(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월20일
(11) 등록번호 10-2068010
(24) 등록일자 2020년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/48 (2013.01)
A61K 38/4866 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7002889
(22) 출원일자(국제) 2013년07월04일
심사청구일자 2018년05월25일
(85) 번역문제출일자 2015년02월03일
(65) 공개번호 10-2015-0036351
(43) 공개일자 2015년04월07일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2013/000729
(87) 국제공개번호 WO 2014/005183
국제공개일자 2014년01월09일
(30) 우선권주장
2012902874 2012년07월04일 오스트레일리아(AU)

(56) 선행기술조사문헌
JP05132427 A*
JP2011524884 A*
WO2001072328 A2*
WO2002100445 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
제트제트 바이오테크 엘엘씨
미국, 77002 텍사스, 휴스턴, 스위트 1900, 맥키니 1001
(72) 발명자
잭슨, 크리스토퍼 존
호주, 뉴 사우스 웨일즈 2079, 마운트 콜라, 수 플레이스 17
슈에, 밀랑
호주, 뉴 사우스 웨일즈 2194, 캠시, 케컨드 에비뉴 4/50
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 **염증성 피부 질환의 치료**

(57) 요 약

본 발명은 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부 질환에 대해 개체를 치료하기 위해 활성화된 단백질 C (APC)의 효과량을 이용하는 방법에 관계한다.

명 세 서

청구범위

청구항 1

개체에서 피부 질환을 치료하는데 사용하기 위한 활성화된 단백질 C(activated protein C, APC)를 포함하는 약학적 조성물로서,

상기 피부 질환은 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부 영역을 갖고,

상기 피부 질환은 건선, 포진성 피부염, 여드름 및 아토피성 피부염으로 구성된 군에서 선택되며,

상기 조성물은 피부 영역에 접촉하는 것에 적합한 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, APC는 피부 영역에서 염증을 최소화하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, APC는 피부 영역에서 정상적인 각질형성세포의 아폽토시스를 최소화하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, APC는 정상적인 각질형성세포의 성장을 저해하지 않거나, 또는 정상적인 각질형성세포의 증식을 유도하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 조성물은 피부 영역의 ㎠당 1 ㎍ 내지 5 ㎎의 APC를 제공하는데 적합한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 조성물은 겔, 크림, 연고, 스프레이, 로션 또는 피부 표면과의 접촉에 적합한 유사 제제의 형태인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 조성물은 피하 주사에 적합한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 피부 질환은 하기 과정: 아폽토시스, 염증, 손상된 장벽 기능 중에서 하나 또는 그 이상에 의해 특징되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 1에 있어서, 피부 질환은 비 농포성 건선인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 비 농포성 건선은 심상성 건선 또는 홍색피부성 건선인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 피부 질환은 농포성 건선인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 농포성 건선은 전신 농포성 건선, 수장족저 농포증, 윤상 농포성 건선, 연속말단피부염 또는 포진성 농가진인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 피부 영역은 건선성 플라크인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 15

여드름을 치료하는데 사용하기 위한 APC를 포함하는 약학적 조성물로서,

상기 조성물은 여드름에 의해 특징되는 피부 영역에 접촉하는 것에 적합한 약학적 조성물.

청구항 16

아토피성 피부염을 치료하는데 사용하기 위한 APC를 포함하는 약학적 조성물로서,

상기 조성물은 아토피성 피부염에 의해 특징되는 피부 영역에 접촉하는 것에 적합한 약학적 조성물.

청구항 17

청구항 1, 15 및 16 중 어느 한 항에 있어서,

항염증성 작용제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **발명의 분야**

[0002] 본 발명은 건선이 포함되지만 이에 국한되지 않는, 각질형성세포의 과다증식에 의해 특징되는 피부 질환, 그리고 이의 치료에 관계한다.

배 경 기 술

[0003] **발명의 배경**

[0004] 명세서 내에 임의의 선행 기술에 대한 언급은 이러한 선행 기술이 오스트레일리아 또는 임의의 다른 관할권에서 통상의 일반적 지식의 일부를 형성하거나 또는 이러한 선행 기술이 당업자에 의해 유관하게 확인되고, 이해되고, 간주될 것으로 합리적으로 예측될 수 있다는 시인 또는 임의의 형태의 암시로서 간주되지 않고, 그리고 간주되지 않아야 한다.

[0005] 가장 두드러진 자가면역 질환인 건선은 성질에서 만성일 뿐만 아니라 재발성이다. 이것은 손상된 장벽 기능, 표피 각질형성세포의 과다증식 및 염증 세포의 확연한 침윤에 의해 특징된다.

[0006] 최근 자료는 비록 염증성 T 세포가 상기 질환에 필수적이긴 하지만, 각질형성세포가 인터류킨 (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-17, 인터페론 (INF)-γ, 그리고 TNF-α (1,2)에 대한 통합 반응, 그리고 표피 각질형성세포의 면역 항상성을 유지하는 신호전달 분자인 핵 인자 NF-κB의 활성화 (3,4)를 통해, 건선에서 병원성 염증의 핵심 구동자라는 것을 보여주었다.

[0007] 건선에 대한 치료제는 없다. 국소 약제, 광선요법, 전통적인 전신성 작용제, 그리고 생물제제는 이의 증상의 관리를 위한 옵션을 제공할 뿐이다. 작용제의 조합은 중등도-내지-중증도 증례를 위해 빈번하게 필요하고, 그리고 긍정적인 장기 결과는 약물치료 이행을 필요로 한다 (5).

[0008] 전형적으로, 국부적인 질환 (10% 체표면적)은 국소 약제로 관리되는 반면, 더욱 큰 구역은 광선요법 또는 전신요법을 필요로 한다. 손바닥과 발바닥에 국부적인 질환은 종종, 전신적으로 치료되는데, 그 이유는 이러한 구역 내에 피부 두께가 국소 요법에 순응하지 않기 때문이다.

[0009] 국소 치료제는 코르티코스테로이드, 예를 들면, 클로베타솔, 그리고 비타민 D 유사물질, 예를 들면, 칼시트리올 또는 칼시포트리엔을 포함한다 (6,7). 코르티코스테로이드는 염증을 감소시키고, 유사분열 활성을 억제하고, 그리고 표적화된 구역에서 혈관수축을 유발함으로써 효과를 발휘한다. 비타민 D 유사물질 작용의 기전은 완전히 이해된 건 아니지만, 각질형성세포 증식과 분화를 조절하는 것으로 보인다 (6). 따라서 양쪽 치료제의 성분은 비록 비 특이적이긴 하지만, 세포 증식의 저해를 포함한다.

[0010] 국소 코르티코스테로이드는 병든 구역에서 피부 위축증, 자극, 그리고 건조를 유발할 수 있다. 비타민 D 유사물질은 일반적으로 안전하지만, 자극을 유발할 수 있는데, 매우 큰 분량으로 이용되면 고칼슘혈의 위험이 있다 (8).

[0011] 광범위한 건선성 질환에서, 광선요법 또는 전신 치료가 이용된다. 광범위한 건선에 대한 일선 치료는 자외선, 예를 들면, UVB와 UVA를 통해 이루어진다. 하지만, 이러한 치료는 특히 더욱 밝은 피부색을 갖는 환자에서, 화상과 피부암의 더욱 큰 위험과 연관된다. UV 광 요법이 무효한 것으로 입증되면, 저분량 메토트렉사트 역시 이용될 수 있다. 메토트렉사트는 건선을 제어하는데 합리적으로 효과적이지만, 심각한 독성 효과에 의해 극히 제한된다.

[0012] 상기 질환의 면역 성격에 관한 지식이 증가함에 따라서, T 림프구, TNF-α, IL-12, 그리고 IL-23을 표적으로 하는 생물학적 작용제가 중등도-내지-중증도 건선에서 성공적으로 활용되고 있다 (8). 3가지 통상적으로 이용되는 TNF 저해제는 Enbrel (에타네르셉트), Humira (아달리무맙), 그리고 Remicade (인플릭시맙)를 포함한다. IL-12와 IL-23을 표적으로 하는 새로운 작용제인 우스테키누맙은 2009년에 시판이 승인되었고, 항-TNF 작용제와 유사한 효능과 안전성 프로필을 제공하였다 (9).

[0013] 생물학적 작용제는 이전에 가용했던 전신 요법에 비하여 상당한 이점을 제공하긴 하지만, 이들 약물의 임상 시험은 이런 화합물의 활성이 장기적으로 다수의 불리를 동반한다는 것을 증명하였다 (10-11). 첫째, 잠복성 결핵균 (Mycobacterium tuberculosis) (TB) 감염을 앓는 환자에서, 활동성 TB가 인플릭시맙으로 치료의 개시 직후에 발생할 수 있다. 이에 더하여, TNF 저해제를 복용하는 환자는 기회성 진균 감염, 예를 들면, 폐와 파종성 히스토플라스마증, 콕시디오이데스진균증, 그리고 분아균증의 증가된 위험에 처해있다. 둘째, 림프종과 피부암을 비롯한 악성의 용량-의존성 증가된 위험이 일부 치료제에 적용된다. 셋째, 일부 환자는 이들 작용제에 반응하지 않거나, 또는 초기 반응을 유지하는데 실패한다. 생물학적 작용제의 가용성은 또한, 높은 경제적 비용에 의해 제한된다.

[0014] 활성화된 단백질 C (APC)는 항 아폽토시스 인간 유전자 bcl-2와 MIHB의 유전자 발현을 유도한다. 이러한 항-아폽토시스 기능에 기초하여, APC는 큰 범위의 장기 특이적이고 비 특이적인 염증성 질환, 자가면역 질환, 신생물과 감염성 질환을 비롯하여, 아폽토시스가 우려되는 넓은 범위의 질환에서 아폽토시스의 최소화를 위해 언급되었다. 특히, APC의 이용은 이들 질환에서 모든 증상을 치료하는데 제안되지 않고, 단지 아폽토시스를 최소화하는 것으로 제안된다 (WO2001/072328 참조).

[0015] 게다가, 당해 분야에서 다수는 WO2001/072328에서 제안된 바와 같은 항-아폽토시스 효과가 세포 증식의 기능장애 조절이 나타나는 장애, 특히 각질형성세포 과다증식을 수반하는 장애의 치료에 대해 APC를 부적합하도록 만든다는 견해를 취한다. 특히, APC에 의한 세포 아폽토시스의 예방을 통한 칼슘-유도된 세포 사멸의 약화와 별개로, APC는 또한, 각질형성세포 증식에 대한 유력한 자극 효과를 갖고, 그리고 APC는 EPCR, 표피 성장 인자 수용체와 ERK 1/2의 활성화를 통한 자가분비 방식으로 각질형성세포 생존, 성장과 이주를 증진하는 것으로 알려져 있다 (17, 20).

[0016] 각질형성세포 과다증식에 의해 특징되는 질환 또는 장애, 예를 들면, 건선의 치료를 위한, 또는 이들의 진행 또는 증상을 최소화하기 위한 새로운 접근법과 요법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] **발명의 요약**

[0018] 본 발명은 상기 문제 또는 한계 중에서 하나 또는 그 이상을 해결하는 것을 추구하고, 그리고 일정한 구체예에

서, 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부 질환에 대해 개체를 치료하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0019] 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부 영역을 갖는 개체를 제공하고;

[0020] 피부 영역을 활성화된 단백질 C (APC)의 치료 효과량과 접촉시키고;

[0021] 따라서 상기 피부 질환에 대해 개체를 치료한다.

[0022] 다른 구체예에서, 건선에 대해 개체를 치료하는 방법이 제시되고, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0023] 건선성 플라크를 갖는 개체를 제공하고;

[0024] 활성화된 단백질 C (APC)의 치료 효과량을 포함하는 조성물을 플라크에 적용하고;

[0025] 따라서 건선에 대해 개체를 치료한다.

[0026] 다른 구체예에서, 여드름에 대해 개체를 치료하는 방법이 제시되고, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0027] 여드름을 갖는 개체를 제공하고;

[0028] 활성화된 단백질 C (APC)의 치료 효과량을 포함하는 조성물을 여드름에 적용하고;

[0029] 따라서 여드름에 대해 개체를 치료한다.

