

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.⁷
C07K 14/47
A61K 38/08

(45) 공고일자 2005년05월24일
(11) 등록번호 10-0491365
(24) 등록일자 2005년05월17일

(21) 출원번호 10-2004-0101627(분할)
(22) 출원일자 2004년12월06일
(62) 원출원 특허10-1996-0042260
원출원일자 : 1996년09월25일
(65) 공개번호
(43) 공개일자
심사청구일자 2001년08월07일

(30) 우선권주장 JP-P-1995-00270725 1995년09월26일 일본(JP)
JP-P-1996-00067434 1996년02월29일 일본(JP)
JP-P-1996-00269105 1996년09월20일 일본(JP)

(73) 특허권자 가부시끼가이샤 하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸조
일본국 오카야마켄 오카야마시 시모이시 1쵸메 2-3

(72) 발명자 아키타젠지
일본국 오카야마켄 오카야마시 구와노 525-3
누카다요시유키
일본국 오카야마켄 오카야마시 오쿠다 1-7-10-106
후지이미쓰기요
일본국 오카야마켄 오카야마시 오노우에 1636
다니모토다다오
일본국 오카야마켄 오카야마시 야마자키 312-88
구리모토마사시
일본국 오카야마켄 오카야마시 가쿠난쵸 2-7-25

(74) 대리인 김기종
권동용
최재철

심사관 : 박정웅

(54) 면역담당 세포에 의한 인터페론- γ 의 생산을 유도하는단백질

요약

면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하고 N 말단 또는 그 부근에서 서열번호 (SEQ ID NO :) 1 및 6의 아미노산 서열을 가진 인간세포 기원의 단백질을 제공한다.

이 단백질은 임파아구, 임파구, 단아구, 단핵 세포, 골수아구, 골수구, 과립구 및 대식세포 등의 인간 세포로 부터 제조할 수 있으며 IFN- γ 감수성 질환의 예방 및/또는 치료에 사용할 수 있다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 단백질의 펩티드 맵 (peptide map)을 나타낸 도면.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 면역담당 세포(immunocompetent cell)에 의한 인터페론- γ (이하, "IFN- γ " 라 약칭함)의 생산을 유도하는 신규의 단백질에 관한 것이다.

IFN- γ 는 항바이러스 작용, 항종양 작용 및 면역조절 작용을 가진 단백질인데, 항원 또는 유사분열 물질(mitogen)에 의해 자극을 받는 면역담당 세포에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. 이들 생물 활성으로 인해 IFN- γ 는 그 발견 이후부터 항종양제로서의 용도가 기대되어 왔고, 뇌종양을 비롯한 일반적인 악성 종양의 치료제로서의 임상시험에 대해 정력적으로 연구가 진행 되고 있다. 현재 시판되고 있는 IFN- γ 제제는 면역담당 세포에 의해 생산되는 천연형 IFN- γ 그룹과 천연형 IFN- γ 를 코우드하는 DNA 를 에세리히아 콜리중의 미생물에 도입하여 제조되는 형질 전환체에 의해 생산되는 재조합형 IFN- γ 그룹의 두가지로 대별된다. 위의 임상시험에 있어서 이들 두가지 그룹의 IFN- γ 중의 어느 하나를 "외래 IFN- γ " 로 하여 환자에게 투여하고 있다.

이들 IFN- γ 중에서 천연형 IFN- γ 는 통상적으로 주화(株化)된 면역담당세포계를 IFN- γ 유도제가 첨가된 영양 배지중에서 배양하여 IFN- γ 를 생성시키고, 생성된 IFN- γ 를 수득한 배양물로 부터 정제하여 제조되고 있다. IFN- γ 유도제가 IFN- γ 수율, IFN- γ 정제의 용이성 및 최종 IFN- γ 제제의 안전성 등에 크게 영향을 미치고 있다는 것은 잘 알려져 있다. 일반적으로, 콘카나발린 A(Con A), 렌즈콩 렉틴 (lentil lectin), 자리콩 렉틴, 엔도톡신 및 리포다당 등의 유사분열 물질을 IFN- γ 유도제로 사용할 수 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

그러나, 이들 유사분열 물질은 (가) 그 기원과 정제방법에 따라 그 분자량과 품질이 다양하게 달라지고, (나) 일정한 IFN- γ 유도능을 가진 제제를 만족한 수율로 제조 하기가 어렵다는 문제점이 있다. 더욱이, 이들 유사분열 물질의 대부분은 생체에 투여할 경우 바람직하지 못한 부작용을 유발하고 이들중 어떤 것들은 독성을 나타내는 것도 있으므로 이러한 IFN- γ 를 생체에 직접 투여하여 IFN- γ 생산을 유도하는 것이 실질적으로 곤란하다.

발명의 구성 및 작용

본 발명자들은 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 신규의 단백질에 근거하여 된 것이다. 본 발명자들은 포유 동물 세포에 의해 생성되는 사이토카인류에 대한 연구도중 코리네박테리움(Corynebacterium)의 사균체(死菌體)와 리포다당으로 처리된 마우스의 간에서 IFN- γ 생산을 유도하는 물질이 존재함을 발견하였다. 본 발명자들은 칼럼 크로마토그래피를 중심으로 한 각종 정제 방법을 이용함으로써 이 물질을 분리하여 그 특성과 성상에 대해 연구를 한 결과, 그 실체는 아래의 물리화학적 성질을 가진 단백질이라는 것을 판명하였다.

(1) 분자량

소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법(SDS-PAGE)에 의해 $19,000 \pm 5,000$ 달톤.

(2) 등전점 (pI)

크로마토포커싱(chromatofocusing)에 의해 $pI 4.8 \pm 1.0$ 을 나타냄.

(3) 부분 아미노산 서열

서열번호 8 (SEQ ID NO : 8) 및 서열번호 9 (SEQ ID NO : 9)의 부분 아미노산 서열을 가짐.

(4) 생물작용

면역담당 세포에 의해 IFN- γ 생산을 유도함.

이들 물리화학적 성질을 가진 단백질은 아직까지 알려진바 없으므로 데이터로부터 이 물질은 신규물질이라는 결론을 내릴 수 있다. 본 발명자들은 마우스 간세포에 대해 연구를 계속한 결과, 이 단백질을 코우드하는 DNA 를 분리하는데 성공하였다. 본 발명자들은 이 DNA 를 해독한 결과, 이 DNA 는 471 염기 쌍으로 되어 있고 서열번호 10 (SEQ ID NO : 10) ("서열번호"를 이후부터는 "SEQ ID NO : " 라 함)의 아미노산 서열을 코우드하는 것임을 확인하였다 (여기서 부호 "Xaa"는 "메티오닌" 또는 "트레오닌" 임).

이 발견에 근거하여 본 발명자들은 인간의 간세포에 대해 더욱 연구를 계속하여 면역담당 세포에 의해 IFN- γ 생산을 유도하는 또 다른 신규의 물질을 코우드하는 DNA 를 얻었다. 본 발명자들은 그 실체가 폴리펩티드인 것을 판명하였고, 또한 DNA 를 해독한 결과 SEQ ID NO : 6 의 아미노산 서열 (여기서 부호 "Xaa" 는 "이소로이신" 또는 "트레오닌" 임)을 가지고 있음이 판명되었다.

본 발명자들은 DNA 를 에체리히아 콜리에 도입하여 폴리펩티드를 발현시켜 배지에서 고수율로 생성시켰다.

이들 사실은 본 출원인의 일본국 특허공개 제 27,189/96 호 공보 및 제 193,098/96 호 공보에 개시되어 있다. 본 출원인의 일본국 특허출원 제 78,357/95 호에는 감수성 질환체로서의 폴리펩티드가 개시되어 있다. 기타 의약과 혼합하여 인간에게 투여되는 생물학적 활성을 가진 단백질이 일반적으로 인간 세포 기원의 것이어야 하더라도 이러한 폴리펩티드를 생산하는 인간 세포에 대해서는 전혀 보고된 바 없다.

위와 같은 사정을 고려하여 본 발명의 목적은 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 인간 세포 기원의 단백질을 제공함에 있다.

본 발명의 다른 목적은 이 단백질의 제조방법을 제공함에 있다.

본 발명의 추가적인 목적은 이러한 단백질의 감수성 질환용 의약으로서의 용도를 제공함에 있다.

본 발명의 제 1 목적은 SEQ ID NO : 1 의 아미노산 서열을 가지며 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 인간 세포 기원의 단백질에 의해 달성된다.

본 발명의 제 2 목적은 단백질을 생산할 수 있는 인간 세포를 증식시키고, 증식된 세포로부터 단백질을 채취하여서 되는 단백질의 제조방법에 의해 달성된다.

본 발명의 제 3 목적은 상기 단백질을 유효성분으로 함유하는 감수성 질환용 의약에 의해 달성된다.

