



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0022044
(43) 공개일자 2010년02월26일

(51) Int. Cl.

A61K 31/195 (2006.01) A61P 27/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7026139

(22) 출원일자 2008년05월13일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년12월15일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/006072

(87) 국제공개번호 WO 2008/143824

국제공개일자 2008년11월27일

(30) 우선권주장

2007118237 2007년05월17일 러시아(RU)

60/957,201 2007년08월22일 미국(US)

(71) 출원인

사이클론 파아머슈티컬 인코오퍼레이티드

미합중국, 캘리포니아 94404, 포스터 시티, 스위트 900, 타워 레인 950

(72) 발명자

콜로보브, 알렉산드르 에이.

러시아, 세스트로레츠크 188640, 에이퍼티. 2, 265

심비르트세브, 안드레이 에스.

러시아, 상트페테르부르크, 2 무린스키 피알, 에이퍼티. 123, 34

(74) 대리인

박경재

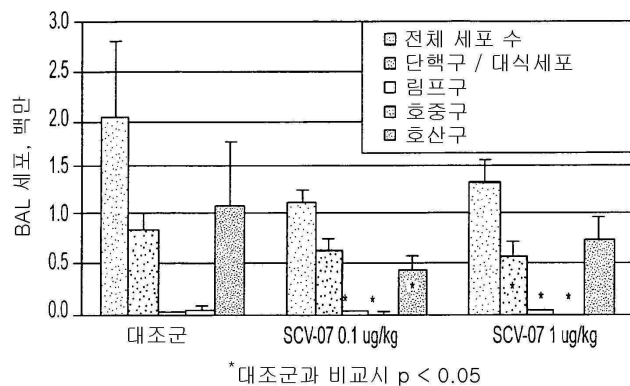
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 면역 조절제 화합물을 이용한 알레르기성 질환의 치료 방법

(57) 요약

환자의 알레르기성 질환 또는 그의 영향을 치료하거나, 예방하거나, 억제하거나 또는 감소시키기 위한 치료 방법은 방향족 또는 헤테로사이클릭 아미노산 잔기를 포함하는 면역 조절제 화합물 또는 그의 유도체의 효과량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 면역 조절 화합물은 D- 또는 L-트립토판 잔기를 포함하는 디펩티드이다.

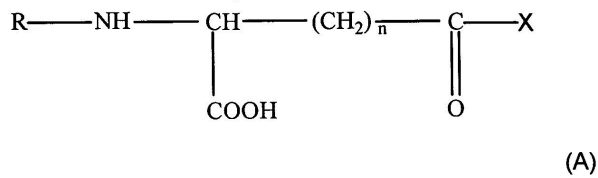
대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

환자에서 알레르기성 질환 또는 그의 영향을 치료, 예방, 억제 또는 감소시키기 위한 치료 방법으로서, 다음 식(A)을 갖는 유효량의 면역 조절제 화합물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하고,



상기 식(A)에서, n은 1 또는 2이고, R은 수소, 아실, 알킬 또는 펩티드 단편이며, X는 방향족 또는 헤테로사이클릭 아미노산 또는 그 유도체인, 치료 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 X는 L-트립토판 또는 D-트립토판인, 치료 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 SCV-07인, 치료 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 질병은 천식인, 치료 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 천식은 아토피성 기관지 천식인, 치료 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 약 0.001 ~ 10mg의 투여량으로 투여되는, 치료 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 약 0.01 ~ 1mg의 투여량으로 투여되는, 치료 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 환자 체중 1kg당 약 0.0001 ~ 100mg의 투여량으로 투여되는, 치료 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 환자 체중 1kg당 약 0.001 ~ 1mg의 투여량으로 투여되는, 치료 방법.

청구항 10

제 4항에 있어서, 상기 화합물은 SCV-07인, 치료 방법.

청구항 11

제 5항에 있어서, 상기 화합물은 SCV-07인, 치료 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 SCV-07은 약 0.01 내지 1mg의 감마-D-글루타밀-L-트립토판의 일일 투여량으로 등장성 용액 형태로 비경구 투여되는, 치료 방법.

청구항 13

제 1항에 있어서, 상기 SCV-07은 약 1.5mg 이하의 일일 투여량으로 주기적으로 투여되는, 치료 방법.

청구항 14

제 1항에 있어서, 상기 SCV-07은 약 5 내지 14일의 기간 동안 1일 1회 투여되는, 치료 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원 발명은 2007년 5월 17일자로 출원된 러시아 출원 제 2007118237호의 우선권을 주장하고, 2007년 8월 22일자로 출원된 미국 가특허 출원 제 60/957,201호의 이권을 주장한다.

[0003] 본 발명은, 알레르기성 질환의 치료 분야에 관한 것이다.

배경기술

[0004] 아토피성 기관지 천식은 산업 선진국에 만연된 질병이다. 그들에 의해 생산된 T 림프구 및 시토킨의 역할은 현재 천식의 병원론에 있어서 의심의 여지가 없다. 주도적인 가설들 중의 하나에 따라, 인터류킨-4 (IL-4)의 지배적인 생산에 의해 수반되는 제 2 타입 T 헬퍼의 방향으로 T 헬퍼의 밸런스가 이동하는 것은 폐조직 내 천식 프로세스를 시동하고 유지하는 중요한 인자이다.

[0005] 알레르기 상태는, 환자의 신체의 면역 상태의 악화 및 환경의 점진적 오염과 관련하여, 산업 선진국에서 만연되고 있다.

[0006] 상이한 제약학적 그룹에 속하는 제제들이 현재 알레르기를 예방 및 치료하기 위해 사용된다. 특히, 항염증제 (aspirin, ibuprofen, voltaren, hydrocortisone)의 사용이 제안되고; 항히스타민 제제 (dimedrol, pipolphen)는 지방 세포의 칼슘 채널 봉쇄제 (소듐 chromalin)와의 상이한 도식 및 조합 및 증상을 나타내는 작용제, 기관지 확장제, 흡착제 및 천연 및 인공 기원의 여러 유사 요법 제제, 코르티코스테로이드 등과 조합한 호르몬 요법에 사용된다. (RU 2240126, 2002; RU 2139100, 1996; RU 21167691, 1994; Handbook for the Practical Physician, Moscow, Meditsina, 1988, Vol , pages 60-68; SU 1544438, 1990; Immunocorrection on Pulmonology/edited by A. G. Chuchalin, Moscow, Meditsina, 1989, pages 202-210; Allergology. General Allergology, Vol. 1/edited by G. B. Fedoseev, St. Petersburg, Nordmed Publishers, 2001, 816 pages).

[0007] 대부분의 공지된 제제의 단점은 비교적 낮은 효율 및 또한 다수의 금기(contraindications)이다. 특히, 소듐 크로모글리케이트 (intal)는 흡입 노출 중에 및 알레르기성 질환이 약간 발현된 경우에만 유일하게 효과적이고; 항히스타민 제제는 천식에서 효과적이지 않고, 아스피린 3징후(triad)는 현저한 부작용(RU 2170091, 1994) 등을 나타낸다.

[0008] 최근에, 하나의 이론이 고려되어 있고, 일반적으로 그에 따라 알레르기성 질병은 타입 2 T-헬퍼 세포(Th2)라 불리워지는 헬퍼 T-림프구의 알레르겐-특이적 클론의 활성화와 연관된 면역 시스템에 대한 조절에 있어서 질환에 의해 유발됨을 받아들인다 (Allergology. 일반적 Allergology, Vol. 1/edited by G. B. Fedoseev, St. Petersburg, Nordmed Publishers, 2001, 816 pages). 이와 관련하여, 반대 타입 1 T-헬퍼 클론 (Th1)의 차별화 유도제를 도입함으로써 또는 그들에 의해 합성된 시토킨을 사용함으로써 T-헬퍼 클론의 상호 조절의 사용이 알레르기의 치료를 위해 제안되고 있다. 특히, 인터류킨-12, 감마 인터페론 (IFN- γ) 및 기타 물질이 이러한 목적을 위해 사용되어 왔다.

[0009] 그러나, 수거된 결과는 충분히 신뢰할 수 없고, 많은 경우에 상반되는 것으로 입증되었다. 따라서, IFN- γ 의 레벨은 염증 알레르기성 반응의 세기 및 질병의 임상적 발현의 심각도와 상관되는 것으로 드러났다 (Leonardi A., Curnow S., Zhan H., Calder V. 계절성 및 만성 알레르기성 눈병에서 인간의 눈물 시험편에서 및 결막 섬유아세포 배양액에서 다중 사이토킨. Clin. Exp. Allergy, 2006, V. 36, p. 777-784). 동시에, 생쥐에서의 다수의 천식 모델에서, 동물들에서 IFN- γ 의 투여는 기관지의 활동 과다의 증가를 유도할 수 있음을 나타내었다 (Hessel E., Van Oosterhout A., Van Ark I. et al. 과민 반응의 발현은 IFN-감마의 의존적이고 호산구 침투에 의존적

이다. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 1997, V. 16, p. 325- 335).

[0010] 천식인 환자에게 제조합 인터류킨-12 제제를 투여함으로써 호산구 증가증의 감소를 유발하였지만, 충분히 높은 일반적 독성의 배경에 대한 기관지 경련의 활동 과다 및 증상의 감소를 유도하지 않았다 (Bryan S., O'Connor B., Matti S. et al. 호산구, 기도 과민 반응, 및 말기 천식 반응증에 대한 제조합 인간 IL-12의 효과. Lancet, 2000, V. 356, p. 2149-2153).

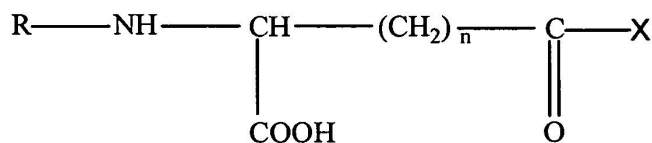
[0011] 인터류킨-18 (IL-18)은 알레르기성 질환의 치료에 사용되어 왔다 (Wild J., Sigounas A., Sur N. et al. IFN- γ -유도 인자 (IL-18)는 알레르기성 천식의 생쥐 모델에서 알레르기성 감작화, 혈청 IgE, Th2 사이토킨, 및 기도 호산구 증가증을 증가시킨다. J. Immunol., 2000, V. 164, p. 2701-2710). 동물에서 IL-18의 투여는 전체적으로 유기체에 대한 긍정적인 효과를 발휘하고, 몇몇 경우에, 이는 알레르기성 발현의 증가를 유도한다. 명백히, 이는 IL-18이 T-헬퍼 클론의 모든 타입을 활성화시킬 수 있고, IFN- γ 및 IL-4 모두의 합성을 강화시킨다는 사실과 연관된다.

[0012] IL-18 및 기타 상기 제제의 단점은 임상 시험에서 발견된 면역 시스템의 폴리클로날 활성화, 효과의 선택성의 부재, 및 높은 독성이다.

[0013] 환자에서 알레르기성 질환 또는 그의 영향을 치료하거나, 예방하거나, 억제하거나 또는 감소시키기 위한 치료 방법에 대한 필요성이 당업계에 남아있다.

발명의 상세한 설명

[0014] 본 발명에 따라, 환자에서 알레르기성 질환 또는 그의 영향을 치료하거나, 예방하거나, 억제하거나 또는 감소시키기 위한 치료 방법은 유효량의 화학식 A:



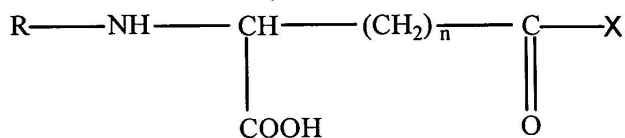
[0015]

[0016] (상기 화학식 A에서, n는 1 또는 2이고, R은 수소, 아실, 알킬 또는 펩티드 단편이고, X는 방향족 또는 헤테로 사이클릭 아미노산 또는 그의 유도체이다. 바람직하게는, X는 L- 트립토판 또는 D-트립토판이다)의 면역 조절제 화합물을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

실시예

[0025] 일 실시예에 따라, 본 발명은 환자에서, 바람직하게는 인간 환자에서 천식과 같은 알레르기성 질환 또는 그의 영향을 치료하거나, 예방하거나, 억제하거나, 또는 감소시키는 치료 방법에 관한 것이다. 특정 실시예에서, 아토피성 기관지 천식이 치료된다.

