



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0133949

(43) 공개일자 2006년12월27일

(21) 출원번호 10-2006-7003700

(22) 출원일자 2006년02월23일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년02월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/028068

(87) 국제공개번호 WO 2005/021777

국제출원일자 2004년08월26일

국제공개일자 2005년03월10일

(30) 우선권주장	279/MUM/2004	2004년03월05일	인도(IN)
	280/MUM/2004	2004년03월05일	인도(IN)
	60/498,449	2003년08월28일	미국(US)
	60/498,785	2003년08월28일	미국(US)
	60/498,923	2003년08월28일	미국(US)

(71) 출원인 휴이양테크 (유에스에이), 인크.
미국 뉴욕 11357 화이트스톤 141-07 20 애비뉴 슈트 604 월드 플라자

(72) 발명자 웨이, 구양웬
중국 시추안 610 017 쉹두 유사 로드 넘버 8

(74) 대리인 최은실
김경희
정우성

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 단백질 기능을 조절하기 위한 공간 배열의 용도

(57) 요약

본 발명은 단백질의 공간 배열을 조절하기 위한 방법을 제공한다. 첫째로, 숙주 코돈 용법에 따른 표적 단백질을 암호화하는 아미노산 코돈을 선별한다. 두번째로, 공간 배열을 조절할 수 있는 조합을 선별하여 숙주를 형질전환할 수 있는 상이한 벡터내로 작제한다. 세번째로, 프로모터의 암호 서열 및 표적 단백질을 조합한 다음 염기쌍의 조합을 모니터링함으로써 벡터 프로모터를 선별한다. 마지막으로, 표적 단백질의 발현, 리폴드(refold) 및 정제하기 위해 적절한 발현 숙주를 선별하여 활성도 및 공간 배열을 측정한다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

- a) 단백질의 코돈 용법을 변경하는 단계;
- b) 정제된 단백질을 수득하기 위해 상기 변경된 코돈을 사용하여 단백질을 발현시키는 단계; 및
- c) 변경된 코돈 용법을 갖는 발현된 단백질을 변경된 코돈 용법을 갖지 않는 단백질과 비교하는 단계를 포함하는 상기 단백질의 1차 아미노산 서열을 바꾸지 않고 단백질의 기능을 조절하기 위한 방법에 있어서, 기능의 증가 또는 새로운 기능의 확인은 상기 단백질의 기능이 조절되었음을 나타내는 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 변경된 코돈 용법은 상기 단백질의 높은 발현을 초래하는 방법.

청구항 3.

- a) 단백질의 코돈 용법을 변경하는 단계;
- b) 정제된 단백질을 수득하기 위해 상기 변경된 코돈을 사용하여 단백질을 발현시키는 단계; 및
- c) 변경된 코돈 용법을 갖는 발현된 단백질을 변경된 코돈 용법을 갖지 않는 단백질과 비교하는 단계를 포함하는 상기 단백질의 1차 아미노산 서열을 바꾸지 않고 향상되거나 또는 새로운 기능을 갖는 단백질의 제조 방법에 있어서, 기능의 증가 또는 새로운 기능의 확인은 향상 및 새로운 기능을 갖는 단백질이 제조되었음을 나타내는 방법.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 변경된 코돈 용법은 상기 단백질의 높은 발현을 초래하는 방법.

청구항 5.

제 3항 또는 제 4항의 방법에 의해 제조되는 단백질.

청구항 6.

독특한 2차 또는 3차 구조를 갖는 제 5항의 단백질.

청구항 7.

발현될 때 향상된 또는 새로운 기능을 나타내는 변경된 코돈을 갖는 합성 유전자.

청구항 8.

제 7항의 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 9.

제 7항의 유전자를 포함하는 발현 시스템.

청구항 10.

제 7항의 유전자를 포함하는 숙주 세포.

청구항 11.

선택된 코돈 선호(codon preference)를 갖는 인공 유전자를 적절한 숙주내로 도입, 상기 단백질의 발현을 위한 적절한 조건하에서 상기 도입된 숙주를 배양 및 상기 발현된 단백질을 채취하는 것을 포함하는 향상된 기능 또는 새로운 기능의 단백질을 생성하는 방법.

청구항 12.

제 11항에 있어서, 상기 인공 유전자는 효과적으로 벡터에 결합되는 방법.

청구항 13.

제 11항에 있어서, 발효 배양액(broth)으로부터 상기 단백질의 추출 또는 봉입체의 수집 및 채취된 단백질의 변성 및 복원을 포함하는 방법.

청구항 14.

제 11항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 단백질.

청구항 15.

제 5항, 제 6항 또는 제 14항의 단백질을 포함하는 조성물 및 적절한 담체.

청구항 16.

제 5항, 제 6항 또는 제 14항의 생성된 단백질을 포함하는 약제학적 조성물 및 약제학적으로 허용가능한 담체.

명세서

기술분야

본 발명은 단백질 기능을 조절하기 위한 공간 배열에 관한 것이다.

배경기술

사람 게놈 프로젝트의 완성은 많은 유전자의 치료 효과를 입증하였으며 이들 유전자의 일부는 치료 단백질로 개발되었지만, 이들 유전자의 대부분은 당해 기술분야의 유전자 또는 단백질 기법에 의해 조절될 수 없다. 이들 유전자는 이들 유전자가 갖는 완전한 치료 효과를 유지하는 단백질로 정확하게 번역될 수 없다. 성공적인 단백질 번역을 위한 가장 큰 장애는 정확한 단백질-폴딩이다. 효과적인 공간 배열을 갖는 단백질을 어떻게 획득하는지에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

아미노산 서열의 변동 없이 단백질의 공간 배열을 바꾸는 것은 특정 단백질의 기능을 바꿀 수 있을 것이다. 예를들면, 비정상적인 3차 구조를 갖는 일부 단백질은 광우병(BSE), 알츠하이머 질환, 낭포성 섬유증, 가족에 유전하는 아밀로이드 질환, 특정 암종 또는 백내장과 같은 질환을 사람 및 동물에서 유발할 수 있다. 이들 질환은 폴딩-질환으로 또한 불린다. "프리온" 단백질은 BSE를 유발하며 정상 단백질을 감염시킬 수 있다.

단백질 구조의 연구 과정에서 단백질의 정확한 공간 구조를 회수하는 데 가장 중요한 부분은, 변성 및 리폴딩(refolding) 기술이라고 대부분의 연구자들은 생각한다. 수많은 문헌들은 다양한 샤프론(chaperon) 또는 역미셀 등과 관련된 리폴딩에 대한 개선을 보고하였다. 더욱 천연의 환경에서 그러한 단백질이 발견되도록 많은 분비 발현 벡터가 개발되었지만, 이러한 모든 노력들은 질적 변화가 아닌 단백질의 수율의 증가만을 초래하였다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 단백질의 공간 배열을 조절하기 위한 방법을 제공한다. 첫째로, 숙주 코돈 용법에 따른 표적 단백질을 암호화하는 아미노산 코돈을 선별한다. 둘째로, 공간 배열을 조절할 수 있는 조합을 선별하여 숙주를 형질전환할 수 있는 상이한 벡터내로 작제한다. 그러므로, 적절한 숙주를 갖는 적합한 벡터가 선택될 것이다. 세번째로, 프로모터의 암호 서열 및 표적 단백질을 조합한 다음 염기쌍의 조합을 모니터링함으로써 벡터 프로모터를 선별한다. 마지막으로, 표적 단백질의 발현, 리폴드(refold) 및 정제하기 위해 적절한 발현 숙주를 선별하여 활성도 및 공간 배열을 측정한다.

