(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년05월16일
(11) 등록번호 10-0830268
(24) 등록일자 2008년05월09일

(51) Int. Cl.
C07K 14/56 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2002-7008401
(22) 출원일자 2002년06월27일
심사청구일자 2006년04월17일
번역문제출일자 2002년06월27일
(65) 공개번호 10-2002-0065620
(43) 공개일자 2002년08월13일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2001/008390
국제출원일자 2001년09월26일
(87) 국제공개번호 WO 2002/36153
국제공개일자 2002년05월09일
(30) 우선권주장
JP-P-2000-00328539 2000년10월27일 일본(JP)
JP-P-2001-00116710 2001년04월16일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
WO1993016107 A1
전체 청구항 수 : 총 14 항

(73) 특허권자
가부시끼가이샤 하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸조
일본국 오까야마껭 오까야마시 시모이시이 1죠메 2-3
(72) 발명자
야나이요시아키
일본국오까야마껭오까야마시시모이시1죠메2-3,가부시끼가이샤하야시바라세이부쓰가가꾸겐꾸조내
사노오사무
일본국오까야마껭오까야마시시모이시1죠메2-3,가부시끼가이샤하야시바라세이부쓰가가꾸겐꾸조내
구리모토마사시
일본국오까야마껭오까야마시시모이시1죠메2-3,가부시끼가이샤하야시바라세이부쓰가가꾸겐꾸조내
(74) 대리인
권동용, 김기종, 서장찬, 최재철

심사관 : 손영희

(54) 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제

(57) 요 약

단백질 합성 억제 유전자의 발현을 현저하게 증강하는 인간 인터페론 α에서의 서브타입의 조합을 특정하고, 이러한 조합의 서브타입을 유효성분으로 함유한 이 유전자의 발현 증강제와 그 용도를 제공한다. 유효성분으로서 인간 인터페론 α에서의 서브타입 α2 및 α8을 함유한 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제와, 이 증강제의 의약품을 포함한 용도를 제공함으로써 해결한다.

(81) 지정국

국내특허 : 캐나다, 대한민국, 미국

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 터어키

특허청구의 범위

청구항 1

인간 인터페론(interferon; IFN)-α에서의 IFN-α의 서브타입으로서 IFN-α2 서브타입 및 IFN-α8 서브타입을 유효성분으로 함유해서 된 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 발현 증강제에서의 IFN-α2 서브타입과 IFN-α8 서브타입의 활성비가 국제단위 환산으로 1:0.25 이상 1:1.5 미만인 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 단백질 합성 억제 유전자인 2',5'-올리고아데닐산 합성효소 유전자 및 이중가닥 RNA 의존성 프로테인 키나아제 유전자로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상의 유전자의 발현 증강제로서의 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제.

청구항 5

인간 IFN-α에서의 IFN-α의 서브타입으로서 IFN-α2 서브타입 및 IFN-α8 서브타입을 유효성분으로 함유해서 되고, IFN-α2 서브타입과 IFN-α8 서브타입의 중량비가 1:0.05 내지 1:0.5인 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제.

청구항 6

제1항, 제3항 및 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 증강제에 있어서의 유효성분으로서의 IFN-α2 서브타입 및 IFN-α8 서브타입이 그 폴리펩티드쇄에 공유결합해 있는 수용성 고분자를 가진 것인 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 수용성 고분자가 본질적으로 말토트리오스를 반복단위로 하는 다당류인 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제.

청구항 8

2',5'-올리고아데닐산 합성효소 유전자 또는 이중가닥 RNA 의존성 프로테인 키나아제 유전자의 전사조절 영역의 제어하에 있는 구조 유전자의 발현 증강제로서의, 인간 IFN-α에서의 IFN-α의 서브타입으로서 IFN-α2 서브타입 및 IFN-α8 서브타입을 유효성분으로 함유해서 된 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

인간 IFN-α에서의 IFN-α의 서브타입으로서 IFN-α2 서브타입을 유효성분으로 함유해서 IFN-α8 서브타입에 의한 유전자 발현을 증강하는, 인간 IFN-α에서의 IFN-α8 서브타입에 의한 단백질 합성 억제 유전자의 유전자 발현유도 작용의 증강제.

청구항 12

인간 IFN-α에서의 IFN-α의 서브타입으로서 IFN-α8 서브타입을 유효성분으로 함유해서 IFN-α2 서브타입에 의한 유전자 발현을 증강하는, 인간 IFN-α에서의 IFN-α2 서브타입에 의한 단백질 합성 억제 유전자의 유전자 발현유도 작용의 증강제.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 단백질 합성 억제 유전자가 2',5'-올리고아데닐산 합성효소 유전자 및 이중가닥 RNA 의존성 프로테인 키나아제 유전자로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상의 유전자인 증강제.

청구항 14

인간 IFN-α에서의 IFN-α의 서브타입으로서 IFN-α2 서브타입과 IFN-α8 서브타입을 인간 IFN-α 감수성 세포에 작용시키는 것을 특징으로 하는 유전자 발현의 in vitro 증강방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 인간 IFN-α 감수성 세포가 가진 단백질 합성 억제 유전자의 발현을 증강하는 유전자 발현의 in vitro 증강방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 단백질 합성 억제 유전자가 2',5'-올리고아데닐산 합성효소 유전자 및 이중가닥 RNA 의존성 프로테인 키나아제 유전자로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상의 유전자인 유전자 발현의 in vitro 증강방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 인간 IFN-α 감수성 세포가 가진, 2',5'-올리고아데닐산 합성효소 유전자 및 이중가닥 RNA 의존성 프로테인 키나아제 유전자로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상의 유전자의 전사조절 영역의 제어하에 있는 유전자의 발현을 증강하는 유전자 발현의 in vitro 증강방법.

명 세 서

기 술 분 야

<1> 본 발명은 단백질 합성 억제 유전자의 신규한 발현 증강제, 상세하게는 인간 인터페론 α에서의 서브타입(subtype) α2 및 서브타입 α8(이하, 인터페론을 "IFN", 인터페론 α를 "IFN-α", 인간 인터페론 α에서의 서브타입 α2 및 서브타입 α8을 각각 "IFN-α2" 및 "IFN-α8"로 줄여 기재함)을 유효성분으로 함유해서 된 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> IFN은 척추동물 세포가 바이러스 감염이나 항원자극 등의 외부로부터의 자극을 받았을 때에 세포밖으로 분비하는 항바이러스 활성을 가진 일군의 단백질에 주어진 총칭인데, 그 항원 특이성에 따라 IFN-α, IFN-β 및 IFN-γ의 세가지 타입으로 대별되고 있다. IFN은 항바이러스 활성 외에 세포증식 억제 활성, 항종양 활성 등의 다양한 생리활성을 가진 것이 알려져 있다. IFN에 대한 수용체에 대해서도 분리 및 확인이 진행되어, 예컨대 문헌["The Cytokine Facts Book", edited by Robin E. Callard and Andy J. H. Gearing, published by Academic Press, pp. 148-162 (1994)]에 기재되어 있는 바와 같이 IFN-α 및 IFN-β는 공통의 수용체를 공유하는 한편, IFN-γ에 대해서는 이것과는 다른 수용체가 존재하는 것이 알려져 있다. 기타의 사이토카인의 경우와 마찬가지로 IFN에 의한 생리활성의 발현은 IFN에 의한 감수성 세포의 자극, 즉, 세포표면에서 발현된 IFN 수용체에 대한 IFN의 결합을 시초로 하여, 여기에 이어서 세포내 정보전달계가 작동하고, 그 정보에 응답하여 세포내에서 특정의 유전자 발현이 일어나는 등, 세포가 여러가지 변화를 일으킴으로써 달성된다. 이 세포내 정보전달계에 관한 분자의 분리 및 확인도 근년 급속히 진행되고 있다.

<3> IFN에 의한 세포의 자극에 응답하여 발현이 유도되는 유전자로는 여러가지의 것이 있다. 예컨대 문헌["The Cytokine Handbook", 3rd edition, edited by Angus Thomson, published by Academic Press (1998)]의 제18장, 표 2에는 IFN-α 및 IFN-β의 자극에 의해 발현이 유도되는 유전자의 산물(단백질)로서 2',5'-올리고아

데닐산 합성효소(이하, 간단히 "2-5A"라 함), 이중가닥 RNA 의존성 프로테인 키나아제(이하, 간단히 "PKR"이라 함), Mx 단백질, 클라스 I 및 클라스 II의 MHC 분자, β-2 미크로글로불린, 구아닐산 결합 단백질, 및 메탈로티오네인 등을 들고 있다. 이들은 대부분의 경우 IFN-γ에 의해서도 유도된다. IFN에 의해 유도되는 이들 유전자의 산물 중에서 단백질 합성을 억제하는 효소인 2-5A 합성효소와 PKR이나 Mx 단백질은 세포의 종양화와 세포에 대한 바이러스 감염 등의 이상이 발생한 세포에서 이러한 이상을 억제하는 직접적인 역할을 한다. 한편, MHC 분자나 β-2 미크로글로불린은 생체에서의 면역계의 기능과 관련된 단백질이고, 생체의 면역계의 작동을 통해 종양이나 바이러스를 생체로부터 제거하는 것과 간접적으로 관여한다. 그리고 구아닐산 결합 단백질 및 메탈로티오네인에 대해서는 IFN에 의한 생리활성의 발현과의 관련은 현재로서는 상세하게 해명되어 있지 않다.

<4> IFN은 발견 당초에는 "꿈의 신약"으로 불리우는 등, 의약으로서 크게 기대되었다. 그러나 이 기대와는 반대로 어떤 종류의 질환에 대해서는 기대한 만큼의 치료효과는 얻어지지 않고 있다. 그 한가지 원인으로서는 IFN은 개개의 타입이나 서브타입에 따라 그것을 작용시키는 조건, 예컨대 대상으로 하는 세포, 그 세포에 감염해 있는 바이러스의 종류 및 사용하는 IFN의 조합 등에 따라 발휘되는 작용의 종류와 강약에 특성이 있는데 대하여 개개의 상황에서 목적으로 하는 작용을 충분히 발휘시키는 가장 적합한 조건이 완전하게는 해명되어 있지 않음에 있다고 생각된다.

<5> IFN-α, IFN-β 및 IFN-γ 사이에서의 유전자 발현 증강작용의 비교에 관해서는, 예컨대 문헌["Journal of Biological Response Modifiers", Vol. 5, No. 6, pp. 562-570 (1986) by PL. Triozzi; 및 "Journal of Interferon Research", Vol. 8, No. 1, pp. 113-127 (1988) by EM. Coccia et al.]에서 알 수 있는 바와 같이, IFN-γ는 IFN-α 및 IFN-β에 비하여 2-5A 합성효소 유전자나 PKR 유전자의 발현 유도능이 불량하다는 것이 보고되었다. 이에 대하여 IFN-α에는 IFN-β 및 IFN-γ와는 달리 적어도 십 수종 이상의 서브타입이 존재하고 있으나, IFN에 의한 유전자의 발현의 유도작용을 현저하게 발휘시키기 위한 IFN-α의 작용조건, 특히 그렇게 하기 위한 IFN-α에서의 서브타입의 조합의 최적화를 목표로 한 연구예는 현재로서는 전혀 보고된 바 없다.

발명의 상세한 설명

<6> 이러한 상황하에서 본 발명자들은 IFN에 의해 발현이 유도되는 단백질 합성 억제 유전자의 산물이 IFN에 의한 어떤 종류의 작용의 발휘에 직접적으로 관여하는 것 및 이 유전자의 발현유도에서의 IFN-α의 서브타입의 조합의 최적화를 목표로 한 연구가 아직 되어 있지 않은 것에 착안하여, 이 유전자의 발현을 현저하게 증강하는 IFN-α에 있어서의 서브타입의 적절한 조합을 발견할 수 있으면, IFN의 의약으로서의 더욱 유효한 이용을 달성할 수 있다고 생각하였다.

<7> 즉, 본 발명의 과제는 단백질 합성 억제 유전자의 발현을 현저하게 증강하는 IFN-α에 있어서의 서브타입의 적절한 조합을 특정하고, 이러한 조합의 서브타입을 유효성분으로 함유하는 유전자의 발현 증강제와 그 용도를 제공함에 있다.