본 발명에 의한 단백질은 면역담당 세포에 단독 또는 적당한 보인자(cofactor)와 더불어 작용시키면 IFN- γ 생산을 유도한다.

이 단백질은 인간으로 부터 유래하는데, 인간 세포를 이용하는 본 발명의 제조방법에 의해 용이하게 제조할 수 있다.

본 발명에 의한 감수성 질환용 의약은 인간에게 투여할 경우 인체중의 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하여 IFN- γ 감수성 질환의 치료와 예방에 적극적인 효과를 발휘한다. 이 단백질이 킬러 세포의 세포 장해성을 증가시키거나 킬러 세포의 생성을 유도하게 되면 악성 종양을 비롯한 난치성 질환에 대해 적극적인 효과를 발휘한다. 이하, 본 발명에 의한 바람직한 실시 형태에 대하여 설명한다.

본 발명에서 말하는 "단백질" 이라 함은 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하고 SEQ ID NO : 1 의 아미노산 서열을 가진 일반적인 폴리펩티드 및 당단백질(glycoprotein)을 뜻한다. 인간 세포의 종류와 증식조건에 따라 이 단백질은 각각 N 말단 및 C 말단 부근에서 SEQ ID NO : 1 및 3 의 아미노산 서열을 가지며, 경우에 따라서는 내부단편으로서의 SEQ ID NO : 4 및 5 의 아미노산 서열을 포함하여 완전 아미노산 서열로서의 SEQ ID NO : 6 의 아미노산 서열 (부호 "Xaa" 는 "이소로이신" 또는 "트레오닌" 을 뜻함)을 가진다. 이 단백질은 환원제 존재하에 소듐 도데실 술페이트 폴리악릴아미드 겔 전기 영동법(SDS-PAGE)으로 측정할 경우 분자량 14,000 ~ 24,000달톤, 통상적으로 18,000 ~ 19,500 달톤에 상응한 위치에서 단백질 밴드로 검출된다. 인간 세포의 종류와 증식조건에 따라 위에 나온 SEQ ID NO : 1 및 3 의 N 말단 및/또는 C 말단에 하나 이상의 아미노산이 부가되거나 N 말단 및/또는 C 말단에서의 하나 이상의 아미노산이 결실될 수도 있다. 면역담당 세포에 단독 또는 적당한 보인자와 더불어 작용시킬 경우 IFN- γ 생산을 유도하고, 이들 아미노산 서열중 어느 하나를 가지며 인간 세포로부터 유래하는 것이면 어떠한 단백질이라도 본 발명에서 사용할 수 있다.

이들 단백질을 인간 세포를 사용하는 본 발명의 방법으로 제조할 수 있다. 통상적으로 본 발명에 사용되는 인간 세포로서는 임파아구, 임파 세포, 단아구, 단핵 세포, 골수아구, 골수구, 과립구 및 대식 세포 등의 조혈 세포 유래의 세포주를 들 수 있다. 이들 세포주의 예로서는 골수성 백혈병, 전골수 포성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병 및 모세포 백혈병 등의 백혈병과 임파종이 있는데, 특히 문헌 [Jun MINOWADA in "Cancer Review", Vol.10, pp. 1-18 (1988)] 에 보고된 U-937 세포(ATCC CRL1593), HBL-38 세포, HL-60 세포(ATCC CCL240), K-562 세포(ATCC CCL243), KG-1 세포(ATCC CCL246), Mo 세포(ATCC CRL8066) 및 THP-1 세포(ATCC TIB202)와 인간의 악하선(submaxillary gland)의 유포피암 A-253 세포(ATCC HTB41) 등을 들 수 있다. 이들 세포주의 돌연변이체도 본 발명에서 사용할 수 있다. 이들 세포주는 증식이 잘되어 본 발명의 단백질을 보다 많이 생성하므로 본 발명에서 유리하게 사용할 수 있다. 특히, A-253 세포 등의 유포피암 세포주와 HBL-38 세포, HL-60 세포, KG-1 세포, THP-1 세포 및 U-937 세포 등의 인간의 골수 단핵세포 세포주는 본 발명의 단백질의 생산성이 극히 높으므로 본 발명에서 유리하게 사용된다.

본 발명의 방법에 있어서 위에 나온 인간 세포를 먼저 증식시킨 다음, 증식된 세포로부터 본 발명의 단백질을 채취한다. 이들 인간 세포를 증식시키는 본 발명의 방법은 특히 한정되지 않으며 종래의 생체내 또는 생체외 증식방법을 사용할 수 있다. 생체의 증식방법이라 함은, 소태아 혈청을 0.3 ~ 30 w/v % 첨가한 RPMI 1640 배지, MEM 배지 및 DEM 배지 등의 종래 이 분야에서 동물세포 증식에 사용되는 배지중에 약 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 개/ml, 바람직하게는 약 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 개/ml 의 세포 밀도가 되도록, 인간 세포를 현탁하고, 이들 세포를 36 ~ 38°C 의 온도, 바람직하게는 약 37°C 의 온도 및 pH 7 ~ 8, 바람직하게는 pH 7.2 ~ 7.4에서 이들 배지를 새것으로 교체해 주면서 약 1 ~ 7 일 동안 배양하는 영양배지를 이용한 세포증식 방법을 뜻한다. 이어서 증식된 세포를 배양물로 부터 분리하여 목적의 단백질을 얻는다. 인간 세포의 종류와 배

양 조건에 따라 어떤 세포는 배양도중 본 발명의 단백질을 세포밖에서 분비한다. 인간 세포에 의한 본 발명의 단백질 생산을 유도하는 IFN- γ 및/또는 유사분열 물질 등의 유도제를 배지중에 공존시키면 단백질을 전부 또는 거의 대부분을 세포밖에서 생산할 수도 있다. 이 경우에 있어서, 이 단백질을 배양 상청액으로부터 채취한다.

인간을 제외한 온혈동물을 사용하는 인간 세포의 생체내 증식방법은 동물의 면역 반응을 억제하기 위해 토끼 유래의 항입과구 항체를 새로 태어난 마우스, 누우드 마우스, 래트, 누우드 래트, 기니아 피그 및 햄스터 등의 설치류에 주사하고, 인간 세포를 동물 한마리당 약 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 개의 복강내에 주사 또는 피하에 주사하거나 동물의 체내 또는 체외에 확산체임버를 매몰설치하여 이 체임버내에서 동물의 체액을 순환시키면서 이 체임버내에 인간 세포를 주입하여 약 2 ~ 10 주 동안 종래 방법으로 동물을 사육하는 것이다. 사육도중 동물의 체액을 받으면서 인간 세포를 증식시킨다. 증식된 인간 세포를 종양 덩어리, 복수(腹水) 또는 세포 현탁액 형태로 채취한다. 필요에 따라 적당한 용매중에서 이들 인간세포를 현탁시켜 세척한 후에 목적의 단백질을 채취한다. 생체내 증식방법은 생체의 증식방법에 비하여 본 발명의 단백질을 저렴한 인건비로 고수율로 얻는다는 점에서 장점을 가진다. 생체내 증식방법은, 예컨대 일본국 특허공고 제54,158/81 호 공보에 개시되어 있다.

증식된 세포로부터 본 발명의 단백질을 채취하자면 배양액으로부터 목적의 단백질을 분리하기 전 또는 분리후에 이들 세포를 조음과 파쇄하고 균질화하여 동결, 해동하거나, 이들 세포를 상당히 낮은 삼투압을 가진 용매중에 침지한 다음 세포 파쇄물로부터 또는 세포 파쇄물과 배양 상청액의 혼합물로부터 단백질을 채취한다. 세포 파쇄물 또는 혼합물로부터 단백질을 채취하자면 약 37°C에서 1 ~ 24 시간 배양한후 세포 파쇄물 또는 혼합물을 이 분야에서 생물활성 물질을 정제하는 종래의 방법, 예컨대 염석, 투석, 여과, 농축, 분별침강, 겔 여과 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 크로마토포커싱, 겔 전기영동 및/또는 등전점 전기영동등의 방법으로 처리한다. 이들 종래 방법중 두가지 이상을 선택하여 병용할 수 있다. 채취된 단백질을 농축 및/또는 동결건조하여 최종용도에 부합되는 액상 또는 고상으로 얻는다.

본 출원인의 일본국 특허출원 제 58,240/95 호에 개시된 모노클로날 항체를 사용하여 본 발명의 단백질을 정제할 수도 있다. 모노클로날 항체를 사용하는 면역 친화성 크로마토그래피에서는 본 발명의 단백질을 최고 가능한 순도로서 저렴하게 얻게 된다.

