



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0045750
(43) 공개일자 2017년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인 고담 바이오파마슈티컬스 임크. 미국 뉴욕주 10017 뉴욕 원 월드 트레이드 센터 스위트 8500
<i>A61K 38/46</i> (2006.01) <i>A61K 31/10</i> (2006.01)	
<i>A61K 31/145</i> (2006.01) <i>A61K 31/185</i> (2017.01)	
<i>A61K 31/198</i> (2006.01) <i>A61K 9/00</i> (2006.01)	
(52) CPC특허분류 <i>A61K 38/465</i> (2013.01) <i>A61K 31/10</i> (2013.01)	(72) 발명자 번스, 베리 미국 뉴욕주 11234 브룩클린 133 이 55 스트리트 1331
(21) 출원번호 10-2017-7009617	(74) 대리인 특허법인 광장리앤고
(22) 출원일자(국제) 2015년09월04일 심사청구일자 없음	
(85) 번역문제출일자 2017년04월07일	
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/048606	
(87) 국제공개번호 WO 2016/040169 국제공개일자 2016년03월17일	
(30) 우선권주장 62/047,361 2014년09월08일 미국(US)	

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 폐 사르코이드증 치료 방법

(57) 요 약

본원에는 폐 사르코이드증을 치료하는 방법이 개시되어 있다. 폐 사르코이드증에 대한 치료를 필요로 하는 환자들에게 치료 유효량의 DNase I와 같은 점액 용해제가 투여된다. 일부 실시양태에서, DNase I은 도르나제 알파와 같은 재조합 인간 DNase I이다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/145 (2013.01)

A61K 31/185 (2013.01)

A61K 31/198 (2013.01)

A61K 9/0078 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

치료 유효량의 점액 용해제를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 폐 사르코이드증(pulmonary sarcoidosis) 치료 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 점액 용해제는 DNase I인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 점액 용해제는 소듐 2-술파닐에탄술포네이트(sodium 2-sulfanylethanesulfonate), 디소듐 2,2'-디술판디일디에탄술포네이트(disodium 2,2'-disulfanediylmethanesulfonate), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 DNase I은 재조합 DNase I인 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 재조합 DNase I은 재조합 인간 DNase I인 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 재조합 인간 DNase I은 흡입에 의해 환자의 폐에 투여되는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 흡입은 네뷸라이저(nebulizer)의 사용으로 수행되는 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 재조합 인간 DNase I은 천연 인간 DNase I의 아미노산 서열을 갖는 방법.

청구항 9

제 5 항에 있어서, 상기 재조합 인간 DNase I은 서열 3(SEQ ID NO. 3)의 아미노산 서열을 갖는 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 폐 사르코이드증은 급성 폐 사르코이드증인 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 폐 사르코이드증은 만성 폐 사르코이드증인 방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 환자에게 항생제를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 환자에게 기관지 확장제(bronchodilator)를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 환자에게 흉부 물리 치료 또는 체위배액(postural drainage)을 수행하는 단계를 포함하는 방

법.

청구항 15

제 4 항에 있어서, 소듐 2-суль파닐에탄슬포네이트; 디소듐 2,2'-디슬판디일디에탄슬포네이트; N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine); 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 추가의 점액 용해제를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2014년 9월 8일에 제출된 잠정적인 미국특허출원 번호 제62/047,361호로부터 우선권을 주장하며, 그 기재 내용은 모두 참조로 본원에 합체된다.

[0002] 본 발명은 점액 용해제(mucolytic agent)의 투여를 포함하는 폐 사르코이드증 치료 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 폐 사르코이드증을 가진 환자에게 치료상 유효량의 DNase I을 투여하는 단계를 포함한다.

배경기술

[0003] DNase I은 DNA에서 인산디에스테르 결합(phosphodiester linkage)을 절단하는 포유동물 및 진핵생물에서 발견되는 앤도뉴클레이제(endonuclease)이다. 이는 DNA의 크기를 감소시키고, 자유 수산기로 5'-인산염-말단 폴리뉴클레오티드(5'-phosphate-terminated polynucleotides)를 생성하기 위해, 단일 가닥 DNA, 이중 가닥 DNA, 및 크로마틴에 작용한다. 인간 DNase I 및 특정 변이체는 미국특허 제5,279,823호; 제6,348,343; 및 제6,391,607호에 개시되어 있다.

[0004] DNase I은 낭포성 섬유증(Cystic fibrosis)을 치료하기 위해 사용되어 왔다. 낭포성 섬유증은 특정 세포의 염소통로 조절제인 낭포성 섬유증 막조절 단백질(CFTR)의 돌연변이에 의해 야기된 질환이다. 이는 백인의 가장 일반적인 상염색체 열성 질환이다. 상기 돌연변이는 기도 상피 세포막의 염소 통로 내장을 통한 Cl⁻ 이온의 정상적인 통행을 막아, 폐의 상피 세포에서 염소 이온에 대한 상대적 불투과성 및 감소된 기도 표면 액체 체적을 야기한다. CFTR 단백질의 기능 장애의 결과로서, 점액 점도가 증가하며, 두꺼워지고 끈끈한 분비물이 낭포성 섬유증 환자의 폐의 기도를 차단한다. 낭포성 섬유증 환자의 폐의 기도를 차단하고 있는 많은 양의 점성 점액은 만성 감염의 경향을 야기하고, 염증, 점진적인 기도 및 실질조직(parenchymal) 손상, 기관지 확장증, 폐의 악화, 폐 기능 감소 및 빈번한 조기 사망을 일으킨다. 개선된 치료가 증가된 생존성을 갖더라도, 중앙 예상 수명은 단지 35년일 뿐이며, 환자들은 상당한 이환율(morbidity) 및 입원을 경험한다. 약 95%의 낭포성 섬유증 사망은 폐감염으로 인한 것이다.

[0005] 1993년에, 미국 식품 의약국(FDA)은 낭포성 섬유증 치료용 재조합 인간 DNase I 제제를 승인하였다. 이는 30년 동안 낭포성 섬유증을 위해 FDA에 의해 승인된 최초의 치료이다. 상기 승인된 제품은 미국 내에서 PULMOZYME®의 브랜드 명으로, 제넨텍 사(Genentech, Inc)에 의해 시판되었다. PULMOZYME®은 낭포성 섬유증의 특징인 두꺼운 점액 분비를 내의 DNA를 절단하여 작용한다고 알려져 있다. 이는 점액을 액화시키는 경향이 있고, 인체에 대해 기도로부터 상기 점액을 제거하기 용이하게 하며, 결과적으로 기도 기능을 향상시키고 세균감염에 대한 민감성을 감소시킨다.

[0006] 낭포성 섬유증 치료에 있어서 PULMOZYME®의 성공은 기관지 확장증, 점액 증강이 중요한 역할을 한다고 생각되는 또 다른 폐질환에서 그 연구를 촉진시켰다. 불행하게도, 기관지 확장증 환자들에 대한 대규모 임상 시험은 PULMOZYME®로부터의 어떠한 이득도 입증하지 못하였을 뿐 아니라, 이러한 치료가 잠재적으로 유해하다는 점을 제시하였다(O'Donnell, et al., 1998, Chest 113:1329-1334).

[0007] 사르코이드증은 종종 결절로서 존재하는 육아종(granuloma, 염증세포의 비정상적 무리)을 수반하는 질환으로서, 피부, 심장, 간, 폐, 신경기관, 및 위장관을 포함하는 다양한 기관에 형성될 수 있다. 상기 육아종은 호중구, 단핵구, 대식세포, 및 활성화 T 세포의 축적과 함께, 종양 괴사 인자-α (TNF-α), 인터페론-γ, 및 인터류킨-2와 같은 염증 매개체의 높은 수준의 생산이 특징이다.

