



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월31일
(11) 등록번호 10-1701080
(24) 등록일자 2017년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 19/00 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7020384(분할)
(22) 출원일자(국제) 2008년06월20일
심사청구일자 2015년08월25일
(85) 번역문제출일자 2015년07월27일
(65) 공개번호 10-2015-0092355
(43) 공개일자 2015년08월12일
(62) 원출원 특허 10-2009-7025293
원출원일자(국제) 2008년06월20일
심사청구일자 2013년01월21일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/005020
(87) 국제공개번호 WO 2008/155134
국제공개일자 2008년12월24일
(30) 우선권주장
07012219.7 2007년06월21일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/071,705 2008년05월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Proc Natl Acad Sci U S A. 97(10):5657-5662.
(2000. 5. 9)*
Proc Natl Acad Sci U S A. 101(34):12491-1296.
(2004. 8. 24)*
Int J Biochem Cell Biol. 37(7):1386-1395.
(2005. 7)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
엑스엘-프로테인 게엠베하
독일 85354 프라이징 리제 마이트너 스트라쎄 30
(72) 발명자
스케라 아르네
독일 85354 프레이징 막스-레흐너-스트라쎄 19
테오발드 이나
독일 85354 프레이징 오베러 그라벤 62
스클랍스키 마르틴
독일 85354 프레이징 스크네그스트라쎄 3
(74) 대리인
특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 유성진

(54) 발명의 명칭 **증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 갖는 생물학적 활성 단백질**

(57) 요약

본 발명은 적어도 2개의 도메인을 포함하는 생물학적 활성 단백질에 관한 것으로서, 상기 적어도 2개의 도메인 중 제1 도메인은 상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 적어도 2개의 도메인 중 제2 도메인은 바람직하게는 랜덤 코일 구조를 형성하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하며, 상기 랜덤 코일 구조는 상기 생물학적 활성 단백질의 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 매개한다. 아울러, 본 발명의 생물학적 활성 단백질을 코딩하는 핵산 분자 및 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터 및 세포가 개시된다. 또한, 본 발명은 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물뿐만 아니라 본 발명의 생물학적 활성 단백질, 핵산 분자, 벡터 및 세포의 특정한 용도를 제공한다.

대표도 - 도1a

```
gccTCTCCAGCTGCACCTGCTCCAGCAAGCCCTGCTGCACCACTCCGCTCTGCTCTGCT
|||||
AGAGGTCGACGTGGACGAGTCTGTCGGGACGACGTGTCGAGGCAGACGAGGACGcg
AlaSerProAlaAlaProAlaProAlaSerProAlaAlaProAlaProSerAlaProAlaAla
```

(52) CPC특허분류

A61K 47/48238 (2013.01)

C07K 14/435 (2013.01)

C07K 2319/31 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 2개의 도메인을 포함하는 생물학적 활성 단백질로서,

(a) 상기 적어도 2개의 도메인 중 제1 도메인은 상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열을 포함하고; 및

(b) 상기 적어도 2개의 도메인 중 제2 도메인은 랜덤 코일 구조를 형성하는 적어도 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하고, 랜덤 코일 구조를 형성하는 상기 제2 도메인은 알라닌, 세린 및 프롤린 잔기로 이루어지며,

상기 랜덤 코일 구조는 상기 생물학적 활성 단백질의 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 매개하는 생물학적 활성 단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

랜덤 코일 구조를 형성하는 상기 제2 도메인은 복수의 아미노산 반복체를 포함하고, 상기 반복체는 알라닌, 세린 및 프롤린 잔기로 이루어지며, 최대 6개의 연속하는 아미노산 잔기가 동일한 생물학적 활성 단백질.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 프롤린 잔기는 랜덤 코일 구조를 형성하는 상기 제2 도메인의 4% 이상 40% 이하의 아미노산을 구성하는 생물학적 활성 단백질.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

제2 도메인은 ASPAAPAPASPAAPAPSAPA(서열번호 18), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS(서열번호 20), APSSPSPASPSSPASPSS(서열번호 22), SAPSSPSPASPSSPASPSS(서열번호 63), SSPSAPSPSSPASPSSSPA(서열번호 24), AASPAAPSAPAAASPAAPSAPPA(서열번호 26) 및 ASAAAPAAASAAASAPAAAA(서열번호 28) 또는 이들 서열의 전체 또는 일부로서 이들 서열의 환형으로 변경된 버전 또는 멀티머(들)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 생물학적 활성 도메인.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 적어도 2개의 도메인 중 상기 제2 도메인은 랜덤 코일 구조를 형성하는 100개 내지 3,000개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 생물학적 활성 단백질.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 제1 도메인은 결합 분자, 항체 절편, 사이토카인, 성장 인자, 호르몬 또는 효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성 단백질.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 결합 분자는 항체, Fab 절편, F(ab')₂ 절편, CDR-유래의 펩티도유사물, 단일쇄 가변 절편(scFv), 력틴 및 리포칼린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성 단백질.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 제1 도메인은 과립구 콜로니 자극 인자, 인간 성장 호르몬, 알파-인터페론, 베타-인터페론, 감마-인터페론, 종양 괴사 인자, 에리트로포이에틴, 응고 인자 VIII, gp120/gp160, 용해성 종양 괴사 인자 I 및 II 수용체, 레테플라제, 엑센딘-4, 아나킨라, 인터루킨-2 및 호중성구 젤라티나제-연관 리포칼린(Neutrophil gelatinase-associated lipocalin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성 단백질.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 생물학적 활성 단백질의 상기 증가된 생체내 안정성은, 제2 도메인을 형성하는 상기 랜덤 코일이 없는 상기 생물학적 활성 단백질과 비교할 때, 제2 도메인을 형성하는 상기 랜덤 코일을 포함하는 상기 생물학적 활성 단백질의 연장된 혈장 반감기인 생물학적 활성 단백질.

청구항 10

청구항 1에 따른 생물학적 활성 단백질을 포함하는 자가면역 질병, 암, 빈혈, 신생혈관성 질병, 감염성/염증성 질병, 혈전증, 심근경색증, 당뇨병 또는 재관류 손상을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 1의 생물학적 활성 단백질을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 12

청구항 11의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 13

청구항 11에 따른 핵산을 포함하는 세포.

청구항 14

청구항 13에 따른 세포를 배양하는 단계 및 그 배양물로부터 상기 생물학적 활성 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 청구항 1에 따른 생물학적 활성 단백질의 제조 방법.

청구항 15

자가면역 질병, 암, 빈혈, 신생혈관성 질병, 감염성/염증성 질병, 혈전증, 심근경색증, 당뇨병 또는 재관류 손상을 치료하기 위한 상기 생물학적 활성 단백질의 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 갖는 약물을 제조하기 위한 방법으로서, 상기 약물은 청구항 1에 따른 생물학적 활성 단백질, 청구항 11에 따른 핵산, 청구항 12에 따른 벡터 또는 청구항 13에 따른 세포를 포함하는 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 적어도 2개의 도메인을 포함하는 생물학적 활성 단백질에 관한 것으로서, 상기 적어도 2개의 도메인 중 제1 도메인은 상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 적어도 2개의 도메인 중 제2 도메인은 바람직하게는 랜덤 코일 구조(random coil conformation)를 형성하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하며, 상기 랜덤 코일 구조는 상기 생물학적 활성 단백질의 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 매개한다. 아울러, 본 발명의 생물학적 활성 단백질을 코딩하는 핵산 분자 및 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터 및 세포가 개시된다. 또한, 본 발명은 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물뿐만 아니라 본 발명의 생물학적 활성 단백질, 핵산 분자, 벡터 및 세포의 특정한 용도를 제공한다.

배경 기술

- [0003] 인간 혈청 알부민(HSA) 및 인간화된 항체를 포함하는 면역글로불린(Ig)과 같은 보통의 혈장 단백질은 전형적으로 2 내지 3주의 긴 반감기를 나타내는데, 이는 이들과 신생아(neonatal) Fc 수용체(FcRN)의 특정한 상호작용에 기인하며, 엔도솜성 재생을 이끈다(Ghetie (2002) Immunol Res, 25:97-113). 반면, 약학적으로 관심있는 대부분의 다른 단백질들, 특히 제조항 항체 절편, 호르몬, 인터페론 등은 신속한 (혈액) 제거(clearance)를 나타낸다. 이는 약 70 kDa의 신장 여과 역치값 이하 크기인 단백질의 경우에 특히 그러하다(Caliceti (2003) Adv Drug Deliv Rev 55:1261-1277). 이들 경우에 있어서, 변형되지 않은 약학적 단백질의 혈장 반감기는 1시간보다 훨씬 짧을 수 있으며, 따라서 대부분의 치료 적용시 본질적으로 쓸모가 없게 된다. 지속적인 약동학적 활성과 개선된 환자의 순응(compliance)(수일 또는 심지어 수주까지 연장된 필요한 투약 간격)을 얻기 위하여, 생약학적 약물을 개발하기 위한 목적으로 몇 가지 전략이 이미 확립되었다.
- [0004] 첫 번째로, 예를 들면 TNF α 수용체의 세포외 도메인과 인간 IgG1 사이의 교잡물(hybrid)인 Enbrel[®]과 같은 Ig의 Fc 부분(portion)과의 융합 단백질(Goldenberg (1999) Clin Ther 21:75-87), 또는 예를 들면 HSA와 IFN α 의 대응하는 융합물인 Albuferon[®]과 같은 혈청 알부민과의 융합 단백질(Osborn (2002) J Pharmacol Exp Ther 303:540-548)을 제조함으로써 천연 혈장 단백질의 재생 메커니즘을 도입하였다. 600 μ M의 높은 혈장 농도를 갖는 알부민은 또한 간접 방식으로 사용되어 왔으며, 예를 들면 스트렙토코커스 단백질 G 유래의 박테리아 알부민-결합 도메인(ABD)과의 융합(Makrides (1996) J Pharmacol Exp Ther 277:534-542), 또는 파지 디스플레이 라이브러리 유래로서 HAS에 대해 선택되는 펩티드와의 융합(Dennis (2002) J Biol Chem, 277:35035-35043; Nguyen (2006) Protein Eng Des Sel 19:291-297)을 통해 알부민-결합 기능을 갖는 생약학제제(biopharmaceutical) 용의 담체 비히클(carrier vehicle)로 작용한다.
- [0005] 두 번째로, 생약학제제의 혈장 반감기를 연장하기 위한 근본적으로 상이한 방법론은 매우 용매화되고(solvated) 생리학적으로 불활성인 화학 폴리머와 콘주게이션(conjugation)시킴으로써, 대략 3-5 nm의 사구체 구멍 크기 이상으로 치료 단백질의 수력학적 반경(hydrodynamic radius)을 효과적으로 증대시키는 것이다(Caliceti (2003) loc. cit.). 라이신 측쇄를 통해 무작위로(Clerk (1996) J Biol Chem 271:21969-21977) 또는 특정하게 도입된 시스테인 잔기를 이용함으로써(Rosendahl (2005) BioProcess International: 52-60) 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 활성화된 유도체와 생화학적으로 온화한 조건 하에 공유 커플링시키는 것은 적당히 성공적이었으며, 현재 몇 가지 승인된 약물에 도입되고 있다. 이러한 이점은 특히, 예를 들면 화학적으로 PEG화된 제조항 IFN- α -2a인 Pegasys[®]와 같이, 특정한 약동학적 활성을 갖는 작은 단백질과 관련하여 달성되어 왔다(Harris (2003) Nat Rev Drug Discov, 2:214-221; Walsh (2003) Nat Biotechnol 21: 865-870).
- [0006] 그러나, 생물학적 활성 단백질과 합성 폴리머의 화학적 커플링은 생약학제제의 개발과 제조에 있어서 결점을 가질 수 있다. 적합한 PEG 유도체는 특히 고순도가 요구될 때에는 고가이고, 이들과 제조항 단백질의 콘주게이션은 추가적인 시험관내 가공 및 정제 단계를 필요로 하는데, 이는 수율을 떨어뜨리고 제조 비용을 상승시킨다. 사실, PEG는 종종 알데히드 및 퍼옥사이드로 오염되며(Ray (1985) Anal Biochem 146:307-312), 산소의 존재 하에 보관할 때에는 본질적으로 화학적으로 분해되는 경향이 있다. 또한, 그 생물학적 활성 부위 근처의 아미노

산 측쇄가 PEG화 공정에 의해 변형된다면, 치료 단백질의 약학적 기능이 방해될 수 있다. 아울러, 합성 폴리머와의 화학적 커플링은 보통 분자들의 이형(heterogeneous) 혼합물로 되어서, 생체내 활성에 상당한 변화를 보일 수 있다.

[0007] 세 번째로, 혈청 반감기를 연장하기 위하여 새로운 N-연결된 글리코실화 보존 서열이 도입된 생물학적 활성 단백질의 글리코실화 동족체(analog)를 사용하는 것이 제안되어 있다(W002/02597; Perlman (2003) J Clin Endocrinol Metab 88:2327-2335; 또는 Elliott (2003) Nat Biotechnol 21:414-420 참조). 그러나, 개시된 당 가공된(glycoengineered) 단백질은 변형된 생체내 활성을 나타내었으며, 이는 새로운 탄수화물 측쇄가 가공된 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 또한, 추가된 탄수화물 측쇄는 결과물인 생물학적 활성 분자의 항원성을 증가시키는 경향이 있으며, 이는 실질적으로 안전성 문제를 야기한다.

[0008] 아울러, 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*) 유래의 인공 반복 서열인 PSTAD를 포함하는 융합 단백질이 트랜스-시알리다제의 연장된 혈장 반감기를 유도한다는 것이 보고되어 있다(Alvarez (2004) PNAS 279:3375-3381). 그러나, 이러한 트리파노소마 크루지 유래의 반복체(repeat)는 체액성(humoral) 면역 반응을 유도하는 것으로 보고되어 있다(Alvarez (2004) loc. cit.). 따라서, 생물학적 활성 단백질의 작용을 연장시키기 위한 다른 수단이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 기초를 이루는 기술적 과제는 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 갖는 생물학적 활성 단백질을 제공하는 것이다. 상기 기술적 과제의 해결은 청구의 범위에서 특정되는 구현예를 제공함으로써 달성된다.

[0011] 따라서, 본 발명은 적어도 2개의 도메인을 포함하는 생물학적 활성 단백질에 관한 것으로서,

[0012] (a) 상기 적어도 2개의 도메인 중 제1 도메인은 상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열을 포함하고; 및

[0013] (b) 상기 적어도 2개의 도메인 중 제2 도메인은 바람직하게는 랜덤 코일 구조를 형성하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함한다.

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 제2 도메인 형성/채용 랜덤 코일 구조는 상기 생물학적 활성 단백질의 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 매개할 수 있다. 따라서, 하기에서 정의된 바와 같이, 상기 제2 도메인은 주어진 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 주어진 단백질(또는 그의 절편)의 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 유도한다.

과제의 해결 수단

[0016] 이하 및 첨부된 실시예에 개시된 바와 같이, 놀랍게도 랜덤 코일 도메인/파트를 포함하도록 변형된 생물학적 활성 단백질을 정맥내 투여하면, 변형되지 않은 생물학적 활성 단백질, 즉 상기 랜덤 코일 도메인이 없는 단백질과 비교할 때 예상치 못한 연장된 혈장 반감기를 나타낸다는 것이 발견되었다.

[0017] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "랜덤 코일"이란 용어는 아미노산 폴리머를 포함하는 폴리머 분자의 임의의 구조를 나타내며, 상기 폴리머 구조를 형성하는 개별 모노머 요소는 본질적으로 인접한 모노머 요소를 향해 랜덤하게 배향하고 있지만, 여전히 상기 인접한 모노머 요소에 화학적으로 결합되어 있다. 특히, "랜덤 코일 구조"를 채용하는/갖는/형성하는 폴리펩티드 또는 아미노산 폴리머는 정의된 2차 및 3차 구조를 실질적으로 갖고 있지 않다. 폴리펩티드 랜덤 코일의 성질 및 그 실험적인 확인 방법은 본 기술분야의 당업자에게 알려져 있으며, 과학 문헌에 개시되어 있다(Cantor (1980) Biophysical Chemistry, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, New York; Creighton (1993) Proteins - Structures and Molecular Properties, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, New York; Smith (1996) Fold Des 1:R95-R106).

[0018] 본 발명의 생물학적 활성 단백질은 생리학적 조건에서 랜덤 코일 구조를 채용/형성하는 도메인(전술한 것을 본 발명의 생물학적 활성 단백질의 상기 "제2 도메인"으로 정의함)을 포함한다. "생리학적 조건"이란 용어는 본 기술분야에 알려져 있으며, 단백질이 보통 그 천연 구조를 채용하는 그러한 조건을 나타낸다. 보다 구체적으로, "생리학적 조건"이란 용어는 전형적으로 고등한 형태의 생물, 구체적으로는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에게 유효한 생물리학적 파라미터를 나타낸다. "생리학적 조건"이란 용어는 포유동물, 특히 인간의

체내(특히 체액)에서 보통 발견되는 생화학적 및 생물리학적 파라미터에 관한 것일 수 있다. 상기 "생리학적 조건"은 건강한 신체에서 발견되는 해당 파라미터뿐만 아니라 아픈 포유동물 또는 인간 환자에서 발견되는 파라미터에 관한 것일 수 있다. 예를 들면, 아픈 포유동물 또는 인간 환자는 상기 포유동물 또는 상기 인간이 열병을 앓고 있을 때, 높지만 "생리학적인" 온도 조건을 가질 수 있다. 단백질이 그 천연 구조/상태를 채용하는 "생리학적 조건"과 관련하여, 가장 중요한 파라미터는 온도(인체의 경우 37℃), pH(인간 혈액의 경우 7.35-7.45), 삼투압(280-300 mmol/kg H₂O) 및 필요시 단백질 함량(66-85 g/l 혈청)이다. 그러나, 본 기술분야의 당업자는 생리학적 조건에서 이들 파라미터가 변할 수 있으며, 예컨대 상기 온도, pH, 삼투압 및 단백질 함량은 혈액, 뇌척수액, 복수액 및 림프와 같은 주어진 신체 또는 조직에서 상이할 수 있음을 알고 있다(Klinke (2005) Physiologie, 5th ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart). 상기 뇌척수액에서, 예컨대 삼투압은 290 mmol/kg H₂O일 수 있고, 단백질 농도는 0.15 g/l 내지 0.45 g/l 사이일 수 있다. 상기 림프에서, pH는 7.4 부근일 수 있고, 단백질 함량은 3 g/l 및 5 g/l 사이일 수 있다.

[0019] 후술하는 방법을 이용한 실험 조건 하에서 아미노산 폴리머/서열이 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는지를 결정할 때, 온도, pH, 삼투압 및 단백질 함량과 같은 생물리학적 파라미터는 생체내에서 보통 발견되는 생리학적 조건과 상이할 수 있다. 1℃ 및 42℃ 사이 또는 바람직하게는 4℃ 내지 25℃의 온도가 시험관내에서 생리학적 조건 하에 단백질의 생물리학적 특성 및 생물학적 활성을 테스트 및/또는 확인하기에 유용한 것으로 고려될 수 있다.

[0020] 특히 실험적인 세팅(예를 들면, 특히 원편광이색성(circular dichroism, CD) 측정 및 본 기술분야의 당업자가 단백질/아미노산 스트레치(stretch)의 구조적인 특성을 결정하도록 하는 다른 방법으로, 단백질 구조를 결정하는)에서의, 또는 약학적 조성물용 버퍼, 용매 및/또는 부형제에서의 몇 가지 버퍼가 시험관내 "생리학적 용액"/"생리학적 조건"을 나타내는 것으로 고려된다. 이러한 버퍼의 예로는, 예컨대 포스페이트-버퍼 식염수(PBS: 115 mM NaCl, 4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄ pH 7.4), 트리스 버퍼, 아세테이트 버퍼, 시트레이트 버퍼 또는 첨부된 실시예에서 사용된 것과 같은 유사한 버퍼가 있다. 일반적으로, "생리학적 용액 조건"을 나타내는 버퍼의 pH는 6.5 내지 8.5의 범위, 바람직하게는 7.0 내지 8.0의 범위, 가장 바람직하게는 7.2 내지 7.7의 범위에 있어야 하고, 삼투압은 10 내지 1,000 mmol/kg H₂O 범위, 보다 바람직하게는 50 내지 500 mmol/kg H₂O 범위, 가장 바람직하게는 200 내지 350 mmol/kg H₂O의 범위에 있어야 한다. 선택적으로, 생리학적 용액 조건을 나타내는 버퍼의 단백질 함량은 생물학적 활성 자체를 갖는 단백질을 제외하고 0 내지 100 g/l의 범위에 있을 수 있으며, 예를 들면 인간 또는 소 혈청 알부민과 같은 전형적인 안정화 단백질이 사용될 수 있다.

[0021] 따라서, 본 발명의 문맥(context)에서 상기에서 정의된 본 발명의 생물학적 활성 단백질의 "제2 도메인"에 포함되는 것과 같은 랜덤 코일 구조는 액체 약학제제와 같은 약학적 조성물 내에 유지된다는 것이 또한 관찰된다. 바람직하게는, "생리학적 조건"은 해당 버퍼 시스템, 용매 및/또는 부형제에서 사용되는 것이다. 그러나, 예를 들면 동결건조 또는 건조된 조성물(예컨대, 약학적 조성물)에서, 본 발명의 생물학적 활성 단백질의 "제2 도메인" 내에 포함되는 것과 같은 랜덤 코일 구조는 일시적으로 존재하지 않거나 및/또는 검출되지 않을 수 있음이 관찰된다. 그러나, 본 발명의 단백질 구조체(construct)에 따르면, 상기 "제2 도메인"은 해당 버퍼/용액/부형제/용매 내에서 재구성된 후 다시 그 랜덤 코일을 채용/형성할 것이다. 이는 예를 들면 본 발명의 단백질 구조체가 동결건조 또는 건조된 경우(예컨대, 약학적 조성물의 형태)이다. 본 발명에서 정의된 것과 같은 상기 "제1" 및 "제2" 도메인을 포함하는 이러한 동결건조/건조된 본 발명의 단백질 구조체를 재구성한 후 상기 랜덤 코일 부분/도메인은 다시 존재하고, 해당 본 발명의 구조체는 예컨대 의학적 개입을 필요로 하는 포유동물 또는 인간 환자에게 투여될 수 있다.

[0022] 전술한 바와 같이, 본 발명의 상기 생물학적 활성 단백질은 생리학적 조건에서/조건 하에 랜덤 코일 구조를 채용/형성하는 도메인(본 발명의 생물학적 활성 단백질의 상기 "제2 도메인"으로 위에서 정의된)을 포함한다.

[0023] 본 발명의 생물학적 활성 단백질과 대조적으로, 변성된 단백질은 그 기능적 구조를 잃어버린 단백질이며, 상기 변성의 결과로 랜덤 코일 구조를 부분적으로 채용할 수 있다. 단백질은 비생리학적 온도, pH 및/또는 염 농도에 노출되거나, 우레아(urea)/구아니디늄 클로라이드 및 세제와 같은 변성 제제에 노출되는 것을 포함하는 다양한 수단을 통해 변성될 수 있다. 따라서, 우레아, 구아니디늄 클로라이드 또는 나트륨 도데실 설페이트와 같이 단백질에 변성 효과를 갖는다고 알려진 화합물이 존재하는 것은 생리학적 조건 하에서 단백질을 연구할 때는 피해야 한다. 우레아는 인간 혈액 또는 소변에서 생리학적 조건 하에 적용하기 위한 단백질을 조사할 때에는 각각 10 mmol/l 또는 심지어 300 mmol/l의 농도까지 허용될 수 있다.

[0024] 변성된 폴리펩티드와 대조적으로, 본 발명의 단백질 구조체 내에 포함되는 것과 같은 랜덤 코일 도메인(상기 "

제2 도메인")의 아미노산 서열은 특히 생체내에서 및 의학적 개입을 필요로 하는 포유동물 또는 인간 환자에 투여될 때 천연적으로 랜덤 코일 구조를 채용/갖는다. 따라서, 본 발명의 상기 단백질 구조체(상기에서 정의된 "제1" 및 "제2 도메인"을 포함함)는 또한 본 발명에서 확인된 알라닌, 세린 및 프롤린 스트레치(또는 생리학적인 조건 하에 랜덤 코일을 형성하는/갖는/채용하는 다른 아미노산 스트레치) 형태의 "제2" 랜덤 코일 형성/채용 도메인을 포함할 수 있지만, (예를 들면, 동결건조 또는 건조된 조성물과 같은 특정한 조성물의 형태에서) 일시적으로 또는 임시로 랜덤 코일 형태가 아닐 수 있는 것으로 예측된다. 그러나, 이러한 본 발명의 단백질 구조체의 "제2 도메인"은 예컨대 해당 버퍼(바람직하게는 "생리학적" 버퍼/부형제 및/또는 용매)에서 재구성된 후 본 발명에서 정의된 랜덤 코일을 다시 채용하는 것이 중요하다. 상기 "제2 도메인"은 (해당 재구성 후) 본 발명의 생물학적 활성 단백질의 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 매개할 수 있다. 본 발명의 생물학적 활성 단백질은 본 발명에서 정의된 것과 같은 추가 "제2 도메인"을 포함하지 않는 동일한 "관심 단백질"/"제1 도메인"과 비교할 때 보다 긴 생체내 및/또는 시험관내 반감기 및 안정성을 갖는다.

[0025] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "도메인"이란 용어는 특정한 구조 및/또는 기능을 자발적으로 채용할 수 있는 아미노산 서열의 임의의 영역/부분을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 문맥에서, "도메인"은 기능 도메인 또는 구조 도메인을 나타낼 수 있다. 본 발명에 개시된 바와 같이, 본 발명의 단백질은 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 적어도 하나의 도메인/부분 및 랜덤 코일 구조를 형성하는 적어도 하나의 도메인/부분을 포함한다. 그러나, 본 발명의 단백질은 또한 2개 이상의 도메인으로 이루어질 수 있으며, 예컨대 본 발명에서 정의된 2개 도메인/부분 또는 다른 도메인/부분 사이에 예컨대 프로테아제 민감성 절단 부위, His₆-태그와 같은 친화성 태그, 신호 펩티드, 유지(retention) 펩티드, 막 전좌(translocation) 펩티드와 같은 표적화 펩티드 또는 항-중양 독소와 연관된 중양 표적화용 항체 절편과 같은 추가 효과기(effector) 도메인 또는 전구약물-활성화용 효소와 같은 추가 링커 구조를 포함할 수 있다.

[0026] 아미노산 폴리머가 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는지 여부를 측정하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있다 (Cantor (1980) loc. cit.; Creighton (1993) loc. cit.; Smith (1996) loc. cit.). 이러한 방법은 하기 예시된 바와 같은 원편광이색성(CD) 분광법을 포함한다. CD 분광법은 광 흡수 분광법을 나타내며, 물질에 의해 오른쪽- 및 왼쪽-원편광된 빛의 흡광도 차이를 측정한다. 단백질의 2차 구조는 대략 190 및 250 nm 사이의 파장을 갖는 원외선 스펙트럼을 이용한 CD 분광법에 의해 측정될 수 있다. 이들 파장에서 α-헬릭스, 평행 및 안티-평행(anti-parallel) β-시트 및 랜덤 코일 구조 각각이 독특한 형태 및 크기의 CD 스펙트럼을 나타내기 때문에, 폴리펩티드에서 보통 발견되는 상이한 2차 구조가 분석될 수 있다. 따라서, CD 분광법을 이용함으로써, 숙련된 당업자는 생리학적 조건에서 아미노산 폴리머가 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는지를 즉시 결정할 수 있다. 다른 확립된 생물리학적 방법은 핵자기공명(NMR) 분광법, 흡수 분광법, 적외선 및 라만 분광법, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 통한 수력학적(hydrodynamic) 부피 측정, 분석적 초원심분리 또는 동적/정적 광산란법뿐만 아니라 마찰 계수 또는 내재성 점도(intrinsic viscosity)의 측정을 포함한다(Cantor (1980) loc. cit.; Creighton (1993) loc. cit.; Smith (1996) loc. cit.).

[0027] 다른 구현예에서, 본 발명의 생물학적 활성 단백질은 분석적 겔 여과(크기 배제 크로마토그래피(SEC)로도 알려진)에 의해 측정할 때 적어도 70 kDa, 바람직하게는 적어도 80 kDa, 보다 바람직하게는 적어도 90 kDa, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 100 kDa, 특히 바람직하게는 적어도 125 kDa 및 가장 바람직하게는 적어도 150 kDa의 수력학적 부피를 갖는다. 본 기술분야의 당업자는 특정한 단백질의 수력학적 부피를 쉽게 측정할 수 있다. 이러한 방법은 하기에서 예시한 것과 같은 동적/정적 광산란법, 분석적 초원심분리 또는 분석적 겔 여과를 포함할 수 있다. 분석적 겔 여과는 매크로분자의 수력학적 부피를 측정하기 위해 본 기술분야에 알려진 방법을 나타낸다. 다른 한편으로, 구형(globular) 폴리펩티드의 수력학적 부피는 그 분자량에 의해 추정될 수 있다. 그러나, 하기 개시된 바와 같이, 상기에서 정의된 제2 도메인, 즉 적어도 100개의 아미노산 잔기를 포함하고 랜덤 코일 구조를 갖는 도메인을 포함하는 본 발명의 단백질의 수력학적 부피는, 그 분자량에 기초하여 해당 접혀진(folded), 구형 단백질에 대해 예측된 수력학적 부피와 관련하여 예상치 못한 높은 수력학적 부피를 갖는 것으로 나타난다.

[0028] 상기에 더하여, 단백질에서의 2차 구조를 예측하기 위한 이론적인 방법이 개시되어 있다. 이러한 이론적인 방법의 한 예는 X-선 결정학(crystallography)으로 결정된 알려진 단백질 구조에 기초한 α-헬릭스, β-시트 및 턴(turn)에서 각각의 아미노산의 상대적인 빈도 분석에 기초하는 초우-파스만(Chou-Fasman) 방법이다(Chou and Fasman (1974) Biochemistry 13:222-245). 그러나, 단백질 2차 구조의 이론적인 예측은 신뢰할만하지 않은 것으로 알려져 있다. 하기에 예시된 바와 같이, 초우-파스만 방법에 따라 α-헬릭스 2차 구조를 채용하는 것으로 예측되는 아미노산 서열은 랜덤 코일을 형성하는 것으로 나타났다. 따라서, 상기 초우-파스만 알고리즘과 같은

이론적인 방법은 주어진 아미노산 폴리머가 랜덤 코일 구조를 채용하는지 여부에 대해 매우 제한된 예측값만을 갖는다.

[0030] 한 구현예에서, 랜덤 코일 구조를 채용하는/갖는/형성하는 아미노산 서열은 적어도 약 100개 아미노산 잔기, 바람직하게는 적어도 약 150개 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 적어도 약 200개 아미노산 잔기, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 250개 아미노산 잔기, 특히 바람직하게는 적어도 약 300개 아미노산 잔기, 보다 특히 바람직하게는 적어도 약 350개 아미노산 잔기 및 가장 바람직하게는 적어도 약 400개 아미노산 잔기로 이루어진다. 다른 구현예에서, 랜덤 코일 구조를 형성하는 아미노산 서열은 최대 약 1,000개 아미노산 잔기, 바람직하게는 최대 약 900개 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 최대 약 800개 아미노산 잔기, 훨씬 더 바람직하게는 최대 약 700개 아미노산 잔기, 특히 바람직하게는 최대 약 600개 아미노산 잔기로 이루어진다. 따라서, 랜덤 코일 구조를 형성하는 아미노산 서열은 최대 약 500개 아미노산 잔기 또는 최대 약 450개 아미노산 잔기로 이루어질 수 있다. 또한 본 발명에서 랜덤 코일 구조를 형성하는 아미노산 서열은 최대 약 1,200개, 약 1,500개 및 약 3,000개까지의 아미노산 잔기로 이루어질 수 있는 것으로 관찰된다. 따라서, 랜덤 코일 구조를 형성하는 아미노산 서열은 약 100개 내지 약 3,000개 아미노산 잔기로 이루어질 수 있다. 특정 구현예에서, 랜덤 코일 구조를 형성하는 상기 아미노산 서열은 본 발명에서 특정된 바와 같이, 즉 하기에서 정의된 바와 같이 알라닌, 세린 및 프롤린을 주된 또는 구별된(unique) 잔기로 포함하는 약 100개 내지 1,000개 아미노산 잔기로 이루어진다. 따라서, 본 발명의 요지는 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 형성하고, 주로 상기 3가지 아미노산 잔기로 이루어지며, 바람직하게는 프롤린 잔기가 랜덤 코일 형성 도메인의 약 4% 내지 약 40%를 나타내는 아미노산 폴리머를 제공하는 것이다. 상기 알라닌 및 세린 잔기는 상기 랜덤 코일 형성 도메인의 나머지 적어도 60% 내지 96%를 포함한다. 그러나, 아래에 상술되는 바와 같이, 상기 랜덤 코일 형성 도메인은 또한 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이한 아미노산을 소량의 성분으로 추가로 포함할 수도 있다.

[0031] "적어도 약 100/150/200/250/300/350 (등) 개의 아미노산 잔기"라는 용어는 상기 정확한 수의 아미노산 잔기에 한정되는 것은 아니며, 10% 내지 20%를 추가로 포함하거나 10% 내지 20% 적은 잔기를 포함하는 아미노산 스트레치를 포함할 수도 있다. 예를 들면, "적어도 약 100개 아미노산 잔기"는 본 발명의 요지를 벗어나는 일 없이 80 내지 100개 및 약 100 내지 120개 아미노산 잔기를 포함할 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명의 생물학적 활성 단백질(들)/폴리펩티드(들)의 "제2 도메인"은 최대 길이 약 1,000개 아미노산 잔기를 포함한다. 그러나, 더 긴 "제2 도메인"이 본 발명의 문맥에서 생리학적 조건 하에 원하는 랜덤 코일 구조를 제공하고 약 3,000개 아미노산 잔기를 포함하는 "제2 도메인"으로 관찰된다. 다시, 상기 문맥에서 "약"이란 용어는 정확한 양의 아미노산 잔기로 한정 또는 제한되는 것이 아니며, 본 발명을 벗어나는 일 없이 \pm 약 10% 또는 \pm 약 20%를 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 문맥에서, 놀랍게도 주로 알라닌 및 세린 잔기로 이루어진, 또는 바람직한 구현예에서 주로 또는 구별되게 알라닌, 세린 및 프롤린 잔기로 이루어진 아미노산 폴리머는 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 형성하는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명은 본 발명에서 정의된 생물학적 활성 단백질/폴리펩티드의 "제2 도메인"의 부분(들)로 사용될 수 있는 알라닌, 세린 및 프롤린으로 이루어진 모듈/서열 단위/폴리머 반복체/폴리머 카세트/빌딩 블록을 제공한다. 그러나, 숙련된 당업자는 아미노산 폴리머는 또한 상기 "제2 도메인" 내의 소량의 성분으로 알라닌, 세린 및 프롤린 이외의 다른 잔기들이 포함되어 있어도 랜덤 코일 구조를 형성할 수 있음을 알고 있다. 본 발명에서 사용된 바와 같은 "소량의 성분"이란 용어는 최대 10%, 즉 상기 랜덤 코일 형성 도메인을 코딩하는 100개 아미노산 중 최대 10개가 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이할 수 있고, 바람직하게는 최대 8%, 즉 100개 아미노산 중 최대 8개가 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이할 수 있고, 보다 바람직하게는 최대 6%, 즉 100개 아미노산 중 최대 6개가 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이할 수 있고, 훨씬 더 바람직하게는 최대 5%, 즉 100개 아미노산 중 최대 5개가 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이할 수 있고, 특히 바람직하게는 최대 4%, 즉 100개 아미노산 중 최대 4개가 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이할 수 있고, 보다 특히 바람직하게는 최대 3%, 즉 100개 아미노산 중 최대 3개가 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이할 수 있고, 훨씬 더 특히 바람직하게는 최대 2%, 즉 100개 아미노산 중 최대 2개가 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이할 수 있고, 가장 바람직하게는 최대 1%, 즉 100개 아미노산 중 최대 1개가 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이할 수 있음을 의미한다. 상기 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이한 아미노산은 Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr 및 Val로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

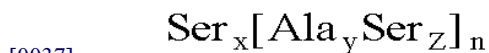
[0033] 본 발명에서 개시된 바와 같은 아미노산 폴리머 및 본 발명에 따라 알라닌, 세린 및 프롤린으로 이루어진 아미노산 폴리머는 놀랍게도 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 채용하는 것으로 나타났다. 따라서, 이들은 본 발명의 생물학적 활성 단백질(들)/폴리펩티드(들), 즉 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 형성하고, 이에 따

라 생물학적 활성("기능성") 단백질(들) 또는 폴리펩티드(들)에 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 매개하는 폴리펩티드 스트레치의 본 발명에서 정의된 "제2 도메인"을 제공하기에 유익한 분자이다. 상기 랜덤 코일 도메인과 융합된 기능성 단백질의 수력학적 부피는, 본 발명에서 개시되고 또한 첨부된 실시예에서 예시된 표준 방법을 이용함으로써 추정될 수 있는 바와 같이, 현저하게 증가된다. 랜덤 코일 도메인은 그 자체로는 안정한 구조 또는 기능을 채용하지 않는 것으로 생각되기 때문에, 랜덤 코일 도메인이 융합되는 관심있는 기능성 단백질에 의해 매개되는 생물학적 활성은 본질적으로 보존된다. 아울러, 본 발명에서 개시된 바와 같은 랜덤 코일 도메인을 형성하는 아미노산 폴리머는 특히 혈액의 혈장에서의 단백질분해(proteolysis), 면역원성, 등전점/정전기 행동, 세포 표면 수용체에 대한 결합뿐만 아니라 내면화(internalisation)와 관련하여 생물학적으로 불활성이지만, 여전히 생분해될 수 있는 것으로 생각되며, 이는 PEG와 같은 합성 폴리머에 비해 명확한 이점을 제공한다.

