



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월25일
(11) 등록번호 10-1761324
(24) 등록일자 2017년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7017019
(22) 출원일자(국제) 2009년12월21일
심사청구일자 2014년12월22일
(85) 번역문제출일자 2011년07월20일
(65) 공개번호 10-2011-0117659
(43) 공개일자 2011년10월27일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2009/001671
(87) 국제공개번호 WO 2010/071923
국제공개일자 2010년07월01일
(30) 우선권주장
61/139,687 2008년12월22일 미국(US)
61/164,491 2009년03월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US07455836 B2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 유니버시티 오브 멜버른
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 그라텐 스트리트
(72) 발명자
해밀튼, 존 알랜
호주, 빅토리아 3053, 칼튼, 205-211 그라텐 스트리트, 씨/- 멜버른 벤취스 피티와이 엘티디
쿡, 앤드류 데이빗
호주, 빅토리아 3053, 칼튼, 205-211 그라텐 스트리트, 씨/- 멜버른 벤취스 피티와이 엘티디
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 6 항

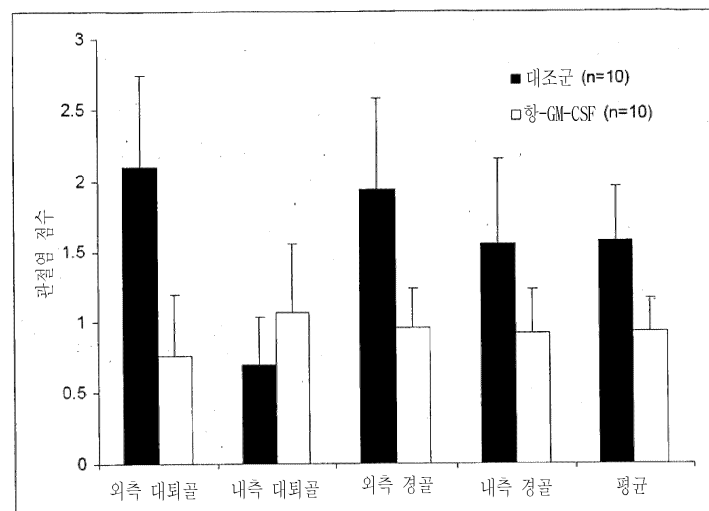
심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 통증 치료

(57) 요약

본 발명은 통증을 치료 및 예방하기 위한 방법과 일반적으로 관련이 있다. 본 발명에 따르면, GM-CSF 길항제가 통증의 치료에 효과적이라고 제안된다. GM-CSF 길항제는 GM-CSF 또는 GM-CSF 수용체에 특이적인 항체를 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다. 본 발명은 GM-CSF 녹아웃(Knock-out) 마우스와 같은 형질전환 동물을 더 제공하며, 이는 특정 질병 모델에서 길항제를 시험하기에 유용하다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

GM-CSF 길항제를 포함하는 피험자의 통증을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 길항제는 GM-CSF 또는 GM-CSF 수용체에 특이적인 항체이고, 상기 통증은 수술 후 통증, 골 암 통증, 류마티스 관절염 통증 및 골관절염 통증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 통증인, 피험자의 통증을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 피험자는 인간인 피험자의 통증을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 통증은 수술 후 통증인 피험자의 통증을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 통증은 골 암 통증인 피험자의 통증을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 통증은 류마티스 관절염 통증인 피험자의 통증을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 통증은 골관절염 통증인 피험자의 통증을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2008년 12월 22일에 출원된 미국 가출원번호 61/139,687 및 2009년 3월 30일에 출원된 미국 가출원번호 61/164,491의 이익을 주장하며, 둘 다 전체가 참조 문헌으로 포함된다.

[0002] 본 발명은 통증을 치료 및 예방하는 방법과 일반적으로 관련이 있다. 본 발명에 따르면, GM-CSF 길항제는 통증의 치료에 효과적이라고 제안했다. GM-CSF 길항제는 GM-CSF 또는 GM-CSF 수용체에 특이적인 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명은 GM-CSF 녹아웃 마우스와 같은 특정 질병 모델에서 길항제를 시험하기에 유용한 유전자 변형 동물을 추가로 제공한다.

배경 기술

[0003] 임의의 유형의 통증은 미국의 내과 의사 진찰의 거의 대부분의 이유이며, 전체 미국인의 절반이 일 년에 한번 병원을 찾게 하는 거의 대부분의 이유이다. 이것은 많은 의학적 질환의 주요한 증상이며, 특히 사람의 삶의 질

및 일반적인 기능을 방해한다. 진단 지속기간, 강도, 유형(둔통, 따끔거림 또는 쑤심), 근원, 또는 신체에서 위치에 따른 다양한 방식으로 통증을 특징 지우는 것에 기초한다. 보통 통증은 치료, 또는 휴식 또는 진통제의 복용과 같은 간단한 조치에 의하지 않고 멈추고, 이러한 것을 급성 통증이라고 부른다. 그러나, 다루기 힘들고, 만성 통증으로 불리는 질환로 발달할 수도 있으며, 이러한 상태는 더이상 증상으로 고려되지 않고 그 자체로써 병이다.

- [0004] 통증은 많은 계획과 정황에 따라 분류될 수 있다. 급성 및 만성의 2 가지 기본적인 유형의 통증이 있다. 급성 통증은 잠시 동안 발생하고, 일시적인 질환을 수반한다. 반면에, 이것은 항상 무엇인가 고장 났다는 알람 신호이다. 만성 통증은 지속적이고 반복되는 것이다. 이것은 만성 질병을 수반하고, 이의 증상 중 하나이다. 통증 강도는 통증을 유발하는 자극의 유형에 의존하는 것뿐만 아니라 통증의 주관적인 지각에도 의존한다. 광범위한 주관적인 지각에도 불구하고, 통증의 몇몇 유형은 하기에 따라 분류되었다.
- [0005] - 통증을 유발하는 자극
- [0006] - 통증의 지속시간
- [0007] - 통증의 성질(강도, 위치 등)
- [0008] 또 다른 분류 시스템은 하기와 같다.
- [0009] - 물어뜯는 듯한 통증. 일정한 강도로 지속됨. 이것은 일반적으로 거동을 악화시킨다.
- [0100] - 지끈거리는 통증. 이는 전형적으로 편두통의 통증이다. 이것은 뇌 혈관의 확장 및 압축에 의해 유발된다.
- [0111] - 쑤시는 통증. 극심함 및 심각함. 이것은 기계적 자극에 의해 유발된다.
- [0122] - 따끔 따끔한 통증. 끊임없는 따끔거리는 느낌은, 예를 들어 속 쓰림에 의해 유발되는 통증의 유형과 비슷하다.
- [0133] - 누르는 듯한 통증. 혈관 또는 근육의 수축에 의해 유발됨.
- [0144] 또한 통증의 특정 유형은 하기와 같다.
- [0155] - 근육통. 근통증(myalgia)으로도 알려진, 이런 통증은 근육과 관련되고, 과로 후에 또는 염증 중에 발생한다.
- [0166] - 산통(colicky pain). 월경 기간동안 자궁과 같은 특정 장기의 근육 수축에 의해 유발된다. 자연에서 일반적으로 순환한다.
- [0177] - 관련통. 고통스러운 느낌이 실제로 발생하는 곳이 아닌 부위에서 느껴지는 경우 발생하며, 이는 뇌가 신체로부터 받은 정보를 어떻게 해석하느냐에 달려있다.
- [0188] - 수술 후의 통증. 수술 후에 발생하고, 수술 과정으로부터의 병소 때문이다.
- [0199] - 골 압 통증. 전립선암, 유방암과 같은 특정 유형의 암 또는 다른 연조직 종양은 전이성 골 질병으로 알려진 고통스러운 골 장애로 진행할 수 있다.
- [0200] **통증 치료를 위한 표준 치료**
- [0211] 통증을 치료하는 많은 방식이 있다. 치료법은 통증의 원인에 따라 다양하다. 주요한 치료법의 옵션은 하기와 같다:
- [0222] 아세트아미노펜 : 타이레놀(아세트아미노펜)은 통증 치료에 사용된다. 통증에 대한 몇몇 다른 약제와 다르게, 타이레놀은 소염 작용을 갖지 않는다. 반면에, 종종 만성 통증의 경우에, 통증 부위에 염증이 없고, 따라서 타이레놀은 적절한 치료를 위한 선택일 수 있다. 타이레놀은 적정량 사용하면 안전하지만, 초과하여 사용하면 위험할 수 있다. 또한, 타이레놀은 다른 특정 약제와 함께 사용되면 부작용을 일으킬 수 있다.
- [0233] 비스테로이드성 소염성 약제(NSAIDs) : 상기 NSAIDs(예, 이부프로펜, 모트린, 알레브 등)은 급성 통증의 경우, 또는 만성 통증을 갖는 환자의 갑작스런 통증에 가장 좋다. 또한, NSAIDs는 건염, 활액낭염 및 관절염을 포함하는 염증성 질환을 치료하는데 탁월하다. 일반적으로, NSAID 사용은 만성 통증을 앓는 환자에 제한되었다. 왜냐하면, 위장병으로의 발달이 우려되기 때문이다. 셀레브렉스(celebrex)와 같은 새로운, 소위 COX-2 억제제로 일컬어지는 것은 이러한 합병증을 피하기 위해 설계되었지만, 이러한 약제를 장기간 사용하는 경우에 여전히 조심해야 할 것이다.

- [0024] 코르티코스테로이드(corticosteroids) : NSAIDs 처럼, 코르티코스테로이드는 강력한 소염성 약제이고, 급성 통증 또는 만성 염증 문제를 위해서 사용하기에 가장 좋다. 코르티코스테로이드는 경구로(예, 메드롤. 프레드니손(Medrol. Prednisone)) 또는 연조직이나 관절 안으로의 주입(코르티손 주사) 중 어느 하나의 방식으로 복용될 수 있다.
- [0025] 진통제(narcotics) : 만일 통증이 다른 방법으로 통제가 안되면, 진통제가 고려되어야 한다. 많은 양의 진통제는 위험하고 중독될 수 있다. 진통제 약제는 급성 통증에 유용하지만, 그들은 현저한 부작용 또한 가진다. 단시간 작용하는 이러한 약제의 유형은 남용을 초래할 수 있어 내성을 발달시킬 수 있다. 장시간 작용하는 옵션은 적은 부작용을 가지고, 만성 통증의 더 나은 조절을 한다. 진통제는 투여량의 점진적인 감소가 없이 긴 시간 동안 사용하거나, 상기 약제를 통증이 아닌 다른 이유로 복용하면 중독될 수 있다.
- [0026] 항경련제 : 항경련제 약제는 신경 통증을 완화하도록 작용하는 약제의 범주이다. 이러한 약제는 뇌로 전달되는 신경 및 신호의 기능을 달라지게 한다. 신경 통증에 대한 가장 흔한 미리 정해진 항경련제 약제는 뉴론틴(Neurontin)(가바펜틴(Gabapentin))이다. 최근에 알려진, 특히 섬유 조직염의 치료를 위한 또 다른 옵션은 리리카(Lyrica)(프레가발린(Pregabalin))이다.
- [0027] 국부 마취약 : 국부 마취약은 영역에 대해 일시적인 통증 완화를 제공할 수 있다. 만성 통증에 사용되면, 국부 마취약은 종종 통증 영역에 국부 패치로서 적용된다. 리도덤(Lidoderm)은 피부에 적용되고, 이 영역의 민감성을 감소시키는 패치이다.
- [0028] 상기 언급된 모든 치료 옵션은 문제점, 부작용을 가지고 있거나, 사용은 특정 통증 유형에 제한된다. 이런 이유로, 통증의 치료에 대하여 아직 채워지지 않는 의학적 필요가 존재한다.
- [0029] **GM-CSF**
- [0030] 과립대식세포집락자극인자(GM-CSF)는 백혈구 성장 인자로서 기능하는 사이토킨이다. GM-CSF는 과립구(호중구, 호산구 및 호염기구) 및 단핵구를 생산하도록 줄기세포를 자극한다. 단핵구는 순환을 떠나서 조직 안으로 이동하며, 그 결과 대식 세포로 성숙한다. 따라서, 이것은 자연적인 면역/염증성 캐스케이드(cascade)의 일부이며, 이에 의하여 적은 수의 대식 세포의 활성화는 그들의 수의 증가, 염증과 싸우는 중대한 과정을 빠르게 초래할 수 있다. GM-CSF의 활성화 형태는 호모다이머(homodimer)로서 세포 밖에서 발견된다. 특히, GM-CSF는 류마티스 관절염 같은(RA) 자가면역 장애에서 염증성 매개체로서, 염증을 발생시키는 사이토킨, 케모킨 및 프로테아제의 생산의 증가를 초래하고, 이에 의하여 결국 관절을 파괴한다고 확인되었다.
- [0031] GM-CSF는 인간과 동물 신체 내의 다양한 과정과 관련된 사이토킨이다. 또한, 최근 들어 염증성 질병과 같은 특정 질병 및 병소는 GM-CSF와 관련이 되었고, GM-CSF는 간섭의 잠재적인 단계로서 제안되었다. 또한, GM-CSF가 통증 치료에 유효한 목표물이라는 것은, 본 발명에서 최초로 공개하는 것이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0032] (비특허문헌 0001) Brennan 등, Pain 64:493-501, 1996
- (비특허문헌 0002) Ghose 등, J Combin Chem: 7:55-68, 1999
- (비특허문헌 0003) Hargreaves 등, 1988
- (비특허문헌 0004) Knappik 등, J. Mol. Biol. 296:57, 2000
- (비특허문헌 0005) Krebs 등, J. Immunol. Methods. 254:67, 2001
- (비특허문헌 0006) Kuzuna 등, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 23:1184-1191, 1975
- (비특허문헌 0007) Lipinski 등, Adv Drug Del Rev: 23:3-25, 1997
- (비특허문헌 0008) Luger 등, Pain 99:397-406, 2002
- (비특허문헌 0009) Pearson 등, Arthritis Rheum. 2:440-459, 1959
- (비특허문헌 0010) Rothe 등, J. Mol. Biol. 376:1182, 2008

