

맥케나, 쉐
미국, 메사추세츠 02332, 덕스베리, 링컨스트리트 679

(74) 대리인 강명구
 강석용

심사관 : 이미정

(54) I F N A R 2 / I F N 복합체

요약

사람의 인터페론 α/β 수용체(IFNAR)의 IFN 결합 사슬과 복합체를 이룬 형태의 인터페론을 투여하여 타입 I 인터페론(IFN)의 *in vivo* 효과를 연장시킬 수 있다. 이와 같은 복합체는 IFN의 안정성을 개선시키고, IFN의 효과를 강화시킨다. 복합체는 비-공유 복합체 또는 IFN이 IFNAR에 공유 결합 또는 펩티드 결합에 의해 결합된 복합체가 될 수 있다. 융합 단백질에서 펩티드 결합에 의해 결합된 경우에 IFN은 펩티드 링커를 이용하여 IFNAR에서 분리될 수 있다. 이와 같은 융합 단백질은 재조합 DNA 기술을 이용하여 만들 수 있다. 이와 같은 복합체 형태로 저장되면, IFN의 저장 수명을 개선시키고, 어느 정도의 조건에서도 저장할 수 있다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 타입 I 인터페론에 관한 것으로 이는 사람의 인터페론 α/β 수용체(IFNAR2) 세포외 도메인과 타입 I 인터페론(IFN α , IFN β , IFN ω)의 폴리펩티드 서열로 구성된다. 이와 같은 복합체는 항-바이러스, 항암 및 면역 조절 활성화에 있어서, *in vivo* 상에서 자유 IFN의 약리역학 능력을 안정화, 강화 및 연장시킨다. 좀더 구체적으로는 복합체는 IFNAR2의 전체 세포외 도메인의 폴리펩티드 서열 또는 이의 임의 인터페론 결합 부분의 폴리펩티드 서열에 타입 I 인터페론(IFN α , IFN β , IFN ω) 또는 이의 임의 생물학적 활성 부분이 복합된 것을 포함하는 융합 단백질 또는 결합 복합체 또는 비-결합 복합체를 말한다.

배경기술

인터페론은 백혈구세포 또는 섬유아세포에서 유도된 타입 I 인터페론 또는 미토겐에서 유도된 또는 면역 타입 II 인터페론(Pestka et al, 1987)으로 분류된다. 서열 분석을 통하여, 확인할 수 있고, 통상의 생물학적 활성을 확인하고, 타입 I 인터페론에는 인터페론 알파(IFN α), 인터페론 베타(IFN β), 인터페론 오메가(IFN ω)가 포함되고, 타입 II 인터페론에는 인터페론 감마(IFN γ)가 포함된다. IFN α , IFN β , IFN ω 유전자는 염색체 9의 짧은 쪽에 뭉쳐져 있다(Lengyl, 1982). 적어도 25개의 비-대립형질 IFN α 유전자, 6개의 비-대립형질 IFN ω 유전자, 단일 IFN β 유전자가 있다. 이들 모두가 한 개의 공통적인 조상 유전자로부터 진화된 것으로 보인다. 종내에서, IFN α 유전자는 서로 서열이 적어도 80%의 상동성을 공유한다. IFN β 유전자는 IFN α 와 약 50%의 서열 상동성을 가지고; IFN ω 는 IFN α 와 약 70%의 서열 유사성을 가진다(Weissman et al, 1986; Dron et al, 1992). IFN α 는 분자량이 17-23kDa(165-166개 아미노산) 범위를 가지고, IFN β 는 약 ~23kDa(166개 아미노산), IFN ω 는 약 ~24 kDa(172개 아미노산) 범위를 가진다.

타입 I 인터페론은 항-암 사이토킨 및 면역 조절물질로써 바이러스 및 기생충 감염에 대해 숙주 방어에 다양한 능력을 가지는 사이토킨이다(Baron et al, 1994; Baron et al, 1991). 타입 I 인터페론의 생리학적 반응에는 정상 세포 및 형질변환된 세포에서 항-증식성 활성화; 임파세포 및 천연 킬러 세포 및 식세포에서 세포독성 활성을 자극; 세포 분화 조절; class I

MHC 항원 발현 자극; class II MHC의 저해; 다양한 세포 표면 수용체의 조절등이 포함된다. 정상적인 생리학적 조건하에서, IFN α 및 IFN β (IFN α/β)는 매우 낮은 수준으로 대부분의 사람 세포에서 지속적으로 분비되는데, 이때 다양한 유도물질을 첨가하면 발현이 상향조절된다. 이와 같은 기능을 하는 유도물질로는 감염성 물질(바이러스, 박테리아, 미코플라즈마, 프로토조아), dsRNA, 사이토킨(M-CSF, IL-1 α , IL-2, TNF α) 등이 포함된다. 대리 표식, 네오프테린, 2',5'올리고이데닐레이트 합성효소, β 2 마이크로글로블린을 이용하면, *in vivo*에서 타입 I 인터페론 작용을 모니터링할 수 있다(Alam et al, 1997; Fierlbeck et al, 1996; Salmon et al, 1996).

타입 I 인터페론(IFN $\alpha/\beta/\omega$)은 세포 표면 수용체 복합체를 통하여 항-바이러스, 항-종양, 면역 조절 활성을 유도할 수 있도록 작용한다. 타입 I 인터페론 수용체(IFNAR)는 적어도 두 개의 다른 폴리펩티드 쇠로 구성된 이형다중체 수용체 복합체이다(Colamonici et al, 1992; Colamonici et al, 1993; Platanius et al, 1993). 이들 쇠의 유전자는 염색체 21에서 볼 수 있고, 이들 단백질은 대부분 세포의 표면에서 발현된다(Tan et al, 1973). 수용체 쇠는 원래 단클론 항체 IFN α R3 및 IFN α R β 1에 각각 인지되는 이들의 능력으로 알파와 베타로 지정하였다. 가장 최근에, 알파 소단위에 대해서는 IFNAR1로, 베타 소단위에 대해서는 IFNAR2로 다시 명명하였다. 대부분 세포에서, IFNAR1(알파 쇠, Uze 소단위)(Uze et al, 1990)는 분자량이 100-300kDa이고, IFNAR2(베타 쇠, β_L , IFN α/β R)는 분자량이 100kDa이 된다. 특정 세포 형(단세포주 및 정상적인 골수 세포)에서, 또다른 수용체 복합체가 확인되었는데, IFNAR2 소단위(β_S)는 분자량이 51kDa을 가지는 절두형 수용체로 발현된다. IFNAR1 및 IFNAR2 β_S 및 β_L 소단위가 클론되었다(Novick et al, 1994; Domanski et al, 1995). IFNAR2 β_S 및 β_L 소단위는 동일한 세포의 및 막통과 도메인을 가지지만, 세포질 도메인에서는 이들은 처음 15개 아미노산에서 상동성을 공유할 뿐이다. IFNAR2 소단위만 IFN α/β 에 결합할 수 있고, IFNAR1 소단위는 IFN α/β 에 결합할 수 없다. 사람의 IFNAR1 수용체만을 무린 L-929 섬유아세포로 트랜스펙트시킬 경우에, IFN α 8/IFN α B를 제외하고는 사람의 IFN α s는 세포에 결합하지 못한다(Uze et al, 1990). 사람의 IFNAR1 소단위 없이 L 세포로 트랜스펙트된 사람 IFNAR2 소단위는 약 0.45nM의 Kd로 사람의 IFN α 2에 결합한다. 사람의 IFNAR2 소단위가 사람의 IFNAR1 소단위 존재하에 트랜스펙트된 경우에는 매우 높은 친화성 결합을 나타낸다(Kd가 0.026-0.114nM)(Novick et al, 1994; Domanski et al, 1995). 대부분의 세포에서 500-20,000의 높은 친화력을 가지는 IFN 결합 부위와 2,000-100,000의 낮은 친화력을 가지는 IFN 결합 부위가 있는 것을 알 수 있다. IFNAR1/2 복합체(α/β_S 또는 α/β_L) 소단위는 매우 높은 친화력으로 IFN α 에 결합하지만, α/β_L 쌍은 기능상의 시그널발생 수용체인 것으로 보인다.

IFNAR1 및 IFNAR2 β_L 소단위를 생쥐의 L-929 세포에 트랜스펙션시키고, IFN α 2와 배양시키면, 항-바이러스 상태를 유도하고, 세포내 단백질 포스포릴화반응이 개시되어, 세포내 카이나제(Jak1 및 Tyk2) 및 전사 인자(STAT 1, 2, 3)를 활성화시키는 원인이 된다(Novick et al, 1994; Domanski et al, 1995). 이에 상응하는 실험에서, IFNAR2 β_S 소단위를 트랜스펙션시켜도 유사한 반응을 시작시키지 못하였다. 따라서, IFNAR 소단위와 연합하여, 기능을 가지는 활성(항-바이러스 반응)을 최대한 유도하기 위해서는 IFNAR2 β_L 소단위가 필요하다.

막 결합된 세포 표면 IFNAR에 추가하여, 가용성 IFNAR도 사람의 뇨 및 혈청에서 모두 확인되었다(Novick et al, 1994; Novick et al, 1995; Novick et al, 1992; Lutfalla et al, 1995). 혈청에서 분리된 가용성 IFNAR은 실제 분자량이 55kDa (SDS-PAGE)이고, 반면에 뇨에서 분리된 가용성 IFNAR은 실제 분자량이 40-45kDa(p40)인 것으로 나타났다. 가용성 p40 IFNAR2에 대한 전사체는 mRNA 수준에서 존재하고, 이는 카르복시 말단에 있는 새로운 두 개 아미노산과 함께 IFNAR2 소단위의 전체 세포의 도메인을 거의 포함한다. 가용성 IFNAR2 수용체에는 5군데 가능성이 있는 글리코실화 부위가 있다. 가용성 p40 IFNAR2은 IFN α 2 및 IFN β 에 결합하고, *in vitro*에서 IFN α 종("백혈구세포 IFN") 및 개별 타입 I IFNs(Novick et al, 1995) 혼합물의 항-바이러스 활성을 저해시키는 것으로 나타났다. 재조합 IFNAR2 소단위 Ig 융합 단백질은 Daudi 세포 및 α/β_S 소단위 이중 트랜스펙트된 COS 세포에 다양한 타입 I IFN 종(IFN α A, IFN α B, IFN α D, IFN β , IFN α Con1, IFN ω)이 결합하는 것을 저해시키는 것으로 나타났다.

타입 I IFN 시그널 생성 경로에 대해서는 최근에 확인된 바 있다(Platanius et al, 1996; Yan et al, 1996; Qureshi et al, 1996; Duncan et al, 1996; Sharf et al, 1995; Yang et al, 1996). 시그널 발생을 유도하는 최초의 사건은 IFN $\alpha/\beta/\omega$ 가 IFNAR2 소단위에 결합하고, 이어서, IFNAR1 소단위가 연합하여, IFNAR1/2 복합체를 형성하는 과정이라고 본다(Platanius et al, 1994). IFN $\alpha/\beta/\omega$ 가 IFNAR1/2에 결합함으로써, IFNAR1 및 IFNAR2 소단위의 특정 티로신을 포스포릴화시키는 것으로 보이는 두 개 Janus 카이나제(Jak1 및 Tyk2)를 활성화시킨다. 이와 같은 소단위가 일단 포스포릴화되면, STAT 분자(STAT 1, 2, 3)는 포스포릴화되어, STAT 전사 복합체가 이량체화되고, 전사 복합체에 핵이 위치를 잡고, 특이적인 IFN 유도성 유전자를 활성화시킨다.

사람에서 타입 IFN β 의 약리역학에 대해서 평가하였다(Alan et al, 1997; Fierlbeck et al, 1996; Salmon et al, 1996). IFN β 는 상당히 빠르게 제거되었고, 대부분의 사이토킨보다 IFN β 의 생체이용성이 더 낮았다. 사람에서 IFN β 의 약리역학에 대해서 평가되었지만, IFN β 의 생체이용성과 임상적인 효과사이엔 분명한 관계에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다. 정상인 지원자에 제조함 CHO에서 유도된 IFN β 의 1회 정맥(iv) 알약 약량(6 MIU)을 투여하였을 경우에, 5분정도의 신속한 분포 상에 이어서 약 5시간 정도의 반감기를 가졌다(Alam et al, 1997). 피하(sc) 또는 근육내(im)로 IFN β 를 투여하는 경우에 혈청 수준이 전신으로 이용한 경우의 약~15%와 같았다. iv, im 또는 sc 투여후에 IFN의 약리역학(PBMCs에서 2'5'-올리고아데닐레이트 합성효소(2',5'-AS)의 변화를 측정하여 평가)는 처음 24동안에는 상승하고, 그 다음 4일을 경과하는 경우에 서서히 기저수준으로 감소되었다. 생물학적 효과의 정도 및 그 지속시간은 투여 경로와는 무관하게 동일하였다.

두 군데 다른 회사(REBIF^R - Serono 및 AVONEX^R -Biogen)에서 제조한 IFN β 의 약동학(PK) 및 약력학(PD)을 제조함 IFN β 6MIU를 1회 약량으로 im 주사하여 평가하였다(Salmon, 1996). 시간에 따라 IFN β 및 IFN β 대용 표식, 네오프테린 혈청 농도를 모니터하였다. 두 가지 IFN β 준비물에서 유사한 PK 프로파일을 얻었는데, IFN β 의 혈청 피크는 약~12-15시간에 나타났다. 단, REBIF^R의 경우에 최대 수준이 더 낮았다. im 주사후 처음 36시간에서는 적어도 REBIF^R 및 AVONEX^R IFN β 수준이 상승되었고, 그 다음 48시간경까지 기저 수준보다 약간 높은 정도로 감소되었다. 네오프테린 수준은 REBIF^R 및 AVONEX^R의 경우에 주사후 약~44-50시간에 최대 수준이 도달하고, 주사후 72시간까지 상승세를 유지하였고, 약 144시간에서는 점진적으로 감소되는 유사한 프로파일을 나타내었다.

IFN β 의 다중 약량의 약력학 연구를 사람의 흑색종 환자에서 실시하였는데(Fierlbeck et al, 1996), IFN β 는 sc경로로 투여되었고, 6개월간 주당 3 MIU/약량으로 3회씩 투여되었다. 약력학 표식인 2',5'-AS 합성효소, β 2- 마이크로글로블린, 네오프테린, NK 세포 활성은 제2회 주사(4일)에 절정을 이루었고, 28일 경우 떨어져, 6개월까지 약간 상승된 수준을 유지하였다.

요약하면, 사람에서 타입 I 인터페론은 상당히 신속하게 제거된다. 임상적으로 효과를 개선시키기 위해서는 장시간 작용할 수 있는 인터페론이 필요하다.

발명의 요약

가용성 IFNAR와 타입 I 인터페론(IFN)이 복합된 것으로 구성된 타입 I 인터페론은 *in vivo* 상에서의 항-바이러스, 항-암 및 면역 조절 활성을 자유 IFN과 비교하였을 때 안정성 및 능력이 개선되었고, 약력학도 연장된 것으로 나타났다.

따라서, 본 발명은 사람의 인터페론 α/β (IFNAR) 소단위 세포의 도메인과 타입 I 인터페론으로 구성된 타입 I 인터페론(IFN) 복합체를 제공하는데, 이는 *in vivo* 상에서의 항-바이러스, 항-암 및 면역 조절 활성을 자유 IFN과 비교하였을 때 안정성 및 능력이 개선되었고, 약력학도 연장된 것으로 나타났다. 적절하게는 복합체는 임의 타입 I 인터페론과 IFNAR2 소단위 세포의 도메인 또는 IFN α 와 IFNAR1 소단위로 구성된다.

좀더 구체적으로는, 복합체는 IFN α 또는 IFN β 또는 IFN ω 또는 이의 임의 생물학적 활성 분취물에 복합된 IFNAR 적절하게는 IFNAR2의 전체 세포의 도메인의 폴리펩티드 서열 또는 이의 임의 인터페론-결합 분취물의 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질, 또는 결합 단백질 또는 비-결합 복합체로 구성된다.

IFNAR는 상기에서 정의한 임의 공지의 세포의 IFNAR 수용체뿐만 아니라 이의 임의 활성 단편으로 이해하면 된다. IFNAR는 또 다른 단백질 예를 들면, IgG와 같은 이뮤노글로블린에 선택적으로 융합될 수 있다. IFN, IFN α , IFN β , IFN ω 는 현재까지 확인된 20개 타입 I 인터페론 또는 미래에 확인될 임의 또 다른 타입 I 인터페론중에 하나로 이해하면 된다.

본 발명의 한 구체예에서 복합체는 화학적 결합을 통하여 IFNAR2에 공유적으로 연결된 IFN α 또는 IFN β 으로 구성된다.

또 다른 구체예에서는 IFNAR2에 비공유적으로 결합된 IFN α 또는 IFN β 으로 구성된 복합체를 제공한다. 이 구체예에는 임의 비율로 타입 I IFN 및 IFNAR2를 포함하는 조성물이 포함된다. 상기에서 정의한 과량의 IFNAR2와 타입 I IFN 조성물은 본 출원에 "복합체" 정의에 포함된다. 두 성분을 별도로 투여하여 *in vivo*에서 복합체를 만들 수도 있다. 따라서, 또 다른 구체예에서, 복합체는 IFN α 또는 IFN β 및 가용성 IFNAR2를 동시에 또는 연속적으로 투여하여 수득할 수 있는 IFNAR2 및 IFN 혼합물이 된다. 또한, IFNAR은 임의 IFN의 투여없이 투여할 수 있는데 이 경우에 내생 순환하는 IFN과 함께 *in vivo*에서 복합체가 형성되어, 내생 IFN의 효과를 강화시킨다.

특정 구체예에서, 복합체는 IFNAR2에 융합된 IFN α 또는 IFN β 또는 IFN ω 로 구성된 재조합 단백질로써, 이때 IFN 및 IFNAR2 부분은 유연성있는 펩티드 링커 분자를 통하여 선택적으로 융합될 수 있다. 이와 같은 펩티드 링커는 *in vivo*에서 절단되거나 절단되지 않을 수 있다.

또한 본 발명은 이와 같은 융합 단백질을 인코딩하는 DNA, 이와 같은 DNA를 포함하는 벡터, 이와 같은 벡터로 형질변환된 숙주 세포, 이때 숙주 세포는 융합 단백질을 발현시켜, 숙주 세포를 배양하여 이와 같은 융합 단백질을 생산하여, 발현된 융합 단백질을 분리하면 얻을 수 있다.