[0030] 다른 구체예에서, 아토피성 피부염에 대해 개체를 치료하는 방법이 제시되고, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0031] 아토피성 피부염을 갖는 개체를 제공하고;

[0032] 활성화된 단백질 C (APC)의 치료 효과량을 포함하는 조성물을 아토피성 피부염 또는 이를 내포하는 피부 영역에 적용하고;

[0033] 따라서 아토피성 피부염에 대해 개체를 치료한다.

[0034] 다른 구체예에서, 괴저성 농피증에 대해 개체를 치료하는 방법이 제시되고, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0035] 괴저성 농피증을 갖는 개체를 제공하고;

[0036] 활성화된 단백질 C (APC)의 치료 효과량을 포함하는 조성물을 괴저성 농피증 또는 이를 내포하는 피부 영역에 적용하고;

[0037] 따라서 괴저성 농피증에 대해 개체를 치료한다.

[0038] 다른 구체예에서, 각질형성세포 과다증식에 의해 특징되는 장애를 갖는 피부 영역에서 상처 치유 또는 조직 재생을 유도하는 방법이 제시되고, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0039] 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 장애를 갖는 피부 영역을 갖는 개체를 제공하고;

[0040] 피부 영역을 활성화된 단백질 C (APC)의 치료 효과량과 접촉시키고;

[0041] 따라서 피부 영역에서 상처 치유 또는 조직 재생을 유도한다.

[0042] 추가의 구체예에서, 개체에서 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부 질환을 최소화하는데 이용하기 위한, 또는 건선, 여드름 또는 아토피성 피부염을 치료하기 위한 APC의 치료 효과량을 포함하는 조성물이 제시된다.

[0043] 다른 추가의 구체예에서, 개체에서 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부 질환을 최소화하기 위한, 또는 건선, 여드름 또는 아토피성 피부염을 치료하기 위한 약제의 제조에서 APC의 용도가 제시된다.

[0044] 다른 추가의 구체예에서, 개체에서 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부 질환을 최소화하기 위한, 또는 건선, 여드름 또는 아토피성 피부염을 치료하기 위한 APC의 용도가 제시된다.

[0045] 다른 추가의 구체예에서, APC의 치료 효과량을 포함하는 조성물, 그리고 개체에서 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 장애의 치료 방법, 또는 건선, 여드름 또는 아토피성 피부염의 치료 방법에서 APC의 이용을 위한 서면 사용설명서를 포함하는 키트가 제시되고, 상기 방법은 본원에서 설명된 바와 같다.

도면의 간단한 설명

[0046] **도면의 간단한 설명**

도면 1. (A) 인간 신생아 포피 각질형성세포는 4 시간 동안 APC로 전처리되고, 이후 TNF-α와 세포는 72 시간 동안 배양되고 증식이 MTT 검정에 의해 검출되었다. 유관한 대조와 비교하여 $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. (B) 크리스털 바이올렛 검정을 이용하여 계량된, 정상적인 생쥐 진피 섬유모세포 (MDF), 정상적인 인간 진피 섬유모세포 (HDF)와 인간 류마티스성 윤활액 섬유모세포 (RSF, 적색)의 성장에 대한 APC의 효과 (평균 ± SD. N=4 별개의 실험. *, ‡, # 유관한 대조와 비교하여 p< 0.01, ANOVA (변량분석). (C) RSF는 24 시간 동안 APC로 처리되었다. 웨스턴 블롯팅에 의해 계량된 p21과 p27.

도면 2: 외인성 또는 내인성 APC는 증식을 자극하고 배양된 각질형성세포의 아폽토시스를 예방한다. A) 증식은 MTT 검정을 이용하여 계량되고, 그리고 자료는 대조와 비교하여 % 세포 증식으로 표시되었다. B) MTT 검정에 의해 검출된, 72 시간 후 PC siRNA와 APC 처리에 응하여 각질형성세포의 증식. 세포 증식은 대조의 백분율로서 표시된다. C&D) 각질형성세포는 PC siRNA (0.5 μm)로 처리되었다. 48 시간 후, 세포는 아폽토시스 세포 (흑색 화살표는 아폽토시스 세포를 지시한다)를 검출하기 위한 TUNEL (종말 dUTP 닉 말단 표지화) 검정에 이용되고 (C), 그리고 고출력 현미경검사 (x 20) 하에 아폽토시스 세포를 계수함으로써 정량되었다 (D). 자료는 15개 필드의 필드당 아폽토시스 세포의 평균 숫자로서 표시되었다 (평균 ± S.E., n = 3). 그래프는 3가지 독립된 실험 중에서 한 가지를 나타낸다. 이미지는 3가지 독립된 실험 중에서 한 가지를 나타낸다. $^{*}p<0.05$, $^{**}p < 0.01$. 눈금자:40 μm.

도면 3: PC 또는 EPCR siRNA 처리는 HUVEC의 성장을 저해하고 이의 아폽토시스를 증진한다. A) MTT 검정에 의해 검출될 때, 외인성 APC 또는 PC의 존재 또는 부재에서 대조, PC siRNA 또는 EPCR siRNA (500 nM) 처리에 응하여 HUVEC의 증식 속도. 세포 증식은 72 시간에 걸쳐 대조의 백분율 (평균 ± SD)로서 표시된다. **대조와 비교하여 P < 0.01 (1번째 바), $^{\#\#}$PCsiRNA와 비교하여 P < 0.01 (2번째 바). B) 재조합 APC의 존재 또는 부재에서 EPCR (RCR252)에 대한 차단 항체에 응하여 HUVEC의 증식. 세포 증식은 72 시간에 걸쳐 대조의 백분율 (평균 ± SD)로서 표시된다. *대조와 비교하여 P < 0.05 (1번째 바), $^{\#}$APC 단독과 비교하여 P < 0.05 (5번째 바). C-E) HUVEC는 대조, PC siRNA 또는 EPCR siRNA (둘 모두 500 nM)로 처리되었다. 36 시간 후, 형질감염된 세포는 재조합 APC (1 μg/ml)로 12 시간 동안 처리되고, 그리고 세포는 48 시간 시점에 수확되었다. 활동성 카스파제-3은 면역형광 염색에 의해 검출되고 (백색 화살표는 활동성 카스파제-3 양성 세포를 지시한다) (C), 그리고 아폽토시스 세포는 원지 세포 사멸 검출 키트에 의해 검출되었다 (백색 화살표는 아폽토시스 세포를 지시한다) (D). 이미지는 3가지 독립된 실험 중에서 한 가지를 나타낸다. 눈금자 40μm. E) 아폽토시스 세포 (D로부터)는 현미경검사 하에 DAPI로 공동-염색된 세포를 계수함으로써 정량되었다. 자료는 높은 배율 (40x) 하에 아폽토시스 세포의 평균 숫자로서 표시된다 (평균 ± SEM, n = 3). 대조와 비교하여 $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (1번째 바), $^{\#}$PCsiRNA 처리와 비교하여 P < 0.05 (2번째 바)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] **구체예의 상세한 설명**

[0048] 앞서 언급된 바와 같이, 발명의 시점에서, 각질형성세포는 건선을 비롯한 다양한 피부 염증성 질환의 병리에 결정적으로 관련되는 것으로 이해되었다. 오래된 항염증성 요법 중에서 다수는 염증 세포의 복제를 유익하게 최소화하는 것으로 이해되었고, 그리고 염증 세포의 성장 및/또는 복제의 저해가 바람직한 점을 고려하면, 항-아폽토시스성인 것으로 예측되었던 이들 화합물은 이들 질환의 치료에서 임상적 이용에 고려되지 않았다. 이들은 본 발명에 앞서, APC가 항염증성 기능에도 불구하고, 각질형성세포의 과증식성, 과형성성 또는 만약 그렇지 않으면, 조절장애된 증식에 의해 특징되는 피부 질환을 최소화하거나 또는 해결하는 것으로 결코 제안된 적이 없는 이유 중의 일부이다. 실제로, 본 발명에 앞서, 각질형성세포 증식에 대한 APC의 자극 효과에 관한 공개된 자료는 APC 요법이 염증성 피부 질환, 예를 들면, 건선, 여드름 및 각질형성세포 과다증식에 의해 특징되는 다른 피부 질환에 유해할 것임을 암시하는 것으로 보였다.

[0049] 본원에서 설명된 바와 같이, 본 발명자는 놀랍게도, APC가 느린 성장 또는 정상적인 인간 각질형성세포 또는 세포에서 아폽토시스를 저해하지만, 비정상적인 또는 빠른 성장 각질형성세포 또는 세포의 증식을 저해하는데 효과를 갖지 않는다는 것을 발견하였는데, 후자는 넓은 범위의 염증성 피부 질환의 매개체이다.

[0050] 이로부터, 본 발명자는 각질형성세포 과다증식과 연관된 피부 질환에서, 항-아폽토시스 APC-매개된 신호에 반응에 대하여 각질형성세포의 2가지 개체군이 실존한다는 것을 인식하였다. 구체적으로, APC에 반응하는 (즉, 기저 수준의 APC에 응하여 아폽토시스를 겪지 않는) 것들은 느린 성장, 정상적인, 비 염증 세포이다. 게다가, APC에 반응하는 (즉, 기저 수준의 APC에 응하여 아폽토시스를 겪는) 것들은 더욱 빠른 성장, 비정상적인 염증 세포이다.

[0051] 중요하게는, 본 발명자는 APC가 더욱 느린 성장 정상적인 세포의 증식을 자극할 수 있긴 하지만, 빠른 성장 세포의 증식을 저해하는 독특한 선별적인 능력을 갖는다는 것을 발견하였다. APC가 내피와 각질형성세포를 비롯하여, 기초 조건 하에 느린-성장 또는 정상적인 인간 세포의 증식을 증강하고 이들의 아폽토시스를 저해한다는 자료가 본원에서 도시된다. 하지만, 본 발명에 따라서, APC는 세포의 염증성 상태에 따라 세포 증식을 차별적으로 조절한다 - 구체적으로, APC는 류마티스성 관절염 윤활막으로부터 TNF-α-자극된 각질형성세포와 빠른 성장 윤활액 섬유모세포의 성장을 저해한다.

[0052] 본원에서 설명된 연구 결과로부터, 본 발명자는 본 발명 이전에 문헌의 이해와 대조적으로, APC의 항염증성 이익이 각질형성세포 과다증식에 의해 특징되는 피부 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 실현될 수 있을 것이라고 생각하였는데, 그 이유는 항염증성 효과는 염증 세포에 적용될 것이지만, 항-아폽토시스 효과는 비 염증성인 각질형성세포에 선별적으로 또는 특정적으로 적용되고, 그리고 염증성 각질형성세포에는 적용되지 않을 것이기 때문이다.

[0053] 게다가, 이런 치료의 결과는 비 염증성 각질형성세포의 지속된 정상적인 증식 (APC의 항-아폽토시스 기능으로부터 발생), 그리고 APC의 투여를 통해, 염증성, 과증식성 각질형성세포가 아폽토시스될 수 있도록 하는 가능성과 함께, 항 염증을 비롯한 조건의 규정일 것이다.

[0054] <u>A. 정의</u>

[0055] 본원에서 이용된 바와 같이, 문맥에서 달리 요구되는 경우를 제외하고, 용어 "*포함한다*" 및 상기 용어의 변이,

예를 들면, "*포함하는*", "*포함한다*"와 "*포함된*"은 추가의 첨가제, 성분, 완전체 또는 단계를 배제하는 것으로 의도되지 않는다.

[0056] "*각질형성세포*"는 일반적으로, 케라틴과 기타 단백질과 스테롤을 합성하는 표피 세포를 지칭한다. 이들 세포는 표피의 95%를 구성하고, 진피-표피 접합부에서 미분화된, 또는 기저 세포로부터 형성된다. 이의 특징적인 중간 필라멘트 단백질은 시토케라틴이다. 이의 다양한 연속적인 시기에서, 케라틴은 유극 세포층 및 과립 세포 층을 형성하고, 여기서 이들 세포는 납작해지고 천천히 사멸하여 최종 층인 각질층을 형성하는데, 이것은 점진적으로 박리한다.

