

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶		(45) 공고일자	1999년02월01일
A61K 38/20		(11) 등록번호	특0170037
A61K 39/395		(24) 등록일자	1998년10월14일
(21) 출원번호	특1995-700624	(65) 공개번호	특1995-702841
(22) 출원일자	1995년02월18일	(43) 공개일자	1995년08월23일
번역문제출일자	1995년02월18일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 93/07646	(87) 국제공개번호	WO 94/04180
(86) 국제출원일자	1993년08월18일	(87) 국제공개일자	1994년03월03일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 그리스 영국 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 베냉 부르키나파소 카메룬 중앙아프리카 차드 콩고 가 봉 말리 모리타니 니제르 세네갈 토고 코트디부아르 기네 국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나 다 체코 핀란드 헝가리 일본 대한민국 카자흐스탄 스리랑카 마다가 스카르 몽골 말라위 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 러시아 수 단 슬로바키아 우크라이나 베트남		
(30) 우선권주장	7/932,900 1992년08월20일 미국(US) 7/933,419 1992년08월21일 미국(US) 7/933,462 1992년08월21일 미국(US) 7/933,950 1992년08월21일 미국(US)		
(73) 특허권자	쉐링 코포레이션 에릭 에스. 딕커		
(72) 발명자	미합중국 뉴 저지 07033 케닐워쓰 갠롭핑 힐 로오드 2000 로버트 코프만 미합중국 캘리포니아 94025 포틀라 밸리 에코 레인 239 얀 이. 드 브리스 미합중국 캘리포니아 94022 로스 알토스 선샤인 드라이브 763 레네 드 왈 말레피트 미합중국 캘리포니아 94086 서니베일 윈더 애비뉴 891 피오나 파우리 미합중국 캘리포니아 94040 마운틴 뷰 #204 델 메디오 애비뉴 541 도나 레닉크 미합중국 캘리포니아 94022 로스 알토스 알몬드 애비뉴 601		
(74) 대리인	이병호, 최달용		

심사관 : 류종훈

(54) 인터루킨-4 및/또는 인터루킨-10을 함유하는 억제학적 조성물

요약

본 발명은 IL-4 및/또는 IL-10의 용도 또는 여러가지 질환의 치료에 사용하기 위한 IL-4 및 IL-10에 대한 항체에 관한 것이다. 한 양태에서, IL-10은 종양성 임파구에 의한 IL-2 생성 억제 또는 IL-2 의존성 종양 세포 증식 억제를 위해 사용 된다. 다른 양태에서, IL-10은 염증성 장 질환을 치료하는데 사용된다. 또 다른 양태에서, IL-4 및 IL-10에 대한 항체는 IFN- γ 의 농도를 증가시키는데 사용된다. 또 다른 양태에서, IL-4 및 IL-10의 배합물은 T 세포에 의한 사이토킨 생성의 IL-10 매개성 억제를 강화하는데 사용된다. 또 다른 양태에서, IL-10은, 단독 또는 IL-4와 함께, 지연형 과민반응을 억제하는데 사용된다. 본 발명은 또한, 억제학적으로 허용되는 담체와 IL-4 및 IL-10의 배합물 또는 IL-4 및 IL-10에 대한 항체 배합물로 구성된 억제학적 조성물을 추가로 제공한다.

명세서

[발명의 명칭]

인터루킨-4 및 또는 인터루킨-10을 함유하는 억제학적 조성물

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 인터루킨-2(IL-2)-의존성 종양 세포 증식, 지연형과민(DTH)반응 및 염증성 장 질환을 치료하고 T 세포에 의한 사이토킨 생성의 억제를 강화시키거나 감마 인터페론(IFN- γ) 생성을 증가시키기 위한 조성물에 관한 것이다. 이들 조성물은 인터루킨-4 (IL-4), 인터루킨-10(IL-10) 또는 이들의 배합물, 또는

중화항체로서 IL-4 및 IL-10의 길항제를 사용한다.

[발명의 배경]

백혈병은 조혈 세포의 악성 변형으로부터 발병하는 종양의 이질성 그룹이며, 임파 또는 골수 세포 유형으로부터 유발될 수 있다. 변형된 세포는 주로 골수 및 림프 조직에서 증식하며 여기에서 정상적인 조혈 작용 및 면역성을 방해한다. 이들은 또한 혈액으로 이동하거나 다른 조직들에 침윤하여, 종종 상이한 세포 유형의 비정상적 분포를 일으킬 수 있다. 백혈병의 예에는, 급성 임파구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 임파구성 백혈병(CLL), 유모 세포(hairy cell) 백혈병, 및 성인 T 세포 백혈병(ATL)이 있다. 백혈병은 임상적 특징에 따라 급성 또는 만성으로 구분된다.

백혈병과 대조적으로 임파종은 주로 임파 조직에 체류하는 세포의 종양적 변형체이다. 임파종은 통상적으로 호지킨(Hodgkin) 질환과 비-호지킨 임파종으로 분류된다. 호지킨 질환에서, 대부분의 세포는 T 세포 표현형을 갖는 작은 림프구이다. 모든 경우의 비-호지킨 임파종 90% 이상이 B 세포 기원이다.

대부분의 이들 질환의 치료는 지금까지 완전히 성공적이지 못했으며, 선행기술의 방법은 주로 화학요법 및 방사선의 사용에 집중되었다. 그러나, 현재까지 이들 치료는 일반적으로 오랜 기간의 차도 또는 치유를 나타낼 수 없다. 따라서, 이러한 질환, 특히 IL-2에 의존적인 종양 세포 증식의 안전하고 신뢰성이 있는 치료 방법이 필요하다.

IFN- γ 는 각종 감염물 및 감염질환에 대해 숙주를 방어시킬 수 있는 대식구의 강력한 활성체로서 인식되어 왔다. 감염에 대한 방어에서 IFN- γ 의 중요한 역할 때문에 IFN- γ 의 생성을 증가시킬 수 있는 조성물 및 방법이 필요하다.

면역체계는 많은 자연적 면역 반응과 적응적 반응을 수행하며, 이의 두가지 넓은 범위의 반응을 체액성 면역 반응과 세포성 면역 반응으로 부른다. 체액성 면역은 광범위하게 혈장 세포를 포함한 B 세포에 의한 항체 생성 및 작용으로 언급한다. 세포성 면역은 T-세포, 단핵구, 대식세포 및 조직세포를 포함한 세포에 의해 매개된다.

T-세포는 다양한 작용 또는 마커에 따라 더 분류된다. 예를 들어, T-세포는 T 헬퍼 세포 또는 T 억제 세포로서 분류될 수 있다. 추가로 T-세포는 세포독성적이 되거나 다른 보다 특수화된 작용을 수행하도록 활성화될 수 있다. 통상적으로, T-세포와 B-세포는 각각의 활성을 어느 정도 조절할 수 있는 상호 작용을 갖는다(참조 : Paul(ed.) Fundamentals of Immunology(2d ed.) Raven Press, New York (1989)).

상이한 항원에 대해서, 통상 서로에 대해 독자적인 양상으로 세포성 반응이나 또는 체액성 반응이 우세할 수 있다. 일부 질환(예 : 나병, 레쉬마니아증 및 일부 유형의 자가면역)의 중증도는 다른 부류의 반응들 보다 한 부류의 반응이 부적합하게 우세하기 때문일 수 있다[참조 : Mosmann et al., Immunol. Today 8:223 (1987); Mosmann et al., Ann. Rev. Immunol. 7:145 (1989); Parish, Transplant, Rev 13:35 (1972); and Liew, Immunol. Today 10:40 (1989)].

면역체계를 조절하는 기작중의 하나는 사이토킨이라 불리는 단백질의 생성을 수반한다. 림포카인은 T-세포 및 일부 B-세포에 의해 생성되는 사이토킨이고, 모노카인은 단핵구에 의해 생성되는 사이토킨이다. 당화될 수도 있는 사이토킨은 많은 면역 반응을 중재한다.

IL-4는 항체 생성 B-세포의 생성을 자극시킬 수 있는 사이토킨이며, 이는 또한 킬러 T-세포 또는 세포독성 T-세포의 성장을 촉진시킨다. IL-4는 또는 T-헬퍼세포 유형 1(Th1)의 활성을 억제시킬 수 있다. 이는 다시 보다 많은 B-세포의 생성 또는 보다 많은 B-세포에 의한 항체 생성을 억제시킬 수 있다. 따라서, IL-4는 내적 조절 기작의 일부이다.

IL-10은 많은 작용 또는 효과를 매개할 수 있는 사이토킨이다. IL-10은 마우스 및 사람 세포 모두에서 분리되었으며, T 헬퍼(Th) 세포의 상이한 부류 또는 서브세트의 면역 반응을 조절하는데 관련된다. Th 세포는 이들의 사이토킨 생성 특성에 의해 구분되는 상이한 서브세트로 분류될 수 있다.

일반적으로 항원 또는 유사 분열성 액틴에 의한 활성화후, Th1 T 세포 클론은 인터루킨-2(IL-2) 및 IFN- γ 를 생성하고, Th2 세포 클론은 IL-10, IL-4 및 인터루킨-5(IL-5)를 분비한다. 두 부류의 Th 세포 클론은 사이토킨, 예를 들어, 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 인터루킨-3(IL-3), 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 생성한다. Th 세포의 제3부류(Th0)는 IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, TNF- α , IL-3 및 GM-CSF를 동시에 생성한다.

Th1 및 Th2 세포의 상이한 사이토킨 생성 패턴은 이들의 헬퍼 기능을 반영한다. Th1 세포는 주로 지연형 과민반응에 관련되며, Th2 세포는 항체 생성에 관련된다. 항체(Th2 경로) 및 지연형 과민(Th1 경로)반응은 종종 서로에 대해 독자적 이므로, Th1 및 Th2 세포는 교차-조절적 효과를 갖는 것으로 생각된다. Th1 세포에 의해 생성되는 IFN- γ 는 Th2 세포의 증식을 억제시키고, Th2 세포에 의해 생성되는 IL-10은 Th1 세포 클론에 의한 사이토킨 합성, 특히 IFN- γ 및 IL-2 생성을 억제시킨다.

지연형 과민반응은, 일반적으로 T 세포 및 단핵구 및/또는 대식세포에 의한 조직의 부종 및 세포 침윤을 특징으로 하는 세포-매개성 면역반응이다. 일부의 사이토킨 세트는 별도로 지연형 과민반응 및 체액성 면역반응에 관련된다[참조 : Cher et al., J. Immunol. 138:3688 (1987); and mosmann et al., 1987 and 1989, 상기 참조]. 이들 부류의 반응과 관련된 질환은 관련 세트의 사이토킨의 부적절한 생성에 의해 유발될 수 있다.

염증성 장 질환(IBD)은 위장관 일부분의 만성적인 비-특이적 염증을 특징으로 하는 위장 질환의 한 그룹을 나타낸다. 사람에게서 IBD의 가장 두드러진 예인 궤양성 결장염 및 크론(Crohn)질환은 어린이의 성장 지연, 직장탈증, 혈변(예 : 흑혈변 및/또는 혈변배설), 식욕, 철 결핍 및 빈혈(예 : 철 결핍성 빈혈 및 만성 질환 또는 만성 염증의 빈혈)을 포함한 많은 증상 및 합병증과 관련된다.

IBD의 병인은 분명하지 않다[참조 : Wyngaarden and Smith(eds.) Cecil's Textbook of Medicine(W.B. Saunders Co. 1985), Berkow (ed.) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy (Merck Sharp Dohme

Research Laboratories, 1982), and Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th Ed., McGraw-Hill, Inc. (1991)].

궤양성 결장염은 주로 결장 점막에서 현시되는, 만성적, 비-특이적, 염증성 및 궤양성 질환이다. 이는 중증 출혈성 설사, 비정상적 경련, 혈변, 점액변, 권태, 발열, 빈혈, 식욕결핍, 체중 감소, 백혈구증다증, 저알부민혈증 및 상승된 적혈구 침강 속도(ESR)가 특징적이다. 합병증은 출혈, 독성결장염, 독성 거대 결장증, 이따금의 직장질 누공, 및 결장암 발생 위험 증가를 포함할 수 있다.

궤양성 결장염은 또한 결장과는 거리가 먼 합병증, 예를 들어 관절염, 강직성 척추염, 천장골염, 후포도막염, 결정성 홍반, 과지성 농피증, 및 상공막염과 관련된다. 치료는 질환의 중증도 및 지속시간에 따라 상당히 다양하다. 예를 들어, 탈수 및 적혈구 불균형을 막기 위한 유체 치료는 때때로 심각한 위험을 내뿜는다. 또한, 때때로 특별한 식이 요법이 유용하다. 투약은 다양한 코르티코스테로이드, 설파살라진 및 이의 유도체의 일부, 및 가능하게는 면역억제 약물을 포함한다.

크론 질환은 궤양성 결장염과 많은 공통된 양상을 갖는다. 크론 질환은, 병변이 인접한 정상적인 장과 선명하게 경계 지어지는 경향이 있는 반면, 이와는 대조적으로 궤양성 결장염의 병변은 상당히 확산된다. 또한, 크론 질환은 주로 회장(회장염) 및 회장과 결장(회결장염)을 병들게 한다. 일부의 경우엔, 결장만이 병들게 되거나(육아종성 결장염) 때때로 소장 전체(공회장염)가 포함되기도 한다. 드문 경우로, 위, 십이지장, 또는 식도가 포함되기도 한다. 병변은 임상 경우의 대략 절반 정도에서 유육종형 유사피 육아종을 포함한다.

크론 질환의 병변은 심부 궤양, 부종, 및 폐쇄 및 누공 형성시킬 수 있는 섬유증 뿐만 아니라 농양 형성을 포함한 경백성일 수 있다. 가끔 섬유증, 폐쇄, 누공형성 및 농양이 궤양성 결장염에서 나타나기는 하지만, 이는 통상 매우 얇은 병변을 만드는 궤양성 결장염과 대조적이다. 현재 치료는 두 질환 모두에 대해서 비슷하며, 스테로이드, 설파살라진 및 이의 유도체, 및 면역억제 약물(예 : 사이클로 스포린 A, 머캅토프린 및 아자티오프린)의 사용을 수반하며, 이들은 모두 강력한 부작용을 일으킬 수 있다.

자연형 과민반응 및 염증성 장 질환의 의학적 중요성 때문에, 이들 상태를 치료하기 위한 개선된 조성물 및 방법이 필요하다.

[발명의 요약]

본 발명은 상기한 상태들을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공함으로써 선행 요구들은 만족시킨다.

보다 특히, 본 발명은 유효량의 IL-10을 IL-2-의존적 종양 세포 증식에 걸린 포유동물에 투여하는 단계를 포함하여, IL-2-의존적 종양 세포 증식을 억제시키는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 IFN- γ 의 생성을 증가시키기에 효과적인 IL-4 및 IL-10에 대한 항체의 양을 환자에게 동시-투여하는 단계를 포함하여, 환자의 IFN- γ 수준을 증가시키는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 유효량의 IL-10을 염증성 장 질환에 걸린 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여, 포유동물에서 염증성 장 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 유효량의 IL-4 및 IL-10을 포유동물에게 동시-투여하는 단계를 포함하여, 포유동물에서 T 세포에 의한 사이토킨 생성의 억제를 강화시키는 방법을 제공한다. 이렇게 치료되는 포유동물로는 사람이 바람직하다.

본 발명은 또한 유효량의 IL-10을 투여하는 단계를 포함하여 포유동물에서 자연형 과민반응을 억제시키는 방법을 제공한다. 바람직한 양태에서, 유효량의 IL-4는 IL-10과 동시-투여된다.

바람직하게는 사람을 치료하기 위해 사람 IL-4 및 IL-10이 앞서의 방법에 사용된다.

[발명의 개시]

본원에 인용된 모든 참조 문헌은 그의 내용이 참조로 인용된다. 기술된 모든 핵산 서열은 좌측에서 우측으로 읽을 때 5'에서 3' 방향이 통상적이다. 표준 일문자 약어가 서열내 뉴클레오타이드 염기에 대해 사용된다(37 C.F.R. 1.822).

[사이토킨 및 항체의 공급원]

본 명세서에서 사용된, 인터루킨-4 또는 IL-4는 (a) 국제특허출원공보 제 WO 87/02990호의 제1C도에 실린 성숙한 사람 IL-4의 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 가지며 (b) 천연 IL-4와 공통된 생물학적 활성을 갖는 단백질을 의미한다. 아미노산 서열의 실질적 동일성은, 공개된 특허출원에 기재된 서열과 비교하여 또다른 IL-4의 서열이 동일하거나 생물학적 활성을 실질적으로 손상시키지 않은 하나 이상의 변형(결실, 첨가, 치환)에 의해 다르다는 것을 의미한다.

IL-4는 다양한 공급원, 예를 들어 젠자임 코퍼레이션(Genzyme Corporation : 메사추세츠주 캠브리지 소재)로부터 시판되거나, 천연 공급원 또는 재조합 DNA 방법(참조 : Sheehan et al., J. Immunol. 142:884 (1989) and Starnes et al., J. Immunol., 145:4185 (1990))을 이용하여 공지 방법으로 제조될 수 있다.

달리는, 공지된 IL-4 뉴클레오타이드 서열에 기초한 올리고뉴클레오타이드 탐침 혼합물을 사용하여 표준 방법으로 제조된 게놈성 또는 cDNA 라이브러리에서 IL-4 암호화 DNA를 동정할 수 있다. 이렇게 동정된 DNA는 제한 엔도뉴클레아제 절단에 의해 라이브러리로부터 절단시키거나 적합한 프라이머 및 폴리머라제 체반응(PCR) 방법(참조 : Saiki et al., Science 239:487 (1988))을 이용하여 제조하고, 서열 분석후, 진핵 발현 시스템에서 또는(필요한 경우 표준 방법으로 인트론 결실후) 원핵 또는 진핵 발현 시스템에서 또는(필요한 경우 표준 방법으로 인트론 결실후)원핵 또는 진핵 발현 시스템에서 발현시킬 수 있다. 물론, cDNA와 게놈성 DNA 라이브러리 모두를 올리고뉴클레오타이드 탐침 또는 PCR의 이용 대신 표준 발현 클로닝 방법을 적용시켜 스크리닝할 수 있다. 이렇게 생성된 IL-4는 면역화학 또는 생검법과 같은 공지 방법을 이용하여 검출할 수 있다.

사용된 IL-4는 사람 재조합 IL-4가 바람직하다. 비당화된 단백질(예 : 화학적으로 합성되거나 박테리아 발현 시스템에서 생성된 것) 뿐만 아니라 당화된 IL-4(예 : 진핵 발현 시스템에서 생성된 재조합 IL-4)가 사용된다.

