



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0107050
(43) 공개일자 2008년12월10일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0054857

(22) 출원일자 2007년06월05일

심사청구일자 2007년06월05일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

(72) 발명자

권병석

울산 남구 무거동 산29번지 울산대학교 생명과학부

김주양

울산 남구 무거동 산 29번지 울산대학교 생명과학부

조홍래

울산 동구 전하동 290-3 울산대학교병원 외과

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 3 항

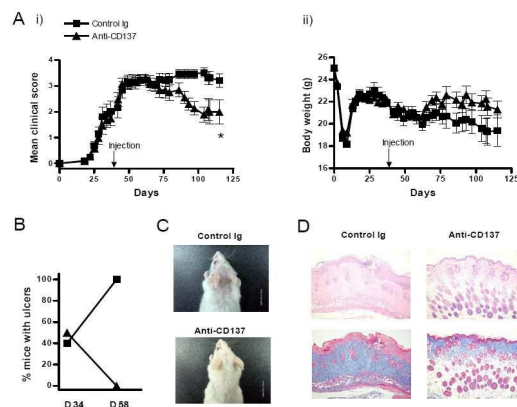
(54) 항-CD 137 단일클론 항체를 포함하는 만성이식편대숙주 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 항-CD137 단일클론 항체를 포함하는 만성 이식편대숙주 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 항-CD137 단일클론 항체를 활성성분으로 포함하는 약학 조성물은 $CD4^+$ T cell 사이토카인을 감소시키고 공여 $CD4^+$ T 세포의 사멸을 증대시킴으로써 만성 이식편대숙주 질환(chronic graft-versus-host disease, cGVHD)을 효과적으로 예방 및 치료하므로, 동종 줄기세포 이식 등에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C00088

부처명 교육부

연구사업명 순수기초연구자그룹 지원사업

연구과제명 다핵세포 분화에서 새로운 G protein의 역할

주관기관 울산대학교

연구기간 2005년 9월 ~ 2006년 8월

특허청구의 범위

청구항 1

항-CD137 단일클론 항체를 활성성분으로 포함하는, 만성 이식편대숙주 질환(chronic graft-versus-host disease, cGVHD)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 만성 이식편대숙주 질환이 수혈 또는 이식에 의해 유발된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 이식이 골수 이식, 줄기세포 이식 및 장기 이식으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<4> 본 발명은 항-CD137 단일클론 항체를 포함하는 만성 이식편대숙주 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

<5> 만성 이식편대숙주 질환(chronic graft-versus-host disease, cGVHD)은 통상적으로 동종(allogenic) 줄기 세포 이식의 수여자에게 일어나는 질환으로, 환자들 간에 그 질환 양상이 다양하나 종종 섬유증(fibrosis) 및 경피증(scleroderma)-유사 질환들을 임상적 합병증으로 수반한다(Gilliam AC, *J. Invest. Dermatol.*, 123, 251-257, 2003). cGVHD는 숙주의 부조직복합성 항원(minor histocompatibility (mH) antigen) 또는 자가항원(autoantigen)에 대한 동종반응(alloreactivity) 후 생성된 병원성 공여 T 세포에 의해 매개되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 T 세포는 직접적인 세포용해성 공격 외에 전염증성 및 섬유성 사이토카인의 분비 또는 자가항체 생산의 촉진 등을 통해 표적 조직을 위협한다(Lee SJ, *Blood*, 105, 4200-4206, 2005). 그러나 부신피질호르몬(corticosteroids)의 전신성 전달을 제외하고는 이러한 cGVHD의 치료에 대해 알려진 바가 없다.

