



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

A61K 38/21 (2006.01)  
C12N 1/00 (2006.01)  
A61P 31/12 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0130009  
(43) 공개일자 2006년12월18일

(21) 출원번호 10-2006-7003699

(22) 출원일자 2006년02월23일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년02월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/028067

(87) 국제공개번호 WO 2005/034853

국제출원일자 2004년08월26일

국제공개일자 2005년04월21일

(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 첩두 유사 로드 넘버 8

(74) 대리인 최은실  
정우성  
김경희

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 변경된 공간 구조를 갖는 인터페론의 용도

(57) 요약

본 발명은 개체에 유효량의 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 기능적 동등물을 투여하는 것을 포함하는 개체에서의 중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome)을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 바이러스에 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 접촉시키는 것을 포함하는 중증급성호흡기증후군 병원체를 억제하는 방법을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1.

개체에 유효량의 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 기능적 동등물을 투여하는 것을 포함하는 개체에서의 중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome)의 예방 또는 치료 방법.

## 청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 인터페론이  $\alpha$ ,  $\beta$  또는  $\omega$ 인 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 슈퍼-화합물 인터페론이 경구투여, 정맥주사투여, 근육주사투여, 복강주사투여, 피하주사투여, 비강투여 또는 점막투여 또는 흡입기를 통한 흡입투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 인터페론이 스프레이 디바이스를 이용하여 운반되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 5.

제 4항에 있어서, 상기 디바이스가 도 7에 기재된 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 6.

제 1항에 있어서, 상기 인터페론이 동결건조(lyophilized)된 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 7.

중증급성호흡기증후군 병원체에 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 직접 또는 간접적으로 접촉시키는 것을 포함하는 중증급성호흡기증후군 병원체의 억제 방법.

## 청구항 8.

제 7항에 있어서, 상기 병원체가 바이러스인 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 9.

바이러스 또는 세포에 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론을 접촉시키는 것을 포함하는 중증급성호흡기증후군 바이러스 또는 중증급성호흡기증후군 바이러스-감염세포를 억제하는 방법.

## 청구항 10.

중증급성호흡기증후군 바이러스 또는 중증급성호흡기증후군 바이러스-감염세포를 억제할 수 있는 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 및 적합한 담체를 포함하는 조성물.

### 청구항 11.

개체에서 중증급성호흡기증후군을 예방 또는 치료할 수 있는 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 및 적합한 담체를 포함하는 조성물.

### 청구항 12.

중증급성호흡기증후군 바이러스 또는 중증급성호흡기증후군 바이러스-감염세포를 억제할 수 있는 유효량의 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

### 청구항 13.

개체에서 중증급성호흡기증후군을 예방 또는 치료할 수 있는 유효량의 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

### 청구항 14.

제 12항 또는 제 13항의 약학적 조성물을 운반하는 디바이스.

### 청구항 15.

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 방법, 제 11항의 조성물 또는 제 13항의 약학적 조성물에 있어서, 상기 개체가 인간인 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

### 청구항 16.

3 밀리리터당 천만단위 활성도를 갖는 20마이크로그램을 함유하는 스프레이를 통하여 슈퍼-화합물 인터페론을 1일 3회 투여하는 것을 포함하는 인간에서 중증급성호흡기증후군을 예방하는 방법.

### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 변경된 공간 배열(spatial configuration)을 갖는 재조합 슈퍼-화합물 인터페론(이하 rSIFN-co라 함)에 관한 것이다. 본 발명의 rSIFN-co의 한 특징은 B형 간염 바이러스의 DNA(데옥시리보핵산) 복제를 억제할 뿐 아니라 HBsAg 및 HBeAg의 분비 또한 억제한다는 것이다.

#### 배경기술

rSIFN-co는 유전공학적 방법을 사용하여 자연 인간  $\alpha$ -IFN 서브타입에서 발견되는 가장 일반적인 보존 아미노산으로 작 제한 신규한 인터페론 분자이다. 이는 미국 특허 제 4,695,623호 및 제 4,897,471호에 기재되어 있다. rSIFN-co는 광범위한 IFN 활성, 바이러스- 및 암-억제활성 및 자연 킬러 세포활성을 갖는 것으로 증명되었다. 암젠사에 의한 미국 특허 제 5,372,808호는 rSIFN-co 치료를 개시하고 있으며, 역시 암젠사에 의한 중국 특허 제 97193506.8호에서는 rSIFN-co에 의한 C형 간염에 대한 재치료를 개시하고 있다. 쉐젠 지우셴 바이오엔지니어링사(Shenzhen Jiusheng Bio-engineering Ltd.)에 의한 중국 특허 제 98114663.5호에는 B형 및 C형 간염에 대한 rSIFN-co 치료를 개시하고 있다.

1997년 말 미연방식약청(FDA)은 암젠사에 만성 C형 간염의 치료를 위하여 *E.Coli*로 rSIFN-co를 생산하는 것을 허가하였다.

B형 간염 환자는 HBsAg 및 HBeAg의 검출에 의하여 동정된다.  $\alpha$ -IFN은 통상적으로 B형 간염의 치료를 위하여 병원에서 사용된다. IFN은 세포막의 표면 리셉터에 결합하여, DNA 및 RNA(리보핵산) 복제를 억제하고, 특정 효소를 유도하여 간염-감염세포에서의 바이러스의 복제를 방지한다. 모든 IFN은 바이러스의 DNA 복제만을 억제할 수 있을 뿐, e 및 s 항원을 억제하는 것은 아니다.

본 발명은 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 및 그 제조 방법 및 용도에 대하여 개시한다.

중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS)으로 지칭되는 비전형 폐렴은 중국 광둥 지방에서 처음 발병 및 동정되었고, 다수 나라에 전파되고 있다. 2003년 2월 및 3월 부터 유사한 경우가 홍콩, 베트남, 캐나다의 환자들에서 발견되었다. 세계보건기구(WHO)는 상기 질병에 대하여 세계적으로 비상 상태임을 선포하였다. 2003년 3월 중반, SARS는 극동(Far East)에서 심각한 호흡기 질병을 앓고 있는 환자를 돌보는 병원 종사자 및 가족 구성원에서도 인지되었다. 이들 중 많은 경우가 복수의 연쇄 전파경로를 통해 홍콩을 방문하고, 폐렴으로 입원한 후 사망했던 광둥 지방의 한 의료 종사자에 의한 것임이 역추적되었다. 2003년 4월 말 세계적으로 25개국 이상의 나라에서 수천의 SARS 케이스 및 수백의 SARS- 관련 사망이 세계보건기구에 보고되었다. 대부분의 케이스들이 집 또는 의료기관에서 SARS 환자에 노출된 후 발병되었다. 본 발명은 SARS의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

현재 아시아에서는 조류 인플루엔자 바이러스(avian influenza virus; H5N1)이라는 또 다른 유행병의 공포가 만연하고 있다. 조류 인플루엔자 A형 인플루엔자 균주에 의하여 조류에 발견되는 염증성 질환이다. 15개의 조류 인플루엔자 서브타입이 존재한다; H5N1은 돌연변이를 일으켜 동물에서 뿐 아니라 인간에서도 급속하게 이환된다는 점에서 각별한 주의를 요한다. 조류 인플루엔자에 의한, 확인된 인간 사망 건수는 2004년 2월 4일 현재 13명에 이른다. 세계보건기구의 세계적 독감 네트워크의 실험실은 상기 바이러스의 조절 및 더 이상의 인간 사망을 방지하기 위해 애쓰고 있다. 그러나, H5N1의 위력 및 전파 경로를 보다 완전하게 이해하기 위해서는 보다 신중한 시험이 요망된다. 나아가, 건강을 위협하는 A형 인플루엔자 균주의 치료 및 예방에는 항바이러스제만이 효과적이다. [http://www.who.int/csr/don/2004\\_01\\_15/en](http://www.who.int/csr/don/2004_01_15/en), Jan. 15, 2004를 참조하라.

St. Jude 및 기타 유수의 인플루엔자 실험실의 연구자는 H5N1에 대한 인간 백신 원형을 제조하고자 노력하고 있다. 상기 원형 백신은 3주 이내 준비될 수 있을 것으로 기대되고 있다. 그럼에도 불구하고, 과학자들은 백신이 만들어지기 전에 H5N1이 인간 슈퍼-독감으로 진전될 가능성을 우려하고 있다. The Wall Street Journal, Scientists Rush to Create Vaccine for Bird Flu-Just in Case, Jan. 28, 2004 참조하라.

본 발명은 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 및 그 제조 방법 및 용도를 개시한다. 특히, 본 발명에 개시된 슈퍼-화합물 인터페론은 간염 바이러스, SARS 바이러스, 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환 및 조류 인플루엔자 바이러스를 억제, 예방 및/또는 치료할 수 있다.

#### [본 발명의 요약]

본 발명은 개체에 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 투여하는 것을 포함하는 개체에서의 바이러스성 질환 또는 암의 억제, 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

본 발명은 슈퍼-화합물 인터페론이 경구투여, 정맥주사투여, 근육주사투여, 복강주사투여, 피하주사투여, 비강 또는 점막 투여 또는 흡입기를 통한 흡입투여되는 상기 기재 방법을 제공한다.

본 발명은 바이러스성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하며, 상기 바이러스성 질환은 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 다른 형태의 간염, 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus), 시토메갈로바이러스(Cytomegalovirus), 단순 헤르페스 바이러스(herpes simplex viruses) 또는 다른 형태의 헤르페스 바이러스, 파포바바이러스(papovaviruses), 폭스바이러스(poxviruses), 피코나바이러스(picornaviruses), 아데노바이러스(adenoviruses), 리노바이러스(rhinoviruses), 인간 T-세포 류케미아 바이러스 I(human T-cell leukemia viruses I) 또는 인간 T-세포 류케미아 바이러스 II(human T-cell leukemia viruses II) 또는 인간 T-세포 류케미아 바이러스 III(human T-cell leukemia virus III) 등의 바이러스들에 의하여 유발된 감염들이다.

본 발명은 항-간염 활성에 대한 방법을 제공한다. HBV-DNA 복제, HBsAg 및 HBeAg 생산을 억제한다.

본 발명은 상부 호흡기 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명은 종양 또는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하며, 상기 종양은 피부암(skin cancer), 기저세포암(basal cell carcinoma), 악성 흑색종(malignant melanoma), 신장암(renal cell carcinoma), 간암(liver cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 비인두암(rhinopharyngeal cancer), 고형암, 전립선암(prostate cancer), 위/복강암(stomach/abdominal cancer), 식도암(esophageal cancer), 직장암(rectal cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암(breast cancer), 난소암(ovarian cancer), 표재성 방광암(superficial bladder cancer), 혈관종(hemangioma), 표피모양암종(epidermoid carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer), 소세포폐암, 신경아교종(glioma), 백혈구 증가증(leucocytomia), 급성 및 만성 백혈구 증가증, 만성 골수 백혈병(chronica myelocytic leukemia), 털세포백혈병(hairy cell leukemia), 림포아테노마(lympadenoma), 다발골수종(multiple myeloma), 진성적 혈구증가증(polycythemia vera) 또는 카포시육종(Kaposi's sarcoma)이다.

본 발명은 개체에 유효량의 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 기능적 동등물을 투여하는 것을 포함하는 개체에서의 중증급성호흡기증후군(SARS) 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

상기 슈퍼-화합물 인터페론은 구강, 정맥주사, 근육주사, 복강주사, 피하주사로의 투여, 비강 또는 점막투여 또는 흡입기를 통한 흡입투여될 수 있다.

본 발명은 중증급성호흡기증후군 또는 바이러스 유도 상부 호흡기 질환의 병원체(causitive agent)를 억제하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 병원체에 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 접촉시키는 것을 포함한다.

본 발명은 또한 중증급성호흡기증후군 바이러스, 중증급성호흡기증후군 바이러스-감염 세포 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환을 억제하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 바이러스 또는 세포에 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론을 접촉시키는 것을 포함한다. 상기 접촉은 직접 또는 간접일 수 있다.

본 발명은 중증급성호흡기증후군 바이러스, 중증급성호흡기증후군 바이러스-감염세포, 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환을 억제, 예방 또는 치료할 수 있는 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 및 적합한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

본 발명은 개체에서 중증급성호흡기증후군, 중증급성호흡기증후군 바이러스-감염세포, 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환을 억제, 예방 또는 치료할 수 있는 유효량의 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명은 변경된 공간 배열 및 증강된 항바이러스 활성을 갖는 재조합 슈퍼-화합물 인터페론을 제조하는 방법을 제공하며,

상기 방법은

- (a) 발현용 선호 코돈(preferred codon)을 갖는 상기 인터페론을 코딩하는 핵산 분자를 적합한 숙주(host)에 도입하는 단계; 및
- (b) 상기 도입된 숙주를 상기 인터페론이 발현될 수 있는 조건에 위치시키는 단계를 포함한다.

본 발명은 상기 발현된 인터페론을 회수하는 단계를 추가적으로 포함하는 인터페론 제조 방법을 제공한다.

본 발명은 변경된 공간 배열을 갖는 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 및 그 동등물을 제공한다. 본 발명은 동일한 1차 서열을 가지는 단백질이 상이한 생물학적 활성을 가질 수 있음을 개시한다. 하기 실시예에서 예시하는 바와 같이, 본 발명은 동일한 아미노산 서열을 가지나 상이한 활성을 가지는 두개의 단백질을 개시한다. 상기 활성도의 효능은 때로는 개선된 것일 수 있고, 또한 변경된 공간 배열을 갖는 단백질은 새로운 기능을 나타낼 수 있다.

동등물은 상기 인터페론 화합물과 기능적으로 유사한 분자이다. 동등물은 원 서열의 결손, 치환 또는 대체 변이체(mutant)일 수 있다. 또한 본 발명은, 재조합 슈퍼-화합물 인터페론의 모방약(mimics)을 포함한다. 상기 모방약은 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 소분자 화합물(small chemical entity)일 수 있다.

본 발명에 개시되는 인터페론은 인터페론  $\alpha$ ,  $\beta$  또는  $\omega$ 를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일실시예에서는 INF-1a, INF-1b 또는 다른 변이체이다.

일실시예에서 개시된 상기 슈퍼-화합물 인터페론은 미국 특허 제 4,695,623호 또는 제 4,897,471호에 개시된 인터페론보다 높은 효능을 나타낸다. 이 슈퍼-화합물 인터페론은 고유한 2차 또는 3차 구조를 가진 것으로 사료된다(예를 들면 도 6 참조).

본 발명에 개시된 슈퍼-화합물 인터페론의 공간 구조 변경은 그 제조 공정의 변경에서 기인된다.

상기 개시된 슈퍼-화합물 인터페론은 특정 프로모터를 사용하는 고효율 발현 시스템에 의하여 제조될 수 있다. 일실시예에서, 상기 프로모터는  $P_{BAD}$ 이다. 이는 당업자에게 용이하게 인식될 수 있다. 다른 유도 프로모터, 예를 들면 열충격 프로모터 또는 중금속 유도 프로모터 등도 본 발명에서 사용될 수 있다.

본 발명의 슈퍼-화합물 인터페론은 또한, *E.Coli*의 코돈 선호(codon preference)에 따라 야생형에서 그 서열을 조절된 인공 합성된 cDNA를 유전자로 하여 제조될 수 있다. 상기 코돈 용법(선호)은 미국 특허 제 4,695,623호에 상세히 개시되어 있다(칼럼 6, 41줄-칼럼 7, 35줄을 보라).

상기 기재된 슈퍼-화합물 인터페론은 항-바이러스 또는 항암 활성을 가지며, 따라서, 바이러스성 질환, 종양 또는 암의 억제, 예방 및 치료에 유용하다.

여기에서, 바이러스성 질환은 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 다른 형태의 간염, 엡스타인-바 바이러스, 시토메갈로바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 또는 다른 형태의 헤르페스 바이러스, 파포바바이러스, 폭스바이러스, 피코나바이러스, 아데노바이러스, 리노바이러스, 인간 T-세포 류케미아 바이러스 I, 인간 T-세포 류케미아 바이러스 II 또는 인간 T-세포 류케미아 바이러스 III에 의한 바이러스 감염을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

바이러스성 상부 호흡기 감염(감기로도 지칭됨)은 상부 호흡 기관의 전염성 바이러스 감염으로서, 점막 염증, 재채기 및 인후통 등의 증상으로 특징 지어진다. 통상 200개 이상의 상이한 바이러스(리노바이러스로 알려져 있음)에 의하여 유발된다. 감기는 인플루엔자를 일으키는 바이러스에 의해서 유발되는 것이 아니다. 감기는 감기에 걸린 사람의 기침 또는 재채기 또는 감기 걸린 사람에 의해 오염된 물체를 손으로 만지는 것 등에 의해 전염된다. 감기의 발생 빈도율은 소아가 가장 높으며, 나이가 들수록 발생 빈도가 줄어드는데 이는 감기를 앓고 난 후 감기 바이러스에 대한 면역을 획득하기 때문이다. 성인이 되어가면서 점차적으로 다양한 종류의 감기 바이러스에 대한 면역을 형성한다. 소아는 일년에 10번 정도 감기에 걸리며, 성인은 일년에 3번 정도 감기에 걸린다.

미국의 질병 조절 및 예방 센터는 미국에서 상부 호흡기 감염(URIs)의 일년 평균 발병 건수가 4억2천9백만건이며, 이로 인한 직간접적인 보건 의료 경비가 25억불 이상인 것으로 추정하고 있다.

감기는 수백개의 리노바이러스(52%)중 하나에 의하여 가장 많이 발생되나, 코로나바이러스(8%) 또는 호흡기세포융합바이러스(respiratory syncytial virus; 7%)에 의해서도 발생된다. 다른 바이러스, 예를 들면 인플루엔자(6%), 파라인플루엔자 및 아데노바이러스 등도 호흡기 증상을 나타낼 수 있으나, 이들은 자주 폐렴, 열 또는 한기를 동반한다.

감기는 계절적 패턴을 나타내는데, 통상 9월 중순에 시작되며, 4월 말 내지 5월 초에 종결된다. 감기는 전염성이 매우 강하며 사람 대 사람간 접촉 또는 공기를 통해 전파된다. 바이러스 발산과 접촉 감염은 2 내지 3주 이상 지속되지만, 상부 호흡기 증상은 통상 노출된 후 1 내지 2일 후 시작되며, 일반적으로 1 내지 2주간 지속된다. 증상은 부비동염과 같은 합병증 또는 기관지염 또는 폐렴과 같은 하부 호흡기 질환이 같이 발병하여 지속될 수 있다.

감기는 다양한 명백한 증상들을 갖는데, 상기 증상으로는 피로감, 코막힘, 콧물, 건성 기침, 약한 인후통 및 때로는 미열 등을 포함한다. 증상의 유사함 때문에 감기는 때로는 무계절알레르기비염과 혼동되기도 한다. 그러나 알레르기는 통상 그 만성도의 차이로 인해 감기와 구별된다.

환자가 바이러스성 상부 호흡기 감염(URI)을 나타 낼때, 치료 방법은 광범위하다. 이러한 감염의 대부분은 자기 제한적 (self-limiting)이므로, 의사들은 통상 휴식과 음료 섭취들을 권고하고, 다른 치료로는 환경 내지 영양요법, 일반매약 (OTC) 및 처방 충혈제거제 및 항히스타민제, 새로운 항히스타민 및 항콜린성 코관련제제 및 항생제등을 포함한다. 표 1은 통상적으로 사용되는 기침 및 감기 제제 및 이들의 부작용을 목록화한 것이다.

(표 1)

통상적인 기침, 감기약 및 이들의 부작용 프로파일

의약품	목적	부작용 및 비고
에어로졸화 베타2 작용제 (예: 알부테롤)	염증후 기관지 경련을 반전	심박수 상승 및 진전을 유발할 수 있음
알코올-기초 액상 조합제제	다수 증상 치료	졸음, 조절 장애
알파1 작용제(경구) (예: 슈도에페드린, 페닐프로파놀아민)	충혈제거	빈맥, 신경과민, 일시적 자극, 어지러움, 졸음, 혈압상승을 유발할 수 있음
항콜린성 화합물: 이프라트로피움 브로마이드(국소)	건조	비강 건조 및 간헐적 비출혈을 유발할 수 있음
기타 항콜린성 화합물 (예: 메타스코폴아민, 아트로핀, 히오시아민)	건조	기립성 저혈압, 열조절의 기능이상, 구강건조감, 변비를 유발할 수 있음
항히스타민제(경구) (예; 클로로페니라민, 디펜히드라민)	건조	졸음, 구강 건조감, 기립성 저혈압
벤조너테이트 캡슐	기침 억제, 국소 마취	씹는 경우 구강 마비감; 진정 및 어지러움을 유발할 수 있음
코데인, 하이드로코돈	기침 억제	졸음, 변비, 오심
덱스트로메토판	기침 억제	졸음 유발할 가능성 있으나 부작용 발현을 낮음
구아이페네신	거담 촉진(점액용해)	부작용 없음: 효과 개선을 위하여 다량의 물과 함께 복용
국소 충혈제거제 (예, 옥시메타졸린, 페닐에프린)	충혈제거	국소적 작열감, 계속 사용시 의존성 유발할 수 있음
아연 및 비타민 C 로젠저(lozenges)	증상 정도 및 기간의 감소	미감 불량, 예민한 경우 옥살레이트 결석의 증가가 올수 있음

<http://www.physsportsmed.com/issues/1998/02feb/swain.htm>에서 요약.

