(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 39/385

(45) 공고일자 2003년07월23일
(11) 등록번호 10-0369286
(24) 등록일자 2003년01월10일

(21) 출원번호	10-1996-0702120	(65) 공개번호	특1996-0705583
(22) 출원일자	1996년04월25일	(43) 공개일자	1996년11월08일
번역문제출일자	1996년04월25일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1994/12231	(87) 국제공개번호	WO 1995/11702
(86) 국제출원일자	1994년10월25일	(87) 국제공개일자	1995년05월04일
(81) 지정국	국내특허 : 캐나다 일본 대한민국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 사이프러스 독일 덴마크 스페인 핀랜드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴		

(30) 우선권주장 08/143575 1993년10월25일 미국(US)

(73) 특허권자 아네르겐, 인코오포레이티드
미국 캘리포니아주 94063 레드우드 시티 페놉스코트 드라이브 301
(72) 발명자 에릭 티. 로디즈
미합중국, 캘리포니아 94591, 밸리조, 브리갠틴 로드 142
비쉬워지트 내그
미합중국, 캘리포니아 94044, 패시피카, 린브룩 드라이브 465
(74) 대리인 안성탁, 김승욱, 나영환, 이상섭

심사관 : 한형미

(54) MHC단백질의원핵세포내발현

명세서

<1> 본 출원은 1993년 10월 25일자 출원된 미합중국 일련 번호 제08/143,575호의 일부 계속 출원이다. 상기 출원은 전문 모두 본 명세서에 참고로 인용되어 있다.

<2> 발명의 배경

<3> 본 발명은 예를 들면 자가면역 질환, 알레르기 반응, 이식 거부반응 및 기타면역 질환을 치료하는데 있어 T 세포 기능을 조절하는 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 단백질을 암호하는 뉴클레오티드 서열로 형질전환시킨 원핵세포 중에서 주 조직적합성 복합체 (MHC) I군 및 II군 단백질을 제조하는 것에 관한 것이다. MHC 단백질은 T 세포를 표적으로 하는 복합체를 만드는데 유용하게 사용된다. 이 복합체는 MHC 단백질 및 특정 질환과 관련된 항원 단편을 대표하는 펩티드를 함유하고 있다. 이 복합체는 방사성동위원소나 기타 진단용 표지에, 또는 복합체를 치료상 유용하게 만드는 독소나 기타 물질에 추가결합할 수 있다.

<4> 원치않는 T 세포 활성화에 따른 다수의 병리학적 반응이 알려져 있다. 예를들면, 다수의 알레르기성 질환은 특정 MHC 대립유전자와 관련이 있거나 또는 자가면역 성분을 가지고 있는 것으로 추정된다.

<5> 기타 유해한 T 세포-중개된 반응으로는 이식편이나 이식체의 형태로 동종이계 숙주로부터 체내로 특정 목적을 가지고 도입된 외래 세포를 파괴하는 것이 포함된다. 이 과정은 "동종이식편 거부반응"으로 알려져 있으며, 외래 MHC 분자와 숙주 T 세포의 상호작용과 관련이 있다. 많은 경우에서, 동종이식편에 대한 숙주의 반응에 광범위한 MHC 대립유전자가 관계한다.

<6> 자가면역 질환은 특히 중요한 유해 면역 반응의 부류이다. 자가면역질환에서는, 자기-내성(self-tolerance)이 상실되어, 면역계가 외부 표적과 마찬가지로 "자기" 조직을 공격한다. 30종 이상의 자가면역 질환이 현재 알려져 있으며, 그중에는 중증성 근무력증(MG)과 다발성 경화증(MS)을 비롯한 다수의 질환이 대중의 주목을 끌고 있다.

<7> 자가면역 질환에 있어 MHC II군 단백질의 관련성은 동물 모델에서 입증된바 있다. MHC II군 단백질 자체에 대한 항체나 MHC II군 유전자의 발현을 유도하는 인자에 대한 항체를 투여하면 상기 모델 시스템에서 자가면역 증세의 진행이 억제된다. 또한, 특징적인 헬퍼 T 세포 수용체인 CD4의 항-CD4 모노클로날 항체를 사용하여 자가면역 시스템을 방해함으로써, 이들 모델에서 헬퍼 T 세포의 역할을 입증하였다 [Shizuru, J.A. 등, Science (1988) 240:659-662].

<8> 최근 실험에서는 특정 환경하에서 자가반응성 임파구에 있어 아네르기(anergy)나 무반응이 유도될 수 있다는 사실이 제시된 바 있다 [참조, Schwartz, Cell (1989) 1073-1081]. 실험관내 실험 결과, 보조-자극 시그날의 부재하에서 MHC II군 분자에 의한 항원 제시로 동계 T 세포에서 증식성 무반응 상태가 유도됨이 제시되었다 (참조, Quill 등, J. Immunol. (1987) 138:3704-3712). 문헌 [Sharma 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:11465-11469)에 따르면, 생체내에서도 아네르기를 유도할 수 있으며, 이

러한 방식으로 자가면역 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

<9> 따라서, MHC 폴리펩티드는 여러 약학적 용도를 가지고 있다. 그러나, 이러한 유형의 치료 가능성을 실현하기 위해서는, 풍부한 MHC 폴리펩티드의 제공원이 필요하다. 포유동물 세포에서 MHC 폴리펩티드가 발현된 바 있다. 예를들면, 생쥐 I-E^k 단백질의 가용성 형태가 CHO 세포에서 발현되었다 [참조, Wettsttein 등, J. Exp. Med. 174: 219-228 (1991)]. 그러나 포유동물계로부터의 발현량은 시판 규모로 MHC 폴리펩티드를 경제적으로 생산하기에 충분치 않다. 또한, 포유동물 세포는 MHC 펩티드 결합 포켓에 내인성 펩티드가 부하되어 있어서, MHC로부터 이러한 펩티드를 제거하는 것이 필요하다. 따라서, 종래의 기술에서는 적은 비용으로, 다량의 치료 활성적 MHC 폴리펩티드를 제조하는 방법이 없었다. 본 발명은 이러한 요구와 관련한 것이다.

<10> **발명의 개요**

<11> 본 발명은 변형된 글리코실화를 지닌, 항원성 펩티드에 결합하는 재조합 MHC 폴리펩티드를 함유한 조성물을 제공한다. 개시된 일부의 재조합 구축물에서 경막(transmembrane) 도메인이 흠결되어 있다. MHC 폴리펩티드 조성물은 MHC 폴리펩티드를 암호하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 이용하여 이. 콜리 같은 원핵 숙주 세포에서 발현된다. α- 및 β-쇄를 포함한 MHC II군 재조합 플리펩티드가 본 명세서에서 설명된다. 다수의 재조합 MHC 폴리펩티드는 임의로 결합되어 활성 MHC 조성물을 형성한다.

<12> 본 발명에는 (a) 폴리펩티드가 발현되는 조건하에서, MHC 폴리펩티드를 암호하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 함유한 원핵 세포를 배지에서 증식시키는 단계: 및 (b) MHC 폴리펩티드를 추출하고 단리하는 단계를 포함하여, MHC 폴리펩티드를 제조하는 방법이 포함된다. 이 방법에 따르면, 단일 원핵세포중에서 이종이량체를 형성하는 두개의 MHC 폴리펩티드가 발현된다. 이 방법에 의해 제조된 조성물 또한 본 발명의 과제이다.

<13> 본 발명은 또한 원핵세포의 프로모터 서열에 작동가능하게 결합된 MHC 폴리펩티드를 암호하는 뉴클레오티드 서열을 함유한 원핵 발현 벡터를 제공한다. 벡터내에는 MHC 폴리펩티드 서열에 작동가능하게 결합된 시그날 서열이 임의로 포함되어 있기도 한다. MHC 폴리펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열은 전장 MHC 폴리펩티드외에도 절단형 MHC 폴리펩티드나 경막 도메인이 결실된 MHC 폴리펩티드 및 전길이 MHC 폴리펩티드로부터 유래된 기타 구성체를 암호할 수 있다. 이. 콜리 같은 원핵 세포를 형질전환하는데 벡터를 사용할 수 있다.

<14> 본 발명은 추가로 변형된 글리코실화 및 항원성 펩티드가 결합하는 항원결합 부위를 가진 재조합 MHC 성분 단리체와 항원성 펩티드로 실질적으로 구성된 실질적으로 순수한 MHC-펩티드 복합체를 제공한다. 이 펩티드는 통상 약 8 내지 약 30 개의 아미노산으로 되어 있으나, 이보다 짧거나 길 수도 있다. 펩티드는 항원 결합 부위에 비공유 결합할 수 있다. 본 발명은 자가항원성이어서 자가면역질환과 관련있는 펩티드를 포함한다. 펩티드상의 에피토프는 예를 들면 다발성 경화증, 류마티스성 관절염 또는 중증성 근무력증과 관련있는 자가반응성 T 세포에 의해 인식될 수 있다. 적합한 펩티드로는 인체 AChR α 서브유니트의 잔기 138-167. 인체 MBP의 잔기 84-102 및 인체 MBP의 잔기 148-162를 함유한 것이 포함된다.

<15> 또한, 약학적으로 허용되는 담체와 재조합 MHC-펩티드 복합체를 함유하는 약학 조성물이 제공된다. 약학 조성물의 일례로는 MHC-펩티드 복합체가 리포좀내에 봉매된 조성물이 있다.

<16> **정의**

<17> "MHC 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열"은 세포중에 존재시, MHC 폴리펩티드를 발현하는 전장 폴리뉴클레오티드 서열이나 소서열을 말한다. 재조합 구축물의 발현에 있어서, 당업자라면 삽입된 폴리뉴클레오티드 서열이 동일할 필요는 없으며, 이것이 유래된 유전자의 서열과 "실질적으로 동일"하다는 것을 알 수 있을 것이다. 이하의 설명을 통해서, 상기 용어가 이러한 변이체도 특별히 포괄함을 알 수 있다.

<18> 삽입된 폴리뉴클레오티드 서열이 전사 및 해독되어 기능적 폴리펩티드를 생성하는 경우, 당업자라면 코돈 축합성으로 인해 다수의 폴리뉴클레오티드 서열이 동일한 폴리펩티드를 암호하게 된다는 것을 알고 있을 것이다. 이들 변이체도 또한 상기 용어에 특별히 포함된다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드에는 특별히 MHC 유전자 서열과 실질적으로 동일(후술된 바와 같이 결정)하고 MHC 폴리펩티드의 기능을 보유한 단백질을 암호하는 전장 서열이 포함된다. 따라서, 본 명세서에 개시된 MHC 단일 서브유니트를 암호하는 서열의 경우, 이 용어에는 본 명세서에 개시된 서열과 실질적으로 동일하며 항원성 펩티드와 결합하고 T 세포 수용체와 결합할 수 있는 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오티드 서열 변이체도 포함된다. 본 발명의 폴리펩티드는 전장 MHC 서브유니트나 또는 이것의 단편으로 구성될 수 있다.

<19> 두개의 핵산 서열이나 폴리펩티드는 두 서열내의 뉴클레오티드나 아미노산 잔기 서열 각각이 후술하는 바와 같이 최대 대응 관계로 배열하였을때 동일한 경우를 "동일"한 것으로 말한다. "상보적"이란 용어는 이 서열이 대조 폴리뉴클레오티드 서열 전부나 일부와 동일한 것을 의미하는 것으로 본 명세서에서 사용되고 있다.

<20> 두개(또는 그이상)의 폴리뉴클레오티드나 폴리펩티드간의 서열 비교는 통상 "비교 윈도우"를 통해 유사 서열의 국부적 영역을 동정하고 비교하여 두 서열의 서열을 비교함으로써 수행한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "비교 윈도우"란 약 20이상, 일반적으로 약 50 내지 약 200, 및 더욱 일반적으로 약 100 내지 약 150의 인접 위치의 분절을 의미하며, 여기서 두 서열을 적정 배열한후, 어떤 서열을 인접위치의 동일 수의 대조 서열과 비교한다.

<21> 비교를 위해 서열을 적정 배열하는 것은 문헌 [Smith 및 Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)] 의 국소적 상동성 연산법, 문헌[Needleman 및 Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)] 와 상동성 배열 연산법, 문헌 [Pearson 및 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988)] 의 유사성 연구 방법 및 이들 연산법의 컴퓨터 실행에 의해 수행할 수 있다. 통상, 최고의 동일성 비율을 제공하는

프로그램을 사용한다.

<22> "서열 동일성의 백분율"은 비교 윈도우를 통해 두개의 적정 배열된 서열을 비교함으로써 결정되는데, 이때 비교 윈도우의 폴리뉴클레오티드 서열 부분은 두 서열의 적정 배열에 대해 대조 서열 (첨가나 결실은 미포함) 에 비해 첨가나 결실(즉, 갭) 을 포함할 수도 있다. 상기 백분율은 양 서열내에 동일 핵산 염기나 아미노산 잔기가 존재하는 위치의 수를 결정하여 정합(matched) 위치의 수를 산출하고, 이 정합 위치의 수를 비교 윈도위내 전체 위치의 수로 나눈후, 그 결과를 100으로 곱하여 서열 동일성 비율을 산출함으로써 계산된다.

<23> 용어 "실질적으로 동일한" 폴리뉴클레오터드 서열이란 표준 파라미터를 이용한 전술한 프로그램으로 대조 서열과 비교하여 폴리뉴클레오티드의 서열이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상 및 가장 바람직하게는 95% 이상 동일한 서열을 의미한다. 당업자라면, 코돈 축합성, 아미노산 유사성, 리딩 프레임 위치설정 등을 고려하여 두 뉴클레오티드 서열에 의해 암호된 단백질의 대응 동일성을 결정하도록 이들 수치를 적절히 보정할 수 있다는 것을 알고 있을 것이다. 이러한 목적에 비추어 실질적으로 동일한 아미노산 서열이라 함은 통상 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상 및 가장 바람직하게는 95% 이상이 동일한 서열을 의미한다.

<24> 뉴클레오티드 서열이 실질적으로 동일한지를 알아내는 다른 방법은 두 분자를 엄중한 조건하에서 서로에게 하이브리드화시켜보는 것이다. 엄중 조건은 서열에 따라 다르며, 상황에 따라 달라지게 된다. 일반적으로, 엄중한 조건은 규정 이온 강도 및 pH에서 특정 서열에 대해 융점 온도(Tm)보다 약 5℃ 낮도록 선택한다. Tm은 표적 서열의 50%가 완전하게 정합되는 프로브에 하이브리드화되는 온도 (규정 이온 강토 및 pH하에서) 이다. 통상, 엄중 조건은 염농도가 pH 7에서 약 0.02 몰이상이고 온도가 약 60℃이상인 것이다.

<25> 단백질 서열이 실질적으로 동일한지를 알아내는 다른 방법은 한 단백질을 다른 단백질에 대해 생성된 항체와 면역 반응시켜보는 것이다. 따라서, 본 발명의 단백질은 MHC 폴리펩티드에 대해 생성된 항체와 면역학적으로 반응하는 단백질을 포함한다.

<26> 본 명세서에서 사용된 용어 "단리", "실질적으로 순수" 및 "실질적으로 균질"은 본래 수반하고 있던 성분으로부터 분리된 단백질을 기술하는데 사용된다. 통상, 단량체 단백질은 샘플의 약 60 내지 75% 이상이 단일의 폴리펩티드 주쇄를 나타낼때 실질적으로 순수한 것으로 본다. 소폭의 변이체 또는 화학적 변이체는 통상 동일한 폴리펩티드 서열을 공유하고 있다. 실질적으로 순수한 단백질은 중량 또는 분자수 기준으로 일반적으로 단백질 샘플의 약 85 내지 90% 이상, 더욱 일반적으로는 약 95% 이상 및 바람직하게는 약 99% 이상의 순도를 포함하고 있다. 단백질 순도나 군질도는 단백질 샘플을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동시킨후, 이 폴리아크릴아미드 겔 염색후 이 겔상의 단일 폴리펩티드 밴드를 관찰하는 것과 같은 당해 분야에 잘 알려진 다수의 방법에 의해 알아낼 수 있다. 특별한 경우에는 고 해상도가 요구되며, 정제를 위해서는 HPLC나 유사 방법이 사용된다.

<27> 본 명세서에서 사용된 용어 "MHC 폴리펩티드"는 MHC 복합체의 효과부의 전부 또는 일부(즉, 적절한 T 세포 수용체에 의해 인식되는데 필요한 서열과 항원결합 부위 또는 부위들을 포함하는 펩티드)를 구성할 수 있는 단일쇄 MHC 단백질(예, II군 분자의 α 또는 β쇄 또는 I군 분자의 중쇄)로, 천연 상태외의 것, 예를 들면 정상적으로 MHC를 발현하는 세포의 세포막과 결합하지 않는 형태를 지칭한다.

<28> 용어 "변형된 글리코실화"란 MHC 폴리펩티드가 비글리코실화된 것이거나 또는 천연 폴리펩티드에서 발견되는 것과는 다른 글리코실화 패턴을 가지고 있는 MHC 폴리펩티드의 글리코실화를 지칭한다. 본 출원에서 변형된 글리코실화는 생체내 과정을 통해 이루어지는 글리코실화를 말하며, 효소나 화학물질로 MHC 폴리펩티드를 처리하여 탈글리코실화된 분자를 생성하는 것과 같은 실험관내 공정을 의미하는 것은 아니다.

<29> "비글리코실화된 재조합 MHC 폴리펩티드"는 실질적으로 모든 천연적으로 존재하는 글리코실화가 이루어지지 않은 MHC I군 또는 II군 폴리펩티드이다. 일반적으로, 본 발명의 폴리펩티드는 MHC 폴리펩티드를 인체 세포에서 생성하였을때 약 10% 미만의 글리코실화를 가지게 된다. 인체 세포에서 생성된 MHC 폴리펩티드에 부착된 탄수화물 약 5% 미만을 가지는 것이 더욱 바람직하며, 약 1% 미만인 것이 가장 바람직하다.

<30> 본 발명의 비글리코실화된 재조합 MHC 폴리펩티드는 MHC 폴리펩티드를 암호하는 뉴클레오티드 서열로 형질전환시킨 원핵 숙주 세포에 의해 생성되는 것이 일반적이다. 유전자 발현을 제어하는 시그날에 MHC-암호 뉴클레오티드 서열을 결합시키는데는 일반적으로 재조합 DNA 기술을 이용한다. 원핵 숙주 세포에서 생산한 결과, MHC 폴리펩티드는 진핵 세포로부터 유래된 MHC 폴리펩티드에서 정상적으로 발견되는 탄수화물 부위는 결실되어 있다.

도면의 간단한 설명

<31> 제1도는 이. 콜리에서 발현된 재조합 DR2 쇄에 대한 펩터드의 결합 속도를 나타내는 도면이다.

<32> 제2도는 재조합 DR2-펩티드 복합체의 안정성을 나타내는 도면이다.

<33> 제3도는 정제한 재조합 DR2 폴리펩티드 쇄에 대한 MBP 펩티드의 최대 결합의 최적 pH를 나타내는 도면이다.

<34> 제4도는 본 발명의 복합체와 접촉한 T 세포에서의 γIFN 생산을 나타내는 도면이다.

<35> 제5도는 본 발명의 복합체와 접촉한 T 세포에서의 γIFN 생산을 나타내는 도면이다.

<36> 제6도는 다발성 경화증에 대한 동물 모델에 있어서 본 발명의 복합체의 효능을 나타내는 도면이다.

<37> **바람직한 구체예에 대한 설명**

<38> 본 발명은 T 세포 기능을 조절하는데 유용한 복합체를 형성하는데 사용할 수 있는 재조합 MHC 폴리펩티드 및 이 MHC 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다. 이 복합체는 항원성 펩티드와 복합체를 형성한 MHC 폴리펩티드로 구성되어 있으며, 이를 사용하면 알레르기 반응, 동종이식편 거부반응 및 자가면역질환 같은 유해한 T 세포-중개된 면역 반응을 억제할 수 있다. 또한, 이 복합체는 면역 반응을 촉진하는데 사용할 수 있으며, 백신으로 사용할 수도 있다.

<39> 본 발명은 또한 시판 규모로 MHC 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의해 제공되는 또다른 잇점은 목적하는 각종 용도에 사용가능한 변형된 MHC 폴리펩티드의 제조를 제조하는 용이하게 하는 수단을 제공한다는 데 있다. 예를 들어, 면역 반응 촉진용 복합체나 백신을 이용하는 경우, T 세포 활성화를 담당하는 보조자극 시그날에 함유된 경합 항원 제시 세포 보유 리간드에 부착되도록 하기 위해서는 MHC 폴리펩티드를 변형시킬 것이 요구된다. 대안의 방안으로, MHC 복합체를 T 세포 증식이 유도되도록 단리된 보조자극(costimulatory) 리간드에 결합시킬 수도 있다. 따라서, T 세포는 복합체에 의해 제시된 항원성 펩티드에 응답으로써 면역 반응이 개시된다.