[0008] 사르코이드증의 원인은 알려져 있지 않지만, 항원에 대한 노출이 중단된 이후에 지속되는 일부 전염성 항원 또는 환경항원에 대한 면역 반응에 의해 촉발된다는 추측이 있다. 폐는 90% 이상의 사례에서 가장 일반적으로 포

함되는 기관이다. 대부분의 환자들은 증상을 나타내지 않으며, 그들이 사르코이드증을 가졌다는 점을 인식하지 못한다. 모든 무증상 사르코이드증 환자의 절반은 일상적인 흉부 x-레이 이후에 진단된다. 가장 일반적으로 나타나는 증상은 기침과 호흡장애이다. 가장 일반적인 진단 임상 증상은 i) 호흡장애, ii) 기침, iii) 피부 발진, iv) 안구 염증, v) 체중 감소, vi) 피로, vii) 열, 및 viii) 식은땀이다. 육아종의 비특이적 특성으로 인해, 사르코이드증은 일반적으로 악성 종양 및 감염과 같은 다른 질병을 배제시킴으로써 진단된다. 사르코이드증의 폐는 전형적으로 흉부 x-레이 상에서 양측 폐문 림프절 종대(bilateral hilar lymphadenopathy)를 나타낸다. 흉부 x-레이 상에서 폐 실질의 결절성 망상 침윤(nodular reticular infiltrate) 및 "젖빛 유리(ground-glass)" 출현에 특징이 있는 사르코이드증의 가역 단계(주사 방사선 단계 I 및 II)는 치료가 필요하지 않을 수 있다. 폐낭포, 간질성 폐 질환, (폐포의 응고화로 인한) 벌집형(honey comb) 폐 구조 및 기관지 확장증에 특징이 있는 사르코이드증의 비가역 단계(단계 III 및 IV)는 좋지 못한 장기간의 예후와 폐의 악화/재발의 높은 발생률을 갖는다. 단계 III 및 VI에 대한 컴퓨터 단층촬영법("CT") 조사 결과들은 세기관지 결절(기관지 혈관 및 늑막 하부), 두꺼워진 소엽 사이 격막(interlobular septae), 폐 구조 왜곡 및 집합 덩어리(conglomerate masses)를 포함한다. 의료 개입이 필요치 않은 약 70%의 사르코이드증 환자들에서, 대증요법은 대개 이부프로펜 또는 아스피린과 같은 비스테로이드 항염증제(NSAIDs)로 이루어진다. 그러나, 모든 환자들의 약 3분의 1은 치료가 필요한 만성 사르코이드증의 진행형으로 발달한다. 이러한 모든 만성 사르코이드증 환자들의 1차 치료는 상당히 부정적인 부작용(감염에 대한 민감성, 골다공증 및 기침으로 인한 늑골 골절, 당뇨, 정신 착란, 체액저류, 피로 등)을 갖는 경구 스테로이드(예를 들어, 프레드니손 또는 프레드니솔론)이며, 이러한 부정적 약물 반응으로 인해 만성 또는 장기 치료에 사용될 수 없다. 일부 환자들에서, 코르티코스테로이드는 질환의 경과를 둔화시키거나 역전시키지만, 많은 환자들은 스테로이드에 대해 저항성(refractory)으로 되거나, 전혀 반응하지 않을 수 있다. 이러한 환자들은 기관지 내강으로의 육아종 유출을 포함해, 농축된 분비물 및 세포 잔해를 제거 및 배출하기 위한 과도한 기침의 에피소드들과 관련된 빈번하고 극심한 호흡기 감염을 경험할 수 있다. 극심한 증상 및 다른 치료 옵션이 없는 코르티코스테로이드 비반응자들에게는, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 마이코페놀산 및 레프루노미드(lefunomide)와 같은 다른 세포독성제가 시도될 수 있다. 물론, 메토트렉세이트가 가장 광범위하게 사용되며, 종종 코르티코스테로이드와 조합하여 신경 사르코이드증의 1차 치료로 고려된다. 일반적으로, 세포독성제는 세포독성으로 인한 증가된 이환율을 능가하는 이점을 갖지 않는다. 말기 질환에 대한 유일한 최종 치료는 폐 이식이며, 폐 사르코이드증에 걸린 이러한 환자들은 뉴욕 장로회(New York Presbyterian), 흉부외과 폐 이식 서비스(J.R. Sonnet, 퍼스널 커뮤니케이션)에서 실시된 모든 폐 이식의 약 30%를 차지한다.

[0009] 면역억제제로 사르코이드증을 치료하는데 있어서의 일부 성공이 관찰되었다. 상기 치료의 근거는 사르코이드증과 관련된 육아종이 면역계 세포, 특히 기도 호중구 및 혈중 T-세포의 집합에 의해 야기된다는 것이다. 인플릭시맙(infliximab)은 TNF-α의 작용에 길항작용을 하는 단일클론항체로서, 임상 시험에서 폐 사르코이드증을 치료하는데 일부 성공적으로 사용되어 왔다. 반면에, 에타너셉트(etanercept)(또 다른 TNF-α 길항제)는 포도막 사르코이드증이 있는 사람들에서 어떠한 유의한 효능도 입증하지 못하였다. 또한, 항 TNF-α 단일클론항체 골리무맙은 폐 사르코이드증에 걸린 사람들에서 어떠한 이점을 나타내지 못하였다. 아달리무맙(adalimumab)(또 다른 항 TNF-α 단일클론항체)은 사르코이드증 환자의 약 절반에서 유효한 반응을 유발하였다. Baughman, et al., 2013, European Respiratory Journal 41:1424-1438 참조.

[0010] 개별화된 치료는 현대 의학에서 새로운 패러다임으로서, 이는 "블록버스터" 약물로부터 계층화된 개인 맞춤형 의약으로 전환된다. 불행하게도, 이러한 접근법은 대규모 무작위 임상 시험(RCT)의 평균 결과에 의해 최적으로 뒷받침되지 않는다. n=1 접근법은 개인 맞춤형 의약을 달성하기 위한 가장 강력한 평가 도구이며, 이러한 접근법을 이용하는 경우, 환자는 치료 평가에서 관찰의 유일한 단위이다. 발생 이점은 여러가지가 있다. 첫째로, 단일 환자 연구에서는, 계층화 집단(arm)이 개입(intervention)에 유리한 객관적 증거를 초래하는 한, 설계의 이질성이 용인되는 반면에, 대규모 인구 기반 RCTs는 교란(confounding) 일반화를 예방하기 위해 설계 균일성을 필요로 한다. 둘째로, n=1 시험에서 환자는 객관적으로 이득을 얻도록 설계된 개입 전략의 최적 발현과 개선을 기본으로 한 상기 시험으로부터 즉각적인 이점을 도출해 낸다. 이는 신체적 고통을 겪고 있는 개별 환자가 전체 연구 기간 동안 위약을 처방 받았을 수 있는 인구 기반 RCT와 완전히 상이하다.

[0011] 놀랍게도, 보다 강력한 n=1 접근법은 대부분의 만성 질환 상태에 대해 작용하는 의료 개입이 RCT에서는 효과가 없다는 점이 지나치게 자주 입증되어 왔다는 인식에서 발생하였음에도 불구하고, 일반 임상 및 의료 환경에서 매우 드물게 사용되어 왔다(Jorgensen, 2008, Expert Rev. Mol. Diagn. 8(6):689-695; Jorgensen, 2009, Oncologist 14(5):557-558). 의약의 임상 실습이 종종 매우 고비용의 치료 옵션이 필요한 희귀 질환이 있는 환자들의 독특한 개별 특성을 인식하고 받아들여야 하며, 환자 관리를 개인화하기 위해 노력해야 한다는 추정이 증가하고 있다(Hu et al., 2005, Biotechniques 39(10 Suppl):S1-S6; Langreth & Waldholz, 1999, Oncologist

4(5):426-427; Trusheim et al., 2007, Nat. Rev. Drug Discov. 6(4):287-293).

[0012] 현재의 신약 개발 시대에서, 대규모 샘플 병행 그룹 RCT는 종종 최적의 치료 용량, 환자 선별 기준, 및 반응자인 환자 비율의 초기 추정치(샘플 크기 결정을 위해 중요하다), 후속 시험의 기반이 되는 최적의 결과, 장기/생애 치료를 위한 안전성 등의 상세한 지식 없이 개시된다. 단일 환자가 상세하고 개별화된 정보를 이용할 수 있는 최근 환경에서의 수많은 이러한 이슈들을 해결하는데 있어서, 미국 국립보건원(National Institutes of Health, NIH)은 진보적인 "정밀 의약" 증거 기반 접근법에서 매우 개별화된 치료에 대한 환자 반응의 n=1 연구의 유용성을 지지하고 인정하였다. 개별화된 치료는 결과 평가를 개선하며, 이는 치료 처방이 환자의 질환 계층화에 맞춤화되기 때문이다. 예를 들어, 항암제 세툭시맙(cetuximab)(대장암)은 종양 내의 KRAS 단백질이 특정한 돌연변이를 갖는 경우 무효하며(Van Cutsem et al., 2009, N. Engl. J. Med. 360(14):1408-1417), 미국 FDA는 상기 약물을 사용 전에 유전자 프로파일링을 요구하도록 재표기하였다. 많은 다른 약물은 특정 환자 계층에서 다양한 효과를 갖고 있어, FDA 재표기를 야기하였다(예를 들어, 와파린, 카르바마제핀, 클로피도그렐)(Flockhart et al., 2009, Clin. Pharmacol. Ther. 86(1):109-113; Topol, 2010, Sci. Transl. Med. 2(44):44cm22). 또한, FDA는 n=1 프로토콜이 승인 과정을 용이하게 하는 치료를 이용한 동반 진단 시험에 대한 능률적인 검토 접근법을 개발하고 있다(Hamburg & Collins, 2010, N. Engl. J. Med. 363(4):301-304).

