(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월19일
(11) 등록번호 10-2012025
(24) 등록일자 2019년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *A61K 38/21* (2006.01)
C07K 14/56 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 19/00 (2013.01)
A61K 38/212 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7006439
(22) 출원일자(국제) 2013년08월07일
심사청구일자 2017년09월28일
(85) 번역문제출일자 2015년03월12일
(65) 공개번호 10-2015-0063375
(43) 공개일자 2015년06월09일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2013/007136
(87) 국제공개번호 WO 2014/027789
국제공개일자 2014년02월20일
(30) 우선권주장
1020120088610 2012년08월13일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
JP2010529859 A*
US20120134961 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
제이더블유크레아젠 주식회사
경기 성남시 중원구 사기막골로 137, 5차 2층 (상대원동, 중앙인더스피아)
(72) 발명자
배용수
경기도 수원시 장안구 수일로 205 광교산임광그대가아파트 107동 1402호
홍승호
경기도 성남시 중원구 자혜로 17번길 16 현대아파트 114동 506호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 김지윤

(54) 발명의 명칭 **세포질 잔류성 세포막 투과 펩타이드 및 폴리에틸렌글리콜이 결합된 인터페론 알파 융합 단백질**

(57) 요 약

본 발명은 IFNα 단백질에 세포질 잔류성 세포막 투과 펩타이드(CTP)와 폴리에틸렌글리콜(PEG)이 결합된 IFN-α 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 IFN-α 융합 단백질은 인터페론의 고유활성이 높게 유지되며, 생체 투여 시 반감기가 연장되고, 간 이동능이 향상된다. 본 발명의 IFN-α 융합 단백질은 각종 바이러스성 감염 등을 포함하는 간질환의 예방 또는 치료에 효과적인 단백질 의약품의 개발에 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
C07K 14/56 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)
C07K 2319/033 (2013.01)
(72) 발명자
김영훈
경기도 남양주시 화도읍 수레로 1142-7 현대1차아파트 103동 301호
한승수
경기도 성남시 중원구 산성대로 408번길 46, 303호
김진
서울특별시 광진구 능동로 27길 19-9, 101호

명 세 서

청구범위

청구항 1

CTP-X-IFNα-Y-PEG으로 표시되는 인터페론-알파 융합 단백질로서,

상기 PEG는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)이고,

상기 CTP-X-IFNα-Y는 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 인터페론-알파 융합 단백질.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌글리콜은 선형(linear)인 것을 특징으로 하는 인터페론-알파 융합 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌글리콜의 분자량은 20-60 kDa인 것을 특징으로 하는 인터페론-알파 융합 단백질.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 제1항에 기재된 인터페론-알파 융합 단백질내의 “CTP-X-IFNα-Y”으로 표시되는 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 부분을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 11

상기 청구항 제 10 항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 12

상기 청구항 제 11 항의 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 13

(a) 청구항 제1항의 인터페론-알파 융합 단백질의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체;를 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 간질환은 간암 또는 간염인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 간염은 HCV(Hepatitis C virus) 간염에 의한 C형 간염인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인터페론-알파(interferon-α, IFNα) 단백질에 세포질 잔류성 세포막 투과 펩타이드(Cytoplasmic Transduction Peptide, CTP)와 폴리에틸렌글리콜이 함께 결합된 인터페론-알파 융합 단백질에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인터페론은 간염 치료제로 사용되고 있으며, 인터페론-알파 제제(Intron-A: Schering, Roferon-A: Roche) 및 인터페론-알파 제제보다 투여회수를 줄인 PEGylated IFN 제제(PEG-Intron: Schering, Pegasys: Roche) 등으로 판매되고 있다.

[0003] 인터페론-알파 치료의 초기 부작용으로 발열, 오한, 전신무력감, 식욕부진, 오심 및 근육통이 있으며, 이러한 증상은 거의 모든 환자에서 투여 용량에 비례하여 나타나는데 치료 초기에 가장 심하며 일반적으로 치료를 중단하면 사라진다. 또한, 간염 환자에서 PEG-인터페론-알파 치료 중 부작용의 빈도와 중증도는 인터페론-알파 치료와 비슷하다고 알려져 있다(Kwan Sik Lee, Dong Joon Kim *et al.* Management of Chronic Hepatitis B, *The Korean Journal of Hepatology*.13:447-488, (2007)).

[0004] 상기한 바와 같이, 인터페론의 투여 용량에 따른 부작용들이 알려짐에 따라 치료제로서 인터페론을 사용함에 있어, 부작용을 최소화하기 위한 투여량의 감소가 요구 되고 있다.

[0005] 종래에는 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여, 세포질 잔류성 세포막 투과 펩타이드(cytoplasmic transduction peptide, CTP)를 인터페론에 융합시킴으로써 인터페론의 간 이동성을 개선시킴으로써, 인터페론 알파 치료의 부작용을 해결하기 위한 수단이 제시된 바 있다. 그러나 상기 융합 단백질을 마우스 모델에 투여시 초기 활성이 급격하게 감소되어 약 6 시간 후에는 활성이 반 이상으로 감소되어, 융합 단백질의 간 이동 및 잔류 특성이 개선되어야 하는 필요성이 대두되었다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 외래 펩타이드와 폴리에틸렌글리콜의 결합과 같은 단백질 변형을 통해 종래의 인터페론의 약학적 효능을 향상시킨 인터페론-알파 융합 단백질을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 인터페론-알파 단백질의 N 말단에 세포질 잔류성 세포막 투과 펩타이드(CTP)를 링커를 통하여 결합시킴과 동시에 C 말단에 링커를 통하여 폴리에틸렌글리콜을 결합시키면, 인터페론의 고유활성이 높게 유지되면서, 생체내 반감기가 연장되고, 간 이동능이 향상된다는 것을 실험적으로 증명하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 기존 인터페론 융합 단백질의 간 이동 및 체류특성이 개선됨으로써, 결과적으로 인터페론 투여량 감소를 기대할 수 있는 인터페론-알파 융합 단백질을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 인터페론-알파 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 인터페론-알파 융합 단백질의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 간질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 CTP-X-IFNα-Y-PEG 으로 표시되는 인터페론-알파 융합 단백질로서, 상기 CTP 는 세포질 잔류성 세포막 투과 펩타이드(cytoplasmic transduction peptide)이고; 상기 X 는 1-10 개의 글리신(glycine)으로 이루어지는 펩타이드 링커이고; 상기 Y 는 1-100 개의 시스테인(cysteine), 글리신, 또는 글리신 및 시스테인으로 이루어지는 펩타이드 링커이고; 상기 IFNα는 인터페론-알파 2a 또는 인터페론-알파 2b 이고; 상기 PEG 는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)인 것을 특징으로 하는 인터페론-알파 융합 단백질을 제공한다.

[0016] 본 발명자들은 외래 펩타이드와 폴리에틸렌글리콜의 결합과 같은 단백질 변형을 통해 종래의 인터페론의 약학적 효능을 향상시킨 인터페론-알파 융합 단백질을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 본 발명의 일 실시예를 통하여, 인터페론-알파 단백질과 CTP 사이에 링커를 도입시킨 후, 인터페론-알파 단백질의 구조를 변형시키지 않는 링커를 선별하고, 상기의 융합 단백질의 C-말단에 폴리에틸렌글리콜을 융합시킨 후, 이의 활성을 분석하였다.

[0017] 그 결과, 인터페론-알파 단백질의 N-말단에 세포질 잔류성 세포막 투과 펩타이드(CTP)를 링커를 통하여 결합시킴과 동시에 C-말단에 링커를 통하여 폴리에틸렌글리콜을 결합시키면, 인터페론의 고유활성이 높게 유지되면서, 생체내 반감기가 연장되고, 간 이동능이 향상된다는 것을 실험적으로 확인하였다. 즉, 상기 결과는 링커를 통하여 인터페론 알파 융합 단백질에 CTP 및 PEG 를 각각 N 및 C 말단에 연결함으로써, 융합 단백질의 생체 내 이동 및 잔류 효과가 개선되는 것을 최초로 입증하는 것으로서, 종래 PEG 또는 PEG 및 CTP 가 연결된 융합 단백질의 치료효과를 개선한 것이다. 구체적으로 이러한 효과는 1) 링커를 통하여 인터페론 알파 단백질과 CTP 가 연결됨으로써 CTP 의 기능이 최적화되고, 2) 폴리에틸린글리콜이 인터페론 알파 단백질의 C 말단에 융합됨으로써 생체내 반감기를 연장시키고, 3) 선형(linear form) 폴리에틸렌글리콜을 인터페론-알파 단백질의 C 말단에 연결시킴으로써 달성되었다.

[0018] 본 명세서에서, 사용되는 상기 용어 "인터페론-알파(IFNα) 융합 단백질" 은 인터페론-알파 단백질에 CTP 만이 결합된 단백질 또는 CTP 와 PEG 가 동시에 결합된 단백질을 의미한다. 본 명세서에서 인터페론-알파 단백질에 CTP 만이 결합된 융합 단백질을 의미하는 경우 "CTP-X-IFNα-Y" 으로도 기재한다.

[0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 "세포질 잔류성 세포막 투과 펩타이드(CTP)" 는 본 발명자들에 의해 최초로 도입된 용어로서, 세포막 투과능을 보유하면서도 세포질에 잔류하는 특성, 즉 핵 내로의 이동이 억제되는 특성을 갖는 펩타이드를 의미한다.

[0020] 본 발명의 IFNα 융합 단백질에 포함되는 CTP 는 본 발명자들에 의해 PTD 의 문제점을 해결하고자 세계 최초로 개발된 전달 펩타이드(delivery peptide)로서 이를 출원하여 특허 등록되었고(대한민국 특허 제 0608558 호, 미합중국 특허 제 7101844 및 일본 특허 제 4188909 호), 상기 특허 문헌에 개시되어 있는 CTP 에 관한 내용은 본 발명의 내용으로서 삽입된다.