[0057] "*과다증식*"은 일반적으로, 급속한 분열에 의한 세포의 증식의 비정상적으로 높은 속도를 지칭한다. 과다증식은 일부 배경에서, 세포 주기의 G_1, S 또는 G_2 단계에서 광범위하게 존재하는 세포로부터 발생할 수 있다. 과다증식은 또한, 과형성으로 지칭될 수 있고, 그리고 과증식성 세포는 과형성성 세포 또는 조직으로 지칭될 수 있다.

[0058] "*과증식성 각질형성세포*"는 일반적으로, 세포 주기 중에서 간기의 시기, 예를 들면, G_1, S 또는 G_2에서 존재하는 경향이 있는 각질형성세포이다. 이들 세포는 정상적인 각질형성세포가 간기 또는 확장된 G_1 단계와 별개의 시기이고, G_1의 종결 시점에서 발견되는 세포 주기 검사점인 제한 점을 후행하는 G_0 (간극 제로)에서 일반적으로 존재한다는 점에서, 정상적인 각질형성세포와 상이하다. 과증식성 각질형성세포는 또한, 일반적으로 염증성 유전자 및 특히, NF-κB 신호전달 경로에 관련된 유전자의 발현을 갖는 것으로 특징된다.

[0059] "*정상적인 각질형성세포*"는 일반적으로, G_0 또는 확장된 G_1 단계에 존재하는 경향이 있는 각질형성세포이다. 일반적으로, 이들 각질형성세포는 전형적으로, TNF-α로 자극되지 않는 것들이고, 그리고 이들은 일반적으로, NF-κB 신호전달 경로의 유전자의 발현을 갖지 않는다.

[0060]

[0061] "*활성화된 단백질 C*" 또는 "*AFC*"는 일반적으로, 단백질 S에 결합하고 인자 Va와 VIIIa를 단백분해적으로 불활성화시킴으로써, 그리고 플라스미노겐 활성제 저해제의 중화를 통해 피브린용해를 자극함으로써 항응고제로서 기능하는 세린 단백분해효소를 지칭한다. Walker et al., FASEB J. 6, 2561-2567 (1992); Esmon, Arterioscler. Thromb. 12, 135-145 (1992); van Hinsbergh et al., Blood 65, 444-451 (1985). 전구체 단백질 C는 간에서 일차적으로 생산된다. 활성화는 단백질 C의 중쇄의 N-말단에서 도데카펩티드의 제거에 의해 달성된다. 단백질 C 경로는 트롬빈이 내피 세포 표면 단백질, 트롬보모둘린에 결합하고, 그리고 단백질 C가 내피 세포 단백질 C 수용체에 결합할 때 시작된다. 인자 Va와 VIIIa를 불활성화시킴으로써, APC는 형성되는 트롬빈의 양을 제한한다. Esmon, Arterioscler. Thromb. 12, 135-145 (1992).

[0062] "*치료하는*"과 "*치료*"는 일반적으로, 질환, 질병 또는 장애를 제거하거나, 또는 질환, 병리학적 상태 또는 장애의 증상 또는 합병증의 개시를 방지적으로 예방하는 지에 상관없이, 질환, 질병 또는 장애와 싸우기 위한 환자의 관리와 간호를 지칭한다.

[0063] "*과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부 질환*"은 일반적으로, 과증식성 각질형성세포의 우세, 그리고 특히, 정상적인 조직과 비교하여 과증식성 각질형성세포의 풍부가 나타나는 질환, 질병, 증후군 등을 지칭한다. 장애는 염증성 장애일 수 있고, 그리고 전형적으로, 기저층 (배아층), 유극층, 과립층, 투명층과 각질층 중에서 하나 또는 그 이상을 침범한다. 피부 질환의 실례는 본원에서 설명된 형태를 비롯한 농포성 (화농성)과 비 농포성 (비 화농성) 건선, 그리고 보통 여드름 또는 낭포성 여드름을 비롯한 여드름을 포함한다.

[0064] "*치료 효과량*"은 일반적으로, 원하는 임상 결과를 제공하는 제약학적 화합물의 양을 지칭한다. 일정한 구체예에

서, APC의 치료 효과량은 일반적으로, 정상적인 각질형성세포에 대한 항-아폽토시스 효과를 제공하고, 그리고 과증식성 각질형성세포에 대한 아폽토시스 효과를 제공하거나 제공하지 않는다. 한 구체예에서, APC의 치료 효과량은 과증식성 각질형성세포의 증식을 중단시키고 및/또는 항염증성 효과를 제공한다. 유관한 양은 본원에서 개시된 발명의 방법에 따라 확립되거나 또는 결정될 수 있다.

[0065] "*아폽토시스 유도성 양*"은 일반적으로, 과증식성 각질형성세포의 아폽토시스의 유도를 제공하는 APC의 양을 지칭한다.

[0066] "*성장 자극성 양*"은 일반적으로, 비 과증식성 각질형성세포, 그리고 특히, 느린 성장, 정상적인, 비 염증성 각질형성세포의 증식의 유도를 제공하는 APC의 양을 지칭한다.

[0067] "*항염증성 양*"은 일반적으로, 과증식성 각질형성세포에 의해 특징되는 피부 질환의 염증의 최소화를 제공하는 APC의 양을 지칭한다.

[0068] <u>B. 치료 방법</u>

[0069] APC가 염증성 과증식성 각질형성세포가 아폽토시스를 겪는 것을 예방하지 않는다는 깨달음으로, 본 발명자는 본 발명 이전에 알려져 있던 바와 같이, 염증성 각질형성세포가 아폽토시스로부터 예방되거나 또는 만약 그렇지 않으면, 증식하거나 또는 성장하도록 유도되면 달리 발생했을 장애, 예를 들면, 건선과 여드름을 심화시키거나 또는 악화시키지 않으면서, APC가 이들 질환에 항염증성 효과를 제공하는데 이용될 수 있다는 것을 인식하였다. 이런 이유로, 일정한 구체예에서, 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부 질환에 대해 개체를 치료하는 방법이 제시된다. 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0070] 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부 영역을 갖는 개체를 제공하고;

[0071] 피부 영역을 활성화된 단백질 C (APC)의 치료 효과량과 접촉시키고;

[0072] 따라서 상기 피부 질환에 대해 개체를 치료한다.

[0073] 상기 방법에 따라, APC는 APC 또는 이를 내포하는 제제를 유관한 영역과 접촉시킴으로써, 과증식성 각질형성세포의 존재에 의해 특징되는 피부의 부위 또는 영역에 직접적으로 전달된다. 부위 또는 영역은 여드름 또는 농포성 건선에서 발생하는 바와 같은 열린 상처 또는 파열된 피부 표면이거나, 또는 부위 또는 영역은 실제적으로 파열되지 않는다, 다시 말하면, 이것은 플라크 또는 다른 융기된, 경화된 또는 섬유증 조직과 더욱 유사하다. 부위 또는 영역이 파열되거나 또는 이와 유사하다는 의미에서 개방성인 경우에, APC는 파열을 둘러싸는 표면 및/또는 피부 표면 아래에 정상적으로 있는 노출된 조직 (가령, 기저층 (배아층), 유극층, 과립층, 투명층)에 적용될 수 있다.

[0074] 이러한 문맥에서, 본 발명자의 중요한 발견은 APC가 피부가 실제적으로 온전한 필요한 부위에, 예를 들면, 파열 농포를 둘러싸는 영역에, 또는 만약 그렇지 않으면, 실제적으로 파열되지 않은 피부 표면에 전달될 수 있다는 것이다. 이것은 APC 또는 유관한 제제와 부위의 직접 접촉에 의한 국부 전달을 가능하게 하고, 파종성 질환 또는 장애, 예를 들면, 패혈증의 치료에서 APC의 이전 임상적 전신성 적용과 매우 상이한 것이다. 본 발명에 따른 APC의 국부 투여는 파종성 또는 전신성이기 보다는 국부적인 질환에 유리하고 적용가능한데, 그 이유는 이것이 국부 영역에 APC 전달과 연관된 위험을 제한하고, 그리고 예로서 연속성 주입에 의한 APC의 전신성 전달과 연관된 위험을 실제적으로 최소화하기 때문이다.

[0075] 우려되는 부위에 APC의 국부 전달은 다른 질환과 장애의 치료를 위한 당분야에 공지된 APC의 투여로부터 유의미

한 이탈이다. 본 발명의 시점에서 당분야에 공지된 방법에 따라, APC는 인간 환자의 경우에, 약 1 μg/일 내지 약 500 mg/일 또는 약 1 IU/kg/일 내지 약 6000 IU/kg/일의 분량에서 바람직하게는 비경구, 가장 바람직하게는 정맥내 투여된다. 가령, U.S. 특허 번호 5,151,268과 5,571,786을 참조한다. 심각한 패혈증의 경우에, Xigris™이 약 2 시간의 주입 후, 약 45 ng/ml APC의 항정 상태 혈장 농도를 제공하기 위해 약 12 μg/kg/시간 내지 약 30 μg/kg/시간의 속도에서 연속성 주입에 의해 투여된다. 본 발명은 일반적으로, 전신성 투여에 의한 연속성 주입에 기초되지 않는다. 오히려, 본 발명은 본원에서 설명된 바와 같이, 피부 영역을 APC의 치료 효과량과 접촉시킴으로써 APC의 국부 투여에 기초된다.

[0076] APC의 치료 효과량과 접촉되는 피부 영역은 염증이 생기거나, 또는 염증이 함몰 상태에 있을 수 있다. 한 구체예에서, 피부 질환은 하기 과정 중에서 하나 또는 그 이상, 또는 모두에 의해 특징된다: 아폽토시스, 염증, 손상된 장벽 기능.

[0077] 한 구체예에서, 피부 영역은 염증이 생긴다. 한 가지 특히 중요한 실례는 만성 염증과 연관된 피부 영역이다. 이러한 피부는 건선성 플라크의 모양을 갖고, 그리고 비록 플라크가 실제적으로 비 농포성일수도 있지만, 농포와 관련하여 현성이다.

[0078] 피부 질환은 건선, 포진성 피부염, 심상성 천포창, 백반, 그리고 보통 여드름 또는 낭포성 여드름으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0079] 피부 질환은 비 농포성 건선, 예를 들면, 심상성 건선 또는 홍색피부성 건선일 수 있다.

[0080] 피부 질환은 농포성 건선, 예를 들면, 전신 농포성 건선, 수장족저 농포증, 윤상 농포성 건선, 연속말단피부염 또는 포진성 농가진일 수 있다.

[0081] 전형적으로, 질환이 건선인 경우에, APC와 접촉된 피부 영역은 건선성 플라크이다. 따라서, 다른 구체예에서, 건선에 대해 개체를 치료하는 방법이 제시된다. 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0082] 건선성 플라크를 갖는 개체를 제공하고;

[0083] 활성화된 단백질 C (APC)의 치료 효과량을 포함하는 조성물을 플라크에 적용하고;

[0084] 따라서 건선에 대해 개체를 치료한다.

[0085] 질환이 보통 여드름인 경우에, APC와 접촉된 피부 영역은 파열된 피부와 파열되지 않은 피부를 포함할 수 있다. 따라서, 다른 구체예에서, 여드름에 대해 개체를 치료하는 방법이 제시된다. 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0086] 여드름을 갖는 개체를 제공하고;

[0087] 활성화된 단백질 C (APC)의 치료 효과량을 포함하는 조성물을 여드름에 적용하고;

[0088] 따라서 여드름에 대해 개체를 치료한다.

[0089] 질환이 아토피성 피부염인 경우에, APC와 접촉된 피부 영역은 파열된 피부와 파열되지 않은 피부를 포함할 수 있다. 따라서, 다른 구체예에서, 아토피성 피부염에 대해 개체를 치료하는 방법이 제시된다. 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0090] 아토피성 피부염을 갖는 개체를 제공하고;

[0091] 활성화된 단백질 C (APC)의 치료 효과량을 포함하는 조성물을 아토피성 피부염에 적용하고;

[0092] 따라서 아토피성 피부염에 대해 개체를 치료한다.

[0093] 아토피성 피부염은 내생성 습진, 굴면성 습진, 영아 습진으로 구성된 군에서 선택되는 습진의 형태일 수 있고, 그리고 또한, "베니에 양진", "신경피부염", 또는 "디아테시퀘 양진"으로 알려져 있다.

