

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2008-0094482 (43) 공개일자 2008년10월23일
(51) Int. Cl. <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 37/02</i> (2006.01)	(71) 출원인 울산대학교 산학협력단 울산 남구 무거2동 산29	(72) 발명자 권병세 울산광역시 울주군 청량면 삼정리 755 쌍용하나빌리지 307-120
(21) 출원번호 10-2007-0038977 (22) 출원일자 2007년04월20일 심사청구일자 없음	(74) 대리인 신동인	

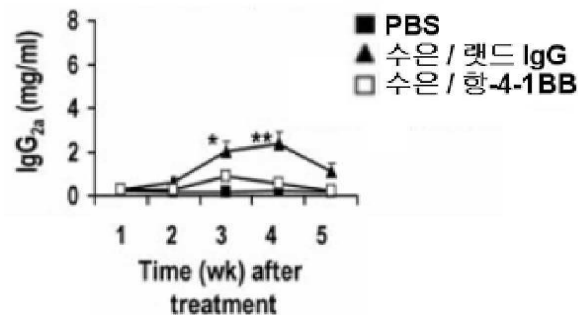
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 항-4-1B B 항체를 함유하는 수은 유도성자가면역질환의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 수은 유도성 자가 면역질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 4-1BB(CD 137) 분자에 특이성을 갖는 단일클론 폴리펩티드인 항-4-1BB 항체를 유효성분으로 함유하는 수은 유도성 자가면역질환의 예방 및 치료용 약학조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 단순히 수은 유도성 자가면역질환의 발병을 억제할 뿐만 아니라 이미 발병된 질병을 치료하는 효과 또한 뛰어나므로, 수은 유도성 자가면역질환의 예방 및 치료용 약학조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

4-1BB(CD 137) 분자에 특이성을 갖는 단일클론 폴리펩티드인 항-4-1BB 항체를 유효성분으로 함유하는 수은 유도성 자가면역 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체는 조성물 총 중량에 대해 0.1 ~ 50 중량%인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 3

4-1BB (CD137) 분자에 특이성을 갖는 단일클론 폴리펩티드인 항-4-1BB 항체를 유효성분으로 함유하는 수은 유도성 자가면역 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 4

제 4항에 있어서, 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제인 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<16> 본 발명은 4-1BB(CD 137) 분자에 특이성을 갖는 단일클론 폴리펩티드인 항-4-1BB 항체를 유효성분으로 함유하는 수은 유도성 자가면역질환의 예방 및 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

<17> 수은은 자연계에 다양하게 존재하며 치과의 아말감(amalgam), 화장품, 보존제, 훈증제, 비료, 및 백신 준비물 (vaccine preparation) 등 다양한 용도로 사용된다 (Bagentose, L. M., P. Salgame, and M. Monestier., *Immunol. Res.*, 20, pp67-78, 1999; Pelletier, L., M. Castedo, B. Bellon, and P. Dreut., *Mercury and autoimmunity*, pp539-552, 1994). 수은의 독성이 잘 알려져 있음에도 불구하고, 수은은 매일 다양한 용도로 사용되고 있다 (Crespo-Lo'pez, M. E., A. M. Herculano, T. C. Corvelo, and J. L. Do Nascimento., *Mercury and neurotoxicity. Rev. Neurol.*, 40, pp441-447, 2005; Bhan, A., and N. N. Sarkar., *Mercury in the environment: effect on health and reproduction. Rev. Environ. Health.*, 20, pp39-56, 2005).

<18> 드루엣(Druet) 등은 수은이 브르윈 노르웨이 랫트(Brown Norway rat)에서 면역 기능장애를 유발할 수 있음을 최초로 보고하였다 (Druet, E., C. Sapin, E. Gunther, N. Feingold, and P. Druet., *genetic control. Eur. J. Immunol.*, 7, pp348-351, 1977; Druet, P., E. Druet, F. Potdvin, and C. Sapin., *Ann. Immunol.*, 129C, pp777-792, 1978). 수은이 어떻게 면역체계를 활성화시켜 전신성 자가면역질환을 유도하는지는 정확하게 알려지지 않았다. 생쥐의 경우 DBA/2 (H-2d)와 CBA (H-2k)는 수은에 의한 효과에 저항성이 있으며, SJL, B10.S 및 AS.W와 같은 H-2s 생쥐의 경우 수은에 대한 높은 감수성이 있는 것으로 보고 되었다 (Warfvinge, K., H. Hansson, and P. Hultman., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 132, pp299-309, 1995; Hultman, P., S. J. Turley, S. Enestrom, U. Lindh, and K. M. Pollard., *J. Autoimmun.*, 9, pp139-149, 1996).

<19> H-2d 생쥐의 수은 유도성 자가면역질환은 사람에서 발생하는 화학물질과 관련된 자가면역질환의 좋은 모델이다. 수은에 의해 유도되는 자가면역질환은 혈청내 IgG1/IgE의 증가, 항핵 항체의 증가 및 신장내 면역복합체의 침착으로 특징 된다 (Rowley, B., and M. Monestier., *Mol. Immunol.*, 42, pp833-838, 2005; Nielsen, J. B., and P. Hultman., *Environ. Health Perspect.*, 110 (Suppl. 5), pp877-881, 2002). 사람과 생쥐 모델을 통한 수은의 효과 연구들은 Th2 타입 사이토카인(Th2 type cytokine), 특히 IL-4가 IgG1/IgE로의 전환에 중요함을 증명하고 있다. 그러나 IL-4를 중화시켜도 자가면역반응 중 일부만 차단될 뿐 모든 자가면역반응이 억제되는 것은 아니었으며, 이 결과는 IL-4 이외의 다른 면역조절물질이 수은 유도성 자가면역질환에 관련되어 있음

을 시사하였다 (Bagenstose, L. M., P. Salgame, and M. Monestier., *Clin. Exp. Immunol.*, 114, pp9-12, 1998; Haggqvist, B., and P. Hultman., *Clin. Exp. Immunol.*, 134, pp202-209, 2003).