본 발명은 단백질-작제 과정중에 표적 단백질의 아미노산을 암호화하는 코돈의 변화, 선택 벡터의 차이, 프로모터의 조절 및 숙주 발현 벡터의 선별, 심지어는 변성 및 복원의 조건, 병원체 등은 표적 단백질의 공간 배열을 조절하기 위해 조절할 수 있는 인자들임을 발견하였다. 따라서, 새로운 기능을 얻기 위해 그리고 활성도를 향상시키기 위해 단백질의 공간 배열의 조절은 체계적인 분석의 결과이다.

본 발명은 a) 상기 단백질의 코돈 용법을 변경하는 단계; b) 정제된 단백질을 획득하기 위해 상기 변경된 코돈을 사용하여 단백질을 발현시키는 단계; 및 c) 변경된 코돈 용법을 갖는 발현된 단백질을 변경된 코돈 용법을 갖지 않는 단백질과 비교하는 단계를 포함하는 상기 단백질의 1차 아미노산 서열을 바꾸지 않고 단백질의 기능을 조절하기 위한 방법을 제공하며, 여기에서 기능의 증가 또는 새로운 기능의 확인은 단백질 기능이 조절되었음을 나타낸다.

한 구체예로서, 상기 변경된 코돈 용법은 상기 단백질의 높은 발현을 초래한다.

본 발명은 a) 상기 단백질의 코돈 용법을 변경하는 단계; b) 정제된 단백질을 획득하기 위해 상기 변경된 코돈을 사용하여 단백질을 발현시키는 단계; 및 c) 변경된 코돈 용법을 갖는 발현된 단백질을 변경된 코돈 용법을 갖지 않는 단백질과 비교하는 단계를 포함하는 상기 단백질의 1차 아미노산 서열을 바꾸지 않고 향상된 또는 새로운 기능을 갖는 단백질을 제조하는 방법을 또한 제공하며, 여기에서 기능의 증가 또는 새로운 기능의 확인은 향상된 또는 새로운 기능을 갖는 단백질이 제조되었음을 나타낸다.

한 구체예로서, 상기 변경된 코돈 용법은 상기 단백질의 높은 발현을 초래한다. 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 단백질을 또한 제공한다. 한 구체예로서, 상기 단백질은 독특한 2차 또는 3차 구조를 갖는다.

본 발명은 발현될 때 향상되거나 또는 새로운 기능을 생성하는 변경된 코돈을 갖는 합성 유전자를 또한 제공한다. 한 구체예로서, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현 시스템을 제공한다. 또 다른 구체예로서, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

본 발명은 선택된 코돈 선호(codon preference)를 갖는 인공 유전자를 적절한 숙주내로 도입, 상기 단백질의 발현을 위한 적절한 조건하에서 상기 도입된 숙주를 배양 및 상기 발현된 단백질을 채취하는 것을 포함하는 향상된 기능 또는 새로운 기능의 단백질을 생성하는 방법을 또한 제공한다.

본 발명은 상기 방법을 제공하는 바, 상기에서 인공 유전자는 효과적으로 벡터에 결합된다. 한 구체예로서, 상기 방법은 발효 배양액(broth)으로부터 상기 단백질의 추출 또는 봉입체의 수집 및 채취된 단백질의 변성 및 복원을 포함한다.

본 발명은 상기 임의의 방법에 의해 생성된 단백질을 또한 제공한다.

본 발명은 상기 임의의 단백질 및 적절한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 상기 생성된 임의의 단백질 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 또한 제공한다.

본 발명의 한가지 중요한 점은, 상기 유전자로부터 유래된 기능 또는 통상적인 기술을 사용하여 생성되는 단백질에서 나타나지 않는 기능을 갖거나 또는 현존하는 단백질과 비교할 때 향상된 활성도를 갖는 단백질내로 치료 효과를 갖는 유전자의 번역 과정에서 단백질의 공간 배열을 조절한다는 것이다.

인터페론의 경우, 사람 INF- α 의 유전자를 역전사 발현 벡터내로 작제하여 PDOR-INF- α 의 발현 벡터를 생성하고, 이어 2.2.15 세포를 형질감염시킨다. 세포의 배양 상청액에서 HBsAg 및 HBeAg를 측정한다. 상기 결과는 HBsAg 및 HBeAg에 대한 rSIFN-co의 억제율이 62% 및 67.7%이었지만, 유전자 재조합 기법에 의해 생성된 재조합 인터페론 단백질은 시험관내에서 상기 효과를 갖지 않음을 나타낸다. 또한, 역전사 바이러스 벡터를 사용하여 사람 INF- α 2 발현 벡터의 작제 및 발현 벡터를 HIV 세포 균주-A3.01내로의 형질감염 시험은 HIV-DNA의 복제 및 전사를 완전히 억제할 수 있음을 입증하였다. 그러나, 인터페론의 효과는 HIV 질환의 치료에 제한된다.

실시예

실시예 1: INF-CONL의 입체배치 재구성

rSIFN-co는 유전공학 방법에 의해 사람 INF- α 서브타입의 보존성 아미노산에 따라 작제된 새로운 인터페론 분자이다. 상기 인터페론은 미국특허 번호 제4,695,263호 및 제4,897,471호에 개시되어 있으며, 강한 항바이러스 효과, 항-종양 및 천연 세포 치사 효과를 갖는 광범위-스펙트럼 인터페론 활성을 갖는 것으로 문헌 및 특허에서 입증되었다.

상기 DNA 코딩 서열은 먼저, pHY-4 벡터내로 삽입의 작제, P_{BAD} 프로모터에 의한 다운-스트림 발현의 매개, 이어 숙주 로 E. Coli를 선택함으로써 E. Coli 코돈 용법에 따라 재고안하였다. 상기 높은 순도의 생성물은 POROS HS/M 양이온 교환 크로마토그래피 후, 6mol/L 구아니딘 히드로클로리드에 의한 변성 → 4mol/L 아르기닌에 의한 복원 → Cu²⁺-킬레이트 친화도 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 수득하였다.

rSIFN-co 및 IFN-con1간의 B형 간염 바이러스 DNA의 복제 및 HBsAg 및 HBeAg 억제의 분비에 대한 비교 시험에서 rSIFN-co는 IFN-con1이 갖지 않는 HBsAg 및 HBeAg의 분비억제 효과를 가지는 것으로 입증되었다. 다른 시험에서, 상기 HBV 코어/예비게놈(C/P) 프로모터 및 연합 시스-작용 요소를 루시페라아제-암호화 플라스미드의 업스트림에 두었다. 이 리포터 작제물을 HpeG2 세포내로 형질감염시켰다. 상기 세포를 상이한 인터페론으로 처리하였으며 루시페라아제 리포터 유전자 발현을 측정하였다. rSIFN-co는 루시페라아제 리포터 유전자 발현의 68%를 억제할 수 있는 반면, IFN-con1 및 IFN- α 2b는 각각 35% 및 27%만을 억제하는 것으로 결과가 나타났다. 그러므로, HBcAg에 대한 rSIFN-co의 억제효과는 명백히 향상되었다.