<8> 상기한 과제를 해결하기 위해 본 발명자들은 인간 IFN-α에서의 여러가지 서브타입의 분리 표품(標品)을 사용하여 개개의 표품이 세포에 대해 나타내는 작용을 각각 단독의 경우와 적절히 조합했을 경우에 대해 널리 조사하고, 그 결과를 서로 비교하였다. 그 결과, 인간 IFN-α에서의 서브타입인 IFN-α2 및 IFN-α8을 조합하여 세포에 작용시키면 그 세포내에서 2-5A 합성효소 유전자 등의 단백질 합성 억제 유전자의 발현량이 상승적으로 높아진다는 전혀 새로운 현상을 발견하였다. 그리고 이 현상은 2-5A 합성효소가 직접적으로 관여하게 되는 항바이러스 활성을 지표로 하여 조사했을 때에도 상승작용으로서 확인된다는 사실에 의해 뒷받침되었다. 본 발명은 본 발명자들에 의한 이들의 아주 새로운 발견에 근거한 것이다.

<9> 즉, 본 발명은 인간 IFN-α에서의 서브타입인 IFN-α2 및 IFN-α8을 유효성분으로서 함유해서 된 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제와, 이 증강제의 의약품을 비롯한 용도를 제공함으로써 상기한 과제를 해결하는 것이다.

<10> [발명을 실시하기 위한 최선의 형태]

<11> 본 발명은 인간 IFN-α에서의 서브타입(이하, 인간 IFN-α에서의 서브타입을 간단히 "서브타입"이라 할 경우가 있음)인 IFN-α2 및 IFN-α8을 유효성분으로서 함유해서 된 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제(이하, "본 발명의 증강제" 또는 "이 증강제"라 할 경우가 있음)에 관한 것이다. 본 발명에서 말하는 IFN-α2 및 IFN-α8는 Amos Bairoch(스위스국)에 의한 단백질 데이터 베이스 "SWISSPROT"에 수탁 코드 "P01563" 및 "P32881"을 부여하여 기록되어 있는 이들 양 서브타입의 아미노산 서열(어느것이라도 N 말단부의 시그날 서열을 포함함. 각각 본 명세서에서의 서열표에 서열번호(SEQ ID NO:) 1 및 2로서 표시되어 있음)과 실질적으로 동등한 서열을 가지

며, 아래에서 상세히 설명하는 적당한 측정계에 있어서 항바이러스 활성이 확인되는 단백질을 의미하는 것이고, 그 고차적인 구조나 아미노산 서열 이외의 당쇄(糖鎖) 등의 구조는 불문이다. 여기서 말하는 "실질적으로 동등한 서열"이라 함은 사용하는 서브타입의 아미노산 서열이 IFN-α로 분류되는 것으로서 공지의 IFN-α에서의 서브타입의 아미노산 서열과 비교했을 때, 서열표에서의 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열과 높은 상동성을 나타내는 것을 의미한다. 공지의 인간 IFN-α에서의 서브타입의 아미노산 서열은, 예컨대 G. Allen et al., "Journal of Interferon and Cytokine Research", Vol. 16, pp. 181-184 (1966년)에 개개의 아미노산 서열을 보고하고 있는 원보(原報)를 인용하면서 요약정리되어 있다. 즉, G. Allen 등에 의한 이 문헌에는 IFN-α2에는 서열표에서의 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 단백질과 함께 이 아미노산 서열과는 1개소 아미노산이 다른 서열을 가진 다른 2종류의 단백질이 포함되며, 그리고 IFN-α8에는 서열표에서의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가진 단백질과 함께 이 아미노산 서열과는 4 또는 6개소 아미노산이 다른 서열을 가진 다른 2종류의 단백질이 포함되는 것이 나타나 있다. 본 발명에서 말하는 IFN-α2 및 IFN-α8도 서열번호 1 또는 2에 나온 아미노산 서열에 한정되는 것은 아니며, 서열표에서의 서열번호 1 또는 2에 나온 아미노산 서열에 있어서 통상, 10개소 이하, 바람직하게는 8개소 이하, 보다 바람직하게는 6개소 이하에서 아미노산이 상이한 아미노산 서열을 가질 경우가 있다.

<12> 본 발명에서 사용하는 서브타입은 상기한 바와 같이 정의되는 IFN-α2 및 IFN-α8인 한, 그 공급원이나 조제방법은 불문이다. 예컨대, 인간세포로부터 얻어지는 천연형의 서브타입이나 인간세포를 포함한 척추동물 세포, 무척추동물 세포, 식물세포, 대장균 및 고초균 등의 원핵세포 및 효모나 곰팡이 등의 진핵세포를 포함한 미생물 중의 어느것을 숙주로 하여 관용의 유전자 공학적 수법에 의해 산생시킨 재조합형의 서브타입 등이 유용한 외에, 소기의 활성을 유지하고 있는 한, IFN-α2 및/또는 IFN-α8로서 폴리펩티드쇄에 공유결합해 있는 수용성 고분자(다음에 설명함)를 가진 천연물 및 인위적인 조제물로서의 서브타입(이하, 간단히 "수용성 고분자에 의한 수식물(修飾物)"이라 할 경우가 있음) 등도 유리하게 이용할 수 있다. 그리고 수용성 고분자에 의한 수식물로서의 서브타입은, 예컨대 본래적으로 수용성 고분자를 가지고 있는 천연형의 서브타입이더라도, 그리고 미리 조제된 천연형 혹은 재조합형의 서브타입에 인위적으로 수용성 고분자를 공유결합시켜 얻게 되는 것이더라도 소기의 활성을 유지하고 있는 한, 어느것이라도 유리하게 이용할 수 있을지라도 후술하는 바와 같은 인위적인 수법에 의하여 얻어지는 수용성 고분자에 의한 수식물로서의 서브타입은, 이 증강제를 의약용도로 이용할 경우, 적용환자에게 투여했을 때, 그 생체내에서의 안정성이 높은 점에서 비교적 우수하다는 특징이 있다. 그리고 천연형의 서브타입을 사용하면 적용환자에 대한 항원성이 낮다는 점에서 유리한 경우가 있다. 한편, 재조합형의 서브타입은 비교적 저코스트로 조제 내지는 입수할 수 있다는 이점이 있다. 따라서 본 발명의 실시에 있어서는 이상과 같은 각각의 종류의 서브타입의 성질을 감안하여 상황에 따라 이용목적에 합치하는 것을 선택하여 이용할 수가 있다.

<13> 본 발명에서 사용하는 서브타입이 IFN-α2 또는 IFN-α8인가의 확인은, 목적으로 하는 서브타입을 통상의 방법에 따라 해독하여 얻어지는 부분 아미노산 서열이라든가, 혹은 이 서브타입의 공급원으로부터 대응하는 cDNA를 단리하여 그 염기서열의 해독결과로부터 추측되는 아미노산 서열과, 서열표에서의 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열의 해당부와의 동일성을 조사함으로써 실시할 수가 있다.

<14> IFN-α 활성(역가, titer)은 통상, 항바이러스 활성에 근거하여 IFN-α의 국제표준 시료와의 비교에 의해 국제단위(이하, "IU"로 기재할 경우가 있음)로서 표시된다. 인간 IFN-α의 국제표준 시료는 미합중국 국립 위생 연구소로부터 코드번호 "Ga23-901-532"로서 1 앰플당 25,000 IU 봉입한 상태로 제공되고 있다. 항바이러스 활성은 여러가지 방법에 의해 확인할 수 있다. 예컨대, J. Imanishi 등의 "Biken Journal", 제24권, 108 내지 109 페이지 (1981년)에 기재된 색소흡수법을 이용하면 바이러스가 세포에 미치는 세포변성 효과(cytopathic effect. 이하, 간단히 "CPE"라 할 경우가 있음)에 대하여 IFN-α가 나타내는 억제활성으로서 항바이러스 활성을 정량적으로 확인할 수가 있다. 본 명세서를 통하여 IFN-α활성은 이 방법에 따라 바이러스로서 Sindbis 바이러스를, 세포로서 인간 양막(羊膜) 유래의 수립 세포주인 FL 세포(ATCC CCL-62)를 사용하여 측정되는 IU로 표시하고 있다. 그 원리를 설명하면, 먼저, FL 세포에 대한 Sindbis 바이러스의 CPE를 50% 저해하는 상기 국제표준 시료의 농도 ×(IU/ml)를 구하고, 이어서 이것과 동일한 조건하에서 피험시료(목적으로 하는 IFN-α를 함유한 시료)가 CPE를 50% 저해하는 농도 Y (mg/ml)를 구하며, 얻어진 결과에 따라 피험시료 1 mg 당의 활성 Z (IU/mg)을 수식 Z = X/Y에 의하여 산출한다. 그리고 이 방법에 따라 구해지는 활성과 단백질 정량의 결과를 조합하면 비활성(IU/mg 단백질)이 구해진다.

<15> 본 발명에서 말하는 단백질 합성 억제 유전자라 함은 세포에서의 단백질 합성의 과정, 즉, DNA로부터 mRNA로의 전사 또는 mRNA로부터의 단백질의 번역 중의 어느 한 공정에 속하는 세포내에서의 반응을 억제 내지 저해하는

기능을 가진 단백질을 코드하는 유전자인데, 통상, IFN의 자극에 의해 그 발현이 유도되는 것을 의미한다. 여기서 말하는 전사의 공정은, DNA로부터 1차 전사 산물 RNA의 생성, RNA의 스플라이싱, RNA의 캡 구조(cap structure) 또는 폴리아데닐산의 부가 등의, 주형 DNA에 대응한 서열의 기능적인 mRNA를 생성하는 모든 세포내 반응을 포함한다. 그리고 위에서 말하는 번역의 공정은, mRNA으로의 리보좀의 결합을 계기로 하는, 소위 "단백질의 생합성의 개시", mRNA상의 유전암호에 따라 아미노산을 연결하는, 소위 "폴리펩티드쇄의 신장", mRNA상의 종시(終始) 코돈에서의, 소위 "단백질의 생합성의 종결" 등의, mRNA에 대응한 서열의 폴리펩티드를 생성하는 모든 세포내 반응을 포함한다. 본 발명의 대상이 되는 단백질 합성 억제 유전자의 구체적인 예로서는, 예컨대 2-5A 합성효소 유전자 및 PKR 유전자를 들 수 있다. 이러한 유전자의 산물인 2-5A 합성효소는 ATP를 기질로 하여 세포내에서 2-5A를 생성하며, 2-5A는 세포내에 불활성형으로서 존재하는 리보뉴클레아제 L을 활성형으로 변환하며, 활성형의 리보뉴클레아제 L이 RNA를 분해함으로써 단백질의 합성을 저해한다. 한편, PKR은 위에서 말하는 단백질의 생합성의 개시에 관여하는 인자인 eIF-2의 α서브유닛을 이중가닥 RNA 의존적으로 인산화하여 불활성화함으로써 단백질의 합성을 저해한다.

<16> 본 발명에서 말하는 "IFN의 자극에 의한 유전자 발현의 유도"라 함은, IFN에 의한 세포의 자극에 응답하여 그 세포내의 유전자의 발현의 레벨이 유전자의 전사량 및/또는 mRNA의 번역량의 상승으로서 확인되는 것을 의미한다. 유전자의 종류나 이 유전자를 가진 세포의 종류에도 따른다 하더라도 본 발명이 대상으로 하는 단백질 합성 억제 유전자는, IFN의 자극에 의해 그 발현 레벨이, 통상, 1.5배 이상, 바람직하게는 2배 이상, 더욱 바람직하게는 2.5배 이상 상승한다. 유전자의 발 레벨을 전사량으로 비교하자면, 예컨대, 통상의 정량적인 RT-PCR이나 northern blotting 등을 이용하면 좋다. 즉, 상기예의 유전자의 염기서열은 미합중국의 National Center of Biotechnology Information에 의한 핵산 데이터 베이스 "GenBank"에 각각 아래의 표 1에 나온 수탁 코드를 부여받아 등록되어 있기 때문에 이 정보에 의거하여 조제한 프라이머와 프로우브를 사용하여 이들 방법을 실시하면 목적으로 하는 유전자의 전사량을 양호한 감도로 정량적으로 검출할 수가 있다. 한편, 유전자의 발현 레벨을 번역량으로 비교하자면 그 유전자의 발현산물인 단백질을 특이적으로 정량하는 방법을 이용하면 좋은데, 예컨대, 대상으로 하는 유전자의 발현산물에 대한 특이항체가 입수가능한 경우에는 면역학적 수법(immunoassay 등)에 의해, 또한 대상으로 하는 유전자의 발현산물이 효소활성을 가진 경우에는 소정의 효소활성 측정법에 의해, 그리고 대상으로 하는 유전자의 발현산물이 생리활성을 가진 경우에는 소정의 바이오어세이에 의해 정량적으로 검출할 수가 있다.