본원에 사용된 인터루킨-10 또는 IL-10은 (a) 국제특허출원 공보 제 WO 91/00349호에 기술된 바와 실질적으로 같은 성숙한(예 : 분비 리더 서열 부족) IL-10의 아미노산 서열을 갖고, (b) 천연 IL-10과 공통된 생물학적 활성을 갖는 단백질로서 정의된다. 당화된(예 : 진핵 세포(예 : CHO 세포)에서 생성된) IL-10과 비당화된(예 : 표준 방법으로 화학적으로 합성되거나 이.콜라이에서 생성된) IL-10 모두가 사용될 수 있다. 또한 IL-10의 생물학적 활성을 갖는 BCRF1(엡스타인 바르 바이러스 바이러스성 IL-10; 또한 단순히 바이러스성 IL-10으로도 불림) 단백질을 포함한 유데인 및 기타 동족체도 포함된다. 국제 특허출원공보 제 WO 91/00349호는 IL-10 활성을 측정하는데 적합한 많은 시험관내 검정을 기술한다. IL-10의 많은 바람직한 변형이 본원에서 기술된다.

본 발명에서 사용하기에 적합한 IL-10은 많은 공급원으로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 이는 단백질을 분비할 수 있는 활성화된 T-세포의 배양 배지로부터 분리할 수도 있다. 또한, IL-10 또는 이의 활성 단편은 당분야에 공지된 표준 기술을 이용하여 화학적으로 합성할 수도 있다.(참조 : Merrifield, *Science* 233:341-47 (1986) and Atherton et al., *Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*, 1989, I.R.L. Press, Oxford).

재조합 사람 IL-10은 또한 예를 들어 페프로텍, 인코포레이티드(PeproTech, Inc : 뉴저지주 록키 힐 소재)로부터 시판된다.

달리는, 재조합 IL-10은 공지된 사람 IL-10 또는 바이러스성 IL-10 서열 정보를 이용하여 IL-4에 대해 상술한 바와 같이 제조할 수 있다. 재조합 사람 IL-10을 제조하는 방법이, 예를 들어 국제 특허출원공보 제 WO 91/00349호에 기술되어 있다. 사람 IL-10을 암호하는 서열을 포함하는 클론이 1989년 12월 20일 기탁 번호 68191 및 68192로 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland)에 기탁되었다. 웨스타인 바르 바이러스로부터 바이러스성 IL-10(BCRF1 단백질)을 클로닝하고 발현시키는 것이 문헌[참조 : Moore et al., *Science* 248:1230 (1990)]에 기술되어 있다.

사람의 치료에 다른 포유동물종의 IL-10 또는 바이러스성 IL-10이 대신 사용될 수 있으나, 바람직하게는 사람 IL-10이 사용된다. 가장 바람직하게는 사용되는 IL-10은 사람 IL-10이다.

공급원에 무관하게 IL-4 및 IL-10은, 이로써 제한되지는 않으나, 산 또는 염침전, 이온-교환 크로마토그래피, 금속 킬레이트화 크로마토그래피, 겔 여과, 신속한 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC), 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 예비 디스크 겔 또는 커튼 전기영동, 등전점 포커싱, 저온 유기 용매 분획화, 역전류 분배 및 면역 친화성 크로마토그래피를 포함한 표준 방법을 이용하여 정제할 수 있다.

항체는 표준 방법을 이용하여 IL-4 및 IL-10에 대해 제조될 수 있다. 본원에 사용된 용어 항체는 폴리클로날 및 모노클로날 항체(McAb) 모두를 말한다. 이는 또한 전체 면역 글로불린 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

폴리클로날 항체는 래빗, 래트, 염소, 양, 마우스 등과 같은 숙주 동물을 IL-4 또는 IL-10으로 면역화시켜 제조할 수 있다. 바람직하게는, 초기 주입후, 항체 역가를 증가시키기 위해 1회 이상의 부스터 주입을 수행한다. 이어서 동물로부터 채혈하고, 혈청을 준비한후, 항원으로서 폴리펩타이드를 사용하는 효소-결합된 면역흡착 검정(ELISA)으로 스크리닝한다. 면역글로불린 분획은 표준 방법으로 제조할 수 있다.

바람직하게는, IL-4 또는 IL-10의 면역원성은 많은 공지의 보조제중 하나와 배합하고/하거나 면역화전에 예를 들어 표준 방법을 이용하는 교차-결합에 의해 보다 큰 형태로 전환시켜 증가시킨다.

이렇게 면역화시킨 동물로부터 제조된 혈청은 직접적으로 사용될 수 있다. 달리는, IgG 분획은 혈장반출 또는 고정시킨 단백질 A와 같은 IgG 특이적 흡착제를 사용한 흡착 크로마토그래피와 같은 표준 방법으로 혈청으로부터 분리시킬 수 있다.

본 발명에 사용하는데 바람직한 모노클로날 항체는, 예를 들어 문헌[참조 : Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975); Eur. J. Immunol. 6:511 (1976)]에 기술된 바와 같은 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 필수적으로 동물을 상술한 바와 같이 면역화시켜 항체-분비 체세포를 만든다. 이어서 이들 세포를 골수종 세포에 융합시키시 위해 면역화시킨 동물로부터 적출한다.

항체, 특히 B 세포를 생성할 수 있는 체세포가 골수종 세포주와의 융합에 적합하다. 이들 체세포는 프라이밍된 동물의 림프절, 비장 및 말초혈로부터 유래될 수 있다. 래트 비장 세포가 마우스 골수종 세포주와 안정한 융합물 형성 비율(상대적 백분율)이 높으므로 이들의 비장세포가 종종 사용된다. 그러나, 대신에 사람, 마우스, 래빗, 양, 염소 또는 기타 세포를 사용할 수도 있다.

특수화된 골수종 세포주가 하이브리도마-생성 융합 공정에 사용하기 위해 림프구성 종양으로부터 개발되었다[참조 : Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511 (1976); Shulman et al., *Nature* 276:269 (1978); Volk et al., *J. Virol.* 42:220 (1982)]. 항체-생성 비장 또는 림프절 세포와 골수종 세포와의 하이브리드를 생성하는 방법은 종종 세포막 융합을 촉진시키는 작용물(들)(화학 물질, 바이러스 또는 전기)의 존재하에서 체세포를 골수종 세포와 각각 10:1의 비율(비율은 약 20:1 내지 약 1:1로 변할 수 있다)로 혼합하는 것을 수반한다. 융합 방법이 문헌에 기술되어 있다(참조 : Kohler and Milstein, 상기 참조 Geffer et al., *Somatic Cell Genet.* 3:231 (1977), and Volk et al., *J. Virol.* 42:220 (1982)]. 상기 연구자들에 의해 사용된 융합-촉진 작용물은 센다이 바이러스 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다.

융합 공정은 생존 하이브리드를 매우 낮은 빈도로 생성하므로(예를 들어 비장을 체세포의 공급원으로 사용하는 경우, 대략 매번의 1×10^5 개 비장 세포에 대해 단지 하나의 하이브리드 만이 수득된다), 나머지 융합되지 않은 세포(특히 융합되지 않은 골수종 세포)로부터 융합된 세포 하이브리드를 선별할 수단이 필요하다. 다른 생성된 융합된 세포 하이브리드중에서 목적하는 항체-생성 하이브리도마를 검출하는 방법도

또한 필요하다.

일반적으로, 융합된 세포 하이브리드의 선별은 하이브리도마의 성장은 지지하되 비융합된 골수종 세포의 성장은 억제시키는 배지중에서 통상 무한히 분열하는 세포를 배양하여 수행한다. 융합에 사용되는 체세포는 시험관내 배양에서 장기간 동안 생존하지 않으므로 문제가 되지 않는다. 예를들어, 하이포크산틴 포스포라이보실 트랜스퍼라제(Hprt-네가티브) 결핍된 골수종 세포가 사용될 수 있다. 이들 세포에 대한 선별은 융합된 세포 하이브리드가 비장 세포의 Hprt-포지티브 유전자형 때문에 생존하는 배지인 하포크산틴/아니노프테린/티미딘(HAT) 배지중에서 수행된다. 유전자형적으로 컴피턴트 하이브리드의 성장을 지탱하는 배지중에서 선별될 수 있는 상이한 유전적 결핍(약물, 민감성등)을 갖는 골수종 세포의 이용이 또한 가능하다.

융합된 세포 하이브리드를 선별적으로 배양하는데는 수주일의 걸린다. 이러한 기간중 초기에는, 목적하는 항체를 생성하고, 이에 따라 클로닝 및 증식시키게될 하이브리드를 확인하는 것이 필요하다. 일반적으로 수득된 하이브리드중 약 1내지 약30%의 범위가 일반적이기는 하지만 약 10%가 목적하는 항체를 생성한다.

항체-생성 하이브리드의 검출은 문헌(참조 : Kennet et al. (editors), *Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, pp. 376-384, Plenum Press, New York (1980))에 기술된 효소-결합 면역검정방법 및 방사선 면역검정법을 포함한 여러가지 표준 검정 방법중 하나로 수행할 수 있다.

일단 목적하는 융합된 세포 하이브리드가 선별되고 개개의 항체-생성 세포주내로 클론화되면, 각각의 세포주는 2가지 표준 방법중 하나로 증식시킬 수 있다. 하이브리도마 세포의 현탁액을 조직문화성 동물에 주입할 수 있다. 이어서 주입된 동물은 융합된 세포 하이브리드에 의해 생성되는 특이적 모노클로날 항체를 분비하는 종양을 발생시킬 것이다. 동물의 체액(예 : 혈청 또는 복수액)을 천자하여 모노클로날 항체를 고농도로 수득한다. 달리는, 개개의 세포주를 실험실 배양 용기내에서 시험관내에서 증식시킬 수 있다. 단일한 특이적 모노클로날 항체를 고농도로 포함하는 배양 배지를 경사분리, 여과 또는 원심분리로 수거한후 정제할 수 있다.

일단 목적하는 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마가 수득되면, 한 종의 모노클로날 항체의 결합 영역이 다른 종의 모노클로날 항체의 비-결합 영역과 조합된 중간 특이적인 모노클로날 항체를 생성하는 기술을 이용할 수 있다(참조 : Liu et al., *Proc. Natl. Acad. sci. USA* 84:3439 (1987)). 예를 들어, 설치류의 모노클로날 항체로부터 CDR을 사람 항체의 골격에 이식시켜 사람화 설치류 항체를 제조한다[참조 : Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988)]. 보다 특히, CDR은 사람 불변 영역이 있거나 없는 사람 항체 가변 영역으로 그라프트시킬 수 있다. 이러한 방법을 이용하여, 예를 들어 사람 인터루킨-2 수용체의 p55(Tac) 소단위에 대한 마우스 모노클로날 항체를 사람화시킨다[참조 : Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029 (1989)]

달리는, 사람 모노클로날 항체를 IL-4 또는 IL-10 및 문헌[참조 : Banchereau et al., *Science* 251:70 (1991)]에 기술된 방법을 이용하여 제조할 수 있다.

본 발명은 또한 Fab, F(ab')₂, Fv 단편 등과 같은 항체 결합 단편을 포함한다. 항체 단편의 사용 및 생성은 널리 공지 되어 있다. 예를 들어 Fab 단편[참조 : Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* (Elsevier, Amsterdam, (1985))], Fv 단편[참조 : Hochman et al., *Biochemistry* 12:1130 (1973); Sharon et al., *Biochemistry* 15:1591 (1976); Ehrlich et al., U.S. 특허 제4,355,023호] 및 항체 1/2 분자[참조 : Auditore-Hargreaves, U.S. 특허 제4,470,925호].

바람직하게는, 본 발명에 사용된 항체 및 항체 단편은 이들이 제조되는 IL-4 또는 IL-10에 특이적으로 결합하고 IL-4 또는 IL-10의 생물학적 활성을 중화시킨다.

[IL-2 의존성 종양 세포 증식의 억제]

하기 실시예에 나타난 바와 같이, 사람 및 바이러스성 IL-10은 사람 T 세포에 직접적인 영향을 끼친다. 사람 Th0-, Th1- 및 Th2-유사 세포의 증식 반응 모두는, Fcγ RII(CD32)로 감염된 L 세포가 항-CD3 모노클로날 항체 또는 항-CD2 모노클로날 항체의 유사 분열 생성쌍과 병용되는 경우, IL-10에 의해 억제되는 것으로 밝혀졌다. 또한, 사람 T-세포 클론의 항원-특이적 증식 반응은, 관련된 제11형 MHC 분자로 형질감염된 마우스 L 세포가 APC로서 사용되는 경우, IL-10에 의해 억제된다. IL-10은 형질감염된 제11형 MHC 유전자의 구성적 발현이 SV40 프로모터의 조절하에 있으므로 이 시스템에서 제11형 MHC 발현에 영향을 미치지 않는다.

IL-10의 억제 효과는 주로 mRNA 수준에서의 IL-2의 생성 억제를 통한 T 세포 클론상의 IL-10의 직접적 효과에 기인한다. 억제 효과는 IL-10이 IFN-γ, IL-4, IL-5 및 GM-CSF의 생성에 영향을 미치지 않으므로 IL-2에 특이적이다. IL-10과 IL-10 수용체의 상호 작용은 분명히 IL-2 합성을 특이적으로 억제하는 시그널화 경로를 출발시킨다.

다른 검정법을 이용하여 본 발명의 조성물의 효능을 입증 할 수 있다. 예를 들어, 누드 마우스 이종이식 모델을 사용할 수 있다. 이러한 모델은 다양한 화학요법제를 시험하는데 사용되어 왔다(참조 : Howard et al., *Cancer Res.* 51:3274 (1991) and McLemore et al., *Cancer Res.* 47:5132 (1987))

이러한 세포 증식은 B 세포 CLL과 같은 백혈병과 관련될 수 있다. 본 발명의 방법으로 치료되는 포유동물은 IL-2 의존성 종양 세포 증식에 걸린 사람 환자가 바람직하다.

IL-2 의존적 종양 세포 증식을 억제시키기 위한 본 발명의 방법은, 포유동물, 바람직하게는 종양 세포 증식에 걸린 사람 환자에게 치료학적으로 유효한 용량의 IL-10을 투여 하는 단계를 포함한다. 치료학적으로 유효한 용량의 제2의 생물학적 활성제가 또한 투여될 수 있다.

IL-10 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물은 통상적으로 정맥내로 투여된다. IL-10은 또한 리포솜내에 캡슐화 될 수 있다.

본원에서 사용된 용어 IL-2 의존성 종양 세포 증식은 증식이 조절되지 않으며 진행성이고 지속적 증식을 위해 IL-2에 의존적인 조직의 신규하거나 비정상적인 성장으로 정의된다. 성장은 양성 또는 악성일 수 있다. 악성 성장은 통상적으로 종양 세포에서 보다 높은 정도의 역행위축(탈분화)이 특징적이다. IL-2-의존적 종양 세포는 통상적으로 임파구주 또는 골수종주로부터 기원된다.

IL-2는 T 세포에 의해 생성되고 T 세포, NK 세포 및 B 세포를 포함한 다양한 세포 유형에 대해 다중 활성을 갖는다. IL-2는 T 세포 성장 인자로서 작용하고 IL-2의 존재하에 자극 되는 경우 T 세포에 의한 사이토키인의 생성을 증가시키는 것으로 나타났다. IL-2는 천연 킬러(NK) 세포를 활성화시켜 MHC 비-특이적 방식으로 표적 세포를 죽인다. 또한, IL-2는 지령받은 세포의 증대에 관련하여 이들 세포에 의한 항체 생성을 증가시킨다.

IL-2의 이러한 활성에 기초하여, IL-10에 의한 IL-2 생성의 억제가 몇몇 질환 상태에 중요할 수 있다. 예를 들어, 이는 T 세포 증식 및 성장이 바람직하지 않은 경우, 예를 들어 자가면역 질환형 자가면역 갑상선염, 인슐린-의존성 당뇨병, 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 낭창 및 다발성 경화증에서 T 세포의 IL-2 유도된 증식을 감소시키는 수단으로 사용될 수 있다.

또한, IL-2 유도된 T 세포 증대를 저하시키는 IL-10의 능력이 급성 숙주 대이식체 질환 및 만성 염증 질환(예 : 염증성 장 질환, 유육종 및 폐 섬유증)의 치료에 강력한 임상적 유용성을 갖는다. 또한, IL-4 및 IL-5의 강력한 생성자인 알레르기-특이적 T 세포의 IL-2-유도된 증식을 억제시킴으로써, IL-10은 천식 및 아토피성 피부염을 포함한 알레르기성 질환을 치료하는데 사용할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물로 치료될 수 있는 종양 성장을 수반하는 질환은, IL-2에 의존적인 것으로 공지된 백혈병 (예 : B 세포 CLL 및 ATL)을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물을 각종 약물 전달 수단에서 사용하기에 적합하다.[참조 : Langer, Science 249:1527 (1990)]. 투여 가능한 화합물을 제조하기 위한 방법이 공지되어 있거나, 당해 분야의 전문가에게 있어 명백할 것이며, 예를 들어 문헌[참조 : Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1985)]에 상세히 기술되어 있다.

본 발명에서 사용되는 IL-10은 약제학적으로 허용되는 매질, 예를 들어 염수, 인산염 완충 염수(PBS), 링거 용액, 텍스트로즈/염수, 행크 용액, 및 글루코즈 중의 제형으로 제조될 수 있다. 본 조성물은 생리학적 상태에 근접시키는데 필요한 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들어 완충제, 강장 조절제, 습윤제, 청정제등을 포함할 수 있다. 첨가제는 또한 부가적 활성 성분, 예를 들어 박테리아 살상제 또는 안정화제를 포함할 수 있다. 환자에게 투여되는 양은 투여되는 물질, 투여 목적(예 : 예방 또는 치료), 숙주의 상태, 투여 방식 등에 따라 다양할 수 있다.

약제학적 조성물은 통상적으로 경피 또는 비경구 투여, 예를 들어 정맥내, 피하 또는 근육내 투여된다. 경구 투여 형태도 또한 바람직하며 위의 환경을 우회시키기 위해 조성물은 변형시켜 제공할 수 있다. 본 조성물은 예방 및/또는 치료 처리에 사용될 수 있다. 바람직하게는 약제학적 조성물은 정맥내 투여된다. 따라서, 본 발명은 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체에 용해되거나 현탁된 IL-10 폴리펩타이드를 포함하는 무균 여과시킬 수 있다.