본 발명의 또 다른 특징은 본 발명의 복합체를 이용하여, IFN의 *in vivo* 효과를 연장시켜, IFN으로 치료할 수 있는 임의 질환을 치료할 수 있다.

본 발명의 또 다른 특징은 IFN 조제물에서 안정화제로 IFNAR을 이용하는 것과 관계한다. 자유 IFN β 는 올리고머화되는 경향을 가진다. 일단 IFNAR 특히 IFNAR2에 복합되는 경우에 이와 같은 경향이 차단된다. 현재 재조합 IFN β 조제물은 산성 pH를 가지고, 이는 투여하였을 경우에 일부 국소적인 자극의 원인이 된다. IFNAR을 안정화제로 이용하는 경우에 비-산성 조제물로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

본 발명은 다음의 도면을 참고로 하면 이해하기가 더욱 쉽다.

도 1은 IFN β 존재하에서 약량-의존성이 있는 sIFNAR2 또는 IFNAR2Ig(사람 IgG1 힌지 CH2, CH3 도메인에 융합된 hIFNAR2 세포의 도메인으로 구성됨)의 항-바이러스 활성의 그래프이다.

도 2는 최적 수준 이하의 IFN β 약량에서 sIFNAR2 및 IFN β 의 항-바이러스 활성을 그래프로 나타낸 것이다. 한 시간-선배양 후에 중간 수준의 IFN β 약량에서 IFN β 와 sIFNAR2의 시너지성 항-바이러스 활성이 나타났다.

도 4는 선배양 시간에 대한 함수로써 sIFNAR2 및 준-효과량인 IFN β (0.95 IU/ml)에서 항-바이러스 활성을 나타낸 그래프이다. 지정한 시간동안 선 배양후에, WISH 세포를 IFN β (0.95 IU/ml sub-effective dose)에 노출시킨다. 선배양 후 4시간 경에서야 시너지성 항-바이러스 활성이 관찰되었다. 항-바이러스 활성은 VSV 도전 후 48시간경에 MTT 전환을 측정하여 알 수 있다. IFN β 의 준-치료요법적 수준에서, IFNAR2/IFN 복합체 형성으로 항-바이러스 활성이 강화되었다.

도 4는 sIFNAR2로 선배양 시킨 후에 사람 IFN β 의 항-바이러스 활성이 강화되었음을 알 수 있다.

도 5는 sIFNAR과 연합된 사람 IFN β 의 강화된 항-바이러스 활성은 다른 단백질이 아닌 IFNAR2에 특이적이라는 것을 보여주는 그래프이다.

도 6은 ELISA에 의해 측정된 결과 사람 IFN β 및 IFN β /IFNAR2 복합체의 약력학을 비교한 그래프이다.

도 7은 생검에 의해 측정된 결과 사람 IFN β 및 IFN β /IFNAR2 복합체의 약력학을 비교한 그래프이다.

도 8은 ELISA에 의해 측정된 결과 사람 IFN α 및 IFN α /IFNAR2 복합체의 약력학을 비교한 그래프이다.

도 9는 생검에 의해 측정된 결과 사람 IFN α 및 IFN α /IFNAR2 복합체의 약력학을 비교한 그래프이다.

도 10은 n=2 IFNAR2/IFN β 융합 단백질(서열:14)의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. (GGGGGS)₂(서열 14의 잔기 240-249) 링커는 밑줄을 한 것이다.

도 11은 10% PAG에서 pCMV-IFNAR2/IFN β 의 제한효소 분석을 한 겔을 나타낸 것이다; 라인 3-7: BamHI/XhoI 절단; 라인 2: SmaI/XhoI 절단; 라인 1: pBR322 DNA-MspI 절단 표식; 라인 2: pCMV-IFNAR2/IFN β , 0GS; 라인 3: 1GS; 라인 4: 2GS; 라인 5: 3GS; 라인 5: 4GS; 라인 7: 5GS; 라인 8: ϕ X174 RFDNA HaeIII 절단 표식을 나타낸다.

도 12는 IFNAR2/IFN β 발현 벡터의 제한효소 엔도뉴클레아제 유전자지도이다.

도 13은 IFNAR2/IFN β 융합 단백질의 웨스턴 블랏 분석을 한 것이다. 라인 1은 링커를 포함하지 않은 IFNAR2/IFN β 구조체; 라인 2는 Gly₄Ser(서열:1) 링커 한 개를 포함하는 IFNAR2/IFN β 구조체; 라인 3은 Gly₄Ser(서열:1) 링커 2개를 포함하는 IFNAR2/IFN β 구조체; 라인 4는 Gly₄Ser(서열:1) 링커 3개를 포함하는 IFNAR2/IFN β 구조체; 라인 5는 Gly₄Ser(서열:1) 링커 4개를 포함하는 IFNAR2/IFN β 구조체; 라인 6은 Gly₄Ser(서열:1) 링커 5개를 포함하는 IFNAR2/IFN β 구조체이다.

도 14는 CHO 세포 상청액에서 발현된 인터페론 분자의 항-바이러스 활성을 IFN β 표준 활성으로 표준화시킨 것을 나타낸 그래프이다.

도 15A는 IFNAR2를 정맥으로 투여한 후에 투여된 IFNAR2의 약력학을 나타낸 그래프이다. IFN β 를 IFNAR 복합체로 단독으로 주사하거나 또는 i.v.로 IFNAR2를 투여한 후에 바로 투여하였다. IFN β 특이적인 ELISA(도 15A) 및 WISH 항-바이러스 검사(도 15B)에서의 생활성으로 지정된 시간에서의 혈청 반감기를 측정하였다.

도 16은 통상의 IFN 단독 또는 기준을 투여한 것과 비교하였을 때, sIFNAR2 복합체로써 "통상의" IFN(사람 IFN α /D) 복합체를 다양한 약량으로 이용하였을 때 세포독성에 대한 보호 효과를 나타낸 그래프이다.

도 17은 인터퓨전 GS5 또는 hIFN β 단독으로 단일 정맥 주사한 후에 시간에 대한 함수로써 IFN의 혈청 농도를 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 IFNAR/IFN 복합체 및 이 복합체를 생산하는데 요구되는 기술에 대해서 하기에서 설명한다. 대부분의 결과에서 IFN β 가 실시예로 선택되나 이에 한정되지는 않는다.

융합 단백질

IFNAR2의 C-말단 또는 이의 임의-인터페론 결합 부서열을 IFN β 의 N-말단 또는 이의 생물학적 활성 단편에 융합시키고, 이때 두 분자를 연결시키기 위해 최대로 짧은 거리를 요구한다. 가역적인 구조로 준비할 수 있는데, 즉 IFN β 의 C-말단 또는 이의 단편은 IFNAR2의 N-말단 또는 이의 부서열에 융합될 수 있다.

IFNAR2/IFN β 복합체의 분자 모델로부터, 활성 복합체에서 IFNAR2의 C-말단 세포의 도메인과 IFN β 의 N-말단간의 거리를 측정된 결과 ~80Å가 되었다. 활성 복합체가 유지될 수 있도록 IFNAR2/IFN β 복합체를 작제하기 위해, 예를 들어, Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(GGGGS)(서열:1) 반복체와 같은 유연성있는 펩티드 링커를 이용할 수 있다. 또는, 링커는 유연성이 있어, 혈청, 막결합된 또는 세포 프로테아제에 의한 단백질 분해 효소의 표적이 된다. 혈청 프로테아제 절단 부위의 경우, 조각된 IFNAR2/IFN β 복합체는 Factor Xa 절단 부위를 가질 수 있다. Factor Xa는 Arg273 및 Arg322의 두 위치에서 프로트롬빈을 절단하고, 이는 4가 펩티드 인지 시그널 Ile-Glu-Glu-Arg(서열:2)을 가진다(Nagai et al, 1984). Factor Xa 자체가 다양한 활성물질 가령, 조직 인자등에 의해 본질적으로 그리고 외부적인 경로에 의해 발생되고, 맥관 내피 세포, 대식세포 및 호중구에 의해 방출된다.

Factor Xa는 링커 도메인에 있는 Factor Xa 인지 서열을 포함하는 sIFNAR2/IFN 융합 단백질에 작용할 수 있고, IFNAR2/IFN 복합체를 방출시켜, 복합체가 비-공유 복합체로 기능을 할 수 있도록 한다.

또는, IFNAR2/IFN β 융합 복합체는 세포 막 프로테아제(가령 헤파신) 절단 부위를 가진다. 헤파신은 간 조직에서 상당히 높은 수준으로 발현되는 51kDa의 막 결합된 세린 프로테아제 자이모겐으로써, 신장, 췌장, 폐, 갑상선, 뇌하수체 및 고환에서도 발견된다. 헤파신에 의해 절단되는 것으로 알려진 한 가지 서열은 Factor VII에 있는 Arg152-Ile153 펩티드 결합이다. 헤파신은 종양 세포에서 트롬빈 형성에 얽혀있다(Kazam et al, 1995).

헤파신은 또한 링커 도메인에 있는 헤파신 인지 서열을 포함하는 sIFNAR2/IFN 융합 단백질에 작용할 수 있고, IFNAR2/IFN 복합체를 방출시켜, 복합체가 비-공유 복합체로 기능을 할 수 있도록 한다.

또는 IFNAR2/IFN β 복합체는 세포내 프로테아제 절단 부위를 가질 수 있다. 다양한 프로테아제가 세포의 피사 및 아포프토시스에 의해 방출된다. 여기에는 카스파제(인터루킨 1 베타-전환 효소형 프로테아제), 메탈로 프로테나제, 리소좀성 프

로테아제(예를 들면, 카텡신 B), 엘라스타제등이 포함된다. 엘라스타제는 질병상태에서(가령 폐혈증) 과립세포에 의해 방출되고, 아미노산 절단 서열에 대해 광범위한 특이성을 가지고, 트립신의 것과 동족이다(Ertel et al, 1994; Szilagyi et al, 1995).

세포내 프로테아제는 링커 도메인에 있는 헬신 인지 서열을 포함하는 sIFNAR2/IFN 융합 단백질에 작용할 수 있고, IFNAR2/IFN 복합체를 방출시켜, 복합체가 비-공유 복합체로 기능을 할 수 있도록 한다.

몇 가지 융합 단백질 구조체를 준비할 수 있는데, sIFNAR2(p40-ESEFS)의 C-말단을 유연성 링커를 통하여 IFNβ(MSY)의 N-말단에 연결되어 있다. 펩티드 링커의 예를 들면 다음과 같다;

ESEFS(GGGGS)_nMSY 이 때, n=5(서열:3), 4(서열:4), 3(서열:5), 2(서열:6), 1(서열:7);

ESEFS(hCG-CTP)MSY 이 때, hCG-CTP=SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ(서열:8);

ESEFS(EFM)_nMSY 이 때, n=5(서열:9), 4(서열:10), 3(서열:11);

ESEFS (EFGAGLVLGQFM)_nMSY 이 때 n=1(서열:12), 2(서열:13) 및

복합체 모델에서 IFNAR2 결합 부위와 IFNβ사이 에 거리를 연결시킬 수 있고, 인터페론과 수용체 부분 사이에 면역원성 에 피토프를 형성하지 않는 임의 적절한 링커등이 될 수 있다. 적절하게는 이와 같은 링커는 길이가 최고 30개 아미노산으로 구성된다.

공유 결합체

화학적으로 교차결합된 분자를 만드는 한 가지 예는 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 같은 생분해가능한 링커를 IFNAR2에 있는 또는 만든 시스테인과 반응시켜, Ser₂₁₀을 Cys 또는 Asn₈₉을 Cys으로 아미노산 치환시켜, 부위특이적으로 IFNAR2을 변형시키는 것이다. 다음과 같은 구조체를 만들 수 있다;

IFNAR2(S210C)-PEG_n-IFNβ(Cys17) 이 때 n=2000, 5000, 10,000 달톤, 또는

IFNAR(N89C)-PEG_n-IFNβ(Cys17).

두 가지 다른(선택적으로 조작된) 부분 사이에 Cys에 공유적으로 이황화결합을 만드는 것도 본 발명의 범위에 속한다.

비-공유 복합체

활성 복합체가 발생될 수 있는 최대 조건하에서 사람의 IFNAR2는 IFNβ와 복합될 수 있다. *In vitro*에서 실시예에서 보고 된 바와 같이 최대 활성 복합체를 생산하는데에는 2.5ng의 IFNAR2에 대해 IFNβ(IN)의 비율이 요구된다. *in vivo* 활성에 대해 활성 복합체를 생산하는데 있어서 IFNAR2에 대해 IFNβ의 최대 비율을 결정해야 하는데, 최적 비율은 IFNβ의 농도에 따라 달라진다. 따라서, 항-종양 활성을 강화시키는데 있어서, 2×10^4 IU/mouse/day IFNβ농도에서, IFNAR2:IFNβ의 최적 비율은 하루에 2.5ng IFNAR2/IFNβpg이고, 5×10^4 IU/mouse/day IFNβ농도에서는 0.3ng IFNAR2/pg IFNβ이 된다. *in vitro*에서 활성 복합체를 최대로 만드는데 이용되는 비율로 *in vivo*에서 IFN의 역력학을 연장시킬 수 있다.

적절하게는 복합체를 생산하는데 이용되는 IFNAR2 및 IFNβ는 재조합 분자이다. *in vitro* 항-바이러스 검사에서, IFNβ단독의 활성과 비교하였을 때, 인터페론/수용체 복합체의 활성이 강화된 것으로 나타났다. IFNβ의 일정 농도를 다양한 농도의 재조합 sIFNAR2과 혼합시키고, 이 혼합물(IFNAR2/IFN 복합체)를 WISH 세포(사람의 양막세포)에 첨가한다. 이와 같은 WISH 세포에 수포성 내구염 바이러스(VSV)에 도전을 받도록 하고, IFN의 항-바이러스 활성은 48시간 배양후에 세포 생존도를 평가하여 측정하였다. 각 실험에서, 일정한 양의 IFNβ에 IFNAR2을 첨가하면 IFNAR2에 대해 IFN의 비율이 최적일 경우에 VSV의 도전에 세포 생존은 약량에 따라 증가되는 것을 알 수 있다. 이와 같은 결과로 인하여, IFNAR2 및 IFN 복합체는 항-바이러스 검사에서 자유 IFNβ와 비교하였을 경우에 활성이 강화되었다는 것을 알 수 있다. 이는 IFNAR2/IFNβ복합체는 IFN 자체의 활성을 가지는 것과 같은 다양한 치료요법적 지수에서 자유 IFN과 비교하였을 경우에

능력이 강화되었다는 것을 알 수 있다. 이는 자유 IFN이 일부 치료요법적 활성 가령, 항-바이러스, 항-암 및 면역 조절 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있다. 실제 능력으로 IFNAR2/IFN β 복합체는 활성이 강화되었고, 약리학(반감기)의 개선으로 바이러스, 암 및 면역 질환을 치료하는데 좀더 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

*in vivo*로 투여하였을 경우에, 인터페론 수용체 복합체는 IFN의 생체이용성, 약리학 및 약동학을 강화시켜, IFN의 항-바이러스, 항-암 및 면역 조절 성질을 증가시켰다.

IFN 또는 IFNAR 성분의 연속적인 투여, IFN/IFNAR 공유 복합체의 투여 또는 IFNAR/IFN 융합 단백질의 투여를 통하여, IFN/IFNAR 비-공유 복합체의 사전-형성, 자유 IFN과 IFNAR의 동시-투여에 의해 복합체에 의해 증가되는 IFN의 생체 이용성을 강화시킬 수 있다.

또 다른 구체예에서, 임의 IFN을 추가하지 않고서, IFNAR 성분을 단독으로 투여하여, 이와 같은 생체이용성을 강화시킬 수 있다. IFNAR은 *in vivo*에서 내생 IFN과 함께 "복합체"를 형성하여, 내생 IFN의 생체이용성, 약리학 및 약동학을 강화시킬 수 있다. 이는 특히, 고유 IFN의 유도의 원인이 되는 질환을 가지는 환자를 치료하는데 유용한데, IFN은 이와 같은 질환과 싸울 수 있는 고유의 효과를 위해 순환될 수 있다. 첨가된 IFNAR이 고유 IFN의 효과를 강화시킬 수 있다.

본 발명의 복합체에 이용할 수 있는 적절한 분자는 고유 IFN 및 IFNAR의 서열을 가지는 것이다. 고유 서열은 자연 발생하는 사람의 IFN 또는 IFNAR의 것이 된다. 이와 같은 서열은 공지되어 있고, 이는 문헌에서 바로 찾을 수 있다. 자연 발생되는 대립형질 변이체 또한 고유 서열인 것으로 간주된다.

또한 본 발명에는 본 발명의 상기 IFNAR2/IFN 복합체의 유사체에 관계하는데, 유사체는 필수적으로 고유 IFNAR2 및 IFN의 서열을 가지는 복합체의 동일한 생물학적 활성을 보유한다. 이와 같은 유사체는 최고 약 30개 아미노산이 결손되거나, 첨가되거나 또는 복합체에 있는 IFNAR2 또는 IFN 부분에 있는 다른 것으로 치환될 수 있는데, 이와 같은 변화는 복합체 자체와 비교하였을 때, 키메라 단백질 유사체의 생물학적 활성이 변화되지 않는다. 다양한 유사체는 복합체에서 두 부분을 연결시키는 링커 펩티드 부위에서 서로 다르고, 기초가 되는 복합체 분자와도 상이하하다(이는 IFNAR2 및 IFN 서열에서 자연적으로 발생하는). 상기에서 보고된 바와 같이, 이와 같은 링커는 길이가 최고 30개 아미노산이 되고, 이는 복합체에서 서로에서 IFNAR2 및 IFN 부분을 분리시키는 작용을 한다. 링커에 대해서는 이 서열을 선택하는데 있어서 신중해야 하고(따라서, 적절한 표준 검사에서 이와 같은 유사체를 생물학적으로 테스트한다), 예를 들면 이는 복합체의 부적절한 폴딩을 시켜서는 안되고, 이와 같은 부적절한 폴딩은 비활성 복합체 유사체 또는 활성이 강화되지 않은 유사체를 만들어, 환자에서 이에 대한 항체를 유도하였을 때, 유사체는 중간 또는 장시간 치료용 약물로써 효과를 가지지 못한다. 본 발명의 복합체 유사체에 대해서, 이와 같은 유사체는 본 발명의 기초 복합체의 아미노산 잔기 한 개 이상 최고 30개가 다른 아미노산 잔기로 대체되거나, 결손되거나, 또는 한 개 이상의 아미노산 잔기가 본 발명의 고유 복합체에 추가될 수 있고(이는 고유 IFNAR2/IFN 서열에 필수적인 것만을 가지고), 이는 본 발명의 기본적인 복합체와 비교하였을 때 생성된 생성물의 활성에는 큰 변화를 가지지 않는다. 이와 같은 유사체는 공지의 합성 또는 부위-직접적인 돌연변이 발생 기술 또는 임의 공지의 다른 적절한 기술을 이용하여 준비할 수 있다.

