

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁸
C07K 14/565 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년01월11일
(11) 등록번호 10-0541850
(24) 등록일자 2006년01월02일

(21) 출원번호 10-2003-0019924
(22) 출원일자 2003년03월31일

(65) 공개번호 10-2004-0085287
(43) 공개일자 2004년10월08일

(73) 특허권자 삼성정밀화학 주식회사
울산 남구 여천동 190

(72) 발명자 장건희
서울특별시서초구방배1동905-13202호

이소영
경기도수원시장안구율전동360-7성원주택305호

연정흠
서울특별시금천구시흥본동840-8726통10반

윤호철
경기도수원시장안구천천동268-21그린빌라304호

(74) 대리인 김동완

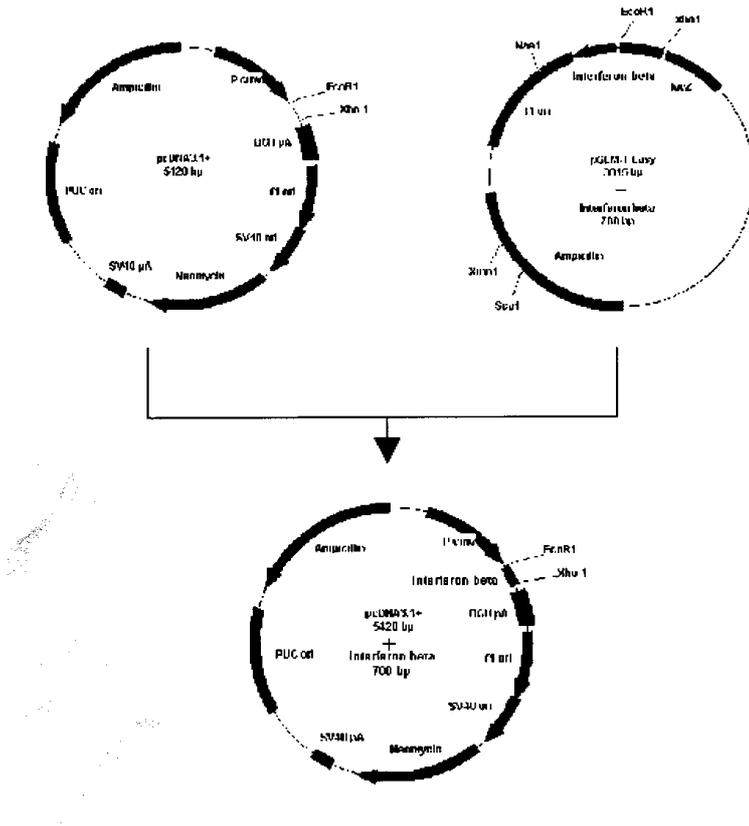
심사관 : 김지윤

(54) 인간 인터페론-베타 변이체 및 그의 제조방법

요약

본 발명은 인간 인터페론-베타 유전자 변이체 및 그로부터 발현되는 인터페론-베타 변이체에 관한 것이다. 인터페론-베타 변이체는 수용성과 생물학적 활성을 증진시키기 위해 유전자 조작방법인 자리지정 돌연변이를 이용하여 당쇄 부가가 가능한 7부위의 아미노산을 부분적으로 치환한 것이다. 인터페론-베타 변이체는 천연형 인터페론-베타에 비해 하나 이상의 당쇄가 부가되었으며 항바이러스 활성이 증가되었다.

대표도



색인어

개량형, 인터페론-베타, 변이체, 치환, 중국산 햄스터 세포, 당쇄, 부가

명세서

도면의 간단한 설명

- 도 1a는 인터페론-베타(IFN-β)의 cDNA 서열 중 인공 돌연변이 치환 위치를 나타내는 도면이다.
- 도 1b는 인터페론-베타(IFN-β)의 아미노산 서열 중 인공 돌연변이 치환 위치를 나타내는 도면이다.
- 도 1c는 인터페론-베타(IFN-β)의 인공 변이체를 제조하기 위한 프라이머 염기서열을 나타내는 도면이다.
- 도 2는 인터페론-베타를 발현시키기 위한 발현벡터 pcDNA3.1-IFN-β의 조립 과정을 나타내는 모식도이다.
- 도 3은 인터페론-베타를 발현시키기 위한 발현벡터 pcDNA3.1-IFN-β와 psp72-DHFR을 동물세포에 주입하기 위해 코-트랜스펙션시키는 과정을 나타내는 모식도이다.
- 도 4는 CHO 세포를 이용하여 발현시킨 개량형 인터페론-베타 변이체를 전기영동하여 단백질의 발현을 확인시킨 사진이다.
- 1, 2 레인은 천연 인터페론-베타의 발현을 나타낸 것이고, 3, 4 레인은 한 개의 당쇄가 부가된 인터페론-베타 변이체이고, 5, 6 레인은 두 개의 당쇄가 부가된 인터페론-베타 변이체를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 인터페론-베타의 항바이러스 활성을 비교하기 위한 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 천연 인터페론-베타의 특정 아미노산 부위를 당쇄를 부가할 수 있는 아미노산으로 인공 변이시켜 제조된 하나 또는 둘 이상의 당쇄가 추가로 부가된 인터페론-베타 변이체에 관한 것이다. 더욱 상세히는, 천연 인터페론-베타의 아미노산 서열 72, 73, 75, 110, 116, 117, 137 위치의 아미노산 중 하나 또는 둘 이상을 아스파라긴으로 인공 치환시켜, 동물 세포 등에서 상기 변이체를 발현시 상기 아미노산 치환 부위에 당쇄가 부가되어, 하나 또는 둘 이상의 당쇄가 추가로 부가된 인터페론-베타 변이체 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

인터페론(IFNs)은 항 바이러스 활성을 나타내고, 세포증식을 억제하며, 자연 면역반응을 조정하는 중요한 사이토카인류의 단백질군이다(Baron 등 JAMA 266: p 1375, 1991). 이중 인터페론-베타(interferon-beta; IFN β)는 5개의 알파 헬릭스를 가지고 있는 구형 단백질이며, 크기는 25 kD이며 당쇄를 제거하면 20 kD이 된다(Arduini 등 Protein Science 8: pp 1867-1877, 1999).

건강한 세포는 이중가닥 RNA가 생성되지 않지만 바이러스가 감염되면 이중가닥 RNA가 생성이 되고 이것이 IFN β 합성을 유도하는 신호가 된다(Janeway 등 Immunobiology: The immune system in health and disease. 4th ed. New York: Elsevier Science/Garland Publishing. pp 385-386, 1999). IFN β 의 세포내 작용을 위한 신호전달의 시작은 수용체(receptor)에 의해 이뤄지고 이 수용체는 550개의 아미노산과 487개의 아미노산이 헤테로다이머(heterodimer)의 형태를 지니고 있다(Russell-Harde 등 Biochemical and Biophysical Research Communications 255: pp 539-544, 1999). 이후 인산화된 수용체는 STAT2에 결합하고, STAT2가 이량체를 형성하여 핵으로 이동 후 다양한 유전자의 전사를 활성화한다(Arduini 등 Protein Science 8: pp 1867-1877, 1999).

IFN β 는 CD7 세포의 인식을 용이하게 해주고, 이로 인해 바이러스 감염세포의 파괴효율을 증대시킨다(Janeway 등 Immunobiology: The immune system in health and disease. 4th ed. New York: Elsevier Science/Garland Publishing. pp 385-386, 1999). 특히 바이러스 감염으로 인해 이중결합 RNA가 존재할 때 dsRNA 의존 키나제(dependent kinase)에 의해 eIF2(전사개시인자)가 불활성화 되고 단백질 합성이 억제된다(Biron 등 Seminars in Immunology 10: pp 383-390, 1998).

IFN β 의 임상적용에 관한 연구는 활발하게 진행 중에 있고, 특히 다발성경화증(Multiple Sclerosis)에 대한 증상의 완화 및 경감 또는 치료제로 각광을 받고 있으며, 자가면역질환은 중추신경계(뇌, 척수)를 다발성으로 침범하는 염증성 질환으로서, 중추신경계의 신경세포인 T세포가 자신의 항원을 외부의 것으로 인식하여 방어하여 발생하는 자가면역기전에 의한 것이라는 학설이 가장 유력하다(Goodkin 등 Multiple sclerosis: Treatment options for patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis, 1999).

