

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
A61K 39/00

(45) 공고일자 1990년06월22일
(11) 공고번호 90-004313

(21) 출원번호	특1987-0004111	(65) 공개번호	특1987-0010183
(22) 출원일자	1987년04월28일	(43) 공개일자	1987년11월30일
(30) 우선권주장	856, 909 1986년04월28일 미국(US)		
(71) 출원인	뉴욕 블러드센터 인코포레이티드	아아론 켈너	
	미합중국 뉴욕주 뉴욕 이스트 67 스트리트 310캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지 도날드 알.파울러		
	미합중국 캘리포니아주 파사데나 이스트 캘리포니아 볼르 바르드 1201		
(72) 발명자	알렉산더 로버트 뉴래스		
	미합중국 뉴욕주 뉴욕 이스트 79 스트리트 230		
	스테판 비.에이취.켄트		
	미합중국 캘리포니아주 파사데나 웨스트 캘리포니아 볼르 바르드 615		
	나탄 스트릭		
	미합중국 뉴욕주 뉴욕 그라스메어 테라스 619		
(74) 대리인	장용식		

심사관 : 정진수 (책자공보 제1911호)

(54) 합성 펩티드를 함유하는 복합 면역원

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

합성 펩티드를 함유하는 복합 면역원

[도면의 간단한 설명]

제 1 도는 본 발명에 따르는 복합체의 현미경사진.

제 2a 도 및 제 2b 도는 본 발명에 따르는 복합체로 면역된 토끼에 있어서의 항체반응의 그래프.

제 3 도는 본 발명에 따르는 복합체로 면역된 토끼에 있어서 항체반응의 시간 경과를 나타내는 그래프.

제 4 도는 HBV의 DNA 서열에서 추론된 pre-S 유전자영역의 번역산물의 아미노산 서열을 나타내는 도면. 서열은 한문자의 아미노산 암호단어(아래의 부호의 설명에 정의 되어있다)로 제시되어있다. 5개의 다른 HBV 아형들에 대한 서열이 제시되어 있다. 6번째의 아래의 글은 5개의 모든 아형에 공통된 아미노산 단기를 나타낸다.

* 도면의 주요부분에 대한 부호의 설명

D Asp : 아스파르트산	N Asn : 아스파라긴
T Thr : 트레오닌	S Ser : 세린
E Glu : 글루탐산	Q Gln : 글루타민
P Pro : 프롤린	G Gly : 글리신
A Ala : 알라닌	C Cys : 시스테인
V Val : 발린	M Met : 메티오닌
I Ile : 이솔로이신	L Leu : 로이신

Y Tyr : 티로신 F Phe : 페닐알라닌
W Trp : 트립토판 K LyS. : 리신
H His : 히스티딘 R Arg : 아르기닌

합성펩티드 : 천연적으로 존재하지 않는 펩티드

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 사포닌유도체와 다음의 활성화-카르복실기, 알데히드기, 알킬아민기 및/또는 티올기-를 한종류 또는 두종류이상 함유하는 유기화합물(예들들면 지방족 화합물 또는 방향족 화합물) 또는 소수성펩티드로 구성된 복합체(핵구조)에 관한 것이다.

어떠한 지방족 화합물이나 방향족 화합물 또는 소수성 펩티드를 사용할 수 있으며 단 그것들이 위에서 기술한 활성화기중의 하나를 포함해야 하며, 솔폭시화디메틸, 디메틸 포름아미드, 에탄올등과 같은 물에 섞이기 쉬운 유기용매에 가용성이어야 한다. 그리고는 그 복합체를 겔여과를 시켜 유기용매와 과량의 사포닌 유도체를 제거한다. 그다음에 1개이상의 다른 합성펩티드를 그 복합체에 공유결합시킨다. 이 펩티드들은 특이하게도 지방족 화합물의 활성화기에 공유결합한다. 본 발명에 사용되는 사포닌 유도체는 Quil A.이다.

사포닌(C₃₄H₆₄O₁₈ ; 분자량=726.5)은 거품장구채, 킬라야피 그리고 특히 모라엑셀사 Mora excelsa, 영국연방소속의 가이아나산 목재의 심재에서 얻어지는 식물배당체(glucoside)이다. 사포닌은 분자의 아글루콘 부분을 구성하는 사포게닌과 당으로 이루어져 있다. 사포게닌은 스테로이드 또는 트리테르펜일 수 있고 당부분은 포도당 또는 갈락토스 또는 오탄당 또는 메틸펜토스일 수 있다.

지방족 화합물은 탄소원자 7 내지 24개를 가지며, 바람직하게는 12 내지 18개, 가장 바람직하게는 14 내지 18개를 가진다. 그리고-COOH,-CHO,-NH₂ ,-SH의 군으로부터 선택된 1개 또는 2개이상의 활성화 성분을 갖는다. 본 발명에서 사용되는 지방산(포화 및 불포화)의 무제한적인 예를 열거해보면 스테아르산, 올레산, 팔미트산 미리스트산등이고 이것들은 카르보디이미드 예들들면 N-에틸-N'(디메틸아미노프로필)카르보디이미드와 함께 활성화될 수 있다. 바람직한 지방족 화합물은 옥타데칸티올이다.

펩티드는 지방족 화합물의 활성화부위에 결합한다. 예들들면 그 펩티드의 한쪽끝(N-terminal end : N-말단 끝)에 위치한 -NH₂ 기는 그 복합체의-COOH 또는-CHO 활성화부위와 결합할 수 있다. 양자택일로 펩티드의-COOH 말단은 복합체의-NH₂ 활성화부위와 결합할 수 있다. 더욱 상세히 말하면 펩티드의 C말단 쪽의 호모세린락톤 끝이 복합체의 아민부위와 결합할 수 있다(T.Kempe, S.B.H.Kent, F.Chow,

S.M.Peterson, W.I.Sundquist와 J.J.L'Italien, Gene , 39 , 239(1985)).