[0021] 본 발명의 IFNα 융합 단백질에 포함되는 CTP 에 있어서, 펩타이드의 길이는 당업계에 수용되는 일반적인 길이에 해당하는 것이며, 바람직하게는 9-20 아미노산, 보다 바람직하게는 9-15 아미노산, 가장 바람직하게는 11 아미노산이다.

[0022] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명의 IFNα 융합 단백질에 포함되는 CTP 는 서열번호 1 내지 서열번호 14 에 개시된 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는 본 발명에서 CTP 는 서열번호 1 의 서열을 포함한다.

[0023] CTP 는 세포막 투과능이 우수하고, 세포 내로 도입된 후에도 핵으로의 이동이 억제되는 특성을 가짐으로 인해 생체 내에서 다른 전달체[특히, PTD(protein transduction domain) 또는 폴리아르기닌(polyarginine)]에 비해 세포독성이 낮으며 융합된 단백질을 간으로 이동시키는 독특한 성질을 가지고 있어 간을 타깃으로 하는 질환 치료를 위한 효과적인 약물 전달 펩타이드이다.

[0024] 본 명세서에서, 사용되는 용어 "인터페론-알파(IFNα)" 는 바이러스의 복제 및 세포 증식을 억제하고 면역 반응을 조절하는, 동질성이 크고 종-특이적인 단백질군을 의미한다.

[0025] 본 발명의 IFNα 융합 단백질에 포함되는 인터페론-알파(IFNα)는 재조합 IFNα 2b, 재조합 IFNα 2a, 재조합 IFNα 2c, 천연 알파-인터페론의 정제된 혼합물인 IFNα-n1, 컨센서스 알파-인터페론(미합중국 특허 제 4,897,471 호 및 제 4,695,623 호 참조) 또는 천연 알파-인터페론의 혼합물인 IFNα-n3 이고, 보다 바람직하게는 IFNα 2a 또는 IFNα 2b, 가장 바람직하게는 IFNα 2b 이다. IFNα 2b 의 제조 방법은 미합중국 특허 제 4,530,901 호에 상세히 기재되어 있다.

[0026] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명의 IFNα 융합 단백질에 포함되는 IFNα는 서열번호 21 에 개시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 본 발명의 IFNα 융합 단백질에서 상기 X 는 1-10 개의 글리신(gylcine) 잔기로 이루어지는 펩타이드 링커이다. 이 펩타이드 링커를 통해 CTP 가 IFNα의 N-말단에 결합된다.

[0028] CTP 와 IFNα 사이를 펩타이드 링커 X 로 연결시킴으로써 CTP 펩타이드에 유연성(flexibility)과 자유로운 회전능(free rotation)능을 부여하여 CTP 가 본래 기능을 원활히 수행케 할 수 있다.

[0029] 또한, CTP 가 결합된 융합 단백질의 발현 및 정제시에 소수성을 갖는 CTP 로 인해 발생되는 융합 단백질의 침전을 최소화함으로써 정제 수율을 증대시킬 수 있다.

[0030] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 의하면, CFN1 단백질(CTP-IFNα)을 정제하는 경우 침전이 발생하였으나 펩타이드 링커가 결합된 CFN8 단백질(CTP-GGGG-IFNα)의 경우 침전이 발생하지 않았다.

[0031] 바람직하게는 상기 펩타이드 링커 X 는 1-10 개의 글리신 잔기, 바람직하게는 1-8 개의 글리신 잔기, 보다 바람직하게는 1-7 개의 글리신 잔기, 이보다 더욱 바람직하게는 1-5 개 일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 3-5 개 글리신 잔기일 수 있으며, 4 개 일 수 있다.

[0032] 본 발명의 IFNα 융합 단백질에서 상기 Y 는 1-100 개의 시스테인 잔기, 글리신 잔기, 또는 글리신 및 시스테인 잔기로 이루어지는 펩타이드 링커이다. 이 펩타이드 링커를 통해 폴리에틸렌글리콜(PEG)이 IFNα의 C-말단에 결합된다. 상기 펩타이드 링커 Y 는 0-10 개의 글리신 잔기 및 1-80 개의 시스테인 잔기로 이루어질 수 있으며, 보다 바람직하게는 0-10 개의 글리신 잔기 및 1-60 개의 시스테인 잔기, 더 바람직하게는 1-10 개의 글리신 잔기 및 1-10 개의 시스테인 잔기, 이 보다 더 바람직하게는 1-5 개의 글리신 잔기 및 1-5 개의 시스테인 잔기로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 펩타이드 링커 Y 는 0-10 개의 글리신 잔기 또는 1-80 개의 시스테인 잔기로 이루어질 수 있으며, 보다 바람직하게는 1-10 개의 글리신 잔기 또는 1-60 개의 시스테인 잔기로 이루어질 수 있으며, 더 바람직하게는 1-10 개의 글리신 잔기 또는 1-10 개의 시스테인 잔기, 이 보다 더 바람직하게는 1-5 개의 글리신 잔기 또는 1-5 개의 시스테인 잔기로 이루어질 수 있으며 가장 바람직하게는 3-5 개의 글리신 잔기 또는 3-5 개의 시스테인 잔기로 이루어질 수 있다.

[0033] 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면, 본 발명의 인터페론-알파(IFNα) 융합 단백질내의 "CTP-X-IFNα-Y" 으로 표시되는 펩타이드 부분(peptide moiety)은 서열번호 15 내지 서열번호 20 에 개시된 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드이며, 보다 바람직하게는 서열번호 18 의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드이다.

[0034] 본 발명에서 "CTP-X-IFNα-Y" 으로 표시되는 펩타이드 부분의 아미노산 서열은 상기 서열번호 15 내지 서열번호 20 중 어느 하나의 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 아미노산 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 동일성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 동일성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.

[0035] 본 발명의 IFNα 융합 단백질의 C-말단에는 폴리에틸렌글리콜(PEG)이 결합된다.

[0036] 본 발명에서 PEG 가 IFNα 융합 단백질의 N-말단에 결합되는 경우 CTP 의 세포막 투과성과 간 이동성을 저해하게 되어 바람직하지 않다. 즉, 하기 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 입증되는 바와 같이, PEG 가 IFNα 융합 단백질의 N-말단에 결합하면 인 비트로(*in vitro*) 항바이러스 활성 및 혈액 내에서의 안정성은 우수하나, 간이동성이 현저히 저하된다.

[0037] PEG 는 신장 클리어런스 기작을 감소시켜 혈액 내 반감기를 연장시킴으로써 본 발명의 융합 단백질의 투여량을 감소시키는 효과를 가진다.

[0038] 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면, 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 분자량은 20-60 kDa 이며, 보다 바람직하게는 20-50 kDa 이고, 이 보다 더욱 바람직하게는 30-45 KDa 이며, 더욱 바람직하게는 35-45 KDa 이며, 가장 바람직하게는 40-45kDa 일 수 있다. 40-45KDa 의 PEG 를 사용하는 경우 간 이동성 증대 효과가 가장 크다.

[0039] 본 발명의 다른 바람직한 실시예에 의하면, 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)는 선형 PGE(linear PEG) 또는 가지형 PEG(branched PEG)일 수 있다.

[0040] 본 명세서에서 상기 용어 "선형 PEG" 는 PEG 가 가지가 없이 단일한 사슬(chain)로 이루어진 PEG 형태를 의미하고, 용어 "가지형 PEG"는 2-10 개의 PEG 사슬이 중심 코어 그룹(central core group)으로 부터 분기되어 뻗어 나온 형태를 의미한다.

[0041] 본 발명의 PEG 는 선형 PEG 으로서 인터페론 알파 단백질의 특정 아미노산 잔기에 특이적으로 결합되므로, 최종 생성된 PEG-인터페론 알파 융합 단백질의 분리 및 정제가 용이하고, 단백질의 품질 관리에서도 이점이 있다.

[0042] 본 발명의 IFNα 융합 단백질에 상기 PEG 를 결합시키는 페길레이션 반응은 당업계에 공지된 방법을 통해 수행될 수 있다[M. J. Roberts, M.D. Bentley *et al.*, Chemistry for peptide and protein PEGylation, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459476(2002); Francesco M., Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions, *Veronese Biomaterials* 22:405-417(2001)].

[0043] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 인터페론-알파(IFNα) 융합 단백질내의 "CTP-X-IFNα-Y" 으로 표시되는 펩타이드 부분(peptide moiety)을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0044] 본 명세서에서 용어 "핵산 분자" 는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs,* John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

[0045] 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면, 상기 본 발명의 IFN-α 융합 단백질내의 "CTP-X-IFNα-Y" 으로 표시되는 펩타이드 부분을 코딩하는 핵산 분자는 서열번호 15 내지 서열번호 20 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드를 코딩하는 핵산 분자이며, 보다 바람직하게는 서열번호 18 의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드를 코딩하는 핵산 분자이며, 가장 바람직하게는 서열번호 22 의 DNA 염기서열을 갖는 핵산 분자이다.

[0046] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 IFN-α 융합 단백질내의 "CTP-X-IFNα-Y" 으로 표시되는 펩타이드 부분을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0047] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook *et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0048] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 뉴클레오타이드 서열이 원핵 세포 유래이고, 배양의 편의성 등을 고려하여, 원핵 세포를 숙주로 하는 것이 바람직하다.

[0049] 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ프로모터, pRλ프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로머터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli* 가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터(pLλ프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0050] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pUC19, pET 등), 파지(예: λgt4λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0051] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈(genome)으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및

HSV 의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0052] 본 발명의 벡터에서 벡터로부터 발현되는 본 발명의 IFN-α 융합 단백질의 "CTP-X-IFNα-Y" 으로 표시되는 펩타이드의 정제를 용이하게 하기 위하여, 필요에 따라 다른 서열과 융합될 수도 있으며, 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(IBI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0053] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명의 벡터에 의해 발현된 "CTP-X-IFNα-Y" 으로 표시되는 펩타이드는 양이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피에 의해 정제된다.

[0054] 한편, 본 발명의 발현 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0055] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[0056] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당 업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0057] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포 및 사람 세포 [예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주] 등이 이용될 수 있다.

