



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년08월11일
 (11) 등록번호 10-0975042
 (24) 등록일자 2010년08월04일

(51) Int. Cl.
C07K 14/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2003-7012923
 (22) 출원일자(국제출원일자) 2002년04월05일
 심사청구일자 2007년04월05일
 (85) 번역문제출일자 2003년10월02일
 (65) 공개번호 10-2003-0088485
 (43) 공개일자 2003년11월19일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2002/003808
 (87) 국제공개번호 WO 2002/81508
 국제공개일자 2002년10월17일
 (30) 우선권주장
 0108821.0 2001년04월06일 영국(GB)
 (뒷면에 계속)
 (56) 선행기술조사문헌
 WO0006604 A2*
 WO 9007861 A1*
 EP 0449769 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 유니버시티 오브 브리스톨
 영국 브리스톨 비에스8 1티에이치 톨돌 애비뉴 세
 너트 하우스
 (72) 발명자
허어링, 스테펜, 데이비드
 영국 에스티15 8제트에스 스테포드셔 스톤 줄스
 드라이브 1
데이안, 콜린, 마크
 영국 비에스2 8비엑스 브리스톨 하이버리 빌라스
 18
노만, 마이클, 로텐
 영국 비에스6 5에스엑스 브리스톨 코담 프레만틀
 로드 31
 (74) 대리인
김성완, 김영, 장수길, 홍은정

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 문동현

(54) 스테로이드-내성 환자에서의 CD25 결합 분자의 용도

(57) 요약

본 발명은 스테로이드-민감성 또는 스테로이드-내성 환자에게 효과적인 양의 CD25 결합 분자를 투여함을 포함하
 는, 스테로이드-민감성 또는 스테로이드-내성 환자의 자가면역성 간염, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 유육종 및
 크론병으로 이루어진 군에서 선택된 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

(30) 우선권주장

0108817.8 2001년04월06일 영국(GB)

0108816.0 2001년04월06일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

(a) 아미노산 서열 Arg-Tyr-Trp-Met-His를 갖는 추가변 영역 CDR1, 아미노산 서열 Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Gly를 갖는 추가변 영역 CDR2, 및 아미노산 서열 Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Phe를 갖는 추가변 영역 CDR3을 순서대로 포함하는 하나 이상의 도메인을 포함하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하고,

(b) 아미노산 서열 Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tyr-Met-Gln을 갖는 추가변 영역 CDR1', 아미노산 서열 Asp-Thr-Ser-Lys-Leu-Ala-Ser을 갖는 추가변 영역 CDR2', 및 아미노산 서열 His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tyr-Thr을 갖는 추가변 영역 CDR3'을 순서대로 포함하는 추가의 도메인을 포함할 수 있는

CD25 결합 분자 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는, 스테로이드-내성 환자의 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 또는 크론병의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 4

CD25 결합 분자인 다클리주맵(daclizumab) 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는, 스테로이드-내성 환자의 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 또는 크론병의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 CD25 결합 분자가 바실릭시맵(basiliximab)인 약학 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 CD25 결합 분자가

(a) 제3항에 정의된 바와 같은 추가변 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 순서대로 포함하는 제1 도메인; 및

(b) 아미노산 서열 Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tyr-Met-Gln을 갖는 추가변 영역 CDR1', 아미노산 서열 Asp-Thr-Ser-Lys-Leu-Ala-Ser을 갖는 추가변 영역 CDR2', 및 아미노산 서열 His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tyr-Thr을 갖는 추가변 영역 CDR3'을 순서대로 포함하는 제2 도메인

을 포함하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 CD25 결합 분자가

(a) (i) 제3항에 정의된 바와 같은 추가변 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 순서대로 포함하는 가변 도메인, 및 (ii) 인간 중쇄의 불변부 또는 그의 단편

을 포함하는 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 또는 그의 단편; 및

(b) (i) 아미노산 서열 Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tyr-Met-Gln을 갖는 추가변 영역 CDR1', 아미노산 서열 Asp-Thr-Ser-Lys-Leu-Ala-Ser을 갖는 추가변 영역 CDR2', 및 아미노산 서열 His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tyr-Thr을 갖

는 추가변 영역 CDR3'을 순서대로 포함하는 가변 도메인, 및 (ii) 인간 경쇄의 불변부 또는 그의 단편을 포함하는 하나 이상의 면역글로불린 경쇄 또는 그의 단편을 포함하는 키메릭 항-CD25 항체인 약학 조성물.

청구항 9

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 CD25 결합 분자가 사이클로스포린, 라파마이신, 아스코마이신 또는 이들의 면역억제 유사체, 코르티코스테로이드, 사이클로포스파미드, 아자티오프렌, 메토틱세이트, 금 염, 술폰살라진, 항말라리아약, 브레퀴나, 레플루노마이드, 미조리바인, 마이코페놀산, 마이코페놀레이트 모페틸, 15-데옥시스페르구알린, 면역억제 단클론 항체, 및 다른 면역조절 화합물로부터 선택되는 스테로이드 또는 추가의 약물과 함께 사용되는 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 면역억제 유사체가 사이클로스포린 A, 사이클로스포린 G, FK-506, 시롤리무스 또는 에버롤리무스인 약학 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 코르티코스테로이드가 프레드니손인 약학 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 면역억제 단클론 항체가 백혈구 수용체에 대한 단클론 항체인 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 백혈구 수용체가 MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45 또는 CD58, 또는 이들의 리간드인 약학 조성물.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 다른 면역조절 화합물이 CTLA4Ig인 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 스테로이드-내성 환자의 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 및 크론병으로 이루어진 군에서 선택된 질환의 치료에서의 CD25 결합 분자의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] **궤양성 대장염**

[0003] 궤양성 대장염을 앓고 있는 대부분의 환자의 경우, 스테로이드는 효과적인 치료법이다. 그러나, 궤양성 대장염 환자의 30% 내지 50%는 스테로이드 요법에 반응하지 않고, 이들 환자의 내과 치료는 여전히 만족스럽지 못하며, 다수는 외과 수술을 필요로 한다. 중증의 궤양성 대장염의 치료법으로서 스테로이드를 도입하기 전에, 사망률은 50% 정도였다(트루러브(Truelove S. C.) 및 위츠(Witts L. J.)의 문헌[*BMJ* 1955; ii:1041-8]). 현재의 관행은 5 내지 7일의 스테로이드 요법에 반응하지 않는 이러한 중증의 궤양성 대장염 환자에게 긴급 수술을 권하는 것이다(주웰(Jewell D. P.) 등의 문헌[*Gastroenterol. Int.* 1991; 4:161-4]). 외과 수술 치료법은 적어도 일시적으로 회장루 형성술을 필요로 하므로, 환자는 종종 수술받는 것을 내키지 않아 한다. 그러나, 내과 요법에 반응하지 않은 환자의 경우 외과 수술을 지연하는 것은 수술전 천공이 일어날 수 있기 때문에 위험하며, 이는 사망률의 증가와 관련된다(리치에(Ritchie J. K.)의 문헌[*BMJ* 1974; i:264-268]). 외과 수술의 대안으로서, 일부 스테로이드-내성 궤양성 대장염 환자를 치료하기 위해 면역억제성 약물인 사이클로스포린이 사용되었다(리호티거(Lichtiger S.) 등의 문헌[*N. Engl. J. Med.* 1994; 330:1841-5]). 그러나, 장기간의 결과는 처음에 6개월내에 외과 수술을 필요로 하는 반응하는 많은 환자, 및 면역억제, 신부전 및 고혈압으로 인한, 뉴모시