이상 설명한 바와 같이 본 발명의 단백질은 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 성질이 있으므로 세포 배양법에 의한 IFN- γ 생산의 유도제로 만족스럽게 사용할 수 있고, AIDS, 침균 콘딜롬 등의 바이러스성 질환 ; 악성신종양(nephroma), 육아종, 균상 식육증, 뇌종양 등의 악성종양 ; 및 관절 류마티즘, 알레르기증 등의 면역질환을 비롯한 IFN- γ 감수성 질환의 치료 및 예방에 사용할 수 있다.

통상, 면역담당 세포를 배양하거나 IFN- γ 감수성 질환 치료 및/또는 예방을 위해 인간에게 투여할 경우 IFN- γ 생산용 영양배지에 본 발명의 단백질을 첨가한다. 전자의 경우에는 포유동물 말초혈로부터 분리된 백혈구와 HBL-38세포, Mo 세포(ATCC CRL8066), Jurkat 세포(ATCC CRL8163), HuT78 세포(ATCC TIB161), EL4 세포(ATCC TIB39), L12-R4 세포 등의 면역담당 세포의 주화된 세포주 및 이들의 변이주를 본 발명의 단백질 약 0.1 ~ 1,000 ng/ml, 바람직하게는 약 1 ~ 100 ng/ml 를 함유하는 배지중에 현탁한다. 필요에 따라 유사분열 물질, 인터로이킨 2 및 앤티-CD3 항체 등의 T 세포 자극물이 첨가된 영양배지중에서 이들 세포를 약 1 ~ 100 시간 동안 종래 방법으로 배양하는데, 배양도중 이 배지를 새것으로 교체해 준다.

수득한 배양액으로부터 염석, 투석, 여과, 농축 분별침강, 겔 여과 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 크로마토포커싱, 겔 전기영동 및/또는 등전점 전기영동 등의 IFN- γ 정제에 사용되는 종래의 방법 한가지 이상에 의해 본 발명의 단백질을 채취한다.

본 발명의 단백질은 인간 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하므로 유효성분으로서 단백질을 함유한 감수성 질환용 의약은 인간에 투여될 경우 인간면역담당 세포를 자극하여 IFN- γ 를 생성하여 IFN- γ 감수성 질환의 치료 및/또는 예방에 현저한 효과를 발휘한다. 본 발명의 단백질이 후술하는 실험 및 실시예의 단백질과 마찬가지로 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하고, 세포 장해성 T 세포 등의 킬러 세포와, NK 세포 및 LAK 세포를 비롯한 림포카인 활성화 킬러세포의 세포 장해성을 촉진하며, 킬러세포의 생성을 유도할 때에는 킬러세포는 감수성 질환의 치료 및/또는 예방에 관여하게 된다. 본 발명에서 말하는 "감수성 질환" 이라 함은 IFN- γ 감수성 질환을 포함하여 IFN- γ 및/또는 킬러 세포가 직접 또는 간접으로 관여하여 치료 및/또는 예방할 수 있는 일반적인 질환을 의미한다. 예컨대 간염, 헤르페스증, 침균 콘딜롬 및 에이즈 등의 바이러스성 질환 ; 칸디다증, 말라리아증, 크립토콕스증 및 예르시니아증(Yersinia) 등의 감염성 질환 ; 악성 종양, 균상식육증, 만성 육아종 등의 고형 악성 종양 ; 성인 T 세포 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 악성 종양 등의 혈구계 악성 종양 ; 및 알레르기증, 류마티즘 등의 면역질환을 들 수 있다. 본 발명의 단백질을 인터로이킨 3 과 더불어 사용하면 백혈병, 골수종 및 악성 종양을 치료하기 위한 방사선 조사 및 화학 요법제 투여에 따른 백혈구 감소증과 혈소판 감소증의 완치 또는 경감에 강력한 효과를 발휘한다.

본 발명의 감수성 질환용 의약은 위에 나온 감수성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 항종양제, 항바이러스제, 항균제, 면역억제제, 혈소판 증가제 또는 백혈구 증가제등으로서 널리 사용할 수 있다.

감수성 질환용 의약의 제형과 치료될 감수성 질환의 종류에 따라 달라지지만 본 발명의 감수성 질환용 의약은 통상적으로 액상, 페이스트상 또는 고상으로 제조되는데, 이 단백질을 건조 고형물 기준(d.s.b.)으로 0.000001 ~ 100 w/w %, 바람직하게는 0.0001 ~ 0.1 w/w % 함유한다.

본 발명의 감수성 질환용 의약은 그대로 사용하거나 혹은 생리화적으로 허용되는 담체, 보조제, 부형제, 희석제 및/또는 안정제 등과 혼합하고, 필요에 따라서는 인터페론- α , 인터페론- β , 인터로이킨 2, 인터로이킨 3, 인터로이킨 12, TNF- α , TNF- β , 카르보콘(carboquone), 시클로포스파미드, 아클라루비신, 티오테파, 부솔판, 안시타빈, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 5-플루오로-1-(테트라히드로-2-푸릴)우라실, 메토티렉세이트, 악티노마이신 D, 크로노마이신 A₃, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 미토마이신 C, 빈크리스틴, 빈블라스틴, L-아스파라기나아제, 금콜로이드, 크레스틴, 피시바닐, 렌티날 및 마루야마 백신 등의 기타 생리활성 물질 1 종 이상과 혼합하여 조성물로 가공할 수 있다. 이들 조합중에서 본

발명의 단백질과 인터로이킨 2 로 된 것은 단백질이 면역담당 세포에 의해 IFN- γ 생산을 유도할 때 인터로이킨 2 가 단백질의 보인자(補因子)로서 작용하므로 특히 유용하다. 천연형 또는 재조합형 인간 인터로이킨 2 와 이 단백질을 병용함으로써 이 단백질이 실질적으로 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하지 않는 단백질을 소량만 사용해도 비교적 많은 양의 IFN- γ 생산을 유도한다.

이 단백질과 인터로이킨 12 를 병용하면 이 단백질 또는 인터로이킨 12 를 단독으로 사용하여 용이하게 달성할 수 없는 다량의 IFN- γ 생산을 유도할 수 있다.

본 발명의 단백질은 인체의 면역 글로블린 E 항체의 생산을 억제하는 인터로이킨 12 의 활성을 증가시키므로 과민성 천식, 과민성 기관지 천식, 고초열, 알레르기성 비염, 과민성 피부염, 혈관 부종 및 과민성 소화기계 장애 등의 면역질환용 의약으로서 유리하게 사용된다. 때로는 비교적 적은 양의 인터로이킨 12 라도 인간에 있어서 효과를 나타낸다. 이 경우에 있어서 인간에게 이 단백질을 투여하면 소량의 효과를 얻을 수 있다.

본 발명의 감수성 질환용 의약은 투여에 적합한 물리적으로 성형된 약제로서의 단위 투여형태의 것들을 포함하는데, 이 단백질을 1 회 투여량의 1/40 ~ 몇 배(4 배 까지)의 용량으로 함유한다. 이러한 약제의 예로서는 주사제, 액제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 설하제(舌下劑), 점안제, 점비제 및 좌제 등이 있다.

본 발명의 감수성 질환용 의약은 환자에게 경구적으로 또는 비경구적으로 투여할 수 있고, 아래에 나온 바와 같이 생체에서 항종양 세포를 활성화하는데 사용할 수 있다. 이 의약은 두가지 투여의 경우에서도 감수성 질환의 치료 및/또는 예방에 만족스러운 효과를 발휘한다. 감수성 질환의 종류와 투여전후의 증상에 따라 달라지겠으나 감수성 질환용 의약을 약 0.1 μg ~ 50 mg/회, 바람직하게는 약 1 μg /회 ~ 1 mg/회의 투여량으로 하여 1 일 1 ~ 4 회 또는 1 주 1 ~ 5 회, 1 일 ~ 1 년 동안 경구 투여하거나 피내, 피하, 근육내 및 정맥내에 비경구 투여한다.

본 발명의 감수성 질환용 의약은 인터로이킨 2 를 사용하는 소위 "항종양 R 면역요법"에도 사용할 수 있다. 일반적으로 항종양 면역요법은 (가) 악성종양 환자의 체내에 직접 인터로이킨 2 를 투여하는 방법과, (나) 인터로이킨 2 에 의해 생체 내에서 미리 활성화시킨 항종양 세포를 도입하는 방법, 즉 양자 면역요법 (adoptive immunotherapy)으로 크게 나누어진다. 이 단백질과 더불어 투여할 경우에는 이 단백질은 상기한 면역요법 효과를 유의하게 증가시킬 수 있다. (가)의 방법에서는 인터로이킨 2 의 투여와 동시에 또는 투여전에 이 단백질을 성인 1 인당 1 회에 약 0.1 μg ~ 1 mg 의 투여량으로 하여 1 회 ~ 10 회 환자에게 투여한다. 인터로이킨 2 의 투여량은 악성 종양의 종류, 환자의 증상, 본 발명의 단백질의 용량에 따라 달라지겠으나 일반적으로 성인 1 인당 약 10,000 ~ 1,000,000 단위/회로 한다. (나)의 방법에서는 악성 종양 환자로 부터 채취한 단핵 세포 또는 임파구를 인터로이킨 2 존재하에 배양하는데, 이들 혈구 1 $\times 10^6$ 개당 이 단백질을 약 0.1 ng ~ 1 μg 공급시켜준다. 일정 시간 동안 배양한 후 배양물로 부터 NK 세포 또는 LAK 세포를 회수하여 동일한 환자의 체내에 도입한다. 본 발명의 항종양 면역요법으로 치료할 수 있는 질환의 예로서는 백혈병, 악성 임파종 등의 혈구계 악성종양과 결장암, 직장암, 대장암, 위암, 갑상선암, 혀암, 방광암, 용모암, 간암, 전립선암, 자궁암, 후두암, 폐암, 유방암, 악성 흑색종, 카포시 육종, 뇌종양, 신경아세포종, 난소종양, 고환종양, 골육종, 췌장암, 신장암, 부신종, 혈관내피종 등의 고형악성종양을 들 수 있다.

