



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0098279
 (43) 공개일자 2013년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7001190
 (22) 출원일자(국제) 2011년06월17일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2013년01월16일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2011/040819
 (87) 국제공개번호 WO 2011/159976
 국제공개일자 2011년12월22일
 (30) 우선권주장
 61/356,176 2010년06월18일 미국(US)

(71) 출원인
엑스바이오테크, 인크.
 캐나다, 비씨 브이6이 2이9, 밴쿠버, 스윗 300,
 1055 웨스트 해스팅스 스트리트
 (72) 발명자
시마드, 존
 미국, 텍사스 78744, 오스틴, 수트 100,
 비엘디취. #4, 8201 이스트 리버사이드 드라이브
 (74) 대리인
허용록

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **관절염 치료**

(57) 요약

특이적으로 IL-1 α 를 대상으로 하는 단일클론항체(mAb) 투여는 관절염의 관절 및 관절 외 증상을 치료하는 데 유용하다.

특허청구의 범위

청구항 1

인간 대상자에서 관절염과 관련된 염증성 병적 측면의 적어도 하나의 증상을 치료하기 위한 항 IL-1 α 항체의 용도.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 적어도 하나의 증상은 관절 염증인 용도.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 적어도 하나의 증상은 눈의 염증인 용도.

청구항 4

제3항에 있어서,
상기 염증은 포도막염인 용도.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 항 IL-1 α 항체는 단일클론항체인 용도.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 단일클론항체는 IgG1인 용도.

청구항 7

제5항에 있어서,
상기 단일클론항체는 MABp1의 상보성 결정부위를 포함하는 용도.

청구항 8

제5항에 있어서,
상기 단일클론항체는 MABp1인 용도.

청구항 9

제1항에 있어서,
상기 항 IL-1 α 항체는 주사에 의한 투여에 적합한 제약 조성물로 제형화되는 용도.

청구항 10

제1항에 있어서,
상기 항 IL-1 α 항체는 눈으로 국소 투여하기에 적합한 제약 조성물로 제형화되는 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 2010년 6월 18일 출원된 미국 가출원 일련번호 제61/356,176호의 우선권을 주장하며, 이의 내용은 전체로서 본원에 참조로 포함된다.

[0002] 본 발명은 일반적으로 면역학, 염증, 관절염 및 의학 분야에 관한 것이다. 더 상세하게는, 본 발명은 하나 이상의 관절염 증상을 치료하기 위하여 인터루킨-1 α (IL-1 α)에 특이적으로 결합하는 항체(Ab)의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 미국에서 장애의 가장 흔한 원인인 관절염은 골관절염, 류마티스 관절염, 통풍, 건선성 관절염, 패혈성 관절염 및 반응성 관절염과 같은 여러 가지 질환의 집합이다. 모든 유형의 관절염은 환부에 통증, 부기, 발적, 경직 및 체온 상승을 유발하는 관절 염증을 특징으로 한다. 괴로워하는 대상자들은 통증과 경직 탓에 덜 움직이므로, 관절염은 간접적으로 비만, 고 콜레스테롤 및/또는 심장 질환을 초래할 수 있다. 관절염은 홍채염, 포도막염, 입궤양, 위장관 염증, 비노생식관 염증 및 피부병변과 같은 관절 외 질병도 유발할 수 있다.

[0004] 대부분 유형의 관절염에 대해, 치유법은 존재하지 않으며, 치료는 주로 증상에 관하여, 예를 들어, 진통제와 소염제 투여 식으로 이루어진다. 염증과 통증을 줄이기 위하여 비스테로이드성 항염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)를 이용할 수 있다. 비스테로이드성 항염제는 일반적으로 효과가 있지만, 복통, 출혈, 궤양 및 간과 신장 손상과 같은 부작용을 유발할 수 있다. 코르티코스테로이드는 염증 및 관절 손상을 줄이는 데 효과적이지만, 타박상, 체중 증가, 백내장, 골 손실(bone thinning), 당뇨 및 고혈압을 포함한 여러 가지 관련 부작용을 유발할 수 있다. 관절염 치료에 흔히 사용하는 기타 약물은 메토티렉세이트, 시클로스포린, 시클로포스파미드, 레플루노마이드, 하이드록시클로로퀸, 술파살라진 및 미노사이클린이다. 이것들 역시 간 손상 및 면역억제와 같은 부작용을 유발할 수 있다. 에타너셉트(etanercept, 엔브렐(Enbrel)), 인플릭시맵(infliximab, 레미케이드(Remicade)) 및 아달리무맵(adalimumab, 후미라(Humira))와 같은 종양 괴사 인자(TNF) 억제제 또한 관절염을 치료하는 데 유용하다. 종양 괴사 인자 억제제의 부작용은 주사 부위 반응, 심장기능상실, 림프종 및 감염 위험 증가를 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 관절염 치료를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 관절염을 앓는 인간 대상자에서 특이적으로 IL-1 α 를 표적화하는 항체(Ab) 투여 시, 대상자의 CD14+IL-1 α + 말초 혈액 단핵세포의 수를 줄이고, 관절 및 관절 외 부위 모두에서 현저하게 염증을 개선하며, 이 모든 것이 투여 부위의 통증 이외에는 관찰된 부작용 없이 이루어진다는 발견을 기초로 한 것이다.

[0007] 따라서 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 담체와 인간 대상자의 염증성 병적 측면의 적어도 하나의 증상을 줄이기에 효과적인 양의 항 IL-1 α 항체를 포함하는 제약 조성물을 대상자에 투여하여 인간 대상자에서 관절염과 관련된 염증성 병적 측면을 치료하는 방법을 특징으로 한다. 증상은 손목 또는 어깨의 관절과 같은 관절 염증 또는 포도막염과 같은 눈의 염증일 수 있다. 항 IL-1 α 항체는 IgG1과 같은 단일클론항체일 수 있다. 항 IL-1 α 항체는 MABp1으로 지정한 단일클론항체 또는 MABp1의 하나 이상의 상보성 결정 부위(CDR)를 포함하는 단일클론항체일 수 있다.

