(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. 7
A61K 38/21

(11) 공개번호 특2002 - 0002376
(43) 공개일자 2002년01월09일

(21) 출원번호 10 - 2001 - 7009163
(22) 출원일자 2001년07월20일
번역문 제출일자 2001년07월20일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2000/00032
(86) 국제출원출원일자 2000년01월20일
(87) 국제공개번호 WO 2000/43033
(87) 국제공개일자 2000년07월27일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 - 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 코스타리카, 도미니카연방, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 그레나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 유고슬라비아, 짐바브웨,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비쏘,

(30) 우선권주장 PP8239 1999년01월20일 오스트레일리아(AU)

(71) 출원인 더 유니버서티 어브 퀸슬랜드
포터 더글라스
오스트레일리아 퀸슬랜드 4072 세인트 루시아

(72) 발명자 모튼할
오스트레일리아4151퀸스랜드브리즈번코어파루오리온스트리트75
카바나그앨리스
오스트레일리아4053퀸스랜드브리즈번미첼튼글렌호름스트리트41

(74) 대리인 유미특허법인(대표변리사김원호송만호)

심사청구 : 없음

(54) 다발성 경화증의 샤페로닌 10 및 베타-인터페론 치료법

요약

본 발명은 다발성 경화증(MS)의 치료 방법에 관한 것으로, 샤페로닌 10 및 INF-β의 제약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 또한 샤페로닌 10 및 INF-β를 포함하는 MS 치료용 제약학적 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.

색인어

다발성 경화증, 샤페로닌10, INF-β, 인터페론, 재발가능성

명세서

기술분야

본 발명은 cpn10 및 β-인터페론의 혼합 치료법을 이용하여 다발성 경화증을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 cpn10 및 β-인터페론을 포함하는 제약학적 조성물 및 키트에 관한 것이다.

배경기술

다발성 경화증(MS)은 미국에서만 약 25 만명 중 한 명이 걸리는 신경계에 관한 가장 흔한 자가면역 질병이다. 임상적으로, MS는 분산된 중추신경계(CNS)의 탈수초화가 되어 신경근육의 기능이 약화, 마비, 감각의 상실 및 일반적 제어가 손상되는 것이 특징이다.

인터페론-β(IFN-β)

IFN-β는 바이러스 자극에 반응하여 섬유아세포에 의해 생산되는 항 바이러스성 및 항 신생물성 사이토킨이다. 이것은 면역계 조절자로 작용하고 적절하게 제어된 임상에서 MS의 본래의 기록을 실질적으로 변경시켰다(The IFN-β Multiple Sclerosis Study Group, 1993, Neurology43:655-61). 그러나 이 연구에서 다량의 IFN-β(2일마다 8 Million International Units(MIU)를 주사)가 내성(耐性)이 높고 MS가 재발하고-악화되는 과정에 유익한 작용을 하였지만, 이것은 부분적으로만 작용한다는 것이 명확하게 밝혀졌다. 이들 환자들은 비록 속도가 늦춰지고 임상적인 심각성이 상대적으로 미약해지겠지만 악화를 거듭하게 된다. 그러나 증가된 함량(16 MIU)을 1주일에 3회 투여하면 수용할 수 없는 독성을 생산하게 된다는 초기의 예비 시험 결과 때문에 상기 함량을 증가시킬 수 없었다. 상기 언급된 임상시험에서 대조군으로 사용된 2개의 투여군(1.6 및 8 MIU)에서는 주목할 만한 부작용의 발생률은 낮았다.

IFN-β치료와 관련된 가장 흔한 실험실에서의 이상 증상은 백혈구 수의 현저한 변화와 관련이 없는 림프구감소증(lymphopenia)이다. 알려진 다른 부작용은 독감 유사 증상 및 주사 자리 반응이 있다. 실험실내 연구에서는 INF-β가 MS 환자 및 건강한 대상 모두에서 유래된 미토겐 자극된 말단의 혈액의 단핵세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 보여주고 있다. 이러한 항 증식성 작용은 감소된 IL-2R 발현과 관련되어 있다(Rudicket al., 1993, Neurology, 43:2080-7).

실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE)의 치료제로서 IFN-β의 효능을 알아보기 위한 광범위한 연구가 실험실의 래트와 마우스로 실행되었다. EAE는 MS의 가장 유용한 동물 모델이고 설치동물에서 CNS의 $CD4^+$ T 세포-중개된 염증성 탈수초성 질병이다(Pettinelli & McFarlin, 1981, J. Immunol.127:1420-3). 감수성이 강한 동물에 CNS 항원(마이엘린 기저 단백질, 마이엘린 단백지질 단백질, 마이엘린 올리고덴드로사이트 당단백질) 및 보조제로 접종하여 EAE를 유도할 수 있다. EAE의 증후의 발현은 T-림프구 및 거대세포에 의한 신경계의 침윤과 관련된다(Raine, 1984, Lab. Invest.50:608-35). EAE로부터 자연 회복기 동안, 부분적으로 중추 신경계에서 T-림프구와 거대세포의 세포자멸에 기인하는(Tabiet al., 1994, Eur. J. Immunol.24:2609-17; McCombeet al., 1996, J. Neurol. Sci.,139:1-6) 신경계에서 염증 세포수의 감소가 일어난다(McCombeet al., 1992, J. Neurol. Sci.113:177-86). EAE로부터 회복은 또한 IL-10 및 TGF-β와 같은 분해조정하는(downregulatory) 사이토킨의 생산과 관련되어 있다(Kennedyet al., 1992, J. Immunol,149:2496-2505).

Ruulset al., 1996, J. Immunol.157:5721 - 31의 연구에서는 Lewis 래트에 합성 MEP로 접종하여 EAE를 유도하였다. 이들 래트를 재조합 래트의 IFN - β(3×10^{5}U/day s.c.)에 의해 접종 후 8일부터 17일까지 치료하는 것으로 치료기간 동안 질병으로부터 실험 동물을 완전히 보호하였다. 그러나 치료의 중단으로, 대부분의 동물은 병의 심각성이 매우 악화되어, 병변이 확대되어 재발하는 발병 과정을 겪었다. 치료가 26일까지 계속되었다면, 치료가 중단된 후에도 동물은 재발하지 않았다. 이러한 결과로부터, EAE의 회복기 동안 치료의 중단은 심각한 마비성 질병의 발병을 가속화시키는 것과 관련이 있는 것으로 보인다.

EAE의 특징 중 하나는 질병의 병상기 동안 점진적으로 체중이 감소한다는 것이고, 동물이 회복하는 동안 빠르게 복구된다는 것이다(Ruulset al., 1996, 상기 논문). IFN - β로 8일부터 26일까지 치료하는 것으로 대조군과 비교한 경우 체중의 감소가 억제되었다. 그러나 치료후 모든 동물은 성장이 지연되었고 이것은 접종 후 약 25일에 뚜렷해졌다. 다양한 질병에 대해 IFN - β치료 동안 환자에게 투여량에 제한적인 부작용 중 하나로 체중 증가의 실패가 관찰되었다.

EAE의 마우스 모델(Yuet al., 1996, J. Neuroimmunol.64:91 - 100)을 사용하여, 마이엘린 단백지질 단백질(PLP) 면역지배적 펩타이드 p131 - 151로 면역화한 후 (SWR ×SJL)F $_1$ 마우스에서 EAE의 경과에 대해 마우스 IFN - β로 치료한 효과를 측정하였다. 평균 신경학적 장애가 현저한 감소되고, 악화의 발생 및 악화의 속도가 현저하게 지연되고 DTH의 감소를 보여주었다. IFN - β 치료는 평균 임상 점수에서 장기간의 개선, 명확한 조직병리학적 개선 및 장애(disability)로 진행을 지연시켰다. 실험실에서 IFN - β는 투여량에 의존하는 방식으로 결정인자가 프라임된 림프절 세포의 증식을 억제하였다. 결론적으로, 발명자는 IFN - β 처리된 마우스에서 조직병리학적 개선이 있었지만, 이러한 개선은 치료에는 못미치는 것이었다는 것을 인지하였다. CNS의 염증의 심각성 및 발생에 대한 현저하지만 완만한 장기간 치료효과는 MS 환자에 대해 기재되어 있다(IFN - β다발성 경화증 연구군, 1993).

임신 초기 인자(EPF)

EPF는 Mortonet al., 1974, Nature,249:459 - 60 및 Mortonet al., 1976, Proc. R. Soc. Lond.,193:413 - 9에서 최초로 기재되었다.

EPF는 모태의 혈청에서 수정후 6 - 24시간 내에 발견되는 것으로, 연구된 모든 종의 적어도 초기 절반의 임신기 동안 존재하는 것이고, 태아의 성장 및 생존을 지속하기에 필수적인 것이다(Mortonet al., 1987, Current Topics in Developmental Biology23:73 - 92; Athanasas - Platsiset al., 1989, J. Reprod, Fert.87:495 - 502; Athanasas - Plastsiset al., 1991, J Reprod. Fert.92:443 - 51). EPF는 또한 종양 세포를 위한 자가 분비 생존 인자(Quinnet al., 1990, Clin. Exp. Immunol.80:100 - 8; Quinn & Morton, 1992, Cancer Immunol. Immunother,34:265 - 71)이고, 부분적 간 절제술 이후의 간세포의 재생을 위한 자가 분비 생존 인자(Quinnet al., 1994, Hepatology20:1294 - 302)이다. 다른 다수의 생존 인자와 같이, EPF는 혈소판에 존재하는 것으로, 상처의 치료에서 생리학적 작용을 가질 수 있음을 암시한다(Cavanagh & Morton, 1994, Eur. J. Biochem.222:551 - 60).

EPF는 또한 면역조절 특성을 가진다. 이것은 우선 EPF가 면역억제성 항 - 림프구 혈청(Mortonet al., 1974, 상기 논문; Mortonet al., 1976, 상기 논문) 및 항 - CD - 8 항체가 아닌 항 - CD4 항체(Mortonet al., 1976, Pregnancy Proteins, Eds. B. Grudzinskas, B. Teisner, M. Seppala, Academic Press, Sydney, 391 - 405)의 로제트 억제 특성을 증대시킬 수 있다는 것이 제안되었다. 후속의 연구에서 EPF는 마우스에서 트리니트로클로로벤젠(TNCB)에 대한 지연된 형태의 과민성(DTH) 반응을 억제할 수 있고(Noonanet al., 1979, Nature278:646 - 51), 미토겐 - 유도된 림프구 증식을 억제할 수 있고(Athanasas - Platsis, 1993, PhD Thesis, The University of Queensland), 또한 T - 세포와 결합된 EPF에 의해 IFN - γ생산을 억제할 수 있다는 것을 보여준다. EPF의 면역 억제 작용은 억제 인자 및/또는 림포킨(lymphokines)의 후속 유도를 통해 조정된다. EPF는 CD4+ T 세포에 결합하여, 2가지 유전적으로 제한된 억제 인자 EPF - S_1 및 EPF - S_2 를 분비한다(Rolfeet al., 1988, Clin. Exp. Immunol.73: 219 - 25; Rolfeet al., 1989, Immunol. Cell Biol.67: 205 - 8). EPF는 이의 작용에서 종의 제한적이거나 균주 제한적이지 않지만, EPF - S $_1$ 작용은 마우스 MHC의 I 영역에 제한되고 인간에서 HLA - DR에 제한되지만, EPF - S $_2$ 작용은 Igh 지역에 제한되게 된다.

샤페로닌 10(Chaperonin 10)

인간의 혈소판으로부터 정제된 EPF의 아미노산 서열화(Cavanagh & Morton, 1994 상기 논문)에서는 단백질의 열충격 단백질의 일종인 샤페로닌 10(cpn 10)과 아미노산 서열을 공유한다는 것으로 나타났다(Hartmanet al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,89:3394-8). 따라서, EPF와 cpn 10은 동족체인 것으로 보인다. cpn 10은 세균에서 인간까지 다양한 유기체에서 존재하는 것이다. cpn 10의 구조는 세균과 포유류 사이에서는 덜하지만, 포유류 종에서 매우 잘 보존되어 있다. cpn 10은 단백질을 겹치게 만드는 역할을 하는 미토콘드리아에 존재하고(Ellis & van der Vies, 1991, Annu. Rev. Biochem.60:321-47) 다른 열충격 단백질인 Cellular cpn10은 세포 스트레스 중 상승조절된다.

EPF와 같이 cpn10은 로제트-억제 분석에 활성이고 래트에서 동종이형의 피부 이식물의 생존가능성을 연장하는 면역억제 활성을 보여준다. EAE에 대해, cpn10은 래트 모델에서 EAE의 발현을 지연하고 질병의 임상적 특성을 변경시키는 것이 국제 특허 공보 제 WO95/15338호에 기재되어 있다.

따라서, cpn10과 IFN-β모두가 면역억제성이라는 것은 상기 문헌에서 분명해 진다.

본 발명자들은 이하의 실험에서 마우스에서 EAE의 치료에 대해 cpn-10과 INF-β를 비교하였고 다른 기전을 통해 cpn10과 INF-β작용한다는 것을 의외로 발견하게 되었다. 이러한 발견의 결과, cpn-10과 INF-β는 서로 협력 작용하여 EAE의 치료의 개선을 제공할 수 있다는 것을 알게 되었다. 따라서, cpn10과 INF-β가 협력 작용하여 인간에서 MS의 치료의 개선을 제공할 수도 있다는 것을 의미한다.

따라서 본 발명의 목적은 다발성 경화증(MS)의 치료 방법 및 치료용 제약학적 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 제1 특징은 MS의 치료방법에 관한 것으로, cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

본 발명의 바람직한 실시예에서, MS의 재발을 방지하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제2 특징은 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량 및 제약학적으로 수용가능한 담체 및 희석제를 포함하는 MS 치료용 제약학적 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 제3 특징은 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량 및 제약학적으로 수용가능한 담체 및 희석제를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.

바람직하게, 상기 INF-β는 탈수된 형태로, 사용시 상기 제약학적으로 수용가능한 담체 또는 희석제에 의해 재수화되는 것이다.

일 실시예에서, 상기 cpn10은 탈수된 형태로, 사용시 상기 제약학적으로 수용가능한 담체 또는 희석제에 의해 재수화되는 것이다.

다른 실시예에서, 상기 cpn-10은 정제 또는 캡슐의 형태이다.

상기 특징들에 따르면, cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량은 5-60 ㎎의 cpn10을 포함하는 것이 바람직하다.

더욱 바람직하게, cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량은 10-30 ㎎의 cpn10을 포함한다.

바람직하게, cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량은 1-10 MIU의 INF-β을 포함한다.

더욱 바람직하게, cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량은 4-6 MIU의 INF-β을 포함한다.

명세서 및 특허청구의 범위 전면에서, " 포함" , " 포함한다" , " 포함하는" 이라는 용어는 배타적인 의미가 아니고 포괄적인 의미로 사용된 것으로, 언급된 정수, 또는 정수의 군은 하나 이상의 언급되지 않은 정수 또는 정수의 군을 포함할 수도 있다.

본 발명은 EAE 증상을 가진 마우스와 래트를 cpn10 및 INF-β가 별도의 기작을 통해 공통 작용하여 증상을 완화한다는 것을 본 발명자가 발견함으로써 적어도 부분적으로 본 발명을 착안하게 되었다는 것을 이해할 것이다. 특히, INF-β와 cpn10의 혼합 치료에서는 치료 중단후, EAE 재발이 현저하게 개선되는 예방능력을 보여준다. 따라서, 본 발명은 인간에서 MS의 치료에 연루된 것이고, EAE가 인간의 MS의 실험 모델에서 가장 잘 나타난다. 이점에서, INF-β의 투여는 MS의 잘 알려진 방법이지만 특히 높은 함량의 INF-β에서 부작용이 나타난다. 따라서, 본 발명은 cpn10과 INF-β가 INF-β 단독의 투여량보다 질병 증상을 더 크게 완화시키므로, 부작용을 일으키는 정도로 INF-β를 투여하여야 할 필요를 감소시킨다. cpn10 및 INF-β를 사용한 혼합 치료는 INF-β치료를 중단하여야 할 필요가 없거나 또는 MS 재발의 가능성을 제거하거나 감소시키기 때문에 극히 유익하기 때문에 MS의 치료에 INF-β가 필수 불가결해질 것이라는 것을 알 수 있을 것이다.

본 발명의 제1 특징에서는 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량을 투여함으로써 MS를 치료하는 방법을 제공한다.

바람직한 실시예에서, 본 발명의 방법은 MS 재발을 방지하는 데 이용된다.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, " MS 재발" 이라는 용어는 초기 발병하고 회복한 후 MS 증상이 재발하는 것을 의미한다. MS 재발은 예를 들면 부작용의 위험 또는 발생으로 INF-β치료를 중단하거나 INF-β의 투여량을 감소시키면 일어날 수 있다. 본 발명의 방법으로 MS의 재발이 방지될 수 있다. 즉 MS-증상의 재현이 지연되거나 또는 증상의 심각성이 완화될 수 있다.

