(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[5]
C12N 9/00

(45) 공고일자 1992년02월11일
(11) 공고번호 특1992-0001377

(21) 출원번호	특1983-0004437	(65) 공개번호	특1984-0006676
(22) 출원일자	1983년09월22일	(43) 공개일자	1984년12월01일

(30) 우선권주장 PCT/JP 82/00445 1982년11월22일 일본(JP)

(71) 출원인 다께다야꾸힝고오교 가부시끼가이샤 구라바야시 이꾸시로
일본국 오오사까시 히가시꾸 도쇼오마찌 2쪼메 27반찌

(72) 발명자 기꾸찌 마사까즈
일본국 오오사까후 도요노군 도요노쬬 히가시도끼 와다이 7쪼메 4반찌 16
쓰까모도 고오조
일본국 오오사까후 스이따시 센리야마니시 4쪼메 39방 A-204고
구로가와 쓰또무
일본국 효오고껭 가와니시시 스이메이다이 1쪼메 1반찌 50

(74) 대리인 이준구, 백락신

심사관 : 김성완 (책자공보 제2659호)

(54) 인체 면역 인터페론 단백질의 제조방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

인체 면역 인터페론 단백질의 제조방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 실시예 1(vii)에서 수득된 플라스미드 pHIT 3709에 대한 제한효소 지도이며, 는 시그날 펩티드인 펩티드를 코우딩한 부분이며, 는 I-IF 폴리펩티드를 코우딩한 부분이다.

제2도는 실시예 1(vii)에서 수득된 플라스미드 pHIT 3709에 삽입된 삽입물의 1차구조(염기 서열)를 나타낸다.

제3도는 실시예 2(ⅰ) 및 (ii)에 각각 기재된 ptrp 701 및 ptrp 771에 대한 구조도표이다.

제4도는 실시예 2(iii)에 기재된 pHIT trp 1101에 대한 구조 도표이다.

제5도는 실시예 2(iv)에 가재된 pHIT trp 2101에 대한 구조 도표이다.

제6도는 실시예 6(ⅰ)의 전기 영동의 결과를 나타낸다.

제7도는 실시예 6(ⅰ)의 분자량 측정 결과를 나타낸다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 인체 면역 인터페론 단백질 및 유전공학 기술에 의한 그의 제조 방법에 관한 것이다.

인터페론(이하 때때로 IFs로 약칭함)은 비루스, 핵산 등에 의해 자극된 고등동물 세포에 의해 제조된 단백질이며, 항비루성 및 항종양 활성을 갖는다.

오늘날, 인터페론은 일반적으로 특성에 의해 서로 다른 세가지 형태, 즉 α, β 및 γ형으로 분류되는데, α 및 β형은 비루스 또는 핵산에 의해 유도되며 γ형은 유사분열 물질 등에 의해 유도된다.

α형 IF(이하 IF-α로 약칭함) 및 β형 IF(이하 IF-β로 약칭함)에 대한 연구는 상당히 진전되었으며, 그의 제조 조작이 상당한 정도로 상세히 설명되고 있다. 더우기, 유전공학 기술의 발달로 인해,

IF-α, IF-β_1, 및 IF-α_1은 에스케리키아 콜리(IF-α 및 IF-β_1) 및 이스트(IF-α_1)를 배양함으로써 생물적 활성인 단백질의 형태로 대량 제조할 수 있다[Goeddel, D.V. et al., Nature, 287, 411(1980) ; Yelverton, E. et al., Nucleic Acids Res., 9, 731(1981) ; Goeddel, D.V. et al., Nucleic Acids Res., 8, 4057(1980) ; Hitzeman R. et al., Nature, 293, 717(1981)]. 또한, 임상적 치료를 목적으로 하는 대규모 생산이 시도되고 있다.

γ형 IF(이하 때때로 IF-γ로 약칭함)는 림파구 형질전환(아세포로 전환) 또는 림포킨 생산이 일어나는 조건하에 면역적으로 적합한 세포(면역세포)로부터 제조되며, 따라서 면역 인터페론(이하 때때로 I-IF로 약칭함)이라 명명된다. I-IF는 IF-α 및 IF-β와 비교해서 높은 항세포증식 또는 항종양 활성을 가지며, 따라서 임상적 관점에서 기대되고 있다. 그러나 I-IF 제조를 위해 새로운 림파구의 필요와 같은 각종 제한으로 인해 효과적인 생산계가 이루어지지 않고 있다. 다른 실험계에서 다른 세포종이 다른 분자종의 I-IF를 제조할 수 있다는 것이 제안되었다. 그의 구조 및 특성은 아직 여러 면에서 알려지지 않고 있다.

한편, IFs는 상당한 종-특이성을 갖기 때문에 인체에 사용되는 IFs는 인체에서 유도된 것이어야 한다. 그러나, 인체 면역 인터페론의 대규모 생산이 어렵기 때문에, 그의 임상적 적용이 현재로는 불가능하며, 따라서 고순도의 인체 I-IF를 대량, 염가로 쉽게 제조할 수 있는 기술의 개발이 요청되고 있다.

본 발명자들은 바람직한 인체 I-IF 단백질을 얻을 수 있는 기술의 개발 목적으로, 유전자 조작기술을 이용하여 인체 I-IF 유전자를 클로닝하고, 얻어진 제조합 DNA 분자를 숙주에 도입하여 인체 I-IF 유전자를 형질 발현시키는 것을 포함한 연구를 계속하고 있다. 이에 따라 본 발명자들은 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명은 인체 면역 인터페론이 코우딩된 염기 서열을 함유한 DNA를 갖는 형질 전환체를 성장시키고, 얻어진 인체 면역 인터페론 단백질 함유 액체를 인체 면역 인터페론에 결합할 수 있는 단클론성 항체를 사용하여 정제함을 특징으로 하는 고순도 제조합 인체 면역 인터페론 단백질 및 그의 제조방법을 제공한다.

인체 I-IF 유전자를 클로닝할 수 있다고 믿는 그레이등은 그로부터 유도된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 보고하였다[Nature, 295, 503(1982)]. 그후 데보등[Nucleic Acids Research, 10, 2487(1982)] 및 데린크등[ibid., 10, 3605(1982)]에 의해 유사한 내용들이 보고되었다. 그러나 지금까지 IF-유사 물질의 존재는 단지 항비루스 활성을 검출함으로써 추측되고 있으며, 순수 인체 면역 인터페론 단백질이 수득될 수 있다는 보고는 없다.

본 발명자들은 실제 순수 인체 면역 인터페론 및 그의 제조방법을 설정하고 본 발명을 완성하였다.

본 발명에 따라 사용된 인체 I-IF 코우딩 DNA는 예를 들면 일반식

(5') TGT TAC TGC CAG GAC CCA TAT GTA AAA GAA GCA
GAA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA GGT CAT TCA
GAT GTA GCG GAT AAT GGA ACT CTT TTC TTA GGC ATT
TTG AAG AAT TGG AAA GAG GAG AGT GAC AGA AAA ATA
ATG CAG AGC CAA ATT GTC TCC TTT TAC TTC AAA CTT
TTT AAA AAC TTT AAA GAT GAC CAG AGC ATC CAA AAG
AGT GTG GAG ACC ATC AAG GAA GAC ATG AAT GTC AAG
TTT TTC AAT AGC AAC AAA AAG AAA CGA GAT GAC TTC
GAA AAG CTG ACT AAT TAT TCG GTA ACT GAC TTG AAT
GTC CAA CGC AAA GCA ATA CAT GAA CTC ATC CAA GTG
ATG GCT GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA ACA GGG AAG
CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CGA GGT CGA AGA
GCA TCC CAG-X(3') (I)

(식중 X는 TAA, TGA 또는 TAG이다)로 표시되는 염기 서열을 갖는 DNA이다.

상기의 DNA(Ⅰ)은 5′-말단에

5' ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TTT CAG CTC TGC ATC GTT TTG
GGT TCT CTT GGC 3' (II)

또는 ATG(Ⅲ)을 가질 수 있다.

DNA(Ⅰ)은 트립토판(trp) 프로모터, 락토오즈(lac) 프로모터 또는 단백질 사슬 신장인자 Tu(tufB)

프로모터, 바람직하게는 trp 프로모터와 같은 프로모터로부터 하류에 연결된다.

일반식(Ⅰ)에 있어서, X로 표시되는 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 TAA이다.

본 명세서, 도면 및 청구 범위에 있어서 사용된 기호는 표 1과 같이 정의된다.

[표 1]

DNA : 데옥시리보핵산
A : 아데닌
T : 티민
G : 구아닌
C : 시토신
RNA : 리보핵산
dATP : 데옥시아데노신 트리포스페이트
dTTP : 데옥시티미딘 트리포스페이트
dGTP : 데옥시구아노신 트리포스페이트
dCTP : 데옥사시티딘 트리포스페이트
ATP : 아데노신 트리포스페이트
EDTA : 에틸렌디아민 테트라아세트산
SDS : 소듐 도데실설페이트
Gly : 글리신
Ala : 알라닌
Val : 발린
Leu : 류신
Ile : 이소류신
Ser : 세린
Thr : 트레오닌
Cys : 시스테인
Met : 메티오닌
Glu : 글루탐산
Asp : 아스파르트산
Lys : 리신
Arg : 아르기닌
His : 히스티딘

Phe : 페닐알라닌
Tyr : 티로신
Trp : 트립토판
Pro : 프롤린
Asn : 아스파라긴
Gln : 글루타민
Z : 카르보벤족시
BOc : t-부톡시카르보닐
Mtr : 4-메톡시-2,3,6-트리메틸벤젠술포닐
Pme : 펜타메틸벤젠술포닐
OBu : t-부틸에스테르
ONB : N-히드록시-5-노르보르텐-2,3-디카르복시 아미도에스테르
DCC : N,N'-디시클로헥실카르보디이미드
DCU : N,N'-디사클로헥실우레아
HONB : N-히드록사-5-노르보르텐-2,3-디카르복시아마드
HOBt : N-히드록시벤조트리아졸
CHA : 시클로헥신아민
DCHA : 디시클로헥실아민
TEA : 트리에틸아민
TFA : 트리플루오로아세트산
MSA : 메탄술폰산
THF : 테트라히드로푸란
DMF : 디메틸포름아미드
MeOH : 메탄올
AcOEt : 에틸 아세테이트

본 발명에 따라, 인체 I-IF를 코우딩한 이중가닥 DNA는 예를들면 인체 말초 혈액 림파구와 같은 인체 I-IF 분비 세포를 배양하고, 그 배양 브로스로 부터 인체 I-IF 코우딩 전달(m) RNA를 분리한 후, 예를 들면 역전사 효소를 사용하여 단일가닥 상보 DNA(cDNA)를 합성하고 그로 부터 이중가닥 DNA를 유도한 후, 이를 플라스미드에 삽입하여 생성된 플라스미드로 예를들면 에스케리키아 콜리를 형질전환시키고 cDNA 함유 플라스미드를 분리함으로써 제조될 수 있다.

여기에 사용된 인체 말초 혈액 림파구는 비감광세포 또는 감광세포일 수 있다.

본 발명에 사용되는 I-IF 인듀서는 인체 림파구 세포를 유도하여 I-IF를 제조할 수 있는 것이라면 어떤 것일 수 있다. 예를들면 피토헤마글루티닌(PHA), 콘카나발린 A(ConA), 스타필로코칼 엔테로톡신 A(SEA), 뉴라미니다제-갈락토오즈 옥시다제(NAGO) 및 12-O 테트라데카노일 포르볼-13-아세테이트(TPA)일 수 있다. 이들 단독으로 또는 혼합하여 사용될 수 있다.