[0008] 제약 조성물은 피하로, 정맥 내로, 근육 내로, 안구 내로, 또는 염증이 생긴 관절에 직접 주사하여 대상자에게 투여될 수 있다. 항체는 눈에 국소적으로 투여될 수도 있을 것이다. 방법에서, 대상자의 염증성 병적 측면의 적어도 하나의 증상을 줄이기에 효과적인 양의 항 IL-1 α 항체는 대상자의 항 IL-1 α 항체의 말초 혈액 농도를 적어도 4 μ g/ml까지 상승시키기에 충분하고; 및/또는 대상자의 CD14+IL-1 α + 말초혈액단핵세포의 수를 적어도 5% 줄이기에 충분할 수 있다.

[0009] 또한, 방법은 제약 조성물 투여 후에 대상자의 말초 혈액 내의 CD14+IL-1 α + 단핵세포의 수를 측정하는 단계를 포함할 수 있고, 예를 들어 여기서 대상자의 말초 혈액 내의 CD14+IL-1 α + 말초혈액단핵세포의 수를 측정하는 단계는 제약 조성물 투여 후에 적어도 두 번의 다른 시점에 이루어진다.

[0010] 다른 측면에서, 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 담체와 단핵세포에서 공포 형성을 유도하기에 효과적인 양의

항 IL-1a 항체를 포함하는 제약 조성물을 대상자에 투여하여 대상자에 단핵세포 공포형성을 유도하는 방법을 특징으로 한다.

[0011] 특별히 정의하지 않는 한, 본원에 이용된 모든 기술적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미를 나타낸다. 일반적으로 이해되는 생물학 용어의 정의는 Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; and Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994에서 볼 수 있다. 일반적으로 이해되는 의학 용어의 정의는 Stedman's Medical Dictionary, 27th Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000에서 볼 수 있다.

[0012] 본원에 사용된 바와 같이, “항체” 또는 “Ab”는 면역글로불린(Ig), 동일 또는 이질적인 면역글로불린 용액 또는 면역글로불린의 혼합물이다. “항체”는 또한 Fab, Fab', 및 F(ab')₂ 조각과 같은 면역글로불린의 조각 및 조각된 버전; 및 scFv, 헤테로콘주게이트 항체, 및 항원 특이성을 제공하기 위해 면역글로불린에서 유래된 CDR을 이용하는 비슷한 인공 분자를 나타낼 수 있다. “단일클론항체” 또는 “mAb”는 특정 항원의 특정 항원 결정부위와 면역반응을 할 수 있는 항원 결합 부위를 한 종만 함유하는 하나의 클론성 B 세포주 또는 Ab 분자 집단으로 표현되는 Ab이다. “다클론항체” 또는 “다클론 Ab”는 이질적인 Ab의 혼합물이다. 일반적으로, 다클론항체는 특정 항원을 항원의 서로 다른 항원결정부위와 면역 반응하는 서로 다른 Ab 중 적어도 일부와 결합하는 무수히 많은 서로 다른 Ab 분자를 포함할 것이다. 본원에 이용된 바와 같이, 다클론 Ab는 둘 이상의 mAb의 혼합물일 수 있다.

[0013] Ab의 “항원 결합 부분”은 Ab의 Fab 부분의 가변 영역 내에 함유되어 있으며, Ab에 항원 특이성을 부여하는 Ab의 부분(즉, 일반적으로 Ab의 무거운 사슬과 가벼운 사슬의 CDR에 의해 형성된 3차원 포켓)이다. “Fab 부분” 또는 “Fab 영역”은 파파인으로 소화시킨 Ig의 단백질 가수분해 부위로, 그 Ig의 항원 결합 부분을 함유한다. “비 Fab 부분”은 Fab 부분 이내가 아닌, 예컨대, “Fc 부분” 또는 “Fc 영역” 내의 Ab의 부분이다. 항체의 “불변영역”은 가변영역 외의 항체의 부분이다. 불변영역 내에 일반적으로 포함되는 부분은 항체의 “효과기 부분”으로, 면역반응을 촉진하는 기타 면역계 성분 결합을 담당하는 항체 부분이다. 따라서, 예를 들어, 보체 성분 또는 Fc 수용체에 (항원 결합 부분을 통하지 않고) 결합하는 Ab 상의 부위는 그 Ab의 효과기 부분이다.

[0014] Ab와 같은 단백질 분자를 언급할 때, “정제된”은 그러한 분자들을 자연적으로 동반하는 성분들로부터 분리되었음을 의미한다. 일반적으로, Ab 또는 단백질은 그것이 자연적으로 회합되어 있는 비 Ab 단백질 또는 기타 자연발생적 유기 분자들이 중량을 기준으로 적어도 약 10%(예컨대, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.9% 및 100%) 없을 때 정제된 것이다. 순도는 임의의 적당한 방법, 예를 들어, 칼럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 HPLC 분석으로 측정할 수 있다. 화학적으로 합성된 단백질 또는 자연적으로 발생하는 세포 유형 이외의 세포 유형에서 생산된 기타 재조합 단백질은 “정제된” 것이다.

[0015] “결합하다” 또는 “반응하다”는 하나의 분자가 시료 내의 제2의 특정 분자를 인식하고 그것에 들러붙지만, 시료 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 그것에 들러붙지는 않는다. 일반적으로, 다른 분자에 “특이적으로 결합하는” Ab는 그 다른 분자에 대해 약 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹, 또는 10¹² 리터/몰(mole)보다 큰 K_d를 나타낸다.

[0016] “치료적으로 유효한 양”은 치료된 동물 또는 인간에서 의학적으로 바람직한 효과(예컨대, 질병 또는 질병의 증상의 개선 또는 예방)를 낳을 수 있는 양이다.

[0017] 본원에 기술된 바와 비슷하거나 동일한 방법과 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 이용될 수 있지만, 적합한 방법과 재료를 아래에 기술하였다. 또한, 아래에서 논한 특정 실시예는 예시적일 뿐, 한정하고자 함이 아니다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 반응성 관절염을 앓는 인간 대상자에 MABp1을 투여한 후, MABp1의 약물 동력학을 나타내는 그래프와 표이다.

