

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2019년 6월 27일 (27.06.2019) WIPO | PCT

WO 2019/124666 A2

(51) 국제특허분류:

A61K 39/395 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/008879

(22) 국제출원일: 2018년 8월 6일 (06.08.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0175167 2017년 12월 19일 (19.12.2017) KR

(71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR];
37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR).

(72) 발명자: 이승우 (LEE, Seung Woo); 37673 경상북도 포항시 지곡로 155, 4동 103호, Gyeongsangbuk-do (KR). 김영민 (KIM, Young Min); 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, 기숙사 15-311, Gyeongsangbuk-do (KR). 이송원 (LEE, Seung Won); 05508 서울시 송파구 올림픽로 399, 8동 901호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 아이시스 (ISIS IP LAW LLC); 06160 서울시 강남구 테헤란로 63길 14, 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,

ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING INTERLEUKIN-17 INHIBITOR AND TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA INHIBITOR AS EFFECTIVE INGREDIENT FOR PREVENTING OR TREATING NEUTROPHILIC LUNG INFLAMMATION DISEASE

(54) 발명의 명칭: 인터류킨-17 억제제 및 종양괴사인자-알파 억제제를 유효성분으로 포함하는 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising an interleukin-17 inhibitor and a tumor necrosis factor-alpha inhibitor as effective ingredients for preventing or treating a neutrophilic lung inflammation disease or a method for screening a therapeutic material for a neutrophilic lung inflammation disease. As a result of research into a change of hematopoiesis in the bone marrow of a neutrophilic asthma mouse model in which a neutrophilic lung inflammatory response had been induced, the present inventors newly revealed G-CSF as a mediator changing the hematopoiesis of the bone marrow, furthermore identified G-CSF production induced by co-stimulation with IL-17 and TNF- α in lung epithelial cells, and experimentally investigated that the hematopoiesis of the bone marrow was normalized by administration of an anti-G-CSF antibody alone or a combination of an anti-IL-17 antibody and an anti-TNF- α antibody in the mouse model, with a resultant therapeutic effect brought about on neutrophilic asthma. Accordingly, the present invention suggests a new therapeutic target for neutrophilic lung inflammation disease, and the IL-17 inhibitor and TNF- α inhibitor according to the present invention are expected to be a new therapeutic modality for neutrophilic lung inflammation disease, which has not been effectively treated with conventional methods.

(57) 요약서: 본 발명은 인터류킨-17 억제제 및 종양괴사인자-알파 억제제를 유효성분으로 포함하는 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 호중구성 폐 염증질환 치료물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명자들은 호중구성 폐 염증반응이 유도된 호중구성 천식 마우스 모델을 이용해 골수에서 조혈작용의 변화를 연구한 결과, 골수의 조혈작용을 변화시키는 매개인자인 G-CSF를 새롭게 규명하였고, 나아가 폐 상피세포에서 IL-17과 TNF- α 의 동시 자극에 의해 G-CSF의 생성이 유도되는 것을 확인하였으며, 마우스 모델을 이용해 항-G-CSF 항체의 단독 투여 또는 항-IL-17 항체와 항-TNF- α 항체의 동시투여에 따른 골수의 조혈작용 정상화 및 이에 따른 호중구성 천식의 치료효과를 실험적으로 확인하였다. 이에 본 발명은 호중구성 폐 염증질환의 새로운 치료 표적을 제시하며, 본 발명에 따른 IL-17 억제제 및 TNF- α 억제제는 종래 효과적인 치료법이 없는 호중구성 폐 염증질환에 대한 새로운 치료법이 될 것으로 기대된다.



WO 2019/124666 A2

명세서

발명의 명칭: 인터류킨-17 억제제 및 종양괴사인자-알파 억제제를 유효성분으로 포함하는 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 인터류킨-17 억제제 및 종양괴사인자-알파 억제제를 유효성분으로 포함하는 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 호중구성 폐 염증질환 치료물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 천식(Asthma)은 폐 속의 기관지가 아주 예민해진 상태로, 유전 및 환경적 요인이 합쳐져 생기는 대표적인 알레르기 질환이며, 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD)은 유해한 입자나 가스 흡입에 의해 폐에 비정상적인 염증반응이 일어나면서 폐 기능이 저하되고 호흡곤란을 유발하게 되는 호흡기 질환이다.
- [3] 이러한 천식 및 COPD는 기도 또는 폐 조직에 침투하는 면역 세포의 유형 및 침윤 양상에 따라 호산구성(eosinophilic) 및 호중구성(neutrophilic)으로 세분화될 수 있다.
- [4] 골수(Bone marrow)는 혈액의 세포성분을 형성하는 조혈(hematopoiesis)의 주요 부위로, 염증 완화에 필요한 면역 세포를 제공함으로써 원위 조직에서 염증성 질환의 병태생리에 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다. 이에 따라 감염(infection), 자가 면역 질환, 암 및 알레르기를 포함하는 염증성 질환의 연구를 통해 골수와 염증 조직 사이의 면역학적 연관성이 꾸준히 제안되어 왔다. 그러나 골수가 과립 세포의 생성 중심부위임에도 불구하고, 그동안 천식에 대한 연구는 천식을 기도에서의 국소적 염증반응으로 간주하여 주로 폐에서의 면역학적 반응으로 초점이 맞추어져왔다. 그러나 최근 전임상 및 임상 연구를 통해 IL-5의 높은 혈청 농도와 골수에서 호산구 전구체의 증가로 인해 호산구성 천식에서 전신성 염증반응이 나타남이 보고된바 있으며(Am J Respir Crit Care Med. 1998 Sep;158(3):951-7.), 이러한 관찰은 천식에서 폐/골수 관계에 대한 새로운 개념을 뒷받침하는 것이다.
- [5] 한편, 이와는 다른 유형의 호중구성 천식은 천식 환자의 약 25%에서 나타난다고 알려져 있고, 전신 염증과도 높은 연관이 있으며 많은 경우 기존 천식 치료제인 스테로이드 제제에 저항성을 보인다고 보고되어 있다. 이러한 호중구성 천식 환자군은 전체 환자에서 약 10% 정도에 불과하지만 전체 천식 치료에 발생하는 사회 경제적 비용의 약 50%를 차지할 정도로 치료 및 관리가 힘든 실정이다. 따라서 호중구성 천식의 면역학적 기전을 이해하고 이를 표적으로 하는 새로운 치료제 개발의 필요성이 대두되고 있으나, 아직까지

호중구성 천식의 발병 원인 및 메커니즘에 대해서는 잘 규명되어 있지 않은 실정이다.

- [6] 이에, 본 발명자들은 골수에서 생성되는 가장 풍부하게 존재하는 면역세포인 호중구의 염증성 측면과 생물학적 특성을 고려할 때, 골수가 호중구성 천식을 포함하는 호중구성 폐 염증질환의 병태생리학적 측면에서 중요한 역할을 할 것이라 생각하고 골수의 조혈작용을 연구하는 것이 중요할 것이라는 가설 하에 호중구성 천식에서 골수가 미치는 영향을 연구하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 상기와 같은 가설 하에 호중구성 폐 염증반응을 유도하여 호중구성 천식을 유발시킨 마우스 모델을 제작하고 이를 이용해 호중구성 천식에서 골수의 조혈작용 변화를 분석한 결과, 상기 호중구성 천식 마우스의 혈청에서 G-CSF가 현저히 높은 농도로 존재하며, 또한 상기 G-CSF가 조혈 줄기 및 전구세포(HSPCs)의 유전적 및 기능적 특성을 바꿈으로써 골수에서 조혈작용의 균형이 변화하는 것을 발견하였다. 이러한 발견을 토대로 G-CSF에 대한 항체를 이용해 상기 단백질의 활성을 직접적으로 차단하거나, G-CSF의 생성을 유도하는 사이토카인인 IL-17 및 TNF- α 에 대한 중화항체를 동시에 처리하여 G-CSF의 발현을 억제하는 경우 골수에서의 조혈작용이 정상화되며, 이에 따라 기도와 폐에서 호중구성 염증 개선효과를 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [8] 이에, 본 발명은 인터류킨-17(IL-17) 억제제 및 종양괴사인자-알파(TNF- α) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 호중구성 폐 염증질환의 치료물질 스크리닝 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[10]

- [11] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인터류킨-17(IL-17) 억제제 및 종양괴사인자-알파(TNF- α) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [13] 본 발명의 일구현예로, 상기 호중구성 폐 염증질환은 호중구성 천식(neutrophilic asthma), 호중구성 만성폐쇄성폐질환(neutrophilic chronic obstructive pulmonary disease), 특발성 폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis; IPF), 급성 폐 손상(acute lung injury; ALI), 및 급성 호흡곤란 증후군(acute

respiratory distress syndrome; ARDS)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

- [14] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 IL-17 억제제는 상기 IL-17 단백질에 특이적으로 결합하는 항-IL-17 항체일 수 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 TNF- α 억제제는 상기 TNF- α 단백질에 특이적으로 결합하는 항-TNF- α 항체일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 IL-17 억제제 및 TNF- α 억제제는 과립구집락자극인자(granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF)의 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 G-CSF 억제제를 추가로 포함할 수 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 G-CSF 억제제는 상기 G-CSF 단백질에 특이적으로 결합하는 항-G-CSF 항체일 수 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 G-CSF에 의한 골수에서 조혈작용의 균형 변화를 정상화시킬 수 있다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 기관지 폐포 세척액 및 폐 조직의 호중구 침윤을 감소시킬 수 있다.
- [21] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 골수세포형과산화효소(Myeloperoxidase; MPO)의 활성을 감소시킬 수 있다.
- [22] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 기도 과민반응을 감소시킬 수 있다.
- [23] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 호중구성 폐 염증질환 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [24] (a) *In vitro* 상에서 폐 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
- [25] (b) 상기 폐 세포에서 인터류킨-17(IL-17) 및 종양괴사인자-알파(TNF- α)의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- [26] (c) 후보물질 비처리군에 비하여 상기 IL-17 및 TNF- α 의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 호중구성 폐 염증질환의 치료물질로 선정하는 단계.
- [27] 본 발명의 일구현예로, 상기 치료물질은 과립구집락자극인자(granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF)의 발현을 억제할 수 있다.
- [28] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [29] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 호중구성 폐 염증질환 예방 또는 치료용도를 제공한다.

발명의 효과

- [30] 본 발명자들은 호중구성 폐 염증반응이 유도된 호중구성 천식 마우스 모델을 이용해 골수에서 조혈작용의 변화를 연구한 결과, 골수의 조혈작용을

변화시키는 매개인자인 G-CSF를 새롭게 규명하였고, 나아가 폐 상피세포에서 IL-17과 TNF- α 의 동시 자극에 의해 G-CSF의 생성이 유도되는 것을 확인하였으며, 마우스 모델을 이용해 항-G-CSF 항체의 단독 투여 또는 항-IL-17 항체와 항-TNF- α 항체의 동시투여에 따른 골수의 조혈작용 정상화 및 이에 따른 호중구성 천식의 치료효과를 실험적으로 확인하였다. 이에 본 발명은 호중구성 폐 염증질환의 새로운 치료 표적을 제시하며, 본 발명에 따른 IL-17 억제제 및 TNF- α 억제제는 종래 효과적인 치료법이 없는 호중구성 폐 염증질환에 대한 새로운 치료법이 될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1a는 골수와 호중구성 천식 간의 관련성을 조사하기 위한 LPS/OVA로 유도된 호중구성 천식 마우스 모델의 제작과정을 도시한 것이고, 도 1b 내지 도 1d는 상기 호중구성 천식이 유도된 마우스의 골수에서 조혈작용 변화를 분석한 결과로서, 조혈줄기세포(HSC) 및 다능성 전구세포(MPP)를 포함하는 LSK 세포의 증가(도 1b), 과립구와 단핵구 전구세포(GMP)/거핵구와 적혈구 전구세포(MEP)의 비율 증가를 통한 골수 형성 쪽으로의 조혈 균형 변화(도 1c), 및 B220+ 림프구 감소, CD11b+ 미엘로이드 세포 및 CD11b/B220 비율 증가를 통한 골수 계통 세포의 발달(도 1d)을 나타낸 것이다.
- [32] 도 2a는 호중구성 천식이 유도된 마우스의 혈청에서 G-CSF가 높은 수준으로 존재함을 보여주는 결과이고, 도 2b 내지 도 2d는 마우스에 재조합 마우스 G-CSF(rmG-CSF)를 전신적으로 투여한 후 조혈작용의 변화를 분석한 결과로서, LSK 세포의 증가(도 2b), GMP/MEP의 비율 증가를 통한 골수 형성 쪽으로의 조혈 균형 변화(도 2c), 및 B220+ 림프구 감소, CD11b+ 미엘로이드 세포 및 CD11b/B220 비율 증가를 통한 골수 계통 세포의 발달(도 2d)을 나타낸 것이다.
- [33] 도 3은 G-CSF에 의한 HSPC의 유전적 및 기능적 변화를 분석한 결과로서, 도 3a 및 도 3b는 각각 호중구성 천식이 유도된 마우스 및 마우스에 rmG-CSF를 투여한 경우 CD150+LSK 세포에서 미엘로이드 관련 유전자(myeloid)들의 발현 증가 및 림포이드 관련 유전자(lymphoid)들의 발현 감소를 통한 골수 생성 쪽으로의 조혈작용의 변화를 보여주는 결과이고, 도 3c 및 도 3d는 호중구성 천식이 유도된 마우스(LPS/OVA)에서 CD150+LSK 세포의 GMP/MEP의 비율 증가 및 비장과 말초 혈액에서 미엘로이드/림포이드 비율의 증가를 통해 미엘로이드 계통 쪽으로의 조혈작용 변화를 분석한 결과이다.
- [34] 도 4는 G-CSF 중화에 의한 조혈작용 정상화 및 호중구성 기도 염증 개선효과를 검증한 결과로서, 도 4a는 호중구성 천식이 유도된 마우스 모델을 이용한 실험 프로토콜을 그림으로 도시한 것이고, 도 4b 내지 도 4d는 상기 호중구성 천식이 유도된 마우스에서 G-CSF 중화 항체 투여에 따른 증가된 HSPCs의 감소(도 4b), 증가된 GMP/MEP의 비율 감소(도 4c), 및 미엘로이드 계통 세포의 발달의 감소(도 4d)를 통한 조혈작용의 정상화를 나타낸 것이며, 도 4e 내지 도 4h는

G-CSF 중화 항체 투여에 따른 기관지 폐포 세척액(BAL fluid)의 호중구 침투 감소(도 4e), MPO 활성 감소(도 4f), 폐 조직의 호중구 수 감소(도 4g, 4h)를 나타낸 결과이다.

- [35] 도 5는 폐 상피세포에서 IL-17 및 TNF- α 에 의한 G-CSF의 생성을 확인한 결과로서, 도 5a는 폐 상피세포(epithelial)에서 호중구성 기도 염증(LPS/OVA)에 반응하여 G-CSF가 높은 수준으로 발현됨을 나타낸 결과이고, 도 5b는 *in vitro* 수준에서 마우스 폐 상피세포주(MLE-12)에 IL-17A 및 TNF- α 를 동시 자극시켰을 때 G-CSF 생성이 유도됨을 보여주는 결과이며, 도 5c 및 도 5d는 상기 두 사이토카인을 마우스 비강으로 투여하였을 때 폐 상피세포에서의 G-CSF 생성(도 5c) 및 혈청에서의 G-CSF 순환 증가(도 5d)를 나타낸 결과이다.
- [36] 도 6은 마우스에서 IL-17 및 TNF- α 의 동시 투여(IL17+TNF- α) 시 골수의 조혈작용 변화를 분석한 결과로서, LSK 세포의 증가(도 6a), GMP/MEP의 비율 증가(도 6b), 및 B220+ 림프구 감소, CD11b+ 미엘로이드 세포 및 CD11b/B220+ 비율 증가(도 6c)를 통한 미엘로이드 세포 형성 쪽으로의 조혈 균형 변화를 나타낸 결과이다.
- [37] 도 7은 IL-17 및 TNF- α 중화에 의한 조혈작용 정상화 및 호중구성 기도 염증 개선효과를 검증한 결과로서, 도 7a는 호중구성 천식이 유도된 마우스 모델을 이용한 실험 프로토콜을 그림으로 도시한 것이고, 도 7b 내지 도 7f는 상기 호중구성 천식이 유도된 마우스에 IL-17 와 TNF- α 중화 항체를 혼합하여 투여한 후 BAL fluid에서 호중구 침윤 감소(도 7b) 및 MPO 활성의 현저한 감소(도 7c), 폐 조직에서 호중구 감소(도 7d, 7e), 및 기도 과민반응 감소(도 7f)를 확인한 결과이다.
- [38] 도 8a는 호중구성 천식이 유도된 마우스에 각각의 IL-17 및 TNF- α 중화 항체를 함께 투여(α -IL-17+ α -TNF- α)한 경우 BAL fluid, 폐 조직 용해물(Lung lysate) 및 혈청(Serum)에서 G-CSF의 농도 감소를 나타낸 결과이고, 도 8b 내지 도 8d는 상기 IL-17 및 TNF- α 중화 항체 투여에 따른 증가된 HSPC의 감소(도 8b), 증가된 GMP/MEP의 비율 감소(도 8c), 및 골수 계통 세포의 발달의 감소(도 8d)를 통한 조혈작용의 정상화를 나타낸 것이다.
- [39] 도 9는 IL-17 또는 TNF- α 중화 항체의 각각 단독투여 및 혼합투여 의한 호중구성 천식 치료효과를 확인하여 혼합투여의 우수성을 보여주는 결과로서, 도 9a 내지 도 9d는 호중구성 천식이 유도된 마우스에 대조군 항체(Iso), IL-17 항체 단독 투여(α -IL-17), TNF- α 단독 투여(α -TNF- α), 및 혼합투여(combi)를 실시하였을 때 BAL fluid에서 호중구 침윤 감소(도 9a), MPO 활성의 감소(도 9b), 및 폐 조직에서 호중구 감소(도 9c 및 도 9d) 효과를 비교한 결과이고, 도 9e는 BAL fluid, 폐 조직 용해물(Lung lysate) 및 혈청(Serum)에서 G-CSF의 농도를 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [40] 본 발명자들은 G-CSF에 대한 중화항체를 이용해 직접적으로 활성을 차단하거나, G-CSF의 생성을 유도하는 사이토카인인 IL-17 및 TNF- α 에 대한 중화항체를 동시에 처리하여 G-CSF의 발현을 억제하는 경우 골수의 조혈작용 변화의 정상화와 함께 기도 및 폐에서 호중구성 염증 개선효과를 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [41] 이에, 본 발명은 인터류킨-17(IL-17) 억제제 및 종양괴사인자-알파(TNF- α) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [42] 본 발명에서 예방 또는 치료대상으로 하는 질병인 호중구성 폐 염증질환은 폐 조직으로의 호중구의 침윤에 의한 염증반응이 유발되어 나타나는 질환을 모두 포함하며, 바람직하게는 호중구성 천식(neutrophilic asthma), 호중구성 만성폐쇄성폐질환(neutrophilic chronic obstructive pulmonary disease), 특발성 폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis; IPF), 급성 폐 손상(acute lung injury; ALI), 및 급성 호흡곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome ; ARDS)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 보다 바람직하게는 호중구성 천식 또는 호중구성 만성폐쇄성폐질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [43] 본 발명자들은 지질다당류(LPS) 및 오브알부민(OVA)을 투여하는 방법을 이용해 호중구성 천식을 모방하는 마우스 모델을 제작하였으며, 이를 이용한 실시예를 통해 호중구를 생성하는 주요 부위인 골수가 호중구성 폐 염증반응과 관련이 있을 것이라는 가설을 세우고 이를 검증하였다.
- [44] 본 발명의 일실시예에서는, 호중구성 천식 마우스 모델에서 골수의 조혈작용을 분석한 결과, 미엘로이드 세포 형성 쪽으로의 조혈 균형이 변화하는 것을 확인하였고, 이러한 현상을 매개하는 인자를 조사한 결과 상기 마우스의 혈청에서 G-CSF가 현저히 높은 농도로 존재하는 것을 확인하였다. 나아가 G-CSF가 골수의 조혈작용을 직접적으로 변화시킨 인자인지 검증하기 위해 마우스에 재조합 마우스 G-CSF를 전신적으로 투여한 결과 상기에서와 동일한 양상으로 골수의 조혈작용에 변화가 유도되는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [45] 본 발명의 다른 실시예에서는, 체내에 순환하는 G-CSF가 조혈 줄기세포 및 전구세포(HSPCs)의 계통 결정인자로써 작용하는지 분석한 결과 호중구성 천식이 유도된 마우스에서와 동일하게 재조합 마우스 G-CSF를 전신적으로 투여한 마우스에서 역시 CD150+LSK세포의 유전적 프로파일이 미엘로이드 세포 생성 쪽으로 프로그램화함으로써 골수 내 조혈작용을 미엘로이드 세포 계통으로 변화시킨다는 것을 알 수 있었다(실시예 3 참조).
- [46] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, G-CSF에 특이적으로 결합하여 이의 활성을 차단하는 중화항체를 호중구성 천식이 유도된 마우스에 투여한 결과, 기도 및 폐에서의 호중구성 염증반응이 완화되었으며, 골수 조혈작용의 변화도 정상화되는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [47] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 호중구성 염증반응이 유도되었을 때

G-CSF의 생성을 유도하는 인자를 조사한 결과, 폐 상피세포에서 IL-17 및 TNF- α 의 동시 자극에 의해 G-CSF가 유도되는 것을 확인하였으며, 마우스에 상기 두 가지 사이토카인을 동시에 투여하였을 때 G-CSF를 투여한 경우와 동일하게 골수의 조혈작용 변화가 유도되는 것을 확인하였다(실시예 5 참조).

- [48] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 호중구성 천식이 유도된 마우스에 IL-17 및 TNF- α 각각에 대한 항체를 동시에 투여하여 이들의 활성을 차단한 결과, BAL fluid, 폐 조직 용해물, 및 혈청에서 G-CSF의 농도가 현저히 감소하였으며 항-G-CSF 항체를 처리하였을 때와 마찬가지로 기도 및 폐에서 호중구성 염증반응이 완화되었고 골수의 조혈작용 변화도 정상화되는 것을 확인하였다. 또한, 이러한 효과는 상기 IL-17 및 TNF- α 에 대한 항체를 동시에 처리하였을 때 나타났으며, 각각 처리한 경우 제한된 치료효과가 나타남을 확인하였다(실시예 6 참조).

- [49] 이에, 본 발명자들은 본 실시예를 통해 호중구성 천식의 새로운 치료 표적으로써 G-CSF 및 이의 생성을 유도하는 IL-17 및 TNF- α 를 발견하였으며, 상기 IL-17 및 TNF- α 를 동시에 억제하는 경우 폐 및 기도 조직에서 호중구성 염증반응이 효과적으로 완화되는 것을 확인하였으며, 이의 작용기전을 규명하였다.

- [50] 본 발명에 있어서, 상기 IL-17은 바람직하게는 IL-17A일 수 있으며, 상기 IL-17 억제제는 상기 IL-17 단백질에 특이적으로 결합하는 항-IL-17 항체일 수 있고, 보다 바람직하게는 IL-17A 단백질(NCBI accession #. NP_034682)에 특이적으로 결합하는 항-IL-17A 항체를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [51] 본 발명에 있어서, 상기 TNF- α 억제제는 상기 TNF- α 단백질(NCBI accession #. CAA68530)에 특이적으로 결합하는 항-TNF- α 항체를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [52] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 상기 IL-17 억제제 및 TNF- α 억제제, 보다 바람직하게는 상기 항-IL-17 항체 및 항-TNF- α 항체를 모두 포함하는 것을 특징으로 하며, 과립구집락자극인자(granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF) 억제제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 G-CSF 억제제는 G-CSF 단백질에 특이적으로 결합하는 항-G-CSF 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [53] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 상기 IL-17 억제제 및 TNF- α 억제제를 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에

관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.

