



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2008년11월25일  
 (11) 등록번호 10-0870296  
 (24) 등록일자 2008년11월17일

(51) Int. Cl.  
*C07K 14/54* (2006.01) *C12N 15/24* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2004-7001618  
 (22) 출원일자 2004년02월02일  
 심사청구일자 2005년10월31일  
 번역문제출일자 2004년02월02일  
 (65) 공개번호 10-2004-0049838  
 (43) 공개일자 2004년06월12일  
 (86) 국제출원번호 PCT/GB2002/003581  
 국제출원일자 2002년08월02일  
 (87) 국제공개번호 WO 2003/014359  
 국제공개일자 2003년02월20일  
 (30) 우선권주장  
 0119015.6 2001년08월03일 영국(GB)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 wo9902552  
 전체 청구항 수 : 총 29 항

(73) 특허권자  
 유니버시티 칼리지 카디프 컨설턴츠 리미티드  
 영국, 카디프 씨에프24 0다이, 뉴포트 로드 30-36  
 (72) 발명자  
 존스, 시몬아르네트  
 영국, 카디프씨에프103유에스, 뮤지엄애비뉴(피오박  
 스911), 카디프유니버시티, 모레큐라셀바이오로지리  
 서치그룹, 카디프스쿨오브바이오사이언스  
 토플레이, 니콜라스  
 영국, 카디프씨에프144엑스엔, 헬스파크, 유니버시티  
 오브웨일즈컬리지오브메디슨, 인스티튜트포네프롤  
 로지  
 (74) 대리인  
 특허법인필앤은지

심사관 : 김은희

**(54) 융합 단백질**

**(57) 요약**

본 발명은 기능적 IL-6 분자와 기능적 DS-sIL-6R 분자를 포함하는 융합단백질에 관한 발명이다. 본 발명은 또한 상기 융합단백질을 코딩하는 핵산, 상기 융합단백질 제조방법, 전염병, 염증 및 면역질환의 치료에 상기 융합단백질의 용도에 관한 발명이다.

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 및 IP-10로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는

DS-sIL-6R와 결합하여 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 증가시키는 기능을 하는 기능적 인터루킨-6(interleukin-6; IL-6) 분자 및

IL-6 분자와 결합하여 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 증가시키는 기능을 하는 기능적 차별적으로 스플라이스된-수용성 인터루킨-6 수용체(differentially spliced-soluble interleukin-6 receptor; DS-sIL-6R) 분자로

이루어지는 융합단백질.

**청구항 2**

MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 및 IP-10로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는

DS-sIL-6R와 결합하여 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 증가시키는 기능을 하는 기능적 인터루킨-6(interleukin-6; IL-6) 분자;

링커; 및

IL-6 분자와 결합하여 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 증가시키는 기능을 하는 기능적 차별적으로 스플라이스된-수용성 인터루킨-6 수용체(differentially spliced-soluble interleukin-6 receptor; DS-sIL-6R) 분자로

이루어지는 융합단백질.

**청구항 3**

제 2항에 있어서, 상기 링커는 RGGGGSGGGGSVE 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

**청구항 4**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 기능적 IL-6 분자는 도 3에서 주어진 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

**청구항 5**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 기능적 DS-sIL-6R 분자는 도 4의 113-364 잔기로 이루어지는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

**청구항 6**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 기능적 DS-sIL-6R 분자는 도 4에서 주어진 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

**청구항 7**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 기능적 IL-6 분자는 두 개 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

**청구항 8**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 기능적 DS-sIL-6R 분자는 두 개 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 융합단백질은 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  및 RANTES 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

**청구항 11**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 융합단백질은 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 및 IP-10 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

**청구항 12**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 융합단백질은 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  또는 RANTES 발현을 5배 이상 증가시키는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

**청구항 13**

제 1항 또는 제 2항 중 어느 한 항의 융합단백질을 코딩하는 핵산 분자.

**청구항 14**

제 13항의 핵산분자를 포함하는 발현벡터.

**청구항 15**

제 14항에 있어서, 상기 발현벡터는 핵산분자의 발현을 얻기 위해 하나의 프로모터 및 다른 조절 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

**청구항 16**

제 14항의 벡터로 형질전환된 숙주세포.

**청구항 17**

제 15항의 벡터로 형질전환된 숙주세포.

**청구항 18**

제 13항의 핵산분자를 숙주세포에서 발현하고, 생산된 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 융합단백질 제조방법.

**청구항 19**

제 18항에 있어서, 상기 방법은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터로 숙주세포를 형질전환하고, 숙주세포를 융합단백질을 생산하기 위하여 배양하고, 그 융합단백질을 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 20**

후보 물질이 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 및 IP-10로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 융합단백질의 기능에 영향을 미치는지를 결정하기 위해 후보 물질을 테스트하는 단계를 포함하는 제 1항 또는 제 2항 중 어느 한 항의 융합단백질의 작용제(agonist) 또는 길항제(antagonist)를 규명하는 검색방법.

**청구항 21**

제 1항 또는 제 2항 중 어느 한 항의 융합단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 시스템에서의 신호 경로 조절용 조성물.

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

제 1항 또는 제 2항 중 어느 한 항의 융합단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 AIDS, 세균성 복막염 또는 류마티스 관절염 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 27**

제 13항의 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 AIDS, 세균성 복막염 또는 류마티스 관절염 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 28**

제 14항의 발현백터를 포함하는 것을 특징으로 하는 AIDS, 세균성 복막염 또는 류마티스 관절염 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 29**

제 15항의 발현백터를 포함하는 것을 특징으로 하는 AIDS, 세균성 복막염 또는 류마티스 관절염 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

제 26항에 있어서, 상기 AIDS는 HIV의 M-트로픽 균주에 의한 AIDS인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

**청구항 35**

제 27항에 있어서, 상기 AIDS는 HIV의 M-트로픽 균주에 의한 AIDS인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

**청구항 36**

제 18항에 있어서, 상기 방법은 상기 핵산분자, 프로모터 및 다른 조절 서열을 포함하는 백터로 숙주세포를 형

질전환하고, 숙주세포를 융합단백질을 생산하기 위하여 배양하고, 그 융합단백질을 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

**청구항 37**

제 28항에 있어서, 상기 AIDS는 HIV의 M-트로픽 균주에 의한 AIDS인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

**청구항 38**

제 29항에 있어서, 상기 AIDS는 HIV의 M-트로픽 균주에 의한 AIDS인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

**명세서**

**기술분야**

<1> 본 발명은 기능적 IL-6 분자와 기능적 DS-sIL-6R 분자를 포함하는 융합단백질에 관한 발명이다. 본 발명은 또한 상기 융합단백질을 코딩하는 핵산, 상기 융합단백질 제조방법, 전염병, 염증 및 면역질환의 치료에 상기 융합단백질의 용도에 관한 발명이다.

**배경기술**

<2> 인터루킨-6(IL-6)은 증식/분화, 조혈, 면역반응의 조절을 포함하는 여러 세포 작용을 조절하는데 관여하는 주된 염증성 사이토카인 중 하나이다. 이 과정의 활성화는 일부 세포들의 표면에 존재하는 특정 수용체(IL-6R)에 IL-6가 결합하여 조절된다. IL-6R의 존재가 단지 일부 세포타입에 한정되기 때문에 IL-6의 활성화체가 제한된다. 그러나 IL-6R의 수용성 형태(sIL-6R)에 결합은 IL-6의 생물학적 활성을 조절할 수 있다. sIL-6R은 다양한 생체액에서 발견되었고, 여러 질병에서 증가되었다. sIL-6R은 IL-6에 결합할 수 있고, 정상적으로는 IL-6 혼자 반응할 수 없는 세포 타입의 활성화를 촉진한다. 결론적으로 sIL-6R 분비 조절은 IL-6활성 조절에 중요한 단계이다.

<3> 수용성 사이토카인 수용체들은 전형적으로 단백질 절단(Proteolytic cleavage;PC) 또는 특이적 mRNA 스프라이싱(Differential mRNA splicing;DS)을 통하여 생성된다. sIL-6R의 경우, 양기작 모두를 이용할 수 있고, 그 결과 두가지 이소폼(isoform)이 생성되고, 여기서는 PC-sIL-6R과 DS-sIL-6R로 명명한다. 비록 두 형태가 구조적으로 연관있지만, DS-sIL-6R은 COOH-말단 꼬리 근처에 10개의 독특한 아미노산이 붙어 있어서 PC-sIL-6R과 구별된다. 결론적으로 두 독특한 형태의 sIL-6R이 이 수용성 수용체의 전체 특성을 조절한다.

<4> 위에서 언급한 바와 같이, IL-6에 의한 여러 생물학적 활성은 그것이sIL-6R에 붙는 능력을 통하여 증대된다(Jones et al., FASEB. J. 15, 43-58, 2001). 사실 sIL-6R/IL-6 복합체의 형성은 세포증식, 분화, 염증반응의 조절을 포함하는 여러 세포 작용을 촉진하는 것이 알려졌다. 이 과정의 활성화는 모든 IL-6 관련 사이토카인에 대한 일반적 신호 전달 단위체로 작용하는 일반적으로 발견된 막 결합 gp130의 촉진 복합체의 상호작용에 의하여 일어난다(Heinrich et al., Eur. J. Biochem. 236, 837-842, 1998). 결론적으로 sIL-6R-IL-6 복합체는 비록 gp130은 발현하지만 IL-6 자체와는 반응하지 않는 타입의 세포의 작용물질(agonist)로 작용한다. 같은 성질의 IL-6R의 세포발현이 주로 간세포나 백혈구 서브-군에 한정되었다고 발표되어, sIL-6R은 IL-6에 반응하는 세포타입의 범위를 넓히는 능력을 갖는다. 여러 임상조건에서 증가된 sIL-6R의 발견은 국소적 및 전체 IL-6 증대 반응을 조절하는 이 수용성 수용체의 능력을 강조한다(Jones et al., 2001(supra)). 결과적으로 IL-6 자체에 의해 조절되는 세포작용은 sIL-6R/IL-6 복합체를 통하여 증대되는 것과 구별된다. 이 이슈의 중심은 어떻게 sIL-6R 분비가 in vivo에서 조절되는가를 확인하는 것이 필요하다. 그러나 sIL-6R 수준을 조절하는 기작의 이해는 두가지 이소폼(isoform)인 PC-sIL-6R 또는 DS-sIL-6R의 존재에 의하여 어려워진다. 비록 두 형태가 구조적으로는 연관이 있지만, 특이하게 스프라이스된 변이체는 스프라이싱 과정의 결과로 들어간 새로운 COOH-말단 서열(GSRRRGSCGL)에 의해 구별되는 이소폼으로 구별될 수 있다(Horiuchi et al., Immunology 95, 360-369, 1998). 현재까지 왜 sIL-6R의 활성을 조절하는 두 이소폼이 있는지 불명확하다.

<5> PC- 및 DS-sIL-6R은 독자적으로 in vivo에서 sIL-6R의 전체 특성을 조절하기 때문에 염증 반응의 진행동안 그들의 일시적 관계를 고찰하는 것이 필수적이고, 또 개별 세포 작용을 일으키는 그들의 능력을 평가하는 것이 필수적이다. 여러 질병상태로부터 진단 샘플의 조사는 각 이소폼의 분비는 다르게 조절되고 개인의 연령, 연구한 병의 상태 및 질병 진행 단계에 의존한다는 것이 전에 확인되었다(Jones et al., 2001(supra), Horiuchi et al., 1998(supra), 및 Muller-Newen et al., Eur. J. Biochem. 236, 837-842, 1996).

- <6> 4-5년 전 내에 HIV가 세포 표면 단백질 CD4을 이용하여 세포로 들어가고, 두 독특한 코-리셉터 중 하나는 CXCR4(HIV의 T-트로픽 균주용) 및 CCR5(HIV의 M-트로픽 균주용)로 명명되었다. 이들 코-리셉터의 자연적 작용은 케모카인 수용체로 작용하고 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  및 RANTES 모두가 CCR에 붙는다. 사실 이들 케모카인의 상당히 증가된 혈액 내 수준을 갖는 HIV 환자는 낮은 수준의 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  및 RANTES를 갖는 환자에 비하여 완전한 AIDS로 발전되기가 덜 용이하다. HIV의 M-트로픽 균주 뿐 아니라 모든 세 케모카인이 CCR5에 결합하기 때문에 고농도의 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  및 RANTES는 CCR5 결합을 놓고 바이러스와 경쟁을 하고 효과적으로 HIV 출입을 억제한다. 결론적으로 케모카인을 위한 이들 경쟁의 밸런스를 경감할 수 있는 어느 요소는 HIV 치료에 유용할 수 있다.
- <7> Fisher 등(Nat. Biotechnol., 15, 142-5, 1997)에서 링커에 의해 PC-sIL-6R와 결합된 IL-6를 포함하는 융합단백질은 초기 조혈 전구체의 강한 촉진제임을 알 수 있다. 그 융합단백질은 당업계에서 하이퍼(hyper)-IL-6(H-IL-6)로 명명되었다. H-IL-6의 사용은 또한 Jostock 등(J. Immunol. Methods, 223, 171-183, 1999), Kollet 등(Blood, 94, 923-931, 1999) 및 Chebath 등(Eur. Cytokine. Netw., 8, 359-65, 1997)에 기재되어 있다. WO 00/01731 및 WO 99/02552에서 PC-sIL-6R와 결합된 IL-6를 포함하는 융합단백질이 공개되었다.
- <8> US 특허 US-A-5,919,763호에서는 H-IL-6이 간세포의 재생과 기능을 촉진하여 간 손상의 치료에 사용된다고 기재되어 있다.
- <9> 선행기술 어디에도 IL-6와 DS-sIL-6R을 포함하는 단백질이 알려지거나 암시되지도 않았다.

