

특 허 법 원

제 4 부

판 결

사 건 2024허14469 거절결정(특)
원 고 A

대표자 B

소송대리인 특허법인 한얼

담당변리사 오규환, 박선양

피 고 특허청장

소송수행자 이예리

변 론 종 결 2025. 5. 21.

판 결 선 고 2025. 7. 17.

주 문

1. 원고의 청구를 기각한다.

2. 소송비용은 원고가 부담한다.

청 구 취 지

특허심판원이 2024. 6. 28. 2023원649호 사건에 관하여 한 심결을 취소한다.

이 유

1. 기초사실

가. 이 사건 출원발명(갑 제1호증)

1) 발명의 명칭: 종양성 질병들에 대한 치료

2) 국제출원일/ 번역문제출일(분할출원)/ 출원번호/ 우선권주장일:

2011. 8. 23./ 2021. 10. 12./ 제10-2021-7032773호/ 2010. 8. 23., 2010. 10. 26.,
2010. 11. 8., 2011. 4. 29.

3) 청구범위(2022. 11. 24.자 보정된 것)

【청구항 1】 항-IL-1 α 항체를 포함하는, 인간 대상체에서 종양성 질환(neoplastic disease)을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 항-IL-1 α 항체가 적어도 1×10^9 M⁻¹ 이상의 K_a¹⁾로 인간 IL-1 α 에 결합하는 단일클론 항체(mAb)이고, 상기 종양성 질환이 전이성 종양과 연관되고 IL-1 α 를 발현하거나 IL-1 α -발현 염증 세포로 침윤된 종양을 특징으로 하며, 상기 조성물의 투여 결과 전이된 종양의 크기가 감소하는 것인, 약학적 조성물(이하 '이 사건 제1항 발명'이라 하고, 나머지 청구항도 같은 방식으로 부르며,

1) 'K_a'는 항원에 대한 항체의 친화도를 나타내는 단위로, 'K_a'는 평형 상태에 존재하는 항체-항원 복합체의 양을 말하며, $K_a = [Ab-Ag]/[Ab][Ag]$ 과 같이 정의되고, [Ab-Ag]는 항체-항원 복합체의 몰 농도, [Ab]는 항체의 비어있는 결합 부위(즉, 항원과 결합하지 않은 결합 부위)의 몰 농도, [Ag]는 항원의 비어있는 결합 부위의 몰 농도를 의미한다.

이 사건 제1 내지 18항 발명을 모두 통틀어서는 '이 사건 출원발명'이라 한다).

【나머지 청구항】 (각 기재 생략)

4) 발명의 주요 내용

이 사건 출원발명의 주요 내용은 [별지 1] 기재와 같다.

나. 선행발명들

1) 선행발명 1(갑 제6호증, 을 제1호증)

선행발명 1은 2009. 12. 3. 미국 특허출원공개공보 US2009/0298096호로 공개된 '인터류킨-1 알파 항체 및 사용 방법'에 관한 것으로, 주요 내용은 [별지 2] 기재와 같다.

2) 선행발명 2(갑 제7호증, 을 제2호증)

선행발명 2는 2010. 2. 18. 미국 특허출원공개공보 US2010/0040574호로 공개된 '항-IL-1 알파 항체를 이용한 암의 치료'에 관한 것으로, 주요 내용은 [별지 3] 기재와 같다.

다. 이 사건 거절결정 및 심결의 경위

1) 특허청 심사관은 2021. 12. 27. 원고에게 '이 사건 출원발명은 그 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람(이하 '통상의 기술자'라 한다)이 선행발명들의 결합에 의해 쉽게 발명할 수 있는 것으로서 진보성이 부정된다.'는 취지로 의견제출통지를 하였다.

2) 이에 대하여 원고는 2022. 2. 25. 명세서 등 보정서와 의견서를 제출하였으나, 특허청 심사관은 2022. 7. 27. '청구항 제1, 2, 14 내지 18항은 보정 후에도 여전히 진보성이 부정된다.'는 이유로 거절결정을 하였다.

3) 원고는 2022. 12. 26. 명세서 등 보정서와 의견서를 제출하면서 재심사를 청구하였으나, 특허청 심사관은 2022. 12. 26. '보정 후 청구항 제1, 2, 14 내지 18항은 여전히 진보성이 부정된다.'는 이유로 거절결정(이하 '이 사건 거절결정'이라 한다)을 하였다.

4) 원고는 2023. 3. 27. 특허심판원에 이 사건 거절결정의 취소를 구하는 심판을 청구하였고, 특허심판원은 이를 2023원649호로 심리한 다음, 2024. 6. 28. '이 사건 제1항 발명은 통상의 기술자가 선행발명들의 결합에 의해 쉽게 발명할 수 있어 특허법 제29조 제2항의 규정에 의해 특허를 받을 수 없으므로, 이 사건 나머지 발명에 대하여는 더 나아가 살펴볼 필요 없이 이 사건 출원발명은 특허를 받을 수 없다.'는 이유로 위 심판청구를 기각하는 내용의 심결(이하 '이 사건 심결'이라 한다)을 하였다.

[인정근거] 다툼 없는 사실, 갑 제1 내지 7호증(가지번호 있는 것은 각 가지번호 포함, 이하 같다), 을 제1, 2호증의 각 기재, 변론 전체의 취지

2. 당사자 주장의 요지

가. 원고

이 사건 출원발명은 다음과 같은 이유로 선행발명들에 의해 진보성이 부정되지 않는다. 따라서 이와 결론이 다른 이 사건 심결은 위법하여 취소되어야 한다.

1) 이 사건 제1항 발명의 항-인간 IL-1 α 항체의 의약용도, 즉 '인간 환자에서 전이된 고형 종양의 크기 감소'는 선행발명 1 및 2에 개시되어 있지 않거나 선행발명들로부터 도출될 수도 없고, 선행발명 1 및 2에 개시된 것과 같은 시험관 내 또는 동물시험 결과는 실제 항암 효과를 뒷받침하기에 불충분하다. 또한 이 사건 출원발명의 우선일 당시 IL-1 α 자체가 항암 효과를 가지고 있다고 알려져 있었던 점에 비추어, 이 사

건 발명의 의약용도는 선행발명 1 및 2의 조합으로부터 쉽게 예측할 수 없다.

2) 이 사건 출원발명은 항-인간 IL-1 α 항체의 투여에 의해 인간 환자에서 '전이된 종양의 크기 감소' 효과가 달성된다는 것을 확인하였는데, 이는 선행발명 1 및 2로부터 쉽게 예측될 수 없는 현저한 효과이다.

나. 피고

이 사건 출원발명은 다음과 같은 이유로 선행발명들에 의해 진보성이 부정된다. 따라서 이와 결론을 같이 한 이 사건 심결은 적법하다.

1) 통상의 기술자라면 적어도 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_a 를 갖는 항-IL-1 α 항체를 기재하면서 이 항체의 암 세포 사멸 효과를 제시하고 있는 선행발명 1에다가 이와 마찬가지로 항-IL-1 α 항체를 암 치료를 위한 의약 물질로 기재하면서 그의 전이성 암에 대한 치료 용도를 제시하고 있는 선행발명 2를 결합할 기술적 동기가 충분하고 이와 같은 결합에 기술적 어려움도 없으며, 선행발명 1, 2의 결합에 의해 이 사건 제1항 발명을 쉽게 도출할 수 있다.

2) 통상의 기술자라면 선행발명 1, 2의 각 기재 및 우선일 당시의 기술 상식을 참작하여 선행발명 1, 2로부터 항-IL-1 α 항체가 여러 약리기전을 통하여 암 치료 효과를 갖는다는 것을 알 수 있고, 선행발명 2의 기재로부터 항-IL-1 α 항체의 항종양 효과(암 치료 효과)는 종양 전이에서의 IL-1 α 의 생리학적 차단으로 그 전이를 억제하는 것뿐 아니라, 항체의 직접적인 종양 사멸 작용에서 비롯할 수 있다는 것을 알 수 있으며, 항-IL-1 α 항체가 IL-1 α 를 발현하는 원발성 종양뿐만 아니라 전이성 종양에 대해서도 사멸 작용을 나타내 종양 감소 효과를 보일 것임을 쉽게 예측할 수 있다.

