



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0085041  
(43) 공개일자 2010년07월28일

(51) Int. Cl.

C07K 14/52 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)  
A61K 38/19 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7008264

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년10월23일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년04월15일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/008960

(87) 국제공개번호 WO 2009/053064  
국제공개일자 2009년04월30일(30) 우선권주장  
07450189.1 2007년10월24일  
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

프로타핀 바이오테크놀로지 아게

오스트리아 그라츠 레이닝하우스슈트라쎄 13아 임  
펠스젠티룸 그라츠-웨스트 (우:8020)

(72) 발명자

쿤글 안드레아스

오스트리아 그라츠 아-8045 슈트라쎄로프베크 77  
아

베르너 이자

오스트리아 그라츠 아-8010 리비히가쎄 19/1/7  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

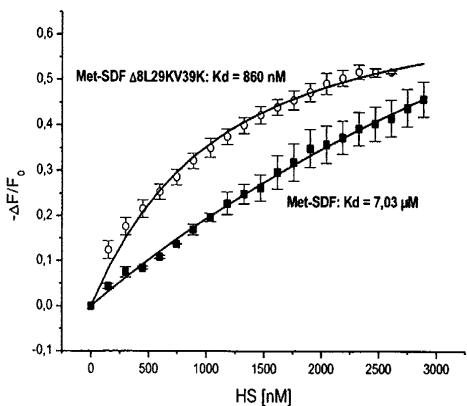
하영옥

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) SDF-1계 글리코스아미노글리칸 길항제 및 그 사용 방법

**(57) 요약**

본 발명은 야생형 SDF-1에 비하여 증가된 글리코스아미노글리칸(GAG) 결합 친화성 및 억제 또는 하방제어된 야생형 GPCR 활성을 나타내는 인간 스트로머 세포 유래 인자-1의 새로운 돌연변이에 관한 것이고, 이를 돌연변이를 제조하는 방법 및 암의 치료용 약을 제조하기 위한 이들의 사용에 관한 것이다.

**대 표 도 - 도2**

(72) 발명자

슬링스비 제이슨

오스트리아 비엔나 아-1070 콜러가제 39/4

알리 시미

영국 뉴캐슬 어폰 타인 엔이20 9디유 폰트랜드 대  
러스 홀 미들 드라이브 153

컬비 존 에이

영국 뉴캐슬 어폰 타인 엔이3 1엔제이 고스포스 더  
그로브 54

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

야생형 SDF-1 단백질에 비하여 증가된 GAG 결합 친화성 및 감소된 GPCR 활성을 갖는 SDF-1 돌연변이 단백질에 있어서:

상기 SDF-1 단백질은 2개 이상의 염기성 및/또는 전자 공여 아미노산의 삽입 또는 2개 이상의 염기성 및/또는 전자 공여 아미노산에 의한 2개 이상의 비염기성 아미노산의 교체에 의한 구조 유지법으로 변형되고, 상기 야생형 SDF-1 단백질의 N-말단 영역의 첫번째 1~10개의 아미노산 중 1개 이상의 아미노산은 1개 이상의 아미노산의 첨가, 제거 및/또는 교체에 의해 변형되는 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 구조 유지법에 의한 변형은 원자외선 CD 분광법에 의해 측정되는 야생형 SDF-1 구조로부터 변형된 구조의 편차가 30% 미만, 바람직하게는 20% 미만인 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 염기성 아미노산은 Arg, Lys, His로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

### 청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 전자 공여 아미노산은 Asn 또는 Gln으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

### 청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 SDF-1 단백질의 N-말단 영역은 8개의 아미노산의 절단에 의해 변형되는 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 SDF-1 단백질의 N-말단 영역은 첫번째 2개의 아미노산을 교체 및/또는 제거함으로써 변형되는 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

### 청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 첫번째 2개의 N-말단 아미노산은 리신, 아르기닌, 프롤린 또는 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산으로 교체되는 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

### 청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

N-말단 Met를 함유하는 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

### 청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

위치 29 또는 39에서 하나 이상의 아미노산이 변형되는 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

#### 청구항 10

변형된 SDF-1 분자의 아미노산 서열이 하기 일반식에 의해 기재되는 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

(M)<sub>n</sub>(X1)<sub>m</sub>(X2)<sub>p</sub>VSLSYRCPCRFRESHVARANVKHLKI(X3)NTPNCALQI(X4)ARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK(GRREEKVGKKEKIGKKKRQKK RKAAQKRKN)

[여기서, X1은 K 또는 R 잔사이고,

X2는 P 또는 G 잔사이고,

X3은 Y 또는 A 잔사로 이루어진 군으로부터 선택되며, 바람직하게는 A이고,

X4는 S, R, K, H, N 또는 Q 잔사로 이루어진 군으로부터 선택되며, 바람직하게는 K이고,

n 및/또는 m 및/또는 p 또는 o는 0 또는 1이고,

위치 X1, X2, X3 또는 X4 중 2개 이상은 변형된다.]

#### 청구항 11

구조 Met-SDF-1 Δ8 L29K V39K인 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질.

#### 청구항 12

제 1 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 기재된 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 단리된 다핵산 분자.

#### 청구항 13

제 12 항에 기재된 단리된 DNA 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

#### 청구항 14

제 13 항에 기재된 벡터로 트랜스펙션되는 것을 특징으로 하는 재조합 세포.

#### 청구항 15

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 기재된 단백질 또는 제 12 항 또는 제 13 항에 기재된 폴리뉴클레오티드 또는 제 14 항에 기재된 벡터 및 의약적으로 수용가능한 캐리어를 포함하는 것을 특징으로 하는 의약조성물.

#### 청구항 16

암의 치료용 약을 제조하는 방법에 있어서, 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 기재된 SDF-1 돌연변이 단백질 또는 제 12 항에 기재된 폴리뉴클레오티드 또는 제 13 항에 기재된 벡터의 사용.

#### 청구항 17

제 16 항에 있어서,

종양 성장 및 확산 과정이 적어도 부분적으로 억제되는 것을 특징으로 하는 SDF-1 돌연변이 단백질 또는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 사용.