이와 같은 임의 적절한 유사체는 실제 유사한 활성을 가지기 위해 기본적인 IFNAR2/IFN 복합체의 것과 충분히 중복되는 아미노산 서열을 가진다. 따라서, 임의 주어진 유사체가 동일한 활성을 가지는지, 또는 본 발명의 기초 복합체와 같이 안정한 것인지를 통상의 실험을 통하여 측정해야 하는데, 이 실험은 이와 같은 유사체를 하기에서 제시하는 실시예 2-7의 생물학적 활성 및 안정성 테스트를 받게한다.

본 발명에 따라 이용되는 복합체 유사체, 이를 코드하는 핵산 서열에는 실제 과도한 실험없이 당업자가 용이하게 수득할 수 있는 치환 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 실제 이에 상응하는 서열을 포함한다. 단백질 화학 및 구조에 대해 상세한 설명은 Schulz, et al, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1978); and Creighton, T.E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co, San Francisco (1983)을 참고로 한다. 코드 선호도와 같은 뉴클레오티드 서열 치환에 대해서는 Ausubel et al (1987, 1992), mm A. 1. I-A. 1.24, and Sambrook et al (1987, 1992), mm 6.3 and 6.4, at Appendics C and D에서 참고할 수 있다.

본 발명에 따른 유사체에 적절한 변화는 "보존성" 치환으로 공지된다. 기본적으로 자연 발생 IFNAR2 및 IFN 서열을 가지는 복합체에서 이와 같은 보존성 아미노산 치환에는 충분하게 유사한 물리화학적 성질을 가지는 군내에 동의 아미노산으로 치환되면, 분자의 생물학적 기능을 보존한다(Grantham, 1974). 이들의 기능에 변화를 주지 않고, 상기 서열에서 아미노산의 삽입 및 결손을 만들 수 있는데, 특히, 삽입 또는 결손은 몇 개 아미노산만 관련되는데, 예를 들면, 30개 미만, 적절하게는 10개 정도가 되고, 기능을 가지는 모양에 중요한 아미노산 가령, 시스테인 잔기를 제거하거나 치환시키지는 않는다(Anfinsen, 1973). 이와 같은 결손 또는 삽입에 의해 생산된 유사체는 본 발명의 범위에 속한다.

적절하게는 동일한 아미노산 군은 표 1에 정의된 것과 같다. 좀더 적절하게는 유사한 아미노산 군은 표 2에 나타내었고, 가장 적절한 아미노산 군은 표 3에 정의된 것과 같다.

[표 1]

Preferred Groups of Synonymous Amino Acids

Amino Acid	Synonymous Group
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

[표 2]

More Preferred Groups of Synonymous Amino Acids

Amino Acid	Synonymous Group
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

[표 3]

Most Preferred Groups of Synonymous Amino Acids

Amino Acid	Synonymous Group
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Glu
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

본 발명에서 이용하기 위해 IFNAR2/IFN 복합체의 유사체를 획득하는데 이용될 수 있는 단백질에서의 아미노산 치환체를 만드는 예는 미국 특허 RE 33,653; 4,959,314; 4,588,585; 4,737,462, to Mark et al; 5,116,943 to Koths et al; 4,965,195 to Namen et al; 5,017,691 to Lee, et al.; 등에서 제시한 임의 공지의 단계 및 미국 특허 4,904,584 (Shaw et al)에서 제시한 리신 치환된 단백질등이 포함된다.

본 발명의 또 다른 적절한 구체예에서, 본 발명에서 이용될 수 있는 복합체의 임의 유사체에는 본 발명의 상기 언급한 기초 복합체에 상응하는 필수 아미노산 서열을 가진다. 이때 "~에 상응하는"이란 기본적인 특징에 영향을 주지 않고, 기본 복합체의 서열에 작은 변화를 가지는 유사체로 이해하면 되는데, 특히 특징이란 암 세포 증식을 저해하는 능력 또는 골수 이식을 촉진시키는 것으로 이해하면 된다. "~에 상응하는"의 범위에 속하는 변화의 종류는 본 발명의 복합체를 인코딩하는 DNA의 통상적인 돌연변이 형성으로 인하여, 작은 변화를 유도하는 것으로 이는 상기에서 설명하는 방식으로 원하는 활성을 스크리닝할 수 있다.

적절하게는 복합체의 IFNAR2 부분은 고유 서열 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 고유 아미노산 서열에 적어도 70% 상동성을 가지고, 이의 생물학적 활성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하는 이들의 변이체과 동일한 핵심 서열을 가진다. 좀더 적절하게는 이와 같은 서열은 고유 서열에 대해 적어도 85%의 상동성, 적어도 90%의 상동성, 가장 적절하게는 적어도 95%의 상동성을 가진다.

복합체의 IFN 부분에 대해서, 이용되는 핵심 서열은 고유 서열 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 고유 서열에 대해 적어도 70%, 적절하게는 적어도 85%의 상동성, 적어도 90%의 상동성, 가장 적절하게는 적어도 95%의 상동성을 가진다.

"서열 상동성"이란 서열을 다음과 같이 비교하였을 때를 말한다. 서열을 Genetic Computing Group's GAP(global alignment program), default(BLOSUM62) 매트릭스(값 -4 to + 11) 이때 gap open penalty는 -12(gap의 처음 null), gap 연장 penalty는 -4(gap에서 각 추가 연속 null)을 이용하여 배열한다. 배열한 다음에, 청구하는 서열에서 아미노산의 수에 대해 일치하는 수로 상동성을 나타낸다.

본 발명에서 유사체는 다음과 같은 공정으로 결정한다. 복합체의 IFNAR 부분 또는 복합체의 IFN 부분에 대해서, 고유 서열의 DNA는 선행기술에서 공지된 것이거나 본 명세서의 뒷부분에서 언급하는 문헌에서 볼 수 있고, 또는 당업자가 바로 이용할 수 있는 것들이다. 임의 핵산 가령, DNA 또는 RNA에 의해 인코딩된 폴리펩티드 및 고유 서열의 생물학적 활성을 보유하는 폴리펩티드의 경우에 매우 스트린전트한 또는 중간 정도의 스트린전트 조건하에 고유 DNA 또는 RNA의 상보체에 하이브리드할 수 있는 핵산에 의해 인코딩된 폴리펩티드등이 본 발명의 범위에 속한다.

스트린전트 조건은 하이펩티드화 실험에 이용되는 온도, 하이펩티드 용액에서 포름아미드의 비율 및 단가 양이온의 양에 대한 함수가 된다. 임의 주어진 조건에 관여된 스트린전트 정도를 결정하기 위해, 당업자는 우선 Meinkoth et al. (1984)의 DNA-DNA 하이브리드의 용융 온도 T_m 으로 나타내는 100% 상동성을 가지는 하이브리드의 안정성을 결정하는 공식을 이용한다;

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.61(\% \text{ form}) - 500/L$$

이때, M은 단가 양이온의 몰랄농도, GC%는 DNA에서 G 및 C 뉴클레오티드의 비율, % Form는 하이브리드 용액에서 포름아미드의 농도, L은 염기쌍에서 하이브리드의 길이를 나타낸다. 각 경우에, 100% 상동성에 대해 계산된 것보다 T_m 이 1°C 감소되었고, 이는 허용된 불일치 양이 약 1%씩 증가된다는 것이다. 따라서, 임의 주어진 특정 염 및 포름아미드 농도에서 하이브리드 실험에 이용된 T_m 이 Meinkoth의 식에 따라 계산된 100% 하이브리드의 경우 T_m 보다 10°C 낮은 경우에, 약 10% 미스매치가 발생되기는 하지만, 하이브리드 반응은 일어난다.

여기에서 이용된 것과 같이, 매우 엄격한 스트린전트 조건은 최고 15%의 서열 다양성을 수용하고, 중간 정도의 스트린전트 조건은 약 20% 서열 다양성을 수용한다. 매우 엄격한 스트린전트(하이브리드의 계산된 T_m 보다 낮은 $12-15^\circ\text{C}$) 및 중간 정도의 스트린전트(하이브리드의 계산된 T_m 보다 낮은 $15-20^\circ\text{C}$) 조건은 하이브리드의 계산된 T_m 이하의 적절한 온도에서 2 X SSC(표준 시트레이트 염) 및 0.5% SDS 용액을 이용한다. 최대 스트린전트 조건은 주로 세척 조건 때문인데, 특히 이용되는 하이브리드 반응 조건이 다소 불안정한 하이브리드를 허용하여, 안정한 하이브리드를 형성하는 경우가 된다. 그 다음 좀더 높은 스트린전트 조건에서 세척하면 다소 불안정한 하이브리드를 제거할 수 있다. 상기에서 설명하는 높은 스트린전트 조건에서 중간 정도의 스트린전트 조건에 이용되는 통상의 하이브리드 조건은 6 X SSC(또는 6 X SSPE), 5 X Denhardt 시약, 0.5% SDS, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 변성된 단편화된 연어 정자 DNA 용액에서 T_m 이하의 온도인 약 20°C 내지 25°C 에서 실시한다. 혼합형 프로브를 이용할 경우에, SSC(Ausubel, 1987, 1998)대신에 테트라메틸 염화암모늄(TMAM)을 이용하는 것이 적절하다.

여기에서 사용된 것과 같은 "기능을 가진 유도체"는 당분야에 공지된 수단에 의해, 잔기의 측쇄 또는 N- 또는 C-말단기에 있는 기능기에서 준비하는데, 이또한 이들이 약리학적으로 수용가능한 활성 즉, 여기에서 설명하는 복합체의 이에 상응하는 단백질의 생물학적 활성을 파괴시키지 않고, 이를 포함하는 또는 여기에서 만들어진 복합체를 포함하는 조성물에 독성을 제공하지 않는 한 본 발명의 범위에 속한다. 유도체는 화학적 잔기 예를 들면 탄수화물 또는 인산염 잔기와 같은 화학적 잔기를 가질 수 있는데, 단 조건은 동일한 생물학적 활성을 가지거나 제약학적으로 수용가능해야 한다.

예를 들면, 유도체에는 카르복실기의 지방족 에스테르, 암모니아 또는 1차 또는 2차 아민과 반응한 카르복실기의 아미드, 아실 부분(가령, 알카노일 또는 카르보사이클 아로일 기)로 만들어진 N-아실 유도체 또는 자유 아미노기 또는 아실 부분과 함께 만들어진 자유 하이드록실의 O-아실 유도체(가령, 세틸 또는 트레오닐 잔기)등이 포함된다. 이와 같은 유도체는 항원성 부분을 차단하고 체액에서 복합체 또는 이의 일부분으로 연장되는 폴리에틸렌 글리콜 측쇄가 포함될 수 있다.

"유도체"는 한 개의 아미노산이 20개의 통상 자연 발생 아미노산으로 변화되지 않은 유도체만을 포함한다.

여기에서 이용된 "염"은 카르복실기의 염과 본 발명의 복합체의 아미노기의 산첨가염 또는 이의 유사체를 모두 말하는 것이다. 카르복실기의 염은 당분야에 공지的手段으로 만들어질 수 있고, 여기에는 무기염, 가령, 나트륨, 칼슘, 암모늄, 철 또는 아연염등이 포함되고, 트리에탄올아민, 아르기닌과 같은 아민으로 만들어진 유기염기 또는 리신, 피페리딘, 프로카인 등과 같은 유기염기가 포함된다. 산 첨가 염에는 염화수소산, 황산과 같은 미네랄산염이 포함되고, 아세트산 또는 옥살산과 같은 유기산염이 포함된다. 물론 이와 같은 염의 염은 본 발명의 복합체 또는 이의 유사체에 유사한 생물학적 활성을 가진다.

여기에서 사용된 "생물학적 활성"은 다음과 같이 해석될 수 있다. 본 발명의 IFNAR2 부분이 관계되는 한, 중요한 생물학적 활성은 타입 I 인터페론에 결합하는 능력이다. 따라서, 유사체, 변이체, 염, 기능적인 유도체는 인터페론-결합 활성을 유지하는 것이어야 한다. 이는 통상의 결합 검사 실험을 이용하여 테스트할 수 있다. 또한, IFNAR2의 단편, 이의 유사체를 이용할 수 있는데, 이들은 인터페론-결합 활성을 보유해야만 한다. 인터페론-결합 폴리펩티드의 어느쪽 단부에서 아미노산을 제거하고, 인터페론-결합 성질에 대해 생성물을 테스트하여, 단편을 바로 준비할 수 있다. 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단쪽에서 한 개 아미노산을 제거하는 공정은 공지의 것이고, 인터페론-결합 성질을 보유하는 단편을 결정하는 것도 통상의 실험만으로 가능하다.

추가로, 이와 같은 인터페론-결합 활성을 가지는 폴리펩티드는 IFNAR2, sIFNAR2, 이의 유사체, 변이체, 염, 기능적인 유도체 및 이의 단편이 될 수 있는데, 이들은 인터페론-결합 폴리펩티드에 인접하여 추가 아미노산을 가질 수 있다. 생성된 분자가 핵심 폴리펩티드의 인터페론-결합 능력을 보유하는 한, 당업자는 이와 같은 인접하는 잔기가 핵심 펩티드의 기초적이고, 새로운 특징 즉, 이의 인터페론-결합 특징에 영향을 끼치는지에 대해 통상의 실험으로 결정할 수 있다. 특정 서열을 언급할 경우에 "기본적으로 구성된다"이란 의미는 추가 인접하는 잔기가 특정 서열의 기초적이고, 신규한 특징에 영향을 주지 않으면서 존재한다는 것을 말한다. 이 용어는 특정 서열내에 치환, 결손 또는 추가된다는 것으로 이해하면 안된다.

이 명세서 및 실시예에서 IFNAR2 또는 sIFNAR2가 이용된 경우에, 이는 단지 적절한 예가 되고, IFNAR1 소단위 특히 이의 세포외 도메인이 IFNAR2에 대체될 수 있지만, 본 명세서에서는 IFNAR2라 칭한다. IFNAR1은 이것이 결합하는 인터페론과 결합하여서만 이용될 수 있다. IFNAR1은 IFN α 에 결합하는 것으로 알려져 있다. IFNAR1을 이용한 염의 복합체는 인터페론 중이고, 적절하게는 IFNAR1이 결합하는 IFN α 이다.

본 발명의 복합체의 일부인 인터페론에 있어서, 염의 유사체 또는 변이체, 염, 기능적인 유도체 또는 이의 단편에서 유지되는 생물학적 활성은 사용되는 용도에 따라 인터페론 활성이 달라진다. 대부분의 경우에, 고유 세포 표면 수용체에 결합하는 능력으로 수용체에 의해 시그널 발생을 증대할 수 있다. 따라서, 이와 같은 유사체, 유도체, 단편은 이들을 이용하기 위한 본 발명에 유용한 수용체 작용 활성을 보유해야만 한다. 다른 한편으로, 어떤 경우에는 고유 인터페론의 생물학적 활성을 방해하기 위해 수용체에서 길항 활성이 있는 분자를 가지는데 유용하다. 이와 같은 길항체는 본 발명의 복합체를 이용하여 장시간의 유익한 효과를 위해 이용될 수 있다. 인터페론의 원하지 않은 효과를 제거하기 위해 이와 같은 용도로 이용하기 위해서는 수용체에 의해 결합되어 있고, 복합체의 IFNAR 부분에 의해 결합되어 있으나, 수용체에서 고유 인터페론에 의한 시그널을 증대하지 않고, 시그널 발생을 차단하지 않는 유사체가 본 발명의 목적에 맞는 생물학적으로 활성이 있고, 이는 본 발명의 복합체에 대해 이용될 경우에 인터페론에 속한다는 것이다. 이와 같은 유사체의 염의 것이 수용체 작용 활성을 보유하는지 또는 수용체 길항 활성을 보유하는지를 직접 실험으로 결정하여, 본 발명의 용도에 이용할 수 있는지를 결정할 수 있다.

본 발명은 본 발명의 상기 복합체 및 이의 유사체를 인코딩하는 DNA 서열뿐만 아니라 적절한 진핵 또는 원핵 숙주 세포에서 발현을 시키기 위한 이와 같은 DNA 서열을 가지는 DNA 벡터에 관계한다. 재조합 단백질 발현 시스템을 이용한 이형 단백질을 다량 만드는 능력으로 다양한 치료제 가령 t-PA 및 EPO(Edington, 1995)를 개발할 수 있다. 재조합 단백질을 만들 수 있는 다양한 발현 숙주의 범위는 고유의 원핵 숙주(가령, 박테리아)(Olins, 1993)에서부터, 하등 진핵 숙주(Ratner, 1989)에서 고등 진핵 숙주 중(가령, 곤충 및 포유류 세포)(Reuveny, 1993; Reff, 1993) 범위가 된다. 이들 시스템 모두는 동일한 원리를 이용하는데, 선택된 세포형으로 관심이 있는 부분의 DNA 서열을 삽입시키고(일시적인 또는 안정된 방식으로 결합된 또는 에피솜성 요소로), 숙주 전사, 해독 및 운반 기작을 이용하여, 이형 단백질로 도입된 DNA 서열을 과다 발현시킬 수 있다(Keown, 1990).

고유 유전자 서열의 발현에 추가하여, 뉴클레오티드 수준에서 DNA를 조절하는 능력은 새롭게 조작된 서열 개발을 촉진시킬 수 있는데, 이는 천연 단백질에 기초하여, 1차 단백질 구조를 변형시킨 결과로 신규한 활성을 보유한다(Grazia, 1997).

