

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> C07K 14/54		(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2003년 10월 23일 10-0393508 2003년 07월 22일
(21) 출원번호 (22) 출원일자 번역문제출일자 (86) 국제출원번호 (86) 국제출원일자	10-1996-0707590 1996년 12월 31일 1996년 12월 31일 PCT/EP1995/02358 1995년 06월 19일	(65) 공개번호 (43) 공개일자 (87) 국제공개번호 (87) 국제공개일자	특 1997-0703990 1997년 08월 09일 WO 1996/01274 1996년 01월 18일
(30) 우선권주장	P4423131.8 1994년 07월 01일 독일(DE)		
(73) 특허권자	바이엘 약티엔게젤샤프트 독일 데-51368 레버쿠센		
(72) 발명자	와일드, 하노 미국 06477 코텍티커트주 오렌지 롱메도우 로드 397 한코, 루돌프 독일 데-40237 뒤셀도르프 실러스트라쎄 23 되르슈크, 미카엘 독일 데-42579 하일리겐하우스 부켄스트라쎄 5 회를라인, 한스-디트리히 독일 데-42113 부퍼탈 파울-에를리히-스트라쎄 20 보이닝크, 위르겐 독일 데-42329 스피쯔베크스트라쎄 29 아펠러, 하이너 독일 데-42115 부퍼탈 클라우디우스베크 3 벨만, 헤르만 독일 데-42349 부퍼탈 마스트베크 30아 세발트, 발터 독일 데-97074 뷔르쯔부르크 마이어-올버슬레벤-스트라쎄 7		
(74) 대리인	주성민		

심사관 : 권오희

(54) 인간 인터루킨 4의 안타고니스트 또는 부분적 아고니스트로서의 신규hIL-4 변이단백질

명세서

- <1> 본 발명은 신규 hIL-4 변이 단백질, 그의 제조 방법, 및 이들의 의약으로서의 용도, 특히 과잉증식, 잘못 조절된 면역 반응 및 자기면역 질환에 관련된 치료제로서의 용도에 관한 것이다.
- <2> PCT 국제 공개 제93/10235호에는 hIL-4 변이 단백질인 hIL-4의 안타고니스트 또는 부분적 아고니스트이거나 이들을 함유하는 치료제에 관해 이미 개시하고 있다.
- <3> 인간 인터루킨 4 (hIL-4)는 여러 사이토킨 중의 하나로서, 림프세포 및 골수세포의 증식, 성숙, 생존 및 분화를 유도 및 조절한다 특히, hIL-4는 IgE 매개된 면역 반응에 관여하고, 흉선세포 및 활성화된 T 세포의 증식을 직접 증진시킨다. 분자량이 140,000인 고 친화도 IL-4 수용체 단백질이 분리되었으며, 그의 cDNA 서열에 따르면 800개의 아미노산 잔기로 이루어져 있다. 이 단백질은 최근에 헤마토포이에틴 (hematopoietin) 수용체 초대형군으로 명명된 수용체군에 속한다.
- <4> 클로닝된 cDNA에 근거할 때, 성숙 IL-4의 아미노산 서열은 129개의 잔기로 이루어진다. cDNA는 이. 콜리 및 효모에서 발현된 바 있다. 높은 생물학적 활성을 지닌 재조합 IL-4를 이들로부터 분리할 수 있다.
- <5> 매우 최근에, 인간 인터루킨 4에 대해 길항 특성을 보이는 모노클로날 항체가 개시되었다. 이 항체는 Fab 단편을 포함하며, 인간/인간 하이브리도마 세포주에 의해 생산된다. (비)글리코실화 인간 IL-4에 대해 면역화된 쥐의 비장 세포로부터의 하이브리도마 세포주 또한 hIL-4에 대한 모노클로날 항체를 생산한다.
- <6> 알레르기성 반응에 인터루킨 4이 관여한다는 사실은 알레르기 질병을 촉발하는 연쇄반응이, 인터루킨 4 매개 반응을 억제하거나 hIL-4와 경쟁하는 물질에 의해 억제될 것이라는 기대에 근거를 제공한다.
- <7> 독일 특허출원 공개 제4137333A1호에는 hIL-4 아생형의 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127

또는 128 위치 중 하나 이상에서 천연적으로 나타나는 아미노산이 각각 하나 이상의 다른 가능한 천연 아미노산으로 치환된 hIL-4 변이 단백질을 기재하고 있다. 이 hIL-4 변이 단백질은 인간 hIL-4의 안타고니스트 또는 부분적 아고니스트이다.

<8> 본 발명은 인간 인터루킨 4의 안타고니스트 또는 부분적 아고니스트로서 121, 124 또는 125 위치에서의 치환 이외에 hIL-4 단백질에 추가 변형이 수행된 신규 hIL-4 변이 단백질에 관한 것이다. 이 변형들은 hIL-4 변이 단백질의 안정성을 증가시키기 위하여, 생물학적 반감기를 연장시키기 위하여 또는 제조 및 정제 과정을 용이하게 하기 위하여 수행된다.

<9> 이를 위하여, 야생형에서 발견되는 천연 아미노산들은 결실되거나, 하나 이상의 위치에서 다른 아미노산으로 치환되거나, C-말단 또는 N-말단에서 다른 부가적 아미노산이 삽입되거나, 하나 이상의 아미노산이 다양한 비단백질 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 및 그의 유도체, 또는 글리코실 잔기에 의해 치환된다.

<10> 본 명세서에서 아미노산은 일반적으로 하기와 같이 나타내며, 간편히 하기 위해 그의 입체 배열 명칭을 생략하고 기재할 수 있다.

Ala	L-알라닌
Arg	L-아르기닌
Asn	L-아스파라긴
Asp	L-아스파르트산
Cys	L-시스테인
Gln	L-글루타민
Glu	L-글루탐산
Gly	L-글리신
His	L-히스티딘
Ile	L-이소루신
Leu	L-루신
Lys	L-리신
Met	L-메티오닌
Pro	L-프롤린
Phe	L-페닐알라닌
Ser	L-세린
Thr	L-트레오닌
Trp	L-트립토판
Tyr	L-티로신
Val	L-발린

<13> 비단백질 중합체는 미국 특허 제4,640,835호, 제4,496,689호, 제4,301,144호, 제4,670,417호, 제4,791,192호 또는 제4,179,337호에 기재된 바와 같이, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌인 것으로 이해된다.

<14> 글리코실화는 탄수화물 골격이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 결합하거나 ("N-글리코실화") 또는 당, 바람직하게는 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스가 세린, 트레오닌, 4-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신에 커플링되는 것(O-글리코실화)으로 이해된다.

<15> 아미노산 124 (티로신), 아미노산 121(아르기닌) 및 아미노산 125 (세린)이, 어떠한 조합으로든, 가능한 천연 아미노산 중 하나로 치환되고, 이에 더불어 분자의 N-말단 및(또는) C-말단이 변형되고(되거나) 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 분자에 공유적으로 결합되고(되거나) 분자 내에 존재하는 글

리코실화 부위가 부분적으로 또는 완전히 결실된 hIL-4 변이 단백질이 바람직하다.

