



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년08월02일 10-0745488 2007년07월27일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-2006-0062400 2006년07월04일 2006년07월04일	(65) 공개번호 (43) 공개일자
----------------------------------	---	------------------------

(73) 특허권자 학교법인 울산공업학원
 울산 남구 무거2동 763-1

(72) 발명자 권병세
 울산광역시 울주군 청량면 삼정리 755 쌍용하나빌리지 307-120

(74) 대리인 신동인

(56) 선행기술조사문헌
 논문(2007.02)

심사관 : 박정민

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 항-4-1B B 항체 및 화학 항암제를 포함하는 암 질환 예방및 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 항-4-1BB (anti-4-1BB) 항체 및 화학 항암제를 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 4-1BB (CD137) 분자에 특이성을 갖는 단일클론 폴리펩티드인 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제를 병용 처리하여 암세포 제거를 유도하는 약학조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 단독적으로 처리시 종양 성장 억제 및 치료 효과가 미미한 항-4-1BB 항체 또는 화학 항암제의 병용 처리로 암세포 특이적인 면역반응 증진 활성 및 탁월한 암세포 제거 활성을 나타내므로 암 질환 예방 및 치료를 위한 약학조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도

도 1a

특허청구의 범위

청구항 1.

암세포 특이적인 면역반응 증진 활성 및 탁월한 암세포 제거 활성을 갖는 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제 조합을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 함유하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 화학 항암제는 시클로포스파미드 (cyclophosphamide), 시스플라틴 (cisplatin), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), 이리노테칸 (irinotecan), 파클리탁셀 (paclitaxel) 또는 독소루비신 (Doxorubicin)인 약학조성물.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제는 조성물 총 중량에 대해 0.1~50 중량%인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 암 질환은 자궁경부암, 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 결장암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종 또는 신장골반 암종인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 상기 암 질환은 폐암, 간암, 피부암 또는 안구내 흑색종인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

수많은 연구자들은 화학 요법과 방사능 치료의 부작용의 극복을 위한 성공적인 암 치료를 위한 방법 및 치료제의 개발을 위해 노력해왔다. 암과 면역세포에 관한 생물학이 진보함으로써 암 치료를 위한 새로운 방법들이 고안되었으며, 흥미로운 방법 중 하나가 숙주의 면역반응을 올려주거나 암에 대항하는 항암 면역반응을 증가시키기 위해 면역관용을 깨는 면역치료법이다 (Waldmann TA, *Nat. Med. Rev.*, 9, pp269-277, 2003; Ye Z et al., *Nat. Med.*, 8, pp343-348, 2002; Yu P et al., *Nat. Immunol.*, 5, pp141-149, 2004).

암 치료에 있어서, 항진성 (agonistic) 항-4-1BB 항체 (anti-4-1BB)의 효능은 이미 증명되어져 있으며, 그 치료 효과는 자연 살해 세포와 CD8+ T 세포 활성화, 그리고 인터페론-감마 (IFN- γ)의 생산을 증가시킴으로서 매개되는 것으로 알려져 있다 (Xu D et al., *Int. J. Cancer*, 109, pp499-506, 2004; Ito F et al., *Cancer Res.*, 64, pp8411-8419, 2004; Sun Y et al., *J. Immunol.*, 168, pp1457-1465, 2002; Ju SA et al., *Immunol. Cell Biol.*, 83, pp344-351, 2005). 그러나 항-4-1BB 항체의 단독투여로는 흑색종 (melanoma)의 성장을 완전하게 억제하지는 못한다 (Ju SA et al., *Immunol. Cell Biol.*, 83, pp344-351, 2005).

항진성 항-4-1BB 항체는 CD8 T 세포의 반응을 차별적으로 증진시키는 것으로 잘 알려져 있으며, 이러한 특징으로 인해 오랫동안 암 치료를 위한 면역치료 표적으로서 연구되어 왔다 (Shuford WW et al., *J. Exp. Med.*, 186(1), pp47-55, 1997; Halstead ES et al., *Nat. Immunol.*, 3(6), pp536-541, 2002). 현재까지의 연구결과들은 4-1BB를 이용한 암 치료 방법들이 상당히 성공적임을 보여주고 있지만 (Chen SH et al., *Mol. Ther.*, 2(1), pp39-46, 2000; Martinet O et al.,

Gene Ther., 9(12), pp786-792, 2002; Melero I et al., *Nat. Med.*, 3(6), pp682-685, 1997), 항진성 항-4-1BB 단독으로는 면역성이 낮은 세포의 치료에는 효과적이지 못한 것으로 나타났다 (Wilcox RA et al., *J. Clin. Invest.*, 109(5), pp651-659, 2002; Ju SA et al., *Immunol. Cell Biol.*, 83(4), pp344-351, 2005). 면역성이 낮은 암세포의 경우 T 세포의 활성화가 어렵고, 이로 인해 4-1BB를 발현하는 세포의 빈도가 낮아짐으로 항-4-1BB 항체의 효과가 비효율적이 된다. 이러한 항-4-1BB 항체를 이용한 암 치료효과의 한계를 극복하기 위해 암세포 특이적인 항원에 대한 면역반응을 높일 수 있는 또 다른 제제와의 복합 투여를 고려해볼 수 있다.

시클로포스파미드 (cyclophosphamide, CTX)는 암 환자의 화학치료 (chemotherapy)에 사용되는 화학물질로, 빠르게 증식하는 세포의 성장을 억제하는 세포 증식 저해제이다 (Lake RA and Robinson BW, *Nat. Rev. Cancer*, 5(5), pp397-405, 2005). 일반적인 화학 항암제들은 세포 증식을 저해하는 물질이기 때문에 암세포 뿐 아니라, 빠르게 증식하는 정상적인 면역세포 역시 제거되는 부작용을 나타낸다 (Lake RA and Robinson BW, *Nat. Rev. Cancer*, 5(5), pp397-405, 2005; Bast RC Jr et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 28(1), pp101-114, 1983; Mackall CL et al., *Blood*, 1994, 84(7), pp2221-2228, 1994). 상기의 특징 때문에, 항체를 이용한 면역치료에 화학 항암제를 병행하여 사용하는 것은 효과적이지 못한 것으로 예상되었다.

그러나 CTX의 경우 B 세포와 CD4+ CD25+ regulatory T 세포만을 선택적으로 제거할 뿐, 정상적인 CD4 및 CD8 T 세포는 제거하지 않는 것으로 알려져 있으며 (Ghiringhelli F et al., *Eur. J. Immunol.*, 34(2), pp336-344, 2004; Taieb J et al., *J. Immunol.*, 176(5), pp2722-2729, 2006; Cupps TR et al., *J. Immunol.*, 128(6), pp2453-2457, 1982; Winkelstein A, *Immunology*, 46(4), pp827-832, 1982; Mackall CL et al., *Blood*, 1994, 84(7), pp2221-2228, 1994), 이러한 특성으로 인해 암세포의 직접적인 제거능력과 면역증진효과를 유발함으로써, CTX는 화학적 치료제임에도 불구하고 면역치료제로서 간주되고 있다 (Lake RA and Robinson BW, *Nat. Rev. Cancer*, 5(5), pp397-405, 2005; Tsung K et al., *J. Immunol.*, 160(3), pp1369-1377, 1998; Le HN et al., *J. Immunol.*, 167(12), pp6765-6772, 2001).