[0058] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. *et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. *et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. *et al., Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. *et al., Virology*, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. *et al., EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. *et al., Gene*, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

[0059] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 "CTP-X-IFNα-Y" 펩타이드를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 *lac* 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG 를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.

[0060] 이하, 본 발명의 IFN-α 융합 단백질의 제조 방법에는 상술한 본 발명의 "CTP-X-IFNα-Y" 으로 표시되는 펩타이드를 제조하는 방법을 포함하고 있기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0061] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 IFNα 융합 단백질의 제조 방법을 제공한다: (a) 프로모터에 작동적으로 연결된 "CTP-X-IFNα-Y" 으로 표시되는 펩타이드 부분을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체를 배양하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 형질전환체 배양액으로부터 융합 단백질을 수득하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)로부터 수득한 융합 단백질의 C-말단에 폴리에틸렌 글리콜(PEG)를 결합시키는 단계.

[0062] 본 발명에서 용어 "프로모터" 는 코딩 서열 또는 기능적 RNA 의 발현을 조절하는 DNA 염기 서열을 의미한다.

[0063] 본 명세서에서 용어 "작동적으로 연결된" 은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.

[0064] 본 발명에서 형질전환체의 배양은 당업계에 공지된 통상의 원핵세포 또는 진핵세포의 배양방법에 따라 행한다. 예를 들어, 형질전환체 배양을 위한 배지는 원핵세포 또는 진핵세포가 효율적으로 이용할 수 있는 탄소원, 질소

원, 무기염 등을 포함한다면 천연 배지 또는 합성 배지를 모두 사용할 수 있다.

[0065] 형질전환체의 배양은 통상적으로 진탕배양 또는 회전기에 의한 회전에 의한 것과 같은 호기성 조건하에서 행한다. 배양 온도는 바람직하게는 15 내지 50℃에서 행하고, 배양시간은 일반적으로 5 시간 내지 7 일간 행한다. 배지의 pH 는 배양 중에서 바람직하게는 3.0 내지 9.0 의 범위를 유지한다. 배지의 pH 는 무기 또는 유기산, 알칼리 용액, 우레아, 칼슘 카보네이트, 암모니아 등으로 조절할 수 있다. 배양 중에는 필요한 경우 암피실린 및 테트라사이클린과 같은 항생제를 첨가할 수 있다.

[0066] 본 발명에서 배양된 형질전환체의 세포로부터 발현된 외래 재조합 단백질을 분리하는 방법은 당업계에서 통상적으로 이용되는 단백질의 분리 및 정제 방법을 사용하여 행할 수 있다. 예컨대, 암모늄 설페이트 또는 PEG 등을 이용한 용해도에 따른 분리(solubility fractionation), 분자량에 따른 한외여과 분리, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 다양한 방법이 이용될 수 있고, 통상적으로는 상기한 방법의 조합을 이용하여 분리 및 정제한다.

[0067] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상술한 본 발명의 IFNα 융합 단백질의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0068] 본 발명의 조성물에 의해서 예방 또는 치료되는 간질환은 간암, 간염, 간경변증 및 기타 간질환을 포함하며, 바람직하게는 간암 및 간염을 포함하고, 예를 들어 상기 간염은 급성 바이러스성 간염, 만성 간염, 전격성 간염 등 일 수 있으며, 보다 바람직하게는 B 형 또는 C 형 간염일 수 있으며, 가장 바람직하게는 HCV(Hepatitis C virus) 간염에 의한 C 형 간염일 수 있다.

[0069] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명의 간질환 치료용 약제학적 조성물은 바람직하게는 비경구로 투여될 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 피하로 투여될 수 있다.

[0070] 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량" 은 상술한 본 발명의 융합 단백질의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0071] 본 발명의 약제학적 조성물은 필요에 따라 약제학적으로 허용되는 통상적인 무독성 담체, 보조제 및 부형제를 함유하는 용량 단위 제제로서 경구적으로, 비경구적으로, 흡입 스프레이에 의해, 직장 내로 또는 국소적으로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 비경구적으로 투여할 수 있다. 국소 투여는 또한 경피적 패치제와 같은 경피 투여 또는 이온 영동 장치를 이용하는 것을 포함할 수 있다.

[0072] 본 명세서에서, "비경구적 투여" 는 피하 주사, 정맥 내, 근육 내, 흉골 내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 약물 제제는 예컨대 문헌(Hoover, John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1975)에 게시되어 있다. 약물 제제에 대한 내용은 또한 문헌[Liberman, H.A. 및 Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980]에서 확인할 수 있다.

[0073] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0074] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 ㎍/kg(체중)일 수 있다.

[0075] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0076] 본 발명의 이점 및 효과를 요약하면 다음과 같다:

[0077] (i) 본 발명은 IFNα 단백질에 세포질 잔류성 세포막 투과 펩타이드(CTP)와 폴리에틸렌글리콜(PEG)이 결합된 IFNα 융합 단백질에 관한 것이다.

[0078] (ii) 본 발명의 IFNα 융합 단백질은 인터페론의 고유활성이 높게 유지된다.

[0079] (iii) 본 발명의 IFNα 융합 단백질은 생체 투여시 반감기가 연장되고, 간 이동능이 향상된다.

[0080] (iv) 본 발명의 IFNα 융합 단백질은 각종 바이러스성 감염 등을 포함하는 간질환의 예방 또는 치료에 효과적인 단백질 의약품의 개발에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0081] 도 1 은 CTP 가 링커를 통해 결합된 본 발명의 INFα 융합 단백질의 구조를 보여준다. CFN7(CTP-GGGGGG-IFNα, 서열번호 32), CFN8(CTP-GGGG-IFNα, 서열번호 33), Hepsin Cleavage 링커가 삽입된 CFN11(서열번호 34), CFN12(서열번호 35), CFN13(서열번호 36)의 구조를 나타내었다.

도 2 는 링커를 결합시켜 제작한 본 발명의 IFNα 융합 단백질의 2 차 구조를 CD 분광 광도계(Jasco-815)를 사용하여 분석한 결과이다.

도 3 은 CTP-INFα 융합 단백질에 PEG 가 다양한 형태로 결합된 CTP-INFα-PEG 융합 단백질들을 보여준다.

도 4 는 본 발명의 IFNα 융합 단백질 401C 및 PEGASYS(Hoffman LaRoche Ltd.)의 원숭이를 사용한 전임상 약물동력학 측정결과를 비교하여 보여준다. 실험에 사용한 시료는 PEGASYS 와 IFNα 융합 단백질 401C 각각 300μg/kg 체중의 용량으로 투여하였다. 시료를 1 회 투여한 후 6 일간 활성을 측정하였다. 본 발명의 IFNα 융합 단백질 401C 는 IFNα 활성이 높고, 6 일 까지 PEGASYS 보다 우수하거나 동등한 활성을 유지하였음을 확인하였다.

도 5a 및 도 5b 는 본 발명의 융합 단백질과 대조군 약물의 간 이동능을 비교한 결과를 보여준다. 마우스에 본 발명의 인터페론-알파 융합 단백질과 대조군 약물 PEGASYS(Hoffman LaRoche Ltd.)를 투여한 후, 각각 혈액(도 5a) 및 간(도 5b)에서의 시간에 따른 항-바이러스 활성을 측정한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0083] **실시예**

[0084] **실시예 1: CTP 융합 IFNα 유전자의 PCR(polymerase chain reaction) 합성**

[0085] 사람 유래 인터페론-알파(Interferon-α, IFNα)의 N-말단에 CTP 펩타이드를 삽입하였고, CTP 와 IFNα 사이에 글리신(glycine) 4 개 또는 6 개로 구성된 글리신 링커(linker)를 삽입하였다. 글리신 링커가 CTP 와 IFNα 사이를 연결함으로써 CTP 펩타이드에 유연성을 제공하여 그 기능을 원활히 할 수 있을 뿐만 아니라, 정제할 때 소수성인 CTP 로 인한 침전을 최소화하는 역할을 한다. 또한 PCR 법을 통해서 IFNα 유전자의 C-말단에 시스테인(cystein)을 삽입함으로 Maleimide PEG 와의 반응으로 PEG 를 C-말단에 부착할 수 있게 하였다. C-말단에 선형 PEG 를 부착함으로 체내 반감기를 크게 향상시킬 수 있었다.

[0086] 먼저, IFNα의 N-말단에 부착된 CTP 펩타이드와 IFNα 사이에 글리신 링커를 삽입하기 위해서, 하기 표 1 에 기재된 프라이머를 사용하여 PCR 을 행하였다.

[0087] IFNα를 주형으로 하고 PR2 와 PR3 프라이머를 사용하여 1 차 PCR 하였다. 생성된 PCR 산물을 다시 주형으로 하고 PR1 과 PR2 프라이머를 사용하여 2 차 PCR 하였다. 이로써 글리신 6 개로 구성된 링커가 연결된 펩타이드 CTP-GGGGGG-IFNα를 코딩하는 핵산 분자를 최종산물로 얻었다. 최종산물 CTP-GGGGGG-IFNα 단백질을 CFN7(서열번호 32)로 명명하였다.

[0088] IFNα를 주형으로 하고 PR2 와 PR4 프라이머를 사용하여 1 차 PCR 하였다. 생성된 PCR 산물을 다시 주형으로 하고 PR1 과 PR2 프라이머를 사용하여 2 차 PCR 하였다. 이로써 글리신 4 개로 구성된 링커가 연결된 CTP-GGGG-

IFNα를 코딩하는 핵산분자를 최종 산물로 얻었다. 이 최종산물 CTP-GGGG-IFNα 단백질을 CFN8(서열번호 33)로 명명하였다.

[0089] IFNα의 N-말단에 부착된 CTP 펩타이드와 IFNα 사이에 hepsin cleavage 서열을 삽입하기 위해서, 하기 표 1 에 기재된 프라이머를 사용하여 PCR 을 행하였다. IFNα를 주형으로 하고 PR2 와 PR5 프라이머를 사용하여 1 차 PCR 하였다. 생성된 PCR 산물을 다시 주형으로 하고 PR1 과 PR2 프라이머를 사용하여 2 차 PCR 하였다. 이로써 hepsin cleavage 서열로 구성된 링커가 연결된 펩타이드 CTP-KQLRVVNG-IFNα를 코딩하는 핵산 분자를 최종산물로 얻었다. 최종산물 CTP-KQLRVVNG-IFNα 단백질을 CFN11(서열번호 34)로 명명하였다.