3) 이 사건 출원발명의 명세서의 기재들은 선행발명 1과 2로부터 쉽게 예측할 수

있는 결과를 확인하여 기재한 정도에 불과하고, 이 사건 제1항 발명의 의약품질에 관한 기재에 포함되는 항체 물질의 범주는 매우 다양하고 광범위함에도 이 사건 출원발명 명세서에는 그중 단 1종의 투여 결과만이 기재되어 있을 뿐이어서, 이로써 이 사건 제1항 출원발명에 기재된 의약품질에 대하여 통상의 기술자가 예측할 수 없는 현저한 효과가 확인되었다고 보기도 어렵다.

3. 이 사건 심결의 위법 여부

가. 이 사건 제1항 발명의 진보성 부정 여부

1) 관련 법리

여러 선행기술문헌을 인용하여 특허발명의 진보성을 판단할 때에 그 인용되는 기술을 조합 또는 결합하면 당해 특허발명에 이를 수 있다는 암시, 동기 등이 선행기술 문헌에 제시되어 있거나 그렇지 않더라도 당해 특허발명의 출원 당시의 기술수준, 기술상식, 해당 기술 분야의 기본적 과제, 발전경향, 해당 업계의 요구 등에 비추어 보아 통상의 기술자가 쉽게 그와 같은 결합에 이를 수 있다고 인정할 수 있는 경우에는 당해 특허발명의 진보성은 부정된다(대법원 2007. 9. 6. 선고 2005후3284 판결 등 참조).

의약품도발명에서는 통상의 기술자가 선행발명들로부터 특정 물질의 특정 질병에 대한 치료효과를 쉽게 예측할 수 있는 정도에 불과하다면 그 진보성이 부정되고, 이러한 경우 선행발명들에서 임상시험 등에 의한 치료효과가 확인될 것까지 요구된다고 볼 것은 아니다(대법원 2019. 1. 31. 선고 2016후502 판결). 그러나 선행발명들이 단순한 선언적 진술에 불과하거나 막연한 기대 또는 가능성을 제시하는 것만으로는 부족하고, 선행발명들에 특정 질병의 발생 기전과 이에 대응되는 예방 및 치료 원리, 특정 물질의 과학적·기술적·기능적 특성과, 그러한 물질의 특성과 질병의 발생 및 치료 원리

와의 관련성 등이 포함되어 있어서 특정 물질의 특정 질병에 대한 치료효과를 합리적으로 예측할 수 있을 정도에 이르러야 한다.

의약개발 과정에서는 약효증대 및 효율적인 투여방법 등의 기술적 과제를 해결하기 위하여 적절한 투여용법과 투여용량을 찾아내려는 노력이 통상적으로 행하여지고 있으므로 특정한 투여용법과 투여용량에 관한 용도발명의 진보성이 부정되지 않기 위해서는 출원 당시의 기술수준이나 공지기술 등에 비추어 통상의 기술자가 예측할 수 없는 현저하거나 이질적인 효과가 인정되어야 한다(대법원 2017. 8. 29. 선고 2014후 2702 판결).

2) 이 사건 제1항 발명과 선행발명 1의 구성요소 대비

구성 요소	이 사건 제1항 발명	선행발명 1
1 (유효 성분)	항-IL-1 α 항체를 포함하는, 상기 항-IL-1 α 항체가 적어도 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_a 로 인간 IL-1 α 에 결합하는 단일 클론 항체(mAb)이고,	- 본 발명은 <u>인간 IL-1α에 특이적으로 결합하는 정제된 인간 IgG1 mAb</u>를 특징으로 하며, ([0006]) - 일 양태에서, 본 발명은 (i) 인간 IL-1α에 대해 매우 높은 결합 친화도를 나타내는 항원-결합 가변 영역, 및 (ii) C1q 결합을 통해 보체계를 활성화시키고 몇몇 상이한 Fc 수용체에 결합하는 데 효과적인 불변 영역을 포함하는 완전 인간 mAb를 특징으로 한다. 인간 Ab는 바람직하게는 IgG1이다. <u>Ab의 K_a는 바람직하게는 적어도 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 또는 그 이상이다.</u> ([0024])
2 (의약 용도)	인간 대상체에서 종양성 질환(neoplastic disease)을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 종양성 질환이 전이성 종양과 연관되고 IL-1 α 를 발현하거나 IL-1 α -발현 염증 세포로 침윤된 종양을 특징	- 암세포의 Ab-매개 사멸화 표준 Ficoll Paque 제제에 의해 연층으로부터 분리된 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 (중략) 이펙터 세포(E)로 사용되었다. <u>THP1 세포들은 표적(T)으로 사용되었다.</u> (중략) 15분 동안 다른 농도의 MABp1과 함께 1×10^4 표적들을 인큐베이션한 이후에, 이펙터 세포들은 25:1 및 50:1의 ET 비율로 1×10^4 표적들에 첨가되었으며 4시간 더 인큐베이션되었다. (중략) A. 비처리된

	으로 하며, 상기 조성물의 투여 결과 전이된 종양의 크기가 감소 하는 것인, 약학적 조성물.	PBMC를 이펙터 세포로서 사용하였다. B. rhIL-2-처리 된 PBMC를 이펙터 세포로서 사용하였다. 두 경우 모 두에서, MABp1의 농도를 증가시키면(1.25에서 20 ug/ ml로) 양쪽 ET 비율에서 표적 세포 사멸화가 증가하게 되었다. ([0046])
--	--	---

3) 공통점 및 차이점

가) 구성요소 1

구성요소 1은 약학적 조성물의 유효성분에 관한 것으로 적어도 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_a 로 인간 IL-1 α 에 결합하는 단일클론 항체(mAb)인 항-IL-1 α 항체이다. 선행발명 1에는 이에 대응하는 구성으로, 인간 IL-1 α 에 특이적으로 결합하는 인간 IgG1 mAb와 그 Ab의 K_a 가 적어도 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 또는 그 이상인 것이 개시되어 있다(선행발명 1의 명세서 식별번호 [0024]). 따라서 이 사건 제1항 발명의 구성요소 1과 선행발명 1의 대응 구성요소는 모두 '적어도 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_a 로 인간 IL-1 α 에 결합하는 단일클론 항체(mAb)인 항-IL-1 α 항체(이하 '항-IL-1 α 항체'라 한다)'로서 동일하다.

나) 구성요소 2

구성요소 2는 약학적 조성물의 의약용도로, 항-IL-1 α 항체를 포함하는 약학적 조성물을 투여하여 '인간 대상체에서 종양성 질환(neoplastic disease)'을 치료하는 것이다. 여기에서 종양성 질환은 '전이성 종양과 연관되고 IL-1 α 를 발현하거나 IL-1 α -발현 염증 세포로 침윤된 종양'을 특징으로 하며, 항-IL-1 α 항체의 투여 결과 '전이된 종양의 크기가 감소한다.'는 것이다.

선행발명 1에는 이에 대응하는 구성으로, '항-IL-1 α 항체인 MABp1의 농도를 증가시키면 암세포인 THP1 세포의 사멸화가 증가한다.'는 내용이 개시되어 있다(선행발

명 1의 명세서 식별번호 [0046]). 그러나 선행발명 1에는 그 치료대상인 종양성 질환이 '① 전이성 종양과 연관되고, ② IL-1 α 를 발현하거나 IL-1 α -발현 염증 세포로 침윤된 종양이며, ③ 전이된 종양의 크기가 감소한다.'라는 것을 명시적으로 한정하지 않은 점에서 차이가 있다(이하 '이 사건 차이점'이라 한다).

4) 차이점의 용이 극복 가능 여부

선행발명 1에는 항-IL-1 α 항체를 투여하는 치료대상을 구체적으로 한정하지는 않았다. 그러나 선행발명 1, 2의 각 기재 및 이 사건 출원발명의 우선일 당시 기술상식 등을 종합하여 인정되는 다음과 같은 사실 및 사정들에 비추어 볼 때, 통상의 기술자는 선행발명 1에다가 선행발명 2를 결합함으로써 이 사건 차이점 즉, 치료대상인 종양성 질환이 ① 전이성 종양과 연관되고, ② IL-1 α 를 발현하거나 IL-1 α -발현 염증 세포로 침윤된 종양이며, 그 치료효과로서 ③ 전이된 종양의 크기가 감소한다는 것을 쉽게 예측할 수 있을 것으로 판단된다.

