



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월22일

(11) 등록번호 10-1800467

(24) 등록일자 2017년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01) *A61K 38/21* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7029688
(22) 출원일자(국제) 2010년05월13일
심사청구일자 2015년05월11일
(85) 번역문제출일자 2011년12월12일
(65) 공개번호 10-2014-0014392
(43) 공개일자 2014년02월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/034741
(87) 국제공개번호 WO 2010/132683
국제공개일자 2010년11월18일
(30) 우선권주장
61/177,924 2009년05월13일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2007121233 A1*
EP01618891 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
젠자임 코퍼레이션
미국, 매사추세츠주 02142, 캠브리지, 500 쉐넬 스트리트
(72) 발명자
카플란, 요한 엠.
미국 01770 매사추세츠주 웨르본 밀 스트리트 123
로버츠, 브루스 엘.
미국 01772 매사추세츠주 사우스보로 파인 힐 로드 108
사이더스, 윌리엄 엠.
미국 02038 매사추세츠주 프랭클린 리사 레인 618
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **루푸스 치료 방법 및 조성물**

(57) 요약

본 발명은 항-CD52 항체를 사용하여 루푸스 환자에서 루푸스를 치료하는 방법을 제공한다. 환자 신체의 이환 부위에서의 조절 T 세포의 침윤을 증가시키는 방법, 노 단백질 및/또는 알부민 수준을 감소시키는 방법, 및 림프구를 고갈시켜 루푸스 증상을 완화시키는 방법 또한 포함한다.

명세서

청구범위

청구항 1

치료 유효량의 항-CD52 항체를 단독 활성 성분으로 포함하는, 루푸스 환자에서 FoxP3⁺ 조절 T 세포를 증가시키기 위한 의약.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조절 T 세포가 적어도 하나의 염증 부위에서 증가되는 것인 의약.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 염증 부위가 혈액, 중추 신경계 (CNS), 심장, 간, 관절, 신장, 폐, 피부, 장관 또는 혈관계인 의약.

청구항 4

치료 유효량의 항-CD52 항체를 단독 활성 성분으로 포함하는, 루푸스 환자에서 뇨 단백질, 또는 뇨 알부민, 또는 그 둘 모두의 수준을 감소시키기 위한 의약.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 인간이고, 항-CD52 항체가 인간화된 항체 또는 인간 항-인간 CD52 항체인 의약.

청구항 6

제5항에 있어서, 항-CD52 항체가 알렘투주맙인 의약.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2009년 5월 13일에 출원된 미국 가출원 제61/177,924호를 우선권 주장한다. 상기 출원의 개시내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0002] 루푸스는 신체 여러 부분, 예를 들어, 혈액, 중추 신경계 (CNS), 심장, 간, 관절, 신장, 폐, 피부, 장관, 및 혈 관계를 이환시킬 수 있는 자가면역 질환이다. 염증은 루푸스에 걸린 조직 또는 기관에서 보편적으로 관찰된다. 루푸스 증상으로는 비정상적인 혈액 폐닐, 관절통, 죽상동맥경화증, CNS 질병, 감염, 관절 통증, 권태감, 발진, 궤양, 신장염 심혈관 질환, 자가항체 생산을 포함한다. 루푸스는 전신 홍반 루푸스, 루푸스 신장염, 피부 홍반 루푸스, CNS 루푸스, 심혈관 소견, 폐 소견, 간 소견, 혈액학적 소견, 위장관 소견, 근골격 소견, 신생아 홍반 루푸스, 소아 전신 홍반 루푸스, 약물 유도성 홍반 루푸스, 항-인지질 증후군, 및 루푸스 소견을 유발하는 보체 결핍 증후군을 비롯한, 소견을 가진다. 예를 들어, 문헌 [Robert G. Lahita. Editor, *Systemic Lupus Erythematosus*, 4th Ed., Elsevier Academic Press, 2004]를 참조한다. 미국에서는 대략 150-200만명의 사람들이 루푸스를 앓고 있다. 이들 루푸스 환자들 중 90%가 여성 환자이다. 현재, 루푸스는 전형적으로 코르티코스테로이드 및 면역억제제로 치료되고 있다. 개선된 루푸스 치료 방법 및 치료용 조성물이 시급히 요구되고 있다.

발명의 내용

- [0003] 발명의 개요
- [0004] 본 발명자들은 항-CD52 항체 (예를 들어, 알렘투주맙)를 사용하여 루푸스를 치료하는 신규의 유용한 방법 및 조성물을 발명하게 되었다. 일부 실시양태에서, 림프구를 유의적으로 고갈시키는 항체가 사용된다. 다른 실시양태에서, 림프구를 유의적으로 고갈시키지 못하는 항체 또한 사용될 수 있다.
- [0005] 한 측면에서, 본 발명은 치료 유효량의 항-CD52 항체를 루푸스 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 루푸스 환자에서 FoxP3+ (예를 들어, CD4+CD25+FoxP3+) 조절 T 세포를 증가시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 조절 T 세포를 자극하는 작용제, 예를 들어, 라파마이신, TGF- β (활성 또는 잠재성을 띠는 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, 또는 TGF- β 5), IL-10, IL-4, IFN- α , 비타민 D3, 텍사메타손, 또는 미코페놀레이트 모페틸을 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 루푸스 환자에서 조절 T 세포는 염증 부위, 예를 들어, 혈액, 중추 신경계 (CNS), 심장, 간, 관절, 신장, 폐, 피부, 장관, 및 혈관계에 침윤할 수 있다.
- [0006] 또 다른 측면에서, 본 발명은 루푸스 환자에게 치료 유효량의 항-CD52 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 루푸스 환자에서 노 단백질 및/또는 알부민 수준을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0007] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 루푸스 환자에게 치료 유효량의 항-CD52 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 루푸스 환자에서 림프구 (예를 들어, B 세포 및 T 세포)를 고갈시키는 방법을 제공한다.
- [0008] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 환자에게 적어도 하나의 제2 화합물과 함께 조합하여 치료 유효량의 항-CD52 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 그를 필요로 하는 환자 (예를 들어, 루푸스 환자)를 치료하는 방법을 제공한다. 제2 화합물은 전형적으로 루푸스 치료에 사용되는 것, 예를 들어, 진료 표준 또는 실험 치료에 사용되는 것이다.
- [0009] 본 발명의 방법은 제한없이, 전신 홍반 루푸스, 루푸스 신장염 피부 홍반 루푸스, 중추 신경계 (CNS) 루푸스, 심혈관 소견, 폐 소견, 간 소견, 혈액학적 소견, 위장관 소견, 근골격 소견, 신생아 홍반 루푸스, 소아 전신 홍반 루푸스, 약물 유도성 홍반 루푸스, 항-인지질 증후군, 또는 루푸스 소견을 유발하는 보체 결핍 증후군을 포함하는, 하나 이상의 루푸스 소견을 가진 환자를 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0010] 본 발명의 조합 요법 방법에서, 항-CD52 항체 및 추가의 치료제는 환자에게 적절한 임의의 순서대로 투여될 수 있다. 항-CD52 항체 및 추가의 작용제(들)는 동시에 또는 순차적으로, 또는 둘 모두의 방식으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 추가의 작용제(들)는 항-CD52 요법 이전 또는 이후에 투여될 수 있다. 그러한 조합 요법에 유용한 키트 또한 본 발명에서 제공한다.
- [0011] 일부 실시양태에서, 환자는 인간 환자이고, 항-CD52 항체는 인간 CD52에 대한 것이다. 상기 실시양태에서, 항-CD52 항체는 인간 항체, 인간화된 항체, 또는 인간 Fc 부위를 포함하는 키메라 항체인 것이 바람직할 수 있다.
- [0012] 본 발명은 또한 본 발명의 치료 방법에 유용한 의약 제조를 위한 항-CD52 항체의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0013] **도 1a-1b**는 모노클로날 래트 항-마우스 CD52 IgG2a 항체로 처리된 NZB/NZWF1 마우스 중의 림프구 고갈 부족을 나타낸다. 기준선에서 개별 마우스로부터 혈액을 수집한 후, 대조군인 래트 IgG 또는 래트 항-마우스 CD52 항체를 1차 주사하고, 2일 후, 상기 항체를 2차 주사하였다. 혈액 샘플을 염색하고, 유식세포 측정법에 의해 분석하여 CD3⁺ T 세포 및 CD19⁺ B 세포의 절대 개수를 수득하였다.
- 도 2a-2f**는 래트 항-마우스 CD52 항체로 처리하였을 때, NZB/NZWF1 마우스에서 노 단백질 수준이 성공적으로 감소하였다는 것을 나타낸다. **도 2a-2e**는 항-마우스 CD52로 처리된 마우스가 양성 대조군인 시클로포스파미드 처리군 중의 마우스의 수준과 유사한 노 단백질 수준을 보인 반면, 대조군인 래트 IgG로 처리된 마우스는 비히클 대조군인 PBS로 처리된 마우스의 수준과 유사한 노 단백질 수준을 보였다는 것을 나타낸다. **도 2f**는 연구 종결 시, 래트 IgG 중 67%, 그리고 비히클로 처리된 마우스 중 60%인 것과 비교하여 항-마우스 CD52 항체로 처리된 마우스 중 단지 38%만이, 그리고 시클로포스파미드로 처리된 마우스 중 20%가 중증 단백뇨 (>500 mg/dL/일)에 도달하였다는 것을 나타낸다.
- 도 3a-3g**는 래트 항-마우스 CD52 항체로 처리하였을 때, NZB/NZWF1 마우스에서 노 알부민 수준이 성공적으로 감소하였다는 것을 나타낸다. 노 중 알부민 수준은 반-정량적 "알부스틱스(Albustix)" 방법 (**도 3a**), 및 정량적

ELISA 분석법 (도 3b)을 사용하여 평가하였다. 도 3a-3f는 항-CD52 항체로 처리된 마우스에서의 뇨 알부민 수준이 비히클 (PBS) 및 대조군인 래트 IgG로 처리된 마우스에서 관찰된 것보다는 낮았다는 것을 나타낸다. 도 3g는 연구 종결시, 비히클로 처리된 마우스 중 80% 및 래트 IgG로 처리된 마우스 중 89%인 것과 비교하여 항-CD52 항체로 처리된 마우스 중 단지 50%에서만 유의적인 알부민뇨 (>40 mg/dL/일)가 발생하였다는 것을 나타낸다.

