

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(43) 국제공개일  
2011년 4월 28일 (28.04.2011)

PCT

(10) 국제공개번호  
WO 2011/049350 A2

- (51) 국제특허분류:  
C07K 14/705 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)  
C12N 15/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/007160
- (22) 국제출원일: 2010년 10월 19일 (19.10.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2009-0099219 2009년 10월 19일 (19.10.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **한올바이오파마주식회사 (HANALL BIOPHARMA CO., LTD.)** [KR/KR]; 대전 대덕구 상서동 400-1, 306-120 Daejeon (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김성욱 (KIM, Sung WuK)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 구미동 250 번지 삼환빌라 102 동 304 호, 463-802 Gyeonggi-do (KR). **전성수 (JUN, Sung Soo)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 서현동 시범단지 현대아파트 426 동 701 호, 463-777 Gyeonggi-do (KR). **박승국 (PARK, Seung Kook)** [KR/KR]; 서울 강남구 일원본동 719 푸른마을 아파트 106-202, 135-942 Seoul (KR). **김송영 (KIM,**

**Song Young)** [KR/KR]; 경기도 수원시 영통구 매단 1 동 172-153 번지 301 호, 443-880 Gyeonggi-do (KR). **김은선 (KIM, Eun Sun)** [KR/KR]; 경기도 수원시 팔달구 우만 2 동 95-1 준용빌딩 610 호, 442-816 Gyeonggi-do (KR). **정재갑 (JEONG, Jae Kap)** [KR/KR]; 경기도 수원시 팔달구 인계동 975-13 다림해피빌 302 호, 442-833 Gyeonggi-do (KR). **김하나 (KIM, Ha Na)** [KR/KR]; 경기도 수원시 팔달구 인계동 754-6 505 호, 442-831 Gyeonggi-do (KR). **송연정 (SONG, Yeon Jung)** [KR/KR]; 경기도 용인시 수지구 상현동 866 번지 상현마을 성원상떼빌 225 동 1904 호, 443-130 Gyeonggi-do (KR).

(74) **대리인: 안소영 (AHN, So-Young)**; 서울 서초구 서초동 1676-1 신승빌딩 10 층 안소영국제특허법률사무소, 137-881 Seoul (KR).

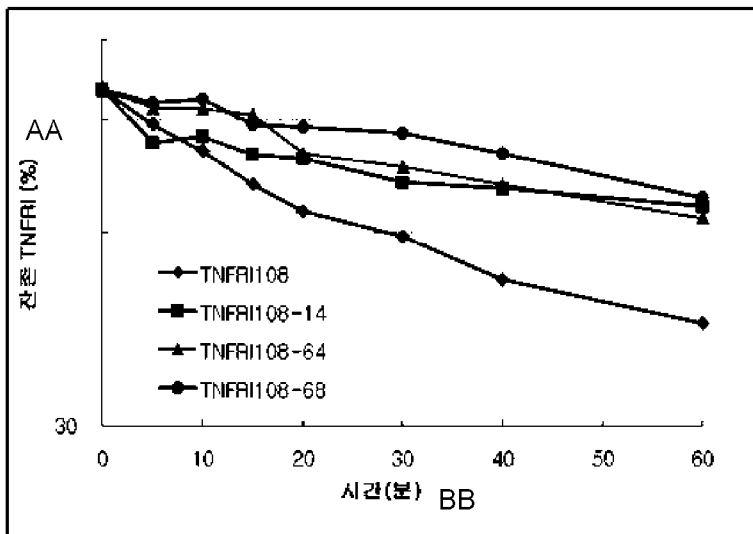
(81) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title:** MODIFIED HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR-1 POLYPEPTIDE OR FRAGMENT THEREOF, AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) **발명의 명칭:** 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편 및 그의 제조방법

[Fig. 4]



AA ... TNF-R1 résiduel (%)  
BB ... Durée (minutes)

(57) **Abstract:** The present invention relates to a modified human tumor necrosis factor receptor-1 polypeptide to be coupled to a tumor necrosis factor in vivo or ex vivo, or to a fragment thereof. The modified human tumor necrosis factor receptor-1 polypeptide or the fragment thereof according to the present invention exhibit improved resistance against in vivo protease activity, and thus exhibit improved bioavailability and an improved absorption rate.

(57) **요약서:** 본 발명은 생체내 (in vivo) 또는 생체외 (ex vivo)에서 종양 괴사 인자와 결합하는 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 (human tumor necrosis factor receptor-1) 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다. 본 발명의 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편은 생체 내에 존재하는 단백질 분해효소에 대한 향상된 저항성을 나타내며, 따라서 개선된 생체 이용률 및 흡수율을 나타낸다.

WO 2011/049350 A2



SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

### 발명의 명칭: 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편 및 그의 제조방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 생체내(in vivo) 또는 생체외(ex vivo)에서 종양 괴사 인자와 결합하는 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 (human tumor necrosis factor receptor-1) 폴리펩티드 또는 그의 절편 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 염증은 항원 자극에 의해 유발되는 신체의 방어 작용이다. 그러나 해로운 항원 물질이 제거된 후에도 염증이 발생하거나, 염증 반응이 자가항원과 같은 부적절한 자극에 의해 유발된다면 병리학적으로 악화되게 된다. 이러한 염증 반응에는 다양한 사이토카인이 관여하며, 특히 염증 조절 역할을 하는 사이토카인으로서 종양 괴사 인자 (Tumor Necrosis Factor, 이하, 'TNF')가 확인되었다.
- [3] TNF는 종양 세포를 제거하는 단백질로 처음 발견되었다 (Carswell 등, PNAS 72:3666-3670 1975; Old 등, Science 230:630-632 1985; Beutler 등, Nature 316:552-554 1985). TNF는 단핵구와 대식세포를 포함한 다수의 세포 형태에서 생산되는 사이토카인으로 염증 반응에 직접적으로 관여한다. 적어도 두 종류의 TNF (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ )가 있으며, 이들 각각은 삼중체로 작용하여 교차 결합 수용체에 의해 세포내 신호 전달을 개시하는 것으로 알려져 있다 (Engelmann 등, J.Biol.Chem 265:14497-14504). 생체내에서 TNF는 염증 반응을 유발함으로써 세포 면역 반응 및 방어 기작을 조절함과 동시에 다수의 상이한 표적 세포에 대한 중요한 생리학적 효과를 갖는다 (Selby 등, Lancet 1:483 1988; Starnes 등, J.Clin.Invest 82:1321 1988; Oliff 등, Cell 50:555 1987; Waage 등, Lancet 1:355 1987, Aggarwal 등, Nat. Rev. Immunol. 3:745-756 2003). 그러나 TNF가 과량 존재할 경우 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 건선, 크론씨병 등과 같은 병적 상태가 발생하며, 이를 저해할 경우 질병에 대한 치유 효과가 있음을 확인하였다 (Feldmann 등, Nat. Med. 9:1245-1250 2003; Kooloos 등, Drug Discov. Today 12:125-131 2007; Rutgeerts 등, Gastroenterology 126:1593-1610 2004; Rothe 등, Nature 364:798-802 1993; Kafrouni 등, J. Leukocyte Biol. 74:564-571 2003; Rahman 등, Plos Pathog. 2:e4 2006; Chan 등, J. Biol. Chem. 278:51613-61621 2003; Wajant 등, Cell Death Differ. 10:45-65 2003)
- [4] 종양 괴사 인자 수용체 (Tumor Necrosis Factor Receptor, 이하 'TNFR')는 TNF와 결합하는 사이토카인 수용체이다.
- [5] TNFR은 현재까지 p55-TNFR I과 p75-TNFR II로 알려진 두 종류가 발견되었다. TNFR I은 포유류의 거의 모든 세포에서 발현되는 것으로 알려져 있으며,

- TNFR<sub>II</sub>는 면역 시스템과 내피 세포에서 제한적으로 발현된다고 알려졌다.
- [6] 상기 두 수용체는 28%의 아미노산 서열의 유사성을 보인다. 두 수용체 모두 세포외 도메인을 가지며, 4개의 시스테인-리치(cysteine-rich) 도메인을 가지고 있다.
- [7] TNFR<sub>I</sub>은 세포질 부분에 세포 사멸 신호를 일으키는 "데스 도메인(death domain)"을 가지나, TNFR<sub>II</sub>에는 데스도메인이 없으며, 현재까지 TNFR<sub>II</sub>의 기능은 명확히 정의되어 있지 않다. 또한, TNFR<sub>I</sub>과 TNFR<sub>II</sub>는 리간드인 TNF- $\alpha$ 에 대한 친화력에서 차이를 보인다. TNFR<sub>I</sub>이 TNFR<sub>II</sub>보다 30배 이상 친화력이 높다고 알려져 있다(Tartaglia 등, *J. Biol. Chem.* 268:18542-18548 1993; Bernard 등, *Cytokine* 7:759-770 1995). 이런 친화력 차이로 인해 TNFR<sub>I</sub>에 대한 의약품 개발이 많이 시도되었다.
- [8] 세포 표면에 붙어있는 TNFR은 단백질 분해효소에 의해 절단되어 수용성 TNFR을 생성하고, 수용성 TNFR은 과량으로 존재하는 TNF를 중화시켜 TNF의 농도를 조절하는 작용을 한다. 자가 면역질환 또는 만성 염증의 경우 이런 조절 능력을 넘어서는 TNF 농도를 가지고 있는 것으로 알려졌다.
- [9] 인위적으로 TNF의 신호 전달을 조절하기 위해, TNF 합성 저해, TNF의 방출 저해, TNF의 신호전달 저해 등 다양한 TNF 저해방법이 적용되어 왔다. TNF 저해방법 중 TNFR과 TNF의 결합을 방해하여 TNF의 신호전달을 저해하는 방법이 의약품 개발에 적용되어 왔다. 이러한 예로 TNFR<sub>II</sub>의 세포막 외 부분과 항체의 Fc 부분을 융합시켜 만든 에타너셉트(etanercept)와, TNF와 결합하는 항체로 아달리뮤맵(adalimumab), 인플릭시맵(infliximab) 등이 류마티스 관절염, 건선, 강직성 척추염 등의 치료제로 전 세계적으로 사용되고 있다.
- [10] 상기 류마티스 관절염 치료제 에타너셉트와 동일한 기술을 적용하여 항체의 Fc와 TNFR<sub>I</sub>의 세포외 도메인을 결합시킨 융합 단백질인 레네셉트(Lenercept)에 대하여 유럽과 미국에서 임상 2상까지 진행되었으며 (Furst 등, *J. Rheumatol.* 30:2123-2126 2003; Rau 등, *J Rheumatol.* 30:680-690 2003 Arbraham 등, *Crit Care Med.* 29:503-510 2001), TNFR<sub>I</sub> 이합체(dimer)와 페길레이션된 수용성 TNFR<sub>I</sub> (pegylated soluble TNFR<sub>I</sub>) 분자에 대한 연구가 진행되었다(Carl 등, *Ann. Rheum. Dis.* 58:173-181 1999; Solorzano 등, *J. Appl. Physiol.* 84:1119-1130 1998; carl 등, *Advanced Drug Delivery Reivews* 55:1315-1336 2003; Honghui 등, *J. Clin. Pharmacol.* 45:490-497 2005 Yugal 등, *The American Journal of Pathology* 172:1411-1418 2008).
- [11] 또한, TNFR<sub>I</sub>의 면역원성을 낮추고 TNF와의 결합력을 높이기 위한 방법으로 아미노산 서열을 변형시키는 연구가 진행되었다. 특히 TNFR<sub>I</sub>의 아미노산 서열 일부를 치환하여 항체 발생을 낮춘 TNFR<sub>I</sub> 돌연변이체, 및 TNFR<sub>I</sub>과 TNF와의 결합력을 증가시킨 돌연변이체가 알려져 있다 (미국 특허 제 7,144,987호).
- [12] TNFR과 TNF의 결합에 관여하는 활성 부위를 찾기 위한 많은 연구가 진행되었으며, TNFR의 네번째 도메인은 TNF와의 결합에 필수적이지 않고

두번째와 세번째 도메인을 결실시킬 경우 TNF 결합 활성을 상실한다고 알려져 있다 (Corcoran 등, Eur. J. Biochem. 233:831-840 1994; Chin-Hsueh 등, J. Biol. Chem. 270:2874-2878 1995; Scallon 등, Cytokine 7:759-770 1995). 또한 TNFRI과 TNF의 결합에 세번째 도메인의 일정부위를 결손 시킬 수 있으며, 인간 TNFRI 폴리펩티드(서열번호 1)의 59번부터 143번 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열이 TNFRI의 생물학적 활성을 나타내는 부위로서 알려져 있다 (미국특허 제 6,989,147호).

- [13] 따라서, 이 부위에서 TNFRI과 TNF의 결합이 이루어지기 때문에 그 이외의 영역에서는 상당한 첨가기, 탈락기 또는 치환기를 포함할 수 있다.
- [14] 한편, TNFRI은 생체내 이용률을 높이기 위하여 완전한 길이의 TNFRI보다는 TNFRI 폴리펩티드 절편이 이용되고 있으며, 단백질 분해효소에 의한 절단가능성을 최소화하면서 세포 투과율을 높이기 위한 효과적인 주사제 및 경구투여용 제제로서 제조되기 위해서는 최대한 작은 크기로 제조될 것이 요구된다.
- [15] 또한, 단백질 치료제는 체내 순환에서 대사, 신장에서의 여과작용 (glomerular filtration), 및 위장관, 조직, 혈액 등에서의 단백질 분해효소에 의한 분해 등과 같은 일반적인 과정에 의해 제거되기 때문에, 생체 내에서 단백질 고유의 활성을 유지하며, 목적하는 장소로까지 전달하는 데 많은 어려움이 따른다. 특히 단백질 분해효소에 의한 제거는 경구, 혈관주사, 근육주사 등에 의한 투여시 단백질 치료제의 반감기에 지대한 영향을 준다.
- [16] 단백질 치료제 중 하나로 생체내의 TNF를 조절하는 인간 중양 피사 인자 저해제가 주사제의 형태로 개발되어 있지만, 주사제 투여는 통증 및 감염 위험 등의 문제를 수반한다. 따라서, 주사 투여 횟수를 줄이거나 경구 투여 등의 다른 방법이 요구된다. 이를 위해서는 인간 중양 피사 인자의 안정성을 높이는 것이 필수적이지만, 상기 단백질 분해효소에 의한 분해가 이에 대한 큰 장애가 된다.
- [17] 그러므로, 경구용 단백질 치료제 개발의 중요한 목표 중 하나는 생물학적 활성을 가지면서 단백질 분해효소에 대해서는 저항성을 갖는 단백질 치료제를 개발하는 것이다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [18] 본 발명은 생체내(in vivo) 또는 생체외(ex vivo)에서 TNF 저해 작용을 가지면서, 위장관, 세포질 및 혈액 중에 존재하는 단백질 분해효소에 대한 향상된 저항성을 가진 변형된 인간 중양 피사 인자 수용체-1(TNFR1) 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공함에 그 목적이 있다.

### 과제 해결 수단

- [19] 별도로 정의하지 않는 한, 하기의 용어는 본 발명의 상세한 설명 및 특허 청구범위에서 다음에 정의된 의미를 가진다.

- [20] 본 발명에서 정의된 "인간 종양 괴사 인자 수용체-1", 또는 "인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드" (이하 TNFRI 또는 TNFRI 폴리펩티드)는 인간 유래로 455개의 아미노산으로 구성되며, TNF와 결합하는 폴리펩티드를 말한다.
- [21] 본 발명에서 정의된 "인간 종양 괴사 인자 수용체-1 절편", 또는 "인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 절편" (이하 TNFRI 절편 또는 TNFRI 폴리펩티드 절편)은 TNFRI의 서열과 서로 상응하는 아미노산의 서열이 100% 일치하며, 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실된 TNFRI의 일부분이다. 결실된 아미노산 잔기(들)은 N-말단 또는 C-말단 또는 내부를 포함하여 폴리펩티드 내에 어느 곳일 수 있다. 이 절편은 TNFRI과 하나 이상의 생물학적 특성을 공유한다. 대표적인 절편의 예는 TNFRI의 N-말단 41번째 아미노산으로부터 108개 또는 126개의 아미노산을 가지는 것으로, 이들은 각각 본원에서 TNFRI108, TNFRI126로 명명된다.
- [22] 본 발명에서 정의된 "TNFRI (돌연)변이체", "TNFRI 절편 (돌연)변이체" 또는 "변형된 TNFRI 폴리펩티드", "변형된 TNFRI 폴리펩티드 절편"은 하기 정의된 바와 같이 천연 또는 재조합 세포로부터 분리된 TNFRI 폴리펩티드 또는 이의 절편과 100% 미만의 서열 동일성을 가지는 TNFRI 폴리펩티드 또는 이의 절편을 나타낸다. 통상 TNFRI 변이체는 야생형 또는 천연형 TNFRI 또는 TNFRI 절편과 약 70% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가진다. 서열 동일성은 바람직하게는 약 75% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 한층 더 바람직하게는 약 85% 이상, 더더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상이다.
- [23] 본 발명에서 정의된 "단일 변이체"는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 또는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 절편의 아미노산 서열 중 한 위치에 돌연변이가 생성된 변이체를 말한다.
- [24] 본 발명에서 정의된 "이중 변이체"는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 또는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 절편의 아미노산 서열 중 두 위치에 돌연변이가 생성된 변이체를 말한다.
- [25] 본 발명에서 정의된 "삼중 변이체"는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 또는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 절편의 아미노산 서열 중 세 위치에 돌연변이가 생성된 변이체를 말한다.
- [26] 본 발명에서 정의된 "TNFRI<sub>m</sub>"는 TNFRI의 아미노산 서열 중 N-말단의 41번째 아미노산으로부터 m개의 아미노산 서열로 이루어진 TNFRI 절편을 말한다. 예를 들어 TNFRI108 절편은 TNFRI N-말단 41번째 아미노산부터 108개의 아미노산 서열을 갖는 TNFRI 절편이다. 다른 예로 TNFRI126은 TNFRI N-말단 41번째 아미노산부터 126개의 아미노산으로 이루어진 TNFRI 절편이다.
- [27] 본 발명에서 정의된 "Met-TNFRI<sub>m</sub>"은 대장균에서 TNFRI을 발현 시키기 위하여 N-말단에 TNFRI 아미노산 서열에 없는 메티오닌 (Methionine)이 첨가된 N-말단 41번째 아미노산부터 m개의 아미노산 개수를 가지는 TNFRI 절편을

- 말한다.
- [28] 본 발명에서 정의된 "xAz"는 아미노산 서열 중 A번째 아미노산 x가 z로 치환된 것을 의미한다. 예로 K48Q는 48번 아미노산 라이신(Lys)이 글루타민(Gln)으로 치환된 것을 의미한다.
- [29] 본 발명은 생체내(in vivo) 및/또는 생체외(ex vivo)에서 TNF 저해 작용을 가지면서 단백질 분해효소에 대한 향상된 저항성을 가지는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편, 및 이의 제조방법, 나아가 이들의 용도에 관한 것이다.
- [30] 본 발명자들은 생체내 및/또는 생체외에서 안정성이 증가된 TNFRI 변이체를 개발하기 위해 예의 연구한 결과, 천연형 TNFRI 절편의 아미노산 서열 중 단백질 분해효소에 의해 인식되어 절단되는 하나 또는 둘 이상의 아미노산을, 단백질 분해효소에 의해 절단되지 않고 물리화학적 특성을 크게 변화시키지 않는 아미노산으로 치환함으로써 단백질 분해효소에 대한 저항성이 향상된 TNFRI 변이체를 완성하였다.
- [31] 따라서, 본 발명은 천연형 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열 중 특정 위치의 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산을 변형함으로써 단백질 분해효소에 대한 저항성이 향상된 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 이의 절편을 제공한다.
- [32] 본 발명의 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 약제학적 생체내 이용률이 우수하며, 당사슬을 포함하지 않아도 활성을 나타내기 때문에 동물세포뿐만 아니라 미생물 세포에서도 용이하게 제조될 수 있다.
- [33] 보다 구체적으로 본 발명을 살펴보면 다음과 같다.
- [34] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에 있어서 61번, 68번, 78번, 85번, 106번, 107번, 109번, 121번, 128번, 133번, 135번, 136번, 138번, 141번, 150번, 156번, 161번, 200번, 203번, 206번 및 207번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치; 보다 바람직하게는 68번, 85번, 109번, 128번, 133번, 135번, 136번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치; 가장 바람직하게는 68번, 109번, 133번, 135번, 136번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서의 아미노산 변형을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다.
- [35] 상기 위치에서의 아미노산 변형은 변형되지 않은 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편과 비교하여 단백질 분해효소에 대한 증가된 저항성을 갖도록 하는 변형으로써, 아미노산의 치환 뿐만 아니라 단백질 번역-후 변형과 같은 상기 위치의 아미노산에 대한 다른 화학적인 변형, 예를 들어 탄수화물 부위에 의한 당화, 아실화(acylation) (예, 아세틸화(acetylation) 또는 숙신화(succinylation), 메틸화(methylation), 인산화(phosphorylation), 해실화(hasylation), 카르바밀화(carbamylation), 황화(sulfation), 프레닐화(prenylation), 산화(oxidation),

구아니딜화(guanidination), 아미딘화(amidination), 카르바밀화(carbamylation) (예, 카르바모일화(carbamoylation)), 트리니트로페닐화(trinitrophenylation), 질산화(nitration), 페길화(PEGylation) 등을 포함한다. 본 발명의 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 상기 위치의 아미노산 변형에 의하여 체내 단백질 분해효소에 대한 증가된 저항성을 나타낸다. 이러한 화학적인 변형은 당업계에서 공지된 통상의 방법에 의하여 아미노산을 조작함으로써 달성될 수 있다.