펩티드(시스테인)의 술폰히드릴기는 복합체(예들들면 옥타데칸티올을 포함하는것)의 술폰히드릴기에 결합할 수 있다. 본 발명은 B형 간염비루스(hepatitis B virus : HBV)의 피막(env)단백질의 pre-S1, pre-S2 및 S 영역들로부터 각각 얻어진 3개의 다른 합성펩티드의 다수 복사체(複寫體)를 함유하는 복합면역원에 관해 특별히 주의를 기울인 것이다.

본 출원인들은 보조물질(adjuvants)의 첨가없이 본 발명의 유인성 복합체(stimulating complex)가 토끼에서 원래의 HBV env 단백질을 인식하는 항체를 유도해낸다는 것을 알았다.

여러가지 다른 펩티드 유사체를 함유하는 본 발명에 따른 복합체는 다음과 같은 가능성을 제공한다. 첫째로, 단일펩티드에 고유한 잠재적인 문제점 즉 면역반응중의 T-B 세포의 불충분한 협동과 면역반응성의 한정된 유전적 제한을 극복할 수 있고, 둘째로 비루스 중화와 감염에 대한 방어에 필요한 중요한 에피토프(epitope)를 함유하는ワク신의 설계이고, 셋째로, 유전적으로 명확한 동물에 있어서 다른 에피토프에 대한 면역반응의 조절을 연구하고 부위에 특정한 항체반응에 대한 각 에피토프들의 상호작용을 검토할 수 있도록 하는 것이다.

본 발명에 사용되는 특별히 바람직한 펩티드는 per-S(120-145)이다. [A.R.Neurath, S.BH.Kent, K.Parker, A.M.Prince, N.Strick B.Brotman과 P.Sproul, "Antibodies to a Synthetic Peptide from the pre-S(120-145) Region of the Hepatitis B Virus Envelope are Virus-Neutralizing" (B형 간염 비루스의 피막의 pre-S(120-145)영역으로부터 얻은 합성펩티드에 대한 항체는 비루스를 중화시킨

다). Vaccine , 4, 35-37,(1986)].

역시 바람직한 펩티드로서 HBV env 단백질의 pre-S와 S영역으로부터 각각 얻어진 pre-S(21-47) 및 S(135-155)펩티드들이다. 여러가지 간염비루스(HBV)분리물의 계놈을 클로닝(cloning)하고 결합서열을 조사함으로써 비루스의 유전적인 구조를 해명할 수 있게 되었다. [P. Tiollais, P.Charnay,

G.N.Vyas, Science , 213,406, (1981)]

B형 간염비루스(HBV)감염에 대한 면역학적인 표지물질(marker)은 S 단백질과 pre-S 단백질을 함유하는 표면항원(HBsAg)과 핵항원(HBcAg), "e"항원(HBeAg) 및 이를 각각의 항체를 포함한다.

표면항원(HBsAg)의 S 단백질과 pre-S 단백질에 대한 항체는 HBV 감염에 대해 방어성이 있다.

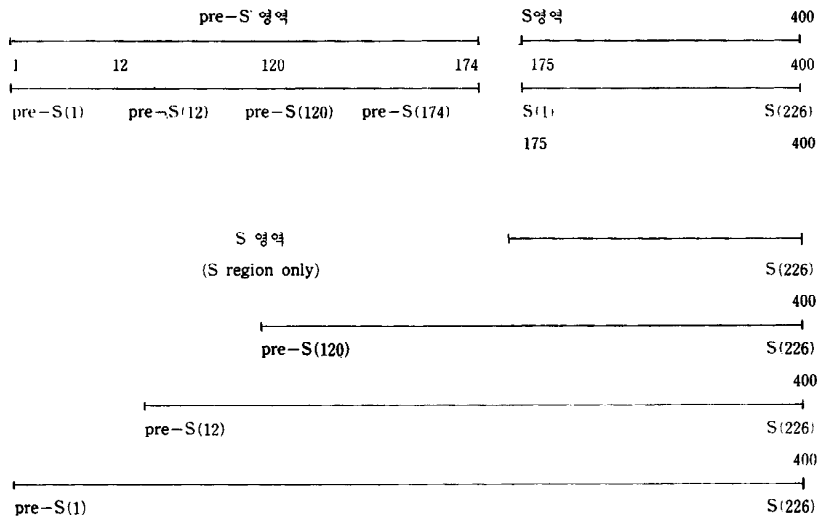
HBV와 직경이 약 22nm인 아비루스성(subviral)입자들의 여러가지 항원아형이 인지되어 있다.[G.Le Bouvier A.Williams, Am. J. Med. Sci , 270 , 165(1975)]

이 아형들(예들들면, ayw, adyw, adw2, adw 및 adr)은 모두 공통된(기에 특이성의)피막에피토프를

가지며, 어떤 비루스아형에 의한 감염에 대해서도 방어하기에 충분한 면역반응을 공유한다[W. Szmunn, C. E. Stevens, E. J. Harley, E. A. Zang, H. J. Alter, P. E. Taylor, A. DeVera, G. T. S. Chem, A. Kellner, et al., N.Engl.J.Med., 307, 1481, (1982)]

HBV 게놈은 2가닥의 DNA, 즉, 긴(L)가닥과 짧은(S)가닥으로 구성되어 있다. L가닥 전사물은 읽기 쉽게 펼쳐보면 4개의 구성영역 즉(S+pre-S), C, P 및 X라고 불리는 영역으로 되어 있다.

(S+pre-S)구성영역은 B형 간염비루스 DNA의 피막유전자와 일치하며 B형 간염비루스피막과 아비루스 성립자에서 발견되는 동종의 단백질에 대한 암호이다. B형 간염비루스 DNA의 피막유전자의 가능한 번역산물을 도식적으로 나타내면 다음과 같다.