도 2는 반응성 관절염을 앓는 인간 대상자에 MABp1을 투여한 후, 유세포 계수법을 이용한 혈액 분석 결과를 나타내는 일련의 그래프와 히스토그램이다.

도 3은 반응성 관절염을 앓는 인간 대상자에 MABp1을 투여한 후, 유세포 계수법을 이용한 혈액 분석 결과를 나

타내는 일련의 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 대상자의 관절염과 관련된 증상 또는 병리학적 과정을 치료하는 조성물 및 방법을 포함한다. 아래에 기술한 바람직한 실시예는 이러한 조성물 및 방법의 각색을 보여준다. 그럼에도, 이들 실시예에 관한 설명으로부터, 본 발명의 다른 측면이 아래에서 제공된 설명을 기초로 하여 만들어지고/만들어지거나 실시될 수 있다.
- [0020] 일반 방법론
- [0021] 기존의 면역학적 및 분자생물학적 기법을 수반하는 방법을 본원에 기술하였다. 면역학적 방법(예를 들어, 항원-Ab 복합체의 검출 및 위치선정을 위한 분석법, 면역침강법, 면역블로팅법 등)이 일반적으로 당해 분야에 알려져 있고, Current Protocols in Immunology, Coligan et al., ed., John Wiley & Sons, New York과 같은 방법론 논문에 기술되어 있다. 분자 생물학 기법은 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; 및 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., ed., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York과 같은 논문에 상세하게 기술되어 있다. Ab 방법은 Handbook of Therapeutic Abs, Dubel, S., ed., Wiley-VCH, 2007에 기술되어 있다. 일반적인 의학적 치료 방법은 McPhee and Papadakis, Current Medical Diagnosis and Treatment 2010, 49th Edition, McGraw-Hill Medical, 2010; 및 Fauci et al., Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition, McGraw-Hill Professional, 2008에 기술되어 있다.
- [0022] 관절염 증상의 치료
- [0023] 본원에 기술한 조성물 및 방법은 대상자의 염증성 병적 측면의 적어도 하나의 증상을 줄이기에 효과적인 양의 항 IL-1 α 항체를 포함하는 제약 조성물을 대상자에 투여하여 포유류 대상자의 관절염과 관련된 염증성 병적 측면을 치료하는 데 유용하다. 포유류 대상자는 인간, 개, 고양이, 말, 소, 양, 염소 및 돼지를 포함하는, 관절염을 앓는 임의의 대상자일 수 있다. 인간 대상자는 남성, 여성, 성인, 아동, 노인(65세 이상) 및 다른 질병을 앓는 이들일 수 있다. 관절염과 관련된 특정 증상 또는 병리학적 과정은 염증, 통증, 경직, 또는 관절(예를 들어, 손목, 손발가락[손허리뼈 또는 발허리뼈 관절] 내), 팔꿈치, 어깨, 엉덩이, 무릎, 발목, 발, 목 또는 등)의 퇴화 또는 관절 외 조직의 퇴화(예를 들어, 홍채염, 포도막염, 입 궤양, 위장관의 염증, 비뇨생식관의 염증 또는 피부병변)일 수 있다.
- [0024] IL-1 α 를 대상으로 하는 항체와 기타 작용제
- [0025] IL-1 α 에 특이적으로 결합하여 대상자에서 관절염으로 유발된 증상 또는 병리학적 과정을 줄이는 임의의 적합한 유형의 Ab가 본 발명에서 이용될 수 있다. 예를 들어, 이용되는 항 IL-1 α Ab는 mAb, 다중클론성 Ab, mAb의 혼합물 또는 scFv와 같은 Ab 조각 또는 조작된 Ab 유사 분자일 수 있다. Ab의 K_a 는 바람직하게는 적어도 $1 \times 10^9 M^{-1}$ 또는 그 이상(예를 들어, $9 \times 10^{10} M^{-1}$, $8 \times 10^{10} M^{-1}$, $7 \times 10^{10} M^{-1}$, $6 \times 10^{10} M^{-1}$, $5 \times 10^{10} M^{-1}$, $4 \times 10^{10} M^{-1}$, $3 \times 10^{10} M^{-1}$, $2 \times 10^{10} M^{-1}$, 또는 $1 \times 10^{10} M^{-1}$ 보다 크다)이다. 바람직한 실시예에서, 본 발명은 (i) 인간 IL-1 α 에 대해 매우 높은 결합친화도를 나타내는 항원 결합 가변영역과 (ii) C1q 결합을 통한 보체계 활성화와 몇 개의 서로 다른 Fc 수용체 결합 모두에 효과적인 불변영역을 포함하는 완전한 인간 mAb를 이용한다. 인간 Ab는 바람직하게는 IgG1이지만, 그것은 IgM, IgA 또는 IgE와 같은 다른 이소형이거나 IgG2, IgG3 또는 IgG4와 같은 서브클래스일 수 있다. 특별히 유용한 mAb의 일례로는 2009년 6월 1일 출원된 미국 특허출원 일련번호 제 12/455,458호에 기술된 IL-1 α 특이적인 IgG1 단일클론항체인 MABp1이다. 다른 유용한 mAb는 MABp1의 CDR 중 적어도 하나, 바람직하게는 MABp1의 CDR 전부를 포함하는 것들이다.
- [0026] 인간 IL-1 α 에 특이적인 Ig를 발현하는 B 림프구는 인간에서 자연적으로 발생하므로, mAb를 생성하는 현재의 바람직한 방법은 대상자에서 그러한 B 림프구를 먼저 분리한 다음, 배양액에서 연속적으로 복제될 수 있도록 불멸화하는 것이다. 인간 IL-1 α 에 특이적인 Ig를 발현하는 자연발생적인 상당수의 B 림프구가 부족한 대상자는 그러한 B 림프구의 수를 늘리기 위해 하나 이상의 인간 IL-1 α 항원으로 면역력을 갖게 할 수 있다. 인간 mAb는 인간 Ab 분비세포(예를 들어, 인간의 형질세포)를 불멸화하여 준비한다. 미국 특허 제4,634,664호 참조.
- [0027] 모범적인 방법에서, 1인 이상의(예를 들어, 5인, 10인, 25인, 50인, 100인, 1000인, 또는 더 많은) 인간 대상자는 혈액 내에 그러한 인간 IL-1 α 특이적인 Ab가 존재하는지를 검진 받는다. 그런 다음, 원하는 Ab를 발현하는