<20> 4-1BB는 종양 괴사인자(tumor necrosis factor)의 수용체로서, T 림프구에서 주로 공동자극분자(costimulatory molecule)로 작용하며, T 세포가 항원특이적인 신호를 받을 경우 발현된다. 또한 4-1BB는 자연 킬러(natural killer; NK) 세포, CD4+CD25+ 조절 T 세포, 대식세포(monocyte), 수지상세포(DC)와 같은 다른 임파구성/골수(lymphoid/myeloid) 세포 계열에서도 발현되는 것으로 알려져 있다. 4-1BB는 T 세포를 공동자극함으로써 암 제거, 일차적인 CD8+ T 세포 반응의 증가, 항원 특이적 CD8+ T 세포의 메모리 풀(memory pool) 강화와 같은 작용체 기능(effector function)을 수행할 수 있게 한다. 이 과정은 주로 T 세포 의존적 항체반응과 염증을 유도하는 CD4+ T 세포의 기능을 저해함으로써 이루어진다. 그러나, 4-1BB에 의해 매개되는 CD4+ T 세포의 억제 기전은 아직 밝혀지지 않았다.

<21> 4-1BB의 자가면역질환에 대한 효과는 인간 4-1비비 분자에 대한 인간화 모노클로날 폴리펩티드 및 이를 포함하는 약학조성물(한국등록특허 10-0500283), “인체 4-1비비 분자에 특이성이 있고 면역억제 효과를 갖는 모노클로날 항체(한국등록특허공보 10-0204733)”, 항-4-1BB 항체를 포함하는 류마티스성 관절염의 예방 및 치료용 약학조성물(한국공개특허 10-2005-0116981)” 및 “가변영역 아미노산 치환을 통한 인간 4-1비비 분자에 대한 결합 특이성이 증가된 변형 인간화 항체의 제조방법 (한국등록특허 10-0452954)등이 보고 되어 있다. 그러나 지금까지 항-4-1BB 항체를 유효성분으로 함유하는 수은 유도성 자가면역질환의 예방 및 치료용 조성물에 대해서는 언급되거나 개시된 바가 없다.

<22> 이에 본 발명자들은, 실제로 수은을 투여하여 자가면역질환을 유도한 A.SW 생쥐에 항진성 항-4-1BB 항체를 투여하여 항-4-1BB 항체에 의해 수은 유도성 자가면역질환의 발병 억제 기전을 확인함으로써, 수은 유도성 자가면역질환의 발병억제뿐 아니라 이미 확립된 질병의 치료 역시 가능하다는 것을 증명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<23> 본 발명의 목적은 4-1BB(CD 137) 분자에 특이성을 갖는 단일클론 폴리펩티드인 항-4-1BB 항체를 유효성분으로 함유하는 수은 유도성 자가면역질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<24> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 4-1BB(CD 137) 분자에 특이성을 갖는 단일클론 폴리펩티드인 항-4-1BB 항체를 유효성분으로 함유하는 수은 유도성 자가면역 질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

<25> 본 발명의 수은 유도성 자가면역 질환의 예방 및 치료용 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 항-4-1BB 항체를 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것을 특징으로 한다.

<26> 본 발명의 4-1BB는 인간을 포함한 다양한 포유동물의 4-1BB를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

<27> 또한, 본 발명은 항-4-1BB 항체를 함유하는 상기 조성물을 인간을 포함한 포유동물에 투여함을 특징으로 하는 수은 유도성 자가면역질환의 예방 및 치료방법을 제공한다.

<28> 상기 항-4-1BB 항체의 수은 유도성 자가면역질환에 대한 효과를 확인하기 위하여, 수은을 주사한 A.S.W 생쥐에 랫트 IgG 또는 항-4-1BB 항체를 투여한 결과, 대표적인 자가면역질환의 증상인 항핵 항체, 혈청내 IgG₁/IgE 및 신장내 IgG 침착이 감소하는 효과를 나타내어 수은 유도성 자가면역질환의 예방 및 치료효과가 탁월함을 확인할 수 있었다.

<29> 본 발명의 항-4-1BB 항체를 포함하는 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<30> 본 발명에 따른 항-4-1BB 항체를 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 시클로크레아틴을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수

있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 시클로크레아틴에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텔솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<31> 본 발명의 항-4-1BB 항체의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 항-4-1BB 항체는 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<32> 본 발명의 항-4-1BB 항체는 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroven tricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

<33> 본 발명은 4-1BB(CD 137) 분자에 특이성을 갖는 단일클론 폴리펩티드인 항-4-1BB 항체를 유효성분으로 함유하는 수은 유도성 자가면역 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

<34> 본 발명의 항-4-1BB 항체를 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.

<35> 또한, 수은 유도성 자가면역 질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 항-4-1BB 항체의 양은 일반적으로 본 발명의 건강 기능 식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

<36> 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제, 액제 등의 형태를 포함한다. 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 항체를 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한점이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

<37> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요한 진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<38> 이하, 본 발명을 참고예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<39> 단, 하기 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

<40> **참고예 1. 항체의 준비**

<41> 항-4-1BB(rat IgG₁ clone 3H3) 단일항체 (anti-4-1BB monoclonal antibody)를 생산하는 융합세포 (3E1)는 로버트 미틀러 박사 (Dr. Robert Mittler, Emory University, Atlanta, GA)로부터 제공 받았다. 상기 항체들은 마우스의 복수 및 융합세포 배양액으로부터 생산되어졌고, 단백질 G-컬럼(protein G-column, Sigma, St. Louis, MO)을 사용하여 실험실에서 정제하였다.