<17> [표 1]

<18>

유전자 산물	염기서열의 수탁 코드
2-5A 합성효소	NM_016817, NM_002534, NM_016816, NM_006187, NM_002535
PKR	AH008429

<19> 본 발명의 발현 증강제는 IFN-α2 및 IFN-α8를 유효성분으로 함유하며, 각각의 서브타입이 단독으로 나타내는 단백질 합성 억제 유전자에 대한 발현유도 작용의 합, 혹은 이러한 합으로 상정되는 작용을 분명히 상회하는 작용, 즉 단백질 합성 억제 유전자의 발현유도에 있어서 상승작용을 발휘하는 것을 특징으로 한다. 이 상승작용은 앞서 설명한 바와 같이 하여 구해지는 전사량과 번역량에 근거하여 확인할 수가 있다. 그리고 본 발명에서 말하는 단백질 합성 억제 유전자의 발현산물은, 통상, IFN-α가 감수성 세포에 대해 나타내는 생리활성의 주요한 기능분자이기 때문에 이 증강제에 의한 상승작용은 이 증강제를 그것에 대한 감수성 세포에 작용시켰을 때의 이 감수성 세포에서의 IFN-α의 생리활성의 발현, 예컨대, 항바이러스 활성, 세포증식 억제활성, 아포토시스(apoptosis) 유도활성 등의 발현에서의 상승작용으로서도 확인 하는 것이 가능하다. 예컨대, 아포토시스 유도활성은 간장암 세포 등의 암세포에 이 증강제를 작용시켜 아포토시스에 특징적인 현상인 세포내 DNA의 단편화 및 Fas 등의 아포토시스 관련 분자의 발현을 정량적으로 관찰하는 관용의 방법에 의해 확인 할 수도 있다. 그리고 이 증강제는 IFN-γ에 의한 단백질 합성 억제 유전자의 발현유도 작용도 상승적으로 현저하게 증강하기 때문에 IFN-γ에 의한 이 유전자의 발현유도 작용의 증강제로서도 이용할 수가 있다.

<20> 상기한 바와 같이 하여 확인되는 이 증강제에 의한 상승작용을 IFN-α2와 IFN-α8 각각 단독에 의한 발현유도 작용의 합 혹은 이러한 합으로 상정되는 값을 수치 1로 하여 나타내면, 이 증강제는, 통상, 1.2 이상, 바람직하게는 1.5 이상으로 나타내어지는 발현유도 작용을 발휘한다. 그리고 이 상승작용은, 예컨대, 문헌[T. C. Chou, "Synergism and Antagonism in Chemotherapy", pp. 61-102 (1991), published by Academic Press]에 기재된

다변량(多變量) 해석(multivariate analysis)에 의해 확인 할 수가 있다. 이 방법에 의하면, 아래의 표 2에 나온 바와 같이 상이한 2종류의 약제에 의한 상승작용의 유무 및 강약을 콤비네이션 인덱스(CI; combination index)로 하여 수치화해서 가할 수가 있다. 이 방법에 의할 때, 이 증강제의 CI는 대상으로 하는 유전자에도 따르겠지만, 통상, 0.9 미만, 바람직하게는 0.85 미만을 나타낸다.

<21> [표 2]

<22>

CI	평가	부호
0.1 - 0.3	강한 상승작용	++++
0.3 - 0.7	상승작용	+++
0.7 - 0.85	완만한 상승작용	++
0.85 - 0.90	약간의 상승작용	+
0.90 - 1.10	거의 부가적 작용	±
1.10 - 1.20	약간 부(負)의 상승작용	-
1.20 - 1.45	완만한 부(負)의 상승작용	--
1.45 - 3.3	부(負)의 상승작용	---

<23> 본 발명의 발현 증강제에서의 IFN-α2와 IFN-α8의 활성비는 단백질 합성 억제 유전자의 적어도 1개에 대해 이러한 상승작용을 발휘하는 한 특히 제한은 없다. 대상으로 하는 유전자의 종류와 세포의 종류에도 따르겠지만, 양자의 활성비를 국제단위 환산으로 1:0.25 이상 1.5 미만으로 할 때에는 소기의 상승작용을 특히 현저하게 발휘하는 특징이 있다. 즉, 소기의 상승작용을 현저하게 발휘시키기 위한 본 발명의 발현 증강제에서의 IFN-α2 및 IFN-α8의 바람직한 존재비를 양자의 중량비로 하여 나타내면, 사용하는 서브타입의 정제도와 조제방법 등에도 따른다 하더라도 통상, 1:0.05 이상 0.5 미만, 바람직하게는 1:0.06 이상 0.4 미만이다. 그리고 본 발명에서 말하는 서브타입의 중량이라 함은, 목적으로 하는 서브타입을 그것이 단리된 상태에서 당쇄를 실질적으로 함유하지 않은 단순 단백질을 표준시료로 하고, Lowry법 및 자외선 흡수법 등의 관용의 단백질 정량법에 사용하여 구해지는 중량(폴리펩티드 체인 부분에 상당하는 중량)을 의미한다.

<24> 본 발명의 발현 증강제에서는 IFN-α2와 IFN-α8에 의한 상승작용을 소실하지 않는 범위에서 이들 이외의 서브타입을 함유시킬 수도 있다. 예컨대, IFN-α1 및 IFN-α7 등은 그 함유량이 비교적 낮은 경우에는 통상, IFN-α2와 IFN-α8에 의한 상승작용에 영향을 주지 않기 때문에 이 증강제에 함유시킬 수가 있다. 대상으로 하는 유전자의 종류와 세포의 종류에 따라 달라지더라도 IFN-α의 총 량에 대한 IFN-α2와 IFN-α8의 합계량의 백분율이 국제단위 환산으로 통상, 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 98% 이상인 이 증강제는 IFN-α2와 IFN-α8 이외에 함유되는 서브타입의 종류에 관계없이 유전자 발현의 유도에서 비교적 현저한 상승작용을 발휘하는 특징이 있다.

<25> 본 발명의 발현 증강제에서의 IFN-α2와 IFN-α8의 활성비 및 IFN-α의 총 량에 대한 IFN-α2와 IFN-α8의 합의 백분율은 아래와 같이 구할 수가 있다. 즉, 먼저, 이 증강제를 항(抗)인간 IFN-α 항체 칼럼 등을 이용하여, 함유하는 단백질이 실질적으로 IFN-α에서의 서브타입만으로 된 상태로 까지 정제한다. 이어서 이 정제표품을, 이온교환 크로마토그래피나 역상 크로마토그래피 등의 IFN-α에서의 서브타입을 분리하는 관용의 방법에 사용하여 분획하여 개개의 서브타입으로 단리한다. 필요에 따라 N 말단 아미노산 서열 분석 등에 의해, 단리된 서브타입이 인간 IFN-α에서의 어떠한 서브타입인가를 확인한다. 그리고 본 발명에서 정하는 방법에 따라, 단리된 개개의 서브타입의 비활성(IU/mg 단백질)을 구한다. 이것과는 별도로 상기한 IFN-α 정제표품을 IFN-α에서의 각 서브타입으로 분리하는 고속 액체 크로마토그래피 등에 의해 분석하고, 그 결과 얻어지는 크로마토그래피에서의 피이크 면적비에 따라 전(全) IFN-α량에 대한 IFN-α2 및 IFN-α8의 존재비(중량비)를 구한다. 이상의 결과로부터 얻어지는 IFN-α2 및 IFN-α8의 비활성과 존재비를 사용하면 목적으로 하는 활성비를 국제단위 환산으로 산출할 수가 있다.

<26> 본 발명의 발현 증강제는 여러가지 방법으로 조제할 수가 있다. 천연형의 IFN-α2 및 IFN-α8은 인간세포에 IFN-α을 산생시키고, 그 산생물로부터 IFN-α2 및 IFN-α8을 채취하여, 이 채취물을 사용하여 이 증강제를 조제할 수가 있다. 여기서 사용하는 인간세포는 IFN-α2 및 IFN-α8 중의 어느 하나 또는 양쪽을 적당한 유도제에 의한 자극에 의해 산생하는 세포이면 좋고, 그 산생능에 따라 2종 이상의 세포를 적절히 조합하여 이용할 수도 있다. 구체적으로는 인간생체로부터 단리된 임파구, 단구 등의 백혈구나 매크로파아지 외에 인간 임파아구 유사

세포 등의 인간 기원의 수립 세포주 등을 들 수 있다. 문헌[S. Hiraki in "Journal of National Cancer Institute", Vol. 59, p. 93 (1977)]에 기재된 인간 임파아구 유사 세포의 일종인 BALL-1 세포는 상기한 두가지 서브타입을 양호하게 산생하므로 본 발명의 실시에 특히 유용하다. 인간세포에 IFN-α를 산생시키기 위해서는 먼저, 이 세포를 생체외 또는 인간 이외의 온혈동물의 생체내에서 증식시킨다. 생체외에서의 증식은 배양기나 퍼멘터 등을 사용한다. 동물세포의 배양을 위한 관용의 방법에 의하면 좋고, 그리고 생체내에서의 배양은, 예컨대, 일본국 특공 소56-54158호 공보에 기재된 방법에 따라 햄스터, 정상 마우스, 누드 마우스, 모르모트, 래트, 토끼, 말, 돼지, 염소, 원숭이, 고양이 및 개 등의 포유류나 닭, 비둘기 등의 조류의 생체를 이용하는 관용의 방법에 의하면 좋다. 그리고 생체외 또는 생체내에서의 세포의 증식 도중 또는 그 전후의 적당한 시기에 이 세포에 IFN 유도제를 작용시킴으로써 IFN-α를 산생시킬 수가 있다. IFN 유도제로서는, 예컨대, 바이러스, 이중가닥 RNA, 세균, 엔도톡신 외에 IFN-α 자신이나 IL-1, TNF 등의 IFN-α의 발현을 유도하는 사이토카인을 들 수 있다.

<27> 이어서 IFN-α을 산생시키는 이상과 같은 공정의 산물로부터 IFN-α 또는 그 서브타입인 IFN-α2 및 IFN-α8의 한쪽 또는 양쪽을 채취한다. IFN-α의 채취는 관용의 방법에 의하면 좋은데, 예컨대, 염석, 투석, 여과, 원심분리, 농축, 동결건조, 겔 여과 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 어피니티 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 등전점 분획, 전기영동 등을 적절히 조합하여 분획되는 획분으로부터 소망의 획분, 예컨대, 소기의 항바이러스 활성을 나타내는 획분을 채취함으로써 소망의 레벨까지 정제된 IFN-α 표품을 얻을 수가 있다. 보다 구체적으로는 먼저, 상기한 바와 같이 하여 IFN-α를 산생시키는 공정의 산물을 항(抗) IFN-α 항체를 담체로 하는 어피니티 크로마토그래피 등의 크로마토그래피로써 분획하여 IFN-α 이외의 협잡 단백질을 실질적으로 함유하지 않는 정제표품을 얻은 다음에 이 정제표품을 이온교환 크로마토그래피나 역상 크로마토그래피 등에 의해 분획하여 개개의 서브타입을 분리하면 전기영동적으로 실질적으로 단일의 IFN-α2 및 IFN-α8의 정제표품을 얻게 된다. 이 정제 서브타입을 필요에 따라 다시 농축, 건조 등의 처리를 가한 후에 소망의 활성비로서 배합하거나, 혹은 필요에 따라 다음에 설명하는 재조합형 서브타입이나 수용성 고분자에 의한 수식물(修飾物)로서의 서브타입으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상과 조합하여 IFN-α2 및 IFN-α8의 활성비가 소망의 비가 되도록 배합하면 이 증강제의 유효성분이 얻어진다. 그리고 IFN-α를 채취하는 과정에서 IFN-α2와 IFN-α8의 활성비가 소기의 범위에 있고, 또한 본 발명의 목적달성을 방해하지 않는 정제 레벨로 까지 도달해 있는 표품이면 이것을 이 증강제의 유효성분으로서 이용할 수도 있다. 더욱이 IFN-α 표품의 시판품(일본국의 Cosmo Bio주식회사 판매의 연구용 시약 등)으로부터 상기한 바와 같이 하여 단리된 IFN-α2와 IFN-α8 표품을 유효성분으로 사용한다거나, IFN-α2와 IFN-α8의 활성비 및 그 정제 레벨이 소기의 레벨에 도달해 있는 경우에는, 이러한 시판품으로부터 정제된, 양 서브타입을 함유하고 있는 표품을 그대로 이 증강제의 유효성분으로 하는 것도 가능하다.