아래의 실험에서 본 발명의 단백질을 설명한다.

실험 1 : 단백질 제조

새로 태어난 햄스터에 토끼 유래의 항홍선 항혈청을 주사하여 종래 방식으로 면역반응을 억제하고, 등부위 피하조직에 인간의 급성 단구성 백혈병 유래의 골수단구계 세포주인 THP-1 세포(ATCC TIB202)를 햄스터 1 마리당 약 5 $\times 10^5$ 개 이식한 후 종래방식으로 3 주 동안 사육하였다. 햄스터 1 마리당 피하조직에 생긴 종양 덩어리 약 15 g 썩을 적출하여 종래방식으로 생리 식염수에 분산한 후 인산 완충 식염수(이하, 간단히 "PBS" 라 함)로 세척하였다. 이렇게 하여 수득한 증식 세포를 10 mM 염화 칼륨, 1.5 mM 염화 마그네슘 및 0.1 mM 디소듐 에틸렌디아민테트라아세트산을 함유한 차가운 20 mM HEPES 완충액(pH 7.4) 10 배 체적으로 세척하고 얼음냉각 조건하에서 신선한 동일 완충액 3 배 체적중에 방치하여 -80°C 에서 동결한 다음 해동하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 원심분리하여 상청액을 얻어 이것을 10 mM 인산 완충액(pH 6.6)으로 미리 평형화 시켜둔 "DEAE-SEPHAROSE" (스웨덴의 Pharmacia LKB Biotechnology 사 판매의 이온교환 칼럼 크로마토그래피용 겔)칼럼속에 공급한 다음, 이 칼럼을 10 mM 인산 완충액(pH 6.6)으로 세척하고, 이 칼럼에 10 mM 인산 완충액(pH 6.6)중에서 0 M 로 부터 0.5 M 로 단계적으로 증가하는 염화나트륨의 기울기 완충액을 공급하여 약 0.2 M 염화 나트륨 농도에서 용출하는 회분을 채취하였다.

이 회분을 10 mM 인산 완충액(pH 6.8)에 대하여 투석하고 "DEAE 5PW" (일본국의 Tosoh 사 판매의 이온교환 크로마토그래피용 겔)칼럼에 공급한 다음 10 mM 인산 완충액(pH 6.8) 중에서 0 M 로 부터 0.5 M 로 단계적으로 증가 하는 염화 나트륨의 기울기 완충액을 통액하여 약 0.2 ~ 0.3 M 염화 나트륨 농도에서 용출한 회분을 채취하였다.

수득한 회분을 한데 모아 PBS 에 대해 투석하고, 본 출원인의 일본국 특허출원 제 158,240/95 호에 개시된 방법에 따라 제조한 모노클로날 항체를 사용하는 면역침화성 크로마토그래피용 겔이 충전된 플라스틱 원통형 칼럼에 공급하여 PBS 로 세척하였다. 이 칼럼에 100 mM 글리신-HCl 완충액(pH 2.5)을 통액하여 용출액으로 부터 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 단백질을 함유한 회분을 채취하였다. 이들 회분을 한데 모아 멸균 증류수에 대하여 투석하고 멤브레인 필터로 농축한 다음 동결건조하여 햄스터 1 마리당 정제 고형 단백질을 약 50 ng 의 수득량으로 얻었다.

실험 2 : 분자량

실험 1 의 방법으로 제조한 정제 단백질을 문헌 [U.K. Laemmli in Nature, Vol. 227, pp. 680 ~ 685 (1970)] 에 보고된 방법에 준하여 2 w/v % 디티오프레이트 존재하에 소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔(SDS-PAGE)에서 전기영동 처리하여 약 18,000 ~ 19,500 달톤에 상응한 위치에서 IFN- γ 유도능이 있는 주 단백질 밴드를 얻었다. 이 실험에 사용

된 마아커(marker) 단백질은 소혈청 알부민 (MW = 67,000 달톤), 오브알부민(MW = 45,000 달톤), 탄산 탈수 효소(carbonic anhydrase)(MW = 30,000 달톤), 대두 트립신 저해제(MW = 20,100 달톤) 및 α-락트알부민(MW = 14,400 달톤) 이었다.

실험 3 : N 말단 부근에서의 아미노산 서열 및 펩티드 맵핑(mapping)

실험 3-1 : N 말단 부근에서의 아미노산 서열

실험 1의 정제 단백질을 단백질 시퀀서(protein sequencer) "MODEL 473A" (미합중국의 Perkin-Elmer 사 판매)로 분석한 결과, SEQ ID NO : 1, 특히 SEQ ID NO : 2의 아미노산 서열을 가지고 있음이 판명되었다.

실험 3-2 : 펩티드 맵핑

실험 1의 방법으로 제조한 정제 단백질을 적당량의 멸균 증류수에 용해한 용액을 0.1 v/v % 트리플루오로아세트산 수용액으로 미리 평형화 시켜둔 고속 액체 크로마토그래피(HPLC) 용 겔인 "ASHAHIPAK C4P-50 4E" (일본국의 Showa Denko 주식회사 판매)칼럼에 통액한 다음, 이 칼럼을 0.1 v/v % 트리플루오로아세트산 수용액으로 세척하여 이 칼럼에 트리플루오로아세트산과 아세토니트릴의 혼합액중에서 0 v/v % 에서 부터 90 v/v % 로 증가하는 아세토니트릴의 직선 기울기 용액을 60 ml/시간의 유속으로 공급하였다. 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 단백질을 함유한 희분을 용출 희분으로 부터 채취하여 한데 모아 1 M Tris 수용액(pH 11.2)으로 중화한 후 통상의 방법으로 농축하였다. 적당량의 클로스트리페인(clostripain) (미합중국 Sigma Chemical Company 판매)을 용해한 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.5)에 몰비로 클로스트리페인의 약 50 배의 양의 단백질을 가하면서 아세토니트릴을 제거하였다. 수득한 혼합물을 pH 8 ~ 9 및 37°C 에서 12 시간 동안 반응시켜 단백질 단편을 함유한 반응 혼합물을 얻었다.

이 반응 혼합물을 0.1 v/v % 트리플루오로아세트산 수용액으로 미리 평형화 시켜둔 HPLC 용 겔인 "ODS-120T" (일본국의 Tosoh 사 판매) 칼럼에 통액한 다음, 0.1 v/v % 트리플루오로아세트산 수용액으로 이 칼럼을 세척하고, 파장 214 nm 에서 펩티드의 흡수레벨, 즉 펩티드 농도를 모니터링하면서 이 칼럼에 트리플루오로아세트산, 아세토니트릴 및 물의 혼합액(트리플루오로아세트산의 농도 0.09 v/v %) 중에서 0 v/v % 로 부터 70 v/v % 로 증가하는 아세토니트릴의 직선 기울기 용액을 30 ml/시간의 유속으로 통액하였다. 도 1은 수득한 펩티드 맵(peptide map) 이다.

도 1에 있어서 용출 개시후 약 59 분, 약 62 분 및 약 68 분에서 용출한 펩티드 단편을 각각 펩티드 단편 1, 펩티드 단편 2 및 펩티드 단편 3 이라 명명하였다. 이들 펩티드 단편을 별도로 채취하여 통상의 방법으로 "MODEL 473A" 단백질 시퀀서(미합중국 Perkin-Elmer 사 판매)로 아미노산 서열을 분석하였다. 그 결과, 펩티드 단편 1 및 2 는 각각 SEQ ID NO : 3 및 7 의 아미노산 서열을 가진 반면 펩티드 단편 3 은 SEQ ID NO : 4 및 5 의 아미노산 서열을 가지고 있음이 판명되었다. 이들 아미노산 서열과 SEQ ID NO : 6 의 아미노산 서열을 비교한 결과 펩티드 단편 1 ~ 3 은 SEQ ID NO : 6 의 아미노산 서열에서의 위치 148 ~ 157, 1 ~ 13 및 45 ~ 58 또는 80 ~ 96 에 각각 대응하는 것임이 판명되었다. 이들 결과로 부터 펩티드 단편 1 및 2 는 분석에 사용된 단백질의 C 말단 단편과 N 말단 단편에 대응한 것이며 펩티드 단편 3 은 단백질의 내부 단편에 대응한 것임이 확인되었다.