위의 개략도에 나타난 숫자는 아미노산(AA)을 말한다. Met1은 아형 adw₂와 adr만을 위해 번역개시장 소로서 존재한다. 다른아형들의 첫째 아미노산은 pre-S12 위치와 일치한다. 앞으로는 pre-S 영역(1 내지 174의 피막 AA)에 해당하는 아미노산서열은 그 접두어 "pre-S"로 나타내고, S 영역(175 내지 400의 피막AA)에 해당하는 아미노산 서열은 그 접두어 "S"로 나타낸다. 피막유전자 산물의 표시에 있어서, S 영역은 아미노산 175에서 400에 걸쳐 있으며, "S영역(S region only)"에서 표시된 1에서 226까지의 아미노산에 비유된다.

위의 개략도에서 pre-S 영역은 아미노산 서열위치 pre-S 1에서 pre-S 174까지로 한정된다,

S 영역은 서열위치 S1(위의 펼쳐진 개략도의 175번째 아미노산이며, pre-S 174에 인접한 아미노산)에서 서열위치 S 226(위의 펼쳐진 개략도의 400번째 아미노산)까지로 한정된다. 유전자 S의 산물(S 단백질)은 이 226개의 아미노산 서열로 구성되어 있다.

pre-S 1 영역은 pre-S 1에서 pre-S 119까지를 포함하고, pre-S 2영역은 pre-S 120에서 pre-S 174까지 포함한다. B형 간염비루스의 자연적으로 존재하는 피막단백질은 다음에 서술하는 것을 포함한다.

(1) HBV 피막유전자의 전범위에 걸친 번역산물, 즉 adw₂와 adr의 경우 pre-S(1-174)와 S(175-400)으로 이루어진 400개의 아미노산 및 ayw, adyw와 adw의 경우 pre-S(12-174)의 S(1-226)으로 이루어진 389개의 아미노산(env 12-400); (2) pre-S(120-174)+S(175-400)=281개의 아미노산(env120-400)=pre-S 영역의 말단쪽의 55개 아미노산+S영역전체로 된 226개의 아미노산(위에 해당하는 단백질은 대략 크기가 33kD와 36kD(P33과 P36)이고 글리코실화(glycosylation)의 정도가 서로 다르다); 및 (3) S(1-226)=226개의 아미노산 즉 S영역전체(env 175-400)로서 글리코실화되지 않은 형태 및 글리코실화된 형태에 있어서 크기가 약 22kD와 26kD인 HBV 피막의 주요한 구성성분을 나타낸다("단백질")

이미 언급한 pre-S(21-47), pre-S(120-145) 및 (135-155)펩티드 외에도 본 발명에 따르는 바람직한 펩티드로서는 다음을 포함한다.

- (1)pre-S(12-32), 그 결합서열은 아형 adw₂에 있어서 MGTNLAVPNPLGFFPDHQLDPI이다(제 4 도참조).
- (2)pre-S(120-145), 그 결합서열은 아형 adw₂에 있어서 MQWNSTAFHQTLQDPRVRGLYPAGGI이다(제 4 도참조).
- (3)pre-S(32-53), 그 결합서열은 아형 adw₂에 있어서 PAFGANSNNPDWDFNPVKDDWI이다(제 4 도참조).
- (4)Pre-S(117-134), 그 결합서열은 아형 adw₂에 있어서 PQAMQWNSTAFHQTLQDPI이다(제 4 도참조).
- (5)pre-S(94-117), 그 결합서열은 아형 adw₂에 있어서 PASTNQSGRQPTPI SPPLRDSHP이다(제 4 도참조).
- (6)pre-S(153-171), 그 결합서열은 아형 adw₂에 있어서 PAPNIASHISSISARTGDP이다(제 4 도참조).
- (7)pre-S(1-21), 그 결합서열은 아형 adw₂에 있어서 MGGWSSKPRKMGMTNLSVNPPI이다(제 4 도참조).
- (8) Pre-S(57-73), 그 결합서열은 아형 adw₂에 있어서 QVGVGAFGPRLTPPHGGI이다(제 4 도참조).

(9) pre-S(1-11), a, adw₂에 있어서 그 결합서열은 MGGVGSKPRKG이다(제 4 도참조), b. adr에 있어서, 그 결합서열은 MGGWSSKPRQG이다(제 4 도참조)

아미노산의 삭제, 다른 아미노산이나 동류의 아미노산(단백질의 아미노산과 거의 같은 구조와 입체성을 갖는 변경된 아미노산)과 같은 것에 의한 아미노산의 치환, 아미노산의 첨가 또는 동류아미노산의 첨가를 포함하는 본 발명의 pre-S 및 S 유전자로 암호된(code) 결합서열의 어떠한 유사체도 사용될 수 있다. 다만 그 결합서열은 HBV의 pre-S 단백질 또는 B형간염 비루스의 표면항원을 인식할 수 있는 항체를 유발시킬 수 있어야 한다.

천연원에서 유도되는 펩티드의 형성에서, 필요로 하는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 화학적이나 효소를 이용하여 단백질을 분해시키는 방법으로 선택적인 단백질 분해를 시킨다. 펩티드를 합성해내기 위해서는 필요로 하는 아미노산 사슬을 화학적으로 합성하는 것이 요구된다.

펩티드잔기가 B형간염비루스의 pre-S 또는 S 유전자로 코드된 영역내의 최소한 6개의 연속된 아미노산과 일치하는지 그리고 B형간염비루스에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 입체적인 구조를 하고 있는지에 대해서 확인하는 것이 바람직하다.

이 끝부분에 아미노산 사슬의 부분으로서 주어진 아미노산 사슬을 결합할 수 있고, 1개 또는 2개 이상의 아미노산을 그것의 한쪽이나 양쪽에 부가시킬 수 있다. 이러한 부가시킨 아미노산들은 아미노산사슬의 안정성을 향상시키기 위한 보조적인 아미노산 역할을 하며 그래서 아미노산 사슬이 B형 간염비루스에 대한 항체에 의해 쉽게 인식된다.

부가적인 아미노산으로서는 천연단백질로 존재하는 것과 똑같은 결합서열의 아미노산과 같은 것일 수 있고, 다른 아미노산을 사용할 수도 있다.