<40> 본 발명의 비글리코실화된 MHC 폴리펩티드는 이. 콜리 같은 원핵 세포에서 생성된다. 원핵세포에서 생성된 본 발명의 MHC 폴리펩티드는 글리코실화된 천연 MHC 폴리펩티드와 유사한 효율로 항원성 펩티드에 결합한다.

<41> 본 발명에 따라, 목적하는 MHC 폴리펩티드를 암호하는 뉴클레오티드 서열을 단리하고, 적합한 원핵 숙주 세포중에서 형질전환시킨후, 이것을 MHC 폴리펩티드를 발현시키는 조건하에 배지중에서 증식한다. 이후, MHC 폴리펩티드를 세포나 배양 상청액으로부터 단리하고 적절한 항원성 펩티드와 결합시켜 본 발명의 복합체를 형성시킨다. 표준 기술에 따라 약학 조성물을 제조하고 투여한다. 이에 대한 일반적인 기술내용은 미합중국 특허 제5,130,297호 및 제5,194,425호를 참조하도록 한다.

<42> MHC 폴리펩티드

<43> MHC에 의해 암호된 단백질을 인체와 쥐 시스템 양자 모두에서 광범위하게 연구하였다. 일반적으로 이 단백질은 모든 세포의 표면상에서 발견되고 세포독성 T 세포에 의해 주로 인식되는 I군 단백질: 및 대식세포 같은 보조 세포를 비롯하여 수종의 세포 표면상에서 발견되고 헬퍼 T 세포에 항원을 제시하는데 관계하는 II군 단백질로 분류된다. 몇몇 조직적합성 단백질이 단리되어 특성이 규명된 바 있다. MHC 단백질 구조와 기능에 대한 일반적인 검토는 문헌 [Fundamental Immunology, 2d Ed., W.E. Paul, ed., Ravens Press N.Y. 1989]을 참조하도록 한다.

<44> 몇 몇 종의 MHC 복합체가 연구되었다. 쥐의 I-A 및 I-E (II군) 소영역에 의해 암호된 MHC 복합체는 두개의 비공유 결합된 펩티드 쇄: 32-38kd의 알파쇄 및 26-29kd의 베타쇄로 이루어져 있는 것으로 입증되었다. 제3의 불변 31kd 펩티드는 세포중에서 이들 두 펩티드와 비공유적으로 결합되어 있어서, 일반적으로 분해되어 항원성 펩티드의 부하를 가능하게 한다. 이 불변 쇄의 표면 발현으로 펩티드에 결합하여 이를 제시할 수 있는 MHC II군 쇄의 능력이 억제된다. I-A 영역의 7개 대립유전자 변이체의 알파쇄 및 베타 쇄가 클로닝 및 서열동정된 바있다 [Estees 등, "T cell Clones" in Regulation of Immune Gene Expression, Feldman 등, eds. (Humana Press 1985), pp. 3-19]. 쥐의 I-A(II군) 조직적합성 단백질을 정제하는 방법은 문헌 [Turkewitz, A.P., 등, Molecular Immunology (1983) 20: 1139-1147]에 기술되어 있다. 이 방법은 I군 분자에도 또한 적합하며, NP-40, 트윈 80 등과 같은 비이온성 세제를 이용하여 목적하는 MHC 분자를 함유하는 세포로부터 가용성 막 추출물을 제조하고, 이후, 목적하는 MHC 분자에 대해 생성된 항체를 함유하는 컬럼을 이용하는 친화성 크로마토그래피에 의해 MHC 분자를 정제한다. 용출 완충액중에 0.02% 트윈-80을 사용하면 정제된 분자의 응집을 제거하는데 도움이 된다.

<45> 인체 I군 단백질에 대해서도 연구가 이루어졌다. 염색체 6의 인체 MHC(HLA)는 3개의 유전자좌, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C를 가지며, 이중 처음 두개는 동종이계 항원을 암호하는 다수의 대립유전자를 가지고 있다. 이들은 44kd 서브유니트와 모든 항원 특이성에 공통인 12kd 베타$_2$-마이크로글로불린 서브유니트로 구성된 것으로 밝혀졌다. 이들 세제-가용성 HLA 항원을 분리시키는 것에 대해서는 문헌 [Springer, T.A., 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1976) 73: 2481-2485; Clementson K.J., 등, in "Membrane Proteins" Azzi, A., ed; Bjorkman, P., Ph.D. Thesis Harvard (1984)] 에 기술되어 있다.

<46> 추가 연구 결과. I군 인체 항원인 HLA-A2의 3차 구조에 대한 상세한 도면이 만들어졌다 [Bjorkman, P.J., 등, Nature (1987) 329: 506-512, 512-518). 이 도면에 따르면, 중쇄의 β_2-마이크로글로불린 단백질과 α_3 분절이 결합되어 있으며; 중쇄의 α_1 과 α_2 영역은 펩티드가 결합하는 항원-결합 부위를 형성하는 것으로 보인다 [Science (1987) 238: 613-614, Bjorkman, P.J. 등, Nature (상기 참조)]. 문헌 [Turner, M.J. 등, J. Biol. Chem. (1977) 252: 7555-7567]에 기술된 바와 같이 호모접합성 인체 임파아세포성 세포주 J-Y로부터 원형질막을 파파인 분해시켜 가용성 HLA-A2를 분해할 수 있다. 파파인은 경막영역에 인접하게 44kd 쇄를 절단하여 α_1, α_2, α_3 및 β_2 마이크로글로불린으로 이루어진 분자를 산출한다.

<47> 인체 II군 MHC 항원의 3차 구조도 조사한 결과, I군 분자와 유사하였다. 항원성 펩티드는 개방말단 항원 결합 홈에 결합되어 있다. 이 결합 홈은 2층막으로부터 연장된 2개의 II군 쇄의 N-말단 도메인 부분으로부터 형성된 것이다[Brown, 등, Nature 364: 33-39 (1993)), II군 유전자를 클로닝시켜 (Estees의 상기 문헌에 기술된 바와 같이) 예를 들면 후술된 바와 같은 II군 MHC 결합 도메인을 조작한다.

<48> MHC 유전자의 클로닝

<49> 기지의 다수 II군 단백질 각각의 아미노산에 대한 유전자 또는 cDNA를 클로닝하였다. 이들 핵산을 본 명세서에 기술된 바와 같이 본 발명에 따라 사용하면 원핵 숙주 세포중에서 MHC 폴리펩티드를 발현할 수 있다.

<50> 목적하는 MHC 유전자나 cDNA가 입수불가능한 경우는, 당업자에게 공지된 클로닝 방법을 이용하여

유전자를 단리해낼 수 있다. 사용가능한 방법중 한 가지는 목적하는 MHC 폴리펩티드를 정제하고, 부분 아미노산 서열을 얻은 후, 이 아미노산 서열에 의거하여 뉴클레오티드 프로브를 합성하고, 이 프로브를 사용하여 cDNA나 게놈 라이브러리로부터 목적하는 유전자를 가진 클론을 규명해내는 것이다.

<51> MHC 폴리펩티드는 임파구로부터 단리하여 수득하고, 목적하는 펩티드 항원에 결합할 수 있는 능력에 대하여 스크리닝할 수 있다. 임파구는 복합체로 치료한 개체종으로부터 얻는다. 예를 들면, 표적 자가면역 질환을 앓고 있는 개체의 인체 B 세포로부터 이들을 단리해낼 수 있다. B 세포를 우선 당해 분야에 공지된 기술을 이용하여 복제 결핍 엡스타인-바르 바이러스로 형질전환시켜 무한증식 세포로 만들 수 있다.

<52> 파파인 처리, 3M KCl 처리 및 세제 처리에 의해 용해시키는 것을 비롯하여 각종 기술을 이용해서 다수의 세포로부터 MHC 폴리펩티드를 단리해냈다. 세제로 임파구로부터 II군 단백질을 추출해낸후, 친화성 정제를 이용하는 것이 바람직한 방법이다. 이후, 투석과 같은 선별 방법에 의해 세제를 제거할 수 있다. MHC 폴리펩티드의 정제 방법은 앞에서 논의된 바 있다.

<53> 효소 단리후, 일부 아미노산을 결정하고, 목적 유전자에 하이브리드화하도록 설계된 축합성 올리고뉴클레오티드 프로브를 합성한다. 아미노산 서열결정을 하고, 문헌 [Sambrook 등, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory]에 기술된 바와 같은 표준 기술에 따라 올리고뉴클레오티드 프로브를 합성한다.

<54> 문헌 [Sambrook 등, 상기 참조]에 기술된 바와 같은 표준 기술에 따라 게놈 라이브러리 또는 cDNA 라이브러리를 제조한다. 게놈 라이브러리 구축을 위해. 무작위 단편화에 의해 큰 분절의 게놈 DNA를 생성하고, 이를 벡터 DNA와 결합하여 적절한 벡터내로 패키징할 수 있는 쇄(concatemer)를 형성한다. 이러한 목적으로 통상, 두 종류의 벡터, 박테리오파지 람다 벡터와 코스미드가 사용된다.

<55> cDNA를 제조하기 위해서, 우선 대상 유기체로부터 mRNA를 단리해낸다. 진핵세포의 mRNA는 3' 말단에 폴리-A 테일로 알려진 아데닌 뉴클레오티드 잔기의 스트링을 가지고 있다. 이후, 1본쇄의 올리고 d-T 뉴클레오티드를 효소 역전사효소에 대한 프라이머로 제공되는 폴리-A 테일과 하이브리드화시킨다. 이 효소는 주형으로 RNA를 사용하여 상보적 DNA(cDNA) 가닥을 합성한다. 이후, 주형으로 제1 cDNA 가닥을 이용하여 제2 DNA 가닥을 합성한다. 이. 콜리내에서 증식시키기 위해서는 플라스미드나 λ 파지 벡터내로 삽입하기 위해 이중-가닥 cDNA에 링커를 첨가한다.

<56> 목적 핵산 분절을 보유한 게놈이나 cDNA 라이브러리에서 클론을 동정하는 작업은 핵산 하이브리드화나 발현 벡터 사용시 암호된 단백질의 면역 검출에 의해 수행한다. 이후, 니트로셀룰로즈 필터 같은 고형 지지체상에 박테리아 콜로니를 복사한다. 이 세포를 용균시키고, 전술한 올리고뉴클레오티드 프로브나 목적단백질에 대한 항체로 프로브한다.

<57> 목적 유전자를 동정하는데 당업자에게 잘 알려진 다른 방법을 사용할 수도 있다. 예를 들면, 폴리머라제 쇄 반응 (PCR) 같은 증폭 기술을 이용하여 목적 뉴클레오티드 서열을 증폭시킬 수 있다. 미합중국 특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호에 이러한 방법이 기술되어 있다. PCR에 의해 증폭된 서열을 아가로즈 겔로부터 정제하고 표준 기술에 따라 적절한 벡터내로 클로닝시킬 수 있다.

<58> <u>MHC 폴리펩티드의 원핵세포내 발현</u>

<59> 본 발명에 따라 숙주 세포로 이용가능한 원핵세포로 가장 빈번하게 사용되는 대표적인 것은 각종 이. 콜리 균주이다. 그러나, 바실러스 서브틸리스 같은 바실러스, 각종 슈도모나스종 또는 기타 박테리아 균주 같은 다른 미생물 균주를 사용할 수도 있다.

<60> 본 발명에 따라, 절단형 또는 전장 핵산을, 원핵세포에서 유전자 발현을 지시하는 시그날에 작동가능하게 결합시켜 MHC 폴리펩티드를 암호하는 클로닝된 뉴클레오티드 서열로부터 MHC 폴리펩티드를 발현하였다. 핵산은 다른 핵산서열과 작용 관계에 있을때 이를 "작동가능하게 결합"된 상태로 본다. 예를 들면, 프로모터나 인헨서가 서열의 전사에 영향을 준다면 암호 서열에 작동가능하게 결합된 것이다. 일반적으로, 작동가능하게 결합된 것이란 결합된 핵산 서열이 두 단백질 암호 영역을 연결해야 하는 경우 판독 프레임내에서 접촉해 있는 것을 의미한다.

<61> MHC 분자를 암호하는 유전자를 "발현 벡터", "클로닝 벡터" 또는 "벡터"내로 삽입할 수 있는데, 이들 용어들은 본 명세서에서 호환적으로 사용하고 있으며, 보통 선택된 숙주 세포중에서 복제할 수 있는 플라스미드나 기타 핵산 분자를 지칭한다. 발현 벡터는 자체적으로 복제가능하거나 또는 당해 분야에 잘 알려진 방법에 의해 숙주 세포의 게놈내로 삽입함으로써 복제할 수 있다. 자체 복제하는 벡터는 선택된 숙주 세포(들)내에서 작용하는 복제 기점이나 자가 복제 서열(ARS)을 가지고 있다.

<62> 선택된 숙주와 상용가능한 종으로부터 유래된 제어 서열과 복제 부위를 함유하는 플라스미드 벡터를 사용한다. 예를 들면, 이. 콜리는 통상 문헌 [Bolivar 등, Gene (1977) 2: 95]에 기술된 이. 콜리종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322의 유도체를 사용하여 형질전환시킨다. 때로는 2 이상의 숙주 세포, 예를들면 클로닝과 구축을 위해서는 이. 콜리 그리고 발현을 위해서는 바실러스 세포에서 사용가능한 벡터가 요망된다.

<63> 발현 벡터는 통상 숙주 세포에서 MHC 분자를 암호하는 DNA를 발현하는데 필요한 모든 요소를 포함하는 전사 유니트나 발현 카세트를 포함한다. 통상의 발현 카세트는 MHC 폴리펩티드를 암호하는 DNA 서열에 작동가능하게 결합된 프로모터와 리보좀 결합 부위를 포함한다. 프로모터는 천연 세팅내의 전사 출발 부위로부터의 거리와 실질적으로 동일한 이종 전사 출발 부위로부터의 거리를 두고 위치하는 것이 바람직하다. 그러나, 당해 분야에 알려져 있는 바와 같이, 이 거리내에서 프로모터 기능을 상실하지 않도록 하면서 다소변동이 일어날 수도 있다. 프로모터 서열외에, 발현 카세트는 또한 효율적인 종결을 제공하고자 구조 유전자 상방에 전사 종결 영역을 포함할 수도 있다. 종결 영역은 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 얻거나 또는 상이한 유전자로부터 얻을 수 있다.

<64> 보편적으로 사용되는 원핵세포의 제어 서열은 리보좀 결합 부위 서열과 함께, 임의로는 작동인자

와 전사 개시용 프로모터를 포함하고 있으며, 이러한 것으로는 베타-락타마제(페니실리나제) 및 락토즈(lac) 프로모터 시스템 [Change 등, Nature (1977) 198: 1056] 및 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 [Goeddel 등, Nucleic Acids Res. (1980) 8: 4057] 및 람다-유도된 P_L 프로모터 및 N-유전자 리보좀 결합 부위 [Shimatake 등, Nature (1981) 292: 128] 같이 보편적으로 사용되는 프로모터가 있다. 원핵세포에서 기능하는 것이라면 어떠한 입수가능한 프로모터 시스템을 사용하여도 무방하다.

<65> 본 발명에는 구성형 또는 조절형 프로모터중 어느 것이든 사용할 수 있다. 조절형 프로모터는 MHC 폴리펩티드의 발현 유도전에 숙주 세포를 고밀도로 증식시킬 수 있기 때문에 유리할 수 있다. 다량의 이종 단백질 발현은 특정상황하에서는 세포 증식을 감속시킨다. 이. 콜리에 사용하기 특히 적합한 조절형 프로모터에는 박테리오파지 람다 P_L 프로모터, 하이브리드 trp-lac 프로모터[Amann 등, Gene (1983) 25: 167: de Boer 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 21] 및 박테리오파지 T7 프로모터 [Studier 등, J. Mol. Biol. (1986); Tabor 등, (1985)]가 있다. 이들 프로모터와 그 사용에 관한 것은 문헌 [Sambrook 등, 상기 참조]에 논의되어 있다.

<66> 이. 콜리 이외의 원핵 세포중에서 MHC 폴리펩티드를 발현시키기 위해서는, 특정 원핵세포종에서 작용하는 프로모터가 필요하다. 이러한 프로모터는 상기 종으로부터 클로닝된 유전자로부터 얻은것, 또는 이종 프로모터를 사용할 수 있다. 예를 들어, 하이브리드 trp-lac 프로모터는 이. 콜리외에 바실러스에서도 기능한다.

<67> 원핵세포내에서 MHC 폴리펩티드를 발현시키는데에는 리보좀 결합부위(RBS)도 또한 필요하다. 이. 콜리의 RBS는 예를 들면 개시 코돈 상방 3-11 뉴클레오티드에 위치한 길이가 3-9 뉴클레오티드인 뉴클레오티드 서열로 구성되어 있다 [Shine 및 Dalgarno, Nature (1975) 254: 34: Steitz, In Biological regulation and development: Gene expression (ed. R.F. Goldberger). vol. 1, p. 349, 1979, Plenum Publishing, NY).

<68> 발현을 증진시키기 위해 해독 커플링을 이용할 수도 있다. 이 기술에서는 해독 시스템 고유의 고도로 발현되는 유전자로부터 유래된 것으로, 프로모터의 하방에 위치한 단형 상방 개방 판독 프레임과 몇몇 아미노산 코돈후 종결 코돈이 뒤를 잇는 리보좀 결합 부위를 이용한다. 종지 코돈 바로 앞에 제2 리보좀 결합 부위가 위치하며, 종결 코든 다음에 해독 개시용 출발 코돈이 온다. 이 시스템은 RNA의 2차 구조를 해결하여, 효율적인 해독 개시를 가능하게 한다 [참조, Squires 등, (1988), J. Biol. Chem. 263: 16297-16302).

<69> MHC 폴리펩티드는 세포내에서 발현하거나 또는 세포로부터 분비할 수 있다. 세포내 발현은 종종 고 수율을 나타낸다. 그러나, 일부 단백질은 불용성 봉입체의 형태로 존재할 수도 있다. 세포내에서 제조된 본 발명의 MHC 폴리펩티드는 세포 용균후 수확시 활성적이기도 하지만, 가용성 활성적 MHC 폴리펩티드의 양은 리폴딩(refolding) 절차를 수행함으로써 증대될 수 있다 [참조, Sambrook 등, 상기 문헌; Marston 등, Bio/Technology (1984) 2: 800; Schoner 등, Bio/Technology (1985) 3: 151). 단일 발현 벡터중에 다수의 전사카세트를 배치함으로써 또는 클로닝 기술에서 사용되는 발현 벡터 각각에 대해 상이한 선별가능한 마커를 이용함으로써 단일 원핵 세포내에서 1종 이상의 MHC 폴리펩티드를 발현시킬 수도 있다.

<70> 본 발명의 MHC 폴리펩티드를 발현시키는 두번째 방안은 폴리펩티드가 세포로부터 페리플라즘이나 세포외 배지로 분비되도록 하는 것이다. MHC 폴리펩티드를 암호하는 DNA 서열을 절단성 시그날 펩티드 서열에 결합시킨다. 이 시그날 서열은 세포막을 경유해 MHC 폴리펩티드가 전위되도록 지시한다. 프로모터-시그날 서열 유니트를 포함하는 이. 콜리에서 사용하기 적합한 벡터의 일례로는 이. 콜리 phoA 프로모터와 시그날 서열을 가지고 있는 pTA1529 이다 [참조, Sambrook 등, 상기 문헌: Oka 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82: 7212: Talmadge 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77: 3988; Takahara 등, J. Biol. Chem. (1985) 260: 2670]. 페리플라스믹(periplasmic) 연합을 위해 단일 세포중에서 다수의 폴리펩티드를 발현할 수 있다.

<71> 본 발명의 MHC 폴리펩티드를 융합 단백질 형태로 생산할 수도 있다. 정상적인 원핵세포 제어 서열이 전사와 해독을 지시하기 때문에 이 방안은 종종 고수율을 나타낸다. 이. 콜리에서는, 종종 lacZ 융합을 이용하여 이종 단백질을 발현시키기도 한다. pUR, pEX 및 pMR100 시리즈 같은 적합한 벡터가 입수용이하다 [참조, Sambrook 등, 상기 문헌]. 특정 분야에 있어서는, 정제후 융합 단백질로부터 비-MHC 아미노산을 절단해내는 것이 요구될 수 있다. 이러한 과정은 시아노겐 브로마이드, 프로테아제 또는 인자 X_a에 의해 절단하는 것을 비롯하여, 당해 분야에 공지된 여러 방법중 임의의 것으로 수행할 수 있다 [참조, Sambrook 등, 상기 문헌; Itakura 등, Science (1977) 198: 1056: Goeddel 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76: 106: Nagai 등, Nature (1984) 309: 810; Sung 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83: 561]. 절단 부위는 목적하는 절단 지점에서 융합 단백질 유전자내로 도입할 수 있다.