- [54] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으나, 바람직하게는 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [55] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 “약학적으로 유효한 양”은 의학적인 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [56] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [57] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 호중구성 폐 염증질환 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [58] (a) *In vitro* 상에서 폐 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
- [59] (b) 상기 폐 세포에서 인터류킨-17(IL-17) 및 종양괴사인자-알파(TNF- α)의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- [60] (c) 후보물질 비처리군에 비하여 상기 IL-17 및 TNF- α 의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 호중구성 폐 염증질환의 치료물질로 선정하는 단계.
- [61] 본 발명에 있어서, 상기 폐 세포는 보다 바람직하게 호중구성 폐 염증질환이 유발된 폐 조직유래 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [62] 상기 치료물질은 G-CSF의 발현을 억제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [63] 상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산, 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[64] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[65] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[66] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 호중구성 폐 염증질환 예방 또는 치료용도를 제공한다.

[67]

[68] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[69]

[70] **[실시예]**

[71] **실시예 1. 실험준비 및 실험방법**

[72] **1-1. 실험동물**

[73] 본 실시예에서는 생후 6주 내지 8주된 야생형 C57BL/6(B6, CD45.1 및 CD45.2) 마우스를 사용하였다. 모든 마우스는 포스텍(POSTECH)의 병원균이 없는 동물 시설에서 사육하였으며, 실험은 포스텍의 동물 지침에 따라 수행하였다.

[74]

[75] **1-2. In vitro 사이토카인 자극**

[76] 마우스 폐 상피세포(MLE-12)를 2% 소태아혈청(FBS), 1x ITS 용액(sigma), 10 nM 하이드로코르티손(hydrocortisone), 10 nM b-에스트라디올(b-estradiol) 및 2 mM L-글루타민(L-glutamine)이 첨가된 DMEM:Ham's F12, 50:50 배지(Welgene)에서 배양하였다. 다음으로 배양한 세포(1×10^5)를 24웰 플레이트에 씨딩하고 10 ng/ml의 마우스 IL-17A(ebioscience) 및/또는 20 ng/ml의 마우스 TNF- α (Biolegend)로 자극시켰다. 24시간 후에 세포 배양액을 회수하여 ELISA를 통해 G-CSF 단백질 수준을 측정하였다.

[77]

[78] **1-3. 호중구성 천식 동물모델 및 이의 치료 효과 분석**

[79] LPS(Lipopolysaccharide)/OVA(ovalbumin)로 유도된 호중구성 천식 마우스 모델을 제작하기 위해, 0일, 1일, 2일 및 7일째에 멸균된 20 μ l의 PBS에 10 μ g LPS와 75 μ g의 OVA(sigma)를 넣어 혼합시킨 후 비강 흡입으로 마우스를 감염시켰다. 이어서 14일째부터 시작하여 4주 동안 일주일에 2회씩 20 μ l의 멸균 PBS에 50 μ g의 OVA를 반복 투여하였다. 또한, 모든 비강 내 주입은 케타민(ketamine)/자일라진(xylazine) 용액 120 μ l를 복강 투여하여 마우스를 마취시킨 후 실시하였다.

[80] 한편, G-CSF 중화 실험을 진행하기 위해, 비강을 통해 마우스를 감염 시킨 후 28일째에 항-G-CSF(ebioscience) 또는 아이소타입 항체(isotype antibody) 100 μ g을

복강으로 투여하였다. 또한 IL-17 및 TNF- α (BioXcell)의 중화를 위해, 50 μ g의 항-IL-17 및/또는 항-TNF- α 또는 아이소타입 항체를 비강을 통한 감작 28일째부터 OVA 투여 3시간 전에 복강 내로 투여하였다. 다음으로 마지막 OVA 투여 후 6, 12, 24 및 48시간째에 마우스를 희생시켜 사이토카인 및 골수 분석을 실시하였다. 또한 마우스 기관(trachea)에 카테터를 삽관하여 기관지 폐포 세척액(BAL fluid)을 수집하였으며, 마우스 폐는 관류시켜 회수한 다음 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde; PFA)에 보관하였다가 조직학적 분석에 이용하였다.

[81]

[82] **1-4. 재조합 마우스 G-CSF, IL-17 및 TNF- α 투여**

[83] 마우스에 2주 동안 연속 2일로 2.5 μ g의 재조합 마우스 G-CSF(Biolegend)를 주입하고 48시간 후 마우스를 희생시켜 골수 세포성을 평가하였다. 또한 500 ng의 재조합 IL-17 및 TNF- α 를 30 μ l의 PBS에 혼합시켜 비강 흡입으로 마우스에 주입한 후, 사이토카인 분석을 위해 6 시간 및 골수 세포성 분석을 위해 48 시간 후에 마우스를 희생시켰다.

[84]

[85] **1-5. 세포 분리**

[86] 마우스유래 폐 세포를 제조하기 위해, 마우스의 오른쪽 폐 조직을 절제하고 격렬히 교반시키면서 37°C에서 15분 동안 콜라게나제(Roche)와 DNase(Roche) 용액에서 배양한 다음, 배양한 조직을 40 μ m 스트레이너에 통과시켜 단일 세포 현탁액을 획득하였다. 한편, 골수 세포 수집을 위해 다리 골(경골 1 개와 대퇴골 1 개)을 2%의 calf serum이 첨가된 RPMI1640 배지(Welgene)로 세척한 후 40 μ m 스트레이너를 사용하여 파편을 제거한 후에 단일 세포 현탁액을 획득하였다. 이후 Coulter Counter를 사용하여 총 세포 수를 측정하였으며, BAL 세포의 경우 BAL fluid를 원심 분리한 다음 펠렛을 2% FBS가 포함된 PBS 100 μ l에 재현탁하고 세포 수를 측정하였다.

[87]

[88] **1-6. 사이토카인 수준 측정**

[89] BAL fluid, 폐 조직 용해물, 및 혈청에서의 G-CSF 수준은 DuoSet ELISA kit(R&D systems)를 이용해 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

[90]

[91] **1-7. 골수세포형과산화효소(Myeloperoxidase; MPO) 활성 분석**

[92] 10 μ l의 BAL 유체를 80 μ l의 88 mM H₂O₂ 및 110 μ l의 TMB 용액과 함께 37°C에서 5분 동안 배양하였다. 이후 50 μ l의 1N H₂SO₄를 처리하여 반응을 중지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[93]

[94] **1-8. 유세포 분석(Flow cytometry)**

[95] 골수, 폐 및 BAL에서 조혈 세포를 분석하기 위해 단일 클론 항체 및 표현형

마커를 이용하여 유세포 분석을 실시하였다. 골수에서 HSPC 분석을 위해 성숙한 계통 세포는 TER119(클론 TER-119), CD11b, Gr-1, CD3e, NK1.1, MHCII 및 B220과 같은 APC 접합 계통 마커를 이용해 배제하였다. 다음으로 LSK 세포(LIN-SCA-1+c-Kit+), LSK CD150+CD48-, LSK CD150-CD48-, LSK CD150-CD48+, LSK CD150+CD48+에 대하여 c-Kit-PE/Cy7(클론 2B8), SCA-1-브릴리언트 바이올렛(클론 D7), CD150-PerCP/eFlour710(클론 mShad150) 및 CD48-PE(클론 HM48-1)를 이용해 확인하였고, MPs는 CMPs(LIN-SCA-1+c-Kit+CD34+FcyRlo), GMP(LIN-SCA-1+c-Kit+CD34+FcyRhi) 및 CLP(LIN-IL-7Rα+c-KitintSCA-1int)에 대하여 c-Kit, SCA-1, CD34-FITC(클론 RAM34), FcγRII/III-PE(CD16/32, 클론 93), IL-7Rα-PerCP/cy5.5(CD127, 클론 A7R34) MMP(LIN-SCA-1+c-Kit+CD34-FcyRlo)를 이용해 확인하였다. 호중구(TER119-CD11b+Gr-1+), 호산구(TER119-CD11bintsiglecF+Gr-1low), B 세포(TER119-Gr-1-CD11b-B220+) 및 폐포대식세포(FSChighSSChighTER119-CD11blowsiglecFhighGr-1-)에 대해서는 골수, 폐, 및 BAL에서 성숙한 면역세포를 TER119-FITC, CD11b-PE/Cy7, B220-PB, siglecF-PE, Gr-1-APC로 확인하였다. 또한, 폐에서 비 조혈세포를 확인하기 위해 상피세포(TER119-CD45-CD31-EpCAM+) 및 내피세포(TER119-CD45-CD31+EpCAM-)는 TER119-FITC, CD45-FITC, EpCAM-PE/Cy7, CD31-PE로 표지하였다. 폐 상피세포에서 사이토카인 수용체의 발현은 IL-17RA-PE, IL-17RC-비오틴, TNFR1-비오틴, TNFR2-PE 및 스트렙타비딘-APC를 사용하여 측정하였다.

[96]

[97] 실시예 2. 순환하는 G-CSF에 의한 골수에서의 조혈작용 변화 확인

[98] 본 발명자들은 골수가 호중구성 천식의 병태생리학적 측면에서 중요한 역할을 할 것이라는 가정을 검증하기 위하여, 먼저 호중구성 천식 마우스 모델에서 골수의 조혈작용이 변화하는지 알아보고자 하였다. 이를 위해, 상기 실시예 1-3 및 도 1a에 나타난 과정에 따라 LPS/OVA로 유도된 호중구성 천식 마우스 모델을 제작하였으며, 호중구성 염증이 유도된 상기 모델에서 골수에서의 조혈작용 변화 여부를 분석하였다.

[99] 그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이 대조군 마우스에 비하여 상기 염증이 유도된 마우스에서 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cells; HSC)와 다능성 전구세포(multipotent progenitor cells; MPP)를 포함하는 LSK 세포가 유의하게 증가하였으며, 도 1c에서 볼 수 있는 바와 같이 상기 전구 세포 중 과립구와 단핵구 전구세포(granulocyte and monocyte progenitors; GMP)는 증가한 반면, 거핵구와 적혈구 전구세포(megakaryocyte and erythrocyte progenitors; MEP)는 오히려 감소한 것으로 나타났다. 상기와 같이 GMP/MEP 비율 증가로 반영되는 미엘로이드 세포 형성 쪽으로의 조혈 균형의 변화는 도 1d에 나타난 바와 같이 B220+ 림프구 감소, CD11b+ 미엘로이드 세포 및 CD11b/B220+ 비율 증가에 의한

골수계통 세포의 발달에 의해서도 알 수 있었다.

- [100] 상기 결과를 바탕으로, 본 발명자들은 기도에서의 염증 신호를 골수로 전달하는 매개인자를 조사하기 위하여 호중구성 마우스 모델에서 마지막 OVA 투여 후 6, 12, 24 및 48 시간에 순환하는 염증 매개체들의 동력학(kinetics)을 평가하였다. 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 놀랍게도 과립구집락자극인자(G-CSF)만이 혈청에서 다량 존재하는 것을 확인하였으며 시간이 지남에 따라 G-CSF의 혈청 내 농도가 감소하는 것을 확인하였다.
- [101] 다음으로 상기 결과에 기반하여 조혈인자로써 G-CSF의 역할을 조사하기 위하여, 재조합 마우스 G-CSF(rmG-CSF)를 마우스에 전신적으로 투여하고 조혈작용의 변화를 분석하였다. 그 결과, 도 2b내지 도 2d에 나타낸 바와 같이 상기 결과들과 유사하게 G-CSF 투여에 의한 HSPC 개체군의 증가 및 미엘로이드 세포들의 증가를 확인하였다. 이러한 결과는 호중구성 천식 마우스의 골수에서 조혈작용의 변화가 순환하는 G-CSF에 의해 유도됨을 의미하는 것이다.
- [102]
- [103] **실시예 3. G-CSF에 의한 HPSC의 유전적 및 기능적 변화 확인**
- [104] 많은 연구들에서 보고된 바와 같이, 염증 매개체는 계통 발생과 관련된 유전적 프로그램을 조절함으로써 조혈 줄기세포 및 전구세포(HSPCs)의 계통 운명을 결정할 수 있다. 따라서 계통 결정 인자로서 G-CSF가 미치는 영향을 확인하기 위해, 본 실시예의 호중구성 천식 마우스 모델에서 HSPCs의 유전적 및 기능적 변화를 분석하였다.
- [105] 그 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이 호중구성 천식이 유도된 마우스의 CD150+LSK 세포는 대조군 마우스에 비해 미엘로이드 관련 유전자(myeloid-affiliated genes)들의 발현이 증가되어 있는 반면 림프이드 관련 유전자(lymphoid-affiliated genes)의 발현은 다소 감소한 것으로 나타났다. 이러한 결과와 유사하게, 도 3b에 나타낸 바와 같이 rmG-CSF를 투여한 마우스의 경우 역시 CD150+LSK 세포에서 미엘로이드 세포계 관련 유전자들의 발현이 증가하고 림프이드계 관련 유전자들의 발현이 감소되어 있는 것을 통해 유전적 프로그램이 좀 더 미엘로이드 세포 형성 쪽으로 재프로그램화되는 것을 알 수 있었다.
- [106] 나아가 이러한 유전적 재프로그램화가 생체 내에서 HSPCs의 계통 선택의 기능적 변화를 반영하는지 여부를 알아보기 위해, 대조군 마우스(PBS/OVA)와 비교하여 염증성 마우스(LPS/OVA)의 CD150+LSK 세포의 골수계통 분화 잠재력을 비교하였다. 그 결과 도 3c 및 도 3d에 나타낸 바와 같이 비장에서 GMP/MEP의 비율 증가와 비장과 말초 혈액에서 미엘로이드/림프 비율의 증가를 통해 염증성 마우스의 HSPC가 대조군보다 미엘로이드 세포 계통으로 진행되는 경향이 있음을 알 수 있었다. 따라서 호중구성 염증이 유도된 기도의 G-CSF는 혈액을 통해 순환하고 HSPC의 유전적 및 기능적 변화를 유도하여 조혈작용을 미엘로이드 세포 계통 쪽으로 변화시킨다는 것을 확인하였다.

[107]

[108] 실시예 4. G-CSF 차단에 의한 조혈작용 정상화 및 이에 따른 호중구성 기도 염증 개선 확인

[109] 본 발명자들은 호중구성 천식에서의 골수의 역할과 조혈작용의 조절 인자로서 G-CSF가 미치는 영향을 좀 더 연구하기 위해, 도 4a에 도시한 과정에 따라 호중구성 천식 마우스 모델에서 OVA를 주기적으로 투여하는 동안 항-GCSF 항체를 주입하여 G-CSF를 중화시킨 후 골수 및 폐에서의 세포성을 분석하였다.

[110] 그 결과, 도 4b 내지 도 4d에 나타낸 바와 같이 G-CSF에 특이적으로 결합하는 항체(α -G-CSF)를 투여하여 G-CSF를 중화시킨 결과 아이소타입(Isotype) 항체(Iso)를 투여한 군의 경우 HSPCs가 증가하는 반면 G-CSF를 중화시킨 경우에는 감소하였고, 미엘로이드/림포이드 세포 비율 증가가 정상대조군과 유사한 수준으로 정상화되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 골수에서 조혈작용이 다시 정상화되는 것을 알 수 있었다. 또한 상기 결과와 양립되게, 폐 조직을 관찰한 결과 isotype 항체를 투여(Iso)한 경우와 달리 G-CSF 중화 항체 투여(α -G-CSF)를 통해 폐의 염증이 완화되었고, 도 4e 내지 도 4h에 나타낸 바와 같이 BAL fluid의 호중구 침투 및 MPO 활성 감소, 폐 조직의 호중구 수 감소를 확인하였다.

[111] 상기와 같은 결과는 호중구성 천식에서 골수의 중요성과 폐와 골수 사이의 신호 매개체로서 G-CSF의 역할을 입증하는 것이다.

[112]

[113] 실시예 5. IL-17 및 TNF- α 에 의한 G-CSF 생성 및 이에 따른 골수 조혈작용 변화 확인

[114] G-CSF는 LPS 또는 사이토카인과 같은 다양한 염증성 자극원들에 반응하여 대식세포, 상피세포, 내피세포, 골수 기질세포 및 섬유아세포를 포함한 여러 유형의 세포에 의해 생성된다고 알려져 있다. 따라서 본 발명자들은 폐에서 G-CSF를 생산하는 주요 세포를 조사하기 위해, 폐의 조혈 및 비-조혈 구획을 분리하고 RT-PCR을 통해 G-CSF mRNA 수준을 분석하였다. 그 결과 도 5a에 나타낸 바와 같이 폐 상피세포(epithelial)가 호중구성 기도 염증(LPS/OVA)에 반응하여 CD45+ 조혈세포 및 내피세포(Endothelial) 보다 현저히 높은 수준으로 G-CSF mRNA를 발현하는 것을 확인하였다.

[115] 나아가 폐 상피세포에서 G-CSF 생산을 유도하는 인자를 알아보기 위해 폐에서 염증성 사이토카인을 측정 후 시험관 내(in vitro)에서 상기 사이토카인들을 단독 또는 혼합하여 마우스 폐 상피세포주 (MLE-12)를 자극시킨 후 G-CSF의 수준을 측정하였다. 그 결과 도 5b에 나타낸 바와 같이, 이전의 연구결과에서 보고된 바와 같이 G-CSF 생산이 단일 사이토카인이 아닌 IL-17A와 TNF- α 의 동시 처리에 의해 유도되는 것을 확인하였다. 이에 더하여 상기 두 사이토카인을 마우스의 비강으로 투여한 결과, 도 5c 및 도 5d에 나타낸 바와 같이 각각 단독으로 투여한 경우와 비교하여 폐 상피세포에서 G-CSF가 현저히 높은

수준으로 생성되었으며, 혈청에서 G-CSF 순환이 증가하는 것을 확인하였다. 주목할 것은, 상기 두 사이토카인을 동시에 마우스에 투여하였을 때 도 6a 내지 도 6c에서 볼 수 있는 바와 같이 HSPCs의 증가 및 골수의 조혈작용 변화가 재현되었다는 것이다.

- [116] 상기 결과들은 호중구성 염증이 유도된 폐에서 IL-17 및 TNF- α 의 공존이 폐 상피세포를 자극하여 G-CSF를 생성하도록 하여 결과적으로 골수에서 조혈작용을 재프로그래밍함을 입증하는 것이다.

[117]

[118] 실시예 6. IL-17 및 TNF- α 차단에 의한 조혈작용 정상화 및 이에 따른 호중구성 기도 염증 개선 확인

- [119] G-CSF 생성 유도에 있어서 IL-17/TNF- α 의 역할을 재확인하고 호중구성 천식에서 표적화된 치료법 개발을 위한 분자 기전을 규명하기 위해, 본 발명자들은 도 7a에 도시한 과정에 따라 호중구성 천식 마우스 모델에 항-IL-17 및 항-TNF α 중화 항체를 함께 투여하여 동시에 IL-17 및 TNF- α 를 차단시켰다. 그 결과, 도 7b 및 도 7f에 나타난 바와 같이 Isotype 항체를 투여(Iso)한 경우와 비교하여 상기 두 항체를 동시에 투여(α -IL-17+ α -TNF- α)한 경우 BAL fluid에서 호중구 침윤 및 MPO 활성이 현저하게 감소하였고, 폐 조직에서 호중구 증가가 감소하였으며 기도 과민반응이 감소한 것을 확인하였다.

- [120] 또한, 상기와 같이 두 사이토카인에 대한 항체를 동시에 처리한 경우 도 8a에서 볼 수 있는 바와 같이 BAL fluid, 폐 조직 용해물 및 혈청에서 G-CSF의 농도가 현저하게 감소한 것으로 나타났으며, 도 8b 내지 도 8d에 나타난 바와 같이 골수에서 HSPC의 증가 및 골수/림프성 발달의 불균형과 같은 호중구성 염증이 유도된 마우스의 골수에서 나타나는 현상이 정상화되는 것을 확인하였다.

- [121] 나아가 상기와 같은 호중구성 염증의 치료효과는 도 9a 내지 도 9e에서 볼 수 있는 바와 같이 IL-17 및 TNF- α 사이토카인이 동시에 제거된 경우에만 효과적이었으며 각 사이토카인에 대한 항체를 단독으로 마우스에 투여한 경우(α -IL-17, α -TNF- α)에는 기도와 폐의 염증 및 G-CSF 유도의 측면에서 제한된 치료 효과를 보였다.

- [122] 본 발명의 상기 결과들을 통해 C-GSF 중화항체 또는 G-CSF의 생성을 유도하는 IL-17 및 TNF- α 중화항체의 동시 처리를 통해 호중구성 천식을 효과적으로 개선할 수 있음을 알 수 있었으며, 이는 G-CSF의 발현 또는 활성 억제에 의한 골수의 조혈작용 정상화를 통한 것임을 확인하였고, 나아가 호중구성 천식의 치료제 개발을 위한 표적으로써 C-GSF 및 IL-17/TNF- α 의 가능성을 보여주는 것이다.