한편, 원편광 이색성 스펙트럼은 IFN-con1과 비교함으로써 rSIFN-co의 2차 구조에 차이가 있음을 또한 입증하였다.

이들 비교 시험은 하기에 상세하게 설명된다.

1) 원편광 이색성 스펙트럼의 비교

주소: 시추안(Sichuan) 대학의 분석 및 시험 센터

장치: J-500C 원편광 이색성 장치(스펙트럼 범위: 250-190nm / 민감도: 2m⁰/cm / 광 경로: 0.2cm. (도 1 및 도 2 참조).

2) rSIFN-co는 HBV-DNA 복제 및 HBsAg 및 HBeAg의 분비를 억제한다.

시료

용매 및 조제 방법: 1 ml의 식염수를 각각의 바이엘에 넣어 용해시키고 상이한 농도에서 MEM 배양 배지와 즉시 혼합한다.

대조용 약물: 동결건조 분말로서 Schering Plough로부터 구입한 IFN-α2b(인트론 A). 3x10⁶U 각각을 배양 배지와 혼합하여 3x10⁶IU/ml을 만듦; Amgen로부터 구입한 0.9μg INFERGEN(액체 용액), 9x10⁶IU와 동일한 0.3ml 각각을 9x10⁶IU/ml 배양 배지와 혼합하여 4℃에서 보관; 2.2.15 세포: 간종양(Hep G2)의 2.2.15 세포주는 클론을 만들어 HBV DNA에 의해 형질감염시키고, Mount Sinai Medical Center에 의해 작제하였다.

시약: MEM 분말(Gibco American Ltd), 송아지 혈청(HycloneLab American Ltd), G-418(게네티신), MEM 디스펜싱(Gibco American Ltd), L-글루타미드(JING KE Chemical Ltd), HBsAg 및 HBeAg 고체-상 방사면역에세이 박스(Northward Reagent Institute of Chinese Isotope Ltd), 바이오그란세티나(Northern China Medicine) 및 리포펙틴(Gibco American Ltd).

시험 장치: 배양용기(Denmark TunclonTM), 24-웰 및 96-웰 배양판(Corning American Ltd), 이산화탄소 해칭 박스(Shel-Lab American Ltd), MEM 배양 배지 100ml, 10% 송아지 혈청, 0.03% 글루타민, G418 380μg/ml, 바이오그란세티나 50U/ml.

방법:

2.2.15 세포 배양: 0.25% 취장 효소를 배양 박스에 부가하여 2.2.15 세포로 가득채웠다. 37℃에서 3분동안 분해시키고, 배양 배지를 부가하여 분해를 중단하였으며 상기 세포를 분산시켰다. 1:13의 비율로 번식시켜 10일 후에 최대 성장에 도달하였다.

독성 시험: 상이한 농도 그룹 및 세포가 약물과 작용하지 않는 대조용 그룹을 설정하였다. 세포를 분해시켜 100,000세포/ml 용액으로 조제하였다. 96-웰 배양 판에 접종시켜 웰당 200μl이 되게 하였다. 5% CO₂를 사용하여 37℃에서 24시간동안 배양시켰다. 단일 세포 층이 성장할 때 시험하였다.

rSIFN-co를 1.8 x 10⁷IU/ml 용액으로 분배하고 이어, 이중 구배에서 희석된 용액을 제조하였다. 96-웰 배양 판에 부가하여 농도당 3개 웰을 만들었다. 4일마다 상기 용액을 바꾸었다. 8일 후 현미경으로 세포변성 효과를 시험하였다. 완전한 파괴는 4로, 75%는 3으로, 50%는 2로, 25%는 1로, 0%는 0으로 나타냈다. 상이한 농도에서 평균 세포 병변 및 억제율을 계산하였다. Reed Muench 방법에 따라 TC50 및 TC0을 계산하였다.

$$TC50 = \text{안티로그} \left(B + \frac{50-B}{A-B} \times C \right)$$

A= 로그 > 50% 약물 농도; B= 로그 <50% 약물 농도; C= 로그 희석 분말.

HBeAg 및 HBsAg에 대한 억제시험: 양성 및 음성 HBeAg 및 HBsAg 대조군 그룹, 세포 대조군 그룹 및 약물 농도 그룹으로 분리하였다.

700,000 세포/ml의 2.2.15 세포를 6-웰 배양 판내로 접종시키고, 웰당 3ml가 되게 하였으며, 5% CO₂를 사용하여 37℃에서 24시간 동안 배양시키고, 이어 삼중 구배에서 5개 희석된 용액을 제조하였으며(5개 용액의 제조에서, 각각은 상이한 단백질 농도로 제조하였다. 용액 2의 농도는 용액 1의 농도보다 3배가 낮으며, 용액 3의 농도는 용액 2의 농도보다 3배가 낮다 등), 5개 용액의 농도는 4.5x10⁶IU/ml, 1.5x10⁶IU/ml, 0.5x10⁶IU/ml, 0.17x10⁶IU/ml 및 0.056x10⁶IU/ml이며, 농

도당 1개 웰을 만들었으며, 5% CO₂를 사용하여 37°C에서 24시간동안 배양시켰다. 동일한 용액을 사용하여 4일마다 용액을 바꾸었다. 8일째에 모든 배양 배지를 수집하였다. -20°C에서 보관하였다. 고체-상 방사면역에세이 박스를 사용하여 HBeAg 및 HBsAg를 측정하기 위해 시험을 3회 반복하였다(Northward Reagent Institute of Chinese Isotope Ltd.). γ-어카운팅 기계를 사용하여 각 웰의 cpm 값을 측정하였다.

효과 측정: 대조군 그룹 및 상이한 농도 그룹의 cpm 평균 값 및 이들의 표준편차, 억제율과 같은 P/N 값, IC50 및 SI를 측정하였다.

$$1) \text{항원 억제율}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A= 대조군의 cpm; B= 시험 군의 cpm.

2) 약물 반-효능(half-efficiency) 농도를 계산하였다.

$$\text{항원 억제 IC50} = \text{안티로그} \left(B + \frac{50-B}{A-B} \times C \right)$$

A= 로그 > 50% 약물 농도; B= 로그 < 50% 약물 농도; C= 로그 희석 분말.

3) 인터스페이스-입체배치의 SI는 2.2.15 세포 배양액에서 HBsAg 및 HBeAg에 대한 rSIFN-co 효과를 바꾸었다.

$$SI = \frac{TC50}{IC50}$$

4) 학생 t 시험을 사용한 대조군 그룹으로부터 각 희석 정도의 cpm 차이를 측정하였다.

