



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0086141
(43) 공개일자 2013년07월31일

- (51) 국제특허분류(Int. C1.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7030148
- (22) 출원일자(국제) 2011년04월18일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년11월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/032910
- (87) 국제공개번호 WO 2011/130745
국제공개일자 2011년10월20일
- (30) 우선권주장
61/325,241 2010년04월16일 미국(US)
61/416,102 2010년11월22일 미국(US)
- (71) 출원인
메디뮨 리미티드
영국 씨비21 6지에이치 캠브리지 그랜타 파크 밀
스테인 빌딩
맥마스터 유니버시티
캐나다 온타리오 웰8에스 4엘8 해밀턴 길모어 훌
306 메인 스트리트 웨스트 1280
- (72) 발명자
핀치 도나
영국 CB21 6GH 캠브리지 그랜타 파크 밀스테인 빌
딩
코일 앤서니
미국 02118 메사추세츠주 보스턴 유니온 파크 12
스탬플리 마틴
캐나다 L8S 4L8 온타리오주 해밀턴 메인 스트리트
웨스트 1280
- (74) 대리인
김진희, 김성기

전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 COPD 악화를 치료하기 위한 조성물 및 방법

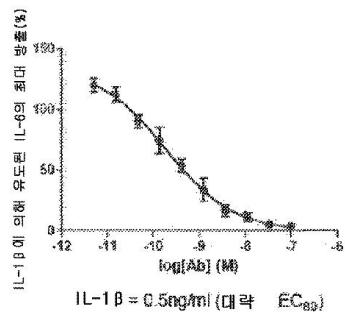
(57) 요 약

본 개시내용은 인터루킨 1 수용체 1(IL-1R1) 또는 IL-1 α 에 대한 항체 및 길항제를 사용하여 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)의 악화를 치료하는 방법에 관한 것이다.

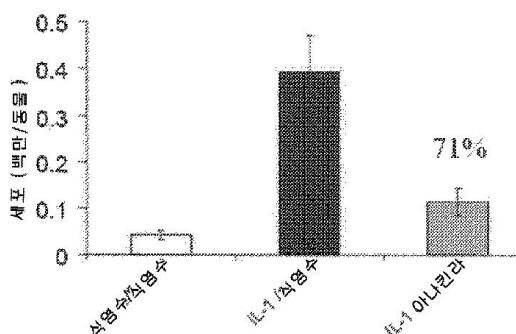
대 표 도

IL-1 β 활성은 시험관내 및 생체내에서 IL-1R1 차단에 의해 억제된다.

a) 항-IL-1R1 항체(Ab6)는 인간 일차 COPD 폐 성유아세포로부터의 IL-1 β 매개 IL-6 방출을 억제한다.



b) 아나킨라(Anakinra)는 마우스 폐에서 IL-1 β 에 의해 유도된 호중구 매개 염증을 억제한다.



특허청구의 범위

청구항 1

인터루킨 1 수용체 1(IL-1R1)에 특이적으로 결합하여 IL-1R1을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 기도 염증의 감소가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 기도 염증을 감소시키는 방법으로서, 이때 상기 환자가 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 악화를 갖는 환자인 방법.

청구항 2

IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1R1을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 인터루킨 1α(IL-1α) 신호전달의 감소가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 IL-1α 신호전달을 감소시키는 방법으로서, 이때 상기 환자가 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 악화를 갖는 환자인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 IL-1α에 대한 IL-1R1의 결합을 억제하는 재조합 항체인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 인터루킨 1β(IL-1β)에 대한 IL-1R1의 결합을 억제하는 재조합 항체인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 기도 염증의 감소가 COPD 악화를 치료하는 방법의 일부인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 기도 염증의 감소가 폐 내로의 호중구 유입의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 약 25 킬로달톤 이상의 분자량을 갖는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 IL-1α 및 IL-1β에 대한 IL-1R1의 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 항체가 인간 항체인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, COPD를 치료하기 위한 치료 요법의 일부인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, COPD를 치료하기 위한 치료 요법이 스테로이드의 투여를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, COPD 악화가 세균 감염에 의해 야기되는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, COPD 악화가 바이러스 감염에 의해 야기되는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, COPD 악화가 연기에 의해 야기되는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 비아코어(Biacore)™에 의해 측정될 때 50 pM 이하의 K_D 로 IL-1R1에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 투여가 전신 투여인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 비강내 투여를 포함하지 않는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 COPD 악화 전에 GOLD 단계 III 또는 GOLD 단계 IV로서 분류된 COPD를 갖는 것인 방법.

청구항 19

IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하는 재조합 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 기도 염증의 감소가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 기도 염증을 감소시키는 방법으로서, 이때 상기 환자가 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 악화를 갖는 환자인 방법.

청구항 20

IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제하는 항체로서, COPD 악화를 치료하기 위한 항체.

청구항 21

IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하는 항체로서, COPD 악화를 치료하기 위한 항체.

청구항 22

IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법으로서, 이때 상기 환자가 인간 리노바이러스(rhinovirus)에 의해 유발된 기도 염증으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자인 방법.

청구항 23

IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법으로서, 이때 상기 환자가 바이러스 또는 세균 감염으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자인 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 기도 염증의 감소가 COPD 악화를 치료하는 방법의 일부인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 기도 염증의 감소가 폐 내로의 호중구 유입의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제20항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, COPD 악화의 치료가 기도 염증의 감소를 포함하는 것인 방법 또는 항체.

청구항 27

제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, COPD 악화의 치료가 폐 내로의 호중구 유입의 감소를 포함하는 것인 방법 또는 항체.

청구항 28

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 약 25 킬로달톤 이상의 분자량을 갖는 것인 방법 또는 항체.

청구항 29

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 약 150 킬로달톤의 분자량을 갖는 것인 방법 또는 항체.

청구항 30

제20항 및 제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 IL-1 α 및 IL-1 β 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제하는 것인 방법 또는 항체.

청구항 31

제20항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 인간 항체인 방법 또는 항체.

청구항 32

제20항 및 제22항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 인간 IL-1R1에 특이적으로 결합할 수 있는 재조합 항체인 방법 또는 항체.

청구항 33

제20항 및 제22항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 비인간 영장류의 하나 이상의 종으로부터의 IL-1R1에 특이적으로 결합할 수 있는 재조합 항체인 방법 또는 항체.

청구항 34

제20항 및 제22항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 뮤린(murine) IL-1R1에 특이적으로 결합하지 않는 것인 방법 또는 항체.

청구항 35

제20항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, COPD를 치료하기 위한 치료 요법의 일부인 방법 또는 항체.

청구항 36

제35항에 있어서, COPD를 치료하기 위한 치료 요법이 스테로이드의 투여를 포함하는 것인 방법 또는 항체.

청구항 37

제20항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, COPD 악화가 세균 감염, 바이러스 감염 또는 이들의 조합에 의해 야기되는 것인 방법 또는 항체.

청구항 38

제20항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 COPD 악화 전에 GOLD 단계 III 또는 GOLD 단계 IV로서 분류된 COPD를 갖는 것인 방법 또는 항체.

청구항 39

제20항 및 제22항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 비아코어™에 의해 측정될 때 50 pM 이하의 K_D 로 IL-1R1에 특이적으로 결합하는 것인 방법 또는 항체.

청구항 40

제20항 및 제22항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 항체가 항체 6, 또는 항체 6의 CDR을 갖는 항체인 방법 또는 항체.

청구항 41

제20항 및 제22항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 항체가 IL-1R1과의 결합에 대해 IL-1 수용체 길항체(IL-1Ra)와 경쟁하는 것인 방법 또는 항체.

청구항 42

제20항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 전신 투여인 방법 또는 항체.

청구항 43

제20항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 상기 조성물의 비강내 투여를 포함하지 않는 것인 방법 또는 항체.

청구항 44

제20항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 상기 조성물의 비강내 투여를 포함하지 않고 상기 조성물의 다른 형태의 폐 국소 투여를 포함하지 않는 것인 방법 또는 항체.

청구항 45

IL-1R1 또는 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1 또는 IL-1 α 를 억제하는 항체로서, 바이러스 또는 세균 감염으로 인한 COPD 악화를 치료하기 위한 항체.

명세서

기술분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호참조

[0002]

본원은 미국 특허법 제119조 제e항(35 U.S.C. § 119(e)) 하에서 2010년 4월 16일자로 출원된 미국 가출원 제61/325,241호 및 2010년 11월 22일자로 출원된 미국 가출원 제61/416,102호(이들 각각의 개시내용은 전체적으로 본원에 참고로 도입됨)의 이익을 주장한다.

[0003]

서열목록에 대한 참조

[0004]

본원은 EFS-웹을 통해 ASCII 형식으로 제출되었고 전체적으로 본원에 참고로 도입되는 서열목록을 포함한다. 2011년 4월 18일자로 생성된 상기 ASCII 사본의 파일명은 MED562PC.txt이고 상기 사본의 크기는 21,079 바이트이다.

[0005]

본 발명의 기술분야

[0006]

본 발명은 항-IL-1R1 및 항-IL-1 α 길항체, 예컨대, 항체를 사용하여 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 악화를 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007]

COPD는 심각한 증가하는 세계적인 건강 문제를 대표한다. 2020년까지, COPD는 전세계적으로 가장 흔한 사망 원인 중 6번째(현재) 사망 원인에서 3번째 사망 원인까지 증가될 것이다. 영국에서, COPD는 현재 매년 30,000명의 사망의 원인인 반면, 미국에서, COPD는 매년 최대 120,000명의 사망의 원인인 것으로 생각된다(Lopez & Murray 1998). 임상적으로, COPD는 2종의 주요 병리학적 양상(presentation)(이들 둘다의 양태가 종종 동일한 환자에서 관찰될 수 있음)를 포함하는 이중 질환이다: 소기도의 섬유증 및 폐쇄를 갖는 만성 폐쇄성 기관지염, 및 폐 실

질의 공기공간의 확장 및 파괴, 폐 탄력성의 상실 및 소기도의 폐쇄를 갖는 폐기종(Barnes 2004).

[0008] COPD의 악화는 환자에 대한 그의 연장된 유해 효과, 질환 진행의 가속화 및 높은 건강관리 비용의 관점에서 매우 중요하다(Wedzicha & Donaldson 2003).

[0009] 인터루킨(IL)-1은 면역 매개 질환 및 감염 동안 염증 반응에 있어서 주요한 역할을 수행하는 다기능성 사이토카인이다. IL-1은 세균 생성물, 바이러스, 사이토카인 또는 면역 복합체에 의한 자극 후에 다양한 유형의 세포로부터 생성된다. IL-1은 다양한 유형의 세포에 대한 자가분비 활성 및 측분비 활성을 나타내어 염증 매개자, 예컨대, 프로스타글란딘, 산화질소, 사이토카인, 케모카인, 금속단백질분해효소(metalloproteinase) 및 부착 분자의 생성을 촉진하다.

발명의 내용

[0010] COPD 악화는 COPD 환자에 대한 심각한 합병증이다. COPD의 악화(COPD 악화)에 대한 치료가 필요하다. 이 상이한 환자(악화를 갖는 환자 또는 악화의 기간 동안의 환자) 하위셋(subset)은 상당한 질환 진행의 증가된 위험을 포함하는, COPD와 관련된 증가된 이환율 및 사망률을 갖는다. 이에 대한 약제의 한 부류는 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 및 임의적으로 IL-1 β 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제하는 약제이다. 상기 약제의 또 다른 부류는 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하는 약제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 약제는 길항제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 약제는 항체 또는 항체 단편이다.

[0011] 본 개시내용은 COPD 악화를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 기도 염증의 감소가 필요한 환자에서 기도 염증을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 폐 기능의 증가가 필요한 환자에서 폐 기능을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0012] 제1 양태에서, 본 개시내용은 기도 염증의 감소가 필요한 환자에서 기도 염증을 감소시키는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 악화를 갖는 환자이다. 상기 방법은 IL-1R1에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 상기 환자는 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1 β 에 대한 IL-1R1의 결합도 억제한다.

[0013] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 악화의 치료가 필요한 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 IL-1R1에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 상기 항체는 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1 β 에 대한 IL-1R1의 결합도 억제한다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 항체는 인간 리노바이러스(rhinovirus)에 의해 유발된 기도 염증으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. 상기 방법은 IL-1R1에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 상기 항체는 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1 β 에 대한 IL-1R1의 결합도 억제한다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 바이러스 감염으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. 상기 방법은 IL-1R1에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 상기 항체는 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1 β 에 대한 IL-1R1의 결합도 억제한다.

[0016] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 세균 감염으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. 상기 방법은 IL-1R1에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 상기 항체는 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1 β 에 대한 IL-1R1의 결합도 억제한다.

[0017] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 IL-1 α 신호전달의 감소가 필요한 환자에서 IL-1 α 신호전달을 감소시키는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 악화를 갖는 환자이다. 상기 방법은 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0018] 치료 방법은 단회 투여량의 투여뿐만 아니라 치료 일정에 따라 1회 초과의 투여량의 투여도 포함한다.
- [0019] 하기 나열된 다양한 특징들은 본 개시내용의 상기 또는 하기 양태(및 실시양태) 중 임의의 양태(및 실시양태)에 적용된다. 일부 실시양태에서, 기도 염증의 감소는 COPD 악화를 치료하는 방법의 일부이다. 일부 실시양태에서, 기도 염증의 감소는 폐 내로의 호중구 유입의 감소를 포함한다. 일부 실시양태에서, COPD 악화의 치료는 기도 염증의 감소를 포함한다. 일부 실시양태에서, COPD 악화의 치료는 폐 내로의 호중구 유입의 감소를 포함한다.
- [0020] 일부 실시양태에서, 항체는 약 25 킬로달톤 이상의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 약 150 킬로달톤의 분자량을 갖는다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1 α 및 IL-1 β 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제한다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 IL-1R1에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 비인간 영장류의 하나 이상의 종으로부터의 IL-1R1에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 뮤린(murine) 또는 설치류 IL-1R1에 특이적으로 결합하지 않는다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 COPD를 치료하기 위한 치료 요법(therapeutic regimen)의 일부이다. 일부 실시양태에서, COPD를 치료하기 위한 상기 치료 요법은 스테로이드의 투여를 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, COPD 악화는 세균 감염, 바이러스 감염 또는 이들의 조합에 의해 야기된다. 일부 실시양태에서, 상기 환자는 COPD 악화 전에 GOLD 단계 III 또는 GOLD 단계 IV로서 분류된 COPD를 갖는다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 비아코어(Biacore)TM에 의해 측정될 때 50 pM 이하의 K_D 로 IL-1R1에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 비아코어TM에 의해 측정될 때 300 pM 이하의 K_D 로 IL-1R1에 특이적으로 결합한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1R1과의 결합에 대해 IL-1Ra와 경쟁한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 투여는 전신 투여이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 조성물의 비강내 투여를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 조성물의 비강내 투여를 포함하지 않고 상기 조성물의 다른 형태의 폐 국소 투여를 포함하지 않는다. 일부 다른 실시양태에서, 길항체는 2종의 상이한 투여 경로를 통해 투여된다. 이러한 투여는 동일한 시간 또는 상이한 시간에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 길항체는 전신으로(예컨대, 정맥내로) 및 비강내로 투여된다. 다른 실시양태에서, 길항체는 전신 경로 및 폐로의 국소화된 전달 경로를 통해 투여된다.
- [0028] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 기도 염증의 감소가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 기도 염증을 감소시키는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 악화를 갖는 환자이다. 유사하게, IL-1 α 길항체의 투여가 고려된다.
- [0029] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 악화의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 인간 리노바이러스에 의해 유발된 기도 염증으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. 유사하게, IL-1 α 길항체의 투여가 고려된다.
- [0030] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 바이러스 감염으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. 유사하게, IL-1 α 길항체의 투여가 고려된다.
- [0031] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 바이러스 감염으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. 유사하게, IL-1 α 길항체의 투여가 고려된다.
- [0032] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 세균 감염으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. 유

사하게, IL-1 α 길항제의 투여가 고려된다.

- [0033] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 IL-1 α 신호전달의 감소가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 IL-1 α 신호전달을 감소시키는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD) 악화를 갖는 환자이다. 유사하게, IL-1 α 길항제의 투여가 고려된다.
- [0034] 치료 방법은 단회 투여량의 투여뿐만 아니라 치료 일정에 따라 1회 초과의 투여량의 투여도 포함한다.
- [0035] 하기 나열된 다양한 특징들은 본 개시내용의 상기 또는 하기 양태(및 실시양태) 중 임의의 양태(및 실시양태)에 적용된다. 일부 실시양태에서, 기도 염증의 감소는 COPD 악화를 치료하는 방법의 일부이다. 일부 실시양태에서, 기도 염증의 감소는 폐 내로의 호중구 유입의 감소를 포함한다. 일부 실시양태에서, COPD 악화의 치료는 기도 염증의 감소를 포함한다. 일부 실시양태에서, COPD 악화의 치료는 폐 내로의 호중구 유입의 감소를 포함한다.
- [0036] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 약 25 킬로달톤 이상의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 약 150 킬로달톤의 분자량을 갖는다.
- [0037] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 IL-1 α 에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 비인간 영장류의 하나 이상의 종으로부터의 IL-1 α 에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 뮤린 IL-1 α 에 특이적으로 결합하지 않는다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 COPD를 치료하기 위한 치료 요법의 일부이다. 일부 실시양태에서, COPD를 치료하기 위한 상기 치료 요법은 스테로이드의 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, COPD 악화는 세균 감염, 바이러스 감염 또는 이들의 조합에 의해 야기된다. 일부 실시양태에서, 상기 환자는 COPD 악화 전에 GOLD 단계 III 또는 GOLD 단계 IV로서 분류된 COPD를 갖는다.
- [0039] 일부 실시양태에서, 투여는 전신 투여이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 조성물의 비강내 투여를 포함하지 않고 상기 조성물의 다른 형태의 폐 국소 투여 형태를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 조성물의 비강내 투여를 포함하지 않는다. 일부 다른 실시양태에서, 길항제는 2종의 상이한 투여 경로를 통해 투여된다. 이러한 투여는 동일한 시간 또는 상이한 시간에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 길항제는 전신적으로(예컨대, 정맥내로) 및 비강내로 투여된다. 다른 실시양태에서, 길항제는 전신 경로 및 폐로의 국소화된 전달 경로를 통해 투여된다.
- [0040] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 인간 리노바이러스에 의해 유발된 기도 염증으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. 상기 방법은 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1R1을 억제하는 IL-1R1의 길항제를 포함하는 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-1R1의 길항제는 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1R1과 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 의 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, 길항작용은 본원에 기재된 임의의 분석을 이용함으로써 평가된다.
- [0041] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 바이러스 감염으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. 상기 방법은 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1R1을 억제하는 IL-1R1의 길항제를 포함하는 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-1R1의 길항제는 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1R1과 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 의 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, 길항작용은 본원에 기재된 임의의 분석을 이용함으로써 평가된다.
- [0042] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상기 환자는 세균 감염으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. 상기 방법은 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1R1을 억제하는 IL-1R1의 길항제를 포함하는 조성물의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-1R1의 길항제는 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1R1과 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 의 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, 길항작용은 본원에 기재된 임의의 분석을 이용함으로써 평가된다.
- [0043] 치료 방법은 단회 투여량의 투여뿐만 아니라 치료 일정에 따라 1회 초과의 투여량의 투여도 포함한다.
- [0044] 하기 나열된 다양한 실시양태들은 본 개시내용의 상기 또는 하기 양태(및 실시양태) 중 임의의 양태(및 실시양태)에 적용된다. 일부 실시양태에서, 상기 길항제는 인간 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 인간 IL-1R1을 억제한다.

- [0045] 일부 실시양태에서, IL-1R1의 길항제는 IL-1R1 및 IL-1Ra에 특이적으로 결합하는 인간 항체로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, IL-1R1의 길항제는 재조합 IL-1Ra이다. 일부 실시양태에서, 상기 길항제는 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1a에 대한 IL-1R1의 결합을 억제한다.
- [0046] 일부 실시양태에서, COPD 악화의 치료는 기도 염증의 감소를 포함한다. 일부 실시양태에서, COPD 악화의 치료는 폐 내로의 호중구 유입의 감소를 포함한다.
- [0047] 일부 실시양태에서, 상기 길항제는 약 25 킬로달톤 이상의 분자량을 갖는다.
- [0048] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 COPD를 치료하기 위한 치료 요법의 일부이다. 일부 실시양태에서, COPD를 치료하기 위한 상기 치료 요법은 스테로이드의 투여를 포함한다.
- [0049] 일부 실시양태에서, 상기 길항제는 IL-1R1과의 결합에 대해 IL-1Ra와 경쟁한다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 투여는 전신 투여이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 조성물의 비강내 투여를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 조성물의 비강내 투여를 포함하지 않고 상기 조성물의 다른 형태의 폐 국소 투여 형태를 포함하지 않는다. 일부 다른 실시양태에서, 길항제는 2종의 상이한 투여 경로를 통해 투여된다. 이러한 투여는 동일한 시간 또는 상이한 시간에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 길항제는 전신으로(예컨대, 정맥내로) 및 비강내로 투여된다. 다른 실시양태에서, 길항제는 전신 경로 및 폐로의 국소화된 전달 경로를 통해 투여된다.
- [0051] 일부 실시양태에서, 상기 환자는 COPD 악화 전에 GOLD 단계 III 또는 GOLD 단계 IV로서 분류된 COPD를 갖는다.
- [0052] 본 개시내용은 상기 양태들 및 실시양태들 중 임의의 양태 및 실시양태의 모든 조합뿐만 아니라 상세한 설명 및 실시예에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태와의 조합도 고려한다.

도면의 간단한 설명

표 및 도면의 간단한 설명

도 1은 IL-1 β 활성이 시험관내 및 생체내 IL-1R1 차단에 의해 억제된다는 것을 보여준다. 도 1a는 시험관내에서 일차 인간 COPD 폐 섬유아세포에서 IL-1 β 에 의해 유도된 IL-6 방출의 항체 6 억제를 보여준다. 도 1b는 아나킨라(Anakinra)가 마우스 폐에서 IL-1 β 에 의해 유도된 호중구 매개 염증을 억제한다는 것을 보여준다. 나타낸 데이터는 IL-1 β +/- 항체 처리를 이용한 기관내 챌린지(challenge)로부터 4시간 후에 기관지폐포 세척물(BAL)로부터 정량된 총 호중구 수이다.

도 2는 담배 연기에 의해 유도된 폐 염증 모델을 보여주는 개략도이다.

도 3은 IL-1 β 차단이 담배 연기에 의해 유도된 폐 염증을 억제한다는 것을 보여준다. 연구에서 다양한 군, 즉 실내 공기 또는 궤련 연기(CS) 챌린지를 받은 식염수 대조군; 궤련 연기 챌린지를 받은 이소타입 대조군(MAB005); 궤련 연기 챌린지를 받은 IL-1R1 항체(35F5) 처리군; 또는 궤련 연기 챌린지를 받은 아나킨라(알젯(ALZET) 삼투 펌프) 처리군에 대해 개략도에서 표시된 연구 종점에서 기관지폐포 세척물(BAL)로부터 정량된 총 세포, 호중구, 대식세포 및 림프구를 보여주는 4개의 폐널이 존재한다.

도 4는 IL-1R1에 의존하고 카스파제(caspase)-1에 의존하지 않는 호중구 염증 반응을 유도하는 궤련 노출의 모델에서 IL-1a 및 IL-1 β 가 발현된다는 것을 보여준다. (a) 실내 공기에 노출된 마우스 및 연기에 노출된 마우스에서 IL-1a 및 IL-1 β 의 발현을 보여주는 대표적인 이미지. 삽입도는 간질(interstitial) 공간으로부터의 대식세포를 나타낸다. IL-1a 단백질의 총 수준(b) 및 IL-1 β 단백질의 총 수준(c)을 실내 공기에 노출된 동물 및 연기에 노출된 동물의 폐 균질화물로부터 ELISA로 측정하였다(n = 군당 5마리의 마우스). 야생형 마우스 및 IL-1R1 결핍 마우스(d 내지 f)(n = 군당 5마리의 마우스) 또는 카스파제-1 결핍 마우스(g 내지 i)(n = 군당 3마리 내지 6마리의 마우스)를 실내 공기 또는 궤련 연기에 노출시켰다. 총 세포(d 및 g), 단핵구(e 및 h) 및 호중구(f 및 i)를 실내 공기에 노출된 마우스 및 연기에 노출된 마우스의 기관지폐포 세척물(BAL)에서 평가하였다. IL-1a 단백질의 총 수준(j) 및 IL-1 β 단백질의 총 수준(k)을 실내 공기에 노출된 야생형 마우스 및 카스파제-1 결핍 마우스, 및 연기에 노출된 야생형 마우스 및 카스파제-1 결핍 마우스(n = 군당 4마리 내지 6마리의 마우스)의 폐 균질화물로부터 ELISA로 측정하였다.

도 5는 항체에 의한 IL-1a의 차단(그러나, IL-1 β 는 차단되지 않았음)이 궤련 연기에 의해 유도된 염증을 억제한다는 것을 보여준다. 연기에 노출된 대조군 마우스 및 실내 공기에 노출된 대조군 마우스는 비처리된 상태로

남아있거나(Rx 부재), 이소타입 항체(IgG 이소타입), 또는 항-IL-1 α 또는 항-IL-1 β 차단 항체를 투여받았다. (a) 호중구 수를 기관지폐포 세척물(BAL)에서 세었다($n =$ 군당 4마리 또는 5마리의 마우스). 비처리 실내 공기 대조군 동물($n =$ 군당 5마리의 마우스)에 비해 상대적인 *cxc1-1*(b) 및 *i1-1* β (d), 또는 *cxc1-2*, *cxc1-10* 또는 *cxc1-5*(f) 전사체의 발현을 플루이디움(fluidigm) 어레이로 평가하였고, CXCL-1(c) 및 IL-1 β (e)의 총 단백질 수준을 메소 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery)(MSD) 기술을 이용하여 측정하였다($n =$ 군당 10마리의 마우스).

도 6은 연기에 노출된 마우스에서 IL-1R1의 발현 패턴이 COPD 환자의 발현 패턴을 반영하고 연기에 의해 유도된 염증을 위해 내방사성(radio-resistant) 비조혈세포 상에서 요구된다는 것을 보여준다. (a) 실내 공기에 노출된 마우스 및 연기에 노출된 마우스로부터의 대표적인 이미지에서의 IL-1R1 발현. (b) GOLD III COPD 환자로부터 수득된 폐 생검에서 평가된 IL-1R1의 발현을 보여주는 대표적인 이미지. (c) (수용자 유전형 내로의 골수 공여자 유전형으로서 코딩된) 다양한 키메라 마우스를 발생시켰다. (d) 호중구를 실내 공기 또는 궤련 연기에 노출된 골수 키메라 마우스의 기관지폐포 세척물(BAL)로부터 세었다($n =$ 군당 5마리 내지 7마리의 마우스). *cxc1-1*(e), *gm-csf*(f) 및 *mmp-12*(g)의 발현을 플루이디움 어레이로 측정하였다($n =$ 군당 6마리 내지 8마리의 마우스).

도 7은 IL-1R 길항제가 급성 폐 염증의 뮤린 흡입 LPS 모델에서 폐 내로의 LPS 매개 염증세포 유입을 억제한다는 것을 보여준다. 흡입 챠린지로부터 48시간 후에 연구 종점에서 BAL로부터 정량된 총 세포, 호중구, 대식세포 및 림프구를 보여주는 4개의 패널이 존재한다. 비처리(무처리), 비히클 또는 아나킨라(알怯 펌프를 통합), 및 식염수 또는 LPS 흡입 챠린지를 제공받은 동물의 군에 대한 데이터가 제시되어 있다.

도 8은 IL-1R1 차단이 시험관내에서 인간 리노바이러스(HRV)에 의해 유도된 염증을 감소시킨다는 것을 보여준다. 도 8a는 BEAS-2b/H292(상피세포주) 세포의 HRV14 감염 및 IL-1R1 길항제 처리에 대한 연구 프로토콜을 보여준다. 도 8b는 BEAS-2b/H292 세포의 HRV14 의존적 IL-8 방출에 대한 IL-1R1 길항제 처리의 효과를 보여준다. 도 8c는 BEAS-2b 세포의 HRV14 감염 및 IL-1R1 길항제 처리에 대한 대안적인 연구 디자인을 보여준다. 도 8d는 이 프로토콜을 이용한 경우 HRV에 의해 유도된 BEAS-2B 세포의 IL-8 방출을 감소시키는 아나킨라의 투여량 범위를 보여준다. 도 8e는 이소타입 대조군 항체를 사용한 경우 관찰된 효과 부재와 비교되었을 때 일차 정상 인간 기관지 상피세포(NHBE 세포)에서 HRV14에 대한 IL-8 반응을 감소시키는 아나킨라 및 IL-1R1 항체의 효능을 보여준다.

