

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C07K 14/54
A61K 38/20

(11) 공개번호 특1999-0077344
(43) 공개일자 1999년10월25일

| | | | |
|---------------|---|-------------|---------------|
| (21) 출원번호 | 10-1998-0705491 | | |
| (22) 출원일자 | 1998년07월16일 | | |
| 번역문제출일자 | 1998년07월16일 | | |
| (86) 국제출원번호 | PCT/DK1997/00021 | (87) 국제공개번호 | WO 1997/26279 |
| (86) 국제출원출원일자 | 1997년01월16일 | (87) 국제공개일자 | 1997년07월24일 |
| (81) 지정국 | AP ARIP0특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 쿠바 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 | | |
| (30) 우선권주장 | PCT/DK96/00029 1996년01월18일 덴마크(DK) | | |
| (71) 출원인 | 스티노 리서치 그룹 에이/에스 라르센 스티ن 그래스티드 | | |
| (72) 발명자 | 덴마크 디케이-5250 오덴스 에스브이 둔비르케베지 6 그룬호지 라르센 크리스티안 덴마크 디케이-8 아아르허스 씨 킬데가르덴 1 게세르 보르발라 덴마크 콜트 디케이-8361 하셀라게르 필레가르드스베이지 233 | | |
| (74) 대리인 | 박장원 | | |

심사청구 : 없음

(54) 합성 IL-10 동족체

요약

본 발명은 다음 서열식에 따른 물질 또는 폴리펩티드의 용도에 관한 것인데:

X₁-X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO: 22)

여기서,

X₁는 Ala 또는 Gly이고,

X₂는 Tyr 또는 Phe이고,

X₃ 및 X₄ 및 X₅는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X₆는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되거나, 및/또는 이 펩티드가 사이클화되거나, 및/또는 이 펩티드가 안정화되거나, 및/또는 아미노기로 종결된 아미노산 잔기가 아실화되거나, 및/또는 카르복시기로 종결된 아미노산 잔기가 아마이드화되는 물질 및 폴리펩티드, 및

상기 서열식을 기초로 하여 모델링된 펩티드 모사체(peptidomimetics)의 TNF α 생성을 감소시키기 위한, 및/또는 체장염을 치료하거나 예방하기 위한 의약 조성물 제조용 용도에 관한 것이다.

대표도

도1

명세서

기술분야

본 발명은 인터로이킨 10(IL-10) 작용약인 물질들의 의약적 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 TNF α 생성을 감소용, 및/또는 체장염, 요산염성 관절염(통풍), 피부 알레르기, 피부에서의 알레르기성 반응, 저산소증/허혈증에 의한 조직의 손상(경색증, 재관류(reperfusion)), 바이러스 감염에 기인한 염증성 반응들의 치료 또는 예방용 의약 조성물을 제조하기 위한, 및/또는 수태촉진제(conceptive agent)를 제조하기 위한 본 발명 물질의 용도에 관한 것이다.

배경기술

hIL-10 또는 vIL-10으로 이루어진 의약 조성물 및 다양한 질병의 치료용 의약 조성물을 제조하기 위한 hIL-10 또는 vIL-10의 용도는 WO 93/02693 및 WO 94/04180 등에 개시되어 있으며, 일부 IL-10 작용약인 WO 96/01318에 개시되어 있다.

발명의 요약

본 발명은 다음 서열식에 따른 물질 또는 폴리펩티드의 용도에 관한 것인데:

$X_1-X_2-X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6$ (SEQ ID NO: 22)

여기서,

X_1 는 Ala 또는 Gly이고,

X_2 는 Tyr 또는 Phe이고,

X_3 및 X_4 및 X_5 는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X_6 는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되거나, 및/또는 이 펩티드가 사이클화되거나, 및/또는 이 펩티드가 안정화되거나, 및/또는 아미노기로 종결된 아미노산 잔기가 아실화되거나, 및/또는 카르복시기로 종결된 아미노산 잔기가 아마이드화되는 물질 및 폴리펩티드, 및

상기 서열식을 기초로 하여 모델링된 펩티드 모사체(peptidomimetics)의 TNF α 생성을 감소시키기 위한, 및/또는 체장염을 치료하거나 예방하기 위한 의약 조성물 제조용 용도에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 다음 서열식을 갖는 물질 또는 폴리펩티드:

$X_1-X_2-X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6$ (SEQ ID NO: 22)

여기서,

X_1 는 Ala 또는 Gly이고,

X_2 는 Tyr 또는 Phe이고,

X_3 및 X_4 및 X_5 는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X_6 는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되거나, 및/또는 이 펩티드가 사이클화되거나, 및/또는 이 펩티드가 안정화되거나, 및/또는 아미노기로 종결된 아미노산 잔기가 아실화되거나, 및/또는 카르복시기로 종결된 아미노산 잔기가 아마이드화되는 물질 또는 폴리펩티드, 및 상기 서열식을 기초로 하여 모델링된 펩티드 모사체에 관한 것인데, 상기 물질 또는 폴리펩티드는 다음과 같은 특성 중 한 가지 이상을 갖는다:

- 인체의 단구 세포(monocytes)에 의한 자발적인 IL-8 생성의 억제를 유도하고,
- 인체의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC: peripheral blood mononuclear cells)에 의한 IL-1 β 유도성 IL-8 생성의 억제를 유도하고,
- 인체의 단구 세포에 의한 인터로이킨-1 수체 길항 단백질(IRAP)의 생성을 유도하고,
- 생체 외에서의 CD8+ 인체 T 림프구의 주화학적 이동을 유도하고,
- rhIL-10에 대한 비반응성을 초래하는 인체 CD8+ T 세포를 제감작화시키고,
- IL-8에 대한 CD4+ 인체 T 림프구의 주화학적 반응을 억제시키고,
- MCAF/MCP-1에 대한 인체의 단구세포의 주화학적 반응을 억제시키고,
- IFN- γ 에 의해 자극된 인체의 단구세포에 대한 클래스 II MHC 분자 발현을 억제시키고,
- 배양된 정상적인 인체의 CD4+ T 세포에 의한 IL-4의 생성을 유도하고,
- 인체의 혼합 백혈구 반응에 있어서 TNF α 생성을 감소시키고,
- 담즙산 유도성 급성 체장염의 토끼 모델에서 TNF α 및 IL-8를 하향 조절하고, 치료되는 토끼의 폐에서의 중성 친화성 백혈구의 침윤(neutrophil infiltration)을 감소시킨다.

작용 메카니즘은 면역 시스템의 매개체, 특히 모노킨, 림포킨, 케모킨 및 모노킨-수체 길항약과 같은 시

토킨의 작용을 방해하는 것을 통해 일어나는 것으로 생각된다(후술되는 면역학적 메카니즘에서 상세히 하기한 바와 같이). 즉, 본 발명의 물질은 몇몇 시토킨의 작용 및/또는 생성을 방해/억제함으로써, 조직 손상을 초래하는 병리학적 경과를 억제하는 것으로 생각되고, 본 발명의 물질이 천연 모노킨-수체 길항약의 생성을 유도하여 TNF α 또는 IL-1과 같은 몇몇 시토킨의 작용을 방해/억제함으로써 조직의 손상을 야기시키는 병리학적 경과를 억제하는 것으로 생각된다.

따라서, 본 발명의 중요한 일례는, 활성 성분으로서 본 발명의 물질로 이루어진 의약 조성물에 관한 것이다.

다른 특징으로, 본 발명은 시토킨에 관련된 생물학적 효과를 실질적으로 억제하기 위한 의약적 조성물 제조용으로의 본 발명 물질의 용도, 즉, IL-1 수체 길항 단백질/펩티드, 림포킨, 모노킨, 인터로이킨, 인터페론, 케모킨 또는 집락형성-촉진 인자(clony-stimulating factor)로서의 본 발명 물질의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 또다른 특징은 시토킨계, 즉, IL-1 수체 길항 단백질/펩티드, 림포킨, 모노킨, 인터로이킨, 인터페론, 케모킨 또는 집락형성-촉진 인자계의 장애와 관련된 질환의 치료 또는 예방용 의약 조성물을 제조하기 위한 본 발명 물질의 용도에 관한 것이다. 추가적인 특징으로, 본 발명은 또한, 시토킨계의 장애와 관련된 인간의 질병의 치료방법에 관한 것으로, 이 방법은 본 발명 물질의 유효량을 환자에게 투여하는 것으로 이루어진다.

세포 면역계는 감염성, 염증성 및 신생물성(neoplastic) 질환과 같은 질병의 발병에 어떤 역할을 한다. 면역경쟁적 세포들과 그들의 산물은 염증성 질환의 발병 개시, 진행 및 가능한 만성 특성에 중요한 역할을 할 수 있다. 이러한 질병들은 대개이러다할 병인을 찾아볼 수 없는 경우가 많으며 진성 당뇨병(diabetes mellitus), 류마티스성 관절염, 위장계 및 피부의 염증성 질환과 같은 흔한 질병이 이에 포함된다. 그러나, 이러한 예와 달리, 세포-매개성 면역 또는 전구-염증 매개체 (pro-inflammatory mediators)는 그외의 많은 염증 및 증식성 질환에 어떤 역할을 한다(표 1 참조).

[표 1a]

대식세포/T-임파구-매개성 면역반응이 병원학적으로 중요한 것으로 여겨지는 질병

| |
|---|
| 피부질환: |
| 건선 아토피성 피부염 접촉성 피부염 피부 T 세포 임파종(CTCL: cutaneous T cell lymphoma) 세자리 증후군 (Sezary syndrome) 심상성 천포창 수포성 유천포창 결절성 홍반 강피증 |
| 자기면역증(류마티스 포함): |
| 포도막염 베체트병 (Behcet's disease) 유육종증(Sarcoidosis Boeck) 쉐그렌 증후군 (Sjogren's syndrome) 류마티스성 관절염 유년성 관절염 라이더 증후군 (Reiter's syndrome) |

[표 1b]

| |
|---|
| 자기면역증(류마티스 포함): |
| 통풍 변형성 관절염 전신성 홍반성 낭창 다발성 근염 심근염 원발성 담즙성 간경변 크론병(Crohn's disease) 궤양성 대장염 다발성 골수염 및 기타 탈골수성 질환 재생불량성 빈혈 특발성 혈소판 감소성 자반증 다발성 골수종 및 B 세포 임파종 시몬즈병(범하수체전엽기능항진증) 그레이브병 (Graves's disease) 및 그레이브 안증 (眼症) 서브-급성 갑상선염 및 하시모토병(Hashimono's disease) 애디슨병 (Addison's disease) 인슐린-의존성 당뇨병 (타입 1) |
| 기타 질환: |
| 혈관염을 수반하는 여러 가지 임상 증후군(결절성 다발성 동맥염, 베게너 육아 종증(Wegener's granulomatosis), 거대세포 동맥염, 열, 권태감 등) 식욕저하(급성 및 만성 염증성 및 감염성 질환 등) 범발성 혈관내 응고(DIC: disseminated intravascular coagulation) 동맥경화증(아테롬성 동맥경화증) 쇼크 (그램-음성 패혈증 등) 악액질(cachexia) (암, 만성 감염성 및 만성 염증성 질환 등) 이식 거부 반응 및 이식편 vs. 숙주 질환 특발성 유산 방지 |

시토킨 생성에 미치는 IL-10 작용:

hIL-10은 단구세포/대식세포 및/또는 T 림프구에 의해 인터페론- γ (IFN- γ), 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 과립구 대식세포 집락형성 촉진 인자(GM-CSF), 과립구-CSF(G-CSF), IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 및 단구세포 주화학적 폴리펩티드-1 (MCP-1/MCAF)을 포함한 여러 가지 시토킨의 생성을 억제한다(4,5). IL-10은 또한 케모킨 MCP-1/MCAF에 대한 응답으로서의 단구세포의 이동 능력도 억제한다(75). 더욱이, hIL-10은 내인성, 천연 인터로이킨-1 수체 길항약(IRAP)의 생성을 유도하여, 수체와의 결합을 놓고 경쟁함으로써 IL-1 α 와 IL-1 β 를 억제한다(6). IL-8은 IL-1 α 와 IL-1 β 에 의해 고도로 유도 가능하기 때문에, IL-10은 IL-1-수용체 길항 IRAP 생성을 촉진함으로써 IL-8 생성에 대한 그의 억제 효과의 일부를 발휘한다. 이 마지막 메카니즘은 다음에 예시되고 설명되는 바와 같이 본 발명의 매우 중요한 특징이 된다. IRAP는 항-염증 작용을 갖고(9), 류마티스성 관절염에 치료 효과가 있다고 개시되어 있다(10). 또한, IRAP는 패혈증 증후군의 치료에도 효과적인 것으로 입증되었으며, Fisher 등의 연구에서 IRAP 치료 (p=0.015) 병용에 의해 투여량 의존적으로, 28 일간의 생존 혜택이 얻어졌다(11). IRAP는 부분적으로는 그의 항-염증 효과를 IL-8 생성과 같은 케모킨-생성을 억제함으로써 발휘할 수도 있다.

IL-10과 항원 발현:

IL-10은 인간의 단구 세포에 대한 클래스 II MHC 발현이 나타나는 것을 억제한다(8). HLA-DR/DP 및 DQ의 본질적이고 IL-4 또는 IFN- γ 유도성 발현이 hIL-10에 의해 억제되었다(12). 게다가, IL-10으로 예비-인큐베이션된 단구 세포는 IL-4 또는 IFN- γ 에 의한 클래스 II MHC 발현의 후속 유도에 고질적이다. IL-

10은 LPS에 의한 활성화에 이어 인간의 단구 세포에 의한 클래스 II 발현을 억제한다(12,76). LPS 치사량과 함께 IL-10 1 내지 10 mg/ml 투여된 BALB/c 마우스는 죽지 않았다(6).

IL-10은 질소 중간체와 초-과산화물(superoxide) 음이온을 억제한다. IL-10은 또한 IFN- γ 에 의한 활성화에 이어, 대식세포에 의한 반응성 산소 중간체(H_2O_2) 뿐만 아니라 반응성 질소 중간체(NO)를 억제하기도 한다(13).

IL-10과 T세포 활성화:

IL-10은 T 세포 기능/활성에 대한 조절적 효과도 갖는다. 따라서, hIL-10은 CD8+ T 림프구에 대한 강력한 주화학적 인자인 반면에, hIL-10은 CD4+ T 세포에 대한 주화학적은 나타내지 않는다(14). 게다가, IL-10은 α -케모킨 IL-8 뿐만 아니라 β -케모킨 RANTES의 주화학적 시그널에 응답하는 CD4+ T 세포의 능력도 억제한다. hIL-10은 또한 인간의 말초 혈액 T 세포 및 CD4+ T 세포 클론의 증식도 직접 억제한다(14).

치료 고려방안:

WO 96/01318 등에 약속된 이러한 생체내 결과/데이터 및 그외의 데이터는 세포-매개성 및 모노킨-증폭 면역 반응을 조절하는 데 있어서 IL-10의 항상성적인 역할을 강력하게 제시하고, IL-10의 저하된/불충분한 생산 및/또는 활성화로 특징지어지는 질병의 치료에 있어서 IL-10 또는 IL-10과 유사한 활성을 갖는 약물의 광범위한 치료적 응용성이 나타나 있다. 표 1과 2에는 IL-10과 같은 면역-조절체 또는 IL-10-유사 활성을 갖는 면역 조절체가 치료적으로 중요한 효과를 갖는 몇몇 질병들을 나타내었다.

[표 2a]

IL-10-유사 활성을 갖는 면역-조절체가, 그의 IRAP 생성 유도 및/또는 시토킨-생성 및/또는 활성화의 억제 능력에 의해 치료적으로 중요한 효과를 가질 수 있는 몇 가지 질병들(참고문헌 20-74 + 109)

감염 또는 기타 질환에 의해 야기되는 조기 분만 류마티스성 관절염 라임 관절염 (Lyme's arthritis) 통풍 패혈증 증후군 고열 케양성 대장염 또는 전장염 골다공증 시토크갈로바이러스 치주 질환 신염 폐의 만성, 비-감염성 염증 (유육종증 및 흡연자 폐 등) 과립종 형성 간의 섬유증 폐의 섬유증 이식 거부 반응 이식편 vs. 숙주 질환 만성 골수종 백혈병 급성 골수종 백혈병 기타 신생물(종양) 질환 기관지 천식 당뇨병, 타입 I (인슐린 의존형) 동맥경화증/아테롬성 동맥경화증 건선 만성 B 림프구 백혈병 일반적인 여러 가지 면역결핍증 기타 생물학적 응답 변형제 이용에 의한 부작용 파종성 혈관내 응고 전신 경화증

[표 2b]

뇌척수염 폐렴 고-IgE 증후군 (hyper IgE syndrome) 전장염 암 전이 및 성장 후천성 면역 요법 후천성 호흡 곤란증 패혈증 재관류 수술후 염증 기관 이식 탈모

발명의 상세한 설명

IL-10 유사 활성을 갖는 IL-10 상동성 노나펩티드의 개발:

vIL-10 및 hIL-10과는 고도의 상동성을 갖는 반면에, mL-10과는 가능한 상동성이 적은 서열이어야 한다는 원칙에 따라, 9 개 아미노산의 길이를 갖는 hIL-10의 부분 서열이 선택되었다. 활성 노나펩티드인 IT9302가 하기 실시예에 후술된 바와 같이 hIL-10의 일부 면역-억압 활성화와 유사한 면역-억압 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. IT9302는 hIL-10의 C-말단으로부터의 노나펩티드 서열과 일치하며 그의 아미노산 서열은 다음과 같다:

NH_2 -Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn-COOH (SEQ ID NO: 1)

이 노나펩티드 IT9302는 상이한 기능을 강력하게 유도하며 매우 안정하고, 수체에 대한 부정확한 커플링은 불가능한 것으로 추정된다. 일반적으로 9 개 아미노산 폴리펩티드 서열이라면 어떤 단백질에 특정한 것이기 때문에 노나펩티드를 선택하였다. 그러나, hIL-10 맨끝의 6 개 아미노산이 가장 중요한 것들이므로 보인다는 것을 주지해야 한다. 따라서, 아미노산 서열 Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn (SEQ ID NO: 1)의 서브-서열(sub-sequence)을 포함하는 물질 또는 폴리펩티드도 본 발명의 범위내에 포함된다.

마찬가지로 어떤 아미노산 치환체들은 쓰레오닌, 라이신 및 아르기닌이 존재하고 그 사이에 하나의 아미노산이 자리하는 정도의 길이인 한, 본문에 정의된 hIL-10 작용약 물질 활성화에 나쁜 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

본 발명은 다음 서열식에 따른 물질 또는 폴리펩티드의 용도에 관한 것인데:

X_1 - X_2 - X_3 -Thr- X_4 -Lys- X_5 -Arg- X_6 (SEQ ID NO: 22)

여기서,

X_1 는 Ala 또는 Gly이고,

X_2 는 Tyr 또는 Phe이고,

X_3 및 X_4 및 X_5 는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X₆는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되거나, 및/또는 이 펩티드가 사이클화되거나, 및/또는 이 펩티드가 안정화되거나, 및/또는 아미노 종결된 아미노산 잔기가 아실화되거나, 및/또는 카르복시기로 종결된 아미노산 잔기가 아미드화되는 물질 또는 폴리펩티드, 및 상기 서열식을 기초로 하여 모델링된 펩티드 모사체(peptidomimetics)의 IL-1 수체를 IRAP로 블록킹함으로써라고 추정되는 방법에 의해 TNF α 생성을 감소시키기 위한, 및/또는 체장염의 치료하거나 예방하기 위한 의약 조성물 제조용 용도에 관한 것이다.

TNF α 생성을 감소시키거나, 및/또는 체장염을 치료하거나 예방하는 데 유용하다고 여겨지는 추정되는 특정 폴리펩티드의 예는 다음과 같다:

1. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Ile-Lys-Met-Arg-Asn-COOH (SEQ ID NO: 2)
2. NH₂-Ala-Phe-Met-Thr-Leu-Lys-Leu-Arg-Asn-COOH (SEQ ID NO: 3)
3. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Val-Arg-Glu-COOH (SEQ ID NO: 4)
4. NH₂-Gly-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 5)
5. NH₂-Ala-Phe-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 6)
6. NH₂-Ala-Tyr-Ile-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 7)
7. NH₂-Ala-Tyr-Leu-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 8)
8. NH₂-Ala-Tyr-Val-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 9)
9. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Ile-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 10)
10. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Leu-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 11)
11. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Val-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 12)
12. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 13)
13. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Met-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 14)
14. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Val-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO: 15)
15. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Asp-Gln-COOH (SEQ ID NO: 16)
16. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Asp-Glu-COOH (SEQ ID NO: 17).