<6> cGVHD의 발병을 위해서는 공여 $CD4^{+}$ T 세포를 필요로 하는데, 흥미롭게도 공여 및 숙주의 항원제시 세포(APCs) 둘 다 $CD4^{+}$ T 세포-매개 피부 GVHD를 매개하며, 이는 cGVHD의 주된 특징으로 제2형 주 조직복합체(MHC(major histocompatibility complex) class II)에서 내인성 및 외인성 숙주 mH 항원들이 공여 $CD4^{+}$ T 세포에 전달될 수 있음을 암시한다(Anderson BE 등, *Blood*, 105, 2227-2234, 2005). 또한, B10.D2→Balb/c 모델에서, 면역우성 항원들이 피부에 발현되고 피부의 미세환경이 헬퍼 타입 2 $CD4^{+}$ T세포(Th2 세포) 발달(development)에 유리하다는 것이 밝혀짐에 따라(Kaplan DH 등, *J. Immunol.*, 173, 5467-5475, 2004), cGVHD는 특별히 H-2^d 유전적 배경에서 Th2 세포에 의해 매개되는 것으로 알려져 있으며(Abraham DJ 등, *Trends Immunol.*, 26, 587-595, 2005), Th2 세포 및/또는 자가항원들에 의해 분비된 사이토카인들에 의해 발병되는 것으로 제시되고 있다(Zhang C 등, *Blood*, 107, 2993-3001, 2006).

<7> CD137은 TNF 수용체 슈퍼패밀리(superfamily)의 하나로 $CD8^{+}$ T 세포에 대한 강력한 보조자극 분자(costimulatory molecule)로서 작용한다(Shuford WW 등, *J. Exp. Med.*, 186, 47-55, 1997; 및 Takahashi C 등, *J. Immunol.*, 162, 5037-5040, 1999). 미틀러(Mittler) 등은 CD137의 생체 내 결합이 T 세포-의존 항체 반응을 억제한다는 것을 입증하였으며, 이는 어고니스틱(agonistic) 항-CD137 단일클론 항체(mAb)가 Th2-매개 면역 질환의 치료에 유용할 것임을 시사한다. 실제로, 자가면역 뇌척수염 및 자가면역 포도막염에 대한 연구를 제외하고, 항-CD137 항체는 자가항체 및 Th2 세포에 의해 매개되는 것으로 알려진 자가면역질환 및 기타 면역 질환들, 예를 들면 전신성 홍반성 루푸스(SLE)(Sun Y 등, *Nat. Med.*, 8, 1405-1413, 2002; 및 Foell J 등, *J.*

Clin. Invest., 111, 1505-1518, 2003), 류마티스 관절염(Seo SK 등, *Nat. Med.*, 10, 1088-1094, 2004; 및 Foe11 JL 등, *Immunology*, 113, 89-98, 2004), 알레르기성 결막염(Fukushima A 등, *J. Immunol.*, 175, 4897-4903, 2005) 및 알레르기성 천식(Cho YS 등, *Clin. Exp. Allergy*, 36, 377-385, 2006) 등에 예방/치료 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다.

<8> 한편, 미국특허 출원 제20030223989호에는 항 CD137 항체를 포유동물에 투여함으로써 천식, 아토피 질환 및 알레르기와 같은 IgE 매개 질환의 치료방법이 개시되어 있고, 미국특허 출원 제2006012103호에는 CD137의 중화 또는 CD137의 발현억제에 의한 암의 치료 방법이 개시되어 있다. 그러나 아직까지 항 CD137 항체의 cGVHD 예방 또는 치료 활성에 대해서는 알려진 바가 없다.

<9> 이에 본 발명자들은 아직까지 그 치료방법이 확립되지 않은 cGVHD의 예방 및 치료에 대해 예의 연구한 결과, GVHD의 B10.D2→Balb/c(H-2^d) mH 항원-부적합성 모델에서 항-CD137 단일클론 항체를 포함하는 조성물이 cGVHD 질환의 예방 및 치료에 효과적임을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<10> 따라서 본 발명의 목적은 항-CD137 단일클론 항체를 포함하는 만성 이식편대숙주 질환(chronic graft-versus-host disease, cGVHD)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<11> 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항-CD137 단일클론 항체를 활성성분으로 포함하는, 만성 이식편대숙주 질환(chronic graft-versus-host disease, cGVHD)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<12> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<13> 본 발명의 조성물에서, 항-CD137 단일클론 항체는 선택적으로 CD137을 인식하여 CD137과 결합함으로써 항진 효과(agonistic effect)를 나타내는 단일클론 항체이다. 항-CD137 단일클론 항체로는 시판되는 것이나 인간을 제외한 포유류로부터 생성, 분리된 것을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 항-CD137 단일클론 항체를 에모리대학의 미틀러 박사로부터 제공받아 사용하였다.

