

효과T세포활성화를 위한 재조합사람인터로이킨-2 변이체의 제조와 그것에 의한 악성홍수제거 및 위암치료효과

최영식, 박형범, 최민, 채순희, 랑명룡

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《...의학과학의 새로운 분야를 개척하며 최신과학기술의 성과를 치료예방사업에 받아들이기 위한 연구사업을 힘있게 벌려야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 81~82페이지)

사람인터로이킨-2(IL-2)는 면역강화기능과 면역조절기능을 다같이 가지고있으므로[1, 3, 5, 6] IL-2에 의한 암성질환치료의 효과성을 높이기 위하여서는 조절T세포는 활성화시키지 않으면서 기타 다른 효과세포들에 대한 자극활성은 보존된 새로운 IL-2변이체[4]를 개발하여야 한다. 또한 모세혈관루출증후군(VLS)과 같은 부작용[2]을 없애거나 감소시켜야 한다.

우리는 IL-2의 42번 페닐알라닌을 알라닌으로, 45번 티로진을 알라닌으로, 72번 로이신을 글리신으로 치환하여 조절T세포의 고친화성접수체 α 사슬에 대한 친화력을 결핍[4]시켜 효과T세포에 대한 자극활성만이 보존되게 하고 38번 아르기닌을 트립토판으로 치환하여 VLS에 의한 부작용이 최소화[2]되도록 한 IL-2변이체(38W/42A/45A/72G/125A)를 유전자 공학적방법으로 개발하고 실험동물에서의 항종양활성, 악성홍수환자치료와 위암환자들의 수술병합료법에 적용하여 그 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

실험에 온도유도발현플라즈미드 pBUG, 클론화운반체 pBluescript KS+, 재조합사람인터로이킨-2유전자가 클론화된 pGEM-T-IL-2(3.4kb), *E. coli* Top 10F', 제한효소 *EcoR* I, *T₄* DNA 리가제, Pfu DNA폴리메라제(《TaKaRa》), 바이오로이킨주사약(Ala¹²⁵치환형rhIL-2, 국규 39178:2012)을 리용하였다.

IL-2/38W/42A/45A/72G/125A(이하 IL-2B라고 함.)유전자의 합성은 pGEM-T-IL-2를 주형으로 Pfu DNA폴리메라제를 리용하여 중첩PCR법으로 진행하였다.

IL-2B의 정제는 초음파에 의한 균체마쇄, 봉입체분리정제, 5% SDS용액에 의한 가용화, 세파크릴 S-200 HR겔탑에 의한 크로마토그래프법으로 진행하였으며 류산동을 리용한 자동산화법으로 재구조화를 진행하고 비활성은 MMT법으로 측정하였다.

실험동물들에서 IL-2B의 항종양효과분석은 다음과 같이 진행하였다.

먼저 크로켈육종(육종-180)세포를 흰생쥐(잡종)의 액와부에 각각 5×10^6 개/0.1mL씩 이식하여 담암모형동물을 만든 다음 연구조에는 IL-2B를 50만U/kg의 용량으로 하루에 한번씩 20일동안, 약물대조조에는 바이오로이킨주사약을 100만IU/kg의 용량으로 하루에 한번씩 20일동안, 대조조에는 0.9% 생리적식염수를 하루에 한번 0.1mL씩 20일동안 복강주사하였다. 14, 21일째 되는 날에 실험동물의 종양크기를 측정한 다음 대조에 비한 종양증식억제률을 각각 계산하였으며 40일에는 실험조와 대조조의 생존일수를 계산한데 기초하여 평균생존일수와 연명률을 산출하는 방법으로 항종양효과를 분석하였다.

IL-2B주사약에 의한 치료효과검토는 악성홍수환자 24명(연구조 14명, 대조조 20명), 위암환자 40명(연구조 20명, 대조조 20명)를 대상으로 진행하였는데 치료방법은 다음과 같다.

악성홍수치료방법 연구조에는 환자의 흉강내 악성홍수를 뽑고 IL-2B주사약(한암플당 50만U/mL)을 홍수량이 적을 때에는 2~3대, 많을 때에는 6~10대씩 2~3일 간격으로 주입하였다. 환자의 홍수가 없어질 때까지 반복하여 치료하였다. 대조조에는 악성홍수를 뽑고 히드로코르티존(10~50mg/회)이나 덱사메타존 한암플을 주입하였다.

위암국소재발치료방법 연구조에는 위암수술후 복강세척을 한 다음 IL-2B주사약 6대를 복강내에 도포하고 봉합하였다. 대조조에는 이 방법을 적용하지 않았다.