또한, 선택된 DNA 서열을 물리적으로 연결하여, 새로운 융합 단백질로 개발할 수 있는 전사체를 만들고, 일단 별개의 단백질은 한 개의 폴리펩티드 단위로 발현된다(Ibanez, 1991). 이와 같은 융합 단백질의 활성은 다를 수 있는데, 가령 개별 단백질보다 더 강할 수 있다(Curtis, 1991).

사람 IFN β 는 포유류 Chinese hamster 난 세포(CHO)를 이용하는 생산공정에 의해 유도될 수 있다. 타입 I 인터페론은 박테리아(Utsumi, 1987), 곤충(Smith, 1983) 및 사람(Christofinis, 1981)을 포함하는 다양한 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 사람의 sIFNAR2는 CHO 숙주 세포를 이용하여 발현될 수 있다. 또는 sIFNAR2와 같은 가용성 수용체는 박테리아 발현 시스템에서 성공적으로 발현되었다(Terlizzese, 1996). 각 유전자의 DNA를 트랜스펙션 공정을 이용하여 CHO 계층으로 도입시키면 재조합 및 발현백터가 결합된다. 원하는 단백질을 발현시키는 세포를 분리시키고, 배양시켜, 단백질을 회수하고 정제하는데, 이때는 당분야에 공지된 표준 공정을 이용한다.

본 발명은 또한, 활성 성분으로 IFNAR2/IFN 복합체 또는 이의 유사체 또는 이의 혼합물 또는 이의 염 및 제약학적 수용가능한 담체, 희석제 또는 부형제로 구성된 제약학적 조성물 조성물에 관계한다. 본 발명의 제약학적 조성물로는 바이러스 질환의 치료 및 항-암 치료, 면역 조절 치료 및 다른 인터페론 및 이와 관련된 사이토킨을 이용하는 데 있어서 강화된 IFN 타입 작용을 위한 제약학적 조성물을 포함한다.

본 발명의 제약학적 조성물은 복합체 또는 이의 유사체를 생리학적으로 수용가능한 담체 또는 안정화제 또는 부형제와 혼합하여, 약형 가령 약량 바이알에서 동결건조시켜 투여할 수 있도록 제조할 수 있다. 투여 방법은 유사한 물질을 투여하는데 수용되는 방식이 될 수 있는데, 이는 치료할 질병에 따라 달라지지만, 정맥, 근육, 피하, 국소주사 또는 국소 제공 또는 주입등의 방식이 있다. 투여될 활성 화합물의 양은 투여 경로, 치료될 질환, 환자의 상태에 따라 달라진다. 가령, 국소 주사의 경우에는 정맥을 통한 주입의 경우보다 체중을 기초로 하였을 경우에 더 적은 양의 단백질을 요구한다.

자유 IFN β 는 올리고머화되는 경향이 있다. 이와 같은 경향을 억제시키기 위해, IFN β 조제물은 산성 pH를 가지는데, 이것으로 인하여, 투여하였을 경우에 일부 국소 자극의 원인이 되기도 한다. IFNAR이 IFN β 에 대해 안정화 인자로 작용하면, 올리고머화되는 것을 방지할 수 있고, IFN β 조제에 이를 이용하면, IFN β 를 안정화시켜, 산성 조제물의 필수성을 피할 수 있다. 따라서, IFN β 및 IFNAR을 포함하고, 다른 통상의 제약학적으로 수용 가능한 부형제를 포함하는 비-산성 제약학적 조성물 또한 본 발명의 일부분이 된다.

본 발명은 또한, 본 발명의 복합체, 이의 유사체, 이의 혼합물을 항-바이러스, 항-암, 면역 조절 치료에 이용하는 것에 관계한다. 특히, 본 발명의 인터페론 수용체-인터페론 복합체는 만성 육아종 질환, 첨규 습우, 청소년 후두 유두종증, 간염 A, 간염 B와 C에 만성 간염등의 치료에 항-바이러스 치료법으로 이용할 수 있다.

특히, 본 발명의 인터페론 수용체-인터페론 복합체는 모(毛) 세포 백혈병, 카포시 육종, 다발성 골수종, 만성 뇌척수 백혈병, 비-호지킨스 임파종 및 흑색종과 같은 질환에 항-암 치료법으로 이용될 수 있다.

본 발명의 인터페론 수용체-인터페론 복합체는 다발성 경색, 류마티스 관절염, 위마비성중증성근무력증, 당뇨병, AIDS, 낭창등의 면역 조절 요법에 이용될 수 있다.

유사하게, 본 발명은 상기 언급한 질환을 치료하는 약물을 제조하는데 또는 상기 징후를 치료하는 약물을 준비하는데 복합체, 이의 유사체 또는 이의 혼합물을 이용할 수 있다.

본 발명은 또한 첨부 도면과 함께 다음의 실시예에서 좀더 구체적으로 설명할 수 있다.

실시예

재료 및 방법

항-바이러스성 WISH 생검 및 복합체 생성

WISH 검사는 Novick et al.,(1982)의 프로토콜에 기초하여 개발되었다.

재료

- ▶ WISH 세포(ATCC CCL 25)
- ▶ -70°C에 저장된 수포성 내구염 바이러스(ATCC V-520-001-522) 주(株)
- ▶ IFN β 사람 재조합 InterPharm Laboratories LTD 90 $\times 10^6$ IU/ml, 특이 활성: 264.5 $\times 10^6$ IU/mg
- ▶ 가용성 사람 IFNAR2, PBS에서 주의 농도는 373 $\mu\text{g/ml}$
- ▶ WISH 성장 배지(MEM 고농도의 당+ Earls 염 + 10% FBS + 1.0% L-글루타민 + 페니실린/스트렙토마이신(100 U/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$),
- ▶ WISH 검사 배지(MEM 고농도의 당+ Earls 염 + 5% FBS + 1.0% L-글루타민 + 페니실린/스트렙토마이신(100 U/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$), MTT 5 mg/ml PBS), -70°C에 저장.

방법

- ▶ WISH 검사 배지에 재조합 사람 IFN β 를 19IU/ml(예정된 EC₅₀ 약량의 4배)로 희석한다
- ▶ 90 $\mu\text{g/ml}$ 에서 시작하여, WISH 검사 배지에서 Eppendorf 튜브내에 세배 희석된 사람 재조합 sIFNAR2를 11개를 만든다. 12번째 튜브에는 WISH 검사 배지만 포함하고 있다.
- ▶ 편평한 바닥으로 된 96웰 플레이트상의 각 웰에 25 μl IFN β 를 첨가한다(IFN β 없이 IFNAR2 효과를 조절하기 위해 한 개 3X12 웰 부분에만 25 μl WISH 검사 배지를 첨가한다).
- ▶ 96-웰 플레이트의 12줄 아래에 3회씩 sIFNAR2 희석물(또는 12번째 줄에만 검사 배지를 첨가) 각 25 μl 를 첨가.
- ▶ WISH 세포를 첨가하기 전에, 37°C 배양기에서 1-4시간동안 sIFNAR2로 IFN β 를 선배양시킨다.
- ▶ 로그 상태로 성장된 WISH 세포를 트립신/EDTA 용액을 이용하여 수득하고, WISH 검사 배지에서 세척하여, 최종 농도가 0.8 $\times 10^6$ 세포/ml이 되도록 한다.
- ▶ 각 웰에 50 μl WISH 세포 현탁액(4 $\times 10^4$ 세포/웰)을 첨가한다. 최종 농도의 IFN β 및 IFNAR2를 세포에 노출시켜, IFN β 의 최종 농도가 4.75IU/ml(1X)이 되게 하고, 첫째 줄에 있는 sIFNAR2의 최종 농도는 22.5 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 한다.
- ▶ 5% CO₂습식 배양기에서 24시간 동안 배양한 후에, 50 μl 1:10 희석물(WISH 검사 배지) VSV 주(48시간이내에 100% WISH 세포를 용해시키는데 결정된 양)을 모든 웰에 첨가하는데 단 바이러스가 없는 기준 웰은 제외한다(이들은 동량의 검사 배지만을 제공받는다).
- ▶ 추가 48 시간 배양 후에, 25 μl MTT 용액을 모든 웰에 첨가하고, 플레이트는 배양기에서 추가 2시간 동안 배양한다.
- ▶ 플레이트를 뒤집어서 웰의 내용물을 버리고, 200 μl 100% 에탄올을 웰에 첨가한다.
- ▶ 1시간 후에, 플레이트는 Soft max Pro 소프트웨어 패키지 및 Spectramax 분광광도계 시스템(Molecular Devices)을 이용하여 595nm에서 읽는다.

모든 서열 반응은 ThermoSequenase™

방사능라벨된 종료물질 사이클 서열화 키트(Amersham Life Science; Cleveland, OH)를 이용하여 실행하였다. 제조업자가 공급하는 프로토콜을 이용하였다. 모든 서열화 반응은 6% 폴리아크릴아미드 및 7M 요소를 포함하는 CastAway™

Precast 서열화 켈(Stratagene; LaJolla, CA)에서 분석하였다. 서열 반응은 A-C-G-T 순서로 적하시킨다. 서열화 켈의 자가방사사진은 수작업으로 읽는다. DNA 서열 분석에는 Genetics Computer Group Sequence Analysis Software Package 및 UNIX 워크스테이션을 이용한다.

실시예 1

사람의 IFNAR2/IFN β 복합체 및 IFNAR2Ig-IFN β 복합체의 항-바이러스 활성을 평가하기 위해, 고정된 농도의 IFN β (4.75 IU/ml)를 3시간 동안 37°C에서 다양한 농도(0.25-30000 ng/ml)의 사람 sIFNAR2(재조합 p40) 또는 사람 IFNAR2Ig와 선배양시킨 다음, WISH-VSV 세포변성 효과 검사를 실시한다. IFN 없는 경우에, 항-바이러스 보호효과가 관찰되지는 않는다(테이타는 나타내지 않음).

대략 30ng/ml sIFNAR2 존재하에서, 타입 I 인터페론(예정된 EC₅₀ 농도에서 이용된)의 항-바이러스 활성이 IFN β 와 함께 의 경우에 최적으로 나타났으나, 단독으로는 나타나지 않는다. 항-바이러스 활성은 VSV 도전 후에 48시간에 MTT 전환으로 측정할 수 있다.

예측된 ED₅₀ 농도에서 IFN이 있는 경우에, 보호효과를 관찰할 수 있다(도 1; 0.45에 상응하는 흡수, 보호가 안되는 경우에 흡수도는 ~0.0이 되고, 완전하게 보호되는 경우에 ~1.8이 됨). IFNAR2 또는 IFNAR2Ig를 다양한 농도에서 역가를 측정하였을 경우에, IFN β 활성이 32ng/ml의 IFNAR2 및 IFNAR2Ig까지 ~4X 강화되었다(실시예 2 및 도 2 참고). 32ng/ml IFNAR 또는 IFNAR2Ig 이상에서, IFN β 활성은 예상한 것과 같이 감소되었는데 이는 아마도 sIFNAR의 IFN β 와 막에 있는 IFNAR와 경쟁하기 때문일 것이다. 따라서, 이 실험으로 IFNAR2/IFN 복합체에서 IFN β 능력의 증가 및 활성이 강화되었다는 것을 알 수 있다.

실시예 2

ED₅₀에 추가하여, 상이한 IFN β 농도에서, sIFNAR2/IFN 복합체 활성에서, IFN β 의 농도를 달리하였을 경우에 효과를 검사하였다. 도 2에서 볼 수 있는 것과 같이 4.75IU/ml IFN β 농도에서, IFNAR2를 1시간 동안 선배양하였을 경우에, 최대 ~32ng/ml 농도에서 IFN β 활성이 약~2X배 증가되었다. 각각 더 높은 농도의 IFN β 에서, 활성이 이미 최대가 되었기 때문에 IFN β 항-바이러스 활성이 강화되었다는 것을 감지하는 것은 불가능하였다. 이와 같은 결과는 IFNAR2/IFN β 복합체가 IFN 활성을 강화시킨다는 내용을 뒷받침해 주는 것이다.

실시예 3

다양한 농도의 IFNAR2로 다양한 시간대에서 IFN β (0.95 IU/ml)의 준-효과 농도의 항-바이러스 활성을 평가함으로써, IFNAR2/IFN β 복합체 형성의 역학을 검사하였다. 도 3에서 볼 수 있는 것과 같이 이와 같은 준-효과 약량에서 IFN β 의 항-바이러스 활성을 강화시키기 위해서는 4시간의 선-배양이 필수적이다. 따라서, 이들 자체에 의해 비활성화되는 IFN β 수준에서, IFNAR2를 첨가하면, 상당한 IFN 항-바이러스 활성을 가지는 복합체를 만들 수 있다. 이와 같은 실험으로 IFNAR2/IFN β 복합체가 IFN 활성을 강화시킨다는 것을 추가로 뒷받침할 수 있다.

실시예 4

37°C에서 *in vitro* 재구성 후에(생리학적 염 완충액 pH 7.4) IFN β 활성이 급격하게 감소되었다. 적어도 부분적으로 IFN β 올리고머 구조가 형성되어 활성이 감소되었기 때문이다. IFNAR2가 생리학적 pH에서 안정성을 강화시키는지 확인하기 위해, 실험을 실시하였는데, 이때 다양한 농도의 IFN β 를 단독으로(RPMI 1640 배지, Gibco) 또는 동일한 배지에 IFNAR2에 대한 IFN β 의 비율이 일정한 상태(2.5 ng/IU)에서 IFNAR2 존재하에 배양하였다.

IFN β (500 IU/ml)를 동량의 sIFNAR2(1.25 μ g/ml) 또는 RPMI만으로 3시간 동안 37°C에서 선-배양시켰다. 두 IFN β 용액에서의 역가 측정을 실시하였는데, 이때 WISH 세포를 첨가시키기 전에 96-웰 플레이트에서 WISH 검사 배지에서 실시한다. VSV를 24시간 후에 첨가하고, 추가 48시간 배양후에 MTT 전환으로 검사하였다.

도 4에서 볼 수 있는 것과 같이 IFN β 단독의 경우에, ED₅₀은 ~104IU/ml이고, 가용성 IFNAR2와 함께 IFN β 를 선-배양한 경우에는 ED₅₀ = ~7IU/ml가 되어 상당히 강화되었다. 이와 같은 IFN β 의 높은 ED₅₀은 용액에서 IFN β 의 올리고머화반응 때문일 것이다. 상기 결과에서 IFNAR2와 복합되었을 때, IFN β 의 안정성이 강화되었다는 것을 다시 한번 보여준다.

실시예 5

IFNAR2 존재하에서, IFN β 의 활성 강화가 IFNAR2의 특이적인 보호때문인지를 확인하기 위해, IFNAR2와 복합화 또는 동일 농도의 다른 무관한 단백질(사람 IgG, 소 혈청 알부민(BSA))과 복합화시켜, IFN β 의 활성을 평가하였다.

도 5에서 볼 수 있는 것과 같이, IFN β (500IU/ml)는 동양의 지적인 단백질(1.25 μ g/ml) 또는 RPMI만으로 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 선-배양시켰다. WISH 검사 배지에서 이와 같은 IFN β 용액의 역가는 WISH 세포를 첨가시키기 전에 96-웰 플레이트에서 실행하였다. 새로 준비된 IFN β 는 IFN β 활성에서 선-배양의 효과를 평가하기 위해 포함된다. 24시간 후에 VSV를 첨가하고, CPE는 추가 48시간 배양한 후에 MTT 전환을 평가하여 측정하였다.

비-특이적인 단백질(가령, BSA 또는 사람 IgG) 2.5ng/IU IFN β 에서 IFN β 와 선-배양하여도 재구성 후에, IFN β 의 보호 효과가 나타나지는 않았다. 이 검사에서 IFNAR2/IFN β 복합체의 활성은 새로 첨가된 IFN β 와 유사하였는데, 이는 sIFNAR2가 IFN β 활성을 안정화시킨다는 발견을 뒷받침해주는 것이다.

실시예 6

IFNAR2/IFN β 복합체는 ELISA 및 생검 분석에서 생쥐에서 IFN β 의 상당히 연장된 약리학 프로파일을 보여주었다(도 6과 7).

B6D2F1 군주 생쥐에 사람 IFN β (2.5 \times 10⁶ IU/kg) EH는 사람 IFNAR2 (2.5 ng/IU IFN)로 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 선-배양된 동일한 농도의 IFN β 를 1회 정맥내 환약 주사를 하였다. 투여후 0.05 내지 48시간에 혈청은 안와후반 총으로부터 혈청을 수집하고, IFN β 농도 및 IFN β 항-바이러스 활성은 ELISA(도 6) 또는 WISH 생검(도 7)을 이용하여 검사하였다. ELISA 검사에서 검사 감응도(7.55 IU/ml)이하의 혈청 농도는 플롯팅을 하지 않았다.

복합체는 상당히 연장된 약리학 프로파일을 제공할 뿐만 아니라, WISH 항-바이러스 검사에서, 생쥐에 생물학적 IFN β 활성의 수준이 시간에 따라 상당히 강화되었음을 볼 수 있고, 이는 IFN β 단독에 대해 본 발명의 IFNAR2/IFN β 복합체의 혈장 반감기가 상당히 연장되고, 안정성도 강화되었음을 나타낸다.

실시예 7

IFNAR2/IFN α 2a 복합체는 ELISA 및 생검 테스트에 기초하면(도 8, 9), 생쥐에서 IFN α 2a의 약리학 프로파일이 상당히 연장되었음을 알 수 있다.

B6D2F1 군주 생쥐에 사람 IFN α (1.25 \times 10⁶ IU/kg) 또는 사람 IFNAR2 (2.5 ng/IU IFN)로 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 선-배양된 동일한 농도의 IFN α 를 1회 정맥내 환약 주사를 하였다. 투여후 0.05 내지 48시간에 혈청은 안와후반 총으로부터 혈청을 수집하고, IFN α 2a농도 및 IFN α 항-바이러스 활성은 ELISA(도 8) 또는 WISH 생검(도 9)을 이용하여 검사하였다.

IFN α 는 사람의 IFN α 에 특이인 ELISA를 이용하여 평가하였다. ELISA 검사에서 검사 감응도(30IU/ml)이하의 혈청 농도는 플롯팅을 하지 않았다.