[0013] n=1 임상 시험 접근법은 매우 비용 효율이 높지만, 질환 진행에서 정상 시간 경과를 갖는 지표 환자(index patient)와 일치하는 적절하게 긴 관찰 간격(질환의 자연 차도에 대한 검사를 위해 주기적인 "치료 정지" 간격(또는 "세척 시기")으로 배치)과 결부되어, 보다 많은 시간 투입과 전문 의료진에 의한 감독이 필요하다. 이러한 표적화된 n=1 장기 연구 접근법은 비용 효율이 높을뿐 아니라, 식습관 및 생활방식 변화, 질환의 진행/퇴행, 유의미한 환자 혜택 등과 같은, 집단 조사에서 존재할 수 있는 치료의 많은 교란 모호성을 해결하였다. n=1 접근법은 미래의 "개인 맞춤형 의약" 지향의 추세를 반영하며, 환자가 그 자신의 대조군으로 작용할 수 있어 준-통계적 정확도를 가지므로, 맞춤화된 치료 결과의 신뢰성을 증가시킨다. 사실, n=1 임상 연구는 고도로 표적화된 치료의 평가를 위해 거의 필수적으로 여겨질 수 있으며, 그 중 많은 경우는 RCT에 따르지 않을 수도 있는 바, 이는 치료에 대한 간격 분산(between variance)이 극도의 희귀 질환에 대해 상대적으로 소규모인 샘플 크기에 비하여 커질 수 있기 때문이다. 이러한 경우에, n=1 접근법은 환자에게 차선의 개입이 주어지는 시간을 최소화하는 임상 시험 설계의 타당성을 전형적으로 보여준다. 또한, 오랜 데이터 수집 과정을 갖는 순차적 설계(sequential design)는 희귀하고 독특한 질환에 특히 유용하다(Everitt & Pickler, 2004, Statistical Aspects of The Design of Clinical Trials. Imperial College Press; London, UK; Gerss & Kopcke, 2010, Adv. Exp. Med. Biol. 686:173-190; Meinert & Tonascia, 1986, Clinical Trials Design, Conduct, and Analysis Monographs in Epidemiology and Biostatistics. Vol. 469. Oxford University Press; NY, USA).

[0014] 유용성 있는 신규 개입에 대한 궁극적인 임상적으로 중요한 이슈는 부분 모집단에 대한 결과의 일반화 가능성이 있다. 여기서, n=1 임상 시험이 우수하면, 집단 수준 관련 연구를 위한 특정한 치료로부터 이득을 다소 얻을 수 있는 그룹으로 환자의 계층화가 가능해진다(Barlow et al., Strategies for Studying Behavior for Change. 3. Vol. 393. Pearson/Allyn and Bacon; MA, USA; Guyatt et al., 1986, N. Engl. J. Med. 314(14):889-892). 치료 반응에 대한 개체 변이는 개체군 변이를 반영하며, 계층화가 우수하게 나타날 경우(Kraemer et al., 2002, Arch. Gen. Psychiatry 59(10):877-883; Kent & Hayward, 2007, JAMA 298(10):1209-1212; Scuffham et al., 2010, J. Gen. Intern. Med. 25(9):906-913), n=1 임상 시험은 이러한 가변성을 객관적으로 정량화하고, 환자 자신의 데이터를 사용하여 개별 환자들을 치료하기 위한 정보화된 지침을 제공한다. 차선 치료를 확인하고 최소화하는데 있어서, n=1 임상 시험의 효율성은 RCT를 이용하는 표준 관리에 비해 월등해, 환자 관리를 개선하고 비용을 절감시킨다.

발명의 내용

[0015] 본원에는 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 점액 용해제를 투여하는 단계를 포함하는 폐 사르코이드증 치료 방법이 개시되어 있다. 특정 실시양태에서, 상기 점액 용해제는 DNase I, 예를 들어 재조합 인간 DNase I(rhDNase I)이다. 특정 실시양태에서, 상기 rhDNase I은 PULMOZYME®의 유효 성분인 rhDNase I이다.

[0016] 특정 실시양태에서, 상기 점액 용해제는 소듐 2-술파닐에탄술포네이트(sodium 2-sulfanylethanesulfonate)(UROMITEXAN®로서 미국에서 시판되는 메스나(mesna)), 디소듐 2,2'-디술판디일디에탄술포네이트(disodium 2,2'-disulfanediylidethanesulfonate)(디메스나(dimesna)), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0017] 특정 실시양태에서, 상기 방법은 DNase I 및 추가의 점액 용해제를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에

서, 상기 추가의 점액 용해제는 메스나, 디메스나, N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다. 점액 용해제일뿐 아니라, 메스나, 디메스나, 및 N-아세틸시스테인은 자유 라디칼 제거제(scavenger)이다. 폐 세포 산화 방지제 방어는 폐 사르코이드증에 대한 염증 반응에서의 파괴적 자유 라디칼의 증가된 조직 수준에 따라 상당히 감소한다(Boots, et al., 2009, Resp. Med., 103:364). 이러한 발견은 메스나, 디메스나 및 N-아세틸시스테인과 같은 자유 라디칼 제거 화합물의 동시 사용의 추가된 유용성을 시사한다. PULMOZYME과 같은 rhDNase I이 추가의 점액 용해제와 함께 환자에게 투여되는 이러한 실시양태에서, rhDNase I은 추가의 점액 용해제 투여 전, 후, 또는 동시에 투여될 수 있다. 바람직하게는, 상기 rhDNase I은 추가의 점액 용해제 전 또는 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, rhDNase I은 분무에 의해 투여되고 메스나 또는 디메스나는 정맥주사로 투여된다. 이러한 실시양태에서, 메스나 또는 디메스나는 자유 라디칼 제거제로서 작용한다.

[0018] 특정 실시양태에서, 상기 방법은 급성 폐 사르코이드증 환자(< 2년 동안에 사르코이드증으로 진단된 환자)를 치료한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 만성 폐 사르코이드증 환자(≥ 2년 동안에 사르코이드증으로 진단된 환자)를 치료한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 12년 이상의 기간 동안 만성 폐 사르코이드증에 걸린 환자를 안전하게 치료한다.

[0019] 만성 폐 사르코이드증으로 진행하는 환자는 재발성 전염병/폐섬유증으로 인해 매우 급속하게 악화되며, 일반적으로 12년 동안 살지 못한다. PULMOZYME®과 같은 rhDNase I를 이용한 치료는 질환 또는 재발하는 폐의 악화의 진행 없이, 또는 최소한의 진행으로 장기화(12년 이상)될 수 있었다. (관찰된 폐 섬유증 및 폐기종과 같은 폐 영역의 손실에 연대적으로 아마도 관여하는) 호중성 프로테아제, 염증성 사이토카인, 산화질소, 및 산소 자유 라디칼을 방출하는, 주화성으로 끌어들인 호중구에 의해 폐쇄성 폐렴 및 조직 손상을 효과적으로 예방하는 PULMOZYME®로 재발성 기도 감염을 예방함으로써, 폐섬유증 및 사망으로 진행되지 못하게 할 수 있다.

[0020] 폐 사르코이드증 환자에서의 PULMOZYME®과 같은 rhDNase I의 사용과 관련한 핵심 질문은 "장기 사용이 환자에 의해 용인되며, 임상 상태가 치료되지 않거나 스테로이드 저항성 질환에서와 같이 악화되는가?"이다. 본원에 기재된 실험 결과들 - 부작용 또는 사고 없이 PULMOZYME®을 이용해 12년 이상의 치료를 받은 환자가 어떠한 폐의 악화도 전혀 갖지 않음 - 은 이러한 질문에 대한 답이 "예"임을 나타낸다.

[0021] PULMOZYME®은 심각하게 고통받는 폐 사르코이드증 환자들에게 있어서, 폐섬유증 및/또는 객혈 및 사망으로 이어지는 기관지 손상, 점액 제거 장애, 재발성 염증 및 보다 큰 손상의 주기를 중단시킨다.

[0022] 본원에 기재된 방법은 다른 약물(예를 들어, 코르티코스테로이드)에 대한 필요성 감소, 기침 감소, 세균감염의 횟수 및 심각성 감소, 환자의 혈액 산소 포화도 개선, 및/또는 큰 신체적 활동 허용(예를 들어, 운동부하 개선)에 의해, 폐 사르코이드증 환자의 건강을 개선할 수 있다.

[0023] 본 발명의 특정한 실시양태는 이하를 포함한다:

[0024] 1. 치료 유효량의 점액 용해제를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 폐 사르코이드증(pulmonary sarcoidosis) 치료 방법. 다른 실시양태는 이하를 포함한다:

[0025] 2. 실시양태 1에 있어서, 상기 점액 용해제는 DNase I인 방법.

