



등록특허 10-2438295



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월31일
(11) 등록번호 10-2438295
(24) 등록일자 2022년08월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/241 (2013.01)
C07K 16/44 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7009539
- (22) 출원일자(국제) 2015년09월15일
심사청구일자 2020년09월11일
- (85) 번역문제출일자 2017년04월07일
- (65) 공개번호 10-2017-0054460
- (43) 공개일자 2017년05월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/050154
- (87) 국제공개번호 WO 2016/044252
국제공개일자 2016년03월24일
- (30) 우선권주장
62/053,018 2014년09월19일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
US20020122799 A1
KR1020110124704 A

(73) 특허권자
시와 코퍼레이션
미국, 일리노이 60601, 시카고 400 이스트 랜돌프
#3913

(72) 발명자
그루버, 루이스, 에스.
미국 일리노이 60601 시카고 #3911 이스트 랜돌프
400

(74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 15 항

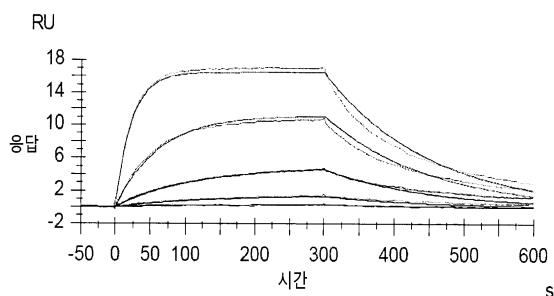
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 염증 및 자가 면역 질환을 치료하기 위한 노화 방지 항체

(57) 요 약

염증 또는 자가 면역 질환을 치료하는 조성물은 (i) 세포 상의 AGE-개질 단백질에 결합한 항체 및 (ii) 항-염증 항체를 포함한다. 또한, 세포 상의 AGE-개질 단백질에 결합하는 항체는 또한 염증 또는 자가 면역 질환을 단독으로 치료하는 데에 효과적이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

염증 또는 자가 면역 질환의 치료를 위한, 항-카르복시메틸리신(carboxymethyllysine, CML) 항체를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 치료는 항-CML 항체-매개성 노화 세포(senescent cells)의 사멸을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 하기를 더 포함하는 것인, 약제학적 조성물:

(a) 전-염증성 인자(pro-inflammatory factor) 또는 전-염증성 인자 수용체에 결합하는 항체로서, 상기 전-염증성 인자는 TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, CD2, CD3, CD20, CD22, CD52, CD80, CD86, C5 보체 단백질, BAFF, APRIL, IgE, α 4 β 1 인테그린 및 α 4 β 7 인테그린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 항체; 또는

(b) 아바타셉트(abatacept), 알레파셉트(alefacept), 아타시셉트(atacicept) 또는 에타너셉트(etanercept).

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 전-염증성 인자는 TNF인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 전-염증성 인자 또는 전-염증성 인자 수용체에 결합하는 항체는, 알렙투주맙(alemtuzumab), 벨리무맙(belimumab), 카나키누맙(canakinumab), 에쿠리주맙(eculizumab), 에프라투주맙(epratuzumab), 나타리주맙(natalizumab), 오크레리주맙(ocrelizumab), 오파투무맙(ofatumumab), 오말리주맙(omalizumab), 오텔릭시주맙(otelixizumab), 리툭시맙(rituximab), 테플리주맙(teplizumab), 베도리주맙(vedolizumab), 아달리무맙(adalimumab), 브리아키누맙(brakinumab), 서톨리주맙 페꼴(certolizumab pegol), 골리무맙(golimumab), 인플릭시맙(infliximab), 메포리주맙(mepolizumab), 레스리주맙(reslizumab), 토시리주맙(tocilizumab) 및 유스테키누맙(ustekinumab)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 성분인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항-CML 항체는 인간 항체인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 항-CML 항체는 인간 항체이거나, 또는 상기 전-염증성 인자 또는 전-염증성 인자 수용체에 결합하는 항체는 인간 항체인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항-CML 항체는 접합 항체(conjugated antibody)인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 접합 항체는, 독소, 세포독성제, 자성 나노입자, 및 자성 스플-볼텍스 디스크(magnetic spin-vortex discs)로 이루어진 군에서 선택된 성분에 접합된 것인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제2항에 있어서,

상기 전-염증성 인자 또는 전-염증성 인자 수용체에 결합하는 항체는 모노클로날 항체(monoclonal antibody)이고, 상기 항-CML 항체는 모노클로날 항체인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 10

제2항에 있어서,

상기 전-염증성 인자 또는 전-염증성 인자 수용체에 결합하는 항체; 또는 상기 항-CML 항체;는 인간, 고양이, 개, 말, 낙타, 알파카, 소, 양, 및 염소로 이루어진 군에서 선택된 종에 대해 비면역원성(nonimmunogenic)인 항체인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 항-CML 항체는 인간, 고양이, 개, 말, 낙타, 알파카, 소, 양, 및 염소로 이루어진 군에서 선택된 종에 대해 비면역원성인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 항-CML 항체는 인간에 대해 비면역원성인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제5항에 있어서,

상기 항-CML 항체는 모노클로날 항체인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서,
약제학적 담체를 더 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 조성물은 단위 투여 형태인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 만성 염증은, 알츠하이머 질병, 당뇨병, 죽상 동맥 경화증 및 암을 포함하는 다양한 질병에 관련되어 있다. 또한, 자가 면역 질병, 예를 들면, 골관절염 및 크론병도 만성 염증에 관련되어 있다. 만성 염증은, 병변 부위

근방에서 기준선보다 높은 수준에 있지만 급성 염증에서 발견되는 것보다 몇 배 낮은 수준으로 존재하는 전-염증성 인자(pro-inflammatory factor)를 특징으로 할 수 있다. 이러한 인자의 예로는, TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, CD2, CD3, CD20, CD22, CD52, CD80, CD86, C5 보체 단백질, BAFF, APRIL, IgE, α 4 β 1 인테그린 및 α 4 β 7 인테그린을 포함한다. 만성 염증에 관련된 질병의 치료는, 예를 들면, 인자의 수용체에 결합하거나 인자에 결합함으로써 전-염증성 인자의 작용을 방해하는 치료를 포함한다.