복합체는 상당히 연장된 약리학 프로파일을 제공할 뿐만 아니라, WISH 항-바이러스 검사에서, 생쥐에 생물학적 IFN α 활성의 수준이 시간에 따라 상당히 강화되었음을 볼 수 있고, 이는 IFN α 단독에 대해 본 발명의 IFNAR2/IFN 복합체의 혈장 반감기가 상당히 연장되고, 안정성도 강화되었음을 나타낸다.

실시예 8

IFNAR2/IFN 융합 단백질의 조작

구조를 조작하여, IFNAR2 세포의 도메인의 C-말단이 성숙한 IFN의 N-말단에 융합시키는데, 이때 다음의 펩티드 링커를 이용하고, 이때 G와 S는 각각 아미노산 글리신 및 세린을 나타낸다.

IFNAR2 세포외(링커) 성숙한 IFN β

...ESEFS (GGGS)_nMSY...

이때, n=0(서열:5), 1(서열:7), 2(서열:6), 3(서열:5), 4(서열:4), 5(서열:3)을 나타낸다.

n=2인 경우에 IFNAR2/IFNβ융합체의 전체 아미노산을 도 10(서열:14)에 나타내었다.

사람의 재조합 IFN을 발현시키는 유전자를 포함하는 발현벡터 pSVEIF를 PCR의 주형으로 이용하였다. 합성 프라이머를 고안하여, 사람의 IFN(MSY...)의 성숙한 단백질 코딩 부분만 주형으로부터 증폭될 수 있도록 한다. 5' 프라이머는 절단된 SmaI 부위의 서열, IFNAR2의 마지막 7개 아미노산(GQESEFS)(서열 14의 잔기 344-349) 및 (GGGS)₁(서열:1) 링커로 구성된다. BamHI 및 XhoI 부위 또한 5' PCR 프라이머로 도입되어 다른 카세트의 클로닝을 실행시킨다. 3' 프라이머에는 hIFNβ의 TGA 정지 코돈 다음에 바로 Avr II 부위를 포함한다. PCR에는 약 1g의 주형 DNA, 1g의 각 PCR 프라이머, 0.2mM의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 및 1X ThermoPol 반응 완충액(10mM KCl, 20mM Tris-HCl(pH8.8 25°C), 10mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100; New England Biolabs; Beverly, MA) 및 3mM MgSO₄ (5 mM MgSO₄ 최종 농도)가 100μl 반응 용적에 포함된다. 30초간 99.9°C에서 VENTR^R 초기 배양 후에, 반응에 2Unit의 VENTR² DNA 폴리메라제를 첨가한다. PCR은 다음의 20 사이클로 구성된다; (a) 99.9°C에서 30초간, (b) 65°C-55°C에서 30초간, 각 사이클에서 0.5°C씩 감소; (c) 75°C에서 40초간. 추가 15 사이클을 상기 프로파일과 같이 실시하나, 단 어닐링 온도는 55°C에서 실시한다. PCR 반응은 WizardTM PCR Preps DNA 정제 시스템(Promega; Madison, WI)을 이용하여 정제하였다. PCR 생성물을 Avr II로 절단한 후에, 반응물은 낮은 용융점 아가로스 겔상에서 정제하였다. hIFNβ성숙한 단백질 서열과 1개 GS 링커를 가지는 겔에 의해 정제된 단편을 (Sma I + Avr II)-절단된 발현벡터 pCMV-p40에 결합시키는데, 이때 이 발현벡터는 가용성 형태의 사람의 재조합 IFNAR2에 대한 코딩 유전자를 포함한다. 결합 반응을 이용하여, 컴피턴트 대장균(*E. coli*) XL-1 Blue 세포를 형질변환시키는데, 이때는 표준 방법을 이용한다(Sambrook et al, 1989). pCMV-IFNAR2/IFNβGS라고 불리는 구조가 정확하게 어셈블리되었는지는 제한효소 엔도뉴클라아제 절단 및 "Interfusion"의 PCR의해 발생된 부분을 서열화시켜 확인할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 카세트를 이용하여 그 다음 구조를 조작하는데, 각 카세트에는 BamHI overhang, 적절한 (GGGS)_n 링커(서열:1 이때 n=1) 및 XhoI overhang을 포함한다. 0 GS 카세트에는 Sma I 및 Xho I overhang을 포함한다. pCMV-IFNAR2/IFNβ 1 GS 벡터의 모양을 확인한 후에, BamHI 및 XhoI 으로 절단한 후에, 적절한 카세트를 이 벡터에 결합시킨다. 0 GS 구조체의 경우에, 벡터는 카세트의 결합을 위해 SmaI 및 XhoI으로 절단한다.

총 6개 벡터가 만들어지는데, pCMV-IFNAR2/IFNβn(GS) 이때, n은 0,1,2,3,4, 5개의 GGGGS(서열:1) 링커 단위를 나타낸다. 도 11에서는 이들 제한효소 절단 결과를 나타낸다. 서열용 프라이머를 고안하여, 각 구조에 대한 카세트를 완전하게 서열화시킨다. 시판되는 키트 및 제조업자가 설명하는 프로토콜에 따라 확인된 구조 각각에 대해, 대규모 플라스미드 DNA 배양물을 준비한다(Qiagen; Chatsworth, CA).

도 12에서는 pCMV-IFNAR2/IFNβ"Interfusion" 발현벡터의 대표적인 플라스미드 유전자 지도를 나타낸다. 사람의 초기 즉각 CMV 프로모터에 의해 IFNAR2/IFNβ융합 단백질을 전사한다. 벡터에 의해 제공되는 사람 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 반응 시그널 서열을 이용하여, IFNAR2/IFNβ전사체의 3' 프로세싱을 실시한다.

벡터 리스트

번호 이름 실험벡터 GGGGS(서열 1)링커

1 pCMV-IFNAR2-IFNβ, 0GS pCMV.PA4 N/A

2 pCMV-IFNAR2-IFNβ, 1GS pCMV.PA4 1개

3 pCMV-IFNAR2-IFNβ, 2GS pCMV.PA4 2개

4 pCMV-IFNAR2-IFNβ, 3GS pCMV.PA4 3개

5 pCMV-IFNAR2-IFNβ, 4GS pCMV.PA5 4개

6 pCMV-IFNAR2-IFN β , 5GS pCMV.PA4 5개

IFNAR2/IFN β 1GS 융합체의 PCR에 의해 생성된 부분에 대한 서열 정보를 얻었다; 이 데이터에서는 예상한 것과 같은 서열이 나타났다. 다른 구조에 대한 펩티드 링커 부분에 대한 서열 데이터를 얻었다. 이 서열 또는 예상한 것과 같았다.

각 구조체로 트랜스펙트된 세포에서 노던 블랏 분석을 실행하였다. IFNAR2 프로브 및 IFN β 프로브 모두에서 IFNAR2/IFN β n GS를 포함하는 모든 라인에서 크기가 약 1.4kb인 밴드가 나타났다. IFN β 프로브의 경우에 약 0.9kb의 추가 밴드가 관찰되었다. 이 밴드의 크기는 IFNAR2의 마지막 6개 아미노산, (n) GS 펩티드 링커, hIFN 성숙한 단백질 코딩 서열을 포함하는 또 다른 접합된 전사체에 상응하는 것이다. 실시예 9의 일시적으로 트랜스펙트된 CHO 세포로부터 분리된 총 RNA에서 준비된 cDNA를 서열화시키면 이를 확인할 수 있다.

실시예 9

일시적인 트랜스펙션

CHO-DUKX 세포는 디하이드로폴레이트 환원효소 활성이 부족한 Chinese hamster 세포의 돌연변이 클론이다(Urlaub et al (1980); Graff et al (1982)). 세포는 Alpha Minimum Essential Medium(aMEM)+ 리보뉴클레오시드 및 데옥시리보뉴클레오시드+ 10% 태아 송아지 혈청(FBS)+ 1% L-글루타민(완전 배지)상에서 유지시킨다. 일시적인 트랜스펙션은 리포펙타민 PLUSTM 시약(GibcoBRL Life Technologies; Gaithersburg, MD)을 이용하고, 제조업자가 제공하는 프로토콜을 이용하여 실시한다. 트랜스펙션 전 약 24시간에 세포는 100mm 직경의 접시에 밀도를 접시당 2×10^6 세포가 되도록 도말시킨다. 트랜스펙션의 경우에, 4 μ g의 슈퍼코일된 벡터 플라스미드 DNA(pCMV-IFNAR2/IFN n GS, 이때 n=0, 1, 2, 3, 4, 5)을 이용한다. 제조업자가 제공하는 무혈청 배지를 이용하여, DNA와 PLUS 시약을 희석시킨다. ELISAs (IFNAR2, IFN β) 및 웨스턴 젤을 위해 완전 배지에서 37 $^{\circ}$ C, 48시간동안 배양시킨 후에, 세포 상청액을 수집하였다.

RNA 추출 및 노던 분석

일시적으로 트랜스펙트된 CHO-DUKX 세포로부터 총 세포 RNA(Chomczynski et al, 1987)를 추출하였다. 라인당 10g 총 RNA를 변성제로 포름알데히드를 포함하는 아가로즈 겔상에서 크기에 따라 분리한다. 샘플은 이중으로 로딩한다. RNA는 GeneScreen과 나일론 막으로 옮기는데(DuPont/NEN Medical Products; Boston, MA) capillary 블랏을 이용하고, 10 X SSC(1.5M 염화 나트륨, 0.15M 구연산 나트륨)에서 실시한다. 고정된 RNA를 ³²p-라벨된 hIFNAR2 및 hIFN β PCR 단편을 포함하는 용액(Church and Gilbert (1984)의 것을 변형한 용액)에서 하이브리드시킨다. 완충액에는 0.25M 인산 나트륨, pH7.2, 0.25M 염화 나트륨, 7% 도데실 황산 나트륨(SDS), 1mM 에틸렌디아민테트라아세트산, 100 μ g/ml *E. coli* tRNA를 포함한다. ³²p-라벨된 프로브는 통상의 시판되는 키트("High Prime" Boehringer Mannheim; Indianapolis, IN) 및 여기에 설명된 과정을 이용하여 만든다. Sephadex G-50 컬럼상에서 크로마토그래피에 의해 비-결합된 방사능활성을 제거한다. 하이브리드 반응 후에, 블랏을 세척하고, 이용된 가장 스트린전트한 조건은 0.2 X SSC, 0.1% SDS, 65 $^{\circ}$ C이다. 블랏은 자가방사선사진을 찍는다.

Interfusion 단백질의 발현

각각 IFNAR2 특이적인 ELISA 및 IFN β ELISA(Toray)을 이용하여 IFNAR2 및 IFN β 발현 수준에 대해 CHO 세포로 일시적으로 트랜스펙트된 Interfusion 구조체 각각의 상청액을 분석하였다. 이 분석 결과는 다음의 표 4에 나타내었다.

[표 4]

CHO 세포에 트랜스펙션된 Interfusion 구조체

Sample Identification	[hIFNβ] [†] , (U/ml)	[hIFNAR2] [†] , (ng/ml)	[hIFNβ] [‡] , (μg/ml)	[hIFNβ] [§] , (pmols)	[hIFNAR2] [§] , (pmols)	IFN/IFNAR
0GS	29,175	1094	0.146	6.571	31.802	0.207
1GS	24,906	994	0.125	5.609	28.895	0.194
2GS	13,597	600	0.068	3.063	17.442	0.175
3GS	14,998	718	0.075	3.378	20.857	0.162
4GS	9,998	535	0.050	2.251	15.538	0.145
5GS	9,597	540	0.048	2.161	15.698	0.138
IFNAR2	Not Found	1176			34.200	
Culture Medium	Not Found	0				

* TORAY 키트를 이용하여 결정함

† hIFNAR2 ELISA를 이용하여 결정함

‡ 2.0X10⁵ U/mg(2X10⁸/mg)의 특이 활성을 기초함

#22,200 달톤에 기초함(hIFNβ의 MALDI-TOF 분석에 의한 평균 질량)

§ 34,400 달톤에 기초함(hIFNβ의 MALDI-TOF 분석에 의한 평균 질량)

상기에서 볼 수 있는 것과 같이, 링커의 길이가 증가할수록 감지가능한 IFNAR2 및 IFNβ가 감소된다는 것을 알 수 있다. 이때, 이 것이 링커의 길이가 증가함에 따라 발현된 Interfusion 단백질의 양이 감소되기 때문인지 또는 링커의 길이가 증가하기 때문인지는 밝히는 것이 불가능하고, IFNβ가 IFNAR2 결합 부위에 결합할 수 있기 때문에, ELISA 검사에서 완전하게 감지되지 않는다는 IFNβ검사에서는 비-복합된 만을 감지하는 것으로 알려져 있다.

IFNAR2/IFNβ융합 단백질의 웨스턴 블랏 분석

Interfusion 단백질이 적절한 분자량으로 발현되는지 그리고 자유 IFNβ가 발현되지 않는지를 확인하기 위해, 트랜스펙트된 세포의 상청액을 웨스턴 블랏으로 분석하는데 이때는 Interfusion을 감지하기 위해 항-IFNβ항체를 이용한다. 이 분석 결과는 도 13에 나타내었다.

IFNAR2/IFNβ구조체(라인 1-6) 또는 IFNAR2 구조체(라인 7), 배양 배지(라인 8) 또는 IFNβ(라인 9)로 일시적으로 트랜스펙트된 CHO 세포의 배양 상청액 15μl을 비-변성 조건에서 SDS-PAGE를 하고, 그 다음 전기 전달에 의해 PVDF 막으로 옮긴다. 막은 토끼의 항-IFNβ항체로 프로브시키고, Western-Stage 발광 감지 키트를 이용하여 알칼리 포스포타제 공액된 염소 항-토끼로 발생시킨다.

임의 Interfusion 구조체의 상청액에서는 자유 IFNβ가 감지되지 않는다는 유사하게, 웨스턴 블랏에 의하면, 각 구조체에서는 각 Interfusion 구조체에 대해 발현된 단백질은 적절한 MW을 가진다.

실시예 10

Interfusion 분자의 항-바이러스 활성

배양물 상청액을 포함하는 각 Interfusion은 세포 변성 검사에서 항-바이러스 활성에 대해 테스트하는데, 이때 WISH 세포(사람의 양막 세포)를 IFNβ(기준) 또는 Interfusion 첨가후에 VSV에 노출시킨다. 그 결과는 도 14에 나타내었다.

발현된 재조합 단백질(ELISA 및 웨스턴 블랏에 의해 감지됨) 또는 CHO 배양 배지만을 포함하는 CHO 세포 상청액은 이 중으로 웰당 75μl 용적으로 96-웰의 바닥이 편평한 조직 배양 플레이트의 상층 줄에 첨가한다. 50μl WISH 세포 검사 배

지를 플레이트의 나머지 웰에 첨가한다. 각 샘플을 3배 연속적으로 희석시키는데, 상청액을 포함하는 웰에서(윗줄) 25 μ l 을 빼내어, 50 μ l의 WISH 검사 배지를 포함하는 그 다음 줄에 첨가하면 희석이 된다. 양성 기준 웰에서, 윗줄의 상청액은 1000 IU/ml 사람 IFN β 를 포함하는 WISH 검사 배지로 대체하는데, 이는 플레이트의 길이로 아래에서 연속적으로 3배 희석하는 것과 같다. 그 다음 각 웰에는 50 μ l WISH세포 현탁액(0.6 \times 10⁶ cells/ml WISH 검사 배지)를 넣고, REBIF^R을 포함하는 윗줄에서 최종 농도가 500IU/ml이 되도록 하고, CHO 세포 현탁액에 있어서, 시작 희석비는 1:2이다. 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후에, 각 웰(단 감염안된 기준 웰로 지정된 것은 제외)에는 50 μ l WISH 검사 배지(수포성 구내염 바이러스(원액의 1:10)을 포함)를 넣는다. WISH 세포의 생존은 배양물을 추가 48시간 배양 후에, MTT 전환으로 측정한다.

정제된 사람의 IFN β 표준에서 결정된 EC₅₀ 것에 대해 EC₅₀을 얻는데 필수적인 상청액의 희석 인자를 표준화시켜, Interfusion 분자에 의해 증개되는 항-바이러스 활성을 결정한다. 링커의 길이가 증가되면, Interfusion 구조체의 항-바이러스 활성도 증가된다.

실시예 11

이 실시예에서는 정맥으로 투여하였을 경우에 사람의 IFN β /sIFNAR2 복합체의 약리학 연구에 관한 것이다. 미리 준비된 그리고 별도로 주사한 복합체 성분사이에서 비교를 한다. 36마리의 D2F1 주 생쥐(주령이 6-8주)(각 20g)을 다음의 4군으로 분리하였다;

집단 1에는 50,000IU/ml 사람 IFN β (최종 약량이 생쥐 한 마리당10,000IU) 용액 200 μ l를 1회 알약으로 정맥으로 주사받은 생쥐가 포함된다.

집단 2에는 50,000 IU/ml 사람 IFN β 및 125mg/ml sIFNAR2(2.5ng/IU 비율) 용액 200 μ l을 제공받은 9마리 생쥐가 포함된다.

집단 3에는 (1) 200 μ l의 125mg/ml 용액 (2)50,000IU/ml 사람 IFN β (2.5 ng/IU 비율) 용액 200ml을 제공받은 9마리 생쥐가 포함된다.

집단 4에는 (1) 200 μ l의 625mg/ml 용액 (2)50,000IU/ml 사람 IFN β (10 ng/IU 비율) 용액 200ml을 제공받은 9마리 생쥐가 포함된다.

모세관을 이용하여, 후측 안구중으로부터 특정 시간에 혈액 샘플(약 200 μ l)을 수집하였다. 각 군에서 3마리 생쥐는 투여 후에, 0.05, 2, 12시간에 취한 샘플을 가진다. 각 군에서 3마리 생쥐는 투여 후에 0.54 및 24시간에 취한 혈액 샘플을 가지고, 각 군의 3마리 생쥐는 투여 후에 1, 8, 48시간에 취한 혈액 샘플을 가진다. 혈액 샘플은 실온에서 1시간 가량 방치하여 덩어리가 지도록 하고, 마야크로원심분리한다. 이로부터 제거한 혈청은 다른 모든 샘플이 수집될 때 까지 -70 $^{\circ}$ C에 저장한다. Toray 사람 IFN β ELISA kit(TFB, Inc.)를 이용하여 IFN β 에 특이적인 ELISA을 이용하여 사람의 IFN β 가 존재하는지를 검사하고, WISH 항바이러스 검사를 이용하여 생활성을 검사하였다.