여기서 결론 지을 수 있는 것은 이들 결과와, 실험 2의 경우에서 밝혀진 바와 같이 이 정제 단백질은 SDS-PAGE 에 의해 약 18,000 ~ 19,500 달톤의 분자량에 상응한 위치에서 주단백질 밴드를 가지고 있다는 사실 및, 이 정제 단백질은 SEQ ID NO : 6 의 아미노산 서열로 부터 계산되는 분자량이 18,199 달톤이라는 사실을 종합적으로 판단하면 실험 1의 방법으로 얻은 정제 단백질은 SEQ ID NO : 6 의 아미노산 서열을 가지고 있다고 결론지을 수 있다.

실험 4 : 생물학적 활성

실험 4-1 : 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산

헤파린화된 주사기로 건강한 지원자의 혈액을 샘플링하여 혈청 무함유의 RPMI1640 배지(pH 7.4)로 2 배로 희석하였다. 희석된 혈액을 피콜(ficoll) (스웨덴국의 Pharmacia LKB Biotechnology AB 판매) 위에 전개한 다음 원심분리 하여 임파구를 채취하였다. 이들 임파구를 10 v/v % 소태아 혈청이 첨가된 RPMI 1640 배지 (pH 7.4)로 세척한 후 세포밀도가 5×10^6 개/ml 되도록 신선한 동일 배지중에 현탁하였다. 이 세포 현탁액을 96 웰(well) 마이크로플레이트에 0.15 ml/well 씩 나누어 넣었다.

실험 1의 방법으로 얻은 정제 단백질을 10 v/v % 소태아 혈청을 첨가한 RPMI 1640 배지(pH 7.4)로 희석한 다음 마이크로플레이트에 각 웰(well) 당 0.05 ml 씩 나누어 넣었다.

Con A 를 2.5 μ g/ml 또는 재조합형 인간 인터로이킨 2 를 50 단위/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 신선한 동일 배지를 상기 마이크로플레이트에 각 웰당 0.05 ml 씩 가한 다음 이 마이크로플레이트를 5 v/v % CO₂ 인큐베이터 중에서 37°C 에서 24 시간 인큐베이트 하였다.

배양완료후 각 웰로 부터 배양 상청액을 0.1 ml 씩 샘플링하여 종래의 효소면역흡수 측정법(EIA)에 의해 IFN- γ 활성을 측정하였다. 대조로서 정제 단백질 무함유 계를 준비하여 위와 마찬가지로 처리하였다. 그 결과는 표 1 에 나와 있는데, 이 표에서는 IFN- γ 함유량을 측정하여 미합중국 국립위생연구소로부터 구한 IFN- γ 의 국제 표준인 "Gg23-901-530" 에 근거하여 국제단위(IU)로 나타내었다.

표 1

단백질 농도 (ng/ml)	IFN- γ 수득량(IU/ml)		
	단백질	단백질 + Con A	단백질 + 인터로이킨 2
0	<0.5	<2	<0.5
0.32	<0.5	6 \pm 2	2 \pm 1
1.6	10 \pm 2	70 \pm 20	60 \pm 20
8	140 \pm 10	490 \pm 80	570 \pm 30
40	180 \pm 20	620 \pm 10	880 \pm 50
200	260 \pm 20	800 \pm 20	1500 \pm 400

주 : 표에서 "단백질" 은 본 발명의 단백질을 의미함.

표 1 의 결과로 부터 면역담당 세포로서의 임파구가 본 발명의 단백질의 작용에 의해 IFN- γ 를 생성하였음을 알 수 있고, 이들 결과로 부터 명백한 바와 같이 보인자로서의 인터로이킨 2 또는 Con A 존재하에서 IFN- γ 생성량이 증가하고 있다.

실험 4-2 : NK 세포에 의한 세포 장해성의 증가

헤파린화된 주사기로 건강한 지원자로 부터 혈액을 채취하여 PBS 로 2 배 희석하였다. 희석액을 피콜(ficoll) 위에 가하고 원심분리하여 고밀도 임파구 층을 얻었다. 이 임파구를 10 μ g/ml 카나마이신, 5×10^{-5} M 2-메르캅토에탄올 및 10 v/v % 소태아 혈청을 함유한 RPMI 1640 배지(pH 7.2)에 부유시켜 12 웰 마이크로플레이트에 0.5 ml/웰씩 나누어 넣었다. 실험 1 의 방법으로 얻은 정제 단백질을 신선한 동일 배지로 적당히 희석하여 마이크로플레이트에 1.5 ml/웰씩 나누어 넣은 다음 이 마이크로플레이트에 재조합형 인간 인터로이킨 2 를 50 단위/ml 가하거나 가하지 아니한 신선한 동일 배지를 0.5 ml/웰씩 가한 후 5 v/v % CO₂ 인큐베이터에서 37℃ 에서 24 시간 배양하고, 수득한 세포를 PBS 로 세척하여 효과 세포로서의 NK 세포를 함유한 배양 임파구를 얻었다. 통상의 방법으로 ⁵¹Cr 로 표지한 NK 세포 감수성 표적 세포로서의 인간 만성 골수성 백혈병 유래의 K-562 세포(ATCC CCL243)를 96 웰 마이크로플레이트에 1×10^4 개/웰씩 취하고, 위에서 얻은 NK 세포를 효과 세포 : 표적세포의 비를 2.5 : 1, 5 : 1 또는 10 : 1 로 하여 혼합한 다음 5 v/v % CO₂ 인큐베이터에서 37℃ 에서 4 시간 배양한 후 각 상청액의 방사능을 측정하여 사멸한 표적세포의 수를 계산하였다. 각각의 계에 있어서 이 실험에 사용된 표적 세포수에 대한 사멸 표적 세포수의 백분율(%)을 계산하여 세포 독성을 평가하였다. 그 결과는 표 2 에 나와 있다.

표 2

단백질 농도 (pM)	인터로이킨 2의 농도 (단위/ml)	세포 장해성		
		효과 세포/ 표적 세포		
		2.5 / 1	5 / 1	10 / 1
0	0	19	36	59
0	10	28	44	61
0.5	0	22	41	63
0.5	10	31	54	69
5	0	28	49	66
5	10	36	58	71
50	0	29	53	67
50	10	42	62	72
500	0	33	56	84
500	10	57	78	96

주 : 표에서 "pM" 은 10^{-12} M 을 뜻하고, "단백질" 은 본 발명의 단백질을 뜻함.

표 2 의 결과로 부터 본 발명의 단백질은 NK 세포에 의한 세포 장해성을 증가 시키는 성질을 가지고 있음을 알 수 있다. 이들 결과로 부터 명백한 바와 같이, 인터로이킨 2 가 공존하면 세포 장해성을 증가시킨다.

실험 4-3 : LAK 세포 생성 유도

통상의 방법으로 ⁵¹Cr 표지된 NK 세포에 대해 비감수성인 표적 세포로서의 인간 Burkitt 임파종 유래의 Raji 세포(ATCC CCL86)를 96 웰 마이크로 플레이트에 각각 1×10^4 개/웰이 되도록 가하고, 실험 4-2 의 방법에서와 마찬가지로 방법으로 72 시간 배양하여 제조한 효과 세포로서의 LAK 세포를 함유한 배양된 임파구와 표적 세포를 5 : 1, 10 : 1 또는 20 : 1(효과 세포 : 표적세포)의 비율로 혼합한 다음 마이크로플레이트에 가하고, 이 마이크로플레이트를 5 v/v % CO₂ 인큐베이터에서 37℃ 에서 4 시간 배양한 후, 통상의 방법으로 각 웰 중의 상청액의 방사능을 측정하였다. 이어서 실험 4-2 에서와 마찬가지로 세포 장해성(%)을 계산하였다. 그 결과는 표 3 에 나와 있다.

표 3

단백질 농도 (pM)	인터로이킨 2의 농도 (단위/ml)	세포 장해성		
		효과 세포 / 표적 세포		
		5 / 1	10 / 1	20 / 1
0	0	12	23	31
0	10	14	25	35
0.5	0	14	24	34
0.5	10	18	32	42
5	0	16	26	37
5	10	21	36	50
50	0	22	41	49
50	10	26	52	56
500	0	27	44	61
500	10	33	59	72

주 : 표에서 "pM" 은 10^{-12} M 을 뜻하고, "단백질" 은 본 발명의 단백질을 뜻함.

