



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0019670
(43) 공개일자 2022년02월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 31/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2866 (2013.01)
A61K 31/28 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7037326
- (22) 출원일자(국제) 2020년04월16일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년11월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2020/016652
- (87) 국제공개번호 WO 2020/213665
국제공개일자 2020년10월22일
- (30) 우선권주장
JP-P-2019-078928 2019년04월17일 일본(JP)

- (71) 출원인
고쿠리츠다이가쿠호진 히로시마다이가쿠
일본 히로시마켄 히가시히로시마시 가가미야마 1
쵸메 3-2
각코우 호우진 도쿄 죠시 이카다이가쿠
일본 도쿄도 신주쿠구 가와다쵸 8-1
추가이 세이야쿠 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 기타쿠 우키마 5쵸메 5반 1고
- (72) 발명자
혼다 히로아키
일본 도쿄도 신주쿠구 가와다쵸 8-1 각코우 호우
진 도쿄 죠시 이카다이가쿠 내
고바타케 고헤이
일본 히로시마켄 히로시마시 미나미쿠 가스미 1쵸
메 2반 3고 히로시마다이가쿠묘인 내
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

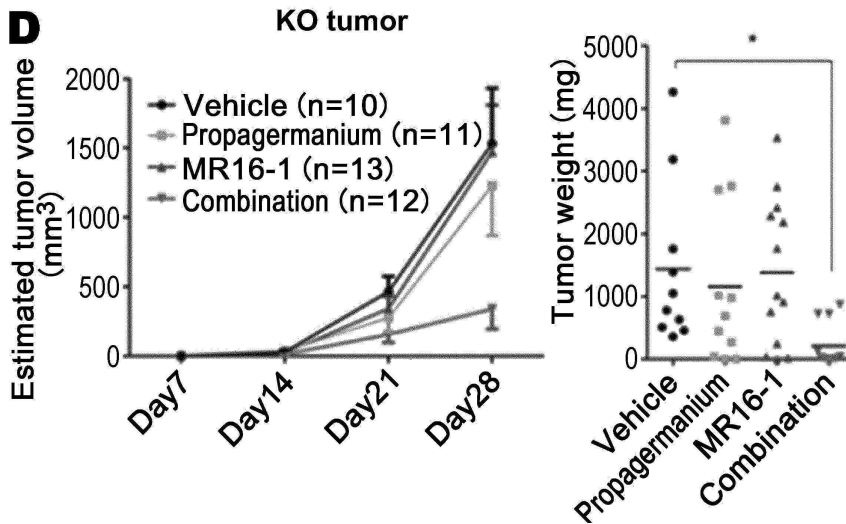
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 IL-6 저해제 및 CCR2 저해제를 조합하여 투여하는 것을 특징으로 하는 비뇨기암의 치료제

(57) 요약

IL-6 활성 및 CCR2/CCL2 활성을 모두 억제하는 것을 특징으로 하는, 비뇨기암, 특히 lysine (K)-specific demethylase 6A (KDM6A)의 기능이 저하된 비뇨기암의 치료제 및 치료 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/24 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

IL-6 저해제를 함유하는, CCR2 저해제와 조합하여 투여하기 위한 비노기암의 치료제 및/또는 예방제.

청구항 2

CCR2 저해제를 함유하는, IL-6 저해제와 조합하여 투여하기 위한 비노기암의 치료제 및/또는 예방제.

청구항 3

IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합을 포함하는, 비노기암의 치료제 및/또는 예방제.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 IL-6 저해제가 항IL-6 항체 또는 항IL-6 수용체 항체인, 치료제 및/또는 예방제.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 항IL-6 항체 및 항IL-6 수용체 항체가, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인, 치료제 및/또는 예방제.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CCR2 저해제가 CCL2 저해제인, 치료제 및/또는 예방제.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CCR2 저해제가 항CCL2 항체 또는 프로파저마늄인, 치료제 및/또는 예방제.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 항CCL2 항체가, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인, 치료제 및/또는 예방제.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암이 방광암, 전립선암, 신장암인, 치료제 및/또는 예방제.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암이 방광암인, 치료제 및/또는 예방제.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암이, lysine (K)-specific demethylase 6A (KDM6A)의 발현 또는 기능이 저하된 암인, 치료제 및/또는 예

방제.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 암이, KDM6A 유전자에 변이를 갖는 암인, 치료제 및/또는 예방제.

청구항 13

제 12 항에 있어서,
상기 KDM6A 유전자의 변이가 기능 결실형 변이인, 치료제 및/또는 예방제.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 암이, p53의 발현 또는 기능이 저하된 암인, 치료제 및/또는 예방제.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 암이, p53 유전자에 변이를 갖는 암인, 치료제 및/또는 예방제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제를 조합하여 투여하는 것을 특징으로 하는, 비뇨기암, 특히 lysine (K)-specific demethylase 6A (KDM6A)의 기능이 저하된 비뇨기암의 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 방광암은 요로 상피 세포의 악성 종양이고, 인구 고령화와 함께 그 발증률은 증가 경향이 있다. 조기의 표재암 이면 경(經)요도적 방광 종양 절제술에 의한 치료가 가능하지만, 재발하기 쉽다는 특징을 갖고 있다. 또한, 진행된 근층 침윤성 암 및 전이 증례의 예후는 개선되어 있지 않고, 분자 병태에 기초하는 신규 치료법이 요구되고 있다.

[0003] UTX(ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X chromosome, 별명 lysine (K)-specific demethylase 6A (KDM6A))는 히스톤 H3K27에 대한 탈메틸화 효소이고, 다양한 인간 종양에서 기능 결실형 변이가 보고되어 있다(비특허문헌 1). 변이 중에서는 방광암(Bladder cancer)의 빈도가 가장 많고, 또한 전립선암(Prostate cancer) 및 음경암(Penile cancer)의 비율도 높아, UTX 기능 결실은 비뇨기과 영역의 종양 발증에 깊게 관여하고 있다고 생각되고 있다(비특허문헌 2, 비특허문헌 3).

[0004] Utx의 방광암 발증에 있어서의 관여를 나타낸 논문으로서, Utx 변이를 갖는 인간 방광암 세포주를 이용한 면역 부전 마우스에의 이식 실험 모델이 보고되어 있지만(비특허문헌 4), 이는 배양 세포를 이용하여 이중 이식을 행한 결과이고, 생체내에서의 Utx 기능 결실을 반영한 모델이라고는 말하기 어렵다. 지금까지, 방광암에 주목하고 유전자 개변의 수법을 이용하여 방광 특이적 Utx 결손(Utx^{Δ/Δ}) 마우스를 제작해서 해석을 행한 연구는 보고되어 있지 않다.

[0005] IL-6은, B 세포 자극 인자 2(BSF2) 혹은 인터페론 β2라고도 호칭된 사이토카인이다. IL-6은, B 림프구계 세포의 활성화에 관여하는 분화 인자로서 발견되고(비특허문헌 5), 그 후, 여러 가지 세포의 기능에 영향을 미치는 다기능 사이토카인인 것이 밝혀졌다(비특허문헌 6). IL-6은, T 림프구계 세포의 성숙화를 유도하는 것이 보고되어 있다(비특허문헌 7).

[0006] CCL2는, 자연 면역 및 Th2 이펙터 응답 및 CD4+ T 세포 분화 등에 관한 케모카인이고, CC-케모카인 리간드 2, 단구 주화성 단백질 1, MCP-1이라고도 칭해진다(비특허문헌 8). CCL2의 수용체로서 CCR2가 알려져 있다.

[0007] 지금까지, 마우스의 방광암 MB49 세포를 부유 배양한 후, 얻어진 sphere 형성 세포(sMB49)에 대하여 in vitro에

서 IL-6을 블록하는 것에 의해, sphere 형성 MB49 세포의 침윤 능력이 저감되었던 것이 보고되어 있다(비특허문헌 9).

[0008] 또한, 항IL-6 항체 및 항CCL2 항체를 침윤성의 유방암의 마우스에 투여한 결과, 암의 침윤이 억제되고, 생존 기간이 늘어났던 것이 보고되어 있다(비특허문헌 10).

[0009] 그러나, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제의 병용에 의한 방광암의 치료 효과는 보고되어 있지 않다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) van Haaften et al. Nature Genetics, volume 41, number 5, 2009
- (비특허문헌 0002) Van der Meulen et al. Epigenetics, volume 9, Issue 5, 2014
- (비특허문헌 0003) Lu Wang, et al., UTX mutation in Human Cancer. Cancer Cell, 2019
- (비특허문헌 0004) Ler et al, Science Translational Medicine, 9, eaai8321 (2017)
- (비특허문헌 0005) Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76
- (비특허문헌 0006) Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78
- (비특허문헌 0007) Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258
- (비특허문헌 0008) Paul, W. E., Fundamental Immunology, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, (Philadelphia, 2003) p. 801-840
- (비특허문헌 0009) Annals of Surgical Oncology, Nov. 2018, vol. 25, Issue 12, pp3518-3526
- (비특허문헌 0010) Nature, Vol. 515, 6, 2014, 130-133

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 이와 같은 상황을 감안하여 이루어진 것이다. 본 발명은 신규한 비뇨기암의 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 상기의 과제를 해결하기 위해서 예의 연구를 행했다. 그 결과, 비뇨기암, 특히 lysine (K)-specific demethylase 6A (KDM6A)의 기능이 저하된 비뇨기암에 대해서, CCL2/CCR2 활성과 IL-6 활성을 모두 억제하는 것에 의해 중앙 증대를 유의하게 억제할 수 있는 것을 발견했다.

[0013] 본 발명은 이와 같은 지견에 기초하는 것이고, 구체적으로는 이하를 포함한다.

[0014] [1] IL-6 저해제를 함유하는, CCR2 저해제와 조합하여 투여하기 위한 비뇨기암의 치료제 및/또는 예방제.

[0015] [2] CCR2 저해제를 함유하는, IL-6 저해제와 조합하여 투여하기 위한 비뇨기암의 치료제 및/또는 예방제.

[0016] [3] IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합을 포함하는, 비뇨기암의 치료제 및/또는 예방제.

[0017] [4] 상기 IL-6 저해제가 항IL-6 항체 또는 항IL-6 수용체 항체인, [1] ~ [3] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/또는 예방제.

[0018] [5] 상기 항IL-6 항체 및 항IL-6 수용체 항체가, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인, [4] 에 기재된 치료제 및/또는 예방제.

[0019] [6] 상기 CCR2 저해제가 CCL2 저해제인, [1] ~ [5] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/또는 예방제.

[0020] [7] 상기 CCR2 저해제가 항CCL2 항체 또는 프로파저마뎀인, [1] ~ [6] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/

또는 예방제.

- [0021] [8] 상기 항CCL2 항체가, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인, [7] 에 기재된 치료제 및/또는 예방제.
- [0022] [9] 상기 암이 방광암, 전립선암, 또는 신장암인, [1] ~ [8] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/또는 예방제.
- [0023] [10] 상기 암이 방광암인, [1] ~ [9] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/또는 예방제.
- [0024] [11] 상기 암이, lysine (K)-specific demethylase 6A (KDM6A)의 발현 또는 기능이 저하된 암인, [1] ~ [10] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/또는 예방제.
- [0025] [12] 상기 암이, KDM6A 유전자에 변이를 갖는 암인, [1] ~ [11] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/또는 예방제.
- [0026] [13] 상기 KDM6A 유전자의 변이가 기능 결실형 변이인, [12] 에 기재된 치료제 및/또는 예방제.
- [0027] [14] 상기 암이, p53의 발현 또는 기능이 저하된 암인, [1] ~ [13] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/또는 예방제.
- [0028] [15] 상기 암이, p53 유전자에 변이를 갖는 암인, [1] ~ [14] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/또는 예방제.
- [0029] [16] KDM6A의 기능의 저하, KDM6A의 발현의 저하, 및/또는 KDM6A 유전자의 변이를 갖는다고 판정된 개체에 투여하기 위한, [1] ~ [10] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/또는 예방제.
- [0030] [17] p53의 발현의 저하, 기능의 저하, 및/또는 p53 유전자의 변이를 갖는다고 판정된 개체에 투여하기 위한, [1] ~ [10] 및 [16] 중 어느 하나에 기재된 치료제 및/또는 예방제.
- [0031] 본 발명은 추가로, 이하의 태양도 포함한다.
- [0032] [18] CCR2 저해제와 조합하여 비뇨기암의 치료 및/또는 예방에 있어서 이용하기 위한, IL-6 저해제.
- [0033] [19] IL-6 저해제와 조합하여 비뇨기암의 치료 및/또는 예방에 있어서 이용하기 위한, CCR2 저해제.
- [0034] [20] 비뇨기암의 치료 및/또는 예방에 있어서 이용하기 위한, IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합.
- [0035] [21] 개체에 유효량의 IL-6 저해제를 투여하는 공정 및 개체에 유효량의 CCR2 저해제를 투여하는 공정을 포함하는, 비뇨기암의 치료 및/또는 예방 방법.
- [0036] [22] 개체에 유효량의 IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합을 투여하는 공정을 포함하는, 비뇨기암의 치료 및/또는 예방 방법.
- [0037] [23] CCR2 저해제와 조합하여 투여하기 위한 비뇨기암의 치료제 및/또는 예방제의 제조에 있어서의, IL-6 저해제의 사용.
- [0038] [24] IL-6 저해제와 조합하여 투여하기 위한 비뇨기암의 치료제 및/또는 예방제의 제조에 있어서의, CCR2 저해제의 사용.
- [0039] [25] 비뇨기암의 치료제 및/또는 예방제의 제조에 있어서의, IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합의 사용.
- [0040] [26] 상기 IL-6 저해제가 항IL-6 항체 또는 항IL-6 수용체 항체인, [18] ~ [25] 중 어느 하나에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0041] [27] 상기 항IL-6 항체 및 항IL-6 수용체 항체가, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인, [26] 에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0042] [28] 상기 CCR2 저해제가 CCL2 저해제인, [18] ~ [27] 중 어느 하나에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0043] [29] 상기 CCR2 저해제가 항CCL2 항체 또는 프로과저마늄인, [18] ~ [27] 중 어느 하나에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0044] [30] 상기 항CCL2 항체가, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인, [29] 에 기재된 저해제, 조합, 치료

방법, 예방 방법 또는 사용.

