

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. ⁶ A61K 47/48	(11) 공개번호 (43) 공개일자	특2000-0064465 2000년 11월 06일
(21) 출원번호	10-1998-0704636	
(22) 출원일자	1998년 06월 18일	
번역문제출일자	1998년 06월 18일	
(86) 국제출원번호	PCT/IL1996/00181	(87) 국제공개번호
(86) 국제출원출원일자	1996년 12월 18일	(87) 국제공개일자
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑 스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스 웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 아이슬란드 일본 북한 대한민국	
(30) 우선권주장	116,436 1995년 12월 18일 이스라엘(IL)	
(71) 출원인	이성 리서치 디벨러프먼트 컴파니 오브 더 히브루 이스라엘 91042 예루살렘 자보틴스키스트리트 36	
(72) 발명자	피쉬맨 알라 이스라엘 예루살렘시 91120 에인 카렘 하다사 의과대학 세포생화학과 야르코니 샤이 이스라엘 예루살렘시 91120 에인 카렘 하다사 의과대학 세포생화학과 로버보움-갈스키 하야 이스라엘 예루살렘시 91120 에인 카렘 하다사 의과대학 세포생화학과	
(74) 대리인	최덕규	

심사청구 : 없음

(54) 알레르기반응의 표적치료용 인키메라 단백질, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약제 조성물

요약

본 발명은 일반적으로 키메라 세포독소(chimeric cytotoxin) Fc_{2'-3}-PE₄₀에 의해 수용체 FcεRI를 발현하는 세포를 표적 제거하는 것을 기본으로 하는 알레르기 반응의 치료에 있어서 새로운 연구에 관한 것이다. 쥐-IgE 분자의 Fc 부위에 있는 아미노산 301-437을 인코딩하는 서열이 세포 결합 부위가 없이 PE의 끝이 잘린 형태인 PE₄₀에 유전적으로 융화되었다. E. coli에서 생성된 키메라 단백질은 골수에서 유도된 1차 마스트 세포 뿐만 아니라, FcεRI 수용체를 발현하는 쥐의 마스트 세포류를 특이하고도 효율적으로 제거한다.

본 발명은 키메라 단백질이 알레르기 반응의 치료에 특히 유용한 세포를 발현하는 FcεRI를 표적대로 제거하도록 제공한다. 상기 키메라 단백질은 세포를 발현하는 FcεRI에 대한 세포표적부(cell targeting moiety) 및 세포파괴부(cell killing moiety)로 구성된다. 바람직하기로는 상기 세포파괴부는 세균성 독소 슈도모나스 엑소톡신(pseudomonas exotoxin; PE)이다. 상기 PE는 슈도모나스 아에루지노사(pseudomonas aeruginosa)의 생성물이다.

본 발명은 또한 상기 단백질의 제조방법에 관한 것이다. 상기 키메라 단백질은 세포 결합 부위가 없는 PE의 끝이 잘린 형태인 PE₄₀에 쥐-IgE 분자의 Fc 부위를 유전적으로 융화시킴으로써 제공한다. 본 발명은 또한 활성요소로서의 상기 키메라 단백질 및 종래의 보조생성물로 구성되며, 알레르기 질병의 치료, 세포 이상증식 및 악성 종양의 치료를 목적으로 하는 약제 조성물을 제공한다.

명세서

발명의 분야

본 발명은 알레르기(allergy) 반응 치료를 위한 새로운 연구에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 세포를 발현하는 FcεRI를 표적 제거하기 위한 키메라 단백질 Fcε-PE, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 약제 조성물에 관한 것이다. 상기 키메라 단백질은 특이 수용체(receptor)를 과발현(overexpress)하는 세포를 인식해서 제거하는 세포파괴부(cell killing moiety)에 연결되어 있는 IgE 분자의 일부분인 세포표적부(cell targeting moiety)로 구성되어 있다. 본 발명의 키메라 단백질에 이용되는 세포파괴부

는 세균성 독소인 슈도모나스 엑소독신(pseudomonas exotoxin; PE)이다.

발명의 배경

세계 인구의 약 20% 가량이 천식, 알레르기성 비염, 음식 알레르기, 아토피성 피부염 및 과민증과 같은 다양한 알레르기성 질병으로 고생하고 있다. 과거 십년에 걸쳐 알레르기성 질병의 출현이 놀랄만하게 증가함으로써 좀 더 효과적인 치료에 대한 요구가 대두되어 왔다.

IgE 및 마스트 세포 또는 호염기성 세포(basophils)와의 상호작용은 알레르기 반응에 있어서 첫번째 작동체(effector) 경로이다. IgE는 이 세포들의 표면에서 대부분이 발견되는 고친화성 수용체(FcεRI)와 일정 부위에 대해 결합한다. 그 결합 자체는 낮은 분해 속도에도 불구하고, 세포의 자극을 유발하지 않는다. 하지만, 다원자가 항원(multivalent antigen)에 의해 IgE와 표면 결합한 세포와의 가교결합(cross-linkage)은 히스타민이나 세레토닌과 같은 알레르기의 매개체가 방출되는 곳에서 수용체 주합(receptor aggregation) 및 자극적이고 폭발적인 세포 탈과립(triggering explosive cellular degranulation)을 유발한다.

수용체 FcεRI의 분포가 알레르기 반응에 참여하는 세포들에 제한된다는 사실은 키메라 세포독소(chimeric cytotoxin)에 의한 표적 면역 치료법에 있어서 관심을 끄는 조건이다. 키메라 세포 독소는 유전자 융화 기술에 의해 구축된 새로운 부류의 표적 분자들이다. 이 분자들은 세포표적부 및 특이 수용체를 과발현하는 세포들을 인식하고 파괴하도록 해주는 세포파괴부(cell killing moiety)로 구성되어 있다.

키메라 단백질 구성에 이용되는 세균성 독소인 PE는 슈도모나스 아에루지노사(pseudomonas aeruginosa)의 생성물이다. 세포질에 근접한 PE는 ADP-리보실화(ribosylation) 활성화에 의해 단백질 합성을 방해함으로써 세포 파괴를 유발한다(미들브룩, J.I., 돌란드, R.B. 1984. 세균성 독소: 활성의 세포 메카니즘. 마이크로비올. Rev. 48, 199). 효과적인 키메라 세포독소는 내인성의 세포 결합 능력이 부족한 PE 유도체들을 갖는 단일 사슬 항체 또는 다양한 성장 요소들을 인코딩(encoding)하는 cDNAs의 융화에 의해 구성되었다. 상기 키메라 단백질종의 하나인 IL₂-PE₄₀는 IL₂ 수용체를 과발현하는 활성화된 T-세포들을 표적하여 선택적으로 제거하도록 구성되어 있는데, 이는 자기면역 질환(autoimmune disorders), 그라프트 거부(graft rejection) 및 암의 다양한 형태에서 효과적이고 선택적인 면역 억제를 제공하는 것으로 나타났다(로버보움-갈스키, H. 1994, 표적 면역치료 및 면역반응 연구를 위한 인터루킨 2-슈도모나스 엑소독신 A (IL₂-PE₄₀) 키메라 단백질. J. Toxicol.- Toxin Reviews, 13(1), 105).

세균에서 발견되는 IgE의 전체적으로 재조합된 일정 부위(Fcε)는 히스타민의 방출을 유도하는 안티-IgE에 대해 호염기성 세포를 민감하게 하는 능력뿐만 아니라, 본래의 IgE와 비교하여 수용체 FcεRI에 대해서 친화성을 갖는다. 세균에서 발견되는 인간 Fcε의 재조합된 단편(fragment)들을 수용체 결합에 대해 시험해보니, 일정 부위의 도메인 2와 도메인 3의 결합에서 잔기들(residues) 301-376과 일치하는 펩티드가 수용체에 대한 고친화성 결합에 있어 충분한 것으로 나타났다. 또한 수용체 결합에 있어서, ε-사슬 이량중합(dimerization)이 필요하지 않음을 알 수 있다(헬름, B., 마크, P., 베르첼리, D., 파드란, E., 구드, H., 및 게아, R. 1988. 인간-IgE에 있는 마스트 세포 결합부. Nature 331, 180).

본 발명은 일반적으로 알레르기 반응 치료에 있어서의 새로운 연구에 관한 것이다. 현재 천식 및 알레르기 질환의 치료용으로 사용되는 잘 알려진 치료제들은 다음과 같다:

- 가. β2 아고니스트(agonist) - 아드레날린성 수용체 2의 시뮬레이션을 통해 기관내 통로(airway) 확장을 유도한다.
- 나. 메틸잔틴(methylxantines) - 근육이완제를 부드럽게 하고, 기관지 확장을 유도한다.
- 다. 글루코코티코이드(glucocorticoids) - 염증을 억제한다.
- 라. 크로몰린소듐(cromolyn sodium) - 마스트 세포의 탈과립화를 방지한다.
- 마. 안티히스타민(antihistamine) - 표적 세포에서의 히스타민 반응을 예방한다.

이 모든 치료제들은 폭넓게 사용될지라도 다음과 같은 두드러진 단점을 갖는다:

- A. 특이성(specificity): 상기 치료제들(크로몰린소듐은 제외)의 반응은 마스트 세포에만 특정지워지지 않는다. 그래서 이 약들은 알레르기 매개체의 방출을 예방하는 것이 아니라 그 반응에 의해 야기되는 효과들을 역행하거나 차단하는 것이다. 이 약들에 의한 치료가 전조가 되어, 알레르기 반응이 진행된 직후에 시작될 수 있으므로, 예방차원으로 사용될 수 없다.
- B. 유독성(toxicity): 특이하지 않으면서, 이 약들은 심각한 부작용을 유발하는 다양한 조직 및 기관에서의 반응을 유도한다. β2 아고니스트의 주된 부작용은 불안감(tremor)이고, 그들은 또한 심장 부정맥(arrhythmias)을 유발한다; 메틸잔틴은 중앙 신경계, 유도 신경, 메스꺼움, 구토, 식욕부진, 두통 및 심장 근육-요인 빈맥을 자극한다. 혈장(plasma) 수준이 높은 경우, 발작 및 부정맥의 위험이 있다. 안티히스타민(antihistamine)은 중앙 신경계 및 유도 진정작용에 영향을 미친다. 스테로이드(steroid)는 상당히 유해하며, 뇌하수체-부신의 기능을 억제하고, 유체 및 전해질 장애, 고혈압, 과혈당증, 감염에 대한 고민감성, 골다공증 및 어린이에 있어서 성장을 저해한다.
- C. 효과의 지속성: β-아드레날린성 아고니스트, 아미노잔틴(aminoxantine) 및 안티히스타민은 대부분 단기 반응제(short-acting drug)이므로 자주 처방되어야 한다. 장기 반응제(long-acting drug)인 스테로이드는 유도시간이 길어 위급시에 별 효과가 없다.