표 3 의 결과로 부터 본 발명의 단백질은 LAK 세포의 생성을 유도하는 성질을 가지고 있음을 알 수 있다. 또한, 이들 결과에 나온 바와 같이 인터로이킨 2 가 공존하면 유도가 증가함을 알 수 있다.

실험 5 : 급성독성 시험

실험 1 의 방법으로 얻은 정제 단백질을 통상의 방법에 따라 8 주령되는 마우스에게 경피, 경구 또는 복강내에 투여하였다. 그 결과, 정제 단백질의 LD_{50} 은 이들 투여경로에 관계없이 약 1 mg/kg 마우스 이상이였다. 이것은 본 발명의 단백질이 인간에게 투여하기 위해 의약품에 안전하게 배합할 수 있음을 뒷받침하는 것이다.

IFN- γ 는 세균에 대한 감염방어, 악성 종양의 성장억제 및 면역조절 기능을 통하여 인간의 생체방어 조절 및 면역 글로블린 E 항체의 생성억제에 깊이 관여하고 있다는 것은 널리 알려져 있다.

위에 나온 바와 같이 IFN- γ 는 현재 시판되고 있으며 인간의 감수성 질환용 의약으로서 사용되고 있는데, 치료를 목적으로 하는 질환, 투여량, 투여경로 및 안전성에 대해서는 거의 알려져 있다. 문헌 ["Cytokines in Cancer Therapy", edited by Frances R. Balkwill, translated by Yoshihiko WATANABE (1991), published by Tokyo-Kagaku-Dojin, Tokyo, Japan] 에 기재된 바와 같이 NK 세포, LAK 세포 등의 킬러 세포를 사용하는 치료법을 항종양 면역요법으로서 이용하여 각종 인간의 질환에 적용했을 경우 거의 만족스러운 치료 효과를 얻었다고 보고하고 있다. 최근, 사이토카인을 사용하는 킬러 세포에 의한 세포 장해성 증가 또는 킬러 세포생성의 유도와 치료효과 사이에 어떤 관계가 있다는 것이 주목되고 있다. 예컨대 T. FUJIOKA 가 문헌 ["British Journal of Urology", Vol 73, No.1, pp. 23-31 (1994)] 에서 보고한 바로서는 LAK 세포 및 인터로이킨 2를 사용한 항종양 면역요법에 있어서 인터로이킨 2 는 LAK 세포 생성을 강력히 유도하며 심각한 독성과 부작용을 유발함이 없이 인간의 암에 대해 현저한 암전이 억제 활성을 발휘하였다고 하고 있다.

따라서 각종 인간의 질환 치료 및/또는 예방에 IFN- γ 와 킬러 세포가 깊이 관여하며, 그 완치 및 경감에 큰 기여를 하고 있음이 판명되고 있다. 이러한 배경하에서 실험 4 및 5 의 결과로 부터 명백한 바와 같이 본 발명의 단백질은 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하고 NK 세포에 의한 세포 장해성을 증가시키며 LAK 세포의 생성을 유도한다는 사실은 본 발명의 단백질을 함유한 감수성 질환용 의약은 심각한 부작용을 유발함이 없이 인간에게 비교적 장기간 반복 투여할 수 있고, IFN- γ 및/또는 킬러 세포와 밀접하게 관련된 질환의 치료 및 예방에 대해 만족스러운 효과를 발휘한다는 것을 시사하고 있다.

아래의 실시예에서 본 발명의 바람직한 실시의 형태에 대해 보다 상세히 설명한다. 실시예 A-1 ~ A-8 은 본 발명의 단백질의 제조방법의 바람직한 실시예 이고 실시예 B-1 ~ B-6 은 본 발명의 감수성 질환용 의약에 대한 바람직한 실시예이다.

실시예 A-1 : 단백질 제조

새로 태어난 햄스터에 토끼 유래의 항흉선 항혈청을 주사하여 종래방식으로 면역반응을 억제하고, 등부위 피하조직에 인간의 급성 백혈병의 골수단구 세포주인 THP-1 세포(ATCC TIB202)를 햄스터 1 마리당 약 5×10^5 개 이식한후 종래방식으로 3 주 동안 사육하였다. 각각의 햄스터의 피하에 생긴 종양 덩어리 약 15 g 썩을 적출하여 종래방식으로 생리 식염수에 현탁한후 PBS 로 세척하였다.

현탁된 세포를 문헌 [Matthew J. Kostura et al. in "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", Vol.86, pp.5,227-5,231 (1989)] 에 기재된 방법에 준하여 10 mM 염화칼륨, 1.5 mM 염화 마그네슘 및 0.1 mM 디소듐 에틸렌디아민테트라아세테이트를 함유한 차거운 20 mM HEPES 완충액 (pH 7.4) 10 배 체적으로 세척하고 신선한 동일 완충액 3 배 체적중에서 얼음냉각 조건하에서 20 분간 방치한후 -80°C 에서 동결건조한 다음 해동하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 원심분리하고 상청액을 "DEAE-SEPHAROSE" (스웨덴국의 Pharmacia LKB

Biotechnology AB 사 판매의 이온 교환 크로마토그래피용 겔)칼럼속에 공급한 다음 이 칼럼을 10 mM 인산 완충액(pH 6.6)으로 세척하고, 이 칼럼에 0 M 로 부터 0.5 M 까지 단계적으로 증가하는 염화 나트륨의 기울기 완충액을 공급하여 약 0.2 M 염화 나트륨 농도에서 용출하는 획분을 채취하였다.

이 획분을 한데 모아 10 mM 인산 완충액(pH 6.8)에 대하여 투석하고 10 mM 인산 완충액(pH 6.8)으로 미리 평형화하여 둔 "DEAE 5PW" (일본국의 Tosoh 사 판매의 이온교환 크로마토그래피용 겔)칼럼에 공급한 다음, 10 mM 인산 완충액(pH 6.8)중에서 0 M 로 부터 0.5 M 까지 증가하는 염화 나트륨의 직선 기울기 완충액을 통액하여 약 0.2 ~ 0.3 M 염화 나트륨 농도에서 용출한 획분을 채취하였다.

수득한 획분을 한데 모아 PBS 에 대해 투석하였다. 본 출원인의 일본국 특허출원 제 158,240/95 호에 개시된 방법에 따라 제조한 모노클로날 항체의 면역 친화성 크로마토그래피용 겔을 먼저 플라스틱제 원통형 칼럼에 충전하여 PBS 로 세척한후 상기 투석 내액(inner solution)을 상기 칼럼에 공급하였다. 이 칼럼에 100 mM 글리신-HCl 완충액(pH 2.5)을 통액하여 분획을 한 다음, 용출액으로 부터 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 단백질을 함유한 획분을 채취하고, 이들 획분을 멸균 증류수에 대하여 투석하고 투석 내액을 멤브레인 필터로 농축하여 이 농축액을 동결건조함으로써 햄스터 1 마리당 고형 정제 단백질을 약 50 ng 의 수득량으로 얻었다.

실시예 A-2 : 단백질 제조

새로 태어난 누우드 마우스의 등부위 피하조직에 인간의 급성 골수 단구성 백혈병 유래의 골수 단구성 세포주인 KG-1 세포(ATCC CCL246)를 약 1×10^6 개씩 주사하고 통상의 방법으로 4 주간 사육하였다. 각 누우드 마우스의 피하에 생긴 종양 덩어리 약 20 g 썩을 적출하여 통상의 방법으로 생리 식염수에 분산하였다. 실시예 A-1 과 마찬가지로 세포를 세척하고 파쇄한 다음, 수득한 혼합물을 정제하여 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 정제 단백질을 누우드 마우스 1 마리당 약 20 ng 얻었다. 이 정제 단백질 일부에 대해 실험 2 ~ 4 의 방법에 따라 아미노산 서열을 분석한 결과, 이 단백질은 N 말단 부근에서 SEQ ID NO : 1 의 부분 아미노산 서열을 가지고 있고, 실험 1 의 단백질과 마찬가지로의 분자량과 생물활성을 가지고 있음이 판명되었다.

실시예 A-3 : 단백질 제조

인간의 급성 전골수세포성 백혈병 유래의 골수단구성 세포주인 HL-60 세포(ATCC CCL240)을 직경 0.5 μ m 의 멤브레인 필터가 설치된 약 10 ml 용량의 플라스틱제 원통형 확산 체임버내에 수용된 RPMI 1640(pH 7.4) 중에 현탁시킨 다음, 이 체임버를 성장한 래트의 복강내에 매설하였다. 이 래트를 통상의 방법으로 4 주간 사육한후 체임버를 제거하였다. 체임버내의 증식된 세포를 회수하여 생리 식염수로 세척하고 실시예 A-1 과 마찬가지로 파쇄한 다음, 수득한 혼합물을 정제하여 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 정제 단백질을 래트 1 마리당 약 20 ng 얻었다.