<14> 예를 들면, 본 발명의 조성물의 유효성분인 항-CD137 단일클론 항체는 CD137을 면역원으로 하여 동물을 면역화시키고, 면역화된 동물의 비장세포를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 생성한 다음 CD137를 선택적으로 인식하는 단일클론 항체를 생산하는 양성 클론을 선별한 후 선별한 하이브리도마를 배양하고, 하이브리도마의 배양액으로부터 항체를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 단일클론 항체는 상기의 하이브리도마를 동물의 복강에 주입하고, 주입 후 일정기간이 지난 다음 회수한 동물의 복수로부터 분리함으로써 제조할 수 있다. 단일클론 항체 및 하이브리도마에 대해서는 다음의 문헌을 참고로 할 수 있다[*Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)].

<15> 면역원으로는 천연형 CD137 단백질 또는 유전자 재조합 CD137 단백질을 이용할 수 있다. 유전자 재조합 CD137은 공지의 염기서열을 이용하여 당 분야의 통상적인 방법에 따라 cDNA를 작제하고 이를 발현벡터에 삽입한 다음 숙주세포에서 발현시킨 후 정제함으로써 획득할 수 있다.

<16> CD137를 선택적으로 인식하고 동시에 이의 활성을 억제하는 활성을 지닌 항CD137 단클론 항체를 얻기 위해 상기에서 얻어진 면역원을 항원으로 하여 동물을 면역화시킨다. 특히 바람직하게는, 마우스와 쥐를 사용한다. 상기 항원은 통상의 면역방법에 따라 복강 내, 근육 내, 안내 또는 피하 주사하여 투여한다. 필요한 경우, 여러 기술을 사용하여 단백질에 의해 발생하는 결과적인 면역 반응을 증가시키고, 보다 큰 항체 반응성을 전개시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항원 단백질에 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 사용하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다. 면역성 부여 기간은 특별히 제한하지는 않지만 항원은 2회 내지 10회, 바람직하게는 2 내지 5회 투여하고 바람직하게는 몇일 내지 몇주 간격, 더욱 바람직하게는 1~3주의 간격을 두는 것이 바람직하다. 최종 면역성 부여기간 후에 1 내지 10일, 바람직하게는 2 내지 5일 후에 동물로부터 항체 생산세포를 획득할 수 있다. 항체 생산세포의 예는 비장세포, 임파선세포, 흉선세포 및 주변혈액세포이고, 일반적으로 비장세포가 가장 바람직하게 사용된다. 마우스의 경우, 한 마리당 0.01~1,000

μg , 바람직하게는, 1~300 μg 의 양을 투여한다.

<17> 상기에서 획득한 항체 생산세포와 골수종 세포를 공지된 방법, 예를 들면 코흘러(Koehler)와 밀스테인(Milstein)의 방법으로 융합한다. 골수종 세포로는, 예를 들면 p3/x63-Ag8, p3-U1, NS-1, MPC-11, SP-2/0, F0, P3x63 Ag8, V653 및 S194등의 마우스 유래의 것이 사용될 수 있다. 또한, 랫트 유래 세포인 R-210 등의 세포주가 사용될 수 있다. 클론을 배양하여 효소면역흡착법을 이용하여 CD137를 선택적으로 인식하는 단일클론을 선택한다. CD137를 선택적으로 인식하는 단일클론의 선별은 당 업계에 공지된 바와 같은 면역화학적 방법을 사용할 수 있다. 이에 한정되지는 않으나, 예를 들면, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역화염색법(Immunofluorescence), 웨스턴 블로팅(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)이 이에 속한다.

<18>

<19> 또한, 항 CD137 단일클론 항체를 코딩하는 DNA를 분리하는 재조합 방법에 의해 제조할 수 있다. 상기 분리된 DNA를 사용하여 당업계에 공지된 방법으로 높은 친화도로 CD137에 결합하여 항진 효과를 나타내는 활성을 가지는 항체를 생산할 수 있다. 예를 들면, 유용한 방법으로는 헵텐 2-페닐로자졸-5-원에 대한 고친화성 항체를 제조하기 위해 사용된 체인 셔플링법(chain shuffling)을 포함한다(Marks et al., *BioTechnology*, 10:779, 1992; Schier et al., *J. Mol. Biol.* 263:551, 1996).