본 발명은 특히 다음 서열식을 갖는 폴리펩티드:

Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO: 19),

다음 서열식을 갖는 폴리펩티드:

X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO: 20),

다음 서열식을 갖는 폴리펩티드:

X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO: 21),

다음 서열식을 갖는 폴리펩티드:

X₁-X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO: 22)

여기서,

X₁는 Ala 또는 Gly이고,

X₂는 Tyr 또는 Phe이고,

X₃ 및 X₄ 및 X₅는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X₆는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되는 폴리펩티드에 관한 것인데,

아미노산 중에서 한 가지 이상이 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되거나, 및/또는 이 펩티드가 사이클화되거나, 및/또는 이 펩티드가 안정화되거나, 및/또는 아미노기로 종결된 아미노산 잔기가 아실화되거나, 및/또는 카르복시기로 종결된 아미노산 잔기가 아미드화되는 폴리펩티드, 및 상기 서열식을 기초로 하여 모델링된 펩티드 모사체에 관한 것인데, 상기 동족체들은 다음과 같은 특성 중 한 가지 이상을 갖는다:

a) 인체의 단구세포(monocytes)에 의한 자발적인 IL-8 생성의 억제를 유도하고,

- b) 인체의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC: peripheral blood mononuclear cells)에 의한 IL-1 β 유도성 IL-8 생성의 억제를 유도하고,
- c) 인체의 단구세포에 의한 인터로이킨-1 수체 길항 단백질(IRAP)의 생성을 유도하고,
- d) 생체 외에서의 CD8+ 인체 T 림프구의 주화학적 이동을 유도하고,
- e) rhIL-10에 대한 비반응성을 초래하는 인체 CD8+ T 세포를 제감작화시키고,
- f) IL-8에 대한 CD4+ 인체 T 림프구의 주화학적 반응을 억제시키고,
- g) MCAF/MCP-1에 대한 인체의 단구세포의 주화학적 반응을 억제시키고,
- h) IFN- γ 에 의해 자극화된 인체의 단구세포에 대한 클래스 II MHC 분자 발현을 억제시키고,
- i) 배양된 정상적인 인체의 CD4+ T 세포에 의한 IL-4의 생성을 유도하고,
- j) 인체의 혼합 백혈구 반응에 있어서 TNF α 생성을 감소시키고,
- k) 담즙산 유도성 급성 췌장염의 토끼 모델에서 TNF α 및 IL-8를 하향 조절하고, 치료되는 토끼의 폐에서의 중성 친화성 백혈구의 침윤을 감소시킨다.

본 발명의 명세서 및 청구범위에서 'IT9302의 생물학적 활성 한 가지 이상'이라 함은 상기한 바와 같은 특성 중의 한 가지 이상을 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

본 발명이 목적하는 펩티드 중 어떠한 것이라도 아실화 또는 벤조일화 등으로 아실화되는 아미노기 종결된 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 또한, 어떠한 목적 펩티드는 아미드화되는 카르복시 종결된 아미노산 잔기를 가질 수 있다.

본 발명은 또한, 상기한 바와 같은 특성 치환기 이외의 보존적 아미노산 치환 반응, 통상적이지 않거나 비-천연성인 아미노산의 치환 반응, 펩티드의 안정화 반응, 펩티드의 사이클화 반응에 의해 형성되는 펩티드 및 상기 IL-10 길항 펩티드에 기초하여 모델링된 펩티드 모사체의 동족체를 목적으로 한다.

보존적 아미노산의 치환 반응에 기초가 되는 원리는, 임의의 아미노산 쌍들이 한 가지로 다른 나머지를 치환할 경우에, 이 펩티드의 삼차원 구조 및 결합 친화도에 대해 최소한의 변화를 갖도록 하는 호환성 부사슬을 갖는다는 것이다. 보존적 치환 반응의 규칙은 참고문헌 (78)에 기재되어 있다.

본문에서 '보존적(conservative)'이라 함은 (i) 그 변형 가능한 배열구조적으로 중립적(neutral)이어서, 천연 단백질과 비교할 때 변이 폴리펩티드의 삼차원 구조의 변화를 최소화시키도록 고안된 것, (ii) 그 변형 가능한 항원적으로 중립적이어서, 천연 단백질과 비교할 때 변이 폴리펩티드의 항원 결정기의 변화를 최소화시키도록 고안된 것을 의미한다. 배열구조적 중립성은 생물 활성을 보존하는 데 요망되며, 항원 중립성은 본 발명 물질로 치료된 환자나 동물에서 면역 응답을 촉발시키는 것을 피하는 데 요망된다. 비록 그 변형이 배열구조적으로, 그리고 항원적으로 중립적인지를 완벽한 정확성으로 선별해내기는 쉽지 않긴 하지만, 당업자로 하여금 배열구조적으로, 및 항원적으로 중립적인 가능성을 높아지도록 변형할 수 있게끔 해주는 규칙이 존재한다(예컨대, (77) 및 (78) 참조). 좀더 중요한 규칙으로는 다음과 같은 것들이 포함된다: (1) 소수성 잔기의 치환은 항원성에 변화를 덜 일으키는 것과 같은 경향이 있는데, 이는 이들이 단백질 내부에 위치하는 것과 같은 경향이 있기 때문이고(예컨대, Berzofsky(상기 인용) 및 Bowie 등(상기 인용) 참조); (2) 물리화학적으 유사한, 즉, 동일한 의미의(synonymous) 잔기는 배열구조적인 변화를 일으킬 가능성이 적는데, 이는 치환 아미노산이 치환된 아미노산과 구조적으로 동일한 역할을 수행할 수 있기 때문이며; (3) 진화적으로 보존되는 서열의 변형은 구조 배열적으로 해로운 효과를 일으킬 수 있는데, 이는 진화적인 보존이라 함은 서열들이 기능적으로 중요할 수 있음을 시사하는 것이기 때문이다. 변이적 서열을 선별하는 이러한 기본적인 규칙에 더해, 생물학적 활성과 조립된 분자의 배열구조를 확인할 수 있는 분석법이 있다. 배열구조의 변화는 다음 두 가지 이상의 공지된 분석법에 의해 테스트될 수 있다: 단백질의 삼차원 구조의 진화적 연구에 있어서 널리 이용되는 미세성분 고정법(예컨대, (79) 및 (80)); 및 배열구조적-특정적인 일련의 모노클로날 항체에 대한 친화도법(예컨대, (81)). 본 발명의 물질에 대한 생물학적 분석은 하기 실시예에 좀더 상세히 후술하였다.

인간의 단구세포에 의한 자발적인 IL-8 생성의 억제 반응은 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 1에 약술된 바와 같이 테스트된다. 이 물질 또는 펩티드 1 ng/ml가 사용될 때 IL-8 생성이 50% 이하로 억제된다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

인간의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 의한 IL-1 β 유도성 IL-8 생성의 억제 반응은 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 2에 약술된 바와 같이 테스트된다. 이 물질 또는 펩티드 1 ng/ml가 사용될 때 IL-8 생성의 억제 퍼센트가 50% 이상이 된다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

인간의 단구세포에 의한 인터로이킨-1 수체 길항 단백질(IRAP)의 생성은 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 3에 약술된 바와 같이 테스트된다. 이 물질 또는 펩티드 10 ng/ml가 사용될 때 IRAP의 유도가 30 ng/ml 이상이 된다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

생체외에서의 CD8+ 인체 T 림프구의 주화학적 이동의 유도는 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 4에 약술된 바와 같이 테스트된다. 이를 10 ng/ml 농도로 사용할 때 이 물질 또는 펩티드의 효능이 존재한다면, 즉 2 이상이 된다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

rhIL-10에 대한 비반응성을 초래하는 인간의 CD8+ T 세포의 제감작화는 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 5에 약술된 바와 같이 테스트된다. 이 물질 또는 펩티드로 세포를 예비-인큐베이션함으로써, 실질적으로 전체적인, rhIL-10에 대한 CD8+ 세포의 반응성의 억제 반응이 야기된다

면, 즉 이 물질 또는 펩티드를 10 ng/ml 농도로 사용하여 대략 1 정도, 예컨대 0.8-1.2 정도의 수치가 얻어진다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

IL-8에 대한 CD4+ 인체 T 백혈구의 주화학적 반응의 억제 반응은 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 6에 약술된 바와 같이 테스트된다. 이 물질 또는 펩티드를 CD4+ 인체 T 백혈구의 현탁액에 첨가함으로써, 실질적으로 전체적인, IL-8에 대한 CD4+ 세포 반응의 억제 반응이 야기된다면, 즉 이 물질 또는 펩티드를 10 ng/ml 농도로 사용하여 대략 1 정도, 예컨대 0.8-1.2 정도의 수치가 얻어진다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

MCAF/MCP-1에 대한 인체 단구세포의 주화학적 반응의 억제 반응은 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 7에 약술된 바와 같이 테스트된다. 이 물질 또는 펩티드를 인간의 단구세포의 현탁액에 첨가함으로써, 실질적으로 전체적인, MCAF/MCP-1에 대한 이 단구세포의 주화학적 반응의 억제 반응이 야기된다면, 즉 이 물질 또는 펩티드를 10 ng/ml 농도로 사용하여 대략 1 정도, 예컨대 0.8-1.2 정도의 수치가 얻어진다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

IFN- γ 에 의해 자극된 인간의 단구세포에 대한 클래스 II MHC 분자 발현의 억제 반응은 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 8에 약술된 바와 같이 테스트된다. IFN- γ 은 세포수내에서 MHC II 항원 발현을 36.8%에서부터 58.4%까지의 범위 정도로 상향 조절하고, 이같은 자극을 rhIL-10 10 ng/ml에 의해 25.25%까지 하향 조절되고, IT9302 1 ng/ml에 의해서는 31.25%까지 하향 조절된다(도 12). 이 물질 또는 펩티드가 1-10 ng/ml의 양으로 첨가되어, 단구세포에 대한 클래스 II MHC 발현을 차단하거나 비자극화된 레벨까지 하향 조절한다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

이 물질 또는 펩티드를 첨가함으로써 10 ng/ml 정도의 물질 또는 펩티드 농도에서 IFN- γ 자극화 효과를 차단시킬 수 있다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

배양된 정상적인 인체 CD4+ T 세포에 의한 IL-4 생성의 유도는 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 9에 약술된 바와 같이 테스트된다. 이 물질 또는 펩티드를 첨가함으로써, 10 ng/ml 정도의 이 물질이나 펩티드의 농도에서 CD4+ T 림프구에서 IL-4의 생성을 유도한다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

인체 혼합 백혈구 반응에서 TNF α 생성의 감소는 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 10에 약술된 바와 같이 테스트된다. 이 물질 또는 펩티드를 첨가함으로써, 10 ng/ml 정도의 이 물질이나 펩티드의 농도에서 24 시간 이내에 인체 혼합 백혈구 반응에서 TNF α 의 생성을 현저히 감소시킨다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

담즙산 유도성 급성 췌장염에 걸린 토끼 모델에서 TNF α 및 IL-8의 하향 조절 및 치료되는 토끼의 폐에서 중성 친화성 침윤의 감소는 IT9302 대신에 합성된 물질이나 펩티드를 이용하여, 하기 실시예 14에 약술된 바와 같이 테스트된다. 이 물질 또는 펩티드를 100 μ g/kg 정도의 농도로 첨가할 경우에, 이 물질 또는 펩티드를 첨가함으로써 테스트 동물의 사망률을 현저히 감소시킨다면, 이 물질 또는 펩티드는 본 발명의 범주에 포함되는 것이다.

따라서, 본 발명의 중요한 일례는 한 가지 이상의 아미노산 잔기이 다양한 아미노산 잔기로 치환되는 폴리펩티드, 및/또는 한 가지 이상의 아미노산 잔기가 삭제 또는 첨가되어 이 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열로 이루어지거나, 하기한 바와 같은 상기 아미노산 서열의 서브-서열로 이루어지지만, 상기한 바와 같은 실질적으로 hIL-10 길항 활성을 갖는 폴리펩티드를 초래하게 되는 폴리펩티드에 관한 것이다.

합성 펩티드의 동족체는 또한, 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 개별적인 잔기들을 치환시킴으로써 제조할 수 있다. 생물학적 호라성을 갖는 펩티드의 서열은 본래 천연적으로 생성되는 20 개의 L-아미노산잔기로 이루어진 단백질로부터 유도된다. 하지만, 합성 펩티드를 구성하기 위해 사용되는 화학적 합성 공정은 D-아미노산, β -아미노산, N-치환된 아미노산, 드문 경우에 천연 아미노산 또는 비-천연성 합성 아미노산 동족체를 포함하는 선택적인 잔기로의 치환이 가능하다(93). 본 발명에 유용한 아미노산의 예는 다음과 같은데, 이에 국한되는 것은 아니다:

| | |
|------|---------------------|
| Aad | 2-아미노아디프산 |
| bAad | 3-아미노아디프산 |
| bAla | 베타-알라니, 베타-아미노프로피온산 |
| Abu | 2-아미노부틸산 |
| 4Abu | 4-아미노부틸산, 피페리딘산 |
| Acp | 6-아미노카프로산 |
| Ahe | 2-아미노헵타노산 |
| Aib | 2-아미노이소부틸산 |
| bAib | 3-아미노이소부틸산 |
| Apm | 2-아미노피멜산 |
| Dbu | 2,4-디아미노부틸산 |
| Des | 데스모신 |
| Dpm | 2,2'-디아미노피멜산 |
| Dpr | 2,3-디아미노프로피온산 |

| | |
|-------|---------------|
| EtGly | N-에틸글리신 |
| EtAsn | N-에틸아스파라긴 |
| Hyl | 하이드록시라이신 |
| aHyl | 알로-하이드록시라이신 |
| 3Hyp | 3-하이드록시프롤린 |
| 4Hyp | 4-하이드록시프롤린 |
| Ide | 이소데스모신 |
| alle | 알로-이소로이신 |
| MeGly | N-메틸글리신, 사르코신 |
| Melle | N-메틸이소로이신 |
| MeLys | 6-N-메틸로이신 |
| MeVal | N-메틸발린 |
| Nva | 노르발린 |
| Nle | 노르로이신 |
| Orn | 오르니틴 |

빈번하지 않지만 추가적인 예로서, 비-천연성 아미노산 또는 구축 블록(building blocks)이 다음과 같이 열거되어 있는데, 이에 국한되는 것은 아니다: Novabiochem 1994/95 카탈로그(Calbiochem-novabiochem AG, Weidenmattweg 4, CH-4448 Laufelfingen/switzerland), pp.65-125; Bachem Feinkemikalien AG 1995 카탈로그(Bachem Feinkemikalien AG, Hauptstrasse 144, CH-4416 Bubendift/Switzerland), pp.753-831; Neosystem Laboratoire 카탈로그 1997/98(Neosystem Laboratoire, 7 rue de Boulogne, 67100 Strasbourg, France), pp.131-176.

상기한 바와 같은 선택적인 잔기들은 (a) 화학적으로 반응성이 있는 잔기들을 대체하고 효소 분해 반응 및 단백질 가수분해 반응 등에 대한 합성 펩티드의 안정성을 향상시키는데, (b) 합성 펩티드의 검출에 유용한 분석용 표지를 제공하는 데, 및 (c) IL-10 수체에 대한 펩티드의 결합 친화도를 증가시키거나 감소시킴으로써, 예컨대, 특정 화학 결합의 회전 자유도를 감소시키는 배열구조적 구축들을 도입함으로써 합성 펩티드의 생물학적 활성을 조절하는 데 이용할 수 있다.

상기 서열식에서 Thr, Lys 또는 Arg 잔기 한 가지 이상을 상기한 바와 같은 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환시킨 추가 물질도 본 발명의 범위내에 포함된다. 본 발명 명세서 및 청구 범위에는 모든 폴리펩티드 서열은, 명시하지 않은 경우에도 또한, N-종결부로부터 C-종결부 말단까지의 통상적인 포맷으로 기재되어 있다.

펩티드 및 그의 동족체의 합성 방법은 고체상 펩티드 합성(SPPS: solid-phase peptide synthesis)이 선택된다. 이 방법은 1963년 Merrifield (100)에 의해 개시되었으며, 그 이후로 다수의 펩티드들이 이 기술 방법에 의해 합성되어 왔다. 펩티드 및 단백질의 통상적인 화학적 합성 방법에 대한 우수한 논문이 S.B.H. Kent에 의해 개시되어 있다(101).

실제로는, 펩티드들은 단계별 SPPS에 의해 조립된다. 부사슬-보호 반응성 유도체가 필요하다면, N-알파-보호된 형태로 C-종결된 아미노산이 직접적으로나, 유기 용매에 부풀린, 폴리머 수지 등의 고체 지지체에 대한 적당한 링커(linker)를 이용해서 공유 결합적으로 커플링된다. 그 후에, N-알파-보호기를 제거하고 바람직한 서열에 따라 후속적으로 보호된 아미노산이 단계별 방식으로 첨가된다.

완전한 펩티드 사슬을 조합한 후에, 부사슬 보호기를 제거하고, 펩티드를 수지로부터 분리시키는데, 이를 동시에 할 수도 있고 단계별로 할 수도 있다.

수년 동안에 개시된 몇몇의 다양한 커플링 기술 방법 중에서, 두 가지가 현재 일반적으로 사용되는데, 다양한 N-알파-보호기를 기초로 하고 부사슬 보호기를 적절하게 설정하는 것이다. Merrifield는 N-알파-보호기로서 tert-부틸록시-카르보닐기(Boc)를 사용한 반면에, 9-플루오로-에닐메톡시카르보닐기(Fmoc)가 Carpino 및 Han에 의해 도입되었다(102). 고체 지지체, 부사슬-보호기, 활성화 방법, 분해 방법, 장치 및, 분석 및 측정 방법을 선택하는 것을 포함한, 이 두 가지 기술 방법의 실제적 응용은 몇몇 모노그래프에 개시되어 있는데, 그 중에서 다음과 같은 것들을 들 수 있다: Stewart 및 Young(103), Atherton 및 Sheppard(104), 및 Pennington 및 Dunn(105). 본 발명의 통상적이지 않거나 비-천연성인 아미노산을 갖는 펩티드 및 그의 동족체는 이같은 원칙에 따라 편리하게 합성된다.

합성의 선형 펩티드의 동족체는 그 구조를 사이클릭 형태로 화학적으로 전환시킴으로써 제조될 수 있다. 선형 펩티드의 사이클화 반응은 표적 단백질에 의한 펩티드의 결합 친화도를 증가 또는 감소시킴으로써 생물학적 활성을 조절할 수 있다(94). 선형 펩티드들은 매우 신축적이어서, 용액내에서 다수의 다양한 배열 구조를 가지는 경향이 있다. 사이클화 반응은 이용가능한 배열 구조의 수를 한정시켜, 좀더 활성이 크거나 작은 펩티드 구조를 갖도록 작용한다. 합성 펩티드의 면역유전학적 특성은 실험적으로 관찰되는 용액내에서의 배열구조의 선호도와 상관 관계를 맺어 왔다(95). 면역유전학적 특성에서의 차이는 사이클릭 펩티드에 대한 특정 항체의 결합 친화도에서의 차이를 나타내는 것이 될 수도 있다.

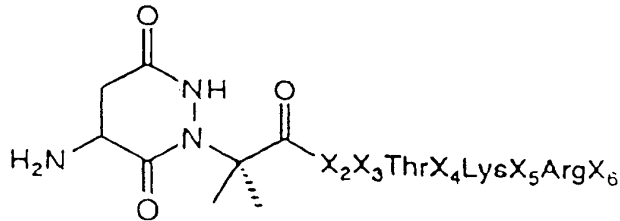
자유로운 N-종결부 및 C-종결부 말단들 사이에 펩티드 결합을 형성시키던지(호모데릭 사이클로펩티드), 아미노산 골격(backbone) 및/또는 부사슬기 사이에 새로운 공유 결합을 형성시킴으로써(헤테로데릭 사이클로펩티드) 선형 펩티드의 사이클화 반응은 달성된다(93). 후자의 사이클화 반응은 선택적인 화학 기술

방법을 이용하여 공유 결합을 형성하는데, 디설파이드, 락톤(또한, 둘다 천연 펩티드에 존재할 수도 있음), 에테르 또는 티오에테르를 예로 들 수 있다. 5 개 이상의 잔기의 선형 펩티드가 비교적 용이하게 사이클화될 수 있다. 펩티드의 중앙 4 개의 잔기에서 베타-턴(β -turn) 배열구조를 형성하는 성향이 호모- 및 헤테로데릭 사이클로펩티드의형성에 유리하다. N- 또는 C-종결 말단부에 프롤린 또는 글리신 잔기가 존재하는 것이 또한, 사이클로펩티드를 형성하는 데, 특히 길이가 6 개의 잔기 미만인 선형 펩티드로부터 사이클로펩티드를 형성하는 데 유리하다.

디설파이드 결합을 형성하기 위한 원칙 및 그외의 펩티드 사이클화 반응을 위한 원칙은 Pennigton 및 Dunn(105), 7장 및 11장에 개시되어 있는 바를 예로 들 수 있다.