**발명의 상세한 설명**

- <10> 본 발명은 기능적 IL-6 분자와 기능적 DS-sIL-6R 분자를 포함하는 융합단백질을 제공한다. 여기서 상기 단백질은 하나 이상의 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES와 IP-10의 발현을 증가한다.
- <11> MIP-1 $\alpha$ 는 또한 CCL3로 MIP-1 $\beta$ 는 CCL4로, RANTES는 CCL5로 IP-10은 CXCL10으로 부른다.
- <12> 본 발명은 기능적 IL-6 분자와 기능적 DS-sIL-6R 분자를 포함하는 융합단백질이 하나 이상의 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES와 IP-10의 발현을 증가하는 원인이 된다는 예측할 수 없는 발견에 기초한다.
- <13> 기능적 IL-6분자와 PC-sIL-6R 기능분자를 포함하는 융합단백질(즉 H-IL-6)은 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 증가시키지 못한다. 따라서 본 발명의 융합단백질은 H-IL-6와 그 작용효과면에서 실질적으로 다르고, 본 발명의 융합단백질 및 H-IL-6 모두는 MCP-1의 발현을 증가시키는 것으로 알려졌지만 본 발명의 융합단백질만이 하나 이상의 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES와 IP-10의 발현을 증가시킨다. 본 발명의 융합단백질은 또한 MIG(CXCL9) 또는 ITAC(CXCL11)과 같은 다른 케모카인의 발현을 증가시킬 수 있다.
- <14> "기능적 IL-6 분자"란 DS-sIL-6R와 결합하여 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 증가시키는 작용을 하는 어떤 IL-6분자를 말한다. 후보물질이 기능적 IL-6분자인지를 결정하기 위해서는 그들이 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현의 증가가 있는지를 결정하기 위하여 DS-sIL-6R와 결합하여 테스트할 수 있다. 그러한 작용을 결정하기 위한 적합한 방법은 실시예1에서 기재한다. 바람직하게는 기능적 IL-6 분자는 도3의 잔기 29에서 212 또는 그것의 기능적 동족체를 포함한다. 더욱 바람직하게는 기능적 IL-6 분자는 도3의 주어진 서열 또는 그것의 기능적 동족체를 포함한다. "기능적 동족체"란 기능적 IL-6 분자의 활성을 가지고 바람직하게는 적어도 60%의 서열 상동성을 갖는 단백질을 말한다. 상동성은 BLAST 분석을 사용하여 바람직하게는 결정한다. 더욱 바람직하게는 동족체는 도3의 잔기 29에서 212와 80%, 더더욱 바람직하게는 동족체는 90%, 가장 바람직하게는 동족체는 도3의 잔기 29에서 212와 95%의 서열 상동성을 갖는다. 바람직하게는 그러한 기능적 동족체는 도3의 잔기 29에서 212와 약 하나에서 열 아미노산이 다르다.
- <15> 바람직하게는 어느 아미노산 변화는 보존적이다. 보존적 변화는 한 아미노산이 그들의 사이드체인이 연관된 아미노산의 계열에서 온 아미노산으로 대체되는 것이다. 예를 들어 루신이 이소루신 또는 발린으로, 아스파테이트가 글루타메이트로, 스테오닌이 세린으로 또는 구조적으로 연관된 아미노산이 유사한 보존적 대체는 그 단백질의 생물활성의 중요한 효과를 갖지 않는 것을 기대할 수 있다. 단백질에서 다른 아미노산과 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 아미노산의 수가 증가하는 돌연변이는 특별히 단백질의 안정성을 증가시키기 위해 바람직하다. 단백질의 기능을 증가시키는 다른 돌연변이들도 만들 수 있다.
- <16> "기능적 DS-sIL-6R 분자"란 기능적 IL-6 분자와 결합하여 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 증가시키는 작용을 하는 어떤 DS-sIL-6R 분자를 말한다.

- <17> 후보물질이 기능적 DS-sIL-6R 분자인지를 결정하기 위해서는 그들이 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현의 증가가 있는지를 결정하기 위하여 IL-6R와 결합하여 테스트할 수 있다. 그러한 작용을 결정하기 위한 적합한 방법은 실시예1에서 기재한다. 바람직하게는 기능적 DS-sIL-6R 분자는 도4의 잔기 113에서 364 또는 그것의 기능적 동족체를 포함한다. 더욱 바람직하게는 기능적 DS-sIL-6R분자는 도4의 주어진 서열 또는 그것의 기능적 동족체를 포함한다.
- <18> "기능적 동족체"란 동족체가 기능적 DS-sIL-6R의 활성을 가져야 하고, 서열의 상동성이 도4의 잔기 113에서 364에 대하여 판단되어지는 것을 제외하곤 위에서 언급한 바와 같다.
- <19> 도4의 DS-sIL-6R 분자의 C-말단 10 아미노산은 DS-sIL-6R와 PC-sIL-6R 간의 주된 차이이기 때문에 C-말단 10 아미노산 또는 기능적으로 균등한 서열은 기능적 DS-sIL-6R 분자에 존재하는 것이 필수적이다.
- <20> 기능적으로 균등한 서열은 IL-6 분자와 결합하여 여전히 DS-sIL-6R 분자가 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 증가시키는 작용을 하는 서열을 말한다. 예를 들어, C-말단 10 아미노산은 위에서 언급한 보존적 아미노산 변화에 의해 변형될 수 있다. 게다가 변형은 도 4의 서열을 가지는 DS-sIL-6R 분자를 사용하여 달성할 수 있는 것 이상으로 DS-sIL-6R 기능적 분자의 기능을 증가(즉 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 증가)하는 형태로 만들 수 있다. 적당한 변형은 C-말단 10 아미노산내의 알기닌 런을 증가시키는 것을 포함한다. 다른 적합한 변형은 특히 알려진 대체인 랜덤 아미노산 대체와 C-말단 10 아미노산의 절단일 수 있다. 그러한 변형은 여기서 기재한 방법을 사용하여 테스트할 수 있다. 특히 RT-PCR은 DS-sIL-6R을 코딩하는 cDNA를 만든다. 이 cDNA는 GSRRRGSCGL 서열 또는 다른 DS-sIL-6R 서열을 변형하기 위한 주형으로 사용될 수 있다. 이 서열에 기초한 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 DS-sIL-6R 서열 근처내에 새로운 코돈을 삽입하는 PCR 접근에 사용된다. 이것은 발현될 때 DS-sIL-6R C 말단의 연속적인 절단과 단계적으로 DS-sIL-6R 서열이 PC-sIL-6R 서열로 전환하는 cDNA 절편을 제조하게 한다. QuikChange<sup>TM</sup> 사이트디렉티드 뮤타제네시스 키트(Stratagene)는 DS-sIL-6R 활성을 중재하는데 관여하는 아미노산을 정확하게 나타내기 위하여 GSRRRGSCGL 서열내에 개별 아미노산을 변형시키는데 사용될 수 있다. 모든 변이체는 서열분석되고 SF9세포의 벡로로바이러스 발현에 적합한 pVL1393(Horiuchi et al., 1998(supra)), COS-7 세포내의 일시적/안정적 발현용 pcDNA-3(Elson et al., 2000, Nature Neuroscience, 3: 867-872)과 같은 적당한 벡터로 클론할 수 있다. DS-sIL-6R의 기능을 증가시키는 다른 돌연변이도 만들 수 있다.
- <21> 수용체 기능성을 확인하고, 각 DS-sIL-6R 돌연변이의 결합 동역학을 평가하기 위하여, 표면 플라즈몬(plasmon) 공명 기술을 CM5 카복시메틸 텍스트란과 같은 매트릭스에 고정화된 IL-6 또는 수용성 gp130(sgp130(예를 들어 10mg/ml 코팅 스톱)을 가지고 이용할 수 있다. 차별적인 DS-sIL-6R 활성을 일으키는 데 중요한 잔기를 밝히기 위해 인간 복막 중피(mesothelium) 세포(HPMC)에 의한 케모카인 발현(MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 및 IP-10)을 ELISA를 사용하여 측정할 것이다(Hurst 등 Immunity, 14, 705-714, 2001). 또한 루시퍼레이즈 표지 분석은 변형이 하기 물질과 방법에서 기재한 바와 같이DS-sIL-6R에 의한 RANTES 프로모터 활성을 제거하는지를 결정하는데 사용될 수 있다.
- <22> 기능적 IL-6분자 및 기능적 DS-sIL-6R 분자는 링커를 통하여 또는 공유결합을 통하여 서로 직접 결합될 수 있다. 적당한 적응성 있는 링커는 당업계에서 잘 알려져 있다. 바람직하게는 적응성 있는 링커는 GGGGSGGGGSLE 서열을 갖는다. 다른 대안으로는 링커는 루이신 지퍼의 형태일 수 있다.
- <23> 기능적 DS-sIL-6R 분자에 기능적 IL-6분자를 직접 결합하는 방법은 IL-6를 PC-sIL-6에 직접 융합한 것을 포함하는 융합단백질에 대한 국제 특허출원 WO 00/-1731에서 가르치는 것에 의해 쉽게 결정될 수 있다.
- <24> 본 발명의 융합단백질은 하나 이상의 기능적 IL-6분자 및 하나 이상의 기능적 DS-sIL-6R 분자를 포함할 수 있다. 기능적 IL-6분자와 기능적 DS-sIL-6R 분자의 비는 반드시 1:1일 필요는 없으나 1:1이 바람직하다. 바람직하게는 본 발명의 융합단백질은 하나의 기능적 IL-6분자 및 하나의 기능적 DS-sIL-6R 분자를 포함한다.
- <25> 본 발명의 융합단백질은 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 적어도 5배, 바람직하게는 적어도 10배, 더욱 바람직하게는 적어도 15배, 가장 바람직하게는 적어도 25배 증가시키는 것이 특히 바람직하다. MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현증가는 in vivo 또는 in vitro에서 측정할 수 있다. 바람직하게는 증가는 in vitro에서 성장한 인간 복막 중피 세포(HPMC)와 같은 적당한 세포계에서 측정된다. MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 증가를 측정하는 적당한 방법은 본 발명에서 기재한다.
- <26> 본 발명의 특정 바람직한 실시예에서 본 발명의 융합단백질은 도 5의 서열을 갖는다. 도5의 융합단백질은 적응성 있는 링커를 통하여 서로 결합된 한 기능적 IL-6분자와 한 기능적 DS-sIL-6R 분자를 코딩하고, C-말단에 c-

myc tag(밀줄 친)를 갖는다. c-myc tag는 융합단백질의 정제를 돕고, 바람직하게는 특히 융합단백질을 검색이나 의로 환경에 사용될 때 본 발명의 융합단백질의 부분이 아니다.

- <27> 본 발명은 또한 본 발명의 융합단백질을 코딩하는 핵산분자를 제공한다.
- <28> 본 발명의 핵산분자는 당업계에서 공지된 방법에 의해 얻을 수 있다. 예를 들어 자연적으로 발생하는 서열은 적당한 세포주 또는 인간이나 마우스와 같은 생물체의 조직으로부터 직접 유래한 DNA 또는 cDNA로부터 지노믹 클로닝 또는 cDNA 클로닝을 통하여 얻을 수 있다. 대안으로는 서열은 포스포라미다이트(phosphoramidite)방법과 같은 표준 합성 방법을 사용하여 합성할 수 있다.
- <29> 여러 기술이 합성 또는 클로닝 방법에 의하여 얻어진 핵산 서열을 변경하는데 사용될 수 있다. 그러한 기술은 당업계에 널리 알려져 있다. 예를 들어 사이트 디렉티드 뉴타제네시스 또는 올리고뉴크레오타이드 디렉티드 뉴타제네시스 및 PCR 기술이 DNA 서열을 변경하는데 사용될 수 있다. 그러한 기술은 당업자에게 주지의 기술이고, 당업자에게 주지의 교재에 잘 기재되어 있다.
- <30> 본 발명은 또한 본 발명의 핵산분자를 포함하는 발현백터를 제공한다. 발현백터는 포유류세포, 곤충세포, 세균 및 효모와 같은 진핵 미생물을 포함하는 여러 다양한 생명체에서 핵산을 발현하는 것이 잘 알려졌다. 그러한 모든 발현백터는 당업자에게 주지되고, 핵산서열을 발현하기 위해 발현백터를 사용하는 것은 당업자에게 주지된 표준 기술이다. 바람직하게는 발현백터는 벡로바이러스 발현백터이다.
- <31> 본 발명의 발현백터는 하나의 프로모터와 본 발명의 핵산분자를 포함하는 것이 바람직하다. 백터는 본 발명의 융합단백질 생산을 일으킨다. 백터는 핵산분자의 발현을 얻는데 필요한 조절 서열을 포함하는 것이 더욱 바람직하다.
- <32> 본 발명의 핵산분자는 적당한 숙주세포에서 세포내에서 발현될 수 있다. 프로모터는 본 발명의 핵산분자에 직접 붙을 수 있고 그 경우에 코딩된 단백질의 N-말단은 ATG 코돈에 의해 코딩된 메티오닌일 수 있다.
- <33> 대안으로 본 발명의 핵산분자에 의해 코딩되는 융합단백질은 본 발명의 핵산분자에 리더 서열을 코딩하는 뉴크레오타이드 서열이 결합되어 적당한 숙주세포로부터 분비될 수 있다. 코딩된 단백질은 본 발명의 핵산분자에 의해 코딩된 융합단백질과 리더 서열 절편을 포함할 것이다. 리더 서열은 세포의 밖으로 융합단백질의 분비를 일으킬 것이다. 바람직하게는 리더서열을 효소 또는 화학적으로 절단하여 제거할 수 있는 가공자리가 리더 서열과 본 발명의 핵산분자에 의해 코딩되는 융합단백질 사이에 존재한다. 그러한 리더 서열의 예가 아데노바이러스 트리파라이트(triparite) 리더이다.
- <34> 바람직하게는 본 발명의 백터는 하나의 프로모터와 본 발명의 핵산분자의 원하는 발현을 얻는데 필요한 다른 조절 서열을 포함한다.
- <35> 본 발명은 또한 본 발명의 백터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- <36> "형질전환"이란 외래 핵산분자를 숙주세포에 직접 업데이크, 트랜스덕션, f-메이팅 또는 전기포레이션 등 삽입에 사용된 방법에 상관없이 삽입하는 것을 말한다. 외래 핵산은 비-통합 백터(episome)으로 얻을 수 있고, 또는 숙주 지놈으로 통합될 수 있다.
- <37> 바람직하게는 숙주세포는 진핵세포이고, 더욱 바람직하게는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, HPMCs, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK)세포, HepG2 세포와 같은 간 기원세포, 밀로마(myeloma) 또는 하이브리도마 세포주와 같은 포유류세포이다. 바람직하게는 숙주세포는 대장균 같은 원핵세포이다.
- <38> 또 본 발명은 본 발명의 백터를 숙주세포에 트랜스펙션하고 트랜스펙션된 숙주세포를 핵산분자의 발현 및 본 발명의 융합단백질의 생산을 이끌기 위해 적당한 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는 본 발명의 융합단백질 생산 방법을 제공한다. 그 후 융합단백질은 융합단백질이 분비되느냐에 따라 표준방법을 사용하여 트랜스펙션된 세포 또는 세포성장 배지로부터 얻을 수 있다.
- <39> 또 본 발명은 본 발명의 융합단백질의 작용약(agonist) 또는 길항물질(antagonist)을 밝히는 검색방법을 제공한다. 검색방법은 후보물질의 존재가 본 발명의 융합단백질의 기능에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위한 후보물질 테스트단계를 포함하는 것이 바람직하다. 예를 들어 후보물질은 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10과 같은 케모카인의 생산을 증가 또는 감소시킬 수 있고 또는 융합단백질에 의해 영향을 받는 케모카인의 범위를 변경할 수 있다.
- <40> 후보물질은 세포, 비세포(cell-free)제조물, 화학적 라이브러리 또는 천연 산물 믹스로부터 얻을 수 있다. 후보

물질은 천연 또는 변형된 기질, 리간드, 효소, 수용체, 항체 분자 또는 구조적 혹은 기능적 유사물(mimetic)일 수 있다. 적당한 검색 기술 리뷰에 관해서는 Coligan 등의 Current Protocols in Immunology, 1(2): Chapter 5, (1991)을 참조하면 된다.