**URI 예방 또는 치료를 위한 슈퍼-화합물 인터페론의 용도**

거의 70~80%의 URI는 호흡기세포융합바이러스, 아데노바이러스, 리노바이러스, 코사키바이러스, 코로나바이러스 및 그 변이체, 인플루엔자 A 바이러스 및 그 변이체, 인플루엔자 B 바이러스 및 그 변이체, 파라인플루엔자 바이러스 및 그 변이체 또는 엔테로바이러스 및 그 변이체와 같은 바이러스에 의하여 유발된다. 성인에서의 URI의 주 병인은 리노바이러스이다. 소아의 경우 호흡기세포융합바이러스 및 파라인플루엔자 바이러스가 주된 유발원이다.

슈퍼-화합물 인터페론은 URI를 유발하는 바이러스와 싸우는데 중요한 역할을 한다. 슈퍼-화합물 인터페론은 하기 두 기전을 통하여 주로 그 항바이러스활성을 나타낸다.

1. 감수성이 있는 세포의 표면에 부착하여 항-바이러스 단백질을 생산하도록 유도하고, 이후 생체내에서 바이러스의 복제와 재생산을 막는다.
2. 슈퍼-화합물 인터페론은 생체내에서 T-세포 면역 반응, NK 세포 활성화, 모노카리온(monocaryon)의 식균 기능 및 나아가 항체의 생성 등을 포함하는 면역 반응을 조절할 수 있다.

URI의 치료에 있어서, 슈퍼-화합물 인터페론은 스프레이 흡입을 통하여 감염 부위에 직접적인 적용이 가능하다. 이러한 치료방법은 목적 세포에 인터페론이 바로 도달될 수 있게 한다. 결국 스프레이 형태의 공급은 경구 또는 주사 방식보다 인터페론의 투여에 있어 보다 안전하고 효과적이다.

**SARS 예방 또는 치료를 위한 슈퍼-화합물 인터페론의 용도**

SARS 예방 및 제어에 대한 시추안 워킹 그룹의 동의로, 슈퍼-화합물 인터페론의 배급은 2003년 5월에 시작되었다. 슈퍼-화합물 인터페론 스프레이는 SARS 고위험 밀집지구에 소재하는 병원의 의사 및 간호사, SARS 예방 및 제어에 대한 국립\_리서치 그룹에 할당되었다. 2003년 12월 19일 현재 3000명의 사용자 중 상기 스프레이 사용에 관련하여 어떠한 부작용 사례도 보고되지 않았다. 나아가, 상기 슈퍼-화합물 인터페론 스프레이를 사용한 의사 및 간호사, 시추안 지방 사람들 또는 기타 조직 중 누구도 SARS에 감염되지 않았다.

따라서, 본 발명은 바이러스 또는 바이러스-감염 세포에 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 접촉시킴으로써 바이러스 복제 또는 바이러스-감염세포를 억제, 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

또한 본 발명의 슈퍼-화합물 인터페론은 하기 암 또는 증양의 억제, 예방 또는 치료에 유용하다.

(표 2)

암	피부암	기저세포암 악성흑색종	
	신장암		
	간암		
	갑상선암		
	비인두암		
	고형암	전립선암	
		위/복강암	
		식도암	
		직장암	
		췌장암	
	유방암		
	난소암&표재성 방광암		
	혈관종		
표피모양암종	자궁경부암		
	비-소세포폐암		
	소세포폐암		
	신경아교종		
악성혈액질환	백혈구증가증	급성백혈구증가증 만성백혈구증가증	
	만성 골수성 백혈병		
	털세포백혈병		
	림프아데노마		
	다발골수종		
	적혈구증가증		
기타	카포시육종		

환자 #1. 난소암을 앓고 있는 여성환자에게 주입을 개시하였다. 7월 14일, 7월 16일, 7월 18일, 7월 20일, 7월 22일 15 $\mu$ g 씩 주입하였다. 7월 14일에는 2000ml의 복수가 관찰되었다. 7월 22일 화학요법을 시행하였다. 8월 3일 환자의 복막이 개방되었다. 2L의 복수가 있을 것으로 예견되었으나, 오직 200ml의 복수만이 관찰되었다. 좌우측 난소 및 림프선은 암성 (cancerous)이었으나, 기타 다른 기관은 모두 깨끗하였다.

환자 #2. 신장암 환자에 하기 방식으로 처치하였다. 반개월간 rSIFN-co을 9 $\mu$ g씩 3회, 15 $\mu$ g씩 3회 주입하였다. 다음 한달 간 격일로 rSIFN-co을 각각 9 $\mu$ g, 15 $\mu$ g씩 주입하였다. 신장 생검 결과 상기 코스의 치료후에는 전이가 나타나지 않았다. 상기 환자는 완치되었다. 완치후 반년마다 한달 주기에 걸쳐 15 $\mu$ g의 rSIFN-co을 15회 주입하였다.

이상과 같이 본 발명은 종양 또는 암세포에 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 접촉시킴으로써 종양 또는 암세포 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

추가적으로, 슈퍼-화합물 인터페론은 B형 간염 바이러스의 DNA복제 및 HBsAg 및 HBeAg의 분비를 억제한다.

본 발명은 또한 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물에 대한 인공적인 유전자 코드를 제공한다. 인공적인 유전자를 디자인하는 것은 당업자의 통상적인 기술에 속한다. 핵산 서열을 생성하는 다양한 방법 및 기타 분자 생물학적 기술은 이미 개시되었다. 예를 들어, Joseph Sambrook 및 David W. Russel의 Molecular Cloning: A laboratory Manual, December 2000(Cold Spring Harbor Laboratory Press발행)을 참조하라.

본 발명은 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

본 발명은 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 발현 시스템을 제공한다. 상기 세포는 원핵세포 또는 진핵세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명은 또한 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

본 발명은 선택된 선호 코돈을 갖는 인공 유전자를 적합한 숙주에 도입하는 단계, 상기 도입 숙주를 상기 인터페론 화합물의 발현에 적합한 조건에서 배양하는 단계 및 상기 발현된 인터페론 화합물을 채취하는 단계를 포함하는 재조합 슈퍼-화합물 인터페론을 제조하는 방법을 제공한다.

상기 방법은 발효 액체 배지에서 슈퍼-화합물 인터페론의 추출, 봉입체(inclusion body)의 수집, 채취된 단백질의 변성 및 복원을 포함할 수 있다.

상기 방법은 상기 슈퍼-화합물 인터페론이 다른 약제와 병용되거나 특정 농도에서도 고효능을 유지할 수 있다. 상기 방법은 또한 상기 슈퍼-화합물 인터페론의 분리 및 정제를 포함한다. 상기 방법은 정제된 슈퍼-화합물 인터페론의 동결건조를 추가로 포함한다. 상기 방법은 슈퍼-화합물 인터페론의 액상 주사제의 제조를 포함한다.

본 발명은 또한 상기 방법에 의해 제조된 슈퍼-화합물 인터페론을 제공한다.

본 발명은 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물 및 적합한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

본 발명은 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명은 개체에 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 투여하는 것을 포함하는 개체에서의 바이러스성 질환 또는 종양을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

본 발명은 바이러스성 질환이 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 다른 형태의 간염, 엡스타인-바 바이러스, 시토메갈로바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 또는 다른 형태의 헤르페스 바이러스, 파포바바이러스, 폭스바이러스, 피코나바이러스, 아데노바이러스, 리노바이러스, 인간 T-세포 류케미아 바이러스 I, 인간 T-세포 류케미아 바이러스 II 또는 인간 T-세포 류케미아 바이러스 III에 의한 바이러스 감염을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 상기 기재 방법을 제공한다.

본 발명은 상기 슈퍼-화합물 인터페론이 구강, 정맥주사, 근육주사, 복강주사, 피하주사로의 투여, 비강 또는 점막투여 또는 흡입기를 통한 흡입투여되는, 상기 기재 방법을 제공한다.

본 발명은 슈퍼-화합물 인터페론이 이틀마다 9 $\mu$ g 또는 15 $\mu$ g씩, 일주일에 3회, 24주간 시행되는 주입 프로토콜에 따라 투여하는, 상기 기재 방법을 제공한다.

놀랍게도 변경된 공간 구조를 갖는 rSIFN-co는 B형 간염 바이러스의 DNA 복제를 억제할 뿐 아니라 2.2.15세포상에서 HBsAg 및 HBeAg의 분비를 억제함을 발견하였다.

본 발명의 목적은 직접적으로 B형 간염 바이러스의 DNA 복제를 억제하고 또한 B형 간염의 HBsAg 및 HBeAg의 분비를 억제하고 이를 정상 수준으로 감소시킬 수 있는 rSIFN-co 제제를 제공하는 것이다.

일 실시예에서 rSIFN-co는 재조합 기술로 제조되었다. 고정된 아미노산서열 조건상에서 IFN DNA는 *E. Coli* 코돈 용법에 따라 재디자인되었고, 이후 상기 rSIFN-co 유전자는 인공적으로 합성되었다. rSIFN-co cDNA는 DNA 재조합 기술에 의하여 고효율의 *E. Coli* 발현 벡터내로 클로닝되었으며, P<sub>BAD</sub> 프로모터의 전사를 활성화하는 L-아라비노스(L-arabinose)의 유도/활성 기전을 사용하여 고효율로 발현된 rSIFN-co를 수득하였다.

유전공학의 통상적인 열-유도, pH 유도 및 IPTG 유도 시스템과 비교하여 볼때, 아라비노스 유도/활성 시스템은 몇가지 이점이 있다:(1) 통상적인 시스템은 "탈억제(derepression)"패턴을 생성함으로써 프로모터 기능을 푼다. 이후 프로모터는 하류 유전자 발현을 유도한다. 온도, pH 변화 및 IPTG의 추가는 프로모터를 직접적으로 활성화할 수 없다. 본 명세서에 개시된 시스템에서, L-아라비노스는 rSIFN-co의 고효율 발현을 유도하는 P<sub>BAD</sub> 프로모터의 전사를 불활성화하고 억제할 뿐 아니라 활성화시키기도 한다. 따라서, 아라비노스 유도/활성화 시스템은 보다 효율적인 발현 시스템이다. (2) 외인성(Exogeneous)과 L-아라비노스 용량과의 관계가 선형이다. 이는 L-아라비노스의 농도를 변경시켜 외인성 유전자의 발현 수준을 조절할 수 있음을 의미한다. 따라서, *E. Coli* 내에서 외인성 유전자의 발현 수준을 조절하기 위해서는 온도 및 pH 값을 변경하는 것 보다 아라비노스를 변경하는 것이 훨씬 용이하다. 이러한 특성은 봉입체의 형성에 중요하다. (3)L-아라비노스는 풍부하고, 값싸며 안전한 반면, IPTG 등의 다른 유도체들은 그렇지 않은 결점이 있다.

본 실시예는 L-아라비노스 유도/활성 시스템을 갖는 효과적인 저항적인 rSIFN-co-발현 *E. Coli* 기술주(rSIFN-co-expressing *E. Coli* engineering strain)를 제공한다. 상기 균주는 세균체를 채취하는데 적당한 조건하에서 배양되고 발효된다. 이후 박테리아를 파괴하고 세척하는 반복적 공정을 통하여 봉입체를 정제한다. 이후 상기 봉입체를 변성 및 복원시키고, 일련의 정제 단계를 거쳐, 본 발명 및 임상적 치료를 위한 최종 산물인 고순도의 공간-구조가 변경된 rSIFN-co 단백질 수득하였다.

이하의 rSIFN-co 제제를 개시한 것이다: 정제, 캡슐제, 경구 투여를 위한 액제, 페이스트제, 주사제, 스프레이제, 좌제 및 용액제. 주사제가 추천된다. 통상 피하 주사 또는 정맥 주사용 의약품이다. 의약품의 담체는 탄수화물, 셀룰로섬(cellulosum), 접착제, 붕괴제, 에몰리언트, 충전제, 추가-용해제(add-dissolving agent), 아마르티제이션(amortization), 보존제, 농후제, 매칭(matching) 등을 포함하여 허용가능한 의약품 담체라면 어떤 것이든 가능하다.

본 발명은 또한 상기 조성물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 목적을 위하여, "약학적으로 허용가능한 담체"는 표준 약학적 담체를 의미한다. 적합한 담체의 예로는 당업계에 공지된 것이며, 인산완충식염액 및 다양한 습윤제 등 표준 약학적 담체 들을 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 기타 담체는 정제, 과립제, 캡슐제 등에서 사용되는 첨가제를 포함할 수 있다. 전형적으로 전분, 우유, 설탕, 특정 형태의 클레이, 젤라틴, 스테아린산 또는 그 염, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트, 탈크, 식물성 지방 또는 오일, 검, 글리콜 또는 기타 알려진 부형제 등의 첨가제를 포함한다. 이러한 담체는 또한 향미제 또는 착색제 등 기타 성분을 포함할 수 있다. 이러한 담체를 포함하는 조성물은 공지의 통상적인 방법에 의하여 제제화된다.

본 발명은 개체에 유효량의 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 기능적 동등물을 투여하는 것을 포함하는 개체에서의 중증급성호흡기증후군, 바이러스 유도 상부 호흡기 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

상기 방법의 한 태양으로서, 상기 인터페론은  $\alpha$ ,  $\beta$  또는  $\omega$ 이다.

상기 슈퍼-화합물 인터페론은 경구투여, 정맥주사투여, 근육주사투여, 복강주사투여, 피하주사투여, 비강투여 또는 점막 투여 또는 흡입기를 통한 흡입투여될 수 있다.

한 태양으로 상기 인터페론은 스프레이 디바이스(spray device)에 의하여 운반된다.

특정 실시예에서, 상기 디바이스는 도 7에 기재되어 있다.

한 실시예에서, 상기 인터페론은 동결건조된다.

본 발명은 병원체에 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 또는 그 동등물을 접촉시키는 것을 포함하는 중증급성호흡기증후군 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환의 병원체의 억제 방법을 제공한다.

SARS의 병원체는 바이러스임이 알려져 있다(예를 들어, Rota 등(2003), Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome, Science 1085952, [www.sciencexpress.org](http://www.sciencexpress.org) 및 Marra 등(2003), The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus. Science 1085853, [www.sciencexpress.org](http://www.sciencexpress.org) 를 보라).

본 발명은 또한 바이러스 또는 세포에 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론을 접촉시키는 것을 포함하는 중증급성호흡기증후군 바이러스, 중증급성호흡기증후군 바이러스-감염 세포, 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환, 또는 상부 호흡기 질환을 유발할 수 있는 상기 바이러스에 감염된 세포를 억제하는 방법을 제공한다. 이 접촉은 직접 또는 간접일 수 있다.

본 발명은 중증급성호흡기증후군 바이러스 또는 중증급성호흡기증후군 바이러스-감염세포, 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환, 또는 상부 호흡기 질환을 유발할 수 있는 상기 바이러스에 감염된 세포를 억제할 수 있는 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 및 적합한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

본 발명은 개체의 중증급성호흡기증후군 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 유효량의 슈퍼-화합물 인터페론 및 적합한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

본 발명은 중증급성호흡기증후군 바이러스 또는 중증급성호흡기증후군 바이러스-감염세포, 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환, 또는 상부 호흡기 질환을 유발할 수 있는 상기 바이러스에 감염된 세포를 억제할 수 있는 유효량의 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명은 개체에서 중증급성호흡기증후군 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 유효량의 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명은 상기 기재된 약학적 조성물을 운반하는 디바이스를 제공한다.

바람직한 실시예에서, 상기 개체는 인간이다. 당업계에 용이하게 인식될 수 있는 바와 같이, 상기 슈퍼-화합물 인터페론은 기타 동물이나 포유동물에도 사용될 수 있다.

본 발명은 3 밀리리터에 천만단위 활성도에 상당하는 20마이크로그로그램의 인터페론을 함유하는 스프레이를 통하여 슈퍼-화합물 인터페론을 1일 3회 투여하는 것을 포함하는, 인간에서 중증급성호흡기증후군 또는 바이러스-유도 상부 호흡기 질환을 예방하는 방법을 제공한다.

본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 자세히 설명한다. 그러나 하기에 기재한 특정 방법과 결과는 본 발명을 보다 잘 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명에 이에 제한되지 않음은 당업자에 있어 명확할 것이다.

### **실시예 1**

rSIFN-co 는 유전 공학적 방법을 사용하여 인간 INF- $\alpha$  서브타입의 보존 아미노산에 따라 작제된 새로운 인터페론 분자이다. rSIFN-co 이 높은 항바이러스 및 중양 억제활성과 같은 광범위한 INF 활성이 있음이 증명되었으며, 특히 C형 간염의 치료에 효과적인 것이 증명된 바 있다.

E.Coli 코돈을 사용하여 rSIFN-co cDNA을 재디자인하고, 공개된 rSIFN-co DNA 서열 및 유추된 아미노산 서열에서 rSIFN-co cDNA를 인공적으로 합성하였다(도 1).

순수한 rSIFN-co 단백질을 수득하기 위하여, rSIFN-co cDNA을 E.Coli 고효율 발현 벡터에 클로닝하고, 벡터내에서 강력한 P<sub>BAD</sub>-프로모터를 활성화할 수 있는 L-아라비노스를 사용하여 rSIFN-co 유전자의 고발현을 유도하였다.

### **E.Coli cDNA 서열의 합성**

**rSIFN-co cDNA의 재디자인**

rSIFN-co cDNA은 *E. Coli*내 고발현할 수 있도록 *E. Coli* 코돈 용법에 따라 재디자인되었다. 재디자인된 rSIFN-co의 cDNA에서 유추된 아미노산 서열은 공개된 rSIFN-co의 원시 아미노산 서열과 완전히 일치하였다(도 1).

**rSIFN-co cDNA 서열 합성**

**rSIFN-co cDNA의 5'말단 및 3'말단 반분자 합성**

두개의 반분자가 직접 합성될 수 있다: rSIFN-co cDNA 5' 말단 280bp(단편 I) 및 3' 말단 268bp(단편 II)가 PCR로 합성됨. 단편 II 및 단편 I사이에는 41bp의 오버래핑이 존재한다.

(1) 올리고데옥시뉴클레오티드 단편의 화학적 합성:

올리고머 A:

5'ATGTGCGACCTGCCGCAGACCCACTCCCTGGGTAACCGTCGTGCTCTGATCCTGCTGGCTCA  
GATGCGTCGTATCTCCCCGTTCTCCTGCCTGAA AGACCGTCACGAC3'

올리고머 B:

5'CTGAAAGACCGTCACGACTTCGGTTTCCCGCAGGAGAGGTTTCGACGGTAACCAGTTCCAGA  
AGCTCAGGCTATCTCCGTTCTGCACGAAATGATCCAGCAGACCTTC3'

올리고머 C:

5'GCTGCTGGTACAGTTCGGTGTAGATTTTTCCAGCAGGGATTCGTCCCAAGCAGCGGAGGAG  
TCTTTGGTGGAGAACAGGTTGAAGGTCTGCTGGATCATTTTC3'

올리고머 D:

5'ATCCCTGCTGGAAAAATTCTACACCGAACTGTACCAGCAGCTGAACGACCTGGAAGCTTGCG  
TTATCCAGGAAGTTGGTGTGAAGAAACCCCGCTGATGAAC3'

올리고머 E:

5'GAAGAAACCCCGCTGATGAACGTTGACTCCATCCTGGCTGTTAAAAATACTTCCAGCGTAT  
CACCTGTACCTGACCGAAAAAAAATACTCCCCGTGCGCTTGGG3'

올리고머 F:

5'TTATTCTTTACGACGCAGACGTTCCCTGCAGGTTGGTGGACAGGGAGAAGGAACGCATGATTT  
CAGCACGAACAACCTCCCAAGCGCACGGGGAGTATTTTTTTTCGGTCAGG3'

단편 I용 PCR I: 올리고데옥시뉴클레오티드 B를 주형으로 하고, 올리고데옥시뉴클레오티드 A 및 C를 프라이머로 하여 280bp 단편 I을 합성한다.

PCR I 혼합액(단위:  $\mu\text{l}$ )

멸균 증류수 39

10×Pfu buffer(Stratagen American Ltd.) 5

dNTP 혼합액(dNTP 농도 2.5mmol/L) 2

올리고머 A 프라이머(25  $\mu\text{mol/L}$ ) 1

올리고머 C 프라이머(25  $\mu\text{mol/L}$ ) 1

올리고머 B 주형(1 $\mu\text{mol/L}$ ) 1

Pfu DNA 폴리머라제(Stratagen American Ltd.) (25U/ $\mu\text{l}$ ) 1

전체 용량: 50 $\mu\text{l}$

PCR 사이클: 95I

2m → (95°C45s → 65°C1m → 72°C1m) × 25 cycle → 72°C10m → 4°C

단편 II 용 PCR II: 올리고데옥시뉴클레오티드 E를 주형으로 하고, 올리고데옥시뉴클레오티드 D 및 F를 프라이머로 하여 268bp 단편 II를 합성한다.

PCR II 혼합액(단위:  $\mu\text{l}$ )

멸균 증류수 39

10×Pfu buffer(Stratagen American Ltd.) 5

dNTP 혼합액(dNTP 농도 2.5mmol/L) 2

올리고머 D 프라이머(25  $\mu\text{mol/L}$ ) 1

올리고머 F 프라이머(25  $\mu\text{mol/L}$ ) 1

올리고머 E 주형(1 $\mu\text{mol/L}$ ) 1

Pfu DNA 폴리머라제(Stratagen American Ltd.) (25U/ $\mu\text{l}$ ) 1

전체 용량: 50 $\mu\text{l}$

PCR 사이클: 상기 PCR I과 동일.