I-IF 유도는 RPMI-1640 배지 또는 MEM 배지, 바람직하게는 송아지 태아 혈청을 함유한 RPMI-1640 배지와 같은 공지의 배지에서 세포를 배양함으로써 수행될 수 있다. 배양은 35~39℃, 바람직하게는 36~38℃에서 12~72시간, 바람직하게는 22~26시간 동안 수행된다. 세포는 공지의 방법에 의해 수집되며, 구아니딘 티오시아나이드 벤토나이트, 헤파린, 폴리비닐황산, 아우린트리카르복실산, 바나듐착제, 디에틸피로카르보네이트(DPC) 또는 소듐도데실 설페이트(SDS)와 같은 RNase 저해제를 가하고, 예를들면 N-라우로일사르코신, 트윈 80 또는 노니데트(Nonidet) P-40을 가함으로써 세포를 용해한다. RNA 추출을 수행한다. 필요하다면 페놀, 페놀-클로로포름 등을 이 RNA 함유 추출물에 가한 후 추출을 반복한다. 에탄올 침전에 의해 RNA 분획을 모은다. 진핵세포의 세포질에 존재하는 대부분의 mRNA는 그의 3′-말단에 폴리 A서열을 갖는다는 것이 공지이기 때문에, 폴리 (A^+)RNA는 예를들면 올리고(dT) 셀룰로오즈 또는 폴리(U)세파로오즈를 사용하여 수집되며, 슈크로오즈 밀도 경사 원심 분리에 의해 분획된다. 각 분획을 번역을 위해 크세노푸스 라에비스의 난모세포에 주사한다[Gurdon, J.B. et al., Nature, 233, 177(1971)]. 생성된 단백질의 항비루스성을 시험한다. 이런 방법으로 I-IF에 대한 mRNA를 함유한 12-16S 분획이 수득될 수 있다. mRNA는 포름아미드-폴리아크릴아미드겔 전기 영동 또는 글리옥살을 사용한 아가로즈 겔 전기 영동에 의해 정제될 수 있다.

주형으로서 상기에서 얻어진 mRNA를 사용하여 예를들어 역전사효소를 사용한 공지의 방법에 의해 상보 DNA(cDNA) 사슬을 합성하고, cDNA를 이중가닥 DNA로 전환시킨다[Maniatis, T. at al., Cell, 8, 163(1976)].

이 DNA를 예를들면 dG-dC 또는 dA-dT 호모폴리머 테일링 방법에 의해 플라스미드 pBR 322의 Pst I 또는 Sph I 제한 엔도뉴 클레아제 절단 부위에 삽입한다[Nelson. T.S., Methods in Enzymology, 68, 41(1979), Academic Press Inc., New York]. 재조합 DNA는 형질 전환을 위해 예를 들면 에스케리키아 콜리 X1776에 도입한다. 형질 전환체 선택은 테트라시클린 내성 또는 앰피실린 내성에 따른다. 한편 I-IF 폴리펩티드의 아미노산 서열을 상응하는 염기 서열을 갖는 올리고 뉴클레오티드를 화학적

으로 합성하고, 탐침을 위해 32p로 라벨링한 후, 이를 사용하여 공지의 집락 혼성법에 의해 바람직한 클론을 위해 전에 수득된 테트라시클린-또는 앰피실린 내성 형질 전환체를 스크린한다 [Grunstein, M. and Hogness, D.S., Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 72, 3961(1975)].

집락 혼성화에서 양성인 클론을 막삼 길버트법[Maxam, A.M. & Gilbert, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560(1977)] 또는 파지 M13을 사용한 디뉴클레오티드 합성 사슬 종결법[Messing, J. et al., Nucleic Acids Res., 9, 309(1981)]에 의해 염기 서열을 검사하여 I-IF 유전자 존재를 확인한다. 상기의 방법으로 수득된 클론으로부터 I-IF 유전자를 부분 또는 전체 절단하고, 적당한 숙주에 도입하기 위해 적당한 프로모터 및 SD(Shine 및 Dalgarno) 서열로부터 하류에 연결한다.

프로모터의 예로는 상술한 것들이 있다. 바람직한 숙주는 에스케리키아 콜리 균주(294, W3110, C600 등)가 있으며, 이중 균주 294는 특히 바람직하다.

균주 294는 공지의 것이며[Backman, K. et al., proc. Natl.Acad. Sci. USA, 73, 4174(1976)] 오오사까 발효 연구소(IFO)에 기탁번호 IFO-14171로 기탁되어 있다.

본 발명에 따라 숙주를 DNA로 형질 전환하는 것은 예를들면 공지 방법에 의해 수행된다[Cohen. S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110(1972)].

이와 같이 수득된 형질 전환체는 공지의 배지에서 배양된다.

배지는 예를들면 글루코오즈 및 카사미노산을 함유한 M9 배지이다[Miller J., Experiments in Molecular Genetics, 431-433(Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972)].

효과적인 프로모터 작용을 위해 3β-인돌릴 아크릴산 또는 기타 시약을 필요시 가할 수 있다.

배양은 일반적으로 15~43℃에서 3~24시간 동안 수행된다. 필요하다면 통기 및/또는 교반이 수행될 수 있다.

배양 후, 공지 방법에 의해 세포를 모으고, 예를들면 완충액 중에 현탁시키고, 예를들면 초음파처리, 리소자임 및/또는 동결-용해에 의해 용해한다. 상층액을 원심 분리에 의해 수집한다. 세포 용혈을 위해 동결 및 용해 후 리소자임 처리하는 것이 바람직하다.

상기 상층액에서 인체 I-IF는 인체 I-IF에 결합할 수 있는 단클론성 항체, 바람직하게는 일반식(IV)의 폴리펩티드에 대한 단클론성 항체를 사용함으로써 유리하게 정제될 수 있다.

(N) (C)
H-X-Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly-Y-OH (IV)

(식중 X는 하나의 결합, 또는

(N)
Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala

(C)
Ala Lys Thr Gly Lys Arg

의 펩티드 사슬의 C말단으로 부터 세어 1~16 아미노산을 갖는 펩티드 또는 아미노산 잔기이며, Y는 신규 폴리펩티드인

(N) (C)
Arg Arg Ala Ser Gln

의 펩티드 사슬의 N말단으로 부터 세어 1~5 아미노산을 갖는 펩티드 또는 아미노산 잔기이다).

폴리펩티드(IV)에 있어서 Y는 Arg Arg Ala Ser Gln 또는/ 및 X는 Lys Arg인 것이 바람직하다. 또한 폴리펩티드(IV)가 15~25 아미노산 잔기를 갖는 것이 바람직하다.

상기 단클론성 항체는 항체 컬럼형으로 사용될 수 있다.

항체 컬럼은 예를 들면 하기와 같은 방법으로 융합세포로 접종된 복수로 부터 얻어진 정제 상태의 상기 단클론성 항체를 적당한 담체와 결합시킴으로써 제조될 수 있다.

담체는 결합 후 I-IF가 특별히 효과적으로 흡착될 수 있으며 적당한 방법으로 용출될 수 있는 것이면 어떤 것일 수도 있다. 예를들면 단백질의 1차 아미노기의 결합을 용이하게 하기 위해 활성화된 비이드형의 아가로즈 겔, 즉 하기의 방법으로 사용될 수 있는 AFFI-GEL 10(Bio-Rad Lab., USA)이 있다. AFFI-GEL 10과 항체와의 반응은 0.001-1M, 바람직하게는 0.1M 중탄산염 완충용액에서 수행된다. 반응 조건은 0~20℃, 10분~24시간 및 여러 가지 pH이며, 바람직한 조건은 4℃, 4시간 및 pH 3~10이다. AFFI-GEL 10 및 항체 사이의 정량비는 AFFI-GEL 1ml당 항체 약 50mg 이하의 범위로 선택될 수 있으며, 이 범위에서 항체의 양이 증가할 때 AFFI-GEL과 결합된 항체의 양이 증가한다. 결합 효과의 관점에서 항체는 상기 기준에서 30mg 이하의 양으로 사용된다. 이와같이 제조된 항체-담체 결합 생성물을 반응에 사용된 것과 같은 완충 용액으로 세척한 후 수일 방치하거나 최종 농도 0.05M의 에틴올아민 히드로클로라이드로 4℃에서 1시간 처리하거나 또는 다른 방법에 의해 남아있는 미반응 활성기를 보호하고 적당한 컬럼에 패킹하여 항체 컬럼을 수득한다.

상기 항체 컬럼으로 정제하기 위해, 세포 용혈에 의한 상충액과 같은 인체 면역 인터페론 단백질 함유 용액을 예를 들면 포스페이트 완충액 또는 트리스히드로클로라이드 완충액과 같은 중성 완충액에 용해시키고, 항체 컬럼에 흡착시킨다. 컬럼을 같은 완충액으로 세척하고 I-IF를 용출시킨다. 유용한 용리액으로는 약산성 용액(예, 아세트산 용액), 폴리에틸렌 글리콜 함유용액, 목적 단백질과 비교해서 항체에 대한 친화력이 더 큰 펩티드를 함유한 용액, 고농도의 염용액, 및 이의 혼합물이 있다. 인체 I-IF의 분해를 상당한 정도로 촉진하지 않는 용리액이 바람직하다.

컬럼으로 부터의 용출액을 공지의 방법에 의해 완충액으로 중화한다. 필요하다면 상기 항체 컬럼을 사용한 정제 과정을 되풀이 할 수 있다.

상기에 수득된 인체 I-IF 단백질 용액을 투석하고, 필요시 동결 건조에 의해 분말을 제조한다. 동결 건조를 수행할 때, 소르비톨, 만니톨, 덱스트로즈, 말로즈 또는 글리세롤과 같은 안정제가 첨가될 수 있다.

상기의 인체 면역 인터페론 단백질은 수포성 구염 비루스(VSV)에 의해 인체 양수 유도 WISH 세포의 변성 저해 효과를 평가하기 위한 시험에서 항비루스성을 분석할 때 10^7 U/mg 이상의 고유 활성도를 나타낸다.

IF 활성 U/ml(단위/ml)는 하기의 방법으로 결정된다. 단위가 설정된 국제표준 IF-α 및 백혈구 유도 조 IF-γ는 VSV에 의해 인체 양수 유도 FL 세포계에 야기되는 세포 변형에 대한 저해효과 측정시험에서 분석되며, 백혈구 유도 IF-γ의 역가는 측정된 역가와 비교하여 결정되며, 상기 IF-γ는 실험실 표준 IF-γ로써 사용된다.

물질에서 IF-γ 역가 계산에 있어, 이 실험실 표준 IF-γ는 상기 WISH-VSV계 분석에서 항상 병행하여 사용되며, 역가 계산은 역가비를 기준으로 이행된다.

본 발명에 인체 면역 인터페론 단백질은 바람직하는 일반식

(N) H-Y-Z_1 Tyr Z_2 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu
Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His
Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly
Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys
Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys
Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln
Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val
Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp
Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu
Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln
Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly
Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg
Arg Ala Ser Gln-OH(C) (V)

(식중 Y는 Met 또는 화학결합이고, Z_1 및 Z_2는 각각 Cys 또는 1/2 Cys이다)의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 함유한다.

본 발명의 인체 I-IF 단백질은 건조상태로 90% 이상, 특히 95% 이상 순도로 상기 폴리펩티드를 함유한다.