### 명세서

#### 발명의 내용

[0001] 본 발명은 야생형 SDF-1과 비교하여 (i) 증가된 글리코스아미노글리칸(GAG) 결합 친화력 및 (ii) 억제 또는 해방제어된 GPCR 활성을 나타내는 인간 스트로마 세포 유래 인자(human stromal cell-derived factor)-1의 신규

한 돌연변이 즉, SDF-1 $\alpha$  또는 SDF-1 $\beta$  또는 SDF-1 감마 또는 그들의 임의의 변종에 관한 것이고 또한, 암의 치료 처리를 위한 그들의 사용에 관한 것이다.

[0002] 케모카인은 작은(8-11 kD) 가용성 화학유인물질 사이토카인이다. 그들은 시스테인 잔사의 상대적 위치에 따라서 4개의 패밀리(family)로 이루어진다. 상기  $\alpha$ -케모카인은 첫번째 2개의 시스테인 잔사(CXC-모티브)를 분리하는 1개의 비보존성 아미노산을 갖는 반면에, 상기  $\beta$ -케모카인은 서로 인접한 그들의 첫번째 2개의 시스테인을 갖는다(CC-모티브). 프렉탈카인은 다른 3개의 패밀리의 4 시스테인과 비교하여 첫번째 2개의 시스테인을 갖는다(CX3C-모티브) 및 총 2개의 시스테인만을 지닌 패밀리의 유일한 립포텍틴 멤버(C-모티브)를 분리하는 3개의 비보존성 아미노산을 지닌 케모카인 패밀리의 유일한 대표이다(Baggiolini et al., *Adv. Immunol.*, 55, 97-179 (1994)). 스트로머 세포 유래 인자-1 $\alpha$  (SDF-1, CXCL12)는 상기 클래스의 일반적인 대표는 아니지만,  $\alpha$ -케모카인에 속한다. 다른 인간 CXC- 및 CC-케모카인에 대한 서열 동일성은 단지 각각 27% 및 21%이다. 이것은 2개의 큰 케모카인 패밀리에 대하여 동일하게 분명한 관계임에도 불구하고, 성숙한 SDF-1는 다른 종들과 매우 높은 유사성을 나타낸다. 인간과 마우스 사이에서 거의 99%의 서열 동일성 및 인간과 고양이 사이에서 거의 100%의 서열 동일성으로, 종래부터 보존 사이토카인이 잘 알려져 있다(Shirozu et al., *Genomics*, 28, 495-500 (1995)). 상동체는 무악류, 원시 척추동물 분야에서 실질적으로 확인되고 있다. SDF-1의 다른 특성은 그것의 유전자 SCYB12이고, 이것은 염색체 10 상에 배치되는 반면에, 다른 모든 CXC 케모카인 및 대다수의 CC 케모카인은 염색체 4 및 염색체 17 상에 클러스터된다.

[0003] SCYB12는 4개의 엑손을 함유한다. 가장 일반적인 스플라이스 이소폼인 SDF-1 $\alpha$ 는 엑손 1-3으로부터 유래되는 반면에, SDF-1 $\beta$ 는 C-말단에서 4개의 부가 아미노산으로 얹어진 엑손 4로부터의 추가 서열도 함유한다. 상기 SDF-1의 3차원 구조는 3개의 역평행  $\beta$ -스트랜드의 코어 및 C-말단  $\alpha$ -헬릭스를 나타낸다(Crump et al., *EMBO J.*, 16, 6996-7007 (1997)).

[0004] 3원 특성과는 달리, 4원 구조는 항상 논쟁의 소지를 갖는다. 주장의 대립은 NMR-연구에서 모노머형, 결정학적인 측정으로 디아머형 또는 침강속도 원심분리 및 동적광산란법에 따른 가정된 모노머-다이머 평형 사이에서 명백했다. 이하에, 실제로 SDF-1 $\alpha$ 가 모노머-다이머 평형으로 존재하고, 다이머 회합이 안정한 카운터 이온의 존재 및 상기 용액 pH에 매우 의존한다는 것을 발견했다. 또한, 글리코스아미노글리칸(GAGs)이 SDF-1 $\alpha$  다이머 형성을 촉진시킨다는 것을 발견했다(Veldkamp et al., *Protein Sci.*, 14, 1071-1081 (2005)).

[0005] GAG는 결합, 조성 또한 N- 및 O-황산화 패턴이 다양한 반복 사카리드 유닛을 포함하는 직선상 다당류이다(Capila & Linhardt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 41, 391-412 (2002)). 그들 중 대부분은 단백질 코어와 연결됨으로써 소위 프로테오글리칸이라 불리는 것을 형성한다. GAG의 예는 혜파란 설레이트(HS), 혜파린, 캐라틴 설레이트, 콘드로이틴 설레이트, 데르마탄 설레이트 및 히알루론산이다. 설레이트 및 카르복실레이트기의 존재로 인하여 GAG는 매우 음으로 대전된다. 이것은 가용성 글리코스아미노글리칸 및 세포 표면 또는 세포외 매트릭스 상에 부착된 GAG를 결합하는 양으로 대전된 케모카인의 결합을 유도한다. 혜파린과 유사하지만 거의 대전되지 않은 혜파란 설레이트는 케모카인의 생물학적 활성에 기본이라 여겨진다. 그것은 대부분의 세포형에 의해 제조되고 몇몇의 코어 단백질은 HS-쇄를 운반한다. 예컨대, 세포 표면에서의 신데칸 및 글리피칸, 및 세포외 매트릭스에서의 애그린 및 페레칸이다. SDF-1 $\alpha$ 는 신데칸-4와 결합되지만 신데칸-1, 신데칸-2, CD44 또는 베타-글리칸과는 결합되지 않으면, 어떠한 가치도 없다. Lys24, Lys27 및 더 낮은 정도의 Arg41 및 Lys43은 SDF-1과 HS를 결합하기 위해 필수적인 것을 나타낸다(Sadir et al., *J. Biol. Chem.*, 276, 8288-8296 (2001)). 이들 염기성 아미노산은 상기 SDF-1 $\alpha$  다이머의  $\beta$ -스트랜드 사이의 작은 개구에 위치된다(Lortat-Jacob et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 1229-1234 (2002)).