- [0045] [31] 상기 암이 방광암, 전립선암, 신장암인, [18] ~ [30] 중 어느 하나에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0046] [32] 상기 암이 방광암인, [18] ~ [31] 중 어느 하나에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0047] [33] 상기 암이, lysine (K)-specific demethylase 6A (KDM6A)의 발현 또는 기능이 저하된 암인, [18] ~ [32] 중 어느 하나에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0048] [34] 상기 암이, KDM6A 유전자에 변이를 갖는 암인, [18] ~ [33] 에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0049] [35] 상기 KDM6A 유전자의 변이가 기능 결실형 변이인, [34] 에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0050] [36] 상기 암이, p53의 발현 또는 기능이 저하된 암인, [18] ~ [35] 중 어느 하나에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0051] [37] 상기 암이, p53에 유전자 변이를 갖는 암인, [18] ~ [36] 중 어느 하나에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0052] [38] KDM6A의 기능의 저하, KDM6A의 발현의 저하, 및/또는 KDM6A 유전자의 변이를 갖는다고 판정된 개체에 투여하기 위한, [18] ~ [32] 중 어느 하나에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.
- [0053] [39] p53의 발현의 저하, 기능의 저하, 및/또는 p53 유전자의 변이를 갖는다고 판정된 개체에 투여하기 위한, [18] ~ [32] 및 [38] 중 어느 하나에 기재된 저해제, 조합, 치료 방법, 예방 방법 또는 사용.

발명의 효과

- [0054] 본 발명에 의해, 신규한 비뇨기암의 치료제가 제공되었다.

도면의 간단한 설명

- [0055] [도 1] 도 1A는, N-butyl-N-(4-hydro-oxybutyl) nitrosamine(BBN)의 투여로부터 10주간 후의 컨트롤 마우스 (Utx^{+/+}, p53^{+/-} 마우스) 및 Utx^{Δ/Δ}, p53^{+/-} 마우스의 방광에 있어서의, 정상 조직(Normal), 이형성~상피내암(Dysplasia~CIS), 및 근층에의 침윤암(Muscle invasive cancer)의 비율을 나타내는 도면이다. 도 1B는, BBN이 투여된 Utx^{Δ/Δ}, p53^{+/-} 마우스의 방광으로부터 채취된 조직 절편을 헤마톡실린·에오신 염색한 결과를 나타내는 사진이다. 도면 중의 화살표는, 근층에의 침윤암을 나타내고 있다.

[도 2] 도 2는, BBN 투여 4주의 시점에서의 컨트롤의 Utx^{+/+} 마우스 및 Utx^{Δ/Δ} 마우스의 요로 상피로부터 추출된 RNA를 이용한 트랜스크립토姆 해석 및 KEGG에 의한 패스웨이 해석의 결과를 나타내는 도면이다. 도 2A는, 컨트롤 마우스와 Utx^{Δ/Δ} 마우스의 패스웨이 비교 결과의 도면이고, 컨트롤 마우스와 비교하여 Utx^{Δ/Δ} 마우스에서 발현 향상하고 있는 경로를 나타내고 있다. 도 2B는, 컨트롤 마우스와 Utx^{Δ/Δ} 마우스의 "Cytokine-cytokine receptor interaction" 경로의 142유전자의 발현 비교 결과를 나타내고 있다.

[도 3] 도 3A는, 마우스 방광암 세포주 MBT2에서 유래하는 Utx 발현주(EV clones) 및 Utx 결손주(KO clones)에 있어서의 UTX 단백질의 발현을, 항UTX 항체 또는 항β 액틴 항체를 이용한 웨스턴 블롯법에 의해 해석한 결과를 나타내는 사진이다. 도 3B는, 종양 이식 마우스에 있어서의 프로파저마늄(Propagermanium) 및/또는 MR16-1의 투여 스케줄을 나타내는 도면이다. 도 3C 및 D는, C3H 마우스에 Utx 발현주(C) 또는 Utx 결손주(D)를 이식한 결과로서 생긴 종양의 종양 체적(Estimated tumor volume) 및 종양 중량(Tumor weight)을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0056] 본 발명의 비한정적인 일 국면으로서, IL-6 활성화 및 CCR2/CCL2 활성을 모두 억제하는 것을 특징으로 하는, 비뇨기암의 치료제 또는 예방제(비뇨기암의 치료 또는 예방용의 의약 조성물이라고도 표현된다) 및 병용 요법이 제공된다. 당해 국면의 일 태양에 있어서, 비뇨기암은, 방광암, 전립선암, 신장암, 또는 음경암이다. 당해 국면

의 일 태양에 있어서, 비노기암은, lysine (K)-specific demethylase 6A (KDM6A)의 발현이 저하된 암, 또는 KDM6A의 기능이 저하된 암이고, 임의로 KDM6A 유전자에 변이(예를 들면, 기능 결실형 변이)를 갖는 암이다. 당해 국면의 일 태양에 있어서, 비노기암은, p53에 변이를 갖는 비노기암이다. 당해 국면의 일 태양에 있어서, IL-6 저해제와 CCR2 저해제를 병용하는 것에 의해, IL-6 저해제 또는 CCR2 저해제 단독에 의한 처치와 비교해서, 비노기암의 치료 또는 예방에 있어서 상승적인 효과가 얻어진다.

- [0057] 상기 국면의 일 태양에 있어서, IL-6 저해제를 유효 성분으로서 함유하는, CCR2 저해제와 조합하여 투여하기 위한 비노기암의 치료제 또는 예방제가 제공된다. 당해 태양에 있어서, IL-6 저해제를 함유하는 비노기암의 치료제 또는 예방제는, CCR2 저해제와 동시에, 따로따로, 또는 순차적으로 투여된다. 이들 저해제의 제형은, 동일한 제형이어도 상이한 제형이어도 된다. 예를 들면, 쌍방이 비경구 제제, 주사제, 점적제, 정맥내 점적제 중 하나로서 서로 상이한 제형이어도 되고, 쌍방이 비경구 제제, 주사제, 점적제, 정맥내 점적제 중 하나로서 동종의 제형이어도 된다. 당해 태양은, CCR2 저해제와 조합하여 비노기암의 치료 또는 예방에 있어서 이용하기 위한, IL-6 저해제; IL-6 저해제를 투여하는 공정 및 CCR2 저해제를 투여하는 공정을 포함하는, 비노기암을 치료 또는 예방하는 방법; 또는 CCR2 저해제와 조합하여 투여하기 위한 비노기암의 치료제 또는 예방제의 제조에 있어서의, IL-6 저해제의 사용이라고 표현할 수 있다.
- [0058] 상기 국면의 다른 태양에 있어서, CCR2 저해제를 유효 성분으로서 함유하는, IL-6 저해제와 조합하여 투여하기 위한 비노기암의 치료제 또는 예방제가 제공된다. 당해 태양에 있어서, CCR2 저해제를 함유하는 비노기암의 치료제 또는 예방제는, IL-6 저해제와 동시에, 따로따로, 또는 순차적으로 투여된다. 이들 저해제의 제형은, 동일한 제형이어도 상이한 제형이어도 된다. 예를 들면, 쌍방이 비경구 제제, 주사제, 점적제, 정맥내 점적제 중 하나로서 서로 상이한 제형이어도 되고, 쌍방이 비경구 제제, 주사제, 점적제, 정맥내 점적제 중 하나로서 동종의 제형이어도 된다. 당해 태양은, IL-6 저해제와 조합하여 비노기암의 치료 또는 예방에 있어서 이용하기 위한, CCR2 저해제; 개체에 유효량의 IL-6 저해제를 투여하는 공정 및 개체에 유효량의 CCR2 저해제를 투여하는 공정을 포함하는, 비노기암을 치료 또는 예방하는 방법; 또는 IL-6 저해제와 조합하여 투여하기 위한 비노기암의 치료제 또는 예방제의 제조에 있어서의, CCR2 저해제의 사용이라고 표현할 수 있다.
- [0059] 상기 국면의 다른 태양에 있어서, IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합을 유효 성분으로서 함유하는, 비노기암의 치료제 또는 예방제가 제공된다. 당해 태양은, 비노기암의 치료 또는 예방에 있어서 이용하기 위한, IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합; 개체에 유효량의 IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합을 투여하는 공정을 포함하는, 비노기암을 치료 또는 예방하는 방법; 또는 비노기암의 치료제 또는 예방제의 제조에 있어서의, IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합의 사용이라고 표현할 수도 있다.
- [0060] 본 발명에 있어서의 「IL-6 저해제」란, IL-6에 의한 시그널 전달을 차단하고, IL-6의 생물학적 활성을 저해하는 물질이다. IL-6 저해제는, 바람직하게는 IL-6, IL-6 수용체 및 gp130 중 어느 하나의 결합에 대한 저해 작용을 갖는 물질이다.
- [0061] 본 발명의 IL-6 저해제로서는, 예를 들면 항IL-6 항체, 항IL-6 수용체 항체, 항gp130 항체, IL-6 개변체, 가용성 IL-6 수용체 개변체 혹은 IL-6 또는 IL-6 수용체의 부분 펩타이드, 및 이들과 마찬가지로의 활성을 나타내는 저분자 물질을 들 수 있지만, 특별히 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 IL-6 저해제로서는, 바람직하게는 IL-6 수용체를 인식하는 항체를 들 수 있다.
- [0062] IL-6은, 세포 상에서 2종의 단백질을 개재시켜 그 생물학적 활성을 전달한다. 하나는, IL-6이 결합하는 분자량 약 80kD의 리간드 결합성 단백질의 IL-6 수용체이다(비특허문헌 4, 5). IL-6 수용체는, 세포막을 관통하여 세포막 상에 발현하는 막결합형 외에, 주로 그 세포의 영역으로 이루어지는 가용성 IL-6 수용체로서도 존재한다.
- [0063] 다른 하나는, 비리간드 결합성의 시그널 전달에 관련하는 분자량 약 130kD의 막단백질 gp130이다. IL-6과 IL-6 수용체는 IL-6/IL-6 수용체 복합체를 형성하고, 이어서 gp130과 결합하는 것에 의해, IL-6의 생물학적 활성이 세포내에 전달된다(Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581).
- [0064] 본 발명에 있어서의 「CCR2 저해제」란, CCL2, CCL7 또는 CCL8에 의한 시그널 전달을 차단하고, CCL2, CCL7 및/또는 CCL8의 생물학적 활성을 저해하는 물질이며, CCL2 저해제, CCL7 저해제 및 CCL8 저해제를 포함한다. 본 발명에 있어서의 「CCL2 저해제」란, CCL2에 의한 시그널 전달을 차단하고, CCL2의 생물 활성을 차단하는 물질이다.
- [0065] 본 발명의 CCL2 저해제로서는, 예를 들면 항CCL2 항체, CCL2의 수용체인 CCR2에 대한 항체(항CCR2 항체), CCR2에 결합하고 CCL2에 의한 시그널 전달을 차단하는 저분자 물질을 들 수 있지만, 특별히 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 CCL2 저해제로서는, 바람직하게는 항CCL2 항체, CCR2에 결합하고 CCL2에 의한 시그널 전달을 차단하는 저분자 물질(예를 들면 프로파제라닙)을 들 수 있다.