<28> 한편, 재조합 DNA 기술을 이용하여 이 증강제를 조제하자면, 먼저, 공지의 정보를 참조하여 목적으로 하는 서브타입을 코드하는 DNA를 입수한다. 예컨대, 문헌[M. O. Diaz et al, in "Journal of Interferon and Cytokine Research", Vol. 16, No. 2, pp. 179-180 (1996)]에는 인간 IFN-α에서의 각종 서브타입을 코드하는 DNA를 보고하고 있는 논문이 정리되어 있다. 그리고 관용의 핵산 데이터 베이스도 유용한데, 예컨대, 미합중국의 National Center of Biotechnology Information에 의한 핵산 데이터 베이스 "GenBank"에 수탁 코드 "J00207" 및 "X03125"로서 등록되어 있는 뉴클레오티드 서열은 각각 IFN-α2와 IFN-α8을 코드하는 DNA의 서열이다[각각, 본 명세서의 서열표에 서열번호(SEQ ID NO:) 3 및 4로서 나타나 있음]. 이들 정보에 근거하여, 적당한 공급원으로부터 얻은 RNA 또는 DNA를 사용하여 PCR 등의 DNA의 클로화를 위한 관용의 방법을 적용하면 목적으로 하는 DNA를 얻을 수가 있다. 이어서 입수된 DNA를 소망의 발현 벡터에 삽입한다. 본 발명에서 사용할 수가 있는 발현 벡터로서는, 예컨대, pET, pKK223-3, pcDNAI/Amp, BCMGSNeo, pcDL-SRα, pKY4, pSV2-neo, pSV-2gpt, pCDM8, pCEV4, pME18S, pEF-BOS 등의 플라스미드 벡터를 들 수 있다. 정제가능한 벡터는, 통상, 프로모우터, 인핸서, 복제 기점(origin), 전사종결 부위, 스플라이싱 서열 및/또는 선택서열 등의 본 발명의 DNA가 개개의 숙주에서 발현하기 위한 적당한 염기서열을 함유하고 있다. 그리고 프로모우터로서, 예컨대, 열 쇼크(heat shock) 단백질 프로모우터, 혹은 동일한 특허 출원인에 의한 일본국 특개 평7-163368호 공보에 개시된 프로모우터를 사용할 때에는 형질 전환체에서의 이 DNA의 발현을 외부자극에 의해 인위적으로 제어할 수가 있다.

<29> 이어서, 이러한 재조합 DNA를 적당한 숙주에 도입한다. 숙주로서는 이 분야에서 관용되는 적당한 원핵세포 및 진핵세포를 포함한 미생물과, 식물, 척추동물 및 무척추동물을 포함한 동물에서 유래하는 세포, 더욱이는 동식물체 그 자체를 사용할 수가 있다. 동물유래의 숙주세포의 구체적인 예로서는, 예컨대, 3T3-Swiss albino 세포(ATCC CCL-92), C1271 세포(ATCC CRL-1616), CHO-K1 세포(ATCC CCL-61), CV-1 세포(ATCC CCL-70), COS-1 세포(ATCC CRL-1650), HeLa 세포(ATCC CCL-2), MOP-8 세포(ATCC CRL-1709) 및 이들의 변이주를 비롯하여 인간, 원숭이, 마우스 및 햄스터 유래의 상피계 세포, 간질계 세포 및 조혈계 세포를 들 수 있다. 이러한 숙주에 본 발

명의 DNA를 도입하자면, 예컨대, 공지의 DEAE-덱스트란법, 인산칼슘법, 전기영동법, 리포펙션법(lipofection), 마이크로인젝션법(microinjection), 더욱이는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 헤르페스 바이러스, 백시니아 바이러스 등에 의한 바이러스 감염법 등을 사용하면 좋다. 이렇게 하여 얻어지는 형질 전환체에서 소기의 서브타입을 산생하는 클론을 선택하면 된다. 이렇게 하여 얻어지는 클론을 적당한 배지에서 배양하고, 필요에 따라 유도제를 가하여 IFN-α를 산생시키고, 그 산물을 앞서 설명한 천연형의 IFN-α2와 IFN-α8의 조제방법과 마찬가지로, 혹은 사용한 숙주-벡터계에 적합한 관용의 방법에 따라 정제하면 재조합형의 IFN-α2와 IFN-α8을 얻을 수 있다. 그리고 소망의 활성비로 양 서브타입을 배합하거나, 혹은 필요에 따라 앞서 설명한 천연형 서브타입이나 다음에 설명하는 수용성 고분자에 의한 수식물로서의 서브타입로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상과 조합하고, IFN-α2와 IFN-α8의 활성비가 소망의 비가 되도록 배합하면 이 증강제의 유효성분이 얻어진다.

<30> IFN-α2 및/또는 IFN-α8의 수용성 고분자에 의한 수식물을 조제하기 위해서는, 먼저, 상기한 어느 한가지 방법에 의해 천연형 또는 재조합형의 목적으로 하는 서브타입을 조제하고, 얻어진 서브타입에 수용성 고분자를 공유결합시키는 공지의 반응에 사용하면 된다. 본 발명에서 말하는 수용성 고분자라 함은, 동일종 또는 2종 이상의 모노머에 의한 반복구조에 의해 본질적으로 구성된다. 통상, 분자량 500 이상의 물질인데, 물에 대한 용해성을 가진 분자를 의미하며, 천연분자, 합성분자 및 이들의 부분 분해물과 수식물을 포함한다. 본 발명에서 이용할 수 있는 수용성 고분자로서는, 예컨대, 가용성 전분, 아밀로펙틴, 덱스트린, 폴리수크로오스, 풀룰란, 엘시난, 카아들란, 아리비아 검, 트라가칸트 검, 구아르 검, 크산탄 검, 카라기이난 검, 히알루론산, 헤파린, 글루코만난, 키토산, 리포다당, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 아시알로 오로소무코이드, 아시알로페투틴, 알부민, 갈락토오스 수식 알부민, 폴리리신 및 갈락토오스 수식 폴리리신 등을 들 수 있으며, 본 발명의 실시에서 바람직한 분자량은 사용하는 수용성 고분자의 종류에 따라 평균 분자량으로서, 통상, 500 내지 10,000,000, 보다 바람직하게는 10,000 내지 1,000,000의 범위이다.

<31> 상기한 바와 같은 수용성 고분자를 IFN-α2 및/또는 IFN-α8에 공유결합시키자면, 예컨대, 디아조법, 펩티드법, 알킬화법, 가교법, 아미도 결합법 등의 공지의 방법에 의하면 좋다. 예컨대, 동일한 특허 출원인에 의한 일본국 특개 평3-93730호 공보 및 동일한 특허 출원인에 의한 일본국 특허 제1162778호 공보에는 그 대표적인 방법이 상세히 설명되어 있는데, 본 발명에서도 유리하게 이용할 수가 있다. 그리고 트란스글루타미나아제의 작용을 이용하여 소망의 단백질에 수용성 고분자를 공유결합시키는 관용의 방법도 유리하게 이용할 수가 있다. 예컨대, 국제특허출원 공개공보 WO96/10089에는 트란스글루타미나아제의 작용을 이용하는 방법이 개시되어 있다.

<32> 디아조법에 의해 수식물을 얻자면, 목적에 따라 선택되는 수용성 고분자에, 예컨대, p-아미노벤질기, p-아미노벤조일기, m-아미노아니솔기, m-아미노벤질옥시메틸기, 3-(p-아미노페녹시)-2-히드록시프로피오닐기 및 3-(p-아미노-m-메틸아닐리노)-5-클로로트리아지닐기 등의 방향족 아미노기를 공지의 방법에 의해 도입하여 얻은 수용성 고분자의 유도체를 IFN-α2 및/또는 IFN-α8 서브타입과 반응시킨다.

<33> 펩티드법에 의해 수식물을 얻자면, 예컨대, 카르복실기를 본래적으로 가진 수용성 고분자 혹은 카르복실기를 도입한 수용성 고분자를 통상적인 방법에 의해 산 아지드, 산 클로라이드, 카르복시이미드, 이소시아네이트 등의 카르복실산 유도체로 하거나, 혹은 히드록시기를 본래적으로 가진 수용성 고분자에 시아누르산 할로겐화물을 반응시켜 시아누르산 할로겐화물 활성화 수용성 고분자로 하는 등으로 하여 수용성 고분자를 활성화하고, 이러한 활성화 수용성 고분자와 IFN-α2 및/또는 IFN-α8 서브타입을 반응시킨다.

<34> 알킬화법에 의해 수식물을 얻자면, 예컨대, 적당한 수용성 고분자에 클로로아세틸기, 브로모아세틸기, 요오도아세틸기, 또는 할로겐화 트리아지닐기 등을 통상적인 방법에 의해 도입하여 얻어지는 수용성 고분자의 할로겐화 알킬 유도체를 IFN-α2 및/또는 IFN-α8 서브타입과 반응시킨다.

<35> 가교법에 의해 수식물을 얻자면, 예컨대, IFN-α2 및/또는 IFN-α8 서브타입과 수용성 고분자를, 예컨대, 글루타르알데히드, 글리옥살, 숙신알데히드, 헥사메틸렌 디이소시아네이트, 톨루엔-2,4-디이소시아네이트, 비스-아조벤지딘 및 N,N'-에틸렌-비스-말레이드 등의 가교시약 존재하에 반응시킨다.

<36> 아미도 결합법에 의해 수식물을 얻자면, 예컨대, 아미노기를 본래적으로 가진 수용성 고분자 혹은 아미노기를 도입한 수용성 고분자를, 예컨대, 브로모아세틸브로마이드, 클로로부티릴클로라이드, 플루오로프로피오닐플루오라이드, 요오도발레릴 오요다이드 등의 할로아실할라이드와 반응시켜 얻어지는 활성화 수용성 고분자와 IFN-α2 및/또는 IFN-α8 서브타입과 반응시킨다.

<37> 트란스글루타미나아제(EC 2.3.2.13)의 작용에 의해 수식물을 얻자면, 예컨대, 아미노기를 본래적으로 가진 수용성 고분자 혹은 아미노기를 도입한 수용성 고분자와 IFN-α2 및/또는 IFN-α8 서브타입을 소망의 기원의 트란스

글루타미나아제 존재하에 반응시킨다. 반응조건은 트란스글루타미나아제에 의해 촉매되는, 단백질 중의 글루타민 잔기의 γ-카르복시아미도기와 1급 아민과의 사이에서의 아실기 전이반응을 방해하지 않는 것이면 좋다. 미생물 기원, 특히 방선균(Actinomycetes) 기원의 이 효소는 열이나 pH 안정성이 기타의 기원의 것에 비하여 비교적 높기 때문에 본 발명의 실시에서의 수식물의 조제에 특히 유용하다.