본 발명의 한 형태는, 최소한 6개의 아미노산의 사슬길이를 갖는 펩티드가 그것의 어느 한쪽에 아미노산을 부가시켜, 예를들면 그 잔기의 어느 한쪽에 3개의 아미노산을 결합하여 더 긴 아미노산사슬을 형성할 수 있다. 아미노산 사슬은 B형 간염비루스의 표면항원의 pre-S 영역내의 최소한 6개의 연속된 아미노산과 일치하는 아미노산 서열을 1개이상 포함할 수 있다.

각각의 아미노산 서열의 길이는 그 결합서열을 합성하는 방법에 따라 좌우된다. 결합서열이 각각의 아미노산을 화학적인 수단으로 회합함으로써 이루어졌다면 이 결합서열의 길이는 대체로 50개의 아미노산을 초과하지 못하고 더욱 자세히는 40개의 아미노산을 초과하지 못한다. 합성펩티드가 DNA로부터 얻어지면 사슬길이는 더욱 길며, 예를들어, 100개 이상의 아미노산으로 이루어질 수 있다.

그러나 천연적인 pre-S 단백질 보다는 보통 더 짧고, 자세히 말하면 상당히 더 짧다. 그러므로 S 영역과 pre-S 영역의 구성단위를 갖는 펩티드에서, S 영역에 해당하는 펩티드 부분이 천연적인 S 단백질보다 더 짧고, 예를들면, 아미노산 100개에 지나지 않으며 자세히는 40개의 아미노산에 불과하며 보통 아미노산이 30개 이하이다.

이러한 경우에 pre-S 영역에 해당하는 펩티드부분은 pre-S 전영역과 일치한 길이일 수도 있으나 일반적으로는 pre-S 전영역보다 짧다. 그러나 아미노산 서열이 1개이상 있는 경우에서처럼 아미노산서열이 긴 사슬의 부분일 경우, 사슬에 여러가지 성분들의 잔기 예를들면 폴리아미노산이나 다당류의 조각을 포함시킬 수 있다.

B형 간염비루스의 pre-S 영역내의 최소한 6개의 연속된 아미노산과 일치하는 1개 또는 2개 이상의 다르거나 같은 아미노산 서열, 예를들면 B형간염 비루스의 pre-S 영역내의 서로 다른 에피토프(항원 결정인자)와 일치하는 1개이상의 아미노산 서열을 포함하는 것 이외에도, 본 발명의 면역원은 B형간염 비루스에 대한 확실히 및 한종류이상의 부가적인 질병들, 예를들면, 홍역, 유행성감기, 천연두, 소아마비, 디프테리아등에 대한 확실히 사용할 수 있도록 서로 다른 항원이나 알레르겐의 에피토프를 함유하는 아미노산사슬을 포함할 수 있다. 이러한 부가적인 아미노산 결합서열은 아미노산사슬길이 가 다양할 수 있다.

천연적으로 존재하는 B형 간염비루스의 피막단백질이 없는 것을 특징으로 하는 면역원은 본 발명에 의해 실현되었다. 즉 본 발명의 면역원은 B형 간염비루스의 피막단백질의 제한된 부분에 해당하는 펩티드서열의 1개 또는 2개이상으로 구성되어 있다.

본 발명의 면역원은 비리온(virion)에서 발견되는 다른 단백질이 역시 없다. 펩티드의 화학적인 합성방법이 다음과 같은 간행물에 기술되어 있다. [S.B.H.Kent, Biomedical polymers, eds., E.P.Goldberg and A.Nakajima, (Academic press, New York), 213-242, (1980); A.R.Mitchell,

S.B.H.Ken, M.Engelhard, and R.B.Merrifield, J.Org.Chem, 43, 2845-2852, (1978); J.P.Tam, T.-W.Wong, M.Riemen, F.-S.Tjoeng, and R.B.Merrifield, Tet.Letters, 4033-4036, (1979);

S.Mojsov, A .R. Mitchell, and R.B.Merrifield, J.Org.Chem, 45, 555-560, (1980); J.P.Tam, R.D.DiMarchi and R. B. Merrifield, Tet.Letters, 2851-2854, (1981); and S.B.H.Kent, M.Riemen,

M.LeDoux and R.B. Proceedings of the IV International Symposium on Methods of Prpoteom Sequence Analysis (단백질 일차구조 분석방법에 대한 IV 국제심포지움의 회보 Brookhaven Press Brookhaven, NY), 1981]

화학적 합성방법 ; 소위 "메리필드 고상법(Merrifield solid phase procedure)"에서 L-아미노산들의 적절한 결합서열은 카르복실기 말단 아미노산으로부터 아미노기 말단 아미노산까지 조립된다.

폴리스티렌수지 또는 다른 적당한 수지의 염화메틸기, 벤즈히드릴아민기 또는 다른 반응성이 있는 기에 화학결합으로 부착시킨 적절한 카르복실기 말단 아미노산으로부터 시작하여 다음순서를 이용하여 여 아미노산을 하나씩 붙여나간다. 펩티드-수지는 다음과 같은 절차를 거친다.

(a) 염화메틸렌으로 씻어준다.

(b) 염화메틸렌속에서 5%(v/v)의 디이소프로필에틸아민(또는 다른 방해염기)으로 실온에서 10분동안 혼합함으로써 중화시킨다.

(c) 염화메틸렌으로 씻어준다.

(d) 늘어나는 펩티드사슬의 몰량의 6배에 상당하는 양의 아미노산을 0°C에서 10분동안 카르보디이미

$$\frac{1}{2}$$

드(예를들면 디시클로헥실-카르보디이미드 또는 디이소프로필카르보디이미드) 배의 몰량으로 화학시켜 활성화하면 대칭형 아미노산 무수물이 형성된다. 사용되는 아미노산은 원래는 N- α -제 3부틸 옥시카르보닐유도체로 공급되어야 하며 벤질에스테르(예를들면 아스파르트산 또는 글루탐산의 경우) 또는 벤질에테르(예를들면 세린, 트레오닌, 시스테인 또는 티로신의 경우), 벤질옥시카르보닐기(리신의 경우) 또는 펩티드합성에서 흔히 사용하는 다른 보호기등으로 보호된 측쇄를 가진 유도체들도 공급 가능하다.