이에 본 발명자들은, 활성화된 T 세포가 작용대상인 항-4-1BB 항체의 경우 CTX와 병행하여 사용하여도 서로의 항암효과를 상쇄시키지 않을 것으로 기대하였으며, 이를 증명하기 위하여 CTX를 포함한 다양한 화학 항암제와 항진성 항-4-1BB 항체를 이용하여 B16-F10 흑색종 암세포를 대상으로 예방 및 치료 효과를 실험하였으며, 그 결과 항-4-1BB와 항암제 각각의 단독 치료에 비해 복합투여가 암세포 특이적인 면역반응 증진 및 탁월한 암세포 제거 활성을 가짐을 확인하여 암의 예방 및 치료에 더 효과적이라는 것을 증명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 암세포 특이적인 면역반응 증진 활성 및 탁월한 암세포 제거 활성을 갖는 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 질환의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 암세포 특이적인 면역반응 증진 활성 및 탁월한 암세포 제거 활성을 갖는 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제 조합을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

본원 발명의 항-4-1BB 항체는 4-1BB (CD137) 분자에 특이성을 갖는 폴리펩티드, 바람직하게는 단일클론 항-4-1BB 항체 (monoclonal anti-4-1BB antibody)를 포함한다.

본원 발명의 4-1BB는 인간을 포함한 다양한 포유동물의 4-1BB를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

본원 발명의 화학 항암제는 시클로포스파미드 (cyclophosphamide), 시스플라틴 (cisplatin), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), 이리노테칸 (irinotecan), 파클리탁셀 (paclitaxel) 또는 독소루비신 (Doxorubicin; Doxo), 바람직하게는 시클로포스파미드 (cyclophosphamide)를 포함한다.

본원 발명의 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제는 조성물 총 중량 중 0.1 ~ 50 중량%를 포함하는 것을 특징으로 한다.

또한, 본 발명은 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제를 함유하는 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 질환의 예방 및 치료방법을 제공한다.

상기 암 질환은 자궁경부암, 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 결장암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 바람직하게는 폐암, 간암, 피부암 또는 안구내 흑색종을 포함한다.

C57BL/6 마우스에 흑색종 암세포주인 B16F10세포로 종양을 유발함과 동시에 본 발명의 항-4-1BB항체 및 화학 항암제인 시클로포스파미드 (CTX)의 복합투여는, 종양의 크기를 감소시킴과 동시에 마우스의 생존율을 향상하여 종양 예방 효과를 나타내었으며, 상기 실험은 다른 화학 항암제인 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 독소루비신, 이리노테칸 및 파클리탁셀과 항-4-1BB 항체를 복합투여한 경우와 비교하였을 때 훨씬 탁월한 항종양 활성 및 생존율 향상을 나타내었다. 또한 종양이 유발된 마우스에서도 본 발명의 항-4-1BB항체 및 시클로포스파미드의 복합투여가 종양의 크기를 감소시킴과 동시에 마우스의 생존율을 향상하여 종양 치료 효과를 나타내었다. 상기 결과들은 본 발명의 항-4-1BB항체 및 시클로포스파미드의 복합투여가 탁월한 암세포 제거 활성을 갖음을 나타낸다. 또한, 흑색종 암세포주인 B16F10세포로 종양을 유발한 C57BL/6 마우스에 본 발명의 항-4-1BB항체 및 시클로포스파미드를 복합 투여한 경우 CTX 단독으로 처리한 경우와 비교하여 면역세포인 CD4 및 CD8 T세포의 수의 감소가 상쇄되었으며, CD8 T 세포의 경우 인터페론-감마를 발현하는 CD8 T세포의 개체수가 증가하여, 본 발명의 항-4-1BB항체 및 시클로포스파미드의 복합 투여는 각각의 단독처리와 비교하였을 때 암세포 특이적인 면역반응 증진 활성을 나타내었으므로 암 질환의 예방 및 치료효과가 탁월함을 확인할 수 있었다.

본 발명의 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제를 포함하는 약학조성물을 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

본 발명의 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제는 단독 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제를 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서는 본 발명의 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제는 1일 0.0001 mg/kg 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

본 발명의 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제는 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

본 발명의 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

참고예 1. 항체 및 화학 항암제

항-4-1BB 단일클론항체 (anti-4-1BB monoclonal antibody)를 생산하는 융합세포는 로버트 미틀러 박사 (Dr. Robert Mittler, Emory University, Atlanta, GA)로부터 제공 받았다. 상기 항체들은 마우스의 복수 및 융합세포 배양액으로부터 생산되어졌고, 단백질 G-컬럼(protein G-column, Sigma, St. Louis, MO)을 사용하여 실험실에서 정제하였다. 화학 항암제인 시스플라틴 (cisplatin; Cis), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil; 5-FU)은 중외제약 (서울, 한국)으로부터, 이리노테칸 (irinotecan)은 주식회사 아벤티스파마 (서울, 한국)로부터, 파클리탁셀 (paclitaxel; Taxel)은 브리스톨-마이어스 스쿼브 (Bristol-Myers Squibb, New York, NY)로부터, 그리고 독소루비신 (Doxorubicin; Doxo)은 보령제약 주식회사 (서울, 한국)로부터 구입하였다.

대조군의 항체로 사용된 정제된 쥐 IgG는 시그마사(Sigma-Aldrich)로부터 구입하였으며, 항-CD4-FITC 항체 및 항-CD8a-PE 항체, 그리고 항-IFN- γ -PE 항체들은 이바이오사이언스사 (eBioscience, San Diego, CA)로부터 구입하였다.

참고예 2. 실험동물 및 세포주

실험동물은 C57BL/6 웅성 마우스 (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN)를 사용하였고, 동물사육실에서 일정한 조건 (온도: 21± 2 °C, 명암: 12시간 명암주기)에서, 사료와 음수의 자유로운 섭취가 가능하도록 하였으며, 실험시작 전까지 물과 먹이를 충분히 제공하였다. 마우스 흑색종 세포주인 B16F10 (ATCC CRL-6475, 미국)은 10% 우태아혈청 (Fetal Bovine Serum; FBS, Gibco BRL, NY), 2 mM L-글루타민, 100 U/l 페니실린 (penicillin, Invitrogen, USA) 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신 (streptomycin, Invitrogen, USA)이 첨가된 DMEM 배지 (Dulbeco's modified eagle's medium, GIBCO BRL, USA)를 사용하여 배양하였다.

실시예 1. 종양유발 마우스에 항체 및 화학 항암제 투여

마우스에 종양을 유발하기 위하여 흑색종 세포인 B16F10 (4×10^5 개)를 마우스의 등 중앙 부위에 피하주사 하였다. 이때, 암세포를 주사함과 동시에 시클로포스파미드 (CTX) 3 mg 및 항 4-1BB 단일클론 항체 100 μ g를 1회 복강주사 하였으며, 항 4-1BB 단일클론 항체의 경우 5일 간격으로 복강주사 하였다. 투여시기의 비교를 위한 대조군 마우스에는, 암세포 주사로 종양유발 후 5일째 또는 10일째부터 CTX 및 항 4-1BB 단일클론 항체를 동일양을 동일방법으로 주사하였다. 또한, 다양한 화학 항암제와의 비교를 위한 대조군 마우스에는, 암세포 주사와 동시에 시스플라틴 (cisplatin; Cis) 50-200 μ g, 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil; 5-FU) 800-10,000 μ g, 이리노테칸 (irinotecan) 2 mg 및 파클리탁셀 (paclitaxel; Taxel) 200-500 μ g은 복강주사 하였으며, 독소루비신 (Doxorubicin; Doxo) 200-400 μ g은 정맥주사 하였다. 암조직의 크기 및 생존율은 주기적으로 측정하였다.