배경 기술

[0002]

만성 염증 및 만성 염증에 관련된 질병의 치료에 대한 약물의 중요한 분류에는 항-염증 항체를 포함한다. 이러한 약물의 분류에는, 항체를 포함할 뿐 아니라, 전-염증성 인자 또는 전-염증성 인자 수용체에 결합하는 기타 단백질을 포함하고, 항체의 불변 영역(constant region)을 포함한다. 항-염증 항체의 예로는, 아바타셉트(abatacept), 알레파셉트(alefacept), 알렘투주맙(alemtuzumab), 아타시셉트(atacicept), 벨리무맙(belimumab), 카나키누맙(canakinumab), 에쿠리주맙(eculizumab), 에프라투주맙(epratuzumab), 나타리주맙(natalizumab), 오크레리주맙(ocrelizumab), 오파투무맙(ofatumumab), 오말리주맙(omalizumab), 오텔릭시주맙(otelixizumab), 리툭시맙(rituximab), 테플리주맙(teplizumab), 베도리주맙(vedolizumab), 아달리무맙(adalimumab), 브리아키누맙(briakinumab), 서톨리주맙 페글(certolizumab pegol), 에타너셉트(etanercept), 골리무맙(golimumab), 인플릭시맙(infliximab), 메포리주맙(mepolizumab), 레스리주맙(reslizumab), 토시리주맙(tocilizumab) 및 유스테키누맙(ustekinumab)을 포함한다.

[0003]

노화 세포는 비가역적 중식 억제 상태의 세포이다. 노화는 세포의 독특한 상태로, 예를 들면, p16^{Ink4a}를 활성화하고 β -갈락토시다제를 발현하는 바이오마커에 관련된다. 노화 세포는, 또한 전-염증성 인자를 포함하는 세포 간 정보전달에 관여하는 많은 인자의 분비에 관련되고, 이러한 인자의 분비는 노화에 관련된 분비 표현형 또는 SASP로 지칭되고 있다.

[0004]

최종당화산물(AGE, AGE-개질 단백질, 또는 최종당화산물)은, 노화 세포 내에서 단백질의 측쇄와 당의 비-효소 반응으로부터 생성된다 (Ando, K. et al., Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products during Aging in the Circulation, *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 258, 123, 125 (1999)). 이러한 과정은, 환원 당과 아미노기 사이의 가역적 반응을 시작해서 시프 염기(Schiff base)를 형성하고, 공유 결합된 아마도리 재배열 산물(Amadori rearrangement product)을 형성한다. 아마도리 산물이 형성되면, 추가로 재배열해서 AGE를 생성한다. 당뇨병(DM)에 의해서 발생되는 고혈당증(hyperglycemia) 및 산화적 스트레스에 의해서 멤브레인 단백질의 번역 후의 변형을 촉진한다(Lindsey JB, et al., "Receptor For Advanced Glycation End-Products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): Cardiovascular Implications," *Diabetes Vascular Disease Research*, Vol. 6(1), 7-14, (2009)). AGE는 당뇨병 합병증, 염증, 망막증, 신증, 죽상 동맥 경화증, 뇌졸증, 내피세포 기능 이상, 및 신경 퇴행성 질환을 포함하는 다수의 병적 상태에 관련되어 있다 (Bierhaus A, "AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept," *Cardiovasc Res*, Vol. 37(3), 586-600 (1998)).

[0005]