(비특허문헌 0011) Schwei 등, J: Neuroscience 79:10886-10897, 1999

발명의 내용

해결하려는 과제

[0033] 본 발명의 목적은 통증을 치료하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0034] 첫 번째로, 본 발명은 GM-CSF가 통증의 치료에 유효한 목표물이라는 것을 설명한다. 이러한 발견은 새롭고, 선행 문헌은 통증의 치료에서 개입이라는 이유로 어떠한 합리적인 것도 설명하거나, 제안하거나, 제공하지 않았다. 따라서, 본 발명은 예를 들어, 피험자의 통증의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 피험자에게 유효량의 GM-CSF 길항제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0035] 또 다른 양태에서, 본 발명은 피험자의 고통을 예방하는 방법을 생각할 수 있으며, 상기 방법은 상기 피험자에게 유효량의 GM-CSF 길항제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 통증으로 고통받는 또는 통증으로 고통받는 것처럼 보이는 피험자의 세포의 성장 및/또는 생존을 활성, 증식, 유도하는 GM-CSF의 능력에 대적할 수 있는 GM-CSF 길항제를 포함하는 조성물을 목적으로 하며, 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 더 포함한다.
- [0037] 또 다른 양태에서, 본 발명은 통증의 치료에 유용한 GM-CSF 길항제를 포함하는 조성물을 목적으로 하며, 상기 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 더 포함한다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 양태에서, 상기 GM-CSF 길항제는 GM-CSF에 특이적인 항체이다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 양태에서, 상기 GM-CSF 길항제는 GM-CSF 수용체에 특이적인 항체이다.
- [0040] 다른 양태에서, 본 발명은 통증의 치료용 약제의 제조에 GM-CSF 길항제의 사용을 목적으로 한다.
- [0041] 다른 양태에서, 본 발명은 통증의 치료를 위한 GM-CSF 길항제를 제공한다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 양태에서, 상기 통증은 수술 후 통증이다. 본 발명의 대안적인 양태에서, 상기 통증은 골암 통증이다. 또 본 발명의 대안적인 양태에서, 상기 GM-CSF 길항제는 진통효과를 가진다.
- [0043] 본 발명의 구체적인 양태에서, 상기 통증은 염증성 통증이다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 양태는 GM-CSF-/- 유전자형을 가지는 유전자 조작된 포유류를 제공한다. 구체적인 양태로, 상기 포유류는 마우스이다.
- [0045] 본 명세서를 통하여, 문맥상 필요로 하지 않는 한, 단어 "포함하다", "가지다" 및 "포함하는", "갖는", "가지는"과 같은 다양한 각각의 변형은 진술된 성분 또는 정수 또는 성분군 또는 정수들이 포함하지만 임의의 다른 성분 또는 정수 또는 성분군 또는 정수들이 제외된다는 것을 함축하는 것으로 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 관절염을 앓는 마우스 모델에 GM-CSF 항체로 치료상의 치료의 무릎관절 조직학 점수를 보여준다. Lat.=측방. Med.=내측. 결과는 평균 \pm SEM으로 나타났다. 대퇴골 내측을 제외한 모든 영역에서, 대조군 마우스와 비교했을 때 항-GM-CSF 항체로 치료된 마우스에서 더 적은 질병이 관찰됐다.
- 도 2는 후지(hind limb) 중량 분포를 무력화도 측정기(incapacitance meter)에서 평가하는 실험의 결과를 보여준다. 데이터는 그래프에서 표시되듯이, 27 일째에 OA 유도 후로부터 중요하다(unpaired t-test).
- 도 3은 염증성 질병의 치료(mBSA/IL1에 의해 유래된 단일관절 관절염)에서 GM-CSF 길항제의 효과를 입증하는 실험의 결과를 보여준다. 도시된 것은 치료 후 7 일째에 무릎관절의 임상 점수이다. 색이 채워진 막대는 C57BL/6 마우스에 대해 기록된 결과를 보여주고, 색이 채워지지 않은 막대는 GM-CSF가 녹아웃(Knock-out)된 마우스에 대한 결과이다. 좌측: 인도메타신으로 치료된 마우스. 우측: 인도메타신으로 치료받지 않은 마우스.
- 도 4는 염증성 통증의 치료(mBSA/IL1에 의해 유래된 단일관절 관절염)에서 GM-CSF 길항제의 효과를 입증하는 실험

험의 결과를 보여준다. 보이는 것은 mBSA/IL1-유래된 단일관절 관절염을 갖는 마우스의 통증의 측정으로서 무력화도 측정기로 측정된 중량 분포이다. 결과는 주입된 다리/대조군 다리 x 100으로 표현되었다.

도 5는 염증성 통증의 치료에서 GM-CSF 길항제의 효과를 입증하는 실험의 결과를 보여준다. 보이는 것은 CFA를 좌측(L) 발페드에 주입한 후에 염증의 수준을 발 두께의 변화로 측정한 것이다. 상기 우측(R) 발페드는 정상이었다. "+ 인도메타신"군은 각각의 측정이 있기 1 시간 전에 복강내에 인도메타신(1 mg/kg)으로 치료되었다. N = 12 마리 마우스/군

도 6은 염증성 통증의 치료에서 GM-CSF 길항제의 효과를 입증하는 실험의 결과를 보여준다. 보이는 것은 CFA를 좌측 발페드에 주입한 후에 통증의 측정으로서 무력화도 측정기로 측정된 중량 분포이다. 상기 우측 발페드는 정상이었다. "+ 인도메타신"군은 각각의 측정이 있기 1 시간 전에 복강내에 인도메타신(1 mg/kg)으로 치료되었다. 결과는 주입된 사지/대조군 사지 x 100으로 표현되었다. N = 12 마리 마우스/군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0047] 본 발명은 GM-CSF 가 통증의 치료에 대한 유효한 목표물이라는 것을 입증한다. 이러한 관점에서 본 발명은 일 양태로, 통증 분야에서의 예방적 또는 치료적 이익을 가져오는 GM-CSF 길항제의 사용방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명은 이러한 질병의 치료에 필요한 피험자에게 약학적으로 유효량의 GM-CSF 길항제의 투여를 포함하는 치료방법을 제공한다. 본 명세서에서 사용된 "치료적 유효량" 또는 "유효량"은 원하는 생물학적 반응이 일어나는데 필요한 GM-CSF 길항제의 양을 의미한다. 본 발명의 약학적 유효량은 통증을 치료하거나 예방하는데 필요한 양이다.
- [0049] 특정 양태에서, 본 발명은 수술 후 통증을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 양태에서 본 발명은 골 암 통증을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 진통효과를 갖는 GM-CSF 길항제를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 류마티스 관절염 통증을 치료하는 방법을 제공한다. GM-CSF 길항제는 류마티스 관절염과 관련된 통증을 억제하거나 차단할 수 있다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 피험자의 류마티스 관절염 통증의 발생을 줄이고, 류마티스 관절염 통증을 개선하고, 류마티스 관절염 통증을 억제하고, 류마티스 관절염 통증을 완화시키는 방법을 제공하며, 및/또는 피험자의 류마티스 관절염 통증의 징후, 발생, 경과를 늦추는 방법을 제공하며, 상기 방법은 피험자에게 유효량의 GM-CSF 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 GM-CSF 길항제를 투여함으로써 개개의 골관절염 통증을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효량의 GM-CSF 길항제를 투여하는 것을 포함하는 개개의 류마티스 관절염과 관련된 염증성 약액질(체중 감소)을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 피험자의 골관절염 통증의 발생을 줄이고, 골관절염 통증을 개선하고, 골관절염 통증을 억제하고, 골관절염 통증을 완화시키는 방법을 제공하며, 및/또는 골관절염 통증의 징후, 발생, 경과를 늦추는 방법을 제공하며, 상기 방법은 피험자에게 유효량의 GM-CSF 길항제를 투여하는 것을 포함한다.
- [0050] 통증 또는 통증의 하나 이상의 증상(류마티스 관절염 통증과 골관절염 통증과 같은)을 "완화"시키는 것은, 본 발명에 따른 GM-CSF 길항제로 개인 또는 개인의 집단을 처치하였을 때, 하나 이상의 원하지 않는 수술 후 통증의 임상적 양상의 정도를 감소시키는 것을 의미한다.
- [0051] 특정 양태에서, 상기 통증은 GM-CSF 길항제를 투여한 후 24시간 이내에 완화된다. 다른 양태에서, 상기 통증은 GM-CSF 길항제를 투여한 후 4일 이내에 완화된다.
- [0052] 본 명세서에서 사용된 "GM-CSF 길항제"는 가장 넓은 의미의 GM-CSF 길항제; GM-CSF의 활성 또는 기능을 억제하는 모든 물질, 또는 GM-CSF에 대한 약학적 효과를 이끌어내는 모든 방법이 포함된다. 상기 용어 GM-CSF 길항제는 GM-CSF에 특이적으로 결합하는 항체, GM-CSF에 특이적인 억제성 핵산 또는 GM-CSF에 특이적인 작은 유기 분자를 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 또한 GM-CSF 길항제라는 용어의 의미 안에는 GM-CSF 수용체에 특이적으로 결합하는 항체, GM-CSF에 특이적인 억제성 핵산, GM-CSF에 특이적인 작은 유기 분자를 포함된다.
- [0053] 억제성 핵산은 안티센스(antisense) DNA, 트리플렉스 형성 올리고뉴클레오티드(triplex-forming oligonucleotides), 외부 가이드 서열(external guide sequence), siRNA 및 microRNA를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 유용한 억제성 핵산은 대조군에 비해 GM-CSF를 암호화하는 RNA의 발현을 최소한 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95 % 감소시키는 핵산을 포함한다. 억제성 핵산 및 이를 생산하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. siRNA 디자인 소프트웨어가 이용 가능하다.
- [0054] GM-CSF 또는 상기 GM-CSF 수용체에 특이적인 작은 유기 분자는 천연물 스크리닝 또는 화합물 라이브러리

(chemical libraries)의 스크리닝을 통해서 확인할 수 있다. 일반적으로 상기 SMOLs의 분자량은 500 Da 미만이며, 바람직하게는 160 내지 480 Da이다. 다른 SMOLs의 일반적인 특징은 하기에서 기술되는 특징 중 하나 이상이다.

- [0055] - 분배계수 로그 P는 -0.4 내지 +5.6이다.
- [0056] - 분자 굴절도(refractivity)는 40 내지 130이다.
- [0057] - 원자 번호는 20 내지 70이다.

[0058] 검토를 위해서 문헌[Ghose 등, *J Combin. Chem.* 1:55-68, 1999] 및 [Lipinski 등, *Adv Drug Del Rev.* 23:3-25, 1997]을 참고하라.

[0059] 바람직하게는 본 발명에서 사용하는 GM-CSF 길항제는, GM-CSF에 특이적인 항체 또는 GM-CSF 수용체에 특이적인 항체이다. 이러한 항체는 쥐 항체, 쥐 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체와 같은 어떠한 유형일 수 있다. "인간" 항체 또는 기능성 인간 항체 절편(functional human antibody fragment)은 키메라가 아니고 (예를 들어, "인간화 된"것이 아니며), 비인간 종으로부터 유래되지 않은 것(전체적 또는 부분적으로)으로 본 명세서에서 정의된다. 인간 항체 또는 기능성 항체 절편은 인간으로부터 유래 될 수 있거나, 합성 인간 항체일 수 있다. "합성인간 항체"는 인실리코(in silico)방식을 이용하여 알려진 인간 항체 서열의 분석에 기초한 합성 서열로부터 유래된 서열을 전체적으로 또는 부분적으로 가지는 항체를 본 명세서에서 정의한다. 예를 들어, 인간 항체 서열 또는 이의 절편의 설계는 인간 항체의 데이터베이스 또는 항체 절편 서열을 분석하고, 이것으로부터 얻어진 데이터를 활용하여 폴리펩타이드 서열을 고안해냄으로써 달성될 수 있다. 인간 항체 또는 기능성 항체 절편의 또 다른 예는 인간 유래의 항체 서열의 라이브러리로부터 단리된 핵산에 의해 암호화된 것이다(즉 인간 천연원(natural source)으로부터 얻은 항체에 기초한 라이브러리).