[0090] IFNα의 N-말단에 부착된 CTP 펩타이드와 IFNα 사이에 글라이신 과 hepsin cleavage 서열 함께 삽입하기 위해서, 하기 표 1 에 기재된 프라이머를 사용하여 PCR 을 행하였다. IFNα를 주형으로 하고 PR2 와 PR7 프라이머를 사용하여 1 차 PCR 하였다. 생성된 PCR 산물을 다시 주형으로 하고 PR1 과 PR2 프라이머를 사용하여 2 차 PCR 하였다. 이로써 hepsin cleavage 서열과 그 좌우에 각각 글리신 4 개와 글리신 3 개로 구성된 링커가 연결된 펩타이드 CTP-GGGGKQLRVVNGGGG-IFNα를 코딩하는 핵산 분자를 최종산물로 얻었다. 최종산물 CTP-GGGGKQLRVVNGGGG-IFNα 단백질을 CFN12(서열번호 35)로 명명하였다.

[0091] IFNα의 N-말단에 부착된 CTP 펩타이드와 IFNα 사이에 글리신과 hepacyte growth factor activator 를 함께 삽입하기 위해서, 하기 표 1 에 기재된 프라이머를 사용하여 PCR 을 행하였다. IFNα를 주형으로 하고 PR2 와 PR8 프라이머를 사용하여 1 차 PCR 하였다. 생성된 PCR 산물을 다시 주형으로 하고 PR1 과 PR2 프라이머를 사용하여 2 차 PCR 하였다. 이로써 hepacyte growth factor activator 와 글리신 3 개로 구성된 링커가 연결된 펩타이드 CTP- AKTKQLRVVNGGGG-IFNα를 코딩하는 핵산 분자를 최종산물로 얻었다. 최종산물 CTP-AKTKQLRVVNGGGG-IFNα 단백질을 CFN13(서열번호 36)로 명명하였다.

[0092] 상기 제작한 CFN7, CFN8, CFN11, CFN12, 및 CFN13 의 구조는 도 1 에 나타내었다.

표 1

[0093]

프라이머 명칭	프라이머의 염기서열	서열 번호	비고
PR1	5' - TAA TCT AGA AAA AAC CAA GGA GGT AAT AAC ATA TGT ATG GTC GTC GTG CAC GT - 3'	23	
PR2	5' - CAA GGA TCC CTC GAG CTA TTA TTC TTT GCT ACG CAG GCT - 3'	24	
PR3	5' - TAT GGT CGT CGT GCA CGT CGT CGT CGT CGT CGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT TGC GAT CTG CCG CAG ACC - 3'	25	CFN7
PR4	5' - TAT GGT CGT CGT GCA CGT CGT CGT CGT CGT CGT GGT GGT GGT GGT TGC GAT CTG CCG CAG ACC - 3'	26	CFN8
PR5	5' -TAT GGT CGT CGT GCA CGT CGT CGT CGT CGT CGT aaa CAG CTG CGT GTG GTG AAC GGT TGC GAT CTG CCG CAG ACC-3'	27	CFN11
PR6	5' -TAT GGT CGT CGT GCA CGT CGT CGT CGT CGT CGT GGT GGT GGT GGT AAA CAG CTG CGT GTG GTG AAC GGT GGT GGT GGT TGC GAT CTG CCG CAG ACC-5'	28	CFN12
PR7	5' -TAT GGT CGT CGT GCA CGT CGT CGT CGT CGT CGT GCA AAA ACC AAA CAG CTG CGT GTG GTG AAC GGT GGT GGT GGT TGC GAT CTG CCG CAG ACC-5'	29	CFN13

[0094] 다음으로, C-말단에 시스테인을 삽입하기 위해서 PCR 을 행하였다. 4 개의 글리신 링커가 연결된 CTP-GGGG-IFNα 주형으로 하고 PR8 과 PR9 프라이머를 사용하여 CTP-GGGG-IFNα 유전자의 C-말단에 시스테인이 삽입된 CTP-GGGG-IFNα-C 를 코딩하는 핵산분자를 최종 산물로 얻었다. 이 최종산물 CTP-GGGG-IFNα-C 단백질을 CFN8C(서열번호 18)로 명명하였다.

표 2

[0095]

프라이머 명칭	프라이머의 염기서열	서열 번호	비고
PR8	5' -C TAG TCT AGA AAA AAC CAA GGA GGT AAT AAC ATA TGT ATG -3'	30	
PR9	5' - CGC GGA TCC CTA TTA GCA ACC ACC ACC ACC TTC TTT GCT ACG CAG GCT TTC TTG C -3'	31	CFN8C

[0096] **실시예 2: 인터페론-알파 융합 단백질의 대장균 발현 벡터의 제조**

[0097] PCR 을 통해 확보된 CFN7(CTP-GGGGGG-IFNα), CFN8(CTP-GGGG-IFNα), CFN8C(CTP-GGGG-IFNα-C), CFN11(CTP-KQLRVVNG-IFNα), CFN12(CTP-GGGGKQLRVVNGGGG-IFNα), 및 CFN13(CTP-AKTKQLRVVNGGGG-IFNα)를 코딩하는 각각의 유전자를 대장균에서 발현하기 위하여 대장균 발현벡터인 pCFM536 에 각각의 유전자를 클로닝하여 pCFM536-CFN7, pCFM536-CFN8, pCFM536-CFN8C, pCFM536-CFN11, pCFM536-CFN12, 및 pCFM536-CFN13 발현벡터를 제작하였다.

[0098] 우선, CFN7(CTP-GGGGGG-IFNα), CFN8(CTP-GGGG-IFNα), CFN8C(CTP-GGGG-IFNα-C), CFN11(CTP-KQLRVVNG-IFNα), CFN12(CTP-GGGGKQLRVVNGGGG-IFNα) 및 CFN13(CTP-AKTKQLRVVNGGGG-IFNα) PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 각각 클로닝하고 염기서열을 분석하여 원하는 아미노산 서열이 변형 없이 합성된, pGEM-CFN7, pGEM-CFN8, pGEM-CFN8C, pGEM-CFN11, pGEM-CFN12, 및 pGEM-CFN13 재조합 벡터를 얻었다. 이러한 재조합 pGEM-CFN7, pGEM-CFN8 과 pGEM-CFN8C 벡터로부터 PCR 시 프라이머에 포함된 *Xba*I 과 *Bam*HI 제한효소를 이용하여 인서트(insert)를 얻고, 이들을 pCFM536 벡터에 도입하여 발현벡터 pCFM536-CFN7, pCFM536-CFN8, pCFM536-CFN8C, pCFM536-CFN11, pCFM536-CFN12 및 pCFM536-CFN13 를 각각 완성하였다.

[0099] **실시예 3: 대장균에서 인터페론-알파 융합 단백질의 발현 및 확인**

[0100] 상기 실시예 2 에서 제조된 CFN7, CFN8, CFN8C, CFN11, CFN12, 및 CFN13 유전자가 클로닝된 pCFM536 벡터를 POP2136 컴피턴트 세포(competent cell)에 형질전환하여 암피실린(ampicillin)이 첨가된 고체배지에 도말하였다. 고체배지에서 자란 콜로니(colony)를 얻어 LB 배지(broth)에 접종한 후 30℃에서 18 시간 배양하였다. 600 nm 파장에서의 흡광도가 0.4 내지 0.6 이 되었을 때, 42℃로 온도를 높여 발현을 유도(induction)하였다. 추가적으로 4 시간 동안 더 배양한 후에, 배양한 세포로부터 SDS-PAGE 분석을 통하여 단백질의 발현을 확인하였다.

[0101] **실시예 4: 인터페론-알파 융합 단백질의 대량 생산**

[0102] IFNα 융합 단백질을 대량 확보하기 위하여 5L 발효조를 사용하여 대량 배양 및 정제를 실시하였다.

[0103] **1. 5L 발효조를 이용한 대량 배양**

[0104] 생산 균주를 배양하여 IFNα 융합 단백질을 대량으로 확보하기 위하여 5 L 발효조(Biostat B, B.Braun Biotech International)를 이용하여 대량배양을 실시하였다. 우선, IFNα 융합 단백질의 발현이 확인된 균주를 각각 MCB(Master cell bank)와 WCB(Working cell bank)로 제작하여 -80℃에 보관하였다. 본 배양 하루 전에 100 ㎖의 2xYT 배지(트립톤 16 g/L, 효모 추출물 10 g/L, NaCl 5 g/L)에 암피실린 농도가 50㎍/ml 이 되도록 첨가한 뒤에 보관된 WCB 를 접종하여 30℃에서 16 시간 배양하였다. 본 배양을 위해 3 L 의 2xYT 배지(트립톤 16 g/L, 효모 추출물 10 g/L, NaCl 5 g/L)에 암피실린 농도가 50 ㎍/ml 이 되도록 첨가하여 배양 배지를 준비하였다. 본 배양 시작 시 조건은 온도 30℃, pH 6.8, vvm 1, DO 50% 이하로 떨어지지 않도록 하였다. 1 시간 간격으로 OD 값을 측정하며, OD 값이 10 이 되었을 때 배지를 추가로 첨가하고 배양 온도를 42℃로 올려서 발현을 유도하였다. 발현 유도 후에도 1 시간 간격으로 OD 값을 측정하여, OD 값이 더 이상 증가하지 않는 구간에서 배양을 종료하였다.