생성된 수용액은 그 자체로 사용하기 위해 포장되거나 동결건조 될 수 있으며, 동결건조된 제제는 투여전에 살균 수성 담체와 배합된다. IL-10은 또한 제2의 생물학적 활성제, 예를 들어 표준 화학요법제와 함께 투여될 수 있다. 이러한 제제는 빈크리스틴, 다우노루비신, L-아스파라기나제, 미톡잔트론 및 암사크린을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

치료학적 적용에서, 약제학적 조성물은 IL-2 의존적 종양 세포 증식을 억제 시키기에 충분한 양으로 환자에게 투여된다. 목적하는 효과를 얻는데 적합한 양을 치료학적 유효 용량으로 정의한다. 치료학적 유효 용량은, 예를 들어 치료가 행해지는 특정 용도, 투여방식, 환자의 건강 및 상태, 및 처방 의사의 판단에 따라 다양할 것이다. 예를 들어, 연속 주입을 위한 용량은 통상적으로 체중 70kg 환자에 대해 일일 약 500ng 내지 약 800 μ g, 바람직하게는 약 10 μ g 내지 약 300 μ g의 범위이다. 용량은 통상적으로 700ng/kg/일 내지 16 μ g/kg/일 이다.

약제학적 제형물중 IL-10의 농도는 약 10 μ g 내지 약 5mg/ml, 바람직하게는 약 100 μ g 내지 약 2mg/ml로 다양하게 변화할 수 있다. 그 농도는 통상적으로 주로 선택된 특정 투여방식에 따라 유체 용적, 점도등에 의해 선택된다. 따라서, 정맥내 주입을 위한 전형적인 약제학적 조성물은 250ml의 텍스트로즈/염수 용액 및 2.5mg IL-10을 포함하도록 제조될 수 있다.

고형 조성물에 대해서, 통상적인 무독성 고형 담체는, 예를 들어 약제학적 등급의 만니톨, 락토즈, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 탈슘, 셀룰로즈, 글루코즈, 슈크로즈, 탄산마그네슘 등이 사용될 수 있다. 경구 투여를 위해서, 약제학적으로 허용되는 무독성 조성물은 앞서 열거된 담체와 같은 통상 사용되는 부형제 및 활성 성분(즉, 본 발명의 IL-10 폴리펩타이드) 일반적으로 10 내지 95%, 바람직하게는 25% 내지 75%를 혼합시킴으로써 형성된다.

에어로졸 투여를 위해서, IL-10은 바람직하게는 계면 활성제 및 추진제와 함께 미세분된 형태로 공급된다. IL-10의 통상적인 비율(백분율)은 0.01 내지 20중량%, 바람직하게는 1내지 10중량%이다. 물론, 계면활성제는 무독성이고, 바람직하게는 추진제중에 용해되어야 한다. 이러한 작용물의 대표적인 것은 탄소수 6 내지 22의 지방산 에스테르 또는 부분 에스테르, 예를 들어 지방족 다가알콜 또는 이의 사이클릭 무수물(예: 에틸렌, 글리콜, 글리세롤, 에리트리톨, 아르비톨, 만니톨, 소르비톨, 소르비톨로부터 유도된 헥시톨 무수물)을 갖는 카프로산, 옥탄산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레스테르산 및 올레산, 및 이들 에스테르의 폴리 옥시에틸렌 및 폴리옥시프로필렌 유도체이다. 혼합 또는 천연 글리세라이드와 같은 혼합 에스테르가 사용될 수 있다.

계면활성제는 조성물의 0.1중량% 내지 20중량%, 바람직하게는 0.25 내지 5중량%를 구성할 수 있다. 조성물의 나머지는 일반적으로 추진제이다. 액화 추진제는 통상적으로 주위 조건에서 가스상이며 가압하에 응축된다. 적합한 액화 추진제중에는, 탄소수 5 이하의 저급 알칸, 예를 들어 부탄 및 프로판, 및 바람직

하게는 불소처리 되거나 불소와 염소 처리된 알칸이 있다. 또한 이들의 혼합물이 사용될 수 있다. 에어로졸 제조시, 적합한 밸브가 장착된 용기를 미세분된 펩타이드(들) 및 계면활성제를 포함하는 적합한 추진제로 충전시킨다. 성분들은 밸브 작용에 의해 방출될 때까지 승압하에 유지된다.

혈청 반감기를 늘리기 위해서, IL-10은 캡슐화되거나, 리포좀의 루멘으로 도입되거나, 콜로이드로서 제조되거나, 다른 통상의 기술이 이용되어 펩타이드의 유효시간을 연장시킬 수 있다. 따라서, 특정 태양에서, IL-10은 리포좀내로 캡슐화 될 수 있다. 리포좀 제조에 대해 다양한 방법이 이용된다[참조: Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), U.S. 특허 제4,235,871호, 제4,501,728호 및 제4,837,028호].

제조후, 리포좀은 목적하는 크기의 범위 및 비교적 좁은 리포좀 크기 분포를 가질 수 있도록 크기별로 분류할 수 있다. 리포좀을 목적하는 크기로 분류하는데 몇몇 기술이 이용 가능하며, 이중 하나가 미합중국 특허 제4,737,323호에 기술되어 있다.

가장 효율적인 캡슐화 방법하에서 조차, 초기 크기 분류된 리포좀 현탁액은 유리 형태의 약물을 50% 이상 포함할 수 있다. 리포좀 현탁액으로부터 캡슐화되지 않은 화합물을 제거시키기 위해 몇몇 방법이 이용 가능하다. 한가지 방법에서, 현탁액중의 리포좀은 고속 원심 분리기로 펠렛화시켜 유리 화합물 및 매우 작은 리포좀을 상등액에 잔류시킨다. 또다른 방법은 한외여과로 현탁액을 농축시킨후 농축된 리포좀을 대체 매질에 재현탁시키는 것을 수반한다. 달리는, 겔 여과를 이용하여 용질 분자로부터 큰 리포좀 입자를 분리시킬 수 있다.

상기한 처리를 수행한후, 리포좀 현탁액은 정맥내 투여에 사용하기 위해 목적하는 농도로 조절된다. 이는 예를 들어 원심 분리 또는 한외여과로 농축시킨 리포좀을 적합한 용적의 주입용 매질에 재현탁시키거나, 약물 제거 단계로 현탁액의 총용적을 증가시킨 현탁액을 농축시키는 것을 수반할 수 있다. 이어서 현탁액을 상술한 바와 같이 여과로 살균시킨다. 본 발명의 펩타이드를 포함하는 리포좀을 상술한 바와 같이 비경구로 투여할 수 있다.

[IFN- γ 의 증가된 생성]

본 발명의 방법은, IL-4 및 IL-10의 생성에 의해 환자의 면역계가 IFN- γ 의 생성을 억제시키는 감염성 질환을 앓는 경우 특히 유용하다. 대표적인 질환은 내장의 레쉬마니아증, 나병, 및 진균 감염을 포함한다. 대표적인 진균 감염은 칸디다(Candida), 파라코시디오이도미코시스(Paracoccidioidomycosis), 블라스토마이세스(Blastomyces) 및 크립토스피로이둠(Cryptosporidium)으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 진균속을 포함한다.

많은 감염성 유기체는 저수준의 IFN- γ 로부터 직접적으로 또는 간접적으로 이익을 본다. 이들 감염도 종종 만성적이고 감염원에 대한 Th2 대 Th1 반응의 불균형으로 예시된다. 이러한 불균형의 결과가 Th2 세포에 의한 IL-4 및 IL-10 생성에 따른 Th1 세포에 의한 IFN- γ 생성의 억제이다.

본 발명에 사용되는 항체는 환자에게 자가성인것이 바람직하다. 동일한 종의 세포로부터 유도된 비-자기 항체도 또한 유용하다. 상이한 종의 항체가 사용될 수 있으나, 가능한 해로운 면역반응(HBMA)를 조절하는 수단이 사용될 수 있다. 예를 들어, 사람화 래트 항체는 여러가지 다양한 결합성 단편과 같이 사람 환자에서 면역 반응을 최소화시킬 수 있다. 이 항체는 이들의 천연 수용체에 대한 IL-4 및 IL-10의 친화성에 근접하거나 초과하는 결합 상수를 갖는 것이 바람직하다.

상응하는 수용체에 대한 사이토킨의 100-배 미만 보다 큰 결합 상수를 갖는 항체가 바람직하다. 결합 비교는 표준 평형 방법으로 실시한다. 기본 기술이 문헌[참조: Chpt 25 of Vol. 1: Immunochimistry, Ed. D.M. Weir, 4th Ed. 1986, Blackwell Scientific Publ. 25.1-25.30]에서 기술되어 있다. 달리는, 표준 시험관내 생검으로 IL-4 또는 IL-10의 규정량을 중화시키는 항체의 몰과량을 측정하기 위한 검정법을 이용할 수 있다. 이러한 검정법의 예를 문헌[참조: Mosmann et al., J. Immunol. Methods 116:151 (1989) (IL-4) and Fiorentino et al., J.Exp. Med. 170:2081 (1989)]에서 찾을 수 있다. 타당한 범위는 주어진 양의 IL-4 또는 IL-10을 10 내지 1,000배 과량으로 중화시키는 항체의 범위이다.

본원에서 사용된 용어 동시-투여되는 IL-4 및 IL-10에 대한 항체가 이들이 환자에서 함께 존재하도록 시간적으로 충분히 근접하여 투여함을 의미한다. 투여의 특정 순서는 중요하지 않으며, 항체는 예비 혼합 또는 분리 투여로 동시에 또는 별도로 투여될 수 있다.

투여 수단은 통상적으로 비경구이며 정맥내 투여가 바람직하다. 항체는 표준 정맥내 기술을 이용하여 환자에게 주입될 수 있다. 항체를 먼저 살균된 생리학적으로 적합한 매질(예: 포스페이트 완충된 염수)중으로 현탁시킨다. 약제학적으로 허용되는 부형제, 예를 들어 레시틴, 글루코즈, 덱스트로즈, 항생제를 항체 내에 포함시킬 수 있다.

동시-투여되는 항체의 양은 체중 Kg당 항체 1 내지 10mg의 범위이다. 항체는 각각의 항체에 대해 혈청 ml 당 약 1 내지 150 μ g, 바람직하게는 10 내지 100 μ g의 순환 수준을 제공하는 양으로 투여되는 것이 바람직하다. 항체는 통상적으로 2 내지 7일의 반감기를 갖고, 항체의 수준이 목적 수준 이하로 떨어졌을때는 반복 투여가 적합하다. 혈청중 항체 수준은 통상적인 면역 검정법, 바람직하게는 ELISA 검정법을 이용하여 측정한다.

IL-4 및 IL-10에 대한 모노클로날 항체가 이러한 본 발명의 양태를 설명하는데 사용되지만, 다른 길항제도 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, IL-4 또는 IL-10 수용체에 특이적으로 결합하여 사이토킨 결합을 억제시키는 항체가 사용될 수 있다. 유사하게, 막투과 도메인이 부족한 IL-4 또는 IL-10 수용체의 가용성 형태가 사용될 수 있다. 마지막으로, 상응하는 수용체에 강력하게 결합하나 생물학적 활성이 부족한 IL-4 및 IL-10의 돌연변이체 길항제 형태가 사용될 수 있다. 야생형 사람 IL-4의 124 위치에 있는 잔기인 타이로신이 아스파르트산 잔기로 대체된 하나의 IL-4 돌연변이체 길항제가 문헌[참조: Kruse et al., EMBO J. 11:3237 (1992)]에 기술되어 있다.

길항제는 무균성 수성 혼합물을 사용하여 정맥내로 동시-투여되는 것이 바람직하다. 혼합물은 어떠한 약

제학적으로 허용되는 부형제(예: 무균 완충액, 염수, 항생제 등)라도 포함할 수 있다.

치료는 통상적으로 환자의 임상 반응으로 측정되는 것과 같이 감염이 조절되는 경우 종료된다. 통상의 항생제 치료도 또한 본 발명과 병용될 수 있다.

[염증성 장 질환]

용어 염증성 장 질환 또는 IBD는 궤양성 결장염 및 크론 질환을 포함하여 사용된다. IBD를 치료하기 위한 IL-10의 투여는 맥관 내와 같은 비경구 투여가 바람직하다. 가장 바람직하게는, 투여는 정맥내 투여이며 치료되는 포유동물은 사람이다.

투여되는 IL-10의 양은 일반적으로 체중 kg당 약 $1\mu\text{g}$ 내지 약 100mg 의 범위일 수 있다. 종종, 그 범위는 체중 kg당 약 $10\mu\text{g}$ 내지 약 $1,000\mu\text{g}$ 일 수 있다. 가장 바람직하게는 체중 kg당 약 $50\mu\text{g}$ 내지 약 $100\mu\text{g}$ 의 용량이 투여된다.

IL-10은 하나 이상의 추가의 치료제와 병용하여 동시투여되거나 단독 투여될 수 있다. 장 조직의 우연한 염증을 조절 하는데 유용한 작용물의 예에는, 코르티코스테로이드, 설파살라진, 설파살라진 유도체, 면역 억제 약물(예: 사이클로스포린A, 머캅토프린, 및 아자티오프린), 및 기타 사이토킨이 있다. 동시-투여는 연속적이거나 동시적일 수 있다. 동시-투여는 일반적으로 특정 시간 간격 동안 수용체에게 다수(2회 이상) 치료가 있다는 것을 의미한다. 통상적으로, 제2 작용물이 제1 작용물의 반감기 내에 투여되는 경우, 2개의 작용물은 동시-투여로 간주된다.

본 발명은 또한 포유동물로부터 취한 샘플의 IL-10 수준을 검정하는 단계를 포함하여 IL-10의 최적 이하의 수준이 특징적인 염증 상태의 발생에 대해 포유동물의 소인을 예측하는 방법을 제공한다. 최적 이하의 수준은 검출 가능하지 않은 양을 포함한다. 검출 가능한 수준은 IL-10의 공지된 정상 수준과 비교될 수 있다. 달리는, 시판되는 진단 키트를 사용하여 IL-1, IL-6, TNF 및 IFN- γ 와 같은 염증 매개체에 대해 검정할 수 있다.

이러한 매개체중 하나의 과잉생성은 불충분한 양의 IL-10이 활용되고 있다는 것을 나타낼 수 있다. 바람직하게는, 혈액이 샘플 공급원이다. 이 방법은 다수의 염증 상태, 예를 들어 IBD 또는 빈혈, 관절염, 피부염, 또는 기타 IBD와 관련된 증후군에 대한 소인을 예측 가능하게 한다.

약제학적 조성물이 또한 제공된다. IBD(예: 궤양성 결장염 또는 크론 질환)를 갖는 포유동물에게 투여하기 위한 조성물은 포유동물에서 IBD의 하나 이상의 증후군 또는 징후를 경감시키는데 효과적인 양의 IL-10 및 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

일반적으로, 용어 증후군은 환자의 상태 또는 질환의 특정한 주관적 증거를 언급한다. 여기에는 환자가 느끼는 것도 포함한다. IBD의 증후군의 예로는, 토사, 복통, 열, 흑색변, 혈변 및 체중 감량이 있다. 용어 징후는 일반적으로 실험실 평가로 나타나거나 초음파 검사 또는 방사선 사진 시험으로 나타나는 양성 또는 담당 의사에 의해 느껴지는 질환 또는 상태의 특정한 객관적 징후를 언급한다.

IBD의 징후에 대한 예에는 복부 팽창, 설염, 아프타성 궤양, 항문열상, 항문 주변 누공, 빈혈, 흡수불량 및 철분 결핍이 있다. 때때로, 징후와 증후군이 겹친다. 예를 들어, 혈변 (증후군)에 대한 환자의 불평과 변 샘플에 대한 실험실 시험은 출혈에 대해 양성이다(징후).

이러한 양태에 대한 본 발명의 약제학적 조성물은 바람직하게는 비경구 투여에 적합하다. 바람직하게는, 유효량은 앰플내 제시되는 단위 투여량이다. 달리는 유효량이 다수 투여량을 함유하는 바이알에 제시되거나 일부 다른 형태에 제공될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 첨가제의 예에는 비히클, 예를 들어 수성 비히클, 완충제, 희석제, 항미생물제 및 방부제가 있다.

사이토킨 자체의 생물학적 검정은 또한 IL-10 활성을 측정하는데 이용될 수 있다. 사람 임파독소에 대한 생물학적 검정이 문헌[참조: Aggarwal, Methods in Enzymology 116:441 (1985) and Matthews, et al., (Clemens, et al., eds.), Cytokines and Interferons: A Practical Approach: pp. 221-225 (IRL Press, Washington, D.C 1987)]에 기술되어 있다. 사람 IL-2 및 GM-CSF는 각각 ATCC 기탁 번호가 TIB 214 및 CCL 246인 ATCC로부터 입수 가능한 인자-의존성 세포주 CTLL-2 및 KG-1 으로 검정될 수 있다. 사람 IL-3은 연질 한천 배양물에서 조혈 세포 콜로니의 광범위한 형성을 자극하는 능력에 의해 검정될 수 있다[참조: Metclaf, The Hemopoietic Colony Stimulating Factors (Elsevier, Amsterdam, 1984)]. IFN- γ 는 항-바이러스 검정으로 정량될 수 있다[참조: Meager in Clemens, et al., (eds) pp 129-147]. 이들 사이토킨의 모니터링으로 유효량의 IL-10이 투여되는 경우의 유용한 정보를 제공할 수 있다. ELISA와 같은 면역화학적 검정도 또한 이용될 수 있다.

IL-10은 다양한 첨가제 및/또는 희석제의 존재 또는 부재하에 수성 비히클(예: 물, 염수 또는 완충된 비히클)중에 투여될 수 있다. 달리는, 아연 현탁액과 같은 현탁액이 IL-10을 포함하도록 제조할 수 있다. 이러한 현탁액은 피하(SQ) 또는 근육내(IM) 주사에 유용할 수 있다. IL-10 및 첨가제의 비율은 둘 모두가 유효량으로 존재하는 광범위하게 다양할 수 있다. 1회 투여량을 기준으로 하여, IL-10의 양은 약 $1\mu\text{g}$ 내지 약 100mg 의 범위일 수 있다.

총 일일 투여량은 통상적으로 체중 1kg 당 약 $1\mu\text{g}$ 내지 약 100mg 의 범위이다. 바람직하게는, 투여량은 체중 kg 당 약 $10\mu\text{g}$ 내지 약 $1,000\mu\text{g}$ 의 범위내에서 선택된다. 보다 바람직하게는, 투여량은 체중 kg 당 약 $50\mu\text{g}$ 내지 약 $100\mu\text{g}$ 의 범위내에서 선택된다. 투여량은 목적하는 치료 효과를 나타내며 장-단기에 걸쳐 주기적이거나 이러한 염증의 우연적 특성에 의해 나타나는 바와 같이 부정기적일 수 있는 스케줄에 따라 투여된다.