#### **rSIFN-co cDNA의 어셈블링**

오버랩핑 및 익스텐딩 PCR 방법을 사용하여 단편 I 및 II를 함께 어셈블링하여 전체 cDNA 분자 서열을 얻었다. 제한효소 Nde I 및 Pst I를 도입하여 rSIFN-co cDNA 서열을 플라스미드내로 클로닝하였다.

(1) 화학적 합성 프라이머

올리고머 G: 5'ATCGGCCATATGTGCGACCTGCCGCAGACCC3'

올리고머 H: 5'ACTGCCAGGCTGCAGTTATTCTTTACGACGCAGACGTTCC3'

(2) 오버래핑 및 익스텐딩 PCR

PCR 혼합액 (단위:  $\mu\text{l}$ )

멸균 증류수 38

10×Pfu buffer(Stratagen American Ltd.) 5

dNTP 혼합액(dNTP 농도 2.5mmol/L) 2

프라이머 G(25  $\mu\text{mol/L}$ ) 1

프라이머 H(25  $\mu\text{mol/L}$ ) 1

\* 단편 I 산물(1  $\mu\text{mol/L}$ ) 1

\* 단편 II 산물(1  $\mu\text{mol/L}$ ) 1

Pfu DNA 폴리머라제(Stratagen American Ltd.) (2.5U/ $\mu\text{l}$ ) 1

전체 용량: 50 $\mu\text{l}$

\* PCR 산물은 Stratagen American사에서 생산된 StrataPrep PCR 정제 키트를 사용하여 분리 및 정제한 후, 멸균 증류수에 용해시킨다.

PCR 사이클: 상기 PCR I과 동일.

### rSIFN-co 유전자 클론 및 서열 분석

클로닝 벡터로서 pLac T7 플라스미드. pLac T7 플라스미드는 Stratagen사에 의해 제조된 pBluescript II KS(+ )플라스미드로 작제된다(도 3).

rSIFN-co cDNA 의 정제 PCR 생산은 StrataPrep PCR 정제 키트를 사용한다. cDNA 및 pLac T7 플라스미드는 NdeI 및 PstI로 분해시킨다. 1% 아가로스 겔 전기영동을 걸고, 이중-분해된 DNA 단편을 분리시킨다. 507bp의 긴 rSIFN-co DNA 단편 및 2.9kb의 플라스미드 DNA 단편을 회수한다. 상기 단편들을 T4 DNA 리가제로 결합시켜 재조합 플라스미드를 형성한다. 상기 재조합 플라스미드로 DH<sub>5</sub> $\alpha$  적격세포(DH<sub>5</sub> $\alpha$  competent cells; Gibco)를 형질전환시키고, 37°C에서 밤새 배양한다. 양성 재조합 콜로니를 동정하고, pHY-1으로 명명하였다.

American Epicentre Technologies사에서 제조한 SequiTherm<sup>TM</sup> Cycle Sequencing 키트로 L1-COR. Model 4000L을 사용하여 DAN 서열분석을 시행한다. 프라이머로서는 T7 및 T3 공통 서열 프라이머이고, DAN 시퀀싱 결과는 이론적인 디자인과 일치하였다.

rSIFN-co를 정제하고, N-말단 아미노산을 서열 분석한 결과, N- 말단 아미노산 서열은 다음과 같이 실험적 디자인과 일치하였다.

N-Cys-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser-Leu-Gly-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-

### 발현 벡터의 작제, 형질전환, 동정 및 유전적 안정성

## 발현백터의 작제과 형질전환

Nde I로 분해시켜 선형화된 *E. Coli* 발현 백터 pHY-4(도 3)를 계속하여 Xba I로 분해시킨다. 1% 아가로스겔 전기영동을 시행하고, QIAEX II 키트(QIAGEN GERMANY사 제조)로 4.8 kb pHY-4 Nde I-Xba I분해 단편을 정제한다.

동시에, pHY-4 플라스미드를 Nde I-Xba I로 이중 분해시킨다. 1% 아가로스겔 전기영동을 시행하고, 715bp 단편을 정제한다. rSIFN-co 및 pHY-4 단편을 T4 DNA 리가제로 결합하여 재조합 플라스미드를 작제한다(도 4). DH<sub>5a</sub> 적합세포를 상기 플라스미드로 형질전환한다. 상기 형질전환된 세포를 LB (Amp 추가) 플레이트상에 도포하고, 37°C에서 밤새 배양한다.

## 양성 클로닝 균주 스크리닝

상기 LB 플레이트에서 랜덤하게 *E. Coli* 콜로니를 선택하여, 엔도뉴클레아제 분해 및 PCR 분석을 시행하여 재조합 백터를 함유하는 양성 균주를 스크리닝한다. 양성 재조합 플라스미드중 하나를 pHY-5로 명명하고, pHY-5 플라스미드를 함유하는 균주를 PVIII 으로 명명한다. 증폭하고, 상기 양성 균주를 -80°C 글리세롤에서 보관한다.

## E.Coli에서 rSIFN-co 유전자의 고발현.

pHY-5 플라스미드에서, rSIFN-co 유전자는 강력한 프로모터 P<sub>BAD</sub>의 조절하에 있다. 상기 프로모터는 AraC 유전자 산물에 의하여 양성 및 음성 조절된다. AraC 유전자는 아라비노스와 복합체를 형성하는 전사 조절자이다. 아라비노스 결합시 AraC 다이머는 O<sub>2</sub> 및 I<sub>1</sub>과 결합하여 210bp 루프를 형성한다. 상기 루프가 형성됨으로써 전사가 완전히 방해된다. 아라비노스의 존재하에서 상기 다이머는 O<sub>2</sub>를 방출하고 I<sub>1</sub> 및 I<sub>2</sub>와 결합하여 전사가 시행된다. 아라비노스 결합은 P<sub>BAD</sub> 프로모터의 전사를 불활성화, 억제하고, 활성화시키기도 하여, P<sub>BAD</sub>를 자극하여 rSIFN-co의 고발현을 유도한다. PVIII에서의 rSIFN-co 발현수준은 전체 *E. Coli* 단백질의 50% 이상이다.

## 요약

RSIFN-CO는 인간 α 인터페론의 보존 아미노산에 따라 인공적으로 구축된 새로운 인터페론 분자이다. 항간염 약제로서 효과적인 것이 증명된 바 있다. 순수한 rSIFN-co 단백질을 충분히 수득하기 위하여, rSIFN-co 단백질을 고효율로 발현하는 안정한 재조합 *E. Coli* 균주를 작제하였다.

먼저, 공개된 rSIFN-co 아미노산 서열에 따라, *E. Coli* 코돈을 사용하여 rSIFN-co의 전체 cDNA를 합성하였다. 이 DNA 단편을 시퀀싱한 결과 501bp 코돈 서열 및 TAA 종결코돈서열이 유효하며 이론적인 디자인과 동일함을 확인하였다. 후속적인 분석으로 재조합 균주에 의해 생산된 rSIFN-co의 구성 아미노산 및 N-말단 아미노산 서열이 예측과 동일함을 확인하였다.

rSIFN-co cDNA를 *E. Coli* 고발현 백터 pHY-4 플라스미드에 클로닝하여 재조합 플라스미드 pHY-5 플라스미드를 작제하였다. 나아가 상기 pHY-4 플라스미드로 *E. Coli* LMG194 균주를 형질전환하여 안정한 rSIFN-co 고발현 형질전환체를 수득하였다. 상기 형질전환체는 30세대 동안 배양되었다. *E. Coli* LMG194 균주내의 pHY-5 재조합 플라스미드의 유전성은 정상이고, 안정적이었으며, rSIFN-co의 발현 역시 높고 꾸준하였다.

재조합 pHY-5 플라스미드를 함유하는 *E. Coli* LMG194는 실질적으로 이상적인 고발현 기술주이다.

## 참조

1. Blatt L M, Davis J M, Klein S B. et al. The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon-α species, consensus interferon. Journal of Interferon and Cytokine Research, 1996; 16(7):489-499.

2. Alton, K. et al: Production characterization and biological effects of recombinant DNA derived human IFN-.alpha. and IFN-.gamma. analogs. In: De Maeger E, Schellekens H. eds. The Biology of Interferon System. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983: 119-128
3. Pfeffer L M. Biologic activity of natural and synthetic type 1 interferons. Seminars in Oncology, 1997; 24 (3 suppl 9):S9-63-S9-69.
4. Ozes O N, Reiter Z, Klein S, et al. A comparison of interferon-con1 with natural recombinant interferons-( antiviral, antiproliferative, and natural killer-inducing activities. J. Interferon Res., 1992; 12:55-59.
5. Heathcote E J L, Keeffe E B, Lee S S, et al. Re-treatment of chronic hepatitis C with consensus interferon. Hepatology, 1998; 27(4):1136-1143.
6. Klein M L, Bartley T D, Lai P H, et al. Structural characterization of recombinant consensus interferon-alpha. Journal of Chromatography, 1988; 454:205-215.
7. The Wisconsin Package, by Genetics Computer Group, Inc. Copyright 1992, Medison, Wis., USA
8. Nishimura, A et al: A rapid and highly efficient method for preparation of competent E. coli cells. Nuclei. Acids Res. 1990, 18:6169
9. All molecular cloning techniques used are from: Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd ed. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y. 1989.
10. Guzman, L. M et al: Tight regulation, modulation, and high-level express-ion by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J. Bacteriol. 1995, 177: 4121-4130.

**E.Coli 코돈 용법에 따라 디자인된 rSIFN-co cDNA 서열 및 유추된 rSIFN-co 아미노산 서열**

5' 11 21 31 41 51

+ 1 M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A

1 ATGTGCGACC TGCCGCAGAC CCACTCCCTG GGTAACCGTC GTGCTCTGAT CCTGCTGGCT

TACACGCTGG ACGGCGTCTG GGTGAGGGAC CCATTGGCAG CACGAGACTA GGACGACCGA

5' 71 81 91 101 111

+ 1 Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P

61 CAGATGCGTC GTATCTCCCC GTTCTCCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CGGTTTCCCG

GTCTACGCAG CATAGAGGGG CAAGAGGACG GACTTTCTGG CAGTGCTGAA GCCAAAGGGC

5' 131 141 151 161 171

+ 1 Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E

121 CAGGAAGAAT TCGACGGTAA CCAGTTCCAG AAAGCTCAGG CTATCTCCGT TCTGCACGAA

GTCCTTCTTA AGCTGCCATT GGTCAAGGTC TTTCGAGTCC GATAGAGOCA AGACGTGCTT

5' 191 201 211 221 231

+ 1 M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E

181 ATGATCCAGC AGACCTTCAA CCGTTCCTCC ACCAAAGACT CCTCCGCTGC TTGGGACGAA  
TACTAGGTCG TCTGGAAGTT GGACAAGAGG TGGTTTCTGA GGAGGCGACG AACCCCTGCTT

5' 251 261 271 281 291

+ 1 S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C

241 TCCCTGCTGG AAAAYTCTA CACCGAACTG TACCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCTTGC  
AGGGACGACC TTTTAAAGAT GTGGCTTGAC ATGGTCGTCG ACTTGCTGGA CCTTCGAACG

5' 311 321 331 341 351

+ 1 V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A

301 GTTATCCAGG AAGTTGGTGT TGAAGAAACC CCGCTGATGA ACGTTGACTC CATCCTGGCT  
CAATAGGTCC TTCAACCACA ACTTCTTTGG GCGACTACT TGCAACTGAG GTAGGACCGA

5' 371 381 391 401 411

+ 1 V K K Y F Q R I T L Y L T E K K Y S P C

361 GTTAAAAAAT ACTTCCAGCG TATCACCTG TACCTGACCG AAAAAAATA CTCCCCGTGC  
CAATTTTTTA TGAAGGTCGC ATAGTGGGAC ATGGACTGGC TTTTTTTTAT GAGGGGCACG

5' 431 441 451 461 471

+ 1 A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q

421 GCTTGGGAAG TTGTTCGTGC TGAAATCATG CGTTCCTTCT CCCTGTCCAC CAACCTGCAG  
CGAACCTTC AACAAGCACG ACTTTAGTAC GCAAGGAAGA GGGACAGGTG GTTGGACGTC

5' 491 501

+ 1 E R L R R K E #

481 GAACGTCTGC GTCGTAAAGA ATAA  
CTTGCAGACG CAGCATTTCT TATT

## 실시예 2

### rSIFN-co의 분리 및 정제

#### 1. 발효(Fermentation)

LB 배지내 재조합 균주를 접종하고, 37°C에서 밤새(약 18시간) 진탕(200 rpm)하고, 이후 30% 글리세롤을 발효 액체배지에 넣고 최종 농도를 15%로 한 후, 1ml 튜브에 분주하고 -20°C에서 제조용 시드(seed)로서 보관한다.

상기 시드의 1%를 LB 배지에 가하고, 37°C에서 밤새 진탕(200 rpm)하여, 시드의 스케일을 확장시킨 후 10%의 비율로 RM 배지에 가한 후, 37°C에서 배양한다. OD600이 약 2.0이 될 즈음 인덕터로서 아라비노스(20% 용액)를 0.02% 가한다. 약 4시간 후 배양 공정을 정지하고, 원심분리로 박테리아를 수거한 후, 펠렛을 버퍼 A로 재현탁한 후 -20°C에서 밤새 보관한다. 호모게나이저로 상기 박테리아를 분쇄한 후 원심분리한다. 수득한 펠렛을 버퍼 B, 버퍼 C 및 증류수로 세척하여 상대적으로 순수한 봉입체를 수득한다.

## 2. 변성 및 복원(Denaturation and renaturation)

상기 봉입체를 6 mol/L 구아니딘-HCl(또는 urea)에 녹인다. 상기 용액은 약간 혼탁하다. 상기 용액을 10000rpm으로 원심분리한다. 상청액의 단백질 농도를 측정한다. 상기 상청액은 "변성 용액"으로 지칭된다. 상기 변성 용액을 복원 버퍼에 가하고 최종 단백질 농도를 1.3mg/ml 이하로 유지한다. 상기 완전히 변성된 용액은 한 단계로 가하는 것보다 3단계로 가하는 것이 좋다. 상기 용액을 4°C이하에서 밤새 보관한다. 이후 10 mol/L, 5mol/L PB 버퍼 및 증류수로 투석하고 2mol/L HAC-NaAc로 pH를 조정한다. 정지후 여과한다.

## 3. 정제

POROS HS/M 음이온 교환 크로마토그래피:

20 mmol/L HAC-NaAc(pH 5.0)로 등량된 칼럼

↓

30ml/min의 속도로 샘플 로딩

↓

20CV 20 mmol/L HAC-NaAc(pH 5.0)로 세척

↓

5CV의 0.15mol/L NaCl + 20 mmol/L HAC-NaAc(pH 5.0)로 세척

↓

3CV의 0.18mol/L NaCl + 20 mmol/L HAC-NaAc(pH 5.0)로 세척

↓

0.25 mol/L NaCl + 20 mmol/L HAC-NaAc(pH 5.0)로 목적 단백질 용출

킬레이팅 세파로스™ 고속 흐름:

HS에서 0.2 mol/L(pH 6.6) PB 버퍼 및 4 mol/L NaCl용액을 가하여 용액의 pH를 6.0로, NaCl 농도를 1mol/L로 조정한다.

버퍼 D로 칼럼화

↓

1 ml/min의 속도로 로딩

↓

버퍼 E로 세척

↓

버퍼 F로 세척

↓

버퍼 G로 용출

용출 용액을 POROS HS/M으로 농축한다. 보다 엄격한 정제 조건을 만족하기 위해서 세파크릴(sephacryl) S-100 정제 단계가 추가될 수 있다.

Note:

버퍼 A: 100 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 - 10 mmol/L EDTA - 100 mmol/L NaCl

버퍼 B: 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 - 1 mol/L Urea - 10 mmol/L EDTA - 0.5% Triton X-100

버퍼 C: 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 - 2 mol/L Urea - 10 mmol/L EDTA - 0.5% Triton X-100

버퍼 D: 1 mol/L NaCl -----50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 5.5)

버퍼 E: 1 mol/L NaCl -----50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 5.0)

버퍼 F: 1 mol/L NaCl -----50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 4.0)

버퍼 G: 1 mol/L NaCl -----50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 3.6)

복원 버퍼: 0.5 mol/L 아르기닌-150 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 - 0.2 mmol/L EDTA

**LB 배지:1L**

트립톤 10g

효모 추출물 5g

NaCl 10g

**RM 배지:1L**

카제인 20g

MgCl 1mmol/L(0.203g)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g

NaCl 0.5g

$\text{NH}_4\text{Cl}$  1g

정제후, POROS HS/M에 의한 농축 단계에 따라 상기 버퍼는 PBS(pH 7.0)으로 변경되었다. 이를 "단백질 원액(stock solution)"으로 지칭한다. 상기 용액은 주사 또는 스프레이제제에 바로 사용될 수 있고, 2-8°C 에서 저장된다.

주사용 포뮬러:

용액 동결건조 파우더

rSIFN-co 용액 34.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  34.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

PB(pH 7.0) 25 mmol/L 10 mmol/L

글리신 - 0.4 mol/L

NaCl 0.1 mol/L -

스프레이용 포뮬러:

EDTA 0.01%

트윈80 0.05%

트리소듐시트레이트 10 mmol/L

글리세롤 1.26%

소듐클로라이드 0.03%

페닐메탄올 0.5%

HSA 0.1%

rSIFN-co 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

### 품질관리 공정

정제중 각 단계 후마다 단백질 함량, 단백질 순도, 비활성도 및 발열원(pyrogen)에 대한 테스트를 시행한다. 원액이 수득 될 때 표에 열거된 모든 시험을 차례로 시행한다.

제품의 질은 "생물학적 제제에 대한 중국 요건(Chinese Requirement for Biologics)"에 따라 관리된다.

#### 1. 오리지널 단백질 용액

(표 3.1)

Lowry

시험 항목	방법
<b>단백질 원액</b>	
단백질 함량 시험	로리
단백질 순도 시험	비환원성 SDS-PAGE (소듐도데실설페이트 폴리아크릴아미드겔 전기영동) HPLC 분석
분자량 시험	환원성 SDS-PAGE
비활성도 시험	“인터페론 비활성도 시험”의 방법에 따라
잔여 외인성 DNA 시험	DNA 라벨링 및 검출 키트 사용
잔여 항생제의 활성도 시험	“생물학적 제제에 대한 화학적 및 기타 시험 방법”의 방법에 따라
박테리아 엔도톡신 시험	“생물학적 제제의 박테리아 엔도톡신 시험에 대한 요건”의 방법에 따라
등전점 시험	등전 포커싱 전기영동
단백질 특성 확인 시험	UV 스펙트럼(파장 범위: 190-380nm)
	단백질 지도(체장 효소에 의해 가수분해, C-18 칼럼으로 분석)
	N-말단 서열 시험
	C-말단 서열 시험
	원형광 이색성
	아미노산 분석
<b>반제품</b>	
박테리아 엔도톡신 시험	“생물학적 제제의 박테리아 엔도톡신 시험에 대한 요건”의 방법에 따라
<b>제품</b>	
외관 검사	
화학적	생물학적 제제에 대한 화학적 및 기타 시험 방법”의 방법에 따라
비활성도 시험	“인터페론 비활성도 시험”의 방법에 따라
무균시험	“c”의 방법에 따라
비정상 독성 시험	마우스에 시험
발열원 시험	“생물학적 제제의 발열원 시험에 대한 요건”의 방법에 따라
제품의 안정성 검사	

주: “생물학적 제제에 대한 화학적 및 기타 시험 방법”, “생물학적 제제의 발열원 시험에 대한 요건” 및 “생물학적 제제의 박테리아 엔도톡신 시험에 대한 요건”은 모두 “생물학적 제제에 대한 중국 요건”에 있다. PAN Zhengan, ZHANG Xinhui, DUAN Zhibing 등. 중국 생물학적 제제 표준화 위원회, 화학 산업 발행 회사, 2000 발행.

### 실시예 3

#### 제조합 슈퍼-화합물 인터페론 주사의 동결건조 파우더의 안정성

안정성 실험은 2개의 규격과 3개 배치의 제조합 슈퍼-화합물 인터페론(rSIFN-co) 주사의 동결건조 파우더 시료에 대하여 시행하였으며, 2000년 4월에 시험을 시작하였다.

#### 1. 시료원

시료는 시추안지방의 시추안 휘양 생명공학회사에서 공급받았다. 로트 번호: 990101-03, 990101-05, 990102-03, 990101-05, 990103-03, 990103-05.

#### 2. 시료 규격

본 시험의 모든 시료는 하기 표의 조건을 만족하여야 한다.

(표 3.2)시험 시료 표준

항목	표준
----	----

1. 외관	백색의 흩어진 파우더
2. 용해 시간	실온에서 주사용수에 신속 용해(2분이내)
3. 투명도	무색 또는 약간의 우유빛 반짝임을 갖는 용액: 혼탁하거나 불순물 또는 침전물이 있으면 안됨
4. pH 값	6.5 ~ 7.5
5. 역가(IU/dose)	표시량의 80% ~ 150% (9 $\mu$ g:4.5 $\times$ 10 <sup>6</sup> IU, 15 $\mu$ g:7.5 $\times$ 10 <sup>6</sup> IU)
6. 수분	3.0%(W/W)이하

**3. 실험 함량**

2~8℃에서의 시료: 시료를 2~8℃ 냉장고에 넣고, 1개월, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 30개월, 36개월이 되는 때 각각 상기 항목에 대하여 시험한 후 결과를 기록하였다.