<72> N-말단의 상태를 유지하도록 이. 콜리로부터 재조합 단백질을 얻는 바람직한 시스템은 문헌 [Miller 등, Biotechnology 7: 698-704 (1989)]에 기술되어 있다. 이 시스템에서, 문제의 유전자는 펩티다제 절단 부위를 포함하는 효모 우비퀴틴(ubiquitin) 유전자의 처음 76 잔기에 대한 C-말단 융합체로서 생성된다. 두개의 부위의 접합부를 절단한 결과, 무상(無傷)의 진성(眞性) N-말단잔기를 가진 단백질이 생성된다.

<73> MHC 폴리펩티드를 암호하는 핵산을 함유하는 벡터를 원핵 숙주 세포내로 형질전환시켜 발현한다. "형질전환"은 잘 알려진 방법에 의해 숙주 세포내로 문제의 핵산을 함유하는 벡터를 직접 도입시키는 것을 의미한다. MHC 폴리펩티드 발현을 위해 숙주 세포내로 유전 물질을 도입시키는데 사용되는 특정 절차는 그리 중요하지는 않다. 숙주 세포내로 외부 뉴클레오티드 서열을 도입시키는 잘 알려진 절차중 어떠한 것을 사용해도 무방하다. 사용된 절차에 의해 하나 이상의 유전자를, 이 유전자를 발현할 수 있는 숙주 세포내로 성공적으로 도입할 수 있기만 하면된다.

<74> 형질전환 방법은 숙주 세포의 유형에 따라 달라지는데, 이러한 방법으로는 일렉트로포레이션: 염화 칼슘, 염화 루비듐, 인산 칼슘 또는 기타 물질을 이용한 형질감염; 마이크로프로젝타일 범바드먼트

(microprojectile bombardment): 감염(벡터가 감염체인 경우); 및 기타 방법이 있다 [참조, Sambrook 등, (1989) 상기 문헌, 및 Current Protocols in Molecular Biology, 상기 문헌], 전술한 핵산을 도입하는 세포란 또한 이러한 세포의 후손을 포함하는 의미이다. MHC 폴리펩티드를 발현하기 위한 발현 벡터를 포함하는 형질전환된 원핵 세포도 또한 본 발명에 포함된다.

<75> 표준 형질감염이나 형질전환 방법을 사용하여 다량의 MHC 폴리펩티드를 발현하는 원핵 세포주를 생성한후, 이 폴리펩티드를 표준 기술을 이용하여 정제한다 [참조, Colley 등, (1989) J. Biol. Chem. 64: 17619-17622; 및 Methods in Enzymology, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, ed. Vol. 182(1990)]. 재조합 세포를 증식시키고, MHC 폴리펩티드를 발현시킨다. 정제 프로토콜은 MHC 폴리펩티드를 세포내로, 페리플라즘내로 발현하느냐 또는 세포로부터 분비하는냐에 따라 좌우된다. 세포내 발현의 경우, 세포를 수확하고, 용균하며, 이 세포 용균물로부터 MHC 폴리펩티드를 회수한다 [Sambrook 등, 상기 문헌]. 페리플라즈믹 MHC 폴리펩티드를 표준 기술에 의해 페리플라즘으로부터 방출시킨다 [Sambrook 등, 상기 문헌). MHC 폴리펩티드가 세포로부터 분리되는 경우는, 배양 배지를 분비된 단백질의 정제를 위해 수확한다. 이 배지를 통상 원심분리하거나 여과하여 청정화시켜 세포와 세포 파편들을 제거해낸다.

<76> MHC 폴리펩티드는 예를 들면 CDP-세파로즈, 아시알로프로트롬빈-세파로즈 4B 또는 Q 세파로즈 같은 적합한 수지에 흡착시키거나, 황산 암모늄 분별화, 폴리에틸렌 글리콜 침전을 이용하거나 또는 한외여과하여 농축시킬 수 있다. 당해 분야에 공지된 기타 수단을 마찬가지로 적절히 이용해도 된다.

<77> 표준 기술, 예를 들면 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 크로마토그래피 또는 기타 균질하게 하기 위해 사용되는 단백질 정제 기술에 의해 MHC 폴리펩티드를 추가 정제시킬 수 있다. 정제한 단백질은 이후 후술된 바와 같이 약학 조성물을 제조하는데 사용한다.

<78> 변형된 MHC 폴리펩티드

<79> 숙주 세포를 형질감염시키는데 사용되는 뉴클레오티드 서열을 표준 기술에 따라 각종 목적 특성을 가진 MHC 플리펩티드를 생성하도록 변형할 수 있다. 본 발명의 MHC 폴리펩티드는 다양한 재조합 DNA 기술을 이용하여 용이하게 고안하고 제조할 수 있다. 많은 기술이 당업자에게 잘 알려져 있으며, 또한 인용참고문헌으로 제공되어 있다. 예를 들면, 아미노산 삽입, 치환, 결실 등에 의해 주요한 구조 수준의 천연적으로 존재하는 서열로부터 MHC 폴리펩티드를 변형시킬 수 있다. 단백질 융합을 이용하여 MHC 폴리펩티드에 새로운 활성이나 병합활성을 제공할 수도 있다. 이러한 변형방법 다수를 병용하여 최종 변형된 MHC 폴리펩티드 쇄를 생성할 수 있다.

<80> 아미노산 서열 변이체는 재조합 폴리펩티드의 정제와 제조를 용이하게 하는 것과 같이 다양한 목적에 따라 제조할 수 있다. 치료 반감기를 변화시키고, 치료효능을 향상시키며, 치료중에 중증 정도를 경감시키거나 부작용 발생을 줄이는데 변형 폴리펩티드가 또한 유용하다. 아미노산 서열 변이체는 보통 천연적으로는 발견되지 않으나, 천연-서열 MHC와 동일한 펩티드-결합 및 T-세포 결합 활성을 나타내는 소정의 변이체이다. 예를 들면, 주요한 구조의 일부(보통 약 60-80%이상, 통상 90-95%)만을 함유하는 폴리펩티드 단편을 생성할 수 있다. MHC 폴리펩티드가 본질적으로 전장 폴리펩티드로부터의 α_1 또는 β_1 도메인으로 이루어진 것이 바람직하다. 이러한 단편은 통상 약 50 내지 약 100개, 바람직하게는 약 60 내지 90개, 더욱 바람직하게는 약 70 내지 약 80개의 아미노산을 포함한다. 대안적인 방안으로, 합성 방법을 이용하여 폴리펩티드를 제조할 수도 있다 [참조, Merrifield (1986) Science 232: 341-347; Atherton 등, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford].

<81> 일반적으로, MHC 폴리펩티드를 암호하는 서열의 변형은 부위-지시 돌연변이 같은 다양한 잘 알려진 기술에 의해 용이하게 수행된다 [참조, Gillman 및 Smith (1979) Gene 8: 81-97, 및 Roberts, S. 등, (1987) Nature 328: 731-734). 목적 특성에 적합한 분석으로 통상의 스크리닝을 수행함으로써 대부분의 변형을 평가한다. 예를 들면, 펩티드에 결합하거나 T-세포 증식에 영향을 줄 수 있는 폴리펩티드의 능력에 대한 다양한 변형의 효과는 이하 기술된 분석을 이용하여 용이하게 결정할 수 있다. 산화환원 또는 열안정성, 소수성, 단백질분해에 대한 감수성 또는 응집 경향같은 기타 특성의 변형도 모두 표준 기술에 따라 분석한다.

<82> 특정 분야에 있어서는, 경막 도메인을 결실시켜 가용성 MHC 폴리펩티드를 발현하도록 MHC cDNA 암호 서열을 변형시킨다. 올리고뉴클레오티드-지시 결실 돌연변이나 폴리머라제 쇄 반응에 의해 MHC cDNA 절두를 수행할 수 있다. 올리고뉴클레오티드-지시 실험관내 돌연변이는 예를 들면 문헌 [Kunkel 등, (1987) Meth. Enzymol. 154: 367-382; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 등., eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) and periodic supplements]에 기술되어 있다.

<83> MHC 폴리펩티드의 약학적 용도

<84> 본 발명의 원핵세포에서 발현되는 비글리코실화 MHC 폴리펩티드를 사용하여 예를 들면, 자가면역, 동종이식편 거부반응 또는 알레르기 반응과 관련된 항원을 나타내는 펩티드와의 복합체를 형성할 수 있다. 상기 복합체의 성분은 면역계에 목적하는 효과를 가지는 것을 선택한다. MHC 폴리펩티드의 효과부는 적합한 T 세포 수용체에 의한 MHC-펩티드 복합체 인식에 필요한 항원 결합 부위 및 서열을 가진 부분이다. MHC 성분은 I군 또는 II군 분자중 어느 것이든 가능하다. MHC 단백질의 항원 결합 부위와 펩티드 항원 사이의 결합은 공유결합 또는 비공유결합일 수 있다.

<85> 기타 구체예에서 복합체는 일반적으로 독소 또는 표지인 효과인자 성분을 포함할 수도 있다. 효과인자 부분은 MHC-암호된 단백질에 또는 자가항원성 펩티드에 접합될 수 있다. 복합체의 제조 및 용도는 미합중국 특허 제5,130,297호(상기 참조)에 개시되어 있다.

<86> 펩티드 항원

<87> 본 발명의 복합체에 사용되는 항원성 펩티드는 길이가 약 8개 잔기 이상, 일반적으로 약 10개 잔기 이상, 더욱 일반적으로는 약 12개 이상이다. 통상적으로, 최대 길이는 약 30개 잔기, 더욱 통상적으로는 약 25개 잔기이고, 종종 20개 미만일때도 있다. 그러나, MHC 분자에 결합할 수 있는 펩티드의 길이는

다양할 수 있다. 따라서, 100개의 잔기에 이르는 것과 같은 보다 긴 길이의 펩티드를 상기 복합체에 사용할 수도 있다. 통상, 펩티드는 길이가 약 50개 잔기 미만, 바람직하게는 약 30개 미만이다.

<88> 많은 면역질환에 사용되는 항원성 단백질 또는 조직은 잘 알려져 있다. 예를들면, 상기 복합체를 사용하여 알레르기 반응을 치료할 수 있다. 이러한 증상의 예로는 복강 질환(celiac disease) 및 크론 질환(Crohn disease)과 같은 식품과민증, 및 두드러기쑥(ragweed), 먼지 진드기(dust mites), 고양이, 꿀벌의 독 및 풀의 화분에 대한 알레르기 반응을 들 수 있다. 본 발명의 방법을 이용한 치료에 적합한 알레르기 질환에 대한 검토는 문헌 [O'Hehir 등, Ann. Rev. Immunol., 9:67-95(1991)]을 참조하도록 한다.

<89> 실험적으로 유도된 자가면역 질환에서, 병인에 관련된 항원들의 특성이 결정되었다: 쥐 및 생쥐의 관절염에서는, 천연의 타입-II 콜라겐이 콜라겐- 유도관절염에서 결정되었고, 보강(adjuvant) 관절염에서는 마이코박테리아의 열 충격 단백질이 동정되었으며 [Stuart 등 (1984), Ann. Rev. Immunol. 2: 199-218: van Eden 등 (1988), Nature 331: 171-173]: 생쥐의 실험 알레르기성 갑상선염(EA7)에서는 티로글로불린이 결정되었으며 [Maron 등 (1988), J. Exp. Med. 152: 1115-1120]: 실험 알레르기성 중증근무력증(EAMG)에서는 아세틸콜린 수용체(AChR)가 결정되었으며 [Lindstrom 등 (1988). Adv. Immunol. 42: 233-284]; 그리고 생쥐 및 쥐의 실험 알레르기성 뇌척수염(EAE)에서는 미엘린 기초 단백질(MBP) 및 단백지질 단백질(PLP)이 결정되었다 [Acha-Orbea 등 (1989) Ann. Rev. Immunol 7: 377-405]. 또한, 예를 들면, 표적 항원이 인체에게서 확인되었다: 인체의 류마티스 관절염에서의 타입-II 콜라겐(Holoshitz등(1986) Lancet ii: 305-309): 및 중증성 근무력증에서의 아세틸콜린 수용체 (Lindstrom등(1988), 상기 참조).

<90> 항원성 단백질을 보다 작은 펩티드 단위로 가수분해하면 항원 제시세포(APC)표면상에 MHC 당단백질에 의한 항원이 제시되는 것으로 믿어지고 있다. 항원성 단백질내에서의 이러한 보다 작은 분절의 위치는 실험적으로 결정할 수 있다. 이들 분절은 길이가 8 내지 18개 잔기이고, 아그레토프 (agretope, MHC 분자에 의해 인식됨) 및 에피토프(T-헬퍼 세포상의 T 세포 수용체에 의해 인식됨)를 둘다 포함하는 것으로 생각되고 있다. 에피토프 자체는 T-헬퍼 세포의 항원-특이적 수용체를 인식하는 5 내지 6개 아미노산의 인접 서열 또는 비인접 서열이다. 아그레토프는 MHC 단백질과 펩티드의 결합을 담당하는 인접 서열 또는 비인접 서열이다.

<91> 관련된 8 내지 18개의 아미노산 서브유니트를 결정하는 실험적 방법을 골격근의 아세틸콜린 수용체의 알파 서브유니트를 사용하여 설명하고자 한다. 중증성 근무력증(MG)에서 자가면역 반응은 상기 서브유니트의 영역과 관련이 있다. 신경근 연결부의 시냅스후 막상에서 아세틸콜린 수용체가 상실되면 MG 징후가 나타난다.

<92> MG에서, 아세틸콜린 수용체(AChR)의 알파 서브유니트에 대한 자가항체는 AChR에 의한 자가면역반응과 관련된다. MG 환자의 85%가 알파 서브유니트와의 반응성이 있는 자가항체를 가진다. 이들중 60%는 잔기 60 내지 80에 위치한 주면역원 영역(MIR)이라 불리는 알파 서브유니트의 펩티드 분절에 결합하는 항체를 가진다 [Tzartos 및 Lindstrom, Proc. Natl. Acad. Sci USA (1980) 77:755]. 자가반응성 인체 T 세포에 의해 인식되는 펩티드 분절 역시 알파 서브유니트에 위치해 있다 [Hohlfeld 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84: 5379-5383]. 이들 T 세포에 의해 인식되는 에피토프는 잔기 1-30 125-147, 169-181, 257-271 및 351-368에 위치되어 있다. 또한, 인체에서 AChR 펩티드 195-212 및 257-269는 중증성 근무력증 환자에서 HLA-DR5 및 HLA-DR3, DQw2 MHC 반수체의 에피토프로서 각각 부분적으로 특성이 규명되었다 [참조, Acha-Orbea (1989) 상기 문헌].

<93> 이 수용체의 알파 서브유니트와 결합된 에피토프를 제시할 수 있는 아그레토프를 보유하는 펩티드는 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들면, 생쥐 모델에서 적합한 펩티드의 결정은 다음과 같이 수행한다.

<94> 토피도 캘리포르니쿠스(Terpede californicus) AChR로 면역시켰을때 사람의 중증성근무력증의 특징을 다수 가진 질환을 발병시키는 생쥐계통을 모델로서 사용한다. MHC II군 당단백질은 렉틴 및 모노클로날 항체 친화성 지지체를 사용하여 상기 생쥐계통의 비장 세포로부터 단리한다. 정제된 MHC II군 단백질은 세제 투석에 의해 인식질 소포내에 혼입시킨다. 그후 생성된 소포를 융합하여 MHC 분자를 함유하는 각 평면 지질 2층상에 유리 커버 슬립이 생성되도록 세정한다 [Brian 및 McConnel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1984) 81:6159].

<95> 부착성 평면 지질막내 봉매된 MHC II군 분자를 함유하는 하나의 커버 슬립을 몇개의 24-웰 배양 평판의 각 웰에 놓는다. 알파 서브유니트 서열에 상응하고 하나 이상의 방사성 표지된 아미노산 잔기(하기와 같이 제조함)를 함유하는 20-잔기의 합성 펩티드와 중첩하는 약 40개 분자를 각각 커버 슬립과 PBS를 가진 웰에 넣고 며칠동안 항온처리한다. MHC II군 당단백질 항원 결합부위내 펩티드의 결합 정도를 평면 지질막 단독의 것에 대한 커버 슬립상의 MHC II군-평면 지질막내로 혼입된 방사성의 양으로 측정한다. 방사성의 특이적 혼입량은 결합된 펩티드가 평면 지질막에 존재하는 MHC II군 분자의 여러 종중 하나의 아그레토프(MHC II군 펩티드 결합 부위)를 포함한다는 것을 나타낸다. 이런방식으로, AChR의 알파 서브유니트에 대한 아그레토프 세트는 AChR 또는 정제된 알파 서브유니트로 면역화시킨후 MG의 증상을 나타내는 생쥐계통에 대해 정해진다.

<96> 다음, 아그레토프를 함유하는 알파 서브유니트 합성 펩티드 분절을 각각 다시 커버 슬립상의 평면 지질막에 봉매된 MHC II군 단백질 분리체의 항원 결합부위내로 혼입시킨다. 하나의 커버 슬립을 24-웰의 배양 평판의 각 웰에 첨가하고, AChR에 대해 면역시킨 생쥐에서 유래한(그리고 부착성 MHC II군 단백질을 단리해낸 균주에서 유래한) 비장 세포를 각 웰에 첨가한다. 3중수소 표지한 티미딘의 DNA내로의 혼입에 의해 측정되는 T 세포 하이브리도마 증식은 MHC II군 단백질-결합된 펩티드가 T 세포에 결합하는 에피토프 및 아그레토프를 둘다 포함함을 암시한다. T 세포 클론의 활성화는 IL-3 생산의 측정에 의해 결정한다[Quill 등, 상기 문헌].

<97> 고속 다중 펩티드 합성(rapid multiple peptide synthesis: RAMPS)을 위한 듀폰사의 장치 및 기술을 사용하여 토피도 캘리포르니쿠스 AChR의 알파 서브유니트로부터 한 세트의 중첩하는(10개 잔기 중첩) 20-잔기의 펩티드를 합성한다. 하나 이상의 방사성 아미노산을 각각의 합성 펩티드내에 혼입시킨다. 측쇄-보호된 FMOC 아미노산의 펜타플루오르페닐 활성 에스테르를 사용하여 상기 펩티드들을 합성하는 데, 이때 표준 다단계 고체상 펩티드 합성 방법과 그에 이은 표준 측쇄 보호기제거 및 고체 지

지체로부터의 펩티드 아미드의 동시 방출 방법을 이용한다.

<98> 대안의 방안으로, 아세틸콜린 수용체 단백질과 같은 항원성 단백질의 8 내지 18개 아미노산의 추정 분절을 포함하는 중첩 서열을 문헌 [Geysen, H.M. 등, J. Immun. Meth. (1987) 102: 274]의 방법으로 합성할 수 있다. 합성된 방사성 표지된 펩티드를 상기와 같은 2층 지질막내에 제형화시킨 정제된 MHC 단백질과 함께 개별적으로 항온처리(평판상에서)하여 시험하였다.

<99> 중추 신경계의 미엘린 수초의 파괴를 초래하는 다발성 경화증(MS)에서, 미엘린의 주요 단백질 성분인, 미엘린 염기성 단백질(MBP)이 주요한 자가항원이다. MBP 단백질의 관련 분절은 소의 미엘린 기초 단백질로 면역시켰을때 실험적 알레르기성 뇌척수염(EAE)을 발병시키는 생쥐 계통을 사용하여 실험적으로도 결정된다.

<100> 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus: SLE)는 복잡한 증상을 가지나, 적혈구에 대한 자가면역 반응에서 기인한다. 이 질환의 항원성 효과인자인 펩티드는 적혈구 표면의 단백질에서 발견된다.

<101> 류마티스성 관절염(RA)은 활액에서 발견되는 단백질에 대한 면역반응으로부터 야기되는 만성 염증 질환이다.

<102> 인슐린-의존성 진성 당뇨병(insulin-dependent diabetes melltus: IDDM)은 인슐린 분비를 담당하는 랑겔한스섬내 베타 세포에 대한 자가면역성 공격에서 기인한다. 랑겔한스섬 세포 표면 항원 및 인슐린에 대한 순환성 항체가 IDDM을 진행시키는 것으로 알려져 있다. IDDM에서 면역 반응을 유도하는 주된 펩티드는 인슐린 서열 및 베타 세포막 표면 단백질의 일부인 것으로 믿어진다.

<103> 관련된 항원성 펩티드 서브유니트는 비교적 짧기 때문에 펩티드 합성을 위한 표준 자동 방법을 사용하여 쉽게 합성할 수 있다. 대안의 방안으로, 상기 서브유니트는 단리된 또는 합성 DNA 서열을 사용하여 재조합 방법으로 만들 수 있지만, 이것은 이 길이의 펩티드에 대해 가장 효과적인 방법은 아니다.

<104> 따라서, 요약하면, 한 세트의 표지된 시험 펩티드가 제조되며, MHC 단백질을 함유하는 평면 지질막내 MHC에 결합하는 펩티드는 아그레토프를 포함하는 것으로 나타난다.