조성물은 체내에 경구 투여되거나 주사될 수 있다. 경구용 제제는 위장관내에서 일어나는 프로테아제에 의한 폴리펩타이드 분해를 막는 화합물을 포함한다. 주사는 통상 근육내, 피하, 피내, 또는 정맥내 주사이다. 달리는, 적합한 환경에서 동맥내 주사 또는 기타 경로를 이용할 수 있다. 또한, IL-10을 포함하는 조성물은 환자에게 이식되거나 약물 전달 시스템을 사용하여 주사될 수 있다[참조: Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24:199 (1984); Lewis, ed. Controlled Release of Pesticides and

Pharmaceuticals (Plenum Press, New York, 1981); 미합중국 특허 제3,773,919호 및 제3,270,960호].

바람직하게는, 펩타이드는 비경구적으로 바람직하게는 단위 투여량 주사 형태로 투여된다. 주사 형태의 예에는 액제, 현탁제 및 유제가 있다. 보다 바람직하게는, 유효량의 IL-10을 정맥내 투여한다.

본원에서의 용어 유효량은 자가면역 상태 또는 바람직하지 않거나 부적절한 염증성 또는 면역 반응의 증후군 또는 징후를 경감시키기에 충분한 양을 의미한다. 통상의 포유동물 숙주는 마우스, 래트, 고양이, 개 및 영장류(사람 포함)를 포함한다. 특정 환자에 대한 유효량은 치료해야 할 상태, 환자의 전체적 건강, 투여 방법, 경로 및 투여량, 및 부작용의 중증도와 같은 인자에 따라 다양할 수 있다.

적합한 투여량은 당 분야에 공지된 파라메타를 이용하여 임상 의에 의해 결정된다. 일반적으로, 투여량은 최적 투여량 보다 다소 적은 양으로 시작하여 목적하는 또는 최적 효과에 달할때까지 조금씩 증가시킨다. 일반적으로 문헌[참조: The Merck Manual 269 Pharmacokinetics and Drug Administration]을 참조한다. TNF α , IFN- γ , IL-1 및 IL-6 수준은 유효 투여량이 도달했을 때의 중요한 표지자이다. 바람직하게는, 치료되는 포유동물종으로부터 유도되는 IL-10이 사용될 수 있다.

통상적으로, IL-10은 약제학적 담체, 예를 들어 규정 염수, 링거 용액, 덱스트로즈 용액 및 당분야에 공지된 기타 수성 담체와 함께 주사된다. 적합한 비-수성 담체도 또한 사용될 수 있으며, 예를 들어 비휘발성 오일 및 에틸 올레레이트를 포함한다. 바람직한 담체는 염수중의 5% 덱스트로즈이다. 종종, 완충액과 같은 담체중의 첨가제 및 방부제 또는 등장성 및 화학적 안정성을 증가시키는 기타 물질을 포함하는 것이 바람직하다.

총 일일 투여량은 단일 주사로서 또는 연속 주입으로 투여할 수 있다. 달리는, 거한 정맥내 투여 또는 근육내 주사와 같은 다른 경로로 투여하기 위해 수개의 소투여량으로 분할될 수 있다. 바람직하게는, IL-10은 정맥내 거환으로 투여된다.

IL-10은 단독으로 또는 다른 치료제와 배합하여 투여될 수 있다. 염증성 장 징후에서 이러한 치료제의 예로는 코르티코스테로이드, 설파살라진, 설파살라진 유도체, 및 사이클로스포린 A, 머캅토류린 및 아자티오프린과 같은 선택된 세포독성 약물이 있다. 통상적으로, 다수의 투약물을 나누어 주입하거나 연속적으로 주사한다. 적합한 환경에서, 다수의 투약물을 혼합하고 다른 사이토킨, 스테로이드, 또는 다른 치료제와 함께 동시에 주입하거나 주사한다.

IBD 증후군은 우연적일 수 있으므로 효과적인 치료는 적절한 순간에 소투여량으로 투여하여 수행할 수 있다는 것을 주목해야 한다. 달리는, 소량의 연속적 투여로 병을 앓는 표적 동물을 오랫동안 아무일 없이 건강하게 할 수 있다.

동시-투여는 동시적이거나 연속적일 수 있다. 일반적으로, 동시-투여는 특정한 시간 간격 동안 수용체에 사이토킨이 모두 존재한다는 것을 의미한다. 통상적으로, 투여될 제1 사이토킨의 반감기내에 제2 사이토킨이 투여되는 경우, 2개의 사이토킨은 동시-투여되는 것이다. 바람직하게는, 동시-투여는 비경구적이며, 보다 바람직하게는 정맥내이다. 유효량은 포유동물의 체중 kg당 약 15 μ g 내지 약 1,500 μ g의 범위에서 선택된다.

[지연형 과민반응의 억제]

이러한 양태의 본 발명은 포유동물에게 유효량의 IL-10을 투여하는 단계를 포함하여 포유동물에서 지연형 과민반응을 억제시키는 생체내 방법을 제공한다. 유효량의 IL-4를 IL-10과 함께 포유동물에게 동시-투여할 수 있으며, 포유동물은 통상적으로 사람이다. IL-4 및 IL-10의 동시-투여는 동시적이거나 연속적일 수 있다. 통상, 투여는 비경구적, 바람직하게는 맥관내이다.

추가로, 본 발명에 의해 포유동물 신체의 염증 부위의 세포 이동을 억제시키는 방법이 제공된다. 세포 이동은 염증 부위에 대한 림프구, 단핵구, 및 대식세포를 포함하는 포유동물의 세포 면역 반응의 보충 또는 유인을 말한다. 또한, 포유동물 조직의 부기(swelling)를 억제시키는 방법이 제공된다.

상기한 방법은 비경구적(예: 맥관내)이거나, 국소 염증에 근접하여 IL-4 및/또는 IL-10을 투여하는 것을 포함할 수 있다. IL-4 또는 IL-10의 유효량은 통상 포유동물의 체중 kg당 약 15 μ g 내지 약 1,500 μ g의 범위 중에서 선택된다.

본 발명은 또한 포유동물에게 유효량(포유동물 체중 kg당 약 15 μ g 내지 약 1,500 μ g의 범위 중에서 선택된다)의 각각의 IL-4 및 IL-10을 동시-투여(비경구적)하는 단계를 포함하여, 포유 동물에서 지연형 과민반응을 제한시키는 생체내 방법을 제공한다. 유효량은 약 100 μ g 내지 1,000 μ g의 범위중에서 선택될 수 있다.

또한, 본 발명은 포유동물에서 T세포에 의한 사이토킨 생성의 IL-10 매개성 억제를 강화하기 위한 키트를 포함한다. 이 키트는 IL-4 및 IL-10의 혼합물의 단위 투여량을 함유하는 앰플로 구성된다. 앰플 대신에 몇가지 다른 용기가 사용될 수가 있다. 예로는 바이알, 플라스틱 백, 유리시험관 등이 있다. 바람직하게는, IL-4 및 IL-10의 혼합물은 비경구 투여용으로 적합한 형태로 존재한다. 단위 투여량은 전형적으로 포유동물의 체중 kg당 각각 IL-4 및 IL-10의 약 15 μ g 내지 약 1500 μ g의 범위에서 선택한다.

본 발명의 근간이 되는 개념은 T-세포 활성화에 대한 IL-4와 IL-10의 공조효과이다. 본 발명은 처음에는 이와 같은 공조 효과가 T-세포가 특이적으로 관련되어 알려진 것으로 나타났다. 선행 데이터는 대식세포 또는 단핵구 및 대식세포의 작용제 역할에 대한 지시된 효과를 언급하고 있다. T-세포 활성화에 대한 IL-4 및 IL-10의 부가 효과는 놀라운 것이며 특히 세포 매개성 면역성에 대한 추가의 치료적 용도를 지지하고 있다. IL-4와 IL-10의 배합이 IL-10 매개된 T-세포 사이토킨 생성의 억제를 강화시키기 때문에, 본 발명은 사이토킨 생성과 관련하여 T-세포 반응을 조절하고자 한다면 언제라도 유용할 수 있다. 이의 예로는 지연형 과민반응, 세포 매개성 염증(CMI) 및 T-세포 증식과 활성화에 대한 효과이다.

예를 들어, 자가면역 질환 당뇨병 증후군 타입1은 임파구, 대식세포 및 혈장 세포내로의 미세포(islet cell)의 침윤을 특징으로 한다. T-세포에 의한 사이토킨 생성의 억제는 당뇨병의 증상 및 미세포 손상을

완화시킨다. 또한, 본 발명은 기관이식 및 이식체와 관련된 세포-매개성 면역반응의 치료에 관여한다.

신장거부는 세포 매개성 면역성을 포함하는 것으로 알려져 있다. 이식된 신장 부위에서의 사이토킨은 세포 활성화, 증식, 응집, 피브로겐형성, 성장 억제 및 세포독성을 유발시킨다. 유사하게, 본 발명은 GVHD의 치료에 유익한 역할을 할 수 있다. 또한, 임파구증식성 질환인 유육종증은 감소된 DTH의 증거 및 후에 녹내장을 일으키는 활성화된 T 또는 헬퍼세포와 관련되어 있다.

[실시에]

본 발명은 다음의 비제한적인 실시예에 의해 설명될 수 있다. 달리 나타내지 않는 한, 고체 혼합물중의 고체, 액체 중의 액체 및 액체중의 고체에 대해 하기 나타낸 %는 각각 wt/wt, wt/vol 기준이다.

[IL-2 의존성 종양세포 증식의 억제]

[실시예 1]

IL-10은 CD32로 형질감염시킨 마우스 L 세포상에 교차결합시킨 항-CD3 모노클로날 항체에 의해 활성화된 후, 사람 Th0, Th1 및 Th2 유사 클론의 증식을 억제한다.

[세포 및 세포주]

이용된 세포주는 $CD2^+$, $CD3^+$, $CD4^+$ 및 $CD8^-$ 이다. 클론 HY-06, 827 및 837은 이미 기술된 바 있다[참조: Yssel, et al., Eur. J. Immunol. 16:1187 (1986) and Haanen, et al., J. Exp. Med. 174:583 (1991)]. T 세포 클론 827은 HLA-DR3과 관련하여 파상풍 독소(TT)를 인지하며 T 세포 클론 HY-06은 마이코박테리움 레프레(*Mycobacterium leprae*)의 65kD 열 쇼크 단백질로 부터의 펩타이드 2~12를 인지한다. T 세포 클론 837의 항원 특이성은 알려져 있지 않다.

T 세포 클론 SP-B21과 SP-A3는 태아 흉선과 태아 간 이식술을 성공적으로 시술한 심각한 합병증 면역결핍증(SCID)으로 고생하는 환자로부터 수득한다[참조: Roncarolo, et al., J. Exp. Med. 168:2139 (1988)]. T 세포 클론 NP12, NP14 및 NP44는 아토피성 환자의 PBMC로부터 확립되었고 집먼지 진드기의 주된 알레르겐인 Der p I 분자의 p89-117 펩타이드에 반응시켜 특이적으로 증식시킨다[참조: Yssel, et al., J. Immunol. 148:738 (1992)]. T 세포 클론 CR253, CR378, CR380, AP74 및 AP75는 만성 라임 관절염(Lyme arthritis)으로 고생하는 환자로부터의 PBMC로부터 분리하였으며 보렐리아 버그도르페리(*Borrelia burgdorferi*) 60 kD 열 쇼크 단백질 동족체(HSP60)와 반응성이다[참조: Shanafelt, et al., J. Immunol. 146:3985 (1991)].

이들 T 세포 클론은 이들의 림포카인 생성 프로파일로 인해 T 헬퍼 서브세트로 칭해왔다(표 1 참조). T 세포 클론(2×10^5 세포/ml)을, 전술한 바와 같이, 24웰 린브로 플레이트(참조: Flow, Mc Lean, VA)에서 ml당 10^6 개의 조사(4000라드)시킨 이질유전자성 말초혈액 백혈구(PBL), 앱스타인-바르 바이러스 형질전환시킨 B 세포주(EBV-LCL)JY ml당 10^5 개의 조사시킨(5000라드) 세포 및 0.1mg/ml의 정제시킨 PHA(영국 켄트 백켄함 소재의 Wellcome Diagnostics사 제조)로 구성된 세포 혼합물을 공급하여 2주 간격으로 자극시킨다[참조: Spits, et al., J. Immunol. 128:95 (1982)]. 각각의 재자극 3내지 4일후, 배양물을 분할하고 200U/ml rIL-2를 함유하는 매질중에서 더 확장시킨다. 클로닝된 모든 T 세포주 및 EBV-LCL을, 1% 사람 AB⁺혈청을 보충한 Yssel의 배지[참조:Yssel, et al., J. Immunol. Methods. 72:219 (1984)]에서 배양한다.

CD32(Fc γ RII)(16.2 CG7)로 형질감염시킨 마우스 L 세포를 본원에서 참고로 인용하고 있는 문헌[참조: Peltz, J. Immunol. 141:1891 (1988)]에 따라 제조한다. 간단하게, 사람 단백질 세포주 U937 돌연변이체로부터 분리한 Fc γ RII cDNA 클론 16.2를 사용한다[참조: Stuart et al., J. Exp. Med. 166:1668 (1987)]. 표준 위치 특이적 돌연변이 발생기술을 사용하여, 예상되는 세포질 영역의 처음 아미노산(아르기닌) 후에, 두개의 라이신 코돈을 정지코돈으로 변화시키는 돌연변이를 발생시켜 세포질 영역이 결핍된 돌연변이체를 작제한다. 표준기술에 따라 마우스 L 세포의 일시적 형질감염을 수행한다.

[시약]

재조합 IL-10을 이.콜라이내에서 발현시키고 문헌에 따른 방법으로 정제한다[참조: Waal Malefyt et al., J. Exp. Med. 174:915 (1991) 및 W0/91/00349 상기 참조].

[증식 분석]

클로닝된 T 세포는 공급 세포로 자극시킨지 10일 내지 12일후에 사용한다. 이 단계에서, T 세포 클론은 작고 휴지 상태에 있다. T 세포 클론(2×10^4 세포/웰)을 항-CD3 mAb(SPV-T3b)(1 μ g/ml)의 존재하에 CD32 형질감염된 L 세포(2×10^4 세포/웰)와 200 μ l 평저 플레이트(뉴저지주 링컨 파크 소재의 Becton Dickinson사 제조)에서 배양한다[참조: Spits, et al., Hybridoma 2:423 (1983)]. T 세포를 가하기 전에, L 세포를 IL-10(100U/ml)의 존재 또는 부재하에 mAb(1 μ g/ml)와 1시간 미리 배양한후 72시간 배양한다. L 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 45분간 마이토마이신 C(미저리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Chemical Co. 사 제조)(50mg/ml)로 처리하고 이어서 사용하기 전에 4회 세척한다. 세포를 37 $^{\circ}$ C 및 50% CO $_2$ 에서 72시간 배양하고 [3 H]TdR로 4시간 펄스처리하며 문헌[참조: Yssel, et al., Eur. J. Immunol. 16:1187 (1986)]에 기술한 바와 같이 수거한다. 결과는 [3 H]TdR 혼입의 cpm으로서 나타내며 3중 배양물의 평균을 표시한다.

T 세포 클론의 증식에 대한 IL-10의 영향은 T 세포 림포카인 생성 패턴에 따라 달라지지는 않는다. T 세포 클론 837, SP-B21 및 827은 활성화됨에 따라 IL-2, IL-4, IFN- γ 를 생성하며 따라서 이들은 사람 Th0 클론을 나타내는 것으로 간주된다. HY-06, CR 253, CR 378, CR 380, AP 74 및 AP 75는 고수준의 IFN- γ 를 생성하며 검출되지 않거나 낮은 농도의 IL-4 및 IL-5를 생성한다. 이들 클론은 사람 Th1 유사 클론을 나타내는 것으로 간주되나, NP 12와 NP 44는, 이들이 이들의 특이적 항원에 의해 활성화된후, 고농도의 IL-4와 IL-5 및 검출되지 않거나 또는 저농도의 IFN- γ 를 생성하기 때문에 사람 Th2 유사 클론을 나타낸다.

T 세포 클론 SP-A3는 IL-2, IL-5, IFN- γ 및 GM-CSF를 생성하나 활성화후 IL-4를 생성하지는 않는다.

표1에 나타난 바와 같이, IL-10은 활성화후 T 세포 클론 837, SP-B21, SP-A3, 827, HY-06, CR 253, CR 378, CR 380, AP 75, NP 12 및 NP 44의 증식을 억제시킨다. 따라서, IL-10은 모든 T 헬퍼 서브세트에 포함되는 T 세포 클론의 증식을 억제할 수 있다. 일반적으로, IL-10은 본 발명의 시험 조건하에서 T 세포 클론의 증식을 20 내지 50% 억제한다. 이러한 억제는 투여량 의존적이고 특이적인데 이는 중화성 항-IL-10 mAb 19F1에 의해 역전될 수 있기 때문이다.

[표 1]

CD32(Fc γ R II) 형질감염시킨 L 세포에 교차결합 항-CD3 mAb에 의한 활성화후 사람 Th0, Th1 및 Th2 클론의 증식 반응에 대한 IL-10의 영향.

T 세포 클론 타입	T 세포 클론	[3 H]TdR 혼입(cpm $\times 10^{-3}$)	
		대조군	+IL-10 (100U/ml)
T 헬퍼 0	837	69	51
	SP-B21	88	51
	827	5.5	3.5
	SP-A3	28	12
T 헬퍼 1	HY-06	11	8
	CR 253	12.8	10
	CR 378	14.9	4.3
	CR 380	19.8	8.5
	AP 74	22	9
	AP 75	38	33
T 헬퍼 2	NP 12	72	49
	NP 44	15.3	7

중 특이적인 쥐과 IL-10은 이들 사람 T 세포 클론의 증식에 아무런 영향이 없다. 이 같은 사실은 IL-10이 T 세포 클론에 직접적으로 작용하며 항-CD3 mAb를 교차 결합시키는데 사용된 CD32 형질감염된 마우스 L 세포를 통해서 작용하지 않음을 나타낸다. 이 같은 결과는 IL-10이, CD32로 형질 감염된 L 세포상에 교차 결합된 항-CD3 mAb에 의한 TCR/CD3 복합체를 통해 활성화된후, 사람 Th0, Th1 및 Th2 클론의 증식을 직접적으로 억제함을 나타낸다.

[실시예 2]

IL-10은, ICAM-1, LFA-3 또는 B7에 의해 제공되는 동시자극성 시그널과 무관하게 CD4 $^{+}$ T 세포 클론의 증식을 억제한다.