본 발명의 방법에 의해 제조된 인체 면역 인터페론 단백질은 하기의 특성을 갖는다.

1) SDS-폴리아크릴아미드 겔(17.5%) 전기영동에서 17,000±1,000의 분자량을 나타낸다.

2) 아미노-말단 아미노산으로서 시스테인 또는 반시스틴 또는 메티오닌을 함유한다.

3) H-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Met-Leu-Phe-Arg-Gly-Arg-Arg-Ala-Ser-Gln-OH에 대한 단클론성 항체와 결합한다.

본 발명에 따라 제조된 인체 인터페론 단백질은 공지의 방법에 의해 얻어진 I-IF종과 같은 방법으로 같은 목적을 위해 사용될 수 있다. 오염 단백질 및 피로겐에서 그 함량이 적기때문에 예를들면 주사액 제조용 물질로서 더 안전하게 사용될 수 있다.

본 발명의 인체 I-IF 단백질은 항비루스, 항종양, 세포 증식 저해 및 면역 강화 활성을 갖는다. 본 발명의 인체 I-IF 단백질은 의학적 목적을 위해 그 자체로 또는 멸균수, 인체 혈청 알부민(HSA), 생리 식염수 또는/ 및 기타 공지의 생리적 무독인 담체, 부형제 또는 희석제와 혼합된 인체 I-IF 함유 약학적 조성물로써 사용될 수 있으며, 비경구 또는 국부적으로 투여될 수 있다. 예를들면 하루에 성인 1인당 100,000-100,000,000단위, 바람직하게는 50,000,000-60,000,000단위의 양으로 정맥내 또는 근육내 또는 기타 다른 경로로 투여될 수 있다.

본 발명의 인체 I-IF 단백질을 함유한 약학적 제제는 염, 희석제, 보조제, 기타 담체, 완충액, 결합

제, 표면 활성제 및 보존제와 같은 생리적 무독인 불활성 성분을 함유할 수 있다. 비경구 투여를 위해, 이 제제는 멸균 수용액 또는 생리적 무독인 용매에 녹인 현탁액의 앰푸울 형 또는 사용전 희석제로 희석해야 하는 멸균 분말형(일반적으로 I-IF 용액을 동결 건조시켜 수득됨)으로 제공된다.

더우기, 상기 인체 면역 인터페론 단백질 함유 제제는 본 발명의 물질을 기준으로 1~99%의 IF-α 또는 IF-β 또는 림포킨(예를들면 인터류킨 2)과 같은 다른 활성 성분을 함유할 수 있다.

본 발명은 하기의 실시예 및 참고예에 의해 더욱 상세히 설명되며, 이들 실시예가 본 발명을 제한하는 것은 아니다.

하기의 실시예에 기재된 세포주, 즉 생쥐 B 융합세포 γ2-11.1은 미합중국 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC) 및 프랑스 파리 파스퇴르연구소(CNCM)에 하기표의 기탁번호로 기탁되어 있다.

세포주	ATCC	CNCM
생쥐 융합세포 γ2-11.1	ATCC-HB 8699	I-242

[실시예 1]

i) 인체 I-IF를 코우딩한 mRNA의 분리

인체 말초 혈액으로 부터 제조된 림파구를 I-IFN 유도를 위해 15ng/ml의 12-O-테트라데카노일 포르볼-13-아세테이트(TPA) 및 40㎍/ml의 콘카나발린 A를 함유한 RPMI-1640 배지(10% 송아지 태아 혈청 함유)중에서 37℃에서 배양한다. 24시간후, 유도된 인체 림파구(1×10^{10} 세포)를 티오구아니딘 용액(5M 구아니딘 티오시아네이트, 5% 메로캅토에탄올, 50mM 트리스 HCl, pH 7.6, 10mM EDTA)으로 테프론 균질기에서 파괴시킨다. 소듐 n-라우로일 사르코시네이트를 4% 농도에서 가하고, 균질화 후의 혼합물은 6ml의 5.7M 세슘클로라이드[5.7m 세슘클로라이드, 0.1M 에틸렌 디아민 테트라 아세테이트(EDTA)]위에 적층하고 베크만 SW 27 회전기를 사용하여 15℃, 24000rpm에서 30시간 원심분리하여 RAN 침전을 수득한다. 이 RNA 침전을 0.25% 소듐 N-라우로일 사르코시네이트 용해시키고 에탄올로 침전시켜 8.3mg의 RNA를 수득한다. 이 RNA를 올리고 (dT) 셀룰로오즈 컬럼의 고농도 염 용액(0.5M-NaCl, 10mM-트리스 HCl ; pH 7.6, 1mM-EDTA, 0.3% SDS)에 흡수시키고, 폴리(A)를 함유한 mRNA를 저농도염 용액(10mM-트리스 HCl, pH 7.6, 1mM-EDTA, 0.3% SDS)으로 용출시켜 700㎍의 mRAN를 수득한다. 이 mRNA를 에탄올로 더 침전시키고, 0.2ml의 용액(10mM 트리스 HCl, pH 7.6, 2mM EDTA, 0.3% SDS)에 용해시킨 후 65℃에서 2분간 처리하고, 베크만 SW27 회전기를 사용 20℃ 및 25000rpm에서 10~35% 슈크로오즈 밀도 경사 원심분리에 의해 21시간 분획하여 22분획을 얻는다. 각 분획을 크세노푸스라에비스 난모 세포에 주사하고, 합성된 단백질의 인터페론 활성을 분석한다[인체 양수로부터 유도된 WISH 세포에 수포성 구염 비루스를 사용한 세포 병리적 효과 저해 분석에 의해 결정된 항비루스 활성(Stewart, W.E. The interferon System, Springer New York, 1979, Page 11)].

이 방법에서 분획 12(침강상수 12~14S)는 RNA 1㎍당 195단위의 활성을 갖는다. 상기의 분획 12에서 mRAN는 약 20㎍이다.

ii) 단일 가닥 RNA의 합성

상기 mRNA 및 역전사 효소를 사용하여, 10μl의 반응 혼합물(5㎍의 mRAN, 50㎍의 올리고(dT), 100단위의 역전사 효소, 각 1mM의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 80mM $MgCl_2$, 50mM KCl, 10mM 디티오 트레이톨 및 50mM 트리스 HCl, pH 8.3)을 42℃에서 1시간 배양하고 페놀을 가하여 탈단백질화 한 후, 0.1N NaOH로 70℃에서 20분간 처리하여 분해에 의해 RNA를 제거한다.

iii) 이중 가닥 DNA의 합성

이와 같이 합성된 단일가닥 상보 DNA를 50μl의 반응 혼합물(mRAN 및 올리고 dT가 없는 것을 제외하고 상기와 같음)에서 42℃에서 2시간동안 반응시켜 이중가닥 DNA를 합성한다.

iv) dC 말단의 첨가

이중가닥 DNA를 50μl의 반응 혼합물(이중 가닥 DNA, 0.1M 아세트산 나트륨, pH 4.5, 0.25M NaCl, 1.5mM Z_nSO_4, 60단위 S1 뉴클레아제)중에서 실온에서 30분간 뉴클레아제 S1로 처리한다. 페놀을 가하여 반응 혼합물을 탈단백질화하고, DNA를 에탄올로 침전시킨다. 수득된 DNA를 50μl의 반응 혼합물(이중 가닥 DNA, 0.14M 포타슘 카코딜레이트, 0.3M 트리스(염기)(pH 7.6), 2mM 디티오트레이톨, 1mM $CoCl_2$, 0.15mM dCTP, 30단위 말단 트랜스퍼라제)중 37℃에서 3분간 말단 트랜스퍼라제와 반응시켜 DNA의 각 3′-말단에 약 20데옥시시티딘(약 20) 단위에 의해 이중가닥 DNA를 신장시킨다. 상기의 반응에 의해 약 300ng의 데옥시시티딘 말단 이중가닥 DNA가 제조된다.

v) 에스케리키아 콜리 플라스미드의 절단 및 dG 말단의 첨가

한편, 10㎍의 에스케리키아 콜리 플라스미드 PBR 322 DNA를 50μl의 반응 혼합물[10㎍ DNA, 50mM NaCl, 6mM 트리스 HCl(pH 7.4), 6mM $MgCl_2$, 6mM 2-메르캅토에탄올, 100㎍//mg 소혈청 알부민, 20단위 Pst I]중에서 37℃에서 3시간동안 제한효소 Pst I으로 처리하여 pBR 322 DNA에 존재하는 하나의 Pst I 인지 부위를 절단하고, 반응 혼합물을 페놀로 탈단백질화한후, 50μl의 반응혼합물[10㎍ DNA, 0.14M 포타슘 카코딜레이트, 0.3M 트리스(염기) pH 7.6, 2mM 디티오트레이톨, 1mM $CoCl_2$, 0.15mM dGTP, 30단위 말단 트랜스퍼라제]중에서 37℃에서 3분간 말단 트랜스퍼라제 처리하여 상기 pBR 322 플라스미드 DNA의 각 3′-말단에서 약 8데옥시 구아니딘을 신장시킨다.

vi) cDNA의 어닐링(Annealing) 및 에스케리키아 콜리의 형질 전환

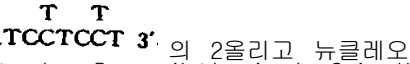
0.1M Nacl, 50mM 트리스 HCl pH 7.6, 1mM EDTA를 함유한 용액중에서 상기의 합성 이중가닥 DNA 및 0.5㎍의 상기 pBR 322 플라스미드를 65℃에서 2분간 및 45℃에서 2시간 가열함으로써 어닐링을 수행하고 점차 냉각시킨다. 에스케리키아 콜리 X1776의 형질 전환을 에니아 등의 방법에 의해 수행한다[J.Mol.Biol., 96, 495(1975)].

vii) cDNA 함유 플라스미드의 분리

약 8,500 테트라시클린 내성 집락을 분리하고, 각 집락의 DNA를 니트로셀룰로오즈 필터에 고정시킨다[M.Grunstein 및 D.S. Hogness. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961(1975)].

한편 D.V. 괴델등에 의해 보고된 것[Nature, 295, 503(1982)]과 같은 IF-γ의 아미노산 서열을 기준으로, 상기 I-IFN 서열의 아미노산 번호 1-5(Cys, Try, Cys, Gln, Asp) 및 아미노산 번호 77-

82(Lys, Gln, Asp, Met, Asn, Vla)에 상응하는 5′TCCTGGCAGTAGC 3′ 및



5′ACATTCATATCCTCCT 3′ 의 2올리고 뉴클레오티드를 트리에스테르 방법에 의해 화학적으로 합성한다[R.Creal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765(1978)]. 이들 올리고 뉴클레오티드를 50μl의 반응 혼합물(0.2㎍ 올리고 뉴클레오티드, 50mM 트리스 HCl pH 8.0, 10mM $MgCl_2$, 10mM 메르캅토에탄올, 50μCi γ-^{32}P ATP, 3단위 T4 폴리뉴클레오티드 키나제) 중에서 T4 폴리뉴클레오티드 키나제로 37℃에서 1시간동안 처리한다. 5′-말단에 ^{32}P로 레벨된 이들 올리고펩티드를 탐침용으로 사용하고, 로운등의 방법에 의해 상술한 니트로셀룰로오즈 필터에 DNA로 어닐링한다[Nucleic Acids Res., 9, 6103(1981)].