[123]

- [124] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을

이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

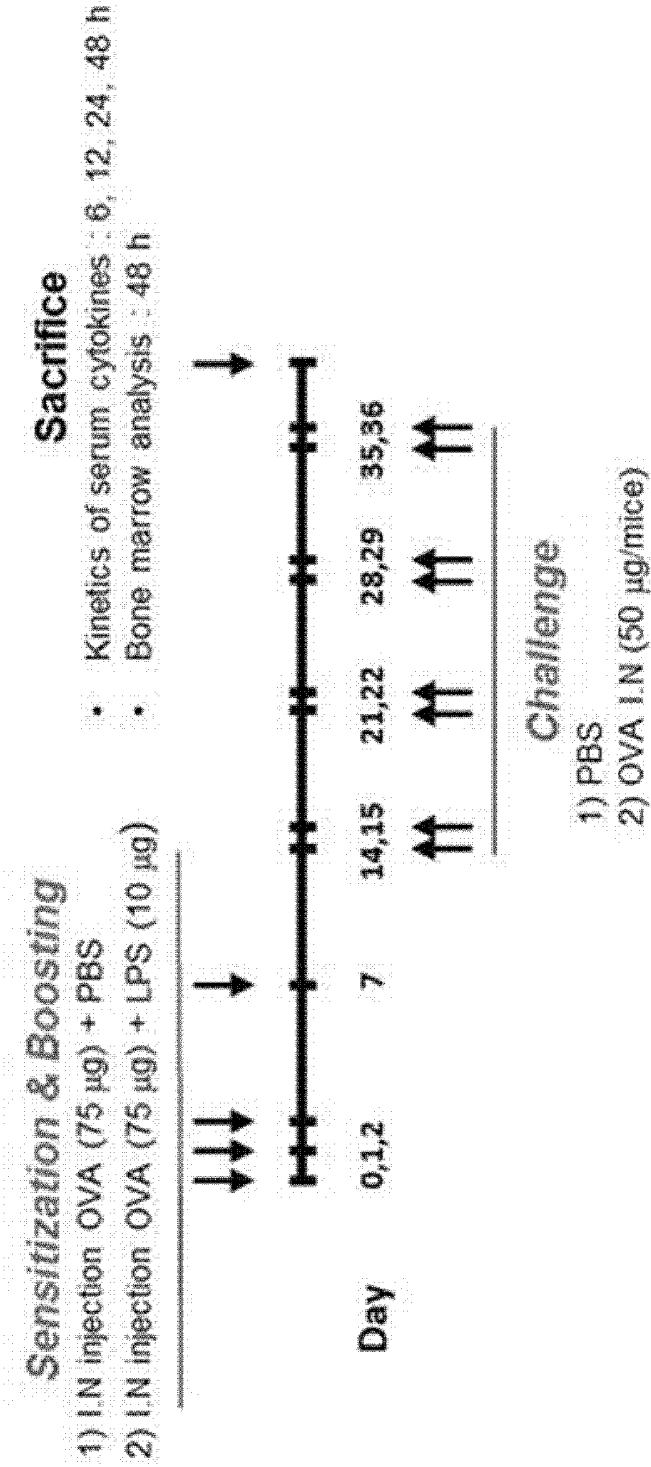
- [125] 본 발명에 따른 IL-17 억제제 및 TNF- α 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 또는 상기 조성물에 항-G-CSF 억제제를 추가로 포함하는 약학적 조성물은 우수한 골수의 조혈작용 정상화 및 이에 따른 호중구성 천식의 치료효과를 나타내는바, 종래 효과적인 치료법이 없는 호중구성 폐 염증질환에 대한 새로운 치료 표적을 제안하며, 상기 질환에 대한 치료제 개발 분야에서 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

청구범위

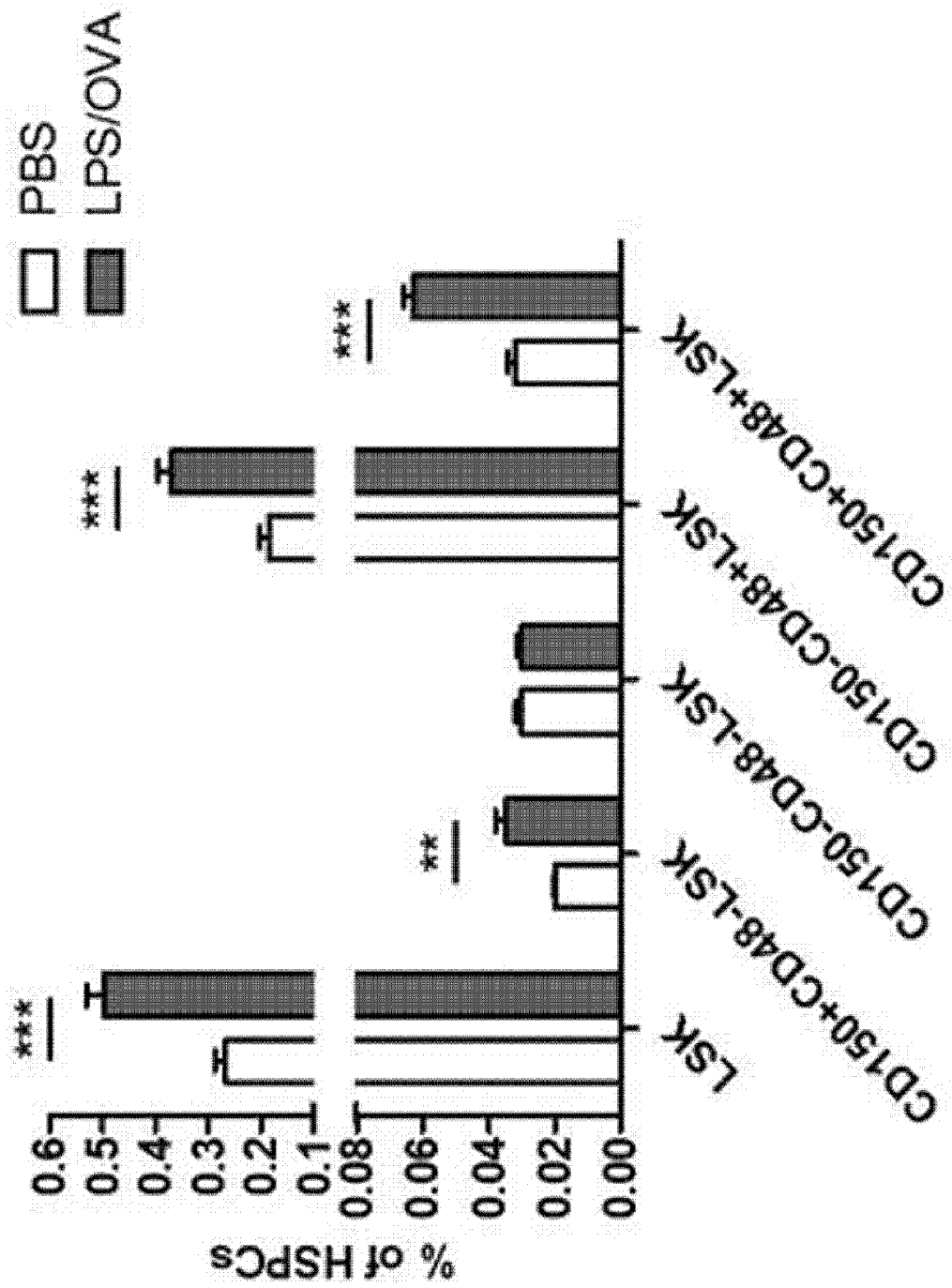
- [청구항 1] 인터류킨-17(IL-17) 억제제 및 종양괴사인자-알파(TNF- α) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 호중구성 폐 염증질환은 호중구성 천식(neutrophilic asthma), 호중구성 만성폐쇄성폐질환(neutrophilic chronic obstructive pulmonary disease), 특발성 폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis; IPF), 급성 폐 손상(acute lung injury; ALI), 및 급성 호흡곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome; ARDS)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 IL-17 억제제는 상기 IL-17 단백질에 특이적으로 결합하는 항-IL-17 항체인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 TNF- α 억제제는 상기 TNF- α 단백질에 특이적으로 결합하는 항-TNF- α 항체인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 IL-17 억제제 및 TNF- α 억제제는
과립구집락자극인자(granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 G-CSF 억제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 G-CSF 억제제는 상기 G-CSF 단백질에 특이적으로 결합하는 항-G-CSF 항체인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 G-CSF에 의한 골수에서 조혈작용의 균형 변화를 정상화시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 기관지 폐포 세척액 및 폐 조직의 호중구 침윤을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 골수세포형과산화효소(Myeloperoxidase; MPO) 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 기도 과민반응을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 12] 하기의 단계를 포함하는, 호중구성 폐 염증질환 치료물질의 스크리닝 방법:
(a) *In vitro* 상에서 폐 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
(b) 상기 폐 세포에서 인터류킨-17(IL-17) 및 종양괴사인자-알파(TNF- α)의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
(c) 후보물질 비처리군에 비하여 상기 IL-17 및 TNF- α 의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 호중구성 폐 염증질환의 치료물질로 선정하는 단계.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 호중구성 폐 염증질환은 호중구성 천식(neutrophilic asthma) 또는 호중구성 만성폐쇄성폐질환(neutrophilic chronic obstructive pulmonary disease), 특발성 폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis; IPF), 급성 폐 손상(acute lung injury; ALI), 및 급성 호흡곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome ; ARDS)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
상기 치료물질은 과립구집락자극인자(granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.
- [청구항 15] 인터류킨-17(IL-17) 억제제 및 종양괴사인자-알파(TNF- α) 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 16] 인터류킨-17(IL-17) 억제제 및 종양괴사인자-알파(TNF- α) 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의, 호중구성 폐 염증질환의 예방 또는 치료용도.

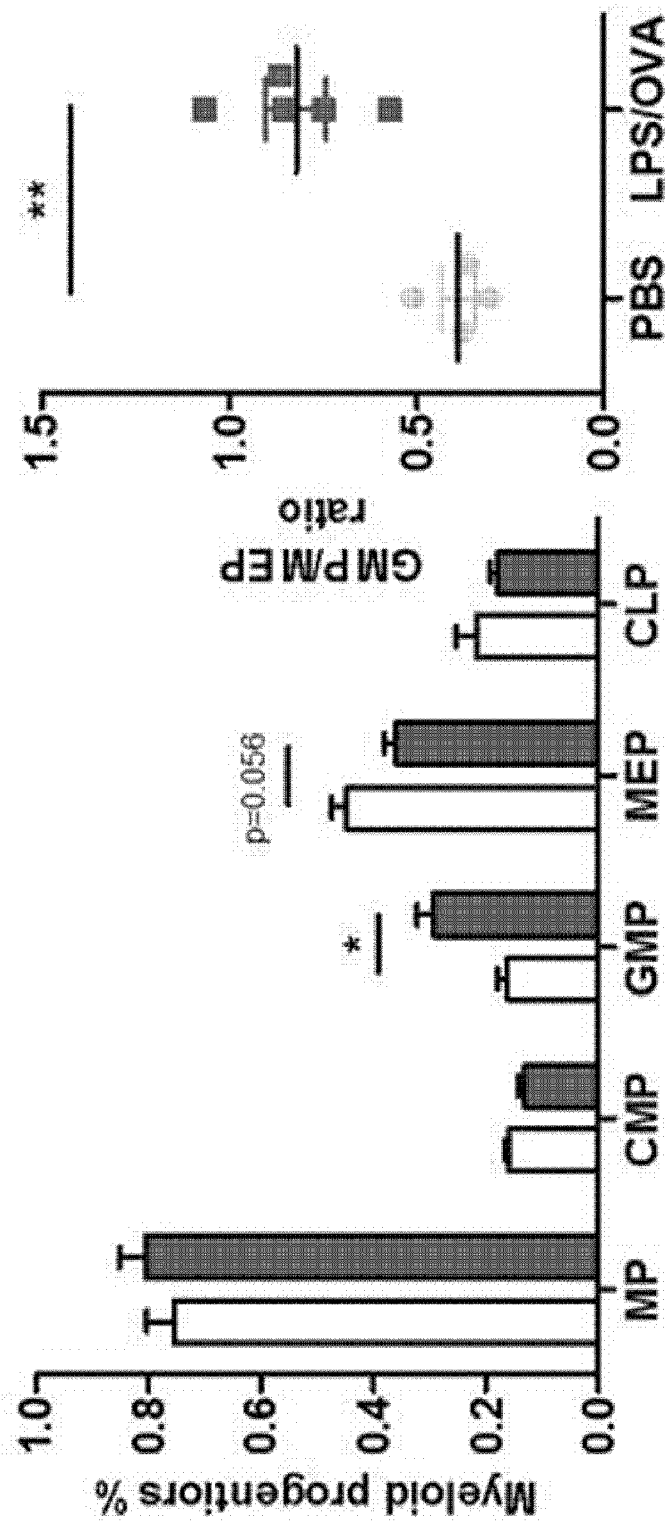
[Fig. 1a]



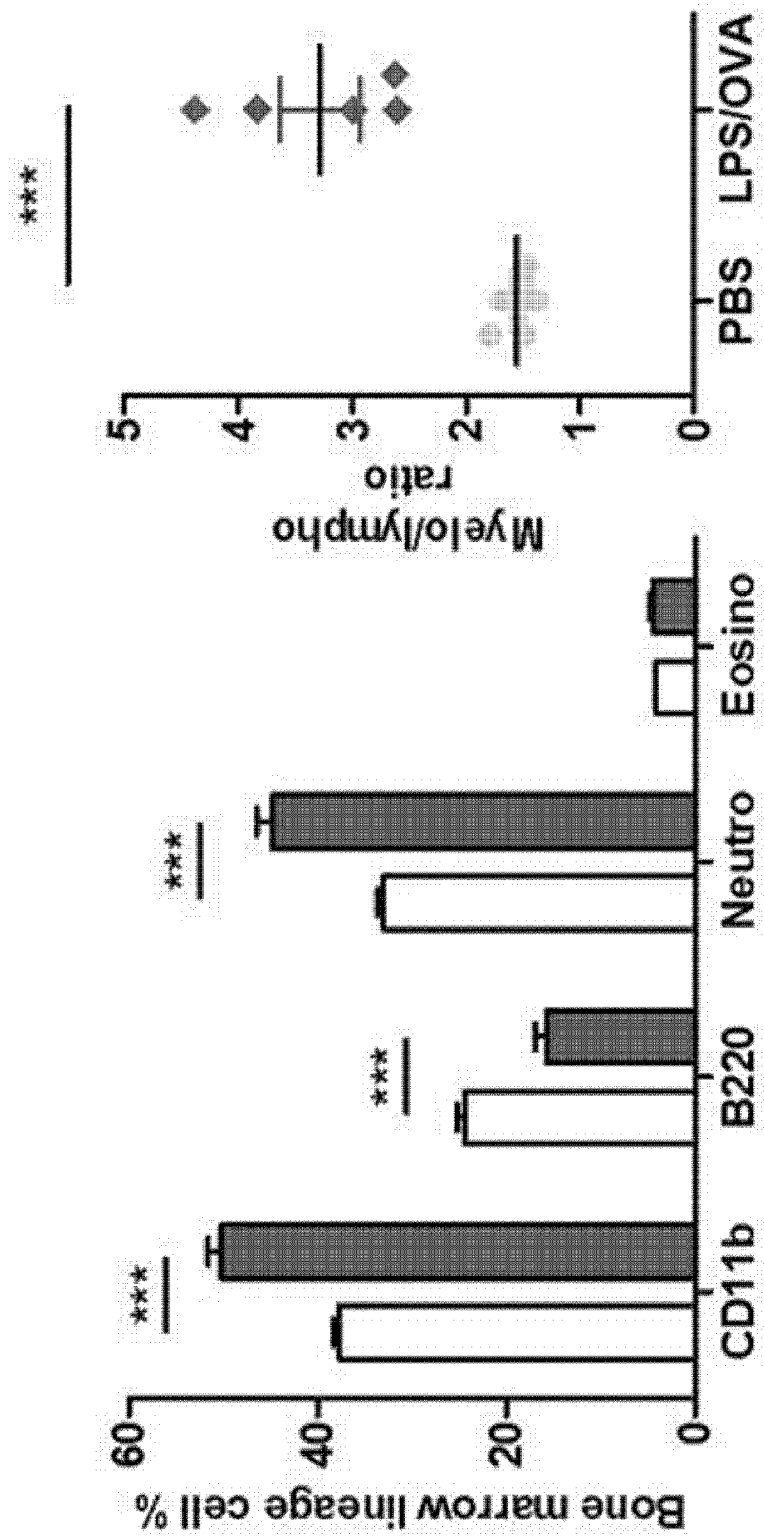
[Fig. 1b]



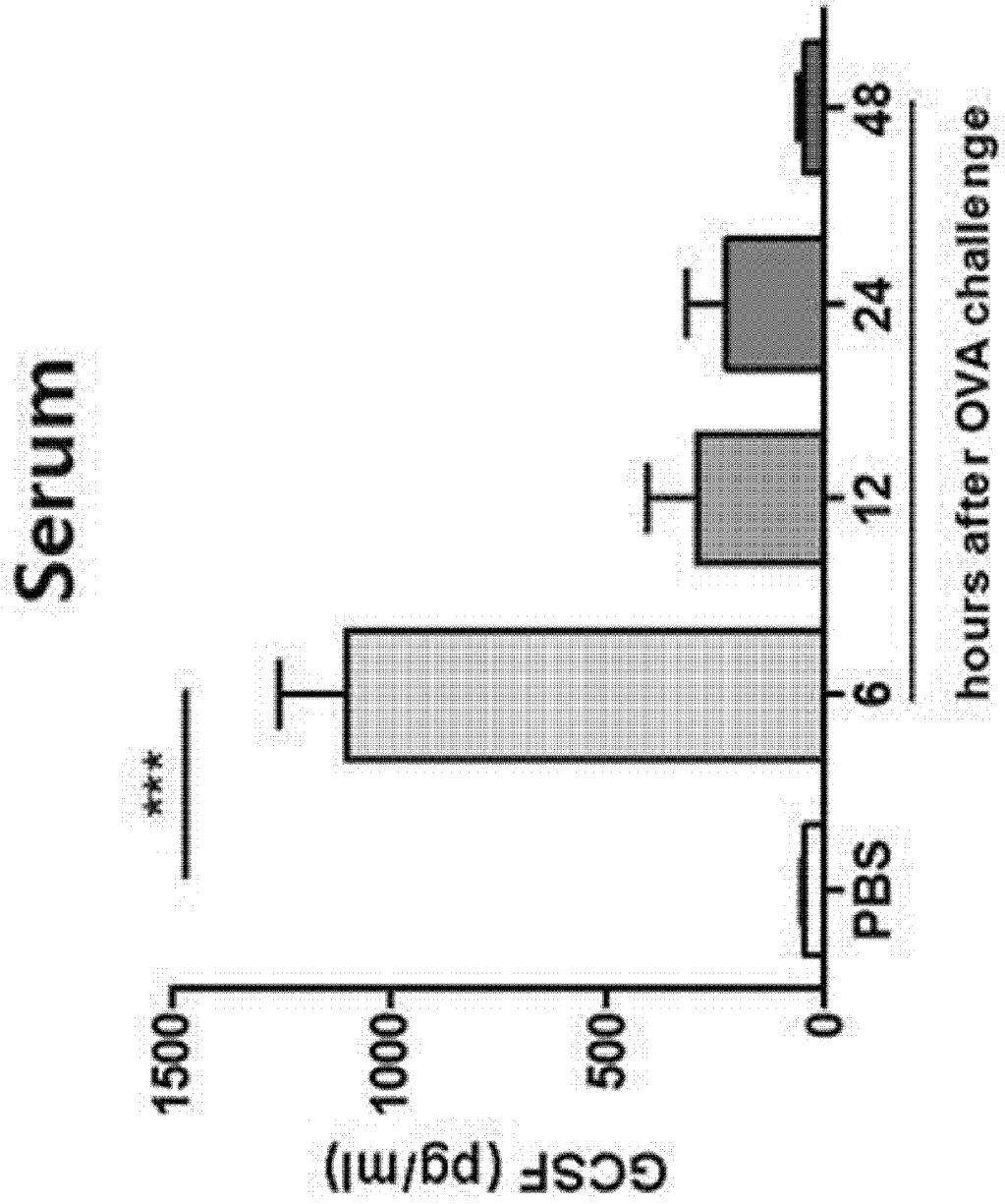
[Fig. 1c]



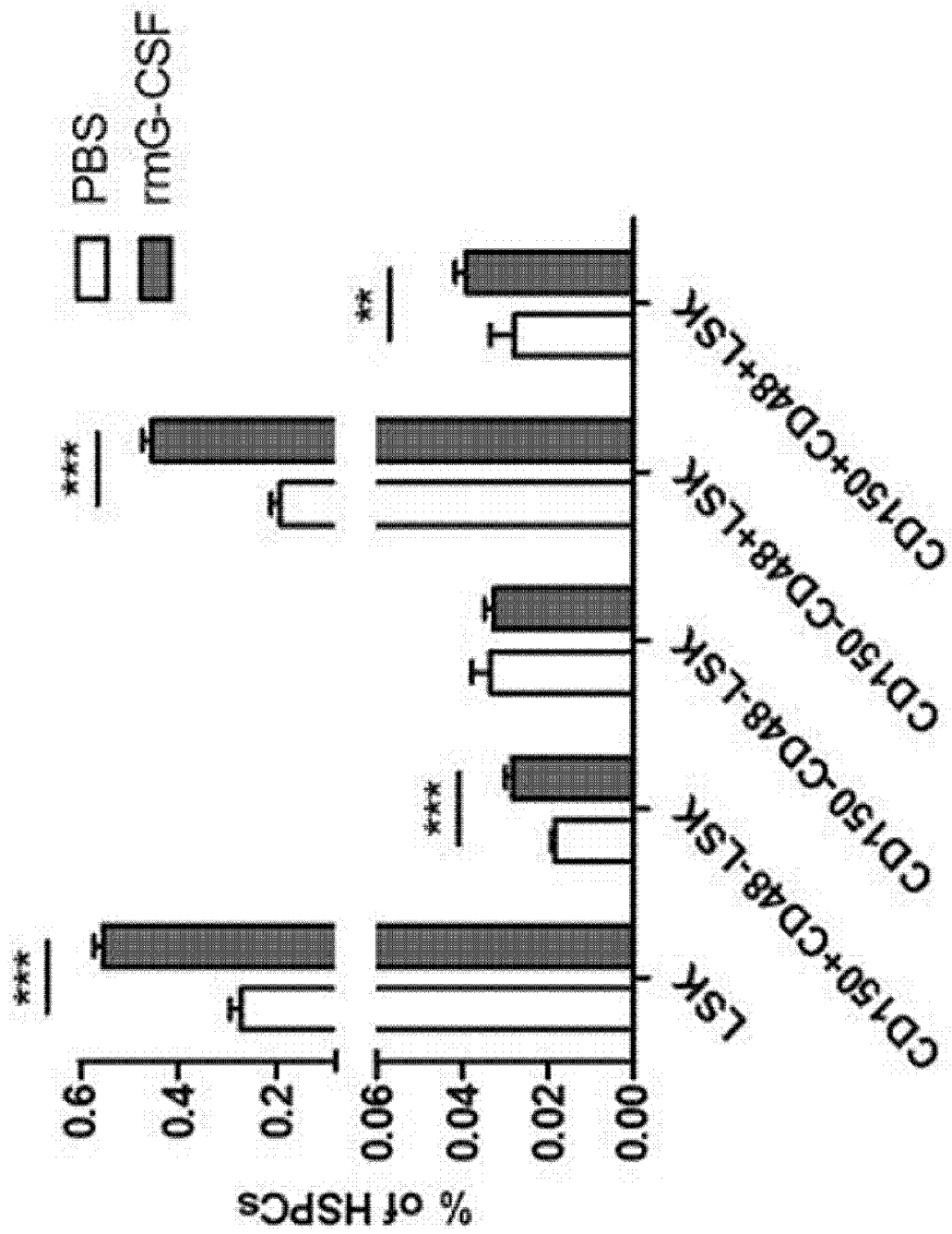
[Fig. 1d]



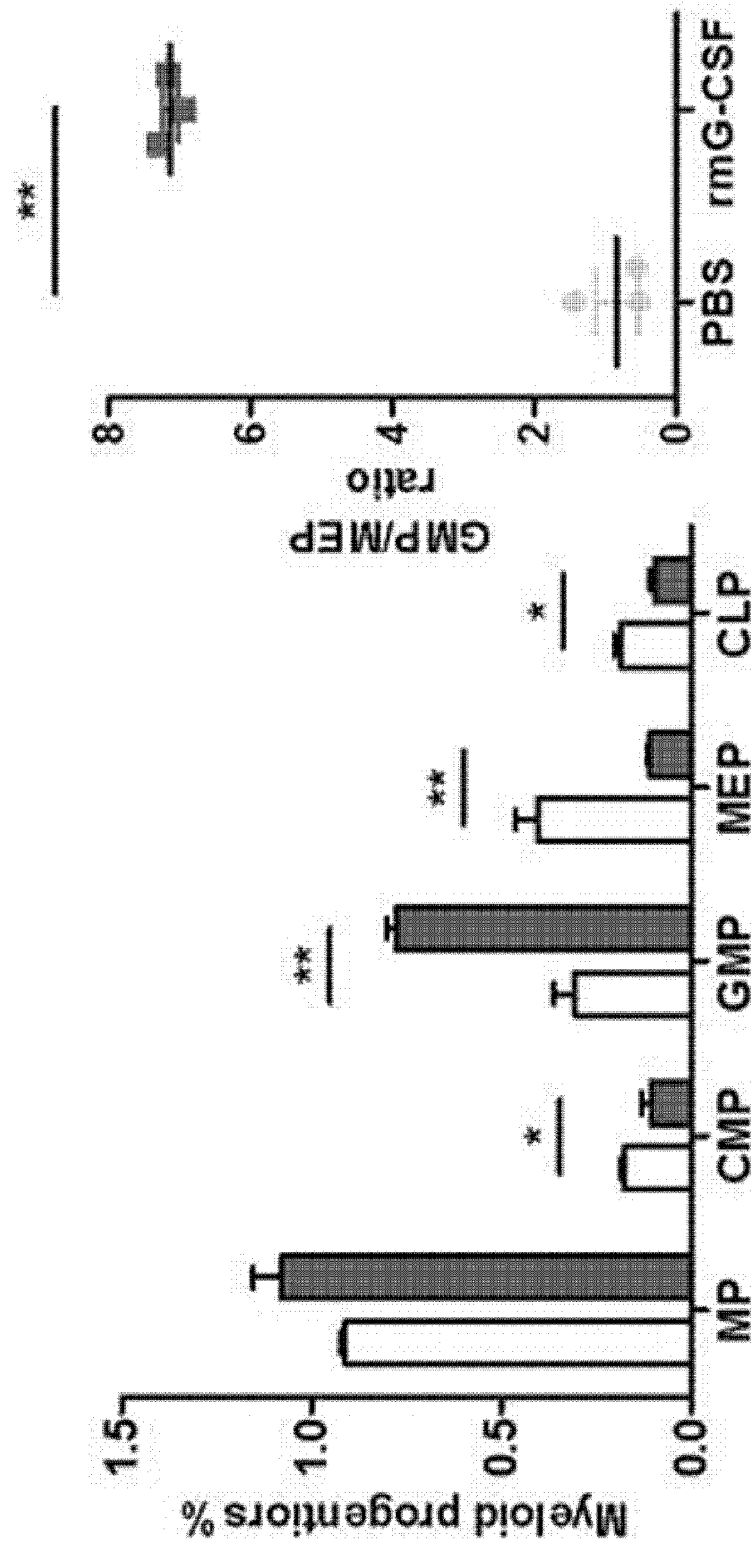
[Fig. 2a]