가) 이 사건 출원발명의 우선일 당시, 종양 세포에서 IL-1 α 가 분비될 경우에는 종양의 침습이나 암 세포의 전이에 중요한 역할을 한다는 사실을 확인한 여러 연구 결과가 있었고, 선행발명 1, 2에는 IL-1 α 를 표적하여 결합하는 항-IL-1 α 항체를 이용하여 암 세포의 전이를 저하시키는 효과가 이미 개시되어 있었다.

(1) 정상적인 상태에서 IL-1 α 는 세포 매개성 면역 반응과 같은 항종양 효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 그러나 많은 경우의 암 세포에서 가장 강력한 염증 유발 사이토카인인 IL-1 α 분비되고, 악성 세포에서 분비된 IL-1 α 는 세포 접착 분자(ICAM-1, VCAM, E-selectin) 등의 발현을 유도하여 종양 세포의 침습 및 암세포의 전이에도 중요한 역할을 한다는 사실, 암 환자의 혈청 내 세포유착분자의 농도 증가는 암 전이와

높은 상관관계가 있는 사실 등은, 이 사건 출원발명의 우선일 당시에 해당 기술 분야에서 널리 연구되어 여러 논문 등을 통해 공개되어 있었다.

을 제9호증(2008년)

Royuela, M 등, 인간 전립선 암에서의 TNF- α /IL-1/NF- κ B 전달 경로(TNF- α /IL-1/NF- κ B transduction pathway in human cancer prostate), Histol Histopathol (2008), 23

(제1283면)

정상 인간 전립선에서는 IL-1 β 와 IL-1RI만 발견되었고, IL-1 α , IL-1RII 및 IL-1R α 는 발견되지 않았습니다 ..(중략)..

인간 양성 전립선 비대증(BPH)의 조직 배양에서 상피 세포는 IL-1 α 의 과잉 생산을 보였으며, 이는 세포 증식의 증가와 관련이 있습니다(Giri and Ittmann, 2000). 전립선암(PC)에서는, 안드로겐 비의존성 전립선암 세포주(PC-3 및 DU-145)가 IL-1 α 발현을 보였으며(Hoosein, 1998), 이는 신경내분비 표현형과 관련이 있을 뿐만 아니라 성장과 분화와도 관련이 있다고 보고되었습니다(Abdul and Hoosein, 2002).

을 제10호증(2006년)

Apte, R.N. 등, 종양 발생, 종양 침습성, 전이 및 종양-숙주 상호작용에서 IL-1의 관여(The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions) Cancer Metastasis Rev (2006) 25

(제391면)

IL-1 α 는 위암 세포, B-계통 림프모세포, 급성 골수성 세포 및 카포시 육종의 방추형 세포를 포함한 여러 악성 세포 유형에서 자가분비²⁾ 성장 자극제로 작용하는 것으로 나타났습니다. 일부 경우에는 세포에서 분비되지 않고도 작용할 수 있습니다[11, 12].

(397면)

다양한 인간 종양 세포에서 IL-1 α 와 IL-1 β 의 in vitro 생산에 관한 방대한 증거가 있으며, ... (중략)...

악성 세포에서 IL-1 발현의 메커니즘은 다루어지지 않았지만, 종양 세포에서 IL-1 생성 및 분비의 패턴이 정상 세포에서 관찰되는 것보다 더 '다양하다'는 것으로 보입니다. 예를 들어, 정상 세포에서는 IL-1 α 를 분비하는 일이 드물지만, 여러 종류의 종양 세포에서는 이를 분비합니다. ...(후략)...(398면~399면)

멜라노마³⁾에서, 종양 진행의 각 단계에서 다양한 사이토카인 발현 패턴이 관찰되었습니다.

자가분비 성장 인자들은 악성 세포의 증식을 직접적으로 자극하며(예: bFGF, MGSA/GRO, IL-8, 때때로 IL-6, PDGF-A, IL-10), 반면, 근처 세포에서 작용하는 성장 인자들(예: PDGF, EGF, TGF β , IL-1 α , IL-1 β , GM-CSF, IGF-1, NGF, VEGF)은 종양 성장, 침습 및 전이를 촉진하는 미세 환경을 조절하는데, 이는 단백질 분해 효소의 활성화, 기질 형성 및 혈관 생성을 통해 이루어집니다(리뷰: [131]). ...(중략)...

따라서, IL-1 α 와 IL-1 β 는 많은 다른 사이토카인들과 함께 인간 멜라노마 세포의 미세환경에서 발현됩니다. ...(후략)...위장 종양에서, 55%의 샘플이 IL-1 α 양성으로 나타났으며, 분화된 종양에서 더 뚜렷하게 나타났고, 간 전이와 유의미한 상관관계를 보였습니다. 수술적 치료를 받은 환자 중 IL-1 α 양성 종양을 가진 환자들은 간 재발의 발생률이 더 높았습니다[142]. ...(후략)...

(400면)IL-1 α 의 자연적인 막 결합형 형태는 항종양 효과를 발휘하는 데 중요합니다. 이는 부착 분자로 작용하여 IL-1 수용체를 가진 악성 세포와 면역 효과 세포 사이의 효율적인 세포 간 상호작용을 가능하게 하며, 저수준의 발현에서도 효과적으로 작용하는 표적 면역보조제로 작용할 수 있기 때문입니다.(중략) 종양 세포에 관련된 IL-1 α 에 의한 항종양 면역반응은 악성 세포가 이 사이토카인을 분비할 때에는 관찰되지 않습니다. 따라서 IL-1 α 를 도입한 A375 흑색종 세포는 이 사이토카인을 적극적으로 분비하고, 면역결핍 생쥐(nude mice)에서 실험적으로 폐 전이를 유도하는 것으로 나타났습니다. 종양 세포에 관련된 전이는 ICAM-1, VCAM-1 및 E-selectin의 IL-1 α 매개발현을 통해 악성 세포가 내피세포에 단단히 부착함으로써 촉진되었습니다. 따라서 종양세포의 악성 표현형은 침습성을 촉진하는 특성과 항종양 면역을 유도하는 능력 간의 상반된 특징에 의해 영향을 받으며, 이러한 특징들은 서로 다른 미세환경(면역체계가 온전한 생쥐와 면역 결핍 생쥐)에서 차별적으로 발현됩니다.

을 제11호증(1999년)

Kurtzman, S.H. 등, 인간 유방암에서 사이토카인: IL-1 α 및 IL-1 β 의 발현(Cytokines in human breast cancer: IL-1 α lpha and IL-1beta expression) Oncology Report 6(1) 65-135 (1999)

(초록)

우리는 인간 유방암(HBC) 샘플에서 인터루킨-1알파(IL-1 α)와 인터루킨-1베타(IL-1 β)가 존재하며, 종양 세포와 관련이 있다고 가설을 세웠습니다. 이 가설을 검증하기 위해: a) IL-1 α (n=49)와 IL-1 β (n=42)의 분포를 분석하기 위해 인간 유방암(HBC) 조직 절편에서 면역학적 분석을 수행하였고; ...(중략)... 면역조직화학 분석 결과, 침윤성 암 및 유관상피암(in situ

ductal carcinoma) 환자의 종양 세포에서 IL-1 α 와 IL-1 β 가 존재함을 확인했습니다. ...(후략)...
을 제12호증(1996년)

류완희 등, 폐암 환자에서 혈청 soluble ICAM-1 농도의 변화
(530면)

sICAM-1은 비만세포, 임파구, 호산구, 기관지의 상피세포 및 내피세포등에 존재하는 80~100kD의 당단백분자로서, cytokine IL-1, TNF 등의 자극에 의해 염증부위와 면역 반응 부위에서 유리되어 세포의 활성화를 일으키고, 유착분자의 발현을 증가시켜 여러 질환의 병인에 관련되는 것으로 보인다. 이는 백혈구 표면의 배위자인 LEA-1과 결합함으로써, 세포 매개성 면역반응에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 최근에는 sICAM-1이 악성 흑세포종의 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었으며(중략), 본연구에서 저자들은 폐암 환자에서 정상대조군과 혈청 sICAM-1농도를 비교하였으며(중략), 폐암에서는 조직학적 분류에 상관 없이 폐암의 전이 및 진행에 따라 혈청내 ICAM-1농도가 유의하게 증가하였다.