상기 두 올리고뉴클레오티드 탐침에 반응성인 4균주를 방사선 자동사진법에 의해 분리한다.

이들 각 균주의 박테리아 세로포부터 알카리법에 의해 플라스미드 DNA를 분리한다[H.C. Birnboim 및 J.Doly, Nucleic Acids Res., 7, 1513(1979)]. 플라스미드 DNA의 삽입물을 Pst I 제한 효소로 잘라낸다. 분리된 플라스미드 중에서 가장 긴 삽입물을 함유한 것을 선택하여 "pHIT 3709"라고 명명한다.

pHIT 3709 플라스미드에 삽입된 cDNA 서열의 구조(염기 서열)를 디뉴클레오티드 합성사슬 종말법 및 막삼-길버트 법에 의해 결정한다. 상기 1차 구조는 제2도와 같다(출원번호 1160/1983 참조).

pHIT 3709의 IF-γ코우딩부분(코오돈 번호 S~146)의 염기 서열은 핵산연구(Nucleic Acids Res.,) 10, 2487(1982)의 제3도에 기재된 것과 동일하다.

[실시예 2]

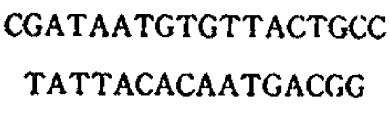
(ⅰ) 에스케리키아 콜리에서 트립토판 합성용 프리모터 부분을 함유한 플라스미드 ptrp 601(pBR 322인 벡터)[프로모터 및 오퍼레이터 함유 DNA 단편, 276염기 쌍, G.N 베니트 등 J. Mol. Biol. 121, 113(1978)]은 형질 발현 플라스미드와 마찬가지로 형성된다.

한편, 플라스미드 pBR 322를 제한 효소 EcoR I 및 Ava I으로 절단한다. 이와 같이 수득된 테트라시클린 내성 유전자 함유 EcoRI-AvaI 단편의 점성말단을 DNA 폴리머라제 I 큰 단편으로 채운다. 이 단편을 T4 DNA 리가제를 사용하여 ptrp 601의 PvuII 절단부위에 접합시킨다. ptrp 701은 이와같이 형성된다(제3도).

(ⅱ) ptrp 701에 존재하는 두 제한 효소 Cla I 절단 부위중 하나를 제거할 목적으로 ptrp 701을 Cla I로 부분 분해 처리하여 두 Cla I 절단 부위중 하나가 절단된 ptrp 701을 수득한다. 점성 말단을 DNA 폴리머라제 I 큰 단편으로 채운 후, 상기의 수득된 ptrp 701을 T4 DNA 리가제를 사용 다시 접합시켜 ptrp 771을 수득한다(제3도).

(ⅲ) pHIT 3709를 제한효소 PstI으로 절단하여 IF-γ의 구조적 유전자를 함유한 Pst I 단편을 수득한다. 이 단편을 제한 효소 BstN I으로 부분 소화시켜 IF-γ 구조적 유전자에 존재하는 BstN I 부위에서 절단된 BstN I-Pst I 단편을 수득한다. BstN I 절단 부위의 점성말단을 DNA 폴리머라제 I 큰 단편으로 채운다.

상술한 트리에스테르법에 의해 화학적으로 합성되었으며 단백질 합성 출발 코오돈 ATG를 함유한 상기 단편 및 올리고 뉴클레오티드 어댑터



CGATAATGTGTTACTGCC

TATTACACAATGACGG

를 T4 DNA 리가제를 사용 결찰시킨다.

한편, 상술한 어댑터와 연결된 IF-γ 유전자를 T4 DNA 리가제를 사용하여 트립토판 프로모터로 부터 하류의 플라스미드 벡터 ptrp 771의 Pst I-Cla I 부위에 삽입한다. IF-γ형질 발현 플라스미드 pHIT trp 1101를 형성한다(제4도).

(ⅳ) pHIT trp 2101은 하기와 같이 pHIT trp 1101을 더 개발하여 형성된다.

ptrp 601을 먼저 제한효소 Cla I 및 Hpa II로 처리하여 trp 프로모터를 함유한 0.33Kb의 Cla I-Hpa II 단편을 수득한다. 이 단편을 T4 DNA 리가제를 사용하여 Cla I로 절단되고 알카리성 포스파타제로

처리된 pHIT trp 1101과 결찰시킨다. 두 연속 trp 프로모터를 함유한 pHIT trp 2101을 수득한다(제5도).

코헨등(cit.supra)의 방법에 의하여 플라스미드 pHIT.trp 2101으로 에스케리키아 콜리 294를 형질전환시켜 균주 이.콜리 294/pHIT.trp 2101을 수득한다.

[실시예 3]

이.콜리 294/pHIT trp 2101 1ℓ 플라스크중에 8㎍/ml 테트라시클린, 0.4% 카사미노산 및 1% 글루코오즈를 함유한 200ml의 M9 배지에 37℃에서 배양한다. 박테리아의 성장이 KU 220에 도달했을 때 3β-인돌릴 아크릴산(IAA)를 30㎍/ml 농도로 가하고 혼합물을 4시간 더 배양한다.

[실시예 4]

실시예 3에서 수득된 배양용액 1.2ℓ를 원심분리한 후, 세포를 모아 10% 슈크로오즈를 함유한 0.05M 트리스 HCl(pH 7.6) 60ml에 현탁시킨다. 이 세포 현탁액에, 0.3ml의 0.2M 페닐메틸-술포닐플루오라이드(PMSF), 24ml의 5M NaCl 용액, 2.4ml의 0.2M 에틸렌디아민 테트라아세테이트(EDTA), 2.4ml의 1M 스퍼미딘 및 2.4ml의 리소자임(5mg/ml)를 가한다. 혼합물을 0℃에서 1시간 방치하고 37℃에서 5분간 배양한 후, ARTEK(USA) 초음파 분해기를 사용하여 0℃에서 30초간 파괴한다.

이 분해 용액을 105,000×g에서 1시간동안 원심분리하여 66ml의 상층액을 취한다.

[실시예 5]

실시예 4에서 수득된 상층액 60ml를 1mM EDTA 및 0.15M NaCl(pH 7.6)을 함유한 20mM 트리스-HCl(TEN)으로 희석하여 150ml로 만들고 이 희석액을 참고예 10의 방법에 의해 제조된 항 IF-γ항체 컬럼(9ml)에 넣는다. 이 컬럼을 TEN 및 0.01% 노니데트 p-40(쉘) 및 0.5M NaCl을 함유한 TEN으로 잘 세척한다. IF-γ를 0.25M NaCl 함유 0.1M 아세트산으로 용출시킨다. 용출액을 1M 트리스-HCl(pH 7.6)으로 즉시 중화시킨다. 생성된 용액을 증류수에 4℃에서 16시간 동안 투석하고 아세톤 드라이아이스로 동결시킨 후 동결 건조시켜 분말을 수득한다.

얻어진 결과는 하기와 같다.

	단백질(mg)	총활성도(U)	고유활성도(U/mg)	회수(%)
분해물의 상층액	250.8	4×10^{8}	1.6×10^{6}	–
항체컬럼에 처리한후	2.0	1.5×10^{8}	7.5×10^{7}	37.5

수득된 최종 인체 면역 인터페론 단백질 생성물의 고유활성도[VSV 및 WISH 세포를 사용한 세포 병리효과 저해 분석에 의한 생존 활성도 측정을 기준]는 7.5×10^{7} U/mg이다. 이 단백질의 특성은 하기에 나타낸다.

[실시예 6]

[인체 면역 인터페론 단백질의 특성]

(ⅰ) 분자량

실시예 5에서 수득된 단백질을 2-메르캅토 에탄올로 처리하고, SDS-폴리아크릴아미드겔(17.5%) 전기 영동(15mV, 6시간)한 후 코마시블루로 염색한다. 이 단백질은 단일 밴드로 확인될 수 있다(제6도). 동시에 전기 영동한 분자량 마커에 대한 이동 거리 및 단백질에 대한 이동 거리 사이의 관계로부터 단백질의 분자량이 17,000±1,000임이 계산된다(제7도).

2-메르캅토 에탄올로 처리하지 않은 단백질에 있어, 또 다른 밴드가 분자량 33,000±2,000에 상응하는 지점에서 검출된다. 이 값은 IF-γ의 분자량, 즉 17,000±1,000의 약 2배이며, 이 밴드는 이중 IF-γ 때문이다.

(ⅱ) 아미노산 분석

실시예 5에서 수득된 단백질의 분획을 가수분해하기 위해 유리튜브에 넣고 4% 티오글리콜산을 함유한 일정비점 염산을 200배(v/w)량으로 가한다. 튜브를 감압하 밀봉하고, 110℃에서 24,48 및 72시간 동안 가수분해를 수행한다. 각 가수분해 후, 튜브를 열고, 염산을 감압하 제거한후 잔류물를 0.02N 염산에 용해시키고 히다찌 모델 835 고속 아미노산 분석기를 사용하여 분석한다. 시스틴 및 시스테인을 측정하기 위해, 상기 단백질을 히어스등에 따라 퍼포름산으로 산화시키고[Methods in Enzymology, 11, 197, (1967)], 24시간 동안 상기와 같은 방법으로 가수분해한 후 아미노산 분석기를 사용하여 시스테인산을 정량적으로 측정한다. 24,48 및 72시간 동안 가수분해한 후 얻어진 세측정치의 평균은 세린, 트레오닌, 티로신 및 트립토판의 경우를 제외한 각 아미노산의 측정치로서 사용되며 이 값는 가수분해 기간의 외삽법에 의해 0시간까지 측정된다. 결과는 표 2에 나타낸다.

[표 2]

검출된 아미노산	몰%	검출된 아미노산	몰%
아스파르트산	13.4	메티오닌	2.9
트레오닌	3.6	이소류신	4.8
세린	7.4	류신	6.8
글루탐산	12.5	티로신	3.4
프롤린	1.4	페닐알라닌	6.7
글리신	3.8	리신	13.5
알라닌	5.3	히스티딘	1.5
시스테인산	1.3	아르기닌	5.4
발린	5.7	트립토판	0.9

(iii) 아미노말단 아미노산 분석

실시예 13에서 수득된 단백질을 히어스 등의 방법에 따라 퍼포름산으로 산화하고[Methods in Enzymology, 11, 197, (1967)], 이와나가 등의 변형된 에드만 분해 방법에 의해 아미노말단 아미노산 분석을 수행한다[Eur. J. Biochem., 8, 189, (1969)]. 생성된 페닐티오히단토인-아미노산(PTH-아미노산)을 확인하고, 아커등의 방법에 의해 울트라스페어-ODS 컬럼(알텍스, 미국 : 4.6×250mm 입자 크기 5μm)을 사용하여 베리안(미국) 모델 5040 고수율 액체 크로마토그래피로 정량 분석한다[Altex chromatogram, 3, 8, (1980)]. 결과로서 PTH-메티오닌 술폰 및 PTH-시스테인산이 검출된다.

상술한 실시예로부터, 7.5×10^{7} U/mg 이상의 고유활성도를 갖는 실제로 순수한 인체 면역 인터페론 단백질이 본 발명에 의해 제조될 수 있다는 것을 알 수 있다.

[실시예 7]

[주사제의 제조.]

본 발명의 인체 I-IF 단백질 5mg(고유활성도 2×10^{7} U/mg)을 100ml의 5% HSA에 용해시킨다. 막필터(구멍크기 : 0.12μm)를 사용하여 용액을 여과하고 무균 조건하 100바이알로 나눈다. 바이알의 용액을 무균 동결 건조시켜 즉시 사용하기 위한 주사제를 제조한다.

