(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0079702
(43) 공개일자 2008년09월01일

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 1/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7020504(분할)
(22) 출원일자 2008년08월21일
심사청구일자 2008년08월21일
(62) 원출원 특허 10-2002-7009850
원출원일자 2002년07월31일
심사청구일자 2006년03월16일
번역문제출일자 2008년08월21일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2001/003541
국제출원일자 2001년03월28일
(87) 국제공개번호 WO 2001/72845
국제공개일자 2001년10월04일
(30) 우선권주장
0007911.1 2000년03월30일 영국(GB)

(71) 출원인
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
(72) 발명자
아담 한스요에르그
독일연방공화국 93049 레겐즈버그 로테르 브라크베그 68
파르베르 로타르
독일연방공화국 90562 헤롤드베르그 드로셀베그 6
(74) 대리인
이은선, 최규팔

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 위장관 염증 질환의 치료에서 CD25 결합 분자의 용도

(57) 요 약

위장관 염증 질환 치료에서 사용하기 위한, 서열중 과가변부위 (hypervariable region) CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 영역을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함하는 CD25 결합 분자의 용도(여기에서, CDR1은 Arg Tyr Trp Met His 아미노산 서열을 갖고, CDR2는 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly 아미노산 서열을 갖고, CDR3은 Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe 아미노산 서열을 갖는다).

특허청구의 범위

청구항 1

위장관 염증 질환의 치료에 사용하기 위한, 서열중 고가변부위(hypervariable region)로서 아미노산 서열 Arg-Tyr-Trp-Met-His을 갖는 CDR1, 아미노산 서열 Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Gly을 갖는 CDR2, 및 아미노산 서열 Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Phe을 갖는 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 영역을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함하는 CD25 결합 분자 또는 그의 직접적인 동등물.

청구항 2

서열중 고가변부위로서 아미노산 서열 Arg-Tyr-Trp-Met-His을 갖는 CDR1, 아미노산 서열 Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Gly을 갖는 CDR2, 및 아미노산 서열 Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Phe을 갖는 CDR3을 포함하는 영역을 포함하는 항원 결합 부위를 포함하는 CD25 결합 분자를 함유하는, 위장관 염증 질환 치료용 약제.

청구항 3

제2항에 있어서, 염증 질환이 과민성 대장 증후군(IBS), 염증성 대장 질환(IBD), 크론병, 궤양성 대장염 또는 염증성 장 질환인 약제.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, CD25 결합 분자가 바실릭시마브인 약제.

청구항 5

유효량의 제1항에 따른 CD25 결합 분자 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 위장관 염증 질환 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

유효량의 a) 제1항에 따른 CD25 결합 분자 및 b) 위장관 염증 질환 치료에서 유효한 추가의 약물을 포함하는 위장관 염증 질환 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 추가의 약물이 사이클로스포린, 라파마이신, 아스코마이신, 코르티코스테로이드, 사이클로포스파미드, 아자티오프렌, 메토트렉세이트, 골드염, 설파살라신, 항말라리아제, 브레퀴나르, 레플루노마이드, 미조리빈, 마이코페놀산, 마이코페놀레이트 모페틸, 15-데옥시스퍼구아린, 면역 억제 모노클로날 항체, 그 리간드 및 면역조절 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 추가의 약물이 사이클로스포린 A, FK-506, 라파마이신, 마이코페놀산, 마이코페놀레이트 모페틸, 백혈구 수용체에 대한 모노클로날 항체, 그 리간드 및 CTLA41g로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 모노클로날 항체가 CD28, CD40 또는 그 혼합물에 대한 모노클로날 항체인 약제학적 조성물.

청구항 10

제5항 또는 제6항에 있어서, 염증 질환이 과민성 대장 증후군(IBS), 염증성 대장 질환(IBD), 크론병, 궤양성 대장염 또는 염증성 장 질환인 약제학적 조성물.

청구항 11

제5항 또는 제6항에 있어서, CD25 결합 분자가 바실릭시마브인 약제학적 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 위장(GI)관 염증 질환 치료에서 CD25 결합 분자의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> EP-B-449,769에 기재된 바와 같이 예로서, 림프구 혼합배양반응(mixed lymphocyte reaction) 분석에서 관찰된 작용에 기초하여 CD25 결합 분자가 이식 거부 발작을 예방하거나 치료하는데 유용하다는 것이 발견되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<3> 본 발명에 따라, 현재는 놀랍게도 CD25 결합 분자가 위장관 염증 질환의 치료에 유효하다는 것이 발견되었다.