- [0066] CCL2는, 자연 면역 및 Th2 이펙터 응답 및 CD4+ T 세포 분화 등에 관한 케모카인이고, CC-케모카인 리간드 2, 단구 주화성 단백질 1, MCP-1이라고도 칭해진다(Paul, W. E., *Fundamental Immunology*, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, (Philadelphia, 2003) p. 801-840). CCL2는, 케모카인 수용체 CCR2를 개재시켜 결합하고 시그널 전달하는 것이 알려져 있다. CCR2는, 단구, T 세포, B 세포 및 호염기구를 포함하는 수많은 세포에 발현하는, 7회 막관통 영역 G 단백질 공역 수용체이다.
- [0067] 본 발명에 있어서의 항체의 유래는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 포유동물 유래이고, 보다 바람직하게는 인간 유래의 항체를 들 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 사용되는 항IL-6 항체, 항IL-6 수용체 항체, 항gp130 항체, 항CCL2 항체 및 항CCR2 항체는, 공지된 수단을 이용하여 폴리클로날 또는 모노클로날 항체로서 얻을 수 있다. 본 발명에서 사용되는 항IL-6 항체, 항IL-6 수용체 항체, 항gp130 항체, 항CCL2 항체 및 항CCR2 항체로서, 특히 포유동물 유래의 모노클로날 항체가 바람직하다. 포유동물 유래의 모노클로날 항체로서는, 하이브리도마에 의해 생성되는 것, 및 유전자 공학적 수법에 의해 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환한 숙주에 의해 생성되는 것이 있다. 이와 같은 항IL-6 항체는 IL-6과 결합하는 것에 의해, IL-6의 IL-6 수용체에의 결합을 저해하고 IL-6의 생물학적 활성의 세포내로의 전달을 차단한다.
- [0069] 이와 같은 항IL-6 항체로서는, MH166(Matsuda, T. et al., *Eur. J. Immunol.* (1988) 18, 951-956)이나 SK2 항체(Sato, K. et al., 제21회 일본면역학회 총회, 학술 기록(1991) 21, 166) 등을 들 수 있다. 이하에, 본 발명에서 사용되는 각종 항체의 예로서 항IL-6 항체의 제작 방법 등을 기재하지만, 다른 항체도 기본적으로는 마찬가지로의 수법 및 공지 기술을 사용하여(항CCL2 항체에 대해서는, 일본 특허 제9067399호, 일본 특허공개 평 05276986호, W003048083호, US20040047860호, US20060039913호, W02006/125202호의 기재를 참조하는 것에 의해서도) 제작할 수 있다.
- [0070] 항IL-6 항체 생성 하이브리도마는, 기본적으로는 공지 기술을 사용하여, 이하와 같이 해서 제작할 수 있다. 즉, IL-6을 감작 항원으로서 사용하고, 이것을 통상의 면역 방법에 의해 면역하고, 얻어지는 면역 세포를 통상의 세포 융합법에 의해 공지된 친세포와 융합시키고, 통상의 스크리닝법에 의해, 모노클로날인 항체 생성 세포를 스크리닝하는 것에 의해 제작할 수 있다.
- [0071] 구체적으로는, 항IL-6 항체를 제작하기 위해서는 다음과 같이 하면 된다. 예를 들면, 항체 취득의 감작 항원으로서 사용되는 인간 IL-6은, *Eur. J. Biochem* (1987) 168, 543-550, *J. Immunol.* (1988) 140, 1534-1541, 혹은 *Agr. Biol. Chem.* (1990) 54, 2685-2688에 개시된 IL-6 유전자/아미노산 서열을 이용하는 것에 의해 얻어진다.
- [0072] IL-6의 유전자 서열을 공지된 발현 벡터에 삽입하여 적당한 숙주 세포를 형질 전환시킨 후, 그 숙주 세포 중 또는 배양 상청 중으로부터 목적의 IL-6 단백질을 공지된 방법으로 정제하고, 이 정제 IL-6 단백질을 감작 항원으로서 이용하면 된다. 또한, IL-6 단백질과 다른 단백질의 융합 단백질을 감작 항원으로서 이용해도 된다.
- [0073] 본 발명에서 사용되는 항IL-6 수용체 항체는, 공지된 수단을 이용하여 폴리클로날 또는 모노클로날 항체로서 얻을 수 있다. 본 발명에서 사용되는 항IL-6 수용체 항체로서, 특히 포유동물 유래의 모노클로날 항체가 바람직하다. 포유동물 유래의 모노클로날 항체로서는, 하이브리도마에 의해 생성되는 것, 및 유전자 공학적 수법에 의해 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환한 숙주에 의해 생성되는 것이 있다. 이 항체는 IL-6 수용체와 결합하는 것에 의해, IL-6의 IL-6 수용체에의 결합을 저해하고 IL-6의 생물학적 활성의 세포내로의 전달을 차단한다.
- [0074] 이와 같은 항체로서는, MR16-1 항체(Tamura, T. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90, 11924-11928), PM-1 항체 (Hirata, Y. et al., *J. Immunol.* (1989) 143, 2900-2906), AUK12-20 항체, AUK64-7 항체 혹은 AUK146-15 항체(국제 특허출원 공개번호 WO 92-19759) 등을 들 수 있다. 이들 중에서, 인간 IL-6 수용체에 대한 바람직한 모노클로날 항체로서는 PM-1 항체가 예시되고, 또한 마우스 IL-6 수용체에 대한 바람직한 모노클로날 항체로서는 MR16-1 항체를 들 수 있다.
- [0075] 항IL-6 수용체 모노클로날 항체 생성 하이브리도마는, 기본적으로는 공지 기술을 사용하여, 이하와 같이 해서 제작할 수 있다. 즉, IL-6 수용체를 감작 항원으로서 사용하고, 이것을 통상의 면역 방법에 따라 면역하고, 얻어지는 면역 세포를 통상의 세포 융합법에 의해 공지된 친세포와 융합시키고, 통상의 스크리닝법에 의해, 모노

클로날인 항체 산생 세포를 스크리닝하는 것에 의해 제작할 수 있다.

- [0076] 구체적으로는, 항IL-6 수용체 항체를 제작하기 위해서는 다음과 같이 하면 된다. 예를 들면, 항체 취득의 감각 항원으로서 사용되는 인간 IL-6 수용체는, 유럽 특허출원 공개번호 EP 325474에, 마우스 IL-6 수용체는 일본 특허출원 공개번호 특허공개 평3-155795에 개시된 IL-6 수용체 유전자/아미노산 서열을 이용하는 것에 의해 얻어진다.
- [0077] IL-6 수용체 단백질은, 세포막 상에 발현하고 있는 것과 세포막으로부터 이탈해 있는 것(가용성 IL-6 수용체)(Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676)의 2종류가 있다. 가용성 IL-6 수용체는 세포막에 결합하고 있는 IL-6 수용체의 실질적으로 세포의 영역으로 구성되어 있고, 세포막 관통 영역 혹은 세포막 관통 영역과 세포내 영역이 결손되어 있는 점에서 막결합형 IL-6 수용체와 상이하다. IL-6 수용체 단백질은, 본 발명에서 이용되는 항IL-6 수용체 항체의 제작의 감각 항원으로서 사용될 수 있는 한, 어느 IL-6 수용체를 사용해도 된다.
- [0078] IL-6 수용체의 유전자 서열을 공지된 발현 벡터계에 삽입하여 적당한 숙주 세포를 형질 전환시킨 후, 그 숙주 세포 중 또는 배양 상청 중으로부터 목적의 IL-6 수용체 단백질을 공지된 방법으로 정제하고, 이 정제 IL-6 수용체 단백질을 감각 항원으로서 이용하면 된다. 또한, IL-6 수용체를 발현하고 있는 세포나 IL-6 수용체 단백질과 다른 단백질의 융합 단백질을 감각 항원으로서 이용해도 된다.
- [0079] 본 발명에서 사용되는 항gp130 항체는, 공지된 수단을 이용하여 폴리클로날 또는 모노클로날 항체로서 얻을 수 있다. 본 발명에서 사용되는 항gp130 항체로서, 특히 포유동물 유래의 모노클로날 항체가 바람직하다. 포유동물 유래의 모노클로날 항체로서는, 하이브리도마에 의해 산생되는 것, 및 유전자 공학적 수법에 의해 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환한 숙주에 의해 산생되는 것이 있다. 이 항체는 gp130과 결합하는 것에 의해, IL-6/IL-6 수용체 복합체의 gp130에의 결합을 저해하고 IL-6의 생물학적 활성의 세포내로의 전달을 차단한다.
- [0080] 이와 같은 항체로서는, AM64 항체(일본 특허공개 평3-219894), 4B11 항체 및 H4 항체(US5571513) B-S12 항체 및 B-P8 항체(일본 특허공개 평8-291199) 등을 들 수 있다.
- [0081] 항gp130 모노클로날 항체 산생 하이브리도마는, 기본적으로는 공지 기술을 사용하여, 이하와 같이 해서 제작할 수 있다. 즉, gp130을 감각 항원으로서 사용하고, 이것을 통상의 면역 방법에 따라 면역하고, 얻어지는 면역 세포를 통상의 세포 융합법에 의해 공지된 친세포와 융합시키고, 통상의 스크리닝법에 의해, 모노클로날 항체 산생 세포를 스크리닝하는 것에 의해 제작할 수 있다.
- [0082] 구체적으로는, 모노클로날 항체를 제작하기 위해서는 다음과 같이 하면 된다. 예를 들면, 항체 취득의 감각 항원으로서 사용되는 gp130은, 유럽 특허출원 공개번호 EP 411946에 개시된 gp130 유전자/아미노산 서열을 이용하는 것에 의해 얻어진다.
- [0083] gp130의 유전자 서열을 공지된 발현 벡터계에 삽입하여 적당한 숙주 세포를 형질 전환시킨 후, 그 숙주 세포 중 또는 배양 상청 중으로부터 목적의 gp130 단백질을 공지된 방법으로 정제하고, 이 정제 gp130 단백질을 감각 항원으로서 이용하면 된다. 또한, gp130을 발현하고 있는 세포나 gp130 단백질과 다른 단백질의 융합 단백질을 감각 항원으로서 이용해도 된다.
- [0084] 감각 항원으로 면역되는 포유동물로서는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 세포 융합에 사용하는 친세포와의 적합성을 고려하여 선택하는 것이 바람직하고, 일반적으로는 설치류의 동물, 예를 들면, 마우스, 래트, 랫스터 등이 사용된다.
- [0085] 감각 항원을 동물에 면역하기 위해서는, 공지된 방법에 따라 행해진다. 예를 들면, 일반적 방법으로서, 감각 항원을 포유동물의 복강내 또는 피하에 주사하는 것에 의해 행해진다. 구체적으로는, 감각 항원을 PBS(Phosphate-Buffered Saline)나 생리 식염수 등으로 적당량으로 희석, 현탁시킨 것을 희망에 따라 통상의 아쥘반트, 예를 들면, 프로인트 완전 아쥘반트를 적량 혼합하고, 유화 후, 포유동물에 4~21일마다 수회 투여하는 것이 바람직하다. 또한, 감각 항원 면역 시에 적당한 담체를 사용할 수 있다.
- [0086] 이와 같이 면역하여, 혈청 중에 희망하는 항체 레벨이 상승하는 것을 확인한 후에, 포유동물로부터 면역 세포가 취출되고, 세포 융합에 부쳐진다. 세포 융합에 부쳐지는 바람직한 면역 세포로서는, 특히 비(脾)세포를 들 수 있다.
- [0087] 상기 면역 세포와 융합되는 타방의 친세포로서의 포유동물의 미엘로마 세포는, 이미, 공지된 여러 가지 세포주,

예를 들면, P3X63Ag8.653(Kearney, J. F. et al. J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag8U.1(Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1(Kohler. G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11(Margulies. D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0(Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO(de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194(Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210(Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 등이 적절히 사용된다.

- [0088] 상기 면역 세포와 미엘로마 세포의 세포 융합은 기본적으로는 공지된 방법, 예를 들어, 밀스타인 등의 방법(Kohler. G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 등에 준해서 행할 수 있다.
- [0089] 보다 구체적으로는, 상기 세포 융합은 예를 들면, 세포 융합 촉진제의 존재하에 통상의 영양 배양액 중에서 실시된다. 융합 촉진제로서는 예를 들면, 폴리에틸렌 글라이콜(PEG), 센다이바이러스(HVJ) 등이 사용되고, 추가로 희망에 따라 융합 효율을 높이기 위해서 다이메틸 설펡사이드 등의 보조제를 첨가 사용할 수도 있다.
- [0090] 면역 세포와 미엘로마 세포의 사용 비율은, 예를 들면, 미엘로마 세포에 대해서 면역 세포를 1~10배로 하는 것이 바람직하다. 상기 세포 융합에 이용하는 배양액으로서, 예를 들면, 상기 미엘로마 세포주의 증식에 적합한 RPMI1640 배양액, MEM 배양액, 그 밖에, 이 종류의 세포 배양에 이용되는 통상의 배양액이 사용 가능하고, 추가로 소태아혈청(FCS) 등의 혈청 보액을 병용할 수도 있다.
- [0091] 세포 융합은, 상기 면역 세포와 미엘로마 세포의 소정량을 상기 배양액 중에서 잘 혼합하고, 미리, 37℃ 정도로 가온한 PEG 용액, 예를 들면, 평균 분자량 1000~6000 정도의 PEG 용액을 통상, 30~60%(w/v)의 농도로 첨가하고, 혼합하는 것에 의해 목적으로 하는 융합 세포(하이브리도마)가 형성된다. 계속해서, 적당한 배양액을 추가 첨가하고, 원심하여 상청을 제거하는 조작을 반복하는 것에 의해 하이브리도마의 생육에 바람직하지 않은 세포 융합제 등을 제거할 수 있다.
- [0092] 당해 하이브리도마는, 통상의 선택 배양액, 예를 들면, HAT 배양액(하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함하는 배양액)으로 배양하는 것에 의해 선택된다. 당해 HAT 배양액에서의 배양은, 목적으로 하는 하이브리도마 이외의 세포(비융합 세포)가 사멸하는 데 충분한 시간, 통상 수 일~수 주간 계속한다. 이어서, 통상의 한계 희석법을 실시하여, 목적으로 하는 항체를 산생하는 하이브리도마의 스크리닝 및 클로닝이 행해진다.
- [0093] 또한, 인간 이외의 동물에 항원을 면역하여 상기 하이브리도마를 얻는 것 외에, 인간 림프구를 in vitro에서 희망하는 항원 단백질 또는 항원 발현 세포로 감작하고, 감작 B 림프구를 인간 미엘로마 세포, 예를 들면 U266과 융합시키고, 희망하는 항원 또는 항원 발현 세포와의 결합 활성을 갖는 희망하는 인간 항체를 얻을 수도 있다(일본 특허공개 평1-59878 참조). 또, 인간 항체 유전자의 레퍼토리를 갖는 트랜스제닉 동물에 항원 또는 항원 발현 세포를 투여하고, 전술한 방법에 따라 희망하는 인간 항체를 취득해도 된다(국제 특허출원 공개번호 WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735 참조).
- [0094] 이와 같이 해서 제작되는 모노클로날 항체를 산생하는 하이브리도마는, 통상의 배양액 중에서 계대 배양하는 것이 가능하고, 또한 액체 질소 중에서 장기 보존하는 것이 가능하다.
- [0095] 당해 하이브리도마로부터 모노클로날 항체를 취득하기 위해서는, 당해 하이브리도마를 통상의 방법에 따라 배양하고, 그 배양 상청으로서 얻는 방법, 혹은 하이브리도마를 이것과 적합성이 있는 포유동물에 투여하여 증식시키고, 그 복수(腹水)로서 얻는 방법 등이 채용된다. 전자의 방법은, 고순도의 항체를 얻는 데 적합하고, 한편 후자의 방법은, 항체의 대량 생산에 적합하다.
- [0096] 예를 들면, 항IL-6 수용체 항체 산생 하이브리도마의 제작은, 일본 특허공개 평3-139293에 개시된 방법에 의해 행할 수 있다. PM-1 항체 산생 하이브리도마를 BALB/c 마우스의 복강내에 주입하여 복수를 얻고, 이 복수로부터 PM-1 항체를 정제하는 방법이나, 본 하이브리도마를 적당한 배지, 예를 들면, 10% 소태아혈청, 5% BM-Condimed H1(Boehringer Mannheim제) 함유 RPMI1640 배지, 하이브리도마 SFM 배지(GIBCO-BRL제), PFHM-II 배지(GIBCO-BRL제) 등에서 배양하고, 그 배양 상청으로부터 PM-1 항체를 정제하는 방법으로 행할 수 있다.
- [0097] 본 발명에는, 모노클로날 항체로서, 항체 유전자를 하이브리도마로부터 클로닝하고, 적당한 벡터에 짜 넣고, 이것을 숙주에 도입하고, 유전자 재조합 기술을 이용하여 산생시킨 재조합형 항체를 이용할 수 있다(예를 들면, Borrebaeck C. A. K. and Larrick J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 참조).
- [0098] 구체적으로는, 목적으로 하는 항체를 산생하는 세포, 예를 들면 하이브리도마로부터, 항체의 가변(V) 영역을 코