도 9는 IL-1R1 항체가 리노바이러스에 의해 유도된 급성 폐 염증의 마우스 모델에서 바이러스에 의해 유도된 염증을 감소시킨다는 것을 보여준다. 나타낸 군들을 나타낸 투여량으로 인산염 완충 식염수(PBS), 이소타입 대조군 항체(MAB005) 또는 항-IL-1R1 항체(35F5)로 복강내로 또는 비강내로 처리하고 PBS, HRV-1b 또는 UV 조사된 HRV1b(UV-HRV1b)로 비강내로 처리한다. 측정된 세포는 HRV 또는 식염수 투여로부터 24시간 후에 연구 종점에서 BAL로부터 정량된 총 세포이다. 항체 또는 식염수를 HRV 투여로부터 24시간 전에 투여하였다.

도 10은 연기, 연기 + 바이러스, 또는 연기 및 바이러스 모사체(mimic)에 의해 유도된 염증에 대한 IL-1R1 수용체 차단 또는 결핍의 영향을 보여준다. 도 10a는 BEAS-2B 세포에서의 연기 + IL-1R1 길항제 연구 디자인을 보여준다. 도 10b는 연기에 의해 유도된 IL-8 방출에 대한 아나킨라의 투여량 의존적 효과를 보여준다. 도 10c는 BEAS-2B 세포에서의 연기 + 바이러스 + IL-1R 길항제(아나킨라) 연구 디자인을 보여준다. 도 10d는 아나킨라가 연기 및 바이러스 둘다를 염증 자극으로서 사용하였을 때 관찰된 증가된 IL-8 방출을 억제한다는 것을 보여준다. 도 10e는 연기에 노출된 정밀 절단 폐 슬라이스(PCLS)에서의 IL-1R1 결핍이 바이러스 자극에 대한 폐 정주(resident) 반응을 약화시킨다는 것을 보여준다. 실내 공기 또는 궤련 연기에 노출된 야생형 동물 및 IL-1R1 결핍 동물로부터 발생된 PCLS를 생체외에서 바이러스 모사체인 폴리I:C로 자극하였다. 실내 공기 대조군 모의물(mock)에 의해 자극된 PCLS(데이터는 나타내지 않음)에 비해 상대적인 *cxc1-1*(패널 10e에서 가장 좌측 그래프), *cxc1-2*(패널 10e에서 중심 그래프) 및 *cxc1-5*(패널 10e에서 가장 우측 그래프)의 발현을 실시간 정량 RT-PCR로 평가하였다($n =$ 3회의 독립적인 실험으로부터 7개 내지 14개의 폐 슬라이스).

도 11은 IL-1R1 결핍 및 IL-1 α 항체 차단이 연기에 노출된 마우스의 H1N1 인플루엔자 바이러스 감염 모델에서 악화된 염증을 약화시킨다는 것을 보여준다. (a 내지 c) 실내 공기 또는 연기에 노출된 야생형 마우스 또는 IL-1R1 결핍 마우스는 비히클을 주입받았거나 H1N1 인플루엔자 A 바이러스에 감염되었다. 감염으로부터 5일 후, 총 세포 수(a), 단핵구(b) 및 호중구(c) 수를 기관지폐포 세척물(BAL)($n =$ 군당 19마리 또는 20마리의 마우스)로부터 세었다. (d 및 f) 이소타입 또는 IL-1 α 차단 항체로 매일 처리된, 실내 공기에 노출된 야생형 마우스 및 연기에 노출된 야생형 마우스는 비히클을 주입받았거나 H1N1 인플루엔자 A 바이러스에 감염되었다. 감염으로부터

5일 후, 총 세포 수(d), 단핵구(e) 및 호중구(f) 수를 BAL에서 세었다(n = 군당 4마리 또는 5마리의 마우스).

도 12는 COPD의 악화 동안 COPD 환자에서 IL-1 α 및 IL-1 β 수준을 보여준다. 패널 A는 질환의 안정 또는 악화 기간 동안 객담 측정에 의한 COPD 환자의 IL-1 α 및 IL-1 β 수준을 보여준다. 청색 막대 - 악화 기간; 적색 선 - IL-1 α ; 및 녹색 선 - IL-1 β . 패널 B는 증가된 IL-1 β 수준이 COPD 폐 내의 세균 존재와 관련되어 있다는 것을 보여준다.

도 13은 IL-1 α 및 IL-1 β 가 COPD 환자의 폐에서 증가된다는 것을 보여준다. GOLD 단계 I/II COPD 환자로부터 수득된 폐 생검에서 평가된 IL-1 α (a) 및 IL-1 β (b)의 발현을 보여주는 대표적인 이미지. (c) 양성 세포를 각각의 환자로부터 수득된 2개의 생검 샘플로부터 세었다(n = 5명의 비-COPD GOLD 단계 I-II 환자, 및 n = 9명의 COPD GOLD 단계 I-II 환자). 동일한 환자의 다중 샘플링을 고려하기 위해 (분산에 대해 조절된) 음이항(negative binomial)을 갖는 일반화된 선형 혼합 효과 모델을 이용하여 통계학적 유의성을 측정하였다. 상자그림의 음영은 1 내지 99 백분위수를 나타낸다. 동일한 생검 샘플로부터의 폐 절편을 상피에서의 IL-1 α (d) 및 IL-1 β (e) 염색에 대해 다음과 같이 점수화하였다: 0, 염색 부재; 1, 가끔 염색; 2, 현저한 국소 염색; 3, 현저한 확산 염색. 총화 월록손 랭크섬(stratified Wilcoxon Ranksum) 검정을 이용하여 염색 카테고리(0, 1, 2 및 3)의 빈도를 비교하였고 그래프로 나타내었다(블록의 크기는 빈도에 비례함). 비-COPD 샘플과 COPD 샘플 사이에 IL-1 α 상피 염색의 유의한 차이는 없었으나, IL-1 β 염색은 COPD 샘플과 비-COPD 샘플 사이에 유의하게 상이하였다(p<0.0001). IL-1 α 및 IL-1 β 의 수준을 질환의 안정 기간 동안(f), 악화의 개시 시점에서(g), 및 악화 후 7일째 날(h) 및 35일째 날(i)에서 등록 환자로부터 수득된 객담 샘플에서 측정하였다. IL-1 α 수준과 IL-1 β 수준은 모든 방문 시점에서 유의한 상관관계를 가졌다.

표 1a는 항체 1 내지 3 각각의 CDR에 대한 아미노산 서열을 나열한다. 표 1a는 기재된 순서대로 각각 서열번호 2 및 3, 11, 2 및 3, 12, 2 및 3, 13 내지 15, 14 및 15, 및 14 내지 18을 개시한다.

표 1b는 항체 4 내지 10 각각의 CDR에 대한 아미노산 서열을 나열한다. 표 1b는 기재된 순서대로 각각 서열번호 2 및 3, 19, 2 및 3, 20, 2 내지 4, 2 및 3, 21, 2 및 3, 22, 2 및 3, 23, 2 및 3, 24, 6 및 7, 25 및 26, 8, 및 27 내지 30을 개시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054]

(i) 도입

[0055]

염증은 COPD 악화 동안 증가하는(악화의 기간 동안 증가하는) COPD의 특징으로서 잘 확립되어 있다. 그러나, 이를 염증 반응을 유도하는 분자 기작은 잘 이해되어 있지 않다. 기도 염증을 감소시키는 방법 및 COPD 악화를 치료하는 방법이 본원에 개시되어 있다. 구체적으로, 상기 방법들은 IL-1R에 결합하여 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 를 억제하는 항체를 사용하는 단계를 포함한다. 기도 염증의 감소는 전구염증 매개자 및 부산물(예를 들면, 사이토카인 또는 염증세포의 유입)의 감소를 측정함으로써 미시적 수준에서 측정될 수 있거나, 세계 만성 폐쇄성 폐질환 기구(GOLD)에 의한 COPD 중증도의 5 단계 분류에 의해 카테고리화된 바와 같이 증가된 폐 기능에 의해 거시적 수준에서 측정될 수 있다.

[0056]

평활근의 비대, 기도 조직의 만성 염증 및 기도벽의 모든 부분의 일반적인 비후는 COPD를 갖는 환자에서 기도 직경을 감소시킬 수 있다. 또한, 기도를 둘러싼 조직의 염증 및 부종이 기도의 직경을 감소시킬 수 있다. 기도벽 내의 조직에 의해 방출된 염증 매개자는 기도 평활근 수축에 대한 자극제로서 작용할 수 있다. 염증 매개자의 생성 및 방출을 감소시키는 요법은 평활근 수축, 기도의 염증 및 부종을 감소시킬 수 있다. 염증 매개자의 예는 사이토카인, 케모카인 및 히스타민이다. 염증 매개자를 생성하고 방출시키는 조직은 기도 평활근, 상피 및 비만세포를 포함한다. 본원에 개시된 조성물 및 방법을 이용한 치료는 염증 매개자를 생성하거나 방출하는 기도 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 방출된 염증 매개자의 감소는 만성 염증뿐만 아니라 COPD 악화의 기간 동안 관찰된 급성 염증도 감소시켜 기도 내부 직경을 증가시킬 것이고 기도 평활근의 과반응을 감소시킬 수도 있다.

[0057]

사이토카인의 IL-1 과(family)는 11개의 개별 구성원으로 구성되고, 이를 중 4개의 구성원, 즉 IL-1 α , IL-1 β , IL-18 및 IL-1Ra(IL-1 수용체 길항제)는 보다 완전하게 특징규명되어 있고 다양한 질환에서 병리학적 과정과 관련되어 있다(참고문헌 1). IL-1은 2종의 상이한 형태, 즉 별개의 유전자의 생성물인 IL-1 α 및 IL-1 β 로 존재한다. 이를 단백질들은 아미노산 수준에서 관련되어 있는데, IL-1 α 와 IL-1 β 는 22%의 상동성을 공유하고, IL-1 α 와 IL-1Ra는 18%의 상동성을 공유한다. IL-1 β 는 IL-1Ra와 26%의 상동성을 공유한다. IL-1 α , IL-1 β 및 IL-1Ra에 대한 유전자들은 인간 염색체 2q14에서 유사한 영역 상에 위치한다(참고문헌 2 및 3).

- [0058] IL-1 α 및 IL-1 β 는 17 kDa의 성숙 IL-1 α 및 IL-1 β 를 발생시키도록 절단되는 31 kDa의 전구체 웨티드로서 합성된다. IL-1 β 는 상피세포 및 대식세포를 포함하는 다양한 유형의 세포에 의해 생성된다. IL-1 β 는 시스테인 단백질분해효소(protease) 카스파제-1(IL-1 β 전환 효소(ICE)(참고문헌 4))에 의한 절단 후에 세포로부터 방출된다. IL-1 α 는 칼파인(calpain) 단백질분해효소에 의해 절단되고 원형질막 상에서 유지될 수 있고, 상기 원형질막으로부터 직접적인 세포 대 세포 접착을 통해 세포를 활성화시키는 것으로 보인다(참고문헌 5). 전구-IL-1 α 는 다양한 세포 경로의 활성화를 유발할 수 있는 핵 편재화(localization) 서열을 그의 아미노 말단 내에 함유한다(참고문헌 6).
- [0059] IL-1Ra는 IL-1 시스템의 천연 발생 억제제이다. IL-1Ra는 선택적 mRNA 스플라이싱(alternative mRNA splicing) 및 선택적 번역 개시로부터 유도된 4종의 상이한 동형체(isoform)로서 생성된다. IL-1Ra의 17 kDa의 분비된 동형체는 22 kDa 내지 25 kDa의 가변적으로 글리코실화된 종(현재 sIL-1Ra로 지칭됨)으로서 발현된다(참고문헌 7 및 8). 18 kDa의 세포내 동형체는 icIL-1Ra1로 지칭된다(참고문헌 9). 동형체 icIL-1Ra2는 icIL-1Ra1과 sIL-1Ra 제1 엑손 사이에 위치된 엑손으로부터 선택적 전사 스플라이싱에 의해 생성된다(참고문헌 10). icIL-1Ra3으로 지칭되는 16 kDa의 제3 세포내 동형체도 확인되었다(참고문헌 11). 키네렛(KINERET)[®](아나킨라로도 공지되어 있음)은 인간 인터루킨-1 수용체 길항제(IL-1Ra)의 재조합 비글리코실화된 형태이다. 키네렛[®]은 그의 아미노 말단에서 단일 메티오닌 잔기의 부가를 갖는다는 점에서 천연 인간 IL-1Ra와 상이하다. 키네렛[®]은 153개의 아미노 산으로 구성되고 17.3 칼로달톤의 분자량을 갖는다. 키네렛[®]은 중등도 내지 중증 활성 류마티스 관절염의 치료용으로 승인되어 있다. 아나킨라(본원에서 아나킨라 및/또는 키네렛[®]으로 지칭됨)는 IL-1R1 신호전달을 길항하는 IL-1R1 길항제의 일례이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 IL-1R1 길항제, 예컨대, 아나킨라 또는 유사한 형태의 IL-1Ra를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0060] IL-1 α 및 IL-1 β 는 IL-1 수용체 과에 속하는 경막 수용체인 IL-1R1(인간 IL-R1의 경우 RefSeq NM_00877)에 결합함으로써 그들의 생물학적 효과를 발휘한다. IL-1 수용체 과의 3개 구성원, 즉 IL-1 수용체 1(IL-1R1(80 kDa), IL-1RII(68 kDa) 및 IL-1 수용체 보조 단백질(IL-1RacP)이 존재한다. IL-1R1 및 IL-1RacP는 세포막에서 복합체를 형성하여 IL-1 α 또는 IL-1 β 의 결합 시 신호전달을 할 수 있는 고친화성 수용체를 발생시킨다. IL-1Ra는 IL-1R1에 결합하나 IL-1RacP와 상호작용하지 않는다. IL-1 α , IL-1 β 및 IL-1Ra도 세포내 신호전달 도메인을 갖지 않는 IL-RII에 결합한다.
- [0061] IL-1R1은 리간드 결합 및 IL-1RacP와의 복합체 형성 시 신호 전달도입이 213개 아미노산 잔기로 구성된 그의 세포질 꼬리(tail)를 통해 개시되기 때문에 신호전달 수용체로 지칭된다(참고문헌 12). 현재 문헌은 IL-1RII가 가용성 형태로서 세포 표면 또는 세포외에서 "미끼(decoy) 수용체"로서만 작용한다고 암시한다(참고문헌 13). IL-1R1과 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 의 결합의 조절은 IL-1 신호전달을 조절하는 방법이다.
- [0062] IL-1 신호전달은 많은 만성 염증 질환들에서 중요한 역할을 수행한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 적어도 IL-1 α 와의 결합을 적어도 억제함으로써 IL-1R1 활성을 억제하는 IL-1R1 항체를 투여함으로써 (COPD 악화에 대한 치료의 일부로서) IL-1 신호전달을 억제하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1 β 에 대한 IL-1R1의 결합도 억제한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 IL-1R1 길항제(IL-1R1의 길항제)를 투여함으로써 (COPD 악화에 대한 치료의 일부로서) IL-1 신호전달을 억제하는 것을 포함한다. 상기 IL-1R1 항체는 IL-1R1의 이러한 길항제의 예이다. 다른 예로는 아나킨라 및 천연 발생 형태의 IL-1Ra가 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하는 IL-1 α 항체를 투여함으로써 (COPD 악화에 대한 치료의 일부로서) IL-1 신호전달을 억제하는 것을 포함한다.
- [0063] 이들 방법들, 및 이들 방법들에서 사용될 수 있는 조성물의 추가 특징은 본원에 기재되어 있다.
- [0064] (ii) 용어
- [0065] 본 개시내용을 더 상세히 계속 기재하기 전, 이 개시내용이 특정 조성물 또는 과정 단계로 한정되지 않는다는 것(이들은 변경될 수 있기 때문임)을 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 문맥이 달리 명시하지 않은 한, 단수형 지시대상은 복수형 지시대상을 포함한다는 것을 인식해야 한다.
- [0066] 달리 정의되어 있지 않은 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어들 및 과학 용어들은 이 개시내용과 관련된 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 예를 들면, 문헌(the

Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press); 문현(The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press); 및 문현(the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press)은 이 개시내용에서 사용된 용어들 중 대다수의 용어들의 일반적인 사전을 당업자에게 제공한다.

- [0067] 아미노산은 본원에서 그들의 통상적으로 공지된 3 문자 부호, 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명 협회에 의해 권장된 1 문자 부호에 의해 지칭될 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오티드는 그들의 통상적으로 허용된 1 문자 코드에 의해 지칭될 수 있다.
- [0068] 항체의 가변 도메인인 상보성 결정 영역(CDR) 및 골격 영역(FR) 내의 아미노산의 넘버링은, 달리 표시되어 있지 않은 한, 문현(Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))에 기재된 카바트(Kabat) 정의를 따른다. 이 넘버링 시스템을 이용하는 경우, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축에 상응하는 보다 적은 아미노산 또는 가변 도메인의 FR 또는 CDR 내로의 삽입에 상응하는 추가 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들면, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 산입(카바트에 따라 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기(예를 들면, 카바트에 따라 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 상동성 영역에서 주어진 항체의 서열을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 정렬함으로써 상기 항체에 대해 결정될 수 있다. 골격 잔기의 최대 정렬은 넘버링 시스템에서 Fv 영역을 위해 사용될 "스페이서(spacer)" 잔기의 삽입을 종종 필요로 한다. 또한, 임의의 주어진 카바트 부위 번호에서 일부 개별 잔기의 정체(identity)는 중간 또는 대립유전자 차이로 인해 항체 쇄마다 다를 수 있다.
- [0069] 본원에서 사용된 바와 같이, 면역글로불린으로도 공지되어 있는 용어 "항체" 및 "항체들"은 단일클론 항체(전장 단일클론 항체를 포함함), 다중클론 항체, 2개 이상의 상이한 에피토프 결합 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체(예를 들면, 이중특이적 항체), 인간 항체, 인간화된 항체, 낙타화된(camelised) 항체, 키메라 항체, 단일쇄 Fv(scFv), Fab 단편, F(ab')2 단편, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편(예를 들면, 항원 결합 부분), 이황화 결합에 의해 연결된 Fv(dsFv) 및 항-이디오타입(anti-idiotypic)(항-Id) 항체(예를 들면, 본 개시내용의 항체에 대한 항-Id 항체를 포함함), 인트라바디(intrabody), 및 상기 항체들 중 임의의 항체의 에피토프 결합 단편을 포함한다. 구체적으로, 항체는 면역글로불린 분자, 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 단편, 즉 하나 이상의 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함한다. 면역글로불린 분자는 임의의 이소타입(예를 들면, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 하위이소타입(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 동종이형(예를 들면, Gm, 예를 들면, G1m(f, z, a 또는 x), G2m(n), G3m(g, b 또는 c), Am, Em 및 Km(1, 2 또는 3))의 면역글로불린 분자일 수 있다. 항체는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 토끼, 개, 고양이, 마우스 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 포유동물, 또는 다른 동물, 예컨대, 조류(예를 들면, 닭)로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 그의 분자량에 기초하여 더 기재될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자량은 25 킬로달톤 이상이다. 일부 실시양태에서, 항체는 불변 영역을 포함하는 전장 항체이다.
- [0070] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "길항체"는 생물학적 활성을 억제하는 화합물을 지칭한다. 예를 들면, IL-1R1 길항체는 IL-1R1 신호전달의 길항체이다. 예를 들면, IL-1R1에 결합하여 IL-1R1을 통해 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 신호전달을 억제하는 화합물은 IL-1R1 길항체이다. 중화 항체, 예컨대, IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1R1과 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 의 결합을 억제하는 항체는 IL-1R1 길항체의 일례이다. IL-1Ra 화합물, 예컨대, 아나킨라는 IL-1R1 길항체의 또 다른 예이다. 일부 실시양태에서, 상기 길항체는 단백질일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 길항체는 비폴리펩티드 길항체, 예컨대, 핵산 또는 소분자일 수 있다.
- [0071] 항체는 (시험관내 경쟁 결합 분석에서 측정될 때) 과량의 항체가 수용체에 결합된 리간드의 양을 50%, 60% 또는 80% 이상, 보다 통상적으로 약 85% 초과의 수준까지 감소시킬 때 리간드와 수용체의 결합을 억제한다.
- [0072] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "기도"는 공기에 노출된 대상체의 호흡 시스템의 일부 또는 전부를 의미한다. 따라서, "기도"는 기관, 기관지, 세기관지, 말단 및 호흡 세기관지, 폐포관 및 폐포낭을 포함하나 이들로 한정되지 않는 상부 기도 통로 및 하부 기도 통로를 포함한다. 기도는 부비동, 비강 통로, 비강 점막 및 비강 상피를 포함한다. 기도는 인후, 후두, 기관기관지분지 및 편도를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0073] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1R1"은 인터루킨 1 수용체 1을 의미한다. 인간 IL-1R1의 핵산 서열 및 아미노산 서열은 공개적으로 입수 가능하다(RefSeq NM_000877). 몇몇 실시양태에서, IL-1R1은 인간 또는 사이노몰거스(cynomolgus) 원숭이 IL-1R1일 수 있다. 본원의 다른 부분에서 기재된 바와 같이, IL-1R1은 재조합 IL-1R1일 수 있고/있거나 글리코실화된 또는 비글리코실화된 IL-1R1일 수 있다.

- [0074] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1 α " 또는 "IL-1알파"는 인터루킨 1 α 를 의미한다. 인간 IL-1 α 의 핵산 서열 및 아미노산 서열은 공개적으로 입수 가능하다(RefSeq NM_000575.3). 몇몇 실시양태에서, IL-1 α 는 인간 또는 사이노몰거스 원숭이 IL-1 α 일 수 있다. 본원의 다른 부분에서 기재된 바와 같이, IL-1 α 는 재조합 IL-1 α 일 수 있고/있거나 글리코실화된 또는 비글리코실화된 IL-1 α 일 수 있다.
- [0075] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1 β " 또는 "IL-1베타"는 인터루킨 1 β 를 의미한다. 인간 IL-1 β 의 핵산 서열 및 아미노산 서열은 공개적으로 입수 가능하다(RefSeq NM_000576). 몇몇 실시양태에서, IL-1 β 는 인간 또는 사이노몰거스 원숭이 IL-1 β 일 수 있다. 본원의 다른 부분에서 기재된 바와 같이, IL-1 β 는 재조합 IL-1 β 일 수 있고/있거나 글리코실화된 또는 비글리코실화된 IL-1 β 일 수 있다.
- [0076] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "기하평균"(기하학적 평균으로도 공지되어 있음)은 기수 10으로 다시 전환된 데이터 셋의 대수 값의 평균을 의미한다. 이것은 2회 이상의 측정, 예를 들면, 2회 이상, 바람직하게는 5회 이상, 보다 바람직하게는 10회 이상의 반복측정이 존재할 것을 요구한다. 당업자는 반복측정의 횟수가 클수록 기하평균 값이 보다 더 정확해질 것임을 인식할 것이다. 반복측정 횟수의 선택은 당업자의 재량에 맡겨질 수 있다.
- [0077] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단일클론 항체"는 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터의 항체를 지칭한다. 용어 "mAb"는 단일클론 항체를 지칭한다.
- [0078] 본원에서 사용된 "및/또는"은 다른 특징 또는 구성요소와 함께 또는 다른 특징 또는 구성요소 없이 2개의 특정된 특징 또는 구성요소 각각이 구체적으로 개시된 것으로서 간주되어야 한다는 것을 편의상 여기서 지적한다. 예를 들면, "A 및/또는 B"는 (i) A, (ii) B 및 (iii) A 및 B 각각이 마치 본원에서 개별적으로 기재되어 있는 것처럼 이들 각각이 구체적으로 개시된 것으로서 간주되어야 한다.
- [0079] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "악화"는 환자의 기준 상태에 비해 상대적인 COPD 증상의 악화를 지칭한다. 일부 실시양태에서, COPD 악화는 상기 질환의 자연 경과에서 일어나는 사건으로서, 정상적인 일간(day-to-day) 변이를 초과하고 개시 시점에서 급성을 나타내고 근원적인 COPD를 갖는 환자에서 약물치료의 변화를 보증할 수 있는, 환자의 기준 폐 기능, 호흡곤란, 기침 및/또는 객담의 변화를 특징으로 하는 사건으로서 정의될 수 있다. 일부 실시양태에서, COPD의 악화는 호흡의 짧아짐 및/또는 천명 증상의 갑작스런 증가, 및/또는 화농 객담(고름을 함유하는 객담) 생성의 증가일 수 있다.
- [0080] (iii) 항체 및 길항체
- [0081] COPD 악화를 치료하는 본원에 개시된 방법은 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 결합하는 길항체 및/또는 항체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 길항체는 표적에 결합하여 표적을 억제하고 몇몇 경우 다른 리간드에 의한 결합을 방해하는 단백질, 핵산 또는 소분자일 수 있다.
- [0082] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 IL-1R1에 결합하여 IL-1R1을 억제하는 IL-1R1 항체이다 (본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 공보 제20040097712호 및 제20100221257호). 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1R1, 예컨대, 인간 IL-1R1에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1R1에 결합하여 IL-1R1과 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 의 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 항체 6이 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하거나 IL-1R1과의 결합에 대해 항체 6과 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IL-1R1과의 결합에 대해 IL-1Ra와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 IL-1R1과의 결합에 대해 IL-1Ra와 경쟁하지 않는다.
- [0083] 예를 들면, IL-1R1에 특이적으로 결합하는 예시적인 인간 항체가 본원에서 제공되어 있다. 이들 인간 항체에 대한 CDR의 아미노산 서열은 표 1a 및 1b에 기재되어 있다. 이들 항체들 중 한 항체(항체 6) 및 이의 생식세포주 유래 버전(germlined version)의 VH 및 VL의 아미노산 서열이 본원에서 제공되어 있다. IL-1R1에 특이적으로 결합하는 예시적인 설치류 항체는 비디 파밍겐(BD Pharmingen)/비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)로부터 상업적으로 입수 가능한 35F5 항체이다.
- [0084] 또 다른 실시양태에서, 예시적인 인간 항체는 미국 특허출원 공보 제20040097712호의 도 5, 6, 7, 8, 9, 10 및 11(이들 도면은 참고로 구체적으로 도입됨)에 개시된 26F5, 27F2 및 15C4를 포함하는, 미국 특허출원 공보 제20040097712호에 개시된 항체를 포함한다. 이들 항체들에 대한 아미노산 서열은 본원에서 제공되어 있다.
- [0085] IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 와의 결합을 억제하는 이들 항체들 및 다른 항체들은 본 방법에서 유용한 IL-1R1 항체의 예시적인 항체이다. 이러한 항체들도 IL-1R1 길항체의 예이다.