[0105] **2. 응집체(inclusion body) 분리 및 리폴딩(refolding)**

[0106] 상기에서 세포 배양액으로부터 세포를 회수하고 회수된 세포를 PBS 로 세척하였다. 응집체 세척액 1 [50 mM Tris(pH 8.0), 1% Triton X-100]에 부유한 후 세포파쇄기를 사용하여 파쇄 후 원심 분리하여 불용성의 응집체 분획을 회수하였다. 응집체 세척액 1-4 [세척액 1 : 50 mM Tris(pH8.0), 1% Triton X-100, 세척액 2 : 50 mM

Tris, 1% Triton X-100, 0.1 M NaCl(pH8.0), 세척액 3 : 50 mM Tris, 1% Triton X-100, 0.2 M NaCl(pH8.0), 세척액 4 : 50 mM Tris, 1% Triton X-100, 0.3 M NaCl(pH8.0)]를 순차적으로 사용하여 세포부유, 교반, 세척, 원심분리의 순으로 세척과정을 진행하여 불용성의 응집체 분획을 회수하였다.

[0107] 구조적으로 활성을 가진 IFNα 융합 단백질을 얻기 위해서 분리된 응집체를 종류별로 최적화된 가용화(solubilization) 완충액에 각각 녹이고 이를 다시 각각의 리폴딩 완충액에서 교반하여 리폴딩을 실시하였다. 각 IFN 의 응집체의 가용화 및 리폴딩에 사용한 완충액 및 조건을 다음 표 3 에 나타내었다:

표 3

[0108]

종류	가용화 완충액	리폴딩 완충액	리폴딩 조건
IFN	50 mM Glycine, 8 M Urea(pH 11.0)	50 mM Glycine, 2 M Urea(pH 9.5)	상온에서 24 시간 교반
CFN7 CFN8 CFN8C CFN11 CFN12 CFN13	50 mM tris-HCl, 5 mM EDTA 8 M Urea(pH 11.0)	50 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 M Urea, 10% Sucrose, 0.1 mM oxidized glutathione, 1 mM reduced glutathione (pH 8.0)	4℃에서 4 시간 교반

[0109] 단백질 회수는 3 차 증류수를 0.5 ml 넣고 세포를 부유한 후 가용화 완충액[6 M 구아니딘(Guanidine), 50 mM Tris, 2.5 mM EDTA(pH 9.5)]을 1 ml씩 첨가하며 최종농도 6M 구아니딘이 되도록 응집체를 용해하였다. 4 시간 이상 교반하여 응집체가 완전히 용해된 후 원심분리(12,000rpm, 4℃, 30 분)하여 상등액을 0.2 ㎛ 필터로 여과하였다.

[0110] 완전히 용해된 응집체를 희석 방법으로 리폴딩을 진행하였다. 리폴딩 완충액(50 mM Tris, 1 mM GSH, 0.2 mM GSSG, 1 mM EDTA, 5% Sucrose, pH 8.0)에 최종 구아니딘 농도가 1.5 M 이 되도록 하여 4℃에서 24 시간 동안 천천히 혼합하며 반응시켰다. 반응 완료 후 이 시료에 아세트산(acetic acid)을 첨가하여 pH 를 4.0 으로 맞추었다. 2 시간 이상 추가 반응 후 0.2 ㎛ 필터로 여과하였다. RP-HPLC 를 이용하여 리폴딩 여부를 확인하였다.

[0111] **3. 크로마토그래피를 통한 고순도 정제**

[0112] 상기 방법에 의해 리폴딩을 실시한 후 구조적으로 정상 리폴딩된 CTP-X-IFNα-Y 단백질을 고순도로 정제하기 위하여 탈염(desalting)과 양이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다.

[0113] 리폴딩이 완료된 CTP-X-IFNα-Y 단백질을 컬럼 결합 완충액(50 mM Sodium Citrate-Citric acid, 1 mM EDTA, pH 4.0)에서 16 시간 투석(dialysis)하여 1.5 M 구아니딘을 제거하였다. 10 ml의 세파로스(sepharose) 양이온 크로마토그래피 수지를 컬럼에 충진하여 FPLC 에 장착하였다. 컬럼 결합 완충액(50 mM Sodium Citrate-Citric acid, 1 mM EDTA, pH 4.0)으로 컬럼을 평형화(equilibration) 시킨 후 샘플을 컬럼에 결합시켰다. 농도구배 완충액(50 mM Sodium Citrate-Citric acid, 1 mM EDTA, 1M NaCl, pH 4.0)을 사용하여 컬럼에 결합된 샘플을 분리하였다. HPLC 분석법을 사용하여 분리, 정제된 단백질을 확인하였다. 분리된 시료는 브래드포드법(Bradford)과 UV 흡광 광도계를 사용하여 595nm 에서 농도를 측정하였다.

[0114] **실시예 5: 인터페론-알파 융합 단백질의 구조분석**

[0115] 상기 실시예에서 설명된 바에 따라 링커를 결합시켜 제작한 IFNα 융합 단백질의 2 차 구조를 분석하였다. 2 차 구조의 분석은 대조군으로서 IFNα(interferon-α)와, CFN1(CTP-IFNα), CFN7(CTP-GGGGGG-IFNα), CFN8(CTP-GGGG-IFNα), Hepsin Cleavage 링커가 삽입된 CFN11, CFN12, CFN13 를 대상으로 실시하였다. 단백질의 2 차 구조 분석은 CD 분광 광도계(Jasco-815)를 사용하여 행하였다. 분석하고자 하는 단백질을 50 mM Sodium Citrate-Citric acid, 1 mM EDTA(pH4.0) 내에서 최종 농도가 1 mg/ml 이 되도록 하여 25℃, 0.2 nm 의 분해능(resolution), 1.0 nm 의 대역폭 및 50 nm/min 의 스캔 속도를 갖고, 경로 길이가 0.1cm 인 석영 셀을 사용하여 190 nm 내지 250 nm 의 범위에서 스펙트럼을 얻었다.

[0116] 도 2 에 나타낸 스펙트럼의 분석 결과 인터페론 알파와 가장 유사한 2 차 구조를 유지하고 있는 후보물은 글리신 링커가 삽입되어 있는 CFN7, CFN8 이었으며, Hepsin cleavage 링커가 삽입된 CFN11, CFN12, CFN13 의 경우 알파-힐릭스(α-helix)가 감소한 변형된 2 차 구조를 보였다. 따라서, 있는 CFN7 및 CFN8 IFNα 융합 단백질이 IFNα와 유사한 활성을 가질 것으로 예측되었다.

[0117] **실시예 6: 인터페론-알파 융합 단백질의 페길레이션**

[0118] 분자량 30 kDa 또는 40 kDa 의 선형 PEG(linear PEG) 또는 가지형 PEG(branched PEG)를 N-말단, C-말단 또는 내부에 페길레이션하였다. N-말단 페길레이션은 IFNα 융합 단백질의 CTP 의 앞에 PEG 가 부착된 형태이며, 내부 페길레이션(랜덤 페길레이션)은 IFNα 융합 단백질 내부의 라이신(lysine) 잔기에 무작위적으로 PEG 를 부착한 형태이다. 또한 C-말단 페길레이션은 선형 PEG 또는 가지형 PEG 를 IFNα 융합 단백질의 C-말단에 부착한 형태이다(도 3 참조).

[0119] N-말단 페길레이션을 위해 IFNα 융합 단백질 CFN8(CTP-GGGG-IFNα, 서열번호 33)을 50 mM 인산 나트륨(sodium phosphate, pH 4.5) 버퍼로 교체하였다. IFNα 융합 단백질 CFN8 과 Aldehyde-PEG 를 1:10 으로 혼합하였다. 이 혼합액에 1M $NaBH_3CN$ 을 환원제로 첨가하여 최종 농도가 20 mM 이 되도록 한 후 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 페길화 정도를 SDS-PAGE 로 확인하였고, 페길레이션된 단백질을 양이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피를 실시하여 최종 분리하였다. 페길레이션 수율은 약 40% 이었다.

[0120] 내부 페길레이션은 IFNα 융합 단백질 CFN8(CTP-GGGG-IFNα, 서열번호 33)을 50 mM 인산 나트륨(sodium phosphate, pH 7.5) 버퍼로 교체하였다. PEG-NHS ester 를 1:10 으로 혼합하였다. 이 혼합액에 1M $NaBH_3CN$ 을 환원제로 첨가하여 최종 농도가 20 mM 이 되도록 한 후 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 2M 글리신을 첨가하여 반응을 중지시킨 후 페길화 정도를 SDS-PAGE 로 확인하였다. 페길레이션된 단백질을 양이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피를 실시하여 최종 분리하였다. 페길레이션 수율은 약 17%이었다.

[0121] C-말단 페길레이션은 IFNα 융합 단백질 중에서 IFNα의 C-말단에 시스테인을 첨가한 CFN8C(CTP-GGGG-IFNα-C, 서열번호 18) 단백질에 대해 진행하였다. CFN8C(CTP-GGGG-IFNα-C)의 C-말단에 생성된 시스테인과 결합하도록 Maleimide-PEG 를 사용하여 PEG 를 부착하였다. 이때 단백질과 PEG 의 비율을 1:10 으로 혼합하였고, 1M 인산나트륨(Sodium phosphate, pH 8.0) 버퍼를 최종농도가 100 mM 이 되도록 첨가하여 2 시간 동안 반응하였다. 페길화 정도를 SDS-PAGE 로 확인하였고, 페길레이션된 단백질을 양이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피를 실시하여 최종 분리하였다. 페길레이션 수율은 약 25% 이었다.

[0122] 아래 표 4 에 페길레이션 방법에 따른 각각의 제조 수율을 표시하였다.