을 제13호증(2002년)

김용삼 등, 셀렉틴의 당생물학- 암 및 염증의 발생과 전이에 관련하여
(14면)

몇몇 암세포에서도 셀렉틴과 그 리간드가 정상적으로 발현되었는데 p-셀렉틴이 결여된 쥐에서는 폐암세포의 전이가 감소되었다. 이러한 현상은 혈소판에 결합되는 암세포의 수가 적어지기 때문인 것으로 생각된다.

(2) 선행발명 1의 명세서에는, 다음과 같이 IL-1 α 이 염증이나 종양 전이에 역할을 한다는 사실(식별번호 [0004]) 및 항-IL-1 α 항체인 MABp1은 기저막 매트릭스로의 종양 세포 침범을 저해한다는 사실이 각 기재되어 있고(식별번호 [0051] 실시예 7), 항-IL-1 α 항체인 MABp1이 내피 세포에서 세포 접착 분자(ICAM1 및 E-셀렉틴 등)의 발현을 저하시킨다는 사실도 기재되어 있다(식별번호 [0036], 실시예 8 및 9 참조).

선행발명 1(을 제1호증)

[0004] IL-1 α 는 염증, 면역 반응, 종양 전이, 및 조혈을 포함한 수많은 상이한 활동에서 역할을 하는 전(pro-)염증성 사이토카인이다.

2) 'autocrine', 즉 자신이 분비하여 자신에게 영향을 준다는 의미이다.

3) 멜라노마는 피부암의 일종이다.

[0036] MABp1은 내피 세포상에서 IL-1 α 유도 ICAM1 및 E-셀렉틴 발현을 저하시켜 왔다.

[0051] 마트리겔⁴⁾을 침범하는 세포의 퍼센트는 MABp1의 존재 하에 유의하게 저해되었다.

[0052] HUVEC 세포의 표면 상에서 rhIL1A에 의해 유도된 ICAM-1 접착 분자의 상향조절은, 비자극 HUVEC 세포에 의해 나타난 기준선 수준까지 MABp1에 의해 중화되었다.

실시에 7

MABp1은 기저막 매트릭스로의 종양 세포 침범을 저해한다.

실시에 8

MABp1은 내피 세포에서 ICAM1 발현의 증가를 차단한다.

실시에 9

MABp1은 내피 세포에서 E-셀렉틴 발현의 증가를 차단한다.

[0053] 막성 GPI-IL-1 α 에 의해 유도된 HUVEC 세포의 표면 상에서의 상향조절된 E-셀렉틴 발현은, 비자극 HUVEC 세포에 의해 나타난 기준선 수준까지 MABp1에 의해 중화되었다.

(3) 선행발명 2의 명세서에도, 다음과 같이 인간 환자의 전이성 암에서 발현되는 IL-1 α 를 표적하는 항-IL-1 α 항체를 투여함으로써 항체 의존적 세포 매개 세포독성 작용(ADCC)⁵⁾에 의해 직접 종양 세포를 사멸시키고, 종양의 전이 가능성을 억제할 수 있다는 사실(식별번호 [0006], [0042], [0044]), 확립된 전이성 병변이 발생한 후에 치료를 받은 마우스에서 전이성 병변이 뚜렷하게 억제되는 등 항-IL-1 α 항체를 투여함으로써 확립된 전이성 질환이 퇴행된다는 사실도 기재되어 있다(식별번호 [0037], [0038]).

선행발명 2(을 제2호증)

청구항 1

암을 치료하는 방법으로서, 치료를 필요로 하는 포유류 환자에게 치료적 유효량의 항-IL-1 α 항체를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 환자는 인간인, 방법.

청구항 4

4) 세포생물학 및 암 연구에서 자주 사용되는 세포외기질(Extracellular Matrix) 유사물질이다.

5) 항체가 표적 세포에 결합한 후, 면역세포(주로 NK세포)가 그 항체의 항원을 인식하고 항체의 일정한 부위(Fc)를 인식하여 표적 세포를 죽이는 면역반응을 의미한다.

제 1 항에 있어서, 암은 전이성인, 방법.

[0006] 항체를 이용한 IL-1 α 표적화는 암 치료법으로 사용될 수 있다. 특히, 항-IL-1 α 항체는 종양 전이에서 종양 유래 IL-1 α 가 수행하는 생리학적 역할을 방해함으로써 종양의 전이 가능성을 억제할 수 있다. 더욱이 IL-1 α 는 종양에서 발현되기 때문에 IL-1 α 를 표적으로 하는 항체는 항체 지휘(directed) 세포성 세포독성(보통 ADCC 라고 함)을 통해 직접적인 종양 세포 독성(cytotoxicity)을 유발할 수 있다.

실시에 4

[0032] aIL-1 α 항체는 전이 발생률을 저하시킨다

[0035] 유방 종양 모델에서, 가시적인 림프절, 폐 및 간 전이는 $m_{a_h}IL-1\alpha$ 를 이용한 처리에 의해 또는 $m_{a_h}IL-1\alpha$ b+ $m_{a_h}IL-1\alpha$ b 를 이용한 조합 처리에 의해 저하되었다. (중략) 유사한 관찰이 전립선 종양 모델에서 이루어졌고, 여기서 $m_{a_h}IL-1\alpha$ -1 α 또는 $m_{a_h}IL-1\alpha$ b+ $m_{a_h}IL-1\alpha$ b 를 받고 있는 마우스는 전이성 부담을 저하시켰다.

[0037] 확립된 전이성 병변이 발생한 후에만 치료를 받은 마우스는 이후 확립된 병변을 모두 제거할 수는 없는 것으로 보인다. 그러나 이러한 치료를 받은 쥐의 전이성 병변은 뚜렷하게 억제된다.

[0038] 항체 치료로 인해 확립된 전이성 질환이 퇴행(regression)되는 것으로 보인다.

[0042] 종양에서 발현되는 IL-1 α 에 대한 항체는 강력한 항종양 효과를 나타낸다. 항종양-IL-1 α 항체를 투여받은 동물에서의 강한 항종양 효과는 종양 전이에서 IL-1 α 의 생리학적 차단을 포함하는 것으로 보일 뿐 아니라 항체의 직접적인 종양 사멸 작용(tumoricidal action)을 포함할 수 있다. 본 발명자들은, 보체 고정 및 항체 지휘 세포성 세포독성(ADCC)을 효율적으로 유도하는 항체 하위부류인 IgG1 항체를 사용하여 종양-발현 IL-1 α 를 표적화하는 것은 누드 마우스 모델에서 IL-1 α 발현 종양에 대한 상당한 살종양 작용을 나타낼 수 있음을 예상한다. (후략)

[0044] 단일클론 항체를 사용하여 종양 세포에 의한 IL-1 α 생산을 표적화하는 것은 생존율을 연장시키고 전이성 부담을 저하시키는 효과적인 수단이다. IL-1 α 발현 종양의 항체 표적화는 인간 질환 설정에서 잠재적인 치료적 가치일 것이고, 초기 또는 진행성 질환 병기의 수많은 형태의 암에 대한 효과적인 치료 표적을 나타낼 수 있다.

나) 우선일 당시 기술상식에 비추어, 통상의 기술자는 선행발명 1에 개시된 항-IL-1 α 항체의 치료 대상인 '종양성 질환'은, IL-1 α 를 발현하거나 IL-1 α -발현 염증 세포로 침윤된 종양이라는 점을 쉽게 예측할 수 있다.

(1) 선행발명 1에는 '비정상적인 IL-1 α 발현과 연관된 병리(pathology)를 치료하기 위해 인터류킨-1 α (IL-1 α)에 특이적으로 결합하는 항체(Ab)를 사용하는 방법'(식별번호 [0003]) 및 '세포를 인간 IL-1 α -특이적 mAb와 접촉시키는 단계에 의해 인간 IL-1 α -발현 세포를 사멸화시키는 방법'(식별번호 [0036])이 개시되어 있으므로, 통상의 기술자는 선행발명 1로부터 항-IL-1 α 항체의 치료 대상인 종양성 질환이 IL-1 α 발현과 연관된 종양, 즉 IL-1 α 를 발현하거나 IL-1 α -발현 염증 세포로 침윤된 종양임을 쉽게 인식할 수 있다.