- [0086] 추가 예시적인 IL-1R1 길항제는 아나킨라 또는 다른 형태의 IL-1Ra를 포함한다.
- [0087] 본 개시내용의 방법에서 사용되기에 적합할 수 있는 IL-1R1 또는 IL-1 α 의 추가 길항제는 적어도 하기 국제 특허출원들에 개시되어 있다: 국제 특허출원 공보 제W02004/022718호; 제W02005/023872호; 제W02007/063311호; 제W02007/063308호; 제W02005/086695호; 제W01995/014780호 및 제W02006/059108호.
- [0088] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 화합물은 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제한다. 예시적인 화합물은 IL-1 α 에 특이적으로 결합하는 항체, 예컨대, 알 앤드 디 시스템스(R&D Systems)로부터 상업적으로 입수 가능한 항체 ALF161(카탈로그 번호 MAB4001)이다.
- [0089] 청구된 방법에서 사용되는 항체 및 길항제를 기술할 수 있는 예시적인 특징은 이하에 기재되어 있다.
- [0090] 또 다른 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 또는 길항제는 30 pM의 IL-1 β 의 존재 하에서 인간 전혈에서 IL-1 β 에 의해 유도된 IL-6 생성의 억제에 대해 1 nM 미만의 평균 IC₅₀을 나타낸다. 추가 실시양태에서, 평균 IC₅₀은 800 pM 미만, 700 pM 미만, 600 pM 미만, 500 pM 미만, 400 pM 미만, 300 pM 미만, 200 pM 미만 또는 100 pM 미만이다.
- [0091] 본 개시내용의 길항제(항체 또는 비항체 길항제)는 예를 들면, 높은 효능으로 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 결합하여 IL-1R1 또는 IL-1 α 를 중화시킨다. 중화는 IL-1R1 또는 IL-1 α 의 생물학적 활성의 억제를 의미한다. 본 개시내용의 길항제는 IL-1R1의 하나 이상의 생물학적 성질을 중화시킬 수 있고, 전형적으로 청구된 방법에서 사용되는 길항제는 IL-1 α 및 IL-1 β 와 IL-1R1의 결합을 억제한다.
- [0092] 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 길항제는 인간 IL-1R1에 특이적으로 결합하여 인간 IL-1R1을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 길항제는 인간 IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 인간 IL-1 α 를 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 길항제는 인간 이외의 종에서 천연적으로 발생하는 IL-1R1 또는 IL-1 α 오르토로그(ortholog)를 의미하는 비인간 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 결합하여 비인간 IL-1R1 또는 IL-1 α 를 중화시킬 수도 있다. 일부 실시양태에서, 비-인간 종은 비-인간 영장류의 하나 이상의 종, 예컨대, 사이노몰거스이다.
- [0093] 결합 특이성은 예를 들면, 표준 경쟁 분석에서 측정될 수 있거나 입증될 수 있다.
- [0094] IL-1R1 또는 IL-1 α 의 중화를 측정하기에 적합한 분석은 예를 들면, 리간드 수용체 생화학적 분석 및 표면 플라스몬 공명(SPR)(예를 들면, 비아코어™)을 포함한다.
- [0095] IL-1R1 또는 IL-1 α 항체 및 길항제의 결합 동역학 및 친화성(평형 해리 상수 K_D로서 표현됨)은 예를 들면, 표면 플라스몬 공명(예를 들면, 비아코어™)을 이용함으로써 측정될 수 있다. 본 개시내용의 항체 및 길항제는 정상적으로 IL-1R1 또는 IL-1 α , 예컨대, 인간 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 대해 약 1 nM 미만의 친화성(K_D)을 나타내고, 몇몇 실시양태에서 약 500 pM, 400 pM, 300 pM, 250 pM, 200 pM 또는 100 pM 미만의 K_D를 나타내고, 다른 실시양태에서 약 50 pM 미만의 K_D를 나타내고, 다른 실시양태에서 약 25 pM 미만의 K_D를 나타내고, 다른 실시양태에서 약 10 pM 미만의 K_D를 나타내고, 다른 실시양태에서 약 1 pM 미만의 K_D를 나타낸다.
- [0096] 다수의 방법이 항체 또는 길항제와 그의 항원의 결합 친화성을 측정하는 데에 이용가능하고, 이러한 한 방법이 KinExA이다. 동역학 배제 분석(KinExA)은 항원/항체 상호작용에 대한 평형 해리 상수, 및 결합 및 해리 속도 상수를 측정할 수 있는 범용 면역분석 플랫폼(기본적으로 유동 분광형 광계(flow spectrofluorimeter))이다. KinExA는 평형이 달성된 후에 수행되기 때문에, 상호작용의 해리 속도가 매우 느릴 수 있는 고친화성 상호작용의 K_D를 측정하기 위해 이용하는 유리한 기법이다. KinExA의 이용은 항체와 항원의 친화성이 표면 플라스몬 공명 분석에 의해 정확히 예측될 수 있는 친화성보다 더 높은 경우 특히 적합하다. KinExA 방법은 문헌(Drake et al (2004) Analytical Biochemistry 328, 35-43)에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다.
- [0097] 본 개시내용의 한 실시양태에서, 본 개시내용의 항체 또는 길항제는 KinExA 방법을 이용하여 측정하였을 때 300 pM 이하의 K_D로 IL-1R1에 대한 특이성을 나타낸다. 대안적으로, K_D는 200 pM 이하, 100 pM 이하, 50 pM 이하, 20 pM 이하, 10 pM 이하 또는 1 pM 이하이다.
- [0098] 생물학적 활성의 억제는 부분적 또는 전체적일 수 있다. 길항제는 IL-1R1 생물학적 활성, 예컨대, CYNOM-K1 세포에서 IL-1 β 에 의해 유도된 IL-8 방출 또는 HeLa 세포에서 IL-1 α 및 IL-1 β 에 의해 유도된 IL-8 방출을, 길항제의 부재 하에서의 최대 가능한 활성의 50% 또는 80%를 유도하는 농도의 IL-1 α 또는 IL-1 β 의 활성의 100%

까지, 또는 대안적으로 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 60% 이상 또는 50% 이상까지 억제할 수 있다. 길항제는 IL-1 α 의 생물학적 활성, 예컨대, HeLa 세포에서 IL-1 α 에 의해 유도된 IL-8 방출을, 길항제의 부재 하에서의 최대 가능한 활성의 50% 또는 80%를 유도하는 농도의 IL-1 α 의 활성의 100%까지, 또는 대안적으로 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 60% 이상 또는 50% 이상까지 억제할 수 있다.

[0099] 길항제의 중화 효능은, 달리 표시되어 있지 않은 한, 통상적으로 nM 단위의 IC₅₀ 값으로서 표현된다. 기능적 분석에서, IC₅₀은 생물학적 반응을 그의 최대치의 50%까지 감소시키는 길항제의 농도이다. 리간드 결합 연구에서, IC₅₀은 수용체 결합을 최대 특이적 결합 수준의 50%까지 감소시키는 농도이다. IC₅₀은 최대 생물학적 반응의 %를 길항제 농도의 log의 함수로서 작도하고 소프트웨어 프로그램, 예컨대, 프리즘(그래프패드 소프트웨어 인코포레이티드(GraphPad Software Inc.), 미국 캘리포니아주 라 졸라 소재)을 이용하여 S자형 함수를 데이터에 피팅하여 IC₅₀ 값을 발생시킴으로써 계산될 수 있다. 효능은 당업자에게 공지되어 있고/있거나 본원에 기재되어 있거나 언급되어 있는 하나 이상의 분석을 이용함으로써 확인될 수 있거나 측정될 수 있다. 길항제의 중화 효능은 기하평균으로서 표현될 수 있다.

[0100] 일부 실시양태에서, 길항제에 의한 IL-1R1 또는 IL-1 α 활성의 중화는 본원에 기재된 분석, 또는 길항제가 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 결합하여 IL-1R1 또는 IL-1 α 를 중화시킨다는 것을 표시하는 임의의 표준 분석을 이용함으로써 입증된다. 길항제와 IL-1R1 또는 IL-1 α 의 결합을 측정하는 데에 이용될 수 있는 다른 방법은 ELISA, 웨스턴 블로팅, 면역침전, 친화성 크로마토그래피 및 생화학적 분석을 포함한다.

[0101] 청구된 방법에서 사용되는 본 개시내용의 길항제는 다른 종의 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 대해서보다 인간 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 대해 유사한 또는 더 강한 친화성을 나타낼 수 있다. 인간 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 대한 길항제의 친화성은 사이노몰거스 원숭이 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 대한 길항제의 친화성과 유사할 수 있거나 이 친화성의 5배 또는 10배 이내에 있을 수 있다.

[0102] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 본 개시내용의 길항제는 골격 내에 하나 이상의 CDR, 예를 들면, "CDR 셋"을 포함하는 IL-1R1 결합 모티프를 포함한다. CDR 셋은 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 (이때, H는 중쇄를 지칭하고, L은 경쇄를 지칭함)으로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, CDR 셋은 임의적으로 표 1a 및 1b에 기재된 HCDR1, HCDR2, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3으로부터 선택된 하나 이상의 CDR과 조합된, 표 1a 및 1b에 기재된 HCDR3을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, CDR 셋은 임의적으로 HCDR1, HCDR2, LCDR1 및 LCDR2로부터 선택된 하나 이상의 CDR과 조합된, 표 1a 및 1b에 기재된 HCDR3 및 LCDR3을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, CDR 셋은 표 1a 및 1b에 기재된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

[0103] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 표 1a에 나타낸 CDR을 갖는 항체이다. 요약하건대, 표 1a에 나타낸 CDR 서열 셋을 갖는 인간 모 항체 문자가 단리되었다(항체 1 참조). 모 CDR 서열로부터 유래된 CDR 서열을 갖고 표 1a에 표시된 위치에서 변형을 갖는, 2 및 3으로 넘버링된 인간 항체 클론들의 패널이 최적화 과정을 통해 발생되었다. 따라서, 예를 들면, 항체 2는 모 HCDR1, HCDR2, LCDR1 및 LCDR2를 갖고, 카바트 잔기 100E가 T로 치환되어 있고, 카바트 잔기 100F가 V로 치환되어 있고, 카바트 잔기 100G가 D로 치환되어 있고, 카바트 잔기 100H가 A로 치환되어 있고, 카바트 잔기 100I가 A로 치환되어 있고, 카바트 잔기 101이 V로 치환되어 있고, 카바트 잔기 102가 D로 치환되어 있는 모 HCDR3 서열을 갖는다는 것을 표 1a로부터 알 수 있다.

[0104] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 표 1b에 나타낸 CDR을 갖는 항체이다. 요약하건대, 표 1b에 나타낸 CDR 서열 셋을 갖는 제2 모 인간 항체 문자가 단리되었다(항체 4 참조). 모 CDR 서열로부터 유래된 CDR 서열을 갖고 표 1b에 표시된 위치에서 변형을 갖는, 5 내지 10으로 넘버링된 인간 항체 클론들의 패널이 최적화 과정을 통해 발생되었다. 따라서, 예를 들면, 항체 5는 모 HCDR1, HCDR2, LCDR1 및 LCDR2를 갖고, 카바트 잔기 100A가 A로 치환되어 있고, 카바트 잔기 100B가 P로 치환되어 있고, 카바트 잔기 100C가 P로 치환되어 있고, 카바트 잔기 100D가 P로 치환되어 있고, 카바트 잔기 100E가 L로 치환되어 있고, 카바트 잔기 100F가 G로 치환되어 있고, 카바트 잔기 100I가 G로 치환되어 있는 모 HCDR3 서열을 갖는다는 것을 표 1b로부터 알 수 있다.

[0105] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 또는 길항제는 표 1a 또는 1b에 기재된 하나 이상(1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개)의 CDR을 갖는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항

체는 표 1a 또는 1b에 기재된 CDR을 갖는 인간 항체이고, 이때 상기 CDR 중 하나 이상의 CDR이 하나 이상의 아미노산 부가, 치환, 결실 및/또는 삽입을 갖는다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 항체 1 또는 항체 4의 모 서열에 비해 상대적으로 1개 내지 5개(1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개)의 부가, 치환, 결실 및/또는 삽입을 갖고 IL-1R1에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한다.

- [0106] 일부 실시양태에서, 항체 또는 길항체는 항체 6의 CDR을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 6의 생식세포주 유래 버전이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 6 또는 이의 생식세포주 유래 버전의 VH 및/또는 VL을 포함한다. 항체 6 및 항체 6의 생식세포주 유래 버전에 대한 아미노산 서열은 본원에서 제공되어 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 6이 결합하는 에피토프와 동일한 또는 실질적으로 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 IL-1R1과의 결합에 대해 항체 6과 경쟁한다.
- [0107] 일부 실시양태에서, 항체 또는 길항체는 하기 치환 또는 결실 중 하나 이상의 치환 또는 결실을 갖는 항체 1 HCDR3을 포함한다:
- [0108] T로 치환된 카바트 잔기 100E;
- [0109] V 또는 L로 치환된 카바트 잔기 100F;
- [0110] D로 치환된 카바트 잔기 100G;
- [0111] A 또는 P로 치환된 카바트 잔기 100H;
- [0112] A 또는 P로 치환된 카바트 잔기 100I;
- [0113] V 또는 G로 치환된 카바트 잔기 101; 및
- [0114] D 또는 V로 치환된 카바트 잔기 102.
- [0115] 일부 실시양태에서, 항체 또는 길항체는 하기 치환 또는 결실 중 하나 이상의 치환 또는 결실을 갖는 항체 4 HCDR3을 포함한다:
- [0116] A 또는 E로 치환된 카바트 잔기 100A;
- [0117] P, Q 또는 A로 치환된 카바트 잔기 100B;
- [0118] P, Y, S 또는 L로 치환된 카바트 잔기 100C;
- [0119] P, G 또는 A로 치환된 카바트 잔기 100D;
- [0120] L 또는 V로 치환된 카바트 잔기 100E;
- [0121] G, V 또는 P로 치환된 카바트 잔기 100F;
- [0122] V로 치환된 카바트 잔기 100G;
- [0123] Y로 치환된 카바트 잔기 100H;
- [0124] G 또는 D로 치환된 카바트 잔기 100I;
- [0125] A로 치환된 또는 결실된 카바트 잔기 100J;
- [0126] F로 치환된 카바트 잔기 101; 및
- [0127] V로 치환된 카바트 잔기 102.
- [0128] 일부 실시양태에서, 항체 또는 길항체는 하기 치환 중 하나 이상의 치환을 갖는 항체 1 LCDR3을 포함한다:
- [0129] H 또는 A로 치환된 카바트 잔기 94;
- [0130] A로 치환된 카바트 잔기 95;
- [0131] E 또는 R로 치환된 카바트 잔기 95A;
- [0132] Q 또는 V로 치환된 카바트 잔기 95B; 및
- [0133] H 또는 L로 치환된 카바트 잔기 97.
- [0134] 몇몇 실시양태에서, 항체 또는 길항체는 하기 치환 중 하나 이상의 치환을 갖는 항체 4 LCDR3을 포함할 수

있다:

- [0135] A, V, D, H, L 또는 R로 치환된 카바트 잔기 94;
- [0136] G, R 또는 A로 치환된 카바트 잔기 95;
- [0137] G, L, A, V 또는 D로 치환된 카바트 잔기 95A;
- [0138] H, R, A 또는 D로 치환된 카바트 잔기 95B;
- [0139] H, P 또는 A로 치환된 카바트 잔기 96; 및
- [0140] H, V 또는 Q로 치환된 카바트 잔기 97.
- [0141] 일부 실시양태에서, 항체 또는 길항체는 하기 치환 또는 부가 중 하나 이상의 치환 또는 부가를 갖는 항체 6 HCDR3을 포함한다:
- [0142] G 또는 A로 치환된 카바트 잔기 100A;
- [0143] S, P 또는 A로 치환된 카바트 잔기 100B;
- [0144] D, P, S 또는 L로 치환된 카바트 잔기 100C;
- [0145] Y, P 또는 A로 치환된 카바트 잔기 100D;
- [0146] T 또는 L로 치환된 카바트 잔기 100E;
- [0147] T, G 또는 P로 치환된 카바트 잔기 100F;
- [0148] V로 치환된 카바트 잔기 100G;
- [0149] Y로 치환된 카바트 잔기 100H;
- [0150] G 또는 D로 치환된 카바트 잔기 100I;
- [0151] 항체 6에서 결실되어 있고 A 또는 F로 복원되어 있는 카바트 잔기 100J;
- [0152] D로 치환된 카바트 잔기 101; 및
- [0153] I로 치환된 카바트 잔기 102.
- [0154] 몇몇 실시양태에서, 항체 또는 길항체는 하기 치환 중 하나 이상의 치환을 갖는 항체 6 LCDR3을 포함한다:
- [0155] S, A, D, H, L 또는 R로 치환된 카바트 잔기 94;
- [0156] L, G 또는 A로 치환된 카바트 잔기 95;
- [0157] S, G, A, V 또는 D로 치환된 카바트 잔기 95A;
- [0158] G, R, A 또는 D로 치환된 카바트 잔기 95B;
- [0159] S, P 또는 A로 치환된 카바트 잔기 96; 및
- [0160] L, H 또는 Q로 치환된 카바트 잔기 97.
- [0161] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 길항체는 IL-1R1과의 결합에 대해 IL-1Ra 및/또는 표 1a 및 1b에 기재된 CDR을 갖는 항체와 경쟁하거나 교차경쟁하는 길항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 길항체는 표 1a 및 1b에 기재된 CDR을 갖는 항체가 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하는 길항체이다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 길항체는 항체 6, 또는 항체 6의 CDR을 포함하는 항체가 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하는 길항체이다. 길항체들 사이의 경쟁은 시험관내에서, 예를 들면, ELISA를 이용하고/하거나, 하나 이상의 다른 비태깅된(untagged) 길항체의 존재 하에서 검출될 수 있는 특정 레포터 분자를 하나의 길항체에 태깅하여 동일한 에피토프 또는 중복 에피토프에 결합하는 길항체의 식별을 가능하게 함으로써 용이하게 분석될 수 있다. 이러한 방법은 당업계에서 통상의 기술을 가진 자에게 용이하게 인식되고 본원에 보다 상세히 기재되어 있다.
- [0162] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 IL-1R1 또는 IL-1a 항체는 인간, 키메라 또는 인간화된 항체이다. 상기 항체는 당업자에게 잘 공지되어 있는 표준 방법에 따라 수득될 수 있는 단일클론 항체, 특히 인간, 뮤

린, 키메라 또는 인간화된 항체로부터 유래된 단일클론 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 길항체는 비항체 길항체이다.

- [0163] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 IL-1R1 길항체는 항체 6의 VH 도메인에 대해 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 나타내는 VH 도메인을 포함하거나, 표 1a 또는 1b에 나타낸 HCDR 셋(예를 들면, HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3)을 포함하는 항체이다. 상기 항체 분자는 임의적으로 항체 6의 VL 도메인에 대해, 또는 표 1a 또는 1b에 나타낸 LCDR 셋(예를 들면, LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3)에 대해 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 나타내는 VL 도메인도 포함할 수 있다. 2개의 아미노산 서열들의 % 동일성을 계산하는 데에 이용될 수 있는 알고리즘은 예를 들면, 디폴트 파라미터를 이용하는, 예를 들면, BLAST(참고문헌 14), FASTA(참고문헌 15), 또는 스미쓰-와터만(Smith-Waterman) 알고리즘(참고문헌 16)을 포함한다.
- [0164] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 IL-1R1 길항체는 인간 항체 26F5, 27F2 또는 15C4의 VH 도메인, 및/또는 인간 항체 26F5, 27F2 또는 15C4의 VL 도메인을 포함하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 상기 길항체는 인간 항체 26F5의 VH 도메인 및 VL 도메인, 인간 항체 27F2의 VH 도메인 및 VL 도메인, 또는 인간 항체 15C4의 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는 인간 항체이다. 다른 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 IL-1R1 길항체는 인간 항체 26F5, 27F2 또는 15C4의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR을 포함하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 IL-1R1 길항체는 인간 항체 26F5, 27F2 또는 15C4의 VH 도메인에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 99% 이상의 동일성을 나타내는 VH 도메인, 및/또는 인간 항체 26F5, 27F2 또는 15C4의 VL 도메인에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 99% 이상의 동일성을 나타내는 VL 도메인을 포함하는 항체이다.
- [0165] 청구된 방법에서 사용되는 항체는 항체 불변 영역 또는 이의 일부, 예를 들면, 인간 항체 불변 영역 또는 이의 일부를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, VL 도메인은 그의 C_κ 말단에서 인간 C_κ 또는 C_λ 쇄를 포함하는 항체 경쇄 불변 도메인에 부착될 수 있다. 유사하게, VH 도메인에 기초한 길항체는 그의 C 말단에서 임의의 항체 이소타입, 예를 들면, IgG, IgA, IgE 및 IgM, 및 임의의 상기 이소타입 하위부류, 특히 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 유래된 면역글로불린 중쇄의 전부 또는 일부(예를 들면, CH1 도메인)에 부착될 수 있다. IgG1은 그의 제조 용이성 및 안정성, 예를 들면, 반감기로 인해 유리하다. 길항체 기능 및/또는 성질을 조절하는, 예를 들면, 가변 영역을 안정화시키는 임의의 합성 또는 다른 불변 영역 변이체도 본 개시내용에서 유용할 수 있다.
- [0166] 나아가, 서열을 원하는 동종이형, 예를 들면, 백인 집단에서 발견되는 동종이형에 맞추기 위해 본원에 기재된 아미노산 서열, 특히 인간 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 변형시키는 것이 본 개시내용에 따라 바람직할 수 있다.
- [0167] 일부 실시양태에서, 항체는 인간 생식세포주 유전자 서열의 골격 영역을 포함할 수 있거나 비생식세포주 유래의 항체일 수 있다. 따라서, 골격은 상기 골격 내의 하나 이상의 잔기가 가장 유사한 인간 생식세포주 골격 내의 등가 위치에서 존재하는 잔기와 일치하도록 변경되어 있는 경우 생식세포주 유래의 골격일 수 있다. 따라서, 청구된 방법에서 사용되는 길항체는 인간 생식세포주 골격, 예를 들면, 인간 생식세포주 IgG VH 골격 내에 HCDR 셋을 포함하는 VH 도메인을 갖는 단리된 인간 항체 분자일 수 있다. 상기 길항체는 예를 들면, 인간 생식세포주 IgG VL 골격 내에 LCDR 셋을 포함하는 VL 도메인도 가질 수 있다.
- [0168] 일부 실시양태에서, 항체는 하나 이상의 아미노산 잔기(들)을 비천연 발생 또는 비표준 아미노산으로 치환시킨 것, 하나 이상의 아미노산 잔기를 비천연 발생 또는 비표준 형태로 변형시킨 것, 또는 하나 이상의 비천연 발생 또는 비표준 아미노산을 서열 내로 삽입시킨 것을 포함할 수 있다. 서열 내의 변경의 수 및 위치의 예는 본원의 임의의 부분에 기재되어 있다. 천연 발생 아미노산은 그들의 표준 1 문자 코드에 의해 G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D 및 E로서 확인된 20개의 "표준" L 아미노산을 포함한다. 비표준 아미노산은 폴리펩티드 주쇄(backbone) 내로 도입될 수 있거나 기존 아미노산 잔기의 변형으로부터 발생될 수 있는 임의의 다른 잔기를 포함한다. 비표준 아미노산은 천연 발생 또는 비천연 발생 아미노산일 수 있다. 여러 천연 발생 비표준 아미노산, 예컨대, 4-하이드록시프롤린, 5-하이드록시라이신, 3-메틸히스티딘, N-아세틸세린 등이 당업계에서 공지되어 있다(참고문헌 17). 그의 N- α 위치에서 유도체화될 수 있는 아미노산 잔기는 아미노산 서열의 N 말단에만 위치할 것이다. 통상적으로, 아미노산은 L 아미노산이지만 D-아미노산일 수 있다. 따라서, 변경은 L 아미노산을 D 아미노산으로 변형시키거나 L 아미노산을 D 아미노산으로 치환시키는 것을 포함할 수 있다. 아미노산의 메틸화된, 아세틸화된 및/또는 인산화된 형태도 공지되어 있고, 본 개시내용에서 아미노산은 이와 같이 변형될 수 있다.

- [0169] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 하나 이상의 선택된 VH 및/또는 VL 유전자의 무작위 돌연변이유발을 이용하여 전체 가변 도메인 내에서 돌연변이를 발생시킴으로써 발생된다. 이러한 기법은 오류 유발(error-prone) PCR을 이용한 그람 등(Gram *et al.*)(참고문헌 18)에 의해 기재되어 있다. 몇몇 실시양태에서, 1개 또는 2개의 아미노산 치환이 전체 가변 도메인 또는 CDR 셋 내에서 만들어진다.
- [0170] 이용될 수 있는 또 다른 방법은 VH 또는 VL 유전자의 CDR 영역에 대한 직접적인 돌연변이유발이다. 이러한 기법은 바바스 등(Barbas *et al.*)(참고문헌 19) 및 슈어 등(Schier *et al.*)(참고문헌 20)에 의해 개시되어 있다.
- [0171] 전술된 기법들 모두가 당업계에서 그 자체로 공지되어 있고, 당업자는 당업계의 관용적인 방법을 이용하여 본 개시내용의 길항체를 제공하기 위해 이러한 기법들을 이용할 수 있을 것이다.
- [0172] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 또는 길항체는 항체 단편이다. 단편의 예로는 (i) VL, VH, 불변 경쇄 도메인(CL) 및 불변 중쇄 도메인 1(CH1) 도메인으로 구성된 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; (iv) VH 또는 VL 도메인으로 구성된 dAb 단편(참고문헌 21, 22 및 23); (v) 단리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) 단일쇄 Fv 분자(scFv)(이때, VH 도메인과 VL 도메인은 이들 2개의 도메인이 연결되어 항원 결합 부위를 형성하게 하는 웹티드 링커(linker)에 의해 연결되어 있음)(참고문헌 24 및 25); (viii) 이중특이적 단일쇄 Fv 이량체(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제W01993/011161호에 개시된 이량체); 및 (ix) 유전자 융합에 의해 구축된 다가 또는 다중특이적 단편인 "디아바디(diabody)"(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제W01994/13804호 및 문헌(참고문헌 26)에 개시된 디아바디)가 있다. Fv, scFv 또는 디아바디 분자는 VH 도메인과 VL 도메인을 연결하는 이황화 가교의 도입에 의해 안정화될 수 있다(참고문헌 27). CH3 도메인에 연결된 scFv를 포함하는 미니바디도 만들어질 수 있다(참고문헌 28). 결합 단편의 다른 예는 몇 개의 잔기(항체 헌지 영역으로 부터의 하나 이상의 시스테인을 포함함)가 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단에 부가됨으로써 Fab 단편과 구별되는 Fab', 및 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 자유 티올 기를 보유하는 Fab' 단편인 Fab'-SH이다.
- [0173] 일부 실시양태에서, 적합한 단편은 본원에 개시된 인간 또는 설치류 항체들 중 임의의 항체로부터 수득될 수 있다. 다른 실시양태에서, 적합한 단편은 본원에 기재된 항체들 중 임의의 항체의 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하거나 항원과의 결합에 대해 이러한 임의의 항체와 경쟁하는 인간 또는 설치류 항체로부터 수득된다.
- [0174] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 또는 길항체는 표지되거나, 반감기를 증가시키도록 변형되거나, 또는 기타 변형을 갖는다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 길항체는 예컨대, PEG화(PEGylation) 또는 리포좀 내로의 도입에 의해 화학적으로 변형된다.
- [0175] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 길항체는 이하에 더 논의되어 있는 비항체 분자 내에 통상적으로 하나 이상의 CDR에 의해 제공된 항원 결합 부위를 포함할 수 있다(예를 들면, 비항체 단백질 스카폴드(scaffold) 내에 CDR 셋을 포함할 수 있음).
- [0176] 항원 결합 부위는 비항체 단백질 스카폴드, 예컨대, 피브로넥틴 또는 사이토크롬 B 상에 CDR을 배열시킴으로써(참고문헌 29, 30 및 31), 또는 단백질 스카폴드 내의 루프의 아미노산 잔기를 무작위화시키거나 돌연변이시켜 원하는 표적에 대한 결합 특이성을 부여함으로써 제공될 수 있다. 단백질 내의 신규 결합 부위를 조작하기 위한 스카폴드는 나이그렌 등(Nygren *et al.*)(참고문헌 31)에 의해 상세히 검토되어 있다. 항체 모사체를 위한 단백질 스카폴드는 전체적으로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공보 제W0200034784호(여기서, 발명자들은 하나 이상의 무작위화된 루프를 갖는 피브로넥틴 III형 도메인을 포함하는 단백질(항체 모사체)를 기술함)에 개시되어 있다. 하나 이상의 CDR, 예를 들면, HCDR 셋을 이식하기에 적합한 스카폴드는 면역글로불린 유전자 상과(supersfamily)의 임의의 도메인 구성원에 의해 제공될 수 있다. 상기 스카폴드는 인간 또는 비인간 단백질일 수 있다. 비항체 단백질 스카폴드의 이점은 이 스카폴드가 적어도 몇몇 항체 분자들보다 더 작고/작거나 제조하기에 더 용이한 스카폴드 분자 내의 항원 결합 부위를 제공할 수 있다는 점이다. 작은 크기의 길항체는 유용한 생리학적 성질, 예컨대, 세포 내로 들어가는 능력, 조직 내로 깊이 침투하거나 다른 구조체 내의 표적에 도달하는 능력, 또는 표적 항원의 단백질 캐비티(cavity) 내에서 결합하는 능력을 부여할 수 있다. 비항체 단백질 스카폴드 내의 항원 결합 부위의 용도는 문헌(Wess, 2004)(참고문헌 32)에서 검토되어 있다. 안정한 주쇄 및 하나 이상의 가변 루프를 갖는 단백질로서, 상기 루프 또는 루프들의 아미노산 서열이 표적 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 생성하도록 특이적으로 또는 무작위적으로 돌연변이되어 있는 단백질이 전형적이다. 이러한 단백질은 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)로부터의 단백질 A, 트랜스페린, 테트라넥틴, 피브로넥틴(예를 들면, 제10 피브로넥틴 III형 도메인), 리포칼린뿐만 아니라 감마 결정질 스카폴드 및 다른 아필린(Affilin)™ 스카폴드(Scil 단백질)의 IgG 결합 도메인을 포함한다. 다른 수단의 예로는 사이클로타이드(분자내 이황화 결합을 갖는

작은 단백질)에 기초한 "마이크로바디", 마이크로단백질(베르사바디스(Versabodies)™, 아뮤닉스 인코포레이터드(Amunix Inc), 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재) 및 앤키린(ankyrin) 반복 단백질(DARPins, 몰레큘라 파트너스 아게(Molecular Partners AG), 스위스 취리히-슐리렌 소재)이 있다. 이러한 단백질은 작은 조작된 단백질 도메인, 예를 들면, 면역도메인(예를 들면, 미국 특허출원 공보 제2003/082630호 및 제2003/157561호 참조)도 포함한다. 면역도메인은 항체의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 함유한다.