- <16> 아미노산 124 (티로신), 아미노산 121 (아르기닌) 및 아미노산 125 (세린)이, 어떠한 조합으로든, 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환되고, 이에 더불어 분자의 N-말단 및(또는) C-말단이 변형되고(되거나) 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 분자에 공유적으로 결합되고(되거나) 분자 내에 존재하는 글리코실화 부위가 부분적으로 또는 완전히 결실된 유테인(mutein)이 그들 중에서도 특히 바람직한 실시태양이다.
- <17> 바람직한 실시 태양은 또한 아미노산 121 (아르기닌) 및 125 (세린)이 천연 아미노산, 바람직하게는 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환되고, 이에 더불어 분자의 N-말단 및(또는) C-말단이 변형되고(되거나), 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 분자에 공유적으로 결합되고(되거나), 분자 내에 존재하는 글리코실화 부위가 부분적으로 또는 완전히 결실된 것이다.
- <18> 더욱이, 특히 아미노산 124 (티로신)이 천연 아미노산으로 치환되고, 121 및(또는) 125 위치에서 1개 이하의 아미노산이 추가로 다른 가능한 아미노산으로 치환되며, 이에 더해 분자의 N-말단 및(또는) C-말단이 변형되고(되거나), 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 분자에 공유적으로 결합되고(되거나), 분자 내에 존재하는 글리코실화 부위가 부분적으로 또는 완전히 결실된 hIL-4 변이 단백질이 특히 바람직하다.
- <19> 아미노산 124 (티로신)이 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환되고, 위치 121이 다른 가능한 아미노산, 바람직하게는 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환되는 것 외에, 분자의 N-말단 및(또는) C-말단이 변형되고(되거나), 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 분자에 공유적으로 결합되고(되거나), 분자 내에 존재하는 글리코실화 부위가 부분적 또는 완전히 결실된 hIL-4 변이 단백질이 특히 바람직하다.
- <20> N-말단 메티오닌과 hIL-4 변이 단백질의 천연 N-말단 사이에 아미노산, 바람직하게는 Ala, Gly, Pro, Ser, Thr 또는 Val, 특히 바람직하게는 Ala이 삽입되는 것이 상기 예시에 있어서 N-말단 변형의 바람직한 실시 태양이다.
- <21> 이러한 타입의 발현된 생성물의 예는 Ala(-1)-Tyr(124)Asp, Ala(-1)-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp, Ala(-1)-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp, Ala(-1)-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp, Ala(-1)-Arg(121)Asp-Ser(125)Asp이 있다.
- <22> 상기된 실시태양에서 글리코실화 부위가 결실된 바람직한 실시 태양은 38 위치의 아스파라긴이 다른 천연 아미노산, 바람직하게는 아스파르트산으로 치환되고(되거나), 105 위치의 아스파라긴이 다른 천연 아미노산, 바람직하게는 아스파르트산으로 치환되는 것이다.
- <23> 이러한 타입의 발현된 생성물의 예는 Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Tyr(124)Asp, Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp, Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp, Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp, Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Arg(121)Asp-Ser(125)Asp이 있다.
- <24> hIL-4는, 예를 들어, 이. 콜리에서 유전자 조작에 의해 재조합 단백질(rhIL-4)로서 생산할 수 있다. 이와 같이 형성된 단백질을 가공화, 재생 및 단리할 수 있다. 이어서, rhIL-4는 예를 들어, 활성화된 T 세포의 DNA 합성/증식 또는 활성화된 B세포의 CD23 발현을 측정함으로써 결정될 수 있는 높은 특이적 생물학적 활성을 갖는다 [Kruse, N. 등 (1991) FEBS Lett. 286, 58-60; Kikutani, H, 등 (1986) Cell 47, 657-665].
- <25> hIL-4의 성숙 영역을 코딩하는 DNA 영역을 포함하거나, 그 자체가 hIL-4의 성숙 영역을 코딩하는 cDNA를 얻는 것에 관해서, 문헌 [Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., De Vries, J.E. Lee, F. 및 Arai, K.I. (1986) Proc. Natl Acad. Sci., USA 83, 5894-5898] 및 그의 참고 문헌으로 인용된 문헌을 참조할 수 있다. 본 명세서에서 "hIL-4의 성숙 영역을 코딩하는 cDNA"는 그로부터 예견되는 hIL-4 유테인이 마찬가지로 안타고니스트 또는 부분적 아고니스트인 전제하에, 대략 동일 수의 염기쌍을 가지며, 당업계의 구체적인 방법으로 특정화되는 cDNA의 변이형을 구성하는 cDNA로서 이해된다.
- <26> 본 명세서에서는 문헌 [Garr. C. 등 Biochemistry 1991, 30, 1515-1523]에 따라 hIL-4의 성숙 영역을 코딩하는 DNA 영역에 번호를 매긴 것이다.
- <27> 재조합적으로 제조된 cDNA (예를 들어, British Bio-Technology Ltd., 옥스포드, 영국)로부터 EcoRV/BamHI 단편을 잘라냄으로써 hIL-4의 성숙 영역을 코딩하는 cDNA를 단리할 수 있다. DNA 단편을 합성 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, 인터루킨 4의 첫번째 4개의 아미노산 코돈 및 개시 메티오닌을 위한 코돈을 포함하는 5'-CATGCACAAGTGCGAT 및 5'-ATCGCACTTGTG<sup>TS</sup>와 함께 발현 벡터, 예를 들어, 발현 벡터 pR<sup>TS</sup> pRC 109의 NcoI 및 BamHI 절단 부위 사이로 통합시킨다 [Weigel, U., Meyer, M. 및 Sebald, W. (1989) Eur. J. Biochem. 180, 295-300].
- <28> 적절히 변형된 뉴클레오타이드를 IL-4 코딩 DNA로 도입하거나 목적하는 IL-4 형태를 시험관내 합성함으로써 IL-4의 아미노산 서열 변형체를 생성한다. 이러한 변형체는 예를 들어, IL-4 아미노산 서열 내에서 잔기의 결실 또는 삽입 또는 치환을 포함한다. 본 명세서에서, 결실, 삽입 및 치환은 최종 생성물이 목적하는 특성을 보이는 한, 어떠한 조합으로나 최종 생성물을 얻는 데 이용할 수 있다. 이런 아미노산 변화에 의해서는 IL-4의 번역후 프로세싱도 변화시킬 수 있고, 예를 들어, 글리코실화 부위의 수 또는 위치, 막 결합 특성 및(또는) IL-4의 세포내 위치를 천연 IL-4의 리더 서열에서의 삽입, 결실 또는 기타 다른 조작에 의해 변화시킬 수 있다.
- <29> IL-4의 아미노산 서열 변형체를 작제할 때, 변이 부위의 위치 및 변이의 특성은 변화될 IL-4의 특성에 따라 달라진다. 변이 부위를, 예를 들어, (1) 초기에는 보존적으로 선택된 아미노산으로, 나중에는 성취될 결과에 따라 더 파격적인 대체물로 치환, (2) 표적 잔기의 결실, 또는 (3) 이들 변이 부위의

부근에 잔기의 삽입을 통해 개별적으로 또는 연속적으로 변화시킬 수 있다.