<42> **참고예 2. 실험동물의 준비**

<43> 실험동물은 암컷 A.SW-H2, H2-T18^b/SnJ 마우스 (A.S.W, stock no. 000471, The Jackson Laboratory)를 사용하였으며, 동물사육실에서 일정한 조건(온도: 21± 2 °C, 명암: 12시간 명암주기)에서, 사료와 음수의 자유로운 섭취가 가능하도록 하였으며, 실험시작 전까지 물과 먹이를 충분히 제공하였다.

<44> **실험예 1. 4-1BB 신호전달에 의한 수은 유도성 자가면역질환의 발병억제**

<45> 1-1. IgG₁, IgG_{2a} 및 IgE 확인

<46> 4-1BB에 의해 수은 유도성 자가면역질환의 발병 억제 효과를 확인하기 위하여 샌드위치 ELISA 키트 (Bethyl Laboratories)를 이용하여 전체 혈청에서 IgG₁, IgG_{2a} 및 IgE 를 제조사에서 제공된 실험방법에 따라 측정하였다.

<47> A.S.W 생쥐에 PBS 단독, 대조군 랫트 IgG (control Ig; Sigma-Aldrich) 와 HgCl₂를 함께 또는 항-4-1BB 항체 (rat IgG₁ clone 3H3)와 수은을 함께 주사하였다. 실험 기간동안 멸균된 PBS 100μl에 수은 30mg을 용해하여 생쥐에 일주일에 세 번 피하 주사하였다. 항체를 투여할 경우 수은 투여와 동시에 랫트 IgG 또는 항-4-1BB 항체를 100μl/day로 복강 주사하여, 매주 혈액을 수거하였으며 ELISA를 이용하여 혈청내 IgG₁, IgG_{2a} 및 IgE의 양을 측정하였다.

<48> 상기 실험결과, 수은에 노출된 A.S.W 생쥐는 혈청내 IgG₁ 및 IgE의 농도가 급격히 증가하였으며, 약 3주 후에 최고조에 달하였다. 그러나 항-4-1BB 항체를 투여한 생쥐의 경우 수은에 의한 IgG₁ 및 IgE의 증가가 미비하였으며(도 1 및 도 3 참조), IgG_{2a}의 경우 수은 노출 이후 일시적으로 증가하였을 뿐, 지속되지 않았다 (도 2 참조).

<49>

<50> 1-2. 신장내 면역복합체 축적의 확인

<51> 혈청내 IgG₁ 및 IgE의 증가와 더불어 수은 유도성 자가면역반응의 또 다른 특징인 신장내 면역복합체의 축적을 확인하기 위해 각 실험군의 생쥐들로부터 신장을 분리하여 냉동절편(cryosection)을 만들었으며, 이들을 FITC가 부착된 항-마우스 IgG 항체로 형광 염색하여 분석하였다(Schiffer L, Sinha J, Wang X, Huang W, von Gersdorff G, Schiffer M, Madaio MP, Davidson A., Short term administration of costimulatory blockade and cyclophosphamide induces remission of systemic lupus erythematosus nephritis in NZB/W F1 mice by a mechanism downstream of renal immune complex deposition. *J Immunol.*, 171, pp489-497, 2003).

<52> A.S.W 생쥐에 PBS 또는 수은을 반복적으로 투여하였으며, 동시에 랫트IgG 또는 항-4-1BB 항체를 상기 실험예 1-1과 같이 투여하였다.

<53> 실험결과, 수은과 랫트 IgG를 투여한 생쥐의 신장을 항-마우스 IgG₁ 항체로 형광 염색할 경우, 많은 면역복합체 (immune complex)의 침착을 관찰할 수 있었다. 그러나 PBS만을 투여하거나 수은과 함께 항-4-1BB 항체를 투여한 생쥐의 신장에서는 낮은 수준의 면역복합체 침착이 유발되었다 (도 4 참조).

<54> 1-3. 항핵 항체의 검출

<55> 자가면역질환의 전형적인 특징인 항핵 항체 (anti-nucleolar Ab; ANoA)의 양을 각 실험군의 생쥐 혈청을 순차적으로 희석하여 간접 면역 형광 검사법에 의해 하기와 같이 조사하였다(Schiffer L, Sinha J, Wang X, Huang W, von Gersdorff G, Schiffer M, Madaio MP, Davidson A., Short term administration of costimulatory blockade and cyclophosphamide induces remission of systemic lupus erythematosus nephritis in NZB/W F1 mice by a mechanism downstream of renal immune complex deposition. *J Immunol.*,

171, pp489-497, 2003).

<56> PBS로 희석한 혈청을 45분 동안 HEp-2 슬라이드 (Antibodies Incorporated)에서 반응시킨 후, 항핵 항체는 염소 항-마우스 IgG₁-FITC 또는 염소 항-마우스 IgG_{2a}-FITC (Southern Biotechnology Associates)로 검출하였다.

<57> 실험결과, 자가면역질환의 전형적인 특징인 항핵 항체 (anti-nucleolar Ab; ANoA) 역시 수은 투여 후 3주부터 급격히 증가하였으며, 4주 이후 최고수준을 유지하였다, 그러나 PBS만을 투여하거나 수은과 함께 항-4-1BB 항체를 투여한 생쥐에서는 낮은 수준의 항핵 항체가 검출되었다(도 5 참조).