유일한 마스트 세포 특이제는 크로몰린소듐(cromolyn sodium)이다. 이 약은 부작용 없이 필수적이며 질병 예방 차원으로 사용될 수 있다. 하지만, 반감기(half life)가 매우 짧고, 유도시간이 매우 길어서, 그것에 반응하는 환자의 일부에만, 국소적으로 적용할 수 있다. 이러한 이유로 크로몰린소듐의 사용이 상당히 제한된다.

최근 몇년간 항알레르기 치료법에 대한 기초로서, IgE와 고친화성의 수용체와의 상호작용을 저해하는 수많은 시도들이 연구되어져 왔다. IgE(헬름, B., 케보, D., 베르첼리, D., 글로브스키, M.M., 구드, H., 이시자카, K., 게아, R. 및 이시자카, T. 1989. 76 아미노산의 재조합된 인간-ε-사슬 단편에 의한 IgE 항체를 갖는 인간의 마스트 세포와 호염기성 백혈구의 비활성의 민감성에 대한 마비. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9465) 또는 FcεRI(라, C., 쿠로미추, S., 히로세, T., 야수다, S., 후루이치, K. 및 오쿠무라, K. 1993. IgE에 있어서 IgE를 매개체로 하는 알레르기 반응을 없애주는 수용체 인간-고친화성 수용체. Int. Immunol. 5, 47; 하악-프렌드쇼, M., 리지웨이, J., 쉴드, R., 로빈스, K., 고르만, C. 및 자슈, P. 1993. 생체내 비활성의 피부과민증을 방지하는 인간-IgE 수용체의 α-사슬의 IgG. J. Immunol. 151, 351)로부터 구조적 요인을 구성하는 재조합된 펩티드는 IgE-FcεRI 상호작용에 있어서 경쟁적 방해자로서 조사 보고 되었다. IgE(바니아쉬, M. 및 에쉬하르, Z. 1984. 쥐과의 IgE에 대한 단클론 항체에 의한 마스트 세포 및 호염기성 세포와의 IgE 결합의 억제. Eur. J. Immunol. 14, 799) 또는 FcεRI(키타니, S., 크래프트, D., 피쉴러, C., 메르겐하겐, S. E. 및 시라가니안, R. P. 1998. 고친화성 IgE 수용체에 대한 단클론 항체와의 알레르기 반응의 억제. J. Immunol. 140, 2585)에 대항하여 만들어졌고, 마스트 세포 탈과립화를 유발하지 않으면서 수용체와 결합하고 있는 IgE를 방어할 수 있는 단클론 항체도 또한 연구되었다. 그러나 FcεRI에 대한 IgE의 친화성이 매우 높아서($K_M=10^{-10}$ M), 수용체에 한번 붙기만 하면 IgE 분자는 몇주 동안이나 세포막에 붙어있는 것이다. 또한 마스트 세포는 수용체의 빈도가 낮은 경우에도 활성이 된다: 5% 정도의 극빈의 수용체의 가교 결합은 마스트 세포의 탈과립화를 유발하기에 충분하다. 이 시스템의 상기 두가지 성질은 질항제(competitive agent)에 의한 저해를 방지하며, 임상적 가치를 제한한다. 본 발명의 항알레르기 분자는 IgE와의 대항 능력에 의존하는 정도가 훨씬 더 적다. IgE 수용체가 없는 곳을 경유하여 표적 세포에 한 번 들어가기만 하면, 이 키메라 단백질은 표적 세포에 영향을 미친다. 또한, 마스트 세포가 성숙해가는 과정에서 수용체가 초반에 발현되면, 세포가 매개인자를 방출할 능력을 갖기도 전에 미성숙된 표적 세포가 제거된다. 상기 수용체가 스템 세포(stem cell)에서 발현되지 않기 때문에, 전체적으로 골수의 손상은 없을 것으로 예상된다.

상기 IgE 시스템은 굉장히 복잡하고 다양하다. IgE와 그의 결합구조 사이의 상호작용은 알레르기 반응과는 별도로 발현 초반에만 어느 정도 많은 기능을 갖는다. IL-4, IL-4 수용체 또는 저친화성을 갖는 IgE 수용체에 대한 단클론 항체는 쥐에 있어서는 IgE의 발현을 억제하지만, 더욱 일반적인 면역억제 효과를 갖는다. 그러므로 IgE 시스템 전체가 아니라 친화성이 높은 IgE 수용체만을 표적으로 하는 본 발명의 이점은 확실한 것이다.

발명의 요약

본 발명은 일반적으로 키메라 세포독소(chimeric cytotoxin) Fc₂₋₃-PE₄₀에 의해 수용체 FcεRI를 발현하는 세포를 표적 제거하는 것을 기본으로 하는 알레르기 반응의 치료에 있어서 새로운 연구에 관한 것이다. 쥐-IgE 분자의 Fc 부위에 있는 아미노산 301-437을 인코딩하는 서열이 세포 결합 부위가 없이 PE의 끝이 잘린 형태인 PE₄₀에 유전적으로 융화되었다. E. coli에서 생성된 키메라 단백질은 골수에서 유도된 1차 마스트 세포 뿐만아니라, FcεRI 수용체를 발현하는 쥐의 마스트 세포류를 특이하고도 효율적으로 제거한다.

본 발명은 키메라 단백질이 알레르기 반응의 치료에 특히 유용한 세포를 발현하는 FcεRI를 표적대로 제거하도록 제공한다. 상기 키메라 단백질은 세포를 발현하는 FcεRI에 대한 세포표적부 및 세포파괴부로 구성된다. 바람직하기로는 상기 세포파괴부는 세균성 독소 슈도모나스 엑소톡신(PE)이다. 상기 PE는 슈도모나스 아에루지노사(pseudomonas aeruginosa)의 생성물이다.

본 발명은 또한 상기 단백질의 제조방법에 관한 것이다. 상기 키메라 단백질은 세포 결합 부위가 없는 PE의 끝이 잘린 형태인 PE₄₀에 쥐-IgE 분자의 Fc 부위를 유전적으로 융화시킴으로써 제공한다.

본 발명은 또한 활성요소로서의 상기 키메라 단백질 및 종래의 보조생성물로 구성되며, 알레르기 질병의 치료, 세포 이상증식 및 악성 종양의 치료를 목적으로 하는 약제 조성물을 제공한다.

본 발명은 PE₄₀에 유전적으로 융화된 쥐-IgE 분자의 Fc부위 및 필요하다면 종래의 보조생성물을 더하여 구성되는 상기 약제 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약제 조성물은 주사, 국소 부위 적용 또는 구강 치료에 적당한 형태로 제조가 가능하다.

발명의 상세한 설명

본 발명에 따른 키메라 단백질 Fc-PE는 현존하는 알려진 치료제들보다 더 많은 장점들이 있다.

- A. 특이성: Fc-PE는 상당히 특효가 있으며, 알레르기성 매개인자를 방출하는 역할을 하는 세포(마스트 세포 및 호염기성 세포)에 영향을 미친다. 알레르기의 침입을 방지하는 질병예방적 치료로서 상당한 가치가 있다.
- B. 유독성: 상기 Fc-PE는 세포의 작동체이며 조직성분이 아니므로 부작용이 거의 없다. 또한 수용체가 스템 세포 위에서 발현되지 않기 때문에 골수 및 면역억제에 있어 피해가 예기되지 않는다. 치료 종료 후 수주내에 정상외 신경상태로의 복귀가 기대된다.
- C. 효과의 지속성: 마스트 세포가 성숙되려면 몇주 걸리기 때문에 Fc-PE의 효과는 오래 지속되고, 치료는 자주 받을 필요가 없다. 또한 4시간도 되기전에 세포내 단백질 합성이 80% 감소한 실험결과로부터 Fc-PE의 유도시간은 비교적 짧고, 알레르기 반응상에 사용할 수 있을 것으로 예상된다.

Fcε-PE는 또한 조직의 마스토사이토시스(mastocytosis)(양성 및 악성형태 모두)와 호염기성 백혈병과 같이, 마스트 세포 및 호염기성 세포의 이상증식(hyper-plasias)과 악성 종양(malignancy)의 치료에 효과적이다. 양성 마스토사이토시스 환자에게는 심각한 부작용때문에 화학요법이 적당하지 않다. 반면에 악성 종양 치료제로서 좋은 임상외 프로토콜이 없다. 상당히 효능있으며 선택적인 키메라 단백질 Fcε-

PE는 수용체 FcRI를 발현하는 세포를 포함하는 양성 및 악성 조건 모두에 이용될 수 있다.

하기의 실험결과로부터 본 발명에 따른 키메라 단백질 Fc_{2'-3}-PE₄₀이 효과적이고 선택적인 알레르기 치료에 효과적임을 알 수 있다.

본 발명은 키메라 세포독소 단백질인 Fcε-PE가 세포를 발현하는 FcεRI를 제거하도록 제공하며, 천식, 알레르기성 비염, 음식 알레르기, 아토피성 피부염 및 과민증과 같은 알레르기성 반응의 치료에 특히 유용하다.

본 발명은 하기의 실시예에 의하여 보다 더 구체화될 것이다. 하기 실시예는 본 발명의 구체적인 예시에 불과할 뿐 본 발명의 보호범위를 한정하거나 제한하고자 하는 것은 아니다.