(e) 활성화된 아미노산을 실온에서 2시간동안 펩티드-수지와 반응시킨다. 그결과 늘어나는 펩티드 사슬의 말단에 새로운 아미노산이 첨가된다.

(f) 펩티드-수지를 염화메틸렌으로 씻는다.

(g) 염화메틸렌속에서 30 내지 65%의 트리플루오로아세트산, 바람직하게는 50%(v/v)의 트리플루오로 아세트산으로 실온에서 10 내지 30분동안 반응시켜 맨 마지막에 첨가한 아미노산으로부터 N- α -(제3 부틸옥시카르보닐기)를 제거한다.

(h) 펩티드-수지를 염화메틸렌으로 씻는다.

(i) 필요로 하는 펩티드서열이 완성될때까지 단계(a)부터 (h)를 계속 반복한다.

그리고는 10%(v/v)의 아니솔 또는 다른 적당한(방향성) 스캔빈지를 함유하는 무수불화수소산과 반응 시킴으로써 펩티드를 수지로부터 분리시키며 동시에 측쇄의 보호기도 제거된다. 계속해서 펩티드를 겔여과법, 이온교환법, 고압액체크로마토그래피법 또는 다른 적절한 방법에 의해서 정제한다.

어떤 경우에도 화학적인 합성방법이 고상수지 없이 실행될 수 있으며 이때에는 합성반응들이 용액내에서 수행된다. 반응은 거의 유사하며 이 분야에 공지되어 있고, 최종생성물은 본질적으로 동일한 것이다.

천연원으로부터의 분리 : 완전한 단백질 항원을 충분한 양만큼 구입할 수 있다면, 소망하는 아미노산 서열을 가지는 분자의 제한된 부분을 다음 방법중의 어느하나에 의해서 절단해낼 수 있다.

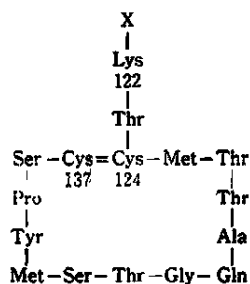
(a) 단백질 가수분해효소, 특히 소망하는 아미노산 결합서열에 바로 인접한 부위에서 단백질을 분해시킬수 있는 기질 특이성을 가지는 효소에 의한 단백질의 분해.

(b) 화학적인 방법에 의한 단백질 분해. 아미노산 사이의 특정한 결합은 특정시약과 반응시켜 절단시킬수 있다. 예를들면 메티오닌을 함유하는 결합은 브롬화시아노겐에 의해서 절단될 수 있으며, 아스파라긴과 글리신 사이의 결합은 히드록실아민에 의해 절단될 수 있다.

(c) 단백질 분해효소 및 화학적인 분해방법을 조합하기 원하는 아미노산의 서열로 고드된 천연원 혹은 합성방법에 의해 제조된 것 또는 그것의 조합을 포함하는 방법에 의해서 얻은 DNA의 작은조각을 역시 클로닝할 수 있어야 하며 그 결과 세균이나 다른 세포에 의해서 펩티드가 생산된다. HBsAg(S영역)의 항원결정인자와 흡사한 펩티드로서는 다음을 포함한다.

S(135-155)(A.R.Neurath, S.B.H.Kent와 N.Strick "비루스단백질인 B형 간염 비루스표면항원의 조각과 공동된 서열을 가지는 합성펩티드에 의해서 항체의 특이성", Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 79, 7871-7875,Dec.1982);

(1) 펩티드 1



펩티드 2는 5개의 첨가된 아미노산잔기를 함유한다.

Ser-Thr-Gly-Pro-Ser-X,
117 121

[G. R. Dreesman, Y. Sanchez, I. Ionescu-Matiu, J. T. Sparrow, H. R. Six, D. L. Peterson, F. B. Hollinger와 J.L.Melnick, "연결되지 않은 합성 HbsAg 펩티드들의 단일 접합후에 B형 간염표면항원에 대한 항체", Nature, 295, 158-160, 1982] ; 과 (2) 다음의 펩티드들 :

위치	배열순서
48-81	Cys-Leu-Gly-Gln-Asn-Ser-Gln-Ser-Pro-Thr-Ser-Asn -H is-Ser-Pro-Thr - Ser-Cys-Pro-Pro-Thr-Cys-Pro-Gly-Tyr- Arg-Trp-Met-Cys-Leu-Arg-Arg-Phe-Ile
2-16	Glu-Asn-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Leu-Gly-Pro-Leu-Leu-Val-Leu- Gln-Cys
22-35	Leu-Thr-Arg-Ile-Leu-Thr-Ile-Pro-Gln-Ser-Leu-Asp-Ser-Trp- Cys
38-52	Ser-Leu-Asn-Phe-Leu-Gly-Gly-Thr-Thr-Val-Vys-Leu-Gly-Gl n-Asn
47-52	Val-Cys-Leu-Gly-Gln-Asn
95-109	Leu-Val-Leu-Leu-Asp-Tyr-Gln-Gly-Met-Leu-Pro-Val-Cys- Pro-Leu
104-109	Leu-Pro-Val-Cys-Pro-Leu

본 발명의 복합체는, B형 간염 바이러스표면항원의 합성 펩티드 유사체와 특히 HBV의 pre-S 유전자로 코드된 영역에 있는 것과 일치하는 아미노산 서열을 함유하는 B형간염 바이러스표면항원의 새로운 합성펩티드 유사체외에도 여러가지 바이러스성, 세균성 알레르겐과 사람과 동물의 기생적인 단백질의 합성펩티드 유사체(방어 항체를 유발시킴)를 결합하기 위해 이용될 수 있다.

따라서 본 발명의 복합체는 다음과 같은 바이러스물의 합성펩티드 유사체를 결합하기 위해 사용될 수 있다.