[0026] 본 발명에 따른 면역 조절제 화합물은 다음 화학식 A:



(A)

[0027]

[0028] (화학식 A에서, n은 1 또는 2이고, R은 수소, 아실, 알킬 또는 펩티드 단편이고, X는 방향족 또는 헤테로사이클릭 아미노산 또는 그의 유도체이다. 바람직하게는, X는 L- 트립토판 또는 D-트립토판이다)의 면역 조절제를 포함한다.

[0029] "X"에 대한 방향족 또는 헤테로사이클릭 아미노산의 적절한 유도체는 아마이드, 모노- 또는 디-(C₁-C₆) 알킬 치환 아마이드, 아릴아미드, 및 (C₁-C₆) 알킬 또는 아릴 에스테르이다. "R"에 대한 적절한 아실 또는 알킬 모이어티는 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 분지 또는 미분지 알킬 그룹, 2 내지 약 10개의 탄소 원자를 갖는 아실 그룹, 및

카르보벤질옥시 및 t-부틸옥시카르보닐과 같은 블로킹 그룹이다. 바람직하게는 화학식 A에 나타낸 CH 그룹의 탄소는 입체적 구성을 갖고, n이 2인 경우, 그것은 X의 입체적 구성과 상이하다.

[0030] 바람직한 실시예는 γ -D-글루타미드-L-트립토판, γ -L-글루타미드-L-트립토판, γ -L-글루타미드-Nin-포르미드-L-트립토판, N-메틸- γ -L-글루타미드-L-트립토판, N-아세틸- γ -L-글루타미드-L-트립토판, γ -L-글루타미드-D-트립토판, β -L-아스파티드-L-트립토판, 및 β -D-아스파티드-L-트립토판과 같은 화합물을 이용한다. 특히 바람직한 실시예는 γ -D-글루타미드-L-트립토판을 이용하고 이는 때때로 SCV-07이라 칭한다. 이들 화합물, 이들 화합물의 제조 방법, 이들 화합물의 제약학적으로 허용되는 염 및 이들의 제약학적 제형은 미국 특허 제 5,916,878호에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참고 문헌으로 인용한다.

[0031] SCV-07, 즉 γ -D-글루타미드-L-트립토판은 γ -글루타미드 또는 β -아스파티드 모이어티를 갖는 면역 조절 약물 부류의 일원으로서, 이는 러시아의 과학자들에 의해 발견되었고, SciClone Pharmaceuticals, Inc에 의해 미국에서 여러 지시 사항에서의 효능에 대해 조사 중에 있다. SCV-07은 다수의 생체내 및 시험관내 면역 조절 활성을 갖는다. SCV-07은 Con-A-유도 흉선 세포 및 림프구 증식을 증가시키고, Con-A-유도 인터류킨-2 (IL-2) 생산 및 비장 림프구에 의한 IL-2 수용체 발현을 증가시키고, 골수 세포에 대한 Thy-1.2 발현을 자극한다. 생체내에서, SCV-07은 양의 적혈구 세포에 의한 면역화 모델에서 5-FU-면역-억제 동물에 대한 강한 면역 자극 효과를 갖는다.

[0032] 화학식 A의 화합물은 임의의 효과적인 투여량으로, 예를 들면 약 0.001 ~ 10 mg 범위의 투여량으로 투여될 수 있다. 투여량은 주당 1회 이상, 예를 들면 1일당 1회 이상 투여되는 투여량을 갖는 일일 기반으로 투여될 수 있다. 투여는 경구, 비내, 경피, 설하, 주사, 주기적 주입, 연속 주입 등을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 이루어질 수 있다. 당해 투여량은 다른 형태의 주사 및 주입이 이용될 수 있지만, 근육 내 주사에 의해 투여될 수 있고, 경구 또는 비내 흡입 또는 경구 섭취와 같은 다른 형태의 투여가 사용될 수 있다.

[0033] 바람직한 실시예에서, 화학식 A의 화합물은 약 0.001 ~ 10 mg의 범위의 투여량, 더욱 바람직하게는 0.01 ~ 1 mg, 가장 바람직하게는 약 0.1 mg의 투여량으로 투여된다.

[0034] 투여량은 또한 약 0.00001 ~ 100 mg/kg 범위, 더욱 바람직하게는 약 0.0001 ~ 1 mg/kg 범위, 훨씬 더 바람직하게는 약 0.001 ~ 0.01 mg/kg 범위의 투여량으로 킬로그램당 마이크로그램으로 측정될 수 있다.

[0035] SCV-07은 화학적 합성에 의해 입수되고, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 정제되는 활성 원소 디펩티드- γ -D-Glu-L-Trp (감마-D-글루타미드-L-트립토판)을 함유한다 (RU 2091389, 1997; RU 2120298, 1998). 당해 제제는 감염성 질병에서 및 외과적 수술 후에 면역성을 회복하기 위해 이미 사용되었다. 당해 제제는 체중 kg당 0.00001 mg 내지 0.01 mg 만큼 낮은 투여량에서 면역-자극 효과를 갖고, 즉 당해 제제는 극히 낮은 농도에서 그 효과를 발휘한다.

[0036] 알레르기성 질환을 치료하기 위해, 당해 제제는 약전에 허용된 투여량으로 투여된다. 신체에 투여되는 형태 및 질병의 특성에 따라, 특정 실시예에서, 당해 제제의 1일 복용량은 0.1 내지 1.5 mg이다. 더 적은 복용량으로 당해 제제를 사용하는 것이 가능하지만, 이는 치료 효과를 감소시키고, 1.5 mg을 초과하는 복용량으로 당해 제제를 사용하는 것은 경제적으로 적합하지 않다. 당해 제제는 사용된 복용량의 최소 100,000 배를 초과하는 복용량에서도 무독성이다.

[0037] 비경구적으로 (근육 내 또는 복강내) 사용되는 경우, 당해 제제는 특정 실시예에서 일정 부피의 1 mL 등장성 염화나트륨 용액으로 사용되고, 여기서 당해 활성 원소 (γ -D-Glu-L-Trp 100 μ g)는 부형제 (D-만니톨 9.0 mg, 염화나트륨 1.0 mg)와 함께 용해된다. 특정 실시예에서 단일 복용량은 0.1 mg이다 (0.001 mg/kg). 당해 제제에 의한 치료는 특정 실시예에서 5-10 주사 과정의 형태로 수행된다.

[0038] 경구적으로 사용되는 경우, 당해 제제는 특정 실시예에서 활성 원소 0.35 또는 1.5 mg을 함유하는 정제 형태로 사용된다. 당해 제제는 특정 실시예에서 1-2주 동안 1일 1회 또는 2회 사용된다.

[0039] SCV-07의 생물활성과 실질적으로 유사한 생물활성을 갖는 치환되거나, 결실되거나, 신장되거나, 대체되거나, 또는 그렇지 않으면 변성된 부분을 갖는 생물학적 활성 유사체, 예를 들면, SCV-07과 실질적으로 동일한 방식으로 기능하고 실질적으로 동일한 활성을 갖도록 SVC-07과 충분한 상동성을 갖는 SCV-07 유도 펩티드가 포함된다.

[0040] 일 실시예에 따라, 화학식 A의 화합물은 유효량의 화학식 A의 화합물을 환자의 순환계에서 치료 또는 예방 기간 동안 실질적으로 연속적으로 유지하도록 환자에게 투여될 수 있다. 본 발명에 따라 훨씬 더 긴 치료 기간이 예상되더라도, 본 발명의 실시예는 유효량의 화학식 A의 화합물을 환자의 순환계에서 적어도 약 6, 10, 12 시간

이상의 치료 기간 동안 실질적으로 연속적으로 유지하는 것을 포함한다. 다른 실시예에서, 치료 기간은 적어도 약 1일이고, 심지어 여러날, 예를 들면 1주일 이상이다. 그러나, 상기한 바와 같이, 유효량의 화학식 A의 화합물이 환자의 순환계에서 실질적으로 연속적으로 유지되는 치료 방법들은 유사하거나 또는 상이한 기간의 비치료 기간과 구별될 수 있을 것으로 예상된다.

[0041] 일 실시예에 따라, 화학식 A의 화합물은 예를 들면, 유효량의 화학식 A의 화합물을 환자의 순환계에서 실질적으로 연속적으로 유지시키도록 치료 기간 동안 정맥내 주입에 의해 환자에게 연속적으로 주입된다. 당해 주입은 미니펌프에 의해서와 같이 임의의 적절한 수단에 의해 수행될 수 있다.

[0042] 대안으로, 화학식 A의 화합물의 주사 요법은 유효량의 화학식 A의 화합물을 환자의 순환계에서 실질적으로 연속적으로 유지하도록 유지될 수 있다. 적합한 주사 요법은 유효량의 면역 조절제 화합물 펩티드를 환자의 순환계에서 치료 기간 동안 실질적으로 연속적으로 유지하도록 1, 2, 4, 6시간 마다의 주사 등을 포함할 수 있다.

[0043] 화학식 A의 화합물의 연속 주입 동안, 투여는 실질적으로 더 오랜 기간 동안 이루어질 것으로 예상되지만, 일 실시예에 따라 화학식 A의 화합물의 연속 주입은 적어도 약 1시간의 치료 기간 동안 이루어진다. 더욱 바람직하게는, 연속적 주입은 더 오랜 기간 동안, 예를 들면 적어도 약 6, 8, 10, 12 시간 이상의 기간 동안 수행된다. 다른 실시예에서, 연속적인 주입은 적어도 약 1일, 심지어 1주 이상과 같이 여러 날 동안 이루어진다.

[0044] 일부 실시예에서, 화학식 A의 화합물은 주사용 물, 생리적 농도의 식염수 또는 유사물과 같이 제약학적으로 허용되는 액체 캐리어 중에 존재한다.

[0045] 유효량의 화학식 A의 화합물은 통상의 복용량-적정 실험에 의해 측정될 수 있다.

[0046] 화학식 A의 화합물은 또한 다른 천식-치료제와 함께 투여될 수 있다.

[0047] 다음 비제한적인 예는 본 발명을 예시한다.

[0048] 예 1: 아토피성 기관지 천식의 치료

[0049] SCV-07은 면역 시스템에 대한 광범위한 작용 스펙트럼을 갖고, 특히, IL-2 및 인터페론- γ 생산을 강화할 수 있는 합성 면역 조절제이다. 당해 활성은 명백히 제 1 타입의 T 헬퍼 쪽으로 체제의 영향 하에 T 헬퍼의 밸런스가 이동하는 것으로부터 유래한다. 이러한 작업의 목적은 생쥐들에서 실험적 알레르기성 천식에 대한 SCV-07의 영향을 조사하는 것이었다. 이러한 목적을 위해, 알레르겐의 흡입 투여에 의한 알레르기성 오브알부민 천식의 하나의 모델을 사용하였다. SCV-07은 알레르겐으로 예비 감작된 유기체를 직면하는 상황을 모델링하기 위한 예비 전신 면역화 후에 동물에게 투여되었다.

[0050] 재료 및 방법

[0051] 실험적 알레르기성 천식의 모델링

[0052] Balb/C 라인의 암컷 비병원성 생쥐 ("Pushchino" 실험실 동물 종)를 일정 온도에서 12-시간 낮/밤 주기로 SPF-사육장 상태에 유지시키고, 멸균 먹이 및 물을 임의로 주었다. 2개의 일련의 실험에서, 6 ~ 8 주 내지 18 ~ 20 주령의 생쥐들이 각각 실험 시작 시에 사용되었다.

[0053] 동물은 생쥐당 8 μ g의 투여량으로 황산 암모늄 기재 아췌반트 중의 오브알부민 용액 (Sigma)에 의해 5-일 간격으로 2회 면역되었다. SCV-07은 최초 면역화 후 6일 내지 11일간 1일 1회 PBS 중의 0.1 또는 1.0 μ g/kg의 투여량으로 200 μ l의 부피로 복강 내 투여되었다. 대조군은 동일한 날짜에 생리적 식염수를 투여받았다. 각각의 그룹은 6 내지 10마리의 동물로 구성되었다. 최초 면역 후 12일째, 16일째 및 20일째에, 당해 동물은 밀폐된 상자 내에 놓였고, 여기서 PBS 중의 1% 오브알부민 용액 (OVA)의 에어로졸이 공기와 연속적으로 혼합됨에 따라 1분 동안 초음파 네블라이저 LD-207U (Little Doctor)에 의해 발생되었다. 당해 동물들이 에어로졸에 노출된 기간은 15분이었다. 실험적 알레르기성 천식의 심각도의 분석은 최종 에어로졸 노출 후 24시간에 수행되었다.