1. 키메라 단백질 Fcε-PE₄₀의 구성

키메라 단백질의 세포 표적부에 있어서, 쥐-IgE 일정 부위(Fcε)의 단편들은 사람 및 쥐의 고친화성의 IgE 수용체에 모두 결합되어 사용된다(콘라드, D. H., 원가드, J.R. 및 이시자카, T. 1983. 사람 호염기성 세포의 IgE 수용체를 갖는 사람 및 설치류의 IgE와의 상호작용. J. Immunol. 130, 327).

본 발명자들은 도메인 2와 전체 도메인 3(C₂'-C₃)의 끝부분인 C00H를 포함하는 아미노산 301-437과 일치하는 서열을 사용하였다. 또한 전체 도메인 C₂-C₄를 포함하는 아미노산 225-552과 일치하는 서열을 사용하였다. 상기 단편(fragment)들에 대한 cDNA는 IgE 및 일체의 프라이머(primers)를 분비하도록 동위원소로 교환된 쥐-B세포로부터 분리된 RNA를 사용하여 RT-PCR에 의해 얻었다. 생후 6주된 BALB/C 쥐의 비장에서 획득한 B세포는 안티-Thy1.2 및 토끼 보체를 이용하여 네가티브(negative) 선택으로 분리되었다. 세포는 IgE 생성을 위한 동위원소로 전환시키기 위해서 리포다당류(lipopolysaccharide)(LPS, 10μg/ml) 및 IL₄(500U/ml)의 존재하에 5일 동안 2×10⁶ cells/ml에서 부화시켰다. 5일 뒤, 전체 세포 RNA가 분리되었다(바이오텍 연구소, 휴스턴, USA에서 제작한 RNAzol TM B 분리 키트(isolation kit)). 그리고 나서 전체 RNA(2.5μg)를 역전사 시스템(프로메가, USA)을 이용하여 적정 조건하에서 첫번째 스트랜드(strand) cDNA로 역전사시켰다. cDNA를 TE 버퍼(10mM 트리-염산, pH 7.6, 1mM EDTA)로 전체 부피 1ml가 되도록 희석시키고, 사용전까지 4°C에 저장하였다.

Fcε₂₋₃ 서열에 있어서 5'-GCG GAT CCC ATA TGG AGC AAT GGA TGT CGT-3'(센스, 유전자은행 서열 J00476에 따라서 뉴클레오티드 406에서 시작)와 5'-GCG GAT CCC ATA TGT GGG GTC TTG GTG ATG GAA C-3'(안티센스, 뉴클레오티드 813에서 시작) 및 Fcε₂₋₄ 서열에 있어서 5'-GCG GAT CCC ATA TGC GAC CTG TCA ACA TCA CTG-3'(센스, 뉴클레오티드 175에서 시작)와 5'-GCG GAT CCC ATA TGG GAG GGA CGG AGG GAG G-3'(안티센트, 뉴클레오티드 1167에서 시작)의 합성된 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 프라이머(oligonucleotide primer) 및 cDNA를 이용하여 Fcε 단편들을 PCR에 의해 제조하였다.

합성된 올리고뉴클레오티드는 DNA 합성기(Applied Biosystems)에서 합성시키고, 올리고뉴클레오티드 정제 카트리지에서 정제시켰다. 벤투폴리머라제(TM) 효소(Biolabs)는 확장시에 사용하였다. 반응 혼합물은 DNA 열순환기(MJ 리서치, Inc., USA)에서 33 사이클(cycle)동안 부화시켰다. 각 싸이클은 95°C에서 1분간 가열하다가 72°C에서 2분간 냉각시켰다. 각 쌍의 프라이머에 사용했던 황산마그네슘(MgSO₄) 농도 및 가열냉각 온도는 각각 Fc_{2'-3}에는 2.5mM, 61°C이고, Fc₂₋₄에는 2mM, 57°C로 하였다.

pHL 906 플라스미드(plasmid)는 IL₂-PE₄₀를 인코딩하며, 종래에 잘 기술되어있다(휘시맨, A., 바-가나, Y., 스테인 버거, I. 및 로버보움-갈스키, H. 1994, 리소좀 멤브레인에 대한 표적 신호를 갖는 키메라 단백질 IL₂-PE의 증가된 세포독성. Biochem. 33, 6235). pHL 906 플라스미드는 NdeI로 커팅하고, 3596 bp의 더 큰 단편을 얻었다. 상기 Fc 단편은 pHL 906의 NdeI 사이트(site)에 삽입시켰다. 결과적으로 플라스미드 pAF2302와 pAF2415는 각각 5'에서 PE₄₀로 융화된 C₂'-C₃와 C₂-C₄ 단편을 각각 코딩하고, 제한 및 연속분석으로 특징지웠다. 플라스미드의 형질 전환 및 제조에 E. Coli 스트레인 HB101을 사용하였다.

2. 키메라 단백질의 발현 및 부분 정제

플라스미드 pAF2302로 인코딩되는 신개발 키메라 단백질 Fcε-PE₄₀은 T7 RNA 폴리머라제 유전자를 용원성이며 유도적 형태로 운반하는 E. coli 스트레인 BL21 (람다-DE3)에서 발현되었다. 유도는 이소프로필 β-D-티오갈락토시드(IPTG, 최종 농도 1mM)의 존재하에 O.D.₆₀₀ 0.5에서 180분동안 이행되었다. 세포 발현 펠릿(pellet)은 리소자임 0.2mg/ml을 포함하는 TE 버퍼(50mM 트리 pH 8.0, 1mM EDTA)로 현탁시키고, 초음파 처리(3개의 30s 버스트)하였으며, 30,000Xg에서 30분간 원심분리시켰다. 상층액(수용성 부분)을 분리하여 분석하였다. 펠릿은 추출 버퍼(6M 구아니딘-염화수소, 0.1M 트리 pH 8.6, 1mM EDTA, 0.05M 염화나트륨 및 10mM DTT)에서 변성시키고, 4°C에서 30분간 저어주었다. 현탁액은 30,000Xg로 15분간 원심 분리하여 깨끗이 하고, 펠릿은 버렸다. 그리고 상층액을 0.1M 트리 (pH 8.0), 1mM EDTA, 0.25mM NaCl 및 0.25mM L-아르기닌에 대해 16시간 동안 투석시켰다. 투석물은 15,000Xg에서 15분간 원심 분리하였으며, 나머지 상층액(불용성 부분, 구아니딘-염화수소로 처리)은 키메라 단백질의 원천으로 사용하였다. 단백질은 겔 전기영동법(gel electrophoresis)(2D)으로 분석하였다. 세포 추출물 전체중 단백질의 프로파일은 키메라 단백질의 높은 발현 수준을 나타냈다.

상기 단백질은 PE(도3a) 및 IgE(세로텍, 영국)(도3b)에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯(western blot) 분석법으로 더 분석하였다. 전기영동법을 이용한 샘플은 니트로셀룰로오스(nitrocellulose)로 전이되고, 이뮤노블롯(immunoblot)되었다(로버보움-갈스키, H., 핏저랄드, D.J., 샤프하리, V., 야사, S. 및 파스탄, I. 1988. E. coli에서 생성된 인테루킨 2-슈도모나스 엑소톡신 키메라 단백질의 세포내 독성의 활성화. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1992). 제조업자의 지시대로 벡타스테인(vectastain) ABC 키트(벡터 연구실, USA)을 사용하였다. 상기 키메라 단백질은 두 개의 항체와 반응하였고, 전체가 다 갖추어진

키메라 단백질이 클로닝되고 생성된 것을 확인하였다.

발현세포의 부세포 분할로부터 불용성 부분(봉입체-inclusion body)에 키메라 단백질이 특히 많음을 알 수 있었다(도2). 그래서 이 부분을 키메라 단백질의 원천으로 사용하였다.

실험한 샘플의 ADP-리보소움화 활성은 앞서 기술한 바와 같이 기질로서 연장 요소(elongation factor) 2에서 보강된 맥아 추출물을 이용하여 측정하였으며, 새로운 키메라 단백질이 효소적으로 활성화 되었음을 알 수 있었다(결과에는 명시하지 않음).

3. 쥐-마스트 세포류에 있는 키메라 단백질 Fc_{2'-3}-PE₄₀의 효능

FcεRI 수용체를 발현하는 것으로 알려진 다양한 쥐-마스트 세포류에서 키메라 단백질의 세포 독성 효과를 실험하였다. 상기 키메라 단백질의 세포 독성의 활성은 [3H] 루이신 결합으로 측정하여 단백질 합성의 억제에 의해서 평가되었다. 인산염-완충액 염류에서 0.25% 소 혈청 알부민(albumin)으로 희석시킨 키메라 단백질을 다양한 농도로 하여 96-웰 플레이트(well plate)에서 20시간 동안 시드처리한 2×10⁴ cells/0.2ml에 첨가한 다음, [3H]-루이신의 2Ci로 8시간 펄스를 행하였다. 실험 결과는 세포들을 키메라 단백질에 노출시키지 않은 대조 실험(control experiment)의 백분율로서 나타내었다. 모든 실험은 세 부류로 나누어 세번씩 하였다.

FcεRI 수용체를 발현하는 세 개의 표적 세포류(cell line)가 사용되었다: 쥐의 태아 간에서 획득하였으며 성장을 위해 IL₃에 종속되는 마스트 세포류인 MC-9, C57 및 쥐의 골수에서 획득한 독립적인 마스트 세포류인 IL3; 그리고 아벨슨-비루스(Abelson-virus)는 쥐의 임신중인 태반에서 획득한 마스트 세포류를 변형시켰다.

Fcε-PE₄₀은 시험한 모든 세포류에 있어서 투여량에 종속되어 세포내 독성을 갖는 것으로 나타났다(도4). MC-9 및 C57 마스트 세포류는 ID₅₀이 각각 50-75ng/ml 및 100-125ng/ml로 키메라 독소에 광장히 민감했다. 아벨슨 세포류는 훨씬 덜 민감했다(ID₅₀가 1200-1500ng/ml임).