선행발명 1(을 제1호증)

[0003] 본 발명은 일반적으로 면역학, 염증, 암, 혈관 장애, 및 의학 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 인터류킨-1 α (IL-1 α)에 특이적으로 결합하는 항체(Ab), 및 비정상적인 IL-1 α 발현과 연관된 병리(pathology)를 치료하거나, 예방하거나 검출하기 위해 이러한 Ab를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0036] 본 발명은 또한 세포를 인간 IL-1 α -특이적 mAb 와 접촉시키는 단계에 의해 인간 IL-1 α -발현 세포를 사멸화시키는 방법을 제공한다.

(2) 이에 더하여, 앞서 살펴 본 선행발명 2의 기술 내용 및 우선일 당시 항원-항체 결합 관계에 대한 일반적인 기술상식에 비추어 보면, 항-IL-1 α 항체는 IL-1 α 를 표적으로 하는 것으로서 IL-1 α 를 발현하는 세포에 작용하므로, 항-IL-1 α 항체를 이용한 암 치료의 표적, 즉 종양 치료의 대상은 IL-1 α 를 발현하는 종양이나 IL-1 α 를 발현하는 염증성 세포가 침투된 종양이 될 수 있다는 점도 통상의 기술자가 충분히 예상할 수 있다.

다) 우선일 당시 기술상식에 비추어, 통상의 기술자는 선행발명 1에 개시된 종양성 질환의 치료 효과가 '전이된 종양의 크기가 감소하는 것'이라는 점도 쉽게 예측할 수 있다.

이 사건 출원발명의 우선일 당시, 암과 같은 종양성 질환은 전이를 수반하고, 종양성 질환의 치료는 종양의 크기를 감소시키는 것임은 널리 알려진 기술 상식이었다.⁶⁾

이 사건 출원발명의 출원일 이전에 발행된 문헌으로서, 2005년 발행된 FDA 드래프트 가이드라인(을 제6호증의1)에는 객관적 반응률(ORR), 즉 임상시험에 참여한 환자 중 종양 크기가 감소한 환자의 비율이 항암제의 신속 허가를 지지하는데 사용되는 일차 대리 평가변수이며, 객관적 반응률(ORR)은 의약품의 효과에 직접적으로 기인한다는 내용이 기재되어 있기도 하다.

을 제6호증의1

[3면]

지난 10년 동안, 정식 허가에서의 제한된 규칙뿐만 아니라 객관적인 반응률(ORR)은 몇가지의 이유로 항암제의 신속 허가를 지지하는데 사용된 일차 대리 평가변수였다. 첫째로, 객관적인 반응률(ORR)은 의약품 효과에 직접적으로 기인하였다(종양은 거의 자발적으로 줄어들지 않는다. 그러므로 객관적인 반응률을 단일군 시험에서 정확하게 평가될수 있다.). 두 번째로, 종양반응은 객관적인 반응율(OPR)과 관련이 있으며, 암치료과정을 설명함에 있어, 종양반응은 오랜동안 받아들여지고 있는 사실이다. 마지막으로, 만약 객관적인 반응률(OPR)이 충분하고 반응이 충분한 기간동안 이루어진 것이라면, 객관적인 반응률은 임상 유익성을 예상하는데 합리적인 것으로 보인다.

이에 따르면 항암의약품의 임상시험에서 종양의 크기 감소는 일반적으로 확인하는 평가 지표임을 알 수 있는데, 임상시험은 시험관 내(in vitro) 및 동물에 대한 시험을 수행한 다음 사람을 대상으로 안전성과 유효성을 증명하기 위해 실시하는 것이라는 점을 고려하면, 암세포의 사멸화 등 시험관 내(in vitro) 항종양 효과가 확인된 항암제를 대상으로 임상시험을 수행함에 있어 종양 크기의 감소는 예측·기대되는 효과라고 할 것이다. 그렇다면 위와 같은 주지의 사실과 사정을 알고 있는 통상의 기술자는 항

6) 을 제3 내지 8호증의 각 기재

-IL-1 α 항체가 암세포를 사멸화시킨다는 선행발명 1의 기재로부터 종양의 크기가 감소하는 치료효과를 쉽게 예측할 수 있다.

5) 원고의 나머지 주장에 대한 검토

가) 원고는, 선행발명 1은 '혈액암 세포의 시험관 내(in vitro) 살상'에 대해서만 기재할 뿐이어서 이 사건 제1항 발명의 대상 질환인 전이된 고형 종양에 대한 효과를 설명하지 않는다는 취지로 주장한다.

그러나 ① 이 사건 제1항 발명은 대상 질환을 고형 종양으로 한정하지 않rh, ② 앞서 살펴 본 바와 같이, 통상의 기술자는 시험관 내 암세포의 살상으로부터 종양 크기의 감소 효과를 예측할 수 있으며, ③ 항-IL-1 α 항체의 원발성 종양에 대한 효과와 전이성 종양에 대한 효과가 다르다고 볼 만한 사정도 없으므로, 원고의 주장은 받아들이지 않는다.

나) 원고는, 선행발명 2는 항-IL-1 α 항체가 전이 유무에 미치는 영향을 연구한 결과를 개시할 뿐 전이된 종양의 크기 감소와 관련된 결과를 제공하지 않으며, 마우스 이종이식 종양 모델과 인간의 종양성 질환 간이나 마우스와 인간 IL-1 α 시스템 간의 상당한 차이가 존재하므로 마우스 모델에서 관찰된 결과로부터 인간 환자에서의 결과를 예측하기 어렵다는 취지로 주장한다.

그러나 ① 앞서 살펴 본 바와 같이, 선행발명 2에는 IL-1 α 를 발현하는 종양 모델에서 마우스 항-인간 IL-1 α 항체가 전이 발생률을 저하시킨다는 점, 항체 치료로 인해 확립된 병변이 뚜렷하게 억제 또는 퇴행되는 것으로 보인다는 점 등이 기재되어 있으므로, 임상시험 등에 의한 치료효과가 확인된 것은 아니라고 하더라도 통상의 기술자는 선행발명 2의 기재로부터 이 사건 제1항 발명의 치료효과를 쉽게 예측할 수 있

고, ② 임상시험에 앞서 행해지는 시험관 내(in vitro) 시험이나 동물 시험이 모든 경우에 사람에게 대한 임상시험의 결과와 동일하거나 유사한 결과를 보여주는 것은 아니지만 통상적인 의약 개발 과정에서 시험관 내(in vitro) 시험이나 동물 시험 등을 통해 수집된 약물의 유효성에 관한 정보가 임상시험의 근거자료나 참고자료 등으로 이용되는 점을 고려하면, 마우스 모델이 인간에서의 질환을 재현하지 못한다는 점이 이 사건 제1항 발명의 치료효과 예측을 어렵게 할 정도라고는 보기 어려우며, ③ 마우스와 인간의 일반적인 IL-1 α 시스템에 상당한 차이가 있다고 하더라도, 마우스에 이식된 IL-1 α 발현 종양에 대한 항-IL-1 α 항체의 항종양 효과에 관한 선행발명 2의 실험결과를 접한 통상의 기술자라면 이 사건 제1항 발명의 치료효과를 예측하는 데 어려움이 없을 것으로 보이므로, 원고의 주장은 받아들이지 않는다.

다) 원고는, 모든 암이 전이를 수반하는 것이 아니고 또한 암 치료라고 하여 종양 크기의 감소를 반드시 포함하는 것도 아니므로, 선행발명 1에 '암 치료' 용도가 개시되어 있다고 하더라도 이것이 '전이암 치료'를 곧바로 의미한다고 할 수 없으며, 항-IL-1 α 항체가 직접적인 살상 작용을 나타낸다는 선행발명 2의 기재를 근거로는 전이성 종양에서도 항-IL-1 α 항체가 직접 작용하여 효과를 나타낼 것임을 쉽게 인식하거나 예상할 수 있다는 결론을 도출할 수 없다는 취지로 주장한다.

원고가 제출한 일부 증거들(갑 제29호증 내지 33호증)에 의하면, 전이된 종양이 원발 종양과 유전형 및 표현형 등에서 차이를 보이는 경우가 있고, 원발 종양과 전이 종양에서 항암치료의 효과가 동일하지 않은 경우도 있다는 사실은 인정된다.⁷⁾ 그러나

7) 갑 제32호증의 기재에 의하면, 5-FU 대사 효소의 유전자 발현이 원발 직장암과 그에 상응하는 간 전이 병변 사이에서 다르다는 점이 화학요법에 대한 감수성을 평가할 때 고려되어야 한다고 기재하고 있는데, 이러한 기제는 원발 종양과 전이 병변 사이에 효소 발현의 차이와 같은 차이가 있는 경우에 항암제의 치료 효과 차이가 발생할 수 있다는 것으로 이해된다.