다발성경화증에 대한 억제 기전은 자세히 알려져 있지 않으나 억제 T세포의 기능을 회복시키면서, 자가 면역반응이 완화되는 것으로 알려져 있다(Dayal 등 All-trans retinoic acid potentiates the ability of interferon beta-1b, 1998). 또 하나는 다발성경화증의 생성에 주요한 인자 산화질소(nitric oxide)를 합성하는 효소의 생성을 억제하여 증상을 완화시킨다는 보고도 있다(Hua 등 Beta inteferon prevents nitric oxide/peroxynitrate from damaging the central nervous system, 1998.) IFN β 는 최초의 다발성경화증의 치료제이고, 1993년 FDA에 승인을 받은 생물학적 의약품이다(Revelle M 1993 07 Sept. FDA licenses interferon beta-1b).

이때 승인 받은 IFN β 1b는 대장균을 통하여 유전자 조작으로 생산된 것으로서 당쇄 부가되지 않은 형태이다(Arduini 등 Protein Science 8: pp 1867-1877, 1999). 이 제품은 'Betaseron'이라는 제품명으로 현재 시판 중에 있고 다발성 경화증 중증환자에 대한 적응증이 있는 유일한 약물로 미국에서 최초 승인 받았다.

다발성경화증 치료제로써 두 번째로 1996년 미국 FDA에 승인을 받은 제품은 IFN β 1a이고, 이것은 차이니즈 햄스터의 난소세포에서 자연적인 인간의 인터페론 베타(HnIFN β)단백질을 생산한 것이다. 또한, 이 IFN β 단백질은 당쇄를 가지며 'Avonex'라는 상품명으로 미국 Biogen사에서 생산 판매하고 있다(Goodkin 등 Multiple sclerosis: Treatment options for patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis, 1999).

가장 최근에 FDA 승인을 받은 제품은 'Rebif'(제품명)로서, Serono사에서 생산, 판매하고 있는 제품이다. 'Rebif'는 기존 제품인 'Avonex'와 IFN β 유전자는 동일하나, 제제화의 형태, 투여횟수, 투여 농도 증상의 완화 정도 등에 대한 차이로 새로운 물질로 인정되어 승인 받은 제품이다(J. Biotechnol. 87: pp 279-284, 2001).

다발성경화증 이외 인터페론 베타는 고유 활성인 항바이러스 능력, 세포 성장 억제 또는 항 성장 능력, 항 증식, 림프구 세포독성 증대, 면역조절 활성, 표적 세포의 분화 유도 또는 억제, 대식세포의 활성화, 사이토카인 생성의 증가, 세포독성 T 세포의 효과 증가, 대식세포의 효과 증가 및 natural killing 세포의 증가(Cirelli 등 1995 Major therapeutic uses of interferons. Clin Immunother 3: pp 27-87)로 암, 자가면역 장애 및 바이러스 감염 등을 치료하는데 이용될 수 있다. HIV와 관련된 질병, C형 간염 등에 대한 IFN β 의 효과가 입증되는 연구결과가 최근 많이 보고되고 있는 실정이며(Pilling 등 European Journal of Immunology 29: pp 1041-1050, 1999), 자가면역질환의 일종인 류마티스성 관절염의 경우에도 치료의 효과가 있다(Young 등 Neurology 51: pp 682-689, 1998).

본 발명은 MS 치료제인 IFN β 의 생체내(*in vivo*) 활성이 증진된 인터페론-베타 변이체(mutein)에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 IFN β 분자에 한개 이상의 당쇄를 증가시킴으로써 용해성(solubility)증진과 반감기(half-life) 증가활성을 갖는 인터페론-베타 변이체에 관한 것이다.

IFN β 의 생체내 활성도는 생체내 반감기와 비례한다. 생체내에서 반감기는 당단백질이 갖는 당쇄의 말단에 위치하는 사이알릭산(sialic acid)의 함량과 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, IFN β 변이체의 생체내 활성은 당쇄의 존재에 의해 크게 좌우된다. 그런데, 당쇄의 형태는 세포의 종류에 따라 각각 다르게 나타나므로, 동일한 당단백질을 서로 다른 종류의 세포에서 발현시키면 각기 독특한 당쇄 형태를 나타낸다.

박테리아, 예를 들어 대장균(*E. coli*)은 단백질에 당쇄를 붙이지 못하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로, 대장균에서 발현되는 단백질에는 당이 첨가되어 있지 아니하므로, 대장균에서 발현된 IFN β 는 당쇄를 포함하지 않고, 이 경우 시험관내(*in vitro*)에서는 활성이 확인되지만 생체내에서는 당쇄가 결여된 IFN β 는 당쇄를 갖는 것에 비해 체내에서 급속히 배설되어 그 반감기가 극히 짧기 때문에 결국, 당쇄의 존재 유무는 IFN β 의 활성에 매우 중요한 역할을 담당한다.

천연형 IFN β 의 활성을 개선하고자 하는 연구들이 다양하게 진행되고 있는데 이는 크게 4가지 방법으로 접근하고 있다.

그 중 주류를 이룬 것은 돌연변이 유발방법(mutagenesis)을 이용하여 IFN β 유전자에 인공 돌연변이를 유발시킴으로써 몇몇 아미노산을 치환시켜 그 목적을 달성하는 방법이다. 예를 들어, Redlich 등, (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol.88, pp.4040-4044, 1991)은 돌연변이 C17S를 가진 재조합 인간 IFN β 의 펩타이드 스트레치(stretch)에 대응하는 합성 펩타이드에 대한 항체의 면역반응의 결과를 보여주고 있으며, 돌연변이 유발에 의해 에리스로포이에틴(EPO)의 당 함량을 증가시킴으로써 체내 반감기를 증가시키는 방법(PCT/US94/09257, 에리스로포이에틴 유사제) 또한 개시되어 있다.

또한 hTPO의 C-말단 부위를 결실시키거나 또는 C-말단 부위를 결실시킨 후 새로운 아미노산을 결합시키는 것으로 암젠(Amgen)사는 hTPO₁₅₁(아미노산 1-151), hTPO₁₇₄(아미노산 1-174) 유도체와 hTPO₁₆₃의 N-말단에 메치오닌-라이신을 첨가시킨 유도체를 제조하였다. 그러나 상기 유도체들은 시험관내 실험에서 활성이 유지되는 반면 생체내 실험 결과 천연형 hTPO 보다 활성이 저하된 것으로 나타났다(국제특허공개 WO95/26746호, 국제특허공개 WO95/25498호).

두 번째 방법은 암젠사의 hTPO₁₆₃-PEG와 같이 hTPO 절편에 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, 이하 'PEG'로 약칭함)을 부가하여 유도체를 만드는 것이다(국제특허공개 WO95/26746호). 그러나, 상기 방법은 hTPO의 안정성에 중요한 역할을 하는 C-말단부위가 없으므로 체내 안정성 저하 및 단백질 접힘(folding)의 변화로 인한 체내 면역학적 방어 시스템에의 노출 용이성으로 인한 안전성 저하 그리고 단백질 발현에의 문제점 등이 나타날 수 있다. 또한 PEG가 hTPO 절편에 부가될 때 일정 비율로 부가되지 않으므로 품질의 불균질성 문제를 일으킬 수 있다. 또한 특별한 글리코실화(glycosylation) 패턴을 가진 인터페론 β 분자 및 이들의 제법이 보고되었다(EP 287075 및 EP 539300).