[0006] GAG는 혈류에 의해 야기된 전단력에도 불구하고, 세포 표면 상의 케모카인의 체류를 일으켜 케모카인의 국부적인 농도를 증가시킨다. 상기 상호작용 케모카인을 씻어버리지 않는다면, 이후의 백혈구 또는 출기세포에 대한 주화성 그레이디언트를 확립할 수 없다. GAG 연결은 생체 내 활동을 위한 전제 조건이다. GAG 결합 부위에 돌연변이를 지닌 케모카인은 생체 내 세포를 동원할 수 없다. 예컨대, 올리고머화를 야기하는 케모카인의 구조적 변화는 GAG와 연결됨으로써 구동된다. 또한, HS 또는 혜파린과의 결합은 생체 내 디펩ти딜 웹티다아제 IV(DDP IV)/CD26에 의한 단백질 분해적 절단으로부터 SDF-1을 보호할 수 있다.

[0007] SDF-1로만 알려진 수용체는 CXC 케모카인 수용체 4(CXCR4)이다(Y. R. Zou, A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, D. R. Littman, *Nature*, 393, 595-599 (1998)). 상호적으로 SDF-1은 CXCR4로만 알려진 내인성 리간드이다(M. K. Schwarz, T. N. Wells, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, 407-417 (1999)). CXCR4는 7개의 막관통도메인을 특징으로 하는 백일해 독소 예민성 G-단백질 결합 수용체(GPCR)에 속한다. SDF-1 및 CXCR4에 대한 2단

계 결합 모델이 제안되어 있다(M. K. Schwarz, T. N. Wells, Curr. Opin. Chem. Biol., 3, 407-417 (1999)).

[0008] 또한, 문자동역학 시뮬레이션으로 SDF-1과 CXCR4의 2단계 결합 매카니즘이 확인되었다. SDF-1은 매우 강한 케모카인이고 림프구 및 단핵 백혈구, 또한 조혈모 및 전구 세포를 유인한다(K. Hattori, B. Heissig, K. Tashiro, T. Honio, M. Tateno et al., Blood, 97, 3354-3360 (2001)).

[0009] 케모카인 유인 및 림프구 및 단핵 백혈구 유인에서의 SDF-1의 역할 및 암 치료용 신약에 대한 끊임없는 수요의 관점에서, 본 발명의 목적은 케모카인 수용체 상호작용을 변형시키기 위한 새로운 단백질을 제공하는 것에 있다.

[0010] 본 발명은 SDF-1 알파 또는 SDF-1 $\beta$  또는 SDF-1 감마 또는 그것의 임의의 변이체 일 수 있는 인간 SDF-1로 높은 GAG 결합 친화성을 조작하는 것에 기초를 두고, 동시에 CPCR 활성, 특히 상기 케모카인의 CXCR4 활성을 제어하여 감소시키거나 폐쇄시키는 것에 기초를 둔다. 이것은 GAG 결합 친화성을 증가시키기 위해서 염기성 아미노산을 SDF-1의 GAG 결합 부위로 도입하고, 8개의 아미노산의 절단에 의해서 또는 첫번째 2개의 아미노산을 교체/제거에 의해서 상기 케모카인의 N-말단을 변형시킴으로써 행해진다. 상기 SDF-1 돌연변이는 표준 GAG(헵파린 또는 헵파란 설플레이트)에 대해 최소 5배 개선된 Kd를 나타내고 표준 단핵 Boyden 챔버에서 감소된 주화성 활성을 나타낸다. 이를 특성에 대한 생물리학 및 세포 생물학의 증거가 얻어져 있다.

[0011] 본 발명의 주목적은 종양 성장 및 확산 과정의 맥락에서 SDF-1계 돌연변이로 GAG 상호작용에 길항함으로써, CXCR4-양성 세포 이동, 보다 구체적으로는 줄기 세포 및 전이 세포를 억제하는 것에 있다. 항종양적 특성은 인간 유방암 세포를 사용하여 마우스 이종 이식 모델로 나타낸다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 SDF-1 돌연변이의 서열을 나타내고, 야생형 케모카인에 관한 돌연변이에 밀줄을 그었다.

도 2는 wtSDF-1 및 HS와 결합한 Met-SDF-1 $\Delta$ 8L29KV39K의 등온 형광 적정을 나타낸다.

도 3은 wtSDF-1, Met-SDF-1 및 Met-SDF-1 $\Delta$ 8L39KV39K에 의해 유도된 단핵 백혈구 (Thp-1) 주화성을 나타낸다.

도 4는 마우스 이종 이식 모델에 있어서 측정된 바와 같이 Met-SDF-1 $\Delta$ 8L29KV39K("돌연변이"로 의도됨)에 의해 간으로의 인간의 유방암 세포 이동의 억제를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 비변성 GAG 결합 단백질과 경쟁자로서 작용하는 변형된 단백질로 야기된 상기 GAG 결합 영역에서 염기성 아미노산의 상대량을 증가시킴으로써 증가된 GAG 결합 친화성이 발생될 수 있는 것을 나타낸다(WO 05/054285, 이하의 참고로 포함됨). 이것은 특히 인터류킨-8로 나타내어진다. GAG 결합 영역의 특정 위치 및 염기성 아미노산을 선택적으로 도입하는 것에 의한 그들의 변형은 SDF-1(CXCL12) 단백질에 대해서 기재되어 있지 않다.