[0060] "인간화된 항체" 또는 기능성 인간화된 항체 절편은 (i) 인간 생식세포 서열에 기초한 비인간으로부터 유래한 항체(예를 들면, 이중의 면역체계를 나타내는 형질전환 마우스); 또는 (ii) 가변 도메인(variable domain)은 비인간 유래이고 불변 도메인(constant domain)은 인간으로부터 유래한 키메라이거나 (iii) 가변 도메인의 CDRs은 비인간 유래이고, 상기 가변 도메인의 하나 이상의 뼈대(framework)는 인간 유래이고 불변 도메인도(만약 존재한다면) 인간 유래인, 이식된 CDR(CDR-grafted)로 본 명세서에서 정의된다.

[0061] 상기 용어 "키메라 항체" 또는 기능성 키메라 항체 절편은, 어느 한 종에서 발견되는 서열 및 이와 다른 종으로부터 유래되는 가변 항체 영역에서 발견되는 서열로부터 유래하거나 이에 상응하는 불변 항체 영역을 가지는 항체 분자로서 본 명세서에서 정의된다. 바람직하게는, 상기 불변 항체 영역은 인간에게서 발견되는 서열, 예를 들어 인간 생식 주(germ line) 또는 체세포로부터 유래되거나 이에 상응하고, 상기 가변 항체 영역(예를 들어, VH, VL, CDR 또는 FR 영역)은 비인간 동물 예를 들어, 마우스, 쥐, 토끼 또는 햄스터에서 발견되는 서열로부터 유래한 것이다.

[0062] 특이적 결합은 절대적인 것이 아니라 상대적인 것이기 때문에, 만약 항체가 어떠한 항원과 하나 이상의 기준 항원(reference antigen)을 구별할 수 있다면, 본 명세서에 사용된 "~에 특이적으로 결합하는", "~에 특이적 결합" 항체는 항원(본 명세서에서, GM-CSF 또는 GM-CSF 수용체)에 대해 "특이적" 이거나 항원을 "특이적으로 인식"한다. 기준 항원은 하나 이상의 밀접한 관련을 갖는 항원(들)일 수 있으며, 이들은 기준점으로 예를 들어, IL3, IL5, IL-4, IL13 또는 M-CSF로서 사용된다. 이것의 가장 일반적인 형태에서(그리고, 정의된 기준이 언급되지 않은 경우), "특이적 결합"은 항체가 원하는 항원과 관련되지 항원을 구별할 수 있는 능력을 의미하며 이것은 다음과 같은 방법 중의 하나로 결정될 수 있다. 이러한 방법은 웨스턴블랏(Western blot), 엘리사(ELISA) 분석법, RIA-시험, ECL-시험, IRMA-시험 및 펩타이드스캔(peptide scan)을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 예를 들어, 표준 엘리사(ELISA) 분석(assay)이 수행될 수 있다. 점수기입(Scoring)은 표준 색 발생(standard color development)을 이용하여 할 수 있다(예를 들어, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)를 포함하는 항체 및 과산화수소를 포함하는 테트라메틸 벤지딘(tetramethyl benzidine)). 특정 웰(well)에서의 반응은 예를 들어, 450 nm에서의 광학 밀도로 점수를 매길 수 있다. 가장 일반적인 바탕(=음성 반응)은 0.1 OD 일 수 있다. 가장 일반적인 양성 반응은 1 OD 일 수 있다. 이것은 양성과 음성의 차이가 열 배 이상 일수 있다는 것을 의미한다. 일반적으로 결합 특이성의 결정은 단일의 기준 항원을 사용하지 않고, 우유과우더, BSA, 트랜스페린(transferring) 등과 같은 약 3개 내지 5개 정도의 관련되지 않는 항원의 세트를 이용하여 수행된다. 부가적으로, "특이적 결합"은 항체가 이것의 목표 항원의 다른 부분 예를 들면, GM-CSF 또는 GM-CSF수용체의 다른 부분, 또는 GM-CSF 또는 GM-CSF 수용체의 하나 이상의 주요 아미노산 잔기 또는 아미노산 잔기의 가치를 구

별할 수 있는 능력과 관련될 수 있다.

[0063] 또한, 본 명세서에서 사용된 "면역 글로불린 항체"(Ig)는 IgG, IgM, IgE, IgA 또는 IgD(또는 임의의 상기의 하위 분류) 분류에 속하는 단백질을 나타내고, 상기의 종래에 알려진 항체 및 기능성 절편을 모두 포함한다. 항체/면역 글로불린 항체의 "기능성 절편"은 항원-결합 영역을 보유하는(예, IgG의 다양한 영역) 항체/면역 글로불린 항체의 절편을 나타낸다. 일반적으로 항체의 "항원-결합 영역"은 항체의 하나 이상의 초가변영역(hypervariable)에서 발견되고, 즉 CDR-1, -2, 및/또는 -3 영역에서 발견되며; 반면에, 가변성 "뼈대" 영역은 CDR에 대하여 스캐폴드(scaffold)를 제공하는 것과 같은 항원 결합에서 중요한 역할을 담당할 수 있다. 바람직하게는, 상기 "항원-결합 영역"은 적어도 아미노산 잔기가 4개 내지 103 개인 가변성 경(VL)쇄 및 5개 내지 109 개인 가변성 중(VH)쇄를 포함하며, 더 바람직하게는 아미노산 잔기가 3개 내지 107개인 VL 및 4개 내지 111개인 VH, 가장 바람직한 것은 가능한 최대의 VL 및 VH 쇄이다(아미노산 위치가 1 내지 109인 VL 및 1 내지 113인 VH; W097/08320에 따라 번호를 붙임). 본 발명에서 사용하기 위한 면역 글로불린 항체의 바람직한 분류는 IgG이다. 본 발명의 "기능성 절편"은 F(ab')₂ 절편, Fab 절편, scFv 또는 단일 면역 글로불린 항체 가변성 도메인 또는 단일 도메인 항체 폴리펩타이드, 예를 들어 단일 중쇄 가변성 도메인 또는 단일 경쇄 가변성 도메인을 포함하는 구조물의 도메인을 포함한다. 상기 F(ab')₂ 또는 Fab는 C_{H1}과 C_L 도메인 사이에서 발생하는 분자간 이황화 상호작용을 최소화하거나 완전히 제거하도록 제작될 수 있다.

[0064] 본 발명의 항체는 아미노산 서열에 기초하는 재조합 항체 도서관으로부터 유래될 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 인실리코(in silico)로 설계되고 합성으로 만들어진 핵산에 의해 암호화된다. 아미노산 서열의 인실리코 설계는 예를 들어, 인간 서열의 데이터베이스를 분석하고 이로부터 얻은 데이터를 이용하여 폴리펩타이드 서열을 창안함으로써 달성된다. 인실리코로 만들어진 서열을 설계하고 얻는 방법은 예를 들어, 문헌[Knappik 등, *J. Mol. Biol.* 296:57, 2000]; 문헌[Krebs 등, *J. Immunol. Methods.* 254:67, 2001], 문헌[Rothe 등, *J. Mol. Biol.* 376:1182, 2008] 및 2000 년도 이전에 Knappik 등에 의해 공개된 미국특허 제6,300,064호에서 개시되며, 이들의 전부가 참조로써 포함된다.

[0065] GM-CSF에 특이적인 임의의 항체는 본 발명과 함께 사용될 수 있다. 예시적인 항체는 미국특허출원 제 11/914,599호에서 개시되며, 이는 전체가 참조로써 포함된다. 다른 예시적인 항체는 서열번호: 1에서 묘사되는 아미노산 서열의 중연쇄 가변 영역 또는 서열번호: 2에서 묘사되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다. 또 다른 예시적인 항체는 서열번호: 1에서 묘사되는 아미노산 서열의 중연쇄 가변 영역 또는 서열번호: 2에서 묘사되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체로부터 유래된 항체를 포함한다. 또 다른 예시적인 항체는 동일한 특이성을 가지고/가지거나 서열번호: 1에서 묘사되는 아미노산 서열의 중연쇄 가변 영역 또는 서열번호: 2에서 묘사되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체로서 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 또 다른 예시적인 항체는 서열번호: 1에서 묘사되는 서열에 적어도 70 %, 적어도 80 %, 적어도 90 % 또는 적어도 95 % 상동하는 중연쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다. 또 다른 예시적인 항체는 서열번호: 2에서 묘사되는 서열에 적어도 70 %, 적어도 80 %, 적어도 90 % 또는 적어도 95 % 상동하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다.

[0066] 서열번호 1 : Met Glu Leu Ile Met Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Glu Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Arg Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Arg Val Ser Ser Val Ser Gly Ser

[0067] 서열번호 2 : Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Ile Gln Ser Gln Lys Phe Val Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn Val Ala Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ser Gly Arg Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Thr Thr Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Asn Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Lys Gly Glu Phe

[0068] 본 발명에 사용될 수 있는 대안적 예시적인 항체는 서열번호: 3에서 묘사되는 아미노산 서열의 중연쇄 가변 영역(heavy chain variable region) 또는 서열번호: 4에서 묘사되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역(light

chain variable region)을 포함하는 항체이다. 다른 예시적인 항체는 서열번호: 3에서 묘사되는 아미노산 서열의 중연쇄 가변 영역 또는 서열번호: 4에서 묘사되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체로부터 유래된 항체를 포함한다. 또 다른 예시적인 항체는 동일한 특이성을 가지고/가지거나 서열번호: 3에서 묘사되는 아미노산 서열의 중연쇄 가변 영역 또는 서열번호: 4에서 묘사되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체로서 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 또 다른 예시적인 항체는 서열번호: 3에서 묘사되는 서열에 적어도 70 %, 적어도 80 %, 적어도 90 % 또는 적어도 95 % 상동하는 중연쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다. 또 다른 예시적인 항체는 서열번호: 4에서 묘사되는 서열에 적어도 70 %, 적어도 80 %, 적어도 90 % 또는 적어도 95 % 상동하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다.

- [0069] 서열번호 3: 중(heavy) MOR
- [0070] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWRQAPGKGLEWVSGIENKYAGGATYYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGF GTDFWGQGTIVTVSS
- [0071] 서열번호 4: 경(light) MOR
- [0072] DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLT VLGQ
- [0073] 본 발명에서 사용될 수 있는 대체가능한 예시적인 항체는 하기로부터 선택되는 H-CDR3 서열을 포함하는 항체이다.
- [0074] Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp (서열번호 5),
- [0075] Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro (서열번호 6),
- [0076] Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr (서열번호 7),
- [0077] Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr (서열번호 8),
- [0078] Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro (서열번호 9),
- [0079] Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp (서열번호 10),
- [0080] Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser (서열번호 11),
- [0081] Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr (서열번호 12),
- [0082] Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr (서열번호 13),
- [0083] Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn (서열번호 14),
- [0084] Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro (서열번호 15), 및
- [0085] Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr (서열번호 16).
- [0086] 바람직하게는, 서열번호 5 내지 16 중 어느 하나로부터 선택되는 H-CDR3 서열을 포함하는 상기 항체는, 하기 H-CDR1 서열:
- [0087] Asp Tyr Leu Leu His (서열번호 17),
- [0088] 및/또는 하기 H-CDR2 서열:
- [0089] Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly (서열번호 18),
- [0090] 및/또는 하기 L-CDR1 서열:
- [0091] 서열번호 19 : Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile Leu Asn,
- [0092] 및/또는 하기 L-CDR2 서열:
- [0093] 서열번호 20 : Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser,
- [0094] 및/또는 하기 L-CDR3 서열을 부가적으로 포함한다.
- [0095] 서열번호 21 : Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arc Thr

