에 걸쳐 세척한 후, IGF-1 없이 DMEM 중에서 인큐베이션시켰다. 0, 1, 2, 및 4일째 디스크를 수집하였다. 연골 추출물에 남아있는 단백질은 웨스턴 블롯 분석법 및 ELISA에 의해 검출하였다.

<53> 연골 생합성 분석법

<54> 앞서 기술된 바와 같이 연골세포 프로테오글리칸 합성은 [<sup>35</sup>S]설페이트 (미국 메사추세츠주 월섬 소재의 퍼킨엘머(PerkinElmer)) 혼입에 의해 연골세포 프로테오글리칸 합성을 측정하였다 (문헌 [Sah, et al., *J. Orthop. Res.* 7:619-636 (1989)]). 1일 동안 무혈청 배지 중에서 연골 디스크를 평형화시키고, 100 nM HB-IGF-1, Xpress-IGF-1 또는 대조군 IGF-1 (시그마)을 함유하는 배지 중에서 2일 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 디스크를 PBS로 3회에 걸쳐 세척하고, IGF-1이 없는 배지로 교체하였다. 배양된 디스크를 배양의 마지막 24시간 동안 5 μCi/ml [<sup>35</sup>S]설페이트를 사용하여 방사성 동위원소로 표지하였다. 표지한 후, 4°C에서 0.8 mM 프롤린 및 1 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 함유된 1.0 ml PBS 중에서 각 디스크를 3회에 걸쳐 세척하여 유리 방사성 동위원소를 제거하였다. 1.0 ml의 프로테이나제 K (0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA 및 5 mM 시스테인 중 125 μg/ml (pH 6.0))에서 디스크를 분해하였다. 20 μl의 분해물과 180 μl의 핵스트 염료 33258(24)과의 반응에 의해 형광 분석함으로써 샘플을 DNA 함량에 대해 분석하였다. 이어서, 분해물의 [<sup>35</sup>S]설페이트 함량은 섬광 계수기 (왈락 마이크로베타 트리룩스 (Wallac MicroBeta TriLux), 미국 메사추세츠주 월섬 소재의 퍼킨엘머)에서 측정하고, 에너지 넘침(spillover)과 소광에 대하여 보정하였다.

<55> 통계학적 분석

<56> 허용 수준 α = 0.05를 사용하여 스튜던트의 t-검정에 의해 통계학적 분석을 실시하였다. α = 1-(1-α<sub>0</sub>)<sup>1/n</sup> (여기서, α<sub>0</sub> = 0.05이고, n = 총 비교 횟수이다)을 사용하여 다중 비교를 위해 t-검정을 보정하였다. 모든 데이터는 평균±SE로 표시하였다.

<57> 결과

<58> HB-IGF-1의 정제

<59> IGF-1은 3개의 이황화 결합을 갖고, 70개의 아미노산을 포함한다. IGF-1 용합 단백질은 단백질 정제를 위한 폴리-히스티딘 태그와, 단백질 검출을 위한 Xpress 태그를 함유한다. HB-IGF-1 및 Xpress-IGF-1의 분자량은 각각 14,018 Da 및 11,548 Da이다. HB-IGF-1은 IGF-1의 N-말단 상에 HB 도메인을 갖는다. HB 도메인은 21개의 아미노산을 가지며, 12개의 양전하를 띤 아미노산을 포함한다. 재폴딩 이후에 RP-HPLC를 사용하여 신규한 용합 단백질의 최종 정제를 실시하였다. 앞서 기술된 바와 같이 올바르게 폴딩된 단백질 동정을 실시하고 (문헌 [Milner, et al., *Biochem. J.* 308(Pt 3):865-871 (1995)]), 생체활성 분석으로 확인하였다. RP-HPLC 이후에 쿠마시 블루 염색 및 재폴딩된 IGF-1 단백질의 항-Xpress 항체를 사용한 웨스턴 분석법 결과, 단일 밴드를 나타내었다.