<38> 상기한 수식물을 얻기 위한 반응에서의 IFN-α2 또는 IFN-α8과 수용성 고분자와의 비율은 반응방법에 따라 중량비로서, 통상, 1:0.001 내지 1:1,000, 바람직하게는 1:0.01 내지 1:100의 범위에서 선택된다. 반응방법에 따라서는 이 범위를 크게 하회하면 IFN-α2 또는 IFN-α8끼리의 결합이 현저하게 일어날 경우가 있고, 한편, 이 범위를 크게 상회하면 수용성 고분자끼리의 결합이 현저하게 일어날 경우가 있으므로 바람직하지 않다. 반응의 온도, pH 및 시간은 IFN-α2와 IFN-α8가 실활한다거나 분해한다거나 함이 없고, 또한 부반응의 진행을 될 수 있는 한 억제하는 것이면 좋은데, 온도를, 통상, 0℃ 내지 100℃, pH 약 1 내지 12로 하고, 반응시간능 0.1 시간 내지 50 시간으로 하는 것이 비교적 바람직하다. 그리고 예컨대, IFN-α2 및/또는 IFN-α8의 수식물의 이용목적 등에 따라 평균 분자량과 분자량 분포의 점에서 특정의 특성을 나타내는 수용성 고분자에 의한 수식물이 필요로 하게되는 경우에는 이러한 수식물의 조제시에 목적에 합치한 특성을 가진 수용성 고분자를 재료로 사용하는 것이 바람직하다. 시판의 수용성 고분자의 조제품에는 평균 분자량이나 분자량 분포를 특정하여 제공하고 있는 것이 있으므로 이러한 시판의 조제품 중에서 목적에 합치하는 것을 선택하여 재료로 할 수가 있다. 그리고 동일한 특허 출원인에 의한 일본국 특개 평6-65302호 공보 및 특허 제866889호 공보에는 풀룰란 산생능을 가진 미생물의 배양조건을 제어하여 소망의 평균 분자량과 분자량 분포를 가진 풀룰란을 산생시키는 방법이 개시되어 있는데, 이들 방법은 본 발명에서 사용하는 수식물의 재료의 조제에 유용하다. 이상과 같은 IFN-α2 및/또는 IFN-α8의 수식물 중에서 본질적으로 말토트리오스를 반복단위로 하는 풀룰란 및 엘시난 등의 다당류, 바람직하게는 분자량이 10,000 내지 1,000,000의 범위에 있는 이 다당에 의한 수식물은 인간 생체내에서의 안정성이 높고 인간 생체에 대한 항원성이 낮다는 점에서 비교적 우수하므로, 본 발명에서 특히 유리하게 이용할 수 있는 것들 중의 하나이다.

<39> 이상과 같은 반응에 의해 수식된 IFN-α2와 IFN-α8 서브타입은 천연형 혹은 재조합형의 IFN-α2와 IFN-α8의 정제방법에 준하여 정제수단에 사용함으로써 소망의 레벨까지 정제된 표품으로서 얻을 수가 있다. 그리고 이상과 같이 하여 얻어지는 수식된 IFN-α2와 IFN-α8을 소망의 활성비로서 배합하거나, 혹은 필요에 따라 앞서 설명한 천연형 및 재조합형 서브타입으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상과 조합하여 IFN-α2와 IFN-α8의 활성비가 소망의 비가 되도록 배합하면 좋다.

<40> 이렇게 하여 얻어지는 IFN-α2와 IFN-α8 서브타입을 함유한 조성물은 그 자체가 목적에 따라 담체, 완충제, 안정제, 용제, 희석제 등의 적당한 다른 성분과 배합함으로써 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제로서 여러 종류의 분야에서 이용할 수가 있다. 예컨대, 이 증강제는 인간 생체에서 단백질 합성 억제 유전자의 발현에 의해 세포의 이상을 억제하는 효과를 현저히 발휘하며, 더욱이 이 증강제에 함유되는 IFN-α2와 IFN-α8은 어느것이라도 인간을 대상으로 하는 의약용도에 널리 이용되기 때문에 이 증강제를 의약용 조성물의 유효성분으로서 유리하게 이용할 수가 있다. 본 발명에 의한 의약용 조성물은 유효성분으로서의 이 증강제와 더불어, 통상, 생리학적으로 허용되는, 즉 의약품 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제, 안정제, 용제, 완충제, 더욱이는 필요에 따라 기타의 생리활성 물질 1종 혹은 복수종을 추가로 함유하는 조성물로 하여 액상, 고체상, 반고체상 등, 적응증 및 적용방법에 따라 적절한 형태로 제공된다. 여기서 이용할 수 있는 안정제로서는, 구체적으로는 혈청알부민이나 젤라틴 등의 단백질, 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 말토오스, 트레할로오스, 소르비톨, 말티톨, 만니톨, 락티톨 등의 당질을 들 수 있다. 그리고 완충제로서는 시트르산염 혹은 인산염을 주체로 하는 완충제 등을 들 수 있고, 또한, 병용할 수 있는 기타의 생리활성 물질로서는, 예컨대, 염산 나이트로젠 머스타드 N-옥사이드, 메르캅토푸린, 에토포시드, 악티노마이신 D, 염산 미토크산트론, L-아스파라기나아제, 렌티난, 아시클로비르 등의 외에 IL-1, TNF 및 IFN-γ등의 사이토카인을 들 수 있다.

<41> 이상과 같이 구성되는 본 발명에 의한 의약용 조성물은, 단백질 합성 억제 유전자의 발현이 직접적 또는 간접적으로 관여하여 증상이 치료, 완화 또는 예방되는 질환, 즉 이 유전자의 발현에 감수성을 나타내는, 예컨대, 면역계, 조혈조직, 순환기, 피부조직, 소화기, 신경계, 근육, 눈 등에 있어서의 여러가지 질환, 보다 상세하게는 알레르기, 류마티즘, 에이즈, 백혈병, 악성 흑색종, 육종, 결막염, 간염, 장염 등을 위한 치료약, 완화약, 예방약으로서 이용할 수가 있다. 투여경로는 대상질환에 따라 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 장강(腸腔)내, 경피, 경구 등으로부터 적절히 선택된다, 투여량은 대상자의 연령, 질환의 종류 및 증상, 투여경로에 따르는데, 이 의약용 조성물은, 근육내 주사에 의해 투여할 경우, 성인 1인, 1일당 유효성분의 총량으로서 국제단위 환산으로, 통상, 100만 IU 내지 1000만 IU, 보다 바람직하게는 300만 IU 내지 600만 IU의 용량으로 연일 또는 증상을 관찰하

면서 1일 또는 2일 이상의 간격을 두고 투여된다. 그리고 경구투여할 경우에는 성인 1인, 1일당, 통상, 10 IU 내지 2000 IU, 바람직하게는 20 IU 내지 800 IU, 더욱 바람직하게는 40 IU 내지 400 IU의 용량으로 연일 또는 증상을 관찰하면서 1일 또는 2일 이상의 간격을 두고 투여된다.

<42> 이 증강제가 IFN-α2 또는 IFN-α8 서브타입 단독의 경우에 비하여 단백질 합성 억제 유전자의 발현을 보다 현저하게 유도하는 것은 이 증강제를 IFN-α 감수성 세포에 작용시켰을 때의 세포내의 반응을 보다 명확히 관찰할 수 있는 것을 의미한다. 따라서 이 증강제는 IFN-α가 그 감수성 세포에 작용하여 단백질 합성 억제 유전자의 발현을 유도할 때의 세포내의 분자기구, 예컨대, 세포내 정보전달계를 분자 레벨에서 해석하기 위한 연구용 시약으로서 유리하게 이용할 수 있다.

<43> 이 증강제에 의한 상승작용은 이 증강제가 대상으로 하는 유전자의 전사조절 영역의 구조에 오로지 의존하고 있고, 유전자의 발현산물 자체에는 통상적으로 관여하지 않는다. 따라서 이 증강제가 대상으로 하는 유전자의 전사조절 영역을 단리하고, 그 제어하에 소망의 단백질을 코드하는 유전자(구조 유전자)를 배치한 재조합 DNA를 준비하고, 이 재조합 DNA를 IFN-α 감수성 세포에 도입한 후에 이 세포를 이 증강제로써 자극하면, 이 세포는 목적으로 하는 단백질을 현저하게 발현하게 된다. IFN-α 감수성 세포로서는, 본래적으로 IFN-α 수용체를 세포표면에서 발현하고 있는 인간세포 외에 재조합 DNA 기술에 의해 인간 IFN-α 수용체를 세포표면에서 발현하도록 작출한 인간 또는 인간 이외의 척추동물 세포도 이용할 수 있다. 그리고 여기서 산생의 대상으로 하는 단백질은 그것을 코드하는 DNA를 입수할 수 있는 한, 인간기원이어도 좋고, 그 이외의 기원, 예컨대, 인간 이외의 척추동물, 무척추동물, 식물 또는 미생물 기원의 것이어도 좋다. 따라서 이 증강제는 재조합 단백질의 산생에서의 유도제로서도 유리하게 이용할 수 있다.

<44> 위에서 설명한 바와 같이 IFN-α2와 IFN-α8 서브타입은 단백질 합성 억제 유전자의 발현유도에서 상승작용을 나타내므로 IFN-α2를, IFN-α8을 사용하여 단백질 합성 억제 유전자의 발현을 유도할 때에 이러한 유도작용을 증강하기 위한 용도로서, 그리고 역으로, IFN-α8을, IFN-α2를 사용하여 단백질 합성 억제 유전자의 발현을 유도할 때에 이러한 유도작용을 증강하기 위한 용도로서 각각 사용할 수도 있다. 이러한 사실에 근거하여 본 발명은 IFN-α2 또는 IFN-α8을 유효성분으로 하는 유전자 발현의 증강제 및 이러한 어느 한쪽 혹은 양쪽의 서브타입을 사용하는 이 유전자의 발현의 증강방법도 제공하는 것이다. 본 발명에 의한 이들 증강제 및 증강방법은 이 증강제를 이용할 수 있는 의약품, 연구용 시약, 단백질 제조 등의 여러가지 분야에서 유리하게 이용할 수 있다.

<45> 그런데 본 발명이 개시하는 발현 증강제의 구성은 유전자 요법에 응용할 수도 있다. 즉, 통상의 유전자 요법에 따라 IFN-α2와 IFN-α8을 코드하는 DNA를, 예컨대, 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 수반 바이러스 등의 바이러스 유래의 벡터에 삽입하거나, 이 DNA를 필요에 따라 기타의 염기서열과 연결한 후에 카티오닉 폴리머 및 막융합형 리포솜 등의 리포솜에 포매(包埋; embedding)하고, 이 상태에서 단백질 합성 억제 유전자의 발현에 감수성을 나타내는 질환에 걸린 환자에게 직접 주입한다. 혹은 상기 DNA를 적당한 벡터에 삽입한 후에 이 환자로부터 채취한 임파구에 생체외에서 도입하고, 이것을 환자에게 자가이식한다. 더욱이 각 서브타입을 코드하는 DNA를 전사활성이 다른 전사조절 영역의 제어하에 배치하도록 조작함으로써 각 서브타입의 발현량의 비를 가감하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 이와 같은 유전자 요법을 받은 환자의 생체내에서는 IFN-α2와 IFN-α8 서브타입이 공존하게 되므로 위에서 예시한 바와 같은 질환의 치료·완화가 달성된다. 더욱이 이들 유전자 요법을 실시하기 위한 일반적 순서는, 예컨대, 일본국의 島田隆, 齊藤泉, 小澤敏之 편집, "實驗醫學別冊바이오메뉴얼 UP 시리즈 유전자 치료의 기초기술" (1996년, 羊土사 발행) 등에 상세히 설명되어 있다.

<46> 이하, 실험 및 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다.