<58> 실험예 2. 항-4-1BB 항체에 의한 수은 유도성 자가면역질환의 치료효과

<59> 항-4-1BB 항체에 의한 수은 유도성 자가면역질환의 치료효과를 확인하기 위해 상기 실험예 1의 방법과 동일하게 IgG₁/IgE, 항핵 항체 및 신장내 면역복합체를 측정하였다.

<60> AS.W 생쥐에 30ug의 수은을 매주 삼회 피하 주사하였다. 그룹 a는 수은 투여 3주후, 그룹 b는 2주후, 그룹 c는 1주후, 그룹 d는 수은 투여와 동시에 항-4-1BB 항체 투여를 시작하였다. 수은 투여 후 4주째 각 실험군을 분석하였다.

<61> 실험결과, 항-4-1BB 항체의 예방효과와 유사하게, 자가면역질환의 치료효과가 나타났다. 항핵 항체의 농도 역시 항-4-1BB 항체 투여시 감소하였으며, 투여시기가 늦춰질수록 항-4-1BB에 의한 항핵항체 감소효과는 점진적으로 감소하였다. 또한 신장내 면역 복합체 축적과 혈청내 IgG₁ 및 IgE 수준 역시 항핵 항체 결과와 유사하였다(도 6, 도 7, 도 8 및 도 9 참조).

<62> 실험예 3. 항-4-1BB 항체 투여에 의한 T 세포 증가 및 B 세포 감소

<63> 수은 노출에 의한 자가항체 (autoantibody)의 생성은 CD4 T 세포에 의해 조절된다(Biancone, L., G. Andres, H. Ahn, A. Lim, C. Dai, R. Noelle, H. Yagita, C. de Martino, and I. Stamenkovic., *J. Exp. Med.*, **183**, pp1473-1481, 1996). 4-1BB를 통한 신호전달은 T 세포의 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있지만, 수은 유도성 자가면역질환은 억제하였다. 따라서 항-4-1BB 항체 투여 후, T 세포의 기능 및 반응에 어떤 영향이 유발되었는지 조사하기 위하여 유세포 분석 방법을 이용하여 하기와 같이 실험하였다(Seo SK, Choi JH, Kim YH, Kang WJ, Park HY, Suh JH, Choi BK, Vinay DS, Kwon BS., 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med.*, **10**, pp1088-94, 2004).

<64> 수은에 노출된 AS.W 생쥐에 랫트 IgG 또는 항-4-1BB 항체를 투여하였으며, 이 생쥐의 비장을 분쇄하여 면역세포를 분리한 후, RBC 용해 용액(RBC lysing solution (BioWhittaker))을 이용하여 적혈구를 제거하였다. 차가운 염색용 버퍼 (PBS, 5% FBS, 0.09%Na₃)에 세포를 분주하여 부유시킨 후, 형광이 부착된 단일 클론항체들인 항-CD4(BD biosciences) 또는 항-CD8b(BD biosciences) 항체로 염색하여 CD4 및 CD8 T 세포의 비율을 유세포 분석하였으며, 또한 항-B220(BD biosciences) 및 항-CD5 (BD biosciences) 항체로 비장세포를 염색하여 B220+, B-1a (CD5+B220+) 및 B-1b (CD5-B220+) 세포의 비율을 측정하였으며, 수거된 전체 세포수와 곁하여 각 세포군의 수를 계산하였다. 4°C에서 30분 동안 염색한 후, 염색용 버퍼로 세척하였으며, BD FACSCalibur 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다.

<65> 실험결과, 항-4-1BB 항체 투여 후, CD4 및 CD8 T 세포의 수는 점차 증가하였으며, 또한 수은 및 항-4-1BB 항체 투여 후 2주차부터 증가하기 시작하여, 3주 이후 최고조를 이루었다(도 10 참조). 이와는 달리 B 세포의 경우 2주째부터 감소하기 시작하였으며, 시간이 지남에 따라 B220+, B-1a 및 B-1b 세포 모두 점진적으로 감소하였다 (도 11 참조).

<66> 실험예 4. 4-1BB 자극에 의한 Th2 반응의 Th1 반응 전환

<67> IFN- γ 는 수은 유도성 자가면역질환을 조절하는 것으로 알려져 있지만, 결국 질병의 후반부에는 Th2 반응이 증가하게 된다. 4-1BB 자극은 Th1 반응을 유도하는 것으로 잘 알려져 있기 때문에, 항-4-1BB 항체 투여 후 Th1 대 Th2 반응의 밸런스에 어떤 변화가 유발되는지 제조사에서 제공된 실험방법에 따라 RNA 분해효소 보호법(RNase protection assay (RPA))을 수행하여 확인하였다.

<68> AS.W 생쥐에 수은과 함께 랫트 IgG 또는 항-4-1BB 항체를 상기 실시예 3의 방법과 동일하게 투여하였다. 3주 후 각 실험군의 생쥐의 비장으로부터 비장세포를 분리하여 RBC를 제거한 후, 비장세포 현탁액

(suspension)을 준비하였고, 이 비장 세포 현탁액에 항-CD4 마이크로비드를 첨가하여 30분간 배양 한 후 MACS 컬럼(Miltenyi Biotec)을 이용하여 CD4 T 세포를 높은 순도로 분리하였다. 준비된 CD4 T 세포로부터 TRIzol (Invitrogen Life Technologies)을 이용하여 전체 RNA를 분리하였고, 사이토카인 mRNA 수준은 제조사의 사용 지침(Riboquant; BD Biosciences)에 따라 RNA 분해효소 보호법을 통하여 정량하였다. 간략하게, 10 μ l의 전체 mRNA를[a-32P]-5'-UTP로 표지된 리보프로브(riboprobe)와 함께 56°C에서 결합시키고, 결합되지 않은 단일 가닥의 RNA(ssRNA)는 RNase를 처리하여 제거하였다. 그리고 이중 가닥의 RNA(dsRNA)는 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 통하여 순수 분리하였다. 분리된 시료는 7M 우레아(urea)가 함유된 6 % 폴리아크릴아마이드이 젤에서 전기영동 하여 건조 한 후, 방사능 사진 분석법을 통하여 분석하였다.

