



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0137174
(43) 공개일자 2014년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0057768

(22) 출원일자 2013년05월22일

심사청구일자 2013년05월22일

(71) 출원인

주식회사 녹십자

경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 107 (보정동)

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

강희정

서울특별시 강동구 동남로79길 26, 106동 901호
(고덕동, 고덕IPark)

박정규

서울특별시 중구 퇴계로 447, C동 1005호 (황학동, 황학 아크로타워)

김기용

경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 107 (보정동, (주)녹십자)

(74) 대리인

이처영

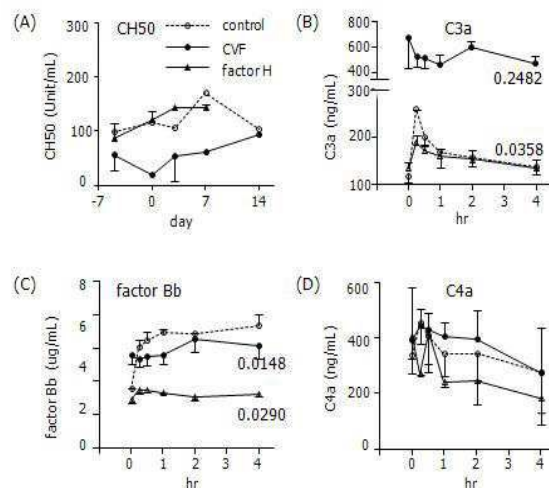
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 대체보체경로 억제제를 함유하는 대체보체경로 억제용 조성물 및 이를 이용한 대체보체경로 억제방법

(57) 요약

본 발명은 대체보체경로 억제제를 함유하는 대체보체경로 억제용 조성물 및 이를 이용한 대체보체경로 억제방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 보체인자 H 또는 인자 B 길항제와 같은 대체보체경로 억제제 및 면역 억제물질들을 함유하는 대체보체경로 억제용 조성물 및 이를 이용한 대체보체경로 억제방법에 관한 것으로, 이는 IMBIR을 저해하고 이식물의 존속 기간을 연장하는 효과가 있어 성체 돼지로부터 분리한 췌도의 내분 이식 등 이식 수술에 활용될 수 있다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0021930

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업> 일반연구자지원사업> 기본연구지원사업(유형I)

연구과제명 이종체도이식에서 즉각성 혈액배개성 염증반응 기전 규명 및 보체 경로 특이적 억제자를 통한 조절 기술 개발

기 여 율 5/10

주관기관 한림대학교

연구기간 2010.09.01 ~ 2011.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A3011269

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업> 일반연구자지원사업> 여성과학자지원사업

연구과제명 항 알파갈 IgG 항체의 중쇄 분석을 통한 이종체도이식 후 급성체액성거부반응의 기전 탐구

기 여 율 1/10

주관기관 한림대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A040004

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 바이오이종장기개발사업단 중 '영장류 전임상시험 및 임상시험 면역반응분석지원과 치료용 단백질 및 항체의 개발

기 여 율 4/10

주관기관 서울대학교

연구기간 2010.04.01 ~ 2013.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

대체경로 억제제를 함유하는 대체경로 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대체경로 억제제가 보체인자 H 또는 인자 B 길항제인 것을 특징으로 하는 대체경로 억제용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 인자 B 길항제가 소분자, 핵산, 핵산 유사체, 펩티드, 단백질, 리보솜, 항체, 억제 핵산, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi, shRNA, siRNA, miRNA 및 그의 변이체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 대체경로 억제용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 대체경로 억제제가 C3a의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 대체경로 억제용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물에 면역 억제물질을 더 함유하는 것을 특징으로 하는 대체경로 억제용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 면역 억제물질이 안티-인간 CD154 단일클론항체(5C8), 라파마이신, 안티-인간 ICAM-1 단일클론항체, 안티-흉선세포 글로불린, 안티-인간 CD40 단일클론항체, 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 타크로리무스(tacrolimus), 보르테조미(bortezomib), 리툭시맙(rituximab) 및 TNF α 길항체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 대체경로 억제용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 급성혈액매개성 염증반응(IBMIR)을 저해하는 것을 특징으로 하는 대체경로 억제용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 동종 또는 이종 기관 또는 조직 이식 시 나타나는 거부반응(rejection)을 완화시키는 것을 특징으로 하는 대체경로 억제용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 동종 또는 이종 기관 또는 조직이 체도인 것을 특징으로 하는 대체경로 억제용 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항의 조성물을 이용한 대체경로 억제방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 대체보체경로(Alternative Complement Pathway) 억제제를 함유하는 대체보체경로 억제용 조성물 및 이를 이용한 대체보체경로 억제방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 보체인자 H 또는 인자 B 길항제와 같은 대체보체경로 억제제 및/또는 면역 억제물질을 함유하는 체계의 이종이식 시 급성혈액매개성 염증반응(instant blood-mediated inflammatory reaction; IMBIR)을 저해하고 이식물의 존속기간을 연장하는 대체보체경로 억제용 조성물 및 이를 이용한 대체보체경로 억제방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 장기이식은 장기 부전으로 고통받는 환자들에게 행해지는 치료법으로 최근 더욱 일반화되고 있으나, 공여자 부족 및 거부반응에 의해 제한되고 있다. 한 개체에서 동일한 개체로의 이식을 자가이식(autologous transplantation), 유전적으로 동일한 또는 동계 개체 사이의 이식을 동계이식(syngeneic transplantation), 동일한 종의 유전적으로 상이한 두 개체 사이의 이식을 동종이식(allogeneic transplantation), 상이한 종의 개체 사이의 이식을 이종이식(xenogeneic transplantation)으로 부른다. 동종이식은 이종이식보다 성공할 가능성이 높지만, 수용자에 대한 공여자 장기의 여러 면역 공격으로 인해 거부반응이 유발될 수 있다. 거부반응은 일반적으로 T세포 매개 또는 항체 공격에 의한 결과이지만, 부가적으로 보체의 효과도 함유된다.
- [0003] 보체계는 미생물 감염에 대한 선천 면역의 중요한 성분으로, 이들의 주요 기능은 염증을 매개하고 외래 미생물을 제거하는 것이며, 정상적인 혈청 내에 비활성 상태로 존재하는 단백질의 집단을 함유한다. 상기 단백질은 3개의 활성화 경로, 즉, 고전적인 경로, 렉틴 경로 및 대체보체경로로 구성된다. 미생물 표면의 분자는 상기 경로를 활성화시켜 C3-전환효소로 알려진 프로테아제 복합체의 형성을 일으킬 수 있다. (V.M.Holers et al., Complement. In *Clinical Immunology: Principles and Practice*, ed. Rich, R.R., 363-391, 1996). 고전적인 경로는 칼슘·마그네슘 의존형 캐스케이드(cascade)로, 일반적으로 항원에 대한 항체 결합으로 활성화가 개시되며, 감염을 제거하는데 충분한 활성화를 제공하기 위해서는 다수의 항원-항체 복합체가 형성되어야 하고, 리간드와 복합된 C-반응성 단백질의 결합 또는 병원체에 의한 항체 비의존성 방식으로도 활성화될 수 있다. 반면, 대체경로는 특정 표면에 C3의 침착에 의해 활성화되는 마그네슘 의존형 캐스케이드로, 낮은 농도의 항체에서 활성화될 수 있고, 다양한 억제물질의 조절하에 낮은 비율로 자발적으로 활성화된다. 대체경로는 고전적인 경로 및 렉틴 경로의 활성 증폭에 관여한다(C.Suankratay et al., *Mol. Immunol.* 27, 1155-1161, 1990).
- [0004] 특히, 체계 이식은 유형 I 당뇨병 환자들에게 유용한 치료 수단이지만, 인간 체계의 공급은 제한적이며 늘어나는 요구를 만족시킬 수가 없는 것이 현실이다. 이에 따라 돼지로부터 분리한 체계가 췌장 β세포의 대체적 공급원으로 인식되어 왔으며, 성체 또는 신생 돼지 체계의 내문 이식 시, 안티-CD154 항체를 사용한 면역 억제로 당뇨병 비인간 영장류(NHP)의 장기간 글루코오스 조절을 할 수 있다고 알려져 있으나, 이식된 돼지 체계의 손실에 기여하는 개별적인 요인들에 대한 연구가 필요하다(Hering BJ et al., *Xenotransplantation*, 16(4), 196-202, 2009; Cardona K et al., *Nature medicine*, 12(3), 304-6, 2006).
- [0005] 내문 체계 이식 시, 간문맥으로 주입된 체계는 신선한 혈액과 접촉하여 주입된 체계의 상당량을 파괴하는 급성 혈액매개성 염증반응(IBMIR)이라 불리는 즉각적인 염증반응을 일으킨다. 약 50~70%의 이식된 체계가 손실된다. 조직 인자 또는 콜라겐 잔기와 같은 체계의 숨겨진 표면 분자들의 노출에 의하여 유발된 응고와 혈소판 활성화 및 항체매개 보체 활성화가 IBMIR의 발달에 기여한다(van der Windt DJ et al., *Xenotransplantation*, 14(4), 288-97, 2007; Korsgren O et al., *Transplantation*, 79(10), 1289-93, 2005). 돼지 체계 이식 시, 이종이식에서 주요 거부반응 매커니즘인 이종반응성 항체 결합과 뒤이은 보체 활성화가 IBMIR의 발달을 증대시키기 때문에, 동종타가이식보다 IBMIR이 더 심각할 것으로 예상된다. 이식물 손상이 IgM 및 체계의 보체 퇴적에 의해 개시되며, 결국 63~91%의 주입된 체계가 NHP에서 내문 성체 돼지 체계 이식 후 72 시간 내에 손실된다는 것이