도 4는 래트 항-마우스 CD52 항체로 처리하는 것이 dsDNA에 대한 자가항체 발생에는 어떤 검출가능한 효과도 없다는 것을 나타낸다. 항-마우스 CD52로 처리된 마우스의 항체 역가는 비히클 및 래트 IgG로 처리된 마우스의 역가와 유사하였다. 오직 시클로포스파미드로 처리한 것만이 dsDNA에 대한 혈청 항체의 상승을 감소시켰다.

도 5는 래트 항-마우스 CD52 항체로 처리하는 것이 NZB/NZW1 마우스의 생존에 유의적으로 도움이 되었다는 것을 나타낸다. 항-마우스 CD52 항체를 2회 투여하였을 때의 생존 수준 (생존율 75%)과 시클로포스파미드를 매주 주사하였을 때의 생존 수준 (80%)은 유사하였다 (P 값 = 0.9218, 항-마우스 CD52 항체 대 시클로포스파미드). 대조군인 래트 IgG로 처리된 마우스의 생존율은 단지 20% 정도밖에 되지 않았다 (P 값 = 0.0401, 항-마우스 CD52 항체 대 대조군인 래트 IgG) (도 5).

도 6a-6c는 수집된 마우스의 신장에 대한 조직학적 검사를 나타낸다. 처리군들 사이에는 사구체병증, 간질성 염증 또는 단백질 원주 중증도 점수의 중앙값에 있어 통계학적 어떤 유의적인 차이도 없었지만, 도 6a에 나타난 바와 같이, 항-마우스 CD52 항체 및 시클로포스파미드로 처리하였을 때에는 래트 IgG 및 비히클 대조군과 비교하여 사구체병증 점수 중앙값이 감소한 것으로 나타났다. 도 6b에 나타난 바와 같이, 시클로포스파미드 처리군에서도 또한 간질성 염증이 감소한 것으로 관찰되었다.

도 7a-7c는 신장에 침윤하는 FoxP3⁺ 조절 T 세포가 증가하였다는 것을 나타낸다. CD4⁺, CD8⁺, 및 FoxP3⁺ 세포 존재 여부를 알기 위해 마우스 신장을 면역형광 방식으로 태깅된 항체를 사용하여 염색하였다. 신장 절편을 맵 검 방식으로 양성 세포의 상대적인 존재비에 대해 0부터 4까지의 등급으로 점수를 매겼다. 시클로포스파미드로 처리하였을 때 신장에 침윤하는 CD4⁺, CD8⁺, 및 FoxP3⁺ 세포는 현저하게 감소하였다. 그에 비해, 항-CD52 항체로 처리하였을 때에는 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구의 신장에서의 침윤을 막지는 못했지만, 조절 T 세포에 대한 마커인 FoxP3에 대하여 양성을 띠는 세포의 존재는 증가하였다.

도 8a-8b는 NZB/NZW1 마우스에서 상이한 용량 수준 (1 mg/kg, 5 mg/kg 및 10 mg/kg)의 모노클로날 마우스 항-마우스 CD52 항체 (클론 W19)에 의한 효과적인 림프구 고갈을 나타낸다. 혈액에서의 경우 (도 8a), 5 mg/kg 및 10 mg/kg 용량을 통해 모든 림프구성 군집이 용량에 의존하는 방식으로 고갈됨으로써 모든 세포 유형 (CD4⁺ 세포, CD8⁺ 세포, NK 세포 및 B 세포)이 거의 완전하게 고갈되는 것으로 관찰되었다. 비장에서의 경우 (도 8b), 유사하게 용량에 의존하는 방식으로 고갈된 것이 관찰되었다. 특히, 비장에서는 CD4⁺ 세포 및 CD8⁺ T 세포, 둘 모두가 유의적으로 고갈된 것이 관찰된 반면, 검사된 모든 용량 수준에서 B 세포는 보다 적게 고갈된 것으로 보였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

발명의 상세한 설명

[0015]

본 발명은 대상체에게 항-CD52 항체를 투여하는 것과 관련된 본 발명자들의 발견에 기초한다. 본 발명자들은 항-CD52 항체가 마우스 루푸스 모델에서 FoxP3⁺ 조절 T 세포의 국소 염증 조직 (신장)에서의 침윤을 증가시킨다는 것을 발견하게 되었다. 본 발명자들은 또한 항-CD52 항체를 사용한 치료가 상기 마우스 모델에서 뇨 단백질 및 알부민 수준을 감소시킬 수 있다는 것도 발견하게 되었다.

[0016]

따라서, 본 발명은 환자 (예를 들어, 인간 환자)에서 항-CD52 항체를 사용하여 루푸스를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 치료법은 FoxP3+ 조절 T 세포를 국소 염증 조직, 예를 들어, CNS, 신장, 심장, 및 간으로 동원하는 데 도움을 줄 것이며, 그로써 루푸스 환자에서 증상은 경감되거나, 예방될 것이다. 일부 실시양태에서, 본 치료법은 루푸스 환자에서 뇨 단백질 및/또는 알부민 수준을 감소시키는 데 도움을 줄 것이다. 일부 실시양태에서, 본 치료법은 루푸스 환자에서 림프구를 고갈시킬 것이다. 본 발명의 추가의 실시양태에서, 환자의 면역계 조절을 개선시키고, 자가면역 증상을 경감시키기 위해 FoxP3+ 조절 T 세포의 성장 및/또는 활성화를 자극하는 작용제를 사용하여 환자를 치료할 수 있다.

- [0017] **루푸스 소견**
- [0018] 본 발명의 방법은 제한없이, 전신 홍반 루푸스; 루푸스 신장염; 피부 홍반 루푸스; CNS 루푸스; 심혈관, 폐, 간, 혈액학적, 위장관 및 근골격 소견; 신생아 홍반 루푸스; 소아 전신 홍반 루푸스; 약물 유도성 홍반 루푸스; 항-인지질 증후군; 및 루푸스 소견을 유발하는 보체 결핍 증후군을 포함하는, 다양한 루푸스 소견을 앓는 환자에서 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 루푸스 에피소드를 앓는 환자, 또는 불활성 루푸스를 앓는 환자를 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0019] **항-CD52 항체 요법**
- [0020] 본 발명의 방법에서, CD52에 대한 항체는, 이화된 기관 시스템 (예를 들어, 루푸스 신장염의 경우 혈뇨 및/또는 단백뇨)을 모니터링하고/거나, 수개의 기관 시스템 전역의 질환 중증도에 대한 복합 점수를 제공하는 질환 활성 지수 (예를 들어, BILAG, SLAM, SLEDAI, ECLAM)를 사용함으로써 측정된 바, 임상적 종점에 도달할 수 있도록 하는 치료 유효량으로 환자에게 투여된다. 예를 들어, 문헌 [Mandl et al., "Monitoring patients with Systemic lupus erythematosus" in *Systemic lupus Erythematosus*, 4th edition, pp. 619-631, R. G. Lahita, Editor, Elsevier Academic Press, (2004)]를 참조한다. 항-CD52 항체의 치료 유효량은 치료받은 대상체가 하나 이상의 원하는 임상적 종점에 도달할 수 있도록 하는 데 도움을 주는 양이다.
- [0021] CD52는 정상 및 악성, 둘 모두의 B 및 T 림프구에 의해 고수준으로 발현되는 세포 표면 단백질이다 (문헌 ([Hale et al., *J Biol regul Homeost Agents* **15**:386-391 (2001)]; [Huh et al., *Blood* **92**: Abstract 4199 (1998)]; [Elsner et al., *Blood* **88**:4684-4693 (1996)]; [Gilleece et al., *Blood* **82**:807-812 (1993)]; [Rodig et al., *Clin Cancer Res* **12**:7174-7179 (2006)]; [Ginaldi et al., *Leuk Res* **22**: 185-191 (1998)]). CD52는 단핵구, 대식세포, 및 호산구에 의해서는 보다 낮은 수준으로 발현되고, 성숙한 자연살 (NK) 세포, 중성구, 및 혈액 줄기 세포 상에서는 거의 발현되지 않는 것으로 밝혀져 있다 (상기 문헌 동일). CD52는 또한 부고환 및 정관 중의 상피 세포에 의해서도 생산이 되며, 생식관을 통과하는 동안 정자에 의해서도 획득된다 (문헌 [Hale et al., 2001, 상기 문헌 동일]; [Domagala et al., *Med Sci Monit* **7**:325-331 (2001)]). CD52의 정확한 생물학적 작용은 여전히 불명확한 상태로 남아있지만, 일부 증거를 통해 CD52가 T 세포 이동 및 공자극에 관여할 수 있다고 제안되고 있다 (문헌 ([Rowan et al., *Int Immunol* **7**:69-77 (1995)]; [Masuyama et al., *J Exp Med* **189**:979-989 (1999)]; [Watanabe et al., *Clin Immunol* **120**:247-259 (2006)]).
- [0022] 인간 CD52 항원 폴리펩티드 서열의 예는 하기와 같다:
- MKRFLFLLLT ISLLVMVQIQ TGLSGQNDTS QTSSPSASSN
ISGGIFLFFV ANAIHLCFCF S (서열 1; NCBI 수탁번호 NP_001794).
- [0023]
- [0024] 성숙한 인간 CD52 항원은 상당히 더 짧고, 단지 12개의 아미노산만을 가지고 있을 뿐이며 (문헌 [Xia et al., *Eur J Immunol*. **21**(7):1677-84 (1991)]), 이는 글리코실화되어 있다. 예를 들어, 성숙한 인간 CD52 항원은 하기 폴리펩티드 서열을 가질 수 있다: GQNDTSQTSSPS (서열 2).
- [0025] 본 발명에 포함된 항-CD52 항체 요법은 임의의 적합한 이소형, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4 중의 항체를 비롯한 항-CD52 항체를 사용하는 임의의 치료 요법을 포함한다. 유용한 항체로는 또한 그의 불변/Fc 영역이 변형되어 있고, 동일하거나, 그보다 더 우수한 친화도로 중성구 및/또는 NK 세포 상의 Fc 수용체에 결합하며, 다르게는 개선된 항체-의존 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및 보체-의존 세포독성 (CDC) 작용을 가진 항체를 포함한다. 본 발명에 유용한 항-CD52 항체는 특이적으로 CD52에 결합하고, 특이적으로 비-CD52 분자에는 결합하지 않는 항체이다. 예를 들어, 유식세포 측정법에 의해 항체의 CD52+ 세포에의 결합에 대한 EC₅₀을 측정함으로써 항-CD52 항체와 CD52 사이의 특이적인 결합을 측정할 수 있다. 특이적인 결합이라는 것은 예를 들어, 0.5-10 μ g/ml 범위의 EC₅₀에 의해 나타낼 수 있다. 임상 적용을 위해, 항-CD52 항체는 제약상 허용되는 순도를 가진 모노클로날인 것이 바람직할 수 있다. 항체는 치료 유효량으로, 예를 들어, 원하는 임상적 종점에 도달할 수 있도록 하는 데 도움을 주는 양으로, 임의로는 제약상 허용되는 담체와 함께 임의의 적합한 방법으로 투여될 수 있다.
- [0026] 치료하고자 하는 환자가 인간일 때, 항-CD52 항체는 특이적으로 인간 CD52에 결합하는 것이 바람직하다. 인간 환자에게 반복 투여할 때 면역원성을 최소화시키기 위해서는 항체가 키메라화된 항체 (예를 들어, 무린 항체의 불변 도메인이 인간 항체의 것으로 치환된 무린 항-CD52 항체), 인간화된 항체 (인간 항체의 CDR이 무린 항-인