서던 블롯: (1) 2.2.15 세포에서 HBV-DNA를 추출하고 세포를 8일동안 배양하였다. 배양 배지를 외흡입(exsuction)하였다(상기 배양 배지를 배출(drainage)시킴으로써 배양 배지로부터 세포를 분리함). 용해 완충액을 부가하여 세포를 파괴시키고 이어, 페놀, 클로로포름 및 이소아밀 알코올의 혼합물(1:1:1)로 2회 추출하여 10,000g 원심분리하였다. 침전된 핵산에 무수 알코올을 부가함으로써 상청액을 수집하였다. 진공으로 흡입하여 20μl TE 완충액에서 다시 용해시켰다. (2) 전기영동: 6X DNA 로딩 완충액을 부가하고, 고정 압력에서 14-18시간 동안 1.5% 아가로스 겔, 상에서 전기영동하였다(IV/cm). (3) 변성 및 잡종교배: 겔을 HCl, 변성 완충액 및 중화된 완충액에 각각 담그었다. (4) 막 횡단: 하이본드(Hybond)-N 막으로 DNA를 순서대로 운반하였다. 점 블롯 잡종교배를 사용하여 베이킹(bake), 잡종교배 및 노출시켰다. 겔-프로 소프트웨어를 사용하여 스캔 및 상대밀도 분석하였다. 억제율 및 IC50 계산하였다.

결과

결과는 표 1, 2 및 3에 나타내었다. 2.2.15 세포를 사용하여 8일동안 최대 무해 농도지수에서 배양한 후, 상기 최대값은 9.0±0x10⁶IU/ml이었으며, HBeAg에 대한 최대 무해 농도 rSIFN-co의 평균 억제율은 46.0±5.25%(P < 0.001)이었으며, IC50은 4.54±1.32x10⁶IU/ml이었으며, SI는 3.96이었으며; HBsAg에 대한 비율은 44.8±6.6%이었으며, IC50은 6.49±0.42x10⁶IU/ml이었으며, SI는 2.77이었다. 이는 rSIFN-co 가 HBeAg 및 HBsAg의 활성도를 상당히 억제할 수 있지만, 대조군의 IFN 및 INFERGEN은 억제할 수 없음을 나타낸다. rSIFN-co은 HBeAg 및 HBsAg를 감소시킬 수 있거나 또는 이들을 정상 수준으로 회복시킬 수 있다.

(표 1)

HBsAg 및 HBeAg에 대한 rSIFN-co의 억제율 결과

첫번째 배치(batch):(rSIFN-co)

HBeAg에 대한 억제효과											
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	억제율			평균 억제율	축적 억제율	1-축적 억제율	축적된 억제율				
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰								
900	9026	8976	10476	0.436227	0.43925	0.345659	0.407079	0.945909	0.592921	0.614693546	
300	9616	12082	10098	0.3993754	0.245347	0.369269	0.337997	0.5388299	1.254924	0.300392321	
100	9822	16002	12800	0.386508	0.0005	0.2005	0.195836	0.200833	2.059088	0.08867188	
33.33333	15770	19306	16824	0.014991	0	0	0.004997	0.0049969	3.054091	0.001633453	
11.11111	19172	22270	18934	0	0	0	0	0	4.051091	0	
대조용	세포	16010		블랭크	0		회석	3	IC50	602.7446016	
HBsAg에 대한 억제효과											
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	억제율			평균 억제율	축적 억제율	1-축적 억제율	축적된 억제율				
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰								
900	7705	7240	7114	0.342155	0.381936	0.392693	0.372261	0.922258	0.627739	0.595006426	
300	8856	7778	9476	0.2439816	0.336008	0.191053	0.257014	0.5499972	1.370724	0.286349225	
100	10818	10720	10330	0.07649	0.084856	0.118149	0.093165	0.292983	2.27756	0.113977019	
33.33333	10744	11114	10570	0.082807	0.051221	0.097661	0.07723	0.1998179	3.20033	0.058767408	
11.11111	10672	9352	10810	0.088953	0.201639	0.077173	0.122588	0.122588	4.077742	0.02918541	
대조용	세포	11714		블랭크	0		회석	3	IC50	641.7736749	

두번째 배치(batch):(rSIFN-co)

HBeAg에 대한 억제효과												
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	억제율						평균 억제율			1-축적	축적된 억제율	
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰			
900	7818	8516	9350	0.554378	0.514592	0.467054	0.371181	0.512008	1.371181	0.487992	0.737521972	
300	10344	10628	9160	0.4103967	0.394209	0.477884	0.8591731	0.427497	0.8591731	1.060496	0.447563245	
100	12296	14228	13262	0.299134	0.18901	0.244072	0.4316522	0.244072	0.4316522	1.816423	0.19201839	
33.33333	15364	17414	16188	0.124259	0.00741	0.77291	0.069653	0.069653	0.1876045	2.74677	0.063933386	
11.11111	17386	13632	15406	0.009006	0.222982	0.121865	0.117951	0.117951	0.117951	3.628819	0.03148073	
대조용	세포	16962	불량크	0	0	0	0	0	0	IC50	365.9357846	
HbsAg에 대한 억제효과												
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	억제율						평균 억제율			1-축적	축적된 억제율	
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰			
900	5784	6198	5792	0.498265	0.462353	0.497571	0.893477	0.486063	0.893477	0.513937	0.634835847	
300	7150	8534	8318	0.379771	0.259715	0.278452	0.4074138	0.30598	0.4074138	1.207957	0.252210647	
100	9830	11212	10210	0.147294	0.027412	0.11433	0.101434	0.096345	0.101434	2.111612	0.04583464	
33.33333	13942	12368	13478	0	0	0	0.0050891	0	0.0050891	3.111612	0.001632835	
11.11111	12418	11634	11352	0	0	0.015267	0.005089	0.005089	0.005089	4.106523	0.001237728	
대조용	세포	16962	불량크	0	0	0	0	0	0	IC50	611.0919568	

세번째 배치(batch):(rSIFN-co)

HBeAg에 대한 억제효과											
농도 (x104IU/ml)	억제율			세번째 웰	평균 억제율	1-축적	축적된 억제물	억제율			축적된 억제물
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰					첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	
900	9702	9614	8110	0.428016	0.433204	0.52187	0.461031	1.316983	0.538969	0.709599543	0.440859127
300	8914	10032	8870	0.4744723	0.40856	0.47706	0.453366	0.8559525	1.085603	0.440859127	0.440859127
100	16312	12688	13934	0.038321	0.251975	0.17851	0.156271	0.402586	1.929332	0.1726641621	0.1726641621
33.33333	15080	12814	13288	0.110954	0.244547	0.21660	0.190701	0.2463153	2.738631	0.082519158	0.082519158
11.11111	21928	15366	15728	0	0.094093	0.07275	0.005561	0.055615	3.683017	0.014875633	0.014875633
대조용	세포	17544		블랭크	0		회색	3	IC50	382.0496935	
HBsAg에 대한 억제효과											
농도 (x104IU/ml)	억제율			세번째 웰	평균 억제율	1-축적	축적된 억제물	억제율			축적된 억제물
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰					첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	
900	5616	6228	5346	0.496864	0.442035	0.52105	0.486651	0.763125	0.513349	0.597838293	0.597838293
300	8542	8590	7096	0.234725	0.230425	0.36427	0.276474	0.2764738	1.236875	0.182690031	0.182690031
100	11420	11360	11394	0	0	0	0	0	2.236875	0	0
33.33333	12656	11582	13110	0	0	0	0	0	0	0	0
11.11111	13142	12336	13342	0	0	0	0	0	4.236875	0	0
대조용	세포	11528		블랭크	0		회색	3	IC50	694.7027149	