[0034] 다른 구현예에서, 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 채용하는 아미노산 폴리머는 복수의 "아미노산 반복체"/"아미노산 카세트"/"카세트 반복체"를 포함하며, 상기 "아미노산 반복체"/"아미노산 카세트"/"카세트 반복체"는 Ala, Ser 및 Pro 잔기(본 발명에서 "PAS" 또는 "APS"로 나타냄)로 이루어지고, 최대 6개의 연속하는 아미노산 잔기가 동일하며, 상기 프롤린 잔기는 상기 제2 도메인 형성 랜덤 코일의 4% 이상 및 40% 이하의 아미노산을 구성한다. 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 채용하는 아미노산 폴리머는 복수의 동일한 아미노산 반복체/카세트 반복체 또는 복수의 동일하지 않은 아미노산 반복체를 포함할 수 있다. Ala, Ser 및 Pro 잔기로 이루어진 "아미노산 반복체", "빌딩 블록", "모듈", "반복체", "아미노산 카세트" 등의 비제한적 예는 이하에 제공된다; 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 26 및 서열번호 28 또는 이들 서열의 절편 또는 멀티머(multimer) 참조. "절편"은 적어도 3개 아미노산을 포함하며, 적어도 하나의 알라닌, 하나의 세린 및/또는 하나의 프롤린을 포함한다.

[0035] 본 발명에 따른 아미노산 반복체는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 그 이상의 아미노산 잔기로 이루어질 수 있으며, 각각의 반복체는 Ala, Ser 및 Pro 잔기(들)을 포함한다. 한 구현예에서, 본 발명에 따른 아미노산 반복체는 100개 이상의 아미노산 잔기를 포함하지 않는다. 바람직하게는, 본 발명에서 정의된 바와 같은 아미노산 반복체/카세트 반복체는 약 4% 이상, 바람직하게는 약 5% 이상, 보다 더 바람직하게는 약 6% 이상, 특히 바람직하게는 약 8% 이상, 보다 특히 바람직하게는 약 10% 이상, 훨씬 더 특히 바람직하게는 약 15% 이상 및 가장 바람직하게는 약 20% 이상의 프롤린 잔기를 포함한다. 본 발명에서 정의된 바와 같은 이러한 아미노산 반복체/카세트 반복체는 바람직하게는 약 40% 이하 또는 약 35% 이하의 프롤린 잔기를 포함한다; 또한 하기 제공된 PAS 구조체 참조.

[0036] 또 다른 구현예에서, 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 형성하는 아미노산 폴리머는 하기 식 (I)을 갖는다:



[0038] 상기에서, 상기 식 (I)에 따른 아미노산 폴리머는 본 발명에서 정의된 바와 같은 프롤린 잔기를 추가로 포함하며, x는 독립적으로 0 내지 6의 정수로부터 선택된다. 아울러, 각각의 n에 대하여, y는 독립적으로 1 내지 6의 정수로부터 선택되고, 각각의 z는 독립적으로 1 내지 6의 정수로부터 선택된다. 마지막으로, n은 임의의 정수로서, 상기 제2 도메인은 적어도 약 100개 아미노산 잔기, 특히 적어도 약 100개 내지 약 3,000개 아미노산 잔기, 바람직하게는 약 2,000개, 보다 바람직하게는 약 1,000개 아미노산 잔기로 이루어진다.

[0039] 바람직한 구현예에서, 상기에서 정의된 "아미노산 반복체"/"아미노산 카세트"/"카세트 반복체" 형성 랜덤 코일 구조는 최대 5개의 동일하게 반복되는 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 최대 4개의 동일하게 반복되는 아미노산 잔기 및 가장 바람직하게는 최대 3개의 동일하게 반복되는 아미노산 잔기를 포함한다.

[0040] 상기에서 이미 나타난 바와 같이, 랜덤 코일 구조를 형성하는 본 발명의 아미노산 폴리머는 프롤린 잔기를 포함하며, 상기 프롤린 잔기는 상기 랜덤 코일 형성 도메인을 구성하는 아미노산의 약 4% 이상, 바람직하게는 약 5% 이상, 보다 더 바람직하게는 약 6% 이상, 특히 바람직하게는 약 8% 이상, 보다 특히 바람직하게는 약 10% 이상, 훨씬 보다 특히 바람직하게는 약 15% 이상 및 가장 바람직하게는 약 20% 이상을 구성한다. 이러한 랜덤 코일 구조를 형성하는 본 발명의 아미노산 폴리머는 바람직하게는 상기 랜덤 코일 형성 도메인을 구성하는 아미노산의 약 40% 이하 또는 약 35% 이하를 포함한다. 첨부된 실시예 13에 나타난 바와 같이, Pro 잔기의 비율이 적은 PAS#1P2 폴리머는 그 CD 스펙트럼이 200 nm 부근에서 덜 뚜렷한 최소값을 보여주는데, 이는 본 발명에 따른 아

미노산 폴리머의 랜덤 코일 특성이 프롤린 잔기의 함량에 의존하고 있음을 나타낸다.

- [0041] 다른 바람직한 구현예에서, 상기에서 정의된 "아미노산 반복체"/"아미노산 카세트"/"카세트 반복체" 형성 랜덤 코일 구조는 상기 랜덤 코일 형성 도메인을 구성하는 아미노산의 알라닌 잔기를 약 4% 이상 약 50% 이하, 바람직하게는 약 10% 이상 약 50% 이하, 가장 바람직하게는 약 20% 이상 약 50% 이하로 포함한다.
- [0042] 다른 바람직한 구현예에서, 상기에서 정의된 "아미노산 반복체"/"아미노산 카세트"/"카세트 반복체"를 포함하는 아미노산 폴리머 형성 랜덤 코일 구조는 상기 랜덤 코일 형성 도메인을 구성하는 아미노산의 세린 잔기를 약 4% 이상 약 50% 이하, 바람직하게는 약 10% 이상 약 50% 이하, 가장 바람직하게는 약 20% 이상 약 50% 이하로 포함한다.
- [0043] 따라서, 상기 아미노산 폴리머 형성 랜덤 코일 구조는 상기 랜덤 코일 형성 도메인을 구성하는 아미노산에서 약 35%의 프롤린 잔기, 약 50%의 알라닌 잔기 및 약 15%의 세린 잔기를 포함할 수 있다. 다른 한편으로, 상기 아미노산 폴리머 형성 랜덤 코일 구조는 상기 랜덤 코일 형성 도메인을 구성하는 아미노산에서 약 35%의 프롤린 잔기, 약 15%의 알라닌 잔기 및 약 50%의 세린 잔기를 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용된 바와 같이 "약"이란 용어는 또한 주어진 백분율의 정확한 값을 나타낸다.
- [0044] 또한, 본 발명에서는 AAAASSASSSSSSAAASA(pISA; 서열번호 2) AASAAASSAAASAAASASS(서열번호 4), ASASASASASSAASAASA(서열번호 6), SAASSSASSSSAASSASAAA(서열번호 8), SSSSAASAAASAAAASSSAS(서열번호 10), SSASSSASSSSSASAA(서열번호 12), SASASASASAAASSASSAS(서열번호 14) 및 ASSAAASAAAASSAASASS(서열번호 16)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 폴리머가 개시된다. 상기 개시된 알라닌-세린 모듈/서열 단위의 멀티머는 결과물인 아미노산 서열이 상기에서 정의된 바와 같은 프롤린 잔기를 추가로 포함하는 경우에 랜덤 코일 구조를 형성할 수 있다. 이들 예시적인 모듈/서열 단위는 하기 서열 GCGCTGCTGCATCCTCTGCAAGCTCCGCTTCTTCTCTAGCTCCGAGCTGCATCTGCT(서열번호 1), GCTGCTTCCGCTGCTGCTTCTCCGCTGCTGCTTCCGCTGCTGCTTCCGCTTCTCC(서열번호 3), GCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCTCCGCTGCTTCCGCTGCTTCCGCT(서열번호 5), TCCGCTGCTTCTCTCCGCTTCTCTCTCCGCTGCTTCTCCGCTTCCGCTGCTGCT(서열번호 7), TCTCTCTCTCCGCTGCTTCCGCTGCTTCCGCTGCTGCTGCTTCTCTCTCCGCTTCC(서열번호 9), TCTCTCCGCTTCTCTCTCCGCTGCTTCTCTCTCCGCTTCTCTCTCCGCTTCCGCTGCT(서열번호 11), TCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTGCTTCTCTCCGCTTCTCTCCGCTTCC(서열번호 13) 및 GCTTCTCTCCGCTGCTGCTTCCGCTGCTGCTTCTCTCCGCTGCTTCCGCTTCTCTCTCC(서열번호 15)를 포함하는 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있다.
- [0045] 바람직한 구현예에서, 상기 아미노산 폴리머 형성 랜덤 코일 구조는 ASPAAPAPASPAAPAPSAPA(PAS#1; 서열번호 18), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS(PAS#2; 서열번호 20), SAPSSPSPASPSPSPASPS(변형된 PAS#3; 변형된 서열번호 22) 및 APSSPSPASPSPSPASPSS(PAS#3, 서열번호 22, 변형되지 않음)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 다른 한편으로, 약간 변형되지만 여전히 활성형인 PAS#3은 상기에서 언급된 서열 SAPSSPSPASPSPSPASPS(서열번호 63)을 가질 수 있다. 상기 서열은 본 발명에서 제공된 서열번호 22의 환형으로 변경된(circularly permuted) 형태에 해당하며, 마지막 세린이 제거되고 다른 세린이 출발 아미노산에 첨가되었다. 결과적으로, 본 발명에 따른 상기 변형된 서열의 멀티머는 맨 처음과 맨 마지막 잔기를 제외하고는 본질적으로 변형되지 않은 서열의 멀티머와 동일한 내부 반복 단위를 갖는다. 따라서, 상기 변형된 PAS#3(서열번호 63)은 본 발명에 따라 본 발명에서 제공된 아미노산 폴리머의 다른 "모듈"/"빌딩 블록"의 예로 간주될 수 있다. 본 발명에서 제공된 아미노산 폴리머의 다른 "모듈" 및 (짧은) 절편 또는 원형으로 변경된 버전 또한 제공된 생물학적 활성 단백질의 본 발명에서 정의된 "제2 도메인"에 대한 "모듈", "반복체" 및/또는 빌딩 블록으로 사용될 수 있음은 본 기술분야의 당업자에게 자명하다. 그러나, 랜덤 코일 구조를 형성하는 또 다른 및 예시적인 (illustrative) 아미노산 폴리머는 SSPSAPSPSPASPSPSPA(PAS#4; 서열번호 24), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA(PAS#5; 서열번호 26) 및 ASAAAPAAASAAASAPSA(PAS#1P2; 서열번호 28)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 이들 서열 및 본 발명에서 제공된 상기 서열들의 절편 또는 멀티머(들) 또는 환형으로 변경된 버전이 본 발명의 문맥에서 본 발명의 생물학적 활성 단백질(들)/폴리펩티드(들)의 본 발명에서 정의된 "제2 도메인"용 빌딩 블록으로 도입될 수 있다. 본 기술분야의 당업자는 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 형성하고 본 발명에서 정의된 바와 같이 주로 알라닌, 세린 및 프롤린으로 구성되는 추가 아미노산 폴리머를 즉시 생성할 수 있는 위치에 있다. 본 발명의 생물학적 활성 단백질(들)/폴리펩티드(들)의 본 발명에서 정의된 "제2 도메인"의 빌딩 블록 또는 모듈로 사용되는 랜덤 코일 구조 형성 아미노산 폴리머의 이러한 다른 및 추가 예는 특히 상기에서 나타낸 특정 "빌딩 블록", "폴리머

카세트" 또는 "폴리머 반복체"의 조합 및/또는 절편 또는 환형으로 변경된 버전을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 예시된 랜덤 코일 도메인의 모듈/서열 단위/폴리머 반복체/폴리머 카세트는 또한 새롭게 조합되어 본 발명에 따른 추가 모듈/서열 단위/폴리머 반복체/폴리머 카세트를 형성할 수 있는 개별 절편으로 제공할 수 있다.

[0046] "모듈(들)", "서열 단위(들)", "폴리머 반복체(들)", "폴리머 카세트(들)" 및 "빌딩 블록(들)"이란 용어는 본 발명에서 동의어로 사용되며, 본 발명의 생물학적 활성 단백질/폴리펩티드의 본 발명에서 정의된 "제2 도메인"을 형성하기 위해 사용될 수 있는 개별 아미노산 스트레치를 나타낸다. 상기 제2 도메인은 바람직하게는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하며, 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 형성한다.

[0047] 상기 예시된 본 발명의 생물학적 활성 단백질/폴리펩티드의 랜덤 코일 도메인(즉, 상기 생물학적 활성 단백질/폴리펩티드의 본 발명에서 정의된 "제2 도메인")의 모듈/서열 단위/폴리머 반복체/폴리머 카세트/빌딩 블록은 하기 서열 GCCTCTCCAGCTGCACCTGCTCCAGCAAGCCCTGTCGACCAGCTCCGCTGCTCCTGCT(서열번호 17), GCTGCTCCGGCTTCCCCGGCTCCGGTCTCCGCTCCGGTCCGGTCCGGTCTCCGCTCC(서열번호 19), GCTCCGCTCTCCCGTCCCGTCCGCTCCGCTCTCCCGTCCCGGCTCCCGTCC-TCC(서열번호 21), TCCTCCCGTCCGCTCCGCTCCCGTCTCCCGGCTCCCGTCCCGTCTCCCGGCT(서열번호 23), GCCGTTCTCCAGCAGCTCTTCTGCTCCACCAGCAGCTGCAAGCCCTGTCGACCAAGCGCACCTCCTGCT(서열번호 25) 및/또는 GCCTGTGCTGCAGCACCTGCAGCAGCAAGCGCAGCTGCATCTGCTCCATCTGCAGCTGCT(서열번호 27)을 포함하는 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있다.

[0048] 본 발명에서 상기 개시된 바와 같은 변형된 PAS#3(변형된 서열번호 22)은 하기 핵산 서열 TCCGCTCCGCTCTCCCGTCCCGTCCGCTCCGCTCTCCCGTCCCGGCTCCCGTCC(변형된 서열번호 21)에 의해 코딩될 수 있다.

[0049] 숙련된 당업자의 지식에 따르면, 본 발명에서 개시되고 예시된 랜덤 코일 도메인(또는 이의 절편 또는 멀티머 또는 이의 환형으로 변경된 버전)의 모듈/서열 단위/폴리머 반복체/폴리머 카세트/빌딩 블록은 퇴화된(degenerated) 본성을 갖는, 즉 상이한 뉴클레오티드 트리플렛 코돈(triplet codon)이 동일한 아미노산 잔기를 코딩할 수 있는 유전자 코드에 따라 상이한 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있음은 본 발명에 있어서 중요하고 비제한적이다. 또한, 상기 말단 잔기는 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열 카세트의 디자인 및 이의 멀티머를 얻기 위해 도입되는 결찰(ligation) 전략에 따라 상이할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 18 및 서열번호 30에 나타난 "모듈" PAS#1은 각각 서열번호 17 및 서열번호 29의 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호 18과 대조적으로, 서열번호 30은 C-말단에 알라닌을 추가로 포함하며, 첨부된 실시예의 일부에 개시되어 있는 바와 같이 개별 뉴클레오티드 서열 카세트가 점착성(sticky) 말단을 통해 결찰되어 있다면 그 코돈은 결실될 수 있다.

[0050] 상기에 따르면, 아미노산 폴리머 형성 랜덤 코일 구조는 본 발명에서 상기에 개시된 바와 같은 서열번호 18, 20, 22, 24, 26 또는 28의 아미노산 서열 중 어느 하나로 이루어진 멀티머를 포함할 수 있거나, 서열번호 18, 20, 22, 24, 26 및 28의 아미노산 서열 중 하나 이상으로 이루어진 멀티머를 포함할 수 있다. 아울러, 이들 예시된 서열의 절편 또는 환형으로 변경된 버전 또한 본 발명의 생물학적 활성 단백질(들)/폴리펩티드(들)의 랜덤 코일 도메인("제2 도메인")의 추가 모듈/서열 단위/폴리머 반복체/폴리머 카세트/빌딩 블록을 제조하는데 사용될 수 있는 것으로 관찰된다.

[0051] 다른 구현예에서, 아미노산 폴리머 형성 랜덤 코일 구조는 ASPAAPAPASPAAPAPSAPA(서열번호 18), AAPASPAPAPASPAAPAPS(서열번호 20), APSSPSAPSSPSASPSS(서열번호 22), 또는 변형된 서열인 S-APSSPSAPSSPSASPSS(서열번호 63), SSPSAPSSPSASPSSSPA(서열번호 24), AASPAAPSAPAAASPAAPSAPPA(서열번호 26) 및 ASAAAPAAASAAAPSAAA(서열번호 28)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 (환형) 변경체로 구성되는 멀티머 또는 이들 (환형으로) 변경된 서열의 멀티머를 포함할 수 있다.

[0052] 또 다른 구현예에서, 아미노산 폴리머 형성 랜덤 코일 구조는 ASPAAPAPASPAAPAPSAPA(서열번호 18), AAPASPAPAPASPAAPAPS(서열번호 20), APSSPSAPSSPSASPSS(서열번호 22) 또는 변형된 서열인 S-APSSPSAPSSPSASPSS(서열번호 63), SSPSAPSSPSASPSSSPA(서열번호 24), AASPAAPSAPAAASPAAPSAPPA(서열번호 26) 및 ASAAAPAAASAAAPSAAA(서열번호 28)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 절편/일부로 구성되는 멀티머 또는 이들 예시된 모듈/서열 단위/폴리머 반복체/폴리머 카세트/빌딩 블록의 멀티머(들)을 포함할 수 있다. 본 발명의 생물학적 활성 단백질/폴리펩티드의 "제2 도메인"을 생성하기 위해 본 발명에 따라 도입되는 이들 서열의 "절편"은 서열번호 18, 20, 22, 24, 26 및 28로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개, 보다 바람직하게는 적어도 5개, 보다 더 바람직하게는 적어도 6개, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 8개, 특히 바람직하게는 적어도 10개, 보다 특히 바람직하게는 적어도 12개, 보다 더

특히 바람직하게는 적어도 14개, 훨씬 더 특히 바람직하게는 적어도 16개 및 가장 바람직하게는 적어도 18개의 연속하는 아미노산으로 구성될 수 있다.

[0053]

전술한 바와 같이, 본 발명에서 제공된 랜덤 코일 도메인의 모듈/서열 단위/빌딩 블록 등은 단지 생리적인 조건 하에 랜덤 코일 구조를 형성하는 본 발명의 아미노산 폴리머의 예일 뿐이다. 본 발명의 요지에 따르면, 상기 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"는 상기에서 확인된 알라닌, 세린 및 프롤린의 내용물/분획(fraction)을 포함한다. 따라서, 추가로 본 발명에 따른 이러한 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"를 생성하는 것은 당업자의 일반적인 기술 내에 포함된다. 예를 들면, 알라닌, 세린 및 프롤린의 전체적인 분포 및 양에 대한 상기에서 확인된 규칙이 지켜지는 한, 본 발명에서 확인된 본 발명의 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"의 개별 절편은 다른 개별 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"와 조합될 수 있다. 다시, 이들 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"는 또한 추가로 아미노산 잔기를 포함할 수 있지만, 단지 최소량 또는 소량의 성분(개별 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"의 최대 10%, 바람직하게는 최대 2%)으로만 포함될 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기 개별 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 구성된다. 개별 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"는 더 긴 랜덤 코일 형성 아미노산 폴리머를 형성하기 위하여 조합될 수 있으며, 생물학적 활성 단백질의 본 발명에서 정의된 "제2 도메인"의 최대 길이는 약 3,000개 아미노산이다. 본 발명의 문맥에서 적어도 2개의 도메인을 포함하는 생물학적 활성 단백질이 바람직하며, 상기에서 정의된 바와 같이 상기 적어도 2개의 도메인 중 제1 도메인은 상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열을 포함하고; 상기에서 정의된 바와 같이 상기 적어도 2개 도메인 중 제2 도메인은 바람직하게는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하고 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 형성한다. 본 발명에서 제공되고 주로 알라닌, 세린 및 프롤린으로 이루어진 상기 랜덤 코일 구조는 상기 생물학적 활성 단백질의 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 매개한다. 상기 제2 도메인은 본 발명에서 제공된 바와 같은 개별 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"를 포함할 수 있거나, 이들 개별, 설명적 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"의 절편 또는 일부를 포함할 수 있다. 그러나, 상기 제2 도메인은 본 발명에서 제공된 사상을 추종 및 따르고 하기 명세서 및 첨부된 실시예에 예시되어 있는 추가 및/또는 다른 개별 "모듈", "서열 단위" 및/또는 "반복체"로 만들어질 수 있다. 예를 들면, 첨부된 실험에 부분은 본 발명에서 정의된 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 제공하는 "제2 도메인"(예를 들면, 약 200 또는 약 400 또는 약 600개 아미노산 잔기로 이루어지고, "빌딩 블록"으로 PAS#1/서열번호 18, PAS#2/서열번호 20, PAS#3/서열번호 22, PAS#5/서열번호 26 및/또는 PAS#1P2/서열번호 28을 포함함)을 추가로 포함하는 단백질이 변형되지 않은 생물학적 활성 단백질과 비교할 때 심지어 생체내에서도 유익한 혈청 안정성 및 혈장 반감기를 갖는다는 충분한 증거를 보여준다. 본 발명의 비제한적인 예로서, 본 발명에서 정의된 바와 같은 "제2 도메인"을 추가로 포함하고, 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 채용하는 변형된 IFNa2b의 생체내 안정성과 변형되지 않은 IFNa2b의 생체내 안정성을 비교하였다.

[0054]

대부분의 아미노산, 특히 소수성 아미노산의 호모-폴리머는 보통 수용액에서 불용성이다(Bamford (1956) Synthetic Polypeptides - Preparation Structure, and Properties, 2nd ed., Academic Press, New York). 몇 가지 친수성 아미노산의 호모-폴리머는 2차 구조를 형성하는 것으로 알려져 있으며, 예를 들면 Ala의 경우에는 α -헬릭스(Shental-Bechor (2005) Biophys J 88:2391-2402) 및 Ser의 경우에는 β -시트(Quadrioglio (1968) J Am Chem Soc 90:2760-2765)를 형성하지만, 가장 뻗은 호모올리고펩티드(Schimmel (1967) Proc Natl Acad Sci USA 58:52-59)인 폴리-프롤린은 수용액에서 II형 트랜스 헬릭스(Cowan (1955) Nature 176:501-503)를 형성한다.

[0055]

폴리머 생물리학의 이론적인 원리를 이용함으로써, 200개 아미노산 잔기 사슬의 랜덤 코일 직경은 예를 들면 폴리-글리신의 경우에 약 75Å의 양이 될 것이다 - 이는 말단에서 말단까지 거리의 평균 루트 평균 제곱(average

root mean square)인 $\sqrt{\langle r^2 \rangle_0} = l \cdot \sqrt{n \cdot C_\infty}$ 로 계산되며, 이때 폴리(글리신)의 경우 $n=200$, 각

각의 C_a-C_a 거리에 대한 회전가능한 결합 길이인 $l=3.8\text{\AA}$ 및 '특징 비'인 $C_\infty \approx 2.0$ 이다(Brand (1967) J Mol Biol 23:47-65; Creighton, (1993) loc. cit.). 이러한 관계는 본 기술분야의 당업자가 랜덤 사슬 아미노산 폴리머의 수력학적 부피가 (a) 더 긴 사슬 길이 l 을 이용하거나, (b) 더 큰 특징 비 C_∞ 를 나타내는 아미노산 중 하나를 사용함으로써 연장될 수 있다는 것을 예측할 수 있음을 보여준다. C_∞ 는 분자 랜덤 사슬의 고유 강직도를 측정하는 것이며, 대부분의 아미노산의 경우 일반적으로 9의 값을 갖는다(Brant (1967) loc. cit.). 결사슬이 없는 Gly과 아미노산인 Pro 만이 현저하게 작은 값을 나타낸다. 따라서, Gly와 Pro는 (변성 조건 하에) 랜덤

코일 단백질의 치수를 감소시키는데 기여할 것으로 예측된다(Miller (1968) Biochemistry 7:3825-3935). 따라서, 프롤린 잔기를 포함하는 아미노산 폴리머는 상대적으로 조밀한(compact) 수력학적 부피를 갖는 것으로 예측된다. 그러나, 이와 대조적으로, 본 발명에서는 알라닌, 세린 및 프롤린 잔기의 혼합물을 포함하는 본 발명의 아미노산 폴리머의 수력학적 부피가 분석적 겔 투과 크로마토그래피로 측정할 때 예측되는 수력학적 부피와 비교하여 극적으로 증가된 수력학적 부피를 갖는 것으로 나타난다. 사실, 각각 단독으로는 한정된 2차 구조를 갖는 호모올리고펩티드를 형성하는 경향이 있는 이들 3가지 아미노산의 혼합물을 포함하는 폴리펩티드가 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 채용한다는 것은 놀라운 일이다. 이러한 본 발명의 폴리펩티드는 동일한 수의 Gly 잔기를 포함하는 호모-폴리머보다 더 큰 수력학적 반경을 가지며, 본 발명에 따른 생물학적 활성 단백질에 더 나은 용해도를 부여한다.

[0056] W02006/081249는 Gly, Asn 및 Gln을 갖는 2 내지 500개 단위의 아미노산 반복체를 주된 구성으로, Ser, Thr, Asp, Gln, Glu, His 및 Asn을 소량의 구성으로 포함하는 폴리펩티드와 커플링된 생물학적 활성 단백질을 포함하는 단백질 콘주게이트를 개시하고 있다. 상기 단백질 콘주게이트는 콘주게이트되지 않은 생물학적 활성 단백질과 비교할 때 증가되거나 감소된 혈장 반감기 중 하나를 갖는 것으로 개시되어 있다. 그러나, W02006/081249는 특정한 아미노산 반복체가 콘주게이트의 혈장 반감기를 감소 또는 연장시킬 수 있음을 예측하는 어떠한 시사도 하고 있지 않다. 아울러, W02006/081249는 상기 콘주게이트된 단백질이 본 발명에서 나타난 바와 같은 랜덤 코일 구조를 형성하는 아미노산 반복체를 포함할 때 단백질의 혈장 반감기가 증가될 수 있음을 시사 또는 제시하고 있지 않다. 아울러, W02006/081249에 개시되어 있는 아미노산 반복체는 Gly, Asn 및 Gln으로부터 선택되는 적어도 2개의 잔기를 포함하며, 이는 우선적으로 Ala, Ser 및 Pro 잔기로 이루어지는 본 발명의 폴리펩티드 반복체와는 명확하게 대조되는 것이다.

[0057] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "생물학적 활성"이란 용어는 생명체에 대한 물질의 생물학적 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명에서 사용된 바와 같은 "생물학적 활성 단백질" 또는 "생물학적 활성을 갖는 및/또는 매개하는 폴리펩티드"란 용어는 상기 단백질 또는 폴리펩티드에 노출된 살아있는 세포/생물에 생물학적 효과를 유도할 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드를 나타낸다. 그러나, 본 발명의 문맥에서 "생물학적 활성 단백질"이란 용어는 상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열 및 랜덤 코일 구조를 형성하는 아미노산 서열 모두를 포함하는 본 발명의 전체 단백질을 나타낸다는 것을 주목해야 한다.

[0058] 따라서, 본 발명에서 사용된 바와 같은 "생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열" 또는 "생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열"이란 용어는 상기에서 정의된 "생물학적 활성"을 매개하거나, 갖거나, 매개할 수 있거나, 또는 가질 수 있는 본 발명의 생물학적 활성 단백질의 상기에서 정의된 "제1 도메인"을 나타낸다. "생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열" 또는 "생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열"이란 용어는 또한 본 발명의 "생물학적 활성 폴리펩티드" 또는 "생물학적 활성 폴리펩티드 스트레치"를 나타내고, 또한 상기 생물학적 활성 단백질의 "제1 도메인"을 나타낸다. 또한, "생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열" 또는 "생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열"이란 용어에는 생체내 또는 시험관내 중 어느 하나에서 그 반감기가 연장될 필요가 있는 관심있는 임의의 단백질의 기능적 절편이 포함된다. 본 발명의 한 구현예에서, 본 발명에 따른 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열은 임의의 "관심있는 단백질", 즉 약학적 또는 생물학적으로 관심있는 임의의 단백질 또는 치료/진단 제제로 유용한 임의의 단백질로부터 추론될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 생물학적 활성 단백질은 천연적으로 제조된 폴리펩티드 또는 재조합 DNA 기술에 의해 제조된 폴리펩티드로부터 유래되는 생물학적 활성 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 관심있는 단백질은 결합 단백질, 면역글로불린, 항체 절편, 운송(transport) 단백질, 사이토카인, 성장 인자, 호르몬 또는 효소와 같은 신호 단백질/펩티드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0059] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "결합 단백질"이란 용어는 잠재적인 결합 파트너(들)과 특이적으로 상호작용하여, 잠재적인 결합 파트너(들)이 되는 상기 다수의 상이한 분자들의 풀로부터 단지 상기 잠재적인 결합 파트너(들)만이 결합되거나, 또는 현저하게 결합되는 정도까지 상기 잠재적인 결합 파트너(들)와 잠재적인 결합 파트너(들)이 되는 상기 다수의 상이한 분자들 사이를 구별할 수 있는 분자를 나타낸다. 잠재적인 결합 파트너에 대한 결합 단백질의 결합을 측정하기 위한 방법은 본 기술분야에 알려져 있으며, 예컨대 ELISA, 등온선 적정 열량측정법, 평형 투석법, 풀다운(pull down) 분석법 또는 비아코어(Biacore) 장치를 이용함으로써 일상적으로 수행될 수 있다. 본 발명의 문맥에서 유용한 예시적인 결합 단백질은 항체, Fab 절편, F(ab')₂ 절편, 단일쇄 가변 절편(scFv), 항체의 단리된 가변 영역(VL- 및/또는 VH-영역), CDR, 단일 도메인 항체, CDR-유래의 펩티도유사물과 같은 항체 절편, 렉틴, 리포칼린 또는 예를 들면 Skerra (2000) J Mol Recognit 13:167-187 또는 Binz (2005) Nat Biotechnol 23:1257-1268에 개시된 것과 같은 다양한 유형의 주형틀(scaffold)-유래의 결합 단백질

을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 문맥에서 유용한 다른 예시적인 생물학적 활성 단백질은 과립구(granulocyte) 콜로니 자극 인자, 인간 성장 호르몬, α -인터페론, β -인터페론, γ -인터페론, 종양 괴사 인자, 에리트로포이에틴, 응고(coagulation) 인자 VIII과 같은 응고 인자, gp120/gp160, 용해성 종양 괴사 인자 I 및 II 수용체, 레테플라제(reteplase)와 같은 혈전용해제(thrombolytics), 엑센딘(exendin)-4, 아나킨라(anakinra)와 같은 인터루킨-1 수용체 길항제, 인터루킨-2 및 호중성구(neutrophil) 젤라티나제-연관 리포칼린(lipocalin) 또는 Walsh (2003) Nat Biotechnol 21:865-870 또는 Walsh (2004) Eur J Pharm Biopharm 58:185-196에 나열되어 있는 것들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 상기에서 언급한 것과 같은 호중성구 젤라티나제-연관 리포칼린(NGAL, 인간 호중성구 리포칼린, 24p3, 우테로칼린, 시데로칼린 또는 뉴(neu)-관련 리포칼린으로도 불림)은 리포칼린 패밀리의 결합 단백질의 일원으로서, 호중성구 과립 성분으로 최초로 확인되었다. NGAL은 카테콜레이트-유형의 시데로포어(siderophore)인 FeIII·엔테로첼린(enterochelin)/엔테로박틴(enterobactin)(Goetz (2002) Mol Cell 10:1033-1043) 뿐만 아니라 *M. tuberculosis* 카르복시마이코박틴을 포함하는 마이코박테리아의 일부 다른 시데로포어(Holmes (2005) Structure 13:29-41)에 단단히 결합하는 것으로 나타났다. 이들 시데로포어는 인간 체액에서 일어나는 것과 같은 제한적인 철 농도에 대한 반응으로 병원성 박테리아에 의해 분비되는 매우 강력한 철 킬레이터로서, 특수화된 박테리아 이입(import) 시스템에 의해 철을 흡수하도록 한다. 따라서, 호중성구는 선천적 면역 시스템의 항균 전략으로 감염 부위에 NGAL(최근 '시데로칼린'으로도 명명됨)을 방출하는 것으로 보인다. NGAL의 생리학적 관련성을 해당 녹아웃(knock-out) 마우스에서 조사하였으며, 엔테로첼린을 생성하는 박테리아의 성장을 제한하는 것으로 나타났다(Flo (2004) Nature 432:917-921). 결과적으로, NGAL은 박테리아의 철 흡수를 방지함으로써 작용하는 신규한 종류의 항생제로 적용될 수 있다. 이외에도, NGAL은 신장에 의한 철-회수를 위한 생리학적 경로에 관여하는 것으로 개시되어 있다(Yang (2002) Mol Cell 10:1045-1056). 상기 메카니즘은 최근 중증 신부전 마우스 모델에서 허혈-재관류 손상으로부터 신장을 보호하는 것으로 나타났으며(Mori (2005) J Clin Invest 115:610-621), 이는 치료 적용분야의 또 다른 영역을 열 수 있다.

[0062] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 생물학적 활성 단백질에 관한 것으로서, 상기 제1 도메인은 상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 폴리펩티드를 코딩하는 아미노산 서열을 포함하고, 랜덤 코일 구조를 형성하는 상기 제2 도메인은 폴리펩티드 링커에 의해 연결되어 있다. 상기 제1 및 상기 제2 도메인 사이에 삽입되는 상기 폴리펩티드 링커는 바람직하게는 이들 도메인에 공유결합되어 있는 복수의, 친수성, 펩티드-결합된 아미노산을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 폴리펩티드 링커는 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 폴리펩티드를 포함하는 상기 제1 도메인의 방출을 조절하는 혈장 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 상이한 유형 및 길이의 링커는 특정한 폴리펩티드의 완전한 기능적 활성을 얻기 위해 과도한 노력 없이도 확인될 수 있다.

[0063] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 생물학적 활성 단백질은 융합 단백질이다. 본 발명에서 개시된 것과 같은 융합 단백질은 생물학적 활성을 매개하는 적어도 하나의 도메인 및 랜덤 코일 구조를 형성하는 적어도 하나의 다른 도메인을 단일한 멀티-도메인 폴리펩티드로 포함하는 것을 의미한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 생물학적 활성 단백질은 단백질 콘주게이트를 나타낼 수 있으며, 관심있는 단백질 또는 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 폴리펩티드/폴리펩티드 스트레치/아미노산 서열은 비-펩티드 결합을 통해 랜덤 코일 구조를 형성하는 아미노산 서열에 콘주게이트된다. 단백질을 가교시키는데 유용한 비-펩티드 결합은 본 기술분야에 알려져 있으며, 예컨대 Cys 결사슬 사이의 디설파이드 결합, 티오에테르 결합 또는 디숙신이미딜 수베레이트(DSS) 또는 설포숙신이미딜 4-[p-말레이미도페닐]부티레이트(설포-SMPB)와 같은 화학적 가교제에 의해 유도되는 비-펩티드 공유 결합뿐만 아니라 비-공유 단백질-단백질 상호작용도 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명의 "생물학적 활성 단백질"은 또한 하나 이상의 "생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열"을 포함할 수 있으며, 즉 본 발명에서 정의된 생물학적 활성 단백질의 "제1 도메인"은 본 발명의 문맥에서 관심있는 하나의 단일한 생물학적 활성으로 한정되지 않음을 주목해야 한다. 아울러, 본 기술분야의 당업자는 본 발명의 생물학적 활성 단백질 내에 포함되는 것과 같은 "생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열" 및 "랜덤 코일 도메인/부분"은 특정한 순서로 조직될 수 있음을 알고 있다. 하나의 랜덤 코일 도메인/부분(즉, 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어지고 랜덤 코일을 형성하는 아미노산 서열) 및 상이한 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 두 개의 아미노산 서열을 포함하는 본 발명의 "생물학적 활성 단백질"의 비제한적 예에서, 상기 도메인 순서는 "첫 번째 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열" - "랜덤

코일 도메인/부분" - "두 번째 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열"일 수 있다.