<105> 그 후 통상의 고체상 합성법으로 확인된 펩티드를 제조하고, 질환-유도 헬퍼 T 세포 클론에 대한 에피토프를 포함하는 서브세트는 쥐의 항원-제시 세포(APC)와 (또는 MHC 복합체 단리체와) 그리고 전길이의 단백질로 면역시킨 생쥐의 비장 또는 임파절 T 세포와 함께 피검 펩티드를 항온처리하여 결정한다. 성공적인 피검 펩티드는 이 시스템에서 T 세포 증식을 자극할 것이다. 이 두번째의 보다 작은 서브세트가 적합한 펩티드 성분을 제시한다.

<106> 복합체의 형성

<107> 복합체의 요소는 미합중국 특허 제5,130,297호(상기 참조)에 개시된 바와 같이 당해 분야에 공지된 표준 수단에 의해 결합시킬 수 있다. 항원성 펩티드는 MHC 단백질의 포켓부와 예를 들면, 이 두 성분을 혼합하므로써 비공유 결합시킬 수 있다. 과량의 펩티드는 한외여과 또는 투석과 같은 다수의 표준 방법중 하나로 제거할 수 있다. 상기 펩티드들은 예를 들면, 광친화성 표지법 같은 표준 방법을 사용하여 공유 결합시킬 수도 있다 [참조, Hall 등, Biochemistry 24: 5702-5711 (1985)]. 대안의 방안으로, 펩티드는 단일의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 펩티드 및 MHC 성분을 발현시키므로써 MHC 성분에 공유 결합시킬 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드는 가요성의 펩티드 링커를 통해 MHC 성분에 공유적으로 부착시킬 수 있다 [참조, Kozono 등, Nature 369: 151-154(1994)].

<108> 복합체의 평가

<109> 본 발명의 MHC 폴리펩티드를 사용하여 형성된 복합체를 실험관내 시스템 또는 생체내 모델을 사용하여 분석할 수 있다. 실험관내 시스템에서, 복합체는 그 펩티드와 관련된 증세를 담당하는 단백질 또는 항원에 대해 면역성을 보이거나 그것으로 면역시킨 환자에서 유래한 말초혈 T 세포와 함께 항온처리한다. 성공적인 복합체는 추가의 항원으로 자극할때조차도 동계 T 세포에서 아네르기를 유도하며, T 세포의 증식을 방해한다.

<110> 생체내 시스템에서, APC의 존재하에 전길이의 항원 또는 분리된 에피토프에 반응하여 증식하는 T 세포를 클로닝한다. 면역화되지 않은 조직적합성 동물내로 상기 클론들을 주사하여 자가면역 질환을 유도한다. 관련 복합체는 상기 질환의 증상을 약화시키거나 제거하여야 한다.

<111> 효과인자 성분이 있거나 또는 없는 둔 유형의 복합체중 어느 것을 사용하여도 좋다. 한 가지 방법에서 치료는 이중으로 실시한다. 환자를 항원성 펩티드의 효과부를 포함하는 원핵세포에서 발현된 MHC-암호 항원 제공 단백질의 복합체로 치료하여 면역계를 억제 조절한다. 추가의 억제-조절(down-regulation)은 3개 성분의 복합체, 즉 원핵세포에서 발현된 MHC-암호 항원 제시 단백질, 치료할 자가면역 질환에 특이적인 항원성 펩티드의 효과부, 및 효과인자 성분을 포함하는 3성분 복합체로 치료한다. 또한, 복합체의 패널을 치료에 사용할 수도 있다. 예를 들면, 항원의 하나 이상의 펩티드가 자가면역 반응에 관련된 것으로 추정되는 경우, 및/또는 하나 이상의 항원이 관련된 것으로 추정되는 경우, 환자를 적합한 원핵세포에서 발현된 MHC-암호 항원 제시 폴리펩티드의 효과부, 및 항원성 펩티드의 효과부를 포함하는 패널에서 선택되는 여러가지 복합체로 처리할 수 있다; 상기 복합체에는 효과인자 성분이 있을 수도, 없을 수도 있다.

<112> 표지된 복합체를 투여하면 진단학적 이용 분야에서 질환에 관련된 면역계의 상기 부분들을 동정하는 것이 가능하다.

<113> 치료 및/또는 진단용 MHC 복합체의 선별

<114> 특정 질환에 대한 환자의 진단 또는 치료에 사용할 MHC 복합체를 선별하기 위하여, 항원의 제시에 관계되는 MHC 항원의 유형을 동정한다. 이하, 자가면역 질환과 관련한 항원의 동정에 관해 기술하고 있으나, 당업자라면 동일한 일반적인 방법을 알레르기와 같은 기타 질환에 사용할 수 있음을 알고 있을

것이다.

<115> 특이적 자가면역 기능장애는 특이적 MHC 유형과 상호관련되어 있다. 어느 대립유전자 그리고 이어서 어느 MHC 암호된 폴리펩티드가 자가면역 질환과 관련되었는지를 동정하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. EP 제286447호에 개시된 방법이 적합하다. 이 방법에서는 몇가지 단계가 이어진다. 첫째, MHC 항원과 자가면역 질환 사이의 관련성은 유전자 연구에 기초하여 결정된다. 이들 연구를 수행하는 방법은 당업자에게는 공지되어 있고, 인체의 모든 공지된 HLA 질환 관련성에 관한 정보는 코펜하겐의 HLA 및 질환 등록기관에 보존되어 있다. 상기 질환과 관련된 폴리펩티드를 암호하는 유전자좌는 그 질환과 가장 큰 관련성을 가질 수 있는 유전자좌이다.

<116> 둘째, MHC 항원/폴리펩티드와 관련된 질환을 암호하는 특이적 대립유전자를 동정한다. 대립유전자의 동정에서는 감수성 대립유전자를 우성으로 가정한다. 대립유전자의 동정은 상기 질환과 특이적 아형과의 강한 양의(positive) 관련성을 측정하므로써 이루어진다. 이것은 여러가지 방법으로 이루어질 수 있는데, 이들 방법은 모두 당업자에게는 공지되어 있다. 예를 들면, 아형분류는 혼합 임파구 반응(mixed lymphocyte response: MLR) 분류 및 프라이밍된 임파구 시험(primed lymphocyte testing: PLT)에 의해 실시할 수 있다. 이들 두 방법은 문헌 [Weir 및 Blackwell eds., Handbook of Experimental Immunology]에 기재되어 있다. 상기 분류는 검사할 MHC 유정자좌에 특이적인 DNA 프로브를 사용하여 DNA 제한 단편장 다형성(restriction fragment length polymorphism: RFLP)을 분석하여 실시할 수도 있다 [참조, Nepom(1986) Annals N.Y. Acad. Sci. 475: 1]. MHC 좌에 대한 프로브를 제조하는 방법은 당업자에게는 공지되어 있다 [참조, Gregersen 등 (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5966: Weissman 등, Medicine in Transition: the Centennial of the University of the University of Illinois College of Medicine (E.P. Cohen ed., 1981)].

<117> 질환 감수성을 부여하는 아형의 가장 완전한 규명은 그 유전자좌의 게놈 DNA, 또는 그 유전자좌내에 전사된 mRNA의 cDNA 사본의 서열분석에 의해 실시한다. 서열분석되는 DNA는 MHC 암호된 폴리펩티드의 초가변 영역을 암호하는 부분을 포함한다. 특이적으로 목적하는 DNA를 프로브로 규명하는데, 여기서 목적 영역을 증폭시키기 위한 기술은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 폴리머라제 쇄 반응(PCR) 기술이 있다.

<118> 일단 특이적 자가면역 질환에 감수성을 부여하는 대립유전자가 동정되면, 그 대립유전자내에 암호된 폴리펩티드도 동정가능한데 즉, 폴리펩티드 서열을 그것을 암호하는 대립유전자내 DNA의 서열로부터 추론할 수 있다. 진단 및/또는 치료에 사용되는 본 발명의 MHC 항원 복합체는 자가면역 질환 상태와 관련된 MHC 항원의 효과부로부터 그리고 동일한 질환 증상과 관련한 자가면역 항원으로부터 유래한다.

<119> 일례로서, 류마티스성 관절염 환자의 90% 이상이 DR4(Dw4), DR4(Dw14) 또는 DR1의 반수체를 가진다. 인체 류마티스성 관절염의 표적항원이 II형 콜라겐이라는 것도 공지되어 있다. 그러므로, 류마티스성 관절염 환자의 진단 또는 치료에 사용되는 본 발명의 복합체는 질환을 유도하는 항원을 제시할 수 있거나, 또는 질환을 억제하는 항원을 제시할 수 없는 DR4(Dw4), DR1 및/또는 DR4(Dw14)에서 유래하며 II형 콜라겐의 효과부와 복합체를 이룬 폴리펩티드를 함유하는 것들을 포함할 수 있다.

<120> 본원에서 "개체(individual)"란 용어는 기본적으로 대등한 MHC 시스템을 가진 모든 포유동물 및 모든 척추동물을 포괄한다.

<121> 제형화 및 투여

<122> MHC 서브유니트의 경막 영역을 포함하는 경우, 본 발명의 원핵세포에서 발현된 MHC 플리펩티드를 사용하여 형성된 복합체는 지질 단일층 또는 2층내로 혼입시켜 투여하는 것이 편리하다. 이 목적으로 통상의 리포좀이 사용되나, 세포의 평면 지질막 또는 세포막(예; 적혈구) 같은 어떠한 유형의 지질막을 사용해도 된다. 복합체들은 미셀내로 혼입시키는 것이 편리하기도 한다. 하기 실시예 2에 제시된 데이타는 이량체 MHC 분자를 포함하는 MHC-펩티드 복합체가 주로 응집체로서 존재함을 나타낸다.

<123> 리포좀은 하기 제시된 바와 같이 표준 방법에 따라 제조할 수 있다. 그러나, 경막 영역이 결실되어 있는 경우, 복합체는 펩티드-함유 약제에 통상 사용되는 방식으로 투여할 수 있다.

<124> 투여는 전신 투여이고, 주사, 바람직하게는 정맥 주사에 의해 투여하며, 따라서 투여의 주사 경로에 적합한 제형을 사용할 수 있다. 적합한 제형은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)]에 개시되어 있다. 본 발명의 복합체와 약학적으로 효과적인 담체를 함유하는 다양한 약제 조성물을 제조할 수 있다. 약학조성물은 각종 약물 전달 시스템에 적합한 것으로 한다. 약물 전달에 관한 본 방법의 간략한 검토는 문헌 [Langer, Science 249: 1527-1533 (1990)]을 참조하도록 한다.

<125> 본 발명의 원핵세포에서 발현된 비글리코실화 MHC 폴리펩티드를 사용하여 약학 조성물을 제조하는데 있어서는, 본 발명의 복합체를 변형시켜 그 약물속도와 생체분포를 변화시키는 것이 바람직할 때가 많다. 약물속도론에 관한 일반적인 논의에 대해서는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 상기 문헌, Chapters 37-39]을 참조할 수 있다. 약물속도와 생체분포를 변화시키는 다수의 방법이 당업자에게 공지되어 있다 [참조, Langer, 상기문헌], 예를 들면, 단백질, 다당류와 같은 가용성의 거대분자, 또는 폴리에틸렌 글리콜 같은 합성 중합체에 접합시키는 것이 효과적이다. 기타 방법으로는 단백질, 지질(예를 들면 리포좀), 탄수화물 또는 합성 중합체와 같은 물질로 이루어진 소포내에 복합체를 보호시키는 방법이 있다.

<126> 본 발명의 리포좀은 통상 상기 복합체가 T 세포 수용체와의 상호작용에 이용될 수 있도록 리포좀의 표면에 위치한 MHC-펩티드 복합체를 함유한다. 경막영역은 보통 막 형성시에 먼저 막내로 혼입한다. 리포좀은 특정 자가반응성 T 세포로 목적 약물 (예, 독소 또는 화학치료제)을 인도하는 데 사용할 수 있다. 대안의 방안으로, 리포좀에 봉매된 복합체를 사용하여 표적 세포에서 아네르기를 유도할 수도 있다.

<127> 리포좀 제조에는 다양한 방법을 이용할 수 있는데, 그들 방법은 예를 들면, 문헌 [Szoka 등, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980)], 미합중국 특허 제4,235,871호, 제4,501,728호 및 4,837,028

호에 개시되어 있다.

<128> 미셀은 또한 당해 분야에서 비극성 영역을 가진 분자의 용해도를 증진시키는데 통상 사용된다. 따라서 당업자라면 미셀이 본 발명의 조성물에 유용하다는 것을 알고 있을 것이다. 본 발명의 복합체를 함유하는 미셀은 당해 분야에 잘 알려진 방법 [참조, Remington's Pharmaceutical Sciences, 상기 문헌, Chap. 20]에 따라 제조한다. 본 발명의 복합체를 함유하는 미셀은 통상 표준 계면활성제 또는 세제를 사용하여 제조한다.

<129> 당업자에게는 널리 알려진 통상의 계면활성제를 본 발명의 미셀에 사용할 수 있다. 적합한 계면활성제로는 나트륨 라우레에이트, 나트륨 올레에이트, 나트륨 라우릴 설페이트, 옥타옥시에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 옥톡시놀 9 및 플루로닉(PLURONIC) F-127? (Wyandotte Chemicals Corp.)이 있다. 바람직한 계면활성제는 트윈(TWEEN)-80?, 플루로닉 F-68?, n-옥틸-β-D-글루코피라노사이드등과 같이 정맥 주사에 적합한 비이온성 폴리옥시에틸렌 및 폴리옥시프로필렌 세제이다. 또한, 리포좀 생성에 사용되는 것으로 개시된 것과 같은 인식질을 미셀 형성에 사용할 수도 있다.

<130> 본 발명의 MHC 서브유니트가 친유성 경막 및 비교적 친수성의 세포외 도메인을 포함하기 때문에, 혼합된 미셀은 통상의 계면활성제 또는 인식질 및 서브유니트의 존재하에 형성된다. 본 발명의 혼합된 미셀은 서브유니트, 인식질 및/또는 계면활성제의 임의의 배합물을 포함할 수 있다. 따라서, 미셀은 서브유니트와 인식질, 인식질과 세제 둘다와의 서브유니트 또는 서브유니트와 인식질을 포함할 수 있다.

<131> 본 발명의 복합체를 포함하는 약학 조성물에 있어, 투여량은 예를 들면, 복합체 종류, 투여 방식, 치료할 질환 종류 및 그 중증도, 환자의 전체적인 건강과 상태 및 처방 의사의 소견 등에 따라 달라진다. 쥐에 대한 투여량은 일반적으로 약 10㎍ 내지 약 500㎍ 이다. 총 약 50㎍ 내지 300㎍의 투여량이 바람직하다. 예를들면, 질환의 경과시에 행해지는 치료에서는 3회 25㎍ 또는 100㎍의 투여량이 효과적이다. 총 투여량은 약 0.15 내지 약 15㎍/kg의 범위, 바람직하게는 약 0.15 내지 약 10㎍/kg의 범위이다.

<132> 약학 조성물은 예방 및/또는 치료를 위해 비경구, 국소, 경구 또는 국부 투여, 예를 들면, 에어로졸 형태로 또는 경피적으로 투여 할 수 있다. 약학 조성물은 투여 방법에 따라 다양한 단위 투여 형태로 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 투여에 적합한 단위 투여 형태로는 분제, 정제, 환제 및 캅셀제가 있다.

<133> 약학 조성물은 정맥내로 투여하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체에 용해되거나 현탁된 복합체의 용액을 함유하는 정맥 투여용 조성물을 제공한다. 물, 완충수, 0.4% 염수 등과 같은 다양한 수성 담체를 사용할 수 있다. 예를 들면, 인산염 완충 염수(PBS)가 본 발명의 가용성 복합체의 투여에 특히 적합하다. 바람직한 제제는 0.02% 트윈-80을 함유하는 PBS이다. 이들 조성물은 통상의 널리 공지된 멸균 기술에 의해 멸균시키거나 또는 멸균 여과할 수 있다. 생성된 수용액은 사용을 위해 그대로 또는 동결건조 상태로 포장할 수 있는데, 동결건조된 제제는 투여하기 전에 멸균 수용액과 배합한다. 상기 조성물은 대략 생리적 조건을 얻는데 필요한 약학적 허용 보조 물질을 함유할 수 있는 데, 그 물질들의 예로는 pH 조정 및 완충제, 긴장 조정제, 습윤제 등으로서, 구체적으로 아세트산 나트륨, 락트산 나트륨, 염화 나트륨, 염화 칼륨, 염화 칼슘, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트 등이 있다.

<134> 복합체의 농도는 다양한 범위를 가질 수 있어서 약 0.05% 미만으로부터, 통상 약 1 중량% 또는 그 이상으로부터 10 내지 30 중량%까지의 범위이며, 선택되는 투여 방식에 따라 유체 부피, 점도 등에 의해 주로 선택된다. 정맥 투여에 바람직한 농도는 PBS중에서 약 0.02% 내지 약 0.1% 또는 그이상이다.

<135> 고형 조성물에는 통상의 무독성 고체 담체를 사용할 수 있으며, 그 예로는 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 활석, 셀룰로스, 글루코스, 슈크로스, 탄산 마그네슘 등이 있다. 경구 투여용의 약학적으로 허용되는 무독성 조성물은 전술한 것들과 같은 통상 이용되는 임의의 부형제, 및 일반적으로 10 내지 95%의 활성 성분을 혼입시켜 형성한다.

<136> 에어러졸 투여용의 경우는, 복합체를 계면활성제 및 분사제와 함께 미분된 형태로 제공하는 것이 바람직하다. 물론 계면활성제는 무독성이어야 하며, 분사제에 가용성인 것이 바람직하다. 이러한 제제로 대표적인 것은 카프로산, 옥타노산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레스테르산 및 올레산과 같은 탄소수 6 내지 22개의 지방산과, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 에리트리톨, 아라비톨, 만니톨, 소르비톨, 소르비톨에서 유도된 헥시톨 무수물과 같은 지방족 다가 알코올 또는 그 시클릭 무수물과의 에스테르 또는 부분 에스테르, 및 이들 에스테르의 폴리옥시에틸렌 및 폴리옥시프로필렌 유도체이다. 혼합 또는 천연 글리세라이드와 같은 혼합 에스테르를 이용할 수도 있다. 계면활성제는 조성물 중량의 0.1 내지 20%, 바람직하게는 0.25 내지 5%를 차지한다. 조성물의 나머지 부분은 통상 분사제이다. 액화된 분사제는 주위 조건에서 통상 기체이며, 가압하에 응축시킨다. 적절히 액화된 분사제는 부탄 및 프로판 같은 탄소수 5개 까지의 저급알칸이며, 플루오르화된 또는 플루오로염소화된 알칸이 바람직하다. 상기한 것들의 혼합물을 이용할 수도 있다. 에어로졸 제조에서는, 적합한 밸브를 장착한 용기를 미분화합물 및 계면활성제를 함유하는 적합한 분사제로 채운다. 따라서 성분들은 밸브의 작용에 의해 방출될 때까지 고압으로 유지한다.

<137> 상기 복합체를 함유하는 조성물은 치료용, 예방용 또는 진단용으로 투여할 수 있다. 치료용의 경우, 조성물은 전술한 질환을 이미 앓고 있는 환자에게, 그 질환 및 합병증의 증상을 치료하거나 적어도 부분적으로 저지하기에 충분한 양으로 투여한다. 이를 수행하기에 적절한 양을 "치료상 유효 투여량"으로 정의한다. 이러한 사용에 효과적인 양은 증상의 심각성 및 환자의 체중과 일반적 건강 상태에 따라 달라질 것이다. 상기에서 논의한 바와 같이, 그 양은 통상 약 0.5mg/kg 내지 약 25mg/kg, 바람직하게는 약 3 내지 약 15mg/kg의 범위이다.

<138> 예방용의 경우, 본 발명의 복합체는 특정 질환에 걸리기 쉽거나 아니면 발병 위험이 있는 환자에게 투여한다. 그 양을 "예방상 유효 투여량"이라 정의한다. 이용도에서, 정확한 양도 역시 환자의 건강 상태 및 체중에 따라 좌우된다. 투여량은 통상 상기에 제시한 범위를 가질 수 있다.

<139> 진단용의 경우, 적합한 복합체 또는 그 혼합물을 함유하는 조성물을 자가면역 질환 상태를 가진 것으로 추정되는 환자에게 투여하여 그 질환과 관련된 자가반응성 T 세포의 존재를 측정한다. 대안의 방안으로, 특정 치료의 효과를 모니터할 수도 있다. 이를 수행하는데 충분한 양을 "진단상 유효 투여량"이라 규정한다. 이 용도에서, 정확한 양은 환자의 건강 상태 등에 따라 다르나, 일반적으로 1회 투여분당 0.01 내지 1000mg, 특히 환자당 약 10 내지 약 100mg의 범위를 가진다.