실시예 2. 출수림프절 (draining lymph node) 내 면역세포 수의 변화 측정

항-4-1BB 및 항암제의 복합 투여에 의한 출수림프절 내 면역세포 수의 변화를 측정하기 위하여 상기 실시예 1의 방법으로 마우스에 종양을 유발한 직후, CTX 3 mg 그리고/또는 항-4-1BB 단일클론 항체 100 μ g를 1회 복강투여 하였다 (Tsong K et al., *J. Immunol.*, 160(3), pp1369-1377, 1998; Wilcox RA et al., *J. Clin. Invest.*, 109(5), pp651-659, 2002). 암세포 주사 후 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24일째에 각 실험군의 출수림프절을 분리하여 세포수를 조사하였다. CD4 및 CD8 T 세포수를 계산하기 위해 각 실험군으로부터 림프절 세포 현탁액을 준비하였으며, 이들 세포는 Fc 부위를 통한 염색항체들의 비특이적인 결합을 막기 위해 Fc 저해용 항체 (2.4G2, BD Biosciences, USA)로 4 °C에서 10분간 반응시켰으며, 이후, 항-CD4-FITC (eBioscience, USA) 및 항-CD8a-PE 항체 (eBioscience, USA)를 사용하여 세포 표면을 염색하였다. 유세포분석기 (FACScan, BD Bioscience, USA)를 이용하여 각 샘플 내 면역 세포의 비율을 측정하였으며, 전체 세포수와 각 세포군의 비율을 곱하여 CD4 및 CD8 T 세포의 숫자를 계산하였다.

실시예 3. 림프절 (lymph node) 내 인터페론-감마 (IFN- γ)의 발현도 측정

항-4-1BB 및 항암제의 복합 투여에 의한 림프절 내 인터페론-감마의 발현 변화를 측정하기 위하여 상기 실시예 1의 방법으로 마우스에 종양을 유발한 직후, CTX 3 mg 그리고/또는 항-4-1BB 단일클론 항체 100 μ g를 1회 복강투여 하였다. 암세포 주사 후 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24일째에 각 실험군의 종양 조직과 가장 가까운 출수림프절 (draining lymph node; inguinal lymph node)을 분리하여 인터페론-감마 (IFN- γ)의 발현 정도를 측정하였다 (Kim YH et al., *Cell. Immunol.*, 238(2), pp76-86, 2005). 세포 내 IFN- γ 사이토카인 염색을 위해서 각 실험군으로부터 림프절 세포 현탁액을 준비하였으며, 분리된 세포들은 브레펠딘 A (Brefeldin A, BD Bioscience, USA)가 포함된 배양액에 50 ng/ml PMA 및 500 ng/ml 아이오노마이신 (Ionomycin, Sigma, USA)을 처리한 후 6시간 배양하였다. 6시간 후, 세포의 Fc 부위를 막는 2.4G2를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰으며, FITC-항CD8 또는 항-CD4로 염색하였다. 그 후, 사이토폭스/사이토펙 키트 (Cytofix/cytoperm, BD Pharmingen, USA)을 이용하여 제조사에서 제공한 사용설명서에 따라 고정/투과 시켜서 항-IFN-감마-PE (anti-IFN- γ -PE, eBioscience, USA)로 염색하였으며, 모든 시료는 유세포 분석기 (FACScan, BD Bioscience, USA)로 분석하였다.

실험예 1. 항-4-1BB 단일클론 항체 및 CTX의 복합투여에 의한 항암 효과

1-1. 항-4-1BB 항체 및 CTX의 복합투여에 의한 암 예방 효과

항진성 항-4-1BB 항체와 CTX의 복합투여에 의한 암 예방 효과를 조사하기 위해 흑색종 암세포주인 B16-F10 (4×10^5 개)를 등쪽에 투여하여 종양을 유발한 C57BL/6 마우스를 사용하여 실험하였으며, 실시예 1과 같이 암세포를 주사함과 동시에 시클로포스파미드 (CTX) 3 mg 또는/및 항-4-1BB 단일클론 항체 100 μ g를 1회 복강주사 하였으며, 항-4-1BB 단일클론 항체의 경우 5일 간격으로 6회 복강주사 하였다. 실험기간 동안, 종양의 크기 및 마우스의 생존율을 분석하여 하기 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, B16-F10 흑색종 암세포만을 주사한 마우스의 경우, 약 15일째부터 종양이 성장하기 시작하였으며, 암세포 주사 후 30일을 전후하여 모두 사망하였다. 항-4-1BB 항체를 투여한 마우스의 경우, 종양의 성장에는 음성 대조군과 별다른 차이가 없었으나 마우스의 생존이 약 6-7일 정도 연장되었다. CTX를 투여한 마우스의 경우, CTX 단독만으로도 암조직의 성장이 약 30일까지 크게 증가하지 않을 정도로 강한 암 성장 억제 효과가 있는 것으로 나타났으며, 마우스의 생존 또한 약 20일 정도 연장되었다. 항-4-1BB 항체 및 CTX를 복합 투여한 마우스의 경우, 암세포 주사 후 약 50일까지 종양의 부피도 크게 증가하지 않았으며, 90 % 이상의 마우스가 생존하였다. 그러나, 50일 이후 암조직의 성장이 조금씩 증가하였으며, 생존율 역시 감소하기 시작했다. 항-4-1BB 항체 및 CTX를 복합투여한 마우스 중 약 20 %는 100일 이상 생존하였다.

1-2. 항-4-1BB 항체 및 CTX의 복합투여에 의한 암 치료 효과

항진성 항-4-1BB 항체와 CTX의 단독 또는 복합투여에 의한 암 치료 효과를 조사하기 위해 흑색종 암세포주인 B16-F10 (4×10^5 개)를 등쪽에 투여하여 종양을 유발한 C57BL/6 마우스를 사용하여 실험하였으며, 실시예 1과 같이 암세포를 주사한 후 5일째 및 10일째에 시클로포스파미드 (CTX) 3 mg을 복강주사 하였으며, 항-4-1BB 항체의 경우 암세포 주사 후 5일째 또는 10일째부터 5일 간격으로 6회 복강주사 하였다. 실험기간 동안, 종양의 크기 및 마우스의 생존율을 분석하여 하기 도 2에 나타내었다.

도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이, 암세포 주사 후 5일째에 항-4-1BB 항체를 투여한 경우 암조직의 성장 및 마우스의 생존율에 아무런 영향을 미치지 못하였으며, CTX 역시 실험예 1의 암 예방 효과와는 다르게 전혀 항암 효과를 나타내지 않았다. 랫트 이뮤노글로불린 G (Rat IgG)를 투여한 대조군과 유사하게 항-4-1BB 항체 또는 CTX를 단독투여한 마우스들은 약 35일 이내에 모두 사망하였으며, 종양의 성장 역시 대조군과 동일하였다. 그러나, 항-4-1BB 항체 및 CTX를 복합 투여한 경우 약 30일까지 종양의 성장이 둔화되었으며, 30일 이후에는 종양의 성장이 조금씩 증가하였다. 암세포 투여 30일 이후 항-4-1BB 항체 및 CTX를 복합 투여한 실험군의 생존율은 감소하기 시작하였으며, 50일째에는 생존율이 40 %로, 80일 전후로 모든 마우스가 사망하였다. 도 2c 및 도 2d에 나타난 바와 같이, 암세포 주사 후 10일째부터 항-4-1BB 항체 또는/및 CTX를 단독투여 한 경우, 5일째부터 투여한 결과와 동일하게 아무런 항암효과를 나타내지 않았다. 그러나, 항-4-1BB 항체 및 CTX의 복합투여의 경우 5일째부터 투여한 결과와 유사한 수준으로 종양조직의 성장이 둔화되었으며, 생존율 역시 크게 증가되었다.

CTX는 암세포가 조직을 형성하기 전에 효과적으로 항암반응을 유도하지만 암세포가 조직을 형성한 이후에는 그 항암효과가 감소되며, 항-4-1BB 항체 또한 암세포의 면역성이 낮은 경우 항암반응을 충분히 유도할 수 없다는 것을 나타내는 상기의 결과는 CTX 및 항-4-1BB 항체가 복합되어 사용될 경우에만 암의 예방 및 치료 효과가 증진될 수 있다는 것을 나타낸다.