- <41> 본 발명은 또 본 발명의 융합단백질의 저해형과 관련 있다, 여기서 저해형은 gp130에 결합하고 H-IL-6 및 본 발명의 융합단백질의 효과를 저해한다. 바람직하게는 본 발명의 융합단백질의 저해형은 본 발명의 융합단백질에 의해 일어나는 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10의 발현을 저해하고, H-IL-6에 의해 일어나는 MCP-1의 발현을 저해한다. 그러한 저해형은 기능적 동족체 생산에 관해 위에서 설명한 바와 같이 본 발명의 융합단백질을 돌연변이시켜 제조할 수 있다. 게다가 저해형의 기능은 기능적 동족체를 테스트에 관해 위에서 설명한 것과 같은 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 융합단백질의 저해형은 바람직하게는 H-IL-6 및 본 발명의 융합단백질의 효과를 억제하거나 실질적으로 감소(즉 적어도 50%, 바람직하게는 75%)한다. 바람직하게는 본 발명의 융합단백질의 저해형은 단지 본 발명의 융합단백질의 효과를 저해만 하고, 여기서 융합단백질의 저해형은 H-IL-6이 아니다.
- <42> 본 발명은 또 세포계의 신호경로를 조절하는 방법에서 본 발명의 융합단백질 또는 그 융합단백질의 저해형의 용도를 제공한다. 세포계의 신호조절에 의해 신호경로에 관한 정보를 얻을 수 있고, 이것은 원하는 결과를 얻기 위해 타겟될 수 있는 경로의 다른 부분을 밝힐 수 있다. 세포계는 세포배양과 같은 in vitro 세포계 또는 생물체와 같은 in vivo 세포계가 가능하다.
- <43> 본 발명은 또한 약리적으로 수용가능한 담체, 어쥬반트 또는 운송수단(vehicle)과 결합된 본 발명의 융합단백질, 본 발명의 핵산분자 또는 본 발명의 발현백터를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- <44> 적당한 약리적으로 수용가능한 담체, 어쥬반트 또는 운송수단(vehicle)은 하기에서 설명한다.
- <45> 본 발명은 또 치료용도로 본 발명의 융합단백질, 본 발명의 핵산분자 또는 본 발명의 발현백터를 제공한다.
- <46> 본 발명은 또 전염병, 염증 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 의약에 본 발명의 융합단백질, 본 발명의 핵산분자 또는 본 발명의 발현백터의 용도를 제공한다.
- <47> 본 발명은 또 면역반응을 증가 또는 변화시키기를 원하는 경우 전염병, 염증 또는 면역질환의 예방 또는 치료에 있어 본 발명의 융합단백질, 본 발명의 핵산분자 또는 본 발명의 발현백터의 용도를 제공한다.
- <48> 본 발명은 또 면역반응을 증가 또는 변화시키기를 원하는 경우 전염병, 염증 또는 면역질환의 예방 또는 치료에 있어 본 발명의 융합단백질, 본 발명의 핵산분자 또는 본 발명의 발현백터의 유효량을 그런 치료가 필요한 개인에게 투여하는 단계를 포함하는 전염병, 염증 또는 면역질환 예방 및 치료방법을 제공한다.
- <49> 전염병은 감염체가 CCR5 수용체를 사용하여 결합하는 모든 질병이 가능하며, 특히 HIV의 M-트로픽 균주에 의해 일어나는 AIDS가 바람직하다.
- <50> 융합단백질은 케모카인 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES 또는 IP-10 뿐 아니라 다른 케모카인의 수준을 증가시키고, 융합단백질은 염증성 반응을 증가 또는 변형할 수 있기 때문에 면역반응을 증가 또는 변화시키기를 원하는 경우 염증성 질병의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 적당한 염증성 질병은 세균성 복막염 및 크론(Crohn) 병이다. 본 발명의 융합단백질은 특히 세균성 복막염의 치료에 유용하다(실시예 7 참조). 본 발명의 융합단백질은 또 자가면역질환과 같은 면역 이상의 예방 및 치료에도 사용될 수 있다.
- <51> 본 발명은 또 류마티스성 관절염과 같은 고 수준의 IL-6과 관련된 면역 이상의 예방 또는 치료에 본 발명의 융합단백질의 저해형의 용도를 제공한다.
- <52> 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 화합물 중 하나( 즉 본 발명의 융합단백질, 본 발명의 핵산분자 또는 본 발명의 발현백터)와 약리적으로 수용가능한 담체, 어쥬반트 또는 운송수단(vehicle)을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에서 사용될 수 있는 약리적으로 수용가능한 담체, 어쥬반트 또는 운송수단(vehicle)은 이온 교환수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트(stearate), 레시틴, 인간 시림 알부민과 같은 시림 단백질, 포스페이트와 같은 버퍼 물질, 글라신, 소르비산, 소르베이트 칼륨, 포화 식물성 지방산, 물, 염 또는 전해질의 부분적 글리세라이드 혼합물, 프로타민 설페이트, 이소듐 하이드로젠 포스페이트, 포테슘 하이드로젠 포스페이트, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈(pyrrolidone), 셀룰로스-기초 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 폴리머, 폴리에틸렌 글리콜 및 울(wool) 지방을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

- <53> 본 발명의 약학 조성물은 경구 및 흡입 스프레이 또는 이식된 저장기를 통하여 비경구 투여할 수 있다. 바람직하게는 그 약학 조성물은 경구 또는 주사로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상적인 비독성 약리적으로 수용가능한 담체, 어쥬반트 또는 운송수단(vehicle)을 가질 수 있다. 본 발명에서 사용된 "비경구"란 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액내(intrasynovial), 흉골내, 포막내(intrathecal), 모든 외상성 조직 및 두개골 내 삽입 또는 주입물 기술을 포함한다.
- <54> 약학 조성물은 살균 주사 가능한 제조물의 형태로 예를 들어 살균 주사 가능한 수용성 또는 유성 현탁액일 수 있다. 이 현탁액은 적당한 분산제 또는 습식제(예를 들어 Tween 80) 및 현탁제를 사용하여 당업계에서 알려진 기술에 따라 제조될 수 있다. 또 살균 주사 가능한 제조물은 1,3-부탄디올 용액과 같은 비독성 비경구-수용 가능한 희석액 또는 용매 상의 살균 주사 가능한 용액 또는 현탁액일 수 있다. 본 발명에서 제공된 수용 가능한 운송물질 및 용매 중에는 만니톨, 물, 링거액 및 등장 염화나트륨 용액이 있다. 이외에 용매 또는 현탁 매질은 살균, 고정된 오일이 통상적으로 채택될 수 있다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 다이글리세라이드를 포함하는 통상의 혼합유를 채택할 수 있다. 주사 가능한 제조물에 유용한 오레익산과 같은 지방산 및 그것의 글리세라이드 유도체는 올리브 오일, 캐스터 오일과 같은 천연 약리학적으로 수용가능한 오일 특히 그들의 폴리옥시에틸레이트 형태이다. 이들 기름 용액 또는 현탁액은 또한 긴사슬 알콜 희석액 또는 Ph. Helv와 같은 분산제 또는 유사 알콜을 포함할 수 있다.
- <55> 본 발명의 약학 조성물은 캡슐, 정제 및 수용성 현탁제 및 용액을 포함하는 경구 수용 가능한 조제 형태로 투여될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 경구용 정제의 경우에는 통상적으로 사용되는 담체는 락토스 및 옥수수 전분을 포함한다. 마그네슘 스트아레이트와 같은 윤활제가 전형적으로 추가된다. 캡슐 형태의 경구 투여용으로 유용한 희석제는 락토스 및 건조 옥수수전분을 포함한다. 수용성 현탁액을 경구투여시 활성성분은 에멀전 및 현탁제와 결합된다. 원하는 경우에 일부 감미제 및/또는 향 및/또는 발색제가 첨가될 수 있다.
- <56> 본 발명의 약학 조성물은 코 연무제 또는 흡입제로 투여될 수 있다. 그러한 조성물은 약학 조제의 기술에서 공지된 기술에 따라 제조되고 벤질알콜 또는 다른 적합한 보존제, 생체이용율을 증가시키기 위한 흡수 프로코터, 불화탄소 및/또는 당업계에서 알려진 다른 용액 및 분산제가 함유된 식염수로 제조될 수 있다.

**실시예**

- <72> 본 발명은 하기 실시예 및 도면을 통하여 상세하게 설명한다.
- <73> 물질 및 방법
- <74> 시약
- <75> 베클로바이러스 발현된 sIL-6R 이소폼은 전에 기재된 방법에 따라 얻었다(Horicuhi 등, Immunology 95, 360-369, 1994). 단일클론 항-IL-6와 항-sIL-6R(각각 mAb-226 및 mAb-227)은 R&D 시스템으로부터 구입하였다. 항-DS-sIL-6R(mAb-2F3)은 DS-sIL-6R의 COOH-말단 서열에 대하여 얻었다(Horicuhi 등, (supra)).
- <76> 인간 복막 중피 세포의 분리 및 배양
- <77> 인간 복막 중피 세포(HPMC)은 선택적 복부 수술을 수행한 동의한 환자로부터 복강내의 망 조직의 연속적 트립신 (0.1% w/v 트립신: 0.02% w/v EDTA) 처리에 의해 분리되었다(Topley 등, American. J. Pathology, 142, 1876-1886, 1993). 세포는 10%(v/v) fetal calf serum, 2mM L-글루타민, 100U/ml 페니실린, 100µg/ml 스트렙토마이신, 5µg/ml 트랜스페린, 5µg/ml 인슐린 및 0.4µg/ml 하이드로코티손(Life Technology 또는 Sigma)을 포함하는 Earle's buffer 199배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 분위기에서 배양하였다. 실험 전에 HPMC 모노레이어는 시럼 결핍에서 성장을 정지시켰다. 이 조건하에서 HPMC는 96시간까지 생존 및 정지(quiescent) 상태를 유지하였다(Topley 등, (supra)). 촉발은 시럼 결핍과 두 번째 페시지(passage) 전의 세포에서 수행되었다.
- <78> 염증성 매디에이터 농도의 결정자(determinator)
- <79> 염증성 매디에이터 농도는 샌드위치 ELISA 기술을 사용하여 정량하였다. 인간 MCP-1 레벨은 Pharmingen, Becton-Dickinson의 조화되는 항체 쌍 OptEIA 키트를 사용하여 결정하였다. 인간 RANTES는 R&D 시스템으로부터 구입한 적당한 어울리는 항체쌍(mAb678/NAF278)으로 정량하였고 MIP-1α, MIP-1β 및 eotaxin은 Amersham BIOTRAK ELISA 키트를 사용하여 분석하였다.