스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*) 폐렴과 같은 치명적인 기회 감염을 포함하는 부작용을 겪는 많은 환자에게 있어서 실망스럽다(스미스(Smith M. B.)의 문헌[*N. Engl. J. Med.* 1992; 327:497-8]; 샌드본(Sandborn W. J.)의 문헌[*Inflamm. Bowel Dis.* 1995; 1:48-63]). 아자티오프린은 만성 활동성의, 스테로이드-내성 또는 스테로이드-의존성 궤양성 대장염의 효과적인 치료법이다. 그러나, 그의 작용 개시 지연(3 내지 4개월)은 긴급한 치료를 필요로 하는 중증의 궤양성 대장염 환자에게 적합하지 않음을 뜻한다(아디슨(Ardixxon S.) 등의 문헌[*J. Clin. Gastroenterol.* 1997; 25:330-3]). 따라서, 스테로이드-내성 궤양성 대장염의 치료는 여전히 어려우며, 일반적으로 개구를 생기게 하는 외과 수술을 필요로 한다. 스테로이드-내성 궤양성 대장염의 또 다른 내과 치료법이 필요하며, 그의 확인은 일부 궤양성 대장염 환자가 스테로이드 요법에 반응하지 못하는 이유의 이해를 필요로 한다. 개별 환자에게 있어서, 스테로이드 요법에 대한 반응 및 외과 수술 또는 다른 내과 요법에 대한 필요를 예상하기란 어렵다. 중증의 궤양성 대장염에서, 질환 중증도의 초기 정도는 최후 결과(스테로이드 요법에 대한 반응)와 거의 상관없다(린드그렌(Lindgren S. C.) 등의 문헌[*Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1998; 10:831-5]). 스테로이드 요법에 반응하지 않는 환자가 반드시 가장 위중한 질환을 앓는 환자는 아니다.

[0004] 천식

[0005] 천식의 현재 치료법은 글루코코르티코이드와 같은 스테로이드를 투여하는 것이다. 그러나, 통상의 유리한 반응에도 불구하고, 스테로이드 요법에 반응하지 않는 환자의 군이 있다. 이러한 환자는 "스테로이드-내성 천식"을 갖는 것으로 불리며, 1968년에 처음 밝혀졌다. 그 후, 스테로이드-내성 천식은 프레드니솔론을 1일 20mg의 투여량으로 7일 투여한 후 노력 호기 폐활량(forced expiratory volume, FEV₁: 천식에서 감소되는 폐 기능의 정도)을 1초에 15%씩 증가시키는데 실패하는 것으로 정의되었다(카미컬(Carmichael J.) 등의 문헌[*BMJ* 1981; 282:1419-22]). 스테로이드-내성 천식 환자를 스테로이드-민감성 천식 환자와 비교하였는데, 기준선 폐 기능 시험 결과 및 기관지확장제에 대한 반응은 거의 다르지 않으며, 이는 스테로이드-내성 천식 환자가 더 중증의 질환을 갖고 있지 않음을 나타낸다. 스테로이드-내성 천식 환자로부터의 말초 혈액 림프구의 림프구 스테로이드 민감성은 글루코코르티코이드에 의한 파이토해마글루티닌(phytohaemagglutinin, PHA) 자극된 증식의 저해를 사용하여 측정하였다(포즈난스키(Poznansky M. C.) 등의 문헌[*Clin. Sci.* 1984; 67:639-45]; 알바레즈(Alvarez J.) 등의 문헌[*J. Allergy Clin. Immunol.* 1992; 89:714-21]; 코리간(Corrigan C. J.) 등의 문헌[*Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144:1026-32]; 하크주(Hackzu A.) 등의 문헌[*J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 93:510-9]; 스파hn(Spahn J. D.) 등의 문헌[*J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 98:1073-9]). 모든 연구 결과, 스테로이드-내성 천식 환자로부터의 림프구는 스테로이드-민감성 천식 환자로부터의 림프구보다 스테로이드에 의해 덜 유의적으로 저해된 것으로 나타났으며, 이는 스테로이드-내성 천식 환자는 스테로이드-내성 림프구를 가짐을 나타내었다. 추가의 연구에서, 8명의 스테로이드-내성 천식 환자가 스테로이드-내성 림프구를 갖는 것으로 밝혀졌으며, 메토티렉세이트로 치료되었다(브루트(Vrugt B.) 등의 문헌[*Eur. Respir. J.* 2000; 15:478-85]). 8주 후, 기도 점막 염증이 감소되었고, 림프구 스테로이드 민감성은 증가하였다. 스테로이드-내성 천식에서 기도 점막에 대한 메토티렉세이트의 유리한 효과는 스테로이드 민감성의 증가로 인한 것으로 주장되었다. 이는 "스테로이드 증진인자"로서 작용하고, 림프구 스테로이드 민감성을 증가시키면서 임상적으로 효과적인 약물의 한 예이다. 3차 진료의뢰 센터로 의뢰된 "치료하기 어려운" 천식 환자의 약 25%가 스테로이드-내성 림프구를 갖는 것으로 밝혀졌다(찬(Chan M. T. S.) 등의 문헌[*J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 101:594-601]).

[0006] 자가면역성 간염

[0007] 자가면역성 간염은 일반적으로 코르티코스테로이드에 의한 치료에 반응하는 진행성 간세포 염증을 특징으로 하는 만성 간 질환의 형태이다. 그러나, 자가면역성 간염 환자의 10%는 코르티코스테로이드가 듣지 않으며, 진행성 간 질환 및 간경변이 발병한다. 스테로이드-내성 질환을 갖는 이러한 군의 환자를 치료하는 것은 어려우며, 이식을 필요로 할 수 있다. 사이클로스포린은 스테로이드-내성 자가면역성 간염의 치료법으로서 사용되었다(페르난데스(Fernandes N. F.) 등의 문헌[*Am. J. Gastroenterol.* 1999; 94:241-8]). 5명의 환자를 시험하였는데, 4명의 환자에서 성공적이었다. 불행하게도, 사이클로스포린에 반응하지 않은 1명의 환자는 진행성 간부전이 발병하였고, 동소성 간 이식을 받았고, 그 후 파종성 거대세포바이러스 감염으로 사망하였다. 사이클로스포린은 일반적으로 잘 복용되어지며, 환자중 어느 누구도 신부전증이 발병되지 않았다. 스테로이드-내성 자가면역성 간염 환자는 스테로이드-내성 림프구를 갖는 것으로 예상될 것이다.