이 주사제는 1ml의 증류수에 용해시켜 사용한다.

하기의 참고예에서, 메르크 $60F_{254}$ 실리카겔 플레이트 또는 후나고시 유꾸힌의 AVICEL SF 셀룰로오즈 플레이트를 사용하여 박막 크로마토 그래피를 수행하며, 전개 용매는 하기와 같다.

Rf^{1} : 클로로포름-메탄올-아세트산=9:1:0.5

Rf^{2} : 에틸아세테이트-피리딘-아세트산-물=30:10:3:5

Rf^{3} : 클로로포름-메탄올-물=7:3:0.5

Rf^{4} : n-부탄올-피리딘-아세트산-물=30:20:6:24

Rf^{5} : 에틸아세테이트-n-부탄올-아세트산-물=1:1:1:1

[참고예 1]

(i) Z-Ser-Gln-OBu^{t}의 제조

Z-Gln-OBu^{t} (10.1g)을 500ml의 메탄올에 용해시키고, 촉매로써 팔라듐 블랙을 사용하여 수소기체기류에서 촉매적 환원을 수행한다. 촉매를 여거하고, 용매를 유거한다. 잔류물을 250ml의 DMF에 7.5g의 Z-Ser-OH 및 6.8g의 HONB와 함께 용해시키고, 용액을 빙냉한다. DCC(7.15g)을 빙냉하면서 가하고, 혼합물을 0℃에서 4시간 및 실온에서 12시간 교반한다. 생성된 DCU를 여거하고, 용매를 유거한다. 잔류물을 300ml의 AcOEt로 추출하고, 추출물을 4% $NaHCO_3$ 용액, 0.2N 염산 및 물로 순서대로 세척하고 무수황산 나트륨으로 건조시킨다. 용매를 유거하고, 생성된 결정성 침전물을 여과에 의해 모으고 건조시킨 후 CH_3CN으로 재결정한다.

수율 6.5g(51.2%), 융점 97~100℃

$[\alpha]_D^{25}$ -24.1° (c=0.40, 메탄올) Rf^{1} 0.64.

원소분석 : $C_{20}H_{29}O_7N_3$에 대한

계산치 : C ; 56.72, H ; 6.90, N ; 9.92

실측치 : C ; 56.21, H ; 6.72, N ; 9.76

(ii) Z-Ala-Ser-Gln-OBu^{t}의 제조

Z-Ser-Gln-OBu^t (4.23g)를 300ml의 메탄올에 용해시키고, 촉매로서 팔라듐 블랙을 사용하여 수소 기체 기류에서 촉매적 환원을 수행한다. 촉매를 여거하고, 용매를 유거한다. 잔류물을 200ml의 AcOEt, 200ml의 디옥산 및 100ml의 EMF 혼합 용매에 2.34g의 Z-Ala-OH 및 2.27g의 HONB와 함께 용해시키고 용액을 빙냉한다. DCC(2.38g)을 냉각하면서 가하고, 혼합물을 0℃에서 4시간 및 실온에서 12시간 교반한다. DCU를 여거하고, 용매를 유거한다. CH_3CN 및 에테르를 잔류물에 가하고 생성된 결정성 침전을 여과에 의해 모아 건조시키고 CH_3CN으로 재결정한다. 수율 3.72g(75.3%), 융점 165~170℃

$[\alpha]_D^{25}$ -41.2° (c=0.50, 메탄올) Rf^1 0.60.

원소분석 : $C_{23}H_{34}O_8N_4$에 대한

계산치 : C ; 55.86, H ; 6.93, N ; 11.33

실측치 : C ; 55.58, H ; 6.74, N ; 11.12

(iii) Z-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBu^{t}의 제조

Z-Ala-Ser-Gln-OBu^t (3.46g)를 300ml의 메탄올에 용해시키고, 촉매로써 팔라듐 블랙을 사용하여 수소 기체 기류에서 촉매적 환원을 수행한다. 촉매를 여거하고 용매를 유거한다. 잔류물을 Z-Arg(Pme)-OH[4.54g의 Z-Arg(Pme)-OH.CHA로부터 제조] 및 1.9g의 HOBt와 함께 150ml의 DMF에 용해시키고, 용액을 빙냉한다. DCC(1.9g)을 가하고, 혼합물을 0℃에서 4시간 및 실온에서 15시간 교반한다. DCU를 여거하고 용매를 유거한다. AcOEt를 잔류물에 가하고, 생성된 침전을 여과에 의해 모아 건조시킨후 메탄올 및 AcOEt로 재침전시킨다. 수율 4.55g(75.5%), 융점 130~134℃

$[\alpha]_D^{25}$ -24.1° (c=0.26, 메탄올) Rf^1 0.57.

원소분석 : $C_{40}H_{60}O_{11}N_8S.1/2H_2O$에 대한

계산치 : C ; 55.22, H ; 7.07, N ; 12.88, S ; 3.69

실측치 : C ; 55.23, H ; 6.93, N ; 12.54, S ; 3.48

(iv) Z-Arg(Pme)-ArG(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBut의 제조.

Z-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBut(4.3g)을 400ml의 메탄올에 용해시키고, 촉매로써 팔라듐 블랙을 사용하여 수소기체 기류에서 촉매적 환원을 수행한다. 촉매를 여거하고, 용매를 유거한다. 잔류물을 Z-Arg(Pme)-OH[3.24g의 Z-Arg(Pme)-OH.CHA로 부터 제조] 및 1.42g의 HOBt와 함께 200ml의 DMF에 용해시키고, 용액을 빙냉한다. DCC(1.41g)을 가하고, 혼합물을 0℃에서 4시간, 실온에서 20시간 교반한다. DCU를 여거하고 용매를 유거한다. AcOEt를 잔류물에 가하고, 생성된 침전을 여과에 의해 모아 건조시키고 메탄올 및 AcOEt로 재침전시킨다. 수율 4.4g(71.7%), 융점 125~130℃

$[\alpha]_D^{25}$ -18.0° (c=0.40, 메탄올) Rf^1 0.63.

원소분석 : $C_{57}H_{86}O_{14}N_{12}S_2.H_2O$에 대한

계산치 : C ; 54.96, H ; 7.12, N ; 13.50, S ; 5.15

실측치 : C ; 54.66, H ; 6.92, N ; 13.32, S ; 5.34

(v) Z-Arg(Pme)-Gly-OBu^{t}의 제조.

Z-Gly-OBu^t (13.0g)을 500ml의 MeOH에 용해시키고, 촉매로써 팔라듐 블랙을 사용하여 수소 기체 기류에서 촉매적 환원을 수행한다. 촉매를 여거하고, 여과액을 감압하 농축한다. 잔류물을 200ml DMF에 용해시키고, Z-Arg(Pme)-OH[20.0g의 Z-Arg(Pme)-OH.CHA로 부터 제조] 및 5.4g의 HOBt를 가하고 빙냉한다. DCC(8.2g)을 가하고, 혼합물을 48시간동안 교반한다. 생성된 DCU를 여거하고 여과액을 농축한다. 잔류물을 500ml의 AcOEt에 용해시키고, AcOEt 용액을 4% $NaHCO_3$ 용액 및 100% 시트르산용액으로 세척하고 Na_2SO_4 로 건조시킨후 농축한다. 석유에테르를 가하고 침전물을 여과에 의해 모은다. 수율 19.8g(96.8%), 융점 71~73℃.

$[\alpha]_D^{25}$ +0.2° (c=0.9, DMF), Rf^1 0.62.

원소분석 : $C_{31}H_{45}O_7N_5S$에 대한

계산치 : C ; 58.93, H ; 7.18, N ; 11.09, S ; 5.08

실측치 : C ; 59.42, H ; 7.58, N ; 10.95, S ; 4.84

(vi) Z-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^{t}의 제조.

Z-Arg(Pme)-Gly-OBu^t (10.0g)을 500ml의 MeOH에 용해시키고 촉매적 환원을 수행한다. 생성물을 300ml

DMF에 용해시킨다. Z-Phe-OH(4.72g) 및 2.35g의 HOBt를 가하고, 혼합물을 빙냉한다. DCC(3.59g)을 가하고, 전 혼합물을 15시간 교반한다. 생성된 DCU를 여거하고 여과액을 농축한다. 잔류물을 400ml의 AcOEt에 용해시키고 AcOEt 용액을 4% $NaHCO_3$ 용액 및 10% 시트르산 용액으로 세척하고 Na_2SO_4로 건조시킨 후 농축한다. 에테르를 가하고, 생성된 결정성 침전을 여과에 의해 모으고, MeOH-에테르로 재결정한다. 수율 10.5g(85.3%), 융점 101~103℃

$[\alpha]_D^{26}$ -8.3° (c=0.9, DMF), Rf^1 0.64

원소분석 : $C_{40}H_{54}O_8N_6S$에 대한

계산치 : C ; 61.67, H ; 6.99, N ; 10.79, S ; 4.12

실측치 : C ; 61.66, H ; 6.56, N ; 10.93, S ; 4.14

(vii) Z-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^t의 제조

Z-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^t (5.5g)을 300ml의 MeOH에서 촉매적 환원시키고 300ml의 DMF에 용해시킨다. Z-Leu-OH(3.31g의 Z-Leu-OH.DCHA로 부터 제조) 및 1.47g의 HONB를 가하고, 혼합물을 빙냉한다. DCC(1.68g)을 가하고, 전 혼합물을 48시간 교반한다. 생성된 DCU를 여거하고, 여과액을 농축한다. 잔류물을 300ml의 AcOEt에 용해시키고 AcOEt 용액을 4% $NaHCO_3$ 용액 및 10% 시트르산 용액으로 세척하고, Na_2SO_4로 건조시킨 후 농축한다. 에테르를 가하고 침전을 여과에 의해 모은다. 수율 6.2g(98.3%), 융점 171~173℃

$[\alpha]_D^{26}$ -15.5° (c=0.9, DMF), Rf^1 0.64.

원소분석 : $D_{46}H_{65}O_9N_7S$에 대한

계산치 : C ; 61.93, H ; 7.34, N ; 10.99, S ; 3.59

실측치 : C ; 62.02, H ; 7.37, N ; 11.08, S ; 3.59

(viii) Boc-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^t의 제조.

Z-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^t (6.0g)을 200ml의 MeOH에서 촉매적 환원시키고, 150ml의 DMF에 용해시킨다. Boc-Met-OH(3.0g의 Boc-Met-OH.DCHA로부터 제조) 및 1.39g의 HONB를 가하고, 혼합물을 빙냉한다. DCC(1.59g)을 가하고, 전 혼합물을 15시간 교반한다. 생성된 DCU를 여거하고 여과액을 농축한다. 잔류물을 n-BuOH-AcOEt에 용해시키고, 용액을 10% 시트르산 용액으로 세척한후 Na_2SO_4로 건조시키고 농축한다. 에테트를 가하고, 결정을 여과에 의해 모은다. 수율 6.2g(93.1%), 융점 192~195℃

$[\alpha]_D^{26}$ -19.7° (c=1.0, DMF), Rf^1 0.64.

원소분석 : $C_{48}H_{76}O_{10}N_8S_2$에 대한

계산치 : C ; 58.27, H ; 7.74, N ; 11.33, S ; 6.48

실측치 : C ; 58.48, H ; 7.79, N ; 11.34, S ; 5.98

(ix) Boc-Gln-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OH의 제조.