또한, AGE-개질 단백질은 노화 세포의 마커이다. 최종당화산물과 노화 사이의 이러한 관계는, 종래 기술에 충분히 공지되어 있다. 예를 들면, Gruber, L. (WO 2009/143411, 26 Nov. 2009), Ando, K. et al. (Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products during Aging in the Circulation, *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 258, 123, 125 (1999)), Ahmed, E.K. et al. ("Protein Modification and Replicative Senescence of WI-38 Human Embryonic Fibroblasts" *Aging Cells*, vol. 9, 252, 260 (2010)), Vlassara, H. et al. (Advanced Glycation Endproducts on Erythrocyte Cell Surface Induce Receptor-Mediated Phagocytosis by Macrophages, *J. Exp. Med.*, Vol. 166, 539, 545 (1987)) 및 Vlassara et al. ("High-affinity-receptor-mediated Uptake and Degradation of Glucose-modified Proteins: A Potential Mechanism for the Removal of Senescent Macromolecules" *Proc. Natl. Acad. Sci. USAI*, Vol. 82, 5588, 5591 (1985)) 참조. 또한, Ahmed, E.K. et al. 는, 최종당화산물이 세포 단백질 및 세포외 단백질에 대해 자발적 손상을 일으키는 주요한 원인 중 하나라는 것을 나타낸다(Ahmed, E.K. et al., see above, page 353). 따라서, 최종당화산물의 측적은 노화 및 기능 부전에 관련되어 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0006] 제1형태에서, 본 발명은 (i) 세포 상의 AGE-개질 단백질에 결합하는 항체, 및 (ii) 항-염증 항체를 포함하는, 염증 또는 자가 면역 질환을 치료하는 조성물이다.
- [0007] 제2형태에서, 본 발명은 세포 상의 AGE-개질 단백질에 결합하는 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 염증 또는 자가 면역 질환의 치료 방법이다.
- [0008] 제3형태에서, 본 발명은 전-염증성 인자의 활성을 방해하는 단계, 및 노화 세포를 죽이는 단계를 포함하는, 염증 또는 자가 면역 질환의 치료 방법이다.
- [0009] **정의**
- [0010] 용어 "최종당화산물" 또는 "AGE-개질 단백질"(또한, 최종당화산물)은, 단백질의 측쇄와 당의 반응 결과로 형성되고 추가로 재배열하여 비가역적 가교를 형성하는 개질된 단백질을 지칭한다. 이러한 과정은, 환원 당과 아미노기 사이의 가역적 반응을 시작해서 시프 염기를 형성하고, 공유 결합된 아미도리 재배열 산물을 형성한다. 아미도리 산물이 형성되면, 추가로 재배열하여 AGE를 생성한다. AGE 개질 단백질 및 AGE-개질 단백질에 대한 항체는 미국 특허 제5,702,704호 (Bucala) 및 미국 특허 제6,380,165호 (Al-Abed et al.)에 기재되어 있다. 당화 단백질 상에서 발견되는 에피토프, 예를 들면, 당화 알부민 상에서 발견되는 N-데옥시프루토실리신은 AGE가 아니다. AGE의 예로는, 2-(2-푸로일)-4(5)-(2-푸란일)-1H-이미다졸 ("FFI"); 5-히드록시메틸-1-알킬파롤-2-카르발데하이드 ("페랄린"); 1-알킬-2-포르밀-3,4-디글리코실 파롤 ("AFGP"), 비-형광성 모델 AGE; 카르복시메틸리신; 및 웬토시딘을 포함한다. 또 다른 AGE인 ALI는 Al-Abed et al에 기재되어 있다.
- [0011] "세포 상의 AGE-개질 단백질에 결합하는 항체"는 AGE-개질 단백질에 결합하고 항체의 불변 영역을 포함하는 항체 또는 기타 단백질을 의미하고, 이러한 AGE-개질된 단백질은 일반적으로 세포 표면 상에 결합된 것으로 발견되는 단백질이고, 세포는, 바람직하게는 포유류 세포이고, 더 바람직하게는 인간, 고양이, 개, 말, 낙타(예를 들면, 낙타 또는 알파카), 소, 양, 또는 염소 세포이다. AGE-개질된 알부민은 세포 상의 AGE-개질된 단백질이 아니고, 이는 일반적으로 세포의 표면 상에 결합된 것으로 발견되는 단백질이 아니다. "세포 상의 AGE-개질 단백질에 결합하는 항체"는 단지 세포의 제거, 파괴, 또는 사망으로 이어지는 항체를 포함한다. 또한, 예를 들면, 독소, 약물, 또는 기타 약품 또는 입자에 접합된(conjugated) 항체도 포함된다. 바람직하게, 항체는 모노클로날 항체이지만, 폴리클로날 항체도 가능하다.
- [0012] "전-염증성 인자"는 염증을 촉진하는 인자를 의미한다. 전-염증성 인자의 예로는, TNF 또는 TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, CD2, CD3, CD20, CD22, CD52, CD80, CD86, C5 보체 단백질, BAFF, APRIL, IgE, $\alpha 4\beta 1$ 인테그린 및 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린을 포함한다. 이러한 인자 및/또는 이러한 수용체의 대부분은 상이한 동물 내에서 상이한 구조를 가질 수 있다. 명칭의 앞의 소문자는 다음과 같이 상이한 동물 또는 인간으로부터 유래하는 인자를 지정하기 위해서 사용된다: 인간 = h, 고양이 = f, 개 = d, 말 = e, 낙타 (또는 알파카) = c, 소 = b, 양 = o, 및 염소 = g, 예를 들면, hTNF는, 인간 TNF를 의미한다. 또한, 인자의 명칭 다음의 "R"은 인자의 수용체를 나타내고, 예를 들면, TNF-R은 TNF에 대한 인간 수용체이거나, IL-6R은 IL-6에 대한 수용체이다. 이러한 지정은 조합해서 사용될 수 있고, 예를 들면, hIL-6R은 IL-6의 인간 수용체이다.
- [0013] "항-염증 항체"는 전-염증성 인자 또는 전-염증성 인자 수용체에 결합하고, 전-염증성 인자 또는 수용체의 활성을 감소시키고, 항체의 불변 영역을 포함하는 항체 또는 기타 단백질을 의미한다. 항-염증 항체의 예로는, 아바타셉트, 알레파셉트, 알렙투주맙, 아타시셉트, 벨리무맙, 카나키누맙, 에쿠리주맙, 에프라투주맙, 나타리주맙, 오크레리주맙, 오파투무맙, 오말리주맙, 오텔릭시주맙, 리툭시맙, 테플리주맙, 베도리주맙, 아달리무맙, 브리아키누맙, 서톨리주맙 폐골, 에타너셉트, 글리무맙, 인플리시맙, 메포리주맙, 레스리주맙, 토시리주맙 및 유스테키누맙을 포함한다. 바람직하게, 항체는 모노클로날 항체이지만, 폴리클로날 항체도 가능하다.
- [0014] "노화 세포"는, 비가역적 증식 억제 상태이고 p16^{Ink4a}를 활성화하고 β -갈락토시다제를 발현하는 노화의 하나 이상의 바이오마커를 발현하는 세포를 의미한다. 또한, "노화 세포"는 생체내에서 증식하지 않지만, 예를 들면, ALS 환자의 근육 내에서 발견되는 일부 위성 세포와 같은 특정 조건하에서에서 생체 외에서 증식할 수 있는, 노화의 하나 이상의 바이오마커를 발현하는 세포가 포함된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 경우에 따라 노화 세포가 연구되었지만, 최근에 노화 세포의 생체내 효과에 대해서만 실시되었다. Baker, D.J. et al. ("Clearance of p16Ink4a-positive senescent cell delays ageing-associated disorders", Nature, vol. 479, pp. 232-236, (2011))에 의한 최근의 연구에서는, 마우스 내에서 노화 세포의 클리어런스 효과를 조

사했다. 그러나, 염증 및 전-염증성 인자에 대한 효과는 기재되어 있지 않았다. 본 출원 이전에, 염증 및 전-염증성 인자에 대한 노화 세포의 제거 또는 사멸의 효과는 공지되어 있지 않았다.

[0016] 본 발명은 염증과 관련된 많은 세포 망이 포지티브 피드백 성분을 갖는다는 인식에 기초한다. 노화 세포는 전-염증성 입자를 생성하기 때문에, 이러한 세포만을 제거하여 염증 및 전-염증성 인자의 양 및 농도가 현저하게 감소한다. 이는, 세포 상의 AGE-개질 단백질에 결합하는 항체를 투여함으로써 수행될 수 있다.