[0014] WO 01/85196은 CXCR4 길항제 및 조혈 세포 치료용으로의 그들의 활용 용도를 기재하고 있지만, SDF-1 문자의 GAG 결합 친화성을 증가시키기 위한 조치는 없다. WO 01/85196에는 SDF-1 유래 웨티드가 기재되어 있고 여기서, 그들의 부분은 GAG와 결합한 SDF-1 그들의 도메인을 포함하는 SDF-1의 C-말단 단편에 연결기 서열에 의해 공유적으로 결합될 수 있어 상기 웨티드의 길항 효과를 증가시킬 수 있다. 상기 출원에 있어서, SDF-1의 GAG 결합 친화성을 증가시키는 것에 대해서는 결코 언급되어 있지 않는다. 상기 출원에서 기재된 GAG 결합 단백질의 다른 예와 마찬가지로, 참조는 단백질-GAG 결합의 일반적인 원리로 상기 방법에 의해 이루어지고, SDF-1로의 높은 GAG 결합 친화성을 도입하는 특정 기술은 아니다.

[0015] 현재, 본 발명은 적어도 2개의 염기성 및/또는 전자 공여 아미노산의 삽입 또는 바람직하게는 적어도 2개의 염기성 및/또는 전자 공여 아미노산에 의해 비변성 GAG 결합 부위의 구조적인 부근에서, 또는 상기 SDF-1 부위내에서의 적어도 2개의 비염기성 아미노산의 교체를 특징으로 하는 야생형 SDF-1 단백질에 비하여 증가된 GAG 결합 친화성 및 감소된 GPCR 활성을 SDF-1 돌연변이 단백질에 제공하고, 상기 야생형 SDF-1 단백질의 N-말단 영역의 첫번째 1~10개의 아미노산 중 적어도 1개의 아미노산은 적어도 1개의 아미노산의 첨가, 제거 및/또는 교체에 의해 변형된다.

[0016] 본 발명에 따라 정의된 용어 "부근"은 상기 GAG 결합 부위의 구조 근방 내에 위치되지만 GAG 결합 부위에 직접 위치하지 않는 아미노산 잔사를 포함한다. 구조 근방은 단백질의 상기 아미노산 서열에 관하여 GAG 결합 아미노산 잔사에 인접하게 위치된 아미노산 잔사나, 또는 상기 단백질의 3차원 구조(또는 접힘)의 결과로서 GAG 결합

아미노산 잔사에 인접하게 위치된 아미노산으로서 정의될 수 있다.

[0017] 그들의 생물학적 기능을 발휘시키기 위해서, 단백질은 한번 또는 그 이상 수소 결합, 이온성 상호작용, 반데르발스 힘 및 소수성 패킹 등의 다수의 비공유 상호작용에 의해서 구동되는 도메인이라 불리는 특정 공간적 구조로 접힌다. 3차원 구조는 X-선 결정학 또는 핵자기공명과 같은 공자의 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0018] 비변성 GAG 결합 부위의 동정은 예컨대, 돌연변이 생성 실험에 의해 달성을 수 있다. 단백질의 GAG 결합 부위는 상기 단백질의 표면에 주로 위치되는 염기성 잔사를 특징으로 한다. 이들 영역이 GAG 결합 부위로 규정되는지 여부를 테스트하기 위해서, 이들 염기성 아미노산 잔사는 예컨대, 알라닌 잔사로 교체함으로써 돌연변이가 생성되어 헤파린 결합 친화성의 감소를 측정할 수 있다. 이것은 본 분야에서 알려진 바와 같은 임의의 친화성 측정 기술로 행해질 수 있다.

[0019] 염기성 또는 전자 공여 아미노산의 삽입 또는 치환에 의해 합리적으로 설계된 돌연변이 생성은 상기 GAG 결합 부위의 증가된 사이즈 및 GAG 결합 친화성의 증가로 얻어질 수 있는 비변성 GAG 결합 부위의 근방에 외래의 아미노산을 도입하여 행해질 수 있다.

[0020] 상기 GAG 결합 부위 또는 상기 부위의 근방은 참조에 의해 본 원에 포함되는 US 61/07565에 상세하게 기재된 방법을 사용함으로써 측정될 수도 있다. 이것은 이하를 포함한다:

[0021] (a) 상기 단백질 및 상기 GAG 리간드 문자 예컨대, 헤파린 설페이트(HS), 헤파린, 캐라틴 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 테르마탄 설페이트 및 히알루론산 등이 상기 단백질과 결합되는 것을 포함하는 착체를 제공;

[0022] (b) 상기 단백질을 분열시킬 수 있는 단백질 예컨대, 트립신과 같은 분열 시약과 상기 착체를 접촉. 여기서, 상기 GAG 리간드 문자가 연결된 상기 단백질의 영역에서 상기 GAG 리간드 문자가 단백질 분열을 방해함으로써 상기 단백질은 상기 결합된 GAG 리간드 문자에 의해 방해되지 않은 영역에서 분열된다:

[0023] (c) 상기 분열된 펩티드를 분리 및 검출. 여기서, 상기 단백질의 영역에서 분열 사건이 없는 것은 상기 GAG 리간드 문자가 상기 영역에서 결합된 것을 나타낸다. 검출은 예컨대, LC-MS, 나노 HPLC-MS/MS 또는 질량분석 방법에 의해 할 수 있다.

[0024] GAG 결합 부위를 도입 또는 개선시키기 위한 프로토콜은 예컨대, WO 05/054285에 부분적으로 기재되어 있고, 이하와 같다:

[0025] -GAG 결합에 포함된 상기 단백질의 영역을 동정한다.

[0026] -염기성 또는 전자 공여 아미노산, 바람직하게는 임의의 위치에서의 Arg, Lys, His, Asp 및 Gln 잔사를 도입(교체 또는 삽입)하거나 GAG 결합을 방해하는 아미노산이 제거됨으로써 새로운 GAG 결합 부위를 설계한다.

[0027] -실리카에서 상기 얻어진 돌연변이 단백질의 구조 안정성을 체킹한다.

[0028] -상기 야생형 단백질 cDNA를 클로닝한다(또는: cDNA를 구입한다).

[0029] -상기 변경이 상기 아미노산 서열로 도입되기 위해서 PCR-보조 돌연변이 생성용 주형으로서 이것을 사용한다.

[0030] -상기 돌연변이 유전자가 적당한 발현 시스템으로 써브클로닝한다(생물학적으로 요구된 후변역 변형에 따른 원핵성 또는 진핵성).