- <80> 루시퍼레이즈 표지자 분석
- <81> 완전한 프로모터 서열 또는 공지된 전사인자 결합 모티프내의 변이를 갖는 루시퍼레이즈 결합 RNATES 프로모터 구조물은 Nagasaki 대학 H. Moriuchi 교수로부터 얻었다(Moriuchi 등, J. Immunol. 159, 5441-5449, 1997). 간단히 HPMC(1x 104 세포/6 웰 마이크로타이트 플레이트)를 60-70% 칸후르언시(confluency)에 도달할 때까지 10% FCS를 갖는 M199 배지에서 배양하였다. 모노레이어를 세척하고, 세포를 각 루시퍼레이즈 연결된 프로모터 구조물(0.5-1.0 $\mu$ g)로 트랜스펙션시켰다. 일시적 트랜스펙션은 표준 인산칼슘 침전 기술(Graham 및 van de Eb, Virology, 52, 456-458, 1973)을 사용하여 수행하였다. 일단 HPMC가 회수하고 세포를 실시예4에서 나타난 바와 같이 24시간 동안 자극하였다. 세포 파쇄물을 제조하고 루시퍼레이즈 활성을 상업적인 루시퍼레이즈 분석 키트(Promega)를 사용한 루미노메트리에 의해 결정하였다.
- <82> 핵추출물의 제조
- <83> 핵추출물은 DNA 결합 단백질의 추출용 신속 기술을 사용하여 HPMC로부터 제조하였다. 간단하게 세포를 아이스 콜드 PBS(pH 7.4)에서 수집하여 원심분리에 의하여 펠렛화하였다. 세포를 콜드 버퍼 A(10mM HEPES-KOH (pH 7.9), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 0.3mM DTT, 0.2mM PMSF)에서 재부유하였고 얼음상에서 20분 더 정치하였다. 세포 데브리스를 원심분리에 의해 펠렛화하고 상등액을 필요시까지 -80 $^{\circ}$ C 에서 저장하였다.
- <84> 전기영동 이동 변화 어세이(EMSA) 및 슈퍼쉬프트
- <85> EMSA는 전에 기재한 바와 같이 수행하였다(Zhang 등, J. Biol. Chem. 272, 30607-30609, 1997). NF- $\kappa$ B(5'-GATCCATGGGGAATTC CCC-3' & 5'-CATGGGGAATTC CCCATGGA-3'), STAT-3(SIE-m67 5'-CGACATTC CCGTAAATCG-3' & 5'-CGACGATTTACGGGAAATG-3') 및 C/EBP(5'-GACGTCACATTCGACAATCTTAA-3' & 5'-TATTAAGATTGTGCAATGTGACG-3') 결합에 대한 컨센서스 모티프를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 EMSA에서 사용하기 위해 어닐링하였다. 이 이중 나선 절편들을 DNA 중합효소 I의 Klenow 절편을 사용하여 [ $\alpha$  <sup>32</sup>P]-dTTP로 방사성동위원소표지하였다. 핵 추출물을 표지된 컨센서스 서열로 배양하였고, 6% 폴리아크릴아마이드 젤 상에서 전기영동에 의해 DNA- 단백질 상호작용을 분석하였다.
- <86> 실시예 1: CCR5-리간드의 차별적 유도
- <87> 인간 복막 중피 세포는 10ng/ml의 인간 IL-6과 공동으로 여러 농도(0-50ng/ml)의 DS-sIL-6R(●) 또는 PC-sIL-6R(○)로 자극하기 전에 48시간동안 성장을 정지시켰다. 오버나잇 배양 후에 비세포(cell-free) 상등액을 취하고 케모카인 생성을 특정의 ELISA를 사용하여 결정하였다. 값들은 4번의 독자적 실험을 통한 평균 $\pm$ SEM이다. 데이터는 IL-6의 존재하에서 DS-sIL-6R은 CCL3(MIP-1 $\alpha$ ), CCL4(MIP-1 $\beta$ ), CCL5(RANTES) 및 CXCL10(IP-10)의 발현을 유도하는 반면에 PC-sIL-6R은 효과가 없다(도 6 참조). CCL2(MCP-1) 및 CCL11(Eotaxin)은 각각 양성 및 음성 대조군으로 표시하였다.
- <88> 실시예2: DS-sIL-6R 중재된 케모카인 분비의 저해
- <89> 성장 정지된 인간 복막 중피 세포는 10ng/ml의 인간 IL-6과 공동으로 30ng/ml의 DS-sIL-6R로 자극(24시간)하였다. CCL2 및 CCL5의 분비는 ELISA를 사용하여 정량화하였다. 도7A는 처리 전에 인간 복막 중피 세포를 48시간 성장 정지된 것을 보여준다. 세포를 10ng/ml의 IL-6 + 20ng/ml의 DS-sIL-6R의 존재(채워진 기호) 또는 부존재(빈 기호) 하에서 여러 단일클론 항체(0-5 $\mu$ g/ml)로 처리하였다. MAb 206(항-IL-6)로 처리한 세포를 채워진 네모로 보여준다. MAb 227(항 수용성 IL-6)로 처리한 세포를 채워진 원으로 보여준다. MAb 2F3(DS-sIL-6R의 C 말단에 대한)로 처리한 세포를 채워진 다이아몬드로 보여준다. 조건화된 배지를 24시간 후에 모아서 ELISA를 사용하여 CCL2/MCP-1 및 CCL5/RANTES 수준을 정량하였다. 값들은 4번의 독자적 실험을 통한 평균 $\pm$ SEM이다.
- <90> 도7B는 PC-sIL-6R에 의한 RANTES 생성의 특이적 방해를 보여준다. DS-sIL-6R 중재된 RNATES 분비는 증가하는 농도의 PC-sIL-6R(0-50ng/ml)(●) 하에서 모니터하였다. PC-sIL-6R 및 10 ng/ml IL-6에 반응한 RANTES 분비는 대조군(○)으로 보여준다. 값들은 4번의 독자적 실험을 통한 평균 $\pm$ SEM이다. 다른 실험에서 RANTES 분비는 수용성 gp130, Hyper-IL-6의 함유물에 의해 억제되었다.
- <91> 실시예3: 케모카인 유도의 시간 경과
- <92> 성장 정지된 인간 복막 중피 세포는 10ng/ml의 IL-6 존재하에서 50ng/ml의 DS-sIL-6R(●) 또는 PC-sIL-6R(○)로 자극하였다. 자극되지 않은 세포(빈 사각박스)를 비교예로 보여준다. 정해진 시간 간격에 비세포(cell-free) 상등액을 모으고, CCL2(MCP-1) 및 CCL5(RANTES) 분비를 결정하였다. 값들은 4번의 독자적 실험을

통한 평균±SEM으로 표시하였다. 데이터는 비록 CCL2 생성이 sIL-6R에 의한 자극 3-4시간 후에 검출되었지만, DS-sIL-6R 중재된 CCL5의 분비는 초기 자극 후 15시간까지 관찰되지 않았다는 것을 보여준다(도 8 참조). 이 발견은 CCL5의 발현조절은 CCL2의 조절과 차이가 있다는 것을 암시한다.

<93> 실시예4: 루시퍼레이즈 표지 분석

<94> 1.4kb RANTES 프로모터 절편(RNATES-1.4) 또는 공지된 전사인자 컨센서스 서열내의 여러 변이( $\Delta$ NF- $\kappa$ B,  $\Delta$ STAT 및  $\Delta$ NF-IL-6)를 갖는 루시퍼레이즈 표지 구조물(Moriuchi 등, 1997 (supra))을 인간 복막 중피 세포내로 순간적으로 트랜스펙션시켰다. 회복 후에 세포를 100pg/ml IL-1, 10ng/ml IL-6 단독 또는 50ng/ml의 DS-sIL-6R(DS) 또는 PC-sIL-6R(PC)와 공동으로 자극하였다. 24시간 자극 후에 루시퍼레이즈 활성을 모니터하였다.  $\Delta$  NF-IL-6 구조물의 활성을 대조군으로 이오노마이신을 사용하여 확인하였고 약 40배의 루시퍼레이즈 활성 증가가 유도되었다(데이터는 보여주지 않음). 값들은 각 일차 중피세포 분리체를 사용하여 수행한 실험을 통하여 얻은 유도배수와 평균±SEM(n=4)를 나타낸다. 이 데이터는 NF-IL-6의 파괴는 루시퍼레이즈 활성의 DS-sIL-6R 중재 유도를 억제하는 반면에 PC-sIL-6R 및 IL-6 단독은 상기 대조 레벨 구조물을 가지고 증가가 없다는 것을 보여준다.

<95> 실시예 5: EMSA 분석

<96> 핵 추출물은 10pg/ml IL-1 또는 50ng/ml의 DS-sIL-6R(DS) 또는 PC-sIL-6R(PC)와 공동으로 10ng/ml IL-6로 30분 동안 자극한 HPMC로부터 얻었다. NF- $\kappa$ B, STAT-3(SIE m67) 및 C/EBP(NF-IL-6)에 대한 컨센서스 서열은 동위원소표지하였고, 그 핵추출물로 정지하였다. 6% 폴리아크릴아마이드 젤 상에서 전기영동에 의해 DNA-단백질 상호작용을 분석하였고 오토라디오그래피에 의해 밴드를 보았다(도 10 참조). 대조군으로 NF- $\kappa$ B 및 STAT-3의 활성화를 사용하였다. 이 초기 실험은 DS-sIL-6R이 C/EBP 컨센서스 서열에 증가된 결합을 유도한다는 것을 강조한다. 이 컨센서스 올리고뉴클레오타이드는 개별 C/EBP 계열 멤버를 구별할 수 없게 하기 때문에 경쟁 EMSA 및 특정 항체를 사용한 슈퍼쉬프트 접근이 현재 NF-IL-6  $\alpha$  (C/EBP  $\beta$ ) 또는 NF-IL-6  $\beta$  (C/EBP  $\delta$ )의 관여를 확인하기 위하여 사용되고 있다.

<97> 실시예6: Hyper DS-sIL-6R의 발현 및 기능적 특성

<98> COS-7 세포를 시럼 결핍 조건하에서 pcDNA-3(Mock) 또는 pcDNA-3/Hyper DS-sIL-6R(Hyper DS-sIL-6R)로 순간적으로 트랜스펙션하였다. 37°C에서 24시간 배양 후에 조건화된 배지를 모으고 인간 IL-6 및 sIL-6R 농도를 특정 ELISA를 사용하여 정량하였다(도 11A 참조). 이 조건화된 배지를 시럼 결핍된 인간 활액 피브로브라스트에 첨가하였다. 37°C에서 24시간 배양 후에 조건화된 배지를 모으고 인간 CCL2/MCP-1 및 CCL5/RNATES의 농도를 특정 ELISA를 사용하여 정량하였다(도 9B 참조). 값들은 단일 실험을 통한 평균±SD이다.

<99> 실시예 7: 염증성 능력

<100> 우리는 *Staphylococcus epidermidis*(SES)로부터 제조된 비세포 상등액을 사용하여 야생형 및 IL-6 결핍(IL-6<sup>-/-</sup>) 모두에서 복막 염증 모델의 특성을 보고하였다(Hurst 등, Immunity, 14, 705-714, 2001). 이 모델을 사용하여 우리는 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스에서 DS- 및 PC-sIL-6R의 염증성 능력을 조사하였다. 마우스를 살균된 PBS(대조군), 마우스 당 100ng DS-sIL-6R 및 마우스 당 25ng IL-6(DS-sIL-6R), 마우스 당 100ng PC-sIL-6R 및 마우스 당 25ng IL-6(PC-sIL-6R), SES 단독(SES) 또는 DS-sIL-6R 및 IL-6과 공동으로 또는 PC-sIL-6R 및 IL-6와 공동(각각 SES + DS-sIL-6R 또는 SES + PC-sIL-6R)으로 복강내 투여하였다. 3시간 자극 후 복막 강을 세척하고 염증성 지표를 결정하였다. PC-sIL-6R에 대해서는 전에 보고한 바와 같이(Hurst 등, Immunity, 14, 705-714, 2001) 양 이소폼은 SES 노출 후에 뉴트로필의 침투를 저해한다(도 12A 참조). CCL5/RANTES 레벨은 복강 세척액에서 결정되었고 DS-sIL-6R + IL-6의 작용에 의해 바람직하게 유도된다고 밝혀진 우리의 in vitro 데이터와 일치하였다(도 12B 참조). 값들은 평균±SEM(n=3-4 동물/조건 \*p < 0.05; \*\*p < 0.001)이다.

<101> 실시예 8: 야생형(IL-6<sup>+/+</sup>) 및 IL-6 결핍성(IL-6<sup>-/-</sup>) 마우스내의 CCL5 및 CXCL10의 발현

<102> DS-sIL-6R에 의한 수용체 CCR5(CCL3, CCL4, CCL5) 및 CXCR3(CXCL10)에 특이적인 케모카인의 선택적 유도는 이 이소폼이 염증의 자리에서 T-림프구 및 모노사이트를 끌어들이는데 중요하다는 것을 암시한다. 이것을 테스트하기 위해 복막 염증의 최근 밝혀진 모델을 IL-6<sup>+/+</sup> 및 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스에서 CCL5 및 CXCL10(CRG-2, IP-10의 유사인 동족체)의 일시적 발현을 결정하는데 사용하였다. 이 모델은 복막 투석환자에서 전형적으로 발견되는 세균 복막염 에피소드와 밀접하게 닮았고 *Staphylococcus epidermidis*(SES) 유래 비세균 상등액의 복강내 투여에 기초한다(Hurst 등, 2001). 도13A에서 설명한 바와 같이, SES 첼린지된 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스에서 보여지는 CCL5 및

CXCL10의 발현에 대한 프로파일은 IL-6+/+ 마우스에서 만나는 것과 상당히 다르다. 이 변형된 발현 패턴은 수용성 gp130(sgp130)에 의한 sIL-6R 활성의 억제가 SES 처리된 IL-6<sup>+/+</sup> 마우스에서 보여지는 CCL5 및 CXCL10의 분비 프로파일을 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스에서 관찰되는 것으로 전환하기 때문에 sIL-6R 신호의 결과이다.

<103> 실시예9: IL-6<sup>-/-</sup> 마우스에서 DS-sIL-6R 활성의 기능적 특성

<104> IL-6<sup>-/-</sup> 마우스에서 CCL5 및 CXCL10의 분비의 변화된 패턴이 루코사이트 모임(recruitment)에 직접 영향을 갖는지를 테스트하기 위해, IL-6<sup>+/+</sup> 및 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스를 SES로 챌린지하고, 쥐 CCR5 및 CXCR3에 대한 항체를 사용하여 복막강에서 세척되어 회수된 세포에 대한 FACS 스테이닝을 수행하였다(도 14 참조). SES로 IL-6<sup>+/+</sup> 마우스에 처리한 경우에는 CCR5 및 CXCR3를 갖는 세포타입의 증가가 유도되었으나 이 침투(infiltration)는 SES로 처리된 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스에서는 덜하게 되었다. 또한 CCR5+/CXCR3+ 세포의 침투는 DS-sIL-6R 및 IL-6의 존재하에서 SES로 챌린지된 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스에서 평가하였다(도 15a). 케모카인 데이터에서 예측한 바와 같이, DS-sIL-6R로 IL-6 신호의 재구성은 CCR5<sup>+</sup>/CXCR3<sup>+</sup> 양성세포의 유입을 IL-6<sup>+/+</sup> 마우스에서 만나는 수준까지 회복하였다. 이 루코사이트의 모집은 DS-sIL-6R에 특이적이고, sgp130에 의해 억제되었다(도 15a). 유사항 데이터를 항-CD3 및 항-CCR5로 이중 표지된 세포군에서 얻을 수 있다(도 15b). 이들 반응은 DS-sIL-6R에 특이적이고, PC-sIL-6R을 통해서 유도되지 않는다. 모든 경우에 SES로 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스의 투여는 복막 강에 모인 루코노사이트의 총수를 크게 증가시킨다(도 15b). 결론적으로 IL-6는 DS-sIL-6R 결합을 통하여 CCR5 및 CXCR3를 발현하는 루코노사이트의 끌어당김에 영향을 주는 것을 나타내고, DS-sIL-6R의 생물학적 특성은 PC-sIL-6R의 것과 분명한 차이가 있다는 것을 강조한다.