[0017] 또한, 노화 세포 수의 감소와 함께 전-염증성 인자의 활성의 감소를 결합함으로써, 시너지 효과가 생성되고, 이는 염증의 감소가 어느 성분 단독의 효과에 기초해서 예상되는 것보다 클 수 있다. 이는, 예를 들면, 항-염증 항체 및 세포 상의 AGE-개질 단백질에 결합하는 항체를 투여함으로써 수행될 수 있다.

[0018] 세포 상의 AGE-개질 단백질에 결합하는 항체 (또는 "항-AGE 항체")는 관련 기술 분야에서 공지되어 있다. 이러한 항체의 예는, 미국 특허 제5,702,704 (Bucala) 및 미국 특허 제6,380,165호 (Al-Abed *et al.*)에 기재된 것을 포함한다. 이러한 항체의 예는, 하나 이상의 AGE, 예를 들면, FFI, 피랄린, AFGP, ALI, 카르복시메틸리신 및 펜토시딘에 결합한 항체를 포함한다. 바람직하게는, 항체가 카르복시메틸리신에 결합한다. 바람직하게는, 항체가 사용될 동물에 대해 비-면역원성이고, 예를 들면, 인간; 개, 고양이 및 말을 포함하는 반려 동물; 및 시관되는 중요한 동물, 예를 들면, 낙타(또는 알파카), 소(숫과의 동물), 양, 및 염소에 대해 비-면역원성이다. 바람직하게는, 항체가, 예를 들면, (인간에 대해)인간화, (고양이에 대해)고양이화, (개에 대해)개화, (말에 대해)말화, (낙타 또는 알파카에 대해)낙타화, (소에 대해)소화, (양에 대해)양화, 또는 (염소에 대해)염소화와 같은, 항체에 대한 면역 반응을 감소시키기 위해서, 동물의 항체와 동일한 종의 불변 영역을 갖는다. 더 바람직하게, 항체가 사용될 동물의 항체와 동일하고(가변 영역 제외), 예를 들면, 인간 항체, 고양이 항체, 개 항체, 말 항체, 낙타 항체, 소 항체, 양 항체, 또는 염소 항체이다. 이러한 동물에 대한 항체의 불변 영역 및 그 외의 부분의 상세는 다음에 기재되어 있다.

[0019] 항-AGE 항체는 항체-항원 복합체로부터 해리 속도 또는 k_d (또한, k_{back} 또는 오프-레이트(off-rate)로 지칭한다)가 낮고, 바람직하게 최대로 9×10^{-3} , 8×10^{-3} , 7×10^{-3} 또는 6×10^{-3} (sec^{-1})이다. 항-AGE 항체는 세포의 AGE-개질 단백질에 대한 높은 친화도를 갖고, 최대 9×10^{-6} , 8×10^{-6} , 7×10^{-6} , 6×10^{-6} , 5×10^{-6} , 4×10^{-6} 또는 3×10^{-6} (M)의 낮은 해리 상수 K_D 로 발현될 수 있다.

[0020] 항-AGE 항체가 AGE-개질 세포의 파괴를 일으키는 제제에 접합될 수 있다. 이러한 제제는, 독소, 세포 독성제, 자성 나노입자, 및 자성 스피-볼텍스 디스크(magnetic spin-vortex discs)일 수 있다.

[0021] 항-AGE 항체에 접합된 독소, 예를 들면, 기공 형성 독소(PFT)(Aroian R. *et al.*, "Pore-Forming Toxins and Cellular Non-Immune Defenses (CNIDs)," *Current Opinion in Microbiology*, 10:57-61 (2007))가 AGE-개질 세포를 선택적으로 표적으로 하고 제거하도록 환자에게 주사될 수 있다. 항-AGE 항체는 AGE-개질 세포를 인식하고 결합한다. 이어서, 독소는 세포 표면에 기공을 형성하고 이어서 삼투압 용해를 통해 세포를 제거한다.

[0022] 항-AGE 항체에 접합된 자성 나노입자는, AGE 개질 세포를 표적으로 하고 제거하도록 환자에게 주사될 수 있다. 자성 나노입자는, AGE-개질 세포를 선택적으로 제거하기 위해서 자기장을 적용함으로써 가열될 수 있다.

[0023] 또 다른 자성 스피-볼텍스 디스크로서, 이는 혈관을 막을 수 있는 자기-옹집을 피하기 위해서 자기장이 적용되는 경우에 자화되고, 자기장이 적용되는 경우 회전하기 시작하여 표적 세포의 멤브레인 파괴를 일으킨다. 항-AGE 항체에 접합되는 자성 스피-볼텍스 디스크는, 그 외의 세포를 제거하지 않고 AGE-개질 세포 형태를 특이적으로 표적으로 한다.

[0024] 항체는, 일반적으로 "Y" 형상 분자를 형성하기 위해서 결합된 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄의 폴리펩티드를 포함한다. 불변 영역은, 항원을 표적으로 하기 위해서 사용되는 메카니즘을 결정한다. "Y"(가변 영역)의 팀 내에서의 아미노산 서열은 상이한 항체 중에서 변화한다. 이러한 변화에 의해서, 항원에 결합하는 항체 특이성을 항체에 제공한다. 경쇄 및 중쇄의 말단을 포함하는 가변 영역은, 초가변영역 (HV-또한 경우에 따라 상보성 결정 영역 또는 CDR으로 지칭됨) 및 프레임워크(FR) 영역으로 더 분할된다. 항체가 재조합으로 제조되는 경우, 2개의 상이한 항원에 결합하는 가변 영역(또는 상보성 결정 영역)을 갖는 단일 항체를 가질 수도 있고, "Y"의 각각의 팀은 각각의 항원에 대해 특이적이고; 이들은 이중특이적 항체로 지칭된다.