펩티드 모사체 기술 방법은 펩티드의 분자 모사체의 디자인이 된다. 이러한 분자를 성공적으로 디자인할 수 있는 능력 여부는 이 선형 펩티드 서열의 특성 및 IL-10 수체에 대해 제시되는 배열구조를 이해하는 데에 따라 좌우된다. 이 모사체의 합성은 좀더 큰 생물학적 활성, 개선된 용해도 및 안정도를 나타내는 화합물을 제공할 수 있다(96).

일례로서, IL-10의 C-종결부가 α -나선형으로 존재한다(98)는 공지 사실과 함께, US 5,446,128 (97)에 개시되어 있는 시토킨의 C-종결 펩티드 모사체에서 α -나선형 주형(α -helical templates)을 기초로 하여 다음 펩티드 모사체가 유도되었다.



펩티드의 N-종결부에 이같은 작은 분자의 부착에 의해, 합성 펩티드의 α -나선형 구조가 안정화되고, 이 펩티드는 단백질의 가수분해에 대한 내성이 커진다. US 5,446,128에 개시되어 있는 바를 기초로 하여 그외의 펩티드 모사체를 유도할 수도 있다. X_1 이외의 다른 잔기에서 치환이 일어난 이러한 물질들, 및/또는 상기 서열식으로 나타낸 N-종결 분자 이외의 다른 잔기에서 치환이 일어난 이러한 물질들도 본 발명의 범위에 속한다.

본 발명에 따라서는, '펩티드 동족체'라 함은 상기 서열식들을 기초로 하여 유도되고, IT9302와 유사한 생물학적 활성 중 한 가지 이상을 나타내는, 의약적 활성을 띠고 의약적으로 허용되는 화합물을 지칭하는데, 이러한 동족체의 유도체, 특히 의약적으로 허용되는 염, 에스테르 및 그의 용매 화합물이 포함된다.

다음과 같은 용어들은 Wo 96/01318에 개시된 바와 같이 정의된다: '시토킨', '림포킨', '인터로킨', '모노킨' 및 '폴리펩티드'.

본 발명의 흥미를 갖는 일례는, 아미노산의 수가 총 6, 7, 8, 9 또는 10 개로부터 약 100 개의 아미노산 까지에 이르는, 예컨대 11, 12, 13, 14 또는 15 개의 아미노산, 또는 20 개의 아미노산이나 30 개의 아미노산과 같이 좀더 큰 것에 이르는 본 발명의 폴리펩티드에 관한 것이다.

본 발명의 바람직한 일례에는, 물질 또는 폴리펩티드가 실질적으로 정제된 형태로 사용된다. 이를 얻기 위해서, 폴리펩티드의 정제 방법이 필요할 수도 있다. 폴리펩티드를 정제하기 위해 이용되는 방법은 다음과 같이 예를 들 수 있다: (i) 항체와의 면역침착법(immunoprecipitation) 또는 항체와의 친화도 크로마토그래피법, (ii) 알맞은 리간드와의 친화도 크로마토그래피법, (iii) 겔 여과법, 이온 교환 또는 고성능 액체 크로마토그래피법(HPLC) 또는 상기한 바 중에서 어느 것의 유도제법 등의 기타 크로마토그래피법, (iv) 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법, 변형 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법, 아가로오스 겔 전기 영동법 및 등전 집중법과 같은 전기 영동법, 및 (v) 그 외의 어떠한 특정 용해법 및/또는 정제법이 있다.

본 발명의 물질 또는 폴리펩티드와 의약적으로 허용되는 부형제로 이루어진 의약 조성물 또한 본 발명의 범위내에 속한다. 이 조성물은 예컨대, 정제된 합성 단백질 또는 정제된 재조합 폴리펩티드로 이루어질 수도 있다.

본 발명에 사용되는 IL-10 작용약은 의약적으로 허용되는 배지, 예컨대, 식염수, 인산염 완충 용액(PBS), 링거액, 덱스트로오스/식염수, 행크액(Hank's solution) 및 글루코오스와 배합물로서 제조될 수도 있다. 이 조성물은 생리 조건에 근접하기 위해 필요한 의약적으로 허용되는 보조 물질, 예컨대 완충제, 강장성(tonicity) 조절제, 습윤제, 세정제 등을 함유할 수 있다. 또한, 첨가물로는 추가 활성 성분, 예컨대 살균제 또는 안정제를 함유할 수도 있다. 환자에게 투여되는 양은 투여 물질, 예방 또는 치료와 같은 투여 목적, 호스트의 상태, 투여 방법 등에 따라 다양하게 될 것이다.

이 의약 조성물은 전형적으로 경피 투여 또는 비경구 투여, 예컨대 피하 주사또는 근육 주사로 투여된다. 또한, 경구 투여 형태가 바람직하다면, 이 조성물을 위장 경로를 경유하도록 변형시킬 수도 있다. 이 조성물은 예방 및/또는 치료 요법으로 사용될 수 있다.

국부 투여에 알맞은 본 발명의 의약 조성물은 예컨대, 크림, 연고, 로션, 린네먼트(linements), 젤, 용액, 현탁액, 페이스트, 스틱, 스프레이 또는 분말 등이 될 수 있다. 이 조성물은 예컨대, 패드, 고약 또는 스트립 등에 주입 또는 분산시킬 수도 있으며, 1 일 1-10 회 정도로 편리하게 투여된다.

국부 조성물은 일반적으로, 이 조제물의 총 중량을 기초로하여 활성 성분 1-80 중량%, 예컨대 활성 성분 0.001-25% w/w, 예컨대 0.1-10%, 0.5-5% 또는 2-5% 정도로 이루어질 것이다. 이 조성물은 국부 투여용으로 통상 사용되는 의약 부형제로 통상적인 의약 조제 방법에 따라 배합될 수 있다. 조성물에 사용될 수

있는 물 이외의 기초제는 연화제, 용매, 습윤제, 밀도 증강제 및 분말과 같은 고체 또는 액체를 포함할 수 있다.

이 조성물의 pH는 4-8 정도가 바람직하긴 하지만, 대체로 3-9와 같이 매우 광범위하게 될 수도 있다. 바람직한 pH를 얻을 수 있도록 통상적인 완충제를 사용할 수도 있다.

예를 들면, 경피 투여용 조성물은 살리실산 0.05%를 함유한 Moistion's 중성 크림(the pharmacy of Å rhus Kommnehospital)과 같은 크림 1 g에 용해된 물질 1 mg을 함유할 수 있으며, 피부상의 플라스틱 하에서 0.4-0.5 mg의 양으로 투여될 수 있다. 이 조성물은 하기 실시예 16 및 17에서 사용된다.

의약 조성물은 선택적으로 정맥내로 주사될 수도 있다. 따라서, 본 발명은 허용 가능한 담체, 바람직하게는 수용성 담체에 용해되거나 현탁화된 IL-10 작용약 물질로 이루어진 조성물을 제공한다. 이 조성물은 통상적인 멸균법에 의해 멸균화되거나 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액은 이용할 수 있도록 현탁대로 포장하거나, 동결건조시키는데, 이 동결 건조 제제는 투여되기 전에 멸균 수용성 담체와 배합된다. IL-10 작용약은 또한, 표준 화학 치료제와 같은 2차 생물학적 활성제로 투여될 수도 있다. 이러한 작용제는 빈 크리스틴(vincristine), 다우노르빈신(daunorubicin), L-아스파라긴나제(L-asparaginase), 미톡산트론(mitoxantrone) 및 암새크린(amsacrine)을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

치료 요법으로의 적용에 있어서는, 이 의약 조성물을 '치료에 유효한 투여량'으로 정의된 바와 같이, 원하는 효과가 나타나기에 충분한 양을 환자에게 투여한다. IL-10 작용약의 치료에 유효한 투여량은, 예컨대 이 치료법이 행해지는 특정 용도, 투여 방법, 환자의 증상 및 건강, 및 담당 의사의 판단 등에 따라 달라질 것이다. 예를 들면, 연속 주사용 투여량은 전형적으로 500 ng/kg/day와 50 µg/kg/day 사이가 될 것이다. 이같은 투여량은 인체에서 IL-10의 무작위적 대조구 시험을 기초로하여 산출된 것이다(90).

의약 배합물에서의 IL-10 작용약의 농도는 광범위하게 변화될 수 있는데, 즉, 약 10 µg~5 mg/ml 정도, 바람직하게는 약 100 µg~2 mg/ml 정도로 변화될 수 있다. 이 농도는 대개 선택된 투여 방법의 특정 유형에 따라서, 유체의 부피, 점도 등에 의해 우선적으로 정해질 것이다. 따라서, 정맥 주사용의 전형적인 의약 조성물은 텍스트로스/식염수 용액 250 ml와 IL-10 작용약 2.5 µg을 함유하도록 구성될 수 있다.

고체 조성물로는, 통상적인 비독성 고체 담체를 사용할 수 있는데, 예컨대 마니톨, 락토스, 전분, 마그네슘스테아르산염, 나트륨사카린산염, 활석, 셀룰로오스, 글루코오스, 슈크로오스, 탄산마그네슘 등의 의약 등급품을 포함한 것들을 사용할 수 있다. 경구 투여용으로, 의학적으로 허용되는 비독성 조성물을 상기한 바와 같은 담체 등과 같은 정상적으로 사용되는 부형제와 활성 성분을, 즉 IL-10 작용약 물질을 일반적으로 10~95%, 바람직하게는 25-75% 정도로 혼합함으로써 생성시킨다.

에어로졸 투여용으로는, IL-10 작용약이 계면활성제와 포사약(propellant)과 함께 미세하게 분화된 형태로 공급되는 것이 바람직하다. IL-10 작용약의 전형적인 퍼센트 농도는 0.01~20 중량%, 바람직하게는 1~10 중량%가 된다. 물론 계면활성제는 비독성이어야 하며, 포사약에 용해되는 것이 바람직하다. 대표적인 이러한 작용제는 카프로산(caproic), 옥타노산(octanoic), 라우르산(lauric), 팔미트산(palmitic), 스테아르산(stearic), 리놀산(linoleic), 리놀렌산(linolenic), 올레스테르산(olesteric) 및 올레산(oleic) 등의 6~22 개의 탄소를 함유하는 지방산과 지방족 다가알콜과의 부분 에스테르 또는 에스테르 또는 그의 사이클릭 무수물, 예컨대, 에틸렌글리콜(ethylene glycol), 글리세롤(glycerol), 에리트ρί톨(erythritol), 아르비톨(arbitol), 마니톨(manitol), 소르비톨(sorbitol), 소르비톨에서 유도된 헥시톨 무수물(hexitol anhydride), 및 이 에스테르의 폴리옥시에틸렌 및 폴리옥시프로필렌 유도체를 들 수 있다. 혼합 또는 천연 글리세리드와 같은 혼합 에스테르가 사용될 수 있다.

계면활성제는 이 조성물의 0.1~20 중량%, 바람직하게는 0.25~5 중량%로 함유될 수 있다. 일반적으로 이 조성물의 나머지는 포사약이 된다. 액화 포사약은 전형적으로 대기 하에서는 기체이며, 가압하여 응축된 것이다. 적절한 액화포사약은 부탄 및 프로판과 같은 탄소원자 5개 이하를 함유하는 저급 알칸이 되고, 바람직하게는 불소 치환된 또는 불화 염소 치환된 알칸이 된다. 상기한 것들의 혼합물을 사용하는 것도 가능하다. 에어로졸을 생산하는데 있어서, 적절한 밸브가 장착된 용기를 미세하게 분화된 폴리펩티드와 계면 활성제를 함유하는 적절한 포사약으로 채운다. 따라서, 이 성분들은 밸브의 동작에 의해 방출될 때까지 고압 유지된다.

혈청 반감기를 연장하기 위하여, IL-10 작용약을 캡슐로화하거나, 리포솜의 루멘(lumen)에 주입하거나, 콜로이드로 제조하거나, 폴리펩티드의 반감기를 연장시킬 수 있는 그 외의 통상적인 기술 방법을 사용할 수 있다. 따라서, 어떤 실시예에서는, IL-10 작용약을 리포솜으로 캡슐화할 수 있다. 예컨대, (83), (84), (85) 및 (86)에 개시된 바와 같이, 다양한 방법들을 리포솜 제조용으로 이용할 수 있다.

상기한 바와 같이, IT9302 및 그의 동족체 및 변이체가 상기 병리학적인 이상 증상에 연고나된 것으로 알려진 시토킨의 효과를 예방하는 데 유용하다고 알려져 있다.

따라서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 동족체 또는 유도체를 이용한 치료법이 가능하다고 여겨지며, hIL-10 및/또는 IRAP의 치료가 효과적이라고 기대되는 모든 질병에 대해 연구될 필요가 있다(상기한 바와, 표 1 및 2 참조).

도면의 간단한 설명

도 1은 IT9302가 정제된 배양 인체 단구세포에 의한 자발적인 IL-8의 생성을 억제시키는 것을 나타낸 다이어그램이다.

도 2는 IT9302가 인체 말초 혈관 단핵 세포에 의한 IL-1 유도성(1 ng/ml) IL-8의 생성을 억제하는 것을 나타낸 다이어그램이다.

도 3은 IT9302 자극된 인체 단구세포에 의한 IRAP 생성을 나타낸 도면이다.

도 4는 IL-10 자극된 인체 단구세포에 의한 IRAP의 생성을 나타낸 도면이다.

도 5는 CD8+ T 세포에 대한 IT9302의 주화학적 활성을 나타낸 도면이다.

도 6은 IL-10(10 ng/ml) 유도된 주화학적성에 대한 CD8+ T 세포의 비반응성을 야기시키는, IT9302에 의한 CD8+ T 세포의 제감작화를 나타낸 도면이다.

도 7은 IT9302에 의한 CD4+ T 세포에 대한 IL-8 활성의 억제를 나타낸 도면이다.

도 8은 IT9302가 MCAF/MCP-1 유도된 단구세포 주화학적성을 억제한다는 것을 나타낸 다이어그램이다.

도 9는 ECL-웨스턴 블롯팅(Western Blotting)에 의해, CD4+ T 세포 시도졸 단편들 (fractions)에서의 IL-4 생성을 나타낸 도면이다.

도 10은 ECL-웨스턴 블롯팅에 의해, 인체 혼합 림프구 배양 시도졸 단편들에서의 TNF- α 생성을 나타낸 도면이다. TNF- α 웨스턴 블롯팅은 Materials and Methods에 기재된 IL-4와 같이 실시하였는데, 토끼 anti-인체 TNF- α 항체(Pepro Tech. Inc., London, England) 및 호오스-래디쉬 과산화효소-표지된 이차 항체(horse-radish peroxidase-labelled secondary antibody: Cat.no. P217, Dako, Denmark)를 이용하여 실시하였다.

도 11은 IL-10 및 IT9302에 의한 T 세포 증식의 조절을 나타낸 도면이다.

도 12은 인체 단구세포에 대한 HLA-DR 발현을 나타낸 도면이다(플로우-시토메트리: flow-cytometry).

도 13은 총 백혈구 카운팅에 의해 나타낸 것으로, LPS 유도된 속 및 백혈구감소증이 IT9302에 의해 조절되는 것을 나타내는 도면이다.

도 14는 체장염을 유발시키기 전에 쥐(murine)의 IT9302를 토끼에게 주사하는 것이 백혈구감소증을 예방한다는 것을 나타내는 도면이다.

실시에

물질 및 제조 방법

시토킨 및 화학 유도제(chemoattractants)

재조합 hIL-10을 Pero Tech Inc., NJ.(Cat. No. 200 10)으로부터 구했다. 재조합 hIL-1 β 및 재조합 hIL-8을 일본 오사카의 Dainippon Pharmaceutical Company에서 증여받았다. 배양 배지는, Limulus Amoebocyte Lysate 분석(Sigma E-Toxate Kit Cat. No. 210-A1)에 따라 LPS가 없는, RPMI 1640 GIBCO를 사용하였다. rhMCAF/MCP-1은 일본의 카나자와의 Kouji Matsushima 교수로부터 증여받았다.

백혈구의 화학 조성 분석

T 세포의 화학 조성

CD4 항원이나 CD8 항원 둘 중 한 가지로 표시되는 것이 특징인 CD4+ 및 CD8+ T 림프구의 서브-세트(subset)를 정상 제공자(normal donors)의 헤파린 처리된 혈액으로부터 정제하였다. 따라서, Hanks 평형 염 용액(HBSS) 1 : 1로 헤파린 처리된 혈액 100 mL를 희석하여, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 이 혈액으로부터 정제한 후에, Lymphopac™(Nycomed Pharma, Oslo, Norway)에서 세포를 층분리시켜 2000 rpm으로 20 분 동안 그레디언트(gradient) 원심 분리하였다. 이 단핵 세포들을 HBSS로 3 회 씻어주고, 이 세포 펠릿(cell pellet)을 1%의 송아지 태아 혈청을 함유하는 HBSS 4 mL로 희석시키고, 모노클론(monoclonal) 항체로 코팅된 다이아비드(Dynabead)를 사용하여 4 °C에서 CD4 또는 CD8 항원에 저장하였다(다이아비드 M-450 CD4 Cat.No. 111.16, 다이아비드 M-450 CD8 Cat. No. 111.08, DETACHaBEAD Cat.No. 125.04). 비드 : 세포의 비율은 10 : 1이었으며, 인큐베이션 시간은 1 시간이었다. 이 비드들은 제조자의 지시에 따라 폴리클론의 anti-마우스 항체를 첨가하여 분리시켰다.

주화학적성은 상기한 바와 같이(ref. 3과 ref. 14) 48-웰 마이크로 챔버 테크닉(Neuroprobe, Rockville, MD)으로 분석하였다. 화학 유도제(chemoattractants)는 RPMI 1640(GIBCO Cat.No. 61870-010)에 1%의 멸균 여과 송아지 태아 혈청으로 희석시키고 25 μ l 하위(lower) 챔버에 보관하였다. T 세포 주화학적성을 측정하는 경우에, T 세포(5×10^6 /mL)는 배지에 현탁액화하고, 50 μ l를 타입 IV 콜라겐 (Sigma Cat. No. C 0543)으로 코팅된, 5 μ m 공극 크기의 폴리카보네이트 필터로서, 폴리비닐피롤리돈이 없는 필터(Nucleopore Corp., Pleasanton, CA)에 의해 하위 챔버로부터 분리되어 상위(upper) 챔버에 놓았다. 세포들을 37 °C에서 5% CO₂로 2 시간 동안 이동시켰다. 그 후에, 필터를 조심스럽게 제거하고, 70%의 메탄올로 고정시켜 쿠마스 브릴리언트 블루(Coomas's Brilliant Blue)로 5 분 동안 염색하였다. 디지털 분석용 컴퓨터 시스템에 연결되어 주화학적 이동을 관찰측정하기 위한 소프트웨어에 의해 지원되는 현미경용 비디오 카메라를 사용하여, 이 필터의 하위 표면에 붙어 있는 세포들의 면적을 측정해서 이 세포들을 산출하였다. 12,000~13,000 세포들에 해당하는 약 5% 정도의 T 세포들이 자발적으로 이동하였는데, 날짜별로 달라지긴해도 같은 날의 실험에서는 그 차이가 거의 없다. 따라서, 상기한 바와 같이(ref. 3와 ref. 14), 자발적인 이동을 반영하는, 샘플에서의 세포 이동 수와 음성 대조군(ne-gative control)에서의 수의 비로서 이 결과들을 보고하는 것이 채택되었다. 이 비율은 주화학적 지수(CI)로서 인용되는 것이다. 모든 샘플들은 삼중으로 분석되었으며, 각각의 웰에서의 세포 이동이 면적의 평균치를 산출하기 전에 세 분야에서 산출되었다. 몇몇 실험에서는 주화학적막(chemotaxis membrane)이 콜라겐으로 코팅되어 있지 않았으므로, 본 분석 시스템에서는 세포의 이동이 화학 조성 챔버의 하위 웰의 바닥으로 떨어질 것이다.

첫 번째 실험에서는, 하위 챔버에 첨가되는 일련의 IT9302 희석물을 테스트하고 상기한 바와 같이 주화학적성을 측정함으로써, CD8+ T 세포에 대한 IT9302의 주화학적 활성에 관한 작업을 수행하였다.

두 번째 실험에서는, rhIL-10(10 ng/ml)에 대한 반응으로서의 CD8+ T 세포의 이동에 대한 IT9302의 제감작화 성능을, 주화학적성에 관한 실시 30 분 전에 IT9302를 표적 세포에 첨가함으로써 연구하였다. IT9302

를 연속적인 농도로 첨가하였으며 rhIL-10의 주화학적 반응을 상기한 바와 같이 측정하였다.

세 번째 실험에서는, rhIL-8(10 ng/ml)에 대한 CD4+ T 세포의 주화학적 반응을 억제하는 IT9302의 성능을, 주화학성에 관한 실시 30 분 전에 IT9302를 표적 세포에 첨가함으로써 연구하였다. IT9302를 연속적인 농도로 첨가하였으며 rhIL-8의 주화학적 반응을 상기한 바와 같이 측정하였다.