[0094] 전술한 내용에도 불구하고, 당업자에 의해 APC, 단백질 C, 단백질 C의 합성을 증가시키는 작용제, 및/또는 단백질 C 활성제의 용량은 이용된 특정 화합물 또는 화합물들의 조합, 치료되는 질환 또는 장애, 질환 또는 장애의 심각도, 국부 투여의 유형(들), 화합물의 배출 속도, 치료의 지속 시간, 동물에 투여되는 임의의 다른 약물의 실체, 동물의 연령, 크기와 종, 그리고 의학 분야에 알려진 유사 인자에 따라 변할 것으로 이해된다. 일반적으로, 화합물 또는 화합물들의 조합의 적합한 일일량은 치료적 효과를 발생하는데 효과적인 가장 낮은 분량인 양일 것이다. 투여의 용량, 제형과 방식은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 주치의에 의해 결정될 것이다. 다양한 화합물 및 화합물들의 조합(들)에 대한 투여의 효과적인 용량, 제형, 그리고 방식은 실험적으로 결정될 수 있고, 그리고 이런 결정을 내리는 것은 당해 분야의 기술 범위 내에 있다

[0095] 일정한 구체예에서, APC는 APC와 피부 각질형성세포의 접촉이 가능하도록 제공되는 것이 중요한데, 그 이유는 가설에 의해 한정됨 없이, APC가 본 발명의 선별적인 항-아폽토시스 활성 (즉, 비 염증성 비 과증식성 세포에 선별적인), 그리고 항염증성 활성을 제공하는 것이 이러한 접촉에 의한 것으로 생각되기 때문이다. 일반적으로, APC와 접촉된 세포는 하기 특징, 더욱 높은 수준의 활성화된 매트릭스 금속단백분해효소(MMP)-2와 내피 단백질 C 수용체 (EPCR) 및 더욱 낮은 활성의 활성화된 MAP 키나아제 ERK, 그리고 세포와 APC의 이러한 접촉을 갖는 것으로 인식될 수 있고, 그리고 이런 이유로, 치료의 치료적 효능은 이들 세포 표현형을 사정함으로써 확립될 수 있다.

[0096] 일정한 구체예에서, APC의 치료 효과량은 일반적으로, 정상적인 각질형성세포에 항-아폽토시스 효과 및 과증식성 각질형성세포에 아폽토시스 효과를 제공한다. 이러한 결과는 하기와 같이 사정될 수 있다: 세포 생존/증식 (MTT) 검정과 세포 아폽토시스 (TUNEL 검정)를 계량하고, 따라서 APC의 치료 효과량이 제공되었는지를 확립한다. 예시적인 방법은 본원에서 더욱 도시된다.

[0097] 한 구체예에서, APC의 치료 효과량은 과증식성 각질형성세포의 증식을 중단시키고 및/또는 항염증성 효과를 제공한다. 이러한 결과는 하기와 같이 사정될 수 있다:

[0098] - 세포 생존력/증식 (MTT 검정);

[0099] - 염증성 사이토킨 - IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-21/23 또는 TNF-α에 대한 효소 연결 면역흡착 검정 (ELISA) 또는

[0100] - EPCR에 대한 ELISA (R&D Systems, Inc., MN);

[0101] - 아폽토시스에 대해 프로피디움 요오드화물 (PI) 또는 PI + 아넥신으로 FACS 분석;

[0102] - 염증성 신호전달 분자, 예를 들면, NF-κB를 검출하기 위한 웨스턴 블롯을 계량하고;

[0103] 따라서 APC의 치료 효과량이 제공되었는지를 확립한다.

[0104] 다른 구체예에서, 상기 결과는 피부 영역 내에 피부 조직의 g당 1 ug 내지 100 mg의 APC에서 APC의 국부 조직 농도를 확립함으로써 획득된다. 이것은 국소 마취 하에 피부 펀치 생검을 동일한 만성 플라크로부터 채취함으로써 결정될 수 있다. APC의 양은 이후, 당분야에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 한 가지 실례에서, 생검 조직은 얼음 위에서 다져지고 용해된다. 원심분리 후, 투명한 상층액은 ELISA에 의해 PC 농도를, 그리고 발색기질 Spectrozyme PCa 검정 (American Diagnostica)에 의해 APC 활성을 계량하는데 이용된다. 효소 활성은 λ 450 nm에서 단위 시간당 산출된 유리 발색단의 흡광도에서 증가를 계량함으로써 결정된다.

[0105] 일정한 구체예에서, APC의 치료 효과량은 APC가 적용된 피부 영역의 cm^2당 0.1 μg 내지 5000 μg의 APC, 또는 APC가 적용된 피부 영역의 cm^2당 1 μg 내지 2000 μg의 APC, 또는 APC가 적용된 피부 영역의 cm^2당 10 μg 내지 1000 μg의 APC, 또는 APC가 적용된 피부 영역의 cm^2당 10 μg 내지 200 μg, 또는 10 μg 내지 400 μg, 또는 10 μg 내지 800 μg의 APC이다.

[0106]

[0107] APC는 질환의 성격에 따라, 주 1회 내지 하루 2회까지 투여될 수 있다. 이것은 일반적으로, 20 주 이내의 연속일, 또는 6 주 이내의 연속일 동안 제공된다.

[0108] <u>B.1 치료 방법 - 국소</u>

[0109] 예로서, 페이스트, 겔, 크림, 기름, 로션, 거품, 연고 또는 유사 물질을 이용한 국소 치료 방법은 유관한 피부 영역이 파열된 피부 표면을 내포하는 경우에 특히 유용한데, 그 이유는 이것이 염증성 각질형성세포가 소재하는 피부 조직의 유관한 층에 APC의 침투를 허용하기 때문이다. 하지만, 이들 치료는 또한, 피부 표면이 실제적으로 파열되지 않은 경우, 예를 들면, 건선성 플라크에도 적용될 수 있다.

[0110] 한 구체예에서, APC의 치료 효과량은 피부 영역의 cm^2당 0.1 내지 2000 μg, 바람직하게는 20 내지 200 μg의 APC일 수 있다. 더욱 높은 양은 일반적으로, 피부가 더욱 심하게 병든 경우에 바람직하고, 그리고 일반적으로, 병소가 궤양과 함께 존재하는 심각한 만성 플라크-유형 건선 [12보다 크거나 이와 동등한 건선 구역 심각도 지수 (PASI), 10보다 크거나 이와 동등한 체표면적 (BSA)]에 바람직한데, 여기서 APC는 궤양의 치유를 증진할 수 있다. 더욱 적은 양은 피부가 심하게 병들지 않은 경우, 예를 들면, 병소가 궤양 없이 존재하는 경우에 바람직하다.

[0111] 제제 내에 APC의 농도는 약 10 ug/ml 내지 1 mg/ml일 수 있고, 그리고 피부 영역에 적용된 조성물의 부피는 약 100 ul 내지 10 ml일 수 있다.

[0112] 일반적으로, 유관한 질환이 건선인 경우에, 조성물은 일반적으로 약 10 mm 두께, 바람직하게는 약 3 mm 두께 이내의 층에서 무균 표면, 예를 들면, 손가락 또는 주걱으로 피부에 제공된다. 이것은 이후, 피부 영역 및 주변 구역 내로 문질러지거나 또는 마사지된다. 이러한 적용은 일반적으로, 하루 1회 내지 주 1회이고, 그리고 일반적으로 20 주 이내, 또는 12 주 이내이다.

[0113] 유사한 적용 절차와 투약 섭생이 여드름 또는 아토피성 피부염의 치료에 적용될 수 있다.

[0114] 한 구체예에서, APC 내포 조성물은 고체 기질, 다시 말하면, 붕대, 드레싱 등에 적용되고, 그리고 상기 기질은 이후, 유관한 피부 영역에 고정된다.

[0115] <u>B.2 치료 방법 - 피내 주사</u>

[0116] 일정한 구체예에서, 상기 결과는 기준선보다 최소한 2배 높은 APC의 국부 농도를 확립함으로써 획득된다. APC의 이러한 양은 전술한 바와 같은 ELISA와 발색 기질 Spectrozyme PCa 검정을 이용하여 피부 생검의 APC 활성을 계

량함으로써 계량될 수 있다. 피내 또는 피하 주사는 일반적으로, 각질층이 무손상이고 주제 피부 층 전역에서 APC의 침투가 제한되는 성격일 때 투여 루트로서 바람직하다. 일반적으로, 1 ml 주사기에서 (~28-34G) 바늘 상에서 미세 게이지 바늘이 이용된다. 복수 주사가 cm^2당 ~1 주사로, 피부의 표면적을 커버하기 위해 제공될 수 있다. 주사마다 양은 10 μl 내지 1 ml에서 변할 것이고, 전형적인 양은 50 μl이다. 일반적으로, 투여는 하루 1회 내지 주 1회, 그리고 일반적으로 20 주 이내에 제공된다. 피내 또는 피하 주사가 APC의 주제 적용과 동시에 이용될 수 있다. 바람직한 처방은 건선 또는 아토피성 피부염이지만, 각질형성세포 과다증식에 의해 특징되는 다른 질환이 이러한 치료에 종속될 수 있다.

[0117] 피하/피내 투여의 예시적인 구체예는 병소가 궤양과 함께 또는 궤양 없이 존재하는 심각한 만성 플라크-유형 건선 [건선 구역 심각도 지수 (PASI) ≥ 12, 체표면적 (BSA) ≥ 10]에 유용할 수 있다. APC는 플라크 또는 병소의 크기에 따라, 12 주, 그 이후에 4-주 추적 조사 기간 동안 주 2회, 200 - 2000μg의 분량에서 피하 투여된다. 이러한 주사는 500μl 내지 5 ml, 바람직하게는 1 ml의 전체 부피를 갖는 30 게이지 바늘에 의해 수행된다. APC는 병소를 둘러싸는 동등하게-이격된 부위에서 수회 주사되고 (피내 또는 피하) - 병소가 <10 cm^2이면, 4개 부위가 있고, 그리고 부위와 투약의 숫자는 병소 크기에서 증가와 비례하여 증가한다. APC는 등장성 완충된 염 용액을 만들기 위해 물에서 용해된다. 필요하면, 이러한 치료는 국소 치료와 합동될 수 있다. 액체에서 APC는 피하 치료의 동일한 기간 동안 계속하여 매일 병소에 적용될 수 있다. 양쪽 연구 (국소 치료와 함께 또는 국소 치료 없이)에서, PASI, 의사의 정적 전반 평가 (sPGA), 건선 환자의 삶의 질 지수 (DLQI), 부작용, 그리고 일과적인 혈액학적 실험실 값 (가령, 사이토킨, 조직학적 검사, PC/APC 활성)이 분석될 수 있다. 예상된 결과: 12 주에서, 모든 환자에서 PASI의 >30% 향상 및 50%의 환자에서 PASI의 >60% 향상이 예상된다.

[0118] 한 구체예에서, 상기 설명된 방법은 피부 영역을 APC의 항염증성 양과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0119] 한 구체예에서, 상기 설명된 방법은 피부 영역을 APC의 성장 자극성 양과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0120] 한 구체예에서, 상기 설명된 방법은 피부 영역을 APC의 아폽토시스 유도성 양과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0121] C. APC 및 이의 제제

[0122] 앞서 설명된 방법에서 이용을 위한 APC는 조성물의 형태를 취하거나, 또는 만약 그렇지 않으면, 하기에 설명된 바와 같은 과정에 의해 획득될 수 있다.

[0123] APC는 혈장으로부터 정제된 단백질 C의 시험관내 활성화에 의해 제조되거나 또는 당분야에서 잘 알려진 방법에 의한 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 가령, U.S. 특허 번호 4,981,952, 5,151,268, 5,831,025, 6,156,734, 6,268,344, 그리고 6,395,270을 참조한다.

[0124] 대안으로, APC는 재조합 DNA 기술에 의해 직접적으로 제조될 수 있다. 가령, U.S. 특허 번호 4,981,952, 5,151,268, 6,156,734, 6,268,344와 6,395,270을 참조한다. 재조합 활성화된 단백질 C는 재조합 인간 단백질 C 효소원을 시험관내에서 활성화함으로써 또는 세포로부터 단백질 C의 활성화된 형태의 직접 분비에 의해 생산될 수 있다. 단백질 C는 예로서, 효소원으로서 인간 신장 293 세포로부터 분비를 포함하는 유전자도입 동물, 유전자도입 식물, 또는 다양한 진핵세포에서 생산되고, 이후 당업자에게 알려져 있는 기술에 의해 정제되고 활성화될 수 있다.