- [0177] 일부 실시양태에서, 길항체는 예를 들면, 웨티드 또는 폴리웨티드, 예컨대, 폴딩된 도메인을 형성하거나 항원에 결합하는 능력 이외의 또 다른 기능적 특성을 분자에 부여하는 다른 아미노산을 포함할 수 있다. 길항체는 검출 가능한 표지를 보유할 수 있거나, (웨티딜 결합 또는 링커를 통해) 독소, 또는 표적화 모이어티(moiety) 또는 효소에 접합될 수 있다.
- [0178] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 길항체 또는 항체의 반감기는 약 4일 내지 7일 이상이다. 일부 실시양태에서, 평균 반감기는 약 2일 내지 5일, 3일 내지 6일, 4일 내지 7일, 5일 내지 8일, 6일 내지 9일, 7일 내지 10일, 8일 내지 11일, 8일 내지 12일, 9일 내지 13일, 10일 내지 14일, 11일 내지 15일, 12일 내지 16일, 13일 내지 17일, 14일 내지 18일, 15일 내지 19일 또는 16일 내지 20일 이상이다.
- [0179] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 용기를 포함하는 제품을 제공한다. 상기 용기는 본원에 개시된 길항체 또는 항체를 함유하는 조성물, 및 상기 조성물이 COPD 악화 및/또는 COPD 악화의 증상을 치료하는 데에 사용될 수 있다는 것을 표시하는 포장 삽입물 또는 표지를 포함한다.
- [0180] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 길항체 또는 항체를 함유하는 조성물, 및 상기 조성물을 치료가 필요한 대상체에게 투여할 것을 지시하는 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0181] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 또는 길항체는 변이체 Fc 영역, 즉 비천연 발생 Fc 영역, 예를 들면, 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 아미노산 결실, 부가 및/또는 변형을 포함하는 Fc 영역도 본 개시내용의 변이체 Fc 영역에 의해 포함된다.
- [0182] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 또는 길항체는 약 25 킬로달톤 이상의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 또는 길항체는 약 50 킬로달톤, 약 75 킬로달톤, 약 90 킬로달톤, 약 100 킬로달톤, 약 110 킬로달톤 또는 약 125 킬로달톤 이상의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 길항체는 약 150 킬로달톤 이상의 분자량을 갖는다.
- [0183] 본 개시내용은 상기 특징들 중 하나 이상의 특징의 임의의 조합을 갖는 항체 및 길항체의 사용을 고려한다. 예를 들면, IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 의 결합을 억제하고 상기 특징들 중 임의의 하나 이상의 특징을 가질 수 있는 항체 또는 길항체가 본원에 기재된 방법에서 사용될 수 있다. 유사하게, IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 IL-1R1에 대한 IL-1 α 의 결합을 억제하고 상기 특징들 중 임의의 하나 이상의 특징을 가질 수 있는 항체 또는 길항체가 본원에 기재된 방법에서 사용될 수 있다.
- [0184] (iv) 사용 방법
- [0185] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 및 길항체는 COPD의 악화를 치료하고/하거나 예방하는 데에 유용하다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 및 길항체는 COPD의 악화 동안 폐 기능을 증가시키는 데에 유용하다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 및 길항체는 악화 지속기간을 감소시키는 데에 유용하다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 및 길항체는 악화 동안 기도 염증을 감소시키는 데에 유용하다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 및 길항체는 악화 동안 IL-1 α 신호전달을 감소시키는 데에 유용하다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 및 길항체는 악화 동안 IL-1 α 및 IL-1 β 를 감소시키는 데에 유용하다. 일부 실시양태에서, COPD의 악화는 폐의 감염(예를 들면, 바이러스 감염, 인간 리노바이러스에 의해 유발된 기도 염증, 세균 감염) 또는 공기 오염(예를 들면, 연기)에 기인한다. 일부 실시양태에서, 기도 염증의 감소는 COPD 악화를 치료하는 방법의 일부이다. 일부 실시양태에서, 기도 염증의 감소는 폐 내로의 염증세포 유입의 감소를 포함한다. 일부 실시양태에서, COPD 악화의 치료는 폐 내로의 염증세포 유입의 감소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증세포는 호중구이다. 일부 실시양태에서, 염증세포는 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 염증세포는 림프구이다. 일부 실시양태에서, 염증세포는 단핵구이다. 일부 실시양태에서, COPD 악화의 치료는 기도 염증의 감소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 약 25 킬로달톤 이상의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 사용되는 항체는 약 50 킬로달톤, 60 킬로달톤, 75 킬로달톤, 100 킬로달톤, 110 킬로달톤, 125 킬로달톤 또는 150 킬로달톤 이상의 분

자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 사용되는 항체는 약 150 킬로달톤의 분자량을 갖는다. 유사하게, 일부 실시양태에서, 상기 범위 내의 임의의 분자량을 갖는 비항체 길항체가 사용된다.

[0186] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 COPD 증상의 악화를 치료하고/하거나 예방하는 데에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, COPD의 악화의 증상은 하기 증상들 중 하나 이상의 증상을 포함한다: 증가된 무호흡, 증가된 기침 및 객담 생성, 객담의 색채 및/또는 농도의 변화, 천명, 흉부 조임 및 발열. COPD의 악화는 환자의 기준치, 즉 예를 들면, 폐 기능의 평가에 의해 평가될 수 있는 평균 COPD 상태의 변화를 나타낸다.

[0187] 세계 만성 폐쇄성 폐 질환 기구(GOLD)는 치료 방법을 안내하기 위해 COPD 중증도의 5 단계 분류를 만들었다 (Executive Summary: Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD(2009년에 갱신됨)). 이들 환자에서, 단계 0은 기류 폐쇄를 갖지 않으면서(예를 들면, 정상 폐활량측정) 기침, 객담 및 무호흡의 고전적인 임상적 증상을 갖는 것을 특징으로 하는 상태를 정의한다. 단계 I은 질환 상태를 알 수 있거나 알 수 없는 만성 증상을 갖거나 갖지 않으면서 70% 미만의 1초간 강제호기량(FEV1)/강제폐활량(FV) 및 80% 초과의 예측된 FEV1을 갖는 환자를 정의한다. 단계 II(70% 미만의 FEV1/FVC, 30% 내지 79%의 FEV1)는 하위단계 IIb에서 환자에 의해 경험되는 보다 높은 악화율(이것은 결과적으로 건강 상태와 반비례함)에 따라 하위단계 IIa(50% 내지 79%의 FEV1) 및 IIb(30% 내지 49%의 FEV1)로 나누어진다. 그러나, 하위단계 IIb는 종종 당업계 및 본원에서 단계 III으로 지칭된다. 최종적으로, 단계 IV(70% 미만의 FEV1/FVC, 및 30% 미만의 예측된 FEV1, 저산소증 또는 우측 심장 기능상실의 임상적 징후)는 최악의 건강 상태와 관련되어 있는 것으로 예측된다.

[0188] 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 악화 전에 측정될 때 단계 I 또는 보다 높은 GOLD 점수 COPD를 갖는 환자의 치료에 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 단계 II 또는 보다 높은 GOLD 점수 COPD를 갖는 환자의 치료에 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 악화 전에 평가되었을 때 단계 III 또는 보다 높은 GOLD 점수 COPD를 갖는 환자의 치료에 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 악화 전에 평가되었을 때 단계 IV GOLD 점수 COPD를 갖는 환자의 치료에 이용될 수 있다.

[0189] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 바이러스 감염, 세균 감염 및/또는 환경 인자에 의해 야기된 COPD의 증상의 악화를 예방하거나 감소시키는 데에 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 환경 인자는 담배 연기이다. 일부 실시양태에서, 세균 감염은 LPS와 관련되어 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 감염은 인간 리노바이러스(HRV) 감염이다.

[0190] 일부 실시양태에서, IL-1R1에 특이적으로 결합하여 IL-1 α 에 대한 IL-1R1의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 COPD 악화의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 COPD 악화를 치료하는 방법이 제공되고, 이때 상기 환자는 인간 리노바이러스에 의해 유발된 기도 염증으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자이다. HRV 감염은 증가된 염증 사이토카인으로 호중구 유입을 야기한다. 숙주 염증 반응, 특히 IL-8은 일반 감기 증상의 발병기전에 있어서 중요한 역할을 한다. 이것은 만성 폐 질환을 갖는 환자에서 근원적인 호흡 상태의 증상을 악화시킬 수 있다. 바이러스 감염의 증상은 COPD 악화의 3분의 2에서 먼저 나타난다. 입원한 급성 악화 환자의 40%는 비강 및/또는 객담 샘플에 존재하는 HRV를 갖는다. 따라서, 인간 리노바이러스에 의해 유발된 기도 염증으로 인한 COPD 악화를 갖는 환자의 치료는 COPD 악화의 위험을 유의하게 감소시킬 수 있고 COPD를 갖는 환자의 건강을 유의하게 개선시킬 수 있는 중요한 중재시술을 대표한다. 따라서, 본 조성물 및 방법은 HRV 또는 다른 기도 바이러스 감염에 의해 유도된 COPD 악화의 치료, 감소 및 예방에 유용할 수 있다.

[0191] 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 인간, 키메라 또는 인간화된 항체이다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 항체 단편, 예컨대, 25 킬로달톤 이상의 분자량을 갖는 단편이다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 또는 길항체는 인간 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체 또는 길항체는 인간 및/또는 비인간 영장류의 하나 이상의 종으로부터의 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 뮤린 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 특이적으로 결합하지 않는다.

[0192] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 COPD 악화를 관리함으로써 COPD를 치료하기 위한 치료 요법의 일부이다. 일부 실시양태에서, COPD를 치료하기 위한 치료 요법은 스테로이드의 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 길항체는 비아코어™에 의해 측정될 때 50 pM 이하의 K_D 로 인간 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 청구된 방법에서 사용되는 항체는 항체 6 또는 6g1(생식세포주 유래 버전)이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 길항체는 IL-1R1과의 결합에 대해 IL-1Ra와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 투여는 전신 투여이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 조성물의 비강내 투여를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서,

상기 방법은 2종의 투여 경로, 즉 전신 및 국소 경로를 통한 상기 길항제의 투여를 포함한다. 예를 들면, 길항제는 전신으로, 예컨대, 정맥내로 및 비강내로 투여되거나 다른 형태의 국소 투여를 통해 폐로 투여된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 매일 1회 이하의 투약 일정으로 상기 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0193] 일부 실시양태에서, COPD 증상은 치료 전에, 치료 동안 또는 치료 후에 모니터링된다. 일부 실시양태에서, 모니터링은 연속적이다. 일부 실시양태에서, 모니터링은 치료 동안 정기적으로, 예컨대, 매시간, 매일 또는 매주 수행된다. 일부 실시양태에서, 모니터링은 치료 후에 정기적으로, 예컨대, 매일, 매주 또는 매월 수행된다. 모니터링 간격은 상태의 중증도에 기초하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, COPD 증상은 폐 기능 시험, 예컨대, 폐활량측정에 의해 모니터링된다. 일부 실시양태에서, COPD 증상은 흉부 X-선 및/또는 컴퓨터 단층촬영(CT) 스캔에 의해 모니터링된다. 흉부 X-선 또는 CT 스캔은 COPD의 주원인들 중 하나인 폐기증을 보여줄 수 있다. 일부 실시양태에서, COPD 증상은 동맥 혈액 기체 분석에 의해 모니터링된다. 일부 실시양태에서, COPD 증상은 객담 검사에 의해 모니터링된다. 일부 실시양태에서, 치료의 효능은 상기 시험들 중 임의의 하나 이상의 시험을 이용함으로써 평가된다. 일부 실시양태에서, 치료는 악화의 중증도, 지속기간 또는 빈도를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 환자의 상태(예를 들면, 기준 폐 기능 등)는 치료 후에 악화 전 기준 수준으로 회복된다.

[0194] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물 또는 방법은 연기에 노출된 동물 모델, 동물 리노바이러스 모델, 또는 당업계에서 통상의 기술을 가진 자에게 공지되어 있는 만성 폐 질환 모델에서 분석된다(예를 들면, 문현(Contoli et al., Contrib Microbiol. 2007;14:101-12)). 일부 실시양태에서, 동물 모델은 마우스 모델이다(예를 들면, 문현(Bartlett et al., Nat Med. 2008 Feb;14(2):199-204)). 일부 실시양태에서, 마우스 모델은 엘라스스타제(elastase) 및 LPS에 노출된 마우스 모델로부터 선택된다(문현(Sajjan et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009 Nov;297(5):L931-44) 참조). 일부 실시양태에서, 실시예에 기재된 세포 또는 동물 모델들 중 임의의 세포 또는 동물 모델이 이용될 수 있다.

[0195] 일부 실시양태에서, 증상이 중증인 경우 입원이 요구될 수 있다. 일부 실시양태에서, 증상이 보다 경미한 경우, 환자가 외래환자로서 치료받을 수 있다.

[0196] 일부 실시양태에서, 흡연, 입원, 폐 회복 프로그램의 결핍, 흡입기의 부적절한 사용 및 약물 치료 프로그램에의 부족한 참여가 보다 빈번하고/하거나 보다 길게 지속되는 COPD 악화의 증상발현(episodes)과 모두 관련되어 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 흡연, 입원, 폐 회복 프로그램의 결핍, 흡입기의 부적절한 사용 및 약물 치료 프로그램에의 부족한 참여 중 하나 이상을 갖는 환자를 치료하는 데에 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 보다 빈번하고/하거나 보다 길게 지속되는 COPD 악화의 증상발현을 갖는 환자를 치료하는 데에 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 COPD 악화에 대한 구체적인 위험을 갖는 환자를 치료하는 데에 이용될 수 있다.

[0197] 본 개시내용은 IL-1R1 또는 IL-1 α 의 하나 이상의 효과가 길항되도록 유효량의 본 개시내용의 하나 이상의 길항제와 접촉시키거나 상기 길항제를 투여하는 단계를 포함하는, IL-1R1 또는 IL-1 α 의 상기 하나 이상의 효과를 길항하는 방법도 제공한다. 본 개시내용의 방법에 의해 길항될 수 있는 IL-1R1의 효과는 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 에 의해 매개되는 생물학적 반응, 및 이를 결합 반응의 결과로서 일어나는 임의의 하류 효과를 포함한다. 다수의 본 개시내용의 길항제가 투여되는 경우, 이들은 동일한 시간 또는 상이한 시간에서 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 다수의 본 개시내용의 길항제가 사용되고, 상기 방법은 IL-1R1 길항제, 예컨대, 항체, 및 IL-1 α 길항제, 예컨대, 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 다수의 길항제는 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0198] 전술된 실시양태들 중 임의의 실시양태에 있어서, 상기 방법은 일반적으로 적절한 투여량의 항-IL-1R1 또는 항-IL-1 α 물질을 포함하는 조성물의 투여를 포함한다.

[0199] 용어 "치료", "치료하는" 등은 일반적으로 약제를 치료가 필요한 대상체에게 제공하여 상기 대상체의 상태를 개선시킴으로써 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 의미하기 위해 본원에서 사용된다. 일부 실시양태에서, 치료는 악화의 빈도 및/또는 중증도의 감소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 기도 염증의 치료를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 폐 내로의 염증세포, 예컨대, 호중구의 유입의 방지 또는 감소를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "치료"는 (a) 악화의 억제(예를 들면, 증상이 악화되지 않도록 악화의 발달을 정지시키는 것); 또는 (b) 질환 또는 상태의 경감(예를 들면, 질환 또는 상태의 퇴행을 유발시키거나, 하나 이상의 증상에서의 개선을 제공하거나, 악화의 지속기간을 감소시키거나, 악화의 빈도를 감소시키는 것)을 포함한다. 임의의 상태에서의 개선은 표준 방법 및 당업계에서 공지되어 있는 기법에 따라 용

이하게 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자의 상태는 효과적인 치료 후에 그의 악화 전 기준 상태로 복귀된다. 일부 실시양태에서, 환자는 악화 전에 중등도 또는 중증 COPD(예를 들면, GOLD 단계 III 또는 GOLD 단계 IV로서 분류된 COPD)를 갖는다.

[0200] 용어 "치료 유효량" 또는 "유효량"은 원하는 효과를 생성하기 위해 투여되는 투여량을 의미한다. 정확한 투여량은 치료 목적에 의해 좌우될 것이고 공지된 기법을 이용함으로써 당업자에 의해 확인될 수 있다(예를 들면, 문현(Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding) 참조).

[0201] 본 개시내용은 본 개시내용의 상기 또는 하기 양태들 및/또는 실시양태들 중 하나 이상의 임의의 양태 및/또는 실시양태가 조합되어 있는 방법을 고려한다. 예를 들면, 임의의 항체 또는 길항제(IL-1R1 또는 IL-1 α 를 길항하는 임의의 조성물)가 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법에서 사용될 수 있다. 더욱이, 본원에 기재된 임의의 항체 또는 길항제는 단독으로 사용될 수 있거나 조합물, 예컨대, 본 개시내용의 또 다른 항체 또는 길항제와의 조합물 형태로 사용될 수 있다.

[0202] (v) 약학 조성물

[0203] 따라서, 본 개시내용의 추가 양태는 COPD 악화를 치료하기 위한 본원에 기재된 항체 또는 길항제의 용도를 제공한다. 항체 및 길항제는 조성물, 예를 들면, 항체 또는 길항제를 포함하는 약학 조성물로서 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 길항제는 재조합적으로, 예컨대, 상기 항체 또는 길항제를 코딩하는 핵산을 숙주 세포 내에서 발현시킴으로써 제조된다. 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제에 의해 제제화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 발열원을 함유하지 않거나 실질적으로 발열원을 함유하지 않는다.

[0204] 약학적으로 허용가능한 부형제는 이차 반응을 불러 일으키지 않으면서 예를 들면, 활성 화합물(들)의 투여를 용이하게 하거나, 체내에서 그의 수명 및/또는 그의 효능을 증가시키거나, 용액에서의 그의 가용성을 증가시키거나, 그의 보존을 개선시키는, 약학 조성물 내로 들어가는 화합물 또는 화합물의 조합일 수 있다. 이를 약학적으로 허용가능한 부형제는 잘 공지되어 있고 선택된 활성 화합물(들)의 성질 및 투여 방식의 함수로서 당업자에 의해 채택될 것이다.

[0205] 본 개시내용의 항체 및 길항제는 통상적으로 상기 길항제 이외에 하나 이상의 성분을 포함할 수 있는 약학 조성물의 형태로 투여될 것이다. 따라서, 본 개시내용에 따라 사용될, 본 개시내용에 따른 약학 조성물은 활성 성분 이외에 약학적으로 허용가능한 부형제, 담체, 완충제, 안정화제 또는 당업자에게 잘 공지되어 있는 다른 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 무독성 물질이어야 하고 활성 성분의 효능을 방해하지 않아야 한다. 상기 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은 투여 경로에 의해 좌우될 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 전신으로, 예컨대, 정맥내, 복강내, 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 경구 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 구체적으로 폐로의 상기 조성물의 직접적인 투여, 예를 들면, 흡입, 폐 세척 또는 비강내 전달에 의해 상기 조성물의 투여를 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 동일한 또는 상이한 항체/길항제가 동일한 또는 상이한 투여 경로를 통해 투여된다. 예를 들면, 항체는 전신으로 투여될 수 있고, 동일한 또는 상이한 길항제는 전신으로 또는 국소로 투여될 수 있다.

[0206] 액체 약학 조성물은 일반적으로 액체 담체, 예컨대, 물, 석유, 동물성 또는 식물성 오일, 광물 오일 또는 합성 오일을 포함한다. 생리식염수 용액, 텍스트로스 또는 다른 당류 용액 또는 글리콜, 예컨대, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜이 사용될 수 있거나 포함될 수 있다.

[0207] 정맥내 주사의 경우, 활성 성분은 발열원을 함유하지 않고 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용가능한 수용액의 형태로 존재할 것이다. 당업자는 예를 들면, 등장성 비히클, 예컨대, 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 젖산염 함유 링거 주사액을 사용하여 적합한 용액을 잘 제조할 수 있다. 완충제, 예컨대, 인산염, 구연산염 및 다른 유기산; 항산화제, 예컨대, 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3'-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 폴리펩티드; 단백질, 예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이팅제, 예컨대, EDTA; 당, 예컨대, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대, 나트륨; 금속 치약(예를 들면, Zn-단백질 치약); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대, 트윈(TWEEN)TM, 플루로닉스(PLURONICS)TM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는 보존제, 안정화제, 완충제, 항산화제 및/또는 다른 첨가

제가 필요에 따라 사용될 수 있다.

- [0208] 본 개시내용의 길항제 및 항체는 분자의 물리화학적 성질 및 전달 경로에 따라 액체, 반고체 또는 고체 형태로 제제화될 수 있다. 제제는 부형제, 또는 부형제의 조합, 예를 들면, 당, 아미노산 및 계면활성제의 조합을 포함할 수 있다. 액체 제제는 광범위한 항체 농도 및 pH를 포함할 수 있다. 고체 제제는 예를 들면, 동결건조, 분무건조 또는 초임계 유체 기술에 의한 건조에 의해 제조될 수 있다.
- [0209] 일부 실시양태에서, 약학 조성물을 포함하는 본 개시내용의 조성물은 비발열원성 조성물이다. 즉, 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 발열원을 실질적으로 함유하지 않는다. 한 실시양태에서, 상기 제제는 내독소 및/또는 관련된 발열원성 물질을 실질적을 함유하지 않는 발열원 무함유 제제이다. 내독소는 미생물 내부에 국한되어 있고 상기 미생물이 파괴되거나 사멸하는 경우에만 방출되는 독소를 포함한다. 또한, 발열원성 물질은 세균 및 다른 미생물의 외막으로부터의 발열 유도 열안정성 물질(당단백질)을 포함한다. 이들 물질들 둘다가 인간에게 투여된 경우 발열, 고혈압 및 쇼크를 야기할 수 있다. 잠재적인 유해 효과로 인해, 소량의 내독소조차도 정맥내로 투여되는 약학 약물 용액으로부터 제거되어야 한다. 식품의약청("FDA")은 정맥내 약물 적용의 경우 1시간 내에 체중 kg당 투여량당 5 내독소 유닛(EU)의 상한을 설정하였다(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). 치료 단백질이 체중 kg당 수백 또는 수천 mg의 양으로 투여되는 경우(항체를 사용하는 경우일 수 있음), 미량의 유해한 위험 내독소조차도 제거되어야 한다. 일부 특정 실시양태에서, 조성물 중의 내독소 및 발열원 수준은 10 EU/mg 미만, 5 EU/mg 미만, 1 EU/mg 미만, 0.1 EU/mg 미만, 0.01 EU/mg 미만 또는 0.001 EU/mg 미만이다.
- [0210] 일부 실시양태에서, 조성물은 정맥내 관주에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 관주는 10분 이상, 15분 이상, 20분 이상 또는 30분 이상의 시간에 걸쳐 수행된다. 다른 실시양태에서, 관주는 60분, 90분 또는 120분 이상의 시간에 걸쳐 수행된다. 관주 시간과 관계없이, 본 개시내용은 항체 또는 길항제가 규칙적인 일정에 따라(예를 들면, 1일당 1회, 매주, 매월 등) 투여되는 경우 각각의 관주가 전체 치료 계획의 일부인 것을 고려한다. 유사하게, 투여 경로와 관계없이, 항체 또는 길항제가 규칙적인 일정에 따라(예를 들면, 1일당 1회, 매주, 매월 등) 투여되는 경우 각각의 투약이 전체 치료 계획의 일부인 것을 고려한다.
- [0211] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물(예를 들면, 항-IL-1R1 항체, 항-IL-1 α 항체, 항-IL-1R1 길항제)은 COPD 약화를 치료하기 위한 조합 요법 또는 치료 요법의 일부로서 사용될 수 있다. 조합 치료, 특히 항-IL-1R1 또는 항-IL-1 α 길항제와 하나 이상의 다른 약물의 조합을 사용하여 부가적 또는 상승작용적 효과를 제공할 수 있다. 치료 요법이 다수의 화합물들(예를 들면, 약물, 생물학적 약제)의 투여를 수반하는 경우, 이러한 화합물들은 예를 들면, 동시적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있거나 조합된 제제로서 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 치료 요법은 스테로이드 요법을 포함한다.
- [0212] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 COPD에 대한 하나 이상의 이용가능한 치료와 함께 치료 요법의 일부로서 사용될 수 있다.
- [0213] 본 개시내용에 따른 조성물은 단독 요법으로서 제공될 수 있거나 본 개시내용의 하나 이상의 다른 약제 및/또는 하기 약제들 중 하나 이상의 약제와 함께 조합 또는 부가 요법으로서 제공될 수 있다:
- [0214] - 글루코코르티코이드, 예컨대, 플루니솔라이드(flunisolide), 트리암시놀론 아세토나이드(triamcinolone acetonide), 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate), 부데소나이드(budesonide), 플루티카손 프로페오네이트(fluticasone propionate), 시클레소나이드(ciclesonide) 및/또는 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate);
- [0215] - 항균제, 예를 들면, 페니실린 유도체, 테트라사이클린, 마크로라이드(macrolide), 베타-락탐, 플루오로퀴놀론(fluoroquinolone), 메트로니다졸(metronidazole) 및/또는 흡입된 아미노글리코사이드; 및/또는
- [0216] - 항바이러스제, 예를 들면, 아시클로비어(acyclovir), 팜시클로비어(famciclovir), 발라시클로비어(valaciclovir), 간시클로비어(ganciclovir), 시도포비어(cidofovir); 아다만타딘(amantadine), 리만타딘(rimantadine); 리바비린(ribavirin); 자나마비어(zanamivir) 및/또는 오셀타마비어(oseltamivir); 단백질분해 효소 억제제, 예컨대, 인디나비어(indinavir), 넬피나비어(nelfinavir), 리토나비어(ritonavir) 및/또는 사퀴나비어(saquinavir); 뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 예컨대, 디다노신(didanosine), 라미부딘(lamivudine), 스타부딘(stavudine), 잘시타빈(zalcitabine), 지도부딘(zidovudine); 비뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 예컨대, 네비라핀(nevirapine), 에파비렌즈(efavirenz).
- [0217] 조합 치료는 항생제를 포함할 수 있다. 급성 약화의 약 50%가 주로 세균 스트렙토코커스 뉴모니아

(*Streptococcus pneumoniae*)(폐렴을 야기함), 해모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)(감기를 야기함) 및 모락셀라 카타르할리스(*Moraxella catarrhalis*)(폐렴을 야기함)에 기인한다. 다수의 항생제가 이들 감염을 효과적으로 치료할 수 있다.