과제 해결수단

<4> 더욱 특히 본 발명은 제 일면으로 서열중 과가변부위(hypervariable region) CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 영역을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함하는 CD25 결합 분자 또는 그의 직접적인 동등물의 용도를 제공한다(여기에서, CDR1은 Arg Tyr Trp Met His 아미노산 서열을 갖고, CDR2는 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly 아미노산 서열을 갖고, CDR3은 Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe 아미노산 서열을 갖는다).

효 과

<5> GI관 염증 질환 치료는 질환 및/또는 그 후유증, 예로서 증상의 방지 또는 개선, 및 병인 성분의 조절 또는 개선을 포함한다. 또한 치료는 임상적인 병의 재발을 저해하는 것을 포함한다.

<6> GI관 염증 질환은 만성 염증성 장질환, 예를 들면, 과민성 대장증후군(IBS), 크론병, 궤양성 대장염 및 염증성 장 질환 및 다른 염증성 GI 질환 및 GI관의 염증 질환을 포함한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<7> "CD25 결합 분자"는 단독으로 또는 고친화성 IL-2 수용체를 형성하기 위하여 다른 분자들과 결합된 CD25 항원에 결합할 수 있는 어느 분자를 의미한다.

<8> 바람직하게,

<9> a) 서열중 과가변부위 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 제 1 영역(여기에서, CDR1은 Arg Tyr Trp Met His 아미노산 서열을 갖고, CDR2는 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly 아미노산 서열을 갖고, CDR3은 Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe 아미노산 서열을 갖는다); 및

<10> b) 서열중 과가변부위 CDR1', CDR2' 및 CDR3'을 포함하는 제 2영역(여기에서, CDR1'은 Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met Gln 아미노산 서열을 갖고, CDR2'는 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser 아미노산 서열을 갖고, CDR3'은 His Gln Arg Ser Ser Tyr Thr 아미노산 서열을 갖는다)을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함하는 CD25 결합 분자, 또는 그의 직접적인 동등물이 사용된다.

<11> 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에서 모든 폴리펩티드는 N-터미널 말단에서 개시되고 C-터미널 말단에서 종결되는 아미노산 서열을 갖는 것으로 설명된다.

<12> 항원 결합 부위가 제 1 및 제 2 영역을 포함하는 경우, 이는 동일한 폴리펩티드 분자상에 위치할 수 있거나, 바람직하게 각 영역은 상이한 쇄, 즉 제 1 영역은 이뮤노글로블린 중쇄 부분 또는 그의 단편 및 제 2 영역은 이뮤

노글로블린 경쇄 부분 또는 그의 단편상에 존재할 수 있다.

<13> 따라서, 본 발명은 GI관 염증 질환 치료에서 1번 아미노산 위치에서 개시되고 117번 아미노산 위치에서 종결되는, 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 서열번호 1에 나타낸 것과 일치하거나 실질적으로 일치하는 아미노산 서열을 갖는 제 1 영역 또는 1번 아미노산 위치에서 개시되고 104번 아미노산 위치에서 종결되는, 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 서열번호 2에 나타낸 것과 일치하거나 실질적으로 일치하는 아미노산 서열을 갖는 제 1 영역을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함하는 CD25 결합 분자의 용도를 제공한다.

<14> 본 발명에 따른 용도를 위한 더욱 바람직한 CD25 결합 분자는 적어도

<15> a) (i) 서열중 과가변부위 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 가변 영역 및 (ii) 인간 중쇄의 불변(constant) 부위 또는 그의 단편을 포함하는 하나의 이뮤노글로블린 중쇄 또는 그의 단편(여기에서, CDR1은 Arg Tyr Trp Met His 아미노산 서열을 갖고, CDR2는 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly 아미노산 서열을 갖고, CDR3은 Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe 아미노산 서열을 갖는다); 및

<16> b) (i) 서열중 과가변부위 CDR1', CDR2' 및 CDR3'을 포함하는 가변 영역 및 (ii) 인간 경쇄의 불변 부위 또는 그의 단편을 포함하는 하나의 이뮤노글로블린 경쇄 또는 그의 단편(여기에서, CDR1'은 Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met Gln 아미노산 서열을 갖고, CDR2'는 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser 아미노산 서열을 갖고, CDR3'은 His Gln Arg Ser Ser Tyr Thr 아미노산 서열을 갖는다)을 포함하는 키메라성 항-CD25 항체 및 그의 직접적인 동등물로부터 선택된다.