단구세포의 주화학적

단구세포의 주화학적은 T 세포의 경우에서 상기한 바와 같은 Boyden 챔버 장치를 사용하여 측정하였다. 화학 유도제 MCAF/MCR-1을 RPMI 1640 배지에 0.5% BSA로 희석시키고 10 ng/ml의 농도로 하위 챔버에 첨가하였다. 표준 플라스틱 부착 기법 (standard plastic adherence technique)에 의해 정제된, 정상 인체 PBMC로부터 상기한 바와 같이 얻어진 단구세포를 RPMI 1640 배지에 0.5% BSA로 현탁액화시킨 후에, IT9302의 존재 하에서 다양한 농도로 30 분 동안 인큐베이션시켰다. 그 후에, 이 세포들을 10^6 세포/ml 농도로 상위 주화학적 챔버에 첨가하였다. 상위 및 하위 챔버들은 8 μ m 공극 크기를 갖는 폴리비닐피롤리돈이 없는 폴리카보네이트 필터 (Nucleopore, Pleasanton, CA)에 의해 분리되었다. 이 챔버는 37 °C로 90 분 동안 인큐베이션되었다. 이동 세포를 함유하는 막을 상기한 바와 같이 처리하고 상기한 바와 같은 방법에 의해 주화학적 지수를 측정하였다.

정상 인체 말초 혈관 단핵 세포(PBMC)에 의한 IL-8의 생성

PBMC는 정상 제공자의 헤파린 처리된 혈액으로부터 정제되었다. Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Norway)로 그레디언트 원심 분리를 실시한 후에, 1%의 멸균 여과 가열 비활성화된(heat-inactivated) 송아지 태아 혈청과 페니실린(10,000 IE/ml), 스트렙토마이신(10 mg/ml) 및 젠타마이신(2.5 mg/ml)을 함유하는 LPS 없는 RPMI 1640 배지(Gibco Cat.No. 6187-010)에서 2×10^6 cells/ml로 이 단핵 세포를 희석시켰다. 세포들을 24 웰의 Nunc Micro Plates(Nunc, Denmark)에서 다양한 농도의 IT9302(0.1 μ g, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng/ml)로 24 시간 동안 배양시켰다. 24 시간 동안의 인큐베이션 후에, 또다른 투여량의 IT9302를 1 회 추가 첨가하고, 1 시간 후에 r-hIL-1B(1 ng/mL)를 이 세포 배양물에 첨가하였다. 총 48 시간 동안 인큐베이션한 후에, 상등액을 모아서 분비된 IL-8의 농도를 IL-8 ELISA 키트(Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japan)을 사용하여 IL-8 ELISA로 측정하였다. 간단하게는, 표준액과 세포 상등액을 한 시간 동안 인큐베이션시키는데, 마이크로 플레이트 셰이커(micro-plate shaker)에서 20 °C로 이중으로 인큐베이션시켰다. 그 후에, 세척하고 이차 항체를 한 시간 동안 첨가하고, 과산화효소-표지된 염소 안티-토끼 IgG로 한 시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척한 후에, 이 반응을 o-페닐렌디아민으로 진행시켰다. 30 분 후에, 1.6 N의 황산으로 이 반응을 종결시켰다. 광학 밀도(OD)는 490 nm에서 ELISA 판독기로 측정되었다. IL-8 농도는 미지의 흡수도 vs. IL-8의 표준 농도의 보정 곡선을 통해 산출하였다.

IRAP 농도 측정

PBMC를 상기한 바와 같이 정제하였다. PBMC를 RPMI 1640, 10%의 멸균 가열 비활성화된 송아지 태아 혈청(페니실린 10,000 IE/ml, 스트렙토마이신 10 mg/ml, 젠타마이신 2.5 mg/ml 포함)에서 배양하였으며, 세포 농도는 5×10^6 cells/ml가 되었다. 그 후에, 단구세포를 표준 플라스틱 부착 기법으로 정제하였다. 그리고 나서, 단구세포를 RPMI 1640 에서 2% FCS(2.5×10^6 세포/mL) 및 rhIL-10 또는 IT9302의 다양한 희석액으로 배양하였다. 이 세포들을 24 시간 동안 자극하고, IRAP 측정용으로 상등액을 채집하였다. R&D Systems Europe Ltd.제의 인체 IL-1ra 관티킨 면역분석 키트(Human IL-1ra Quantikin Immunoassay Kit; Cat. No. DRA 00, Abingdon, Oxon, UK)를 사용하여 IRAP ELISA를 실시하였다.

T 세포 증식의 측정

증식 분석. PBMCs(2×10^5)을 10% FCS가 함유된 RPMI 배지 200 μ l에서 PHA 0.5 μ l/ml 및 rhIL-10(1, 10, 100 ng/ml) 또는 IT9302(0.1, 1, 10 ng/ml)로 해서 삼중으로 72 시간 동안 배양하였다. 최종 18 시간 동안 3 H-티미딘을 0.5 μ Ci/well로 첨가하였다(Amersham, Denmark). 이 세포들은 필터로 채집되고, 신틸레이션 유체(scintillation fluid: Ultima, Gold MV, Packard)를 첨가하였다. 이 신틸레이션 카운팅을 Tri-Carb model 1600 TR, Packard로 수행하였다.

단구세포에 대한 클래스 II 항원 발현의 측정

인체 단구세포에 대한 HLA-DR 발현. 새로 헤파린 처리된 혈액을 10% FCS를 함유한 RPMI 1640에서 37 °C로 플라스틱에 부착시킴으로써 단구세포를 분리하였다. 인큐베이션시킨 후에, 상등액을 제거하고, Hank's 용액(1% FCS가 함유, 4 °C)를 첨가하고, -20 °C에서 15 분 동안 냉각시켜 테이블을 향해 약하게 내리침으로써 세포들을 분리시켰다. IFN- γ 전에 첨가된 rhIL-10(100, 10, 1 ng/ml) 또는 IFN- γ (10 ng/ml)으로 2% FCS가 첨가된 RPMI 1640에서 40 동안 단구세포들이 자극되었다(2×10^6 cells/ml). 상기한 바와 같이 냉각시켜 이 세포들을 웰로부터 분리시켰다. 새로운, 비-고정된 세포들은 HLA-DR에 대한 안티휴먼 항체에 의해 타이핑되는 표면에 사용되었다. 이 세포들은 1% FCS가 함유된 Hank's 용액에 재현탁액화하고(1×10^6 cells/ml), FIFC 콘주게이티드 마우스-안티-인체 HLA DR, DP, DK 항체들을 45 분 동안 첨가하였다(F 0817, DAKO Denmark). 이 세포들을 Hank's 용액으로 3 회 씻어주고, Coulter-Epics XL-MCL 플로우 시토미터로 488 nm의 파장에서 FACS 분석을 수행하였다. 비-특정적인 결합이 비-연관성 Fitch 콘주게이티드 항체로 측정되었다(마우스 안티 염소 DAKO F 479).

또다른 세포들은 10% DMSO, 40% RPMI 1640 및 50% 멸균 FCS로 고정되고, -80 °C에서 보관되어 DNA 타이핑에 이용되었다.

단구세포에서의 아포토시스(apoptosis)의 측정

자극된 단구세포의 DNA 타이핑. 상기 고정된 세포들을 70% 에탄올에서 60 분 동안 인큐베이션시키고, Hank's 용액으로 3 회 씻어주었다. 1×10^6 세포들을 pH 8.4 1.12% 시트르산나트륨 용액에서의 RNasw 1 μ g

/ml 250 μ l에 재현탁액화하고(Ribonuclease A, Pharmacia No. 17-0442-01), 37 °C에서 3 분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 프로피디움요오드 250 μ l(propidiumiodide: Hank's 용액에 50 μ g/ml)를 첨가하고, 세포들을 암실에서 30 분 동안 인큐베이션시켰다. 이같은 세포들을 Hank's 용액으로 2 회 씻어준 후에 (Jensen 등,(110)), Coulter-Epics XL-MXL로 파장 550 nm에서 플로우 시토크리에 의해 DNA 함량을 측정하였다.

결과

IL-10 및 IT9302에 의한 T 세포 증식의 조절

PBMC's는 상기한 바와 같이 PHA로 자극되고, rhIL-10 및 IT9302를 최종 18 시간 동안 측정하였다. 도 11에 나타난 바와 같이, rhIL-10 및 IT9302 모두가 100 ng/ml rhIL-10 및 10 ng/ml IT9302의 적정 농도에서 세포 증식이 하향 조절되었다.

인체 단구세포에 대한 HLA-DR의 발현

단구세포는 상기한 바와 같이 정제되고 IFN- γ 30 분전에 첨가되는 IT9302및/또는 rhIL-10 및/또는 IFN- γ (10 ng/ml)에 의해 40 시간 동안 자극되었다. MHC II 항원 발현은 FIFC 콘주게이트드 마우스-안티-인체 HLA DR, DP, DK 항체에 의한 인큐베이션으로 연구되었다. 도 12에 나타난 바와 같이, IFN- γ 에 의해 MHC II 항원 발현이 상향 조절되었으며, rhIL-10 10 ng/ml 및 IT9302 1 ng/ml는 마찬가지로 MHC II 항원 발현을 하향 조절하였다.

자극된 단구세포의 DNA 타이핑

상기로부터의 IFN- γ 자극된 단구세포는 프로피디움 요오드로 인큐베이션되고, 플로우 시토크리에 의해 DNA 함량이 측정되었다. 세포 증식의 G₁ 또는 G₂ 상에서 DNA 발현 단편이 측정되었으며, 아포프토시스 발현 단편 또한 측정되었다. 도 12에 나타난 바와 같이, 비-자극된 단구세포는 6.6% 아포프토시스를 발현하며, IFN- γ 자극은 4.4%로 아포프토시스를 하향 조절한 반면에, 세포의 IL-10, IFN- γ 및 IT9302 + IFN- γ 자극 모두는 각각 아포프토시스 단편을 10.3% 및 9.3%로 유도하였다.

CD4+ T 림프구에 의한 IL-4 생성의 측정

세포 배양

CD4+ T 림프구를 헤파린 처리된 정상 인체의 혈액으로부터 정제하였다. Lympho- prep™(Nycomed Pharma, Oslo, Norway) 그라데이션 원심 분리를 실시한 후에, 모노클론 안티-CD4 항체로 코팅된 다이아비드(Dynal AS, Norway)를 사용하여, 이 단핵 세포를 4 °C에서 추가로 분류하였다. 이 비드는 폴리클론 안티-마우스 항체(Dynal AS, Norway)를 첨가하여 분리하였다. 이와 같이 분명하게 선택된 세포들의 순도는 FACS 분석에 의한 평가로는 99%보다 높았다. IL-8로 자극된 T 세포에 의한 IL-4의 재-생성(de novo production)을 검출할 때, T 세포는 1%의 멸균 여과 가열 비활성화된 송아지 태아 혈청(FCS), 페니실린 (10,000 IU/ml), 스트렙토마이신(10 mg/ml) 및 젠타마이신(2.5 mg/ml)을 함유한 LPS가 없는 RPMI 1640(Gibco Cat.no. 61870- 010)에서 5×10^6 cells/ml 배양한다.

rIL-8(100 ng/ml), rIL-10(100 ng/ml), IT9302(10 ng/ml) 및 IFN- γ (10 ng/ml)를 사용하여, T -세포를 3 일 동안 자극시켰다. 재조합 인체 IL-8(rhIL-8)은 일본 오사카의 Dainippon Pharmaceuticals Co. Ltd로부터 증여된 것이었으며, IFN- γ 는 독일의 Boehringer Ingelheim Am Rhein에서 판매되는 것이었다. IL-8의 자극의 특정 억제 반응을 얻기 위해서는, 중화시키는 모노클론 안티-IL-8 항체 (WS.4)를 사용하였다(일본의 Dr. K. Matsushima로부터 증여됨). 재조합 IL-10은 Pepro Tech. Inc.(영국의 런던)에서 구입하였다.

겔 전기영동법용 세포 물질 및 배양 상등액의 제조

배양된 T 세포 및 배양 배지를 2000 rpm으로 5 분 동안 원심 분리법에 의해 분리시켰다. 이 상등액은 냉동 건조시킨 후에, 용해 완충제 100 μ l에 용해시켰다. 이 세포들을 바로 겔 용해 완충제 100 μ l에 재현탁액화하였다(9). 이 물질을 다음 실험을 위해 -80 °C에 보관하였다.

CD4+ T 세포 유도 단백질의 ECL-웨스턴 블롯팅

세포 또는 냉동 건조된 세포 배양 상등액을 IL-4 단백질 함량 측정용으로 사용하였다. 일차원의 15% SDS-PAGE 겔로부터의 단백질을 블롯팅에 의해 Hybond-ECL 니트로셀룰로오스막(Amersham RPN2020D, 영국)에 옮기고, 5%의 소 혈청 알부민(Sigma)으로 0.1%의 트윈(Tween)-20을 함유하는 트리스(Tris) 완충 식염수(pH 7.8)에서 블로킹되었다. 그 후에, 이 블로팅시킨 것을 폴리클론 염소 안티-인체 IL-4 항체(R&D Systems, UK)로 인큐베이션시킨 후에, 호오스 래디쉬 과산화효소 표지된 이차 항체(Cat.no. RPN 2106 ECL, Amersham, UK)로 인큐베이션시키고, 면역염색을 90 초 동안 필름(Kodak X-OMAT-S, USA) 노출에 의해 검출하였다.

실시예 1

인체의 단구세포에 의한 자발적인 IL-8 생성의 억제

이 테스트는 '정상 인체의 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)에 의한 IL-8의 생성(Production of IL-8 by normal human peripheral mononuclear cells(PBMC))'에 개시된 바와 같이 실시하였다. 단구세포를 플라스틱 부착 기법으로 정제하고, 3.0×10^6 cells/ml를 40 시간 동안 자극시켰다. 도 1에 나타난 바와 같이, IT9302가 단핵 세포에 의한 IL-8의 생성을 억제시키며, IT9302 0.1 ng/mL로 IL-8 생성은 생체외에서의 자발적인 생성의 35%로 억제되었다. 세포들의 생존력은 배양 1 일 후에 80%를 넘었고, 본 실시예에서나 다음의 실시예에서 IT9302의 첨가가 IT9302 농도 0.1-1000 ng/ml(IT9302 MW: 1,127 dalton, rhIL-10 예상 MW: 18,400 dalton) 중의 어떤 농도에서의 생존력에 영향을 미치지 않았다.

실시예 2

인체 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 의한 IL-1 β 유도된 IL-8 생성의 억제

이 테스트는 '정상 인체의 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)에 의한 IL-8의 생성'에 개시된 바와 같이 실시하였다. 도 2에서 나타난 바와 같이, IT9302는 투여량 종속 방식으로 생체외에서의 정상 인체 말초 혈액 단핵 세포에 의한 IL-8의 생성의 IL-1 β 유도 생성을 억제하였다. IL-8 생성의 억제는 IT9302 농도 0.01-100 ng/mL에서 고원처럼 평평하게 되었다.

실시예 3

인체 단구세포에 의한 인터로이킨 1 수체 길항 단백질(IRAP)의 생성

이 테스트는 'IRAP 농도 측정(Determination of IRAP concentration)'에 개시된 바와 같이 실시하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, IT9302 투여량 종속적으로 인체의 단핵 세포에 의한 IRAP의 생성을 유도하였다. IT9302의 농도를 10 ng/ml 이상 사용할 경우에, 이 생성이 급격히 증가하였다. 도 4는 rhIL-10에 의한 IRAP의 유도를 나타내며, hIL-10이 IT9302보다 약 20 배 정도가 크므로 유효농도에서 IT9302 10 ng/ml는 IL-10 200 ng/ml와 같다. 따라서, IT9302와 rhIL-10의 유효성을 비교할 수 있으며, 낮은 농도에서는 대략 IRAP의 유도에 있어서 같다. 하지만, IT9302 농도가 10 ng/ml를 넘게되면, IRAP의 유도는 급격히 증가하여 60 ng/ml 정도의 chleo 수준에 이르게 된다. 또한, 특히 IT9302에 대해 지시되는 항체에 의한 이같은 유도의 특정성이 테스트되었다. 단구세포가 자발적으로 IRAP 3.5 ng/ml를 생성시키고, 이들이 1-10 ng/ml IT9302에 의해 10.6 + 0.6 ng/ml의 최대 IRAP 생성까지 유도되는 분리 실험에서, 이같은 생성은, IT9302 10 ng/ml를 첨가하기 30 분 전에 2 μ g/ml가 첨가되는 IT9302에 대한 폴리클론 항체에 의해 차단되어, IRAP 레벨이 2.9 + 0.3 ng/ml 정도로 하향 조절될 수도 있다. 이같은 결과들은 IL-10에 대한 항체로 얻어진 결과와 반대되는 것인데, IL-10에 대한 항체로는 동일한 방식으로 첨가하여도(IT9302 10 ng/ml를 첨가하기 30 분 전에 2 μ g/ml) IRAP 생성을 차단시키지 않았으며, 오히려 22 μ g/ml로 상향 조절되었다. 이같은 항체가 IT9302가 아닌 내인성 IL-10을 중화시킬 수 있다는 것으로 이같은 결과를 설명할 수 있다. 세포 배양에서 자발적으로 생성된 IL-10은 IT9302에 의해 IRAP 생성에 대해 음성 자동조절 효과를 갖는다.

실시예 4

인체 CD8+ T 림프구에 대한 주화학적 효과

이 실험은 '백혈구 주화학적 분석(Leukocyte chemotaxis assay)'에 개시된 바와 같이 실시하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, IT9302는 생체외에서 CD8+ 인체 T 림프구의 주화학적 이동을 유도하는 반면에, CD4+ T 세포에는 영향을 미치지 않았다(데이터 미첨부). 다시, IT9302의 경향성을 상기한 바와 같은 rhIL-10의 경향성과 비교할 수 있다(14).

실시예 5

rhIL-10에 대한 비반응성을 야기시키는, 인체 CD8+ T세포를 제감화

이 실험은 '백혈구 주화학적 분석'에 개시된 바와 같이 실시하였다. CD8+ T 세포를 rhIL-10에 대한 주화학적 반응에 대한 테스트를 실시하기 30 분 전에, IT9302를 CD8+ T 세포의 현탁액에 첨가하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, 세포를 IT9302로 예비 배양시키는 것이 결과적으로 hrIL-10에 대한 CD8+ T 세포의 반응성을 억제시켰다. 이 결과는 IT9302가 rhIL-10과 IL-10 수체와의 결합에 영향을 미칠 수도 있다는 것을 나타낸다.

실시예 6

IL-8에 대한 CD4+ T 림프구의 주화학적 반응의 억제

이 실험은 '백혈구 주화학적 분석'에 개시된 바와 같이 실시하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, 투여량 종속 방식이며 인체 CD4+ T 림프구의 현탁액에 첨가된 IT9302가 IL-8에 대한 CD4+ T 세포의 반응을 억제시킨다.

실시예 7

MCAF/MCP-1에 대한 인체 단구세포의 주화학적 반응의 억제

본 실험은 '단구세포의 주화학적(Monocyte chemotaxis)'에 개시된 바와 같이 실시하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, 투여량 종속 방식이며 인체의 단구세포의 현탁액에 첨가된 IT9302가 MCAF/MCP-1에 대한 단구세포의 반응을 억제시킨다.

실시예 8

IFN- γ 로 자극되는 경우에, 인체 단구세포에 대한 클래스 II MHC 분자 발현의 억제

새로운 실험 모델(플로우-시토메트리)에서, IFN- γ fh 자극된 단구세포가 MHC II 항원의 그의 발현을 상향 조절하고, 이같은 유도가 동일한 방식으로 IL-10 및 IT9302에 의해 차단될 수 있다는 것을 나타내고 있다. 동시에, 두 가지 펩티드 모두 단구세포에서 아포토시스를 나타내는 세포의 수를 상향 조절한다(도 12 참조) 이 실험들은 IL-10 및 IT9302가 클래스 II MHC 발현의 하향조절을 통해 단구세포의 능력을 나타내는 항원을 감소시킴으로써 T 세포 증식에 종속적인 단구세포/대식세포를 억제시킬 수 있다(도 12 참조).

PHA에 의해 자극된 PMBC's는 ³H-티미딘과의 병용에 의해 나타난 바와 같이, 증식을 개시하는데, 이또한 IL-10 및 IT9302에 의해 하향 조절될 수 있다. PHA는 Ca²⁺ 종속 채널의 활성화를 통해 T 세포 증식을 자극한다. 인체 T 세포 클론(clones)에서 Ca²⁺ 플럭스(fluxes)는 세포들을 IL-10으로 예비-인큐베이션할 때 감소되었다(Taga, K. 등, 1992). 본 실험은 IT9302에 의해서, 또한 Ca²⁺ 종속 채널의 조절에 의해 하향 조절

된다는 것을 나타낸다.