HBeAg: 평균 IC50: 450.2434 SD: 132.315479
 HBsAg: 평균 IC50: 649.1894 SD: 42.29580

(표 2)

HBsAg 및 HBeAg에 대한 인터론 A(IFN-a2b)의 억제율 결과

HBeAg에 대한 억제효과										
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	억제율				세번째 웰	평균 억제율	1-축적	축적된 억제율	1-축적	축적된 억제율
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	네번째 웰						
300	14918	11724	9950	0	0.029711	0.176529	0.068747	0.068747	0.931253	0.06874724
100	14868	16890	15182	0	0	0	0	0	1.931253	0
33.33333	16760	21716	16400	0	0	0	0	0	2.931253	0
11.11111	20854	15042	16168	0	0	0	0	0	3.931253	0
3.703704	12083	12083	12083	0	0	0	0	0	4.931253	0
대조용	세포	17544		블랭크	0		회색	3	IC50	가상 (false)
HBsAg에 대한 억제효과										
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	억제율				세번째 웰	평균 억제율	1-축적	축적된 억제율	1-축적	축적된 억제율
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	네번째 웰						
300	9226	8196	9658	0.152489	0.247106	0.521054	0.1708	0.189295	0.8292	0.185857736
100	10946	10340	10828	0	0.050156	0.364272	0.018495	0.018494	1.810705	0.010110817
33.33333	12250	12980	13934	0	0	0	0	0	2.810705	0
11.11111	12634	12342	12000	0	0	0	0	0	3.810705	0
3.703704	10886	10886	10886	0	0	0	0	0	4.810705	0
대조용	세포	10886		블랭크	0		회색	3	IC50	가상 (false)

(표 3)

HBsAg 및 HBeAg에 대한 인페르겐의 억제율 결과

첫번째 배치(batch):(인페르겐)

HBeAg에 대한 억제효과												
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	억제율			평균 억제율	축적	1-축적	축적된 억제율		
				첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰						
900	14172	12156	17306	0.091655	0.220869	0	0.104175	0.306157	0.895825	0.254710274		
300	13390	12288	16252	0.1417767	0.212409	0	0.118062	0.2019827	1.777764	0.102024519		
100	14364	18834	14194	0.079349	0	0.090245	0.056531	0.083921	2.721232	0.029916678		
33.33333	15722	16034	16340	0	0	0	0	0.0273897	3.721232	0.007306592		
11.11111	17504	17652	14320	0	0	0.082169	0.02739	0.02739	4.693843	0.005801377		
대조용	세포	15602		불명크	0	0	최소치		IC50	가성(1a)99		
HbSAg에 대한 억제효과												
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	억제율			평균 억제율	축적	1-축적	축적된 억제율		
				첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰						
900	12080	11692	12234	0	0.01275	0	0.00425	0.025163	0.99575	0.024647111		
300	12840	11484	12350	0	0.030313	0	0.010104	0.0209125	1.985646	0.010422073		
100	12894	14696	15086	0	0	0	0	0.010808	2.985646	0.003606955		
33.33333	15032	12928	13020	0	0	0	0	0.0108081	3.985646	0.002704416		
11.11111	11794	11984	11508	0.004137	0	0.028287	0.010808	0.010808	4.974837	0.002167838		
대조용	세포	11843		불명크	0	0	최소치		IC50	가성(1a)99		

두번째 배치(batch):(인페르겐)

HBeAg에 대한 억제효과											
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	첫번째 웰			두번째 웰			세번째 웰			평균 억제율	
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	1-축적	축적된 억제율
900	6278	6376	6408	0.200051	0.187564	0.183486	0.190367	0.274635	0.809633	0.253290505	
300	7692	9092	6394	0.0198777	0	0.18527	0.068383	0.0842678	1.74125	0.046161005	
100	8960	7474	8190	0	0.047655	0	0.015885	0.015885	2.725365	0.005794856	
33.33333	8530	8144	9682	0	0	0	0	0	3.725365	0	
11.11111	7848	7848	7848	0	0	0	0	0	4.725365	0	
대조용	세포			블랭크			희석			IC50	
				0			0			3	
HBsAg에 대한 억제효과											
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	첫번째 웰			두번째 웰			세번째 웰			평균 억제율	
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	1-축적	축적된 억제율
900	12364	12268	12274	0.036171	0.043655	0.043187	0.041004	0.140162	0.958996	0.12751773	
300	11590	12708	13716	0.0965076	0.009355	0	0.035287	0.0991561	1.923709	0.0490186	
100	12448	13468	13982	0.029623	0	0	0.009874	0.063871	2.913834	0.02144964	
33.33333	12616	11346	12444	0.016526	0.115529	0.029935	0.053996	0.053996	3.859838	0.013796309	
11.11111	12828	12828	12828	0	0	0	0	0	4.859838	0	
대조용	세포			블랭크			희석			IC50	
				0			0			3	

세번째 배치(batch):(인페르겐)

HBeAg에 대한 억제효과												
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	억제율				평균 억제율	1- 축적	축적	축적된 억제율	억제율			
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	네번째 웰					첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	네번째 웰
900	7240	6642	6158	0.064599	0.14186	0.204393	0.217399	0.863049	0.201211735	0.863049	0.201211735	
300	11072	8786	6902	0	0.108269	0.03609	0.0804479	1.82696	0.042176564	1.82696	0.042176564	
100	7016	5726	7552	0.09354	0	0.024289	0.044358	2.787683	0.015663017	2.787683	0.015663017	
33.33333	7622	6866	8676	0.015245	0	0	0.0050818	3.782601	0.001341671	3.782601	0.001341671	
11.11111	7740	7740	7740	0	0	0	0	4.782601	0	4.782601	0	
대조용	세포	7740	7740	블랭크	0	0	0	IC50	가성(false)	IC50	가성(false)	
HBSAg에 대한 억제효과												
농도 ($\times 10^4$ IU/ml)	억제율				평균 억제율	1- 축적	축적	축적된 억제율	억제율			
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	네번째 웰					첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	네번째 웰
900	11048	11856	11902	0.04775	0	0	0.015917	0.984083	0.015916796	0.984083	0.015916796	
300	13454	12896	11798	0	0	0	0	1.984083	0	1.984083	0	
100	12846	13160	12546	0	0	0	0	2.984083	0	2.984083	0	
33.33333	12680	12458	12360	0	0	0	0	3.984083	0	3.984083	0	
11.11111	11602	11602	11602	0	0	0	0	4.984083	0	4.984083	0	
대조용	세포	11602	11602	블랭크	0	0	0	IC50	가성(false)	IC50	가성(false)	

HBeAg: 평균 IC50: 0 SD: 0
HBSAg: 평균 IC50: 0 SD: 0

실시예 2: HBV 유전자 발현에 대한 상이한 인터페론의 억제효과 비교

B형 간염 바이러스(HBV) DNA는 결합 활성도가 인터페론에 의해 조절되는 단백질의 트랜스액티베이트를 위한 컨센서스 요소를 함유한다. 인터페론에 의한 HBV-감염 간세포의 치료는 HBV 유전자 발현의 억제를 초래하였다. 이 연구의 목적은 HBV 조절 전사에 대한 상이한 인터페론의 효과가 특징이다. HBV-인핸서(Enh) I, Enh II 및 코어 프로모터의 조절하에서 반딧불 루시페라아제 유전자를 함유하는 리포터 플라스미드에 의한 사람 간종양 세포의 일시적인 형질감염을 사용하여, 출원인은 전사에 대한 세가지 상이한 인터페론의 생물학적 활성도를 연구하였다.