- [0218] 조합 치료는 호흡 자극제를 포함할 수 있다. 코르티코스테로이드는 COPD의 급성 악화에서 유리할 수 있다. 스테로이드는 정맥내로 제공될 수 있다. 급성 기관지연축을 감소시키기 위해 급성 악화 동안 기관지확장제 투여량이 증가될 수 있다. COPD의 급성 악화 동안 테오플린(Theophylline)이 사용될 수 있다.
- [0219] 일부 실시양태에서, 산소 요구가 증가할 수 있고 보충 산소가 제공될 수 있다.
- [0220] COPD의 급성 악화를 갖는 환자는 호흡 기능상실을 발달시킬 위험에 있을 수 있다. 호흡 기능상실은 호흡 수요가 반응하는 호흡 시스템의 능력을 초과할 때 일어난다. 일부 실시양태에서, 조합 치료는 기계적 인공호흡 (mechanical ventilation)을 포함할 수 있다.
- [0221] 기계적 인공호흡은 환자가 공기를 흡입하기 위해 그의 호흡기 근육을 이용하는 대신에 인공호흡기를 통해 공기를 환자의 폐 내로 밀어 넣는 수단이다. 따라서, 기계적 인공호흡은 환자의 호흡 노력을 감소시키거나 불필요하게 만들고, 환자는 임의의 노력 없이 계속해서 그의 폐 내로 공기를 제공받고 수동적으로 숨을 내쉰다. COPD에서 기계적 인공호흡을 위해 2종의 통상적으로 이용되는 방법이 존재한다: 비비삽관식 인공호흡 및 삽관식 인공호흡.
- [0222] 삽관식 인공호흡 동안, 기관내관, 즉 작은 직경의 플라스틱 관이 기관 내로 배치된 후, 공기를 폐 내로 밀어 넣는 인공호흡기에 연결된다. 삽관식 인공호흡은 의식이 없거나 진정제를 다량으로 제공받은 환자에게 적용될 수 있고 비삽관식 인공호흡보다 더 효과적이다.
- [0223] 비삽관식 인공호흡은 의식이 있는 협조적인 환자에서 이용될 수 있다. 이 방법에서, 산소는 코 또는 입 및 코 주변에서 밀봉부(seal)를 형성하는 마스크를 통해 전달된다.
- [0224] 일부 실시양태에서, 조합 치료는 폐렴 백신 및/또는 매년 접종되는 감기(annual flu) 백신을 포함할 수 있다.
- [0225] 본 개시내용에 따라, 제공된 조성물은 포유동물, 예컨대, 인간 환자에게 투여될 수 있다. 투여는 통상적으로 환자에게 이점을 보여주기에 충분한 양인 "유효량"으로 수행된다. 이러한 이점은 하나 이상의 증상의 적어도 완화일 수 있다. 예시적인 증상은 기도 염증, 폐 내로의 호중구 유입 및 감소된 폐활량을 포함한다.
- [0226] 투여되는 실제 양, 및 투여의 속도 및 시간 경과는 치료될 대상의 성질 및 중증도, 치료될 구체적인 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 질환의 원인, 조성물의 전달 부위, 길항제의 유형, 투여 방법, 투여 일정, 및 의사에게 공지되어 있는 다른 인자들에 의해 좌우될 것이다. 치료의 처방, 예를 들면, 투여량 등의 결정은 일반의 및 다른 의사의 책임 내에 있고 치료될 질환의 증상의 중증도 및/또는 진행에 의해 좌우될 수 있다. 항체의 적절한 투여량은 당업계에서 잘 공지되어 있다(참고문헌 33 및 34). 투여될 약제의 유형에 적합하다면 본원 또는 문헌(Physician's Desk Reference (2003))에 표시된 특정 투여량이 사용될 수 있다. 치료 유효량 또는 적합한 투여량은 동물 모델에서 그의 시험관내 활성과 생체내 활성을 비교함으로써 결정될 수 있다. 마우스 및 다른 시험동물의 유효 투여량을 인간에게 외삽하는 방법은 공지되어 있다. 정확한 투여량은 항체(예를 들면, 전장 항체, 단편 또는 디아바디)의 정확한 성질, 환자 상태 및 투약 일정에 의해 좌우될 것이다. 전형적인 항체 투여량은 전신 적용의 경우 $100 \mu\text{g}$ 내지 1 g 의 범위 내에 있을 것이다. 일부 실시양태에서, 초기 보다 높은 부하(load) 투여량이 투여된 후, 보다 낮은 투여량이 1회 이상 투여될 수 있다. 전형적으로, 항체는 전장 항체, 예를 들면, IgG1 이소타입, IgG2 이소타입, IgG3 이소타입 또는 IgG4 이소타입일 것이다. 이것은 성인 환자의 단회 치료를 위한 투여량이고, 이 투여량은 소아 및 유아에 대해 비례적으로 조절될 수 있고 분자량에 비례하여 다른 항체 형식(format)에 대해서도 조절될 수 있다. 치료는 의사의 재량으로 매일, 매주 2회, 매주 또는 매월 간격으로 반복될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 피하 투여의 경우 2주 내지 4주마다 수행될 수 있고, 정맥내 투여의 경우 4주 내지 8주마다 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 대상체의 수명의 나머지 기간 동안 주기적 투약을 필요로 한다.
- [0227] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 전신으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 흡입에 의해 효과적으로 전달되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 비전신으로 효과적으로 전달되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 연속 투약을 필요로 한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일의 기간 동안 연속 투약을 필요로 한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주의 기간 동안 연속 투약을 필요로 한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물

은 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 12개월의 기간 동안 연속 투약을 필요로 한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 대상체의 수명의 나머지 기간 동안 연속 투약을 필요로 한다.

[0228] (vi) 항체 및 길항체의 제조

[0229] 일부 양태에서, 본 개시내용은 유효 약제가 IL-1R1에 특이적으로 결합하는 항체인 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 유효 약제가 IL-1 α 에 특이적으로 결합하는 항체인 방법을 제공한다. 예시적인 항체는 뮤린, 키메라, 인간화된 및 인간 항체뿐만 아니라 항원 결합 단편도 포함한다. 적합한 항체는 당업계에서 잘 공지되어 있는 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 항체는 재조합적으로 발생될 수 있거나, 파지 표시를 이용함으로써 제조될 수 있거나, 하이브리도마 기술을 이용함으로써 생성될 수 있다. 기법의 비제한적인 예는 이하에 간단히 기재되어 있다.

[0230] 일반적으로, 단일클론 항체 또는 이의 기능성 단편, 특히 뮤린으로부터 유래된 단일클론 항체 또는 이의 기능성 단편을 제조하기 위해, 매뉴얼("Antibodies") (참고문헌 35)에 구체적으로 기재되어 있는 기법, 또는 코흘러 (Kohler) 및 밀스테인 (Milstein) (참고문헌 36)에 의해 기재된 하이브리도마로부터의 제조 기법을 참조할 수 있다.

[0231] 단일클론 항체는 예를 들면, IL-1R1 또는 IL-1 α , 또는 상기 단일클론 항체에 의해 인식되는 에피토프를 함유하는 IL-1R1 또는 IL-1 α 의 단편들 중 하나에 대해 면역화된 동물로부터 수득된 세포로부터 수득될 수 있다. 적합한 단편 및 이를 포함하는 웨티드 또는 폴리웨티드를 사용하여 동물을 면역화시킴으로써 IL-1R1 또는 IL-1 α 에 대한 항체를 발생시킬 수 있다. 상기 IL-1R1 또는 IL-1 α , 또는 이의 단편들 중 하나는 특히 통상적인 작업 방법에 따라 생성될 수 있거나, IL-1R1 또는 IL-1 α , 또는 이의 단편을 코딩하는 cDNA 서열 내에 함유된 핵산 서열로 시작되는 유전적 재조합에 의해 생성될 수 있거나, IL-1R1 또는 IL-1 α , 및/또는 이의 단편의 웨티드 서열 내에 포함된 아미노산 서열로부터 시작되는 웨티드 합성에 의해 생성될 수 있다.

[0232] 단일클론 항체는 예를 들면, IL-1R1 또는 IL-1 α , 또는 상기 단일클론 항체에 의해 인식되는 에피토프를 함유하는 IL-1R1 또는 IL-1 α 의 단편들 중 하나가 이미 고정되어 있는 친화성 컬럼 상에서 정제될 수 있다. 보다 구체적으로, 단일클론 항체는 단백질 A 및/또는 G 상의 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있고, 상기 크로마토그래피 후, 본질적으로 잔류 단백질 오염물질뿐만 아니라 DNA 및 지질다당류(LPS)를 제거하는 것을 목적으로 하는 이온 교환 크로마토그래피를 수행하거나 수행하지 않을 수 있고, 상기 이온 교환 크로마토그래피 후, 이량체 또는 다른 다량체의 존재로 인한 잠재적인 응집체를 제거하기 위한 세파로스™ 겔 상의 배제 크로마토그래피를 수행하거나 수행하지 않을 수 있다. 한 실시양태에서, 이를 기법 전부가 동시적으로 또는 연속적으로 이용될 수 있다.

[0233] 단일클론 항체 및 다른 항체를 수득하고 재조합 DNA 기술의 기법을 이용하여 표적 항원에 결합하는 다른 항체 또는 키메라 분자를 생성할 수 있다. 이러한 기법들은 항체의 면역글로불린 가변 영역 또는 CDR을 코딩하는 DNA를 상이한 면역글로불린의 불변 영역 또는 불변 영역 플러스 골격 영역에 도입하는 단계를 수반할 수 있다. 예를 들면, 유럽 특허출원 공보 제184187호, 영국 특허출원 공보 제2188638A호 또는 유럽 특허출원 공보 제239400호, 및 매우 많은 후속 문헌을 참조한다. 하이브리도마 또는 다른 항체 생성 세포는 생성된 항체의 결합 특이성을 변경시킬 수 있거나 변경시킬 수 없는 유전적 돌연변이 또는 다른 변화를 가질 수 있다.

[0234] 항체 조작 분야에서 이용가능한 추가 기법은 인간 항체 및 인간화된 항체를 단리하는 것을 가능하게 하였다. 예를 들면, 인간 하이브리도마는 콘터만(Kontermann) 및 뒤벨(Dubel) (참고문헌 37)에 의해 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 길항체를 발생시키는 또 다른 확립된 기법인 파지 표시는 많은 문헌, 예컨대, 콘터만 및 뒤벨의 문헌(참고문헌 37), 국제 특허출원 공보 제W092/01047호(이하에 더 논의되어 있음), 및 미국 특허 제5,969,108호, 제5,565,332호, 제5,733,743호, 제5,858,657호, 제5,871,907호, 제5,872,215호, 제5,885,793호, 제5,962,255호, 제6,140,471호, 제6,172,197호, 제6,225,447호, 제6,291,650호, 제6,492,160호 및 제6,521,404호에 상세히 기재되어 있다.

[0235] 마우스 면역 시스템의 다른 구성성분을 온전한 상태로 남겨두면서 마우스 항체 유전자가 불활성화되어 있고 인간 항체 유전자로 기능적으로 치환되어 있는 형질전환 마우스는 인간 항체를 단리하는 데에 사용될 수 있다(참고문헌 38). 인간화된 항체는 당업계에서 공지되어 있는 기법, 예를 들면, 국제 특허출원 공보 제W091/09967호, 미국 특허 제5,585,089호, 유럽 특허 제592106호, 미국 특허 제5,565,332호 및 국제 특허출원 공보 제W093/17105호에 개시된 기법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 또한, 국제 특허출원 공보 제W02004/006955호는

비인간 항체의 가변 영역의 CDR 서열에 대한 정규 CDR 구조 유형을 인간 항체 서열, 예를 들면, 생식세포주 항체 유전자 분절의 라이브러리로부터의 상응하는 CDR에 대한 정규 CDR 구조 유형과 비교함으로써 인간 항체 유전자로부터 가변 영역 골격 서열을 선택하는 것에 기초하여 항체를 인간화시키는 방법을 기술한다. 비인간 CDR과 유사한 정규 CDR 구조 유형을 갖는 인간 항체 가변 영역들은 인간 항체 서열들을 구성원으로 하는 하위셋을 형성하고, 이로부터 인간 골격 서열을 선택한다. 상기 하위셋 구성원은 인간 CDR 서열과 비인간 CDR 서열 사이의 아미노산 유사성에 의해 추가로 등급이 매겨질 수 있다. 국제 특허출원 공보 제WO2004/006955호의 방법에서, 상위 등급의 인간 서열은 비인간 항체와 인간 항체 사이에 골격 서열을 비교할 필요 없이 선택된 하위셋 구성원 인간 골격을 사용하여 인간 CDR 서열을 비인간 CDR 대응물로 기능적으로 치환시킴으로써 높은 친화성 및 낮은 면역원성을 나타내는 인간화된 항체를 제공하는 키메라 항체의 구축을 위한 골격 서열을 제공하도록 선택된다. 상기 방법에 따라 제조된 키메라 항체도 개시되어 있다.

[0236] 합성 항체 분자는 예를 들면, 크나피크 등(Knappik *et al.*)(참고문헌 39) 또는 크렙스 등(Krebs *et al.*)(참고문헌 40)에 의해 기재된 바와 같이 합성되어 적합한 발현 벡터 내에 조립된 올리고뉴클레오티드에 의해 발생된 유전자로부터의 발현에 의해 생성될 수 있다.

[0237] 관심있는 항체가 어떻게 처음으로 확인되고 제조되는지와 관계없이, 임의의 이러한 항체는 추후에 재조합 기법을 이용함으로써 생성될 수 있다는 것을 인식해야 한다. 예를 들면, 상기 항체를 코딩하는 핵산 서열은 숙주 세포 내에서 발현될 수 있다. 이러한 방법은 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 별개의 벡터로부터 발현시키는 것뿐만 아니라 상기 핵산 서열을 동일한 벡터로부터 발현시키는 것도 포함한다. 다양한 유형의 세포를 사용하는 이들 기법 및 다른 기법은 당업계에서 잘 공지되어 있다.

[0238] 적합한 항체들은 하나 이상의 분석에서 시험될 수 있다. 예를 들면, 항체들은 이들이 이들의 대표적인 항체들과 유사한 기능성을 보유하는지를 확인하기 위해 실시예에서 제공된 분석들 중 임의의 분석에서 시험될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 항체들은 이들이 이들 항체들 중 임의의 항체가 결합하는 에피토프와 동일한 또는 실질적으로 동일한 에피토프에 결합하는지를 평가하기 위해 시험될 수 있다. 항체들이 하나 이상의 원하는 종으로부터의 표적 항원에 특이적으로 결합하는지를 확인하기 위한 결합 분석도 수행될 수 있다. 또한, 중화 성능(예를 들면, IL-1R1과 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 의 결합을 방해하는 항-IL-1R1 항체의 능력)이 시험될 수 있다.

[0239] 비항체 길항체의 경우, 이러한 길항체는 당업계에서 공지되어 있는 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 단백질 길항체는 재조합 기술을 이용함으로써 제조될 수 있거나 합성적으로 제조될 수 있다. 예시적인 단백질 길항체는 IL-1Ra의 상업적으로 입수 가능한 형태인 키네лет이다.

0240] 실시예

[0241] 본 개시내용은 지금까지 일반적으로 기재되어 있지만, 본 개시내용의 일부 양태 및 실시양태의 예증을 위한 목적으로만 포함되고 본 개시내용을 한정하기 위한 것이 아닌 하기 실시예를 참고함으로써 더 용이하게 이해될 것이다. 예를 들면, 본원에 개시된 구체적인 구축물 및 실험적인 디자인은 적절한 기능을 검증하기 위한 예시적인 수단 및 방법을 대표한다.

[0242] **실시예 1 - IL-1R1 차단은 시험관내에서 및 생체내에서 IL-1 β 의 효과를 억제한다.**

[0243] 본 실시예 및 추가 실시예에서 사용된 수단들 중 몇몇은 항체 6(IL-1R1에 특이적으로 결합하는 인간 항체; 본원에서 제공된 서열) 및 아나킨라(키네лет으로도 공지되어 있음)이다. 마우스의 기관내로 주입되었을 때, 항체 6은 일차 인간 COPD 섬유아세포에서 IL-1 β 에 의해 유도된 IL-6을 완전히 억제하였고(도 1a), 아나킨라는 4시간 후 BAL에서 회수된 호중구를 증가시키는 IL-1 β 의 능력을 71%까지 억제하였다(도 1b). 이것은 IL-1R1에 작용하여 IL-1 β 에 의해 매개된 효과를 억제하는 것으로 밝혀진 아나킨라 및 다른 항-IL-1R1 항체, 예컨대, 항-마우스 IL-1R1 항체 35F5에 대한 문헌의 결과와 일치한다. 실시예에서 더 기재되어 있는 바와 같이, 본 개시내용은 IL-1 α 에 의해 매개된 활성에 대한 추가적인 놀라운 효과를 밝힘으로써 IL-1 α 가 COPD와 관련되어 있다는 것을 처음으로 밝혔다.

[0244] COPD 조직에서 IL-1 β 에 대한 IL-1R1의 효과를 조사하기 위해, IL-1R1 길항체로 처리된 일차 COPD 폐 섬유아세포에서 IL-6 수준을 조사하였다. IL-1R1 길항체 활성을 나타내는 항체 6(인간 IL-1R1에 특이적으로 결합하는 인간 항체; 본 실험에서 사용된 생식세포주 유래 베전)은 COPD 폐 섬유아세포에서 IL-1 β 에 의해 유도된 IL-6 방출을 억제하였다(도 1a). IL-1 β 처리 농도는 약 0.5 ng/ml(대략 EC₅₀)이었다.

[0245] 전술된 바와 같이, 마우스 폐에서 IL-1 β 에 의해 유도된 호중구에 의해 매개된 염증에 대한 IL-1R1 길항체 처리

의 효과도 조사하였다(도 1b). 5 ng/50 μ l의 IL-1 β 를 처리하기 1시간 전에 아나킨라(키네렛TM)를 피하 투약하였다. 4시간 후에 세포 수를 BAL로 수득하였다. 아나킨라는 대조군 IL-1 처리 동물과 비교되었을 때 세포 수를 71%까지 감소시켰다.

[0246] 시험관내 방법:

[0247] 폐 이식을 받은 중증 COPD 환자의 COPD 폐 조직으로부터의 내피세포 발생의 부산물로서 COPD 섬유아세포를 발생시켰다. 조직 제거 시, 환자의 질환은 안정하였고 악화되지 않았다.

[0248] 조직 배양 플라스크를 멸균 여과 후 젤라틴(증류수 중의 0.2%)으로 코팅하였고 사용 전에 세포 배지로 세정하였다.

[0249] 흉막으로부터 조직을 절개하였고 RPMI+(RPMI+는 RPMI 배지 + 10% FCS, 1% 폐니실린/스트렙토마이신/암포테리신 B 용액이었음) 배지 중의 메잘루나(mezzaluna)를 사용하여 잘게 절단하였다. 절단된 조직(표준 파스테르 피펫 내로 용이하게 흡인되기에 충분한 정도로 미세한 경우)을 40 마이크론 필터 상에서 세척하여 파편(debris) 및 적혈구 세포를 제거하였다. 멸균 기구를 이용하여 세포를 상기 필터로부터 제거하였고 RPMI, 0.1% BSA 및 0.2% 콜라겐분해효소(collagenase) II형에서의 분해를 위해 재현탁시켰다. 조직을 실온에서 롤러 상에서 2시간 동안 항온처리하였다. 튜브를 때때로 약하게 진탕하여 조직이 뭉쳐져 정치되는 것을 방지하였다. 2시간 후, 혼탁액을 약하게 교반한 후, 큰 메쉬 여과기(strainer)를 통해 여과한 다음 100 마이크론 필터를 통해 여과하였다. 그 다음, 여과액을 실온에서 1,200 rpm에서 5분 동안 회전시켰다. 그 다음, 세포 펠렛을 RPMI+로 세척하였고, 회전 및 세척을 반복하였다. 그 다음, 세포를 내피 배양 배지(EGM-2-MV 불릿키트(BulletKit), 클로네틱스(Clonetics) #CC3202)에 재현탁시켰고 젤라틴으로 코팅된 플라스크 내로 플레이팅하였다. 세포를 T225 플라스크당 약 2e7개 세포의 밀도로 플레이팅하였다. 다음 날, 배지로 세포를 씻어내었고, 세포가 컨플루언스(confluence)에 도달하였을 때 세포 탈착액을 사용하여 세포를 계대배양하였다. 이 시점에서, CD31 다이나비드(Dynabead)를 사용하여 내피세포를 풍부하게 하였고, 이때 비드와의 결합에 대해 음성을 나타내는 세포는 주로 섬유아세포이었고, 이 세포의 수를 세어 COPD 섬유아세포 분석에 사용할 수 있었다.

[0250] 이 시점부터, 세포를 10% 태아소 혈청(FCS)으로 보충된 DMEM에서 배양하였다. 섬유아세포를 96 웰 평저 풀리스 티렌 플레이트 내에 웰당 1e5개 세포의 밀도로 플레이팅하였고 37°C에서 밤새 항온처리하여 부착시켰다. 0.5 ng/ml 최종 분석 농도의 IL-1 β 농도로 IL-1 β (알 앤드 디 시스템스 201-LB/CF)를 첨가하기 전에 항체 또는 배지만을 이중 웰 내에서 세포와 함께 30분 동안 예비항온처리하였다. 각각의 웰에서 최종 부피는 200 μ l이었다. 상기 플레이트를 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 항온처리하였다. 상기 플레이트를 얇게 회전시킨 후, 알 앤드 디 시스템스 ELISA(DY206)를 이용하여 IL-6 수준을 분석하기 위해 상청액을 회수하였다.

[0251] 생체내 방법:

[0252] 마우스는 성체 Balb/c 암컷이었다. 50 μ l 중의 5 ng의 투여량을 이용하여 IL-1 β 를 마우스에게 기관내로 투여하기 1시간 전에 아나킨라를 피하로 투약하였다. 4시간 후, 상기 마우스의 폐를 본질적으로 급성 연기 노출 모델(실시예 2)의 경우에서와 같이 세척하였고, 총 세포 및 분화 세포 계수(counting)를 수행하였다.

[0253] 실시예 2 - IL-1R1 길항제는 폐 염증의 급성 담배 연기 노출 모델에서 세포 유입을 억제한다.

[0254] 항체 35F5는 마우스 IL-1R1에 결합하여 IL-1 β 및 IL-1 α 둘다와 수용체 IL-1R1의 결합을 방해하는 단일클론 항체이다. 아나킨라는 IL-1 β 및 IL-1 α 둘다의 효과를 길항한다. 인터루킨 1은 인간에서 안정한 질환, 및 염증 과정에서 흡연에 의해 유도된 변경과의 강한 질환 연관성을 보여준다. 본 실시예에서 나타낸 데이터는 35F5에 의한 IL-1R1의 억제가 COPD와 관련된 자극, 예컨대, 연기에 의해 유도된 뮤린 폐 염증의 급성 모델에서 염증을 감소시킨다는 것을 확인시켜준다. 이것은 공용 도메인에서의 이전의 관찰결과, 및 IL-1Ra(아나킨라; IL-1 수용체 길항제)를 사용한 다른 연구와 일치한다. 이 마우스 모델에서, 궤련 연기는 4일간의 연기 흡입 후에 호흡구 BAL 세포 수의 유의한 증가를 야기한다. 궤련 연기 흡입에 대한 급성 염증 반응에 대한 IL-1R1 경로 억제의 효과를 연구하기 위해, Balb/c 마우스를 5일 동안 매일 2회씩 (50분 동안) 궤련 연기에 노출시켰고, 일차 연기 노출 48시간 전에 시작하여 4일 동안 계속하여 35F5, 이소타입 대조군 래트 IgG1(MAB005) 또는 식염수를 매일 1회 씩 복강내로 투약하였다. 5일째 날, 동물들을 희생시켰고, BAL을 수행하였다. 동물들을 전술된 바와 같이 궤련 연기에 노출시키되 일차 연기 노출 48시간 전에 투약을 시작하여 관주 펌프(알겟)를 이용하여 아나킨라를 연속적으로 피하(SC) 투약하는 추가 치료 아암(arm)을 포함시켰다. 35F5 및 알겟에 의해 투여된 아나킨라 둘다가 마우스의 BAL에서 담배 연기에 의해 유도된 급성 염증세포 침윤을 유의하게 억제한 반면, 이소타입 대조군 항체

(MAB005)는 효과를 나타내지 않았다. 35F5는 연기에 의해 유도된 총 세포($p<0.001$), 호중구($p<0.01$) 및 램프구($p<0.001$)의 증가를 유의하게 감소시켰다. 본 연구에서, 연기 노출에 반응하여 일어난 BAL 중의 대식세포의 유의한 증가는 없었다. 폐 염증세포에 대한 연기 노출의 효과 및 IL-1R1 질항체에 의한 억제에 대한 요약은 도 3에 제공되어 있다. 본 연구에 대한 프로토콜은 도 2에 나타나 있고 방법 단락에 기재되어 있다. 알겠 처리를 위한 삼투 펌프의 이식은 처리 전에 회복되도록 순화와 처리 사이에서 수행되었다. 35F5는 비디 바이오사이언시스/비디 파밍겐에 의해 시판되는 상업적으로 입수 가능한 설치류 항체이다. MAB005 이소타입 대조군은 알 앤드 디 시스템스로부터 입수 가능하다.

[0255] 방법:

[0256] 성체 Balb/c 암컷 마우스를 두 연구를 위해 사용하였다. 항체 35F5는 비디 바이오사이언스(센 디에고 소재)(정제된 NA/LE 래트 항-마우스 CD121a, 카달로그 번호 624094)로부터 공급되었고, IL-1R1에 대해 특이적인 래트 IgG1 단일클론 항체이었다. 상기 항체는 매우 낮은 수준의 내독소($<0.01 \text{ ng}/\mu\text{g}$ 내독소)를 함유하였고 보존제를 함유하지 않았다. 래트 이소타입 대조군은 알 앤드 디 시스템스(카달로그 번호 MAB005, 배치 CAN070905A)로부터 공급되었고 낮은 수준의 내독소($<0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$)를 함유하였다. 아나킨라는 약국으로부터 입수되었다 - 키네텍 DB00026(BTD00060; BIOD00060) 로트 번호 1004729(004699) exp 072009(암젠). 필터가 제거된 켄터키 연구 등급 관련 IR3F를 사용하였다(담배와 건강 연구소, 켄터키 대학). 몇몇 마우스에서 아나킨라를 연속적으로 투여하기 위해 사용된 삼투 펌프는 알겠 모델 2001(공칭 성능(37°C 에서) $0.93 \mu\text{l}/\text{hr}$, 7일 지속, 0.23 ml 저장기 부피)이었다. 펌프를 실온까지 가온된(광으로부터 보호된) 아나킨라로 충전시켰다. $48 \text{ mg}/\text{kg}/\text{일}$ 의 투여량을 제공하기 위해 $150 \text{ mg}/\text{ml}$ 의 원액을 등장성 식염수로 희석하였고, 상기 펌프를 제조자의 설명서에 따라 멸균 상태에서 충전시켰다.

[0257] 실험을 시작하기 7일 이상 전에 동물들을 제공받았고, 흡연 기계와 연결된 노출 박스에서 증가된 시간 동안 연기를 공급하지 않으면서 상기 동물들을 순화시켰고 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 12시간 명/암 주기 및 $55 \pm 15\%$ 습도를 갖는 시설 내에서 유지시켰다. 표준 음식물 및 수돗물을 사용하여 상기 동물들에게 음식물 및 물을 무제한적으로 공급하였다. 연구 시작 전, 동물들을 군으로 무작위로 나누었다. 삼투 펌프 이식을 받은 동물들의 체중을 측정하였고 이 동물들을 혼수 상태 하에서 이소플루오란 혼합물(N_2O , O_2 1.4:1.2 및 3% 이소플루란)로 마취시켰고, 좌측 견갑골 부위를 면도하고 세정한 후, 미측 견갑골 연(*marginus caudalis scapulae*) 뒤에서 5 cm의 작은 등배 피부 절개부를 만들었다. 절개 부위를 위생처리액(sanitising fluid)(마카인 50 mg/ml)에 담근 후, 가위를 이용하여 피하 조직에서 주낭(pocket)을 개방하였다. 충전된 펌프를 일차 전달 문맥(portal)인 상기 주낭 내에 삽입하여 상기 절개부와의 상호작용을 최소화하였다. 상기 절개부를 멸균 상태 하에서 봉합사로 폐쇄시키고 마우스를 회복할 때까지 관찰하였다. 이 절차로부터 48시간 이상의 시간 후에 관련 연기(CS) 노출 기간을 시작하였다.

[0258] 항체(또는 복강내 아나킨라 군에서 아나킨라)를 $200 \mu\text{l}$ 미만의 부피 내지 $10 \text{ ml}/\text{kg}$ (체중) 이하의 부피로 복강내(i.p.)로 투여하였다(개별 연구 일정에 따라 4회 주사). 항체(또는 복강내 아나킨라 군에서 아나킨라)를 $15 \text{ mg}/\text{kg}$ 의 공칭 농도로 투약하였다.

[0259] 삼투 펌프 이식으로부터 48시간 후 또는 복강내 항체 투여로부터 1시간 후, 상기 마우스에게 일차 흡연 기간을 제공하였다. 마우스를 연기 노출 기간마다 전신 노출 상자 내에 무작위적으로 배치하였고 1일째 날 내지 4일째 날에 매일 2회씩 50분 동안 연기에 노출시켰다. 50분 동안의 연기는 10개의 관련에 해당하고, 연기 기계는 공기와 연기의 "내뿜기"를 교대로 수행한다. 대조군에게 동일한 절차를 제공하되 연기 대신에 공기를 제공하였다. 5일째 날(최종 연기 노출로부터 16시간 후), 펜토바르비탈을 투여하여 마우스를 회생시켰다. 기관의 노출 후, 폐를 23 cm의 정수압에서 실온의 PBS(Mg 및 Ca 무함유)로 세척하였다(2분 유입 및 1분 유출, 및 이 절차의 반복). 세포를 원심분리하였고(상청액은 매개자에 대해 분석될 수 있었음), 자동 계수기, 예컨대, 시스멕스(Sysmex) XT-1800i Vet를 이용하여 상기 세포를 총 세포 및 분화 세포 계수에 대해 분석하였다. 일방(one-tailed) 분포 및 2 샘플 이분산(unequal variance)을 갖는 스튜던트 t 검정을 이용하여 군 사이의 차이의 유의성을 최소 유의성으로서 계산하였다(일측 스튜던트 t 검정, 이분산). p 값에 대한 한계는 $p \leq 0.05$ 이다.

[0260] 실시예 3 - IL-1 α 는 급성 마우스 모델에서 담배 연기에 의해 유도된 염증에 있어서 중요한 역할을 한다.

[0261] 연기에 의해 유도된 염증 모델에서 IL-1 α 의 억제를 보여주는 연구는 없다. IL-1 α 및 IL-1 β 둘다가 시험관내 단순 활성 분석에서 유사한 농도에서 IL-1R1의 동등한 활성화를 유도하므로, 본 발명자들은 IL-1 α 및 IL-1 β 둘다가 질환에서 존재하는 경우 IL-1R1을 활성화시킬 수 있다고 가정하였다. 그러나, 질환에서 IL-1 α 의 임의의 연관성을 기술하는 문헌은 아직까지 없었다. 여기서, 본 발명자들은 IL-1 α 가 연기에 의해 유도된 급성 염증에

서 중추적인 역할을 수행한다는 것을 입증한다.