많은 참고문헌들은 폴리머 콘주게이션 또는 글리코실화에 의한 폴리펩타이드의 변형에 대하여 공개하고 있다. 미국 특허 제4,904,584호는 PEG화된 리신이 결손된 폴리펩타이드를 공개하고 있는데, 여기서 적어도 하나의 리신(lysine) 잔기가 제거되거나 또는 다른 아미노산 잔기와 대체된다. WO99/67291은 PEG를 가진 단백질을 콘주게이트하는 공정을 공개하고 있는데, 단백질은 단백질에 콘주게이션을 달성하기에 충분한 조건하에 PEG와 접촉한다. WO99/03887은 성장 호르몬상과(superfamily)에 포함되는 폴리펩타이드의 PEG화된 변이체에 대하여 공개하고 있는데, 여기서 시스테인(cysteine) 잔기는 폴리펩타이드의 구체화된 영역에 위치한 비-필수 아미노산 잔기로 치환된다.

인터페론 β는 성장 호르몬 상과에 포함되는 폴리펩타이드의 하나의 예로 언급된다. WO00/23114은 글리코실화되고 PEG화된 IFNβ를 공개하고 있다. 미국 특허 제5,218,092호는 천연상태 폴리펩타이드와 비교하였을 때 적어도 하나의 부가적인 탄수화물 체인을 도입하도록 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF) 및 다른 폴리펩타이드의 변형을 공개하고 있다. 인터페론 β는 미국 특허 제5,218,092호에서 설명된 기술에 따라 변형될 수 있는 많은 폴리펩타이드 중의 하나의 예로 언급된다.

세 번째 방법으로는 당쇄를 도입함으로써 IFNβ의 활성을 증가시키는 것이다. 일반적으로 많은 단백질들은 당과 단백질이 결합된 당단백질로 존재한다. 이러한 당쇄화는 단백질의 특정위치에서 발생하며 대개 두가지 종류로 분류되는데, 대개 당의 결사슬이 세린 또는 트레오닌 아미노산의 산소에 부착되는 O-연결형 당쇄화와 아스파라긴-X-세린/트레오닌(X는 프롤린을 제외한 아미노산)의 아스파라긴의 아미드기에 부착되는 N-연결형 당쇄화가 있다. 당단백질의 당쇄는 단백질의 물리화학적, 생물학적 특성에 많은 영향을 미쳐 단백질의 안정성과 분비에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 생체내 생물학적 활성 및 약물동력학적 성질에 중요한 영향을 준다(Jenkins 등, Nature Biotechnological, 14: pp 975-981, 1996); Liu 등, Act. TIBTECH, 10: pp 114-120, 1992). 그 예로써 인간 인터페론 감마(human interferon-γ)나 글루코오스 전달 단백질(glucose transport protein)의 경우 N-당쇄 부위가 도입되는 아스파라긴산을 다른 아미노산으로 치환함으로써 당쇄가 도입되지 못하도록 하였을 때, 단백질의 생물학적 활성도가 현저히 감소하는 것으로 나타남으로써 N-당쇄가 당단백질의 활성에 많은 영향을 미치는 것이 확인되었다(Sareneva 등, Biochemical J. 303: pp 831-840, 1994; Asano 등, FEBS, 324: pp 258-261, 1993). 이러한 방법으로써 암젠사는 hTPO를 암호하는 cDNA에 있는 특정 염기를 치환시켜 아스파라진-X-세린/트레오닌(X는 프롤린을 제외한 아미노산)의 형태로 돌연변이시킴으로써 C-말단이 결실된 174개 아미노산으로 구성된 hTPO에 N-연결형 당쇄를 하나 이상 도입하여 활성이 증가된 hTPO 유도체를 제조하고자 하였다(국제특허공개 WO96/25498호).

그러나 당쇄가 추가로 도입된다고 하여 단백질의 생물학적 활성이 따라서 증가되는 것은 아니다. 이는 상기 암젠사 및 한국생명공학연구소의 선행기술(국제특허공개 WO96/25498호; 박홍록 등, J. Biol. Chem., 273: pp 256-261, 1998)들에서도 확인되는데, 이들의 경우 당쇄가 추가되었지만 단백질의 생물학적 활성은 오히려 천연형보다 감소하였다. 따라서 당쇄가 추가로 도입됨으로써 단백질의 활성이 증가되기 위하여는 당쇄가 많이 붙은 것보다 특정위치에 도입되는 것이 중요하다. 암젠사의 EPO는 미국 특허 제5,618,698호에서 설명된 기술과 같이 적어도 한개 이상의 당쇄를 추가적으로 부여하여 체내 활성(반감기)의 증가를 공개하고 있다.

다른 방법으로는 융합단백질(fusion protein)이 있다. 그 예로 EPO의 이량체(dimer) 형성에 의해 생체내 반감기를 증가시키려는 시도도 있었다(A.J. Sytkowski *et al.*, J. Biol. Chem. vol. 274, No. 35, pp 24773-24778). 그밖에도, 유전공학적 방법을 이용하여 EPO 분자에 새로운 아미노산, 펩타이드 또는 단백질 단편을 융합시켜 EPO의 당쇄 함량, 구체적으로는, 사이알릭산의 함량을 증가시킴으로써 생체내 활성도를 증진시키는 방법이 알려져 있다. 그러나, 이때 아미노산, 펩타이드 또는 이종의 단백질 단편으로 아무 것이나 사용할 수는 없다. 대부분의 경우, 이러한 변형은 단백질 고유의 활성을 저하 또는 상실시키는 결과를 초래하며 체내에 사용될 때 통상 발생할 수 있는 항원성의 문제를 일으킬 수 있기 때문이다. IFNβ에 대한 것은 아니지만 융합단백질 또는 키메라 단백질(chimeric protein) 등이 연구되고 있으며, 잘 알려진 예로는 성호르몬의 일종인 난포형성호르몬에 대한 것이 있다(Furuhashi *et al.*, 1995, Mol. Endocrinol.).

IFNβ 활성을 분석하기 위한 다양한 방법들이 공지되어 있다. 유용한 분석법의 예로는 항-바이러스 분석법, 예를 들어 CPE(미국 특허 제5,545,723호 및 제4,914,033호); 수용체 결합(예를 들어 미국 특허 제5,545,723호 및 ; STAT 활성화); IFNβ2 반응성 유전자(예를 들어 루시퍼라제 등과 같은 리포터 유전자에 작동가능하게 연결된 인터페론-자극 반응 요소(ISRE))의 활성화; 제I형 수용체의 인산화; 항-중식(미국 특허 제4,914,033호, 세포주의 복제에 대한 IFNβ2의 억제력 평가); 면역조절(미국 특허 제4,914,033호, 항체-의존성 세포의 세포독성; 문헌[Noronha *et al.*, J. Neuroimmunol., 46: pp 145-154, 1993], T-림프구 및 이에 의한 IFN-감마('IFN-γ') 생성의 억제; 실험적 알레르기성 뇌척수염('EAE')(예를 들어 [Louboutin *et al.*, Acta Neurol. Scand., 88: pp 97-99, 1993], [Rott *et al.*, Eur. J. Immunol., 23: pp 1745-1751, 1993]) 등이 있다.

암젠사의 EPO(미국 특허 제5,618,698호)에서 설명된 기술과 같이 한개 이상의 당쇄를 추가적으로 부여하여 단백질 활성(반감기)의 증가를 보인바 있다. 따라서 열거한 다양한 방법 중에서 특정부위에 당쇄를 부가하여 당단백질의 활성을 증가시키는 방법을 본 발명에서 사용한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 MS 치료제인 IFN β 의 생체내(*in vivo*) 활성이 증진된 인터페론-베타 변이체(mutein)를 제공하는 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 IFN β 분자에 한 개 이상의 당쇄를 증가시킴으로써 용해성증진과 반감기, 활성증가 등을 갖는 인터페론-베타 변이체를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 천연 인터페론-베타의 166개 아미노산 서열(서열번호: 1) 중 72, 73, 75, 110, 116, 117, 137 위치의 아미노산 중 하나 또는 둘 이상을 아스파라긴으로 인공 변이시켜 동물 세포에서 발현 제조된 하나 또는 둘 이상의 당쇄가 추가로 부가된 인터페론-베타 변이체를 제공하는 것이다.