" 제약학적 유효량" 이라는 용어는 개체에 투여되는 경우 상기 개체에서 질병의 증상을 예방하고 완화하고, 저감하거나 낮추거나 및/또는 상기 질병 증상의 심각성 또는 기간이 감소되는 cpn10 및 INF-β의 약제 또는 약품의 함량을 의미한다. 본 발명은 cpn10 및 INF-β을 단독으로 투여한 경우 효과가 없거나 또는 최적화되지 않는 함량이지만 함께 투여하는 경우, 제약학적으로 효과적인 함량이 되는 것으로, cpn10과 INF-β를 투여하는 것에 착안하였다는 것을 알 수 있을 것이다.

바람직하게, cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량은 5-60 ㎎의 cpn10를 포함한다.

더욱 바람직하게 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량은 10-30 ㎎의 cpn10를 포함한다.

바람직하게, cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량은 1-10 Million International Units(MIU)의 INF-β를 포함한다.

더욱 바람직하게, cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량은 4-6 MIU의 INF-β를 포함한다.

상기 제약학적 유효량은 통상 70 ㎏의 개체에 대해 산출된 것이라는 것을 당업자들은 알 수 있을 것이다. 따라서, 함량은 체중, 연령, 성별, 개체의 일반적인 건강 및 상태, 및 개체가 받고 있는 기타 다른 치료에 따라 달라질 것이다. 또한, cpn10 및 INF-β의 투여량은 투여회수 및 시기에 상호의존할 것이다.

이 점에서, cpn10 및 INF-β의 투여 회수 및 시기가 변경될 수 있다는 것을 고려하여야 한다. 따라서, 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 고려되는 2가지 방식의 치료가 있다는 것이 분명하다:

(ⅰ) 각각을 다른 시간 및/또는 다른 회수로 투여하는 INF-β와 cpn10의 혼합 치료, 및

(ii) INF-β와 cpn10을 함께 투여하는 치료

투여 회수를 더 줄일 수도 있지만(예를 들면 1주에 2회 또는 3회) cpn10을 매일 투여하는 것이 바람직하다.

이하에서 논의하겠지만, INF-β는 INF-β공급원에 따라 통상 1주에 1회 또는 1주에 3회 투여한다. 상기 투여 회수는 얼마나 자주 cpn10을 투여하는 가에 상관 없이 유지될 것이다. 그러나 INF-β와 cpn10을 함께 매일 투여하는 것이 바람직할 것이다. (ii)의 투여의 경우가 cpn10과 INF-β를 피하 또는 근육내 주사용 상기 조성물에서 혼합하는 경우 특히 적합할 것이다.

실시예에서, INF-β를 피하 또는 근육내 주사하여 투여하고 cpn10을 주사 또는 경구로 투여한다.

바람직하게, cpn10은 정제 또는 캡슐의 형태로 하여 경구로 투여한다.

다른 실시예에서, INF-β 및 cpn10은 근육내 또는 피하 주사에 의해 함께 투여한다.

cpn10은 정제된 재조합 합성 형태로 제공되는 것이 바람직하다. 이와는 달리, cpn10을 화학적으로 합성하여 생산할 수 있다. 그러나 cpn10의 크기가 화학적 합성에 덜 바람직한 조건이 될 것이라는 것을 당업자는 알 수 있을 것이다.

이 점에서, 적합한 cpn10 뉴클레아타이드 및 아미노산 서열은 해당 분야에서 잘 공지된 것이지만, 당업자는 다음의 포유류의 cpn10 서열을 참조하기가 용이할 것이다.

(i) 인간의 cpn10 (NCBIEntrezAccession No.UO7550; Chenet al., 1994, Biochim. Biophys. Acta.1219:189-190);

(ii) 마우스의 cpn10 (NCBIEntrezAccession No.UO9659; Dicksonet al., 1994, J. Biol. Chem.269:26858-864); 및

(iii) 래트의 cpn10 (NCBIEntrezAccession No.X71429; Ryanet al., 1994, FEBS Lett.337:152-156), 이들은 참고문헌으로 본 명세서에 인용된다.

pGEX 시스템을 사용하는 재조합 합성 cpn10의 생산 및 정제의 예가 이하에 기재되어 있다. 다른 유용한 접근법은 이스트 또는 박쿨로바이러스 발현 시스템과 같은 재조합 합성 cpn10의 생산용 진핵 발현 시스템을 이용하는 것이다. 박테리아 발현보다 이 시스템의 잠재적인 이점은 cpn10가 진핵 세포에서 변성된 N-말단없이 생산될 수 있다는 것이다. 이것은 크게 특이적인 활성 및 개선된 안정성을 제공할 것이다. 재조합 단백질 발현의 유용한 방법의 예는 본 명세서에서 참고문헌으로 인용되는 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE(Eds. Coliganet al.; John Wiley & Sons Inc., 1995-99)에서 찾을 수 있다.

MS의 임상적 치료에 사용되는 INF-β의 현재 사용되는 3가지 공급원이 있다. 이들은 다른 해당 정보와 함께 표 1에 기재되어 있다.

예를 들면 Betaseron(또는 Betaferon)은 담체 또는 희석제로 덱스트로즈 및 인간의 혈청 알부민과 함께 탈수된 형태로 Schering에 의해 통상 공급된 것이다. 주사하기 전 탈수된 INF-β/덱스트로즈/인간 혈청 알부민을 재수화하는 수성 담체 또는 희석제로 작용하는 0.54% NaCl이 포함될 수도 있다.

적합하게, 제약학적 조성물은 제약학적으로 수용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.

" 제약학적으로 수용가능한 담체 또는 희석제" 라는 용어는 전신 투여에 안전하게 사용될 수 있는 고체 또는 액체 충진제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 탈수된 INF-β/덱스트로즈/인간 혈청 알부민을 재수화하는 상기 0.54%의 NaCl 수성 담체 또는 희석제는 하나의 예가 된다. INF-β에 특히 적합한 담체의 다른 예로는 본 명세서에서 참고문헌으로 언급된 미국 특허 제4,992,271호 및 제5,643,566호가 있다.

투여의 특정 경로에 따라, 해당 분야에서 잘 공지된 다양한 제약학적으로 수용가능한 담체가 사용될 수도 있다. 이들 담체는 당분, 전분, 셀룰로즈, 및 이의 유도체, 맥아, 젤라틴, 탈크, 황산칼슘, 식물성 오일, 합성 오일, 폴리올, 알긴산, 인산염 완충된 용액, 유화제, 등장성 식염수, 및 피로겐-없는 물로 이루어진 군에서 선택될 수도 있다.

투약의 형태는 정제, 분산, 현탁액, 주사, 용액, 시럽, 알약, 캡슐, 좌약, 에어로졸, 경피성 패치 등을 포함한다. 투약의 형태에는 이러한 방식으로 작용하도록 변형된 방출이 조절된 장치 또는 다른 형태의 이식물을 포함할 수도 있다. 치료제의 방출을 조절하는 것은 약제를 예를 들면 아크릴 수지, 왁스, 고지방성 알콜, 폴리락트산 및 폴리글리콜산, 하이드록시프로필메틸 셀룰로즈와 같은 특정 셀룰로즈 유도체를 포함하는 소수성 폴리머로 코팅함으로써 작용할 수 있다. 또한, 방출을 조절하는 것은 다른 폴리머 매트릭스, 리포좀 및/또는 마이크로스피어를 이용하여 작용할 수도 있다.

경구 또는 주사 투여로 적합한 본 발명의 제약학적 조성물은 캡슐, 알약, 또는 정제와 같은 별도의 단위체로, 분말 또는 과립상으로, 또는 수용액, 비수용액, 수중유적형 에멀젼, 또는 유중수적형 액상 에멀젼의 용액 또는 현탁액으로 존재할 수도 있다. 상기 조성물은 임의의 제약방법으로 제조될 수도 있지만, 모든 방법은 cpn10 및/또는 INF-β를 담체와 결합시키는 단계를 포함하여야 한다. 일반적으로 cpn10 및/또는 INF-β를 액상 담체 또는 미세하게 분할된 고체 담체 또는 이들 모두와 균일하고 충실하게 미리 혼합하고, 필요하다면, 소망하는 형태로 제품을 성형함으로써 조성물을 제조할 수 있다.

비강-인두용 스프레이 및 흡입기와 같은 폐에 대한 투여를 보조하는 담체도 해당 분야에서 잘 공지되어 있는 것이다.

따라서, MS 치료용 키트를 고려할 수 있다는 것은 명확하다. 이 경우, INF-β 및 cpn10은 담체 또는 희석제와 함께 탈수된 형태로 제공할 수 있고, 이 둘은 모두 주사하기 전 재수화되어야 한다. 또한, 키트가 cpn10을 정제 또는 캡슐의 형태로 포함하여, cpn10은 경구로 투여하지만 INF-β는 주사로 투여하기 위해 담체 또는 희석제에서 재수화되어야 한다.

상기 키트는 바늘, 시린지, 흡입기, 에어로졸 통 등으로 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량을 투여하는 것을 보조할 수도 있다.

본 발명은 당업자가 본 발명을 보다 상세하게 이해할 수 있도록 다음의 비제한적인 실시예를 참조할 수도 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 MBP로 접종한 날로부터 재조합 cpn10을 EAE 래트에 복막내 투여한 결과를 보여주는 도면이다. 수치는 평균 장애 ±평균의 표준 오차(SEM)로 표현된다. cpn10 처치는 총 장애 점수를 유의적으로 감소시켰다($p=0.001$; Mann-Whitney Rank Sum Test, Sigma Stat 2.0, Jandel Scientific).

도 2는 MBP로 접종한 날로부터 재조합 cpn10을 EAE 래트에게 경구로 투여한 결과를 보여주는 도면이다. 수치는 평균 장애 ±평균의 표준 오차(SEM)로 표현된다. cpn10 처치는 총 장애 점수를 유의적으로 감소시켰다($p=0.005$; Mann-Whitney Rank Sum Test, Sigma Stat 2.0, Jandel Scientific).

도 3은 MBP로 접종한 날로부터 재조합 cpn10 pGEX를 EAE 래트에게 복막내(i/p) 또는 경구(O/F)로 투여한 결과를 나타내는 도면이다. 수치는 그룹당 체중의 감소 %로 표현된다(10일때의 체중과 비교).

도 4는 MBP로 접종한 날로부터 재조합 cpn10을 래트에서 복강내(ip) 또는 경구로 투여하고, 또는 비교 부형제로 처리하여 MBP에 대한 지연된 형태의 과민성(DTH) 반응을 관찰한 결과를 나타내는 도면이다. 4개의 군의 래트(1군당 n=4)에게 0일에 MBP로 접종시키고 경구(OF: 제2 군) 또는 ip(제 3 군)또는 부형제 단독 ip(제1 및 4 군)로 0 내지 16일까지 매일 투여하였다. 15일째에, 래트의 양쪽 귀의 두께를 측정한 후, 10 ㎕의 식염수에 20㎕의 MBP를 제2-4 군의 양쪽 귀의 기저에 주사하였다. 제1 군은 식염수만을 주사하였다. 24시간 후, 양쪽 귀를 다시 측정하고 귀의 종창을 빼기에 의해 결정하였다. 제 4군과 비교하여*** $p < 0.001$;**$p < 0.003$(Student's t 테스트).

도 5는 MBP로 접종한 날 재조합 cpn10을 래트에게 매일 i.p. 또는 경구로 재조합 cpn10 투여가 상이한 백혈구 개수에 대한 작용을 하는 지를 나타내는 도면이다. 계수(표준 표차와 함께 도시됨)는 16일째 얻어졌다.

도 6은 재조합 cpn10에 의해 실험실에서 MBP-자극된 백혈구 증식의 억제를 보여주는 도면이다. cpn10을 희석하여 플레이트 상에 최종 농도로 조제하고 3개로 나누어 100 ㎕을 분배하였다. 각 웰에 50 ㎕의 세척된 림프구(4×10^6/㎖) 및 50 ㎕의 MBP(80 ㎍/㎖)을 첨가하였다. 대조군의 웰에는 a) MBP를 가지나 cpn10이 없는 세포, 또는 b) MBP가 없고 cpn10도 없는 세포가 포함된다. 플레이트는 72시간동안 배양하고 0.5 μCi[methyl-^{3}H]티미딘으로 최종 18시간 동안 펄스하였다. cpn10을 가지거나 가지지 않고 배양된 세포에서 병합된 방사활성을 측정하여(cpm+표준편차) 증식을 평가하였다.*** $p < 0.001$;**$p < 0.005$(Student's t 테스트).

도 7은 부형제만으로 처리된 마우스와 비교하여 재조합 cpn10으로 처리된 SJL 마우스에서 EAE의 평균 장애 점수가 감소하는 것은 나타내는 도면이다. 0일부터 20일까지 PLP 펩타이드 p130-151 및 cpn10(10 ㎍/마우스/48시간 또는 2.5 ㎍/마우스/48시간) 또는 부형제 단독을 ip 투여로 마우스(군당 n=10)에서 EAE를 유도하였다. 8일째부터는 임상적 증후가 매일 검사되었고 각 마우스의 총 장애가 기록되었다. 결과는 평균 장애 점수/군으로 표현하였다.

도 8은 a. 재조합 cpn10(rcpn10) 또는 rcpn10+INF-β, b. INF-β 또는 rcpn10_INF-β으로 처리된 SJL/J 마우스에서 PLP-EAE의 평균 장애 점수를 부형제만으로 처리된 마우스와 비교한 도면이다. 0일에 PLP 펩타이드로 접종하여 EAE를 유도하고, a. 0 내지 20일 동안 이틀에 한번 rcpn10(2.5 ㎍/마우스)을 ip로, b. 10일 내지 20일 동안 이틀에 한번 INF-β(5×10^3 units/마우스)를 sc로 또는 이 둘의 혼합물을 투여하였다. 대조군의 마우스는 부형제만을 투여하였다. 8일부터 60일까지 임상적 증후는 매일 조사하고 각 군의 평균 장애 점수를 기록하였다. 결과는 각 군 당 평균 장애 점수로 표현하였다.

도 9는 초기 충격 및 재발 기간 동안 재조합 cpn10, INF-β또는 이 둘의 혼합물로 처리된 SJL/J 마우스에서 PLP-EAE의 총 평균 장애 점수(±sem)를 나타내는 도면이다. 0일에 PLP 단백질에 의해 접종되어서 EAE를 유도하였고, 마우스에 rcpn10을 ip로(2.5 ㎍/마우스를 0 내지 20일까지 이틀에 한번), INF-β sc(5,000 유니트/마우스를 10일부터 20일까지 이틀에 한번) 또는 이 둘의 혼합물을 투여하였다. 대조군의 마우스는 부형제만을 투여하였다. 임상적 징후를 8일부터 21일 동안, 22일부터 60일 동안 관찰하였다. rcpn10과 INF-β을 혼합한 처리군에서는 대조군과 비교하여 초기 발병 동안 장애가 유의적으로(*$p=0.050$) 억제되었고, rcpn10 + INF-β은 재발 기간 동안 유의적으로(**$p=0.030$,*** $p=0.014$) 억제되었다.

도 10은 (A) 대조군 및 (B) 재조합 cpn10(2.5 ㎍/마우스를 0부터 20일까지 이틀에 한번 ip로 처리한 마우스의 14일째 샘플의 천골의 척수의 단면을 나타내는 도면이다. 대조군의 마우스(A)에서 염증(큰 화살표) 및 많은 섬유의 탈수초화가 현저한 영역(작은 화살표)이 있었다. cpn10-처리된 마우스(B)에서는 연질막 영역에서 염증(큰 화살표)이 관찰되었으나 탈수초화의 발생은 거의 관찰되지 않았다.

도 11은 rcpn10, 합성 cpn10(scpn10) 및 INF-β에 의해 실험실내에서 MBP-자극된 림프구의 억제를 나타내는 도면이다. MBP로 접종 10일 경과후 림프구는 래트의 림프절의 배수가 회복되었고, MBP(20 ㎍/㎖)와 도시된 농도의 rcpn10, scpn10 및 INF-β으로 배양하였다(2×10^5 세포). 대조군의 웰에는 a) MBP를 포함하나 cpn10은 없는 세포 또는 b) MBP도 없고 cpn10도 없는 세포 중 하나가 포함되어 있다. 플레이트는 3일간 배양되었고 0.5 μCi[methyl-^{3}H]티미딘으로 최후 18시간 동안 펄스하였다. 세포에 병합된 방사활성을 측정하여 증식을 평가하였고 자극 지수(MBP를 가진 웰의 평균/MBP를 가지지 않은 웰의 평균; 표준 편차를 기재)으로 표현하였다. cpn10 또는 INF-β를 가진 웰에서 결과를 cpn10 또는 INF-β를 가지지 않은 웰의 값과 비교하였다. *** $p < 0.001$;**$p < 0.005$(Student's t 테스트).

도 12는 INF-β, 합성 cpn10(scpn10) 및 재조합 cpn10(rcpn10)의 로제트 억제 테스트에 대한 활성을 나타내는 도면이다. cpn10 제제(50 ㎍/㎖) 및 INF-β(0.5 ㎍/㎖)을 10배 희석하여 각 희석물의 로제트 억제 타이터를 측정하였다. 억제 함량(log reciprocal sample dilution, 표준 편차 기재)을 샘플의 가장 큰 희석값으로 기록하여 분석값을 양의 결과로 제공하였다.