드하는 mRNA를 단리한다. mRNA의 단리는, 공지된 방법, 예를 들면, 구아니딘 초원심법(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), AGPC법(Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 등에 의해 전체 RNA를 조제하고, mRNA Purification Kit(Pharmacia제) 등을 사용해서 mRNA를 조제한다. 또한, QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia제)를 이용하는 것에 의해 mRNA를 직접 조제할 수 있다.

- [0099] 얻어진 mRNA로부터 역전사 효소를 이용하여 항체 V 영역의 cDNA를 합성한다. cDNA의 합성은, AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 등을 이용하여 행할 수 있다. 또한, cDNA의 합성 및 증폭을 행하기 위해서는 5'-Ampli FINDER RACE Kit(Clontech제) 및 PCR을 이용한 5'-RACE법(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)을 사용할 수 있다. 얻어진 PCR 산물로부터 목적으로 하는 DNA 단편을 정제하고, 벡터 DNA와 연결한다. 또, 이것으로부터 재조합 벡터를 제작하여, 대장균 등에 도입하고 콜로니를 선택하여 희망하는 재조합 벡터를 조제한다. 목적으로 하는 DNA의 염기 서열을 공지된 방법, 예를 들면, 다이데옥시법에 의해 확인한다.
- [0100] 목적으로 하는 항체의 V 영역을 코드하는 DNA가 얻어지면, 이것을 희망하는 항체 정상 영역(C 영역)을 코드하는 DNA와 연결하고, 이것을 발현 벡터에 짜 넣는다. 또는, 항체의 V 영역을 코드하는 DNA를, 항체 C 영역의 DNA를 포함하는 발현 벡터에 짜 넣어도 된다.
- [0101] 본 발명에서 사용되는 항체를 제조하기 위해서는, 후술하는 바와 같이 항체 유전자를 발현 제어 영역, 예를 들면, 인핸서, 프로모터의 제어하에서 발현하도록 발현 벡터에 짜 넣는다. 다음으로, 이 발현 벡터에 의해 숙주 세포를 형질 전환하여, 항체를 발현시킬 수 있다.
- [0102] 본 발명에서는, 인간에 대한 이중 항원성을 저하시키는 것 등을 목적으로 해서 인위적으로 개변한 유전자 재조합형 항체, 예를 들면, 키메라(Chimeric) 항체, 인간화(Humanized) 항체, 인간(human) 항체를 사용할 수 있다. 이들 개변 항체는, 기지의 방법을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0103] 키메라 항체는, 상기와 같이 해서 얻은 항체 V 영역을 코드하는 DNA를 인간 항체 C 영역을 코드하는 DNA와 연결하고, 이것을 발현 벡터에 짜 넣고 숙주에 도입하여 산생시키는 것에 의해 얻어진다(유럽 특허출원 공개번호 EP 125023, 국제 특허출원 공개번호 WO 92-19759 참조). 이 기지의 방법을 이용하여, 본 발명에 유용한 키메라 항체를 얻을 수 있다.
- [0104] 인간화 항체는, 재구성(reshaped) 인간 항체 또는 인간형화 항체라고도 칭해지고, 인간 이외의 포유동물, 예를 들면 마우스 항체의 상보성 결정 영역(CDR)을 인간 항체의 상보성 결정 영역에 이식한 것이며, 그 일반적인 유전자 재조합 수법도 알려져 있다(유럽 특허출원 공개번호 EP 125023, 국제 특허출원 공개번호 WO 92-19759 참조).
- [0105] 구체적으로는, 마우스 항체의 CDR과 인간 항체의 프레임워크 영역(FR; framework region)을 연결하도록 설계한 DNA 서열을, 말단부에 오버랩되는 부분을 갖도록 제작한 수 개의 올리고뉴클레오타이드로부터 PCR법에 의해 합성한다. 얻어진 DNA를 인간 항체 C 영역을 코드하는 DNA와 연결하고, 이어서 발현 벡터에 짜 넣고, 이것을 숙주에 도입하여 산생시키는 것에 의해 얻어진다(유럽 특허출원 공개번호 EP 239400, 국제 특허출원 공개번호 WO 92-19759 참조).
- [0106] CDR을 개재시켜 연결되는 인간 항체의 FR은, 상보성 결정 영역이 양호한 항원 결합 부위를 형성하는 것이 선택된다. 필요에 따라, 재구성 인간 항체의 상보성 결정 영역이 적절한 항원 결합 부위를 형성하도록 항체의 가변 영역의 프레임워크 영역의 아미노산을 치환해도 된다(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).
- [0107] 키메라 항체, 인간화 항체에는, 인간 항체 C 영역이 사용된다. 인간 항체 C 영역으로서, C_γ를 들 수 있고, 예를 들면, C_γ1, C_γ2, C_γ3 또는 C_γ4를 사용할 수 있다. 또한, 항체 또는 그 산생의 안정성을 개선하기 위해서, 인간 항체 C 영역을 수식해도 된다.
- [0108] 키메라 항체는 인간 이외의 포유동물 유래 항체의 가변 영역과 인간 항체 유래의 C 영역으로 이루어지고, 또한 인간화 항체는 인간 이외의 포유동물 유래 항체의 상보성 결정 영역과 인간 항체 유래의 프레임워크 영역 및 C 영역으로 이루어지며, 양자는 인간 체내에 있어서의 항원성이 저하되어 있기 때문에, 본 발명에 사용되는 항체로서 유용하다.
- [0109] 본 발명에 사용되는 항IL-6 수용체 항체의 인간화 항체의 바람직한 구체예로서는, 인간화 PM-1 항체를 들 수 있다(국제 특허출원 공개번호 WO 92-19759 참조).

- [0110] 또한, 인간 항체의 취득 방법으로서 앞서 기술한 방법 외, 인간 항체 라이브러리를 이용하여, 패닝에 의해 인간 항체를 취득하는 기술도 알려져 있다. 예를 들면, 인간 항체의 가변 영역을 1본쇄 항체(scFv)로서 파지 디스플레이법에 의해 파지의 표면에 발현시키고, 항원에 결합하는 파지를 선택할 수도 있다. 선택된 파지의 유전자를 해석하면, 항원에 결합하는 인간 항체의 가변 영역을 코드하는 DNA 서열을 결정할 수 있다. 항원에 결합하는 scFv의 DNA 서열이 밝혀지면, 당해 서열을 포함하는 적당한 발현 벡터를 제작하여, 인간 항체를 취득할 수 있다. 이들 방법은 이미 주지이고, WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388을 참고로 할 수 있다.
- [0111] 상기한 바와 같이 구축한 항체 유전자는, 공지된 방법에 의해 발현시킬 수 있다. 포유류 세포를 이용한 경우, 상용되는 유용한 프로모터, 발현되는 항체 유전자, 그 3'측 하류에 폴리 A 시그널을 기능적으로 결합시킨 DNA 혹은 그것을 포함하는 벡터에 의해 발현시킬 수 있다. 예를 들면 프로모터/인핸서로서는, 인간 사이토메갈로바이러스 전기(前期) 프로모터/인핸서(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)를 들 수 있다.
- [0112] 또한, 그 밖에 본 발명에서 사용되는 항체 발현에 사용할 수 있는 프로모터/인핸서로서, 레트로바이러스, 폴리오마바이러스, 아데노바이러스, 시미안바이러스 40(SV40) 등의 바이러스 프로모터/인핸서나 인간 일통게이션 팩터 1 α (HEF1 α) 등의 포유류 세포 유래의 프로모터/인핸서를 이용하면 된다.
- [0113] 예를 들면, SV40 프로모터/인핸서를 사용하는 경우, Mulligan 등의 방법(Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114), 또한 HEF1 α 프로모터/인핸서를 사용하는 경우, Mizushima 등의 방법(Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)에 따르면 용이하게 실시할 수 있다.
- [0114] 대장균의 경우, 상용되는 유용한 프로모터, 항체 분비를 위한 시그널 서열, 발현시키는 항체 유전자를 기능적으로 결합시켜 발현시킬 수 있다. 예를 들면 프로모터로서는, lacZ 프로모터, araB 프로모터를 들 수 있다. lacZ 프로모터를 사용하는 경우, Ward 등의 방법(Ward, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. et al. FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), araB 프로모터를 사용하는 경우, Better 등의 방법(Better, M. et al. Science (1988) 240, 1041-1043)에 따르면 된다.
- [0115] 항체 분비를 위한 시그널 서열로서는, 대장균의 페리플라즘에 산생시키는 경우, pelB 시그널 서열(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383)을 사용하면 된다. 페리플라즘에 산생된 항체를 분리한 후, 항체의 구조를 적절히 리폴드(refold)하여 사용한다(예를 들면, WO96/30394를 참조).
- [0116] 복제 기원으로서, SV40, 폴리오마바이러스, 아데노바이러스, 소유두종바이러스(BPV) 등에서 유래한 것을 이용할 수 있고, 더욱이 숙주 세포계에서 유전자 카피수 증폭을 위해, 발현 벡터는 선택 마커로서, 아미노글라이코사이드 포스포트랜스페라아제(APH) 유전자, 티미딘 키나아제(TK) 유전자, 대장균 잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스페라아제(Ecogpt) 유전자, 다이하이드로엽산 환원 효소(dhfr) 유전자 등을 포함할 수 있다.
- [0117] 본 발명에서 사용되는 항체의 제조를 위해서, 임의의 산생계를 사용할 수 있다. 항체 제조를 위한 산생계는, in vitro 및 in vivo의 산생계가 있다. in vitro의 산생계로서는, 진핵 세포를 사용하는 산생계나 원핵 세포를 사용하는 산생계를 들 수 있다.
- [0118] 진핵 세포를 사용하는 경우, 동물 세포, 식물 세포, 또는 진균 세포를 이용하는 산생계가 있다. 동물 세포로서는, (1) 포유류 세포, 예를 들면, CHO, COS, 미엘로마, BHK(baby hamster kidney), HeLa, Vero 등, (2) 양서류 세포, 예를 들면, 아프리카발톱개구리 난모 세포, 혹은 (3) 곤충 세포, 예를 들면, sf9, sf21, Tn5 등이 알려져 있다. 식물 세포로서는, 니코티아나 타바쿰(Nicotiana tabacum) 유래의 세포가 알려져 있고, 이것을 캘러스 배양하면 된다. 진균 세포로서는, 효모, 예를 들면, 사카로마이세스(Saccharomyces)속, 예를 들면 사카로마이세스 세레비시애(Saccharomyces cerevisiae), 사상균, 예를 들면 아스퍼질러스속(Aspergillus)속, 예를 들면 아스퍼질러스 니제르(Aspergillus niger) 등이 알려져 있다.
- [0119] 원핵 세포를 사용하는 경우, 세균 세포를 이용하는 산생계가 있다. 세균 세포로서는, 대장균(E. coli), 고초균이 알려져 있다.
- [0120] 이들 세포에, 목적으로 하는 항체 유전자를 형질 전환에 의해 도입하고, 형질 전환된 세포를 in vitro에서 배양하는 것에 의해 항체가 얻어진다. 배양은, 공지된 방법에 따라 행한다. 예를 들면, 배양액으로서, DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM을 사용할 수 있고, 소태아혈청(FCS) 등의 혈청 보액을 병용할 수도 있다. 또한, 항체 유전자를 도입한 세포를 동물의 복강 등에 옮기는 것에 의해, in vivo에서 항체를 산생해도 된다.

