



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년07월30일
(11) 등록번호 10-0972943
(24) 등록일자 2010년07월23일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-0007874

(22) 출원일자 2003년02월07일

심사청구일자 2008년02월05일

(65) 공개번호 10-2003-0067588

(43) 공개일자 2003년08월14일

(30) 우선권주장

10205520.3 2002년02월08일 독일(DE)

(56) 선행기술조사문헌

Blood Coagulation and Fibrinolysis 12(5),
375-383 (2001.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

체에스엘 베링 게엠베하

독일 35041 마르부르크 에밀-폰-베링 슈트라세 76

(72) 발명자

뢰미슈위르겐

오스트리아-2331

비젠도르프락센부르거슈트라세152

랑비간트

독일데-35091 쾰베아카친백2

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이병호, 장훈

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 이민정

(54) 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제에 대한 억제모노클로날 항체

(57) 요약

본원에서는, 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 및 이의 전구효소를 억제하는 모노클로날 항체 및 당해 모노클로날 항체를 첨가하여 안정화시킨 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 및 이의 전구효소를 기술한다. 적합한 모노클로날 항체는 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2533에 의해 제조된다. 혈액 응고 제제를 안정화시키는데 있어서 및 혈액 응고를 감소시키기 위한 제제에서의 억제 모노클로날 항체의 용도를 기술한다.

(72) 발명자

포이쓰너안네테

독일테-35043마르부르크랑게비젠백10

무트-나우만구드룬

독일테-35083베터탈블릭크2

슈퇴르한스-아르놀트

독일테-35083베터술슈트라쎄66

칸네마이어크리스티안

독일테-35390지쎄노이슈타트19

프라이쓰너클라우스

독일테-35394지쎄탄넨백10

나카자와후미에

일본도쿄도분쿄구코이시카와4-17-19-202

특허청구의 범위

청구항 1

혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 (FSAP) 및 이의 전구효소에 특이적으로 결합하여 이를 억제하며, 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2533에 의해 생산되는, FSAP 및 이의 전구효소에 대한 모노클로날 항체.

청구항 2

삭제

청구항 3

기탁 번호 DSM ACC 2533하에 기탁된 하이브리도마 세포주.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 따르는 항체의 결합 특이성을 갖는 단일쇄 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 운반 단백질 (carrier protein)에 결합하는 항체.

청구항 11

제1항에 따르는 항체의 결합 특이성을 가지는 사람화 항체.

청구항 12

제1항에 따르는 모노클로날 항체; 및 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 (FSAP), 이의 전구효소 또는 이들 모두를 함유하는, FSAP, 이의 전구효소 또는 이들 모두의 제제.

청구항 13

인자 VII-활성화 프로테아제 및 이의 전구효소를 억제하는 제1항에 따르는 모노클로날 항체를 함유하는, 인자 VII 제제.

청구항 14

제1항에 따르는 모노클로날 항체; 및 인자 V, 인자 VIII 또는 피브리노겐을 함유하는, 인자 V, 인자 VIII 또는 피브리노겐 제제.

청구항 15

제1항에 따르는 모노클로날 항체를 함유하는, 혈액의 응고성을 감소시키기 위한 약제학적 제제.

청구항 16

제1항에 따르는 모노클로날 항체를 피검 샘플에 첨가하여 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 (FSAP)의 아미드 분해 활성을 억제시키고, 샘플 중에 잔류하는 아미드 분해 활성을 측정하는, FSAP 활성의 측정방법.

청구항 17

제1항에 따르는 모노클로날 항체를 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 (FSAP) 또는 이의 전구효소를 결합하기 위한 면역흡착제로서 사용하는, FSAP 또는 이의 전구효소의 제조방법.