- [36] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 61번, 68번, 78번, 85번, 106번, 107번, 109번, 121번, 128번, 133번, 135번, 136번, 138번, 141번, 150번, 156번, 161번, 200번, 203번, 206번 및 207번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서의 아미노산이 치환된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다.
- [37] 바람직하게는, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 68번, 85번, 109번, 128번, 133번, 135번, 136번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치, 보다 바람직하게는 68번, 109번, 133번, 135번, 136번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 치환된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다.
- [38] 상기 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 61번, 68번, 78번, 85번, 106번, 107번, 109번, 121번, 128번, 133번, 135번, 136번, 138번, 141번, 150번, 156번, 161번, 200번, 203번, 206번 및 207번 위치의 아미노산 치환은 본래의 아미노산이 단백질 분해효소에 의해 인식되어 절단되지 않고 물리화학적 특성을 크게 변화시키지 않는 아미노산으로 치환된 것으로서, 바람직하게는 R은 Q 또는 H로; E는 Q 또는 N으로; K는 Q 또는 N으로; D는 N 또는 Q로; M은 I 또는 V로; P는 A 또는 S로; Y는 I 또는 H로; F는 I 또는 V로; W는 H 또는 S로; L은 I 또는 V로 치환된다.
- [39] 본 발명은 또한 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 K61Q, K61N, L68I, L68V, D78Q, E85N, R106H, R106Q, K107Q, M109I, R121H, R121Q, R128H, R128Q, R133Q, Y135I, Y135H, W136H, W136S, E138Q, E138N, F141I, F141V, L150I, L156I, K161Q, K161N, E200Q, K203Q, E206Q, D207Q 및 D207N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다.
- [40] 바람직하게는, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 L68I, L68V, E85N, M109I, R128H, R133Q, Y135I, W136S, F141I, F141V, K161Q 및 K161N 으로 이루어진 군, 더욱 바람직하게는 L68I, L68V, M109I, R133Q, Y135I, W136S, F141I, F141V, K161Q 및 K161N 으로 이루어진 군, 더더욱 바람직하게는 L68I, L68V, R133Q, Y135I, F141I, K161Q 및 K161N 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는



둘 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다.

[41] 바람직하게는, 본 발명은 상기 언급된 아미노산 변형을 1개 또는 2개 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다.

[42] 즉, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 K61Q, K61N, L68I, L68V, D78Q, E85N, R106H, R106Q, K107Q, M109I, R121H, R121Q, R128H, R128Q, R133Q, Y135I, Y135H, W136H, W136S, E138Q, E138N, F141I, F141V, L150I, L156I, K161Q, K161N, E200Q, K203Q, E206Q, D207Q 및 D207N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 또는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을; 바람직하게는, 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 L68I, L68V, E85N, M109I, R128H, R133Q, Y135I, W136S, F141I, F141V, K161Q 및 K161N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 또는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을; 더욱 바람직하게는 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 L68I, L68V, R133Q, Y135I, F141I, K161Q 및 K161N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 또는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다.

[43] 또한, 상기 2개의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 바람직한 구현에으로써, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 L68V, R133Q, F141V, K161Q, K161N, E200Q 및 D207N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다. 보다 바람직하게는, 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 R133Q, F141V, K161Q, K161N, E200Q 또는 D207N 중에서 선택된 하나의 아미노산 치환과 L68V의 2개의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다. 더욱 바람직하게는, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 아미노산 서열에서 L68V/K161Q, L68V/K161N, 또는 L68V/D207N으로부터 선택되는 아미노산 치환을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다.

[44] 상기 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드의 절편은 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드의 일부분을 의미한다. 본원에서는 특히, 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산 서열(서열번호 2 TNFRI171), 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산

서열(서열번호 3; TNFRI126), 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 148번으로 이루어진 아미노산 서열(서열번호 4 TNFRI108)이 이용된다. 그러나, 본 발명의 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드의 절편은 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는 한 상기 언급된 TNFRI171, TNFRI126, TNFRI108에 국한되는 것은 아니다.

- [45] 상기 변형된 TNFRI 폴리펩티드의 "절편"은 변형된 TNFRI 폴리펩티드와 실질적으로 동등한 효과를 나타내며, 당업자에 의해 용이하게 제조될 수 있는, 변형된 TNFRI 폴리펩티드의 일부분을 의미한다.
- [46] 따라서, 본 발명의 단백질 분해효소에 대한 저항성이 향상된, 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 이의 절편의 범주에는 이하에서 기술되는 것들이 포함된다.
- [47] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산 서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산 서열에 있어서, 61번, 68번, 78번, 85번, 106번, 107번, 109번, 121번, 128번, 133번, 135번, 136번, 138번, 141번, 150번, 156번, 161번, 200번, 203번, 206번 및 207번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서 아미노산 변형; 바람직하게는, 68번, 85번, 109번, 128번, 133번, 135번, 136번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서 아미노산 변형; 더욱 바람직하게는 68번, 109번, 133번, 135번, 136번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서 아미노산 변형을 포함하는 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편 (TNFRI171 변이체 또는 그의 절편)을 제공한다. 여기서, 아미노산변형은 상기 위치에서의 아미노산 변형에 관하여 앞서 언급된 구체적인 변형들 및 바람직한 변형들이 동일하게 적용된다.
- [48] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산 서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산 서열에 있어서, 61번, 68번, 78번, 85번, 106번, 107번, 109번, 121번, 128번, 133번, 135번, 136번, 138번, 141번, 150번, 156번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서 아미노산 변형; 바람직하게는, 68번, 85번, 109번, 128번, 133번, 135번, 136번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서 아미노산 변형; 더욱 바람직하게는 68번, 109번, 133번, 135번, 136번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서 아미노산 변형을 포함하는 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편 (TNFRI126 변이체 또는 그의 절편)을 제공한다. 여기서, 아미노산 변형은 상기 위치에서의 아미노산 변형에 관하여 앞서 언급된 구체적인 변형들 및 바람직한 변형들이 동일하게 적용된다.
- [49] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산 서열의 41번 내지 148번으로 이루어진 아미노산 서열에 있어서, 61번,

68번, 78번, 85번, 106번, 107번, 109번, 121번, 128번, 133번, 135번, 136번, 138번 및 141번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서 아미노산 변형; 바람직하게는, 68번, 85번, 109번, 128번, 133번, 135번, 136번 및 141번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서 아미노산 변형; 더욱 바람직하게는 68번, 109번, 133번, 135번, 136번 및 141번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치에서 아미노산 변형을 포함하는 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편(TNFRI108 변이체 또는 그의 절편)을 제공한다. 여기서, 아미노산 변형은 상기 위치에서의 아미노산 변형에 관하여 앞서 언급된 구체적인 변형들 및 바람직한 변형들이 동일하게 적용된다.

- [50] 본 발명은 또한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 TNFRI 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 폴리펩티드에 있어서 상기 언급된 아미노산 변형 또는 그에 상응하는 변형을 포함하는 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다. 상기 "서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 TNFRI 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 폴리펩티드"는 TNFRI의 본질적인 활성을 해하지 않는 수와 종류의 아미노산 변형, 즉 아미노산 치환, 결실, 부가 또는 기타 변형을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 구체적으로는, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드와 90%이상, 95%이상, 96%이상, 97%이상, 98%이상, 또는 99%이상의 상동성을 갖는 변이체에서 상기 언급된 아미노산 변형에 상응하는 변형을 포함하는, 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다.
- [51] 상기 언급된 변이체는 서열번호 1에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드와, 본 발명의 단백질 분해효소에 대한 저항성 향상을 위한 아미노산 변형을 제외하고, 90%이상, 95%이상, 96%이상, 97%이상, 98%이상, 또는 99%이상의 서열 상동성을 가지는 것으로, 인간 TNFRI 폴리펩티드의 대립유전자형 변이체 동종형, 조직-특이적인 동종형 그리고 그것들의 대립유전자형 변이체들, 하나 이상의 아미노산 돌연변이, 치환, 결실, 삽입, 또는 추가를 가진 합성 변이체들, 핵산을 번역함으로써 제조된 합성분자들, 인간 및 비인간 조직과 세포로부터 추출한 단백질들, 키메라 TNFRI 폴리펩티드 및 그것의 변형된 형태들을 포함할 수 있다.
- [52] 상기 언급된 "상응하는 변형"은, 다른 동종형인 폴리펩티드들 사이에 비교되는 잔기들의 변형을 의미한다. 즉, 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 TNFRI 폴리펩티드의 아미노산 서열과 서열 배열(sequence alignment)시, 기능적으로 불변인 것으로 파악되는 잔기를 가지는 위치에서의, 본 발명의 단백질 분해효소에 대한 저항성 향상을 위한 아미노산 변형에 상응하는 변형을 의미한다. 당업계의 숙련자는 그러한 폴리펩티드들 중에서 상응하는 잔기들의 변형을 쉽게 파악할 수 있다. 예를 들어 당업자는 보존적이고 동일한 아미노산 잔기들을 가이드로 사용하여 TNFRI 폴리펩티드의 서열을 정렬함으로써

상응하는 잔기들을 동정해 낼 수 있다.

- [53] 본 발명은 또한 서열번호 6 내지 서열번호 266으로 표현된 아미노산 서열을 포함하는 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편, 바람직하게는 서열번호 18, 19, 33, 52, 62, 69, 70, 73, 78, 79, 94, 95, 109, 128, 138, 145, 146, 149, 154, 155, 164, 165, 178, 179, 193, 212, 222, 229, 230, 233, 238, 239, 248, 249, 또는 258 내지 266으로 표현된 아미노산 서열을 포함하는 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편, 더욱 바람직하게는 서열번호 18, 19, 69, 70, 78, 94, 95, 145, 146, 154, 164, 165, 178, 179, 229, 230, 238, 248, 249, 또는 261 내지 263으로 표현된 아미노산을 포함하는 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제공한다.
- [54] 상기한 본 발명의 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 상기 아미노산 변형에 추가로 단백질 번역-후 변형과 같은 다른 화학적인 변형, 예를 들어 탄수화물 부위에 의한 당화, 아실화(acylation) (예, 아세틸화(acetylation) 또는 숙신화(succinylation), 메틸화(methylation), 인산화(phosphorylation), 해실화(hasylation), 카르바밀화(carbamylation), 황화(sulfation), 프레닐화(prenylation), 산화(oxidation), 구아니딜화(guanidination), 아미딘화(amidination), 카르바밀화(carbamylation) (예, 카르바모일화(carbamoylation)), 트리니트로페닐화(trinitrophenylation), 질산화(nitration), 페길화(PEGylation)을 단백질 분해효소에 대한 저항성 증가, 면역원성 감소, 또는 생물학적 활성 유지 또는 증가를 위해 포함할 수 있다.
- [55] 본 발명은 또한 상기한 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 암호화하는 유전자를 제공한다.
- [56] 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 암호화하는 유전자는 대장균 내 발현을 최적화하기 위해 조작된 유전자를 포함한다. 인간과 대장균의 유전자 코돈이 상이하기 때문에 인간 유전자를 대장균에서 발현시키는 경우, 발현 수율이 낮다. 따라서, 본 발명에서는 인간 TNFRI 유전자에 기초하여 대장균 발현에 적합하도록 조작된 유전자, 예컨대 서열번호 5의 TNFRI 유전자를 사용할 수 있다. 상기 유전자는 대장균 발현 벡터 (예컨대, pET44a (Novagen, Cat. No: 71122-3))에 삽입하여 코돈이 부가되지 않은 대장균 세포 (예: BL21(DE3))에서 발현시 인간 TNFRI 유전자보다 높은 발현량을 나타낸다. 따라서, 상기 유전자를 이용하여 TNFRI 절편 및 TNFRI 변이체를 대장균 내에서 효과적으로 생산할 수 있다.
- [57] 본 발명은 또한 상기 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명에서 유전자 도입을 위해 사용가능한 벡터는 당업계에 공지된 벡터를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 도1, 도5의 개열지도를 갖는 벡터를 사용할 수 있다.
- [58] 본 발명은 또한 상기 벡터로 형질전환된 미생물 또는 동물세포를 제공한다. 본 발명에서 벡터의 형질전환을 위해 사용가능한 미생물 또는 동물세포는 당업계에서 사용되는 형질전환을 위한 공지의 미생물 또는 동물세포를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 대장균 세포, CHO 세포, HEK293 세포 등을 사용할 수

있으며, 보다 바람직하게는 대장균 세포(예컨대, E.coli BL21(DE3))을 사용할 수 있다.

[59] 본 발명은 대장균을 이용한 TNFRI의 제조방법을 제공한다.

[60] TNFRI은 동물세포를 이용하여 생산 가능하다(Bernie 등, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 301: 418-426 2002; Scallon 등, *Cytokine*. 7:759-770 1995).

[61] TNFRI을 대장균에서 발현시키는 경우 구조적으로 활성을 갖지 않는 봉입체(inclusion body) 형태로 발현되기 때문에, 활성을 가지는 단백질로의 재접힘(refolding) 과정이 요구된다(Silvia 등, *Analytical Biochemistry* 230: 85-90 1995; Karin 등, *Cytokine*. 7:26-38 1995). 따라서, 본 발명의 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 대장균에서 봉입체 형태로 발현시키고, 이를 재접힘 과정을 통해 활성을 가지는 TNFRI을 제조한 후, 이를 겔 여과 크로마토그래피 방법 등을 사용하여 정제하여 제조할 수 있다. 또한 본 발명의 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 친수성의 용합 단백질을 붙여 발현하는 방법, 낮은 온도에서 배양하는 방법 등을 사용하여 대장균에서 봉입 과립 형태가 아닌 가용성 단백질 형태로 제조될 수 있다. 본원의 실시예에서는 친수성인 NusA 단백질을 TNFRI 단백질의 N-말단에 결합시킴으로써 대장균에서 가용성의 단백질로 TNFRI을 제조하였다.

[62] 또한 본 발명은 상기 유전자를 적당한 벡터에 도입하고 이 벡터로 숙주세포를 형질전환하고 이로부터 얻어진 형질 전환체를 배지에서 배양하여 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 얻는 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 제조방법을 제공한다.

[63] 본 발명은 또한 TNF에 의해 매개되는 질병이나 내과 증상 (이하, 'TNF-매개 질병'이라 함)에 대한 치료방법을 제공한다. TNF-매개 질병, 이와 관련된 후유증 및 이와 관련된 증상의 예는 다음과 같다: 어른 호흡곤란 증후군 식욕부진 암, 예를들어, 백혈병 만성피로 증후군 이식편 대 숙주 거부반응 통각과민 염증성 장질환 신경염증성 질환 대뇌 국소빈혈을 포함하는 국소빈혈/재관류 손상, 각각 신경변성을 초래할 수도 있는 외상, 간질, 출혈 또는 발작의 결과로서의 뇌 손상 당뇨병, 예를들어, 제 1형 연소성 당뇨병 다발성경화증 안 질환 동통 철회장염 폐섬유증 류마티스성 질환, 예를들어, 류마티스양 관절염, 골관절염, 연소성(류마티스양) 관절염, 혈청반응음성 다발성관절염, 강직성 척추염, 라이터 증후군 및 반응성 관절염, 건선성 관절염, 장질환성 관절염, 다발성근염, 피부근염, 공피증, 전신성 경화증, 맥관염, 대뇌 맥관염, 쇼그렌 증후군, 류마티스성 발열, 다연골염 및 다발성근육통, 류마티스성 및 거대세포 동맥염 폐혈증성 쇼크 방사선요법으로 인한 부작용 전신성 홍반성루푸스 측두하악골 관절 질환 갑상선염 및 조직이식.

[64] 본 발명은 또한 상기한 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 포함하는 류마티스관절염 또는 TNF-매개 질병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

- [65] 본 발명은 또한 상기한 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 암호화하는 유전자 본 유전자를 포함하는 벡터 또는 본 벡터로 형질전환된 미생물 또는 동물세포를 포함하는 류마티스관절염 또는 TNF-매개 질병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [66] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 및 흡입 투여 외 정맥 및 피하로 투여될 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 목적하는 순도를 갖는 TNFRI 변이체를 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 저장 또는 투여용으로 제조될 수 있다. 이러한 물질은 사용되는 투여량 및 농도에서 복용자에게 무독성인 것으로, 인산염, 시트르산염, 아세트산염 및 다른 유기산염과 같은 완충제 아스코르브산과 같은 산화방지제 폴리아르기닌, 단백질, 예를 들면 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 저분자량 (약 10개 미만의 잔기를 갖는) 펩티드 폴리비닐피롤리디논과 같은 친수성 중합체 글리신, 글루탐산, 아스파르트산 또는 아르기닌과 같은 아미노산 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 셀룰로오스 또는 그의 유도체를 포함하는 다른 탄수화물, 글루코스, 만노스 또는 덱스트린 EDTA와 같은 킬레이트제 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알콜 나트륨과 같은 카운터 이온 및(또는) 트윈(Tween), 플루로닉스(Pluronics) 또는 폴리에틸렌글리콜과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.
- [67] 본 발명의 약제학적 조성물은 주사용 멸균 조성물의 형태로 당업계의 통상적 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 주사용 멸균 조성물은 비히클, 예를 들면, 물 또는 참깨유, 땅콩유 또는 면실유와 같은 천연 식물성 오일 또는 에틸 올레이트와 같은 합성 지방 비히클 중의 활성 화합물의 용액 또는 현탁액을 포함할 수 있다. 상기 주사용 멸균 조성물에는 또한 완충제, 방부제, 산화 방지제 등이 당업계에 통상적으로 사용되는 모습에 따라 혼입될 수 있다.
- [68] 본 발명의 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편, 또는 이를 암호화하는 유전자, 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 미생물 또는 동물세포는 상기 TNF-매개 질환의 치료적으로 유효한 양으로 약제학적 조성물 내 포함된다.
- [69] 상기 "치료적으로 유효한 양"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상 의에 의해 생각되는 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 일 예로, 성인의 경우, 본 발명의 TNFRI 변이체를

1일 1회 투여시, 0.01 - 1,000 mg/체중kg, 바람직하게는 0.1 - 100 mg/체중 kg 의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

- [70] 또한, 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 다른 요법에 대한 부가물로서 투여될 수 있으며, 치료될 적응증(indication)에 적합한 다른 약제학적 조성물과 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 하나 또는 둘 이상의 공지의 또는 신규한 항-염증성 약물 중 임의의 약물과 개별적으로 또는 함께 투여할 수 있다. 이러한 약물에 해당하는 화합물에 관한 정보는 The Merck, Manual of Diagnosis and Therapy, Sixteenth Edition, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, NJ (1992) 및 파마프로젝츠, 피제이비 퍼블리케이션 리미티드에서 찾을 수 있다.
- [71] 상기 병용 사용의 한 예로, 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 류마티스성 질병 [예를 들어, 라임병, 연소성 (류마티스양) 관절염, 골관절염, 건선성 관절염, 류마티스양 관절염 및 스타필로코컬-유도성 ("폐혈증성") 관절염] 과 같은 급성 및 만성 염증을 포함하는, TNF-매개 질병의 치료를 위하여, 비-스테로이드성, 항-염증성 약물 (NSAIDs) 로서 분류되는 염증 조절을 위한 제 1 선 약물과 함께 사용될 수 있다.
- [72] 상기 병용 사용의 다른 예로, 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 상기 TNF-매개 질병 및 다발성 경화증 치료를 위하여, 하나 이상의 서서히 작용하는 항류마티스성 약물 (SAARDs) 또는 질병 변형 항류마티스성 약물 (DMARDs), 이의 약물 전구체 에스테르 또는 약제학적으로 허용되는 염 중 어느 것과 함께 사용될 수 있다.
- [73] 상기 병용 사용의 다른 예로, 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 상기한 TNF-매개 질병 치료를 위하여, 하나 이상의 COX2 저해제, 그것의 약물 전구체 에스테르 또는 약제학적으로 허용되는 염 중 어느 것과 함께 사용될 수 있다.
- [74] 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 상기한 TNF-매개 질병 치료를 위하여 하나 이상의 항균약, 약물 전구체 에스테르, 또는 약제학적으로 허용되는 염 중 어느 것과 함께 사용될 수 있다.
- [75] 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 상기한 TNF-매개 질병 치료를 위하여, 하나 이상의 다음의 화합물 중 어느 것과 함께 사용될 수 있다: 과립구 군체 자극인자 탈리도미드 테니답 티아파판트 니메솔리드 파나비어 툴리프람 썰파살라진(sulfasalazine); 발라살라지드(balsalazide); 올살라진(olsalazine); 메살라진(mesalazine); 프레드니솔론(prednisolone); 부테소니드(budesonide); 메틸프로드니솔론(methylprednisolone); 하이드로코르티손(hydrocortisone); 메소트렉세이트(methotrexate); 싸이트로스포린(cyclosporin); 펩티드 T; (1R,3S)-시스-1-[9-(2,6-디아미노푸린)]-3-히드록시-4-시클로펜탄 히드로클로라이드 (1R, 3R)-트랜스-1-[9-(2,6-디아미노)푸린]-3-아세톡시사이클로펜탄 (1R, 3R)-트랜스-1-[9-아데닐]-3-아지도사이클로펜탄

히드로클로라이드 및

(1R,3R)-트랜스-1-[6-히드록시-푸린-9-일]-3-아지도사이클로펜탄.