앞에서 본 바와 같이 일반적으로 많은 암은 전이를 수반하고 있고, 일반적으로 암세포에 작용하여 암 치료 효과를 나타내는 물질은 특별한 사정이 없는 한 전이 암에서도 동일한 효과를 작용하는 점을 고려하면, 통상의 기술자가 원발성 종양에 대한 효과로부터 전이성 종양에 대한 효과를 예측할 수 없을 정도로 원발성 종양과 전이성 종양에 대한 항암제의 작용효과의 차이가 있다고 보기 부족하고, 달리 이를 인정할 만한 증거가 없다. 오히려 원고가 원용하고 있는 갑 제33호증의 기재에 의하더라도, 원발 부위인 폐에서의 항암 치료의 효과가 전이 부위(간, 뇌, 부신, 림프절)에서 보다 더 우수하다는 연구 내용으로, 이는 전이 부위에서의 항암 치료 효과를 부정한 것은 아니다.⁸⁾ 또한 항암 치료의 효과는 원발 부위와 전이 종양에서 모두 나타난다거나 전이 부위가 림프절인 경우에는 그 치료 효과가 상당히 좋다거나, 전이 종양에 대하여도 종양 감소의 효과가 있다는 내용이 다수 포함되어 있다.⁹⁾ 따라서 원고의 위 주장도 받아들이지 않는다.

라) 원고는, 이 사건 발명의 우선일 당시에는 이 사건 발명을 부정적으로 교시하는 사실, 즉 IL-1 α 자체가 항-종양 효과를 가지는 것으로 알려져 있었으므로, 이를 알고 있는 통상의 기술자라면 항-종양 효과를 달성하기 위해 항-IL-1 α 항체를 통해 IL-1 α 을 억제하고자 하지 않을 것이며, 항-IL-1 α 항체가 전이된 종양의 크기를 감소시킬 수 있을 것이라는 점을 쉽게 예측할 수 없었다는 취지로 주장한다.

그러나 앞에서 본 바와 같이, 이 사건 출원발명의 우선일 당시에도 정상 세포가 아닌 종양 세포에서 IL-1 α 가 분비될 경우에는 ICAM-1, VCAM-1 및 E-selectin과 같은 세포 접착 분자의 발현을 유도하고, 이는 악성 세포가 내피세포에 단단히 부착되는 것

8) 갑 제33호증의 표 2 참조.

9) 갑 제33호증의 초록, 제316면 도 1, 제317면 등 참조.

을 촉진하여 종양의 침습이나 암 세포의 전이를 증가시킨다는 사실을 확인한 연구 결과가 있었고, 선행발명 1, 2에는 IL-1 α 에 결합하는 항-IL-1 α 항체를 이용하여 암 세포의 전이를 저하시키는 항종양 효과가 이미 개시되어 있었다. 따라서 통상의 기술자로서는 우선일 당시의 기술상식과 선행발명 1, 2의 기재로부터 항-IL-1 α 항체를 이용한 종양 질환의 치료 및 전이성 종양에 대한 치료 효과도 충분히 인식할 수 있었다고 봄이 타당하다.

6) 검토 결과

이 사건 제1항 발명은 이 사건 출원발명의 우선일 당시 기술상식 등에 비추어, 통상의 기술자가 선행발명 1과 선행발명 2를 결합하여 쉽게 발명할 수 있어 그 진보성이 부정된다. 특허출원에서 청구범위가 둘 이상의 청구항으로 이루어진 경우에 어느 하나의 청구항이라도 거절이유가 있으면 그 출원은 일체로 거절되어야 하므로, 이 사건 출원발명의 나머지 청구항들에 대하여 더 나아가 살펴볼 필요 없이 이 사건 출원발명은 특허를 받을 수 없다. 이와 결론을 같이한 이 사건 심결은 적법하고 원고 주장과 같은 위법이 없다.

4. 결론

그렇다면 이 사건 심결의 취소를 구하는 원고의 청구는 이유 없으므로, 이를 기각하기로 하여 주문과 같이 판결한다.

재판장 판사 우성엽

판사 이지영

판사 임현화

이 사건 출원발명의 주요 내용

① 기술분야

【0008】본 발명은, 일반적으로 의학, 종양학, 그리고 면역학 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 종양-관련 질병 및 기타 종양-관련 병태들을 치료하기 위해, 인터루킨(interleukin)-1 α (IL-1 α)에 특이적으로 결합하는 항체들(Ab들)의 이용에 관한 것이다.

② 배경기술

【0010】많은 발전에도 불구하고, 암과 같은 종양-관련 질병들은 선진국에서 사망과 질이병률 주요 원인 중 하나로 남아 있다. 종양발생의 분자 메커니즘의 많은 부분들이 이제 밝혀졌지만, 가장 공격적인 종양의 표준 치료는, 수술 절제, 화학 요법, 그리고 방사선 치료가 지속되고 있다. 점점 더 성공적이긴 하지만, 이들 치료 각각은 여전히 많은 원치 않는 부작용을 초래하고 있다. 예를 들어, 수술법은 고통, 건강한 조직에 외상성 부상, 그리고 흉터를 남긴다. 방사선 치료와 화학 요법은 구역질, 면역 억제, 위궤양 형성 및 2차적으로 종양발생을 유발할 수 있다.

【0011】지난 몇 년 동안, 암성 종양들을 치료하는데 항체들(Ab들)과 같은 생물학적 작용물질(agent)들을 사용하는 것에서 많은 진전이 이루어지고 있다. Ab들은 환자의 면역 반응을 활용하는 종양세포들의 특정 유형을 직접적으로 표적화함으로써, 종양을 죽일 수 있다. 또한, 그들은 세포 성장인자들을 표적화함으로써 종양세포들의 성장을 방해할 수 있다. 종래 화학 요법의 작용물질과 마찬가지로, 모든 항 종양 Ab들이 모든 유형의 종양들을 치료하는데 유용하지는 않으며, 많은 초기에 효과적이던 항체들이 나중에 효력을 잃게 된다. 따라서 새로운 항 종양 Ab들이 요구되고 있다.

③ 해결하려는 과제

【0013】본 발명은 종양성 질병들에 대한 치료를 제공하는 것을 목적으로 한다.

【0014】본 발명에 따르면, IL-1 α 에 특이적으로 결합하는 mAb는 다양한 종양-관련 질병들을 치료하는데 유용하다는 발견에 기반을 두고 있다.

【0015】따라서, 본 발명은, 인간에서 종양성 질환(예를 들어, KRAS 돌연변이를 갖는 대장암, 코인두암 또는 버킷 림프종과 같은 EBV-관련 암, 비소세포 폐암(NSCLC) 또는 캐슬만병 같은 종양들과 관련된 비 암적 조건들) 치료를 위한 약물 및 방법을 특징으로 한다. 본 방법은, 피험체들에서 적어도 약 10 %(예를 들어, 최소한 8, 9, 10, 15, 17, 20, 30, 40, 50, 60,

70, 80, 90, 또는 100 %) 종양의 크기를 줄이거나 및/또는 종양과 관련된 병리 증상이 호전될 정도로 효과적인 양의 항-IL-1 α Ab 와 약학적으로 허용되는 담체를 함유한 약학적 조성물을 피험체에 투여함으로써 수행될 수 있다.

【0016】본 약물은 항-IL-1 α Ab를 포함할 수 있다. 항-IL-1 α Ab는 IgG1 같은 mAb가 될 수 있다. 항-IL-1 α Ab는 MABp1로 표기되는 mAb 또는 MABp1의 하나 이상의 상보성 결정 영역들(CDR들)을 가진 mAb가 될 수 있다.