사람 T 세포 클론의 활성화는 T 세포상의 보조분자와 항원 제공성 세포(APC)상의 이들의 카운터 구조물과의 상호작용에 의해 조절될 수 있다. LFA-1과 ICAM1, CD2와 LFA3, CD28과 B7 또는 CTLA-4와 B7간의 상호작용은 T 세포의 증식 및 작용자 기능을 향상시키는 동시자극성 시그널을 제공하는 것으로 나타났다. 이들 보조분자의 동시자극성 작용에 영향을 가함으로써 IL-10이 T 세포 증식을 억제하는지의 여부를 알아보기 위해 CD32 및 ICAM-1을 발현시키는 L 세포, LFA-3 또는 B7를 작제한다.

[pCD-SR α -LFA-3HYG, pCDM8-ICAM-1 HYG 및 pBJ-B7 HYG의 작제]

LFA-3 cDNA는 LFA-3 특이적 프라이머를 사용하여 PCR 증폭으로 라지(Raji) cDNA 라이브러리로부터 수득한다. 이 라지 cDNA 라이브러리는 앞서 기술한 바와 같이 pCD-SRa 벡터에서 작제한다[참조: Matsui et al., Science 154:1788 (1991)]. 다음의 프라이머가 LFA-3의 막투과형의 클로닝을 위해 사용되었다:

센스: 5'-GGCTGCAGCGACGAGCCATGGTTGCTGGGAGCGACGCG-3'

(nt 1-30) 및

안티센스: 5'-TTCATCTTCTGGTACCAATCAATTGGAGTTGGTTC-3'

(nt 780-745).

LFA-3 센스 프라이머는 Pst-I 부위, 및 증폭된 생성물의 편리한 아클로닝에 적합한 Kpn-1 부위를 갖는 LFA-3 안티센스 프라이머를 써서 디자인한다. 증폭은 다음의 조건하에서 수행한다: 1 μ g의 Hind-III 분해시킨 라지 라이브러리의 플라스미드 DNA를 25nmol의 각각의 프라이머, 125mM의 각각의 dGTP, dATP, dCTP 및 dTTP(스웨덴 읍살라 소재의 Pharmacia사 제조), 50mM KCl, 10mM 트리스-HCl, pH 8.3, 1.5mM MgCl₂, 1mg/ml 젤라틴 및 5단위의 Taq 폴리머라제(코벡티커트주 뉴 헤이븐 소재의 IB사 제조)를 함유하는 50 μ l 반응액중에서 증폭시킨다.

이 혼합물을 퍼킨-엘머/세투스 CNA 열 사이클러에서 20 사이클 동안 배양한다(94 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 어닐링, 72 $^{\circ}$ C에서 60초간 연장). 5 μ l의 분취량을 얻어내고 동일한 조건하에서 제2 라운드 증폭을 실시한다. 반응물을 CHCl₃로 추출하고 1% 아가로스 겔상에 부하시킨다. 785bp의 추정 사이스를 갖는 증폭 생성물을 분리후 겔로부터 절단해내고 제네클린(Geneclean) 키트(캘리포니아주 라졸라 소재의 Bio 101사 제조)를 사용하여 실리카상에 흡착시켜 분리하고 Pst-1 및 Kpn-1으로 절단시키며 블루스크립트 II KS(+)(캘리포니아주 라졸라 소재의 Stratagene사 제조)에서 아클론시킨다.

LFA-3를 함유하는 다수의 클론을 표준기술로 분리해내고 4개의 클론을 세쿼나제 DNA 서열화 키트(오하이오주 클리브랜드 소재의 USB사 제조)를 사용하여 디데옥시 말단화 방법으로 서열화시킨다. 전체 4개 클론이 공개된 서열과 100% 동일했다. 이들 클론중 하나의 Pst-1-Kpn-1 단편을 분리시키고, pCD-SR α 296 발현 벡터내에서 아클론시킨다. [참조: Matsui et al., 상기참조]. pCDM8-ICAM-1[참조: Blanchard et al., J. Immunol. 138:2417(1987)]은 브리안 시드박사(마이애미주 보스턴 소재의 메사추세츠 종합병원)로부터 얻은 것이다. 하이그로마이신-B 내성을 암호화하는 아미노사이클리톨 포스포트랜스퍼라제 유전자는 SV-40 프로모터와 폴리아데닐화 시그날의 조절하에 있으며, 표준기술로 pCD-SR α -LFA-3와 pCDM8-ICAM-1의 Sfi-I 부위에 삽입시켜, 각각, pCD-SR α -LFA-3HYG와 pCDM8-ICAM-1 HYG를 수득한다. pB-B7-HYG는 SR α 프로모터의 조절하에 있는 사람 B7을 함유하며[참조: Makgoba et al., Nature 331:86 (1988)], 엘. 라니에르박사(DNAX Research Znstitute)로부터 얻은 것이다.

HLA-DR3 또는 CD32를 발현시키는 L 세포를, 제조자의 지시에 따라 리포펙션(lipofection)(미들랜드주 게티스버그 소재의 BRL사 제조)으로 pCD-SR α -LFA-3-HYG, pCDM8-ICAM-1-HYG 또는 pBJ-B7-HYG에 형질감염시킨다. 형질감염후 48시간뒤에 세포를 분리시키고 200 μ g/ml 하이그로마이신-B(인디애나 인디애나폴리스 소재의 Lilly사 제조)를 함유하는 배지를 가하고 매 3일마다 교체시킨다.

12일후 개개의 하이그로마이신-B 내성 콜로니가 보이게 된다. 이들 세포를 모아 간접 면역형광으로 LFA-3, ICAM-1 또는 B7의 발현에 대해 염색한후 FACS-스타 플러스상에서 2회의 연속적 양성 분류 라운드로 정제한다. 동시감염시킨 세포주를 200 μ g/ml 하이그로마이신-B 및 10% FCS를 보충한 RPMI-1640중에 유지시킨다.

FACS 분석을 위해, 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 정제한 mAb(10 μ g/ml)와 V-저미세역가 플레이트(버이지니아주 맥킨 소재의 Flow Laboratories사 제조)에서 배양한다. 0.02mM 나트륨 아자이드와 1% BSA(미저리주 세인트루이스 소재의 Sigma사 제조)를 함유하는 PBS로 2회 세척한 후 세포를, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 염소 항-마우스 항체의 1/40 희석시킨 FITC 표지된 F(ab')₂ 단편(캘리포니아주 벌링게임 소재의 TAGO, Inc. 사 제조)과 배양한다. 추가로 3회 세척한 후, 표지된 세포 샘플을 FACScan(캘리포니아주 서니베일 소재의 Becton Dickinson 사 제조)상에서 유동 미세불소측정기(FMF)로 분석한다. 항-LFA-3 mAb TS 2/9를 사용한다[참조: Krensky, et al., J. Immunol. 132:2180 (1984)]. 항-ICAM-1 mAb LB2 및 항-B7 mAb L307을 사용한다[참조: Azuma, et al., J. Exp. Med. 175:353 (1992)].

T 세포 클론을, IL-10의 존재 또는 부재하에 CD32와 ICAM-1, LFA-3 또는 B7을 동시발현시키는 L 세포상에 교차결합된 항-CD3 또는 항-CD2 mAb로 활성화시킨다. 클론을, ICAM-1 및 LFA-3를 동시발현시키는 CD32 형질감염시킨 L 세포에 의해 나타내지는 항-CD3 mAb로 자극시킬 때 T 세포 클론 SP-R21 및 NP 12의 증식이 증가됨이 관찰되었다. LFA-3의 동시발현은 ICAM-1 또는 B7과 비교하여 T 세포 클론의 증식을 증진시키는 데 보다 효율적이며 일정하게 2 내지 4배의 증식 증가가 나타난다. ICAM-1의 동시발현에 의해서는 단지 미온적인 증식 증가가 나타났다. B7은 일반적으로 T 세포 클론의 증식에 영향을 주지 않았다.

IL-10은, 심지어 ICAM-1, LFA-3 및 B7의 존재하에서도 CD32에 의해 형질감염된 L 세포상에 교차결합된 항-CD3mAb로 활성화시킨 후에도 T 세포 클론의 증식 반응을 억제한다. 그러나, LFA-3를 발현시키는 L CD32 세포에 의해 활성화되는 T 세포 클론 증식의 IL-10에 의한 억제는 그리 현저하지 않다.

T 세포 클론의 증식은 또한, T 세포 클론 SP-B21 및 NP-12에 대한, L CD32 세포상에 교차결합된 항-CD2

mAb의 유사 분열적 배합에 의해 유도할 수도 있다. T 세포 클론(2×10^4 세포/웰)을, 상술한 바와 같이, 200 μ l 환자 플레이트(버어지니아주 맥린 소재의 Flow Laboratories 사 제조) 중에서 항-CD mAb X11-1 (0.5mg/ml) 및 D66(0.5mg/ml)로 촉진시킨다. 이들 항체의 제조는 문헌을 참조한다[참조: Brottier, J. Immunol. 135:1624 (1985)].

T 세포 증식은 ICAM-1 또는 LFA-3가 동시발현될 경우에 영향 받지는 않는다. 그러나, 증식의 완만한 증가는 CD32와 B7을 동시발현시키는 L 세포가 사용될 때 관찰된다. T 세포 클론의 항-CD2 유도성 증식은 또한 CD32 및 ICAM-1, LFA-3 또는 B7을 발현시키는 L 세포가 사용될 때 IL-10의 존재하에 30 내지 50%가 억제된다. IL-10은 T 세포 클론에 의한 LFA-1, CD2 또는 CD28의 발현에 영향을 주지는 않는다. 전체적으로, 이 같은 결과는, T 세포 증식에 대한 IL-10의 직접적 억제 효과가 ICAM-1, LFA-3 또는 B7에 의해 제공되는 동시자극성 시그날에 의한 변화의 결과가 아님을 나타낸다.

[실시예 3]

IL-4가 아닌 IL-2는 IL-10에 의한 T 세포 증식 억제를 역전시킬 수 있다.

IL-2 또는 IL-4의 첨가가 IL-10에 의해 유도된 T 세포 증식의 억제를 역전시킬 수 있는 여부를 알아보기 위해, T 세포 클론을, IL-2 또는 IL-4 존재하에 CD32 및 ICAM-1, LFA-3 또는 B7을 발현시키는 L 세포상에 교차결합시킨 항-CD3 또는 항-CD2 mAb로 활성화시킨다. IL-2를 20U/ml 및 IL-4를 200U/ml로 가한다. 정제된 사람 γ -IL-4(비활성 2×10^7 U/mg)는 슈링-플라우 리서치(Schering-Plough Research; 뉴 저지주 블룸필드 소재)에서 입수한다.

낮은 농도에서의 IL-2의 첨가는 T 세포 클론 SP-B21과 NP-12의 증식에 대한 IL-10의 억제 효과를 완전히 역전시킬 수 있는 것으로 나타났다. 그러나, 200U/ml의 농도로 첨가된 IL-4는 T 세포 증식에 대한 IL-10의 억제 효과를 역전시킬 수 없는 것으로 나타났다. IL-10 존재하의 72시간 이하의 T 세포 클론 배양은 IL-2 수용체 α 또는 β 쇄 발현에 하향조절의 결과로 나타나지는 않는다. 또한, IL-10 존재하에 PHA에 의한 T 세포 클론의 활성화는 IL-2 수용체 α 및 β 쇄 발현의 유도에 아무런 영향도 없다. 문헌[참조: Herve, et al., Blood 75: 1017(1990)]에 기술된 항-IL-2R α mAb BB10을 사용한다. 문헌[참조: Takeshita, J. Exp. Med. 169:1323 (1989)]에 기술된 항-IL-2R β mAb Tu 27도 사용한다. 전체적으로, 이 같은 결과는, IL-10에 의한 T 세포 증식의 억제는 IL-2에 의해 역전될 수 있으나, IL-4에 의해서는 역전되지 않으며, 이는 IL-2 생성의 억제에 의한 것으로 보인다.

[실시예 4]

IL-10은 IL-2는 억제하지만, 사람 T 세포 클론에 의한 IL-4, IL-5, IFN- γ 및 GM-CSF 생성은 억제하지 못한다.

IL-10의 T 세포 클론의 증식에 대한 직접적인 억제 영향이 IL-2 생성의 억제에 의한 것인지를 알아보기 위해, T 세포 클론 837, SP-B21, 827, HY-06, CR 253, NP 12 및 NP 44를 IL-10의 존재 또는 부재하에 24 시간 동안 CD 32와 ICAM-1, LFA-3 또는 B7로 형질감염시킨 L 세포상에 교차결합시킨 항-CD3 mAb로 활성화시킨 다음, 사이토킨-특이적 ELISA로 IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ 및 GM-CSF 생성을 측정한다. 이들 ELISA의 감도는 IL-2, 10pg/ml; IL-4, 50pg/ml; IL-5, 5pg/ml; IFN- γ , 300pg/ml; 및 GM-CSF, 50pg/ml이다.

상기한 바와 같이 공급물 세포로 자극시킨지 10일 내지 12일 후에 림포카인 생성을 분석을 위해 T 세포 클론을 수거한다. 세포를 37°C에서 가습 5% CO₂ 대기에서 24시간 배양하고, 배양 상등액을 수거하며 250 x g로 회전시키고 분취량을 취하여 시험전에 -20°C에 저장한다.

T 세포 클론의 활성화는, 이들의 적절한 Th 세포 서브세트 사이토킨 생성 프로파일에 따라 IL-2, IL-4, IL-5, GM-CSF 및 IFN- γ 의 생성으로 나타난다. 일반적으로, 사이토킨 생성의 최고 수준은 T 세포 클론을 CD32 및 LFA-3 또는 B7을 발현시키는 L 세포에 의해 활성화시킬 때 측정된다. 실제로, IL-2의 생성은 L CD32-LFA-3 및 L CD32-B7 형질감염체상에서 항-CD3에 의해 활성화된 T 세포 클론의 상등액에서 주로 검출된다. IL-10은 T 세포 클론에 의한 IL-2의 생성을 강력하게 억제시킨다. IL-4의 생성은 IL-10에 의해 영향받지 않으나, IL-5, GM-CSF 및 IFN- γ 의 생성은 IL-10에 의해 약간의 영향을 받는다. 따라서, IL-10은 활성화된 사람 T 세포 클론에 의해 IL-2 생성을 특이적으로 억제한다.

[실시예 5]

폴리클로날 활성화후 IL-10은 사람 T 세포 클론에 의해 IL-2 생성을 억제시킨다.

IL-10이 림포카인 생성을 억제하기 위해 사람 T 세포 클론에 직접적으로 작용할 수 있는지의 여부를 좀더 알아보기 위해, T 세포 클론 827, SP-B21 및 NP 44를 테트라데카노일포르볼 아세테이트(TPA)(Calbiochem), 항-CD3 mAb, 및 TPA, PHA 및 TPA, 또는 보조 세포의 부재하에 항-CD2의 유사분열적 배합으로 활성화시킨다.

T 세포 클론을 1×10^6 세포/ml의 농도에서 PHA(100ng/ml), 항-CD3 mAb SPV-T3b(1 μ g/ml), 및 TPA(1ng/ml)로 자극시킨다.

표2에 나타난 바와 같이, T 세포 클론 827, SP-B21 및 NP 44의 폴리클로날 활성화는, 이들의 림포카인 생성 프로파일에 따라 고수준의 림포카인 생성으로 나타난다. IL-10은, 시험된 모든 모드의 활성화에서 이 같은 클론에 의해 IL-2의 생성을 강하게 억제시키는 반면, IL-4, IL-5, IFN- γ 및 GM-CSF의 생성은 영향을 끼치지 못한다. IL-10은, 항-CD3 + TPA에 이어 Ca⁺⁺ 이온 운반체 + TPA에 의한 활성화에 의한 이들 T 세포 클론에 의해 IL-2 생성을 억제할 수 있는데, 이것은 억제의 기작이 T 세포 수용체/CD3 시그널 전도 경로를 포함하지 않으며 이 같은 기작이 단백질 키나제 C 활성화의 하류에 작용하는 것으로 나타낸다.

[표 2]

항-CD3mAb와 TPA, PHA와 TPA 또는 ConA로 활성화시킨후 T 세포 클론 827, HY-06 및

NP44에 의한 림포카인 생성에 대한 IL-10의 영향

T 세포 클론 자극		림포카인 생성 (ng/ml)									
		IL-2		IL-4		IL-5		IFN- γ		GM-CSF	
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
827	배지	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CD3+TPA	10.6	4.9	6.1	6.4	2.4	2.9	26.9	21.0	15.4	15.2
	PHA+TPA	17.8	5.7	5.1	4.0	0.8	0.6	32.8	39.3	14.3	15.5
	ConA	3.4	1.4	2.3	2.4	ND	ND	32.6	33.7	14.0	15.2
HY-06	배지	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CD3+TPA	1.3	0.2	ND	ND	ND	ND	23.9	25.5	10.0	13.2
	PHA+TPA	5.0	2.0	ND	ND	ND	ND	17.6	19.9	16.4	13.1
	ConA	5.1	0.2	ND	ND	ND	ND	12.8	14.9	14.2	13.3
NP44	배지	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CD3+TPA	0.5	ND	18.6	19.6	6.3	5.9	1.5	1.1	9.1	8.8
	PHA+TPA	1.3	0.3	35.4	33.5	8.4	7.9	1.4	1.6	13.1	14.6
	ConA	0.3	ND	20.1	18.7	7.8	7.3	2.6	2.6	18.9	18.9

T 세포 클론(10세포/웰)을 24시간동안 IL-10(100U/ml)의 부재 또는 존재하에 항-CD3mAb(0.5 μ g/ml)와 TPA(1ng/ml), PHA(200ng/ml)와 TPA 또는 ConA(10 μ g/ml)로 활성화시키고, 사이토킨 특이적 ELISA로 IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ 및 GM-CSF의 생성을 측정한다. ND: 검출안됨(각각의 ELISA의 측정감도미만)

[실시에 6]

IL-10은 mRNA 수준에서 사람 T 세포 클론에 의한 IL-2 생성을 억제한다.

어느 수준의 IL-10이 IL-2의 생성을 억제시키는지 알아보기 위해 IL-2, IL-4, IL-5 및 IFN- γ mRNA 발현을, IL-10의 부재 또는 존재하에 항-CD3 mAb 및 TPA에 의해 활성화시킨후 T 세포 클론 NP-12, HY-06, 827, SP-A3, 837 및 SP-B21에서 노던 블롯으로 분석한다. 총 RNA를 문헌의 방법으로 분리한다[참조: Chirgwin, et al., Biochem. 18:5294 (1979)]. 노던 분석은 문헌에 따라 수행한다[참조: Waal Malefyt, J. Immunol. 142:3634 (1989)].