즉 HTLV III/LAV, 인플루엔자 혈구응집소(A/memphis/102/72/strain, A/Eng 1878/69 strain, A/NT/60/68/29c strain, and A/Qu/7/70 strain, A/PR8/34, A1/CAM/46, and A2/Singapore/1/57 ; B형인플루엔자바이러스, 예를들면 B/Lee/40), 가금페스트 바이러스혈구응집소, 우두진, 소아마비, 풍진, 거대세포바이러스(cytomegalovirus), 천연두, 단순포진 I, II형, 황열, 전염성 엑트로멜리아 바이러스, 우두바이러스, 소의 전염성 비기관염 바이러스, 말의 비폐염(말의 낙태)바이러스, 가축의 악성카르비루스, 고양이의 비기관염바이러스, 개의 포진바이러스, Epstein-Barr바이러스(전염성 단핵증과 버키트 임파종과 관련됨), 마력병 바이러스, 양의 폐선증(jaagziekte)바이러스, 거대세포바이러스 아데노바이러스군, 사람의 유두종바이러스, 고양이의 범 백혈구감소증 바이러스, 족제비의 장염바이러스, 아프리카마역 바이러스(9가지 혈청형), 청설 병바이러스(12가지 혈청형), 송어의 전염성 체장 괴사증바이러스, 조류육종바이러스(여러가지 변종), 조류의 백혈증 바이러스(내장성, 적아구성, 골수아구성), 골화석증바이러스, 뉴우카슬병바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 1, 파라인플루엔자바이러스 2, 파라인플루엔자바이러스 3, 파라인플루엔자바이러스 4, 유행성이하선염바이러스, 터어키바이러스, CANADA/58, 견운열바이러스, 마진바이러스, 호흡합포세 포바이러스, 예를들면 B형 인플루엔자바이러스, 예를들면 B/Lee/40; 광견병바이러스 : 동부마뇌염바이러스; 베네주엘라 마뇌염바이러스 : 서부마뇌염바이러스 : 황열바이러스, 뎅그열 1형바이러스(=6형), 뎅그열 2형바이러스(=5형), 뎅그열 3형바이러스 ; 뎅그열 4형바이러스, 일본뇌염바이러스, Kyasanur Forest 바이러스 ; 도약형 바이러스 : 머레이게곡뇌염바이러스 : Omsk 출혈성열병바이러스(I, II형) ; 센트루이스뇌염 : 사람의 리노바이러스, 구제역바이러스(Foot-and-Mouth disease virns), 희백염바이러스 1형 ; 엔테로바이러스 폴리오 2; 엔테로바이러스폴리오 3 ; 조류의 전염성 기관지염바이러스 ; 돼지의 이식가능성 위장염바이러스 ; 임파구성맥락수막염바이러스 ; Lassa 바이러스 ; Machupo 바이러스 ; Pichinde 바이러스 ; Tacaribe바이러스 ; 유두종바이러스 : Sindbis바이러스 등과 같은 바이러스들이다.

본 발명의 복합체는 또한 나병, 결핵, 매독, 임질등의 세균의 합성펩티드 유사체를 결합하기 위해 사용될수 있다.

본 발명의 복합체는 다음과 같은 기생충들의 합성펩티드 유사체를 결합하기 위해서 역시 사용될 수 있다.

즉 말라리아 운반체(열대 열말라리아 원충, 난형말라리아원충동), 주혈흡충증, 회선사상충, 다른 사상충속의 기생충들, 트라파노솜, 레이슈마니아, 샤가스병, 아메바증, 십이지장충등과 같은 기생충들이다.

본 발명의 면역원은 약편의 활성성분으로서 사용될 수 있고 예를들면 인산원충용액과 같은 생리적으로 받아들일 수 있는 희석액(매체)과 함께 사용될 수 있다.

일반적으로 말하면 생리적으로 받아들일 수 있는 매체내에서의 합성펩티드 농도는 1회 투여량이 약

10마이크로그램(micrograms) 이상 1밀리그램(miligram) 이 하가 될 것이다.

확진은 피하, 피내 또는 근육내 주사로 투약될 수 있다. 바람직한 방법은 특정한 확진에 따라 좌우 되는 반면에 일반적으로 근육내 주사가 적절하다고 생각된다.

투약의 횟수는 확진에 따라 다를 것이다.

일반적으로 말해서 확진은 약 한달을 차이로해서 2회 투여되고 그다음 1차 면역후의 6개월에서 1년 사이에 2차 주사를 한다. 후속의 투여나 2차주사는 처음면역의 결과로 생긴 혈액내의 항체의 농도에 의존하여 어떤 경우에는 필요하지 않을 수도 있다.

본 발명에 따르는 확진은 면역반응을 향상시키고 공지된 어떤 B형간염바이러스 확진(예를들면 pre-S 영역의 아미노산 서열과 같은 펩티드를 함유하지 않음)에 대한 비반응성을 개선하기 위해 사용될 수 있다.

이제 본 발명이 다음의 무제한적인 실시예에 관하여 서술될 것이다.

[실시예]

옥타데칸티올(8mg)(Fluka, Hauppauge, New York)과2-메르캅트에탄올(ME: 20mg)을 20°C에서 2ml의 솔 폭시화디메틸(DMSO)에 용해시켰다.

30분후에 Spikoside(=saponin derivative Quil A, Isotec AB, Lulea, Sweden) 8mg을 첨가하고 혼합 물을 pH 6.7의 0.8% 초산나트륨으로 미리 씻은 "SEPHADEX G-10"(Pharmacia, Piscataway, New Jersey)의 40ml 칼럼의 윗부분에 쏟아넣고 계속해서 2mg/ml로 Spikoside를 함유하는 같은 완충액 2ml를 넣었다.

샘플사용후에 칼럼을 2µg/ml로 Spikoside를 함유하는 같은 완충액으로 용리시켰다.