[0008] 습진

[0009] 습진은 다양한 환경적 또는 본질적 인자, 예컨대 접촉 알러지 항원 및 자극원, 전염원 및 아토피에 의해 유도되거나 유지될 수 있는 피부 염증의 특유한 패턴이다. 습진 환자의 대다수는 가벼운 질환을 앓고 있으며, 간헐적

인 국소 요법을 필요로 한다. 그러나, 일부 환자는 더 중증의 질환을 가지며 전신 스테로이드 요법을 필요로 한다(호아레(Hoare C.) 등의 문헌[*Health Technol. Assess.* 2000; 4: 1-191]; 헤들(Heddle R. J.) 등의 문헌 [*Br. Med. J.(Clin. Res. Ed.)* 1984; 289: 651-4]). 스테로이드 요법에 반응하지 못하면 사이클로스포린과 같은 면역억제성 약물에 의한 대체 요법이 필요하다(그란룬드(Granlund H.) 등의 문헌[*Acta Derm. Venereol.* 1996; 76: 371-6]). 이렇게 스테로이드 요법에 반응하지 못하는 것은 스테로이드-내성 림프구를 갖는 스테로이드-내성 환자이기 때문인 것으로 예상된다.

[0010] 혈관염

[0011] 혈관염은 동맥의 염증을 특징으로 하는 상태의 군이다. 이들 상태중 일부는 또한 사구체신염(베게너 육아종증, 구드패스처 증후군 및 결절성 다발 동맥염 포함)을 일으킨다. 스테로이드는 여전히 이러한 모든 상태의 1차 치료법이다(보쉬(Bosch X.) 등의 문헌[*Lupus* 1999; 8:258-62]; 길레빈(Guillevin L.)의 문헌[*Nephrol. Dial. Transplant* 199; 14:2077-9]; 라인홀트-켈러(Reinhold-Keller E.) 등의 문헌[*Arthritis Rheum.* 2000; 43:1021-32]). 면역억제 요법은 일반적으로 스테로이드와 함께 제공되고, 이 복합 치료의 실패는 치명적일 수 있다. 치료에 반응하지 못한 상당수의 환자는 스테로이드-내성 림프구를 가질 것으로 생각된다.

[0012] 측두 동맥염

[0013] 측두 동맥염도 또한 혈관염의 형태이다. 합병증은 동맥의 염증에 의해 초래된 눈으로의 혈액 공급 방해로 인한 실명이다. 환자의 약 15%는 1차 스테로이드 치료에 반응하지 않는다(체발레트(Chevalet P.) 등의 문헌[*J. Rheumatol.* 2000; 27:1484-91]). 이들 환자는 종종 장기간의 비효과적인 스테로이드 과정으로 치료받는다. 스테로이드-내성 질환의 경우 메토트렉세이트와 같은 대체 요법이 사용되었다(크랄(Krall P. L.) 등의 문헌[*Cleve Clin. J. Med.* 1989; 56:253-7]). 이렇게 스테로이드 요법에 반응하지 못하는 것은 스테로이드-내성 림프구를 갖는 스테로이드-내성 환자이기 때문인 것으로 예상된다.

[0014] 유육종

[0015] 유육종증은 원인 불명의 전신 육아종 장애이다. 유육종증은 미지의 항원에 대한 지나치게 흥분한 T 세포-매개성 면역 반응으로부터 생긴다. 스테로이드는 여전히 1차 치료법이다(바르나드(Barnard J.) 등의 문헌[*Curr. Opin. Rheumatol.* 2001; 13:84-91]). 스테로이드의 대체 요법은 종종 스테로이드 불내성 때문에 또는 스테로이드 투여량 및 부작용을 줄이기 위한 시도로 도입된다.

[0016] 전신 홍반성 루푸스

[0017] 전신 홍반성 루푸스는 T 림프구, 및 자가항체를 생성하는 과반응성 B 세포에 이상을 유도하는 자가면역성 장애이다. 이 질환을 치료하지 않은 채로 두면 말기 신부전증 또는 사망에 이를 수 있다.

[0018] 글루코코르티코이드는 전신 홍반성 루푸스의 치료를 위한 1차 선택 약물이다. 그러나, 일부 환자는 스테로이드 요법에 반응하지 못한다. 시험관내 림프구 스테로이드 민감성과 스테로이드 요법에 대한 임상 반응간의 상호관계는 또한 전신 홍반성 루푸스(SLE) 환자에서 검사되었다(세키(Seki M.) 등의 문헌[*Arthritis Rheum.* 1998; 41:823-30]). 1개월동안 경구 프레드니솔론(1일 50 내지 60mg)으로 치료받은 27명의 일본 여성이 연구되었다. 스테로이드 치료에 대한 임상 반응에 따라 19명의 환자는 스테로이드-민감성으로서 분류되고, 8명은 스테로이드-내성으로서 분류되었다. 림프구 스테로이드 민감성은 말초 혈액 림프구의 시험관내 스테로이드 유도성 아폽토시스(apoptosis; 세포 사멸)를 측정함으로써 결정되었다. 스테로이드-내성 군의 SLE 환자로부터의 림프구는 고농도의 프레드니솔론에서 스테로이드-민감성 군에 비하여 상당히 더 낮은 비율의 아폽토시스 세포를 가졌다(44.8% 대 68.8%; p<0.05). 따라서, 림프구 스테로이드 민감성을 측정하는 방법은 글루코코르티코이드에 의한 PHA 자극된 림프구 증식의 저해 수준을 측정하는 방법과 상이했지만, 스테로이드 요법에 반응하지 않은 환자는 스테로이드-내성 림프구를 가졌다.

[0019] 백혈병

[0020] 백혈병은 백혈구 전구체가 증식하지만 분화하지는 않는 백혈구의 악성 장애이다. 백혈병은 염증성 상태가 아니지만, 글루코코르티코이드는 이 상태를 치료하는데 사용된 화학요법에 포함된다. 글루코코르티코이드는 림프아구 아폽토시스를 유도하고, 이는 급성 림프아구성 백혈병(acute lymphoblastic leukaemia, ALL)에서 스테로이드 민감성의 척도로서 사용되었다. 높은 시험관내 아폽토시스의 비율은 우수한 임상 반응과 관련된다. 바꿔 말하자면, 스테로이드-내성은 새로 진단된 ALL 환자의 약 30%에서 존재하며, 중요한 임상 문제를 나타낸다(카스퍼스(Kaspers G. J. L.) 등의 문헌[*Leuk. Lymphoma.* 1994; 13:187-201]). 두 연구는 시험관내 림프구 민감성을

스테로이드(텍사메타손 및 프레드니솔론) 뿐만 아니라, L-아스파르기나제 및 빈크리스틴에 대하여 비교하였다(카스퍼스 등의 문헌[Blood 1997; 90:2723-9]; 홍고(Hongo T.) 등의 문헌[Blood 1997; 89:2959-65]). 이들 약물에 대한 림프구 민감성을 척도로서 사용하여, 환자를 민감성(모든 약물에 대해 민감함), 중간(2가지 또는 3가지의 약물에 대해 민감함), 또는 내성(1가지 또는 0가지 약물에 민감함)으로 분류하였다. 3년의 질병소실 생존은 민감성 환자에게서 최고이었고(85 내지 100%), 내성 환자에게서 최저이었다(43 내지 55%). 따라서, 모든 ALL 환자의 림프아구 시험관내 민감성 및 생체내 질환 민감성은 스테로이드 민감성 뿐만 아니라 다른 화학요법제와도 상관있다.