- <30> Cunningham 및 Wells (Science, 244: 1081-1085, 1989)에 의해 설명된 "알라닌-스캐닝 변이 유발"은 IL-4에서 바람직한 변이 부위가 될 특정 잔기 또는 영역을 찾아내는 데 적절한 방법이다. 이러한 경우에, 표적 잔기 또는 표적 잔기의 군을 찾아내고, (예를 들어, Arg, Asp, His, Lys 및 Glu와 같은 대전된 잔기), 아미노산과 세포의 내부 또는 주변 수성 환경의 상호 작용에 영향을 미치기 위하여 중성 또는 음성으로 대전된 아미노산 (가장 유리하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환한다. 이어서, 이 치환과 기능상 민감하게 반응하는 영역을 이 치환 부위에 또는 이 치환 부위 대신에 추가의 변형 또는 다른 변형을 도입함으로써 얻는다. 이것이 의미하는 바는, 아미노산 서열을 변화시키기 위한 부위는 미리 결정되지만, 아미노산 변화 그 자체의 특성이 미리 결정되어야 하는 것은 아니라는 것이다.
- <31> 따라서, 특정 부위에서 변이의 수행을 최적화하기 위하여, 표적 코돈 또는 표적 영역에서 Ala 스캐닝 또는 무작위 변이 유발 방법을 수행하고, 목적하는 특성을 얻는 것과 관련하여 발현된 IL-4 변형체가 최적으로 조합되었는가를 시험한다.
- <32> 결과적으로, 아미노산 서열 변형체를 제작할 때에는 두 가지 중요한 변수, 즉 변이 부위 및 변이 특성이 고려된다.
- <33> 대체적으로, 아미노산 서열에서 결실 크기는 약 1 내지 30개의 잔기, 바람직하게는 약 1 내지 10개의 잔기이고, 통상적으로 연속적이다. 일반적인 경우에, 결실은 서로 간에 바로 인접한 아미노산 잔기에 영향을 미친다.
- <34> 연속적 결실의 수는 이 결실이 일어난 영역에서 IL-4의 3차 구조, 예를 들어 시스테인 가교, 베타-폴리티드 시트 구조 또는 알파 나선 등이 유지되도록 선택된다.
- <35> 아미노산 서열에서의 삽입 예로는, 단일 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 갖는 폴리펩티드에 이르는 길이의 아미노 말단 및(또는) 카르복실 말단 융합, 및 서열 내부에 위치하는, 개개의 또는 수 개의 아미노산 잔기의 삽입 등이 있다. 서열 내에 위치하는 삽입 (즉, IL-4 서열 내의 삽입)은 약 1 내지 10개의 잔기, 바람직하게는 1 내지 5개의 잔기, 최적으로는 1 내지 3개의 잔기로 이루어질 수 있다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 IL-4, 재조합 세균 세포 배양물에서 IL-4의 직접 발현의 인공물, 세균 특이적 프로테아제 등에 의한 메티오닌의 용이한 제거를 위하여 메티오닌과 천연 N-말단 사이에 하나 이상의 아미노산의 추가 삽입, 재조합 숙주 세포로부터 성숙 IL-4의 방출을 촉진하기 위하여 이중 N-말단 신호 서열의 IL-4 분자의 N-말단으로의 통합, 및 IL-4의 용이한 단리를 위하여 폴리아미노산, 예를 들어, 폴리히스티딘의 통합이 있다. 대개, 이러한 신호 서열은 숙주 세포의 예상 타입으로부터 선택되므로 이러한 타입과 동족이다. 적절한 서열의 예는 이. 콜리 세포에 있어서, ompA, ompT, phoA, molE, amp 또는 pelB이고, 효모 세포에 있어서, 알파 인자, 아밀라제, 인버타제, 킬러 독소 및 멜리틴 프리프로-펩티드이고, 포유류 세포에 있어서, 헤르페스 gD와 같은 바이러스 신호가 있다.
- <36> 더욱 바람직한 신호 서열은 인터루킨 4의 천연 신호 서열이다.
- <37> 특히 바람직한 것은 인터루킨 4 변이 단백질이 천연 N-말단을 가질 수 있도록 발현 유기체 자체에 의해 제거되는 신호 서열이다.
- <38> 신호 서열 제거후 바람직한 발현 생성물은 Tyr(124)Asp, Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp, Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp, Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp, Arg(121)Asp-Ser(125)Asp이다.
- <39> IL-4의 다른 삽입 변형체로는 IL-4의 N-말단 또는 C-말단에 면역원성 폴리펩티드, 예를 들어 베타-락타마제와 같은 세균 폴리펩티드 또는 이. 콜리 trp 부위에 의해 코딩되는 효소, 또는 효모 단백질을 융합시킨 것과, 면역글로불린 불변 영역(또는 다른 면역글로불린 영역), 알부민 또는 페리틴과 같은 긴 반감기를 갖는 단백질을 IL-4의 C-말단으로 융합시킨 것 등이 있다 (1989년 4월 6일에 공개된 국제 공개 제89/02922호에 기재됨).
- <40> 추가의 변형체 군은 아미노산 치환을 갖는 것들이다. 이러한 변형체에서, IL-4 분자 중 하나 이상의 잔기가 다른 잔기로 치환된다.
- <41> 천연적으로 발생하는 잔기는 그들이 공통적으로 함유하는 측쇄의 특성에 기초하여 몇 개의 군으로 나뉜다.
- <42> 1) 소수성: Met, Ala, Val, Leu 및 Ile
- <43> 2) 중성 친수성: Cys, Ser 및 Thr
- <44> 3) 산성: Asp 및 Glu
- <45> 4) 염기성: Asn, Gln, His, Lys 및 Arg
- <46> 5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly 및 Pro
- <47> 6) 방향족: Trp, Tyr 및 Phe
- <48> 비보존적 치환은 이 군들 중 한 군의 구성원이 다른 군의 구성원으로 치환되는 것이다.
- <49> 폴리펩티드의 천연 글리코실화 패턴을 변화시킬 때, 대표적으로 아미노산 치환이 사용된다. "변화"란 천연 IL-4 중 하나 이상의 탄수화물 골격을 결실시키고(거나) 천연 IL-4에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 추가시키는 것을 의미한다.
- <50> 통상적으로, 폴리펩티드의 글리코실화는 N-결합 또는 O-결합된다. "N-결합"은 탄수화물 골격이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 커플링되는 것을 의미한다. 트리-펩티드 서열인 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 아미노산일 수 있음)은 탄수화물 골격의 아스파라긴 측쇄에 대한 효소적 커플링을 위한 인식 서열이다. 결과적으로, 폴리펩티드 중 이 트리-펩티드 서열의 존재는

잠재적 글리코실화 부위를 형성한다.