표 1은 MS의 처리에 현재 사용되는 INF-β 제제의 리스트이다. sc= 피하 주사; im=근육내 주사.

표 2는 재조합 cpn10의 처리가 Lewis 래트에서 MBP-EAE의 평균 총 임상 점수를 감소시킨다는 것을 보여준다. 0일에 래트의 뒷발바닥에 MBP를 접종하였다. 개시일 0부터 17일 까지 기재된 시간 간격으로 cpn10 또는 부형제 단독을 복막내(ip) 또는 경구로 투여하였다(1군당 7마리의 래트). 10일부터 20일까지 임상적 징후를 매일 기록하고 이들 군의 시험을 35일까지 계속하였다(*로 표시) 각 쥐의 평균 임상 점수를 각 군에 대해 측정하였다. 시험군에서 각 래트의 평균 총 임상 점수를 동이에 시험한 부형제만을 투여받은 군의 래트에 대한 평균 총 임상 점수와 비교하였다(Mann-Whitney Rank Sum Test).

표 3은 rcpn10으로 처리된 군에서 SJL/J 마우스에서 PLP-EAE의 총 장애 점수가 감소되는 것을 보여주는 표이다. PLP 펩타이드 139-151로 SJL/J 마우스에서 EAE를 유도하였다(Greeret al., 1996, J. Immunol.,156:171-179). 마우스(1군당 10마리)를 rcpn10 또는 부형제로 처리하여 8일부터 42일까지 또는 60일까지 임상적으로 조사하였다. 부형제만을 투여한 군과 비교하여 rcpn10 처리군에서 시험기간에 걸쳐 평균 장애 점수/마우스로 결과를 기록하였다(Mann-Whitney Rank Sum test).

표 4는 재조합 cpn10(rcpn10)과 INF-β의 혼합 처리군은 SJL/J 마우스에서 PLP-EAE의 총 임상 점수를 감소되는 것을 보여주는 표이다. PLP 펩타이드 139-151로 SJL/J 마우스에서 EAE를 유도하였다. 마우스(1군당 10마리)를 상기에서 기재된 바와 같이 rcpn10, INF-β, 또는 이들의 혼합물, 또는 부형제만으로 처리하였다. 8일부터 60일까지, 8일부터 21일까지, 및 22일부터 60일까지 마우스를 임상적으로 평가하였다. 시험기간에 걸쳐 각 군의 마우스 당 총 평균 임상점수 결과를 기록하였다. rcpn10, INF-β, 및 rcpn10+INF-β처리군의 결과를 동시에 처리된 부형제만으로 처리된 군의 결과와 비교하였다(Mann-Whitney Rank Sum test).

표 5는 SJL/J 마우스에서 항원-유도된 과민증을 예방하는 것을 보여주는 표이다. PLP 펩타이드 139-151로 4개의 군의 SJL/J 마우스에서 EAE를 유도하였다. 0일에 1 및 2군은 48시간 동안 마우스당 2.5 ㎍ cpn10을 ip로 투여하였으나 3 및 4군은 부형제만을 투여하였다. 10일에 1 및 3군은 PBS/0.1%BSA에 녹인 INF-β0.5 $\times 10^{4}$ 유니트를 투여하였고 2 및 4군은 PBS/BSA를 투여하였다. 8일부터 마우스의 체중을 재고 매일 EAE의 임상적 징후를 시험하였다. PBS/0.1%BSA에 녹인 INF-β또는 PBS/BSA 단독으로 처리된 개시일 후 8 내지 12일에 사망한 각 군의 마우스의 개체수를 나타내었다. 1 및 2군과 3 및 4군 사이의 사망률의 통계적 비교에서는 카이-스퀘어 분석을 사용하여 $p< 0.02$에서 나타내었다.

실시예

실시예 1실시예 1

일반적인 재료일반적인 재료

1.1 동물

생후 8주 내지 10주된 암컷 루이스 래트(JC종)를 Queensland 대학의 Central Animal Breeding House로부터 얻었다. 8주 내지 12주된 암컷 SJL/J 마우스는 오스트레일리아 서부에 소재하는 Animal Resources Centre로부터 구하였다. 이계교배(outbred)의 Quackenbush 마우스 암컷을 Central Animal Breeding House로부터 얻었다.

모든 동물에게는 - 22 내지 - 26℃의 온도 및 광조절(12시간 광, 12시간 암흑) 방에서 마우스/래트 펠릿과 물을 지속적으로 공급하였다. 수술 전, 래트(평균 체중 170 g)를 10 ㎖의 케타민(100 mg/㎖), 6.2 ㎖의 자일라진(20 mg/㎖), 0.8 ㎖의 아트로핀(600 ㎍/㎖) 및 10 ㎖의 염수(0.9% w/v)를 함유하는 복강내 마취제 혼합물(o.2 ㎖)로 마취하였다. 동물에서의 모든 연구는 University of Queensland Animal Experimentation Ethics Committee의 인정 기준 및 Australian National Health and Medical Research Committee의 지침에 따라 수행하였다.

1.2 재조합 cpn10(rcpn10)

본 발명에 참고로 인용된 국제 특허 공보 제WO95/15338호에 기재된 바와 같이 플라스미드 pGEX - 2T 박테리아 발현 시스템(Amersham Pharmacia Biotech, Sweden의 Uppsala 소재)을 사용하여 인간의 재조합 cpn10을 제조하였다. 간단히 말하면, 배치 기법을 이용하여, 글루타티온 - 세파로스 4B 겔(Amersham Pharmacia Biotech), 트롬빈[0.05 M 트리스 - HCl(pH 8.0)/0.15 mM $CaCl_2$ 완충용액, 1000 단위의 트롬빈(Sigma T6884; Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA); 완충용액 1]에 의해 절단된 cpn10과 함께 세포 용균물로부터 글루타티온 S - 트랜스퍼라아제 융합 단백질을 회수하고, 현탁물(샘플 1)을 회수하였다. 그런 다음, 겔을 고염분 완충용액(0.05 M, 트리스 - HCl(pH 8.0)/2 M NaCl; 완충용액 2)으로 세척하였다(샘플 2). 림프구의 증식 분석에 사용하기 위하여(이하 참조), Resource RPC 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech) 상에서 cpn10을 정제하였다. 대조 제조물로서 블랭크 전개물을 사용하였다. Lowry 등의 방법(J. Biol. Chem. 193:265 - 75, 1951)을 이용하여 현탁물(cpn10 샘플 1) 및 고염분 세척물(cpn10 샘플 2)의 단백질 농도를 측정하였다. 15%의 트리스 - Tricine 겔(Schagger & von Jagow, 1987, Analytical Biochem, 166:368 - 79)을 사용한 SDS - PAGE를 이용하여 제조물의 순도를 측정하였다. 이중 항체 샌드위치 ELISA를 이용해 cpn10의 농도를 측정하고, 로제트 억제 테스트(Cavanagh & Morton, 1996, Today's Life Science, 8:24 - 7)에서 생활성을 측정하였다. pGEX - 2T 발현 시스템을 사용해 제조한 cpn10의 아미노산 서열은 N - 말단에 부가의 G - S - M을 가지는 인간의 cpn10과 동일하며, 아세틸화되지 않았다.

1.3 화학 합성 cpn10

단계식 고체상법(Love 등, 1998, In: New Methods for the Study of Biomolecular Complexes, Vol. 510, Series C: Mathematical and Physical Science, Ens, Standing & Chernushecich eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 171 - 9)을 이용하여 N - 말단이 아세틸화된 형태의 합성 cpn10(scpn10)을 제조하였다.

1.4 재조합 IFN - β

설치류의 재조합 IFN - β (Calbiochem - Novabiochem Corp. La Jolla CA, USA)는 ㎖당 48.4 ㎍의 단백질(4.5×10^5 단위) 농도로 0.1 w/v %의 BSA를 함유하는 PBS 내에 함유된 형태로 공급되었다. 래트의 재조합 IFN - β (0.1 mg/1×10^5 단위, Biosource International, Camarillo, CA, USA)를 림프구의 증식 분석에서 테스트하였다. 래트의 IFN - β를 1.0 ㎖의 증류수에 용해시키고, 분액을 - 70℃에서 냉동시키고, 단 1회 해동하였다. 부형제는 0.1 w/v%의 BSA를 함유하는 PBS(PBS/BSA; Sigma #9418)만으로 이루어졌다.

1.5 마이엘린 프로토리피드 단백질(PLP)

단계식 고체상법을 이용하여 139 - 151 잔기의 뇌염 유발성 PLP 펩타이드(HCLGKWLGHP알; Greer 등, 1996, J. Immunol., 156:371 - 9)를 합성하고, 역상 HPLC를 이용해 정제하였다. 전자 현미경 질량 분광측정법을 이용하여 순도를 측정하였다(순도 ≥90%).

실시예 2실시예 2

cpn10을 사용한 시험관내 실험cpn10을 사용한 시험관내 실험

2.1 EAE 유도 및 임상 평가

Deibler 등의 방법(Prep. Biochem., 2:139-165, 1972)을 이용하여 기니아 돼지의 뇌로부터 마이엘린계 단백질(MBP)을 제조하였다. 0.1 w/v%의 NaCl(염수) 중의 MBP를 4 mg/㎖의Mycobacterium butyricum을 함유하는 동일한 부피의 불완전한 프로인트 면역보강제 내에서 에멀젼화하였다. 첫째 날, 마취 상태 하의 래트에게 한쪽 뒷다리의 발을 통해 0.1 ㎖의 에멀젼을 접종하였다(50 ㎍의 MBP/래트). 10일 뒤부터 매일 래트의 체중을 측정하고, 임상 징후를 관찰하였다. Pender의 J. Neurol. Sci., 75:317-28(1986)에 기재된 바와 같이, 꼬리, 뒷다리, 및 앞다리의 유약한 정도를 0(유약한 징후가 없음)에서 4(전신 마비) 등급까지 개별적으로 분류하였다. 매일매일의 실험에서 각 래트에게서 나타나는 전신 장애를 기록하고 그 결과를 평균 장애값/그룹으로 나타내었다. 몇몇 경우 회복 후 다음 몇주 내에 병이 재발하기는 하였으나, 보편적으로 20일까지는 래트의 질병이 회복되었다.

2.2 cpn10을 이용한 EAE의 치료

접종 첫날부터 17일까지 24시간 또는 48시간을 주기로 1 ㎍ 내지 50 ㎍ 용량의 cpn10 또는 적절한 대조 부형제를 래트에게 투여하였다(표 2 참조). 부가의 처리 없이 cpn10 샘플 1 또는 완충용액 1을 래트에게 투여하였다. 투여 전, 1%의 래트의 표준혈청을 첨가한 뒤 cpn10 샘플 2 또는 완충용액 2를 PBS 내에서 하룻밤 동안 투석하였다. 곡선형 공급 바늘(O/F, 경구 공급)을 사용하여 cpn10을 복막내(ip) 또는 경구를 통해 투여하고, 20일째까지 각 래트의 체중 및 임상 경과를 기록하였다. 50 ㎍/24시간을 수여한 래트를 35일째까지 실험하였다.

복막내 또는 경구를 통해 EAE 래트에게 cpn10를 처리한 결과, 10일에서 20일 사이에 장애 및 체중 감소가 용량-의존적으로 줄어들었다(표 2). 50 ㎍/일을 수여한 래트 그룹에서 cpn10을 복막내 또는 경구 투여한 래트간에는 전체 장애 감소에 있어 차이가 없었다(도 1 및 2). 대조군의 낮은 수준의 재발율과 비교해, 이들 그룹 중 어느 그룹에서도 재발이 관찰되지 않았다. 대조군에 비하여 체중 감소에 있어서 기대치 못한 감소가 나타났다(도 3). 래트가 회복기에 들어가자, 그들의 체중이 대조군 마우스의 체충에 필적하게 증가하였다(도 3).

테스트된 cpn10 용량에서, 동물들은 EAE의 임상 징후에 대해 완벽하게 보호되지 못했으나, 제한된 cpn10의 공급으로 인해 보다 높은 용량을 테스트할 수 없었다. 이 분자는 그들의 N-말단이 혈청의 담체 단백질과 결합하기 어렵도록 변형되었기 때문에 이상적이지 아닌 것으로 판단되었다. 그러나, 고용량에서는 임상 경과 및 체중 감소에 있어 현격한 감소가 입증되었다. 17일간 처리가 중단된 cpn10 처리 마우스에게서는 재발이 관찰되지 않았으며, 체중 증가에 대해서는 장기간 효과가 없었다. 이러한 결과는 IFN-β를 처리한 뒤 관찰된 결과(Ruuls 등, 1996, supra)와 대조된다.

2.3 cpn10 처리 래트는 MBP에 대한 DTH 반응이 억제된 것으로 나타남

래트에게 MBP를 접종한 다음, 한 그룹당 4마리씩 4개의 그룹으로 나누었다. 수여 당일부터 16일 동안 각각 경구와 복막내 투여를 통해, 1 그룹과 4 그룹에는 부형제만을 수여하고, 2 그룹과 3 그룹에는 cpn10를 수여하였다(50 ㎍/래트/24시간). 15일 뒤, 공학용 초미계(Mitutoyo)를 사용하여 래트의 양쪽 쥐의 두께를 측정한 다음, 10 ㎕ 염수 중의 20 ㎍ MBP를 염수만을 수여받은 2 그룹과 4 그룹의 래트의 양쪽 귀의 기부에 주사하였다. 24시간 후, 양쪽 귀를 재측정하고, 감산법을 이용해 귀의 종창을 측정하였다.

대조 부형제를 수여한 MBP 투여된 4 그룹의 래트에게서 실질적인 귀의 종창이 관찰되었다(도 4). MBP를 투여하기 전, 경구(2 그룹) 또는 복막내(3 그룹) 투여를 통해 cpn10이 처리된 래트에서는 현저한 종창 감소가 나타났다. 대조 부형

제를 처리한 염수 투여 1 그룹의 래트에서는 귀의 두께에 있어 별다른 차이가 나타나지 않았다. 실제, 이러한 차이는 4 그룹 래트에서 귀의 기부 주변에 심각한 염증성 붉은 부분이 나타났다는 점으로 보아 매우 현격하였으며, 이는 2 그룹과 3 그룹에서는 뚜렷하지 않았다. 중복 실험에서도 유사한 결과가 얻어졌다.

이러한 결과는 cpn10이 IFN-β와 같이 Th1의 면역반응을 억제함을 입증하고, 경구 투여된 cpn10이 이러한 면에서 복막내 투여된 cpn10만큼 효과적임을 보여준다.

2.4 백혈구(WBC)의 총개수 및 미분개수

복막내 또는 경구를 통해 부형제 또는 cpn10을 EAE 래트에게 처리한 뒤(50 ㎍/래트/24시간) 16일 후(n = 3/그룹), WBC 계수를 위하여 꼬리로부터 혈액 샘플을 채취해 EDTA에 넣고, 미분 계수를 위해 Wright-Giemsa로 염색된 혈액 도말(blood smear) 표본을 준비하였다.

결과는 도 5에 나타내었다. 그룹간 총 WBC, 림프구 또는 호중구에 있어 현저한 차이는 없었다. 중복 실험에서도 유사한 결과가 얻어졌다.

이러한 결과는 50 ㎍의 cpn10을 매일 투여하는 것이 회복기 동안 그들의 체중 증가에 효과가 없음을 입증하는 동시에, cpn10이 매우 심각한 어떠한 부작용도 일으키지 않음을 시사한다. 다시 말하면, 이것은 IFN-β에는 없는 특징이다. IFN-β 처리는 사람에서는 현저한 림프구 감소를 유도할 수 있으며, 마우스에서는 IFN-β 주사 후(10^5 U/주사) 12시간 뒤에 림프구 개수가 31.7% 억제된 것으로 나타났다(Soos 등, 1995, J. Immunol., 155:2747-53).

실시예 3실시예 3

MBP에 감응하여 림프 결절 세포의 증식에 대한 cpn10의 효과MBP에 감응하여 림프 결절 세포의 증식에 대한 cpn10의 효과

접종 후 10일 뒤, 2마리의 래트를 마취시키고, 심장에 구멍을 뚫어 혈액을 채취하고, 살균 조건 하에서 각 래트의 접종 림프를 방출하는 오금의 림프 결절을 제거하였다. 림프 결절을 미세하게 썰어 2 mM의 L-글루타민, 25 mM의 HEPES, 50 μM의 2-머캡토에탄올, 1 mM의 Na-피루베이트, 50 ㎍/㎖의 겐타마이신, 1%의 열-불활성화 루이스 래트의 혈청을 함유하는 RPMI1640(배지; ICN, Costa Mesa, CA, USA) 내에서 현탁하였다. 잔해를 제거한 다음, 현탁된 림프구들을 혼합하여 2회 세척하고 세포 농도를 4×10^6 세포/㎖로 조절하였다. 증식 분석을 위해 테스트하기 전, HPLC를 통해 정제된 cpn10을 (1%의 래트의 표준 혈청을 사용하여) PBS에 대해 48시간 동안 투석한 후, NAP-5 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech사) 상의 배지로 옮기고, Millex-GV4 0.22 ㎛ Filter Unit(Millipore사, Bedford, MA, USA)로 통과시켜 여과 살균하였다. 대조 배지(HPLC로부터의 표준 전개물)를 유사하게 처리하였다. 이중 항체 샌드위치 ELISA를 통해 여과 제조물 내의 cpn10의 농도를 확인하였다.