<20>

본 발명자들은 cGVHD 연구를 위해 개발된 동물 모델을 사용하여 항-CD137 단일클론 항체가 생체 내에서 공여 Th2 CD4⁺ T 세포의 사멸을 증대시켜 수혈 또는 골수 이식시 일어날 수 있는 만성 이식편대숙주 질환(cGVHD)을 예방 및 치료할 수 있음을 규명하였다.

<21>

cGVHD의 연구를 위해 개발된 동물 모델인 GVHD의 B10.D2→Balb/c(H-2^d) mH 항원-부적합성 모델은 인간 cGVHD의 비교적 말기에 해당하는 증상들, 예를 들면 피부 섬유증, 궤양, 및 콜라겐 침착 증가를 수반한 탈모증 등을 나타내는 것으로 보고 되었다(Jaffee BD 등, *Cell Immunol.*, 77, 1-12, 1983; McCormick LL 등, *J. Immunol.*, 163, 5693-5699, 1999; Zhang Y 등, *J. Immunol.*, 168, 3088-3099, 2002; 및 Nonomura A 등, *Pathol. Int.*, 48, 421-427, 1998). 또한, 이러한 쥐 모델은 태선양 상피하 침윤(lichenoid subepithelial infiltrates), 난포성 탈락(follicular drop-out), 피하지방 감소, 진피 단핵성 침윤(dermal mononuclear infiltrates) 등의 조직학적 특징 외에도 폐섬유증, 침샘 및 눈물샘의 염증 및 파괴, 그리고 간내 및 간의 담관의 단핵성 침윤 후 담관벽의 섬유성 비후(fibrous thickening) 및 경화가 나타나는 것을 특징으로 하는 간질환 등을 특징으로 한다(Jaffee BD 등, *Cell Immunol.*, 77, 1-12, 1983; Anderson BE 등, *J. Clin. Invest.*, 112, 101-108, 2003; 및 Li J 등, *Transplantation*, 62, 1621-1628, 1996).

<22>

본 발명의 일 실시예에서는 cGVHD를 나타내는 B10.D2→Balb/c(H-2^d) mH 항원-부적합성 마우스 모델에서, cGVHD 발병유도 초기 및 cGVHD가 진행된 이후에 항-CD137 단일클론 항체를 투여하고 체중 측정, 발병 징후(임상 점수) 평가, 궤양을 지닌 마우스의 백분율 평가 및 조직학적 분석을 수행함으로써 항-CD137 단일클론 항체가 cGVHD의 치료효능이 있는지를 확인하였다(실시예 1 및 실시예 2 참조).

<23>

그 결과, 항-CD137 단일클론 항체의 투여에 의해 발병 징후 평가에서 마우스들은 질병이 치료됨을 확인할 수 있었으며, 체중이 증가하고 피부의 궤양이 치료되며, 피부병변에서의 털이 다시 나는 것이 관찰되었으며, 조직 분석 결과에서도 cGVHD에서 관찰되던 병변들이 정상으로 회복됨을 확인할 수 있었다(도 1 및 도 2 참조). 따라서 항-CD137 항체를 이용하여 cGVHD를 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

<24>

항-CD137 단일클론 항체에 의한 cGVHD의 치료 효능은 다음의 기작에 의한 것으로 추정된다. 발병유도 초기에 항-CD137 단일클론 항체를 투여한 경우에는 공여 CD4⁺ T 세포의 사멸이 유도되는 반면 급성 GVHD(aGVHD) 질환과 관련된 '사이토카인 폭풍(cytokine storm)'과 함께 Th1 세포의 활성화가 이루어져 aGVHD를 유발하게 되나, 이미 cGVHD가 진행된 이후에 항-CD137 단일클론 항체를 투여하는 경우에는 Fas/Fas 리간드(FasL) 결합을 통해 공여 CD4⁺ T 세포의 사멸을 유도함으로써 더 이상의 cGVHD의 진행을 차단할 뿐 아니라 우수한 치료효과도 나타낸다.