이 정제 단백질 일부에 대해 실험 2 ~ 4 의 방법에 따라 아미노산 서열을 분석한 결과, 이 단백질은 N 말단 부근에서 SEQ ID NO : 1 의 부분 아미노산 서열을 가지고 있고, 실험 1 의 단백질과 마찬가지로의 분자량과 생물활성을 가지고 있음이 판명되었다.

실시예 A-4 : 단백질 제조

인간의 급성 단구성 백혈병 유래의 골수단구성 세포주인 THP-1 세포(ATCC TIB202)를 10 v/v % 소태아 혈청이 첨가된 RPMI 1640 배지(pH 7.2) 중에 세포 밀도가 약 3×10^5 개/ml 되게 현탁하고 10 v/v % CO₂ 인큐베이터중에서 37℃에서 3 주간 배양하면서 배지를 새것으로 바꾸어 주었다. 증식된 세포를 배양액으로부터 분리하고 실시예 A-1 과 마찬가지로 생리 식염수로 세척하여 파쇄한 다음, 수득한 혼합물을 정제하여 IFN- γ 생산을 유도하는 정제 단백질을 배양액 1 리터당 약 10 ng 얻었다.

이 정제 단백질 일부에 대해 실험 2 ~ 4 의 방법에 따라 아미노산 서열을 분석한 결과, 이 단백질은 N 말단 부근에서 SEQ ID NO : 1 의 부분 아미노산 서열을 가지고 있고, 실험 1 의 단백질과 마찬가지로의 분자량과 생물활성을 가지고 있음이 판명되었다.

실시예 A-5 : 단백질 제조

새로 태어난 햄스터에게 통상의 방법으로 토끼 항흉선 혈청을 주사하여 면역 억제 처리하고 등 부위 피하조직에 인간의 악하선(submaxillary gland)의 유평피암인 A-253 세포(ATCC HTB41)를 1 마리당 약 5×10^5 개 주사하여 통상의 방법으로 3 주간 사육한후, 각 햄스터의 피하에 생긴 종양 덩어리 약 10 g 썩을 적출하여 생리 식염수에 분산시킨 다음 PBS 로 세척하였다.

이와 같이하여 수득한 증식세포를 10 mM 염화칼륨, 1.5 mM 염화 마그네슘 및 0.1 mM 디소듐 에틸렌디아민테트라아세테이트를 함유한 20 mM Hepes 완충액(pH 7.4)으로 세척하고 신선한 동일한 완충액중에 세포밀도 약 2×10^7 개/ml 되도록 현탁시켜 균질기로 파쇄한후 원심분리하여 세포 파쇄물을 제거하였다. 수득한 상청액을 한외여과용 멤브레인으로 농축하여 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 단백질을 함유한 세포 추출물을 얻었다. 이 추출물을 실시예 A-1 의 방법과 마찬가지로 정제하고 농축한후 동결건조함으로써 햄스터 1 마리당 고형 정제 단백질을 약 3 μ g 얻었다.

이 정제 단백질을 샘플링하여 실험 2 ~ 4 의 방법에 따라 분석한 결과, 이 단백질은 N 말단 부근에서 SEQ ID NO : 1 의 아미노산 서열을 가지고 있고, 실험 1 의 단백질과 마찬가지로의 분자량과 생물활성을 가지고 있음이 판명되었다.

실시예 A-6 : 단백질 제조

10 v/v % 소태아 혈청이 첨가된 RRMI 1640 배지(pH 7.4)에 통상의 방법으로 A-253 세포의 종배양물을 접종하고 37℃에서 배양하여 세포의 단일층을 형성시킨 다음, 이 세포를 "TRYPsin-EDTA" (미합중국의 Gibuco BRL 사 판매의 트립신)을 사용하여 배양용기 표면으로부터 분리하여 PBS 로 세척하였다. 실시예 A-1의 방법에 따라 세포를 파쇄하고 여과하여 원심분리함으로써 상청액을 얻고, 이 상청액을 37℃에서 6시간 인큐베이트 한후 정제, 농축 및 동결건조하여 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 고형의 정제 단백질을 세포 10⁷ 개당 약 1 μ g 얻었다.

상청액을 샘플링하여 실험 2 ~ 4의 방법에 따라 분석한 결과, 이 단백질은 N 말단 부근에서 SEQ ID NO : 1의 아미노산 서열을 가지고 있고, 실험 1의 단백질과 마찬가지로 분자량과 생물활성을 가지고 있음이 판명되었다.

실시예 A-7 : 단백질 제조

10 v/v % 소태아 혈청이 첨가된 RMI 1640 배지(pH 7.4)에 통상의 방법으로 A-253 세포의 종배양물을 접종하고, 37℃에서 배양하여 세포의 단일층을 형성하였다. 이어서 이 배지를 IFN- γ 유도제로서의 KG-1 세포 유래의 천연형 IFN- γ 10 IU/ml 가 첨가된 혈청 무함유 RPMI 1640 배지(pH 7.4)로 바꾸어 주고 37℃에서 48시간 배양하였다. 이 배양물을 원심분리하여 상청액을 얻어 실시예 A-1의 방법으로 정제하고 농축한후 동결건조하여 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 고형의 정제 단백질을 세포 10⁷ 개당 약 5 ng 얻었다.

상청액을 샘플링하여 실험 2 ~ 4의 방법에 따라 분석한 결과, 이 단백질은 N 말단 부근에서 SEQ ID NO : 1의 아미노산 서열을 가지고 있고, 실험 1의 단백질과 마찬가지로 분자량과 생물활성을 가지고 있음이 판명되었다.

실시예 A-8 : 단백질 제조

실시예 A-1의 방법으로 얻은 정제 단백질을 적당량의 멸균 증류수에 용해하고, 이 용액을 0.1 v/v % 트리플루오로아세트산 수용액으로 미리 평형화 시켜 둔 "ASAHI-PAK C4P-50 4E" (일본국의 Showa Denko 주식회사 판매의 고속 액체 크로마토그래피용 겔)칼럼에 통액한 다음, 이 칼럼을 0.1 v/v % 트리플루오로아세트산 수용액으로 세척하고 이 칼럼에 트리플루오로아세트산과 아세트오니트릴의 혼합액중에서의 0 v/v % 로 부터 90 v/v % 까지 증가하는 아세트오니트릴의 직선 기울기 용액을 60 ml/시간의 유속으로 통액하였다. 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 단백질을 함유한 획분을 용출 획분으로부터 채취하여 1M Tris 수용액(pH 11.2)으로 중화하고 통상의 방법으로 농축한 다음, 수득한 농축물로부터 아세트오니트릴을 제거하여 순도 95 % 이상의 농축 단백질을 고형물당 원료 단백질에 대해 약 10 중량 %의 수율로 얻었다.

실험 2의 방법에 따라 농축 단백질을 샘플링하여 분자량을 측정된 결과, 분자량 18,400 \pm 1,000 달톤에 상응한 위치에서 IFN- γ 생산을 유도하는 단일 단백질 밴드를 얻었다. 또 다른 샘플을 새로 채취하여 실험 3 및 4의 방법으로 아미노산 서열을 분석한 결과, N 말단 부근에서 SEQ ID NO : 1의 아미노산 서열과 SEQ ID NO : 3의 아미노산 서열, 보다 구체적으로는 SEQ ID NO : 7의 아미노산 서열을 가지고 있음이 판명되었고, 더욱이 SEQ ID NO : 4 및 5의 아미노산 서열을 내부단편으로 가지고 있으며, 비교적 고농도로 농축하더라도 실험 1의 단백질과 유사한 생물활성을 나타내었음이 밝혀졌다.

실시예 B-1 : 액제

안정제로서 1 w/v % 인간 혈청 알부민을 함유한 생리 식염수에 실시예 A-1의 방법으로 얻은 정제 단백질을 용해한 다음, 이 용액을 멸균여과하여 액제를 얻었다.

이 제품은 안정성이 우수하므로 악성종양, 바이러스성 질환, 세균 감염증 및 면역 질환 등의 감수성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 주사제, 점안액 또는 점비제로 사용할 수 있다.

실시예 B-2 : 건조 주사제

안정제로서 1 w/v % 정제 젤라틴을 함유한 생리 식염수에 실시예 A-2의 방법으로 얻은 정제 단백질을 용해하고, 이 용액을 통상의 방법으로 멸균 여과 하였다. 이 멸균액 1 ml 씩을 취하여 바이알병에 나누어 넣고 동결 건조한 후 캡으로 밀봉하였다.

이 제품은 안정성이 우수하므로 악성종양, 바이러스성 질환, 세균성 감염증 및 면역 질환 등의 감수성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 건조 주사제로서 사용할 수 있다.