간 CD52 항체로부터의 것으로 치환된 것인 인간 항체), 또는 전체 인간 항체인 것이 바람직할 수 있다. 유용한 항체의 예로는 알렘투주맵 (예를 들어, CAMP ATH-1H[®] 및 그의 변이체)이 있다. 알렘투주맵은 28 kD의 글리코실화된 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-결합 세포 표면 단백질인 인간 CD52 (hCD52)에 대한 재조합 인간화된 IgG1 모노클로날 항체이다 (문헌 ([Hale et al., *Tissue Antigens* **35**:118-27 (1990)]; [Hale et al., 2001, 상기 문헌 동일])). 알렘투주맵은 현재 B-세포 만성 림프성 백혈병에 대한 제1선 치료법으로서 승인을 받은 상태이며, 다발 경화증 치료용으로서 III상 임상 시험 중에 있다. 유용한 항체로는 제한없이, hCD52에의 결합에 대해 알렘투주맵과 경쟁하고/거나, 알렘투주맵과 동일 또는 중복 에피토프에, 또는 hCD52 상의 다른 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 예를 들어, 국제 출원 PCT/US2010/034704에 기술되어 있는 인간화된 항체가 사용될 수 있다.

[0027] 인간 항-hCD52 항체는 예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE)[®] 기술 (암젠: 캘리포니아주 사우전드 오크스)을 사용하여 당업자에 의해 제조될 수 있다. 키메라 및 인간화된 항-hCD52 항체는 잘 확립된 항체 기술을 사용함으로써 예를 들어, 래트 항-hCD52 항체 또는 마우스 항-hCD52 항체로부터 제조될 수 있다.

[0028] 원하는 경우, 본 발명에서 유용한 항-CD52 항체는 요법, 진단, 또는 분석에서 모니터링이 될 수 있도록 하는 검출가능한 표지를 포함할 수 있다. 적합한 검출가능한 표지로는 예를 들어, 방사성동위원소 (예를 들어, 인듐-111, 테크네튬-99m 또는 요오드-131), 양전자 방출 표지 (예를 들어, 붕소-19), 상자성 이온 (예를 들어, 가돌리늄 (III), 망간 (II)), 에피토프 표지 (태그), 친화성 표지 (예를 들어, 비오틴, 아비딘), 스핀 표지, 효소, 형광기, 또는 화학발광기를 포함한다. 표지가 사용되지 않을 경우, 표면 플라즈몬 공명, ELISA, 유식세포 측정법, 또는 다른 적합한 방법에 의해 복합체 형성을 측정할 수 있다. 본 발명에 사용되는 항-CD52 항체는 또 다른 치료제, 예를 들어, 생체활성 화합물 (예를 들어, 사이토카인, 및 세포독성제)에 접합될 수 있다. 본 발명에 사용되는 항-CD52 항체는 또한 예를 들어, 화학 반응 또는 유전적 변형에 의해, 항체의 약동학적 성질, 예를 들어, 반감기를 개선시키는 다른 부분 (예를 들어, 폐결화 부분)에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 사용되는 항-CD52 항체는 예를 들어, 화학적 접합 또는 유전적 변형을 통해 적합한 사이토카인에 연결될 수 있다 (예를 들어, 프레임내 사이토카인의 코딩 서열을 항체 코딩 서열에 부가함으로써 항체:사이토카인 융합 단백질 생성).

[0029] **FoxP3⁺ 조절 T 세포의 침윤 증가**

[0030] 본 발명자들은 항-CD52 항체가 FoxP3⁺ 조절 T 세포의 국소 조직, 예를 들어, 염증 또는 조직 손상 부위에서의 침윤을 증가시키는 것을 비롯하여, 항-CD52 항체가 다른 T 세포와 비교하여 FoxP3⁺ 조절 T 세포를 증가시키는 경향이 있음을 발견하게 되었다. 조절 T 세포 (이는 또한 "Treg" 또는 억제 인자 T 세포)는 접촉-의존 또는 접촉-독립 (예를 들어, 사이토카인 생산) 기전을 통해 다른 림프구성 세포의 증식 및/또는 작용을 억제시킬 수 있는 세포이다. $\gamma \delta$ T 세포, 자연살 T (NKT) 세포, CD8⁺ T 세포, CD4⁺ T 세포, 및 이중 음성 CD4⁻CD8⁻ T 세포를 비롯한, 여러가지 유형의 조절 T 세포가 기술된 바 있다. 예를 들어, 문헌 [Bach et al., *Immunol* **3**:189-98 (2003)]을 참조할 수 있다. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 조절 T 세포는 "천연적으로 발생된" 조절 T 세포로서 지칭되며; 상기 세포는 CD4, CD25 및 포크헤드계 전사 인자 FoxP3 (포크헤드 박스 p3)를 발현한다.

[0031] 치료하는 자가면역 질환의 증상을 감소시키기 위해서는 Treg를 증가시키는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, FoxP3⁺ (예를 들어, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) 조절 T 세포를 자극하는 작용제를 환자에게 투여할 수 있다. 그러한 작용제는 예를 들어, 상기 T 세포를 활성화시킬 수 있고, 상기 세포 개체수를 확장시킬 수 있고, 상기 세포를 이동시키고, 그의 순환을 증가시킬 수 있고/거나, 상기 세포를 표적 부위로 동원시킬 수 있다. 그러한 작용제의 예로는 라파마이신, 활성 또는 잠재성을 띠는 TGF- β (예를 들어, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, 및 TGF- β 5), IL-10, IL-4, IFN- α , 비타민 D3, 텍사메타손, 및 미코페놀레이트 모페틸이 있다 (예를 들어, 문헌 ([Barrat et al., *J Exp Med* **195**:603-616 (2002)]; [Gregori et al., *J Immunol* **167**: 1945-1953 (2001)]; [Battaglia et al., *Blood* **105**: 4743-4748 (2005)]; [Battaglia et al., *J Immunol* **177**: 8338-8347 (2010)]) 참조). 본 발명의 일부 실시양태에서, Treg 증가는 하나의 또는 다중의 염증 부위 (예를 들어, 혈액, 중추 신경계, 심장, 간, 관절, 신장, 피부, 장관, 또는 혈관계)에서 일어날 수 있다.

[0032] Treg-자극제는 항-CD52 항체를 사용하는 치료 이전, 그 동안, 또는 그 이후에 투여될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 항-CD52 항체는 차별적으로 FoxP3⁺ Treg는 보존시키면서, 차별적으로 T 효과기 세포 및 B 세포는 고갈시

킨다 (예를 들어, 문헌 ([Hu et al., *Immunology* 128: 260-270 (2009)]). 따라서, 항-CD52 항체 및 Treg-자극제, 둘 모두를 사용하는 치료 요법이 환자의 면역계를 재-평형화시킴으로써 루푸스 치료, 또는 다른 자가면역 질환 치료의 효능을 현저하게 증진시킬 수 있다.