<25>

특히, 마우스 모델의 경우 cGVHD의 발병 후 30 내지 60일 사이에 항-CD137 항체를 투여한 경우 가장 우수한 치료효과를 얻을 수 있다.

<26>

따라서 본 발명에 따른 항-CD137 단일클론 항체를 포함하는 약학 조성물은 cGVHD를 효과적으로 예방 및 치료하는데 유용하다. 한편, 상기 cGVHD는 바람직하게는 수혈 또는 이식에 의해 유발된 것일 수 있으며, 상기

세포 이식은 골수 이식, 줄기세포 이식 또는 장기 이식일 수 있다.

<27> 또한, 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분으로는 항-CD137 단일클론 항체의 단편도 포함될 수 있다. "항체 단편"은 표적 항원, 이 경우 CD137 또는 이의 특이적 부분에 결합할 수 있는 항체의 어떠한 부분을 말한다. 예를 들어, 항체 단편은 F(ab')₂, Fab, Fab' 및 Fv 단편을 포함한다. 이들은 통상적으로 재조합 DNA 기술로 제조하거나, 또는 파파인 또는 펩신으로 항체 단백질을 분해시키는 전통적인 방법을 사용하여 제조할 수 있다 (CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, John Wiley and Sons Coligan et al., eds. (1991-92)).

<28> 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 다른 약물, 화합물 또는 제약 조성물과 함께, 주사를 비롯한 통상적인 경로에 의해 투여되거나 시간에 따른 점진적 주입에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 이에 한정되지는 않으나 투여는 경구, 정맥내, 복막내, 근육내, 관강내, 피하, 국소 또는 경피 투여될 수 있다.

<29> 본 발명의 조성물의 경구 투여시, 활성성분인 항-CD137 단일클론 항체는 담체 및 희석제와 혼합하여 정제, 캡슐제 등의 형태로 제형화될 수 있으며, 비경구 투여시에는, 항-CD137 단일클론 항체를 10% 포도당 수용액, 등장식염수, 무균수 또는 유사한 액체로 용해한 후 정맥내에 점적 또는 주사에 의해서 또는 근육내 주사에 의해서 투여 되도록 바이알 또는 앰플로 밀폐시킬 수 있다. 또한, 안정성을 증가시키기 위해서, 본 발명의 조성물을 바이알이나 앰플에 주입시킨 후 동결건조시킬 수 있다.

<30> 본 발명의 약학적 조성물은 활성성분인 항-CD137 단일클론 항체 외에 1종 이상의 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제는 인간을 비롯한 포유동물에게 투여하기 적합한, 1종 이상의 고체 또는 액체 충전제, 결합제, 캡슐화 물질, 활택제, 습윤제, 붕괴제, 유탁 및 현탁제, 감미제 또는 방향제 등을 의미한다. 또한, 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 농도의 염, 완충제(예를 들면, 아세트산 염, 시트르산 염, 붕산 염 및 인산 염), 보존제(예를 들면, 벤즈알코늄 클로라이드, 클루로부탄올, 파라벤 및 티메로살), 면역 강화 보충제(예를 들면, 아주반트 (adjuvant) 및 사이토카인), 및 임의의 다른 치료제(예를 들면, 화학요법제)를 추가로 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 또 환자에게 투약 후에 활성성분이 급속히, 지속적으로 또는 지연적으로 방출되도록 처방할 수 있다.

<31> 본 발명의 약학적 조성물에서, 항-CD137 단일클론 항체의 바람직한 1일 투여량은 5 내지 10 mg/kg 체중의 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 활성성분의 실제 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<32> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에 만 한정되는 것은 아니다.