- [0262] 먼저, 본 발명자들은 IL-1 α 및 IL-1 β 둘다가 연기에 노출된 마우스의 폐에 존재한다는 것을 입증하였다. 실내 공기 대조군 마우스에서 IL-1 α 의 발현은 주로 폐포 공간 내의 대식세포, 및 종종 세기관지 점막 내의 상피내세포에 국한되었고, 낮은 등급의 염색이 종종 세기관지 상피세포 및 상피분비세포 상에서 인지되었다(도 4a). 연기에 노출된 마우스에서, IL-1 α 염색이 종종 과다형성 세기관지 상피세포 상에서도 인지되었지만, 증폭된 폐포 대식세포 집단 상에서의 현저한 IL-1 α 발현은 핵심적인 조직학적 표현형이었다. 물론, 세기관지 및 혈관 외막 구획 내의 침윤 세포는 음성을 나타내었다.
- [0263] IL-1 α 발현 패턴과 대조적으로, IL-1 β 의 광범위한 조직 발현이 실내 공기 및 연기에 노출된 마우스에서 관찰되었다(도 4a). 실내 공기 대조군에서, 가변적인 발현이 폐포 대식세포 집단에서 인지되었다. 또한, 폐포 I형 (ATI) 및 ATII 세포 상에서, 특히 ATII 세포의 말단 폐포싹(alveolar bud) 내에서 및 종종 비대 ATII 세포 상에서 발현이 존재하였다. 연기에 노출된 동물에서, 증폭된 폐포 대식세포 집단에서의 현저한 염색이 관찰되었다. 게다가, ATI 및 ATII 세포 둘다, 특히 비대 형태의 세포에서 증가된 발현이 관찰되었다. IL-1 β 의 광범하고 현저한 발현은 세기관지 상피 상에서도 관찰되었다. 이것은 특히 비대세포 및 상피분비세포 상에서 뚜렷하였다. 실시예 12, 및 도 13a 및 13b와의 비교에 의해 알 수 있는 바와 같이, 연기에 노출된 마우스에서 IL-1 α 및 IL-1 β 의 조직 발현은 COPD 환자에서 관찰된 집단과 유사한, 염증 침윤물 및 정주세포 둘다로 구성된 집단을 수반한다.
- [0264] COPD 환자로부터의 샘플 및 상기 마우스 모델에서 IL-1 α 및 IL-1 β 의 발현 프로필 사이의 유사성을 고려하여, 본 발명자들은 이 실험 모델을 플랫폼으로서 이용하여 궤련 연기에 의해 유도된 염증 및 바이러스성 악화에 있어서 IL-1 α 및 IL-1 β 의 기능적 중요성 조사하였다. 상기 모델은 COPD 및 COPD 악화를 재현할 것으로 예측된다. 본 발명자들은 대조군과 비교되었을 때 연기에 노출된 동물의 폐에서 총 IL-1 α 및 IL-1 β 의 증가된 수준을 관찰하였다(각각 도 4b 및 4c).
- [0265] 본 발명자들의 모델에서 호중구 염증의 역할을 평가하기 위해, IL-1R1 결핍 마우스 및 야생형 마우스를 궤련 연기에 노출시켰다. 야생형 대조군과 비교되었을 때 IL-1R1 결핍 동물의 기관지폐포 세척물(BAL)에서 호중구증가(neutrophilia)가 완전히 악화되었다(도 4f). IL-1R1 결핍은 연기에 노출된 마우스의 BAL에서 총 세포 및 단핵구의 수에 영향을 미치지 않았다(각각 도 4d 및 4e). 호중구 동원 케모카인인 CXCL-1, CXCL-2 및 CXCL-5의 발현이 야생형 마우스의 연기 노출 후에 증가되었지만, IL-1R1 결핍은 이 유도를 유의하게 감소시켰다.
- [0266] 카스파제-1이 전구-IL-1 β 를 그의 생체활성 형태로 절단하고 이 과정이 궤련 연기에 의해 유도된 호중구 염증에 기여하는 것으로 밝혀진 점을 고려하여, 본 발명자들은 카스파제-1 결핍 마우스를 궤련 연기에 노출시켰다. 카스파제-1 결핍은 BAL에서 연기에 의해 유도된 호중구증가를 유의하게 변경시키지 않았다(도 4i). 유사하게, BAL의 총 세포 및 단핵구의 수는 야생형 대조군과 비교되었을 때 연기에 노출된 카스파제-1 결핍 마우스에서 감소되지 않았다(각각 도 4g 및 4h). 흥미롭게도, 본 발명자들은 야생형 마우스 및 카스파제-1 결핍 마우스에서 총 IL-1 α 및 IL-1 β 단백질의 유사한 수준을 관찰하였고(각각 도 4j 및 4k), 이것은 IL-1 β 의 프로세싱 및 활성화도 독립적으로 또는 카스파제-1의 부재 하에서 달성될 수 있거나, IL-1 β 의 겸출이 불활성 전구-IL-1 β 와 활성화 IL-1 β 를 식별하지 못한다는 것을 암시한다.
- [0267] 호중구 염증에 있어서 IL-1 α 및 IL-1 β 의 상대적인 역할을 확인하기 위해, 본 발명자들은 항-IL-1 α 또는 항-IL-1 β 차단 항체, 또는 이소타입 대조군 항체를 궤련 연기에 노출된 마우스에게 투여하였다. 항-IL-1 α 투여는 연기에 의해 유도된 호중구증가를 방해한 반면(도 5a), 항-IL-1 β 차단 및 이소타입 대조군의 투여 중 어떠한 것도 궤련 연기에 의해 유도된 염증에 영향을 미치지 않았다. 이들 데이터는 궤련 연기에 의해 유도된 염증을 막개하는 데 있어서 IL-1 α 의 중추적인 역할을 암시한다.
- [0268] IL-1 α 가 연기에 노출된 마우스의 폐로의 호중구 동원을 유의하게 악화시켰기 때문에, 본 발명자들은 호중구 동원 케모카인이 IL-1 α 의 차단에 의해 우선적으로 감소되는지를 평가하였다. 본 발명자들은 궤련 연기 노출 후에 CXCL-1 RNA 및 단백질의 유의하게 증가된 발현을 관찰하였다(각각 도 5b 및 5c). 항-IL-1 α 는 연기에 노출된 마우스에서 CXCL-1 RNA 및 단백질 발현을 감소시켰지만 항-IL-1 β 는 감소시키지 못하였다. 이소타입 항체 전달도 전사체 또는 단백질 발현 수준을 변경시키지 못하였다. 나아가, 연기 노출 후에 증가된 CXCL-2, CXCL-10 및 CXCL-5 유전자 발현은 항-IL-1 α 를 사용한 처리 후에 감소하였지만, 항-IL-1 β 를 사용한 처리 후에는 감소하지 않았다(도 5f). 더불어, 이들 데이터는 연기에 노출된 동물에서 관찰된 호중구 염증이 CXCL-1, CXCL-2 및 CXCL-5의 발현을 필요로 하고, 이들 인자들의 발현이 IL-1 α 의 차단에 의해서는 악화되나 IL-1 β 의 차단에 의해서는 악화되지 않는다는 결론과 일치한다.

- [0269] 그 다음, IL-1R1을 통한 IL-1 α 및 IL-1 β 신호 둘다로서, 본 발명자들은 IL-1 α 억제가 IL-1 β 의 발현을 감소시키는지를 조사하였다. 도 5는 항-IL-1 α 항체를 제공받은, 궤련 연기에 노출된 마우스에서 유의하게 감소된 IL-1 β 전사체 및 단백질 수준을 보여준다(각각 패널 d 및 e). 유사하게, 본 발명자들은 궤련 연기에 의해 유도된 염증과 관련되어 있는 것으로 최근에 밝혀진 사이토카인인 GM-CSF의 감소된 발현을 관찰하였다. 또한, 본 발명자들은 항-IL-1 α 가 대식세포 엘라스타제 MMP-12의 발현 수준을 유의하게 감소시키지만 IL-1 β 억제는 감소시키지 못한다는 것을 발견하였다. 이들 데이터는 IL-1 α 가 연기에 노출된 마우스의 폐 내에서의 호중구의 축적을 유발하는 신호를 매개하는 데 있어서 결정적으로 중요하지만 IL-1 β 는 중요하지 않다는 것을 입증한다.
- [0270] 동물. BALB/c 마우스(6주령 내지 8주령)를 찰스 리버 레이보레이토리스(Charles River Laboratories)(캐나다 몬트리올 소재)로부터 구입하였다. IL-1R1 결핍 및 카스파제-1 결핍 마우스인 C57BL/6을 잭슨 레이보레이토리스(Jackson Laboratories)(미국 메인주 바 하버 소재)로부터 입수하였다. 마우스를 접근 제한 영역 내에서 특정 발열원 무함유 조건 하에서 12시간 명암 주기로 유지시켰고, 이때 음식물 및 물을 무제한적으로 공급하였다.
- [0271] 궤련 연기 노출. 전술된 바와 같이 SIU-48 전신 연기 노출 시스템(프로메흐 랩 아베(Promech Lab AB), 스웨덴 빈트리 소재)을 이용하여 마우스를 궤련 연기에 노출시켰다. 요약하건대, 마우스를 필터가 제거된 12개의 2R4F 기준 궤련(담배와 건강 연구소, 켄터키 대학, 미국 켄터키주 렉싱턴 소재)에 약 50분의 시간 동안 노출시켰다. 이 연기 노출 프로토콜은 검증되었고 일반 인간 흡연자에서 발견되는 수준에 필적할만한 혈중 카르복시해모글로빈 및 코티닌 수준을 달성하는 것으로 밝혀졌다. 대조군 동물들은 실내 공기에만 노출되었다.
- [0272] 항체의 투여. 400 μ g의 항-IL-1 α (클론 ALF161; 알 앤드 디 시스템스, 캐나다 벌링تون 소재), 항-IL-1 β (클론 B122; 알 앤드 디 시스템스) 또는 아르메니아 햄스터 이소타입 대조군 항체(잭슨 이뮤노리서치, 캐나다 벌링تون 소재)를 1차 연기 노출 12시간 전에 복강내로 마우스에게 주사한 후, 2차 연기 노출로부터 1시간 후에 매일 복강내로 상기 마우스에게 주사하였다. IL-1에 의해 유도된 bEnd-3(마우스 내피세포주) 세포로부터의 IL-6 방출이 억제된다는 것을 입증함으로써 IL-1 α 항체 및 IL-1 β 항체의 생체활성을 (공급자 질 조절 단계 이외에) 시험관내에서 확인하였다.
- [0273] 표본의 수집 및 측정. 폐를 0.25 mL의 냉동 1x PBS에 이어서 0.2 mL의 1x PBS로 충전시킨 후에 기관지폐포 세척물(BAL) 유체를 수집하였다. 혈구계를 이용하여 총 세포 수를 수득하였다. 분화 세포 수를 측정하기 위해 사이토스핀을 준비하였고 헤마(Hema) 3(바이오케미칼 사이언시스 인코포레이티드(Biochemical Sciences Inc.), 미국 뉴저지주 스웨데스보로 소재)으로 염색하였다. 사이토스핀당 300개의 세포를 세고, 표준 혈구학적 기준을 이용하여 단핵구, 호중구 및 호산구를 분류하였다.
- [0274] 조직학적 분석 및 면역조직화학. 마우스 폐의 BAL 후, 좌엽을 30 cm H₂O 압력에서 10% 포르말린으로 고정시켰다. 폐를 파라핀 블록 내에 포매시켰고, 4 μ m 두께의 횡단면을 발생시켰다. IL-1 α 및 IL-1 β 염색을 위해, 일차 항체 항온처리 전에 설치류 M 블록(바이오케어 메디칼(Biocare Medical), 미국 캘리포니아주 콘코드 소재)을 각각의 슬라이드에 30분 동안 첨가한 후 0.05% 트윈-20을 함유하는 트리스 완충 식염수(TBS-T)로 세척하였다. 10 μ g/mL의 염소 항-마우스 IL-1 α 및 IL-1 β (알 앤드 디 시스템스, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)를 올트라 항체 회석제(씨모 사이언티픽(Thermo Scientific), 미국 일리노이주 록포드 소재)로 제조하였고 상기 슬라이드와 함께 1시간 동안 항온처리하였다. 이차 염소 중합체 호스-라디쉬 과산화효소(peroxidase)를 제조자(바이오케어 메디칼, 미국 캘리포니아주 콘코드 소재)의 설명서에 따라 사용하였다.
- [0275] 플루이디아임 분석을 위한 RNA 추출. 쿼아젠 알엔이지(Qiagen RNeasy) 섬유 조직 키트를 제조자의 프로토콜(퀘이젠, 독일 헬렌 소재)에 따라 사용하여 단일 마우스 엽으로부터 RNA를 추출하였다. RNA를 정량하고 표준화하였고, 아질런트(Agilent) RNA 6000 나노 키트(아질런트, 미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재)를 사용하여 아질런트 생체분석기로 RNA 무결성(integrity)을 평가하였다. 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)로부터의 수퍼스크립트(SuperScript) III 키트를 제조자의 프로토콜(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)에 따라 사용하여 cDNA 발생을 수행하였다. 이미 기재되어 있는 바와 같이, 관심있는 전사체에 대한 프로브로 적재된 플루이디아임 바이오마크 다이나믹(Fluidigm Biomark Dynamic) 어레이를 이용하여 상대적인 전사체 발현을 평가하였다.
- [0276] ELISA 및 메소 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery) 분석. IL-1 α 및 IL-1 β 에 대한 효소 연결된 면역분석 키트를 알 앤드 디 시스템스(미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)로부터 구입하였고, 상기 분석을 권장된 프로토콜에 따라 수행하였다. 메소 스케일 디스커버리(MSD; 미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재)에 의해 개발된 다중어레이 뮤린 전구염증 및 Th1/Th2 사이토카인 패널 검출 시스템을 이용하여 케라틴으로부터 유래된 사이토

카인(KC) 및 IL-1 β 의 다중어레이 플랫폼 사이토카인 검출을 수행하였다.

- [0277] 데이터 및 통계학적 분석. 그레프패드 프리즘 소프트웨어 버전 5(미국 캘리포니아주 라 콜라 소재)를 이용하여 데이터를 분석하였고 평균±표준오차(SEM)로서 표현하였다. SPSS 통계 소프트웨어(버전 17.0)(미국 일리노이주 시카고 소재)를 이용하여 통계학적 분석을 수행하였다. 본 발명자들은 SPSS 일변량 일반 선형 모델(Univariate General Linear Model)을 이용하여 유의성($p<0.05$)을 평가한 후, 2개의 군을 비교하기 위해 t 검정을 수행하였거나 다수의 군을 비교하기 위해 던넷 사후(Dunnett post-hoc) 검정을 이용하여 일방 ANOVA를 수행하였다.
- [0278] **실시예 4** - 내방사성 간질 세포 상에서의 IL-1 수용체 발현은 궤련 연기에 의해 유도된 염증에 필수적이다.
- [0279] 도 6a와 6b의 비교에 의해 알 수 있는 바와 같이, 연기에 노출된 마우스에서 IL-1R1의 조직 발현은 COPD 환자에서 관찰된 집단과 유사한 정주세포 집단을 수반한다.
- [0280] 궤련 연기에 의해 유도된 COPD 염증 모델에서 조혈세포와 비조혈세포 사이의 상호작용의 중요성을 시험하기 위해, 본 발명자들은 IL-1R1 결핍 골수 키메라 마우스를 발생시켰다. 야생형 또는 IL-1R1 결핍 마우스로부터의 골수세포를 방사선조사된 야생형 또는 IL-1R1 결핍 수용자 마우스에게 정맥내로 전달하였다(도 6c). 8주 동안의 재구성 후, 마우스를 궤련 연기에 노출시켰고, 다양한 염증 파라미터를 평가하였다. 야생형 골수세포를 제공받은 야생형 동물(WT 내로의 WT)은 궤련 연기 노출에 반응하여 강력한 호중구증가를 발생시켰지만(도 6d), IL-1R1 결핍 골수세포로 재구성된 IL-1R1 결핍 동물(KO 내로의 KO)에서는 호중구증가가 관찰되지 않았다. 방사선조사된 IL-1R1 결핍 마우스 내로의 야생형 조혈세포의 전달(WT 내로의 WT)로부터 발생된 키메라 마우스는 연기에 대한 호중구 반응을 나타내지 못하였는데, 이것은 내방사성 비조혈세포 상에서의 IL-1R1 발현이 궤련 연기에 의해 유도된 염증을 위해 필수적이라는 것을 암시한다. 마지막으로, 방사선조사된 야생형 수용자 마우스 내로의 IL-1R1 결핍 조혈세포의 전달(WT 내로의 KO)은 궤련 연기에 의해 유도된 호중구증가에 있어서 유의하지만 부분적인 감소를 보였다.
- [0281] 또한, 본 발명자들은 CXCL-1, GM-CSF 및 MMP-12(각각 도 6e 내지 6g)를 포함하는 다양한 유전자의 발현도 조사하였고, 이들 모두가 IL-1R1 결핍 골수세포로 재구성된 IL-1R1 결핍 동물(KO 내로의 KO)에서 감소되었다. 흥미롭게도, WT 대조군 동물 내로 전달된 WT와 비교되었을 때, KO 키메라 동물 내로 전달된, 궤련 연기에 노출된 WT는 유의하게 감소된 유전자 발현을 가졌지만, WT 동물 내로 전달된 KO는 유의하게 감소된 유전자 발현을 갖지 않았다. 이들 결과는 IL-1R1에 의해 매개된 비조혈세포의 활성화가 궤련 연기에 의해 유도된 염증을 위한 전제 조건이지만, 조혈세포 상의 IL-1R1 발현은 최대 호중구 침윤을 위해 필요하다는 것을 뒷받침한다. 이것은 폐에서 상향조절된 IL-1 α 및 IL-1 β 가 IL-1R1을 발현하는 폐 정주세포에 대해 이론적으로 신속하게 국소적으로 작용하여 염증을 유도하기 때문에 중요하다. 이론에 구속받고자 하는 것은 아니지만, 이들 결과는 IL-1R1 차단 전략이 가용성 IL-1 차단보다 더 효과적일 수 있고, 폐 및 전신 둘다에서 IL-1R1의 차단이 추가 이점을 가질 것임을 암시할 수 있다.
- [0282] 방법. 인간 절편에서 IL-1R1 염색에 대한 면역화학에 대해서는 실시예 12를 참조한다. 마우스 면역화학은 5 μ g/ml의 염소 항-마우스 IL-1R1 항체(알 앤드 디 시스템스, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)가 항-IL-1 α 또는 항-IL-1 β 항체 대신에 1시간 동안 슬라이드 상에서 항온처리되었다는 점을 제외하고 본질적으로 실시예 3과 동일하였다.
- [0283] IL-1R1 결핍 골수 키메라 마우스의 발생. 5백만 개의 C57BL/6 야생형 또는 IL-1R1 결핍 골수세포를 방사선조사된(550 라드의 2회 조사(총 11 그레이)) 수용자 C57BL/6 야생형(WT) 또는 IL-1R1 결핍(넉아웃(KO)) 마우스에게 정맥내로 주사하였다. 방사선조사 1주일 전 및 방사선조사 2주일 후에 트리메토프림 및 셀파메톡사졸 항생제 처리된 물을 수용자 마우스에게 공급하였다. 조혈골수세포를 재구성하도록 8주의 기간을 마우스에게 허용하였다. 연기 노출은 본질적으로 실시예 3과 동일하였다.
- [0284] 하기 실시예는 COPD의 급성 악화(AECOPD)와의 관련성 모델에 관한 것이다.
- [0285] **실시예 5** - IL-1R1 길항제는 LPS에 의해 매개된 폐 내로의 염증세포 유입을 억제하였다.
- [0286] 지질다당류(LPS)는 그람 음성 세균의 세균 세포벽의 구성성분이다. 이들 세균은 COPD의 급성 악화의 한 유발자인 것으로 밝혀져 있고, 흡입된 LPS에 의해 유도된 염증은 이러한 사건을 모델링하는 한 방법이다. IL-1R1 길항제인 아나킨라의 효과를 LPS에 의해 매개된 폐 내로의 염증세포 유입의 마우스 모델에서 조사하였다. 아나킨라는 BAL 총 세포에 의해 측정된 경우 대조군 LPS 처리 마우스와 비교되었을 때 LPS에 의해 매개된 폐 내로의 염증세포 유입을 47%까지 억제하였다($p<0.001$)(도 7).

- [0287] 방법:
- [0288] 급성 연기 노출 모델에 대해 기재된 바와 같이 알레트 삼투 펌프를 이용하여 아나킨라를 전달하였고 LPS 투여 48시간 전에도 마우스에게 투여하였다. 마우스는 성체 암컷 Balb/c 마우스이었다.
- [0289] 마우스를 반개방 노출 흡입 상자내에 넣었고(최대 10마리의 마우스) 에어로졸화된 LPS에 1회 노출시켰다(총 흡입 시간 12분). 슈도모나스 애리기노사(*P. aeruginosa*) LPS를 5 mg/ml의 농도로 사용하였고 분사기(예컨대, 파리스타 젯 스타(PariStar Jet Star) 분사기)를 이용하여 에어로졸화시켰고 5 ml 부피로 충전시켰고, 상기 분사기로부터의 유속은 5 l/분(압력 = 2 bar)이었다. PBS를 사용한 점만을 제외하고 동일한 절차를 대조군에게 제공하였다. LPS 챌린지로부터 48시간 후에 페토바르비탈의 복강내 주사를 이용하여 마우스를 희생시켰고, 기관을 노출시켰고, 23 cm의 유체 압력에서 실온의 PBS(Ca 또는 Mg 무함유)를 사용하여 폐를 세척하였다(2분 유입 및 1분 유출 후, 이 절차의 반복). 그 다음, BAL을 원심분리하였고, 세포 웰렛을 표준 자동 세포 계수 및 분화 세포 계수를 이용하여 분석하였다. 또한, mRNA 분석 또는 사이토카인/매개자 분석을 위한 균질화를 위해 폐를 회수하였다. 일방 분포 및 2 샘플 이분산을 갖는 스튜던트 t 검정을 이용하여 군 사이의 차이의 유의성을 계산하였다. 이분산 t 검정을 이용하였을 때 p 값에 대한 한계는 p<0.05이다.
- [0290] 실시예 6 - IL-1R1은 리노바이러스 감염에 대한 폐 상피세포주 및 일차 정상 인간 기관 상피세포의 반응을 조절한다.
- [0291] 인간 리노바이러스는 COPD의 급성 악화(AECOPD)와 관련되어 있는 흔한 바이러스이다. COPD 환자는 리노바이러스에 대한 악화된 반응을 갖는 것으로 밝혀져 있다. 인간 리노바이러스(HRV)에 의해 매개된 염증 반응에서 IL-1의 역할을 연구하기 위해, PEG에 의해 정제된 HRV14를 사용하여 BEAS-2b/H292 세포(ATCC로부터 입수가능한 인간 세포)를 감염시켰고, 이를 세포를 IL-1R 길항제에 노출시켰다(도 8a). 방법에 대해서는 실시예 8을 참조한다. 상기 세포의 처리 및 HRV14 감염 후, 원형 염증 매개자 IL-8(CXCL-1)을 조사하였다(도 8). IL-8 수준은 항체 6(생식세포주 유래 버전) 및 아나킨라 둘다에 의해 감소되었지만(도 8b), 이소타입 대조군 항체에 대해서는 감소되지 않았다. 세포에 대해 사용된 아나킨라의 농도는 25 nM이었다. 대안적인 프로토콜을 도 8c에 나타낸 바와 같이 추가로 사용하였고, 결과는 도 8d에 제공되어 있다. 아나킨라를 3개의 농도에서 시험하였는데, 이를 농도 모두가 BEAS-2B 세포에서 HRV14에 반응하여 일어난 IL-8 방출을 감소시켰다. BEAS-2B 세포 및 H292 세포는 상피세포주이므로, 추가로 이 반응을 론자(Lonza)로부터 공급된 보다 더 생리학적으로 관련된 일차 정상 인간 기관지 상피세포에서 분석하였다(도 8e). 정상 인간 기관지 상피세포(NHBE 세포)의 인간 리노바이러스 감염(HRV1b)은 감염으로부터 48시간 후에 측정될 때 배양 배지 내로의 IL-8 방출을 증가시켰다. 항체 6(생식세포주 유래 버전)(Ab6GL; 10 nM)은 리노바이러스 + 이소타입 대조군과 비교되었을 때 리노바이러스에 대한 반응을 유의하게 억제하였다. Ab6GL은 양성 대조군으로서 사용된 아나킨라(키네렛[®])와 유사한 정도로 상기 반응을 억제하였다. 아나킨라(10 nM)는 리노바이러스 단독 군과 비교되었을 때 리노바이러스 감염에 반응하여 일어난 상피세포로부터의 IL-8 방출에 대해 유의한 효과를 나타내었다(도 8e). 시험관내에서의 IL-1R1 차단의 효과와 생체내에서의 IL-1R1 차단의 효과를 비교할 수 있도록 인간 리노바이러스-1b(소수 군 바이러스)를 이들 실험에서 사용하였다(실시예 7 참조): 인간 리노바이러스-1b는 마우스를 감염시킬 수 있는 반면, 주요 군 HRV(예컨대, HRV14)는 마우스를 감염시킬 수 없다. 소수 군 리노바이러스 및 주요 군 리노바이러스(HRV14)에 의해 유도된 IL-8 생성에 대한 IL-1 차단의 시험관내 효과는 유사한 경향을 보였다. 이것은 IL-1R1 차단이 시험관내에서 인간 리노바이러스에 대한 전구염증 반응을 감소시킨다는 것을 보여준다. 이 특성은 리노바이러스 감염에 대한 COPD 악화된 반응을 정상화시키는 데 있어서 유용하다.
- [0292] 실시예 7 - IL-1R1 차단은 급성 마우스 모델에서 HRV 바이러스에 의해 유도된 염증을 감소시킨다.
- [0293] 항-IL-1R1이 바이러스에 대한 전구염증 호중구 반응을 제거할 수 있는지를 조사하기 위해, 상업적으로 입수가능한 항-마우스 IL-1R1 항체 35F5(전술되어 있음)를 뮤린 HRV 챌린지 모델에서 사용하였다. 소수 군 혈청형 HRV1b는 마우스 상피세포를 감염시키고 마우스 폐에서 급성 염증을 유도하는 것으로 밝혀져 있고 본 연구에서 사용되었다. 항-IL-1R1 억제가 생체내 바이러스 챌린지 모델에서 유사한 소염 효과를 나타내는지를 시험하기 위해, 전신으로 및 비강내로 투여된 35F5가 폐에서 HRV에 의해 유도된 세포 염증을 감소시키는 능력을 측정하였다. 인간 리노바이러스-1b 비강내 투여(정제된 바이러스, 107 플라크 형성 유닛[pfu]/ml)는 바이러스 투여로부터 24시간 후에 BAL에서 총 세포 및 호중구 수를 유의하게 증가시켰다. 상기 모델의 급성 성질로 인해 바이러스 부하는 측정되지 않았다. 자외선조사된 리노바이러스는 BAL 내로의 세포 침윤에 의해 측정될 때 감소된 염증 반응을 생성하였는데, 이것은 상기 반응의 상당한 부분이 온전한 바이러스에 의존한다는 것을 보여준다. 정제된 HRV1b를 사용한 비강내 챌린지 24시간 전에 항-마우스 IL-1R1 항체 35F5 또는 이소타입 대조군(래트 IgG1; MAB005)을 15

mg/kg의 단회 투여량으로서 복강내로 또는 100 μg 의 단회 투여량으로서 비강내로 마우스에게 제공하였다. 바이러스 주입으로부터 24시간 후에 동물의 BAL 내로의 세포 침윤물을 측정하였다. 35F5는 HRV1b 캘린지에 반응하여 일어난 마우스 BAL 내로의 총 세포 침윤(도 9) 및 호중구의 유입을 유의하게 감소시켰다. 바이러스에 반응하여 일어난 호중구 염증을 감소시키는 것은 바이러스 감염에 의해 악화되는 근원적인 만성 염증이 있는 COPD에서 유리할 것이다.