- [76] 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 상기한 TNF-매개 질병 치료를 위하여, 하나 이상의 부가적 TNF 저해제와 함께 사용될 수 있다. TNF 저해제는 TNF의 생체 내 합성 또는 세포 외 방출을 차단시키는 화합물 및 단백질로서 다음을 포함한다: 항-TNF 항체 [예를 들어, MAK 195F Fab 항체 (Holler et al. (1993), 1st International Symposium on Cytokines in Bone Marrow Transplantation, 147); CDP 571 항-TNF 모노클로날 항체 (Rankin et al. (1995), British Journal of Rheumatology, 34 : 334 - 342); BAY X1351 쥐의 항 - 종양 괴사인자 모노클로날 항체 (Kieft et al. (1995), 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 9); CenTNF cA2 항 - TNF 모노클로날 항체 (Elliott et al. (1994), Lancet, 344: 1125 - 1127 and Elliott et al. (1994), Lancet, 344: 1105 - 1110)]
- [77] 본 발명은 또한 상기한 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 포함하는 약제학적 제제를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 제제는 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가적으로 포함한다.
- [78] 본 발명의 약제학적 제제는 경구제, 흡입제, 주사제, 점막투여제제, 및 외용제로 이루어진 군으로부터 선택된 약제학적 제제일 수 있다.
- [79] 본 발명의 약제학적 제제는 약제적으로 허용가능한 희석제, 보존제, 용해제, 이멸시파이어, 어주번트 또는 운반체 등을 치료에 효과적인 양으로 포함한다. 또한, 본 발명의 약제학적 제제는 당업계에서 사용되는 통상의 완충용액들 (예컨대, 트리스완충액, 아세트산완충액, 인산완충액), 계면활성제 (예컨대, Tween 80), 향산화제 (예컨대, 아스코르브산, 소듐 메타바이설파이트), 보존제(예컨대, 티메로살, 벤질 알코올), 그리고 벌킹 희석제 (예컨대, 유당, 만니톨)와 같은 첨가제를 포함할 수 있다. 상기 첨가제들은 폴리락탄산, 폴리글라이콜산 리포솜 등의 폴리머 조성물을 이용하여 입자성 물질로 제공될 수 있다. 또한 본 발명의 약제학적 제제는 순환계 내 지속성 증가를 위하여 하이알루론산을 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 제제는 선택적으로 약제학적 운반체, 부형물, 혹은 배지로서 약제학적으로 허용되는 액체, 반고체, 혹은 고체 희석물들을 포함할 수 있다. 이러한 물질에는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트, 전분류, 설탕, 텍스트로오스, 아카시아검, 칼슘 인산염, 미네랄 오일, 코코아 버터, 및 테오브로마 오일 등이 포함될 수 있으며, 이것에 한정되지 않는다.
- [80] 본 발명의 약제학적 제제는 또한 위장관 환경, 그리고 장내에서의 생물학적인 활성을 가지는 물질의 분비로부터 보호받을 수 있게 해주는 안정적인 첨가물질들을 포함한다.
- [81] 본 발명의 약제학적 제제는 공지된 기술, 예를 들어 혼합, 용해, 과립화, 드라제화(dragee-making), 부양화(levigating), 에멀전화, 캡슐화, 트랩핑(entrapping) 또는 정제화 공정을 사용하여 제조된다.



- [82] 본 발명의 약제학적 제제는 액체(예: 현탁액, 액리시르 및/또는 용액), 또는 고체(예: 분말, 정제 및/또는 캡슐) 형태일 수 있으며, 디포(depot) 형태로 제형화될 수 있다. 상기 디포 제제는 비디포 제제보다 일반적으로 장시간 작용성이다. 상기 디포 제제는 적합한 중합체 또는 소수성 물질(예: 적합한 오일 중 에멀전) 또는 이온 교환 수지 또는 난용성 유도체, 예를 들어 난용성 염을 사용하여 제조된다. 또한, 본 발명의 약제학적 제제는, 리포솜 및 에멀전과 같은 전달 시스템을 포함한다. 특정 전달 시스템은 소수성 화합물을 포함하는 제제를 포함하여 특정 약제학적 제제를 제조하는 데 유용하며, 디메틸설폭사이드와 같은 유기 용매가 사용될 수 있다. 본 발명의 다른 모습으로, 본 발명의 약제학적 제제는, 약제학적 제제를 특정 조직이나 세포 유형에 전달하도록 고안된 하나 이상의 조직-특이적 전달 분자를 포함한다. 예를 들어, 특정 양태에서, 약제학적 제제는 조직-특이적 항체로 피복된 리포솜을 포함한다.
- [83] 바람직하게는 본 발명의 약제학적 제제는 고체형태의 경구투여제제로 제제화될 수 있다. 고체 투여형태들은 정제, 캡슐, 환약, 트로키, 펠렛 등의 형태를 포함한다.
- [84] 리포솜이나 프로티노이드 인캡슐레이션이 또한 본 발명의 조성물을 제제화하는데 사용될 수 있다. 상기 리포솜들은 포스파티딜콜린 (PC), 포스파티딜에탄올아민 (PE), 포스파디드산 (PA), 포스파티딜이노시톨 (PI), 및 스펅고미엘린 (SM)과 같은 인지질, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐메틸에테르, 폴리메틸옥사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리하이드록시프로필옥사졸린, 폴리하이드록시프로필메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 폴리하이드록시프로필메타크릴레이트, 폴리하이드록시에틸아크릴레이트, 하이드록시메틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 폴리에틸렌글리콜, 및 폴리아스파르트아미드과 같은 친수성 폴리머로부터 제조될 수 있다.
- [85] 한편, 본 발명의 약제학적 제제 내에 포함된 상기의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은, 필요하다면, 경구투여가 효과적하도록 화학적으로 변형될 수 있다. 일반적으로, 화학적인 변형은 TNFRI 변이체 폴리펩티드 내에 하나 또는 둘 이상의 잔기를 붙이는 것이다. 여기서 잔기는 단백질 분해효소에 저항성을 가지게 하는 물질이거나 위장관으로부터 혈류속으로의 흡수를 도와주는 물질일 수 있다. 바람직하게는 상기 화학적 변형을 위한 잔기는 본 발명의 약제학적 제제의 전체적인 안정성을 증가시켜 인체내에서 순환시간을 증가시키는 화학적 변형을 위한 잔기일 수 있다. 이러한 잔기들의 예로서, 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공동 복합체, 카르복시메틸 셀룰로오스, 덱스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 파이롤리돈 그리고 폴리프롤린등이 있을 수 있다. 사용가능한 또다른 폴리머들로는 폴리-1,3-다이옥세인 및 폴리-1,3,6-티옥소케인 등이 있다. 가장 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜 잔기(폐길화)가 사용된다.

- [86] 본 발명의 경구투여용 형태의 약제학적 제제의 흡수율을 증가시키기 위한 운반체로서 소듐 N-(8-[2-하이드록시벤조일]아미노) 캐프릴레이트 (SNAC) 과 같은 변형된 알리파틱 아미노산의 염을 사용할 수 있다.
- [87] 본 발명의 약제학적 제제는 과립이나 입자의 크기가 대략 1mm 의 펠렛 형태의 고운 멀티파티클레이트의 형태로 제제화될 수 있다. 이 경우, 제제는 캡슐 형태일 수 있으며, 멀티파티클레이트 형태의 제제는 분말, 가볍게 눌러진 충전물이나 혹은 정제 등의 형태일 수 있다. 또한, 상기 제제는 압축에 의해서도 제조될 수 있다.
- [88] 본 발명의 약제학적 제제는 또한 발색제나 향신료를 추가로 포함하여, 예를 들면, 리포솜이나 마이크로스피어 인캡슐레이션의 형태로 제제화될 수 있다.
- [89] 또한, 본 발명의 약제학적 제제 내 유효성분인 상기의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 흡수율을 증가시키기 위하여, 지방산들, 올레인산, 리놀레인산 등과 같은 첨가제를 사용할 수 있다.
- [90] 한편, 본 발명의 약제학적 제제는 방출 제어성 제제일 수 있다. 이러한 제제 내 유효성분인 상기의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편은 비활성의 담체에 담겨 확산 혹은 용해의 기전에 의하여 제어되어 방출된다. 또한, 상기 방출 제어성 제제는 서서히 분해되는 담체, 예를 들어, 알긴산, 폴리사카라이드 등을 포함할 수 있다. 상기 방출 제어성 제제의 또다른 형태로는 오로스 치료 시스템 (OROS: Osmotic Release Oral delivery System, 알자사 제작)에 기반한 형태일 수 있다. 상기 방출 제어성 제제는 반투과성 막 내에 본 발명의 유효성분인 TNFRI 변이체가 담겨져 물이 안으로 유입하여 상기 유효성분을 하나의 작은 구멍을 통해 삼투압 효과로 밀어내도록 한다. 또한, 본 발명의 방출 제어성 제제는 장용성 코팅물질로 코팅함으로써 지연된 약물방출 효과를 나타낼 수 있다.
- [91] 본 발명의 약제학적 제제는 또한 필름으로 코팅된 타블렛의 형태일 수 있으며 이러한 필름 코팅에 사용되는 물질로는 다음의 2가지 군이 있다. 첫번째 군은 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 하이드록세틸 셀룰로오스, 메틸하이드록실-에틸 셀룰로오스, 하이드록실프로필 셀룰로오스, 하이드록시프로필-메틸 셀룰로오스, 소듐 카르복시-메틸 셀룰로오스, 프로비돈 그리고 폴리에틸렌글라이콜 등과 같은 비장용성 물질이며, 두번째 군은 프탈릭산의 에스터들과 같은 장용성 물질이다. 구체적으로는, 상기 장용성 물질로는 장용성 고분자, 즉, 장용성 셀룰로오스 유도체, 장용성 아크릴산계 공중합체, 장용성 말레인산계 공중합체, 장용성 폴리비닐 유도체, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것이 사용된다. 상기 장용성 셀룰로오스 유도체는 히프로멜로오스아세테이트숙시네이트, 히프로멜로오스프탈레이트, 히드록시메틸에틸셀룰로오스프탈레이트, 셀룰로오스아세테이트프탈레이트, 셀룰로오스아세테이트숙시네이트, 셀룰로오스아세테이트말레이트, 셀룰로오스벤조에이트프탈레이트, 셀룰로오스프로피오네이트프탈레이트, 메틸셀룰로오스프탈레이트, 카르복시메틸에틸셀룰로오스 및

에틸히드록시에틸셀룰로오스프탈레이트 중에서 선택된 하나 또는 둘 이상 상기  
 장용성 아크릴산계 공중합체는 스티렌-아크릴산 공중합체,  
 아크릴산메틸-아크릴산 공중합체, 아크릴산메틸메타크릴산 공중합체,  
 아크릴산부틸-스티렌-아크릴산 공중합체, 메타크릴산-메타크릴산메틸  
 공중합체(예컨대, 유드라짓 L 100, 유드라짓 S, 데구사),  
 메타크릴산·아크릴산에틸공중합체(예컨대, 유드라짓 L 100-55, 데구사), 및  
 아크릴산메틸-메타크릴산-아크릴산옥틸공중합체 중에서 선택된 하나 또는 둘  
 이상 상기 장용성 말레인산계 공중합체는 아세트산비닐-말레인산 무수물  
 공중합체, 스티렌-말레산 무수물 공중합체, 스티렌-말레인산모노에스테르  
 공중합체, 비닐메틸에테르-말레인산 무수물 공중합체, 에틸렌-말레인산 무수물  
 공중합체, 비닐부틸에테르-말레인산 무수물 공중합체,  
 아크릴로니트릴-크릴산메틸·말레인산 무수물 공중합체, 및  
 아크릴산부틸-스티렌-말레인산 무수물 공중합체 중에서 선택된 하나 또는 둘  
 이상 또는 상기 장용성 폴리비닐 유도체는 폴리비닐알콜프탈레이트,  
 폴리비닐아세탈프탈레이트, 폴리비닐부티레이트프탈레이트, 및  
 폴리비닐아세트아세탈프탈레이트 중에서 선택된 하나 또는 둘 이상이다.

- [92] 상기 코팅물질들의 혼합물이 최적의 필름 코팅을 위해 사용될 수 있다. 필름 코팅은 펜 코터 혹은 유동층 조립기 또는 압축 코팅기에서 수행될 수 있다.
- [93] 본 발명의 방출 제어성 억제학적 제제는 또한 지속 방출을 위하여 성형품, 예를 들면 필름 또는 마이크로캡슐 형태의 반투과성 고상 소수성 중합체 매트릭스 내에 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 포함할 수 있다. 상기 지속 방출을 위한 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 [예: Langer 등, *J.Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277, 1981 및 Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105, 1982에 기재된 폴리(2-히드록시에틸메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)], 폴리락티드 (미국 특허 제3773919호, 유럽 특허 제58,481호), L-글루타민산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체 (Sidman 등, *Biopolymers*, 22:547-556, 1983), 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트 (상기 Langer 등의 문헌), 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 (예: 루프론 데포트 TM(Lupron DepotTM; 락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤라이드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 소구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산 (유럽특허 제133988호)을 포함한다.
- [94] 캡슐화된 단백질이 장기간 동안 체내에 체류하게 되면, 37°C에서 습기에 노출된 결과 변성되거나 또는 응집될 수 있고, 이 결과, 생물학적 활성이 손실되고 면역원성에 변화가 일어날 수 있다. 따라서, 관련 메카니즘에 따라 공지의 방법을 이용하여 단백질 안정화를 달성할 수 있다. 예를 들면, 응집 메카니즘이 디설피드 교환을 통한 분자간 S-S 결합을 형성하는 것으로 알려진 경우, 술폰히드릴 잔기를 변성하고, 산성 용액으로부터 동결 건조 시키고, 수분 함량을 조절하고, 적당한 첨가제를 사용하고, 특정 중합체 매트릭스 조성물을 개발함으로써 안정화시킬 수 있다.

- [95] 본 발명은 또한 본 발명의 TNFRI 변이체, 및 이를 포함하는 약제학적 제제의 사용방법을 제공한다. 그러한 약제적인 제제는 주사, 경구투여, 비강내 투여, 피부를 통한 투여, 혹은 다른 방법을 통한 투여가 가능하다. 이러한 방법에는 정맥내(intravenous), 진피내(intradermal), 근육내(intramuscular), 유방내(intramammary), 복강내(intraperitoneal), 포막내(intrathecal), 안내(intraocular), 폐내(intrapulmonary) 혹은 피하주사(subcutaneous injection), 설하(sublingual), 항문(anal), 질(vaginal), 외과적인 주입(surgical implantation) 등이 있다. 상기 치료는 단회 투여나 혹은 일정기간 동안 반복투여일 수 있다.
- [96] 또한 본 발명의 약제학적 제제는 폐를 통한 전달방법에 의해 전달될 수 있다. 본 발명의 약제학적 제제는 포유동물의 폐를 통해서 숨을 쉬는 동안에 전달될 수 있으며 그것은 폐의 상피세포를 지나면서 혈류 속으로 흡수된다.
- [97] 폐를 통한 약물의 전달을 위해 고안된 다양한 기계적 장치들이 본 발명의 약제학적 제제의 폐를 통한 전달을 위하여 사용될 수 있다. 이것들은 네블라이저들, 눈금이 붙은 용량 흡입기, 및 가루흡입기 등 당업계에서 시판되는 여러 기기들을 포함한다.
- [98] 본 발명의 약제학적 제제는 상기 장치들에 적용에 최적화하기 위하여 적절히 제제화될 수 있다. 일반적으로, 각각의 제제들은 적용된 장치의 형태에 따라 특이적이며, 경우에 따라 희석제, 어주번트, 또는 운반체에 추가로 추진제들을 적절하게 함께 사용할 수 있다.
- [99] 폐를 통한 전달을 위한 본 발명의 약제학적 제제는 입자성 물질로 만들어지는 것이 바람직하며, 그것의 평균 입경은 대략 10 마이크로미터 이하이다. 가장 바람직하게는 0.5 에서 5 마이크로미터가 되어야 먼 곳의 폐까지 효과적으로 전달된다.
- [100] 폐를 통한 전달을 위한 본 발명의 약제학적 제제는 또한 운반체로서 트레할로오스, 만니톨, 자일리톨, 수크로오스, 락토오스 및 소르비톨과 같은 탄수화물을 포함할 수 있다. 상기 제제에는 디팔미토일포스파티딜콜린 (Dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC), 디올레오일포스파티딜 에탄올아민 (Dioleoylphosphatidyl ethanolamine, DOPE), 디스테아로일포스파티딜콜린 (Distearoylphosphatidylcholine, DSPC) 및 디올레오일포스파티딜콜린 (Dioleoylphosphatidylcholine, DOPC) 등이 추가로 포함될 수 있다. 상기 제제는 또한 천연의 혹은 합성 계면활성제들을 포함할 수 있다. 상기 제제는 또한 폴리에틸렌 글라이콜 환형텍스트란과 같은 텍스트란 담즙산과 다른 연관된 유도체들 및 완충용액의 제제로 사용되는 아미노산을 추가로 포함할 수 있다.
- [101] 또한 본 발명의 약제학적 제제의 폐를 통한 전달을 위하여 리포솜, 마이크로캡슐 또는 마이크로스피어, 인클루전 복합체들 또는 운반체들의 다른 형태들이 사용될 수 있다.
- [102] 본 발명의 약제학적 제제를 네블라이저를 사용하여 폐로 전달하는 경우, 제트 또는 초음파를 함께 사용할 수 있다. 네블라이저에 적용하기 위한 본 발명의

약제학적 제제는 용액의 1 ml 당 대략 0.1 에서 25 mg 의 TNFRI 변이체를 포함한다. 상기 네블라이저용 제제는 또한 완충용액과 단당류를 포함하며, 이들은 예를 들어 단백질 안정화와 삼투압 안정에 기여한다. 상기 네블라이저용 제제는 또한 에어로졸의 형성에서 용액의 원자화에서 야기되는 단백질의 어그리게이션을 유발하는 표면을 줄이기 위하여 계면활성제를 포함할 수 있다.

- [103] 눈금용량의 흡입기기를 위한 본 발명의 약제학적 제제는 일반적으로 본 발명의 TNFRI 변이체를 포함하는 조성물을 고운 가루로 만들어 계면활성제의 도움 하에 추진제에 혼합한 형태이다. 상기 추진제는 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본, 혹은 티르클로로플루오로메탄, 다이클로로다이플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄올, 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄올과 같은 하이드로카본, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 사용될 수 있는 적절한 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트 및 소야 레시틴을 포함한다. 올레익산 또한 계면활성제로 사용될 수 있다.
- [104] 가루 흡입기로부터 방출되는 본 발명의 약제학적 제제는 본 발명의 TNFRI 변이체를 포함하는 조성물을 포함하는 말린 고운 가루 형태로 구성되며, 락토오스, 소르비톨, 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스 또는 자일리톨과 같은 희석제를 포함할 수 있다. 이들은 기기장치로부터 그 가루를 분산시키는 것을 촉진시킬 수 있다.
- [105] 본 발명의 약제학적 제제는 또한 비강을 통하여 전달을 위한 제제일 수 있다. 코를 통한 전달은 단백질 치료제가 코로 들어온 이후 곧장 혈류속으로 들어갈 수 있게 하여 폐에 그 치료제가 쌓이는 것을 막는다. 비강을 통한 전달을 위한 본 발명의 약제학적 제제는 덱스트란 또는 환형 덱스트란 등을 포함한다. 본 발명의 약제학적 제제는 기타 다른 점막 조직들을 통하여 전달되기 위한 제제일 수 있다.
- [106] 본 발명의 약제학적 제제의 투여용량은 상기 설명된 질병들을 치료하는 방법과 관련하여 의사에 의해 약물의 효과를 변형시킬 만한 요인들, 예를 들어 나이, 상태, 체중, 성별, 식이, 어떤 감염에 의한 중증도, 투여시점 등의 기타 임상학적인 조건에 따른 요인들에 따라서 결정되어야 한다.
- [107] 본 발명의 약제학적 제제는 단회 또는 계속적 투여가 가능하다. 다만, 초회 투여 후 일정한 순환계 농도를 유지시키기 위해 계속적인 투여를 하는 것이 바람직하다. 효과적인 투여용량과 방법은 당업계에 공지된 일반적 기술들에 기초하여 최적화될 것이며, 반복투여 횟수는 각 환자의 약동학적인 인자들과 투여경로에 따라 달라질 것이다. 상기 투여용량, 용법 및 투여횟수는 또한 투여된 약물의 물리적인 상태, 안정성, 생체내 방출속도, 생체내 제거율 등에 따라 최적화될 수 있다. 또한, 투여경로에 따른 적절한 투여용량이 체중, 체표면적, 장기의 크기에 따라 계산될 수 있다. 적절한 용량은 적절한 용량-반응 자료와 함께 혈중농도의 자료와 함께 판단하여 확정되어야 한다. 최종의

투여법은 의사에 의해 결정될 것이며, 의사는 약물의 비활성, 환자의 중증도, 약물에 대한 환자의 반응정도, 나이, 컨디션, 체중, 성별, 그리고 식이와 기타 다른 임상학적인 요인들을 고려하여 처방해야 한다. 연구가 진행됨에 따라, 다양한 종류의 질병들과 조건들에 대응하는 적절한 투여 용량과 처방기간들에 관한 보다 많은 정보들이 나올 것이다.