100 ㎍/㎖(10.0 μM) 내지 20 ㎍/㎖(2.0 nM) 배지 내의 cpn10의 희석액을 준비하고(도 6 참조), 각각 100 ㎕의 희석액을 96개의 웰로 이루어진 평평한 바닥 플레이트(Nunclon™ △ MicroWell Plates, Ninc, Roskilde, Denmark)에 3개씩 분배하였다. MBP(50 ㎕, 80 ㎍/㎖ 배지) 및 준비된 결절 세포 현탁액(50 ㎕; 4×10^6 세포/㎖)을 각 웰에 첨가하였다. 대조 세포(각각 6개의 웰)는 (a) MBP는 함유하고 cpn10은 함유하지 않는 세포 또는 (b) MBP와 cpn10 모두를 함유하지 않는 세포 중 하나를 함유한다. 플레이트를 37℃ 하의 습한 5% CO_2 대기 하에서 72시간 동안 배양하고, 각각의 웰에 0.5 μCi [메틸-^{3}H] 티미딘(Amersham Pharmacia Biotech)을 첨가하고, 섬광 계수기(EG& G Wallac, Turku, Finland) 상에서 삽입된 방사능을 측정하였다. cpn10을 함유하는 웰로 삽입된 방사능과 cpn10을 함유하지 않는 웰의 방사능을 비교하였다. 세포의 생존 능력을 평가하기 위하여 평행 플레이트를 준비하였다. 72시간 배양 후, 현탁 배지를 제거하고, 세포를 PBS(20 ㎕) 중의 0.1 w/v%의 트립판 블루 내에서 재현탁하였다.

cpn10은 MBP에 의해 유도되는 림프구의 증식을 용량-의존적 방식으로 억제하였다(도 6). 따라서, cpn10은 IFN-β와 같이(van der Meide 등, 1998, J. Neuroimmunol. 84:14-23) MBP 반응성 T 세포를 하향 조절할 수 있다.

3.2 로제트 억제 테스트

상기에 기재된 방법(Morton 등, 1976, supra; Cavanagh & Morton, 1996, supra)을 이용하여 cpn10 및 래트의 재조합 IFN - β (BioSource International, Camarillo, CA, USA)를 로제트 억제 테스트를 위해 테스트하였다. (1) 0.5 ㎖의 PBS/0.01 w/v%의 BSA 내의 1.0 ㎍의 cpn10; 및 (2) 0.5 ㎖의 PBS/0.01 w/v%의 BSA 내의 1.0 ㎍의 rIFN - β를 함유하는 용액을 준비한 뒤, NAP - 5 칼럼 상의 Hank의 균형 염수 용액/0.01%의 BSA(HBSS/0.01% BSA)로 옮겼다(cpn10dhk IFN - β의 최종 농도: 1.0 ㎍/㎖). HBSS/0.01% BSA를 사용해 샘플을 10^{-5} 에서 10^{-15} 로 10배 희석하고, 각 희석물의 로제트 억제 역가(RIT)를 측정하였다. cpn10 역가(로그 역수 샘플 희석수)를 분석에서 양성 결과를 가져오는 샘플의 최고 희석수로 기록하였다.

cpn10 샘플(1.0 ㎍/㎖)은 분석에서 10^{-12} 의 역가를 제공한 반면, IFN - β 샘플은 어떠한 농도에서도 활성을 나타내지 않았다.

cpn10은 로제트 억제 테스트에 대해 활성인 유전적으로 제한된 억제 인자를 방출하는 Th1 세포에 결합한다. 이러한 결과는 IFN - β가 Th1의 면역반응을 억제하는 메커니즘과 cpn10의 메커니즘이 다름을 보여주다.

래트 모델에서, cpn10 처리에 의해 다음과 같은 결과가 얻어졌다:

(i) EAE를 가지는 동물의 장애 및 체중 감소 억제;

(ii) 시험관 내에서 DTH 억제; 및

(iii) 시험관 내에서 뇌염 유발성(MBP 반응성) 세포 활성의 하향 조절.

따라서, cpn10는 IFN - β와 같이, Th1 반응을 억제하였다. 그러나, 이 반응을 하향 조절하는 수단은 다른 것 같다.

cpn10은 CD4+ T 세포 유래의 유전적으로 제한된 특정 억제 인자를 방출시킬 수 있는 그들의 능력을 측정하는 로제트 억제 테스트에 대해 활성이다. IFN - β는 이 분석에서 활성이 없었다.

cpn10는 래트에게 투여되어도 림프구의 총수에 영향을 주지 않았으나, Soos 등의 supra(1995)에 따르면 IFN - β 처리된 마우스는 현저한 림프구 감소를 나타낸다. 또한, 이것은 IFN - β 처리된 환자에게서도 관찰된다. IFN - β 처리와는 달리, cpn10 처리는 처리 후의 체중 증가를 통해 평가해 본 결과, 래트의 안녕에 대해 장시간 동안 효과를 나타내지 않는다.

이러한 결과는 IFN - β 및 cpn10의 작용 방식이 다름을 의미하지만, Th1 면역반응을 억제할 수 있고, 이로 인해 EAE 증후를 변형시킬 수 있음을 의미한다. EAE의 마우스 모델을 발병시켜 EAE의 치료에 있어 IFN - β와 cpn10 사이의 상보적인 혼합 치료가 달성될 수 있는지의 여부를 결정하였다.

실시예 4실시예 4

마우스에서의 EAE 유발마우스에서의 EAE 유발

물과 완전 프로인트 면역보강제(Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA; Greer 등, 1996, supra) 에멀젼 내의 100 ㎍의 PLP p139 - 151 및 400 ㎍의Mycobacterium tuberculosisH37Ra(Difco Laboratories, Detroit, MI,USA)를 옆구리에sc주사하여 SJL/J 마우스 내에서 EAE를 유도하였다. 또한, 각 마우스에게 0.3 ㎖의 0.9 w/v% NaCl(염수) 내의 0.3 ㎍의 Perussis 독소(Bordetella pertussis, List Biological Laboratories, Inc, CA, USA)를 당일과 3일째에 iv 주사하였다. 8일 후부터 매일, 다음과 같이 마우스를 임상 평가하였다: 0 = 질병 없음; 1 = 꼬리 상태 저하 및 약간 굽음; 2 = 꼬리 이완 및/또는 다소 굽음 및/또는 곧게 서는 능력이 약화됨; 3 = 사지 약화; 4 = 사지 마비; 5 = 거의 죽어가는 상태. 42일 또는 60일 동안 마우스를 실험하였다(표 3 참조). 실험하는 동안 매일매일, 각 처리 그룹에서 평균 장애값/마우스를 측정하였다.

실험기 전반에 걸쳐, 전체 평균 장애값/마우스/그룹을 산출하였다. 이 값을 실험 기간 내에 발생한 1차 발병(8일에서 21일) 및 재발 기간 동안(22일에서 60일; 표 4 참조)의 전체 평균 장애값으로 나타내었다. 두 마우스 그룹(실험 #4 밑 #5, 표 3 참조)에서, 실험 기간을 60일에서 68일로 연장하고, 61일부터 68일 까지의 전체 평균 장애값을 기록하였다.

실시예 5실시예 5

마우스에서의 EAE에 대한 cpn10의 치료 효과마우스에서의 EAE에 대한 cpn10의 치료 효과

마우스 그룹(n = 10/그룹)에게 2.5 ㎍, 5 ㎍의 용량의 재조합 cpn10(rcpn10)을 매일 ip 투여를 통해 처리하였다. 처리는 접종 당일(0일) 또는 질병이 발병한 시기(8일)에 시작하고, 18일 또는 20일 동안 계속하였다(표 3 참조). 실험 기간은 표 3에 나타내었다. 상이한 용량 체계로, rcpn10을 수여한 그룹의 전체 평균 장애값을 부형제만을 수여한 그룹의 전체 평균 장애값과 비교하고, 테스트를 계속하였다(Mann - Whiney Rank Sum test, Sigma Stat 2.0, Jandel Scientific).

PLP 펩타이드 139 - 151 접종 후, 마우스(10마리/그룹)는 EAE의 만성 재발성 형태로 발전하였다. 8일과 10일 사이에 임상 징후의 발병이 나타났고, 14일에서 16일에 절정에 달했으며, 21일째에 감소하였다(도 8a). 마우스는 불완전하게 회복되었으며, 이어서 임상 질환에 대한 추가의 에피소드가 나타났다. 당일부터 18일 까지 매일 2.5 ㎍, 5 ㎍, 또는 10 ㎍의 rcpn10을 처리한 결과, 부형제만을 수여한 그룹에 비해 실험기 전반에 걸쳐 전체 장애가 억제되었다(표 3). 20 ㎍의 rcpn10/1회 용량은 질병을 억제하였으나, 그 성과는 부형제를 수여한 그룹에서의 성과와 현저한 차이가 없었다(표 3). 처리를 접종 시점(0일)이 아닌 질병이 발생한 시점에서 시작한 경우, 처리 그룹의 반응에 있어 차이가 관찰되지 않았다(표 3). 60일 후, rcpn10 처리된 그룹의 마우스는 61일에서 68일 사이에 부형제만을 수여한 마우스 그룹의 값과 비교해 현저한 차이가 없는 전체 평균 장애값을 가지는 EAE의 임상 징후를 나타내었다(데이터는 나타내지 않음).

실시예 6실시예 6

IFN - β와 cpn10의 합동 치료IFN - β와 cpn10의 합동 치료

EAE의 임상 징후의 억제에 있어 rcpn10와 IFN - β이 공동 - 작용에 의해 효과를 나타내는 지를 결정하기 위하여, 마우스 그룹에 rcpn10과 IFN - β를 개별적으로 처리하고 함께 처리하였다(도 8a 및 도 8b). 공동 - 작용에 의한 효과가 존재하는 경우, 공동 - 작용에 의한 효과가 쉽게 관찰될 수 있도록 rcpn10와 IFN - β의 최적 이하의 용량을 선택하였다. 접종 당일, 2 그룹과 4 그룹에게 2.5 ㎍의 rcpn10를 ip 수여하고, 당일부터 20일 동안 매일매일 수여하였다. 1 그룹과 3 그룹에는 부형제를 수여하였다. IFN - β를 염수를 사용해 10^5 단위/㎖로 희석하고, 3 그룹과 4 그룹의 마우스에게 10일부터 20일까지 매일 염수 중의 5,000 단위(0.5 ㎍; Yu 등, 1996, supra)씩을 sc 수여하였다. 1 그룹과 2 그룹의 마우스에게는 염수에 의해 1/4 희석된 PBS 내 50 ㎕의 0.1% BSA를 수여하였다. 18일과 20일째에 모든 마우스에게 마취제(Pyrilamine, Sigma - Aldrich)를 10 ㎍/체중 단위로 ip 처리하여(Jose 등, 1994, J. Exp. Med., 179:881 - 887) IFN - β 및 대조 부형제제 내에 존재하는 BSA 담체 투여에 의한 과민증을 예방하였다. 60일째까지 상기에 기재된 바와 같이 매일매일 래트를 실험하였다. cpn10, IFN - β, cpn10+IFN - β수여한 그룹의 결과와 부형제만을 수여한 그룹의 결과를 비교하였다(Mann - Whitney Rank Sum 테스트). 이러한 실험을 2회 수행하였다.

당일부터 20일 동안 하루 걸러 2.5 ㎍의 rcpn10를 EAE 마우스에 처리한 결과, 8일부터 60일까지의 실험 기간 동안 부형제만을 수여한 마우스에 비해 전체 평균 장애값이 감소되었다(도 8a, 표 4). 본 발명자들은 이러한 결과에 비추어 rcpn10와 IFN - β의 효능을 비교한 결과, IFN - β는 MS의 공지된 치료제로서 EAE에 대항하는 활성을 나타내었다(Yu 등, 1996, supra). 10일부터 20일까지 5,000 단위의 IFN - β를 투여하였으나 동일한 실험 기간 동안 현저한 억제 효과를 나타내지 않았다(표 8b, 표 4). 그러나, 이들을 함께 투여한 경우, rcpn10와 IFN - β의 혼합물은 대조군과 비

교할 때 주어진 반응제 중 하나의 효과보다 큰 억제효과를 제공하였다(도 8a, 8b, 표 4). 장애에 대한 억제효과는 1차 발병(8일에서 21일 사이) 시기보다는 재발 시기 동안에 더욱 뚜렷하였다. cpn10과 IFN-β이 모두 처리되지 않은 경우에는 1차 발병기 동안 현저한 억제효과가 나타나지 않은 반면, 혼합 처리는 효과적이었다(도 9, 표 4). 재발 기간 동안, 전체 평균 장애값의 억제는 대조군에 비해 혼합 치료를 수행함으로써 증가되었다(표 4). 2회 실험에서도 유사한 결과가 얻어졌다(데이터는 나타내지 않음).

예비 실험(데이터는 나타내지 않음) 동안, IFN-β 제제 또는 대조 부형제 내의 BSA를 sc 전달한 후 대략 50%의 마우스가 10일 내지 12일(즉 20일에서 22일) 사이에 죽었다. 이는 BSA에 대한 감작에서 오는 과민성 발병에서 기인하는 것으로 여겨졌다. 상기에 보고된 실험에서, 18일과 20일째에 마우스에게 항히스타민을 처리하였더니(Jose et al., 1994, supra), 더 이상의 사망은 발생하지 않았다.

실시예 7실시예 7

재조합 cpn10 또는 부형제 처리된 마우스에 대한 조직학적 연구재조합 cpn10 또는 부형제 처리된 마우스에 대한 조직학적 연구

접종 후 14일 뒤, 매일 2.5 ㎍의 재조합 cpn10/마우스를 ip 수여한 그룹의 마우스 2마리와 부형제만을 수여한 그룹의 마우스 2마리를 마취시키고 Karnovsky의 고정제(McCombe et al., 1992, supra)를 살포하였다. 살포를 위해 각 그룹으로부터 선택된 마우스는 그날 그룹의 평균을 나타내는 장애값을 나타내었다. 척수를 제거하고 톨루이딘 블루로 염색된 경부(C5), 흉부(T6), 요추(L4) 및 천골(S2) 척수 및 꼬리 첨족 유래의 중간정도로 얇은 구획 및 Epox 8112에 주입하였다. 염증 및 수초탈락의 증거에 대해 구획을 실험하였다.

대조군 및 rcpn10 처리된 마우스 유래의 다양한 수준의 척수로부터 얻은 구획을 도 10에 도시하였다. 대조 마우스에서, 실질 조직 내 연막 아래부분과 말초혈관 부분에서 염증이 관찰되었다. 수초탈락의 증거가 있었으며, 경부삭보다는 천골 및 요추 척수 내에서 더 많이 나타났다. rcpn10 처리된 마우스, 특히 실질에서 염증이 더 적었으며, 수초탈락이 적다는 것이 입증되었다.

실시예 8실시예 8

MBP에 감응하여 림프 결절 세포의 시험관내 증식MBP에 감응하여 림프 결절 세포의 시험관내 증식

시험관내 림프구 증식 분석에서 IFN-β, 재조합 cpn10 및 화학 합성 cpn10(scpn10)의 활성을 측정하였다. 사용 전, rcpn10(200 ㎍/㎖) 및 scpn10(100 ㎍/㎖)을 자가 이식 래트의 혈청과 함께 인산염 완충 염수(PBS; 0.05 M 인산나트륨(pH7.4)/0.14 M 염화나트륨)에 대해 3일간 투석하고, NAP-5 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech) 상의 배지(2 mM의 L-글루타민, 25 mM의 HEPES, 50 μM의 2-머캡토에탄올, 1 mM의 Na-피루베이트, 50 ㎍/㎖의 겐타마이신, 1%의 열 불활성화 자가이식 래트 혈청을 함유하는 RPMI1640)로 옮겨, Millex-GV4 0.22 ㎛ Filter Unit(Millipore, Bedford, MA, USA)를 통과시켜 여과 살균하였다. 대조 부형제도 유사한 방식으로 처리하였다. MBP를 접종하여 루이스 래트 내에서 MBP-EAE를 유도하였다. 10일 뒤, 2마리 래트의 접종된 사지를 약화시키는 오금의 림프 결절을 제거하고, 배지 내의 세포 현탁액(4×10^6/㎖)을 준비하였다. 림프 결절 세포(2×10^5/㎖)를 MBP(최종 농도 20 ㎍/㎖) 및 최종 농도 0.1 - 50 ㎍/㎖의 IFN-β 또는 cpn10 존재 하의 96개 웰로 이루어진 평평한 바닥 플레이트 내에서 3회 테스트하였다(도 11). 대조 세포(각각 6개 웰)는 (a) MBP는 함유하고 cpn10은 함유하지 않는 세포 또는 (b) MBP와 cpn10 모두를 함유하지 않는 세포를 함유한다. 플레이트를 37℃ 하의 습한 5% CO_2 대기 하에서 72시간 동안 배양하였다. 마지막 18시간 동안, 각각의 웰에 0.5 μCi [메틸-^{3}H] 티미딘(Amersham Pharmacia Biotech)을 첨가하고, 삽입된 방사능을 측정하였다. 결과를 자극율, 즉 MBP를 함유하는 웰의 평균/MBP를 함유하지 않는 웰의 평균으로 나타내었다. 다양한 희석율의 cpn10에 따른 자극율을 cpn10이 없는 경우의 자극율과 비교하였다(학생 테스트).