4. Fc-PE₄₀ 반응의 특이성

Fc_{2'-3}-PE₄₀ 활성의 특이성을 확인하기 위해서, 두 개의 대조 단백질인 PE₄₀ 및 Fc_{2'-3}-PE₄₀을 구성하여 표적 세포 및 비표적 세포에 대한 효과를 측정하였다. Fc_{2'-3}-PE₄₀을 구성하기 위해서, PE의 C-터미널에서 122개의 아미노산에 대해 코딩한 부위를 EcoRI 및 BamHI로 활성화 시켜서, 아미노산 553에서 결실(deletion)을 행하는 단편에 의해 치환시켰다.

PE₄₀은 본질적으로 표적 능력을 갖지 않으며, 예상대로 표적 세포류에 영향을 미치지 않았다(도4). 변형되고, 효소적으로 비활성의 형태인 PE₄₀에 연결되어 있는 Fc_{2'-3}부위를 포함하는 Fc_{2'-3}-PE₄₀은 또한 표적 세포에 세포독성을 갖지 않았다(도4).

또한, 전체 쥐-IgE(40g/ml, 도5a) 또는 εPE 다클론 항체(10g/ml, 도5b)로 표적 세포에 대한 Fc_{2'-3}-PE₄₀의 세포 독성 효과를 저해할 수 있었다.

다양한 쥐의 비표적 세포류(표1)에서 Fc_{2'-3}-PE₄₀의 효과도 또한 실험하였다. 조혈성 근원(hemopoetic origin)의 모든 세포류는 키메라 단백질의 영향을 받지 않았다. ID₅₀의 수치가 MC-9 세포보다 24배나 높았음에도 불구하고, 놀랍게도 섬유아세포(fibroblast) 및 혈종(hematoma) 세포류는 키메라 단백질의 독성에 약간 민감함을 보였다(표1).

[표 1]

<다양한 쥐-세포에 대한 키메라 단백질 Fc_{2'-3}-PE₄₀의 세포독성>

		세포류 (cell line)	근원세포 (cell origin)	ID50 (ng/ml)
표적 세포		MC-9	마스트 세포	50-100
		C57	마스트 세포	100-125
		BMMC	1차 골수에서 유도한 세포	
		아벨슨	변형된 마스트 세포	1,200-1,500
비-표적 세포	지혈성	L10A	B-세포, 넌-세크레팅	>10,000
		X16B	B-세포, 넌-세크레팅	>10,000
		UT	B-세포, 넌-세크레팅	>10,000
		PD1.1	T-세포, 미성숙	>10,000
		EL-4	T-세포, 성숙	>10,000
		에리스로루케미아		>10,000
	결합조직	LTK	섬유아세포	1,900
헤파토마			1,500	

상기 결과로부터 마스트 세포류에 대한 $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 의 독성 효과는 키메라 단백질의 독성 부분(PE_{40})을 상기 세포에 표적하는 $FC_{2'-3}$ 부위에 의해 유인되는 특이 반응성에 기인함을 알 수 있었다.

5. 키메라 단백질의 1차 마스트 세포에 대한 효과

신선한 쥐과 동물의 마스트 세포는 형성된 세포류와는 별도로 반응하는 것 같아서, 본 발명자들은 $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 에 대한 민감성을 측정하기 위해서 정상적인 쥐에서 얻은 1차 마스트 세포를 시험하였다. IL_3 의 존재하에 2주 동안 배양하였더니, 쥐의 골수는 입자를 함유하고 $Fc\epsilon RI$ 수용체를 발현하는 마스트 세포의 미성숙된 형상을 가진 거의 순수한 세포들로 구별지어졌다.

생후 4-6주의 BALB/C 쥐들을 희생시켜서, 그들의 대퇴골에서 0.9% 차가운 염화나트륨 용액으로 무균하에 골수를 꺼냈다. 세포현탁은 0.9% 염화나트륨 용액으로 두 번 씻고, 300Xg에서 10분 동안 원심분리하였으며, 마지막으로 10% 비활성된 송아지 태아 혈청, 4mM L-글루타민, 1mM 소듐 피루베이트(sodium pyruvate), 0.1mM 비이센셜(nonessential) 아미노산, $5 \times 10^{-5} M$ β -메르캅토에탄올(mercapto-ethanol), 100u/ml 페니실린(penicillin), 100 μ g/ml 스트렙토마이신(streptomycin) 및 20u/ml 재조합된 쥐- IL_3 를 포함하는 RPMI 1640 배양기에서 재현탁시켰다. 세포들은 10^6 cells/ml의 밀도로, 37°C에서 5% CO_2 로 2-3주 동안 조직 배양 플라스크에서 배양시켰다. 미디어는 7일마다 교환하였다. 재조합된 IL_4 (10U/ml)는 배양한지 7일 후부터 첨가하였다.

세포의 성숙도를 측정하기 위해, 세포를 슬라이드에 올려 놓고, 산성 톨루이딘 블루(toluidine blue, pH 1.0)로 염색하고, 오일 아래에서 현미경으로 관찰하였다.

키메라 단백질의 효과는 골수에서 추출한 마스트 세포(BMMC)를 가지고 배양한지 16일째에 측정하였다. 제6도에서 보는 바와 같이, $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 는 $1D_{50}$ 가 125ng/ml이며, 투여량에 따라 종속적으로 BMMC에 대해서 세포독성을 나타내었다. 키메라 단백질의 양이 많은 경우에는, 단백질 합성을 거의 100% 저해하였다. 대조 단백질은 $FC_{2'-3}-PE_{40M}$ 또는 PE_{40} 어느 것도 BMMC에 대해서 세포독성을 나타내지 않았다(도6). 따라서, 1차 마스트 세포는 키메라 단백질에 있어서 형성된 마스트 세포류와 유사하게 반응한다(도4 및 도6).

6. $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 의 수용체 특이성

3개의 다른 세포막 표면 구조는 친화성이 높은 수용체 $Fc\epsilon RI$ 외에도, 친화성이 낮은 $Fc\epsilon RII$ 수용체, ϵBP 갈락토시드(galactoside)-결합 단백질(또한 MAC-2 또는 CBP35로 표현함) 및 $Fc\gamma RII/III$ 수용체를 갖는 IgE와도 결합하는 것으로 보고되어져 있다. 상기 구조들은 다양한 종류의 세포에서 나타나는데, 주로 조혈성 근원에서 나타나지만 섬유아세포(ϵBP)에서도 나타난다. $Fc\gamma RII/III$ 및 ϵBP 는 마스트 세포의 세포막에서 $Fc\epsilon RI$ 와 함께 나타난다. 본 발명의 목적은 마스트 세포만을 표적으로 하는 것이므로, 키메라 단백질이 이 구조들을 인식하지 못해서, 그 구조를 통한 내화화 이루어질 수 없음을 증명하는 것이 중요하였다. 이론적으로는 본 발명의 키메라 단백질은 저친화성의 IgE 결합구조인 $Fc\gamma RII$, ϵBP 및 $Fc\gamma RII/III$ 과의 결합조건을 만족하지 못한다. 본 발명의 단백질은 이량체화(dimerization)에 꼭 필요한 도메인 4가 없으며, $Fc\epsilon RII$ 는 ϵ -사슬 이량체(dimer)로 연결되어 있는 이항화물에만 결합된다. BP는 해당과정의(glycosylated) IgE에만 결합되어 있다; 세균에서 생성된 $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 는 해당되어 있지 않다. $Fc\gamma RII/III$ 는 복합면역 IgE에는 결합하지만, 자유(free) IgE에는 결합하지 않는다. 그럼에도 수용체 결합에 대해서는 많은 실험들이 시도되어 졌다.

ϵBP 및 $Fc\gamma RII/III$ 를 포함하는 실험들은 $Fc\epsilon RI$ 외에도 상기 수용체들을 발현하는 것으로 알려진 마스트 세포 C57를 이용하여 이행되었다. 키메라 단백질이 $Fc\gamma RII/III$ 수용체를 통해 세포로 들어갈 수 있는지의 여부를 실험하기 위해서, 키메라 단백질을 첨가하기 전에 세포들을 항체 2.4G2 (파미젠) (50 μ g/m)로 전배양시켰다. 이 단클론 항체는 $Fc\gamma RII$ 및 $Fc\gamma RIII$ 수용체의 엑스트라세포 부위에 결합되어 있으며, IgE 결합의 경쟁적인 저해물질로 나타났다. 제7a도에서 보는 바와 같이, 대조 세포 및 항체로 먼저 배양시킨 세포와의 $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 에 대한 세포반응이 차이가 없는 것으로 나타났다.

다음으로 ϵBP 가 $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 의 세포독성에 관여하는지를 관찰하였다. ϵBP 는 세포막 탄수화물 결정인자에 붙어 있으므로, 배지에 락토오스를 첨가함으로써 이를 세포 표면에서 분리할 수 있다. 락토오스(25mM)가 있든지, 없든지 간에 $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 과의 세포 반응에는 차이가 없음을 알 수 있었다(도7b).

키메라 단백질과 부분적으로 반응하는 섬유아세포류에 항체 2.4G2 및 락토오스를 첨가하고 추가로 실험을 행하였다(표1). 또한 처리세포 및 대조세포에 대한 $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 의 세포독성에는 차이가 없었다(결과 명시하지 않음).

$FC_{2'-3}-PE_{40}$ 이 $Fc\epsilon RII$ -베어링(bearing) 세포에 영향을 미치는가를 시험해보기 위해서, 0.12A3 세포류 및 $Fc\epsilon RII$ 수용체를 발현하는 쥐-B세포 하이브리도마(hybridoma)를 사용하였다. 0.12A3 세포는 많은 양을 투여했음에도(5000ng/ml), $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 에 전혀 반응하지 않았다(도8). 상기 세포류는 오래된 배지에서 수용체를 잃기 때문에, 수용체에 대한 항체 B3B4 (파미젠)를 가지고서 FACS 분석을 했다. 결과는 54%의 세포에서 수용체가 발현되었다(결과 명시하지 않음).