- <51> "0-결합"은 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중 하나가 히드록시아미노산, 특히 세린 또는 트레오닌에 커플링되는 것을 의미하지만, 4-히드록시프롤린 또는 5-히드록시세린도 또한 사용될 수 있다.
- <52> 아미노산 서열이 하나 이상의 상기한 트리-펩티드 서열 (N-결합 글리코실화 부위를 위한 것임)를 포함하도록 서열을 변화시켜 글리코실화 부위를 IL-4에 어려움 없이 부가한다. 0-결합된 글리코실화 부위의 경우에는, 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 천연 IL-4 서열에 가하거나 치환시킴으로써 마찬가지로 변화시킬 수 있다. 이 과정을 간편화하기 위해, IL-4 아미노산 서열을 바람직하게는 DNA 수준에서 변화시킴으로써, 특히 목적하는 아미노산으로 번역되는 코돈이 생산되도록, 미리 선택된 염기에서 IL-4 코딩 DNA를 변이시킴으로써 변화시킨다. 유사한 방법으로, (N-결합 글리코실화를 위해) 존재하는 하나 이상의 트리-펩티드 서열은 탄수화물 골격의 결실이 바람직한 경우, 트리-펩티드의 전체 또는 부분을 치환 또는 결실시킴으로써 변형된다. 0-글리코실화 부위의 경우에, 탄수화물 골격은 상응하는 아미노산을 치환하거나 결실시킴으로써 결실될 수 있다.
- <53> 글리코시드의 폴리펩티드로의 화학적 또는 효소적 커플링은 IL-4 중 탄수화물 골격의 수를 증가시키기 위한 추가의 방법이다. 이 방법들은 N-결합 및 0-결합된 글리코실화를 수행할 수 있는 숙주세포에서 폴리펩티드가 제조되는 필요가 없는한 유리하다. 사용된 커플링 메카니즘에 따라 당을 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카르복실기, (c) 유리 술폰드릴기, 예를 들어, 시스테인의 술폰드릴기, (d) 유리 히드록실기, 예를 들어, 세린, 트레오닌 또는 히드록시프롤린의 히드록실기, (e) 방향족 잔기, 예를 들어 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 방향족 잔기, (f) 글루탐인의 아미도기에 결합시킬 수 있다. 이 방법들은 1987년 9월 11일에 공개된 국제 공개 제87/05330호 및 문헌 (Aplin 및 Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp 259-306 (1981))에 기재되어 있다.
- <54> 상기 방법 외에, 천연 IL-4에 존재하는 탄수화물 골격을 제거하기 위한 화학적 또는 효소적 방법을 또한 사용할 수 있다. 화학적 탈글리코실화의 경우에, 폴리펩티드를 트리플루오로메탄술폰산 또는 그와 등가의 화합물에 노출시키는 것이 필요하다. 이 처리로 인해 대부분 또는 모든 당이 결합된 당 (N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)으로부터 떨어져 제거되는 반면, 폴리펩티드는 온전하게 유지된다. 화학적 탈글리코실화는 문헌[Hakkimuddin 등, Arch. Biochem. Biophysics., 259: 52 (1987) 및 Edge 등, Anal. Biochem., 118:31 (1981)]에 기재되어 있다. 폴리펩티드 중 탄수화물 골격은 Thotakura 등 (Meth. Enzymol., 138: 350 (1987))에 의해 기재된 바와 같이, 일련의 엔도글리코시다제 및 엑소글리코시다제를 사용하여 효소적으로 제거될 수 있다.
- <55> 잠재적 글리코실화 부위에서 글리코실화는 Duskin 등(J. Bio. Chem., 257: 3105 (1982))에 의해 기재된 바와 같이, 화합물 투니카마이신을 사용하여 방지될 수 있다. 투니카마이신은 단백질-N-글리코시드 결합의 형성을 차단한다.
- <56> IL-4의 공유적 변형의 추가 형태로는 미국 특허 제4,640,835호, 제4,496,689호, 제4,301,144호, 제4,670,417호, 제4,791,192호 또는 제4,179,337호에 기재된 바와 같이, IL-4을 상이한 비단백질 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌에 결합시키는 것이 있다.
- <57> 가공용으로 사용된 화합물, 치환 정도 및 반응 조건은 이관능성 화합물, 바람직하게는 각각 상이한 측쇄와 반응하는 일련의 화합물을 사용하여 실행함으로써 선택한다.
- <58> 생체 내에서 순환하는 단백질의 반감기를 증가시키기 위해 바람직하게 사용되는 방법은 그러한 단백질을 반감기를 연장시키는 중합체에 결합시키는 것이다. 따라서, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 C1-NH에 결합시키는 것은 반감기를 연장시키는 훌륭한 방법으로 입증되었다. PEG는 산화에틸렌 1 분자 당 물 3분자를 함유하는 비면역원성, 선형, 비대전된 중합체로서, 자신이 결합된 분자의 유체역학 특성을 극적으로 변화시킬 수 있다 (Maxfield, Polymer, 16: 505-509 (1975); Bailey, F.E., Nonionic Surfactants [Schick, M.J., Ed.] pp 794-821, 1967). 치료에 사용되는 효소 중에는 그들의 생체내 반감기를 효과적으로 증가하려는 목적으로 PEG에 결합시킨 사례가 몇몇 있다 (Abuchowski, A. 등, J. Biol. Chem., 252: 3582-3586, 1977; Abuchowski, A., Cancer Biochem. Biophysics., 7:175-186, 1984). IL-2 (인터루킨 2)를 PEG에 결합시키는 것은 순환 중 그의 수명 시간의 연장 뿐아니라 그의 효능을 증가시키는 것으로 보고되었다 (Katre, N.V 등, Proc. Natl. Acad. Sci., 84: 1487-1491 (1987); Goodson, R. 등, Bio/Technology, 8: 343-346, 1990). PEG를 다른 분자에 결합시키는 것은 이 분자들의 면역원성 및 독성을 감소시키는 것으로 보고되어 있다 (Abuchowski, A. J. Biol. Chem., 252: 3578-3581, 1977).
- <59> IL-4은 또한 예를 들어, 코아세르베이션 기술 또는 "계면 중합"에 의해 제조된 마이크로캡슐 (예를 들어, 히드록시메틸 셀룰로오즈 또는 젤라틴 마이크로캡슐 및 폴리-[메틸메타크릴레이트]마이크로캡슐), 또는 콜로이드성 약물 방출계 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노 스케일 입자 및 나노 스케일 캡슐), 또는 마크로에멀전 내에 포함시킬 수 있다. 이러한 기술은 Remington의 문헌 [Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Osol, A., Ed. (1980)]에 기재되어 있다.
- <60> IL-4 제제는 IL-4 분석법을 위한 표준물로서(예를 들어, 방사성 면역 분석법, 효소-커플링된 면역 분석법 또는 방사성 수용체 분석법에서 표준물로 사용하기 위하여 IL-4를 표지화함으로써), 항체의 단리에, 또한 친화 정제 기술에, 또한 방사성 요오드, 효소, 플루오로포어, 스핀 표지 등으로 표지될 경우에는, (IL-4의 경쟁적 형태의) 수용체 결합 분석법에 사용하기에 적절하다.
- <61> IL-4 변형체의 특성을 예견하는 것이 어렵기 때문에, 최적 변형체를 얻기 위해 생성된 변형체의 특정 스크리닝이 요구되는 것이 이해될 것이다. 따라서, 예를 들어, IL-4 분자의 면역학적 특성의 변화, 예를 들어, 특정 항체에 대한 친화도는 경쟁적 면역분석법으로 측정한다. 변형체를 그와 동일한 분석법으로 관찰된 천연 IL-4의 활성과 비교하여 변형체의 활성 감소 또는 증대에 관여하는 변화가 무엇인지 관찰한다. 단백질 또는 폴리펩티드 특성 중 다른 잠재적 변화, 예를 들어, 산화 환원 또는 열 안정성, 소수성, 단백질 분해에 대한 감수성, 재조합 세포 배양물 또는 플라즈마에서의 안정성, 또는 담체와 결합

하려는 경향 또는 멀티머를 형성하려는 경향을 당업계에 공지된 방법으로 측정한다.