표 4

[0123]

PEGylation 방법	관능기 (단백질)	관능기 (PEG)	후보물질	CFN8 (mg)	CFN8C (mg)	PEG-CFN8 또는 CFN8C-PEG (mg)	수율 (%)
N-말단 PEGylation	Amine	Aldehyde	301N-PEG linear type	26		2.6	10
			Di-PEG linear type			1.5	6
			401N-PEG linear type	10		2.0	20
			202N-PEG branch type	10		4.0	40
랜덤 PEGylation	Amine	NHS-ester	202K-PEG branch type	10		1.6	17
			[2+4]K-PEG brach type				
C-말단 PEGylation	Thiol	Maleimide	401C-PEG linear type		9	2.2	25
			202C-PEG branch type		9	1.6	19

[0124] **실시예 7: 인터페론-알파 융합 단백질의 항-바이러스 활성 측정**

[0125] **1. 항-바이러스 활성 측정 방법**

[0126] 제조한 인터페론-알파 융합 단백질들의 항바이러스 활성을 시험관내 실험(in vitro)으로 측정하였다. 항바이러스 활성은 MDBK(Madin-Darby Bovine Kidney) 세포(한국세포주은행)에 VSV(Vesicular stomatitis virus)(한국세포주은행)를 감염시켰을 때 발생하는 세포병변 효과(cytopathic effect)를 인터페론-알파 융합 단백질들이 얼마나 완화시킬 수 있는가를 확인함으로써 측정하였다.

[0127] 먼저 MDBK 세포를 DMEM 배지에서 1.0 X 10^5 세포/㎖이 되도록 희석한 후 96 웰 플레이트 각 웰 마다 200 ㎕씩 분주하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 약 18 시간 배양한다. 단백질의 경우, 5000 pg/ml 농도의 인터페론-알파 융

합 단백질, 1/50 으로 희석한 혈액, 1/10 으로 희석한 간 샘플을 준비한 후 1/2 씩 연속 희석하여 100 ㎕씩 세포에 처리하였다. 37℃, 5% CO_2 에서 4 시간 동안 반응을 유도한 후 모든 웰에 VSV(Vesicular stomatitis virus)을 0.01 MOI(Multiplicity of Infection)가 되게 희석하여, 96 웰 플레이트 각 웰 마다 100 ㎕씩 넣어 주었다. VSV 를 감염시키고 약 18 시간 추가 배양하여 세포병변 효과를 유발하였다. 배양 종료된 세포를 PBS 을 이용하여 2 회 세척 후, 4% 포름알데히드를 200 ㎕씩 각 웰에 넣어서 30 분간 세포를 고정하였다. PBS 을 이용하여 2 회 세척 후 0.05% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)을 100 ㎕씩 각 웰에 넣어 30 분간 염색하였다. PBS 을 이용하여 2 회 세척 후 한 30 분간 건조하였다. 80% 에탄올을 100 ㎕씩 각 웰에 가하여 염색약을 녹여내고 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 감염시키지 않은 대조군에 비해 50%의 세포병변 효과가 나타난 웰을 기준으로 활성도를 측정하였다.

[0128] **2. 인터페론-알파 융합 단백질 형태에 따른 항-바이러스 활성 측정 결과**

[0129] 상기 측정 방법에 따라, 인터페론-알파 융합 단백질 CFN 7, CFN 8, CFN 11, CFN 12, CFN 13 의 활성을 측정하였으며, 그 결과는 아래 표 5 에 나타내었다.

표 5

[0130]

융합 단백질	IFN 에 대한 상대활성(%)
IFN	100
CFN7	57.6
CFN8	90.7
CFN8C	95.0
CFN11	40.8
CFN12	43.6
CFN13	34.2

[0131] **3. 인터페론-알파 융합 단백질의 페길레이션에 따른 항-바이러스 활성 측정 결과**

[0132] 상기 측정 방법에 따라, PEG 사이즈 및 페길레이션 방법 차이에 따른 인터페론-알파 융합 단백질의 항-바이러스 활성을 측정하였다.

[0133] 항-바이러스 활성의 측정은 CTP 및 PEG 가 부착되지 않은 인터페론 알파 단백질로서 표준품 IFNα; N-말단에 CTP 가 부착되었으나 PEG 가 부착되지 않은 IFNα 융합 단백질(CTP-X-IFNα-Y 단백질); CTP-X-IFNα-Y 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 다양한 형태로 PEG 가 부착된 IFNα 융합 단백질인 Di-PEG, 202K, [2+4]K, 401C, 202C 에 대해서 행하였다.

[0134] 상기 Di-PEG 융합 단백질은 2 개의 선형 PEG(30 kDa)가 CFN8 단백질 N-말단 아미노산의 아민기(NH_2)와 단백질 내부 라이신 잔기의 아민기(NH_2)에 각각 결합되어 있는 형태의 IFNα 융합 단백질이고, 상기 202K 융합 단백질은 2 개의 선형 PEG(20 kDa)가 CFN8 단백질 내부 라이신의 아민기(NH_2)에 동시에 결합되어 있는 형태의 IFNα 융합 단백질이고, 상기 [2+4]K 융합 단백질은 2 개의 선형 PEG(5 kDa)와 4 개의 선형 PEG(7.5 kDa)가 CFN8 단백질의 내부 라이신 잔기의 아민기(NH_2)에 동시에 결합되어 있는 형태의 IFNα 융합 단백질이고, 상기 401C 융합 단백질은 1 개의 선형 PEG(40 kDa)가 CFN8C 단백질의 C-말단 시스테인 잔기의 설프하이드릴(SH)기에 결합되어 있는 형태의 IFNα 융합 단백질이고, 상기 202C 융합 단백질은 2 개의 선형 PEG(20 kDa)가 CFN8C 단백질의 C-말단 시스테인의 설프하이드릴(SH)기에 동시에 결합되어 있는 형태의 IFNα 융합 단백질이다(도 3 참조).

[0135] 하기 표 6 에 기재한 결과와 같이, 표준품 IFNα와 비교하여, PEG 가 결합되지 않은 인터페론-알파 융합 단백질의 경우는 항-바이러스 활성이 표준품 IFNα의 활성과 거의 동등하였다. 반면에 PEG 가 결합된 IFNα 융합 단백질은 PEG 형태와 결합 방법에 따라 활성 값이 다양하였으나, PEG 가 부착되지 않은 표준품에 비해서는 활성이 모두 감소하였다.

[0136] 또한, 본 발명의 IFNα 융합 단백질인 401C 와 현재 시판되는 PEG 부착 IFNα 약물인 PEGASYS(Hoffman LaRoche Ltd.)의 항-바이러스 활성을 비교하여 측정하였다. PEGASYS 는 20 kDa 의 가지형 PEG 가 IFNα 단백질에 무작위적으로 결합된 IFNα 융합 단백질이다. 실험결과 하기 표 6 에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 401C 융합 단백질이 PEGASYS(Hoffman LaRoche Ltd.) 보다 항-바이러스 활성이 3 배 더 높은 것으로 확인되었다.

표 6

[0137]

단백질			활성도 비율(%)
표준품	IFNα		100.0
PEG 미부착	CFN8(CTP-GGGG-IFNα)	CFN8C(CTP-GGGG-IFNα-C)	95
다양한 형태의 PEG 부착 단백질	Di-PEG	-	16.7
	202N	-	57.2
	202K	-	22.1
	[2+4]K	-	17.8
	-	401C	32.4
	-	202C	39.0
PEGASYS	-	-	10.8

[0138] **실시예 8: 인터페론-알파 융합 단백질의 약물동력학적 특성 측정**

[0139] **1. 마우스 약물동력학 데이터**

[0140] 마우스 3 마리를 하나의 실험군 또는 대조군으로 하여 시간 별로(4h, 8h, 12h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d) 각 인터페론-알파 융합 단백질 시료를 30 ㎍씩 마우스 목뒤에 피하로 주사하였다. 실험에 사용한 시료는 시험군으로서 202K, 202C 및 401C 의 융합 단백질을 사용하였고, 대조군으로서 PEG 부착 IFNα 약물인 PEGASYS(Hoffman LaRoche Ltd.)를 사용하였다. PEGASYS 는 20 kDa 의 가지형태의 PEG 가 IFNα 단백질에 무작위적으로 결합된 IFNα 융합 단백질이다. 시료를 주사한 후 각 시간 별로 마우스 눈에서 약 1 ㎖을 채혈하여 얼음에 1 시간 꽂아 둔 후 원심분리하여(13,000 rpm, 4℃, 0.5h) 혈청만 회수하였고, 회수한 혈청을 1/50 으로 희석하여 항-바이러스 활성을 측정하였다. 측정한 결과는 하기 표 7 에 기재하여 나타내었다. 표 7 의 결과에서 나타난 바와 같이, 401C 형태가 202K 또는 PEGASYS 보다 혈액내 활성, 간 내 활성 및 혈액 내 활성 대비 간 내 활성의 비율이 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0141] **2. 원숭이 약물동력학 데이터**

[0142] 원숭이 2 마리를 하나의 군으로 하여 시간 별로(4h, 8h, 12h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d) 각각의 샘플을 300 ㎍/kg 씩 원숭이 목뒤에 피하로 주사하였다. 샘플은 시험군으로 PEG 가 부착된 인터페론-알파 융합 단백질(401C)과 대조군으로 PEG 가 부착된 시판되는 IFN-α 약물 PEGASYS 를 사용하였다. 주사 전과 주사 후 시간 별로 원숭이 뒷다리 정맥에서 약 2.5 ㎖를 채혈하여 얼음에 1 시간 꽂아 둔 후 원심분리하여(13,000 rpm, 4℃, 0.5h) 혈청만 회수하였다. 혈청을 1/50 으로 희석하여 항바이러스 활성을 측정하였다. 측정결과는 도 4 에 나타내었다.

[0143] 원숭이를 사용한 본 발명의 인터페론-알파 융합 단백질 401C 약물동력학적 에 의하면, 본 발명의 인터페론 알파 융합 단백질 401C 을 투여한 후 3 일 이내인 약물 투여 전기에서는 PEGINTRON(간염 치료제, Merck & Co., Inc)과 유사한 정도의 약물 투여 후 초기 활성 증가의 효과를 보였으며, 투여 후 4-7 일 내의 약물 투여 후기에서는 PEGASYS(간염치료제, Hoffman LaRoche Ltd.)와 유사한 정도의 안정성을 보여주었다(도 4 참조). 이와 같은 결과는 본 발명에서 제조한 인터페론 알파 융합 단백질 401C 가 약물 투여 후 초기 활성이 감소되지 않으면서, 7 일 까지 높은 활성이 유지된다는 것을 보여주는 것이다. 이러한 지속력은 본 발명의 일 실시에에 따른 융합 단백질을 구성하는 링커, 폴리에틸렌글리콜의 종류, 위치 및 방법을 최적화되었음을 입증하는 것이다.