$Fc\epsilon RII$ 의 발현을 자극하기 위해서 LPS(50 μ g/ml)로 16시간 동안 전배양시킨 신선한 쥐 B 스플레노사이트(splenocyte)를 가지고 추가로 실험하였다. FACS 분석에 의한 결과, 69%의 세포가 수용체를 발현했음에도 불구하고 $FC_{2'-3}-PE_{40}$ 은 B 스플레노사이트에 아무런 영향을 미치지 않았다.

종합적으로, 이 결과들로부터 Fc_{2'-3}-PE₄₀는 저친화성 IgE-결합구조, 즉 FcεRII, FcRII/III 및 εBP에 결합하지 않음을 알 수 있다.

7. Fc_{2'-3}-PE₄₀이 세포 탈과립화에 미치는 효과

Fc_{2'-3}-PE₄₀을 임상적으로 적용할 수 있으므로, Fc_{2'-3}-PE₄₀을 갖는 마스트 세포를 처리하면 키메라 단백질에 의한 FcRI 결합을 자극하는 알레르기 매개인자를 방출하는 결과가 나올 것인지의 여부를 시험하는 것이 중요하였다.

C57 세포는 37°C에서 [3H]-히드록시트리프타민(10 μci/ml)([3H]-hydroxytryptamine)으로 방새도록 배양시켰다. 세포는 자유 [3H]-히드록시트리프타민을 제거하기 위해 3번 씻었고, 24 웰 조직 배양기에서 티로드 완충액(Tyrod's buffer) (10mM Hepes pH 7.4, 130mM NaCl 5mM KCl, 5.6mM 글루코스 및 0.5% BSA)으로 2 × 10⁵ cells/0.5ml로 배양시켰고, 그리고 4°C에서 1시간 동안 IgE(10 μg/ml)으로 배양시켰다. 그리고 나서 염화마그네슘 및 염화칼슘을 각각 1mM 및 1.6mM씩 첨가한 후에, 37°C에서 30분간 디니트로페닐-사람 혈청 알부민(DNP-HSA 50ng/ml)으로 또는 다양한 시간동안 키메라 단백질의 농도를 달리하고 배양시켰다. 세포가 없는 상층액은 원심분리하여 얻었고, 방출된 [3H]-히드록시트리프타민의 양을 측정하였다. 실험한 키메라 단백질의 농도와는 상관없이 탈과립이 관측되지 않았다(도9a). 대조실험으로서, IgE로 전배양시킨 세포들을 같은 조건에서 DNP에 노출시켰다. DNP에 의한 탈과립 유인 효과를 명백히 볼 수 있었다(도9b). Fc_{2'-3}-PE₄₀는 단백질 합성을 80%이상 저해하는 반면(도9c), 상기 표적 세포와의 상호작용의 나중 단계에서도 탈과립을 전혀 유발하지 않았다(도9b). Fc_{2'-3}-PE₄₀는 세포와의 상호작용이 진행되는 동안의 어느 단계에서도 탈과립을 유발하지 않는 결과를 나타내었다.

8. Fc_{2'-3}-PE₄₀의 전기영동 특성

비-저하 조건(시료 완충액에서 2-메르캅토에탄올을 제거)에서 반응하는 전기영동된 시료를 웨스턴 블롯(western blot) 분석 결과, 키메라 단백질 Fc_{2'-3}-PE₄₀은 단량체로서 현저하게 존재하는 것으로 관찰되었다(도10b). 자연 그대로의 PAGE를 위해서, 시료 완충액에서 2-메르캅토에탄올(2-mercaptoethanol)을 제거하고, 시료는 가열하지 않았다. 또한 SDS를 겔(gel), 시료 완충액 및 전극 유지 완충액에서 동부피의 물로 치환하였다. 비-변성 조건에서 키메라 단백질은 광범위한 밴드로 작용한다(도10c). 단일 본래의 시스템은 단백질 전기영동도에서 분자량, 전하 및 구조에 대한 효과를 구별할 수 없다. 하지만, 밴드상에서 분자 근처에는 이 계수들이 상당히 다를 수 있다는 것을 나타내준다.

9. 내화분석(internalization assay)

시험관내에서 키메라 단백질의 활성은 그것의 내화도에만 의존한다. 키메라 단백질이 내화되는지 여부를 시험하기 위해서, 5 × 10⁵ cell/3ml을 37°C에서 1시간 동안 20 μg의 키메라 단백질로 배양시켰다. 펠릿을 차가운 PBS로 3번 씻은 후, 세포막 결합된 키메라 단백질을 제거하기 위해 0.5ml(0.15M NaCl, 0.15M 아세트산(pH 3))의 산성 용액으로 3분동안 얼음위에서 처리하였다. 그리고 나서 50% FCS를 첨가하여 pH를 중성으로 만들고, RPMI/10% FCS로 세 번 씻었다. 세포 펠릿은 용해 완충액 RIPA(150mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM 트리-HCl pH 7.4, 1mM 페닐메틸술포닐 플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride), 15% SDS, 1% 데옥시콜린산(deoxycholic acid) 및 1% 노니덱(nonidet) P-40) 0.3ml로 용해시켰다. 다양한 시료를 전기영동 분석하였고 ε-PE 및 ECL 점출계(아메르삼)를 이용하여 이유노블롯(immunoblot)시켰다. 웨스턴 블롯 분석을 통해 키메라 단백질 Fc_{2'-3}-PE₄₀는 표적 세포로 내화됨을 확실히 알 수 있었다(도11).

(57) 청구의 범위

청구항 1

세포를 발현하는 FcεRI에 대한 세포표적부(cell targeting moiety) 및 세포파괴부(cell killing moiety)로 구성되며, 세포를 발현하는 상기 FcεRI를 표적 제거하는 방법에 의한 알레르기 반응의 치료를 특징으로 하는 키메라 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포파괴부는 세균성 독소 슈도모나스 엑소톡신(pseudomonas exotoxin; PE)인 것을 특징으로 하는 키메라 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포표적부는 쥐-IgE 분자의 Fc 부위인 것을 특징으로 하는 키메라 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포표적부 및 상기 세포파괴부는 유전적으로 융화되는 것을 특징으로 하는 키메라 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 쥐-IgE 분자의 상기 Fc 부위에 있는 아미노산 225-552을 인코딩(encoding)하는 서열이 세포 결합 부위가 없이 PE의 끝이 잘린 형태인 PE₄₀에 유전적으로 융화되는 것을 특징으로 하는 키메라 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 쥐-IgE 분자의 상기 Fc 부위에 있는 아미노산 301-437을 인코딩하는 서열이 세포 결합 부위가 없이 PE의 끝이 잘린 형태인 PE₄₀에 유전적으로 융화되는 것을 특징으로 하는 키메라 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 알레르기 반응은 천식, 알레르기성 비염, 음식 알레르기, 아토피성 피부염 및 과민증으로부터 선택되는 하나인 것을 특징으로 하는 키메라 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제6항의 어느 한 항에 있어서, 활성요소로서의 상기 키메라 단백질 및 종래의 보조생성물로 구성되며, 알레르기 질병, 상기 수용체 FcεRI를 발현하는 세포를 방출하는 세포 이상증식 및 악성 종양을 치료하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 약제 조성물은 주사용(정맥, 동맥, 피하, 근육내 및 복막내), 코안으로 투여, 포막내로 투여, 피부안으로 투여, 피부 이식, 흡입, 국소 치료, 구강치료, 일련의 릴리스 및 내부 경로(entral route)에 대해 적절한 형태인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 10

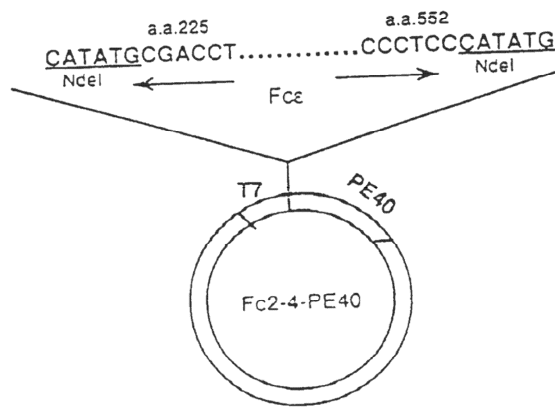
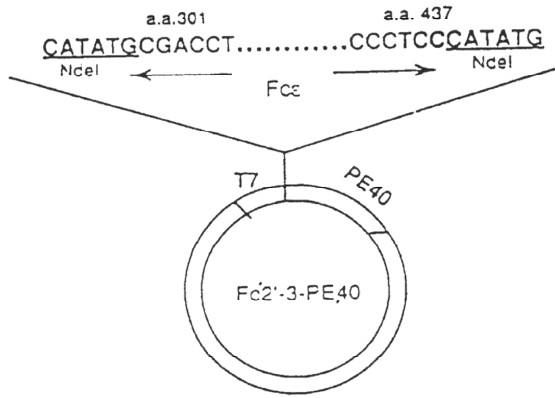
제9항에 있어서, 상기 쥐-IgE 분자의 상기 Fc 부위를 PE에 유전적으로 융화시키고 필요하다면 종래의 보조생성물을 첨가하는 것으로 구성되는 상기 약제 조성물을 상기 적절한 형태중 하나의 형태로 제조하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항의 어느 한 항에 있어서, 알레르기 반응치료용으로 펩티드(peptide)를 인코딩하는 DNA 분자에 사용 가능하도록 연결되어 있는 프로모터(promoter)로 이루어지는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