IFN β 특이적인 ELISA 검사 결과를 도 15A에 나타내었고, WISH 항바이러스 검사 결과는 도 15B에 나타내었다.

IFNAR 복합체로써 주사하였을 경우에 IFN β 의 반감기는 별도의 IFNAR 주사후에 주사된 IFN β 의 것과 유사하다는 것을 볼 수 있다. 이와 같은 결과는 반감기가 강화된 IFN β /IFNAR2 복합체의 *in vivo* 형성과 일치한다.

실시예 12

C57BL/6 생쥐는 "보편적인" IFN(사람IFN α /D) 및 sIFNAR2 복합체로 처리하였다. 세포독성에 대한 보호 효과는 보편적인 IFN 단독으로 또는 기준을 다양한 약량으로 투여한 것과 비교할 수 있다. 제 1 집단에는 5 \times 10³ IU 보편적인 IFN(5/ng IU sIFNAR2와 복합을 이룬)을 제공하였다. 제 2 집단에는 5 \times 10³ IU 보편적인 IFN을 제공하였다. 제 3 집단에는 5 \times 10⁴ IU 보편적인 IFN을 제공하였고, 제 5 집단에는 PBS/2% NMS를 제공하였다. 각 생쥐에 있어서, NK 활성은 NK표적 세포인 YAC-1에 대해서 비장 세포의 세포독성으로 측정하였다. 도 16에서 그 결과를 나타내었다. 보편적인 IFN만으로 처리된 생쥐와 비교하였을 때 보편적인 IFN/sIFNAR2 복합체로 처리된 생쥐에서 NK 활성이 상당히 높았다.

실시예 13

상기에서 지적한 것과 같이, 약리학 연구에 따르면, IFN 수용체 소단위의 가용성 형태인 sIFNAR2와 복합하여 투여하였을 경우에, 타입 I IFNs의 혈청 반감기는 극적으로 강화된다는 것이다. *In vitro* 결과에 따르면, IFNAR2와 물리적으로 연합된 경우에는 보통은 화학적으로 불안정한 IFN을 안정화시킨다는 것이다. 강화된 PK 프로파일 및 IFNAR2의 안정화 효과가 *in vivo*에서 IFN 중개된 효과의 강화 및 연장의 원인이 되는지를 결정하기 위해, 모델을 개발하였는데, 심각한 면역결핍 합병증(*scid/scid*)이 있는 생쥐에, 치사량의 IFN-감응성 Daudi 사람 B 세포 임파종 세포주(Ghetie, 1991; Ghetie, 1990)의 도전을 받게한다. 이 생쥐는 확산된 임파종의 조직학적 증거와 관계하여 중앙 세포 주사후에 14-20일 사이에 마비가 일어난다. 분명한 것은 매일 사람의 IFN β 를 피하로 투여하여 약량에 따라 이들 생쥐의 생존이 연장될 수 있다는 것이다. 이 모델을 이용하여, *in vivo*에서 타입 I IFNs과 연합된 생물학적 활성의 강화물질로의 IFNAR2을 평가할 수 있다.

Daudi Scid 모델에서 마비와 IFN β 약량사이의 평균 시간관계를 정립하기 위해, 5마리 BALB/cByJSmn-*scid/scid* 균주 생쥐(주령이 4-5주, 암컷) 5군에 0일부터 30일까지 매일 사람의 IFN β 를 하루에 생쥐 한 마리당 200 μ l씩 투여한다. 냉동된 원주에서 확장된 표준 Daudi 세포 약량은 0일째에 PBS를 이용하여 목에 생쥐 한 마리당 5 \times 10⁶세포가 된다. 생쥐 군은 다음의 IFN을 제공받았다.

Group 1: 135 \times 10⁴ IU/mouse (675 \times 10⁴ IU/ml)

Group 2: 45 \times 10⁴ IU/mouse (225 \times 10⁴ IU/ml)

Group 3: 15 \times 10⁴ IU/mouse (75 \times 10⁴ IU/ml)

Group 4: 5 \times 10⁴ IU/mouse (25 \times 10⁴ IU/ml)

Group 5: PBS with 2% NMS

개별적인 마비 시간 및 평균 치는 표 5에 나타내었다.

[표 5]

개별적인 마비 시간 및 평균 치

	마비되는 일수	평균(\pm SD)
Group 1	26, 31, 35, 37, 40	33.8 (5.4)
Group 2	20, 23, 23, 23, 26	23.0 (2.1)
Group 3	20, 20, 22, 22, 23	21.4 (1.3)
Group 4	17, 18, 18, 18, 18	17.8 (0.5)
Group 5	14, 14, 15, 15, 15	14.6 (0.6)

Daudi/Scid 이형이식편 모델에서 마비까지의 평균 시간이 사람 IFN β 를 매일 피하로 투여하는 약량에 따라 연장된다는 것을 볼 수 있다.

실시예 14

IFNβ의 항-종양 효과가 IFNAR2와 2.5 ng/IU농도에서 복합되었을 때 강화되는 지를 확인하기 위해, 5마리 생쥐로 된 7개 집단을 실시예 13에서 논의된 동일한 프로토콜을 이용하여 처리하는데, 단 각 집단에 투여되는 테스트 물질은 다음과 같다;

생쥐에 IFNβ만 제공 IFNβ+ sIFNAR2/mouse

Group 1 2×10^2 IU Group 4 2×10^2 IU plus 0.5 μg

Group 2 2×10^3 IU Group 5 2×10^3 IU plus 5.0 μg

Group 3 2×10^4 IU Group 6 2×10^4 IU plus 50.0 μg

개별적인 마비 시간 및 평균 치는 표 6에 나타내었다.

[표 6]

개별적인 마비 시간 및 평균 치

	마비까지 시간	평균(± SD)
Group 1	16, 16, 17, 18, 19	17.2 (1.3)
Group 2	17, 18, 18, 19, 19	18.2 (0.8)
Group 3	17, 17, 17, 18, 18	17.6 (0.9)
Group 4	17, 17, 18, 18, 19	17.8 (0.8)
Group 5	17, 18, 19, 20, 20	18.8 (1.3)
Group 6	21, 22, 22, 23, 26	22.8 (1.9)*
Group 2	16, 16, 17, 17, 17	16.6 (0.6)

*: one-way 방식의 ANOVA로 측정하였을 때 비-복합형에서 동일한 IFNβ

농도의 것과는 상당히 차이가 있음(p값은 ≤ 0.05)

낮은 약량의 IFNβ 2×10^4 IU/mouse/day의 항-종양 활성 및 Daudi/scid이형이식편 모델의 항-종양 활성은 IFNAR2와 복합되었을 때 상당히 강화된다는 것을 볼 수 있다.

추가 실험에서(나타내지 않음), 평균 마비 시간에서의 주사 빈도 효과를 연구하였다. Daudi/scid 이형이식편 모델에서 상당히 강화된 항종양 활성을 수득할 수 있는데, 이는 하루에 1회 자유 IFNβ를 투여하였을 경우와 비교하였을 때, 일주일에 1회정도의 덜 빈번하게 주사하였을 경우 IFNβ/IFNAR G2 복합체로 처리하면 된다. 또한, 추가 실험(나타내지 않음)에서 IFNAR에 대한 IFNβ의 비율을 테스트하였다. IFNβ일회 농도(2×10^4 IU/mouse/day)에서 항종양 활성 강화시에 IFNAR2:IFNβ의 최적 비율은 IFNβpg당 2.5ng IFNAR2이 된다.

제 2 실험에서, IFNβ 5×10^4 IU/생쥐/1일의 농도에서 항 종양 활성 강화시에 IFNAR2:IFNβ의 최적 비율은 IFNβpg당 0.3ng IFNAR2이 된다는 것을 밝혔다. 이와 같은 두 실험에서 최적 비율은 IFNβ농도에 따라 달라지고, 더 높은 농도의 IFNβ를 이용하는 경우에, 비율은 더 낮아진다는 것을 알 수 있다.

동일한 모델을 이용한 또 다른 실험에서, IFNAR2만을 투여하였을 경우에, 연구에서 생쥐의 생존이 강화되지는 않았다.

실시예 15

이 실시예에서는 1회 알약을 정맥으로 주사하였을 경우에 생쥐 혈청에서 Interfusion 5GS 분자의 혈청 반감기를 결정하기 위한 약력학에 관한 것이다. 21마리 암컷 B6D2F1주 생쥐(6-8주령)(약 20g)을 다음과 같이 3집단으로 나누었다.

집단 1: 100,000 IU/ml Interfusion 5GS 용액(최종 약량은 20,000 IU/mouse 또는 5×10^6 IU/kg) 용액 200 μ l을 1회 알약으로 정맥으로 주사를 받은 9마리 생쥐를 포함한다.

집단 2: 100,000 IU/ml 사람 IFN β 용액 200 μ l을 제공받은 9마리 생쥐를 포함한다.

집단 3: 음성 기준으로 주사를 맞지 않은 3마리 생쥐를 포함한다.

생쥐당 약 2ml 혈액에서 이론적으로 C_{max} 및 T_{max} 은 집단 1과 2에서 10,000 IU/ml이다. 각 집단 1과 2의 세 마리 생쥐는 투여후 각 0.05, 2, 12시간에 혈액 샘플을 가진다. 각 집단 1과 2의 각 세 마리 생쥐는 투여후 0.5, 4, 24 시간에 혈액 샘플을 가지고, 각 집단 1과 2의 각 세 마리 생쥐는 투여후 1, 8, 48 시간에 혈액 샘플을 가진다. WISH 검사를 이용하여 생활성 사람 IFN β 가 존재하는지를 혈청 검사를 한다.

그 결과는 도 17에 나타내었다. IFN β 가 바로 제거되나, Interfusion 분자는 주사후 상당히 오래 유지된다. 이는 융합 단백질이 원하는 안정화 효과를 가진다는 것을 보여주는 것이다.

전술한 특정 구체에는 본 발명의 일반적인 특징을 충분히 나타내는 것으로 과도한 실험없이 그리고 일반적인 개념을 벗어나지 않고서도 이와 같은 구체에 현재 지식을 이용하여 바로 변형시킬 수 있기 때문에, 이와 같은 변형은 상기 구체와 동일한 범위로 이해하면 된다. 여기에서 이용된 구 또는 용어는 본 발명을 설명하기 위함이지 이에 본 발명을 한정시키고자 함은 아니다. 본 발명의 다양한 기능을 실행하는데 있어서, 수단, 물질 및 단계는 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 다양하게 변화시킬 수 있다. 따라서, 상기 명세서에서 볼 수 있는 용어는 "~수단"등의 용어 및 임의 방법의 단계는 어떠한 구조, 물리적, 화학적 또는 전기적 요소 또는 임의 단계등은 본 발명의 범위에 속하는 것으로 이해하면 된다.

REFERENCES

Alam et al, "Comparative pharmacokinetics and Pharmacodynamics of two recombinant human interferon beta-1 (IFN β -1 α) products administered intramuscularly in healthy male and female volunteers", Pharmaceutical Research 14:546-549 (1997)

Anfinsen, "Principles That Govern The Folding of Protein Chains", Science 181:223-230 (1973)

Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience (New York, 1987-1992)

Baron et al, "The interferons: A biological system with therapeutic potential in viral infections", Anviral Res. 24:97-110 (1994)

Baron, et al, "The interferons. Mechanisms of action and clinical applications", J. Am. Med. Assoc. 266:1375-1383 (1991)

Chomczynski et al, Anal. Biochem. 162:156-159 (1987)

Christofinis, G.J., "Interferon Production by Human Lymphoblastoid Cell Lines of Different Origins", Journal of General Virology 52:169-171 (1981)

Church et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995 (1984)

- Colamonici et al, "Multichain structure of the interferon alpha receptor on hematopoietic cells", J. Immunol. 148:2126-2132 (1992)
- Colamonici et al, "Identification of a novel subunit of the Type I interferon receptor localized to human chromosome 21", J. Biol. Chem. 268:10895-10899 (1993)
- Curtis, B. M., "Enhanced Hematopoietic Activity of a Human Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor-Interleukin 3 Fusion Protein", Proc. Natl. Acad. Sci. 88:5809-5813 (1991)
- Domanski et al, "Cloning and Expression of a Long Form of the β Subunit of the Interferon α β Receptor That is required for Signaling", The Journal of Biological Chemistry 270:6 (1995)
- Duncan et al, "The transcription factor interferon regulatory factor-1 is essential for natural killer cell function in vivo", J. Exp. Med. 184:2043-2048 (1996)
- Dron et al, "Interferon α/β gene structure and regulation" in Interferon: Principles and Medical Applications, Baron et al, Editors, (University of Texas Medical Branch: Galveston, TX, 1992) pp. 33-45
- Edington, S.M., "Biotech Products as Drug Leads", BioTechnology 13:649 (1995)
- Ertel et al, Arch. Surg. 129:1 (1994)
- Fierlbeck et al, "Pharmacodynamics of recombinant IFN β during long-term treatment of malignant melanoma", Jouranal of Interferon and Cytokine Research 16:777 (1996)
- Ghetie et al, Cancer Research 51:5876 (1991)
- Ghetie et al, Blood 80:2315 (1990)
- Graff et al, Mol Cell. Biol. 2:93-96 (1982)
- Gratham, Science 185:X62-X64 (1974)
- Grazia Cusi, M., "Harlequin Granulocyte-colony Stimulating Factor Interleukin 6 Molecules with Bifunctional and Antagonistic Activities", Immunotechnology 3:61-69 (1997)
- Ibanez, C. F., "Chimeric Molecules with Multiple Neurotrophic Activities Reveal Structural Elements Determining the Specificities of NGF and BDNF", EMBO Journal 10:2105-2110 (1991)
- Kazam et al, J. Biol. Chem. 270:1 (1995)
- Keown, W.A., "Methods for Introducing DNA into Mammalian Cells", Methods in Enzymology 185:527-537 (1990)
- Lengyl, P., "Biochemistry of interferons and their actions", Ann. Rev. Biochem. 51:251-282 (1982)
- Lutfalla et al, "Mutant USA cells are complemented by an interferon- α - β receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster", EMBO Journal 14:5100-5108 (1995)
- Meinkoth et al, Anal. Biochem. 138:267-284 (1984)
- Nagai et al, Nature 309:810 (1984)

- Novick et al, J. Immunol. 129:2244-2247 (1982)
- Novick et al, "Soluble interferon- α receptor molecules are present in body fluids" FEBS Lett. 314:445-448 (1992)
- Novick et al, "The human interferon α / β receptor: Characterization and molecular cloning", Cell 77:391-400 (1994)
- Novick et al, "Soluble and membrane-anchored forms of the human IFN- α / β receptor", J. Leuk. Bio. 57:712-718 (1995)
- Olins, P.O., "Recent Advances in Heterologous Gene Expression in Escherichia coli", Current Opinion in Biotechnology 4:520-525 (1993)
- Pestka, et al, "Interferons and their actions", Ann. Rev. Biochem. 56:727-777 (1987)
- Platanias et al, "Characterization of the α -subunit of the interferon α receptor: evidence of N- and O-linked glycosylation and association with other surface proteins", J. Immunol. 150:3382-3388 (1993)
- Platanias et al, "Tyrosine phosphorylation of the α and β subunits of the Type I interferon receptor", J. Biol. Chem. 269:17761-17764 (1994)
- Platanias et al, "Differences in interferon α and β signaling, " J. Biol. Chem. 271:23630-23633 (1996)
- Qureshi et al, "Function of Stat2 protein in transcriptional activation by alpha interferon", Mol. Cell. Bio. 16:288-293 (1996)
- Ratner, M., "Protein Expression in Yeast", Bio/Technology 7:1129-1133 (1989)
- Reff, M., "High-level Production of Recombinant Immunoglobulins in mammalian Cells", Current Opinion in Biotechnology 4:573-576 (1993)
- Reuveny, S., "Production of Recombinant Proteins in High Density Insect Cell Cultures", Biotechnology and Bioengineering 42:235-239 (1993)
- Salmon et al, "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human IFN β in healthy male volunteers", Journal of Interferon and Cytokine Research 16:759 (1996)
- Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY, 1989)
- Sharf et al, "Functional domain analysis of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) and its association with interferon regulatory factors, " J. Biol. Chem. 270:13063-13069 (1995)
- Smith, G.E., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology 3:2156-2165 (1983)
- Szilagy et al, Biochim. Biophys. Acta 1251:1 (1995)
- Tan et al, "The linkage of genes for the human interferon induced antiviral protein and indophenol oxidase-B traits to chromosome G-21", J. Exp. Med. 137:317-330 (1973)

Terlizzese, M., "In vitro comparison of inhibiting ability of soluble TNF receptor p75 (TBP II) vs. Soluble TNF Receptor p55 (TBP I) against TNF- α and TNF- β ", Journal of Interferon and Cytokine Research 16:1047-1053 (1996)

Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:4216-4220 (1980)

Utsumi, J., "Characterization of E. coli-derived Recombinant Human Interferon-beta as Compared with Fibroblast Human Interferon-beta", Jouranal of Biochemistry 101:1199-1208 (1987)

Uze et al, "Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA", Cell 60:225-234 (1990)

Weissmann et al, "The interferon genes", Prog. Nucleic Acid Res. 33:251-302 (1986)

Yan et al, "Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFNaR1) domain required for TYK2 binding and signal transduction", Mol. Cell. Bio. 16:2074-2082 (1996)

Yang et al, "Direct association of STAT3 with the IFNAR-1 chain of the human Type I interferon receptor", J. Biol. Chem. 271:8057-8061 (1996)

(57) 청구의 범위

청구항 1.