### 발명의 효과

- [108] 본 발명의 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1(TNFRI) 폴리펩티드 또는 그의 절편은 단백질 분해효소에 대하여 증가된 저항성을 가지기 때문에 주사제 또는 경구제로 투여시 개선된 생체 이용률과 흡수율을 나타내며, 따라서, 지속형 주사제 및 경구용 단백질 제제로서 유리하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [109] 도1은 NusA 단백질을 암호화하는 유전자를 가진 pET44a 벡터에 TNFRI108 유전자를 삽입하여 NusA가 융합된 TNFRI108을 발현하는 대장균 발현 벡터를 제작하는 과정을 나타낸 모식도이다.
- [110] 도2는 pET44a-NusA-TNFRI108 발현 벡터로 형질전환된 대장균에서 NusA가 융합된 TNFRI108의 발현을 확인하고, 메탈 친화 크로마토그래피 (Immobilized metal affinity chromatography)와 소수성 크로마토그래피 (Hydrophobic interaction chromatography) 로 순수하게 정제한 사진이다.
- [111] 도3은 TNF- $\alpha$ 에 대한 TNFRI108 절편(대조군)과 TNFRI108 절편 단일 변이체 TNFRI108-68의 결합력을 BIAcore 분석(3A)과 ELISA 분석(3B)을 통해 확인한 그래프이다.
- [112] 도4는 TNFRI108 절편에 대한 TNFRI108 절편 단일 변이체 TNFRI108-14, TNFRI108-64, 및 TNFRI108-68 의 단백질 분해효소 저항성 증가를 확인한 그래프이다.
- [113] 도5는 pET44a 벡터에 Met-TNFRI126 또는 Met-TNFRI171 유전자를 삽입하여 Met-TNFRI126 또는 Met-TNFRI171을 발현하는 대장균 발현 벡터를 제작하는 과정을 나타낸 모식도이다.
- [114] 도6A는 겔 여과 크로마토그래피 크로마토그램(chromatogram)을 이용하여 Met-TNFRI126 및, Met-TNFRI171 단백질의 용출을 확인한 도이고 (분획 A4), 도6B는 정제된 Met-TNFRI126 및 Met-TNFRI171을 환원 상태에서 SDS-PAGE 방법으로 분석한 결과를 나타낸 사진이다.
- [115] 도7은 TNF- $\alpha$ 에 대한 Met-TNFRI126 절편(대조군)과 Met-TNFRI126 절편 변이체 Met-TNFRI126-14, Met-TNFRI126-64, Met-TNFRI126-65, 및 Met-TNFRI126-68 의 결합력을 ELISA 방법으로 측정된 그래프이다.
- [116] 도8A는 TNF- $\alpha$ 에 대한 Met-TNFRI171 절편(대조군)과 Met-TNFRI171 절편 변이체 Met-TNFRI171-83, Met-TNFRI171-84, 및 Met-TNFRI171-92 의 결합력을 측정된 도이고, 도8B는 Met-TNFRI171 절편에 대한 Met-TNFRI171 절편 단일

변이체 Met-TNFRI171-83, Met-TNFRI171-84, 및 Met-TNFRI171-92 의 단백질 분해효소 저항성 증가를 확인한 그래프이다.

[117] 도9는 TNF- $\alpha$ 에 대한 Met-TNFRI171 절편(대조군)과 Met-TNFRI171 절편 이중 변이체 Met-TNFRI171-204, Met-TNFRI171-205, 및 Met-TNFRI171-206 의 결합력을 ELISA 방법으로 확인한 그래프이다.

[118] 도10은 Met-TNFRI171 절편에 대한 Met-TNFRI171 절편 이중 변이체 Met-TNFRI171-204(10A), Met-TNFRI171-205(10B), 및 Met-TNFRI171-206(10C) 의 단백질 분해효소 저항성 증가를 확인한 그래프이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

[119] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 후술하는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되지 않는다.

[120] 본 발명의 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제조하기 위하여 이미 유전체가 공개 되어 있는 인간 TNFRI 유전체 정보를 이용하였다.

[121] TNFRI 절편 유전자를 중합효소 연쇄반응 (이하 PCR) 방법을 사용하여 합성하고, 이를 벡터 pGEM-T (Promega, Cat. No: A1380)에 클로닝하고 이를 다시 대장균 발현을 위한 pET44a (Novagen, Cat. No: 71122-3)에 삽입하여 미생물 발현 벡터를 만들었다 (도1). 이를 BL21Star(DE3) (Invitrogen, Cat. No: C6010-03)에 형질 전환하여 NusA가 융합된 TNFRI 절편이 세포 내 가용성 단백질로 생산됨을 확인하였으며, 발현된 TNFRI은 96웰 플레이트를 이용한 크로마토그래피 방법을 사용하여 순수하게 정제하였다.

[122] 또한 pET44a 발현 벡터를 이용하여 NusA가 없는 TNFRI 절편만을 발현하는 발현 벡터를 제작하였다 (도5). 이때 TNFRI 절편은 봉입체(inculsion body)로 발현되었다. 봉입체로 발현된 TNFRI 절편은 변성 용액을 이용하여 가용화하고, 리폴딩(refolding) 과정을 거쳐 활성이 있는 단백질로 제조하였으며, 겔 여과 크로마토그래피 방법으로 정제하였다.

[123] 단백질 분해효소에 저항성을 가지는 변이체를 제작하기 위해 TNFRI 절편의 단백질 분해효소에 의한 절단 위치를 추정하였다. TNFRI 절편의 아미노산 서열 상의 위장관, 세포내 및 혈액 중에 존재 하는 대표적인 단백질 분해효소 10종에 대한 절단 위치를 Expsy (Expert Protein Analysis System)에서 제공하는 peptide cutter (<http://www.expsy.org/tools/peptidecutter/>) 프로그램을 이용하여 추정하였다.

[124] 단백질 분해효소에 의해 절단될 것으로 예측된 아미노산을 구조적 변화가 적으면서 단백질 분해효소에 의해 절단되지 않는 아미노산으로 치환하기 위하여 PAM250 매트릭스 (W. A Pearson, *Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA*, in *Methods in Enzymology*, ed. R. Doolittle (ISBN 0-12-182084-X, Academic Press, San Diego) 183:63-98 (1990))를

이용하였다. 앞서 추정된 위치의 아미노산을 PAM250 매트릭스에서 0 이상의 양수 값을 가지는 아미노산 중 단백질 분해효소에 의해 인식되지 않는 아미노산으로 치환하여 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 제조하였다.

- [125] 상기 결정된 TNFRI 변이체를 암호화하는 유전자를 NusA가 융합된 가용성 단백질 형태로 발현하는 벡터를 주형으로 사용하여 위치 지정 돌연변이체 제작(site-specific mutagenesis)방법으로 각 변이체 벡터를 제작하였다. 이를 BL21Star(DE3)에 형질 전환하여 NusA가 융합된 TNFRI 절편을 세포 내 가용성 단백질로 생산하여 활성 및 단백질 분해효소 저항성을 분석하였다. NusA 융합으로 인한 영향을 확인하기 위해 NusA가 없는 TNFRI 돌연변이체를 생산하였으며, 활성 및 단백질 분해효소 저항성을 비교 분석하였다.
- [126] 이하, 본 발명의 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편의 제조 및 확인에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [127] [제조예] TNFRI 유전자 절편 제작: TNFRI171 유전자의 제조
- [128] 인간 TNFRI 은 4개의 세포외 도메인을 가지고 있으며, 이중 TNFRI 의 세개의 도메인(TNFRI126)만으로도 TNF- $\alpha$ 에 대한 결합이 가능하며, 그 이상의 결손이 존재해도 TNF- $\alpha$ 와의 결합에 영향이 없다고 보고되어 있다. 이에 서열번호 1에 기재된 인간 TNFRI 폴리펩티드의 41번부터 171개의 아미노산을 갖는 TNFRI171 (서열번호 2), 인간 TNFRI 의 41번부터 126개의 아미노산을 갖는 TNFRI126 (서열번호 3), 41번부터 108개의 아미노산을 갖는 TNFRI108 (서열번호 4)를 본 발명의 변이체를 제조하기 위한 후보 펩티드로 선정하였다. 위와 같은 변이체를 생산하기 위해 TNFRI171의 염기서열을 대장균 내 발현에 용이하도록 대장균에 맞는 코돈을 사용하여 변형시켰다(서열번호 5). 이를 PCR 방법을 이용한 유전자 합성 방법을 통해 제작하였다.
- [129] 상기 합성된 대장균 발현용 TNFRI171 유전자 서열(서열번호 5)을 pGEM-T(Promega, Cat. No: A1380) 벡터에 삽입하기 위해 1 ul의 pGEM-T 벡터에 합성 유전자 3 ul를 첨가하고, 1 ul 라이게이즈(NEB, Cat. No: M2200S)와 라이게이션 용액(2x ligation buffer)을 넣은 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 반응 용액 2 ul를 취하여 XL1-blue 컴피턴트 세포(competent cell)(RBC, Cat. No: RH119-J80)에 넣어 37°C에서 2분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고, 암피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정지 배양하여 콜로니를 얻었다. 이 콜로리를 암피실린이 포함된 LB 액체 배지에서 배양한 후 플라스미드를 분리하고, PCR을 사용하는 ddNTP에 형광물질을 표지하는 방식으로 유전자 서열을 확인하였다(솔젠트, 한국). 이 유전자를 pGEM-TNFRI171로 명명하였다. 이하에서, TNFRI171 이외의 TNFRI126, TNFRI108 유전자는 앞서 얻어진 pGEM-TNFRI171 유전자를 주형으로 이용하여 PCR 방법으로 확보하였다.
- [130] [실시에 1] TNFRI 단일 변이체 설계
- [131] 변이체 제작을 위하여 먼저 단백질 분해효소에 저항성을 가지는 변이체를



설계하였다. 돌연변이 위치 결정은 TNFRI171 아미노산 서열에 대해 하기 표 1에 표시된 위장관, 세포 및 혈액 속에 존재 하는 대표적인 단백질 분해효소 10종에 대한 절단 위치를 Expsy (Expert Protein Analysis System)에서 제공하는 peptide cutter (<http://www.expsy.org/tools/peptidecutter/>) 프로그램을 이용 추정하고, 추정된 절단 부위의 아미노산을 구조적 변화가 적으면서 단백질 분해효소에 의해 절단되지 않는 아미노산으로 치환하였다. 치환될 아미노산의 결정은 PAM250 매트릭스 (matrix)를 이용하였다. PAM250 매트릭스에는 각각의 아미노산에 대해 양수, 0, 음수의 값을 가지는 19가지의 대응 아미노산들을 참고하여 단백질 분해효소에 의한 절단이 되지 않으면서 양수 또는 0의 값을 가지는 아미노산을 치환할 아미노산으로 결정하였다.

[132] [표 1] 단백질 분해효소 특이적 아미노산 및 저항성 유도 아미노산

[133]

단백질 분해효소	인식 절단 아미노산	저항성 유도 치환 아미노산
Arg-C proteinase	R	H 또는 Q
Asp-N endopeptidase	-D	N 또는 Q
Chymotrypsin	[FYWML], not before P	S 또는 I, H
Enterokinase	K	N 또는 Q
Glutamyl endopeptidase	E	N 또는 Q
Lys-C	K	N 또는 Q
Lys-N	K	N 또는 Q
Proline endopeptidase	H, K or R, -P	A 또는 S
Thrombin	R	N 또는 Q
Trypsin	K	N 또는 Q

[134] 상기의 방법에 의하여 설계된 TNFRI 변이체의 목록은 표 2에 나타내었다.

[135]

[136] [표 2] 설계된 TNFRI 단일 변이체 목록

[137]

변이체 번호	변이 내용	변이체 번호	변이 내용
TNFRIx-1	K48Q	TNFRIx-47	M109I
TNFRIx-2	K48N	TNFRIx-48	M109V
TNFRIx-3	Y49I	TNFRIx-49	E113Q
TNFRIx-4	Y49H	TNFRIx-50	E113N
TNFRIx-5	P52A	TNFRIx-51	D120N
TNFRIx-6	P52S	TNFRIx-52	D120Q
TNFRIx-7	K61Q	TNFRIx-53	R121H
TNFRIx-8	K61N	TNFRIx-54	R121Q
TNFRIx-9	K64Q	TNFRIx-55	D122N
TNFRIx-10	K64N	TNFRIx-56	D122Q
TNFRIx-11	Y67I	TNFRIx-57	R128H
TNFRIx-12	Y67H	TNFRIx-58	R128Q
TNFRIx-13	L68I	TNFRIx-59	K129Q
TNFRIx-14	L68V	TNFRIx-60	K129N
TNFRIx-15	Y69I	TNFRIx-61	Y132I
TNFRIx-16	Y69H	TNFRIx-62	Y132H
TNFRIx-17	D71N	TNFRIx-63	R133H
TNFRIx-18	D71Q	TNFRIx-64	R133Q
TNFRIx-19	D78N	TNFRIx-65	Y135I
TNFRIx-20	D78Q	TNFRIx-66	Y135H
TNFRIx-21	D80N	TNFRIx-67	W136H
TNFRIx-22	D80Q	TNFRIx-68	W136S
TNFRIx-23	R82H	TNFRIx-69	E138Q
TNFRIx-24	R82Q	TNFRIx-70	E138N
TNFRIx-25	E83Q	TNFRIx-71	L140I
TNFRIx-26	E83N	TNFRIx-72	L140V
TNFRIx-27	E85Q	TNFRIx-73	F141I
TNFRIx-28	E85N	TNFRIx-74	F141V
TNFRIx-29	F89I	TNFRIx-75	F144I
TNFRIx-30	F89V	TNFRIx-76	F144V
TNFRIx-31	E93Q	TNFRIx-77	L150I
TNFRIx-32	E93N	TNFRIx-78	L150V
TNFRIx-33	L96I	TNFRIx-79	L156I
TNFRIx-34	L96V	TNFRIx-80	L156V
TNFRIx-35	R97H	TNFRIx-81	E160Q
TNFRIx-36	R97Q	TNFRIx-82	E160N
TNFRIx-37	L100I	TNFRIx-83	K161Q
TNFRIx-38	L100V	TNFRIx-84	K161N
TNFRIx-39	K104Q	TNFRIx-85	E200Q
TNFRIx-40	K104N	TNFRIx-86	E200N
TNFRIx-41	R106H	TNFRIx-87	K203Q
TNFRIx-42	R106Q	TNFRIx-88	K203N
TNFRIx-43	K107Q	TNFRIx-89	E206Q
TNFRIx-44	K107N	TNFRIx-90	E206N
TNFRIx-45	E108Q	TNFRIx-91	D207Q
TNFRIx-46	E108N	TNFRIx-92	D207N

[138] \*하기 실시예와 관련하여, 상기 표의 x는 변이체 번호 1번 내지 76번에 대하여는 108, 126, 또는 171 일 수 있으며, 변이체 번호 77번 내지 84번에 대하여는 126 또는 171일 수 있으며, 변이체 번호 85번 내지 92번에 대하여는 171 일.

[139] [실시예 2] TNFRI108 변이체의 제조

[140] (1) TNFRI108 유전자 및 발현 벡터의 제조

[141] 대장균에서 가용성의 TNFRI108 단백질을 발현하기 위해 NusA 유전자를 포함하는 상업적으로 이용 가능한 pET44a 벡터(Novagen, Cat. No: 71122-3)를 이용하여 발현 벡터를 구성하였다.

[142] 구체적으로 TNFRI108 유전자는 상기 제조예에서 제작된 pGEM-TNFRI171

플라스미드를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 확보하였다. 이때 pET44a 벡터로의 클로닝을 위하여 5' 말단에 *Sma* I, 3' 말단에 *Hind* III 제한 효소 인식 자리를 첨가하였다.

[143] 정방향 프라이머 : 5'- ccccggggcgatgacgatgacaaagatagcgtgtgcccg-3'

[144] 역방향 프라이머 : 5'- taagcttattacagggagcaattaaacactgg-3'

[145] PCR은 1차 변성 95°C 5분, 2차 변성 95°C 1분, 프라이머 접합 60°C 40초, 신장반응 72°C 1분 중 2차 변성에서 신장반응 과정을 25회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소 반응을 72°C 10분으로 수행하여 반응을 종료하였다. 증폭된 유전자 2 ul를 사용하여 제조사에서 제시한 방법에 따라 pcDNA3.3 TOPO TA 벡터(Invitrogen, Cat. No: K8300-01)로 삽입하였다. 반응 용액 2 ul를 취하여 XL1-blue 컴피턴트 세포(competent cell)(RBC, Cat. No: RH119-J80)에 넣어 42°C에서 1분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고, 암피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정치 배양하여 콜로니를 얻었다. 이 콜로니를 암피실린이 포함된 LB 액체 배지에서 배양한 후 플라스미드를 분리하고, ddNTP에 형광물질을 표지하는 방식으로 유전자 서열을 확인하였으며(솔젠트, 한국), pcDNA3.3-TNFRI108로 명명하였다.

[146] 상기 제작된 pcDNA3.3-TNFRI108 벡터와 pET44a 벡터에 각각 제한 효소(*Sma* I, *Hind* III)를 첨가하여 37°C에서 3시간 반응시켰다. 제한 효소 처리 후 1% 아가로스 젤 전기영동을 수행하여 해당 크기의 DNA 밴드를 면도칼로 잘라내어 DNA 추출 키트(GeneAll, Cat. No: 102-102)를 이용하여 추출하였다. 추출한 pET44a 벡터와 TNFRI108 유전자 DNA 는 라이게이즈(NEB, Cat. No: M2200S)를 사용하여 연결 반응을 시켰다. 반응 용액 2 ul를 취하여 XL1-blue 컴피턴트 세포(competent cell)(RBC, Cat. No: RH119-J80)에 넣어 37°C에서 2분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고, 암피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정치 배양하여 콜로니를 얻었다. 이 콜로니를 암피실린이 포함된 LB 액체 배지에서 배양한 후 플라스미드를 분리하여 TNFRI108 대장균 발현 벡터를 제작하였다(도 1). 제작된 TNFRI108 대장균 발현 벡터는 pET44a-NusA-TNFRI108 플라스미드로 명명하였다.

[147] (2) TNFRI108 단일 변이체를 코딩하는 DNA의 제조

[148] 위치 특이적 TNFRI108 단일 변이체를 제작하기 위해 위치 지정 돌연변이체 제작 (site-directed mutagenesis) 방법에 의해 TNFRI108 단일 변이체를 제작하였다. TNFRI108 단일 변이체 제작에 사용한 프라이머를 하기 표 3에 나타내었다.

[149] 구체적으로는 상기 pET44a-NusA-TNFRI108 플라스미드를 주형으로 하기 표 3의 1~76번 변이체에 해당하는 프라이머 각 쌍을 20 pmole이 되도록 증류수에 녹인 후 Pfu 폴리머레이즈를 이용한 PCR 반응을 진행하여 부위 특이적 변이체를 제작하였다. 증폭 반응에 사용된 용액의 구성은 다음과 같다.

pET44a-NusA-TNFRI108 플라스미드 DNA 1.0 ul, 20 pmole의 정방향 프라이머

1.0ul, 20 pmole의 역방향 프라이머 1.0 ul, 2X PrimeSTAR PCR buffer 25.0 ul, 200uM의 dNTP 4.0 ul, PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara, Cat. No: R044A) 0.5 ul와 17.5 ul 증류수를 넣어 50 ul 의 반응 용액을 만들었다.

[150] PCR은 1차변성 98°C 5분, 2차변성 98°C 30초, 프라이머 접합 55°C 30초, 신장반응 72°C 9분 과정 중 2차변성에서 신장반응을 17회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소반응을 72°C 10분으로 수행하여 반응을 종료하였다.