25℃에서의 시료: 시료를 25℃ 항온기에 넣고, 1개월, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 30개월이 되는 때 각각 상기 항목에 대하여 시험한 후 결과를 기록하였다.

37℃에서의 시료: 시료를 37℃ 항온기에 넣고, 1개월, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월이 되는 때 각각 상기 항목에 대하여 시험한 후 결과를 기록하였다.

**4. 결과 및 결론**

- 1) 테스트 전 결과 및 상기 각 시점에서 수득한 데이터를 비교한 결과에 따르면, 37℃에서는 역가는 6개월이 되는 시점부터 역가가 감소하기 시작하였으며, 이러한 변화는 3개의 배치에서 유사하였다. 다른 항목은 특별한 변화가 없었다.
- 2) 테스트 전 결과 및 상기 각 시점에서 수득한 데이터를 비교한 결과에 따르면, 25℃에서는 역가가 약간 변경되었으며, 이러한 변화는 3개의 배치에서 유사하였다. 다른 항목은 특별한 변화가 없었다.
- 3) 테스트 전 결과 및 상기 각 시점에서 수득한 데이터를 비교한 결과에 따르면, 2~8℃에서는 모든 배치의 역가가 안정하였다. 다른 항목도 역시 변화를 나타내지 않았다.

결론적으로, 주사용 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 동결건조 파우더는 저온에서 보관, 수송되는 것이 바람직함이 시사되었다. 그러한 조건이 되지 않을 경우, 실온에서도 짧은 기간(즉 3개월) 보관이 가능하다.

**실시예 3.5**

**rSIFN-co의 제조 흐름도**

1. 생산

1.1 발효

LB + M9 혼합액을 배양 배지로 사용한다. 접종량은 1.5%이다. 32℃ 하에서 OD600=0.4(약 3.5시간)이 될 때까지 진탕한 후, 42℃ 까지 상승시킨다. 6시간을 더 진탕하면, rSIFN-co 발현이 최고치에 도달한다. SDS-PAGE 겔을 스캔한 결과 발현 수준은 57%까지 도달하였고, 이는 중국에서 가장 높은 수준이다.

1.2 정제

박테리아 용액을 원심분리하여 박테리아 펠렛을 수거

↓

생리적 식염수로 2번 세척

↓

버퍼(50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1% Triton X-100, 1-2 M Urea)를 가하고, 20-30분간 초음파 처리하여 박테리아 세포를 파괴

↓

버퍼용액을 침전시키고 순수한 백색으로 될 때까지 수회 세척

↓

7M 구아니딘HCl을 사용하여 변성

↓

구아니딘HCl을 희석하여 복원시키고, 밤새 정치

↓

세파덱스 G25로 탈염

↓

0.1 M NaCl 을 CM-세파로스에 적용

↓

단계적 용출로 활성 피크 수거

↓

활성피크의 탈염후 HPLC 양전하 칼럼에 적용

↓

0.1M NaCl의 단계적 용출로 rSIFN-co 산물인 활성 피크 수거

↓

보호 담체 및 동결제 첨가

↓

동결건조된 물질(rSIFN-co) 분리

상기 과정에서 제조된 산물(rSIFN-co)의 순도는 SDS-PAGE(분자량 14.5 Kda) 테스트 결과 95%로 나타났다. 역상 HPLC 결과 단일 피크를 나타내었으며, 순도는 97%에 달하였다. 비활성도는  $1 \times 10^9$  IU/(단백질 mg)에 달하였다.

### 1.3 포장 및 검사

HPLC 정제후, 2% 인간 혈청 알부민, 1% 슈크로스 및 1% 글루코스를 rSIFN-co에 첨가한다. 이후 분리하고 동결건조하여 주사용 샘플로 한다. Wish-VVS 검사 시스템하에서 검정한 결과,  $4.5 \times 10^8$  IU이었다. 중국 표준 요건하에서 무균 검사 및 발열원 검사 결과 음성으로 나타났다. 본 결과는 IV 주사에 대한 요건을 만족한다.

## 2. 품질 관리

### 2.1 생리학적 특성

- (1) 박테리아 배양에 LB+ M9 사용시, 그 특성은 E-Coli 박테리아의 전형적인 특성에 부합되어야 한다. 다른 박테리아는 검출되지 않았다.
- (2) 그램 염색후 현미경 조사 결과, 박테리아-음성이었다.
- (3) 항생제에 대한 반응은 원 박테리아와 동일하였다.
- (4) 전자 현미경 검사 결과 E-Coli 박테리아의 전형적인 특성을 나타내었다. 마이코플라즈마, 바이러스 아포 또는 기타 미세 오염물질은 검출되지 않았다.
- (5) 생화학적 검사 결과 E-Coli 박테리아의 특성을 나타내었다.

### 2.2 인터페론 발현의 품질 관리

- (1) 인터페론 발현(진탕 플랫폼에서 배양)은 투입된 원 박테리아에서의 발현량과 일치한다.
- (2) 항-인터페론 혈청으로 검사시 반응을 나타냄.
- (3) 플라즈미드 검사: 제한 분해는 원플라즈미드와 일치하였다.

### 2.3 박테리아 균주 산물

박테리아 균주 산물은 상기 1.2 과정에서 생성된 원 박테리아 균주에서의 표본을 의미한다.

상기 박테리아 균주 산물은 하기와 같이 검사하여 어떠한 파생도 없음을 확인한다.

LB를 사용하여 2-3 조각으로 평판화하고 배양한다. 분리후 인터페론 발현 테스트용 5-10 박테리아균을 취한다. 상기 시험을 적어도 2회 반복한다. 가장 높은 %을 보이는 균주만을 박테리아 균주 산물로 사용한다.

### 2.4 접종

접종은 발효후 선별된 박테리아 균주 산물을 의미한다. 박테리아 균주에 따라, 량, 배양시간 및 가장 적절한 접종 OD치를 결정한다. 어떠한 접종물이 생성되든, 항오염 박테리아 과정을 적용한다.

### 2.5 박테리아 균주의 성장

박테리아 균주의 성장은 무균환경 즉 같은 방에서는 하나 이상의 박테리아가 성장하지 않는 환경에서 수행된다. 박테리아 균주 및 접종물 둘다에 대하여 동일한 배양배지가 사용된다. rSIFN-co에는 LB 배지가 사용된다.

### 2.6 발효

- (1) 발효는 단일 박테리아 발효 환경을 갖는 무균발효실험실에서 수행된다.
- (2) 발효 용기 및 튜브의 세척은 배양 배지의 삽입 전 및 후, 2회 수행된다. 이후 상기 용기는 냉동시켜 접종에 적절한 온도에 도달시킨다.
- (3) 배양배지의 세포 성장에 영향을 줄 수 있는 항생제의 사용을 피한다.
- (4) 온도, pH치, 용해된 산소 및 요구 시간 등과 같은 발효 파라미터는 박테리아 균주의 타입에 따라 변경될 수 있다.

## 2.7 박테리아 수거

- (1) 박테리아 용액을 원심분리하여 박테리아를 수거하거나 다른 방법에 사용한다. 모든 기기는 동작 전 및 후에 세척된다. 폐기용액은 세척 과정후 배수한다.
- (2) 박테리아는 24시간 이내에 분리될 경우에는 4-8℃ 하에서 보관한다. 기타 경우에는 -30℃ 에서 보관한다. 이 조건하에서 보관된 경우 6개월 이내에 사용될 수 있다.

## 2.8 박테리아 세포 용해

- (1) 적절한 버퍼 용액을 사용하여 박테리아 균주의 균형을 맞춘다. 세포 용해는 생리적, 화학적, 생물학적 방법에 의해 수행된다. 원심분리하여 박테리아를 침전시키고 세척 용액을 가한다.
- (2) 화학적 방법으로 세포분리하는 경우에는 인체에 해로운 용액은 사용되어서는 아니된다.

## 2.9 정제

- (1) 정제는 대부분의 비-인터페론 내용물을 제거한다. 정제 과정에서 추가 요소가 부가되는 때 어떠한 독성 물질도 발견되어서는 안된다.
- (2) 정제에 항체 친화 크로마토그래피를 사용한 경우, 정제원 및 정제정도에 대한 표지가 있어야 한다. 또한, 소량의 IgG에 대한 검사도 수행되어야 한다.
- (3) 정제 과정중 발열원의 제거가 중요하다. 모든 기구는 이러한 방해물이 제거되었는지 체크되어야 한다.
- (4) 고농축 인터페론은 "중간 산물"로 알려져 있다. 검사 및 시험후 알부민을 가하여 그 농도를 2%로 올린다("알부민 중간 산물"). 검사 및 시험후 -30℃ 에서 보관하고 사용전에는 해동시켜서는 안된다. 이 산물은 6개월 이내 사용되어야 한다.
- (5) 본 과정에서 사용된 알부민은 하기 검사 및 요건을 만족하여야 한다: RBSAG 검사시 음성 및 모노머, 다이머 및 폴리머 간 비율의 표시.

## 2.10 튜브 산물로서의 제조

- (1) 여과: 0.22μ 멤브레인을 사용하여 박테리아를 여과한다. 이 산물은 무균 기술로 조작 된다. 인터페론 값을 검사하기 위해 시료를 취한다.
- (2) 희석: 알부민 중간 산물을 2% 희석제로 희석한다. 방부제는 첨가되어서는 안된다. 무균 검사 및 발열원 검사 이후 상기 산물을 동결건조할 수 있다.

## 2.11 동결건조

동결건조는 인터페론의 활성도에 영향을 미쳐서는 안되며, 상기 동결건조물의 수분 함량은 유지된다.

## 2.12 검사

두가지 타입의 rSIFN-co가 존재한다. 하나는 주사용이며 나머지는 국소용이다. 상기 두 타입에 대한 규격은 상이하다. 각 타입에 대하여 중간 산물과 최종 산물이 있다. 주사 타입의 경우, 중간 산물은 정제 인터페론, 알부민 중간 산물 및 박테리아-유리 알부민 중간 산물을 포함한다. 주사 타입의 최종 산물은 동결 건조 제품만을 의미한다. 국소 타입의 중간 산물은 정제 인터페론만을 의미한다. 국소 타입의 최종 산물은 분리포장된 액체 형성 동결건조 산물만을 의미한다.

## 2.13 포장

주사 타입 및 국소 타입에 대하여 상이한 포장이 존재한다.

## 2.14 보관

상기 산물들은 4℃에서 보관한다. 정제 용액은 냉동 상태에서 보관되어서는 안된다.

## 2.15 만료

동결건조 산물의 유효기간은 동결 과정후 2년이다. 액화 산물의 경우 개별 포장 6개월 후 유효기간이 만료된다.

## 실시예 4

**rSIFN-co의 HBV-DNA 복제, HBsAg 및 HBeAg의 분비 억제 효과.**

### 실험물질

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

대조용 약물: 동결건조 분말로서 웨링 프라우로부터 구입한 IFN-α2b(인트론 A). 3x10<sup>6</sup>U 각각을 배양 배지와 혼합하여 3×10<sup>6</sup>IU/ml을 만듦; Amgen로부터 구입한 Infergen<sup>®</sup>(액체 용액)0.9μg, 0.3ml( 9x10<sup>6</sup>IU 해당) 각각을 배양 배지와 혼합하여 4℃에서 보관; 2.2.15 세포: 간종양(Hep G2)의 2.2.15 세포주는 Mount Sinai Medical Center에 의해 클로닝되고 HBV DNA으로 형질감염시켜 작제되었다.

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

실험 장치: 배양 용기(Denmark Tunclon<sup>TM</sup>), 24-웰 및 96-웰 배양판(Corning American Ltd), 이산화탄소 헤칭 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: 2.2.15 세포로 가득 채워진 배양 박스에 0.25% 취장 효소를 가하여, 37℃에서 3분간 분해시키고, 배양 배지를 가하여 분해를 중단시키고, 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 분해시키고, 100,000 세포/ml 용액으로 조제하였다. 96-웰 배양판에 접종시켜 웰당 200μl이 되게 한 후, 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 하에서 24시간 동안 배양하였다. 단일 세포층이 성장할 때 시험하였다.

rSIFN-co를 1.8 × 10<sup>7</sup>IU/ml 용액으로 분배하고 이어, 이중 구배로 희석시킨 일련의 용액을 제조하였다. 96-웰 배양판에 가하고, 각 농도당 3개 웰을 준비하였다. 4일마다 상기 용액을 바꾸었다. 8일 후 현미경으로 세포변성 효과를 관찰하였다. 완전한 파괴는 4로, 75% 파괴는 3으로, 50% 파괴는 2로, 25% 파괴는 1로, 미파괴는 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 배양판 내로 접종시키고, 웰당 3ml가 되게 하였으며, 5% CO<sub>2</sub>를 사용하여 37°C에서 24시간 동안 배양시키고, 이어 삼중 구배로 5개의 희석 용액을 제조하였으며(각각 상이한 단백질 농도로 제조한 5개 용액을 제조하였다. 용액 2의 농도는 용액 1의 농도보다 3배가 낮으며, 용액 3의 농도는 용액 2의 농도보다 3배가 낮다 등), 5개 용액의 농도는 4.5×10<sup>6</sup>IU/ml, 1.5×10<sup>6</sup>IU/ml, 0.5×10<sup>6</sup>IU/ml, 0.17×10<sup>6</sup>IU/ml 및 0.056×10<sup>6</sup>IU/ml이며, 농도당 1개 웰을 만들었으며, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 동안 배양시켰다. 동일한 용액을 사용하여 4일마다 용액을 바꾸었다. 8일째에 모든 배양 배지를 수집하였다. -20°C에서 보관하였다. 고체-상 방사면역 분석박스를 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 평균값 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= 시험군의 cpm.

2) 약물 반-효능(half-efficiency) 농도

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

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

3) 인터스페이스-입체배치의 SI는 2.2.15 세포배양액에서 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(drain)시킴으로써 배양 배지로부터 세포를 분리함). 용해 버퍼를 부가하여 세포를 파괴시키고 이어, 페놀, 클로로포름 및 이소아밀 알코올의 혼합물(1:1:1)로 2회 추출하여 10,000g 원심분리하였다. 상청액을 수거하고 무수 알코올을 가하여 핵산을 침전시켰다. 진공으로 흡입하여 20μl TE 버퍼에 재용해시켰다. (2) 전기영동: 6XDNA 로딩 버퍼를 부가하고, 고정 압력에서 14-18시간 동안 1.5% 아가로스 겔상에서 전기영동하였다(IV/cm). (3) 변성 및 혼성화(Hybridization): 겔을 HCl, 변성 버퍼 및 중화 버퍼에 각각 담그었다. (4) 트랜스멤브레인: 하이본드(Hybond)-N 막으로 DNA를 순서대로 운반하였다. 점 블롯 혼성화법을 사용하여 베이킹(bake), 혼성화 및 노출시켰다. 겔-프로 소프트웨어를 사용하여 스캔 및 상대밀도 분석하였다. 억제율 및 IC50을 계산하였다.

## 결과

결과는 표 4.1, 4.2 및 4.3에 나타내었다: 2.2.15 세포를 사용하여 8일동안 최대 무해 농도지수에서 배양한 후, 상기 최대 값은 9.0±0×10<sup>6</sup>IU/ml이었으며, HBeAg에 대한 최대 무해 농도 rSIFN-co의 평균 억제율은 46.0±5.25%(P < 0.001)이었으며, IC50은 4.54±1.32×10<sup>6</sup>IU/ml이었으며, SI는 3.96이었으며; HBsAg에 대한 비율은 44.8±6.6%이었으며, IC50은 6.49±0.42×10<sup>6</sup>IU/ml이었으며, SI는 2.77이었다. 이는 rSIFN-co 가 HBeAg 및 HBsAg의 활성도를 상당히 억제할 수 있지만, 대조군의 IFN 및 Infergen<sup>®</sup>은 억제할 수 없음을 나타낸다. 임상에서도 rSIFN-co이 HBeAg 및 HBsAg를 감소시킬 수 있거나 또는 이들을 정상 수준으로 회복시킬 수 있음을 입증하였다.

(표 4.1)

HBsAg 및 HBeAg에 대한 rSIFN-co의 억제율 결과

첫번째 배치(rSIFN-co)

HBeAg에 대한 억제효과											
농도 ( $\times 10^4$ IU/mL)	억제율			평균 억제율	1-축적	축적	평균 억제율	1-축적	축적	평균 억제율	
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰								
900	9026	8976	10476	0.436227	0.43935	0.345659	0.407079	0.592921	0.945909	0.61469357	
300	9616	12082	10098	0.3993754	0.245347	0.369269	0.337997	1.254924	0.5388299	0.300392321	
100	9822	16002	12800	0.386508	0.0005	0.2005	0.195836	2.059088	0.200833	0.08867188	
33.33333	15770	19306	16824	0.014991	0	0	0.004997	3.054091	0.0049969	0.001633482	
11.11111	19172	22270	18934	0	0	0	0	4.054091	0	0	
대조용	15010			블랭크 0			회색	3			602.74445016
HBsAg에 대한 억제효과											
농도 ( $\times 10^4$ IU/mL)	억제율			평균 억제율	1-축적	축적	평균 억제율	1-축적	축적	평균 억제율	
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰								
900	7706	7240	7114	0.342155	0.381936	0.392693	0.372261	0.922258	0.922258	0.627739	
300	8856	7778	9476	0.2439816	0.336008	0.191053	0.257014	1.370724	0.5459972	0.286349225	
100	10818	10720	10330	0.07649	0.084856	0.118149	0.093165	2.27756	0.292983	0.113977019	
33.33333	10744	11114	10570	0.082807	0.051221	0.097661	0.07723	3.20033	0.1998179	0.058767408	
11.11111	10672	9352	10810	0.088953	0.201639	0.077173	0.122588	4.077742	0.122588	0.02918541	
대조용	11714			블랭크 0			회색	3			641.7736749

두번째 배치(rSIFN-co)

HBeAg에 대한 억제효과											
농도 ( $\times 10^4$ IU/ml)	첫번째 억제물			두번째 억제물			세번째 억제물			평균 억제물	
	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	1.371181	0.487992	0.73752196	0.487992	0.73752196
300	10344	10628	9160	0.4103967	0.394209	0.477884	0.427497	1.060496	0.447563245	1.060496	0.447563245
100	12296	14228	13262	0.299134	0.18901	0.244072	0.244072	1.816423	0.19201899	1.816423	0.19201899
33.33333	15364	17414	16188	0.128259	0.00741	0.77291	0.069653	2.74677	0.063933886	2.74677	0.063933886
11.11111	17386	13632	15406	0.009006	0.222982	0.121865	0.117951	3.628819	0.03148078	3.628819	0.03148078
대조용	세포	16962		블랭크	0		회색	IC50	365.9357846	IC50	365.9357846

HBeAg에 대한 억제효과											
농도 ( $\times 10^4$ IU/ml)	첫번째 억제물			두번째 억제물			세번째 억제물			평균 억제물	
	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	0.486063	0.893477	0.634835847	0.513937	0.634835847
300	7150	8534	8318	0.379771	0.259715	0.278452	0.30598	1.207957	0.252210647	1.207957	0.252210647
100	9830	11212	10210	0.147294	0.027412	0.11433	0.096345	2.111612	0.04583464	2.111612	0.04583464
33.33333	13942	12368	13478	0	0	0	0	3.111612	0.001632835	3.111612	0.001632835
11.11111	12418	11634	11352	0	0	0.015267	0.005089	4.106523	0.001237728	4.106523	0.001237728
대조용	세포			블랭크	0		회색	IC50	611.09195668	IC50	611.09195668

세번째 배지(rSIFN-co)

HBeAg에 대한 억제효과											
농도 (× 10 <sup>4</sup> IU/ml)	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	억제율			평균 억제율	축적 억제율	1-축적	축적된 억제율	
				첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰					
900	9702	9614	8110	0.428016	0.433204	0.521872	0.461031	1.316983	0.538969	0.709599548	
300	8914	10032	8870	0.4744723	0.408566	0.477066	0.453366	0.8559525	1.085603	0.440859122	
100	16312	12688	13934	0.038321	0.2519757	0.178517	0.156271	0.402586	1.929332	0.172641622	
33.33333	15080	12814	13288	0.110954	0.2445472	0.216602	0.190701	0.2463153	2.738631	0.082519158	
11.11111	21928	15366	15728	0	0.0940931	0.072751	0.0055615	0.055615	3.683017	0.014875633	
대조용	세포	17544		블랭크	0		회색	3	IC50	382.0496935	
HBsAg에 대한 억제효과											
농도 (× 10 <sup>4</sup> IU/ml)	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	억제율			평균 억제율	축적 억제율	1-축적	축적된 억제율	
				첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰					
900	5616	6228	5346	0.496864	0.4420354	0.521054	0.486651	0.763125	0.513349	0.597838293	
300	8542	8590	7096	0.234725	0.2304252	0.364272	0.276474	0.2764738	1.236875	0.182690031	
100	11420	11360	11394	0	0	0	0	0	2.236875	0	
33.33333	12656	11582	13110	0	0	0	0	0	0	0	
11.11111	13142	12336	13342	0	0	0	0	0	4.236875	0	
대조용	세포	11528		블랭크	0		회색	3	IC50	694.7027149	
HBsAg:	평균 IC50:	450.2434		SD:	132.315479						
HBsAg:	평균 IC50:	649.1894		SD:	42.29580						