- [0096] 본 발명에서 사용될 수 있는 대체가능한 예시적인 항체는 하기 L-CDR1 서열:
- [0097] 서열번호 22 : Arg Ala Ser His Arg Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala,
- [0098] 및/또는 하기 L-CDR2 서열:
- [0099] 서열번호 23 : Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr,
- [0100] 및/또는 하기 L-CDR3 서열:
- [0101] 서열번호 24 : Gln Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Val Thr,
- [0102] 및/또는 하기 H-CDR1 서열:
- [0103] 서열번호 25 : Gly Tyr Ile Phe pro Thr Phe Ala Leu His,
- [0104] 및/또는 하기 H-CDR2 서열:
- [0105] 서열번호 26 : Ser Ile Asn Thr Ala ser Gly Lys Thr Lys Phe Ser Thr Lys Phe Gln,
- [0106] 및/또는 하기 H-CDR3 서열을 포함하는 항체이다.
- [0107] 서열번호 27 : Asp Arg Phe Gln Asn Ile Met Ala Thr Ile Leu Asp Val.
- [0108] 바람직하게, 상기 항체는 서열번호 22 내지 27의 모든 CRD를 포함한다.
- [0109] 상기 GM-CSF 수용체는 조혈소 수용체 상과의 일부이다. 이것은 헤테로다이머릭(heterodimeric)이며, 알파 및 베타 서브유닛으로 구성된다. 상기 알파 서브유닛은 GM-CSF에 고도로 특이적이지만, 상기 베타 서브유닛은 IL3 및 IL5를 포함하는 다른 사이토킨(cytokine) 수용체와 함께 공유된다. 이는 상기 베타 수용체 서브유닛의 넓은 조직 분포를 나타낸다. 상기 알파 서브유닛, GM-CSFR α 는 골수세포, 및 호중구, 대식 세포, 호산구, 수지상 세포, 상피 세포 및 기도 상피 세포와 같은 비조혈성 세포에서 최초 발현된다. GM-CSFR α 의 전체길이는 유형 I 사이토킨 수용체 과에 속하는 400개의 아미노산 유형 I의 막 당단백질이고, 22 개의 아미노산 신호 펩타이드 (위치 1-22), 298개의 아미노산 세포 밖의 영역(위치 23-320), 막횡단 영역(위치 321-345) 및 짧은 55 개의 아미노산 세포내의 영역으로 구성된다. 상기 신호 펩타이드는 GM-CSFR α 의 성숙한 형태를 제공하도록 378개의 아미노산 단백질로서 절단된다. 인간 및 쥐과의 GM-CSFR α 의 cDNA 클론이 사용될 수 있고, 단백질 수준에서 상기 수용체 서브유닛은 36 %의 동일성을 갖는다. GM-CSF는 상대적으로 낮은 친화성을 갖고 α 서브유닛에 홀로 (Kd 1-5nM) 결합할 수 있지만, β 서브유닛에는 홀로 전혀 결합할 수 없다. 반면에, α 및 β 서브유닛 모두의 존재하에서는 고도의 친화성 리간드 수용체 복합체(Kd >> 100 pM)를 낳는다. GM-CSF 신호는 상기 GM-CSFR α 외에 최초 결합한 후에, JAK-STAT 경로를 인산화하는 고친화성 상호작용을 발생시키도록 더 큰 서브유닛과 보통의 β 쇄가 가교되어 발생한다.
- [0110] GM-CSF 수용체에 특이적인 임의의 항체는 본 발명과 함께 사용될 수 있다. 예시적인 항체는 서열번호: 28-46 중에서 묘사되는 H-CDR3 서열의 아미노산 서열을 포함하는 항체를 포함한다. 다른 예시적인 항체는 서열번호: 29-46 중에서 묘사되는 H-CDR3의 아미노산 서열을 포함하는 항체로부터 유래된 항체를 포함한다. 또 다른 예시적인 항체는 동일한 특이성을 가지고/가지거나 서열번호: 29-46 중에서 묘사되는 H-CDR3의 아미노산 서열을 포함하는 항체로서 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 또 다른 예시적인 항체는 서열번호: 28-46 중에서 묘사되는 H-CDR3 서열에 적어도 70 %, 적어도 80 %, 적어도 90 % 또는 적어도 95 % 상동하는 H-CDR3 서열을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0111] 서열번호 28 : Val Gly Ser Phe Ser Gly Ile Ala Tyr Arg Pro
- [0112] 서열번호 29 : Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro
- [0113] 서열번호 30 : Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr
- [0114] 서열번호 31 : Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro
- [0115] 서열번호 32 : Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu
- [0116] 서열번호 33 : Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu
- [0117] 서열번호 34 : Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro

- [0118] 서열번호 35 : Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu
- [0119] 서열번호 36 : Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro
- [0120] 서열번호 37 : Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu
- [0121] 서열번호 38 : Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
- [0122] 서열번호 39 : Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
- [0123] 서열번호 40 : Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr
- [0124] 서열번호 41 : Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
- [0125] 서열번호 42 : Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu
- [0126] 서열번호 43 : Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu
- [0127] 서열번호 44 : Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu His Leu
- [0128] 서열번호 45 : Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe
- [0129] 서열번호 46 : Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu
- [0130] 특정 양태에서, 본 발명은 피험자의 통증을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 GM-CSF 길항제를 상기 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다. 이와 관련하여 사용된 "피험자"는 임의의 포유류를 나타내며, 사이노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey)(군 필리핀원숭이), 붉은털원숭이(벵골원숭이) 또는 인간(호모사피엔스)과 같은 영장류 및 마우스 또는 쥐와 같은 설치류를 포함한다. 바람직하게, 상기 피험자는 영장류이며, 가장 바람직하게는 인간이다.
- [0131] 특정 양태에서, 본 발명은 통증으로 고통받는 또는 통증으로 고통받는 것처럼 보이는 피험자의 세포의 성장 및/또는 생존을 활성, 증식, 유도하는 GM-CSF의 능력에 대적할 수 있는 GM-CSF 길항제를 포함하는 조성물을 목적으로 하며, 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 항-GM-CSF 항체는 통증에서 GM-CSF의 임의의 역할에 적대감을 일으킬 수 있다.
- [0132] 본 발명의 또 다른 양태는 피험자의 통증을 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 GM-CSF 길항제를 상기 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다. 이와 관련하여 사용된 "예방"은 질병의 시작을 막거나 질병의 시작을 지연시키는데 목적을 두는 방법을 나타낸다.
- [0133] 본 발명의 특정 양태는 통증의 치료에 유용한 GM-CSF 길항제를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 더 포함한다.
- [0134] 본 발명의 다른 양태는 통증의 치료를 위한 약제의 제조에 GM-CSF 길항제의 사용을 제공한다.
- [0135] 본 발명의 다른 양태는 통증의 치료를 위한 GM-CSF 길항제를 제공한다.
- [0136] 본 발명의 상기 조성물은, 바람직하게는, 통증의 치료를 위한 GM-CSF 길항제 및 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물이다. 이러한 담체, 희석제 및 부형제는 당해 분야에 잘 알려진 것이고, 숙련된 기술자는 본 발명의 GM-CSF 길항제로 피험자를 치료하는 가장 적합한 제제 및 투여 경로를 발견할 것이다.
- [0137] 본 발명의 또 다른 양태는 GM-CSF-/- 유전자형을 가지는 유전자 변형된 포유류를 제공한다. 구체적인 양태로, 상기 포유류는 마우스이다. 상기 용어 "녹아웃" 마우스(또는 포유류), 특정 유전자가 "파괴된" 마우스(또는 포유류), 및 "-/- 유전자형"을 갖는 마우스(또는 포유류)는 본 발명에서 상호교환적으로 사용되고, 당해 분야에서 인정된다. 각각의 동물은 대립 형질 염색체 모두 상의 각각의 유전자에서, 여기서는 GM-CSF의 결핍이 있다.

실시예 1

- [0138] **GM-CSF-/-마우스의 생산**
- [0139] GM-CSF-/-마우스의 생산은 Stanley 등(1994)에 개시된다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5592). 요약하자면, 파괴된(disrupted) GM-CSF 유전자와 함께 129/OLA 유래 ES 세포(H-2b)를 C57BL/6(H-2b) 숙주 배반포에 미량주입하여 키메라 마우스를 생산하였다. 돌연변이된 GM-CSF 유전자의 생식세포 전이자를 C57/BL6 마우스에서 11세

대에 걸쳐 교배시키고, 실험을 위해 사용되는 GM-CSF^{-/-}, GM-CSF^{+/-}, GM-CSF^{+/+}를 얻도록 만들어진 GM-CSF^{+/-} 마우스를 교배했다. GM-CSF 유전자형의 상태는 테일(tail) DNA의 PCR 분석을 통해 결정되었다. 동물들에 일반적인 쥐과의 사료를 먹였고, 임의로 물을 급수하였고 한배에서 난 동일한 성을 가진 동물끼리 우리에 넣어두었다. 실험을 위해 두 성(sex)의 마우스의 나이를 8 내지 15주로 맞추었다.

실시예 2

- [0140] GM-CSF 길항제는 수술후 통증의 치료에 효과적이었다.
- [0141] GM-CSF 길항제의 효능을 평가하기 위해 수술 후 통증을 모방하는 통증 모델이 이용되었다.
- [0142] 동물:
- [0143] 220 내지 240g 무게의 수컷 Sprague Dawley 쥐를 수술 전에 한 주 동안 동물실험시설에서 순응시켰다.
- [0144] 수술:
- [0145] 수술 과정은 Brennan 등에 개시되어 있는 과정에 기초하였다(Pain 64:493-501,1996). 동물은 2 % 아이소플로렌(isoflurane)을 이용하여 흡입 마취하였고, 노즈콘(nose cone)을 이용하여 유지하였다. 오른쪽 뒷발의 바닥쪽에 포비돈-아이오다인(povidone-iodine)을 도포하였고, 뒤꿈치의 0.5 cm 떨어진 곳에서 시작하여 발톱을 향하여 중앙에 1 cm의 세로방향 절개를 피부와 근막에 걸쳐서 하였다. 길이의 측정은 발의 구부러진 부분에서 자를 이용하여 하였다. 뒷발바닥 근육을 곡형검자를 이용하여 들어올렸고, 세로방향으로 절개를 하였다. 수술 중의 출혈은 거즈로 압박하여 지혈하였다. 절개부위는 와육봉합(mattress suture)을 2번 시행하여 닫았다(5-0 비흡수성 검은 단일봉합사를 이용함). 봉합에 매듭을 5회 내지 6회 정도 지었고, 첫 번째 매듭은 느슨하게 묶었다. 봉합부위를 바시트라신 용액(bacitracin solution)을 이용하여 닦아냈다. 행동학적 시험을 시작하기 전에 동물들을 깨끗한 우리(cage)에서 2시간 이상 동안 쉬게 하였다.
- [0146] 휴식통증의 평가:
- [0147] 체중부하(Weight bearing)의 정도와 관련된 통증 평가를 위해 누적 통증점수를 이용하였다. 동물들의 발을 밑에서 검사하기 위해 우리(cage)를 플랫폼보다 위로 올렸고(높이: 18") 동물들을 플라스틱 철조망(격자간격: 8mm²)이 있는 깨끗한 우리에 놓아두었다. 20 분 동안의 수용 후에, 체중부하의 정도를 0 내지 2의 점수로 평가하였다. 0 이라는 점수는 뒷발이 철조망에 탈색되거나 눌린 경우에 주어지고, 이것은 완전한 체중부하를 나타낸다. 1 이라는 점수는 뒷발이 철조망에 닿아있는 피부의 도움을 받아 탈색되거나 피부의 자국이 없는 경우에 주어진다. 2 라는 점수는 뒷발이 완전하게 철조망에서 떨어진 경우에 주어진다. 쥐가 여전히 움직이지 않는 경우에, 뒷발을 움찔하는 것은 2로 간주되었다. 각각의 동물은 5분 간격을 두고 1분 동안 관찰되었다. 30분 동안 얻어진 6개 점수(0-12)의 합을 절개된 발의 통증을 평가하기 위해 이용하였다. 동물들에 의한 발의 보호나 극심한 통증의 발생을 평가하기 위해 점수 2의 빈도도 또한 계산되었다. 각각의 동물을 수술하기 24시간(기준)전에 검사하였고, 수술 후 2시간, 24시간, 48시간, 72시간에 검사하였다. 이 실험의 결과는 GM-CSF 길항제에 의해 처리된 동물에서 관찰된 누적된 휴식 통증(resting pain)점수가 대조군 동물과 비교했을 때 현저하게 줄어들었음을 보여주었다. 체중부하의 정도는 얼마나 동물이 발을 잘 이용할 수 있는지와 관련해서 좋은 상관관계를 가지므로 이것은 효과적인 통증 완화의 측정치이다. 바람직하게는, GM-CSF 길항제는 GM-CSF에 특이적이며, GM-CSF 수용체에 특이적인 항체이다. 이러한 항체는 절개 15시간 전에 다양한 농도로 복강 내 주입 하였다(예를 들면, 동물의 몸무게 1 kg당 0.004, 0.01, 0.02, 0.1, 0.6, 1 mg). 음성의 대조군은 항체를 투여하지 않았고 식염수를 복강 내에 주입하였다. 양성의 대조군은 수술 후 24시간 전에 테스트하기 30분 전에 0.01 mg/kg의 펜타닐(Fentanyl)을 복강 내에 주입하였다. 각각의 조건에서 각각의 실험은 8마리의 동물을 이용(그룹당 n=8)하였다. 그리고 대조군 집단은 56마리의 동물을 이용하였다. 수술과 누적 통증 점수의 평가는 상술한 바와 같이 수행하였다. 휴식통증은 수술 후 24시간이 지난 후에 평가하였다.
- [0148] GM-CSF 길항제는 0.02 mg/kg 내지 1 mg/kg의 투여량으로 투여되었을 때, 수술 후의 휴식 통증을 현저히 경감시켰다.
- [0149] 또 다른 실험에서, GM-CSF 길항제가 수술 후에 투여되었을 때, 수술 후 통증을 경감시키는 효능이 있는지 시험하였다. GM-CSF 특이적인 또는 GM-CSF 수용체에 특이적인 항체를 수술 후 2시간에 정맥 내 주입하였다. 대조군 그룹은 항체를 투여하지 않았고 식염수를 정맥 내 주입하였다. 수술의 수행과 누적 통증점수로 표현되는 휴식 통증은 수술 후 24시간이 되는 때에 평가되었다. GM-CSF 길항제가 절개 후 2시간에 투여되었을 때, 절개 후 24시간 때의 휴식 통증이 현저히 경감되었다. 이러한 결과는 GM-CSF 길항제가 수술 후에 투여되었을 때, 수술

후 통증을 효과적으로 완화시킨다는 것을 증명한다.