<69> 실험결과, 수은을 투여한 생쥐의 CD4 T 세포는 높은 수준의 IL-4를 발현할 뿐 아니라, IL-5 및 IL-13의 발현 수준 역시 높았다. 그러나 항-4-1BB 항체를 투여할 경우, 이들의 발현은 감소 되었으며, 반면 IFN- γ , TNF- α 및 IL-2와 같은 Th1 타입 사이토카인들의 발현은 증가되었다(도 12 참조).

<70> 실험예 5. Th2 타입 사이토카인과 수은 유도성 자가면역질환의 발병의 관련성

<71> 상기 실험예 4에서 보는 바와 같이 항-4-1BB 항체 투여에 의해 IL-4, IL-5 및 IL-13의 발현이 감소 되었기 때문에, IL-4, IL-5 및 IL-13의 중화를 통해 각각의 사이토카인이 수은 유도성 자가면역질환의 발병에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다.

<72> AS.W 생쥐에 멸균된 PBS 100 μ l에 수은 30 μ l을 녹여 일주일에 3회씩 3주 동안 피하주사 하였다. 수은이 주사된 마우스에 항-IL-4(clone 11b11, rat IgG; 자체 생산), 항-IL-5 (clone TRFK5, rat IgG₁; eBiosecece), 항-IL-13 (clone 38213.11, rat IgG_{2a}; R&D System) 또는 항-IFN- γ (clone R4-6A2, ratIgG₁; 자체 생산)을 처리한 항-사이토카인 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 실험기간 동안 하루에 100 μ l씩 투여한다. 그 후, 수은이 투여 3주 후에 채혈하여, 혈청내 항핵 항체의 양을 측정하였으며, 동시에 신장을 수거하여 면역복합체의 양을 측정하였다.

<73> 실험결과, 이전의 결과와 동일하게 랫트 IgG를 투여한 생쥐에서는 높은 수준의 항핵 항체가 형성되었으며, 항-4-1BB 항체 투여로 인해 감소되었다. 또한 항-IL-4, 항-IL-5, 또는 항-IL-13 중화항체를 투여한 경우 부분적인 IgG 형태의 항핵 항체의 발현 감소가 유발되었다. 그러나 IgG₁ 항핵 항체는 감소하였지만, IgG_{2a} 항핵항체의 경우엔 항-IL-4, 항-IL-5, 또는 항-IL-13 항체 투여에 의해 전혀 감소하지 않았다. 따라서 이들 각각의 Th2 타입 사이토카인들은 부분적으로 수은 유도성 자가면역질환의 발병에 관여하는 것으로 판단된다(도 13 참조).

<74> 실험예 6. 항-4-1BB 항체에 의해 유도된 B 세포 감소와 IFN- γ 관련성

<75> 항-4-1BB 항체 투여 후 IFN- γ 의 발현이 급격히 증가하였으며, 루퍼스(lupus, 전신성홍반성낭창)의 경우 IFN- γ 의 증가를 통해 항-4-1BB 항체가 치료 효과를 나타내며, IFN- γ 중화시 부분적인 B 세포의 기능 및 수를 회복한다고 보고하였다(Sun, Y., H. M. Chen, S. K. Subudhi, J. Chen, R. Koka, L. Chen, and Y.-X. Fu., *Nat. Med.*, 8, pp1405-1413, 2002). 따라서 수은 유도성 자가면역질환의 경우에도 IFN- γ 에 의해 B 세포의 기능이 억제되어 치료효과가 나타난 것인지 IFN- γ 를 중화시킴으로써 확인하였다.

<76> AS.W 생쥐에 수은과 랫트 IgG 또는 항-4-1BB 항체를 각각 또는 함께 3주간 투여하였다. 또한 IFN- γ 를 중화시키기 위해 수은 투여와 동시에 항-IFN- γ 항체(clone R4-6A2, ratIgG₁; 자체 생산)를 100 μ l/day 농도로 3주간 투여하였다. 3주 후 각 실험군의 생쥐로부터 채혈하여, 혈청내 항핵 항체의 양을 측정하였다.

<77> 실험결과, 항-4-1BB 항체 투여는 수은에 의한 항핵 항체의 증가를 억제시켰으며, 이러한 항-4-1BB 항체의 효과는 IFN- γ 를 중화함으로써 부분적으로 회복되었다. IgG₁ 및 IgG_{2a} 항핵 항체 모두 IFN- γ 를 중화함으로써 부분적으로나마 복구되었으며(도 14 참조), 혈청내 IgE의 양 역시 IFN- γ 를 중화함으로써 다시 증가하였다 (도 15 참조). 따라서 항-4-1BB 항체에 의한 B 세포의 반응 억제 현상은 부분적으로 IFN- γ 를 매개로 유발되었음을 증명하였다.