[0031] -생체 내 상기 돌연변이 단백질의 발현, 정제 및 특징화한다.

[0032] 증가된 GAG 결합 친화성에 대한 기준:  $K_d^{\text{GAG}}(\text{돌연변이}) \leq 10\mu\text{M}$

[0033] -원자외선 CD 분광법 또는 1-D NMR 분광법에 의해 구조적인 유지를 체킹한다.

[0034] 본 발명에 따른 구조 유지 변형으로서, 원자외선 CD 분광법에 의해 측정되는 야생형 구조로부터의 변형 구조의 편차가 30% 미만, 바람직하게는 20% 미만으로 규정된다.

[0035] 전자 공여 아미노산은 전자 또는 수소 원자를 공여하는 이들 아미노산이다(Droenstedt 정의). 바람직하게는 이들 아미노산은 Asn 또는 Gln일 수 있다. 염기성 아미노산은 Arg, Lys 또는 His으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0036] 상기 염기성 또는 전자 공여 아미노산으로 교체된 비변성 아미노산이 염기성 아미노산이면, 상기 치환 아미노산은 염기성 아미노산이거나, 또는 상기 비변성 단백질 구조로 다소 구조적 유연성을 도입하는 것이 보다 바람직

하다.

[0037] 본 발명에 따른 구조적 유연성은 GAG 리간드 결합의 결과로서 유도된 적합성을 수용하는 정도로 규정된다.

[0038] 본 발명의 구체적인 실시형태에 따라서, 염기성 및/또는 전자 공여 아미노산에 의해 교체된 비변성 아미노산은 비염기성 또는 염기성이 적은 아미노산이다.

[0039] 본 발명에 따라서, 상기 SDF-1 돌연변이 단백질은 구조 유지 방법에서의 변형을 포함할 수 있고, 여기서, 야생형 SDF-1 구조로부터 원자외선 CD 분광법에 의해 측정되는 변형된 구조의 편자는 30% 미만이고, 20% 미만이 바람직하며, 10% 미만이 보다 바람직하다.

[0040] 다른 실시형태에 따라서, 상기 구조 보존 변형은 상기 SDF-1 단백질의 N-말단 내에 위치되지 않는다.

[0041] 본 발명은 상기 SDF-1 단백질의 비구조적 영역이 적어도 2개의 염기성 아미노산의 삽입 또는 교체에 의해 변형되고 상기 SDF-1 단백질의 N-말단 영역이 8개의 아미노산의 절단 또는 상기 첫번째 2개의 아미노산을 교체/제거함으로써 변형되는 것을 특징으로 하는 증가된 GAG 결합 친화성 및 감소된 GPCR 활성으로 SDF-1 돌연변이 단백질을 커버한다.

[0042] 구체적인 실시형태에 따라서, 상기 N-말단 아미노산은 리신, 아르기닌, 프롤린 또는 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0043] 또한, 위치 29 또는 39에서 적어도 하나의 아미노산은 본 발명의 SDF-1 돌연변이 단백질로 변형될 수 있다. 또한, 아미노산 제거, 치환 또는 삽입은 아미노산 위치 24, 25, 26, 27 및/또는 41, 42, 43에서 행해질 수도 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 SDF-1 돌연변이 단백질의 아미노산 서열은 일반식에 의해 기재될 수 있다:

[0045]  $(M)_n(X1)_m(X2)_pVSLSYRCPCRFFFESHVARANVKHLKI(X3)NTPNCALQI(X4)ARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK(GRREEKVGKKEKIGKKKRQKKRKAAQKRKN)$

[0046] 여기서, X1은 K 또는 R 잔사이고,

[0047] X2는 P 또는 G 잔사이고,

[0048] X3은 Y 및/또는 A 잔사로 이루어진 군으로부터 선택되며, 바람직하게는 A이고,

[0049] X4는 S, R, K, H, N 및/또는 Q 잔사로 이루어진 군으로부터 선택되며, 바람직하게는 K이고,

[0050] n 및/또는 m 및/또는 p 및/또는 o는 0이거나 1일 수 있고,

[0051] 위치 X1, X2, X3 또는 X4 중 적어도 2개는 변형된다.

[0052] 본 발명의 다른 실시형태에 따라서, SDF-1 돌연변이 단백질은 N-말단 Met를 함유할 수 있다.

[0053] 본 발명의 또 다른 실시형태는 상술된 바와 같이 본 발명의 단백질을 코딩하는 단리된 다핵산 분자이다. 상기 다핵산은 DNA 또는 RNA이어도 좋다. 따라서, 본 발명의 SDF-1 돌연변이 단백질을 야기한 상기 변형은 DNA 또는 RNA 레벨 상에서 행해진다. 본 발명의 단리된 다핵산 분자는 진단법 또한 유전자 테라피 및 큰 규모의 본 발명의 SDF-1 돌연변이 단백질의 제조를 위해서 적합하다.

[0054] 보다 바람직하게는, 상기 단리된 다핵산 분자는 가혹한 조건하에서 상기 규정된 본 발명의 다핵산 분자와 혼성된다. 상기 혼성 조건에 따라서, 완전하게 매칭되거나, 또는 비매칭된 염기를 포함함으로써 상기 2개의 DNA 또는 RNA 분자 사이에 상보성 겹나사선을 형성한다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). 약 50개의 뉴클레오티드보다 긴 프로브는 25~30%의 비매칭된 염기를 달성해도 좋다. 프로브가 작을수록 더 적은 비매칭을 이룰 수 있다. 비매칭된 염기쌍을 함유하는 겹나선을 형성하도록 타겟과 프로브의 경향은 혼성 베퍼프에서의 염 또는 포름아미드의 농도, 상기 혼성 및 후-혼성 세정 조건의 온도 등의 인자의 그 자체의 기능인 혼성 조건의 가혹성에 의해 제어된다. 목적의 가혹성을 갖는 혼성 겹나선 조건의 형성에서 발생되는 공지의 원리를 적용함으로써 각종 혼성 베퍼프, 온도 및 세정 조건을 선택함으로써 상기 분야에서의 당업자에 의해 달성될 수 있다. 이로써, 완전하게 매칭되거나 또는 부분적으로 매칭된 혼성 겹나선의 검출을 허용하는 조건이 선택될 수 있다. 겹나선의 융점(T<sub>m</sub>)은 적절한 혼성 조건을 선택하는데 유용하다. 일반적으로 길이가 200개의 뉴클레오티드를 초과하는 다핵산 분자에 대한 가혹한 혼성 조건은 예상된 겹나선의 융점 이하의 15~25°C 온도에서의 혼성을 포함한다. 프로브보다 긴 안정한 겹나선을 거의 형성하지 않