증명되었다(Kirchhof N et al., *Xenotransplantation*, 11(5), 396-407, 2004).

[0006] 최근 들어, 코브라 독 인자(CVF) 또는 sCRI에 의해 보체 활성을 억제함으로써 IBMIR을 감소시키고 NHP 수용체에 이식한 돼지 이식물의 초기 손실을 막을 수 있다는 것이 증명되었다(Rood PP et al., *Transplantation*, 83(2), 202-10, 2007). 그러나, 성체 돼지 돼지가 인간 및 NHP에서 미리 형성된 이종반응성 항체들의 주요 목적물인 Gal α (1,3)Gal 에피토프(α Gal)를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 것을 고려할 때, 돼지에의 이종반응성 항체 결합이 단독으로 성체 돼지 돼지와 접촉 후 보체 활성화의 이유가 되는 것인지 의문이다. 또한, IBMIR의 경우 거부 반응의 속도가 수분 이내로 너무 빨라서 면역억제제의 사용만으로 문제를 해결할 수 없어 아무런 조치를 취할 수 없는 실정인바, IBMIR과 같은 급성 거부반응을 완화시킬 수 있는 새로운 대체보체경로 억제 물질이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 대체보체경로 억제제, 특히 보체인자 H 또는 인자 B 길항제 및/또는 면역 억제물질을 함유하며, 돼지의 이종이식 시 급성혈액매개성 염증반응(instant blood-mediated inflammatory reaction; IBMIR)을 저해함으로써, 이식물의 존속기간을 연장하고, 궁극적으로는 돼지 이종이식 시의 거부반응을 억제할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 대체경로 억제제를 함유하는 대체경로 억제용 조성물 및 이를 이용한 대체경로 억제방법을 제공한다. 본 발명에 따른 대체보체경로 억제용 조성물에는 추가적으로 면역억제물질이 더 포함될 수 있다.

[0009] 본 발명에 따른 대체보체경로 억제용 조성물은 동종 또는 이종 간 기관 또는 조직 이식 시, 특히 돼지 이식 시 거부반응을 매우 효과적으로 억제할 수 있다.

[0010] 본 발명에서, "대체경로"는 별다른 정의가 없는 한, "대체보체경로"와 동일하게 보체 활성화 경로 중 하나인 대체보체경로를 의미한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른, 대체경로 억제제를 함유한 조성물을 이용하는 경우, 동종 또는 이종 이식 시, 특히 돼지 이식 시 IBMIR과 같은 급성 염증반응을 효율적으로 완화시키는 효과가 있는바, 장기이식 시 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 성체 돼지로부터 분리한 돼지를 1시간 동안 37°C에서 20% 인간 혈청 내 배양시킨 다음, 인간 IgG, IgM, C3 및 인자 B에 대한 각각의 항체로 착색시킨 후, 이들의 형광 강도를 유동 세포 분석법에 의해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 성체 돼지로부터 분리한 돼지를 10nM EDTA-젤라틴 베로날 완충액(EDTA-GVB), 칼슘 및 마그네슘 강화 GVB(GVB⁺⁺), 또는 마그네슘 강화 EGTA-GVB(Mg-EGTA-GVB) 완충액으로 희석한 20% 인간혈청에 배양시켜, 플루오레세인 결합 안티-인간 C3 항체로 면역형광 착색한 후, 돼지 무리의 C3 침전물을 형광현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다; (A)는 EDTA-GVB, (B)는 GVB⁺⁺, (C)는 Mg-EGTA-GVB 완충액에서의 결과이다.

도 3은 성체 돼지로부터 분리한 돼지를 EDTA-GVB, GVB⁺⁺, 또는 Mg-EGTA-GVB 완충액에 희석한 20% 인간혈청에서 배양한 후 상청액 내 C3a, C4d 및 인자 Bb의 양을 ELISA로 측정된 결과를 비교하여 나타낸 것이다.