<78> 하기에 본 발명의 조성물을 포함하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<79> 제제예 1. 산제의 제조

<80>	항-4-1BB 항체	200 mg
<81>	유당	1000 mg
<82>	탈크	10 mg

<83> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

<84> **제제예 2. 정제의 제조**

<85>	항-4-1BB 항체	200 mg
<86>	옥수수전분	100 mg
<87>	유당	100 mg
<88>	스테아린산 마그네슘	2 mg

<89> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<90> **제제예 3. 캡슐제의 제조**

<91>	항-4-1BB 항체	50 mg
<92>	옥수수전분	100 mg
<93>	유당	100 mg
<94>	스테아린산 마그네슘	2 mg

<95> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<96> **제제예 4. 주사제의 제조**

<97>	항-4-1BB 항체	50 mg
<98>	주사용 멸균 증류수	적량
<99>	p H 조절제	적량

<100> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제

<101> 조한다.

<102> **제제예 5. 액제의 제조**

<103>	항-4-1BB 항체	100 mg
<104>	이성화당	10 g
<105>	만니톨	5 g
<106>	정제수	적량

<107> 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

<108> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<109>	항-4-1BB 항체	1000 mg
<110>	비타민 혼합물	적량
<111>	비타민 A 아세테이트	70 μ g
<112>	비타민 E	1.0 mg
<113>	비타민 B1	0.13 mg

<114>	비타민 B2	0.15 mg
<115>	비타민 B6	0.5 mg
<116>	비타민 B12	0.2 μ g
<117>	비타민 C	10 mg
<118>	비오틴	10 μ g
<119>	니코틴산아미드	1.7 mg
<120>	엽산	50 μ g
<121>	판토텐산 칼슘	0.5 mg
<122>	무기질 혼합물	적량
<123>	황산제1철	1.75 mg
<124>	산화아연	0.82 mg
<125>	탄산마그네슘	25.3 mg
<126>	제1인산칼륨	15 mg
<127>	제2인산칼슘	55 mg
<128>	구연산칼륨	90 mg
<129>	탄산칼슘	100 mg
<130>	염화마그네슘	24.8 mg

<131> 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

<132> **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<133>	항-4-1BB 항체	1000 mg
<134>	구연산	1000 mg
<135>	올리고당	100 g
<136>	비타민 C	500 mg
<137>	카라멜	10 mg
<138>	정제수를 가하여 전체	900 ml

<139> 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

<140> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

발명의 효과

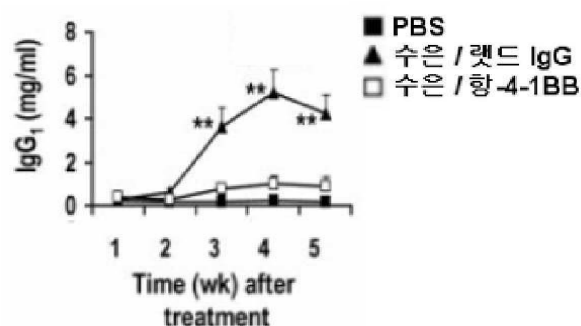
<141> 이상에서 설명한 본 발명의 4-1BB(CD 137) 분자에 특이성을 갖는 단일클론 폴리펩티드인 항-4-1BB 항체를 유효성분으로 함유하는 조성물은 항핵 항체, 혈청내 IgG₁/IgE 및 신장내 IgG 침착 감소 효과를 갖으며, 또한 단순히 수은 유도성 자가면역질환의 발병을 억제할 뿐만 아니라 이미 발병된 질병을 치료하는 효과 또한 뛰어나므로, 수은 유도성 자가면역질환의 예방 및 치료용 약학조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

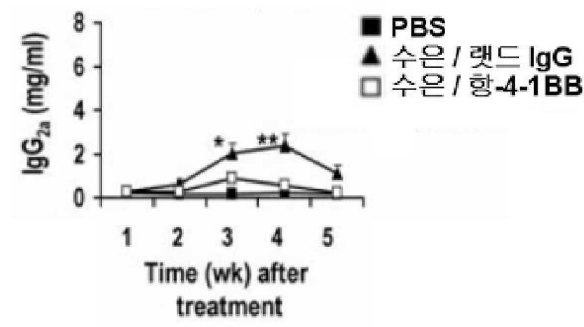
- <1> 도 1은 ELISA를 이용하여 AS.W 생쥐의 혈청내 IgG₁의 양을 측정한 도이며,
- <2> 도 2는 ELISA를 이용하여 AS.W 생쥐의 혈청내 IgG_{2a}의 양을 측정한 도이고,
- <3> 도 3는 ELISA를 이용하여 AS.W 생쥐의 혈청내 IgE의 양을 측정한 도이며,
- <4> 도 4는 AS.W 생쥐의 신장내 면역 복합체의 축적을 확인한 도이고,
- <5> 도 5은 AS.W 생쥐의 혈청내 항핵 항체의 양을 나타낸 도이며,
- <6> 도 6은 AS.W생쥐에서 HEp-2의 염색분포를 나타낸 도이고 (그룹 a는 수은 투여 3주후, 그룹 b는 수은 투여 후 2주후, 그룹 c는 수은 투여 후 1주후 및 그룹 d는 수은 투여와 동시에 항-4-1BB 항체 투여 시작),
- <7> 도 7은 AS.W생쥐에서 혈청내 항핵 항체의 농도를 나타낸 도이며 (그룹 a는 수은 투여 3주 후, 그룹 b는 수은 투여 후 2주 후, 그룹 c는 수은 투여 후 1주 후 및 그룹 d는 수은 투여와 동시에 항-4-1BB 항체 투여 시작),
- <8> 도 8은 AS.W생쥐에서 혈청내 IgG₁의 농도를 나타낸 도이고 (그룹 a는 수은 투여 3주후, 그룹 b는 수은 투여 후 2주 후, 그룹 c는 수은 투여 후 1주 후 및 그룹 d는 수은 투여와 동시에 항-4-1BB 항체 투여 시작),
- <9> 도 9는 AS.W생쥐에서 혈청내 IgE의 농도를 나타낸 도이며 (그룹 a는 수은 투여 3주후, 그룹 b는 수은 투여 후 2주후, 그룹 c는 수은 투여 후 1주후 및 그룹 d는 수은 투여와 동시에 항-4-1BB 항체 투여 시작),
- <10> 도 10은 AS.W 생쥐에서 CD4 및 CD8 T세포의 비율을 유세포 분석한 도이고,
- <11> 도 11은 AS.W 생쥐에서 B220+, B-1a (CD5+B220+) 및 B-1b (CD5-B220+) 세포의 비율을 측정한 도이며,
- <12> 도 12는 AS.W 생쥐에서 분리된 CD4 T 세포의 RNA를 추출하여 RPA를 수행한 도이고,
- <13> 도 13은 AS.W 생쥐에서 혈청내 항핵 항체의 양을 측정하여 Th2 사이토카인의 중화에 의한 수은 유도성 자가 면역질환의 발병의 부분적 억제를 확인한 도이며,
- <14> 도 14는 AS.W 생쥐에서 항 4-1BB 항체에 의해 감소된 IgG₁ 및 IgG_{2a} 항핵 항체가 IFN-감마를 중화시킴으로써 부분적으로 회복되는 것을 나타낸 도이고,
- <15> 도 15는 AS.W 생쥐에서 항 4-1BB 항체에 의해 감소된 IgE 항핵 항체가 IFN-감마를 중화시킴으로써 부분적으로 회복되는 것을 나타낸 도이다.