대상자는 B 림프구 공여자로 이용될 수 있다. 가능한 하나의 방법에서, 말초 혈액은 인간 IL-1 α 특이적인 Ab를 발현하는 B 림프구를 보유하는 인간 공여자로부터 획득된다. 그런 다음, 인간 IL-1 α 특이적인 Ig를 발현하는 B 림프구를 선별하기 위하여 그러한 B 림프구는 예를 들어, 세포 분리(예컨대, 형광 활성화 세포 분리(fluorescence activated cell sorting, "FACS") 또는 자기성 비드 세포 분리)에 의해 혈액 시료로부터 분리시킨다. 그런 다음, 이들 세포는 알려진 기법에 따라 바이러스에 의한 형질전환(예를 들어, EBV를 이용)으로 또는 인간 골수종과 같은 다른 불멸화된 세포로 융합시켜 불멸화할 수 있다. 그런 다음, 인간 IL-1 α 에 특이적인 Ig를 발현하는 이러한 집단 내의 B 림프구는 한계희석법(예를 들어, 인간 IL-1 α 에 특이적인 Ig에 대해 양성인 마이크로티터 플레이트 웰 내의 세포를 선별하여 계대배양하고, 원하는 클론계가 분리될 수 있을 때까지 그 과정을 반복)으로 분리할 수 있다. 예를 들어, Goding, *Monoclonal Abs: Principles and Practice*, pp. 59-103, Academic Press, 1986 참조. 인간 IL-1 α 에 대해 적어도 나노몰 또는 피코몰의 결합친화도를 나타내는 Ig를 발현하는 클론성 세포계가 바람직하다. 이러한 클론성 세포계가 분비하는 mAb는 배양 배지 또는 체액(예를 들어, 복수)에서 솔트 컷(salt cuts), 크기 배제, 이온 교환 분리 및 친화도 크로마토그래피와 같은 종래의 Ig 정제 절차로 정제할 수 있다.

[0028] 불멸화된 B 림프구를 시험관 내 배양에서 직접 mAb를 생산하는 데 이용할 수 있지만, 특정한 경우에는 mAb를 생산하기 위해 이중 발현계(heterologous expression system)를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원번호 제11/754,899호에 기술된 방법 참조. 예를 들어, 인간 IL-1 α 에 특이적인 mAb를 암호화하는 유전자를 클로닝하여, 이중의 숙주 세포(예를 들어, CHO 세포, COS 세포, 골수종 세포 및 대장균 세포) 내 발현을 위한 발현 벡터(예를 들어, 플라스미드를 기초로 한 발현 벡터)로 도입시킬 수 있다. Ig는 H₂L₂ 배열에 무거운 사슬(H)과 가벼운 사슬(L)을 포함하므로, 각각을 암호화하는 유전자를 별도로 분리하여 서로 다른 벡터에서 발현시킬 수 있다.

[0029] 대상자가 항 Ab 반응을 발달시킬 가능성이 커서 일반적으로 더 적게 선호되지만, 서로 다른 동물 중에서 유래된 서로 다른 부분(예를 들어, 인간 Ig의 불변영역에 융합된 마우스 Ig의 가변영역)이 있는 항원 결합 분자인 키메라 mAb(예를 들어, "인간화" mAb)가 본 발명에 이용될 수 있다. 그러한 키메라 Ab는 당해 분야에 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, Morrison et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 81:6851, 1984; Neuberger et al., *Nature*, 312:604, 1984; Takeda et al., *Nature*, 314:452, 1984 참조. 마찬가지로, Ab를 당해 분야에 공지된 방법으로 인간화시킬 수 있다. 예를 들어, 원하는 결합 특이성을 나타내는 단일클론성 Ab는 다양한 판매사에 의해 또는 미국 특허번호 제5,693,762호, 제5,530,101호 또는 제5,585,089호에 기술된 바와 같이 인간화될 수 있다.

[0030] 본 명세서에 기술된 mAb는 VH 및 VL 도메인 셔플링(domain shuffling: Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783, 1992), 고도가변 영역(hypervariable regions, HVRs) 및/또는 골격 잔기(framework residue)의 무작위 돌연변이법(Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813, 1994; Schier et al. *Gene* 169:147-155, 1995; Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004, 1995; Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9, 1995; and Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896, 1992)과 같은 공지된 방법으로 그들의 결합 특이성을 향상 또는 달리 변경하도록 친화도를 성숙시킬 수 있다. Ab의 아미노산 염기서열 변이형은 Ab를 암호화하는 뉴클레오타이드 염기서열에 적절한 변화를 도입하여 제조할 수 있다. 또한, mAb를 암호화하는 핵산 염기서열에 대한 수정은 특정 발현계 내에서 mAb 생산을 향상하고자 (예를 들어, mAb의 아미노산 서열을 변화시키지 않고) 변경시킬 수 있다(예를 들어, 주어진 발현계에 대한 인트론 제거 및/또는 코돈 최적화). 또한, 본 명세서에 기술된 mAb는 다른 단백질(예를 들어, 다른 mAb) 또는 비 단백질 분자에 접합(conjugation)시켜 수정할 수 있다. 예를 들어, mAb는 폴리에틸렌 글리콜 또는 탄소 나노튜브와 같은 수용성 고분자에 접합될 수 있다(예컨대, Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605, 2005 참조). 미국 특허 출원번호 제11/754,899호 참조.