[0054] SCV-07을 사용하는 동안 실험적 알레르기성 천식의 심각도 변화의 분석은 기관지 폐포 세척의 세포학적 조성, 조직학적 조사, 및 항원-특이적 IgE 항체의 역가 투여에 따라 수행되었다.

[0055] 생쥐들은 치사량의 소듐 바르비탈을 복강내로 투여함으로써 사망하였다. 기관지 폐포 세척(BAL)은 1 mL PBS 용액에 의해 기관을 통해 폐를 세척함으로써 획득되었다. 당해 BAL 세포는 원심 분리함으로써 침전되었고, 당해 침전물은 재현탁되었다. 당해 세포 농도는 Goryaev 챔버에서 계수되었고, 도말 표본(smears)이 제조되었다. 당해 도말 표본은 Romanovskii 염료에 의해 건조되고, 고정되고, 염색되었다. 기관지 폐포 세척의 세포학적 조성

은 오일 침지되는 광학 현미경 (접안 렌즈 * 16, 대물 렌즈 * 100) 하에 조사되었다. 200 세포당 단핵구/대식세포, 호중구, 호산구 및 림프구의 수가 계수되었고, 여기서 5 이상의 시야(visual fields)가 조사되었다. 각각의 세포 개체군의 상대적 세포수는 세포의 총수의 백분율로서 표현되었다.

[0056] 기관지 폐포 세척을 행한 후, 폐는 3 ~ 7일 동안 4% 파라포름알데히드 중에 고정되었고, 증가하는 알콜에 따른 Peterfi 용액 (2% celluidine-피마자유) 및 클로로포름을 통해 통과되고, 파라핀 내로 부어졌다. 5 μ m 두께의 섹션들이 제조되었다. 당해 섹션들은 세포 침투의 세기를 평가하기 위해 헤마톡시린-에오신으로 염색하고, 배상 세포의 수를 계수하기 위해 Schiff-요오드산으로 염색하였다.

[0057] 기관지 주위 및 혈관 주위 침투의 정량적 평가는 Scion 이미지 프로그램 패키지에 의해 형태 계량적으로 수행되었다. 3개의 기관지 및 3개의 혈관이 각각의 동물의 폐의 섹션에 대해 분석되었다. 당해 침투 영역은 기관지 또는 혈관을 함유하는 조직의 영역과 그를 둘러싼 침투, 및 혈관 또는 기관지 자체의 영역 사이의 차이로서 산출되었다. 침투의 인덱스는 혈관 또는 기관지의 면적에 대한 침투 면적의 비율로서 산출되었다. 실험 그룹은 분석에 포함된 기관지 및 혈관의 면적의 견지에서 비교되었다 (그룹들 간의 차이는 현저하지 않았다, $p > 0.6$).

[0058] 기관지의 섹션들 상의 배상 세포 또는 상피 세포의 수는 각각의 동물의 폐로부터의 섹션들 상에서 5 이상의 시야에서 계산되었고, 세포들의 총수의 백분율로서 표현되었다. 당해 실험 그룹들은 분석에 포함된 기관지의 치수로 비교되었다 (그룹들 간의 차이는 기관지 내의 세포수의 견지에서 현저하지 않았다, $p > 0.5$).

[0059] 말초 혈액은 레트로-오비탈 (retro-orbital) 부비동으로부터 수집하였다. 혈청 및 기관지 폐포 세척액 중의 항-OvA IgE의 역가는 다음 반응식에 따라 고체상 IFA에 의해 측정되었다. 비오틴 (Caltag)으로 라벨링된 쥐과 IgE에 대한 쥐 항체는 제조업자에 의해 권장되는 희석으로 IFA ((Corning Costar)에 대해 96-웰 플레이트 (100 μ l/well)로 도입되었고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션되고, 세척되었다. 이어서, 혈청 시료 또는 BAL은 연속 희석액 중에 도입되었고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션되고 세척되었다. 이어서, OvA이 첨가되고, 고추냉이 퍼옥시다제로 라벨링되며, 실온에서 1시간 동안 진탕기 상에서 인큐베이션되고, 세척되며, 퍼옥시다제용 기질 (OPD, Sigma)이 도입되고, 15분 동안 인큐베이션되었다. 당해 반응은 1M H₂SO₄를 첨가함으로써 정지되고, 플레이트들은 450 nm 파장에서 Victor2 분광 광도계 (Wallac) 상에서 분석되었다. 배경을 삭감한 후 항원-특이적 IgE의 역가를 정량적으로 비교하기 위해, 본 발명자들은 동물 대조군의 시료에 대한 각각의 희석액 중의 평균 광학 밀도를 산출하고, 입수된 값의 백분율로서 대응하는 희석으로 실험의 모든 동물로부터 시료 내의 광학 밀도를 표현하였다.

[0060] 당해 결과들의 통계적 처리는 윈도우즈 v.13용의 Microsoft Excel 및 SPSS 프로그램에 따라 수행되었고, 분포의 정상성은 Kholmogorov-Smirnov 기준에 따라 측정되었다. 정상적으로 분포된 값들에 대한 그룹들 간의 차이의 유의 수준을 평가하기 위해, 본 발명자들은 비정상적으로 분포된 유의 수준-Mann-Whitney 시험을 위해, 동일하지 않은 편차를 갖는 양면 학생 시험을 사용하였다. 당해 유의 수준은 $p < 0.05$ 에서 현저한 것으로 고려되었다. 달리 지적되지 않는 한, 당해 데이터는 평균 \pm 표준 편차의 형태로 제공된다.

[0061] 입수된 결과에 따라, 어린 동물들 (실험 시작 시에 6-8주령)에 대한 실험에서 BAL의 세포 조성의 분석은 SCV-07의 현저한 영향을 보이지 않았다. 모든 그룹 내의 BAL의 전체 세포질은 거의 동일하였다 (대조군에서 $2.00 \pm 0.34 \times$ 백만 세포, 당해 제제 0.1 μ g/kg을 투약받은 그룹에서 $1.96 \pm 0.99 \times$ 백만, 및 당해 제제 1 μ g/kg을 투약받은 그룹에서 $2.21 \pm 1.16 \times$ 백만). BAL 중의 백혈구의 개별 개체군들의 상대적 백분율을 비교함으로써, 본 발명자들은 대조군 동물들과 비교하여 SCV-07 1 μ g/kg을 투약받은 그룹에서 호산구의 현저하게 더 낮은 백분율 및 대식세포의 더 높은 백분율에 주목하였다 (표 1 참조). BAL 중의 개별 개체군들의 세포의 절대량은 그룹들 사이에서 현저하게 다르지 않았다.

[0062] [표 1] BAL 세포의 백분율 조성 (6 내지 8 주령 동물들)

인덱스	동물들의 그룹		
	대조군	SCV-07 0.1 μ g/kg	SCV-07 1 μ g/kg
호산구, %	65.1 ± 5.1	57.4 ± 21.3	$56.7 \pm 9.5^*$
단핵세포/대식세포, %	32.9 ± 5.3	41.2 ± 20.7	$40.6 \pm 9.4^*$
호중구, %	1.2 ± 1.0	0.9 ± 0.8	2.1 ± 0.9
림프구, %	0.8 ± 0.8	0.4 ± 0.5	0.6 ± 0.7

[0064] * 대조군과 비교시 $p < 0.05$

[0065] 18 내지 20 주령의 동물들에 대한 실험에서, BAL 및 SCV-07을 투약받은 그룹들의 세포 조성의 변화는 본질적으로 상이하였다. 본 발명자들은 당해 제제 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 을 투약받은 그룹에서 세척액 중의 세포의 총수의 현저한 감소 (대조군에서 $2.03 \pm 0.78 \times$ 백만과 비교하여 $1.12 \pm 0.15 \times$ 백만, $p < 0.05$), 및 SCV-07 1 $\mu\text{g/kg}$ 을 투약받은 그룹에서 이러한 인텍스의 감소 쪽으로의 독특한 경향 ($1.32 \pm 0.23 \times$ 백만)에 주목하였다. 개별 부분 개체군들의 백혈구의 백분율 함량에서 현저한 유의 수준의 부재 하에, 절대 값의 분석은 SCV-07 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 을 투약받은 그룹에서 호산구, 호중구 및 림프구의 수, 및 당해 제제 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 을 투약받은 그룹에서 단핵구/대식세포, 호중구 및 림프구의 수의 현저한 감소를 보였다 (표 2, 도 1 참조, 여기서 SCV-07은 SCV-07이라 칭한다).

[0066] [표 2] BAL 세포의 부차 집단 조성 (18 내지 20 주령 동물들)

[0067]

인텍스	동물들의 그룹		
	대조군	SCV-07 0.1 $\mu\text{g/kg}$	SCV-07 1 $\mu\text{g/kg}$
호산구, 천	1151 \pm 655	456 \pm 144*	690 \pm 247
단핵세포/대식세포, 천	806 \pm 178	629 \pm 134	586 \pm 144*
호중구, 천	44 \pm 33	17 \pm 14*	18 \pm 10*
림프구, 천	30 \pm 9	22 \pm 11*	26 \pm 9*

[0068] * 대조군과 비교시 $p < 0.05$

[0069] 6 내지 8개월령의 동물들[sic]의 혈청 및 기관지 폐포 세척액 모델에 사용된 IgE 항원에 특이적인 역가의 측정 은 대조군과 비교시 SCV-07 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 을 투약받은 그룹에서 혈청 내 역가의 현저한 감소를 보인다. SCV-07 1 $\mu\text{g/kg}$ 을 투약받은 생쥐들에서, 항-OvA IgE의 역가는 혈청에서 및 기관지 폐포액 모두에서 현저히 낮았다 (표 3, 도 2 참조, 여기서 SCV-07은 SCV-07이라 칭한다).

[0070] [표 3] 항-OvA IgE의 역가 (6 내지 8주령 동물).

[0071]

인텍스	동물들의 그룹		
	대조군	SCV-07 0.1 $\mu\text{g/kg}$	SCV-07 1 $\mu\text{g/kg}$
혈청의 IgE 역가, 1:640 희석 대조군의 평균 %	100 \pm 26	86 \pm 42	65 \pm 26*
BAL의 IgE 역가, 1:8 희석 대조군의 평균 %	100 \pm 47	59 \pm 33*	46 \pm 24*

[0072] * 대조군과 비교시 $p < 0.05$

[0073] 18 내지 20 주령의 생쥐들이 사용된 실험에서, 본 발명자들은 또한 SCV-07을 사용한 후 IgE에 특이적인 역가의 감소 경향을 관찰하였지만, 모든 그룹에서 당해 인텍스는 매우 높은 다양성을 갖고, 유의 수준은 통계적으로 현저하지 않았다 (표 4 참조).

[0074] [표 4] 항-OvA IgE의 역가 (18 내지 20주령 동물들)

[0075]

인텍스	동물들의 그룹		
	대조군	SCV-07 0.1 $\mu\text{g/kg}$	SCV-07 1 $\mu\text{g/kg}$
혈청의 IgE 역가, 1:400 희석 대조군의 평균 %	100 \pm 44	92 \pm 44	79 \pm 46
BAL의 IgE 역가, 1:32 희석 대조군의 평균 %	100 \pm 91	85 \pm 70	101 \pm 51

[0076] 생쥐의 섹션들의 형태학적 분석은 대조군과 비교시 현저하게, SCV-07 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 을 투약받은 동물들의 기관지의 상피에서 배상 세포의 백분율에서 2배 이상의 감소를 보였다 (표 5 참조). 기관지 주위 및 혈관 주위 침투 세기의 형태 계측적 평가는 현재는 완료되지 못하였다.

[0077] [표 5] 기관지 상피 내의 배상 세포의 백분율 (6 내지 8주령 동물들)

[0078]

인텍스	동물들의 그룹		
	대조군	SCV-07 0.1 $\mu\text{g/kg}$	SCV-07 1 $\mu\text{g/kg}$

세포들의 총수 중의 배상 세포 % (중간, 최소-최대)	39.3 (3-85)	15.2* (4-90)	36.5 (3-92)
-----------------------------------	----------------	-----------------	----------------

* 대조군과 비교시 $p < 0.05$

기관지 주위 및 혈관 주위 침투의 세기의 형태 계측 평가는 나타내야 할 SCV-07을 투약받은 두 그룹의 기관지 주위의 침투에서 신뢰할 수 있는 감소를 허용하였다. 혈관 주위의 침투의 세기 역시 SCV-07을 투약받은 그룹들에서 감소되는 독특한 경향이 있었지만, 대조군으로부터 유의 수준은 증상들의 큰 다양성으로 인해 통계적으로 신뢰할 수 없었다 (표 6 참조).