<33> <실시예 1>

<34> 진행된 cGVHD에 대한 항-CD137 항체의 치료 효과 1

<35> 진행된 cGVHD에 대한 항-CD137 항체의 치료 효과를 확인하기 위해, B10.D2→Balb/c(H-2^d) mH 항원-부적합성 모델을 사용하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 6-8주령의 Balb/c 마우스(Orient, 한국)에 세슘 방사선 조사 장치로 750 cGy의 방사선 조사한 후, 6-8주령의 수컷 B10.D2 마우스(SLC, 일본)로부터 얻은 5×10⁶ T-세포-고갈된 골수(BM)세포를 단독으로 또는 B10.D2 마우스의 1×10⁷개의 분리된 CD4⁺ T 세포와 함께 이식하여 B10.D2→Balb/c(H-2^d) cGVHD 모델을 얻었다. 얻어진 마우스 모델들을 대상으로 매 3일마다 체중을 측정하고, 15일째 GVHD 발병 백분율, 발병의 피부 징후(임상 점수) 및 체중 등을 측정하였다. 피부 징후의 평가 기준은 다음과 같으며, 최소 점수를 0, 최대 점수를 3.9로 하여 평가하였다:

<36> 건강한 정상 징후: 0,

<37> 1 cm² 미만 범위의 탈모를 동반한 피부 병변: 1,

<38> 1 내지 2 cm² 범위의 탈모를 동반한 피부 병변: 2,

<39> 2 cm² 초과 범위의 탈모를 동반한 피부 병변: 3,

<40> 귀, 꼬리 및 발에 나타난 피부 질환: 각 질환 당 0.3 추가.

<41> 얻어진 B10.D2→Balb/c(H-2^d) cGVHD 모델 마우스들을 대상으로 이식 후 34일에 세포이식 직후에 대조군 면역글

로볼린(Ig)(랫트 IgG, St. Louis, MO) 또는 랫트의 복수로부터 분리한 항-CD137 단일클론 항체(3H3)(에모리대학의 미틀러 박사로부터 입수)를 마우스 당 200 μ g의 양으로 투여하였으며, 투여 후 3일 간격으로 이식 후 120일 까지 마우스 모델들의 체중을 측정하고 발병 징후(임상 점수)를 평가하였다. 이식 후 34일(항체주사한 날)과 58일에는 목 뒤쪽 피부를 관찰하고, 궤양을 지닌 마우스의 백분율을 확인하였다. 그리고 피부를 약 2 cm로 잘라내어 10% 포르말린으로 고정 후 파라핀에 포매하였으며, 얻어진 파라핀 절편을 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin & eosin), 또는 마손트릭롬(Masson's trichrome) 염색하여 조직분석을 수행하였다. 발병 백분율은 임상점수가 0.6이상인 마우스의 수를 전체 마우스의 수로 나눈 다음 100을 곱해 계산하였다. 실험그룹 간의 통계적 차이의 유의성을 검증하기 위해 Mann-Whiney 분석법을 사용하였다.

<42> 그 결과, 도 1Ai에 나타낸 바와 같이, 항-CD137 항체를 투여한 마우스 모델의 경우, 발병 징후 평가에서 마우스들은 질병이 치료됨을 확인할 수 있었다(도 1A의 i). 또한, 대조군과 비교하여 볼 때, 항-CD137 항체 투여된 마우스들은 체중이 증가한 것을 확인하였다(도 1A의 ii).

<43> 아울러, 항-CD137 항체를 투여한 마우스 모델의 경우 모두 피부의 궤양이 치료되었고(도 1의 B 및 C), 피부병변에서의 털이 다시 나는 것이 관찰되었으며, 조직 분석 결과에서도 cGVHD에서 관찰되던 병변들이 정상으로 회복됨을 확인하였다(도 1의 D).

<44> 따라서 항-CD137 항체를 이용하여 cGVHD를 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

<45> <실시예 2>

<46> 진행된 cGVHD에 대한 항-CD137 항체의 치료 효과 2

<47> 마우스에 세포를 이식한 후 56일에 항-CD137 항체 또는 대조군 Ig를 투여하고 항체투여 후 58일에(이식 후 110일) 병리학적 증상들을 관찰한 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 항-CD137 항체의 cGVHD 치료효과를 확인하였다.

<48> 그 결과, 이식 후 34일에 항체를 투여했을 때와 마찬가지로 항-CD137 항체는 cGVHD에 대한 우수한 치료효과를 나타냄을 확인하였다(도 2의 A 내지 D).