<60> HB-IGF-1은 헤파린 및 세포 표면에 결합한다

<61> 본 발명자들은 먼저 HB-IGF-1이 헤파린에 선택적으로 결합하는지 여부를 시험하였다. 헤파린 아가로스 비드를

300 pmol HB-IGF-1 또는 Xpress-IGF-1과 함께 인큐베이션시킨지 2시간이 경과한 후에 비등시켜 결합한 단백질을 비드로부터 추출하였다. 헤파린 아가로스 비드와 결합한 단백질의 쿠마시 블루 염색한 결과, HB-IGF-1은 Xpress-IGF-1과 비교하여 헤파린에 선택적으로 결합하는 것으로 나타났다. 이어서, 본 발명자들은 3T3 섬유모 세포 세포 및 신생아 래트 심장 근육세포를 사용하여 헤파린 설페이트 프로테오글리칸을 갖는 세포 표면에 HB-IGF-1이 결합할 수 있는 능력에 관하여 시험하였다. 0-100 nM의 HB-IGF-1을 2시간 동안 전처리한 후, 세포를 PBS로 3회에 걸쳐 세척하였다. 이러한 시험들을 위해 시판용 IGF-1을 대조군으로서 사용하였다. 10 nM 및 100 nM 농도로 처리하였을 때 HB-IGF-1은 3T3 섬유모세포 세포에 결합하였다. 신생아 심장 근육세포에 결합한 HB-IGF-1은 10 nM 및 100 nM에서 뚜렷하게 선택적인 HB-IGF-1 결합을 나타내었고, 100 nM에서는 매우 약한 IGF-1 밴드를 나타내었다. 이러한 결과는 상기 HB 도메인이 서브마이크로몰 범위에서 헤파린에 결합한 것과 일치한다. 본 발명자들은 또한 다중 세포 유형을 함유하는 것인 배상체의 배아 줄기 세포에 결합할 수 있는 HB-IGF-1의 능력에 대해 연구하였다. HB-IGF-1은 Xpress 에피토프 태그에 대한 면역형광법에 의해 배상체중 세포 표면상에서 용이하게 검출되었는데, 이는 HB-IGF-1이 다중 세포 유형에 결합할 수 있다는 것을 시사한다.

<62> HB-IGF-1 생체활성

<63> HB 도메인이 생체활성을 방해하는지 여부를 측정하기 위해 IGF-1 수용체 인산화 및 Akt 활성화에 대한 생물학적 검정법을 실시하였다. 대조군인 IGF-1, HB-IGF-1 및 Xpress-IGF-1, 모두는 신생아 심장 근육세포의 IGF-1 수용체를 용량에 의존하여 활성화시켰고, 동일하게 Akt 인산화를 유도하였다. 대조군인 IGF-1, HB-IGF-1 및 Xpress-IGF-1, 모두는 유사한 시간 추이내에서 Akt를 활성화시켰다. 이러한 데이터는 헤파린-결합 도메인을 첨가하는 것이 IGF-1의 생체활성을 방해하지 않는다는 것을 입증한다.

<64> 연골에서의 HB-IGF-1 수송

<65> 연골은 프로테오글리칸이 풍부한 조직이며, 연골세포는 세포의 기질 합성 증가에 따라 IGF-1에 반응한다. 따라서, 장기간의 IGF-1 신호화의 국소 자극이 연골 수복에 유익할 수 있기 때문에 본 발명자들은 HB-IGF-1이 연골에 결합할 수 있는 능력에 관해 연구하였다. 크기가 동일한 소 관절 연골 디스크를 1일, 3일 또는 6일 동안 500 nM HB-IGF-1 또는 Xpress-IGF-1과 함께 인큐베이션시켰는데, 상기 기간에 걸쳐 연골로 확산된 IGF-1 단백질 양에 있어서의 차이는 없었다. 48시간 동안 HB-IGF-1 또는 Xpress-IGF-1과 함께 사전 인큐베이션시킨 후, 0일째 연골 디스크를 PBS로 세척하고, 동일한 양의 IGF-1을 검출하였다. 그러나, 1일, 2일, 및 4일째 IGF-1 단백질을 제거한 후에는 오직 HB-IGF-1만이 연골에 남아있었는데, 이는 HB-IGF-1이, 프로테오글리칸이 풍부한 세포 외 기질에 결합하였음을 제안하는 것이다. 대조적으로, Xpress-IGF-1은 세척 후 1일째에도 검출되지 못했다. 본 발명자들은 또한 연골 추출물을 사용한 상기 선택적 결합 실험과 ELISA 측정법을 실시하였다. 이러한 결과는 HB-IGF-1이 연골에 의해 선택적으로 유지되는 반면, Xpress-IGF-1은 빠르게 손실된다는 것을 확인시켜 주었다.