72시간 동안 배양한 후, rcpn10, scpn10 및 IFN-β 모두 MBP에 의해 유도되는 MBP-EAE 래트의 림프 결절로부터 유래된 세포의 증식을 억제하였다(도 11). IFN-β가 가장 유력하였으며, 1.9 ㎍/㎖(96 nM)의 농도에서 세포의 증식을 50% 억제하였다. 이러한 수준으로 억제를 달성하기 위해서는 11 ㎍/㎖의 scpn10(1.1 μM) 및 28 ㎍/㎖의 rcpn10(2.8 μM)이 요구된다는 것이 비교된다.

실시예 9실시예 9

로제트 억제 테스트, cpn10에 대한 생물학적 정량로제트 억제 테스트, cpn10에 대한 생물학적 정량

scpn10, rcpn10 및 IFN-β에 대해 로제트 억제 테스트에서의 활성을 테스트하였다. 즉, cpn10을 생물학적으로 정량하였다(Cavanagh & Morton, 1996, supra). scpn10과 rcpn10 (50 ㎍)을 Hank의 균형 염수 용액/0.01%의 BSA(HBSS/0.01% BSA)를 사용해 10^{-5} 에서 10^{-15} 로 10배 희석하였다. IFN-β(0.5 ㎍/㎖)을 HBSS/BSA를 사용해 10^{-13} 농도로 10배 희석하였다. Quachenbush 마우스 유래의 비장 세포를 사용하여 각 희석물의 로제트 억제 역가(RIT)를 측정하였다. 제한량(로그 상반 샘플 희석수)을 분석에서 양성 결과를 가져오는 샘플의 최고 희석수로 기록하였다.

이 실험에서 rcpn10과 scpn10은 로제트 억제 테스트에서 동일하게 작용하였다(도 12). 반면, IFN-β는 이 분석에서 어떠한 농도에서도 활성을 나타내지 않았다.

실시예 10실시예 10

cpn10은 마우스 내에서 항원에 의해 유도되는 과민성 사망을 예방함cpn10은 마우스 내에서 항원에 의해 유도되는 과민성 사망을 예방함

실시예 6에 기재된 실험의 견지에서, 과민성 뇌졸중으로 여겨지는 증상에 의한 마우스의 사망을 추가 연구하였다. 4그룹의 마우스에 PLP P139-151을 접종하였다. 당일, 2그룹에는 cpn10을 수여하고, 2그룹에는 대조 부형제를 수여하였다. 이로부터 10일 후, 각각의 cpn10 그룹 중 한 그룹에 IFN-β 또는 PBS/BSA를 수여하고, 각각의 대조 부형제 그룹 중 한 그룹에도 IFN-β 또는 PBS/BSA를 수여하였다.

표 5에 나타난 바와 같이, PBS/BSA 중의 IFN-β 또는 PBS/BSA 주사를 시작한 후 8일과 12일 사이에 BSA를 수여하고 cpn10는 수여하지 않은 그룹에서는 4/9 및 6/10의 마우스가 사망하였고, BSA과 cpn10을 수여한 그룹에서는 3/10 및 0/9의 마우스가 사망하였다. 이들 마우스는 BSA 담체 단백질의 투여로 인한 과민증 때문에 사망한 것으로 여겨진다. cpn10를 수여한 마우스는 BSA의 면역접종에 의해 야기되는 과민성 뇌졸중을 방어한 반면, IFN-β는 이러한 방어효과를 나타내지 못하는 것으로 결론지어졌다. 또한, cpn10이 투여된 투여 자리에서는 염증이 감소하였다.

실시예 11실시예 11

총괄적인 검토총괄적인 검토

얻어진 결과로부터 cpn10은 SJL/J 마우스 내에서 마이엘린 프로테오리피드 단백질에 의해 유도되는 EAE의 임상 징후를 억제하는 것이 입증되었다. 이 모델은 사람에서 MS의 임상 경과와 유사한 EAE의 만성 재발성 형태이다. MS를 가지는 환자는 PLP 펩타이드에 대해 강화된 T 세포 반응을 나타내며(Greer 등, 1997, Brain 120 1447-60), 이는 PLP에 의해 유도되는 EAE가 MS의 좋은 모델임을 시사한다. 실험 기간 동안 장애를 억제하는 데 가장 효과적인 용량은 하루 5 ㎍ 내지 10 ㎍이다. 이보다 많은 용량은 효과가 덜하다. 이와 같이 고용량에서 효능이 감소되는 것은 이식 자리에 국부적으로 전달된 cpn10이 래트에서 동종 피부 이식물의 생존 기간을 연장할 수 있음을 입증하는 앞에서의 연구에서도 관찰되었다. EAE 마우스에서 cpn10의 억제효과는 1차 발병 때보다는 재발기 동안에 더욱 뚜렷하였다. 1차 발병기보다 재발기 동안의 장애 억제율이 큰 이유는 이 기간 동안 활성인 cpn10이 천연 억제인자의 메커니즘을 증대시키거나, 제1 에피소드로부터 상이한 병태 생리를 갖기 때문일 수 있다. 만성 EAE의 후반 에피소드 동안, 이들은 다른 항원

에 대한 면역반응으로 확산되어 후반 에피소드의 병인과 1차 발병의 병인을 상이하게 할 수 있다. 이러한 연구는 또한 cpn10과 IFN-β이 EAE를 억제하는 그들의 능력에 공동으로 작용함을 보여준다. cpn10과 IFN-β를 함께 투여하면 장애의 억제에 있어 그들 중 하나만을 따로 투여할 때보다 큰 성과가 얻어진다. 이는 질병의 재발기에 특히 뚜렷하나, 어떤 경우에도 cpn10과 IFN-β는 질병을 억제하는 그들의 능력에 있어 공동 작용하였고 길항효과는 관찰되지 않았다.

cpn10과 IFN-β는 그들의 작용 메커니즘이 서로 상이함을 입증하는 로제트 억제 테스트 및 림프구 증식 분석에서 상이하게 반응하였다. 로제트 억제 테스트는 EPF를 최초 발견한 후(Morton 등, 1976, supura), EPF와 cpn10를 생물학적으로 정량하는 분석이다. 로제트 억제 테스트에서 EPF의 작용은 마우스 및 사람에서 림포카인인 EPF-S_1 및 EPF$_2$에 의해 매개되고, 후속하여 이어지는 EPF와 CD4+ 세포의 결합을 유도한다(Rolfe 등, 1998, supra; Rolfe 등, 1989, supra). 이들 림포카인은 지발성 과민 반응을 억제하는 그들의 능력으로 인해 억제 인자라 지정되었다(Rolfe 등, 1988, supra). 이들은 그들의 활성에 있어 유전적으로 제한된다. EPF-S $_1$ (Mr 14,000 - 18,000)의 제한은 설치류 H2의 I 부분에 대해 맵핑되고, 인간에서는 HLA-DR에 대해 맵핑되었으나, EPF-S $_2$ (Mr ~55,000)는 Igh 부분에 편재되어 있다(Rolfe 등, 1988, supra; Rolfe 등, 1989, supra; Rolfe 등, 1995, supra). rcpn10 처리 후 임상 징후의 억제효과는 1차 발병 후 처리가 중단되었음에도 불구하고 60일 동안 유지되었다. 이는 장기간 동안 억제 활성이 유도됨을 암시한다. IFN-β는 로제트 억제 테스트에서 활성을 나타내지 않았으며, 이는 이들이 림프구 활성의 하향 조절에서 동일한 억제 유발 경로를 사용하지 않음을 보여준다.

MBP에 대한 반응에서 시험관 내에서 MBP에 의해 활성화된 림프구의 증식을 억제하는 그들의 능력에 있어 IFN-β는 cpn10보다 훨씬 더 효과적이다. IFN-β(Arnason, 1993, Neurology 43:641-643)와 cpn10 모두 활성화 T 세포에 의해 IFN-γ의 생산을 억제한다. IFN-β는 IFN-γ의 분비를 억제하고, MS 환자 내에서 불완전 억제인자의 활성을 증대하며, 항원 제공 세포의 표면 상에서 IFN-γ에 의해 유도되는 II군의 주요 조직 적합성 복합체(MHC)의 항원 발현을 억제한다(The IIFN-β Multiple Sclerosis Study Group, 1993, Neurology 43:655-661). cpn10은 CD4+ 세포, CD8+ 세포 및 단핵세포의 특정 생물형군에 결합한다. cpn10과 활성화 CD4+ T 세포의 특정 생물형군의 결합은 결과적으로 IFN-γ의 생산을 억제한다. 이는 cpn10이 면역조절 효과를 유도하고 EAE에서 장애를 억제하는 그들의 능력이 어떠한 방식으로 측정되는 지를 의미한다.

이러한 연구는 cpn10이 마우스에서 만성 EAE를 억제 할 수 있으며, EAE의 임상 징후를 억제하는 IFN-β의 능력을 증대시킬 수 있음을 보여주었다. 결정적으로, 본 발명자들에 의해 밝혀진 cpn10와 IFN-β의 상이한 작용 메커니즘은 EAE와 MS의 공동 작용 치료제로서 이들 제제에 대한 새로운 전망을 열어주었다. 실제 그렇게 제안된 문헌이 있기는 하지만, cpn10과 IFN-β가 유사한 면역억제 메커니즘으로 작용한 다면, EAE 모델에서 공동 작용 또는 상승 효과는 관찰될 수 없다. 반면, 본 명세서에 제시된 그들의 상이한 작용 메커니즘과 EAE 데이터는 cpn10과 IFN-β이 사람에게 유용한 MS의 통합 치료제일 수 있다는 제안에 대한 이론적 근거를 제공한다.

IFN-β는 사람의 다발성 경화증(MS)에 대한 질병 변형 치료제로서 광범위하게 사용된다. 이것은 재발-완화 다발성 경화증 환자에서 임상 재발율을 감소시키고, 장애에 대한 지속적인 진전이 발생하는 시기를 지연시키고, 새로운 MRI 병소의 수를 감소시킨다(European Study Group on Interferon β-1b, 1998, Lancet, 352:1491-1497). 그러나, 몇몇 환자는 치료를 시작하고 2년 이내에 장애가 지속적으로 진전되었으며, 이는 IFN-β의 효능과 함께 IFN-β에 다른 유망한 치료제가 결합된 경우의 효능을 조사하는 추가의 연구가 이루어져야 함을 암시한다.

요약하면, 본 명세서에서 제시된 동물 모델의 결과는 cpn10이 인간의 MS 치료에 있어 IFN-β와 함께 유망한 후보임을 암시한다. 첫째, cpn10은 EAE/MS 증후를 경감시키는 데 있어 IFN-β와 상승작용을 하는 것으로 여겨진다. 둘째, cpn10와 IFN-β 혼합 치료를 중단한 다음 EAE 재발에 있어서의 현저한 감소는 이것이 부작용으로 인해 IFN-β 투

여가 일시적으로 중단되어야 하는 치료에 유용할 수 있음을 암시한다. 셋째, cpn10은 통상적으로 IFN-β를 포함하는 약제 조성물 내에 존재하는 담체 단백질 항원(예를 들면, BSA)에 대한 과민성 반응의 가능성을 감소시키는 것으로 여겨진다.

당업자는 본 명세서에 상세히 기재된 본 발명이 변형 및 변경될 수 있으며, 그럼에도 이러한 변형 및 변경은 본 명세서에 설정된 본 발명의 광범위한 사상 및 범위 내에 포함됨을 이해할 것이다.

표 1표 1

	Betaseron	Avonex	Rebif
제조사	Schering	Biogen	Ares-Serono
주사 자리	sc	im	sc
주사 횟수	주당 3회	주당 1회	주당 3회

표 2표 2

전달	용량(μg)	시간(시)	실험 기간(일)	전체 평균 임상값/래트(SEM)부형제	전체 평균 임상값/래트(SEM)cpn10	P값
ip	1	48	10-20	34.7(3.8)	39.7(2.2)	0.252
ip	1	24	10-20	30.7(3.2)	28.3(2.3)	0.552
ip	20	48	10-20	34.7(3.8)	33.4(0.5)	0.534
ip	20	24	10-20	34.2(1.4)	24.6(1.9)	< 0.001
경구	20	24	10-20	38.2(3.6)	32.1(2.4)	0.180
ip	50	24	10-20*	34.8(3.2)	25.4(0.8)	0.001
ip	50	24	10-35	51.0(12.3)	25.7(1.0)	0.001
경구	50	24	10-20*	41.0(3.4)	27.3(2.1)	0.008
경구	50	24	10-35	52.2(11.6)	27.6(2.1)	0.005

표 3표 3

실험번호	rcpn10/마우스/48시간(μg)	처리 기간(일)	실험 기간(일)	전체 평균 장애값/마우스±sem		
				부형제	재조합 cpn10	p값
#1	2.5	0-20	8-60	89.1±17.9	38.8±8.4	0.038
#2	5	0-18	8-42	59.6±4.7	36.2±4.5	0.004
#3	10	0-18	8-42	57.6±4.7	34.4±6.8	0.015
#4	20	0-18	8-60	76.3±12.6	49.3±8.6	0.121
#5	20	8-18	8-60	80.0±12.9	40.3±5.9	0.065

표 4표 4

처리	전체 평균 장애값/마우스					
	전체 질환(8일-60일)		1차 발병(8일-21일)		재발기(22일-60일)	
	평균±SEM	P	평균±SEM	P	평균±SEM	P
부형제	B9.1±17.9		24.6±4.1		64.5±14.6	
cpn10(2.5μg/마우스/48시간0일-20일)	38.8±8.4	0.038	14.1±2.3	0.065	24.6±8.5	0.050
IFN-β(5000단위/마우스/48시간10일-20일)	44.6±9.2	0.052	17.4±2.5	0.211	27.1±8.5	0.061
cpn10(2.5μg/마우스/48시간 0일-20일)과 IFN-β(5000단위/마우스/48시간 10일-20일)	31.4±12.3	0.014	13.6±2.1	0.039	17.9±10.9	0.014

표 5표 5

	PBS/BSA 중의 IFN-βsc	PBS/BSAsc
cpn10ip	1 그룹: 3/10	2 그룹: 0/9
대조 부형제ip	3 그룹: 6/10	4 그룹: 4/9

(57) 청구의 범위

청구항 1.

개체에 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 다발성 경화증 치료방법.

청구항 2.

제1항에 있어서,

MS 재발을 방지하기 위한 치료제로 사용하는 방법.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서,

INF-β 및 cpn10을 함께 투여하는 방법.

청구항 4.

제1항 또는 제2항에 있어서,

INF-β 및 cpn10을 별도로 투여하는 방법.

청구항 5.

제3항에 있어서,

INF-β 및 cpn10을 주사로 투여하는 방법.

청구항 6.

제4항에 있어서,

cpn10을 경구로 투여하는 방법.

청구항 7.

제4항 또는 제6항에 있어서,

INF-β를 주사로 투여하는 방법.

청구항 8.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 cpn10 5-60 ㎎을 포함하는 방법.

청구항 9.

제8항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 cpn10 10-30 ㎎을 포함하는 방법.

청구항 10.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 INF-β 1-10 Million International Units (MIU)를 포함하는 방법.

청구항 11.

제10항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 INF-β 4-6 MIU를 포함하는 방법.

청구항 12.

제약학적 유효량의 cpn10 및 INF-β 및 제약학적으로 수용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 MS 치료용 제약학적 조성물.

청구항 13.

제12항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 cpn10 5-60 ㎎을 포함하는 조성물.

청구항 14.

제13항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 cpn10 10-30 ㎎을 포함하는 조성물.

청구항 15.

제12항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 INF-β 1-10 MIU를 포함하는 조성물.

청구항 16.

제15항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 INF-β 4-6 MIU를 포함하는 조성물.

청구항 17.

제약학적으로 유효량의 cpn10 및 INF-β 및 제약학적으로 수용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 키트.

청구항 18.

제17항에 있어서,

상기 INF-β가 탈수된 형태이고, 사용시 상기 제약학적으로 수용가능한 담체 또는 희석제에 의해 재수화되는 키트.

청구항 19.

제18항에 있어서,

상기 cpn10가 탈수된 형태이고, 사용시 상기 제약학적으로 수용가능한 담체 또는 희석제에 의해 재수화되는 키트.

청구항 20.

제17항 또는 제18항에 있어서,

상기 cpn10가 정제 또는 캡슐의 형태인 키트.

청구항 21.