[0026] 3. 실시양태 1에 있어서, 상기 점액 용해제는 소듐 2-술파닐에탄술포네이트(sodium 2-sulfanylethanesulfonate), 디소듐 2,2'-디술판디일디에탄술포네이트(disodium 2,2'-disulfanediyl diethanesulfonate), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

[0027] 4. 실시양태 1에 있어서, 상기 DNase I은 재조합 DNase I인 방법.

[0028] 5. 실시양태 4에 있어서, 상기 재조합 DNase I은 재조합 인간 DNase I인 방법.

[0029] 6. 실시양태 5에 있어서, 상기 재조합 인간 DNase I은 흡입에 의해 환자의 폐에 투여되는 방법.

[0030] 7. 실시양태 6에 있어서, 상기 흡입은 네뷸라이저(nebulizer)의 사용으로 수행되는 방법.

[0031] 8. 실시양태 5에 있어서, 상기 재조합 인간 DNase I은 천연 인간 DNase I의 아미노산 서열을 갖는 방법.

[0032] 9. 실시양태 5에 있어서, 상기 재조합 인간 DNase I은 서열 3(SEQ ID NO. 3)의 아미노산 서열을 갖는 방법.

[0033] 10. 실시양태 1에 있어서, 상기 폐 사르코이드증은 급성 폐 사르코이드증인 방법.

- [0034] 11. 실시양태 1에 있어서, 상기 폐 사르코이드증은 만성 폐 사르코이드증인 방법.
- [0035] 12. 실시양태 1에 있어서, 환자에게 항생제를 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0036] 13. 실시양태 1에 있어서, 환자에게 기관지 확장제(bronchodilator)를 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0037] 14. 실시양태 1에 있어서, 환자에게 흉부 물리 치료 또는 체위배액(postural drainage)을 수행하는 단계를 포함하는 방법.
- [0038] 15. 실시양태 4에 있어서, 소듐 2-술파닐에탄솔포네이트; 디소듐 2,2'-디솔판디일디에탄솔포네이트; N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine); 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 추가의 점액 용해제를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 Shak et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9188-9192에서 보고된 뉴클레오티드 서열 1(SEQ ID NO. 1) 및 인간 DNase I의 유추되는 아미노산 서열 2(SEQ ID NO. 2)을 나타낸 것이다. 뉴클레오티드는 좌측에 번호가 매겨져 있다. 아미노산들은 성숙 효소 서열의 Leu +1에서 시작하여 22-아미노산 추정 시그널 서열(밀줄)에 앞선 라인의 상부에 번호가 매겨져 있다. 4개의 시스테인잔기들은 굽은 글씨로 인쇄되어 있다. 2개의 잠재적 N-결합 글리코실화 부위는 아미노산 서열 상부에 선에 의해 표시되어 있다.
- 도 2는 미국특허 제6,348,343호에서 보고된 천연 인간 DNase I (SEQ ID NO. 3)의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- 도 3은 실시예 1에서 환자의 치료에 대한 임상 시간표를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 본원에서 사용된 "DNA 가수분해 활성"은 5'-인산화 올리고뉴클레오티드 최종 산물을 생성하도록 DNA를 절단하기 위한 천연 인간 DNase I 또는 천연 인간 DNase I의 변이체의 효소 활성을 의미한다.
- [0041] 본원에서 사용된 "점액 용해제"는 폐의 기도로부터 점액을 완화하고 제거하기 위해 점액을 용해시키는데 사용되는 물질을 의미한다.
- [0042] 본원에서 사용된 "환자"는 인간 환자를 의미한다.
- [0043] 본원에서 사용된 "rhDNase I"는 재조합 인간 DNase I, 다시 말해 중국 햄스터 난소(CHO) 세포와 같은 특정 숙주 세포에서 인간 DNase I를 코딩하는 DNA 작제물(DNA construct)을 발현함으로써 얻어진 인간 DNase I를 의미한다.
- [0044] 본원에서 사용된 "인간 DNase I의 변이체"는 천연 인간 DNase I과 상이하지만 천연 인간 DNase I과 적어도 90%의 아미노산 서열 동일성(amino acid sequence identity)을 여전히 유지하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0045] 본원에서 사용된 "치료 유효량"은, 예를 들어 폐 사르코이드증과 관련된 하나 이상의 증상을 지연 또는 최소화 시키거나, 폐 사르코이드증에 대한 또 다른 치료제에 의해 제공된 치료 이득을 향상시킴으로써, 폐 사르코이드증의 치료 또는 관리에 치료 이득을 제공하는 점액 용해제의 양을 의미한다.
- [0046] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용되는 rhDNase I의 형태는 천연 인간 DNase I을 발현시키도록 유전자 조작된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로부터 얻어진 rhDNase I의 고도로 정제된 수용액을 포함하는 PULMOZYME®에서 발견되는 것이다. PULMOZYME® 내의 rhDNase I은 37,000 달톤의 분자량을 가진 260 개의 아미노산을 포함하고 있는 단백질이다. 이러한 단백질의 주요 아미노산 서열은 천연 인간 DNase I의 아미노산 서열과 동일하다. 그 일반적 명칭은 도르나제 알파(dornase alfa)이다. 특정 실시양태에서, PULMOZYME®은 낭포성 섬유증 환자들에게 투여되는 것과 동일한 일반적 방식(예를 들어, 투여량 및 투여 방법)으로 폐 사르코이드증 환자들에게 투여된다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용되는 rhDNase I의 형태는 PULMOZYME®의 바이오시밀러(biosimilar)이다.
- [0047] 천연 인간 DNase I의 DNA 및 아미노산 서열은 Shak et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9188-9192 (Shak)에서 발견할 수 있다. 또한, Shak에서는 인간 퀘장 cDNA 라이브러리로부터의 λgt10에서 복제됨으로써 인간 DNase I을 코딩하는 뉴클레오티드가 어떻게 얻어질 수 있는지, 상기 뉴클레오티드가 어떻게 재조합적으로 발

현될 수 있는지에 대한 상세한 설명도 발견할 수 있다. 이러한 Shak의 개시 내용은 본원에 참조로 포함된다. Shak의 도 1A는 천연 인간 DNase I의 DNA 및 아미노산 서열을 나타내며, 본 발명의 도 1로서 본원에 재현된다.

[0048] PULMOZYME®에서 발견된 rhDNase I의 대안으로서, 본원에 기재된 방법은 상이한 rhDNase I를 투여함으로써 실시될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 제5,279,823호는 사용될 수 있는 탈아미드화된 rhDNase I를 개시하고 있다. 미국특허 제6,348,343호는 본원에 기재된 폐 사르코이드증을 치료하기 위한 방법에 사용될 수 있는 천연 인간 DNase I에서 발견되는 것과 약간 상이한 아미노산 서열을 갖는 rhDNase I 변이체를 개시하고 있다. 예를 들어, 이하에 기재되어 있다:

[0049] 천연 인간 DNase I의 서열에 대응하는 이하 위치에서 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 인간 DNase I (SEQ ID NO: 3)의 변이체: Leu45, Val48, Gly49, Leu52, Asp53, Asn56, His64, Tyr65, Val66, Val67, Ser68, Glu69, Ser94, Tyr96 or Ala 114, 여기서 상기 변이체는 DNA 가수분해 활성을 갖는다;

[0050] SEQ ID NO: 3과 적어도 99%가 동일한 아미노산 서열을 갖는 인간 DNase I의 변이체, 여기서 상기 변이체는 DNA 가수분해 활성을 갖는다;

[0051] SEQ ID NO: 3과 적어도 95%가 동일한 아미노산 서열을 갖는 인간 DNase I의 변이체, 여기서 상기 변이체는 DNA 가수분해 활성을 갖는다;

[0052] SEQ ID NO: 3과 적어도 90%가 동일한 아미노산 서열을 갖는 인간 DNase I의 변이체, 여기서 상기 변이체는 DNA 가수분해 활성을 갖는다;

[0053] 하나의 아미노산 치환만에 의해 SEQ ID NO: 3과 상이한 아미노산 서열을 갖는 인간 DNase I의 변이체, 여기서 상기 변이체는 DNA 가수분해 활성을 갖는다;

[0054] E13A, E13H, E13R, E13W, E13Y, H44A, H44D, H44Y, H44W, H44C, H44Q, H44N, H44E, L45C, L45K, L45R, V48C, V48K, V48R, G49C, G49I, G49K, G49R, G49Y, L52C, L52K, L52M, L52N, L52R, D53A, D53K, D53R, D53Y, D53C, D53L, D53M, N56C, N56F, N56K, N56L, N56R, N56W, D58T, H64N, Y65A, Y65R, Y65W, Y65C, Y65K, Y65M, Y65S, Y65N, Y65E, Y65P, V66T, V66N, V67A, V67E, V67K, V67C, V67D, V67H, V67M, V67P, V67R, V67S, V67T, V67N, S68K, S68R, S68M, S68N, E69K, E69R, E69A, E69C, E69M, E69T, P70T, S94N, Y96T, A114C, A114E, A114G, A114H, A114K, A114L, A114M, A114Q, A114R, A114W 및 A114Y로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 인간 DNase I(SEQ ID NO: 3)의 변이체, 여기서 상기 변이체는 DNA 가수분해 활성을 갖는다;

[0055] E13A, E13H, E13R, E13W, E13Y, H44A, G49R, D53R, D53K, D53Y, D53A, D53C, N56R, Y65A, Y65R, Y65W, V67E, E69K, E69R A114G 및 A114H로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 인간 DNase I(SEQ ID NO: 3)의 변이체; 및

[0056] H44A:D53R:Y65A, H44A:Y65A:E69R, D53R:Y65A, D53R:E69R, S94N:Y96T, V67N:E69T, Y65N:V67T 및 H64N:V66T로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 인간 DNase I(SEQ ID NO: 3)의 변이체.