(표 4.2)

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

농도 ( $\times 10^4$ IU/ml)	HBeAg에 대한 억제효과										1-축적	축적 억제율	축적된 억제율
	첫번째			두번째			세번째			평균 억제율			
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰				
300	14918	11724	9950	0	0.029711	0.176529	0.068747	0	0.068747	0	0.931253	0.068747	0.068746794
100	14868	16890	15182	0	0	0	0	0	0	0	1.931253	0	0
33.33333	16760	21716	16400	0	0	0	0	0	0	0	2.931253	0	0
11.11111	20854	15042	16168	0	0	0	0	0	0	0	3.931253	0	0
3.703704	12083	12083	12083	0	0	0	0	0	0	0	4.931253	0	0
대조용	세포	17544	블랭크	0	0	0	0	0	0	0	IC50	3	가성(false)
농도 ( $\times 10^4$ IU/ml)	HBsAg에 대한 억제효과										1-축적	축적 억제율	축적된 억제율
	첫번째			두번째			세번째			평균 억제율			
	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰	첫번째 웰	두번째 웰	세번째 웰				

(표 4.3)

HBsAg 및 HBeAg에 대한 Infergen®의 억제율 결과

첫번째 배치(Infergen®)

농도 ( $\times 10^4$ IU/ml)	FBsAg에 대한 억제효과						평균 억제율	축적 1-축적	축적된 억제율	
	억제율			축적						
	첫번째 시험관 시험관 시험관	두번째 시험관 시험관 시험관	세번째 시험관 시험관 시험관	첫번째 시험관 시험관 시험관	두번째 시험관 시험관 시험관	세번째 시험관 시험관 시험관				
900	14172	12156	17306	0.091655	0.220869	0	0.104175	0.305157	0.895825	0.254710274
300	13390	12288	16252	0.1417767	0.212409	0	0.118062	0.2019627	1.777764	0.10202451
100	14364	18834	14194	0.079349	0	0.090245	0.056531	0.083921	2.721232	0.029910678
33.33333	15722	16034	16340	0	0	0	0	0.0273597	3.721232	0.007306292
11.11111	17504	17652	14320	0	0	0.082169	0.02739	0.02739	4.693843	0.005801227
대조용	세포	15602		불량크	0		희석	3	IC50	기성(falser)
FBsAg에 대한 억제효과										
농도 ( $\times 10^4$ IU/ml)	억제율						평균 억제율	축적 1-축적	축적된 억제율	
	억제율			축적						
	첫번째 시험관 시험관 시험관	두번째 시험관 시험관 시험관	세번째 시험관 시험관 시험관	첫번째 시험관 시험관 시험관	두번째 시험관 시험관 시험관	세번째 시험관 시험관 시험관				
900	12080	11692	12234	0	0.01275	0	0.00425	0.025163	0.99575	0.024667111
300	12840	11484	12350	0	0.030313	0	0.010104	0.0209125	1.985646	0.010422073
100	12694	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		불량크	0		희석	3	IC50	기성(falser)

두번째 배치(Infergen®)

HBsAg에 대한 억제효과												
농도 ( $\times 10^4$ IU/ml)	첫 번째 웰			두 번째 웰			세 번째 웰			평균 억제율	1-축적	축적된 억제율
	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰			
900	6278	6376	6408	0.200051	0.187564	0.183486	0.190367	0.274635	0.809633	0.25329080		
300	7692	9092	6394	0.0198777	0	0.18527	0.068383	0.0842678	1.74125	0.046161085		
100	8960	7474	8190	0	0.047655	0	0.015885	0.015885	2.725365	0.005794866		
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	7848		블랭크	0		회색	3	IC50	가성(false)		
HBsAg에 대한 억제효과												
농도 ( $\times 10^4$ IU/ml)	첫 번째 웰			두 번째 웰			세 번째 웰			평균 억제율	1-축적	축적된 억제율
	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰			
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	0.0991581	1.923709	0.0490186		
100	12448	13468	13962	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	0.0539965	3.859838	0.013796309		
11.11111	12828	12828	12828	0	0	0	0	0	4.859838	0		
대조용	세포	12828		블랭크	0		회색	3	IC50	가성(false)		

세 번째 배지(Infergen®)

HBeAg에 대한 억제효과												
농도 ( $\times 10^4$ IU/ml)	첫 번째 억제물			두 번째 억제물			세 번째 억제물			평균 억제물	1-축적	축적된 억제물
	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰			
900	7240	6642	6158	0.064599	0.14186	0.204393	0.136951	0.217399	0.863049	0.201211735		
300	11072	8786	6902	0	0.108269	0.03609	0.0804479	1.82696	0.042176564			
100	7016	9726	7552	0.09354	0	0.024289	0.039276	0.044358	2.787683	0.015663017		
33.33333	7622	8866	8676	0.015245	0	0	0.005082	0.0050818	3.782601	0.001341671		
11.11111	7740	7740	7740	0	0	0	0	0	4.782601	0		
대조용	세포	7740	7740	블랭크	0		희석	3	IC50	가정(false)		

HBsAg에 대한 억제효과												
농도 ( $\times 10^4$ IU/ml)	첫 번째 억제물			두 번째 억제물			세 번째 억제물			평균 억제물	1-축적	축적된 억제물
	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰	첫 번째 웰	두 번째 웰	세 번째 웰			
900	11048	11856	11902	0.04775	0	0	0.015917	0.015917	0.984083	0.015916796		
300	13454	12896	11798	0	0	0	0	0	1.984083	0		
100	12846	13160	12546	0	0	0	0	0	2.984083	0		
33.33333	12680	12458	12360	0	0	0	0	0	3.984083	0		
11.11111	11602	11602	11602	0	0	0	0	0	4.984083	0		
대조용	세포	11602	11602	블랭크	0		희석	3	IC50	가정(false)		

HBeAg: 평균 IC50: 0 SD: 0  
 HBsAg: 평균 IC50: 0 SD: 0

실시예 5

rSIFN-co 의 제조

동결 건조 주사의 동결건조 파우더의 제조

rSIFN-co 의 원액 34.5 $\mu$ g/ml

PB (pH 7.0) 10 mmol/L

글리신 0.4 mol/L

제조 기술: 처방전에 따라 각 물질을 칭량하고, 무균 및 발열원이 없는 물에 용해시킨다. 0.22 $\mu$ m 멤브레인을 통과시켜 박테리아를 제거하고 6-10 $^{\circ}$ C 에서 보관한다. 무균 및 발열원이 없음을 확인한 후 바이알에 충전시키고(0.3 ml/바이알 또는 0.5 ml/바이알), 동결건조기에서 동결건조한다.

액상 주사용액의 제조

rSIFN-co 의 원액 34.5 $\mu$ g/ml

PB (pH 7.0) 25 mmol/L

NaCl 0.1 mol/L

제조: 처방전에 따라 각 물질을 칭량하고, 무균 및 발열원이 없는 물에 원하는 수준으로 가한다. 0.22 $\mu$ m 멤브레인을 통과시켜 박테리아를 제거하고 6-10 $^{\circ}$ C 에서 보관한다. 무균 및 발열원이 없음을 확인한 후 밀봉 바이알에 충전시키고(0.3 ml/바이알 또는 0.5 ml/바이알), 2-10 $^{\circ}$ C 에서 보관하고 차광한다.

## 실시예 6

### rSIFN-co의 급성 독성

마우스에 대량(150 $\mu$ g/kg, 성인환자치료에 사용되는 킬로그램 상용량의 1000배에 해당)의 rSIFN-co를 한번에 근육주사한다. 이후 치사 및 독성 반응을 관찰하고 기록한다. 그 결과: 주사후 24시간, 특별한 이상반응이 기록되지 않았다. 몇마리를 선택하여 치사시킨후 내부 기관 관찰시 특별한 비정상적인 변화를 나타내지 않았다. 나머지 잔여 마우스는 2주일 후에도 모두 정상적으로 생존하였다. 실험군 및 대조군의 마우스 체중은 모두 증가하였으며, 14일째 체중에 대한 증가비율은 두 그룹간 특별한 차이를 나타내지 않았다( $P > 0.05$ ). 2주후 상기 마우스의 주요 기관에서도 아무런 비정상적인 반응이 관찰되지 않았다.

#### 1. 실험 물질

##### 1.1 동물

시추안 실험 동물 조절 센터에서 보증하는 18-22g의 건강한 성인쥐(자웅 반반) 40마리를 사용하였다.

##### 1.2 약물

rSIFN-co(시추안 휘양 생명 공학 주식회사 제공,로트번호 981201) 멸균 용액 0.15 mg/ml 을 사용하였으며, 식염수내에서 근육주사로 투여되었다.

#### 2. 방법

40마리의 마우스를 두그룹으로 분리하여, 하나는 실험 약물군으로 나머지는 대조군으로 하였다. 속해 있는 그룹에 따라 각 마우스에 약물 또는 식염수를 동비율(0.1 ml/10g)로 근육 주사하였다(실험군의 경우 rSIFN-co 150 $\mu$ g/kg; 대조군은 식염수). 주사후 마우스에 나타나는 급성 독성반응을 관찰하고 기록하였다. 24시간 후 상기 마우스의 반을 치사시켜(자웅 각각 반씩) 심장, 비장, 간, 폐, 신장, 부신, 위, 십이지장 등의 주요 기관에서의 특별한 비정상적 병리학적 변화가 발생되었는지를 체크하였다. 생존한 잔여 마우스는 14일이 되는 날까지 관찰하였다. 모든 마우스를 칭량하고, 치사시킨 후 상기 기재한 각 기관의 외관을 관찰하였다. 상기 두 그룹간 체중 증가의 상이성을 분석하면서, 병리 조직을 채취하여 검사하였다.

#### 3. 결과

rSIFN-co 150 $\mu$ g/kg(성인환자치료에 사용되는 킬로그램 상용량의 1000배에 해당)을 한꺼번에 근육 주사한 경우에도 모든 마우스에서 급성 독성 반응이 나타나지 않았다. 주사 후 14일, 모든 마우스는 건강하게 생존하였다. 모든 마우스는 정상적으로 먹고, 마시며, 운동하고, 배설하고, 정상적인 모(hair) 상태를 나타내며, 한마리도 죽지 않았다. 무작위 선택된 마우스의 주요 기관 또한 주사 한지 24시간 후에도 아무런 비정상적 변화를 나타내지 않았다. 주사 14일 후, 모든 잔여 마우스를 치사시켜 부검한 결과 아무런 변화를 나타내지 않았다. 상기 두 그룹의 마우스들은 모두 체중이 증가하였으며, 통계적 차이를 나타내지 않았다( $p > 0.05$ ). 표 6.1을 참조하라.

##### (표 6.1)

rSIFN-co 주사후 마우스의 체중에 대한 영향

그룹	용량	동물	주사전 체중(g)	주사후 체중(g)	체중증가치(g)
대조군	0	20	19.8±1.7	30.8±2.8	11.0±2.9
rSIFN-co	150	20	19.4±1.7	32.1±3.3	12.7±4.3

4. 결론

본 실험의 조건하에서, rSIFN-co 150µg/kg을 주사한 모든 마우스에서 독성 반응이 나타나지 않았다. 따라서 마우스의 근육주사시 최대 내약량은 성인환자치료에 사용되는 킬로그램 상용량의 1000배에 해당하는 150µg/kg으로 결론지을 수 있다.

실시에 7

제조합 슈퍼-화합물 인터페론(rSIFN-co)의 임상적 효과

제조합 슈퍼-화합물 인터페론(rSIFN-co)은 바이러스성 질환의 치료 특히 간염에 대한 발명이다. 한편, 상기 화합물은 EB 바이러스, VSV, 단순 헤르페스 바이러스, 코로나바이러스, 홍역(measles)바이러스 등의 활성을 억제할 수 있다. 항바이러스 활성에 대한 시험으로서 Wish cells/VSV 시스템을 사용한 결과: 다른 rIFN은  $0.9 \times 10^8$  IU/mg, Intron A는  $2.0 \times 10^8$  IU/mg 및 rSIFN-co는  $9 \times 10^8$  IU/mg이었다. rSIFN-co의 항바이러스 활성은 상기 두 화합물에 비하여 월등히 높았다.

중국FDA(SFDA)의 허락 아래, 2003년 2월 이후로 웨스트 차이나 병원, 시추안 대학, 종퉁 의학 대학의 제2 병원, 췌지양 의학대학의 제1병원에서 임상시험이 행해졌다. 복수센터의 지도아래 B형 간염에 초점을 두어 임상 처치가 수행되고, 이중 맹무작위시험을 시행하였다. IFN-α1b가 대조약으로 사용되었으며, 1차 결과는 하기와 같다.

만성 활동성 B형 간염 치료에 있어 rSIFN-co 및 IFN-α1b의 효과 비교

1. 선별된 환자의 기준: 기준 1-4는 rSIFN-co(9 µg) 및 IFN-α1b(5MU; 50µg)에 모두 적용되며, 기준 1-5는 rSIFN-co (15 µg)에 적용됨.

- 1) 나이: 18-65세
- 2) HBsAg-검사 6개월 이상 양성 지속, HBeAg-검사 양성, PCR 분석, HBV-DNA 카피 ≥  $10^5$ /ml
- 3) ALT ≥ 정상치의 두배
- 4) IFN 치료받은 적 없음; 또는 라미비딘 치료를 받았으나 실패 또는 재발됨
- 5) SFDA 기준에 따라 6개월 이전 기타 IFNs(3 MU 또는 5 MU)로 치료받았으나, 실패 또는 재발.

2. 효과 평가

제10차 중국 바이러스 간염 및 간병리학의 국가 위원회 권고를 참조하여, ALT 수준, HBV-DNA 및 HBeAg 검사에 따라 그 효과를 3 등급으로 분류하였다.

반응: ALT 정상 수준, HBV-DNA 음성, HBeAg 음성

부분 반응: ALT 정상 수준, HBV-DNA 또는 HBeAg 음성

무반응: ALT, HBV-DNA 및 HBeAg 변화 없음

반응 및 부분 반응은 효과가 있는 경우로 간주되었다.

3. 임상 시험의 결과

그룹 A: rSIFN-co(9 µg)으로 치료

그룹 B: IFN-α1b(5 MU, 50µg)

기간	그룹	약물	케이스	효율	HBsAg의 음성화 비율	HBeAg의 음성화 비율	HBV-DNA의 음성화 비율	간기능 회복비율
8-12주	A	rSIFN-co (9µg)	32	46.88 (15)	9.38 (3)	28.12 (9)	37.50 (12)	84.38 (27)
	B	IFN-α 1b (5 MU, 50µg)	32	21.88 (7)	0.00 (0)	9.38 (3)	15.62 (5)	56.25 (18)
16-24주	A	rSIFN-co (9µg)	64	54.69 (35)	7.81 (5)	25.00 (16)	34.38 (22)	90.62 (58)
	B	IFN-α 1b (5 MU, 50µg)	64	25.00 (16)	0.00 (0)	9.38 (6)	18.75 (12)	78.13 (50)

그룹 C는 만성 활동성 B형 간염 치료를 위하여 전치료로 기타 IFNs(3MU 또는 5MU)를 투여 받았으나, 실패 또는 재발하고 이후 rSIFN-co(15 µg)을 24주일 동안 날마다 피하주사 한 경우이다. 전체 13 케이스였다. 12주 치료후, 13케이스 중 7 케이스(53.85%)에서 효과를 나타내었다. 13케이스 중 3케이스(23.08%)가 HBeAg 음성화되었고; 7케이스(53.85%)가 HBV-DNA 음성화되었으며; 11케이스(84.62%)에서 간 기능이 정상으로 회복되었다.

**4. 치료시 IFN-α1b과 rSIFN-co의 부작용 비교**

IFN의 부작용은 열, 오심, 근육통, 식욕부진, 탈모, 백혈구 감소증 및 저혈소판혈증 등을 포함한다. IFN-α1b의 최대량은 시간당 5MIU이며; 통상량은 3MIU이다. 통상량의 투여시, 90%의 환자가 I도 내지 II도(WHO 기준)의 부작용을 나타낸다. 38℃ 미만의 열, 오심, 근육통, 식욕부진 등을 나타낸다. 최대량 투여시, 부작용률이 명백하게 상승하는 것은 아니나, 보다 심각하다. rSIFN-co의 최대량은 3개월간 날마다 피하주사시 24µg이다. 통상량은 9µg이다. 통상량으로 투여시 50% 이하의 환자가 38℃ 미만의 열, 오심, 근육통, 식욕부진, 백혈구 감소증 및 경미한 저혈소판혈증을 포함하는 I도 내지 II도(WHO 기준)의 부작용을 나타내었다. 최대량 투여시, 약 50% 환자가 rSIFN-co을 한달간 투여받은 후 백혈구 감소증 및 저혈소판혈증을 나타내었으나, 치료 중단 약 1주내로 상기 부작용은 모두 소실되었다. 따라서 계속 사용에도 안전하다.

rSIFN-co의 C형 간염 치료에의 관찰

**1. 환자 선별 기준**

- 1) 나이: 18-65세
- 2) HCV 항체 양성
- 3) ALT ≥ 정상치의 1.5배, 6개월 이상 지속

**2. 효과 평가**

C형 간염 치료용 Infergen® 기준을 참조하고, ALT 수준, HCV-RNA 검사에 따라 그 효과를 3 등급으로 분류하였다.

반응: ALT 정상 수준, HCV-RNA 음성

부분 반응: ALT 정상 수준, HCV-RNA 변동 없음

무반응: ALT 및 HCV-RNA 변동 없음

**3. 임상 효과**

임상 시험은 B형 간염 치료와 동시에 시행되었다. 46케이스가 치료(24주간 날마다 각 9 $\mu$ g씩 피하주사) 받았다. 치료후 46 케이스중 26 케이스(56.52%)가 명백한 효과를 나타내었으며, 12 케이스(26.08%)가 HCV-RNA 음성화되었고, 26 케이스 (56.52%)에서 간 기능이 정상으로 회복되었다.

**실시예 8**

**재조합 슈퍼-화합물 인터페론 스프레이**

**주성분:** 재조합 슈퍼-화합물 인터페론

**특성:** 액상, 불용성 물질 없음

**약리학:** 재조합 슈퍼-화합물 인터페론은 광범위 항-바이러스 활성을 갖는다. 효과는 출시되어있는 기타 인터페론(IFNs)에 비하여 5-20배 높다. 세포 배양에서 코로나바이러스의 성장을 억제할 수 있다. 그 기전은 IFN과 상응하는 리셉터간의 조합 반응을 방해하고, 2'5'-A 합성효소(synthesienzyme), 타겟 세포에서의 프로테인 키나아제 R의 발현을 유도하여 바이러스 단백질의 발현을 억제하는 것이다. IFN은 다양한 항-바이러스 단백질의 발현을 유도하여 바이러스 단백질의 재생산을 억제하고, 자연 살해 세포(NK cell)의 기능 및 기타 면역 조절 기능을 증강시키고, 바이러스의 침범을 억제한다.

**급성 독성:** 최대량(인간 용량의 1000배)을 피하 주사한 후에도 모든 마우스는 생존하였으며, LD<sub>50</sub>은 관찰되지 않았다.

**적응증:** 중증급성호흡기증후군의 예방

**용량 및 투여:** 양쪽 비강 및 인후에 1일 3회 스프레이

**부작용:** rINF 스프레이의 사용에 따른 어떤 부작용도 보고된 바 없다. 알레르기를 유발하지 않았다. 자극이 간헐적인 경우, 유해한 장관반응은 경미하였으며, 치료중 기타 다른 명백한 부작용은 나타나지 않았으며, 지속적인 사용에 안전하다. 모든 작용들은 자연 소실된다.