【0031】종양과 관련된 질환에 대한 치료

【0032】여기서 설명된 조성들과 방법들은, 피험체에서 종양과 관련된 질환에서 적어도 하나의 특질을 개선시킬 정도로 효과적인 항 IL-1 α Ab의 양을 포함한 약학적 조성물을 피험체에 투여함으로써, 포유류 피험체에서 종양과 관련된 질환을 치료하는데 유용하다. 포유류 피험체는 인간, 개, 고양이, 말, 소, 양, 염소, 그리고 돼지를 포함하는, 종양과 관련된 질환을 앓고 있는 임의의 대상일 수 있다. 인간 피험체는 남성, 여성, 성인, 어린이, 노인(65세 이상 성인) 및 다른 질병을 가진 이들이 될 수 있다. 특히 바람직한 피험체는 화학 요법, 방사선 치료, 수술, 및/또는 생물학적 작용물질(agents)로 치료 후 질병이 진행되고 있는 자들이다. 항 IL-1 α Ab 치료에 민감한 임의 유형의 종양과 관련된 질병이 표적이 될 수 있다. 항 IL-1 α Ab 투여는 대장 종양류(예를 들어, KRAS 변이를 가진 대장암류), 코인두 암 또는 버킷 림프종과 같은 EBV-관련의 종양류, NSCLC, 및 캐슬만병 같은 혈액 세포 종양들을 치료하는데 특히 효과적일 것으로 생각된다. IL-1 α 염증성 세포가 침투된 종양이나 IL-1 α 를 발현하는 종양을 가진 질병이 또한 표적이 될 수 있다. 개선될 수 있는 종양과 관련된 질병의 특별한 특성으로는, 종양 크기(예를 들어, T0, Tis, 또는 T1-4), 전이 상태(예를 들어, M0, M1), 관찰 가능한 종양의 수, 절 전이(예를 들어, N0, N1-4, Nx), 등급(즉, 등급 1, 2, 3, 또는 4), 단계(예, 0, I, II, III, 또는 IV), 세포나 체액에서 특정 마커의 존재 또는 농도(예를 들어, AFP, B2M, 베타-HCG, BTA, CA 15-3, CA 27.29, CA 125, CA 72.4, CA 19-9, 칼시토닌, CEA, 크로모그라닌 A, EGFR, 호르몬 수용체들, HER2, HCG, 면역 글로불린들, NSE, NMP22, PSA, PAP, PSMA, S-100, TA-90, 및 갑상샘글로불린), 및/또는 관련된 병태들(예를 들어, 복수 또는 부종) 또는 증상들(예를 들어, 악액질, 발열, 거식증, 또는 통증)들이 있다. 퍼센트로 측정할 수 있다면, 개선 정도(퍼센트 단위로 측정 가능한 경우에 한함)는, 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 또는 90% 가 될 수 있다(예를 들어, 종양의 부피 또는 선형 치수).

【0034】IL-1 α 를 표적으로 하는 항체들 및 기타 작용물질들

【0035】피험체에서, IL-1 α 에 특이적으로 결합해서 종양과 관련된 질병의 특질을 감소시키는,

적절한 형태의 Ab 또는 기타 생물학적 작용물질(예를 들어, IL-1수용체 같은 IL-1 α 결합성분을 포함한 융합 단백질)이 본 발명에서 이용될 수 있다. 예를 들어, 이용되는 항 IL-1 α Ab는, mAb, 다클론성 Ab, mAb들의 혼합물 또는 Ab 조각 또는 scFv와 같은, 가공된 Ab-유사 분자가 될 수 있다. Ab의 K_a 는 적어도 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상(예를 들어, $9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, 또는 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 초과)이 바람직하다. 바람직한 구현예로는, 본 발명은, (i) 인간 IL-1 α 에 매우 높은 결합 친화도(예를 들면, 적어도 나노몰 또는 피코몰)를 보이는 항원-결합 가변 영역과 (ii) 불변 영역을 포함하는 완전한 인간 mAb을 이용한다. 비록 IgM, IgA, 또는 IgE 같은 다른 이소타입(isotype)나 IgG2, IgG3, 또는 IgG4 같은 하위 군(subclass)이 될 수도 있지만, 바람직하게는 인간 Ab는 IgG1이다. 특히 유용한 mAb 중 한 예는, 2009년 6월 1일에 출원된, 미국 특허 출원 번호 제12/455,458호에서 설명된 MABp1, IL-1 α -특이 IgG1 mAb 이다. 기타 유용한 mAb로는, MABp1의 적어도 하나 그러나 바람직하게는 모든 CDR들을 포함하는 것이다.

[4] 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

【0054】실시예 1: Xilonix™

【0055】Xilonix™는 안정화된 등장 완충액(pH 6.4)에 들어있는 15 mg/ml MABp1의 살균 주입 가능한 액체 제제이다. 각 유형I 봉규산 유리 혈청 바이알 10 ml에 제제 5 ml가 포함되어 있으며, 20 mm 다이코 플루로텍(Daikyo Flurotec) 부틸 고무 마개와 제거할 수 있는 알루미늄 씰로 봉인되어 있다. 이 제품은, $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 에 저장되며, 잠시 이동 시, 실온이 허용된다.

【0061】실시예 2: IL-1 α -특이 MAb(Xilonix™)으로 대장암 치료

【0062】사람 피험체는 전이성 대장암(KRAS 돌연변이 양성) 진단을 받은 63세 여성이었다. Xilonix™로 치료를 하기 전에, 피험체는 우측 결장 반절제술을 받았으며, T3N1MX 단계로 보고되었다. 그녀는 이후 약 6개월 동안 총 12주기로 폴폭스(FOLFOX)를 사용해 보조 항암 화학 요법을 받았다. 폴폭스 완료 후 약 2달쯤에 PET CT 검사를 한 결과, 그녀의 골반에서 덩어리가 보였다. 피험체는 종양 때문에 명확히 폐쇄성 수신증이 생겨, 요관에 스텐트를 설치하기 위해 그 당시 입원했다. 그녀는 그후 짧게 폴피리(FOLFIRI)와 아바스틴(Avastin)으로 시작하였고 8주기로 치료를 받았다. 피험체는 이후 재단계 설정용 PET CT 검사를 받았는데, 골반에 질병을 확인하였으며, 전이성 질병과 일치하는 소형 폐 결절들이 또한 보였다. 흉부, 복부 및 골반에 대한 CT 검사에서 12cm 크기의 골반 내 덩어리, 2cm 크기의 장막 내 덩어리, 요관 스텐트와 관련된 우측에서 수신증이 보였다. 그녀는 폴피리와 아바스틴을 추가로 2주기를 받았다. 이후 PET CT 검사는 양측 폐 결절들의 진행을 보였다. 피험체는 그리고 나

서 이리노테칸(irinotecan)과 에비투스(Erbix[®])(Cetuximab) 치료를 시작했다. 후속 PET CT 검사는 폐에서의 질병의 진행을 보여 주었다.

【0063】피험체는 1상 시험을 독실(Doxil[®])(Doxorubicin Liposomal), 벨케이드(Velcade[®])(Bortezomib) 및 켄자(Gemzar[®])(Gemcitabine)로 시작했지만, 불행하게도 첫번째 재단계 설정에서 질병의 진행이 보고되었다. 그녀는 또한 아자시티딘(azacitidine)과 결합한 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 또 다른 1 상 시험을 완료했으며, 질병 진행 전에 2주기를 완료했다. 이 최종 임상 1상 시험에 그녀가 참여하도록 결론이 났으며, 피험체는 현 임상시험에 등록되었다.

【0064】그녀는 첫 번째 용량 코호트(0.25 mg/ml)에 참여하고 프로토콜에 따라 5-21 일 주기를 완료하여, 매 21일 마다 총 5회의 MABp1(0.25 mg/kg)를 받았다. 피험체의 용량은 주기 6의 1일에는 0.75 mg/kg으로 증가되었다. 초기 PET CT 검사는 추적 중인 환자에서 종양의 직경들의 합이 약 17% 감소했음을 보였다. MABp1 의 추가 용량들 이후, 환자의 추적되는 종양의 직경들의 합이 30% 이상 감소됨을 보였다. 흉부 CT도 이전에 3.5 cm 로 측정되었던 기관 옆 림프절이 주기 6 종료 시, 2.9 cm로 감소되었음을 보였다. 왼쪽 폐 전이는 2.2 cm에서 1.9 cm로, 왼쪽 직근의 이식물 (implant)은 3.2 cm에서 2.7 cm로 감소하였다. 기준치가 81인 CEA 종양 마커는 주기 3 종료 시 69.2로 줄었고, 주기 7의 1일에는 27.9가 되었다. 이 환자는 71주 이상 동안 치료를 계속해 오고 있으며, 질병은 안정된 상태로 유지되고 있다.