도 4는 성체 돼지로부터 분리한 돼지를 고전적 경로 억제제인 인간 C1 에스테르가수분해효소 억제제, 그리고 대

체경로 억제제인 안티-인간 인자 B 항체 또는 인간 인자 H를 첨가하여 희석한 인간혈청에 넣고 37℃에서 배양한 후, 상청액 내 C3a의 농도를 ELISA로 측정하여, 음성조절로써 얼음에서 배양시킨 결과를 함께 비교하여 나타낸 것이다.

도 5는 성체 돼지로부터 분리한 채도를 고전적 경로 억제제인 인간 C1 에스테르가수분해효소 억제제, 또는 대체 경로 억제제인 안티-인간 인자 B 항체를 첨가하여 희석한 인간혈청에 넣고 37℃에서 배양한 후, 유동 세포 분석법에 의해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 성체 돼지로부터 분리한 채도를 내문 이식한 후 NHP 수용체 내 보체 활성화 마커의 양의 변화를 나타낸 것이다; (A)는 C3a, (B)는 인자 Bb, (C)는 C4a 및 (D)는 C4d에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 5C8 유도 면역억제 전후 7 NHP 수용체(R5-R11) 내 안티-αGal IgG(A) 및 IgM(B)의 양을 정량 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 성체 돼지로부터 분리한 채도를 NHP 수용체에 내문 이식한 후, 보체 활성화 마커의 양의 변화를 대조군, CVF 그룹 및 보체인자 H 그룹간 비교하여 나타낸 것이다; (A)는 CH50의 양을 조작 Mayer의 50% 용혈방법을 이용하여 측정한 결과이고, (B)는 C3a, (C)는 인자 Bb, (D)는 C4a의 양을 ELISA로 측정하여 나타낸 결과이다.

도 9는 성체 돼지로부터 분리한 채도를 NHP 수용체에 내문 이식한 후, D-이합체의 플라즈마 농도를 STA Compact 응고 분석기로 측정한 결과를 대조군, CVF 그룹 및 보체인자 H 그룹간 비교하여 나타낸 것이다.

도 10은 성체 돼지로부터 분리한 채도를 NHP 수용체에 내문 이식한 후, 트롬빈-항트롬빈(TAT)의 양을 Enzygnost TAT micro ELISA로 측정한 결과를 대조군, CVF 그룹 및 보체인자 H 그룹간 비교하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0014] 본 발명에서는, 보체인자 H 또는 인자 B 길항제와 같은 대체경로 억제제 및 면역 억제물질들을 함유한 조성물을 제조하여 성체 돼지로부터 분리한 채도의 내문 이식 모의실험을 수행하였다. 그 결과 상기 조성물이 C3a의 양을 감소시켜 대체경로 억제 효과가 있음을 확인하였다.
- [0015] 본 발명에서, "보체"는 척추동물의 신선한 혈청 속에서 각종 면역 반응이나 감염 방어 등에 관여하는 약 20여종의 단백질의 총칭으로, 열에 불안정하며, 항원과 항체의 결합물에 특이하게 결합하는 성질이 있는, 항원과 항체의 복합체에 반응하여 활성화되며 혈구를 파괴시키는 용혈 작용이나 세균을 파괴시키는 용균 작용 등을 촉진시킴으로써 여러 가지 효과를 가져오는 단백질을 말한다. 고전적인 경로 보체 단백질에는 C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9 및 C5b-9 복합체가 포함되며, 대체경로 보체 단백질에는 인자 B, 인자 D, 프로페르딘, 인자 H 및 인자 I가 포함된다.
- [0016] 본 발명에서, "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물 뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 분해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.
- [0018] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 대체경로 억제제 및 면역 억제물질들을 함유한 조성물을 이용하여 보체 활성화 마커인 C3a의 양을 측정한 결과 C3a의 양이 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0019] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 대체경로 억제제를 함유한 대체경로 억제용 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 대체경로 억제제가 보체인자 H 또는 인자 B 길항제인 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 인자 B 길항제가 소분자, 핵산, 핵산 유사체, 펩티드, 단백질, 리보솜, 항체, 억제 핵

산, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi, shRNA, siRNA, miRNA 및 그의 변이체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 대체경로 억제제가 C3a의 형성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0023] 또한 본 발명에 있어서, 상기 조성물에 면역 억제물질을 더 함유하는 것을 특징으로 하며, 상기 면역 억제물질이 안티-인간 CD154 단일클론항체(5C8), 라파마이신, 안티-인간 ICAM-1 단일클론항체, 안티-흉선세포 글로불린, 안티-인간 CD40 단일클론항체, 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 타크로리무스(tacrolimus), 보르테조미(bortezomib), 리툭시맙(rituximab) 및 TNF α 길항제 등으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명에 따른 조성물에는 보체인자 H의 경우, 약 내지 mg/kg, 바람직하게는 내지 mg/kg의 대체경로 억제제가 포함될 수 있고, 인자 B 길항제의 경우, 약 내지 mg/kg, 바람직하게는 내지 mg/kg의 대체경로 억제제가 포함될 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 급성혈액매개성 염증반응(IBMIR)을 저해하는 것을 특징으로 하며, 또한 동종 또는 이종 기관 또는 조직 이식 시 나타나는 거부반응(rejection)을 완화시키는 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는 상기 동종 또는 이종 기관 또는 조직이 체도인 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명에서, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 바람직하게는 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 보다 바람직하게는 이식 시 내문투여하거나 정맥내 투여하는 것이 좋다. 그러나 경구 투여시, 단백질은 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 또한, 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0027] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.

[0028] 본 발명에서, "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태 또는 질환을 앓고 있거나 그러한 위험이 있는 포유동물을 의미하며, 바람직하게 사람을 의미한다.

[0029] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0030] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 증상의 경중도, 환자의 체중, 연령, 성, 투여 방식 및 투여시간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 상기 요소들을 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대의 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자가 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.

[0031] 본 발명은 다른 관점에서, 대체경로 억제제 및 면역 억제물질을 함유한 대체경로 억제용 조성물을 이용한 대체경로 억제방법에 관한 것이다.

[0032] [실시예]

[0033] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0034] 실시예 1: 돼지로부터 췌장 획득 및 췌도 분리

[0035] 서울국립대학교(SNU) 미니어처 돼지인 공여 돼지들을 특정 병원체가 없는 벽이 있는 시설에서 사육하였고, SNU 의학대학의 동물 자원 개발 센터의 동물 시설에서 특정 병원체가 없는 조건 하에서 부양하였다. 수송체인 원숭이들은 중국으로부터 수입하였으며, 검역 과정을 거쳐, 상기 조건하에서 부양하였다. 본 연구에서 사용된 모든 동물들을 국립위생연구소의 실험동물사용과 주의지침서에 엄격히 근거하여 부양하였고, 초기 연구 프로토콜은 서울국립대학교 병원의 연구 윤리 위원회의 승인을 받았다.