- [0121] 한편, *in vivo*의 산생계로서는, 동물을 사용하는 산생계나 식물을 사용하는 산생계를 들 수 있다. 동물을 사용하는 경우, 포유류 동물, 곤충을 이용하는 산생계 등이 있다.
- [0122] 포유류 동물로서는, 염소, 돼지, 양, 마우스, 소 등을 이용할 수 있다(Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). 또한, 곤충으로서는, 누에를 이용할 수 있다. 식물을 사용하는 경우, 예를 들면 담배를 이용할 수 있다.
- [0123] 이들 동물 또는 식물에 항체 유전자를 도입하고, 동물 또는 식물의 체내에서 항체를 산생시키고, 회수한다. 예를 들면, 항체 유전자를 염소 β 카제인과 같은 유즙 중에 고유하게 산생되는 단백질을 코딩하는 유전자의 도중에 삽입하여 융합 유전자로서 조제한다. 항체 유전자가 삽입된 융합 유전자를 포함하는 DNA 단편을 염소의 배(胚)에 주입하고, 이 배를 암컷 염소에 도입한다. 배를 수용한 염소로부터 태어나는 트랜스제닉 염소 또는 그 자손이 산생하는 유즙으로부터 희망하는 항체를 얻는다. 트랜스제닉 염소로부터 산생되는 희망하는 항체를 포함하는 유즙량을 증가시키기 위해서, 적절히 호르몬을 트랜스제닉 염소에 사용해도 된다. (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).
- [0124] 또한, 누에를 이용하는 경우, 목적의 항체 유전자를 삽입한 바칼로바이러스를 누에에 감염시키고, 이 누에의 체액으로부터 희망하는 항체를 얻는다(Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594). 또, 담배를 이용하는 경우, 목적의 항체 유전자를 식물 발현용 벡터, 예를 들면 pMON530에 삽입하고, 이 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens*와 같은 박테리아에 도입한다. 이 박테리아를 담배, 예를 들면 *Nicotiana tabacum*에 감염시키고, 본 담배의 잎으로부터 희망하는 항체를 얻는다(Julian, K. -C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).
- [0125] 전술한 바와 같이 *in vitro* 또는 *in vivo*의 산생계에서 항체를 산생하는 경우, 항체 중쇄(H쇄) 또는 경쇄(L쇄)를 코딩하는 DNA를 따로따로 발현 벡터에 짜 넣고 숙주를 동시 형질 전환시켜도 되고, 혹은 H쇄 및 L쇄를 코딩하는 DNA를 단일의 발현 벡터에 짜 넣고, 숙주를 형질 전환시켜도 된다(국제 특허출원 공개번호 WO 94-11523 참조).
- [0126] 본 발명에서 사용되는 항체는, 본 발명에 적합하게 사용될 수 있는 한, 항체의 단편이나 그의 수식물이어도 된다. 예를 들면, 항체의 단편으로서, Fab, F(ab')₂, Fv 또는 H쇄와 L쇄의 Fv를 적당한 링커로 연결시킨 싱글체인 Fv(scFv)를 들 수 있다.
- [0127] 구체적으로는, 항체를 효소, 예를 들면, 파파인, 펩신으로 처리하여 항체 단편을 생성시키거나, 또는 이들 항체 단편을 코딩하는 유전자를 구축하고, 이것을 발현 벡터에 도입한 후, 적당한 숙주 세포에서 발현시킨다(예를 들면, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515, Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-66, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 참조).
- [0128] scFv는, 항체의 H쇄 V 영역과 L쇄 V 영역을 연결하는 것에 의해 얻어진다. 이 scFv에 있어서, H쇄 V 영역과 L쇄 V 영역은 링커, 바람직하게는 펩타이드 링커를 개재시켜 연결된다(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883). scFv에 있어서의 H쇄 V 영역 및 L쇄 V 영역은, 상기 항체로서 기재된 것 중 어느 것에서 유래해도 된다. V 영역을 연결하는 펩타이드 링커로서는, 예를 들면 아미노산 12-19잔기로 이루어지는 임의의 1본쇄 펩타이드가 이용된다.
- [0129] scFv를 코딩하는 DNA는, 상기 항체의 H쇄 또는 H쇄 V 영역을 코딩하는 DNA, 및 L쇄 또는 L쇄 V 영역을 코딩하는 DNA를 주형으로 하고, 이들 서열 중 희망하는 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 부분을, 그 양단을 규정하는 프라이머쌍을 이용하여 PCR법에 의해 증폭하고, 이어서, 추가로 펩타이드 링커 부분을 코딩하는 DNA 및 그 양단을 각각 H쇄, L쇄와 연결되도록 규정하는 프라이머쌍을 배합하여 증폭하는 것에 의해 얻어진다.
- [0130] 또한, 일단 scFv를 코딩하는 DNA가 제작되면, 그들을 함유하는 발현 벡터, 및 해당 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주를 통상적 방법에 따라 얻을 수 있고, 또한 그 숙주를 이용하여 통상적 방법에 따라, scFv를 얻을 수 있다.
- [0131] 이들 항체의 단편은, 상기와 마찬가지로 해서 그 유전자를 취득하여 발현시키고, 숙주에 의해 산생시킬 수 있다. 본 발명에서 말하는 「항체」에는 이들 항체의 단편도 포함된다.
- [0132] 항체의 수식물로서, 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 등의 각종 분자와 결합한 항체를 사용할 수도 있다. 본 발명에

서 말하는 「항체」에는 이들 항체 수식물도 포함된다. 이와 같은 항체 수식물을 얻기 위해서는, 얻어진 항체에 화학적인 수식을 실시하는 것에 의해 얻을 수 있다. 이들 방법은 이 분야에 있어서 이미 확립되어 있다.

- [0133] 상기한 바와 같이 산생, 발현된 항체는, 세포 내외, 숙주로부터 분리하여 균일하게까지 정제할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 항체의 분리, 정제는 어피니티 크로마토그래피에 의해 행할 수 있다. 어피니티 크로마토그래피에 이용하는 컬럼으로서는, 예를 들면, 프로테인 A 컬럼, 프로테인 G 컬럼을 들 수 있다. 프로테인 A 컬럼에 이용하는 담체로서, 예를 들면, HyperD, POROS, Sepharose F.F. 등을 들 수 있다. 그 밖에, 통상의 단백질에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법을 사용하면 되고, 전혀 한정되는 것은 아니다.
- [0134] 예를 들면, 상기 어피니티 크로마토그래피 이외의 크로마토그래피, 필터, 한외 여과, 염석, 투석 등을 적절히 선택, 조합하면, 본 발명에서 사용되는 항체를 분리, 정제할 수 있다. 크로마토그래피로서는, 예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피, 소수 크로마토그래피, 겔 여과 등을 들 수 있다. 이들 크로마토그래피는 HPLC(High performance liquid chromatography)에 적용할 수 있다. 또한, 역상 HPLC(reverse phase HPLC)를 이용해도 된다.
- [0135] 상기에서 얻어진 항체의 농도 측정은 흡광도의 측정 또는 ELISA 등에 의해 행할 수 있다. 즉, 흡광도의 측정에 의한 경우에는, PBS(-)로 적당히 희석한 후, 280nm의 흡광도를 측정하고, 1mg/ml를 1.350D로서 산출한다. 또한, ELISA에 의한 경우는 이하와 같이 측정할 수 있다. 즉, 0.1M 중탄산 완충액(pH 9.6)으로 1 μ g/ml로 희석한 염소 항인간 IgG(TAG제) 100 μ l를 96웰 플레이트(Nunc제)에 가하고, 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 인큐베이션하여, 항체를 고상화한다. 블로킹 후, 적절히 희석한 본 발명에서 사용되는 항체 또는 항체를 포함하는 샘플, 혹은 표품으로서 인간 IgG(CAPPEL제) 100 μ l를 첨가하고, 실온에서 1시간 인큐베이션한다.
- [0136] 세정 후, 5000배 희석한 알칼리 포스파타아제 표지 항인간 IgG(BIO SOURCE제) 100 μ l를 가하고, 실온에서 1시간 인큐베이션한다. 세정 후, 기질 용액을 가하고 인큐베이션 후, MICROPLATE READER Model 3550(Bio-Rad제)을 이용하여 405nm에서의 흡광도를 측정하여, 목적의 항체의 농도를 산출한다.
- [0137] 본 발명에서 사용되는 IL-6 개변체는, IL-6 수용체와의 결합 활성을 갖고, 또한 IL-6의 생물학적 활성을 전달하지 않는 물질이다. 즉, IL-6 개변체는 IL-6 수용체에 대해 IL-6과 결합적으로 결합하지만, IL-6의 생물학적 활성을 전달하지 않기 때문에, IL-6에 의한 시그널 전달을 차단한다.
- [0138] IL-6 개변체는, IL-6의 아미노산 서열의 아미노산 잔기를 치환하는 것에 의해 변이를 도입하여 제작된다. IL-6 개변체의 토대가 되는 IL-6은 그 유래를 불문하지만, 항원성 등을 고려하면, 바람직하게는 인간 IL-6이다.
- [0139] 구체적으로는, IL-6의 아미노산 서열을 공지된 분자 모델링 프로그램, 예를 들어, WHATIF(Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56)를 이용하여 그 2차 구조를 예측하고, 추가로 치환되는 아미노산 잔기의 전체에 미치는 영향을 평가하는 것에 의해 행해진다. 적절한 치환 아미노산 잔기를 결정한 후, 인간 IL-6 유전자를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 벡터를 주형으로 해서, 통상 행해지는 PCR법에 의해 아미노산이 치환되도록 변이를 도입하는 것에 의해, IL-6 개변체를 코딩하는 유전자가 얻어진다. 이것을 필요에 따라서 적당한 발현 벡터에 짜 넣고, 상기 재조합형 항체의 발현, 산생 및 정제 방법에 준하여 IL-6 개변체를 얻을 수 있다.
- [0140] IL-6 개변체의 구체예로서는, Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93, 및 Savino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, WO 96-18648, WO 96-17869에 개시되어 있다.
- [0141] 본 발명에서 사용되는 IL-6 부분 펩타이드 또는 IL-6 수용체 부분 펩타이드는, 각각 IL-6 수용체 혹은 IL-6과의 결합 활성을 갖고, 또한 IL-6의 생물학적 활성을 전달하지 않는 물질이다. 즉, IL-6 부분 펩타이드 또는 IL-6 수용체 부분 펩타이드는 IL-6 수용체 또는 IL-6에 결합하고, 이들을 포착하는 것에 의해 IL-6의 IL-6 수용체에의 결합을 특이적으로 저해한다. 그 결과, IL-6의 생물학적 활성을 전달하지 않기 때문에, IL-6에 의한 시그널 전달을 차단한다.
- [0142] IL-6 부분 펩타이드 또는 IL-6 수용체 부분 펩타이드는, IL-6 또는 IL-6 수용체의 아미노산 서열에 있어서 IL-6과 IL-6 수용체의 결합에 관련하는 영역의 일부 또는 전부의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드이다. 이와 같은 펩타이드는, 통상 10~80, 바람직하게는 20~50, 보다 바람직하게는 20~40개의 아미노산 잔기로 이루어진다.
- [0143] IL-6 부분 펩타이드 또는 IL-6 수용체 부분 펩타이드는, IL-6 또는 IL-6 수용체의 아미노산 서열에 있어서, IL-6과 IL-6 수용체의 결합에 관련하는 영역을 특정하고, 그 특정한 영역의 일부 또는 전부의 아미노산 서열에 기초하여 통상 알려진 방법, 예를 들면 유전자 공학적 수법 또는 펩타이드 합성법에 의해 제작할 수 있다.