실험에 관한 토의

본 데이터는, 전구-염증 활성을 반영하는 경로에 있어서, IL-8 생성 및 단구세포 및/또는 T 세포의 이동을 포함하는, 합성 노나펩티드, IT9302의 투여량 종속 억제 효과를 입증한다. 따라서, IT9302는 방새 배양된 인간의 단구세포에 의한 IL-8의 자발적인 생성을 억제시킬 수 있었다. 이 결과는 IL-8 mRNA 생성 및/또는 후속 단백질 생성 및/또는 방출에 대한 직접적인 억제 효과로 설명할 수 있었다. 또 다른 메커니즘은, 시험관에서 배양된 단구세포가 IL-1을 나타내고 생성할 것인데, 그 후에 교대로 IL-8의 생성을 유도한다는 사실로 설명할 수 있었다. IT9302가 단구세포로부터 IRAP의 생성을 강력하게 유도한다는 것이 증명된 사실이 이를 뒷받침해준다. 그러므로, IT9302는 IL-1의 작용을 방해하여 자발적인 IL-8의 생성을 억제시키기도 한다. 배양에 IL-1을 첨가하기, 적어도 16 시간 전만을 제외하고, 배양에 첨가된 IT9302가 IL-1 유도 IL-8생성을 방해하기 때문에, IT9302에 의한 IRAP의 관찰되는 유도가 생물학적 활성 IRAP을 유도하는 것으로 나타난다. 이는 IT9302가 IRAP의 생성을 유도하여 IL-1 유도 IL-8의 생성을 억제한 후에, 그의 수체를 통해 교대로 IL-1의 활성을 차단시킨다는 것을 의미하는 것일 수 있다. IT9302가 직접적으로 IL-8의 생성을 억제한다면, IL-1을 첨가하기 1 시간 전에 IT9302를 배양물에 첨가하는 것이 IL-8의 생성을 억제시킬 수 있다고 예측되어질 수 있었으나, 실제로는 그렇게 되지 않았다(데이터 미첨부). 따라서, 관찰되는 IT9302의 IL-8 생성 억제는 IL-8 생성의 직접적인 억제보다는 IRAP 생성의 유도에 기인한다는 것이 타당하다. IT9302는 특히 IRAP의 유도 및, 그에 따른 TNF α , IL-8 및 그 외의 다수의 시토카인과 인자들과 같은 IL-1에 의해 유도되는 그 외의 시토카인의 유도에 의해 IL-1 수체를 차단시킨다. 이 유도의 특성은 IT9302에 대한 본 발명의 항체가 IRAP의 유도를 차단시킬 수 있다는 것에 의해 확인되었다. 또 다른 IL-10 항체 19F1은 IT9302-유도되는 IRAP 생성을 차단시키지 않았다.

IT9302는 또한, IL-8에 대한 반응으로서 이동하는 CD4+ T 세포의 작용 능력을 억제하여 IL-10과 유사한 활성을 띤다. IL-8이 많은 다양한 염증 상태와 관련된 것이고, 피부 알레르기 등의 T 세포 조절 면역 염증의 침윤물에서 일찍 나타나기 때문에, 이와 같은 특성들이 T-세포 매개 면역 염증성 질환 치료용으로서의 명확한 의약 효과를 갖는다는 것이 입증될 수도 있다.

이와 같이 밝혀진 IT9302의 CD8+ T 세포 주화학적 활성은 IL-10의 활성과 유사한 것이기도 해서, IT9302가 T-세포 조절 면역 염증을 종결시키는 억제 인자의 작용과 함께 T 세포군들을 활성화시킬 수도 있다. 따라서, 상기한 바와 같이 밝혀진, 실시예에 따른 IT9302가 IL-10 및/또는 IRAP 역시 의약 효과를 갖을 수도 있는 질병에서, 의약적인 효과를 갖는다. 추가적으로, IL-8 및/또는 MCAF 및/또는 IL-1이 발병원 역할을 한다고 여겨지는 질병에서, IT9302는 의약적인 효과를 갖을 수도 있다. 본 발명은 IT9302의 동족체, 즉 상기한 바와 같은 특성 중의 적어도 일부를 갖는 물질 또는 펩티드에 관한 것이다.

실시예 9

CD4+ T 림프구에서의 IL-4 생성의 유도

배경기술

IL-10와 같이, IL-4는 T_H2 타입의 CD4+ T 세포의 생성물이다. 배양된 재조합 인체 CD4+ T 세포에 의해 IL-4의 생성이 유도된다는 것이 관찰되었다. 이는 IL-10이 그 자체의 면역 억제 기능에 더하여, 또 다른 면역 억제 시토카인, IL-4의 생성 또한 유도한다는 것을 의미하는 것이다. 따라서, IT9302도 CD4+ T 세포에 의한 IL-4의 생성을 유도하는지에 대해서도 테스트하였다.

따라서, 'T 세포의 주화학성에 대한 방법(Methods for T cell chemotaxis)'에 개시된 바와 같이 정제되고, 'CD4+ T 림프구에 의한 IL-4의 생성의 측정(Determination of IL-4 production by CD4+ T lymphocytes)' 절에 개시된 바와 같이 배양된 CD4+ T 세포를 IT9302(10 ng/ml) 또는 IL-10(100 ng/ml)으로 3 일 동안 자극시켰다. 시토줄 단백을 모아서 웨스턴 블롯팅(도 9) 및 염소 안티-인체 IL-4 폴리클론 항체를 이용하여 그 IL-4의 함량을 분석하였다.

도 9에서 나타난 바와 같이, IL-10 및 IT9302가 배양된 정상 인간 CD4+ T 세포에 의한 IL-4의 생성을 유도하는 것이 관찰되었다.

실시예 10

혼합 백혈구 반응(MLR) 동안의 TNF- α 생성의 억제

혼합 백혈구 반응이 부분적으로 반응 중의 TNF- α 생성에 종속적이라는 것이 입증되었다. IT9302가 MLR을 현저하게 감소시키는 것이 나타난 것이 아니라, MLR 동안의 TNF- α 의 생성을 현저하게 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

따라서, 인체의 백혈구를 정제한 후에, 알로겐 제공자(allogeneic donor)로부터 4 일 동안 1,000,000 세포/mL를 배양시켜 MLR을 실시하였다. 배양을 설정하기 전에, 세포군 중의 1 군을 베타 조사(beta irradiation)를 사용하여, 2 분 동안 조사하였다. 시토줄 단백질 단백을 'CD4+ T 림프구에 의한 IL-4의 생성의 측정' 절에 개시된 바와 같이 정제하여, 토끼 안티 휴먼 TNF- α 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다.

도 10에 나타난 바와 같이, TNF- α 의 생성에 있어서의 현저한 감소가 인체 혼합 백혈구 반응 동안에 관찰되었다.

실시예 11

돼지의 LPS 유도된 속 및 백혈구감소증의 조절

IT9302가 TNF- α 및 IL-8을 포함한 시토카인의 생성을 조절한다는 것이 밝혀짐과 개시된 돼지 IL-10의 서열(88)을 참고로 해서, IT9302가 돼지의 LPS 유도 백혈구감소증을 조절할 수 있는지 여부를 테스트하였다

(도 13).

예비 실험에 있어서, IT9302 01 mg/kg의 정맥 주사가 돼지에서 LPS 2 μ g/kg의 정맥 주사에 대한 효과를 어떻게 조절하는지를 테스트하였다(N = 3). LPS를 주사하기 30 분 전에 IT9302를 주사하고, 혈액 샘플을 도 13에 나타난 바와 같이 채혈하였다. 총 백혈구 수 및 분화 세포수(differential cell count)를 측정하고, 이 결과를 기초로 하여 중성 친화성 백혈구의 총수를 기준하여 산출하였다.

밝혀진 바와 같이, LPS의 주사는 일시적인 백혈구감소증을 야기시켰다. 하지만, IT9302의 주사가 도면에 나타난 바와 같이 백혈구 감소증을 예방하였다.

실시예 12

마우스에서 LPS투여 후의 혈장에서의 TNF- α 방출에 대한 인체 IT9302과 유사한 쥐의 IT9302의 효과

재조합 쥐 IL-10이 치명적인 내독소병(endotoxemia)를 예방할 수 있다고 하는 것이 입증되어 있고(89), 추가로 인체에 투여된 IL-10이 T-세포에 대해 억제 효과를 가지며, 전구-염증성 시토키류의 생성을 억제한다는 것이 밝혀져 있다(90). 이 연구의 목적은 IT9302가 LPS 투여 후에 내독소 유도성 속에 노출된 마우스에서 TNF- α 의 생성을 억제할 수 있는지를 테스트하는 것이다(도 14).

8 주령 BALB/C 마우스를 사용하였다(Centre for Research Animals, Bomholtgaard, Bomholtvej 10, DK-8680 Ry, Denmark에서 구입함). E. coli의 LPS를 Sigma (batch 3444114)에서 구입하고, IT9302를 Schafer-N, Lerso Parkalle 42, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark에서 구입하였다.

마우스에 0.9 M NaCl 1 mL로 LPS 100 μ g을 복강내 주사하였다. 이 LPS를 주사하기 60 분 전에, 인체 IL-10의 0.1 μ g, 1 μ g 및 10 μ g에 등가로 쥐의 IT9302를 투여하였다. 5 마리의 동물군을 각각 1, 2, 3 및 4 시간 후에 마취시켰다(Imobilon, Pherrovet, Malmo, Sweden). 그 후에, 심장 펀칭을 통해 최대한의 전체 혈액을 채혈하였다. 이 혈액을 차가운 상태로 원심분리하고, 혈청을 채집하고, ELISA에 의한 후속 TNF- α 함량 분석을 위해 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다(TNF- α 마우스 면역 분석 진단 키트, Genzyme, Cambridge, MA, USA).

밝혀진 바와 같이, mIT9302로 처리되지 않은 대조군에 비해, 쥐의 IT9302 10 μ g이 마우스 혈청에서 TNF- α 를 명확히 억제하는 것이 관찰되었다(표 3 참조).

[표 3]

마우스 혈청에서의 m-TNF- α ng/ml + SEM

| LPS 주사 60 분 전에 첨가되는 hIL-10과 등가인 쥐의 IT9302 | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 0 | 0.1 μ g | 1 μ g | 10 μ g |
| 1 h | 2.48 \pm 0.16 | 1.92 \pm 0.48 | 2.64 \pm 0.38 | 1.84 \pm 0.16 |
| 2 hs | 1.43 \pm 0.17 | 1.68 \pm 1.27 | 1.16 \pm 0.21 | 0.62 \pm 0.14 |
| 3 hs | 0.48 \pm 0.04 | 0.05 \pm 0.02 | 0.18 \pm 0.05 | 0.0 |
| 4 hs | 0.09 \pm 0.06 | 0.06 \pm 0.02 | 0.20 \pm 0.04 | 0.05 \pm 0.01 |

실시예 13

쥐의 IT9302를 이용한, 담즙산에 의해 유도된 급성 췌장염의 조절

설치 동물, 마우스 및 토끼가 대개 동물 모델로 사용되며, 최근에 겐자임 진단법 (Genzyme Diagnostics) 이 시토킨 연구 생성물(Cytokine Research Products)에 대한 교차 반응성 키트로 알려져 있다. 특히, 마우스 면역 분석 키트로 토끼 TNF- α 및 INF- γ 를 측정할 수 있었다. 실험적인 급성 췌장염에서의 IL-8의 병인학적 역할을 연구하는, 토끼 모델로의 실험에서와 같이, 유도된 백혈구감소증에 대한 쥐 IT9302의 효과 연구하였다(도 14). 본 발명자들의 가설은 마우스와 토끼에서 IL-10까지도 동일하며, 급성 췌장염 진행중인 췌장에서 IL-8 유도성 백혈구 침해에 대한 효과를 가질 수 있다는 것이었다.

실험 모델

1.7-4.0 kg의 뉴질랜드산 화이트 토끼(Oryctolagus cuniculus)를 18-24 시간 동안 절식시켰다. Banerjee 등, 1994(91) 및 Hong 등, 1962(92)에 따른 수술 과정이 수행되었으며, 5% 담즙산을 췌장관에 투여함으로써 토끼에게서 급성 췌장염을 유발시켰다. 쥐의 IT9302(100 μ g/kg)을 중앙 정맥에 담즙산 투여 30 분 전에 투여하였으며, 그후에 즉시 토끼 체중당 100 μ g/kg의 투여량을 피하 주사하였다. 혈장 샘플을 도 14에 따라 채집하였다.

밝혀진 바와 같이, 쥐의 IT9302를 췌장염을 유발시키기 전에 토끼에게 주사하는 것이 도면에 나타난 바와 같이 백혈구감소증을 예방하는 것이 관찰되었다.

실시예 14

인체 IT9302를 이용한, 담즙산에 의해 유도되는 토끼의 급성 췌장염의 조절

쥐의 IT9302를 인체 IT9302로 대체한 것을 제외하고는, 상기 실시예 13과 동일한 실험 모델을 사용하였다. 5% 케모데옥시콜린 담즙산 2.0 mL를 췌장관내 주사하여 급성 췌장염을 유도하였다(10 마리의 동물). 또다른 동물군을 인체 IT9302로 처리하였는데(8 마리의 동물), 급성 췌장염을 유발시키기 1시간 반 전에 피하주사로 일차 투여하고(100 μ g/kg) 정맥 주사로 이차 투여하였다(100 μ g/ml). 급성 췌장염을 유발시킨 후에 0, 1, 3, 6 및 12 시간 간격으로 시토킨 측정을 위한 혈청 샘플을 채집하였다.

토끼 혈청에서의 TNF- α 및 IL-8의 측정 방법

겐자임 마우스 TNF- α ELISA 키트 코드 No. 80-3807-00을 토끼의 혈청의 TNF- α 측정용으로 변형된 형태로 이용하였다. 이 키트는 혈청내의 TNF- α 를 포집하는 고체상 모노클론 햄스터 anti-마우스 TNF- α 항체 및, 과산화효소-콘주게이티드 폴리클론 염소 anti-마우스 TNF- α 항체, 기질 및 크로마젠 TMB로 구성된다. 혈청 및 표준 TNF- α 의 인큐베이션 시간은 4 시간 동안이고, 기질 인큐베이션을 위한 전개 시간은 30 분이였다.

토끼 혈청에서의 토끼 IL-8 측정은 Kouji Matsushima 교수(Tokyo, Japan)로부터 증여받은 특정 IL-8 ELISA 키트에 의해 수행되었다. 간단하게는 모노클론 anti-IL-8, 돼지쥐 anti-토끼 IL-8 및 알칼리인산염-콘주게이티드 토끼 anti-돼지쥐 면역글로불린 G 항체가 각각 포집체, 이차 및 검측 항체로서 이용되었다. 그 방법은 Ikeda 등의 참고문헌을 참고할 수 있다(106).

[표 4]

| 5% 담즙산에 의한 토끼에서의 급성 췌장염의 경우, 혈청에서의 TNF- α 의 함량 (pg/ml \pm SEM) | | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| 0 | 1 | 3 | 6 | 9 | 12 |
| 1210 \pm 396 | 1206 \pm 239 | 1918 \pm 374 | 1662 \pm 357 | 1884 \pm 698 | 915 \pm 431 |
| 5% 담즙산 투여 30 분 전에 인체 IT9302로 처리된 급성 췌장염의 경우, 혈청에서의 TNF- α 의 함량 (pg/ml \pm SEM) | | | | | |
| 0 | 1 | 3 | 6 | 9 | 12 |
| 347 \pm 77 | 739 \pm 339 | 697 \pm 146 | 658 \pm 156 | 872 \pm 594 | 463 \pm 203 |

[표 5]

| 5% 담즙산에 의한 급성 췌장염의 경우, 혈청에서의 IL-8의 함량 (pg/ml \pm SEM) | | | | | |
|---|---------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 1 | 3 | 6 | 9 | 12 |
| 1154 \pm 351 | 780 \pm 153 | 2210 \pm 459 | 2690 \pm 468 | 2196 \pm 1058 | 1833 \pm 1114 |
| 5% 담즙산 투여 30 분 전에 인체 IT9302로 처리된 급성 췌장염의 경우, 혈청에서의 IL-8의 함량 (pg/ml \pm SEM) | | | | | |
| 0 | 1 | 3 | 6 | 9 | 12 |
| 875 \pm 181 | 695 \pm 205 | 900 \pm 178 | 1037 \pm 244 | 1207 \pm 210 | 1087 \pm 216 |

요약

최대 TNF- α 유도는 3 시간 경과후에 달성되었으며, 최대 IL-8은 6 시간 경과후에 달성되었다. 혈액 순환에서의 TNF- α 와 IL-8 레벨 두 가지 모두가 0-12 시간 동안 현저히 하향 조절되었다. 혈액내 췌장 효소(아밀라아제, 리파아제 및 트립타아제)의 레벨 또한 측정되었으며, 이들 모두는 급성 췌장염을 유도시킨 후에 3-6 시간 경과하고나서 피크가 나타났으며, IT9302에 의한 처리에 있어서는 이들 효소중 어떠한 것도 나타나지 않았다. 병력적으로 유사한 췌장 변화가 이 두 가지 군에서 관찰되었는데, 폐에서의 간질성 중성 친화성 침윤이 현저히 감소되었다.

결론

IT9302는 담즙산 유도성의 급성 췌장염 모델에서 TNF- α 및 IL-8 생성을 하향 조절하고, 이같은 치료 토끼들의 폐에서의 중성 친화성 침윤을 차단하고, 이로써 이같은 동물들에서 ARDS-유사 증후군의 전개를 예방하고, 12 시간 후에 치사율을 60%에서 0%로 감소시킨다. 인터로이킨 1 β 는 급성 췌장염의 중요한 유도 인자로 여겨지고(참고 문헌 107 참조), 이로써 IT9302가 모든 IL-1 유도 가능한 효과를 차단할 수 있다고 하는 가설을 뒷받침해준다. 인체 IT9302를 토끼 모델에서 사용할 수 있는 이유는, 토끼(Lagomorpha) 단백질이 계통 발생론적으로 다른 설치류(마우스, 래트,...) 단백질 보다도 영장류(인간) 단백질에 좀더 유사하다고 하는 Dan Gae 등에 의한 관찰 및 동년의 Nature에 개시된 바(108)에 의해 해명될 수 있다.

실시예 15

암 치료제로서 및, 그의 전이 예방에서의 IT9302

세포의 IL-10의 전신 투여가 시험관에서의 마우스에서 수립된(established) 종양에 대해 효과적이고, 특정적이며 생존기가 긴 면역 반응을 유도한다는 것이 최근에 밝혀졌다(111). 이러한 효과는 T 세포 증식, CD8+ T 세포의 화학적 유도, 및 림포킨-활성화된 킬러 세포 활성화의 자극의 공동-자극화를 포함한, 다양한 세포 타입에 대한 IL-10은 공지된 효과에 의해 부분적으로 설명된다고 제시되었다. 인체 IL-10이 바이러스성 IL-10의 국부 면역 억제 효과를 역전시킬 수 있다는 것 또한 관찰되어 있다. 또다른 연구진은 IL-10이 악성 종양을 전이시키는 것을 포함해서, 다양한 암을 갖는 마우스로의 시험관내 실험에서의 천연 킬러 세포-종속적인 메카니즘을 통해 전이를 억제한다는 것을 관찰함으로써, 암에서의 IL-10 투여의 잠재적인 치료 역할을 확인하였다(112). Kundu 등(1996)은 IL-10이 인체 유방암의 쥐 모델에서 anti-전이성 및 anti-종양성 효과를 발휘한다는 것을 보고하였다(113).

이같은 관찰들은 암의 생물학적인 치료에 있어서, 인체 IL-10 및 IT9302 투여의 잠재적인 역할을 나타내는 것이다.

실시예 16

바이러스성 감염증의 치료에서 면역 보조제로서의 IT9302

IL-10은 어떤 항-바이러스성 능력을 갖는다고 알려져 있다. 따라서, Koliman 등 (1996)은 IL-10이 인체의 태아 흉선 및 간으로 SCID 마우스의 생체내에서의 급성 HIV 감염을 억제한다는 것이 밝혀졌다(114). 본 출원인/발명자 중의 2 명이, 등의 피부상에 플라스틱 포장 교함 하에서의 크림 배합물에서의 IT9302 (총 투여량 400-500 μg)를 24 시간 동안 적용하는 경우에, CD8+ T 세포의 총수가 증가하였으며(각각 60% 및 90%), 혈청 IRAP 농도도 1 ng/ml에서 2 ng/ml까지로 증가되었다. 7 명의 비-처리된 지원자들에게서는, IRAP 농도가 1.1 ng/ml를 초과하지 못하였다. 뜻하지 않던 예상밖의 관찰 결과로서, 두 사람의 연구자들은 IT9302를 함유한 크림을 적용하고 3-4 일 경과한 후에, 통상적인 사마귀(피부 HPV 감염에 기인한)가 그 주위가 붉어지며 가렵고 염증의 투명한 표시를 나타내는 것을 발견하였다. 이 염증성 반응은 시험원 중 한 사람에게서는 몇몇 손가락에서 동시에 발생된 반면에, 다른 사람에게서는 손가락의 사마귀 하나에만 나타났다. 이 두 경우 모두에서, 사마귀는 후속 4-7 일 동안에 신속하게 서서히 크기가 줄어들어, 10-11 일이 경과한 후에는 남아있는 사마귀 감염의 임상학적 표시가 없어졌다. 2 개월간의 후속 조정 후에, 감염의 재발 표시도 없었다.