[0144] **실시예 9: 인터페론 알파 융합 단백질의 간이동성 측정**

[0145] 마우스 3 마리를 하나의 군으로 하여 시간 별로(4h, 8h, 12h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d) 각각의 샘플을 30 ㎍씩 마우스 목뒤에 피하로 주사하였다. 실험에 사용한 시료는 시험군으로서 202K, 202C 및 401C 의 융합 단백질을 사용하였고, 대조군으로서 PEG 부착 IFNα 약물인 PEGASYS(Hoffman LaRoche Ltd.)를 사용하였다. 주사 후 시간 별로 마우스의 배를 절개한 후 간의 혈관으로 냉장 보관된 PBS 를 주입하여 간 관류(perfusion)을 실시하였다. 간에서 혈액이 제거되면 간 전체를 절단하여 10% 수크로스 버퍼에 넣었고 간을 PBS 로 2 차례 세척하였다. 간을 단백질 분해효소 억제제(protease inhibitor)가 들어있는 PBS 버퍼에 넣고 분쇄기로 분쇄하였다. 400 ㎕의 10x RIPA 버퍼를 넣어 1x RIPA 버퍼가 되도록 하여 섞어준다. 샘플당 약 1.2ml 씩을 1.5ml 튜브 3 개로 분주하여 4℃에서 12 시간 보관하였다. 원심분리(13,000rpm, 4℃, 0.5h)한 후 각 튜브당 700 ul 의 상층액만을 회수하여

각 샘플당 약 2ml 씩을 모았다. 샘플 1ml 을 FPLC(Hi-trap desalting column 사용, flow 는 3 으로 고정)로 정제하였다. 회수된 단백질 분획의 양을 측정하기 위해서 AUC(Area under concentration)를 계산하여 희석배수를 산출하였다. [ELISA 측정값(ng/ml)x 2 x 2 x 분쇄한 총 부피(ml)]/[간 무게(g) x(FPLC 정제로 얻은 단백질의 양)/(FPLC 정제 단백질의 전체 양)] = ng/g 간. 시간별 간 추출물을 사용하여 인터페론-α의 활성도를 측정함으로 PEG 가 부착된 IFN-α 융합 단백질과 시판 약물인 PEGASYS 사이의 간 이동성을 비교 평가하였다.

[0146] 도 5a 및 도 5b 의 결과에서 보여지는 바와 같이 마우스를 사용한 간 이동성 측정 실험결과에 의하면, 본 발명의 인터페론-알파 융합 단백질의 간 이동성은 PEGASYS 에 비해서 401C 는 약 13 배, 202K 는 약 6 배 높았다. PEGASYS 가 자체 PEG 에 의한 간이동성 특성이 높은 것을 감안하면, 본 발명의 인터페론-알파 융합 단백질의 간 이동성이 현저히 높다는 것을 알 수 있다. 또한, 202N 의 경우 간 이동성이 거의 나타나지 않음을 알 수 있었다. 이는 202N 의 형태에서 PEG 가 C-말단의 CTP 에 페길레이션됨으로써 CTP 의 간 이동능을 저해하였기 때문인 것으로 보여진다.

[0147] 아래 표 7 은 혈액과 간에서 약동력학적으로 가장 우수한 시험군인 401C 와 202K 의 활성값을 대조군인 PEGASYS 의 활성값과 비교한 것이다. 결과적으로 401C 가 시험군 뿐만 아니라 대조군에 비해서도 혈액과 간에서 가장 탁월한 약동력학적 활성을 나타내었다.

표 7

[0148]

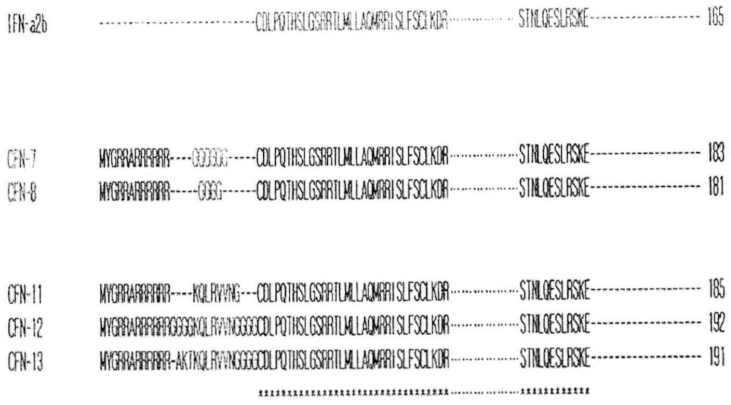
융합 단백질	혈액 내 활성(AUC) (IU · d/ml)		간 내 활성(AUC) (IU · d/g 간)		간 내 활성/ 혈액 내 활성(%)
	측정값	PEGASYS 대비 배수	측정값	PEGASYS 대비 배수	
401C	850,333	3.7	32,986	13	3.87
202C	1,084,000	4.8	2,078	0.84	0.19
202K	704,042	3.1	14,150	5.7	2.00
202N	62,767	0.3	0	0	0
PEGASYS	225,267	1.0	2,463	1.0	1.09

[0149] 종합하면, 본 발명은 간 이동 및 잔류 특성을 개선한, 인터페론 알파 융합 단백질에 관한 것으로, 융합 단백질을 연결하는 링커의 종류 및 길이에 따른 인터페론 알파 융합 단백질의 구조를 기준으로, 구조적인 변화를 유발하지 않는 링커를 선별하고, 이러한 융합 단백질의 시험관 내(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*) 특성을 통하여, 인터페론 알파 단백질의 활성, 간 이동 및 잔류 특성이 개선되었음을 입증함으로써 발명을 완성하였다. 또한, 본 발명의 일 실시에에 따른 융합 단백질은 기존의 융합 단백질 대비 활성 및 반감기가 개선되었을 뿐만 아니라, 품질 유지 및 제조가 용이하므로, 간질환 치료용 조성물에 유용하게 활용될 수 있다.

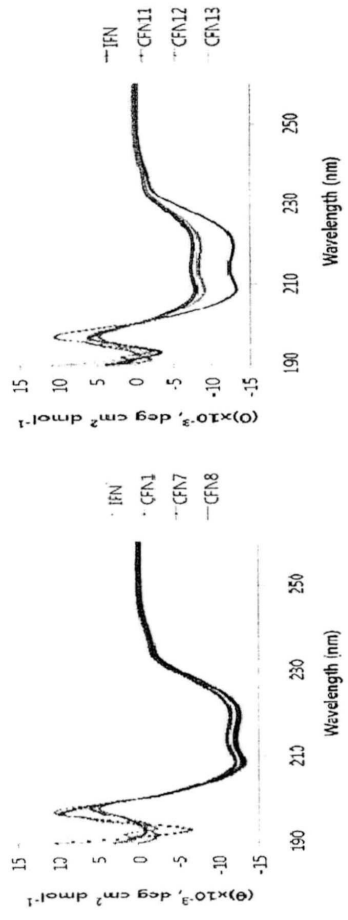
[0150] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

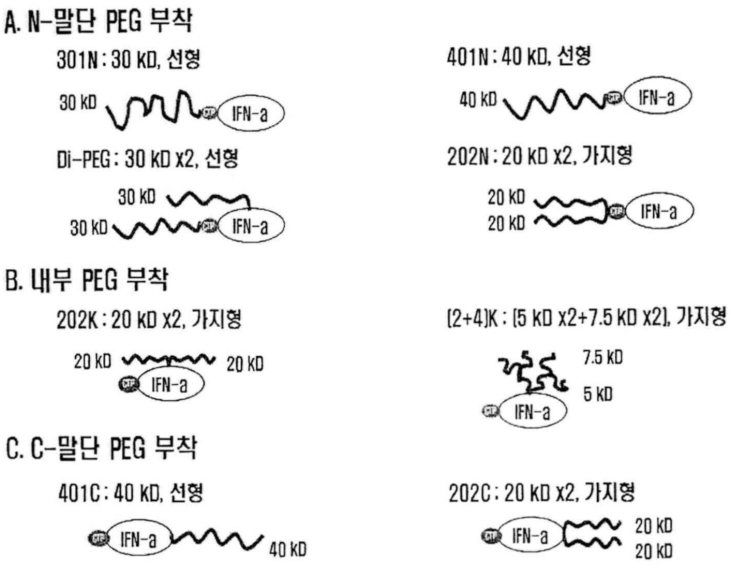
도면1


IFN-a2b
CFN-7
CFN-8
CFN-11
CFN-12
CFN-13

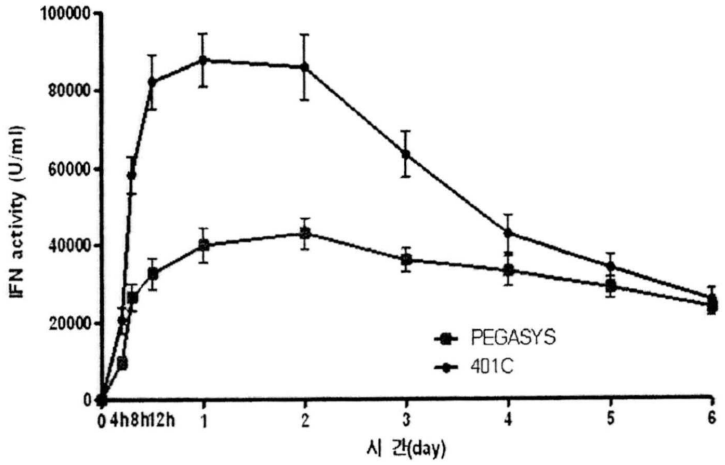
도면2


IFN
CFN11
CFN12
CFN13
Wavelength (nm)
IFN
CFN1
CFN7
CFN8
Wavelength (nm)