결과 및 논의

1) IL-2B발현대장균그루의 제조와 분리정제

IL-2B유전자를 합성하기 위한 프라이머는 표 1과 같이 설계하였다.

표 1. 중첩PCR법으로 IL-2B유전자를 합성하기 위한 프라이머

프라이머 이름	배열(5'-3')	크기 /nt	PCR산물 크기/bp
FP1	GGCGAATTCATGGCACCTACTTCAAGTTC	29	134
RP1	TGTGAGCATCCAGGTGAGTTTGGGATTCTTGTAATT	36	
FP2	AAACTCACCTGGATGCTCACATTTAAGTTTTACAT	35	78
RP2	TTACGTTGATACGGCTGATTAAGTCCCTGGGTC	33	
FP3	CTTAATCAGCCGTATCAACGTAATAGTTCTGGAACATAAG	40	199
RP3	GCGGAATTCAAGTCAGTGTGAGATGATGCTTTG	34	

표 1의 설계에 따라 125번 시스테인이 알라닌으로 치환된 갑작변이체 IL-2유전자가 클론화된 pGEM-T-IL-2를 주형으로 FP1과 RP1을 리용한 PCR(이하 PCR1), FP2와 RP2를 리용한 PCR(이하 PCR2), FP3과 RP3을 리용한 PCR(이하 PCR3)을 진행하였다.(그림 1) 이렇게 얻은 세가지 PCR산물을 같은 양으로 섞은 후 FP1과 RP3을 리용하여 중첩PCR(이하 PCR4)를 진행(그림 2)하여 IL-2B유전자를 합성하였다. PCR는 예비변성 94℃에서 3min→변성 94℃에서 30s, 해당 온도에서 아닐링 30s, 연장 72℃에서 30s, 순환 30회→최종연장 72℃에서 10min, 램프각 4℃에서 10min으로 진행하였는데 PCR1, PCR2, PCR3, PCR4의 아닐링 온도는 각각 50, 60, 45, 55℃였다.

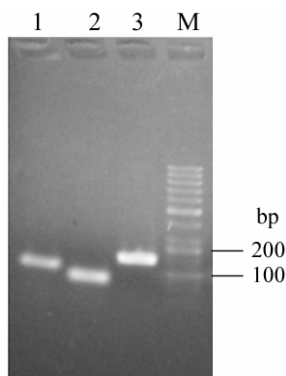


그림 1. PCR1, 2, 3산물들의 2% 아가로스 겔전기영동상
1-PCR1산물, 2-PCR2산물, 3-PCR3산물,
M은 50bp DNA분자크기표식자

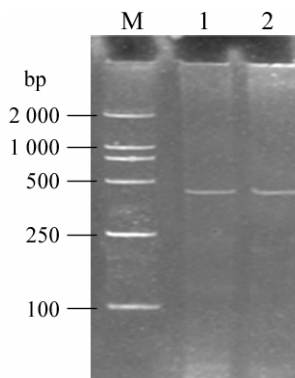


그림 2. PCR4산물의 2% 아가로스 겔전기영동상
M은 DNA분자크기표식자(DL 2000),
1, 2는 각각 PCR4산물

그림 1, 2에서 보는바와 같이 PCR1, PCR2, PCR3산물의 떠들이 각각 134, 78, 199bp 되는 위치에, PCR4는 410bp 되는 위치에 나타났으므로 중첩PCR에 의하여 IL-2B유전자(PCR4 산물)가 정확히 합성되었다는것을 알수 있다.

PCR4/EcoRI산물을 pBluescript KS+의 EcoR I인식부위에 클론화하고 배렬분석을 진행한 결과 38번아미노산이 Trp(TGG)으로, 42번과 45번아미노산들이 각각 Ala(GCG)로, 72번 아미노산이 Gly(GGC)로, 125번아미노산이 Ala(GCT)로 치환되었다는것을 확인하였다.

그림 3에 제시된 설계에 따라 IL-2B유전자를 온도유도발현운반체 pBUG의 EcoRI인식 부위에 클론화하여 pBUG-IL-2B를 제조하고 겔전기영동법으로 확인(그림 4)하였으며 42°C 온도유도법으로 분자량이 15KD인 발현산물을 확인하였다.(그림 5)