[0031] 바람직하게는, 최소의 부작용으로 고 역가의 인간 IL-1 α 특이적인 mAb가 대상자에게 투여될 수 있도록, 본 발명의 mAb 조성물은 (임의의 부형제를 제외한) 순수 중량을 기준으로 적어도 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9 이상의 퍼센트이다. 본 발명의 mAb 조성물은 mAb의 단일 유형만을 포함할 수 있거나(즉, 단일 클론성 B 림프구계(lymphocyte line)로부터 생성된 mAb) 둘 이상의(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상) 상이한 유형의 mAb의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0032] 기능을 수정하거나 향상하고자, 인간 IL-1 α mAb는 세포 독소와 같은 다른 분자에 접합될 수 있다. IL-1 α 를 발현하는 세포를 더 효과적으로 죽이기 위해, 인간 IL-1 α 특이적인 mAb는 하나 이상의 세포 독소와 접합시킬 수

있다. 본 발명에 이용하기 위한 세포 독소는 인간 IL-1 α 특이적인 mAb에 접합될 수 있는 임의의 세포 독성제(예컨대, 세포와 접촉한 후에 그 세포를 죽일 수 있는 분자)일 수 있다. 세포 독소의 예로는 제한 없이 방사성 핵종(예를 들어, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ²⁰¹Tl, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁵⁷Cu, ²¹³Bi 및 ²¹¹At), 접합된 방사성 핵종 및 화학 요법제를 포함한다. 세포 독소의 또 다른 예로는 항대사물질(예를 들어, 5-플루오르우리실(5-FU), 메토트렉세이트(MTX), 플루다라빈 등), 항 미세관제(예를 들어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, (파클리탁셀 및 도세탁셀과 같은) 탁산류 등), 알킬화제(예를 들어, 시클로포스파미드, 멜팔란, 비스클로로에틸니트로소우레아(bischloroethylnitrosurea, BCNU) 등), 백금제(예를 들어, 시스플라틴(cDDP라고도 함), 카르보플라틴, 옥살리플라틴, JM-216, CI-973 등), 안트라사이클린(예를 들어, 독소루비신, 다우노루비신 등), 항균 요법제(예를 들어, 미토마이신 C), 토포이성질화효소 저해제(예를 들어, 에토포시드, 테노포시드 및 캅토포테신), 또는 리신, 디프테리아 독소(DT), 슈도모나스 외독소(PE) A, PE40, 아브린, 사포린, 아메리카 자리공(pokeweed) 바이러스 단백질, 브롬화 에티듬, 글루코코르티코이드, 탄저병 독소 등과 같은 다른 세포 독성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 미국 특허번호 제5,932,188호 참조.

[0033] 위에서 기술한 IL-1 α 특이적인 Ab가 본 발명에 이용하기 바람직하지만, 일부 경우에는 특이적으로 IL-1 α 를 대상으로 하는 기타 작용제를 투여한 결과, 하나 이상의 관절염 증상 개선으로 이어지는 한, 이러한 기타 작용제가 이용될 수 있다. 이러한 기타 작용제는 특이적으로 IL-1 α 를 결합하는 작은 유기 분자, 앵타머, 펩티드 및 단백질을 포함할 수 있다.

[0034] 제약 조성물 및 방법

[0035] 항 IL-1 α Ab 조성물은 투여의 방식과 경로 및 표준 약제업무(pharmaceutical practice)를 기초로 하여 선택되는, 약학적으로 허용 가능한 담체(예를 들어, 살균 식염수)로 동물 또는 인간에 투여될 수 있다. 제약 제제뿐만 아니라 약학적으로 허용 가능한 담체의 목록은 이 분야의 표준 교재인 Remington's Pharmaceutical Sciences와 미국약전(USP/NF)에서 볼 수 있다. 기타 물질이 조성물에 추가될 수 있으며, 기타 단계가 조성물을 안정화 및/또는 보존하고자 및/또는 대상자에 대한 투여를 촉진하고자 취해질 수 있다.

[0036] 예를 들어, Ab 조성물은 동결 건조(Draber et al., J. Immunol. Methods, 181:37, 1995; 및 PCT/US90/01383 참조); 나트륨과 염화 이온을 포함하는 용액에 용해; 알부민, 글루코스, 말토스, 수크로스, 소르비톨, 폴리에틸렌 글리콜 및 글리신과 같은 하나 이상의 안정제를 포함하는 용액에 용해; 여과(예를 들어, 0.45 및/또는 0.2미크론 필터를 이용); 베타 프로피오락톤과 접촉; 및/또는 살균제(예를 들어, 세제, 유기 용매 및 세제와 유기 용매의 혼합물)를 포함하는 용액에 용해될 수 있다.

[0037] Ab 조성물은 임의의 적합한 기법으로 동물 또는 인간에 투여될 수 있다. 전형적으로, 그러한 투여는 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 근육 내 또는 복강 내 도입)일 것이다. 조성물은 또한 예를 들어 주사 또는 국소 도포로 목표 부위(예를 들어, 염증이 생긴 관절 또는 포도막 또는 결막)에 직접 투여될 수 있다. 기타 전달 방법, 예를 들어, 리포솜을 이용한 전달 또는 조성물이 함침된 장치로부터 발산이 당해 분야에 알려져 있다. 조성물은 단일 볼루스(bolus), 복수 차례의 주사, 또는 연속적인 투입으로(예를 들어, 정맥 내 또는 복막 투석에 의해) 투여될 수 있다.