<47> 실험 1: 단백질 합성 억제 유전자의 발현유도에서의 IFN-α2와 IFN-α8에 의한 상승작용

<48> 실험 1-1: IFN-α2 및 IFN-α8의 조제

<49> 실험 1-1(a): IFN-α2 서브타입 산생 형질 전환체의 조제

<50> 핵산 데이터 베이스 "GenBank"로부터 수탁 코드 J00207로서 등록되어 있는 IFN-α 유전자의 염기서열에 관한 정보를 입수하였다. 이 서열은, 서열표에 서열번호 3으로 나타나 있다. 이 정보에 근거하여 설계해서 조제한 프라이머와, 주형으로서의 인간 염색체 DNA를 사용하여 통상적인 PCR에 의해 5' 말단에 개시 코돈이 부가된 성숙형의 IFN-α2에 대응하는 염기서열(서열표의 서열번호 3에서의 염기번호 580 내지 1077)을 함유한 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭한 DNA 단편을 통상적인 방법에 의해 대장균용의 발현 벡터(일본국의 東洋紡績 주식회사 판매, "pET-3a)의 프로모우터의 하류에 삽입하였다. 이렇게 하여 IFN-α2 발현 플라스미드를 조제하였다. 이 플라스미드를 통상적인 방법에 의해 대장균 컴피턴트 셀(일본국의 東洋紡績 주식회사 판매, "BL21 (DE3)")에 도입하여

IFN-α2 산생(産生) 형질 전환체를 얻었다.

<51> 수탁 코드 X03125를 부여받아 등록되어 있는 IFN-α8 유전자의 염기서열에 관한 정보를 핵산 데이터 베이스 "GenBank"로부터 입수하였다. 이 서열은 서열표에 서열번호 4로 나와 있다. 이 정보에 근거하여 설계해서 조제한 프라이머와, 주형으로서의 인간 염색체 DNA를 사용하여 통상적인 PCR에 의해 5' 말단에 개시 코돈이 부가된 성숙형의 IFN-α8에 대응하는 염기서열(서열표의 서열번호 4에서의 염기번호 117 내지 614)을 함유한 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭한 DNA 단편을 통상적인 방법에 의해 대장균용의 발현 벡터(일본국의 東洋紡績 주식회사 판매, 상품명 "pET-3a")의 프로모우터의 하류에 삽입하였다. 이렇게 하여 IFN-α8 발현 플라스미드를 조제하였다. 이 플라스미드를 통상적인 방법에 의해 대장균 컴피턴트 셀(일본국의 東洋紡績 주식회사 판매, "BL21 (DE3)")에 도입하여 IFN-α8 산생 형질 전환체를 얻었다.

<52> 실험 1-1(b): IFN-α 서브타입의 산생과 정제

<53> 실험 1-1(a)에서 얻은 형질 전환체를 각각 통상적인 방법에 따라 배지로서 L-브로드(broth) 배지를 사용하고, 유도제로서 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 사용하여 배양해서 각각 서브타입을 균체내에 산생시켰다. 배양물을 원심분리하여 균체를 회수하여 PBS에 현탁후 초음파 처리하여 균체를 파쇄하였다. 균체 파쇄물을 원심분리하고, 상청획분을 채취하였다. 채취한 각각의 상청획분을 통상적인 방법에 따라 소수(疏水) 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 분획하여 항바이러스 활성획분을 정제하였다. 통상적인 방법에 따라 환원조건하에서의 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 사용하여 얻어진 정제획분이 전기영동적으로 실질적으로 단일인 것을 확인하였다.

<54> 각각의 형질 전환체로부터 얻은 겔 여과 정제획분의 일부를 취하여 통상적인 방법에 따라 환원 카르복시이미드 메틸화 처리한 후에 에드만 분해법에 의해 N 말단으로부터 30 잔기까지의 아미노산 서열을 해독하였다. IFN-α2 산생 형질 전환체로부터 얻은 정제획분은 N 말단이 메티오닌이고, 그 이후의 서열은 서열표의 서열번호 1에 나온 IFN-α2의 아미노산 서열(데이터 베이스 "SWISSPROT", 수탁 코드 "P01563")에서의 시그날 펩티드를 제외한 N 말단부의 아미노산 서열(아미노산 번호 24 내지 52)와 완전히 일치하였다. 한편, IFN-α8 산생 형질 전환체로부터의 경우는 N 말단이 메티오닌이고, 그 이후의 서열은 서열표의 서열번호 2에 나온 IFN-α8의 아미노산 서열(데이터 베이스 "SWISSPROT", 수탁 코드 "P32881")에서의 시그날 펩티드를 제외한 N 말단부의 아미노산 서열(아미노산 번호 24 내지 52)와 완전히 일치하였다. 이상의 결과로부터 이 실험에서 얻은 전기영동적으로 단일의 두 가지 정제표품이 각각 IFN-α2와 IFN-α8의 정제표품인 것을 확인하였다.

<55> 실험 1-1(c): 비활성

<56> 문헌[J. Imanishi in "Biken Journal", Vol. 24, pp. 108-109]에 기재된 색소 흡수법에 따라 인간 양막 유래의 수립 세포주인 FL 세포에 대한 Sindbis 바이러스에 의한 세포변성 효과(CPE)에 대한 IFN-α 시료의 억제작용을, 색소로서 neutral red를 사용하여 정상세포에 흡수시킨 색소량을 파장 540 nm의 흡수에서 측정함으로써 정량적으로 구하였다. IFN-α 시료로서 실험 1-1(b)에서 얻은 IFN-α 서브타입의 정제표품을 2배마다 단계적으로 희석한 단계 희석액과, IFN-α의 국제표준품 "Ga23-901-532" (25,000 IU/앰푸울, 미합중국 국립 위생 연구소로부터 입수)의 2배마다의 단계 희석액을 사용하여 각각 이 CPE를 50% 저해했을 때의 희석 배율을 구하였다. 얻어진 결과로부터 실험 1-1(b)에 의한 IFN-α 서브타입의 정제표품의 항바이러스 활성(IU/ml)을 산출하였다. 한편, 이것과는 별도로 실험 1-1(b)에 의한 IFN-α 서브타입의 정제표품의 단백질 함량을 Lowry법에 따라 측정하였다. 이상의 결과로부터 실험 1-1(b)에 의한 IFN-α2 정제표품의 비활성은 7.2×10^7 IU/mg 단백질, IFN-α8 정제표품의 비활성은 3.0×10^8 IU/mg 단백질로 산출되었다.

<57> 실험 1-2: 단백질 합성 억제 유전자의 발현의 유도에서의 IFN-α2와 IFN-α8의 상승작용

<58> 인간 간세포 유래의 수립주 세포인 HepG2 세포(ATCC HB-8065)를 10% (v/v) 소태아 혈청을 함유한 RPMI1640 배지 중에서 통상의 방법에 의해 소기의 세포수에 달할 때까지 배양한 후, 이 배지에 의해 세포밀도 1×10^5 개/ml의 세포 부유액을 조제하였다. 이 세포 부유액을 96 웰 마이크로플레이트에 1 웰당 100 ㎕씩 주입하고 5% (v/v) CO_2 인큐베이터 중에서 37℃에서 48 시간 배양하였다.

<59> 실험 1-1(b)에서 얻은 정제표품을 사용하고, IFN-α2와 IFN-α8을 국제단위 환산으로 10:0, 8:2, 6:4, 5:5, 4:6, 2:8, 또는 0:10의 활성비로 함유하며 IFN-α 활성의 계산상의 총 합이 1×10^4 IU/ml인 IFN-α2/IFN-α8 혼합액을 준비하였다. 각각의 혼합액을 상기한 배지로써 2배 마다 단계희석하였다. 그리고 여기서 준비한 혼합

액에서의 IFN-α2와 IFN-α8의 중량비는 실험 1-1(c)에서 구한 비활성에 근거하여 계산하면, 각각 100:0. 94:6, 86:14, 81:19, 74:26, 51:49 및 0:100이다.

<60> 마이크로플레이트 중에서 48 시간의 배양을 끝낸 HepG2 세포의 각 웰에 개개의 활성비의 IFN-α2/IFN-α8 혼합액의 각 단계 희석액을 각각 50 ㎕씩 첨가하고, 각 웰 속을 충분히 혼합한 후 다시 24 시간 배양을 계속하였다.

<61> 그 후, 각 웰로부터 배양 상청을 제거하고, 각 웰에 미리 준비해둔 바이러스 밀도 3 $\times 10^5$ pfu/ml의 VSV(수포성 구내염 바이러스)액을 100 ㎕씩 첨가하고, 다시 24 시간 배양하였다. 그리고 대조로서 상기와 동일한 1 웰당의 세포수로부터 개시하는 한편, IFN-α 처리 및 VSV 처리를 하지 않은 계를 만들어 동일한 시간동안 배양하였다. 또한 모든 배양계에 대해 동일한 것을 3조씩 만들었다.

<62> 배양후, 각 웰로부터 세포를 회수하여 통상적인 방법에 따라 각 웰에서의 생세포수를 계측하고, 각 계의 평균치를 구하였다. 이 결과에 근거하여 각 IFN-α2/IFN-α8 혼합액에 대해 HepG2 세포의 생존 곡선(혼합액의 희석배율에 대해 생세포수를 플로트)을 작성하였다. 생존 곡선에서 각 IFN-α2/IFN-α8 혼합액이 HepG2 세포의 생존을, 대조의 세포수의 50%을 유지했을 때의 희석배율로부터 HepG2 세포에 대한 VSV의 CPE(세포변성 효과)를 50% 저해하는 각 혼합액의 농도(IC_{50}, 1 ml당의 계산상의 IFN-α 활성의 총 합으로서, IU/ml)의 평균치를 산출하였다. 그리고 산출된 값을 문헌[T. C. Chou, "Synergism and Antagonism in Chemotherapy", pp. 61-102 (1991), published by Academic Press]에 기재된 다변량 해석법(multivariate analysis)에 의해 해석하여 IFN-α2 및 IFN-α8에 의한 상승작용의 유무 및 강약을 콤비네이션 인덱스(CI)로서 수치화하였다. 그리고 CI가 나타내는 상승작용의 강도는 앞서 설명한 표 2에 나와 있는 바와 같다. 그 결과를 표 3에 나타낸다.

<63> [표 3]

<64>

IFN-α2/IFN-α8의 활성비	항바이러스 활성 (IC_{50}, IU/ml)	상승작용의 평가 CI	부호
10:0	512		
8:2	318	0.99	±
6:4	285	0.90	+
5:5	241	0.73	++
4:6	254	0.94	±
2:8	231	1.06	±
0:10	210		

<65> 표 3에 나온 바와 같이 HepG2 세포에 VSV가 CPE를 나타내는 계에서는, IFN-α2와 IFN-α8을 각각 단독으로 첨가했을 경우에는 IFN-α8이 현저한 항바이러스 활성, IC_{50}로서 비교하면 IFN-α2의 2.4배 정도의 항바이러스 활성을 나타내는 것이 판명되었다(10:0과 0:10의 결과로부터). 이 결과로부터 IFN-α2와 IFN-α8을 혼합하여 IFN-α8의 비율이 순차로 높아지도록 단계적으로 활성비를 변화시켜 조제한 양자의 혼합액에서는, 양자가 단순히 상승적으로 항바이러스 활성을 나타내는 것이면, IC_{50}은 순차 감소하여 0:10의 경우의 값으로 되어버린다고 상정되었다. 그러나 5:5의 IFN-α2/IFN-α8 혼합액의 전후에서는 실제로 구하여진 IC_{50}은 이러한 상정에 반하는 값을 나타내며, 양 서브타입은 특정의 활성비로 존재할 때 상승작용을 나타낸다고 생각되었다. 그리고 이것은 표 3에서의 오른쪽란에 나온 바와 같이 IC_{50}의 다변량 해석에 의해 지지되고 있으며, 양 서브타입의 활성비가 6:4 내지 5:5일 때에 상승작용이 특히 현저함이 판명되었다.

<66> 이상이 결과에서 나타난 바와 같이 IFN-α2와 IFN-α2은 항바이러스 활성의 발현에 있어서 소정의 활성비로 공존할 때, 현저한 상승작용을 발휘한다. 이 사실은 이러한 활성비로 IFN-α2와 IFN-α8이 공존할 때, 항바이러스 활성을 직접적으로 담당하는 기능분자를 코드하는 유전자이다. 2-5A 합성효소 유전자나 PKR 유전자 등의 단백질 합성 억제 유전자의 발현의 유도에서 양자가 현저한 상승작용을 나타내는 것을 의미하고 있다.