따라서, IT9302가 아마도 NK 세포의 전신 활성화 및/또는 세포독성 CD8+ 세포 활성을 통해 피부 HPV 감염에 대한 잠재적인 면역 반응을 일깨우고, 결국 바이러스성 감염의 임상학적 완화를 가져온다고 하는 것을 알게 되었다. 따라서, IT9302는 HIV 및 HPV 감염과 같은 바이러스성 감염증의 치료에 가능한 치료 방법이 된다.

실시예 17

염증성 관절 질환(관절염)의 치료에서 면역 보조제로서의 IT9302

안티-IL-1 치료법 및 안티-TNF- α 치료법은 관절염 치료에서 명확한 임상학적 잠재 능력을 보인다(Maini, 1996)(115). 본문외에서도 기재한 바와 같이, 본 발명자들은 IT9302가 TNF- α 생성의 억제 인자일 뿐만 아니라, 인체 모노클론 세포의 IRAP (IL-1 수체 길항 단백질) 자극 인자라는 것을 알게 되었다. 따라서, IT9302는 관절염의 유력한 치료 방식이 된다. 이는 본 발명의 출원인 중의 한 사람의 관찰 결과에 의해 뒷받침되는데, 그 사람은 피부에 24 시간 동안 크림 기제로 IT9302를 적용한 후에(대략 500 μg), 관절염에 기인한 만성 관절 통증이 경감되는 것을 관찰하였다고 한다. 이같은 관찰은 3 회 수행되었으며, 각각의 경우에서 IT9302 적용을 제거한 후 다음주 동안에 증상이 서서히 재발되었다. 따라서, 본 발명자들은 생체내에서 관절염이나 그외의 자기-면역 질환과 같은 급성 또는 만성 염증성 반응의 치료에 IT9302를 이용하는 데 이론적 근거를 갖게 되었다.

참고 문헌

1. Bendtzen K. Lymphokines in inflammation. Inflammation Basic Mechanisms Tissue Injuring Principles and Clinical Models (P Venge & A Lindbom eds) 1985; Almqvist & Wiksell International. Stockholm: 187-217.
2. Bendtzen K. Interleukin-1, Interleukin-6, and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. Immunol Lett 1988;19:183-192.
3. Larsen C.G. Leukocyte activating and chemotactic cytokines in cell-mediated immune reactions of the human skin. Acta Dermatovenerol. 1991; Suppl. 160:1-48
4. Fiorentino D. F., M. W. Bond, and T. R. Mosmann. 1989. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J. Exp. Med., 170:2081.
5. Viera P., R. de Wall-Malefyt, M.-N. Dang, K. E. Johnson, R. Kastelein, D. F. Fiorentino, J. E. de Vries, M.-G. Roncarolo, T. R. Mosmann, and K. W. Moore. 1991. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL-10) cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 88:1172.
6. Moore, K.W., O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira, Mosmann T.R. 1993. Interleukin-10, Annu Rev. Immunol, 11:165-90.

7. Kim, J.M., Brannan, C.I. Copeland N.G., Jenkins, N.A., Khan, T.A., Moore, K.W. 1992. Structure of the mouse interleukin-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J. Immunol* 148:3618-23.
8. Carter, D.B., Deibel, M.R-Jr, Dunn, C.J. et al. 1990. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *NATURE* 344:633-638.
9. Hannum, C.H., Wilcox, C.J., Arend, W.P. et al. 1990. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343:336-40.
10. Firestein, G.S., Boyle, D.L., Yu, C., et al. 1994. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37:644-652.
11. Fisher, C.J.-Jr., Slotman, G.J., Opal, S.M., Pribble, J.P. et al. 1994. Initial evaluation of recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group. *Crit-Care-Med.* 22:12-21.
12. de Waal-Malefyt, R., Haanen J., Spits, H., et al. 1991. IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II MHC expression. *J. Exp. Med.* 174:915-24.
13. Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., James, S.L., Sher, A., 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitric oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *J. Immunol.* 148:1792-96.
14. Jinquan, T., Larsen, C.G., Gesser, B., Matsushima, K., Thestrup-Pedersen, K. 1993. Human IL-10 is a chemo-attractant for CD8+ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8- induced CD4+ T lymphocyte Migration. *Journal of Immunology*, 151:4545-4551.
15. Rousset F., E. Garcia, T. Defrance, C. Peronne, D.-H. Hsu, R. Kastelein, K. W. Moore, and J. Banchereau. 1992. IL-10 is a potent growth and differentiation factor for

- activated human B lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 175:671.
16. Howard, M., O'Garra, A., Ishida, H., de Waal Malefyt, R., de Vries, J. 1992. Biological properties of Interleukin-10. J. Clin. Immunol 12:239-47.
 17. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Muller, W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell 75: 263-74.
 18. Sher, A., Fiorentino, D.F., Caspar, P., Pearce, E., Mosmann, T. 1991. Production of IL-10 by CD4+ lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. J. Immunol. 147:2713-16.
 19. Clerici, M., Shearer, G.M. 1993 Immunology Today. 14:107-111.
 20. Bry, K., Lappalainen, U. 1994. Interleukin-4 and transforming growth factor-beta 1 modulate the production of interleukin-1 receptor antagonist and prostaglandin E2 by decidual cells. Am-J-obstet-Gynecol 170 (4): 1194-1198
 21. Firestein, G., S., Boyle, D. L., Yu, C., Paine, M. M., Whisenand, T. D., Zvaifler, N. J., Arend, W. P. 1994. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. Arthritis-Rheum, 37/5: 644-652
 22. Roberge, C. J., De-Medicis, R., Dayer, J. M., Rola-Pleszczycki, M., Naccahe, P. H., Poubelle, P. E. 1994. Crystal-induced neutrophil activation: V. Differential production of biologically active IL-1 receptor antagonist. J. Immunol 152/11: 5485-5494
 23. McCall, R. D., Haskill, S., Zimmermann, E. M., Lund, P. K., Thompson, R. C., Sartor, R. B. 1994. Tissue interleukin 1 and interleukin-1 receptor antagonist expression in enterocolitis in resistant and susceptible rats. Gastroenterology (4):960-72
 25. Kimble, R. B., Vannice, J. L, Bloedow, D. C., Thompson, R. C., Hopfer, W., Kung, V. T., Brownfield, C., Pacifici, R. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist de-

- creases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J. Clin Invest.* 93/5: 1959-1967
26. Kline, J. N., Geist, L. J., Monick, M. M., Stinski, M. F., Hunninghake, G. W., 1994. *J. Immunol.* 152 (5): 2351-7
 27. Tompkins, R. G. 1994. Human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome (editorial; comment). *Crit-Care-Med.* 22 (1): 3, 22 (1):12-21
 28. Everaerd, B., Brouckaert, P., Fiers, W. 1994. Recombination IL-1 receptor antagonist protects against TNF-induced lethality in mice. *J. Immunol.* 152/10: 5041-5049
 29. Fischer, C. J. Jr., Slotman, G. J., Opal, S. M., Pribble, J. P., Bone, R. C., Emmanuel, G., Ng, D., Bloedow, D. C., Catalano, M. A. 1994. Initial evaluation of human recombination interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group (see comments). *Crit-Care-Med.* 22(1): 12-21, 22(1): 3
 30. Gomez-Reino-Carnoto, J. J. 1994. New therapies in rheumatoid arthritis. *Med-Clin* 543-545.
 32. Nishihara, T., Ohsaki, Y., Ueda, N., Saito, N., Mundy, G. R. 1994. Mouse interleukin-1 receptor antagonist induced by actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide blocks the effects of interleukin-1 on bone resorption and osteoclast-like cell formation. *Infect-Immun.* 62(2): 390-7
 33. Simon, C., Frances, A., Piquette, G. N., el-Danasouri, I., Zurawski, G., Dang, W., Polan, M. L. 1994. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist (see comments). *Endocrinology.* 134(2): 521-8, 134(2): 519-20
 34. Baergen, R., Benirschke, K., Ulich, T. R., 1994. Cytokine expression in the placenta. The role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist expres-

- sion in chorioamnionitis and parturition. *Arch-Pathol-Lab-Med.* 118(1): 52-5
35. Tang, W.W., Feng, L., Vannice, J. L., Wilson, C. B. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates experimental antiglomerular basement membrane antibody-associated glomerulonephritis. *J. Clin-Invest.* 93(1): 279-9.
 36. Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., Calzetti, F., Bonara, S. 1994.
 37. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J. Exp-Med.* 179/5: 1695-1699
 38. Mancini, R., Bendetti, A., Jezequel, A. M. 1994. An interleukin-1 receptor antagonist decreases fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rat liver. *Virchows-Arch.* 424/1: 25-31
 39. Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., Burdick, M. D., Lincoln, P. M., Strieter, R. M. 1993.
 40. Interleukin-1 receptor antagonist blocks chemokine production in the mixed lymphocyte reaction. *Blood.* 82(12): 3668-74
 41. Bandara, G., Mueller, G. M., Galea-Lauri, J., Tindal, M. H., Georgescu, H. I., Suchanek, M. K., Hung, G. L., Gloriso, J. C., Robbins, P. D., Evans, C. H. 1993.
 42. Intraarticular expression of biologically active interleukin 1-receptor-antagonist protein by ex vivo transfer. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 90(22): 10764-8
 43. Dinarello, C. A. 1994. Anti-interleukin-1 strategies in the treatment of the septic shock syndrome. *Can-J-infect-Dis.* 5(suppl. A): 9A-16A
 44. Oelmann, E., Topp, M. S., Reufi, B., Papadimitriou, C., Koeningsmann, M., Oberberg, D., Thiel, E., Berdel, W. E. 1994. *Int-J-Oncol.* 4/3: 555-558
 45. Estrov, Z. 1993. Interruption of autocrine and paracrine growth-stimulatory mechanisms: a new therapeutic strategy for chronic myelogenous leukemia. *Semin-Hematol.* 30(3 suppl 3): 35-6

46. Wooley, P.H., Whalen, J.D., Chapman, D.L., Berger, A.E., Richard, K.A., Aspar, D.G., Staite, N.D. 1993. The effect of an interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 36 (9): 1305-1314
47. Peterson, C.M., Hales, H.A., Hatasaka, H.H., Mitchell, M.D., Rittenhouse, L., Jones, K.P. 1993. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) modulates prostaglandin production and the natural IL-1 receptor antagonist inhibits ovulation in the optimally stimulated rat ovarian perfusion model. *Endocrinology* 133 (5): 2301-2306
48. Estrov, Z., Kurzrock, R., Talpaz, M. 1993. Role of interleukin-1 inhibitory molecules in therapy of acute and chronic myelogenous leukemia. *Leuk. Lymphoma* 10 (6): 407-418
49. Chensue, S.W., Bienkowski, M., Eessalu, T.E., Warming-ton, K.S., Hershey, S.D., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. 1993. A novel IL-1 receptor antagonist protein (IRAP) regulates schistosome egg granuloma formation and the regional lymphoid response. *J. Immunol.* 151 (7): 3654-3662
50. Bowyer, J.F., Davies, D.L., Schmued, L., Broening, H.W., Newport, G.D., Slikker, W Jr., Holson, R.R. 1994. Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268/3: 1571-1580
51. Cole, O.F., Sullivan, M.H.F., Elder, M.G. 1993. The 'interleukin-1 receptor antagonist' is a partial agonist of prostaglandin synthesis by human decidual cells. *Prostaglandins* 46/6: 493-498
52. Jenkins, J.K., Arend, W.P. 1993. Interleukin 1 receptor antagonist production in human monocytes is induced by IL-1alpha, IL-3, and IL-4 and GM-CSF. *Cytokine* 5/5: 407-415
53. Cocceani, F., Lees, J., Redford, J., Bishai, I. 1992. Interleukin-1 receptor antagonist: effectiveness

- against interleukin-1 fever. *Can. J. Pharmacol.* 70 (12): 1590-1596
54. Schiro, R., Longoni, D., Rossi, V., Maglia, O., Doni, A., Arsura, M., Carrara, G., Maserà, G., Vannier, E., Dinarello, C.A., Rambaldi, A., Biondi, A. 1994. Suppression of juvenile chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1 receptor antagonist. *Blood* 83/2: 460-465
55. Watson, M.L., Smith, D., Bourne, A.D., Thompson, R.C., Westwick, J. 1993. Cytokines contribute to airway dysfunction hyperreactivity, pulmonary eosinophil accumulation and tumor necrosis factor generation by pre-treatment with an interleukin-1 receptor antagonist. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8 (4): 365-369
56. Abhyankar, S., Gilliland, D.G., Ferrara, J.L.M. 1993. Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 56/6: 1518-1523
57. Lan, H.Y., Nikolic Paterson, D.J., Zarama, M., Vannice, J.L., Atkins, R.C. 1993. Suppression of experimental crescentic glomerulonephritis by the interleukin-1 receptor antagonist. *Kidney Int.* 43 (2): 479-485
58. Herve, P. 1993. Prevention and treatment of acute GvHD - New modalities. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 35/3: 295-297
59. Conti, P., Panara, M.R., Barbacane, R.C., Placido, F.C., Bongrazio, M., Reale, M., Dempsey, R.A., Fiore, S. 1992. Blocking the interleukin-1 receptor inhibits leukotriene B4 and prostaglandin E2 generation in human monocyte cultures. *Cell Immunol.* 145 (1): 199-209
60. Kristensen, M., Deleuran, B., Eedy, D.J., Feldmann, M., Breathnach, S.M., Brennan, F.M. 1992. Distribution of interleukin-1 receptor antagonist protein (IRAP), interleukin-1 receptor, and interleukin-1 alpha in normal and psoriatic skin, Decreased expression of IRAP in psoriatic lesional epidermis. *Br. J. Dermatol.* 127 (4): 305-311

61. Romero, R., Sepulveda, W., Mazor, M., Brandt, F., Cotton, D.B., Dinarello, C.A., Mitchell, M.D. 1992. The natural interleukin-1 receptor antagonist in term and pre-term parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167 (4 Pt 1): 863-872
62. Dinarello, C.A. 1992. Reduction of inflammation by decreasing production of interleukin-1 or by specific receptor antagonism. *Int. J. Tissue. React.* 14 (2): 65-75
63. Conti, P., Panara, M.R., Barbacane, R.C., Bongrazio, M., Dempsey, R.A., Reale, M. 1993. Human recombinant IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) inhibits leukotriene B4 generation from human monocyte suspensions stimulated by lipopolysaccharide (LPS). *Clin. Exp. Immunol.* 91/3: 526-531
64. DeForge, L.E., Tracey, D.E., Kenney, J.S., Remick, D.G. 1992. Interleukin-1 receptor antagonist protein inhibits interleukin-8 expression in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *Am. J. Pathol.* 140 (5): 1045-1054
65. Porat, R., Poutsiaka, D.D., Miller, L.C., Granowitz, E.V., Dinarello, C.A. 1992. Interleukin-1 (IL-1) receptor blockade reduces endotoxin and Borreliella burgdorferi-stimulated IL-8 synthesis in human monoclear cells. *Faseb. J.* 6 (7): 2482-2486
66. Boermeester, M.A., van Leeuwen, P.A.M., Schneider, A.J., Houdijk, A.P.J., Ferwerda, C.C., Wesdorp, R.I.C. 1993. Interleukin-1 receptor antagonist: A new therapeutic agent in the treatment of septic syndrome. *Ned. Tijdschr. Geneesks.* 137/7: 337-342
67. Smith, R.J., Chin, J.E., Sam, L.M., Justen, J.M. 1991. Biologic effects of an interleukin-1 receptor antagonist protein on interleukin-1-stimulated cartilage erosion and chondrocyte responsiveness. *Arthritis Rheum.* 34 (1): 78-83
68. Conti, P., Barbacane, R.C., Panara, M.R., Reale, M., Placido, F.C., Fridas, S., Bongrazio, M., Dempsey, R.A. 1992. Human recombinant interleukin-1 receptor antago-

- nist (hrIL-1ra) enhances the stimulatory effect of interleukin-2 on natural killer cell activity against MOLT-4 target cells. *Int. J. Immunopharm.* 14/6: 987-993
69. Selig, W., Tocker, J. 1992. Effect of interleukin-1 receptor antagonist on antigen-induced pulmonary responses in guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 213/3: 331-336
70. McCarthy, P.L. Jr., Abhyankar, S., Neben, S., Newman, G., Sieff, C., Thompson, R.C., Burakoff, S.J., Ferrara, J.L.M. 1991. Inhibition of interleukin-1 by an interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host diseases. *Blood* 78/8: 1915-1918
71. Estrov, Z, Kurzrock, R., Wetzler, M., Kantarjian, H., Blake, M., Harris, D., Gutterman, J.U., Talpaz, M. 1991. Suppression of chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors: A novel application for inhibitors of IL-1 activity. *Blood* 78/6: 1476-1484
72. Thomas, T.K., Will, P.C., Srivastava, A., Wilson, C.L., Harbison, M., Little, J., Chesonis, R.S., Pignatello, M., Schmolze, D., Symington, J., Kilin, P.L., Thompson, R.C. 1991. Evaluation of an interleukin-1 receptor antagonist in the rat acetic acid-induced colitis model. *Agents Actions* 34/1-2: 187-190
73. Carter, D.B., Deibel, M.R. Jr., Dunn, C.J., Tomich, C.S.C., Laborde, A.L., Slightom, J.L., Berger, A.E., Bienkowski, M.J., Sun, F.F., McEwan, R.N., Harris, P.K.W., Yem, A.W., Waszak, G.A., Chosay, J.G., Sieu, L.C., Hardee, M.M., Zurcher Neely, H.A., Reardon, I.M., Heinrikson, R.L. et al. 1990. Purification, cloning expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344/6267: 633-638
74. Larsen C.G, Anderson A.O, Apella E., Oppenheim J.J., Matsushima K., 1989. *Science* 243:1464;
75. Larsen C.G., Jinquan T., Deleurant B., Thestrup-Pedersen K. 1993, IL-10 is a potent regulator of the

- chemotactic response of mononuclear cells, but not of granulocytes. *J. Invest. Dermatol.* Vol 100, No 6
76. Sankoff and Kruskal in chapter 1 of "Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison" (Addison-Wesley, Reading, Mass. 1983).
 77. Berzofsky, *Science* **229**, (1985) 932-940
 78. Bowie et al., *Science* **247**, (1990) 1306-1310
 79. Wasserman et al., *J. Immunol.* **87**, 1961, 290-295
 80. Levine et al., *Methods in Enzymology* **11**, 1967, 928-936
 81. Lewis et al., *Biochemistry* **22**, 1983, 948-954
 82. Rene de Waal Malefyt, John Abrahams, Bruce Bennet, Carl G. Figdor and Jan E. de Vries (1991), Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J. Exp. Med.* **174**, 1209-1220
 83. Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, 1980, 467
 84. US Patent No. 4,235,871
 85. US 4,501,728
 86. US 4,837,028.
 87. Walter H. Gotlieb, John S. Abrams, Joanna M. Watson, Thierry J. Velu, Jonathan S. Berek, Otoniel Martinez-Meza (1992), Presence of interleukin 10 (IL-10) in the ascites of patients with ovarian and other intra-abdominal cancers. *Cytokine* **4**, No. 5, 385-390
 88. Blancho G., P. Gianello, Sh. Germana, M. Baetscher, D.H. Sachs and Chr. LeGuern (1995), Molecular identification of porcine interleukin 10: Regulation of expression in kidney allograft model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2800-2804
 89. Howard, M., T. Muchamuel, S. Andrade, S. Menon (1993), Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J. Exp. Med.* **177**, 1205-1208
 90. Chernoff, A.E., E.V. Granowitz, L. Shapiro, E. Vannier, G. Lonnemann, J.B. Angel, J.S. Kennedy, A.R. Rabson, S. Wolff, C.A. Dinarello (1995), A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory

- cytokine production and immune responses. *J. Immunol.* **154**, 5492-5499
91. Banerjee, A.K., S.W. Galloway and A.N. Kingsnorth (1994), Experimental models of acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* **81**, 1096-1103
 92. Hong, S.S., D.S. Chin, T.S. Cho, S.E. Kim (1962), Experimental pancreatitis induced by alcohol and bile in rabbits. *Annals of Surgery* **156(6)**, 929-939
 93. Bodansky, M. (1984), *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin
 94. Pelton, J.T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 233-239
 95. Dyson, H., et al. (1988), *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **17**, 305-324).
 96. Nakanishi, H., et al. (1993), Peptidomimetics of the immunoglobulin supergene family - a review. *Gene* **137**, 51-56
 97. US 5,446,128
 98. Walter et al. (1995), *Biochemistry* **34**, 12118-25
 99. Marshall, G.R. (1993), *Tetrahedron* **49**, 3547-3558
 100. Merrifield, R.B. (1963), *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154)
 101. Kent, S.B.H. (1988), *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 957-989
 102. Carpino, L.A. and Han, G.Y. (1972), *J. Org. Chem.* **37**, 3404-3409
 103. Stewart, J.M. and Young, J.D. (1983), "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois
 104. Atherton, E. and Sheppard, R.C. (1989), "Solid Phase Peptide Synthesis", IRL Press at Oxford University Press
 105. Pennington, M.W. and Dunn, B.M. (eds.) (1994), "Peptide Synthesis Protocols", Humana Press, Totowa, New Jersey
 106. Ikeda, N. et al. (1995), *Infection and Immunity*, 4812-4817
 107. Fink, G.W. and Norman, J.G. (1996), "Intrapancreatic Interleukin-1 β Gene Expression by Specific Leukocyte

- Populations during Acute Pancreatitis", *J. Surgical Research* 63, 369-373
108. Gaur, D. et al. (1996), "Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies)", *Nature*, 379, 333-335
109. Poli, G. et al. (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 108-112
110. Jensen, I.M. et al. (1993), *Analyt. Cell. Pathol.* 5, 213-223
111. Berman, R.M., Suzuki, T. et al. (1996), "Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific, longlived immune response against established tumors in mice", *J. Immunol.* 157, 231-238
112. Zheng, L.M., Ojcius, D.M. et al. (1996), "IL-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism", *J. Exp. Med.* 184, 579-584
113. Kundu, N., Beaty, T.L. et al. (1996), "Antimetastatic and anti-tumor activities of IL-10 in a murine model of breast cancer", *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 479-480
114. Kollmann, T.R., Pettoello-Mantovani, M. et al. (1996), "Inhibition of acute in vivo HIV infection by human IL-10 treatment of SCID mice implanted with human fetal thymus and liver", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3126-3131
115. Maini, R.N. (1996), "A perspective on anti-cytokine and anti T cell directed therapies in rheumatoid arthritis", *Clin. Exp. Rheumatol.* 13, suppl. 12, S35-40

서열 리스팅

- (1) 개요
- (i) 출원인 :
- (A) 성명 : 스티노 리서치 그룹 A/S
- (B) 스트리트 : 둔비르케베지 6
- (C) 시티 : 오텐스 SV
- (E) 국가 : 덴마크
- (F) 우체국 코드 (ZIP) : 5250
- (ii) 발명의 제목 : 면역 조절체
- (iii) 서열의 수 : 23
- (iv) 컴퓨터 판독 형태 :
- (A) 미디어 타입 : 플로피 디스크
- (B) 컴퓨터 : IBM PC 호환형
- (C) 오퍼레이팅 시스템 : PC-DOS/MS-DOS
- (D) 소프트웨어 : 페이턴트 인 릴리즈 #1.0, 버전 #1.30 (EPO)
- (2) SEQ ID NO: 1의 정보 :
- (i) 서열 특성 :
- (A) 길이 : 아미노산 9 개

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 타입 : 펩티드

(iii) 가설 : 없음

(xi) 서열의 기술 : SEQ ID NO: 9 :

Ala Tyr Val Thr Met Lys Ile Arg Asp

1 5

(2) SEQ ID NO: 10의 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 아미노산 9 개

(B) 타입 : 아미노산

(C) 꼬임 :

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 타입 : 펩티드

(iii) 가설 : 없음

(xi) 서열의 기술 : SEQ ID NO: 10 :

Ala Tyr Met Thr Ile Lys Ile Arg Asp

1 5

(2) SEQ ID NO: 11의 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 아미노산 9 개

(B) 타입 : 아미노산

(C) 꼬임 :

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 타입 : 펩티드

(iii) 가설 : 없음

(xi) 서열의 기술 : SEQ ID NO: 11 :

Ala Tyr Met Thr Leu Lys Ile Arg Asp

1 5

(2) SEQ ID NO: 12의 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 아미노산 9 개

(B) 타입 : 아미노산

(C) 꼬임 :

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 타입 : 펩티드

(iii) 가설 : 없음

(xi) 서열의 기술 : SEQ ID NO: 12 :

Ala Tyr Met Thr Val Lys Ile Arg Asp

1 5

(2) SEQ ID NO: 13의 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 아미노산 9 개

(B) 타입 : 아미노산

(C) 꼬임 :

(D) 형태 : 선형

(xi) 서열의 기술 : SEQ ID NO: 21 :

Xaa Xaa Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa

1 5

(2) SEQ ID NO: 22의 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 아미노산 9 개

(B) 타입 : 아미노산

(C) 꼬임 :

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 타입 : 펩티드

(iii) 가설 : 없음

(xi) 서열의 기술 : SEQ ID NO: 22 :

Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa

1 5

(2) SEQ ID NO: 23의 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 기본 페어(base pairs) 27 개

(B) 타입 : 핵산

(C) 꼬임 : 단일(single)

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 타입 : DNA(게놈성: genomic)

(iii) 가설 : 없음

(xi) 서열의 기술 : SEQ ID NO: 23 :

GCCTACATGA CAATGAAGAT ACGAAAC

(57) 청구의 범위

청구항 1

다음 서열식에 따른 물질 또는 폴리펩티드의 용도로서:

$X_1-X_2-X_3$ -Thr- X_4 -Lys- X_5 -Arg- X_6 (SEQ ID NO: 22)

여기서,

X_1 는 Ala 또는 Gly이고,

X_2 는 Tyr 또는 Phe이고,

X_3 및 X_4 및 X_5 는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X_6 는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되거나, 및/또는 이 펩티드가 사이클화되거나, 및/또는 이 펩티드가 안정화되거나, 및/또는 아미노기로 종결된 아미노산 잔기가 아실화되거나, 및/또는 카르복시기로 종결된 아미노산 잔기가 아마이드화되는 폴리펩티드 또는 물질, 및

상기 서열식을 기초로 하여 모델링된 펩티드 모사체의 TNF α 생성을 감소시키기 위한 의약 조성물 제조용 용도.

청구항 2

다음 서열식에 따른 물질 또는 폴리펩티드의 용도로서:

$X_1-X_2-X_3$ -Thr- X_4 -Lys- X_5 -Arg- X_6 (SEQ ID NO: 22)

여기서,

X_1 는 Ala 또는 Gly이고,

X₂는 Tyr 또는 Phe이고,

X₃ 및 X₄ 및 X₅는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X₆는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되거나, 및/또는 이 펩티드가 사이클화되거나, 및/또는 이 펩티드가 안정화되거나, 및/또는 아미노기로 종결된 아미노산 잔기가 아실화되거나, 및/또는 카르복시기로 종결된 아미노산 잔기가 아마이드화되는 물질 또는 폴리펩티드, 및

상기 서열식을 기초로 하여 모델링된 펩티드 모사체의 체장염을 치료하거나 예방하기 위한 의약 조성물 제조용 용도.

청구항 3

다음 서열식에 따른 물질 또는 폴리펩티드의 용도로서:

X₁-X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO: 22)

여기서,

X₁는 Ala 또는 Gly이고,

X₂는 Tyr 또는 Phe이고,

X₃ 및 X₄ 및 X₅는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X₆는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되거나, 및/또는 이 펩티드가 사이클화되거나, 및/또는 이 펩티드가 안정화되거나, 및/또는 아미노기로 종결된 아미노산 잔기가 아실화되거나, 및/또는 카르복시기로 종결된 아미노산 잔기가 아마이드화되는 물질 또는 폴리펩티드, 및

상기 서열식을 기초로 하여 모델링된 펩티드 모사체의 후천성 면역 결핍증(AIDS) 또는 피부의 HPV-감염증과 같은 바이러스성 감염증을 치료하거나 예방하기 위한 의약 조성물 제조용 용도.

청구항 4

다음 서열식에 따른 물질 또는 폴리펩티드:

X₁-X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO: 22)

여기서,

X₁는 Ala 또는 Gly이고,

X₂는 Tyr 또는 Phe이고,

X₃ 및 X₄ 및 X₅는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X₆는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되는데, 이 물질이나 폴리펩티드가 IT9302의 생물학적 활성 중 한 가지 이상을 갖는 물질 또는 폴리펩티드.

청구항 5

다음 서열식에 따른 물질 또는 폴리펩티드:

X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO: 21)

여기서,

X₂는 Tyr 또는 Phe이고,

X₃ 및 X₄ 및 X₅는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X₆는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되는데, 이 물질이나 폴리펩티드가 IT9302의 생물학적 활성 중 한 가지 이상을 갖는 물질 또는 폴리펩티드.

청구항 6

다음 서열식에 따른 물질 또는 폴리펩티드:

X_3 -Thr- X_4 -Lys- X_5 -Arg- X_6 (SEQ ID NO: 20)

여기서,

X_3 및 X_4 및 X_5 는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X_6 는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되는데, 이 물질이나 폴리펩티드가 IT9302의 생물학적 활성 중 한 가지 이상을 갖는 물질 또는 폴리펩티드.

청구항 7

다음 서열식에 따른 물질 또는 폴리펩티드:

Thr- X_4 -Lys- X_5 -Arg- X_6 (SEQ ID NO: 19)

여기서,

X_4 및 X_5 는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X_6 는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되고,

임의로 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 중에서 한 가지 이상이 각각 비-천연성이거나 통상적이지 않은 아미노산으로 치환되는데, 이 물질이나 폴리펩티드가 IT9302의 생물학적 활성 중 한 가지 이상을 갖는 물질 또는 폴리펩티드.

청구항 8

제 4-7 항 중 어느 항에 있어서, 사이클화된 물질 또는 펩티드.

청구항 9

제 4-7 항 중 어느 한 항에 있어서, 안정화된 물질 또는 펩티드.

청구항 10

제 4-7 항 중 어느 한 항에 있어서, 아미노기로 종결된 아미노산 잔기가 아실화된 물질 또는 펩티드.

청구항 11

제 4-7 항에 있어서, 카복실기로 종결된 아미노산 잔기가 아마이드화된 물질 또는 펩티드.

청구항 12

다음 서열식을 기초로하여 모델링된 폴리펩티드 모사체:

X_1 - X_2 - X_3 -Thr- X_4 -Lys- X_5 -Arg- X_6 (SEQ ID NO: 22)

여기서,

X_1 는 Ala 또는 Gly이고,

X_2 는 Tyr 또는 Phe이고,

X_3 및 X_4 및 X_5 는 각각 Met, Ile, Leu 및 Val로 이루어진 군 중에서 선택되고,

X_6 는 Asp, Gln 및 Glu로 이루어진 군 중에서 선택되는데,

이 폴리펩티드 모사체가 IT9302의 생물학적 활성 중 한 가지 이상을 갖는 폴리펩티드 모사체.

청구항 13

제 4-12 항 중 어느 한 항에 의한 물질 또는 폴리펩티드로 이루어진 의약 조성물.

청구항 14

표 1 및 2에 개시되어 있는 질병 중 한 가지 이상의 치료용 또는 예방용의, 제 4-12 항 중 어느 한 항에 의한 물질 또는 폴리펩티드의 용도.

청구항 15

표 1 및 2에 개시되어 있는 질병 중 한 가지 이상을 치료하거나 예방하기 위한 의약 조성물 제조용의, 제 4-12 항 중 어느 한 항에 의한 물질 또는 폴리펩티드의 용도.

청구항 16

표 1 및 2에 개시되어 있는 질병 중 한 가지 이상의 질병을 앓는 환자에게 제 4-12 항 중 어느 한 항에

의한 물질 또는 폴리펩티드의 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 양을 투여하는 것으로 이루어진, 표 1 및 2에 개시되어 있는 질병 중 한 가지 이상의 질병의 치료 방법 및/또는 예방법.

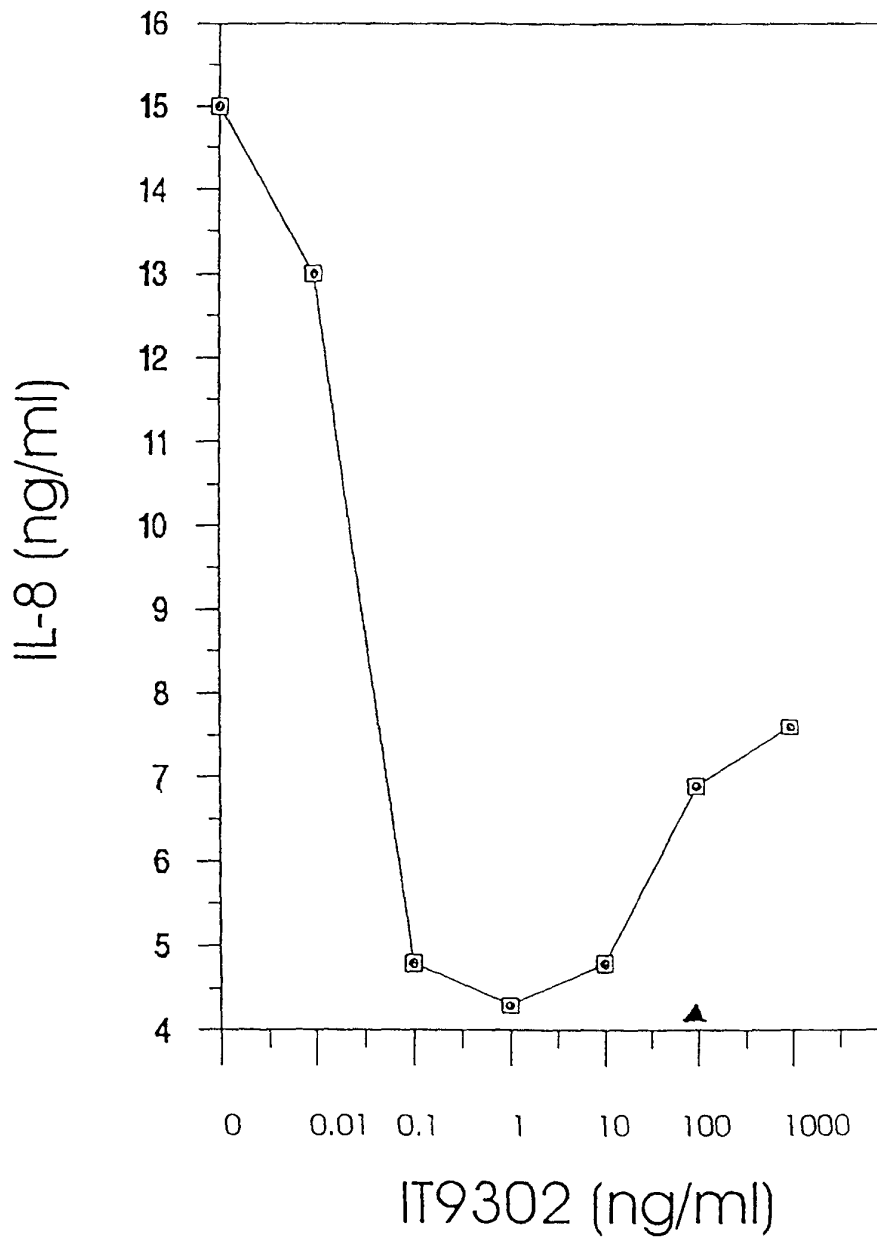
청구항 17

다음 단계로 이루어진, 고체상 펩티드 합성법(SPPS)을 이용한, 제 4-12 항 중 어느 한 항에 의한 물질 또는 펩티드의 합성 방법:

- a) N-알파-보호된, 임의로 부사슬-보호된 반응성 유도체의 형태로 C-종결된 아미노산을 직접적으로나 고체 지지체에 대한 적절한 링커에 의해 공유 결합적으로 커플링하고,
- b) N-알파 보호기를 제거하고,
- c) 단계별 방식으로 목적하는 서열에 따라 후속으로 보호된 아미노산인을 첨가하고,
- d) 존재하는 부사슬 보호기를 제거하고,
- e) 완전한 펩티드 사슬이 조립되면 수지와 펩티드를 분리하고, 임의로
- f) 펩티드의 안정화 및/또는 사이클화 및/또는 아미노기로 종결된 아미노산 잔기의 아실화 및/또는 카르복실기 종결된 아미노산 잔기의 아미드화함.

도면

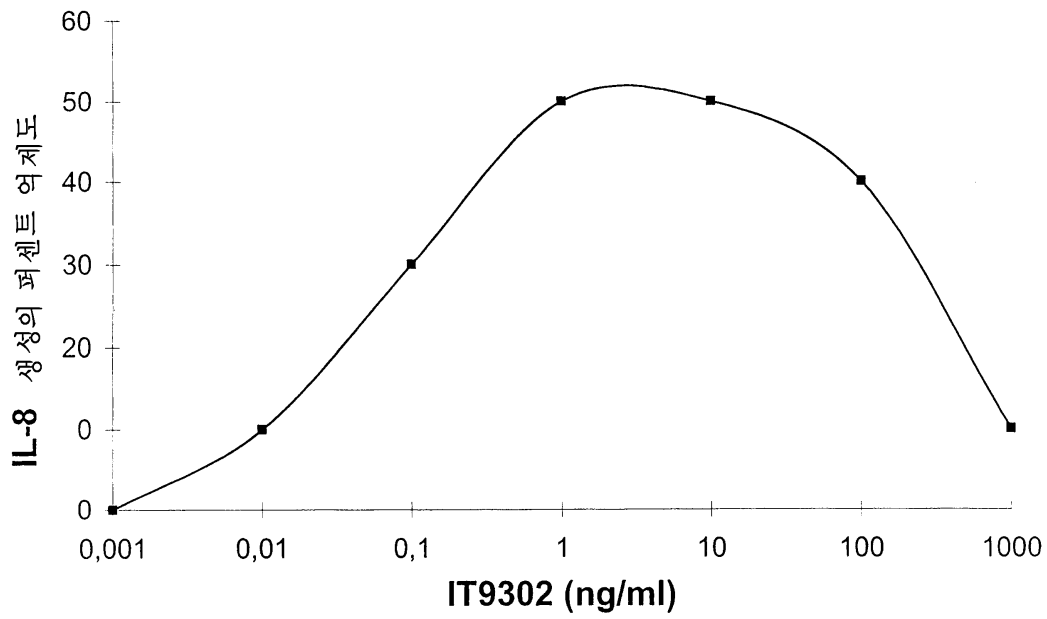
도면1



IT9302가 정제된 배양 단구세포에 의한 자발적인 IL-8의 생성을 억제함. (▲)은 rh IL-10 (100 ng/ml)를 사용할 때의 IL-8의 레벨을 나타냄.