제17항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 cpn10 5-60 ㎎을 포함하는 키트.

청구항 22.

제21항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 cpn10 10-30 ㎎을 포함하는 키트.

청구항 23.

제17항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 INF-β 1-10 MIU를 포함하는 키트.

청구항 24.

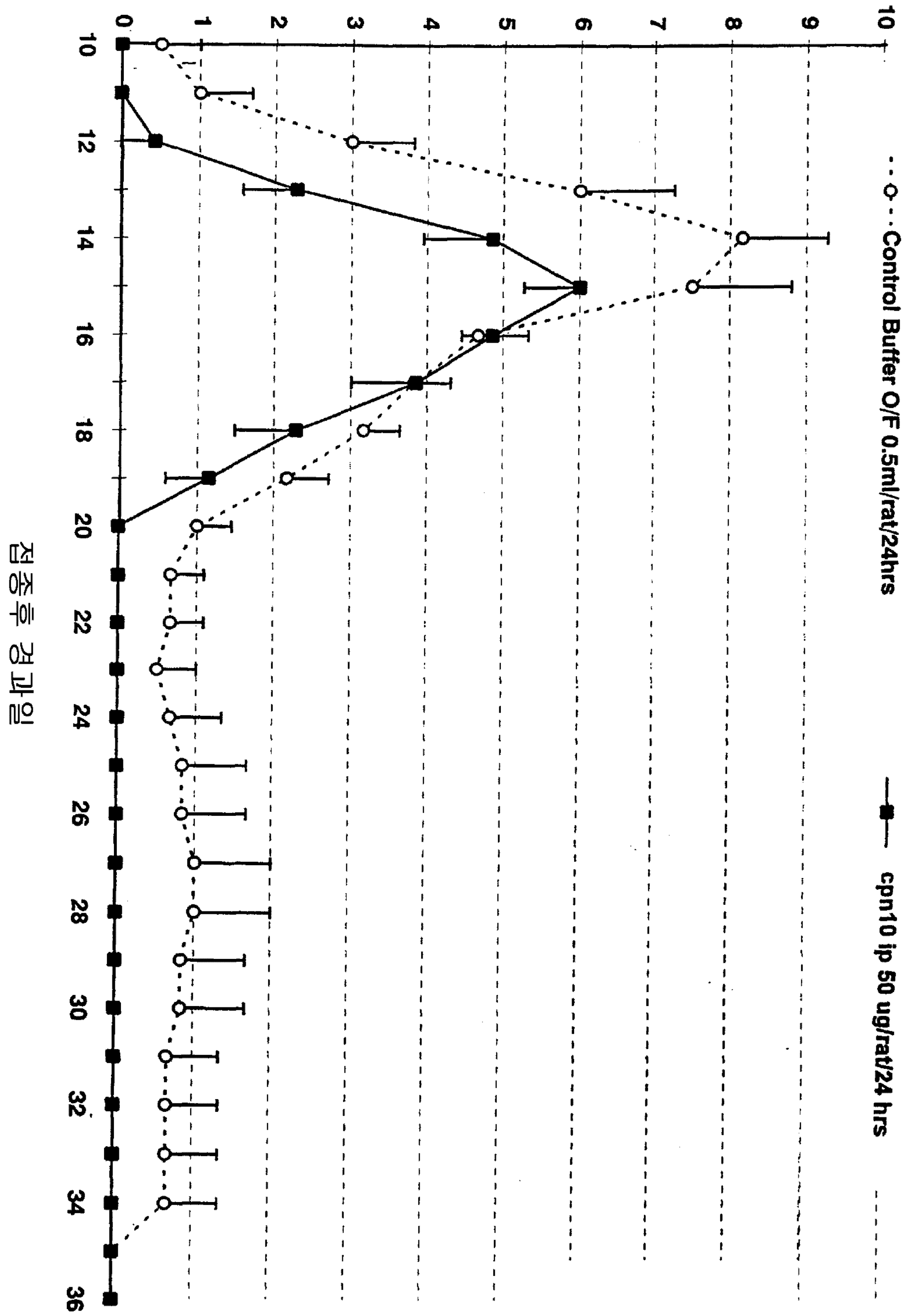
제23항에 있어서,

상기 cpn10 및 INF-β의 제약학적 유효량이 INF-β 4-6 MIU를 포함하는 키트.

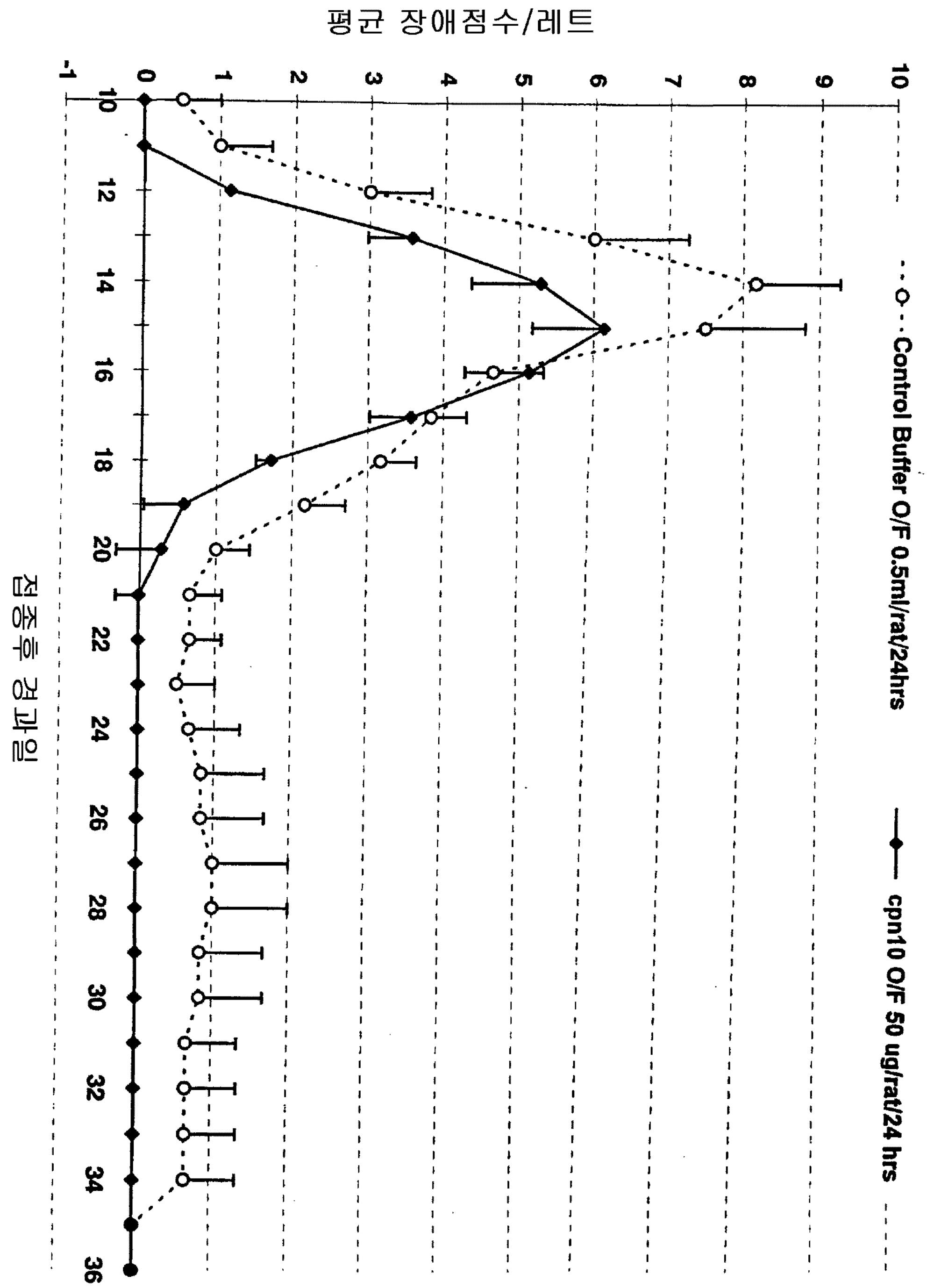
도면

도면 1

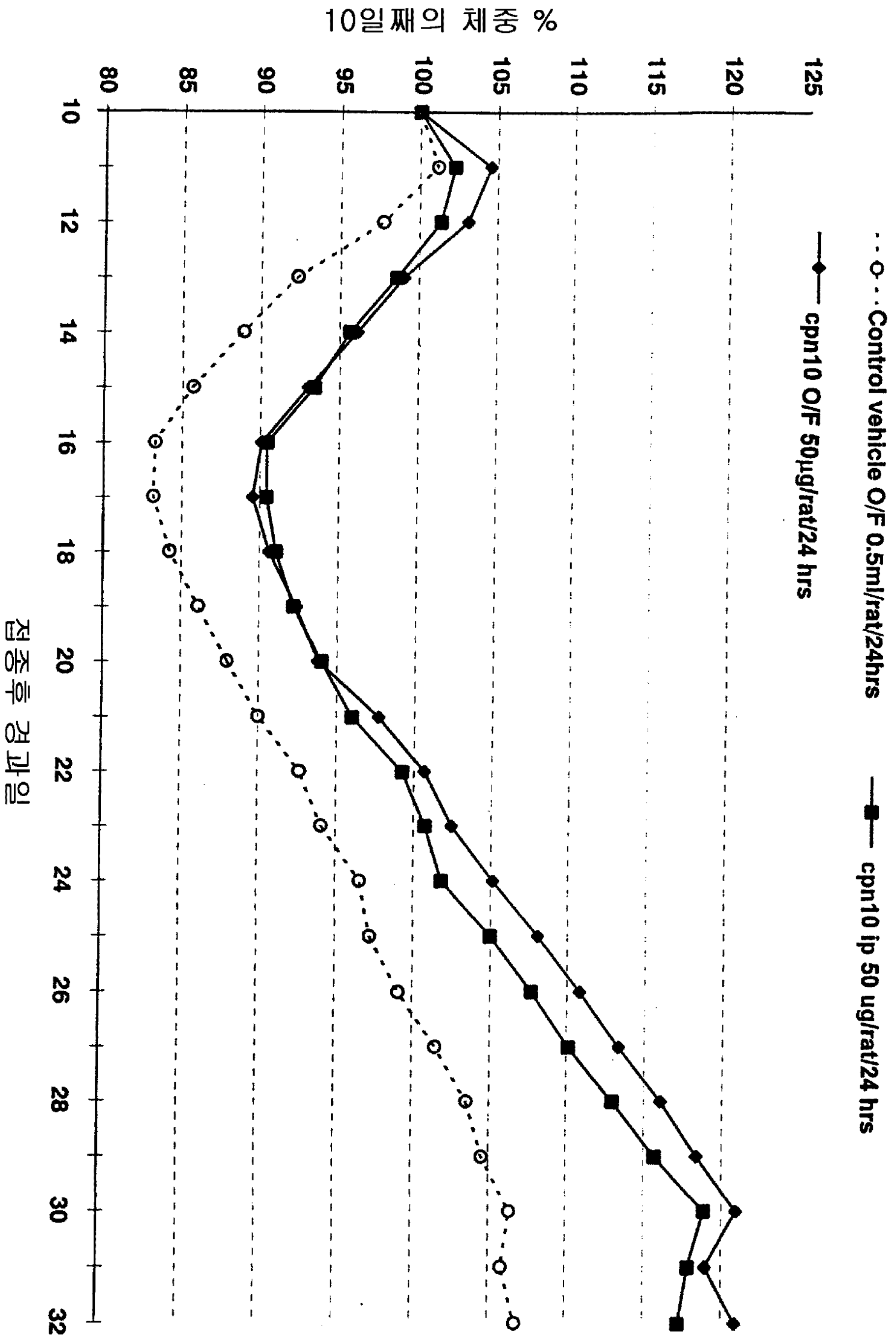
평균 장애점수/레트



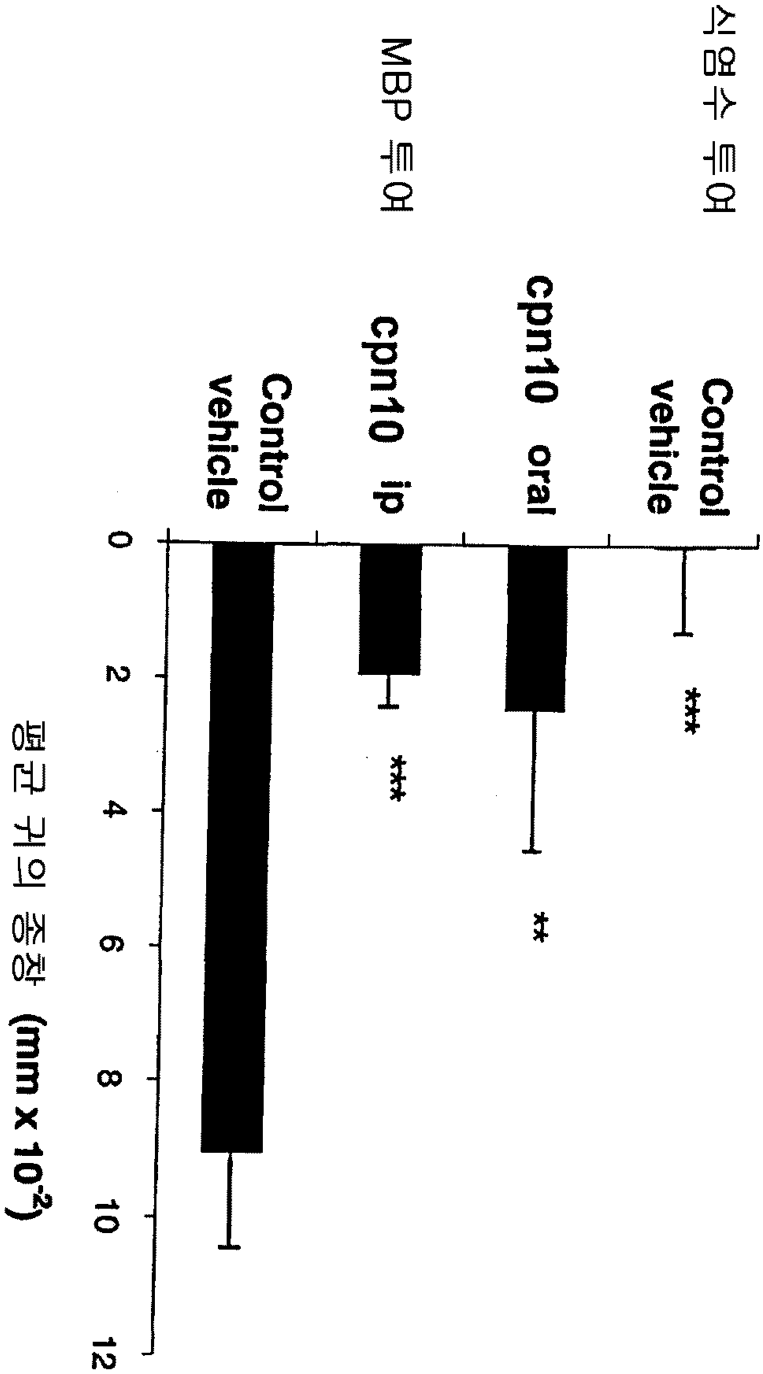
도면 2


평균 장애점수/레트
Control Buffer O/F 0.5ml/rat/24hrs
cpn10 O/F 50 ug/rat/24 hrs
접종후 경과일
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36