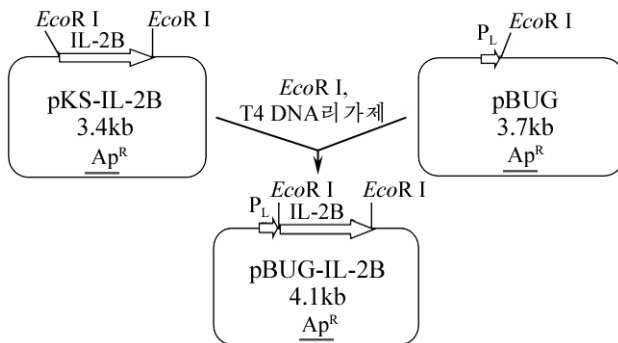


그림 3. IL-2B발현플라스미드의 제조설계도

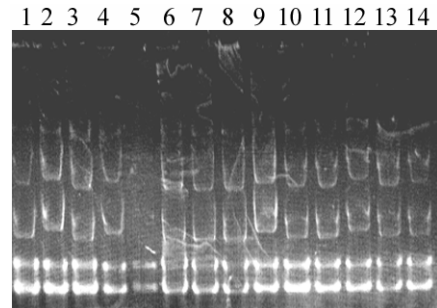


그림 4. pBUG-IL2B선발을 위한 1% 아가로스겔전기영동상
1-pBUG, 2-14는 형질전환체

그림 4에서 보는바와 같이 형질전환체 2, 4, 9, 12가 pBUG(약 3.7kb)보다 큰 재조합 플라스미드 즉 IL-2B발현플라스미드라는것을 알수 있다.

그림 5에서 보는바와 같이 재조합체 2, 4의 온도유도결과 약 15KD의 IL-2B유도산물이 확인되었다.

봉입체를 5% SDS용액으로 가용화한 다음 세파크릴 S-200HR에 의한 탑크로마토 그래프를 통하여 얻은 러과분획들을 전기영동한 결과는 그림 6과 같다.

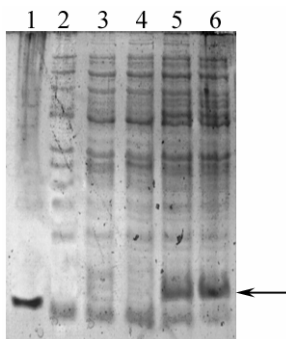


그림 5. IL-2B발현산물의 12.5% SDS-PAGE상
1-리조짐(14.4KD), 2-pBUG(비유도), 3, 4-재조합체 2와 4(비유도), 5, 6-재조합체 2와 4(유도)

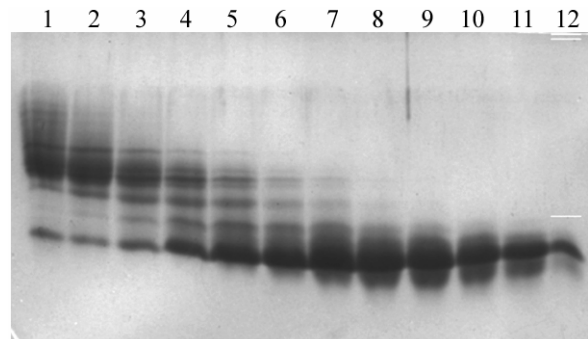


그림 6. 세파크릴 S-200HR에 의한 IL-2B 겔러과분획들의 12.5% SDS-PAGE상
1-12는 겔러과분획들임.

그림 6에서 보는바와 같이 얻어진 러과분획들가운데서 IL-2B가 고순도로 들어있는 분획은 9-12였다. 95%이상의 순도를 가진 분획들을 재구조화하고 MTT법으로 IL-2B의 비활성을 분석한 결과 약 $(1.40 \pm 0.39) \times 10^7 \text{ U/mg}$ 이었다.

2) 담암모형동물에서 종양증식억제률과 연명률에 미치는 IL-2B의 영향

담암모형 동물에서 종양증식억제률과 연명률에 미치는 IL-2B의 영향을 조사한 결과는 표 2, 3과 같다.

표 2. 담암모형동물에서 종양증식억제률에 미치는 IL-2B의 영향

구분	종양증식억제률/%		
	적용량/(U·kg ⁻¹)	14d	21d
대조조	—		
IL-2B조	50만	42.52*	55.42**
바이오로이킨조	100만	30.54	40.37*

n=13, * p<0.05, ** p<0.01(대조와 비교)

표 3. 담암모형동물의 연명률에 미치는 IL-2B의 영향

구분	례수 /마리	평균생존 일수/d	연명률 /%
대조조	15	23.20±2.84	—
IL-2B조	15	32.40±3.28*	39.66
바이오로이킨조	15	28.93±2.05*	20.40

* p<0.05(대조와 비교)

표 2에서 보는바와 같이 연구조에서 종양이식후 14일부터, 바이오로이킨조에서는 종양이식후 21일에 종양증식억제률이 대조조에 비하여 유의성있게 높아졌다.