실시예 B-3 : 건조 주사제

실시예 A-5의 방법으로 제조한 정제 단백질과, 안정제로서 "TREHALOSE" (일본국의 Hayashibara 사 판매의 트레할로오스 결정분말)을 사용한 것외에는 실시예 B-2와 마찬가지로 하여 고형제제를 제조하였다.

이 제품은 안정성이 우수하므로 악성종양, 바이러스성 질환, 세균 감염증 및 면역 질환 등의 감수성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 건조 주사제로 유리하게 사용할 수 있다.

실시예 B-4 : 연고제

카르복시비닐 폴리머 "HI-BIS-WAKO 104" (일본국의 Wako Pure Chemicals 사 판매)와 "TREHALOSE" (일본국 Hayashibara 사 판매의 트레할로오스 결정 분말)를 각각 농도 1.4 w/w % 및 2.0 w/w % 가 되도록 멸균 증류수에 용해하고, 이 용액에 실시예 A-3의 방법으로 얻은 정제 단백질을 균일히 혼합한 후, 이 용액의 pH를 7.2가 되게 조정하여 페이스트 1g 당 정제 단백질 약 1mg을 함유하는 페이스트를 얻었다.

이 제품은 퍼짐성과 안정성이 우수하므로 악성종양, 바이러스성 질환, 세균성 감염증 및 면역질환 등의 감수성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 연고제로서 사용할 수 있다.

실시예 B-5: 정제

실시예 A-4의 방법으로 얻은 정제 단백질과 세포 활성화제로서의 LUMIN, 즉(1-1'-1"-트리헵틸-11-퀴놀릴(4)·4·4'-펜타메틸퀴노시아닌-1-1'-"-디요오 다이드)을 무수 결정질 α-말토오스 "FINETOSE" (일본국의 Hayashibara 사 판매)와 균일히 혼합하고, 이 혼합물을 통상의 방법으로 타정하여 하나당 중량이 약 200mg 이고 정제 단백질과 LUMIN을 각각 약 1mg 함유하는 정제를 얻었다.

이 제품은 삼키기가 쉽고 안정성과 세포 활성화 작용이 우수하므로 악성종양, 바이러스성 질환, 세균 감염증 및 면역 질환 등의 감수성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 정제로서 사용할 수 있다.

실시예 B-6: 양자 면역요법제 (養子 免疫療法劑)

악성 임파종 환자의 말초혈로부터 단핵세포를 분리하여, 10 v/v % 인간 AB 혈청이 첨가되어 37°C 로 예열된 RPMI 1640 배지(pH 7.2)에 분산시켜 세포밀도 약 1×10^6 개/ml 로 한후, 여기에 실시예 A-1의 방법으로 얻은 정제 단백질 약 1.0 ng/ml 와 재조합 인간 인터로이킨 2 약 100 단위/ml 를 혼합한 다음 37°C 에서 1주간 배양하고, 배양물을 원심분리하여 LAK 세포를 회수하였다.

이 LAK 세포는 환자의 체내에 도입할 경우 임파종 세포에 대해 강력한 세포 장해성을 나타내고, 또한 인터로이킨 2 단독을 사용하여 종래의 양자 면역요법에 의해 얻게되는 경우보다 훨씬 높은 치료 효과를 발휘한다. 환자의 단핵세포 대신에 환자의 종양조직에 침입한 임파구를 처리하여 얻는 세포 장해성 T 세포를 공여자인 환자에게 재주입한 결과 LAK 세포에 의해 나타나는 것과 마찬가지로의 효과를 나타내었다. 이 양자 면역요법제는 악성 신장암, 악성 흑색종, 대장암 및 폐암 등의 고형악성 종양을 치료하는데 유리하게 사용할 수 있다.

발명의 효과

이상 설명한 바와 같이 본 발명은 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 유도하는 신규의 단백질 및 이 단백질을 생산하는 인간세포의 발견에 근거하여 된 것이다. 이 단백질은 아미노산 서열이 부분적으로 규명된 물질로서 면역담당 세포에 의한 IFN- γ 생산을 안정하게 유도한다.

따라서 이 단백질을 세포를 배양하여 얻게되는 IFN- γ 생산을 위한 IFN- γ 유도제로서 뿐만아니라 IFN- γ 에 대해 감수성이 많은 바이러스성 질환, 악성종양 및 면역질환 등의 IFN- γ 감수성 질환을 위한 치료 및/또는 예방제로서 널리 사용할 수 있다.

본 발명의 단백질을 유효성분으로 함유하는 감수성 질환용의 의약품 악성종양 등의 난치성 질환 치료에 현저한 효과를 나타낸다. 이 단백질은 강력한 IFN- γ 생성 유도능을 가지고 있고 그 독성이 비교적 낮으므로 소량만으로도 소요량의 IFN- γ 생산을 유도할 수 있으며, 환자에게 비교적 다량을 투여하더라도 심각한 부작용을 실질적으로 일으키지 않는다. 따라서 본 발명의 단백질은 그 투여량을 엄격히 제한하지 않고서도 소요량의 IFN- γ 생산을 신속히 유도하는 장점을 가지고 있다.

특히 인간 세포 기원의 본 발명의 단백질은 의약품 조성물 형태로 하여 인간에게 투여할 경우 재조합 기술에 의해 인공적으로 제조된 폴리펩티드에 비하여 부작용이 거의 없고 항체를 거의 유발하지 않는 장점이 있다.

이러한 우수한 특성을 가지고 있는 본 발명의 단백질은 인간세포를 사용하는 본 발명의 방법에 의해 소요량을 제조할 수 있다. 따라서 이들 현저한 기능과 효과를 가진 본 발명은 이 분야에 기여하는 바가 큰 유익한 발명이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열표의 서열번호 (SEQ ID NO :) 6 (여기서 "Xaa"는 "이소로이신" 또는 "트레오닌"임)에 나온 아미노산 서열을 가지고, 면역담당 세포에서 인터페론- γ 의 생산을 유도하는, 인간 조혈계 세포 또는 인간 상피 유사 세포로부터 단리된 단백질.

청구항 2.

제1항에 있어서, 인간 조혈계 세포주 또는 인간 상피 유사 세포주가 주화 세포인 단백질.

청구항 3.

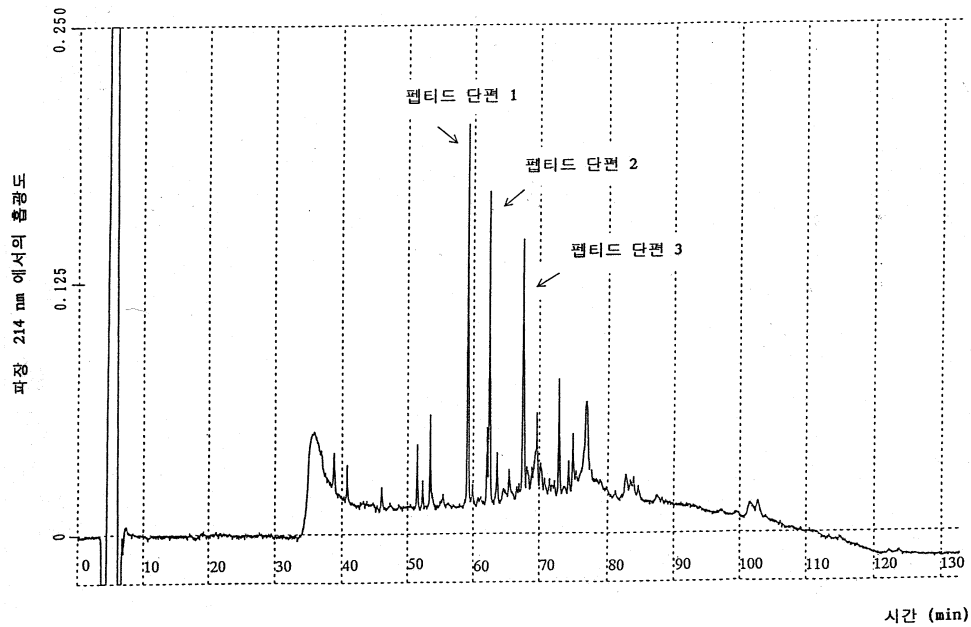
제1항에 있어서, 제1항에 기재한 단백질을 생성하는 능력을 가진 세포주를 배지 또는 인간 이외의 온혈동물의 몸체로부터 영양 보급함으로써 증식시키고, 증식한 세포주로부터 상기 단백질을 채취함으로써 얻어진 단백질.

청구항 4.

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 기재한 단백질을 함유해서 되고, 간염, 헤르페스증, 침규 콘딜롬, 에이즈, 칸디다증, 말라리아증, 크립토콕스증, 예르시니아증, 악성 종양, 균상 식육증, 만성 육아증, 성인 T 세포 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 알레르기증 또는 류마티즘을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물.

도면

도면1



서열목록 전자파일 첨부