<49> 따라서 항-CD137 항체는 심한 cGVHD에 대해서도 우수한 치료효과를 가짐을 알 수 있다.

<50> <실시예 3>

<51> CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포에 의해 유도된 cGVHD에 대한 항-CD137 항체의 치료효과

<52> CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포에 의해 유도된 cGVHD에 대한 항-CD137 항체의 예방 효과를 확인하기 위해, 6×10^6 개의 분리하지 않은 B10.D2 비장/림프절 세포를 사용한 것 외에 상기 실시예 1에서 얻어진 B10.D2→Balb/c(H-2^d) cGVHD 모델 마우스들을 대상으로 세포이식 30일후에 대조군 Ig 또는 항-CD137 단일클론 항체를 투여하였으며 30일 동안 매 3일마다 발병징후(임상점수)를 평가하였다. 또한, 마우스의 생존율을 평가하였고, 실시예 1과 동일한 방법으로 이식 후 34일(항체주사한 날)과 58일에는 목 뒤쪽 피부를 관찰하고, 궤양을 지닌 마우스의 백분율 및 조직분석을 수행하였다.

<53> 그 결과, 항-CD137 단일클론 항체 투여에 의해 모델 마우스가 치사되지 않고 생존할 수 있음을 확인하였으며(도 3의 A), 발병징후 역시 대조군에 비해 감소함으로써(도 3의 B) 치명적인 cGVHD를 억제하고 cGVHD를 치료하는데도 우수한 효과를 보여주었다. 항-CD137에 의한 cGVHD의 치료효과는 이 항체를 투여 받은 마우스의 발병부위에 털이 재생하는 결과(도 3의 D)와 조직학적 검사결과(도 3의 E)에서도 확인할 수 있었다.

<54> 이로 부터 항-CD137 항체가 치명적인 cGVHD를 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

<55>

발명의 효과

<56> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 항-CD137 단일클론 항체를 활성성분으로 포함하는 약학 조성물은 CD4⁺ T 세포 사이토카인을 감소시키고 공여 CD4⁺ T 세포의 사멸을 증대시킴으로써 만성 이식편대숙주 질환을 효과적으로 예방 및 치료하므로, 동종 줄기세포 이식 등에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

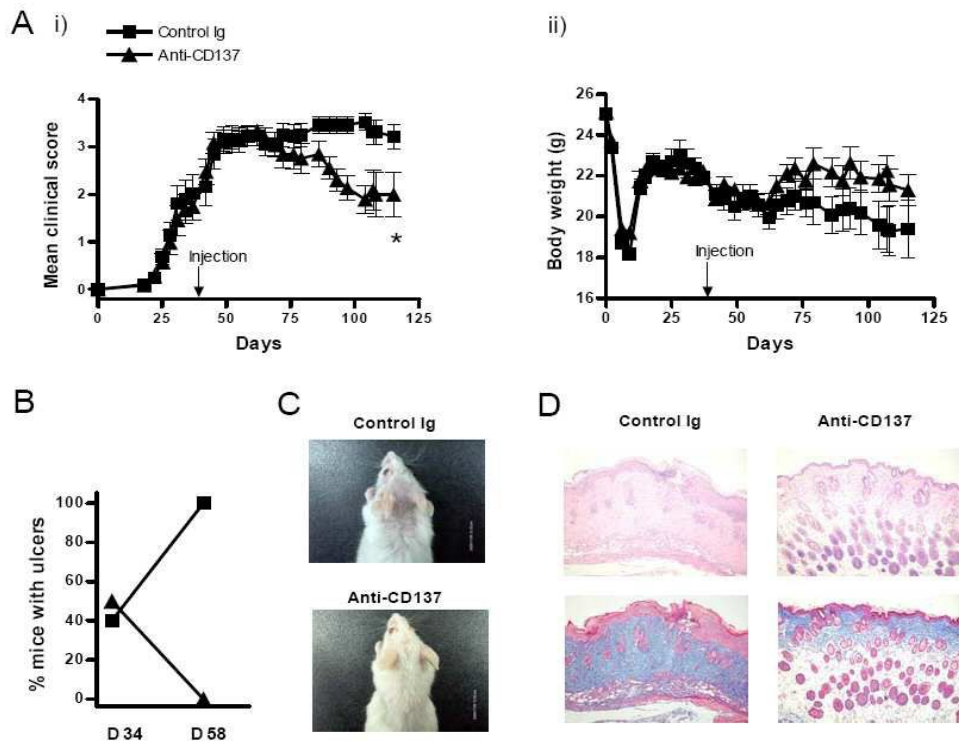
<1> 도 1은 B10.D2→Balb/c(H-2^d) cGVHD 모델 마우스를 대상으로 세포 이식 후 34일에 항-CD137 항체 또는 대조군 Ig를 투여한 후, 항체투여일 및 항체투여 후 120일까지 발병 정도(A의 i) 및 체중(A의 ii) 변화를 확인한 결과와 항체투여 후 24일(이식 후 58일)에 피부 궤양 범위(B), 마우스 상태(C) 및 병변 조직 상태(D)를 확인한 결과이다.