[0057] 또한, 미국특허 제6,391,607호는 본원에 기재된 폐 사르코이드증을 치료하기 위한 방법에 사용될 수 있는 천연 인간 DNase I에서 발견되는 것과 약간 상이한 아미노산 서열을 갖는 rhDNase I 변이체를 기재하고 있다. 예를 들어, 천연 인간 DNase I (SEQ ID NO: 3)의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성 및 천연 인간 DNase I의 Gln9, Thr14, Asn74, Ser75, 및 Thr205에 대응하는 하나 이상의 아미노산 잔기에서의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 DNase I 변이체가 기재되어 있다.

[0058] rhDNase I은 적합한 인간 DNase I을 코딩하는 적합한 발현 벡터로 형질감염된 CHO 세포를 배지(medium)에서 성장시키고, 통상의 수단, 예를 들어 접선류 여과(tangential flow filtration) 및 칼럼 크로마토그래피에 의해 상기 rhDNase I을 정제함으로써 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 재조합적으로 제조될 수 있다. 대안적으로, rhDNase I은 당업계에 공지된 바와 같은 다른 적합한 재조합 숙주 세포를 사용해 제조될 수 있다.

[0059] 본원에 기재된 방법에서 사용되는 점액 용해제는 적합한 네뷸라이저 또는 네뷸라이저/컴프레서 시스템을 사용하는 흡입에 의해 폐에 투여될 수 있다. 적합한 네뷸라이저/컴프레서 시스템은 이하를 포함한다:

[0060] 허드슨(Hudson) T UP-DRAFT II® 네뷸라이저와 PULMO-AIDE® 컴프레서;

[0061] 마퀘스트(Marquest) ACORN II® 네뷸라이저와 PULMO-AIDE® 컴프레서;

[0062] PARI LC® Jet+ 네뷸라이저와 PARI PRONEB® 컴프레서;

- [0063] PARI BABY® 네뷸라이저와 PARI PRONEB® 컴프레서;
- [0064] 내구성 있는 SIDESTREAM® 네뷸라이저와 MOBILAIRE® 컴프레서; 및
- [0065] 내구성 있는 SIDESTREAM® 네뷸라이저와 PORTA-NEB® 컴프레서.
- [0066] 상기 점액 용해제가 DNase I일 경우, 약 2.5 mg의 투여량이 1일 1회 사용될 수 있다. 대안적으로, 약 2.5 mg의 투여량이 1일 2회 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 양은 1일당 1회 또는 2회에 약 0.5 mg, 약 1.0 mg, 약 1.5 mg, 약 2.0 mg, 약 2.5 mg, 약 3.0 mg, 약 3.5 mg, 약 4.0 mg, 약 4.5 mg, 또는 약 5.0 mg을 포함한다. 1 일당 1회 또는 2회로, 0.5 mg 내지 5.0 mg, 1.0 mg 내지 4.0 mg, 또는 1.5 mg 내지 3.5 mg의 투여량도 또한 이 용될 수 있다.
- [0067] 특정 실시양태에서, 상기 점액 용해제는 특정 기간 동안 주당 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7 회 흡입에 의해 환자에게 전달된다. 특정 실시양태에서, 상기 기간은 약 1주, 약 2주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 6개월, 약 9 개월, 약 1년, 약 2년, 약 3년, 약 4년, 약 5년, 약 6년, 약 7년, 약 8년, 약 9년, 약 10년, 약 11년, 또는 약 12년이다.
- [0068] 치료 유효량의 rhDNase I 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물은 본원에 기재된 방법에 따라 폐 사르코이드증에 대한 치료를 필요로 하는 환자들에게 투여될 수 있다. DNase I의 완충 또는 비완충 수용액, 예를 들어 pH 7에서 1.0 mM의 염화칼슘을 포함하고 있는 150 mM의 염화나트륨 같은 등장성 염 용액이 적합한 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0069] 한 실시양태에서, rhDNase I은 방부제 없이 1.0 mg/mL의 도르나제 알파, 0.15 mg/mL의 염화칼슘 탈수물, 및 8.77 mg/mL의 염화나트륨 염을 포함하고 있는 멸균 수용액으로서 투여된다. 상기 용액의 공청(nominal) pH는 6.3이다. 한 실시양태에서, rhDNase I은 네뷸라이저를 통해 2.5 mL의 상기 용액을 전달하는 일회용 앰플로 공급된다.
- [0070] 특정 실시양태에서, 상기 방법은 폐 사르코이드증에 대한 치료를 필요로 하는 환자에게 점액 용해제 및 경구 코르티코스테로이드, 예를 들어 프레드니손 또는 프레드니솔론을 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 폐 사르코이드증에 대한 치료를 필요로 하는 환자에게 점액 용해제 및 기관지 확장제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0071] 특정 실시양태에서, 상기 방법은 폐 사르코이드증에 걸린 환자에게 점액 용해제 및 항생제를 투여하는 단계를 포함한다. 상기 점액 용해제는 DNase I일 수 있으며, 상기 항생제는 TOBREX®, TOBI®, 토브라마이신(tobramycin), AKTOB®, BETHKIS®, TOBI® 포드할러(Podhaler), PROVENTIL®, VENTOLIN®, 알부테롤(albuterol), ZITHROMAX®, 아지트로마이신(azithromycin), 아자사이트(Azasite), Cotazym, CREON®, ZENPEP®, 판크레아제(Pancreaze), PERTZYE®, ULTRESA®, VIOKASE®, 네브신(Nebcin), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 항생제는, 예를 들어 내뷸라이저를 사용하는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 상기 항생제는 점액 용해제와 함께, 또는 별도로 투여될 수 있다.
- [0072] 특정 실시양태에서, 점액 용해제는 폐 사르코이드증을 치료하는데 전형적으로 사용되는 비약제학적 요법(예를 들어, 흉부 물리 치료 및/또는 체위배액)에 의해 투여될 수 있다.
- [0073] **실시예**
- [0074] 환자(중년 여성, 아프리카 혈통)는 매년 항생제 치료가 필요한 다발성 폐의 악화로 만성 폐 사르코이드증을 쇠약하게 하는 병력이 있었다. 지속적인 기침으로 늑골 골절 및 복강내 혜르니아(abdominal hernia)가 발생하였다. 간혹, 상기 환자는 아파서 누워있거나(bedridden), 호흡 곤란이 있었으며, 의자에 오르거나 10 피트 이상 걸을 수 없었다. 스테로이드가 폐 전문의에 의해 처방되었다. 그러나 스테로이드 치료의 부작용(당뇨, 체중 증가, 기억 손실, 정신 착란, 심하게 손상된 관절 통증)을 견딜 수 없었다. 상기 환자의 폐 사르코이드증은 스테로이드 치료에 대해 궁극적으로 저항성으로 여겨져서, 중단되어 이 환자에 대해 근본적으로 아무런 치료 옵션도 남아있지 않았다.
- [0075] 치료를 개시하기 위해 면허를 소지한 의사에 의해 PULMOZYME®가 환자에게 처방되었다. 환자는 PULMOZYME® 치료에 대해 이하와 같이 반응하였다:
1. PULMOZYME®과 관련한 부작용 보고 - 10년 이상의 치료 동안 없음;
 2. 기침, 천명, 호흡장애 - 없음(개선된 폐 기능을 유지하기 위해 지속적인 PULMOZYME® 치료가 주당 3-4일 요

구되었으나, 치료를 중단하기 위한 주기적 시도로 즉시 퇴행하기 시작한다)

[0078] 3. 현재, 동맥의 O₂ 포화도는 실내 공기에서 98%이다(finger pulse oximetry);

[0079] 4. 치료 동안의 운동 부하 - 제한되지 않음;

[0080] 5. 폐의 악화(폐렴) - 10년 이상의 치료 동안 없음;

[0081] 6. 육아종 형성/가래 배출 - 가끔;

[0082] 7. 폐 사르코이드증과 관련한 응급실 방문과 입원 - 10년 이상의 치료 동안 없음;

[0083] 8. 치료 동안의 혈액화학, 간 및 신장 기능 - 정상;

[0084] 9. PULMOZYME® 치료 동안 치료된 무관한 임상 상태:

[0085] a. 척추마취 동반 복식자궁절제;

[0086] b. 부비강염 - 항히스타민제로 2회 치료;

[0087] c. 흉벽 지방종 - 국소마취 하에서 외과적으로 제거;

[0088] d. 후방 무릎 지방종 - 국소마취 하에서 외과적으로 제거;

[0089] 10. 체위배액 동반 흉부 물리 치료 - PULMOZYME® 치료 동안 요구되지 않음;

[0090] 11. 늑골 골절 및 복강내 헤르니아 - PULMOZYME® 치료 동안 없음;

[0091] 12. 일반적인 삶의 질 - PULMOZYME® 치료 동안 크게 개선.