[0025]

본 발명에 따른 인간화 항-AGE 항체는 다음의 아미노산의 인간 불변 영역 서열을 가질 수 있다:

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS					
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
GLYSLSSVVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KCCVECPPCP APPVAGPSVF					
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR					
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN					
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
QVSLTCLVKQ FYPSDISVEW ESNQOPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN					
<u>310</u>	<u>320</u>				
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK					

[0026]

항-AGE 항체는 다음의 상보성 결정 영역 중 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0028]

CDR1H (중쇄): SYTMGV

[0029]

CDR2H (중쇄): TISSGGGSTYYPDVK

[0030]

CDR3H (중쇄): QGGWLPPFAX

[0031]

CDR1L (경쇄): RASKSVTSSRGYSYM

[0032]

CDR2L (경쇄): LVSNLES

[0033]

CDR3L (경쇄): QHIRELTRS

[0034]

항-염증 항체가 충분히 공지되어 있고, 많은 항체가 인간 사용에 대해 이미 승인되어 있다. 항-염증 항체의 예로는, 아바타셉트, 알레파셉트, 알렘투주맙, 아타시셉트, 벨리무맙, 카나키누맙, 에쿠리주맙, 에프라투주맙, 나타리주맙, 오크레리주맙, 오파투무맙, 오말리주맙, 오텔릭시주맙, 리툭시맙, 테플리주맙, 베도리주맙, 아달리무맙, 브리아키누맙, 서톨리주맙 폐글, 에타너셉트, 골리무맙, 인플릭시맙, 메포리주맙, 레스리주맙, 토시리주맙 및 유스테키누맙을 포함한다. 바람직하게, 항-염증 항체는 TNF 또는 TNF-R에 결합하는 항체이다. 상기 항체 중 임의의 것은 인간 이외의 동물 내에서 임의의 가능한 면역 반응을 줄이기 위해서, 전-염증성 인자 또는 전-염증성 인자 수용체에 결합하지 않는 부분을, 동물로부터 유래하는 항체의 불변영역, 예를 들면, 고양이, 개, 말, 낙타(또는 알파카), 소, 양, 또는 염소의 항체 불변 영역으로 대체함으로써 개질될 수 있다.

[0035]

이러한 불변 영역, 또한, 이러한 동물 항체의 그 외의 부분은 충분히 공지되어 있고, 일부는 다음에서 발견될 수 있다: Yaofeng Zhao, et al. "The bovine antibody repertoire" Developmental & Comparative Immunology, Vol. 30, Issues 1-2, 2006, Pages 175-186; Wagner B, et al. "the complete map of the Ig heavy chain constant gene region reveals evidence for seven IgG isotypes and for IgD in the horse" J Immunol. 2004 Sep 1;173(5):3230-42; Strietzel CJ, et al. "In Vitro functional characterization of feline IgGs" Vet Immunol Immunopathol. 2014 Apr 15;158(3-4):214-23; Mayuri Patel, et al. "Sequence of the dog immunoglobulin alpha and epsilon constant region genes" Immunogenetics, March 1995, Volume 41, Issue 5, pp 282-286; and David R. Maass, et al. "Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant

camelid heavy chain antibodies (VHHs)" J Immunol Methods. Jul 31, 2007; 324(1-2): 13-25.

[0036] 항-염증 항체는, 항체-항원 복합체로부터의 해리 속도 또는 k_d (또한, k_{back} 또는 오프 레이트로 지칭된다)가 작고, 바람직하게, 최대 9×10^{-3} , 8×10^{-3} , 7×10^{-3} , 6×10^{-3} , 5×10^{-3} , 4×10^{-3} , 3×10^{-3} , 2×10^{-3} , 또는 1×10^{-3} (sec^{-1})이다. 항-염증 항체는 그 결합 항원에 대한 친화도를 갖고, 이는 최대 9×10^{-6} , 8×10^{-6} , 7×10^{-6} , 6×10^{-6} , 5×10^{-6} , 4×10^{-6} , 3×10^{-6} , 2×10^{-6} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} 또는 1×10^{-8} (M)의 낮은 해리 상수 K_D 로 발현될 수 있다.

[0037] 이러한 항체의 예로는, 미국 특허 제6,090,382호에 기재된 항-TNF 항체를 포함한다. 이러한 항체는, 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0038] CDR3L (경쇄): Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa, 여기서 Xaa는 Thr 또는 Ala이다.

[0039] CDR3H (중쇄): Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa, 여기서 Xaa는 Tyr 또는 Asn이다.

[0040] 경쇄 가변 영역: Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys.

[0041] 중쇄 가변 영역: Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser.

[0042] 항-AGE 항체 및 항-염증 항체인 이중 특이적 항체가 또한 사용될 수 있다. 이러한 항체는, 항-AGE 항체의 것으로부터의 가변 영역(또는 상보성 결정 영역) 및 항-염증 항체로부터의 가변 영역(또는 상보성 결정 영역)을 갖는다.

[0043] 추가의 항체가 기재되는 경우, 이들은 충분히 공지된 방법을 사용해서 제조될 수 있다. 예를 들면, 폴리클로날 항체(pAbs)는 면역원, 및 필요에 따라 아주반트 중 하나 이상을 주사하여 포유류 숙주 내에서 발생된다. 일반적으로, 면역원(및 아주반트)는 피하 또는 복강내 주사에 의해서 포유류 내에 주사된다. 면역원은 세포의 AGE-개질된 단백질, 전-염증성 인자, 전-염증성 인자 수용체, 또는 그 단편일 수 있다. 아주반트의 예로는, 프로인트(Freund's)의 불완전한, 모노포스포릴 리피드 A 합성-트레할로스 디코리노미콜레이트, 알루미늄 하이드록사이드(alum), 열충격 단백질 HSP 70 또는 HSP96, 모노포스포릴 리피드 A를 함유하는 스쿠알렌 에멀전, α 2-마크로글로불린 및 오일 에멀전, 플루로닉 폴리올, 폴리양이온 및 디니트로페놀을 포함하는 표면 활성 물질을 포함한다. 면역 반응을 개선하기 위해서, 면역원은 숙주 내에서 면역원성을 갖는 폴리펩티드에 접합될 수 있고, 폴리펩티드는, 예를 들면, 키홀 림펫 혈모시아닌(keyhole limpet hemocyanin, KLH), 혈청 알부민, 소티로글로불린, 콜레라 독소, 불안정한 엔테로톡신, 실리카 입자 또는 소이빈 트립신 억제제이다. 또한, pAbs는 IgY 분자를 생성하는 닭 내에서 제조될 수 있다.