5.5g의 Boc-Met-Leu-Phe-Art(Pme)-Gly-OBu^t 에 50ml의 TFA를 가하고 혼합물을 실온에서 10시간 흔든 후, 농축한다. 에테르를 가하고, 침전물을 여과에 의해 모으고 건조시킨다. 이것을 50ml의 DMF에 용해시키고, 용액을 빙냉한 후, 1.8ml의 TEA를 가한다. Boc-Gln-ONB(1.85g의 Boc-Gln-OH, 1.49g의 HONB 및 1.90g의 DCC로 부터 제조)를 가하고, 혼합물을 15시간 교반한 후, 농축시킨다. AcOH를 가한 후 AcOEt를 가하고, 생성된 침전을 여과에 의해 모은다. 수율 5.3g(89.8%), 융점 181~183℃(분해)

$[\alpha]_D^{26}$ -19.6° (c=1.0, DMF), Rf^1 0.30.

원소분석 : $C_{49}H_{76}O_{12}N_{10}S_2$에 대한

계산치 : C ; 55.45, H ; 7.22, N ; 13.20, S ; 6.04

실측치 : C ; 55.39, H ; 7.17, N ; 13.34, S ; 6.20

(x) Z-Ser-NHNH-Boc의 제조.

Z-Ser-OH(10.0g) 및 6.2g의 t-부틸 카르바자이트를 150ml의 DMF에 용해시키고 용액을 빙냉한다. HONB(8.0g) 및 9.3g의 DCC를 가하고, 혼합물을 15시간 교반한다. 생선된 DCU를 여거하고, 여과액을 농축한다. 잔류물을 AcOEt로 추출하고, AcOEt 용액을 4% $NaHCO_3$ 용액 및 10% 시트르산 용액으로 세척한 후 Na_2SO_4 로 건조시키고, 농축시킨다. 에테르를 가하고, 여과에 의해 결정을 모은다. 수율 7.3g(50.4%), 융점 95~98℃

$[\alpha]_D^{26}$ -6.2° (c=0.8, DMF), Rf^1 0.62.

원소분석 : C ; $_{16}H_{23}O_6N_3$에 대한

계산치 : C ; 54.38, H ; 6.56, N ; 11.89

실측치 : C ; 54.77, H ; 6.88, N ; 12.29

(xi) Z-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc의 제조.

Z-Ser-NHNH-Boc(3.9g)을 300ml의 MeOH에서 촉매 환원시키고, 50ml의 DMF에 용해시킨다. Z-Arg(Pme)-OH[6.2g의 Z-Arg(Pme)-OH.CHA로 부터 제조] 및 1.5g의 HOBt를 가하고, 혼합물을 빙냉한다. DCC(2.3g)을 가하고, 전 혼합물을 15시간 교반한다. 생선된 DCU를 여거하고, 여과액을 농축한다. 잔류물을 AcOEt에 용해시키고, AcOEt 용액을 4% $NaHCO_3$ 용액 및 10% 시트르산 용액으로 세척한 후 Na_2SO_4로 건조시키고 농축시킨다. 에테르를 가하고, 생성된 침전을 여과에 의해 모은다. 수율 7.45g(93.7%), 융점 100~101℃

$[\alpha]_D^{26}$ -0.9° (c=1.2, DMF), Rf^1 0.51.

원소분석 : $C_{33}H_{49}O_9N_7S$에 대한

계산치 : C ; 55.06, H ; 6.86, N ; 13.62, S ; 4.46

실측치 : C ; 55.49, H ; 6.94, N ; 13.14, S ; 3.86

(xii) Z-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc의 제조.

Z-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc(3.9g)을 300ml의 MeOH에 용해시키고, 촉매적 환원을 수행한다. 생성물 50ml의 DMF에 용해시키고, Z-Lys(Mtr)-OH[3.4g의 Z-Lys(Mtr)-OH.DCHA로 부터 제조] 및 0.88g의 HOBt를 가한다. 혼합물을 빙냉시키고, 1.34g의 DCC를 가한다. 전체 혼합물을 20시간 교반한다. 생선된 DCU를 여과하고, 여과액을 농축한다. AcOEt를 가하고, 분말상 침전물을 여과에 의해 모으고 MeOH-AcOEt로 재결정한다. 수율 5.1g(93.4%), 융점 103~105℃

$[\alpha]_D^{26}$ -7.2° (c=0.8, DMF), Rf^1 0.57.

원소분석 : $C_{49}H_{73}O_{13}N_9S_2$에 대한

계산치 : C ; 55.50, H ; 6.94, N ; 11.89, S ; 6.05

실측치 : C ; 55.70, H ; 7.15, N ; 11.60, S ; 5.63

(xiii) Z-Arg(Pme)-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc의 제조.

Z-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc(4.8g)을 300ml의 MeOH에 용해시키고, 촉매적 환원을 수행한다. 생성물 70ml의 DMF에 용해시키고, Z-Arg(Pme)-OH[2.8g의 Z-Arg(Pme)-OH.CHA로 부터 제조] 및 0.74g의 HOBt를 가한다. 혼합물을 빙냉하고 1.12g의 DCC를 가한다. 전체 혼합물을 15시간 교반한다. 생선된 DCU를 여거하고, 여과액을 농축한다. 잔류물을 AcOEt에 용해시키고, AcOEt 용액을 4% $NaHCO_3$ 용액 및 10% 시트르산용액으로 세척한 후, Na_2SO_4로 건조시키고 농축한다. 에테르를 가하고, 생성된 침전물을 여과에 의해 모아서 MeOH-에테르로 재침전시킨다. 수율 5.8g(89.8%), 융점 136~137℃

$[\alpha]_D^{26}$ -6.6° (c=1.0, DMF), Rf^1 0.58.

원소분석 : $C_{66}H_{99}O_{16}N_{13}S_3$에 대한

계산치 : C ; 55.56 H ; 6.99, N ; 12.76, S ; 6.74

실측치 : C ; 55.34, H ; 7.07, N ; 12.50, S ; 6.59

(xiv) Z-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc의 제조.

Z-Arg(Pme)-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc(3.0g)을 150ml의 MeOH에 용해시키고, 촉매적 환원을 수행한다. 생성물을 60ml의 DMF에 용해시키고, Z-Lys(Mtr)-OH[1.54g의 Z-Lys(Mtr)-OH.DCHA로 부터 제조] 및 0.31g의 HOBt를 가한다. 혼합물을 빙냉시키고, 0.57g의 DCC를 가한다. 전체 혼합물을 15시간 교반한다. 생선된 DCU를 여거하고, 여과액을 농축시킨다. 잔류물을 AcOEt에 용해시키고, AcOEt 용액을 4% $NaHCO_3$ 용액 및 10% 시트르산 용액으로 세척한 후, Na_2SO_4로 건조시키고 농축한다. 에테르를 가하고, 결정성 침전을 여과에 의해 모아서 AcOEt로 재결정한다. 수율 2.70g(72.8%), 융점 123~125℃

$[\alpha]_D^{26}$ -5.9° (c=1.1, DMF), Rf^1 0.57.

원소분석 : $C_{82}H_{123}O_{20}N_{15}S_4$에 대한

계산치 : C ; 55.73 H ; 7.02, N ; 11.89, S ; 7.26

실측치 : C ; 55.89, H ; 7.30, N ; 11.72, S ; 7.08

(xv) Boc-Gln-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-Arg(Pme)-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBu^t의 제조.

Z-Arg(Pme)-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBu^t (1.0g)을 100ml의 MeOH에 용해시키고, 촉매적 환원을 수행한

다. 생성물을 20ml의 DMF에 용해시키고, 0.85g의 Boc-Gln-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OH 및 135mg의 HOBt를 가한다. 혼합물을 빙냉하고, 210mg의 DCC를 가한다. 전체 혼합물을 20시간 교반한다. 생성된 DCU를 여거하고, 여과액을 농축한다. MeOH를 가하고, 생성된 침전물을 여과에 의해 모은다. 수율 1.50g(87.4%), 융점 216~217℃(분해)

$[\alpha]_D^{26}$ -11.8° (c=1.0, DMF), Rf^1 0.43.

원소분석 : $C_{98}H_{154}O_{23}N_{22}S_4$에 대한

계산치 : C ; 55.09 H ; 7.27, N ; 14.42, S ; 6.00

실측치 : C ; 54.81, H ; 7.33, N ; 14.23, S ; 5.79

(xvi) H-Lye-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Met-Leu-Phe-Arg-Gly-Arg-Arg-Ala-Ser-Gln-OH의 제조.

1.0g의 Boc-Gln-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-Arg(Pme)-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBu^t 에 10ml의 TFA를 가하고, 혼합물을 실온에서 50분간 흔든 후 농축시킨다. 에테르를 가하고 침전을 여과에 의해 모아서 건조시킨다.

한편, 10ml의 TFA를 0.83g의 Z-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc에 가하고, 혼합물을 실온에서 10분간 흔든후 농축시킨다. 에테르를 가하고, 침전을 여과에 의해 모아서 건조시킨다. 이것을 10ml의 DMF에 용해시키고 용액을 드라이아이스-아세톤으로 냉각시킨 후 0.23ml의 6.2NHCl/AcOEt 및 이소아밀나이트라이트(0.075ml)를 가한다. 온도를 -25°~-20℃에서 20분간 유지하고(히드라진 시험에 음성), 반응 혼합물을 드라이아이스-아세톤으로 다시 냉각시킨 후, 0.25ml의 TEA로 중화한다. 아민 성분을 40ml의 DMF에 용해시키고 용액을 빙냉한다. TEA(0.16ml)를 가하고, 상기 아지드 용액을 가한다. 전체 혼합물을 4℃에서 72시간 교반하고, 묽은 아세트산에 붓는다. 생성된 침전을 여과에 의해 모으고 CH_3CN 용액으로 세척한다. 수율 1.40g(81.5%), Rf^2 0.09.

이 생성물의 일부(400mg)을 0.15M MSA를 함유한 60ml의 TFA-티오아니솔-메틸설파이드(8:1:1)에 용해하고, 용액을 실온에서 2시간 교반한다. $AcONH_4$(400mg)을 가하고 혼합물을 농축한다. 에테르를 가하고 침전을 여과에 의해 모은 후 건조시킨다. 이것을 소량의 1N AcOH에 용해시키고 용액을 세파덱스 G-25 컬럼(2.2×120cm)를 통해 통과시킨다. 이때 용리액은 1N AcOH를 사용한다. 160~260ml의 분획을 합하고 동결 건조시킨다. 동결 건조물을 앰버라이트 IRA-410(아세테이트형) 컬럼에 통과시키고 동결 건조시킨다. 이 동결 건조물을 TSK-LS-410 컬럼(2.14×75cm+2.14×30cm)을 사용하여 HPLC에 의해 정제하여 상기에 확인된 화합물을 수득한다.

수율 45mg. $[\alpha]_D^{24}$ -45.9° (c=0.7, 0.1N AcOH), Rf^4(셀룰로오즈) 0.20.

아미노산 분석 : Lys 1.71, Arg 4.71, Ser 1.69, Glu 2.12, Gly 1.00, Ala 1.03, Met 0.32, Leu 1.30, Phe 1.08(평균 회수율 77%)

[참고예 2]

담체단백질-폴리펩티드 착체의 합성.