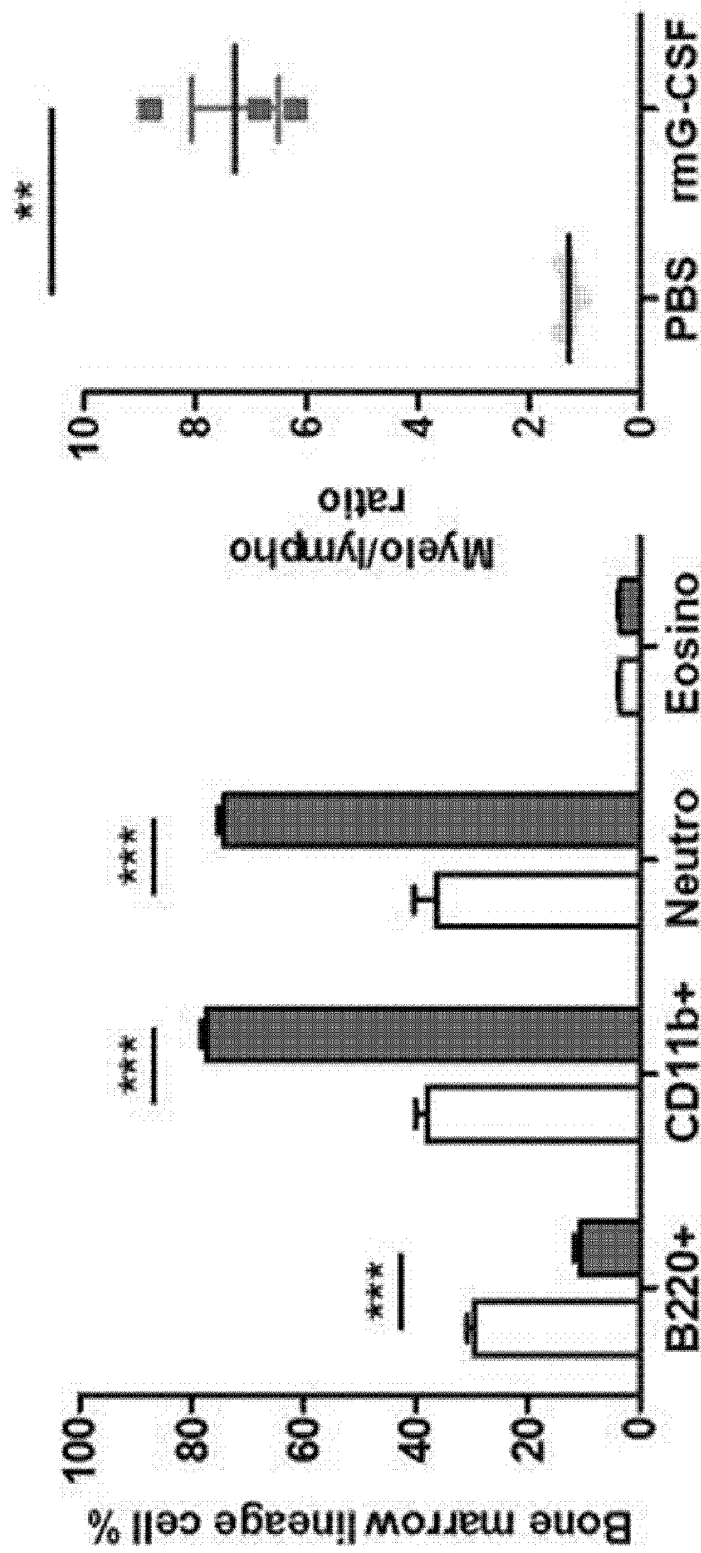
[Fig. 2b]



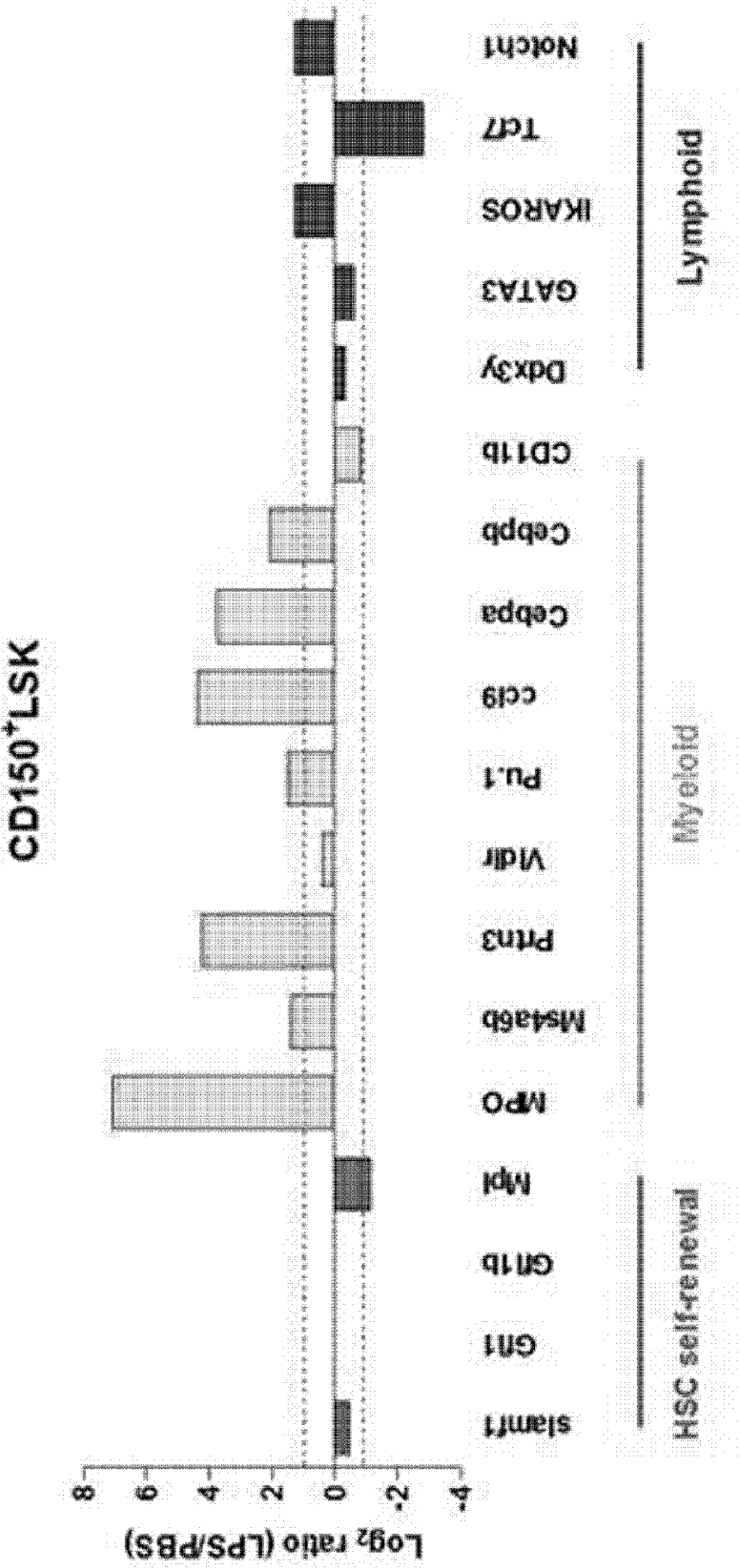
[Fig. 2c]



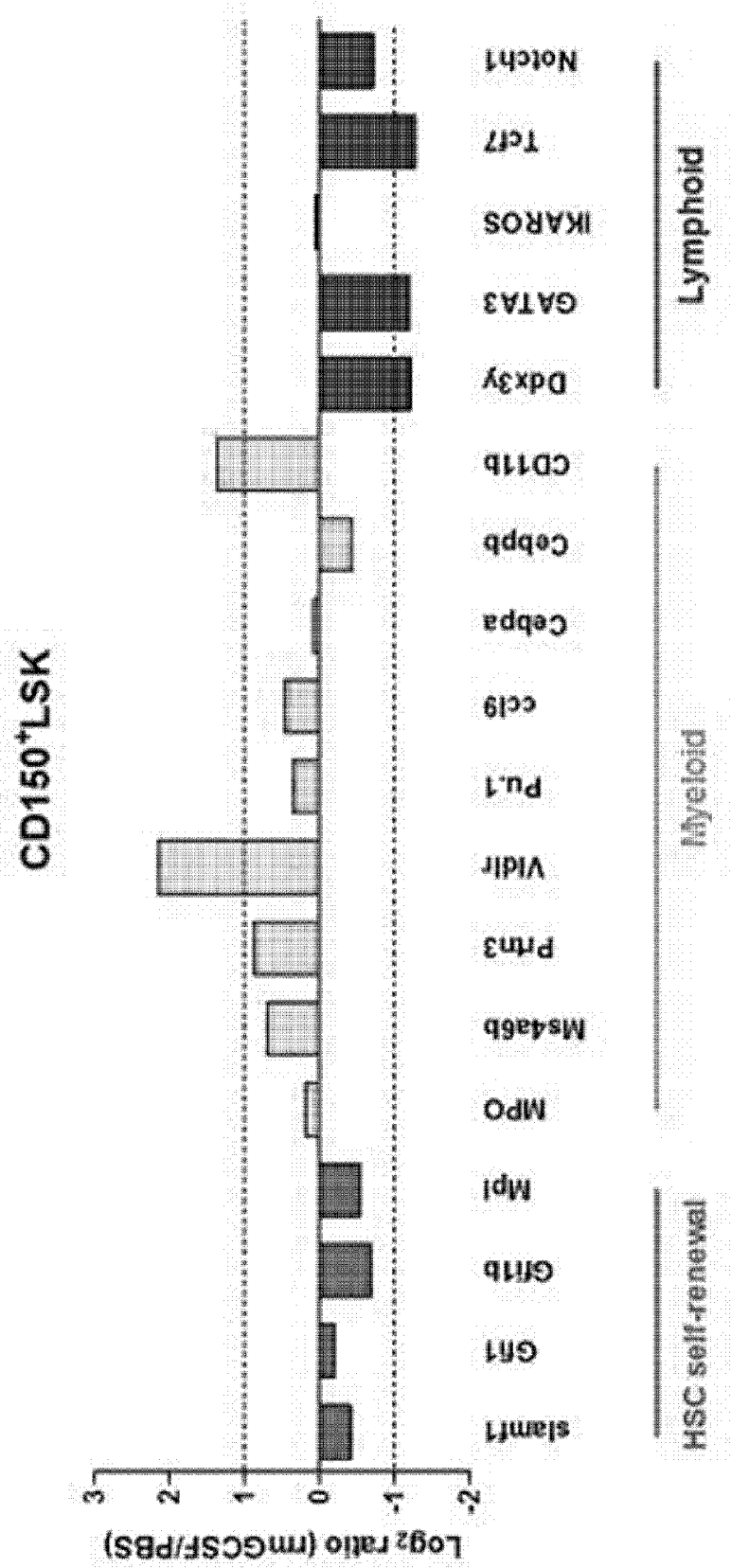
[Fig. 2d]



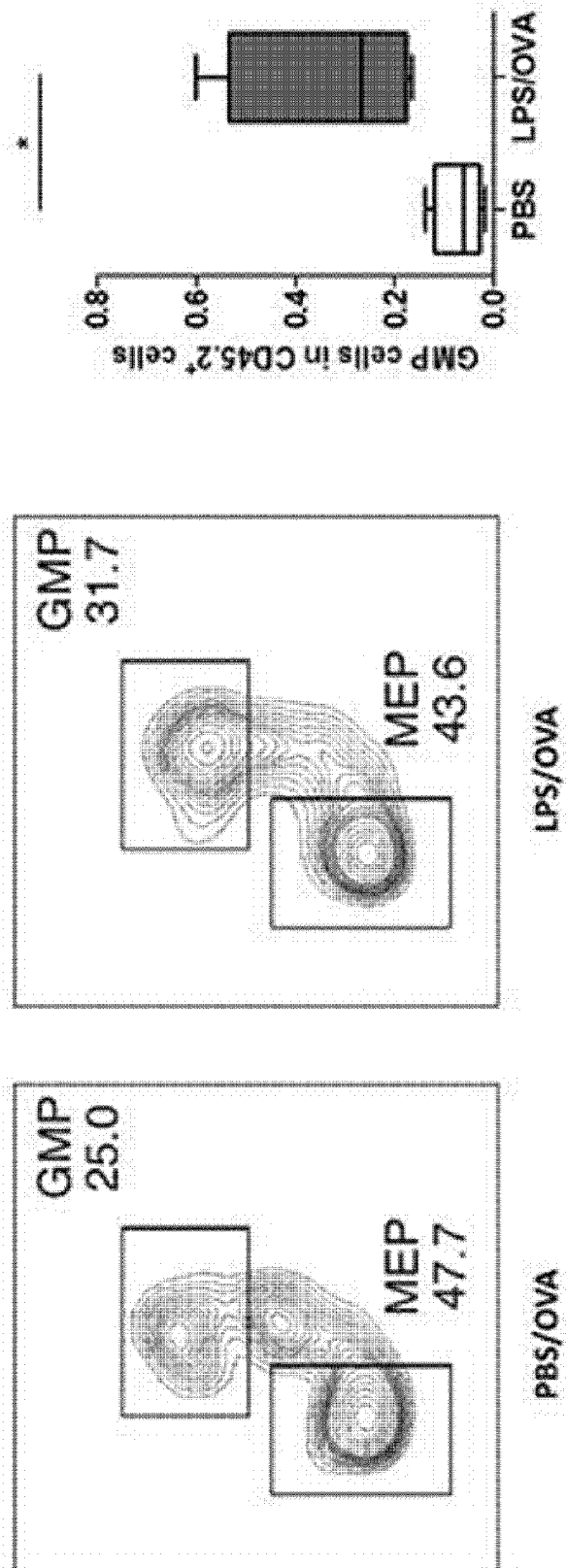
[Fig. 3a]



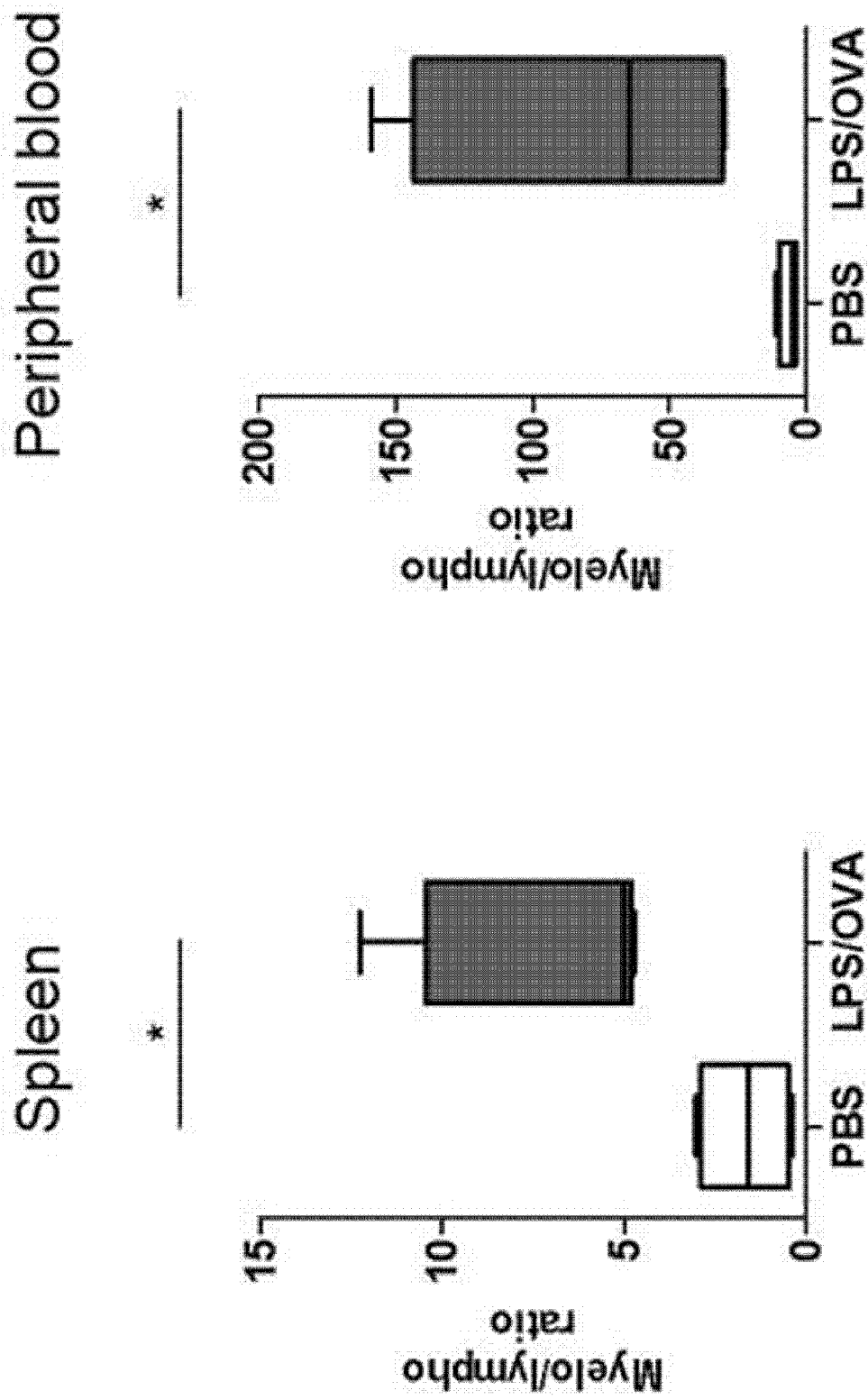
[Fig. 3b]



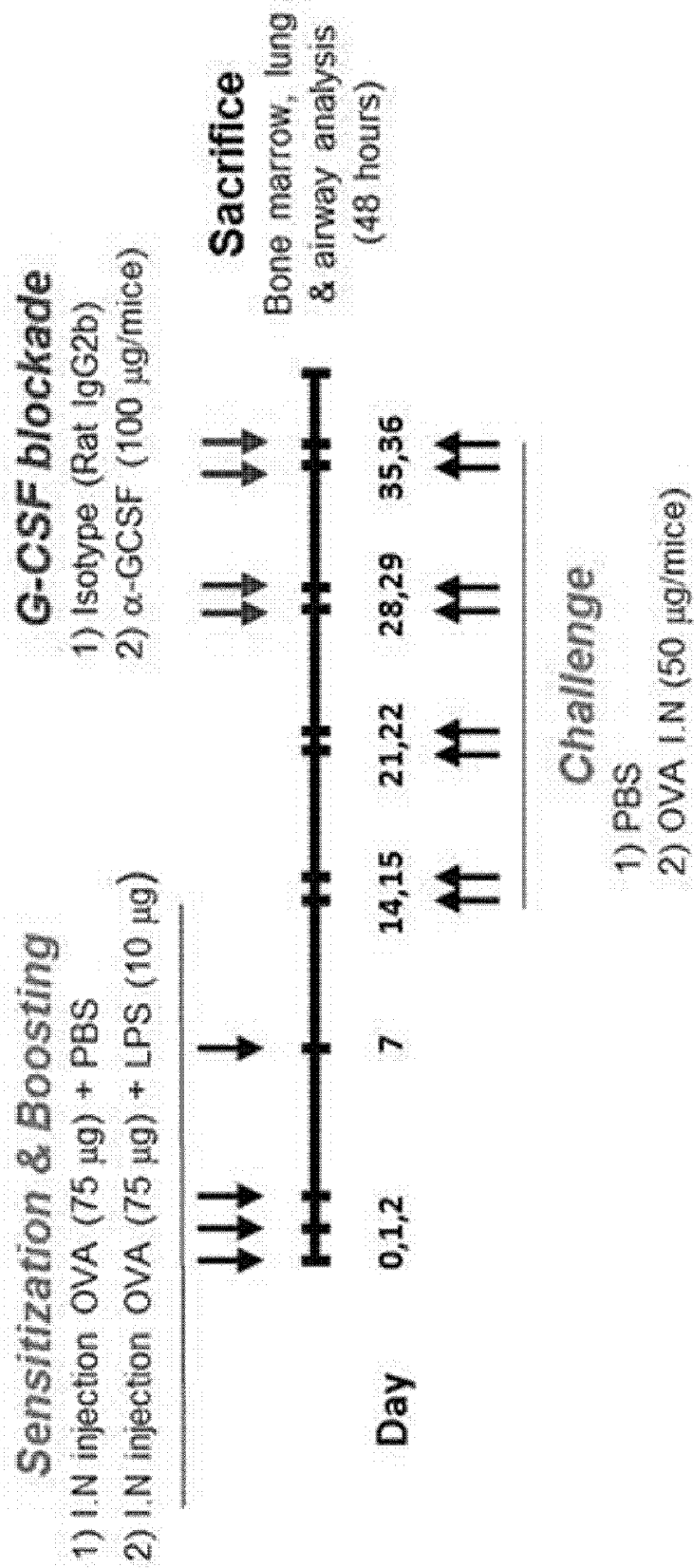
[Fig. 3c]