[0021] 사구체신염

[0022] 사구체신염은 신장의 염증을 특징으로 하며, 일반적으로 자가면역성이다. 스테로이드는 중요한 치료법이고(오스틴(Austin H. A.) 등의 문헌[N. Engl. J. Med. 1986; 314:614-9]), 이 상태에 대한 스테로이드 요법의 실패는 신부전증을 일으킬 수 있다. 스테로이드-내성 신장 질환 환자에서 스테로이드 치료법의 실패는 면역억제 약물의 시험을 하게 하였다(퀘양성 대장염에서와 같이)(맥콜리(McCauley J.) 등의 문헌[Nephrol. Dial. Transplant. 1993; 8:1286-90]). 연구 결과, 16명의 사구체신염 환자에게서 다양한 림프구 스테로이드 민감성이 나타났다(브리그스(Briggs W. A.) 등의 문헌[J. Clin. Pharmacol. 1996; 36: 707-14]). 림프구 스테로이드 민감성의 범위는 스테로이드 요법에 대한 가변성 반응을 설명한다고 주장되었지만, 이 연구에서 림프구 스테로이드 민감성과 임상 질환 반응의 비교는 없었다. 국소성 분절성 사구체 경화증(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)은 사구체신염의 한 형태로서, 이 또한 스테로이드로 치료되지만, 일부 환자는 반응하지 않는다(잉굴리(Ingulli E.) 등의 문헌[J. Am. Soc. Nephrol. 1995; 5:1820-5]). 이 상태에서, 림프구 스테로이드 민감성이 임상 반응과 비교되었고, 스테로이드 치료법에 반응하여 신장 기능에서의 개선을 예상하는 것으로 나타났다. 가장 민감한 림프구를 갖는 환자는 스테로이드 요법에 최상으로 반응한 반면에, 스테로이드-내성 림프구를 갖는 환자는 스테로이드에 대하여 불충분하게 반응하였다.

[0023] 다발성 경화증

[0024] 다발성 경화증은 미엘린 단백질과 반응성인 T 림프구가 중요한 병원 역할을 하는 중추신경계의 염증성 탈수초성 질환이다. 글루코코르티코이드는 다발성 경화증을 치료하는데 사용된다(브루사페리(Brusaferrì F.) 등의 문헌[J. Neurol. 2000; 247:435-42]). 스테로이드 치료법은 다발성 경화증 환자에게서 단기간 회복을 가속화하는데 효과적이며, 또한 재발 위험을 감소시키는데 효과적일 수 있다. 그러나, 임상 반응은 상이한 환자들간에 광범위하게 변한다. 림프구 스테로이드 민감성을 다발성 경화증 환자에게서 측정하였고(웨이(Wei T.) 등의 문헌[Acta Neurologica Scandinavica 1997; 96:28-33]), 광범위한 림프구 민감성이 밝혀졌다. 림프구 스테로이드 민감성과 스테로이드 요법에 대한 다발성 경화증의 임상 반응을 비교한 연구는 없지만, 시험관내 림프구 스테로이드 민감성의 범위는 부분적으로 스테로이드 요법에 대한 반응이 가변성인 이유를 설명할 수 있다고 주장되었다.

[0025] 림프구 스테로이드 민감성

[0026] 진술한 바와 같이, 림프구는 자극되어 미토젠(mitogen) PHA에 의해 시험관내 증식될 수 있다(린달 키슬링(Lindahl Kiessling K.), 피터슨(Peterson R. D.)의 문헌[Exp. Cell Res. 1969; 5585-7]). 배양 배지에 스테로이드를 첨가하면 림프구 증식을 저해한다(월커(Walker K. B.) 등의 문헌[Transplant Proc. 1985; 17:1676-8]). 일부 경우에서, 림프구는 소량의 스테로이드의 첨가에 대하여 스테로이드-민감성이어서 뚜렷한 증식 저해를 일으키고, 다른 경우에서 림프구는 다량의 스테로이드의 첨가에 대하여 스테로이드-내성이어서 최소 증식 저해를 일으킨다. 본 발명자들은 중증의 퀘양성 대장염 환자의 군에서 스테로이드 요법에 반응하여, LSS와 임상 결과 사이의 관련을 이미 연구한 바 있다(히어링(Hearing S. D.) 등의 문헌[Gut 1999; 45:382-8]). 모든 환자를 표준 투여량의 정맥내 스테로이드로 치료하였고, 말초 혈액 림프구의 PHA 유도된 증식의 텍사메타손 저해를 사용하여 환자의 림프구 스테로이드 민감성(LSS)을 측정하였다. 임상 결과와 LSS 사이의 중요한 상호관계가 증명되었다. 스테로이드-민감성 림프구를 갖는 모든 환자는 스테로이드 요법에 대하여 완전한 반응을 나타내었고, 스테로이드-내성 림프구를 갖는 모든 환자는 스테로이드 요법에 대하여 불충분한 반응을 나타내었다. 따라서, 퀘양성 대장염에서 스테로이드 요법에 대한 LSS와 임상 반응 사이에 상호관련이 있으며, 스테로이드-내성 림프구는 스테로이드 요법에 대한 불충분한 반응이 예상된다.

[0027] 인터류킨은 면역 반응중에 활성화된 대식세포 및 림프구에 의해 생성된 사이토킨의 군이다. 이들은 림프구 및 다른 백혈구에 작용하여 이들의 증식 및 분화를 자극한다. 이 군의 일원인 인터류킨-2(IL-2)는 활성화된 T 세포에 의해 생성된 제1 사이토킨중 하나로서, 자가분비적으로 작용하여 그를 생성하는 T-세포의 증식 및 분화를

자극한다. 궤양성 대장염에서 활성화된 T 림프구에 의해 생성된 IL-2는 다른 염증성 세포를 활성화하여 추가의 염증성 세포 모충 및 활성화를 일으킬 추가의 사이토킨을 생성함으로써 점막 염증을 지속시키는데 중요한 역할을 할 수 있다(키만(Kirman I.) 등의 문헌[J. Dig. Dis. Sci. 1995; 40:291-5]). 환자가 스테로이드 요법에 반응성이라고 가정할 때, 스테로이드의 중요한 작용은 IL-2 생성을 저해하여 림프구 증식 및 관련 염증을 방해하는 것이다(스테로이드는 IL-2 저해가 오직 하나의 작용인 다중 작용을 함). 그러나, 환자가 스테로이드-내성이면, IL-2 생성은 스테로이드에 의해 저해되지 않을 것이며, 염증 과정은 저해되지 않은 채 계속될 것이다.