[151] PCR 산물은 *Dpn* I 효소로 37°C, 2시간 처리하여 대장균 유래의 DNA를 분해하고 PCR에 의해 증폭된 DNA를 확보하였다. DNA 용액 2 ul를 취하여 XL1-blue 컴피턴트 세포(competent cell)(RBC, Cat. No: RH119-J80)에 넣어 42°C에서 1분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고 암피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정지 배양하여 콜로니를 얻었다. 이 콜로니를 암피실린이 포함된 LB 액체 배지에서 배양한 후 플라스미드를 분리하고, 염기서열 분석을 통해 부위 특이적인 돌연변이의 완성을 확인하였다.

[152] [표 3] 위치 특이 돌연변이 유도를 위한 프라이머

[153]

변이체 번호	변이 내용	프라이머 방향	프라이머 서열
TNFRI-1	K48Q	정방향 역방향	5'-atagcgtgtgcccgagggtcagtataatcatcc-3' 5'-ggatgaatatactgaccctgcgggcacacgctat-3'
TNFRI-2	K48N	정방향 역방향	5'-gtgtgccccgagggttaactatattcatccgcaaa-3' 5'-tttgccggatgaatatagttaccctgcgggcacac-3'
TNFRI-3	Y49I	정방향 역방향	5'-gcccgagggttaagattatcatccgcaaaaat-3' 5'-atttgccggatgaataatctaccctgcgggc-3'
TNFRI-4	Y49H	정방향 역방향	5'-gtgccccgagggttaagcatalatcatccgcaaaaat-3' 5'-atttgccggatgaatagcttaccctgcgggcac-3'
TNFRI-5	P52A	정방향 역방향	5'-cgcagggttaagtataatcatgcgcaaaaataactc-3' 5'-gagttatttgcgcatgaataactaccctgcg-3'
TNFRI-6	P52S	정방향 역방향	5'-gggtaagtataatcatagccaaaataactctatc-3' 5'-gatagagttatttggctatgaataacttacc-3'
TNFRI-7	K61Q	정방향	5'-taactctatctgttgccacacagtgccaaaaggg-3'
		역방향	5'-cccttgtagactgtgtgcaacagatagagta-3'
TNFRI-8	K61N	정방향	5'-ctctatctgttgccaaaactgtcacaagggac-3'
		역방향	5'-gtcccttgtagacagttgtgcaacagatagag-3'
TNFRI-9	K64Q	정방향	5'-gcacaaaaggtgccaccaggggacgtacctgtat-3'
		역방향	5'-atacaggtacgtcccctgtgtgacactttgtc-3'
TNFRI-10	K64N	정방향	5'-gcacaaaaggtgccacaacgggacgtacctgtata-3'
		역방향	5'-tatacaggtacgtcccgtgtgacactttgtc-3'
TNFRI-11	Y67I	정방향	5'-gtcacaaggggacgattctgtataatgactgtc-3'
		역방향	5'-gacagtcattatacagaatcgtccccttgtag-3'
TNFRI-12	Y67H	정방향	5'-gtgtcacaaggggacgcactctgtataatgactg-3'
		역방향	5'-cagtcattatacagatgcgtccccttgtagac-3'
TNFRI-13	L68I	정방향	5'-cacaaaaggggacgtacattataatgactgtccgg-3'
		역방향	5'-ccggacagtcattataaatgtacgtccccttg-3'
TNFRI-14	L68V	정방향	5'-gtgtcacaaggggacgcactctgtataatgactg-3'
		역방향	5'-cagtcattatacagatgcgtccccttgtagac-3'
TNFRI-15	Y69I	정방향	5'-caaaggggacgtacctgattaatgactgtccgggg-3'
		역방향	5'-ccccggacagtcattaatcaggtagtccccttg-3'
TNFRI-16	Y69H	정방향	5'-caaaggggacgtacctgcataatgactgtccggg-3'
		역방향	5'-ccccggacagtcattatgcaggtagtccccttg-3'
TNFRI-17	D71N	정방향	5'-gggacgtacctgtataataactgtccggggc-3'
		역방향	5'-gccccggacagttattatacaggtagtccc-3'
TNFRI-18	D71Q	정방향	5'-gggacgtacctgtataatcagtgccggggcc-3'
		역방향	5'-ggccccggacactgattatacaggtagtccc-3'
TNFRI-19	D78N	정방향	5'-ggggccgggtcagaacaccgactgccgcg-3'
		역방향	5'-cgcggcagtcgggtctgtgacctggccc-3'
TNFRI-20	D78Q	정방향	5'-ggggccgggtcagcagaccgactgccgc-3'
		역방향	5'-gcggcagtcgggtctgtgacctggccc-3'
TNFRI-21	D80N	정방향	5'-gggtcaggataccaactgccgagtg-3'
		역방향	5'-cactcgcggcagttggtatcctgacct-3'
TNFRI-22	D80Q	정방향	5'-gggtcaggataccagtgccgagtg-3'
		역방향	5'-cgcactcgcggcactgggtatcctgacct-3'
TNFRI-23	R82H	정방향	5'-ggataccgactgccatgagtgccgagagtg-3'
		역방향	5'-cccactctgcactcatggcagtcggtatcc-3'
TNFRI-24	R82Q	정방향	5'-ggataccgactgccaggagtgccgagagtg-3'
		역방향	5'-ccactctgcactcctggcagtcggtatcc-3'

변이체 번호	변이 내용	프라이머 방향	프라이머 서열
TNFRI-25	E83Q	정방향 역방향	5'-accgactgccgccagtgcgagagtg-3' 5'-cactctgcactggcggcagtcggt-3'
TNFRI-26	E83N	정방향 역방향	5'-ataccgactgccgcaactgcgagagtggtc-3' 5'-gaccactctcgcagtgccggcagtcggtat-3'
TNFRI-27	E85Q	정방향 역방향	5'-ctgccgcgagtgccagagtggtcatt-3' 5'-aatgaccactctggcactcgcggcag-3'
TNFRI-28	E85N	정방향 역방향	5'-gactgccgcgagtgcaacagtggtcattacag-3' 5'-ctgtaaatgaccactgtgactcgcggcagtcg-3'
TNFRI-29	F89I	정방향 역방향	5'-gtgcgagagtggtcaattacagcagtgag-3' 5'-ctcactcgtgtaattgaccactctgcac-3'
TNFRI-30	F89V	정방향 역방향	5'-cgagtgcgagagtggtcagtgacagcagtg-3' 5'-cactcgtctcactgaccactctgcactcg-3'
TNFRI-31	E93Q	정방향 역방향	5'-gtgggtcattacagcagtgacagatcatctgcg-3' 5'-cgcagatgattctgactcgtgtaaatgaccac-3'
TNFRI-32	E93N	정방향 역방향	5'-gtcattacagcagtaacaatcatctgccac-3' 5'-gtggcgcagatgattgtactcgtgtaaatgac-3'
TNFRI-33	L96I	정방향 역방향	5'-gcgagtgagaatcatattgccactgcctgagc-3' 5'-gctcaggcagtgccgaatgatattcactcgc-3'
TNFRI-34	L96V	정방향 역방향	5'-tacagcagtgagaatcatgctgcgccactgc-3' 5'-gcagtgccgcacatgattctcactcgtgta-3'
TNFRI-35	R97H	정방향 역방향	5'-gagtgagaatcatctgcacactgcctgagctg-3' 5'-cagctcaggcagtgatgcagatgattcactc-3'
TNFRI-36	R97Q	정방향 역방향	5'-gagtgagaatcatctgcagcactgcctgagctg-3' 5'-cagctcaggcagtgctgcagatgattcactc-3'
TNFRI-37	L100I	정방향 역방향	5'-catctgcgccactgcattagctgttaagtgc-3' 5'-gacactagaacagctaagcagtgccgcagatg-3'
TNFRI-38	L100V	정방향 역방향	5'-catctgcgccactgcgtgagctgttctaag-3' 5'-cttagaacagctcacgcagtgccgcagatg-3'
TNFRI-39	K104Q	정방향 역방향	5'-cgccactgcctgagctgttctcagtgctgtaa-3' 5'-tttacgacactgagaacagctcaggcagtgccg-3'
TNFRI-40	K104N	정방향 역방향	5'-cactgcctgagctgttctaactgtcgtaaagag-3' 5'-ctctttacgacagtagaacagctcaggcagtg-3'
TNFRI-41	R106H	정방향 역방향	5'-gctgtctaagtgtcataaagagatggccaag-3' 5'-ctggcccactctttatgacacttagaacagc-3'
TNFRI-42	R106Q	정방향 역방향	5'-gctgtctaagtgtcagaaagagatggccaag-3' 5'-ctggcccactctttctgacacttagaacagc-3'
TNFRI-43	K107Q	정방향 역방향	5'-gttctaagtgtcgcaggagatggccaagttg-3' 5'-caactggcccactctcctgacgacacttagaac-3'
TNFRI-44	K107N	정방향 역방향	5'-gttctaagtgtcgtaacgagatggccaagttg-3' 5'-caactggcccactctcgttacgacacttagaac-3'
TNFRI-45	E108Q	정방향 역방향	5'-gctgtctaagtgtcgtaaacagatggccaag-3' 5'-ctggcccactctgttacgacacttagaacagc-3'
TNFRI-46	E108N	정방향 역방향	5'-gttctaagtgtcgtaaaaacatggccaagttg-3' 5'-caactggcccactgttttacgacacttagaac-3'
TNFRI-47	M109I	정방향 역방향	5'-ctaagtgtcgtaaagagatggccaagttgaaat-3' 5'-attcaactggccaactctttacgacacttag-3'
TNFRI-48	M109V	정방향 역방향	5'-ctaagtgtcgtaaagaggtggccaagttgaaat-3' 5'-attcaactggcccactctttacgacacttag-3'

변이체 번호	변이 내용	프라이머 방향	프라이머 서열
TNFRI-49	E113Q	정방향 역방향	5'-gagatgggccaagttcagatttctcatgtacgg-3' 5'-ccgtacatgaagaaatcgaactggccccatctc-3'
TNFRI-50	E113N	정방향 역방향	5'-gagatgggccaagttaacatttctcatgtacgg-3' 5'-ccgtacatgaagaaatgtaactggccccatctc-3'
TNFRI-51	D120N	정방향 역방향	5'-tttctcatgtacggtaaacccgcgatacgggtatg-3' 5'-cataccgtatcgcggttaccgtacatgaagaaa-3'
TNFRI-52	D120Q	정방향 역방향	5'-tttctcatgtacggtagcagcgcgatacgggtatg-3' 5'-cataccgtatcgcgctgtaccgtacatgaagaaa-3'
TNFRI-53	R121H	정방향 역방향	5'-catgtacggtagaccatgatacggtagtggttg-3' 5'-caaccacataccgtatcatggctaccgtacatg-3'
TNFRI-54	R121Q	정방향 역방향	5'-catgtacggtagaccaggatacggtagtggttg-3' 5'-caaccacataccgtatcctggctaccgtacatg-3'
TNFRI-55	D122N	정방향 역방향	5'-gtacggtagaccgcaacacggtagtggttgcc-3' 5'-ggcaaccacataccgtgtgctaccgtac-3'
TNFRI-56	D122Q	정방향 역방향	5'-gtacggtagaccgccagacggtagtggttgcc-3' 5'-ggcaaccacataccgtctggcggctaccgtac-3'
TNFRI-57	R128H	정방향 역방향	5'-cggtatggttgccataaaaaaccagtatcgcc-3' 5'-ggcgatactggtttatggcaaccacataccg-3'
TNFRI-58	R128Q	정방향 역방향	5'-cggtatggttgccagaaaaaccagtatcgcc-3' 5'-ggcgatactggtttctggcaaccacataccg-3'
TNFRI-59	K129Q	정방향 역방향	5'-ggtatggttgccgctcagaaccagtatcgcc-3' 5'-ggcgatactggtctgacggcaaccacatacc-3'
TNFRI-60	K129N	정방향 역방향	5'-ggtatggttgccgtaacaaccagtatcgcc-3' 5'-ggcgatactggtgttacggcaaccacatacc-3'
TNFRI-61	Y132I	정방향 역방향	5'-gtgccgtaaaaaccagattcgccattattggtc-3' 5'-gaccaataatggcgaatctggttttacggcaac-3'
TNFRI-62	Y132H	정방향 역방향	5'-gtgccgtaaaaaccagcattcgccattattggtc-3' 5'-gaccaataatggcgaatctggttttacggcaac-3'
TNFRI-63	R133H	정방향 역방향	5'-gccgtaaaaaccagtatcattattggtcag-3' 5'-ctgaccaataatgatgatactggttttacggc-3'
TNFRI-64	R133Q	정방향 역방향	5'-gccgtaaaaaccagtatcagcattattggtcag-3' 5'-ctgaccaataatgctgatactggttttacggc-3'
TNFRI-65	Y135I	정방향 역방향	5'-ccagtatcgccattattggtcagaaaaactgttc-3' 5'-gaacagggtttctgaccaataatggcgatactgg-3'
TNFRI-66	Y135H	정방향 역방향	5'-ccagtatcgccattattggtcagaaaaactgttc-3' 5'-gaacagggtttctgaccaatgatggcgatactgg-3'
TNFRI-67	W136H	정방향 역방향	5'-cagtatcgccattatcattcagaaaaactgttc-3' 5'-ggaacagggtttctgaatgataatggcgatactg-3'
TNFRI-68	W136S	정방향 역방향	5'-cagtatcgccattatagctcagaaaaactgttc-3' 5'-ggaacagggtttctgagctataatggcgatactg-3'
TNFRI-69	E138Q	정방향 역방향	5'-cgccattattggtcacagaacctgttccagtg-3' 5'-cactggaacagggtctgtgaccaataatggcg-3'
TNFRI-70	E138N	정방향 역방향	5'-cgccattattggtcaaacacctgttccagtg-3' 5'-cactggaacagggtttgaccaataatggcg-3'
TNFRI-71	L140I	정방향 역방향	5'-atggtcagaaaaacatttccaggttttaattg-3' 5'-caattaaacactggaaaatgtttctgaccaat-3'
TNFRI-72	L140V	정방향 역방향	5'-atggtcagaaaaacgtgttccaggttttaattg-3' 5'-caattaaacactggaaacagtttctgaccaat-3'
TNFRI-73	F141I	정방향 역방향	5'-ggtcagaaaaacctgattcaggttttaattgctc-3' 5'-gagcaattaaacactgaatcagggtttctgacc-3'
TNFRI-74	F141V	정방향 역방향	5'-ggtcagaaaaacctggtgcaggttttaattgctc-3' 5'-gagcaattaaacactgcaccagggtttctgacc-3'
TNFRI-75	F144I	정방향 역방향	5'-gaaaacctgttccagtgatattaattgctccctg-3' 5'-cagggagcaattaatacactggaacagggtttc-3'
TNFRI-76	F144V	정방향 역방향	5'-gaaaacctgttccagtgatgaattgctccctg-3' 5'-cagggagcaatcacactggaacagggtttc-3'

[156] (3) TNFRI108 및 TNFRI108 변이체의 발현

[157] 상기에서 제작한 플라스미드 용액 1 ul를 취하여 BL21Star(DE3)(Invitrogen, Cat. No: C6010-03) 컴피턴트 세포에 넣어 42°C에서 1분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고 암피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정지 배양하여 콜로니를 얻었다. pET44a-NusA-TNFRI108 및 TNFRI108 변이체 벡터를 포함하고

있는 대장균(BL21 Star(DE3))를 100 ug/ml 농도의 암피실린이 들어 있는 5ml LB 액체 배지(BD, Cat. No: 244620)에 접종하여 37°C에서 16시간 통기 배양하였다. 배양액을 100 ug/ml 암피실린이 들어 있는 50 ml 배지에 접종하여 600 nm의 흡광도가 0.6~0.8일 때까지 배양하고, 최종 농도가 1.0 mM 농도가 되게 isopropyl-beta-D-thigalactopyranoside (IPTG) (Sigma, Cat. No: I9003)를 첨가하여 발현을 유도하였다. 발현 유도 후 37°C에서 3시간 통기 배양을 계속하였다. 배양 세포는 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 수집하였다.

[158] (4) TNFRI108 및 TNFRI108 변이체의 정제

[159] 앞서 수집한 세포를 세포 파쇄 후 상층액을 회수하여 메탈 친화 크로마토그래피로 1차 정제 후 소수성 크로마토그래피로 2차 정제하여 순도 90% 이상의 시료를 얻었다.

[160] 구체적으로 상기에서 수집한 세포를 600 nm 흡광도가 10이 되도록 재현탁 용액 (25 mM 트리스 용액 (pH 8.5))으로 재현탁 시켰다. 재현탁한 시료를 Sonicator(Sonics, Cat. No: VCX750)를 사용하여 세포 파쇄하고, 12,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상층액을 회수하였다. 96웰 필터 플레이트(Pall, Cat No: PN5065)에 300 ul 하이퍼셀 레진(Pall, Cat No: 20093-010)을 로딩하고, 4컬럼 부피의 증류수 세척 후 2컬럼 부피의 0.1 M NiCl<sub>2</sub> 를 부가하여 니켈 이온을 레진에 결합시켰다. 2컬럼 부피의 증류수를 흘려준 후, 평형화 용액 (25 mM 트리스, 0.1 M NaCl (pH 8.5))으로 6컬럼 부피로 세척하였다. 2컬럼 부피의 시료를 부가 후 4컬럼 부피의 평형화 용액을 사용하여 결합하지 않은 시료를 제거하였다. 10컬럼 부피의 세척 용액 (25 mM 트리스, 0.1 M NaCl, 50 mM 이미다졸 (Imidazole) (pH 8.5))으로 세척하고, 컬럼에 결합된 TNFRI108을 회수하기 위해 2컬럼 부피의 용출 용액 (25 mM 트리스, 0.1 M NaCl, 250 mM 이미다졸 (pH 8.5))으로 용출하였다.

[161] 메탈 친화 크로마토그래피에서 용출된 단백질 용액에 400 mM 농도가 되도록 1.0 M 암모늄 설페이트((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)용액을 첨가하였다. 96웰 필터 플레이트에 300 ul의 페널 세파로스 레진(GE, Cat. No: 17-108201)을 로딩하고, 6컬럼 부피의 평형화 용액 (20 mM 소듐 포스페이트(Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 400 mM 암모늄 설페이트 (pH 7.0))을 흘려주었다. 메탈 친화 크로마토그래피 용출액을 컬럼에 부가하고, 2컬럼 부피의 평형화 용액을 흘려주어 결합되지 않은 단백질을 제거하였다. 10컬럼 부피의 세척 용액 (20mM 소듐 포스페이트(Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 160 mM 암모늄 설페이트 (pH 7.0))로 세척하고, 6컬럼 부피의 용출 용액 (20 mM 소듐 포스페이트(pH 7.0))으로 용출하였다. 용출된 시료를 100ug/mL 이상의 농도로 농축한 후, 브래드포드 방법을 사용하여 정량하였다. 정제된 모든 시료는 SDS-PAGE 분석을 사용하여 순도를 확인하였다(도 2).

[162] [실험예 1] 리간드(TNF- $\alpha$ )와 TNFRI108간의 결합력 확인

[163] 세포 내 가용성 단백질로 생산된 TNFRI108 절편 및 TNFRI108 단일 변이체(TNFRI108-68)를 메탈 친화 크로마토그래피와 소수성 크로마토그래피



방법을 사용하여 순수 분리하였다. 상기 정제된 TNFRI108 절편(대조군) 및 TNFRI108 절편 변이체는 브래드포드 방법을 사용하여 정량하고, ELISA 분석과 BIAcore 분석을 사용하여 TNF- $\alpha$ 와의 결합력을 측정하였다 (도3).

- [164] 구체적으로, BIAcore 분석은 CM5 칩(chip)을 사용하여 BIAcore3000 시스템에서 분석하였다. 칩의 첫번째 셀은 TNF- $\alpha$ 를 고정화시키지 않고, 0.05 M NHS/0.2 M EDC 용액을 사용하여 활성화 시키고, 1.0 M ethanolamine hydrochloride (pH8.5)로 비활성화만을 수행하였다. 두번째 셀은 키네틱(kinetic) 분석을 위해 TNF- $\alpha$ 를 800 RU만큼 고정화시켰다. CM5 chip을 0.05 M NHS/0.2 M EDC 용액을 사용하여 활성화 시키고, TNF- $\alpha$ 를 800 RU까지 고정화하였다. 800 RU의 TNF- $\alpha$ 를 고정화 시킨 후, 1.0 M ethanolamine hydrochloride (pH8.5)를 반응시켜 비활성화 시켰다. 각 시료 분석은 100 mM NaCl이 포함된 25mM 트리스(pH8.5) 용액을 유속 15  $\mu$ L/min으로 흘려주며, 칩의 두번째 셀 RU 값에서 첫번째 셀의 RU값을 빼줌으로써 분석하였다. 시료의 주입은 키네틱 모드(kinetic mode)에서 100  $\mu$ g/mL과 50  $\mu$ g/mL로 각각 240 초로 주입하고, 해리 시간(dissociation time)을 900 초로 수행하였다. 재분석을 위해 세척 용액(5 mM NaOH, 10 mM NaCl)을 퀵주입 모드(Quickinject mode)에서 20초간 주입하였다. 두 농도의 센서그램(sensorgram) 결과를 BIAcore 결과 프로그램을 사용하여 처리함으로써 결합력을 결정하였다(도 3A). 도 3에서 확인된 바와 같이, 본 발명의 TNFRI108 단일 변이체 (TNFRI108-68)는 TNFRI108과 비교하여 동등 수준의 결합력을 나타내었다.