청구항 18

제1항에 따르는 모노클로날 항체를 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 (FSAP)가 수득되는 출발 물질에 첨가하는, FSAP 또는 이의 전구효소의 제조방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- [0001] 본 발명은 인자 VII-활성화 프로테아제 또는 이의 전구효소를 특이적으로 억제하지만 기타 프로테아제의 단백질 분해 성질은 손상시키지 않는 모노클로날 항체에 관한 것이다.
- [0002] 프로테아제는 유기체내에서 활성 효소를 이의 전구체인 전구효소로부터 방출하는데 있어 중요한 기능을 하는 것으로 공지되어 있다. 그러나, 프로테아제는 활성화된 효소를 다시 분해하는 성질을 또한 가지므로, 활성화된 효소는 흔히 단지 단시간 후에 다시 불활성화된다. 따라서, 안정화된 약제학적 제제를 제조하기 위해서는 특이적 프로테아제의 활성을 억제하는 것이 종종 요구된다.
- [0003] 따라서, 프로테아제에 의해 유발되는 분해에 대한 안정화는, 혈액 응고 인자를 함유하는 약제학적 제제의 경우에서 또한 특히 비교적 긴 저장 기간 후에도 이러한 제제의 효능을 보장하기 위한 중요한 과제이다.
- [0004] 혈액 응고 시스템은 혈장중에 존재하는 2가지의 상이한, 응고 인자의 다단계 (cascade)형 활성화 경로를 포함한다. 유발 기작에 따라서, 바람직하게는 내인성 또는 외인성 경로 중 어느 하나가 응고를 개시한다.
- [0005] 조직 손상시, 트롬보플라스틴 (조직 인자, TF)이 외인성 응고 경로의 개시제로서 표면에 노출된다. 응고 인자 VII (FVII) 뿐만 아니라, 순환하는 활성화된 FVII (FVIIa)가 막에 결합된 트롬보플라스틴에 결합된다. 칼슘 이온 및 지질의 존재하에, 이러한 TF-FVIIa 복합체는 제한된 단백질 분해에 의해 활성화 형태 (FXa)로 전환되는 FX의 결합을 야기한다. FXa는 프로트롬빈을 트롬빈으로 활성화시킴으로써 피브린의 형성을 야기하여 최종적으로 상처를 봉합한다.
- [0006] FVIIa는 건강한 사람의 혈장중에서 매우 낮은 농도로 발견된다. 아직까지는 혈중 FVIIa 순환의 원인 및 유래에 대해 거의 알려져 있지 않다. 미량의 발현된 트롬보플라스틴 또는 세포 파괴 중에 방출된 트롬보플라스틴이 여기서 중요한 역할을 할 것이다.
- [0007] 독일 공개특허공보 제199 03 693호에는 FSAP (Factor Seven-Activating Protease)로도 지칭되는 FVII-활성화 프로테아제가 기재되어 있다. 당해 성질로 인해 FSAP는 혈액 응고를 가속화시킬 수 있으며 약제로서 출혈 합병증에 적용할 수 있다.

[0008] FSAP는 혈장중에 전구효소 (단일쇄 FSAP, scFSAP)로서 존재한다. 전구효소가 제조 동안에 활성화되기 때문에, 공지된 크로마토그래피 방법을 사용하여 활성화 형태로서 2개의쇄를 갖는 프로테아제 (2개의쇄 FSAP, tcFSAP)만을 주로 수득할 수 있다. 이러한 활성화는 우로키나제와 같은 기타 프로테아제에 의해 유발될 수 있을 뿐만 아니라 자가촉매작용에 의해서도 발생할 수 있다. 활성화된 FASP는 단백질분해에 의해 그 자체를 불활성화시킬 수 있다. 따라서, scFSAP의 제조가 특히 어려우나 무손상 tcFSAP의 제조 또한 간단하지 않다. FSAP를 제조하기 위한 최적의 방법은 독일 공개특허공보 제139 37 218호 및 제139 37 219호에 기재되어 있다. 이와 관련된 중요한 방법 단계는 매트릭스-커플링된 모노클로날 항체에의 면역흡착 및 용출물을 안정화시키기 위한 특이적 조건이다. 그러나, 면역흡착시에도 심지어 소량의 tcFSAP 형성을 피하기 위해 상당한 주의를 기울여 가능한 신속히 작업해야 한다. 이는 제조시에 아프로티닌, C1-에스테라제 억제제 또는 α -2 안티플라스민과 같은 다가 프로테아제 억제제 대신에, FSAP의 활성화 또는 자가활성화만을 방지하거나 감소시키는 특이적 모노클로날 항체를 사용함으로써 가장 성공적으로 달성된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