- [0144] IL-6 부분 펩타이드 또는 IL-6 수용체 부분 펩타이드를 유전자 공학적 수법에 의해 제작하기 위해서는, 희망하는 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열을 발현 벡터에 짜 넣고, 상기 재조합형 항체의 발현, 산생 및 정제 방법에 준하여 얻을 수 있다.
- [0145] IL-6 부분 펩타이드 또는 IL-6 수용체 부분 펩타이드를 펩타이드 합성법에 의해 제작하기 위해서는, 펩타이드 합성에 있어서 통상 이용되고 있는 방법, 예를 들면 고상 합성법 또는 액상 합성법을 이용할 수 있다.
- [0146] 구체적으로는, 「속(續) 의약품의 개발 제14권 펩타이드 합성(감수: 야지마 하루아키, 히로카와 서점, 1991년)」에 기재된 방법에 준하여 행하면 된다. 고상 합성법으로서는, 예를 들면 유기 용매에 불용성인 지지체에 합성하려고 하는 펩타이드의 C 말단에 대응하는 아미노산을 결합시키고, α-아미노기 및 측쇄 작용기를 적절한 보호기로 보호한 아미노산을 C 말단으로부터 N 말단 방향의 순번으로 1아미노산씩 축합시키는 반응과 수지 상에 결합한 아미노산 또는 펩타이드의 α-아미노기의 해당 보호기를 탈리시키는 반응을 교호로 반복하는 것에 의해, 펩타이드쇄를 신장시키는 방법이 이용된다. 고상 펩타이드 합성법은, 이용되는 보호기의 종류에 따라 Boc법과 Fmoc법으로 대별된다.
- [0147] 이와 같이 해서 목적으로 하는 펩타이드를 합성한 후, 탈보호 반응 및 펩타이드쇄의 지지체로부터의 절단 반응을 한다. 펩타이드쇄와의 절단 반응에는, Boc법에서는 불화 수소 또는 트라이플루오로메테인 설폰산을, 또한 Fmoc법에서는 TFA를 통상 이용할 수 있다. Boc법에서는, 예를 들면 불화 수소 중에서 상기 보호 펩타이드 수지를 아니올 존재하에서 처리한다. 이어서, 보호기의 탈리와 지지체로부터의 절단을 하고 펩타이드를 회수한다. 이것을 동결건조하는 것에 의해, 조(粗)펩타이드가 얻어진다. 한편, Fmoc법에서는, 예를 들면 TFA 중에서 상기 와 마찬가지로의 조작으로 탈보호 반응 및 펩타이드쇄의 지지체로부터의 절단 반응을 행할 수 있다.
- [0148] 얻어진 조펩타이드는, HPLC에 적용하는 것에 의해 분리, 정제할 수 있다. 그 용출에 있어서, 단백질의 정제에 통상 이용되는 물-아세트나이트릴계 용매를 사용하여 최적 조건하에서 행하면 된다. 얻어진 크로마토그래피의 프로파일의 피크에 해당하는 획분을 분취하고, 이것을 동결건조한다. 이와 같이 해서 정제한 펩타이드 획분에 대하여, 매스 스펙트럼 분석에 의한 분자량 해석, 아미노산 조성 분석, 또는 아미노산 서열 해석 등에 의해 동정한다.
- [0149] IL-6 부분 펩타이드 및 IL-6 수용체 부분 펩타이드의 구체예는, 일본 특허공개 평2-188600, 일본 특허공개 평7-324097, 일본 특허공개 평8-311098 및 미국 특허공보 US5210075에 개시되어 있다.
- [0150] 본 발명에 사용하는 항체는, 폴리에틸렌 글라이콜(PEG), 방사성 물질, 독신 등의 각종 분자와 결합한 콘주게이트 항체여도 된다. 이와 같은 콘주게이트 항체는, 얻어진 항체에 화학적인 수식을 실시하는 것에 의해 얻을 수 있다. 한편, 항체의 수식 방법은 이 분야에 있어서 이미 확립되어 있다. 본 발명에 있어서의 「항체」에는 이들 콘주게이트 항체도 포함된다.
- [0151] 또한, 본 발명에 있어서의 「항체」에는, 번역 후 수식을 받은 것이 포함된다. 번역 후 수식은, 중쇄 또는 경쇄 N 말단의 글루타민 또는 글루탐산의 피로글루타미화에 의한 피로글루탐산에의 수식을 포함하지만, 이것으로 한정되지 않는다.
- [0152] 본 발명에 있어서의 「항IL-6 수용체 항체」의 바람직한 예로서는, 인간화 항IL-6 리셉터 IgG1 항체인 토실리주맙, 토실리주맙의 가변 영역 및 정상 영역의 개변을 행한 인간화 항IL-6 리셉터 항체, 및 토실리주맙과 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 들 수 있다.
- [0153] 구체적으로는 서열 번호: 1의 중쇄 가변 영역(토실리주맙의 중쇄 가변 영역) 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역(토실리주맙의 경쇄 가변 영역)을 포함하는 항체, 및 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역(SA237의 중쇄 가변 영역) 및 서열 번호: 6의 경쇄 가변 영역(SA237의 경쇄 가변 영역)을 포함하는 항체를 들 수 있다.
- [0154] 더 구체적으로는, 서열 번호: 3의 중쇄(토실리주맙의 중쇄) 및 서열 번호: 4의 경쇄(토실리주맙의 경쇄)를 포함하는 항체, 및 서열 번호: 7의 중쇄(SA237의 중쇄) 및 서열 번호: 8의 경쇄(SA237의 경쇄)를 포함하는 항체를 들 수 있다.
- [0155] 이와 같은 항체는, 예를 들면 W02010/035769, W02010/107108, W02010/106812 등에 기재된 방법에 따라 취득할 수 있다. 구체적으로는, 상기 항IL-6 수용체 항체의 서열을 토대로, 당업자에게 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 항체를 제작하는 것이 가능하다(예를 들면, Borrebaeck CAK and Larrick JW, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 참조). 재조합형 항체는, 그것을 코딩하는 DNA를 하이브리도마, 또는 항체를 산생하는 감작 림프구 등의 항체 산생 세포로부터 클로닝하

고, 적당한 백터에 짜 넣고, 이것을 숙주(숙주 세포)에 도입하여 산생시켜 얻을 수 있다.

- [0156] 이와 같은 항체의 분리, 정제는, 통상의 항체의 정제에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법을 사용하면 되고, 전혀 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 크로마토그래피 컬럼, 필터, 한외 여과, 염석, 용매 침전, 용매 추출, 증류, 면역 침강, SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동, 등전점 전기영동법, 투석, 재결정 등을 적절히 선택, 조합하면 항체를 분리, 정제할 수 있다.
- [0157] 참조 항체와 「동일한 에피토프에 결합하는 항체」는, 경합 어세이에 있어서 그 참조 항체가 자신의 항원에 하는 결합을 50% 이상 저지하는 항체를 말하고, 또한 반대로 말하면, 참조 항체는, 경합 어세이에 있어서 전술한 항체가 자신의 항원에 하는 결합을 50% 이상 저지한다. 구체적으로는, 참조 항체와 「동일한 에피토프에 결합하는 항체」는, 경합 어세이에 있어서 그 참조 항체가 자신의 항원에 하는 결합을 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상 저지하는 항체를 말한다.
- [0158] 다른 국면에 있어서, IL-6 수용체에의 결합에 관해서 토실리주맙과 경합하는 항체를 동정하기 위해서, 경합 어세이가 사용될 수 있다. 특정한 태양에 있어서, 그와 같은 경합 항체는, 토실리주맙에 의해 결합되는 것과 동일한 에피토프(예를 들면, 선상 또는 입체 구조 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 매핑하는, 상세한 예시적 방법은, Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66(Humana Press, Totowa, NJ)에 제공되어 있다.
- [0159] 예시적인 경합 어세이에 있어서, 고정화된 IL-6 수용체는, IL-6 수용체에 결합하는 제 1 표지된 항체(예를 들면, 토실리주맙) 및 IL-6 수용체에의 결합에 관해서 제 1 항체와 경합하는 능력에 관해서 시험되는 제 2 미표지된 항체를 포함하는 용액 중에서 인큐베이트된다. 제 2 항체는, 하이브리도마 상청에 존재할 수 있다. 대조로서, 고정화된 IL-6 수용체가, 제 1 표지된 항체를 포함하지만 제 2 미표지된 항체를 포함하지 않는 용액 중에서 인큐베이트된다. 제 1 항체의 IL-6 수용체에 대한 결합을 허용하는 조건하에서의 인큐베이션 후, 여분의 미결합된 항체가 제거되고, 고정화된 IL-6 수용체에 결합한 표지의 양이 측정된다. 고정화된 IL-6 수용체에 결합한 표지의 양이 대조 샘플과 비교하여 시험 샘플에 있어서 실질적으로 감소하고 있는 경우, 그것은 제 2 항체가 IL-6 수용체에의 결합에 관해서 제 1 항체와 경합하고 있는 것을 나타낸다. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)를 참조.
- [0160] 본 발명에 있어서의 「항CCL2 항체」의 예로서는, 일본 특허 제9067399호, 일본 특허공개 평05276986호, WO03048083호, US20040047860호, US20060039913호, WO2006/125202호에 기재된 항체를 들 수 있지만, 그들로 한정되지 않는다. 보다 구체적인 예로서는, ABN912 및 CNT088(carlumab)을 들 수 있다. 이들 항체는, 일본 특허 제9067399호, 일본 특허공개 평05276986호, WO03048083호, US20040047860호, US20060039913호, WO2006/125202호에 기재된 방법에 따라, 임의로 공지 기술을 사용하는 것에 의해 제작할 수 있다.
- [0161] CCR2 저해제가 저분자 물질인 경우, 당해 물질의 예로서는, 프로파저마늄(3-옥시저밀프로피온산 폴리머), INCB3344, RS-504393, 또는 WO2006/187393에 기재된 것을 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0162] 본 발명의 치료제 또는 예방제는, 필요에 따라서, 적당한 약학적으로 허용되는 담체, 매체 등과 혼합해서 조제하여, 동결건조 제제 또는 용액 제제로 할 수 있다. 적당한 약학적으로 허용되는 담체, 매체로서는, 예를 들면, 멸균수나 생리 식염수, 안정제, 부형제, 산화 방지제(아스코르브산 등), 완충제(인산, 시트르산, 히스티딘, 다른 유기산 등), 방부제, 계면활성제(PEG, Tween 등), 킬레이트제(EDTA 등), 결합제 등을 들 수 있다. 또한, 그 밖의 저분자량의 폴리펩타이드, 혈청알부민, 젤라틴이나 면역글로불린 등의 단백질, 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 메싸이오닌, 아르기닌 및 라이신 등의 아미노산, 다당 및 단당 등의 당류나 탄수화물, 만니톨이나 소비톨 등의 당 알코올을 포함하고 있어도 된다. 주사용의 수용액으로 하는 경우에는, 예를 들면 생리 식염수, 포도당이나 그 밖의 보조약을 포함하는 등장액, 예를 들면, D-소비톨, D-만노스, D-만니톨, 염화 나트륨을 들 수 있고, 적당한 용해 보조제, 예를 들면 알코올(에탄올 등), 폴리알코올(프로필렌 글라이콜, PEG 등), 비이온성 계면활성제(폴리소베이트 80, 폴리소베이트 20, 폴록사머 188, HCO-50) 등과 병용해도 된다. 또한, 제제 중에 히알루로니다아제(hyaluronidase)를 혼합하는 것에 의해, 보다 큰 액량을 피하 투여하는 것도 가능하다(Expert Opin Drug Deliv. 2007 Jul;4(4):427-40.). 또한, 본 발명의 의약 조성물은 미리 주사통에 넣어져 있어도 된다. 한편, 용액 제제는 WO2011/090088에 기재된 방법에 따라 제작할 수 있다.
- [0163] 또한, 필요에 따라 본 발명의 치료제 또는 예방제를 마이크로캡슐(하이드록시메틸셀룰로스, 젤라틴, 폴리[메틸메타크릴산] 등의 마이크로캡슐)에 봉입하거나, 콜로이드 드러그 딜리버리 시스템(리포솜, 알부민 마이크로스피

어, 마이크로에멀션, 나노입자 및 나노캡슐 등)으로 할 수도 있다("Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980) 등 참조). 또, 약제를 서방성의 약제로 하는 방법도 공지이고, 본 발명의 치료제 또는 예방제에 적용할 수 있다(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 267-277 (1981); Langer, Chemtech. 12: 98-105 (1982); 미국 특허 제3,773,919호; 유럽 특허출원 공개(EP) 제58,481호; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP 제133,988호).

[0164] 본 발명의 치료제 또는 예방제는, 유효 성분으로서 저분자 물질을 포함하는 경우, 적당한 약학적으로 허용되는 담체 등과 혼합해서 조제하여, 정제, 캡슐제, 과립제, 산제, 환제로 할 수도 있다.

[0165] 약학적으로 허용되는 담체 등의 예로서는, 유당, 포도당, 자당 등의 당류; 옥수수 전분, 감자 전분 등의 전분류; 셀룰로스 및 카복시메틸셀룰로스 나트륨, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스 등의 유도체; 트래거캔스 검 분말; 맥아; 젤라틴; 톨크; 스테아르산이나 스테아르산 마그네슘 등의 고흡윤활제; 황산 칼슘; 땅콩유, 면실유, 참기름, 올리브유, 옥수수유, 식물유, 카카오유 등의 식물유; 프로필렌 글라이콜, 글리세린, 소비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글라이콜 등의 다가 알코올; 알긴산; TWEEN과 같은 유화제; 레시틴과 같은 습윤제; 착색제; 향료; 정제화제(tableting agent); 안정제; 항산화제; 방부제; 파이로젠 프리수; 등장염 수용액; 및 인산 완충액 등을 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0166] 본 발명의 치료제 또는 예방제의 투여는, 임의의 적절한 경로를 통해 환자에게 투여할 수 있다. 예를 들면, 블리스로서 또는 일정 기간에 걸친 지속 주입에 의한 정맥내, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 경피, 피하, 피내, 관절내, 설하, 활액내, 경구, 흡입, 국소 또는 외용에 의한 경로에 의해 환자에게 투여된다.

[0167] 투여량으로서는, 예를 들면, 1회당 체중 1kg당 활성 성분이 0.0001mg~100mg의 범위에서 선택하는 것이 가능하다. 또는, 예를 들면, 인간 환자에게 투여하는 경우, 환자당 활성 성분이 0.001~1000mg/kg·body·weight의 범위를 선택할 수 있다. 항체를 유효 성분으로 하는 IL-6 저해제 또는 CCR2 저해제이면, 1회당 투여량으로서는, 예를 들면 0.01~50mg/kg·body·weight 정도의 양이 포함되는 것이 바람직하다.

[0168] 병용 요법 및 의약 조성물

[0169] 본 발명에 있어서의 비한정된 일 태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 세포 증식을 억제하거나, 종양 중량을 억제하거나, 종양 체적을 억제하거나, 암을 치료하거나, 또는 암을 예방하는 방법을 제공한다. 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, IL-6 저해제 또는 CCR2 저해제의 단독 요법과 비교해서, 세포 증식을 억제하거나, 종양 중량을 억제하거나, 종양 체적을 억제하거나, 암을 치료하거나, 또는 암을 예방하는 효과가 높다. 다른 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, 세포 증식을 억제하거나, 종양 중량을 억제하거나, 종양 체적을 억제하거나, 암을 치료하거나, 또는 암을 예방하는 상승 효과 또는 상가 효과를 갖는다.