#### <62> IL-4의 치료 제제 및 투여

<63> 본 발명의 신규 화합물은 인터루킨 4 매개되는 프로세스를 억제하거나 hIL-4와 경쟁한다. 따라서, 이들은 과잉증식 또는 잘못 조절된 면역 반응 및 자기면역 질병을 치료하는 데 적절하다. 이런 질병으로는 원발성 및 속발성 면역 결핍증이 포함된다. 이것 외에도, 본 발명의 안타고니스트는 이식술 및 종양 질병의 동종완화요법에 사용할 수 있다. 이들은 예를 들어, 알레르기 (1차 반응 및 IgE 매개된 반응의 차단, 공지된 알레르기의 경우에 불감화, 아토피성 질병, 천식 발병과 관련된 완화, IgE 과다 증후군), 이식 (기관 이식 중 HLA-DR 발현의 감소, 골수를 제거하는 경우, GVHR의 억제), IL-4 수용체를 발현하는 백혈병 및 충실성 종양 (오토크린 IL-4의 과잉생산의 감소, 종양 증식의 억제), 혈소판의 과잉생산과 관련된 반대 조절, 응집 장애의 치료 (단핵세포 차단을 경유), 지질 대사 장애에서의 용도, 탄수화물 균형 장애의 교정, 감염 (패혈증)에서 면역 상태의 증진을 포함한다.

<64> IL-4 변이 단백질은 수용해성이 우수하므로 전신 및 국부 양쪽으로 사용할 수 있으며, 특히 흡입 스프레이로서 사용할 수 있다. 또한 느린 방출 제제로서 제조하는 것이 가능하다. 모든 치료 형태에 있어서, 단기간 치료 또는 연속적 치료가 가능하다.

<65> 목적하는 순도를 얻은 후, IL-4 안타고니스트를 생리학적으로 허용가능한 담체, 보조 물질 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences, loc. cit)와 혼합함으로써 동결건조 또는 수용액의 형태로 보관되는 IL-4 안타고니스트의 치료 제제를 제조한다. 허용가능한 담체, 보조 물질 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도가 수용체에 유독하지 않은 것이며, 예를 들면 인산염, 시트르산염 및 다른 유기산과 같은 완충액, 아스코르브산과 같은 산화방지제, 저분자량 폴리펩티드 (약 10개 미만의 잔기), 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질, 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산, 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예를 들어, 글루코스, 만노스 또는 덱스트란, EDTA와 같은 킬레이트제, 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알코올, 나트륨과 같은 염 형성 카운터 이온 및(또는) 트윈, 플루로닉스 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)와 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.

<66> 생체 내에 이용하기 위하여, IL-4 안타고니스트는 멸균되어야 한다. 동결 건조 및 재구성 (reconstitution)의 전후에, 이를 멸균 막 여과지를 통해 여과시킴으로써 쉽게 수행한다. IL-4 안타고니스트를 일반적으로 동결 건조 형태로 또는 용액형태로 보관한다.

<67> 느리게 방출시키는 제제의 적절한 예는 IL-4 단백질을 함유하는 고흡 소수성 중합체로 이루어진 반투과성 매트릭스이고, 이 매트릭스들은 성형품, 예를 들어, 필름 정제 또는 마이크로캡슐이다. 느리게 방출시키는 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 [예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸메타크릴레이트)-Langer 등, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981); Lange, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)- 또는 폴리(비닐알코올)], 폴리액티드 (미국 특허 제3,773,919호, 유럽 특허 제58,481호), L-글루탐산과 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체 (Sidman 등, Biopolymers, 22: 547-556 (1983)), 비분해성 에틸렌/비닐 아세테이트 (Langer 등), 루프론 데포트 티엠 (Lupron Depot TM, 락트산/글리콜산 공중합체 및 루프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 마이크로스피어)와 같은 분해성 락트산/글리콜산 공중합체 및 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산이 있다 (유럽 특허 제133,988호). 에틸렌/비닐아세테이트 및 락트산/글리콜산과 같은 중합체는 분자를 100일 넘는 기간동안 방출하는 반면, 단백질은 특정 히드로겔의 경우에 비교적 단기간에 걸쳐 방출된다. 캡슐화된 단백질이 체내에 비교적 장기간 동안 남아 있는 경우, 37°C에서 수분에 의해 변성되거나 응집되어 생물학적 활성이 손실되며, 면역원성의 가능한 변화가 초래된다. 단백질을 안정화하기 위한 의미있는 방법은 관여하는 메카니즘에 의존하는 것이다. 예를 들어, 응집을 초래하는 메카니즘이 티오디술피드 변환의 결과인 분자 내 S-S 브릿지 형성에 기반을 둔 경우, 안정화는 술피드릴기의 변형, 산성용액으로부터 동결건조, 수분 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특정 중합체/매트릭스 조성물의 개발에 의하여 얻을 수 있다.

<68> 느린 방출을 보이는 IL-4 안타고니스트의 제형으로는 또한 리포솜에 IL-4 안타고니스트가 둘러싸인 것을 들 수 있다. IL-4 안타고니스트 함유 리포솜은 공지된 방법으로 제조된다 (독일특허 제3,218,121호, Epstein 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3688-3692 (1985), Hwang 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 17, 4030-4034(1980), 유럽특허 제52,322호, 유럽특허 제36,676호, 유럽특허 제88,046호, 유럽특허 제143,949호, 유럽특허 제142,641호, 일본특허 출원 제83-118008호, 미국특허 제4,485,045호 및 4,544,545호 및 유럽특허 제102,324호). 이런 리포솜은 대개 작고 (약 200 내지 800 Å) 단층 형태이며, 지질 내용물 중 콜레스테롤의 비율은 대략 30몰% 이상이나, 이 비율은 최적 IL-4 안타고니스트에 맞게 경우에 따라 조절된다. 순환 시간을 연장시키는 리포솜은 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다.

<69> 본 명세서의 다른 응용에는 IL-4 안타고니스트를 "성형품"으로 혼입하는 것이다. 이 성형품들은 쇼크 발생을 조절 또는 방지하기 위해 사용될 수 있다.

#### <70> 실시예 1

##### <71> hIL-4 변이 단백질에서 잠재적 N-글리코실화 부위의 제거

<72> 아스파라긴 커플링된 글리코실화 부위 2개가 천연 hIL-4 아미노산 서열 중 아미노산 38 및 105 위치에 존재한다. 구조 유전자 중 상응하는 코돈을 아스파르트산에 대한 코돈으로 치환할 수 있다. 이 치환에 의해 생성된 hIL-4 변이 단백질은 그 유전자가 효모 균주에서 발현될 때 N-글리코실화가 차단된다.

<73> hIL-4 변이 단백질에 대한 구조 유전자 중 두개의 코돈의 치환 (위치지정 변이유발)는 Deng 및 Nickoloff [Anal. Biochem. 200: 81(1992)]에 의한 방법에 따라 클로닝 벡터 pUC18을 사용하여 수행하였다. 구조 유전자를 변화시키기 위해 요구되는 합성 올리고뉴클레오타이드의 서열은 하기와 같다.

<74> a) 38 위치에서 아스파라긴을 아스파르트산으로 치환

5'-GCC TCC AAG GAC ACA ACT GAG-3'

<76> b) 105 위치에서 아스파라긴을 아스파르트산으로 치환

5'-GTG AAG GAA GCC GAC CAG AGT ACG-3'

<78> 뉴클레오티드 서열 중 밑줄이 그어진 위치가 아스파르트산에 대한 코돈을 표시한 것이다.