또한 상기 인터페론-베타 변이체는 바람직하게는 천연 인터페론-베타 아미노산 서열 중 72번 위치에 글루타민을 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(Q72N), 73번 위치에 아스파테이트를 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(D73N), 75번 위치에 세린을 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(S75N), 110번 위치에 아스파테이트를 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(D110N), 116번 위치에 루이신을 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(L116N), 117번 위치에 메티오닌을 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(M117N), 137번 위치에 글루타메이트를 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(E137N) 등과 같이 천연 인터페론-베타의 아미노산 서열 중 하나의 아미노산만을 치환시켜 동물 세포에서 발현, 하나의 당쇄를 추가로 부가시킨 인터페론-베타 변이체이다.

또한 바람직하게는 둘 이상의 당쇄가 추가로 부가된 인터페론-베타 변이체를 들 수 있으며, 예를 들면 72번 위치에 글루타민과 110번 위치에 아스파테이트를 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(Q72N-D110N), 72번 위치에 글루타민과 116번 위치에 루이신을 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(Q72N-L116N), 72번 위치에 글루타민과 117번 위치에 메티오닌을 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(Q72N-M117N), 72번 위치에 글루타민과 137번 위치에 글루타메이트를 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(Q72N-E137N), 73번 위치에 아스파테이트와 110번 위치에 아스파테이트를 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(D73N-D110N), 73번 위치에 아스파테이트와 116번 위치에 루이신을 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(D73N-L116N), 73번 위치에 아스파테이트와 117번 위치에 메티오닌을 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(D73N-M117N), 73번 위치에 아스파테이트와 137번 위치에 글루타메이트를 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(D73N-E137N), 75번 위치에 세린과 110번 위치에 아스파테이트를 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(S75N-D110N), 75번 위치에 세린과 116번 위치에 루이신을 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(S75N-L116N), 75번 위치에 세린과 117번 위치에 메티오닌을 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(S75N-M117N), 75번 위치에 세린과 137번 위치에 글루타메이트를 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(S75N-E137N), 110번 위치에 아스파테이트와 116번 위치에 루이신을 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(D110N-L116N), 110번 위치에 아스파테이트와 117번 위치에 메티오닌을 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(D110N-M117N), 110번 위치에 아스파테이트와 137번 위치에 글루타메이트를 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(D110N-E137N), 116번 위치에 루이신과 137번 위치에 글루타메이트를 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(L116N-E137N), 117번 위치에 메티오닌과 137번 위치에 글루타메이트를 모두 아스파라긴으로 치환시킨 변이체(M117N-E137N) 등이다.

한편 본 발명은 천연 인터페론-베타를 코드화시키는 뉴클레오타이드 서열(서열번호: 2) 중 서열 214~216, 217~219, 223~225, 328~330, 346~348, 349~351, 409~411 중 일부를 변형시킨 상기 인터페론-베타 변이체를 발현시키는 cDNA 클론을 제공하는 것이다.

또한 본 발명은 상기 인터페론-베타 변이체를 발현시킬 수 있는 cDNA 클론을 함유한 조립 벡터를 CHO 세포 등의 동물 세포에서 발현시켜 하나 또는 둘 이상의 당쇄가 추가로 부가된 인터페론-베타 변이체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

개량형 IFN β 제작을 위한 유전자 돌연변이

천연형 인터페론-베타를 주형으로 하여 자리지정 유전자 돌연변이법(Site-directed mutagenesis for point mutation)을 통하여 개량형 인터페론-베타를 제조하였다. 돌연변이를 시키고자 하는 부위(도 1a)를 대상으로 프라이머쌍(도 1c)을 제작하여 PCR(polymerase chain reaction)방법을 통하여 시료는 5 μ l의 10 \times 반응완충용액에 5~50ng의 주형 유전자와 125ng의 프라이머쌍을 그리고 1 μ l dNTP mix를 첨가하여 최종적으로 50 μ l로 초순수로 부피를 맞추었고, 1 μ l Pfu Turbo DNA 중합효소(2.5 U/ μ l)를 첨가하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 30초간 반응시켜 주형유전자를 변성시킨 후 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 60초, 68 $^{\circ}$ C에서 480초의 사이클을 12회 반복시켰다. PCR로 합성한 반응물에 1 μ l DpnI(10U/ μ l)을 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 처리

하여 메틸화된 주형유전자를 제거하였다. DpnI 처리된 반응액을 얼음에서 녹인 XL1-blue 대장균세포에 1 μ l의 반응액을 처리한 후 42°C에서 45초간 열을 가한 후 얼음으로 냉각시켰다. 대장균세포에 500 μ l의 배양배지를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양한 후 원심분리를 통하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 LB 한천배지에 도말하여 37°C에서 16시간 이상 배양한 후 콜로니 생성을 나타냈다. 획득한 유전자는 유전자 서열분석을 수행하여 서열을 확인을 하였다.

발현백터제조

pGEMT-IFN β 를 주형으로 이용하고 아래의 프라이머 P1(서열번호: 3)과 P2(서열번호: 4)를 사용하여 PCR을 수행하고, IFN β 유전자만을 얻는다. 이때 DNA 증합효소(Stratagene)를 이용하고 이 유전자 말단은 제한효소 Hind III와 EcoRI 위치를 갖는다. pCDNA3.1 (Invitrogen사)와 위에서 얻은 IFN β 유전자를 제한효소 Hind III와 EcoRI로 각각 처리한다. 아가로스 겔(Agarose gel)에서 선형화된 pCDNA3.1과 IFN β 유전자를 Qiagen 용출키트를 이용하여 얻은 후 대장균 DH5a를 형질전환 시킨다. LB-암피실린 고체배지에서 하룻밤 키운 후 나타난 콜로니로부터 플라스미드를 분리하고 제한효소 Hind III와 EcoRI를 처리하여 1% agarose gel 전기영동으로 IFN β 유전자가 삽입된 콜로니만을 선별한다. 이 플라스미드를 pCDNA3.1-IFN β 라 명명한다(1).

P1(3'): CCGGAATTCGCCACCATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAA

P2(5'): CCGCTCGAGGTCACCTAAACAGCATCTGCTGGTTGA

형질감염(Transfection) 및 세포배양(Cos세포)

제조된 각각의 재조합 발현백터를 COS세포에 형질감염시켰다. 즉, 전배양한 COS세포를 2 \times 10⁵ cells/ml 농도로 60mm 조직배양 플레이트에 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 개량형 IFN β 제작을 위한 유전자 돌연변이과정에서 제조된 각각의 재조합 발현백터로부터 분리한 DNA 2 μ g과 7 μ l 리포펙틴(LipofectinTM, Gibco BRL) 시약을 혈청을 함유하지 않은 DMEM 배지 100 μ l에 각각 첨가하여 상온에서 15분 동안 반응시킨 후, 두 용액을 서로 혼합하여 다시 상온에서 15분 동안 반응시켜 리포펙틴-DNA 복합체를 형성하였다. 상기 리포펙틴-DNA 복합체에 혈청을 함유하지 않은 DMEM을 첨가한 후 이것을 COS 세포위에 살짝 엮어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 동안 배양하여 형질 감염시켰다. 각각의 발현백터가 형질 감염된 COS 세포는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, JRH), 50 μ g/ml 페니실린, 50 μ g/ml 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 48 시간 동안 배양하였다.

형질감염(Transfection) 및 세포배양(CHO세포)

개량형 IFN β 제작을 위한 유전자 돌연변이과정에서 제조된 각각의 재조합 발현백터를 CHO/dhfr- 세포에 발현백터의 제조과정과 동일한 방법으로 형질 감염시켰다. 각각의 발현백터가 형질 감염된 CHO/dhfr- 세포는 10% 소 태아혈청(fetal bovine serum, JRH), 50 μ g/ml 페니실린, 50 μ g/ml 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 48 시간 동안 배양하였다.