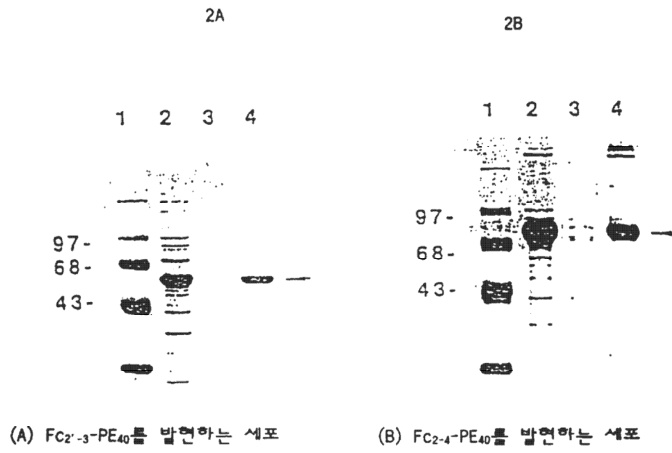
도면

도면1



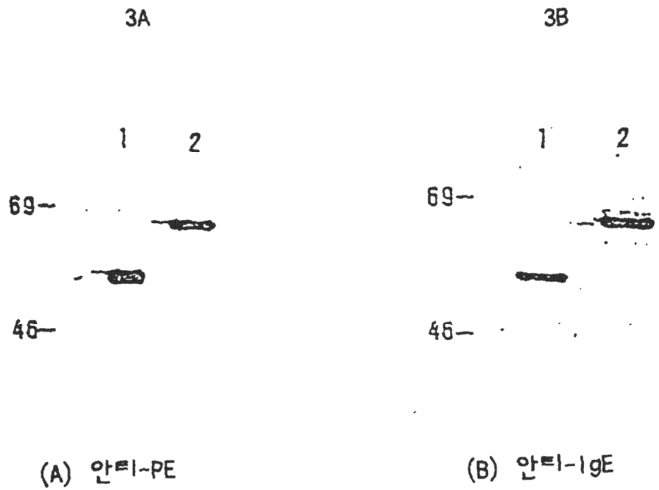
키메라 단백질 Fc₂-3-PE₄₀ 및 Fc₂-4-PE₄₀에 대한 플라스미드 코딩의 개략적
 명시.

도면2



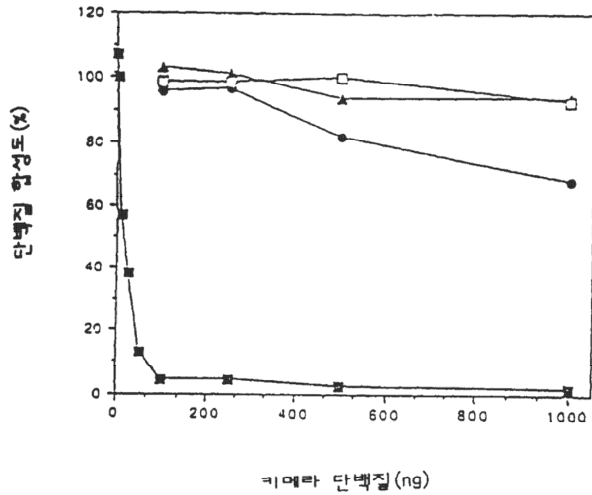
키메라 단백질 Fc ϵ -PE₄₀을 함유하는 세포 부분의 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 분석. 전체 단백질 5 μ g을 함유하는 샘플을 10% 겔에 입혔다. (A) F_{2'-3}-PE₄₀를 발현하는 세포. 레인1, 마커; 레인2, 총 세포 추출물; 레인3, 수용성 부위; 레인4, 불용성 부위. (B) F₂₋₄-PE₄₀를 발현하는 세포. 부위는 (A)에서 표현한 바와 같음.

도면3



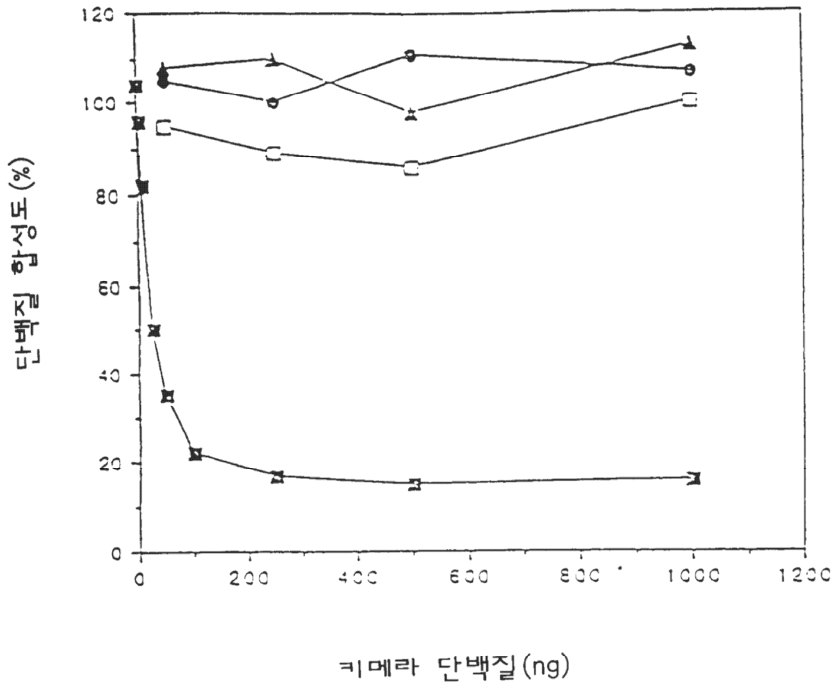
PE(A) 및 IgE(B)에 대한 항체를 갖는 키메라 단백질 $Fc\epsilon-PE_{40}$ 를 포함하는 불용성 부위의 이뮤노블로팅(immunoblotting). 총 단백질 $1\mu g$ 을 포함하는 샘플을 10%의 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 입혔다. 전기영동된 샘플을 니트로셀룰로오스 위로 옮겼고, 물질 및 방법에 기술한 대로 진행시켰다. (A) αPE : 레인1, $F_{2-3}-PE_{40}$; 레인2: $F_{C2-4}-PE_{40}$. (B) αIgE : 레인은 (A)에서 기술한 바와 같음.

도면4a

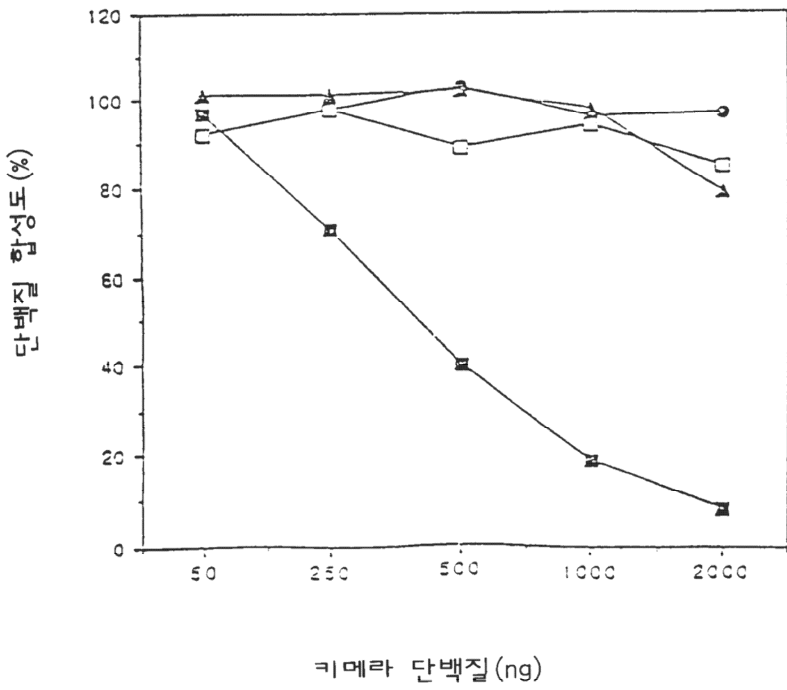


MC-9 세포(A), C57 세포(B) 및 아벨슨 세포(C)에 대한 키메라 단백질의 세포독성 활성. 세포는 키메라 단백질을 함유하는 불용성 부위와 함께 20시간 동안 다양한 농도로 배양시켰다. -■- FC₂₋₃-PE₄₀; -●- FC₂₋₄-PE₄₀; -▲- FC₂₋₃-PE_{40M}; 또는 -□- PE₄₀. MC-9 세포를 이용한 실험은 IL₃(20u/ml) 및 IL₄(10u/ml)의 존재하에서 실시되었다. 세포단백질에 [³H]루이신의 결합은 물질 및 방법에서 기술한 바대로 측정되었다. 결과는 키메라 단백질에 노출되지 않은 대조 세포의 단백질 합성의 백분율(%)로 나타낸다.