[0033] **노 단백질 및/또는 알부민노 수준 감소**

[0034] 루푸스 환자는 노 중 과량의 혈청 단백질 또는 알부민이 존재하는 것인 단백노 또는 알부민노를 보일 수 있다. 루푸스에서 노 중의 단백질 또는 알부민 수준을 측정할 바, 신장 손상이 가장 급성의 손상 중 하나이며, 사망의 적어도 50%를 차지한다. (항-CD52 항체를 단독으로 사용하거나, 또는 항-CD52 항체 및 Treg-자극제의 조합물을 사용하는) 본 발명의 치료 방법은 환자의 노 단백질 및/또는 알부민 수준을 치료 이전 수준과 비교하여 적어도 25%, 50%, 75% 또는 90% 만큼 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-CD52 항체 투여 이전의 노 단백질 수준은 적어도 500 mg/L/일 (예를 들어, 1,000 mg/L/일, 2,000 mg/L/일, 또는 3,000 mg/L/일)보다 크거나, 또는 그와 동일한 수준이다. 항-CD52 항체를 사용한 초기 치료 이후, 노 단백질 수준은 500 mg/L/일 미만, 또는 1,000 mg/L/일 미만으로 감소될 수 있다.

[0035] **조합 요법**

[0036] 본 발명의 일부 측면에서, 항-CD52 항체는 조합 요법으로 하나 이상의 추가의 치료제 (예를 들어, 면역억제제)와 함께 루푸스 환자에게 공투여될 수 있다. 제2 치료제는 예를 들어, 코르티코스테로이드, 비-스테로이드성 항-염증 약물, 질환 조절 항-류마티스성 약물 (DMARD) (예를 들어, 시클로포스파미드 또는 미코페놀산), 면역억제제 (예를 들어, 메토트렉세이트 및 아자티오프린), B 또는 T 림프구를 표적하는 분자 (예를 들어, CD20 항체, 예를 들어, 리툭산(Rituxan)[®]으로도 공지되어 있는 리툭스맙(Rituximab), 항-BLys 항체, 또는 항-BAFF-R 항체)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 항-CD52 항체에 의해 매개되는 림프구 고갈 이후 발생하는 재구성 과정을 편중, 조작, 및/또는 증강시키는 것, 예를 들어, 사이토카인 (예를 들어, IL-7), 항-사이토카인 수용체 항체, 또는 가용성 수용체일 수 있다 (예를 들어, 문헌 ([Sportes et al., "*Cytokine Therapies: Ann. N. Y. Acad Sci.* 1182:28-38 (2009)] 참조). 추가의 치료제(들)는 항-CD52 항체를 사용하는 치료 이전, 그 동안, 또는 그 이후에 투여될 수 있다.

[0037] 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 숙련가에 의해 보편적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에 기술하는 것과 동일하거나 등가인 방법 및 물질 또한 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있기는 하지만, 예시적인 방법 및 물질을 하기에 기술한다. 본원에서 언급된 모든 공개 문헌 및 다른 참고 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 상충되는 경우, 정의를 비롯한 본 명세서는 조정될 것이다. 다수의 문헌들이 본원에 참고로 포함되어 있지만, 이와 같이 포함하는 것이 이들 문헌 중 어느 것이 당업계의 통상의 일반 지식 중 일부를 형성한다는 것을 인정한다는 것은 아니다. 본 명세서 및 특허청구범위 전역에 걸쳐, "포함한다" 또는 파생어, 예를 들어, "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는"이라는 단어는 언급한 정수 또는 정수군을 포함하기는 하지만, 임의의 다른 정수 또는 정수군은 배제시키지 않는다는 것을 암시하는 것으로 이해되어야 한다. 물질, 방법, 및 실시에는 단지 예시적인 것이며, 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0038] **실시예**

[0039] 하기의 실시예는 본 발명의 방법 및 물질을 설명하기 위한 것이다. 당업자들에게는 명백하고, 당업계에서 보통 접하게 되는 기술된 조건 및 파라미터에 대한 적합한 변형 및 개조도 본 발명의 정신 및 범주 내에 포함된다.

[0040] **마우스 루푸스 모델**

[0041] NZB/NZWf1 마우스는 자발적인 루푸스 모델을 나타낸다. 노령화되어 가면서 상기 동물에서는 다양한 세포 항원에 대한 자가항체가 발생하게 되고, 결국에는 신장에 면역 복합체가 침착되어 점진적으로 치명적인 신장 질환이 발생하게 된다 (문헌 [Peutz-Kootstra et al., *J Lab Clin Med* 137: 244-260 (2001)]). 하기 실시예에서, 본 발명자들은 항-CD52 항체가 전신 루푸스 과정에 미치는 효과를 연구하기 위해 NZB/NZWf1 암컷 마우스를 사용하였다.

[0042] **항-CD52 항체**

[0043] 실시예 1-6에서는 모노클로날 래트 항-마우스 CD52 IgG2a 항체를 사용하였다. 래트 이소형이 마우스에서 효과기 작용 (예를 들어, 보체 고정 및 항체-의존 세포-매개 세포독성)에 대한 최적의 이소형은 아니었다. 실시예 7-8에서는, 모노클로날 IgG2a 마우스 항-마우스 CD52 항체를 사용하였다.

[0044] 실시예 1-6에서 본 발명자들은 NZB/NZWF1 마우스 (15주령, 잭슨 랩스(Jackson Labs))를 4개의 군으로 나누고, 상이한 시험 항목으로 상기 군들을 처리하였다 (표 1). 실시예 1-6에서는 시클로포스파미드, 질소 머스타드 알킬화제가 양성 대조군으로서 사용되었다. 시클로포스파미드는 각종 유형의 암, 및 루푸스를 비롯한 특정 자가면역 질병을 치료하기 위하여 사용하였다.

표 1

처리군 번호	시험 항목	투여량	군당 동물 마리수
1	PBS (비히클 대조군)	복강내 주사: 400 μ l	5
2	정상적인 래트 IgG (시그마(Sigma))	복강내 주사: 400 μ l의 350 μ g/mL 스탁 용액 (140 μ g/마우스 또는 ~ 3 mg/kg)	10
3	모노클로날 래트 항-마우스 CD52 항체	복강내 주사: 400 μ l의 측정된 350 μ g/mL* 스탁 용액 (140 μ g/마우스 또는 ~ 3 mg/kg)	9
4	시클로포스파미드	복강내 주사: 매주 200 μ l 염수 중 50 mg/kg. 마우스의 체중을 측정하여 투여량을 조절한다.	5

* 래트 IgG2a ELISA는, 스탁 용액 중의 전체 단백질 함량 중 단지 184 μ g/ml 만이 래트 IgG2a로 구성되어 있음을 나타내며, 이는 유효량이 1.7 mg/kg 정도로 낮을 수 있다는 것을 시사한다.

[0045]

[0046] 실시예 1-6의 시점은 하기와 같았다:

[0047] i) 19주령째에 시작하여, 그 이후 4주일마다, IgG 항-더블-스트랜드 DNA (항-dsDNA) 항체 역가를 평가하기 위하여 혈액을 개별 마우스로부터 수집하고, 단백뇨 및 알부민뇨를 측정하기 위해 대사 우리에서 24시간 동안 진행되는 뇨 수집을 수행하였다.

[0048] ii) 동물에서 dsDNA에 대한 항체의 유의적인 역가가 발생하기 시작하고/거나, 단백뇨가 상승하였을 때인 31주령째 시험 항목을 사용한 처리를 개시하였다. 정상적인 래트 IgG로 처리된 2군 및 래트 항-마우스 CD52 항체로 처리된 3군에 각각 총 2회에 걸쳐 주사하였다. 시클로포스파미드로 처리된 4군에는 연구 종결시까지 매주 주사하였다.

[0049] iii) 1차 항체 주사 이전에, 기준선 형광-활성화 세포 분류 (FACS) 분석을 위해 2군 및 3군으로부터 혈액을 수집하였다 (CD3, CD19 양성 세포에 대해 염색하고, 림프구 절대 개수를 계수하였다).

[0050] iv) 1차 항체 주사 이후 2일이 경과하였을 때, 2군 및 3군에 2차 항체 주사를 실시하였다. 2차 주사 이전에, 유식세포 측정법 분석법을 위해 2군 및 3군으로부터 혈액을 수집하였다 (CD3, CD19 양성 세포에 대해 염색하고, 절대 개수를 계수하고 그 계수값을 수집하였다). 유식세포 측정 염색을 위해 2군 중의 마우스 1마리 및 3군 중의 마우스 1마리로부터 유래되는 비장을 수집하였다. 연구 진행 과정 동안 빈사 상태가 된 임의의 동물을 희생시키고, 가능하다면 신장을 수집하였다. 마우스가 43주령이 되었을 때 연구를 종결하고, 조직학적 성질을 분석하기 위해 각 동물로부터 신장을 수집하였다.

[0051] **실시예 1: 래트 항-마우스 CD52 항체로 처리된 NZB/NZWF1 마우스에서 림프구 고갈 부족**

[0052] 모노클로날 래트 항-마우스 CD52 항체 처리로 CD52⁺ 림프구가 고갈되었는지 여부를 확인하기 위해 기준선에서, 래트 IgG 또는 래트 항-마우스 CD52의 1차 주사 이전에, 및 2일 후 항체의 2차 주사 이전에 혈액을 개별 마우스로부터 수집하였다. 혈액 샘플을 염색하고, 유식세포 측정법에 의해 분석하여 CD3⁺ T 세포 및 CD19⁺ B 세포의 절대 개수를 수득하였다. 50 μ l의 전혈 샘플을 RPMI 배지 중에서 10%의 정상적인 마우스의 혈청 및 0.05% 아지드화나트륨으로 차단시킨 후, 래트 항-마우스 CD3-APC 및 래트 항-마우스 CD19-PE (BD 파미젠(BD Pharminge: 캘리포니아주 샌디에고))로 염색하였다. FACSCaliburTM 시스템 (벡턴-딕킨슨(Becton-Dickinson: 캘리포니아주 샌디에고)) 상에서 염색에 대해 림프구를 분석하였다. 셀 퀘스트 프로 소프트웨어(Cell Quest Pro Software)

(백틴-디킨슨)로 데이터 분석을 실시하였다. 상기 결과를 통해 B 또는 T 림프구의 유의적인 고갈은 없었던 것으로 나타났다 (도 1a 및 1b).