[0092] 만성 폐 사르코이드증의 치료에 대한 이러한 임상 소견들은 흑인 여성 환자들이 전형적으로 좋지 못한 장기간의 예후 및 높은 재발률과 함께 보다 심각한 폐 침범(invovement)을 가지므로, 더욱 주목할만 하다.

[0093] 폐 사르코이드증의 특성을 고려하였을 때, 상기 기재된 환자에 대한 연장된 임상 시간표는 적절했다. 모든 폐 사르코이드증 환자들의 약 50%가 증상 발현의 2년 이내에 차도를 경험한다. 질병의 발현에 대한 스캐딩(Scadding) 방사선 단계는 대략적인 차도 가능성을 예측한다는 점은 일반적으로 인정된다. 일부 경우에는, 경구 스테로이드 치료로 차도가 따르지만, 모든 경우에서 차도의 원인은 공지되어 있지 않다. 폐섬유증(단계 IV) 환자들은 차도를 경험하지 않으며, 적은 비율의 만성 폐 사르코이드증 환자(20% □)만이 차도를 겪는다.

[0094] 폐 사르코이드증에서 질환의 진정한 차도가 예측되지 않는 반면에, 말기 질환은 환자의 상태가 점진적으로 악화됨에 따라 전형적으로 5-10년의 기간에 걸쳐 진행된다. 만성 폐 사르코이드증에 대한 전형적인 임상 과정은 폐 기능의 지속적인 악화로서, 다양하게는 i) 폐 실질 조직 파괴; ii) 객혈, iii) 폐렴; 또는 iv) 간질성 섬유화(interstitial fibrosis)로 인해 급성 호흡 부전(ARF)으로 종료된다.

[0095] 가장 나쁜 임상 예후는 이하 기재된 환자와 관련되어 있었다:

[0096] i) 발병시 나이 >40

[0097] ii) 흑인 혈통

[0098] iii) 여성

[0099] iv) 스테로이드에 대한 요구

[0100] v) 피부/신경학상 침범

[0101] vi) 단계 II-IV 흉부 방사선투과사진

[0102] vii) 상당한 폐 기능 장애

[0103] viii) ER 방문, 항생제, 입원 등을 요하는 재발성 폐렴

[0104] ix) 발현시 농축된 분비물에 의한 극심한 호흡장애

[0105] 상기 기재된 연장된 임상 시간표는 질환의 차도와 안정 사이의 구별이 이루어지도록 하였다. 치료적 개입에 의해 환자들의 질환이 안정화되어 준 안정화 상태로 유지되는 환자들로부터 차도가 있는 환자를 구별하기 위한 하나의 방법은 적합하게 긴 간격(아마도 ARF 및 사망으로 이어지는 간격과 동일)에 걸쳐 치료를 관찰하고, 질환

증상이 악화되거나 변화없이 유지되는지 여부를 관찰하기 위해 주기적으로 치료를 중단함으로써 질환의 진정한 차도를 표시하는 것이다. 이는 전형적인 "생존 창(survival window)"에 대해 상기 설명한 환자에 대해 매년 실시되었다(진행성 만성 질환이 있는 환자에 대해 8-14년).

[0106] 상기 기재된 PULMOZYME®을 이용한 환자의 치료에 대한 임상 시간표는 사전 치료 중, 모든 치료 간격에 대해 도 3에 도해적으로 나타내었다. 치료 중에는 환자가 비충혈, 두통 및 불쾌감과 함께, 몇몇의 수술 및 몇몇의 단기 간 상부 기도 감염을 겪었으나, 폐 악화는 조금도 나타나지 않았다. 맥박산소측정(pulse oximetry)을 통한 동맥 산소 투여가 사전 PULMOZYME® 치료 간격 동안 $SaO_2 = 70\%$ 로부터, 실내 공기에서 최근 측정된 $SaO_2 = 99\%$ 까지 개선되었고, 이는 운동 능력에서의 점진적인 개선 및 운동 시 호흡장애의 소실과 일치한다. 상기 환자는 질환의 퇴행이 발생하였거나, PULMOZYME®을 이용한 지속적인 치료가 필요한지 여부를 결정하기 위해 치료 기간 동안 매년 2주 간격 동안 PULMOZYME®을 이용한 치료를 자발적으로 중단하였다. PULMOZYME® 치료 중단의 각각의 사례에서, 환자의 폐 질환 증상들(호흡장애, 놓축된 분비물 등)이 악화되었으나, PULMOZYME® 치료(2.5 mg qd 4 x 매주)의 재개시 해결되었다. 가끔, 상기 환자는 폐 조직의 "덩어리" 배출, 아마도 유출된 기도 육아종을 보고하였으며, 가장 최근의 표본은 회복되어 조직병리학용 10% 포르말린에서 고정되었다. 상기 환자의 일상적인 흉부 x-레이에는, 보다 극심한 질환으로 진행되지 않은 흉터의 증거로, 치료 중의 개선을 보여주었다. PULMOZYME® 치료 동안 인지된 일시적인 기침 애피소드들은 점액 플러그 및/또는 유출 육아종의 배출로 인해, 주기적인 기관지 자극과 연관되어 있었으며, 어떠한 것도 복강내 헤르니아 또는 늑골 골절을 일으키기에 충분하지 않았다. 환자의 사르코이드 피부 침범은 변화되지 않았으며, 환자의 식사는 제한되지 않았다. 상기 환자는 최근 양호한 건강 상태이며, 현저하게 개선된 삶의 질을 즐기고 있으나, PULMOZYME®을 이용한 치료를 2.5 mg qd, 4x - 5x 매주의 유지 스케줄로 가까운 미래 동안 지속해야 한다.

[0107] 이러한 질환의 임상 증상 및 신호의 근접 모니터링을 이용한 장기간에 걸친 상기 단일 환자의 관찰은 삶의 질에 있어서 놀라운 치료 관련 개선, 폐 악화의 완벽한 부재, 및 혈액 산소포화도/운동 부하에 있어서 주목할만한 개선을 입증하였다. PULMOZYME®을 이용한 치료의 14일 동안의 연례적 중단은 모든 사례에서 질환 증상의 악화(증가된 기침, 호흡장애 및 신체적 불편)를 유발하였으므로, 질환의 차도는 이 환자에서 분명하지 않았다. 이러한 순차적 장기 모니터링은 PULMOZYME® 치료의 유익한 결과 및 장기 사용과 관련된 부작용의 완벽한 부재에서 매우 높은 수준의 신뢰성을 제공한다.

[0108] 상기 환자에 있어서 만성 폐 사르코이드증의 점진적 특성 및 매우 낮은 차도 가능성으로 인해, PULMOZYME® 치료의 단기간에 걸친 관측으로부터 유의미한 결과를 이끌어내기는 어렵다. 대신에, 연장된 기간의 순차적 관찰을 실시하였고, 이는 단일 환자만이 연구되고 또 치료 중단 이외는 단일 환자에서 질환의 진행 또는 차도를 평가하기 위해 사용될 수 있는 어떠한 시험 또는 지표도 없었기 때문이다.

[0109] 상기 기재된 치료에서는 6개의 기본적으로 중요한 질문이 확정적으로 다루어졌다:

[0110] 1. 생애 치료가 예상되는 경우에, 단기 치료 간격(1년)은 장기 반응(10년)을 예측하는가(Kravitz et al., 2009, Contemp. Clin. Trials 30(5):436-445)?

[0111] 2. 치료적 개입은 부정적 약물 반응(ADR) 없이 무제한적으로 용인될 수 있는가?