[0038] 치료적으로 유효한 양은 치료된 동물 또는 인간에서 의학적으로 바람직한 결과를 낼 수 있는 양이다. 항 IL-1 α 항체 조성물의 효과적인 양은 구조적 손상 예방뿐만 아니라 통증 및 기능 개선으로 측정되는 바와 같이 관절염 환자에서 임상적 효능을 나타내는 양이다. 의학 분야에서 잘 알려진 바와 같이, 임의의 한 동물 또는 인간에 대한 투여량은 대상자의 크기, 체표면적, 연령, 투여되는 특정 조성물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반 건강, 및 동시에 투여되는 기타 약물을 포함하는 여러 가지 요인에 의존한다. 바람직한 투여량은 대상자 말초 혈액의 항 IL-1 α Ab 농도를 적어도 4(예를 들어, 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2500, 또는 5000)마이크로그램/ml로 높이기엔 충분한 투여량이다. 적당한 Ab 투여량은 피하 투여 시, 약 0.2 내지 20(예를 들어, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50, or 100)mg/kg 체중 범위 및 안구로 국소 투여 시, 안구당 약 0.001 내지 50(예를 들어, 0.001, 0.01, 1, 5, 10, 15, 25, 또는 50)mg 범위리라 예상된다. 투여량은 반복적으로, 예를 들어, 매시간, 매일, 매주 또는 매월 투여될 수 있다.

[0039] 실시예

[0040] 실시예 1 - 실로닉스(Xilonix™)

[0041] 실로닉스(Xilonix™)는 안정화 등장 완충액(pH 6.4)에 15mg/mL MABp1의 멸균 주사 가능한 액체 제제이다. 각각의 10mL 유형 I 봉규산 유리 혈청 바이알은 5mL의 제제를 포함하고, 20mm Daikyo Flurotec 부틸 고무 마개와 플

립-오프 알루미늄 밀폐물로 밀폐되어 있다. 제품은 5±3℃에 보관되며, 실온으로 잠깐 벗어나는 것이 허용된다. 약 제품의 정확한 조성은 아래에 나타내었다.

약 제품 조성(Xilonix™)			
성분	등급	제조사	농도
MABp1 항체	GMP	XBiotech	15 mg/mL
이염기성 인산나트륨	공정서 등급	JT Baker	12 mg/mL
시트르산 단일수화물	공정서 등급	JT Baker	2 mg/mL
트레할로스·2H ₂ O (고 순도 저 내독소)	공정서 등급	Ferro-Pfanstiehl	60 mg/mL
폴리소르베이트 80	공정서 등급	JT Baker	0.2 mg/mL
pH 조절을 위한 인산	공정서 등급	JT Baker	0.04 mg/mL
주사용 물	공정서 등급	Microbix	충분한 양

[0042]

[0043]

실시예 2 - IL-1α 특이적인 단일클론항체를 이용한 반응성 관절염 치료

[0044]

반응성 관절염을 앓는 48세의 남성 환자에 2009년 6월 1일 출원된 미국 특허출원 일련번호 제12/455,458호에 기술된 IL-1α 특이적인 단일클론항체인 MABp1을 총 220밀리그램 투여하였다. 그 환자는 왼쪽 무릎에 심각한 염증으로 입원하던 중, 라이터 증후군으로 진단 받았던 16세에 시작하여, 오랜 반응성 관절염 병력을 가졌다. 이 염증은 해소되었지만, 환자는 이십 대 중반까지 여러 관절에 주기적인 재발을 겪었다. 35세에 환자가 8주 동안 지속되는 심각한 한쪽 포도막염 삽화를 겪기 전까지는 더 이상의 삽화가 발생하지 않았었다. 포도막염은 안과용 코르티코스테로이드와 경구용 NSAIDS로 제대로 관리되지 않아서 약간 위협적인 상태로 되었다. 환자는 이후 강도를 달리 하는 적어도 세 차례의 추가적인 포도막염 삽화와 코르티코스테로이드의 각질 하 주사를 요하는 한 번의 삽화를 겪었다.

[0045]

48번째 생일 직전에, 환자의 왼쪽 어깨와 손목에 심각한 통증이 생겼다. 거의 완전히 이동성을 상실한 채, 눈에 띄는 부기와 발적은 손목에 발생했다. 환자는 극심한 어깨 통증으로 왼쪽 팔을 약 20° 보다 크게 벌릴 수 없었다. 그 날, 환자는 왼쪽 어깨에 코르티코스테로이드 견봉 하 주사를 맞았다. 환자는 그 상태가 계속하여 악화되었으며, 어깨와 손목의 통증이 계속 이어져 일을 방해하고 수면을 막았다고 보고했다. 또한, 왼쪽 눈의 통증과 자극이 뒤따라, 포도막염 삽화 개시를 알렸다. 이것이 처음으로 관절 염증과 포도막염이 함께 발생한 것이라고 한다. 환자는 거의 뚜렷한 이익 없이 안구용 코르티코스테로이드와 경구용 및 국소 안구용 NSAIDS를 받고 있었다.

[0046]

0일째에(코르티코스테로이드 견봉 하 주사 후 42일 경과 시), 환자는 총 110mg의 MABp1을(같은 투여량으로) 전달하는 네 번의 MABp1 피하 주사를 맞았다. 주사하는 동안 통증 이외에는 아무런 부작용도 보고되지 않았다. 두 개의 5ml 헤파린 나트륨 튜브로 주사하기 직전에 정맥천자로 채혈하였다. 기존의 내인성 항 IL-1α 항체 검출을 위한 효소결합면역흡착검사(ELISA)를 이용한 혈장 분석 결과, 이미 존재하는 항체가 없는 것으로 밝혀졌다.

[0047]

1일째에, 환자는 그날 아침, “깨어날 때의 최초의 감각”이었던 육신거리는 통증 없이 일어났다고 보고했다. 다음 며칠 동안, 이동성이 뚜렷하게 향상되었다. 주사 부위에는 아무런 경화 또는 발적도 나타나지 않았다. 백혈구 서브세트와 단핵구 상 IL-1α 발현을 평가하고자, 채혈하고 유동 혈구 계산 분석(FACS)을 하였다. MABp1 수준을 확인하고, MABp1에 대한 약물 동력학적(pK) 데이터 수집을 시작하고자 혈장에 대한 분석도 하였다. PBMC의 FACS 분석은 대부분의 CD14+ 단핵구(72.6%)가 IL-1α를 발현한다는 점을 보여주었다. 3.2µg/ml의 MABp1 혈장 농도가 관찰되었다.