는 30개의 뉴클레오티드를 초과하는 올리고뉴클레오티드 프로브에 대해서는 일반적으로 가혹한 혼성은 용점 이하의 5~10°C에서 혼성함으로써 달성된다. 핵산 겹나선의 용점은 상기 핵산에 함유된 G+C 퍼센트에 대한 식을 사용하고, 상기 식 등의 쇄 길이를 고려하여 산출될 수 있다.

$$[0055] T_m = 81.5 - 16.6(\log[Na^+]) + 0.41(\% G+C) - (600/N)$$

[0056] 여기서, N=쇄 길이

[0057] 다른 실시형태는 상술된 바와 같이 본 발명에 따라 단리된 DNA 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 상기 벡터는 단백질의 효율적인 트랜스펙션, 또한 효율적인 발현을 위해 필요한 모든 조절 요소를 포함한다. 이러한 벡터는 본 분야에서 공지되어 있고 임의의 적합한 벡터는 상기 목적을 위해 선택될 수 있다.

[0058] 본 발명의 다른 실시형태는 상술된 바와 같이 본 발명의 벡터로 트랜스펙션된 재조합 세포에 관한 것이다. 세포의 트랜스펙션 및 재조합 세포의 배양은 본 분야에서 공지된 바와 같이 행해질 수 있다. 이러한 재조합 세포, 또한 그로부터의 임의의 자손 세포는 상기 벡터를 포함한다. 이로써, 연속적으로 또는 상기 벡터에 따른 활성화 시에 상기 SDF-1α 돌연변이 단백질을 발현하는 세포주가 제공된다.

[0059] 본 발명의 다른 실시형태는 상술된 바와 같이 본 발명에 따른 SDF-1α 돌연변이 단백질, 다핵산 또는 벡터 및 의약적으로 수용가능한 캐리어를 포함하는 의약 조성물에 관한 것이다. 물론, 상기 의약 조성물은 염, 베피, 유화제, 착색제 등의 의약 조성물에서 일반적으로 존재하는 부가적인 물질을 더 포함하여도 좋다.

[0060] 본 발명의 다른 실시형태는 각각의 야생형 단백질의 생물학적인 활성을 금지하거나 억제하기 위한 방법에 있어서 상술된 바와 같이 본 발명에 따른 SDF-1 단백질, 다핵산 또는 벡터의 사용에 관한 것이다. 상술된 바와 같이, 본 발명의 SDF-1 돌연변이 단백질은 특정 길항제로서 작용할 수 있어 공지의 재조합 단백질로 발생된 부작용이 본 발명의 SDF-1 돌연변이 단백질로는 발생되지 않는다. 상기 GAG 결합 친화성을 증가시킴으로써 상기 변형된 SDF-1 단백질은 특정 길항제로서 작용하고 GAG 결합을 위한 야생형 GAG 결합 단백질과 경쟁할 수 있다.

[0061] 이러한 경우에 있어서, 특히, 이것은 암 발생에 포함되는 생물학적 활성일 수 있다.

[0062] 따라서, 상술된 바와 같이 본 발명에 따른 상기 SDF-1 단백질, 다핵산 또는 벡터의 또 다른 사용은 암의 치료용 약을 제조하기 위한 방법에 있다. 특히, 부작용없는 길항제로서 작용할 수 있고, 특히, 암 질병의 치료에 적합할 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 실시형태는 또한, 암 질병을 치료하기 위한 방법이고, 여기서, 본 발명에 따른 SDF-1 돌연변이 단백질, 본 발명에 따른 단리된 다핵산 분자 또는 벡터 또는 본 발명에 다른 의약 조제물은 환자에게 투여된다.

[0063] 본 발명은 이하의 예로 더욱 설명되지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0064] (실시예)

#### 실시예 1: GAG 결합 친화성의 증가

[0066] wtSDF-1α에 관하여 상기 SDF-1α 돌연변이의 조작되고 증가된 GAG 결합 친화성은 등온 형광 적정으로 측정했다 (도 2 참조). 정상 상태 형광 측정은 Perkin Elmer(Baconsfield, UK) LS50B 형광계로 행해졌다. 282nm에서의 여기시에 PBS(pH 7.2, 125mM NaCl)에 SDF-1α 야생형 또는 돌연변이의 180mM으로 미리 평형된 용액의 방출이 300~390nm의 범위에 걸쳐 기록됐다. 결합 등온선은 써머스탯(thermostat)에 큐벳 홀더를 연결하고 2분의 평형 기간을 감안하여 혼파란 설페이트의 부분 표본을 첨가함으로써 얻어졌다. 상기 슬릿 폭은 여기 및 방출 모두에 대해 12nm로 설정되었고 상기 스펙트라는 200nm/분으로 기록됐다. 290nm 컷오프(cut-off)를 미광을 피하기 위해서 삽입했다. 상기 형광 스펙트라는 백그라운드 교정되었고 상기 각각의 영역을 300 및 390nm 사이에서 인터그레이션했다. 3개의 독립된 실험으로부터 얻어진 형광 강도(-F/F0)의 정규화 표준화 변화가 상기 리간드 농도에 대하여 플로팅되었다. 상기 얻어진 결합 등온선은 이전에 편찬된(Falsone et al. (2001) Biochem Biophys Res Commun 285, 1180-5) 이분자 조합 반응을 기재한 이하 식에 프로그램 Origin(Microcal Inc., Northampton, USA)을 사용하여 비선형 회귀에 의해 일치시켰다. wtSDF-1α에 관하여 Met-SDF-1 Δ8 L29K V39K 돌연변이의 ca. 10의 인자에 의해 HS 친화성의 명백한 개선이 확인되었다.