[표 6] 폐 조직의 침투의 세기

인덱스	동물들의 그룹		
	대조군	SCV-07 0.1 $\mu\text{g/kg}$	SCV-07 1 $\mu\text{g/kg}$
기관지 주변 침투의 인덱스, 통상적 유닛	0.52 ± 0.23	$0.39 \pm 0.19^*$	$0.35 \pm 0.14^{**}$
혈관 주변 침투의 인덱스, 통상적 유닛	2.46 ± 2.22	1.67 ± 1.08	1.48 ± 1.02

* 대조군과 비교시 $p < 0.05$

** 대조군과 비교시 $p < 0.01$

결론

당해 입수된 결과는 알레르기성 천식 모델에서 SCV-07을 사용하는 동안 실험 과정의 심각도의 감소가 관찰되고, 특히 기관지 내강 내로 백혈구의 출현(emergence) 및 기관지 주위 침투가 감소하고, 기관지 폐포 세척액의 호산구 증가증이 감소하고, 혈액 혈청 및 세척액 중의 항원-특이적 IgE의 양이 감소하고, 기관지 상피 내의 점액-형성 배상 세포의 수 역시 감소한다.

예 2. 클론 Th1 및 Th2에 의한 시토킨 생산에 대한 SCV-07의 영향

SCV-07은 0.1 및 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 체중의 투여량으로 일일 5회 복강내 주사 형태로 손상되지 않은 야생 생쥐에게 투여되었다. 이후, 비장 세포의 단리가 수행되고, 시토킨 합성은 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 투여량으로 콘카나발린 A에 의해 세포를 자극함으로써 배양액 중에서 유도되었다. 합성된 시토킨의 레벨은 정량적 면역 효소 분석에 의해 측정되었다. 실험 결과는 도 1에 나타내고, 이는 SCV-07의 복강내 투여 후 생쥐 비장 세포에 의한 인터류킨-4 및 인터페론- γ 의 미토겐-유도 생산을 보인다. 도 1로부터 명백한 바와 같이, 2개의 다른 [sic] 시토킨 - IFN- γ 및 IL-4의 ConA-유도 생산에 대한 변화는 자연적으로 상호적이었다. SCV-07 (1 $\mu\text{g/kg}$)의 영향 하에, 비장 세포에 의한 IL-4 생산의 2배 감소 및 IFN- γ 생산의 거의 5배 증가가 주목되었다. 당해 데이터는 SCV-07이 IL-2 생산을 강화시키는 비장의 T-세포의 기능적 응답을 자극할 뿐만 아니라, 동시에 타입 1 T-헬퍼 세포를 주로 활성화시킴으로써 T-헬퍼의 분극에 영향을 미침을 제안한다.

예 3. SCV-07에 의한 기관지 천식의 치료

일일 6-7회 호흡 곤란 발작을 겪는 것으로 보고된 1952년생 환자 B-skii는 배출하기 힘든 가래, 호흡 부족 및 비폐색과 함께 기침한다. 그의 병력으로부터, 1985년 이후 그가 기관지 천식으로 고통받고 있고, 질병 악화와 관련하여 알레르기학과에서 응급 의료 서비스로 수차례 입원하였음을 알 수 있다. 1997년 이래, 그는 전신성 글루코코르티코이드 (프레드니솔론 2 알/1일 - 유지 복용량)를 섭취해 왔다. 그는 또한 Beklazom LD 250 (1000 μg /1일 이하), Flixotide 250 (1000 μg /1일까지), 서방형 broncholytics (Serevent 25 μg /유닛 50 $\mu\text{g/s}$), Teotard 200 (2 k/1일, 400 mg/1일)을 투약받고 있다. 당해 발작은 살부타몰(salbutamol) (벤톨린)로 치료한다.

1994년에, 그는 시립 알레르기 사무소 (Municipal Allergy Office)에서 알레르기학 조사를 받았으며 가정내 알레르겐들 (집먼지, 집먼지 진드기)이 밝혀졌고; 질병의 심각한 과정의 견지에서 먼지 ASIT은 수행되지 않았다. 최종 악화는 2주 전이었고, 호흡 곤란 발작이 기본 치료의 배경으로 발생하고, 베타-2 작용질에 의해 치료받았을 때 (단기간), 기관지 경련 및 호흡 부족이 증가하였다. 그는 외래 환자 치료에 대한 불응성과 관련하여 GUZ

병원의 알레르기학과에 2회 입원하였다.

[0092] 알레르기성 병리학에 대한 유전적 형질은 소재 라인에 따라 추적되었다.

[0093] 알레르기 병력:

[0094] · 약물 - 음성;

[0095] · 음식 - 꿀, 감귤류, 수박, 멜론 (비충혈, 호흡 곤란 발작, 기침);

[0096] · 집내 (집먼지) - 호흡 곤란 발작, 기침, 비충혈, 비루 (rhinorrhea);

[0097] · 상피 - 음성;

[0098] · 비염의 먼지-계절적 악화, 결막염, 10년 동안 여름-가을 기간(7월-10월) 내 호흡 곤란의 증가된 빈도;

[0099] · 곤충 - 음성;

[0100] 조사 중: 평균 심각도 상태. 유도된 환자의 위치 (앉음). 스킨 커버-깨끗하고, 창백하고, 건조함. 피하 림프절은 확대되지 않는다. 갑상선은 촉진되지 않는다. 비호흡은 심각하게 제한되고, 스파스 점액은 비강 통로로부터 분리되고; 냄새를 감지하지 못한다. 결막 - 분홍색. 비강 점막 (비경 검사 중) - 창백하고, 부종. 구강 점막 - 분홍색. 내쉬기 숨의 호흡 곤란 특성. 호흡 속도 = 24/1분. 흉강 배럴-모양. 타진법 - 폐 소리의 캡슐 공명. 청진법 - 풍부한 건조 수포음, 모든 허파 부분을 통해 흠뻑러짐. 심장 음색은 리듬이 있다. HR = P5=78/1분. BP = 130/85 mmHg.

[0101] 혀는 백색 외피(incrustation)로 코팅된다. 복부는 부드럽고, 고통이 없다. 간은 늑골궁 (costal arch)의 가장 자리를 따라 있다. 신장 영역은 변경되지 않는다. Pasternak 증후군은 양 측면에서 음성이다.

[0102] 입장 중, 조사가 수행되었다:

[0103] 일반적 혈액 분석: 적혈구 - $5.07 \cdot 10^{12}/L$, 헤모글로빈 = 167 g/L, 백혈구 = $11.6 \cdot 10^9/L$, ESR = 5 mm/h, B = 1%, E = 3%, 막대 핵 = 10%, 세그먼트화된 핵 = 70%, 림프구 = 11%, MON = 5%.

[0104] 일반적 가래 분석: 색 - 회색, 특징 - 점액질, 구성 - 점성,

[0105] 편평 상피 - 10-12 ×, 치경 상피 - 3-5 ×, L - 10-12 ×, 적혈구 - 없음, 배상 세포 - 발견되지 않음.

[0106] 혈액 생화학: 글루코스 - 5.9 mmol/L, 전체 빌리루빈 - 11 μ mol/L, ALT -0.24, AST - 0.16 mmol/h/L, 우레아 - 5.12 mmol/L, 크레아티닌 - 0.108 mmol/L, L-아밀라제 - 7.0 mmol/L.

[0107] 호르몬 상태: 혈청 코르티솔 - 39.8 nmol/L

[0108] 면역 상태의 평가:

[0109] CD3⁺-53% IgG-8.74 TSIK-40 상대적 유닛

[0110] CD4⁺-34% IgA-0.67 NST-94/158/1.7

[0111] CD8⁺-15% IgM-1.39

[0112] CD16⁺-12% IgE-1130.6

[0113] CD20⁺-18%

[0114] CD25⁺-1.3%

[0115] EKG: 부비동 리듬. HR = 76 비트/1 분

[0116] 비전: 병리학 없음

[0117] FVD: FVC = 66%, FEV = 52%, FEV/FVC = 61%,

[0118] MOC75 = 37%, MOC50 = 34%, MOC25 = 51%.

- [0119] PTM: L/exp - 2.0 L/s L/exp - 1.0 Us.
- [0120] 흉부 x-선: 폐 기종, 하위 격벽으로 폐 경화증을 확산시킴.
- [0121] ENT 진찰: 진단: 지속적인 알레르기성 비염. 만성 인두염.
- [0122] 환자는 다음과 같이 진단받았다: DS: 기관지 천식, 지속적이고, 심각한 과정, 호르몬-의존성, 악화. 합병증: DN2. 폐의 폐기종, 폐 경화증.
- [0123] 수반하는 질병: 지속적인 알레르기성 비염. 화분증(pollinosis), 악화되지 않음.
- [0124] 환자는 다음 치료법을 처방받았다:
- [0125] 1. 호흡 곤란 발작 중에 네블라이저를 통해 - 2일 동안 벤톨린(Ventolin), 이어서 호흡 곤란 중에 1일 3-4회 이하 애스탈린(Astalin) (DAI);
- [0126] 2. 정맥내 드립:
- [0127] 1. 생리적 식염수 200.0 mL 중의 프레드니솔론(Prednisolone) 90 nu - 60 nu - 30 nu;
- [0128] 2. 유필린(Euphylline) 2.4%-10.0-5.0 mL.
- [0129] 3. 헤파린(Heparin) 5000 유닛.
- [0130] 4. 베나코트(Benacort) 200 (800 μ g/1일).
- [0131] 5. 프레드니솔론 4 t/1일 (8:00, 12:00)
- [0132] 6. 네블라이저를 통해 라졸반(Lazolvan), 이어서 1일 1t/3회 암브로헥살(Ambrohexal).
- [0133] 급성 증상이 감소되는 동안(입원 후 8일째), SCV-07은 생리적 식염수 1.0 mL 중의 0.1 mg의 양으로 1일 1회 No. 5 일일 [sic] 근육 내로 처방받았다. 치료 과정이 수행된 후 (5 근육 내 주사), 환자는 웰-비잉 감정, 긍정적인 기분의 현저한 개선이 주지되었고, 부작용이 전혀 주지되지 않았으며, 당해 제제는 내성이 생겼고, 체온은 정상적인 값 이내였다.
- [0134] 환자 동적인 조건 하에 다른 조사를 받았다 (SCV-07의 5차 근육 내 주사 후 24시간):
- [0135] 전체 혈액 분석: 적혈구 - $5.12 \cdot 10^{12}$ /L, HB - 159 g/L, 백혈구 - $9.7 \cdot 10^9$ /L,
- [0136] ESR - 6 mm/h, b-, e - 2%, 막대 핵 - 5%, 세그먼트화된 핵 - 67%, 림프구 -20%, M - 6%.
- [0137] 혈액 생화학: 자당 - 5.7; 전체 빌리루빈(bilirubin) - 8.9, ALT - 0.12, AST - 0.13, 우레아 -5.12, 크레아티닌(creatinine) - 0.073
- [0138] 일반적 가래 분석 - 특징 - 점액질, 회색, 일정 점성, 편평 상피 7-8, 치경 상피 - 없음, 백혈구 - 1-2 \times 시야에서.
- [0139] 호르몬의 상태 - 코르티솔(Cortisol) - 72.4
- [0140] 면역 상태의 평가
- [0141] $CD4^+$ -36 Ig G - 11.5
- [0142] $CD3^+$ -52 Ig A - 1.11
- [0143] $CD8^+$ -15 Ig M - 0.9
- [0144] $CD16^+$ -7 Ig E - 672.1 NST - 100/163
- [0145] $CD20^+$ -11 K - 1.6
- [0146] $CD25^+$ -1.3 TSIK - 77
- [0147] 질병의 긍정적인 역학이 환자에서 주목되었다:

- [0148] 호흡 곤란 발작의 제거, 기침, 비염, 호흡 부족의 감소 (16/1분으로), 비충혈, 환자는 냄새를 감지하기 시작했다.
- [0149] 환자는 유지 복용량으로 감소된 코르티코스테로이드 요법 (프레드니솔론 2알/1일), 및 1개월 동안 기본 요법 및 재-조사의 권고에 따라 만족스러운 조건으로 입원 후 15일째에 퇴원하였다.
- [0150] 예 4. 화분증의 특이적 면역 요법의 효과를 강화시키기 위한 SCV-07의 용도
- [0151] 환자. - P-na M. N., 45세. 최초 진찰일 - 2004년 10월.
- [0152] 진단: 나무 꽃가루, 코 결막 형태, 경감 오프-시즌에 대해 실험실 확인된 감작화에 의한 화분증.
- [0153] 예비 실험실 조사의 결과: 알맞은 호산구 증가증 (7%), 알맞은 하이퍼 IgE 면역 글로불린증 (immunoglobulinemia) (165 ME/mL), 자작나무 및 헤이즐넛 꽃가루에 대해 혈청 알레르겐-특이적 IgE의 높은 레벨 (MAST-클래스 3), 감소된 (0.88) 면역 조절 인덱스.
- [0154] 2004년 11월 말부터 2005년 3월 중순까지, 환자는 반응식에 따라 알레르고이드 (allergoid) ("Puretal-tree")를 사용하여, 화분증에 대한 특이적 면역요법 (SIT)을 겪었다: 투여된 엘레르고이드 0.025 mL로 시작하여 1주에 1회 피하, 후속 복용량은 0.5 mL의 단일 복용량에 도달할 때까지 치료 과정 동안 가속화되고 (0.025 mL - 0.05 mL, - 0.1 mL - 0.2 mL - 0.3 mL - 0.4 mL - 0.5 mL), 다음 과정이 당해 복용량에 대해 이루어진다.
- [0155] 화분증의 순차적인 계절적 악화 기간 (2005년 4-6월)의 특성은 SIT의 극히 낮은 효과를 지시하였다: 명백한 코 결막 증상은 전신성 경구 항히스타민 (Erius) 및 국소 스테로이드 요법 (Nasonex)의 필수적인 복용량 체제의 사용을 여전히 요하였다.
- [0156] 상기 상황을 고려하여, 2005년 10월 중에, SIT의 임상적 효과를 증가시키기 위해, 초기 또는 예상 조건 하에, 면역 자극 - 당해 제제 "SCV-07"가 경구적으로 투여되는 과정은 다음과 같다: 10일 동안 연속으로 일일 1회 1.5 mg.
- [0157] "SCV-07" 과정의 완료에 따라, 환자는 2005년 11월 중순부터 2006년 3월 중순까지, 이전 반응식에 따라 알레르고이드 "Puretal-tree"를 사용하여 화분증에 대한 또다른 SIT 과정을 겪었다. 화분증에 대하여 "SCV-07" 과정과 SIT 과정의 시작 사이의 기간은 15일이었다.
- [0158] 화분증의 후속하는 계절적 악화 기간 (2006년 4-6월)의 특성은 수행된 SIT의 현저히 증가된 효과를 제안한다: 계절적 코 결막 증상은 사실상 없었고; 어떠한 항히스타민 제제나 국소성 스테로이드도 나무 수분 계절 동안 환자에 사용되지 않았다.
- [0159] 당해 입수된 결과는 알레르기성 질환을 예방 및 치료하기 위해 "SCV-07"을 사용하는 효과를 지시한다. 당해 제제의 무해성 및 그의 상대적으로 낮은 단가는 독립적 요법으로서 및 통합된 요법의 맥락에서 이러한 목적을 위해 광범위하게 사용하는 것을 유망하게 한다.
- [0160] 예 5: 알레르기성 질환의 기니 피그 모델에서 SCV-07의 효과
- [0161] 요약
- [0162] 천식은 기관지 수축, 폐 내로 염증 세포 침투 (특히 호산구), 기도 과민 반응증 및 증가된 점액 분비를 특징으로 한다. 알레르기성 천식은 알레르겐에 대한 현저한 즉각적 기관 수축 물질 응답뿐만 아니라 알레르겐 노출 후 명백히 24시간 후에 염증 세포 침투 및 폐 손상이 이루어진 기니 피그에서 모델링될 수 있다. 본 연구의 목적은 SCV-07이 알레르겐 면역 테스트 후 폐 내로 염증 세포 침투를 감소시킬 수 있는지 여부를 결정하는 것이다. 기니 피그는 오브알부민의 ip 주사에 의해 감작되었다. 17-21일째에, 이들은 PBS 비히클로, SCV-07 1 ug/kg으로 또는 SCV-07 10 ug/kg으로 ip 처리되었다. 21일째에, 모든 동물은 항히스타민에 의해 전처리되어 치명적일 수 있는 즉각적 기관 수축 물질 응답을 감소시켰다. 순차로, 동물은 에어로졸화된 오브알부민에 노출되어 알레르기 반응을 개시하였다. 대조군 동물은 오브알부민으로 감작되었고, 대조군으로서 식염수 에어로졸로 면역 테스트되었다.
- [0163] SCV-07 치료
- [0164] • 기침 감소, 무리한 호흡, 및 즉각적 알레르기 반응 동안 동물들의 일반적 괴로움.
- [0165] • 폐 조직 내에 체류하는 호산구 및 호중구의 감소

- [0166] · 기관지 폐포 세척액 중의 적혈구 세포 누출의 현저한 감쇠에 의해 명백한 바의 감소된 알레르기성 폐 손상
- [0167] · 알레르기성 폐 내로 염증 세포 침투 또는 오브알부민-특이적 항체 생산을 감지할 정도로 억제하지 않음

[0168] 결론: SCV-07은 즉각적 알레르기 반응 및 순차적인 폐 손상을 감소시키는데 유망한 것으로 보이지만, 알레르기성 폐 내로 염증 세포 침투를 예방하는데는 효과적이지 못하다. 장래 연구는 SCV-07가 알레르겐-유도 기관지 수축을 억제하는 능력을 조사해야 한다. 또한, 적혈구 세포 누출에 대한 SCV-07의 주어진 보호 효과, 마이크로 혈관 투과성에서 알레르겐-유도 변화를 예방하는 그의 능력뿐만 아니라 비만 세포 매개물 방출이 평가되어야 한다.

[0169] 약어

[0170] EPO 호산구 퍼옥시다제

[0171] MPO 미엘로퍼옥시다제

[0172] WBC 백혈구 세포

[0173] RBC 적혈구 세포

[0174] BAL 기관지 폐포 세척

[0175] NSS 정상적 식염수 용액

[0176] PBS 인산염 완충 식염수

[0177] OVA 오브알부민

[0178] ip 복막내

[0179] 배경: 일화적 증거는 다른 지시 사항에 대해 SCV-07을 투약받은 만성 천식인 사람들이 그들의 천식에 대한 구조 약품을 사용할 기회를 감소시킬 수 있었음을 제안한다. 가정: 환자들에서 □₂ 작용제의 사용이 감소되었고, 이는 기도 과민 반응증 및/또는 알레르겐 유도된 초기 및 말기 기관지 수축이 SCV-07에 의해 감쇠되었음을 제안한다. 천식의 생쥐 모델에서 연구는 또한 세포 침투가 알레르겐 면역 테스트 (SciClone communication) 후 현저히 감소될 수 있음을 제안한다.

[0180] 목적: SCV-07가 천식의 기니 피그 모델에서 천식 증상을 경감시킬 수 있는지를 측정하기 위해

[0181] 특정 목표: 감작화 이후이지만 알레르겐 면역 테스트에 앞서 SCV-07의 투여가 천식의 기니 피그 모델에서 세포 침투를 감소시키는지 여부를 측정한다.

[0182] 재료 및 방법

[0183] 동물

[0184] 암컷 Dunkin-Hartley 기니 피그 (200-350 g)를 Charles River, Kingston, New York facility, Barrier K81로부터 구매하였다. 이 동물은 미네소타주 Duluth로 선적되었고, 실험 시작 전 5-7일 동안 우리의 동물 설비에 수용되었다. 실험적 치료 그룹은 표 7에 개략된다.

[0185] [표 7] 실험적 치료 그룹

[0186]

치료 그룹 명칭	감작화	펩티드 처리	에어로졸 면역 테스트	N
PBS NSS	OVA	PBS	NSS	8
PBS OVA	OVA	PBS	OVA	7
SCV 1 NSS	OVA	SCV-07 1 g/kg	NSS	8
SCV 1 OVA	OVA	SCV-07 1 g/kg	OVA	8
SCV 10 NSS	OVA	SCV-07 10 ug/kg	NSS	8
SCV 10 OVA	OVA	SCV-07 10 ug/kg	OVA	7

[0187] 실험당 8-10마리 동물로 이루어진 5개의 별개의 실험이 약 6개월의 기간에 걸쳐 수행되었다. 최초의 실험은 당해 실험적 시스템이 적절히 작동하고 있는 것 및 OVA 면역 테스트된 동물이 현저한 호산구 증가증을 발현시킨

것을 보장하기 위해 4 PBS NSS 동물들 및 4 PBS OVA 동물들로 구성되었다. 후속하는 4 실험은 표 7에 나타난 치료 그룹당 7-8 동물 중의 최종 N마리에 대해 6 치료 그룹 각각으로부터 1-3 동물들로부터 어느 것이나 포함하였다.

[0188] 실험 절차

[0189] 동물은 50 mg/kg OVA로 ip로 0일째에 감작되었다. 17, 18, 19, 및 20일째에, 동물은 PBS, SCV-07 1 ug/kg, 또는 SCV-07 10 ug/kg (펩티드 치료)으로 오전 8시 내지 10시에 ip 주사를 투약받았다. 21일째 오전 8 내지 10시에, 동물은 OVA 또는 식염수 (NSS) 에어로졸 면역 테스트하기 2시간 전에 펩티드를 투여받았다. OVA 또는 NSS 에어로졸 면역 테스트하기 30분 전에 각각의 동물은 항히스타민 (피릴라민 말레이이트 6.1 mg/kg)을 ip 주사를 맞아 에어로졸 OVA 면역 테스트를 수반하는 아나필락시 반응으로 인한 사망을 예방하였다. 동물은 DeVilbiss 모델 35B 초음파 네블라이저를 사용하여 플렉시글래스 챔버 (22 × 22 × 29 cm) 내에서 5분 동안 1% OVA 용액 또는 NSS와 쌍으로 에어로졸에 노출되었다. 동물들 전체 5분의 에어로졸화 기간 동안 관찰되었고, 코멘트가 기록되었다. 면역 테스트한지 22-24시간 내에, 동물은 안락사되고, 심장 천자에 의해 출혈하고, 세척되고, 세포 침투를 측정하기 위해 폐 엽들이 제거되었다. OVA 또는 NSS 면역 테스트 및 안락사되는 시점에, 동물 체중은 대략적으로 350-550 g 범위였고, 단 평균 체중은 약 420 g이었다. 이러한 실험적 프로토콜은 선행 공개된 연구에 사용된 것과 유사하다 (Regal and Fraser, 1996; Regal et al., 2000).

[0190] 세포 침투의 결정

[0191] 동물은 펜토바르비탈 (100-200 mg/kg)에 의해 안락사되고, 심장 천자에 의해 출혈하고, 실온 PBS에 의해 세척되었다. 기관지 폐포 세척 (BAL)을 위해, 당해 기관은 캐놀라를 꽂고 4부피의 PBS가 기관 캐놀라 내로 도입되고, 부드럽게 회수되었다. 전체 세척 부피는 60 ml/kg이었다. 당해 BAL은 원심분리되어 세포를 침전시키고, BAL 세포 펠렛은 각각의 동물의 BAL에 회수된 백혈구 세포 (WBC)의 총수를 측정하기 위해 PBS 1.0 ml에 재현탁되었다. 당해 BAL 상청액은 Lowry et al.의 방법(1951)을 사용하여 BAL 상청액 중에 회수된 전체 단백질을 측정하기 위해 -70 C에서 동결되었다. BAL 중의 전체 백혈구 세포는 Turk 용액을 사용하여 혈구 계산기 중에서 표준 방법에 의해 계수되었다. 시차적 계수가 개질된 Wrights 균주 (Diff Quik, American Scientific Products, McGraw Park, IL)로 염색된 BAL 세포 (3×10^4 세포)의 사이토킨 제제로부터 획득되었다. 400개의 세포가 호산구, 호중구, 또는 단핵 세포로서 계수되고 확인되었다. 당해 BAL 세포 시차 계수 및 백혈구 세포 계수는 BAL로부터 동물당 회수된 각각의 세포 타입의 총수를 산출하기 위해 사용되었다. 폐 조직 내의 호산구 및 호중구의 수의 추정치를 위해 당해 좌측 폐엽이 호산구 퍼옥시다제 (EPO)의 측정을 위해 처리되고 우측 폐엽이 미엘로퍼옥시다제 (MPO) 활성을 위해 각각 처리되었다 (Fraser et al., 1995). 당해 폐의 남은 부분은 그램 건조 중량을 측정하기 위해 80°C에서 3-5일 동안 건조되었다. 세척후 균질화된 폐로부터 EPO 활성은 심장 좌엽으로부터 전체 OD/분으로 표현되었다. 세척후 균질화된 폐로부터 MPO 활성은 심장 우엽으로부터 효소 활성의 전체 유니트로서 표현되었다. SCV-07은 1 ug/ml에서 EPO 또는 MPO 분석을 억제하지 않았다. BAL 중의 RBC의 수는 이미 기재된 바와 같이 RBC의 분해 후 재현탁된 BAL 세포 펠렛의 OD₄₁₂를 측정함으로써 정량화되었다(Fraser et al., 1995). BAL 상청액의 OD₄₁₂는 또한 계수를 위해 세척 과정 동안 및 세포의 재현탁 전에 용해된 RBC의 수를 추정하기 위해 측정되었다. SCV-07은 0.3 ug/ml에서 시험관 내 OD₄₁₂ 측정치에 의해 간섭받지 않았다.