**경고:** aIFN 및 *E.Coli* 산물에 알레르기가 있는 환자는 이 제품을 사용할 수 없다.

**주의:** 처음 사용하는 경우, 2회 분사하여 공기를 빼낸다. 혼탁한 침전물이 있거나, 유효기간이 만료되거나, 바이알상에 이물질이 보이는 경우 사용하여서는 안된다.

**소아 용량:** 명확하지 않음

**노인 용량:** 명확하지 않음

**수유부 및 임신부:** 금기

**약물 상호작용:** 명확하지 않음

**과량:** 각회 150 $\mu$ g(7.5 $\times$ 10<sup>7</sup> IU) 초과시 열, 식욕부진, 근육통, 오한이 자주 발생할 수 있다. 심각한 부작용은 없다.

**공급:** 1 스프레이/팩, 20 $\mu$ g(1 $\times$ 10<sup>7</sup> IU)/3ml

**보관:** 4-8 $^{\circ}$ C 에서 보관, 얼리지 않고, 차광 할 것.

**유효 기간:** 약 1년

**제조:** 시추안 휘양 생명 공학 주식회사 제조

**주소:** 8 Yusa Road, Room 902, Building A

Chengdu, 610017

Sichuan, P.R.China

### 실시예 9-A

#### SARS-관련 코로나바이러스에 대한 새로운 형태의 재조합 화합물 인터페론의 생체외 효과

샘플 공급: 시추안 휘양 생명 공학 주식회사, 시추안 지방

시험자: 육군 의학 아카데미의 미생물 및 역학 기관, 분자 생물학 부서

원 데이터: 육군 의학 아카데미의 미생물 및 역학 기관, 분자 생물학 부서의 아카이브(archive) 보존

#### 1. 시험 물질

약물: 새로운 형태의 재조합 화합물 인터페론, 각  $9\mu\text{g}$ , 시추안 지방의 시추안 휘양 생명 공학 주식회사 제공, 로트 번호: 20020501

세포: Vero E<sub>6</sub>, 육군 의학 아카데미의 미생물 및 역학 기관, 분자 생물학 부서 제공

바이러스: SARS-관련 코로나바이러스(BJ-01), 육군 의학 아카데미의 미생물 및 역학 기관, 분자 생물학 부서 제공

세포 배지: 10% FBS 보충 DMEM 배지

2. 조건: 바이러스는 생안전성에 관한 실험 그레이트 3(grade 3<sup>rd</sup> laboratory of biosafety)에 따라 측정됨

#### 3. 방법

TCID<sub>50</sub>의 CPE(세포병변효과) 분석:

100 $\mu\text{l}$ 의 베로 E<sub>6</sub> 세포를 웰당  $2 \times 10^4$  세포수가 되도록 96-웰플레이트에 가하였다. 37°C에서 24시간 배양후, 베로 E<sub>6</sub> 단층세포에 10중 구배로 희석한 아홉 레벨의 SARS-관련 코로나바이러스를 처리하였다(각 희석별 4웰). 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 하에서 상기 세포를 배양하였다. CPE는 매일 현미경으로 검사하였다. CPE가 25% 이하인 경우 +로, 26-50%인 경우 ++, 51-75%인 경우 +++, 76-100%인 경우 ++++로 하여 기록하였다. 이후, Reed-Muench법으로 TCID<sub>50</sub>을 산출하였다.

약물의 세포독성:

베로 E<sub>6</sub> 세포를 웰당  $2 \times 10^4$  세포수(100 $\mu\text{l}$ )가 되도록 96-웰플레이트에 가하였다. 37°C에서 24시간 배양후, 세포는 단층으로 성장하였다. 약물은 36, 18, 9, 4.5, 2.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (최종 농도)로 희석하고, 각각 4개의 웰에 가하였다. 대조군으로 정상 세포를 세팅하였다. 약물군의 CPE는 5일 주기로 매일 관찰하였으며, 이로부터 독성을 나타내지 않는 약물 농도를 결정하였다.

SARS-관련 코로나바이러스에 대한 약물 활성의 CPE 분석

100 $\mu\text{l}$ 의 베로 E<sub>6</sub> 세포를 웰당  $2 \times 10^4$  세포수가 되도록 96-웰플레이트에 가하였다. 37°C에서 24시간 배양후, 세포는 단층으로 성장하였다. 세포독성을 보이지 않는 최대 농도의 약물을 희석하여 2중 구배로 5 레벨로 희석하였다. 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24시간 배양하면서, 상이한 농도의 바이러스( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ )를 추가하였다. 48-72 시간 동안 바이러스 처

리 후, CPE를 검사하였다(CPE가 25% 이하인 경우 +로, 26-50%인 경우 ++, 51-75%인 경우 +++, 76-100%인 경우 +++++, 정상 세포는 -로 하였다). 세포는 정상 그룹, 약물 대조 그룹 및 상이한 희석의 바이러스 대조 그룹으로 나누고, 그룹당 4웰로 하였다. CPE는 날마다 측정하였다. 바이러스 대조 그룹에서 세포변성효과가 명백하게 나타날 때 까지 인터페론의 항바이러스 활성을 평가하였다. 실험은 반복 수행하였으며, 약물의 IC<sub>50</sub>는 Reed-Muench법으로 산출하였다.

**4. 결과**

**바이러스의 독성:** 바이러스의 TCID<sub>50</sub>는 10<sup>-8</sup>이었다.

**약물의 세포독성:** 세포독성을 전혀 나타내지 않는 재조합 인터페론 화합물의 농도는 18μg/ml이었으며, 세포모양은 대조 그룹과 유사하였고, 아무런 세포 변성 효과를 나타내지 않았다.

**약물의 항-바이러스 효과:** 표 9-A.1 및 표 9-A.2를 참조하라.

(표 9-A.1)

새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물의 항-바이러스 효과(첫번째 실험)

IFN 농도 (μg/ml)	상이한 농도의 바이러스에서의 CPE		
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
18	-	-	-
9	-	-	-
4.5	++	-	-
2.25	+++	++	-
1.125	++++	++++	++
바이러스 대조 그룹	++++	++++	+++
정상 그룹	-	-	-
약물 대조 그룹	-	-	-

(표 9-A.2)

새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물의 항-바이러스 효과(두번째 실험)

IFN 농도 (μg/ml)	상이한 농도의 바이러스에서의 CPE		
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
18	-	-	-
9	-	-	-
4.5	+	-	-
2.25	+++	++	-
1.125	++++	++++	++
바이러스 대조 그룹	++++	++++	++++
정상 그룹	-	-	-
약물 대조 그룹	-	-	-

**5. 결론**

새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물의 세포독성을 나타내지 않는 농도는 18μg/ml이다. SARS-관련 코로나바이러스 10<sup>-5</sup>(1000TCID<sub>50</sub>), 10<sup>-4</sup>(1000TCID<sub>50</sub>), 10<sup>-3</sup>(100000TCID<sub>50</sub>)농도에 따른 상기 인터페론 화합물의 IC<sub>50</sub>은 각각 1.27, 2.25 및 4.04μg/ml(표 9-A.3)이다.

(표 9-A.3)

상이한 바이러스 농도에서의 IFN의 IC<sub>50</sub>

바이러스 희석	IFN의 IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
10 <sup>-3</sup>	4.04
10 <sup>-4</sup>	2.25
10 <sup>-5</sup>	1.27

주체: Jin-yan Wang

실험 보조자: Yan-hong Zhao, Xiao-guang Ji, Xiao-yu Li

원 데이터: 육군 의학 아카데미의 미생물 및 역학 기관, 분자 생물학 부서의 아카이브 보존

날짜: 2003년 5월 12일부터 30일까지

실시에 9-B

SARS-관련 코로나바이러스에 대한 새로운 형태의 재조합 화합물 인터페론 및 재조합 인터페론  $\alpha$ -2b 주사의 생체의 효과

샘플 공급: 시추안 휘양 생명 공학 주식회사, 시추안 지방

시험자: 육군 의학 아카데미의 미생물 및 역학 기관, 분자 생물학 부서

원 데이터: 육군 의학 아카데미의 미생물 및 역학 기관, 분자 생물학 부서의 공문서실 보존

### 1. 시험물질

약물: 새로운 형태의 재조합 화합물 인터페론, 618 $\mu\text{g/ml}$ , 시추안 지방의 시추안 휘양 생명 공학 주식회사 제공; Anfulong (재조합 인터페론  $\alpha$ -2b 주사), 30 $\mu\text{g}$ /바이알(300,000 IU/바이알), 천진시의 화-리-다 생물 공학 주식회사 제공 로트 번호: 20030105.

세포: Vero E<sub>6</sub>, 육군 의학 아카데미의 미생물 및 역학 기관, 분자 생물학 부서 제공.

바이러스: SARS-관련 코로나바이러스(BJ-01) 육군 의학 아카데미의 미생물 및 역학 기관, 분자 생물학 부서 제공

조건: 바이러스는 생산정성에 관한 실험 그레이드 3에 따라 측정됨

### 2. 방법

CPE 분석으로 TCID<sub>50</sub> 측정:

베로 E<sub>6</sub> 세포를 웰당 2 $\times$ 10<sup>4</sup> 세포수(100 $\mu\text{l}$ )로 96-웰플레이트에 접종하였다. 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양후, 10배 희석에 의한 아홉 레벨의 SARS-관련 코로나바이러스를 베로 E<sub>6</sub> 단층세포에 처리하였다(각 희석별 4웰). 37 $^{\circ}\text{C}$  및 5% CO<sub>2</sub> 하에서 상기 세포를 배양하였다. CPE는 매일 위상차 현미경(phase-contrast microscope)으로 검사하였다. CPE가 25% 이하인 경우 +로, 26-50%인 경우 ++, 51-75%인 경우 +++, 76-100%인 경우 ++++로 하여 기록하였다. 이후, Reed-Muench 법으로 TCID<sub>50</sub>을 산출하였다.

MTT 분석으로 측정된 IFNs의 TC<sub>50</sub>:

베로 E<sub>6</sub> 세포를 웰당 2×10<sup>4</sup> 세포수(100μl)로 96-웰플레이트에 접종하였다. 37℃에서 24시간 배양후, 세포가 단층으로 성장할 때 상청액을 제거한 후, 상이한 농도의 IFNs를 베로 E<sub>6</sub> 세포에 처리하였다(각 희석별 4웰). 정상군을 세팅하였다. 5일 관찰후, 상기 세포를 MTT와 4시간 동안 혼합하였다. 이후 액상을 제거하고, 0.5시간 동안 DMSO를 세포내로 추가하였다. OD<sub>570nm</sub>는 마이크로플레이트 리더기로 측정하였다. 최종적으로 Reed-Muench법으로 TC<sub>50</sub>을 산출하였다.

**MTT 분석으로 측정된 SARS-관련 코로나바이러스에 대한 IFNs의 활성**

100μl의 베로 E<sub>6</sub> 세포를 웰당 2×10<sup>4</sup> 세포수가 되도록 96-웰플레이트에 접종하였다. 37℃에서 24시간 배양후, 세포들이 단층으로 되었다. 세포독성을 나타내지 않는 농도의 약물을 5중 구배하여 5 레벨로 희석하였다. 이후 각 희석 약물을 4개의 웰(웰당 100μl)에 가하였다. 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24시간 배양후, IFN 용액을 제거하고, 상이한 농도의 바이러스 희석물(10000, 1000, 100 TCID<sub>50</sub>)을 디쉬에 가하였다(희석물당 4웰). 상기 세포는 정상 그룹, 약물 대조 그룹 및 상이한 희석의 바이러스 대조 그룹(10000, 1000, 100 TCID<sub>50</sub>)으로 나누었다. 바이러스 대조 그룹에서 세포 독성 효과가 나타날 때까지, 상기 세포들을 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub> 하에서 48-72시간 동안 배양하고, CPE를 기록하였다(CPE가 25% 이하인 경우 +로, 26-50%인 경우 ++, 51-75%인 경우 +++, 76-100%인 경우 ++++, 정상 세포는 -로 하였다). 세포의 성장 능력은 MTT 분석으로 측정하고, 이후 IFNs의 항바이러스 효과를 평가하였다. 실험은 3회 반복하였다. 약물의 IC<sub>50</sub>은 Reed-Muench법으로 산출하였다.

**3. 결과**

**바이러스의 TCID<sub>50</sub>:** 바이러스의 TCID<sub>50</sub>는 10<sup>-7</sup>이었다.

**IFNs의 TC<sub>50</sub>:** 새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물의 세포독성을 나타내지 않는 농도는 100μg/ml 이었으며, 재조합 IFN-α-2b의 경우 12.5 μg/ml이었고, 세포모양은 그 농도의 정상 그룹과 유사하였다. 새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물의 TC50은 139.18μg/ml 이었고, 재조합 IFN-α-2b의 경우 17.18 μg/ml이었다.

(표 9-B.1)

**IFNs의 TC<sub>50</sub>**

IFN	TC <sub>50</sub> (μg/ml)			평균(X±SD, n=3)
	1차 실험	2차 실험	3차 실험	
새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물	141.42	125.96	150.08	139.18 ± 12.22
IFN-α-2b	17.68	15.75	18.10	17.18 ± 1.25

**약물의 항바이러스 효과:** 두가지 IFNs의 항바이러스 효과를 생체외에서 관찰하였다. 실험 결과는 표 9-B.2에 나타내었으며, TI 결과는 표 9-B.3에 나타내었다.

(표 9-B.2)

**IFNs의 항바이러스 활성**

IFNs	바이러스 농도 (TCID <sub>50</sub> )	IC <sub>50</sub> (μg/ml)			평균(X±SD, n=3)
		1차 실험	2차 실험	3차 실험	
새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물	10000	0.79	1.04	0.93	0.92 ± 0.12
IFN-α-2b		5.04	4.56	4.65	4.75 ± 0.25

새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물	1000	0.19	0.18	0.18	0.18±0.01
IFN-α-2b		1.18	1.19	1.12	1.16±0.04
새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물	100	0.08	0.10	0.11	0.10±0.02
IFN-α-2b		0.33	0.21	0.30	0.28±0.06

(표 9-B.3)

**IFNs의 항바이러스 활성**

IFNs	바이러스농도 (TCID <sub>50</sub> )	TC <sub>50</sub> (μg/ml)	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	TI (TC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물	10000	139.18	0.92	151.28
IFN-α-2b		17.18	4.75	3.62
새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물	1000	139.18	0.18	773.22
IFN-α-2b		17.18	1.16	14.78
새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물	100	139.18	0.10	1391.80
IFN-α-2b		17.18	0.28	61.36

**4. 결론**

베로 E<sub>6</sub> 세포에 대한 새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물 및 IFN-α-2b의 방어 효과를 생체외에서 관찰한 결과, IFNs의 항바이러스 효과는 명백하였다. 이상의 세 실험에서, 10000, 1000, 100 농도의 SARS-관련 코로나바이러스에 대한 새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물의 IC<sub>50</sub>은 각각 0.92, 0.18 및 0.10μg/ml 이었으며, TI는 각각 151.28, 773.32 및 1391.80이었다. IFN-α-2b의 IC<sub>50</sub>은 각각 4.75, 1.16 및 0.28μg/ml 이었으며, TI(치료 계수)는 각각 3.62, 14.78 및 61.36이었다.

가장 중요한 것은, rSIFN-co의 항-SARS 바이러스에 대한 생체외 효과에 대한 두 실험 결과(상기 실시예 9A 및 9B를 보라) 모두 SARS 바이러스를 억제하는 데 유효한 rSIFN-co의 용량은 현재 중국에서 임상적으로 사용되고 있는 인터페론 α-2b의 유효량의 1/5에 불과함을 보여주고 있으며, rSIFN-co의 치료계수는 인터페론 α-2b의 치료계수에 비하여 약 50 배 가까이 높다는 것이다(육군 의학 아카데미의 미생물 및 역학 기관에 의한 SARS-관련 코로나바이러스에 대한 새로운 형태의 재조합 인터페론 화합물 및 재조합 인터페론-α-2b의 생체외 효과 참조).

3단계의 rSIFN-co 스프레이가 일선 의사, 간호사 및 시추안 지방의 고위험 지역내 사람들에 의하여 사용되었다. 그 결과 시추안 지방에서는 어떠한 의사 및 간호사도 SARS에 감염되지 않았다.

주체: Jin-yan Wang

실험 보조자: Yan-hong Zhao, Xiao-guang Ji, Min Zhang, Jing-hua, Zhao

날짜: 2003년 7월 1일부터 30일까지

실시예 10:

**HBV 유전자 발현에 대한 상이한 인터페론의 억제 효과 비교**

B형 간염 바이러스(HBV) DNA는 인터페론에 의해 결합 활성이 조절되는 트랜스 액티베이팅 단백질에 대한 공통 요소를 포함한다. HBV 감염 간세포를 인터페론으로 치료하는 경우 HBV 유전자 발현이 억제된다. 본 연구의 목적은 상이한 인터

페론들의 HBV 조절 전사에 대한 효과를 규명하는 것이다. HBV-인핸서(Enh) I, Enh II 및 코어 프로모터의 조절하에 개똥벌레 루시페라제 유전자를 함유하는 리포터 플라스미드를 인간 간암세포에 일시적 형질감염시켜, 세가지의 상이한 인터페론의 전사에 대한 생물학적 활성을 연구하였다.

**시험 물질 및 방법**

1. 인터페론: IFN-con1(Intergen<sup>®</sup>), IFN-Hui-Yang( $\gamma$ SIFN-co) 및 IFN-beta 1b
2. 리포터 플라스미드: HBV-인핸서(Enh) I, Enh II 및 코어 프로모터를 함유하는 상기 DNA 단편은 PCR를 사용하여 제조하고, 상기 프로모터- 및 인핸서-없는 개똥벌레 루시페라아제 리포터 플라스미드 pGL3-베이직(미국 위스콘신주 Promega)의 SmaI 부위내로 무단-말단(blunt-end) 클로닝하였다. 생성된 리포터 플라스미드는 pGL3-HBV-Luc로 명명하였다.
3. 세포 배양 및 DNA 형질감염: HepG2 세포는 10% FBS 및 100U/ml 페니실린 및 100 $\mu$ g/ml 스트렙토마이신이 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 상기 세포를 30 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 보관하였다. 배양기의 리포펙틴 형질감염 키트를 사용하여 pGL3-HBV-Luc 리포터 플라스미드로 상기 세포들을 형질감염시켰다. 18시간 후, 형질감염 시약을 함유한 상기 배지를 제거하고 인터페론이 있는 또는 인터페론이 없는 새로운 배지를 부가하였다. 상기 세포를 48시간 더 배양하였다.
4. 루시페라아제 분석: 인터페론을 부가한 지 48시간 후, 상기 세포를 채취하고 세포 용해하였다. 바이오-라드(Bio-Rad) 단백질 분석 키트를 사용하여 세포 용해물의 단백질 농도를 측정하였다. 상기 루시페라아제 활성도 Promega 루시페라아제 리포터 분석 시스템을 사용하고, 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

**결과**

상이한 인터페론-처리 세포 용해물에서 루시페라아제 활성도의 발현

미처리 IFN-con1 IFN-Hui-Yang IFN-베타1b

100 48+ 8 29+ 6 64+ 10

상기 결과는  $\gamma$ SIFN-co가 HBV 유전자 발현을 가장 효과적으로 억제함을 나타냈다.

**실시예 11:**

**$\gamma$ SIFN-co 사용시 부작용 및 체온 변화**

인터페론 사용시 통상 여러 부작용이 존재한다. 이러한 부작용으로는 오심, 근육통, 식욕감소, 탈모, 저백혈구증가증 및 혈소판 감소 등을 포함한다.

**방법**

환자를 두 그룹으로 분류하였다. A 그룹의 11명 환자에게 9 $\mu$ g의 Infergen<sup>®</sup>을 주입하고, B 그룹의 10명 환자에게 9 $\mu$ g의  $\gamma$ SIFN-co를 주입하였다. 주입 후, 상기 두 그룹을 48시간 동안 모니터하였다. 주입한 지 한 시간 후, 첫번째 모니터링을 기록하였으며, 그 후에 매 2시간 마다 기록하였다.

표 11.1은 9 $\mu$ g의 Infergen<sup>®</sup> 및 9 $\mu$ g의  $\gamma$ SIFN-co가 주입된 환자들의 부작용을 비교한 것이다.

(표 11.1)

부작용

		γSIFN-co 9μg	Infergen® 9μg
		환자수 = 10명	환자수 = 11명
신체 시스템	반응	인원수	인원수
일반적	무력함	3	3
	솔히트(sole heat)	1	
	프리고라빌리티 (frigorability)	3	4
	다리 힘 감소		3
	약한 요통	2	1
	신체 통증	4	5
중추신경계/ 말초신경계	두통	3	6
	어지럼증	2	11
	졸림		3
위장절개술	아포클레시스 (apoclesis)	1	
	복통	1	
	설사	1	
근골격계	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(frigorability), 근육통, 발한증 및 관절통을 나타냈다. Infergen®을 주입한 환자들의 부작용은 γSIFN-co를 주입한 환자들의 부작용보다 더 심각했다.

도 9a-1, 9a-2, 9b-1 및 9b-2에서 알 수 있는 바와 같이, 그룹 A 환자의 체온은 그룹 B 환자의 체온보다 높았다. 이는 또한 γSIFN-co의 내구성(endurance)이 Infergen®보다 훨씬 좋다는 것을 반영한다.

**실시예 12:**

**γSIFN-co의 결정 성장 및 결정 파라미터의 시험**

γSIFN-co의 결정. 체계적인 시도 및 시험을 거친 결과, 두가지 유형의 결정을 발견하였다(도 10-12 참조).

**1. 결정 성장**

순수한 물(H<sub>2</sub>O)로 γSIFN-co 단백질을 용해시켜 밀도를 3mg/ml로 만들었다. Hampton사의 Hampton Research Crystal Screen I 및 II를 사용하여 결정화를 조사하였다. 드롭현탁확산법(Drop Suspension diffusion Method)를 사용하여 293K 온도에서 500μl 액체, 1μl 단백질 + 1μl 액체를 적가하였다. 표 12.1에 열거된 바와 같이, 먼저 2개의 상이한 유형의 작은 결정을 발견하였다.

(표 12.1)

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 10	도 11

2. 데이터 수집 및 프로세싱

결정 I을 X-레이 회절 데이터의 수집 및 결정의 예비분석에 사용하였다. 파라미터 역시 시험하였다. 상기 회절 데이터는 실온하에서 수집하였다. 결정 I(조건 I)을 얇은 실리콘 처리된 월(wall) 튜브내로 삽입하였다. BrukerAXS Smart CCD 검출기를 사용하고, Nonius FR591 X-레이 발생기에 의해 광원 CuKα(λ=1.5418Å)을 생성하였다. 광력 2000KW(40kv x 50mA), 파장 1.00Å, 폭발 60초하에서 Δφ=2°, 결정 및 검출기간의 거리는 50mm이었다. 데이터는 Bruker사의 Proteum Procedure Package를 사용하여 프로세싱하였다. 결정 회절 패턴(부분적으로)에 있어서는 도 12을 참조하고, 프로세싱 결과는 표 12.2를 참조하라.