- [0294] **실시예 8 - IL-1R1 차단은 상피세포에서 연기 및 연기 + 바이러스에 반응하여 일어난 염증을 감소시킨다.**
- [0295] 연기 컨디셔닝된(conditioned) 배지 또는 연기 컨디셔닝된 배지 및 바이러스에 반응하여 일어난 시험관내 상피세포의 염증 반응을 측정하였다. 연기 컨디셔닝된 배지는 궐련 연기를 조직 배양(TC) 배지에 베블링시킴으로써 발생시켰고 이하 본 실시예에서 세포의 "연기" 또는 "연기 처리"로서 지칭된다. 25 ml 배지를 통해 베블링된 1개의 궐련(필터가 제거됨)은 100% 연기 처리된(smoked) 배지와 동등하다. 궐련 연기로 처리된 배지를 BEAS-2b 세포 상에서의 IL-8 방출 및 세포 컨플루언스에 대해 적정하였다. 20% 연기 처리된 배지를 모든 실험에서 사용하였는데, 이는 상기 배지가 유의한 세포 사멸 없이 전구염증 사이토카인 방출을 유도하였기 때문이다.
- [0296] 연기 및 바이러스에 의해 유도된 염증에 있어서 IL-1R의 역할을 조사하기 위해, 세포를 IL-1R 길항제의 전처리와 함께 먼저 연기로 처리한 후, 필요에 따라 IL-1R 길항제인 아나킨라의 또 다른 전처리와 함께 HRV 바이러스로 감염시켰다(도 10a 및 10c). 실험은 (도면에 나타낸 바와 같이) 상이한 농도의 아나킨라를 사용하여 4회 수행하였다.
- [0297] 아나킨라 처리는 연기에 의해 유도된 IL-8 반응을 부분적으로 억제하였다(도 10b). 연기 자극과 바이러스 자극은 IL-8 반응의 관점에서 부가적인 효과를 나타내었다. 연기 및 바이러스 노출 후 아나킨라 처리는 조합된 연기 및 바이러스 IL-8 반응을 억제하였다(도 10d). 농도 의존적이고 완전한 억제가 달성되었다. 이를 결과는 IL-8 반응의 억제에 의해 평가되었을 때 IL-1R 길항제를 사용한 처리가 바이러스 감염에 대한 염증 반응뿐만 아니라 연기와 바이러스 감염의 조합에 대한 염증 반응도 억제할 수 있다는 것을 보여준다.
- [0298] (실시예 6 및 실시예 8 둘다에 관한) 방법:
- [0299] 상피 연기 및 바이러스 연구를 위해 사용된 세포는 ATCC로부터 입수되고 공급자의 설명서에 따라 성장된 BEAS-2B 세포(카달로그 번호 CRL-9609), 또는 ECACC로부터 입수되고 공급자의 설명서에 따라 성장된 H292 세포(카달로그 번호 91091815 NCI-H292)이었다.
- [0300] 유리 플라스크 내에 지지된, 조직 배양 배지를 함유하는 팔콘 튜브(50 ml 용량)에 튜빙함으로써 불붙은 궐련(필터 없음)을 연결하였다. 연동 펌프는 상기 튜빙을 통해 연기를 빨아들여 조직 배양 배지 내로 유입시켰다. 배출된 연기는 세제를 함유하는 비이커 내로 빨려들어갔다. 전체 절차를 통기월(fume cupboard) 내에서 수행하여 작동자 및 실험실의 다른 이용자를 보호하였다. 따라서, 상기 절차는 멸균 상태에서 수행되지 않았다. 멸균성을 가능한 높게 유지하기 위해, 70% 에탄올로 닦은 겸자를 이용하여 배지를 함유하는 팔콘 튜브를 원추형 플라스크 내에 넣었다. 연기를 조직 배양 배지로 전달하는 구멍을 통해 삽입된 피펫을 매번 교체하였고 절차 직전에 70% 에탄올로 닦았다. 팔콘 튜브를 겸자로 회수하였고, 덮개를 가능한 즉시 교체하였다. 그 다음, 연기 처리된 배지를 회석하였고 가능한 즉시, 바람직하게는 흡연 절차의 완결로부터 1시간 이내에 세포에 첨가하였다[주의: 상기 배지는 연기 추출물 절차를 위해 혈청을 함유하지 않았음]. 추가로, 이들 세포를 위해 항생제(젠토마이신)를 표준 배양/분석 배지에 포함시켰다. 모든 첨가제와 함께 이 세포주(BEBM)에 대한 기초 배지는 론자/클로네틱스 코포레이션으로부터 키트(BEGM, 키트 카탈로그 번호 CC-3170)로서 입수되었다.
- [0301] 세포를 표시된 일정에 따라 리노바이러스(표준 관행에 따라 헬라-오하이오(HeLa-Ohio) 세포의 사용을 통해 제조되었고 적정되었고 미정체 상태 또는 바이러스의 PEG 침전에 의해 정제된 상태로 사용된 주요 군 HRV14)에 노출시켰다.
- [0302] 세포를 콜라겐으로 코팅된 평저 투명 플레이트 상에 시딩하였고 37°C 및 5% CO_2 에서 항온처리하였고 밤새 부착되게 방치하였다. 배지를 벽으로부터 제거하였고 150 μl 의 배지 +/- 아나킨라(2배 최종 농도의 아나킨라)로 교체하였다. 세포를 37°C 및 5% CO_2 에서 30분 동안 항온처리하였다. 연기 배지를 전술된 바와 같이 제조하였다(센터 키 연구 등급 궐련을 사용하여 연기 추출물을 제조할 수 있음). 연기 추출물을 배지로 40%까지 회석한 후 배지 +/- 아나킨라의 제거 없이 150 μl 의 부피로 세포에 첨가하였다. 몇몇 세포는 대조군으로서 배지만을 가졌다. 이들을 24시간 동안 항온처리하였다. 200 μl 의 상청액을 제거하였고 후속 사이토카인 분석을 위해 동결시켰다. 잔류 배지를 제거하고 버렸다. 아나킨라 또는 배지를 100 μl 의 부피로 세포에 다시 첨가하였고, 30분 후에 바이러

스를 헬라 오하이오 세포에 대한 바이러스 원액의 역가에 의해 결정된 희석비로 첨가하여 추가 100 μl 의 부피로 제조된 각각 배치에 대한 등가 활성을 측정하였다. 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 3시간 동안 항온처리하였다. 그 다음, 세포로부터 모든 배지를 제거하였고, 아나킨라 또는 새로운 배지를 상기 세포에 첨가하였고 37°C 및 5% CO₂에서 추가 48시간 동안 항온처리하였다.

[0303] ELISA 키트(알 앤드 디 시스템스 듀오셋 DY208)를 제조자의 설명서에 따라 사용하였고 분석을 위한 표준물로서 알 앤드 디 재조합 단백질을 사용하여 상청액에서 IL-8을 측정하였다.

[0304] 실시예 9 - 연기에 노출된 정밀 절단 폐 슬라이스(PCLS)에서 IL-1R1 결핍이 바이러스 자극에 대한 폐 정주 반응을 약화시킨다.

[0305] 본 실시예에서, 본 발명자들은 유사한 기작이 바이러스 챌린지에 대한 연기에 노출된 폐의 차별적 반응의 기초가 될 수 있는지를 평가하였다. 본 발명자들은 실내 공기 및 연기에 노출된 야생형 및 IL-1R1 결핍 마우스의 폐로부터 정밀 절단 폐 슬라이스(PCLS)를 발생시켰다. PCLS를 생체외에서 dsRNA 리간드인 폴리이노신산 폴리시티딜산(폴리I:C)으로 자극하였고, 핵심 매개자의 발현을 평가하였다. 본 발명자들은 폴리I:C 자극에 반응하여 일어난 호중구 동원 케모카인, 즉 CXCL-1 및 CXCL-5의 유도가 실내 공기에 노출된 대조군과 비교되었을 때 연기에 노출된 야생형으로부터 발생된 PCLS에서 유의하게 더 높았고 CXCL-2가 적당히 증가하였다는 것을 관찰하였다(도 10e). 측정된 모든 전사체는 바이러스 모사체에 의해 자극되고 연기에 노출된 IL-1R1 결핍 PCLS에서 유의하게 약화되었다. 결론적으로, 이들 데이터는 연기에 의해 유도된 염증을 촉진하는 데 있어서 폐 정주세포의 역할을 입증하고 바이러스 감염에 대한 연기에 노출된 폐의 차별적 반응에 있어서 IL-1R1의 역할을 뒷받침한다.

[0306] 방법:

[0307] 정밀 절단 폐 슬라이싱 및 배양. 문현(Bergner et al., 2002, *Journal of General Physiology* 119: 187-198)에 이미 기재되어 있는 표준 프로토콜에 대한 변형 프로토콜을 이용하여 폐를 슬라이싱하였다. 이러한 변형 프로토콜은 문현(Khan et al., 2007, *European Respiratory Journal* 30: 691-700)에 더 기재되어 있다. 요약하건대, 37°C로 가온되었고 행크 완충 식염수 용액(HBSS) 중의 2% 농도로 제조되었고 N-2-하이드록시에틸피페라진-N'-2-에탄설휴산(HEPES)(0.2 M, pH 7.4)으로 보충된 약 1.4 mL 의 아가로스(VII-A형, 낮은 젤화 온도; 시그마 알드리치, 미국 미조리주 세인트 루이스 소재)를 사용하여 폐를 팽창시켰다. 그 후, 아가로스-HBSS 용액이 전도(conducting) 기도로부터 쏟아져 나오게 하기 위해 0.2 mL 의 공기를 폐 내로 주입하였다. 폐를 4°C까지 15분 동안 냉각시켜 상기 아가로스를 젤 상태로 만들었다. 폐염을 절개하였고, 주 기관지에 대해 평행하게 후단에 위치하는 엽 상에서 평평한 표면을 잘라내었다. 폐염을 슬라이싱 전에 및 슬라이싱 동안 빙냉 1x HBSS 용액에서 유지시켰다. 4°C에서 진동박편절단기(vibratome)(레이카(Leica); 모델 VT 1000S, 캐나다 리치몬드 힐 소재)를 이용하여 120 μm 두께의 슬라이스를 발생시켰다. 약 40개의 슬라이스를 각각의 마우스의 폐로부터 단리하였다.

[0308] 그 후, 폐 슬라이스를 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 L 아스코르브산(시그마-알드리치, 캐나다 오크빌 소재), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 트랜스페린(깁코(Gibco), 캐나다 벌링تون 소재), 2.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 인슐린(시그마-알드리치, 캐나다 오크빌 소재) 및 3.25 ng/ mL 의 셀레늄(원자 흡수 표준 용액; 시그마-알드리치, 캐나다 오크빌 소재)으로 보충된 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)/F12(깁코, 캐나다 벌링تون 소재)로 옮겨 배양하였다. 상기 용액을 0.22 μm 공극 필터를 이용하여 필터 멀균하였다. DMEM/F12 용액을 250 ng/ mL 의 암포테리신 B(시그마-알드리치, 캐나다 오크빌 소재) 및 1%의 페니실린/스트렙토마이신으로 더 보충하였다. 폐 슬라이스 배양물로부터 임의의 잔류 아가로스 및 세포 파편을 제거하기 위해 처음 3시간의 배양 동안 1시간마다 배지를 교체하였다. 다음 날, 폐 슬라이스를 인산염 완충 식염수에서 재구성되었거나 비처리된 상태로 방치된 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 dsRNA 모사체 폴리이노신산-폴리시티딜산(지이 헬쓰케어, 캐나다 미시소거 소재)으로 6시간 동안 자극하였다. 샘플을 RNA레이터(RNALater)(앰비온(Ambion), 미국 텍사스주 오스틴 소재)에서 수집하였고 RNA를 추출할 때까지 -80°C에서 보존하였다.

[0309] 정밀 절단 폐 슬라이스에 대한 RNA 추출 및 실시간 정량 RT PCR. 폐 슬라이스를 수집하였고 200 μl 의 RNA레이터(퀴아젠, 캐나다 온타리오주 미시소거 소재) 내에 넣었고 필요할 때까지 -80°C에서 저장하였다. 알엔이지 키트(퀴아젠, 캐나다 온타리오주 미시소거 소재)로부터의 동물 조직 프로토콜에 따라 상기 폐 슬라이스로부터 RNA를 추출하였다. 임의적으로 컬럼 상에서 DNase 분해를 수행하였다. 아질런트 2100 생체분석기(아질런트 테크놀로지스, 캐나다 온타리오주 미시소거 소재)를 이용하여 RNA를 정량하였다. 아질런트 2100 생체분석기(아질런트, 미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재)를 이용하여 단리된 RNA의 양 및 무결성을 측정하였다. 그 후, 20 μl 의 총 부피로 100 U의 수퍼스크립트 II(인비트로젠, 캐나다 벌링تون 소재)를 사용하여 100 ng의 총 RNA를 역전사시켰다. 무작위 육량체 프라이머를 사용하여 42°C에서 50분 동안 cDNA를 합성한 후, 70°C에서 15분 동안

항온처리하였다. 유니버설 PCR 마스터 믹스(어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems), 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 사용하여 실시간 정량 RT-PCR을 $25 \mu\text{l}$ 의 총 부피로 삼중으로 수행하였다. FAM으로 표지된 프로브와 함께 CXCL-1, CXCL-2, CXCL-5 및 GAPDH에 대한 프라이머를 어플라이드 바이오시스템스로부터 구입하였다. 서열 검출기 소프트웨어 버전 2.2(어플라이드 바이오시스템스, 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 이용하는 ABI PRISM 7900HT 서열 검출 시스템을 이용하여 PCR을 수행하였다. 엘타, 엘타 Ct 방법을 이용하여 데이터를 분석하였다. 요약하건대, 유전자 발현을 하우스킵핑 유전자(GAPDH)로 표준화하였고 대조군(실내 공기 대조군, 모의군)과 비교하여 배수 변화로서 표현하였다.

- [0310] **실시예 10** - IL-1R1 결핍 및 IL-1 α 항체 차단은 연기에 노출된 마우스의 H1N1 인플루엔자 바이러스 감염 모델에서 악화된 염증을 약화시킨다.
- [0311] 연기에 의해 유도된 염증의 유도를 위해 IL-1R1을 통해 신호를 매개하는 데 있어서 IL-1 α 의 중요성이 확립되었고 연기에 노출된 폐의 정주세포가 바이러스 공격에 대한 반응에 있어서 수행하는 역할이 밝혀진 점을 고려하여(실시예 9 참조), 본 발명자들은 이들 기작이 생체내에서 바이러스 감염 후에 관찰된 악화된 염증 반응의 기초가 되는지를 평가하고자 하였다. 야생형 마우스 및 IL-1R1 결핍 마우스를 궤련 연기에 노출시킨 후 H1N1 인플루엔자 바이러스로 감염시켰다. 바이러스에 감염된 실내 공기 대조군 마우스와 비교되었을 때 바이러스 감염 후에 궤련 연기에 노출된 야생형 마우스의 BAL에서 악화된 염증 반응이 관찰되었다(도 11a). IL-1R1 결핍은 연기에 노출되고 인플루엔자에 감염된 마우스에서 총 BAL 염증을 적절히 약화시켰지만($p=0.089$), 야생형 대조군과 비교되었을 때 이들 동물들에서 호중구증가가 유의하게 감소되었다(도 11c). 이들 데이터는 IL-1R1 의존적 기작이 바이러스 감염 후에 연기에 노출된 마우스에서 염증 반응의 악화에 기여한다는 것을 암시한다.
- [0312] IL-1R1 결핍이 연기에 노출되고 인플루엔자에 감염된 동물에서 악화된 염증 반응을 감소시킬 수 있었지만, 본 발명자들은 IL-1 α 가 이 반응의 촉진에 있어서 주도적인 역할을 수행할 것이라고 가정하였다. 이를 시험하기 위해, 본 발명자들은 궤련 연기 노출 및 바이러스 감염의 과정 동안 항-IL-1 α 또는 이소타입 항체를 동물에게 매일 주사하였다. 궤련 연기에 노출된 마우스에서 인플루엔자 A 바이러스에 대한 악화된 반응은 감염으로부터 5일 후에 관찰되었다(도 11d). 항-IL-1 α 중화는 단핵구에 대해서는 유의하게 영향을 미치지만 호중구에 대해서는 영향을 미치지 않으면서 BAL 총 염증을 현저히 약화시켰다(각각 도 11e 및 11f). 종합하건대, 이들 데이터는 IL-1 α / IL-1R1을 차단하는 것을 목적으로 하는 요법이 질환 불안정성 기간 동안, 특히 COPD 악화 기간 동안 유리할 수 있다는 결론을 뒷받침한다.
- [0313] 방법: 실시예 3에 기재된 흡연 모델과 본질적으로 동일하다. 감염의 과정 동안 인플루엔자에 감염된 동물에게도 복강내 주사를 매일 제공하였다.
- [0314] 인플루엔자 감염. 마취된 마우스를 $35 \mu\text{l}$ 의 1x 인산염 완충 식염수(PBS) 비히클 중의 50 PFU의 마우스 적응된 H1N1 인플루엔자 A(A/FM/1/47-MA) 바이러스로 비강내로 감염시켰다. 대조군 동물에게 $35 \mu\text{l}$ 의 PBS 비히클을 제공하였다. A/FM/1/47-MA는 마우스 폐 감염에 대해 생물학적으로 특징규명되어 있는, 완전히 서열분석된 플라크 정제된 제제이다. 동물은 바이러스 전달 당일 또는 바이러스 감염의 전체 과정 동안 궤련 연기에 노출되지 않았다.
- [0315] 바이러스 연구를 위해, BAL 전에 우측 폐로부터 1개의 염을 바이러스 역가의 측정을 위해 회수하였다. 우측 폐의 나머지를 RNA레이터(암비온, 미국 텍사스주 오스틴 소재)에서 보존하였고, 조직학적 평가를 위해 폐의 좌엽을 포르말린으로 팽창시켰다.
- [0316] 하기 실시예는 인간 COPD와 구체적으로 관련되어 있다.
- [0317] **실시예 11** - COPD 환자 악화는 증가된 IL-1 α 및 IL-1 β 수준과 상호관련되어 있다.
- [0318] 연장된 시간 동안 IL-1 α 및 IL-1 β 수준을 악화 시기와 비교하기 위해 COPD 인간 환자의 객담 측정을 분석하였다. 객담 사이토카인 함량을 적어도 교란시키기 위해 DTT 프로세싱을 이용하지 않으면서 PBS 프로세싱을 이용하여 객담을 프로세싱하였다. 이 환자에서, COPD의 악화 시 IL-1 α 및 IL-1 β 둘다가 상향조절되었다(도 12a). 악화 기간은 증가된 IL-1 α 및 IL-1 β 수준과 강한 상관관계를 가졌다.
- [0319] 상이한 환자 하위셋에서, 세균 상태와 IL-1 β 의 상관관계도 분석하였다. IL-1 β 는 객담에서 세균에 대해 양성을 나타내는 것으로 시험된 환자에서 유의하게 더 높았다(도 12b).
- [0320] **실시예 12** - IL-1 α 및 IL-1 β 는 COPD 환자의 폐에서 증가된다.
- [0321] 본 실시예에서, 본 발명자들은 GOLD I 및 II COPD 환자의 폐에서 IL-1 α 및 IL-1 β 의 발현을 조사하였다. 폐 절

편 생검은 IL-1 α 및 IL-1 β 둘다에 대해 양성으로 염색되었다(각각 도 13a 및 13b). 비-COPD 대조군과 비교되었을 때 GOLD I 및 II COPD 환자로부터 수득된 생검 샘플에서 관찰된 IL-1 α 및 IL-1 β 양성 세포의 수가 유의하게 더 높았다(도 13c).

[0322] 염증 반응의 개시에 있어서 폐 구조 세포의 중요성을 고려하여(실시예 4 참조), 본 발명자들은 COPD 환자에서 폐 상피의 IL-1 α 및 IL-1 β 염색을 비-COPD 대조군과 비교하여 평가하였다. IL-1 α 는 비-COPD 대조군과 비교되었을 때 COPD 환자의 상피에서 증가되지 않았지만, IL-1 β 염색은 유의하게 증가되었다($p<0.0001$)(각각 도 13d 및 13e). COPD 환자의 객담으로부터 회수된 IL-1 α 의 수준과 IL-1 β 의 수준은 안정한 질환 기간 동안, 악화 개시 시점에서(추가 처리 전), 및 악화 후 7일째 날 및 35일째 날에 유의한 상관관계를 가졌다($p<0.0001$)(도 13f 내지 13i). IL-1 α 와 IL-1 β 사이의 상관관계는 악화 후 7일째 날에 가장 강하였다. 환자의 하위셋에서, IL-1 α 의 수준 및 IL-1 β 의 수준은 안정한 질환 방문 기간 동안 측정된 수준과 비교되었을 때 악화 시점에서 증가되었다. 종합하건대, 이들 데이터는 IL-1 신호전달이 안정한 COPD 기간 동안뿐만 아니라 급성 악화의 증상발현 동안에도 일정한 역할을 수행하고 IL-1R1의 차단이 악화를 치료하는 성공적인 전략을 대표한다는 결론을 뒷받침한다.

[0323] 방법: 인간 폐 생검 및 객담 샘플. GOLD I의 COPD 환자($n = 3$, 1명의 남성 및 2명의 여성; 현재 흡연자, $n = 3$; FEV1/FVC %의 평균±표준편차 = 60 ± 8) 및 GOLD II의 COPD 환자($n = 6$, 4명의 남성 및 2명의 여성; 현재 흡연자, $n = 2$; FEV1/FVC %의 평균±표준편차 = 56 ± 10)로부터 수득된 생검 샘플들로부터 폐 절편을 수득하였다. 이들 2개의 군으로부터의 생검 데이터를 조합하였다. 데이터를 해부학적으로 정상인 엽 영역으로부터 암 엽절제술에 의해 수득된 비-COPD 물질과 비교하였다. 안정한 질환 기간 동안, 악화 개시 시점에서, 및 악화의 개시 후 7일째 날 및 35일째 날에 등록 COPD 환자로부터 객담 샘플을 수득하였다. 악화는 48시간의 기간 동안 2개의 주요 증상(호흡곤란, 객담 부피 또는 객담 화농) 또는 하나의 주요 증상 및 하나의 가벼운 증상(기침, 천명, 인후통, 비루, 발열)에서의 증가로서 정의되었다. 환자들은 주어진 환경 하에서 정상 표준 관리를 제공받았고, 연구 조사자의 재량으로 객담 샘플을 채취하였다.

[0324] IL-1 α , IL-1 β 및 IL-1R1의 인간 발현을 위해, 37°C에서 중류수 중의 0.2% 트립신/0.2% CaCl₂에서 절편을 10분 동안 항온처리함으로써 항원 재생(retrieval)을 수행하였다. 6% H₂O₂를 사용하여 내인성 과산화효소 활성을 10분 동안 차단시켰다. 이차 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위해, 슬라이드를 20% 정상 토끼 또는 염소 혈청과 함께 20분 동안 항온처리하였다. 과량의 혈청을 제거하였고, 슬라이드를 IL-1 α 토끼 항-인간 항체(애브кам(Abcam), 9614, 2.5 μ g/ml), IL-1 β 토끼 항-인간 항체(애브кам, 2105, 10 μ g/ml) 또는 IL-1R1 염소 항-인간 항체(알 웨드 디 시스템스, Ab-269-NA, 10 μ g/ml), 또는 토끼 또는 염소 IgG 음성 대조군과 함께 1시간 동안 항온처리하였다. 슬라이드를 바이오티닐화된 토끼 항-염소 이차(1:200) 또는 돼지 항-토끼 이차(1:200) 항체와 함께 20분 동안 항온처리하였다. 인간 조직 셋에 대해 2종의 항원 검출 프로토콜을 이용하였다: 1) 실온에서 20분 동안 스트렙 에이비컴플렉스(Strep ABComplex)/HRP(다코), 2회의 10분 완충제 세척, 및 1분 동안 적용된 DAB; 및 2) 실온에서 30분 동안 스트렙 에이비컴플렉스/AP(다코), 2회의 10분 완충제 세척, 5분 동안 푸신(Fuchsin) 기질-크로마겐(Chromagen) 시스템스(다코). 슬라이드를 해마톡실린(시그마)으로 대비염색하였다. 약 10 μ m의 간격을 두고 각각의 환자로부터 채취된 2개의 분리된 생검 샘플들로부터 양성 세포의 수를 세었다. 250 μ m의 계수선을 기저막과 정렬시키고, 3개의 인접한 영역들에서 고유층(lamina propria)에서 세포의 수를 세었다.

[0325] 서열:

[0326]

일부 항체에 대한 서열 정보가 하기에 제공되어 있다.

항체 6 VH 아미노산 서열 = Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Leu Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Val Val Tyr Asp Ala Phe Val Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser (서열번호 1)

항체 6 중쇄 CDR1 = Ser Tyr Ala Met Ser (서열번호 2)

항체 6 중쇄 CDR2 = Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly (서열번호 3)

항체 6 중쇄 CDR3 = Pro Leu Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Val Val Tyr Asp Ala Phe Val (서열번호 4)

항체 6 VL 아미노산 서열 = Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Val Ile Ala Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Val Arg Leu His His Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu (서열번호 5)

항체 6 경쇄 CDR1 = Thr Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His (서열번호 6)

항체 6 경쇄 CDR2 = Gly Asp Thr His Arg Pro Ser (서열번호 7)

항체 6 경쇄 CDR3 = Gln Ser Tyr Asp Thr Val Arg Leu His His Val (서열번호 8)

항체 6 VH - 생식세포 유래 = Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser

[0327]

Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Leu Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr
 Gly Val Val Tyr Asp Ala Phe Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 (서열번호 9)

항체 6 VL - 생식세포 유래 = Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly
 Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala
 Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Ile
 Tyr Gly Asp Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser
 Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Val Arg Leu His His Val Phe Gly Gly Thr Lys
 Leu Thr Val Leu (서열번호 10)

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn
Lys Tyr His Ala His Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Phe Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 Leu Val Thr Val Ser Ser (서열번호 31)

[0328] CDR1, CDR2 및 CDR3은 밀줄친 굵은 글씨체로 표시되어 있다.

[0329] CDR1 = NYGMH(서열번호 32)

[0330] CDR2 = GIWNDGINKYHAHSVRG(서열번호 33)

[0331] CDR3 = ARSFDWLLFEF(서열번호 34)

항체 26F5 - VL(경쇄 가변 도메인)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly
 Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys(서열번호 35)

[0332] CDR1, CDR2 및 CDR3은 밀줄친 굵은 글씨체로 표시되어 있다.

[0333] CDR1 = RASQSVSSYLA(서열번호 36)

[0334] CDR2 = DASNRAT(서열번호 37)

[0337] CDR3 = QQRSNWPPLT(서열번호 38)

항체 27F2 - VH(중쇄 가변 도메인)

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
 Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn
Lys His His Ala Gly Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[0338] Leu Val Thr Val Ser Ser(서열번호 39)

[0339] CDR1, CDR2 및 CDR3은 밀줄친 굵은 글씨체로 표시되어 있다.

[0340] CDR1 = TFSNYGMH(서열번호 40)

[0341] CDR2 = AIWNDGENKHHAGSVRG(서열번호 41)

[0342] CDR3 = GRYFDWLLFEY(서열번호 42)

항체 27F2 - VL(경쇄 가변 도메인)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly
 Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys(서열번호 35)

[0343]

[0344] CDR1, CDR2 및 CDR3은 밀줄친 굵은 글씨체로 표시되어 있다.

[0345] CDR1 = RASQSVSSYLA(서열번호 36)

[0346] CDR2 = DASNRAT(서열번호 37)

[0347] CDR3 = QQRSNWPPLT(서열번호 38)

항체 15C4 - VH(중쇄 가변 도메인)

Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys
 Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Phe His Trp Ile Ala Trp Val Arg
 Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp
Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn
 Ser Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Phe
 Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 Thr Val Ser Ser(서열번호 43)

[0348]

[0349] CDR1, CDR2 및 CDR3은 밀줄친 굵은 글씨체로 표시되어 있다.

[0350] CDR1 = FHWIA(서열번호 44)

[0351] CDR2 = IIHPGASDTRYSPSFQG(서열번호 45)

[0352] CDR3 = QRELDYFDY(서열번호 46)

항체 15C4 - VL(경쇄 가변 도메인)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln
 Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro
Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys(서열번호 47)

[0353]

[0354] CDR1, CDR2 및 CDR3은 밀줄친 굵은 글씨체로 표시되어 있다.

[0355] CDR1 = RASQSIGSSLH(서열번호 48)

[0356] CDR2 = YASQSFS(서열번호 49)

[0357] CDR3 = HQSSSLPLT(서열번호 50)

[0358] 참고문헌의 도입

[0359] 본원에서 언급된 모든 공개문헌 및 특허는 각각의 개별 공개문헌 또는 특허가 참고로 도입되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 표시되는 것처럼 전체적으로 참고로 본원에 도입된다.

[0360] 본 개시내용의 구체적인 실시양태가 논의되어 있지만, 상기 명세서는 예증하기 위한 것이지 한정하기 위한 것이 아니다. 본 개시내용의 많은 변경이 본 명세서 및 하기 특허청구범위를 검토하였을 때 당업자에게 자명해질 것이다. 본 개시내용의 전체 범위는 그의 등가물의 전체 범위와 함께 하기 특허청구범위, 및 상기 변경과 함께 본 명세서를 참고함으로써 결정되어야 한다.

[0361] [豆 1a]

각주 - HCDR1의 경우 위치 34의 서열은 Mo이다.