참고예 1(xvi)에서 수득된 폴리펩티드를 굳프랜드 등의 방법에 따라 티로글로불린(이하 TG)과 결합한다[Science, 144, 1334(1964)]. 2.5mg의 상기 폴리펩티드를 3.75mg의 TG와 혼합하고, 2ml의 50mM 포스페이스 완충액을 가한 후, 혼합물을 빙수에서 잘 교반한다. 여기에 200ml의 증류수에 녹인 30.4mg의 카르보디이미드 히드로클로라이드 용액을 점차 적가한다. 혼합물을 빙수에서 3시간 교반한다. 반응후, 증류수에 대해 충분히 투석을 수행하고, 동결 건조시켜 4.7mg의 단백질 착체를 수득한다.

[참고예 3]

EIA에 의한 항체 검출을 위한 효소 결합 항원의 제조.

EIA를 위한 효소결합 항원을 기따가와등에 따라 제조한다[Journal of Biochemistry, 79, 233, (1976)].

(ⅰ) 말레이미도기를 폴리펩티드에 도입.

참고예 1(xvi)에서 수득된 폴리펩티드(350nmoles)을 1ml의 100mM 포스페이트 완충액(pH 6.8)에 용해시키고, 이 용액을 70l의 N,N-디메틸포름아미드에 녹인 585g(1.75moles)의 N-(4-카르복시 시클로헥실메틸)말레이미드 N-히드록시숙신이미드 에스테르용액에 가한다. 혼합물을 30℃에서 30분간 교반한다. 반응후, 세파덱스 G-25 컬럼을 사용함으로써 분획화하여 말레이미도기가 도입된 185nmoles의 폴리펩티드 분획을 수득한다.

(ⅱ) 말레이미도기 함유 폴리펩티드와 β-D-갈락토시다제의 결합.

참고예 3(i)에서 수득된 말레이미도 함유 폴리펩티드(16.5nmoles)를 3.3nmoles의 β-D-갈락토시다제와 혼합한다. 4℃에서 18시간 반응한후, 412.5nmoles의 β-메르캅토에탄올을 가하여 반응을 종결시킨다. β-D-갈락토시다제 결합 폴리펩티드를 세파로스 6B 컬럼에 분획하고 나머지 실험에 사용한다.

[참고예 4]

[EIA 방법.]

참고예 2에서 수득된 단백질 착체로 면역된 생쥐의 혈청 또는 융합세포 상층액에서의 항체 활성을

EIA 방법에 의해 검출한다[Immunology, 1, 3(1978)]. 혈청 또는 융합세포 상층액을 완충액 A(20mM Na_2HPO_4, 100mM NaCl, 01% NaN_3, 1mM $MgCl_2$, pH 7.0)로 희석하고 희석액 중 100l를 실시예 3에서 수득된 폴리펩티드 유도체 100l와 혼합한 후, 반응을 24℃에서 24시간동안 진행한다. 토끼의 항-생쥐의 IgG와 결합된 3% 셀룰로오즈 100l를 가하고, 반응을 24℃에서 4시간 진행한다. 반응후, 셀룰로오즈를 0.5%의 트윈 20을 함유한 완충액 A로 잘 세척하고 500l의 20g/ml 4-메틸움벨리페릴-β-D-갈락토시다제를 가하고, 37℃에서 2시간 반응시킨후, 3ml의 100mM 탄산염 완충액(pH 10.5)를 가하여 반응을 종결시킨다. 형광 강도를 형광계(자극 : 365nm : 사출 : 450nm)로 측정한다.

[참고예 5]

[면역법.]

7~8주된 6마리된 암컷 BALB/C 생쥐를 프로인트의 완전보조제와 잘 혼합된 참고예 2에서 수득된 단백질 착제(항원) 40g(단백질 기준)으로 피하 접종한다(1차 면역). 1차 면역 후 2주째 되었을 때 프로인트의 불완전 보조제와 혼합된 상기와 같은 량의 항원으로 피하 접종한다(2차 면역). 2주후에, 2차 면역과 같은 방법으로 3차 면역을 수행한다. 3차 면역후 6일 지나서, 쥐로부터 부분 혈액 샘플을 채취하고, 참고예 4에 기재된 EIA 방법에 의해 혈청 항체 역가를 측정한다. 번호가 γ-2인 생쥐는 높은 항체 역가를 나타낸다. 0.5ml의 염화나트륨 수용액에 용해된 120g의 항원으로 정맥내 접종하여 최종 면역을 수행한다. 각 생쥐의 항체 역가 데이터는 표 3에 나타낸다.

[표 3]

면역된 생쥐의 항-펩티드항체 역가

생쥐번호	B/T(%)		
	1차면역 1)	2차면역 2)	3차면역 3)
γ-1	-4)	N.D	24.5
2	N.D 5)	19.3	35.3
3	-	N.D	24.7
4	N.D	1.3	1.7
5	N.D	1.8	5.0
6	-	N.D	0.8
정상 쥐	0.6	0.1	N.D

1) 혈청 희석비 : 1/1000

2) 혈청 희석비 : 1/6300

3) 혈청 희석비 : 1/7800

4) - : 검출되지 않음

5) ND : 측정되지 않음

B/T : (한계효소활성/총 가해진 효소활성)×100

[참고예 6]

[세포융합]

참고예 5의 방법에 의해 면역을 수행한다. 최종면역 3일후, γ-2 생쥐로 부터 비장을 잘라내고, 스테인레스 메시에 압력하 여과한 후 이글의 최소 필수 배지(MEM)에 현탁시켜 비장 세포 현탁액을 수득한다. 세포융합을 위해, BALB/C 생쥐 유도 P3-X63, Ag8.U1(P3UI) 골수 세포를 사용한다[Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1, (1978)]. 본래 방법에 의해 세포융합을 사용한다[Natrue, 256, 495, (1975)]. 비장세포 및 P3UI 세포를 무혈청 MEM으로 따로 3번 세척하고 5:1(세포수)의 비로 혼합한다. 혼합물을 800rpm에서 15분간 원심분리하여 세포를 침전시킨다. 상층액을 제거한 후 침전물을 가볍게 흔들고, 0.3ml의 45% 폴리에틸렌글리콜(PEG) 6000(Koch-Light)를 가한 후, 혼합물을 37℃에서 7분간 유지된 온수 탱크에서 방치하여 세포융합을 수행한다. 여기에 MEM을 1분당 2ml의 속도로 가한다. 총 12ml의 MEM을 가한후, 생성된 혼합물을 600rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 제거한다. 이 세포 침전물을 2×10^5 P3UI 세포/ml 농도의 10% 송아지 태아 혈청(RPMI 1640-10FCS)로 보충된 RPMI-1640 배지에 현탁시키고, 24-웰 멀티디쉬(린브로)에 각 144웰을 1ml의 현탁액으로 시이딩(Seeding)한다. 시이딩후, 5% 이산화탄소 기체 배양기에 37℃에서 세포를 배양한다. 24시간 후, 웰당 1ml의 HAT(1×10^{-4} M 히포크산틴, 4×10^{-7} M 아미노프테린, 1.6×10^{-5} M 티미딘)으로 보충된 RPMI 1640-10FCS 배지(FAT 배지)를 가함으로써 HAT 선택 배양을 시작한다. 배양 시작후 3,5 및 7일에 1ml의 현배지를 1ml의 새 HAT 배지로 바꾸면서 HAT 선택 배양을 계속한다. 세포융합 후 10~14일간 융합세포의 성장이 확연하다. 배양 브로스가 황색으로 변했을때(약 1×10^6 세포/ml) 상층액을 모으고 EIA 방법에 의해 항체의 존재를 검사한다. 이와 같은 방법으로 융합세포의 성장이 현저한 141웰의 상층액을 검사한다. 두웰(γ2-11 및 γ2-100)은 강한 항체 활성을 나타내며 다른 두웰(γ2-62 및 γ2-100)은 강한 항체활성을 나타낸다.

[참고예 7]

[클로닝]

항체 활성이 양성이 3웰(γ2-11, 62 및 100)의 융합세포를 제한 희석법에 의해 클로닝한다. 융합세포를 2융합세포/ml 농도로 RPMI 1640-20FCS에 현탁시키고, 현탁액을 96-웰 미크로플레이트의 웰에 0.1ml씩 분배한다. 상기 분배에서, 웰당 5×10^5의 BALB/C 생쥐 흉선 세포를 공급 세포로서 가한다. 결과로서 약 2주되었을때 세포 증식이 관찰된다. 상층액을 취하여, 실시예 4에 기재된 EIA 방법에 의해 항체의 존재를 검사한다. γ2-11의 19클론중 8, γ2-62의 54 클론중 3 및 γ2-100의 47클론중 5에서 항체활성이 나타난다.

[참고예 8]

[단클론성 항체 생산 융합세포에 의한 복수생성.]

0.5ml의 광물유로 복강내 전처리된 BALB/C 생쥐를 IFN-γ-결합활성을 갖는 항체를 제조할 수 있는 1×10^6 γ2-11.1 클론세포로 복강내 접종함으로써 복수가 생성된다. 융합세포를 복강내 투여하고 10일 후, 복수를 취하여 10^7배 이하로 희석하여 항체활성을 검사한다. 상응하는 클론세포 배양 상층액을 항체 활성을 10^4배 이하로 희석하여 검사한다면 복수의 생성은 항체 활성에 있어 약 1000배 증가한다.

[참고예 9]

[단클론성 항체 정제.]

참고예 8에서 수득된 복수 4ml를 출발물질로써 사용하여, 스타헬린 등의 방법에 의해 단클론성 항체 정제를 수행한다[Journal of Biological Chemistry, 256, 9750, (1981)]. 복수를 먼저 10,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 그로 부터 피브린 물질을 제거하고, 280nm(A_{280})에서 자외선 흡수의 범위가 12~14가 되는 농도가 되도록 포스페이트 완충액-염수(PBS ; 8.1mM NaH_2PO_4, 1.5mM KH_2PO_4, 2.7mM KCl, 137mM NaCl ; pH 7.2)로 희석한다. 희석된 샘플에 포화 황산 암모늄 수용액을 가하여 황산에 대한 농도가 47%가 되게 한다. 혼합물을 4℃에서 60분간 교반하여 염석시키고, 원심분리(10,000rpm, 15분)하여 침전을 수득한다. 침전을 50nM NaCl을 함유한 20nM 트리스 완충액(pH 7.9)에 용해시키고 같은 완충액 2ℓ에 투석시킨다. 2시간후, 투석 용액을 같은 용액 새로운 2ℓ로 바꾸고 투석을 15시간 더 계속한다. 10,000rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 제거하고, 상층액의 A_{280}치가 20~30되도록 농도를 맞춘다. 50mM NaCl을 함유한 충분한 량의 트리스 완충액으로 평형된 DEAE-셀룰로오즈 컬럼(8ml, 와트만 DE_{52})에서 상기 샘플을 분획한다. 1.5ml/분의 유속으로 상기 완충액으로 세척한 후, NaCl 농도를 50mM~500mM에서 직선적으로 증가시킨다. 이 조건하, 유출 분획에서 항체활성을 검사한다.