발명의 상세한 설명

- [0028] 스테로이드 치료가 비효과적인, 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 및 크론병을 앓고 있는 상당수의 환자를 고려하여, 긴급의 침습성 외과 수술에 대한 대안으로서 효과적인 치료법이 필요하다.
- [0029] 더 구체적으로, 본 발명은 제1 양상으로 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 및 크론병의 치료에서의, 추가변 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 순서대로 포함하는 하나 이상의 도메인을 포함하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 CD25 결합 분자; 또는 그의 직접적인 등가물의 용도를 제공하며, 이때 CDR1의 아미노산 서열은 Arg-Tyr-Trp-Met-His이고, CDR2의 아미노산 서열은 Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Gly이고, CDR3의 아미노산 서열은 Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Phe이다. 하기 실시예 1 및 2의 연구에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 CD25 결합 분자는 스테로이드-내성 환자가 스테로이드-민감성으로 되도록 림프구 스테로이드 민감성을 조절한다. 따라서, 본 발명의 CD25 결합 분자는 스테로이드-내성 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 및 크론병 환자의 치료에 사용될 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 CD25 결합 분자는 또한 스테로이드-민감성 환자에서 스테로이드 요법에 대한 반응을 개선시키는데 사용될 수 있다. 스테로이드-민감성 환자는 어떤 식으로든 스테로이드 요법에 반응할 것으로 예상되지만, 본 발명의 CD25 결합 분자의 사용은 이들을 더 빨리 반응하게 하거나 또는 사용되는 스테로이드의 투여량을 낮출 수 있으므로, 스테로이드 치료의 부작용을 상당히 감소시킨다고 예상된다. 따라서, 본 발명의 또 하나의 양상에 따라, 스테로이드-민감성 환자에게 효과적인 양의 본 발명의 CD25 결합 분자 및 필요에 따라 스테로이드를 투여함을 포함하는, 스테로이드-민감성 환자의 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 및 크론병의 예방, 완화 유지(재발 방지) 및 치료를 위한 방법을 제공한다.
- [0031] "CD25 결합 분자"란, CD25 항원에 단독으로, 또는 다른 분자와 결합된 채로 결합하여 고친화성의 IL-2 수용체를 형성할 수 있는 임의의 분자를 뜻한다.
- [0032] 바람직하게는 CD25 결합 분자는 a) 추가변 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 순서대로 포함하는 제1 도메인(이때, CDR1의 아미노산 서열은 Arg-Tyr-Trp-Met-His이고, CDR2의 아미노산 서열은 Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Gly이고, CDR3의 아미노산 서열은 Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Phe임), 및 b) 추가변 영역 CDR1', CDR2' 및 CDR3'을 순서대로 포함하는 제2 도메인(이때, CDR1'의 아미노산 서열은 Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tyr-Met-Gln이고, CDR2'의 아미노산 서열은 Asp-Thr-Ser-Lys-Leu-Ala-Ser이고, CDR3'의 아미노산 서열은 His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tyr-Thr임)을 포함하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 CD25 결합 분자; 또는 그의 직접적인 등가물이 사용된다.
- [0033] 달리 나타내지 않는 한, 임의의 폴리펩티드 쇠는 본원에서 N-말단 끝에서 시작하여 C-말단 끝에서 끝나는 아미노산 서열을 갖는 것으로 기술된다.
- [0034] 항원 결합 부위가 제1 및 제2 도메인을 둘다 포함하는 경우, 이들은 동일한 폴리펩티드 분자에 위치할 수 있거나, 또는 바람직하게는 각각의 도메인은 상이한 쇠에 위치할 수 있고, 제1 도메인은 면역글로불린 중쇄 또는 그의 단편의 일부이고, 제2 도메인은 면역글로불린 경쇄 또는 그의 단편의 일부이다.
- [0035] 따라서, 본 발명은 또한 위치 1의 아미노산으로 시작하여 위치 117의 아미노산으로 끝나는, EP 제449,769B1호(본원에 참조로 인용됨)의 서열 1에 나타난 것과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 제1 도메인 또는 전술된 제1 도메인, 및 위치 1의 아미노산으로 시작하여 위치 104의 아미노산으로 끝나는, EP 제449,769B1호의 서열 2에 나타난 것과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 제2 도메인을 포함하

는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 CD25 결합 분자의 용도를 제공한다.

- [0036] 본 발명에 따라 사용하기에 더 바람직한 CD25 결합 분자는 적어도 a) (i) 추가변 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 순서대로 포함하는 가변 도메인 및 (ii) 인간 중쇄의 불변부 또는 그의 단편을 포함하는 하나의 면역글로불린 중쇄 또는 그의 단편(이때, CDR1의 아미노산 서열은 Arg-Tyr-Trp-Met-His이고, CDR2의 아미노산 서열은 Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Gly이고, CDR3의 아미노산 서열은 Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Phe임) 및 b) (i) 추가변 영역 CDR1', CDR2' 및 CDR3'을 순서대로 포함하는 가변 도메인 및 (ii) 인간 경쇄의 불변부 또는 그의 단편을 포함하는 하나의 면역글로불린 경쇄 또는 그의 단편(이때, CDR 1'의 아미노산 서열은 Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tyr-Met-Gln이고, CDR2'의 아미노산 서열은 Asp-Thr-Ser-Lys-Leu-Ala-Ser이고, CDR3'의 아미노산 서열은 His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tyr-Thr임)을 포함하는 키메릭 항-CD25 항체; 및 그의 직접적인 등가물중에서 선택된다.
- [0037] 또 다르게는, 본 발명에 따라 사용하기 위한 CD25 결합 분자는 a) 본원에 참조로 인용된 EP 제449,769B1호에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 추가변 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 순서대로 포함하는 제1 도메인, b) 본원에 참조로 인용된 EP 제449,769B1호에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 추가변 영역 CDR1', CDR2' 및 CDR3'을 순서대로 포함하는 제2 도메인, 및 c) 제1 도메인의 N-말단 끝 및 제2 도메인의 C-말단 끝에 결합되거나 또는 제1 도메인의 C-말단 끝 및 제2 도메인의 N-말단 끝에 결합되는 펩티드 링커를 포함하는 항원 결합 부위를 포함하는 단쇄 결합 분자; 및 그의 직접적인 등가물중에서 선택될 수 있다.
- [0038] 또 다르게는, 본 발명에 따라 사용하기 위한 CD25 결합 분자는 인간화 항체, 예컨대 본원에 참조로 인용된 EP 제451,216B1호에 그의 제조 방법이 개시된 다클리주맙(daclizumab)을 포함하는 항원 결합 부위를 포함하는 단쇄 결합 분자중에서 선택될 수 있다.
- [0039] 널리 공지된 바와 같이, 아미노산 서열에서 1개 이상 또는 수개의 아미노산의 결실, 부가 또는 치환과 같은 사소한 변화는 동일하거나 실질적으로 동일한 특성(예컨대, 항원 결합 특성)을 갖는 원래 단백질의 대립 유전자 형태를 가져 올 수 있다. 따라서, "그의 직접적인 등가물"이란 용어는 임의의 단일 도메인 CD25 결합 분자(분자 X)(이때, (i) 전체로서 취한 추가변 영역 CDR1, CDR2 및 CD3은 본원에 참조로 인용된 EP 제449,769B1호의 서열 1 또는 EP 제451,216B1호의 도 3 및 도 4에서 나타난 추가변 영역에 80% 이상 상동성이 있고, 바람직하게는 90% 이상 상동성이 있고, 더 바람직하게는 95% 이상 상동성이 있고, (ii) 분자 X와 동일한 프레임워크 (framework) 영역을 갖지만 본원에 참조로 인용된 EP 제449,769B1호의 서열 1 또는 EP 제451,216B1호의 도 3 및 도 4에서 나타난 것과 동일한 추가변 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 갖는 기준 분자와 실질적으로 동일한 정도로 인터류킨 2(IL-2)가 그의 수용체에 결합하는 것을 저해할 수 있음); 또는 결합 부위당 둘 이상의 도메인을 갖는 임의의 CD25 결합 분자(분자 X')(이때, (i) 전체로서 취한 추가변 영역 CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' 및 CD3'이 본원에 참조로 인용된 EP 제449,769B1호의 서열 1 및 서열 2 또는 EP 제451,216B1호의 도 3 및 도 4에서 나타난 추가변 영역에 80% 이상 상동성이 있고, 바람직하게는 90% 이상 상동성이 있고, 더 바람직하게는 95% 이상 상동성이 있고, (ii) 분자 X'과 동일한 프레임워크 영역 및 불변부를 갖지만 본원에 참조로 인용된 EP 제449,769B1호의 서열 1 및 서열 2 또는 EP 제451,216B1호의 도 3 및 도 4에서 나타난 것과 동일한 추가변 영역 CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' 및 CDR3'을 갖는 기준 분자와 실질적으로 동일한 정도로 IL-2가 그의 수용체에 결합하는 것을 저해할 수 있음)를 뜻한다.
- [0040] 이러한 마지막 기준은 본원에 참조로 인용된 EP 제449,769B1호 또는 EP 제451,216B1호에 기술된 다양한 분석으로 편리하게 시험될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따라 사용하기에 더 바람직한 CD25 결합 분자는 키메릭 CD25 항체, 특히 적어도 a) 위치 1의 아미노산으로 시작하여 위치 117의 아미노산으로 끝나는, 본원에 참조로 인용된 EP 제449,769호의 서열 1에 나타난 것과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 도메인 및 인간 중쇄의 불변부를 포함하는 하나의 중쇄; 및 b) 위치 1의 글루탐산으로 시작하여 위치 104의 글루탐산으로 끝나는, 본원에 참조로 인용된 EP 제 449,769B1호의 서열 2에 나타난 것과 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 도메인 및 인간 경쇄의 불변부를 포함하는 하나의 경쇄를 포함하는 키메릭 CD25 항체이다.
- [0042] 인간 중쇄의 불변부는 $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, μ , $\alpha 1$, $\alpha 2$, δ 또는 ϵ 형, 바람직하게는 γ 형, 더 바람직하게는 $\gamma 1$ 형일 수 있는 반면, 인간 경쇄의 불변부는 κ 또는 λ 형($\lambda 1$, $\lambda 2$ 및 $\lambda 3$ 아형을 포함함)일 수 있지만 바람직하게는 κ 형이다. 이들 모든 불변부의 아미노산 서열은 카바트(Kabat) 등의 문헌[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH]에 나와 있다.