[0362]

[0363] [표 1b]

카비트 넘버 정	HDR1										HDR2										HDR3																																																																													
	S	Y	A	M	S	A	I	S	G	S	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	P	L	Y	Y	D	G	S	D	Y	T	T	Y	D	A	F	D	I																																																												
형체 4																																																																																																		
형체 5																																																																																																		
형체 6																																																																																																		
형체 7																																																																																																		
형체 8																																																																																																		
형체 9																																																																																																		
형체 10																																																																																																		
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	100H	100I	100J	100K	100L	100M	100N	100O	100P	100Q	100R	100S	100T	100U	100V	100W	100X	100Y	100Z	101	102

[0364]

참고문헌

[0365] 본 명세서의 임의의 부분에서 인용된 모든 참고문헌들(상기 임의의 부분에서 인용된 참고문헌들을 포함함)은 모든 목적을 위해 전체적으로 본원에 참고로 도입된다.

- 1 Dinarello 2002
- 2 Patterson 1993
- 3 Steinkasser 1992
- 4 Black 1988
- 5 Niki 2004
- 6 Wessendorf 1993
- 7 Carter 1990
- 8 Eisenberg 1990
- 9 Dewberry 2000
- 10 Muzio 1995
- 11 Gabay 1997
- 12 Sims 1994
- 13 Colotta 1994
- 14 Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 405-410
- 15 Pearson and Lipman (1988) *PNAS USA* 85: 2444-2448
- 16 Smith and Waterman (1981) *J. Mol Biol.* 147: 195-197
- 17 Voet & Voet, *Biochemistry*, 2nd Edition, (Wiley) 1995.
- 18 Gram et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:3576-3580
- 19 Barbas et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:3809-3813
- 20 Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551-567
- 21 Ward, E.S. et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)
- 22 McCafferty et al (1990) *Nature*, 348, 552-554
- 23 Holt et al (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490
- 24 Bird et al, *Science*, 242, 423-426, 1988

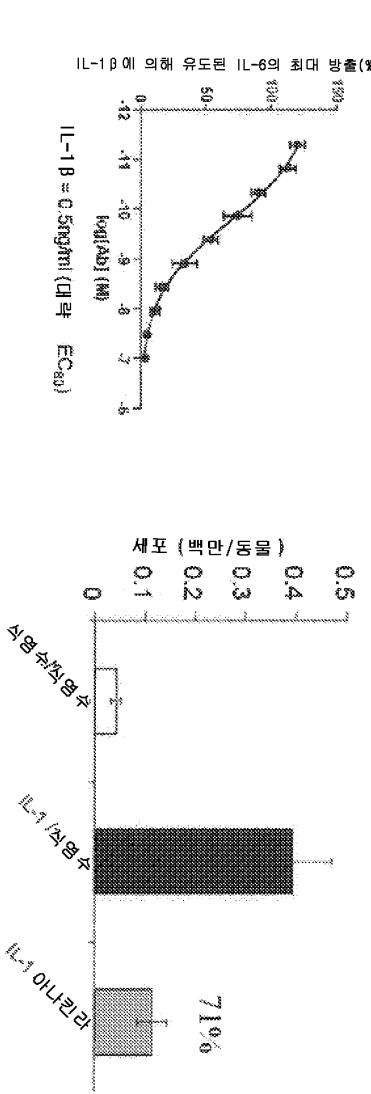
[0367]

- 25 Huston et al, *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988
- 26 Holliger, P. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993
- 27 Reiter, Y. et al, *Nature Biotech*, 14, 1239-1245, 1996
- 28 Hu, S. et al, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996
- 29 Haan & Maggos (2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6
- 30 Koide et al. (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
- 31 Nygren et al. (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469
- 32 Wess, L. In: *BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness*, 12(42), A1-A7, 2004
- 33 Ledermann J.A. et al. (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664
- 34 Bagshawe K.D. et al. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922
- 35 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988
- 36 Köhler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975
- 37 Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545
- 38 Mendez, M. et al. (1997) *Nature Genet*, 15(2): 146-156
- 39 Knappik et al. *J. Mol. Biol.* (2000) 296, 57-86
- 40 Krebs et al. *Journal of Immunological Methods* 254 2001 67-84

[0368]

도면

도면1

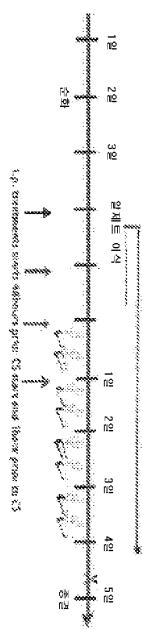


a) 흥-IL-1R1 항체(Ab6)는 인간 일자 COPD 폐 섬유아세포로부터의 IL-1 β 매개 IL-6 방출을 억제한다.

b) 아나킨라(Anakinra)는 마우스 폐에서 IL-1 β 에 의해 유도된 호중구 매개 염증을 억제한다.

IL-1 β 활성은 시험관내 및 생체내에서 IL-1R1 차단에 의해 억제된다.

도면2

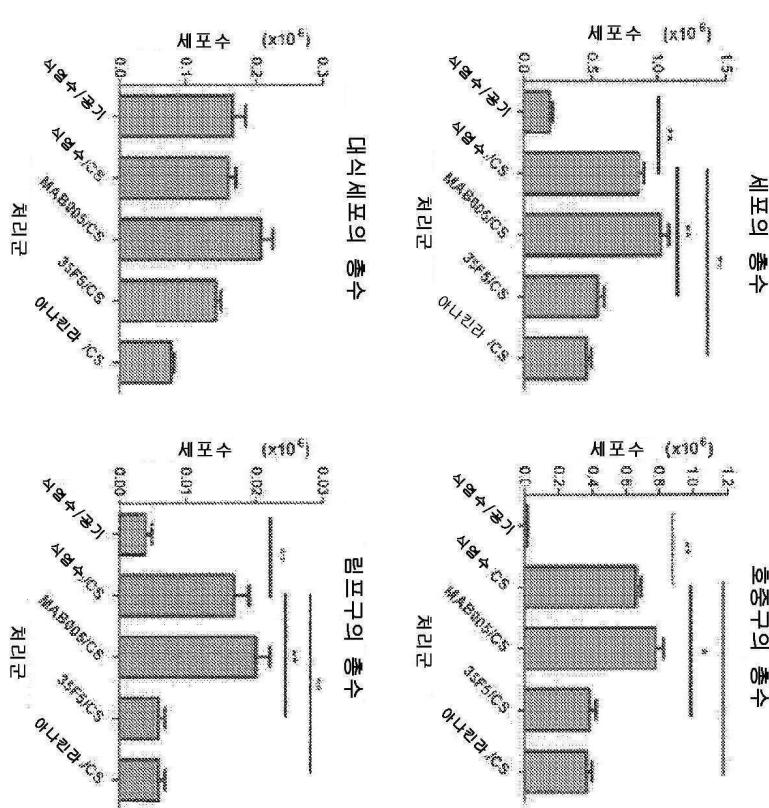


담배 연기에 의한 유도된 폐 염증 모델의 개발도

도면3

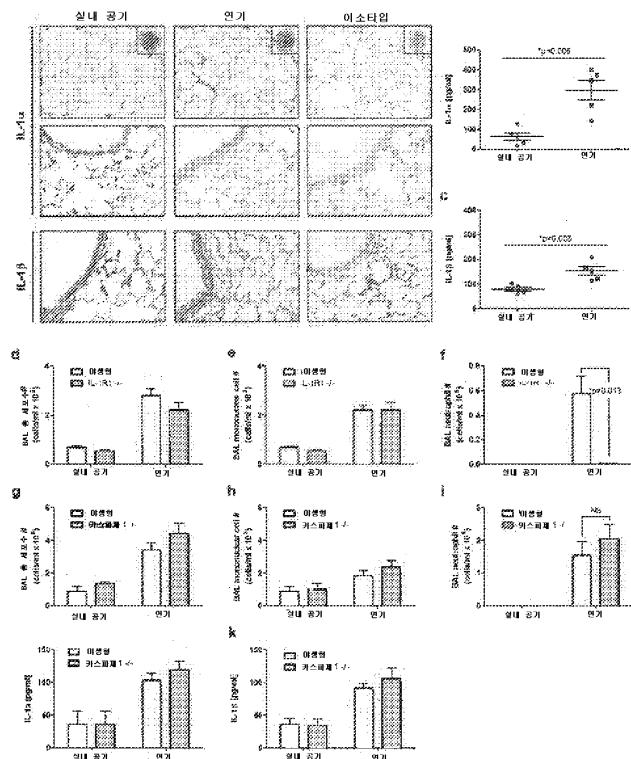
IL-1R 차단이 담배 연기에 의해 유도된 폐 염증을 억제한다.

BAL 총 세포수 및 세포 백분율; *p<0.05, **p<0.001 BAL=기관지폐포 세척물; CS=질련 연기



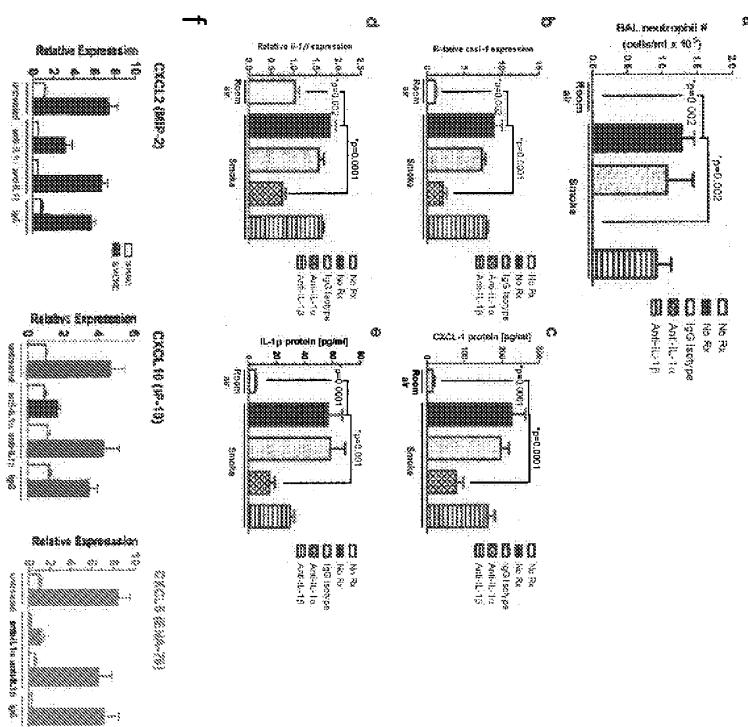
도면4

IL-1 α 는 급성 마우스 모델(1)에서 담배 연기에 의해 유도된 염증에서 중요한 역할을 한다.



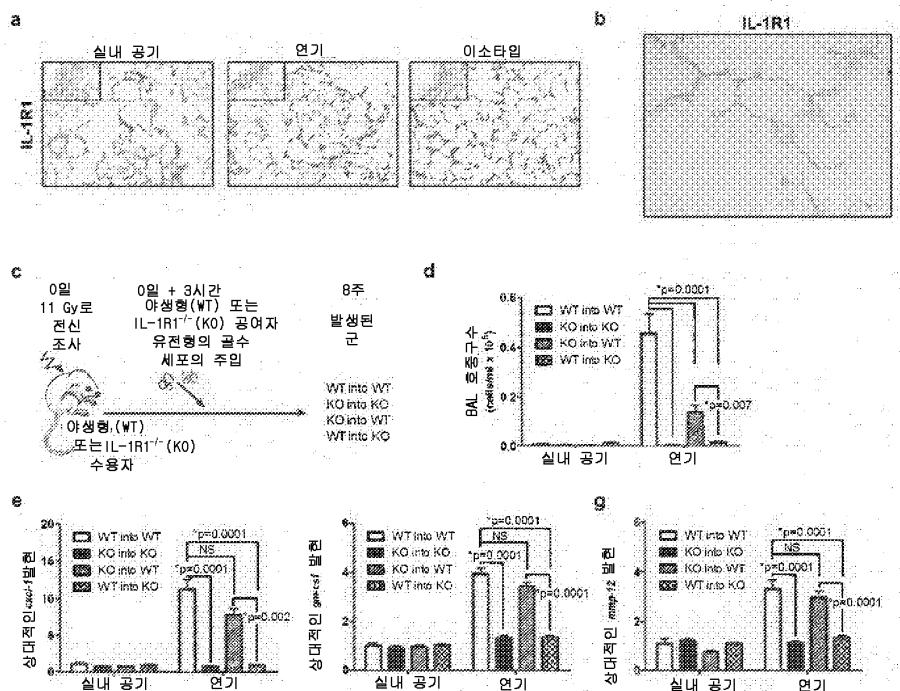
도면5

IL-1 α 는 급성 마우스 모델(2)에서 담배 연기에 의해 유도된 염증에서 중요한 역할을 한다.



도면6

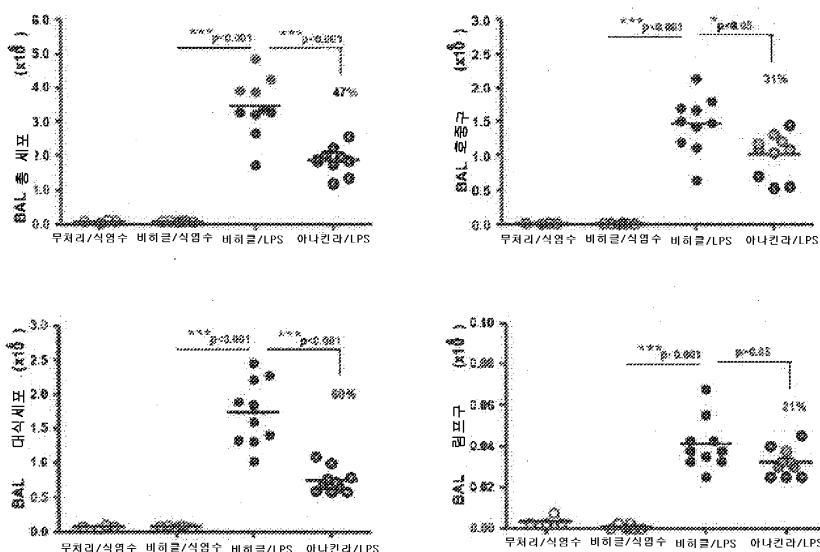
연기에 노출된 마우스에서의 IL-1R1의 발현 패턴은 COPD 환자의 발현 패턴을 반영하고 염증을 위해 내방사성 비조혈세포 상에서 요구된다.



도면7

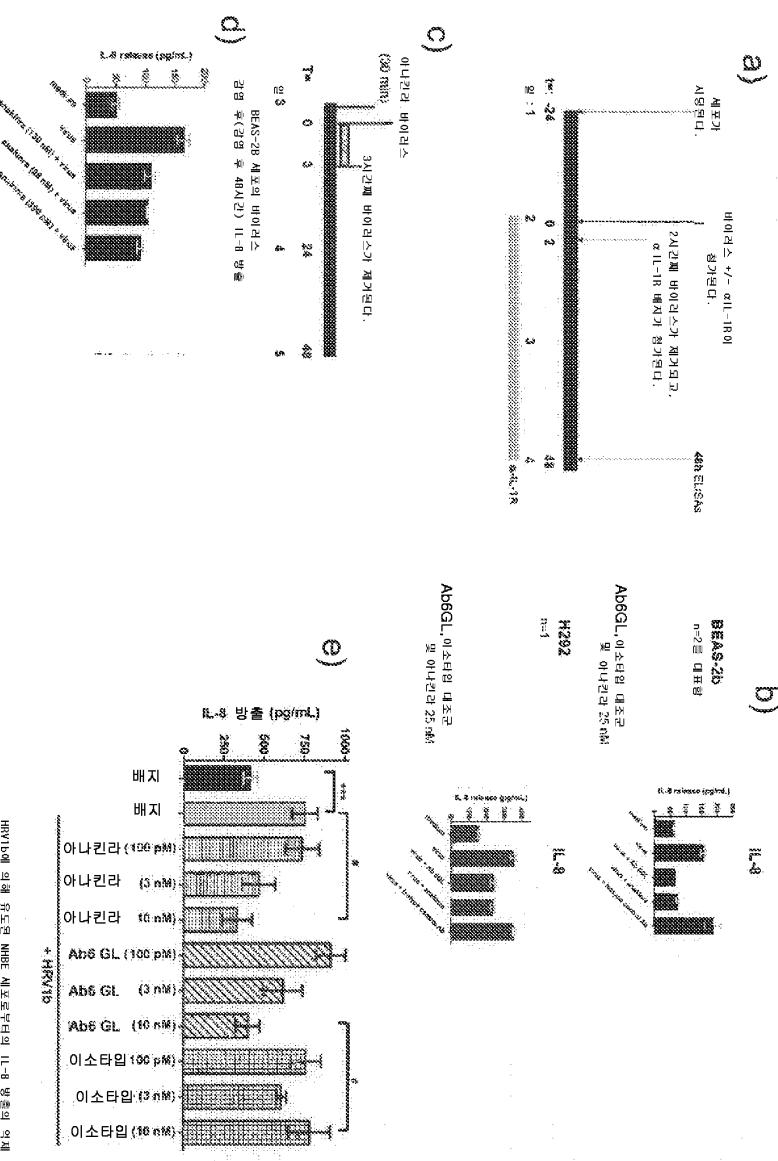
AECOPD와의 관련성 모델

IL-1R 차단은 LPS에 의해 유도된 급성 폐 염증을 감소시킨다.



도면8

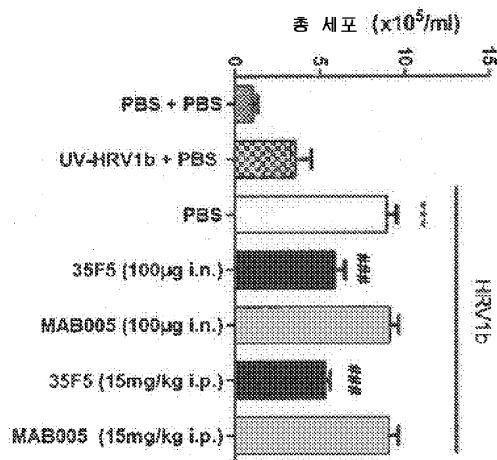
IL-1R 차단은 시험관내에서 HRV에 의해 유도된 염증을 감소시킨다.



**p<0.01 Student's t-test, #p<0.05 One way ANOVA with Dunnett's post test
Data shown are Mean ± SEM, n=4
HRV1b = Human rhinovirus-1b, IL-8 = interleukin-8, NHEK = normal human epidermal keratinocytes.

도면9

IL-1R1 차단은 금성 마우스 모델에서 HRV 바이러스에 의해 유도된 염증을 감소시킨다.



마우스 폐에서 HRV1b 주입에 대한 반응에서 총 세포 BAL
침울에 대한 35F5의 효과

ANOVA = analysis of variance; i.n. = intranasally; i.p. = intraperitoneally; PBS = phosphate-buffered saline;

UV-HRV1b = ultraviolet-inactivated human rhinovirus 1b;

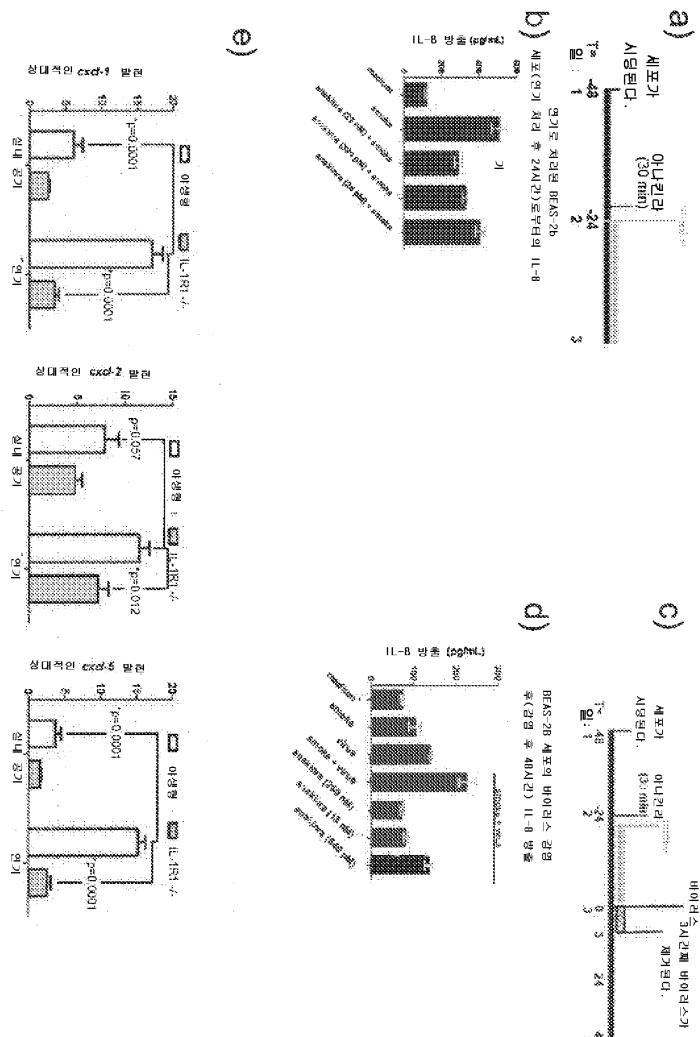
**Student's t-test and Wilcoxon rank sum test; *post test; **p < 0.05; PBS vs. HRV1b

##One Way ANOVA Dunnett's post test; *p < 0.01 PBS vs. HRV1b vs. 35F5

i.p. HRV1b

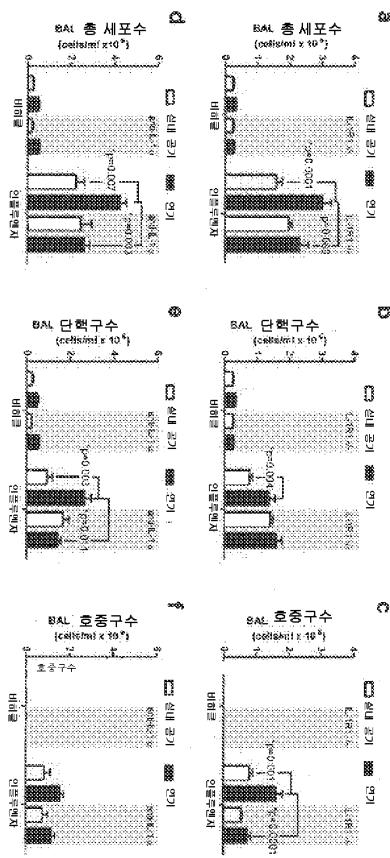
n = 8 ; 16/group

도면10



시험관내에서 얻기 및 얻기 + 바이러스에 의해 유도된 염증 또는 생체외 풀라이스에서의 풀라이-1C 효과에 대한 영향

도면11

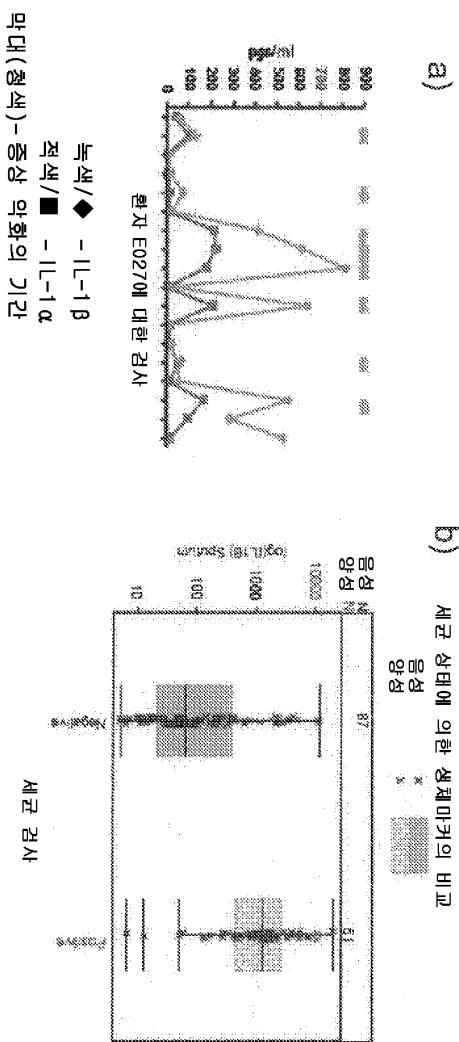


IL-1R1 및 IL-1 α 저단은 생체내에서 연기 + 바이러스 혼증을 감소시킨다.

도면12

인간 COPD와의 관련성

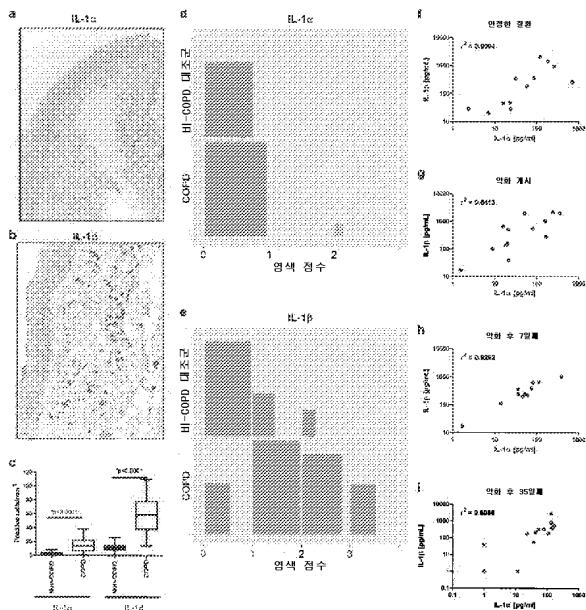
COPD 백담에서의 IL-1 발현



도면13

COPD 조직에서의 IL-1 α 및 IL-1 β 발현; 안정한 객담 및 AECOPD 객담에서의 IL-1 α 와 IL-1 β 의 상관관계

Figure 1 Stamps, MR



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MEDIMMUNE LIMITED

MCMASTER UNIVERSITY

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING COPD EXACERBATION

<130> MED0562.PCT

<140><141><150> 61/416, 102

<151> 2010-11-22

<150> 61/325, 241

<151> 2010-04-16

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Pro Leu Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Val Val Tyr Asp

100 105 110

Ala Phe Val Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 2

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 3

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Val Val Tyr Asp Ala Phe

1 5 10 15

Val

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 5

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly

20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asp Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Val Ile Ala Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Val

85 90 95

Arg Leu His His Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 7

Gly Asp Thr His Arg Pro Ser

1 5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 8

Gln Ser Tyr Asp Thr Val Arg Leu His His Val

1 5 10

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Pro Leu Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Val Val Tyr Asp

100 105 110

Ala Phe Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 10

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly

20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asp Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Val

85 90 95

Arg Leu His His Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 11

Asp Gly Ala Ser Ser Thr Asn Trp Gly Tyr Asn Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 12

Asp Gly Ala Ser Ser Thr Asn Trp Gly Tyr Thr Val Asp Ala Ala Val

1 5 10 15

Asp

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 13

Asp Gly Ala Ser Ser Thr Asn Trp Gly Tyr Thr Leu Asp Pro Pro Gly

1 5 10 15

Val

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 14

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Phe

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 15

Trp Asn Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 16

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Leu Val

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 17

Ala Ala Trp Asp Asp His Leu Glu Gln Leu His

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 18

Ala Ala Trp Asp Asp Ala Ala Arg Val Leu Leu

1 5 10

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 19

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Asp Tyr Thr Thr Tyr Asp Ala Phe

1 5 10 15

Asp Ile

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 20

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Ala Pro Pro Pro Leu Gly Tyr Asp Gly Phe

1 5 10 15

Asp Ile

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 21

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Ala Ala Pro Pro Leu Gly Tyr Asp Gly Phe

1 5 10 15

Asp Ile

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 22

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Ala Pro Ser Pro Leu Gly Tyr Asp Gly Phe

1 5 10 15

Asp Ile

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 23

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Leu Val Tyr Asp Ala Phe

1 5 10 15

Asp Ile

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 24

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Glu Ser Leu Ala Leu Pro Val Tyr Asp Ala

1 5 10 15

Asp Ile

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 25

Gln Ser Tyr Asp Thr Ser Leu Ser Gly Ser Leu

1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 26

Gln Ser Tyr Asp Thr Ala Gly Gly Gly His His

1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 27

Gln Ser Tyr Asp Thr Asp Ala Ala Arg His Gln

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 28

Gln Ser Tyr Asp Thr His Leu Val Ala His Val

1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 29

Gln Ser Tyr Asp Thr Leu Leu Leu Ala Pro Gln

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 30

Gln Ser Tyr Asp Thr Arg Ala Asp Asp Ala His

1 5 10

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 31

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala His Ser Val

50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 32

Asn Tyr Gly Met His

1 5

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 33

Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala His Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 34

Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe

1 5 10

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 35

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 37

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 38

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr

1 5 10

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala Gly Ser Val

50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 40

Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His

1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 41

Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala Gly Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 42

Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr

1 5 10

<210> 43

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 43

Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Phe His

20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser Ala Thr Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 44

Phe His Trp Ile Ala

1 5

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 45

Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15
Gly

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 46

Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 47

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 48

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His

1 5 10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 49

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 50

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr

1 5