[0009] 따라서, 본 발명은 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 또는 이의 전구효소를 억제하는 모노클로날 항체에 관한 것이다. 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2533에 의해 생산되는 모노클로날 항체가 본 목적에 특히 적합하다. 이러한 모노클로날 항체를 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 또는 이의 전구효소에 첨가하는 경우, 후자가 억제된다. 상기 언급한 모노클로날 항체를 함유하는 인자 VII 제제는 인자 VII-활성화 프로테아제 및 이의 전구효소가 억제됨으로써 안정화된다.

발명의 구성 및 작용

[0010] 본 발명의 항체는 제조 및 분석 용도로서 사용할 수도 있다. 사실 독일 공개특허공보 제199 03 693호에는, FSAP가 혈액 응고 인자 VIII/VIIIa 및 V/Va를 항온처리하는 동안 프로테아제 농도 및 항온처리 시간에 따라 좌우되는 방식으로 불활성화되는 성질을 가진다고 기재되어 있다. FASP 작용이 본 발명의 항체 첨가에 의해 억제될 경우 이로 인해 상기 혈액 응고 인자가 단백질분해성 분해로부터 보호된다. 또한, 본 발명의 항체를 첨가함으로써 피브리노겐 용액을 안정화시킬 수 있다.

[0011] 본 발명의 억제 항체는, 이를 프로테아제 함유 용액에 첨가할 경우 FSAP의 선택적 억제를 통해 단백질분해 작용이 FSAP 또는 다른 프로테아제에 기인하는지의 여부를 검출할 수 있다는 사실에 의해, 진단적 사용에 대한 가능성을 열었다. 상기 방법은 활성화된 FSAP를 사용하거나 FSAP-활성화된 우로키나제의 아미드 분해 활성 (amidolytic activity)을 측정함으로써 FSAP 활성, 예를 들어, 발색성 기질의 분해에 기초하는 모든 검정 시스템에서 적용할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 억제 항체는 특정 질환의 경우에서 직접적인 예방 또는 치료 용도를 가질 수도 있다. 따라서, 예를 들어, 혈장중 FSAP 함량의 증가는 혈액의 응고촉진 성질을 증가시켜 혈전증의 위험을 증가시킬 수 있다. 억제 항체의 투여는 혈액의 응고성을 감소시켜 혈전증의 위험을 감소시킬 수 있다.

[0013] 독일 공개특허공보 제19 903 693호에는 또한 혈액 인자 VII-활성화 프로테아제를 함유하는 약제학적 제제의 특정 피브린 용해 작용이 기재되어 있다. 따라서 상기 프로테아제는 피브린 함유 혈전에 의해 유발되는 질환의 치료용으로 사용할 수도 있다. 이로부터, 보다 고 농도의 FSAP가 억제 모노클로날 항체에 의해 방지 또는 감소될 수 있는 출혈 경향을 개시하거나 증가시킬 수 있다는 것은 당연한 결과이다. 이는 또한 상처 치유 또는 임의의 진행에 대한 부작용을 억제할 수 있다.

[0014] FSAP에 대한 억제 모노클로날 항체의 매우 다양한 기술한 가능한 적용은 scFSAP의 활성화 및 이로 인한 후속적 tcFSAP의 형성을 방지하는 상기 항체를 사용하여 달성된다. 앞서 공지된 FSAP의 특성 대부분은 tcFSAP에 의해 매개되기 때문에, FSAP 작용을 차단하기 위해 scFSAP를 억제하는 것으로 충분하다.