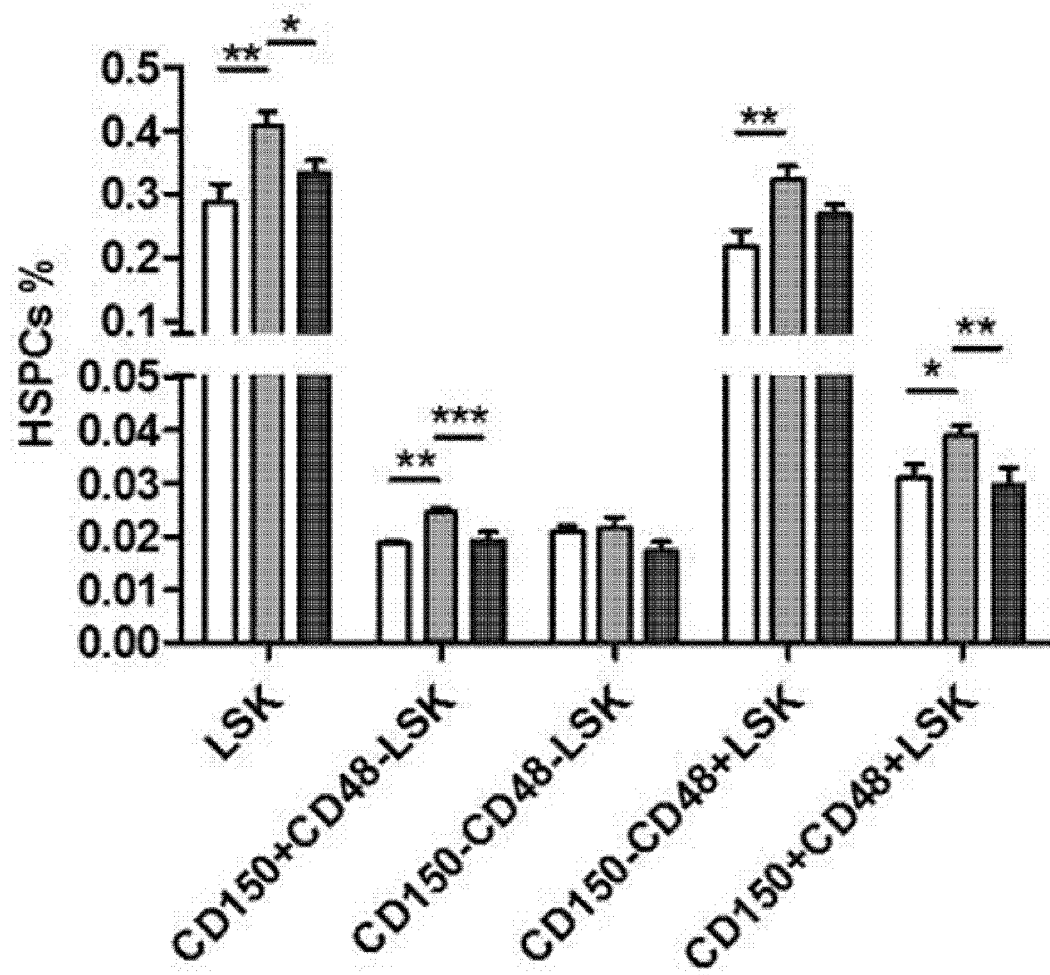
[Fig. 3d]



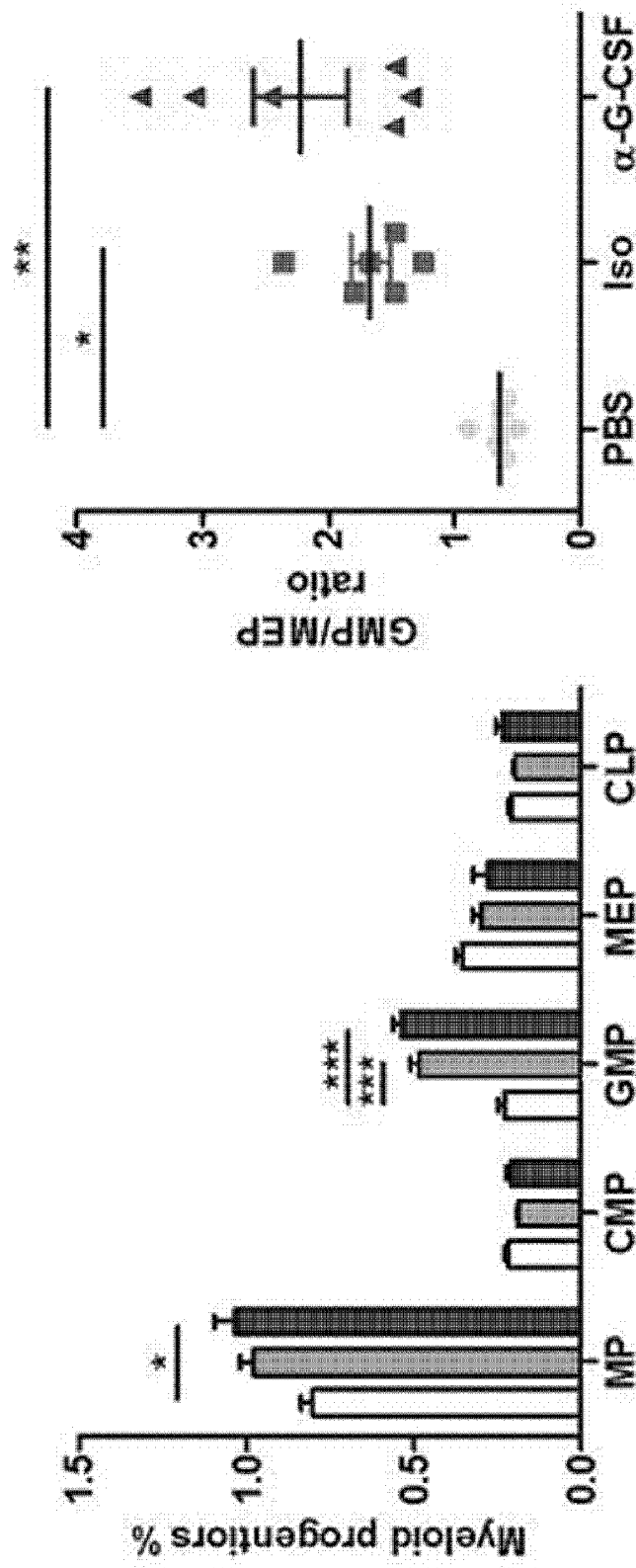
[Fig. 4a]



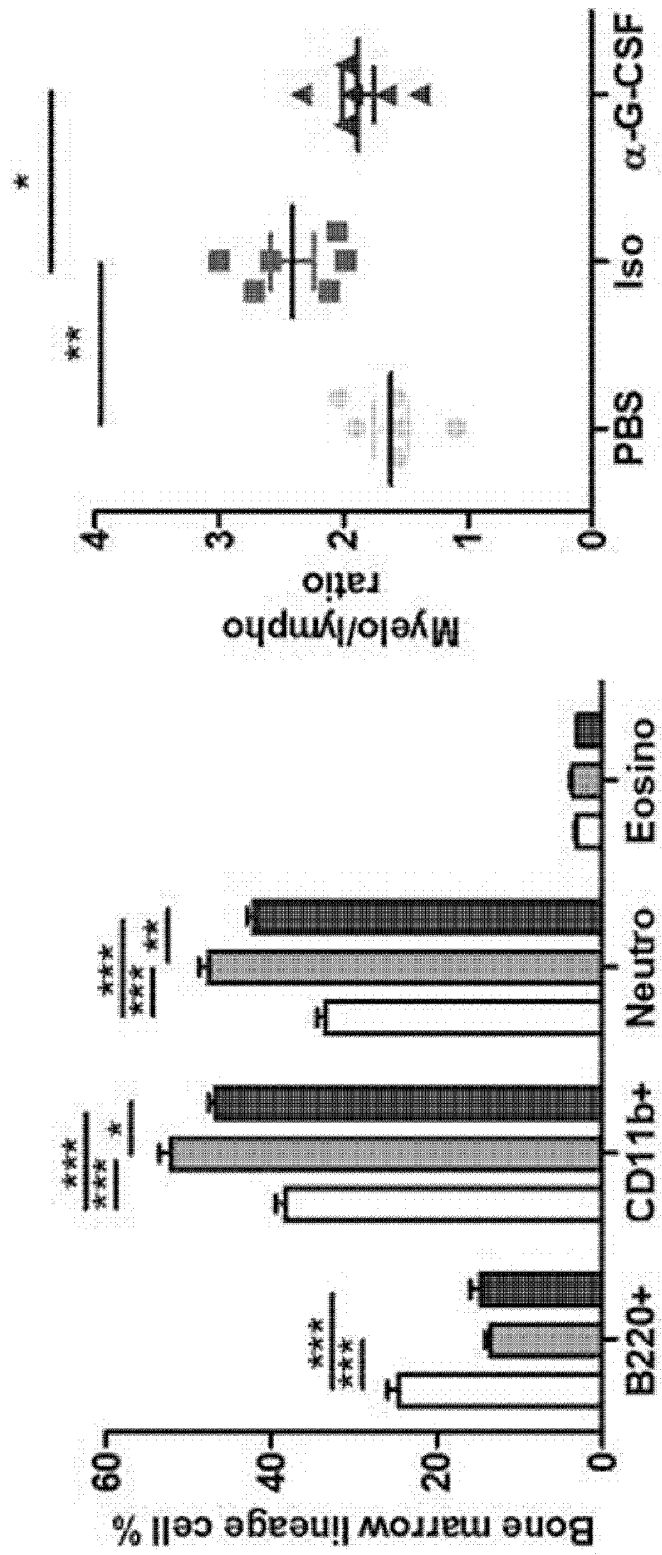
[Fig. 4b]



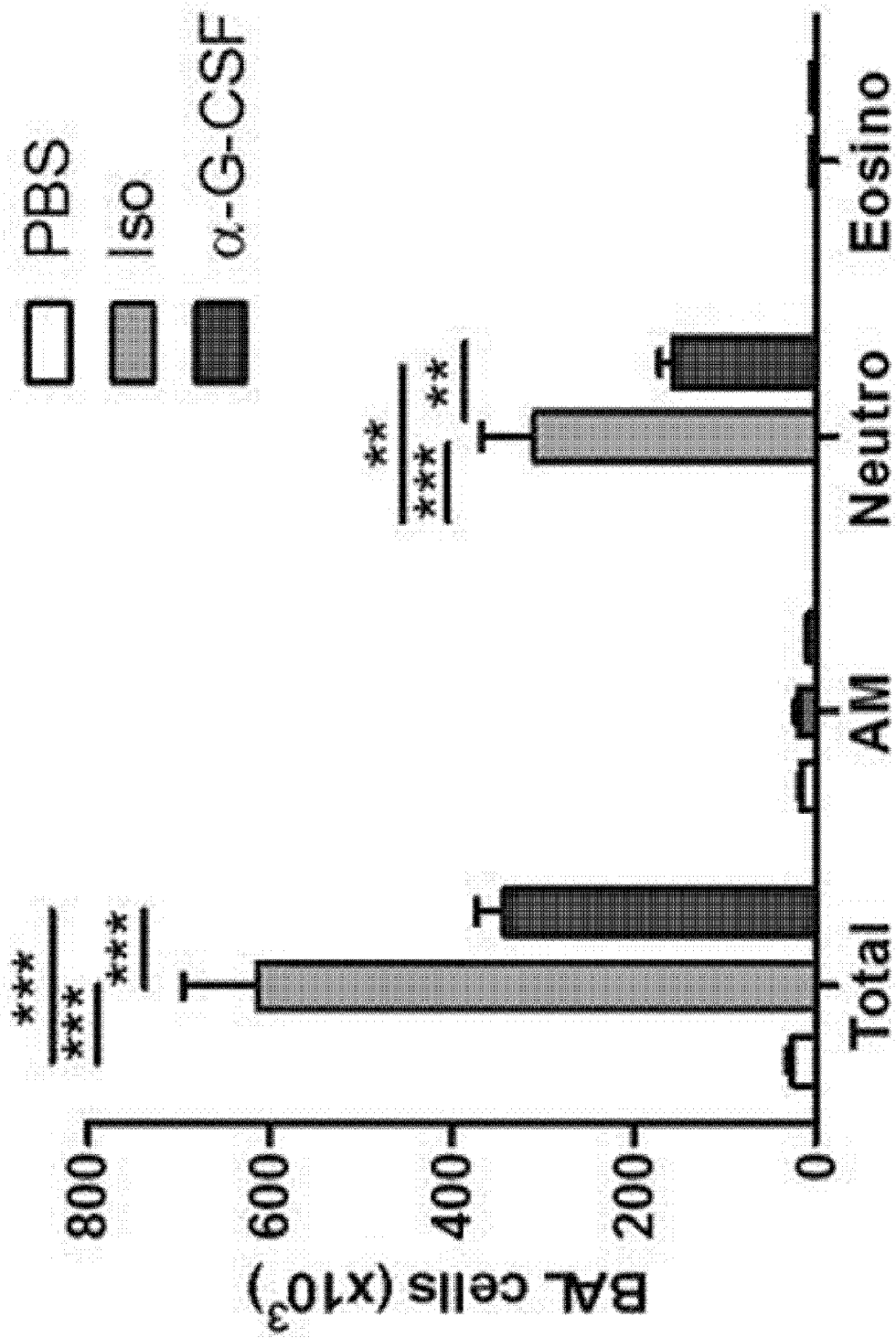
[Fig. 4c]



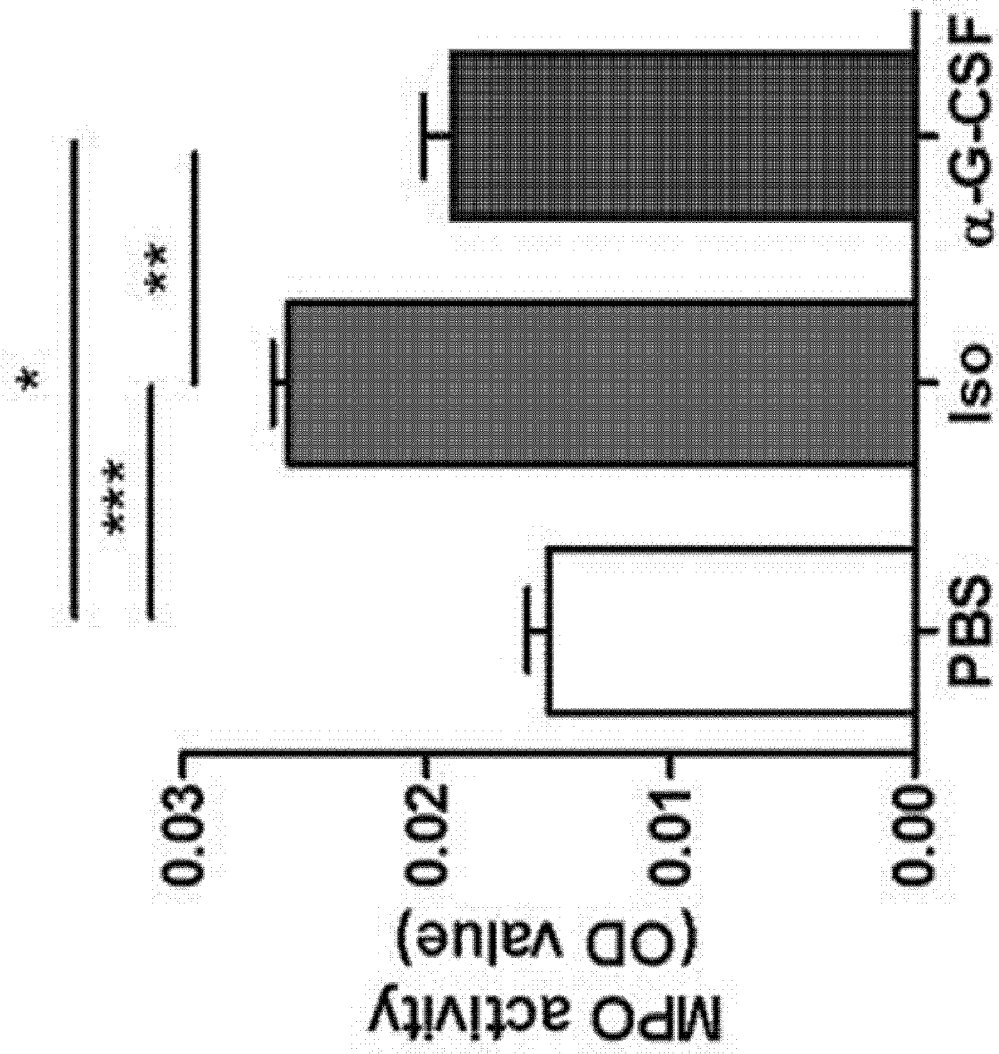
[Fig. 4d]



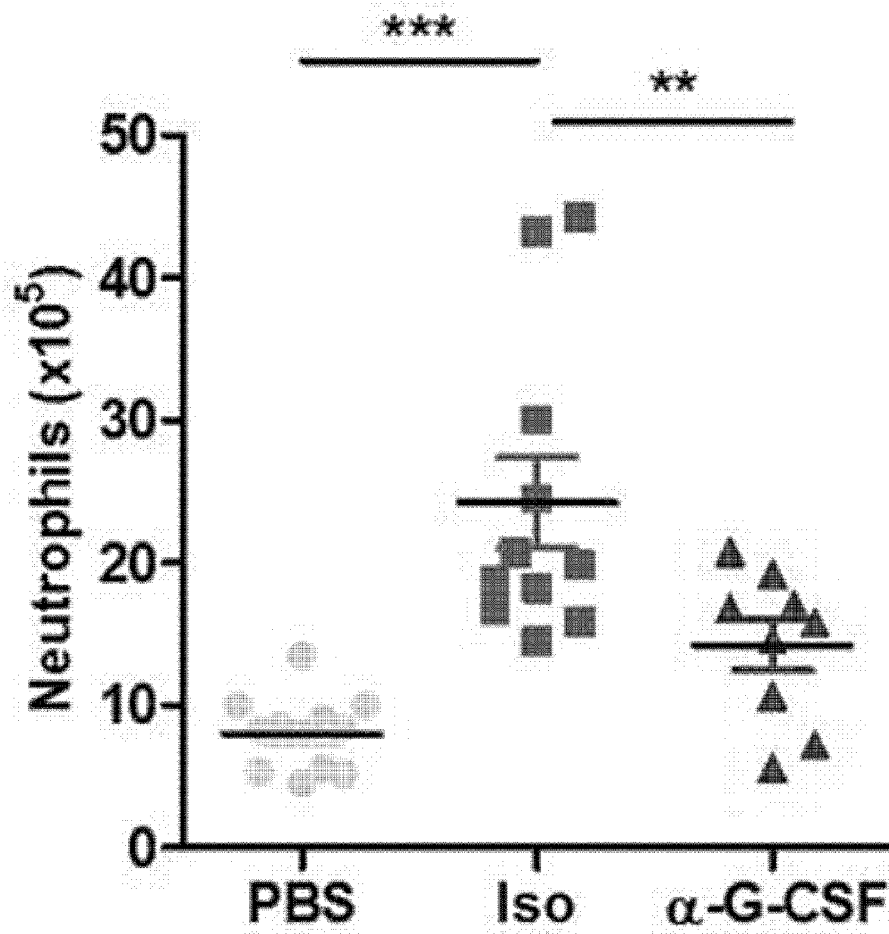
[Fig. 4e]



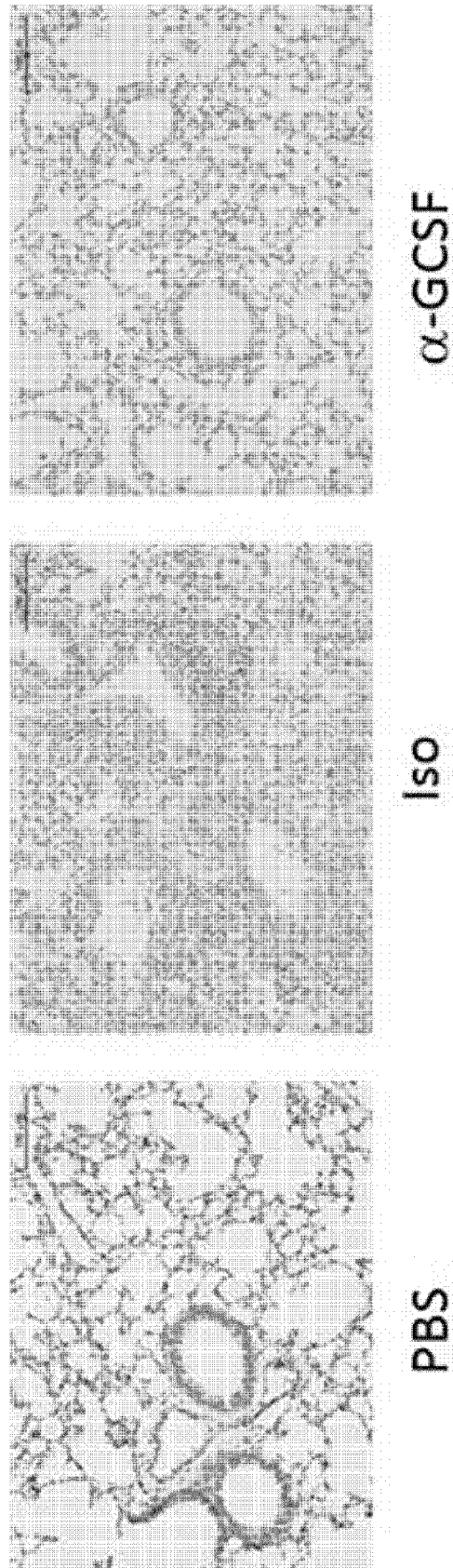
[Fig. 4f]



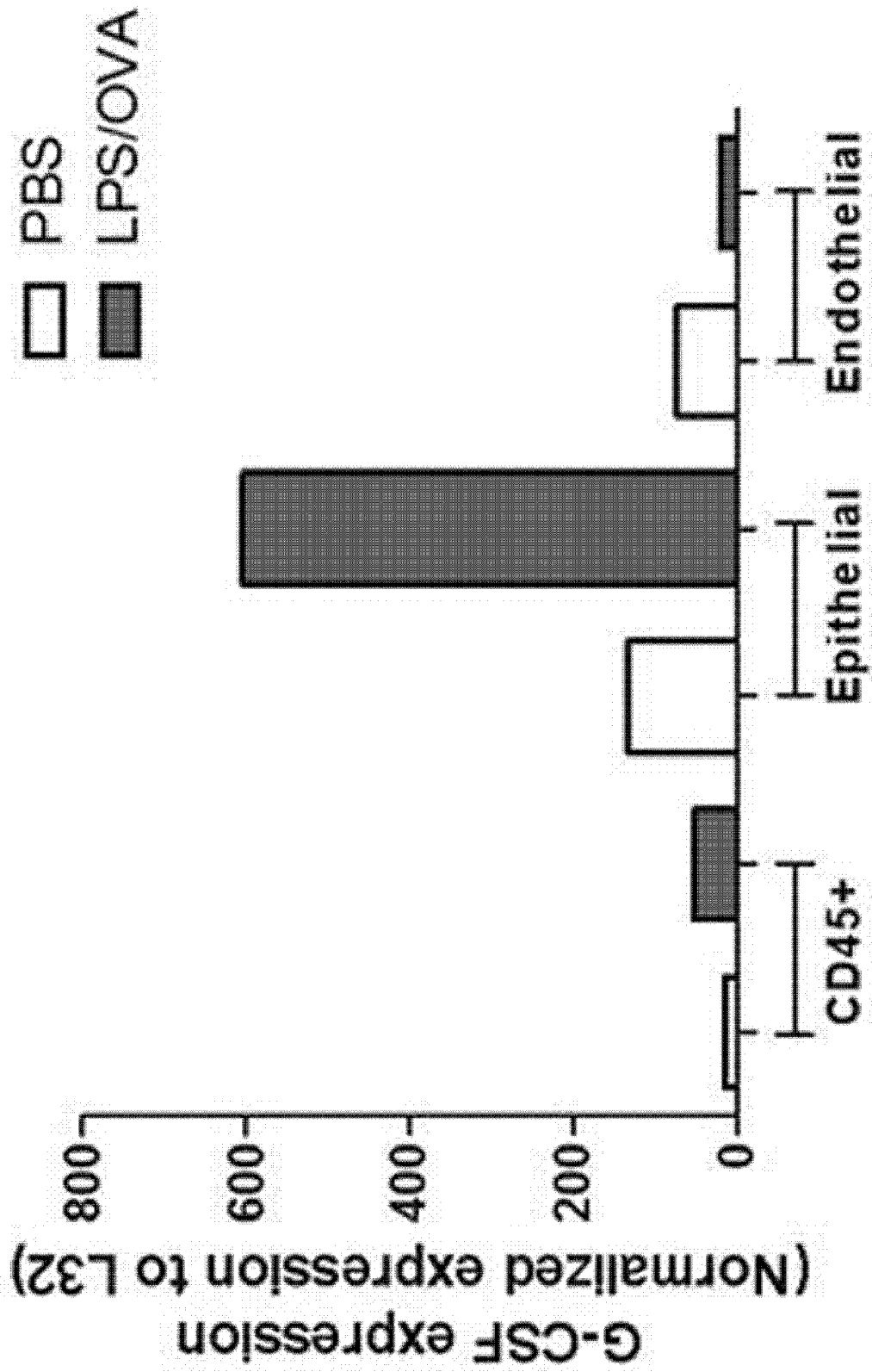
[Fig. 4g]