- [165] 구체적으로, ELISA 분석을 위해 96 웰 플레이트(Costar, Cat. No: 2592)에 1.0  $\mu$ g/ml 농도가 되도록 100  $\mu$ l TNF- $\alpha$ 를 주입한 후, 4°C에서 16시간 고정화하였다. 세척 용액 (0.05% Tween-20, 10mM PBS, pH 7.4)을 이용하여 3회 플레이트를 세척한 후, 1% BSA가 포함된 PBS (pH7.4) 용액으로 2시간 상온에서 반응시켰다. 각각의 웰에 약 1.5  $\mu$ g/ml~100  $\mu$ g/mL에 해당하는 시료 100  $\mu$ l를 주입한 후 상온에서 2시간 반응시켰다. 세척 용액(0.05% Tween-20, 10 mM PBS, pH 7.4)을 이용하여 3회 플레이트를 세척한 후, 마우스에서 얻은 TNFR 복합 항체를 (RnD, Cat. No: DY225) 200 ng/ml이 되도록 100  $\mu$ l를 주입한 후 상온에서 2시간 반응시켰다. 세척 용액을 이용하여 3회 플레이트를 세척한 후, HRP가 융합된 이차항체(RnD, Cat. No: DY225)를 200배 희석하여 100  $\mu$ l를 주입하고 상온에서 15분 반응시켰다. 세척 용액을 이용하여 3회 플레이트를 세척한 후, 기질 용액인 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine, RnD, Cat. No: DY999)를 100  $\mu$ l 주입하여 상온에서 15분 반응시키고, 1.0 M 황산 용액(삼진, Cat. No: S2129) 50  $\mu$ l를 주입하여 반응을 중지하였다. 450, 540 nm의 Vmax 판독기(MD, 모델명: VersaMax)를 이용하여 흡광도를 읽었다. TNFRI108과 TNF- $\alpha$ 와의 결합력을 농도에 따른 흡광도 변화를 통하여 확인하였다. (도 3B)

- [166] [실험예 2] TNFRI108 및 TNFRI108 변이체의 단백질 분해효소 저항성 확인

- [167] TNFRI108 절편 및 TNFRI108 절편 변이체의 단백질 분해효소에 대한 저항성은

순수 분리된 정제액의 전체 단백질 농도를 측정하여 돼지의 판크리아틴(pancreatin)을 총 단백질(순수 분리한 TNFRI108 정제액의 총 단백질을 브래드포드 법에 의해 정량한 값) 양의 24%가 되게 처리, TNFRI108 절편 및 TNFRI108 절편 변이체의 반감기 (half-life)를 조사하여 TNFRI108 폴리펩티드 절편 대비 단백질 분해효소에 저항성을 가지는 TNFRI108 절편 변이체를 확인할 수 있었다.

- [168] 단백질 분해효소에 대해 저항성을 가지는 변이체 TNFRI108을 동정하기 위하여 pancreatin(Sigma, Cat. No: P7545) 처리에 따른 각 변이체의 반감기를 결정 한 후, TNFRI108 대비 반감기가 증가한 변이체를 선별하는 방법을 사용하였다. 대표적인 TNFRI108-14, TNFRI108-64, TNFRI108-68 변이체의 판크리아틴(pancreatin) 처리에 대한 저항성 증가 결과는 도 4에 나타내었다.
- [169] 구체적으로 브래드포드 방법(Bradford assay)으로 정량된 TNFRI108(대조군)과 각 변이체의 농도를 PBS 용액을 사용하여 100 ug/ml 농도로 제조한 후, 250 ul 단백질 시료를 500 ul 원심분리 튜브에 준비하였다. Pancreatin 6 ug이 포함된 0.1 M 소듐 포스페이트 30 ul를 시료에 첨가하여 37°C에서 반응시켰다. 반응 후 0분, 5분, 10분, 15분, 20분, 30분, 40분, 60분에 30 ul 시료를 취하여 5 ul 단백질 분해효소 저해제 (Roche, Cat.No: 11836170001)가 들어 있는 270 ul 5% BSA 용액에 넣고 혼합 후 액체 질소에 보관하였다. 실험이 끝난 시료는 ELISA 정량 방법(RnD, Cat. No: DY225)을 통해 절단되지 않은 양을 분석하여 TNFRI108 변이체의 반감기를 구하였다. TNFRI108의 반감기를 기준으로 했을 때의 각 변이체의 상대적 반감기를 백분율로 표시하였다 (표 4).
- [170] [표 4] TNFRI108 변이체의 단백질 분해효소 저항성(37°C 반응)
- [171]

변이체 번호	TNFRI108 대비 저항성	변이체 번호	TNFRI108 대비 저항성
TNFRI108-1	73%	TNFRI108-39	89%
TNFRI108-2	48%	TNFRI108-40	90%
TNFRI108-3	5%	TNFRI108-41	125%
TNFRI108-4	6%	TNFRI108-42	113%
TNFRI108-5	26%	TNFRI108-43	110%
TNFRI108-6	57%	TNFRI108-44	96%
TNFRI108-7	108%	TNFRI108-45	37%
TNFRI108-8	111%	TNFRI108-46	57%
TNFRI108-9	43%	TNFRI108-47	158%
TNFRI108-10	14%	TNFRI108-48	103%
TNFRI108-11	24%	TNFRI108-49	51%
TNFRI108-12	30%	TNFRI108-50	23%
TNFRI108-13	166%	TNFRI108-51	67%
TNFRI108-14	168%	TNFRI108-52	71%
TNFRI108-15	14%	TNFRI108-53	116%
TNFRI108-16	13%	TNFRI108-54	119%
TNFRI108-17	17%	TNFRI108-55	83%
TNFRI108-18	81%	TNFRI108-56	28%
TNFRI108-19	89%	TNFRI108-57	141%
TNFRI108-20	106%	TNFRI108-58	116%
TNFRI108-21	ND	TNFRI108-59	86%
TNFRI108-22	ND	TNFRI108-60	84%
TNFRI108-23	ND	TNFRI108-61	96%
TNFRI108-24	ND	TNFRI108-62	89%
TNFRI108-25	75%	TNFRI108-63	91%
TNFRI108-26	75%	TNFRI108-64	213%
TNFRI108-27	93%	TNFRI108-65	171%
TNFRI108-28	149%	TNFRI108-66	111%
TNFRI108-29	ND	TNFRI108-67	109%
TNFRI108-30	ND	TNFRI108-68	288%
TNFRI108-31	70%	TNFRI108-69	107%
TNFRI108-32	50%	TNFRI108-70	105%
TNFRI108-33	70%	TNFRI108-71	74%
TNFRI108-34	55%	TNFRI108-72	103%
TNFRI108-35	80%	TNFRI108-73	176%
TNFRI108-36	50%	TNFRI108-74	158%
TNFRI108-37	84%	TNFRI108-75	83%
TNFRI108-38	89%	TNFRI108-76	97%

[172] (ND ; Not Detected)

[173] [실시예 3] TNFRI126 변이체의 제조

[174] (1) Met-TNFRI126 및 Met-TNFRI126 변이체를 발현하는 발현 벡터의 제조

[175] 상기한 TNFRI108을 이용한 단일 변이체 선별을 Met-TNFRI126 및 Met-TNFRI126 변이체를 통해 확인하였다. 이를 위해 변이체 7, 8, 9, 10, 14, 64, 65, 68, 73, 74를 Met-TNFRI126 형태로 생산하여 단백질 분해 효소 저항성을 확인하였다.

[176] 구체적으로 Met-TNFRI126을 발현하기 위한 대장균 발현 벡터 제작은 pET44a

벡터에 TNFRI126 유전자를 삽입하여 완료하였다. TNFRI126 유전자는 상기 제조예에서 제조된 pGEM-TNFRI171을 주형으로 하여 아래와 같은 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 확보하였다. 프라이머 서열에 5' 말단에 *Nde* I, 3' 말단에 *Bam*HI 제한 효소 자리를 첨가시켜 pET44a 벡터의 NusA 단백질이 제거된 Met-TNFRI126 형태로 발현되게 하였다.

[177] 정방향 프라이머 : 5'-acatatggatagcgtgtgccccgc-3'

[178] 역방향 프라이머 : 5'-cggatccttaacaaactgtattctgettc-3'

[179] PCR은 1차 변성 98°C 5분, 2차 변성 98°C 30초, 프라이머 접합 55°C 30초, 신장반응 72°C 1분 중 2차 변성에서 신장반응 과정을 25회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소 반응을 72°C 10분으로 수행하여 반응을 종료하였다. 증폭된 유전자와 pET44a 벡터에 제한 효소(*Nde* I, *Bam*HI)를 첨가하여 37°C 에서 3시간 반응시켰다. 제한효소 처리 후 1% 아가로스 젤 전기영동을 수행하여 해당 크기의 DNA 밴드를 면도칼로 잘라내어 DNA 추출 키트를 이용하여 추출하였다. 50 ng 의 pET44a 벡터와 200 ng의 Met-TNFRI126 유전자를 첨가하고, 2X 라이게이션 프리믹스 10 ul를 넣고 최종적으로 멸균된 증류수를 넣어 20 ul가 되도록 만들고, 반응물을 상온에서 5분간 반응시켰다. 반응액 2 ul를 취하여 BL21Star(DE3) 세포에 넣어 37°C에서 2분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고 암피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정치 배양하여 콜로니를 얻었다. 콜로니를 암피실린이 포함된 LB 액체 배지에서 배양한 후 플라스미드를 분리하고, 유전자 서열 분석을 통하여 유전자 서열을 확인하였다. 상기 과정을 통해 얻은 플라스미드를 pET44a-Met-TNFRI126 플라스미드로 명명하였다(도 5).

[180] (2) Met-TNFRI126 및 Met-TNFRI126 변이체의 발현

[181] 상기에서 제작한 플라스미드 용액 1 ul를 취하여 BL21Star(DE3)(Invitrogen, Cat. No: C6010-03) 컴피턴트 세포에 넣어 42°C에서 1분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고 암피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정치 배양하여 콜로니를 얻었다. 발현 벡터를 포함하고 있는 대장균 BL21Star(DE3)를 100 ug/ml 농도의 암피실린이 들어 있는 50 ml YP 배지(yeast extract: Merck, Cat. No: 103753, peptone: BD, Cat. No: 243620, NaCl: Merck, Cat. No: 1064049025)에 접종하여 37°C에서 16시간 통기 배양하였다. 배양된 배지는 100 ug/ml의 암피실린이 포함된 250ml YP 배지가 들어있는 1 L 플라스크에 600 nm의 흡광도가 0.1이 되게 접종하였다. 37°C에서 배양하여 600 nm의 흡광도가 3~4일 때, 최종 농도가 1.0 mM 농도가 되게 IPTG를 첨가하여 발현을 유도하였다. 발현 유도 후 37°C에서 3시간 더 통기 배양을 계속한 후 세포를 6000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 세포를 수집하였다.

[182] (3) Met-TNFRI126 및 Met-TNFRI126 변이체의 정제

[183] 수집한 세포를 재현탁 용액 (50 mM 트리스, 0.5 mM 이디티에이(EDTA) (pH 8.5))으로 재현탁시켰다. 현탁 세포의 파쇄는 sonicator(Sonics, Cat. No: VCX 750)로 진행하였다. 세포 파쇄 후 8000xg, 10°C, 30분 동안 원심분리하고,

상층액을 버리고 침전된 펠릿을 35 mL 펠릿 세척용액 (50 mM 트리스, 10 mM 이디티에이(EDTA), 0.5% 트리톤 X-100(Triton X-100) (pH 8.0))으로 현탁시키고 8000xg, 10°C, 20분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버리고 펠릿을 재현탁 용액 35 mL로 재현탁시키고, 8000xg, 10°C, 20분 동안 원심분리하였다. 상기 세척된 펠릿은 바로 사용하거나 -80°C에서 동결 저장하였다.

- [184] 상기에서 얻은 펠릿에 6 mL 변성 용액 (6~8 M 요소(Urea) 또는 6~8 M 염화구아니딘(Guanidine-HCl), 10 mM 디티오프레이톨(DTT), 2.0 mM 이디티에이(EDTA), 0.2 M NaCl)을 첨가하여 완전히 용해하였다. 용해 후 0.45  $\mu$ m 실린지 필터를 사용하여 용해되지 않은 펠릿을 제거하였다. 가용화 시킨 펠릿 용액을 리폴딩 용액 (50 mM 트리스, 1.0 mM 이디티에이(EDTA), 0.5 M L-아르기닌(Arginine) (pH 7.5))에 20배 희석하여 4°C에서 12~24 시간 천천히 교반하며 리폴딩(refolding)을 유도하였다.
- [185] 리폴딩(refolding)된 Met-TNFRI126 및 Met-TNFRI126 변이체를 정제하기 위해 리폴딩 용액을 3 kD의 Amicon Ultra(Millipore, Cat. No: UFC900324)을 사용하여 20배 농축하였다. 농축 후 Superdex 75 prep grade(GE)레진을 XK25/70(GE, Cat. No: 19-0146-01) 컬럼에 패키징한 겔여과 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.
- [186] 구체적으로 리폴딩된 시료를 컬럼에 로딩하기 전 4~5 컬럼 부피의 평형화 용액 (50 mM 소듐 포스페이트, 100 mM NaCl (pH 7.0))을 사용하여 컬럼을 평형화시켰다. 컬럼에 2 mL 시료를 로딩한 후, 5.0 mL/min의 유속으로 평형화 용액을 흘려주며 5 mL씩 분획하여 시료를 채취하였다. 채취한 시료를 SDS-PAGE로 분석한 후, 90% 이상의 순도를 보이는 분획만을 취하였다(도 6). Met-TNFRI126과 Met-TNFRI126 변이체를 동일한 방법으로 정제하였다.
- [187] [실험예 3] 리간드(TNF- $\alpha$ )에 대한 Met-TNFRI126 및 Met-TNFRI126 변이체의 결합력 확인
- [188] 정제하여 얻은 순도 90% 이상의 순도를 가진 Met-TNFRI126(대조군) 및 Met-TNFRI126 변이체의 농도를 브레드포드 방법을 사용하여 정량하고, ELISA 분석법을 이용하여 TNF- $\alpha$ 에 대한 결합력을 확인하였다.
- [189] 96 웰 플레이트에 TNFRI190(서열번호 1에서 TNFRI의 22번째 아미노산에서 211번째 아미노산까지 190개 아미노산으로 이루어진 단백질, R&D사, Cat No: 636-R1-025-CF) 1  $\mu$ g/ml 농도로 100  $\mu$ l를 로딩한 후 4°C 에서 16시간 고정화하였다. 세척용액 (0.05% Tween-20, PBS, pH 7.4) 300  $\mu$ l로 3회 각 웰을 세척한 다음, Blocking 용액 (5% skim milk, PBS, pH 7.4) 300  $\mu$ l를 각 웰에 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 이후 세척은 앞서 기술한 바와 같이 동일한 방법으로 진행하였다. 분석하고자 하는 시료를 500 nM, 125 nM, 31 nM, 7.8 nM, 1.9 nM, 0.48 nM, 0.12 nM, 0.03 nM로 제조 후 각 웰에 100  $\mu$ l씩 duplicate 로딩하였다. 시료가 로딩된 각 웰에 50 ng/ml의 TNF- $\alpha$ 를 100  $\mu$ l씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 세척 용액으로 세척 후 100  $\mu$ g/mL의 TNF- $\alpha$  항체 용액을 1/1000으로 희석한 후 각 웰에 100  $\mu$ l씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 세척

용액으로 세척 후, 기질 용액을 각 웰에 100  $\mu$ l씩 넣고 실온에서 15분 반응시키고, 기질 용액인 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine, RnD, Cat. No: DY999)를 100  $\mu$ l 주입한 후 상온에서 15분 반응시키고, 1.0 M 황산 용액(삼전, Cat. No: S2129) 50  $\mu$ l를 주입하여 반응을 중지하였다. 450, 540 nm의 Vmax 관독기(MD, 모델명: VersaMax)를 이용하여 흡광도를 읽었다.

[190] Met-TNFRI126 및 Met-TNFRI126 변이체의 결합력은 농도에 따른 흡광도의 변화를 통하여 확인하였다(도 7).

[191] [실험예 4] Met-TNFRI126 및 Met-TNFRI126 변이체의 단백질 분해효소 저항성 확인

[192] TNFRI108 대신 Met-TNFRI126 및 Met-TNFRI126 변이체를 사용한 것을 제외하고는 상기 실험예 2와 동일한 방법을 이용하여 단백질 분해 효소 저항성을 평가하였다(표 5). TNFRI108에서 단백질 분해효소 저항성이 높은 변이체 14, 64, 68, 73, 74는 동일하게 높은 단백질 분해효소 저항성을 보였으며, TNFRI108에서 낮게 측정되었던 변이체 9, 10은 낮은 단백질 분해효소 저항성을 보였다.

[193] [표 5] Met-TNFRI126 대비 단백질 분해효소 저항성

[194]

변이체 번호	Met-TNFRI126 대비 저항성(%)
TNFRI126-7	87%
TNFRI126-8	95%
TNFRI126-9	65%
TNFRI126-10	30%
TNFRI126-14	143%
TNFRI126-64	152%
TNFRI126-65	99%
TNFRI126-68	120%
TNFRI126-73	159%
TNFRI126-74	169%

[195] [실시에 4] TNFRI171 변이체의 제조

[196] (1) Met-TNFRI171 및 Met-TNFRI171 변이체를 발현하는 발현 벡터의 제조

[197] 실시예 1에서 설계된 단일 변이체 중 TNFRI의 네번째 도메인에 존재하는 단일 변이체를 Met-TNFRI171로 생산하여 평가를 진행하였다.

[198] 이를 위해 대장균에서 Met-TNFRI171 및 Met-TNFRI171 변이체를 발현하는 발현 벡터를 제작하였다.

[199] 구체적으로 Met-TNFRI171 유전자(서열번호 267)는 상기 제조예에서 제작된 pGEM-TNFRI171 플라스미드를 주형으로 PCR 수행 후 확보하였다. 이때 pET44a 벡터로의 클로닝을 위하여 5' 말단에 *Nde* I, 3' 말단에 *Bam*HI 제한 효소 인식

자리를 첨가하였다.