[0036] 췌장 절제를 온허혈시간 없이 수행하였고, 췌도를 조작 리코디 방법(Ricordi method)을 사용하여 분리하였다. 간단히 말해서, 수득한 췌장을 GMP-품질(grade)의 리버라아제(Liberase) MTF C/T 효소를 포함하는 보존액에서, 콜라겐분해효소(collagenase) 0.5mg/ml 및 서몰리신(thermolysin) 0.1mg/ml 농도로(Roche Biochemicals, 바젤, 스위스), 조직 1 그램 당 1.6ml의 보존액 비율로, 도관 내(intraductally) 팽창시켰다. 팽창된 췌장을 조작 리코디 용기(chamber)에서 35-37°C에서 분해시켰다(digest). 유리된 췌도를 연속적인 OptiPrep 밀도구배 원심분리기(OptiPrep density gradient, Axis-Shield, 오슬로, 노르웨이) 및 Cobe 2991 세포분리기(Gambro BCT Inc., 레이크우드, 콜로라도, 미국)를 사용하여 정제하였다. 그 후, 췌도를 in-vitro 및 in-vivo 연구에서 사용되는 10%의 돼지 혈청이 보충된 Medium 199(Gibco, BRL, Life Technologies Ltd, 페이즐리, 스코틀랜드, 영국)에서 자유부유(free-floating) 방법을 사용하여 37°C에서 배양하였다.

[0037] 실시예 2: In-vitro 췌도 이중이식 모의 실험

[0038] In-vitro 실험 데이터는 적어도 3번의 독립적 실험을 반복 수행하여 평균±표준오차로 나타내었다. 그룹간 차이는 in-vitro 실험에 대한 데이터는 스튜던트의 t-test로 비교하였고, in-vivo 실험에 대한 데이터는 일련의 측정 t-test로 비교하였다. 유의확률(p-value)이 0.05보다 적은 경우 유의한 것으로 간주하였다.

[0039] 2-1: 돼지 췌도의 이중향체 및 보체 정량화

[0040] 실시예 1에서 분리된 췌도를 디스파제 II(Roche Biochemicals, 바젤, 스위스)를 이용하여 단일 세포 부유액으로 분해시키고, 씻어낸 후, 세어보았다. 백만개의 췌도 세포들을 1시간 동안 37°C에 Medium 199로 희석한 10%의 인간 혈청 200 μ l에서 배양한 다음, 플루오레세인이 결합된 항체로 착색하였다: 토끼 anti-인간 IgM, 토끼 anti-인간 IgG(DAKO, Glostrup, 덴마크), 및 염소 anti-인간 C3(Mpbiomedical, 산타애나, 캘리포니아, 미국) 그리고 이차 항체로써 염소 anti-인간 인자 B(Comtech, 텍사스, 미국) 및 플루오레세인이 결합된 토끼 anti-염소 IgG. 그 후, 세포들을 FACSCalibur 유세포 분석기(BD Biosciences, 산호세, 캘리포니아, 미국)로 분석하였다.

[0041] 췌도에 의해 유도된 보체 활성화에 대한 기준 이중반응성 항체의 효과를 알아보기 위해, 유동 세포 분석법을 이용하여 인간 혈청으로 배양 후 성체 돼지 췌도에서 IgG와 IgM의 결합 및 보체 파편의 침전물을 평가하였다. IgG와 IgM의 결합은 얼마 안되었지만, 강한 C3 침전물이 있었다. 흥미롭게도, 인자 Bb의 상당한 침전물인 대체경로의 활성화 파편이 관찰되었다(도 1).

[0042] 2-2: 경로특이적 보체 활성화

[0043] 각각의 보체 경로의 역할을 평가하기 위하여, 각기 다른 완충액에서 인간 혈청을 희석하였다: 10mM EDTA-젤라틴 베로날 완충액, 보체 활성 없음; 칼슘 및 마그네슘 강화 GVB(GVB⁺⁺), 모든 보체 활성; 마그네슘 강화 EDTA-GVB(Mg-EDTA-GVB), 대체경로만 활성. 분리된 췌도(3,000 췌도 등가물, IEq)를 1시간 동안 37°C에서 상기 완충액들로 희석한 20%의 인간 혈청 200 μ l 안에서 배양시켰다. 배양 후, 상청액 및 세포 침전물을 원심분리기로 분리하였다. 췌도 다발 위 C3 침전물은 플루오레세인이 결합된 anti-인간 C3 항체로 염색하고 면역형광 얼룩을 형광현미경(Olympus IX71, 도쿄, 일본)으로 관찰하였다. 추가로, 각각의 상청액 내의 보체 경로특이적 파편들, C3a, C4b, 및 인자 Bb의 수준을 효소연계 면역흡착제 분석(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 측정하였다.

[0044] 돼지 췌도에 의해 유도된 보체 활성화가 고전적인 또는 렉틴 경로의 도움 없이 대체경로에 의해 개시되는지를

명확히 하기 위해, 돼지 췌도 세포와 인간 혈청의 혼합물을 각기 다른 조건들 하에서 배양한 결과, GVB⁺⁺에서 전체 보체 활성화에 상응하는 강한 C3 침전물이 관찰되었고, 보체 활성을 없애는 EDTA-GVB에서는 C3 침전물이 없었다. Mg-EGTA-GVB에서 배양된 췌도에서 C3 침전물이 명확히 관찰되었는데, 이는 렉틴 또는 고전적인 경로 활성화 둘 다 아닌, 오로지 대체경로만으로도 보체 활성화가 가능하다는 것을 나타낸다(도 2).

[0045] 배양 후 혼합물의 상청액 내 보체 파편의 양을 측정해본 결과, GVB⁺⁺에서 고전적인 경로 및 대체 보체 경로 둘 다의 활성화를 나타내는, C3a, C4d 및 인자 Bb의 양이 증가되었음을 확인할 수 있었고, Mg-EGTA-GVB에서는 고전적 경로 활성을 의미하는 C4d는 제외하고 C3a 및 인자 Bb의 양이 증가되었음을 확인할 수 있었다(도 3).

[0046] 전체적으로 보아, 상기 데이터는 in-vitro 실험에서 돼지 췌도가 인간 혈청에서 고전적인 경로뿐만 아니라 대체 경로를 통해 보체 활성화를 개시한다는 것을 나타낸다

[0047] 2-3: 경로특이적 대체경로 억제제의 효과

[0048] 각각의 3,000 IEQ 췌도 다발 또는 1.5×10^5 췌도 단일 세포를 보체억제 물질인, 정제된 인간 C1 에스테르 가수 분해 효소(esterase) 억제제(Athens Research & Technology Inc., Athens, 조지아, 미국), 대체경로 활성을 억제하는 안티-인간 인자 B 단일클론항체, 또는 정제된 인간 인자 H(Green Cross Corp., 용인, 한국)를 포함하는 GVB⁺⁺ 희석한 20% 인간 혈청 200 μ l에서 배양하였다. 배양 후, 췌도 다발의 상청액을 ELISA에 의한 C3a 측정에 사용하였고, 단일세포를 이들의 히스토그램을 얻기 위해 유세포 분석기로 분석하였다.