[0112] 3. 실험 설계는 정상 상태의 환자 불균형에서 유지 요법(maintenance therapy)에 대한 지속적인 필요성으로부터 질환의 자발적 차도를 구분할 수 있는가?

[0113] 4. 환자 삶의 질 개선은 치료에 의해 필요한 비용과 노력에 의해 정당화되는지, 또 장기 치료를 평가하기 위해 필요한 평가 도구는 무엇인가?

[0114] 5. $n=1$ 시험은 치료 효능 및 용인성(tolerability)이 수립되거나 입증될 때까지 지속될 수 있는가(Guyatt et al., 1986, N. Engl. J. Med. 314(14):889-892; Rochon, 1990, J. Clin. Epidemiol. 43(5):499-508)?

[0115] 6. 미국 FDA에 의한 치료적 개입의 공식 마케팅 승인을 위해 필수적인 대집단 기반의 RCT를 위한 계층화된 치료 집단(arm)을 개발하기 위해 $n=1$ 결과가 사용될 수 있는가?

[0116] 상기 질문에 대한 답변에서, 목적은 "증거 기반" 의약을 용이하게 하는 계획을 지지하기 위해 지표 만성 폐 사르코이드증 환자를 위해 이러한 $n=1$ 계층화 의약 접근법을 이용하는 것이며(Guyatt et al., 2000, Evidence-Based Medicine Working Group, JAMA 284(10):1290-1296; Sackett et al., 1996, BMJ 312(7023):71-72; Lauer & Collins, 2010, JAMA 303(21):2182-2183; Collins, 2010, Science 327(5961):36-37), 보다 중요하게는, 대체적인 치료 옵션 없이 극심한 고통을 받는 환자를 위해 치료적 정확성을 신속하게 최대화하는 것이다. 매우 중요

한 목표는 치료 과정 동안 생긴 객관적, 결과 중심 기준을 사용해 최적의 개별화된 치료를 결정하는 것이다. 이러한 n=1 시험의 객관적 결과를 기반으로, 이 환자는 위험이 큰 대규모 비균질 집단 내에서 특정한 임상 위험성 프로파일 및 질환의 단계와 스펙트럼을 바탕으로 개별적인 치료 계층화를 수립함으로써 어떻게 개별 결과들이 개선될 수 있었는가를 식별하는 핵심 통찰을 제공하는데 도움이 되었다. 또한, 개별화된 치료의 일부로서, 지표 환자를 이용한 연례적 무치료("세척") 간격들은 시간에 걸쳐 장기 치료의 지속적인 이득을 주기적으로 평가하기 위해 이용되었다.

[0117] n=1 임상 시험에 대한 하나의 단점은 지속적인 장기 모니터링이 요구되며, 환자 모집 및 유지 문제와 관련이 있다. 이러한 적용의 지표 환자에 대해, 모집, 유지 및 준수는 문제가 되지 않았는데, 이는 어떠한 대체적 치료도 존재하지 않았고, 착수 시 환자의 고통 상태가, 사전 시도된 비효과적 표준 관리를 이용한 장기간의 차선 치료를 겪어야 하는 환자측에 있어서 비자발성과 연결된 비관적이고, 지속적으로 쇠퇴하는 의학 예후를 초래하였기 때문이다(도 3에 나타낸 임상 시간표 참조).

[0118] n=1 임상 시험에 대한 두번째 단점은 치료 결과의 해석에 대한 생활 방식 변화(식습관의 변경, 다른 건강관리 문제들, 운동 식이요법 등)의 교란 효과와 관련되어 있다. 그러나, 이러한 교란 변수들은 지표 환자에 대해 시간 경과에 따라 기본적으로 평균화된다. 여기서, 시험 기간의 증가(임상 시간표 참조)는 질환의 자발적 차도 가능성을 비롯한, 교란 변수 효과와 관련된 모호성을 명확하게 해결하였다. 세척 기간(매년 2주의 "비치료" 간격)은 예외없이 질환 증상의 재발과 연관되었으며, 이는 지표 만성 폐 스르코이드증 환자가 준-매일 치료가 필요한 CF 환자와 유사해질 것이라는 점을 나타내었다. 또한, 환자의 주관적인 경험은 치료의 유용성을 확인하였으며, 부정적 약물 반응(ADR)은 본원에 기재된 모든 치료 간격에 걸쳐 관찰되지 않았다.

[0119] PULMOZYME®은 연구 기간 및 지표 환자의 주관적, 객관적 반응들을 기반으로 안전하고 효과적인 평생 치료 처방으로 명확히 입증되었다. 환자 안전의 위태로움을 회피하기 위해 세척 간격 동안 환자를 매일 모니터링 하였음을 유의해야 한다 - RCT의 위약 집단(arm)과 유사한 접근법. 또한, 환자는 신체적 상태(호흡장애, 과도한 기침, 변색된 점액 등)가 악화되는 경우 치료를 재개하도록 지시받았다. 전형적으로 이러한 질환 증상들은 2주의 세척 간격 말미에 앞서, 1주 및 2주 사이에 재발하기 시작하였다.

[0120] 이러한 지표 환자의 장기 결과로부터, 표준 RCT에서 미래 환자군의 특정 계층화가 적절함이 분명하지만, 이러한 노력은 수천만 달러의 비용이 들 것이며, 다수의 국제적 임상 센터 및 합리적으로 대규모인 임상 연구 팀을 수반할 것이다. 본원에 개시된 작업은 임상 연구의 다음 단계를 수립하고, 충분한 자금을 형성하며, 만성 폐 사르코이드증에 사용하기 위한 PULMOZYME®의 미국 FDA 승인으로 이어질 RCT를 완성시키기 위한 핵심이다. 미국이 건강관리 위기 상태에 있다는 인식은 의학 연구의 발전을 위한 진지한 요청(Collins, 2010, Science327(5961):36-37) 및 현재까지 성공적인 치료를 완강히 저항해온 만성 폐 사르코이드증의 희귀 질환에 대한 정밀한 의약 접근법의 채택에 동기를 부여하였다.

[0121] 장기 환자의 장기 PULMOZYME® 치료는 만성 폐 사르코이드증의 이환율을 극적으로 감소시키고, 삶의 질이 개선 함음을 입증하였다. 질환 차도는 이 환자에 대한 치료 간격 동안에는 발생한 것으로 나타나지 않았으며, 의학적 개선은 지속적인 PULMOZYME® 치료에 완전히 의존적이었다. 폐 사르코이드증의 증상은 이 환자에 대해 있어 왔고 완화된 상태를 유지하는 반면, 질환의 근본적인 원인이 남아 있으며, 치료의 중단시 급격한 질환 진행의 가능성이 있다.