실험예 2. 항-4-1BB 단일클론 항체 및 화학 항암제의 복합투여에 의한 항암 효과

상기 실험예 1의 항진성 항-4-1BB 항체 및 CTX의 복합투여는 상호 증진적으로 암 예방 및 치료 효과를 나타내었다. 따라서 현재 임상에서 사용하는 다양한 화학 항암제들도 CTX와 유사한 항-4-1BB 항체와의 상호 증진효과를 갖는지 여부를 조사하기 위해, 흑색종 암세포주인 B16-F10 (4×10^5 개)를 등쪽에 투여하여 종양을 유발한 C57BL/6 마우스를 사용하여 실험하였으며, 실시예 1과 같이 암세포를 피하주사함과 동시에 항 4-1BB 단일클론 항체 100 μg 또는/및 시스플라틴 (cisplatin; Cis) 50 또는 200 μg , 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil; 5-FU) 800 또는 10,000 μg , 이리노테칸 (irinotecan) 2 mg 및 파클리탁셀 (paclitaxel; Taxel) 200 또는 500 μg 은 복강주사 하였으며, 항-4-1BB 항체의 경우 5일 간격으로 6회 복강주사 하였다. 항 4-1BB 단일클론 항체 100 μg 또는/및 독소루비신 (Doxorubicin; Doxo) 200 또는 400 μg 은 단독 또는 복합하여 정맥주사 하였으며, 항-4-1BB 항체의 경우 5일 간격으로 6회 복강주사 하였다. 실험기간 동안, 종양의 크기 및 마우스의 생존율을 분석하여 하기 도 3에 나타내었다.

2-1. 항-4-1BB 단일클론 항체 및 시스플라틴의 복합투여에 의한 항암 효과

도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, 시스플라틴 (cisplatin; Cis)을 단독투여한 마우스의 경우 대조군인 랫트 이뮤노글로블린 G (rat IgG) 투여군에 비해 Cis의 투여 농도에 비례하여 암조직의 성장이 둔화되었으며, 마우스의 생존율 역시 부분적으로 증가하였다. 항진성 항-4-1BB 항체 및 Cis를 복합투여한 마우스의 경우 단독투여보다 높은 수준의 항암효과를 나타내었으며, 200 μg Cis 및 항-4-1BB 항체를 복합투여한 마우스가 가장 낮은 암조직 성장률을 나타내었으며, 암세포 주사 후 50일까지 약 20%의 마우스들이 생존하였다.

2-2. 항-4-1BB 단일클론 항체 및 5-플루오로우라실의 복합투여에 의한 항암 효과

도 3c 및 3d에 나타난 바와 같이, 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil; 5-FU)을 5-FU의 농도에 비례하여 암조직의 성장은 둔화되었지만 마우스의 생존율은 반비례하였다. 항진성 항-4-1BB 항체 및 5-FU를 복합투여한 마우스의 경우 5-FU 단독투여의 부작용은 부분적으로 상쇄되어 암조직의 성장 둔화 뿐 아니라 마우스의 생존율 역시 증가되었다. 그러나 5-FU 역시 모든 실험군의 마우스들이 40일 이전에 사망함으로써, 5-FU는 CTX나 Cis에 비해 항-4-1BB 항체와 낮은 공동 상승작용을 나타내었다.

2-3. 항-4-1BB 단일클론 항체 및 독소루비신의 복합투여에 의한 항암 효과

도 3e 및 3f에 나타난 바와 같이, 독소루비신 (Doxorubicin; Doxo)은 단독 투여에 의해서도 사용 농도에 비례하여 강력한 항암효과를 나타냄으로써, 암조직의 성장 둔화뿐 아니라 마우스들의 생존율 역시 크게 증가시켰다. 항진성 항-4-1BB 항체와 Doxo를 복합투여한 경우 항암효과가 더욱 증가하여 400 μg Doxo과 항-4-1BB 항체를 복합투여한 마우스들은 암조직의 성장이 둔화되었을 뿐 아니라, 암세포 주사 후 50일까지의 60% 수준의 생존율을 유지하였다.

2-4. 항-4-1BB 단일클론 항체 및 이리노테칸의 복합투여에 의한 항암 효과

도 3g 및 3h에 나타난 바와 같이, 이리노테칸 (Irinotecan)의 단독투여 역시 농도에 비례하여 항암효과를 보였지만 다른 항암제에 비해 낮은 수준이었으며, 대부분의 마우스가 대조군인 랫트 IgG 투여 마우스와 유사하게 30일 이내에 모두 사망하였다. 항진성 항-4-1BB 항체와 이리노테칸을 함께 투여할 경우에도 공동 상승작용에 의해 상대적으로 강력한 항암효과를 나타내었지만, 복합투여의 경우에도 40일을 전후하여 모든 마우스가 사망함으로써 다른 항암제와의 복합투여에 비해 일시적인 효과를 나타내었다.

2-5. 항-4-1BB 단일클론 항체 및 파클리탁셀의 복합투여에 의한 항암 효과

도 3i 및 3j에 나타난 바와 같이, 파클리탁셀 (Paclitaxel; Taxel)의 단독투여는 상기의 다른 항암제에 비해 B16-F10 흑색종의 성장 억제효과가 낮은 것으로 나타났다. 투여 농도에 비례하여 약간의 암조직 성장 둔화 및 생존율 증가 현상이 나타났지만 대조군인 랫트 IgG 투여 마우스와 비교하였을 때 큰 유의성은 없었다. 또한 항진성 항-4-1BB 항체와 복합 투여하였을 때에도 증진효과는 나타났지만 유의성은 낮았다.

도 3에 나타난 바와 같이, 상기 실험에서 사용한 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 독소루비신, 이리노테칸, 파클리탁셀과 같은 일반적인 화학 항암제는 면역세포 역시 제거하기 때문에 항-4-1BB 항체와는 상호보완적이지 못한 제제들이지만, 아직 알려지지 않은 기작을 통해 항-4-1BB 자극이 항암제에 의해 감소되는 면역세포의 재분할을 빠르게 촉진함으로써 비교적 높은 공동 상승작용을 나타낸 것으로 예상되며, 시클로포스파미드 (CTX)의 경우 상기 항암제와는 다른 방식으로 항암 작용을 나타낸다. CTX는 암세포를 직접적으로 제거할 뿐 아니라, CTX에 의해 CD4+ CD25+ regulatory T 세포와 B 세포만을 선택적으로 제거함으로써 암세포에 대한 T 세포의 활성을 증가시킨다 (Ghiringhelli F et al., *Eur. J. Immunol.*, 34(2), pp336-344, 2004; Taieb J et al., *J. Immunol.*, 176(5), pp2722-2729, 2006; Cupps TR et al., *J. Immunol.*, 128(6), pp2453-2457, 1982; Winkelstein A, *Immunology*, 46(4), pp827-832, 1982). 따라서 CTX와 항-4-1BB 항체를 복합투여 할 경우, 암세포 특이적인 CD8+ T 세포의 반응이 증진되어 항암효과가 증진됨을 예상할 수 있다.