<140> 치료 또는 진단용도로 키트를 제공할 수도 있다. 따라서, 본 발명의 복합체는 통상 용기내에 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 표지 또는 독소에 접합되거나 또는 접합되지 않은 복합체를 트리스, 인산염, 탄산염 등과 같은 완충제, 안정제, 살생물제, 혈청 알부민 같은 불활성 단백질과 함께 그리고 사용법 안내문과 함께 키트내에 포함시킨다. 일반적으로, 상기 물질들은 복합체 양을 기준으로 약 5 중량% 미만으로 존재하며, 단백질 농도를 기준으로 하면 통상 약 0.001 중량%의 총량으로 존재한다. 부형제가 전체 조성물의 약 1 내지 99 중량%의 범위로 존재하는 경우에는, 활성 성분을 희석시키기 위해 불활성 중량제 또는 부형제를 포함시키는 것이 요망된다. 복합체에 결합할 수 있는 항체를 분석에 이용하는 경우, 이 항체는 통상 별도의 병에 존재하게 된다, 항체는 통상 표지에 접합시키며, 당해 분야에 널리 공지된 기술에 따라 제형화시킨다.

<141> 다른 규정이 없으면, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하고 있는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 설명된 방법 및 재료와 동등하거나 유사한 방법 및 재료를 본 발명의 실시 또는 실험에 사용할 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료를 하기에서 설명하고자 한다.

<142> **실시예 1**

<143> **MHC II군용 박테리아 발현 벡터의 구축**

<144> 방법: MHC II군 분자는 문헌 [Squires 등, J. Biol. Chem. (1988) 263: 16297-16302]에 기술된 것으로부터 유래된 발현 벡터를 이용하여 이.콜리내에서 발현시켰다. MHC 유전자는 T7 프로모터를 함유하는 변형된 발현 벡터내에 삽입하여 삽입 유전자의 발현을 유도하였다. 전장 MHC 유전자 및 절단형(△TM) MHC 유전자를 둘다 발현시켰다. MHC 폴리펩티드의 경막 및 세포질 노출 영역을 암호하는 뉴클레오티드 서열을 △TM 구축물내에서 결실시켰다[참조, 서열 번호 11 및 13]. 서열 번호 11은 HLA DR2-Dw2 α-쇄의 성숙된 전장 형태에 대응하는 DNA 서열을 나타내고, 서열 번호 13은 HLA DR2-Dw2 β-쇄를 나타낸다. △TM 구축물은 α-쇄로부터 577 내지 690번 위치의 영역 및 β-쇄로부터 595 내지 714번 위치의 영역을 각각 결실시키므로써 제조하였다.

<145> 시약 및 재료: β-시아노에틸 포스포르아미다이트 화학법을 이용하여 어플라이드 바이오시스템즈 392 DNA 합성기로 올리고뉴클레오티드를 합성하고, 제조사의 지시에 따라 어플라이드 바이오시스템즈 OPC 카트리지를 이용하여 정제하였다. 박테리오파지 T7 프로모터를 함유하는 플라스미드 pET3a 및 pET11b는 노바겐으로부터 구입하였다. 플라스미드 pUC19 및 모든 제한 효소와 DNA 변형 효소는 뉴 잉글랜드 바이오랩스로부터 구입하였다.

<146> 이. 콜리 K-12 균주 W3110은 ATCC 로부터 입수하였다. 세포주 GM03107 (MHC 서열의 제공원)은 코리엘 의학 연구소의 국립의료원 저장소(NIGMS)로부터 얻었다. GM03107은 그 표면상에 다량의 DR2-Dw2 이종이량체를 발현하는 EBV 형질전환된 인체 세포주이다.

<147> 이. 콜리 발현 플라스미드의 구축: MHC II군 분자용 발현 플라스미드를 pET3a으로부터 하기와 같이 구축하였다.

<148> pET3a를 EcoRI으로 분해하고, DNA 폴리머라제 I(클레노우 단편)로 평활말단화하고, 이를 EcoRV로 분해하였다. 상기 벡터를 재환형화하고, 제한 부위 둘다를 파괴하여 플라스미드 p26404를 생성하였다.

<149> 플라스미드 p26405는 하기와 같은 방법으로 p26404로부터 얻었다. 우선, p26404를 BamHI으로 분해하고, 그 말단을 DNA 폴리머라제 I(클레노우)으로 채워 평활 말단을 생성하였다. 서열이 5'...CGGAATTCCG...3'(서열 번호 15)인 합성 링커는 파괴된 BamHI 부위내로 도입하므로써 새로운 EcoRI 부위로 대체하였다.

<150> NdeI과 EcoRI으로 p26405를 분해하고, 서열이 하기와 같은 합성 링커를 삽입하여 플라스미드 p26411를 생성하였다:

5′...TATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT-

3′...AC CGA TCG TAC TGA CCA CCT GTC GTT TAC CCA-

-CGG GAT CCG AAGCTT AG. .3′ (서열 번호 1)

-GCC CTA GGC TTCGAA TCTAA...5′ (서열 번호 2)

<152> 상기 링커는 phi-10 개방 판독 프레임(커플러)의 최초 14개의 코돈을 제공하고, 삽입된 MHC 유전자의 후속 발현에 적합한 판독 프레임내에 위치한 BamHI 부위를 보유하고 있다. BamHI 부위의 하방에는 EcoRI 부위와 함께 삽입물의 지향성 클로닝을 위한 2개의 하방 부위를 제공하는 HindIII 클로닝 부위가 있다.

<153> 클로닝을 용이하게 하기 위해서, p26411내의 BamHI 부위중 하나를 파괴하여 플라스미드 p27305를 생성하였다. p26411을 EcoRI + PstI으로 분해하고, 3387bp의 단편을 회수하였다. p26411을 또 BamHI과

PstI으로 분해하고, 891bp의 단편을 회수하였다. 하기 서열의 합성 링커를 제조하여 p26411의 두 단편으로 결합하여 p27305를 생성하였다 :

5′...AATTCCTACGTA...3′ (서열 번호 3)

3′. .GGATGCATCTAG . .5′ (서열 번호 4)

<155> 링커는 EcoRI 및 BamHI 점착 말단 둘다를 보유하나, 결합시 EcoRI 부위만을 재생할 것이다. 또한, 상기 링커는 차후의 하방 조작을 위한 SnaBI(평활말단) 클로닝 부위를 보유하고 있다.

<156> 플라스미드 p27313은 p27305상에 $lacI^q$ 억제인자 단백질의 카피를 도입하여 유도전에 표적 유전자의 원하지 않는 전사를 제어한다. p27305를 BamHI 및 PstI으로 분해하고, 917bp의 단편을 회수하였다. 플라스미드 pET11b도 유사하게 처리하여 4608bp의 단편을 회수하였다. 상기 두 단편을 결찰시켜 최종 형태의 발현 플라스미드 p27313을 수득하였다.

<157> DR2-Dw2 알파쇄 및 베타쇄 유전자의 클로닝: 폴리-A^+ mRNA는 하기 제조사의 지시에 따라 패스트트랙 키트(Invitrogen)를 사용하여 5.0 × 10^7 생존 CM03107 세포로부터 제조하였다.

<158> 제조사의 지시에 따라 클론테크 제1 가닥 cDNA 합성 키트를 이용하여 폴리-A^+ mRNA 25 ng으로부터 cDNA를 제조하였다.

<159> 인체 HLA DR2-Dw2 α쇄 (드라) [참조, Lee 등 (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4591-4597] 및 β쇄 (DRB5 0101) [참조, Lee 등 (1984). Nature 299:750-752] 유전자에 대한 서열 정보는 진뱅크 데이타베이스로부터 입수하였다. 각 쇄의 성숙된 유전자 생성물이나 절단형(△TM) 형태의 PCR 증폭을 위해 프라이머를 구축하였다, 각 쇄의 "상부 가닥" 프라이머는 이. 콜리 발현 시스템에 사용된 해독 커플러에 대응하는 phi-10 유전자의 일부를 포함하고 있었다.

<160> DR2-알파쇄:

<161> "상부 가닥"

5′..CGGGATCCGATCGTGGAGGATGATTAAATGATCAAAGAAGAACATGTGATCATC..3′ (서열 번호 5)

<163> 전장의 "하부 가닥"

5′.GTCGAATTCTTACAGAGGCCCCCTGCGTT ..3′ (서열 번호 6)

<165> 절단형(△TM) "하부 가닥"

5′...ATCGAATTCAGTTCTCTGTAGTCTCTGGGAG...3′ (서열 번호 7)

<167> Dr2-베타쇄:

<168> "상부 가닥"

5′...CGGGATCCGATCGTGGAGGATGATTAAATGGGGGACACCCGACCACGTT. .3′ (서열 번호 8)

<170> 전길이의 "하부 가닥"

5′..GTCGAATTCTCAGCTCACGAGTCCTGTTGG...3′ (서열 번호 9)

<172> 절단형(△TM) "하부 가닥"

5′ .ATCGAATTCATTGCTCTGTGCAGATTCAGA...3′ (서열 번호 10)

<174> 증폭후에, PCR 생성물을 BamHI 및 EcoRI으로 분해하고, 유사하게 처리한 플라스미드 pCU9내로 서브클로닝하였다. 재조합 클론을 동정하고, 서열분석하였다. 재조합 알파쇄 및 베타쇄 유전자를 함유하는 플라스미드를 각각 p26416 및 p26417로 명명하였다. 알파쇄의 서열분석 결과, 알려진 서열의 649번 염기에서 점 돌연변이(G -> T)가 밝혀졌다. 상기 돌연변이 결과, 전장 성숙된 유전자 생성물의 217번 잔기가 발린에서 루신으로 치환되었다. 베타쇄의 경우는 알려진 서열과 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

<175> 전장 발현 구축물: 플라스미드 p26416 및 p26417을 BamHI 및 EcoRI으로 처리하였다. 알파쇄 및 베타쇄에 대응하는 단편을 발현 벡터 p27313내로 서브클로닝하였다. 재조합 클론을 제한 분석으로 규명하여, p27317(알파쇄) 및 p27316(베타쇄)로 명명하였다.

<176> △TM 발현 구축물: 전술한 PCR 프라미머 쌍을 이용하여 절단형 알파쇄 및 베타쇄 유전자의 PCR 증폭을 수행하였다. 플라스미드 p26416 및 p26417을 각각 알파쇄 및 베타쇄에 대한 표적 DNA로 사용하였다. PCR 생성물을 BamHI 및 EcoRI으로 처리하고, 동일한 효소로 처리하여 전장의 베타쇄를 제거한 플라스미드 p27316내로 결합시켰다. 생성된 플라스미드를 p26495(α-△TM) 및 p26496(β-△TM)으로 명명하였다.

<177> **실시예 2**

<178> **이.콜리내에서의 MHC II군 분자의 발현**

<179> 숙주 균주 W3110/DE3의 구축: 제조사의 지시에 따라 노바겐에서 시판되는 DE3 용원화 키트를 이

용하여 이. 콜리 균주 W3110을 파지 람다-DE3 (T7 RNA 폴리머라제 유전자의 한 카피를 보유함)에 대해 용원성으로 만들었다.

<180> 재조합 클론의 유도: 플라스미드 p27316, p27317, p26495 및 p26496을 숙주 균주 W3110/DE3내로 형질전환시켰다.

<181> 배양물을 0.4%의 글루코즈 및 100㎍/ml의 암피실린을 함유하는 LB중에서 37℃로 증식시켰다. 이소프로필-β-b-D-티오-갈락토피라노시드 (IPTG)(최종 농도 0.4 mM)를 첨가하므로써 대수 증식 중기로 세포를 유도하고, 37℃에서 증식시켰다. 주기적으로 샘플을 채취하고, 프로세싱전에 빙상에서 냉각하였다.

<182> 세포를 5000 x g, 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 수거하였다. 적정부피의 TE(10mM 트리스-Cl, 1mM EDTA pH 8.0)내에 세포를 재현탁시켜 0.02 OD_{600}/㎕를 얻었다. 동량의 세포 현탁액 및 0.3 M 2-메르캅토에탄올을 함유하는 2X SDS-샘플 완충액을 첨가하고, 5분 동안 비등시키므로써 환원된 샘플을 제조하였다. 샘플 10㎕를 12% SDS-겔에 적용하고, 전기영동한후에 단백질을 쿠마시 브릴란트 블루 염색법으로 가시화하였다.

<183> 용해도 시험을 위해, 세포 현탁액 200㎕를 빙상에서 3회의 10초 파열 동안 4개의 마이크로-팁을 이용하여 초음파처리하였다. 12,000 x g. 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 가용성 물질로부터 불용성 물질을 분리하였다. 불용성 물질(봉입체)을 냉 TE 500㎕로 1회 세척하고 재회전시켰다. 펠릿을 흡인한후, 0.3M 2-메르캅토에탄올을 함유하는 1X SDS-샘플 완충액 400㎕내에 용해시키고, 비등시켰다.

<184> rDR2 알파쇄 및 베타쇄의 정제: 경막 영역을 보유 및 보유하지 않는 재조합 DR2 알파쇄 및 베타쇄는 문헌 [참조, Passmore 등, J. Immunol. Meth. 155: 193-200 (1992)]에 기술된 바와 같이 분취용 전기용출로 정제하였다. 8M 요소 및 10mM DTT중 6mg/ml 농도의 봉입체 제제를 샘플 완충액(25mM 트리스-HCl, pH6.8 및 0.25% SDS)에 대해 16 시간 동안 투석하였다. 출발 샘플 2mg을 13.5% 용해겔 및 4% 충진겔을 함유하는 바이오-라드 프렙 셀 장치에 로딩하였다. 전기영동을 용출 기간 동안 40mA의 일정 전류로 수행하였다. 분획(3ml)을 1ml/분의 유속으로 360분에서 수거하기 시작하였다. 용출된 분획을 13.5%의 비-환원성 SDS-PACE 및 은염색하여 분석하였다. 폴리아크릴아미드 겔 분석에 의거하여, 알파 및 베타 단량체를 수집하고, 아미콘 센트리프렙 10k 분자량 컷-오프 시스템을 이용하여 농축하였다. 최종 단량체 제제를 0.01% 트윈-80 및 0.02% 아자이드를 함유하는 PBS에 대해 투석하였다. 수율을 로우리 분석법으로 계산하였는데, 통상의 회수율 범위는 로딩된 단백질의 15 내지 30%였다. 상기 방법으로 정제한 MHC 폴리펩티드는 검출가능한 오염물질을 함유하고 있지 않았다.

<185> 결과: DR2-Dw2의 성숙된 전장 알파쇄 및 베타쇄 뿐만 아니라 추정 경막 및 세포질성 꼬리 영역이 결손된 절단형의 클론을 구축하고, 이. 콜리내에서의 발현을 위해 T7 발현 벡터내에 이것을 삽입하였다.

<186> 본 명세서에 사용된 알파쇄 클론은 알려진 서열과 비교하였을때, 649번 염기에서 뉴클레오티드가 치환되어 있다. 이 차이는 전장 생성물의 217 번 아미노산이 발린 잔기 대신 루신 잔기로 치환되는 결과로 나타난다. 이 잔기는 상기 분자의 경막 영역내에 존재하며, 따라서 △TM 구조물내에는 존재하지 않는다. 발린 치환을 위한 루신의 보존성 및 그의 경막 영역내의 위치때문에, 상기 돌연변이는 펩티드 결합과 T-세포와의 상호작용에 관한 추가의 실험에 유의한 영향을 미치는 것으로 생각되지 않는다.

<187> W3110/DE3내에서 전장 및 절단형 구축물의 유도로 SDS-PAGE로 평가한 예상 크기와 같거나 유사한 크기의 단백질을 상당량 축적할 수 있었다. 하기 표는 4개의 단백질 각각에 대해 평가한 길이와 예상 분자량을 요약한 것이다:

단백질	잔기	예상 분자량(M_r)
알파 전장	229	25971
베타 전장	237	27035
알파 △TM	192	22174
베타 △TM	198	23024

<189> 상기 세포의 초음파 처리 및 원심분리에 의한 가용성 분획과 불용성 분획의 분리후에, 표적 유전자 생성물을 모든 구축물내의 가용성(봉입체) 분획내에 위치시켰다.

<190> DR2-Dw2 알파쇄 전장 및 △TM 생성물의 최초 5개의 잔기에 대한 NH_2-말단의 아미노산 서열결정 결과는 이. 콜리에 의한 제거가 생체내에서 불완전하게 이루어진 연유로 메티오닌 잔기가 첫번째 위치에서 발견된 것을 제외하면 천연 생성물에 대한 예상 아미노산 서열과 완전히 일치하였다. 베타쇄 유전자 생성물의 최초 5개의 잔기에 대한 NH_2-말단의 아미노산 서열 결정 결과는 첫번째 위치에 메티오닌이 존재하지 않고, 상기 쇄에 대해 예상한 성숙된 서열과 완전히 일치하였다.

<191> 이. 콜리에서 발현된 알파쇄 및 베타쇄는 펩티드 뿐만 아니라 천연적으로 유도된 물질의 쇄 분리체에 결합한다. 따라서, 변성된 1본쇄는 펩티드에 결합할 수 있는 특정 수준의 형태(복잡한 리폴딩 과정은 없음)를 달성할 수 있다.

<192> 복잡한 리폴딩 단계는 꼭 필요한 것은 아닌 것으로 나타났지만, 1본쇄 부위의 조절 정상복귀후 결합 효율의 향상이 이루어질 수 있었다.

<193> **실시예 3**

<194> **재조합 MHC 폴리펩티드에 대한 항원성 펩티드의 결합**

<195> 200㎍/ml 농도의 정제된 쇄 및 400㎍/ml 농도의 DR2 이량체를 방사능 표지된 MBP(83-102)V^{83} 펩티드 또는 MBP(1-14) 펩티드와 함께 37℃에서 96시간 동안 항온처리하였다. 샘를 3㎍을 비-환원 조건하에서 13.5% 폴리아크릴아미드 SDS-PACE로 분석하였다. 겔을 은염색하고, 방사능사진을 촬영하고, 각각의 쇄에 결합된 방사능을 계수하였다. 표지된 펩티드가 점유하는 쇄의 비율(%)을 펩티드 각각의 특이적 활성도로부터 계산하였다.

<196> 제1도에 제시한 결과는 결합된 최대 펩티드가 rDR2β(-TM)이고, 그 후속으로 rDR2α(+TM)과 rDR2β(+TM)이 있음을 나타낸다. rDR2α(-TM)은 MBP(83-102)Y^{83} 펩티드에 실질적으로 결합하지 않음을 나타냈다. 또한, 재조합 쇄는 등몰량의 DR2 천연 이종이량체에 비해 증가된 결합을 나타냈다. 상기 결과는 4번의 다른 실험에서도 동일하게 나타났다. 상기 펩티드 결합의 특이성은 동일한 미엘린 기초 단백질인 MBP(1-14)로부터 취한 동량의 다른 에피토프와 함께 상기 쇄를 항온처리하므로써 입증하였다. 모든 경우에 있어, MBP(1-14)의 결합은 미미하였다.

<197> rDR2와 방사능 표지된 펩티드의 연합 및 해리 속도론: 결합 속도는 상기한 바와 유사하게 측정하였다. 200㎍/ml 농도의 쇄를 표지된 펩티드와 함께 37℃에서 항온처리하였다. 여러 시점에서, 샘플 15㎕를 분리하고, 4℃로 냉각시켜, 13.5% SDS-PAGE로 분석하였다. 펩티드 점유율은 상기한 바와 같이 비(比) 활성도로부터 계산하였다. 쇄-펩티드 복합체의 안정성을 0℃ 및 37℃에서 비교하였다(제2도). 1본쇄-펩티드 복합체는 이종이량체인 천연 DR2-펩티드 복합제 만큼 안정한 것으로 나타났다.

<198> **실시예 4**

<199> **비오티닐화된 항원성 펩티드를 사용한 펩티드 결합 분석**

<200> 상기한 바와 같이 통상의 분취용 크로마토그래피법으로 정제한 4개의 재조합 쇄, rDR2α(+TM), rDR2α(-TM), rDR2β(+TM) 및 rDR2β(-TM)을 이용하여 추가의 결합 연구를 수행하였다. 비오티닐화된-MBP(83-102)Y^{83}, 비오티닐화된-MBP (124-143) 및 비오티닐화된-MBP(1-4)펩티드를 결합 분석을 위해 사용하였다. 0.2mg/ml의 재조합 쇄를 50배 몰 초과량의 비오티닐화된-MBP 펩티드와 함께 항온처리하였다. 비오티닐화된-펩티드가 점유하고 있는 쇄의 비율의 정량하기 위해, 효소 접합된 아비딘 시스템을 이용하여 생성된 복합체를 평판 분석하였다. 1mg/50ml의 친화성 정제된 L243 모노클로날 항체, 폴리클로날 항-알파 및 폴리클로날 항-베타 DR2, 알파쇄 및 베타쇄(경막 영역을 보유 및 보유하지 않음)에 대해 각각 96 웰 미량역가 평판상에 피복하였다. 폴리클로날 항-알파 및 항-베타 항체를 항원-결합된 세파로즈-4B 컬럼상에서 면역시킨 토끼 혈청으로부터 정제하였다. 기지량의 비오티닐화된-BSA를 피복하므로써 상기 분석의 검정을 수행하였다. 복합체를 포획한후, 세척하여 미결합 펩티드를 제거하고, 아비딘-알칼린 포스파타제와 함께 항온처리하였다. 미결합 효소 접합체는 세척하여 제거한후, 비색 기질(시그마 104)을 첨가하고, 405nm에서 흡광도를 측정하므로써 효소 생성물을 검출하였다.