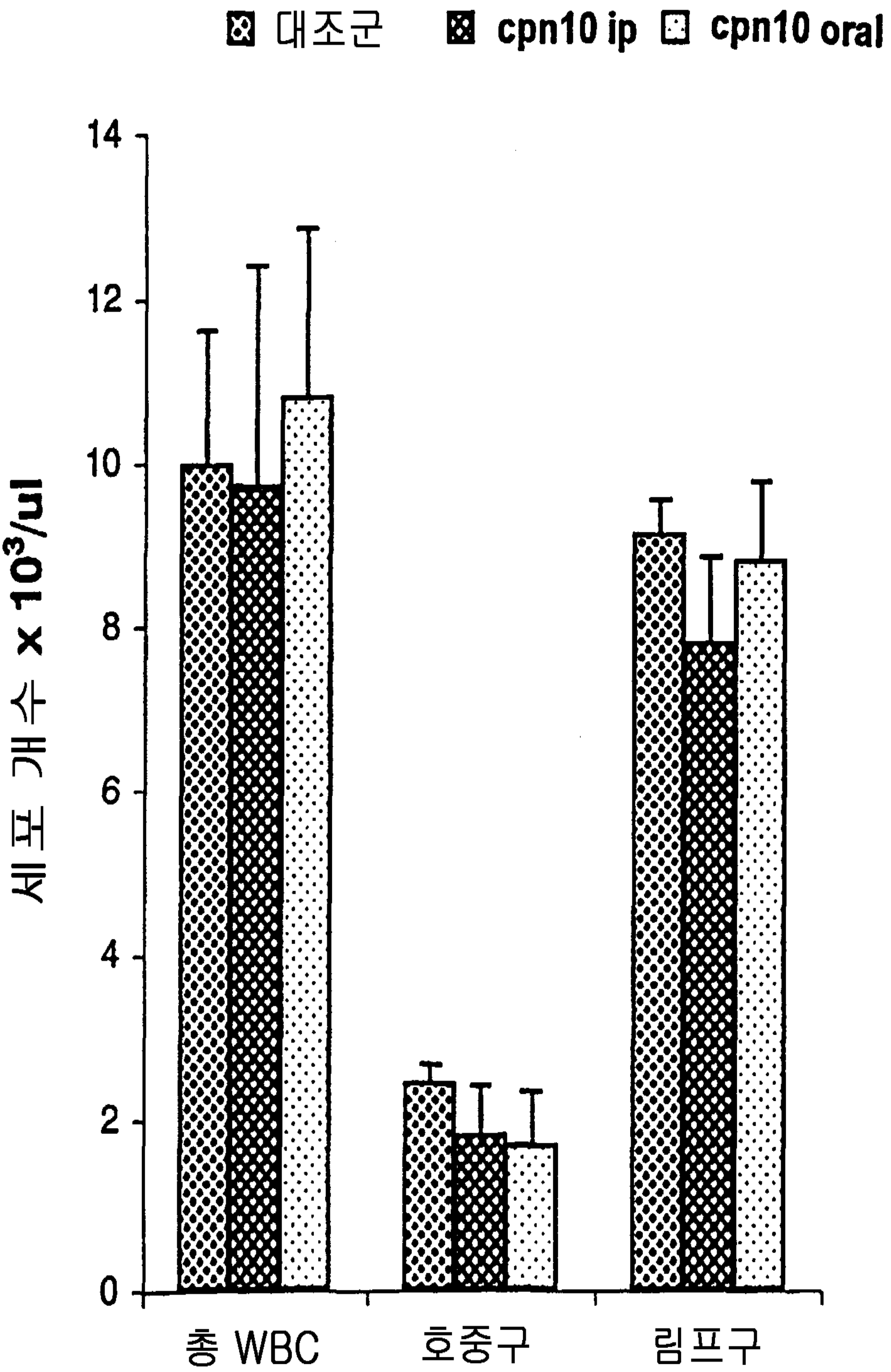
도면 3


10일째의 체중 %
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
접종후 경과일
Control vehicle O/F 0.5ml/rat/24hrs
cpn10 O/F 50μg/rat/24 hrs
cpn10 ip 50 ug/rat/24 hrs

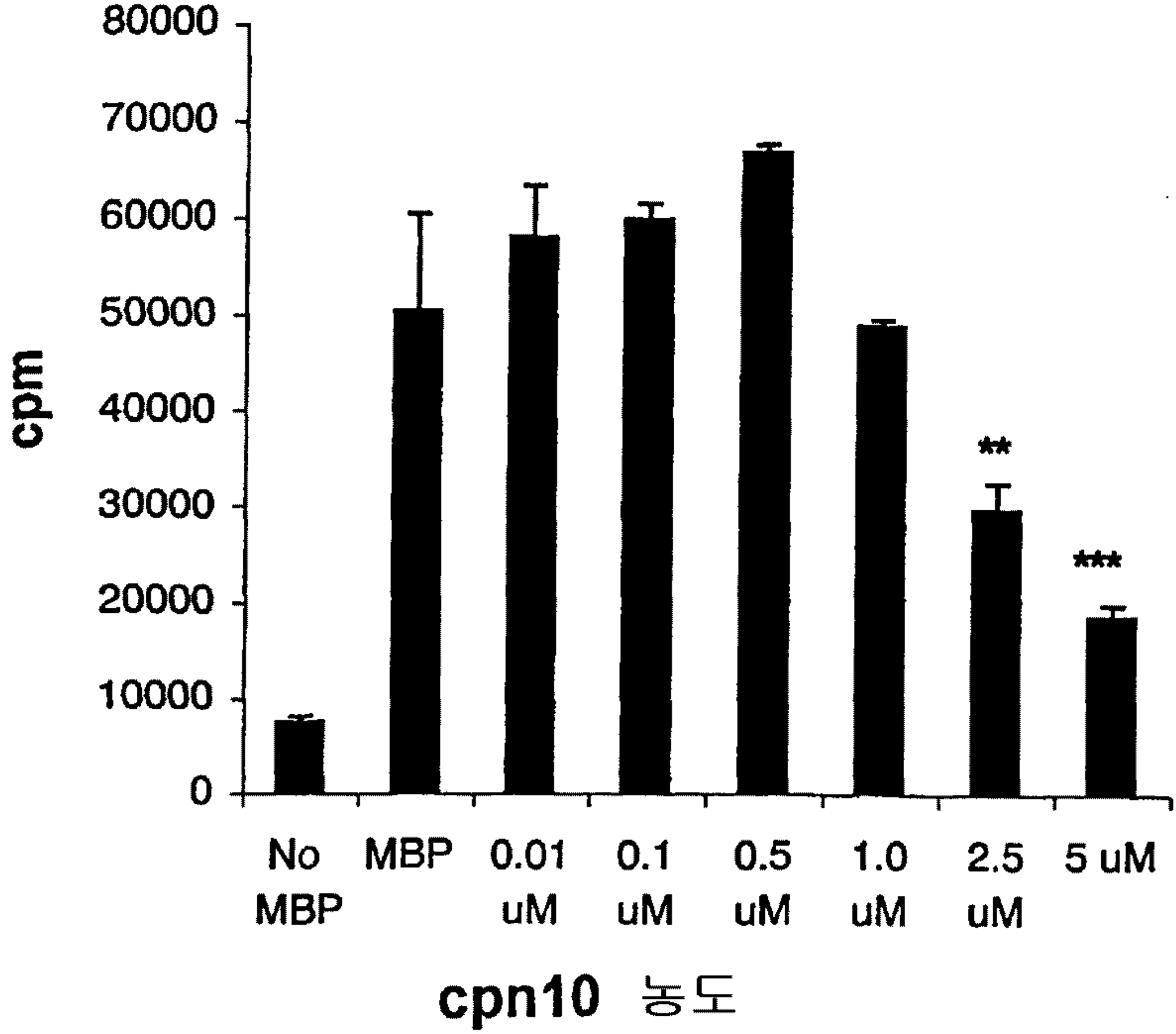
도면 4


식염수 투여
MBP 투여
Control vehicle
cpn10 oral
cpn10 ip
Control vehicle
***
**
***
0
2
4
6
8
10
12
평균 귀의 증창 (mm x 10-2)

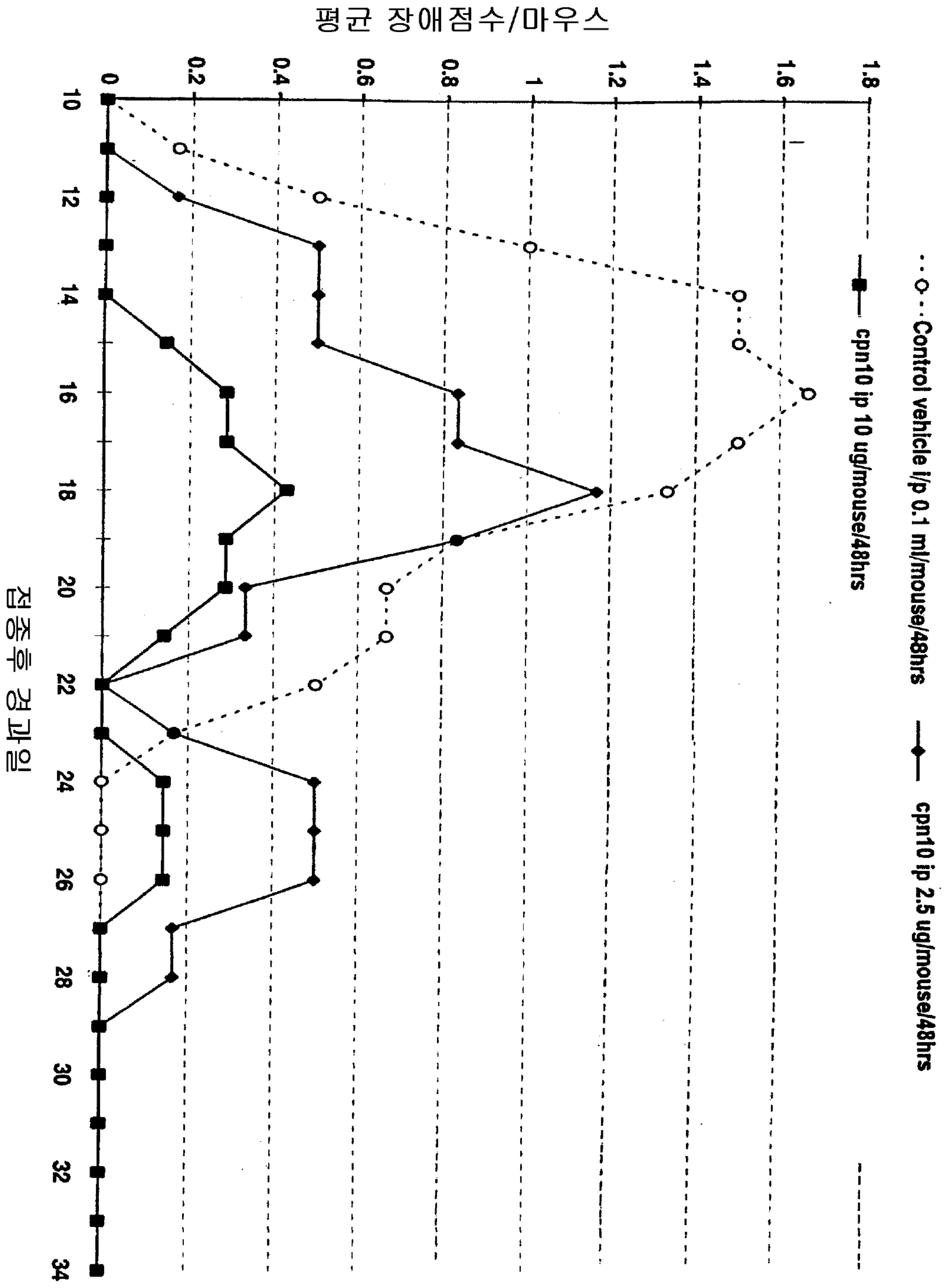
도면 5


대조군
cpn10 ip
cpn10 oral
세포 개수 x 10³/ul
14
12
10
8
6
4
2
0
총 WBC
호중구
림프구

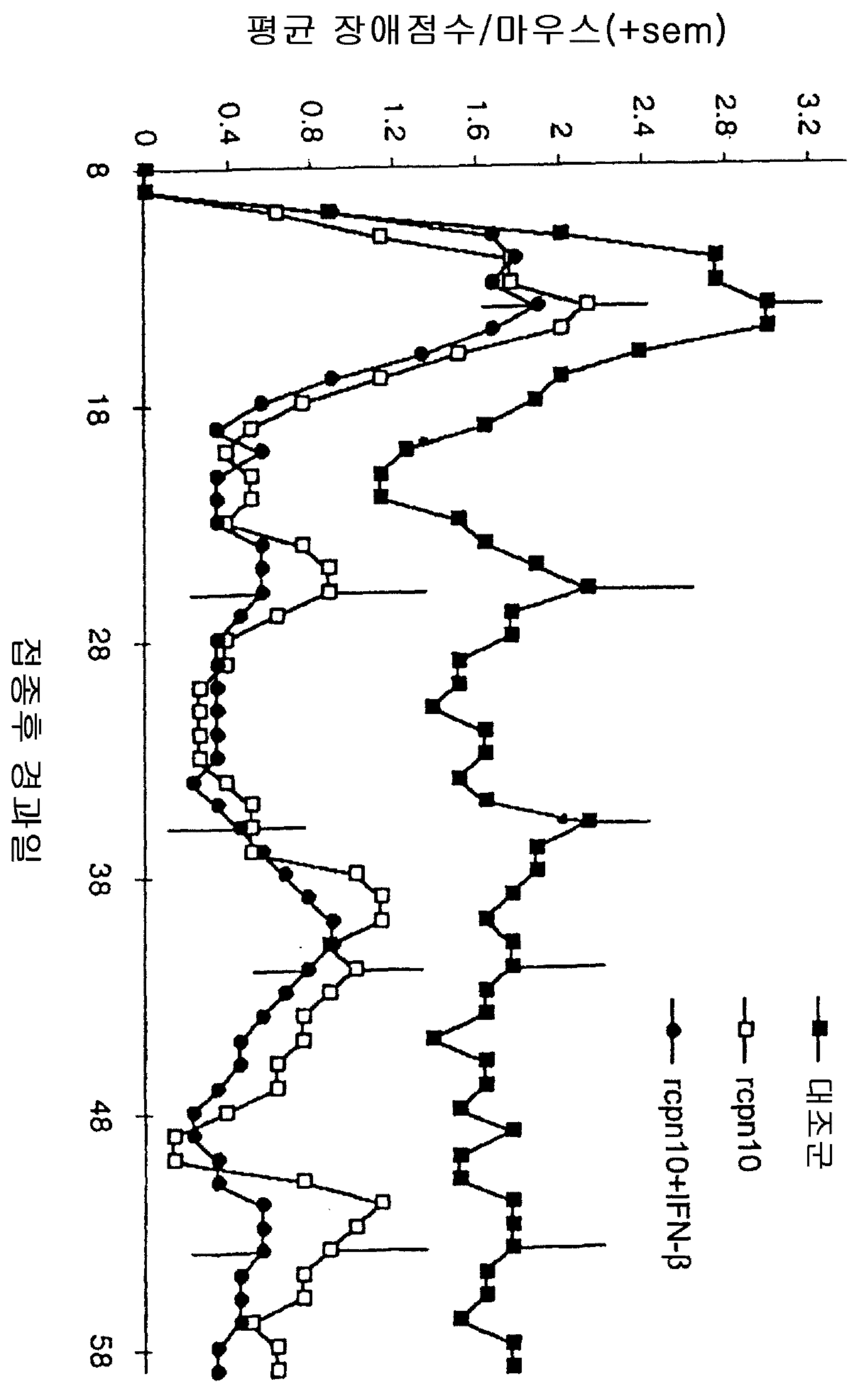
도면 6


80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
cpm
**
***
No MBP
MBP
0.01 uM
0.1 uM
0.5 uM
1.0 uM
2.5 uM
5 uM
cpn10 농도

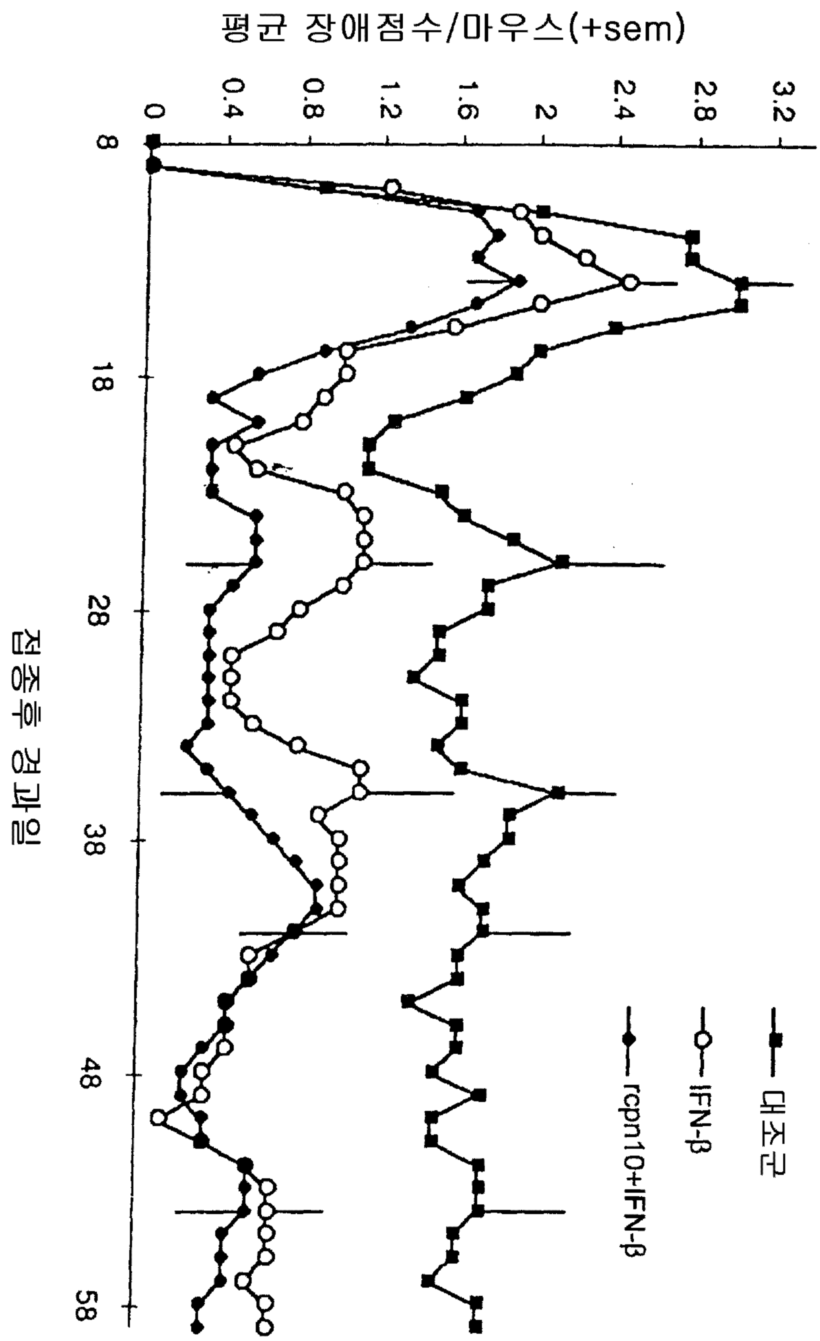
도면 7


평균 장애점수/마우스
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
접종후 경과일
Control vehicle i/p 0.1 ml/mouse/48hrs
cpn10 ip 2.5 ug/mouse/48hrs
cpn10 ip 10 ug/mouse/48hrs