실험예 3. 항-4-1BB 단일클론 항체 및 CTX의 복합투여에 의한 면역세포 재분할 (lymphocyte repopulation) 촉진 효과

CTX는 암세포를 직접적으로 제거할 뿐 아니라, 면역세포 역시 부분적으로 제거한다. 특히 CTX는 B 세포와 CD4+ CD25+ T 세포만을 선택적으로 제거하는 것으로 보고되었다 (Ghiringhelli F et al., *Eur. J. Immunol.*, 34(2), pp336-344, 2004; Taieb J et al., *J. Immunol.*, 176(5), pp2722-2729, 2006; Cupps TR et al., *J. Immunol.*, 128(6), pp2453-2457, 1982; Winkelstein A, *Immunology*, 46(4), pp827-832, 1982). 따라서 CTX 및 항-4-1BB 항체의 복합투여에 의한 지속적인 암 치료 효과는 항암효과를 나타내는 T 세포의 재분할 (repopulation)과 관련이 있을 것으로 예상하였다. 이를 검증하기 위해 실시예 1에 기재된 방법대로 B16-F10 흑색종 세포의 피하주사와 동시에 CTX를 투여한 후, 5일 간격으로 항-4-1BB 항체를 복강투여하면서 실시예 2에 기재된 방법에 따라 림프절 내 세포 수의 변화를 측정하였다. 실험결과 도 4a에 나타난 바와 같이, 랫트 IgG를 투여한 마우스의 림프절 내 세포수는 암세포 투여 후 8일째부터 점진적으로 증가하였으며, 항-4-1BB 항체를 투여할 경우 2-3일 내에 급격히 증가하였다. CTX를 투여한 마우스의 림프절은 일시적으로 감소하였으며, 암세포 주사 후 16일을 전후로 증가하였으나, 세포수를 회복한 후에도 랫트 IgG 또는 항-4-1BB를 투여한 마우스의 세포수에 비하면 1/2~ 1/5 이하 수준에 머물렀다. CTX 및 항-4-1BB 항체의 복합 투여의 경우에도 일시적인 세포수의 감소현상이 발생하였지만, 암세포 주사 후 약 8일째부터 세포수가 증가하기 시작하여, 20일 제에는 항-4-1BB 항체 단독 투여군과 유사한 수준으로 회복되었다. CD4 및 CD8 T 세포수 역시 림프절내 세포수와 유사한 경향을 나타내었다 (도 4b 및 4c 참조). 항-4-1BB 항체를 투여할 경우 CD4 및 CD8 T 세포의 수가 급격히 증가하였으며, CTX 투여시에는 상기 결과와는 반대로 CD4 및 CD8 T 세포의 수는 감소하였다. CTX 단독 투여한 경우 약 14일 후에 정상 수준으로 복구 되었지만, 항-4-1BB 항체를 함께 투여할 경우 8일 후부터 회복되기 시작하였다. 상기 결과들은 항-4-1BB 항체를 투여할 경우 CTX에 의해 나타나는 면역세포의 감소라는 부작용이 상쇄된다는 것을 나타내며, 이로써 항-4-1BB 항체 및 CTX의 복합 투여는 항암효과를 증진시킬 수 있음을 나타낸다.

실험예 4. 항-4-1BB 단일클론 항체 및 CTX의 복합투여에 의한 인터페론-감마 (IFN- γ) 발현 증가 효과

인터페론-감마 (IFN- γ)는 T 세포에 의한 암 치료에 필수적인 역할을 담당하며, 특히 항-4-1BB 항체의 자극 후에 증가되는 가장 대표적인 사이토카인 (cytokine)이다 (Ikeda H et al., *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13(2), pp95-109, 2002; Ye Z et al., *Nat. Med.*, 8(4), pp343-348, 2002). 따라서 항-4-1BB 항체와 CTX에 의한 암 치료효과가 IFN- γ 의 발현증가와 관련되어 있는지 조사하기 위해 하기 실험을 수행하였다. CTX (3 mg)와 항-4-1BB 항체 (100 μ g)를 각각 또는 함께 1회 투여하였으며, CTX 투여 후 세포가 재분할되기 시작하는 시점인 17일째와 림프절 세포의 재분할이 충분히 일어난 22일째에 각 실험군으로부터 세포를 분리하여 실시예 3에 기재된 방법과 같이 유세포분석을 통해 IFN- γ 의 발현을 측정하였다. CTX 투여 후 17일째 분리한 세포를 분석한 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이, 랫트 IgG를 투여한 실험군의 CD4 및 CD8 T 세포는 낮은 수준의 IFN- γ 를 발현하였으며 (<1%), 항-4-1BB 항체 투여시 T 세포, 특히 CD8 T 세포의 IFN- γ 가 증가되었다 (약 5%). CTX 단독 투여의 경우에도 T 세포의 IFN- γ 발현이 다소 높아졌으며 (2~3%), CTX 및 항-4-1BB 항체의 복합 투여의 경우는 CD4 T 세포의 IFN- γ 발현에는 큰 변화가 없었지만 (약 2.3%), CD8 T 세포의 IFN- γ 발현은 증가하였다 (5~6%). CTX 투여 후 22일째에 측정된 IFN- γ 의 경우, 랫트 IgG, 항-4-1BB 항체, 또는 CTX의 단독 투여 실험군에서는 17일째와 큰 차이를 나타내지 않았지만, CTX 및 항-4-1BB 항체의 복합 투여 실험군의 CD8 T 세포중 약 1/3이 IFN- γ 를 발현하였다 (도 5b 참조). 이 결과는 CTX 및 항-4-1BB 항체의 복합 투여의 결과로써 나타난 지속적인 항암효과가 IFN- γ 를 발현하는 CD8 T 세포의 증가 때문일 것임을 시사한다.

상기 실험예의 실험 결과들은, 면역치료제인 항-4-1BB 항체와 화학 항암제가 상호증진적인 암 치료효과를 유발할 수 있으며, 동시에 항원성이 낮은 암세포의 경우에도 면역반응의 시작을 유발할 수 있는 제제와 항진성 항-4-1BB 항체를 복합 투여함으로써 항-4-1BB 항체를 기반으로 한 암 치료가 가능하다는 것을 나타내었다.

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

제제예 1. 주사제제의 제조

- 항-4-1BB 항체 및 CTX.....100 mg
- 소듐 메타비설파이트.....3.0 mg
- 메틸파라벤.....0.8 mg
- 프로필파라벤.....0.1 mg
- 주사용 멸균증류수.....적량

상기의 성분을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2ml이 되도록 제조한 후, 2ml용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조한다.

제제예 2. 환제의 제조

- 항-4-1BB 항체 및 CTX.....120mg
- 옥수수 전분.....100mg
- 멸균증류수.....적량

상기의 성분을 혼합하고, 통상의 환제 제조방법으로 0.3cm 지름으로 제환하여 환제를 제조한다.

제제예 3. 정제의 제조

- 항-4-1BB 항체 및 CTX.....200 mg
- 유당.....100 mg
- 전분.....100 mg
- 스테아린산 마그네슘.....적량

통상의 정제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 타정하여 정제를 제조한다.