[0053] **실시예 2: 단백질 및 알부민뇨 수준**

[0054] **A. 단백질 수준**

[0055] 제조사의 설명서 (마이크로프로테인-PR(Microprotein-PR): 시그마)에 따라 단백질 총 농도를 측정하도록 디자인된 발색 분석법을 사용하여 개별 마우스의 뇨 중 단백질의 수준을 측정하였다. 참조 표준을 사용하여 시험 샘플의 단백질 농도를 계산하였다. 측정시 림프구 고갈 부족에도 불구하고, 래트 항-마우스 CD52 항체로 처리하였을 때에는 총 뇨 단백질에 의해 측정된 바, 신장 질환의 진행은 성공적으로 억제된 것으로 나타났다 (도 2a-2e). 연구가 진행됨에 따라, 항-마우스 CD52로 처리된 마우스는 양성 대조군인 시클로포스파미드 처리군 중의 마우스의 수준과 유사한 뇨 단백질 수준을 보인 반면, 대조군인 래트 IgG로 처리된 마우스는 비히클 대조군인 마우스의 수준과 유사한 뇨 단백질 수준을 보였다 (도 2a-2e). 래트 IgG 중 67%, 그리고 비히클로 처리된 마우스 중 60%인 것과 비교하여 항-마우스 CD52 항체로 처리된 마우스 중 단지 38%만이, 그리고 시클로포스파미드로 처리된 마우스 중 20%가 중증 단백질 (>500 mg/dL/일)에 도달한 것으로 나타났다 (도 2f).

[0056] **B. 알부민뇨 수준**

[0057] 제조사의 설명서 (알부웰-M(Albuwell-M): 엑소셀 인코포레이티드(Exocell Inc.))에 따라 간접 경쟁 ELISA 키트를 사용하여 뇨 중 알부민의 수준을 평가하였다. 뇨 샘플 중 알부민의 농도는 공지된 뮤린 알부민 농도를 사용하여 얻은 표준 곡선으로부터 유추하였다 (도 3b). 반-정량적 "알부스틱스" 방법 (로슈 다이어그나스틱스(Roche Diagnostics)) (도 3a) 또한 사용하는데, 상기 방법에 따라 뇨 중에 존재하는 알부민의 양에 따라 변색되는 인디케이터 여과지 상에 뇨를 놓고, 이어서 그에 따른 점수를 0-6으로 할당하였다. 총 단백질 수준과 같이, 항-마우스 CD52 항체 처리는 NZB/NZWf1 마우스에서의 알부민뇨 발생을 억제시키는 데에도 또한 효과가 있었다 (도 3a-3g). 항-CD52 항체로 처리된 마우스에서의 뇨 알부민 수준은 비히클 및 래트 IgG로 처리된 마우스에서 관찰된 것보다는 낮았다. 그러나, 상기 군에서 관찰된 알부민뇨 억제는 시클로포스파미드 처리군 군에서의 억제만큼 크지는 않았다. 연구 종결시, 비히클로 처리된 마우스 중 80% 및 래트 IgG로 처리된 마우스 중 89%인 것과 비교하여 항-CD52 항체로 처리된 마우스 중 단지 50%에서만 유의적인 알부민뇨 (>40 mg/dL/일)가 발생하였다 (도 3g).

[0058] **실시예 3: 더블-스트랜드 DNA에 대한 항체 수준**

[0059] 개별 마우스로부터 유래된 혈청 샘플 중 dsDNA에 대한 IgG 항체의 역가를 ELISA에 의해 측정하였다. 마우스 dsDNA (더 잭슨 라보라토리(The Jackson Laboratory: 메인주 바하버))를 S1 뉴클레아제 (인비트로젠(Invitrogen: 캘리포니아주 칼즈배드))로 분해하여 임의의 ssDNA를 제거한 후, 이를 사용하여 4°C에서 밤새도록 96-웰 ELISA 플레이트의 웰을 코팅하였다 (100 μ L/웰 1 μ g/ml dsDNA). DNA가 잘 부착될 수 있도록 플레이트를 물 중 0.01% 프로탄인 술페이트로 전처리하였다. 코팅 후, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 2.5% 소혈청 알부민 차단 완충액과 함께 인큐베이션시키고, 세척하였다. 이어서, 100 μ L의 일련의 2배 혈청 희석액을 부분 웰에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하고, 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 염소 항-마우스 IgG (피어스(Pierce: 일리노이주 록퍼드))를 첨가하여 dsDNA에 결합된 항체를 검출하였다 (37°C에서 1시간 동안). 세척한 후, HRP 기질을 첨가하고, 이중 파장 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이스즈(Molecular Devices: 캘리포니아주 서니베일)) 상에서 650 nm의 참조 파장을 사용하여 490 nm에서 발색 생성물의 광학 밀도 (OD)를 판독하였다. 항체 역가는 OD가 0.1 이상인 혈청 희석율의 역수로서 정의하였다. 정상적인 마우스의 혈청을 음성 대조군으로서 사용하고 (역가 \leq 200, 시험된 것 중 희석율이 가장 낮다), 노령의 루푸스 마우스로부터 유래된 혈청을 폴링시켜 얻은 폴링된 혈청을 양성 대조군으로서 사용하였다 (역가 = 25,600). 래트 항-마우스 CD52 항체로 처리하였을 때, dsDNA에 대한 자가항체 발생에는 어떤 검출가능한 효과도 없었다 (도 4). 항-마우스 CD52로 처리된 마우스의 항체 역가는 비히클 및 래트 IgG로 처리된 마우스의 역가와 유사하였다. 오직 시클로포스파미드로 처리한 것만이 dsDNA에 대한 혈청 항체의 상승을 감소시켰다 (도 4).

[0060] **실시예 4: 생존 개선**

[0061] 래트 항-마우스 CD52 항체로 처리하였을 때, NZB/NZWf1 마우스는 우수한 내성을 띠었다. 항-마우스 CD52 항체를 2회 투여하였을 때의 생존 수준 (생존율 75%)과 시클로포스파미드를 매주 주사하였을 때의 생존 수준 (80%)은 유사하였다 (P 값 = 0.9218, 항-마우스 CD52 항체 대 시클로포스파미드) (도 5). 대조군인 래트 IgG로 처리

된 마우스의 생존율은 단지 20% 정도밖에 되지 않았다 (P 값 = 0.0401, 항-마우스 CD52 항체 대 대조군인 래트 IgG) (도 5). 그에 비해, 비히클로 처리된 마우스의 생존율은 60%로 나타났는데 (도 5), 이는 대조군인 래트 IgG 군에서 대량의 면역글로불린을 주사한 것이 아마도 신장에 스트레스를 가함으로써 질환을 악화시켰을 수도 있는 반면, 동량의 항-마우스 CD52 물질은 치료학상 도움이 되었다는 것을 시사한다.

[0062] **실시예 5: 신장에 대한 조직학적 검사**

[0063] 희생시켰을 때 신장을 수집하고, 이를 10% 중성의 완충처리된 포르말린 중에 고정시킨 후, 파라핀에 포매시켰다. 절편을 5 μ m 두께로 절단하고, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E), 포스포텡스텐산 헤마톡실린 (PTAH) 및 과요오드산 쉬프 (PAS) 염색으로 염색하였다. 연구 진행 과정 동안 음성 대조군 (비히클 및 래트 IgG) 중의 동물 몇마리는 틀림없이 희생되었거나, 또는 사망한 것으로 나타났다. 그 결과, 연구 종결시에는 이용가능한 신장이 거의 없었던 바, 통계적 검증력에는 한계가 있었다.

[0064] 수집된 신장을 추가로 검사하였다. 처리군들 사이에는 사구체병증, 간질성 염증 또는 단백질 원주 중증도 점수의 중앙값에 있어 통계학상 어떤 유의적인 차이도 없었다 (도 6a-6c). 그러나, 일정한 경향이 있는 것으로 뚜렷이 나타났다. 항-마우스 CD52 항체 및 시클로포스파미드로 처리하였을 때에는 래트 IgG 및 비히클 대조군과 비교하여 사구체병증 점수 중앙값이 감소한 것으로 나타났다 (도 6a). 시클로포스파미드 처리군에서도 또한 간질성 염증이 감소한 것으로 관찰되었다 (도 6b).

[0065] **실시예 6: 신장에서의 FoxP3⁺ 조절 T 세포 증가**

[0066] CD4⁺, CD8⁺, 및 FoxP3⁺ 세포 존재 여부를 알기 위해 실시예 5에서 수득한 신장 절편을 면역형광 방식으로 태깅된 항체를 사용하여 추가로 염색하였다. CD4 및 CD8 양성 세포를 염색하기 위해, 냉동된 신장 절편을 아세톤으로 고정시키고, 이를 연속하여 퍼옥시다제 (다코(Dako)), 아비딘, 비오틴 (바이오키어(Biocare)) 및 단백질 (다코) 블록과 함께 인큐베이션시킨 후, 비오틴화된 래트 항-마우스 CD4 (클론 L3T4; BD 파미젠) 또는 비오틴화된 염소 항-마우스 CD8 (클론 Ly-2; BD 파미젠), 스트렙타비딘-HRP 및 DAB (3-3'-디아미노벤지딘)과 인큐베이션시켜 양성 세포를 갈색으로 염색하였다. FoxP3 양성 세포를 염색하기 위해, 냉동된 신장 절편을 10% 중성의 완충처리된 포르말린으로 고정시키고, 이를 연속하여 퍼옥시다제 및 단백질 블록과 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 래트 항-마우스 FoxP3 항체를 첨가한 후 (e바이오사이언스(eBioscience)), 마크(Mach)-2 HRP-접합된 항-토끼 항체 (바이오키어) 및 DAB를 첨가하여 양성 세포를 갈색으로 염색하였다. 이어서, 모든 절편을 헤마톡실린으로 염색시킴으로써 세포를 시각화하였다. 절편을 맵검 방식으로 양성 세포의 상대적인 존재비에 대해 0부터 4까지의 등급으로 점수를 매겼다. 시클로포스파미드로 처리하였을 때 신장에 침윤하는 CD4⁺, CD8⁺, 및 FoxP3⁺ 세포는 현저하게 감소하였다 (도 7a-7c). 그에 비해, 항-CD52 항체로 처리하였을 때에는 CD4⁺ 및 CD8⁺ 림프구의 신장에의 침윤을 막지는 못했지만, 조절 T 세포에 대한 마커인 FoxP3에 대하여 양성을 띠는 세포의 존재는 증가하였다 (도 7a-7c).