[0049] 돼지 췌도에 의해 유도된 보체 활성화에 대한 각각의 보체 경로의 기여를 조사하기 위하여, 보체 경로 억제물질의 존재 및 부재 시 돼지 췌도의 배양 후 인간 혈청 내 C3a 양의 증가를 분석한 결과, 혼합물에 고전적인 경로 억제제인 C1 에스테르가수분해효소 억제제의 첨가는 C3a 생성을 억제하지 않았다. 그러나, 대체경로 억제제인 안티-인간 인자 B 단일클론항체 및 인자H의 첨가는 각각, 최대 $66 \pm 15\%$ 및 $29 \pm 17\%$ 로 C3a 생성을 현저히 감소시켰다. 37 $^{\circ}$ C에서 돼지 췌도의 배양 후 증가된 C3a의 양을 100%로, 보체 활성화를 억제하는 얼음에 배양 후 C3a 양을 0%로 나타내었다(도 4).

[0050] 인간 혈청으로 배양된 췌도 세포들을 유동 세포 분석법에 의해 분석하였을 때, 얼음물에서 배양된 세포들은 대개 히스토그램에서 R1 지역(온전한)에 위치하였으나, 37 $^{\circ}$ C에서 배양하여 보체를 활성화시킨 결과로써 상당한 수의 세포가 R1에서 R2 지역(손상된)으로 이동하여 집결되었다. C3a 생성 결과와 마찬가지로, C1 에스테르가수분해효소 억제제(C1E-inh)는 어떠한 차이도 만들지 않았으나, 안티-인간 인자 B 단일클론항체의 첨가는 투여량에 비례하여, R2 지역에서 세포 수를 감소시켰다(도 5 및 표 1).

표 1

[0051] 대체경로 억제제 첨가에 따른 R1 및 R2 지역 세포 비율의 변화

	얼음	37 $^{\circ}$ C					
		none	C1E-inh (mg/ml)		인자 B 길항제 (mg/ml)		
	none		0.05	0.10	0.10	0.20	0.30
R1 (%)	67 $\pm$ 11	22 $\pm$ 10	27 $\pm$ 6	29 $\pm$ 8	43 $\pm$ 2	50 $\pm$ 5	49 $\pm$ 6
R2 (%)	12 $\pm$ 4	57 $\pm$ 1	55 $\pm$ 3	49 $\pm$ 6	34 $\pm$ 8	26 $\pm$ 5	25 $\pm$ 6

[0052] 전체적으로 보아, 상기 데이터는 대체경로가 인간 혈청과의 접촉 후에 췌도 세포 손상에 대한 중요한 조정 단계라는 것을 나타낸다.

[0053] 실시예 3: In-vivo 췌도 이종이식 연구

[0054] 3-1: 붉은털 원숭이에 성체 돼지 췌도의 내문 이식

[0055] 당뇨병의 유도 및 성체 돼지 췌도의 내문 이식을 수행하였다(Jung KC et al., *J Exp Med*, 208(12), 2477-88, 2011). 유형 I 당뇨병은 붉은털 원숭이에 스트렙토조토신(100-120 mg/kg)을 투여하여 유도하였고, 정맥 내 당 부하시험(intravenous glucose tolerance test; IVGTT)을 기반으로 지속적인 다당증 및 C-펩타이드 존재 농도

가 0.2 ng/ml 미만인 것을 확인하였다. 유형 I 당뇨병의 유도 후, 인간 재조합 인슐린의 피하 주입으로 다당증을 조절하였다.

[0056] 표 2에 나타난 바와 같이, 성체 돼지 췌도(20,000-50,000 IEq/kg)를 CD40-CD40L 상호작용을 목적으로 하는 물질뿐만 아니라 보체 억제 물질도 포함하지 않는, 다른 면역억제 투여요법을 받은, 4마리의 당뇨병 붉은털 원숭이에게 이식하였다. 넷 모두 이식 후 6일 안에 anti- α Gal IgG 항체의 농도 증가와 함께 이식물의 기능을 잃어버린 것을 확인하였다. 상기 넷에서, 췌도 이식 후 보체 활성화를 평가하였다. 각각의 수용체마다 면역억제 투여요법이 달랐으나(표 2), 일반적으로 anti- α Gal IgG의 증가를 억제하는 것으로 알려진, anti-CD154는 포함하지 않았다. 돼지 췌도 주입 직후, 보체 활성화 마커인 C3a와 대체경로 활성화에 대한 마커인 인자 Bb의 양이 15분 내에 증가되었으나, 기존 경로 활성화에 대한 마커인 C4a 및 C4d의 양은 가변적이었다(도 6).

표 2

[0057] 면역 억제 투여요법 및 보체활성 억제제

수용체ID	면역 억제 투여요법	보체활성 억제제
R1	타크로리무스, 레프루노마이드, 미코페놀레이트모페틸, 바실릭시맙, 리툭시맙	-
R2	캠퍼스, 타크로리무스, 레프루노마이드, 미코페놀레이트모페틸	-
R3	ATG(anti-흉선글로불린), 보르테조미드, 레프루노마이드, 미코페놀레이트모페틸	-
R4	ATG(anti-흉선글로불린), 보르테조미드	-
R5	anti-CD154, anti-인간 ICAM-1, 라파마이신	CVF
R6	anti-CD154, anti-인간 ICAM-1, 라파마이신	CVF
R7	anti-CD154, anti-인간 ICAM-1, 라파마이신	CVF
R8	anti-CD154, anti-인간 ICAM-1, 라파마이신	-
R9	anti-CD154, anti-인간 ICAM-1, 라파마이신	-
R10	anti-CD154, ATG, 라파마이신	보체인자 H
R11	anti-CD154, ATG, 라파마이신	보체인자 H

[0058] 그 후, 성체 돼지 췌도(60,000-100,000 IEq/kg)의 내문 이식을 α Gal에의 항체 반응을 억제하기 위한 anti-CD154 항체에 기반을 둔 면역억제 투여요법(표 2)을 받은, 추가의 7마리 붉은털 원숭이에 이식을 수행하였다. 면역 억제물질에는 anti-인간 CD154 단일클론항체(5C8, 국립보건원), 라파마이신(Rapamune Wyeth, 미국), anti-인간 ICAM-1(세포부착분자-1; intracellular adhesion molecule-1) 단일클론항체 또는 anti-흉선세포 글로불린(Thymoglobuline Genzyme, 영국)이 사용되었다.