도면

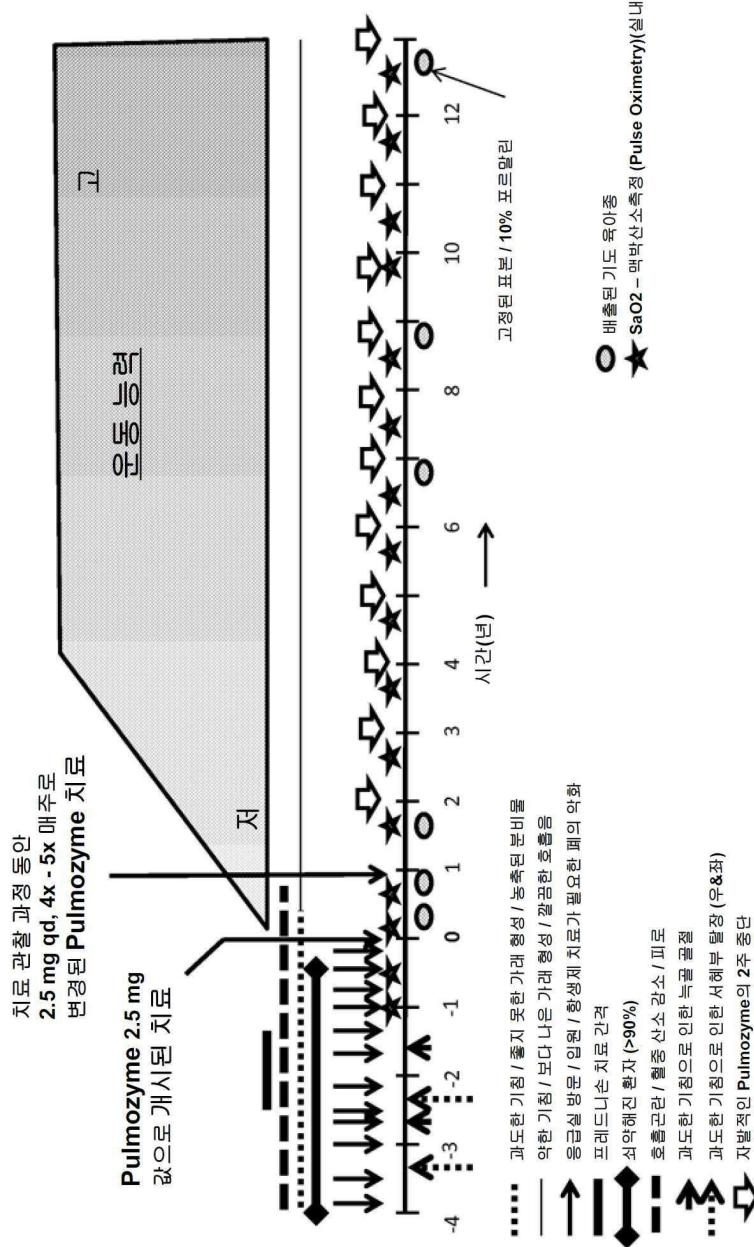
도면1

1 TCCCTGACAGGAGTGGCTTAAGTGTCTTCAGAGCTTTCTCAAGAGAAATTTGTCTAAAGGAGAAATTCCAGATTCTTGAGAG
-10
Met Arg Gly Met Lys Leu Ile Gly Val Leu Leu Ala Ala Leu Ala Val Ser Lys Ile Ala Val Ala Val
10 20 30 40
Met Arg Gly Met Lys Leu Ile Gly Val Leu Leu Ala Ala Leu Ala Val Ser Lys Ile Ala Val Ala Val
Phe Asn Ile Gln Ile Trp Phe Ile Gln Val Ser Ile Val Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Val Arg Asp Ser His Ile
20 30 40
Phe Asn Ile Gln Ile Trp Phe Ile Gln Val Ser Ile Val Gln Ile Val Arg Asp Ser His Ile
241 TTCAACAATCAGAGATTGGGAGACAAAGATGTCATGCCACCTGTCAGCTATTGGAGACCTGCTGAGATGCCTGATGAGATGCACCTG
50 60 70 80
Thr Ala Ile Gln Lys Leu Ile Ala Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His Ile Val Val Ser Gln Phe Ile Gln Arg Ile Val Phe Val Tyr Arg
361 ACTGGCTGGGAGCTGCTGGACAAACCTCAATCAGGATGACAGACCTATCACTACGTTGCTGAGCCACTGGGCAACAGCTTAAGAGGGCTACCTGCTGTAAGGG
90 100 110 120
Pro Asp Gln Ile Val Ile Asp Ser Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Ile Pro Pro Cys Gln Val Asp Asp Thr Phe Asn Ile Val Ile Val Arg Phe His Ser Arg Phe Thr Gln Val
481 CCTGCCAGGTGCTGGGTGAGCTTGGACACTACTACGATGATGCTGGGACCCCTGGGAGACACCTTCAACCAAGACCCACATTGTCAGGTCTCTCCGTTCAAGAGGTC
130 140 150 160
Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ile Val Ile Asp Ile Val Ile Asp Ile Val Ile Asp Ile Val Ile Asp Ile Val Met Leu
601 AGGGAGTTGCCATTGTCCTCTGATGGGCCCGGGGGAGTAGCGAGATGAUCCTCATGAGCTTACCTGGATGTCAGAGAAATGGGCCTGGAGGAGCTGTTG
170 180 190 200
Met Gly Asp Asp Asn Ile Arg Ile Cys Ser Tyr Ile Arg Pro Ser Gln Ile Trp Ser Ser Ile Arg Ile Trp Thr Ser Pro Thr Thr Ala Thr
721 ATGGGGCACTTCAATGGGGCTGAGCTATGTGACCCCTCCAGTGTGTCATCCATCCGCTGTCAGTCCACTGCTGATCCCACAGCCGATGACACACAGCTTACA
210 220 230 240
Pro Thr His Cys Asn Ile Tyr Asp Arg Ile Val Val Val Pro Asp Ser Ile Val Pro Asp Asn Phe Gln Ile Val Val Val Arg Ile Val Ser Asp Gln Ile
841 CCCACGACATGTCCTATGACAGGATGTTGAGGTGGTTCAGGGAATGTCGCTCCGACTGGCTCTCCCTTAACITCCAGGCTGCCTATGCCCTGAGTGACCAACTG
250 260
Ala Gln Ile Leu Asp His Ile Tyr Pro Val Val Val Met Leu Lys 0P*
961 GCCCAAGGCATCACTGACCACTATCCAGGGAGGTGCTGAAGTGGACGCCCTCCCCACACAGTTGAACTGAG

도면2

10 20 30 40 50
LKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGK
60 70 80 90 100
LLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSADSYYYDDG
110 120 130 140 150
CEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIPLHAAPGDAVAEIDALYDV
160 170 180 190 200
YLDVQEKGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSA
210 220 230 240 250
DTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAS
260
DHYPVEVMLK

도면3



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BURNS, BARRY

<120> METHODS OF TREATING PULMONARY SARCOIDOSIS

<130> 16255/2

<140> 14/846,266

<141> 2015-09-04

<150> 62/047,361

<151> 2014-09-08

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1039

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (160)..(1005)

<400> 1

tcctgcacag gcagtgcctt gaagtgcctc ttcatgcacc ttcttcata gactacttt 60

ttttcttaa gcagcaaaag gagaaaattt tcatcaagg atattccaga ttcttgacag 120

cattctcgat atctctgagg acatcacat catctcagg atg agg ggc atg aag 174

Met Arg Gly Met Lys

1 5

ctg ctg ggg gcg ctg ctg gca ctg gcg gcc cta ctg cag ggg gcc gtg 222

Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Gly Ala Val

10 15 20

tcc ctg aag atc gca gcc ttc aac atc cag aca ttt ggg gag acc aag 270

Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys

25 30 35

atg tcc aat gcc acc ctc gtc agc tac att gtg cag atc ctg agc cgc 318

Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg

40 45 50

tat gac atc gcc ctg gtc cag gag gtc aga gac agc cac ctg act gcc 366

Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala

55 60 65

gtg ggg aag ctg ctg gac aac ctc aat cag gat gca cca gac acc tat 414

Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr

70 75 80 85

cac tac gtg gtc agt gag cca ctg gga cgg aac agc tat aag gag cgc 462

His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg

90 95 100

tac ctg ttc gtg tac agg cct gac cag gtg tct gcg gtg gac agc tac 510

Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr

105 110 115

tac tac gat gat ggc tgc gag ccc tgc ggg aac gac acc ttc aac cga 558

Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn Asp Thr Phe Asn Arg

120 125 130

gag cca gcc att gtc agg ttc ttc tcc cgg ttc aca gag gtc agg gag 606

Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu

135 140 145

ttt gcc att gtt ccc ctg cat gcg gcc ccg ggg gac gca gta gcc gag 654

Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu

150 155 160 165

atc gac gct ctc tat gac gtc tac ctg gat gtc caa gag aaa tgg ggc 702

Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly

170 175 180

ttg gag gac gtc atg ttg atg ggc gac ttc aat gcg ggc tgc agc tat 750

Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr

185 190 195

gtg aga ccc tcc cag tgg tca tcc atc cgc ctg tgg aca agc ccc acc 798

Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr

200 205 210

ttc cag tgg ctg atc ccc gac agc gct gac acc aca gct aca ccc acg 846

Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr

215 220 225

cac tgt gcc tat gac agg atc gtg gtt gca ggg atg ctg ctc cga ggc 894

His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly

230 235 240 245

gcc gtt gtt ccc gac tcg gct ctt ccc ttt aac ttc cag gct gcc tat 942

Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr
 250 255 260
 ggc ctg agt gac caa ctg gcc caa gcc atc agt gac cac tat cca gtg 990
 Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val
 265 270 275
 gag gtg atg ctg aag tgaggcagccc ctcccccacac cagttgaact gcag 1039
 Glu Val Met Leu Lys

280
 <210> 2
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr
 20 25 30
 Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val
 35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp
 50 55 60
 Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp
 65 70 75 80
 Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn
 85 90 95
 Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser
 100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn
 115 120 125
 Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe
 130 135 140
 Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly

145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val

165 170 175

Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn

180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu

195 200 205

Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr

210 215 220

Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly

225 230 235 240

Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn

245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser

260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys

275 280

<210> 3

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met

1 5 10 15

Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr

20 25 30

Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val

35 40 45

Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His

50 55 60

Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr

65	70	75	80
Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr			
85	90	95	
Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu			
100	105	110	
Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe			
115	120	125	
Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile			
130	135	140	
Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu			
145	150	155	160
Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val			
165	170	175	
Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe			
180	185	190	
Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His			
195	200	205	
Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala			
210	215	220	
Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly			
225	230	235	240
Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu			
245	250	255	
Val Met Leu Lys			
260			