[0044] 모노클로날 항체(mAbs)는, 또한 숙주 또는 숙주로부터 램프구에 면역력을 부여하고, mAb-분비(또는 잠재적으로 분비) 램프구를 얻고, 이러한 램프구를 불멸화 세포(예를 들면, 골수종 세포)에 융합하고, 원하는 mAb를 분비하는 세포를 선택함으로써 제조될 수 있다. 그 외의 기술로서, 예를 들면, EBV-하이브리도마 기술이 사용될 수 있다. 항체의 가변 도메인을 인코딩하는 유전자를 인간(또는 그 외의 동물)의 불변 도메인의 유전자로 절단함으로써 키메라 항체를 생성하는 기술은, 아미노산 수준에서 실질적으로 인간(인간화) 또는 실질적으로 또 다른 동물(예를 들면, 고양이, 개, 말, 낙타 또는 알파카, 소, 양 또는 염소)화인 "키메라 항체"를 일으킨다. 필요에 따라, mAb는 예를 들면, 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 갤전기영동, 투석, 암모늄설페이트 침전 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 종래의 절차에 의해서 배양 배지 또는 복수(ascites fluid)로부터 정제될 수 있다. 또한, 인간 모노클로날 항체는, 제3카페 IgG 인간 트랜스 유전자좌 및 침묵의 내인성 마우스 Ig 유전자좌를 함유하는 트랜스제닉 마우스에 면역력을 부여하거나 인간 트랜스제닉 마우스를 사용함으로써 생성될 수 있다. 인간화 모노클로날 항체 및 단편의 생성은 또한 파지 디스플레이 기술을 통해 생성될 수

있다.

[0045] "약학적으로 허용되는 담체"는, 임의의 및 모든 용매, 분산 배지, 코팅, 항균 및 항진균제, 약학적 투여에 양립 할 수 있는 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 이러한 담체 또는 희석제의 바람직한 예는, 물, 생리식염수, 렇거액, 및 텍스트로스 용액을 포함한다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물에 포함될 수 있다. 비경구 투여에 사용되는 용액 및 혼탁액은 멸균 희석액, 예를 들면, 주사용수, 생리식염수 용액, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 그 외의 합성 용매; 항균제, 예를 들면, 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예를 들면, 아스크로브산 또는 소디움 비설파이트; 완충제, 예를 들면, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트, 및 장력 조절제, 예를 들면, 소디움 클로라이드 또는 텍스트로스를 포함할 수 있다. pH는 산 또는 염기, 예를 들면, 염산 또는 소디움 하이드록사이드로 조절될 수 있다. 비경구 제제는, 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 일회용 시린지 또는 다중 용량 바이알에 넣을 수 있다.

[0046] 주사에 적합한 약학적 조성물은 멸균 주사 가능한 용액 또는 분산액의 즉시 제조를 위해 멸균 수성 용액 또는 분산액을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체는 생리식염수, 정균성 물, CREMOPHOR EL® (BASF; Parsippany, NJ) 또는 인산 완충 식염수 (PBS)를 포함한다. 모든 경우, 조성물은 시린지를 사용하여 투여되도록 멸균되어야 하고 유체이어야 한다. 이러한 조성물은 제조 및 보존 중에 안정해야 하고, 세균 및 진균과 같은 미생물로부터의 오염에 대해 보존되어야 한다. 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로부타놀, 페놀, 아스코르브산, 및 티메로살은 미생물 오염을 포함할 수 있다. 등장제, 예를 들면, 당, 폴리알콜, 예를 들면, 만니톨, 소르비톨, 및 소디움 클로라이드는 조성물 내에 포함될 수 있다. 흡수를 지연시킬 수 있는 조성물은, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 제제를 포함한다. 멸균 주사 가능한 용액은, 필요에 따라 성분의 하나 또는 조합으로 적합한 용매 내에서 필요한 양으로 항체 및 선택적으로 그 외의 치료 성분을 포함하고, 멸균함으로써 제조될 수 있다. 멸균 주사 가능한 용액을 제조하기 위한 멸균 고체의 제조 방법은 고체를 생성하기 위해서 진공 건조 및 동결 건조를 포함한다.

[0047] 흡입에 의한 투여의 경우, 항체는 적합한 추진체 예를 들면, 이산화 탄소와 같은 기체를 포함하는 분무기 또는 가압 용기로부터 에어로졸 분무로 전달된다. 항체는 또한, 예를 들면, iSPERSE™ 흡입된 약물 전달 플랫폼 (PULMATRIX, Lexington, Mass.)을 사용하여 건조 분말로서 흡입을 통해 전달될 수 있다. 담 항체(IgY)의 사용은 흡입에 의해서 투여되는 경우, 인간을 포함하는 다양한 동물 내에서 비-면역원성일 수 있다.

[0048] 항체의 각 타입의 적합한 용량 수준은 일반적으로 환자의 체중 1 kg당 약 0.01 내지 500 mg일 수 있다. 바람직하게는, 용량 수준은 약 0.1 내지 약 250 mg/kg, 더 바람직하게 약 0.5 내지 약 100 mg/kg이다. 적합한 용량 수준은 약 0.01 내지 250 mg/kg, 약 0.05 내지 100 mg/kg, 또는 약 0.1 내지 50 mg/kg일 수 있다. 이러한 범위 내에서, 용량은 0.05 내지 0.5, 0.5 내지 5 또는 5 내지 50 mg/kg일 수 있다. 항체의 각 타입이 1일당 1 내지 4회(예를 들면, 1일 1회 또는 2회)의 투여계획에 따라 투여되지만, 항체는 일반적으로 생체내에서 긴 반감기를 갖는다. 따라서, 항체의 각 타입은 1일 1회, 1주일 1회, 2주 또는 3주 1회, 1개월 1회 또는 60~90일 1회 투여될 수 있다.