노던 블롯 분석용으로 다음의 프로브를 사용한다: pCD-hIL-2의 285 bp Pst-I-Xba-I 단편(nt 1-285)[참조: Yokota, et al., In Lymphokines 13 (1987)]; pCD-hIL-4의 318 bp Nhe-I-EcoRI 단편(nt 106-424)[참조: Yokota, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5894 (1986)]; pCD-hIFN- γ 의 1100 bp Pst-I-Hind-III 단편(nt5-1106)[참조: Yokota, 상기 참조] 및 pAL의 1200 bp Pst-I 단편[참조: Waal Malefyt, et al., J. Immunol. 145:2297 (1990)].

IL-10은 이들 클론에서 발현된 IL-2 mRNA의 수준을 크게 억제시키나 Th0- 및 Th2- 유사 클론에 의해 IL-4와 IL-5의 발현 또는 Th0- 및 Th1- 유사 클론에 의한 IFN- γ 의 발현은 억제하지 않는다. 이같은 결과는 IL-10이, mRNA 수준에서 사람 T 세포 클론에 의한 IL-2 생성을 특이적으로 억제시킴을 나타낸다.

[실시에 7]

IL-10은 말초혈액 세포로부터 분리된 T 세포에 의한 IL-2 생성을 억제한다.

IL-10이 휴지성 T 세포에 의한 IL-2 생성을 억제하는지 여부를 알아보기 위해 시험되었다. T 세포를 말초혈액으로부터 분리시키고 CD32 형질감염된 L 세포상에 교차결합된 항-CD3 또는 항-CD2 mAb 단독 또는 ICAM-1, LFA-3 또는 B7을 동시 발현시키는 CD32 L 세포로 활성화시킨다. 전체 PBMC를 건강한 공여자의 유화 코트(buffy coat)로부터 문헌[참조: Boyum, A., Scan. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl 97):77 (1968)]에 기술된 바와 같이 피콜-하이파크(Ficoll-Hypaque; 미저리 주 세인트 루이스 소재의 Sigma Diagnostics 사 제조)상에서 원심분리로 분리시킨다.

T 세포를 PBMC로부터 정제하고, 플라스틱 접착시키며, 나일론 울 컬럼상을 통과시키며 자기적 고갈로 네가티브 선별한다. 간단하게, 100x10 PBMC를 37℃에서 30분간 1%의 사람 AB 혈청을 보충시킨 이젤 배지 중에서 100mm 조작 배양 접시(뉴저지주 링컨 파크 소재의 Becton Dickinson 사 제조)중에서 배양한다. 비-접착 세포를 제거하고 나일론을 컬럼(캘리포니아주 서니베일 소재의 Robbins Scientific사 제조)을 통과시킨다[참조: Julius, et al; Eur. J. Immunol. 3:645 (1973)]. 이어서 세포를 40℃에서 30분간, 포화농도의 항-CD14(Leu M3), CD16(Leu 11a), CD19(Leu 12), 및 CD56(Leu 19) mAb와 함께 배양하고, 세척 및 마그네틱 비이드(Dynabeads M450; 노르웨이 오슬로 소재의 Dynal A.S. 사 제조)로 비이드:세포=40:1의 비율로 피복시킨 양-항-마우스 IgG와 함께 배양한다.

이 혼합물을 조용히 진탕시키면서 40℃에서 30분간 배양하고, 로제트를 형성한 세포를 제조자의 추천에 따라 자기 입자 농축기로 제거한다. T 세포 군집은 97-99% CD2, CD3 이다. 항-CD14(Lue-M3), CD16(Leu 11a), CD19(Leu 12) 및 CD56(Leu 19) mAb 및 적절한 이소타입의 대조용 mAb를 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재의 벡튼 디킨슨(Becton Dickinson)사에서 구입한다.

PBMNC T세포(2x10 세포/웰)를, 상기한 바와 같이 LFcγRII 세포 형질감염체상에 교차결합시킨 항-CD3 또는 항-CD2 mAb로 자극시킨다. 배양 상등액을 37℃에서 24시간 배양시킨 후 수거한다.

휴지성 T 세포는 활성화를 위해 CD32 L 세포상의 B7 항원의 존재에 대해 완전히 의존성이 밝혀졌다. CD32 L 세포상에 교차결합된 항-CD3 또는 항-CD2 모두 T 세포 증식 유도 및 림포카인 생성 모두에서 비효과적이었다. 또한, 이들 세포들은, 이들 세포내로 ICAM-1 또는 LFA-3를 동시 형질감염시킨 후에도 여전히 비활성인 채로 남아 있다. 그러나, B7로 도시형질감염된 바 있는 CD32 L 세포에 교차결합된 항-CD2 또는 항-CD3 mAb는 강한 T 세포 증식 및 고수준의 IL-2, IFN-γ 및 GM-CSF 생성을 유도한다. IL-10은 이들 조건하에서 휴지성 L 세포의 증식을 현저하게 억제시키지 않는다. 이와 달리, IL-10은 IL-2의 생성은 억제시키나 이들 세포에서의 IFN-γ와 GM-CSF의 생성은 억제시키지 않는다.

IL-10의 존재하에 생성된 IL-2의 농도는, 그러나, 시험된 시간(3일째)에서 최적 증식을 유도시키기에 여전히 충분했다. 전체적으로, 이같은 결과는, 보조 세포상에서 B7과의 상호 작용에 의한 T 세포상의 CD28 또는 CTLA-4의 관련은 휴지성 T 세포에 의한 증식 림포카인 생성유도에 필수적이며, 이들 조건하에서 IL-10은 여전히 IL-2 생성을 억제시킬 수 있음을 나타낸다.

[실시예 8]

IL-10은 APC로서 사람 HLA 분자로 형질감염시킨 마우스 L 세포를 사용할 때 항원 특이적 T 세포 증식을 억제한다.

파상풍 독소(TT) 특이적 T 세포 클론 827 및 엠.레프래(M. Leprae) 65 KD hsp pt[2-12] 특이적 T 세포 클론 HY-06상의 항원 특이적 증식에 대한 IL-10의 영향을 항원 제공성 세포로서, 상기 언급한 HLA-DR3 또는 HLA-DR3 및 ICAM-1, LFA3 또는 B7 형질감염시킨 마우스 L 세포를 사용하여 시험한다. L 세포 형질 감염체에 의한 HLA-DR, ICAM-1, LFA3 및 B7 발현의 FACS 프로파일은 IL-10이 이들 세포에서 부류 II MHC의 본질적 발현에 아무런 영향을 끼치지 않음을 보이고 있다.

파상풍 독소는 비.비찌니 박사(B.Bizzini; 프랑스 파리 소재의 Institute Pasteur)로부터 제공 받았으며 1μg/ml의 최종 농도로 사용되었다. Hsp pt[2-12]는 고체상 펩타이드 합성법에 따라 제조하였으며 분석용 역상 HPLC 및 아미노산 분석으로 체크하였다. 이 펩타이드는 최종 농도 0.5μg/ml로 사용되었다.

T 세포 클론 827 및 HY-06의 자극, 증식 분석 및 사이토킨 측정은 상기 기술한 바와 같이 수행한다. IL-10은, L 세포와 투여량 의존적 방식으로, 항원 제공세포(APC)로서 HLA-DR3로 형질감염시킨 HY-06 및 827의 항원 특이적 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 10U/ml로 가해진 IL-10은 억제활성을 지니며 100U/ml 및 500U/ml에서 30 내지 50% 이하의 증식 억제가 얻어진다.

이같은 결과는, APC로서 HLA-DR 및 ICAM-1, LFA-3 또는 B7이 L 세포를 형질 감염시킬때 확증된다. T 세포 클론 827 및 HY-06의 증식성 반응은 LFA3로 동시 형질감염시킨 L 세포가 사용될때 증가하여 IL-10의 억제 효과는 덜 크게된다. IL-10에 의한 827 및 HY-06에 대한 증식 반응의 억제는 항-IL-10 mAb 19F1을 중화시킴으로써 완전하게 역전시킬 수 있으며, 이는 억제의 특이성을 나타낸다. 이같은 결과는, APC로서 HLA-DR 형질감염된 마우스 L 세포가 사용될때, IL-10이 827 및 HY-06의 항원 특이적 증식성 반응을 억제함을 나타낸다.

IL-10에 의한 항원 특이적 증식의 억제는 T 세포 수준에서 있는 것으로 밝혀졌다. 이를 확인하기 위해 T 세포 클론 827과 HY-06을 사람 또는 쥐과 IL-10의 존재하에 TT 및 pt[2-12]로 활성화시켜 IL-10이 항원 부여 L 세포상에 작용하는지 또는 T 세포 클론상에 직접적으로 작용하는지를 조사한다. 상기 토의한 바와 같이, 사람 IL-10은 사람 및 마우스 세포에 작용성이나, 쥐과 IL-10은 단지 마우스 세포에만 작용성이다.

쥐과 IL-10은 HLA-DR 단독으로 형질감염되거나 ICAM-1, LFA3 또는 B7으로 동시형질감염된 L 세포가 APC로서 사용될 때, 827과 HY-06의 항원 특이적 증식을 억제할 수 없음이 밝혀졌다. 이같은 결과는 IL-10이 사람 T 세포 클론 증식에 직접적 영향을 가짐을 나타낸다.

T 세포 클론 827과 HY-06을 IL-10 및 IL-2의 존재 또는 부재하에 HLA DR 단독 또는 ICAM-1, LFA3 또는 B7과의 배합으로 발현시키는 L 세포로 TT 또는 pt[2-12] 활성화시켜 외래성 IL-2의 첨가가 IL-10의 억제 효과를 역전시킬 수 있는지 여부를 시험한다. 저농도의 IL-2는 T 세포 클론 827 및 HY-06의 항원 특이적 증식에 대한 IL-10의 억제 효과를 역전시킬 수 있다.

T 세포 클론 HY-06을, IL-10의 존재 또는 부재하에 HLA-DR3 단독 또는 ICAM-1, LFA3 또는 B7과의 배합으로 발현시키는 L 세포로 pt[2-12] 활성화시켜, 24시간째에 배양상등액을 수거하여 IL2 및 IFN-γ의 생성을 확인한다. IL-10은 IL-2의 생성을 억제하나, 항원 특이적 활성화후 T 세포 클론 HY-06에 의한 IFN-γ의 생성은 억제하지 않는다. 전체적으로, 이같은 결과는 IL-10이 IL-2 생성에서 특이적 억제로 항원-특이적 T 세포 증식을 억제함을 나타낸다.

[염증성 장 질환(IBD)]

쥐과 모델 IBD를 개발하였다. 이 모델은 IBD의 병인 또는 기작의 설명에 기여하였다. 또한 이는 여러가지 치료제에 대한 실험적 영역을 제공하였다. 이 모델을 개발하기 위해, IL-10 유전자를 제거하거나 또는 실험동물에 대해 비효과적이거나 또는 비-발현성이도록 하였다. 이 동물을 IL-10 유전자 녹아웃(Knocked out) 또는 녹아웃(Knockout)(KO) 동물로 칭한다. 이 KO는 당해 분야에 공지된 어떤 방법으로도 성취될 수 있다.

예를 들어, IL-10 유전자가 이미 불활성화된, 유전자 전이성 동물을 제조할 수 있다[참조: Goodnow, C., Transgenic Animals, 1502-1504, Encyclopedia of Immunology, Roitt(ed.), Academic Press, San Diego

(1992)]. 간단하게, 정제된 DNA를, 수정된 난세포의 전핵(pronuclei)에 미세주입시킨다. 그후, 난세포를 외과적 양모(foster mother)의 수란관에 이식한다. 달리는, 동형 접합성 돌연변이 동물주를 분리시키기 위해 표준 유전자 번식법을 사용할 수도 있다.

또한, 마우스의 생식계의 특정 유전자를 불활성화시키는 방법도 있다. 이런 경우, 돌연변이체 전이 유전자를 동질성 재조합에 의해 야생형 유전자 대신에 도입시킨다. 배기원 기주(ES: Embryonal stem) 세포주가 마우스 배아세포(blastocyst)로부터 분리 및 시험관내에서 배양될 수 있으며, 후에 다른 배아 세포를 이식시켜 생성된 마우스의 체세포성 및 생식세포성 조직 모두의 부분적인 콜로니 형성을 가능케할 수 있다[참조: Goodnow, 1503].

DNA는 배양물 중의 ES 세포내로 도입시키고 배아세포는 외과적으로 양모에게 이식시킨다. 이형접합성 돌연변이체 후손이 나타나며, 이들을 서로 교배시켜, 궁극적으로, 두가지 돌연변이체 대립 유전자, 즉 동형 접합성 돌연변이체를 갖는 후손을 생성시킨다. 이들 후손들은 문제의 유전자의 작용성 대립 유전자를 가지지 않으며 특이적 유전자를 없애기 위한 유전적 해부를 가능케 한다. 생성된 후손의 분석은 결과적으로 표현형을 유발시키는 KO 마우스에서의 표적화시킨 유전자의 역할을 알 수 있게 해 준다.

특정 유전자 결실을 갖는 실험동물을 제조하기 위한 방법을 위해서는 문헌을 참조한다[참조: McMahon, et al., The Midbrain-Hindbrain Phenotype of Wnt-1/Wnt-1 Mice Results from Stepwise Depletion of engrailed-Expressing Cells by 9.5 Days Postcoitum, Cell 69:581 (1992) and Travis, Scoring a Technical Knockout in Mice, Science 256:1392 (1992)]. 추가의 적용 가능한 기술로는 돌연변이 발생 및 안티센스 기술을 포함한다[참조: Goodnow, C. 1992. 상기 참조].

[실시에 9]

IBD용 쥐 모델

IL-10 유전자를 결핍시킨 마우스를 양육시킨다[참조: Kuhn et al., Science 254:707 (1991); Capecchi, Science 244:1288 (1989); Robertson(ed.) Teratocarcinomas and embryonic stem cell; A Practical Approach, I.R.L. Press, Oxford (1987); and Zijestra, et al. Nature 336:348 (1989); 선택된 유전자를 제거시킨 마우스를 제조하기 위한 일반적 기술과 방법]. IL-10 유전자가 결핍된 마우스를 하기에서 IL-10T 마우스 또는 KO 마우스로 부른다.

[제1 그룹]

골수 분석을 위해 4마리 마우스를 폐사시킨다. 이들 골수의 일부를 분석하여 이들이 골수 및 적혈구 세포 전구체를 생산할 수 있는 이들의 능력(표 3 참조) 및 간(stem) 세포의 생성(표 4 참조)에 대해 분석한다. 잔류 골수는 정상적인 조혈 생성을 지원할 수 있는 미소환경 세포의 능력을 평가하기 위해 장기간 골수 배양시키는데 사용한다. 흉선과 지라는 정상적인 수의 T-세포와 정상적인 수의 B세포를 함유한다. 단기 선조 및 간-세포 분석은 하기 표에 나타내었다. 대조군과 KO 마우스로부터의 세포는 별도로 모았다.

[표 3]

콜로니형성세포수/대퇴골

총세포수/						
	대퇴골	GM	BFU-e	CFU-e	Meg	Meg/Mix
대조용	9.5×10^6	18,430	475	42,500	2,470	285
IL-10T	9.4×10^6	21,902	940	59,700	2,271	658

GM = 과립구 및 대식세포; BFU = 혈액 형성단위; CFU =콜로니 형성 단위; -e = 적혈구 콜로니; Meg/Mix = 거핵구와 다른계통의 혼합. 분석에 사용된 콜로니-자극인자: IL-3+IL-6+에리트로포이에틴(Epo)

[표 4]

14일째 CFU-S의 숫자

대조군	대퇴골 당 1,678
IL-10T 군	대퇴골 당 1,517
간-세포 생성은 마우스 대퇴골에서 CFU-S의 숫자이다. CFUS는 치사량으로 조사시킨 마우스의 지라를 이식시킨 후 조혈질의 형성을 측정한다[참조: Till et al., Radiation Research 14:213 (1961)].	

IL-10T 마우스는 골수, 적혈구 및 간-세포 형성에서 어떠한 뚜렷한 결점을 나타내지 않았다. 동시에, 장기간 배양물 은, IL-10T 마우스로부터의 것도 포함하여 모든 배양물에서 한 층의 지지성 기질을 형성하였다. 이들 배양물을 2단계에서 걸쳐 셋업시킨다: 먼저, 세포를 배양물에 넣어 연속적 조혈을 지지하는데 필요한 복합적 기질층을 형성케한다. 그후, 배양물에 동일한 타입의 공여체로부터의 추가의 골수세포를 재시딩시켜, 기질세포와 관련된 실질적 전구체를 제공한다. 이 두번째 단계는 제2, 제3의 마우스가 사용될 수 있을 때 실시한다.

[제2 및 제3 그룹]

이들 마우스로부터의 골수세포는 장기간 골수 배양 실험을 완성시키는데 필요하다. 이런 목적에 이들 골수를 사용하는 것 외에, 다른 방법도 수행한다(표 5-9 참조). IL-10T 동물은 빈혈성이었으니 정상적 수준의 골수 전구체를 갖는 것으로 보인다. 따라서, 이들의 빈혈을 평가하고, 이들의 기관을 조직학적으로 관찰한다.

[표 5]

말초혈구수

마우스		WBC/ml $\times 10^6$	RBC/ml $\times 10^9$	혈소판/ml $\times 10^8$
대조군	#1	7.2	7.3	12.6
	#2	11.2	5.6	10.7
	#3	10.0	6.7	8.5
	#4	8.2	5.6	9.8
	#5	7.7	5.6	8.0
IL-10T	#1	4.0	2.4	20.6
	#2	4.8	7.1	8.0
	#3	7.5	3.9	27.3
	#4	6.5	5.5	23.9

WBC = 백혈구 세포, RBC = 적혈구 세포

[표 6]

말초혈액분화

마우스		% Lymphs	% Neut	% Mono	% Eos	% Retics
대조군	#1	87	12	1	0	2/4
	#2	72	26	2	0	1.2
	#3	80	18	1	1	0.6
IL-10T	#1	36	64	0	1	3.8
	#2	40	57	0	3	5.3
	#3	23	77	0	0	17.1

Lymphs = 림파구, Neut = 호중구,
 Mono = 단핵구, Eos = 호산구, Retics = 세망세포

[RBC방법론]

모든 대조군 동물은 정상적으로 보이는 적혈구 세포(RBC)를 갖고 있다. IL-10T 마우스는 다양한 형태학을 나타낸다. IL-10T #1은 미소세포성 세포를 가지며; #2와 #3은 미소세포성 세포와 일부의 마크로세포성, 다핵성 세포 및 이따금 핵이 있는 적혈구 세포(NRBC)를 갖는다. 적혈구 도말물을 새로운 메틸렌블루로 염

색하고 라이보솜 염색을 나타내는 세포를 계수한다. 양성 염색은 매우 어린 적혈구 세포(세망세포)에서 나타나며 조혈 기관으로부터의 미숙상태로 방출되었음을 나타낸다. 이것은 세망세포 카운트라한다.