제제예 4. 캡슐제의 제조

- 항-4-1BB 항체 및 CTX.....100 mg
- 유당.....50 mg
- 전분.....50 mg
- 탈크.....2 mg

스테아린산마그네슘.....적량

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

제제예 5. 액제의 제조

항-4-1BB 항체 및 CTX.....1000 mg

설탕.....20 g

이성화당.....20 g

레몬향적량

정제수를 가하여 전체 1000ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

발명의 효과

상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 항-4-1BB 항체 및 화학 항암제의 복합투여는 암세포 특이적인 면역반응 증진 활성화 및 탁월한 암세포 제거 활성을 가지므로, 암 질환의 면역치료 방법을 제공함과 동시에 암 질환의 예방 및 치료용 약학조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 C57BL/6 마우스에 B16F10 암세포를 주사하여 종양을 유발함과 동시에 항-4-1BB 항체 (Anti-4-1BB) 및 시클로포스파미드 (CTX)의 복합투여에 의한 종양의 크기 변화 (a) 및 마우스의 생존율 (b)을 나타낸 도이고,

도 2는 C57BL/6 마우스에 B16F10 암세포를 주사하여 종양을 유발한 후, 항-4-1BB 항체 (Anti-4-1BB) 및 시클로포스파미드 (CTX)의 복합투여에 의한 종양의 크기 변화 및 마우스의 생존율을 나타낸 도로서, 상세하게는 복합물을 5일째 투여한 경우 (a, b) 및 10일째 투여한 경우 (c, d)이며,

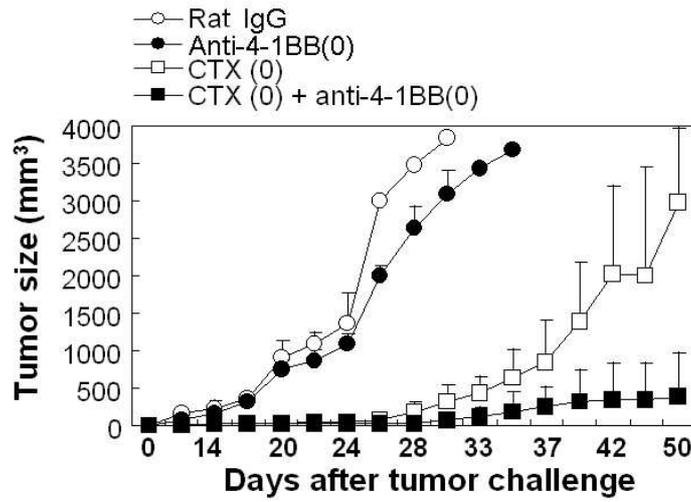
도 3은 C57BL/6 마우스에 B16F10 암세포를 주사하여 종양을 유발한 후, 항-4-1BB 항체 (3E1) 및 여러 종류의 화학 항암제의 복합투여에 의한 종양의 크기 변화 및 마우스의 생존율을 나타낸 도로서, 상세하게는 각 화학 항암제는 시스플라틴 (Cis; a,b), 5-플루오로우라실 (5-FU; c,d), 독소루비신 (Doxo; e,f), 이리노테칸 (irinotecan; g,h) 및 파클리탁셀 (Taxel; i,j)이고,

도 4는 B16F10 암세포를 주사하여 종양을 유발한 C57BL/6 마우스에 시클로포스파미드 (CTX) 및/또는 항-4-1BB 항체 (3E1)를 주사한 후 출수림프절 세포를 수거하여, 림프절세포의 수 (a), CD4 세포 (b) 및 CD8 세포 (c)의 숫자를 계산하여 나타낸 도이고,

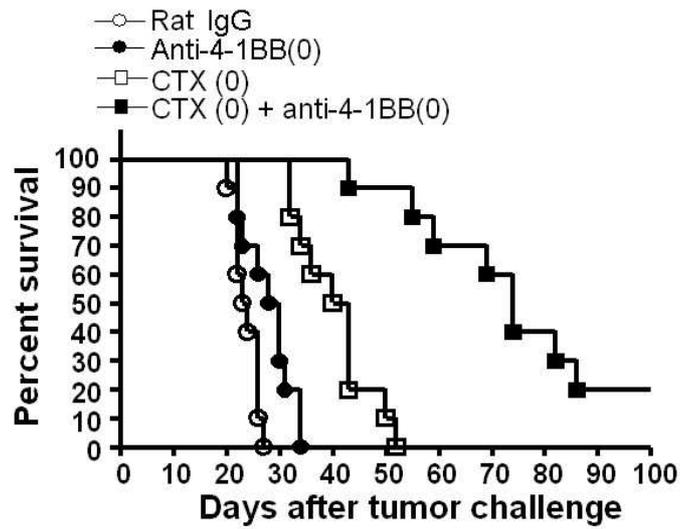
도 5는 B16F10 암세포를 주사하여 종양을 유발한 C57BL/6 마우스에 시클로포스파미드 및/또는 항-4-1BB 항체를 주사한 후 17일째 (a) 및 22일째 (b) 출수림프절 내의 CD4 및 CD8 세포를 염색하여 인터페론-감마의 발현 수준을 측정하여 나타낸 도이다.