표 3에서 보는바와 같이 두 약물조에서 대조조에 비하여 연명률이 유의성있게 높아졌는데 연구조가 바이오로이킨조보다 19%정도 더 높았다.(p<0.05)

3) IL-2B주사약에 의한 악성홍수제거 및 위암치료효과

IL-2B주사약에 의한 악성홍수환자 및 위암환자들에 대한 치료효과를 조사한 결과는 표 4-7과 같다.

표 4. 악성홍수환자들의 자각증상개선유효률(%)

구분	입맛없기	맥없기	구역구토	숨가쁨	잠장애	소화장애	계
대조조	50	57.9	73.3	35.0	55.0	45.0	51.8
IL-2B조	85.7	85.7	100	92.9	92.9	92.9	91.3

표 5. 악성홍수환자들의 평균치료일수와 유효률

구분	평균치료 일수/d	유효률 /%
대조조	25.4±4.6	49.5
IL-2B조	15.6±1.8	92.9*

표 5에서 보는바와 같이 악성홍수환자들에 대한 평균치료일수와 유효률은 IL-2B조에서 92.9%로서 대조조 49.5%에 비하여 높았다.

표 6에서 보는바와 같이 위암환자들의 치료후 자각증상개선유효률은 IL-2B조에서 88.2%로서 대조조 86.1%에 비하여 높았다.

표 6. 위암환자들의 자각증상개선률(%)

구분	입맛없기	맥없기	구역구토	배아픔	잠장애	설사	계
대조조	80.0	66.7	100	100	100	57.1	86.1
IL-2B조	82.8	71.4	100	100	100	60.0	88.2

표 7. 수술 1년후 위암환자에서 국소재발억제률

구분	례수/명	재발없는 례수/명	재발례수/명	재발억제률/%
대조조	20	10	10	50
IL-2B조	20	17	3	85

표 7에서 보는바와 같이 수술 1년후 위암환자들의 국소재발억제률은 IL-2B조에서 85%로서 대조조 50%에 비하여 높았다.

맺 는 말

1) 유전자공학적방법으로 효과T세포활성화를 위한 사람인터로이킨-2변이체(IL-2B/38W/42A/45A/72G/125A)를 발현하는 대장균그루를 제조하고 분리정제하였다.

2) 담압모형동물에서 IL-2B에 의한 종양증식억제률은 14, 21일에 각각 42.52, 55.42%로서 야생형IL-2인 바이오로이킨(30.54, 40.37%)에 비하여 높았다.

3) IL-2B주사약에 의한 악성흉수환자들의 자각증상개선유효률은 91.3%(대조조 51.8%), 평균치료일수와 유효률은 각각 15.6일, 92.9%(대조조 49.5%)로서 높았으며 위암환자들의 자각증상개선유효률은 88.2%(대조조 86.2%), 수술 1년후 국소재발억제률은 85%(대조조 50%)로서 높았다.

참 고 문 헌

- [1] Hosse Ralf et al.; WO 2012/107417 A1.
- [2] Peisheng Hu et al.; WO 03/15697 A2.
- [3] Rahul Roychoudhuri et al.; Current Opinion in Immunology, 33, 101, 2015.
- [4] A. G. Roche Glycard; US20160208017A1.
- [5] L. Sarah et al.; Cytokine, 28, 109, 2004.
- [6] Jin-Gyo Oh et al.; Biochemical and Biophysical Reserch Communications, 1, 300, 2018.

주체110(2021)년 4월 5일 원고접수

Construction of a Recombinant Human IL-2 Variant for the Expansion of Effector T Cells and, Application Effects on Elimination of Malignandy Pleural Effusion and Gastric Cancer Treatment

Choe Yong Sik, Pak Hyong Bom, Choe Min, Chae Sun Hui and Ryang Myong Ryong

We synthesized the gene of IL-2 mutant (IL-2B/R38W/F42A/Y45A/L72G/C125A) by overlapping PCR and expressed in *E. coli* Top10F' in insoluble form. The amino acid substitutions F42A, Y45A, L72K introduced to abolish the affinity to the α -subunit of IL-2R on the T_{reg} cells, but to retain the ability to activate IL-2 signaling in T_{eff} cells, and R38W substitution to eliminate its vasopermeability activity. In mouse cancer model its inhibitory rate of cancer proliferation at days 14, 21 was 42.5% and 55.42%, respectively(in wt IL-2 group 30.54% and 40.37%). Furthermore there was seen no detectable edema in the mouse lung and kidney. Administration of the mutant IL-2B injections to the patients with malignant fluid on the chest showed significant improvement effect of the subjective symptoms with 91.3% and mean treatment period was 15.6 days with efficacy 92.9%. There was no complains about side toxicity during the treatment period and after it.

Keywords: IL-2 mutant, T_{eff}, cancer treatment