- [0043] 본 발명에 따른 가장 바람직한 CD25 결합 분자는 노바티스 아게(Novartis AG)로부터 시물렉트(SIMULECT, 등록상표)로서 상업적으로 입수가 가능한 키메릭 항체 바실릭시맵(basiliximab) 및 로슈(Roche)로부터 제나팍스(ZENAPAX, 등록상표)로서 상업적으로 입수가 가능한 인간화 항체 다클리주맵이다.
- [0044] 본 발명에 따라 사용하기에 적합한 CD25 결합 분자는, 예를 들어 본원에 참조로 인용된 EP 제449,769B1호 및 EP 제451,216B1호에 개시된 기법에 의해 생성될 수 있다.
- [0045] EP 제449,769B1호 및 EP 제451,216B1호에 기술된 바와 같이, CD25 결합 분자는, 예컨대 림프구 스테로이드 민감성(Lymphocyte Steroid Sensitivity) 분석에서 관찰된 활성을 근거로 하여, 스테로이드-민감성 또는 스테로이드-내성 환자의 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 및 크론병의 예방 및 치료에 유용한 것으로 밝혀졌다.
- [0046] 따라서, 본 발명은 또한 (i) 스테로이드-민감성 또는 스테로이드-내성 환자에게 효과적인 양의 전술된 CD25 결합 분자를 투여함을 포함하는, 스테로이드-민감성 또는 스테로이드-내성 환자의 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 및 크론병의 예방 및 치료 방법, (ii) 스테로이드-민감성 또는 스테로이드-내성 환자에게 효과적인 양의 a) 전술된 CD25 결합 분자 및 b) 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 및 크론병의 예방 및 치료에 효과적인 추가의 약물 물질을, 예컨대 동시에 또는 순서대로 투여함을 포함하는, 스테로이드-민감성 또는 스테로이드-내성 환자의 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 및 크론병의 예방 및 치료 방법, (iii) 전술된 CD25 결합 분자 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는, (i) 또는 (ii)에 기술된 방법에 사용하기 위한 약학 조성물, (iv) (i) 또는 (ii)에 전술된 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 전술된 CD25 결합 분자, (v) 전술된 CD25 결합 분자를 포함하는 약학 조성물을 포함하고, 추가로 스테로이드-민감성 또는 스테로이드-내성 환자의 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 유육종 및 크론병의 예방 및 치료에 효과적인 추가의 약물 물질을 포함하는 하나 이상의 약학 조성물을 포함하는, (i) 또는 (ii)에 전술된 임의의 방법에 사용하기 위한, 치료용 조합제제(예컨대, 키트 또는 패키지)를 제공한다.
- [0047] 본 발명에 따라 사용하기 위하여, 적당량은, 물론, 예를 들어 사용되는 특정 CD25 결합 분자, 숙주, 투여 방식 및 치료될 상태의 중증도 및 원하는 효과에 따라 변할 것이다. 만족스러운 결과는 일반적으로 약 0.1mg 내지 약 100mg의 투여량에서 얻어진다고 나타나 있다. 투여는 단일 투여로 또는 질환이 임상적으로 분명하거나 예방적으로 추가의 임상적 재발을 억제하는 시간과 관련하여 지시될 수 있는 정도의 기간에 걸쳐 수회 투여로 이루어질 수 있고, 예를 들어 질환의 제어 또는 회복이 이루어질 때까지 1일 내지 5주, 예컨대 3 내지 6일의 시간차를 두고 약 5 내지 약 100mg의 투여량을 투여할 수 있다. 바람직한 투여 방법은 0일째에 CD25 결합 분자, 예컨대 바실릭시맵 20mg을 투여하고, 4일째에 추가로 20mg을 투여함을 포함한다. CD25 결합 분자는 편리하게는 비경구적으로, 예컨대 정맥내로, 예를 들어 전주 정맥 또는 다른 말초 정맥내로 투여된다. 또 다른 전형적인 투여 방법은 질환의 제어 또는 회복이 이루어질 때까지 28일동안 매일 40mg을 정맥내 투여하는 것이다.
- [0048] 정맥 주입액은 다음과 같이 제조될 수 있다. 동결된 항체를 함께 혼합하고, 인간 알부민 4.5중량%를 함유하는 멸균 완충 식염수 100ml에 분산시킨다. 이러한 식염수 분산액을 순간 정맥 주사로서 또는 정맥 주입으로서 15분에 걸쳐 환자에게 투여할 수 있다.
- [0049] 지금까지의 조사는 CD25 결합 분자의 투여가 사용된 투여량 수준에서 허용불가능한 부작용이 없음을 나타낸다. 특히 미국 연방 의약품(FDA)에 의해 인가된 바람직한 것, 바실릭시맵 또는 다클리주맵이 안전하며, 이들은 상업적으로 입수가 가능하다.
- [0050] 본 발명의 약학 조성물은, 예컨대 본원에 참조로 인용된 EP 제449,769B1호 또는 EP 제451,216B1호에 기술된 바와 같이 통상의 방식으로, 제조될 수 있다.
- [0051] CD25 결합 분자는 유일한 활성 성분으로서 투여되거나 또는 면역조절 방법의 다른 약물 또는 다른 항염증제와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, CD25 결합 분자는 본 발명에 따라 전술된 다양한 질환에 효과적인 약학 조성물과 함께, 예컨대 사이클로스포린, 라파마이신 또는 아스코마이신, 또는 이들의 면역억제 유사체(예컨대, 사이클로스포린 A, 사이클로스포린 G, FK-506, 시롤리무스, 에버롤리무스); 코르티코스테로이드(예컨대, 프레드니손); 사이클로포스파미드; 아자티오프렌; 메토티렉세이트; 금 염, 술파살라진, 항말라리아약, 브레퀴나; 레플루노마이드; 미조리바인; 마이코페놀산; 마이코페놀레이트 모페틸; 15-데옥시시스페르구알린; 다른