[0065] 따라서, 본 발명의 문맥에 있어서, 본 발명의 생물학적 활성 폴리펩티드의 본 발명에서 정의된 "제1" 및 "제2" 도메인의 순서는 순서대로 배열될 수 있으며, 상기 "제1 도메인"(즉, 관심있는 단백질; "상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열")이 본 발명의 폴리펩티드의 아미노(N-) 말단에 위치하고, 상기 "제2 도메인"(즉, 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 도메인)이 카르복시(C-) 말단에 위치한다. 그러나, 상기 순서는 또한 거꾸로 될 수도 있으며, 예컨대 상기 "제1 도메인"(즉, 관심있는 단백질; "상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열")이 본 발명의 폴리펩티드의 카르복시(C-) 말단에 위치하고, 상기 "제2 도메인"(즉, 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 도메인)이 아미노(N-) 말단에 위치한다.

[0066] 그러나, 상기에서 지적한 바와 같이, 상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열로 구성되거나 이를 포함하는 하나 이상의 도메인은 또한 본 발명의 폴리펩티드 구조체의 문맥에서 사용되어야 하는 것으로 예측된다. 따라서, 상기 "제2 도메인"(즉, 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 도메인)은 상기 "제1 도메인들" 사이에 위치되어서, 관심있거나 원하는 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 스트레치가 될 수 있다. 따라서, 상기 "랜덤 코일 스트레치"는 원하는 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 2개의 도메인 사이에 위치될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드/생물학적 활성 단백질의 모든 구현예와 마찬가지로, 상기 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열을 포함하는 상기 도메인(들)은 또한 원하는 생물학적 기능을 갖는 주어진 단백질의 생물학적 활성 절편일 수 있다. 따라서, 본 발명에서 정의된 "제2 도메인"(랜덤 코일을 형성하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열)은 또한 관심있는 단백질의 2개의 생물학적 활성 절편 사이, 또는 관심있는 2개의 단백질의 생물학적 활성 절편 사이에 위치될 수 있다. 그러나, "생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는" 하나 이상의 도메인이 본 발명의 생물학적 활성 단백질 내에 포함될 때에도, 본 발명에서 정의된 "제2 도메인", 즉 랜덤 코일 구조를 형성하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열은 본 발명의 생물학적 활성 단백질의 N- 또는 C- 말단에 위치될 수 있다. N-말단으로부터 시작하는 대응하는 비제한적인 예로는

[0067] "첫 번째 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열" - "랜덤 코일 도메인/부분" - "두 번째 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열" 또는

[0068] "첫 번째 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열" - "두 번째 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열" - "랜덤 코일 도메인/부분" 또는

[0069] "랜덤 코일 도메인/부분" - "첫 번째 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열" - "두 번째 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열"이 있다.

[0070] 해당 순서(들)은 또한 상기 설명이 본 발명의 생물학적 활성 단백질/폴리펩티드의 C-말단으로부터 시작할 때에도 관찰된다. 상기 설명에서 본 발명에서 사용된 바와 같이 "랜덤 코일 도메인/부분"이란 용어는 본 발명에서 정의된 바와 같은 "제2 도메인", 즉 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 채용/가하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열에 해당한다. 다시, "첫 번째 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 서열"이란 용어는 상기 생물학적 활성 또는 기능을 갖거나 및/또는 매개하는 전장(full-length) 폴리펩티드에 한정되는 것은 아니며, 이의 생물학적 및/또는 약동학적 활성 절편도 해당한다는 점이 지적되어야 한다. 특히, 이에 한정되는 것은 아니지만, 본 발명에서 정의된 바와 같은 둘 이상의 "제1 도메인"이 본 발명의 "생물학적 활성 단백질" 내에 포함되는 문맥에서, 이들 "제1 도메인"은 단백질 복합체 또는 이러한 단백질 복합체의 일부 절편의 상이한 부분이거나 이를 나타내는 것으로도 관찰된다.

[0071] 아울러, 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 도메인이 또한 본 발명의 폴리펩티드 구조체의 문맥에서 사용되는 것으로 예측된다. 따라서, 관심있거나 원하는 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 아미노산 스트레치인 상기 "제1 도메인"은 2개의 "제2 도메인"(즉, 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는 적어도 약 100개 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 도메인) 사이에 위치될 수 있다. 따라서, "랜덤 코일 도메인"은 원하는 생물학적 활성을 갖거나 및/또는 매개하는 도메인의 N-말단 및 C-말단 양쪽에 위치될 수 있다.

[0072] 하기에 예시된 바와 같이, 랜덤 코일 도메인을 포함하도록 변형된 본 발명의 생물학적 활성 단백질은 놀랍게도 상기 랜덤 코일 도메인이 없는 변형되지 않은 생물학적 활성 단백질과 비교할 때 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 나타낸다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, "생체내 안정성"이란 용어는 살아있는 신체에 투여되어

생물학적으로 이용가능하고 생물학적으로 활성인 채로 남아있는 특정 물질의 능력을 나타낸다. 생체내에서, 물질은 배출, 응집(agggregation), 분해 및/또는 다른 대사 공정으로 인해 제거되거나 및/또는 불활성화될 수 있다. 따라서, 본 발명의 문맥에서, 증가된 생체내 안정성을 갖는 생물학적 활성 단백질은 신장(소변) 또는 대변을 통해 잘 배출되지 않을 수 있거나 및/또는 단백질분해, 특히 혈액, 뇌척수액, 복수액 및 림프와 같은 생물학적 유체에서의 생체내 단백질분해에 대해 보다 안정할 수 있다. 한 구현예에서, 생물학적 활성 단백질의 증가된 생체내 안정성은 상기 생물학적 활성 단백질의 혈장 반감기가 증가되었음을 증명한다.

[0073] 생물학적 활성 단백질의 생체내 안정성을 측정하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있다. 하기에 예시된 바와 같이, 생물학적 활성 단백질은 웨스턴 블롯팅(Western blotting) 기술 또는 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)을 이용하여 혈장에서 특이적으로 측정될 수 있다. 그러나, 본 기술분야의 당업자는 관심있는 단백질의 혈장 반감기를 특이적으로 측정하기 위하여 다른 방법이 도입될 수 있음을 알고 있다. 이러한 방법은 방사능 표지된 관심있는 단백질의 물리적인 검출을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예컨대, 방사성요오드화(radioiodination)에 의해 단백질을 방사능 표지하는 방법이 본 기술분야에 알려져 있다.

[0074] 본 발명에서 사용된 바와 같은 "증가된 시험관내 안정성"이란 용어는 시험관내 환경에서 분해 및/또는 응집에 저항하고, 그 본래 생물학적 활성을 유지하기 위한 생물학적 활성 단백질의 능력을 나타낸다. 생물학적 활성 단백질의 생물학적 활성을 측정하는 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있다.

[0075] 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명에서 개시된 바와 같은 생물학적 활성 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 따라서, 상기 핵산 분자는 생물학적 활성을 갖는 펩티드를 코딩하는 핵산 서열 및 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 핵산 분자는 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는 본 발명에 개시된 아미노산 서열 중 하나를 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, "핵산 분자"라는 용어는 DNA 분자 및 RNA 분자와 같은 핵산 분자를 포함하는 의도이다. 상기 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있지만, 이중 가닥 DNA인 것이 바람직하다. 바람직하게는, 상기 핵산 분자는 벡터 내에 포함될 수 있다.

[0076] 아울러, 세포를 본 발명에 개시된 바와 같은 핵산 분자 또는 벡터로 전달감염(transfect)시키는 것이 예측된다. 다른 구현예에서, 본 발명은 발현시 본 발명의 생물학적 활성 분자를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 그러나, 추가 구현예에서, 본 발명은 발현시 전체적으로 또는 부분적으로 생리학적 조건 하에 랜덤 코일 구조를 형성/채용하는 본 발명에 개시된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 상기 핵산 분자는 폴리펩티드가 올바르게 전사 및 번역되도록 하기 위한 본 기술분야에 알려진 적합한 발현 조절 서열뿐만 아니라 소기관(organelle)으로 세포성 분비 및 표적화되도록 하기 위한 신호 서열에 융합될 수 있다. 이러한 벡터는 적합한 숙주 세포 및 적합한 조건 하에 상기 벡터가 선별되도록 하는 마커 유전자와 같은 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

[0077] 바람직하게는, 본 발명의 핵산 분자는 본 발명에서 개시된 생물학적 활성 단백질을 코딩하는 핵산 분자가 원핵 생물 또는 진핵생물 세포에서 발현되도록 하는 발현 조절 서열에 기능적으로(operatively) 연결되어 있는 재조합 벡터 내에 포함된다. 상기 핵산 분자의 발현은 상기 핵산 분자가 번역가능한 mRNA로 전사되는 것을 포함한다. 원핵생물 숙주 세포에서 발현되도록 하는 조절 요소는 예컨대 *E. coli*에서 람다 PL, lac, trp, tac, tet 또는 T7 프로모터를 포함한다. 진핵생물 세포, 바람직하게는 포유동물 세포 또는 효모에서 발현되도록 하는 가능한 조절 요소는 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다. 이들은 보통 전사가 개시되도록 하는 조절 서열 및 선택적으로는 전사가 종결 및 전사체가 안정화되도록 하는 폴리-A 신호를 포함한다. 다른 조절 요소로는 전사 및 번역 인핸서(enhancer) 및/또는 천연적으로-연관된 또는 이형의(heterologous) 프로모터 영역을 포함할 수 있다. 진핵생물 숙주 세포에서 발현되도록 하는 조절 요소의 예는 효모에서의 AOX1 또는 GAL1 프로모터, 포유동물 및 다른 동물 세포에서의 CMV, SV40, RSV 프로모터(Rous Sarcoma virus), CMV 인핸서, SV40 인핸서 또는 글로빈 인트론이다. 전사가 개시되도록 하는 요소들 이외에도, 이러한 조절 요소로는 SV40-폴리-A 부위 또는 tk-폴리-A 부위와 같은 코딩 영역 하류의 전사 종결 신호도 포함될 수 있다.

[0078] 재조합 벡터를 제조하기 위하여 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려진 방법이 사용될 수 있다(예를 들면, Sambrook (1989), Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. 및 Ausubel (1989), Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. 참조). 본 문맥에서, Okayama-Berg cDNA 발현 벡터 pcDV1(Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3, pPICZalpha A(Invitrogen) 또는 pSPORT1(GIBCO BRL)과 같은 적합한 발현 벡터가 본 기술분야에 알려져 있다. 아울러, 사용되는 발현 시스템에 따라, 폴리펩티드를 세포 구획(compartment)으로 유도하거나 또는 배양 배지로

방출되도록 할 수 있는 리더(leader) 서열이 본 발명의 핵산 분자의 코딩 서열에 첨가될 수 있다.

[0079] 본 발명은 또한 유전공학에서 전통적으로 도입되고 본 발명의 생물학적 활성 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터, 특히 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 벡터는 발현 벡터 및/또는 유전자 전달 또는 표적화 벡터이다. 레트로바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스 또는 소 파필로마 바이러스와 같은 바이러스로부터 유래되는 발현 벡터가 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 표적 세포 군집(population) 내로 운반하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 핵산 분자를 함유하는 벡터는 숙주 세포의 유형에 따라 달라질 수 있는 잘 알려진 방법에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다. 따라서, 본 발명은 추가로 상기 핵산 분자 또는 상기 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 이러한 방법은, 예를 들면 Sambrook (1989), loc. cit 및 Ausubel (1989), loc. cit.에 개시되어 있는 기술을 포함한다. 따라서, 원핵생물 세포의 경우에는 열화칼슘 전달감염이 보통 사용되지만, 다른 숙주 세포의 경우에는 칼슘 포스페이트 처리 또는 전기천공법(electroporation)이 사용될 수 있다(Sambrook (1989), loc. cit. 참조). 다른 한편으로, 본 발명의 핵산 분자 및 벡터는 표적 세포로 운반하기 위하여 리포솜(liposome) 내로 재구성될 수 있다. 숙주 세포 내에 존재하는 본 발명의 핵산 분자 또는 벡터는 숙주 세포의 계층 내로 삽입되거나, 또는 염색체 밖에서 유지될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 분자 및/또는 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 폴리펩티드를 발현하기 위한 숙주 세포는 본 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예컨대 *E. coli* 세포, 효모 세포, 무척추동물 세포, CHO 세포, CHO-K1 세포, Hela 세포, COS-1 원숭이 세포, Bowes 세포와 같은 흑색종 세포, Swiss, Balb-c 또는 NIH 마우스로부터 유래되는 마우스 L-929 세포, 3T3 세포주, BHK 또는 Hak 햄스터 세포주 등과 같은 원핵생물 세포 및 진핵생물 세포를 포함한다.

[0080] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명에 개시된 바와 같이 본 발명의 (숙주) 세포를 배양하는 단계 및 그 배양물로부터 상기 생물학적 활성 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 본 발명의 생물학적 활성 단백질을 제조하기 위한 방법을 포함한다. 랜덤 코일 도메인을 포함하는 본 발명의 생물학적 활성 단백질은 재조합 DNA 기술에 의해, 예컨대 본 발명의 생물학적 활성 단백질을 코딩하는 개시된 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 세포를 배양하는 단계 및 그 배양물로부터 상기 생물학적 활성 단백질을 분리하는 단계에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 생물학적 활성 단백질은 원핵생물 세포, 예컨대 *E. coli* BL21 또는 JM83, 또는 진핵생물 세포, 예컨대 *Pichia pastoris* 효모 스트레인(strain) X-33 또는 CHO 세포를 포함하는 임의의 적합한 세포 배양 시스템에서 제조될 수 있다. 본 기술분야에 알려진 다른 적합한 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)와 같은 세포주 기탁기관으로부터 얻을 수 있다. "원핵생물"이란 용어는 박테리아 세포를 포함하는 것을 의미하는 반면, "진핵생물"이란 용어는 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유동물 세포를 포함하는 것을 의미한다. 전달감염된 숙주는 발효기에서 자랄 수 있고, 최적의 세포 성장을 얻기 위하여 본 기술분야에 알려진 기술들에 따라 배양될 수 있다. 추가 구현예에서, 본 발명은 생물학적 활성 단백질을 발현시기에 적합한 조건 하에 본 발명의 세포를 배양하는 단계 및 상기 세포 또는 배양 배지로부터 생물학적 활성 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 전술한 생물학적 활성 단백질을 제조하기 위한 공정에 관한 것이다.

[0082] 본 발명의 생물학적 활성 단백질은 성장 배지, 세포 용해물(lysate) 또는 세포막 분획으로부터 분리될 수 있다. 발현된 본 발명의 폴리펩티드의 분리 및 정제는 암모늄 설페이트 침전, 친화 칼럼, 칼럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 임의의 전통적인 수단(Scopes (1982), "Protein Purification", Springer-Verlag, N. Y.)에 의해 수행될 수 있으며, 예컨대 본 발명의 생물학적 활성 단백질과 융합된 태그에 대한 단일클론 또는 폴리클론 항체의 이용을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 단백질은 첨부된 실시예에 개시되어 있는 바와 같이 스트렙타비딘 친화 크로마토그래피(Skerra (2000) Methods Enzymol 326:271-304)를 이용한 Strep-tag II를 통해 정제될 수 있다. 약학적인 용도의 경우에는 적어도 약 90 내지 95%의 균질도를 갖는 실질적으로 정제된 폴리펩티드가 바람직하고, 98 내지 99% 이상의 균질도가 가장 바람직하다. 제조 절차에서 도입되는 숙주에 따라, 본 발명의 폴리펩티드는 글리코실화되거나, 또는 글리코실화되지 않을 수 있다.

[0083] 추가로, 본 발명은 약제를 제조하기 위한 본 발명의 생물학적 활성 단백질, 본 발명의 핵산 분자, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 (숙주) 세포의 용도에 관한 것으로서, 상기 생물학적 활성 단백질은 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 갖는다.

[0084] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 개시된 바와 같은 생물학적 활성 단백질을 이러한 치료를 필요로 하는 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 상기 생물학적 활성 단백질의 증가된 안정성의 이점을 갖는 질병 및/또는 질환을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 단백질의 생물학적 활성에 의존하여, 당업자는 어느 질병/질환이 본 발명의 특정한 생물학적 활성 단백질로 치료되어야 하는지를 즉시 결정할 수 있다. 일부 비

제한적인 예가 아래 표에 나열되어 있다.

표 1

[0085]

생물학적 활성 단백질 (또는 그의 생물학적 활성 절편)	치료되는 질환/질병
과립구 콜로니 자극 인자	압 및/또는 화학치료 관련 호중성구감소증(neutropenia)
인간 성장 호르몬	성장 호르몬 결핍 관련 저혈당증(hypoglycaemia) 및/또는 성장 부전(growth failure)
알파-인터페론	압, 바이러스 감염, C형 간염
베타-인터페론	자가면역 질병, 다발성 경화증
감마-인터페론	바이러스 감염
종양 괴사 인자	압
에리트로포이에틴	빈혈
응고 인자 VIII	혈우병
gp120/gp160	HIV
용해성 종양 괴사 인자 I 및 II 수용체	염증성 질병
레테플라제	혈전증, 심근경색증
엑센딘(exendin)-4	당뇨병
인터루킨-1 수용체 길항제(IL-1ra; anakinra)	자가면역 질병, 류마티스성 관절염
인터루킨-2	압
인슐린	당뇨
아스파라기나제(asparaginase)	급성 림프구성 백혈병, 비-호지킨 림프종
온코나제(onconase)	악성 종괴종 및 다른 유형의 압
스트렙토키나제(streptokinase)	혈전성 질환
호중성구 켈라티나제-연관 리포칼린	미생물 감염, 신장 재관류 손상
단일 도메인 항체, 단일 사슬 및 CDR 유사 펩티드 및 CDR을 포함하는 다른 가공된 절편을 포함하는 항체 및 그의 절편	면역학적, 종양학적, 신생혈관성 및 감염성 질병 등

[0086]

본 발명은 또한 핵산 분자, 벡터뿐만 아니라 본 발명의 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 전달감염된 세포를, 예컨대 세포 기반의 유전자 치료 접근법 또는 핵산 기반의 유전자 치료 접근법과 같은 의학적 접근법에 사용하는 용도에 관한 것이다.

[0087]

추가 구현예에서, 본 발명에서 정의된 본 발명의 "제1" 및 "제2" 도메인(및 본 발명의 핵산 분자 또는 벡터 또는 숙주 세포)을 포함하는 본 발명의 생물학적 활성 단백질은 조성물의 일부이다. 상기 조성물은 하나 이상의 본 발명의 생물학적 활성 단백질 또는 이를 코딩 및/또는 발현하는 핵산 분자, 벡터 또는 숙주 세포를 포함할 수 있다.

[0088]

상기 조성물은 선택적으로는 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 추가로 포함하는 약학적 조성물일 수 있다. 추가 구현예에서, 본 발명은 이러한 약학적 조성물의 섭취를 필요로 하는 질병을 예방, 치료 또는 개선하기 위한 약학적 조성물을 제조하기 위한 본 발명에서 개시된 생물학적 활성 단백질의 용도에 관한 것이다.

[0089]

추가 구현예에서, 본 발명에 개시된 바와 같은 조성물은 선택적으로는 적합한 검출 수단을 추가로 포함하는 진단 조성물일 수 있으며, 상기 진단 조성물은 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 갖는다.

[0090]

본 발명의 조성물은 고체 또는 액체 형태일 수 있으며, 특히 분말(들), 정제(들), 용액(들) 또는 에어로졸(들)의 형태일 수 있다. 아울러, 본 발명의 약제는 약학적 조성물의 원하는 용도에 따라 생물학적 활성 체제를 추가로 포함할 수도 있는 것으로 예측된다.

[0091]

적합한 (약학적) 조성물의 투여는, 예컨대 비경구, 피하, 복강내, 국소, 기관지내, 폐내 및 비강내 투여 및 필요시 국소 치료, 병소내(intralesional) 투여와 같은 상이한 방식으로 수행될 수 있다. 비경구 투여는 복강내, 근육내, 진피내, 피하, 정맥내 또는 동맥내 투여를 포함한다. 또한, 본 발명의 조성물은, 예컨대 특수한 효과 기관과 같은 외부 또는 내부 표적 부위에 대한 바이오리스틱 운반(biolytic delivery)에 의해 표적 부위에 직접 투여될 수 있다.

[0092]

적합한 약학적 담체, 부형제 및/또는 희석제의 예는 본 기술분야에 잘 알려져 있으며, 포스페이트 버퍼 식염수

(phosphate buffered saline) 용액, 물, 오일/물 에멀션(emulsion)과 같은 에멀션, 다양한 유형의 습윤제, 멸균 용액 등을 포함한다. 이러한 담체를 포함하는 조성물은 잘 알려진 전통적인 방법에 의해 제형화될 수 있다. 적합한 담체는 본 발명의 생물학적 활성 단백질과 조합될 때 생물학적 활성 단백질의 생물학적 활성을 유지하는 임의의 물질을 포함할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed 참조). 비경구 투여용 제제물은 멸균된 수용액 또는 비수용액, 현탁액(suspension) 및 에멀션을 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물의 문맥에서 도입되는 것과 같은 상기 버퍼, 용매 및/또는 부형제는 상기에서 정의된 바와 같은 "생리화학적" 것이 바람직하다. 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일 및 에틸 올레이트와 같은 주사용 유기 에스테르이다. 수성 담체는 식염수 및 버퍼 미디어(media)를 포함하는 물, 알코올성/수성 용액, 에멀션 또는 현탁액을 포함한다. 비경구용 비히클(vehicle)은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로오스, 텍스트로오스 및 염화나트륨, 젖산화된 링거 또는 고정된 오일을 포함할 수 있다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충물, 전해질 보충물(링거 텍스트로오스 기반의 것 등) 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 항균제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스 등을 포함하는 보존제 및 다른 첨가제 또한 존재할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 예컨대 바람직하게는 인간 기원의 혈청 알부민 또는 면역글로불린과 같은 단백질성 담체를 포함할 수 있다.

[0093] 이들 약학적 조성물은 적합한 도스(dose)로 대상에게 투여될 수 있다. 투약 계획(dosage regimen)은 담당 내과의 및 임상적 인자에 의해 결정될 것이다. 의학 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 임의의 한 환자에 대한 투약은 환자의 크기, 체표면적, 연령, 투여되는 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강 및 함께 투여되는 다른 약물을 포함하는 많은 인자에 의존한다. 약학적 활성 물질은 도스 당 1 μ g 내지 20 mg/kg 체중 사이, 예컨대 0.1 mg 내지 10 mg/kg 체중 사이, 예컨대 0.5 mg 내지 5 mg/kg 체중 사이의 양으로 존재할 수 있다. 상기 계획이 연속적인 주입이라면, 분당 체중 1 kg 당 1 μ g 내지 10 mg의 범위여야 한다. 그러나, 특히 전술한 인자들을 고려하면, 표시된 예시적인 범위 이하 또는 이상의 도스 또한 예측된다.

[0094] 아울러, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 원하는 용도에 따라 생물학적 활성 제제를 추가로 포함할 수 있는 것으로 예측된다. 이들 추가적인 생물학적 활성 제제는 예컨대 항체, 항체 절편, 호르몬, 성장 인자, 효소, 결합 분자, 사이토카인, 케모카인, 핵산 분자 및 약물일 수 있다.

[0095] 본 발명은 약학적 조성물에 한정되지 않음을 주목해야 한다. 또한, 연구 또는 진단에 사용되는 조성물도 예측된다. 예를 들면, 본 발명에서 정의된 바와 같은 랜덤 코일 도메인을 포함하는 생물학적 활성 단백질은 진단 세팅에 사용되는 것이 예측된다. 이러한 목적의 경우, 본 발명에서 정의된 "제1" 및 "제2" 도메인을 포함하는 본 발명의 생물학적 활성 단백질은 검출가능하게 표지될 수 있다. 이러한 표지는 방사능 표지(예컨대, [3 H]수소, [125 I]요오드 또는 [123 I]요오드), 형광 표지(초록 형광 단백질(GFP)과 같은 형광 단백질 또는 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC)와 같은 플루오로포어(fluorophore)를 포함하지만 이에 한정되지는 않음) 또는 NMR 표지(예컨대, 가돌리늄(gadolinium) 킬레이트)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 정의된 표지 또는 마커는 전혀 한정되는 것이 아니며, 단순히 예시적인 예를 나타낸다. 본 발명의 진단 조성물은 실험을 추적하거나 진단 의학의 세팅에 특히 유용하다.

[0096] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명에서 개시된 바와 같은 생물학적 활성 단백질, 상기 생물학적 활성 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터 또는 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 세포를 포함하는 키트를 제공한다. 유익하게는, 본 발명의 키트는 선택적으로 버퍼(들), 보관 용액 및/또는 의학적, 과학적 또는 진단적 분석 및 목적을 수행하기 위해 필요한 잔여 시약 또는 물질을 추가로 포함한다. 아울러, 본 발명의 키트의 일부는 바이알(vial) 또는 병 내에, 또는 용기 또는 멀티용기 단위와 조합되어 개별 포장될 수 있다.

[0097] 본 발명의 키트는 특히 본 발명의 방법을 수행하기 위하여 유익하게 사용될 수 있으며, 예컨대 진단 키트, 연구 도구 또는 의학적 도구와 같이 본 발명에서 언급된 다양한 적용분야에 도입될 수 있다. 아울러, 본 발명의 키트는 과학적, 의학적 및/또는 진단적 목적에 적합한 검출 수단을 함유할 수 있다. 상기 키트의 제조는 본 기술 분야의 당업자에게 알려진 표준 절차를 따르는 것이 바람직하다.

[0098] 이제 본 발명을 하기 비제한적 도면 및 실시예를 이용하여 설명한다.

도면의 간단한 설명

[0100] 도 1은 Pro-Ala-Ser#1(PAS#1; 서열번호 18), Pro-Ala-Ser#2(PAS#2; 서열번호 20), Pro-Ala-Ser#3(PAS#3; 서열번호 22), Pro-Ala-Ser#5(PAS#5; 서열번호 26), Pro-Ala-Ser#1P2(PAS#1P2; 서열번호 28) 및 Ser-Ala(piSA; 서

열번호 2) 폴리머 서열에 대한 유전자 디자인을 나타낸다.

(A) *Eco*0109I 및 *Sap*I 제한 부위와 상용성인 2개의 점착성 말단(소문자)을 갖는 2개의 상보적 올리고데옥시뉴클레오타이드를 교잡함으로써 얻어지는 PAS#1(각각 서열번호 29 및 서열번호 30)에 대한 빌딩 블록의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열.

(B) *Eco*0109I 및 *Sap*I 제한 부위와 상용성인 2개의 점착성 말단(소문자)을 갖는 2개의 상보적 올리고데옥시뉴클레오타이드를 교잡함으로써 얻어지는 PAS#2(각각 서열번호 31 및 서열번호 32)에 대한 빌딩 블록의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열.

(C) *Eco*0109I 및 *Sap*I 제한 부위와 상용성인 2개의 점착성 말단(소문자)을 갖는 2개의 상보적 올리고데옥시뉴클레오타이드를 교잡함으로써 얻어지는 PAS#3(각각 서열번호 33 및 서열번호 34)에 대한 빌딩 블록의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열.

(D) *Eco*0109I 및 *Sap*I 제한 부위와 상용성인 2개의 점착성 말단(소문자)을 갖는 2개의 상보적 올리고데옥시뉴클레오타이드를 교잡함으로써 얻어지는 PAS#5(각각 서열번호 35 및 서열번호 36)에 대한 빌딩 블록의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열.

(E) *Eco*0109I 및 *Sap*I 제한 부위와 상용성인 2개의 점착성 말단(소문자)을 갖는 2개의 상보적 올리고데옥시뉴클레오타이드를 교잡함으로써 얻어지는 PAS#1P2(각각 서열번호 39 및 서열번호 40)에 대한 빌딩 블록의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열.

(F) *Eco*0109I 및 *Sap*I 제한 부위와 상용성인 2개의 점착성 말단(소문자)을 갖는 2개의 상보적 올리고데옥시뉴클레오타이드를 교잡함으로써 얻어지는 piSA(각각 서열번호 37 및 서열번호 38)에 대한 빌딩 블록의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열.

도 2는 IFNa2b 및 IL-1ra에 대한 융합물로서의 Pro-Ala-Ser 폴리머 서열에 대한 클로닝 전략을 나타낸다.

(A) 폴리머 서열(서열번호 55)을 서브클로닝하기 위해 사용되는 pASK75의 유도체인 pASK-2x*Sap*I의 뉴클레오타이드 서열 스트레치. 상기 뉴클레오타이드 서열은 역방향으로 상보적인 2개의 *Sap*I 제한 부위를 코딩하며, 소화(digest)시 도 1에 나타난 합성 유전자 카세트와 상용성인 말단(막대(bar)로 나타냄)을 돌출하도록 한다. 인식 서열은 밑줄로 나타낸다.

(B) pASK-2x*Sap*I 플라스미드 내로 삽입된 후 200개 잔기를 갖고, pPAS(#1)200으로 되는 PAS#1 폴리머의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열(각각 서열번호 41 및 서열번호 42). 폴리머 서열에 인접한(flanked) 상기 *Sap*I 제한 부위가 표시되어 있다(인식 서열은 밑줄로 나타냄).

(C) pASK-IBA4(IBA GmbH, Göttingen) 상에 클로닝된 후 IFNa2b의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열(각각 서열번호 43 및 서열번호 44). 융합 단백질의 클로닝을 위해 사용된 *Kas*I 및 *Hind*III 단일 제한 부위뿐만 아니라 상기 폴리머 서열의 삽입을 위한 *Sap*I 단일 제한 부위도 표시되어 있다(인식 부위는 밑줄로 나타냄). *Strep*-tag II의 2개의 C-말단 아미노산은 밑줄로 나타나 있다. 성숙한 IFNa2b의 첫 번째 아미노산은 +1로 표시되어 있다.

(D) PAS#1 폴리머 서열의 삽입 후 IFNa2b의 N-말단 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열(각각 서열번호 45 및 서열번호 46). *Kas*I, *Hind*III 및 *Sap*I 단일 제한 부위가 표시되어 있다(인식 서열은 밑줄로 나타냄). 융합 단백질의 일부인 IFNa2b의 첫 번째 아미노산은 (1)로 표시되어 있고, *Strep*-tag II의 2개의 C-말단 아미노산은 밑줄로 나타나 있다.

(E) pASK-IBA4(IBA GmbH, Göttingen) 상에 클로닝된 후 IL-1ra의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열(각각 서열번호 47 및 서열번호 48). 융합 단백질의 클로닝을 위해 사용된 *Kas*I 및 *Hind*III 단일 제한 부위뿐만 아니라 상기 폴리머 서열의 삽입을 위한 *Sap*I 단일 제한 부위도 표시되어 있다(인식 부위는 밑줄로 나타냄). *Strep*-tag II의 2개의 C-말단 아미노산은 밑줄로 나타나 있다. 성숙한 IL-1ra의 첫 번째 아미노산은 +1로 표시되어 있다.

(F) PAS#1 폴리머 서열의 삽입 후 IL-1ra의 N-말단 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열(각각 서열번호 49 및 서열번호 50). *Kas*I, *Hind*III 및 *Sap*I 단일 제한 부위가 표시되어 있다(인식 서열은 밑줄로 나타냄). 융합 단백질의 일부인 IL1ra의 첫 번째 아미노산은 (1)로 표시되어 있고, *Strep*-tag II의 2개의 C-말단 아미노산은 밑줄로 나타나 있다.

(G) pPAS(#1)200-IFNa2b의 플라스미드 지도. PAS(#1)200-IFNa2b에 대한 구조 유전자(박테리아 OmpA 신호 펩티드, *Strep*-tag II, 200개 잔기, 즉 도 1A에 나타난 서열의 10개 반복 카피를 갖는 PAS#1 폴리머인 PAS(#1)200, 및 인간 IFNa2b를 포함함)는 테트라사이클린 프로모터/오퍼레이터($ter^{p/o}$)의 전사 조절 하에 있으며, 리포프로틴 터미네이터(t_{lpp})에서 종결된다. 상기 플라스미드 백본, 즉 *Xba*I 및 *Hind*III 제한 부위에 인접한 발현 카세트의 외부는 일반적인 클로닝 및 발현 벡터인 pASK75(Skerra (1994) Gene 151:131-135)와 동일하다. 단일 제한 부위가 표시되어 있다. PAS(#1)400-IFNa2b 및 PAS(#1)600-IFNa2b에 대한 발현 벡터는 PAS(#1)200 대신에 400 또는 600개 잔기, 즉 도 1A에 나타난 서열의 20 또는 30개 반복 카피를 갖는 PAS#1 폴리머가 코딩되는 것을 제외하고는 동일하다. 유사하게, PAS(#2)200-IFNa2b 및 PAS(#3)200-IFNa2b에 대한 발현 벡터는 200개, 즉 각각 도 1B 및 도 1C에 나타난 서열의 10개 반복 카피를 갖는 PAS#2 또는 PAS#3 폴리머를 운반한다. 유사하게, PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b에 대한 발현 벡터는 192개 또는 384개 잔기, 즉 도 1D에 나타난 서열의 8개 또는 16개 반복 카피를 갖는 PAS#5 폴리머를 운반한다. 유사하게, PAS(#1P2)140-IFNa2b에 대한 발현 벡터는 140개 잔기, 즉 도 1E에 나타난 서열의 7개 반복 카피를 갖는 PAS#1P2 폴리머를 운반한다. PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra 및 PAS(#5)384-IL1ra에 대한 발현 벡터는 IFNa2b 대신에 IL-1ra에 대한 코딩 유전자를 운반하는 것을 제외하고는 IFNa2b에 대한 해당 벡터와 유사하다.

도 3은 인간 호중성구 젤라티나제-연관 리포칼린인 NGAL에 대한 융합물로서의 도 1에 따른 Pro-Ala-Ser 및 Ser-Ala 폴리머 서열에 대한 클로닝 전략을 나타낸다.

(A) pASK75 유도체인 pNGAL15(Breustedt (2006) Biochim Biophys Acta 1794:161-173) 상에 클로닝된 *Strep*-tag II(아미노산 서열은 이탤릭체로 나타냄)를 운반하는 NGAL 변이체(variant)의 C-말단(밑줄)의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열(각각 서열번호 51 및 서열번호 52). *Eco*O109I 제한 부위가 양쪽 코딩 영역의 접합부에 도입되었으며, 소화시 합성 유전자 카세트와 상용성인 말단(막대로 나타냄)을 돌출하도록 하여 pNGAL15-*Eco*를 생성한다. 발현 카세트의 3'-말단의 구별된 *Hind*III 제한 부위가 표시되어 있다(인식 서열은 밑줄로 나타냄).

(B) PAS#1 폴리머 서열과 이후 *Strep*-tag II(이탤릭)을 삽입한 후 NGAL의 C-말단의 뉴클레오타이드 및 코딩된 아미노산 서열(각각 서열번호 53 및 서열번호 54). 발현 카세트의 3'-말단의 구별된 *Hind*III 제한 부위가 표시되어 있다(인식 서열은 밑줄로 나타냄).

(C) pNGAL-PAS(#1)200의 플라스미드 지도. NGAL-1PAS(#1)200에 대한 구조 유전자(OmpA 신호 펩티드, 변형된 NGAL 및 200개 잔기를 갖는 PAS#1인 PAS(#1)200뿐만 아니라 *Strep*-tag II를 포함함)는 테트라사이클린 프로모터/오퍼레이터($ter^{p/o}$)의 전사 조절 하에 있으며, 리포프로틴 터미네이터(t_{lpp})에서 종결된다. 상기 플라스미드 백본, 즉 *Xba*I 및 *Hind*III 제한 부위에 인접한 발현 카세트의 외부는 일반적인 클로닝 및 발현 벡터인 pASK75(Skerra (1994) Gene 151:131-135)와 동일하다. 단일 제한 부위가 표시되어 있다. NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-piSA100에 대한 발현 벡터는 단지 100개 잔기를 갖는 도 1에 따른 PAS#1 또는 piSA 폴리머가 코딩되는 것을 제외하고는 동일하다.

도 4는 정제된 재조합 IFNa2b, IL-1ra 및 NGAL 및 그 폴리머 융합물의 SDS-PAGE 및 그 이후의 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250 염색에 의한 분석이다. 상기 재조합 단백질은 페리플라즘(periplasm) 분비를 통해 *E. coli* BL21에서 제조되었고, 스트렙타비딘 친화 크로마토그래피를 이용한 *Strep*-tag II에 의해 정제되었다.