[0067] **실시예 7: 모노클로날 마우스 항-마우스 CD52 항체로 처리된 NZB/NZWf1 마우스에서의 림프구 고갈**

[0068] 조직내에서(in-house) 생성된 모노클로날 IgG2a 마우스 항-마우스 CD52 항체 (클론 W19)를 사용함으로써 루푸스 마우스에서 마우스 CD52 표적을 통한 림프구 고갈이 쉽게 일어날 수 있는지 여부를 확인하는 고갈 실험을 수행하였다. NZB/NZWf1 마우스를 비히클, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 또는 10 mg/kg의 모노클로날 마우스 항-마우스 CD52 항체로 처리하였다. 처리 후 3일이 경과하였을 때, 비장 세포 및 말초 혈액을 수집하고, 유식세포 측정법을 사용하여 림프구 고갈 정도를 평가하였다. 혈액 및 비장, 둘 모두 모든 용량 수준의 항체에서 림프구 고갈이 유의적인 수준으로 일어난 것이 관찰되었다. 혈액에서의 경우 (도 8a), 5 mg/kg 및 10 mg/kg 용량을 통해 모든 림프구성 군집이 용량에 의존하는 방식으로 고갈됨으로써 모든 세포 유형이 거의 완전하게 고갈되는 것으로 관찰되었다. 비장에서의 경우, 유사하게 용량에 의존하는 방식으로 고갈된 것이 관찰되었다 (도 8b). 비장에서는 CD4⁺ 세포 및 CD8⁺ T 세포, 둘 모두가 유의적으로 고갈된 것이 관찰된 반면, 검사된 모든 용량 수준에서 B 세포는 보다 적게 고갈된 것으로 보였다.

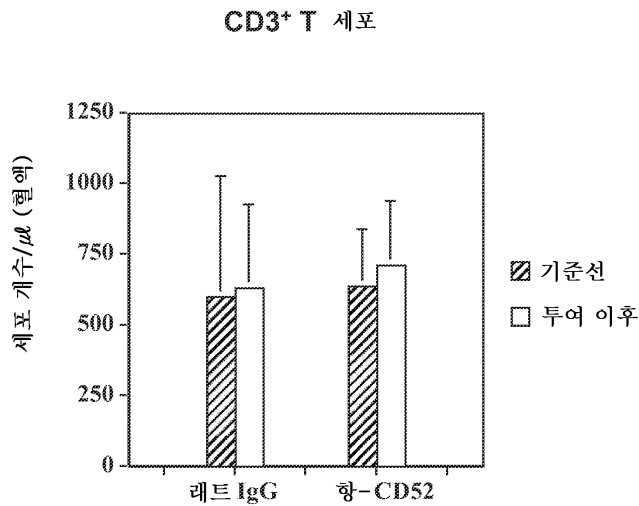
[0069] **실시예 8: NZB/NZW 암컷 마우스에서의 항-마우스 CD52 항체의 효능 분석**

[0070] 실시예 7에서 사용된 모노클로날 항-마우스 CD52 항체가 NZB/NZWf1 마우스 루푸스 모델에서의 질환의 발생 및/또는 진행에 미치는 효과에 대해서 상기 항체를 추가로 시험하였다. 먼저, 현성 질환 발생 1주 전에 약 21주령된 마우스 10마리로 구성된 군에 10 mg/kg의, 대조군 항체 또는 모노클로날 마우스 항-마우스 CD52 항체를 2회

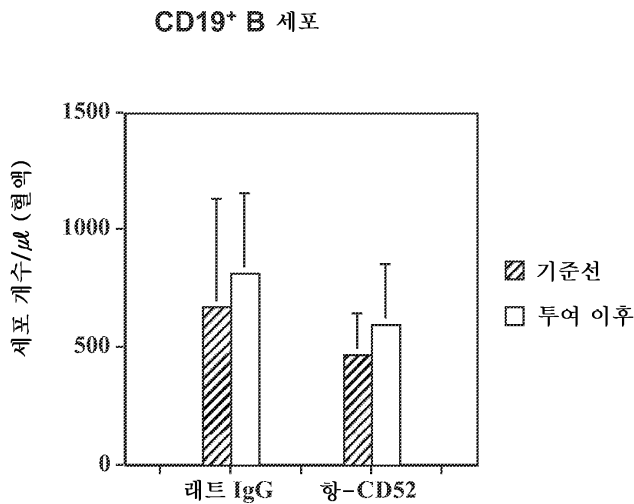
에 걸쳐 주사하였다. 이어서, 질환이 진행되는 동안으로부터 1주간의 시간을 두고 약 32주령된 마우스 10마리로 구성된 별개의 군에 10 mg/kg의, 대조군 항체 또는 모노클로날 마우스 항-마우스 CD52 항체를 2회에 걸쳐 주사하였다. 양성 대조군에서는 약 21주령째일 때를 출발로 하여 매주 50 mg/kg씩 시클로포스파미드를 투여하였다. 본 발명자들은 1) 유식세포 측정법에 의해 측정된 림프구 고갈; 2) ELISA에 의해 측정된, dsDNA에 대한 자가항체의 발생; 3) 단백질; 및 4) 신장의 조직학적 분석에 대한 관독 결과를 조사하고, 이러한 방식으로 CD52를 표적화하는 것이 어느 정도로 신장 손상을 완화시키는지에 대해서도 추가로 측정하였다.

도면

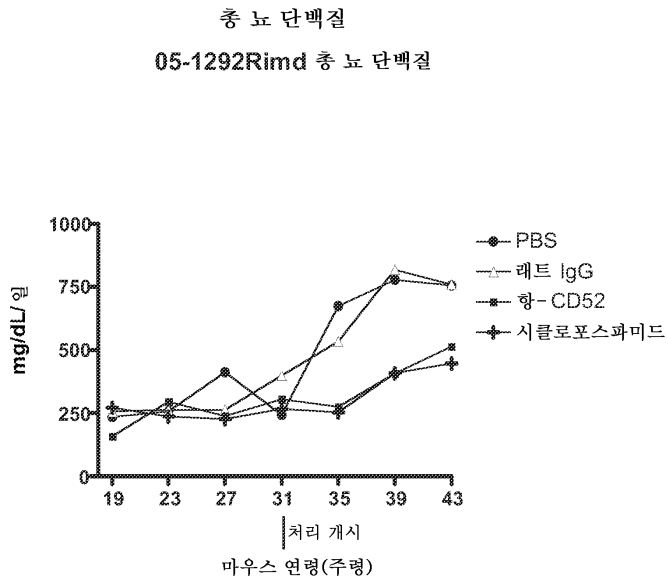
도면1a



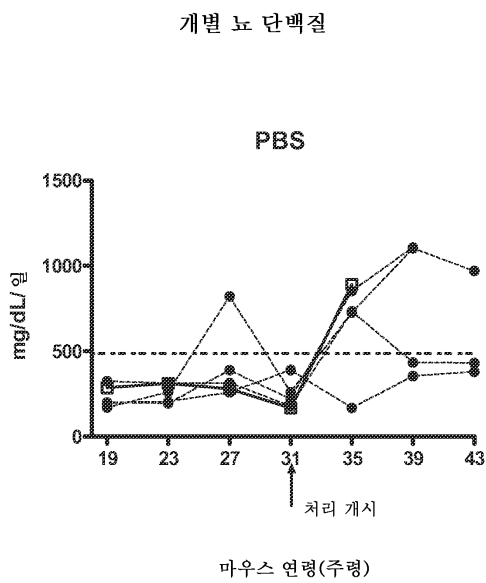
도면1b



도면2a

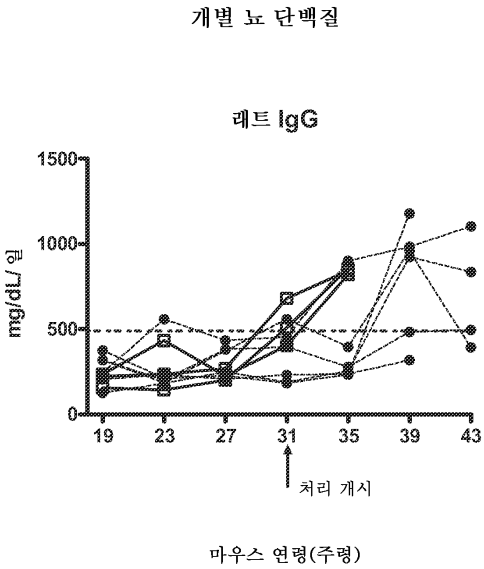


도면2b



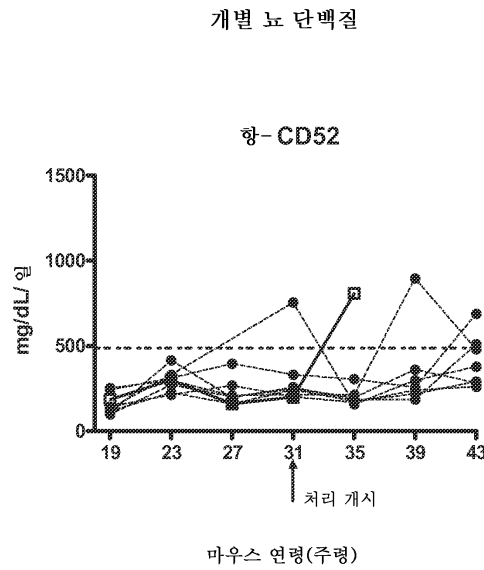
사각형 표시: 연구 진행 과정 동안 사망한 마우스
동그라미 표시: 연구 종결시까지 생존한 마우스