<105> 인터루킨-6는 염증을 일으키는 효과 및 억제하는 효과를 모두 가진 것으로 알려졌다. 그것의 보호 특성의 관점에서 IL-6는 친(pro)-염증성 사이토카인 발현을 저해하고, IL-1 수용체 및 수용성 p55 TNF- $\alpha$  수용체의 길항제 분비를 촉진시키는 그것의 작용을 통하여 염증반응의 양을 조절한다(Schindler 등, Blood 75, 40-44, 1990; Tilg 등, Blood, 83, 113-118, 1994 및 Xing 등, J. Clin. Invest. 101, 311-320, 1998). IL-6는 감염 및 염증 자리에서 뉴트로필의 축적을 억제하기 때문에 루코노사이트의 모집에 영향을 미칠 것이다(Ulich 등, Am. Pathol. 138, 1097-1102, 1991; Barton 등, Infect. Immunol. 61, 1496-1500, 1993 및 Xing 등, J. Clin. Invest. 101, 311-320, 1998). 사실은 IL-6 결핍(IL-6<sup>-/-</sup>)마우스를 엔도톡신 에어로졸로 처리하면 야생형(IL-6<sup>+/+</sup>) 동물 보다 기관지-폐포 세척액에서 뉴트로필의 숫자를 크게 증가시킨다(Xing 등, J. Clin. Invest. 101, 311-320, 1998).

<106> IL-6 중재된 반응의 조절의 중심은 동족의 IL-6 수용체(IL-6R)의 발현이 결핍된 세포형태에서 IL-6반응을 일으키는 리간드-수용체 복합체를 형성하는 수용성 IL-6 수용체(sIL-6R)이다(Jones 등, FASEB, J. 15, 43-58, 2001). 이 [sIL-6R/IL-6] 복합체는 IL-6 계열 사이토카인, gp130에 대한 편재하여 발현되는 신호 전달 요소와 상호작용을 통하여 IL-6와 정상적으로는 반응하지 않는 세포를 활성화하는 능력을 갖는다(Jones 등, FASEB, J. 15, 43-58, 2001). sIL-6R이 일부 사이토카인(IL-8, MCP-1, MCP-3) 및 응착 분자(ICAM-1 및 VCAM-1)의 발현을 유도할 수 있는 것은 바로 이 기작을 통해서이다(Romano 등, Immunity 6, 315-325, 1997; Modur 등, J. Clin. Invest. 100, 2752-2756, 1997 및 Klouche 등, J. Immunol. 163, 4583-4589, 2000). 최근에는 우리는 sIL-6R 분비가 염증의 해결에 중요한 중간체로 작용하고, 감염의 급성 우세한(predominantly) 뉴트로필 단계사이의 전이와 단핵세포 유입을 돕는다는 것을 제안하였다. 결론적으로 sIL-6R에 의해 중재된 신호는 루코노사이트 모집에 대한 IL-6의 전에 기재한 효과에 기여할 것이다.

<107> 본 출원은 PC-sIL-6R 및 DS-sIL-6R이 일부 CC-케모카인들의 발현을 조절하는 것을 보여준다. 비록 두 형태 모두 MCP-1 발현을 활성화하지만, 단지 DS-sIL-6R만이 CCR5 리간드 RANTES, MIP-1 $\alpha$  및 MIP-1 $\beta$ 의 분비를 촉진할 수 있다. 이것은 DS-sIL-6R이 단핵 루코사이트(T-림프구 및 단핵세포) 모집 및 활성화에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 의미한다(Moser & Loetscher, 2001). 사실은 CCR5는 일부 염증 질환과 전형적으로 연관된 Th1 세포 반응에 마커이다(Qin 등, J. Clin. Invest. 101: 746-754, 1998; Sallusto 등, J. Exp. Med. 187: 875-883,

1998). DS-sIL-6R에 의한 특정 RANTES, MIP-1 $\alpha$  및 MIP-1 $\beta$ 의 업 레귤레이션은 이 sIL-6R 이소폼이 이들 자리에서 T-세포 서브셋의 귀소성을 조절하는데 관여한다는 것을 암시한다. 그러나 최근에 IL-6가 T세포에 작용해서 Th1 세포로 그들의 분화를 저해한다는 보고가 있었다(Diehl 등, Immunity, 13, 805-815, 2000). 이 관점에서 T 세포로부터 DS-sIL-6R 분비(Horiuchi 등, Immunology 95, 360-369, 1994)는 sIL-6R이 수용성 gp130의 저해력을 촉진시키는 길항분자로 작용할 수 있기 때문에 Th1 극성화의 조절에 또 다른 역할을 할 수도 있다(Muller-Newen 등, Eur. J. Biochem. 236, 837-842, 1998). 따라서 어느 자유 IL-6, DS-sIL-6R의 마무리에 의해서 직접적으로 그들의 표현형에 영향을 미치는 T 세포 서브셋에 대한 IL-6 작용을 방해한다.

<108> 현재까지 NF-IL-6의 IL-6 중재된 활성화에 의해 조절되는 염증성 결과에 대하여 거의 알려져 있지 않다. 일반적으로 IL-6는 전사인자의 STAT-3 및 NF-IL-6 계열의 활성화를 통하여 활성 두 세트의 유전자들이라고 생각한다. 따라서 이 급성 시기(phase) 반응의 경우 NF-IL-6가 클래스 1 급성 시기(phase) 단백질을 조절하는 것으로 보고되었고(즉 C-반응성 단백질 및 시림 아밀로이드), 반면에 피브리노겐과 같은 클래스 2 급성 시기 유전자는 STAT-3를 통하여 조절된다(Zhang 등, J. Biol. Chem. 272, 30607-30609, 1997). 여기서 나타낸 증거는 비록 sIL-6R의 양 이소폼은 STAT-3을 활성화할 수 있지만 DS-sIL-6R은 NF-IL-6 트랜스액티베이션을 조절하는 독특한 능력을 갖는다는 것을 명백히 보여준다. RANTES의 발현 및 아마도 MIP-1 $\alpha$  및 MIP-1 $\beta$ 의 발현도 조절하는 것을 나타내는 것은 NF-IL-6의 이 차별적인 활성화이다. 이 측면에서 MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$  및 MIP-1 $\beta$  발현의 시간 의존적인 분석은 MCP-1이 RANTES, MIP-1 $\alpha$  및 MIP-1 $\beta$  보다 상당히 초기에 유도된다는 것을 보여준다. 이 CC-케모카인 발현의 명백한 차별적인 조절은 sIL-6R 이소폼에 의한 STAT-3 및 NF-IL-6 트랜스액티베이션의 개별적 조절에 기여할 것이다.

<109> 임상샘플의 분석은 sIL-6R 레벨이 질병의 진행과정 동안 차별적인 mRNA 스프라이싱 및 단백질 절단에 의하여 독자적으로 조절된다는 것을 전에 밝혀졌다(Horiuchi 등, Immunology, 95, 360-369, 1998 및 Jones 등, FASEB, J. 15, 43-58, 2001). 결론적으로 PC-sIL-6R 및 DS-sIL-6R은 이 수용성 싸이토카인 수용체의 총체적 특성에 개별적으로 기여한다. 최근에 우리는 명백한 임상적 복막염을 갖는 계속적인 일시적 복막투석(CAPD) 환자로부터 얻은 복막 유출물에서 sIL-6R에 대한 발현 프로파일을 분석하였다. 이 샘플 분석을 통하여 비록 전체 sIL-6R 레벨은 감염 후 첫 24-48시간 내에 증가하지만, DS-sIL-6R 농도는 단지 염증의 3일째 날에 상당히 증가한다. 이것은 질병의 후기 단계 동안 DS-sIL-6R의 역할을 암시한다. 임상 복막염 샘플 분석을 통하여 우리는 감염의 경과 중 RANTES, MIP-1 $\alpha$  및 MIP-1 $\beta$  발현이 1일째 피크이고 3일째 베이스라인으로 돌아오는 MCP-1 발현보다 훨씬 늦은(4일)에 일어난다는 것을 보았다(데이터 보여주지 않음). 사실 DS-sIL-6R에 의한 RANTES, MIP-1 $\alpha$  및 MIP-1 $\beta$ 의 특이적 유도는 이들 케모카인이 염증성 과정에서 후기에 발현된다는 것 뿐 아니라 그들의 작용이 MCP-1과 같은 CC 케모카인의 것과 차별된다는 것을 암시한다. 이러한 과정에서 모든 CCR5-리간드는 수상세포(dendritic cell)에 의한 IL-12 생성을 활성화하는 반면에 MCP-1-4는 감마-INF 활성화된 단핵 루코노사이트에 의한 IL-12 생성을 억제한다는 보고가 있다(Aliberti 등, Nature Immunol. 1, 83-87, 2000; Braun 등, J. Immunol. 164, 3009-3017, 2000). 결론적으로 sIL-6R 이소폼에 의한 CC케모카인의 차별적 발현은 독특한 단핵 루코노사이트 서브-집단의 모집에 기여할 뿐 아니라, 염증의 해결에 관여하는 다른 중재자의 발현 프로파일에도 영향을 미칠 수 있다.

<110> 여기서 언급한 모든 과학 자료, 특허 및 특허 출원은 레퍼런스에 의해 여기에 삽입하였다.

<111> 본 발명은 실시예에 의하여 순수하게 기재되었고, 첨부된 청구범위 내에서 한정된 것과 같이 본 발명의 범위 내에서 상세한 변형은 가능하다.

**산업상 이용 가능성**

<112> HIV의 M-트로픽 균주 뿐 아니라 모든 세 케모카인은 CCR5에 결합하기 때문에 높은 레벨의 RANTES, MIP-1 $\alpha$  및 MIP-1 $\beta$ 는 CCR5 결합에 대하여 바이러스와 경쟁하고, HIV의 출입을 효과적으로 억제한다. 결론적으로 케모카인을 위해 이 경쟁의 균형을 되찾는 능력을 가진 어떤 인자는 HIV 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 따라서 본 발명의 융합단백질의 용도는 전염체가 CCR5에 결합하는 질병 특히 HIV의 M-트로픽 균주의 치료에 유용하다.

**도면의 간단한 설명**

<57> 도 1은 H-IL-6의 도식적 표현을 보여준다.

<58> 도 2는 막 접촉 형태를 포함하는 완전한 IL-6R 단백질, PC-sIL-6R과 DS-sIL-6R을 보여준다. 추정되고 있는 트랜스멤브레인 도메인은 밑줄로 나타냈다.

- <59> 도 3은 IL-6서열을 보여준다.
- <60> 도4는 DS-sIL-6R의 서열을 보여준다.
- <61> 도 5는 DS-sIL-6R와 적응 가능한 링커를 통하여 연결된 IL-6 서열을 보여준다. 여기서 C-말단 c-myc tag 서열은 밑줄로 표시하였다.
- <62> 도 6은 인간 IL-6와 혼합된 DS-sIL-6R(●) 또는 PC-sIL-6R(○)에 의한 CCR5 리간드의 차별적 유도를 보여준다.
- <63> 도 7은 여러 단일클론 항체(A) 및 PC-sIL-6R(B)를 사용하여 DS-sIL-6R 중재되는 케모카인 분비의 저해를 보여준다.
- <64> 도 8은 DS-sIL-6R(●) 및 PC-sIL-6R(○)에 의한 케모카인 유도에 대한 시간경과를 보여준다.
- <65> 도 9는 루시퍼레이즈 표지자 분석의 결과를 보여준다.
- <66> 도 10은 EMSA 분석의 결과를 보여준다.
- <67> 도 11은 Hyper DS-sIL-6R의 발현 및 기능적 특성을 보여준다. (A)는 생산된 메디에이터의 수준을 보여주고(그래프의 좌측상단), (B)는 생산된 MCP-1 및 RNATES의 수준을 보여준다.
- <68> 도 12는 PC-sIL-6R, DS-sIL-6R, SES, SES + PC-sIL-6R 및 SES + DS-sIL-6R의 염증성 능력을 보여준다.
- <69> 도 13은 IL-6<sup>+/+</sup> 및 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스내의 CCL5 및 CXCL10의 발현을 보여준다. (A)에서 야생형 C57BL/6J(IL-6<sup>+/+</sup>) 및 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스는 SES 또는 PBS로 복강 내 투여하고, 지정된 시간 간격에 복막 강을 세척하였다. (B)는 IL-6<sup>+/+</sup> 마우스는 PBS, 150ng/마우스의 sgp130, SES 또는 150ng/마우스의 sgp130와 함께 SES를 투여하였다. 지정된 시간 간격에 복막 강을 세척하였다. 양 경우 모두 CCL5 및 CXCL 10수준은 ELISA를 사용한 복막강 세척액 내에서 정량하였다. 값은 평균±SEM(n=6 마우스/조건)으로 표시하였다.
- <70> 도 14는 IL-6<sup>+/+</sup> 및 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스내의 CCR 5 및 CXCR3를 발현하는 세포의 보충(recruitment)을 보여준다. 여기서 IL-6<sup>+/+</sup> 및 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스는 PBS(대조군) 또는 SES로 투여되었다. 12시간 후에 복막 강을 세척하였고, 회수된 세포를 CCR 5 및 CXCR3에 대한 항체로 이중 표지하고 FACS로 분석하였다. 대조군 항체에 의한 자기형광에 따라 사분면(Quadrant)이 만들어졌고, 각 조건에 대한 표본 분산도에 따라 오른편 상단에 있는 세포의 퍼센트가 나타난다(4-6 마우스/실험조건에서 온 평균±SEM). 값은 4-6 마우스/실험조건에서 온 평균±SEM을 나타낸다.
- <71> 도 15는 IL-6<sup>+/+</sup> 및 IL-6<sup>-/-</sup> 마우스내의 CCR 5 및 CXCR3을 발현하는 세포의 보충을 보여준다. IL- 마우스는 SES 존재 또는 부재시에 DS-sIL-6R(25ng/마우스)와 IL-6(20ng/마우스)의 결합(DS/IL-6)으로 처리하였다. 또 수용성 gp130(150ng/마우스)이 표시한바와 같이 포함되었다. 대조군 항체에 의한 자기형광에 따라 사분면(Quadrant)이 만들어졌고, 각 조건에 대한 표본 분산도에 따라 오른편 상단에 있는 세포의 퍼센트가 나타난다(4-6 마우스/실험조건에서 온 평균±SEM)(a 참조). (b) 회수된 세포의 퍼센트를 CCR 5 및 CD3에 대한 항체로 이중 표지하였다(상단 그래프). 값은 각 조건 당 4-6 마우스에서 온 평균(%)±SEM을 나타낸다. 각 실험 조건 당 총 루코사이트 유입(하단 그래프). 값은 각 조건 당 4-6 마우스에서 온 평균±SEM을 나타낸다.