(A) 10% SDS-PAGE에 의한 정제된 재조합 IFNa2b 및 각각 200, 400 또는 600개 잔기를 갖는 그의 PAS#1 융합물의 분석. 상기 겔은 각각의 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b 및 PAS(#1)600-IFNa2b 단백질의 2 μ g 샘플을 보여준다. 왼쪽 샘플은 2-메르캅토에탄올로 환원된 반면, 해당 오른쪽 샘플은 환원되지 않은 채로 남겨 두었다. 단백질 마커의 크기(kDa)(환원 조건 하에 적용됨)는 왼쪽에 나타나 있다. 4가지 단백질 모두 환원된 상태에서 각각 약 20 kDa, 약 80 kDa, 약 170 kDa 및 약 300 kDa의 외관상(apparent) 분자 크기를 갖는 단일한 균일 밴드로 나타난다. 상기 값은 37.4 kDa의 PAS(#1)200-IFNa2b 및 54.0 kDa의 PAS(#1)400-IFNa2b의 계산된 질량보다 현저하게 큰 것이다. 이러한 효과는 상이한 길이를 갖는 Pro-Ala-Ser 폴리머로 인한 것이 명백한데, 그 이유는 20.9 kDa의 계산된 질량을 갖는 IFNa2b 자체는 보통의 전기영동성 이동을 나타내기 때문이다. 환원되지 않은 상태의 IFNa2b는 2개의 분자내 이황화물 브릿지(bridge)의 결과인 보다 조밀한 형태로 인하여 약간 높은 전기영동성 이동을 갖는다.

(B) 10% SDS-PAGE에 의한 정제된 재조합 PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b의 분석. 상기 겔은 각각의

단백질의 2 μ g 샘플을 보여준다. 왼쪽 샘플은 2-메르캅토에탄올로 환원된 반면, 해당 오른쪽 샘플은 환원되지 않은 채로 남겨 두었다. 단백질 마커의 크기(kDa)(환원 조건 하에 적용됨)는 왼쪽에 나타나 있다. 2가지 단백질은 환원된 및 환원되지 않은 형태 모두 각각 약 75 kDa 및 약 120 kDa의 외관상 분자 크기를 갖는 단일한 균일 밴드로 나타난다. 이는 36.7 kDa의 PAS(#5)192-IFNa2b 및 52.6 kDa의 PAS(#5)384-IFNa2b의 계산된 질량보다 현저하게 큰 것이다. 이러한 효과는 역시 상이한 길이를 갖는 Pro-Ala-Ser 폴리머로 인한 것이다.

(C) 12% SDS-PAGE에 의한 정제된 재조합 PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b, PAS(#1P2)140-IFNa2b 및 IFNa2b의 분석. 상기 겔은 2-메르캅토에탄올로 환원된 각각의 단백질의 2 μ g 샘플을 보여준다. 단백질 마커의 크기(kDa)는 왼쪽에 나타나 있다. 6가지 단백질은 각각 약 75 kDa(PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b), 70 kDa(PAS(#5)192-IFNa2b), 40 kDa(PAS(#1P2)140-IFNa2b) 및 약 20 kDa(IFNa2b)의 외관상 분자 크기를 갖는 단일한 균일 밴드로 나타난다. 따라서, 상기 폴리머 융합물은 37.4 kDa의 PAS(#1)200-IFNa2b, 37.4 kDa의 PAS(#2)200-IFNa2b, 38.6 kDa의 PAS(#3)200-IFNa2b, 36.7 kDa의 PAS(#5)192-IFNa2b 및 31.7 kDa의 PAS(#1P2)140-IFNa2b의 계산된 질량보다 현저하게 큰 크기를 보여준다. 이러한 효과는 역시 상이한 길이를 갖는 Pro-Ala-Ser 폴리머로 인한 것이다.

(D) 12% SDS-PAGE에 의한 정제된 재조합 IL-1ra 및 각각 200, 400 또는 192 및 384개 잔기를 갖는 그의 PAS#1 및 PAS#5 융합물의 분석. 상기 겔은 2-메르캅토에탄올로 환원된 각각의 IL-1ra, PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra 및 PAS(#5)384-IL1ra 단백질의 2 μ g 샘플을 보여준다. 단백질 마커의 크기(kDa)는 왼쪽에 나타나 있다. 5가지 단백질 각각 약 20 kDa, 약 70 kDa, 약 140 kDa, 66 kDa 및 약 125 kDa의 외관상 분자 크기를 갖는 단일한 균일 밴드로 나타난다. 상기 폴리머 융합물의 경우, 이들 값은 35.3 kDa의 PAS(#1)200-IL1ra, 51.9 kDa의 PAS(#1)400-IL1ra, 34.6 kDa의 PAS(#5)192-IL1ra 및 50.5 kDa의 PAS(#5)384-IL1ra의 계산된 질량보다 현저하게 큰 것이다. 이러한 효과는 상이한 길이를 갖는 Pro-Ala-Ser 폴리머로 인한 것이 명백한데, 그 이유는 19.8 kDa의 계산된 질량을 갖는 IL-1ra 자체는 보통의 전기영동성 이동을 나타내기 때문이다.

(E) 12% SDS-PAGE에 의한 정제된 재조합 NGAL 및 각각 100 또는 200개 잔기를 갖는 그의 PAS#1 폴리머 융합물의 분석. 상기 겔은 각각의 NGAL, NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200 단백질의 4 μ g 샘플을 보여준다. 왼쪽 샘플은 2-메르캅토에탄올로 환원된 반면, 해당 오른쪽 샘플은 환원되지 않은 채로 남겨 두었다. 단백질 마커의 크기(kDa)(환원 조건 하에 적용됨)는 왼쪽에 나타나 있다. NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200은 환원된 및 환원되지 않은 상태 모두에서 각각 약 45 kDa 및 약 60 kDa의 외관상 분자 크기를 갖는 단일한 균일 밴드로 나타난다. 이는 29.8 kDa의 NGAL-PAS(#1)100 및 38.1 kDa의 NGAL-PAS(#1)200의 계산된 질량보다 현저하게 큰 것이다. 이러한 효과는 상이한 길이를 갖는 Pro-Ala-Ser 폴리머로 인한 것인데, 그 이유는 21.5 kDa의 계산된 질량을 갖는 NGAL 자체는 보통의 전기영동성 이동을 나타내기 때문이다.

도 5는 정제된 재조합 IFNa2b, IL-1ra, NGAL 뿐만 아니라 그 폴리머 융합물의 수력학적 부피의 정량 분석이다.

(A) IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b 및 PAS(#1)600-IFNa2b의 분석적 겔 투과 크로마토그래피. 0.25 mg/ml 농도의 각각의 단백질 250 μ l를 포스페이트 버퍼 식염수인 PBS로 평형화된 Superdex S200 10/300 GL 칼럼에 적용하였다. 280 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 각각의 크로마토그래피 구동(run)의 피크는 1의 값으로 표준화하였다. 화살표는 칼럼의 배제 부피(exclusion volume)(8.0 ml)를 나타낸다.

(B) PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b의 분석적 겔 투과 크로마토그래피. 0.25 mg/ml 농도의 단백질 250 μ l를 PBS 버퍼로 평형화된 Superdex S200 10/300 GL 칼럼에 적용하였다. 280 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 각각의 크로마토그래피 구동의 피크는 1의 값으로 표준화하였다. 화살표는 칼럼의 배제 부피(8.0 ml)를 나타낸다.

(C) Superdex S200 10/300 GL을 이용한 (A) 및 (B)로부터의 크로마토그램에 대한 눈금 커브(calibration curve). 마커 단백질(RNase A, 13.7 kDa; 카보닉 안하이드라제(carbonic anhydrase), 29.0 kDa; 오보알부민(ovalbumin), 43.0 kDa; 소 혈청 알부민, 66.3 kDa; 트랜스페린, 81.0 kDa; 알코올 디하이드로게나제, 150 kDa)의 분자량(MW)의 로그값을 그 용출 부피(검은색 동그라미)에 대해 좌표로 나타내었고, 직선으로 일치시켰다. IFNa2b 및 그 융합 단백질(검은색 네모)의 관찰된 용출 부피로부터, 그 외관상 분자량은 다음과 같이 결정되었다: IFNa2b: 22.5 kDa(계산값: 20.9 kDa); PAS(#1)200-IFNa2b: 176 kDa(계산값: 37.4 kDa); PAS(#1)400-IFNa2b: 346 kDa(계산값: 54.0 kDa); PAS(#1)600-IFNa2b: 522 kDa(계산값: 70.5 kDa); PAS(#5)192-IFNa2b: 162 kDa(계산값: 36.7 kDa); PAS(#5)384-IFNa2b: 280 kDa(계산값: 52.6 kDa).

(D) PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b 및 PAS(#1P2)140-IFNa2b의 분석적 겔 투과 크로마토그래피. 0.25 mg/ml 농도의 각각의 단백질 250 μ l를 포스페이트 버퍼 식염수인 PBS로 평형화된 Superdex S200 10/300 GL 칼럼에 적용하였다. 280 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 각각의 크로마토그래피 구동의 피크는 1의 값으로 표준화하였다. 화살표는 칼럼의 배제 부피($V_0=8.0$ ml)를 나타낸다.

(E) Superdex S200 10/300 GL을 이용한 (D)로부터의 크로마토그램에 대한 눈금 커브. 마커 단백질(RNase A, 13.7 kDa; 카보닉 안하이드라제, 29.0 kDa; 오브알부민, 43.0 kDa; 소 혈청 알부민, 66.3 kDa; 트랜스페린, 81.0 kDa; 알코올 디하이드로게나제, 150 kDa)의 분자량(MW)의 로그값을 그 용출 부피(검은색 동그라미)에 대해 좌표로 나타내었고, 직선으로 일치시켰다. IFNa2b 및 그 용합 단백질(검은색 네모)의 관찰된 용출 부피로부터, 그 외관상 분자 크기는 다음과 같이 결정되었다: PAS(#2)200-IFNa2b: 168 kDa(계산값: 37.4 kDa); PAS(#3)200-IFNa2b: 146 kDa(계산값: 38.6 kDa); PAS(#1P2)140-IFNa2b: 66.4 kDa(계산값: 31.7 kDa).

(F) IL-1ra, PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra 및 PAS(#5)384-IL1ra의 분석적 겔 투과 크로마토그래피. 0.25 mg/ml 농도의 각각의 단백질 250 μ l를 포스페이트 버퍼 식염수인 PBS로 평형화된 Superdex S200 10/300 GL 칼럼에 적용하였다. 280 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 각각의 크로마토그래피 구동의 피크는 1의 값으로 표준화하였다. 화살표는 칼럼의 배제 부피를 나타낸다. 보다 명확하게 하기 위하여, 피크만 나타나 있다.

(G) Superdex S200 10/300 GL을 이용한 (F)로부터의 크로마토그램에 대한 눈금 커브. 마커 단백질(RNase A, 13.7 kDa; 카보닉 안하이드라제, 29.0 kDa; 오브알부민, 43.0 kDa; 소 혈청 알부민, 66.3 kDa; 트랜스페린, 81.0 kDa; 알코올 디하이드로게나제, 150 kDa)의 분자량(MW)의 로그값을 그 용출 부피(검은색 동그라미)에 대해 좌표로 나타내었고, 직선으로 일치시켰다. IL-1ra 및 그 용합 단백질(검은색 네모)의 관찰된 용출 부피로부터, 그 외관상 분자 크기는 다음과 같이 결정되었다: IL-1ra: 19.8 kDa(계산값: 18.8 kDa); PAS(#1)200-IL1ra: 161 kDa(계산값: 35.3 kDa); PAS(#1)400-IL1ra: 336 kDa(계산값: 51.9 kDa); PAS(#5)192-IL1ra: 148 kDa(계산값: 34.6 kDa); PAS(#5)384-IL1ra: 305 kDa(계산값: 50.5 kDa).

(H) NGAL, NGAL-PAS(#1)100, NGAL-PAS(#1)200 및 NGAL-piSA100의 분석적 겔 투과 크로마토그래피. 0.25 mg/ml 농도의 각각의 단백질 250 μ l를 PBS 버퍼로 평형화된 Superdex S75 10/300 GL(NGAL 및 NGAL-piSA100) 또는 Superdex S200 10/300 GL(NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200) 칼럼 중 하나에 적용하였다. 280 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 각각의 크로마토그래피 구동의 피크는 1의 값으로 표준화하였다. 화살표는 칼럼의 배제 부피(각각 7.5 ml 및 8.2 ml)를 나타낸다.

(I) Superdex S75 10/300 GL 및 Superdex S200 10/300 GL을 이용한 (H)로부터의 크로마토그램에 대한 눈금 커브. 마커 단백질(SuperdexS75 10/300 GL: 아프로티닌(apritinin), 6.5 kDa; 리보뉴클레아제(ribonuclease), 13.7 kDa; 미오글로빈(myoglobin), 17.6 kDa; 카보닉 안하이드라제, 29.0 kDa; 오브알부민, 43.0 kDa; 소 혈청 알부민, 66.3 kDa; 트랜스페린, 81.0 kDa; Superdex S200 10/300 GL: 시토크롬 c, 12.4 kDa, 카보닉 안하이드라제, 29.0 kDa; 오브알부민, 43.0 kDa; 소 혈청 알부민, 66.3 kDa; 트랜스페린, 81.0 kDa, 알코올 디하이드로게나제, 150 kDa)의 분자량(MW)의 로그값을 그 용출 부피(검은색 동그라미)에 대해 좌표로 나타내었고, 직선으로 일치시켰다. NGAL 및 그 용합 단백질(검은색 네모)의 관찰된 용출 부피로부터, 그 외관상 분자량은 다음과 같이 결정되었다: NGAL: 21.5 kDa(계산값: 21.5 kDa); NGAL-PAS(#1)100: 72.6 kDa(계산값: 29.8 kDa); NGAL-PAS(#1)200: 106.4 kDa(계산값: 38.1 kDa); NGAL-piSA100: 54 kDa(계산값: 29.4 kDa).

도 6은 원편광이색성(CD) 분광법에 의한 정제된 재조합 IFNa2b, IL-1ra, NGAL 뿐만 아니라 그 폴리머 용합물의 실험적 2차 구조 분석이다. 각각의 단백질에 대하여, 스펙트럼은 50 mM K_2SO_4 , 20 mM K-포스페이트 pH 7.5에서 실온에서 기록하였고, 몰 타원율(molar ellipticity)인 Θ_m 으로 표준화하였다.

(A) 정제된 재조합 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b 및 PAS(#1)600-IFNa2b의 원편광이색성(CD) 스펙트럼. IFNa2b에 대한 CD 스펙트럼은 208 nm 및 220 nm 부근에서 2개의 음의 최대값을 갖는 두드러진(predominant) α -헬릭스 단백질의 전형적인 특성을 보여주며(Sreerama in: Circular Dichroism - Principles and Applications (2000) Berova, Nakanishi and Woody (Eds.) Wiley, New York: 601-620), 이는 박테리아에서 제조된 인간 IFNa2b가 올바르게 접혀 있음을 나타낸다. Pro-Ala-Ser 폴리머를 갖는 그 용합 단백질의 스펙트럼은 205 nm 부근에서 두드러진 음의 최소값을 갖는 특징적인 편차(deviation)를 보여주는데, 이는 랜덤 코일 구조를 명확하게 나타내는 것이다. 아울러, 220 nm 부근에 어깨부(shoulder)가 있는데, 이것은 IFNa2b의 α -헬릭스로부터 기여(contribution)되는 결과로, 용합 단백질의 일부로서도 역시 IFNa2b가 올바르게 접혀 있음을 나

타낸다.

(B) 대응하는 융합 단백질의 스펙트럼으로부터 IFNa2b에 대한 스펙트럼을 뺀으로써 얻어진 PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b 및 PAS(#1)600-IFNa2b에 대한 몰 차이(molar difference) CD 스펙트럼. 200, 400 및 600개 잔기를 갖는 PAS#1 폴리머에 대한 상기 차이 CD 스펙트럼은 모두 200 nm 부근에서 강력한 것으로 나타났는데, 이는 상기 버퍼 수용액에서 그 랜덤 코일 구조를 명확하게 나타내는 것이다(Greenfield (1969) *Biochemistry* 8: 4108-4116; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fandrich (2002) *EMBO J* 21:5682-5690).

(C) IFNa2b 하나와 함께 정제된 재조합 PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b 및 PAS(#1P2)140-IFNa2b의 원형광이색성(CD) 스펙트럼. 상기 폴리머 융합 단백질의 스펙트럼은 랜덤 코일 구조를 나타내는 205 nm 부근의 두드러진 음의 최소값 및 올바르게 접혀진 IFNa2b로부터 기여되는 결과인 220 nm 부근의 어깨부를 나타낸다.

(D) IFNa2b에 대한 스펙트럼을 뺀 후 PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b 및 PAS(#1P2)140-IFNa2b에 대한 몰 차이 CD 스펙트럼. 각각 200개 잔기를 갖는 PAS#2 및 PAS#3 폴리머 및 140개 잔기를 갖는 PAS#1P2 폴리머에 대한 상기 차이 CD 스펙트럼은 200 nm 부근에서 현저한 최소값을 보여주는데, 이는 랜덤 코일 구조를 명확하게 나타내는 것이다(Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fandrich (2002) *loc. cit.*).

(E) 정제된 재조합 PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b의 원형광이색성(CD) 스펙트럼. 이들 2가지 융합 단백질의 스펙트럼은 랜덤 코일 구조를 나타내는 205 nm 부근의 두드러진 음의 최소값 및 접혀진 IFNa2b로부터 기여되는 결과인 220 nm 부근의 어깨부를 나타낸다.

(F) IFNa2b에 대한 스펙트럼을 뺀 후 PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b에 대한 몰 차이 CD 스펙트럼. 192개 및 384개 잔기를 갖는 PAS#5 폴리머에 대한 상기 차이 CD 스펙트럼은 200 nm 부근에서 강력한 최소값을 보여주는데, 이는 랜덤 코일 구조를 명확하게 나타내는 것이다(Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fandrich (2002) *loc. cit.*).

(G) 정제된 재조합 IL-1ra, PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra 및 PAS(#5)384-IL1ra의 원형광이색성(CD) 스펙트럼. 상기 4가지 융합 단백질의 스펙트럼은 200 nm 부근에서 두드러진 음의 최소값을 보여주는데, 이는 랜덤 코일 구조를 나타내는 것이다.

(H) IL-1ra에 대한 스펙트럼을 뺀 후 PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra 및 PAS(#5)384-IL1ra에 대한 몰 차이 CD 스펙트럼. 각각 200개 또는 400개 및 192개 또는 384개 잔기를 갖는 PAS#1 및 PAS#5 폴리머 모두에 대한 상기 차이 CD 스펙트럼은 200 nm 부근에서 강력한 최소값을 보여주는데, 이는 랜덤 코일 구조를 명확하게 나타내는 것이다(Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fandrich (2002) *loc. cit.*).

(I) 정제된 재조합 NGAL, NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200의 CD 스펙트럼. NGAL에 대한 DC 스펙트럼은 212 nm 부근에서 음의 최대값을 갖는 두드러진 β -시트 단백질의 전형적인 특성을 갖는다(Sreerama (2000) *loc. cit.*). 200 nm 이하에 양의 밴드가 없는 것은 마우스 동족체(ortholog)인 24p3m1 CD 스펙트럼과 일치하는 것이다(Chu (1998) *J Pept Res* 52:390-397). 함께 고려할 때, 이들 데이터는 박테리아에서 제조된 인간 NGAL 단백질이 올바르게 접혀 있음을 지지한다. 상기 2가지 융합 단백질의 스펙트럼은 랜덤 코일 구조를 나타내는 195 nm 부근의 두드러진 음의 최소값 및 200 nm에서 음의 최소값을 갖는 NGAL로부터 기여되는 결과인 200 nm 부근의 어깨부를 갖는 특징적인 편차를 보여준다. 후자의 관찰은 Pro-Ala-Ser 폴리머와 융합될 때 NGAL 단백질이 올바르게 접혀 있음을 나타낸다.

(J) NGAL에 대한 스펙트럼을 뺀 후 NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200에 대한 몰 차이 CD 스펙트럼. 100개 및 200개 잔기를 갖는 PAS#1 폴리머에 대한 상기 차이 CD 스펙트럼은 200 nm 부근에서 강력한 최소값을 보여주는데, 이는 랜덤 코일 구조를 명확하게 나타내는 것이다(Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fandrich (2002) *loc. cit.*).

(K) 정제된 재조합 NGAL-piSA100의 CD 스펙트럼 및 NGAL에 대한 스펙트럼을 뺀 후의 그 몰 차이 CD 스펙트럼. NGAL-piSA100에 대한 CD 스펙트럼 및 piSA100 폴리머에 대한 차이 CD 스펙트럼 모두 218 nm 부근의 음의 최대값 및 200 nm 이하의 양의 최대값을 갖는 두드러진 β -시트 단백질의 전형적인 특성을 갖는다(Sreerama (2000) *loc. cit.*). 따라서, 상기 차이 스펙트럼은 폴리머 융합 파트너에 기여할 수 있는 랜덤 코일 구조에 의해 명확하게 두드러지는 필적하는 길이를 갖는 Pro-Ala-Ser 폴리머의 경우와 명확하게 상이하다.

도 7은 PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#5)192-IFNa2b의 혈청 안정성 검사이다.

37°C, 83% v/v 마우스 혈장(Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA)에서 48시간까지 0.17 mg/ml 농도의

융합 단백질을 배양함으로써 PAS(#1)200-IFNa2b(A) 및 PAS(#5)192-IFNa2b(B)의 혈청 안정성을 분석하였다. 지시된 시점에서 샘플($6\ \mu\text{l}$)을 취하고, $54\ \mu\text{l}$ SDS-PAGE 전기영동 버퍼 및 β -메르캅토에탄올을 함유하는 $15\ \mu\text{l}$ SDS-PAGE 로딩 버퍼로 희석하였다. $25\ \mu\text{l}$ 당량($0.33\ \mu\text{g}$)의 시험 단백질에 해당 및 레퍼런스(reference) 샘플($0.1\ \mu\text{g}$)을 12% SDS-PAGE에 적용하고, 니트로셀룰로오스 막 위에 블롯팅하였다. 재조합 단백질은 Strep-tag II를 인식하는 StrepTactin[®] 알칼라인 포스파타제 콘주게이트(IBA, Göttingen, Germany)로 배양함으로써 검출하였고, 크로모젠(chromogen) 반응을 통해 현상하였다.

양쪽 시험 단백질의 경우, 블롯은 모든 시점에 대해 일정한 강도의 신호를 나타냈다. 분해 산물은 검출되지 않았으며, 조사된 시간이 지남에 따라 시험 단백질의 농도를 떨어뜨리게 하는 단백질 응집의 표시는 없었다.

도 8은 정제된 재조합 IFNa2b 및 200 또는 400개 잔기를 갖는 그의 PAS#1 폴리머 융합물의 약동학이다.

약 $25\ \text{g}$ 의 체중을 갖는 BALB/c 마우스에 $1\ \text{mM}$ EDTA를 함유하는 PBS 내에서 $1\ \text{mg/ml}$ 농도를 갖는 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 또는 PAS(#1)400-IFNa2b 단백질을 어느 하나를 약 $125\ \mu\text{l}$ 주사하여 체중(b.w.) $1\ \text{kg}$ 당 $5\ \text{mg}$ 의 시험 단백질 도스를 달성하였다. 지시된 바와 같이 혈액 샘플을 취하였다. 제거된(cleared) 혈장 샘플 당량을 PBS로 1:5로 희석하였다. $10\ \mu\text{l}$ 의 희석된 샘플($1\ \mu\text{l}$ 혈장에 해당)의 당량을 12% SDS-PAGE에 적용하고, 니트로셀룰로오스 막 위에 블롯팅하였다. 마우스 항-인간 IFNa2b 항체 9D3(Abcam, Cambridge, UK)으로 배양한 후 항-마우스 IgG 알칼라인 포스파타제 콘주게이트(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)로 배양함으로써 재조합 단백질을 검출하였고, 크로모젠 반응으로 현상하였다.

가장 왼쪽 레인(M)은 레퍼런스로 정제된 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b의 혼합물(각각 $0.1\ \mu\text{g}$, 즉 혈장 샘플에서 $t=0$ 일 경우에 예측되는 양)을 보여준다. 다른 레인은 지시된 시점에서 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b에 대한 혈장 샘플을 보여준다.

상기 블롯은 가장 이른 시점, 즉 30분 후에 모든 3가지 단백질 샘플에 대해 가장 높은 신호를 나타내는데, 이는 IFNa2b가 이미 신속하게 분열된다는 것을 보여주며, 2시간 후에는 더 이상 검출되지 않는다. 반대로, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b는 6시간까지 검출가능하고, 200개 잔기 융합물에 비해 400개 잔기 융합물의 경우에 유지(retention)가 확실히 더 강한데, 이는 융합되지 않은 IFNa2b 단백질과 비교할 때 현저하게 연장된 순환을 나타내는 것이다. 주목할 것은, 이들 단백질 샘플의 경우 단백질분해성 분해를 보이지 않았다는 것이다. 따라서, 관심있는 IFNa2b 단백질뿐만 아니라 그 폴리머 융합물 모이어티(moiety)도 높은 혈청 안정성을 나타낸다.

도 9는 정제된 재조합 IFNa2b 및 200 및 400개 잔기를 갖는 그의 PAS#1 폴리머 융합물 약동학의 정량 분석이다.

샌드위치 ELISA를 이용하여 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 또는 PAS(#1)400-IFNa2b 농도에 대하여 도 8에서 조사된 바와 같은 동일한 동물로부터 혈장 샘플을 정량적으로 분석하였다. 따라서, 미세적정 플레이트의 웰(well)을 포획 항체인 항-인간 IFNa 항체 9D3(Abcam, Cambridge, UK)으로 코팅하였고, 동물 그룹 A(IFNa2b 주사), 그룹 B(PAS(#1)200-IFNa2b) 및 그룹 C(PAS(#1)400-IFNa2b 주사) 유래 혈장 혈액의 순차적인 희석물을 적용하였다. 결합된 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b를 상기 포획 항체의 상이한 에피토프를 인식하는 2차 항-인간 IFNa2b 항체 HRP 콘주게이트(4E10-HRP; Abcam, Cambridge, UK)를 이용하고, 크로모젠 반응에 의해 검출하였다. 알려진 농도에서 도입된 동일한 정제된 재조합 단백질을 이용하여 준비된 표준 커브와 비교함으로써 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b의 농도를 정량하였다. IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b의 혈장 반감기를 추정하기 위하여, 얻어진 농도 값을 정맥 주사 후 시간에 대해 좌표로 나타내었고, 수치적으로 일치시켜 단일-지수 분열(mono-exponential decay)을 추측하였다.

그 결과, 융합되지 않은 IFNa2b 단백질은 $5.5 \pm 1 \times 10^{-5}$ 분의 반감기로 매우 빠른 제거를 나타내었다. 반대로, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b에 대해 측정된 제거 상(phase)은 각각 61.7 ± 5.4 분 및 약 6 ± 6 시간의 반감기로 현저하게 지체되었고, 따라서 상기 융합되지 않은 IFNa2b와 비교할 때, 200개 및 400개 잔기의 Pro-Ala-Ser 폴리머 융합으로 인하여 각각 10배 및 60배 이상의 연장된 순환을 보여주었다.

도 10은 각각 200개, 400개, 600개 잔기를 갖는 정제된 재조합 IFNa2b PAS#1 폴리머 융합물 및 192개 및 384개 잔기를 갖는 PAS#5 폴리머 융합물 약동학의 정량분석이다.

약 $18\ \text{g}$ 의 체중을 갖는 C57BL/6 마우스에 $1\ \text{mM}$ EDTA를 함유하는 PBS 내에서 $1\ \text{mg/ml}$ 농도를 갖는 PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b, PAS(#1)600-IFNa2b, PAS(#5)-IFNa2b 또는 PAS(#5)384-IFNa2b 단백질 중 어느 하나를 약 $125\ \mu\text{l}$ 주사하여 체중(b.w.) $1\ \text{kg}$ 당 $7\ \text{mg}$ 의 시험 단백질 도스를 달성하였다. 30분, 240분, 360분 및

480분 후 혈액 샘플을 취하였다. 샌드위치 ELISA를 이용하여 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 또는 PAS(#1)400-IFNa2b에 대해 혈장 샘플을 정량 분석하였다. PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b, PAS(#1)600-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b의 혈장 반감기를 추정하기 위하여, 얻어진 농도 값을 정맥 주사 후 시간에 대해 좌표로 나타내었고, 수치적으로 일치시켜 단일-지수 분열을 추측하였다.

그 결과, PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b 및 PAS(#1)600-IFNa2b에 대해 측정된 제거 상은 각각 66.2 ± 5.6 분, 316.1 ± 76.8 분 및 약 406.8 ± 60 분의 반감기로 현저하게 지체되었고, 따라서 상기 융합되지 않은 IFNa2b (도 9)와 비교할 때, 200개, 400개 및 600개 잔기의 Pro-Ala-Ser 폴리머 융합으로 인하여 각각 10배, 60배 및 70배 이상의 연장된 순환을 보여주었다. 유사하게, PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b에 대해 측정된 제거 상은 각각 40.4 ± 5.6 분 및 약 321 ± 93.6 분의 반감기로 현저하게 지체되었고, 따라서 상기 융합되지 않은 IFNa2b(도 9)와 비교할 때, 192개 및 384개 잔기의 Pro-Ala-Ser 폴리머 융합으로 인하여 각각 7배 및 60배 이상의 연장된 순환을 보여주었다.

도 11은 정제된 재조합 NGAL 및 100개 또는 200개 잔기를 갖는 그의 PAS#1 폴리머 융합물의 약동학이다.

약 210 g의 체중을 갖는 암컷 위스터 랫트에 PBS 내에서 1 mg/ml 농도를 갖는 NGAL, NGAL-PAS(#1)100 또는 NGAL-PAS(#1)200 단백질 중 어느 하나를 약 1,050 μ l 주사하여 체중(b.w.) 1 kg 당 5 mg의 시험 단백질 도스를 달성하였다. 지시된 바와 같이 혈액 샘플을 취하였다. 제거된 혈장 샘플 당량을 PBS로 1:5로 희석하였다. 상기 3가지 상이한 단백질 중 어느 하나로 주사된 동물로부터 1.25 μ l의 희석된 샘플(0.25 μ l 혈장에 해당)의 3개의 당량을 혼합하고, 12% SDS-PAGE에 적용한 후, 니트로셀룰로오스 막 위에 블롯팅하였다. *Strep-tag II*를 인식하는 StrepTactin[®] 알칼라인 포스파타제 콘주게이트(IBA, Gottingen, Germany)로 배양함으로써 재조합 단백질을 검출하였고, 크로모젠 반응으로 현상하였다.

도 11A 및 도 11B는 그룹 A(NGAL 주사), 그룹 B(NGAL-PAS(#1)100 주사) 및 그룹 C(NGAL-PAS(#1)200 주사) 유래 상이한 동물의 독립적인 혈장 샘플을 이용한 일련의 2회 실험을 나타낸다. 도 11A 및 도 11B에서 가장 왼쪽 레인은 분자 크기 표준(마커 크기는 왼쪽에 있음)을 보여주고, 이후의 레인은 지시된 시점에 NGAL, NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200을 함유하는 3가지 혈장 샘플의 혼합물을 보여주며, 가장 오른쪽 레인은 레퍼런스로 정제된 NGAL, NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200(각각 0.1 μ g)을 보여준다.

상기 블롯은 가장 이른 시점, 즉 5분 후에 모든 3가지 단백질 샘플에 대해 가장 높은 신호를 나타내고, NGAL은 신속하게 분열되며, 30분 후에는 더 이상 검출되지 않는다. 반대로, NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200은 모두 더 긴 기간동안 검출가능하고, 100개 잔기 융합물에 비해 200개 잔기 융합물의 경우에 효과가 약간 더 강한데, 이는 융합되지 않은 NGAL 단백질과 비교할 때 현저하게 연장된 순환을 나타내는 것이다. 주목할 것은, 이들 단백질 샘플의 경우 단백질분해성 분해를 보이지 않았다는 것이다. 따라서, 관심있는 NGAL 단백질뿐만 아니라 그 폴리머 융합물 모이어티도 높은 혈청 안정성을 나타낸다. 마지막으로, 어떤 동물도 급성 독성이나 염증 증상을 보이지 않았는데, 이는 본 발명에 따른 융합 단백질의 높은 내성을 나타내는 것이다.

도 12는 정제된 재조합 NGAL 및 200개 잔기를 갖는 그의 PAS#1 폴리머 융합물 약동학의 정량 분석이다.

샌드위치 ELISA를 이용하여 NGAL 또는 NGAL-PAS(#1)200 농도에 대하여 도 11A에서 조사된 바와 같은 동일한 동물로부터 혈장 샘플을 정량적으로 분석하였다. 따라서, 미세적정 플레이트의 웰을 포획 항체인 항-인간 리포칼린-2/NGAL 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN)로 코팅하였고, 동물 그룹 A(NGAL 주사) 또는 그룹 C(NGAL-PAS(#1)200 주사) 동물 유래 혈장 혈액의 순차적인 희석물을 적용하였다. 결합된 NGAL 및 NGAL-PAS(#1)200을 *Strep-tag II*를 인식하는 StrepTactin[®] 알칼라인 포스파타제 콘주게이트를 이용하고, 크로모젠 반응에 의해 검출하였다. 알려진 농도에서 도입된 동일한 정제된 재조합 단백질을 이용하여 준비된 표준 커브와 비교함으로써 NGAL 및 NGAL-PAS(#1)200의 농도를 정량하였다. NGAL 및 NGAL-PAS(#1)200의 혈장 반감기를 추정하기 위하여, 실험 농도 값을 정맥 주사 후 시간에 대해 좌표로 나타내었고, 수치적으로 일치시켜 단일-지수 분열을 추측하였으며, 보다 명확하게 하기 위하여 360분까지의 데이터 값만을 나타내었다.

융합되지 않은 NGAL 단백질은 3.1 ± 0.2 분의 반감기를 갖는 매우 빠른 제거를 나타내었다. 상대적 스케일링(allometric scaling)(Mahmood (2005) Interspecies Pharmacokinetic Scaling: Principles and Application of Allometric Scaling. Pine House Publishers, Rockville, Maryland) 원리에 따르면, 상기 값은 인간에서 천연 NGAL의 모노머 형태에 대해 개시된 10분의 반감기와 일치하는데(Axelsson (1995) Scand J Clin Lab Invest 55:577-588), 이는 상기 특정한 단백질에 구별될 수 있는 세포성 섭취 메커니즘을 나타낸다. 최근, 저밀도 리포단백질 수용체의 일원인 메갈린(megalin)이 신장 상피 세포에서 NGAL에 대한 수용체로 작용하고, 그 섭취를

매개할 수 있음이 알려져 있다(Hvidberg (2005) FEBS Lett 579:773-777).

반면, NGAL-PAS(#1)200에 대해 측정된 제거 상은 현저하게 느렸고, 최종 반감기는 30.9 ± 1.3 분이었으며, 따라서 상기 융합되지 않은 NGAL과 비교할 때, 200개 잔기의 Pro-Ala-Ser 폴리머 융합으로 인하여 10배의 연장된 순환을 보여주었다. 혈장 반감기에 대한 상기 지체 효과는, NGAL의 경우에 명확한 바와 같이, 특정 제거 메커니즘을 겪는 관심있는 단백질에 대해 보다 더 두드러질 수 있다.

도 13은 IP-10 ELISA에 의한 시판되는 IntronA(Schering, Kenilworth, NJ), 재조합 PAS(#1)200-IFNa2b 및 재조합 Fab 절편(음성대조군으로 작용함)의 비교 활성 분석이다. 2×10^5 인간 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)를 상이한 농도에서 PAS(#1)200-IFNa2b와 유사하게 준비된 IntronA, PAS(#1)200-IFNa2b 또는 Fab 절편으로 배양하였다. IntronA의 비활성(specific activity)은 제조사의 데이터 시트에 따르면 2.6×10^8 U/mg이었다. 유도된 IP-10 단백질은 인간 IP-10 ELISA Set(BD OptEIA™, BD Biosciences Pharmingen, USA)에 의해 정량하였다. IntronA 및 PAS(#1)200-IFNa2b는 유사한 효과를 갖고서 농도-의존적 방식으로 IP-10의 방출을 유도한다. 미자극 PBMC 뿐만 아니라 Fab 절편으로 처리된 PBMC는 현저한 IP-10 생산을 전혀 보이지 않았다.