[0059] 5C8을 정맥주사으로써 -10, -7, -4, 0, 3, 7, 12일에 20mg/kg 투여하였고(-10은 이식 10일 전을, 0은 이식 당일, 3은 이식 후 3일째 되는 날을 각각 의미한다), 이식 10일째에 5C8의 투여를 멈춘 R9를 한 수용체를 제외하고 나머지 수용체에서는 3달 동안 5C8을 한 주에 한 번씩 투여하였다. 라파마이신은 이식 11일 전부터 실험이 끝날 때까지 안전한 트로프(trough) 농도를 3-8 μ g/ml로 맞추어 매일 경구 투여하였다. anti-인간 ICAM-1을 이식 전 9, 6, 3일에 정맥 내로 주사하거나(n=5), anti-티모글로불린을 이식 전 3, 1일에 투여하였다(n=2). IBMIR 억제에 대한 보체활성 억제제의 효과를 비교하기 위하여, 코브라독 인자(CVF, 100 U/kg, Quidel, 샌디에고, 캘리포니아, 미국)를 이식 하루 전에 투여하고(CVF 그룹, n=3), 정제된 인간 인자 H(18 mg/kg, Green Cross Corp., 용인, 한국)를 이식 하루 전, 당일, 그 다음 날에 투여하였으며(보체인자 H 그룹, n=2), 2마리의 수용체에는 투여하지 않았다.

[0060] 또한 수용체의 IBMIR을 관찰하기 위하여, 수용체 혈액을 K₂-EDTA 병에 적시에 모아, 부분 표본(aliquot)을 만들어 플라스마를 사용 전까지 영하 70℃에서 저장하였다.

[0061] 성체 돼지 췌도 내 매우 낮은 α Gal의 발현 때문에, 돼지 췌도예의 항체결합은 무시해도 될 정도였고, 이식 12일 전과 이식 당일에 채취한 샘플에서 anti- α Gal IgG 항체 및 IgM을 정량 ELISA로 측정한 결과, 이식 전 NHP 수용체에 anti-CD154 항체 투여는 혈액 내 anti- α Gal 항체의 양을 감소시켰다(도 7). 따라서, IBMIR의 발달에 대한 각각의 보체 경로의 상대적인 기여는 임상적 배경에 따라 다르다고 할 것이나, 이종항체에 의한 초급성 거부반응(hyperacute rejection)이 NHP에서 성체 돼지 췌도 이식에 의한IBMIR의 발달의 주요 메커니즘이 아니라는 것을 알 수 있었다.

[0062] 보체경로를 계속적으로 활성화시켜 보체 활성 단백질의 고갈을 가져오는 CVF의 처리는 측정이 되지 않을 정도로

CH50의 감소를 가져왔고, C3a 및 인자 Bb의 플라즈마 양을 증가시켰다. 그러므로, CVF 그룹에 C3a 및 인자 Bb 이식 전 기초양은 대조군 및 보체인자 H 그룹에서보다 높다는 것을 알 수 있었다. 반면, 보체인자 H의 처리는 CH50, C3a 및 인자 Bb의 양에 유효한 변화를 일으키지 않았고, 그 양은 이식시점까지 대조군의 양과 비슷하였다. 그러나, 이식 후 즉시, C3a 및 인자 Bb의 양이 대조군 수용체에서 급격히 증가되었다. 반대로, 이식 후 인자 Bb의 증가는 CVF 및 보체인자 H 그룹에서 대조군과 비교하여 상당히 억제되었고(각각 $p=0.0148$ 및 $p=0.0290$), 이식 후 C3a 양의 증가는 대조군에 비하여 보체인자 H 그룹($p=0.0358$)에서 상당히 감소하였고, CVF 그룹에서도 비록 유의수준(significance; $p=0.2482$)에 도달하지 못하였으나 상당히 감소하였다. 이식 후 C4a 양의 변화는 그룹 사이에 현저한 차이가 없었다(도 8).

[0063]

[0064]

3-2: 이식물 기능의 관찰

[0065]

수용체 혈당량을 휴대용 혈당측정기(Accu-Chek) 또는 연속 글루코오스 관찰 시스템(Guardian RT, Medtronic Inc., 캘리포니아, 미국)에 의해 계속적으로 관찰하였다. 수용체 혈액 내 돼지 c-펩타이드 농도를 매주 2번씩 방사면역분석시험(LINCO Research, Inc., St. Charles, 미주리, 미국)에 의해 측정하였다. IVGTT를 두 달에 한 번씩 글루코오스 소실 곡선이 정상혈당 패턴을 나타내는지 수행하였다. 이식물의 기능 소실은 검출가능한 돼지 C-펩타이드의 부재 및 정상혈당을 유지하기 위한 외부 인슐린의 필요를 통해 확인되었다.

[0066]

CD40-CD40-L 상호작용의 봉쇄 없는 이식의 경우, 이종이식물의 기능이 6일보다 길게 지속되지 않았다. 그러나, 5C8 투여요법 처리 하 이식의 경우, 이식물들의 기능이 몇 달간 유지되었다. 모든 CVF 그룹의 수용체에서는(R5, R6 및 R7), 돼지 췌도 이식 후 유글리세미아(euglycemia)가 복구되었고, 외부 인슐린 없이 또는 최소 요구량으로 6달보다 길게 유지되었으며, 거부반응 없이 1년동안 생존하였다. 보체인자 H 그룹의 두 수용체에서(R10 및 R11), 췌도 이식에 의해 당뇨 상태가 고쳐졌으며, 유글리세미아가 각각 6개월 및 4개월이 지난 지금까지 보존되어 있다. 대조군의 두 이식 수용체 내에서도(R8 및 R9), 췌도 이식이 당뇨병 상태를 고쳤으나, 이식물은 유글리세미아를 보존하는데 실패하였고, 돼지 C-펩타이드는 이식 5개월 후 검출하지 못하였다.