<79> 뉴클레오티드 서열 중 코돈 치환은 DNA 서열분석을 통해 입증되었다. 변화된 구조 유전자를 효모 발현 벡터에 삽입하고, 적절한 균주에서 발현시켰다.

## <80> 실시예 2

<81> 이. 콜리에서 N-말단 메티오닌이 없는 IL-4 유테인의 제조를 위한 위치(+2)에서 아미노산의 삽입

<82> N-말단 메티오닌이 없는 IL-4 유테인을 제조하기 위하여, 아미노산을 위치(+2)에 삽입하였고, 이로써 이. 콜리에서 특이적 메티오닌 아미노펩티다제에 의한 N-말단 메티오닌의 제거가 유도되었다 (Flinta 등, Eur. J. Biochem. 154, 193-196, 1986). 이를 위하여, 벡터 RPR9-IL4-Y124D (엔클로저 1)을 제한 엔도뉴클레아제 XhoI 및 BamHI로 잘랐다. 그 결과 IL4Y124D 유전자를 위한 서열 정보 및 상기 벡터의 atpE 영역의 약 50 bp의 짧은 단편을 지니는 약 450 bp 길이의 DNA 단편이 생성되며, 이 단편을 아가로스 겔 전기영동에 의해 정제하고, Sall 및 BamHI로 잘라진 벡터 M13mp18 내로 재클로닝하였다. 단일 가닥 DNA를 제조하고, 하기 올리고뉴클레오티드를 사용하여 시험관내 변이 유발하였다.

5'-CTGGAGACTGCCATGGCCCACAAGTGCGATATCACC-3'

<84> 변이 유발의 결과에 따라, 아미노산 알라닌 (코돈 GCC)는 IL4Y124D 유전자의 위치(+2)에 도입되었다. 또한, NcoI 절단 부위 (CCATGG)를 유전자의 5'-말단에 삽입하여 후속되는 스크리닝 및 발현 벡터로의 클로닝을 용이하게 하였다. 제한 분석법에 의하여 이중 가닥 M13RFDNA (복제 형태)를 사용하여 플라크를 스크리닝 하였다. 양성 클론을 NcoI 및 BamHI 효소를 사용하는 제한 소화에 의해 찾아내었다. 또한, 정확한 서열을 서열분석으로 확인하였다.

<85> 약 400 bp 길이의 DNA 단편을 NcoI 및 BamHI를 사용하여 선택된 M13mp18 클론으로부터 잘라내고, 아가로스 겔 전기영동법으로 정제하고, NcoI 및 BamHI로 잘라낸 벡터 pTrc99A (Pharmacia P-L Biochemicals로부터 구입함)로 클로닝하였다. 이 클로닝으로 형성되고, 암피실린을 함유하는 영양 배지 상에서 선택된 벡터 pAPH100 (IL4Y125D)로 이. 콜리 세포 (TG1)를 형질전환하였다. 단백질의 발현 및 그의 정제로 N-말단 메티오닌이 없는 IL-4 유테인을 얻었다.

## <86> 실시예 3

<87> 효모 세포의 발효

<88> 영양 배지

<89> 하기 영양 배지는 hIL-4 변이 단백질을 발현시키는 효모 세포를 배양하는 데 사용하였다.

성분	영양 용액	
	SD2	Sc6
박토 효모 질소 염기	6.7 g/l	
디프코 효모 추출물		20.0 g/l
글루코스	20.0 g/l	5.0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.7 g/l	1.4 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		2.0 g/l
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O		0.5 g/l
거품억제제 PPG 2000		0.1 g/l

<91> 상기 성분들을 탈이온수에 혼합하고, pH를 5.5로 조정하였다. 혼합물을 121°C에서 20분 동안 멸균하였다. 글루코스를 필요한 탈이온수 부피의 1/5에 용해시키고, 이 용액을 별도로 멸균한 후 냉각하여 나머지 영양 배지에 첨가하였다.

<92> 균주 스톱

<93> 모든 효모 형질전환체의 균주 스톱은 예비 배양물을 2ml씩 나눠, 액체 질소에서 보관하였다.

<94> 예비 배양

<95> 예비 배양물의 발효는 SD2 영양 배지 200 ml을 함유하는 1 ℓ 진탕 플라스크에서 수행했다. 영양 배지를 균주 스톱 또는 SD2 한천 플레이트로부터 단일 콜로니를 취하여 접종하였다. 배양물을 26-30°C에서 2 내지 3일 동안 계속해서 진탕하면서 배양하였다.

<96> 주 배양물의 발효

<97> 주 배양물의 발효를 Sc6 영양 배지에서 10 ℓ 교반 탱크 발효조로 수행하였다. 바이오매스를 예비 배양물로부터 원심분리하고, 접종하기 전에 Sc6 배지에 현탁시켜서 영양 배지를 예비 배양 부피의 3



내지 5%로 접종하였다. 10 ℓ 주 배양에 대한 발효 조건은 하기와 같다.

온도	26-30℃
교반기 회전 속도	600 rpm
통기 속도	0.5 vvm
pH 조절점	5.5 (5 N NaOH 및 5N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 로 조절)

<99> 발효를 시작한지 5시간 부터, 배양물에 연속적으로 글루코스 및 효모 추출물을 공급하였다. 공급 속도를 배양물의 호흡 지수(RQ 값)을 기준으로 조절하였다. RQ 조절점은 1.0이었다. 공급 용액의 조성은 하기와 같다.

글루코스 500 g/ℓ

디프코 효모 추출물 75 g/ℓ

<101> 성분들을 탈이온수에 별도로 용해시키고, 용액을 121℃에서 20분 동안 멸균하였다. 냉각 후 두개의 용액을 혼합하였다.

<102> 유도성 Ga110 프로모터, 또는 Ga110 프로모터의 유도체가 사용되는 경우, 공급 용액 중 글루코스 (500 g/ℓ)에서 갈락토스 (500 g/ℓ)로의 탄수화물의 변화에 의해 유도를 수행했다. 그런 후에 공급 속도를 더 이상 RQ값을 기준으로 조절하지 않았다. 공급 속도를 유도 시점에서 두 배가 되도록 수동적으로 조절하였다. 발효한지 48 시간 후에 Ga110 프로모터가 정상적으로 유도되었다.

<103> 세포 수확

<104> 발효를 끝낸 후 (80 내지 120 시간), 발효기의 함유물을 0 내지 15℃로 냉각하고, 세포내 발현인 경우에 효모 세포를 표준 원심분리 기술 (예를 들어, 버켓 원심 분리)을 사용하여 수확하였다. 원심분리 후 얻은 세포 덩어리를 액체 질소에 직접 적가하여 한냉 펠릿화하고, -80℃에서 보관하였다. 이러한 방법으로 처리된 바이오매스로부터 생성물을 얻었다. 이종 단백질이 배양액으로 방출되는 경우에는, 표준 원심분리 기술 (예를 들어, 버켓 원심분리)을 사용하거나 역류 마이크로필트레이션(예를 들어, Filtron Minisette system)을 사용하여 효모 세포를 배양액으로부터 분리하였다. 필요하다면, 배양액을 여과로 멸균하였다. 이어서, 세포가 제거된 배양액으로부터 생성물을 얻었다.

<105> 실시예 4

<106> 이. 콜리의 발효

<107> 영양 배지

<108> hIL-4 변이 단백질을 발현하는 이. 콜리 형질전환체를 하기 조성을 갖는 LB 영양 배지에서 배양하였다.