도 14는 초우-파스만 방법(Chou and Fasman (1974) Biochemistry 13:222-245)에 따른 Pro-Ala-Ser 및 Ser-Ala 폴리머 서열의 2차 구조의 이론적 예측이다. 본 설명은 버지니아 대학의 서열 비교 및 2차 구조(Sequence Comparison and Secondary Structure) 예측 서버(URL: http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2)에서 이 행된 바와 같은 CHOFAS 컴퓨터 알고리즘의 결과를 보여준다. 아미노 및 카복시 말단에서의 경계 효과를 피하기 위하여, 도 1에 따른 각각의 아미노산 서열 블록을 3회 반복 카피로 붙이고, 가운데 블록(박스)에 대한 결과만을 고려하였다. piSA 폴리머 서열(서열번호 56)의 경우, Chou-Fasman 알고리즘은 20개 잔기 중 20개, 즉 100%에 대해 α -헬릭스 2차 구조를 예측한다. 이는 융합 단백질의 일부로서 상기 폴리머 서열에 대해 실험적으로 관찰된 두드러진 β -시트 구조(도 6 참조)와 명확하게 대조된다. PAS#1 폴리머 서열(서열번호 57)의 경우, Chou-Fasman 알고리즘은 20개 잔기 중 12개, 즉 60%에 대해 α -헬릭스 2차 구조를 예측한다. 이는 융합 단백질의 일부로서 상기 폴리머 서열에 대해 실험적으로 관찰된 두드러진 랜덤 코일 구조(도 6 참조)와 명확하게 대조된다. PAS#5 폴리머 서열(서열번호 58)의 경우, Chou-Fasman 알고리즘은 24개 잔기 중 20개, 즉 83.3%에 대해 α -헬릭스 2차 구조를 예측한다. 이는 역시 융합 단백질의 일부로서 상기 폴리머 서열에 대해 실험적으로 관찰된 두드러진 랜덤 코일 구조(도 6 참조)와 명확하게 대조된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0101] 본 발명은 본 발명의 더 나은 이해와 많은 이점을 제공하는 하기 예시적인 비제한적 실시예를 통해 추가로 설명된다.
- [0102] 달리 나타내지 않는 한, 예를 들면 Sambrook, Russel "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001)에 개시되어 있는 것과 같은 확립된 재조합 유전자 기술 방법이 사용되었다.
- [0103] 하기 실시예는 본 발명을 설명한다.
- [0105] **실시예 1: Pro-Ala-Ser 및 Ser-Ala 아미노산 폴리머에 대한 유전자 합성**
- [0106] 상기에서 개시된 바와 같이, Pro, Ala 및 Ser 잔기로 이루어진 아미노산 반복체는 본 발명에서 "PAS"(종래에는 "APS"로도 알려져 있음)로 나타낸다. 서로 상용성이지만 비-팔린드롬성(non-palindromic) 점착성 말단을 갖는 이점을 갖는 간접 방식으로 콘캐테머(concatamer) 형성을 이용하여 도 1A 내지 도 1F에 나타난 2개의 상보적 올리고데옥시뉴클레오타이드를 교잡 및 결찰시킴으로써, Pro, Ala 및 Ser 잔기(서열번호 18에 해당하는 PAS#1, 서열번호 20에 해당하는 PAS#2, 서열번호 22에 해당하는 PAS#3, 서열번호 26에 해당하는 PAS#5 및 서열번호 28에 해당하는 PAS#1P2) 또는 Ser 및 Ala(서열번호 2에 해당하는 piSA)로 이루어진 반복적 폴리머 서열을 코딩하는 유전자 절편을 얻었다. 올리고데옥시뉴클레오타이드는 IBA(Göttingen, Germany)으로부터 구입하였으며, 예비적인 우레아 폴리악릴아미드 겔 전기영동에 의해 정제하였다. 서열번호 30, 32, 34, 36, 38 및 40에 개시된 아미노산 서열은 각각 알라닌을 추가로 포함하는 서열번호 18, 20, 22, 26, 2 및 28의 클로닝 버전을 나타낸다. 마찬가지로, 서열번호 29, 31, 33, 35, 37 및 39에 개시된 핵산 서열(서열번호 30, 32, 34, 36, 38 및 40에 나타난 아미노산을 코딩함)은 점착성 말단을 통해 결찰될 때 제거되는 알라닌에 대한 cgg 코돈을 추가로 포함한다. 100 μ l의 50 mM Tris/HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP에서 200 pmol의 양쪽 올리고데옥시뉴클레오

티드를 혼합하고, 10 u 폴리뉴클레오티드 키나제(MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)의 존재 하에 37℃에서 30분간 배양함으로써 효소적 인산화를 수행하였다. 80℃에서 10분간 변성시킨 후, 상기 혼합물을 밤새 실온까지 냉각시켜 교잡을 달성하였다. 이후, 1 u T4 DNA 리가제(ligase)(MBI Fermentas) 및 10 μ l의 100 mM Tris/HCl pH 7.4, 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM ATP 및 어떤 경우에는 5 mM의 각각의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 총 부피 100 μ l로 첨가하고, 얼음 위에서 50분간 배양함으로써 상기 용액 50 μ l를 결합시켰다. 70℃에서 10분간 열 불활성화시킨 후, 결합된 생성물을 TAE 버퍼(40 mM Tris, 20 mM 아세트산, 1 mM EDTA)의 존재 하에 1%(w/v) 아가로스 겔 전기영동으로 분리하였다. 에티디움 브로마이드로 염색한 후, 300 bp(pISA), 420 bp(PAS#1P2), 576 bp(PAS#5) 및 600 bp(PAS#1, 2, 3) 길이의 조립된 유전자 세그먼트에 해당하는 밴드를 잘라내고, 페놀 추출에 의해 분리하였다.

[0108] **실시예 2: 인터페론 α -2b(IFNa2b)의 PAS#1, PAS#2, PAS#3, PAS#5 및 PAS#1P2 융합 단백질에 대한 발현 벡터의 제조**

[0109] 실시예 1로부터 PAS#1, PAS#2, PAS#3, PAS#1P2 및 PAS#5를 코딩하는 합성 유전자 절편의 클로닝을 위하여, 역방향 상보적으로 2개의 *SapI* 제한 부위를 갖는 뉴클레오티드 서열(도 2A)을 갖고 있는 pASK75(Skerra, A. (1994) Gene 151:131-135) 유도체인 pASK-2x*SapI*을 도입하였다. 상기 벡터를 *SapI*으로 절단하고, 새우 알칼라인 포스파타제(USB, Cleveland, OH)로 탈인산화시킨 후, 합성 DNA 절편과 결합시켰다(도 2B). 결과물인 중간체 플라스미드는 pPAS(#1)200, pPAS(#2)200, pPAS(#3)200, pPAS(#5)192 및 pPAS(#1P2)140으로 나타내었다.

[0110] *E. coli* XL1-Blue(Bullock (1987) Biotechniques 5:376-378)를 형질전환(transformation)시킨 후, 플라스미드를 준비하였고, 제한 분석 및 BigDye™ 터미네이트 키트와 양쪽 말단으로부터 시퀀싱할 수 있도록 하는 올리고데옥시뉴클레오티드 프라이머를 이용한 자동화된 이중-사슬 DNA 시퀀싱(ABI-Prism™310 Genetic Analyzer, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)에 의해 클로닝된 합성 핵산 삽입체(insert)의 서열을 확인하였다. 폴리머 서열 삽입체의 간단한 추가 서브클로닝을 할 수 있도록 하는 약 200개 잔기의 폴리머 서열을 갖는 결과물인 플라스미드를 중간체 벡터로 사용하였다.

[0111] IFNa2b에 대한 코딩 유전자는 프라이머로 올리고뉴클레오티드 5'-TCTGTGGGCGCC AGCTCTTCTGCCTGTGATCTGCCTCAAACCCAC(서열번호 59) 및 5'-GAACCA AAGCTTATCTCTACTCTTAAAC(서열번호 60)를 이용하여 해당 cDNA를 운반하는 플라스미드 IRAMP995M1713Q(RZPD, Berlin, Germany)로부터 증폭하였다. 제1 프라이머는 5'-말단에 *KasI* 제한 부위 및 이후에 *SapI* 제한 부위(밀줄)를 함유하며, 제2 프라이머는 *HindIII* 제한 부위(밀줄)를 함유한다. 증폭 산물을 정제하고, *KasI* 및 *HindIII*로 소화시킨 후, 이에 따라 절단된 벡터 pASK-IBA4(IBA, Gottingen, Germany)를 이용하여 결합시켰다. *E. coli* XL1-Blue를 형질전환시킨 후, 플라스미드를 준비하였고, 제한 분석 및 자동화된 이중-사슬 DNA 시퀀싱에 의해 클로닝된 합성 핵산 삽입체의 서열을 확인하였다. N-말단 *Strep-tag II* 융합물로서 IFNa2b를 코딩하는 플라스미드를 pASK-IFNa2b(도 2C)로 나타내었다.

[0112] PAS(#1)200, PAS(#1)400 및 PAS(#1)600과의 융합물로서 IFNa2b를 코딩하는 발현 플라스미드를 제조하기 위하여, pASK-IFNa2b를 *SapI*으로 절단하고, 새우 알칼라인 포스파타제로 탈인산화시킨 후, *SapI*으로 제한 소화시킴으로써 중간체 플라스미드 pPAS(#1)200으로부터 분리된 200개 잔기 폴리머에 대한 과량의 유전자 절편과 결합시켰다(도 2D). *E. coli* JM83(Yanisch-Perron (1985) Gene 33:103-119)을 형질전환시킨 후, 플라스미드를 준비하였고, 삽입체를 코딩하는 폴리머의 크기를 제한 분석에 의해 확인하였다. 200개, 400개 및 600개 잔기의 폴리머 서열을 운반하는 IFNa2b, 즉 PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b 및 PAS(#1)600-IFNa2b를 코딩하는 플라스미드를 각각 pASK-PAS(#1)200-IFNa2b(도 2G), pASK-PAS(#1)400-IFNa2b 및 pASK-PAS(#1)600-IFNa2b로 나타내었다. PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b, PAS(#1P2)140-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b를 코딩하는 플라스미드를 각각의 아미노산 폴리머 서열을 코딩하는 적절한 대응 유전자 카세트를 이용하여 유사한 방식으로 제조하였다.

[0114] **실시예 3: 인터루킨-1 수용체 길항제(IL-1ra)의 PAS#1 및 PAS#5 융합 단백질에 대한 발현 벡터의 제조**

[0115] IL-1ra에 대한 코딩 유전자(Carter (1990) Nature 344:633-638)는 프라이머로 올리고뉴클레오티드 5'-ACGATCGGCGCCAGCTCTTCTGCCCCACCCTCTGGGAGAAAATCC(서열번호 61) 및 5'-CTGGGCAAGCTTACTCGTCCTCTGGAAGTAG(서열번호 62)를 이용하여 상기 클로닝된 cDNA를 갖는 플라스미드 IRANp969G0350D6IL1RN(RZPD, Berlin, Germany)로부터 증폭하였다. 제1 프라이머는 5'-말단에 *KasI* 제한 부위 및 이후에 *SapI* 제한 부위(밀줄)를 함유하며, 제2 프라이머는 *HindIII* 제한 부위(밀줄)를 함유한다. 증폭 산물을 정제하고, *KasI* 및 *HindIII*로 소화시킨 후, 이에 따라 절단된 벡터 pASK-IBA4(IBA, Gottingen, Germany)를 이용하여 결합시켰다. *E. coli* XL1-Blue를 형질전환시킨 후, 플라스미드를 준비하였고, 제한 분석 및 자동화된 이중-사슬 DNA 시퀀싱에 의해 클로닝된 합성 핵산

삽입체의 서열을 확인하였다. N-말단 *Strep-tag II* 융합물로서 IL1ra를 코딩하는 플라스미드를 pASK-IL1ra(도 2E)로 나타내었다.

[0116] 아미노산 폴리머 서열 PAS(#1)200, PAS(#1)400, PAS(#5)192 및 PAS(#5)384와의 융합물로서 IL-1ra를 코딩하는 발현 플라스미드를 제조하기 위하여, pASK-IL1ra를 *SapI*으로 절단하고, 새우 알칼라인 포스파타제로 탈인산화시킨 후, *SapI*으로 제한 소화시킴으로써 해당 중간체 플라스미드 pPAS(#1)200 및 pPAS(#5)192로부터 단리된 각각 200개 잔기의 PAS#1 폴리머 또는 192개 잔기의 PAS#5 폴리머에 대한 과량의 유전자 절편과 결합시켰다(도 2F). *E. coli* JM83(Yanisch-Perron (1985) Gene 33:103-119)을 형질전환시킨 후, 플라스미드를 준비하였고, 하나 또는 몇 개의 반복 카피로 결합 과정에서 삽입된 폴리머-코딩 영역의 크기를 제한 분석에 의해 결정하였다. 200개 또는 400개 잔기의 PAS#1 폴리머 서열을 운반하는 IL-1ra, 즉 PAS(#1)200-IL1ra 또는 PAS(#1)400-IL1ra를 코딩하는 플라스미드 및 192개 또는 384개 잔기의 PAS#5 폴리머 서열, 즉 PAS(#5)192-IL1ra 또는 PAS(#5)384-IL1ra를 운반하는 플라스미드를 각각 pASK-PAS(#1)200-IL1ra, pASK-PAS(#1)400-IL1ra, pASK-PAS(#5)192-IL1ra 및 pASK-PAS(#5)384-IL1ra로 나타내었다.

[0118] **실시예 4: 호중구성 켈라티나제-연관 리포칼린(NGAL)의 PAS#1 및 piSA 융합 단백질에 대한 발현 벡터의 제조**

[0119] NGAL의 PAS#1 및 piSA 융합 단백질에 대한 발현 벡터를 제조하기 위하여, 실시예 1로부터 얻은 해당 합성 유전자 절편을, 그 중간에 *EcoO109I* 제한 부위를 운반하고(도 3A) C-말단 *Strep-tag II*(Skerra, (2000) Methods Enzymol 326:271-304)와 융합된 NGAL의 변이체(Breustedt (2006) loc. cit.)에 대한 cDNA를 갖고 있는 pASK75(Skerra, A. (1994) Gene 151:131-135) 유도체 상에 클로닝하였다. pNGAL15-Eco로 명명된 상기 벡터는 *EcoO109I*으로 절단하고, 새우 알칼라인 포스파타제(USB, Cleveland, OH)로 탈인산화시킨 후, PAS#1 또는 piSA를 코딩하는 합성 DNA 절편과 결합시켰다(도 3B).

[0120] *E. coli* XL1-Blue(Bullock (1987) Biotechniques 5:376-378)를 형질전환시킨 후, 플라스미드를 준비하였고, 제한 분석 및 BigDye™ 터미네이트 키트와 양쪽 말단으로부터 시퀀싱할 수 있도록 하는 올리고데옥시뉴클레오타이드 프라이머를 이용한 자동화된 이중-사슬 DNA 시퀀싱(ABI-Prism™310 Genetic analyzer)에 의해 클로닝된 합성 핵산 삽입체의 서열을 확인하였다. PAS(#1)100 및 PAS(#1)200 잔기의 폴리머 서열을 운반하는 NGAL, 즉 NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200을 코딩하는 플라스미드를 각각 pNGAL-PAS(#1)100 및 pNGAL-PAS(#1)200으로 명명하였다(도 3C). piSA100 잔기의 폴리머 서열을 운반하는 NGAL, 즉 NGAL-piSA100을 코딩하는 플라스미드는 pNGAL-piSA100으로 명명하였다.

[0122] **실시예 5: IFNa2b 및 유전공학적으로 코딩된 PAS#1, PAS#2, PAS#3, PAS#5 및 PAS#1P2 폴리머 사이의 융합 단백질의 박테리아 생산 및 정제**

[0123] 재조합 Fab 절편(Schiweck (1995) Proteins 23:561-565)의 생산에 대해 개시된 절차에 따라, 100 mg/ℓ 암피실린 및 30 mg/ℓ 클로람페니콜로 보충된 합성 글루코오스 미네랄 배지를 갖는 8 L 벤치 톱 발효기를 이용하여, 실시예 2의 해당 발현 플라스미드와 함께 접합 헬퍼 플라스미드 pTUM4(Schlapschy (2006) Protein Eng. Des. Sel. 20:273-284)를 갖고 있는 *E. coli* BL21(Novagen, Madison, USA; Wood (1966) J Mol Biol 16:118-133)에서 IFNa2b(계산된 질량: 20.9 kDa), PAS(#1)200-IFNa2b(계산된 질량: 37.4 kDa), PAS(#1)400-IFNa2b(계산된 질량: 54.0 kDa), PAS(#1)600-IFNa2b(계산된 질량: 70.5 kDa), PAS(#5)192-IFNa2b(계산된 질량: 36.7 kDa) 및 PAS(#5)384-IFNa2b(계산된 질량: 52.6 kDa)를 생산하였다. 배양물이 OD₅₅₀=20이 되자마자 500 μg/ℓ의 안하이드로테트라사이클린(Skerra (1994) Gene 151:131-135)을 첨가함으로써 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. 2.5시간의 유도 기간 후 원심분리로 세포를 수확하고, 10분 동안 얼음-냉각된 페리플라즈م 분획화 버퍼(500 mM 수크로오스, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl pH 8.0; 2 ml/ℓ 및 OD₅₅₀)에 재현탁시켰다. 15 mM EDTA 및 250 μg/ml 리소자임(lysozyme)을 첨가한 후, 세포 현탁액을 얼음 위에서 20분 동안 배양하고, 수차례 원심분리한 후, 재조합 단백질을 함유하는 제거된 상등액을 회수하였다. IFNa2b 변이체는 N-말단에 융합된 *Strep-tag II*(Skerra (2000) Methods Enzymol 326:271-304) 및 Superdex S75 또는 S200 HiLoad 16/60 칼럼(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 이용한 겔 여과를 통해 정제하였다.

[0124] 100 mg/ℓ 암피실린 및 30 mg/ℓ 클로람페니콜을 함유하는 2 L LB 배지를 갖는 셰이커 플라스크 배양기를 이용하여, 실시예 2의 해당 발현 플라스미드와 함께 접합 헬퍼 플라스미드 pTUM4를 갖고 있는 *E. coli* BL21에서 22℃에서 PAS(#2)200-IFNa2b(계산된 질량: 37.4 kDa), PAS(#3)200-IFNa2b(계산된 질량: 38.6 kDa) 및 PAS(#1P2)140-IFNa2b(계산된 질량: 31.7 kDa)를 생산하였다. 외래 유전자의 발현 유도는 OD₅₅₀=0.5에서 안하이드로테트라사이클린을 이용하여 밤새 수행하였다(전형적으로는 수확시 약 1.0의 OD₅₅₀이 됨). 50 μg/ml의 리소

자임을 함유하는 500 mM 수크로오스, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl pH 8.0의 존재 하에, 개시된 바와 같이 페리플라즈 추출을 수행한 후(Breustedt (2005) loc. cit.), 고염 버퍼(500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0)를 갖는 스트렙트아비딘 친화 크로마토그래피(Skerra (2000) loc. cit.)를 이용하여 *Strep-tag II*를 통해 정제하였다.

[0125] 모든 재조합 IFNa2b 단백질에 대해 균질한(homogeneous) 단백질 제조물을 얻었으며(도 4A/4B/4C), 수율은 IFNa2b의 경우 $0.15 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, PAS(#1)200-IFNa2b의 경우 $0.1 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, PAS(#1)400-IFNa2b의 경우 $0.06 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, PAS(#1)600-IFNa2b의 경우 $0.04 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, PAS(#2)200-IFNa2b의 경우 $0.05 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, PAS(#3)200-IFNa2b의 경우 $0.05 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, PAS(#5)192-IFNa2b의 경우 $0.08 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, PAS(#5)384-IFNa2b의 경우 $0.04 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$ 및 PAS(#1P2)140-IFNa2b의 경우 $0.05 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$ 였다.

[0126] 시험관내 활성 분석을 위하여, 상기 단백질 제조물에서의 내독소(endotoxin) 오염을 추가로 제거하였다. 따라서, 상기 정제된 단백질을 PBS(115 mM NaCl, 4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 pH 7.4)에 대해 3회 투석하고, 50 ml 수퍼루프(Amersham Biosciences)를 갖는 Akta Purifier 10 시스템을 이용하여 PBS를 구동 버퍼로 Q Sepharose FF 16/200 칼럼(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에 적용하였다. 재조합 단백질을 함유하는 용출물(flow through)을 수집하고, Amicon Ultra 원심분리 필터 장치(30000 MWC0; 15 ml; Millipore, Billerica, MA)를 이용한 초원심분리에 의해 약 1.5 mg/ml 로 농축하였다. PBS를 구동 버퍼로 이용하여 EndoTrap[®] 친화 칼럼(Profos AG, Regensburg, Germany)을 이용하여 내독소 제거 단계를 추가로 수행하였다. Endosafe PTS Kit(Charles River Laboratories, L'Arbresle, France)를 이용하여 측정할 때, 최종 내독소 함량은 1 mg/ml 의 단백질 농도에서 1 EU/ml 이하였다.

[0127] 높은 몰농도(molarity)의 Tris 버퍼 시스템(Fling and Gregerson (1986) Anal Biochem 155: 83-88)을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. IFNa2b 및 본 발명에 따른 그의 다양한 폴리머 융합물 모두에 대하여, 이들은 방향족 산(aromatic acid)이 없어서 UV 흡광도에 기여하지 않기 때문에, $23590 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 의 계산된 소화 계수(extinction coefficient)(Gill and von Hippel (1989) Anal Biochem 182:319-326)를 이용하여 280 nm에서의 흡광도에 따라 단백질 농도를 측정하였다.

[0129] **실시예 6: IL-1ra 및 유전공학적으로 코딩된 PAS#1 및 PAS#5 폴리머 사이의 융합 단백질의 박테리아 생산 및 정제**

[0130] $100 \text{ mg/}\ell$ 암피실린 및 $30 \text{ mg/}\ell$ 클로람페니콜을 함유하는 2 L LB 배지를 갖는 셰이커 플라스크 배양기를 이용하여, 실시예 3의 해당 발현 플라스미드와 함께 접합 헬퍼 플라스미드 pTUM4를 갖고 있는 *E. coli* BL21에서 IL-1ra(계산된 질량: 19.8 kDa), PAS(#1)200-IL1ra(계산된 질량: 35.3 kDa), PAS(#1)400-IL1ra(계산된 질량: 51.9 kDa), PAS(#5)192-IL1ra(계산된 질량: 34.6 kDa) 및 PAS(#5)384-IL1ra(계산된 질량: 50.5 kDa)를 22°C에서 생산하였다. 외래 유전자의 발현 유도는 $\text{OD}_{550}=0.5$ 에서 안하이드로테트라사이클린을 이용하여 밤새 수행하였다(전형적으로는 수확시 약 1.0의 OD_{550} 이 됨). $50 \mu\text{g/ml}$ 의 리소자임을 함유하는 500 mM 수크로오스, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl pH 8.0의 존재 하에, 개시된 바와 같이 페리플라즈 추출을 수행한 후(Breustedt (2005) loc. cit.), 고염 버퍼(500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0)를 갖는 스트렙트아비딘 친화 크로마토그래피(Skerra (2000) loc. cit.)를 이용하여 *Strep-tag II*를 통해 정제하였다.

[0131] 모든 재조합 IL-1ra 단백질에 대해 균질한(homogeneous) 단백질 제조물을 얻었으며(도 4D), 수율은 IL-1ra의 경우 $0.1 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, PAS(#1)200-IL1ra의 경우 $0.1 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, PAS(#1)400-IL1ra의 경우 $0.05 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, PAS(#5)192-IL1ra의 경우 $0.1 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$ 및 PAS(#5)384-IL1ra의 경우 $0.04 \text{ mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$ 였다.

[0133] **실시예 7: NGAL 및 유전공학적으로 코딩된 PAS#1 및 piSA 폴리머 사이의 융합 단백질의 박테리아 생산 및 정제**

[0134] 본질적으로 실시예 4에 개시된 바와 같은 8 L 벤치 톱 발효기를 이용하여, 발현 플라스미드 pNGAL15를 갖고 있는 *E. coli* BL21에서 NGAL(계산된 질량: 21.5 kDa)을 생산하였다. 상기 NGAL은 C-말단에 융합된 *Strep-tag II* (Skerra (2000) Methods Enzymol 326:271-304)를 통해 정제하였다.

[0135] $100 \text{ mg/}\ell$ 암피실린을 함유하는 2 L LB 배지를 갖는 셰이커 플라스크 배양기를 이용하여, 실시예 4의 해당 발현 플라스미드를 갖고 있는 *E. coli* BL21에서 22°C에서 NGAL-PAS(#1)100, NGAL-PAS(#1)200 및 NGAL-piSA100(계산

된 질량: 각각 29.8 kDa, 38.1 kDa 및 29.4 kDa)을 생산하였다. 외래 유전자의 발현 유도는 $OD_{550}=0.5$ 에서 안 하이드로테트라사이클린을 이용하여 밤새 수행하였다(전형적으로는 수확시 약 1.8의 OD_{550} 이 됨). 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 리소자임을 함유하는 500 mM 수크로오스, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl pH 8.0의 존재 하에, 개시된 바와 같이 페리플라زم 추출을 수행한 후(Breustedt (2005) J Biol Chem 280:484-493), 고염 버퍼(500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0)를 갖는 스트렙트아비딘 친화 크로마토그래피(Skerra (2000) loc. cit.)를 이용하여 *Strep-tag* II를 통해 정제하였다.

[0136] NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200에 대해 1단계 친화 크로마토그래피 후 균질한 단백질 제조물을 얻었으며 (도 4E), 수율은 NGAL의 경우 0.1 $\text{mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$, NGAL-PAS(#1)100의 경우 0.5 $\text{mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$ 및 NGAL-PAS(#1)200의 경우 0.8 $\text{mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$ 였다. Superdex S75 HR 10/300 GL 칼럼(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 이용하여 겔 여과를 통해 NGAL-piSA100을 추가로 정제하였으며, 수율은 0.01 $\text{mg } \ell^{-1} \text{OD}^{-1}$ 였다.

[0137] 암컷 위스터 랫트에서 생체내 PK 연구를 위하여, 내독소 오염을 추가로 제거하였다. 따라서, 상기 정제된 NGAL, NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200 단백질을 PBS에 대해 3회 투석하고, 50 ml 수퍼루프(Amersham Biosciences)를 갖는 Akta Purifier 10 시스템을 이용하여 PBS를 구동 버퍼로 Q Sepharose FF 16/200 칼럼(Amersham Biosciences)에 적용하였다. 제조합 단백질을 함유하는 용출물을 수집하고, Amicon Ultra 원심분리 필터 장치(10000 MWCO; 15 ml; Millipore, Billerica, MA)를 이용한 초원심분리에 의해 약 1.5 mg/ml 로 농축하였다. PBS를 구동 버퍼로 이용하여 EndoTrap[®] 친화 칼럼(Profos AG, Regensburg, Germany)을 이용하여 내독소 제거 단계를 추가로 수행하였다. Endosafe PTS Kit(Charles River Laboratories, L'Arbresle, France)를 이용하여 측정할 때, 최종 내독소 함량은 1 mg/ml 의 단백질 농도에서 5.17 및 21.9 EU/ml 사이였다.

[0139] **실시예 8: IFNa2b 및 상이한 길이의 유전공학적으로 코딩된 PAS#1, PAS#2, PAS#3, PAS#5 또는 PAS#1P2 폴리머 사이의 제조합 용합 단백질에 대한 분석적 겔 여과에 의한 수력학적 부피의 측정**

[0140] Akta Purifier 10 시스템(Amersham Bioscience)을 이용하여 PBS(115 mM NaCl, 4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 pH 7.4)를 구동 버퍼로 Superdex S200 HR 10/300 GL 칼럼(Amersham Biosciences)에서 1 ml/분의 유속으로 겔 투과 크로마토그래피를 수행하였다. 실시예 5에 개시된 바와 같은 *Strep-tag* II 친화 크로마토그래피의 결과물인 정제된 IFNa2b 및 200개, 400개 및 600개 잔기를 갖는 그의 PAS#1 폴리머 용합물, 또는 200개 잔기를 갖는 PAS#2 및 PAS#3 폴리머, 또는 192개 및 384개 잔기를 갖는 PAS#5 폴리머 용합물, 또는 140개 잔기를 갖는 PAS#1P2 폴리머 샘플 250 μl 를 개별적으로 PBS에서 0.25 mg/ml 의 농도로 적용하였다. 도 5A/5B/5D에 나타난 바와 같이, 6 가지 단백질 모두 하나의 균질한 피크로 용출되었다.

[0141] 도 5C/5E에 나타난 바와 같은 칼럼 눈금(calibration)을 위하여, 다음의 구형 단백질(Sigma, Dalsenhofen, Germany)의 혼합물 250 μl 를 PBS에서 적용하였다: RNase A(0.2 mg/ml), 카보닉 안하이드라제(0.2 mg/ml), 오브 알부민(0.5 mg/ml), 소 혈청 알부민(0.5 mg/ml), 트랜스페린(0.2 mg/ml) 및 알코올 디하이드로게나제(0.4 mg/ml).

[0142] 그 결과, 200개, 400개 및 600개 잔기를 갖는 PAS#1 폴리머 및 192개 및 384개 잔기를 갖는 PAS#5 폴리머와의 용합 단백질은 동일한 분자량을 갖는 해당 구형 단백질 보다 현저하게 큰 크기를 나타내었다. PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b 및 PAS(#1)600-IFNa2b에 대한 크기 증가는 용합되지 않은 IFNa2b 단백질과 비교하여 각각 8.4배, 16.5배 및 24.9배였다. 반면, 실제 질량은 단지 1.8배, 2.6배 및 3.4배만 더 컸다. PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b에 대한 크기 증가는 용합되지 않은 IFNa2b 단백질과 비교하여 각각 7.7배 및 13.3배였다. 이 경우, 실제 질량은 단지 1.8배 및 2.5배만 더 컸다.

[0143] 유사하게, 200개 잔기를 갖는 PAS#2 및 PAS#3 폴리머와의 용합 단백질은 동일한 분자량을 갖는 해당 구형 단백질 보다 현저하게 큰 크기를 나타내었다. PAS(#2)200-IFNa2b 및 PAS(#3)200-IFNa2b에 대한 크기 증가는 용합되지 않은 IFNa2b 단백질과 비교하여 각각 8배 및 7배였다. 반면, 실제 질량은 양쪽 모두 단지 1.8배만 더 컸다. 140개 잔기를 갖는 PAS#1P2 폴리머와의 용합 단백질 또한 동일한 분자량을 갖는 해당 구형 단백질 보다 더 큰 크기를 나타내었다. 그러나, PAS(#1P2)140-IFNa2b에 대한 크기 증가는 용합되지 않은 IFNa2b 단백질과 비교하여 단지 3배였고, 실제 질량은 단지 1.5배 더 컸다. 따라서, 프롤린 잔기의 수가 감소된(PAS(#1P2)140에서는 14개) PAS(#1P2)140-IFNa2b에 대한 크기 증가는 덜 두드러졌는데, 이는 아미노산 폴리머 서열의 랜덤 코일 특성에 대한 Pro 함량의 주된 영향을 보여주는 것이다.

- [0144] 일반적으로, 상기 관찰은 Pro-Ala-Ser 폴리머 서열이 랜덤 코일 구조를 형성하면 예측되는 것보다 훨씬 증가된 수력학적 부피 효과가 있음을 명확하게 나타낸다(Squire (1981) J Chromatogr A 210:433-442).
- [0146] **실시예 9: IL-1ra 및 상이한 길이의 유전공학적으로 코딩된 PAS#1 및 PAS#5 폴리머 사이의 재조합 융합 단백질에 대한 분석적 겔 여과에 의한 수력학적 부피의 측정**
- [0147] 실시예 8에 개시되어 있는 바와 같이 Akta Purifier 10 시스템(Amersham Bioscience)을 이용하여 1 ml/분의 유속으로 Superdex S200 HR 10/300 GL 칼럼(Amersham Biosciences)에서 겔 투과 크로마토그래피를 수행하였다. 도 5F에 나타난 바와 같이, 5가지 단백질 모두 하나의 균질한 피크로 용출되었다.
- [0148] 도 5G에 나타난 바와 같은 칼럼 눈금을 위하여, 다음의 구형 단백질(Sigma, Dalsenhofen, Germany)의 혼합물 250 μ l를 PBS에서 적용하였다: RNase A(0.2 mg/ml), 카보닉 안하이드라제(0.2 mg/ml), 오브알부민(0.5 mg/ml), 소 혈청 알부민(0.5 mg/ml), 트랜스페린(0.2 mg/ml) 및 알코올 디하이드로게나제(0.4 mg/ml).
- [0149] 그 결과, 200개 및 400개 잔기를 갖는 PAS#1 폴리머 및 192개 및 384개 잔기를 갖는 PAS#5 폴리머와의 융합 단백질은 동일한 분자량을 갖는 해당 구형 단백질 보다 현저하게 큰 크기를 나타내었다. PAS(#1)200-IL1ra 및 PAS(#1)400-IL1ra에 대한 크기 증가는 융합되지 않은 IL-1ra 단백질과 비교하여 각각 8배 및 17배였다. 반면, 실제 질량은 단지 1.8배 및 2.6배 더 컸다. PAS(#5)192-IL1ra 및 PAS(#5)384-IL1ra에 대한 크기 증가는 융합되지 않은 IL-1ra 단백질과 비교하여 각각 7배 및 15배였다. 이 경우, 실제 질량은 단지 1.7배 및 2.5배만 더 컸다.
- [0150] 다시, 상기 관찰은 Pro-Ala-Ser 폴리머 서열이 랜덤 코일 구조를 형성하면 예측되는 것보다 훨씬 증가된 수력학적 부피 효과가 있음을 명확하게 나타낸다(Squire (1981) loc. cit.).
- [0152] **실시예 10: NGAL 및 상이한 길이의 유전공학적으로 코딩된 PAS#1 및 piSA 폴리머 사이의 재조합 융합 단백질에 대한 분석적 겔 여과에 의한 수력학적 부피의 측정**
- [0153] 실시예 8에 개시되어 있는 바와 같이 Akta Purifier 10 시스템(Amersham Bioscience)을 이용하여 0.5 ml/분의 유속으로 Superdex S75 HR 10/300 GL 또는 Superdex S200 HR 10/300 GL 칼럼(Amersham Biosciences)에서 겔 투과 크로마토그래피를 수행하였다. 도 5H에 나타난 바와 같이, 4가지 단백질(NGAL, NGAL-PAS(#1)100, NGAL-PAS(#1)200 및 NGAL-piSA100) 모두 하나의 균질한 피크로 용출되었다.
- [0154] 도 5I에 나타난 바와 같은 칼럼 눈금을 위하여, 다음의 구형 단백질(Sigma, Dalsenhofen, Germany)의 혼합물 250 μ l를 PBS에서 적용하였다:
- [0155] Superdex S75 10/300 GL 구동의 경우, 아프로티닌(0.5 mg/ml), 리보뉴클레아제(0.4 mg/ml), 마이오글로빈(0.2 mg/ml), 카보닉 안하이드라제(0.2 mg/ml), 오브알부민(0.5 mg/ml), 소 혈청 알부민(0.5 mg/ml) 및 트랜스페린(0.2 mg/ml);
- [0156] Superdex S200 10/300 GL 구동의 경우, 시토크롬 c(0.2 mg/ml), 카보닉 안하이드라제(0.2 mg/ml), 오브알부민(0.5 mg/ml), 소 혈청 알부민(0.5 mg/ml), 트랜스페린(0.2 mg/ml) 및 알코올 디하이드로게나제(0.4 mg/ml).
- [0157] 그 결과, 100개 잔기를 갖는, 보다 두드러지게는 200개 잔기를 갖는 버전의 PAS#1 폴리머와의 융합 단백질은 동일한 분자량을 갖는 해당 구형 단백질 보다 현저하게 큰 크기를 나타내었다. NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200에 대한 크기 증가는 융합되지 않은 NGAL 단백질과 비교하여 각각 3.4배 및 4.9배였다. 실제 질량은 각각 1.4배 및 1.8배만 더 컸다. 상기 관찰은 Pro-Ala-Ser 폴리머 서열이 랜덤 코일 구조를 형성하면 예측되는 것보다 더 큰 수력학적 부피 효과가 있음을 명확하게 나타낸다(Squire (1981) J Chromatogr A 210:433-442).
- [0158] 반면, 100개 잔기를 갖는 piSA 폴리머와의 융합 단백질은 동일한 분자량을 갖는 해당 구형 단백질과 비교하여 현저하지 않은 크기 증가를 나타내었다. NGAL-piSA100에 대한 크기 증가는 융합되지 않은 NGAL 단백질과 비교하여 단지 2.5배였고, 실제 질량은 1.4배 더 컸다. 따라서, 100개 잔기의 Pro-Ala-Ser 폴리머와의 융합물은 100개 잔기의 Ala-Ser 폴리머보다 현저하게 더 큰 수력학적 부피를 갖게 한다.
- [0160] **실시예 11: IFNa2b에 융합된 유전공학적으로 코딩된 PAS#1 폴리머에 대한 원평광이색성 분광법에 의한 랜덤 코일 구조의 검출**
- [0161] 석영 큐벳 106-QS(0.1 mm 통로 길이; Hellma, Mullheim, Germany)가 장착된 J-810 분광편광기(Jasco, Groß-Umstadt, Germany)를 이용하여 2차 구조를 분석하였다. 50 mM K₂SO₄, 20 mM K-포스페이트 pH 7.5에서 15.9 나

지 38.7 μM 단백질 용액을 이용하여 16 또는 32회 구동(밴드폭 1 nm, 스캔 속도 100 nm/분, 반응 4 s)을 축적함으로써 실온에서 190 내지 250 nm의 스펙트럼을 기록하였다. 블랭크(blank) 용액에 대해 교정한 후, 기기의 소프트웨어를 이용하여 스펙트럼을 매끄럽게 하고, 하기 방정식에 따라 몰 타원율 Θ_M 을 계산하였다:

$$\Theta_M = \frac{\Theta_{\text{obs}}}{c \cdot d}$$

[0162]

[0163]

상기에서, Θ_{obs} 는 측정된 타원율, c 는 단백질의 농도(mol/ℓ), d 는 석영 큐벳의 통로 길이(cm)를 나타낸다. Kaleidagraph(Synergy Software, Reading, PA)를 이용하여 상기 Θ_M 값을 파장에 대한 좌표로 나타내었다. 재조합 IFNa2b에 대한 원편광이색성(CD) 스펙트럼은 상기 α -헬릭스 번들 단백질에 대한 종래 공개된 데이터(Radhakrishnan (1996) Structure 4:1453-1463)와 일치하지만, PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b 및 PAS(#1)600-IFNa2b에 대한 스펙트럼은 랜덤 코일 구조가 현저하게 기여하고 있음을 나타낸다(도 6A). 보다 상세하게 폴리머 융합 파트너에 의한 분광법적 기여도를 분석하기 위하여, 융합되지 않은 IFNa2b에 대한 몰 차이 CD 스펙트럼을 계산하였다(도 6B). 그 결과, 랜덤 코일 구조의 특징(Greenfield (1969) loc. cit.; Sreerama (2000) loc. cit.; Fandrich (2002) loc. cit.)인 100개에서 200개 잔기까지 크기가 증가하면서 200 nm 부근에서의 강한 최소값이 관찰되었다. 따라서, 재조합 융합 단백질의 일부인 Pro-Ala-Ser 서열은 생리학적 버퍼 조건 하에 랜덤 코일 폴리머로 존재하는 것으로 보인다.