[0015] 따라서, 본 발명에 따라서 하이브리도마 세포 DSM ACC 2533로부터 수득한 모노클로날 항체는 tcFSAP 활성 뿐만 아니라 scFSAP 자가활성화를 매우 효과적으로 억제한다. 물론, 이러한 모노클로날 항체는 사람에서 예방제 또는 치료제로서 적용하기 전에 사람화되어야 한다. 이들 방법은 익히 공지되어 있으며 본원에서 상세히 기술하지 않을 것이다.

[0016] 또한, 독일 특허원 제100 52 319.6호에는 이미 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 (FSAP) 이외에, 시험한 모든 혈액 공여체의 5% 내지 10%가 scuPA 활성화의 측면에서 불활성이며 아미노산 서열이 393번째 아미노산 위치에서 Glu/Gln 대체 및 Gly/Glu 대체를 나타내는 FSAP 돌연변이체라는 것이 기술되어 있다. 이러한 단일-뉴클

레오타이드 다형체 (single-nucleotide polymorphism=SNP)는 프로플라스미노겐 활성화 인자의 활성화의 감소 및 이에 따른 감소된 피브린 용해 가능성 및 증가된 혈전증 위험과 관련된다. 상기 위험을 감소시키기 위해 유럽 특허원 제01 115 691.6호에는 야생형 FSAP의 투여가 제안되어 있다.

[0017] 본 발명은 억제 모노클로날 항체의 투여에 의해 추가의 FSAP 억제 가능성 및 억제 돌연변이체를 제공함으로써 혈전증 또는 혈전색전증 가능성을 감소시킨다. 다른 한편으로, FVII-활성화 성질은 감소되었으나 피브린 용해능은 증가된 FSAP 돌연변이체는 본 발명의 억제 모노클로날 항체를 투여하여 잠재적으로 증가된 출혈 경향을 치료하는데 사용할 수 있다.

[0018] 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2533은 다음과 같이 동정하고 제조한다: 3마리의 마우스를 FSAP로 면역화시킨다. 폴리에틸렌 글리콜 4,000을 용합 시약으로서 사용하여 한마리 마우스로부터의 비장 세포를 쥐 골수종 세포주 SP2/0-Ag 14와 융합시킨다. 당해 세포를 24-웰 배양 플레이트에 분배한다. 사용되는 배지는 10% 태아 소 혈청 및 선택용 HAT를 함유하는 돌베코 변형된 이글 배지 (Dulbecco mod. Eagle's Medium)이다. 약 2주 후, 증식 세포 클론을 48-웰 배양 플레이트의 웰로 옮기고 표시한다. 증식된 1,728개의 세포 클론의 상청액을 ELISA에 의해 마우스 IgG의 존재에 대해 검정한다. 마우스-IgG-양성 상청액은 고정화된 FSAP를 사용하여 특이성에 대해 시험한다. 검정된 클론중 108개가 FSAP에 대해 특이적인 것으로 동정된다. 추가의 실험으로 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2533으로부터의 모노클로날 항체의 억제 성질을 검토한다. 당해 항체는 IgG1형이다.

[0019] 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2533으로부터의 모노클로날 항체는 tcFSAP의 단백질분해 활성을 억제한다. 따라서, 당해 모노클로날 항체는 인자 VII 또는 프로우로키나제를 활성화시키는 FASP의 능력을 억제할 뿐만 아니라 FSAP 자가활성화를 방지한다.

[0020] 하기 실시예로 본 발명을 추가로 설명한다.