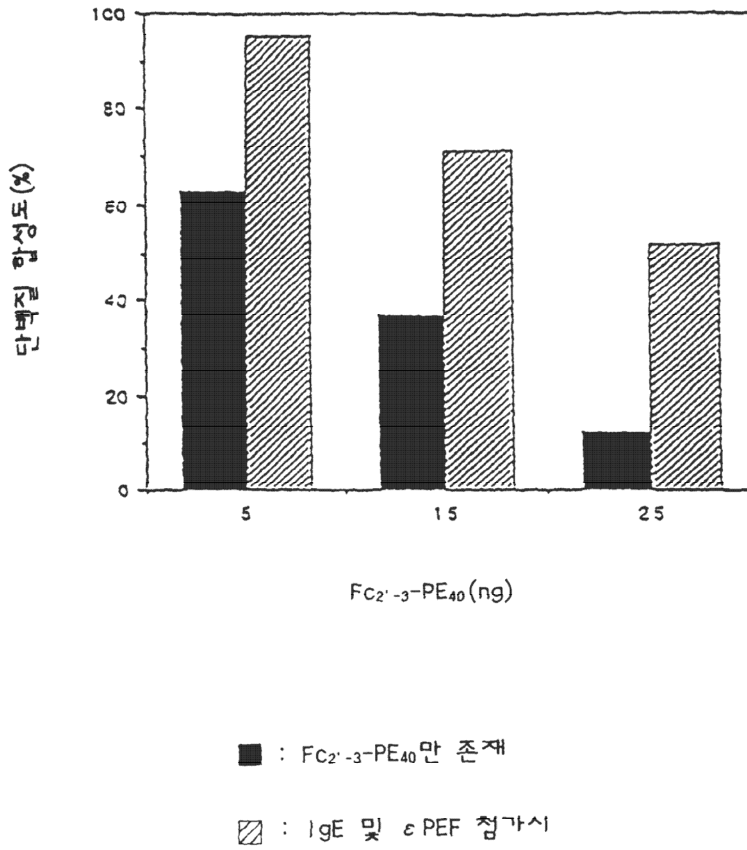
도면4b



도면4c

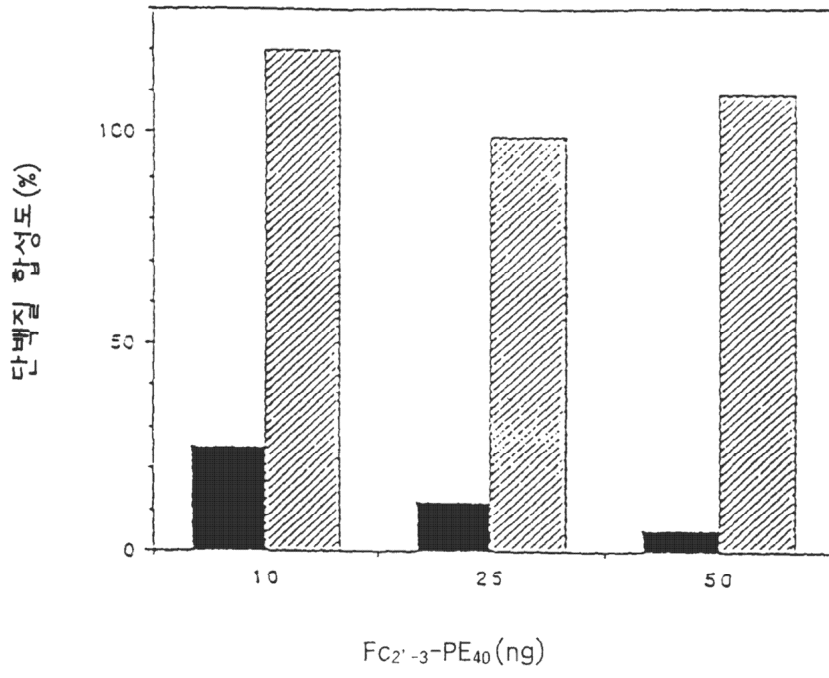


도면5a

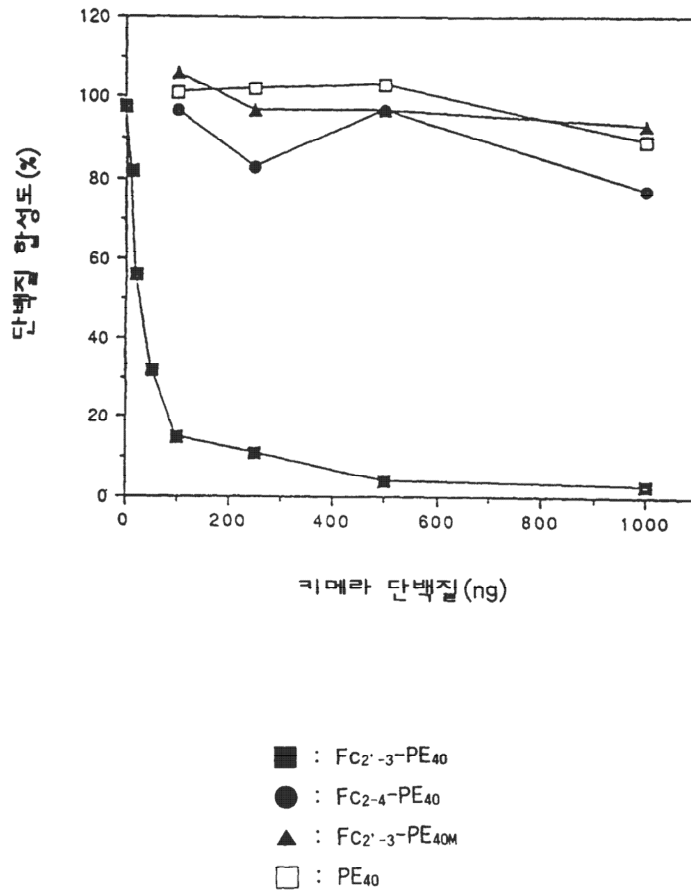


IgE(A) 및 εPE(B)에 의한 F_{2'-3}-PE₄₀의 세포독성의 저해작용. 세포는 F_{2'-3}-PE₄₀을 첨가하기 전에 전체 IgE(40 mg/ml) 7.5μg으로 4℃에서 1시간 동안 배양되었다. εPE(10 mg/ml)는 F_{2'-3}-PE₄₀을 첨가하기 몇분 전에 첨가되었다. 모든 다른 실험 조건은 제4도에서 기술한 바와 같다.

도면5b

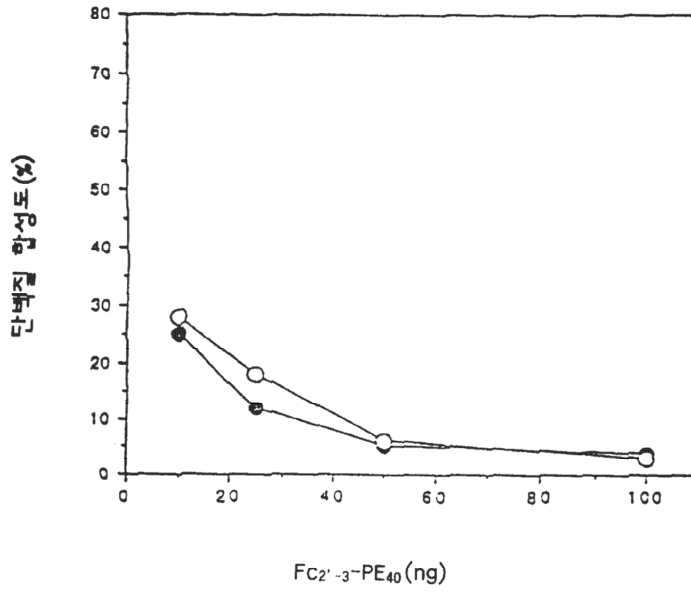


도면6



골수에서 유도된 1차 마스트 세포(BMMC)에 대한 키메라 단백질의 세포독성 활성. 골수는 물질 및 방법에서 기술한 바와 같이 배양되었다. 실험은 IL₃(20u/ml) 및 IL₄(10u/ml)의 존재하에서 제4도에서 기술한 바 대로 배양한지 16일째에 실시되었다. 표시는 제4도와 같다.

도면7a

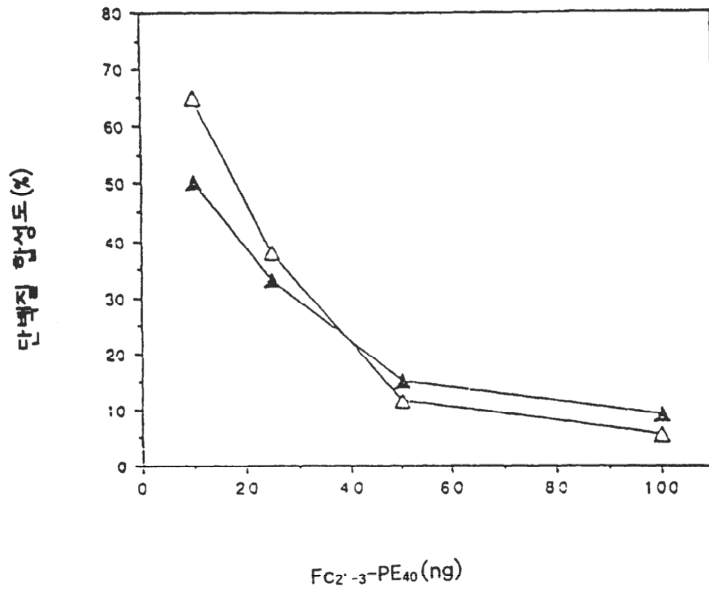


● : 2.4G2가 없는 경우

○ : 2.4G2가 있는 경우

α Fc γ R II/III (2.4G2)의 존재하에서의, C57 세포에 대한 키메라 단백질의 세포독성 활성. 세포는 F_{2'-3}-PE₄₀를 첨가하기 전에 2.4G2 (50 μ g/ml) 또는 갈락토스 (25mM)로 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양되었다. 모든 실험 조건은 제4도에서 기술한 바와 같다.

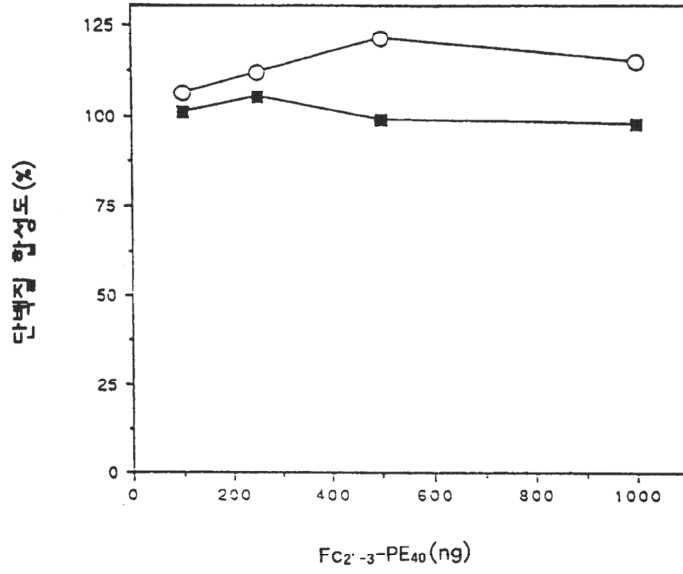
도면7b



△ : 갈락토오스가 없는 경우
 ▲ : 갈락토오스가 있는 경우

갈락토스의 존재하에서의 C57 세포에 대한 키메라 단백질의 세포독성 활성. 세포는 F_{2'-3}-PE₄₀를 첨가하기 전에 2.4G2 (50μg/ml) 또는 갈락토스(25mM)로 37°C에서 30분간 배양되었다. 모든 실험 조건은 제4도에서 기술한 바와 같다.