[IL-10T 마우스의 기관 조직학]

절단한 심장, 폐, 신장 및 흉선은 정상으로 보인다. 간은, 종종 나타나는 단핵성 및 호중구 과립세포를 제외하면 정상으로 나타난다. 지라는 전반적으로 비정상이다. 포낭이 존재하나 적색 펄프 영역이 조혈세포인, 대부분 NRBC와 아세포형(미성숙 세포)로 채워져 있다. 온전한 성숙된 RBC가 없거나 전혀 없으며 대식세포와 철분저장이 전혀 없다.

[표 7]

지라세포분화

		(전체세포 %)						
마우스	세포/지라	Lymph	Mono	Neu	Eos	혈장 세포	Blast	Nuc RBC
대조군	#1 1.5×10^8	88	2	1	<1	<1	1	6
	#2 1.5×10^8	89	1	<1	<1	<1	2	7
	#3 1.1×10^8	79	3	4	1	2	2	8
IL-10T	#1 2.1×10^8	64	2	7	1	1	2	22
	#2 2.5×10^8	54	2	13	3	1	6	21
	#3 1.6×10^8	43	2	10	1	1	10	32

Lymph = 림프구, Mono = 단핵구,
 Neu = 호중구,
 Eos = 호산구
 Retics = 세망세포, Blast = 아세포
 Nuc RBC = 유핵 적혈구세포

[표 8]

골수 분화

(전체 %)									
마우스		Neu	Neu MB	Eos	Eos MB	Nuc RBC	혈장 세포	Lym	Blast Undif
대조군	#1	46	12	10	4	20	<1	4	4
	#2	39	9	5	3	37	<1	5	2
	#3	35	10	12	4	29	<1	6	2
IL-10T	#1	46	12	7	2	28	<1	2	2
	#2	56	19	4	1	18	<1	1	1
	#3	53	14	2	1	27	1	1	1
Neu MB = 호중구성 골수모세포; Eos MB = 호산구성 골수모세포;									
Nuc RBC = 유헤 RBC; Blast Undif = 원시 미분화된 아세포;									
Lym = 림파구									

다음의 데이터는 콜로니-형성 분석의 결과이다. 이 분석은 지라세포 뿐만 아니라 골수세포를 써서 실시하였다. 콜로니-형성세포를 자극시키기 위해 IL-3+IL-6 대신에 IL-3+ c-키트 리간드를 사용하였다. IL-3+ c-키트 리간드의 배합은, 제1 분석(상기)에서 수득한 BFU-e의 수와 하기 분석에서 수득한 BFU-e의 수의 비교로부터 확인된 바와 같이 적혈구 전구체를 자극하는데 보다 효과적이다.

[표 9]

콜로니 형성 분석

마우스	GM	GEM	GEMM	BFU-e	CFU-e	MEG	MEG/MIX
지라 (콜로니/지라)							
C1	18,535	618	309	9,268	42,322	618	1,236
C2	7,736	893	595	2,678	44,926	1,488	893
C3	8,670	650	650	7,152	71,741	433	433
K1	55,020	8,400	3,360	51,660	393,120	2,100	6,300
K2	111,060	25,746	10,601	96,925	498,762	14,135	12,116
K3	68,274	20,096	9,890	103,050	1,012,633	14,357	9,252
골수 (콜로니/대퇴골)							
C1	37,300	3,632	838	7,963	35,065	978	419
C2	49,159	2,552	510	5,954	81,478	680	1,021
C3	30,343	1,916	639	6,069	24,754	958	958
K1	63,440	1,823	1,641	8,750	58,336	1,276	1,276
K2	37,340	6,570	438	8,870	47,085	986	1,276
K3	35,432	4,006	1,753	14,273	52,208	1,628	4,132

C1, C2, 및 C3은 동일한 대조군 마우스를 나타내며 대조군 #1, #2 및 #3으로도 나타낸다. K1, K2, 및 K3은 동일한 마우스를 나타내며 IL-10T #1, #2, 및 #3으로도 나타낸다.

GM = 과립구, 대식세포

GEM = 과립구, 적혈구계, 대식세포,

GEMM = 과립구, 적혈구계, 대식세포, 거핵구

[표 10]

폐쇄 혈액 시험

	마우스	1일째	2일째
대조용	#1	음성	음성
	#2	음성	음성
	#3	샘플 없음	음성
IL-10T	#1	음성	음성
	#2	양성	양성
	#3	양성	양성

[대변검사]

IL-10T 마우스 대변조사는 기생충 감염을 나타내는 총란 징후를 나타내지 않았다. 소장 상하부에 기생하는 기생충은 없는 것으로 보인다.

동물은 사소하게 부터 심각한 빈혈까지 다양했다. 이같은 빈혈증은 적혈구 세포를 생성할 수 없는 것으로 설명될 수 없었다. IL-10T 마우스는 빈혈증을 보상하기 위한 노력의 징후를 나타냈다. 먼저, 이들은 이들의 지라에서 정상적인 숫자 보다 많은 RBC 전구체를 생성해냈다. 마우스에서, 지라는 일반적으로 RBC 결핍증을 보상하기 위해 주력한다. 이들 쥐과의 지라는 정상인것에 비해 2배 더 컸으며 RBC를 생성하기 위해 지나치게 활동적이었다.

일부의 마우스는 잘 보상하고 있었다. 이들은 그들의 혈액내에 거의 정상적인 숫자의 RBC를 가지며, 이들의 세망세포 숫자가 비교적 정상이었기 때문에 순환계로 다수의 미성숙 세포를 방출시키지는 않았다. 그러나, 다른 마우스는 뒤떨어졌으며, 이들은 순환계내로 세포를 미성숙상태로 방출하였으며, 바로 이것이 이들의 세망세포 수가 그렇게 높게(즉, 17%) 나타나는 이유가 된다. 이들은 또한 소수의 순환하는 유핵 RBC를 갖는다.

이들 마우스는 또한 정상인것 보다 높은 혈소판 숫자외에 이들의 지라내에 상승된 거핵세포 숫자를 갖는다. 이같은 점은 이들이 출혈을 겪은바 있음을 암시한다. 혈액 손실은 철 공급원의 소실로 인한 만성 빈혈의 원인이 된다(이 철 결핍은 지라 및 골수 분획에서 뚜렷하다). 생검에 따라, 내부 출혈은 없는 것으로 나타났다. 그러나, 대부분의 IL-10T 마우스는 이들의 대변내에 출혈을 보이고 있으며 또한 직장탈출증을 나타내기도 한다. 마우스를 철저히 시험하였으며 요충, 편충 또는 기타 기생충 감염은 음성인 것으로 나타났다. 대변에서의 출혈과 이들의 빈혈의 심각성 사이에는 직접적인 상호 관련이 있다.

빈혈증과 출혈 문제외에, IL-10T 마우스는 이들의 혈액 내에 임파구보다 다량의 호중구성 과립구세포를 갖는다. 이같은 점은 마우스에 대해 정상인것과는 전혀 반대의 것이다. 말초 혈액 분화참조(표 6). 이같은 관찰은 또한 지라 콜로니-형성 분석(표 9)에서 나타나는 골수 전구체의 엄청난 증가와 일치하기도 한다. 따라서, 마우스는 만성 염증의 빈혈 증상으로 고생하게 된다.

생검시, IL-10 마우스 및 동복자-교배 대조군으로부터 제조한 조직 절편을 시험한다. 대조군으로부터의 모든 시료는 정상으로 나타났다. IL-10T 마우스를 볼때, 흉선과 척수 조직은 정상으로 나타났다. 지라는 적혈구아세포와 골수아세포 및 거핵구에서 완만하거나 급격한 증가를 나타내었다. RBC 풀은 적거나 또는 거의 존재하지 않는다. 프러시안 블루 염색은 철분 저장물의 고갈을 나타내 보이며, 증가된 수질의 조절 작용의 증거를 갖는다.

철분 저장물의 고갈은 혈액손실과 결부되며 비정상적인 적혈구 생성으로 나타난다. 크기를 비교해 볼 때, 지라는 정상 크기 1과 1/2 내지 3배 크기였다. 장간막 임파절은 정상과 비교하여 대단히 비대하였으며 거의 정상적인 지라의 크기 정도로 컸다. B 및 T 세포 소낭 역시 유사하게 확장되었으며, 이같은 점은 염증성 반응과 상통한다.

소장은 잘 형성된 점막 및 아점막을 나타낸다. 일부의 절단면에서, 다형핵화된 백색 세포(PMN)와 단핵성 세포 숫자가 약간 증가하였다. 대장과 직장, 결장의 아랫쪽 부분을 포함하여 근육까지 확장된 직장의 현저한 염증을 나타낸다. 상당량의 부종 및 침윤성 세포가 뚜렷하다. PMN이 우세한 세포 타입이지만, 호산구, 임파구, 혈장세포 및 상피세포(상피와 유사한 세포)도 존재한다. 염증은 점막, 소장선 및 아점막에 걸쳐 일어난다. 종종, 침윤물은 근육층내, 특히 내측 괄약근 주변에서도 발견된다. 많은 경우에, 상피조직은 소실되거나 또는 없다. 다발성 증후군은 응집된 RBC 및 PMN을 갖는 섬유성 물질로 나타난다. 일부의 혈관은 RBC로 폐쇄된다. 상피세포의 응집은 육아종의 조기형성을 암시하지만 확실히-형성된 육아종은 분명치 않다. 만성 염증을 일으키는 기생충, 충란 또는 세포내 박테리아는 없다. 다발성 증후군 및 출혈은 대변폐색 출혈시험의 양성결과와 일치한다. 전체적인 관점은 2차 빈혈 및 쇠약과 관련된 ID와 일치한다.

[실시에 10]

IL-10 KO 마우스는 외인성 IL-10을 사용한 처리에 반응한다.

IL-10 유전자가 결여된 4마리 마우스(IL-10 KO)와 3마리 정상적인 대조군 마우스를 시험한다. 대조군 마우스는 정상적인 신체적 외관을 갖는다. 세마리 대조군 마우스 모두는 음성 폐색 출혈 대변 샘플을 가지며 정상으로 보이는 직장이 있다. IL-10 KO 마우스중 일부는 대조군 보다 현저히 작으며 이들은 빈약한 건강 상태를 갖고 있다. 이들은 흐트러져 뻗쳐있는 앙상한 털을 갖고 있으며 정상의 대조군에 비해 빈약한 생활성을 보인다. 4마리 IL-10 KO 마우스중 한마리는 구부리고 있으며 걷는 모습이 비정상이다. 4마리 IL-10 KO 마우스 모두는 부풀어오른 직장 및 홍반성 직장 조직 또는 뚜렷한 직장 탈출증을 갖고 있다.

실험용 KO 마우스중 2마리가 두가지 별도의 경우에서 한정적으로 양성인 잠재성 출혈 대변 샘플을 가지는 반면, 제3의 마우스는 한가지 경우에는 음성이었으며 제2의 경우에도 같았다. 4마리 KO 마우스 모두에 대해 직장 도말을 실시하여 세마리는 다수의 호중구성 과립구를 다수 갖는 화농성 삼출물을 갖는다. 샘플링 시기에 직장으로부터 채혈한 동물의 개개의 도말물에도 또한 적혈구세포가 나타난다. IL-10 KO 마우스가 시간이 지남에 따라 탈진을 보이므로, IL-10 KO 마우스 및 정상적인 대조군의 체중을 시험의 일환으로 기록해 둔다.

IL-10 마우스중 3마리에게 매일 2주간 35 μ g의 IL-10을 주사한다. 이들 세마리 마우스는 일정한 화농성 삼출물을 나타냈다(3마리중 단지 2마리만이 출혈흔을 나타냈으며 한마리만이 구부리고 비정상적으로 보행하였다). 한마리 IL-10 KO 마우스(출혈 및 화농성 삼출물에 대해 음성)와 정상인 대조군에게 매일 2주일 간 트로메타민(TRIS) 완충액을 주사한다. 일반적인 건강, 신체적 외관, 직장 삼출물, 잠재적 출혈 및 체중을 모니터링한다.

IL-10 주입 제2주후, 모든 세마리 IL-10 KO 마우스는 증가된 생활성, 부드러운 털 및 정상적인 포즈와 보행을 나타내었다. 세마리 모두는 아직도 여전히 염증의 징후가 남아 있기는 하지만 감소된 직장 팽창을 나타냈다. 세마리 모두는 음성 폐색 출혈 결과를 나타내었으며 이들의 직장 도말물에서 적혈구의 징후는 없었다. 삼출물의 양은 감소하였으나 이들의 직장내에서 호중구성 과립구가 여전히 관찰되었다. 한마리 동물의 도말물은 이제 호중구성 과립구세포보다 많은 상피 및 임파구 세포수를 나타내었다. 하나의 동물이 대략 16g의 체중을 유지하였다. 다른 두마리는 이들의 체중이 16에서 17.8g으로 및 11.4에서 14g으로 각각 증가되었다.

2주 동안 TRIS 완충액을 받은 IL-10 KO 마우스는 여전히 음성 잠재성 혈흔대변 샘플을 나타내었다. 이는 또한 다수의 호중구성 과립구 세포를 함유하는 풍부한 삼출물을 나타내었다. 직장은 여전히 팽창되어 있고 탈출증이 일어날 소지가 있다. 동물은 구부리고 비정상적으로 보행한다. 이는 또한 분명한 쇠약을 보였으며 체중은 16.6에서 14g으로 감소하였다. 역시 TRIS 완충액을 주입받은 정상적인 대조군은 이들의 직장을 포함하여 정상적인 건강한 외관을 나타내었다. 이들의 잠재성 출혈 대변 샘플은 여전히 음성이었으며 직장 삼출물은 전혀 검출되지 않았다. 이들의 체중은 17.1g에서 19g으로 및 17.4g에서 18.7g으로 증가하였다. 수주일 후에도, 동물은 여전히 체중이 증가하고 있었다.

[실시에 11]

염증성 장 질환에 기인한 징후 또는 증상의 완화

ID를 가진 사람 환자는 다음과 같이 본 발명에 따라 IL-10으로 처리할 수 있다. 이같은 환자들은 전형적으로 설사, 복부 통증, 열, 흑색변, 혈변배설 및 체중 감소와 복부 팽창, 설염, 아구창 궤양, 항문열상, 항문주변 누공, 빈혈, 흡수 불량 및 철 결핍을 포함할 수 있는 증상을 포함할 수 있는 징후를 갖는다. 환자는 처음에는 일일 체중 kg당 5 μ g의 IL-10으로 처리한다. 환자의 체중이 70kg이므로, 최초 출발 투여량은 일일당 IL-10 350 μ g이다. 이같은 투여량은 정맥내 거환으로서 투여한다. 투여량은 환자의 내성과 반응에 따라 일일 약 50 내지 150 μ g씩 증가시킨다. 수일후 일일 약 700 μ g(일일 체중 kg당 10 μ g)의 최적 투여량이 성취된다.

처음 치료전에 몇 그후 매일 최종 치료후 수일까지, 환자를 임상적으로 및 실험실 기준으로 모니터링한다. 실험실 기준에는 총 백혈구 세포수 및 이의 분화에 중점을 두고 혈구수 카운트를 포함한다. 특히 중요한 것은, 백혈구 세포수가 정상으로 또는 환자의 예비 치료수준으로부터 현저하게 변화됨이 없이 남아 있는가 하는 점이다. 백혈구 세포 분화와 관련하여 특히 주목할만한 것은 미성숙 형태가 말초 혈액중에 잔류하는가 및 상이한 타입의 백혈구세포의 정상적비율이 일정한가 또는 변화되었는가 하는 것이다. 특히 주목할점은 말초 혈액내에서 임파구와 단핵구의 비율이다.

모니터링할 수 있는 추가의 파라메타로는 적혈구 침강 속도(ESR:erythrocyte sedimentation rate), 화학적 프로파일, IL-6, TNF 및 IFN- γ 의 혈중 농도일 수 있다. 최종적으로 정규, 예를 들어, 혈액 및 화농성 삼출물에 대한 환자 대변의 일일 평가는 치료에 대한 환자의 반응을 나타낼 수도 있다. 치료는 소장 염증

의 하나 이상의 증상 또는 징후의 개선으로 나타낸다.

[지역형 과민 반응의 억제]

[실시에 12]

마우스에서의 감소된 효과

BALB/c 마우스를 항-CD4 모노클로날 항체(MoAb)로 예비 처리하고 4주후에 레쉬마니아 메이저(*Leishmania major*)로 감염시킨다. BALB/c 마우스는 상업적으로 시판되는 시몬센 래보라토리즈(Simonsen Laboratories; 캘리포니아주 길로이 소재)에서 입수한 근친교배시킨 마우스종이다. 이 마우스는 8 내지 12주된 것이다. 엘.메이저(WHO 중 지정 WHOM-/173)를, 30%의 태아 송아지 혈청(FCS)(캘리포니아주우드랜드 소재의 J.R. Scientific사에서 시판), 2mM L-글루타민 및 각각 100U/ml의 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 M199(뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 GIBCO사 시판)에서 전편모충으로서 배양한다. 정제된 배양물로부터 전편모충을 수거하고 인산염 완충 염수(PBS)중에서 세척한다. 마우스를 1.5×10^6 생 전편모충을 좌측 후지 발바닥에 피하주입시켜 감염시킨다. 엘.메이저 항원은 기생충의 4회의 냉동 및 해빙사이클 후 원심분리시켜 제조한다. 이 항원 제제를 배양 웰에 2×10^6 생물체/ml 상당으로 가한다

시험관내 분석을 위해 다음의 모노클로날 항체(McAb)를 사용한다: 중화용 항 마우스 IL-4 MoAb(ATCC 기탁번호 HB188), 중화용 항 마우스 IL-10 McAb[참조: Chatelain, et al., J. Immunol. 148:1182 (1992)에 기술된 방법으로 제조], 항 마우스 CD4(ATCC 기탁번호 TIB207). 모든 항체 제제는 이온 교환 크로마토그래피와 겔 여과법으로 조직 배양 상등액으로부터 정제하여 리올루스 응집화 분석으로 측정된 결과 3 엔도톡신 단위(EU)/mg 단백질 미만을 함유한다.