[0048]

6일째에, 다른 혈액 시료를 채취하여 FACS를 이용하여 MABp1에 대해 분석하였다. MABp1으로 염색된 CD14+ 단핵구의 빈도가 47.3%로 줄어들었다. MABp1의 혈장 수준은 7µg/ml로 늘어났다. 확인되지는 않았지만, MABp1 농도의 증가는 MABp1 피하 투여의 저장 효과(depot effect)를 반영하는 것으로 여겨졌다. 개선되긴 했지만, 환자는 여전히 상당한 압통과 움직임에 따른 통증을 나타냈고, 환자가 파티에 참가하여 알코올을 섭취했던 그 전 주말 이후로 포도막염이 확 발발하였다. 환자는 피하로 110mg의 MABp1을 더 투여 받았다.

[0049]

14일째에, 혈액 시료를 채취하여 FACS를 이용하여 분석하였고, 혈장에 대해 pK 분석을 하였다. MABp1으로 염색된 CD14+ 단핵구 빈도는 21.7%까지 더 감소하였다. 그러나 MABp1의 혈장 수준도 5.8µg/ml로 감소하였다. MABp1의 혈장 수준이 최초 주사 후 그 주에 걸쳐 증가했기 때문에, 이는 예상치 못한 것이었다.

[0050]

MABp1을 최초 주사한 지 약 한 달 후에 환자를 다시 평가하였다. 이동성이 눈에 띄게 향상되었으며, 손목에 통증이 없었다. 어깨 통증은 90° 까지 벌렸을 때에만 나타났다. FACS 분석 결과, MABp1으로 염색된 감지할 수 있는 CD14+ 단핵구가 없는 것으로 나타났다. MABp1의 혈장 수준은 1.6µg/ml로 감소되어, MABp1의 반감기가 약 2주

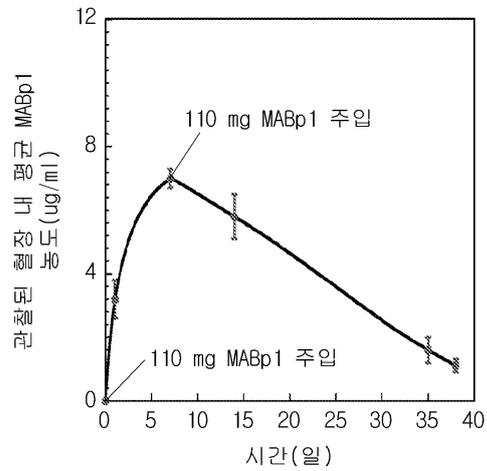
임을 시사하였다.

- [0051] 다음 몇 주 동안, 환자는 점진적이지만 지속적인 이동성 향상을 나타내었다. 포도막염은 완전히 해소되었다. MABp1의 최초 주사 이후 환자가 모든 약물 이용을 중단했음에도 향상됨이 목격되었다. MABp1의 최초 주사 이후 대략 3개월 경과 시, MABp1으로 염색된 CD14+ 단핵구 빈도가 치료 전 수준으로 되돌아갔다. 혈장 내 MABp1 수준은 0.07 μ g/ml로 감소되었다. 그러나 환자는 어깨 움직임을 계속 향상하게 하는 일을 잘 지속하였다.
- [0052] 실시예 3 - hIL-1 α 에 대한 내인성 자가항체를 위한 혈장 시료 선별 및 MABp1의 약물 동력학
- [0053] 직접 ELISA를 이용하여 인간 IL-1 α (hIL-1 α)에 대한 내인성 자가항체를 위한 혈장 시료 선별 방법을 개발하였다. 이 방법은 또한 높은 희석률로 혈장 시료가 만들어진 것을 제외하고, 투여 후의 MABp1의 약물 동력학(pK)을 확인하는 데에 이용하였다.
- [0054] 직접 ELISA는 폴리스티렌 마이크로플레이트 상에 재조합 인간 IL-1 α 를 코팅하는 것을 수반한다. 결합된 인간 IL-1 α 는 시험 시료로부터 내인성 항 인간 IL-1 α 항체를 포획한다. 그런 다음, HRP가 콘주게이트된 Fc에 특이적인 마우스-항-인간 IgG가 포획된 내인성 항-인간 IL-1 α 항체를 검출하는 데 이용되며, TMB 기질 처리가 뒤따른다. HRP 효소와 반응시킬 때, TMB 기질은 진한 푸른 빛깔의 가용성 생성물을 생산한다. 효소적 반응은 푸른 빛깔의 생성물을 노란색으로 바꾸는 종결 용액 첨가로 중단시킨다. 450nm의 마이크로플레이트 리더 상에서 비색 측정을 하였다.
- [0055] 시료당 약 5ml 혈장 시료가 제공된다. 혈장은 분취 전 2~8 $^{\circ}$ C로 유지하며, -80 $^{\circ}$ C에 저장한다. 혈장 시료는 시료로 이용하기 위해 1:500, 1:1000 및 1:2000배 희석시킨다. 마이크로플레이트 상에 1:5,000 및 1:10,000배 희석액으로 20 μ g/ml MABp1 항체주를 함유하는 완충액 내 양성 대조군이 이용된다. 완충액은 1:1,000, 1:2,000 및 1:5,000으로 희석되는 미리 결정된 음성 대조군 혈장뿐만 아니라 음성 대조군으로 이용된다. 추가적인 양성 혈장 대조군이 이용되며, 그것은 20 μ g/ml MABp1 항체를 섞은 혈장으로, 마이크로플레이트 상 시료를 위해 1:5,000 및 1:10,000으로 희석된다.
- [0056] 양성 대조군 값이 ± 2 표준편차의 범위에 들어가면, ELISA 데이터는 허용 가능하다고 여겨진다. 그러나 QC 양성 대조군 값이 ± 2 표준편차의 범위 밖에 있으면, ELISA 데이터는 허용 불가능하다고 여기며, 실험은 반복될 것이다. 칼레이다그래프를 이용하여, 표준용액의 대수 평균 흡광도를 흡광도 에러 바와 함께 대수 농도의 함수로서 기록한다. 표준곡선은 선형 행동을 나타내야 한다. 실시예 2에서 기술한 바와 같이 환자에서 채취한 시료의 약물 동력학 분석 결과는 도 1에 나타내었다.
- [0057] 실시예 4 - 혈통 서브세트의 유세포 계측(FACS) 검사
- [0058] FACS 절차는 전혈 염색과 전혈에서 강화된 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)의 염색 모두를 위해 기술된다. 전혈 염색 및 PBMC 염색 모두, 모든 시료에 대해 하였다. 이러한 FACS 분석은 혈통 서브세트인 B 림프구와 T 림프구, NK 세포, 단핵구, 호중구 및 IL-1 α + 세포의 상대적인 퍼센트를 결정할 수 있게 한다. 실시예 2에서 기술한 바와 같이 환자로부터 채취한 시료의 FACS 분석 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다. 혈액 도말의 현미경 사진은 투여 후 32일 경과 시 분석하였을 때, MABp1 투여가 말초 혈액 단핵구에서 광범위한 공포형성을 유발하였음을 보여주었다.
- [0059] 실시예 5 - IL-1 α 특이적 단일클론항체를 이용한 포도막염 치료
- [0060] 실시예 2에서 기술한 포도막염이 해소된 지 약 2개월 뒤, 환자는 또 다른 포도막염(대부분 홍채염) 삽화를 겪었다. 환자는 코르티코스테로이드와 비스테로이드성 항염 점적약(NSAIDS) 치료를 개시했다. 경구용 NSAIDS 또한 이용되었다. 포도막염은 치료에 반응이 없었고, 진행되고 있었다. 그러나 어떠한 관절의 연루 증거가 없었고, 어깨는 계속하여 이동성 향상을 보였다. 환자는 병에 걸린 눈에 국소적으로 MABp1을 투여 받았다. MABp1(15mg/ml 용액)은 분당 한 방울의 속도로 10분 동안 병에 걸린 눈에 총 열 방울(0.25ml에 대략 3.75mg)을 투여하였다. 투여하는 동안, 환자는 어떠한 통증도 호소하지 않았다. 그러나 몇 시간 후, 환자는 불편과 작열감을 보고하였다. 경구용 NSAIDs를 복용하고 환자는 수면을 취했다. 다음날 아침, 환자는 투여 전보다 상당한 향상, 통증 감소 및 더 적은 염증을 보고했다. MABp1 점적약을 최초 투여하고 24시간 경과 후, 환자는 같은 방식으로 열 방울을 투여하였다. 다시, 불편과 작열감이 기록되었다. 경구용 NSAIDs를 복용하고, 다시 환자는 수면을 취했다. 포도막염이 저절로 완전히 해소되었다. 추가적인 약물은 복용하지 않았다. 향후 4개월 동안 포도막염 재발이 관찰되지 않았다.
- [0061] 기타 실시예