- [200] PCR 증폭에 사용된 프라이머는 다음과 같다.
- [201] 정방향 프라이머 : 5'-acatatggatagcgtgtgccccgc-3'
- [202] 역방향 프라이머 : 5'-cggatccttatgtgtgcctgagtcctc-3'
- [203] PCR은 1차 변성 98°C 5분, 2차 변성 98°C 30초, 프라이머 접합 55°C 30초, 신장반응 72°C 1분 중 2차 변성에서 신장반응 과정을 25회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소 반응을 72°C 10분으로 수행하여 반응을 종료하였다. 증폭된 유전자와 pET44a 벡터에 제한 효소(*Nde* I, *Bam*HI)를 첨가하여 37°C 에서 3시간 반응시켰다. 제한효소 처리 후 1% 아가로스 젤 전기영동을 수행하여 해당 크기의 DNA 밴드를 면도칼로 잘라내어 DNA 추출 키트를 이용하여 추출하였다. 50 ng 의 pET44a 벡터와 200 ng의 Met-TNFRI171 유전자를 첨가하고, 2X 라이게이션 프리믹스 10 ul를 넣고 최종적으로 멸균된 증류수를 넣어 20 ul가 되도록 만들고, 반응물을 상온에서 5분간 반응시켰다. 반응액 2 ul를 취하여 BL21Star(DE3) 세포에 넣어 37°C에서 2분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고 암피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정치 배양하여 콜로니를 얻었다. 콜로니를 암피실린이 포함된 LB 액체 배지에서 배양한 후 플라스미드를 분리하고, 유전자 서열 분석을 통하여 유전자 서열을 확인하였다. 상기 과정을 통해 얻은 플라스미드를 pET44a-Met-TNFRI171 플라스미드로 명명하였다.
- [204] Met-TNFRI171 변이체는 pET44a-Met-TNFRI171 플라스미드를 주형으로 표 6의 변이체에 해당하는 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 진행하여 변이체를 제작하였다.
- [205] [표 6] 위치 특이 돌연변이 유도를 위한 프라이머
- [206]

변이체 번호	변이 내용	프라이머 방향	프라이머 서열
TNFRI-77	L150I	정방향	5'-aattgctccctgtgtattaacggcactgtgcatc-3'
		역방향	5'-gatgcacagtgccgtaatacacagggagcaatt-3'
TNFRI-78	L150V	정방향	5'-ttaattgctccctgtgtgaacggcactgtgca-3'
		역방향	5'-tgcacagtgccgttcacacacagggagcaattaa-3'
TNFRI-79	L156I	정방향	5'-gaacggcactgtgcatattcctgtcaggagaag-3'
		역방향	5'-cttctcctgacaggaaatgacacagtgccgttc-3'
TNFRI-80	L156V	정방향	5'-tgaacggcactgtgcatgtctcctgtcaggagaa-3'
		역방향	5'-ttctcctgacaggacacatgacacagtgccgttc-3'
TNFRI-81	E160Q	정방향	5'-gcacatgtcctgtcagcagaagcagaatacagtt-3'
		역방향	5'-aactgtattctgtctctgacaggacagatgc-3'
TNFRI-82	E160N	정방향	5'-gcacatgtcctgtcagaacaagcagaatacagtt-3'
		역방향	5'-aactgtattctgtctgtcagaggacagatgc-3'
TNFRI-83	K161Q	정방향	5'-atctgtcctgtcaggagcagcagaatacagttg-3'
		역방향	5'-caaactgtattctgtctcctgacaggacagat-3'
TNFRI-84	K161N	정방향	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagttgta-3'
		역방향	5'-tacaactgtattctgtctcctgacaggacag-3'
TNFRI-85	E200Q	정방향	5'-ttgtgctaccaccagattcagaatgtaaggga-3'
		역방향	5'-tgcccttaacattctgaatcggggtaggcacaa-3'
TNFRI-86	E200N	정방향	5'-gtgctaccaccagattaacaatgtaagggcact-3'
		역방향	5'-agtgccttaacattgtaaatcggggtaggcac-3'
TNFRI-87	K203Q	정방향	5'-cccagattgagaatgtcagggcactgaggac-3'
		역방향	5'-gtcctcagtgccctgaacattctcaatcgggg-3'
TNFRI-88	K203N	정방향	5'-cccagattgagaatgtaaacggcactgaggactc-3'
		역방향	5'-gagtcctcagtgccgtaaacattctcaatcggg-3'
TNFRI-89	E206Q	정방향	5'-tgagaatgtaagggcactcaggactcaggcac-3'
		역방향	5'-gtgcctgagtcctgagtgcccttaacattctcaa-3'
TNFRI-90	E206N	정방향	5'-aatgtaagggcactaacgactcaggcaccacat-3'
		역방향	5'-atgtggtgcctgagtcgttagtgcccttaacat-3'
TNFRI-91	D207Q	정방향	5'-gtaagggcactgagcagtcaggcaccacataag-3'
		역방향	5'-cttatgtggtgcctgactgctcagtgcccttaac-3'
TNFRI-92	D207N	정방향	5'-atgtaagggcactgagaactcaggcaccacata-3'
		역방향	5'-tatgtggtgcctgagttctcagtgcccttaacat-3'

[207] 증폭 반응에 사용된 용액의 구성은 다음과 같다. pET44a-Met-TNFRI171 주형 플라스미드 DNA 1.0 ul, 20 pmole의 정방향 프라이머 1.0 ul, 20 pmole의 역방향 프라이머 1.0 ul, 2X PrimeSTAR PCR buffer 25.0 ul, 200 uM의 dNTP 4.0 ul, PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara, Cat. No: R044A) 0.5 ul 와 17.5 ul 증류수를 넣어 50.0 ul 의 반응 용액을 만들었다.

[208] PCR은 1차변성 98°C 5분, 2차변성 98°C 30초, 프라이머 접합 55°C 30초, 신장반응 72°C 9분 과정 중 2차변성에서 신장반응을 17회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소반응을 72°C 10분으로 수행하여 반응을 종료하였다.

[209] PCR 산물은 *Dpn* I 효소로 37°C, 2시간 처리하여 대장균 유래의 DNA를 분해하고 PCR에 의해 증폭된 DNA를 확보하였다. DNA 용액 2 ul를 취하여 XL1-blue 컴피턴트 세포(competent cell)(RBC, Cat. No: RH119-J80)에 넣어 42°C에서 1분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고 암피실린이 포함된



LB 고체 배지에서 정치 배양하여 콜로니를 얻었다. 이 콜로니를 암피실린이 포함된 LB 액체 배지에서 배양한 후 플라스미드를 분리하고, 염기서열 분석을 통해 부위 특이적인 돌연변이의 완성을 확인하였다.

- [210] (2) Met-TNFRI171 및 Met-TNFRI171 변이체의 발현
- [211] 제작한 Met-TNFRI171 및 Met-TNFRI171 변이체 플라스미드들을 추출한 후 상기 실시예 3-(2)의 방법으로 발현을 유도하였다. Met-TNFRI126 대신 Met-TNFRI171을 사용한 것을 제외하면 동일한 방법으로 발현을 수행하였다.
- [212] (3) Met-TNFRI171 및 Met-TNFRI171 변이체 정제
- [213] 발현한 Met-TNFRI171 및 Met-TNFRI171 변이체를 상기 실시예 3-(3)의 방법으로 정제하였다. Met-TNFRI126 대신 Met-TNFRI171을 사용한 것을 제외하면 동일한 방법으로 정제를 수행하였다(도 6).
- [214] [실험예 5] 리간드(TNF- $\alpha$ )에 대한 Met-TNFRI171 및 Met-TNFRI171 변이체의 결합력 확인
- [215] 실험예 3의 Met-TNFRI126 대신 Met-TNFRI171을 사용한 것을 제외하면 동일한 방법으로 활성 평가를 수행하였다. 대표적으로, Met-TNFRI171-83, Met-TNFRI171-84, Met-TNFRI171-92 변이체의 결합력 측정 결과는 도 8A에 나타내었다.
- [216] [실험예 6] Met-TNFRI171 및 Met-TNFRI171 변이체의 단백질 분해효소 저항성 확인
- [217] TNFRI108 대신 Met-TNFRI171 및 Met-TNFRI171 변이체를 사용한 것을 제외하고는 상기 실험예 2와 동일한 방법을 이용하여 단백질 분해 효소 저항성을 평가하였다(표 7). 대표적으로, Met-TNFRI171-83, Met-TNFRI171-84, Met-TNFRI171-92 변이체의 판크리아틴(pancreatin) 처리에 대한 저항성 증가 결과는 도 8B에 나타내었다.
- [218] [표 7] Met-TNFRI171 대비 단백질 분해효소 저항성
- [219]

변이체 번호	Met-TNFRI171 대비 저항성
TNFRI171-77	120%
TNFRI171-78	87%
TNFRI171-79	113%
TNFRI171-80	103%
TNFRI171-81	57%
TNFRI171-82	68%
TNFRI171-83	187%
TNFRI171-84	187%
TNFRI171-85	116%
TNFRI171-86	90%
TNFRI171-87	111%
TNFRI171-88	99%
TNFRI171-89	114%
TNFRI171-90	102%
TNFRI171-91	117%
TNFRI171-92	127%

[220] [실시예 5] TNFRI 이종 변이체 설계

[221] 본 발명자들은 나아가 단일 변이체에서 안정성이 향상된 돌연변이체를 조합시켜 2개의 아미노산이 치환된 이종 변이체를 설계하였다. 이종 변이체는 단일 변이체에서 단백질 분해 효소에 대한 저항성이 확연히 증가한 변이체 14, 64, 74, 83, 84, 85, 92 위치를 조합함으로써 설계하였다. 이종 변이체의 설계 목록은 표 8에 나타내었다.

[222] [표 8] 이종 변이체 설계 목록

[223]

변이체 번호	변이 내용
TNFRI171-201	L68V/R133Q
TNFRI171-202	L68V/F141V
TNFRI171-203	R133Q/F141V
TNFRI171-204	L68V/K161Q
TNFRI171-205	L68V/K161N
TNFRI171-206	L68V/D207N
TNFRI171-207	K161Q/D207N
TNFRI171-208	L68V/E200Q
TNFRI171-209	E200Q/D207N

[224] [실시예 6] Met-TNFRI171 이종 변이체의 제조

[225] (1) Met-TNFRI171 이종 변이체를 발현하는 발현 벡터 제작

- [226] 실시예 5에서 설계된 이중 변이체는 Met-TNFRI171로 생산하여 평가를 진행하였다. 이를 위해 대장균에서 Met-TNFRI171 이중 변이체를 발현하는 발현 벡터를 제작하였다.
- [227] 구체적으로 표 8에 기술된 이중 변이체 중 변이체 201, 202, 204, 205, 206, 208은 Met-TNFRI171-14 단일 변이체의 플라스미드를 주형으로 표 9에 표시된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행함으로써 이중 변이체를 코딩하는 DNA를 제조하였다. 이중 변이체 중 변이체 203은 Met-TNFRI171-64 단일 변이체의 플라스미드를 주형으로, 변이체 207은 Met-TNFRI171-83 단일 변이체의 플라스미드를 주형으로, 변이체 209는 Met-TNFRI171-85 단일 변이체의 플라스미드를 주형으로 표 9에 표시된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행함으로써 이중 변이체를 코딩하는 DNA를 제조하였다.
- [228] 증폭 반응에 사용된 용액의 구성은 다음과 같다. 상기 기술한 각 주형 플라스미드 DNA 1.0 ul, 20 pmole의 정방향 프라이머 1.0 ul, 20 pmole의 역방향 프라이머 1.0 ul, 2X PrimeSTAR PCR buffer 25.0 ul, 200 uM의 dNTP 4.0 ul, PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara, Cat. No: R044A) 0.5 ul 와 17.5 ul 증류수를 넣어 50.0 ul 의 반응 용액을 만들었다.
- [229] PCR은 1차변성 98°C 5분, 2차변성 98°C 30초, 프라이머 접합 55°C 30초, 신장반응 72°C 9분 과정 중 2차변성에서 신장반응을 17회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소반응을 72°C 10분으로 수행하여 반응을 종료하였다.
- [230] [표 9] 이중 돌연변이 유도를 위한 프라이머
- [231]

변이체 번호	변이 내용	프라이머 방향	프라이머 서열
TNFRI171-201	L68V/R133Q	정방향	5'-gccgtaaaaaccagatcagcattattggcag-3'
		역방향	5'-ctgaccaataatgctgatactggtttacggc-3'
TNFRI171-202	L68V/F141V	정방향	5'-ggtcagaaaacctggcagtggttaattgctc-3'
		역방향	5'-gagcaataaaaactgcaccaggtttctgacc-3'
TNFRI171-203	R133Q/F141V	정방향	5'-ggtcagaaaacctggcagtggttaattgctc-3'
		역방향	5'-gagcaataaaaactgcaccaggtttctgacc-3'
TNFRI171-204	L68V/K161Q	정방향	5'-atctgtcctgtcaggagcagcagaatacagttg-3'
		역방향	5'-caaaactgtattctgctgctcctgacaggacagat-3'
TNFRI171-205	L68V/K161N	정방향	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagttgta-3'
		역방향	5'-taciaaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'
TNFRI171-206	L68V/D207N	정방향	5'-atgtaagggcactgagaactcaggcaccacata-3'
		역방향	5'-tatgtggcctgagttctcagtgccctaacat-3'
TNFRI171-207	K161Q/D207N	정방향	5'-atgtaagggcactgagaactcaggcaccacata-3'
		역방향	5'-tatgtggcctgagttctcagtgccctaacat-3'
TNFRI171-208	L68V/E200Q	정방향	5'-ttgtgcctaccccagattcagaatgtaagggca-3'
		역방향	5'-tgccctaacattctgaatctgggtaggcacaa-3'
TNFRI171-209	E200Q/D207N	정방향	5'-atgtaagggcactgagaactcaggcaccacata-3'
		역방향	5'-tatgtggcctgagttctcagtgccctaacat-3'

- [232] PCR 산물은 *Dpn* I 효소로 37°C, 2시간 처리하여 대장균 유래의 DNA를

분해하고 PCR에 의해 증폭된 DNA를 확보하였다. DNA 용액 1 ul를 취하여 XL1-blue 컴피턴트 세포에 넣어 42°C에서 1시간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고 암피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정치 배양하여 콜로니를 얻었다. 콜로니를 암피실린이 포함된 LB 액체 배지에서 배양한 후 플라스미드를 분리하고, 염기서열 분석을 통해 부위 특이적인 돌연변이의 완성을 확인하였다.

[233] (2) Met-TNFRI171 이중 변이체의 발현

[234] 제작한 Met-TNFRI171 이중 변이체 플라스미드들을 추출한 후 상기 실시예 3-(2)의 방법으로 발현을 유도하였다. Met-TNFRI126 대신 Met-TNFRI171 이중 변이체를 사용한 것을 제외하면 동일한 방법으로 발현을 수행하였다.

[235] (3) Met-TNFRI171 이중 변이체 정제

[236] 발현한 Met-TNFRI171 이중 변이체를 상기 실시예 3-(3)의 방법으로 정제하였다. Met-TNFRI126 대신 Met-TNFRI171 이중 변이체를 사용한 것을 제외하면 동일한 방법으로 정제를 수행하였다.

[237] [실험예 7] 리간드(TNF- $\alpha$ )에 대한 Met-TNFRI171 이중 변이체의 결합력 확인

[238] 실험예 3의 Met-TNFRI126 대신 Met-TNFRI171 이중 변이체를 사용한 것을 제외하면 동일한 방법으로 활성 평가를 수행하였다. 대표적인 이중 변이체 Met-TNFRI171-204, Met-TNFRI171-205, Met-TNFRI171-206 변이체의 결합력 측정 결과는 도 9에 나타내었다.

[239] [실험예 8] Met-TNFRI171 이중 변이체의 단백질 분해효소 저항성 확인

[240] TNFRI108 대신 Met-TNFRI171 이중 변이체를 사용한 것을 제외하고는 상기 실험예 2와 동일한 방법을 이용하여 단백질 분해 효소 저항성을 평가하였다(표 10). 대표적인 이중 변이체 Met-TNFRI171-204, Met-TNFRI171-205, Met-TNFRI171-206 변이체의 판크리아틴(pancreatin) 처리에 대한 저항성 증가 결과는 도 10에 나타내었다.

[241] [표 10] Met-TNFRI171 대비 Met-TNFRI171 이중 변이체의 단백질 분해효소 저항성

[242]

변이체 번호	Met-TNFRI171 대비 저항성
TNFRI171-201	101%
TNFRI171-202	51%
TNFRI171-203	50%
TNFRI171-204	224%
TNFRI171-205	251%
TNFRI171-206	212%
TNFRI171-207	100%
TNFRI171-208	115%
TNFRI171-209	94%

## 청구범위

[청구항 1]

서열번호 1로 기재된 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산 서열에서 61번, 68번, 78번, 85번, 106번, 107번, 109번, 121번, 128번, 133번, 135번, 136번, 138번, 141번, 150번, 156번, 161번, 200번, 203번, 206번 및 207번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열;

서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산서열에서 61번, 68번, 78번, 85번, 106번, 107번, 109번, 121번, 128번, 133번, 135번, 136번, 138번, 141번, 150번, 156번, 161번, 200번, 203번, 206번 및 207번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열;

서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산서열에서 61번, 68번, 78번, 85번, 106번, 107번, 109번, 121번, 128번, 133번, 135번, 136번, 138번, 141번, 150번, 156번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열; 또는

서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산서열의 41번 내지 148번으로 이루어진 아미노산서열에서 61번, 68번, 78번, 85번, 106번, 107번, 109번, 121번, 128번, 133번, 135번, 136번, 138번 및 141번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편. 제1항에 있어서,

[청구항 2]

서열번호 1로 기재된 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산 서열에서 68번, 85번, 109번, 128번, 133번, 135번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열;

서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산서열에서 68번, 85번, 109번, 128번, 133번, 135번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열;

서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의

아미노산서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산서열에서 68번, 85번, 109번, 128번, 133번, 135번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열; 또는 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산서열의 41번 내지 148번으로 이루어진 아미노산서열에서 68번, 85번, 109번, 128번, 133번, 135번 및 141번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열 중에서 선택되는 아미노산서열을 포함하는, 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편. 제1항에 있어서,

[청구항 3]

서열번호 1로 기재된 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산 서열에서 68번, 109번, 133번, 135번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열; 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산서열에서 68번, 109번, 133번, 135번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열; 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산서열에서 68번, 109번, 133번, 135번, 141번 및 161번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열; 또는 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 종양 괴사 인자 수용체-1의 아미노산서열의 41번 내지 148번으로 이루어진 아미노산서열에서 68번, 109번, 133번, 135번 및 141번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변형된 아미노산 서열 중에서 선택되는 아미노산서열을 포함하는, 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편. 제1항에 있어서,

[청구항 4]

61번, 107번, 161번, 203번 위치의 K가 Q 또는 N으로; 68번, 150번, 156번 위치의 L이 I 또는 V로; 78번, 207번 위치의 D가 Q 또는 N으로; 85번, 138번, 200번, 206번 위치의 E가 Q 또는 N으로; 106번, 121번, 128번, 133번 위치의 R이 H 또는 Q로; 109번 위치의

- M이 I 또는 V로; 135번 위치의 Y가 I 또는 H로; 136번 위치의 W가 H 또는 S로; 141번 위치의 F가 I 또는 V로 치환된, 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 하나 또는 둘 이상의 위치에서의 아미노산변형이 K61Q, K61N, L68I, L68V, D78Q, E85N, R106H, R106Q, K107Q, M109I, R121H, R121Q, R128H, R128Q, R133Q, Y135I, Y135H, W136H, W136S, E138Q, E138N, F141I, F141V, L150I, L156I, K161Q, K161N, E200Q, K203Q, E206Q, D207Q, 및 D207N 로 이루어진 군으로부터 선택되는하나 또는 둘 이상의 아미노산 변형인,
- 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 하나 또는 둘 이상의 위치에서의 아미노산 변형이 L68I, L68V, E85N, M109I, R128H, R133Q, Y135I, W136S, F141I, F141V, K161Q, 및 K161N 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 아미노산 변형인,
- 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 하나 또는 둘 이상의 위치에서의 아미노산 변형이 L68I, L68V, R133Q, Y135I, F141I, K161Q, 및 K161N 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 아미노산 변형인,
- 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 하나의 아미노산 변형을 포함하는, 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 아미노산 변형은 2개의 아미노산 변형이며, 2개의 아미노산 변형은 R133Q, F141V, K161Q, K161N, E200Q 또는 D207N 중에서 선택되는 1개의 아미노산 변형과 L68V 인,
- 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 아미노산 변형은 L68V/K161Q, L68V/K161N, 또는 L68V/D207N 으로부터 선택되는,
- 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 서열번호 18, 19, 33, 52, 62, 69, 70, 73, 78, 79, 94, 95, 109, 128, 138, 145, 146, 149, 154, 155, 164, 165, 178, 179, 193, 212, 222, 229, 230, 233, 238, 239, 248, 249, 또는 258-266으로 표현된 아미노산 서열을 포함하는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 서열번호 18, 19, 69, 70, 78, 94, 95, 145, 146, 154, 164, 165, 178, 179, 229, 230, 238, 248, 249, 또는 261-263으로 표현된 아미노산 서열을 포함하는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편.

- [청구항 13] 제1항 내지 제12 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 분해효소에 대한 향상된 저항성을 갖는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편.
- [청구항 14] 제1항 내지 제12 항 중 어느 한 항에 기재된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편의 두개 또는 세개 이상이 공유 결합에 의해 연결된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편의 복합체.
- [청구항 15] 제1항 내지 제12 항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편은 추가로 당화, 아실화, 메틸화, 인산화, 해실화, 카르바밀화, 황화, 프레닐화, 산화, 구아니딜화, 아미딘화, 카르바밀화, 트리니트로페닐화, 질산화, 또는 폐길화된 것인 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편.
- [청구항 16] 제1항 내지 제12 항 중 어느 한 항의 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편을 암호화하는 염기서열을 포함하는 유전자.
- [청구항 17] 제16 항에 있어서, 대장균 내 발현에 적합하도록 코돈이 조작된 서열번호 5의 염기서열에 기초하여 제조된 유전자.
- [청구항 18] 제17 항의 유전자를 포함하는 벡터.
- [청구항 19] 제18항의 벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 20] 제18항에 있어서, 대장균인 세포.
- [청구항 21] 제1항 내지 제12 항 중 어느 한 항의 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편을 포함하는 억제학적 제제.
- [청구항 22] 제1항 내지 제12 항 중 어느 한 항의 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편을 포함하는, 어른 호흡곤란 증후군, 식욕부진, 암, 만성피로 증후군, 이식편 대 숙주 거부반응, 통각과민, 염증성 장질환, 신경염증성 질환, 대뇌 국소빈혈을 포함하는 국소빈혈/재관류 손상, 각각 신경변성을 초래할 수도 있는 외상, 간질, 출혈 또는 발작의 결과로서의 뇌 손상, 당뇨병, 다발성경화증, 안 질환, 동통, 채식염, 폐섬유증, 류마티스양 관절염, 골관절염, 연소성(류마티스양) 관절염, 혈청반응음성 다발성관절염, 강직성 척추염, 라이터 증후군 및 반응성 관절염, 건선성 관절염, 장질환성 관절염, 다발성근염, 피부근염, 공피증, 전신성 경화증, 맥관염, 대뇌 맥관염, 쇼그렌 증후군, 류마티스성 발열, 다연골염 및 다발성근육통, 류마티스성 및 거대세포 동맥염, 폐혈증성 쇼크, 방사선요법으로 인한 부작용, 전신성 홍반성루푸스, 측두하악골 관절 질환, 갑상선염 및 조직이식로 이루어진 군에서 선택되는 TNF-매개 질병의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.