**도면**

**도면1**



1J-6R MLAVGCALLAALLAAPCAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVT  
 LTCGVEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLRVQL  
 \*113 HD SGNYCYRAGR PACTVHLLVDVPP<sup>+</sup>EELSCFRKSPLSNVVC  
 EWGPRSTPSTTKAVLLVRKFNQNSPAEDFQEPCCQYSQESQKFS  
 Q LAVPECDSSFYIVSMCVASSVSGKFSKTQTFQCGGILQDP<sup>+</sup>PA  
 NITVTAVARNR<sup>+</sup>WLSVTWQDPHSWNS<sup>+</sup>FFYRLRFELRYRAERSKT  
 FTTW<sup>+</sup>MVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEWSEWSP  
 \*323 EAMGTPWTESRSP<sup>+</sup>PAENEVSTPMQAL<sup>+</sup>TNKKDDNILFRDSANAT

sIL-6R of H-IL-6

Transmembrane domain

SLPVQDSSSVPLPTFLVAGGSLAFGLLCLAI<sup>+</sup>VLRFKK<sup>+</sup>WKLRA  
 DS-sIL6R SLPGSRRRGSCGL  
 PC-sIL6R SLPVQ  
 LKEGKTS<sup>+</sup>MHPYPYSLCQLVPERPRPTPVLVPLIS<sup>+</sup>PVSPSSLGSD  
 NTSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR

도면3

PVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSER  
 IDKQIRYILDGISARKETCNKSNM  
 CESSKEALAENNLNLPKMAEKDGC  
 FQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVY  
 LEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKV  
 LIQFQKKAKNLDAITTPDPTNAS  
 LLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSF  
 KEFLQSSLRALRQM

도면4

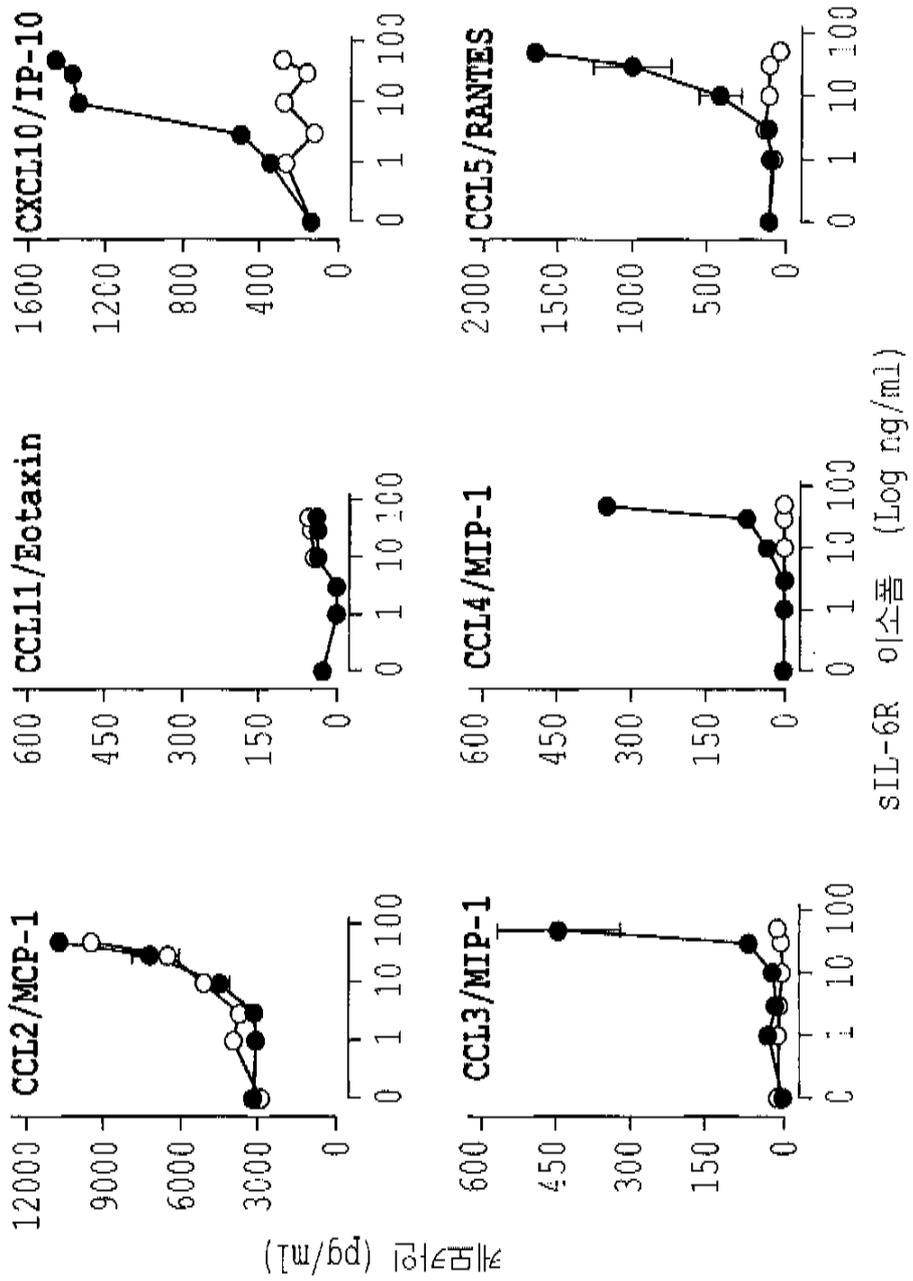
MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVT  
 LCTPGVEPENDATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQL  
 HDSGNYSCYRAGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPLSNVVC  
 EWGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSC  
 QLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFSKTQTFQCGILQPDP  
 PA  
 NITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKT  
 FTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEWSEWSP  
 EAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNI LFRDSANAT  
 SLPSRRRGSCGL

1 50

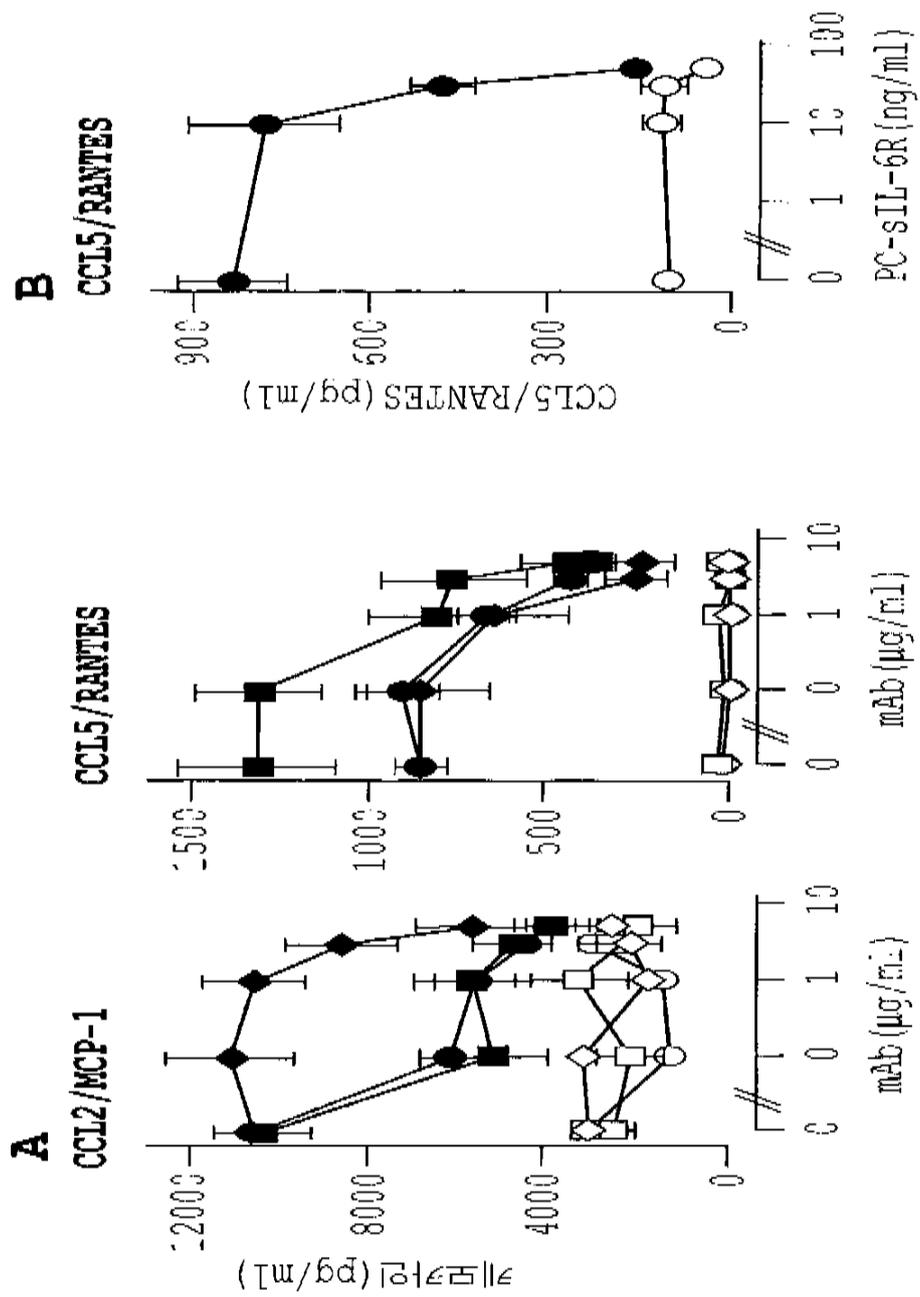
DS-s11-6R | MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCTPGV  
 EPEDNATVHMVLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLILRSVQLHDSGNYSCYRAG  
 RPAGTVHLLVDVPEEPQLSCFRKSPLSNVVCEWGRSTPSLTTKAVLLV  
 RKFNSPAEDDFQEPCCYSQESQFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGS  
 KSKTQTFQGGILQDPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSHWNSFFYRL  
 REELRYRAERSKFTTWMVKDLQHECVLHDAMSGLRHVVQLRAQEEFGQG  
 EWSEWSPAMGTPWTESRSPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSANA  
 TSLPGSRRRCGCGGGGGGGGSEPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSER  
 TDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAE>NNLNLPKMAEKDGGCF  
 QSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESEEQARAVQMSTKVI IQ  
 FLQKAKNLDAITPDPETNASILTKLQANQWLQDMTTHLILRSFKFEFL  
 QSSLRALRQMEQKLISEEDL