<17> 또한, 본 발명에 따른 용도를 위한 CD25 결합 분자는

<18> a) 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 서열번호 1에 나타낸 아미노산 서열을 갖는, 서열중 과가변부위 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 제 1영역;

<19> b) 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 서열번호 2에 나타낸 아미노산 서열을 갖는, 서열중 과가변부위 CDR1', CDR2' 및 CDR3'을 포함하는 제 2영역; 및

<20> c) 제 1영역의 N-터미널 말단 및 제 2영역의 C-터미널 말단에 결합하거나 제 1영역의 C-터미널 말단 및 제 2영역의 N-터미널 말단에 결합하는 펩티드 링커(linker)를 포함하는 항원 결합 부위를 포함하는 단일쇄 결합 분자; 및 그의 그의 직접적인 동등물로부터 선택될 수 있다.

<21> 공지된 바와 같이, 하나 이상 또는 수개의 아미노산의 결실, 추가 또는 치환과 같은 아미노산 서열의 최소한의 변이가 일치 또는 실질적으로 일치하는 성질, 예를 들면, 항원 결합 성질을 갖는 원(original) 단백질의 대립유전자 형태를 이끌어 낼 수 있다. 따라서, 용어 "그의 직접적인 동등물"는

<22> i) 전체적으로 조사된 과가변부위 CDR1, CDR2 및 CDR3이 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 서열번호 1에 나타낸 과가변부위와 적어도 80% 상동성, 바람직하게 적어도 90% 상동성, 더욱 바람직하게 적어도 95% 상동성이고,

<23> ii) 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 서열번호 1에 나타낸 것과 일치하는 과가변부위 CDR1, CDR2 및 CDR3을 갖는 것을 제외하고 분자 X의 것과 일치하는 골격부위를 갖는 인용 분자와 실질적으로 동일하게 인터루킨(IL-2)이 그의 수용체에 결합하는 것을 저해시킬 수 있는 어느 단일 영역 CD25 결합 분자(분자 X); 또는

<24> i) 전체적으로 조사된 과가변부위 CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' 및 CDR3'이 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 서열번호 1 및 2에 나타낸 과가변부위와 적어도 80% 상동성, 바람직하게 적어도 90% 상동성, 더욱 바람직하게 적어도 95% 상동성이고,

<25> ii) 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 서열번호 1 및 2에 나타낸 것과 일치하는 과가변부위 CDR1, CDR2 및 CDR3, CDR1', CDR2' 및 CDR3'을 갖는 것을 제외하고 분자 X'의 것과 일치하는 골격부위 및 불변 부위를 갖는 인용 분자와 실질적으로 동일하게 인터루킨(IL-2)이 그의 수용체에 결합하는 것을 저해시킬 수 있는 한개의 결합 부위당 적어도 두개의 영역을 갖는 어느 CD25 결합 분자(분자 X')를 의미한다.

<26> 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 다양한 분석에서 상기 기준을 용이하게 시험할 수 있다.

<27> 본 발명에 따른 용도를 위한 가장 바람직한 CD25 결합 분자는 키메라성 CD25 항체, 특히 적어도

<28> a) 1번 아미노산 위치에서 개시되고 117번 아미노산 위치에서 종결되는, 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 서열번호 1에 나타낸 것과 일치하거나 실질적으로 일치하는 아미노산 서열을 갖는 가변 영역 및 인간 중쇄의 불변 부위을 포함하는 하나의 중쇄; 및

<29> b) 1번 아미노산 위치에서 개시되고 104번 아미노산 위치에서 종결되는, 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 서열번호 2에 나타낸 것과 일치하거나 실질적으로 일치하는 아미노산 서열을 갖는 가변 영역 및 인간 경쇄의 불변 부위를 포함하는 하나의 경쇄를 포함하는 키메라성 CD25 항체이다.