도면

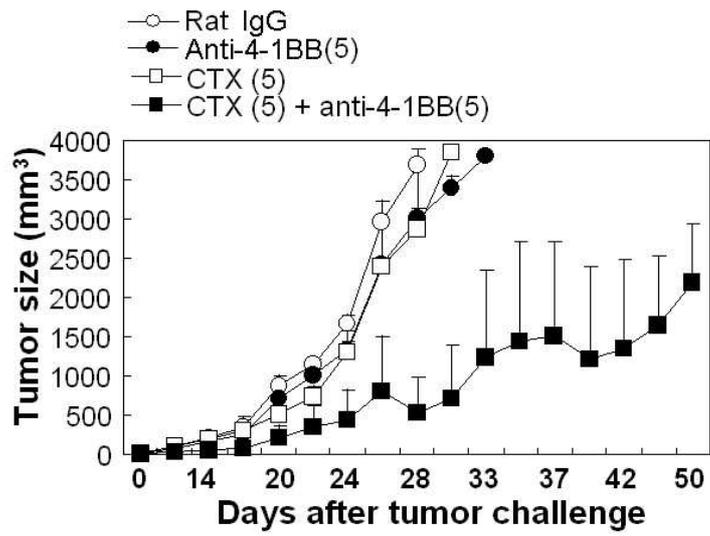
도면1a



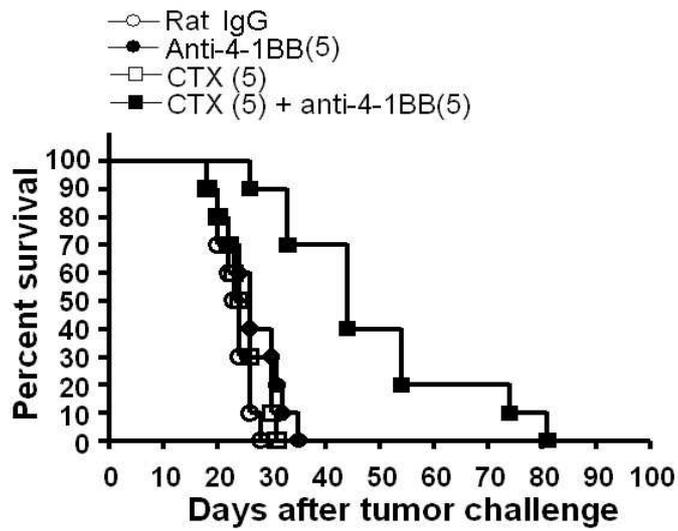
도면1b



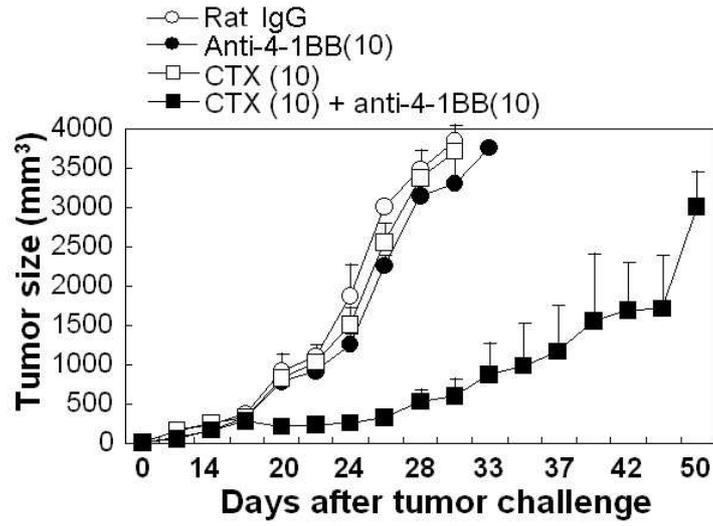
도면2a



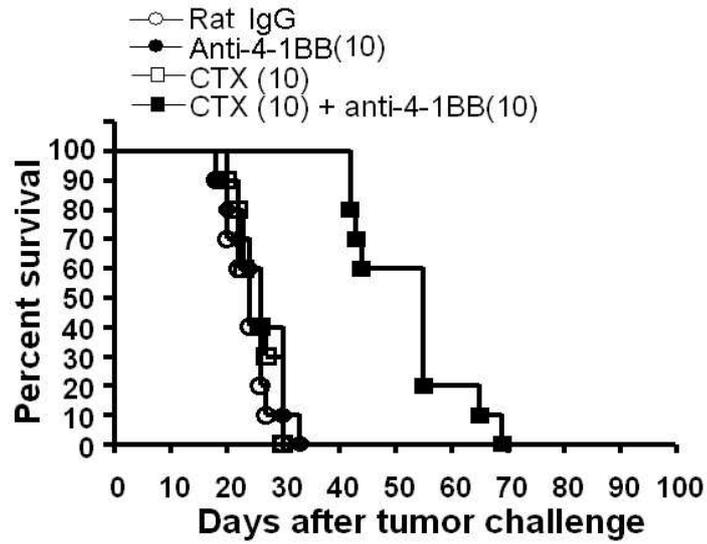
도면2b



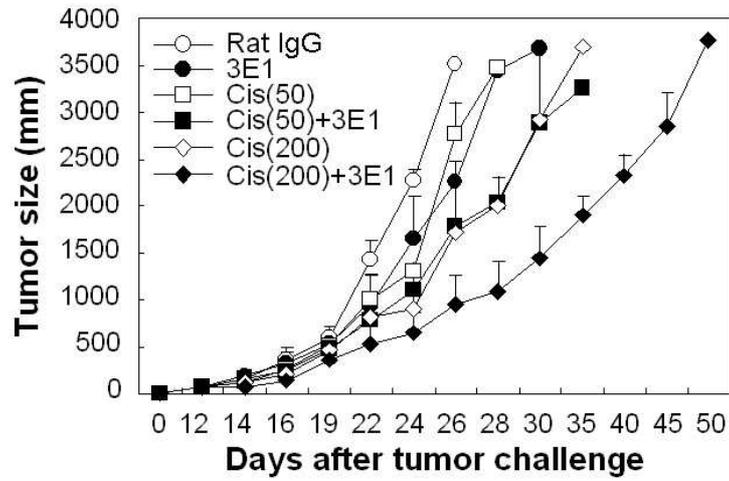
도면2c



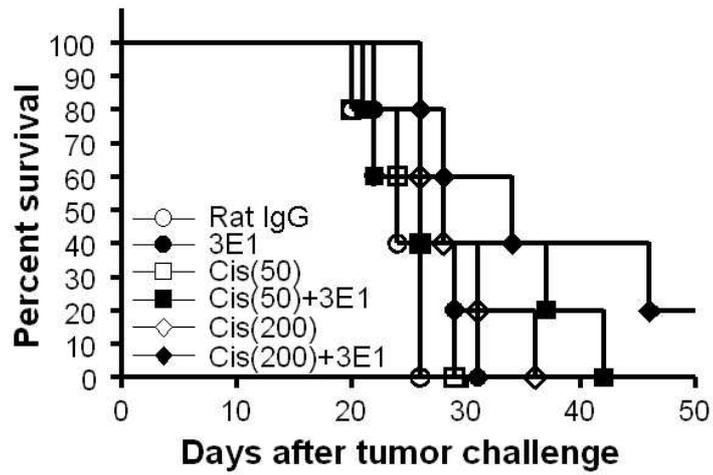
도면2d



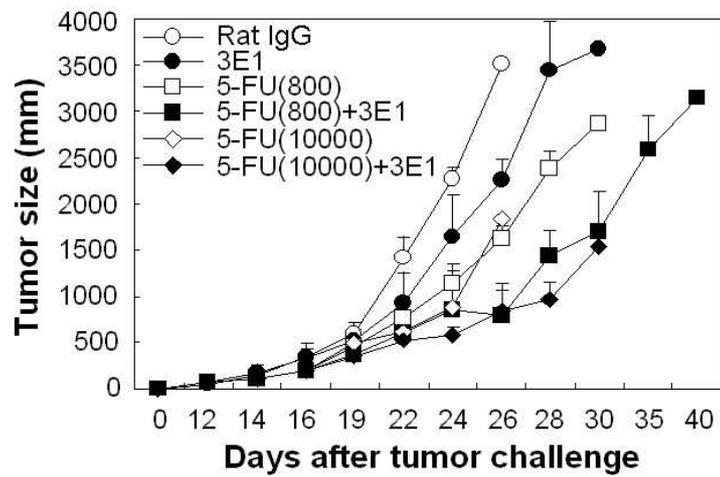
도면3a



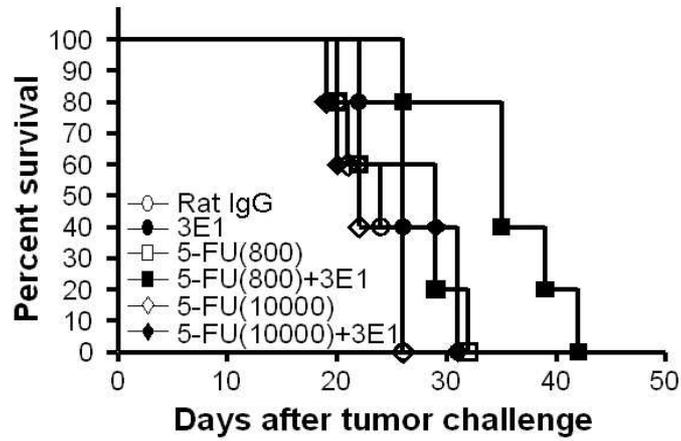
도면3b



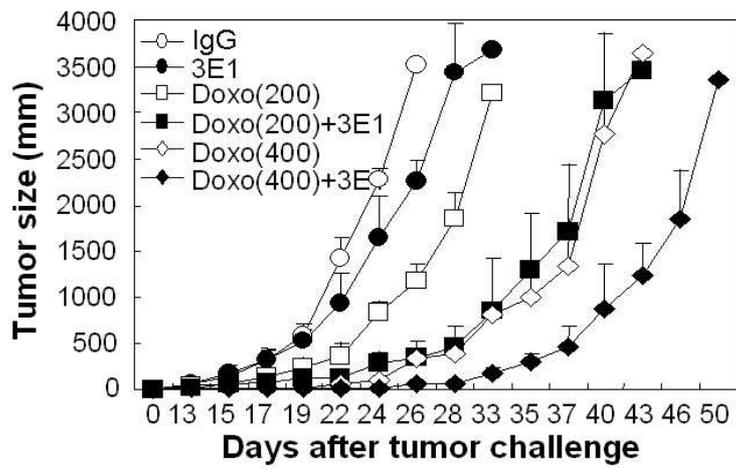
도면3c