도면8

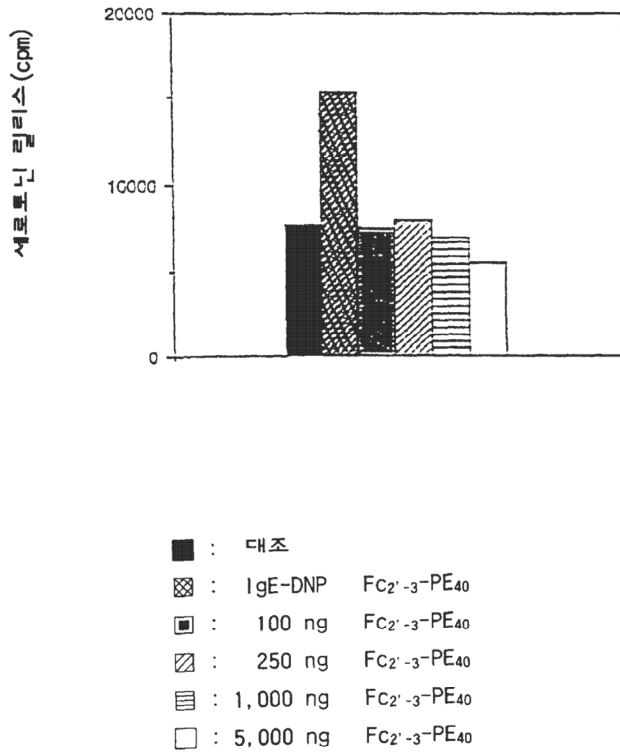


○ : B-스플레노시트

■ : 0.12A3 B-세포 하이브리도마

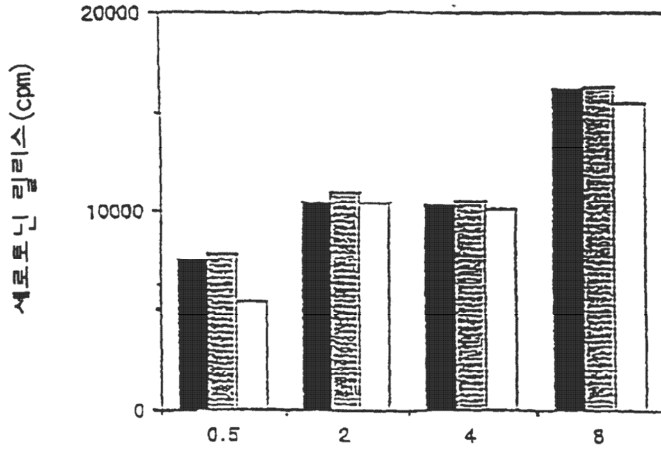
베아링 세포 Fc ϵ R₂에 대한 키메라 단백질의 세포독성 활성. B-스플레노 시트는 LPS(50 μ g/ml) 및 IL₄(50u/ml)로 16시간 동안 전배양시켰다. 모든 다른 실험 조건은 제4도에서 기술한 바와 같다.

도면9a



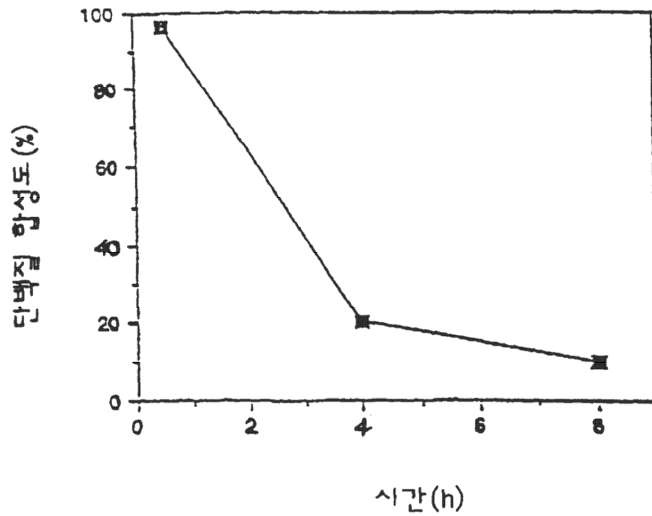
C57 세포로부터 세로토닌 방출에 대한 FC_{2'-3}-PE₄₀의 효과. (A)세포를 [3H] 히드록시트리프타민 크레아티닌 술페이트로 방사도록 라벨링 하였다. 그리고나서 세포를 씻은 후 30분동안 다양한 농도를 갖는 FC_{2'-3}-PE₄₀에 노출시켰다. 대조 세포는 IgE로 전배양시켰고, DNP에 노출시켰고, 배지로 방출된 [3H] 히드록시트리프타민 크레아티닌 설페이트를 측정하였다.

도면9b



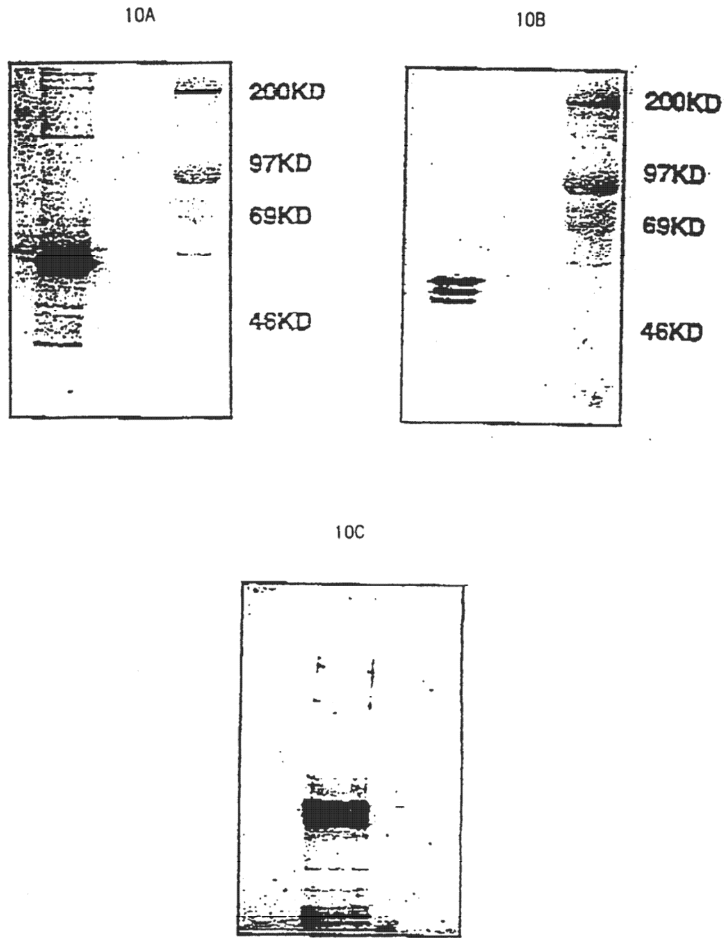
세포는 FC₂₋₃-PE₄₀로 배양시켰다. 여러 다른 시간에서 [3H] 히드록시트리프 타민 크레아티닌 술페이트를 배지에 첨가한 시점을 측정하였다; A에서의 설명과 같다.

도면9c



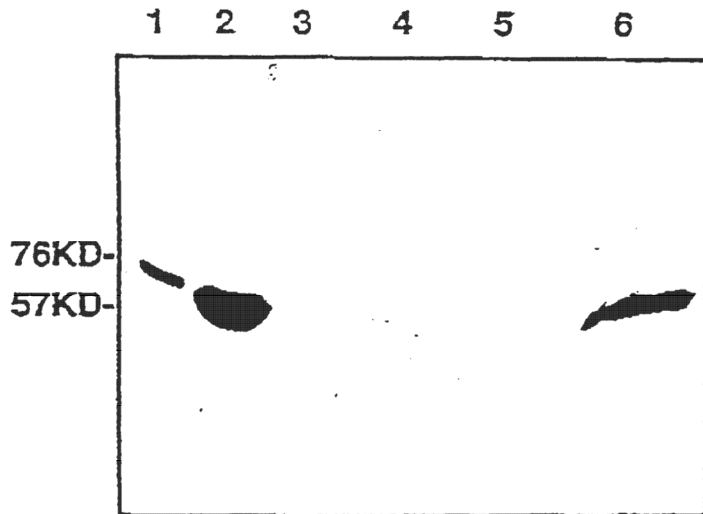
C57 세포에 대한 FC₂₋₃-PE₄₀의 시간 의존적 세포독성. 라벨링하지 않은 세포는 (B)에서와 같이 배양시켰다. 같은 시간 점에서 세포는 [3H] 루이신으로 1시간동안 펄스시켰고, 그것의 세포단백질에의 결합을 측정하였다. 결과는 키메라 단백질에 노출되지 않은 대조 세포의 단백질 합성의 백분율(%)로 나타낸다.

도면10



안티-PE와 하기 조건하에서 전기영동된 키메라 단백질 FC₂₋₃-PE₄₀의 이뮤노 블로팅; (A) 저하 조건하의 SDS에서 (B) 비-저하 조건하의 SDS에서 및 (C) 불변성 겔(즉, 비-저하 및 SDS도 없는).

도면11



MC-9 세포에 의한 키메라 단백질 Fc_{2'-3}-PE₄₀의 내화. 아래의 각 부위에 대해 20 μ g을 포함하는 샘플을 SDS-10% 폴리아크릴아미드겔에 입혔다. 레인1, 40ng Fc_{2'-3}-PE₄₀; 레인2, 세포의 상층액; 레인3, 산처리 전의 최종 수세; 레인4, 산수세 상층액; 레인5, 산처리 후의 최종 수세; 및 레인6, 분해된 세포.