[0150] 온도 통각과민(Thermal hyperalgesia)의 평가:

[0151] 온도 통각과민은 Hargreaves 등(1998)의 수정된 방법을 따르는 쥐 발바닥 시험(plantar test)(Ugo Basile, Italy)을 이용하여 평가하였다. 쥐를 높은 유리 책상 위에 있는 4개의 플렉시글라스(plexiglass) 상자로 이루어진 장치에서 길들였다. 움직일 수 있는 복사열원을 책상 아래에 위치시키고 뒷발에 초점을 맞추었다. 동물이 자고 있지 않고, 움직이지 않는 상태에 있을 때, 컨트롤박스에 있는 버튼을 눌렀고, 복사열원이 켜지고 동물이 열원에서 발을 떼는데 걸리는 시간이 자동적으로 기록되었다. 이러한 발움추림잠복기(paw withdrawal latency)는 복사열원의 반사도의 변화를 일으키는 쥐의 발의 움직임을 감지하는 복사열원에 있는 빛 탐색기에 의해 측정되었다. 발움추림잠복기(PWL)는 순간적으로 기록되었다. 조직 손상을 막기 위해 22.5초에는 자동적으로 꺼지게 설정되어 있었다. 발움추림잠복기는 각각의 동물의 양쪽 뒷발에서 3 내지 4번에 걸쳐서 측정하였고, 이것의 평균은 오른쪽 뒷발 및 왼쪽 뒷발의 기준점을 나타낸다. 결과는 오른쪽 발(수술부위)과 왼쪽 발에서 측정된 점수의 비율을 통해서 나타내었다. 장치는 실험의 시작시에 한 번만 조정하였고, 정상적인 동물에서 약 6초의 발움추림잠복기를 가지는 강도인 40에 맞추었다. 각각의 동물을 수술 전 24시간(기준)에 검사하였고, 수술 후 3시간, 24시간, 48시간, 72시간에 검사하였다. 온도통각과민 측정은 점촉성이질통(tactile allodynia)을 측정한 후에 측정하였다. 이러한 결과는 GM-CSF 길항제의 투여가 수술 후 온도통각과민을 현저하게 감소시킨다는 것을 증명한다.

실시예 3

[0152] GM-CSF 길항제는 골 암 통증의 치료에 효과적이다.

[0153] GM-CSF 특이항체나 GM-CSF 수용체 항체와 같은 GM-CSF 길항제는 골 전이와 관련된 암의 통증을 치료하는데에 효과적이다.

[0154] 우리는 GM-CSF 길항제로의 치료의 효능을 평가하기 위해 쥐의 골 암 통증 모델을 이용하였다. 골 암 통증의 쥐 모델은 골융해 육종 세포(osteolytic sarcoma cell)를 쥐의 대퇴골에 골수 내(intramedullary) 주입을 시행하고 주사바늘의 구멍은 종양이 뼈에 한정되게 하기 위해서 아말감으로 채워졌다(Schwei 등, J: Neuroscience 19:10886-10897, 1999, Luger 등, Pain 99:397-406, 2002 참고). 실험은 다 성장한 C3H/HeJ 마우스에서 수행하였다. 0일째에, 소듐 펜토바비탈(sodium pentobarbital)(50mg/kg, 복강내주입)로 마취를 유도하고 관절절개술(arthrotomy)을 수행하였다. 주사 바늘은 골수강으로 삽입하여 육종 세포가 들어갈 수 있는 길을 만들었다. 그 후에 공압 유형의 치과용 고속 핸드피스(Handpiece)를 이용하여 압력을 가하였다. 나이브(naive) 동물(n=5) 뿐만 아니라, 썸(sham) 동물(n=5)은 대퇴골의 골수강 내로 최소한의 필수적 배지(20 μ l, ATCC, Rockville, MD)를 주입함으로써 생성되지만, 이에 반하여 육종 동물은 105 2472 골융해 육종세포가 함유된 배지가 주입(각각의 시험 조건당 n=5)된다(sarcoma 또는 sarc이라한다). 모든 동물에서, 주사부위는 세포나 주사한 배지가 골수강 내에 한정되도록 하기 위해서 치과용 아말감으로 막았고, 깨끗한 수용액(저장성 용액)으로 세척하였다. 마지막으로 절개 봉합은 클립(clips)을 이용하여 수행하였다. 클립은 행동학적 테스트를 방해하지 않기 위해 5일째 되는 날에 제거하였다. 육종이 주사된 동물의 두 번째 그룹에 6일째와 13일째에 GM-CSF에 특이적이거나 GM-CSF 수용체에 특이적인 항체를 주사하였다(10 mg/kg, 복강내).

[0155] 행동학적 분석:

[0156] 종양 이식 후 10일 및 14일에 통증과 관련된 동물의 행동을 테스트하였다. 동물을 다음과 같은 테스트를 이용하여 행동학적으로 테스트하였다. 지속적인 통증(자발적인 보호와 움찔거림), 보행 통증(사지 이용과 로타로드 시험(rotarod)), 움직임 유발 통증(촉진유발 보호, 촉진 유발 움찔거림)이 그것이다. 동물을 바닥에 철조망이 있는 깨끗한 플라스틱 관찰 상자에 넣어두고 30분 동안 순응할 수 있게 하였다. 순응 후에, 자발적인 보호, 자발적인 움찔거림, 열린 공간에서 정상적인 보행 동안의 사지 이용, 강제적으로 보행을 시키는 동안의 사지 이용이 평가되었다. 육종이 주사되고 허위(sham)로 주사된 동물에서 2분 동안의 원위 대퇴골의 정상적인 무해한 촉진을 한 후에 촉진 유발 보호와 움찔거림을 측정하였다.

[0157] 자극에 반응하는 행동을 대표하는 자발적인 움찔거림의 횟수와 보호하는데 소비한 시간이 2분의 관찰시간 동안 동시에 기록되었다. 보행(ambulatory) 및 움찔거림(flinching)은 동물이 뒷발을 올리는 횟수인 반면, 보호(guarding)는 뒷발을 올리는 시간으로 정의된다. 자발적인 보행에서 정상적인 사지 이용은 점수 5 내지 0으로 평가되었다. 5는 정상적인 이용이고, 0은 완전하게 소실된 사지의 이용을 의미한다.

- [0158] 강제된 보행 보호는 로타로드시험(Rotarod test, Columbus Instrument, Columbus, OH)을 이용하여 평가되었다. 회전기계에는 회전하는 막대기가 있고, 배속, 가속, 감도통제기가 장착되어 있다. 동물을 4배속, 8.0 가속, 2.5 감도로 설정된 막대기 위에 올려놓았다. 강제된 보행 보호는 0 내지 5의 점수로 평가되었다. 5는 정상적인 사지의 이용이고, 0은 완전하게 소실된 사지의 이용을 의미한다. 2분 동안 매초 마다 원위 대퇴골의 정상적으로 무해한 축진을 한 후에, 동물을 관찰 상자에 놓아 두고 2분 동안 동물의 축진 유도 보호와 축진 유도 움찔거림을 측정하였다.
- [0159] **GM-CSF 길항제로 처치**
- [0160] 6일째와 13일째에 육종이 주입된 동물에 항-GM-CSF 또는 항-GM-CSF 수용체 항체와 같은 GM-CSF 길항제를 복강 내에 주입하거나(n=5), 육종이 주사된 동물 및 허위로 주사된 동물에게도 식염수를 복강 내에 주입하였다(각각의 조건마다 n=5임). 모든 동물에 대해 10일째와 14일째에 행동학적인 분석을 하였다.
- [0161] **지속적인 통증(ongoing pain) 행동의 평가**
- [0162] 육종이 주사된 동물(식염수 투여)은 허위로 주사된 동물(식염수 투여)과 비교하였을 때 자발적인 보호를 이용하여 평가된 통계학으로 상당한 지속적인 통증 행동을 보였다.
- [0163] 식염수가 투여된 육종이 주사된 동물과 비교하였을 때, GM-CSF 길항제의 투여는 육종이 주사된 동물에서 육종 이식 후 10일째와 14일째에 현저하게 자발적인 보호와 자발적인 움찔거림이 줄어들게 하였다. 이러한 결과는 GM-CSF 길항제가 육종이 주사된 마우스에서 지속적인 통증을 줄여줬다는 것을 나타낸다.
- [0164] **보행 통증(ambulator pain) 행동의 평가**
- [0165] 육종이 주사된 동물(식염수 투여)은 허위로 주사된 동물(식염수 투여)과 비교하였을 때 사지 이용과 강제된 보행 보호를 이용하여 평가된 보행 통증 행동을 보였다. 식염수가 투여된 육종이 주사된 마우스와 비교하였을 때, GM-CSF 길항제의 투여는 육종이 주사된 마우스에서 육종 이식 후 10일째와 14일째에 현저하게 사지 이용 점수와 강제된 보행 보호 점수를 높였다. 이러한 결과는 GM-CSF 길항제가 육종이 주사된 마우스에서 보행 통증을 줄여주었다는 것을 나타낸다.
- [0166] **접촉 유발 통증(touch-evoked pain) 행동의 평가**
- [0167] 육종이 주사된 동물(식염수 투여)은 허위로 주사된 동물(식염수 투여)과 비교하였을 때 축진-유도 보호와 축진-유도 움찔거림으로 평가된 접촉 유발 통증 행동을 보였다. 식염수가 투여된 육종이 주사된 마우스와 비교하였을 때, GM-CSF 길항제의 투여는 육종이 주사된 마우스에서 육종 이식 후 10일째와 14일째에 현저하게 축진 유도 보호와 축진 유도 움찔거림을 줄여주었다. 이러한 결과는 GM-CSF 길항제가 육종이 주사된 마우스에서 접촉 유발 통증을 줄여주었다는 것을 의미한다.

실시예 4

- [0168] **GM-CSF 길항제의 진통효과**
- [0169] 쥐의 완전프로인트항원보강제(Complete Freund's Adjuvant)(CFA)-유도 만성 관절염에서의 GM-CSF 길항제의 진통효과는 참고 물질로 인도메타신과 비교하여 발성시험(vocalization test)을 이용하여 평가하였다.
- [0170] 본 연구에서는 실험 초기에 150 g 내지 220 g의 몸무게의 50마리의 수컷 루이스 쥐(LEWIS LEW/Cr1 Lco)를 이용하였다. 모든 동물은 실험 전에 최소 5일 동안 보관되었고, 모든 실험진행기간 동안 19.5 내지 24.5 °C의 온도, 45 내지 65 %의 상대습도, 12시간의 낮/밤 주기의 통제된 공간에서 정수된 수돗물(tap-water)과 표준형으로 펠렛화 된 형태(분필모양)의 실험용 사료가 임의로 배급되었다. 꼬리를 통해 동물을 각각 식별하였다.
- [0171] 0일째 날에(D0), 미네랄 오일(mineral oil, 10 mg/ml)에 있는 마이코박테리움 부티리쿰(Mycobacterium butyricum) 현탁액(suspension) 0.5 ml를 꼬리 내로 피내 주사하여 쥐에서 관절염을 유도하였다. 14일째 날에(D14), 뒷발의 부드러운 고품에 의한 쥐의 울음소리와, 앞발 및 뒷발 각각에 대한 염증 점수(inflammatory score)를 이용하여 평가된 쥐의 관절지수에 따라서 관절염 쥐를 실험에 포함시켰다(Kuzuna 등, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 23:1184-1191, 1975 및 Pearson 등, *Arthritis Rheum.* 2:440-459, 1959 참조).
- [0172] 동물은 다음과 같은 기준에 기초하여 점수가 매겨졌다. 점수 0: 정상적인 양태, 점수 1: 홍반(erythema), 점수 3: 약간의 부종을 동반한 홍반, 점수 3: 관절강직증(ankylosis)이 없는 심한 염증, 점수 4: 관절강직증. 관절의 고품에 반응하여 울음소리를 낼 수 있는 동물과 2 또는 3의 점수를 나타내는 동물만 실험에 포함시켰다.