<67> 한편, 이상의 조작에 준하여 별도 조제한 재조합형의 IFN-α1, IFN-α5 및 IFN-α10을 사용하여 IFN-α8과의 조합에서의 효과를 조사한 결과, IFN-α5 또는 IFN-α10을 IFN-α8과 조합하여 사용했을 경우에는 상승작용은 나타나지 않고, 양자의 활성비에 따라서는 명백히 부(負)의 상승작용이 나타나는 경우도 있었다. 그리고 IFN-α1을 IFN-α8과 조합했을 경우에는 약간 상승작용이 나타나는 경우가 있기는 하였으나 IFN-α2와 IFN-α8의 조합

의 경우에서 처럼 현저하지는 않았다. 이상의 결과는 IFN-α2와 IFN-α8의 조합이 단백질 합성 억제 유전자의 발현을 특히 현저하게 증강하는 것을 나타내고 있다.

<68> 실험 2: 2-5A 합성효소 유전자의 발현유도에서의 IFN-α2와 IFN-α8의 상승작용

<69> 인간 간세포 유래의 수립세포주 HepG2 세포(ATCC HB-8065)를 10% (v/v) 소태아 혈청을 함유한 RPMI1640 배지중에서 통상적인 방법에 따라 소기의 세포수에 달할때까지 배양한 후, 이 배지에서 세포밀도 1 $\times 10^5$ 개/ml의 세포 부유액을 조제하였다. 이 세포 부유액을 24 웰 마이크로플레이트에 1 웰당 1 ㎕씩 주입하고 5% (v/v) CO_2 인큐베이터 중에서 37℃에서 48 시간 배양하였다.

<70> 실험 1-1(a)에서 얻은 정제표품을 사용하고, IFN-α2와 IFN-α8을 국제단위 환산으로 10:0, 8:2, 6:4, 5:5, 4:6, 2:8, 또는 0:10의 활성비로 함유하며 IFN-α 활성의 계산상의 총 합이 200 IU/ml인 IFN-α2/IFN-α8 혼합액을 준비하였다.

<71> 이들 혼합액 각각을 마이크로플레이트 중에서 48 시간의 배양을 끝낸 HepG2 세포의 각 웰에 각각 25 ㎕씩 첨가하고, 각 웰 속을 충분히 혼합한 후 다시 24 시간 배양을 계속하였다. 대조로서 상기와 동일한 1 웰당의 세포수로부터 개시하는 한편, IFN-α 처리를 하지 않은 계를 만들어 동일한 시간동안 배양하였다. 또한 모든 배양계에 대해 동일한 것을 3조씩 만들었다.

<72> 그 후, 각 웰로부터 세포를 회수하여 각각 PBS에 현탁한 후에 동결융해하여 세포를 추출하여 100 ㎕의 세포 추출액을 얻었다. 이들 세포 추출액에서의 2-5A 합성효소 활성을, 이 효소의 활성측정을 위한 시판의 키트(일본국의 榮研화학주식회사 제조, 상품명 "2-5A KIT EIKEN")를 사용하여 이 효소의 작용에 의해 생성하는 2-5A 량(pmol/dl)으로서 구하고, 각 계에서 평균치를 구하였다. IFN-α 처리계의 값으로부터 대조계의 값을 뺀 값을 각 시료가 나타낸 2-5A 합성효소 유도활성으로서 평가하였다. 10:0 (IFN-α2만의 처리)의 경우 약 200 pmol/dl, 0:10 (IFN-α8만의 처리)의 경우 약 450 pmol/dl이고, 실험 1-2에서 관찰된 양 서브타입의 항바이러스 활성의 차이와의 사이에 양호한 상관관계가 나타났다.

<73> 한편, 데이터는 생략되어 있지만, 예비적인 실험의 결과로부터 실험 1-2의 방법에 의한 항바이러스 활성(IC_{50})의 대수치(對數値)(베이스 10)와, 이 실험에 의한 조건하에서 측정되는 2-5A 합성효소 유도활성의 측정치(pmol/dl)가 직선관계를 나타낸다는 것을 발견하였다. 이 발견에 근거하여 IFN-α2와 IFN-α8이 상승적으로 작용했다고 상정했을 때의 2-5A 합성효소 유도활성(pmol/dl)에 대한 이 실험에 의한 측정치의 배율을 구하여 상승작용의 유무를 판정하였다. 그 결과를 표 4에 나타낸다.

<74> [표 4]

<75>

IFN-α2/IFN-α8의 활성비	2-5A 합성효소의 유도에서의 상승작용의 판정*
8:2	+
6:4	++
5:5	++
4:6	±
2:8	±

<76> * : IFN-α2와 IFN-α8이 상승적으로 작용했을 경우에 상정되는 2-5A 합성효소 유도활성(pmol/dl)에 대한 측정치의 배율에 의한 판정: ±는 0.9배 이상 1.2배 미만; +는 1.2배 이상 1.5배 미만; ++는 1.5배 이상.

<77> 표 4에 나온 바와 같이 2-5A 합성효소 유도활성은 IFN-α2/IFN-α8 혼합액을 HepG2 세포에 작용시켰을 경우, 양자의 활성비가 4:6 및 2:8인 경우에는 상승적인 작용에 의한 상정치와 거의 동일한 값을 나타낸 것에 대해, 양자의 활성비가 8:2, 6:4 및 5:5인 경우에는 각각의 상정치를 상회하며, 특히 6:4 및 5:5인 경우에 높은 활성을 나타내었다. 이 결과는 실험 1-2에 나온 항 바이러스 활성의 측정에 근거한 사실을 구체적으로 지지하고 있다.

<78> 실시예 1: 의약품 제조용 원액

<79> 안정제로서 함수결정 트레할로오스를 1% (w/v) 함유한 생리 식염수에 실험 1-1(a) 내지 실험 1-1(b)의 방법으로

얻은 IFN-α2 및 IFN-α8의 정제표품을 통상적인 방법에 따라 막농축한 후, 국제단위 환산으로 양자의 활성비가 2:1이 되고, 계산상의 IFN-α 활성의 총 합이 1 $\times 10^6$ IU/ml가 되도록 용해시킨 용액을 통상적인 방법에 따라 정밀여과에 의해 제균하여 액제를 얻었다.

<80> 안정성이 우수한 이 제품은 단백질 합성 억제 유전자의 발현에 감수성을 나타내는, 면역계, 조혈조직, 순환기, 피부조직, 소화기, 신경계, 근육 등에 있어서의 여러가지 질환의 치료제, 완화제, 예방제의 제조용 원액으로서 유용하다. 그리고 이 제품은 연구용 시약이나 재조합형 단백질의 제조에서의 유도제로서 이용할 수도 있다.

<81> 실시예 2: 의약품 제조용 원액

<82> 인간 임파아구성 세포의 일종인 BALL-1 세포 유래의 인간 IFN-α 용액(일본국의 Cosmo Bio 주식회사 판매)을 항인간 IFN-α 모노클로날 항체 칼럼 크로마토그래피[담체: 스위스국의 Lonza사 판매의 "NK-2 Sepharose", 이동상: PBS(인산염 완충 식염수), 용출액: 0.3 M 염화 나트륨을 함유한 0.1 M 시트르산 수용액(pH 2.0)]로 처리하여 이 용액 중에 존재하는 소혈청 알부민을 제거함으로써 정제 인간 IFN-α 표품을 얻었다. 통상적인 방법에 따라 분석한 결과, 이 정제표품에서의 인간 IFN-α의 서브타입은 실질적으로 IFN-α2 및 IFN-α8로 되어 있고, 이 정제표품에서의 양 서브타입의 활성비는 국제단위 환산으로 약 1:1 (= IFN-α2 : IFN-α8)이었다.

<83> 상기한 정제 인간 IFN-α 표품을 PBS에 대하여 투석하고, 투석내액을 채취하여 통상적인 방법에 따라 농축한 후, 안정제로서 함수결정 트레할로오스를 1% (w/v) 함유한 생리 식염수와 혼합하여 IFN-α 활성이 5 $\times 10^6$ IU/ml가 되도록 조정하여 통상적인 방법에 따라 정밀여과에 의해 제균하여 액제를 얻었다.

<84> 안정성이 우수한 이 제품은 단백질 합성 억제 유전자의 발현에 감수성을 나타내는, 면역계, 조혈조직, 순환기, 피부조직, 소화기, 신경계, 근육 등에 있어서의 여러가지 질환의 치료제, 완화제, 예방제의 제조용 원액으로서 유용하다. 그리고 이 제품은 연구용 시약이나 재조합형 단백질의 제조에서의 유도제로서 이용할 수도 있다.

<85> 실시예 3: 의약품 제조용 원액

<86> 실험 1-1(a) 내지 실험 1-1(b)의 방법에 따라 얻은 IFN-α2 및 IFN-α8의 정제표품을 통상적인 방법에 따라 막농축한 후 PBS(pH 7.0)로 희석하여 각 서브타입의 농도 2 mg/ml의 용액을 조제하였다.

<87> 동일한 특허 출원인에 의한 일본국 특개 평6-65302호 공보에 기재된 방법에 따라 조제한 평균 분자량 200,000의 풀룰란을 통상적인 방법에 따라 탈색, 탈염하여 정제하고, 동결건조하여 정제 풀룰란의 분말을 얻었다. 이 정제 풀룰란의 분말을 PBS(pH 7.0)에 용해하여 농도 20 mg/ml의 용액을 조제하였다. 이 풀룰란 용액과, 농도 1% (w/v)로 조정한 염화 시아누르의 아세톤 용액을 체적비 30:1로 혼합하고, 이 혼합물을 완만히 교반하면서 빙냉하에 2 시간 인큐베이트하여 반응시켜 염화 시아누르에 의해 풀룰란을 활성화하였다. 이 염화 시아누르 활성화 풀룰란을 함유한 반응 혼합물과 위에서 얻은 IFN-α2 및 IFN-α8 중의 어느 하나의 용액을 체적비 1:1로 혼합하여 완만히 교반하면서 37℃에서 6 시간 인큐베이트하여 각 서브타입의 풀룰란에 의한 수식(修飾) 반응을 하였다. 그 후, 이 반응 혼합물에 글리신을 농도 5% (w/v)가 되도록 첨가하고 교반하면서 4℃에서 16 시간 인큐베이트하여 반응을 정지시켰다.

<88> 상기한 반응 혼합물을 각각 겔 여과 크로마토그래피(겔 여과 담체로서 일본국의 Amersham Biosciences사 판매의 상품명 "Sephacryl S-200 Column"을 사용. 이동상으로서 PBS를 사용)로 처리하여 분획하였다. 각 획분의 단백질량을 Bradford법으로 분석하였다. 그 결과, 각각의 반응 혼합물에서 유지시간이 상이한 2개의 피이크나 나타났다. 유지시간이 보다 짧은 피이크(분자량 약 200,000 이상에 상당)의 획분을 채취하여 IFN-α2 및 IFN-α8 각각에 대해서의 풀룰란 결합 서브타입 함유 획분으로 하였다. 이어서 얻어진 풀룰란 결합 서브타입 함유 획분을 각각 통상적인 방법에 따라 폴리클로날 항체 칼럼에 의한 크로마토그래피 처리를 하였다. 폴리클로날 항체 칼럼은, 실시예 2의 방법으로 얻은 정제 인간 IFN-α 표품을 항원으로 하여 얻은 토끼 항 인간 IFN-α 폴리클로날 항체를 사용하여 통상적인 방법에 따라 준비한 것을 사용하였다. 이 폴리클로날 항체 칼럼에 대한 결합획분을 채취하여 풀룰란 결합 서브타입(IFN-α2 및 IFN-α8 각각)의 정제표품을 얻었다. 이들 정제표품의 IFN-α 활성을 통상적인 방법에 따라 측정하고, 풀룰란 결합 IFN-α2와 풀룰란 결합 IFN-α8의 활성비가 국제단위 환산으로 1:1이 되도록 양자를 혼합한 후, 안정제로서 함수결정 트레할로오스를 1% (w/v) 함유한 생리 식염수에 대하여 투석하였다. 투석내액을 채취하여 IFN-α 활성이 5 $\times 10^4$ IU/ml가 되도록 상기한 트레할로오스 함유 생리 식염수로 조정하고 정밀여과에 의해 제균하여 액제를 얻었다.