[0170] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 「유효량」은, 개체에 있어서의 질환(본 발명에 있어서의 특히 비뇨기암)을 치료 또는 예방하기 위해서 유효한 IL-6 저해제 및/또는 CCR2 저해제의 용량을 의미한다. 예를 들면, IL-6 저해제가 항체인 경우, 1회의 투여당 체중 1kg당 예를 들면 0.0001mg 내지 1000mg, 바람직하게는 0.001mg 내지 100mg, 더 바람직하게는 0.01~50mg의 범위의 용량으로, 예를 들면 1~10주간마다, 바람직하게는 1~8주간마다, 더 바람직하게는 1~4주간마다 1회 투여하는 것을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, CCR2 저해제가 항CCL2 항체인 경우, 1회의 투여당 체중 1kg당 0.0001mg 내지 1000mg, 바람직하게는 0.001mg 내지 100mg, 더 바람직하게는 0.01~50mg의 범위의 용량으로, 예를 들면 1~10주간마다, 바람직하게는 1~8주간마다, 더 바람직하게는 1~4주간마다 1회 투여하는 것을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, CCR2 저해제가 CCR2에 결합하여 CCL2의 시그널을 차단하는 저분자 물질인 경우, 1회의 투여당, 예를 들면 1일당 체중 1kg당 0.01mg 내지 40mg의 범위에서, 바람직하게는 1일당 체중 1kg당 0.25mg 내지 10mg의 범위에서 매일 투여하는 것을 들 수 있다. CCR2 저해제가 프로파제마늄인 경우, 예를 들면 1일당 20~40mg의 범위에서, 바람직하게는 1일당 30mg으로, 예를 들면 2-4회로 나누어, 바람직하게는 3회로 나누어 투여하는 것을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0171] 본 발명에 있어서의 상기 비뇨기암은 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 방광암이다.

[0172] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 「치료」는, 본 발명의 병용 요법에 의해, 개체의 비뇨기에 있어서의 종양 증대가 억제되는 것, 암세포수가 감소하는 것, 암세포의 증식이 억제되는 것, 종양 체적이 감소하는 것, 종양 중량이 감소하는 것, 암세포의 전이를 억제하는 것, 또는 암에 기인하는 다양한 증상이 개선되는 것을 의미한다. 또한, 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 「예방」은, 감소한 암세포가 재차

증식하는 것에 의한 암세포수의 증가를 방지하는 것, 증식이 억제된 암세포의 재증식을 방지하는 것, 감소한 종양의 사이즈가 재차 증대되는 것을 방지하는 것, 또는 국소 치료에 의해 육안적으로 소실된(또는 치유된) 암이 재차 육안적으로 출현하는 것을 예방하는 것을 의미한다.

[0173] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, IL-6 저해제를 사용하는 것에 의해, CCR2 저해제에 의한 암의 치료 또는 예방에 있어서, 당해 CCR2 저해제의 치료 또는 예방 효과를 증강하는 방법을 제공한다. 다른 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, CCR2 저해제를 사용하는 것에 의해, IL-6 저해제에 의한 암의 치료 또는 예방에 있어서, 당해 IL-6 저해제의 치료 또는 예방 효과를 증강하는 방법을 제공한다. 여기에서, 치료 또는 예방 효과의 증강이란, 예를 들면, 치료의 성공률이 상승하는 것, 치료를 위해서 투여되는 IL-6 저해제 또는 CCR2 저해제의 양이 저감되는 것, 및/또는 IL-6 저해제 또는 CCR2 저해제에 의한 치료 기간이 짧아지는 것을 말하지만, 이들로 한정되지 않는다. 다른 실시태양에 있어서는, 본 발명의 병용 요법은, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 개체에 있어서 무증약 생존 기간을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0174] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제의 투여를 포함한다. IL-6 저해제 및 CCR2 저해제는, 당 기술 분야에서 공지된 임의의 적절한 방법으로 투여할 수 있다. 예를 들면, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제를, 병행해서(즉 동시에) 또는 연속해서(즉 상이한 시점에서) 투여할 수 있다. 몇 가지의 실시태양에 있어서, 해당 IL-6 저해제 및 CCR2 저해제를 연속해서(즉 상이한 시점에서) 투여하는 경우, 해당 IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 투여 간격은 특별히 한정되지 않고, 투여 경로나 제형 등의 요인이 고려되어 설정될 수 있다. 예를 들면, 0시간~168시간이고, 바람직하게는 0시간~72시간이고, 또한 바람직하게는 0~24시간이고, 더 바람직하게는 0시간~12시간이지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0175] 몇 가지의 실시태양에서는, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제는 동시 투여된다. 몇 가지의 실시태양에서는, IL-6 저해제는 간헐적으로(즉 단속적으로) 투여된다. 몇 가지의 실시태양에서는, IL-6 저해제는, CCR2 저해제의 투여 전에 투여된다. 몇 가지의 실시태양에서는, IL-6 저해제는, CCR2 저해제의 투여 후에 투여된다.

[0176] 몇 가지의 실시태양에서는, CCR2 저해제는 간헐적으로(즉 단속적으로) 투여된다. 몇 가지의 실시태양에서는, CCR2 저해제는, IL-6 저해제의 투여 전에 투여된다. 몇 가지의 실시태양에서는, CCR2 저해제는, IL-6 저해제의 투여 후에 투여된다.

[0177] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 공지 또는 본 명세서에 기재된 IL-6 저해제 및 CCR2 저해제가, 본 발명의 병용 요법에 사용될 수 있다.

[0178] 몇 가지의 실시태양에 있어서는, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제의 병용 요법에 더하여, 추가로 추가 요법을 행할 수 있다. 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법에 추가하는 요법에는, 추가의 IL-6 저해제 및/또는 CCR2 저해제의 투여를 포함해도 된다.

[0179] 본 발명의 비한정된 일 태양으로서, 본 발명은, IL-6 저해제, CCR2 저해제, 또는 IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합을 함유하는, 세포 증식 억제제(세포 증식 저해제), 암세포 혹은 암세포를 포함하는 종양 조직의 체적 또는 증량의 억제제, 암 치료제 또는 암 예방제(이하, 본 발명의 의약 조성물로 총칭한다)를 제공한다. 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명의 의약 조성물은, 본 발명의 병용 요법에 이용될 수 있다. 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명의 의약 조성물은, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제가 병용되는 것에 의해, 이들 단독 요법과 비교해서, 세포 증식을 억제하거나, 암세포 혹은 암세포를 포함하는 종양 조직의 체적 또는 증량을 억제하거나, 또는 암을 치료 혹은 예방하는 효과가 높다. 다른 실시태양에 있어서, 본 발명의 의약 조성물은, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제가 병용되는 것에 의해, 세포 증식을 억제하거나, 암세포 혹은 암세포를 포함하는 종양 조직의 체적 또는 증량을 억제하거나, 또는 암을 치료 혹은 예방하는 상승 효과 또는 상가 효과를 갖는다.

[0180] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합을 함유하는 의약 조성물이란, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제를, 질환(본 발명에 있어서는 특히 비뇨기암)의 치료 또는 예방에 있어서 동시에, 따로따로, 또는 순차적으로 투여하기 위해서 조합한 의약 조성물을 의미한다. 예를 들면, 본 발명의 의약 조성물은, IL-6 저해제 및 CCR2 저해제가 모두 함유되는 배합제의 형태로 제공할 수 있다. 또한, 예를 들면, 본 발명의 의약 조성물은, IL-6 저해제를 함유하는 약제와 CCR2 저해제를 함유하는 약제가 따로따로 제공되고, 이들 약제가, 동시에, 또는 순차적으로 사용되어도 된다. 상기 비뇨기암은 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 방광암이다.

[0181] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명은, IL-6 저해제를 유효 성분으로서 포함하는, CCR2 저해제와 병용하기 위한 의약 조성물을 제공한다.

- [0182] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명은, CCR2 저해제를 유효 성분으로서 포함하는, IL-6 저해제와 병용하기 위한 의약 조성물을 제공한다.
- [0183] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명은, IL-6 저해제를 CCR2 저해제와 조합하는 것에 의해, CCR2 저해제에 의한 암의 치료에 있어서, 당해 CCR2 저해제의 치료 효과를 증강하기 위한 의약 조성물을 제공한다.
- [0184] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명은, CCR2 저해제를 IL-6 저해제와 조합하는 것에 의해, 암의 치료에 있어서, 당해 IL-6 저해제의 치료 효과를 증강하기 위한 의약 조성물을 제공한다.
- [0185] 몇 가지의 실시태양에 있어서, 본 발명은, IL-6 저해제 및/또는 CCR2 저해제를 유효 성분으로서 포함하는 의약 조성물을 제조하기 위한 IL-6 저해제 및/또는 그 CCR2 저해제의 사용을 제공한다.
- [0186] 한편, 본 발명에 있어서, IL-6 저해제 및/또는 그 CCR2 저해제를 유효 성분으로서 포함한다는 것은, IL-6 저해제 및/또는 그 CCR2 저해제를 주요한 활성 성분으로서 포함한다는 의미이고, IL-6 저해제 및/또는 그 CCR2 저해제의 함유율을 제한하는 것은 아니다.
- [0187] KDM6A는, 히스톤 수식 단백질이고, 그 유전자는 X 염색체 상에 위치한다. KDM6A는 JmjC 도메인을 개재시켜 트라이·다이메틸화된 히스톤 H3의 27번째의 라이신 잔기(H3K27)의 탈메틸화를 촉진함과 함께, TPR(tetratricopeptide repeat)로 불리는 단백질 상호작용 도메인을 개재시켜 히스톤 메틸화 효소인 MLL3(mixed lineage leukemia 3, KMT2C) 또는 MLL4(mixed lineage leukemia 4, KMT2D)와 결합하고, 단백질 복합체인 COMPASS(complex of proteins assoiated with Set1)-like complex의 구성 요소로서 히스톤 H3의 4번째의 라이신 잔기(H3K4)의 메틸화에 관여하는 것이 알려져 있다. H3K27 메틸화는 전사 억제의 히스톤 마크, H3K4 메틸화는 전사 촉진의 히스톤 마크이고, KDM6A는 상기의 기능을 개재시켜 표적 유전자의 전사 활성화를 촉진한다고 생각된다.
- [0188] 상기 국면의 일 태양에 있어서, 본 발명은, IL-6 저해제, CCR2 저해제, 또는 IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합을 포함하는, 비뇨기암의 치료용 또는 예방용의 의약 조성물(비뇨기암의 치료제 또는 예방제)로서, 개체(예를 들면, 비뇨기암 환자)로부터 얻어진 생물 시료에 있어서의 KDM6A의 기능의 저하, KDM6A의 발현의 저하, 및/또는 KDM6A 유전자의 변이(바람직하게는 기능 결실형 변이)의 유무를 평가하여, KDM6A의 기능의 저하, KDM6A의 발현의 저하, 및/또는 KDM6A 유전자의 변이(바람직하게는 기능 결실형 변이)를 갖는 개체를 상기 의약 조성물에 의한 치료 또는 예방에 대한 응답자로서 선택하고, 당해 선택된 개체에 투여하기 위한, 상기 의약 조성물을 제공한다.
- [0189] 다른 태양에 있어서, 본 발명은, 비뇨기암의 치료 또는 예방에 있어서의 사용을 위한 IL-6 저해제, CCR2 저해제, 또는 IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합으로서, 개체(예를 들면, 비뇨기암 환자)로부터 얻어진 생물 시료에 있어서의 KDM6A의 기능의 저하, KDM6A의 발현의 저하, 및/또는 KDM6A 유전자의 변이(바람직하게는 기능 결실형 변이)의 유무를 평가하여, KDM6A의 기능의 저하, KDM6A의 발현의 저하, 및/또는 KDM6A 유전자의 변이(바람직하게는 기능 결실형 변이)를 갖는 개체를 상기 치료 또는 예방에 대한 응답자로서 선택하고, 당해 선택된 개체에 투여하기 위한, IL-6 저해제, CCR2 저해제, 또는 IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합을 제공한다.
- [0190] 다른 태양에 있어서, 본 발명은, 개체(예를 들면, 비뇨기암 환자)에 유효량의 IL-6 저해제를 투여하는 공정 및 개체에 유효량의 CCR2 저해제를 투여하는 공정을 포함하거나, 또는 IL-6 저해제와 CCR2 저해제의 조합을 투여하는 공정을 포함하는, 비뇨기암을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 개체로부터 얻어진 생물 시료에 있어서의 KDM6A의 기능의 저하, KDM6A의 발현의 저하, 및/또는 KDM6A 유전자의 변이(바람직하게는 기능 결실형 변이)의 유무를 평가하는 공정, 및 KDM6A의 기능의 저하, KDM6A의 발현의 저하, 및/또는 KDM6A 유전자의 변이(바람직하게는 기능 결실형 변이)를 갖는 개체를 상기 치료 또는 예방에 대한 응답자로서 선택하는 공정을 포함하는, 비뇨기암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 상기 평가하는 공정 및 선택하는 공정은, 바람직하게는 상기 투여하는 공정의 전에 실시된다.
- [0191] 이들 태양에 있어서, 개체에 있어서의 p53의 발현의 저하, p53의 기능의 저하, 및/또는 p53의 변이의 유무를 평가하여, p53의 발현의 저하, p53의 기능의 저하, 및/또는 p53의 변이를 갖는 개체를 상기 치료 또는 예방에 대한 응답자로서 선택해도 된다. p53의 변이의 유무를 평가하는 방법은 당 기술 분야에 있어서 공지이다.
- [0192] 본 발명에 있어서, KDM6A의 기능의 저하, KDM6A의 발현의 저하, KDM6A 유전자의 변이, 및 KDM6A 유전자의 기능 결실형 변이는, 예를 들면, 비뇨기암의 환자로부터 채취한 시료를 KDM6A에 대한 항체를 사용하여 면역 염색하는 것에 의해, 또는 환자로부터 채취한 시료에 대하여 웨스턴 블롯법 또는 엑손 시퀀싱법을 실시하는 것에 의해,

확인할 수 있다.