<30> 인간 중쇄중 불변 부위는 γ1, γ2, γ3, γ4, μ, α1, α2, δ또는 ε형, 바람직하게는 γ형, 더욱 바람직하게는 γ1일 수 있는 반면, 인간 경쇄중 불변 부위는 κ또는 λ형(λ1, λ2 및 λ3 서브타입을 포함)일 수 있고 가장 바람직하게는 κ형이다. 이 모든 불변 부위의 아미노산 서열은 Kabat 등(Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Servieces, Public Health Serive, NIH.)에 의해 제공된다.

<31> 가장 바람직한 CD25 결합 분자는 상업적으로 이용가능한 노파르티스 아게사의 SIMULECT^{R}인 바실릭시마브이다.

<32> 본 발명에 따른 용도에 적절한 CD25 결합 분자는 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769의 실시예, 특히 EP 449,769의 실시예 1 내지 5에서 설명된 기술에 의해 제조된 수 있다.

<33> EP-B-449,769에 기재된 바와 같이 예로서, 림프구 혼합배양반응(mixed lymphocyte reaction) 분석에서 관찰된 작용에 기초하여 CD25 결합 분자가 이식 거부 발작을 예방하거나 치료하는데 유용하다는 것이 발견되었다.

<34> 본 발명에 따라, 현재는 놀랍게도 CD25 결합 분자가 위장관 염증 질환의 치료에 유효하다는 것이 발견되었다.

<35> 따라서, 본 발명은

<36> i) 유효량의 상기 기재된 바와 같은 CD25 결합 분자를 환자에게 투여하는 것을 특징으로 하는, 치료가 필요한 환자에서 GI관 염증 질환을 치료하는 방법.

<37> ii) 유효량의 a) 상기 기재된 바와 같은 CD25 결합 분자 및 b) 위장관 염증 질환의 치료에 유효한 추가의 약물을 대상에게 예를 들면, 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는, 치료가 필요한 대상에서 GI관 염증 질환을 치료하는 방법.

<38> iii) 상기 기재된 바와 같은 CD25 결합 분자 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는, (i) 내지 (ii)에 기재된 바와 같은 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

<39> iv) (i) 또는 (ii)에 기재된 바와 같은 방법에서 사용하기 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 상기 기재된 바와 같은 CD25 결합 분자.

<40> v) 상기 기재된 바와 같은 CD25 결합 분자를 포함하는 약제학적 조성물, 및 추가로 GI관 염증 질환 치료에 유효한 추가의 약물을 포함하는 적어도 하나의 약제학적 조성물을 추가로 포함하는, (i) 또는 (ii)에 기재된 방법중 어느 하나에서 사용하기 위한 치료학적 배합물, 예로서 키트 또는 패키지를 제공한다.

<41> 물론, 본 발명에 따른 용도를 위한 적절한 투여량은 예를 들면, 사용되는 특정 CD25 결합 분자, 숙주, 투여 방식 및 치료하고자 하는 이상의 경중도 및 원하는 효과에 따라 달라질 것이다. 만족스러운 결과는 약 0.1mg 내지 약 100mg의 투여량에서 관찰될 수 있다. 투여는 단일 투여 또는 질병이 임상적으로 입증되거나 예방학적으로 추가의 임상 재발을 저해하는 시간과 관련하여 지시될 수 있는 한 일정 기간에 걸쳐 다중 투여될 수 있고, 예를 들면, 약 5 내지 약 100mg 이하의 투여량을 1일 내지 5주 이하, 예를 들면, 3일 내지 6일동안 매일, 타임-래그로 질병이 조절되거나 개선될 때까지 투여할 수 있다. 바람직한 투여 요법은 0일째 20mg의 CD25 결합 분자, 예를 들면, 바실릭시마브를 투여하고, 4일째 추가의 20mg을 투여하는 것을 포함한다. CD25 결합 분자는 전주 정맥 또는 다른 말초 정맥내로 비경구적, 예를 들면 정맥내로 용이하게 투여될 수 있다. 다른 투여 요법의 예는 질병이 조절 또는 개선될 때까지 28일간 매일 40mg을 정맥 투여하는 것이다.