[0125] APC는 동물의 임의의 종으로부터 유래될 수 있지만, 인간 APC가 바람직하다.

[0126] APC의 단편과 유도체는 본원에서 설명된 활성을 전시한다면, 본 발명의 실시에 이용될 수 있다. 가령, U.S. 특허 번호 5,151,268, 5,453,373과 5,516,650, 그리고 PCT 출원 WO 89/12685, WO 01/56532, WO 01/59084와 WO 01/72328을 참조한다.

[0127] APC는 인간 APC의 단백분해, 아미도분해, 에스터분해, 그리고 생물학적 (항응고제, 항염증성, 또는 친-피브린용해) 활성 특징을 갖는 인간 APC의 유도체일 수 있다. 단백질 C 유도체의 실례는 Gerlitz, et al., U.S. 특허 번호 5,453,373, 그리고 Foster, et al., U.S. 특허 번호 5,516,650에 의해 설명되고, 이들의 전체 교시는 본원에서 참조로서 편입된다.

[0128] APC의 적합한 제약학적 조성물은 APC 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 가령, U.S. 특허 번호 6,395,270과 6,159,468, 그리고 PCT 출원 WO 98/48818, WO 01/56532와 WO 01/72328을 참조한다. APC-내포 조성물은 일반적으로, 증량제 (가령, 수크로오스, 만니톨, 트레할로스, 그리고 라피노오스), 염 (가령, 염화나트륨과 염화칼륨), 완충액 (가령, 나트륨 구연산염, Tris-아세트산염, 그리고 인산나트륨), 그리고 APC를 포함하는 높은 순도 안정된 냉동건조된 산물일 수 있다. 예로서, 안정된 냉동건조된 조성물은 약 1 분율 APC, 약 7-8 분율 염, 그리고 약 5-7 분율 증량제의 중량 비를 포함한다. 이런 안정된 냉동건조된 조성물의 실례는 바이알당 5.0 mg APC, 30 mg 수크로오스, 38 mg NaCl, 그리고 7.56 mg 구연산염, pH 6.0이다.

[0129] <u>C.1 국소적으로 투여된 제제</u>

[0130] 한 가지 특히 바람직한 구체예에서, APC는 상기 섹션 B에서 설명된 방법에 따라, 유관한 장애의 개체의 유관한 피부 병소, 플라크 또는 다른 피부 표면에 국소 투여에 적합된 조성물 또는 제제의 형태로 제공된다. 이런 제제의 실례는 유관한 부위에 APC의 국부 투여를 가능하게 하는 유관한 표면에 직접적으로 적용될 수 있는 것들을 포함한다. 이들 제제에는 겔, 기름, 스프레이, 제제에서 롤, 연고, 로션, 거품 등이 포함된다. 한 구체예에서, APC는 메틸-셀룰로오스 겔의 형태로 제공되고, 그리고 안정제, 예를 들면, 탄수화물과 염을 내포할 수 있다.

[0131] 피부 연고는 통상적으로 석유계 유분 기부에서 유기, 건강, 미모 또는 약용 성분의 조합일 수 있다. 이것은 피부 연고에 신체의 표면 상에 더욱 오래 머무르는 더욱 두꺼운, 덜 수용성 배합식 (formula)을 제공하고, 따라서 이들 성분은 매우 다양한 문제점을 치료하는데 더욱 효과적으로 작용할 수 있다. 기업 (가령, Therapex)으로부터 주문될 수 있는 많은 자연과 유기 피부 연고가 있다.

[0132] 클로베타솔 프로피온산염 (CP) 거품 (0.05%) 역시 이용될 수 있다. 이것은 미국에서 코르티코스테로이드-반응성 피부장애의 염증성과 소양성 소견, 그리고 캐나다에서 중등도 내지 중증도 아토피성 피부염의 염증성과 소양성 소견의 치료에 이용되고 있는 유제 에어로졸 거품이다 (Olux-E (클로베타솔 프로피온산염) 거품, 0.05% Stiefel Laboratories Inc, Research Triangle Park, NC (2011).

[0133] 제제가 겔인 경우에, 제제는 APC를 10-5000 μg/g 겔의 양으로 내포할 수 있다.

[0134] <u>C.2 주사가능 제제</u>

[0135] APC의 특히 바람직한 제제는 상표 Xigris™ 하에 Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana에 의해 판매되는

제품이다. Xigris™은 정맥내 주입을 위해 무균, 냉동건조된 분말로서 공급된다. Xigris™의 5 mg 바이알은 5.3 mg/바이알의 인간 재조합 APC, 31.8 mg/바이알 수크로오스, 40.3 mg/바이알 NaCl, 그리고 10.9 mg/바이알 나트륨 구연산염을 내포하고, 그리고 20 mg 바이알의 Xigris™은 20.8 mg/바이알의 인간 재조합 APC, 124.9 mg/바이알 수크로오스, 158.1 mg/바이알 NaCl, 그리고 42.9 mg/바이알 나트륨 구연산염을 내포한다. 이들 바이알은 약 2 mg/ml APC의 농도를 제공하기 위해 주사용 무균수, USP로 재구성되고, 그리고 이러한 희석된 APC는 이후, 환자에 투여를 위한 약 100 내지 약 5000 μg/ml APC의 농도를 제공하기 위해 0.9% 염화나트륨 주사에 첨가된다. 이것은 특히, 상기 섹션 B 하에 설명된 바와 같은 피하 주사 기술에 의한 APC의 투여에 바람직한 제제이다.

[0136] 국소적으로 또는 피하 주사에 의해 투여되는 지와 상관없이, 일정한 구체예에서, 유관한 제제는 단백질 C를 APC의 대안으로서, 또는 APC에 더하여 내포할 수 있다. 예로서, 단백질 C의 효과량이 투여될 수 있고, 이것은 내인성 단백질 C 경로에 의해 생체내에서 활성화되어 APC를 생산할 것이다. 가령, U.S. 특허 번호 5,151,268 및 PCT 출원 WO 93/09807을 참조한다. 전술한 바와 같이, 단백질 C는 혈장으로부터 정제될 수 있고 또는 재조합 DNA 기술에 의해 만들어질 수 있다. 가령, U.S. 특허 번호 4,959,318, 4,981,952, 5,093,117, 5,151,268, 5,571,786, 6,156,734, 6,268,344, 그리고 6,395,270을 참조한다. 단백질 C를 포함하는 적합한 제약학적 조성물은 알려져 있다 (가령, U.S. 특허 번호 5,151,268과 5,571,786 참조).

[0137] APC의 내생성 생산은 또한, 동물에서 단백질 C의 합성을 증가시키는 작용제의 일정량을 투여함으로써 증가될 수 있다. 가령, PCT 출원 WO 93/09807을 참조한다. 적합한 작용제에는 동화작용 스테로이드 (가령, 다나졸롤)를 포함한다. 가령, PCT 출원 WO 93/09807을 참조한다.

[0138] 일정한 구체예에서, APC의 내생성 생산은 내생성으로 합성된 단백질 C 및/또는 공동-투여된 단백질 C로부터 생체내 APC의 생산을 유발하는데 효과적인 단백질 C 활성제의 일정량을 투여함으로써 증가될 수 있다. 가령, PCT 출원 WO 93/09807을 참조한다. 단백질 C 활성제는 APC의 발생을 유발하거나 또는 증가시키는 임의의 화합물이다. 적합한 단백질 C 활성제에는 트롬빈, α-트롬빈, 활성 부위 아실화된 트롬빈, 트롬빈 유사체와 돌연변이체 (가령, 트롬빈 E192Q와 트롬빈 K52E), 가용성 트롬빈-트롬보모듈린 복합체, 트롬빈-트롬보모듈린 복합체의 청소 또는 붕괴를 예방하는 작용제, 트롬보모듈린의 합성을 증강하는 또는 청소를 지연시키는 작용제, 독액 (가령, Protac 또는 Russel 살무사 독액), 인자 Xa, 플라스민, 트립신, 그리고 단백질 C로부터 APC의 발생을 유발하거나 또는 증가시킬 수 있는 임의의 다른 독액, 효소 또는 화합물이 포함된다. 가령, PCT 출원 WO 93/09807을 참조한다. 바람직한 단백질 C 활성제는 트롬빈 및 활성 부위 아실화된 트롬빈이다.

[0139] 일부 구체예에서, APC는 염증, 세포 증식과 아폽토시스 중에서 하나 또는 그 이상을 제어하기 위한 다른 작용제와 함께 투여될 수 있다. 한 가지 특히 바람직한 작용제는 항-IL-17 항체, 특히 이제키주맙인데, 이것은 만성 플라크 건선을 앓는 환자에서 2 단계 연구 동안 위약과 비교하여 피부 질환 심각도 점수에서 유의미한 향상을 보였다 (NEJM, 2012). 염증을 제어하기 위한 작용제의 다른 실례에는 TNF-α 저해제와 항염증성 사이토킨과 생물약제가 포함된다.

[0140] 본 명세서에서 개시되고 정의된 발명은 본문 또는 도면으로부터 언급되거나 또는 분명한 개별 특질 중에서 2개 또는 그 이상의 모든 대안적 조합까지 확장되는 것으로 이해될 것이다. 이들 상이한 조합 모두 본 발명의 다양한 대안적 양상을 구성한다.

[0141] 본 발명의 추가 양상 및 전술한 단락에서 설명된 양상의 추가 구체예는 실례로서 제공된 하기 설명으로부터, 그리고 첨부 도면을 참고로 하면 명백해질 것이다.

[0142] **실시예**

[0143] 실시예 1. 느린 성장, 비 염증성 각질형성세포와 건선 피부 각질형성세포에서 APC의 선별적인 항-아폽토시스 활성을 확립하는 전임상 시험

[0144] 활동성 만성 플라크 건선을 앓는 6명 환자 및 6명 정상적인 개체가 모집된다. 이들은 시료재취에 앞서 최소한 4 주 동안 어떤 치료도 받지 않았다. 2개의 6-mm 펀치 생검이 국부 마취 하에 동일한 만성 플라크로부터 채취된다. 각질형성세포는 이전에 설명된 바와 같이 단리된다 (20).

[0145] 정상적인 각질형성세포는 건선성 표현형을 유도하기 위해 사이토킨의 혼합물 [IL-1α (10 ng/ml), IL-6 (5 ng/ml), TNF-α (5 ng/ml), IL-17A (10 ng/ml)]로 처리된다. APC는 1, 10 μg/ml에서 각질형성세포에 첨가되고 24, 48과 72 시간 동안 처리된다. 세포 증식/생존은 MTT 검정, Brdu 증식 검정을 이용하여 조사된다. 세포 아폽토시스는 TUNEL 검정, 유세포분석법 (프로피디움 요오드화물 (PI) 또는 PI + 아넥신-V)에 의해 조사된다. 사이토킨 생산 및 4개의 선별된 건선-연관된 유전자 TNF, DEFB4, CAMP, PI3은 RT-실시간 PCR과 ELISA에 의해 검출된다. 아폽토시스 신호 분자 카스파제-3, 8과 9 및 MAK 키나아제 ERK의 활성화와 발현은 웨스턴 블롯에 의해 검출된다.

[0146] 이들 결과는 APC가 정상적인 각질형성세포의 성장과 생존을 자극하면서, 건성성 각질형성세포의 아폽토시스를 유도하고 이들의 성장을 늦춘다는 것을 보여줄 것이다. APC는 또한, 염증성 사이토킨 IL-1, TNF-α, IL-17과 IL-6 및 건선-연관된 분자 TNF, DEFB4, CAMP, PI3의 수준을 감소시킨다. 염증 매개체로 처리된 정상적인 대조 세포에서, 세포 성장은 증강되고, 그리고 APC의 첨가는 이러한 효과를 반전시킨다. 전반적으로, 이들 결과는 APC가 건선성 각질형성세포와 연관된 염증을 저해할 뿐만 아니라, 이들 세포와 연관된 특징적인 과잉의 증식을 감소시킬 수 있다는 것을 명확하게 보여줄 것이다.