<201> 천연 HLA-DR2는 펩티드 MBP(83-102)Y^{83} 및 MBP(124-143)에 대해 높은 친화성을 나타냈으며, MBP(1-4)에 대해서는 친화성을 나타내지 않았다. 제3도에 제시한 결과는 천연 이종이량체와 같이 정제된 재조합 폴리펩티드 쇄도 MBP(83-102)Y^{83} 및 MBP(124-143) 펩티드 둘다에 결합할 수 있음를 나타내고 있다. MBP(1-14)는 임의의 정제된 쇄 제제에 대해 실질적으로 결합을 나타내지 않았다. 모든 경우에 있어, 최대 결합을 위한 최적 pH는 천연 DR2와는 상이했다.

<202> **실시예 5**

<203> **T 세포 수용체 점유 분석**

<204> DRB5 0101에 관하여 MBP(83-102)Y^{83}을 인식하는, 포진바이러스 사이미리(HVS) 형질전환된 SS8T 인체 T 세포 클론 [H. Wekerle, Max Planck Institute for Psychiatry에서 제공, 참조 Munich. Cermany. Weber 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11049-11053]을 37℃에서 2 mM L-글루타민, 100유니트/ml의 페니실린, 100㎍/ml의 스트렙토마이신, 10% 소태자 혈청(하이클론) 및 50유니트/ml의 인체 IL-2(ABI)가 보충된 RPMI 1640 배지내에서 배양하였다. 격일마다 세포를 새로운 배지로 이전하였다. 실시예 4에 제시된 결합 결과에 의거하여여, 4개의 정제된 재조합 쇄와 MBP(83-102)Y^{83} 및 MBP(124-143)펩티드의 복합체를 실험관내 기능 분석을 위해 제조하였다. 여러가지 복합체 제제를 최종 농도 10% v/v로 미량역가 조직 배양 평판에 첨가하고, 상기 세포를 IL-2가 없는 배지 200㎕내에 20,0000/웰의 밀도로 첨가하였다. 37℃에서 48시간 동안 배양한 후, 상청액을 각각의 웰로부터 수거하고, 감마-IFN양 증가에 대해 검사하였다. 감마-IFN의 검출을 위해, 눈크 맥시소브 96웰 평판을 0.5㎍/웰의 농도로 항-인체 감마-IFN 모노클로날 항체로 피복하고, 4℃에서 항온처리하였다. 상기 웰을 0.1%의 BSA로 차단하고, 샘플을 실온에서 2시간 동안 항온처리하였다. 희석 범위 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 유니트/ml(270 유니트/ml = 10.75ng/ml)로 인체 감마-IFN을 이용하여 표준 곡선을 생성하였다. 토끼 항-인체 감마-IFN을 1㎍/ml의 농도로 첨가한후, 실온에서 추가로 2시간 동안 항온처리하였다. 웰을 철저히 세척하고, 농도가 800ng/ml인 HRP-접합된 염소 항-토끼와 함께 37℃에서 1시간 동안 항온처리한후, 기질로 TMB를 이용하여 발색시켰다. 5분에 2N의 황산으로 반응을 정지시키고, 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

<205> T 세포의 감마 IFN 증식의 증가는 특이성 리간드에 의한 TCR 점유후에 나타나는 것으로 밝혀졌다. 상기 분석에서 천연 DR2와 MBP(83-102)Y^{83}펩티드의 복합체는 양성 대조용으로 사용하였다. 모든 실험에서, 감마 IFN 생성 증가의 특이성은 천연 DR2 또는 쇄 및 무관련 고 친화성 MBP(124-143) 펩티드와의 복합체에 의해 입증되었다. 유사하게, DR3와 MBP(83-102)Y^{83}펩티드의 복합체를 HL2-DR2에 의한 SS8T 클로닝된 T 세포의 제한을 입증하기 위해 사용하였다. 알파쇄(Tm이 있거나 없음) 및 베타 쇄(Tm이 있거나 없음)의 복합체를 이용하여 수득한 결과가 제4도 및 제5도에 제시되어 있다.

<206> 이들 결과로 항원성 펩티드와 천연 이종이량체의 복합체와 같이 MHC II군 1본쇄-펩티드 복합체가 기능함이 명백히 입증되었다.

<207> **실시예 6**

<208> **재조합에 의해 생성된 I-A^s α쇄를 이용한 EAE의 치료**

<209> 본 실시예는 생체내에서 아네르기를 유도할 수 있는 본 발명의 재조합에 의해 생성된 1본쇄 복합체의 효능을 입증하기 위한 것이다 이 실험들로 SJL/J 생쥐에서 EAE가 예방됨이 입증되었다. IA^s의 α쇄를 본 발명의 방법을 이용하여 재조합에 의해 발현시켰다. 간략히 설명하면, PCR 프라이머를 진뱅크에서 입수가능한 유전자 서열에 의거하여 제조하고 생쥐 비장 세포로부터 유전자를 분리해냈다. 생성된 유전자를 상기한 바와 같이 발현 벡터 p27313을 이용하여 발현시켰다.

<210> EAE를 문헌 [참조, Sharma 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11465-11469 (1991)]에 기술되어 있는 바와 같이 1 × 10^7 개의 MBP(91-103) 반응성 T 세포의 선택성 이전에 의해 유도하였다. 상기 실험은 상기한 바와 같이 제조한 MBP 91-103 또는 1-14와 복합체를 이룬 IA^s의 α쇄를 이용하여 수행하였다. 0, 2, 4 및 6일째에, 상기한 Sharma 등의 문헌에 기술된 바와 같이 각 생쥐에게 복합체 40㎍을 투여하였다. 그 결과는 제6도에 제시되어 있다. 도면에서 확인할 수 있는 바와 같이 PBS만이나 무관련 복합체(IA^s와 MBP(1-14)의 복합체)를 투여한 생쥐는 마비를 나타내는 반면, 관련 복합체(IA^s와 MBP(91-103)의 복합체)를 투여한 생쥐는 마비를 나타내지 않았다.

<211> **실시예 7**

<212> **이.콜리내에서 MHC의 발현을 위한 우비퀴틴 융합 발현 시스템**

<213> 이.콜리내에서 융합 단백질의 생성에서 우비퀴틴을 암호하는 효모 유전자를 사용하는 것에 대해서는 문헌 (Miller 등, Biotechnology 7:698-704 (1989)]에 기술되어 있다. 상기 시스템에서, UPP 절단 부위를 함유하는 효모 우비퀴틴 유전자의 최초 76 개의 잔기에 대한 C-말단 융합으로 문제의 유전자를 생성하였다. 두 부분의 연결부를 절단시킨 결과, 원형의 진정한 N-말단 잔기를 보유하는 단백질이 생성되었다.

<214> 이러한 절단 부위의 예는 효모 우비퀴틴 단백질 펩티다제(UPP) 및 우비퀴틴 특이성 프로테아제(UBPI)에 의해 인식되는 우비퀴틴 서열이다. UPP는 YUH1 유전자의 생성물로, 이.콜리 내에서 활성형으로 발현될 수 있으며, 실험관내 또는 생체내에서 융합 연결부에서 우비퀴틴-단백질 융합체를 절단하는데 사용할 수 있다 [Miller 등, 상기 참조]. UPP에 의한 절단 효율은 융합 생성물의 길이에 의해 영향받으며, 20Kd 이상의 융합체의 절단은 종종 비효율적인 것으로 나타났다. 그러나, 문헌 [Tobias 및 Varshavsky, J. Biol. Chem. 266: 12021 (1991)]에 의하면 UBP1은 UPP와 동일한 단백질분해 특성을 보유하나 융합체의 크기에 의해서는 영향받지 않는 것으로 나타났다.

<215> 우비퀴틴-DR2 알파 융합체의 예상 크기가 M_r 30738 이고, UPP에 의한 절단이 상기 크기의 단백질의 절단에서는 비효율적이라는 사실을 고려해볼때, UBP1이 상기 시스템에 바람직할 것이다.

<216> 이. 콜리에서 "진정한" MHC II 쇄의 생성을 위해 우비퀴틴 시스템을 이용하는 것으로 두가지 방안을 생각해 볼 수 있다. 첫째는, UPP나 UBP1을 이.콜리 내에서 클로닝하고, 발현시키고, 유도된 세포로부터 취한 세포 추출물을 이용하여 실험관내에서 융합 단백질(별개로 제조됨)을 절단하는 방법이다. 둘째는, UPP나 UBP1을 생체내에서 MHC II 쇄와 함께 동시 발현되도록 공급하여 조(組)정제 세포 추출물로부터 직접 "진정한" NHC II를 생성해내는 방법이다.

<217> 우비퀴틴 융합 벡터 p27340의 구축: 우비퀴틴의 76개 아미노산 암호 영역을 암호하는 서열을 PCR에 의해 효모 게놈 DNA로부터 증폭하였다. 상기 프라이머는 진뱅크의 Ubi76에 의거하여 구축하였다. 상기 프라이머는 하기와 같다:

<218> Ubi "상부"프라이머

BamHI

5′...TCAGGATCCGATCGTGGAGGATGATTAAATGCAAATTTTTGTCAAGACTTTGACTGGT...3′ (서열 번호 16)

<220> 상기 프라이머 서열에는 phi-10 커플러 영역이 포함되어 있으며 밑줄 서열은 실질적인 우비퀴틴 5' 서열을 나타낸다.

<221> Ubi "역" 프라이머

EcoRI SacII

5′...TGAATTCCCGCGGAGTCTCAAGACTAAGTGCAAAGTGGA. 3′ (서열 번호 17)

<223> 유일한 SacII 부위는 염기 서열을 변경시켜 융합 클로닝을 위한 제한 부위를 생성하되 상기 분자의 아미노산 서열은 유지하였다.

<224> 상기한 바와 같이 BamHI과 EcoRI을 이용하여 p27313을 분해하고, 동일한 효소로 분해한 259bp의 ubi-76 PCR 생성물과 5500 bP의 단편을 결찰하여 목적하는 융합 생성물의 생성을 위한 발현 벡터 p27340을 생성하였다.

<225> p27340을 사용하여 임의의 유전자를 우비퀴틴 유전자에 융합함으로써 융합 생성물을 제조하고, 이를 이후 특이적으로 분해하여 목적하는 N-말단의 단백질을 얻을 수 있다. 상기 벡터는 암피실린으로 선별할 수 있다.

<226> 경막 영역이 결실된 DR 알파쇄를 암호화하는 핵산을 p27340내에 클로닝하고, 예상 분자량이 30,758 Da인 융합 생성물로서 발현하였다. SDS-PAGE 겔 분석 결과, 플라스미드 p26495로부터의 발현 생성물과 유사한 이중 밴드의 존재가 확인되었다.

<227> p27351 및 p27373의 구축: DR 알파쇄 서열을 PCR을 이용하여 중폭하여 전장의 서열 뿐만 아니라 경막 및 세포질 영역이 결실된 서열을 생성하였다. 우비퀴틴 76 서열에 이들 서열을 융합하기 위해 사용되는 PCR 프라이머는 하기와 같다:

<228> 알파-ubi76 프라이머(상부 가닥)

SacII

5′ ATCCGCGGGGGCATCAAAGAAGAACATGTGATCATC...3′ (서열 번호 18)

<230> SacII 부위를 포함하는 서열은 ubi-76 유전자에 융합시, 우비퀴틴 절단부위를 생성한다. 밑줄 서열은 처음 메티오닌 코돈이 없는 DR 알파쇄를 나타낸다.

<231> 알파 F/L 프라이머(하부 서열)

EcoRI

5′...GTCGAATTCTTACAGAGGCCCCCTGCGTT...3′ (서열 번호 19)

<233> 알파 △TM 프라이머(하부 가닥)

EcoRI

5′...GTCGAATTCTCAGTTCTCTGTAGTCTCTGGGAG ..3′ (서열 번호 20)

<235> 알파 △TM-10 프라이머(하부 가닥)

5′ ..ATCGAATTCTTAAGCATCAAACTCCCAGTGCTT...3′ (서열 번호 21)

<237> p27340을 SacII 및 EcoRI으로 분해하고, 동일한 효소로 분해한 DR △TM알파 PCR 생성물의 589 bp 단편과 5740 bp 단편을 결합시켜 p27351을 생성하였다. 플라스미드 p27373은 경막 영역 및 우비퀴틴 76 서열에 융합된 외세포 도메인으로부터 10개 이상의 잔기가 결실된 DR 알파를 발현한다.

<238> p32941의 구축: p27317의 PCR 증폭에 의해 DR 알파 전장 서열을 수득하였다. PCR 프라이머는 제한 효소 부위 SscII 및 EcoRI를 함유하도록 구축하였으며, 이들을 PCR-증폭된 단편을 p27340내로 서브클로닝하는데 사용하였다.

<239> 이 플라스미드를 발현 숙주 W3110/DE3 내로 형질전환하였다. 증식 및 IPTG 유도후, 예상 분자량 M_r이 34,625인 우비퀴틴 76 + DR 알파 F/L의 융합 단백질의 발현이 관찰되었다.

<240> **실시예 8**

<241> **추가의 이. 콜리 MHC II 발현 플라스미드**

<242> 10개의 잔기가 부족한 DR 알파 △TM 쇄의 발현을 위한 p28524의 구축

<243> 플라스미드 p26495는 pET 발현 시스템내에서 DR 알파 △TM 쇄를 발현하였다. IPTG 유도시, SDS-PAGE 겔 분석 결과, 예상 분자량의 이중 밴드를 나타냈다. 이들 밴드를 최초 5개의 N-말단 잔기에 대해 서열결정한 결과, 양자 모두 알파쇄에 대한 서열과 일치하였다. 플라스미드 p28524를 DR 알파 △TM 쇄의 더 많은 절단형 버젼을 생성하기 위해 구축하였다. 하기 프라이머를 이용하여 상기 서열을 PCR 증폭하였다:

<244> 상부 가닥 프라이머:

5′...CGGGATCCGATCGTGGAGGATGATTAAATGATCAAAGAAGAACATGTGATCAT ..3′ (서열 번호 22)

<246> 하부 가닥 프라이머:

5′...ATCGAATTCTTAAGCATCAAACTCCCAGTGCTT...3′ (서열 번호 23)

<248> PCR 생성물을 BamHI 및 EcoRI으로 분해하고, 동일한 효소로 분해한 p27313내로 클로닝하였다.

<249> 테트라사이클린 내성을 가진 이.콜리 발현 플라스미드의 구축: 이.콜리내에서 MHC II군 1본쇄의 발현을 위해 플라스미드 p26495, p26496, p27316 및 p27317을 구축하였다. 이들 플라미스드는 암피실린 내성의 존재하에서 △TM 및 전장 DR 알파쇄 및 베타 쇄를 발현한다. 이. 콜리 균주의 대규모 배양에, 암피실린은 효과적인 항생제가 아닌데, 그 이유는 암피실린 내성 플라스미드를 함유하는 세포가 분비하는 β-락타마제가 암피실린을 급속하게 분해하기 때문이다. 따라서, 테트라사이클린 내성 유전자를 상기 플라스미드내로 클로닝하여 발효 조건하에서 더 안정한 플라스미드를 제조하였다.

<250> p27329 및 p27330의 구축: 테트라사이클린 내성 유전자를 표적 DNA로 pBR322 및 하기 PCR 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시켰다:

<251> 상부 가닥 프라이머:

5′...ATCTCGAGTTTGACAGCTTATCATCG...3′ (서열 번호 24)
Ava 1

<253> 하부 가닥 프라이머:

5′ ATCTCGAGTCAGGTCGAGGTGGC...3′ (서열 번호 25)
Ava 1

<255> Ava1을 이용하여 p27316을 선형화하고, 송아지 장 포스파타제로 6245bp 단편을 포스파타징하므로써 p27329를 생성하였다. 이 단편을 Ava1으로 분해한 테트라사이클린 PCR 생성물에 결찰하였다. 이렇게 생성된 플라스미드는 암피실린 및 테트라사이클린 마커 둘다의 존재하에서 DRB5 0101 전장 쇄를 발현한다.

<256> p27330은 Ava1으로 분해한 p27317로부터 출발하고, 테트라사이클린 PCR 생성물내에 클로닝하는 유사한 조작으로 생성하였다. 이렇게 생성된 플라스미드는 암피실린 및 테트라사이클린 마커 둘다의 존재하에서 DR 알파 전장 쇄를 발현한다.

<257> p329129 및 p33435의 구축: 테트라사이클린 유전자를 제한 효소에 의해 p28524 및 p26496내로 클로닝하였다. 플라스미드 p26495 및 p26496을 Xba1 및 Ava1으로 분해하였다. 이렇게 생성된 3736 bp의 단편을 Xba1 + Ava1 + Pst1으로 p27329를 분해시켜 생성된 3507 bp의 단편에 결찰하였다. 이렇게 생성된 플라스미드는 암피실린 및 테트라사이클린 마커 둘다의 존재하에서 DR 알파 및 베타 △TM 쇄를 발현한다.

<258> **실시예 9**

<259> **MHC II군 1본쇄를 발현하는 이. 콜리 균주의 발효**

<260> 10ℓ들이 미생물발효 시스템을 뉴 브룬스위크 사이언티픽으로부터 구입하였다. 상기 시스템의 특징은 pH, dO_2, 온도 및 교반 속도를 조사하고, 조절할 수 있다는 점이다. 또한, 상기 시스템에는 발효 육종에 배지를 지속적으로 공급하는데 사용되는 펌프가 구비되어 있다.

<261> 이. 콜리 숙주 W3110/DE3내에서 발현된 모든 MHC II군 1본쇄를 고수율의 단백질을 수득하기 위해 통상의 발효 조건 하에서 발현시켰다. 대략 20의 OD_{600}에서 유도를 수행하였다. 유도 2시간 후에 세포를 수확하고, 봉입체 제조를 위해 처리하였다. 통상적인 발효로 500g 규모로 습윤 세포 페이스트를 생성하고, 이를 -20℃로 동결시켜 배치내에서 용균시킬 수 있다.

<262> 상기 실시예들은 본 발명을 예시하기 위해 제공된 것으로, 본 발명의 범주를 제한하려는 것은 아니다. 당업자라면 본 발명의 다른 변형을 용이하게 알 수 있을 것이며, 이 또한 첨부하는 특허 청구의 범위내에 포함된다. 본 명세서에서 인용한 모든 문헌, 특허공보, 특허출원 명세서는 본원에 참고로 인용된 것이다.