[0192] OVA 특이적 IgG1

[0193] 혈청 내의 OVA 특이적 IgG1은 이미 기재된 바와 같이

[0194] ELISA에 의해 측정되었다 (Fraser et al., 1998; Regal et al., 2000). 당해 데이터는 1로 정의된 표준물 중의 OVA 특이적 IgG1의 농도로 나뉘어지는 시료 중의 OVA 특이적 IgG1의 농도로서 표현되었다. 당해 IgG 표준은 단백질 A 세파로스 컬럼 상에서 OVA 감작된 기니 피그로부터 혈청 풀을 통과시킴으로써 제조되었다. 회수된 IgG는 NSS에 반하여 투석되었고, 분석에서 표준물로 사용하기 위해 분량화되었다.

[0195] 시약

[0196] SCV-07

[0197] SCV-07 200 mg을 SciClone에 의해 Duluth에 선적하고 -70 C에서 저장하였다. 당해 화합물을 정전된 실험실에서 칭량하고 암실에 저장하였다. 20 ug/ml 및 2 ug/ml SCV-07의 원료 용액을 PBS 중에서 제조하고 -70 C 냉동고에 1ml 분량의 폴리프로필렌 튜브 (Sarstedt tubes; Ref 72.694.105) 중에 저장하였다. SCV-07 용액을 구성하기

위해 사용된 PBS는 또한 분량화되고, 대조 PBS 주사액용으로 냉동되었다 (PBS Catalog number, Gibco 10010, 칼슘 또는 마그네슘 없음, 0.03 EU/ml 미만으로서 시험된 엔도톡신). 분량은 사용일에 해동되었고, 호일로 감싸인 튜브 내에서 암실에서 얼음 위에 유지되었다. 당일에 완전히 사용되지 않은 경우 냉장고에서 암실에서 저장되었고, 다음 날까지 사용되거나 또는 폐기되었다. 동물은 SCV 1 (1 ug/kg) 또는 SCV 10 (10ug/kg)의 전달되는 복용량을 초래하는 PBS 0.5 ml/kg, SCV-07 2 ug/ml 또는 SCV-07 20 ug/ml를 투여받았다.

[0198] 감작화를 위한 OVA

[0199] 식염수 (Baxter, 멸균, 비발화성) 중 25 mg/ml로 오브알부민 용액 (A5503, Sigma로부터) 100 ml가 제조되었다. 분량 4 ml가 Nunc 크라이오투브 바이알 (Cat 337516) 내에서 -70에서 냉동되었다. 동물은 당해 50 mg/kg의 최종 전달된 복용량을 초래하는 OVA 용액 2 ml/kg을 21 g 바늘로 ip주사로 투여받았다. 당해 실험에서 모든 동물은 OVA로 감작되었다.

[0200] 에어로졸 면역 테스트를 위한 OVA.

[0201] 1 % OVA 용액은 실온 NSS (Baxter, 멸균, 비발화성) 중에서 에어로졸 면역 테스트하는 날에 신선하게 제조되었다.

[0202] 통계적 분석

[0203] 모든 데이터는 변이량을 균등화시키고 통상적인 파라미터적 모델링을 허용하도록 로그 변환되었다.

[0204] OVA 특이적 IgG1 값들에 대해, 통계적 분석 전에 0.01의 상수가 로그 규모로 편차들에 대한 매우 낮은 값의 영향을 최소화하기 위해 모든 값들에 부가되었다. 모든 도면의 값들은 7-8 값의 기하학적 평균 + 표준 오차 (SE)를 나타낸다.

[0205] 통계적 분석은 JMP 소프트웨어 (SAS Institute Inc., Cary, N. C, USA)를 사용하여 콘트라스트를 갖는 ANOVA를 사용하였다. 통계적 유의 수준은 $p < 0.05$ 로서 정의되었다.

[0206] 결과

[0207] OVA 에어로졸에 대한 즉각적 응답에 대한 SCV-07의 효과

[0208] 동물은 OVA 에어로졸화 동안 관찰되었고, 기록된 설명은 표 8에 요약되어 있다. 당해 실험자들은 치료에 대해 눈을 가리지 않았다. 표 8의 좌측에 나타난 바와 같이, NSS 에어로졸로 면역 테스트된 동물은 정상적인 행동을 보였고, 호흡 패턴이나 동작에서 어떠한 변화도 기록되지 않았다. 일반적으로, OVA로 감작되고 면역 테스트되고, 항히스타민 전-처리된 동물은 알레르겐 면역 테스트로 사망하지는 않지만, 무리한 호흡을 경험할 것이고, 종종 기침 및 숨가쁨을 경험할 것이다. PBS OVA 치료군의 모든 7마리 동물은 예상대로 몇몇 시각적 반응을 보였다. 현저한 발견은 OVA 에어로졸에 대한 어떠한 명백한 반응도 갖지 않는 SCV 1 OVA 및 SCV 10 OVA 치료 그룹의 동물들의 수였다. 당해 데이터는 1 또는 10 ug/kg에서 SCV-07 전처리가 알레르겐 감작화 및 면역 테스트의 즉각적 아나필락시 효과로부터 보호함을 제안한다. 명백한 추론은 SCV-07이 알레르겐 면역 테스트에 대한 즉각적 기관지 수축을 감소시킨다는 것이다. 후속 실험은 이러한 관찰에 의해 명확하게 지시된다.

[0209] [표 8] 기니 피그의 에어로졸화 동안 기록된 설명 (46마리 동물들)

치료 의견	치료 의견
PBS NSS 구석에 웅크림, rx 없음	PBS OVA 약간의 기침
PBS NSS 구석에 웅크림, rx 없음	PBS OVA 약간의 기침
PBS NSS 구석에 웅크림, rx 없음	PBS OVA 챔버로부터 옮겨진 후 숨가쁨
PBS NSS 구석에 웅크림, rx 없음	PBS OVA 거꾸로 뒤집힘, 4분에 매우 피로함
PBS NSS 구석에 웅크림, rx 없음	PBS OVA 거꾸로 뒤집힘, ~2분에 매우 피로함
PBS NSS rx 없음	PBS OVA 기침, ~3분 피로함
PBS NSS rx 없음	PBS OVA 숨가쁨, 피로함
PBS NSS rx 없음	

SCV 1 NSS 구석에 웅크림 SCV 1 NSS 구석에 웅크림 SCV 1 NSS 구석에 웅크림 SCV 1 NSS rx 없음 SCV 1 NSS rx 없음 SCV 1 NSS rx 없음 SCV 1 NSS rx 없음 SCV 1 NSS rx 없음	SCV 1 OVA rx 없음 SCV 1 OVA 약간의 기침 1회 ? SCV 1 OVA rx 없음 SCV 1 OVA rx 없음 SCV 1 OVA rx 없음 SCV 1 OVA 기침 1회 ? SCV 1 OVA rx 없음 SCV 1 OVA 에어로졸화의 거의 말기에 기침
SCV 10 NSS 구석에 웅크림, rx 없음 SCV 10 NSS 구석에 웅크림, rx 없음 SCV 10 NSS rx 없음 SCV 10 NSS rx 없음 SCV 10 NSS rx 없음 SCV 10 NSS rx 없음 SCV 10 NSS rx 없음 SCV 10 NSS rx 없음	SCV 10 OVA rx 없음 SCV 10 OVA 약간의 기침 SCV 10 OVA rx 없음 SCV 10 OVA rx 없음 SCV 10 OVA rx 없음 SCV 10 OVA 기침 1회 ? SCV 10 OVA 깊은 숨쉬기 SCV 10 OVA 깊은 숨쉬기

[0211] 폐 내로 OVA-유도 세포 침투에 대한 SCV-07의 영향

[0212] 모든 동물은 OVA에 의해 감작되었고 SCV-07의 영향은 NSS 에어로졸로 면역 테스트된 동물들 (음성 대조군, 알레르기 반응 없음) 및 OVA 에어로졸로 면역 테스트된 동물들 모두에 대해 측정되었다. 폐 조직 내의 당해 호산구는 균질화된 폐 내의 호산구 퍼옥시다제의 측정에 의해 추정되었고, 폐 조직 내의 호중구는 미엘로퍼옥시다제의 측정에 의해 추정되었다 (도 4). 우리의 실험실 및 다른 실험실 모두로부터 선행된 연구들은 조직 내 염증 세포의 추정치로서 이들 측정을 확인하고 있다. 또한, 본 발명자들은 기실(airspace)에 존재하는 백혈구 세포, 즉 BAL 세포의 수 및 타입을 측정하였다 (도 5-6).

[0213] 폐 내의 체류 세포에 대한 SCV-07의 영향

[0214] 통계적 분석은 초기에 폐 조직 또는 기실 내에 체류하는 호산구 또는 호중구에 대한 SCV-07의 현저한 영향이 존재하는 경우를 측정하기 위해 NSS 에어로졸 만으로 면역 테스트된 대조군 동물들 (n=24)의 콘트라스트를 갖는 ANOVA를 포함하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, SCV-07은 1 ug/kg에서 NSS 에어로졸로 면역 테스트된 동물들에서 MPO를 현저히 감소시켰고, SCV-07은 10 ug/kg에서 EPO를 현저히 감소시켰다 (*p<0.05 대 PBS NSS 대조군). 당해 데이터는 폐 조직에서, SCV-07 치료는 체류하는 호산구 및 호중구의 수를 현저히 감소시키는 것을 제안한다 (도 4). 그러나, NSS로 면역테스트된 대조군 동물들의 BAL에서, SCV-07은 세포의 구성에 현저하게 영향을 미치지 않았다 (도 5, NSS).

[0215] OVA-유도 세포 침투에 대한 SCV-07의 영향

[0216] 도 4 및 5에서 명백한 바와 같이, ANOVA 분석은 폐 EPO 내의 현저한 전체적인 OVA 영향뿐만 아니라 모든 BAL 세포 타입을 지시하였다. 본 발명자들의 이전 결과와 일치하게, 폐 MPO는 OVA 면역 테스트에 의해 현저하게 증가되지 않았다. 체류하는 호산구 및 호중구는 SCV-07 치료에 의해 변화되었기 때문에, 본 발명자들은 다음 ANOVA 콘트라스트를 행하였다:

[0217] (PBS NSS에서 PBS OVA로의 변화) 대 (SCV 1 NSS에서 SCV 1 OVA로의 변화)

[0218] (PBS NSS에서 PBS OVA로의 변화) 대 (SCV 10 NSS에서 SCV 10 OVA로의 변화)

[0219] 도 4에 나타낸 바와 같이, 폐 EPO의 변화는 PBS 치료 (#)에 의해서보다 SCV-07 10 ug/kg 치료에 의해 더 컸다. 폐 MPO의 변화는 SCV-07 치료에 의해 변하지 않았다. BAL 세포를 고려하여, BAL 호중구의 변화는 SCV-07 1 ug/kg 치료에 의해 차별화되었다. 과거에, 이들 유의 수준은 SCV-07 치료에 의한 체류하는 호산구 및 호중구의 감소로 인한 것이었다. %로 표현된 세포 시차는 또한 생쥐 천식 모델 (SciClone doc 43-10718)에서 SCV-07의 연구와 비교하여 도 6A-C에 나타낸다. BAL 중의 호산구 %는 OVA 에어로졸 면역 테스트에 의해 SCV-07 치료된 동물들에서 감소되는 경향이 있었다 (도 6A). 그러나, BAL 중의 전체 호산구는 변화되지 않았다 (도 5B).