[0147] 실시예 2. 12 주에 걸쳐 피하 APC로 2 단계 파일럿 시험

[0148] 환자 선별: 심각한 만성 플라크-유형 건선 [건선 구역 심각도 지수 (PASI) ≥ 12, 체표면적 (BSA) ≥ 10]을 앓는 5명 환자가 등록된다. 일차 포함 기준은 최소한 6 개월 동안 안정된 플라크 건선을 갖는 18세 내지 70세 환자를 포함한다. 일차 배제 기준은 하기를 포함한다: i) 비-플라크 또는 약물-유도된 건선을 앓는 환자; ii) 연구에 앞서 28 일 이내에 생물학적 제제, 예를 들면, 리툭시맙, 아바타셉트, 인플릭시맙, 아달리무맙, 시클로스포린, 또는 미코페놀산과 에타네르셉트 또는 아나킨라의 복용; iii) 연구에 앞서 8 주 동안 임의의 광선요법, 그리고 연구에 앞서 4주 동안 블랜드 피부연화제 이외의 건선에 대한 임의의 표준 국소 요법으로 치료를 비롯한 항건선성 치료를 받은 환자; iv) 연구 동안 국소 요법의 이용은 두피, 겨드랑이, 그리고 사타구니 단독에서 클래스 III 내지 VII 글루코코르티코이드에 국한된다; v) 임의의 활동성 또는 최근 감염의 증거, 또는 악성 또는 다른 자가면역 질환의 병력. 임신 여성 역시 배제 기준이다.

[0149] 치료: 환자는 최대 12 주 동안 또는 플라크가 소실될 때까지 400 ug APC/플라크가 주 2회 피하 투여된다. APC는 말초 주변 (이전에 설명된 바와 같이) 및 건선성 플라크 아래에 고르게 주사되고, 그리고 운반제 단독 (위약)은 다른 신체 면 상에 대칭적으로 국부화된 대조 플라크 내로 유사하게 주사된다. 환자는 이후, 최종 치료 후 추가 4 주 동안 추적 조사된다.

[0150] 계량: PASI, 의사의 정적 전반 평가 (sPGA), 건선 환자의 삶의 질 지수 (DLQI), 부작용, 그리고 일과적인 혈액학적 실험실 값 (가령, 사이토킨, 조직학적 검사, PC/APC 활성)이 분석된다. 안전성 고려 사항은 출혈 위험, 두통, 피로, 감염과 알레르기를 포함한다. 유관한 세포와 생화학 이벤트는 백혈구, 호중구와 혈소판 계수; 혈청에

서 응고 활성, PC/APC 수준 및 APC에 대한 항체 형성을 포함한다. PC/APC와 EPCR의 조직학적 검사, 그리고 주요 건선성 파라미터, 예를 들면, 극세포증, 과다각화증, 그리고 이상각화증, 표피의 유사분열 활성, 유두상 부종, 모세관의 팽창과 비틀림, 그리고 피부, 유극층 뿐만 아니라 각질층 각각에서 호중구의 평가를 수행하기 위해 4 mm 생검이 채취된다.

[0151] 통계학적 분석: 기준선 값, 치료 동안 여러 주에서 값, 그리고 치료 후 4 주 시점에 값이 1-측 2-시료 *t*-검증을 이용하여, 0.05의 유의성 수준에서 비교된다.

[0152] 결과와 토론: APC 치료는 안전하고 충분히 용인되는 것으로 밝혀지고, 그리고 환자는 건선 병소의 최소한 60% 소실을 보이고, 5명 환자 중에서 3명은 플라크의 완전한 소실을 보일 것이다. APC의 효과는 4 주 추적 조사 동안 지속될 것이다. 모든 환자는 치료에 응하여 향상된 PASI, sPGA, DLQI, 그리고 역효과 없음과 형성된 APC 항체 없음을 보일 것이다. 피부에서 표피와 염증 세포의 두께에서 유의미한 감소, 그리고 EPCR의 각질형성세포 발현에서 증가가 관찰될 수 있지만, 순환하는 PC/APC 수준은 영향을 받지 않는다. 전반적으로, 이들 결과는 APC가 안전하고, 충분히 용인되고, 그리고 건선 플라크에 고도로 유효하다는 것을 보여줄 것이다.

[0153] <u>실례 3. 10명 환자에서 보통 여드름에 대한 피하 aPC로 2 단계 파일럿 시험</u>

[0154] 환자 선별: 보통 여드름을 앓는 10명 환자가 등록된다. 일차 포함 기준은 하기를 포함한다: 최소한 6 개월 동안 양측성 안면 여드름을 앓는 18세 내지 30세 환자. 일차 배제 기준은 임의의 활동성 또는 최근 감염의 증거, 또는 악성 또는 다른 자가면역 질환의 병력, 임신 여성을 포함한다.

[0155] 치료: 환자는 12 주 동안 또는 여드름이 소실될 때까지 겔 형태의 200 ug APC가 하루 1회 투여된다. 이들 환자는 L과 R로 표시된 겔의 2개 튜브가 제공되고 튜브로부터 압착된 2 cm의 겔을 지정된 병든 구역에 적용하고 (얼굴의 왼쪽에서 L 및 얼굴의 오른쪽에서 R) 고르게 문지르도록 권고된다. 환자는 이후, 최종 치료 후 추가 4 주 동안 추적 조사된다.

[0156] 계량: 사진은 치료 전 및 4 주마다 촬영되고, 그리고 여드름 구역은 컴퓨터-보조 영상 분석을 이용하여 계산된다. 부작용, 그리고 일과적인 혈액학적 실험실 값 (가령, 사이토킨, 조직학적 검사, PC/APC 활성)이 분석된다. 출혈 위험, 두통, 피로, 감염, 알레르기를 비롯한 안전성이 모니터링된다. 유관한 세포와 생화학 이벤트는 백혈구, 호중구와 혈소판 계수; 혈청에서 응고 활성, PC/APC 수준 및 APC에 대한 항체 형성을 포함한다.

[0157] 통계학적 분석: 기준선 값, 치료 동안 여러 주에서 값, 그리고 치료 후 4 주 시점에 값이 1-측 2-시료 *t*-검증을 이용하여, 0.05의 유의성 수준에서 비교되었다.

[0158] 결과와 토론: APC 치료는 안전하고 충분히 용인되는 것으로 밝혀지고, 그리고 환자는 여드름의 최소한 50% 소실을 보일 것이다. APC의 효과는 4 주 추적 조사 동안 지속될 것이다. 치료에 응하여 역효과 및 형성된 APC 항체가 없을 것이다. 피부에서 표피와 염증 세포의 두께에서 유의미한 감소, EPCR의 각질형성세포 발현에서 증가가 관찰될 것이지만, 순환하는 PC/APC 수준은 영향을 받지 않는다. 전반적으로, 이들 결과는 APC가 안전하고, 충분히 용인되고, 그리고 보통 여드름에 고도로 유효하다는 것을 보여줄 것이다.

[0159] <u>실시예 4. 겔 제제와 치료적 적용</u>

[0160] 본 실시예는 활성 성분 활성화된 단백질 C 및 하기 불활성 성분을 내포하는 비-무균, 낮은 생물부하, 보존된, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스-기초된 국소 겔을 제공한다: 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 빙초산, 1-리신 염산염, m-크레졸, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 아세트산나트륨 삼수화물, 염화나트륨, 그리고 주사용수. 각 그램의 겔은 100 ug 활성화된 단백질 C를 내포한다.

[0161] <u>실시예 5. 겔 제제와 치료적 적용</u>

[0162] Carbopol®*Ultrez 30 중합체 (Lubrizol Advanced Materials, Inc)는 pH 4에서 이러한 차가운 과정 조제에서, 1% 살리실산과 5%의 전해질 내포 추출물의 존재에서 잔탄 검과 병용으로 우수한 점성을 제공한다. 글리세린과 함께 Glucam™* E 20 보습제는 보습성을 부여한다. 하기는 배합식이다.

[0163] INCI 이름, 상표명 중량 % 기능

[0164] A. 1. 탈이온수 79.15 희석제

[0165] 2. 이나트륨 EDTA, 0.05 킬레이트화제

[0166] *Protechem NA2*

[0167] 3. 카보머, 0.80 유동학 조절제

[0168] *Carbopol®* Ultrez 30 중합체*

[0169] B. 4. 글리세린, 2.00 보습제

[0170] *글리세린, 99.7% USP*

[0171] 5. 메틸 Gluceth-20, 1.00 보습제

[0172] *Glucam™* E-20 보습제*

[0173] 6. 잔탄 검, 0.25 농후제

[0174] *Keltrol® CG*

[0175] C. 7. 나트륨 수산화물 (18% 용액) 1.75 중화제

[0176] D. 8. 부틸렌 글리콜 6.00 용해화제

[0177] 9. 알코올, 2.00 용해화제

[0178] *에틸알코올*

[0179] 10. 살리실산 1.00 항-여드름 작용제

[0180] E. 11. PEG-40 수소첨가된 피마자 기름, 0.25 용해화제

[0181] *Cremophol® CO-40*

[0182] 12. 라우릴 젖산염, 0.25 피부연화제

[0183] *Schercemol™*LL 에스테르*

[0184] F. 13. 페녹시에탄올 (및) 에틸헥실글리세린, 0.50 보존제

[0185] *Euxyl® PE 9010*

[0186] 14. 물, 글리세린 5.00 항-자극제

[0187] 절차:

[0188] 1. 부분 D 성분을 합치고, 그리고 살리실산 결정이 완전히 용해될 때까지 혼합한다. 후기 첨가를 위해 한쪽으로 치워둔다.

[0189] 2. 이나트륨 EDTA를 물에 용해시킨다. 이나트륨 EDTA가 완전히 용해될 때, 혼합 속도를 @400-500 rpm에 설정하고 Carbopol®* Ultrez 30 중합체를 물 내로 천천히 분산시킨다. 중합체가 완전히 수화될 때까지 혼합을 계속한다.

[0190] 3. 부분 B 성분을 균일한 슬러리 내로 예혼합한다. 부분 A에 첨가한다. 균일성을 유지하기 위해 필요에 따라 혼합 속도를 증가시킨다.

[0191] 4. 부분 C를 부분 A/B에 첨가하고 균일성을 유지하기 위해 필요에 따라 혼합 속도를 증가시킨다. 10 분 동안 혼합을 계속한다.

[0192] 5. 부분 D를 배치 (batch)에 첨가하고 점성 변화에 기인한 임의의 튀기를 감소시키기 위해 필요에 따라 혼합 속도를 조정한다. 균일할 때까지 혼합한다.

[0193] 6. 부분 E 성분을 예혼합하고 배치에 첨가한다. 균일할 때까지 혼합한다.

[0194] 7. 부분 F 성분을 개별적으로 첨가하고 첨가 사이에 충분히 혼합한다. APC는 10-5000 μg/g 겔 또는 0.01-0.05 w/w%의 양으로 첨가된다.

[0195] 이러한 겔은 병소 구역에 직접적으로 적용될 수 있다.

[0196] <u>실시예 6. 제제에서 스프레이와 치료적 적용</u>

[0197] APC는 주사에 의해 APC에 대해 전술한 바와 같은 등장성 무균 용액에서 가용화되었다. 스프레이 전달은 바이알의 내용물을 뽑기 바늘을 이용하여 2.5 ml 주사기 내로 뽑아냄으로써 달성되었다. 살균된 스프레이 노즐이 주사기의 단부에 달리고 (바늘 대신에), 그리고 치료제 (APC 또는 식염수)가 전체 병든 표면을 커버하기 위해 플라크 위에 고르게 분무되었다. 따라서, 원자화를 획득하기 위한 추진제가 필요하지 않고, 단지 압력만 주사기에 적용되었다. 적용은 필요에 따라, 바람직하게는 하루 1회 반복되었다. 이러한 기술은 치료의 고른 적용범위를 제공하는 일관된 방식으로 수행하고 반복하기가 용이하다.