[청구항 23]

어른 호흡곤란 증후군, 식욕부진, 암, 만성피로 증후군, 이식편 대 숙주 거부반응, 통각과민, 염증성 장질환, 신경염증성 질환, 대뇌 국소빈혈을 포함하는 국소빈혈/재관류 손상, 각각 신경변성을 초래할 수도 있는 외상, 간질, 출혈 또는 발작의 결과로서의 뇌 손상, 당뇨병, 다발성경화증, 안 질환, 동통, 궤양, 폐섬유증, 류마티스양 관절염, 골관절염, 연소성(류마티스양) 관절염, 혈청반응음성 다발성관절염, 강직성 척추염, 라이터 증후군 및 반응성 관절염, 건선성 관절염, 장질환성 관절염, 다발성근염, 피부근염, 공피증, 전신성 경화증, 맥관염, 대뇌 맥관염, 쇼그렌 증후군, 류마티스성 발열, 다연골염 및 다발성근육통, 류마티스성 및 거대세포 동맥염, 패혈증성 쇼크, 방사선요법으로 인한 부작용, 전신성 홍반성루푸스, 측두하악골 관절 질환, 갑상선염 및 조직이식로 이루어진 군에서 선택되는 TNF-매개 질병의 예방 또는 치료를 위한, 제1항 내지 제12 항 중 어느 한 항의 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편의 용도.

[청구항 24]

제1항 내지 제12 항 중 어느 한 항의 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편을 TNF-매개 질병의 예방 또는 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는, TNF-매개 질병의 예방 또는 치료 방법으로써,

상기 TNF-매개 질병은 어른 호흡곤란 증후군, 식욕부진, 암, 만성피로 증후군, 이식편 대 숙주 거부반응, 통각과민, 염증성 장질환, 신경염증성 질환, 대뇌 국소빈혈을 포함하는 국소빈혈/재관류 손상, 각각 신경변성을 초래할 수도 있는 외상, 간질, 출혈 또는 발작의 결과로서의 뇌 손상, 당뇨병, 다발성경화증, 안 질환, 동통, 궤양, 폐섬유증, 류마티스양 관절염, 골관절염, 연소성(류마티스양) 관절염, 혈청반응음성 다발성관절염, 강직성 척추염, 라이터 증후군 및 반응성 관절염, 건선성 관절염, 장질환성 관절염, 다발성근염, 피부근염, 공피증, 전신성 경화증, 맥관염, 대뇌 맥관염, 쇼그렌 증후군, 류마티스성 발열, 다연골염 및 다발성근육통, 류마티스성 및 거대세포 동맥염, 패혈증성 쇼크, 방사선요법으로 인한 부작용, 전신성 홍반성루푸스, 측두하악골 관절 질환, 갑상선염 및 조직이식로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

[청구항 25]

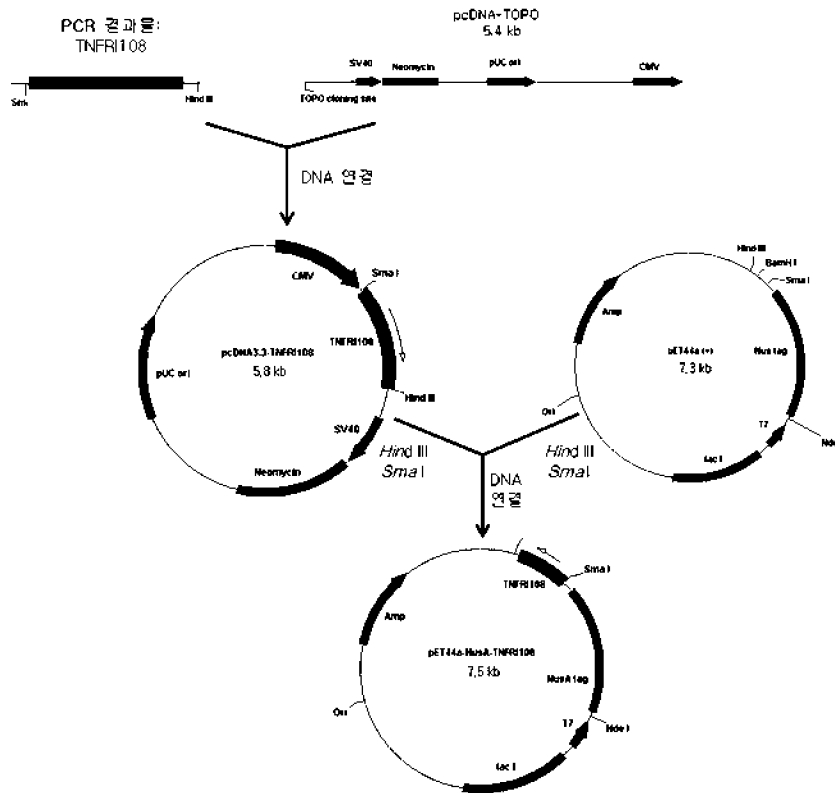
제16항에 기재된 유전자 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는, 어른 호흡곤란 증후군, 식욕부진, 암, 만성피로 증후군, 이식편 대 숙주 거부반응, 통각과민, 염증성 장질환, 신경염증성 질환, 대뇌 국소빈혈을 포함하는 국소빈혈/재관류 손상, 각각 신경변성을 초래할 수도 있는 외상, 간질, 출혈 또는 발작의 결과로서의 뇌

손상, 당뇨병, 다발성경화증, 안 질환, 동통, 궤양, 폐섬유증, 류마티스양 관절염, 골관절염, 연소성(류마티스양) 관절염, 혈청반응음성 다발성관절염, 강직성 척추염, 라이터 증후군 및 반응성 관절염, 건선성 관절염, 장질환성 관절염, 다발성근염, 피부근염, 공피증, 전신성 경화증, 맥관염, 대뇌 맥관염, 쇼그렌 증후군, 류마티스성 발열, 다연골염 및 다발성근육통, 류마티스성 및 거대세포 동맥염, 폐혈증성 쇼크, 방사선요법으로 인한 부작용, 전신성 홍반성루푸스, 측두하악골 관절 질환, 갑상선염 및 조직이식으로 이루어진 군에서 선택되는 TNF-매개 질병의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

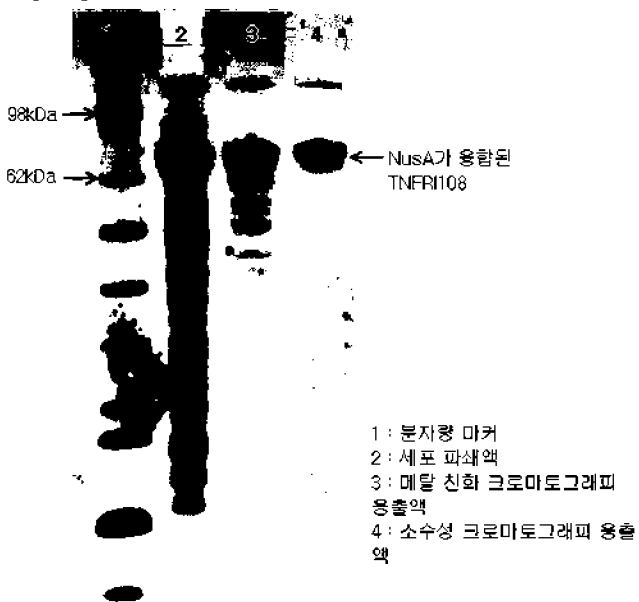
[청구항 26] 제16항에 기재된 유전자 또는 이를 포함하는 벡터를 이용하는 것을 포함하는,

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 기재된 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편의 제조방법.

[Fig. 1]

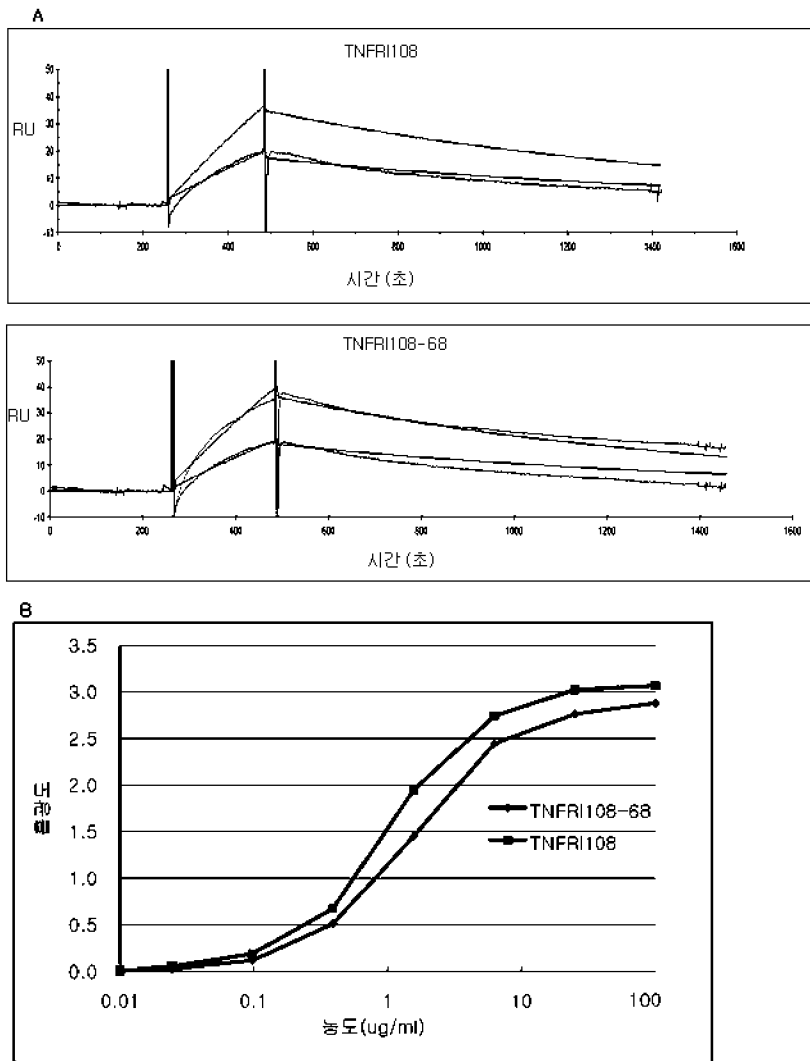


[Fig. 2]

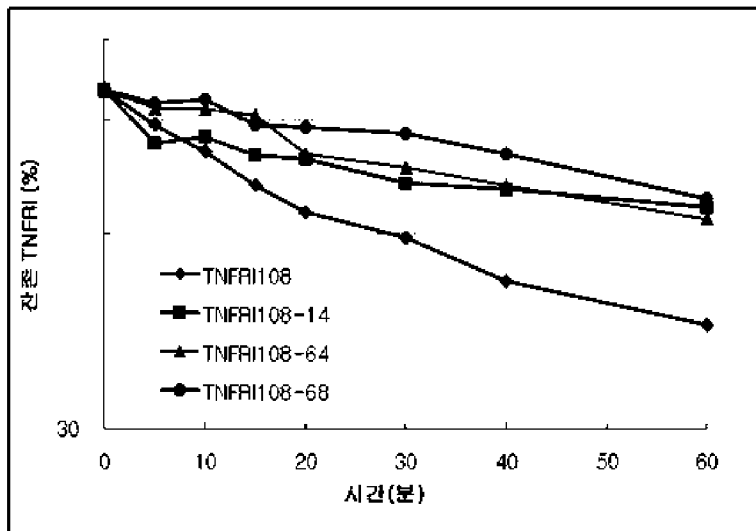


- 1 : 분자량 마커
- 2 : 세포 파쇄액
- 3 : 데달 친화 크로마토그래피  
용출액
- 4 : 소수성 크로마토그래피 용출  
액

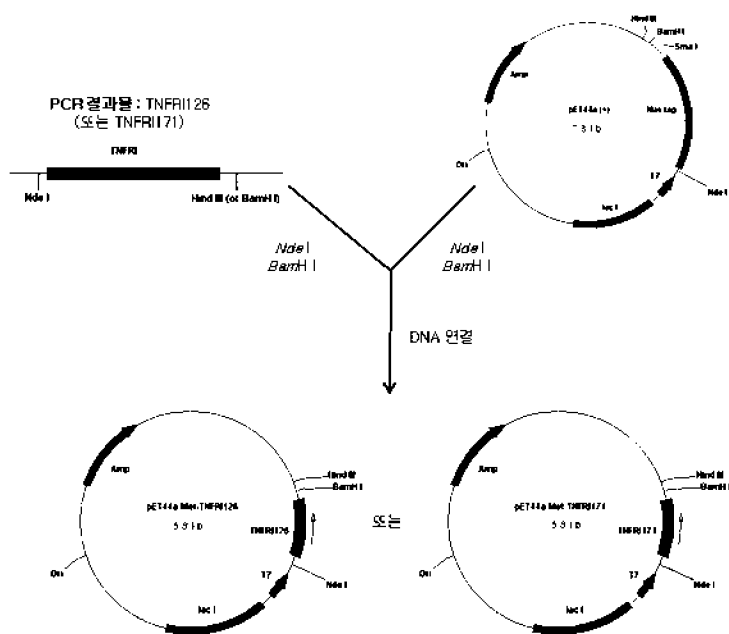
[Fig. 3]



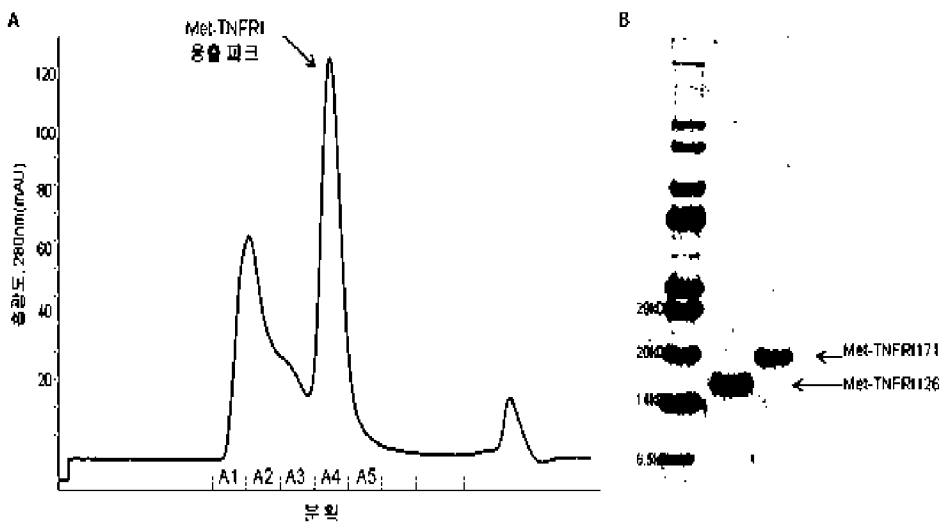
[Fig. 4]



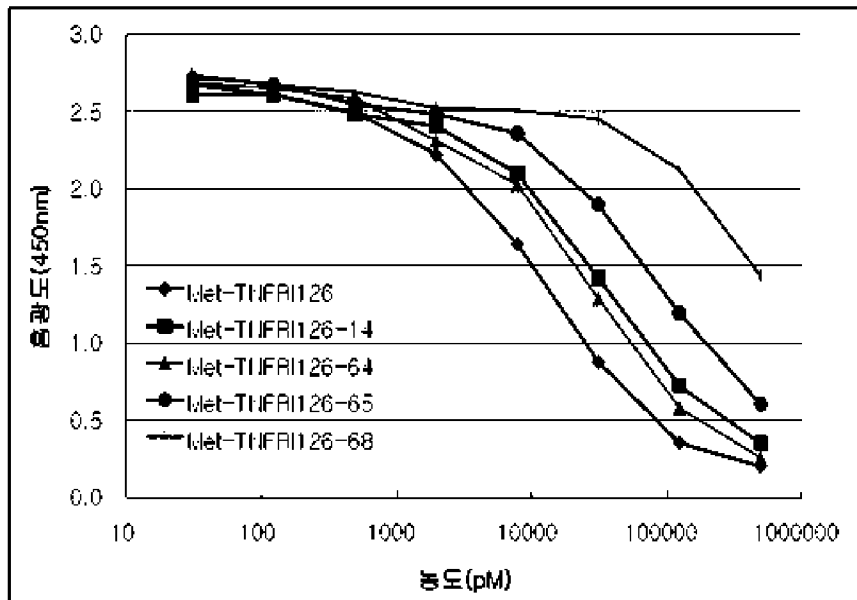
[Fig. 5]



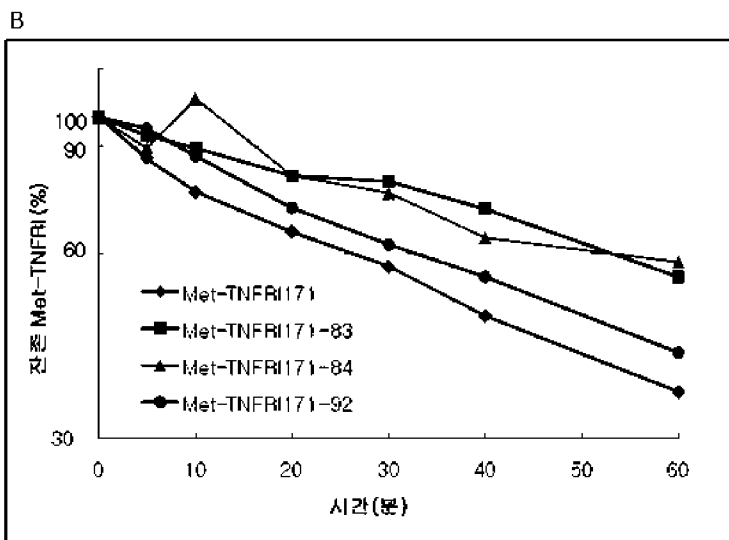
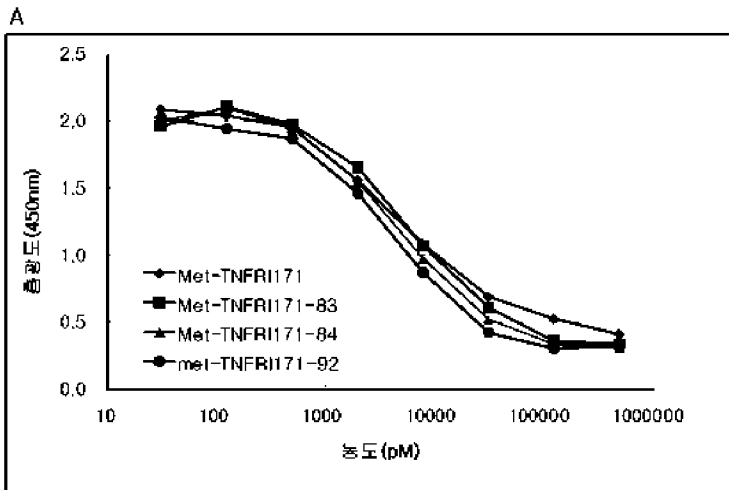
[Fig. 6]



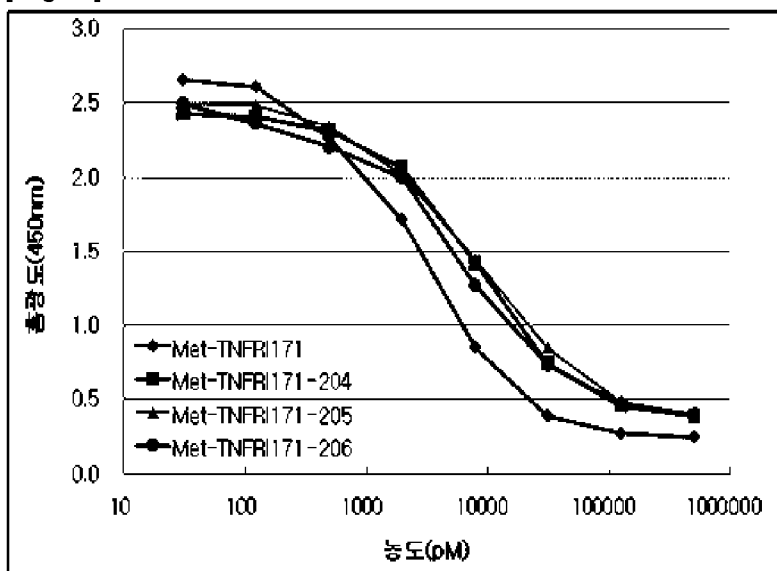
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