(표 12.2)

결정 파라미터 결과

파라미터

a(Å) 82.67

b(Å) 108.04

c(Å) 135.01

α(°) 90.00

β(°) 90.00

γ(°) 98.35

스페이스 그룹 P2 또는 P2<sub>1</sub>

분리의 선명도 5Å

비대칭 분자 # 10

용해 57.6%

또한, 이전 간행물에 기초한 γSIFN-co에 대한 결정 성장은 존재하지 않았다. γSIFN-co에 대해 가장 유사한 결과는 사람 huIFN-a2b<sub>1</sub>이었으나 그 스크린은 매우 복잡하였다. 3회 시딩(seeding) 후, 결정은 0.5×0.5×0.3mm로 성장하였으며, 분리의 선명도는 2.9Å이었으며, 스페이스 그룹은 P2<sub>1</sub>이었다. 상기 결정은 또한 크고, 비대칭 분자 수가 6개이었으며 용해는 약 60%이었다.

## 도면의 간단한 설명

도 1은 *E.Coli* 코돈 용법(codon usage)에 따라 디자인된 rSIFN-co의 cDNA 서열 및 유추된 rSIFN-co 아미노산 서열이다.

도 2는 다른 슈퍼-화합물 인터페론의 서열이다.

도 3은 pLac T7 클로닝 벡터 플라스미드를 나타낸 것이다.

도 4는 pHY-4 발현 벡터 플라스미드를 나타낸 것이다.

도 5는 pHY-5 발현 벡터 플라스미드의 작제 과정을 나타낸 것이다.

도 6a는 Infergen®의 원편광 이색성 스펙트럼을 나타낸 것이다(시추안 대학의 분석 및 측정 센터에서 시험)

스펙트럼 범위: 250nm - 190nm

민감도: 2 m<sup>o</sup>/cm

광 경로: 0.20cm

장치: Circular Dichroism J-500C

시료: IFN-con1 30μg/ml, NaCl 5.9 mg/ml 및 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.0) 3.8 mg/ml을 함유.

암젠사에 의해 제조되는 Infergen®(interferon alfacon-1) 또한 컨센서스 인터페론(consensus interferon)으로 알려져 있으며, 만성 C형 간염(HCV)을 앓고 있는 성인을 치료하기 위하여 시판되고 있다. 상기 약품은 현재 유일한 FDA 승인약물이고, 합리적인 약물 디자인에 의하여 생-적합하게 개발된 인터페론이며, 특히 특히 비반응성 또는 불응성 환자에 대한 데이터가 라벨에 표시된 유일한 인터페론 제제이다. InterMune사는 2002년 1월 Infergen®을 재론칭하면서 Infergen®의 안전하고 적합한 사용에 대해 미국내 간관련 학자들을 대상으로 적극적인 캠페인을 수행하였다. 이 약품은 현재 가능한 다른 치료방법에 의하여 치료되지 않는 50% 이상의 HCV 환자에게 새로운 희망이 되고 있다(<http://www.intermune.com/wt/itmn/infergen>, 8/27/2003 참조).

도 6b는 문헌[Journal of Interferon and Cytokine Reserch. 16:489-499(1996)]에 수록된 Infergen®의 원편광 이색성 스펙트럼을 나타낸 것이다.

컨센서스 인터페론 중속형태(subform)의 원편광 이색성 스펙트럼이다. 컨센서스 인터페론은 음이온 교환 칼럼을 사용하여 분획되었다. 시료는 10mM 소듐 포스페이트(pH 7.4)로 투석되었다. 15°C 셀 항온기내에서 Jasco J-170 spectropolarimeter을 사용하여 측정하였다. (—) 아실레이트형; (---) cis 말단형; (···) met 말단형이다. A는 Far UV 스펙트럼, B는 Near UV 스펙트럼이다.

도 6c는 rSIFN-co의 원편광 이색성 스펙트럼을 나타낸 것이다.

스펙트럼 범위: 320nm - 250nm

민감도: 2 m<sup>o</sup>/cm

광 경로: 2cm

장치: Circular Dichroism J-500C

시료: rSIFN-co 0.5mg/ml, NaCl 5.9 mg/ml, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.0) 3.8 mg/ml을 함유.

도 6d는 rSIFN-co의 원편광 이색성 스펙트럼을 나타낸 것이다.

스펙트럼 범위: 250nm - 190nm

민감도: 2 m<sup>2</sup>/cm

광 경로: 0.20cm

장치: Circular Dichroism J-500C

시료: rSIFN-co 30 $\mu$ g/ml, NaCl 5.9 mg/ml 및 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.0) 3.8 mg/ml을 함유.

상기 스펙트럼으로부터 rSIFN-co의 2차 또는 3차 구조가 Infergen<sup>®</sup>와 전혀 다름을 명확하게 알 수 있다.

도 7a-7c는 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 스프레이를 도시한 것이다.

높이: 90mm

넓이: 25mm(하부), 6mm(상부)

무게: 9g

운반 용적: 0.1ml

도 7d는 재조합 슈퍼-화합물 인터페론 스프레이를 도시한 것이다.

상기 스프레이를 처음 사용할 때는 먼저 캡을 열고 약간의 액상이 분출될 때까지 공기중으로 분사한다. 후속 사용시에는 스프레이를 테스트할 필요가 없다. 사용시, 도시된 지시에 따른다. 즉 (1) 전-스프레이(pre-spray) (2) 노즐을 눌러 약제를 방출한다.

도 8은 HBV 유전자 발현에 대한 상이한 인터페론들의 억제 효과를 비교 도시한 것이다.

도 9a-1은 그룹 A(5 환자)에서의 체온 변화 곡선을 나타낸 것이다. 상기 도는 그룹 A의 5명의 환자들의 체온 변화를 기록한 것이다.

도 9a-2는 그룹 A(6 환자)에서의 체온 변화 곡선을 나타낸 것이다. 상기 도는 그룹 A의 다른 6명의 환자들의 체온 변화를 기록한 것이다.

도 9b-1은 그룹 B(5 환자)에서의 체온 변화 곡선을 나타낸 것이다. 상기 도는 그룹 B의 5명의 환자들의 체온 변화를 기록한 것이다.

도 9b-2는 그룹 B(5 환자)에서의 체온 변화 곡선을 나타낸 것이다. 상기 도는 그룹 B의 다른 5명의 환자들의 체온 변화를 기록한 것이다.

도 10은 rSIFN-co 결정I을 도시한 것이다.

도 11은 rSIFN-co 결정II를 도시한 것이다.

도 12는 rSIFN-co 결정의 X-레이 회절을 도시한 것이다.

도면

도면1

```

5'           11           21           31           41           51
+1 M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A
      1 ATGTGCGACC TGCCGCAGAC CCACTCCCTG GGTAAACCGTC GTGCTCTGAT CCTGCTGGCT
        TACACGCTGG ACGGCGTCTG GGTGAGGGAC CCATTGGCAG CACGAGACTA GGACGACCGA

5'           71           81           91           101          111
+1 Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P
      61 CAGATGCGTC GTATCTCCCC GTTCTCCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CGGTTTCCCG
        GTCTACGCAG CATAGAGGGG CAAGAGGACG GACTTTCCTG CAGTGCTGAA GCCAAAGGGC

5'           131          141          151          161          171
+1 Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E
      121 CAGGAAGAAT TCGACGGTAA CCAGTTCAG AAAGCTCAGG CTATCTCCGT TCTGCACGAA
        GTCCTTCTTA AGCTGCCATT GGTCAAGGTC TTCGAGTCC GATAGAGGCA AGACGTGCTT

5'           191          201          211          221          231
+1 M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E
      181 ATGATCCAGC AGACCTTCAA CCTGTTCTCC ACCAAAGACT CCTCCGCTGC TTGGGACGAA
        TACTAGGTCG TCTGAAAGTT GGACAAGAGG TGGTTTCTGA GGAGGCGACG AACCTGCTT

5'           251          261          271          281          291
+1 S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C
      241 TCCCTGCTGG AAAAATTCTA CACCGAACTG TACCAGGAGC TGAACGACCT GGAAGCTTGC
        AGGGACGACC TTTTAAAGAT GTGGCTTGAC ATGGTCGTCG ACTTGCTGGA CCTTCGAACG

5'           311          321          331          341          351
+1 V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A
      301 GTTATCCAGG AAGTTGGTGT TGAAGAAACC CCGCTGATGA ACGTTGACTC CATCCTGGCT
        CAATAGGTCC TTCAACCACA ACTTCTTTGG GCGGACTACT TGCAACTGAG GTAGGACCGA

5'           371          381          391          401          411
+1 V K K Y F Q R I T L Y L T E K K Y S P G
      361 GTTAAAAAAT ACTTCCAGCG TATCACCTG TACCTGACCG AAAAAAATA CTCCCGTGC
        CAATTTTTTA TGAAGGTCGC ATAGTGGGAC ATGGACTGGC TTTTTTTTAT GAGGGGCACG

5'           431          441          451          461          471
+1 A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q
      421 GCTTGGGAAG TTGTTCTGTC TGAATCATG CGTTCCTTCT CCCTGTCCAC GAACCTGCAG
        CGAACCCCTT CACAAGCAGC ACTTTAGTAC GCAAGGAAGA GGGACAGGTG GTTGGACGTC

5'           491          501
+1 E R L R R K E #
      481 GAACGTCTGC GTCGTAAGA ATAA
        CTTGCAGACG CAGCATTCT TATT
    
```

도면2

```

5'           11           21           31           41           51
+1 M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A
  1 ATGTGTGATT TACCTCAAAC TCATTCTCTT GGTAACCGTC GCGCTCTGAT TCTGCTGGCA
    TACAGACTAA ATGGAGTTTG AGTAAGAGAA CGATTGGCAG CGCGAGACTA AGACGACCGT

5'           71           81           91           I           11
+1 Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P
  61 CAGATGGGTC GTATTTCCCC GTTTAGCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CGGCTTTCCG
    GTCTACGCAG CATAAAGGGG CAAATCGACG GACTTTCTGG CAGTGTGTA GCGCAAAGGC

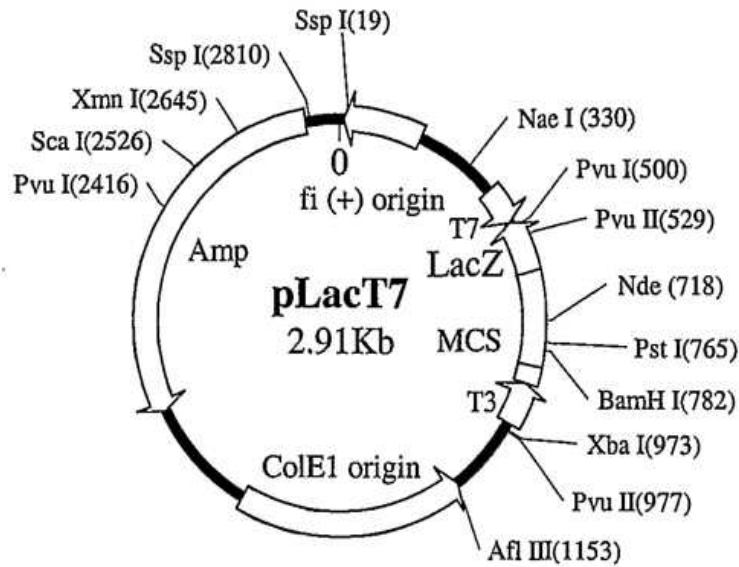
5'           31           41           51           61           71
+1 Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E
  121 CAAGAAGAGT TCGATGGCAA CCAATTCCAG AAAGCTCAGG CAATCTCTGT ACTGCACGAA
    GTTCTTCTCA AGCTACCGTT GGTTAAGGTC TTTCGAGTCC GTTAGAGACA TGACGTGCTT

5'           91           1           11           21           31
+1 M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E
  181 ATGATCCAAC AGACCTTCAA CCTGTTTTCC ACTAAAGACA GCTCTGCTGC TTGGGACGAA
    TACTAGGTTG TCTGGAAGTT GGACAAAAGG TGATTTCTGT CGAGACGACG AACCGTGTCT

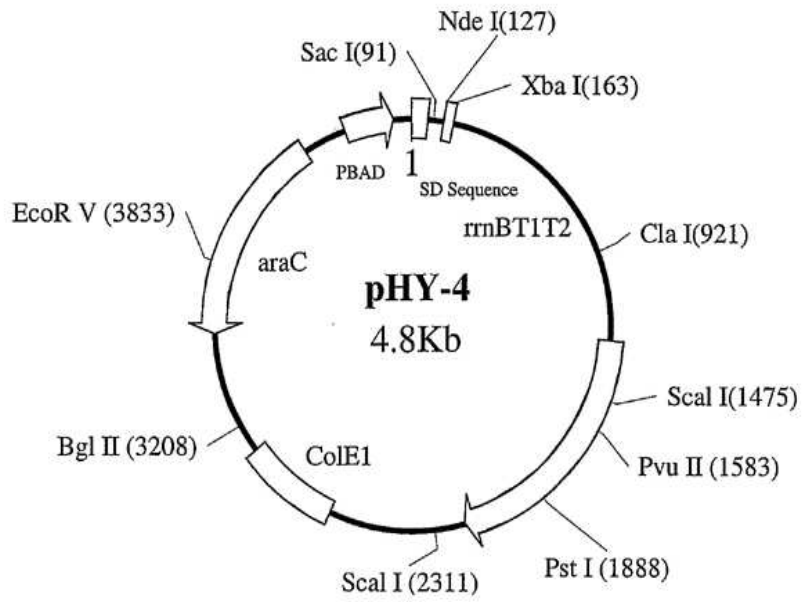
5'           51           61           71           81           91
+1 S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C
  241 AGCTTGCTGG AGAAGTTCTA CACTGAACTG TATCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCATGC
    TCGAACGACC TCTTCAAGAT GTGACTTGAC ATAGTCGTCC ACTTGCTGGA CCTTCGTAGC

5'           11           21           31           41           51
+1 V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A
  301 GTAATCCAGG AAGTTGGTGT AGAAGAGACT CCGCTGATGA ACGTCGACTC TATTCTGGCA
    CATTAGGTCC TTCAACCACA TCTTCTCTGA GCGGACTACT TGCAGCTGAG ATAAGACCGT
    
```