[0198] <u>실시예 7. 정상적인 각질형성세포에 대한 항-아폽토시스 효과 및 과증식성 각질형성세포에 대한 아폽토시스 효과의 사정을 위한 기술.</u>

[0199] 본 발명에 따라, APC의 치료 효과량은 일반적으로, 정상적인 각질형성세포에 대한 항-아폽토시스 효과 및 과증식성 각질형성세포에 대한 아폽토시스 효과를 제공한다. 이러한 결과는 하기와 같이 시험관내 또는 원지 사정될 수 있다:

[0200] 시험관내 방법 1.

[0201] 처리되지 않은 활동성 건선성 피부는 생검 펀치를 이용하여 제거되고 각질형성세포가 단리된다. 간단히 말하면,

세포 (3000개 세포/웰)는 96 웰-평판에서 200 μl의 최종 부피까지 파종되고, 이후 세포가 부착할 수 있도록 4 시간 동안 배양된다. 세포는 이후, 0.1, 1과 10 μg/ml에서 APC로 72 시간 동안 처리된다.

[0202] 1) MTT 검정에 의한 세포 생존/성장률: 이러한 검정에서, 생존가능 세포의 미토콘드리아 탈수소효소는 테트라졸륨 고리를 개열하고, 수용액에서 불용성인 자주색 MTT 포르마잔 결정을 산출한다. 이들 결정은 산성화된 이소프로판올에서 용해될 수 있다. 결과의 자주색 용액은 분광광도법적으로 계량된다. 세포 숫자에서 증가는 형성된 MTT 포르마잔의 양에서 증가 및 흡광도에서 증가를 유발한다. 치료의 완결에 앞서 3 시간 시점에, 10 μl의 5 mg/ml MTT가 세포에 첨가된다. 3 시간 추가 배양 후, MTT 용액이 제거되고 100 μl DMSO에 의해 대체된다. 각 웰의 광학 밀도는 630 nm의 참고 파장에서 570 nm의 파장에서 결정된다. 세포의 생존력은 OD에 직접적으로 관련된다. APC는 생존력을 용량-의존성 방식으로 감소시켰다.

[0203] 2) 아폽토시스 속도 검출은 TUNEL 검정, 프로피디움 요오드화물 (PI) 또는 PI + 아넥신-V)를 이용한 FACS 분석 및 활동성 카스파제 활성에 의해 달성되었다.

[0204] TUNEL 검정은 제조업체 (Roche Diagnostics Australia Pty. Ltd., NSW, Australia)의 사용설명서에 따라, 원지 세포 사멸 검출 키트를 이용하여 수행된다. 간단히 말하면, 세포는 새로 제조된 0.1% 나트륨 구연산염에서 0.1% Triton X-100으로 투과화되고, 그리고 플루오레세인-표지화된 dUTP의 존재에서 말단 데옥시뉴클레오티딜 전달효소와 함께 배양되었다 (37℃에서 60 분). TUNEL 양성 세포는 항-플루오레세인 페록시다아제 (POD) 접합된 항체와 POD 기질 반응을 이용하여 가시화되었다. 절편은 DAPI로 대비 염색되었다. 아폽토시스 세포의 빈도는 높은 확대상 (40 x) 하에 TUNEL 양성 세포와 총 세포 수를 계수하고 TUNEL 양성 세포의 백분율을 계산함으로써, 1명의 블라인드된 조사관에 의해 결정되었다.

[0205] FACS 분석: 각질형성세포는 트립신처리되고 FACS 세척 완충액 (5% FCS를 포함하는 PBS)로 세척된다. 200 μl 세포 현탁액은 프로피디움 요오드화물 (PI) 또는 PI + 아넥신-V 또는 접합된 항체와 함께 배양되고, 그리고 차후에, 세포 주기/세포 아폽토시스와 단백질 발현에 대해 유세포분석기에 의해 검출된다. 자료는 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 분석된다.

[0206] 활동성 카스파제 활성은 웨스턴 블롯에 의해 검출된다. 처리 이후에, 각질형성세포는 PBS로 3회 세척되고, 그리고 단백질분해효소 저해제와 인산염 저해제 (Roche, Indianapolis, IN, USA)로 보충된 용해 완충액 (0.15 M NaCl, 0.01 mM PMSF, 1% NP-40, 0.02 M Tris, 6 M 요소/H_2O)이 첨가되었다. 세포 용해물은 10,000g에서 15 분 동안 원심분리되고, 그리고 상층액은 10% 나트륨-도데실-황산염 폴리아크릴아미드-겔 전기영동 (SDS-PAGE)에 의해 분리되고 PDVF 막에 이전되었다. 항-인간 카스파제-3, 8과 9 항체가 검출된다. 면역반응성은 ECL 검출 시스템 (Amersham, Piscataway, NJ)을 이용하여 검출된다. 항-인간 β-액틴 항체는 불평등 로딩에 대해 정규화하기 위해 포함된다.

[0207] 모든 아폽토시스 검정에서, APC는 빠른-성장 각질형성세포의 아폽토시스를 증진한다.

[0208] 시험관내 방법 2.

[0209] 목적은 APC-처리된 플라크로부터 각질형성세포가 위약-처리된 세포보다 더욱 쉽게 아폽토시스되는 지를 결정하기 위한 것이다. APC는 0.5ml 주사기의 단부에서 살균된 스프레이 노즐을 이용하여, 2가지 방법: i) 국소 주사 (100 ng - 1 mg); ii) 용액 분무 (10 ng - 1 mg)에 의해 건선성 플라크 (크기에서 ~5 - 50 cm^2)에 전달된다. APC 또는 위약으로 처리된 활동성 건선성 피부는 생검 펀치를 이용하여 제거되고 각질형성세포가 단리된다. 세

포는 전술한 바와 같이, FACS 분석을 이용하여 아폽토시스에 대해 즉시 계량된다. 결과는 위약-처리된 피부와 비교하여, APC-처리된 피부로부터 훨씬 높은 수준의 아폽토시스 세포가 존재한다는 것을 지시하였다.

[0210] 원지 방법

[0211] 원지 세포 아폽토시스: 목적은 APC-처리된 플라크로부터 각질형성세포가 위약-처리된 세포보다 더욱 쉽게 아폽토시스되는 지를 결정하기 위한 것이다. APC는 0.5ml 주사기의 단부에서 살균된 스프레이 노즐을 이용하여, 2가지 방법: i) 국소 주사 (100 ng - 1 mg); ii) 용액 분무 (10 ng - 1 mg)에 의해 건선성 플라크 (크기에서 ~5 - 50 입방 cm)에 전달된다. APC 또는 위약으로 처리된 활동성 건선성 피부는 생검 펀치를 이용하여 제거된다. 피부는 고정되고, 그리고 세포 아폽토시스는 제조업체 (Roche Diagnostics Australia Pty. Ltd., NSW, Australia)의 사용설명서에 따라, 원지 세포 사멸 검출 키트를 이용하여 검출된다. 간단히 말하면, 세포는 새로 제조된 0.1% 나트륨 구연산염에서 0.1% Triton X-100으로 투과화되고, 그리고 플루오레세인-표지화된 dUTP의 존재에서 말단 데옥시뉴클레오티딜 전달효소와 함께 배양된다 (37℃에서 60 분). TUNEL 양성 세포는 항-플루오레세인 페록시다아제 (POD) 접합된 항체와 POD 기질 반응을 이용하여 가시화된다. 절편은 DAPI로 대비 염색된다. 아폽토시스 세포의 빈도는 높은 확대상 (40 x) 하에 TUNEL 양성 세포와 총 세포 수를 계수하고 TUNEL 양성 세포의 백분율을 계산함으로써, 1명의 블라인드된 조사관에 의해 결정된다. APC로 처리된 피부는 위약-처리된 피부와 비교하여, 훨씬 높은 수준의 TUNEL-양성 아폽토시스 세포를 갖는다.

[0212] 건선의 생쥐 모델

[0213] 건선 이종이식편 SCID 생쥐 모델 (82마리 생쥐 필요)은 이전에 설명된 바와 같이 수행된다 (Raychaudhuri, 2001 Br. J. Dermatol). 간단히 말하면, 인간 건선성 플라크 (1 cm^2)는 전층 피부 시료를 제거한 후, ~ 8-주령 SCID 생쥐의 배부 내로 합체된다. 건선성 이식편은 3-4 주 이내에 받아들여지고, 그리고 건선-유사 질환은 최소한 10 주 동안 유지된다. APC는 건선 발생 후, 병든 피부 (8/군)에서 0.5ml 주사기의 단부에서 살균된 스프레이 노즐을 이용하여, 2가지 방법: i) 피내 주사 (10 ng - 100 ug); ii) 용액 분무 (10 ng - 100 ug)에 의해 최대 8 주 동안 3회/주 전달된다. 생리 식염수는 위약 대조로서 이용된다. 0 일자 (치료 전)와 28 일자 (치료 후)에 채취된 펀치 생검 (2 mm)은 즉시 동결되고, 그리고 표피 두께, 망상돌기 길이 (표피 두께의 지표)와 염증 세포 침윤을 결정하는 면역염색과 조직학을 위해 처리된다. 28 일자에, 피부는 염증 매개체, 분화 마커와 접합 단백질을 계량하기 위해 수집된다. APC 치료는 피부의 두께 및 염증 세포, 특히 호중구와 T 세포의 숫자를 감소시킨다. 위약과 비교하여, APC-처리된 피부에서 염증성 사이토킨, 특히 종양 괴사 인자-α가 감소되고, 그리고 접합부-연관된 단백질, 특히 조나 오클루덴스-1 클라우딘, 오클루딘, 그리고 JAM-A가 증가된다.

[0214] BrdU 함입을 이용한 세포 증식: DNA 합성을 겪는 세포의 표지화를 달성하기 위해, 성체 생쥐는 안락사 2 시간 전에 BrdU (100 mg kg)의 1회 주사를 받고, 그리고 생쥐 피부가 수집되고 10% 포르말린으로 고정된다. 증식성 세포는 항-BrdU 항체로 면역염색에 의해 검출된다. APC-처리된 세포는 훨씬 적은 BrdU 함입을 전시하고, 이것은 더욱 낮은 증식 능력을 표시한다.

[0215] <u>실시예 8. 5명 환자에서 1 개월에 걸쳐 피하 APC로 2 단계 파일럿 시험</u>

[0216] <u>환자</u>

[0217] 최소한 6 개월 동안 안정된 플라크 건선을 갖는 18세 내지 70세 환자는 광선요법 또는 전신성 건선 요법을 받았거나, 또는 광선요법 또는 전신성 건선 요법의 후보이었다.

[0218] 배제:

[0219] 비-플라크 또는 약물-유도된 건선을 앓는 환자.

[0220] 연구에 앞서 8 주 동안 임의의 광선요법, 그리고 연구에 앞서 4주 동안 블랜드 피부연화제 이외의 건선에 대한 임의의 표준 국소 요법으로 치료를 비롯한 항건선성 치료를 받은 환자. 연구 동안 국소 요법의 이용은 두피, 겨드랑이, 그리고 사타구니 단독에서 클래스 III 내지 VII 글루코코르티코이드에 국한될 것이다.

[0221] 연구에 앞서 3 주 동안 감염에 대한 임상 증거를 갖는 환자, 그리고 암의 병력이 있는 환자.

[0222] <u>연구 설계</u>

[0223] 5명 환자에서 1 개월 동안 매주 피하 APC (100 ug)로 2 단계 파일럿 시험.

[0224] <u>APC 투여 프로토콜</u>.

[0225] 만성 플라크 건선을 앓는 5명의 다른 점에서는 건강한, 남성 환자가 APC로 치료를 위해 선택된다. 상기 약물은 100 ug의 용량에서 4 주의 기간에 걸쳐 주 1회 투여된다.

[0226] APC는 건선성 플라크 아래에 직접적으로 피하 주사되고, 그리고 운반제 단독 (위약)은 다른 신체 면 상에 대칭적으로 국부화된 대조 플라크 아래에 주사된다. 다른 2개에 필적하는 대조 플라크는 주사 없는 연구를 위해 선별된다.

[0227] <u>보고</u>

[0228] 기술적 분석 (기준선)

[0229] 의사의 정적 전반 평가, 사전 국소 치료, 사전 광선요법, 사전 전신 요법, 사전 생물학적 요법에 의해 사정된, 기준선 인구학적 특징 (연령, 중량, BMI, 인종)과 질환 특징 (건선의 지속 시간, 건선에 의해 영향을 받는 신체 구역의 백분율, 평균 PASI 점수, 현저한 또는 심각한 건선의 존재).