#### 실시예 2: GPCR 활성의 저하

[0068] SDF-1α 야생형이고 돌연변이 지향 세포 이동이 5μm PVP-코팅된 폴리카보네이트 맴브레인을 갖춘 48-웰 Boyden 챔버 시스템(Neuroprobe)을 사용하여 조사되었다. 20mM HEPES pH 7.3 및 1mg/ml BSA를 함유하는 RPMI 1640에서 5nM~20nM의 범위의 돌연변이 회석 및 wt SDF-1α은 웰이 베피만을 포함하여 3중 챔버의 하부 웰에 위치되었다.

$2 \times 10^6$  셀/ml로 동일한 매체의 THP-1 세포 혼탁의 50 $\mu\text{l}$ (세포 배양의 유럽 컬렉션)는 상부 웰에 위치되었다. 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 2시간 인큐베이션 후에, 상기 필터의 상부면을 HBSS(Hank's balanced salt solution)으로 세정하였다. 상기 이동 세포를 메탄올로 고정시키고 Hemacolor®(Merck)로 염색시켰다. 웰당 5개의 400× 배율의 이동 세포가 카운팅되었고 독립적으로 행해진 3개 실험의 평균은 백그라운드 교정되었고, 상기 케모카인 농도에 대하여 플로팅되었다(도 3 참조; PA517=Met-SDF-1 Δ8 L29K V39K). 상기 Met-SDF-1 Δ8 L29K V39K 돌연변이는 생체 내에서 명백하게 감소된 주화성을 나타낸다.

#### [0069] 실시예 3: 유방암 전이의 억제

[0070] 암 전이에 대해 SDF-1α 돌연변이의 억제 활성을 조사하기 위해서, 마우스 이종 이식 모델을 사용했다. 10주령 암컷 면역 결핍 SCID 마우스를 생체 내 실험용으로 사용했다. 그들은 실험의 총 과정에 있어서 격리 관리되었다. 상기 동물을 딜리버리한 후에 몇일 동안 방치시켜 실험 시작 전에 진정시켰다.

[0071] LMD-231 세포를 상기 이종 이식 모델로 사용했다. 그들은 MDA-MB-231로 접종된 마우스의 폐 전이로부터 배양되었다. 이들 세포는 CXCR4의 높은 레벨로 발현되는 것이 알려져 있고 통상적으로 이종 이식 실험에 사용된다. 이들 부착 세포는 50:50 비율로 혼합된 완전한 Minimum Essential Medium 및 RPMI에서 배양되었고 세포 플라스크를 1:3의 비율로 분리시켰다. 상기 세포를 습한 분위기하에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양시켰다.

[0072] 생체 내 실험을 위해서, 120,000 LMD-231 세포를 각각의 마우스의 꼬리 정맥으로 주입시켰다. 주입 직전에, 상기 세포는 소망의 농도로 돌연변이 케모카인 또는 대조군용 PBS와 혼합되었다. (상기 세포 및 케모카인은 정식으로 인큐베이션되지 않았고, 주입 전에 그들이 함께 혼합되는 시간은 평균적으로 5-10분이었다.) 100 $\mu\text{l}$ 의 총 부피는 각각의 마우스로 주입되었다.

[0073] 28일째, 상기 동물을 인도적으로 죽이고 기관을 채취했다. 각각의 마우스로부터 반쪽의 간 및 하나의 폐를 미래 연구를 위해 급속 냉동시켰다. 상기 간의 다른 반쪽 및 또 다른 폐를 포르말린으로 고정시킨 후에 파라핀 왁스에 박아 넣었다. 그런 후, 섹션이 상기 간(및 폐)로부터 커팅되었다. 각각의 마우스로부터 2개의 섹션은 인간 상피 세포(유방암)에 특이한 사이토케라틴 마커의 칸테일로 염색되었다.

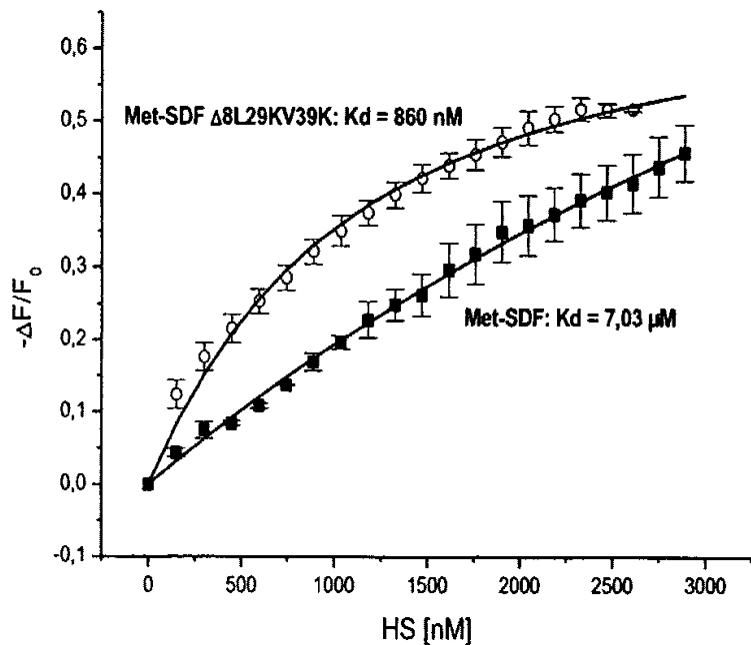
[0074] 간 전이의 평가는 LCM 레이저 캡쳐 현미경 및 통합 소프트웨어라 불리는 것을 사용하여 각각의 섹션의 총 면적을 산출함으로써 달성되었다. 이어서, 각각 섹션에서의 전이의 총 개수가 카운팅되었고 스퀘어 mm<sup>2</sup>당 평균을 산출했다(도 4). 상기 Met-SDF-1 Δ8 L29K V39K 돌연변이는 복용량당 20 $\mu\text{g}$ 으로 상기 간으로의 전이 이동에 대한 명백한 억제 효과를 나타냈다.