도면

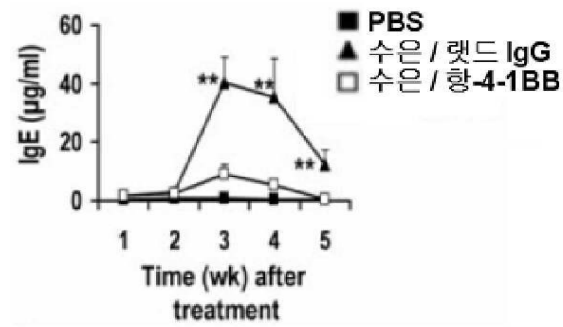
도면1



도면2



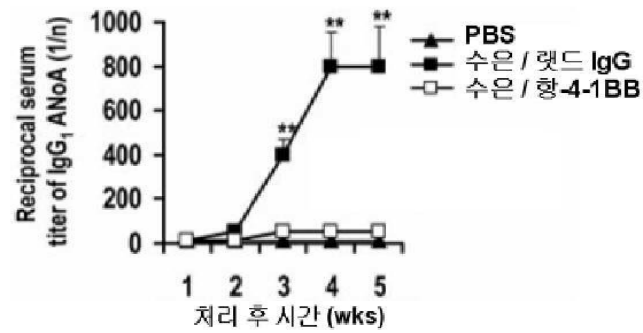
도면3



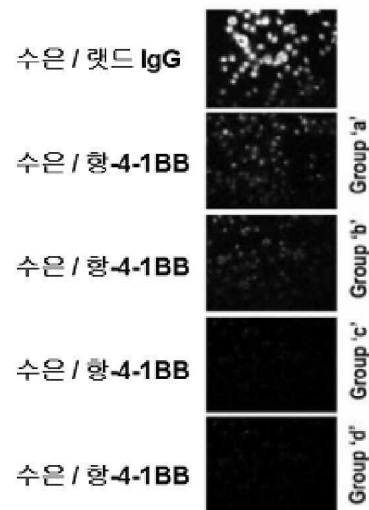
도면4



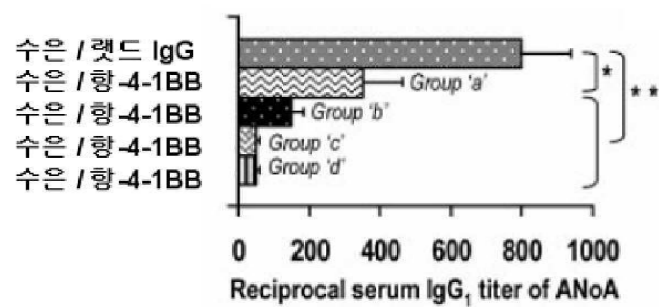
도면5



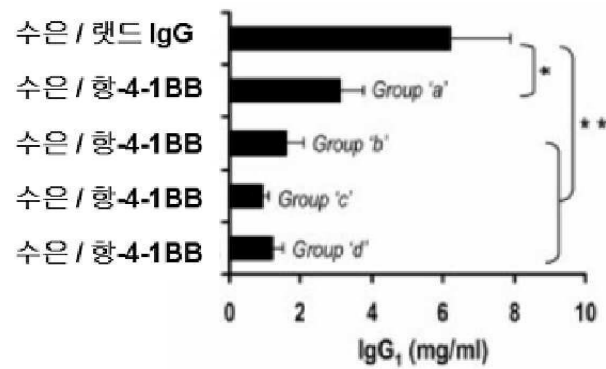
도면6



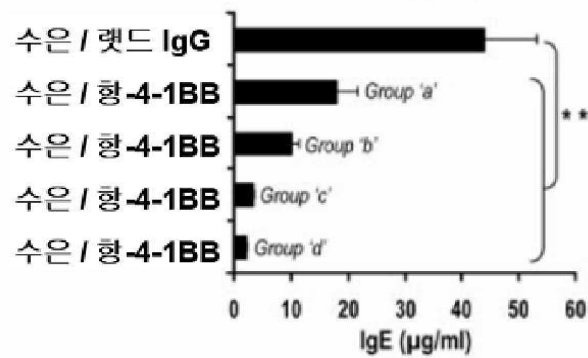