[0173] 각 군당 10마리의 쥐로 하여, 총 4군을 실험에 포함시켰다. 군 1(vehicle)에서 선택 후 14일째에(D14), 쥐에 비히클(식염수)을 정맥 내에 투여하였다. 18일째에(D18), 뒷발을 굽혔을 때에, 자극에 반응하는 강도와 울음소리의 수준의 강도가 각각의 동물에 대하여 기록되었다. 군 2(4일째)에서 선택 후 D14에 쥐에 GM-CSF 특이적인 항체를 정맥 내로 투여하였다. 18일째에(D18), 뒷발을 굽혔을 때에, 자극에 반응하는 강도와 울음소리의 수준의 강도가 각각의 동물에 대하여 기록되었다. 군 3(24시간)에서, CFA를 주사한 후 17일째에, 쥐에 GM-CSF 특이적인 항체 또는 GM-CSF 수용체에 특이적인 항체를 정맥 내에 투여하였다. 24시간 후에 뒷발을 굽혔을 때의 자극에 반응하는 강도와 울음소리의 수준의 강도가 각각의 동물에 대하여 기록되었다. 군 4(인도메타신), 18일째에(D18), 인도메타신(10mg/kg)을 경구투여 하고 한 시간 후에 뒷발을 부드럽게 굽혔을 때의 자극에 반응하는 강도가 평가되었다. 각각의 동물에 대하여 울음소리의 수준의 강도 역시 기록되었다. 시험물질을 맹목 검사(blind and random manner)방법으로 0.5 mg/kg의 용도를 정맥 내에 투여하였다. 반면에 인도메타신은 10 mg/kg의 용도를 경구 투여하였다.

[0174] GM-CSF 길항제는 강력한 진통 효과를 보였다. 처치된 군과 비히클 군간의 통계학적인 유의성은 변이의 일방향 분석 후에 기타변이(residual variance)를 이용하는 던넛츠의 시험(Dunnett's test)을 이용하여 결정하였다. GM-CSF에 특이적인 항체와 GM-CSF 수용체에 특이적인 항체는 항체의 단일 투여 후 24시간 또는 4일 후에 현저하게 류마티스 관절염의 쥐 모델에서의 통증을 감소시켰다.

실시예 5

[0175] **GM-CSF 길항제는 골관절염 통증의 치료에 효과적이다.**

[0176] 본 실험에서, 우리는 GM-CSF에 특이적인 단일항체를 이용하여 GM-CSF 길항제가 골관절염 통증의 치료에 효과적일 수 있는지 증명하였다.

[0177] **콜라겐 유도 골관절염(OA) 마우스 모델:**

[0178] 관절의 불안정(joint instability)을 유도하기 위해서 C57BL/6 쥐에 0일째와 2일째에 1단위의 콜라게나제 유형 VII (collagenase type VII)를 오른쪽 무릎의 관절 내로 주입하였다(Blom 등. (2004) Osteoarthritis Cartilage. 12:627-35 참조).

[0179] **항 GM-CSF 항체 치료:**

[0180] 20마리의 쥐를 무작위로 2개의 군으로 나누었다(10마리/그룹).

[0181] 군 1(n=10): 항-GM-CSF 항체(22E9)

[0182] 군 2(n=10): IgG2a 동형(isotype) 대조군 항체

[0183] 마우스에 6주 동안 일주일에 3번씩 마우스 한마리 당 250 μ g의 항-GM-CSF 항체(22E9) 또는 IgG2a 동형 대조군 항체를 복강 내에 투여하였다. 처치는 골관절염의 유도 4일 전부터 시작하였다(예방). 즉 -4일째, -2일째, 0일째(첫 번째 콜라게나제를 주입한 날)에 쥐를 처치하였고, 그 후에 일주일에 3번씩(6주째에 실험이 끝날 때까지) 처치하였다. 2, 4, 6주째에 마우스에서 채혈을 하였다. 대조군 항체와 항-GM-CSF 항체는 10 내독소단위(endotoxin unit)/ml 미만의 값을 가지도록 정제되었다.

[0184] 예시적인 항-GM-CSF 항체로서 상기 항체 22E9를 사용했다. IgG2a 동형인 22E9는 쥐의 항-마우스 GM-CSF에 특이적인 항체이다. 22E9는 AbD Serotec(Martinsried, Germany; Cat.No. 1023501)에서 구입하였다. eBioscience(SanDiego, CA, USA, Cat.No. 14-7331)과 같은 대체 구입처도 존재하였다.

[0185] **조직학**

[0186] 마지막 주사 후 6주째에, 마우스 무릎관절에 대한 조직학적 분석을 수행하였다. 무릎관절 조직을 모으고, 고정하고, 칼슘을 제거하고 파라핀에 담그고, 박편절단기(microtome)으로 7 μ m의 크기로 절단했다. 관절의 병리학적인 상태를 확인하기 위해 슬라이드를 사프란인-오/패스트 그린(safranin-O/Fast Green)과 헤마토실린/에오신(haematoxylin/Eosin)으로 염색을 하였다. 병리학적인 소견은 연골 손상, 활막염, 골증식체 형성, 관절변형을 포함한다.

[0187] 연골 병리에 대한 점수 시스템(scoring system)은 다음과 같다

[0188] 등급(Grade)

[0189]	0	정상
[0190]	1	불규칙하지만 온전함
[0191]	1.5	거친 표면을 갖는 불규칙함
[0192]	2	얇은 세동(superficial fibrillation)
[0193]	2.5	연골층에 줄어든 세포수를 포함하는 얇은 세동
[0194]	3	수직으로 벌어짐
[0195]	3.5	분지 및/또는 수평으로 벌어짐, 최고수위로 파열
[0196]	4	최고 수위까지 확장되지 않은 연골 소실
[0197]	4.5	최고 수위까지 확장된 연골 소실
[0198]	5	최고 수위를 넘어서 연골소실이 확장되었지만 뼈까지는 확장되지 않음
[0199]	5.5	뼈까지 확장된 연골소실
[0200]	6	골 소실/개조/변형
[0201]	단계(Stage)	
[0202]	1	10% 미만의 면적이 손상
[0203]	2	10 내지 25%의 면적이 손상
[0204]	3	25 내지 50%의 면적이 손상
[0205]	4	50 내지 75%의 면적이 손상
[0206]	등급을 단계와 곱해주어 점수를 산출하였다.	
[0207]	이 점수 시스템은 임상적, 실험적 골관절염에서 골관절염의 조직병리를 평가하기 위한 공인된 방법에 기초한 것이었다(Pritzker 등(2006) <i>Osteoarthritis Cartilage</i> ; 14:13-29 참조). 등급은 골관절염의 연골로의 진행 깊이로 정의된다. 단계는 관련된 연골의 양적인 정도, 즉, 얼마나 많은 연골이 영향을 받았는지로 정의된다. 골관절염의 심각성과 정도의 복합적인 평가를 나타내기 위해서, 전체적인 점수를 산출하기 위해 등급을 단계와 곱한다. 마우스 한 마리당 최대 여섯 부위에서 점수를 매겼다.	
[0208]	등급을 단계와 곱해주어 점수를 산출하였다.	
[0209]	활막염에 대한 점수 시스템은 다음과 같다(활막층 점수 시스템).	
[0210]	0	정상적인 관절에 비해 차이가 없음
[0211]	1	활막선(synovial lining)의 비후(thickening) 및 염증세포의 일부 유입
[0212]	2	활막선의 비후 및 염증세포의 중간 정도의 유입
[0213]	3	활막선의 비후 및 염증세포의 최대로 관찰된 유입
[0214]	통증측정:	
[0215]	골관절염 모델에서 이용되는 통증의 지표는 무력화도 측정기를 이용한 중량의 구별되는 분포이다. 이 장치는 후지가 움직이는 것과 반대쪽에서 움직이는 것, 움직이지 않은 것 사이의 중량분포의 변화를 측정한다. 쥐를 장치에 적응시키기 위해 실험 전에 3번을 순응하도록 하였다. 각각의 후지에 가해진 중량을 5초마다 측정하였다. 각각의 시간마다 마우스 한 마리마다 3번의 분리된 측정을 하였고 이것을 평균 내었다. 측정은 실험기간 동안 일주일에 2번씩 수행하였다. 결과는 콜라게나제 주사된 다리/대조군 다리 x 100으로서 표시되었다.	
[0216]	결과	
[0217]	외측 대퇴골, 외측 경골, 내측 경골과 같은 조직학적 분석이 된 모든 영역에서(내측 대퇴골제외) 항-GM-CSF 항	

체로 처리된 마우스에서 적은 이상을 보이는 명백한 경향이 나타났다. 결과는 도 1에 나와있다.

[0218] 관절염과 관련된 통증의 측정을 위한 중량 분배의 평가에서, mAb로 처리된 대조군에 비해 항-GM-CSF mAb로 처리된 군에서 27일째 이후부터 관절염이 걸린 무릎으로부터 멀리 중량이 현저하게 이동한다는 것이 나타났다. 결과는 도 2에 나와있다.

[0219] GM-CSF 길항제에 의해 처리된 마우스는 대조군 항체에 의해 처리된 마우스와 비교했을 때 더 적은 이상을 보였다. 또한, GM-CSF 길항제에 의해 처리된 마우스는 대조군 항체에 의해 처리된 마우스와 비교했을 때 질병의 후기 단계에서 현저하게 적은 통증을 보였다. 동형 대조군 항체로 처리된 마우스에서는 GM-CSF 특이적인 항체가 투여된 마우스와 비교했을 때 현저하게 증가된 골관절염의 증상을 보였다. 이것은 GM-CSF 길항제가 골관절염의 통증의 치료에 효과적이라는 것을 증명한다.

실시예 6

[0220] **M-CSF 길항제는 염증성 통증/GmBSA 모델의 치료에 효과적이다**

[0221] 본 실험을 통하여 GM-CSF 길항제가 염증성 통증의 치료에도 효과적이라는 것을 증명하였다. 그렇게 하기 위해서, GM-CSF 녹아웃(knock-out)된 마우스와 대조군 마우스에서 mBSA/IL-1 단일관절 관절염이 유도되었다. 통증을 완화시켜주는 물질인 인도메타신을 투여하거나 투여하지 않고 통증을 평가하였으며, 무력화도 측정기를 이용하여 다양한 시점에서 측정하였다.

[0222] **마우스**

[0223] 24마리의 수컷 C57BL/6 마우스 및 24마리의 수컷 GM-CSF^{-/-} 마우스(실시에 1참조)를 4개의 처리 군으로 나누어 사용하였다.

[0224] 군 1 : GM-CSF KO(n=12): 메틸화된(methylated) BSA/IL-1

[0225] 군 2 : GM-CSF KO(n=12): 메틸화된(methylated) BSA/IL-1 +인도메타신

[0226] 군 3 : C57BL/6 야생형(wildtype)(n=12): 메틸화된(methylated) BSA/IL-1

[0227] 군 4 : C57BL/6 야생형(wildtype)(n=12): 메틸화된(methylated) BSA/IL-1 +인도메타신

[0228] **단일관절 관절염의 유도**

[0229] 단일관절 관절염의 유도는 식염수 용액 중 10 μ l의 BSA(20 mg/ml)를 무릎관절의 관절 내로 주입하고, 다른 한쪽의 무릎관절에는 10 μ l의 식염수를 주입하여 유도하였다. 20 μ l의 IL-1 β (250 ng)를 3일 동안 매일 피하 내로 투여하였다. mBSA의 투여 후 4일과 7일 사이에 전형적으로 반응이 발생하였고, 28일째에 사라졌다. 무력화도(Incapacitance)는 2, 3, 4, 5, 7일째에 측정하였다.

[0230] 인도메타신(Sigma)은 열, 통증, 경직, 종창과 같은 증상을 완화하는 비스테로이드성 항염증 약물이다. 이것은 프로스타글란딘의 생산을 억제함으로써 일어난다. 무력화도 측정기로 통증을 평가하기 한 시간 전에 1 mg/kg의 인도메타신을 군 2 및 군 4의 복강 내에 투여하였다.

[0231] **통증에 대한 평가**

[0232] 무력화도 시험기(Dual Weight Averager)를 이용하여 두 뒷발의 중량 분포를 측정함으로써 진통효과를 자동적으로 그리고 재현 가능하게 평가하였다. 각각의 다리에 가해진 힘(gram으로 측정함)을 사용자의 선택가능한 기간으로 평균을 내었고, 이것은 동물이 무게중심을 한쪽에서 다른 쪽으로 옮기는 경향을 나타낸다. 따라서 무력화도의 양적 측정을 제공할 수 있었다.