<263> **서열표**

<264> (1) 일반 정보 :

<265> (i) 출원인 :

<266> (A) 성명 : 에너겐, 인코오포레이티드

<267> (B) 거리명 : 페노브스코트 드라이브 301

<268> (C) 도시명 : 레드우드 시티

<269> (D) 주명 : 캘리포니아

<270> (E) 국가명 : 미합중국

<271> (F) 우편 번호 (ZIP) : 94063

<272> (G) 전화 번호 : (415) 361-8901

<273> (H) 팩시밀리 번호 : (415) 361-8958

<274> (I) 텔렉스 번호 :

<275> (ii) 발명의 명칭 : MHC 단백질의 원핵세포내 발현

<276> (iii) 서열의 수 : 25

<277> (iv) 컴퓨터 판독 형태 :

<278> (A) 매체 유형 : 플로피 디스크

<279> (B) 컴퓨터 : IBM PC 호환형

<280> (C) 작동 체계 : PC-DOS/MS-DOS

<281> (D) 소프트웨어 : PatentIn Release #1.0, 버젼 #1.25

<282> (v) 현행 출원 자료 :

<283> (A) 출원 번호 :
<284> (B) 출원 일자 : 1994년 10월 25일
<285> (C) 분류 기호 :
<286> (vi) 선행 출원 자료 :
<287> (A) 출원 번호 : US 08/143,575
<288> (B) 출원 일자 : 1993년 10월 25일
<289> (vii) 대리인에 관한 정보 :
<290> (A) 성명 : 케빈 엘. 바스티앙
<291> (B) 등록 번호 : 34,774
<292> (C) 참조/열람 번호 : 14058-21-PC
<293> (viii) 통신 정보 :
<294> (A) 전화 번호 : (415) 543-9600
<295> (B) 팩시밀리 번호 : (415) 543-5043
<296> (2) 서열 번호 1 에 대한 정보 :
<297> (i) 서열 특성 :
<298> (A) 길이 : 54 염기쌍
<299> (B) 서열형 : 핵산
<300> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<301> (D) 형태 : 직쇄상
<302> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<303> (xi) 서열 번호 1 의 서열 :

TATGGCTAGC ATGACTGGTG GACAGCAAAT GGGTGCCCTA GGCTTCGAAT CTAA 54

<305> (2) 서열 번호 2 에 대한 정보 :
<306> (i) 서열 특성 :
<307> (A) 길이 : 52 염기쌍
<308> (B) 서열형 : 핵산
<309> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<310> (D) 형태 : 직쇄상
<311> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<312> (xi) 서열 번호 2 의 서열 :

ACCGATCGTA CTGACCACCT GTCGTTTACC CAGCCCTAGG CTTCGAATCT AA 52

<314> (2) 서열 번호 3 에 대한 정보 :
<315> (j) 서열 특성 :
<316> (A) 길이 : 12 염기쌍
<317> (B) 서열형 : 핵산
<318> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<319> (D) 형태 : 직쇄상
<320> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<321> (xi) 서열 번호 3 의 서열 :

AATTCCTACG TA 12

<323> (2) 서열 번호 4 에 대한 정보 :
<324> (i) 서열 특성 :
<325> (A) 길이 : 12 염기쌍
<326> (B) 서열형 : 핵산

<327> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<328> (D) 형태 : 직쇄상
<329> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<330> (xi) 서열 번호 4 의 서열 :

GGATGCATCT AG 12

<332> (2) 서열 번호 5 에 대한 정보 :
<333> (i) 서열 특성 :
<334> (A) 길이 : 54 염기쌍
<335> (B) 서열형 : 핵산
<336> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<337> (D) 형태 : 직쇄상
<338> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<339> (xi) 서열 번호 5 의 서열 :

CGGGATCCGA TCGTGGAGGA TGATTAAATG ATCAAAGAAG AACATGTGAT CATC 54

<341> (2) 서열 번호 6 에 대한 정보 :
<342> (i) 서열 특성 :
<343> (A) 길이 : 29 염기쌍
<344> (B) 서열형 : 핵산
<345> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<346> (D) 형태 : 직쇄상
<347> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<348> (xi) 서열 번호 6 의 서열 :

GTCGAATTCT TACAGAGGCC CCCTGCGTT 29

<350> (2) 서열 번호 7 에 대한 정보 :
<351> (i) 서열 특성 :
<352> (A) 길이 : 31 염기쌍
<353> (B) 서열형 : 핵산
<354> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<355> (D) 형태 : 직쇄상
<356> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<357> (xi) 서열 번호 7 의 서열 :

ATCGAATTCA GTTCTCTGTA GTCTCTGGGA G 31

<359> (2) 서열 번호 8 에 대한 정보 :
<360> (i) 서열 특성 :
<361> (A) 길이 : 49 염기쌍
<362> (B) 서열형 : 핵산
<363> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<364> (D) 형태 : 직쇄상
<365> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<366> (xi) 서열 번호 8 의 서열 :

CGGGATCCGA TCGTGGAGGA TGATTAAATG GGGGACACCC GACCACGTT 49

<368> (2) 서열 번호 9 에 대한 정보 :
<369> (i) 서열 특성 :

<370> (A) 길이 : 30 염기쌍
<371> (B) 서열형 : 핵산
<372> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<373> (D) 형태 : 직쇄상
<374> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<375> (xi) 서열 번호 9 의 서열 :

GTCGAATTCT CAGCTCACGA GTCCTGTTGG 30

<377> (2) 서열 번호 10 에 대한 정보 :
<378> (i) 서열 특성 :
<379> (A) 길이 : 31 염기쌍
<380> (B) 서열형 : 핵산
<381> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<382> (D) 형태 : 직쇄상
<383> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<384> (xi) 서열 번호 10 의 서열 :

ATCGAATTCA CTTGCTCTGT GCAGATTCAG A 31

<386> (2) 서열 번호 11 에 대한 정보 :
<387> (i) 서열 특성 :
<388> (A) 길이 : 690 염기쌍
<389> (B) 서열형 : 핵산
<390> (C) 쇄의 수 : 1본쇄
<391> (D) 형태 : 직쇄상
<392> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)
<393> (ix) 특징 :
<394> (A) 명칭/키 : CDS
<395> (B) 위치 : 1..690
<396> (ix) 특징 :
<397> (A) 명칭/키 : misc_feature
<398> (B) 위치 : 577..690
<399> (D) 기타 정보 : /주 = "HLA DR2-Dw2 알파쇄내의 경막 영역 암호"
<400> (xi) 서열 번호 11 의 서열 :

```
ATC AAA GAA GAA CAT GTG ATC ATC CAG GCC GAG TTC TAT CTG AAT CCT        48
Ile Lys Glu Glu His Val Ile Ile Gln Ala Glu Phe Tyr Leu Asn Pro
  1               5                  10                  15

GAC CAA TCA GGC GAG TTT ATG TTT GAC TTT GAT GGT GAT GAG ATT TTC        96
Asp Gln Ser Gly Glu Phe Met Phe Asp Phe Asp Gly Asp Glu Ile Phe
            20                  25                  30

CAT GTG GAT ATG GCA AAG AAG GAG ACG GTC TGG CGG CTT GAA GAA TTT       144
His Val Asp Met Ala Lys Lys Glu Thr Val Trp Arg Leu Glu Glu Phe
        35                  40                  45

GGA CGA TTT GCC AGC TTT GAG GCT CAA GGT GCA TTG GCC AAC ATA GCT       192
Gly Arg Phe Ala Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala
    50                  55                  60

GTG GAC AAA GCC AAC CTG GAA ATC ATG ACA AAG CGC TCC AAC TAT ACT       240
Val Asp Lys Ala Asn Leu Glu Ile Met Thr Lys Arg Ser Asn Tyr Thr
65                  70                  75                  80

CCG ATC ACC AAT GTA CCT CCA GAG GTA ACT GTG CTC ACG AAC AGC CCT       288
Pro Ile Thr Asn Val Pro Pro Glu Val Thr Val Leu Thr Asn Ser Pro
                85                  90                  95

GTG GAA CTG AGA GAG CCC AAC GTC CTC ATC TGT TTC ATC GAC AAG TTC       336
Val Glu Leu Arg Glu Pro Asn Val Leu Ile Cys Phe Ile Asp Lys Phe
            100                 105                 110

ACC CCA CCA GTG GTC AAT GTC ACG TGG CTT CGA AAT GGA AAA CCT GTC       384
Thr Pro Pro Val Val Asn Val Thr Trp Leu Arg Asn Gly Lys Pro Val
        115                 120                 125

ACC ACA GGA GTG TCA GAG ACA GTC TTC CTG CCC AGG GAA GAC CAC CTT       432
Thr Thr Gly Val Ser Glu Thr Val Phe Leu Pro Arg Glu Asp His Leu
    130                 135                 140

TTC CGC AAG TTC CAC TAT CTC CCC TTC CTG CCC TCA ACT GAG GAC GTT       480
Phe Arg Lys Phe His Tyr Leu Pro Phe Leu Pro Ser Thr Glu Asp Val
145                 150                 155                 160

TAC GAC TGC AGG GTG GAG CAC TGG GGC TTG GAT GAG CCT CTT CTC AAG       528
Tyr Asp Cys Arg Val Glu His Trp Gly Leu Asp Glu Pro Leu Leu Lys
                165                 170                 175

CAC TGG GAG TTT GAT GCT CCA AGC CCT CTC CCA GAG ACT ACA GAG AAC       576
His Trp Glu Phe Asp Ala Pro Ser Pro Leu Pro Glu Thr Thr Glu Asn
            180                 185                 190

GTG GTG TGT GCC CTG GGC CTG ACT GTG GGT CTG GTG GGC ATC ATT ATT       624
Val Val Cys Ala Leu Gly Leu Thr Val Gly Leu Val Gly Ile Ile Ile
        195                 200                 205

GGG ACC ATC TTC ATC ATC AAG GGA GTG CGC AAA AGC AAT GCA GCA GAA       672
Gly Thr Ile Phe Ile Ile Lys Gly Val Arg Lys Ser Asn Ala Ala Glu
    210                 215                 220

CGC AGG GGG CCT CTG TAA                                              690
Arg Arg Gly Pro Leu
225                 230
```

<403> (2) 서열 번호 12 에 대한 정보 :

<404> (i) 서열 특성 :

<405> (A) 길이 : 229 아미노산

<406> (B) 서열형 : 아미노산

<407> (D) 형태 : 직쇄상

<408> (ii) 분자 유형 : 단백질

<409> (xi) 서열 번호 12 의 서열 :

```
Ile Lys Glu Glu His Val Ile Ile Gln Ala Glu Phe Tyr Leu Asn Pro
 1               5                  10                  15

Asp Gln Ser Gly Glu Phe Met Phe Asp Phe Asp Gly Asp Glu Ile Phe
            20                  25                  30

His Val Asp Met Ala Lys Lys Glu Thr Val Trp Arg Leu Glu Glu Phe
        35                  40                  45

Gly Arg Phe Ala Ser Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Ala Asn Ile Ala
    50                  55                  60

Val Asp Lys Ala Asn Leu Glu Ile Met Thr Lys Arg Ser Asn Tyr Thr
65                  70                  75                  80

Pro Ile Thr Asn Val Pro Pro Glu Val Thr Val Leu Thr Asn Ser Pro
                85                  90                  95

Val Glu Leu Arg Glu Pro Asn Val Leu Ile Cys Phe Ile Asp Lys Phe
            100                 105                 110

Thr Pro Pro Val Val Asn Val Thr Trp Leu Arg Asn Gly Lys Pro Val
        115                 120                 125

Thr Thr Gly Val Ser Glu Thr Val Phe Leu Pro Arg Glu Asp His Leu
    130                 135                 140

Phe Arg Lys Phe His Tyr Leu Pro Phe Leu Pro Ser Thr Glu Asp Val
145                 150                 155                 160

Tyr Asp Cys Arg Val Glu His Trp Gly Leu Asp Glu Pro Leu Leu Lys
                165                 170                 175

His Trp Glu Phe Asp Ala Pro Ser Pro Leu Pro Glu Thr Thr Glu Asn
            180                 185                 190

Val Val Cys Ala Leu Gly Leu Thr Val Gly Leu Val Gly Ile Ile Ile
        195                 200                 205

Gly Thr Ile Phe Ile Ile Lys Gly Val Arg Lys Ser Asn Ala Ala Glu
    210                 215                 220

Arg Arg Gly Pro Leu
225
```

<411> (2) 서열 번호 13 에 대한 정보 :

<412> (i) 서열 특성 :

<413> (A) 길이 : 714 염기쌍

<414> (B) 서열형 : 핵산

<415> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<416> (D) 형태 : 직쇄상

<417> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)

<418> (ix) 특징 :

<419> (A) 명칭/키 : CDS

<420> (B)위치 : 1..714

<421> (ix) 특징 :

<422> (A) 명칭/키 : misc_feature

<423> (B) 위치 : 595..714

<424> (D) 기타 정보 : /주 = "HLA DR2-Dw2 베타쇄내의 경막 영역 암호"

<425> (xi) 서열 번호 13 의 서열 :

```
GGG GAC ACC CGA CCA CGT TTC TTG CAG CAG GAT AAG TAT GAG TGT CAT          48
Gly Asp Thr Arg Pro Arg Phe Leu Gln Gln Asp Lys Tyr Glu Cys His
  1               5                  10                  15

TTC TTC AAC GGG ACG GAG CGC GTG CGG TTC CTG CAC AGA GAC ATC TAT          96
Phe Phe Asn Gly Thr Glu Arg Val Arg Phe Leu His Arg Asp Ile Tyr
            20                  25                  30

AAC CAA GAG GAG GAC TTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TAC CGG         144
Asn Gln Glu Glu Asp Leu Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
        35                  40                  45

GCG GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAC GCT GAG TAC TGG AAC AGC CAG         192
Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln
    50                  55                  60

AAG GAC TTC CTG GAA GAC AGG CGC GCC GCG GTG GAC ACC TAC TGC AGA         240
Lys Asp Phe Leu Glu Asp Arg Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg
65                  70                  75                  80

CAC AAC TAC GGG GTT GGT GAG AGC TTC ACA GTC CAG CGG CGA GTT GAG         288
His Asn Tyr Gly Val Gly Glu Ser Phe Thr Val Gln Arg Arg Val Glu
                85                  90                  95

CCT AAG GTG ACT GTG TAT CCT GCA AGG ACC CAG ACC CTG CAG CAC CAC         336
Pro Lys Val Thr Val Tyr Pro Ala Arg Thr Gln Thr Leu Gln His His
            100                 105                 110

AAC CTC CTG GTC TGC TCT GTG AGT GGT TTC TAT CCA GCC AGC ATT GAA         384
Asn Leu Leu Val Cys Ser Val Ser Gly Phe Tyr Pro Ala Ser Ile Glu
        115                 120                 125

GTC AGG TGG TTC CGG AAC AGC CAG GAA GAG AAG GCT GGG GTG GTG TCC         432
Val Arg Trp Phe Arg Asn Ser Gln Glu Glu Lys Ala Gly Val Val Ser
    130                 135                 140

ACA GGC CTG ATT CAG AAT GGA GAC TGG ACC TTC CAG ACC CTG GTG ATG         480
Thr Gly Leu Ile Gln Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Thr Leu Val Met
145                 150                 155                 160

CTG GAA ACA GTT CCT CGA AGT GGA GAG GTT TAC ACC TGC CAA GTG GAG         528
Leu Glu Thr Val Pro Arg Ser Gly Glu Val Tyr Thr Cys Gln Val Glu
                165                 170                 175

CAC CCA AGC GTG ACG AGC CCT CTC ACA GTC GAA TGG AGA GCA CAG TCT         576
His Pro Ser Val Thr Ser Pro Leu Thr Val Glu Trp Arg Ala Gln Ser
            180                 185                 190

GAA TCT GCA CAG AGC AAG ATG CTG AGT GGA GTC GGC GGC TTT GTG CTG         624
Glu Ser Ala Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Val Gly Gly Phe Val Leu
        195                 200                 205

GGC CTG CTC TTC CTT GGG GCC GGG CTA TTC ATC TAC TTC AAG AAT CAG         672
Gly Leu Leu Phe Leu Gly Ala Gly Leu Phe Ile Tyr Phe Lys Asn Gln
    210                 215                 220

AAA GGG CAC TCT GGA CTT CAC CCA ACA GGA CTC GTG AGC TGA                 714
Lys Gly His Ser Gly Leu His Pro Thr Gly Leu Val Ser
225                 230                 235
```

<428> (2) 서열 번호 14 에 대한 정보 :

<429> (i) 서열 특성 :

<430> (A) 길이 : 237 아미노산

<431> (B) 서열형 : 아미노산

<432> (D) 형태 : 직쇄상

<433> (ii) 분자 유형 : 단백질

<434> (xi) 서열 번호 14 의 서열 :

```
Gly Asp Thr Arg Pro Arg Phe Leu Gln Gln Asp Lys Tyr Glu Cys His
 1               5                  10                  15

Phe Phe Asn Gly Thr Glu Arg Val Arg Phe Leu His Arg Asp Ile Tyr
            20                  25                  30

Asn Gln Glu Glu Asp Leu Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
        35                  40                  45

Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln
    50                  55                  60

Lys Asp Phe Leu Glu Asp Arg Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg
65                  70                  75                  80

His Asn Tyr Gly Val Gly Glu Ser Phe Thr Val Gln Arg Arg Val Glu
                85                  90                  95

Pro Lys Val Thr Val Tyr Pro Ala Arg Thr Gln Thr Leu Gln His His
            100                 105                 110

Asn Leu Leu Val Cys Ser Val Ser Gly Phe Tyr Pro Ala Ser Ile Glu
        115                 120                 125

Val Arg Trp Phe Arg Asn Ser Gln Glu Glu Lys Ala Gly Val Val Ser
    130                 135                 140

Thr Gly Leu Ile Gln Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Thr Leu Val Met
145                 150                 155                 160

Leu Glu Thr Val Pro Arg Ser Gly Glu Val Tyr Thr Cys Gln Val Glu
                165                 170                 175

His Pro Ser Val Thr Ser Pro Leu Thr Val Glu Trp Arg Ala Gln Ser
            180                 185                 190

Glu Ser Ala Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Val Gly Gly Phe Val Leu
        195                 200                 205

Gly Leu Leu Phe Leu Gly Ala Gly Leu Phe Ile Tyr Phe Lys Asn Gln
    210                 215                 220

Lys Gly His Ser Gly Leu His Pro Thr Gly Leu Val Ser
225                 230                 235
```

<436> (2) 서열 번호 15 에 대한 정보 :

<437> (i) 서열 특성 :

<438> (A) 길이 : 10 염기쌍

<439> (B) 서열형 : 핵산

<440> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<441> (D) 형태 : 직쇄상

<442> (ii) 분자 유형 : DNA (게놈)

<443> (xi) 서열 번호 15 의 서열 :

CGGAATTCCG 10

<445> (2) 서열 번호 16 에 대한 정보 :

<446> (i) 서열 특성 :

<447> (A) 길이 : 58 염기쌍

<448> (B) 서열형 : 핵산

<449> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<450> (D) 형태 : 직쇄상

<451> (ii) 분자 유형 : DNA

<452> (xi) 서열 번호 16 의 서열 :

TCAGGATCCG ATCGTGGAGG ATGATTAAAT GCAAATTTTT GTCAAGACTT TGACTGGT 58

<454> (2) 서열 번호 17 에 대한 정보 :

<455> (i) 서열 특성 :

<456> (A) 길이 : 39 염기쌍

<457> (B) 서열형 : 핵산

<458> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<459> (D) 형태 : 직쇄상

<460> (ii) 분자 유형 : DNA

<461> (xi) 서열 번호 17 의 서열 :

TGAATTCCCG CGGAGTCTCA AGACTAAGTG CAAAGTGGA 39

<463> (2) 서열 번호 18 에 대한 정보 :

<464> (i) 서열 특성 :

<465> (A) 길이 : 36 염기쌍

<466> (B) 서열형 : 핵산

<467> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<468> (D) 형태 : 직쇄상

<469> (ii) 분자 유형 : DNA

<470> (xi) 서열 번호 18 의 서열 :

ATCCGCGGGG GCATCAAAGA AGAACATGTG ATCATC 36

<472> (2) 서열 번호 19 에 대한 정보 :

<473> (i) 서열 특성 :

<474> (A) 길이 : 29 염기쌍

<475> (B) 서열형 : 핵산

<476> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<477> (D) 형태 : 직쇄상

<478> (ii) 분자 유형 : DNA

<479> (xi) 서열 번호 19 의 서열 :

GTCGAATTCT TACAGAGGCC CCCTGCGTT 29

<481> (2) 서열 번호 20 에 대한 정보 :

<482> (i) 서열 특성 :

<483> (A) 길이 : 33 염기쌍

<484> (B) 서열형 : 핵산

<485> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<486> (D) 형태 : 직쇄상

<487> (ii) 분자 유형 : DNA

<488> (xi) 서열 번호 20 의 서열 :

GTCGAATTCT CAGTTCTCTG TAGTCTCTGG GAG 33

<490> (2) 서열 번호 21 에 대한 정보 :

<491> (i) 서열 특성 :

<492> (A) 길이 : 33 염기쌍

<493> (B) 서열형 : 핵산

<494> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<495> (D) 형태 : 직쇄상

<496> (ii) 분자 유형 : DNA

<497> (xi) 서열 번호 21 의 서열

ATCGAATTCT TAAGCATCAA ACTCCCAGTG CTT 33

<499> (2) 서열 번호 22 에 대한 정보 :

<500> (i) 서열 특성 :

<501> (A) 길이 : 53 염기쌍

<502> (B) 서열형 : 핵산

<503> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<504> (D) 형태 : 직쇄상

<505> (ii) 분자 유형 : DNA

<506> (xi) 서열 번호 22 의 서열 :

CGGGATCCGA TCGTGGAGGA TGATTAAATG ATCAAAGAAG AACATGTGAT CAT 53

<508> (2) 서열 번호 23 에 대한 정보 :

<509> (i) 서열 특성 :

<510> (A) 길이 : 33 염기쌍

<511> (B) 서열형 : 핵산

<512> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<513> (D) 형태 : 직쇄상

<514> (ii) 분자 유형 : DNA

<515> (xi) 서열 번호 23 의 서열 :

ATCGAATTCT TAAGCATCAA ACTCCCAGTG CTT 33

<517> (2) 서열 번호 24 에 대한 정보 :

<518> (i) 서열 특성 :

<519> (A) 길이 : 26 염기쌍

<520> (B) 서열형 : 핵산

<521> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<522> (D) 형태 : 직쇄상

<523> (ii) 분자 유형 : DNA

<524> (xi) 서열 번호 24 의 서열 :

ATCTCGAGTT TGACAGCTTA TCATCG 26

<526> (2) 서열 번호 25 에 대한 정보 :

<527> (i) 서열 특성 :

<528> (A) 길이 : 23 염기쌍

<529> (B) 서열형 : 핵산

<530> (C) 쇄의 수 : 1본쇄

<531> (D) 형태 : 직쇄상

<532> (ii) 분자 유형 : DNA

<533> (xi) 서열 번호 25 의 서열 :