박토 트립톤 10 g/ℓ

박토 효모 추출물 5 g/ℓ

NaCl 10 g/ℓ

<110> 조성물을 탈이온수에 용해시키고 이 용액을 121℃에서 20분 동안 멸균하였다. 접종하기 전에, 형질전환체를 선택하기에 적절한 항생제 (예를 들어, 벡터에서 사용된 선택 마커에 따라 100 mg/ℓ의 Na 암피실린 또는 50 mg/ℓ의 카나마이신 술페이트)를 멸균 조건 하에 영양 배지에 가하였다.

<111> 균주 스톡

<112> 모든 이.콜리 균주는 예비 배양물을 2 ml씩 나눠, 액체 질소 중에 보관하였다.

<113> 예비 배양

<114> 예비 배양의 발효를 LB 영양 배지 200 ml을 함유하는 1ℓ 진탕 플라스크에서 수행했다. 영양 배지를 균주 스톡 또는 LB 한천 플레이트로부터 단일 콜로니를 취하여 접종하였다. 배양물을 30℃에서 12 내지 18시간 동안 계속해서 진탕하면서 배양하였다.

<115> 주 배양물의 발효

<116> 주 배양물의 발효를 LB 영양 배지에서 10 ℓ 교반 탱크 발효기를 사용하여 수행하였다. 바이오매트를 예비 배양물로부터 원심분리하고, 접종하기 전에 LB 배지에 현탁시켜서 예비 배양 부피의 1 내지 5%로 영양 배지를 접종하였다. 10 ℓ 주 배양에 대한 발효 조건은 하기와 같다.

출발 온도	30°C (온도 유도적 프로모터를 사용하는 경우) 37°C (IPTG-유도적 벡터를 사용하는 경우)
교반기 회전 속도	500 rpm
통기 속도	0.5 vvm

<118> 바이오매스의 증식을 모니터하기 위하여, 멸균 시료를 배양액으로부터 약 1시간 간격으로 제거하고, 그들의 흡광도를 600 nm (OD600)에서 측정하였다. 0.8 내지 1.2의 OD600에 도달하였을 때, 배양이 유도되었다. 유도는 선택된 프로모터에 의존하며 하기와 같은 조건에서 일어났다.

온도 유도 30°C에서 42°C로 발효 온도의 증가

IPTG 유도 멸균된 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드  
(IPTG)를 0.4 mM 농도로 첨가

<120> 유도 시간은 통상적으로 4 내지 8시간이었다.

<121> 세포 수확

<122> 발효를 끝낸 후 (6 내지 14 시간), 발효기의 함유물을 10 내지 15°C로 냉각하고, 세균 세포를 표준 원심분리 기술 (예를 들어, 버킷 원심분리)을 사용하여 수확하였다. 원심분리 후 얻은 세포 덩어리를, 적절한 경우, 동결된 상태로 일시적으로 보관하였다. 이러한 방법으로 얻은 바이오매스로부터 생성물을 얻었다.

<123> 실시예 5

<124> 효모 세포에서 구성 프로모터를 사용하는 인터루킨 4 변이 단백질의 발현

<125> hIL-4 변이 단백질 및 구성(constitutive) 프로모터 (예를 들어, 알파 메이팅 인자 프로모터, GAPDH 프로모터 또는 TPI 프로모터)를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터를 함유하는 효모 형질전환체를 10 l 규모로 28°C에서 배양하였다. 발효하는 동안, hIL-4 변이 단백질의 발현을 정량적으로 시험하기 위해 SDS-PAGE를 사용하였다. 총 발효 시간은 96시간이었다. 발효의 종말점에서 얻은 바이오매스 농도는 27 g 건조 중량/l이었다. 세포를 원심분리로 분리하고 (15분, 6500×g, 4°C), 여과로 멸균한 후, 세포 제거된 배양액으로부터 생성물을 얻었다.

<126> 실시예 6

<127> 효모 세포에서 유도적 프로모터를 사용하는 인터루킨 4 변이 단백질의 발현

<128> hIL-4 변이 단백질 및 유도적 프로모터 (예를 들어, Ga110 프로모터 또는 Ca110 프로모터의 유도체)를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터를 함유하는 효모 형질전환체를 10 l 규모로 28°C에서 배양하였다. 48시간의 발효 기간 후, 유도는 공급 용액 중 사용된 탄수화물을 글루코스에서 갈락토스로 변화 시킴으로써 수행했다. 발효하는 동안, hIL-4 변이 단백질의 발현을 정량적으로 시험하기 위해 SDS-PAGE를 사용하였다. 총 발효 시간은 96시간이었다. 발효의 종말점에서 얻은 바이오매스 농도는 24 g 건조 중량/l이었다. 세포를 원심분리로 분리하고, 여과로 멸균한 후, 세포 제거된 배양액으로부터 생성물을 얻었다.

<129> 다른 유도적 프로모터도 hIL-4 변이 단백질의 발현을 위하여 이와 유사한 방법으로 사용할 수 있다. 선택된 프로모터의 특성에 따라 적절한 유도 기술이 사용되어야만 한다.

<130> 실시예 7

<131> 유도적 프로모터를 사용하는 이. 콜리에서 인터루킨 4 변이 단백질의 발현

<132> hIL-4 변이 단백질 및 온도 유도적 프로모터 (예를 들어, λpL 프로모터 또는 λpL 프로모터의 유도체)를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터를 함유하는 이.콜리 형질전환체를 LB 영양 배지에서 10 l 규모로 배양하였다. LB 영양 배지에 100 mg/l Na 암피실린을 가함으로써 (LB+암피실린 영양 배지) 벡터 함유 세포를 선택하였다. 주 배양 배치를 LB+암피실린 영양 배지 중 14시간 배양된 예비 배양액의 5 부피%로 접종하였다. 발효 초기에, 발효 온도는 30°C였고, OD600이 0.8 내지 1.2에 도달한 후에 42°C로 상승시켜 온도 민감성 프로모터를 유도하였다. 발효하는 동안, SDS-PAGE를 hIL-4 변이 단백질의 발현을 정량적으로 시험하는 데 사용하였다. 4 내지 6시간의 유도 기간 후, 배양액을 10 내지 15°C로 냉각시킴으로써 발효를 종결시켰다. 발효의 종말점에서 얻은 바이오매스 농도는 약 5 g 신규생성 중량/l이었다. 이. 콜리 세포를 버킷 원심분리 (15분, 6500×g, 4°C)로 분리하고, 세포 덩어리를 액체 질소에 직접 적가하여 한냉펠릿화하였다. 이러한 방법으로 동결(deep-frozen)한 바이오매스를 -80°C에서 보관하였다. 이러한 방법으로 처리한 바이오매스로부터 생산물을 얻었다.

<133> 다른 유도적 프로모터도 이. 콜리에서 hIL-4 변이 단백질의 발현을 위하여 이와 유사한 방법으로

사용할 수 있다. 선택된 프로모터의 특성에 따라 적절한 유도 기술이 사용되어야만 한다.