시료 및 방법

1. 인터페론: IFN-con1(Infergen®), IFN-Hui-Yang(γ SIFN-co) 및 IFN-베타1b
2. 리포터 플라스미드: HBV-인핸서(Enh) I, Enh II 및 코어 프로모터를 함유하는 상기 DNA 단편은 PCR를 사용하여 제조하였으며, 무딘-말단(blunt-end)은 상기 프로모터- 및 인핸서-없는 반딧불 루시페라아제 리포터 플라스미드 pGL3-베이직(미국 위스콘신주 Promega)의 Sma I 부위내로 클론화하였다. 생성된 리포터 플라스미드는 pGL3-HBV-Luc로 명명하였다.
3. 세포 배양 및 DNA 형질감염: HepG2 세포는 10% FBS 및 100U/ml 페니실린 및 100ug/ml 스트렙토마이신이 부가된 DMEM 배지에서 배양하였다. 상기 세포를 30°C, 5% CO₂ 인큐베이터에 두었다. Boehringer 리포펙틴 형질감염 키트를

사용하여 pGL3-HBV-Luc 리포터 플라스미드로 상기 세포를 형질감염시켰다. 18시간 후, 형질감염 시약을 함유한 상기 배지를 제거하고 인터페론이 있는 또는 인터페론이 없는 새로운 배지를 부가하였다. 상기 세포를 다른 48시간 동안 배양액에 두었다.

4. 루시페라아제 에세이: 인터페론을 부가한 지 48시간 후, 상기 세포를 채취하고 세포 용해를 제조하였다. 바이오-라드 (Bio-Rad) 단백질 에세이 키트를 사용하여 세포 용해물의 단백질 농도를 측정하였다. 상기 루시페라아제 활성도는, 제조사의 지시에 따라 Promega 루시페라아제 리포터 에세이 시스템을 사용하여 측정하였다.

결과

상기한 인터페론-처리된 세포 용해물에서 루시페라아제 활성도의 발현

미처리 IFN-con1 IFN-Hui-Yang IFN-베타1b

100 48+ 8 29+ 6 64+ 10

상기 결과는 γ SIFN-co가 HBV 유전자 발현에 대한 발현을 가장 효과적으로 억제함을 나타냈다.

실시예 3: γ SIFN-co를 사용할 때 부작용 및 체온의 변화

인터페론 사용과 관련하여 더 많은 부작용이 있다. 이러한 부작용으로는 오심, 근육통, 식욕감소, 탈모, 저백혈구증가증 및 혈소판 감소 등을 포함한다.

방법

환자를 두 그룹으로 분류하였다. A 그룹의 11명 환자에게 9 μ g Infergen[®]을 주입시키고, B 그룹의 10명 환자에게 9 μ g γ SIFN-co를 주입하였다. 주입 후, 상기 두 그룹을 48시간 동안 모니터링하였다. 주입한 지 한 시간 후, 첫번째 모니터링을 기록하였으며, 그 후에 매 2시간 마다 기록하였다.

표 4는 9 μ g Infergen[®] 및 9 μ g γ SIFN-co가 주입된 환자들의 부작용을 비교한 것이다.

(표 4)

부작용

		9 μ g γ SIFN-co	9 μ g Infergen [®]
		환자수 = 10명	환자수 = 11명
신체 시스템	반응	인원수	인원수
일반적	무력함	3	3
	술히트(sole heat)	1	
	프리고라빌리티 (frigorability)	3	4
	다리 힘 감소		3
중추신경계/ 말초신경계	약한 요통	2	1
	신체 통증	4	5
	두통	3	6
	어지럼증	2	11
위장절개술	졸림		3
	아포클레시스 (apoclesis)	1	
	복통	1	
근골격계	설사	1	
	근육통	1	2

	관절통	2	
호흡기계	코막힘	1	
가시	눈 부음		1

결과

γSIFN-co를 주입한 환자들의 경우, 부작용은 많지 않았다. 이들은 인플루엔자와 유사한 공통된 증상, 예를 들면 두통, 무력함, 프리고라빌리티(frigolability), 근육통, 발한증 및 관절통을 나타냈다. Infergen®을 주입한 환자들의 부작용은 γSIFN-co를 주입한 환자들의 부작용보다 더 심각했다.

도 4a-1, 4a-2, 4b-1 및 4b-2에서 알 수 있는 바와 같이, 그룹 A 환자의 체온은 그룹 B 환자의 체온보다 높다. γSIFN-co의 내구성(endurance)은 Infergen®보다 훨씬 낮다는 것을 또한 나타냈다.

실시예 4: γSIFN-co의 결정 성장 및 결정학 파라미터의 시험

γSIFN-co의 결정. 전체적인 시도 및 시험 후, 두가지 유형의 결정을 발견하였다(도 5-7 참조).

1. 결정 성장

깨끗한 물로 γSIFN-co 단백질을 용해시켜 밀도를 3mg/ml로 만들었다. Hampton 회사가 제조한 Hampton Research Crystal Screen I 및 II를 사용함으로써 결정화를 조사하였다. Drop Suspension diffusion Method를 사용하여 293K 온도에서 500μl 액체, 1μl 단백질 + 1μl 액체를 적가하였다. 표 5에 열거된 바와 같이, 먼저 2개의 상이한 유형의 작은 결정을 발견하였다.

(표 5)

γSIFN-co 결정체의 스크린

조건	I	II
희석액	0.1M Tris-HCl PH=8.75	0.1M HEPES PH=7.13
침전물	17.5% (w/v) PEG550 MME	10% (w/v) PEG6K
첨가제	0.1M NaCl	3% (v/v) MPD
온도	293K	293K
결정크기 (mm)	0.2x0.2x0.1	0.6x0.02x0.02
크리스탈로그람	도 5	도 6

2. 데이터 수집 및 프로세싱

X-레이 회절 데이터의 수집 및 결정학의 예비분석에 결정 I를 사용하였다. 파라미터의 시험 또한 완성하였다. 상기 회절 데이터는 실온하에서 수집하였다. 결정 I(조건 I)을 얇은 실리콘 처리된 월(wall) 튜브내로 삽입하였다. BrukerAXS Smart CCD 검출기를 사용함으로써, Nonius FR591 X-레이 발생기에 의해 광원 CuKα(λ=1.5418Å)을 생성하였다. 광력 2000KW(40kv x 50mA), 파장 1.00Å, 폭팔 60초하에서 Δφ=2°, 결정 및 검출기간의 거리는 50mm이었다. 데이터는 Bruker 회사가 제조한 Proteum Procedure Package를 사용하여 프로세스하였다. 결정 회절 패턴(부분적으로)에 있어서 도 7을 참조하기 바람. 프로세스 결과는 표 6을 참조하기 바람.