도면2c



사각형 표시: 연구 진행 과정 동안 사망한 마우스
동그라미 표시: 연구 종결시까지 생존한 마우스

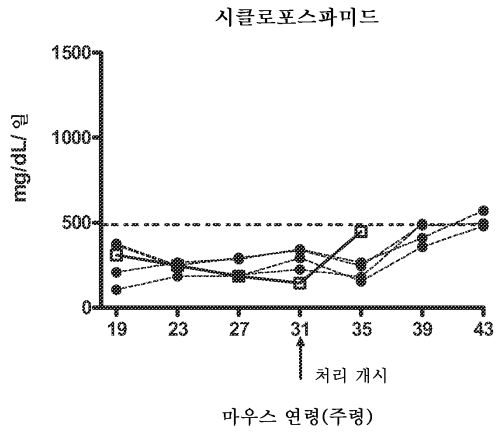
도면2d



사각형 표시: 연구 진행 과정 동안 사망한 마우스
동그라미 표시: 연구 종결시까지 생존한 마우스

도면2e

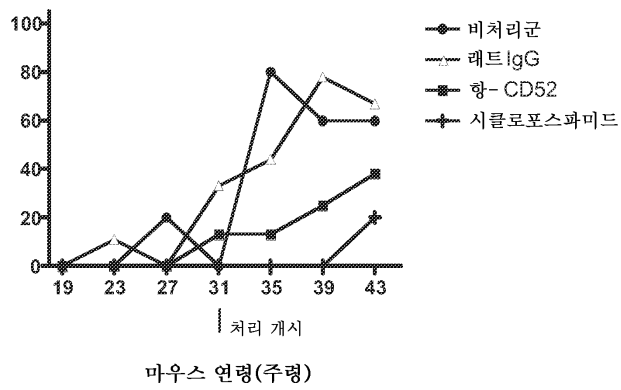
개별 뇨 단백질



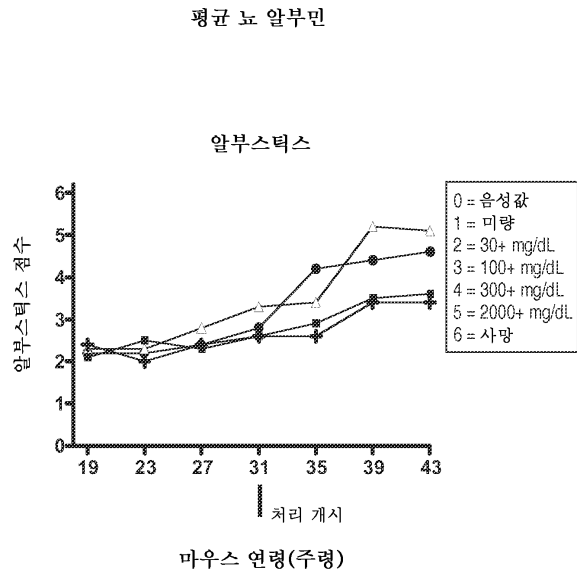
사각형 표시: 연구 진행 과정 동안 사망한 마우스
 동그라미 표시: 연구 종결시까지 생존한 마우스

도면2f

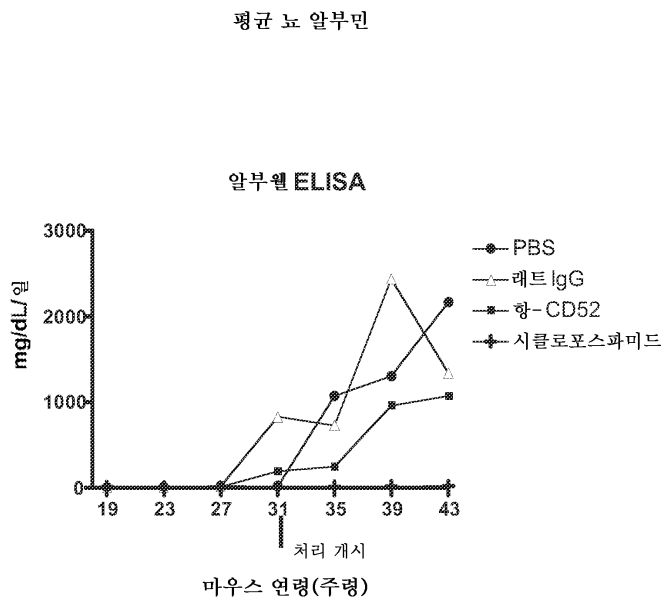
중증 단백뇨 (>500 mg/dL/일)를 앓는 마우스의 비율(%)



도면3a

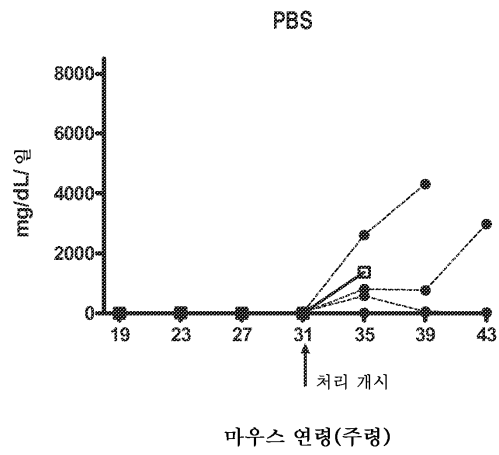


도면3b



도면3c

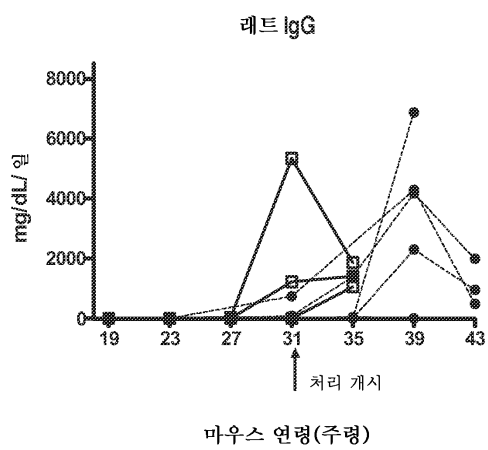
개별 뇨 알부민



사각형 표시: 연구 진행 과정 동안 사망한 마우스
동그라미 표시: 연구 종결시까지 생존한 마우스

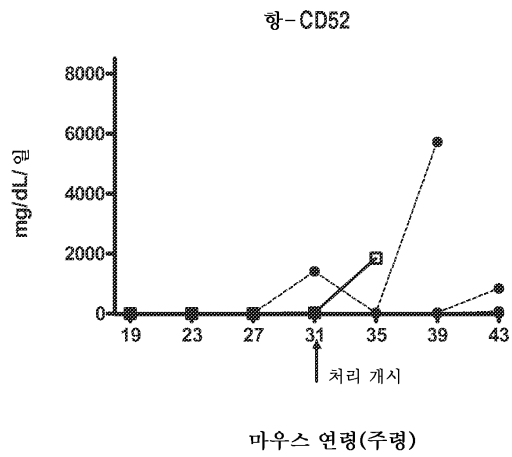
도면3d

개별 뇨 알부민



도면3e

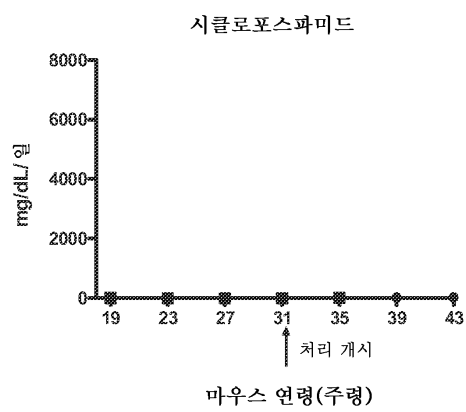
개별 뇨 알부민



사각형 표시: 연구 진행 과정 동안 사망한 마우스
 동그라미 표시: 연구 종결시까지 생존한 마우스

도면3f

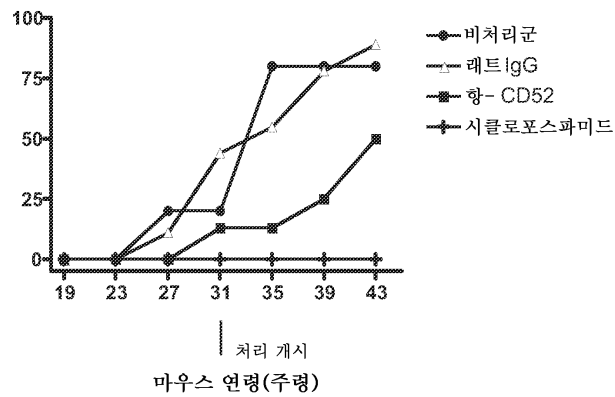
개별 뇨 알부민



사각형 표시: 연구 진행 과정 동안 사망한 마우스
 동그라미 표시: 연구 종결시까지 생존한 마우스

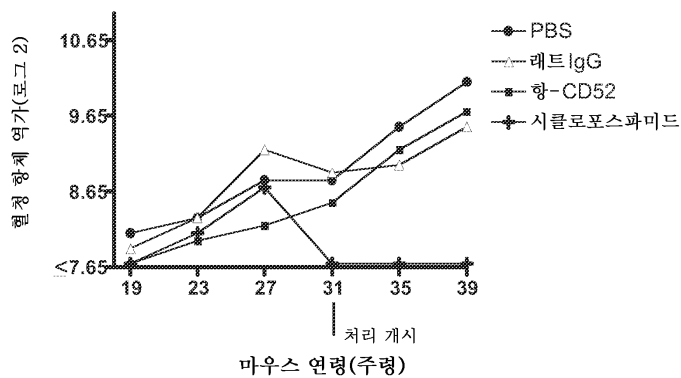
도면3g

중증 알부민뇨 (>40 mg/dL/일)를 앓는 마우스의 비율(%)