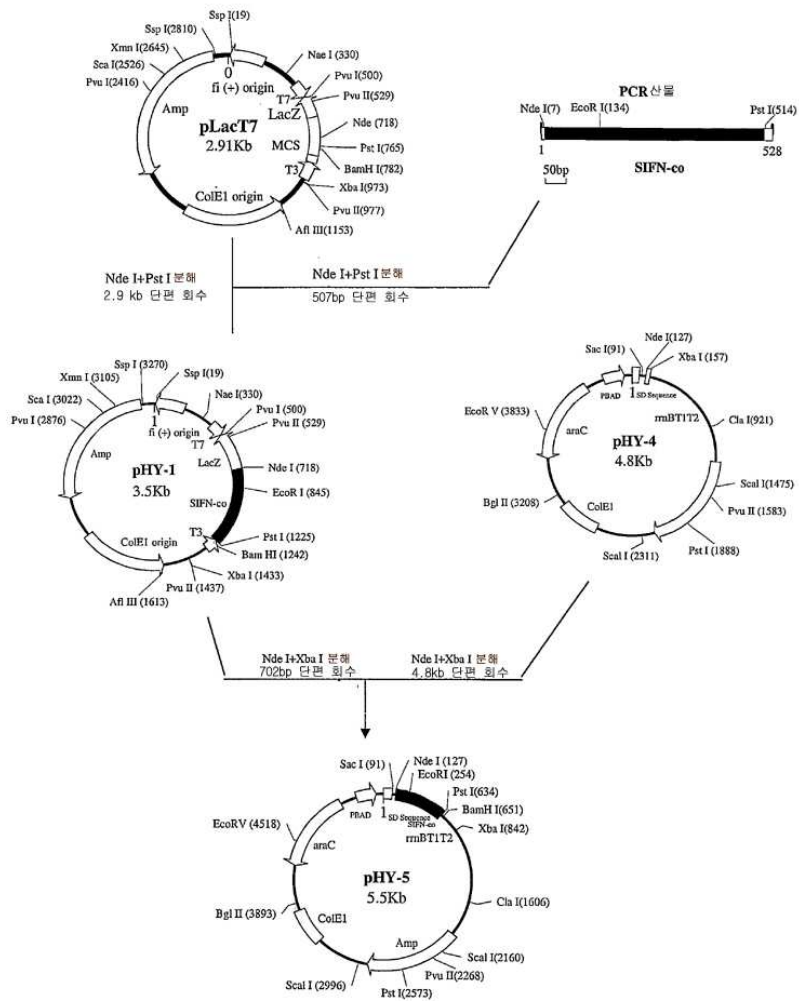
도면3



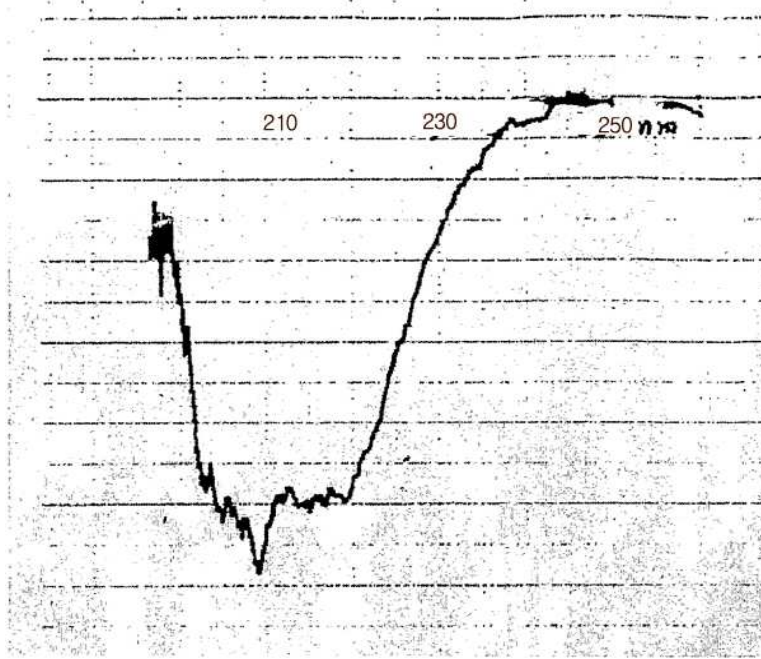
도면4



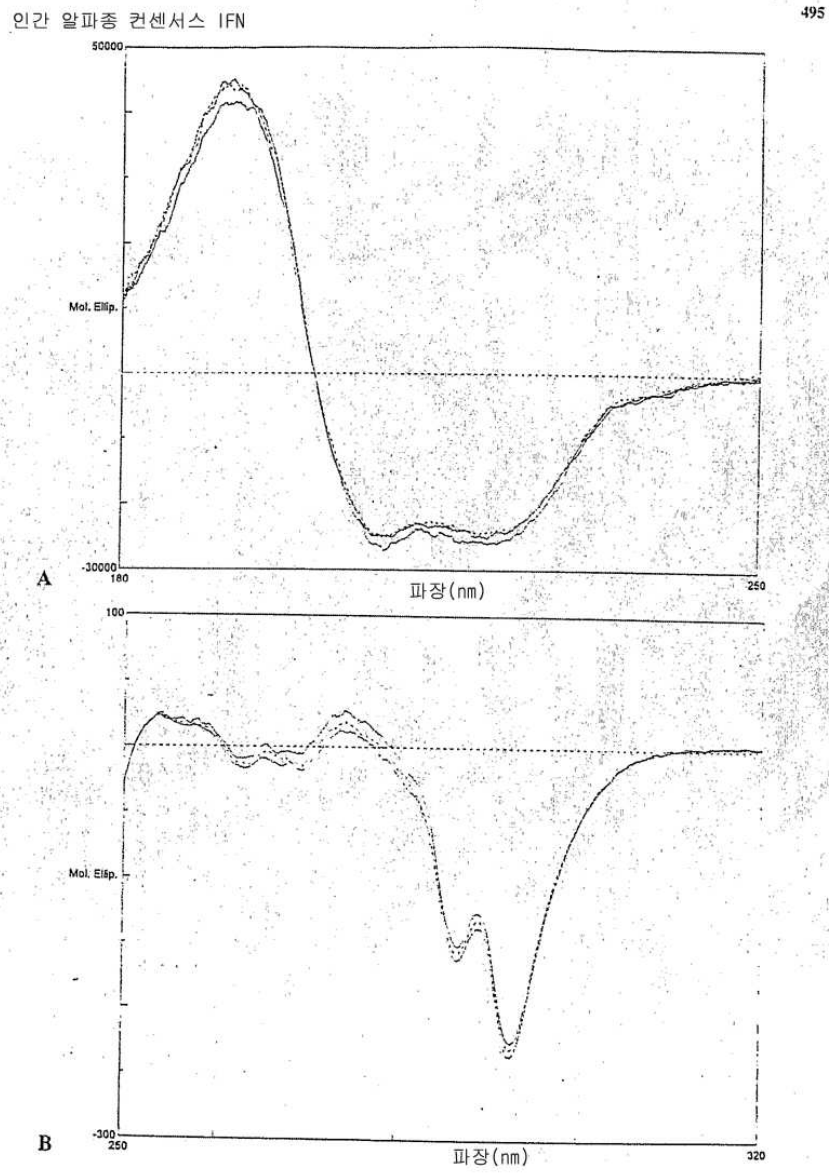
도면5



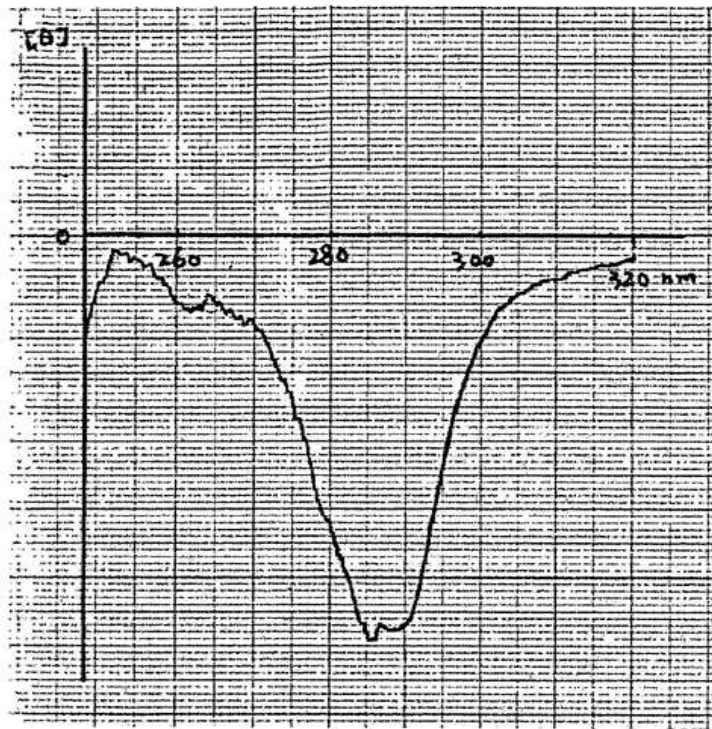
도면6a



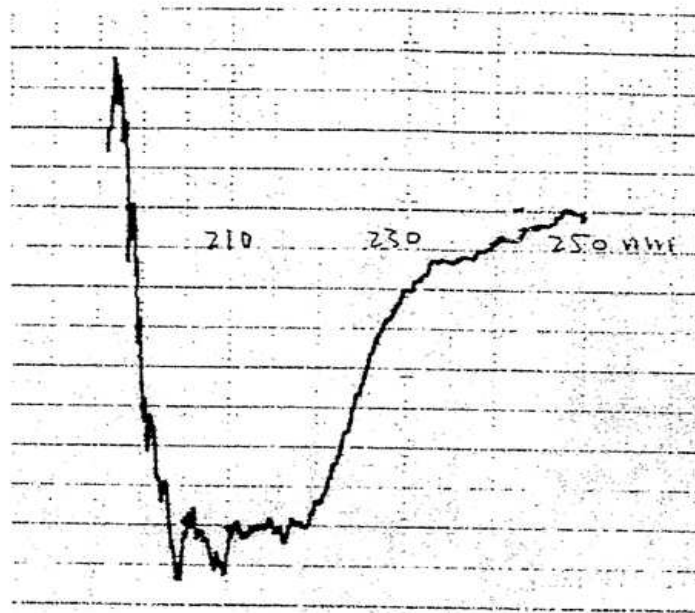
도면6b



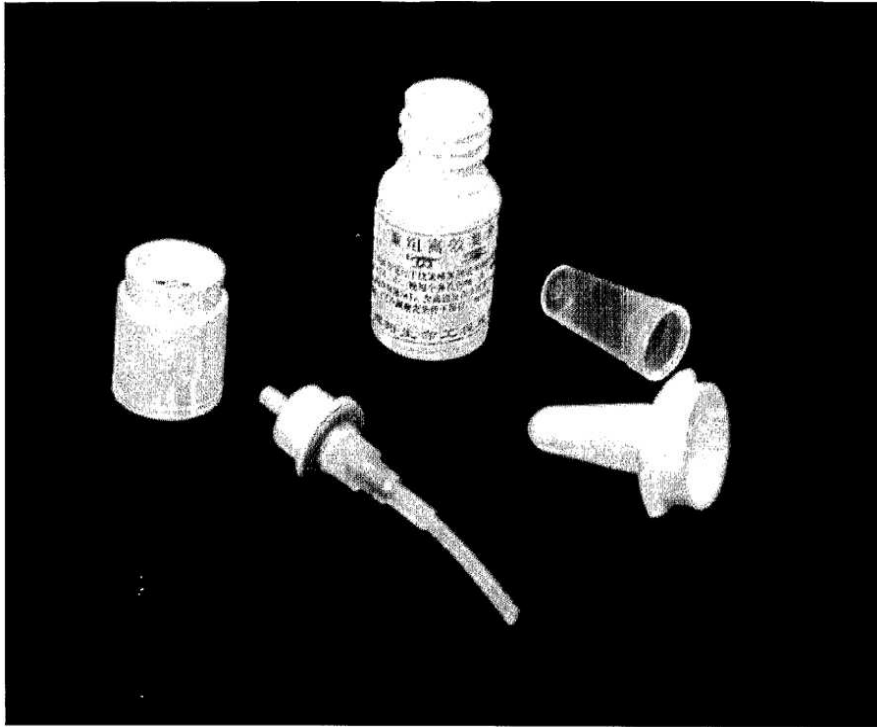
도면6c



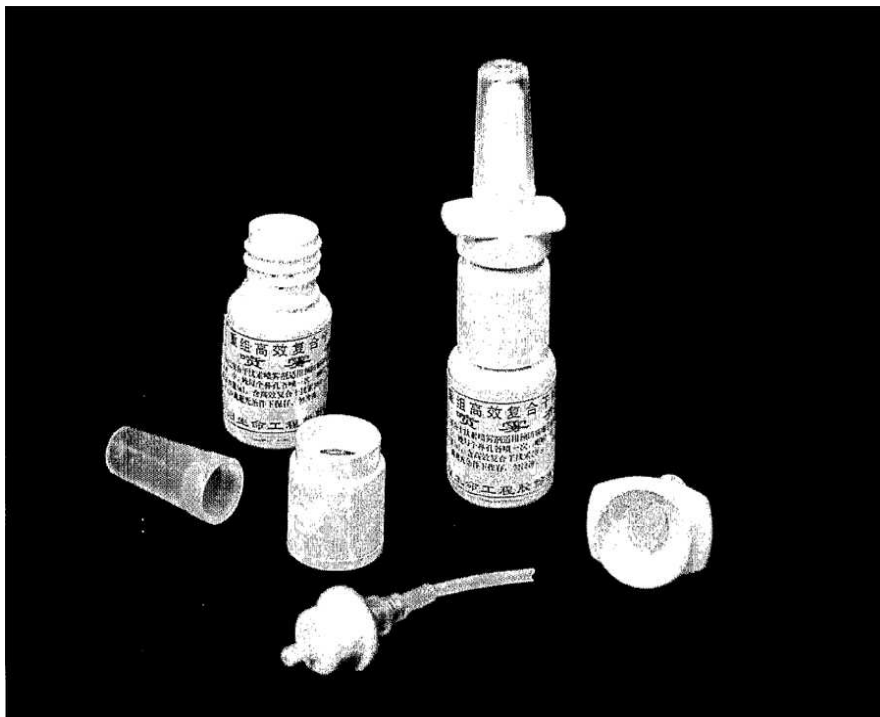
도면6d



도면7a



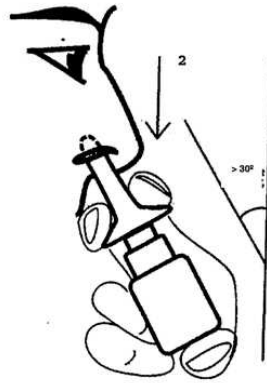
도면7b



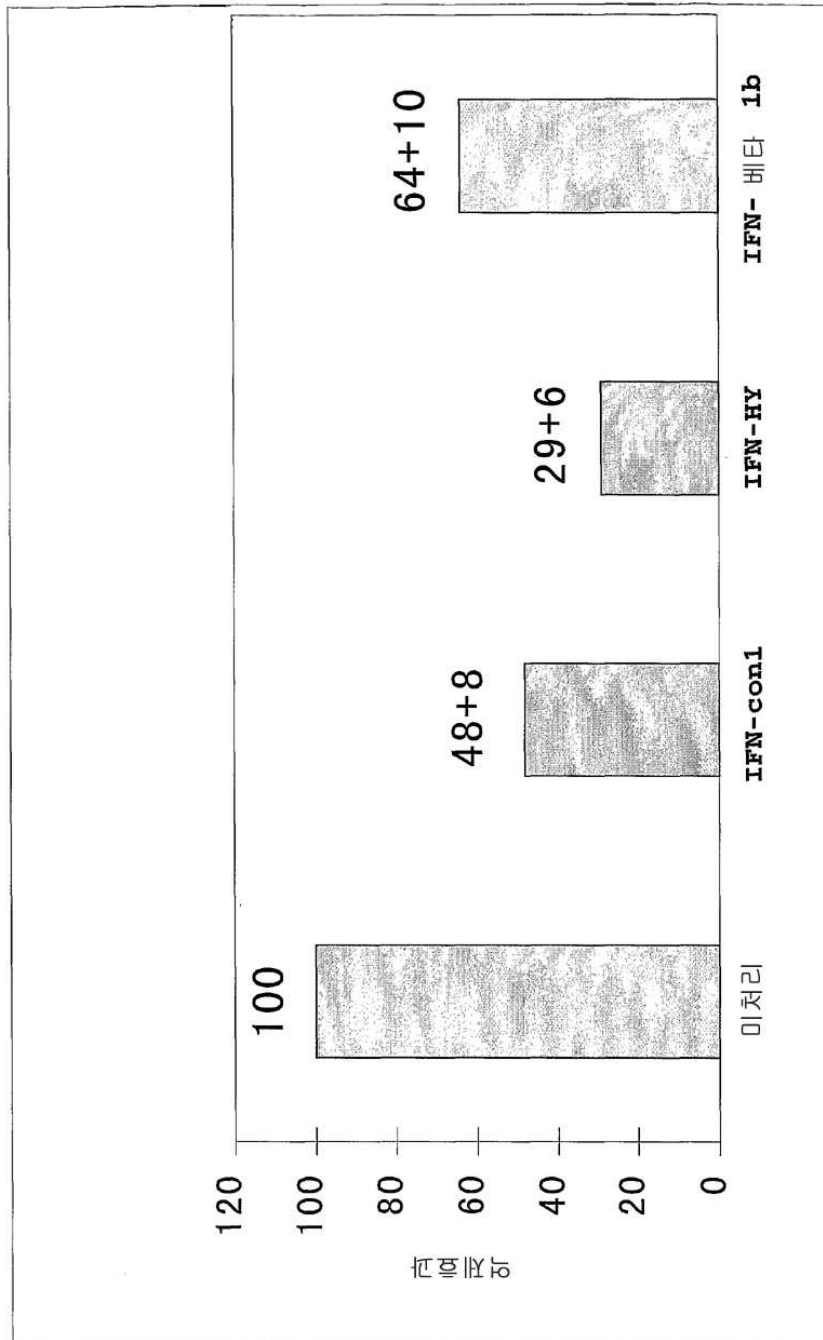
도면7c



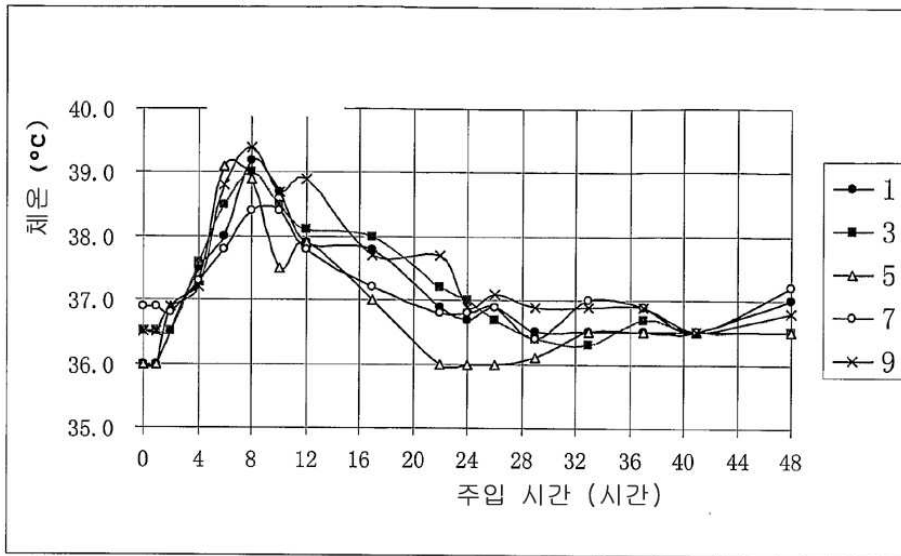
도면7d



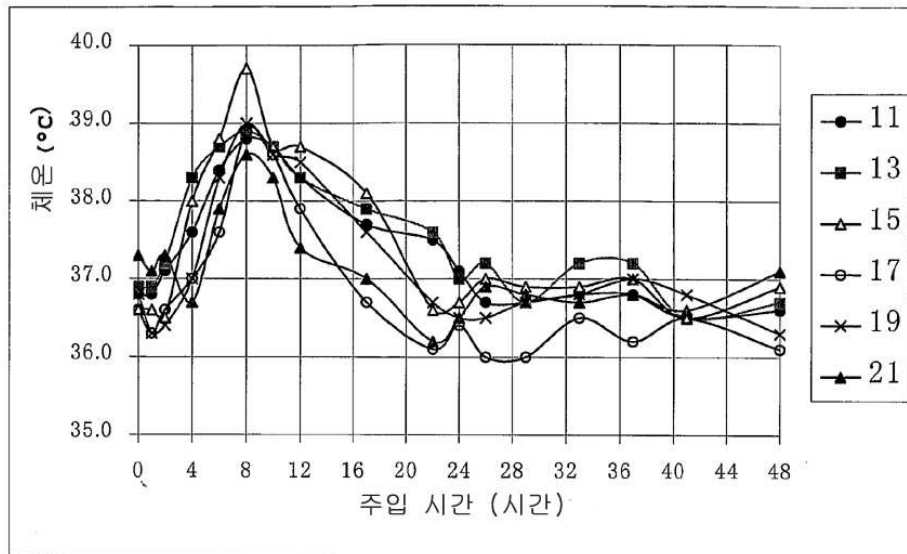
도면8



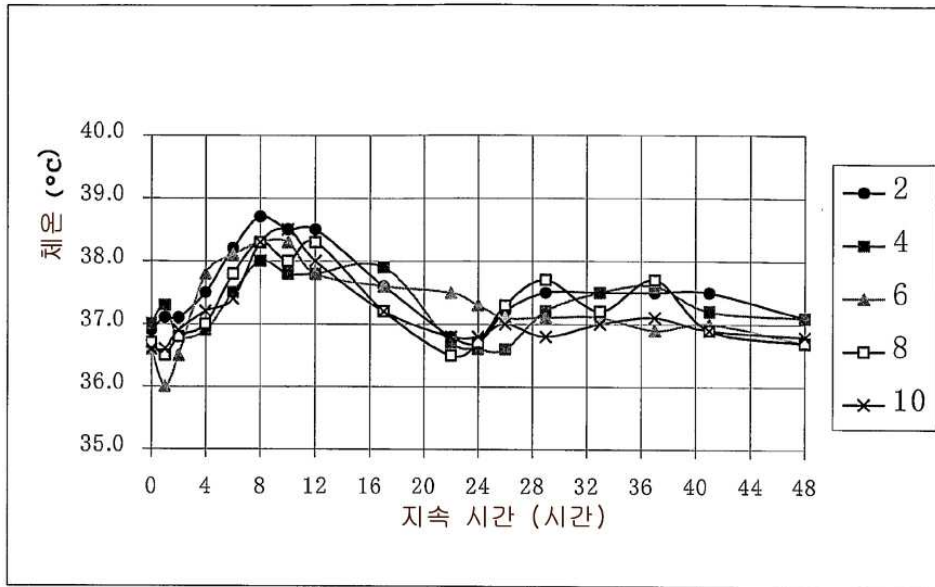
도면9a-1



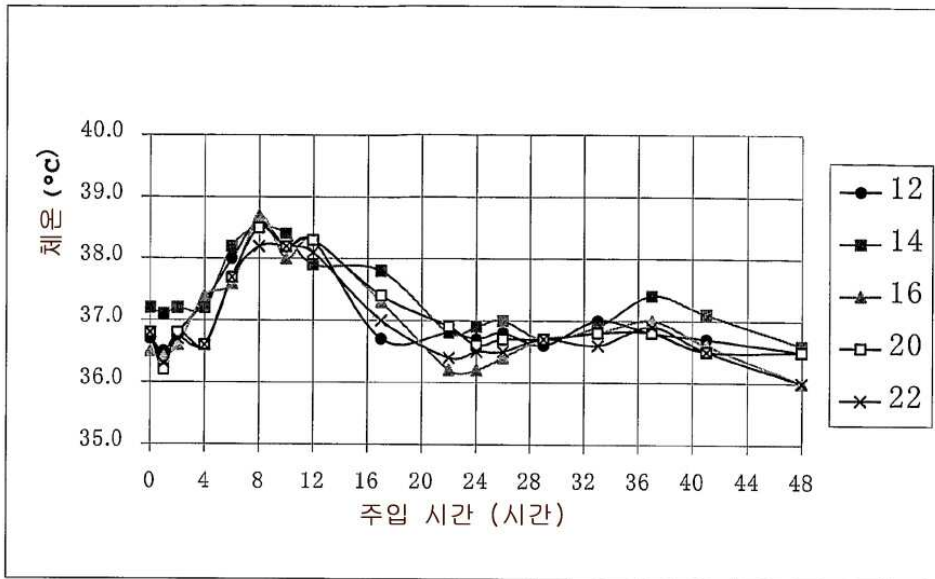
도면9a-2



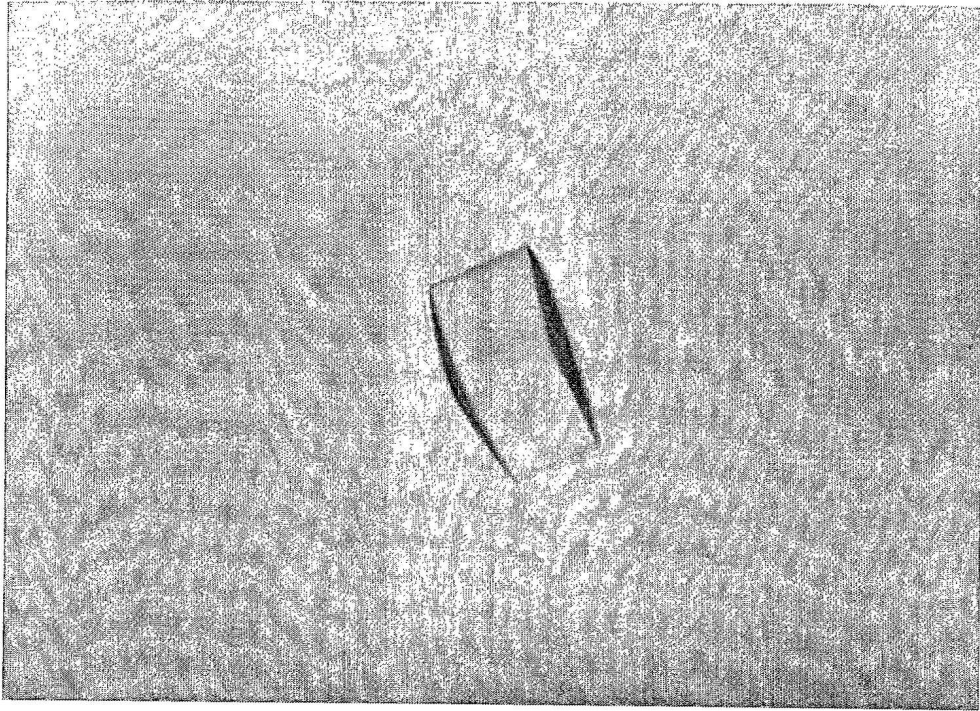
도면9b-1



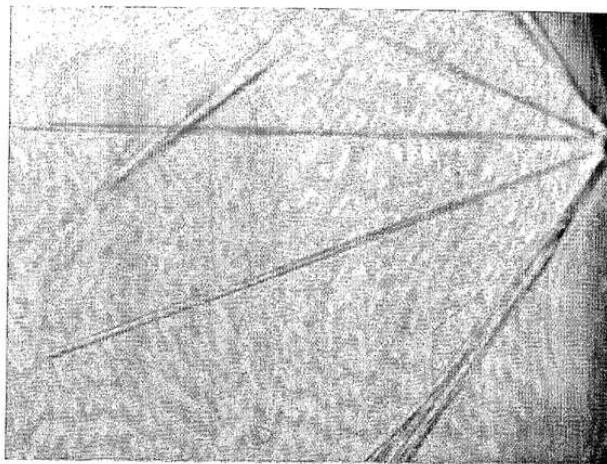
도면9b-2



도면10



도면11



도면12