[0233] 각각의 후지에 부하된 중량을 5초 동안 측정하였다. 마우스 한 마리당 3번의 분리된 측정을 하였고 각각의 시간에서의 측정치를 평균을 내었다. 결과는 주사된 다리/대조군 다리 x 100으로서 표시되었다. 그러므로 100의 값은 똑같은 중량이 오른쪽 후지와 왼쪽 후지에 부하되었다는 것을 의미한다. 100 미만의 값은 대조군 다리(오른쪽)와 비교하였을 때 더 적은 중량이 주입된 다리(왼쪽)에 부하되었음을 의미한다.

[0234] **결과**

[0235] 이 모델은 mBSA를 무릎관절에 주입하여 활막염을 유도하였다. 7일째에 무릎관절을 육안으로 진단하여 0(정상) 내지 3(심각한 염증)의 점수로 평가하였다(도 3). mBSA가 주사된 왼쪽 무릎은 식염수가 주사된 오른쪽 무릎과

비교하였을 때 더 많은 염증이 일어났다(C57 마우스에서는 $p > 0.001$, GM-CSF-/- 마우스에서는 $p = 0.02$)(도 3). 사실, 식염수가 주사된 모든 오른쪽 무릎의 점수는 0이다. 인도메타신이 처치된 마우스와 그렇지 않은 마우스 사이의 유의적인 차이는 존재하지 않았다.

[0236] C57BL/6 마우스는 mBSA/IL-1 단일관절 관절염이 유도되었을 때, GM-CSF-/- 마우스와 비교했을 때 더 많은 통증(mBSA가 주사된 무릎으로부터의 체중부하의 이동으로 측정된 통증)을 보였다(도 4). 이것은 4일째 이후로 더 현저하게 나타났다.

[0237] mBSA/IL-1 단일관절 관절염 유도 후에, 인도메타신으로 처치된 C57BL/6 마우스에서는 처치되지 않은 마우스와 비교했을 때 더 적은 통증을 보였으며(도 4), 그 결과 측정값은 GM-CSF-/- 마우스에 대한 결과와 비슷하다. GM-CSF-/- 에서 통증을 나타내지 않았기 때문에 인도메타신의 투여는 어떠한 효과도 없었다.

[0238] 유의성 수준은 다음과 같다.

[0239] C57/BL6 마우스: 인도메타신의 투여 vs 비투여 군(군 4 vs 군 3):

[0240] 4일째 $p < 0.0001$; 5일째 $p < 0.001$; 7일째 $p = 0.007$

[0241] GM-CSF-/- 마우스 vs C57BL/6 마우스(군 1 vs 군 3):

[0242] 4일째 $p < 0.0001$; 5일째 $p < 0.0001$; 7일째 $p = 0.022$

[0243] 이러한 결과는, GM-CSF-/- 쥐에서는 어떠한 통증의 증상도 나타나지 않는 반면에 C57BL/6 마우스에서는 mBSA/IL-1 단일관절 관절염 모델에서 4일 이후에 현저한 통증이 발생했다는 것을 의미한다. 그러므로 GM-CSF 길항제는 염증성 통증의 치료에 있어서 굉장히 효과적이다.

실시예 7

[0244] GM-CSF 길항제는 염증성 통증/CFA 모델의 치료에 효과적이다

[0245] 본 실험은 염증성 통증의 치료에 GM-CSF 길항제의 효과를 입증하는 추가적인 실험이다. 여기서, 염증성 통증은 완전프로인트항원보강제(Complete Freund's Adjuvant)로 유도되었다. 실시예 5에서처럼, 통증은 인도메타신, 통증 완화 물질을 투여하거나 투여하지 않고 무력화도 측정기를 사용하여 다양한 시점에서 평가되었다.

[0246] 마우스

[0247] 12 마리의 수컷 C57BL/6 마우스 및 12 마리의 수컷 GM-CSF -/- 마우스(실시예 1 참조)를 각각의 세 개의 치료 군으로 사용했다:

[0248] 군 1 : C57BL/6 야생형 (n=12) : CFA

[0249] 군 2 : C57BL/6 야생형 (n=12) : CFA + 인도메타신

[0250] 군 3 : GM-CSF KO (n=12) : CFA

[0251] 염증성 통증의 유도

[0252] 완전프로인트항원보강제(CFA)(Sigma)는 가열살균한(heat-killed) 결핵균(myco bacterium tuberculosis) 균주인 H37Ra를 미네랄 오일 중에 1 mg/ml로 함유한다. 가열살균한 박테리아가 현탁액에 포함되는 것을 보장하도록 완전히 볼텍싱(vortexing)함으로써 CFA를 혼합하였다(Kamala T (Hock immunization: a humane alternative to mouse footpad injections. J Immunol Methods 328:204-214.2007.)) 볼텍싱 직후에, 19-게이지 바늘을 사용하여 유리 주사기 안으로 상기 보강제를 뽑아서 넣었다. 주사기로부터 거품을 조심히 제거했고, 바늘로부터 제거했다. CFA 에멀전 20 μ l를 각각의 마우스의 좌측 후지(foot pad)의 피하에 주입했다. 통증 평가의 한 시간 전에, 군 2의 마우스의 복강 내에 1 mg/kg의 인도메타신(실시예 5 참조)을 주입했다.

[0253] 통증 판독

[0254] 실시예 5처럼, 2개의 후지에 대한 중량 분포를 측정함으로써 진통제 효능의 자동 및 재생 가능한 평가를 위해 무력화도 시험기(Incapitance Tester)(이중 중량 평균기(dual weight averager))를 사용했다. 5초 간격마다 각각의 후지 상에 부하되는 중량을 측정하였다. 각각의 마우스에서 매 시점마다 세 번의 분리된 측정을 한 이후에 이를 평균 냈다. 결과는 주입된 다리/대조군 다리 x 100으로서 표시된다. 그러므로 100의 값은 똑같은 중량이 오른쪽 후지와 왼쪽 후지에 부하되었다는 것을 의미한다. 100 미만의 값은 대조군 다리(오른쪽)와 비교

하였을 때 더 적은 중량이 주입된 다리(왼쪽)에 부하 되는 것을 의미한다. 무력화도는 CFA 주입 후 24, 48 및 72 시간 후에 검사했다.

[0255] **결과**

[0256] 좌측 후지 안으로 CFA를 피하 주입한 후에, 마우스는 좌측 후지에 종창이 발생했으며, 이는 C57BL/6(군 1) 및 GM-CSF-/- 마우스(군 3)와 유사한 정도를 보였다. 또한, 인도메타신으로 처리된 C57BL/6 마우스(군 2)는 종창의 정도에 있어서 전혀 차이를 보이지 않았다(도 5 참조). 임의의 군에서 반대편 쪽(우측)의 발에 종창이 발견되지 않았다.

[0257] 통증의 측정으로서 중량 분포의 평가에서는, 시간이 지남에 따라 C57BL/6 마우스에서 통증이 발생했다는 것을 보여주었으며, 이러한 통증의 발생은 GM-CSF-/- 마우스에서보다 현저히 크며, CFA 주입 후 48 시간에 $p=0.03$ 이고 72 시간에 $p=0.0009$ 였다(도 6). GM-CSF-/- 마우스에서는 눈에 띄는 통증이 발생하지 않았다. 인도메타신으로 C57BL/6 마우스의 처치는 통증을 완화하였고, 그 결과 GM-CSF-/- 마우스에 대한 측정값에는 변화가 없었다(도 6). CFA 주입 후 72 시간에, 인도메타신으로 처리된 C57BL/6 마우스는 인도메타신으로 처리되지 않은 C57BL/6 마우스보다 현저히 더 적은 통증을 앓았다($p=0.05$).

[0258] 현저한 수준의 요약:

[0259] 48 시간:

[0260] 군 3 vs 군 1 - $p=0.03$,

[0261] 군 2 vs 군 1 - $p=0.09$,

[0262] 72 시간:

[0263] 군 3 vs 군 1 - $p=0.0009$,

[0264] 군 2 vs 군 1 - $p=0.05$.

[0265] CFA 주입 후에 후지의 종창 정도는 C57BL/6 마우스와 비교할 때 GM-CSF-/- 마우스에서 차이가 없었다. 게다가, C57BL/6 마우스에 대한 인도메타신의 처치는 종창에 효과가 없고, 이는 무력화도를 측정하기 단지 한 시간 전에 주어진 것 때문일 것이다. 따라서, 대부분의 종창은 첫 번째 인도메타신의 주입이 24 시간 내에 주어지기 이전에 이미 발생했다.

[0266] 이와 대조적으로, CFA 주입 이후에, C57BL/6 마우스는 인도메타신에 의해 감소되었던 현저한 통증이 발생했다. 반면에, GM-CSF-/- 마우스는 어떤 통증의 신호도 보여주지 않았다. 이런 이유로, 이러한 실험은, CFA 주입에 따라 모든 마우스의 하지가 악화 됨에도 불구하고, GM-CSF-/- 마우스에서는 어떤 통증의 신호도 보이지 않는다는 것을 명백하게 보여준다.

실시예 8

[0267] **서열번호: 1 또는 2를 포함하는 GM-CSF 특이 항체의 치료적 효과**

[0268] 실시예 2 내지 7을 반복했다. GM-CSF 길항제로서, 서열번호: 1에서 묘사되는 아미노산 서열의 중연쇄 가변 영역(heavy chain variable region) 또는 서열번호: 2에서 묘사되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역(light chain variable region)을 포함하는 GM-CSF 특이 항체를 사용했다. 마우스 말고 다른 종을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 본 실험에서 사용되는 항체와 교차반응하는 종을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 실험에서 사용되는 상기 동물은 쥐이다.

[0269] 대조군 항체로 처리된 동물들은 서열번호: 1에서 묘사되는 아미노산 서열의 중연쇄 가변 영역 또는 서열번호: 2에서 묘사되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함하는 GM-CSF 특정 항체가 수용된 동물과 비교할 때, 통증의 현저한 증가의 징후를 보여준다. 이러한 것은 통증의 치료에 있어서, 항체의 효과를 입증한다.

실시예 9

[0270] **서열번호: 3 또는 4를 포함하는 GM-CSF 특이 항체의 치료적 효과**

[0271] 실시예 2 내지 7을 반복했다. GM-CSF 길항제로서, 서열번호: 3에서 묘사되는 아미노산 서열의 중연쇄 가변 영역 또는 서열번호: 4에서 묘사되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함하는 GM-CSF 특이 항체를 사용했다.

마우스 말고 다른 종을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 본 실험에서 사용되는 항체와 교차반응하는 종을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 실험에서 사용되는 상기 동물은 쥐이다.

- [0272] 상기 동물들, 예를 들어 대조군 항체로 처리된 쥐는 서열번호: 3에서 묘사되는 아미노산 서열의 중연쇄 가변 영역 또는 서열번호: 4에서 묘사되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함하는 GM-CSF 특정 항체가 수용된 동물과 비교할 때, 통증의 현저한 증가의 징후를 보여준다. 이러한 것은 통증의 치료에 있어서, 항체의 효과를 입증한다.

실시예 10

- [0273] **서열번호: 5-20을 포함하는 GM-CSF 특이 항체의 치료적 효과**

[0274] 실시예 2 내지 7을 반복했다. GM-CSF 길항제로서, 서열번호 5 내지 16 중에서 선택되는 H-CDR3 서열을 포함하는 GM-CSF 특이 항체를 사용했다. 바람직하게는, 상기 항체는 서열번호 16의 H-CDR1 서열, 및/또는 서열번호 18의 H-CDR2 서열, 및/또는 서열번호 19의 L-CDR1 서열, 및/또는 서열번호 20의 L-CDR2 서열, 및/또는 서열번호 21의 L-CDR3 서열을 더 포함한다. 마우스 말고 다른 종을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 본 실험에서 사용되는 항체와 교차반응하는 종을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 실험에서 사용되는 상기 동물은 쥐이다.

[0275] 상기 동물들, 예를 들어 대조군 항체로 처리된 쥐는 본 실시예에 따른 GM-CSF 수용체 특이 항체가 수용된 동물과 비교할 때, 통증의 현저한 증가의 징후를 보여준다. 이러한 것은 통증의 치료에 있어서, 항체의 효과를 입증한다.

실시예 11

- [0276] **서열번호: 21-26을 포함하는 GM-CSF 특이 항체의 치료적 효과**

[0277] 실시예 2 내지 7을 반복했다. GM-CSF 길항제로서, 서열번호 22의 L-CDR1 서열, 및/또는 서열번호 23의 L-CDR2 서열, 및/또는 서열번호 24의 L-CDR3 서열, 및/또는 서열번호 25의 H-CDR1 서열, 및/또는 서열번호 26의 H-CDR2 서열, 및/또는 서열번호 27의 H-CDR3를 포함하는 GM-CSF 특이 항체를 사용했다. 바람직하게는, 상기 항체는 서열번호 22 내지 28의 모든 CRD들을 포함한다. 마우스 말고 다른 종을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 본 실험에서 사용되는 항체와 교차반응하는 종을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 실험에서 사용되는 상기 동물은 쥐이다.