타입 I 인터페론(IFN) 및 타입 I IFN에 결합할 수 있는 사람의 인터페론 α/β 수용체(IFNAR)소단위로 구성된 복합체, 이때, 타입 I IFN은

a) 고유 타입 I IFN;

b) 타입 I IFN의 생물학적 활성을 가지는 (a)의 단편;

c) (a) 또는 (b)와 적어도 70% 서열 상동성을 가지고, 타입 I IFN의 생물학적 활성을 가지는 (a) 또는 (b)의 변이체;

d) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 (a) 또는 (b)를 인코딩하는 고유 DNA 서열의 상보체에 하이브리드할 수 있는 DNA 서열에 의해 인코딩되고, 타입 I IFN의 생물학적 활성을 가지는 (a) 또는 (b)의 변이체;

e) 타입 I IFN의 생물학적 활성을 가지는 a), b), c), d)의 염 또는 이의 기능적 유도체에서 선택되고,

이때, IFNAR은

f) IFNAR 생물학적 활성을 가지는 고유 사람 IFNAR 폴리펩티드 쇄;

g) IFNAR의 생물학적 활성을 가지는 (f)의 단편;

h) (f) 또는 (g)와 적어도 70% 서열 상동성을 가지고 IFNAR의 생물학적 활성을 가지는 (f) 또는 (g)의 변이체;

i) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 (f) 또는 (g)를 인코딩하는 고유 DNA 서열의 상보체에 하이브리드할 수 있는 DNA 서열에 의해 인코딩되고, IFNAR의 생물학적 활성을 가지는 (f) 또는 (g)의 변이체;

j) IFNAR의 생물학적 활성을 가지는 (f), (g), (h), (i)의 염 또는 이의 기능적 유도체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 타입 I IFN이 공유 결합에 의해 IFNAR에 결합된 복합체.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 타입 I IFN이 펩티드 결합에 의해 IFNAR에 결합된 복합체.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 타입 I IFN이 펩티드 링커에 의해 IFNAR에 결합된 복합체.

청구항 7.

제 1 항에 있어서, 타입 I IFN은 IFN α , IFN β , IFN ω 인 복합체.

청구항 8.

제 7 항에 있어서, 타입 I IFN은 IFN β 인 복합체.

청구항 9.

제 1 항에 있어서, IFNAR은 사람 인터페론 α/β 수용체(IFNAR2)의 베타 소단위인 복합체.

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

제 6 항에 있어서, 펩티드 링커는 (GGGS) n 이고, 이때 n 은 1-5인 복합체.

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

제 5 항, 제 6 항, 또는 제 14 항에 따른 융합 단백질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 DNA 분자.

청구항 18.

제 17 항에 따른 DNA를 포함하는 벡터.

청구항 19.

제 18 항에 따른 벡터에 의해 트랜스펙션되고, 벡터에 인코딩된 복합체를 발현하는 숙주 세포.

청구항 20.

제 19 항에 따른 숙주 세포를 배양시키고,

이에 의해 발현된 융합 단백질을 회수하는 단계로 구성된 융합 단백질을 만드는 방법.

청구항 21.

제 1 항에 따른 복합체 형태로 인터페론을 저장하는 것으로 구성된 타입 I 인터페론의 저장 반감기를 개선시키는 방법.

청구항 22.

활성 성분으로 제 1 항에 따른 복합체와 약학적으로 수용가능한 캐리어로 구성된 항-바이러스, 항암, 면역 조절 요법용 약학 조성물.

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

청구항 25.

제 1 항에 있어서, 약물로 이용할 수 있는 복합체.

청구항 26.

제 25 항에 있어서, 항-바이러스, 항암, 면역 조절 요법에 약물로 이용할 수 있는 복합체.

청구항 27.

제 25 항 또는 제 26 항에 있어서, 환자에서 타입 I의 *in vivo* 효과를 연장시키는데 이용될 수 있는 복합체.

청구항 28.

활성 성분으로 타입 I 인터페론(IFN) 및 타입 I IFN에 결합할 수 있는 사람의 인터페론 α/β 수용체(IFNAR)소단위를 포함하는 항-바이러스, 항암 또는 면역 조절 요법 치료용 약물,

이때, 타입 I IFN은

a) 고유 타입 I IFN; 또는

b) 타입 I IFN의 생물학적 활성을 가지는 (a)의 단편이 되며, IFN과 IFNAR 소단위는 별도로 투여되거나 동시 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는 약물.

청구항 29.

제 28 항에 있어서, IFN과 IFNAR 소단위가 별도로 투여되어, 제1항에 따른 복합체가 생체내에서 형성되는 것을 특징으로 하는 약물.

청구항 30.

삭제

청구항 31.

제 28 항 또는 제 29 항에 있어서, 타입 I IFN은 IFN α , IFN β , IFN ω 인 것을 특징으로 하는 약물.

청구항 32.

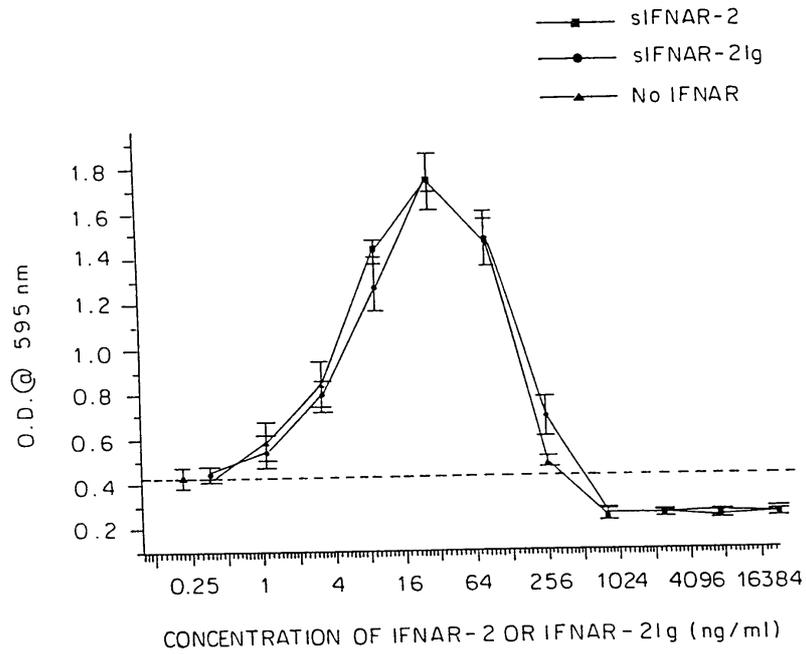
제 31 항에 있어서, 타입 I IFN은 IFN β 인 것을 특징으로 하는 약물.

청구항 33.

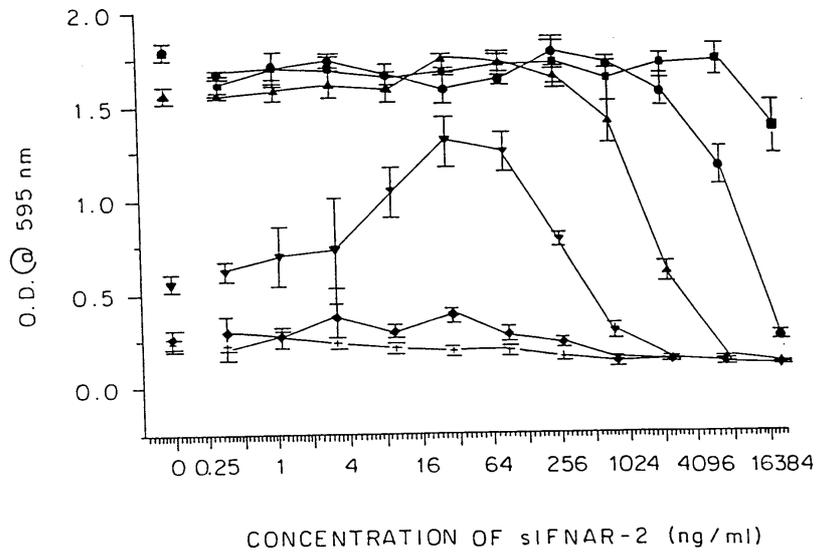
제 28 항에 있어서, IFNAR은 사람 인터페론 α/β 수용체(IFNAR2)의 베타 소단위인 것을 특징으로 하는 약물.

도면

도면1



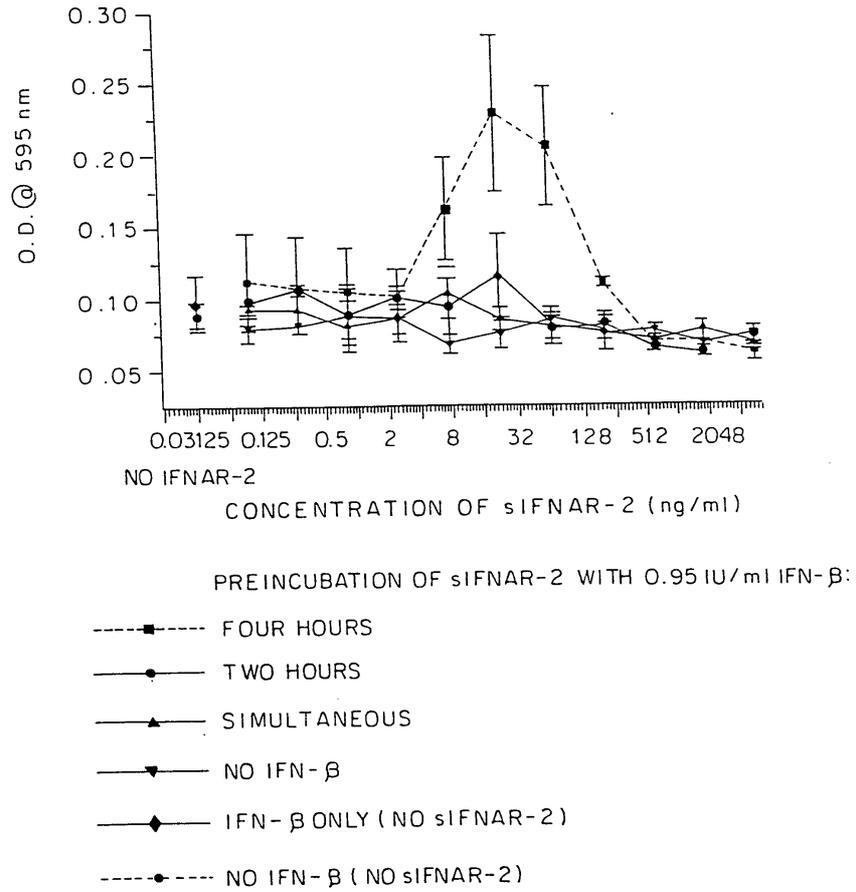
도면2



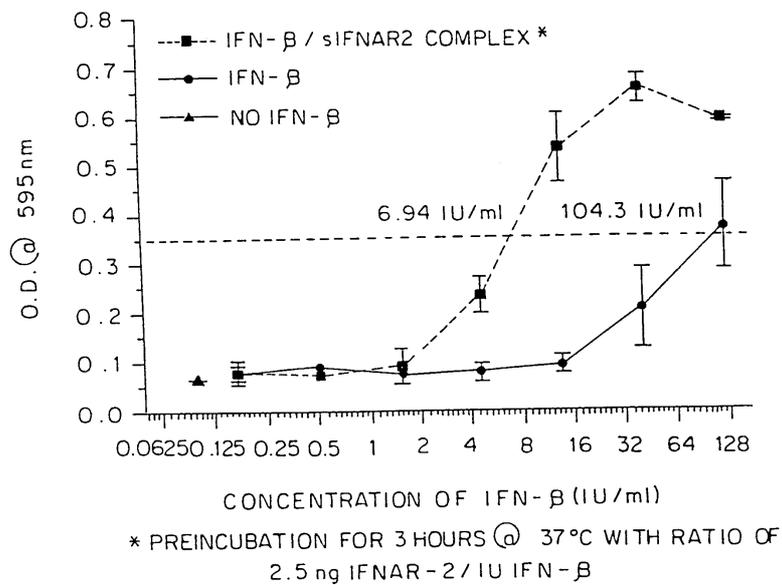
CONCENTRATION OF IFN-β

- 593.75 IU/ml
- 118.75 IU/ml
- ▲ 23.75 IU/ml
- ▼ 4.75 IU/ml
- ◆ 0.95 IU/ml
- + No IFN-β