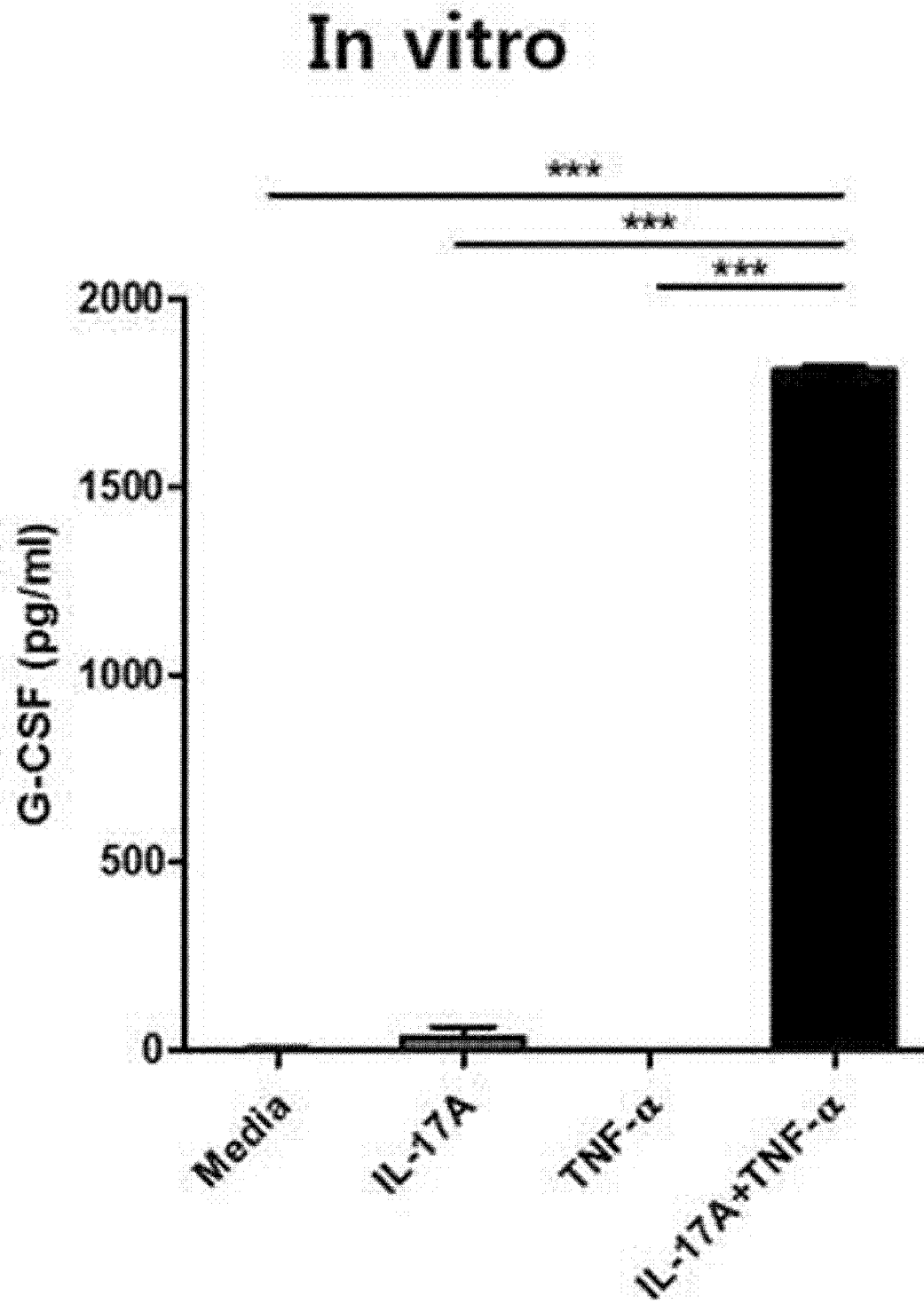
[Fig. 4h]



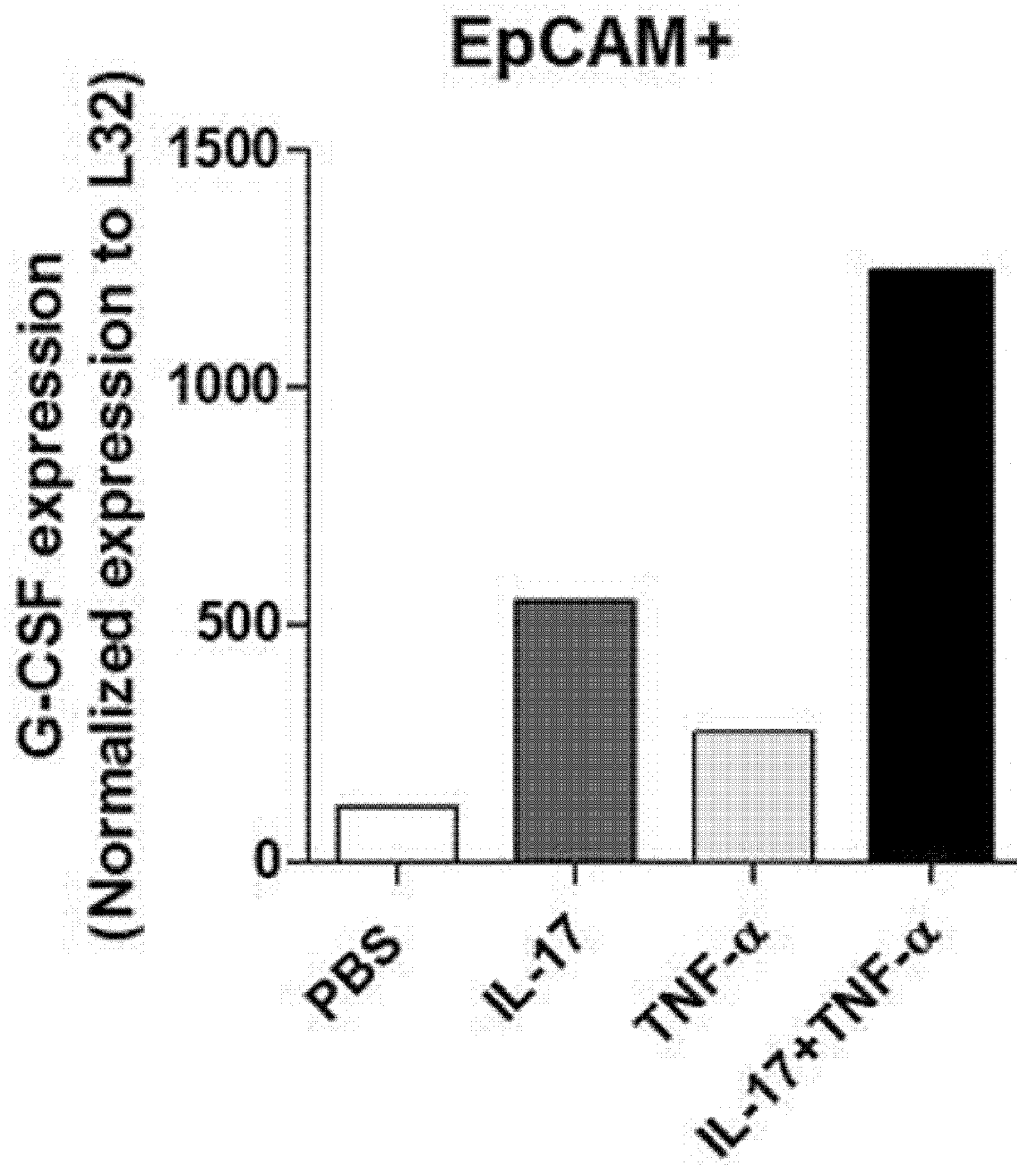
[Fig. 5a]



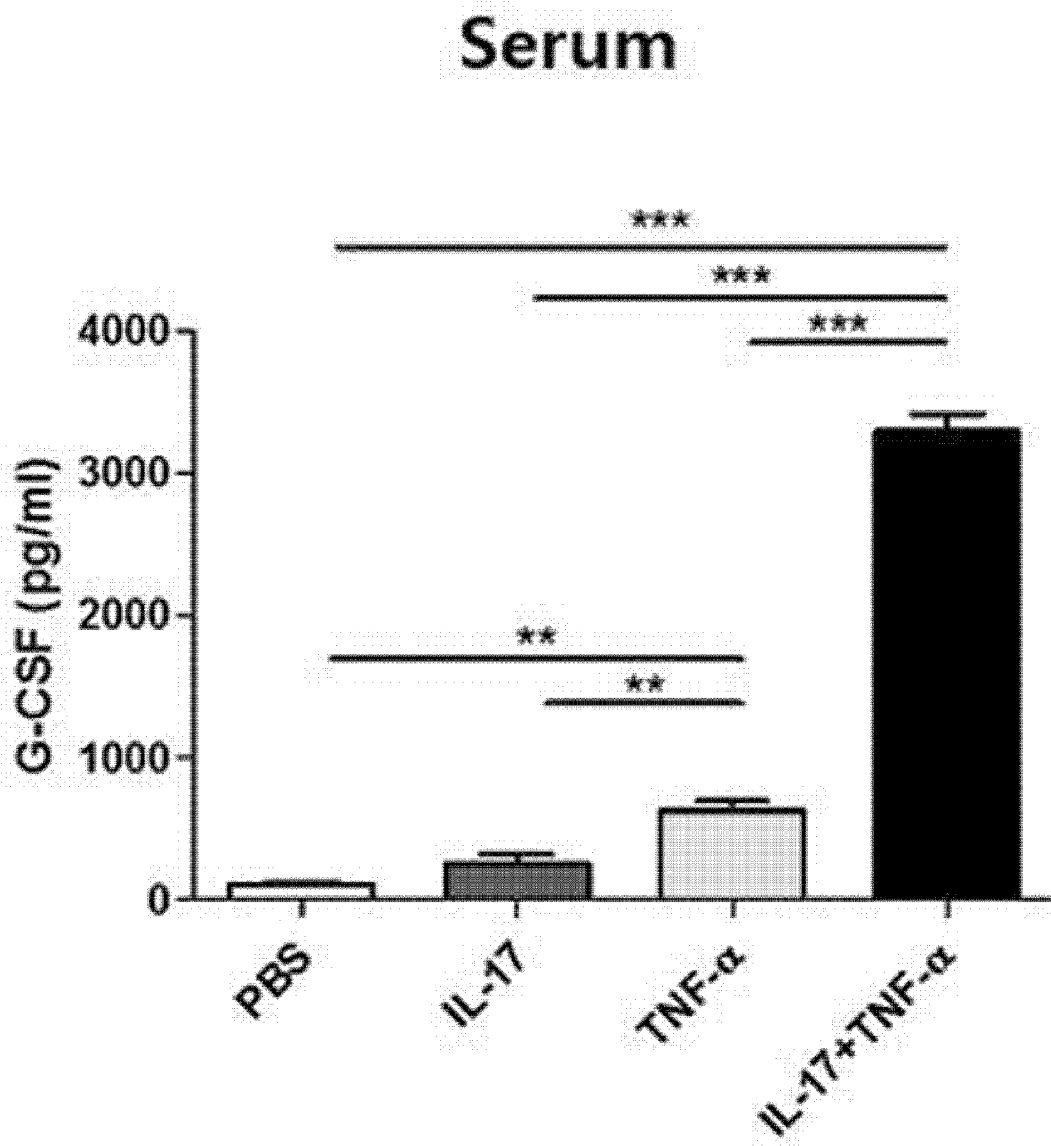
[Fig. 5b]



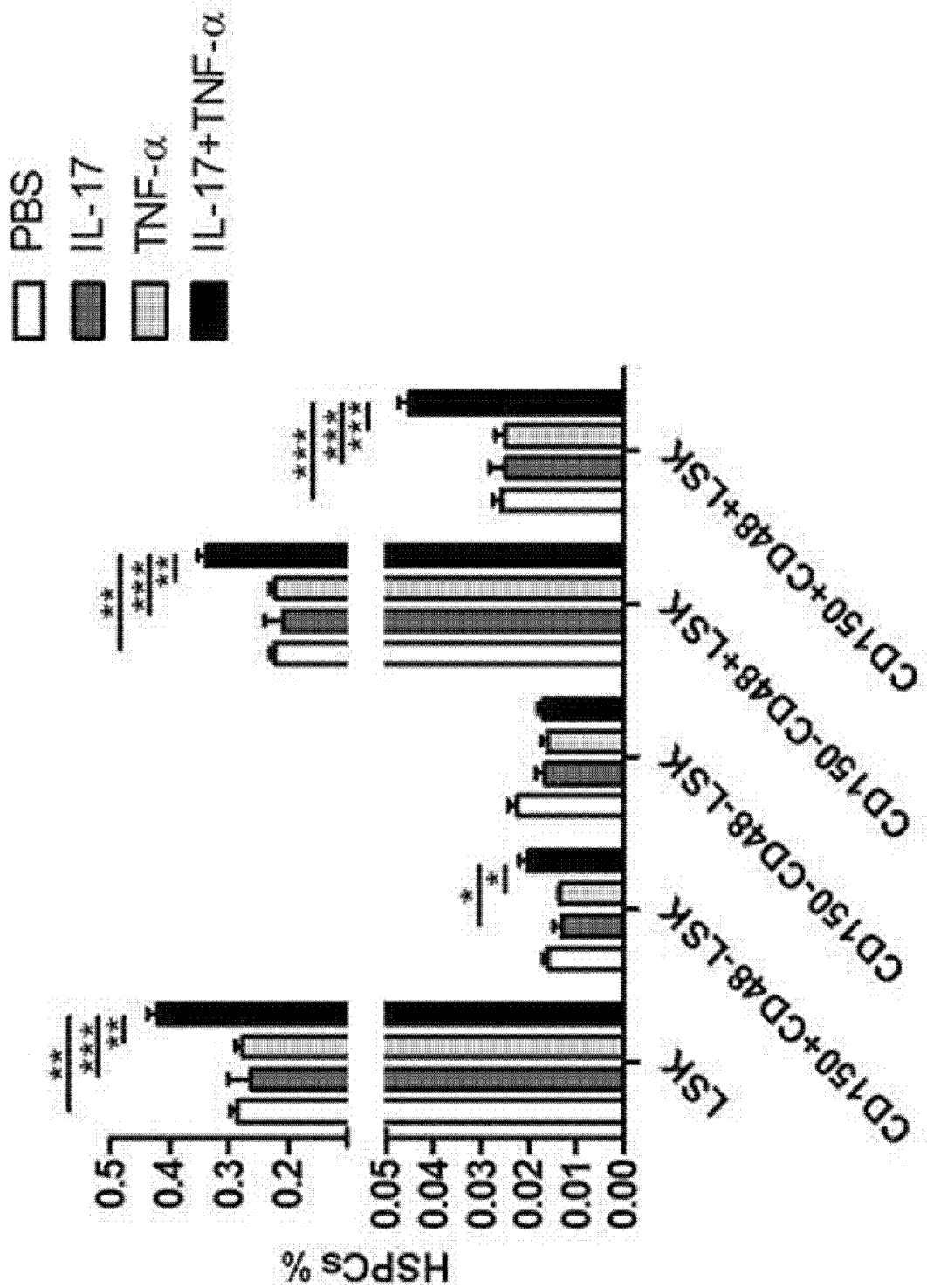
[Fig. 5c]



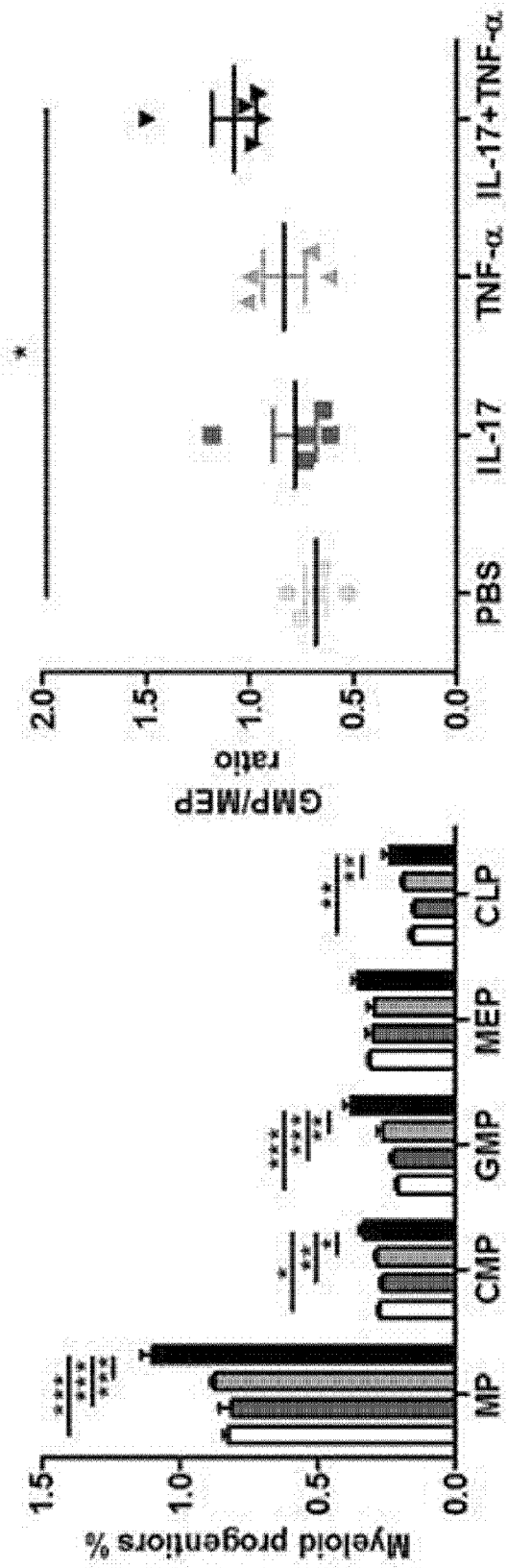
[Fig. 5d]



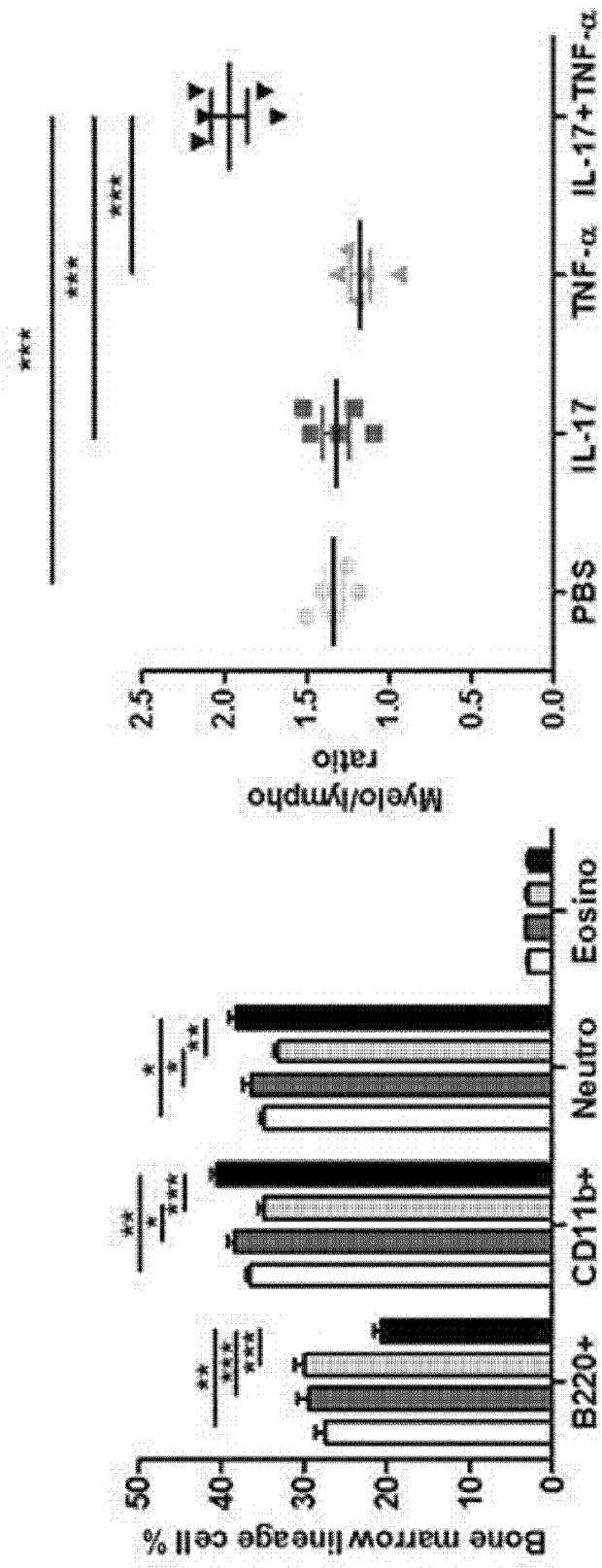
[Fig. 6a]



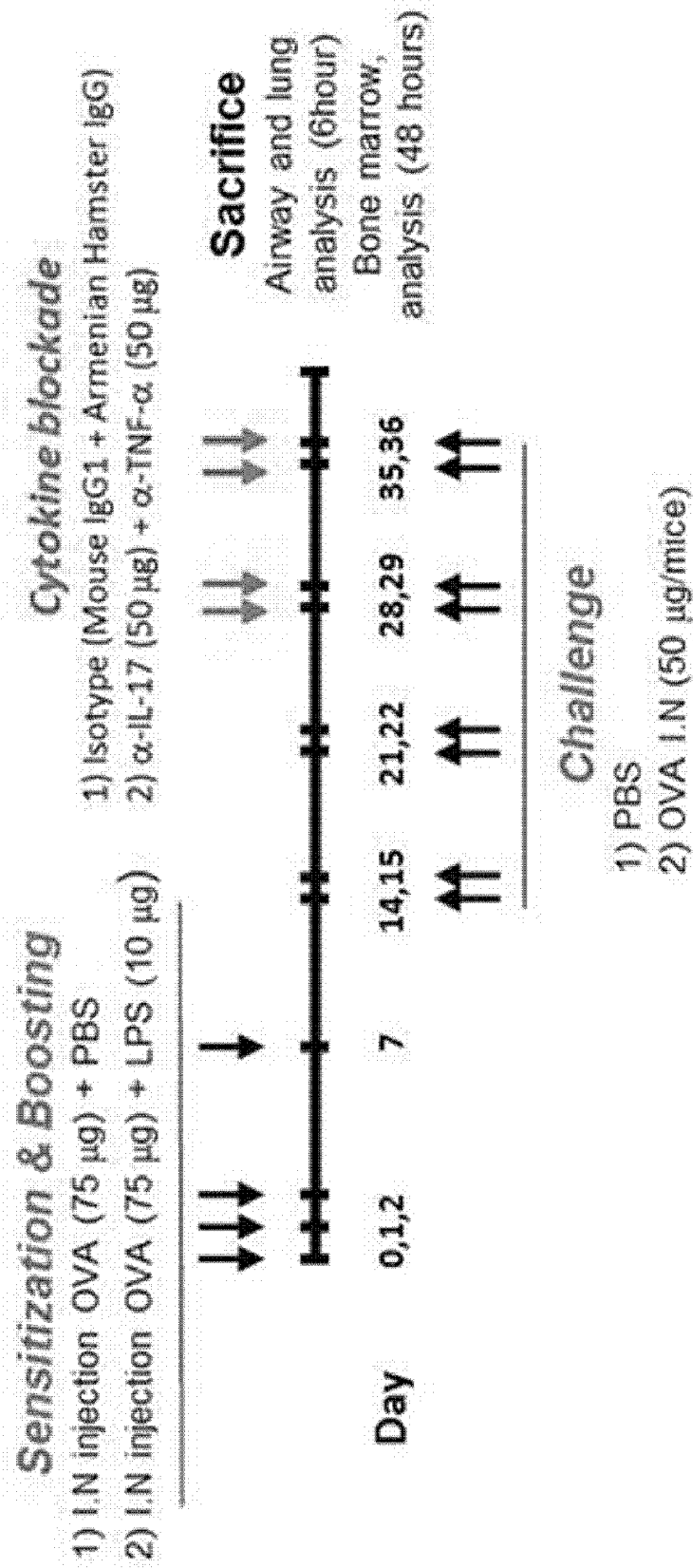
[Fig. 6b]