면역억제 단클론 항체, 예컨대 백혈구 수용체(예컨대, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45 또는 CD58 또는 이들의 리간드)에 대한 단클론 항체; 또는 다른 면역조절 화합물(예컨대, CTLA4Ig)과 함께 사용될 수 있다.

[0052] CD25 결합 분자를 추가의 약물 물질과 함께 동시 투여하는 경우, 혼합 또는 동시 투여 지시와 함께, 이들을 동일한 용기내에 따로따로 포장할 수 있다. 키트의 예로는 다중 배럴 주사기 또는 별개의 단일 투여 형태를 함유하는 이중 팩이 있다.

[0053] 하기의 실시예는 본 발명을 설명한다.

실시예

[0054] **실시예 1:**

[0055] 4명의 남성 및 4명의 여성이 연구에 포함된다. 연구 환자의 평균 연령은 52세(34 내지 70세)이다. 2명의 환자는 건강한 자원자이고, 6명의 환자는 사전 진단된 궤양성 대장염 환자이다. 6명의 환자중 5명은 내과 치료에 대한 불충분한 반응으로 인해 미리 외과 수술을 필요로 하였고, 임의의 항염증성 또는 면역억제 약물을 복용하지 않고 있다. 6번째 환자는 정지성 UC(궤양성 대장염)를 앓고 있으며, 메살라진을 복용하여 왔으나, 샘플 채취날에는 복용하지 않았다. 따라서, 메살라진(그의 하나의 작용은 IL-2의 약한 저해임)은 샘플 채취 시간까지 대사되었을 것이다(시험관내 사용하기 위한 바실릭시맵(상표명 시플렉트)은 노바티스에 의해 공급됨).

[0056] **림프구 스테로이드 민감성의 측정:** 말초 혈액 림프구의 글루코코르티코이드에 대한 민감성은 기능 분석, 즉 파이토해마글루티닌(PHA)에 의해 자극되고 텍사메타손에 의해 저해된 시험관내 증식 분석으로 평가된다(히어링 등의 문헌[Gut 1999; 45:382-8]; 히어링 등의 문헌[J. Clin. Endocrinol. Metab. 1999; 84:4149-54]). 말초 혈액 샘플을 09시에 채취하고, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 부력 원심분리에 의해 분리한다. 부력 원심분리는 피콜 구배에 걸친 원심분리에 의한 혈액 샘플로부터의 림프구의 분리를 포함한다. 피콜은 적혈구를 떨어지게 하지만, 림프구의 관통 이동을 방지한다. 말초 혈액 단핵 세포(림프구 및 대적혈구)를 피콜/혈장 계면으로부터 채취한다. PBMC 증식은 PHA에 의해 자극되고, 10^{-6} 내지 10^{-10} mol/l 의 10배 계단 희석(즉, 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} mol/l)된 텍사메타손으로 저해된다. 세포 증식은 삼중수소화 티미딘 흡수에 의해, 즉 배양 2일 후에 측정되고, 방사성 동위원소 표지된 티미딘(3 H-티미딘)은 림프구 배양 배지에 첨가되어, 증식 림프구의 DNA에 도입되었다. 6시간 후에 세포를 배양기로 옮기고, 세포 수확기를 사용하여 여과기 매트상에 수확하였다. 그 다음, 세포를 웰로부터 세척해내었다. 티미딘이 도입된 림프구 DNA가 여과지에 포획된다. 방사능 수준을 측정할 때, 다수의 활성 증식 림프구를 함유하는(따라서 DNA내로 다량의 티미딘을 도입함) 웰은 고방사능 수준을 나타낼 것이다. 따라서, 방사능 수준(분당 계측수, cpm)은 림프구 증식의 척도로서 사용된다. 결과는 3조 배양의 분당 평균 계측수(cpm)로서 계산된다. 각 농도의 텍사메타손에서의 티미딘 도입을 텍사메타손의 부재하의 PHA 자극된 T 림프구의 티미딘 도입과 비교하고, 저해되지 않은 양성 대조군의 비율로서 표현한다. 림프구 증식에 대한 상이한 농도의 바실릭시맵의 효과도 또한 연구한다. 또한, 동일한 농도의 바실릭시맵을 모든 농도의 텍사메타손에서 각각의 세포 배양 배지에 첨가하고, 항증식 효과를 측정한다.

[0057] **림프구 증식에 대한 시플렉트의 효과:** 바실릭시맵 0.2mg/l 의 혈청 농도는 90%보다 큰 IL-2R 점유를 일으킨다. 바실릭시맵의 시험관내 항증식 효과를 시험하기 위하여, 스테로이드의 부재하에 0.01 내지 10mg/l 의 다양한 농도의 바실릭시맵을 림프구와 함께 배양한다. 이들 분석은 바실릭시맵의 시험관내 효과를 일으키기 위하여 0.1 내지 0.3mg/l 의 시험관 농도의 바실릭시맵이 필요함을 확증한다. 동일한 환자에 대한 추가의 연구를 위하여, 1mg/l 의 농도가 사용된다. 전체적으로, 동일한 8명의 환자를 각 실험에서 연구한다. 스테로이드의 부재하에 PHA-유도된 세포 증식에 대한 1mg/l 의 농도의 바실릭시맵의 효과를 하기 표 1에 나타낸다.

표 1

환자	1	2	3	4	5	6	7	8	평균
PHA 단독(cpm)	38634	25228	40829	32561	45441	66157	28886	36990	39341
PHA+바실릭시맵(cpm)	21827	15157	27239	27538	21446	35003	16122	27209	23943
저해(%)	43.5	39.9	33.3	15.4	52.8	47.1	44.2	26.4	37.8

[0059] 따라서, 바실릭시맵의 첨가는 스테로이드의 부재하에 증식을 평균 37.8% 저해시킨다. 그러나, 이러한 수준의 저해는 여전히 케양성 대장염 환자의 연구에서 불충분한 임상 반응과 관련된다(<60%).