G418을 이용한 선별

상기와 같이 제조된 형질감염된 세포를 G418이 포함된 배지에서 배양하면서 선별하였다. 구체적으로 상기 재조합 발현백터가 형질감염되지 않은 세포를 제거하기 위한 최소의 G418농도를 결정하기 위하여, 세포들을 6-well plate에 접종한 후 다양한 G418농도를 포함하여 DMEM배지에서 배양하였다. 선택배지를 3내지 4일마다 교환해주면서 대부분의 세포가 사멸하는 농도를 결정하였다. 형질감염시킨 세포들을 48시간이 경과한 후 400ug/ml의 G418이 함유되어 있지만 디옥시리보뉴클레오시드(deoxyribonucleoside) 및 리보뉴클레오시드(ribonucleoside)가 결핍된 alpha-MEM 최소배지로 교체하여 배양함으로써 형질 감염된 세포를 선별하였다.

MTX(methotrexate)를 이용한 유전자 증폭

세포주는 세포배양 선별배지에 MTX(methotrexate)를 20nM, 80nM, 320nM, 그리고 마지막으로 1 μ M 농도로 순차적으로 증가시킨 선별배지로 배양하여 유전자 증폭을 실시하였다. 앞서 선별된 세포주가 각각의 MTX 농도에서 적응하여 건강하게 자랄 때까지 약 3 내지 4주 동안 한 농도의 MTX 농도에서 충분히 배양하여 건강한 상태에서 다음 농도로 증가하여 배양하였다. 유전자 증폭 과정에서 이에 상응한 외래 유전자인 IFN β 발현양을 ELISA법을 이용하여 측정하였다.

단일세포분리를 통한 세포주 확립

1uM에서 1달이상 배양하여 건강하게 자라는 세포주에 대해 단일세포분리를 하였다. 먼저 96 well-multi plate의 각 well 당 1개의 단일세포를 넣고 배양한 후 이중 단일세포만 들어간 것을 선별하였다. 이후 ELISA정량분석을 통하여 발현양이 우수한 후보군을 선별하였다. 이렇게 선별한 후보군에 대해서 24well, 6well로 순차적으로 옮겨서 배양하였다. 이렇게 배양한 후보군을 ELISA정량분석을 이용하여 재차 선별하여 최종 IFN β 고발현 세포주를 확립하였다.

개량형 IFN β 고발현 세포주인 CHO에서의 IFN β 발현 측정

CHO 세포의 개량형 IFN β 발현능을 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)으로 측정하였다. 구체적으로, 상기 세포들을 소태아혈청이 결핍된 alpha-MEM 배지에서 배양한 후 원심분리하여 균체와 배양 상등액을 분리하였다. 상기 배양 상등액 시료에 5X 샘플완충용액(125mM Tris-HCl, 5% SDS, 50% glycerol, β -mercapto-ethanol, 1mg/ml bromophenol blue)을 1 : 4의 비율로 혼합하고 95°C에서 5분 동안 전처리 한 후 분자량 표준품과 함께 15% 폴리아크릴아미드 겔 (polyacrylamide gel)의 웰에 20 μ l씩 로딩하여 전개하였다. 전기영동이 끝난 후, 전개된 단백질을 트랜스퍼 블러터 (transfer blotter, Hofer)를 이용하여 나이트로 셀룰로오스 여지(nitrocellulose membrane, Schleicher & Schuell)로 이동시켰다. 상기 나이트로 셀룰로오스 여지를 반응정지액(5% 탈지유 및 0.1% Tween 20을 함유하는 TBS 용액)에 넣어 상온에서 1시간 동안 교반시킨 후 세척액으로 5분 동안 3회 세척하였다. 세척이 끝난 나이트로 셀룰로오스 여지를 인간 IFN β 1차 항체인 항인간-IFN β 마우스 단일클론 항체(anti-human IFN β monoclonal antibody, R&D System)와 상온에서 1시간 동안 반응시키고 세척액(0.1% Tween-20을 포함하는 TBS 용액)으로 세척한 후 2차 항체인 항마우스 면역글로블린 토끼 항체(rabbit anti-mouse IgG antibody conjugated HRP, Zymed)와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세척액으로 3회 세척한 후 발광용액(ECL, amersham)을 첨가하여 인간 개량형 IFN β 양성 밴드가 육안으로 확인 되도록 x-ray film(Hyperfilm, amersham)에 감광시켜 film을 현상하여 관독하였다.

CPE법에 의한 항바이러스 활성 측정

IFN β 의 항바이러스 활성은 세포병리 과 실험(CPE; Cytopathic Effect assay)로 측정하였다. 먼저 희석한 IFN β 시료를 96-well에 100ul씩 분주하였다. 이후 10% FBS가 함유된 MEM 배지에서 배양한 MDBK(ATCC No.CCL-22)세포를 9x10⁵세포/well의 양으로 100ul씩 접종을 하고 37도 인큐베이터에서 2시간 배양하였다. 각 well에 VSV(7x10³/PFU)를 50ul로 첨가하고 20시간 동안 계속 배양하였다. 배양 후에 배지를 제거하고 뉴트럴 레드 용액 100ul를 각 well에 첨가한 후 2시간 동안 37°C 인큐베이터에서 방치한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

이하 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

(실시예 1) 돌연변이를 통해 하나 이상의 당쇄가 부가된 인터페론-베타 클론을 확보

인간 IFN β 의 아미노산 서열 Q72, D73, S75, D110, L116, M117, E137에 당쇄가 결합될 수 있도록 자리지정 유전자 돌연변이를 통하여 N-결합 글리코실화 자리인 아스파라긴의 코돈으로 바꾸었다(도 1a). 이를 통하여 아미노산서열이 각기 N(아스파라긴)으로 변경이 되는 것이다(도 1b). 이때 주형으로 IFN β 유전자가 포함된 플라스미드 pGEM-T Easy vector(Promega, USA)를 사용하였으며 2개의 오버래핑 프라이머-세트(도면 1c)와 Pfu-turbo DNA 중합효소를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 IFN β 의 DNA서열이 Q72N, D73N, S75N, D110N, L116N, M117N, E137N로 바뀌고 이들 돌연변이 서열이 한 개 또는 한 개 이상이 배합이 된 24개의 클론이 제조되었다. 모든 클론은 DNA 서열분석기를 통해 서열이 확인되었다.

본 발명에 있어서 제조된 인터페론-베타 변이체 유전자는 모두 22 종이였다. 이러한 22 종의 유전자에 의해 치환되는 아미노산 위치는 S75N, D110N, L116N, M117N, E137N, Q72N D110N, Q72N L116N, Q72N M117N, Q72N E137N, D73N D110N, D73N L116N, D73N M117N, D73N E137N, S75N D110N, S75N L116N, S75N M117N, S75N E137N, D110N L116N, D110N M117N, D110N E137N, L116N E137N, M117N E137N이었다.

(실시예 2) 발현벡터 제조 및 세포주 선별

(1) pcDNA3.1-IFN β 벡터 제조

발현 벡터로 Invitrogen의 pcDNA3.1 벡터를 이용하였다. pGEMT-IFN β 를 주형으로 이용하고 프라이머 P1과 P2를 사용하여 PCR을 수행하여, 약 700bp의 원하는 융합유전자인 IFN β 유전자만을 얻었다. IFN β 유전자 말단은 각각 제한효소 EcoR I 및 Xho I 위치를 갖는다.

pcDNA3.1과 위에서 얻은 IFN β 를 제한효소 EcoR I 및 Xho I으로 각각 처리하였다. Agarose gel에서 선형화된 pcDNA3.1과 IFN β 유전자를 Qiagen 용출 키트를 이용하여 얻은 후 대장균 DH5 α 에 형질전환시켰다. LB-암피실린 고체 배지에서 하룻밤 키운 후 나타난 콜로니로부터 플라스미드를 분리하고 제한효소 Hind III와 EcoRI를 처리하여 1% 아가로스 젤 전기영동으로 IFN β 유전자가 삽입된 콜로니만을 선별하여 플라스미드 pCDNA3.1-IFN β 를 완성하였다(도 2).