칼럼의 비어 있는 용적에 해당하는 젓빛색 부분을 채우고 HBV피막 단백질 아형 adw₂의 pre-S서열 [A.R.Neurath, S.B.H.Kent와 N.Strick, "B형 간염바이러스의 pre-S유전자 코드된 면역우성의 에피토프의 위치와 화학적 합성법", Science, 224,392-395(1984) ; A.R. Neurath와 S.B.H.Kent, "바이러스면역 화학에서 사람의 간염바이러스의 항원구조 : 혈청진단법과 확진의 기초 " 325-366, Edited by M.H.V.Van Regen-mortel & A.R.Neurath. Amsterdam : Elsevier,(1985)]에서 얻어지고 C-말단에 Gly-Gly-Cys 구성을 갖는 합성펩티드, pre-S 2mg을 혼합하였다.

펩티드를 ME(100µg/ml)로 환원하고 친액성화시켰다.

그리고 pH 6.7을 유지하면서 30°C에서 1시간이내에 페리시안나트륨(6mM)을 5×40µl 표본부분에 첨가했다.

혼합물을 pH 7.2의 인산완충용액(PBS, 0.14몰 NaCl함유한 0.01몰 인산염)에서 투석시켰다.

2,000rpm(원심분회)의 원심분리에 의해 과량의 PBS로부터 iscom(immunostimulating complex ; 면역자극복합체)이 분리되었다.

이것들은 4°C에서 작은 알로 뭉쳐지고 20°C에서 부유하였다.

효소연결면역측정법(ELISA)에서의 β-갈락토시다제에 연결된 pre-S(120-145)[A.R.Neurath, S.B.H.Kent와 N.Scrick "비루스단백질 즉 B형 간염바이러스 표면항원의 단편과 공통된 서열을 가진 합성펩티드에 의해 유발된 항체의 특이성, "Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 79, 7871-7875(1982)]를 가지는 합성펩티드 iscom의 연속적인 희석을 가진 경합적시험은 iscom에 대한 펩티드의 부착이 완전함을 나타낸다.

HBV 피막단백질의 pre-S1과 S서열[Neurath 일동, 1982 상기 참조; A.R.Neurath, S.B.H.Kent, N.Strick, P.Taylor와 C.E.Stevens "B형 간염바이러스는 pre-S 유전자로 암호화된 영역을 포함한다", Nature, 315,154-156, (1985); Neurath와 Kent,(1985) 상기 참고]로부터 각각 얻어낸 pre-s(21-47)와 S(135-155)의 유사체를 함유하는 복합체를 각기 같은 방법으로 제조하고, 단 후자의 펩티드는 분자 배제 크로마토그래피를 위해 pH 8의 0.1몰 인산염용액을 사용하고 페리시안나트륨은 사용하지 않고 iscom에 대한 펩티드의 연결은 16시간까지 연장하였다.

ELISA 경합적 시험은 복합체에 대한 두개의 펩티드 각각의 결합이 완전함을 보여주었다.

3개의 다른 복합체 제조물을 DMSO에 재용해시켜서 함께 합쳤다(총부피=4ml)

Spikoside(4mg)를 첨가하고 2µg/ml의 Spikoside를 함유하는 PBS로 미리 씻어준 "SEPHADEX G-10"로 채워진 40ml칼럼에 혼합물을 가했다.

칼럼의 빈용적에 해당되는 부분과 3개의 다른 펩티드 전부가 부착된 iscom을 함유하는 부분(제 1 도 참조)을 합쳐서 4마리의 토끼에 면역성을 주기 위해 사용하였다. 각각의 면역을 위한 iscom 투여는 3가지 펩티드 각각에 대해 125/µg에 해당되는 양만큼 2주일 간격으로 실행했다.

제 1 도는 HBV 피막단백질의 pre-S1, pre-S2와 S영역들에 대응하는 합성펩티드를 함유하는 iscom(항 pre-S (21-47)로 응집됨)의 현미경사진이다. (250배 위상차 대물렌즈로 찍은사진; 가로줄의 길이는 50µ)iscom의 직경은 약 1 내지 3µ이었다.

토끼들은 iscom에 결합된 모든 합성유사체물에 대해 반응하였고 그결과 완전한 B형간염바이러스 표면항원(HBsAg; pre-S1, pre-S2와 S-단백질 결합서열을 함유(Neurath 일동, Nature, 315, 154-156,(1985)), 상기 참조)과 펩신으로 처리한 HBsAg(오로지 S-단백질만 함유, Neurath일동, Nature, 315,154-156,(1985), 상기 참조)에 존재하는 HBV피막단백질과 반응했다.

전자현미경법에 의해 관찰된 것처럼 항혈청은 HBV입자를 응집시켰다(자료는 제시되지 않음).

가장 반응성이 좋은 두 토끼에서 얻어진 결과가 제 2 도에 제시되어 있다.

제 2 도는, HBV 피막단백질 아형 adw_2 의 pre-S1, pre-S2와 S-단백질서열(Neurath와 Kent, (1985), 상기 참조)로부터 얻어진 합성펩티드를 함유하는 iscom으로 1차 면역한 10주후에 두마리 토끼(상부, 하부)에서의 항체반응의 결과를 나타낸다.

2차 항체로써 125 로 붙인 항토끼 면역글로불린 G(IgG)를 사용하여 RIA(방사선 면역정량법)에 의해 항체를 정량했다.(Naurath 일동, (1982), 상기 참조)고상(固相)의 피막형성에 사용되는 항원은 인서트에 제시되어 있다. 미리 면역된 혈청에 의한 방사능의 계산치는 항복합체 혈청에 의한 계산치로부터 공제했다.

펩티드 S(135-155)에 대한 항체반응은 -단백질에 대한 반응에 빈약하게 상관하기 때문에 제 2 도에 제시되어 있지 않다[Neurath 일동, (1982)상기 참조 Neurath; 일동, 일반바이러스학 잡지, 65,1009-1014,(1984)].

HBsAg를 인식할 수 있는 항체의 농도는 면역의 횟수와 더불어 증가하며(제 3 도), 기억세포의 증가를 암시한다.

제 3 도는 제 2a 도에서 더 나타난 것처럼 면역된 토끼중의 하나에 있는 HBV 피막 단백질에 대한 항체반응의 반응속도를 제시한다. 웨스턴법(Western blots)과 혈청학적인 정량법에 의해 결정되었듯이 모든 피막단백질을 함유하는 HBsAg로 피막형성된 비드(beads) [Neurath 일동, Nature, 315,154-156,(1985), 상기 참조]를 항체를 검출하기 위해 사용하였다.