세포 정제를 위해, 다음의 정제된 McAb가 사용된다: 바이오티닐화 RM-4-5 및 RM-4-4, 항 마우스 CD4 및 AMS-32.1, 항 마우스 Mac-1(ATCC 기탁번호 TIB128), RA3-6B2 및 항 마우스 B220[참조: Coffman, Immunological Reviews 69:5 (1982)]. 제조합체 마우스 IL-4 및 IL-10을 이.콜라이네에서 발현시키고 전술한 바와 같이 친화 정제한다.

엘.메이저 감염의 부위를 고갈시키는 슬라브 림프절(LN)을 후감염 4 내지 6주째에 BALB/c 또는 BALB/c 항-CD4 예비-처리 마우스로부터 분리시키고 0.25% 소혈청알부민(BSA)을 함유하는 PBS중에서 단세포 현탁액으로 처리한다. CD4+ T 세포를 정제하기 위해, 4°C에서 모든 조작을 수행한다. 대략 4×10^6 LN 세포를, 각각 $12 \mu\text{g/ml}$ 의 항-B220, 항-Mac-1, 항-CD8 및 항-클래스 II I-A를 함유하는 2ml의 PBS/BSA 용액으로 30분간 표지시킨다. PBS/BSA중에서 세척한 후, McAb 표지된 세포 현탁액을, 세포당 3개 비이드의 비율로 회전하는 휠중에서 30분간 양 항-래트 피복시킨 다이아비이드(Dynabeads; 캘리포니아주 마운티뷰 소재의 Robbins Scientific사에서 시판)와 함께 배양한다. 자기 분리로 음성 세포가 수득된다.

CD4+ T 세포를, 약 85%의 CD4+에 해당하는 생성된 세포 현탁액으로부터 자기 활성화 세포 분리기(독일연방공화국 뒤셀도르프 밀테니 소재의 MACS사 제조)를 사용하여 양성 선별로 더 농축시킨다. 간단하게, 약 50ml/10 세포에 해당하는 세포를 PBS/BSA중의 $12 \mu\text{g/ml}$ 바이오티닐화 항-CD4로 15분간 표지시킨다. 세포를 PBS중에서 세척하고 약 $50 \mu\text{g}/10$ 세포에서 스트렙토아비딘 마이크로비이드(캘리포니아주서니베일 소재의 Becton Dickinson사에서 입수)와 배양한다. 15분후, 1/50의 최종농도의 스트렙토아비딘-PE(Becton Dickinson 사)를 가한다. 추가로 5분간 배양한 후, 세포 현탁액을 세척하고 제조자의 지시에 따라 자기 컬럼(독일연방공화국 뒤셀도르프 밀테니 소재의 MACS사 제조)을 통해 통과시킨다. 자기처리한 컬럼상에 잔류하는 세포를 자기로부터 컬럼을 분리시키고 PBS/BSA로 철저히 세척하여 용출시킨다. 생성된 세포군은 96% CD4+ 이상이다.

T 세포-고갈된 지라세포를, 상기 LN 세포에 대해 정확하게 기술한 바와 같이 항-래트 다이아비이드를 사용하여 음성 선별에 의해 항-CD4 및 항-CD8 염색성세포를 제거시킨 정상 제공자의 지라로부터 제조한다. 제제는 FACS 분석에 의해 통상적으로 99% CD4 및 CD8 음성이었다.

미분리 임파절 세포 또는 정제된 CD4+ T 세포를, 96웰 한자 플레이트내의 $250 \mu\text{l}$ 용적중에서 지시된 투여량에서 5% FCS를 함유하는 cRPMI 중에 이중 배양물로, 정제된 CD4+ T 세포의 경우, 엘.메이저 항원의 존재 또는 부재하에 5×10^5 세포 고갈시킨 정상 지라세포와 함께 셋업시킨다. cRPMI는 RPMI-1640(겐사스주 레벡사 소재의 J. R. H. Biosciences사로부터 구입), 10% FCS, 2mM L-글루타민, 0.05 mM 2-ME 100U/ml의 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 완전 배양 배지를 나타낸다.

항원 제공 세포(APC: antigen presentation cell)를 엘.메이저 항원 (2×10^6 생물체/ml에 상당) 또는 배지 단독으로 4시간 펄스처리한다. 그후 T 세포 고갈시킨 지라세포를 배양 전에 1000rad γ -조사시킨다. 일부의 경우, 배양웰에 재조합 IL-10(rIL-10)($50 \mu\text{g/ml}$), 재조합 IL-4(rIL-4)(100ng/ml) 및/또는 이들 사이토킨에 대한 중화 McAb를 가한다. 사이토킨 합성 검출을 위해 72시간후 상등액을 수거한다.

상등액중의 사이토킨 농도는 상기 IFN- γ (참조: Chatelain et al., 1992,상기 참조), IL-4(참조: Chatelain et al., 1992, 상기 참조), IL-10 및 IL-3에 대해 상기 기술한 바와 같이 2-위치 샌드위치 ELISA로 검출한다. 샘플은 정제된 재조합 또는 천연 사이토킨의 표준 곡선을 비교하여 정량화한다.

항-CD4 MoAb를 사용한 전처리는 최초에는 동물의 활용 가능한 T 세포를 고갈 시키지만, 궁극적으로는 엘.메이저로 시도한 기생충 시도에 대한 동물의 저항성을 증가시킨다. 비록 이같은 현상이 반-직관적이며 이의 기작이 불명료하지만, 이같은 사실은 광범위하게 관찰되고 있다. OTH는 기생충 감염에 대한 동물의 저항성과 강하게 관련되어 있다.

감염 4주후, 동물의 반대측 발바닥에 레쉬마니아 냉동-해빙 항원으로 공격시킨다. 48시간 경과후, 측정용 캘리포로 발바닥의 부기를 측정한다. 각각의 동물에 5투여량 단위 사이토킨을 복강내 부여한다. 한 그룹은 5 투여량의 IL-4를, 다른 그룹은 5 투여량의 IL-10 및 제3 그룹은 IL-4와 IL-10 배합물의 5 투여량을 투여한다. 5 투여량 각각 항원 공격전 12시간째에 첫 투여로부터 매 12시간마다 투여한다.

[표 11]

IL-4와 IL-10의 배합물은 엘.메이저 항원에 대한 DTH를 억제한다.	
처리	발바닥 크기(mm $\times$ 10 $^{-2}$)
20 μ g IL-4	84 $\pm$ 16
20 μ g IL-10	68 $\pm$ 7
20 μ g IL-4 + 20 μ g IL-10	33 $\pm$ 11
4 μ g IL-4 + 4 μ g IL-10	54 $\pm$ 25
PBS 대조군	91 $\pm$ 20

표 11은 레슈마니아 항원 주입 24시간 후의 마우스 발바닥 크기를 나타낸다. PBS 만을 투여한 대조군 동물의 반응을 지시된 투여량의 IL-4, IL-10 또는 두가지 배합물을 투여한 동물의 반응과 비교한다. 사이토킨은, 항원공격 12시간 전에 출발하여 복강내로(IP) 매 12시간마다 48시간 동안 투여한다. 각 그룹에는 5 마리 동물이 있다.

나타낸 데이터는 IL-4만으로 처리한 마우스가 PBS로 처리한 마우스와 거의 동일하게 생활하고 있음을 입증해 주고 있다. IL-10만으로 처리한 마우스는 대조군보다 부기가 덜하다.

IL-4와 IL-10의 배합물로 처리한 마우스는 가장 낮은 부기를 나타냈으며 특히 각각 20 μ g의 사이토킨으로 처리한 그룹이 낮았다.

[표 12]

IL-4와 IL-10의 배합물은 엘.메이저 항원에 대한 DTH를 억제한다.	
처리	발바닥 크기(mm $\times$ 10 $^{-2}$)
50 μ g IL-4	73 $\pm$ 11
50 μ g IL-10	65 $\pm$ 12
50 μ g IL-4 + 50 μ g IL-10	43 $\pm$ 13
20 μ g IL-4 + 20 μ g IL-10 + ICA	42 $\pm$ 9
20 μ g IL-4 + 20 μ g IL-10 + α IL-10 + α IL-4	93 $\pm$ 21
PBS 대조군	119 $\pm$ 27

표 12는 제2의 독립된 실험의 데이터를 나타내고 있다. 실험 포맷은 발바닥데이터가 레슈마니아 항원 주사 48시간째에 취해진 점을 제외하고 상술한 바와 동일하다.

각 그룹에 5마리 동물이 있다. IL-4와 IL-10의 억제 효과는 IL-4에 대해 2mg의 모노클로날항체 및 IL-10에 대해서는 5mg의 모노클로날 항체를 투여함으로써 차단시킬 수 있다. 양성 대조군으로서 사용된 IL-4 및 IL-10에 대한 항체는 사이토킨의 제1차 투여 12시간전에 복강내 투여한다. 음성 대조군으로서 사용된 5mg의 이소타입 대조군 모노클로날 항체(ICA)는 아무런 억제 효과도 없다. ICA는 문헌에 기술된 바와 같이 제조한다[참조: Chatelain et al., 1992, 상기].

IL-4 및 IL-10에 대한 항체를 가하여 IL-4 및 IL-10에 대한 경쟁이 사이토킨의 효능을 감소시킴을 입증해 보인다. 또한 이들 항체는 재조합적으로-생성된 사이토킨에 대한 추가의 대조군을 제공한다.

이 데이터는 IL-4와 IL-10의 배합이 동물의 DTH 반응을 감소시키는데 있어서 사이토킨 단독 보다 효과적임을 나타낸다. IL-10 단독은 IL-4 보다 효과적이나 둘다를 배합한 경우 보다는 덜 효과적이다. 사이토킨과 각각의 사이토킨에 대해 생성된 모노클로날 항체와의 배합물 투여는 사이토킨 처리 효능의 결여를 나타내는 결과가 된다.

[표 13]

DTH 유도 부위를 고갈시키는 LN 세포로부터 IFN- γ 생성	
<u>처리</u>	<u>IFN-γ (ng/ml)</u>
20 μ g IL-4	147 $\pm$ 34
20 μ g IL-10	109 $\pm$ 49
20 μ g IL-4 및 20 μ g IL-10	53 $\pm$ 33
PBS 대조군	242 $\pm$ 54

표 13의 데이터는, 항원 공격 12시간전에 출발하여, 사이토킨을 매 12시간에 걸쳐 24시간 항원공격 후 24시간까지 투여하여 수득한 결과이다. 레슈마니아 항원 주입의 부위를 고갈시키는 임파절(LN)로부터의 세포를 사이토킨과 항원을 투여받은 동물로부터 항원 공격 5일후에 제거한다. 표 13에서 처리라고 표시한 란은, LN세포가 취해진 동물이 받은 처리를 나타낸다. 임파절을 시험관내에서 엘.메이저 냉동-해빙 항원으로 자극시킨다. 72시간후, 상등액을 IFN- γ 함량에 대해 시험한다. 나타낸 데이터는 세마리의 별도 동물로부터 얻은 것이다(n=3 $\pm$ 표준 오차).

이 데이터는 사이토킨으로 처리한 동물이 PBS로 처리한 대조군 동물에 비해 낮은 IFN- γ 를 나타냄을 보여 주고 있다. 게다가 IL-4와 IL-10의 배합물로 처리한 동물로는, 단일 사이토킨을 투여 받은 실험 동물의 어떠한 대조군 보다 상당히 낮은 IFN- γ 를 나타내었다.

[표 14]

IL-4 및 IL-10의 Th1군에 의한 IFN- γ 생성의 억제	
<u>첨가</u>	<u>IFN-γ (ng/ml)</u>
없음	100 $\pm$ 6
5ng/ml IL-10	53 $\pm$ 4
100ng/ml IL-4	44 $\pm$ 2
5ng/ml IL-10 및 100ng/ml IL-4	20 $\pm$ 1

표 14의 데이터를 수득하기 위해, CD4⁺T 세포(3.5x10⁶/웰)를, 4주전에 엘.메이저로 감염시킨 항-CD4 전처리된 마우스로부터 분리시킨다. 세포를 시험관내에서 엘.메이저 냉동-해빙 항원과 함께 APC원으로서 T 세포 고갈시킨 지라세포(5x10⁶/웰)로 자극시킨다. 72시간 후에 ELISA로 IFN- γ 농도를 측정한다. 첨가라는 란은 Th1 세포가 배양되는 배지에 첨가되는 물질을 나타낸다.

표 14의 데이터는 IL-4와 IL-10 둘다가 단독으로 투여 되어도, PBS 처리한것과 비교해 볼때 Th1 세포에 의해 생성된 IFN- γ 의 농도를 현저하게 감소시킴을 보여준다. 게다가, 배지에 IL-와 IL-10 배합물의 첨가

는 사이토킨 단독을 첨가한 경우 보다 약 50% 낮은 IFN- γ 를 나타낸다.

진술한 데이터는 대조군과 비교하여, IL-10이 일반적으로는 임파절로부터 및 특별하게는 Th1으로부터의 DTH 반응, 부기 및 IFN- γ 생성을 감소시킴으로 보여 주고 있다. 게다가 IL-4와 IL-10의 배합은 동일한 투여량 범위에서 IL-4 또는 IL-10 단독보다 탁월하다. 각각의 사이토킨에 대한 20 μ g에서의 배합 치료는 각각의 IL-4 및 IL-10에 대한 2배 투여량(50 μ g)에서 보다 탁월함을 보이고 있다. 따라서, 혼합 치료로서 투여된 IL-4 및 IL-10 각각의 20 μ g은 단일 치료제로서 투여된 IL-4 또는 IL-10의 50 μ g 보다 탁월한 효과를 갖는다.

[실시예 13]

타입 I 당뇨병을 가진 환자의 치료

치료를 위해, 세계 보건기구의 국립 당뇨병 데이터 그룹에서 개발한 기준을 사용하여 진단해낸, 타입 I 당뇨병 또는 인슐린 의존성 당뇨병을 갖는 환자를 선별한다. 환자는 최초에 일일 체중 kg당 IL-4와 IL-10 각각 20 μ g을 써서 처리한다. 환자 체중이 70kg이므로, 최초 출발 투여량은 각 사이토키닌을 일일 1400 μ g 투여하는 것이다. 이 투여량은 정맥내 거환주입으로 투여한다. 이 투여량은 환자의 허용도와 반응에 따라 일일 약 250 내지 1000 μ g까지 증가시킨다. 수일후에는 일일 약 7000 μ g의 최적 투여량(일일 체중 kg당 100 μ g)이 성취된다.

제1차 치료전에, 및 그후 최종 치료후 수일까지, 환자는 임상적으로 및 실험실 기준으로 모니터링한다. 실험실 기준에는 혈당치와 혈구수가 포함되며 특히 전체 백혈구수와 이의 분화가 중요하다. 혈당치 모니터링은 당뇨병 치료에 널리 골지된 것이다. 추가로 관심을 둘 것은 백혈구세포가 정상으로 남아 있는지 또는 환자의 전-치료 수준으로부터 심각한 변화없이 남아 있는지를 알아보는 것이다. 백혈구세포 분화에 있어서, 특히 주목할 점은 말초 혈액내에 미숙한 형태가 나타나는지 및 상이한 타입의 백혈구 세포의 정상적 비율이 일정한지 또는 변화되는지를 알아보는 것이다. 특히 주목할만한 것은 말초 혈액 중에서 임파구세포와 단핵구세포의 비율에 관한 것이다.

당해 분야의 숙련자에게 명백한 바와 같이, 본 발명의 사상과 범주를 벗어나지 않는한 본 발명의 여러 가지 변형 및 면화가 수행될 수 있다. 본원에서 기술된 특정 양태는 단지 예로든 것이며 본 발명은 첨부된 특허청구의 범위에 의해서만 한정된다.

서열 1

서열 리스트

(1) 일반 정보

(i) 출원인 :

(A) 성명 : 세텀 코퍼레이션

(B) 거리 : 윈 기랄다 팜스

(C) 시 : 메디슨

(D) 주 : 뉴 저지

(E) 국가 : 미합중국

(F) 우편번호(ZIP) : 07940-1000

(G) 전화번호 : 201-822-7375

(H) 팩시밀리 : 201-822-7039

(I) 텔렉스 : 219165

(ii) 발명의 명칭 : IL-4 및/또는 IL-10의 신규한 용도 및 이에 대한 항체

(iii) 서열수 : 4

(iv) 컴퓨터 판독형태 :

(A) 매체타입 : 플로피 디스크

(B) 컴퓨터 : 애플 매킨토시

(C) 운용시스템 : 매킨토시 6.0.5

(D) 소프트웨어 : 마이크로소프트 워드 5.1a

(V) 현출원 데이터 :

(A) 출원번호 :

(B) 출원일 :

(Vi) 선출원 데이터 :

(A) 출원번호 : US 07/933950

(B) 출원일 : 1992. 8. 21

(A) 출원번호 : US 07/933462

(B) 출원일 : 1992. 8. 21

(A) 출원번호 : US 07/933419

(B) 출원일 : 1992. 8. 21

(A) 출원번호 : US 07/932900

(B) 출원일 : 1992. 8. 20

(2) 서열확인번호 1에 대한 정보 :

(i) 서열특징 :

(A) 길이 : 160 아미노산

(B) 유형 : 아미노산

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자유형 : 단백질

(xi) 서열기술 : 서열확인번호:1:

서열 2

```

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

```

(2) 서열확인번호 2에 대한 정보 :

(i) 서열특징 :

(A) 길이 : 147 아미노산

(B) 유형 : 아미노산

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자유형 : 단백질

서열 3

```

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

```

(2) 서열확인번호 3에 대한 정보 :

(i) 서열특징 :

(A) 길이 : 38 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 쇄형 : 단쇄

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자유형 : DNA(게놈성)

(xi) 서열기술 : 서열확인번호:3:

서열 4

GGCTGCAGCG ACGAGCCATG GTTGCTGGGA GCGACGCG

(2) 서열확인번호 4에 대한 정보:

(i) 서열특징 :

(A) 길이 : 35 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 쇄형 : 단쇄

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자유형 : DNA(게놈성)

(xi) 서열기술 : 서열확인번호:4:

서열 5

ICATCTTCT GGTACCAATC AATTGGAGTT GGTTC

35

(57) 청구의 범위

청구항 1

인터루킨-10(IL-10) 및 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 염증성 장 질환 치료에 유용한 억제학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, IL-10이 사람 IL-10인 억제학적 조성물.

청구항 3

IL-10, 인터루킨-4(IL-4) 및 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 지연형 과민반응 억제에 유용한 억제학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, IL-10이 사람 IL-10인 억제학적 조성물.