(2) Cos 세포에서의 일시적 형질 발현

Cos 세포(1×10^6 cells)를 각각 소태아 혈청(FBS, 미국 Gibco사)이 10% 함유되거나 DMEM/F12배지(미국 Gibco사)가 들어있는 6 well-plate에 접종하고 배양하였다. 24시간 배양한 후, 세포들을 리포펙트아민(LipofectAmine, 미국 Gibco사)을 사용하여 형질감염시켰다. 형질감염 후세포를 DMEM/F12배지에서 48시간 동안 배양한 후 하기한 실시3의 방법으로 배양상등액 중의 IFN β 생성량을 측정한다. 결과, Cos 형질 감염체에 의한 COS-IFN β 생성이 양성(10ng/ml)으로 나타남을 확인할 수 있었다.

(3) 효소면역측정법에 의한 IFN β 단백질양 측정

효소면역측정 키트(미국 R&D system사)중의 항체흡착 플레이트의 지정된 각 웰에 희석액을 각각 100 μ l씩 가하고 희석액으로 적절히 희석한 표준액, 국제표준액 및 검액들을 100 μ l 가하여 잘 섞은 후 실온에서 1시간 반응시켰다. 이때 국제표준액은 인간 IFN β 국제 표준(영국 NIBSC사) 앰플 한개를 제형완충액 1ml에 녹인 후 바이알 당 100 μ l씩 분주하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였으며, 사용할 때 -70 $^{\circ}$ C에서 바이알을 꺼내 녹인 후 희석액으로 희석하여 사용하였다. 각 웰의 잔여 반응액을 제거하고 세척용액으로 250 μ l씩 3회 세척 한 후 각 웰에 100 μ l씩의 효소항체 접합체액을 가하고 다시 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 반응액을 제거하고 세척용액으로 200 μ l씩 3회 세척한 후 잔여액을 모두 제거하고 조제한 기질-발색용액 100 μ l씩을 가한 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 각 웰에 반응정지액 100 μ l씩을 가한 후 정지시키고 잘 섞은 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

표준액의 농도를 횡축, 흡광도(A450nm)를 종축으로 하여 표준곡선으로부터 국제표준액과 검액 각각의 흡광도에 따른 인간 IFN β 농도 수치를 구하고 여기에 각각의 희석비를 곱하여 얻은 3가지 희석액 농도수치의 평균값을 계산하여 국제표준 샘플과 검액의 측정치를 구한 후 최종농도를 계산하였다.

(실시예 3) CHO세포에 형질감염 및 생산성 측정

60mm 세포배양 용기에서 CHO세포(tk-)를 키워 40~80% 정도로 차게($1 \sim 4 \times 10^5$ 세포/60mm 디쉬) 배양하였다. Gibco사의 LipofectAmine 시약 3 μ l와 세포배지(α -MEM with media, 무혈청, 무항생제) 97 μ l을 잘 혼합하고 플라스미드 pcDNA3.1-IFN β DNA(0.1 μ g/ μ l 이상, 약 2 μ g)와 pSP72-DHFR(0.2 μ g)를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 준비된 상기 세포에 가하였다. 1일 경과 후 G418을 500 μ g/ml 되게 첨가한 배지로 교환(α -MEM with media, 10% FBS)하였다. 약 7~10일간 G418을 500 μ g/ml 되게 첨가된 배지로 교환해 주면 G418 저항성 유전자를 갖지 않는 세포와 음성 대조군의 세포들은 모두 사멸한다. 이후 CHO DHFR $^{+}$ 형질감염체 세포들을 2차 선별하였다. 2차 선별된 CHO DHFR $^{+}$ 형질감염체 세포들을 한계 희석법(limiting dilution)으로 96 well plate에 클론화하여 선별배지에서 계속 배양한 후 MTX(methotrexate, 미국 sigma사)농도를 20nM에서 1000nM까지 2배수로 점차 증가시키며, 10% 혈청 함유 최소배지에서 배양하면서 MTX 선별배지에서 성장하는 MTX저항성 클론들을 3차 선별하였다. 이를 계대배양하면서 선별된 클론의 배양상등액 중의 IFN β 생성량을 실시예 2-3의 방법으로 측정한다. IFN β 의 생성이 가장 높은 클론을 최종 선별하였다. 상기에서 제조된 재조합 CHO 세포주의 IFN β 생성량 측정결과, CHO-native 세포주는 1.8 μ g/ml/24hr인 반면 돌연변이체를 생산하는 CHO-137 세포주는 8.6 μ g/ml/24hr으로 IFN β 를 생산함을 확인하였고, 이는 천연형의 세포주 보다 2배 이상 높음을 알 수 있었다.

(실시예 4) 하나 이상의 당쇄가 부가된 IFN β 의 발현

1개 이상의 당쇄가 부가되도록 제작된 재조합 발현벡터(도 2)를 CHO/dhfr- 세포에 형질 감염시켰다. 각각의 발현벡터가 형질 감염된 CHO/dhfr- 세포는 10% 소 태아혈청, 50 μ g/ml 페니실린, 50 μ g/ml 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지를

이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 48 시간 동안 배양한 후 PBS로 3회 세포를 세척한 후 무혈청 배지로 교체하여 48 시간 동안 배양한 후 IFNβ 발현 배양액을 회수했다. 회수된 천연형의 IFNβ 및 1개 이상의 당쇄가 부가된 IFNβ를 웨스턴 블롯방법을 이용하여 단백질을 분석하였다(도 4). 결과, 당쇄를 부가하지 않은 천연형 IFNβ로 당쇄가 없는 단백질 분자량인 약 20.0 kDa과 당쇄가 있는 단백질인 약 22.0 kDa의 band를 나타내며, 1개의 당쇄가 부가된 IFNβ은 약 24.0 kDa의 band가 추가되었고 2개의 당쇄가 부가된 IFNβ은 약 26.0 kDa의 band가 추가되는 것으로 확인되었다.

(실시예 5) 개량형 IFNβ의 항바이러스 활성

개량형의 IFNβ와 당쇄가 제거된 IFNβ(IFNβ-1b)의 항바이러스 활성을 천연형 IFNβ에 기준을 두고 상대 비교하였다. 천연형 IFNβ로는 Serono의 Rebif를 이용하였다. 당쇄가 제거된 IFNβ-1b는 동일 조건에서 낮은 활성을 보였으며 이에 비해 개량형은 당쇄가 붙으며 붙을수록 활성이 높게 나타났다. 당쇄가 2개가 붙은 클론 중에는 최고 2배 이상의 항바이러스 효과를 보이는 클론(IFNβDE2)이 발견되었다.

항 바이러스 활성 시험법은 효소 면역 분석법을 이용하여 실시한다. COS 세포에서 일시적인 발현된 여러 인터페론-베타 변이체의 배양액에서 EIA와 항 바이러스 역가측정비를 측정하였다. 이러한 결과에 따라 당쇄가 부가되어 분자량 증가가 확인되고 천연형 인터페론-베타에 비하여 N-2 변이체(D110N), N-19 변이체(D110N M117N), N-20 변이체(D110N E137N), N-22(M117N E137N) 변이체의 항바이러스 활성이 증가됨을 알 수 있었다.

(실시예 6) 세포성장의 억제

세포성장 억제에 대한 IFNβ변이체의 효과가 또한 조사되었다. 항-세포 성장활성은 균락 억제 분석을 이용해 조사되었다. 인간의 양막(WISH) 또는 MDBK 세포는 단일세포에서 생기는 균락을 형성하기 위해 낮은 세포밀도로 깔리었다. 세포는 2% 소의 태아혈청(퉁) 과 필수 및 비필수 아미노산이 첨가된 HMEM 에 있는 24 웰 플레이트에서 웰당 200 또는 400 세포에서 배양되었다. 다양하게 희석된 인터페론이 삼중체의 웰에 첨가되었고 균락을 형성시키기 위해 플레이트는 8일 동안 배양되었다. 균락은 크리스탈 바이올렛으로 염색한 후에 보고 집계되었다. 세포주기 분석은 추가의 7일 동안 0.5% "스펜트(spent)" 배지를 함유하는 HMEM으로 수행되었다. WISH 세포는 동기화 없이 사용되었다.