[0067]

3-3: 보체 및 응고 활성 매개변수의 평가

[0068]

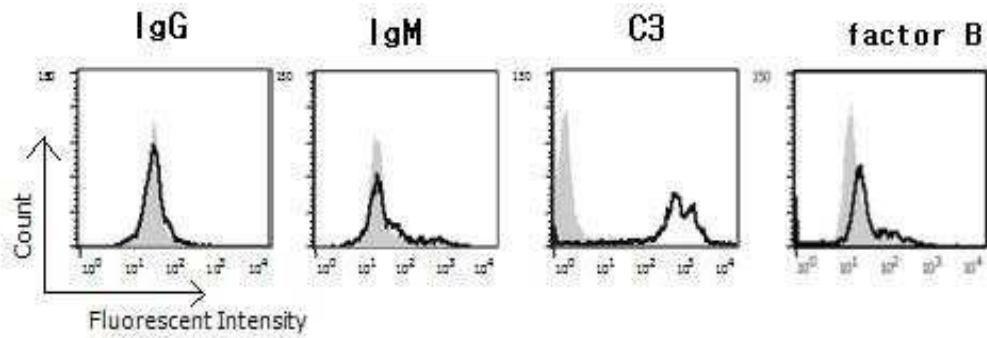
상청액 또는 플라즈마 샘플 내 보체 활성 파편들, C3a, 인자 Bb, C4a 및 C4d의 농도를 상용화된 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다: OptEIA 인간 C3a ELISA (BD Biosciences, 산호세, 캘리포니아, 미국), Bb plus EIA (Quidel, 샌디에고, 캘리포니아, 미국), 인간 C4a ELISA (BD Biosciences, 산호세, 캘리포니아, 미국) 및 C4d 파편 EIA (Quidel, 샌디에고, 캘리포니아, 미국). 트롬빈-항트롬빈(TAT) 농도를 Enzygnost TAT micro Elisa(Siemens Healthcare Diagnostics, 독일)를 이용하여 측정하였다. D-이합체의 플라즈마 농도는 STA Compact 분석기TM (Diagnostica Stago, Asnieres, 프랑스)로 측정하였다. 전체 혈청 용혈 활성을 측정하기 위하여, CH50을 조작된 Mayer의 50% 용혈방법(modified Mayer's 50% hemolysis method)에 의해 평가하였다(Kang HJ et al., *Journal of Clinical Immunology*, 26(2), 186-91, 2006). 이식 후 높은 개체변이와 함께 때때로 혈관 내 응고 활성화의 증거인, D-이합체(도 9) 및 TAT(도 10) 양의 증가를 발견하였으나, 그룹간 상당한 차이는 발견되지 않았다.

[0069]

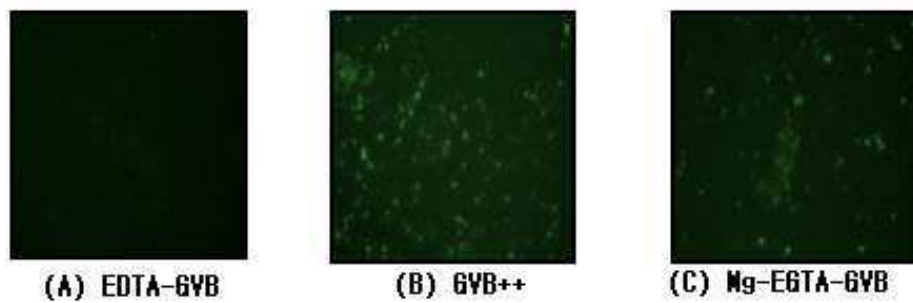
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