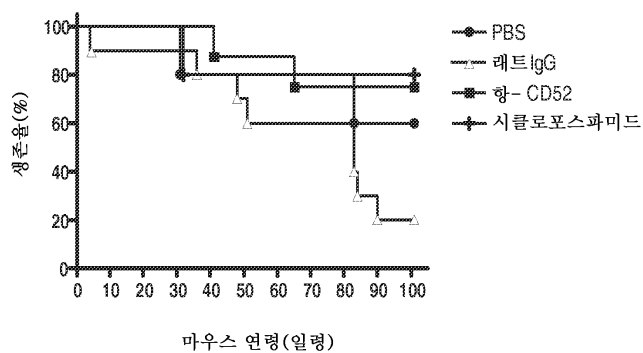


도면4

dsDNA에 대한 혈청 IgG 항체의 역가(로그 2)

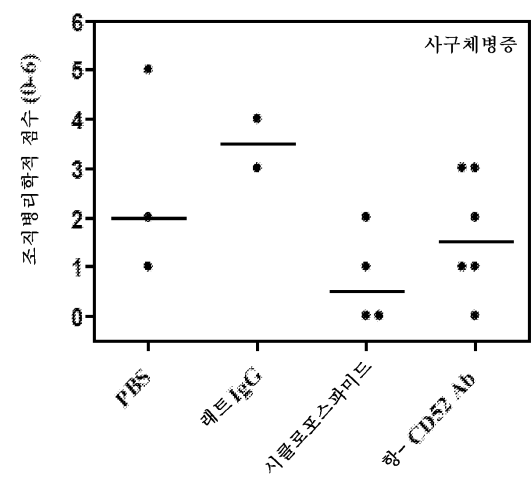


도면5

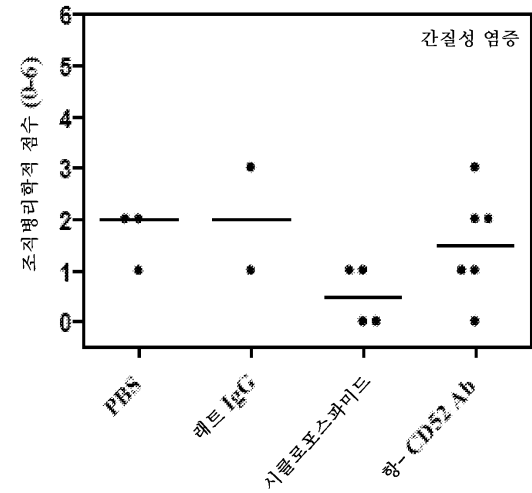


- 19 -

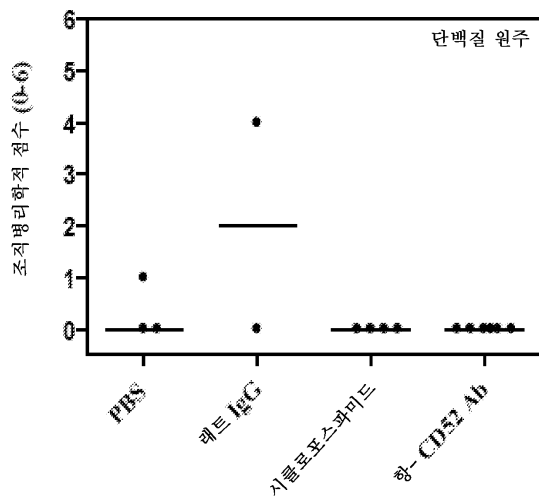
도면6a



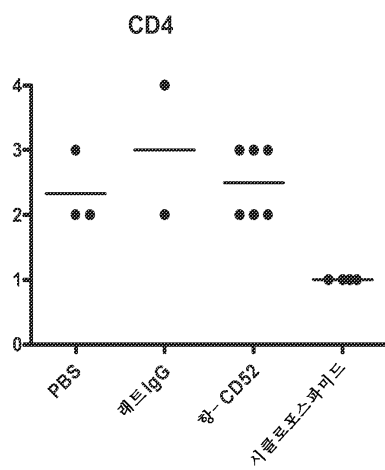
도면6b



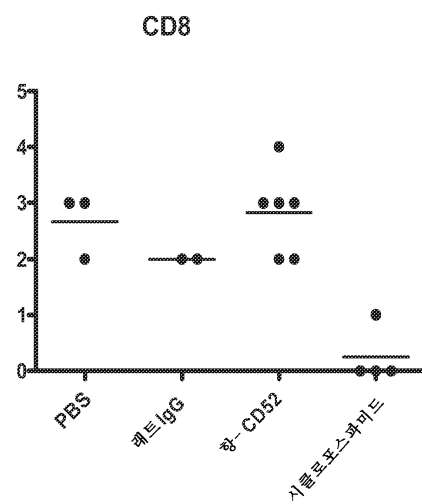
도면6c



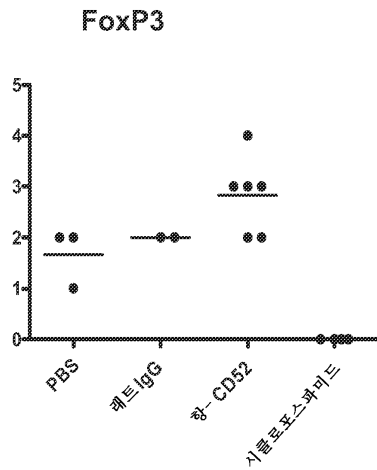
도면7a



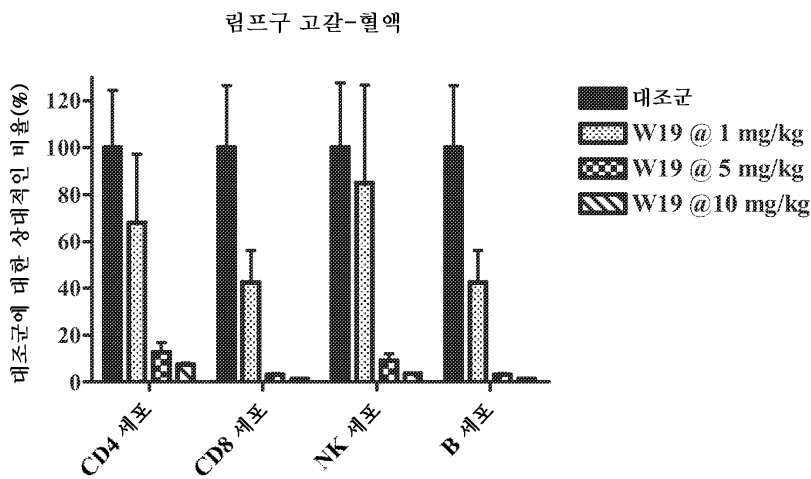
도면7b



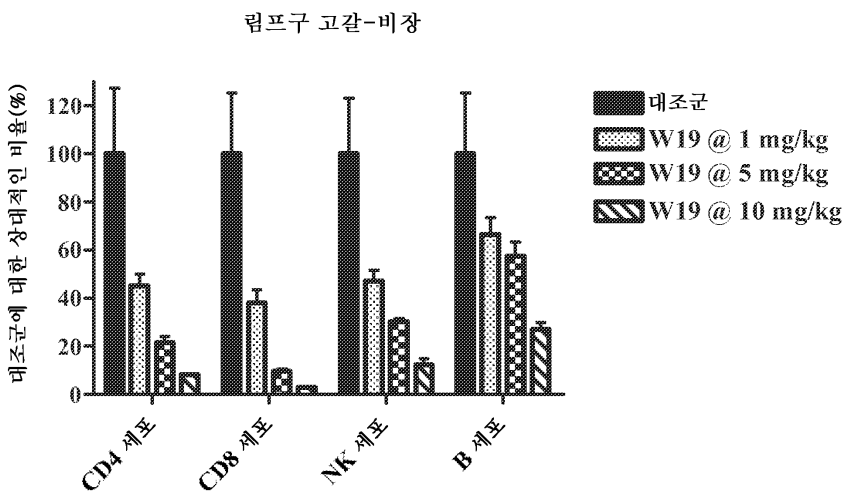
도면7c



도면8a



도면8b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENZYME CORPORATION

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING LUPUS

<130> 001662-0020-W01

<140> PCT/US2010/034741

<141> 2010-05-13

<150> 61/177,924

<151> 2009-05-13

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Arg Phe Leu Phe Leu Leu Leu Thr Ile Ser Leu Leu Val Met

1 5 10 15

Val Gln Ile Gln Thr Gly Leu Ser Gly Gln Asn Asp Thr Ser Gln Thr

20 25 30

Ser Ser Pro Ser Ala Ser Ser Asn Ile Ser Gly Gly Ile Phe Leu Phe

35 40 45

Phe Val Ala Asn Ala Ile Ile His Leu Phe Cys Phe Ser

50 55 60

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Gln Asn Asp Thr Ser Gln Thr Ser Ser Pro Ser

1 5 10