[0062] 본 발명은 상세한 설명과 함께 연계하여 기술되었지만, 앞서 말한 설명은 첨부된 청구항의 범위에 의하여 정의되는 본 발명의 범위를 예시하고자 의도한 것이며, 한정하고자 함은 아니다. 다른 측면, 장점 및 수정사항은 아래 청구항의 범위 내에 있다.

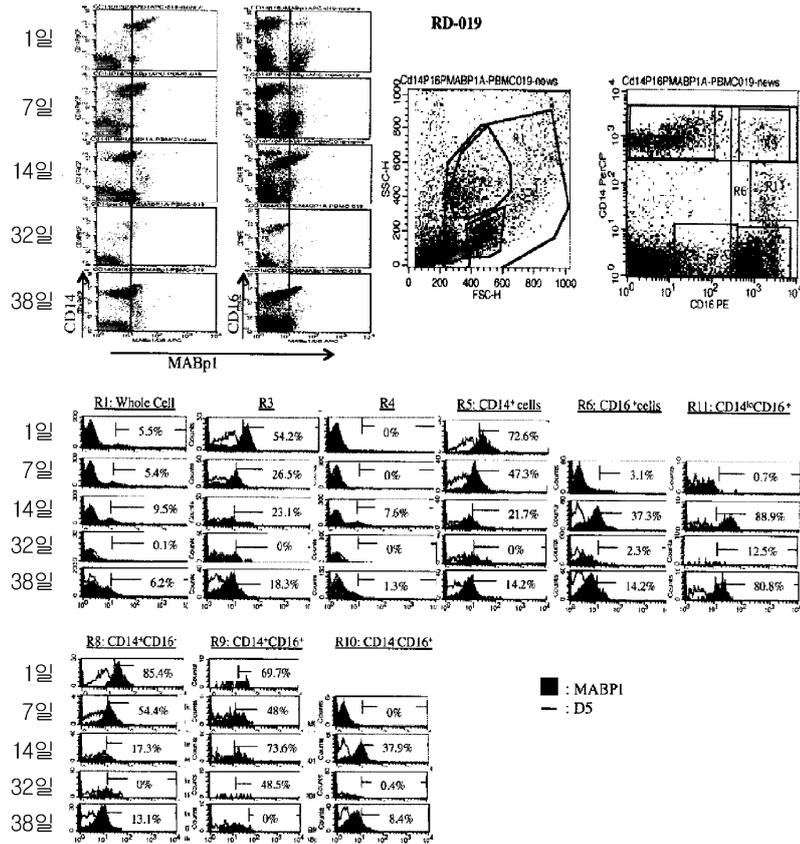
도면

도면1



시간 (일)	시료	혈액 내 주입된 MABp1 농도 (mg)	관찰된 혈장 내 평균 MABp1 농도 (ug/ml)	관찰된 혈장 내 MABp1 농도의 표준편차 (ug/ml)
0	RD019U	0	0.0	0.0
1	RD019S-1	110	3.2	0.6
7	RD019S-2	0	7.0	0.3
14	RD019S-3	110	5.8	0.7
35	RD019S-4	0	1.4	0.2

도면2



도면3