<66> HB-IGF-1은 연골세포 생합성을 증가시켜 준다

<67> HB-IGF-1의 연골로의 선택적 잔류는 이러한 융합 단백질이 연골세포 생합성을 위한 지속적인 자극 물질을 전달할 수 있다고 제안한다. 그러므로, 본 발명자들은 [<sup>35</sup>S]설페이트 혼입에 의해 세포의 기질 프로테오글리칸의 연골세포 생합성을 측정하였다. 연골 디스크를 100 nM HB-IGF-1, 대조군인 IGF-1 또는 Xpress-IGF-1과 함께 2일 동안 인큐베이션시키고, PBS로 3회에 걸쳐 세척한 후, IGF-1을 함유하지 않는 배지에서 배양하였다. 0일째 (세척 이전), 2일째 (세척 직후), 4일째 및 6일째 및 8일째 시작하여 24시간 동안 [<sup>35</sup>S]설페이트 혼입을 측정하였다. 0일째 IGF-1 작제물과 함께 인큐베이션시키는 동안 대조군 IGF-1, Xpress-IGF-1 및 HB-IGF-1 군들 모두는 예측한 바와 같이 프로테오글리칸 합성을 자극시켰다. 그러나, 세척 이후에는 대조군인 IGF-1 또는 Xpress IGF-1 어느 것도 4일째 이후에는 프로테오글리칸 합성을 자극시키지 못했다. 대조적으로, HB-IGF-1은 6일 동안 프로테오글리칸 합성을 지속적으로 자극시켰다. 2일째, 4일째 및 6일째 프로테오글리칸 합성은 HB-IGF-1 대 Xpress-IGF-1과 함께 인큐베이션된 연골에 있어서 유의적으로 더욱 높았다. 이러한 데이터는, 연골에서 선택적으로 유지되는 HB-IGF-1이 보다 지속적인 기간에 걸쳐 연골세포 생합성을 자극시킨다는 것을 입증한다.

<68> 논의

<69> IGF-1을 국소적으로 전달하는 것은 조직 수복과 재생을 개선시키고, 동시에 전신 부작용은 최소화시키는 것에 대한 잠재능을 갖는다. 본 실시예에서, 본 발명자들은, 프로테오글리칸이 풍부한 조직 및 세포 표면에 결합하면서도, IGF-1과 동일한 생체활성을 지니는 신규한 IGF-1 단백질인 HB-IGF-1을 기술한다. 본 발명자들의 데이

타는, HB-IGF-1이 IGF-1 수용체 및 Akt를 활성화시킬 수 있고, 따라서 헤파린-결합 도메인이 IGF-1과 그의 수용체 사이의 상호작용을 방해하지 않는다는 것을 시사한다. IGF-1은 4개의 도메인: B 도메인 (AA1-29), C 도메인 (AA30-41), A 도메인 (AA42-62) 및 D 도메인 (AA63-70)을 갖는데, C 도메인이 IGF-1 수용체에 결합하는데 있어 가장 중요한 역할을 한다. 전체 C 도메인을 대체할 경우 IGF-1 수용체에 대한 친화성은 30배 감소하게 된다. 따라서, IGF-1의 N 말단에 헤파린-결합 도메인을 첨가하는 것이 IGF-1 C 도메인과의 상호작용을 방해할 것이라고는 예상되지 않았다.

<70> 세포외 기질 및 세포 표면은 둘 모두가 프로테오글리칸이 풍부하며, 프로테오글리칸-결합 성장 인자에 대한 저장소로서의 기능을 할 수 있다. 전형적인 일례로는 섬유모세포 성장 인자-2(FGF-2) 시스템이 있는데, 여기서, 친화성이 낮고, 수용능이 높은 프로테오글리칸 수용체 풀은 그의 친화성이 높은 수용체에 대한 FGF-2의 저장소로서의 역할을 한다. 본 발명자들의 실험은, HB-IGF-1이 세포 표면 상에서 선택적으로 유지되기 때문에 HB-IGF-1이 몇몇 환경하에서 유사한 방식으로 작용할 수 있다는 것을 제안한다. IGF-1은 또한 IGF 결합 단백질 (IGFBP)을 통해 세포외 기질과 결합할 수 있으며; 순환시 적어도 99%의 IGF-1이 IGFBP(IGFBP-1 내지 -6)에 결합한다.

<71> IGF-1은 연골 세포외 기질의 합성을 촉진시킬 수 있고, 연골 분해를 저해할 수 있지만 (문헌 [Bonassar, et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 379:57-63 (2000)]); 연골로 IGF-1을 전달하는 실제 모드는 여전히 개발되어야 한다 (문헌 [Schmidt, et al., *Osteoarthritis Cartilage* 74:403-412 (2006)]). 헤파린 설페이트 프로테오글리칸은 특히 페르레칸 및 신데칸-2 상의 쇄로서 연골의 세포주위 기질에 우세하게 존재하고, 이는 다른 리간드, 예를 들면, FGF-2와 결합하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들의 실험은 HB-IGF-1 단백질이 기질과 결합할 수 있고, 연골세포에 대한 장기간의 국소 부위에서의 생체이용성을 증가시킬 수 있으며, 이로써 연골 수복을 개선시킬 수 있다는 것을 제안한다.

<72> 연골 이외에도, HB-IGF-1은 다른 조직에서 사용될 수 있는 잠재능을 갖는다. 예를 들면, IGF-1은 PC12 세포 및 피질척수 운동 뉴런의 축삭 생성을 유도하는 바, 이로써, IGF-1은 운동 뉴런 퇴행성 질환에 이익이 될 수 있다. 진피 상처 치유시, IGF-1은 콜라겐 합성 및 섬유모세포 및 각질세포의 분열유발을 자극하기 때문에 IGF-1은 또한 유효하다. HB-IGF-1이 세포 표면에 결합할 수 있는 능력은 세포 요법 및 다른 재생 전략법을 증진시킬 수 있다.