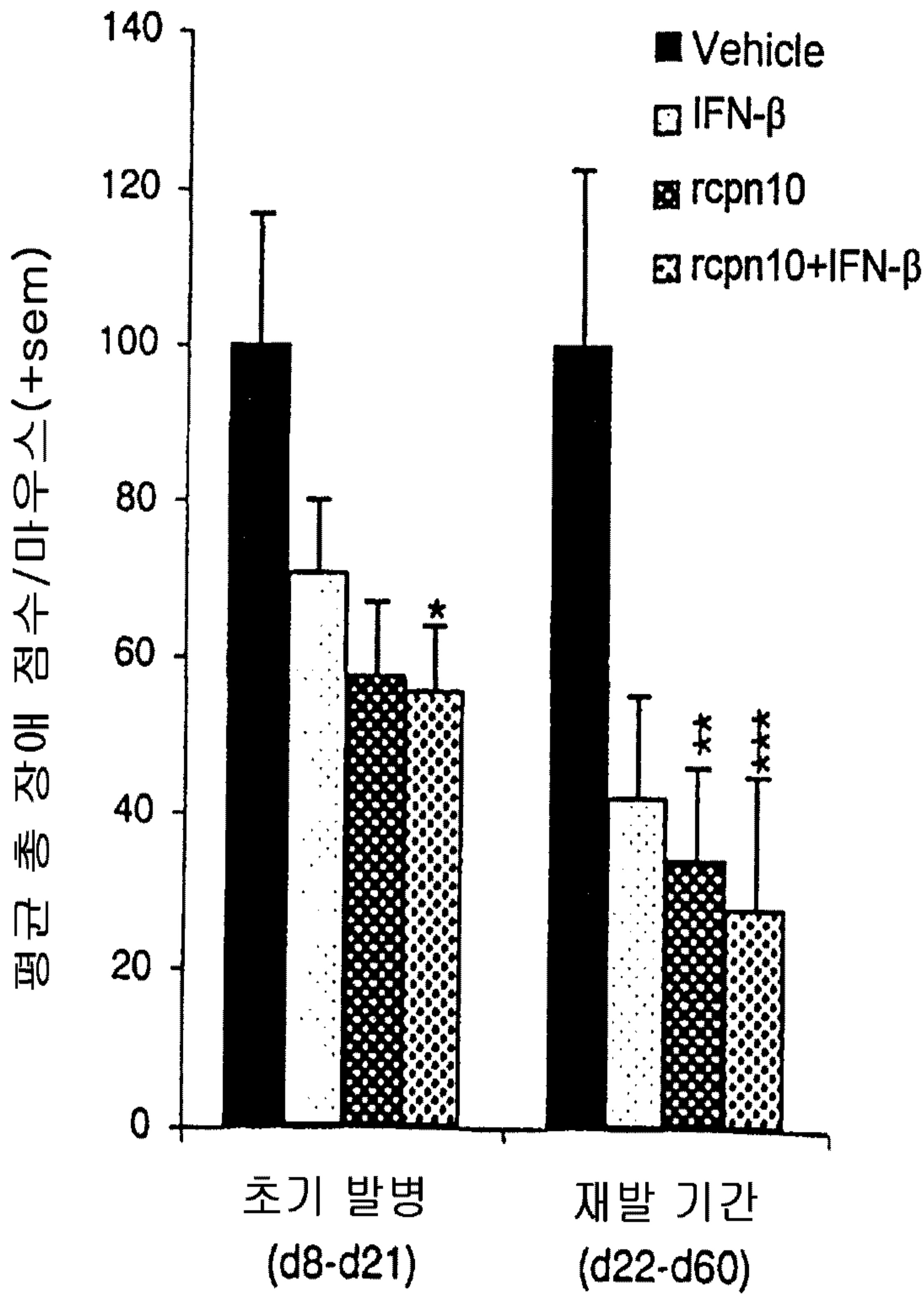
도면 8a


평균 장애점수/마우스(+sem)
0
0.4
0.8
1.2
1.6
2
2.4
2.8
3.2
8
18
28
38
48
58
접종후 경과일
대조군
rcpn10
rcpn10+IFN-β

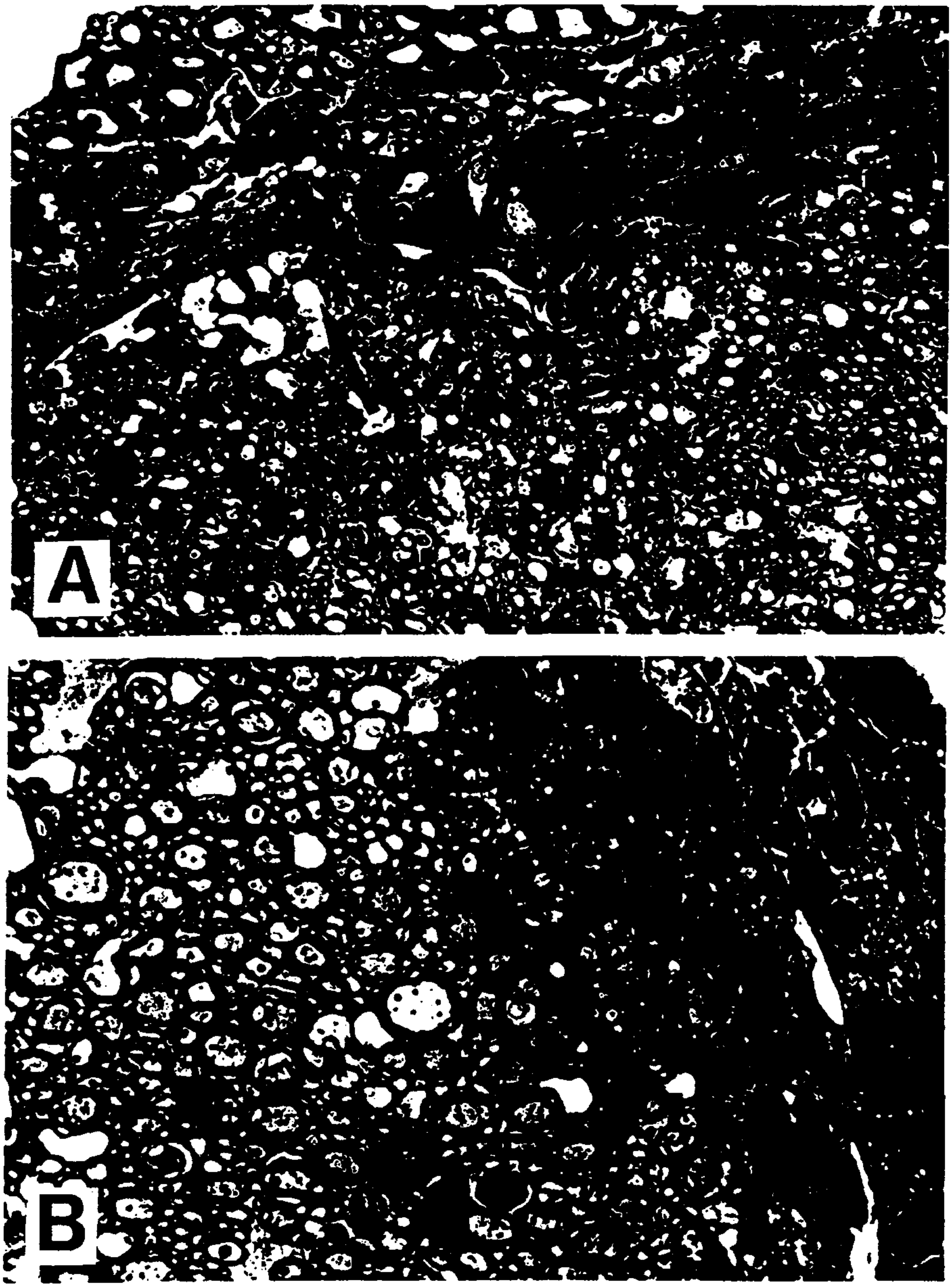
도면 8b


평균 장애점수/마우스(+sem)
0
0.4
0.8
1.2
1.6
2
2.4
2.8
3.2
8
18
28
38
48
58
접종후 경과일
대조군
IFN-β
rcpn10+IFN-β

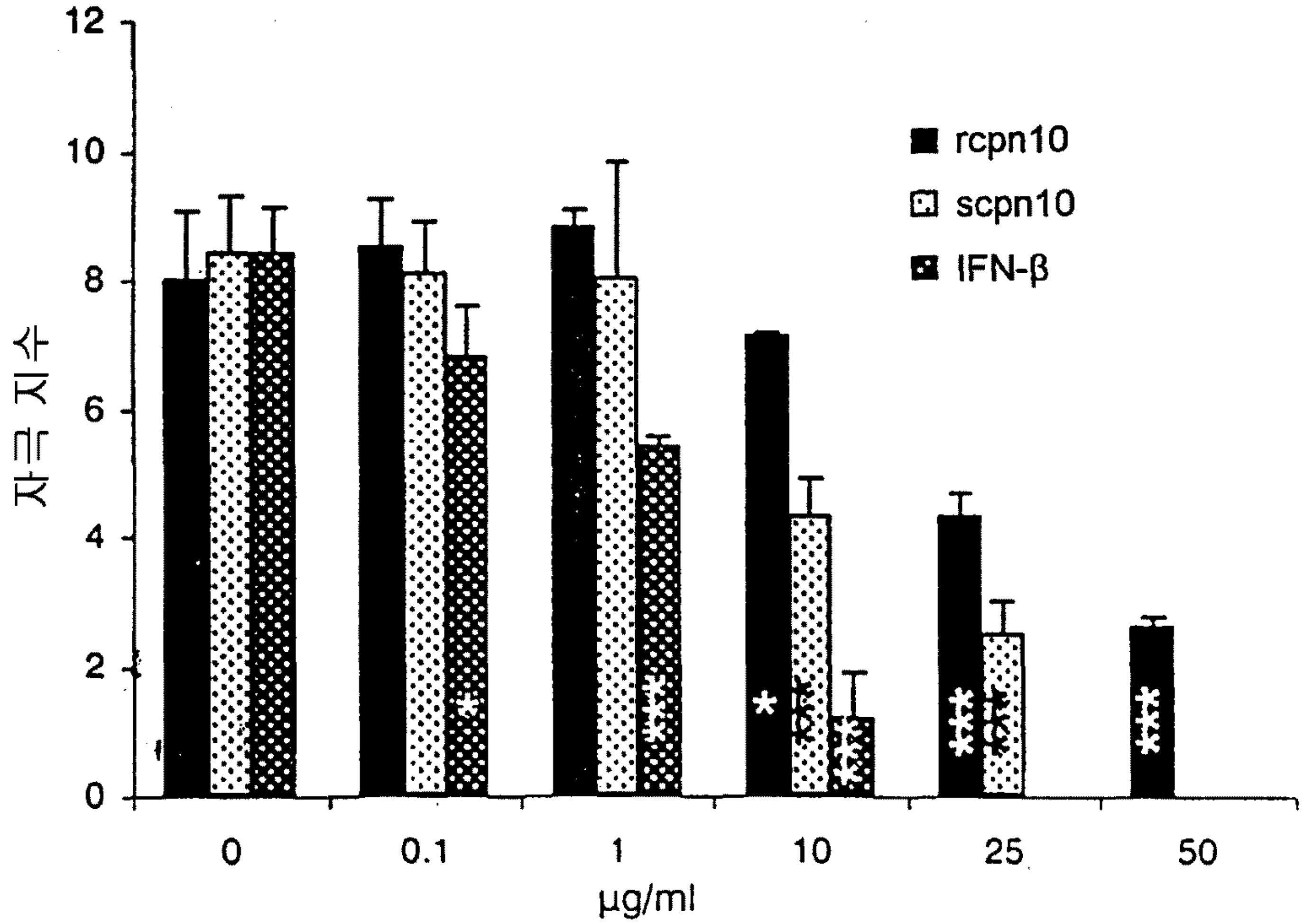
도면 9


140
120
100
80
60
40
20
0
평균 총 장애 점수/마우스(+sem)
Vehicle
IFN-β
rcpn10
rcpn10+IFN-β
*
**
***
초기 발병
(d8-d21)
재발 기간
(d22-d60)

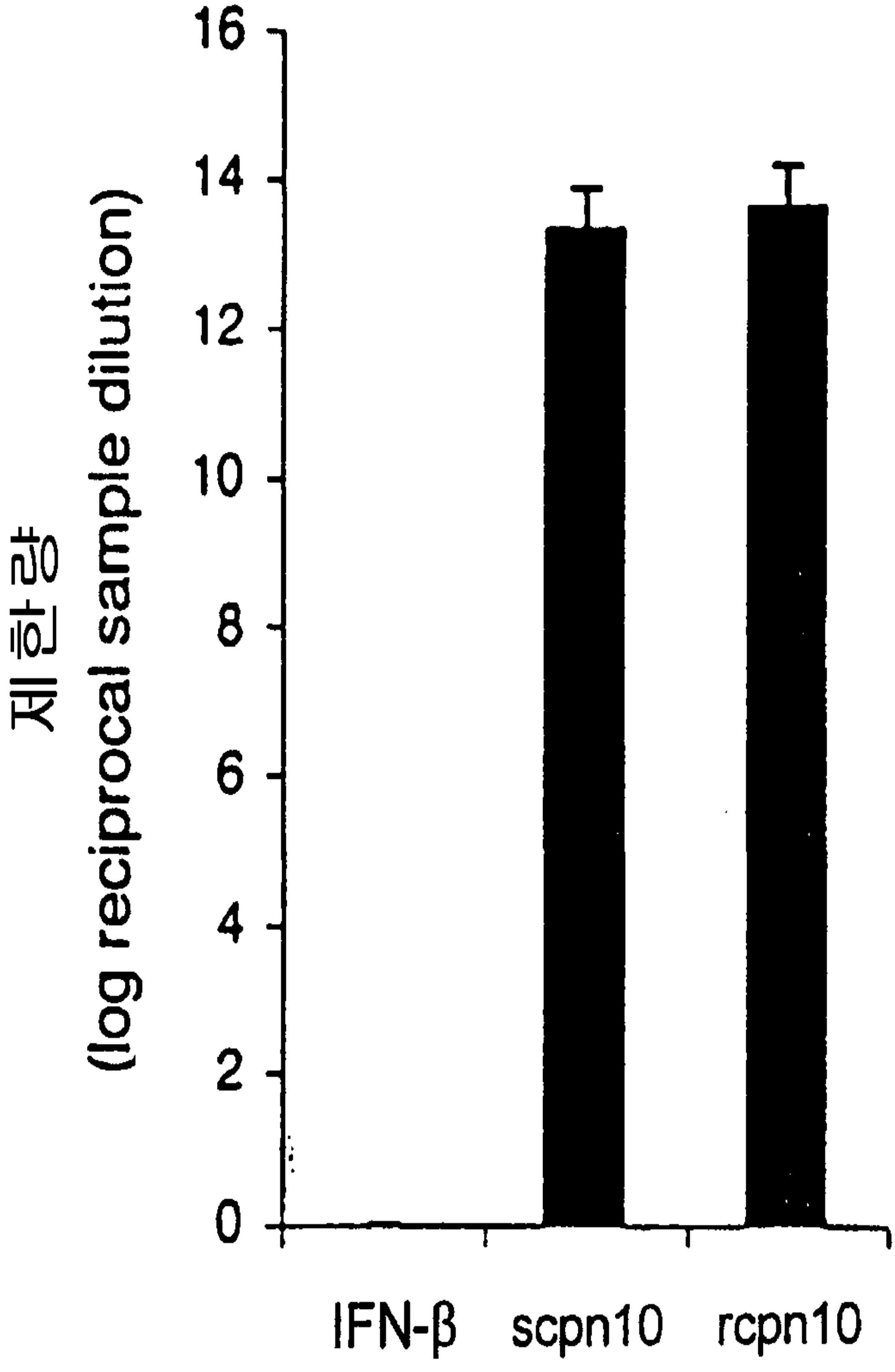
도면 10



도면 11



도면 12


역가
(log reciprocal sample dilution)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
IFN-β
scpn10
rcpn10