(표 6)

결정학 파라미터의 결과

파라미터

a(Å) 82.67

b(Å) 108.04

$c(\text{\AA})$ 135.01

$a(^{\circ})$ 90.00

$\beta(^{\circ})$ 90.00

$\gamma(^{\circ})$ 98.35

스페이스 그룹 P2 또는 P2₁

분리의 선명도 5 Å

비대칭 분자 # 10

용해 57.6%

또한, 이전 간행물을 토대로 한 γ SIFN-co에 대한 결정 성장은 없었다. γ SIFN-co에 대해 가장 유사한 결과는 사람 huIFN-a2b이었으나 상기 스크린은 매우 복잡하였다. 3회 살포한 후, 결정은 0.5x0.5x0.3mm로 성장하였으며, 분리의 선명도는 2.9 Å이었으며, 스페이스 그룹은 P2₁이었다. 상기 결정은 또한 크고, 비대칭 분자 수가 6개이었으며 용해는 약 60%이었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 Infergen[®]의 원편광 이색성 스펙트럼을 나타낸다.

스펙트럼 범위: 250-190nm

민감도: 2m⁰/cm

광 경로: 0.20cm

장치: 원편광 이색성 J-500C

샘플: 30 μ g/ml IFN-con1, 5.9mg/ml NaCl 및 3.8mg/ml의 Na₂PO₄(pH 7.0)를 함유.

도 2는 rSIFN-co의 원편광 이색성 스펙트럼을 나타낸다.

스펙트럼 범위: 250-190nm

민감도: 2m⁰/cm

광 경로: 0.20cm

장치: 원편광 이색성 J-500C

샘플: 30 μ g/ml rSIFN-co, 5.9mg/ml NaCl 및 3.8mg/ml의 Na₂PO₄(pH 7.0)를 함유.

도 3은 HBV 유전자 발현에 대한 상이한 인터페론의 억제효과에 대한 비교를 나타낸다.

도 4a-1은 그룹 A(5명 환자)에서 체온 변화의 곡선을 나타낸다. 이 도면은 그룹 A의 5명 환자들의 체온 변화를 기록한 것이다.

도 4a-2는 그룹 A(6명 환자)에서 체온 변화의 곡선을 나타낸다. 이 도면은 그룹 A의 다른 6명 환자들의 체온 변화를 기록한 것이다.

도 4b-1은 그룹 B(5명 환자)에서 체온 변화의 곡선을 나타낸다. 이 도면은 그룹 B의 5명 환자들의 체온 변화를 기록한 것이다.

도 4b-2는 그룹 B(5명 환자)에서 체온 변화의 곡선을 나타낸다. 이 도면은 그룹 B의 다른 5명 환자들의 체온 변화를 기록한 것이다.

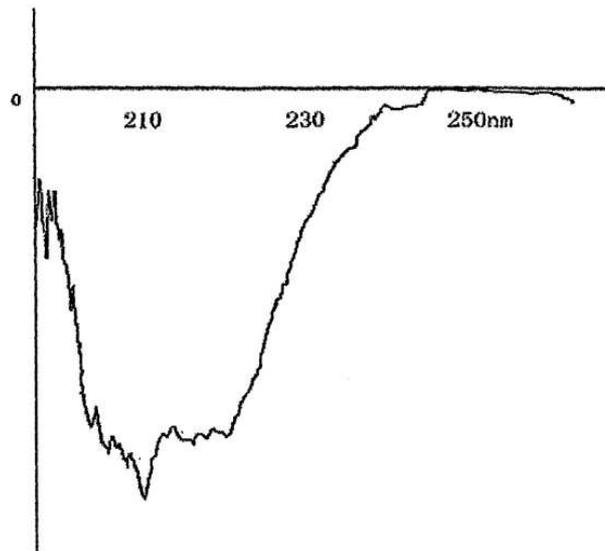
도 5는 rsIFN-co 결정 I이다.

도 6은 rsIFN-co 결정 II이다.

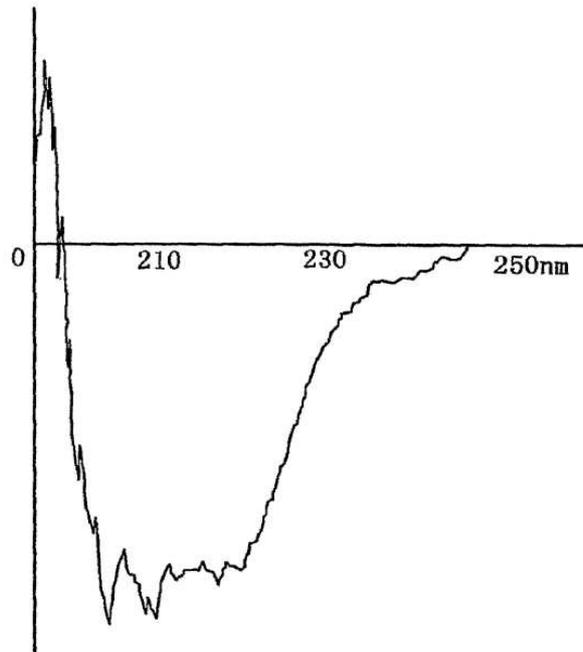
도 7은 rsIFN-co 결정의 X-레이 회절을 나타낸다.