<73> 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 전체적으로 참고로 인용된다. 이에 본 발명을 전반적으로 기술하면서 당업자는, 본 발명이 광범위하고 등가인 범위의 조건, 변수 등 내에서 본 발명의 정신 또는 범주 또는 그의 임의의 실시태양에는 영향을 주지 않으면서 실시될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.  
Lee, Richard T.

<120> Methods of Promoting Cardiac Repair Using Growth Factors Fused to  
Heparin Binding Sequences

<130> 7570/11900

<150> 60/858,406

<151> 2006-11-13

<160> 24

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe  
 1 5 10 15

Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu  
 20 25 30

Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala  
 35 40 45

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe  
 50 55 60

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly  
 65 70 75 80

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys  
 85 90 95

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu  
 100 105 110

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp  
 115 120 125

Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly  
 130 135 140

Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg Met  
 145 150

<210> 2

<211> 69  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val  
 1                   5                   10                   15

Cys Gly Pro Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser  
           20                   25                   30

Ser Ile Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe  
           35                   40                   45

Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys  
           50                   55                   60

Pro Thr Lys Ser Ala  
 65

<210> 3  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Lys Lys Arg Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys  
 1                   5                   10                   15

Leu Lys Lys Tyr Lys Gly  
           20

<210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ile Gln Asn Leu Leu Lys Ile Thr Asn Leu Arg Ile Lys Phe Val  
 1 5 10 15

Lys

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Pro Tyr Val Val Leu Pro Arg Pro Val Cys Phe Glu Lys Gly Met Asn  
 1 5 10 15

Tyr Thr Val Arg  
 20

<210> 6  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

Asn Leu Arg Leu Ser Arg  
 20

<210> 7  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys  
 1                   5                   10                   15

Lys Ile Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ser  
                   20                   25

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile Ala Pro Asp Gly Arg Val  
 1                   5                   10                   15

Asp Gly Val Arg Glu Lys  
                   20

<210> 9  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Tyr Ser Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu  
 1                   5                   10                   15

Gly Pro Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro  
                   20                   25                   30

<210> 10  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Ala Lys Leu Asn Cys Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys  
 1                   5                   10                   15

Leu Val Ser Ala Asn Arg Leu Phe Gly Asp Lys  
           20                   25

<210> 11  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln  
 1                   5                   10                   15

Lys Arg Leu Ala Val Tyr Gln  
           20

<210> 12  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln Ala Ala Trp Gln Glu Arg Leu Arg Ala  
 1                   5                   10                   15

Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val  
           20                   25                   30

Lys Glu Gln Val Ala Glu Arg Ala Lys Leu  
           35                   40

<210> 13  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Lys Gly Lys Met His Lys Thr Cys Tyr Tyr  
 1                   5                   10

<210> 14  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Met Gly Lys Met His Lys Thr Cys Tyr Asn  
 1                   5                   10

<210> 15  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Pro Thr Ile Ile Trp Lys His Lys Gly Arg Asp Val Ile Leu Lys  
 1                   5                   10                   15

Lys Asp Val Arg Phe Ile Val Leu Ser Asn Asn Tyr  
                  20                   25

<210> 16  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Lys Lys His Glu Ala Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly  
 1                   5                   10                   15

Ser Cys Lys Arg Gly Pro

20

<210> 17  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Lys Gly Gly Arg Gly Thr Pro Gly Lys Pro Gly Pro Arg Gly Gln Arg  
 1                    5                    10                    15

Gly Pro Thr Gly Arg Gly Glu Arg Gly Pro Arg Gly Ile Thr Gly Lys  
                   20                    25                    30

<210> 18  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Glu Phe Tyr Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys  
 1                    5                    10

<210> 19  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 19

His Arg His His Pro Arg Glu Met Lys Lys Arg Val Glu Asp Leu  
 1                    5                    10                    15

<210> 20  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Lys Thr Leu Arg Lys Trp Leu Lys Met Phe Lys Lys Arg  
1                    5                    10

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Glu Ala Ala Ala Arg Ala Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg Ala  
1                    5                    10                    15

Ala Ala Arg

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 22

ggaccagagg accctttgcg 20

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 23

agctgacttt gtaggcttca gc 22

<210> 24

<211> 63

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 24

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly  
1                   5                   10                   15

Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ala Gly Gly Ala Ala Ala  
          20                   25                   30

Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Ala Thr Gly Cys  
          35                   40                   45

Cys Thr Thr Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Ala Cys Ala Ala Gly  
          50                   55                   60