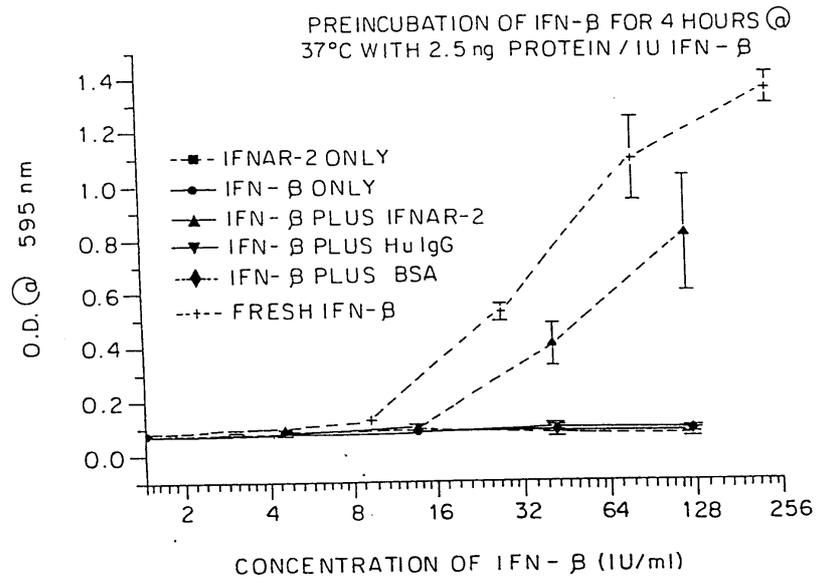
도면3



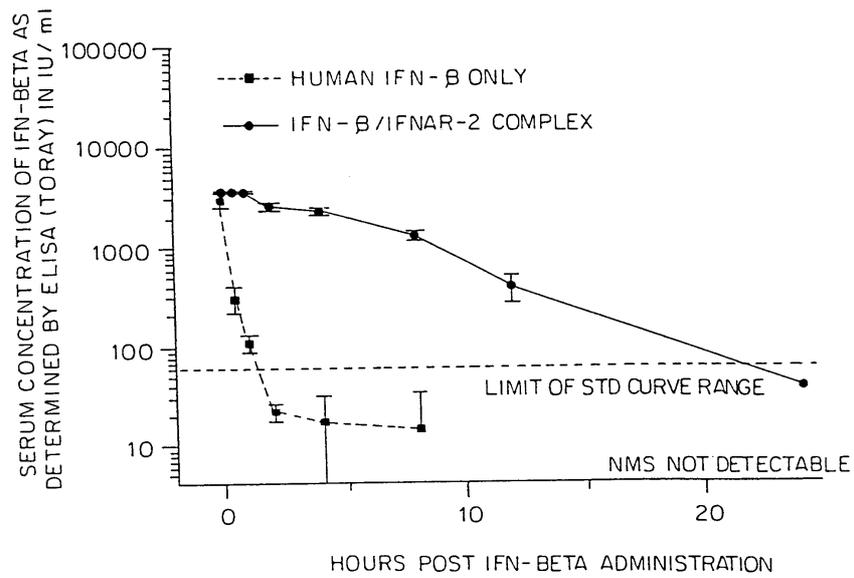
도면4



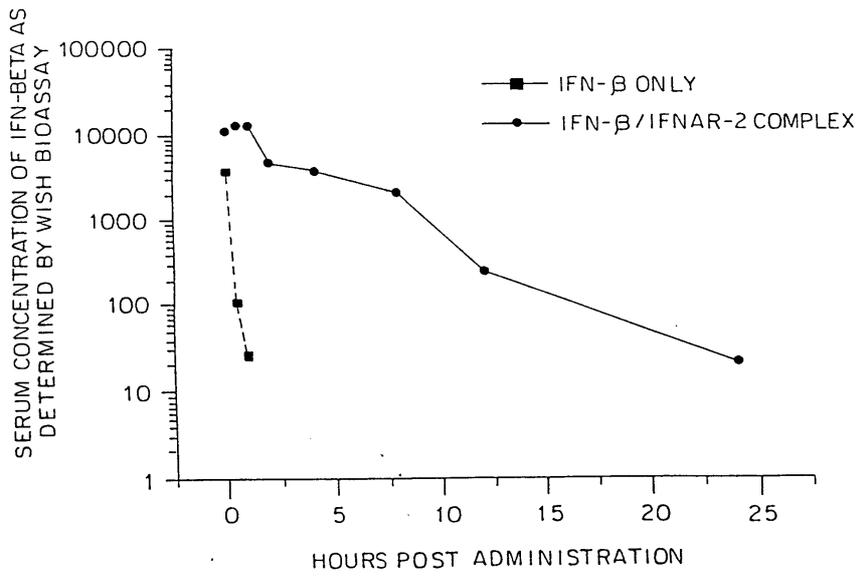
도면5



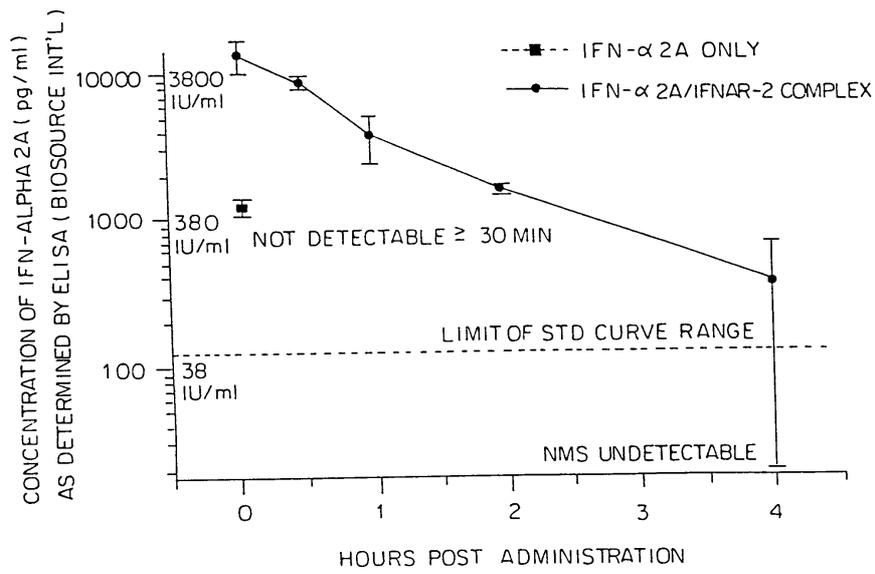
도면6



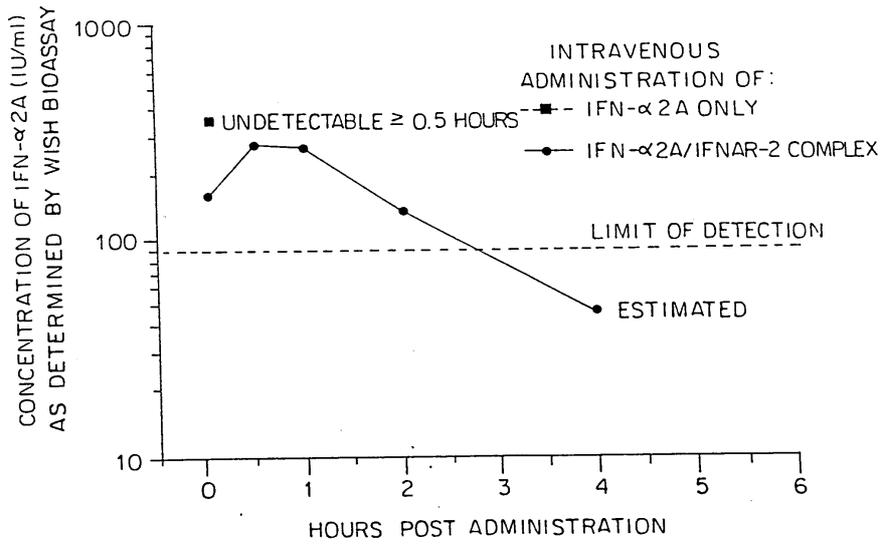
도면7



도면8



도면9



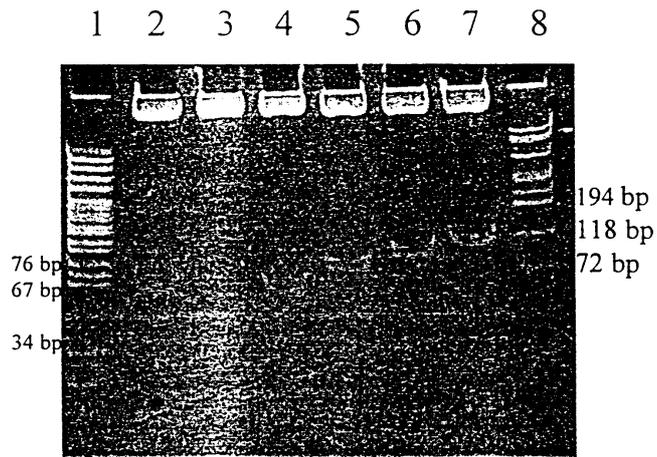
도면10

```

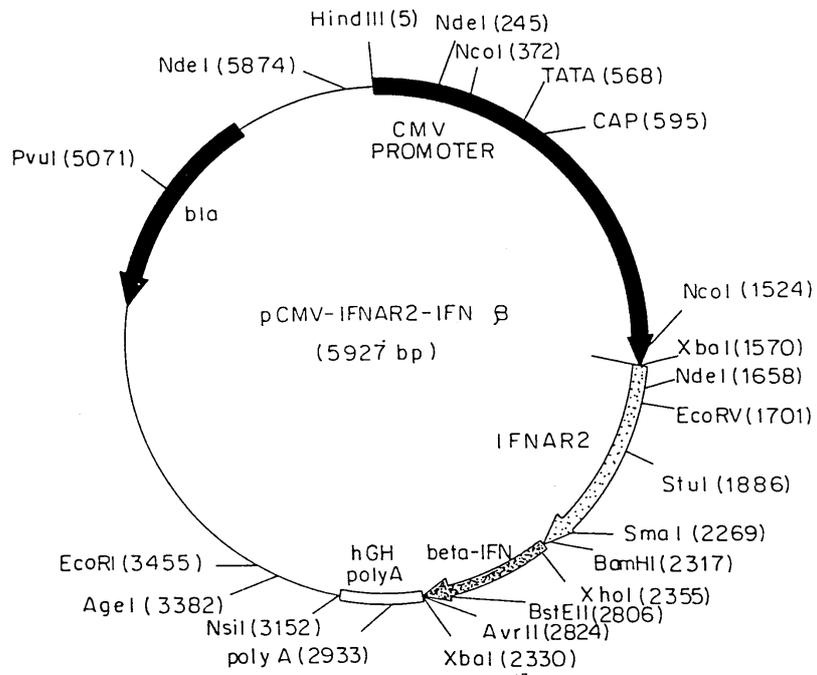
-29 Signal peptide          1 hIFNAR2
MLLSQNAFIV RSLNLVLMVY ISLVFGISYD SPDYTDSECT
FKISLRNFRS
22
ILSWELKNHS IVPHTHYTLLY TIMSKPEDLK VVKNCANTTR
SFCDLTDEWR
72
STHEAYVTVL EGFSGNTTLF SCSHNFWLAI DMSFEPPEFE
IVGFTNHINV
122
MVKFPSIVEE ELQFDLSLVI EEQSEGIVKK HKPEIKGNMS
GNFTYIIDKL
172
IPNTNYCVSV YLEHSDEQAV IKSPLKCTLL PPGQESEFSG
GGGSGGGGSM
221 hIFNβ
SYNLLGFLQR SSNFQCQKLL WQLNGRLEYC LKDRMNFIDIP
EEIKLQQFQ
272
KEDAALTIYE MLQNIFAIFR QDSSSTGWNE TIVENLLANV
YHQINHLKTV
322
LEEKLEKEDF TRGKLMSSLH LKRYYGRILH YLKAKEYSHC
AWTIVRVEIL
372          386
RNFYFINRLT GYLRLN
    
```

Amino Acids: -29--1, signal sequence
 +1-210, human IFNAR2
 211-220, 2x Gly4Ser linker
 221-386, human IFNβ

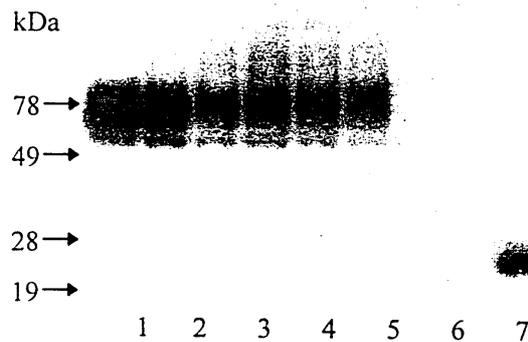
도면11



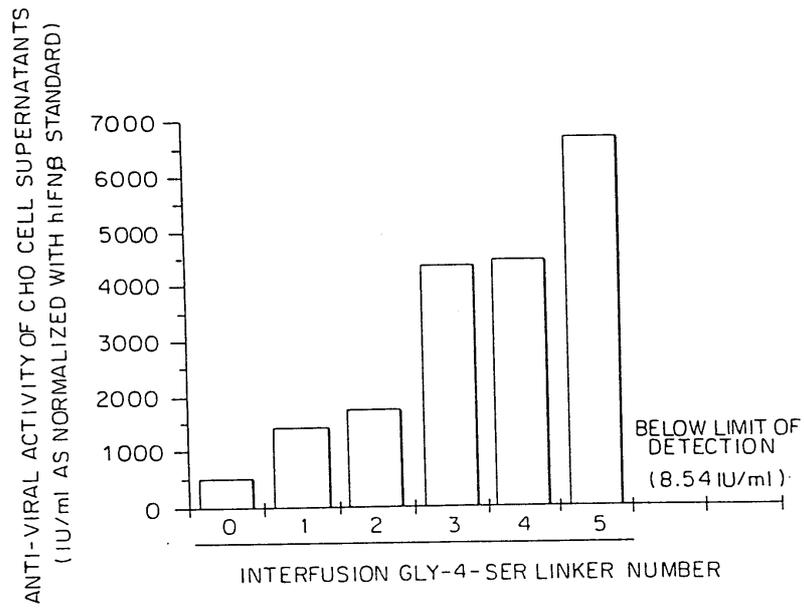
도면12



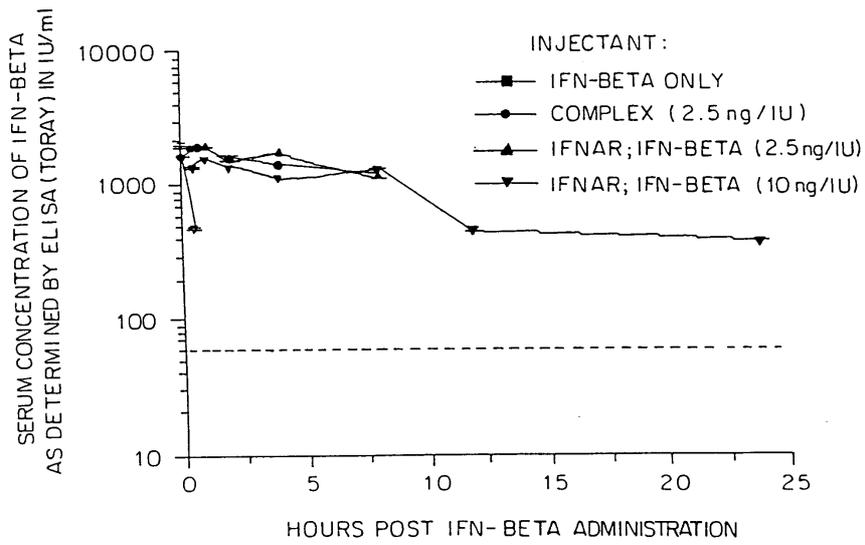
도면13



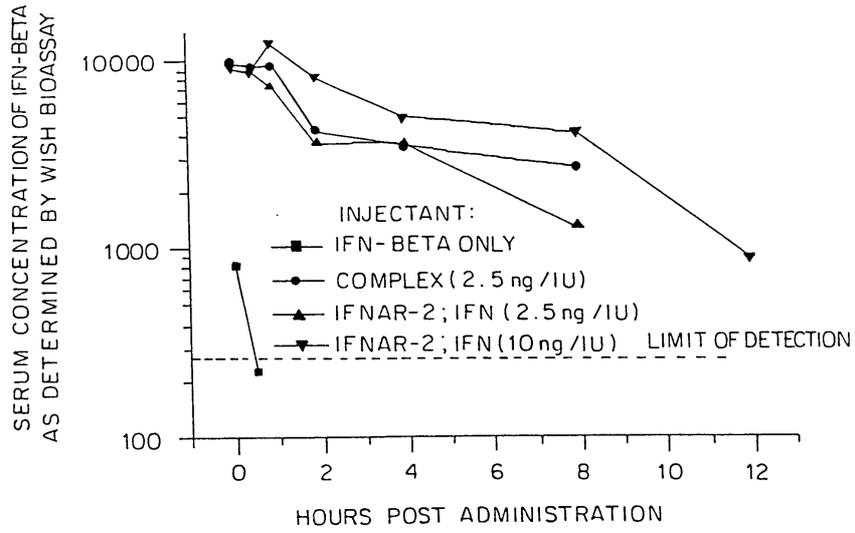
도면14



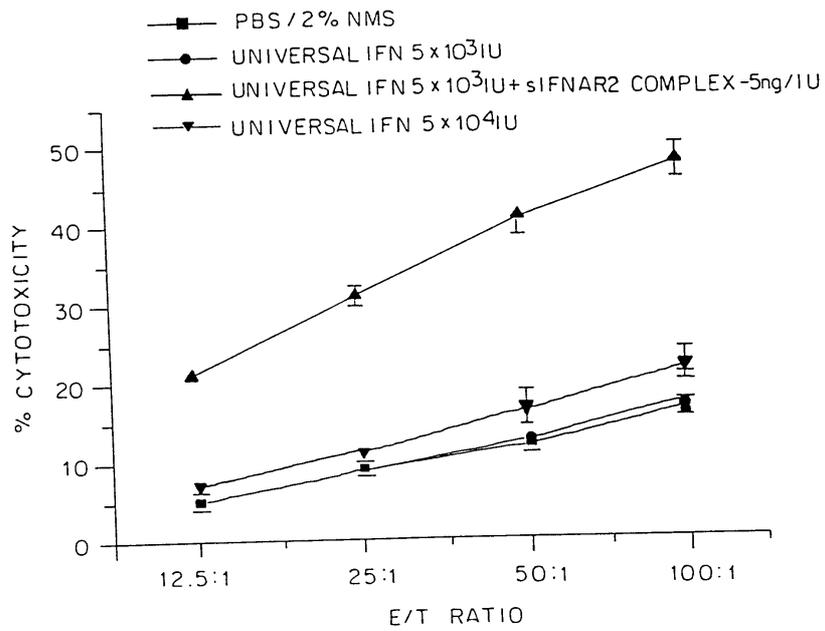
도면15a



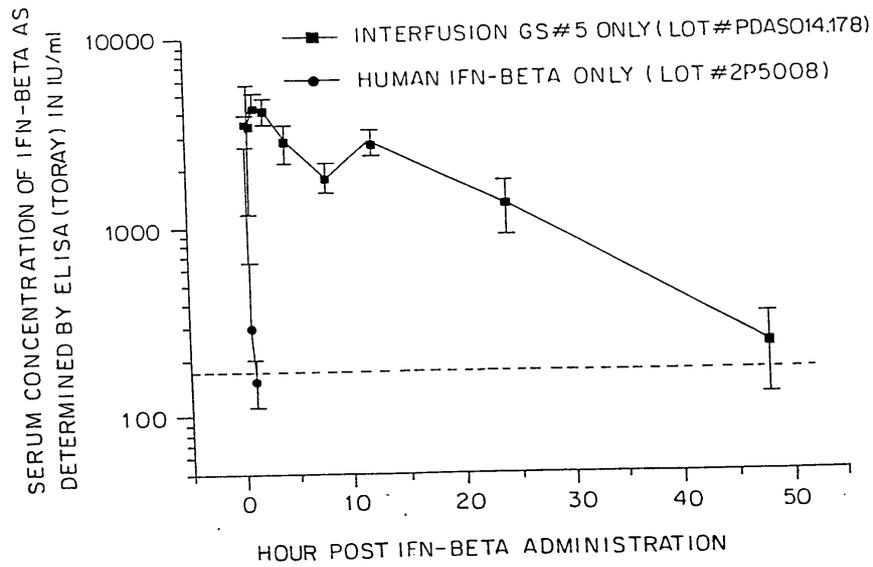
도면15b



도면16



도면17



서열목록

SEQUENCE LISTING

```

<110> TEPPER, Mark
      CUNNINGHAM, Mark
      SHERRIS, David
      EL TAYAR, Nabil
      McKENNA, Sean
<120> IFNAR2/IFN COMPLEX
<130> TEPPER1A.SEQ
<140> not yet received
<141> 1998-12-18
<150> 60/068,295
<151> 1997-12-19
<160> 14
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Description of Unknown Organism: Peptide
<400> 1
Gly Gly Gly Gly Ser
      1             5
<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Description of Unknown Organism: Peptide
<400> 2
    
```

Ile Glu Glu Arg
 1
 <210> 3
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 3
 Glu Ser Glu Phe Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ser
 20 25 30

Tyr
 <210> 4
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 4
 Glu Ser Glu Phe Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ser Tyr
 20 25

<210> 5
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 5
 Glu Ser Glu Phe Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Met Ser Tyr
 20

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 6
 Glu Ser Glu Phe Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met
 1 5 10 15
 Ser Tyr
 <210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide

<400> 7
 Glu Ser Glu Phe Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ser Tyr
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 8
 Glu Ser Glu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
 1 5 10 15
 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 20 25 30
 Gln Met Ser Tyr
 35
 <210> 9
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 9
 Glu Ser Glu Phe Ser Glu Phe Met Glu Phe Met Glu Phe Met Glu Phe
 1 5 10 15
 Met Glu Phe Met Met Ser Tyr
 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 10
 Glu Ser Glu Phe Ser Glu Phe Met Glu Phe Met Glu Phe Met Glu Phe
 1 5 10 15
 Met Met Ser Tyr
 20
 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 11
 Glu Ser Glu Phe Ser Glu Phe Met Glu Phe Met Glu Phe Met Met Ser
 1 5 10 15
 Tyr
 <210> 12
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 12
 Glu Ser Glu Phe Ser Glu Phe Gly Ala Gly Leu Val Leu Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Phe Met Met Ser Tyr
 20

<210> 13
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 13
 Glu Ser Glu Phe Ser Glu Phe Gly Ala Gly Leu Val Leu Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Phe Met Glu Phe Gly Ala Gly Leu Val Leu Gly Gly Gln Phe Met Met
 20 25 30
 Ser Tyr

<210> 14
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220>
 <223> Description of Unknown Organism: Peptide
 <400> 14
 Met Leu Leu Ser Gln Asn Ala Phe Ile Val Arg Ser Leu Asn Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Met Val Tyr Ile Ser Leu Val Phe Gly Ile Ser Tyr Asp Ser Pro
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Asp Glu Ser Cys Thr Phe Lys Ile Ser Leu Arg Asn Phe
 35 40 45
 Arg Ser Ile Leu Ser Trp Glu Leu Lys Asn His Ser Ile Val Pro Thr
 50 55 60
 His Tyr Thr Leu Leu Tyr Thr Ile Met Ser Lys Pro Glu Asp Leu Lys
 65 70 75 80
 Val Val Lys Asn Cys Ala Asn Thr Thr Arg Ser Phe Cys Asp Leu Thr
 85 90 95
 Asp Glu Trp Arg Ser Thr His Glu Ala Tyr Val Thr Val Leu Glu Gly
 100 105 110
 Phe Ser Gly Asn Thr Thr Leu Phe Ser Cys Ser His Asn Phe Trp Leu
 115 120 125
 Ala Ile Asp Met Ser Phe Glu Pro Pro Glu Phe Glu Ile Val Gly Phe
 130 135 140
 Thr Asn His Ile Asn Val Met Val Lys Phe Pro Ser Ile Val Glu Glu
 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Phe Asp Leu Ser Leu Val Ile Glu Glu Gln Ser Glu Gly
 165 170 175
 Ile Val Lys Lys His Lys Pro Glu Ile Lys Gly Asn Met Ser Gly Asn
 180 185 190
 Phe Thr Tyr Ile Ile Asp Lys Leu Ile Pro Asn Thr Asn Tyr Cys Val
 195 200 205

Ser Val Tyr Leu Glu His Ser Asp Glu Gln Ala Val Ile Lys Ser Pro
 210 215 220
 Leu Lys Cys Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Glu Ser Glu Phe Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly
 245 250 255
 Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln
 260 265 270
 Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp
 275 280 285
 Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala
 290 295 300
 Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg
 305 310 315 320
 Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu
 325 330 335
 Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu
 340 345 350
 Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser
 355 360 365
 Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala
 370 375 380
 Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu
 385 390 395 400