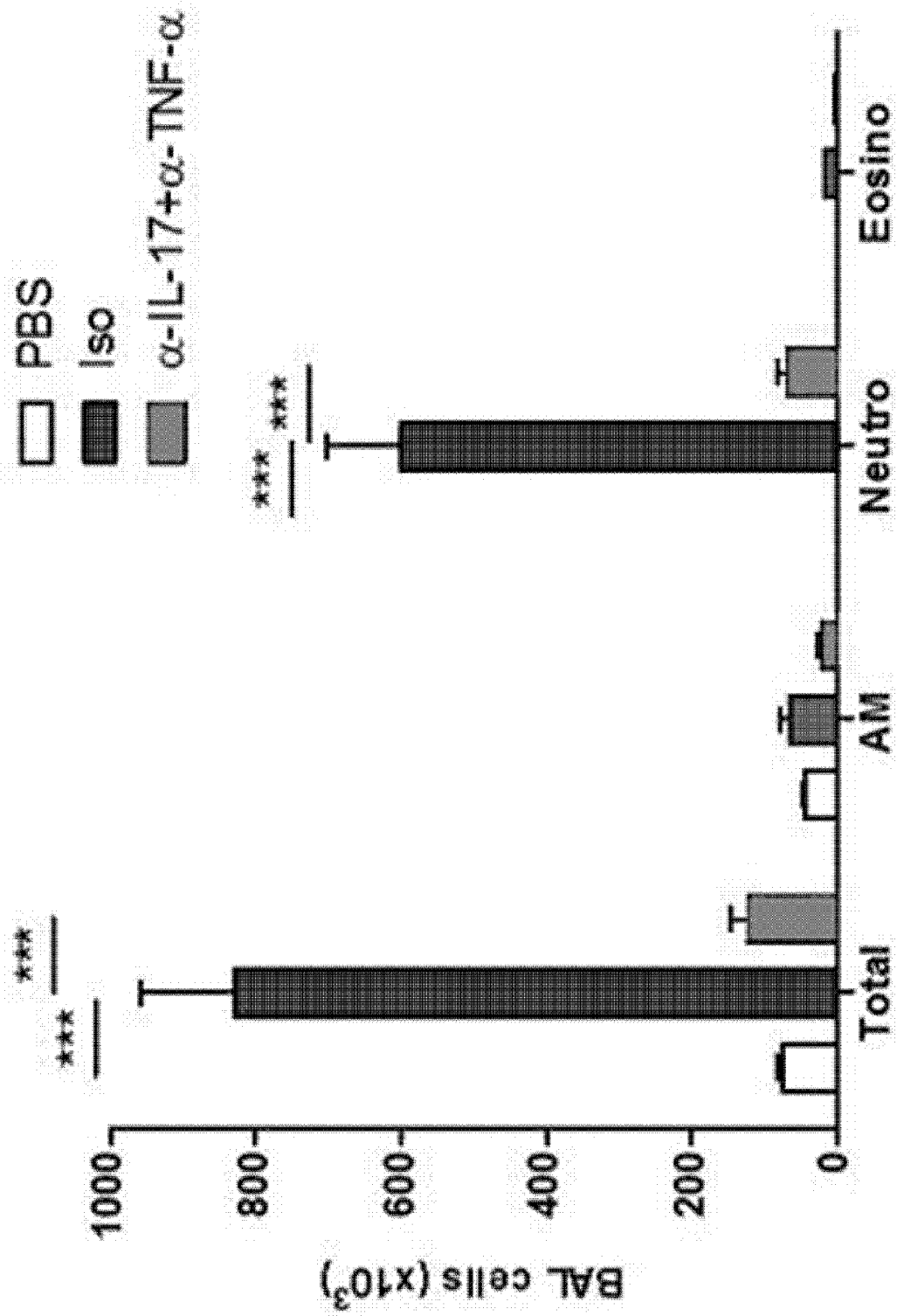
[Fig. 6c]



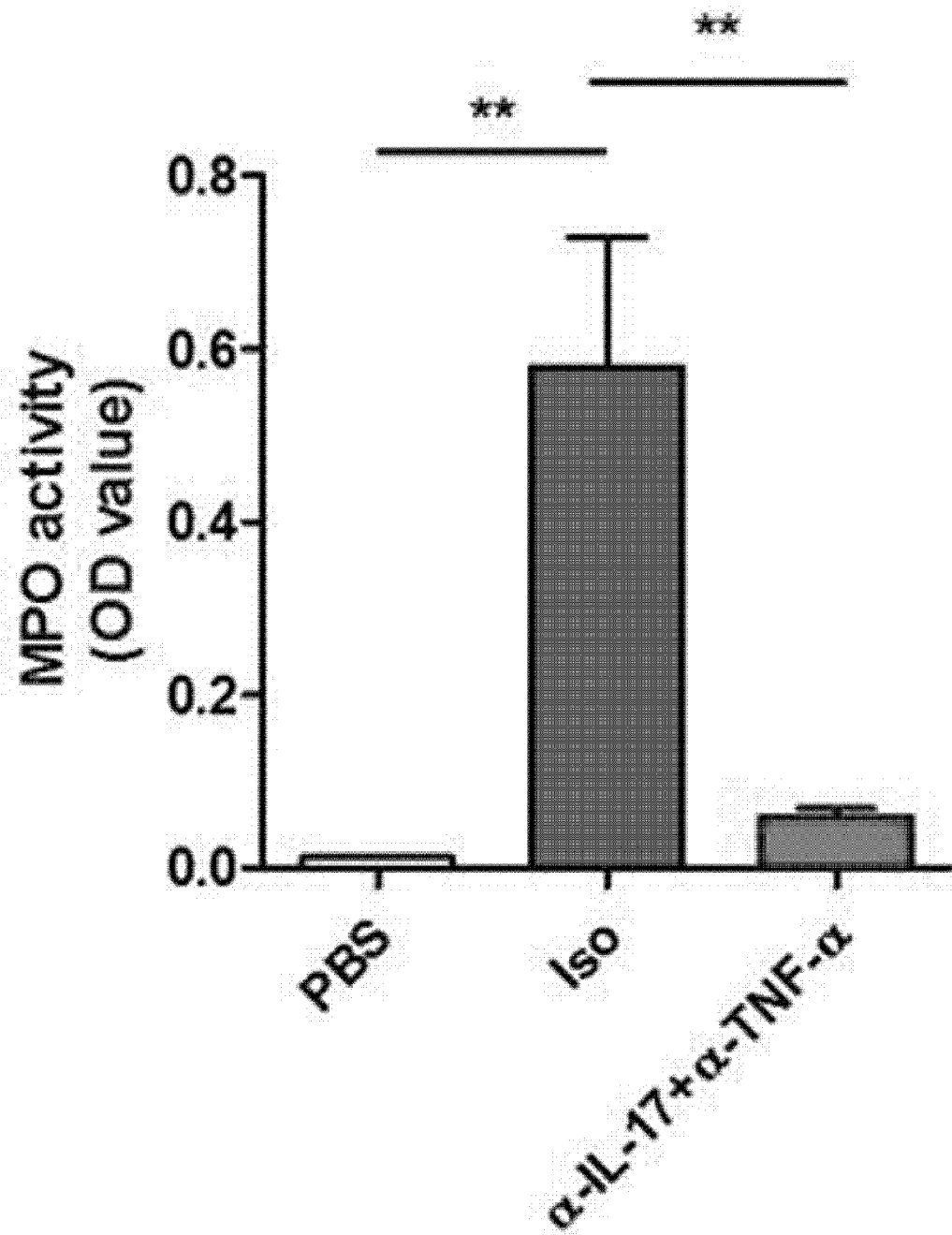
[Fig. 7a]



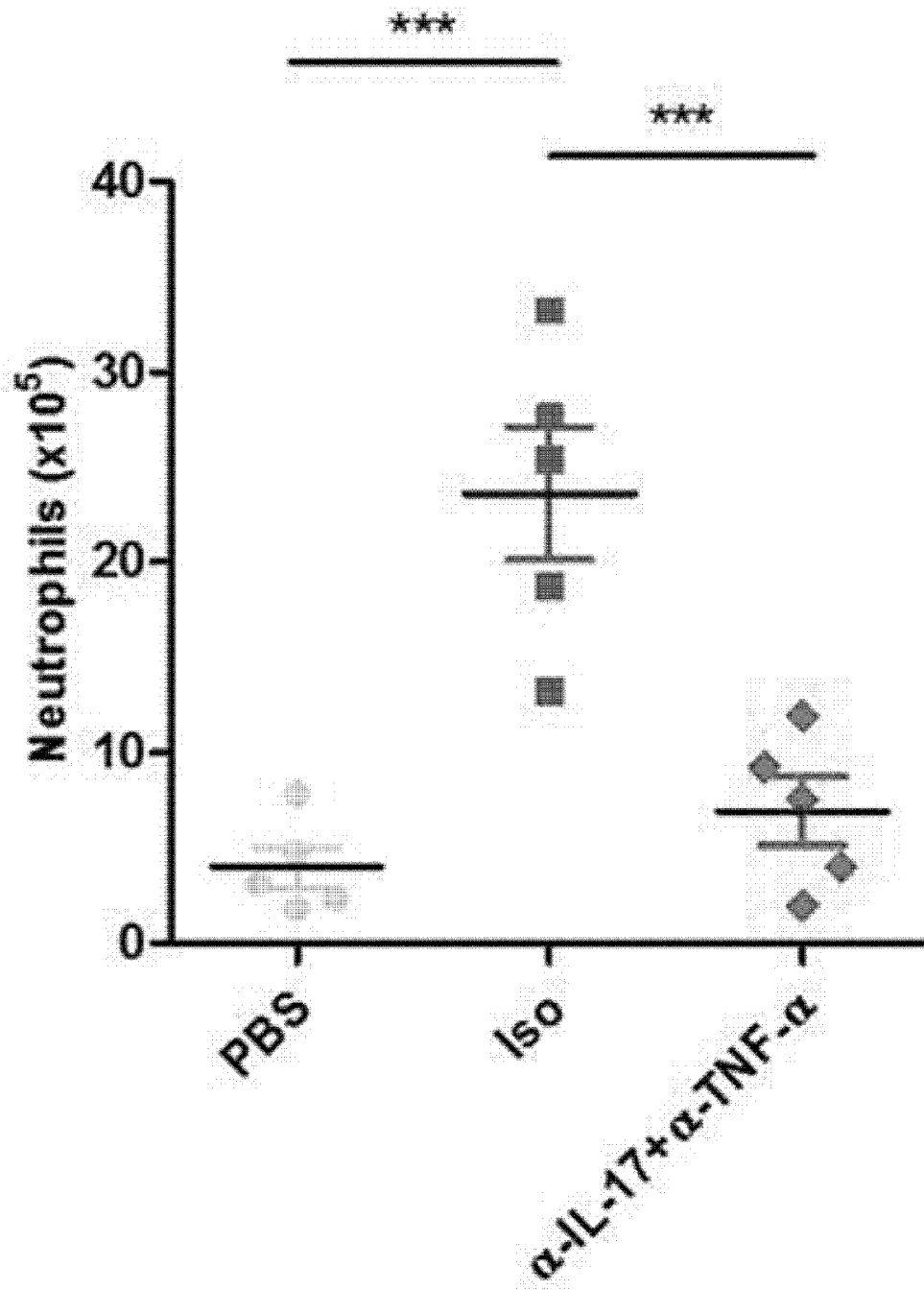
[Fig. 7b]



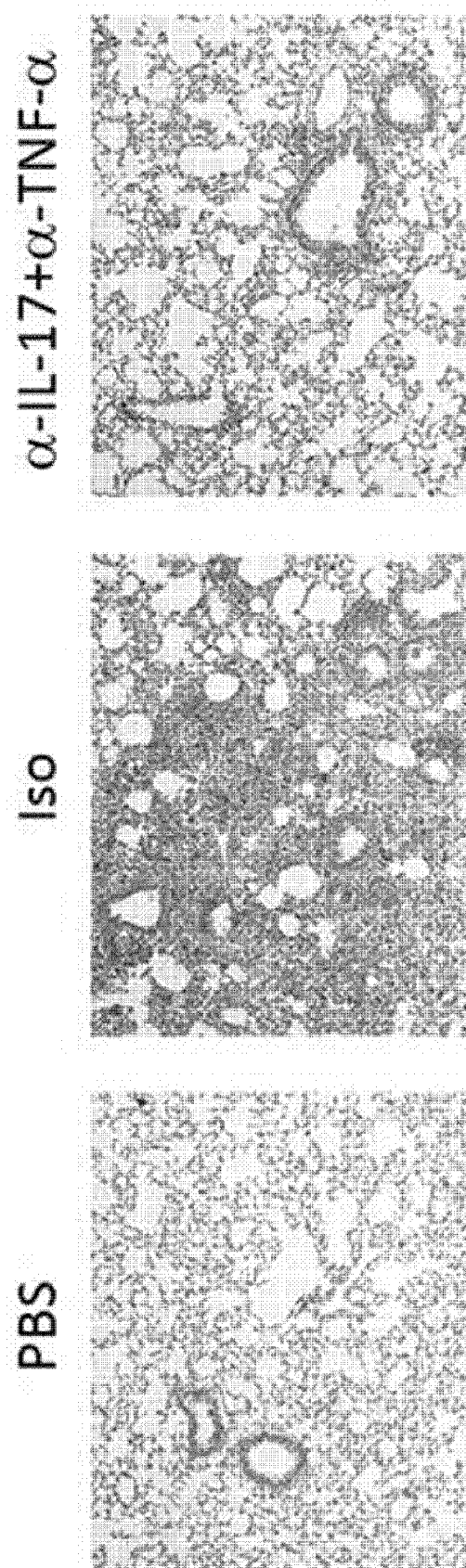
[Fig. 7c]



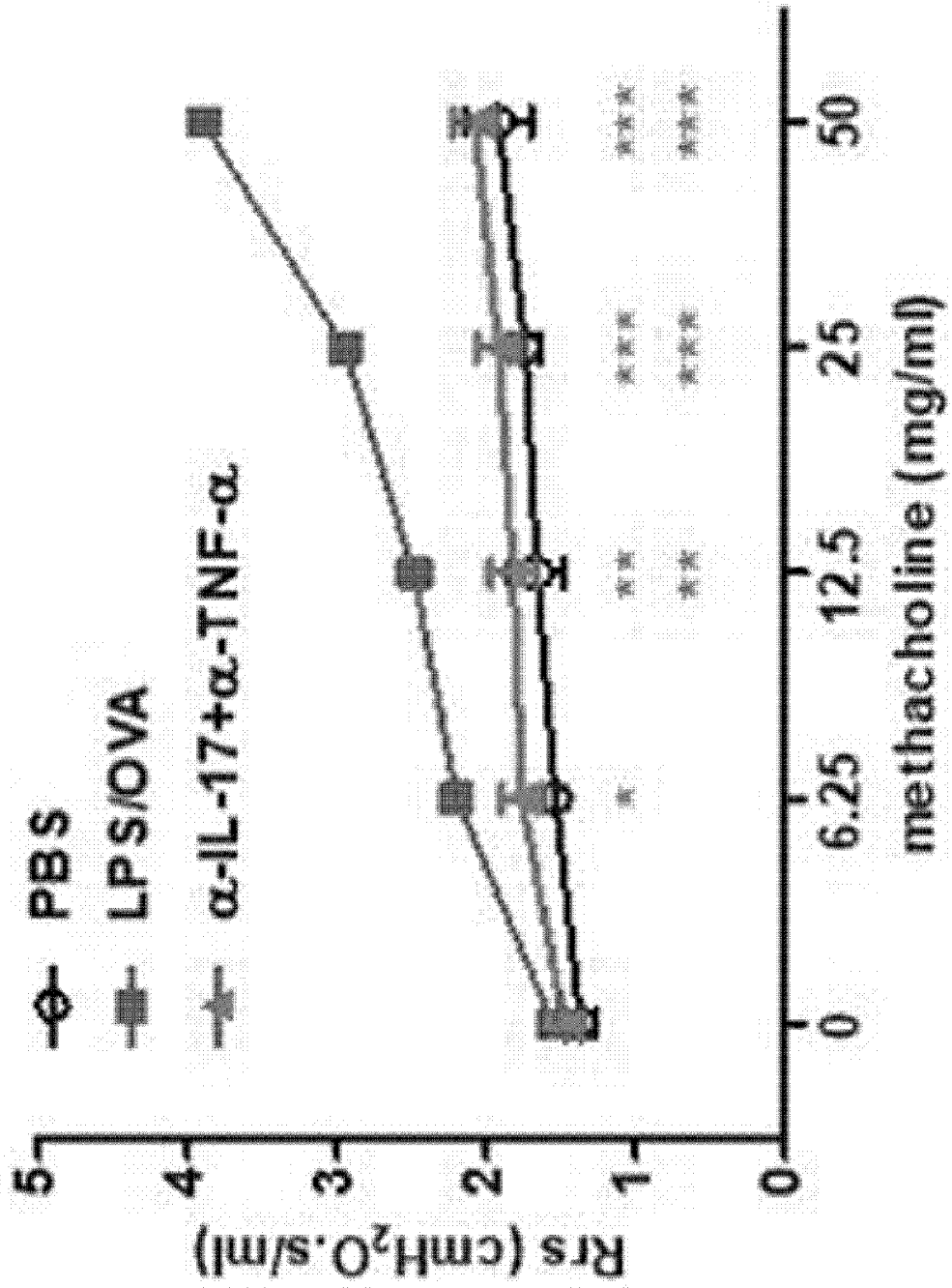
[Fig. 7d]



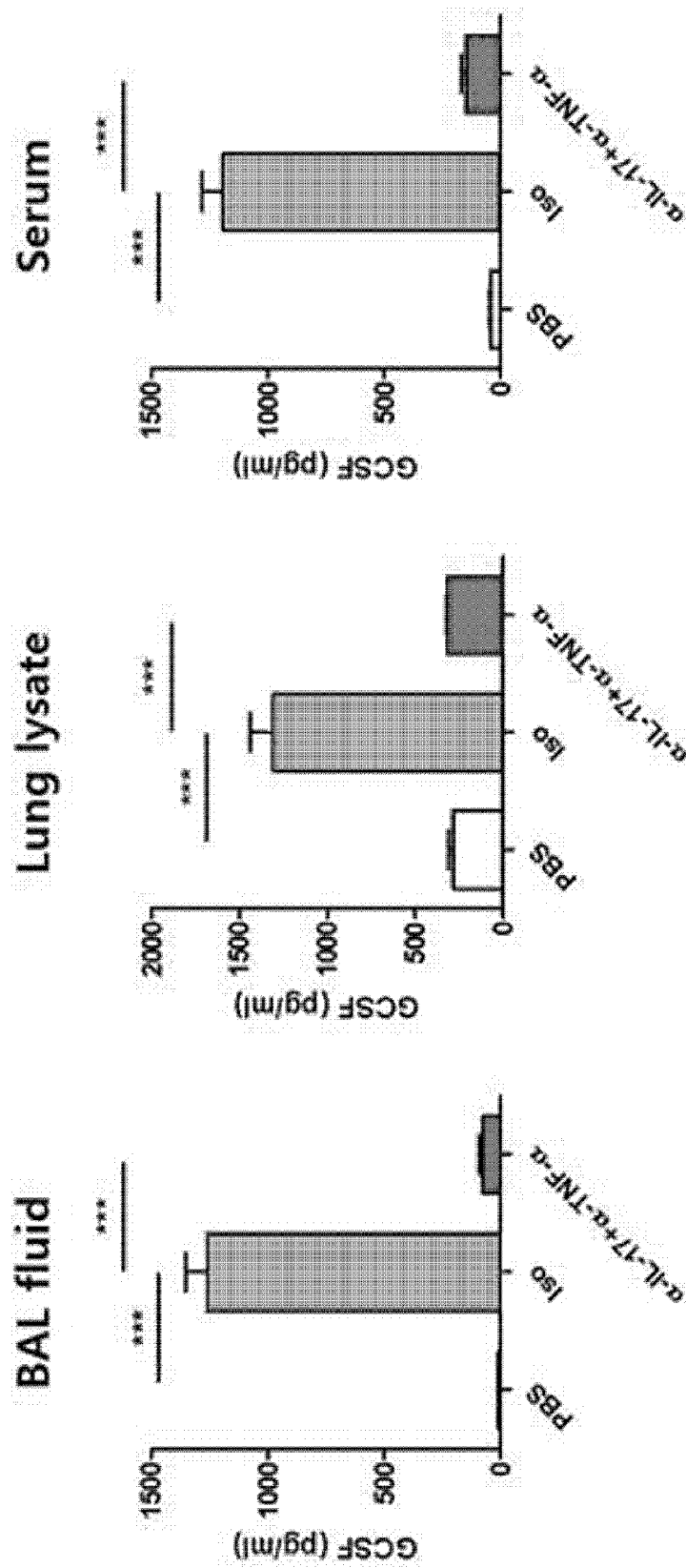
[Fig. 7e]