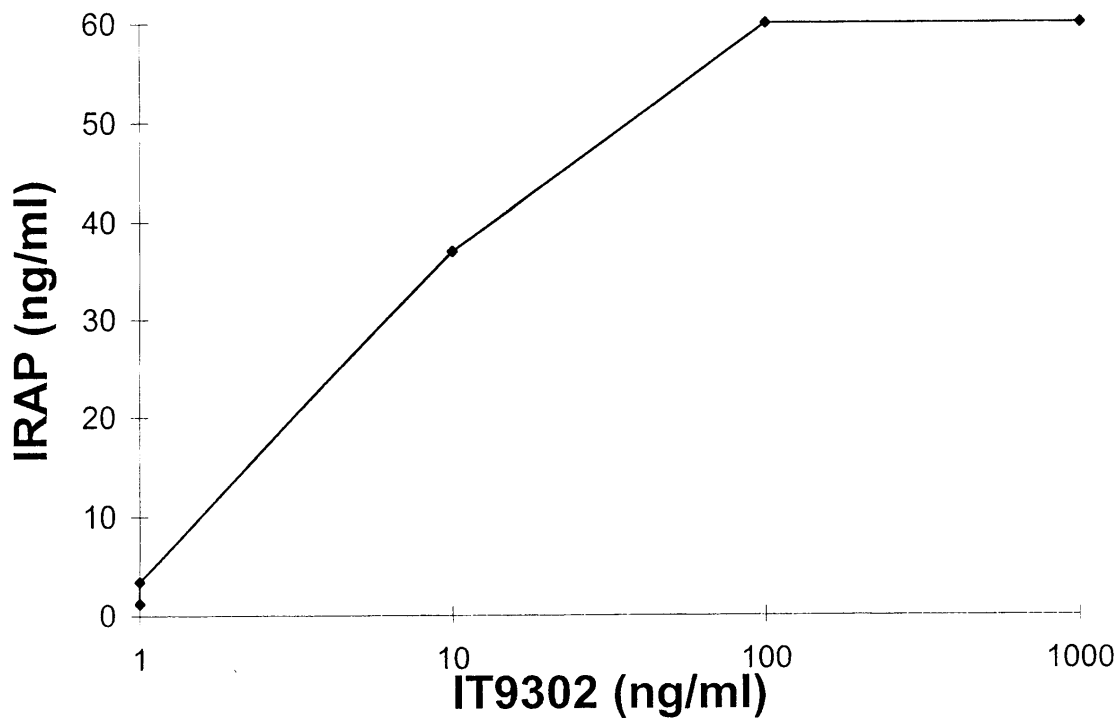
도면2

IT9302 인체 말초 혈관 단핵구 세포에 의한
IL-1 유도성(1 ng/ml) IL-8 생성을 억제함



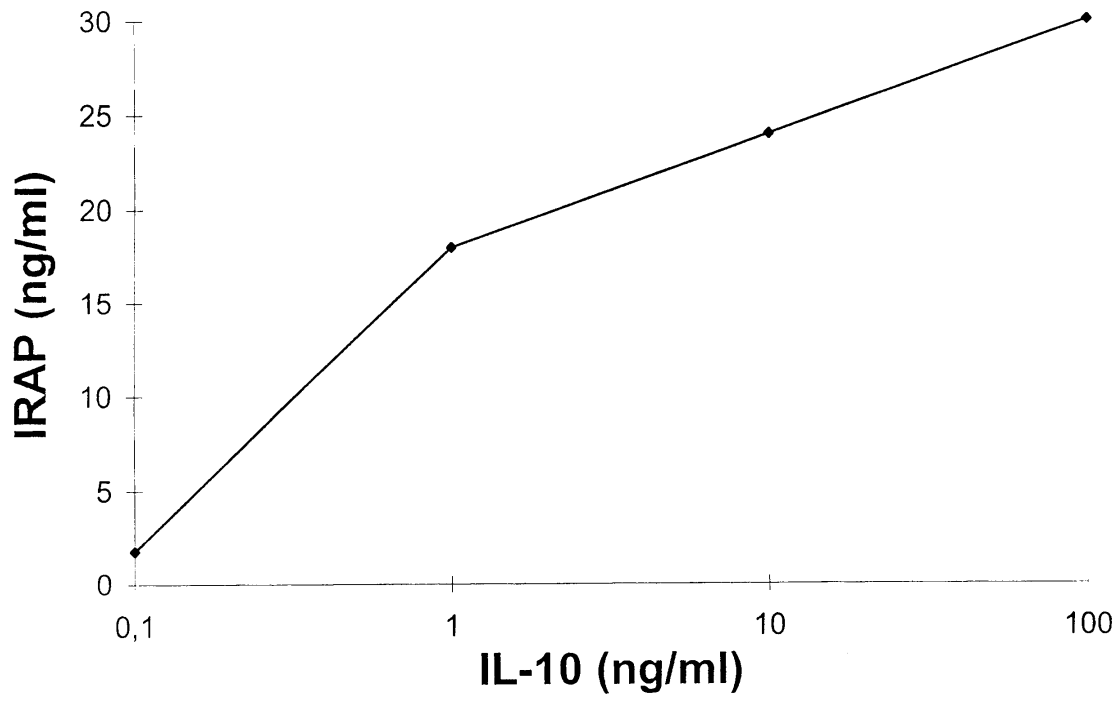
도면3

IT9302 자극된 인체 단구 세포



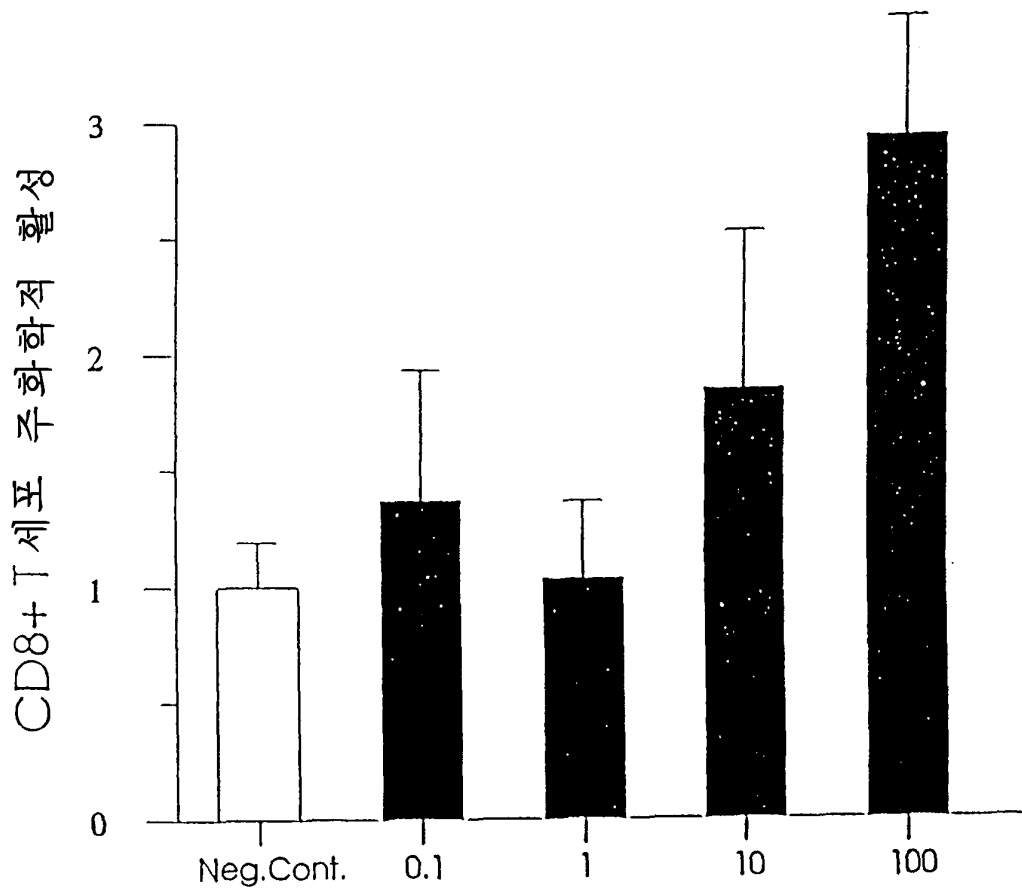
도면4

IL-10 자극된 인체 단구세포



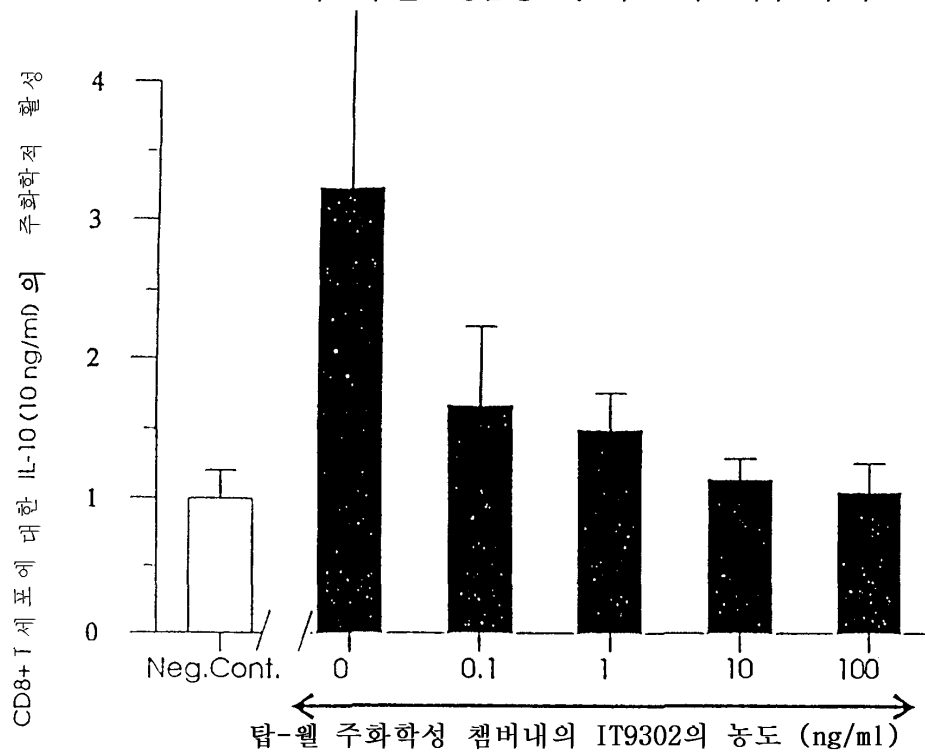
도면5

CD8+ T 세포에 대한 IT9302의 주화학적 활성



도면6

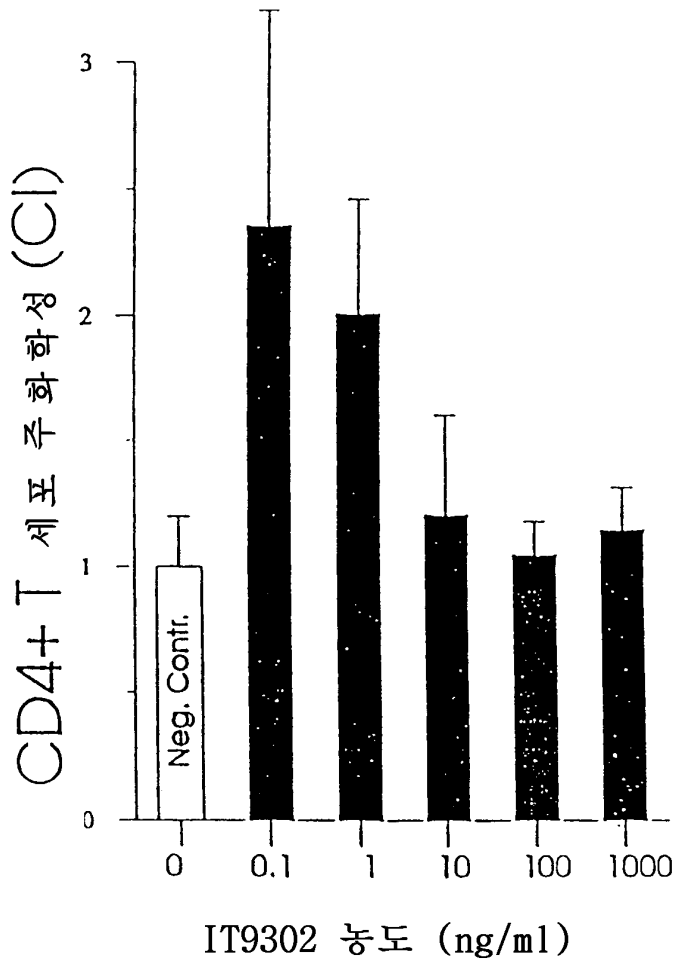
IL-10 (10 ng/ml) 유도 주화학성에 대한
CD8+ T 세포의 비반응성을 야기시키는
IT9302에 의한 CD8+ T세포의 제감작화



도면7

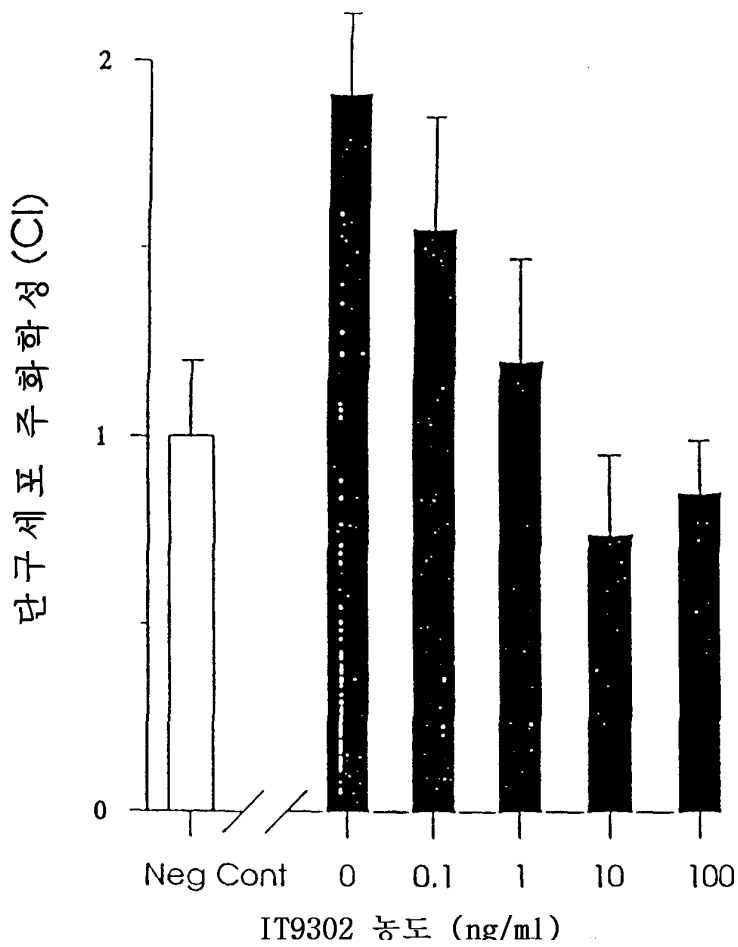
IT9302에 의한 IL-8 활성의 억제

IL-8(10 ng/ml) 매개 주화학성에 대한 IT9302의 효과



도면8

IT9302가 MCAF/MCP-1 유도
단구세포의 주화학성을 억제함



도면9

염소 안티-인체 IL-4 항체를 이용한 CD4+ T 세포 시토줄 단백질의
ECL-웨스턴 블롯팅

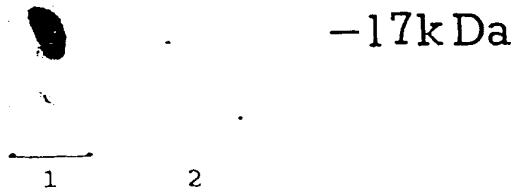


다음과 같은 것에 의한 3 일 동안의 자극화 반응:

1. 대조군
2. mon. 안티-IL-8 항체 WS.4 10 ug/ml,
3. rIL-8 100 ng/ml,
4. rIL-10 100 ng/ml,
5. IT9302 10 ng/ml,
6. rIFN 감마 10 ng/ml.

도면10

토끼 안티-인체 TNF- α 항체를 이용한 인체 혼합 림프구
배양 시토솔 단백질의 ECL-웨스턴 블롯팅

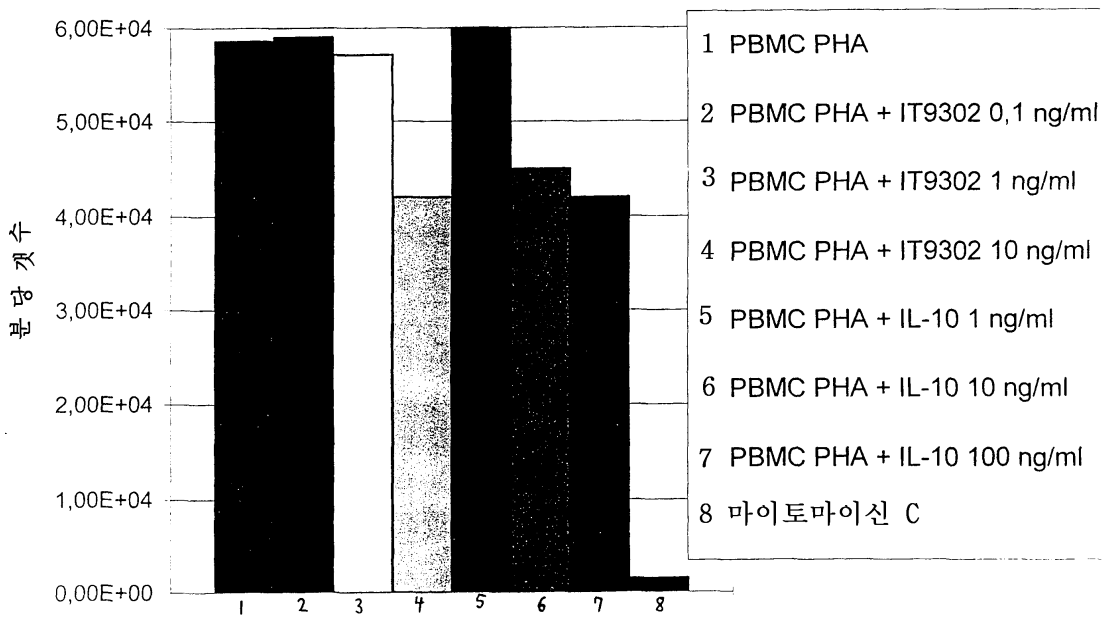


다음과 같은 것에 의한 24 시간 동안의 자극 :

1. 대조군
2. IT9302 10 ng/ml

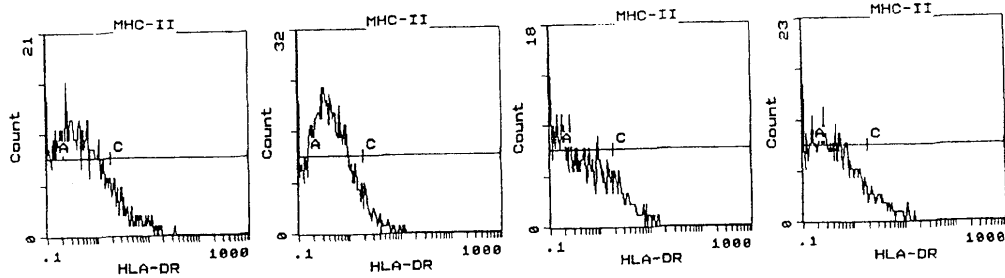
도면11

IL-10 및 IT9302에 의한 증식의 조절



도면12

인체 단구세포에 대한 HLA-DR 발현 (플로우-시토메트리)



무자극화된 세포 + IFN- 감마 (10 ng/ml) +IL-10 (10 ng/ml)+IFN(10 ng/ml) +IT9302 (1 ng/ml)+IFN(10 ng/ml)

HLA-DR 발현 세포%:

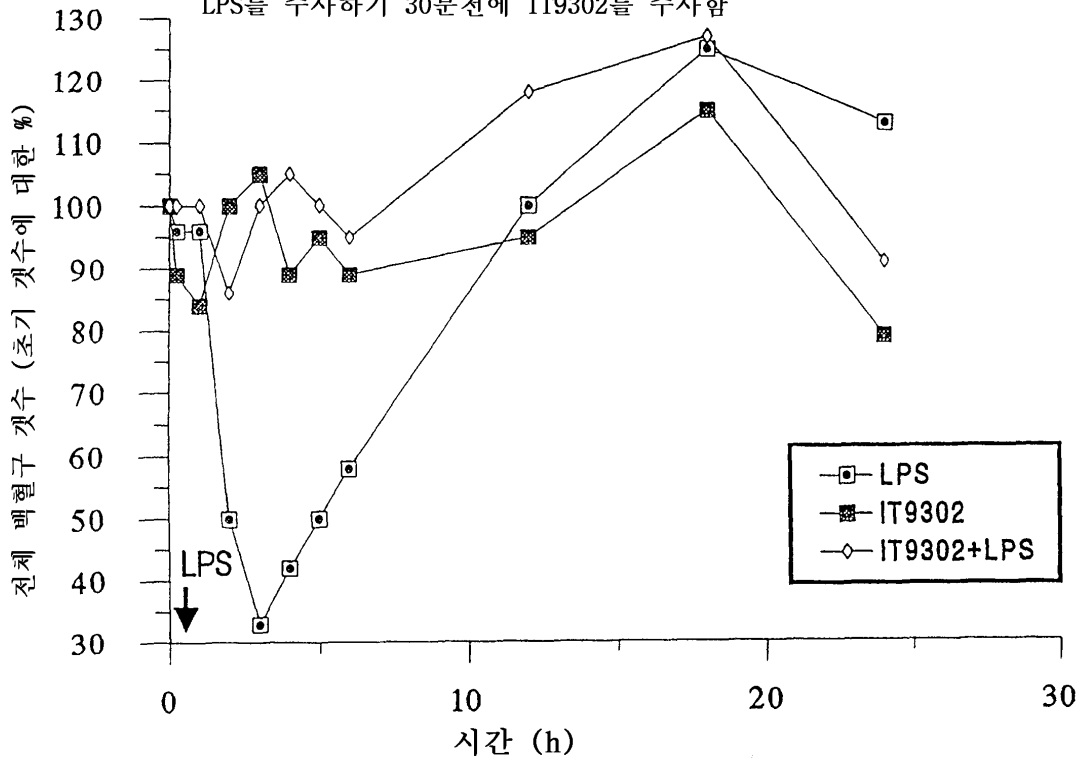
36.8 58.4 25.2 31.2

아포프토시스 세포%:

6.6 4.1 10.3 9.3

도면13

LPS 유도 패혈증성 백혈구감소증에 대한 IT9302의 효과
LPS를 주사하기 30분전에 IT9302를 주사함



도면14

급성 췌장염 유발시킨(5%담즙산)후에 말초혈관 혈액 내 백혈구 갯수 (토끼)