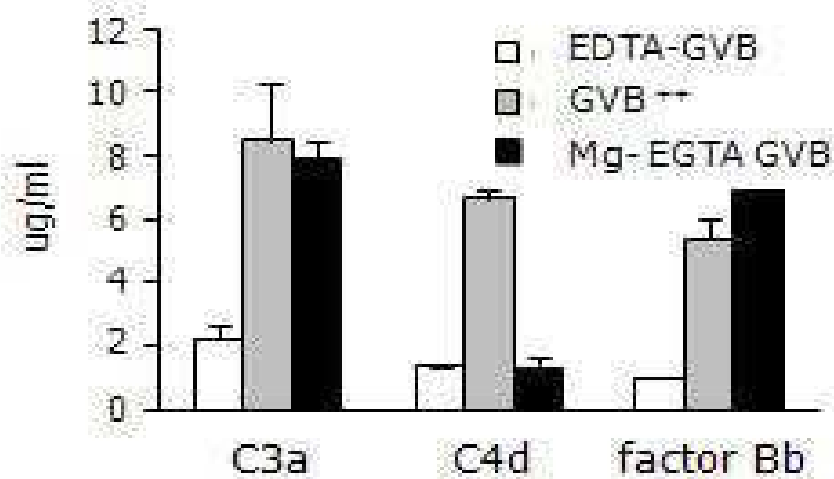
도면1



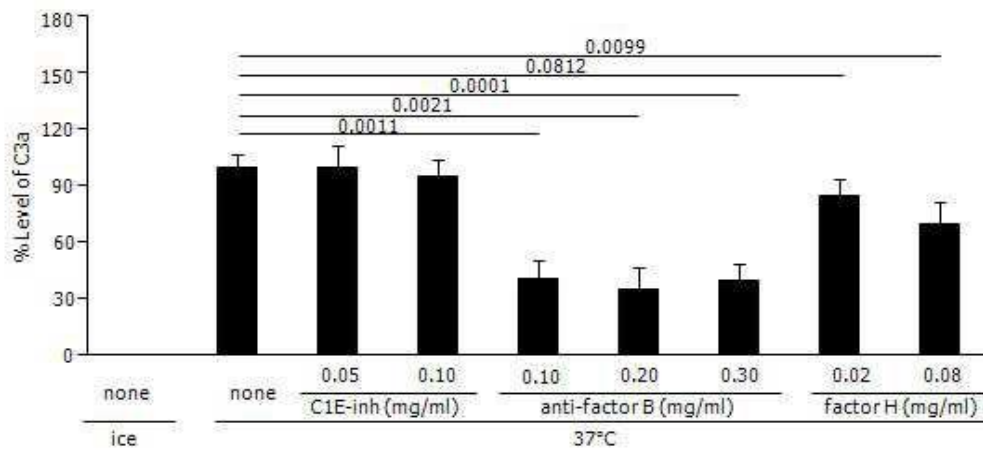
도면2



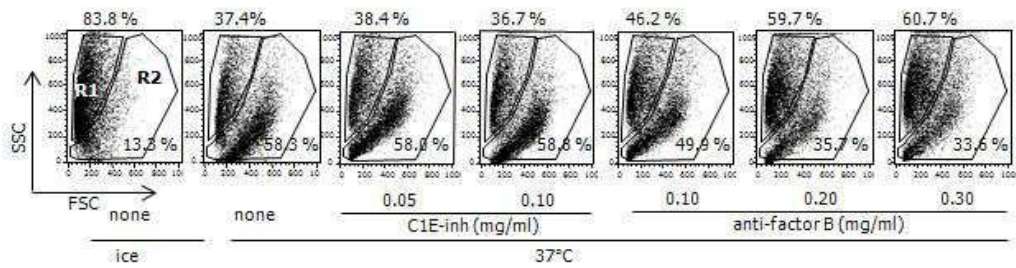
도면3



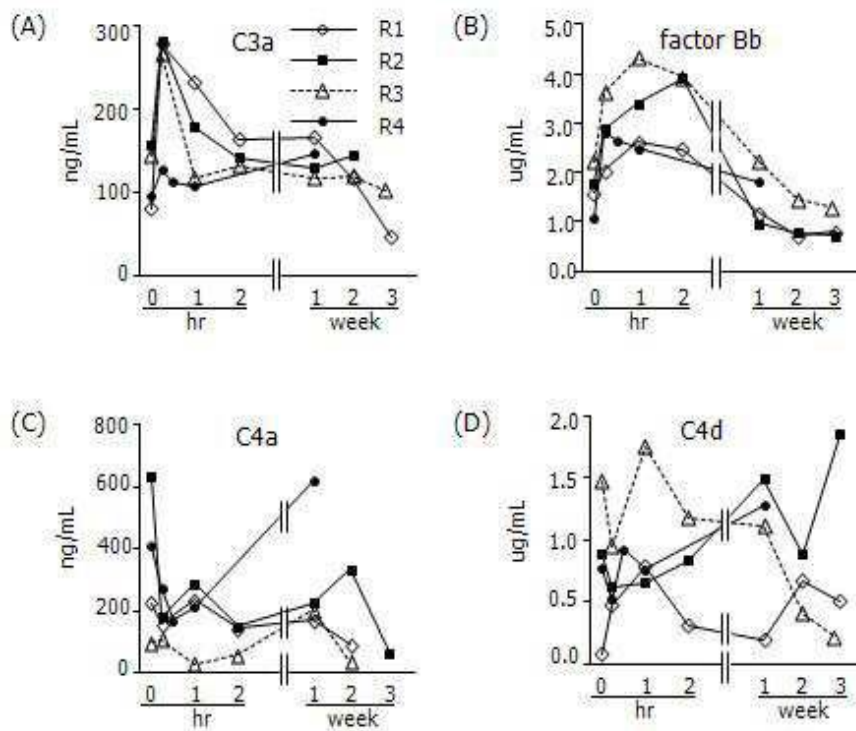
도면4



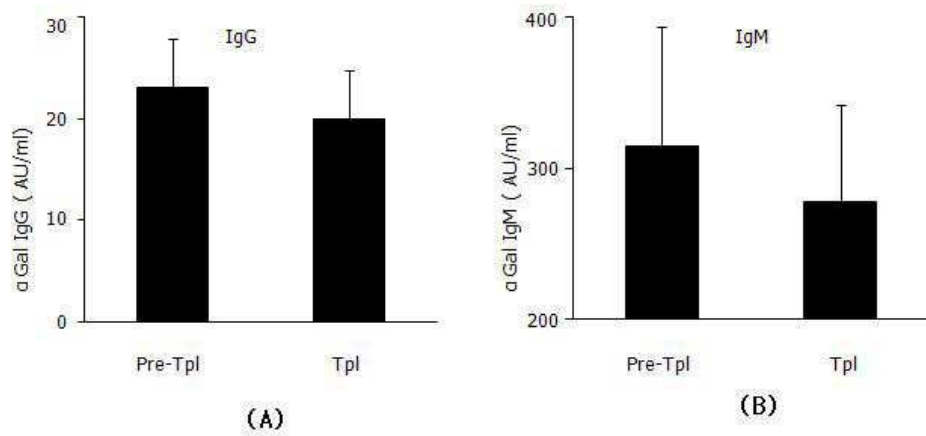
도면5



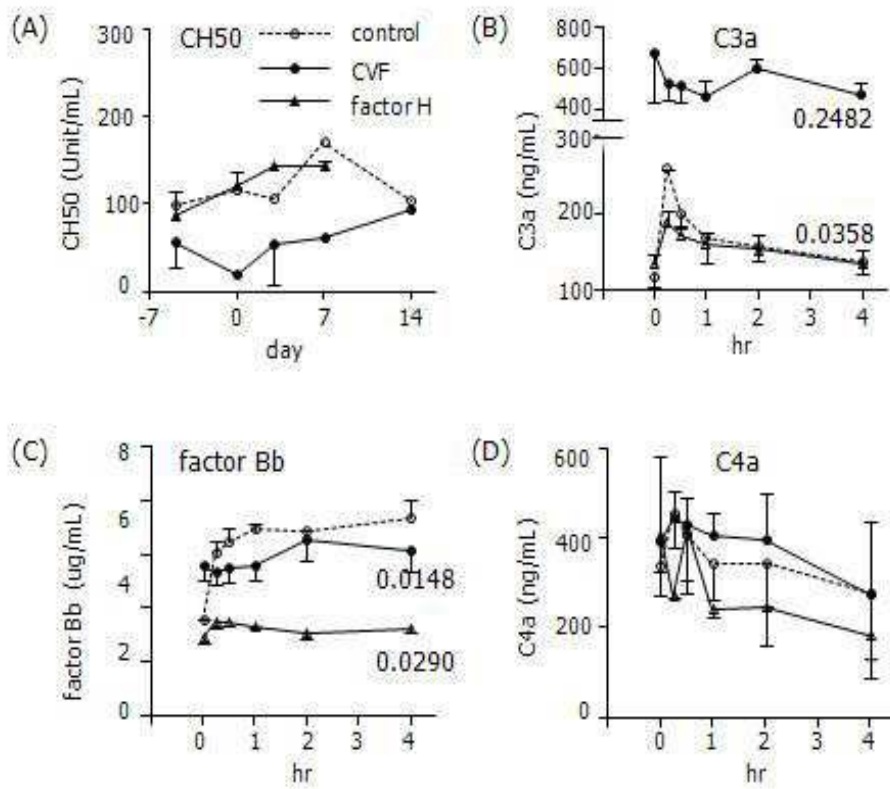
도면6



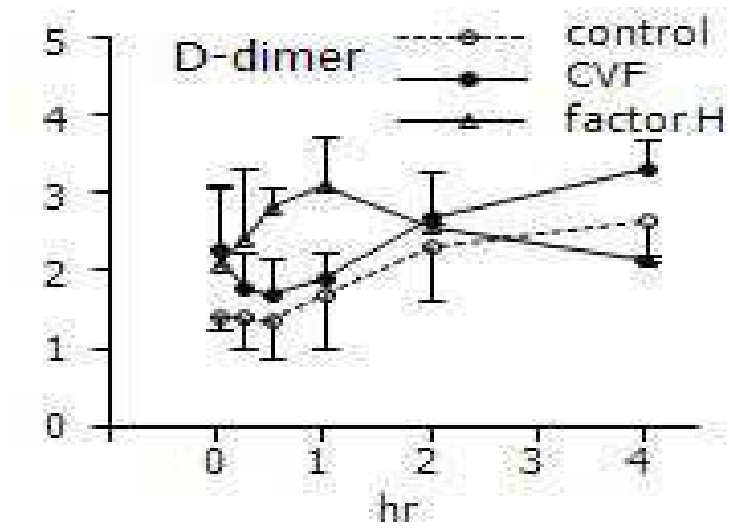
도면7



도면8



도면9



도면10