[0049] 세포 상의 AGE-개질 단백질에 결합하는 항체를 항-염증 항체와 단독 또는 조합, 또는 다수 개 항-염증 항체와의 조합, 또는 기타 항-염증 제제(예를 들면, NSAIDS 및/또는 스테로이드)와의 조합으로 치료의 효과를 결정하기 위해서, 환자의 관찰 또는 다양한 시험이 사용될 수 있다. 예를 들면, 염증 또는 자가 면역 질환의 증상의 개선이 환자; 치료 전에 이러한 수준에 비해 수준의 감소를 나타내는 다양한 전-염증성 인자(예를 들면, TNF)에 대한 혈액 검사; 및 치료 전에 이러한 수준에 비해 수준의 감소를 나타내는 염증 부위 또는 그 근방에서 취해진 조직 생검에서 다양한 전-염증성 인자(예를 들면, TNF)의 검사에서 관찰될 수 있다(예를 들면, 피부 발적의 감소).

[0050] 단위 투여 형태는 투여 및 투약 균일성을 용이하게 하기 위해서 제조될 수 있다. 단위 투여 형태는 치료될 대상에 대해 단일 투여로서 적합한 물리적 개별 단위를 의미하고, 필요한 약학적 담체와 관련하여 하나 이상의 타입의 항체의 치료적으로 유효한 양을 함유한다. 바람직하게, 단위 투여 형태는 밀봉 용기 내에 있고 멸균된다.

[0051] 실시예

[0052] 실시예 1: 안티 최종당화산물 항체 투여의 생체내 연구

[0053] 안티 최종당화산물 항체의 효과를 조사하기 위해서, 항체는 노화된 CD1(ICR) 마우스(Charles River Laboratories)에, 정맥내 주사에 의해 1일 2회, 1주 1회, 3주간(1일, 8 일 및 15일) 투여된 후, 10 주간 치료를 하지 않았다. 시험 항체는 키홀 림펫 혜모시아닌과 접합된, 카르복시 메틸리신, 일반적인 AGE 에피토프에

대해서 발생되는 시판되는 마우스 안티 최종당화산물 항체이었다. 대조 동물에는 생리식염수 대조구 기준을 사용하였다.

[0054] "젊음"으로 지칭된 마우스는 8 주령이었고, "늙음"으로 지칭된 마우스는 88주령(± 2 일)이었다. 항체의 투여로부터 부작용은 발견되지 않았다. 연구에 사용된 동물의 상이한 그룹은 표 1에 표시된다.

표 1

그룹 번호	시험 물질	마우스	용량 수준 ($\mu\text{g/gm/BID/ 주}$)	동물의 수	
				주요 연구	치료 없음
				암컷	암컷
1	생리식염수	젊음	0	20	-
2	생리식염수	늙음	0	20	20
3	항체	늙음	2.5	20	20
4	없음	늙음	0	20	pre
5	항체	늙음	5.0	20	20

- = 미적용, Pre = 지방 조직의 수집을 위해 치료전에 안락사시킨 동물의 서브셋

[0055]

[0056] 노화 세포의 마커인 $\text{P16}^{\text{INK4a}}$ mRNA은, Real Time-qPCR에 의해서 그룹의 지방 조직 내에서 정량화되었다. 결과는 표 2에 표시된다. 표에서, $\Delta \Delta \text{Ct} = \Delta \text{Ct}$ 평균 대조 그룹(2) - ΔCt 평균 실험 그룹 (1 또는 3 또는 5):발현 배수 = $2^{-\Delta \Delta \text{Ct}}$.

표 2

계산 (그룹 4에 대해 조절 되지 않음: 5.59)	그룹 2 대 그룹 1		그룹 2 대 그룹 3		그룹 2 대 그룹 5	
	그룹 2	그룹 1	그룹 2	그룹 3	그룹 2	그룹 5
평균 ΔCt	5.79	7.14	5.79	6.09	5.79	7.39
$\Delta \Delta \text{Ct}$	-1.35		-0.30		-1.60	
발현 배수	2.55		1.23		3.03	

[0057]

[0058] 상기 표에서는, 치료되지 않은 늙은 마우스(대조 그룹 2)가 예상대로 치료되지 않은 젊은 마우스 (대조 그룹 1)보다 2.55 배 많은 p16Ink4a mRNA가 발현되는 것이 표시된다. 이는, 치료 22일에 안락사시킨 그룹 1의 치료되지 않은 젊은 마우스에 비해 회복 85일에 안락사시킨 그룹 2의 치료되지 않은 늙은 마우스를 비교하는 경우 관찰되었다. 그룹 2의 치료되지 않은 늙은 마우스의 결과는, (85일에 안락사시킨)그룹 3의 치료된 늙은 마우스의 결과와 비교하는 경우, p16Ink4a mRNA는 그룹 3에서보다 그룹 2에서 1.23 배 높은 것이 관찰되었다. 따라서, p16Ink4a mRNA 발현의 수준은, 늙은 마우스가 항체의 2.5 $\mu\text{g/gram/BID/주}$ 에 치료된 경우보다 낮았다.

[0059] 그룹 2(대조군)의 치료되지 않은 늙은 마우스의 결과는 그룹 5(5 $\mu\text{g/gram}$) 치료된 늙은 마우스 (22일에 안락사)의 결과와 비교하는 경우, p16Ink4a mRNA 는 그룹 5(5 $\mu\text{g/gram}$)에서보다 그룹 2(대조군)에서 3.03 배 높은 것이 관찰되었다. 이러한 비교는, 5.0 $\mu\text{g/gram/BID/주}$ 로 치료된 경우 p16Ink4a mRNA 발현의 낮은 수준을 갖는 것을 나타내고, 젊은 치료되지 않은 마우스(즉, 그룹 1)의 것에 필적하는 p16Ink4a mRNA 발현 수준을 제공한다. 회복 85일에 안락사시킨 그룹 3((2.5 $\mu\text{g/gram}$) 마우스와 달리, 그룹 5 마우스는 치료 22일에 안락사되었다.