<42> 본 발명의 약제학적 조성물은 본 명세서에서 참조문헌으로 인용되는 EP 449,769에 기재된 것과 같은 통상의 방법으로 제조될 수 있다.

<43> CD25 결합 분자는 활성 성분으로서 단독으로 또는 면역조절 요법의 다른 약물 또는 항-염증제와 함께 투여될

수 있다. 예를 들면, CD25 결합 분자는

<44> 사이클로스포린, 라파마이신 또는 아스코마이신, 또는 그의 면역저해성 아날로그, 예로서, 사이클로스포린 A, 사이클로스포린 G, FK-506, 라파마이신 등; 코르티코스테로이드 예로서, 프레드니손; 사이클로포스파미드; 아자티오프렌; 메토트렉세이트; 골드 염; 설파살라진, 항말라리아제, 브레퀴나르; 레플루노마이드; 미조리빈; 마이코페놀산; 마이코페놀레이트 모페틸; 15-데옥시스퍼구아린; 다른 면역-저해성 모노클로날 항체, 예로서 백혈구 수용체에 대한 모노클로날 항체, 예로서 MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, 또는 CD58 또는 그의 리간드; 또는 다른 면역조절 화합물, 예로서 ,CTLA4Ig와 배합되어 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

<45> CD25 결합 분자를 추가의 약제 물질과 함께 투여하는 경우, 둘 모두를 혼합 또는 수반 투여를 위한 지시서와 함께 동일한 용기내에 따로따로 포장할 수 있다. 키트의 예는 다중관 주사기 또는 분리 유니트 투여형을 포함하는 트윈 팩을 포함한다.

<46> 정맥내 주입제는 하기와 같이 제조될 수 있다: 동결건조된 항체를 함께 혼합하고 4.5중량%의 인간 알부민을 함유하는 100㎖ 멸균된 완충 염수내로 분산시켰다. 상기 염수 분산액을 15분에 걸쳐 정맥내 주입 또는 정맥내 일시주사로서 환자에게 투여할 수 있다.

<47> 연구를 통해 사용되는 투여 수준에서 CD25 결합 분자의 투여는 허용될 수 없는 부작용이 없다는 것을 나타낸다. 특히, 미국식품의약국(Food and Drug Administration(FDA))으로부터 인정받은, 바람직한 바실릭시마브가 안전하고 상업적으로 이용할 수 있다.

<48> GI관의 염증 질환 치료를 위한 CD25 결합 분자의 유용성을 예로서 본 명세서에 기재된 것과 같이 다양한 동물 모델 시스템 및 임상 시험에서 평가할 수 있다. 따라서, 예를 들면, 만성 염증을 감소시키는 CD25 결합 분자의 능력을 IBD에 대한 트리니트로벤젠 설폰산(TNBS)를 사용하여 입증한다.

실 시 예

<49> 래트 TNBS 모델

<50> TNBS 모델은 IBD 발견 연구에서 사용되는 표준 IBD 모델중 하나이고 이는 설치류에서 광범위하게 평가되고 있다. (참조: 예로서, [C.O. Elson et al.(1995), Experimental Models of Inflammatory Bowel Disease, Gastroenterology, 109; 1344-1367 및 본 명세서에서 참조문헌으로 인용됨). 상기 모델에서, TNBS의 단일 관장은 (몇주 이하까지) 전층성(transmural) 지연성 만성 염증 반응을 유도하고 마이엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase(MPO)) 활성의 증가에 의해 증명되는 바와 같은 산화성 손상을 수반하다. 또한, 염증은 분리된 구역의 급성 괴사, 염(inflamation) 및 근육의 비후화(thickening)에 의해 특징화된다. IBD를 갖는 환자에서 항-염증성 효능을 갖는 제제는 이 모델에서 효능을 나타낸다. TNBS가 염증 반응을 유도하는 기작은 공지되지 않았지만,면역학적 근거를 갖는 것으로 판단된다.