[0230] <u>효능과 안전성 평가</u>

[0231] 사진 기록문서 및/또는 20 mHz 초음파에 의한, 1 일 (요법 전) 내지 요법의 중단 후 3 일 (31 일자)까지 효능.

[0232] 3개의 상이한 플라크 (APC와 운반제 투여의 부위 포함)는 에코-불량한 띠 (위쪽 피부에서 표피 극세포증과 침윤물 둘 모두를 나타낸다)에서 감소, 각 환자의 건선 구역 심각도 지수 (PASI)에서 백분율 향상을 결정하기 위해 각 환자에서 상세하게 모니터링된다.

[0233] 조직학적 검사와 면역-조직화학적 검사뿐만 아니라 mRNA를 위한, APC 전 4 일자, 1 주 시점, 그리고 24 일자 (요법의 종결)에 피부 생검 (4-mm 펀치 생검).

[0234] 조직학과 면역조직화학

[0235] 조직학적 조사는 피부, 유극층 뿐만 아니라 각질층 각각에서 주요 건선성 파라미터, 예를 들면, 극세포증, 과다각화증, 그리고 이상각화증, 표피의 유사분열 활성, 유두상 부종, 모세관의 팽창과 비틀림, 그리고 호중구의 평가를 포함한다.

[0236] 면역조직화학 조사

[0237] 안전성

[0238] 부작용, 심각한 부작용, 일과적인 혈액학적 값과 실험실 값, APC에 대한 항체 형성.

[0239] 부작용과 소양증

[0240] 지연형 과민 반응 (DTH)

[0241] **참고문헌**

[0242] 1. Chiricozzi, A., Guttman-Yassky, E., Suarez-Farinas, M., Nograles, K. E., Tian, S., Cardinale, I., Chimenti, S., and Krueger, J. G. (2011) J Invest Dermatol 131, 677-687

[0243] 2. Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., and Nickoloff, B. J. (2009) Nat Rev Immunol 9, 679-691

[0244] 3. Pasparakis, M. (2009) Nat Rev Immunol 9, 778-788

[0245] 4. Pasparakis, M. (2012) Immunol Rev 246, 346-358

[0246] 5. Zanni, G. R. (2012) Consult Pharm 27, 86-88, 90, 93-86

[0247] 6. Berth-Jones, J., and Hutchinson, P. E. (1992) Br J Dermatol 127, 71-78

[0248] 7. Kurian, A., and Barankin, B. (2011) Skin Therapy Lett 16, 4-7

[0249] 8. Tran, B., and Feldman, S. R. (2011) J Dermatolog Treat 22, 18-26

[0250] 9. Herrier, R. N. (2011) American Journal of Health-System Pharmacy 68, 795-806

[0251] 10. Montesu, M. A., Addis, G. M., Satta, R., and Cottoni, F. (2011) G Ital Dermatol Venereol 146, 273-281

[0252] 11. Wallis, R. S. (2011) Infect Dis Clin North Am 25, 895-910

[0253] 12. Esmon, C. T. (2004) Crit Care Med. 32, S298-S301

[0254] 13. Xue, M., Campbell, D., and Jackson, C. J. (2007) Journal of Biological Chemistry 282, 13610-13616

[0255] 14. Xue, M., Campbell, D., Sambrook, P. N., Fukudome, K., and Jackson, C. J. (2005) J Invest Dermatol. 125, 1279-1285

[0256] 15. Esmon, C. T. (2004) Maturitas 47, 305-314

[0257] 16. Yuksel, M., Okajima, K., Uchiba, M., Horiuchi, S., and Okabe, H. (2002) Thromb.Haemost. 88, 267-273

[0258] 17. Xue, M., March, L., Sambrook, P. N., Fukudome, F., and Jackson, C. J. (2007) Ann.Rheum.Dis.

[0259] 18. Xue, M., March, L., Sambrook, P. N., and Jackson, C. J. (2007) Arthritis Rheum. 56, 2864-2874

[0260] 19. Lay, A. J., Donahue, D., Tsai, M. J., and Castellino, F. J. (2007) Blood 109, 1984-1991

[0261] 20. Xue, M., Thompson, P., Kelso, I., and Jackson, C. (2004) Exp Cell Res 299, 119-127

[0262] 21. van Zonneveld, A. J., de Boer, H. C, van der Veer, E. P., and Rabelink, T. J. (2010) Annals of the Rheumatic Diseases 69, i57-i60

[0263] 22. Feistritzer, C, and Riewald, M. (2005) Blood 105, 3178-3184

[0264] 23. Finigan, J. H., Dudek, S. M., Singleton, P. A., Chiang, E. T., Jacobson, J. R., Camp, S. M., Ye, S. Q., and Garcia, J. G. (2005) J.Biol.Chem.

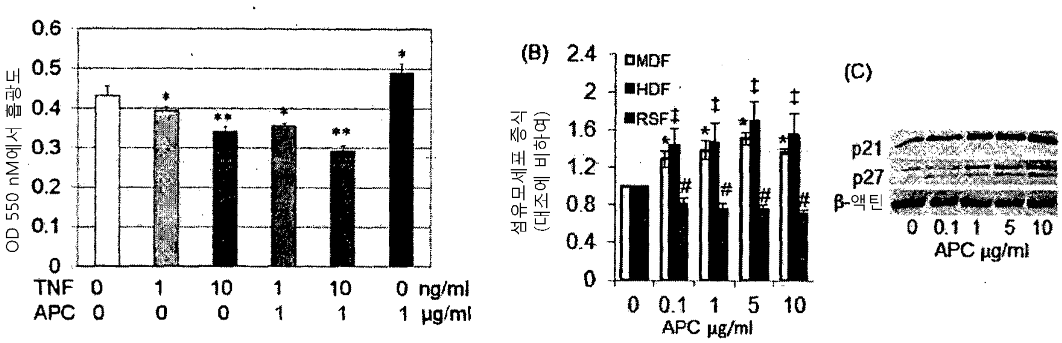
[0265] 24. Xue, M., Chow, S. O., Dervish, S., Chan, Y. K., Julovi, S. M., and Jackson, C. J. (2011) Journal of Biological Chemistry 286, 6742-6750

[0266] 25. Vetrano, S., Ploplis, V. A., Sala, E., Sandoval-Cooper, M., Donahue, D. L., Correale, C, Arena, V., Spinelli, A., Repici, A., Malesci, A., Castellino, F. J., and Danese, S. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A 108, 19830-19835

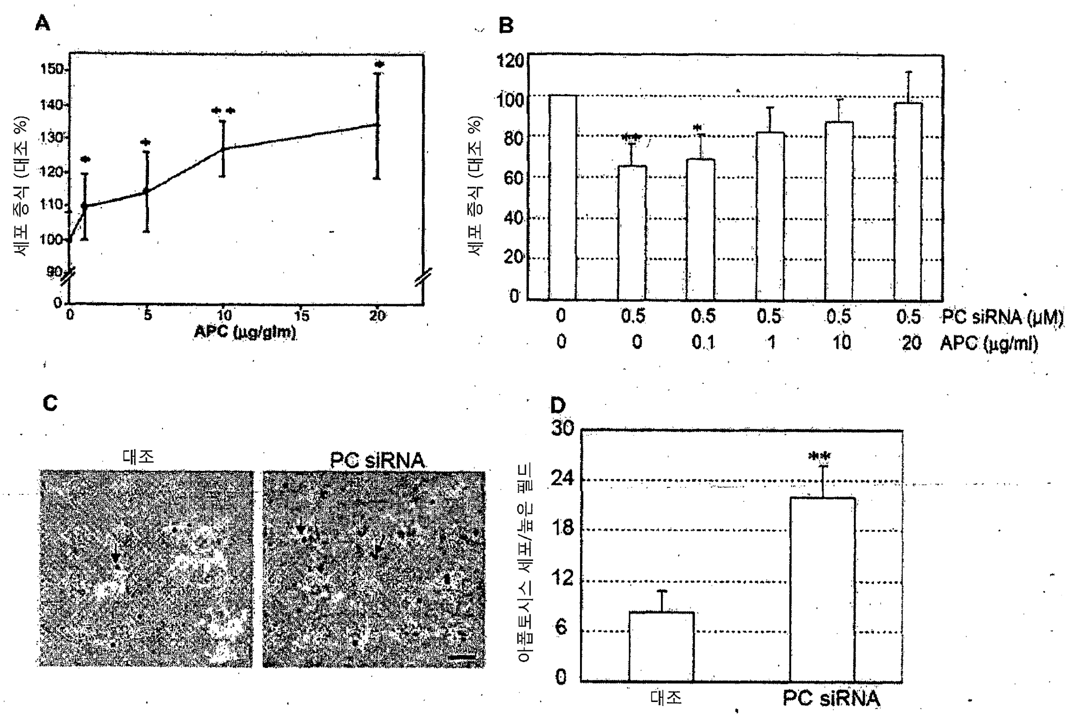
[0267] 26. Uchiba, M., Okajima, K., Oike, Y., Ito, Y., Fukudome, K., Isobe, H., and Suda, T. (2004) Circ Res 95, 34-41

도면

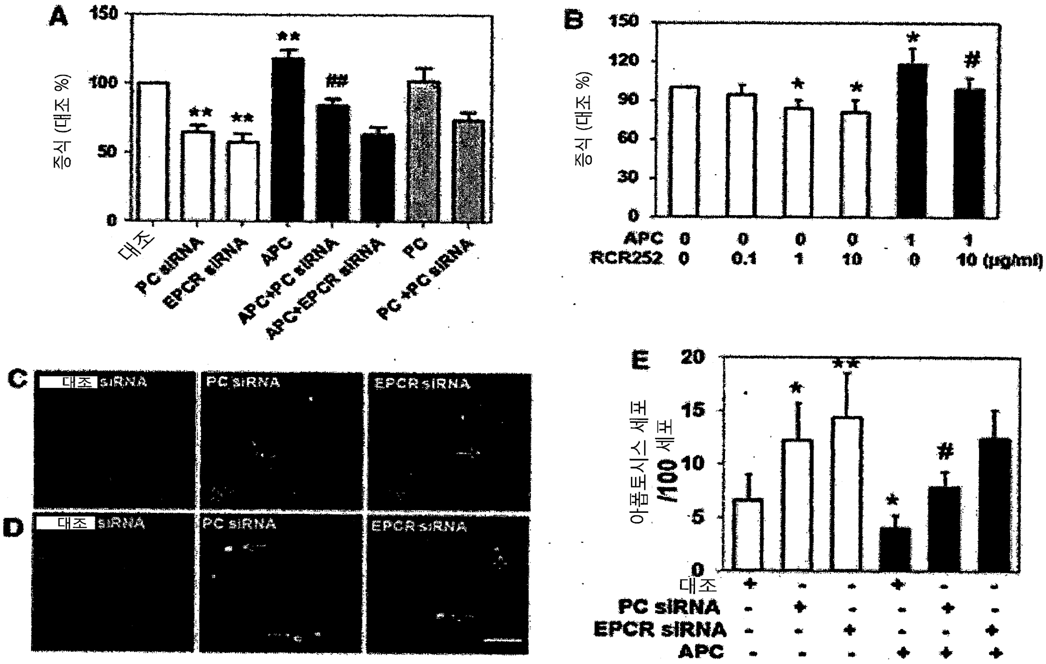
도면1



도면2



도면3


A
증식 (대조 %)
150
100
50
0
대조
PC siRNA
EPCR siRNA
APC
APC+PC siRNA
APC+EPCR siRNA
PC
PC +PC siRNA
B
증식 (대조 %)
150
120
90
60
30
0
APC 0 0 0 0 1 1
RCR252 0 0.1 1 10 0 10 (μg/ml)
C
대조 siRNA
PC siRNA
EPCR siRNA
D
대조 siRNA
PC siRNA
EPCR siRNA
E
아폽토시스 세포 /100 세포
20
15
10
5
0
대조 + - - + - -
PC siRNA - + - - + -
EPCR siRNA - - + - - +
APC - - - + + +