[0220] OVA-유도 폐 손상 및/또는 미세혈관 삼투성의 변화에 대한 SCV-07의 영향

[0221] 알레르겐 면역 테스트는 폐에서 증가된 미세혈관 삼투성뿐만 아니라 기실 내로 적혈구 세포의 누출을 초래할 수

있는 폐 손상을 유발하는 것으로 공지되어 있다. 이들 사건중 어느 것이나 기실 내로 플라즈마 단백질 또는 세포간 유체의 누출로 인해 BAL 유체의 증가된 단백질 함량을 초래할 수 있다. 폐 손상 및/또는 미세혈관 삼투성의 변화는 BAL 중의 RBS(도 7A-B)뿐만 아니라 BAL 유체 (도 7C)의 전체적인 단백질 함량을 측정함으로써 평가되었다. BAL 중의 RBS의 수는 세포 펠렛을 용해시키고, 방출된 헤모글로빈의 OD₄₁₂를 측정함으로써 추정되었다 (도 7A). 또한, BAL 상청액의 OD₄₁₂는 또한 세척 절차 전에 또는 그 동안, 및 계수를 위한 세포의 재현탁 전에 용해된 RBC의 수를 추정하기 위해 측정되었다 (도 7B). 도 7에서 명백한 바와 같이, PBS 치료된 동물의 OVA 면역 테스트는 BAL 중의 RBC 및 BAL 중의 전체 단백질의 수를 현저히 증가시켰다. NSS로부터 OVA로의 변화의 ANOVA 콘트라스트는 SCV-07이 1 또는 10 ug/kg에서 BAL 중의 RBC의 수를 현저히 감소시켰음을 나타낸다 (#, 도 7A). 또한, BAL 상청액의 OD₄₁₂는 SCV-07에 의해 현저히 감소되었고, 이는 현저히 더 적은 RBC가 세척 유체를 수집하는 과정에서 용해되는데 유용하였음을 시사한다 (#, 도 7B). BAL 유체 중의 전체 단백질은 SCV-07 치료에 의해 영향받지 않았다 (도 7C).

[0222] 혈청 OVA-특이적 IgG1 항체에 대한 SCV-07의 영향

[0223] 알레르기성 폐에 연루된 항체를 감작화시키는 비만 세포는 IgE 및 IgG1 항체 모두를 포함하는 기니 피그에서 응답한다. 아췌반트의 부재 하에 OVA로 감작된 기니 피그는 주로 OVA 특이적 IgG1 항체를 만든다. 본 발명자들의 실험실에서 수행된 연구는 본 연구에서 동물들을 감작시키기 위해 사용된 방법은 OVA 특이적 IgE의 생산을 초래하기 쉽지 않은 것으로 결정하였다(Fraser et al., 1995; Regal and Fraser, 1996). SCV-07 치료에 의해 나타난 임의의 효과는 생산된 OVA 특이적 IgG1에서의 변경으로 인한 것이 아니었음을 보장하기 위해, 혈청의 농도는 ELISA에 의해 측정되었다 (도 8). 모든 동물은 본 연구에서 OVA로 감작되었기 때문에, OVA 특이적 IgG1 항체는 모든 그룹에서 검출될 수 있었다. SCV-07 치료 또는 OVA 면역 테스트는 혈청 내의 OVA 특이적 IgG1 항체의 농도에 현저하게 영향을 미치지 않았다.

[0224] 일반적 결론 및 고찰

[0225] 천식 대조군은 현저한 보건 문제이다

[0226] 최근 연구는 천식의 대다수가 유효 약물에 의해 잘 조절되지 않음을 분명히 제안한다. 천식 대조군 및 치료(REACT) 연구의 실제 평가는 제어되지 않는 천식이 크게 만연됨을 제시한다. 이들 결과는 표준 천식 약품을 사용하는 환자의 55%가 조절되지 않는 천식을 가짐을 제안하였다. 이는 보건에 대해 접근하는 이들 환자들의 대다수에도 불구하고 발생하였다(Peters et al., 2007). 천식 대조군에서 이러한 결핍은 현존하는 약품의 부분-최적 사용으로부터, 또는 현존하는 약품이 많은 천식에서 정확한 매개물 및/또는 사건을 타겟으로 하지 않는다는 사실로부터 초래하는지 여부는 분명하지 않다. 따라서, 새로운 천식 요법들은 이들이 알레르겐에 대한 즉각적 응답 또는 알레르겐 노출의 만성 염증 효과를 타겟으로 하는지 여부에 따라 필요하다. 특히, 즉각적 알레르기 반응의 매개물의 방출이 염증 질병의 만성 효과에 기여하는 움직임을 취하는 것이 분명하다(Paul, 1999).

[0227] 기니 피그 모델 즉각적 알레르기성 응답에서 본 연구의 주된 발견

[0228] 기니 피그에서 SCV-07 치료는 OVA 에어로졸 면역 테스트에 의해 나타난 즉각적 알레르기 반응 동안 기침, 무리한 호흡, 및 동물들의 일반적인 피로감을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 생쥐 모델에서 수행된 연구는 에어로졸 알레르겐 면역 테스트 동안 즉각 알레르기성 응답에 관한 임의의 발견을 보고하지 않았다. 일반적으로, 생쥐들은 기니 피그에 비해 폐 기능의 최소 변화를 갖는 알레르겐 면역 테스트에 응답하고, 생쥐들은 즉각적 알레르기 반응 동안 사망을 예방하기 위해 항히스타민 전-치료를 요구하지 않는다. 기니 피그 모델에서 즉각 응답에 대한 SCV-07 효과에 대한 우리의 관찰은 알레르기성 질환에서 SCV-07의 매우 임상적으로 유용한 특성을 제안한다. 피부 및 폐에서 즉각적 알레르기 반응에서 SCV-07 치료의 유용성은 더욱 조사되어야 한다.

[0229] 알레르기성 폐 염증

[0230] 기니 피그는 알레르겐 면역 테스트 후 24시간 내에 폐 내로 염증 세포의 침투에 의한 알레르겐 감작화 및 면역 테스트에 응답한다. 5일의 SCV-07 전-치료는 세포의 총수가 조사되었을 때 기니 피그 폐 내로 호산구 침투의 변화를 억제하지 않는다 (도 5). SCV-07은 BAL 중의 알레르겐 면역 테스트 후 축적된 호산구 %를 감소시키는 경향이 있었다 (도 6). 그러나, 이것은 통계적으로 현저하지 않았다. 기실 내의 세포 타입의 백분율이 임상적으로 중요한지 또는 기실 내의 세포 타입의 전체수가 평가하기에 중요한 변수인지 여부가 토의될 수 있다. 이들 (도 5-6) 모두의 평가는 동일한 결과를 초래한다. SCV-07 치료는 기니 피그 폐 내로 알레르겐 유도된 염증 세포 침투를 인지할 정도로 억제하지 않았다. 그러나, SCV-07 치료는 대조 동물들에서 전체 폐 EPO 및 MPO를 분명히 감

소시켰으며, 이는 당해 화합물이 정상 상태의 폐 내에 체류하는 호산구 및 호중구의 수에 영향을 미치고 있음을 제안한다. 이러한 발견에는 SCV-07 치료만으로 체류하는 세포의 수를 변경하는지 여부를 알기 위해 상이한 치료 그룹의 기니 피그의 폐의 조직 병리학적 조사가 후속되어야 한다.

[0231] SCV-07에 의한 알레르기 및 천식에 의한 모델 시스템에서 선행된 연구는 제한된다. 본 발명자들은 생쥐 천식 모델에서 SCV-07의 연구를 검토하였다 (SciClone Doc 43-10718). 생쥐 연구에서, 생쥐들의 2개의 상이한 연령 그룹이 감작되고, OVA에 의해 면역 테스트되고, 세포 침투가 보고되었다. 생쥐들의 2개의 상이한 연령 그룹에서 본 연구를 수행하는 원리는 분명하지 않았다. 기니 피그에 의한 우리 연구에서, 단 하나의 연령 그룹이 평가되었다. 본 발명자들은 암컷 기니 피그 200 ~ 350g을 사용하는 것을 선택하였고, 이는 아기 및 성체 수컷 및 암컷 기니 피그에서 선행된 우리 연구는 이러한 성별 및 연령의 동물들이 강한 알레르기성 폐 염증을 일정하게 생산하였음을 나타냈기 때문이다(Regal et al., 2006). 이러한 동물은 연구 과정에 걸쳐 능동적으로 성장하고 있고, 이러한 체중의 동물은 알레르기성 염증의 기니 피그 모델에 통상적으로 사용된다. 보고된 생쥐 연구에서, 6 ~ 8 주령의 BAL에서 호산구 %의 적절한 감소는 전체 세포수의 어떠한 변화도 없음에 의해 보고되었다. 18 ~ 20주령의 동물들에서, SCV-07 치료에 의한 세포 타입의 백분율에서 어떠한 유의 수준도 보이지 않았지만, SCV-07은 18 ~ 20주령의 BAL에서 전체 호산구를 감소시켰다. 생쥐 연구에서, 감작되지 않은 동물들 또는 감작되었지만 에어로졸 OVA로 면역 테스트되지 않은 동물들에 대한 BAL로부터 세포 시차 또는 전체 계수는 보고되지 않았다. 정상적인 기니 피그는 폐에서 호산구의 체류 개체를 갖는 한편, 호산구는 정상적인 생쥐 폐에서와 같이 명백하지 않다. 우리 연구에서, 기준선 EPO 및 MPO 측정에 대한 SCV-07 치료 효과 때문에, 적합한 대조 펩티드 전-치료된 그룹에 의해 NSS와 OVA 에어로졸 간의 변수의 변화를 통계적으로 분석하는 것이 중요하다. 생쥐 데이터에 대해 어떠한 그러한 비교도 유용하지 않다.

[0232] 폐 손상 또는 미세혈관 삼투성의 변화

[0233] 기니 피그 폐에서 심각한 알레르기 반응은 24시간 후 BAL에서 적혈구 세포의 증가된 수에 의해 수반된다. 분명히 SCV-07은 이러한 사건을 현저하게 억제하였다 (도 7). 이것이 동물 내의 즉각적 알레르기성 응답의 관찰된 감쇠를 반영하는지 (최초 5분) 또는 즉각 응답 후이지만 최초 24시간 내에 폐에서 발생하는 손상을 반영하는지 여부는 우리의 연구 디자인으로부터 결정될 수 없다. 그러나, SCV-07 치료 후 BAL 중의 RBC의 수의 현저한 차이는 당해 화합물이 매우 현저한 보호 효과를 가짐을 제안한다. 이러한 보호 효과는 매우 중요한 임상적 함축을 갖고, 장래 실험이 후속되어야 한다.

[0234] 체액 면역 응답

[0235] SCV-07 치료는 OVA에 의한 초기 감작화 후 17일째에 시작하였고, 그에 따라 예비 면역 응답은 펩티드 치료에 의해 영향받기 쉽지 않았다. OVA 특이적 IgG1의 혈청 농도는 알레르겐 면역 테스트 후 세척 시점에 측정되었다. 예상되는 바와 같이, 치료 그룹 내의 IgG1의 혈청 레벨에서 현저한 차이가 없었다. 이는 알레르기성 응답에서 보이는 임의의 변화는 당해 응답을 매개하는 친세포성 항체의 유효성에서 유의 수준으로 인해 일어나기 쉽지 않음을 나타낸다. 이는 OVA-특이적 IgE에 대한 작지만 현저한 효과가 SCV-07 치료된 생쥐들에서 나타난 경우에 생쥐로부터 부분적으로 다르다. 그러나, 생쥐 모델에서, SCV-07 치료는 OVA + 명반의 제 2 감작화 주사 후 1일 만에 차별화되고 시작되었다.

[0236] 연구의 강도 및 제한

[0237] 알레르기성 폐 염증의 기니 피그 모델이 인간에서 천식을 반영하는지 여부는 항상 토의될 수 있다. 기니 피그 모델의 장점은 폐 내로 호산구 침투가 용이하게 발생할 수 있다는 것이다. 추가로, 당해 기니 피그는 아쥘반트의 부재 하에 OVA에 대한 항체를 용이하게 생산한다. 단점은 기니 피그가 인간과 마찬가지로 IgE 항체를 생산하지만 친세포성 IgG1 항체를 생산하지 않는다는 것이다. 인간에서와 같이, 기니 피그는 알레르겐 면역 테스트에 대한 현저한 즉각적 기관 수축 물질 응답을 갖는 한편, 당해 생쥐 모델에서 이러한 응답은 최소이고 단명한다. 또한, 당해 기니 피그는 항히스타민에 의해 전-치료되어야 하거나 또는 그의 50% 이하는 우리 모델에서 5분 에어로졸화 동안 사망할 것이다. 따라서, 이러한 추가의 약물 치료는 해석을 복잡하게 할 수 있다.