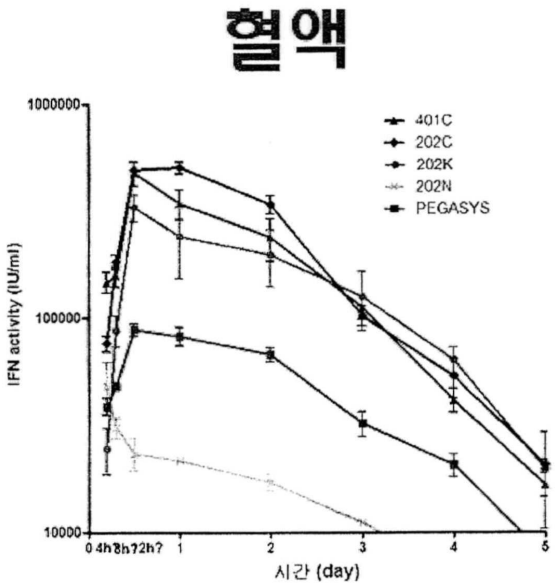
도면3


A. N-말단 PEG 부착
301N : 30 kD, 선형
30 kD
IFN-a
Di-PEG : 30 kD x2, 선형
30 kD
30 kD
IFN-a
401N : 40 kD, 선형
40 kD
IFN-a
202N : 20 kD x2, 가지형
20 kD
20 kD
IFN-a
B. 내부 PEG 부착
202K : 20 kD x2, 가지형
20 kD
20 kD
IFN-a
[2+4]K : [5 kD x2+7.5 kD x2], 가지형
7.5 kD
5 kD
IFN-a
C. C-말단 PEG 부착
401C : 40 kD, 선형
IFN-a
40 kD
202C : 20 kD x2, 가지형
IFN-a
20 kD
20 kD

도면4

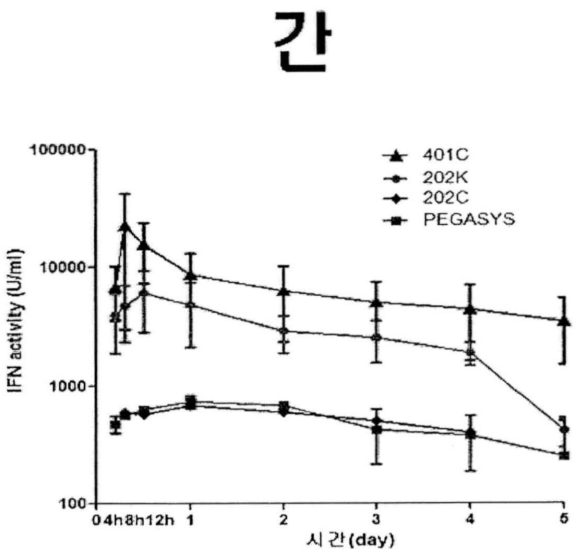

IFN activity (U/ml)
100000
80000
60000
40000
20000
0
0 4h 8h 12h
1
2
3
4
5
6
시 간(day)
PEGASYS
401C

도면5a



	401C	202C	202K	202N	PEGASYS
AUC (IU · d/ml)	850,333	1,084,000	704,042	62.769	225,267
배수	3.7	4.8	3.1	0.3	1.0

도면5b



	401C	202C	202K	202N	PEGASYS
AUC (IU · d/ml)	33,986	2,078	14,150	0	2,463
배수	13.6	0.8	5.7	0	1.0

서 열 목 록

<110> JW CREAGENE

<120> IFN-alpha Fusion Protein Comprising Interferon-alpha Linked to Cytoplasmic Transduction Peptide and Polyethylene glycol

<160> 36

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 1

Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 2

Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 3

Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 4

Tyr Lys Arg Lys Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 5

Tyr Ala Arg Lys Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 6

Tyr Lys Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 7

Tyr Glu Arg Glu Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 8

Tyr Ala Arg Glu Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 9

Tyr Gly Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 10

Tyr Arg Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 11

Tyr Pro Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 12

Pro Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 13

Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cytoplasmic Transduction Peptide

<400> 14

Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-alpha Fusion Protein

<400> 15

Met Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Cys Asp

1 5 10 15

Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu

20 25 30

Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His

35 40 45

Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala

50 55 60

Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

165 170 175
Ser Lys Glu Cys
180

<210> 16
<211> 183
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IFN-alpha Fusion Protein
<400> 16
Met Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
20 25 30
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

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

100 105 110

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

180

<210> 17

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-alpha Fusion Protein

<400> 17

Met Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Cys Asp
1 5 10 15
Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu
20 25 30
Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His
35 40 45

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

Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp

115 120 125

Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu

130 135 140

Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu

145 150 155 160

Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg

165 170 175

Ser Lys Glu Cys Cys

180

<210> 18

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-alpha Fusion Protein

<400> 18

Met Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

20 25 30

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

35 40 45

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

50 55 60

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe

65 70 75 80

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu

85 90 95

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu

100 105 110

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys

115 120 125

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
130 135 140
Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
145 150 155 160
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
165 170 175
Leu Arg Ser Lys Glu Cys
180

<210> 19

<211> 184

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

IFN-alpha Fusion Protein

<400> 19

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

Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln
65 70 75 80
Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu
85 90 95
Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
100 105 110
Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu
115 120 125

Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile

130 135 140

Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val

145 150 155 160

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln

165 170 175

Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu Cys

180

<210> 20

<211> 185

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-alpha Fusion Protein

<400> 20

Met Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr

20 25 30

Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu

35 40 45

Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln

50 55 60

Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln

65 70 75 80

Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu

85 90 95

Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp

100 105 110

Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu

115 120 125

Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile

130 135 140

Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val

145 150 155 160

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln

165 170 175

Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu Gly Cys

180 185

<210> 21

<211> 165

<212> PRT

<213> Interferon-alpha

<400> 21

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe

50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu

65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu

85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys

100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu

115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg

130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser

145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu

165

<210> 22

<211> 546

<212> DNA

<213> IFN-alpha Fusion Protein Encoding Nucleotide Sequence

<400> 22

atgtatggtc gtcgtgcacg tcgtcgtcgt cgtcgtggtg gtggtggttg cgatctgccg 60

cagacccata gcctgggcag ccgtcgtacc ctgatgctgc tggcgcagat gcgtcgtatc 120

agcctgttta gctgcctgaa agatcgtcat gattttggct ttccgcagga agaatttggc 180

aaccagtttc agaaagcgga aaccatcccg gtgctgcatg aaatgatcca gcagatcttt 240

aacctgttta gcaccaaaga tagcagcgcg gcgtgggatg aaaccctgct ggataaattt 300

tataccgaac tgtatcagca gctgaacgat ctggaagcgt gcgtgatcca gggcgtgggc 360

gtgaccgaaa ccccgctgat gaaagaagat agcatcctgg cggtgcgtaa atattttcag 420

cgtatcaccc tgtatctgaa ggaaaaaaaa tatagcccgt gcgcgtggga agtggtgcgt 480

gcggaaatca tgcgtagctt tagcctgagc accaacctgc aagaaagcct gcgtagcaaa 540

gaatgc 546

<210> 23

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 23

taatctagaa aaaaccaagg aggtaataac atatgtatgg tcgtcgtgca cgt 53

<210> 24

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 24

caaggatccc tcgagctatt attctttgct acgcaggct 39

<210> 25

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 25

tatggtcgtc gtgcacgtcg tcgtcgtcgt cgtggtggtg gtggtggtgg ttgcgatctg 60

ccgcagacc 69

<210> 26

<211> 63

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 26

tatggtcgtc gtgcacgtcg tcgtcgtcgt cgtggtggtg gtggttgcga tctgccgcag 60

acc 63

<210> 27

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 27

tatggtcgtc gtgcacgtcg tcgtcgtcgt cgtaaacagc tgcgtgtggt gaacggttgc 60

gatctgccgc agacc 75

<210> 28

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 28

tatggtcgtc gtgcacgtcg tcgtcgtcgt cgtggtggtg gtggtaaaca gctgcgtgtg 60

gtgaacggtg gtggtggttg cgatctgccg cagacc 96

<210> 29

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 29

tatggtcgtc gtgcacgtcg tcgtcgtcgt cgtgcaaaaa ccaaacagct gcgtgtggtg 60

aacggtggtg gtggttgcga tctgccgcag acc 93

<210> 30

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 30

ctagtctaga aaaaaccaag gaggtaataa catatgtatg 40

<210> 31

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 31

cgcggatccc tattagcaac caccaccacc ttctttgcta cgcaggcttt cttgc 55

<210> 32

<211> 183

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-alpha fusion protein

<400> 32

Met Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr

20 25 30

Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu

35 40 45

Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln

50 55 60

Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln

65 70 75 80

Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu

85 90 95

Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp

100 105 110

Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu

115 120 125

Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile

130 135 140

Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val

145 150 155 160

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln

165 170 175

Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

180

<210> 33

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-alpha fusion protein

<400> 33

Met Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

20 25 30

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

35 40 45

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

50 55 60

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe

65 70 75 80

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
85 90 95
Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
100 105 110
Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
115 120 125
Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
130 135 140
Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg

145 150 155 160
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
165 170 175
Leu Arg Ser Lys Glu
180

<210> 34
<211> 185
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IFN-alpha fusion protein
<400> 34
Met Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gln Leu Arg
1 5 10 15
Val Val Asn Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg

20 25 30
Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser
35 40 45
Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly
50 55 60
Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile
65 70 75 80
Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp

85 90 95

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

165 170 175
Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
180 185

<210> 35
<211> 192
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IFN-alpha fusion protein
<400> 35
Met Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Gly Gly Gly Cys Asp Leu Pro Gln
20 25 30

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

Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr

100 105 110

Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln

115 120 125

Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu

130 135 140

Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys

145 150 155 160

Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg

165 170 175

Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

180 185 190

<210> 36

<211> 191

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-alpha fusion protein

<400> 36

Met Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ala Lys Thr Lys

1 5 10 15

Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Gly Gly Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr

20 25 30

His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg

35 40 45

Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe

50 55 60

Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro

65 70 75 80

Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys

85 90 95

Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr

100 105 110

Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly
115 120 125

Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala
130 135 140

Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys
145 150 155 160

Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser
165 170 175

Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

180 185 190