[0021] 실시예 1

[0022] scFSAP의 (자가)활성화에 있어 DSM ACC 2533으로부터의 모노클로날 항체의 효과 연구

[0023] 시트레이트 혈장의 재석회화는 응고를 활성화시켜 최종적으로 피브린 응괴의 형성을 야기한다. 이러한 상황에서, scFSAP는 장기간의 지연후에만 활성화된다. 또한, 텍스트란 설페이트를 첨가하여 "접촉 활성화 인자" 또는 반응성 표면을 자극함으로써 scFSAP를 혈장 환경내에서 활성화시킨다. 이는 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석에 기초하여 매우 명백하게 설명될 수 있다. 상기 목적을 위해, 텍스트란 설페이트가 첨가된 재석회화된 샘플을 상이한 시간 동안 항온처리하고, 후속적 SDS-PAGE를 최상의 가능한 방식으로 수행할 수 있도록 당해 숙련가에게 통상적인 "진성글로불린 (euglobulin)" 침전에 적용한다. 상기 방식으로, 샘플의 단백질 농도를 저하시키고 밴드 패턴의 번짐을 방지한다. scFSAP 활성화로부터 야기된 tcFSAP 중쇄 및 경쇄를 보다 용이하게 동정하기 위해, 환원제를 상기 방식으로 수득된 샘플에 첨가한다. SDS-PAGE로 수득된 밴드 패턴을 니트로셀룰로스로 옮긴 후 (블롯팅 후), 독일 특허원 제100 36 641.4호에 기술된, 표지된 모노클로날 항체 DSM ACC 2453 및 DSM ACC 2454를 두 tcFSAP 밴드를 검출하는데 사용한다.

[0024] 당해 실험의 결과로서, 블롯 상의 scFSAP의 소멸 및 두 tcFSAP 쇄의 증가가 관찰된다. 때때로, tcFSAP 경쇄가 FSAP의 활성 부위를 함유하며 혈장의 항온처리 동안에 C1-에스테라제 억제제 또는 α -2 안티플라스민과 같은 상응하는 억제제 단백질과 반응하여 최종적으로 (유사 공유) 결합체로서 모노클로날 항체 검출에 의해 보다 어렵게 인지되기 때문에 중쇄만이 가시화될 수도 있다.

[0025] DSM ACC 2533으로부터 수득된 모노클로날 항체를 상기 기술한 혈장 샘플에 첨가하고 scFSAP 활성화를 상기 기술한 바와 같이 검출할 경우, (상기 모노클로날 항체를 사용하지 않거나 비억제 모노클로날 항체를 사용한) 대조군과 대조적으로 tcFSAP의 고 분자량 (단일쇄 형태) 밴드의 소멸 및 이에 상응하게 중쇄 (및 경쇄)의 출현이 관찰되지 않는다. 따라서, DSM ACC 2533의 하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 항체는 scFSAP에 결합하여 scFSAP 활성화를 방지하였다.

[0026] 이러한 효과의 역가측정은 상기 항체가 scFSAP 활성화를 억제하는데 있어 매우 강력한 모노클로날 항체임을 나타낸다. 심지어 FSAP와 동일 몰량도 활성화를 현저하게 감소시키며, 이러한 사실은 당해 억제 모노클로날 항체가 매우 유용한 진단 및 제조 부형제가 되도록 한다. 비교적 낮은 농도에서의 고효과는 사람에서 투여용으로서 당해 모노클로날 항체의 잠재적 사용을 호소력있게 만든다.

[0027] 실시예 2

[0028] 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2533으로부터의 억제 모노클로날 항체에 의한 활성화 tcFSAP의 억제

[0029] 독일 특허원 제199 03 693호에 기술되어 있는 바와 같이, FSAP의 활성을 다양한 검정 시스템에서 시험할 수 있다. 플라스미노겐-활성화 인자 전구효소 또는 FVII의 활성화와 상응하는 응혈의 가속화 이외에, 예를 들어 FV, FVIII, FIX 또는 피브리노겐의 불활성화 속도를 모니터할 수도 있다. 이러한 검정 시스템에서, 본 발명의 억제 모노클로날 항체를 이의 억제 성질에 대해 시험한다.

[0030] 그 결과는 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2533으로부터의 억제 모노클로날 항체가 효과적 방식으로 상기 언급한 혈액 응고 인자에 대한 tcFSAP의 활성을 억제한다는 것이다. 상기 실시예 1에서 제시된 바와 같이, scFSAP의 tcFSAP로의 활성화 및 이에 따른 아미드 분해 활성 형태로의 전환이 방지된다는 것 또한 명백하다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 의해, 혈액 응고 인자 VII-활성화 프로테아제 및 이의 전구효소만을 특이적으로 억제하는 억제 모노클로날 항체가 제공된다.