[0238] EPO 및 MPO의 측정은 폐 엽 중의 전체 호산구 및 호중구의 사진을 제공하지만, 당해 세포의 위치에 관한 정보를 제공하지 않는다. 후속 조직 병리학은 염증 세포의 위치를 조사하고 생화학적 발견을 확인할 필요가 있다. 즉각 응답 동안 기록된 설명은 SCV-07이 알레르겐 노출로 인해 즉각 기관 수축 물질 응답으로부터 동물들을 보호하였음을 제안한다. 그러나, 폐 기능의 측정은 이러한 흥미를 자아내는 연구에 후속할 필요가 있다.

[0239] 결론

- [0240] 천식의 이러한 강한 기니 피그 모델에서, SCV-07은 즉각적 알레르기 반응 및 후속하는 폐 손상을 감소시키는데 유망함을 보이지만, 알레르기성 폐 내로 염증 세포 침투를 예방하는데 있어서 효과적이지 않다. 미래 연구는 SCV-07의 알레르겐-유도 기관지 수축을 억제하는 능력을 조사해야 한다. 또한, 폐 손상에 대한 SCV-07의 주어진 보호 효과, 미세혈관 삼투압에서 알레르겐-유도 변화를 예방하는 그의 능력뿐만 아니라 피부 및 폐에서 비만 세포 매개물 방출이 평가되어야 한다.
- [0241] 참고 문헌
- [0242] Fraser DG, Regal JF, and Arndt ML: Trimellitic anhydride-induced allergic response in the lung: Role of the complement system in cellular changes. J. Pharmacol exp Ther 273:793- 801, 1995.
- [0243] Fraser DG, Graziano FM, Larsen CP and Regal JF: The role of IgG1 and IgG2 in trimellitic anhydride-induced allergic response in the guinea pig lung. Toxicology and Applied Pharmacology 150: 218-227, 1998.
- [0244] Larsen CP and Regal JF: Trimellitic anhydride-induced cellular infiltration into guinea pig lung varies with age but not gender, Int Arch Allergy Immunol 127:63-72, 2002.
- [0245] Lowry OJ, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall PJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951 ;193:265-275.
- [0246] Paul WE: Fundamental Immunology, 4th edition, 1999. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- [0247] Peters SP, Jones CA, Haselkorn T, Mink DR, Valacer DJ, and Weiss ST: Real-world evaluation of asthma control and treatment (REACT): Finding from a national Web-based survey. J Allergy Clin Immunol 119: 1454-1461, 2007.
- [0248] Regal JF and Fraser DG: Systemic complement system depletion does not inhibit cellular accumulation in antihistamine pretreated allergic guinea pig lung, Int Arch Allergy Immunol 109:150-160, 1996.
- [0249] Regal JF, Fraser DG, Weeks CD, Greenberg NA: Dietary phytoestrogens have antiinflammatory activity in a guinea pig model of asthma. PSEBM 223:372-378, 2000.
- [0250] Regal JF, Regal RR, Meehan JL, Mohrman ME: Primary prevention of asthma: Age and sex influence sensitivity to allergen-induced airway inflammation and contribute to asthma heterogeneity in guinea pigs, Int Arch Allergy Immunol 141 :241-256, 2006.

산업상 이용 가능성

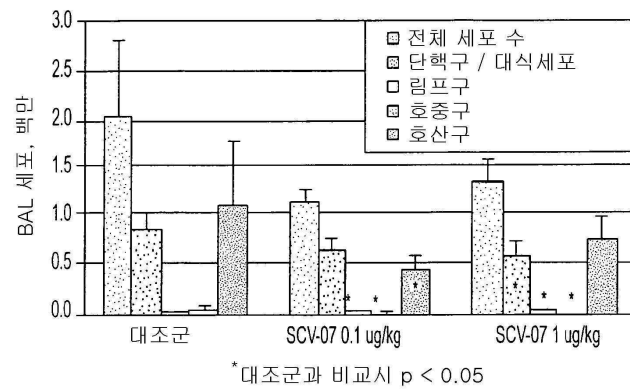
- [0251] 상술한 바와 같이, 본 발명은, 알레르기성 질환을 치료하는 방법을 제공하는데 사용된다.

도면의 간단한 설명

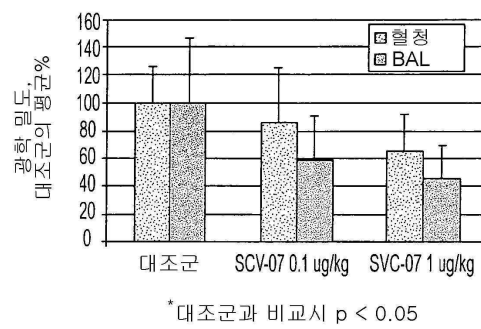
- [0017] 도 1은, 일 실시예에 따른 결과를 그래프로 나타내는 도면.
- [0018] 도 2는, 본 발명에 따른 결과를 추가로 그래프로 나타내는 도면.
- [0019] 도 3은, 본 발명에 따른 결과를 추가로 그래프로 나타내는 도면.
- [0020] 도 4는, 본 발명에 따른 결과를 추가로 그래프로 나타내는 도면.
- [0021] 도 5는, 본 발명에 따른 결과를 추가로 그래프로 나타내는 도면.
- [0022] 도 6은, 본 발명에 따른 결과를 추가로 그래프로 나타내는 도면.
- [0023] 도 7은, 본 발명에 따른 결과를 추가로 그래프로 나타내는 도면.
- [0024] 도 8은, 본 발명에 따른 결과를 추가로 그래프로 나타내는 도면.

도면

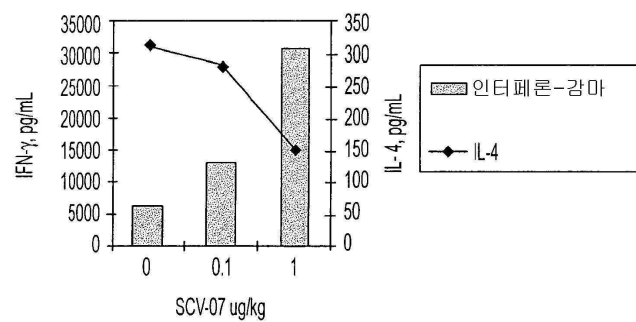
도면1



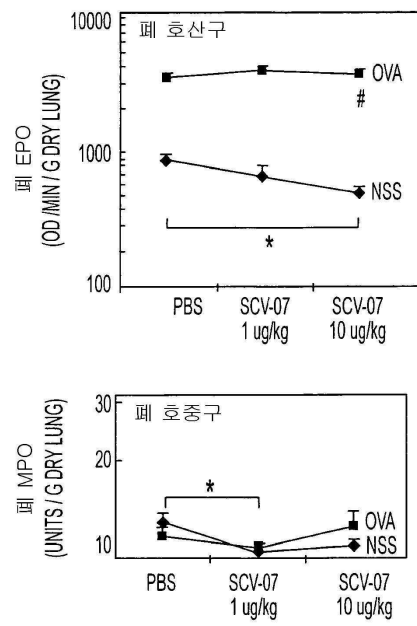
도면2



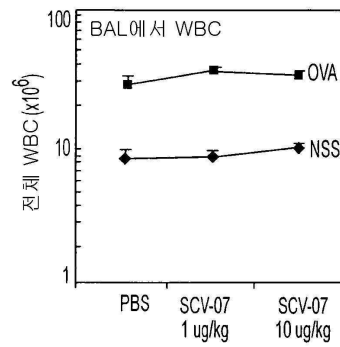
도면3



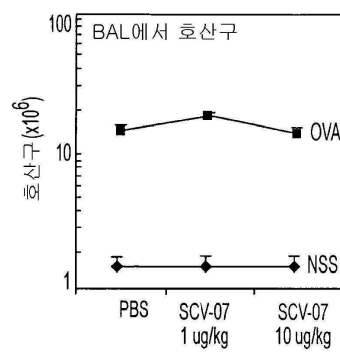
도면4



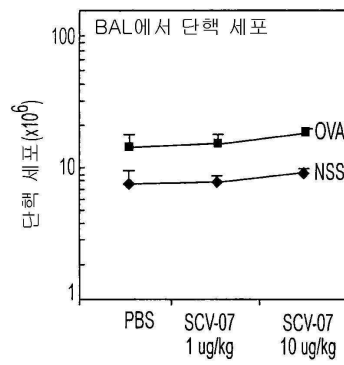
도면5a



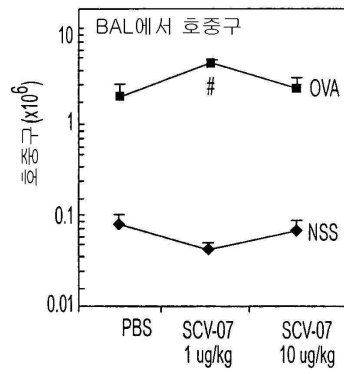
도면5b



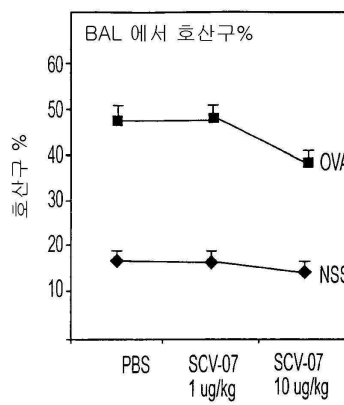
도면5c



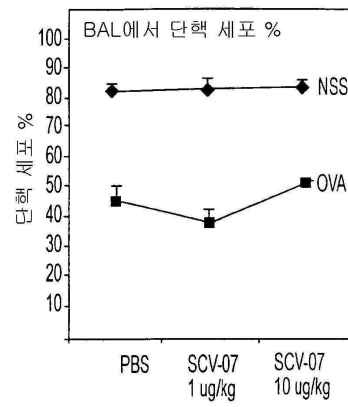
도면5d



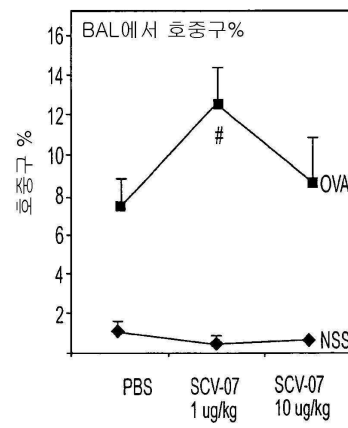
도면6a



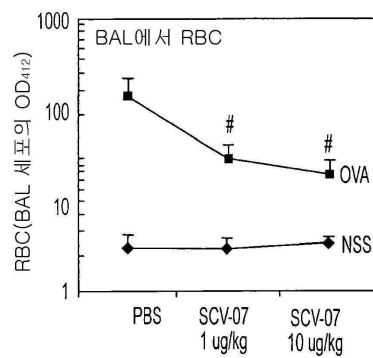
도면6b



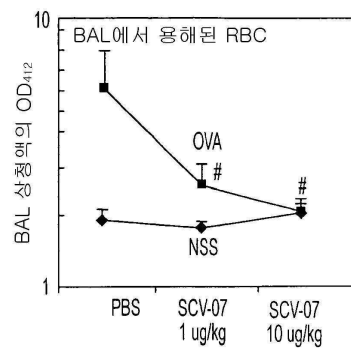
도면6c



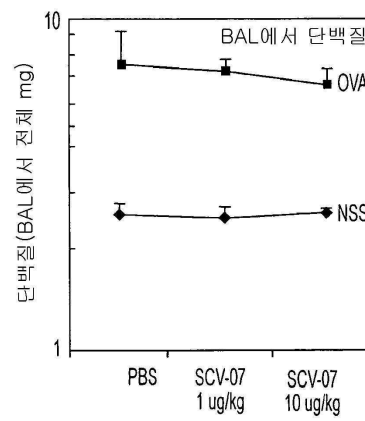
도면7a



도면7b



도면7c



도면8a