도면

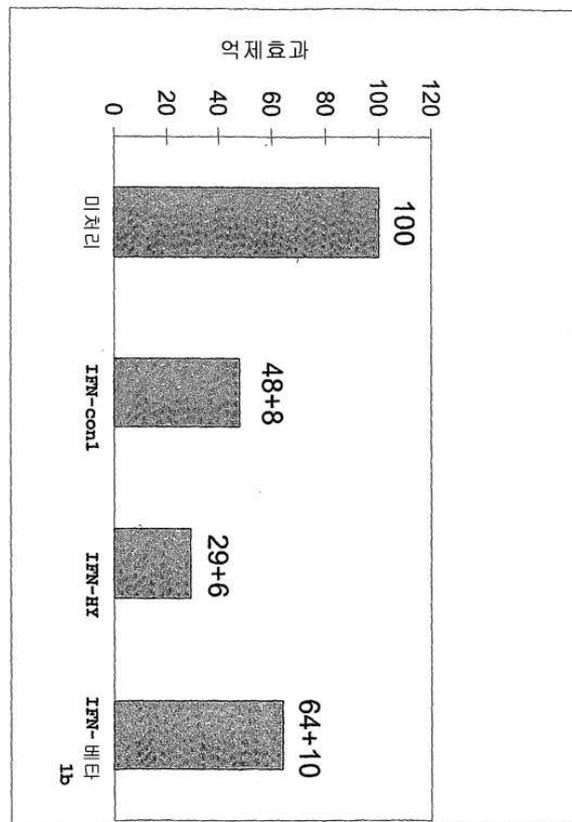
도면1



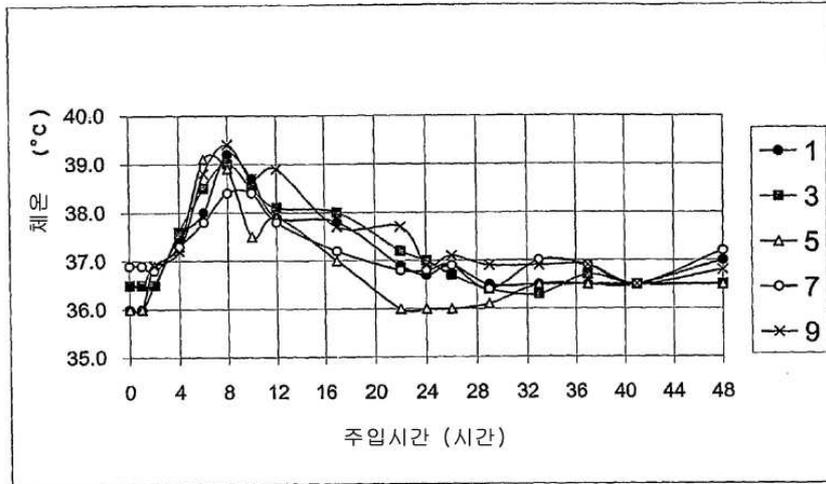
도면2



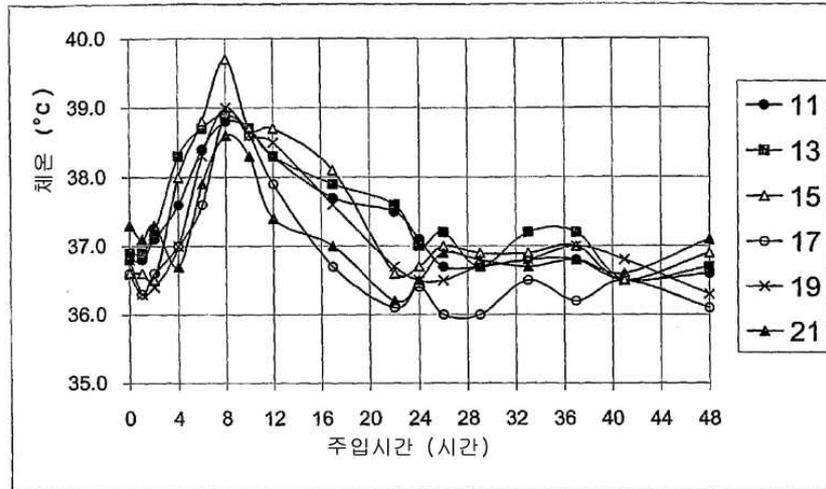
도면3



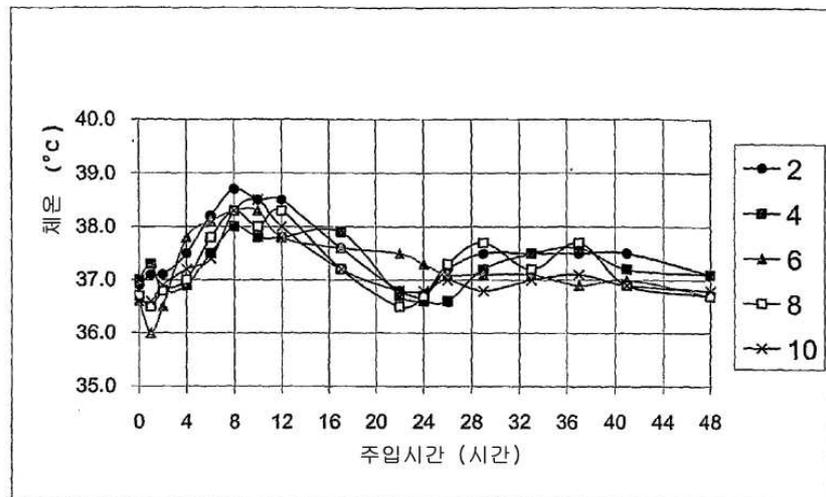
도면4a-1



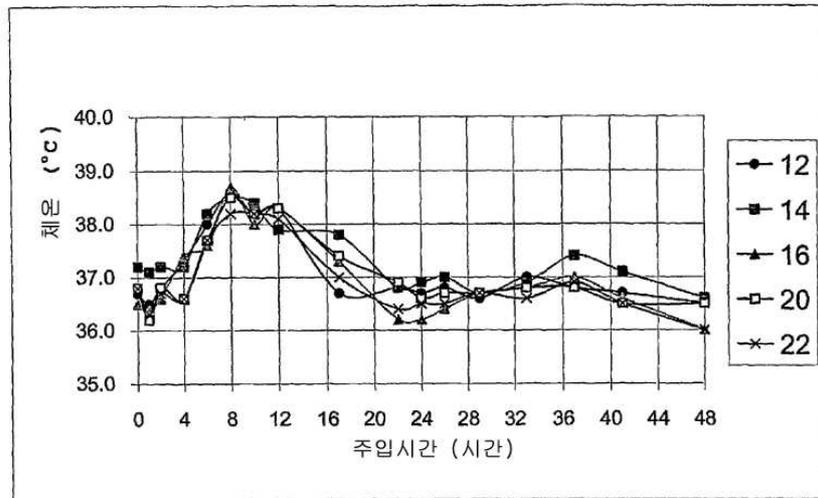
도면4a-2



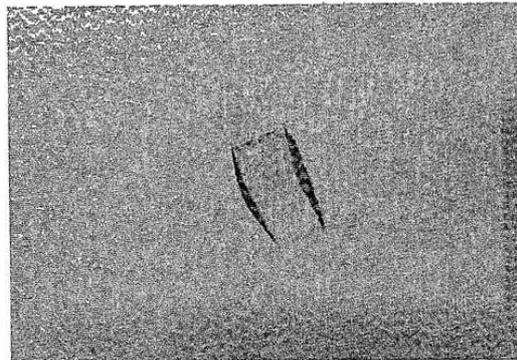
도면4b-1



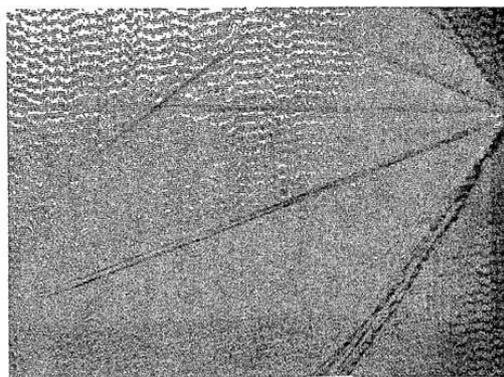
도면4b-2



도면5



도면6



도면7