IFNβ 변이체 활성을 조사하기 위해 세포는 6 웰 플레이트에서 10% FBS와 HMEM에서 웰당 2.5 X 10⁵ 세포에서 다시 깔리어졌다. 다양한 희석액이 1ml의 최종부피를 맞추기 위해 첨가되었다. 플레이트는 12, 15, 18, 24, 또는 48시간 동안 5% CO₂에서 37°C에서 배양되었다. 세포는 트립신으로 처리되었고, 저속 원심분리로 수거되어 세척되었다. 세포 응집체는 건조하게 물려졌고 250 마이크로리터의 핵염색용액(증류수 100ml에서 5mg 프로피디움 요오드, 0.3ml NP 40, 0.1g 시트릭 나트륨)이 각 튜브에 첨가되었다. 튜브는 실온에서 배양되었다. 10분 후에, 250 마이크로리터 RNase(1.12% 시트릭 나트륨에서 500 units/ml)가 튜브당 첨가되었고 20분 더 배양되었다.

핵은 44 마이크로미터 체를 통해 여과되었고 DNA Star 2.0 소프트웨어를 이용해 FACStar(Becton Dickson, Mountain View, CA) 상에서 분석되었다.

소의 상피선, MDBK와 인간 양막선, WISH 둘 다의 균락형성을 이용해 세포성장을 분석하는데 있어, IFNβ변이체는 균락 크기 및 수를 억제하였다. 또한 그것은 중간 활성에 있어 매우 효능이 있다. 그것의 활성은 투여량에 의존적이었고 증식억제는 1 units/ml 처럼 낮은 농도에서 관찰 될 수 있다. 세포 생존율은 손상되지 않는 반면 50,000 units/ml 처럼 높은 농도 (ml 당 항바이러스 활성의 unit)는 증식을 정지시켰다.

(실시예 7) 인간 종양세포계에 대한 IFNβ 변이체의 항증식 효과

인간 종양세포계에 대한 IFNβ 변이체의 항증식 활성은 IFNβ변이체로 처리한 세포안으로 3H-티미딘 도입율을 측정해서 평가되었다.

현탁액에서 자라는 종양계에 대한 실험에, 1 ml의 세포가 24-웰 플레이트 안에서 웰당 2.5⁻⁵ X 10⁵ 세포에서 깔렸다. 삼중체 웰은 IFNβ 변이체의 100,1,000 또는 10,000 units/ml인 적절한 배지를 받거나 또는 rHuIFNa2A의 동등한 항바이러스 농도를 받았다(Lee Biomolecular). 48시간 배양후에, 세포는 집계되고 트립판 블루 배제 방법으로 생존율이 평가되었다.

부착성의 종양계는 6-웰 플레이트에서 1 ml에서 웰당 2.5×10^5 세포에서 깔리어졌다. 그들은 방금 기술한대로 인터페론 처리를 받았으나, 집계전에 트립신화 되었다. 처리물들 사이에 중요한 차이는 슈프(Scheffe's)의 에프-시험(F-test)에 의한 변이분석으로 측정되었다. 세포주기 분석은 프로피디움 요오드를 이용해 흐름세포 측정법으로 수행되었다.

A. 유방 선암종 세포

인간 MCF7 유방 선암종 세포는 3% 텍스트란이 암호된 솟을 박리한 CSPR 과 5% 텍스트란이 암호된 FBS로 첨가된 페놀 레드가 없는 DME-F12 배지에서 대수적으로 증식하는 배양액으로부터 집중되었다. 대략 15-18 시간동안 부착 후에, 세포는 혈청이없는 DME-F12 배지로 한번 세척되었다. 배지는 3% 박리된 CSPR2, 1% 박리된 FBS("3/1" 배지) 또는 인터페론에 대한 수포성 구내염 바이러스 쉐린지 분석에서 결정된 것 처럼 항바이러스 활성 유니트의 표시된 수에서 IFN β 변이체를 포함하는 3/1 배지로 보충된 페놀 레드가 없는 DME-F12 배지로 교체되었다. 유사한 완충용액의 희석액(희석되지 않은 완충용액= 10 mM Tris, 330 mM NaCl[TS])을 함유하는 배지는 대조표본으로 사용되었다. 세포는 대략 처리후 48 시간에서 2시간동안 3H-티미딘으로 과동표지 되었다.

트리클로르아세트산(TCA)으로 침전될 수 있는 포함된 집계는 계수기로 결정되었다. 3개의 이중체는 처리당 포함되었다. IFN β 변이체 처리에 대한 평균값은 담체 TS 완충용액에 비교할수 있는 희석물을 포함하는 시료에 비교되었다.

IFN β 변이체는 실질적으로 인간 암종 세포계에서 3H-티미딘 도입률을 감소시킬수 있었다. 이것은 종양세포 증식, 특히, 포유동물 종양세포 증식을 억제하는데 있어 IFN β 변이체의 효능을 기술한다.

B. 인간 전골수구 백혈병

IFN β 변이체와 IFN α 의 항증식 효과비교는 MDBK 세포에 대해 상기 기술한대로 HL-60(인간 백혈병) 세포(Foa,et al.,1982; Todd,et al.,1981)를 이용해 시행되었다. IFN β 변이체와 rHuIFN α 둘 다는 HL-60 세포증식을 억제한다. IFN β 변이체와 IFN α 둘 다는 HL-60 세포의 성장을 급격히 감소시킬수 있었다는 것을 보여준다. 각 화합물에 대한 성장감소는 시험된 각 농도의 60%를 초과했다. 10,000 units/ml에서, IFN α 는 100% 증식이 감소된 반면 IFN β 변이체는 대략 80% 증식이 감소되었다.

그러나, IFN α 가 성장을 감소시키는 능력의 실질적인 요인은 세포상에서 그것의 독성효과였다. 10,000 units/ml에서, IFN α 의 독성은 남아서 생존하는 세포의 25% 이하였다. 비교해서, IFN β 변이체가 10,000 units/ml에서 적용되었을 때 세포의 거의 100%가 생존하였다.

C. 인간 피부의 T 세포 림프종

피부 T 세포 림프종, HUT 78, IFN β 변이체로 처리했을 때 HL-60 에 유사하게 반응했다. IFN β 변이체 및 rHuIFN α 둘 다는 HUT 78 세포증식을 감소시키나 rHuIFN α 의 10,000 units/ml은 처음에 깔린(5×10^5) 것 이하로 세포수를 감소시켰다. 이것은 대략 60% 까지 세포생존율의 감소를 나타낸다.

3개의 이중체 실험중의 하나의 결과는 세포주기의 각 상에서 세포의 백분율로 나타내어진다. 시료당 10,000 사건이 분석되었다. 이 결과는 세포주기를 통해 세포의 느린 발달에 기인하는 것 같다. rHuIFN α 10,000 units/ml로 처리된 시료에서, 죽은 세포를 동정하는데 있어, 앞쪽은 낮게 측면은 높게 분산되는 커다란 %의 사건이 존재하였다. 이것은 단지 IFN β 변이체가 독성없이 HUT 78 증식을 억제한 증식실험에서 얻은 데이터와 일치한다.

D. 인간 T 세포 림프종

T 세포계 림프종 H9은 약간 상기 기술한 종양세포계 보다 IFNs의 항증식효과에 덜 민감하였다. 3개의 이중체실험 중의 하나의 결과는 평균 증식감소율 \pm SD로 도 10에 나타난다. rHuIFN α 는 H9 세포에 독성이 없었던 반면, 그것은 어떤 검사된 어느 농도에서 상당히 세포분열을 억제하지 못했다. 비교해서, IFN β 변이체는 대략 60% 까지 H9 증식을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 또한, 유일한 IFN β 변이체는 이 T 세포 림프종의 효과적인 증식 억제제다.