[0165]

실시예 12: IFNa2b에 융합된 유전공학적으로 코딩된 PAS#5 폴리머에 대한 원편광이색성 분광법에 의한 랜덤 코일 구조의 검출

[0166]

2.3 내지 5.1 μM 단백질 용액을 이용하여 실시예 11에 개시된 바와 같이 CD에 의해 2차 구조를 분석하였다. PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b에 대한 스펙트럼은 랜덤 코일 구조가 현저하게 기여하고 있음을 나타낸다(도 6E). 보다 상세하게 폴리머 융합 파트너에 의한 분광법적 기여도를 분석하기 위하여, 융합되지 않은 IFNa2b에 대한 몰 차이 CD 스펙트럼을 계산하였다(도 6F). 그 결과, 랜덤 코일 구조의 특징(Greenfield (1969) loc. cit.; Sreerama (2000) loc. cit.; Fandrich (2002) loc. cit.)인 200 nm 부근에서의 강한 최소값이 관찰되었다. 따라서, 재조합 융합 단백질의 일부인 Pro-Ala-Ser 서열은 생리학적 버퍼 조건 하에 랜덤 코일 폴리머로 존재하는 것으로 보인다.

[0168]

실시예 13: IFNa2b에 융합된 유전공학적으로 코딩된 PAS#2, PAS#3 및 PAS#1P2 폴리머에 대한 원편광이색성 분광법에 의한 랜덤 코일 구조의 검출

[0169]

16.1 내지 22.9 μM 단백질 용액을 이용하여 실시예 11에 개시된 바와 같이 CD에 의해 2차 구조를 분석하였다. PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b 및 PAS(#1P2)200-IFNa2b에 대한 스펙트럼은 랜덤 코일 구조가 현저하게 기여하고 있음을 나타낸다(도 6C). 보다 상세하게 폴리머 융합 파트너에 의한 분광법적 기여도를 분석하기 위하여, 융합되지 않은 IFNa2b에 대한 몰 차이 CD 스펙트럼을 계산하였다(도 6D). 그 결과, 랜덤 코일 구조의 특징(Greenfield (1969) loc. cit.; Sreerama (2000) loc. cit.; Fandrich (2002) loc. cit.)인 200 nm 부근에서의 강한 최소값이 관찰되었다. 따라서, 재조합 융합 단백질의 일부인 Pro-Ala-Ser 서열은 생리학적 버퍼 조건 하에 랜덤 코일 폴리머로 존재하는 것으로 보인다. 그러나, 프롤린 잔기의 수가 감소된 PAS#1P2 폴리머의 경우, 랜덤 코일에 대한 CD 신호가 현저하게 감소되었는데, 이는 아미노산 폴리머 서열에서 랜덤 코일 특성에 대한 Pro 함량의 의존성을 보여주는 것이다.

[0171]

실시예 14: IL-1ra에 융합된 유전공학적으로 코딩된 PAS#1 및 PAS#5 폴리머에 대한 원편광이색성 분광법에 의한 랜덤 코일 구조의 검출

[0172]

0.9 내지 3.3 μM 단백질 용액을 이용하여 실시예 11에 개시된 바와 같이 CD에 의해 2차 구조를 분석하였다. 재조합 IL-1ra에 대한 원편광이색성(CD) 스펙트럼은 상기 두드러진 β -시트 단백질에 대한 결정 구조(Schreuder (1997) Nature 386:194-200)와 일치하지만, PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra 및 PAS(#5)384-IL1ra에 대한 스펙트럼은 현저한 분획의 랜덤 코일 구조가 있음을 나타낸다(도 6G). 보다 상세하게 폴리머 융합 파트너에 의한 분광법적 기여도를 분석하기 위하여, 융합되지 않은 IL-1ra에 대한 몰 차이 CD 스펙트럼을 계산하였다(도 6H). 그 결과, 랜덤 코일 구조의 특징(Greenfield (1969) loc. cit.; Sreerama (2000) loc. cit.; Fandrich (2002) loc. cit.)인 200 nm 부근에서의 강한 최소값이 관찰되었다. 따라서, IL-1ra와의 재조합 융합 단백질의 일부인 Pro-Ala-Ser 서열은 생리학적 버퍼 조건 하에 랜덤 코일 폴리머로 존재하는 것으로 보인다.

로 보인다.

- [0174] 실시예 15: NGAL에 융합된 유전공학적으로 코딩된 PAS#1 폴리머에 대한 원편광이색성 분광법에 의한 랜덤 코일 구조의 검출
- [0175] 23 내지 28 μ M 단백질 용액을 이용하여 실시예 11에 개시된 바와 같이 CD에 의해 2차 구조를 분석하였다. 재조합 NGAL에 대한 CD 스펙트럼은 종래 공개된 데이터(Breustedt (2006) loc. cit.)와 일치하지만, NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200에 대한 스펙트럼은 랜덤 코일 구조가 현저하게 기여하고 있음을 나타낸다(도 6I). 보다 상세하게 폴리머 융합 파트너에 의한 분광법적 기여도를 분석하기 위하여, 융합되지 않은 NGAL에 대한 물 차이 CD 스펙트럼을 계산하였다(도 6J). 그 결과, 랜덤 코일 구조의 특징(Greenfield (1969) loc. cit.; Sreerama (2000) loc. cit.; Fandrich (2002) loc. cit.)인 200 nm 부근에서의 강한 최소값이 관찰되었다. 따라서, 재조합 융합 단백질의 일부인 Pro-Ala-Ser 서열은 생리학적 버퍼 조건 하에 랜덤 코일 폴리머로 존재하는 것으로 보인다.
- [0177] 실시예 16: NGAL에 융합된 유전공학적으로 코딩된 piSA 폴리머에 대한 원편광이색성 분광법에 의한 β -시트 구조의 검출
- [0178] 5 μ M 단백질 용액을 이용하여 실시예 11에 개시된 바와 같이 2차 구조를 분석하였다. NGAL-piSA100에 대한 스펙트럼은 현저한 함량의 β -시트 구조가 있음을 나타낸다(도 6K). 보다 상세하게 폴리머 융합 파트너에 의한 분광법적 기여도를 분석하기 위하여, 융합되지 않은 NGAL에 대한 물 차이 CD 스펙트럼을 계산하였다(도 6K). 그 결과, β -시트 구조의 특징(Greenfield (1969) loc. cit.; Sreerama (2000) loc. cit.; Fandrich (2002) loc. cit.)인 218 nm 부근에서의 강한 최소값이 관찰되었다. 따라서, IL-1ra와의 재조합 융합 단백질의 일부인 Pro-Ala-Ser 서열은 생리학적 버퍼 조건 하에 조밀한 β -시트 2차 구조를 채용하는 것으로 보인다.
- [0180] 실시예 17: IFNa2b, NGAL 및 그 폴리머 융합물 2차 구조의 정량 분석
- [0181] 실시예 11, 12, 15 및 16에서 측정된 해당 CD 스펙트럼으로부터 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b, PAS(#1)600-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b, PAS(#5)384-IFNa2b, NGAL, NGAL-PAS(#1)100, NGAL-PAS(#1)200 및 NGAL-piSA100의 2차 구조를 복잡한 CD 스펙트럼을 디콘볼루션(deconvolution)하기 위한 33개의 기본 스펙트럼 세트와 함께 2차 구조 디콘볼루션 프로그램 CDNN ver.2.1(Bohm (1992) Prot Eng 5:191-195)을 이용하여 정량하였다. 상기 디콘볼루션 프로그램 CDNN을 이용하여 얻어진 결과가 하기 표에 나타나 있다.

표 2

	PAS(#1)100- IFNa2b	PAS(#1)100- IFNa2b	PAS(#1)400- IFNa2b	PAS(#1)600- IFNa2b	PAS(#5)192- IFNa2b	PAS(#5)384- IFNa2b	NGAL	NGAL-PAS(#1) 100	NGAL-PAS(#1) 200	NGAL-piSA100
α -헬릭스 인간-평행 β -시트	38.2%	17.6%	10.0%	8.1%	19.1%	10.5%	7.2%	5.9%	6.1%	8.4%
평행 α -시트	1.8%	11.6%	11.7%	7.9%	9.0%	9.9%	38.3%	22.6%	27.2%	50.0%
β -턴	8.4%	3.6%	2.5%	2.0%	3.3%	2.4%	3.6%	2.7%	2.9%	4.4%
랜덤 코일	19.2%	35.6%	36.5%	40.0%	41.4%	40.8%	18.5%	23.7%	22.3%	15.6%
조합계	35.9%	42.0%	46.8%	52.6%	43.5%	48.1%	33.3%	42.2%	39.1%	28.2%
α -턴 및 랜덤 코일	103.5%	110.4%	107.4%	110.7%	116.4%	111.7%	100.8%	97.0%	97.6%	106.6%
	55.1%	77.6%	83.3%	92.6%	84.5%	88.9%	51.8%	65.9%	61.4%	43.8%

[0182]

[0183]

α -헬릭스 번들 단백질로서의 알려진 3차원 구조(Radhakrishnan (1996) loc. cit.)와 일치하는 재조합 IFNa2b의 주된 α -헬릭스 2차 구조 함량과 비교하면, 전체 단백질에 대한 랜덤 코일 및 턴을 포함하는 구조화되지 않은 구조(unstructured conformation) 분획은 IFNa2b에 융합된 PAS(#1) 및 PAS(#5) 폴리머의 길이에 따라 명확하게 증가한다(CDNN 프로그램을 이용한 CD 스펙트럼 디콘볼루션 결과를 요약한 상기 표의 바닥 줄 참조). 일반적으로, 유사하지만 덜 두드러진 효과가 NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200의 경우에도 볼 수 있다. 이들 분광법 데이터는 구조화되지 않은 랜덤 코일 구조를 예측하고 있는(Cantor (1980) loc. cit.; Creighton (1993) loc. cit.) 실시예 8 및 실시예 10에서 측정된 바와 같은 IFNa2b 및 NGAL의 PAS(#1) 및 PAS(#5) 융합 단백질의 실험적으로 측정된 증가된 수력학적 부피와 일치한다.

[0184]

반면, NGAL-piSA100 융합 단백질의 경우, 턴 및 랜덤 코일의 양은 재조합 NGAL보다 훨씬 작지만, 안티-평행 β -

시트의 양은 NGAL의 38.3%에서 NGAL-piSA100의 50.0%로 증가한다. 따라서, Ser 및 Ala 잔기만을 포함하는 piSA100 폴리머는 랜덤 코일보다는 β -시트 구조인 것으로 추측되며, 이는 실시예 10에서 측정된 바와 같은 덜 현저한 수력학적 부피의 증가를 반영한다.

[0185] 초우-파스만 알고리즘(Chou and Fasman (1974) loc. cit.)을 이용하여 PAS#1, PAS#5 및 piSA 폴리머 서열의 이론적인 분석을 수행할 때에는 상이한 결과가 얻어졌다. 상기 분석 결과는 도 14에 설명되어 있다. 아미노산 폴리머의 아미노산 조성 및 서열과 무관하게, 상기 알고리즘은 50% 이상의 α -헬릭스 2차 구조를 예측하는데, 이는 실험 결과와는 명확하게 대조되는 것이다. 따라서, 상기 알고리즘은 자신있게 아미노산 폴리머의 구조화되지 않은 구조를 예측하기에는 유용하지 않다.

[0187] **실시예 18: PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#5)192-IFNa2b의 혈청 안정성 검사**

[0188] 1 mg/ml 농도의 시험 단백질 10 μ l와 마우스 혈장(Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) 50 μ l를 혼합하여 0.17 mg/ml 농도의 시험 단백질과 83%(v/v) 농도의 혈장으로 PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#5)192-IFNa2b의 혈청 안정성을 분석하였다. 상기 샘플을 37°C에서 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. PAS(#5)192-IFNa2b의 경우에는 0시간, 1시간, 3시간, 6시간, 8시간 및 24시간에, PAS(#1)200-IFNa2b의 경우에는 0시간, 1시간, 3시간, 6시간, 8시간, 24시간, 32시간 및 48시간에 샘플(6 μ l)을 취하였고, 즉시 54 μ l의 SDS-PAGE 전기영동 버퍼(50 mM Tris/HCl pH 8.8, 190 mM 글리신, 1 g/l SDS) 및 15 μ l SDS-PAGE 로딩 버퍼(250 mM Tris/HCl pH 8.0, 25%(v/v) 글리세린, 7.5%(w/v) SDS, 0.25 mg/ml 브롬페놀 블루, 12.5%(v/v) β -메르캅토에탄올)로 희석하였다. 95°C에서 5분 동안 가열한 후, 상기 샘플 25 μ l와 레퍼런스 샘플(0.1 μ g의 해당 시험 단백질)을 12% SDS-PAGE에 적용하였다. 반건조 블롯팅 장치에 의해 니트로셀룰로오스 막(Schleicher&Schuell, Dassel, Germany) 상에 전기-전달(electro-transfer)한 후, 상기 막을 접시에 놓고 10 ml의 PBST(0.1% v/v Tween 20을 함유하는 PBS)로 20분 동안 3회 세척하였다. 상기 막을 2 μ g/ml의 계란 흰자 아비딘을 함유하는 20 ml의 PBST에서 10분 동안 배양하여 내인성(endogenous) 단백질에 결합된 바이오틴 기를 마스크한 후, 20 μ l의 StrepTactin[®] 알칼라인 포스파타제 콘주게이트(IBA, Gottingen, Germany)를 직접 첨가하였다(1:1,000의 희석). 상기 막을 1시간 동안 배양하고, 20 ml의 PBST 및 PBS로 5분 동안 2회 및 20 ml의 AP 버퍼(100 mM Tris/HCl pH 8.8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)로 5분 동안 1회 세척한 후, 밴드가 나타날 때까지 5 μ l 니트로블루 테트라졸륨(NBT, Biomol, Hamburg, Germany; 70% w/v DMF에서 75 mg/ml)을 갖는 10 ml의 AP 버퍼 및 30 μ l의 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트 p-톨루이딘 염(BCIP, Roth, Karlsruhe, Germany; DMF에서 50 mg/ml)을 첨가함으로써 크로모젠 반응을 (교반없이) 수행하였다. 상기 막을 물로 세척하고 공기-건조시킨다. 반응이 증진되었다.

[0189] 양쪽 시험 단백질 모두, 상기 블롯은 모든 시점에서 일정한 세기의 신호를 나타낸다(도 7A/7B). 또한, 분해 산물은 검출되지 않았다. 따라서, PAS(#5)192-IFNa2b에 대해서는 24시간, PAS(#1)200-IFNa2b에 대해서는 48시간의 조사된 기간 내에 시험 단백질이 감소되도록 하는 단백질분해성 분해 또는 응집 증상은 없었다.

[0191] **실시예 19: 생체내에서 IFNa2b 및 유전공학적으로 코딩된 PAS#1 폴리머 사이의 제조합 용합 단백질에 대한 연장된 혈장 반감기의 검출**

[0192] 아래 표에 따라 성체 BALB/c 마우스(Harlan-Winkelmann, Borcheln, Germany)를 정맥주사하였다:

표 3

그룹	A	B	C
시험 아이템	IFNa2b	PAS(#1)200-IFNa2b	PAS(#1)400-IFNa2b
투여 경로	정맥내		
도스(mg/kg b.w.)	5.0	5.0	5.0
농도(mg/ml)	1.0	1.0	1.0
적용 부피(ml/kg b.w.)	5.0		
동물의 수/그룹	2	2	2
혈액 샘플링 시점의 수	3	3	3
동물의 수/샘플링 시점	1	1	1
혈액 샘플링 수/동물	2/1	2/1	2/1

[0194] 정맥내 투여된 시험 아이템의 총 부피는 투여일에 기록된 개별 체중에 따라 계산하였다(예컨대, 25 g의 체중

(b.w.)을 갖는 동물은 125 μl 의 1 mg/ml 시험 아이টে를 받았음). 혈액 샘플링은 아래 표에 따라 주사 후 30분, 120분 및 360분에 수행하였다:

표 4

그룹	시험 아이টে	동물 번호	혈액 샘플링 시점(투여 후 분)		
			30	120	360
A	IFNa2b	1	x		x
		2		x	
B	PAS(#1)200-IFNa2b	3	x		x
		4		x	
C	PAS(#1)400-IFNa2b	5	x		x
		6		x	

[0195]

각 물질에 대해 한 그룹 당 2마리의 동물을 주사하였다. 꼬리 정맥으로부터 혈액 샘플(각각 대략 100 μl)을 취하였고, 분쇄한 얼음 위에 약 20분 동안 보관하였다. 10,000 g, 4°C에서 10분간 원심분리한 후, 상등액(혈장)을 즉시 동결시키고 -20°C에 보관하였다.

[0197]

웨스턴 블롯 상의 융합 단백질을 정량적으로 검출하기 위하여, 10 μl 당량의 제거된 혈장 샘플을 90 μl 의 PBS로 희석하였다. 그 중 10 μl (1 μl 혈장에 해당)를 6 μl 의 PBS로 희석하고, 12.5% v/v 2-메르캅토에탄올을 함유하는 4 μl 의 SDS-PAGE 로딩 버퍼(250 mM Tris/HCl pH 8.0, 7.5% w/v SDS, 25% v/v 글리세롤, 0.25 mg/ml 브로모페놀 블루)와 혼합하였다. 95°C에서 5분 동안 가열한 후, 상기 샘플을 10% SDS-PAGE에 적용하였다. 반건조 블로팅 장치에 의해 니트로셀룰로오스 막(Schleicher&Schuell, Dassel, Germany) 상에 전기-전달한 후, 상기 막을 접시에 놓고 10 ml의 PBST(0.1% v/v Tween 20을 함유하는 PBS)로 20분 동안 3회 세척하였다. 이후, 상기 막을 20 μl 의 마우스 항-인간 IFNa2b 항체 9D3(Abcam, Cambridge, UK; 1:1,000 희석)을 함유하는 20 ml의 PBST로 10분 동안 배양하였다. 추가로 60분 동안 배양한 후, 상기 막을 10 ml의 PBST로 20분 동안 3회 세척하고, 항-마우스 IgG 알칼라인 포스파타제 콘주게이트(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)로 60분 동안 배양하였다.

[0198]

상기 막을 20 ml의 PBST로 5분 동안 2회 및 20 ml의 AP 버퍼(100 mM Tris/HCl pH 8.8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2)로 5분 동안 1회 세척한 후, 밴드가 나타날 때까지 5 μl 니트로블루 테트라졸륨(NBT, Biomol, Hamburg, Germany; 70% w/v DMF에서 75 mg/ml)을 갖는 10 ml의 AP 버퍼 및 30 μl 의 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트 p-톨루이딘 염(BCIP, Roth, Karlsruhe, Germany; DMF에서 50 mg/ml)을 첨가함으로써 크로모젠 반응을 (교반없이) 수행하였다. 상기 막을 물로 세척하고 공기-건조시킴으로써 반응을 중지시켰다.

[0199]

도 8은 동등한 시점에서 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b를 함유하는 샘플을 보여준다. IFNa2b는 120분 후에는 더 이상 검출가능하지 않지만, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b는 360분까지의 기간 동안 검출될 수 있다. 상기 데이터는 Pro-Ala-Ser 폴리머와 융합될 때 IFNa2b의 혈장 반감기가 현저하게 연장된다는 것을 나타낸다.

[0200]

ELISA로 융합 단백질을 정량적으로 검출하기 위하여, 96 웰 미세적정 플레이트(Maxisorb, NUNC, Denmark)의 웰을 5%(w/v) NaHCO_3 pH 9.3에서 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 마우스 항-인간 IFNa2b 항체 9D3(Abcam, Cambridge, UK) 용액 100 μl 로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 코팅 용액을 제거한 후, PBS에서 200 μl 의 2%(w/v) BSA로 1시간 동안 블로킹하고, PBST로 3회 세척하였다. 동물 번호 1/2(IFNa2b), 번호 3/4(PAS(#1)200-IFNa2b) 및 번호 5/6(PAS(#1)400-IFNa2b)의 혈장 샘플을 처리되지 않은 동물 유래의 0.5%(v/v) 마우스 혈장을 함유하는 PBST로 일련의 희석하여 적용하였고, 1시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 웰을 PBST로 3회 세척하였고, PBST에서 1:1,000으로 희석된 제2 마우스 항-인간 IFNa2b 항체 HRP-콘주게이트(4E10-HRP; Abcam, Cambridge, UK) 용액 100 μl 로 1시간 동안 배양하였다. PBST로 2회, PBS로 2회 세척한 후, 퍼옥시다제에 대한 기질로 ABTS 버퍼(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)에서 1 mg/ml의 ABTS 용액 100 μl 를 첨가함으로써 크로모젠 반응을 시작하였고, 25°C에서 20분 후, 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 처리되지 않은 동물 유래의 0.5%(v/v) 마우스 혈장을 함유하는 PBST에서 정의된 농도에서 해당 정제된 재조합 단백질에 대한 일련의 희석액에 대해 결정된 표준 곡선과 대조함으로써, 혈장 샘플에서의 IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b의 농도를 정량하였다.

[0201]

IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b의 혈장 반감기를 추정하기 위하여, ELISA 측정값으로부터 각

시점에 대한 농도 값인 $c(t)$ 를 측정하였고, 정맥내 주사 후의 시간인 t 에 대해 좌표로 나타내었다. KaleidaGraph 소프트웨어를 이용하여 상기 데이터를 수치적으로 일치시켰고, 하기 방정식에 따라 단일-지수 분열을 추측하였다.

$$c(t) = c_0 e^{-\ln 2 \frac{t}{\tau_{1/2}}}$$

[0202]

[0203]

상기에서, $\tau_{1/2}$ 은 혈장 반감기이고, c_0 은 0 시점에서의 총 혈액 농도이며, 25 g의 평균 동물 무게와 마우스의 경우 0.064의 전형적인 혈액 대 체중 비의 가정 하에 78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고정된 값으로 세팅되었다.

[0204]

도 9는 생체내 혈액 제거의 동역학을 나타낸다. 재조합 IFNa2b가 단지 약 5.5분의 반감기로 혈액으로부터 신속하게 제거되는 반면, PAS(#1)200-IFNa2b 및 PAS(#1)400-IFNa2b 융합 단백질은 각각 약 61분 및 6시간의 10배 및 60배 이상의 연장된 반감기를 갖는다. 상기 데이터는 전술한 웨스턴 블롯 분석과 일치하며, Pro-Ala-Ser 폴리머와 융합됨으로써 IFNa2b의 생체내 혈장 반감기가 현저하게 연장되고, 아미노산 폴리머의 길이가 증가할수록 반감기가 더 길어지게 된다는 것을 입증한다.

[0206]

실시예 20: 생체내 IFNa2b 및 유전공학적으로 코딩된 PAS#1 및 PAS#5 폴리머 사이의 재조합 융합 단백질에 대한 연장된 혈장 반감기의 검출

[0207]

아래 표에 따라 성체 C57BL/6 마우스(Charles River Laboratories, L'Arbresle, France)를 정맥주사하였다:

표 5

[0208]

그룹	A	B	C	B	C
시험 아이템	PAS(#1)200-IFNa2b	PAS(#1)400-IFNa2b	PAS(#1)600-IFNa2b	PAS(#5)192-IFNa2b	PAS(#5)384-IFNa2b
투여 경로	정맥내				
도스(mg/kg b.w.)	7.0				
농도(mg/mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
적용 부피(mL/kg b.w.)	7.0				
동물의 수/그룹	2	2	2	2	2
혈액 샘플링 시점의 수	4	4	4	4	4
동물의 수/샘플링 시점	1	1	1	1	1
혈액 샘플링 수/동물	2	2	2	2	2

[0209]

정맥내 투여된 시험 아이템의 총 부피는 투여일에 기록된 개별 체중에 따라 계산하였다(예컨대, 18 g의 체중(b.w.)을 갖는 동물은 125 μL 의 1 mg/mL 시험 아이템을 받았음). 혈액 샘플링은 아래 표에 따라 주사 후 30분, 120분, 240분 및 480분에 수행하였다:

표 6

[0210]

그룹	시험 아이템	동물 번호	혈액 샘플링 시점(투여 후 분)			
			30	120	240	480
A	PAS(#1)200-IFNa2b	1	x		x	
		2		x		x
B	PAS(#1)400-IFNa2b	3	x		x	
		4		x		x
C	PAS(#1)600-IFNa2b	5	x		x	
		6		x		x
D	PAS(#5)192-IFNa2b	7	x		x	
		8		x		x
E	PAS(#5)384-IFNa2b	9	x		x	
		10		x		x

[0211]

각 물질에 대해 한 그룹 당 2마리의 동물을 주사하였다. 꼬리 정맥으로부터 혈액 샘플(각각 대략 100 μL)을 취

하였고, 분쇄한 얼음 위에 약 20분 동안 보관하였다. 10,000 g, 4℃에서 10분간 원심분리한 후, 상등액(혈장)을 즉시 동결시키고 -20℃에 보관하였다.

[0212] ELISA로 융합 단백질을 정량적으로 검출하기 위하여, 96 웰 미세적정 플레이트(Maxisorb, NUNC, Denmark)의 웰을 5%(w/v) NaHCO₃ pH 9.3에서 5 µg/ml의 마우스 항-인간 IFNa2b 항체 9D3(Abcam, Cambridge, UK) 용액 100 µl로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 코팅 용액을 제거한 후, PBS에서 200 µl의 2%(w/v) BSA로 1시간 동안 블로킹하고, PBST로 3회 세척하였다. 동물 번호 1/2(PAS(#1)200-IFNa2b), 번호 3/4(PAS(#1)400-IFNa2b), 번호 5/6(PAS(#1)600-IFNa2b), 번호 7/8(PAS(#5)192-IFNa2b) 및 번호 9/10(PAS(#5)384-IFNa2b)의 혈장 샘플을 (처리되지 않은 동물 유래의) 0.25%(v/v) 더미(dummy) 마우스 혈장을 함유하는 PBST로 일련의 희석하여 적용하였고, 1시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 웰을 PBST로 3회 세척하였고, PBST에서 1:1,000으로 희석된 제2 마우스 항-인간 IFNa2b 항체 HRP-콘주게이트(4E10-HRP; Abcam, Cambridge, UK) 용액 100 µl로 1시간 동안 배양하였다. PBST로 2회, PBS로 2회 세척한 후, 권고된 버퍼(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)에서 1 mg/ml의 ABTS 퍼옥시다제 기질 용액 100 µl를 첨가함으로써 크로모젠 반응을 시작하였고, 25℃에서 20분 후, 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 0.25%(v/v) 더미 마우스 혈장을 함유하는 PBST에서 정의된 농도에서 해당 정제된 재조합 단백질에 대한 일련의 희석액에 대해 결정된 표준 곡선과 대조함으로써, 혈장 샘플에서의 PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b, PAS(#1)600-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b의 농도를 정량하였다.

[0213] PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b, PAS(#1)600-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b의 혈장 반감기를 추정하기 위하여, ELISA 측정값으로부터 각 시점에 대한 농도 값인 c(t)를 측정하였고, 정맥내 주사 후의 시간인 t에 대해 좌표로 나타내었다. KaleidaGraph 소프트웨어를 이용하여 상기 데이터를 수치적으로 일치시켰고, 하기 방정식에 따라 단일-지수 분열을 추측하였다.

$$c(t) = c_0 e^{-\ln 2 \frac{t}{\tau_{1/2}}}$$

[0214]

[0215] 상기에서, $\tau_{1/2}$ 은 혈장 반감기이고, c_0 은 0 시점에서의 총 혈액 농도이며, 18 g의 평균 동물 무게와 마우스의 경우 0.064의 전형적인 혈액 대 체중 비의 가정 하에 약 116 µg/ml의 고정된 값으로 세팅되었다.

[0216] 도 10은 생체내 혈액 제거의 동역학을 나타낸다. PAS(#1)200-IFNa2b의 반감기는 약 66분이며, 이는 비록 7 mg/kg b.w.과 비교하여 5 mg/kg b.w.의 낮은 도스가 사용되었지만, 실시예 19에서 PAS(#1)200-IFNa2b에 대한 61분의 반감기와 잘 일치하는 것이다. 따라서, 마우스 주(line)와 도스의 변화는 약동학에 현저한 영향을 미치지 않았다. PAS(#1)400-IFNa2b 및 PAS(#1)600-IFNa2b 융합 단백질은 아미노산 폴리머 서열이 융합되지 않은 재조합 IFNa2b와 비교하여 각각 약 316분 및 406분의 60배 및 70배 이상의 연장된 반감기를 갖는다. PAS(#5)192-IFNa2b 및 PAS(#5)384-IFNa2b 융합 단백질은 각각 약 40분 및 321분의 7배 및 58배 이상의 연장된 반감기를 갖는다. 상기 데이터는 Pro-Ala-Ser 폴리머와 융합됨으로써 IFNa2b의 생체내 혈장 반감기가 현저하게 연장되고, 아미노산 폴리머의 길이가 증가할수록 반감기가 더 길어지게 된다는 것을 보여준다.

[0218] 실시예 21: 생체내에서 NGAL 및 유전공학적으로 코딩된 PAS#1 폴리머 사이의 재조합 융합 단백질에 대한 연장된 혈장 반감기의 검출

[0219] 아래 표에 따라 성체 암컷 위스터 랫트를 정맥주사하였다:

표 7

[0220]

그룹	A	B	C
시험 아이템	NGAL	NGAL-PAS(#1)100	NGAL-PAS(#1)200
투여 경로	정맥내		
도스(mg/kg b.w.)	5.0	5.0	5.0
농도(mg/ml)	1.0	1.0	1.0
적용 부피(ml/kg b.w.)	5.0		
동물의 수/그룹	6	6	6
혈액 샘플링 시점의 수	8	8	8
동물의 수/샘플링 시점	3	3	3
혈액 샘플링 수/동물	4	4	4

[0221] 정맥내 투여된 시험 아이템의 총 부피는 투여일에 기록된 개별 체중에 따라 계산하였다(예컨대, 210 g의 체중(b.w.)을 갖는 104번 동물은 1,050 μ l의 1 mg/ml NGAL을 받았음). 혈액 샘플링은 아래 표에 따라 주사 후 5분, 10분, 30분, 60분, 120분, 240분, 360분 및 1,440분에 수행하였다:

표 8

그룹	시험 아이템	동물 번호	혈액 샘플링 시점(투여 후 분)							
			5	10	30	60	120	240	360	1,440
A	NGAL	104,105	x		x		x		x	
		107,108		x		x		x		x
B	NGAL-PAS(#1)100	110,111	x		x		x		x	
		113,114		x		x		x		x
C	NGAL-PAS(#1)200	116,117	x		x		x		x	
		119,120		x		x		x		

[0223] 각 물질에 대해 한 그룹 당 2마리의 동물이 필요했으며, 각각 상이한 시점에 4가지 샘플을 제공하였고, 상기 실험을 2회 수행하였다. 약한 에테르 마취 하에 레트로-오비탈 망(retro-orbital plexus)으로부터 파스퇴르 피펫으로 혈액 샘플(각각 대략 0.5 ml)을 취하였고, 즉시 리튬 헤파린-Microvette® 바이알로 전달하였으며, 손으로 흔들어 주고, 분쇄한 얼음 위에 약 20분 동안 보관하였다. 10,000 g, 4℃에서 10분간 원심분리한 후, 상등액(혈장)을 즉시 동결시키고 -80℃에 보관하였다. 마지막 혈액 샘플링 직후 에테르 흡입에 의해 동물을 희생시켰다.

[0224] 웨스턴 블롯 상의 융합 단백질을 정량적으로 검출하기 위하여, 100 μ l 당량의 제거된 혈장 샘플을 400 μ l의 PBS로 희석하였다. 그 중 1.25 μ l(0.25 μ l 혈장에 해당)를 14.75 μ l의 PBS로 희석하고, 12.5% v/v 2-메르캅토에탄올을 함유하는 4 μ l의 SDS-PAGE 로딩 버퍼(250 mM Tris/HCl pH 8.0, 7.5% w/v SDS, 25% v/v 글리세롤, 0.25 mg/ml 브로모페놀 블루)와 혼합하였다. 95℃에서 5분 동안 가열한 후, 상기 샘플을 12% SDS-PAGE에 적용하였다. 반건조 블로팅 장치에 의해 니트로셀룰로오스 막(Schleicher&Schuell, Dassel, Germany) 상에 전기-전달한 후, 상기 막을 접시에 놓고 10 ml의 PBST(0.1% v/v Tween 20을 함유하는 PBS)로 20분 동안 3회 세척하였다. 이후, 상기 막을 2 μ g/ml의 계란 흰자 아비딘을 함유하는 20 ml의 PBST에서 10분 동안 배양하여 내인성 단백질에 결합된 바이오틴 기를 마스킹한 후, 20 μ l의 StrepTactin® 알칼라인 포스파타제 콘주게이트(IBA, Gottingen, Germany)를 직접 첨가하고(1:1,000의 희석), 60분 동안 배양을 계속하였다.

[0225] 상기 막을 20 ml의 PBST로 5분 동안 2회 및 20 ml의 AP 버퍼(100 mM Tris/HCl pH 8.8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)로 5분 동안 1회 세척한 후, 밴드가 나타날 때까지 5 μ l 니트로블루 테트라졸륨(NBT, Biomol, Hamburg, Germany; 70% w/v DMF에서 75 mg/ml)을 갖는 10 ml의 AP 버퍼 및 30 μ l의 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트 p-톨루이딘 염(BCIP, Roth, Karlsruhe, Germany; DMF에서 50 mg/ml)을 첨가함으로써 크로모젠 반응을 (교반없이) 수행하였다. 상기 막을 물로 세척하고 공기-건조시킴으로써 반응을 중지시켰다.

[0226] 도 11은 동등한 시점에서 NGAL, NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200을 함유하는 2가지 일련의 혼합된 샘플을 보여준다. NGAL은 10분 후에는 더 이상 검출가능하지 않지만, NGAL-PAS(#1)100 및 NGAL-PAS(#1)200은 120분까지의 기간 동안 검출될 수 있다. 상기 데이터는 Pro-Ala-Ser 폴리머와 융합될 때 NGAL의 혈장 반감기가 현저하게 연장된다는 것을 나타낸다.

[0227] ELISA로 융합 단백질을 정량적으로 검출하기 위하여, 96 웰 미세적정 플레이트(Maxisorb, NUNC, Denmark)의 웰을 PBS에서 5 μ g/ml의 항-인간 리포칼린-2/NGAL 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN) 용액 50 μ l로 4℃에서 밤새 코팅하였다. PBS로 3회 세척한 후, PBST에서 200 μ l의 3%(w/v) BSA로 2시간 동안 블로킹하고, PBST로 다시 3회 세척하였다. 동물 104/105(NGAL) 및 116/117(NGAL-PAS(#1)200)의 혈장 샘플을 처리되지 않은 동물(Elevage Janvier, Le Genest ST. Isle, France; Aurigon Life Science, Tutzling, Germany) 유래의 2.5%(v/v) 랫트 혈장을 함유하는 PBST로 일련의 희석하여 적용하였고, 1.5시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 웰을 PBST로 3회 세척하였고, 1:1,000으로 희석된 StrepTactin® 알칼라인 포스파타제 콘주게이트 50 μ l로 1시간 동안 배양하였다. PBST로 2회, PBS로 2회 세척한 후, 기질로 AP 버퍼에서 0.5 mg/ml의 p-니트로페닐 포스페이트 50 μ l를 첨가함으로써 크로모젠 반응을 시작하였고, 25℃에서 20분 후, 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 처리되지 않은 동물 유래의 2.5%(v/v) 랫트 혈장을 함유하는 PBST에서 정의된 농도에서 해당 정제된 단백질에 대한 일련

의 희석액에 대해 결정된 표준 곡선과 대조함으로써, 혈장 샘플에서의 NGAL 및 NGAL-PAS(#1)200의 농도를 정량하였다.