ATCTCGAGTC AGGTCGAGGT GGC 23

(57) 청구의 범위

청구항 1

사람의 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 잔기 84-102, 사람의 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 잔기 124-143, 사람의 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 잔기 148-162 또는 사람의 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 잔기 (83-102)Y^{83}에 결합하고, 변형된 글리코실화를 가진 재조합 MHC II군 폴리펩티드를 함유하는 자가면역 질환 치료용 또는 예방용의 T 세포 기능 조절 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 MHC 폴러펩티드에 경막 도메인이 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

a) 폴리펩티드가 발현되는 조건하에서 MHC II군 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 함유한 발현 벡터를 함유하는 대장균(E. coli) 세포를 배지에서 증식시키는 단계; 및

b) MHC II군 폴리펩티드를 단리하는 단계를 포함하여, MHC II군 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 4

대장균(E. coli) 프로모터 서열에 작동가능하게 결합되어 있는 MHC II군 플리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 함유한 대장균(E. coli) 발현벡터.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 뉴클레오티드 서열이 절단형 MHC II군 폴리펩티드를 암호하는 것임을 특징으로 하는 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 MHC II군 폴리펩티드는 경막 도메인에 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 7

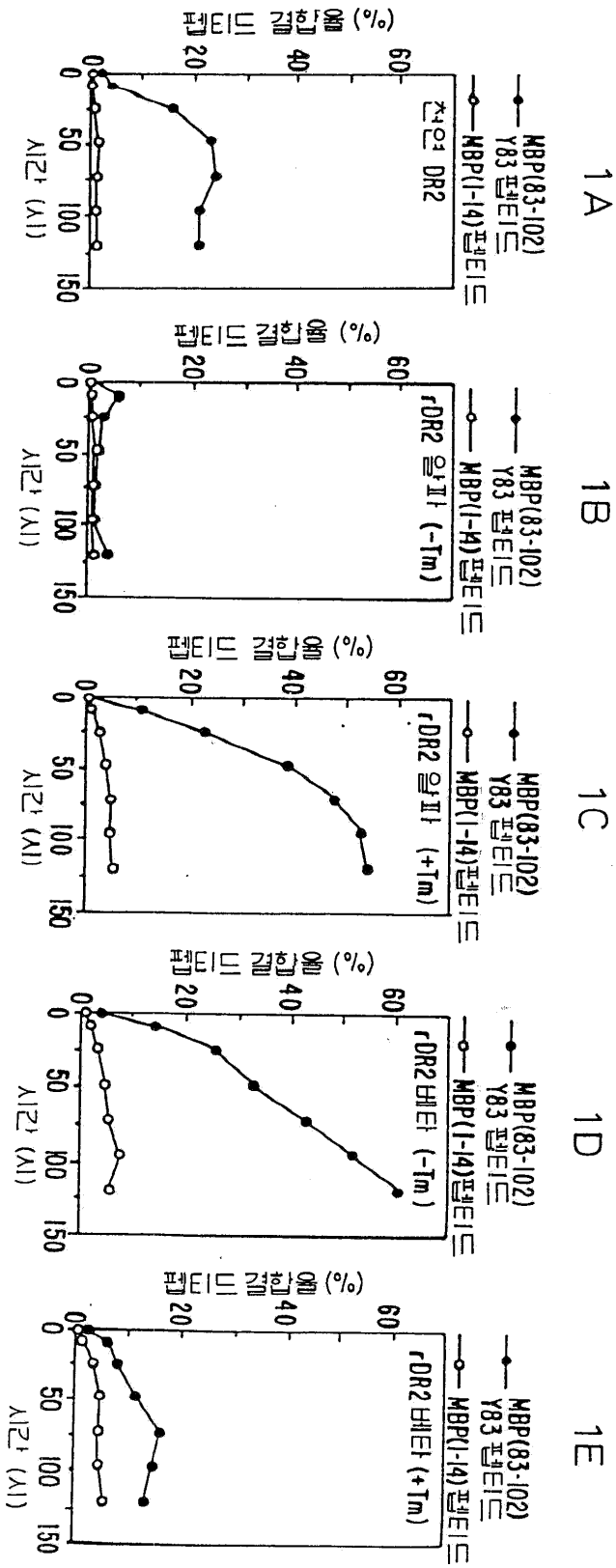
사람의 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 잔기 84-102, 사람의 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 잔기 124-143, 사람의 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 잔기 148-162 또는 사람의 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 잔기(83-102)Y^{83} ; 및 제1항의 단리된 재조합 MHC II군 폴리펩티드로 실질적으로 구성된 MHC-펩티드 복합체.

요약

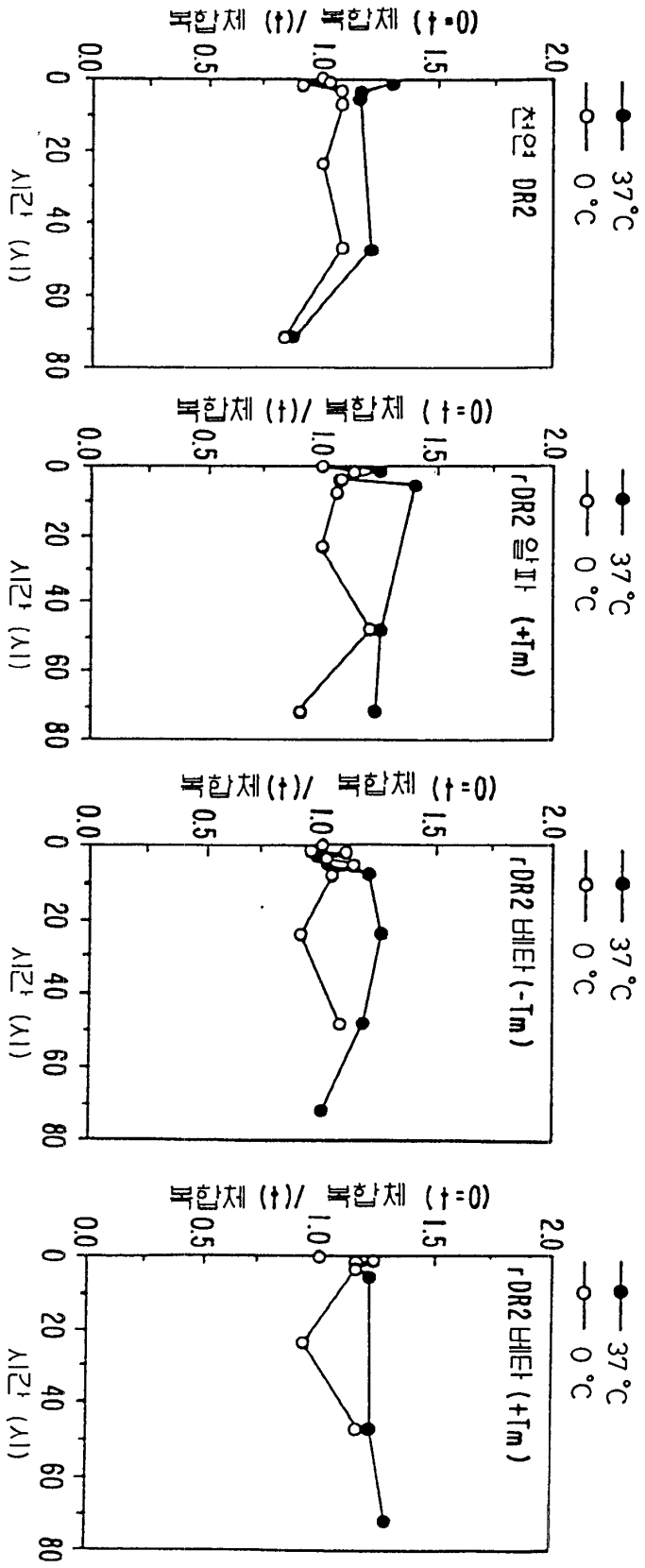
본 발명은 원핵세포에서 발현되는 비글리코실화된 MHC 폴리펩티드, 이들 폴리펩티드의 제조 방법 및 본질적으로 MHC 성분 단리체와 이 MHC 성분의 항원 결합 부위와 결합하는 항원성 펩티드로 구성된 복합체에 관한 것이다. 이들 복합체는 자가면역과 같은 유해 면역 반응을 치료하는데 유용하다.

도면

도면1

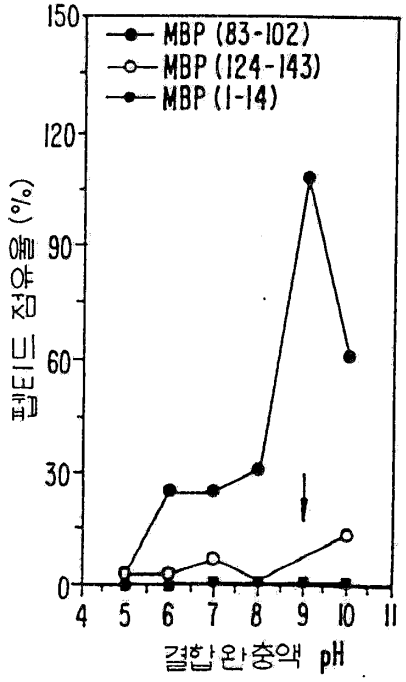

1A
펩티드 결합율 (%)
시간 (시)
MBP(83-102) Y83 펩티드
MBP(1-14)펩티드
천연 DR2
1B
rDR2 알파 (-Tm)
1C
rDR2 알파 (+Tm)
1D
rDR2 베타 (-Tm)
1E
rDR2 베타 (+Tm)

도면2

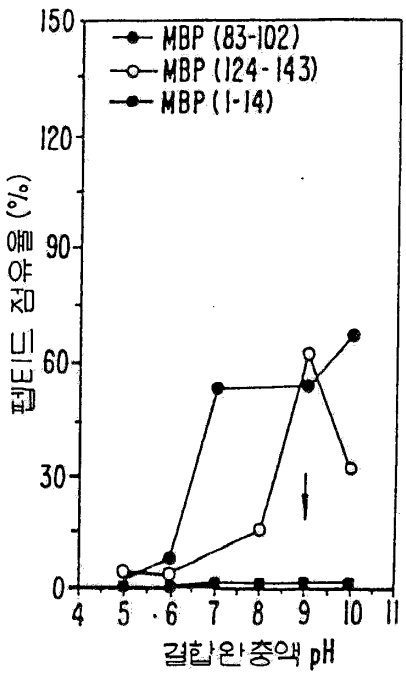

천연 DR2
rDR2 알파 (+Tm)
rDR2 베타 (-Tm)
rDR2 베타 (+Tm)
복합체 (t)/ 복합체 (t=0)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
20
40
60
80
시간 (시)
37°C
0°C

도면3

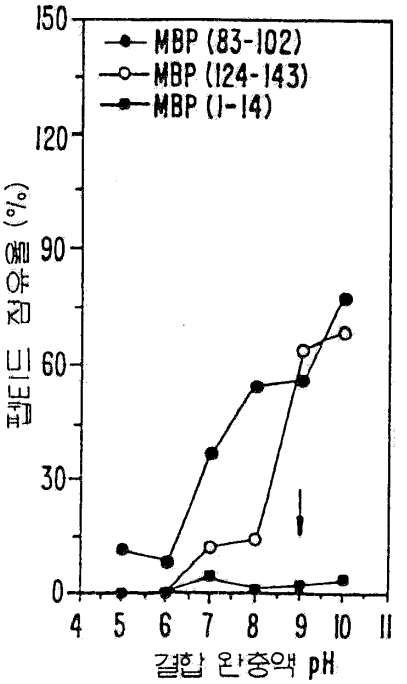
3A



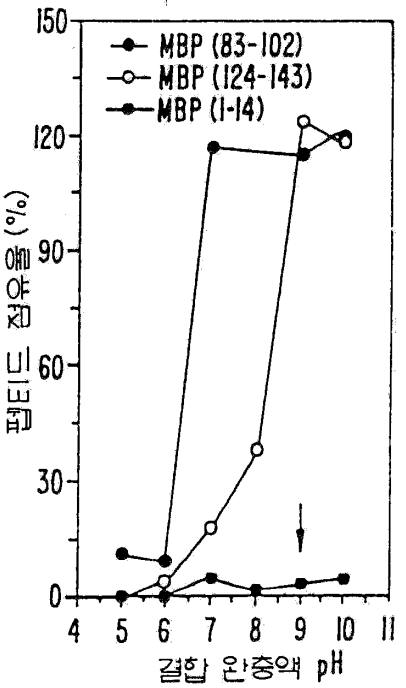
3B



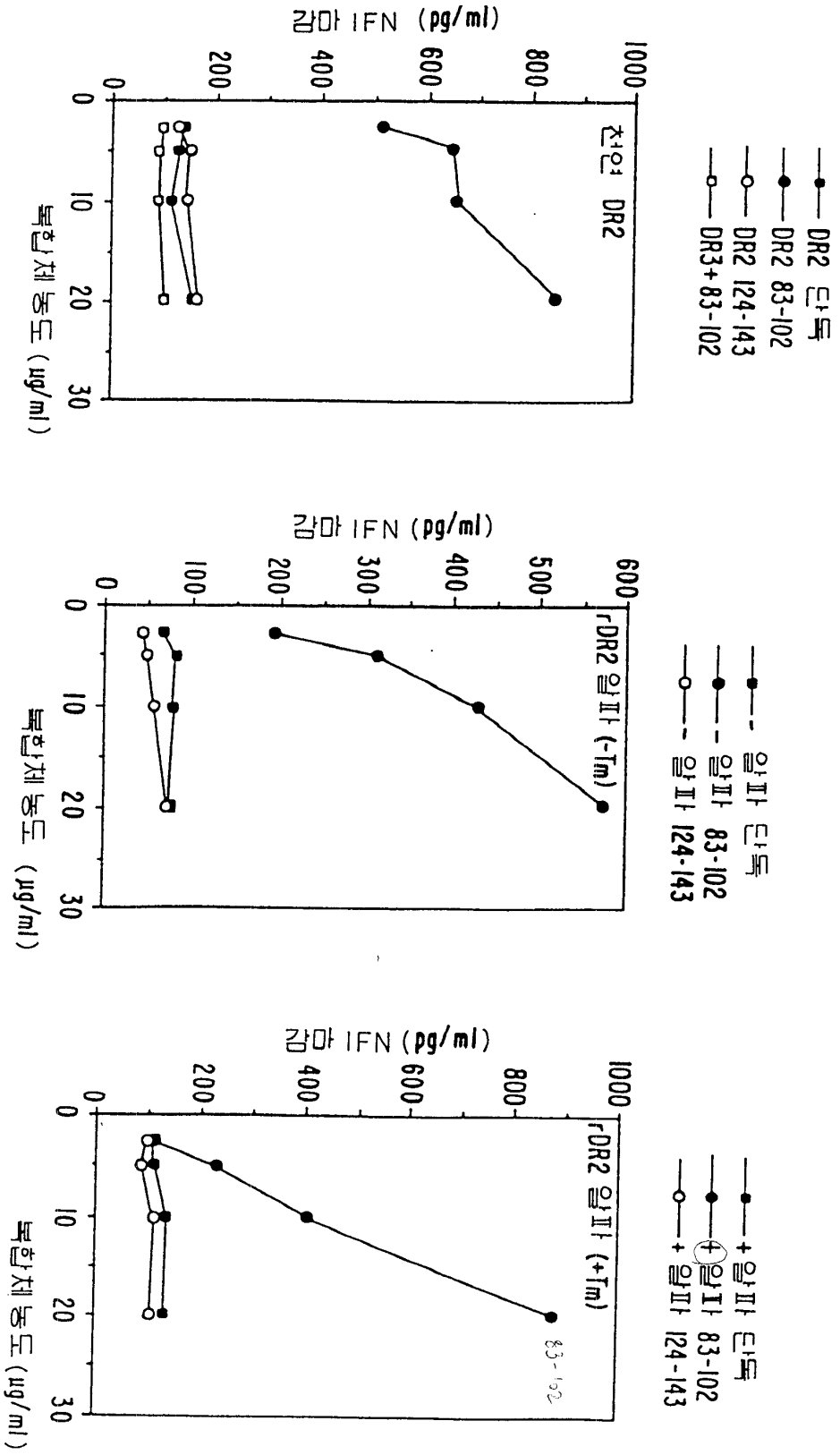
3C



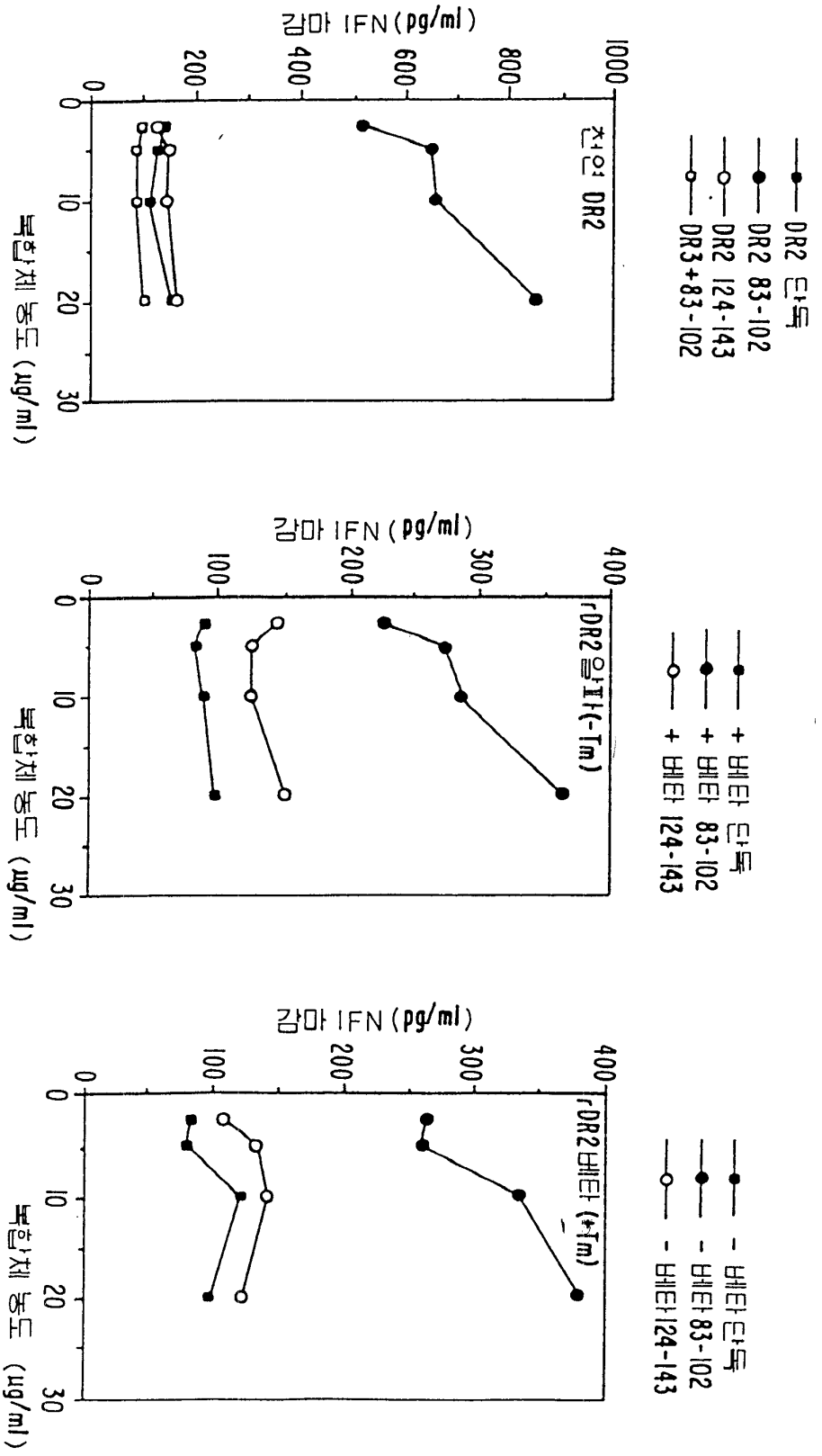
3D



도면4


감마 IFN (pg/ml)
천연 DR2
재조합체 농도 (μg/ml)
DR2 단독
DR2 83-102
DR2 124-143
DR3+ 83-102
rDR2 알파 (-Im)
알파 단독
알파 83-102
알파 124-143
rDR2 알파 (+Im)
+ 알파 단독
+ 알파 83-102
+ 알파 124-143

도면5


감마 IFN (pg/ml)
천연 DR2
DR2 단독
DR2 83-102
DR2 124-143
DR3+83-102
복합체 농도 (μg/ml)
감마 IFN (pg/ml)
rDR2알파(-Tm)
+ 베타 단독
+ 베타 83-102
+ 베타 124-143
복합체 농도 (μg/ml)
감마 IFN (pg/ml)
rDR2베타 (+Tm)
- 베타 단독
- 베타 83-102
- 베타 124-143
복합체 농도 (μg/ml)

도면6