도면7



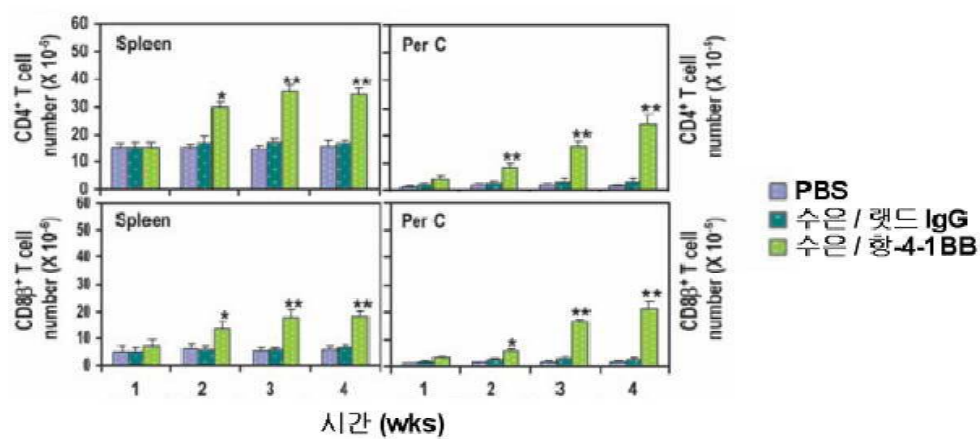
도면8



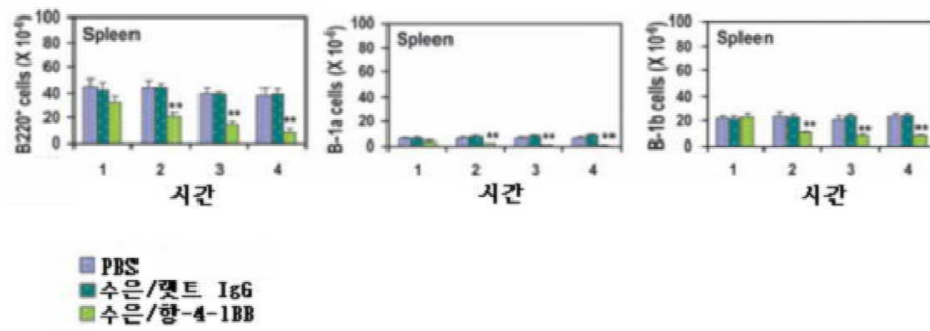
도면9



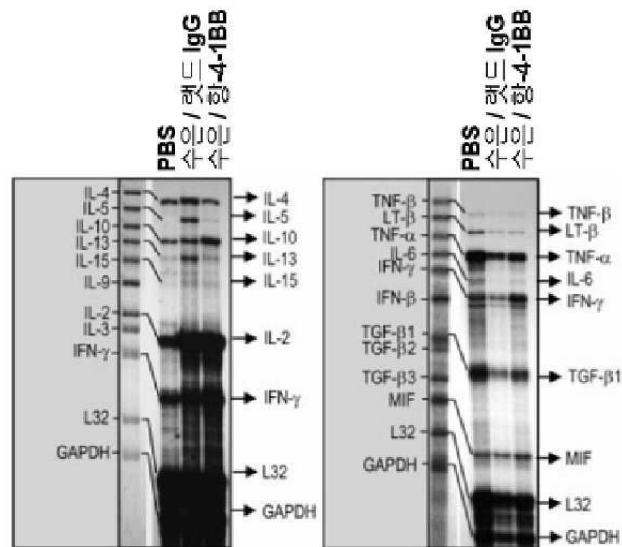
도면10



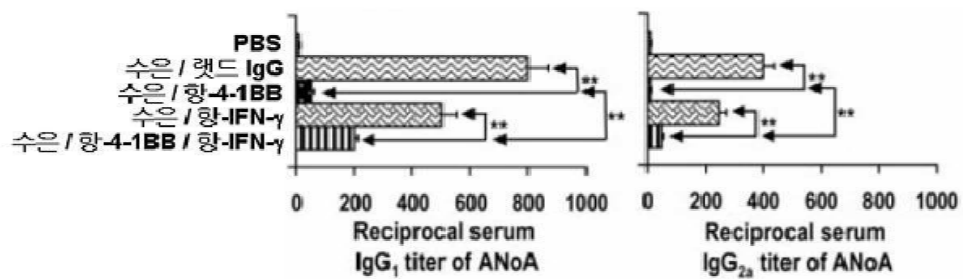
도면11



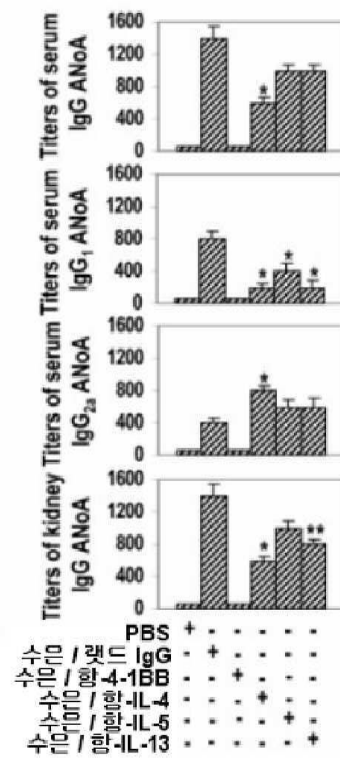
도면12



도면13



도면14



도면15