발명의 효과

본 발명의 효과는 인간 인터페론-베타 유전자 변이체 및 그로부터 발현되는 인터페론-베타 변이체를 제공하는 것이다. 인터페론-베타 변이체는 수용성과 생물학적 활성을 증진시키기 위해 유전자 조작방법인 자리지정 돌연변이를 이용하여 당쇄 부가가 가능한 7부위의 아미노산을 부분적으로 치환한 것이다. 인터페론-베타 변이체는 천연형 인터페론-베타에 비해 하나 이상의 당쇄가 부가되었으며 항바이러스 활성이 증가되었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

천연 인간 인터페론-베타의 166개 아미노산 서열(서열번호: 1)에서 110번 위치의 아스파테이트(D110), 117번 위치의 메티오닌(M117), 137번 위치의 글루타메이트(E137) 중에서 선택된 하나 또는 두 개의 아미노산을 아스파라긴(N)으로 인공 변이시켜 동물세포에서 발현 제조된 하나 또는 두 개의 당쇄가 추가로 부가된 인터페론-베타 변이체

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

천연 인간 인터페론-베타 뉴클레오타이드 서열(서열번호: 2)에서 110번 아미노산을 코딩하는 서열(GAT), 117번 아미노산을 코딩하는 서열(ATG), 137번 아미노산을 코딩하는 서열(GAG) 중에서 선택된 하나 또는 두 개의 서열을 AAT로 인공 변이시킨 상기 인터페론-베타 변이체를 코딩하는 유전자

청구항 5.

제 4항의 인터페론-베타를 코딩하는 유전자를 함유한 cDNA 클론을 벡터에 삽입시켜 CHO 세포와 같은 포유동물 세포주에서 발현시켜 하나 또는 두 개의 당쇄가 추가로 부가된 인터페론-베타 변이체를 제조하는 방법

도면

도면1a

계량형 IFN-β 유전자 서열

atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctccigtigt gcttctccac tacagctctt	60
tccatgagct acaacttgct tggattecta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag	120
ctcctgtggc aattgaatgg gagcettgaa tattgacctca aggacaggat gaactttgac	180
atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc	240
tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag <u>at</u> tc <u>at</u> ctag cactggctgg	300
aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag	360
acagtctctg aagaaaaact ggagaaagaa <u>ga</u> ttttacca <u>gg</u> gaaaaact <u>cat</u> gagcagt	420
ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa <u>gg</u> agtacagt	480
cactgtgcct <u>gg</u> accatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga	540
cttacaggtt acctccgaaa ctgaagatct cctagcctgt ccctctggga ctggacaatt	600
gcttcaagca ttttcaacc agcagatgct gtttaagtga ctgatggcta atgtactgca	660
aatgaaagga cactagaaga ttttgaaatt tttattaat tatgagttat tttatttat	720
ttaaatttta ttttgaaaa taaattat tttgtgc	757

도면1b

IFNβ 아미노산 서열 치환 부위

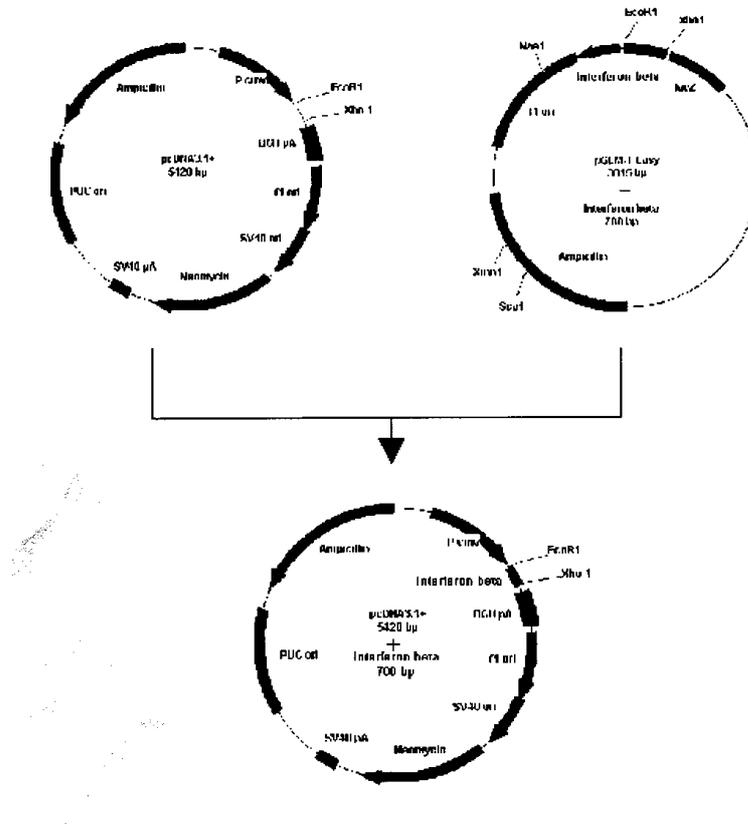
<i>Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe</i>	15
<i>Ser Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu</i>	30
<i>Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu</i>	45
<i>Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp</i>	60
<i>Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp</i>	75
<i>Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile</i>	90
<i>Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val</i>	105
<i>Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys</i>	120
<i>Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly</i>	135
<i>Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile</i>	150
<i>Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr</i>	165
<i>Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg</i>	180
<i>Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn</i>	

도면1c

사용한 프라이머 염기서열

명칭	프라이머 염기서열
1 차Q72N(5')	CTTTGCTATTTTCAGAAAAGATTCATCTAGCACTG
Q72N(3')	CAGTGCTAGATGAATCTTTTCTGAAAATAGCAAAG
2 차Q72N(5')	CTTTGCTATTTTCAGAAAATGATTCATCTAGCACTG
Q72N(3')	CAGTGCTAGATGAATCATTTTCTGAAAATAGCAAAG
1 차S75N(5')	GCTATTTTCAGACAAAATTCATCTAGCACTGGC
S75N(3')	GCCAGTGCTAGATGAATTTTGTCTGAAAATAGC
2 차S75N(5')	CAGACAAGATTCAACTAGCACTGGCTGGAAT
S75N(3')	ATTCCAGCCAGTGCTAGTTGAATCTTGTCTG
D110N(5')	CAGACAAGATTCAAAATAGCACTGGCTGGAAT
D110N(3')	ATTCCAGCCAGTGCTATTTGAATCTTGTCTG
1 차L116N(5')	ACCAGGGGAAAAACACATGAGCAGTCTGCACC
L116N(3')	GGTGCAGACTGCTCATGTGTTTTCCCTGGT
2 차L116N(5')	ACCAGGGGAAAAACATGAGCAGTCTGCACC
L116N(3')	GGTGCAGACTGCTCATGTTTTTCCCTGGT
1 차M117N(5')	ACCAGGGGAAAACTCAAGAGCAGTCTGCACC
M117N(3')	GGTGCAGACTGCTCTTGAGTTTTCCCTGGT
2 차M117N(5')	ACCAGGGGAAAACTCAATAGCAGTCTGCACC
M117N(3')	GGTGCAGACTGCTATTGAGTTTTCCCTGGT
1 차E137N(5')	CCTGAAGGCCAAGGATTACAGTCACTGTGCC
E137N(3')	CGCACAGTGACTGTAATCCTTGGCCTTCAGG
2 차E137N(5')	CCTGAAGGCCAAGAATTACAGTCACTGTGCC
E137N(3')	GGCACAGTGACTGTAATCTTGGCCTTCAGG
P1(3')	CCGGAATTCGCCACCATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAA
P2(5')	CCGCTCGAGGTCACCTAACAGCATCTGCTGGTTGA

도면2



<110> Samsung Fine Chemicals Co., Ltd.
 <120> Mutein of human interferon-beta and its preparation method
 <160> 4
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 2
 <211> 498
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttcagtg tcagaagctc 60
 ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgccctcaagg acaggatgaa ctttgacatc 120
 cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt gaccatctat 180
 gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat 240
 gagactattg ttgagaacct cctgggctaat gtctatcatc agataaacca tctgaagaca 300
 gtctctggaag aaaaactgga gaaagaagat tttaccaggg gaaaactcat gagcagtctg 360
 cacctgaaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaagga gtacagtcac 420
 tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact tttacttcat taacagactt 480
 acaggttacc tccgaaac 498

<210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 3

ccggaattcg ccaccatgac caacaagtgt ctcctccaaa 40
<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 4
ccgctcgagg tcacttaaac agcatctgct ggttga 36