<134>

## 실시에 8

<135>

### IL-4 변이 단백질의 후처리

<136>

### 봉입체의 세포 파괴 및 단리

<137>

실시에 7로부터 얻은 축축한 이. 콜리 덩어리 25 g을 200 ml의 완충액 (0.1M 인산염 완충액, pH 7.3, 0.1% 트라이톤, 1mM EDTA, 1  $\mu$ g/ml 펩스타틴)에 용해시키고, 초음파로 파괴하였다 (Brason B 15 sonifier). 생산물을 함유하는 봉입체는 원심분리 (35,000  $\times$  g, 20분)로 단리하고 추가적으로 4M 우레아를 함유하는 파괴 완충액으로 세척하였다.

<138>

### 생산물의 용해 및 숄파이트 분해

<139>

세척된 봉입체를 완충액 125 ml에 용해하였다 (0.2M 트리스, pH 8.1, 8M 구아니딘히드로클로라이드), 소듐숄파이트 4 g 및 포타슘테트라티오네이트 2 g을 가하고, 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 반응을 끝낸 후, 비용해된 성분들을 원심분리 (35,000  $\times$  g, 20분)로 제거하였다.

<140>

### 겔 투과법

<141>

상등액을 겔 투과 컬럼 (Sephacryl S-300 HR, Pharmacia, 10  $\times$  90 cm)상에 적재하고, 6M 구아니딘히드로클로라이드를 함유하는 PBS 완충액으로 280 ml/시간의 유속으로 겔 투과하였다. 생산물을 함유하는 분획을 SDS-PAGE를 사용하여 찾아내고 혼합하였다.

<142>

### 재생화

<143>

$\beta$ -메르캅토에탄올 (최종 농도 15 mM)를 가하여 분자를 환원시켰다. 실온에서 2시간 동안 배양한 후, 혼합물을 물로 5배 희석하고, 완충액 (3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM KCl, 120 mM NaCl)으로 3 내지 4일 동안 투석하였다.

<144>

### 농도

<145>

투석된 물질을 아세트산으로 pH 5로 조정하고, 물을 가하여 그의 전도도를 10 mS/cm 이하로 감소시켰다. 25 mM 암모늄아세테이트, pH 5.0으로 평형을 이룬 CM 세파로스-FF (Pharmacia) 50 ml을 교반하면서 혼합물에 가하였다. 비결합된 물질을 여과하고, 겔을 사용하여 컬럼을 충전하였다. 생산물을 25 mM 암모늄아세테이트 중 0부터 1M 까지의 NaCl, pH 5.0 선형적 구배로 300 ml/시간의 유속으로 용출하였다. 생산물을 함유한 분획을 SDS-PAGE를 사용하여 찾아내거나 RP 크로마토그래피로 분석하였다.

<146>

### 최종 정제

<147>

CM 세파로스의 컬럼 용출 결과 모은 물질을 0.1% TFA로 평형을 이룬 비닥(Vydac) C-4 컬럼 (1  $\times$  25 cm, 10  $\mu$ m) 상으로 적재하고, 아세트니트릴의 증가되는 구배로 용출하였다. 순수 생산물을 함유한 분획을 SDS-PAGE를 사용하여 찾아내고 동결건조하였다.

## 서 열 표

## (1) 일반적인 정보

## (i) 출원인 :

- (A) 성명 : 바이엘 아게
- (B) 거리 주소 : 바이엘베르크
- (C) 도시 : 레버쿠젠
- (E) 국가 : 독일
- (F) 우편 번호(ZIP) : D-51368
- (G) 전화 : 0214/3061455
- (H) 팩스 : 0214/303482

## (ii) 발명의 명칭 인간 인터루킨 4의 안타고니스트 또는

부분적 아고니스트로서 신규 hIL-4 변이 단백질

## (iii) 서열수 : 5

## (iv) 컴퓨터 판독형 :

- (A) 매체 형태 : 플로피 디스크
- (B) 컴퓨터 : IBM PC 호환성
- (C) 운영 체제 : PC-DOS/MS-DOS
- (D) 소프트웨어 : 페턴트인 릴리스(PatentIN Release) # 1.0,  
버전 # 1.25 (EPO)

## (2) 서열 번호 1에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 .

(A) 길이 . 16 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥수 : 단일 가닥

(D) 위상 : 선형

(ii) 분자 타입: cDNA

(iii) 가설 없음

(iii) 안티센스: 없음

(vi) 공급원:

(C) 개체/단리물: 합성적

(xi) 서열 기재 . 서열 번호 1

CATGCACAAG TGCGAT

(2) 서열 번호 2에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 . 12 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥수 . 단일 가닥

(D) 위상 : 선형

(ii) 분자 형태 : cDNA

(iii) 가설: 없음

(iii) 안티센스: 없음

(vi) 공급원:

(C) 개체/단리물: 합성적

(xi) 서열 기재 : 서열 번호 2 :

ATCGCACTTG TG

(2) 서열 번호 3에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 21 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥수 : 단일 가닥

(D) 위상 : 선형

(ii) 분자 타입: cDNA

(iii) 가설: 없음

(iii) 안티센스: 없음

(vi) 공급원:

(C) 개체/단리물: 합성적

(xi) 서열 기재 : 서열 번호 3 :

GCCTCCAAGG ACACAACTGA G

(2) 서열 번호 4에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 :

- (A) 길이 : 24 염기쌍
- (B) 유형 : 핵산
- (C) 가닥수 : 단일 가닥
- (D) 위상 : 선형

(ii) 분자 타입: cDNA

(iii) 가설: 없음

(iii) 안티센스: 없음

(vi) 공급원:

(C) 개체/단리물: 합성적

(xi) 서열 기재 : 서열 번호 4 .

GTGAAGGAAG CCGACCAGAG TACG

(2) 서열 번호 5에 대한 정보 :

(i) 서열 특징 .

- (A) 길이 : 36 염기쌍
- (B) 유형 : 핵산
- (C) 가닥수 : 단일 가닥
- (D) 위상 : 선형

(ii) 분자 타입: cDNA

(iii) 가설: 없음

(iii) 안티센스: 없음

(vi) 공급원:

(C) 개체/단리물: 합성적

(xi) 서열 기재 . 서열 번호 5 :

CTGGAGACTG CCATGGCCCA CAAGTGCGAT ATCACC

**(57) 청구의 범위**

**청구항 1**

위치 121, 124 또는 125의 아미노산이 치환되었고, 또한 N-말단 메티오닌과 hIL-4 변이 단백질의 천연 N-말단 사이에 부가적으로 아미노산이 삽입된 것을 특징으로 하는, 인간 인터루킨 4의 안타고니스트 또는 부분적 아고니스트로서의 인간 인터루킨 4 변이 단백질.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 삽입된 아미노산이 Gly, Pro, Ser, Thr 또는 Val인 인간 인터루킨 4 변이 단백질.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 삽입된 아미노산이 Ala인 인간 인터루킨 4 변이 단백질.

**청구항 4**

Ala(-1)-Tyr(124)Asp,

Ala(-1)-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp,

Ala(-1)-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp,

Ala(-1)-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp 또는

Ala(-1)-Arg(121)Asp-Ser(125)Asp의 군으로부터 선택된 인간 인터루킨 4 변이 단백질.

**청구항 5**

제1항, 제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 물질을 포함하는 알레르기 반응 치료용 의약.

**요약**

본 발명은 신규 hIL-4 변이 단백질, 그의 제조 방법, 및 특히 과잉증식, 잘못 조절된 면역 반응 및 자기면역 질환에 관련된 그의 치료제로서의 용도에 관한 것이다.