<51> 대장염 유도

<52> 스프래그-돌리 래트 수컷(200-250g)을 일반 우리(우리당 2마리)에서 사육하고 임의대로 음식물 및 식수를 제공하였다. 하룻밤 후 신속하게 래트를 실험실로 데리고 가서 무작위적으로 처리군으로 구분하였다. 5cm 폴리에틸렌 카테르에 부착된 1㎖ 주사기를 사용하여 0.5㎖ TNBS 용액(50% 에탄올 50mg/kg)을 직장내 투여하여 대장염을 유도하였다. 대조군에는 동일한 시점에 염수(0.9%) 또는 1% 메틸 셀룰로오스 현탁액을 투여하였다.

<53> 조직 분석

<54> TNBS 투여 3일 후, 래트를 죽이고 대장을 절단하고 세로로 개봉하였다. 5cm의 대장 단편에서 하기 스케일(scale)을 사용하여 육안적 형태를 평가하였다:

<55>

등급	소견
0	손상되지 않음
1	한개의 구역에서 염증(홍), 궤양 없음
2	궤양, 염증 구역 없음
3	궤양, 한개의 구역에서 염증
4	2개 이상의 궤양, 한 부위에서 염증
5	2개 이상의 궤양, 염증>12cm

<56> 각각의 5cm 대장 단편의 중량을 기록하고 염증성 유도 관장을 평가하였다.

<57> 투여 요법

<58> CD-25 결합 분자를 TNBS 모델에서 1mg/kg s.c.(경구) 투여하여 시험하였다. TNBS를 투여하기 1시간 전 s.c. 주사하여 각 시험 화합물을 투여하였다. 대조군 래트에는 염수만을 투여하였다.

<59> CD-25 결합 분자는 전형적으로 대조군과 비교하여 TNBS-유도 손상을 감소시켰다. 대장 염증을 감소시키는 CD25 결합 분자의 능력을 평가하기 위하여 사용될 수 있는 대체 동물 모델 시스템은 마우스 덱스트란 설페이트 IBD 모델 및 Elson 등(동일문헌)에 기재된 다른 모델을 포함한다.

<60> 크론병 시험

<61> GI관의 염증 질환 치료에서 CD25 결합 분자의 유용성을 크론 병 회복 유지에서 바실릭시마브의 사용을 기술한 하기 임상 실시예에 나타낸다.

<62> 60명의 크론 병 환자를 본 시험을 위해 등록시켰다. 자격 요건은 18세 이상, 전형적인 바륨 X-레이 조사, 수술시 육안적 형태, 내시경검사, 또는 조직학을 포함하는 병변에 의해 확인된 크론 질병에 상응하는 히스토리를 포함한다.

<63> 크론 질병(조직학 포함)

<64> 참가자는 지난 4년내 활동성 질환이 적어도 2번, 지난 18개월내 1번 재발(flare-ups)되었거나 최근 절제술을 한 것을 보고한 사람들이다. 회복은 이전 30일동안 증상이 없고 바세린에서 <150의 스코어를 나타내는 크론 질형 활성 인덱스(Crohn's Disease Activity Index)(CDAI)(Best et al., Gastroenterology 1976;70:439-444)로 정의한다.

<65> 배제 기준(exclusion criteria)은 상기의 전체 직장결장절제술(proctocolectomy); 단기-대장 증후군; 지난 10년내 3번 이상의 절제술에 대한 히스토리; 평가를 방해할 수 있는 만성 항문주위 질병; 궤양성 대장염; 병원체(살모넬라(*Salmonella*), 시겔라(*Shigella*), 예르시니아(*Yersinia*) 및 캄필로박터(*Campylobacter*)), 기생충, 또는 클로스트리디움 이피실레(*Clostridium difficile*) 독소에 대하여 양성인 변; 알코올 또는 약물 남용에 대한 히스토리; 프로토콜 또는 결과의 실행 또는 해석을 어렵게하는 임상적으로 중요한 간, 신경계, 내분비계, 신장, 또는 다른 중요한 전신계 질병; 암에 대한 히스토리(피부중 바닥세포 또는 편평세포 암종 제외); 및 사전동의를 할 수 없는 능력을 포함한다. 또한 환자가 지난 90일내 면역저해제(아자티오프레네, 6-머캅토퓨린, 및 사이클로스포린), 지난 30일내 코르티코스테로이드, 또는 지난 7일내 메사라민 또는 메트로니다졸을 복용한 경우 제외된다.