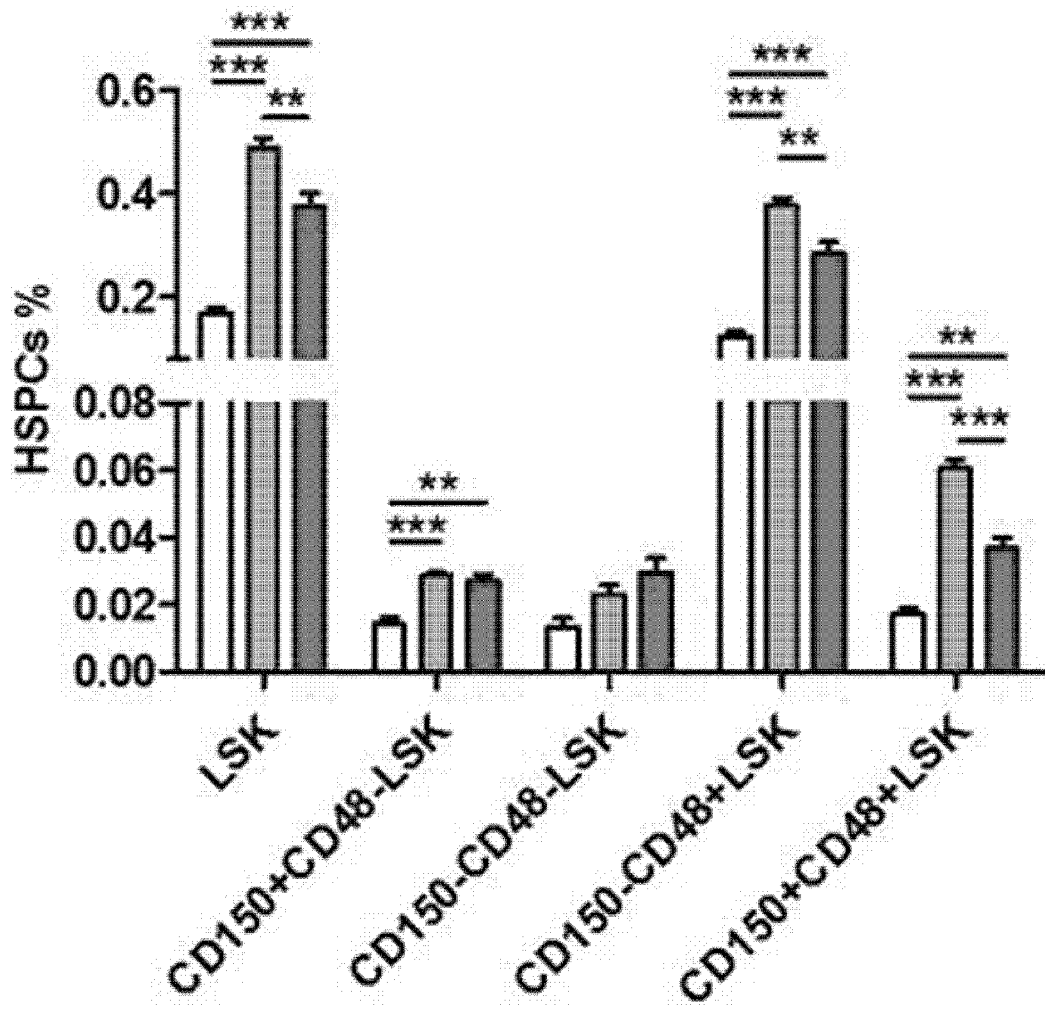
[Fig. 7f]



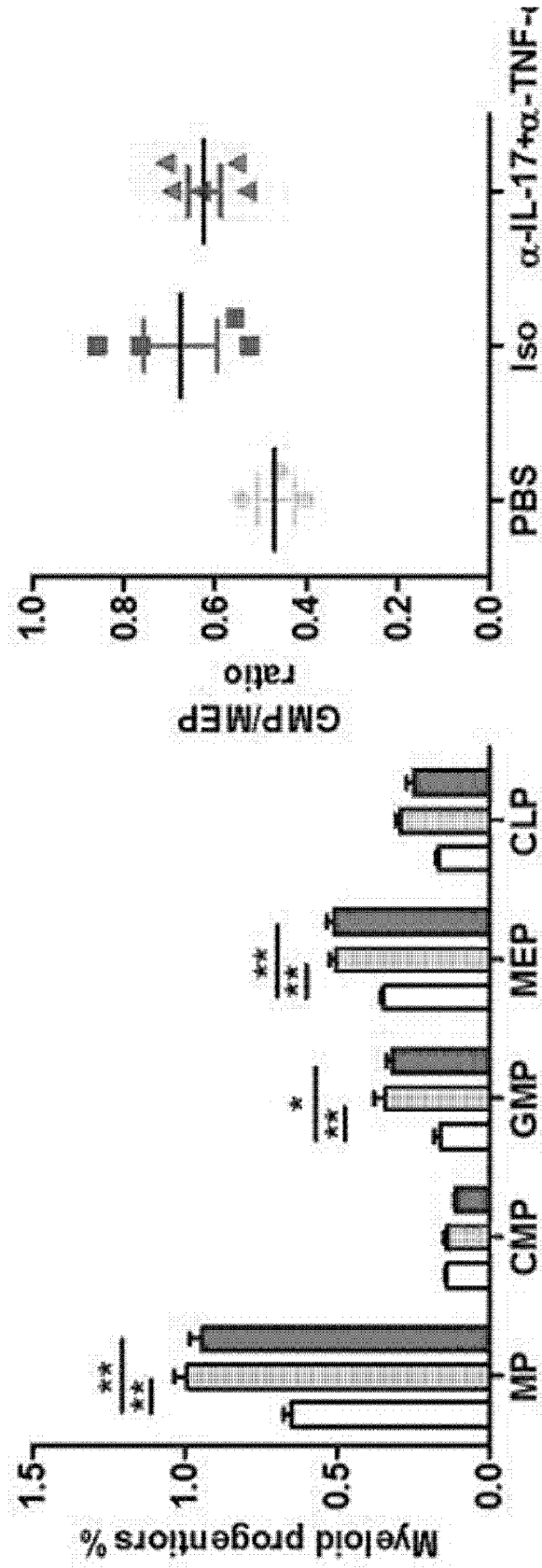
[Fig. 8a]



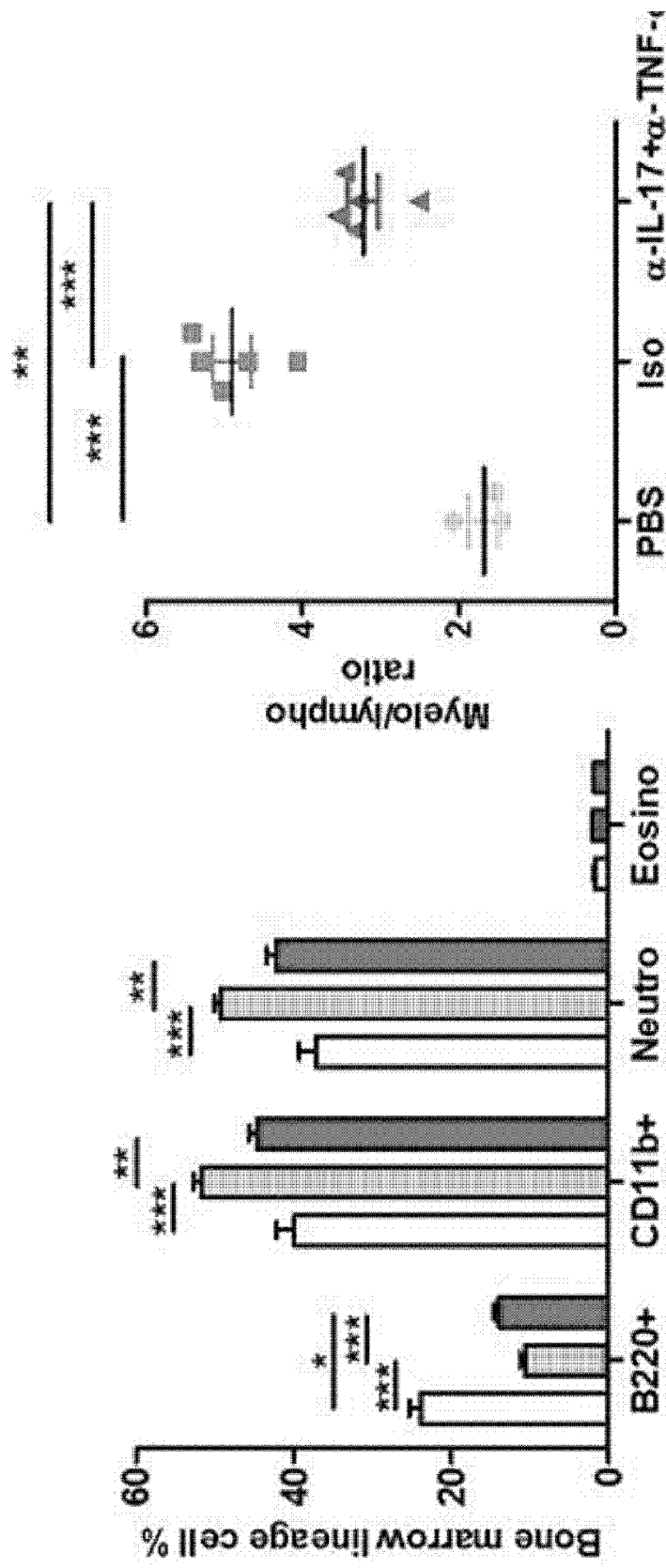
[Fig. 8b]



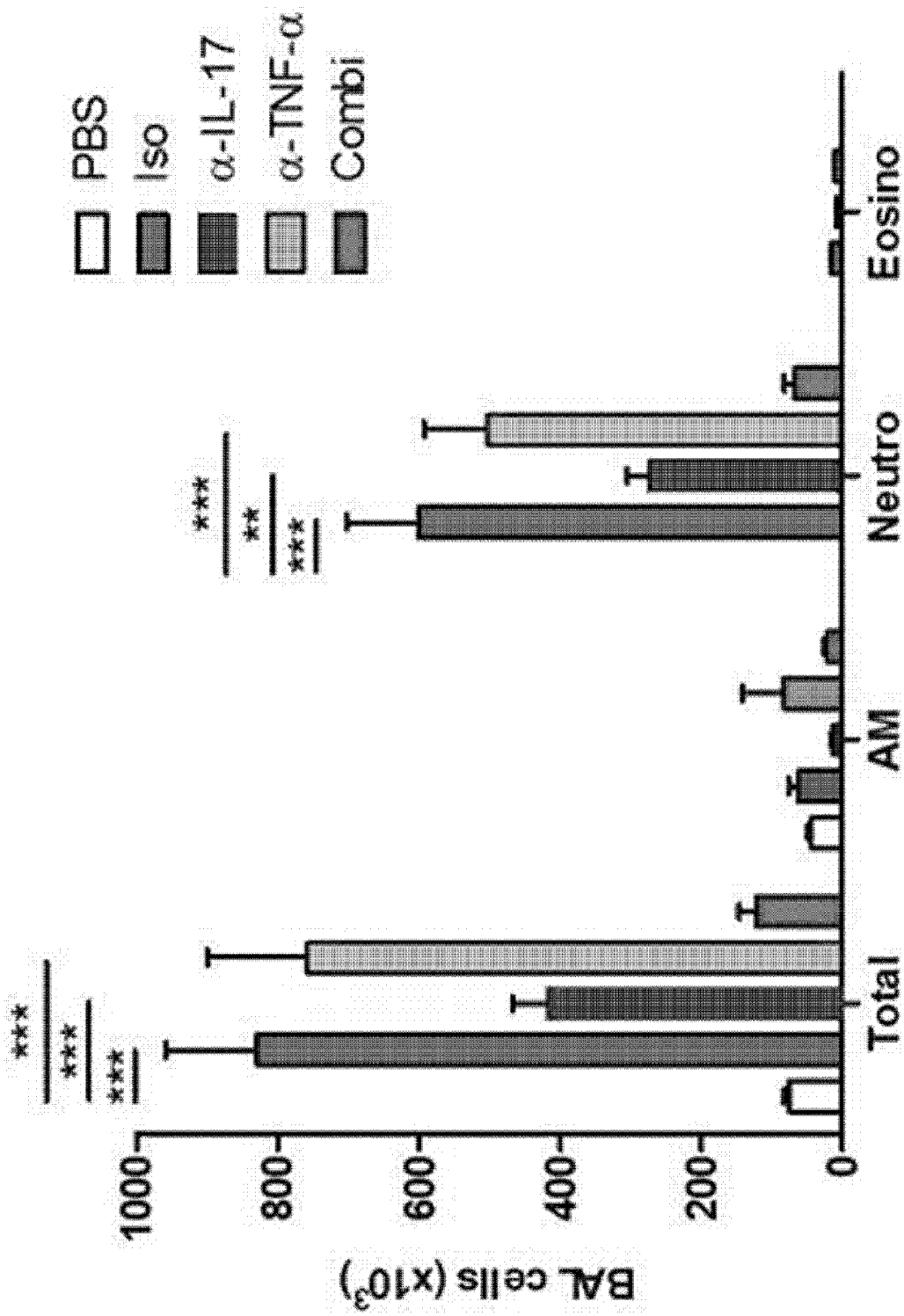
[Fig. 8c]



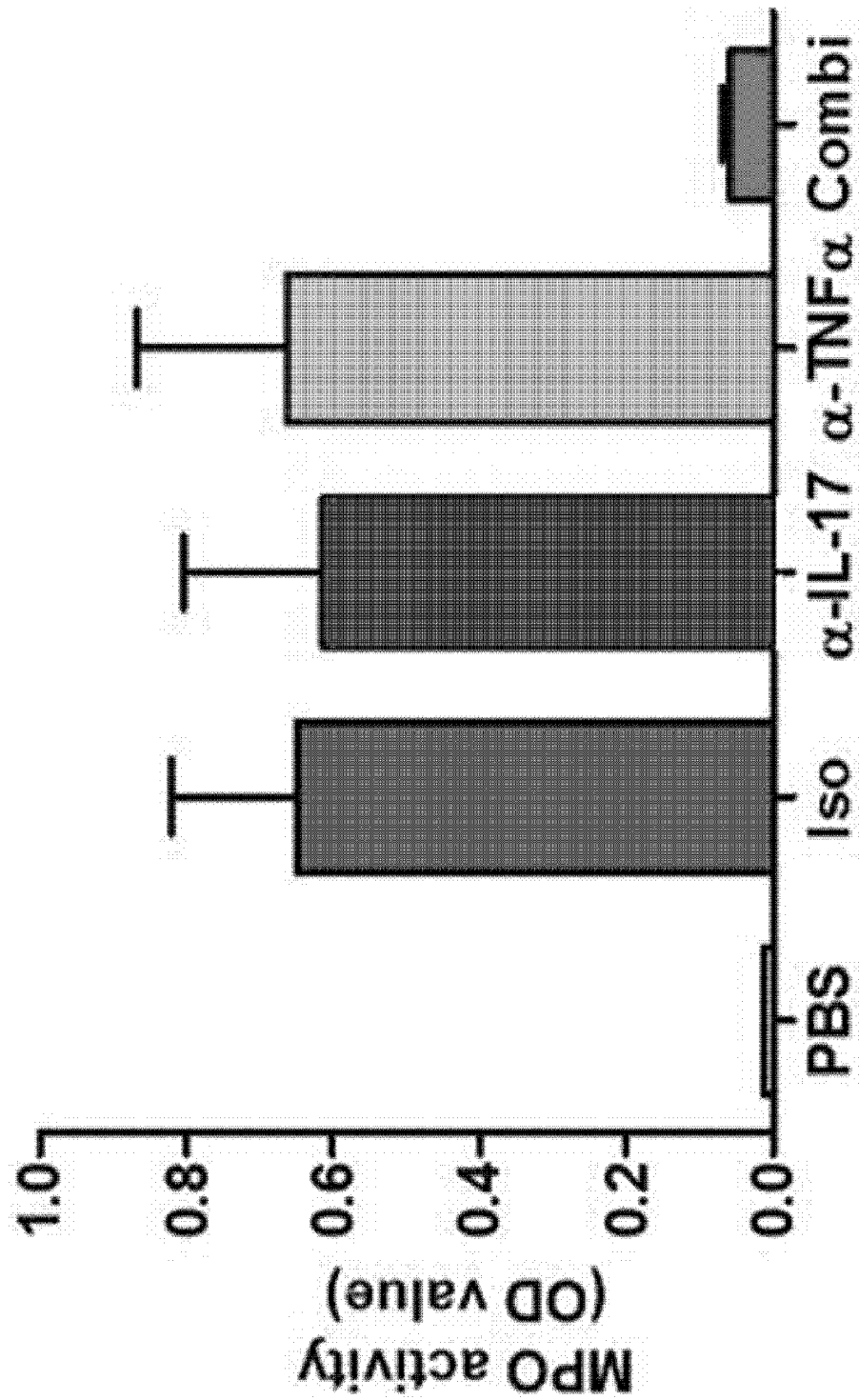
[Fig. 8d]



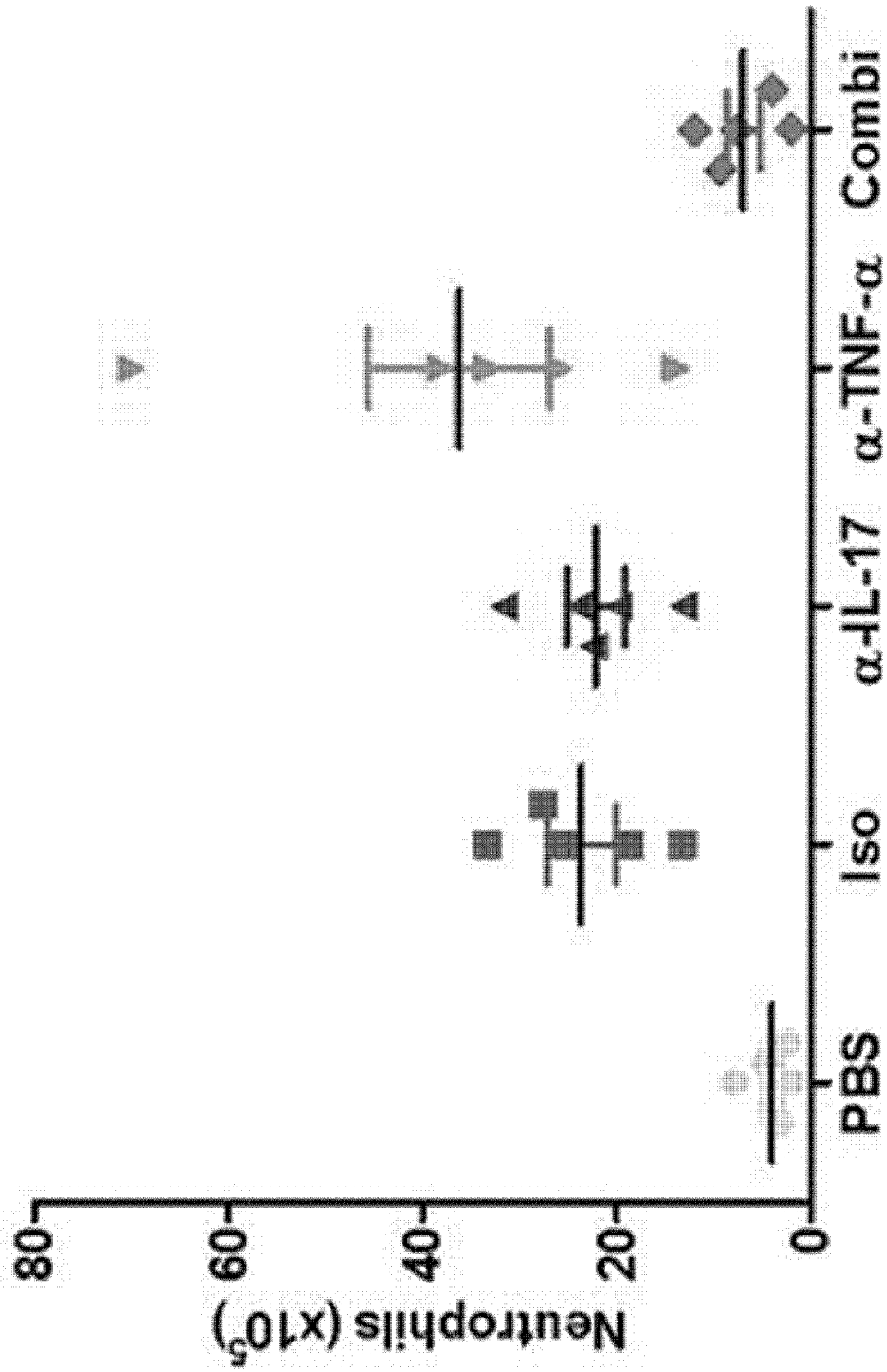
[Fig. 9a]



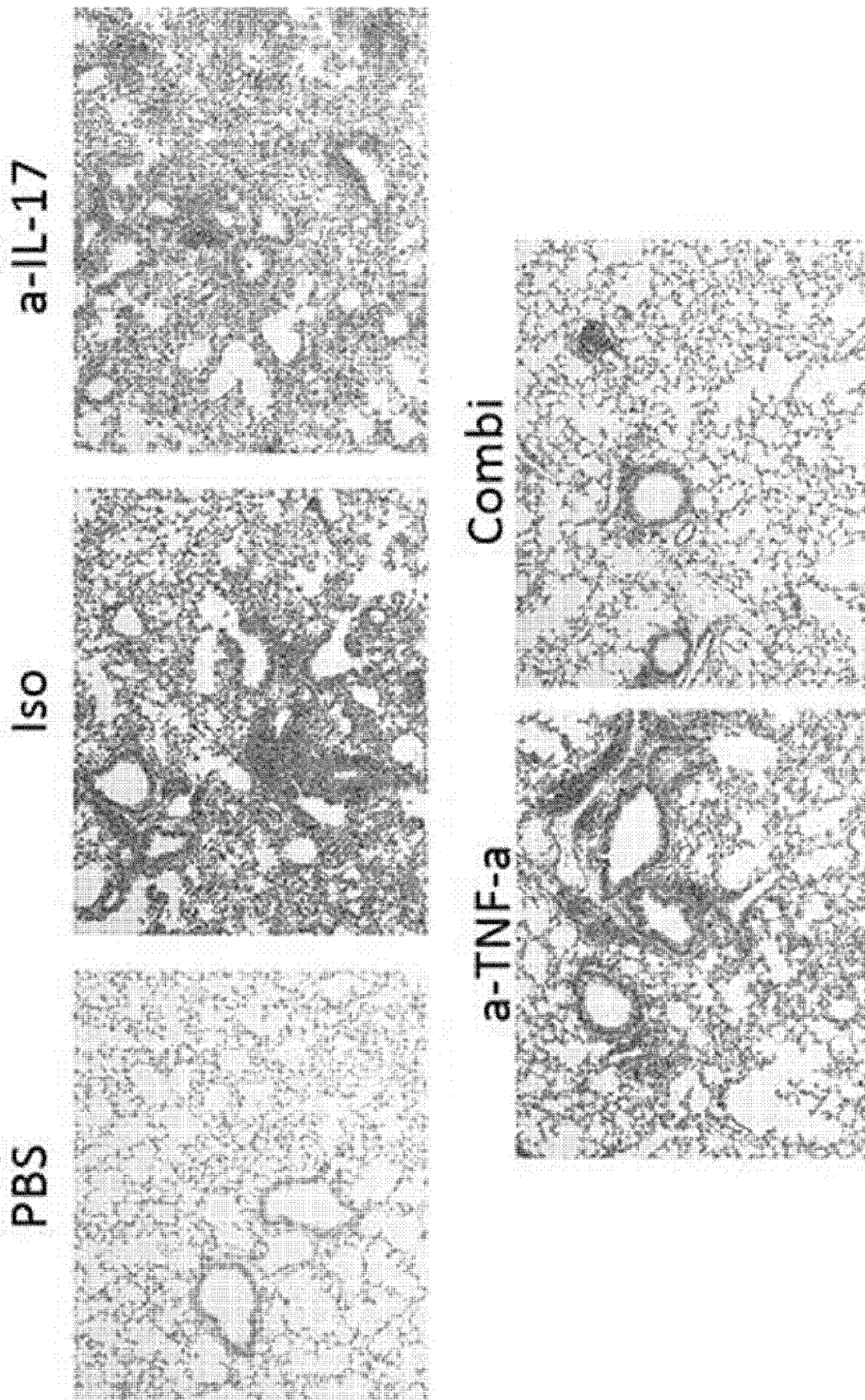
[Fig. 9b]



[Fig. 9c]



[Fig. 9d]



[Fig. 9e]