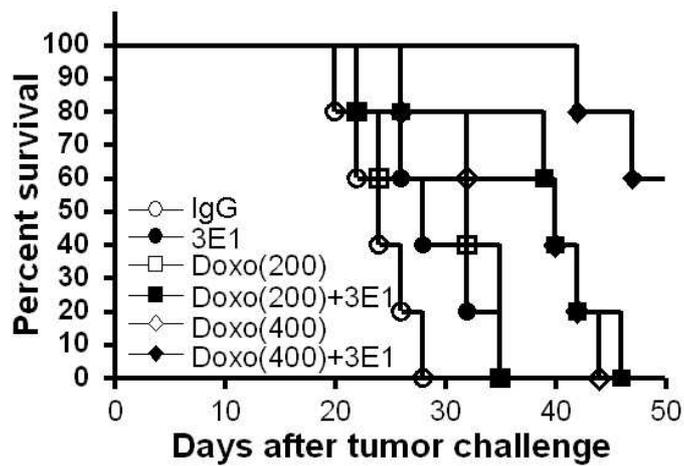
도면3d



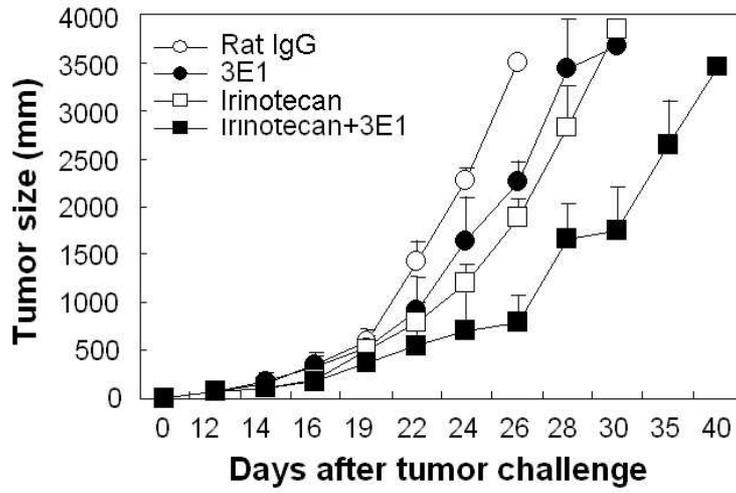
도면3e



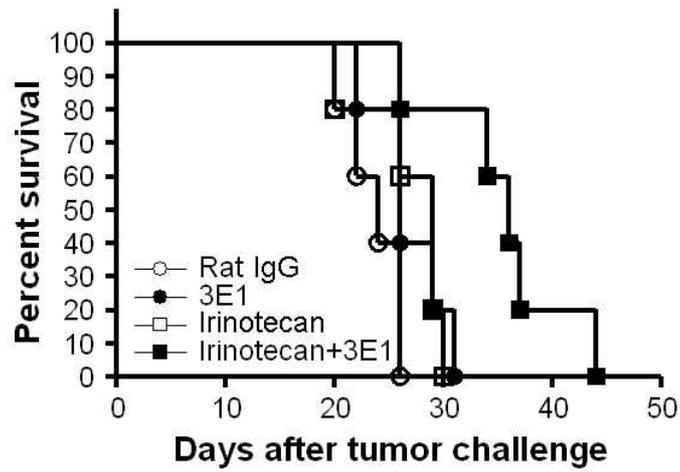
도면3f



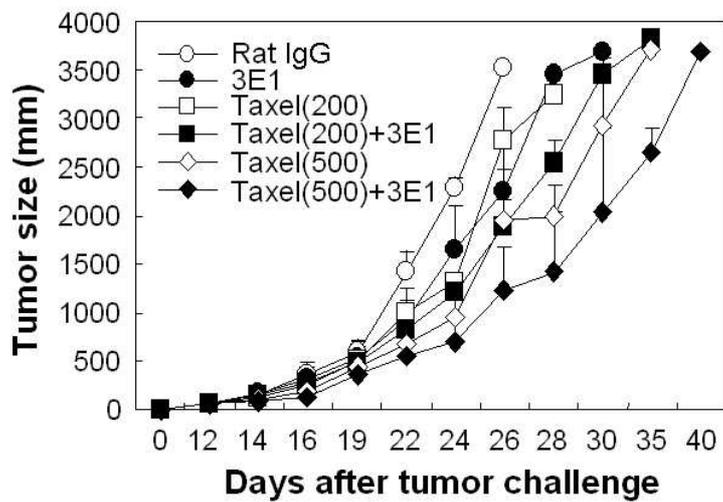
도면3g



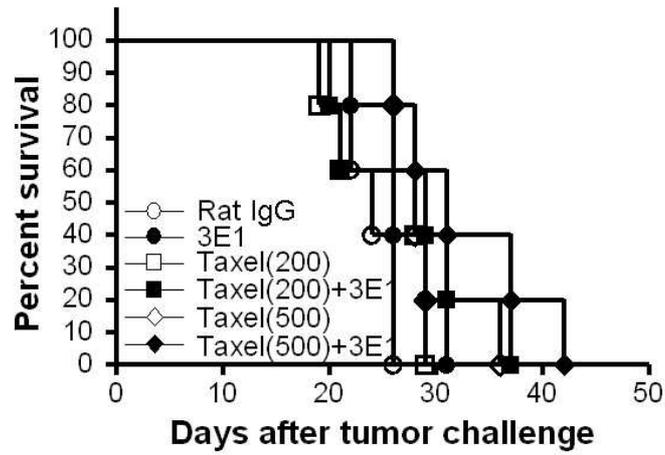
도면3h



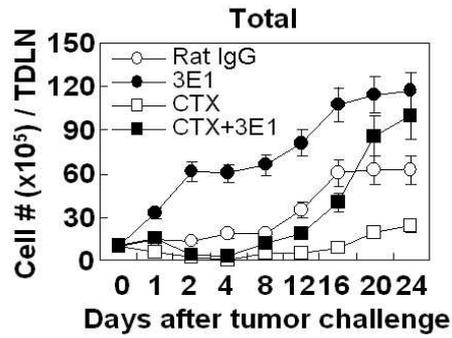
도면3i



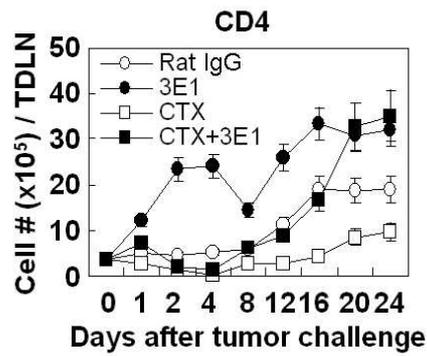
도면3j



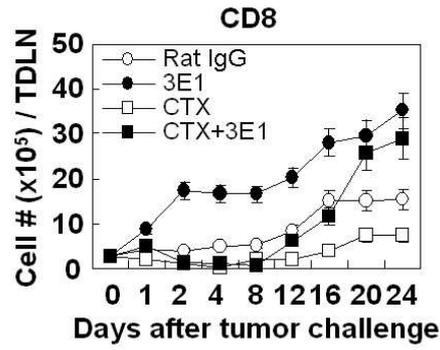
도면4a



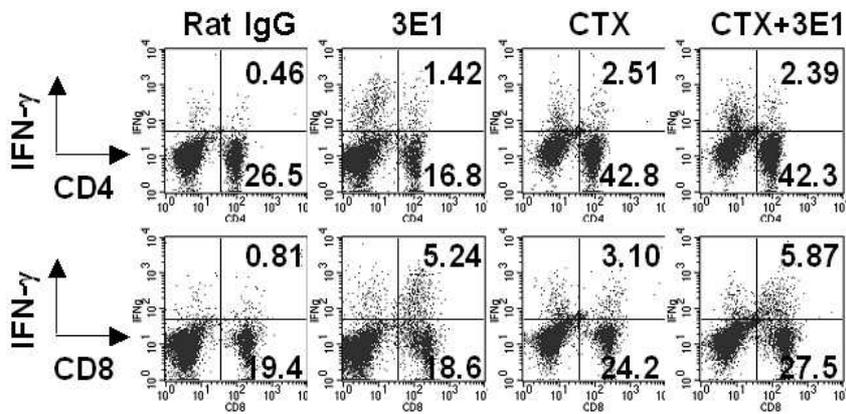
도면4b



도면4c



도면5a



도면5b