<66> 연구하는 동안 하기의 약물을 특히 제외시킨다: 경구 또는 직작용 코르티코스테로이드; 메살라민 제제; 아스피린 또는 다른 비스테로이드성 항-염증 약물; 면역저해제; 설사의 조절을 위해 허용되는, 코데인 또는 라페르아미드를 제외한 마취제(narcotics); 콜레스티르아민의 장기(> 4주) 사용; 수크랄페이트; H_2-차단제; 및 >14일의 지속시간을 위한 오메프라졸 또는 아타시드 및 항생제.

<67> 60명의 환자를 두그룹중 하나로 무작위 추출하였다; 바실릭시마브를 투여받는 그룹 및 위약(placebo)를 투여받는 그룹.

<68> 엔트리에 앞서, 사전동의를 구하고 CDAI의 계산을 위한 다이어리 카드를 배포하는 선별방문을 시행하였다. 크론 질병에 대한 환자의 히스토리 및 일반 데모그라피및 알, 기생충, 배양물 감수성 및 클로스트리디움 이피실레(*Clostridium difficile*) 측정에 요구되는 변 표본을 리뷰하였다. 지난 7일동안의 다이어리 카드 리뷰 및 CDAI의 계산으로 구성된 바셀린 평가를 위해 CDAI<150인 환자는 되돌려 보냈다. 건강 검사를 수행하였다: 환자는 생활 특성에 대한 앙케이트, 염증성 대장 질환(Inflammatory Bowel Disease(IBOQ)에 대한 앙케이트(Guyatt et al., Gatroenterology; 1989; 96:804-810), 및 전혈구계산(치)(complete blood count), 적혈구 침강률, 혈청 생화학(글루코오스, 요소, 질소, 크레아틴, 전해질, 칼슘, 포스포러스, 빌리루빈(bilirubiin), 알칼리성 포스파타아제, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라아제, 락테이트 탈수화제, 총 단백질, 알부민, 아밀라아제, 및 리파아제)을 포함하는 다양한 평가, 및 소변검사를 수행하였다.

<69> 바실릭시마브를 0일째 60mg, 90일째 40mg 및 180일째 40mg의 투여량으로 정맥내 투여하였다. 환자를 4주, 12주, 24주, 36주 및 48주째 안전성, 효능 및 질병 결과에 대하여 평가하였다. 각 평가는 건강 검사를 포함하는 의사의 리뷰, 생활 특성 평가, 반복된 검사실 연구, 및 유해사례에 대한 조사로 구성되었다. 각 방문시 복통, 복부

압통 또는 매스의 존재, 작용능, 및 영양 상태의 평가를 수행하였다. 각각의 경우에 CDAI를 계산하였다.

<70> 초기 효능 결과 한도는 재발 시간 내지 재발되는 시간이다. 치료 실패 또는 재발을 >150 및 기선(base line)보다 높은 적어도 60포이트의 CDAI의 최초출현으로서 정의한다.

<71> 바실릭시마브를 투여받은 환자는 위약을 투여받은 환자와 비교하여 크론 질병의 회복이 유지되었음을 보였다.

<72> 궤양성 대장염 시험

<73> 궤양 치료를 위한 CD25 결합 분자의 유용성을 크론 질병에 대하여 상기 기재된 것과 유사한 임상 시험에 나타낸다. 궤양성 대장염으로 고생하는 것으로 진단받은 환자가 이 시험의 대상이고 질병의 경중도를 스코어링하기 위하여 <6의 Rachmillewita 인덱스를 사용하였다. 배제 기준은 <6의 Rachmillewita 인덱스, 및 크론 질병에 대하여 기술된 다른 기준을 포함한다. 크론 질병에 대한 것과 유사한 치료 요법을 사용하였다. CD25 결합 분자, 즉, 바실릭시마브를 투여받은 환자는 위약을 투여받은 환자와 비교하여 증상이 개선되었음을 보였다.