[0278] 상기 동물들, 예를 들어 대조군 항체로 처리된 쥐는 본 실시예에 따른 GM-CSF 수용체 특이 항체가 수용된 동물과 비교할 때, 통증의 현저한 증가의 징후를 보여준다. 이러한 것은 통증의 치료에 있어서, 항체의 효과를 입증한다.

실시예 12

- [0279] **GM-CSF 수용체에 특이적인 항체의 치료적 효과**

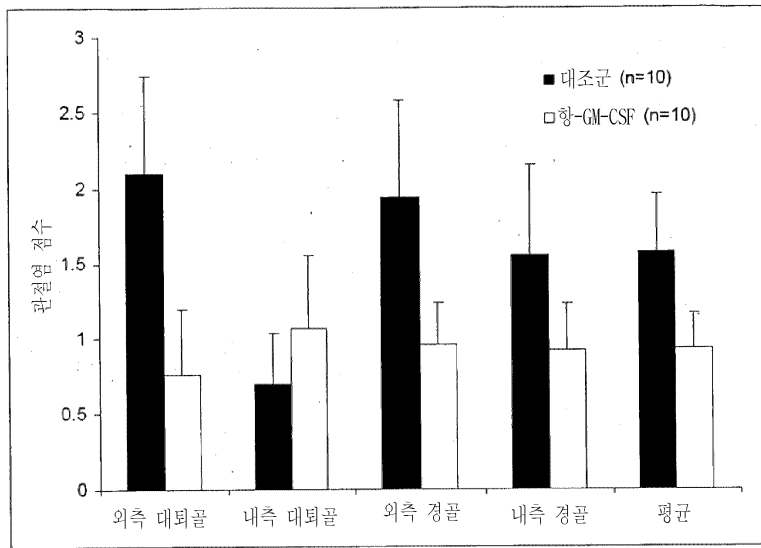
[0280] 실시예 2 내지 7을 반복했다. GM-CSF 길항제로서, 서열번호: 28-46 중 어느 하나로 묘사되는 H-CDR3 서열의 아미노산 서열을 포함하는 GM-CSF 수용체 특이 항체가 사용했다. 마우스 말고 또 다른 종을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 본 실험에서 사용되는 항체와 교차반응하는 종을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 실험에서 사용되는 상기 동물 종은 쥐이다.

[0281] 상기 동물들, 예를 들어 대조군 항체로 처리된 쥐는 본 실시예에 따른 GM-CSF 수용체 특이 항체가 수용된 동물과 비교할 때, 통증의 현저한 증가의 징후를 보여준다. 이러한 것은 통증의 치료에 있어서, 항체의 효과를 입증한다.

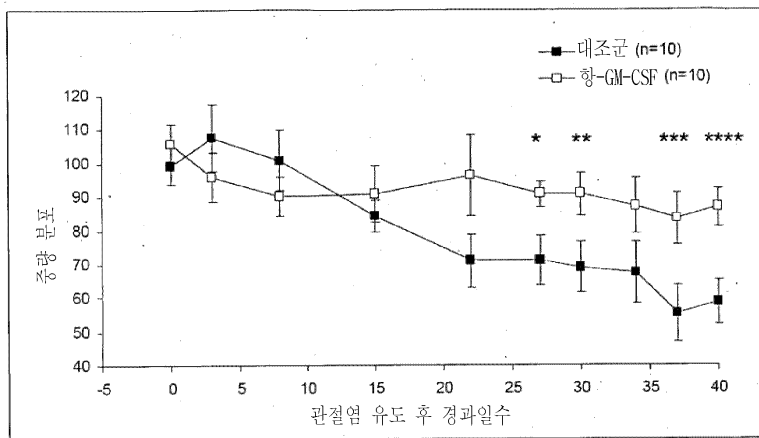
[0282] 당해 기술자는 본 명세서에서 개시된 발명이 구체적으로 개시된 것과 다른 변화 및 변형을 할 수 있다고 인식할 것이다. 본 발명은 모든 이러한 변화 및 변형을 포함하는 것으로 이해된다. 또한, 본 발명은 본 명세서에서 나타내거나 표시된 모든 단계, 모든 특징, 모든 조성물 및 모든 화합물을 개별적으로 또는 전체로 포함하며, 그리고 두 개 이상의 상기 단계 또는 특징의 모든 가능한 조합을 포함한다.

도면

도면1



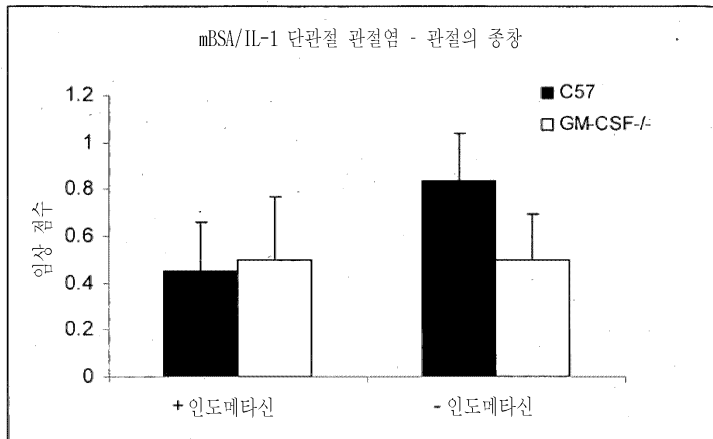
도면2



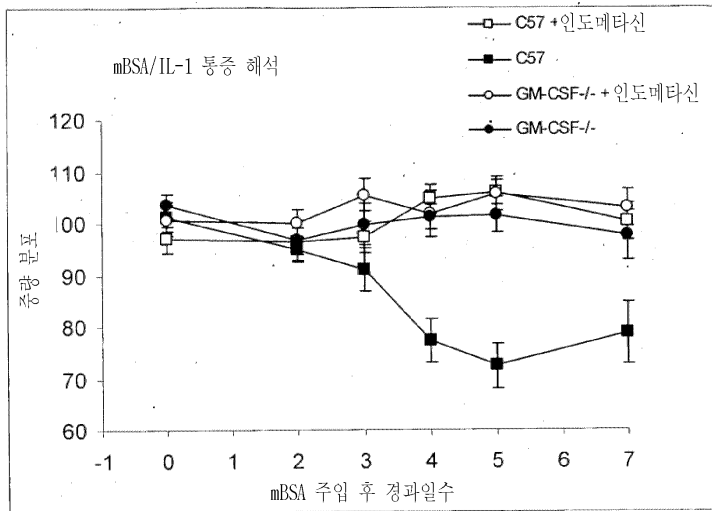
결과는 평균 \pm SEM으로서 나타냈다.

* $p=0.04$, ** $p=0.04$, *** $p=0.02$, **** $p=0.005$, 짝이 없는 t-test

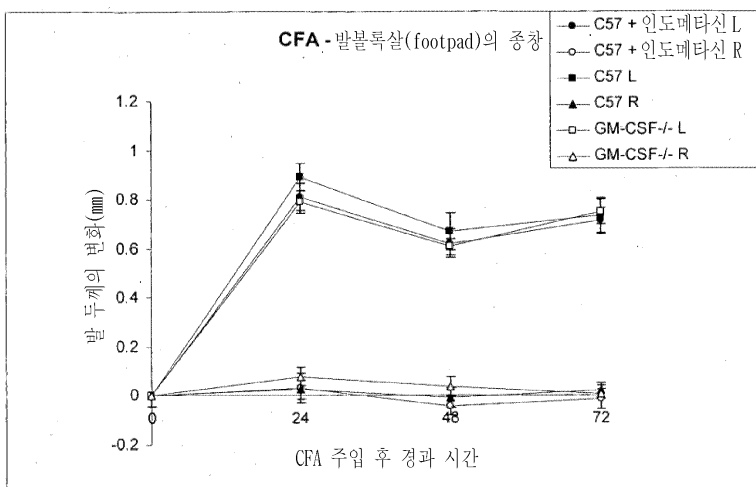
도면3



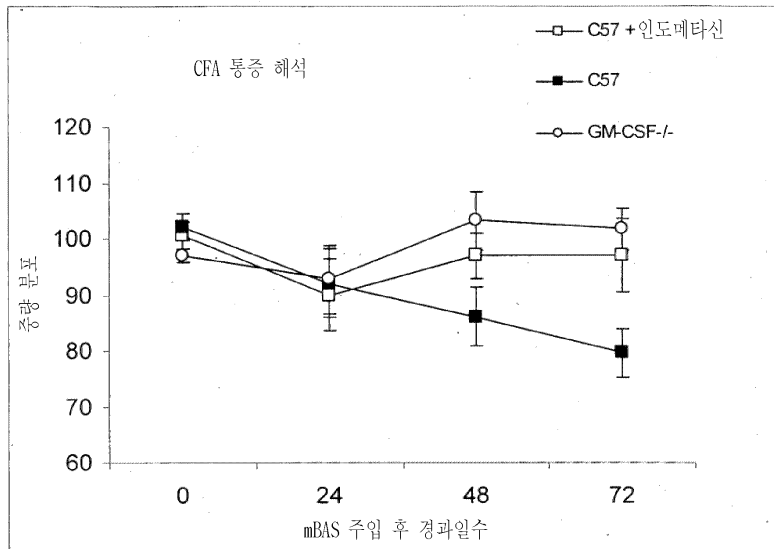
도면4



도면5



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE UNIVERSITY OF MELBOURNE
HAMILTON, John (US Only)
COOK, Andrew (US Only)

<120> PAIN TREATMENT

<130> 30898435/EJH

<150> US 61/139,687

<151> 2008-12-22

<150> US 61/164,491

<151> 2009-03-30

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy chain variable region

<400> 1

Met Glu Leu Ile Met Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His

1 5 10 15
Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 20 25 30
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 35 40 45
Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp
 50 55 60
Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Glu

65 70 75 80
Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 85 90 95
Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
Cys Ala Arg Arg Asp Arg Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
Gly Thr Thr Leu Arg Val Ser Ser Val Ser Gly Ser

130 135 140
<210> 2
<211> 150
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> amino acid sequence of light chain variable region
<400> 2

Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Tyr Met Leu
1 5 10 15
Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Ile Gln Ser Gln
 20 25 30
Lys Phe Val Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys
 35 40 45
Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn Val Ala Trp Leu Gln Gln Lys Pro

50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ser Gly
 65 70 75 80
 Arg Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile
 85 90 95
 Leu Thr Ile Thr Thr Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys

100 105 110
 Gln Gln Phe Asn Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Ser Lys Gly Glu Phe

145 150

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy chain variable region

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val 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
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Glu Asn Lys Tyr Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 4
<211> 105
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> amino acid sequence of light chain variable region

<400> 4
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
50 55 60

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu
65 70 75 80
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Gly Lys Gly Met Val Phe Gly Gly
85 90 95
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> amino acid sequence of Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)
<400> 5
Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp

1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> amino acid sequence of Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)
 <400> 6

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro

1 5 10

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> amino acid sequence of Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)
 <400> 7

Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT

<213> artificial
 <220><223> amino acid sequence of Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)
 <400> 8

Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> amino acid sequence of Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)
 <400> 9

Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro

1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> amino acid sequence of Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 10
 Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> amino acid sequence of Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 11
 Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> amino acid sequence of Homo sapien sCDR3 (H-CDR3)

<400> 12
 Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> amino acid sequence of Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 13
 Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of Homo sapien sCDR3 (H-CDR3)

<400> 14

Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 15

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 16

Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR1 (H-CDR1)

<400> 17

Asp Tyr Leu Leu His

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR2 (H-CDR2)

<400> 18

Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of light CDR1 (L-CDR1)

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile Leu Asn

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence fo light CDR2 (L-CDR2)

<400> 20

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of light CDR3 (L-CDR3)

<400> 21

Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg Thr

1 5

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of light CDR1 (L-CDR1)

<400> 22

Arg Ala Ser His Arg Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of light CDR2 (L-CDR2)

<400> 23

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of light CDR3 (L-CDR3)

<400> 24

Gln Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Val Thr

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 25

Gly Tyr Ile Phe Pro Thr Phe Ala Leu His

1 5 10

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR2 (H-CDR2)

<400> 26

Ser Ile Asn Thr Ala Ser Gly Lys Thr Lys Phe Ser Thr Lys Phe Gln

1 5 10 15

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 27

Asp Arg Phe Gln Asn Ile Met Ala Thr Ile Leu Asp Val

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 28

Val Gly Ser Phe Ser Gly Ile Ala Tyr Arg Pro

1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 29

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 30

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr

1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 31

Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro

1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 32

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu

1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 33

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu

1 5 10

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 34

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro

1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 35

Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu

1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 36

Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro

1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 37

Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu

1 5 10

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 38

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 39

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 40

Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 41

Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223>

amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 42

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu

1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 43

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu

1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 44

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu His Leu

1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 45

Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe

1 5 10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of heavy CDR3 (H-CDR3)

<400> 46

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu

1 5 10