[참고예 10]

참고예 9의 방법에 의해 정제된 유출분획으로 부터의 단클론성 항체 25ml(65.3mg)를 0.1M $NaHCO_3$(pH 8.3)에서 밤새 투석시킨다. 한편으로는 25ml의 AFFI-GEL 10(Bio-Rad)을 유리필터를 사용하여 물로 철저히 세척하고, 0.1M $NaHCO_3$(pH 8.3)에 현탁시킨 후 상기 항체와 혼합한다. 혼합물을 4℃에서 천천히 4시간 교반하여 반응을 수행하고 4℃에서 밤새 방치한다. 생성된 AFFI-GEL10을 유리 필터를 사용하여 0.1M $NaHCO_3$(pH 8.3)으로 잘 세척한다. 이 겔에 0.1M 에탄올아민 및 0.15M NaCl을 함유한 25ml의 용액(pH 8.0)을 가한다. 이 혼합물을 4℃에서 1시간동안 흔들어 잔류 미반응 활성기를 보호한다. 겔을 PBS로 잘 세척하고, 25ml의 0.1% NaN_3-함유 PBS에 현탁시킨다. 현탁액을 4℃에서 저장한다. 가해진 항체의 양 및 회수된 여과액에서의 항체의 양을 기준으로 항체가 겔 1ml당 2.35mg의 비율로 겔에 접합되었다는 것을 알 수 있다. 이와 같은 방법으로 수득된 반응 생성물을 컬럼에 패킹하고 항체 컬럼으로 사용한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

유전자 재조합 기술에 의해 인체면역 인터페론을 코우딩하는 염기 서열을 함유한 DNA를 갖는 대장균 형질 전환체로부터 수득한 인체 면역 인터페론 함유 용액으로부터 하기식 :

H-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Met-Leu-Phe-Arg-Gly-Arg-Arg-Ala-Ser-Gln-OH로 표시되는 폴리펩티드에 대한 단클론성 항체를 사용하여 정제됨을 특징으로 하는 10^7 μ/mg 이상의 비활성도를 갖는 인체 면역 인터페론 단백질의 정제방법.

청구항 2

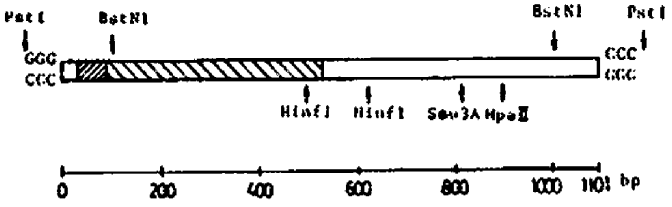
제1항에 있어서, 인체 면역 인터페론을 코우딩하는 염기 서열이 하기 일반식을 갖는 방법.

(5') TGT TAC TGC CAG GAC CCA TAT GTA AAA GAA GCA GAA AAC CTT AAG
AAA TAT TTT AAT GCA GGT CAT TCA GAT GTA GCG GAT AAT GGA ACT CTT
TTC TTA GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA GAG GAG AGT GAC AGA AAA ATA
ATG CAG AGC CAA ATT GTC TCC TTT TAC TTC AAA CTT TTT AAA AAC TTT
AAA GAT GAC CAG AGC ATC CAA AAG AGT GTG GAG ACC ATC AAG GAA GAC
ATG AAT GTC AAG TTT TTC AAT AGC AAC AAA AAG AAA CGA GAT GAC TTC
GAA AAG CTG ACT AAT TAT TCG GTA ACT GAC TTG AAT GTC CAA CGC AAA
GCA ATA CAT GAA CTC ATC CAA GTG ATG GCT GAA CTG TCG CCA GCA GCT
AAA ACA GGG AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CGA GGT CGA AGA
GCA TCC CAG-X(3')

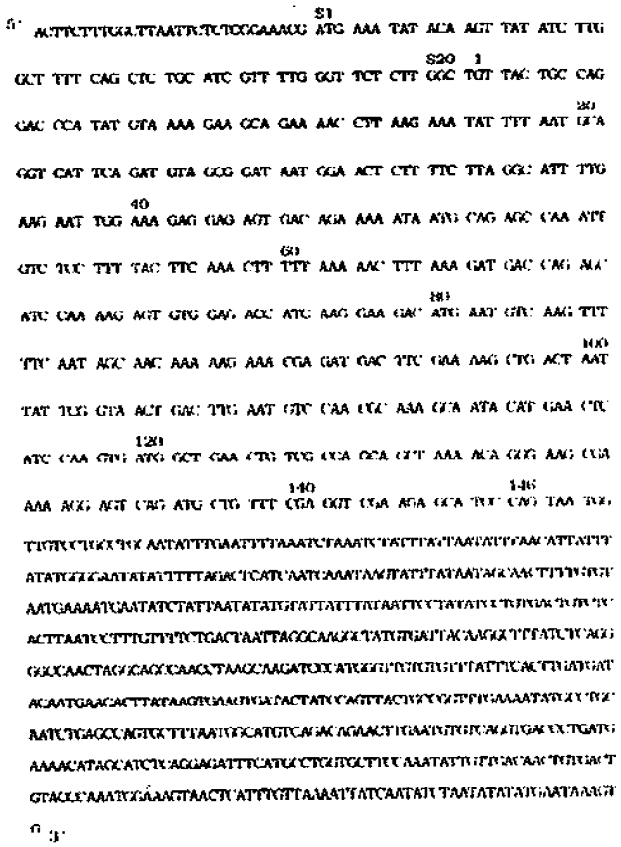
(식중 X는 TAA, TGA 또는 TAG임).

도면

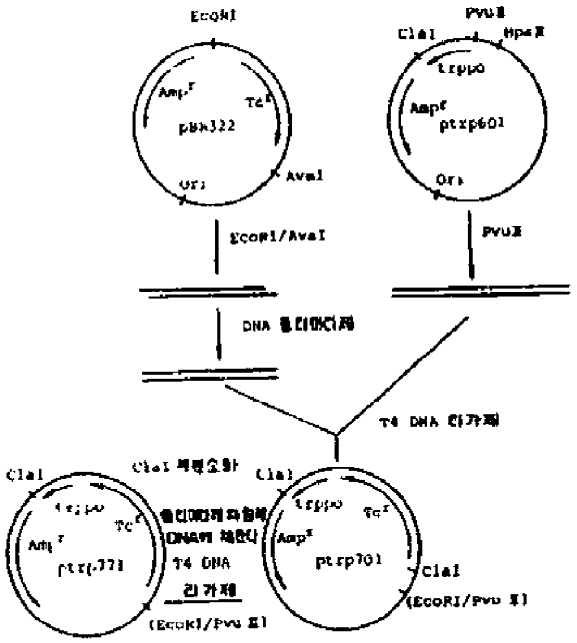
도면1



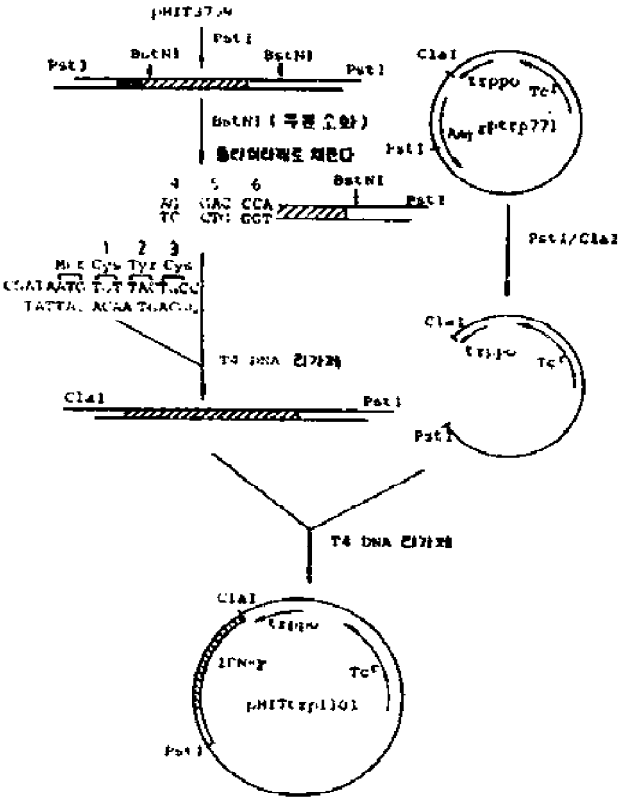
도면2



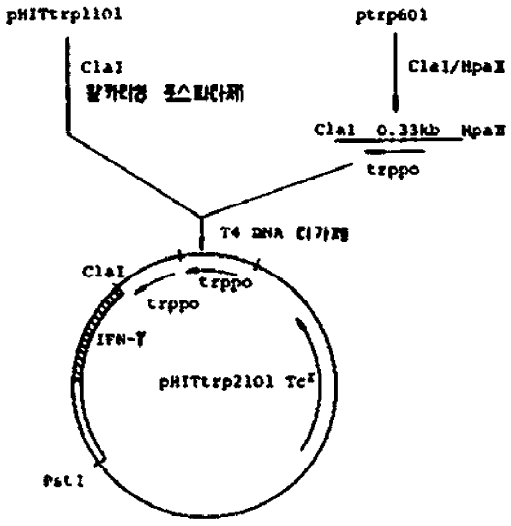
도면3


EcoRI
Amp
Tc
pBR322
Ori
AvaI
EcoRI/AvaI
PvuII
ClaI
HpaII
trpp0
Amp
ptrp601
Ori
PvuII
DNA 폴리머라제
T4 DNA 리가제
ClaI
ClaI 제한효소
ClaI
Amp
Tc
T4 DNA
리가제
(EcoRI/Pvu II)
Amp
ptrp701
ClaI
(EcoRI/Pvu II)

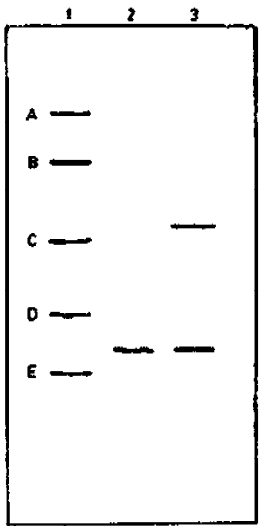
도면4


Pst I
BstNI
ClaI
trppo
Tc^r
Amp^r
ptrp771
T4 DNA 리가제
IFN-γ
pHITtrp1101

도면5


pHITtrp1101
ptrp601
ClaI
ClaI/HpaI
ClaI 0.33kb HpaI
trppo
T4 DNA 리가제
IFN-γ
pHITtrp2101 Tc^r
PstI

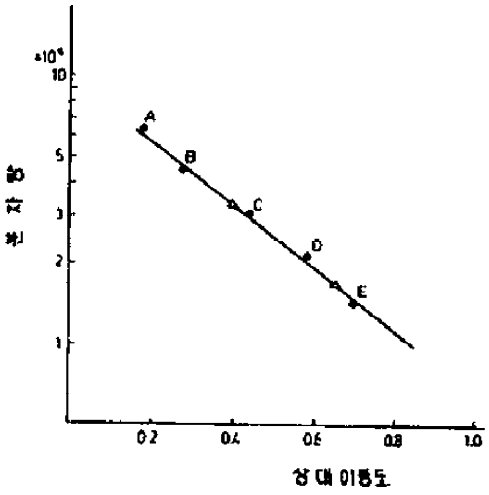
도면6



A 소 혈청 알부민
B 오브 알부민
C 탄산 탈수 효소
D 트립신 저해제 (콩)
E 라이소자임

1 : 분자량 마커
2 : 단 백 질 (2-머르캅토에탄올과 같이)
3 : 단 백 질 (2-머르캅토에탄올 없이)

도면7



A 소 혈청 알부민
B 오브 알부민
C 탄산 탈수효소
D 트립신 저해제
E 라이소자임