서열목록

<110> Novartis AG
<120> Use of CD25 binding molecules in the treatment of inflammatory diseases of the

gastrointestinal tract
<130> 4-31368A
<160> 10
<170> PatentIn version 3.0
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial/Unknown
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(5)
<223> Hypervariable region CRD 1
<400> 1
Arg Tyr Trp Met His

1 5
<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial/Unknown
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Hypervariable region CRD 2
<400> 2
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu

1 5 10 15
Gly

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial/Unknown
<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(8)
<223> Hypervariable region CRD 3
<400> 3
Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe

1 5
<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial/Unknown
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Hypervariable region CRD 1'
<400> 4
Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met Gln

1 5 10
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial/Unknown
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
<223> Hypervariable region CRD 2'
<400> 5
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5
<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial/Unknown
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
<223> Hypervariable region CRD 3'
<400> 6
His Gln Arg Ser Ser Tyr Thr

1 5
<210> 7
<211> 492
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown
<220>

<221> CDS
<222> (1)..(45)
<223> Leading sequence of the immunoglobulin heavy chain variable domai
n

<220>

<221> CDS
<222> (130)..(492)
<223> The immunoglobulin heavy chain variable domain of the RFT5 antibo
d
<400> 7
atg gaa tgt aac tgg ata ctt cct ttt att ctg tcg gta att tca 45
Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ile Ser
1 5 10 15
ggtaaggggc tcaccagttc catatctgaa agaggataca gggtctgaag tgacaatgac 105
atctactctg ctgttctctc caca ggg gtc tac tca gag gtt cag ctc cag 156
Gly
Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln
20
cag tct ggg act gtg ctg gct agg cct ggg gct tcc gtg aag atg tcc 204
Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
25 30 35 40
tgc aag gct tct ggc tac agc ttt acc agg tac tgg atg cac tgg ata 252
Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp Met His Trp Ile
45 50 55

aaa cag agg cct gga cag ggt cta gaa tgg att ggt gct att tat cct 300
Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro
60 65 70
gga aat agt gat act agt tac aac cag aag ttc gag ggc aag gcc aaa 348
Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Lys Ala Lys
75 80 85
ctg act gca gtc aca tcc gcc agc act gcc tac atg
gag ctc agc agc 396
Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
90 95 100
ctg aca cat gag gac tct gcg gtc tat tac tgt tca aga gac tac ggc 444
Leu Thr His Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Asp Tyr Gly
105 110 115 120
tac tac ttt gac ttc tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca 492
Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
125 130 135
<210> 8
<211> 136
<212> PRT
<213> Artificial/Unknown
<400> 8
Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly

1 5 10 15
Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg

20 25 30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

35 40 45
Thr Arg Tyr Trp Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

```
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn

65                  70                  75                  80
Gln Lys Phe Glu Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser

                85                  90                  95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr His Glu Asp Ser Ala Val

            100                 105                 110
Tyr Tyr Cys Ser Arg Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln

        115                 120                 125
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

    130                 135
<210>  9
<211>  555
<212>  DNA
<213>  Artificial/Unknown
<220>


<221>  CDS
<222>  (1)..(48)
<223>  leader sequence of the immunoglobulin light chain variable domain
<220>


<221>  CDS
<222>  (226)..(555)
<223>  The immunoglobulin light chain variable domain of the RFT5
<400>  9
atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca       48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1               5                   10                  15
ggtaacagag ggcagggaat ttgagatcag aatccaacca aaattatttt ccctggggaa    108
tttgagtcta aaatacagtt ttttttttctt tttcttcatc tgaatgttgg gtggtataaa    168
attatttttg tttctctatt tctactaatc
cctttctctc tattttgctt ttttcta       225
gtc ata ctg tcc aga gga caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc      273
Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
            20                  25                  30
atg tct gca tct cca ggg gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc      321
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
        35                  40                  45
tca agt ata agt tac atg

cag tgg tac cag cag aag cca ggc acc tcc      369
Ser Ser Ile Ser Tyr Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
    50                  55                  60
ccc aaa aga tgg att tat gac aca tcc aaa ctg gct tct gga gtc cct      417
Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
65                  70                  75                  80
gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tat tct ctc aca atc      465
Ala Arg Phe

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
                85                  90                  95
agc agc atg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cat cag cgg      513
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg
            100                 105                 110
agt agt tac acg ttc gga ggg ggg acc aaa ctg gaa ata aaa             555
```

Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 10
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial/Unknown
<400> 10

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile

20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Tyr Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser

50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125