- [0228] NGAL 및 NGAL-PAS(#1)200의 혈장 반감기를 추정하기 위하여, ELISA 측정값으로부터 결정된 농도 값인 $c(t)$ 를 정맥내 주사 후의 시간인 t 에 대해 좌표로 나타내었고, KaleidaGraph 소프트웨어를 이용하여 수치적으로 일치시켰다. 하기 방정식에 따라 단일-지수 분열을 추측하였다.

$$c(t) = c_0 e^{-\ln 2 \frac{t}{\tau_{1/2}}}$$

- [0229]
- [0230] 상기에서, $\tau_{1/2}$ 은 혈장 반감기 파라미터이고, c_0 은 0 시점에서의 총 혈액 농도이며, 210 g의 평균 동물 무게와 랫트의 경우 0.064의 전형적인 혈액 대 체중 비의 가정 하에 약 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 값을 가져야 한다.

- [0231] 도 12는 생체내 혈액 제거의 동역학을 나타낸다. 재조합 NGAL이 단지 약 3분의 반감기로 혈액으로부터 신속하게 제거되는 반면, NGAL-PAS(#1)200 융합 단백질은 약 61분의 10배 연장된 반감기를 갖는다. 상기 데이터는 전술한 웨스턴 블롯 분석과 일치하며, Pro-Ala-Ser 폴리머와 융합됨으로써 NGAL의 생체내 혈장 반감기가 현저하게 연장된다는 것을 입증한다.

- [0233] **실시예 22: 인간 PBMC를 이용한 IP-10 방출 분석에 의한 시판되는 IntronA 및 재조합 PAS(#1)200-IFNa2b의 활성 비교**

- [0234] 총 부피 100 μl 의 2×10^5 인간 PBMC를 IntronA(Schering Corporation, Kenilworth, NJ), PAS(#1)200-IFNa2b 및 음성대조군으로 관련없는 재조합 Fab 절편의 일련의 희석액으로 37°C에서 24시간 동안 자극하였다. 모든 3가지 시험 단백질의 출발 농도는 데이터 시트에 특정한 바와 같이 IntronA에 대한 2.6×10^8 U/mg의 비활성에 대해 10^6 U/ml 이었다. PAS(#1)200-IFNa2b의 양 및 동등한 양의 재조합 Fab 절편에 대한 동일한 단위 농도를 계산하기 위하여 상기 특정한 단위 농도를 사용하였다. 인터페론 알파에 의한 유도시 상등액 내에 방출된 IP-10(CXCL10; 인터페론 감마 유도성 10 kDa 단백질)의 농도를 인간 IP-10 ELISA 세트(BD OptEIA™, BD Biosciences Pharmingen, USA)를 이용하여 측정하였다.

- [0235] 도 13은 3가지 시험 단백질의 활성을 나타낸다. 재조합 PAS(#1)200-IFNa2b가 높은 농도에서 IntronA에 필적하는 활성을 보이지만, IntronA는 낮은 농도에서 더 활성적이었으며, 평균적으로 유사한 활성 프로필을 산출하였다. 미자극 PBMC 뿐만 아니라 Fab 절편으로 자극된 PBMC는 현저한 양의 IP-10을 방출하지 않았다. 역시 IP-10의 방출을 유도할 수 있는 내독소가 실시예 5에 개시된 바와 같은 PAS(#1)200-IFNa2b 및 Fab 절편 양쪽의 제조물에서 제거될 때, PAS(#1)200-IFNa2b의 활성은 융합 단백질의 IFNa2b 모이어티에 명확하게 기여할 수 있다. 따라서, Pro-Ala-Ser 폴리머는 IFNa2b의 생물학적 활성을 간섭하지 않는다.

도면

도면1a

```
gccTCTCCAGCTGCACCTGCTCCAGCAAGCCCTGCTGCACCAGCTCCGTCTGCTCCTGCT
|||||
AGAGGTCGACGTGGACGAGGTCGTCGGGACGACGTGGTCGAGGCAGACGAGGACGacgg
AlaSerProAlaAlaProAlaProAlaSerProAlaAlaProAlaProSerAlaProAlaAla
```

도면1b

```
gccGCACCTGCTTCTCCGGCTCCAGCAGCTCCTAGCGCACCGCTCCTGCTGCTCCATCT
|||||
CGTGGACGAAGAGCCGAGGTCGTCGAGGATCGCGTGGTCGAGGACGACGAGGTAGAcgg
AlaAlaProAlaSerProAlaProAlaAlaProSerAlaProAlaProAlaAlaProSerAla
```

도면1c

```
gccCCTTCTTCTCCAAGCCCTTCTGCTCCATCTAGCCCATCTCCTGCATCTCCTAGCTCT
|||||
GGAAGAAGAGGTTTCGGAAGACGAGGTAGATCGGGTAGAGGACGTAGAGGATCGAGAcgg
AlaProSerSerProSerProSerAlaProSerSerProSerProAlaSerProSerSerAla
```

도면1d

```
gccGCTTCTCCAGCAGCTCCTTCTGCTCCACCAGCAGCTGCAAGCCCTGCTGCACCAAGCGCACCTCCTGCT
|||||
CGAAGAGGTCGTGAGGACGAGGTGGTCGTCGACGTTCGGGACGACGTGGTTCGCGTGGAGGACGAcgg
AlaAlaSerProAlaAlaProSerAlaProProAlaAlaAlaSerProAlaAlaProSerAlaProProAlaAla
```

도면1e

```
gccTCTGCTGCAGCACCTGCAGCAGCAAGCGCAGCTGCATCTGCTCCATCTGCAGCTGCT
|||||
AGACGACGTGTCGACGTTCGCTTCGCGTCGACGTAGACGAGGTAGACGTGACGAcgg
AlaSerAlaAlaAlaProAlaAlaAlaSerAlaAlaAlaSerAlaProSerAlaAlaAlaAla
```

도면1f

```
gccGCTGCTGCATCCTCTGCAAGCTCCGCTTCTTCTCTAGCTCCGACAGCTGCATCTGCT
|||||
CGACGACGTAGGAGACGTTCGAGGCGAAGAAGGAGATCGAGGCGTCGACGTAGACGAcgg
AlaAlaAlaAlaSerSerAlaSerSerAlaSerSerSerSerSerAlaAlaAlaSerAlaAla
```

도면2a

```

SapI  SapI
  |    |
ACCGCGGAGAGTGCTCTTCTGCCTGAAGAGCTTAAGCTTTG
1610 +-----+-----+-----+-----+-----+ 1650
TGGCGCCTCTCACGAGAAGACGGACTTCTCGAATTCGAAAC
```

도면2b

```

SapI                               SapI
  |                               |
TGCTCTTCTGCCTCTCCAGCTGCACCT...CCGTCCTGCTCCTGCTGCCTGAAGAGCTT
1621 +-----+-----+-----+-----+-----+ 2242
ACGAGAAGACGGAGAGGTTCGACGTGGA...GGCAGACGAGGACGACGGACTTCTCGAA
AlaSerProAlaAlaPro...ProSerAlaProAlaAla
```

도면2c

```

KasI      SapI
  |        |
GAAAAAGGCCAGCTCTTCTGCCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCTGGGTAGC...
226 +-----+-----+-----+-----+-----+ 282
CTTTTCCGCGGTGAGAGAAGACGGACACTAGACGGAGTTGGGTGTCGGACCCATCG...
GluLysGlyAlaSerSerSerAlaCysAspLeuProGlnThrHisSerLeuGlySer...
+1

HindIII
      |
...ATGAGATCTTTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTAAGAAGTAAGGAATAAGCTT
691 +-----+-----+-----+-----+-----+ 751
...TACTCTAGAAAAAGAACAGTTGTTGAACGTTCTTTCAAATCTTCATTCCTTATTCGAA
MetArgSerPheSerLeuSerThrAsnLeuGlnGluSerLeuArgSerLysGluEnd
```

도면2d

KasI SapI

| |

226 GAAAAGGCCGCGCAGCTCTTCTGCCTCTCCAGCTGCACCT...CCGTCTGCTCTGTGTCGC 849
-----+-----+-----+-----+-----+-----
CTTTTCCGCGGTCGAGAAGACGGAGAGGTCGACGTGGA...GGCAGACGAGGACGACGG
GluLysGlyAlaSerSerSerAlaSerProAlaAlaPro...ProSerAlaProAlaAla

HindIII

|

850 TGTGATCTGCCTCAAACCCAC...TTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAATAAGCTT 1351
+-----+-----+-----+-----+-----+-----
ACACTAGACGGAGTTTGGGTG...AACGTTCTTTCAAATCTTCAATCCTATTATCGAA
CysAspLeuProGlnThrHis...LeuGlnGluSerLeuArgSerLysGluEnd

(1)

도면2e

```

      KasI           SapI
      |             |
GAAAAAGGCGCCAGCTCTTCTGCCCCACCTCTGGGAGAAAAATCCAGCAAGATGCAA...
226 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 282
CTTTTTCGCGGTCGAGAAGACGGGCTGGGAGACCTCTTTTAGTTCGTCTACGTT...
GluLysGlyAlaSerSerSerAlaArgProSerGlyArgLysSerSerLysMetGln...
                               +1
                                           HindIII
                                           |
...AATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCAACAAATCTACTTCCAGGAGGACGAGTAAGCTT
652 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 712
...TTATACGGACTGCTTCCGCAGTACCAGTGGTTTAAGATGAAGTCCCTCCTGCTCATTCGAA
...AsnMetProAspGluGlyValMetValThrLysPheTyrPheGlnGluAspGluEnd

```

도면 $2f$

KasI SapI

| |

GAAAAGGCCGCGCAGCTCTTCTGCCTCTCCAGTCGACCT...CCGTCTGCTCTGTGTGCC
226 -----+-----+-----+-----+----- 849

CTTTTCCGGCGTCGAGAAGACGGAGAGGTTCGACGTGGA...GGCAGACGAGGACGACGG
GluLysGlyAlaSerSerSerAlaSerProAlaAlaPro...ProSerAlaProAlaAla

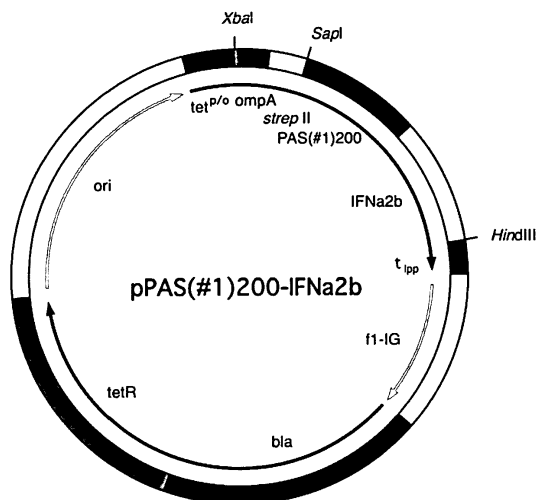
HindIII

|

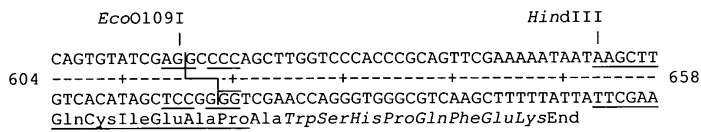
CGACCCCTCTGGGAGAAAA...ACCAAATTCTACTTCCAGGAGGACGAGTAAAGCTT
850 +-----+-----+-----+-----+----- 1312

GCTGGGAGACCCCTCTTTT...TGGTTTAAGATGAAGTCTCTCTGCTCATTCGAA
ArgProSerGlyArgLys...ThrLysPheTyrPheGlnGluAspGluEnd
(1)

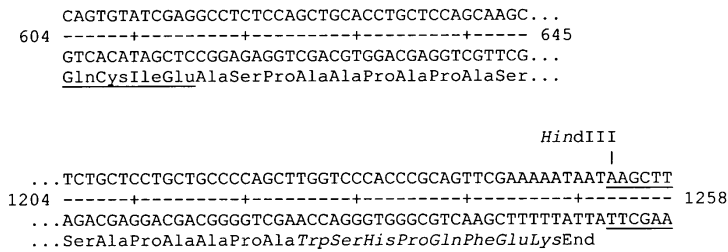
도면2g



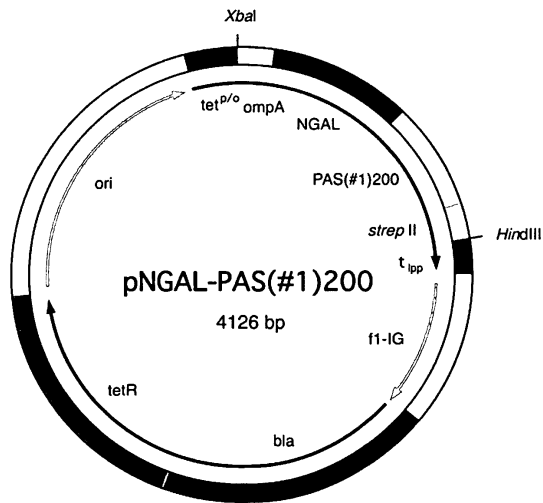
도면3a



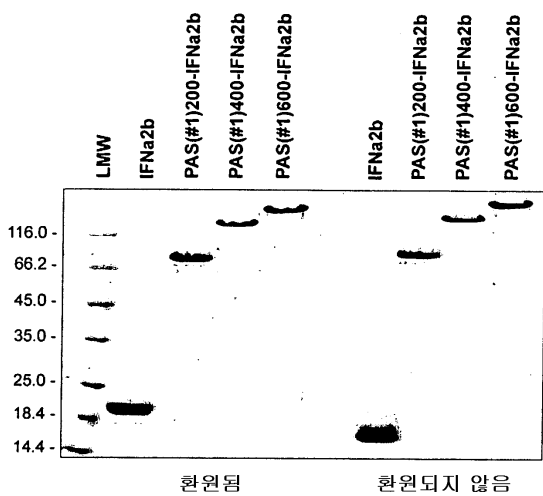
도면3b



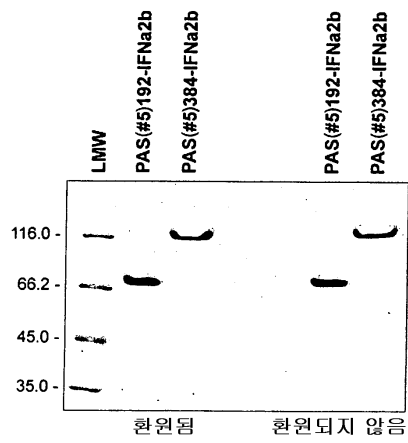
도면3c



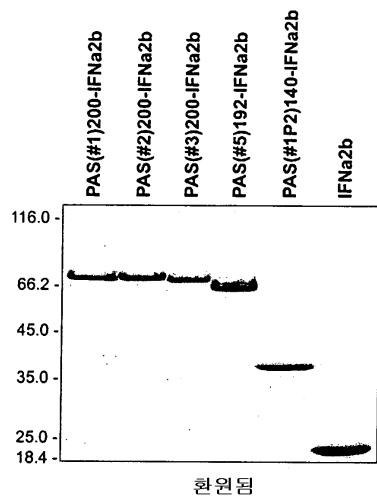
도면4a



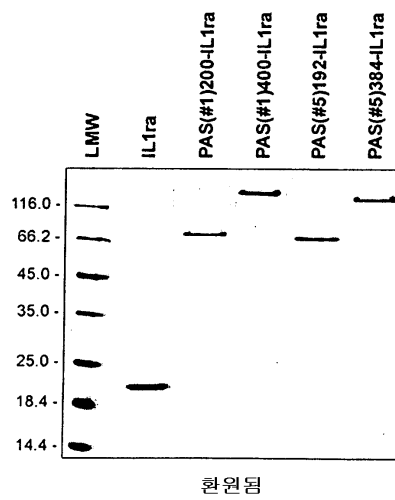
도면4b



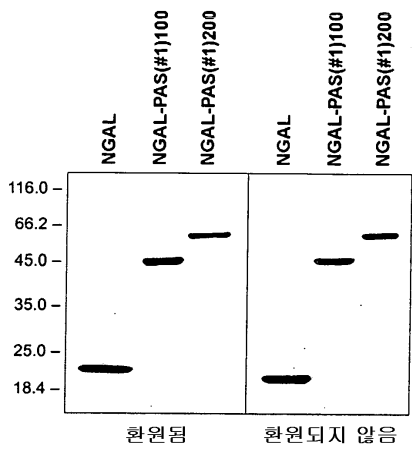
도면4c



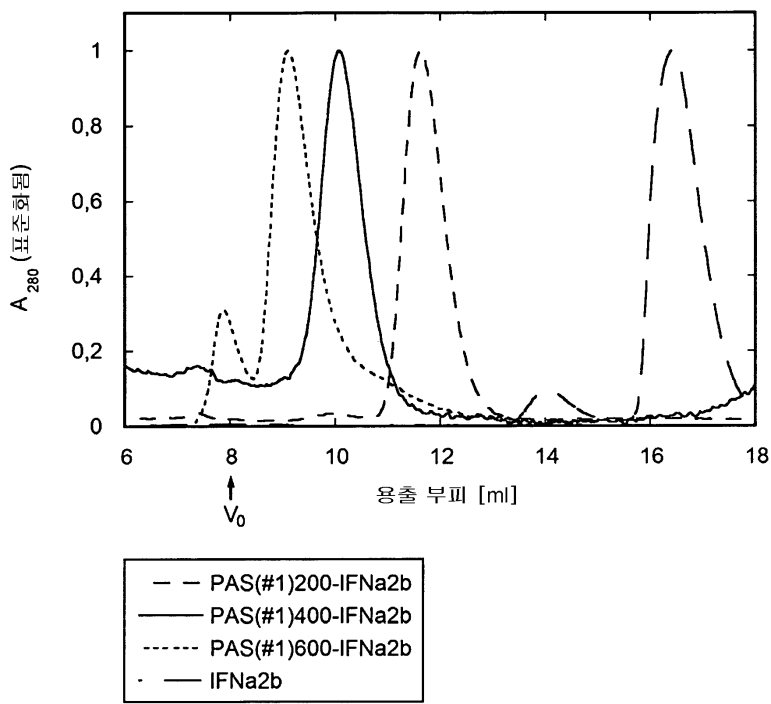
도면4d



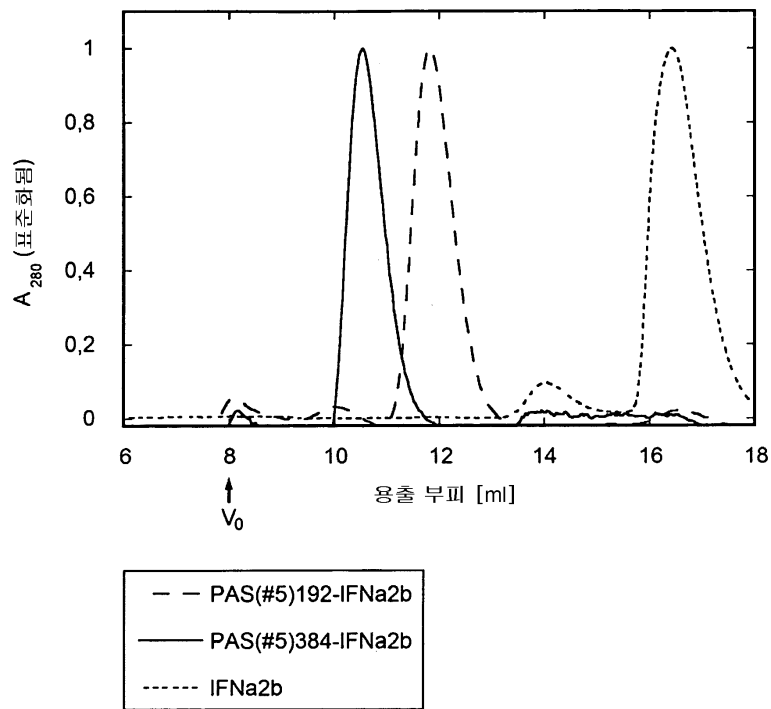
도면4e



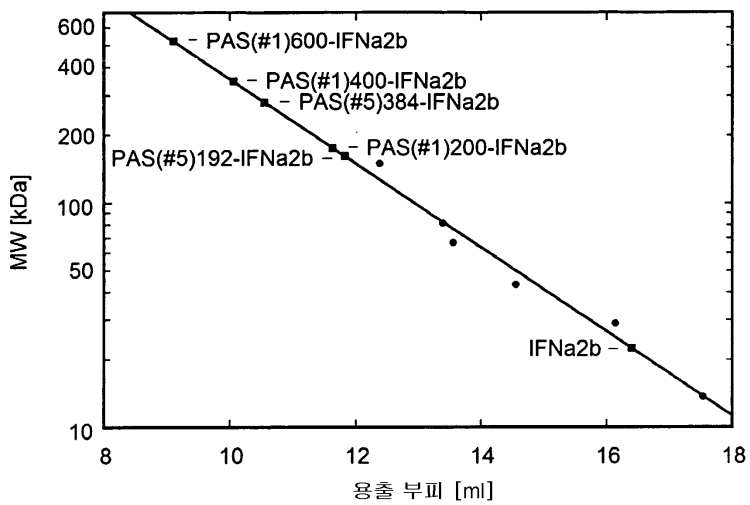
도면5a



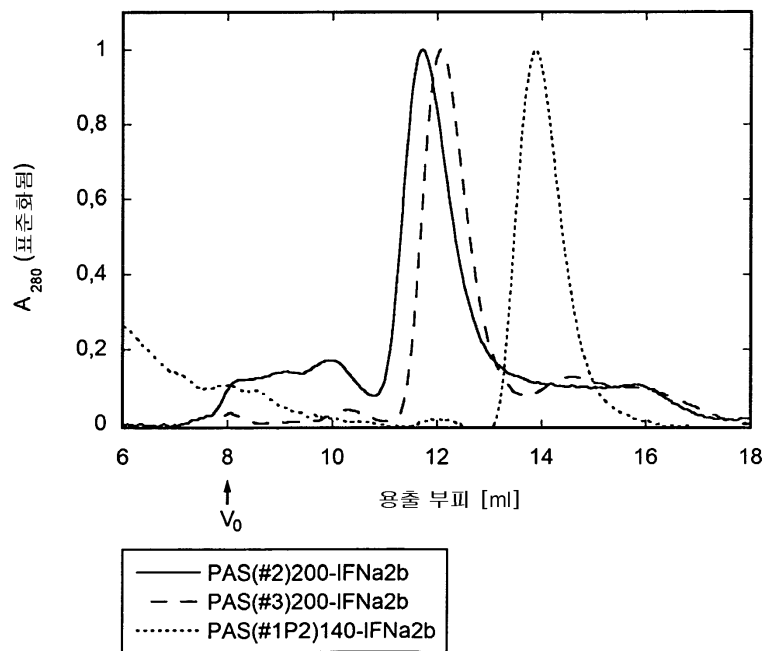
도면5b



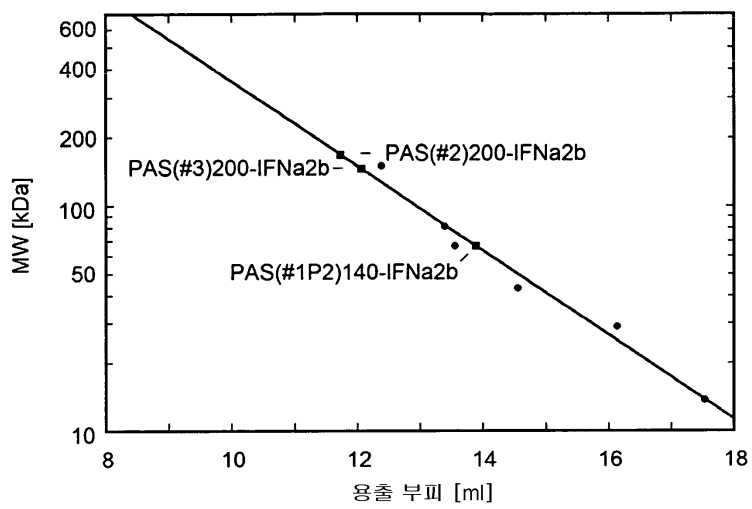
도면5c



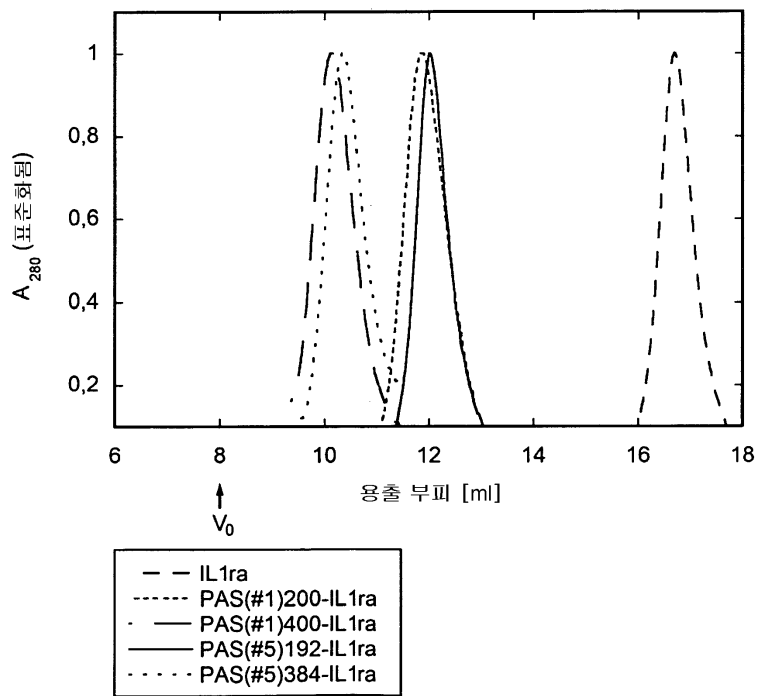
도면5d



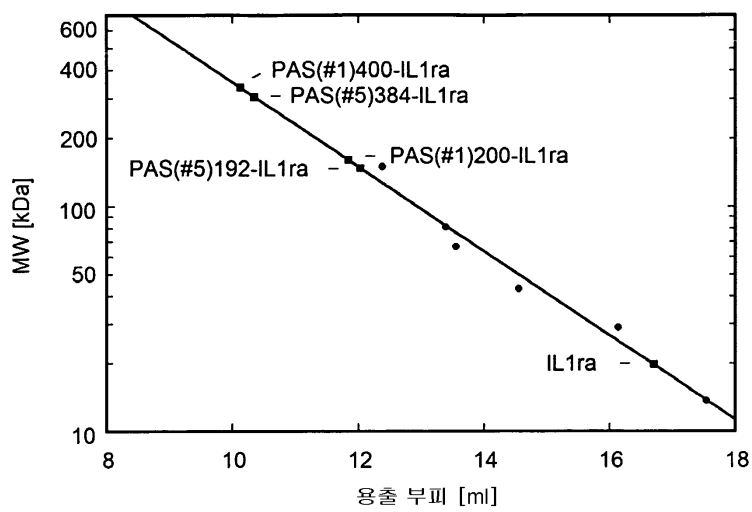
도면5e



도면5f

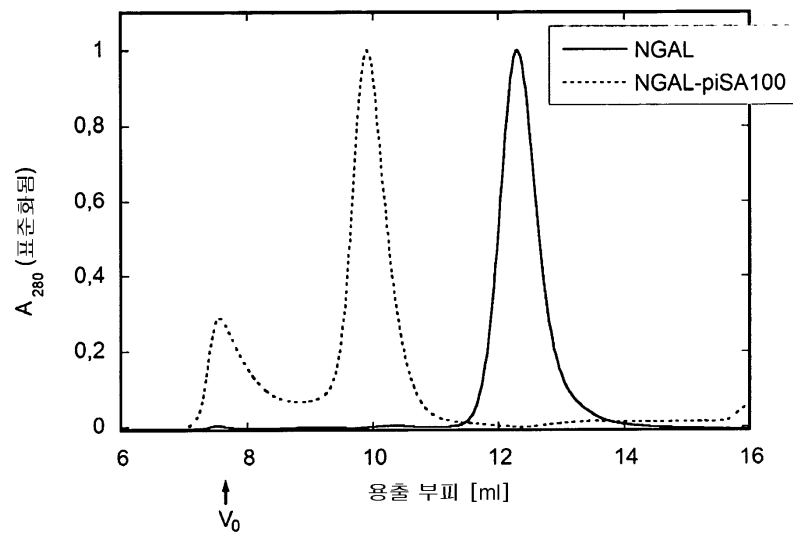


도면5g

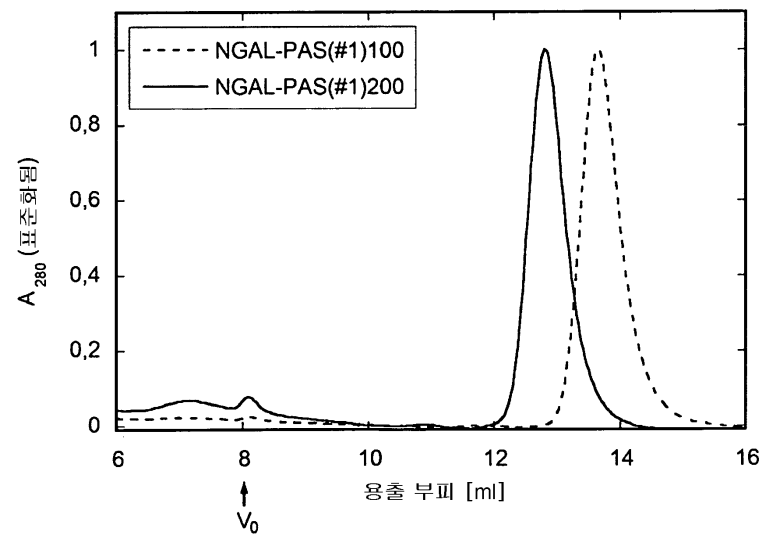


도면5h

Superdex S75:

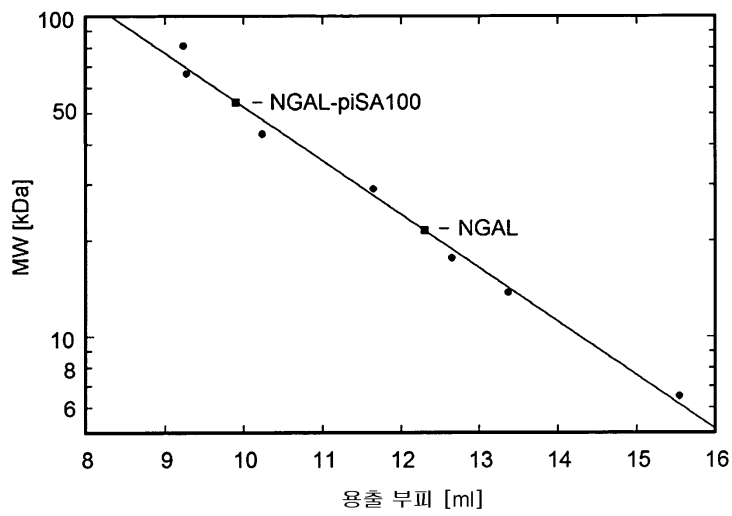


Superdex S200:

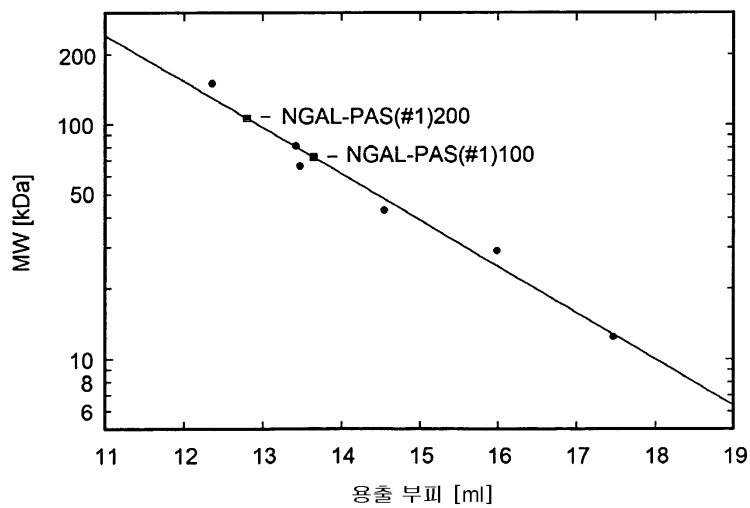


도면5i

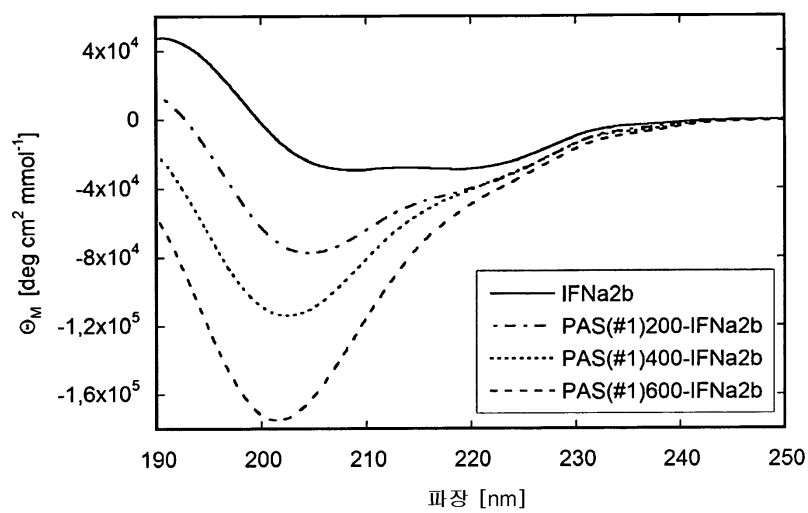
Superdex S75:



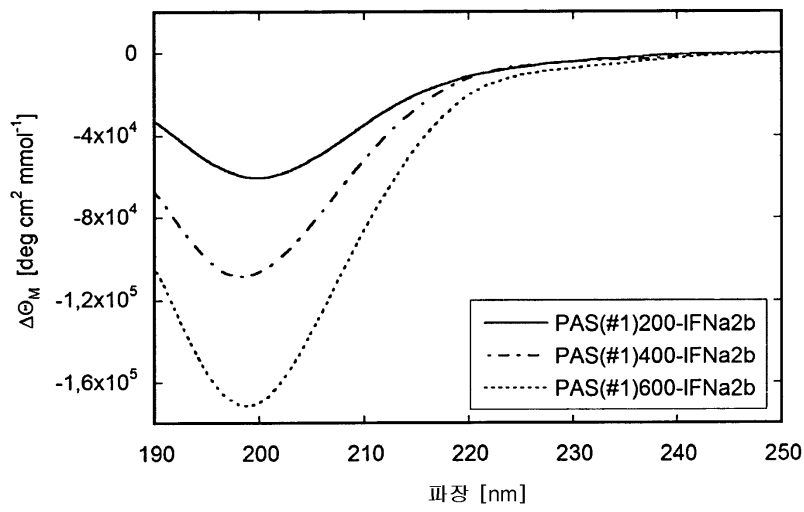
Superdex S200:



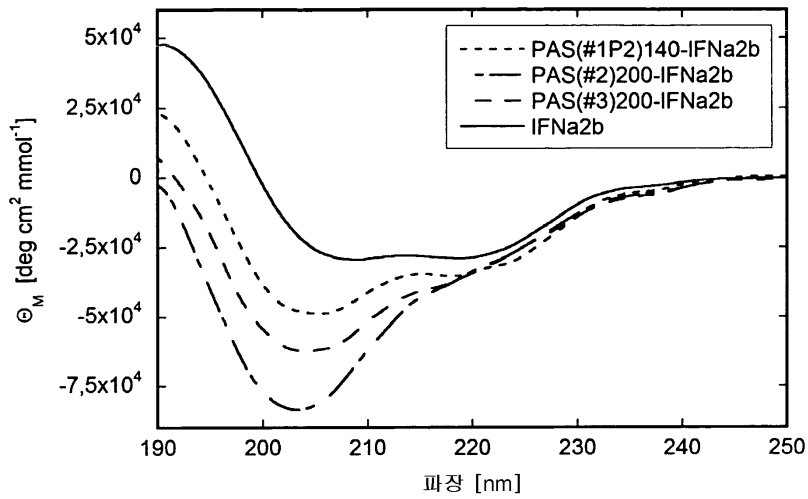
도면6a



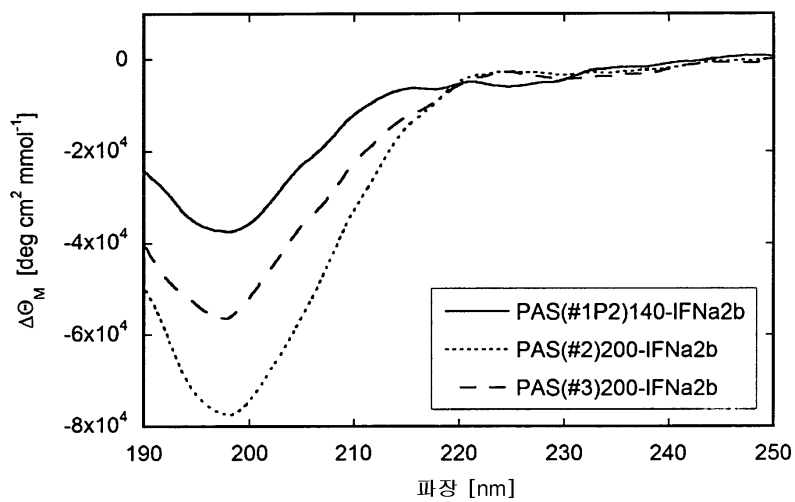
도면6b



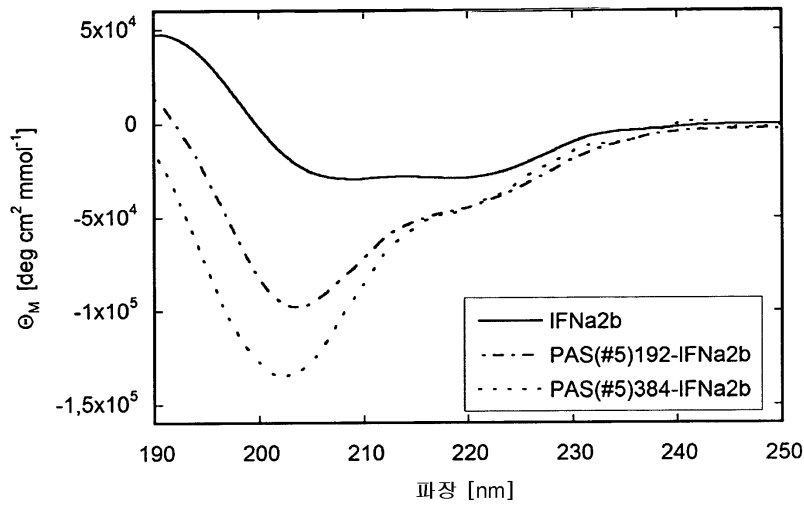
도면6c



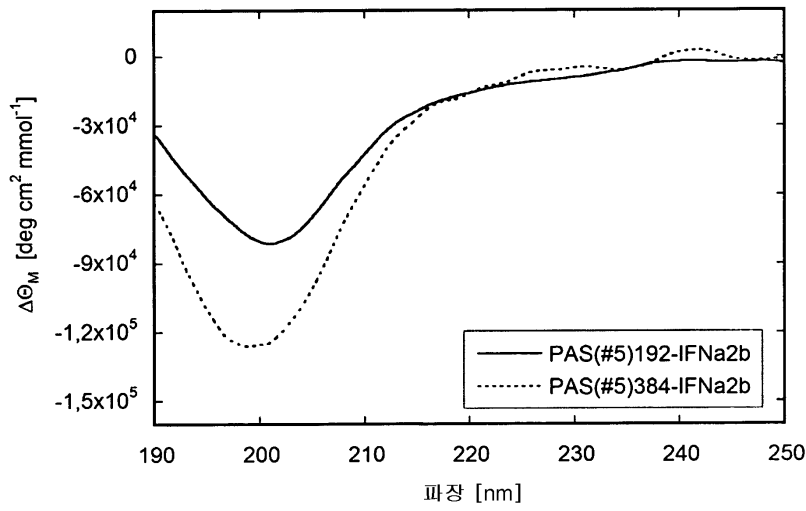
도면6d



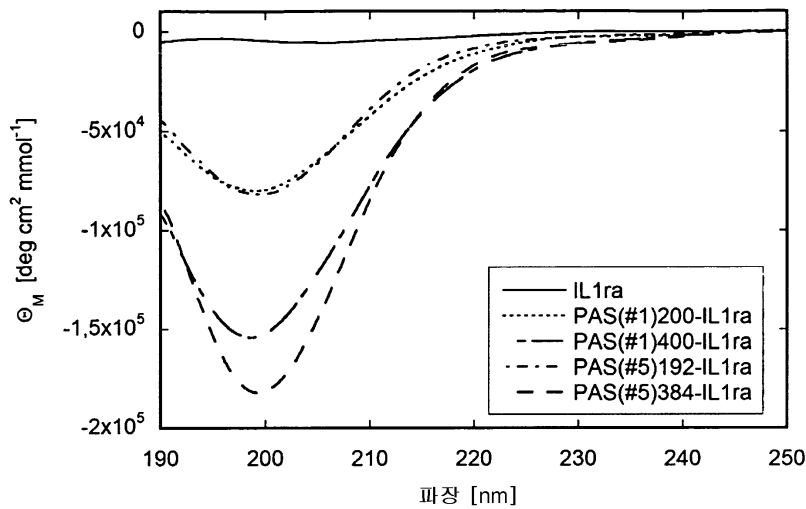
도면6e



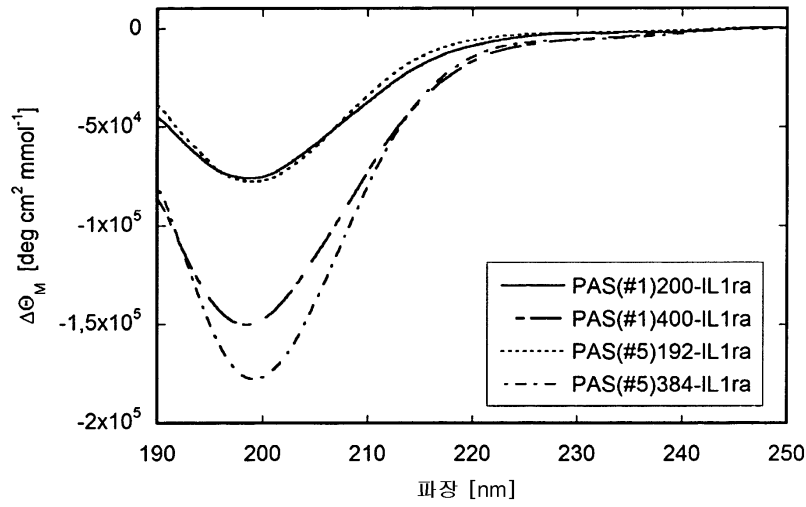
도면6f



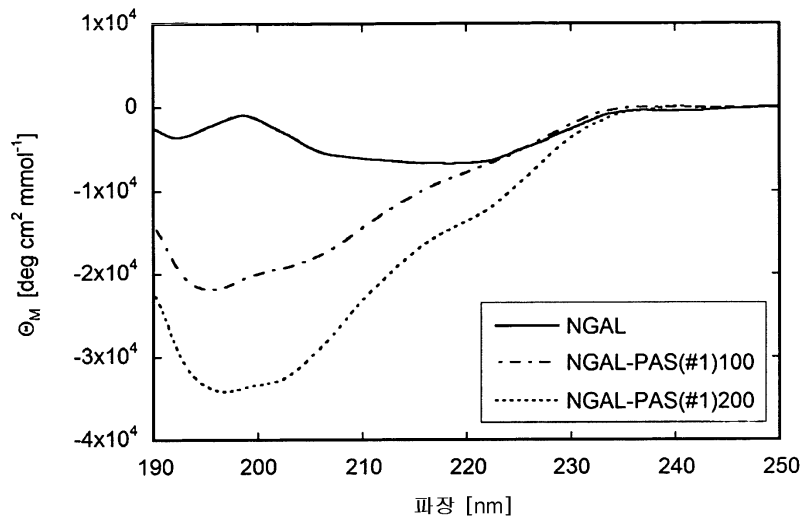
도면6g



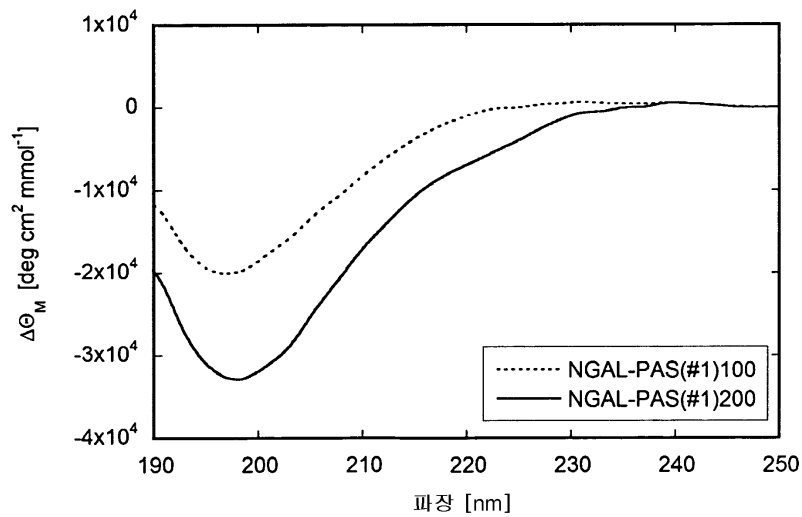
도면6h



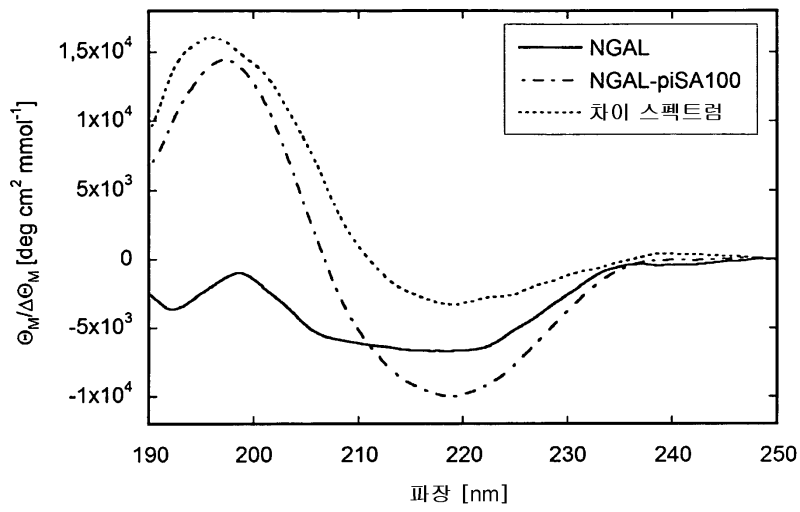
도면6i



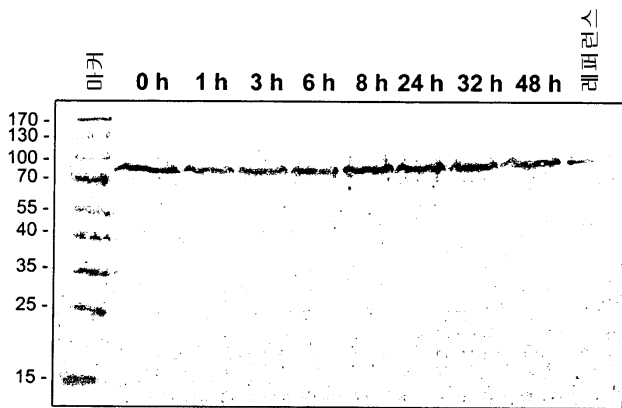
도면6j



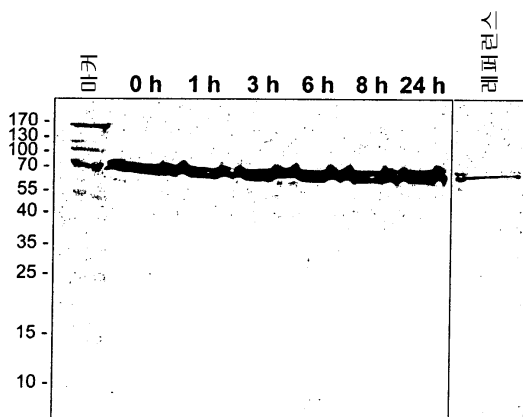
도면6k



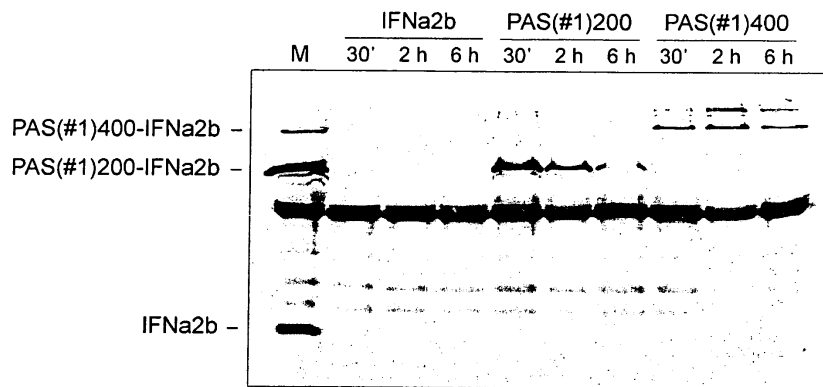
도면7a



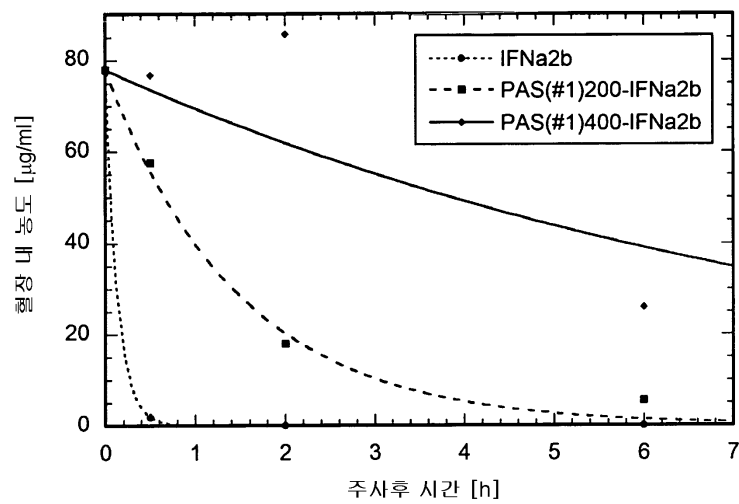
도면7b



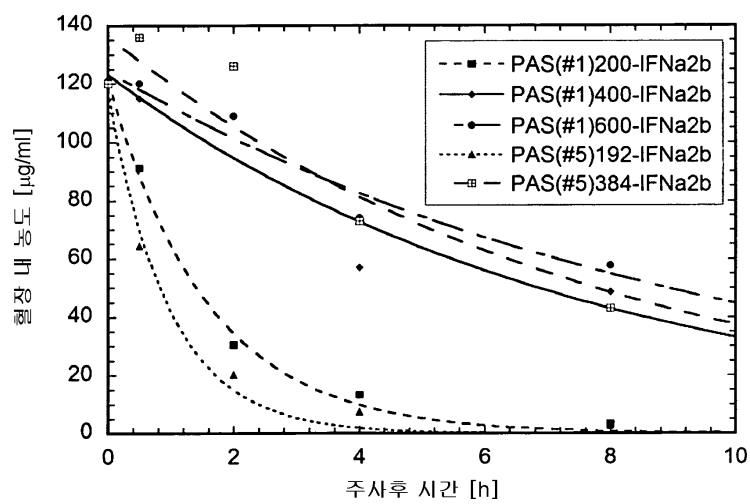
도면8



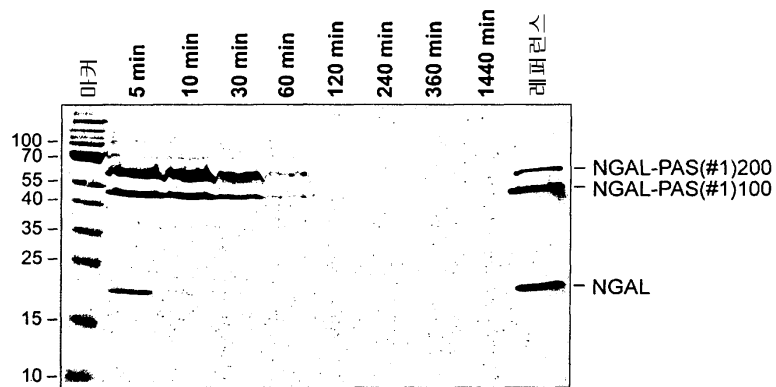
도면9



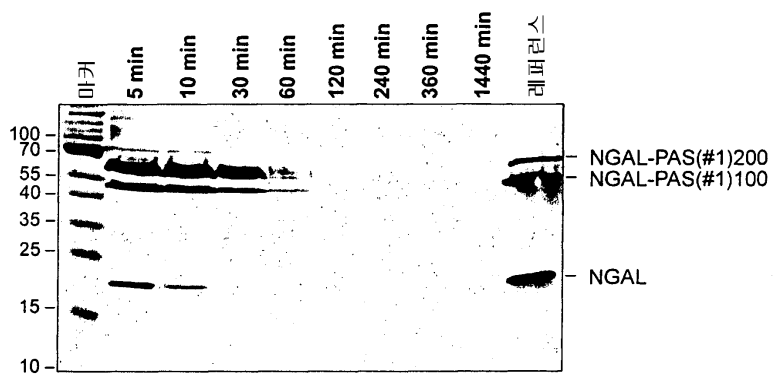
도면10



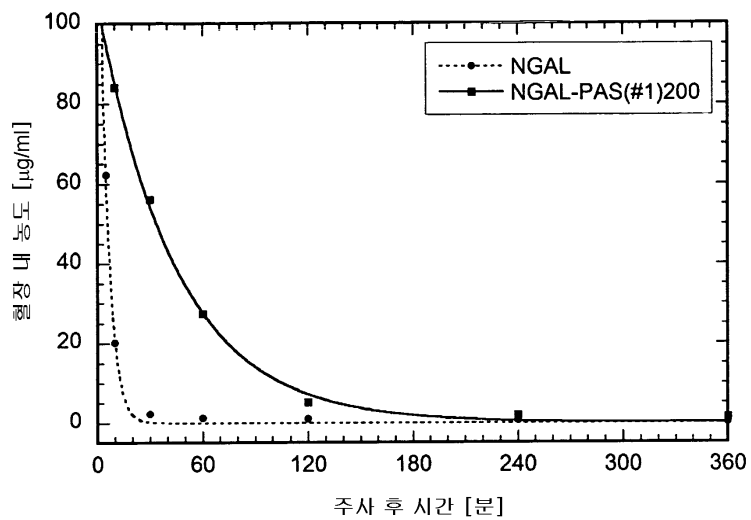
도면11a



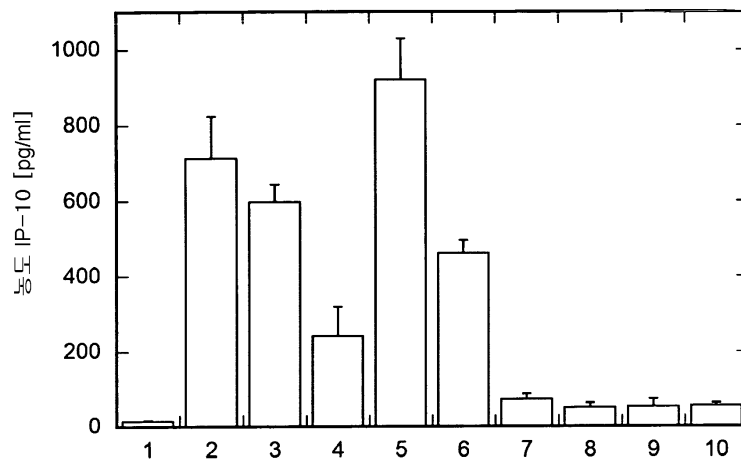
도면11b



도면12



도면13



- 1: 비자극 세포
- 2: IntronA 3850 ng/ml
- 3: IntronA 38.5 ng/ml
- 4: IntronA 0.385 ng/ml
- 5: PAS(#1)200-IFNa2b 3850 ng/ml
- 6: PAS(#1)200-IFNa2b 38.5 ng/ml
- 7: PAS(#1)200-IFNa2b 0.385 ng/ml
- 8: Fab (음성 대조군) 3850 ng/ml
- 9: Fab (음성 대조군) 38.5 ng/ml
- 10: Fab (음성 대조군) 0.385 ng/ml

도면14

p1SA:

Chou-Fasman plot of @, 60 aa;
QUERY

```

      .
AAAASSASSASSSSSSAAASAAAAASSASSASSSSSSAAASAAAAASSASSASSSSSSAAASA
helix <----->
sheet
turns      T T      T T      T T
Residue totals: H: 59  E: 0  T: 6
percent: H: 98.3 E: 0.0 T: 10.0
```

PAS#1:

Chou-Fasman plot of @, 60 aa;
QUERY

```

      .
ASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAAPAPASPAAPAPSAPA
helix <-----> <-----> <----->
sheet
turns T
Residue totals: H: 31  E: 0  T: 1
percent: H: 51.7 E: 0.0 T: 1.7
```

PAS#5:

Chou-Fasman plot of @, 72 aa;
QUERY

```

      .
AASPAAPSAPPAASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPAASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA
helix <-----> <-----> <-----> <-----> <-----> <----->
sheet
turns
AASPAAPSAPPA
helix <----->
sheet
turns      T
Residue totals: H: 56  E: 0  T: 1
percent: H: 77.8 E: 0.0 T: 1.4
```

서열 목록

- <110> Technische Universitat Munchen
- <120> Biological active proteins having increased in vivo and/or in vitro stability
- <130> 2015-FPA-7145D
- <150> EP 0701 2219.7
- <151> 2007-06-21
- <150> US 61/071,705
- <151> 2008-05-14
- <160> 63
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 60
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence"

encoding amino acid polymer piSA"

<400> 1

gccgctgctg catcctctgc aagctccgct tcttcctcta gctccgcagc tgcattctgct 60

60

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer piSA"

<400> 2

Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ala

1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala

20

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence encoding amino acid polymer"

<400> 3

gctgcttcgg ctgctgcttc ctccgctgct gcttcgctg ctgctgcttc cgcttcctcc 60

60

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer"

<400> 4

Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

Ser Ala Ser Ser

20

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid polymer"

<400> 5

gcttcgcgtt ccgcttcgc ttccgcttcc gcttcctccg ctgcttcgc tgcttcgct 60

60

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer"

<400> 6

Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ala Ser

1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala

20

<210> 7

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid polymer"

<400> 7

tccgctgctt cctcctccgc ttctcctcc tccgctgctt cctccgcttc cgctgctgct 60

60

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer"

<400> 8

Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala

1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala

20

<210> 9

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid polymer"

<400> 9

tcctctctct ccgctgcttc cgctgcttcc gctgctgctg ctgcttcttc ctccgcttcc 60

60

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer"

<400> 10

Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ser

1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser

20

<210> 11

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid polymer"

<400> 11

tctctcgctt cctcctccgc tgcttctctc tccgcttctt cctcctccgc ttccgctgct 60
60

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer"
<400> 12

Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser

1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala

20

<210> 13
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid polymer"

<400> 13
tccgcttcgc cttccgcttc cgcttccgct tccgctgctt cctccgcttc ctccgcttcc 60
60

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer"
<400> 14

Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ala

1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser

20

<210> 15

<211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
 encoding amino acid polymer"
 <400> 15
 gcttcctccg ctgctgcttc cgctgctgct gcttcctccg ctgcttcgcg ttcctcctcc 60
 60
 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer"
 <400> 16
 Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Ser Ser
 20
 <210> 17
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
 encoding amino acid polymer PAS#1"
 <400> 17
 gcctctccag ctgcacctgc tccagcaagc cctgctgcac cagctccgtc tgctcctgct 60
 60
 <210> 18
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer
 PAS#1"

<400> 18

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala

20

<210> 19

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid polymer PAS#2"

<400> 19

gctgctccgg cttccccggc tccggtgct cgtccgctc cggtccggc tgctccgtcc 60

60

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer
PAS#2"

<400> 20

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser

20

<210> 21

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid polymer PAS#3"

<400> 21

gctccgtcct ccccgctccc gtccgctccg tctccccgt ccccggttc cccgtcctcc 60

60

<210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer

PAS#3"
 <400> 22
 Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Pro Ser Ser
 20

<210> 23
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
 encoding amino acid polymer PAS#4"

<400> 23
 tctctcccggt ccgctccggt cccgtctctcc ccggttctcc cgtcccggtc ctcccggt
 60
 60

<210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer
 PAS#4"

<400> 24
 Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Ala
 20

<210> 25

<211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
 encoding amino acid polymer PAS#5"

<400> 25
 gccgcttctc cagcagctcc ttctgtcca ccagcagctg caagccctgc tgcaccaagc 60
 gcacctctg ct 72

<210> 26
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer
 PAS#5"

<400> 26
 Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala

20
 <210> 27
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
 encoding amino acid polymer PAS#1P2"

<400> 27
 gcctctgctg cagcacctgc agcagcaagc gcagctgcat ctgctccatc tgcagctgct 60
 60

<210> 28
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid polymer

PAS#1P2"

<400> 28

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala

20

<210> 29

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid sequence for a building block for PAS#1"

<400> 29

gcctctccag ctgcacctgc tccagcaagc cctgctgcac cagctccgtc tgctcctgct 60

gcc 63

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence
for a building block for PAS#1"

<400> 30

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala Ala

20

<210> 31

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence

encoding amino acid sequence for a building block for PAS#2"

<400> 31

gccgcacctg cttctccggc tccagcagct cctagcgcac cagctcctgc tgetccatct 60

gcc 63

<210> 32

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence
for a building block for PAS#2"

<400> 32

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala

20

<210> 33

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid sequence for a building block for PAS#3"

<400> 33

gccccttctt ctccaagccc ttctgctcca tctagcccat ctctgcac tctagctct 60

gcc 63

<210> 34

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence
for a building block for PAS#3"

<400> 34

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala

1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser Ala

20

<210> 35

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence

encoding amino acid sequence for a building block for PAS#5"

<400> 35

gccgcttctc cagcagctcc ttctgtcca ccagcagctg caagccctgc tgcaccaagc 60

gcacctctg ctgcc 75

<210> 36

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence

for a building block for PAS#5"

<400> 36

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro

1

5

10

15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala

20

25

<210> 37

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence

encoding amino acid sequence for a building block for piSA"

<400> 37

gccgctgctg catcctctgc aagctccgct tcttctctta gctccgcagc tgcattctgt 60

gcc 63

<210> 38

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence
 for a building block for piSA"
 <400> 38
 Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Ser Ala Ala
 20
 <210> 39
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
 encoding amino acid sequence for a building block for PAS#1P2"
 <400> 39
 gcctctgctg cagcacctgc agcagcaagc gcagctgcat ctgctccatc tgcagctgct 60
 gcc 63
 <210> 40
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence
 for a building block for PAS#1P2"
 <400> 40
 Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro
 1 5 10 15
 Ser Ala Ala Ala Ala
 20
 <210> 41
 <211> 622
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence encoding amino acid sequence of the PAS#1 polymer with 200 residues"

<400> 41

tgctcttctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct 60

gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct 120

gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct 180

gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct 240

gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct 300

gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct 360

gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct 420

gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct 480

gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct 540

gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct 600

gctcctgctg cctgaagagc tt 622

<210> 42

<211> 201

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence of the PAS#1 polymer with 200 residues"

<400> 42

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala

20 25 30

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

35 40 45

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala

50 55 60

Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala

65 70 75 80
Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 85 90 95

Ser	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Ser	Pro	Ala
100					105					110					
Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro
115					120					125					
Ala	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Pro	Ala
130					135					140					
Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Ala	Pro	Ala
145					150					155					160
Ala	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro

165 170 175

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala

180 185 190

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala

195 200

<210> 43

<211> 526

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid sequence of IFN a2b and Strep-tag II"

43

gaaaaaggcg ccagctcttc tgcctgtgat ctgcctcaaa cccacagcct gggtagcagg 60

aggaccttga tgctcctggc acagatgagg agaatctctc ttttctcctg cttgaaggac 120

agacatgact ttggatttcc ccaggaggag tttggcaacc agttccaaaa ggctgaaacc 180

atccctgtcc tccatgagat gatccagcag atcttcaate tcttcagcac aaaggactca 240

tctgctgctt gggatgagac cctcctagac aaattctaca ctgaactcta ccagcagctg 300

aatgacctgg aagcctgtgt gatacagggg gtgggggtga cagagactcc cctgatgaag 360

gaggactcca ttctggctgt gaggaaatac ttccaaagaa tcactctcta tctgaaagag 420

aagaaataca gcccttgtgc ctgggaggtt gtcagagcag aaatcatgag atctttttct 480

ttgtcaacaa acttgcaaga aagtttaaga agtaaggaat aagctt 526

<210> 44

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence of
IFN a2b and Strep-tag II"

<400> 44

Glu Lys Gly Ala Ser Ser Ser Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg

115 120 125

Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser

130 135 140

Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser

145 150 155 160

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

165 170

<210> 45
 <211> 1126
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
 encoding amino acid sequence of the N-terminus of IFN a2b after
 insertion of PAS#1 polymer sequence"
 <400> 45
 gaaaaaggcg ccagctcttc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 60
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 120
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 180

 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 240
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 300
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 360
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 420
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 480
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 540
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 600

 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctgtgat ctgcctcaaa cccacagcct gggtagcagg 660
 aggaccttga tgcctctggc acagatgagg agaattcttc ttttctcctg ctggaaggac 720
 agacatgact ttggatttcc ccaggaggag ttgggcaacc agttccaaaa ggctgaaacc 780
 atccctgtcc tccatgagat gatccagcag atcttcaatc tcttcagcac aaaggactca 840
 tctgtgtctt gggatgagac cctcctagac aaattctaca ctgaactcta ccagcagctg 900
 aatgacctgg aagcctgtgt gatacagggg gtgggggtga cagagactcc cctgatgaag 960
 gaggactcca ttctggctgt gaggaatac ttccaaagaa tcactctcta tctgaaagag 1020

 aagaaataca gcccttgtgc ctgggagggt gtcagagcag aaatcatgag atctttttct 1080
 ttgtcaaca acttgcaaga aagtttaaga agtaaggaat aagctt 1126
 <210> 46
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence of

the N-terminus of IFN a2b after insertion of PAS#1 polymer
sequence"

<400> 46

Glu Lys Gly Ala Ser Ser Ser Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

1 5 10 15

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala

20 25 30

Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala

35 40 45

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser

50 55 60

Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala

65 70 75 80

Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

85 90 95

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala

100 105 110

Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala

115 120 125

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser

130 135 140

Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala

145 150 155 160

Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

165 170 175

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala

180 185 190

Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Leu Arg Ser Lys Glu

370

<210> 47

<211> 487

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
encoding amino acid sequence of IL-1ra and Strep-tag II"

<400> 47

gaaaaaggcg ccagctcttc tgcccgaccc tctgggagaa aatccagcaa gatgcaagcc 60

ttcagaatct gggatgttaa ccagaagacc ttctatctga ggaacaacca actagttgct 120

ggatacttgc aaggaccaa tgtcaattta gaagaaaaga tagatgtggt acccattgag 180

cctcatgctc tgttcttggg aatccatgga gggaagatgt gcctgtcctg tgtcaagtct 240

ggatgatgaga ccagactcca gctggaggca gttaacatca ctgacctgag cgagaacaga 300
aagcaggaca agcgcttcgc cttcatccgc tcagacagcg gccccaccac cagttttgag 360
tctgccgcct gccccggttg gttcctctgc acagcgatgg aagctgacca gcccgtcagc 420
ctcaccaata tgctgacga aggcgtcatg gtcaccaaat tctacttcca ggaggacgag 480
taagctt 487

<210> 48

<211> 160

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence of

IL-1ra and Strep-tag II"

<400> 48

Glu Lys Gly Ala Ser Ser Ser Ala Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser

1 5 10 15

Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr

20 25 30

Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val

35 40 45

Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu

50 55 60

Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser

65 70 75 80

Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu

85 90 95

Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp

100 105 110

Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe

115 120 125

Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met

130 135 140

Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu

145 150 155 160

<210> 49

<211> 1087

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence encoding amino acid sequence of the N-terminus of IL-1ra after insertion of PAS#1 polymer sequence"

<400> 49

gaaaaaggcg ccagctcttc tgccctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 60

ccagctccgt ctgctcctgc tgccctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 120

ccagctccgt ctgctcctgc tgccctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 180

ccagctccgt ctgctcctgc tgccctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 240

ccagctccgt ctgctcctgc tgccctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 300

ccagctccgt ctgctcctgc tgccctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 360

ccagctccgt ctgctcctgc tgccctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 420

ccagctccgt ctgctcctgc tgccctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 480

ccagctccgt ctgctcctgc tgccctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 540

ccagctccgt ctgctcctgc tgccctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca 600

ccagctccgt ctgctcctgc tgcccgaacc tctgggagaa aatccagcaa gatgcaagcc 660

ttcagaatct gggatgttaa ccagaagacc ttctatctga ggaacaacca actagttgct 720

ggatacttgc aaggaccaa tgtcaattta gaagaaaaga tagatgtggt acccattgag 780

cctcatgctc tgttcttggg aatccatgga gggaagatgt gcctgtcctg tgtcaagtct 840

ggtgatgaga ccagactcca gctggaggca gttaacatca ctgacctgag cgagaacaga 900

aagcaggaca agcgcttcgc cttcatccgc tcagacagcg gccccaccac cagttttgag 960

tctgccgcct gccccggttg gttcctctgc acagcgatgg aagctgacca gcccgtcagc 1020

ctcaccaata tgctgacga aggcgtcatg gtcaccaa at tctacttcca ggaggacgag 1080

taagctt 1087

<210> 50

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence of

the N-terminus of IL-1ra after insertion of PAS'1 polymer

sequence"

<400> 50

Glu Lys Gly Ala Ser Ser Ser Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

1 5 10 15

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala

20 25 30

Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala

35 40 45

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser

50 55 60

Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala

65 70 75 80

Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

85 90 95

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala

100 105 110

Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala

115 120 125

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser

130 135 140

Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala

145 150 155 160

Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

165 170 175

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala

180 185 190

Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala

195 200 205

Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp

210 215 220

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

275 280 285
 Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys
 290 295 300
 Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu
 305 310 315 320
 Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp
 325 330 335
 Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr
 340 345 350

Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
 355 360

<210> 51

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence
 encoding amino acid sequence of the C-terminus of a variant of
 NGAL carrying the Strep-tag II"

<400> 51

cagtgtatcg aggcccccagc ttgggtccac ccgcagttcg aaaaataata agctt 55

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence of

the C-terminus of a variant of NGAL carrying the Strep-tag II"

<400> 52

Gln Cys Ile Glu Ala Pro Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5 10 15

<210> 53

<211> 655

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleic acid sequence encoding amino acid sequence of the C-terminus of NGAL after

insertion of the PAS#1 polymer sequence followed by Strep-tag II"

<400> 53

cagtgtatcg aggcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg	60
tctgctctcg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg	120
tctgctctcg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg	180
tctgctctcg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg	240
tctgctctcg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg	300
tctgctctcg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg	360

tctgctctcg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg	420
tctgctctcg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg	480
tctgctctcg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg	540
tctgctctcg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg	600
tctgctctcg ctgccccage ttgggtccac ccgcagttcg aaaaataata agctt	655

<210> 54

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: amino acid sequence of

the C-terminus of NGAL after insertion of the PAS#1 polymer sequence followed by Strep-tag II"

<400> 54

Gln Cys Ile Glu Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala

1 5 10 15
 Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 20 25 30
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala
 35 40 45
 Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala

50 55 60
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 65 70 75 80
 Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala
 85 90 95
 Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 100 105 110
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala
 115 120 125

Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
 130 135 140
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 145 150 155 160
 Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala
 165 170 175
 Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
 180 185 190
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Pro Ala Trp

195 200 205
 Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 210 215

<210> 55

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: nucleotide sequence"

stretch of pASK-2x SapI"

<400> 55

accgcggaga gtgctcttct gcctgaagag ctttaagcttt g 41

<210> 56

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: three repeated copies

of amino acid polymer piSA"

<400> 56

Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala

1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser

20 25 30

Ser Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ser

35 40 45

Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ala

50 55 60

<210> 57

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: three repeated copies

of amino acid polymer PAS#1"

<400> 57

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala

20 25 30

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

35 40 45

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala

50 55 60

<210> 58

<211> 72

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: three repeated copies
of amino acid polymer PAS#5"

<400> 58

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser

20 25 30

Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala

35 40 45

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro

50 55 60

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala

65 70

<210> 59

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: primer"

<400> 59

tctgtgggcg ccagctcttc tgccctgat ctgcctcaaa cccac 45

<210> 60

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: primer"

<400> 60

gaaccaaagc ttattcctta cttcttaaac 30

<210> 61

<211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: primer"
 <400> 61
 acgatcggcg ccagctcttc tgcccgaccc tctgggagaa aatcc 45

<210> 62
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: primer"
 <400> 62
 ctgggcaagc ttactcgtcc tctggaagt ag 32

<210> 63
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: modified amino acid
 polymer PAS#3"
 <400> 63
 Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Ser
 20