11-6

도면6

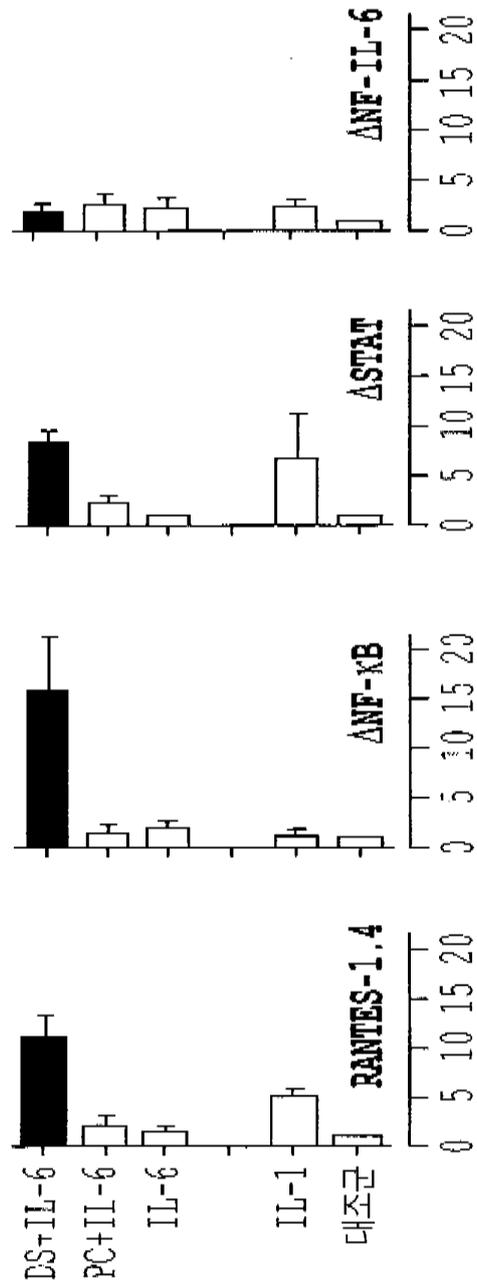


도면7

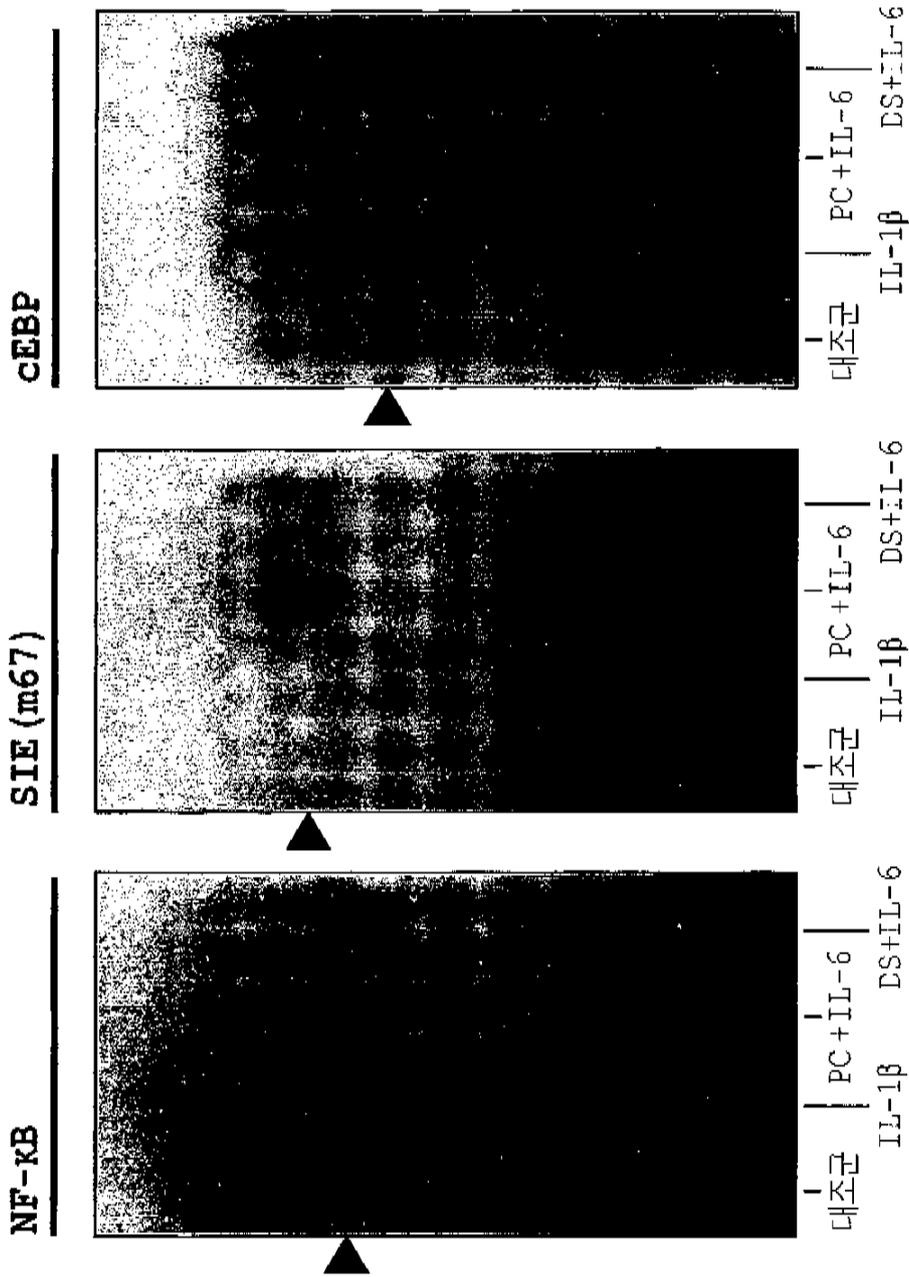




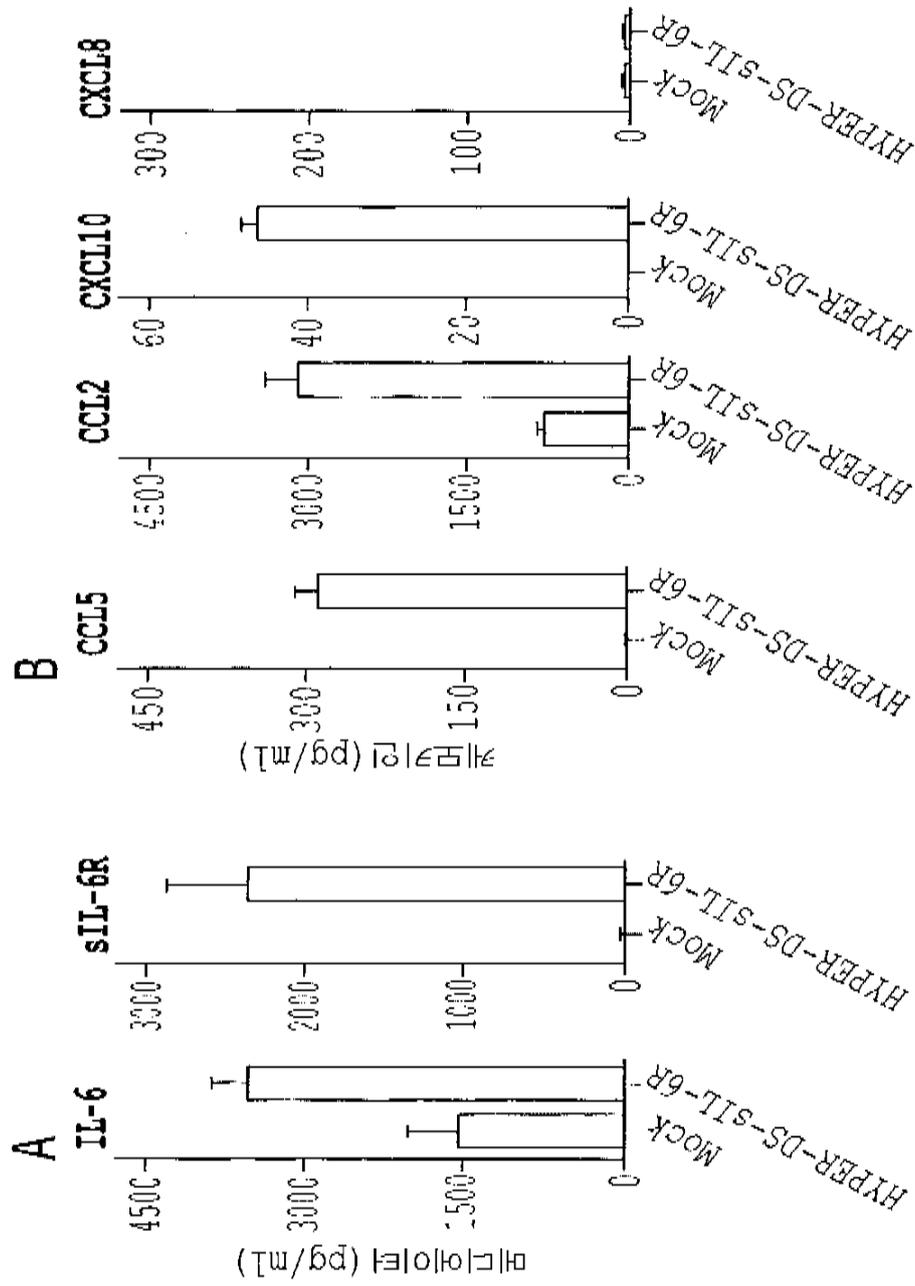
도면9



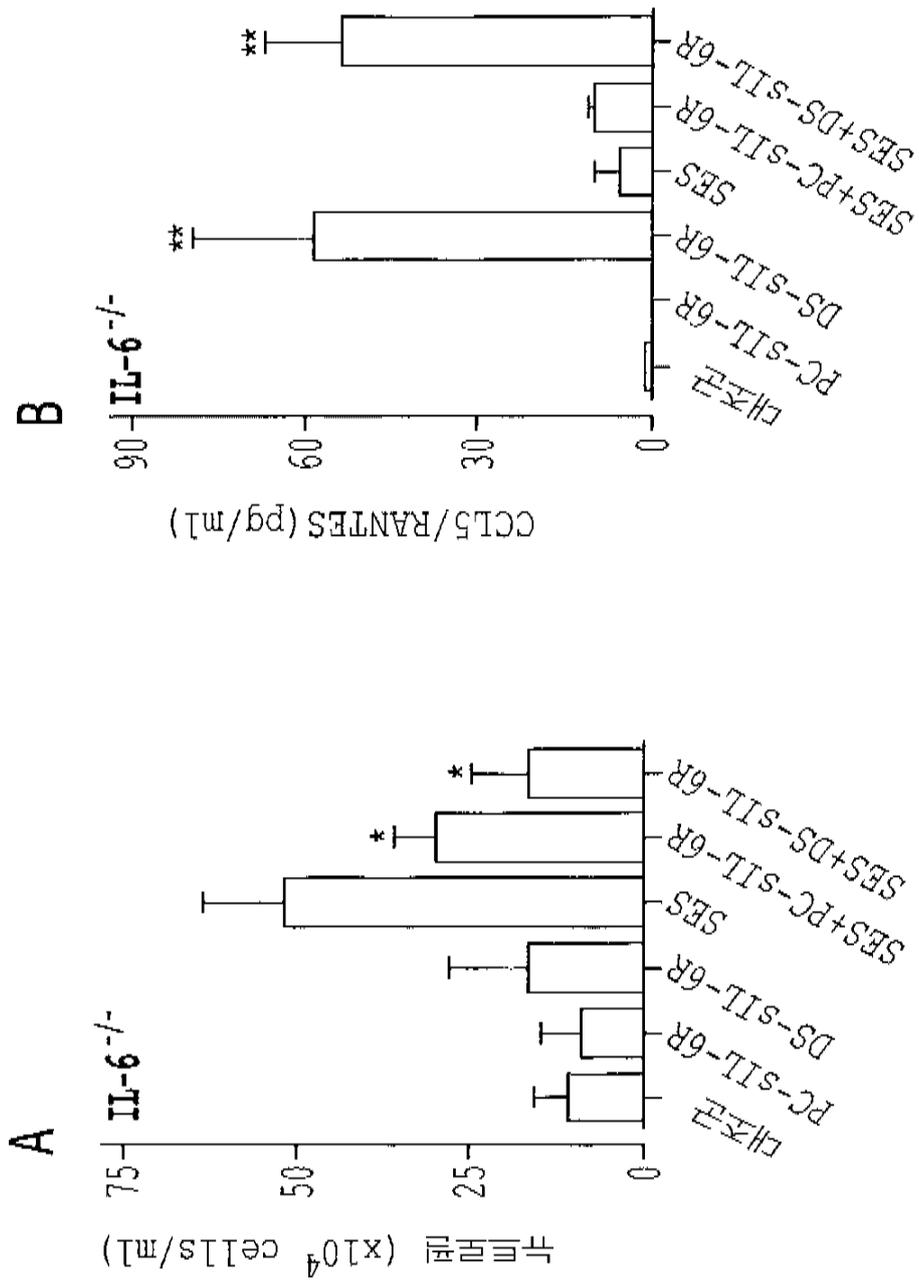
도면10



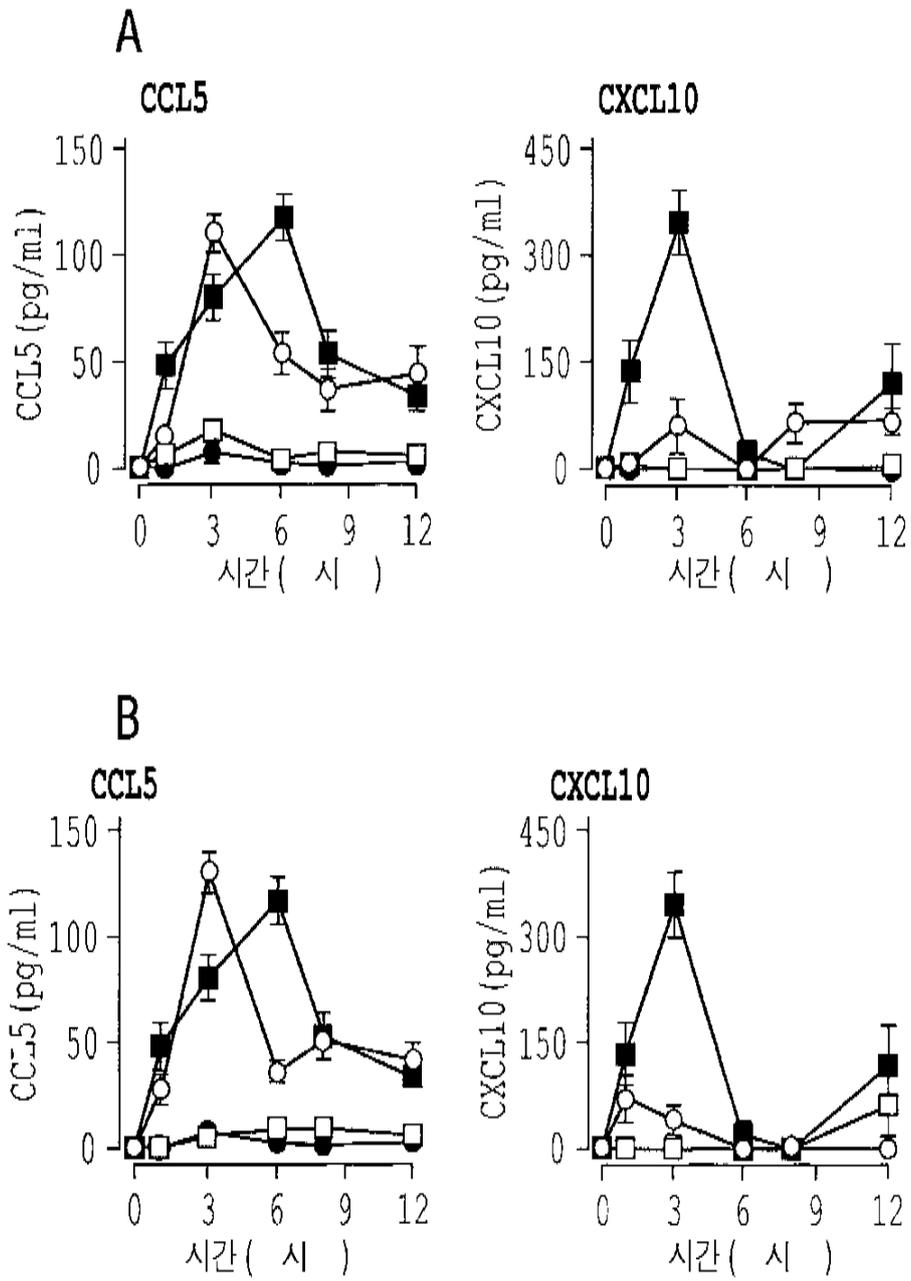
도면11



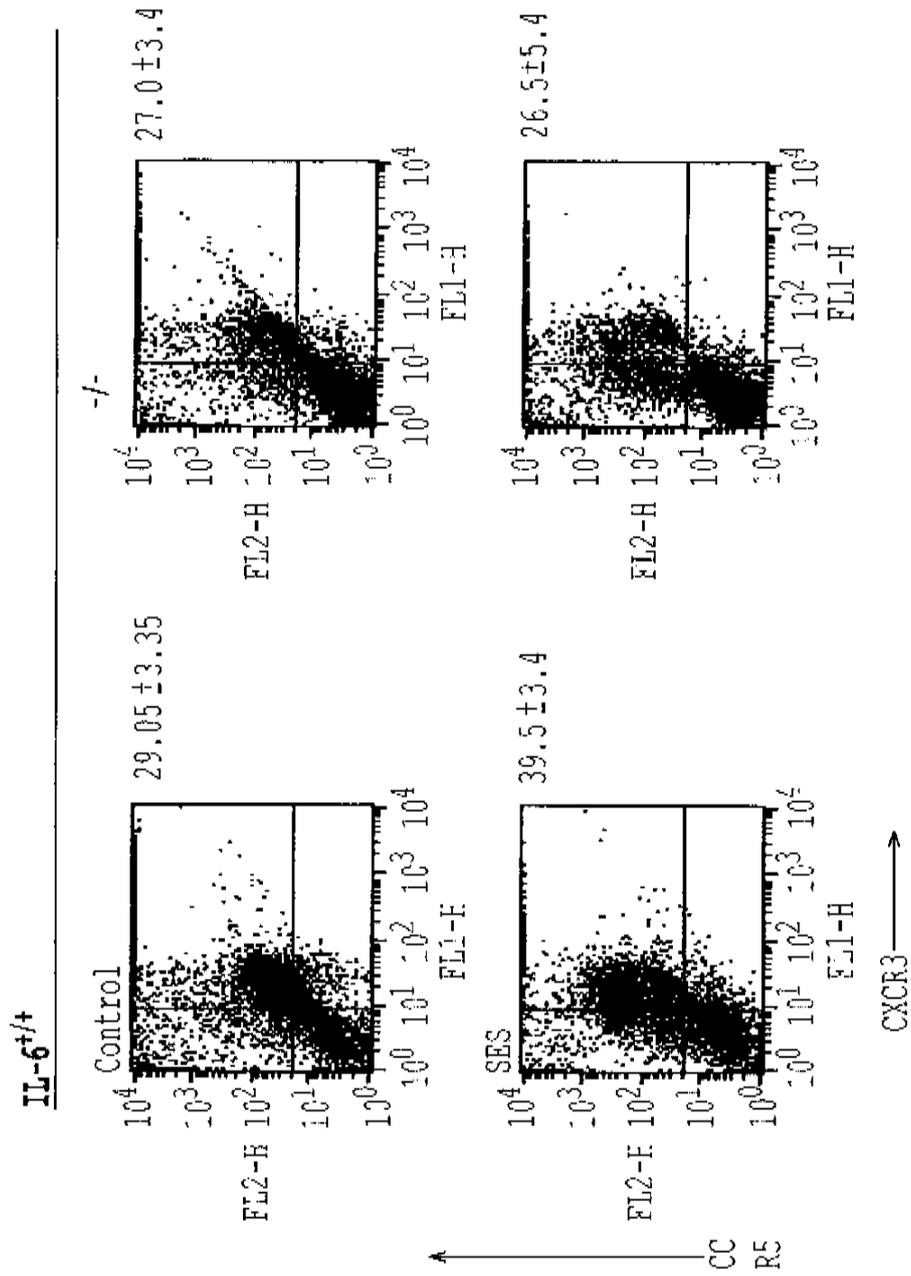
도면12



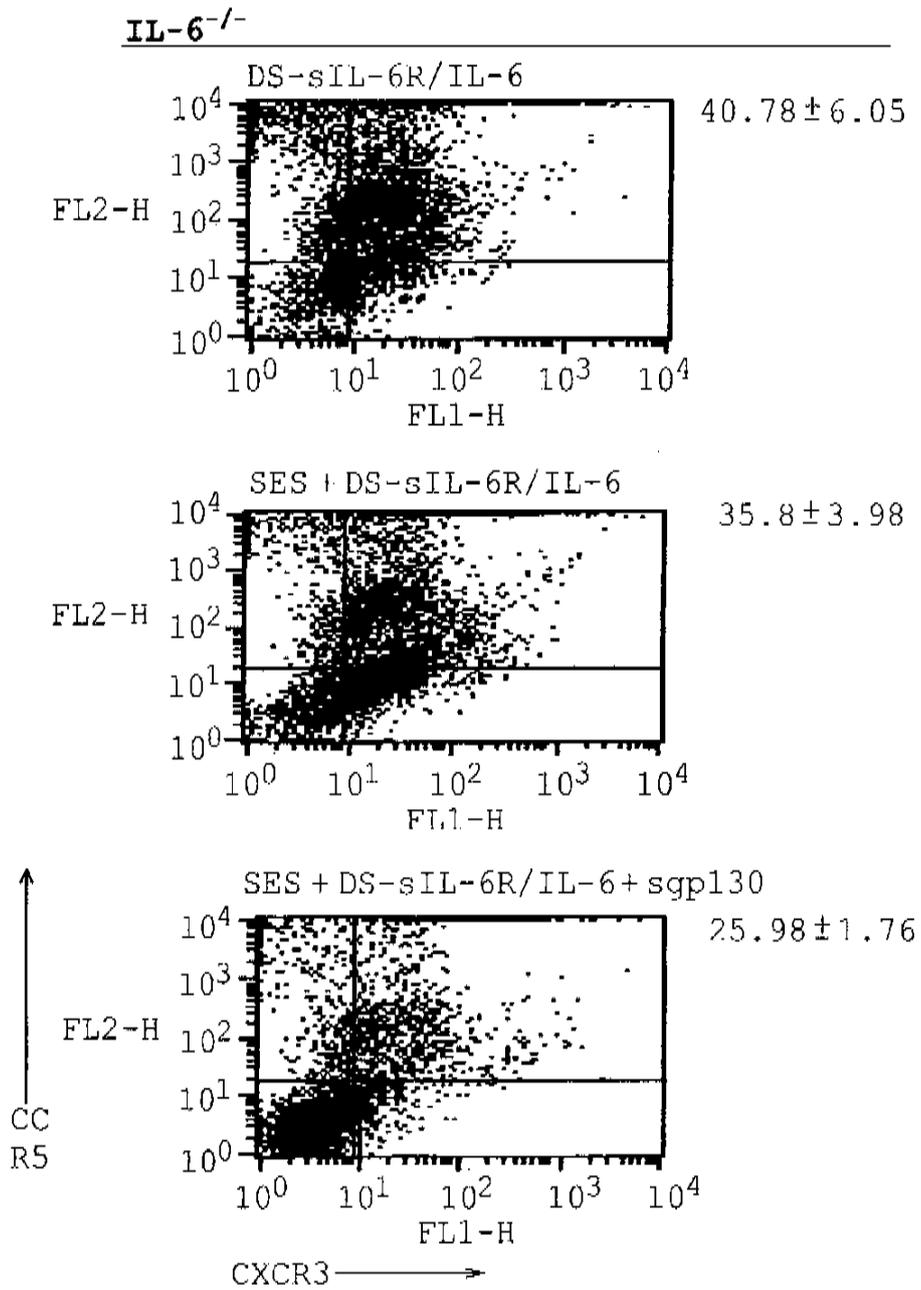
도면13



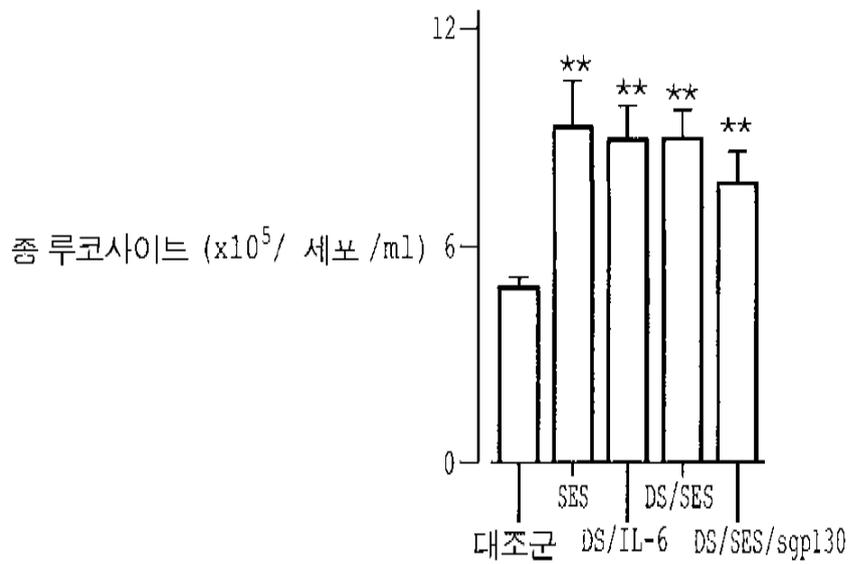
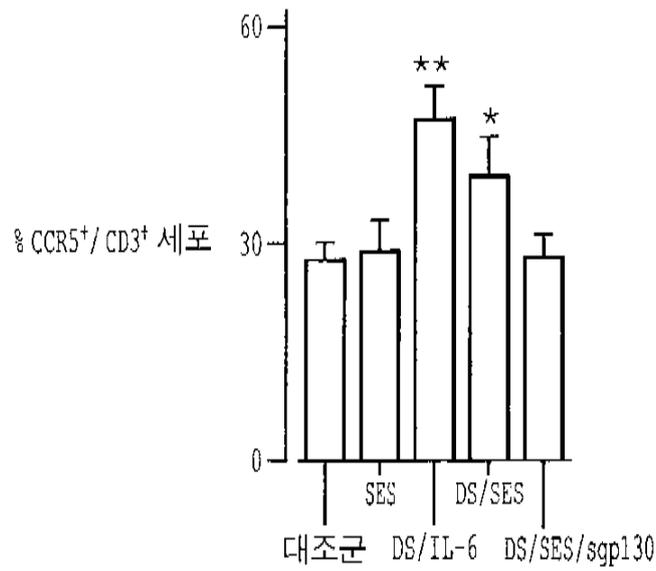
도면14



도면15a



도면15b



서열목록

- <110> University College Cardiff Consultants Limited  
University of Wales College of Medicine
- <120> A Fusion Protein
- <150> GB0119015.6
- <151> 2001-08-03
- <160> 14
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> artificial sequence

<400> 1  
 Gly Ser Arg Arg Arg Gly Ser Cys Gly Leu  
 1 5 10

<210> 2  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> artificial sequence  
 <400> 2  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu  
 1 5 10

<210> 3  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> primer  
 <400> 3  
 gatccatggg gaattcccc 19  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> primer  
 <400> 4  
 catggggaat tcccatgga 20  
 <210> 5  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> primer  
 <400> 5  
 cgacatttc cgtaaactg 19  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> primer  
 <400> 6  
 cgacattta cgggaaatg 19  
 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> primer  
 <400> 7

gacgtcacat tgcacaatct taa 23  
 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> primer  
 <400> 8  
 tattaagatt gtgcaatgtg acg 23

<210> 9  
 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg  
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile  
 20 25 30

Leu Asp Gly Ile Ser Ala Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met  
 35 40 45

Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro  
 50 55 60

Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu  
 65 70 75 80

Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr  
 85 90 95

Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg  
 100 105 110

Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Gln Lys Lys Ala  
 115 120 125

Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser  
 130 135 140

Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr  
 145 150 155 160

Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu  
 165 170 175

Arg Ala Leu Arg Gln Met  
 180

<210> 10  
 <211> 364  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
 Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro  
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg  
 20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Cys Thr Pro  
 35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys  
 50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg  
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys  
 85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val  
 100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser  
 115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr  
 130 135 140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp  
 145 150 155 160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys  
 165 170 175

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met  
 180 185 190

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe  
 195 200 205

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val  
 210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp  
 225 230 235 240

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg  
 245 250 255

Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp  
 260 265 270

Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His  
 275 280 285

Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser  
 290 295 300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser  
 305 310 315 320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr







<211> 357  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13  
 Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg  
 20 25 30  
 Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Cys Thr Pro  
 35 40 45  
 Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys  
 50 55 60  
 Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg  
 65 70 75 80  
 Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys  
 85 90 95  
 Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val  
 100 105 110  
 Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser  
 115 120 125  
 Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr  
 130 135 140  
 Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp  
 145 150 155 160  
 Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys  
 165 170 175  
 Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met  
 180 185 190  
 Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe  
 195 200 205  
 Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val  
 210 215 220  
 Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp  
 225 230 235 240  
 Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg  
 245 250 255  
 Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp  
 260 265 270  
 Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His  
 275 280 285  
 Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser





Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala  
515 520 525

Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser  
530 535 540

Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met Glu  
545 550 555 560

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
565