[0060] 스테로이드 민감성에 대한 시플렉트의 효과: 모든 8명의 환자에게 있어서, PHA-자극된 림프구를 바실릭시맵(1mg / l)의 존재하 및 부재하에 증가하는 농도의 텍사메타손(10^{-10} 내지 10^{-6} mol/l)의 존재하에 배양한다. 본 발명자에 의해 수행된 케양성 대장염의 선행 연구에서, 60% 미만의 최대 억제율(I_{max})은 스테로이드 요법에 대한 불충분한 반응과 상관있다(임상적 스테로이드 내성). 정확한 I_{max} 값은 매우 높은 수준의 텍사메타손에서의 저해이기 때문에 측정할 수 없다. 따라서, 적용된 최대 텍사메타손 농도(10^{-6} mol/l)에서 관측된 증식의 저해율을 I_{max} 값으로서 사용한다. 실제로, I_{max} 와 투여량-반응 곡선으로부터 얻어진 최대 저해의 예상 점근치는 우수하게 일치한다(히어링 등(1999)의 문헌[*Clin. Endocrinol. Metab.* 84:4149-54]). 10^{-7} mol/l의 텍사메타손 농도는 표준 투여량의 정맥 요법으로 얻어진 히드로코르티손의 혈청 농도에 대한 글루코코르티코이드 활성을 고려할 때 거의 동등하다. 따라서, 생체내 바실릭시맵의 잠재적인 효과와 비교하기 위하여, 텍사메타손의 상기 농도에서의 바실릭시맵의 스테로이드 민감화 효과도 또한 중요할 수 있다. 각각의 환자에 대한 림프구 증식 분석의 결과를 하기 표 2에 요약하였는데, 표 2는 LSS에 대한 바실릭시맵의 효과를 나타낸다. 환자는 스테로이드 민감성이 작아지는 순서로 나타낸다(왼쪽이 가장 민감한 환자임).

표 2

[0061]

PHA 단독(cpm)	38634	25229	40829	32562	45442	66157	28887	36991
PHA+Dex 10^{-6} (cpm)	3100	4109	9477	11568	21685	36495	18669	24681
PHA+Bas+Dex 10^{-6}	639	4533	3059	3801	3563	6910	3352	5924
I_{max} (Dex)(%)	92	84	77	64	52	45	35	33
I_{max} (Dex+Bas)(%)	98	82	93	88	92	90	88	84
%억제 Dex 10^{-7}	87	79	65	42	20	32	29	36
%억제 Dex 10^{-7} +Bas	98	84	88	83	87	83	86	81
스테로이드-민감성(SS) 또는 스테로이드-내성(SR)	SS	SS	SS	SS	SR	SR	SR	SR

[0062] 4명의 환자는 스테로이드-민감성이고($I_{max}>60\%$; 환자 1 내지 4번) 다른 4명은 스테로이드-내성이다($I_{max}<60\%$; 환자 5 내지 8번). I_{max} 에 대한 효과로부터, 모든 스테로이드-내성 환자의 경우, LSS는 바실릭시맵에 의해 조절되며 모두 스테로이드-민감성으로 됨을 알 수 있다. 또한, 10^{-7} mol/l의 텍사메타손 농도에서 림프구의 억제율에 대한 효과도 또한 알 수 있다.

[0063] 바실릭시맵에 의한 림프구 스테로이드 민감성의 조절은 자가면역성 간염, 천식, 습진, 혈관염, 측두 동맥염, 전신 홍반성 루푸스, 백혈병, 사구체신염, 다발성 경화증, 케양성 대장염, 유육종 및 크론병을 앓는 스테로이드-내성 환자의 스테로이드 민감성을 바꾸는데 동일하게 적용가능하며, 이러한 모든 상태에서, 스테로이드 요법에 대한 불충분한 반응은 스테로이드-내성 림프구와 관련있을 가능성이 있다. 바실릭시맵에 의해 림프구 스테로이드 민감성을 조절하여 스테로이드-내성 림프구를 스테로이드-민감성으로 만드는 것은 스테로이드 요법에 이미 비반응성인 환자를 스테로이드를 사용하여 성공적으로 치료할 수 있게 할 것이다. 또한, 스테로이드 요법에 반응할 것으로 예상되는 스테로이드-민감성 환자는 바실릭시맵으로 치료되는 경우 스테로이드 요법에 더 빨리 반응할 것이다.

[0064] 실시예 2:

[0065] 말초 혈액 림프구를 부력 밀도 원심분리를 사용하여 32명의 환자(25명의 건강한 자원자 및 7명의 정지성 케양성 대장염 환자)로부터 41번 분리한다. 림프구 스테로이드 민감성은 파이토해마글루티닌 자극된 림프구에 대한 텍사메타손(DEX)의 항증식성 효과를 측정함으로써 평가한다. 최대 스테로이드 유도성 억제는 대조군 림프구 증식

의 (I_{maz}) 로서 표현된다. I_{max} 는 바실릭시맙($1mg/l$)의 부재하 및 존재하에 측정된다. 바실릭시맙의 첨가는 DEX의 항증식성 효과를 상당히 증진시켰다(윌콕슨 부호 순위 검정(Wilcoxon signed-rank test), $p<0.0001$).

[0066]

	중간 $I_{max}(\%)$	사분위수 범위
텍사메타손	78.0	66.1-86.4
텍사메타손+바실릭시맙	92.3	89.3-95.6

[0067]

모든 8명의 스테로이드-내성 환자($I_{max}<60\%$)는 바실릭시맙의 첨가에 의해 스테로이드-민감성으로 조절되었다(시험관내). 따라서, 바실릭시맙은 뚜렷한 시험관내 스테로이드 증진 효과를 나타낸다.

서열 목록

- <110> University of Bristol
Hearing, Stephen
Dayan, Colin
Norman, Michael
- <120> Use of CD25 binding molecules in steroid-resistant patients
- <130> 4-32296A/UOB
- <140> PCT/EP02/03808
- <141> 2002-04-05
- <150> GB 0108821.0
- <151> 2001-04-06
- <150> GB 0108817.8
- <151> 2001-04-06
- <150> GB 0108816.0
- <151> 2001-04-06
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.0
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificial/Unknown
- <220>

- <221> misc_feature
- <222> ()..()
- <223> CDR sequence
- <400> 1
- Arg Tyr Trp Met His
- 1 5
- <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Artificial/Unknown
- <220>

- <221> misc_feature
- <222> ()..()
- <223> CDR sequence
- <400> 2
- Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
- 1 5 10 15
- Gly
- <210> 3

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial/Unknown
 <220>

<221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> CDR sequence
 <400> 3

Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe
 1 5

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial/Unknown
 <220>

<221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> CDR sequence
 <400> 4

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met Gln
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial/Unknown
 <220>

<221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> CDR sequence
 <400> 5

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial/Unknown
 <220>

<221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> CDR sequence
 <400> 6

His Gln Arg Ser Ser Tyr Thr
 1 5