<89> 생체내에서의 안정성 및 생체에 대한 항원성이 낮다는 점에서 우수한 특성을 가진 이 제품은 단백질 합성 억제 유전자의 발현에 감수성을 나타내는, 면역계, 조혈조직, 순환기, 피부조직, 소화기, 신경계, 근육 등에 있어서

의 여러가지 질환의 치료제, 완화제, 예방제의 제조용 원액으로서 유용하다. 그리고 이 제품은 연구용 시약이나 재조합형 단백질의 제조에서의 유도제로서 이용할 수도 있다.

<90> 실시예 4: 의약품 제조용 원액

<91> 실험 3에 나온 염화 시아누르 활성화 풀룰란과 IFN-α2 또는 IFN-α8과의 반응에서의 IFN-α2 또는 IFN-α8 대신에 실시예 2의 방법으로 조제한 정제 인간 IFN-α 표품을 사용한 이외는 실시예 3에 따라 풀룰란에 의한 수식(修飾) 반응을 실시하고, 이어서 실시예 3에 따라 반응 생성물을 겔 여과 크로마토그래피 및 항체 칼럼 크로마토그래피에 의하여 정제하였다. 통상적인 방법에 따라 분석한 결과, 이 정제표품에서의 인간 IFN-α의 서브타입은 실질적으로 풀룰란 결합 IFN-α2 및 풀룰란 결합 IFN-α8로 되어 있고, 이 정제표품에서의 양 서브타입의 활성비는 국제단위 환산으로 1:1이었다. 이 정제표품을, 안정제로서 함수결정 트레할로오스를 1% (w/v) 함유한 생리 식염수에 대하여 투석하였다. 투석내액을 채취하여 IFN-α 활성이 1×10^5 IU/ml가 되도록 상기한 트레할로오스 함유 생리 식염수로 조정하고 정밀여과에 의해 제균하여 액제를 얻었다.

<92> 생체내에서의 안정성 및 생체에 대한 항원성이 낮다는 점에서 우수한 특성을 가진 이 제품은 단백질 합성 억제 유전자의 발현에 감수성을 나타내는, 면역계, 조혈조직, 순환기, 피부조직, 소화기, 신경계, 근육 등에 있어서의 여러가지 질환의 치료제, 완화제, 예방제의 제조용 원액으로서 유용하다. 그리고 이 제품은 연구용 시약이나 재조합형 단백질의 제조에서의 유도제로서 이용할 수도 있다.

<93> 실시예 5: 건조 주사제

<94> 실시예 1 내지 4에 의한 의약품 제조용 원액을 각각 바이알병에 1 ml씩 나누어 넣고 동결건조한 후, 마개로 밀봉하였다. 안전성이 우수한 이 제품은 단백질 합성 억제 유전자의 발현에 감수성을 나타내는, 면역계, 조혈조직, 순환기, 피부조직, 소화기, 신경계, 근육 등에 있어서의 여러가지 질환을 치료, 완화 또는 예방하기 위한 건조 주사제로서 유용하다.

<95> 실시예 6: 연고제

<96> 멸균 증류수에 카르복시비닐 폴리머(일본국의 和光純藥공업주식회사제, 상품명 "Hibis Wako-104")와 함수결정 트레할로오스를 각각 농도 1.4% (w/w) 및 2.0% (w/w)가 되도록 용해하고, 다시 세포 부활제(賦活劑)인 Lumin(일본국의 Hayashibara Biochemical Laboratories사 판매의 감광성 염료, NK-4)을 5 mg/g이 되도록 혼합하였다. 이 혼합물에 실시예 2 또는 4에 의한 의약품 제조용 원액을 5×10^4 IU/g가 되도록 첨가 혼합한 혼합물을 pH 7.2로 조정하여 겔상물을 얻었다.

<97> 연전성(延展性)과 안전성이 우수하고, 세포부활 작용을 아울러 가진 이 제품은 단백질 합성 억제 유전자의 발현에 감수성을 나타내는, 면역계, 피부조직, 신경계, 근육 등에 있어서의 여러가지 질환을 치료, 완화 또는 예방하기 위한 연고제로서 유용하다.

<98> 실시예 7: 정제

<99> 무수 결정 말토오스(일본국의 주식회사 林原상사 판매, 상품명 "FINETOSE®")에 실시예 2 또는 4에 의한 의약품 제조용 원액을 1×10^3 IU/g가 되도록 혼합하고, 이것을 통상적인 방법에 따라 타정(打錠)하여 1정당 약 200 mg의 정제를 얻었다.

<100> 섭취성 안정성이 우수한 이 제품은 단백질 합성 억제 유전자의 발현에 감수성을 나타내는, 면역계, 조혈조직, 순환기, 피부조직, 소화기, 신경계, 근육 등에 있어서의 여러가지 질환을 치료, 완화 또는 예방하기 위한 경우 투여용의 정제로서 유용하다.

산업상 이용 가능성

<101> 이상 설명한 바와 같이 본 발명은, 인간 IFN-α의 서브타입 IFN-α2와 IFN-α8이 공존할 때, 단백질 합성 억제 유전자의 발현유도에서 상승작용을 나타낸다는 본 발명자들에 의한 독자적인 발견에 근거한 것이다. 본 발명의 단백질 합성 억제 유전자의 발현 증강제는 인간을 대상으로 하는 의약품으로서 현재 널리 이용되고 있는 인간 IFN-α에서의 서브타입을 유효성분으로 하기 때문에 의약용도, 특히 단백질 합성 억제 유전자의 발현이 직접적 또는 간접적으로 관여하여 증상이 치료, 완화 또는 예방되는 각종 질환에 대한 의약용도에 유리하게 이용할 수가 있다. 그리고 이 발현 증강제는 IFN의 성성발현에 이르는 분자기구를 해명하기 위한 연구용 시약으로서, 그

리고 재조합형 단백질의 제조에서의 유도제로서도 유용하다.

<102> 본 발명은 이렇게도 현저한 작용효과를 발휘하는 발명이므로 이 분야에서 공헌하는 바 실로 다대한 의의가 있는 발명이다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo
<120> EXPRESSION POTENTIATOR FOR PROTEIN SYNTHESIS REGULATORY GENE
<130> WO866
<160> 4
<210> 1
<211> 188
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> Signal
<222> (1)...(23)
<220>

<221> Mature chain
<222> (24)...(188)
<300>

<308> P01563 (Swissprot)
<400> 1

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

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
 65                  70                  75                  80
Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
                 85                  90                  95
Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
            100                 105                 110
Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
        115                 120                 125
Thr Glu Thr
Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
    130                 135                 140
Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
145                 150                 155                 160
Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
                165                 170                 175
Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu


            180                 185
```

<210> 2
<211> 189
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<221> Signal
<222> (1)...(23)
<220>

<221> Mature chain
<222> (24)...(189)
<300>

<308> P32881 (Swissprot)
<400> 2
Met Ala Leu Thr Phe Tyr Leu Leu Val Ala Leu Val Val Leu Ser Tyr
  1   5   10   15
Lys Ser Phe Ser Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
             20   25   30
Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
         35   40   45
Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu
     50   55   60

Glu Phe Asp Asp Lys Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu
 65   70   75   80
His Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser
                 85   90   95
Ser Ala Ala Leu Asp Glu Thr Leu Leu Asp Glu Phe Tyr Ile Glu Leu
            100   105   110
Asp Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ser Cys Val Met Gln Glu Val Gly
        115   120   125
Val Ile Glu
Ser Pro Leu Met Tyr Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg
    130   135   140
Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser
145   150   155   160
Ser Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser
                165   170   175
Leu Ser Ile Asn Leu Gln Lys Arg Leu Lys Ser Lys Glu
            180   185
<210> 3
<211> 1733
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<
220>
<221> CDS
<222> (511)...(1077)
<220>

<221> sig_peptide
<222> (511)...(579)
<220>

<221> mat_peptide
<222> (580)...(1074)
<300>

<308> J00207 (GenBank)

<400> 3
gcgcctctta tgtacccaca aaaatctatt ttcaaaaaag ttgctctaag aatatagtta 60
tcaagttaag taaaatgtca atagcctttt aatttaattt ttaattgttt tatcattctt 120
tgcaataata aaacattaac tttatacttt ttaatttaat gtatagaata gagatataca 180
taggatatgt aaatagatac acagtgtata tgtgattaaa atataatggg agattcaatc 240
agaaaaaagt ttctaaaaag gctctggggt aaaagaggaa ggaaacaata atgaaaaaaa 300
tgtggtgaga aaaacagctg aaaacccatg taaagagtgt ataaagaaag caaaaagaga 360
agtagaaagt aacacagggg catttggaaa atgtaaacga
gtatgttccc tatttaaggc 420
taggcacaaa gcaaggtctt cagagaacct ggagcctaag gtttaggctc acccatttca 480
accagtctag cagcatctgc aacatctaca atggccttga cctttgcttt actggtggcc 540
ctcctggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc tctgtgggct gtgatctgcc tcaaacccac 600
agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc 660
tcctgcttga aggacagaca tgactttgga tttccccagg aggagtttgg caaccagttc 720
caaaaggctg aaaccatccc tgtcctccat gagatgatcc agcagatctt caatctcttc 780
agcacaaagg actcatctgc tgcttgggat gagaccctcc
tagacaaatt ctacactgaa 840
ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc tgtgtgatac agggggtggg ggtgacagag 900
actcccctga tgaaggagga ctccattctg gctgtgagga aatacttcca aagaatcact 960
ctctatctga aagagaagaa atacagccct tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaatc 1020
atgagatctt tttctttgtc aacaaacttg caagaaagtt taagaagtaa ggaatgaaaa 1080
ctggttcaac atggaaatga ttttcattga ttcgtatgcc agctcacctt tttatgatct 1140
gccatttcaa agactcatgt ttctgctatg accatgacac gatttaaatc ttttcaaatg 1200
tttttaggag tattaatcaa cattgtattc agctcttaag
gcactagtcc cttacagagg 1260
accatgctga ctgatccatt atctatttaa atatttttaa aatattattt atttaactat 1320
ttataaaaca acttattttt gttcatatta tgtcatgtgc acctttgcac agtggttaat 1380
gtaataaaat gtgttctttg tatttggtaa atttatttg tgttgttcat tgaacttttg 1440
ctatggaact tttgtacttg tttattcttt aaaatgaaat tccaagccta attgtgcaac 1500
ctgattacag aataactggt acacttcatt tgtccatcaa tattatattc aagatataag 1560
taaaaataaa ctttctgtaa accaagttgt atgttgtact caagataaca gggtgaacct 1620
aacaaataca attctgctct cttgtgtatt tgatttttgt
atgaaaaaaa ctaaaaatgg 1680
taatcatact taattatcag ttatggtaaa tggtatgaag agaagaagga acg 1733
<210> 4
<211> 633
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>

<221> CDS
<222> (48)...(617)
<220>

<221> sig_peptide
<222> (48)...(116)
<220>

<221> mat_peptide
<222> (117)...(614)
<300>

<308> X03125 (GenBank)
<400> 4
aggggtcatc catctgaacc agctcagcag catccacaac atctacaatg gccttgactt 60
tttatttact ggtggcccta gtggtgctca gctacaagtc attcagctct ctgggctgtg 120
atctgcctca gactcacagc ctgggtaaca ggagggcctt gatactcctg gcacaaatgc 180

gaagaatctc tcctttctcc tgcctgaagg acagacatga ctttgaattc ccccaggagg 240
agtttgatga taaacagttc cagaaggctc aagccatctc tgtcctccat gagatgatcc 300
agcagacctt caacctcttc agcacaaagg actcatctgc tgctttggat gagacccttc 360
tagatgaatt ctacatcgaa cttgaccagc agctgaatga
cctggagtcc tgtgtgatgc 420
aggaagtggg ggtgatagag tctcccctga tgtacgagga ctccatcctg gctgtgagga 480
aatacttcca aagaatcact ctatatctga cagagaagaa atacagctct tgtgcctggg 540
aggttgtcag agcagaaatc atgagatcct tctctttatc aatcaacttg caaaaaagat 600
tgaagagtaa ggaatgagac ctggtacaac acg 633