희석한도는, 똑같이 희석된 미리 면역된 혈청에 상응하는 계산치로 나눈 항혈청의 계산치의 비(RIA ratio units)가 2.10이상인 최고의 희석도를 나타낸다.

S-단백질에 대한 항체는 희석되지 않은 항체를 사용하여 AUSAB 검사(Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois)에 의해서 측정했다.

그결과 제 3 도의 좌우 세로좌표에 나타난 눈금은 비교되지 않는다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

핵구조와 핵구조에 공유결합된 한종류 이상의 다른 합성펩티드의 다수복사체로 구성되며, 핵구조는 사포닌 유도체와 한종류 이상의 활성부분을 갖는 C₇ 내지 C₂₄ 유기화합물 또는 소수성 펩티드로 구성되고, 활성부분은 -COOH, -CHO, -NH₂와 -SH의 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 복합면역원.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 유기화합물은 지방족 화합물인 것을 특징으로 하는 복합면역원.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 지방족화합물은 옥타데칸티올인 것을 특징으로 하는 복합면역원.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 사포닌 유도체는 Quil A.인 것을 특징으로 하는 복합면역원.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 합성펩티드는 B형 간염바이러스 피막단백질의 합성펩티드 유사체인 것을 특징으로 하는 복합면역원.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 합성펩티드는 (1) B형 간염바이러스 피막단백질의 pre-S1영역으로부터 얻은 최소한 한개의 펩티드 유사체, (2) B형 간염바이러스 피막 단백질의 pre-S2영역으로부터 얻은 최소한 한개의 펩티드 유사체, 및 (3) B형 간염바이러스 피막단백질의 S영역으로부터 얻은 최소한 한개의 펩티드 유사체로 구성된 것을 특징으로 하는 복합면역원.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 합성펩티드 유사체(2)는 pre-S(120-145)인 것을 특징으로 하는 복합면역원.

청구항 8

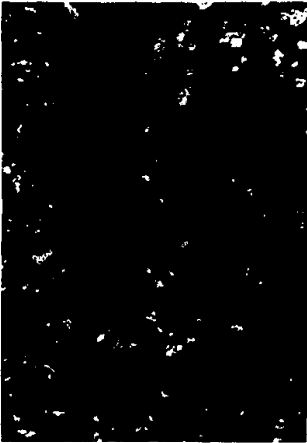
제 6 항에 있어서, 합성펩티드 유사체(1)는 pre-S(21-47)인 것을 특징으로 하는 복합면역원.

청구항 9

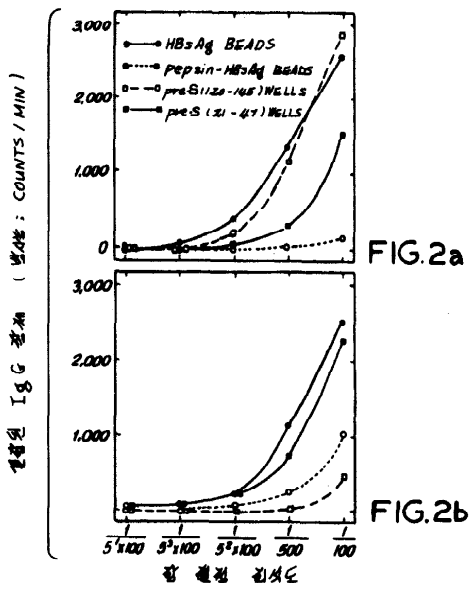
제 6 항에 있어서, 합성펩티드 유사체(3)는 S(135-155)인 것을 특징으로 하는 복합면역원.

도면

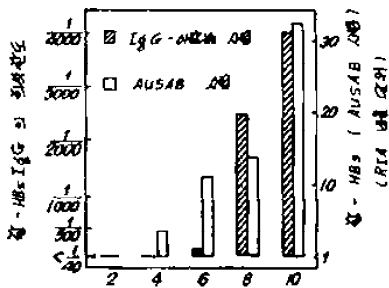
도면1



도면2



도면3



도면4

Pre - 5 2번

1 2 3 4 5 6
 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012

1ayr GHNILGNKIYSWGNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGA GA
 2ayr GHNILGNKNSYSWGNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGA GA
 3ayr HGWSSKPRAGMGTNLSVFNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDTWPDANKVGA GA
 4ayr LGNKSYSIRAGMGTNLSVFNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDTWPDANKVGA GA
 5ayr HGWSSKPRAGMGTNLSVFNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDTWPDANKVGA GA

HG NLS NPLGF PDHQLDPAF AN NPWDFNP KD WP AN YG EA

6 7 8 9 10 11 12
 34567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234

1ayr FGLGFTPPHGGLLGWSPQAQGI LQTLPANPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNS
 2ayr FGLGFTPPHGGLLGWSPQAQGI LQTLPANPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNS
 3ayr FGPRLTPPHGGILGWSPQAQGI LTTVSTLPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDSHPQAMQWNS
 4ayr FGPRLTPPHGGILGWSPQAQGI LTTVSTLPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDSHPQAMQWNS
 5ayr FGPRLTPPHGGILGWSPQAQGI LTTVSTLPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDSHPQAMQWNS

FG TPPHGG LGWSPQAQGI T PPAASTNRQSGRQPTPLSPPLR NHPQAM WNS

12 13 14 15 16 17
 56789012345678901234567890123456789012345678901234

1ayr TTFNQTLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNVPVTTASPLSSIFSRIGDPALN
 2ayr TTFNQTLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNVPVTTASPLSSIFSRIGDPALN
 3ayr TTFNQTLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNVPVTTASPLSSIFSRIGDPALN
 4ayr TTFNQTLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNVPVTTASPLSSIFSRIGDPALN
 5ayr TTFNQTLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNVPVTTASPLSSIFSRIGDPALN

T HQ L DPRVRGLY PAGGSSSGTVNP S SSI R GDP