도면

도면1

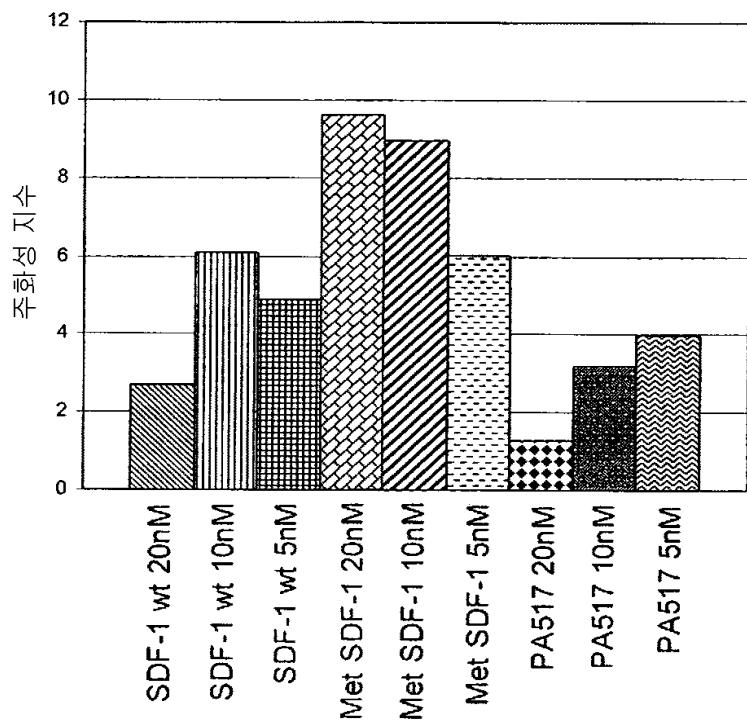
	1	10	20	30	40	50	60	68
SDF-1α (1-68):	KPVSLSYRPCPCRFRESHVARANVKHLKLINTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK							
Met-SDF-1 KIR P2G L29K:	<u>M</u> RGVSLSYRPCPCRFRESHVARANVKHLKLINTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK							
Met-SDF-1 KIR P2G V39K:	<u>M</u> CGVSLSYRPCPCRFRESHVARANVKHLKLINTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK							
Met-SDF-1 48 L29K:	<u>M</u> CGVSLSYRPCPCRFRESHVARANVKHLKLINTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK							
Met-SDF-1 48 L29K V39K:	<u>M</u> CGVSLSYRPCPCRFRESHVARANVKHLKLINTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK							

## 도면2



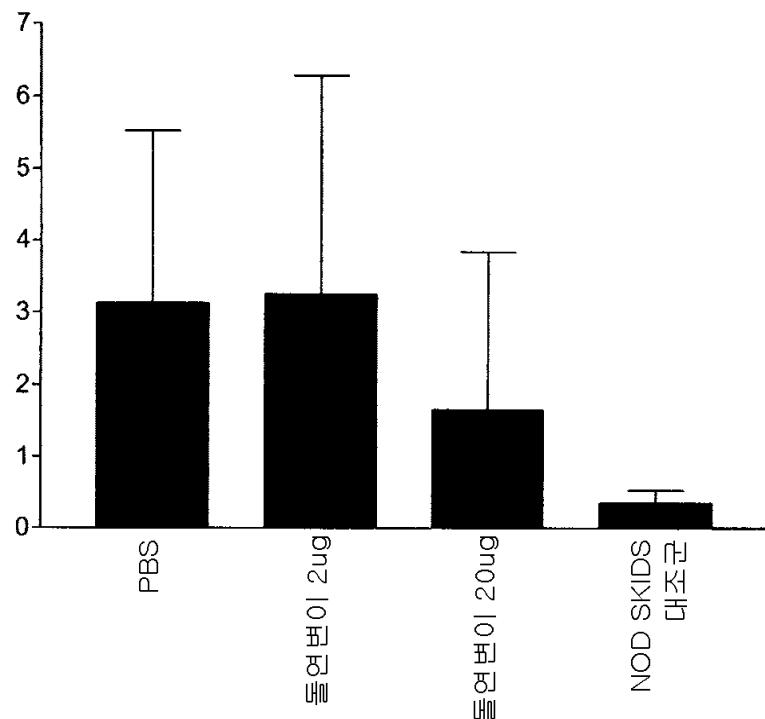
## 도면3

wt SDF-1, Met SDF-1 및 PA517 주화성



**도면4**

SD를 지닌 10mm 스퀘어당 Mets

**서열 목록**

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Protaffin Biotechnologie AG

&lt;120&gt; SDF-1-based glycosaminoglycan antagonists and methods of using

same

&lt;130&gt; R 52397

&lt;150&gt; EP 07450189.1

&lt;151&gt; 2007 10 24

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn version 3.4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 99

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; SDF-1 mutant protein

&lt;220&gt;&lt;221&gt; M = methionine or no amino acid residue

&lt;222&gt; (1)..(1)

<220><221> X = lysine, arginine or no amino acid residue

<222> (2)..(2)

<220><221> X = proline, glycine or no amino acid residue

<222> (3)..(3)

<220><221> X = tyrosine or alanine

<222> (30)..(30)

<220><221> X = serine, arginine, lysine, histidine, asparagine or glutamine

<222> (40)..(40)

<220><221> X = GRREEKVGKKEKIGKKKRQKKRKAQKRKN or no amino acid

<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 Arg Gln Lys Lys Arg Lys Ala Ala Gln Lys

85	90	95
----	----	----

Arg Lys Asn

<210> 2

<211> 68

<212> PRT

<213> 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> Artificial

<220><223> SDF-1 mutant

<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> Artificial

<220><223> SDF-1 mutant

<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> Artificial

<220><223> SDF-1 mutant

<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 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> Artificial

<220><223> SDF-1 mutant

<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 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