[0060] 이러한 결과는, 항체 투여가 노화 세포의 사멸을 일으킨다는 것을 나타낸다.

[0061]

실시예 2: 시험 항체의 친화성 및 운동성

[0062]

실시예 1에서 사용되는 시험 항체의 친화성 및 운동성은 세포의 AGE-개질 단백질에 대한 모델 기질로서 N_a,N_a-비스(카르복시메틸)-L-리신 트리플루오로아세테이트 염 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 사용해서 분석하였다. 라벨-부재 상호작용 분석은 Series S 센서 칩 CM5 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA)을 사용하여 BIACORE™ T200 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) 상에서 수행하고, Fc1은 블랭크로서 세팅되고 Fc2는 시험 항체로 고정된다(분자량 150,000 Da). 러닝 완충액은 25°C 온도에서 HBS-EP 완충액 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA 및 0.05% P-20, pH of 7.4)이었다. 소프트웨어는 BIACORE™ T200 평가 소프트웨어, 버전 2.0이었다. 이 중 기준(Fc2-1 및 완충 주사액)은 분석에 사용되고, 데이터는 랑류어 1:1 결합 모델에 피팅되었다.

표 3

친화성 및 운동성 분석의 실험 셋업

결합 및 해리	
유로	Fc1 및 Fc2
유속 ($\mu\text{l}/\text{min.}$)	30
결합 시간 (s)	300
해리 시간 (s)	300
샘플 농도 (μM)	20 – 5 – 1.25 (x2) – 0.3125 – 0.078 – 0

[0063]

[0064]

응답 대 시간의 그래프가 도 1에 도시된다. 다음의 값은 분석으로부터 결정되었다: k_a ($1/\text{Ms}$) = 1.857×10^3 ; k_d ($1/\text{s}$) = 6.781×10^{-3} ; K_D (M) = 3.651×10^{-6} ; R_{\max} (RU) = 19.52; 및 Chi^2 = 0.114. 피팅의 Chi^2 가 R_{\max} 의 10% 미만이기 때문에, 피트가 신뢰 가능하다.

[0065]

실시예 3(prophetic): 류마티스 관절염의 항원 유도 관절염(AIA) 마우스 모델 내에서 안티 최종당화산물 항체 및 마우스 항-마우스 TNF 항체의 투여의 생체내 연구

[0066]

안티 최종당화산물 항체 및 마우스 항-마우스 TNF 항체의 류마티스 관절염에 대한 효과를 조사하기 위해서(자가 면역 질환인 기존의 염증성 질환), 2개의 항체가 CD1(ICR) 마우스에 동시에 투여되고, 먼저 전신 주사 이어서 관절 내 주사에 의해서 메틸화 소 혈청 알부민으로 사전에 치료되어 AIA 마우스를 형성한다. 안티 최종당화산물 항체 및 항-TNF 항체의 조합 투여는 정맥내 주사에 의해서 1일 2회, 1주 1회 3주간이다(1일, 8일, 15일). 안티 최종당화산물 항체는 키홀 림펫 헤마시아닌에 접합된 일반적인 AGE 에피토프로서 카르복시메틸 리신에 대해 발생되는 시판되는 마우스 안티 최종당화산물 항체이다. 생리식염수의 대조 기준은 제1대조 동물 내에서 사용되고, 제2실험 그룹은 안티 최종당화산물 항체만 투여되고, 항-TNF 항체의 제2대조 기준이 제2대조 동물 내에 사용된다. 각 항체의 5 $\mu\text{g}/\text{gm}/\text{BID}/\text{주의}$ 용량 수준이 사용된다.

[0067]

연구 과정 중에 동물을 관찰하고, TNF의 수준을 결정하기 위해서 혈액을 취한다. 연구 종료시에, 동물은 안락 사하고, 관절 조직은 류마티스 관절염과 관련된 손상의 징후에 대해서 조사한다. 이러한 결과에 따르면, 제2실험 그룹 및 제2대조 그룹은 제1대조 그룹보다 TNF 수준이 낮고 관절 손상이 덜한 것을 나타낸다. 또한, 이러한

제1 실험 그룹은 모든 연구 그룹의 TNF의 가장 낮은 수준 및 적은 관절 손상뿐 아니라, 관절 손상 및 TNF 수준의 감소가 제2실험 그룹 및 제2대조 그룹에 기초해서 예상된 것보다 크다. 이러한 결과는, 안티 최종당화산물 항체 및 항-염증 항체를 사용해서 시너지 효과뿐 아니라 안티 최종당화산물 항체의 항-염증 효과를 나타낸다.

[0068]

참고문헌

[0069]

1. Ando K, et al., "Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products During Aging in the Circulation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 258, 123-27 (1999).

[0070]

2. Lindsey JB, et al., "Receptor For Advanced Glycation End-Products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): Cardiovascular Implications," *Diabetes Vascular Disease Research*, Vol. 6(1), 7-14, (2009).

[0071]

3. Bierhaus A, "AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept," *Cardiovasc Res*, Vol. 37(3), 586-600 (1998).

[0072]

4. Meuter A., et al. "Markers of cellular senescence are elevated in murine blastocysts cultured in vitro: molecular consequences of culture in atmospheric oxygen" *J Assist Reprod Genet*. 2014 Aug 10. [Epub ahead of print].

[0073]

5. A. Freund "Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences" *Trends Mol Med*. 2010 May;16(5):238-46.

[0074]

6. Baker, D.J. et al., "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cell delays ageing-associated disorders", *Nature*, vol. 479, pp. 232-236, (2011).

[0075]

7. Jana Hadraboa, et al. "Chicken immunoglobulins for prophylaxis: Effect of inhaled antibodies on inflammatory parameters in rat airways" *Journal of Applied Biomedicine* (in press; Available online 5 May 2014).

[0076]

8. Gianfranco Ferraccioli, et al. "Interleukin-1 β and Interleukin-6 in Arthritis Animal models: Roles in the Early Phase of Transition from Acute to Chronic inflammation and Relevance for Human Rheumatoid Arthritis" *Mol Med*. 2010 Nov-Dec; 16(11-12): 552-557.

도면

도면1