- [0193] 예를 들면, KDM6A에 대한 항체를 사용한 면역 염색의 결과, KDM6A 양성 컨트롤(예를 들면 KDM6A의 기능이 저하되어 있지 않거나, KDM6A의 발현이 저하되어 있지 않거나, KDM6A 유전자의 변이를 갖지 않거나, KDM6A 유전자의 기능 결실형 변이를 갖지 않는 환자로부터 채취한 생물 시료)과 비교해서, KDM6A 단백질의 발현이 현저하게 저하되어 있는 경우, KDM6A의 기능이 저하되어 있거나, KDM6A의 발현이 저하되어 있거나, KDM6A 유전자가 변이를 갖거나, 또는 KDM6A 유전자가 기능 결실형 변이를 갖는다고 판정할 수 있다.
- [0194] 본 발명에 있어서, KDM6A의 기능의 저하에는, KDM6A 기능의 결실, KDM6A의 불활화(不活化)가 포함된다.
- [0195] 본 발명에 있어서, KDM6A의 발현의 저하에는, KDM6A 단백질의 발현이 현저하게 저하되는 것, KDM6A 단백질이 발현하지 않는 것이 포함된다.
- [0196] 본 발명에 있어서, KDM6A 유전자의 변이에는, KDM6A 유전자의 기능 결실형 변이가 포함된다. 구체적인 변이로서는, 넌센스 변이, 프레임시프트 변이, 스플라이스 변이, 결실 등을 들 수 있다.
- [0197] p53 유전자는, DNA 수복이나 세포 주기의 제어, 아포토시스 등의 유도 등의 기능을 갖는 암 억제 유전자의 하나이고, p53 유전자 변이는 다양한 암에 있어서 확인되고 있다. 변이형 p53 단백질은 반감기가 길고, 세포내에 축적되기 때문에, 혈청 중에 p53 항체가 출현한다(Lowe SW, Bodis S, McClatchey A et al: p 53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. Science 266: 807-810, 1994). 이 때문에 혈청 중 p53 항체를 ELISA법으로 측정하는 것은, p53 유전자 변이를 수반한 암의 발견에 유용하다고 생각되고 있고(Shimada H, Ochiai T, Nomura F et al: Titration of serum p53 antibodies in 1085 patients with various types of malignant tumors. Cancer 97: 682-689, 2003), 2007년 11월부터 식도암, 대장암 및 유방암에 있어서의 종양 마커 검사로서 보험 적용이 인정되고 있다.
- [0198] 본 발명에 있어서, p53의 기능의 저하에는, p53의 기능의 결실, p53의 불활화가 포함된다.
- [0199] 본 발명에 있어서, p53의 발현의 저하에는, p53 단백질의 발현이 현저하게 저하되는 것, p53 단백질의 발현이 검출되지 않는 것이 포함된다.
- [0200] 본 발명에 있어서, p53 유전자의 변이의 구체적인 변이로서는, 미스센스 변이, 넌센스 변이, 프레임시프트 변이, 결실 등을 들 수 있다.
- [0201] **실시예**
- [0202] 다음으로, 실시예에 의해, 본 발명을 더 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0203] 방광암에 있어서의 UTX(KDM6A) 결실의 관여를 검토할 목적으로, 방광 상피 특이적으로 UTX를 결실한 마우스(Utx^{Δ/Δ})를 제작하고, 해석을 행했다. Utx^{Δ/Δ} 마우스의 방광 상피에서는 Utx의 결실이 확인되었지만, 장기간의 관찰에서 방광에 종양 발증은 확인되지 않아, UTX의 단독 결손은 방광암 발증에는 충분하지는 않다고 생각되었다.
- [0204] 방광암에서 가장 고빈도로 변이를 확인하는 유전자는 p53이고, Utx 결실과 p53 변이는 높은 비율로 합병하는 것이 알려져 있다(The Cancer Genome Atlas Research Network, Nature 2014, vol. 507, p. 315-322). 그래서, Utx^{Δ/Δ} 마우스를 p53 헤테로 마우스와 교배하여, Utx^{Δ/Δ}, p53^{+/-} 마우스를 제작했다. 흥미롭게도, Utx^{Δ/Δ}, p53^{+/-} 마우스는 장기간의 관찰의 결과 상피내암(carcinoma in situ, CIS)의 발증이 확인되어, Utx 결실은 p53 변이와 협조하여 방광암 발증에 관여하고 있는 것이 나타났다.
- [0205] 또, 방광암 발증에는 흡연 등의 변이원인의 폭로가 발증에 중요하다고 생각되고 있기 때문에, 마우스에 실험적 방광암 유발 물질인 N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine(BBN)의 투여를 행했다. 그 결과, 투여로부터 10주에 컨트롤의 Utx^{+/+}, p53^{+/-} 마우스는 약 60%에서 이형성~상피내암(Dysplasia~CIS)을 확인한 데 반해, Utx^{Δ/Δ}, p53^{+/-} 마우스는 100% 이형성~상피내암을 발증하고 있고(도 1A), 더욱이 일부는 근층에 침윤암(Muscle invasive cancer)으로 진행되고 있었다(도 1B). 이들 결과는, Utx 결실과 p53 변이는 방광암 감수성을 향진시키고, 변이원과 협조하여 진행암으로 진전하는 것을 나타내고 있다. 우리의 마우스는, 인간 방광 종양을 유전자 변이의 축적 및 환경 변이원의 영향의 견지에서 제작한, 처음의 in vivo 모델이라고 생각된다.
- [0206] 방광암 발증에 있어서의 UTX 결실의 관여에 대하여 해석할 목적으로, 우리는 BBN 투여 4주의 시점에서 컨트롤의

Utx^{+/+} 마우스 및 Utx^{Δ/Δ} 마우스의 방광으로부터 요로 상피를 채취하고, RNA를 추출하여 트랜스크립톰 해석 및 KEGG에 의한 패스웨이 해석을 행했다. 그 결과, Utx^{Δ/Δ} 마우스의 방광 상피에서 가장 항진하고 있는 경로는 "Cytokine-cytokine receptor interaction"이고(도 2A; 두꺼운 테두리), 그 밖에 "MAPK pathway" 및 "JAK-STAT pathway"의 항진이 확인되었다. 이들 결과는, UTX 결실에 의해 방광 상피에 있어서 사이토카인 경로가 활성화되고, 그 결과 MAPK나 JAK-STAT 등의 세포내 정보 전달계가 활성화되어 있는 것을 나타내고 있다. 또, "Cytokine-cytokine receptor interaction" 경로에서 발현 항진하고 있는 유전자를 조사한 바, 가장 발현이 높은 것은 케모카인 CCL2이고, 다음으로 사이토카인 IL6인 것이 판명되었다(도 2B; 굵은 글자).

[0207] 그래서 이들 사이토카인·케모카인의 기능을 억제하는 것에 의해, 방광암의 진전을 억제할 수 있는지 여부를 검토하는 치료 모델 실험을 행했다. MBT2는 C3H라는 마우스 라인으로부터 확립된 방광암 종양주이다. 그래서 우리는 MBT2에 empty vector(EV) 및 Utx knockout(KO) vector를 도입하는 것에 의해, Utx 발현주(EV clones)와 Utx 결손주(KO clones)를 작성했다(도 3A). 이 클론을 동일 계의 C3H 마우스에 이식하고, 7일 생착 기간을 마련하고, 그 후에 vehicle만, Propagermanium(CCL2의 수용체 CCR2의 저해제, 0.005% 농도가 되도록 먹이에 섞어 연일 투여)만, MR16-1(마우스 IL6 수용체에 대한 중화 항체, 1마리당 100 μg을 주 3회 복강내 주사)만, 및 Propagermanium과 MR16-1의 병용(Combination)에 의한 치료를 행했다.

[0208] 그 결과, 도 3C에 나타내는 바와 같이, Utx 발현주를 이식한 결과 생긴 EV tumor에서는 어느 치료법도 vehicle만과 비교하여 유의한 치료 효과가 확인되지 않은 데 비해, 도 3D에 나타내는 바와 같이 Utx 결손주를 이식한 결과 생긴 KO tumor에 대해서는, Propagermanium과 MR16-1의 병용(Combination) 요법이 유의하게 종양 중량을 억제하는 것이 분명해졌다.

[0209] 이들 결과는, Utx 결손 방광암에 대해서, CCL2/CCR2 활성화와 IL6 활성을 모두 억제하는 것에 의해 종양 증대를 유의하게 억제할 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0210] Utx의 방광암 발증에 있어서의 관여를 나타낸 논문으로서, Utx 변이를 갖는 인간 방광암 세포주를 이용한 면역 부전 마우스에의 이식 실험 모델이 보고되어 있지만(Deer Lee et al. Sci Trans Med 2017), 이는 배양 세포를 이용하여 이중 이식을 행한 결과이며, 생체내에서의 Utx 기능 결실을 반영한 모델이라고는 말하기 어렵다. 지금까지, 방광암에 주목하고 유전자 개변의 수법을 이용하여 방광 특이적 Utx 결손(Utx^{Δ/Δ}) 마우스를 제작해서 해석을 행한 연구는 보고되어 있지 않고, 본 발명에 관한 연구와 그 수법은 독자적인 것이라고 생각된다.

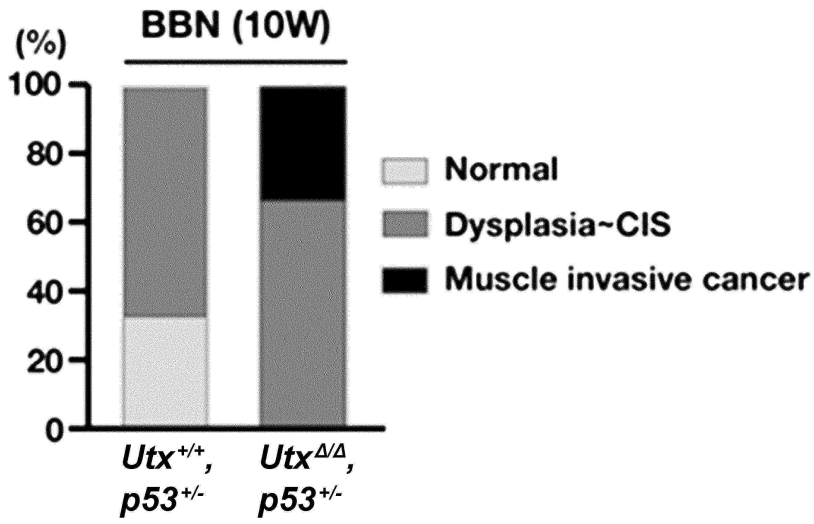
산업상 이용가능성

[0211] 본 발명은, 비뇨기암, 특히 lysine (K)-specific demethylase 6A (KDM6A)의 기능이 저하된 비뇨기암에 대한 새로운 치료제를 제공하는 것이다.

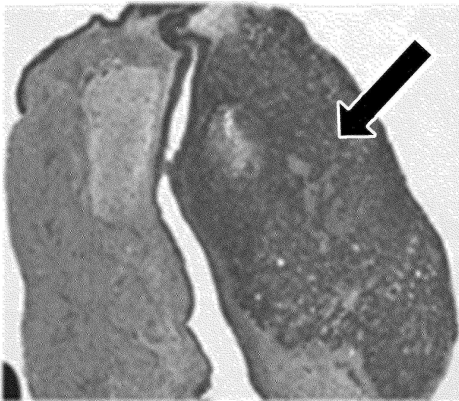
도면

도면1

A

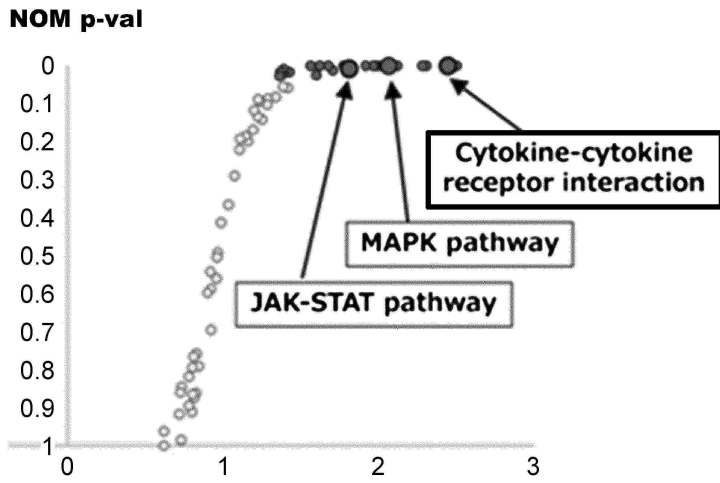


B

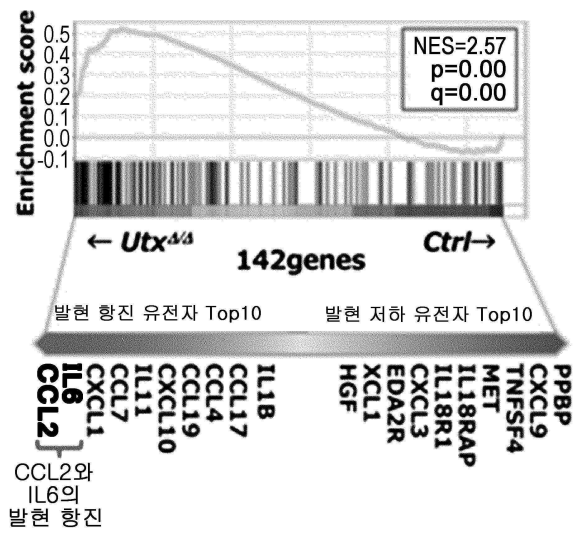


도면2

A



B



도면3