<2> 도 2는 B10.D2→Balb/c(H-2^d) cGVHD 모델 마우스를 대상으로 세포 이식 후 56일에 항-CD137 항체 또는 대조군 Ig를 투여한 후, 항체투여일 및 항체투여 후 54일에(이식 후 110일) 발병 정도(A) 및 체중(B) 변화를 확인한 결과 및 항체투여 후 54일에 피부 궤양 범위(C) 및 마우스 상태(D)를 확인한 결과이다.

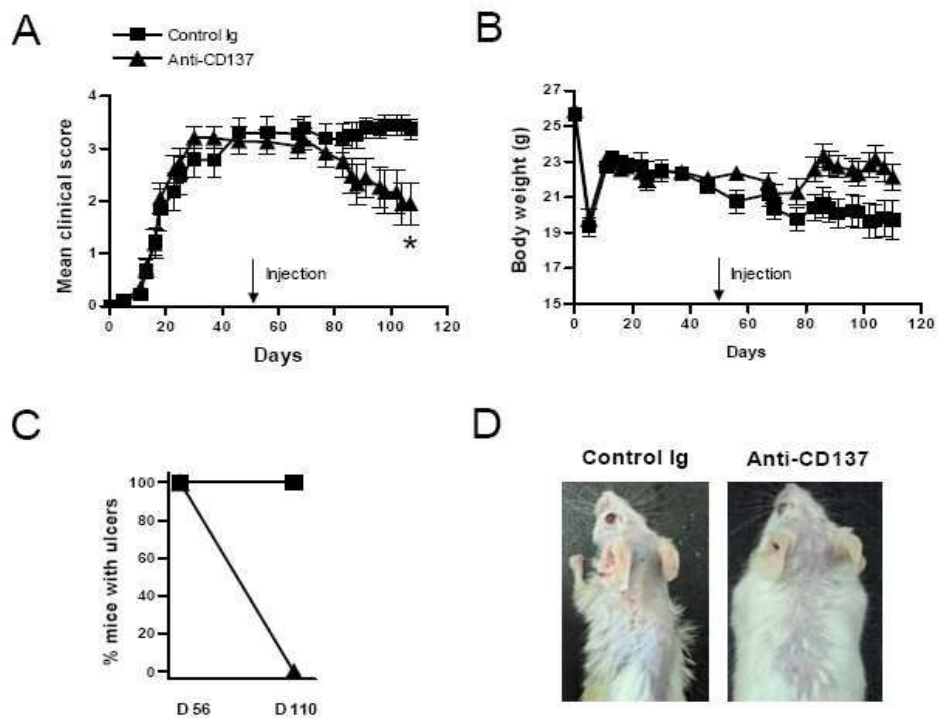
<3> 도 3은 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포로 유도된 B10.D2→Balb/c(H-2^d) cGVHD 모델 마우스를 대상으로 세포 이식 후 30일에 항-CD137 항체 또는 대조군 Ig를 투여한 후, 항체투여일 및 항체투여 후 30일에(이식 후 60일) 생존율(A), 발병정도(B), 피부 궤양 범위(C) 마우스 상태(D) 및 병변조직(E) 상태를 확인한 결과이다.

도면

도면1



도면2



도면3