【0066】실시에 3: IL-1 α -특이 MAb(Xilonix[™])으로 코인두암 치료

【0067】피험체는 조직학적 하위 유형의 림프상피종(이전 용어) 또는 비-각질화 암종을 가진 EBV+(엡스타인-바 바이러스) 코인두 암종을 가진 47세의 중국계 남자였다. 피험체는 이전에 시스플라틴(cisplatin), 5-FU, 방사선 치료, 탁소티리(Taxotere[®])(Docetaxel), 켄자(Gemzar[®])(Gemcitabine), 젤로다(Xeloda[®])(Capecitabine), 입양 EBV-지향성 T 세포의 전달, 그리고 사이메빈(Cymeve[®])(Ganciclovir)를 켄자 (Gemzar[®])(Gemcitabine)와 조합하여 치료를 받았다. 치료를 시작하기 전에, 환자는 피로, 발열과 발한을 보였고, 복수에 대해 자주 치료성 천자술을 받았다.

【0068】피험체는 매 2주씩 0일에 1.25 mg/kg IV 상태로 MABp1 치료를 시작했다. 3일과 4일경에는, 피험체의 피로, 발열, 그리고 발한의 현저한 감소가 보였다. 복수도 또한 해결되었다. 복부 CT로 복부 검사를 했을 때, 암덩어리 중 하나에서 1일에 50.4mm에서 36일에 35.8mm로, 전이성 간 종양의 크기가 감소함(거의 30% 감소)을 보였다. 여러 다른 간 병변의 크기는 감소했고, 뼈 병변은 안정상태를 보였다.

【0070】실시에 4: IL-1 α -특이 MAb(Xilonix™)으로 캐슬만 증후군 치료

【0071】피험체는 캐슬만병(POEMS 증후군으로 알려진 변형)으로 고생하는 55세 여성이었다. 그녀의 증상은 피로, 부종과 신경 통증을 보였다. 리툭산(Rituxan®) (Rituximab)과 조사용 항 IL-6 요법을 이용한 이전 치료는 실패했다. 피험체는 매 21일 마다 총 4회의 MABp1(0.75 mg/kg) 주입이 이루어졌다. 피험체의 용량은 다음 주기에서 1.25 mg/kg 로 증가되었다.

【0072】이 피험체는 2번의 재단계 설정(re-staging)을 통해 안정된 질병 상태를 가졌고, 4개월 이상에 걸쳐 처리되었다. 각각의 주입 후 약 2주 동안, 피로, 부종 및 신경 통증에 대한 그녀의 증상들은 뚜렷이 개선되었고, 다음 주사 때까지 점차적으로 재발하였다. 그녀의 RECIST 단계 설정(staging) 기준은, 첫 재단계 설정 때는 림프절의 크기가 2% 증가했지만, 두 번째 재단계 설정 때는 림프절의 크기가 4% 증가함을 보였다.

【0073】7주기를 완료한 후, 피험체는 또 다른 실험적 치료를 시도해 보기 위해, 치료에 대한 동의를 철회했다. 8주 동안의 연구를 종료한 후, 피험체 내과의사는 "빠른 질병의 진행" 때문에 그녀가 MABp1를 이용한 치료의 재개를 허가받도록 요청했다. 재개 치료 때문에, 피험체의 질병은 안정 상태였고, 그녀는 58주 이상에 걸쳐 연구가 진행되고 있다.

【0075】실시에 5: IL-1 α -특이 MAb(Xilonix™)으로 NSCLC 치료

【0076】피험체는 미세 바늘 흡인으로 진단한 결과, 전이성 비소 세포 폐암의 병력을 가진 84세 여성이었다. 진단 후 3개월째에, 피험체는 타세바(Tarceva®)(Erlotinib)로 8개월 동안 치료를 진행했는데, 이 시점에 질병 진행이 보고되었다. 피험체는 이후 8개월 동안 알림타(Alimta®)(Permetrexed)를 11주기로 치료하였으며, 이 시점에 불확실한 병인에 의한 신부전이 발생으로 치료가 중단되었다. 여섯 달 후, 진행성 질병이 보고되었고, 환자는 다시 타세바(Tarceva®)(Erlotinib)로 3개월 동안 치료를 받았다. 그때, 그녀의 CAT 검사는 폐의 오른쪽 상단 엽 덩어리의 크기가 증가한, 더 진행된 질병, 전이들과 일치하는 폐 결절, 그리고 증가한 흉곽내 선증을 보였다.

【0077】피험체는 이후 질로닉스(Xilonix™)를 사용하는 시험에 등록되었다. MABp1(3.75 mg/kg)가 9주기 동안 매 21일 마다 정맥주사로 주입되었다. 치료 후, 약 30주 동안, 안정된 병 상태가 보고되었고, 가장 최근 재단계 설정(restaging)에서, 우측 폐 병변이 공동(cavitating)의 상태임이 보였다.

【0079】실시에 6: IL-1 α -특이 MAb(Xilonix™)으로 비소 세포 폐암 치료

【0080】피험체는 0일에 폐에서 KRAS-양성 비소 세포(선암종) 암으로 진단된 52세 여성이었다. 14일에서 PET/CT 검사는 4 x 3.5 cm 크기의 좌측 상위 엽 덩어리를 보였는데, 폐와 힐라(hilar) 림프절, 우측 서혜 림프절, 우측 부신, 4번째 우측 갈비뼈, 엉치엉덩 관절로 전이된

질병 상태였다. 피험체는 검사 후, 몇 주에 걸쳐 카보플라틴(Carboplatin), 파클리탁셀(Paclitaxel)과 베바시주맙(Bevacizumab)로 치료를 시작했다. 피험체는 좋은 초기 반응을 보였으며, 첫 번째 치료 후 약 5개월에, 진행하기 전에 5주기를 마쳤다. 그 다음 6개월에 걸쳐, 피험체는 3주기의 도세탁셀(Docetaxel)과 한 주기의 카보플라틴(Carboplatin)와 페메트렉세드(Pemetrexed) 혼합 치료를 받았다. 이 치료에도 불구하고, 그녀는 계속 진행되었다.

【0081】피험체는 이후 MABp1 치료를 시작했다. 단지 4일 후에, 피험체는 두통의 악화를 경험하기 시작했다. 이들은 초기에 축농증에 기인하지만, MRI는 뇌 전이를 보였다. 조사자는 이것들이 치료의 시작 전에 있었던 것으로 생각하지만, 피험체는 감마 나이프 방사선 치료를 받기 위해, 단지 한 용량의 MABp1 치료 후 연구를 멈췄다. 피험체는 초기 MABp1 치료 후, 20일 후속 추적 상태로 관찰되었고, 그녀의 증상들 중에서 흉통이 감소하는 주관적인 개선이 보고되었다. 이것 때문에, 조사자는 흉부 X-레이를 조사했는데, 이 조사는 단지 1회 치료 후에 "그녀의 폐 병변의 크기에서 분명한 감소"를 보였다. 중단이 문제화 됐고, 피험체는 치료를 재개하였다. 초기 MABp1 치료 후, 46일에, 피험체는 재단계 설정을 받았고, RECIST 기준에 의해 등급이 정해졌으며, 병변의 전체 직경의 합에서 6% 감소했다.

선행발명 1의 주요 내용

기술분야

[0003] 본 발명은 일반적으로 면역학, 염증, 암, 혈관 장애, 및 의약 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 인터류킨-1 α (IL-1 α)에 특이적으로 결합하는 항체(Ab), 및 비정상적인 IL-1 α 발현과 연관된 병리(pathology)를 치료하거나, 예방하거나 검출하기 위해 이러한 Ab를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0004] IL-1 α 는 염증, 면역 반응, 종양 전이, 및 조혈을 포함한 수많은 상이한 활동에서 역할을 하는 전(pro-)염증성 사이토카인이다. IL-1 α 에 대한 IgG 자가항체는 일반적인 인간 집단에서 천연적으로 발생하고, 아테롬성 동맥경화증과 같은 질환에서 유익한 것으로 생각된다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 (i) 인간 IL-1 α 에 대해 매우 높은 결합 친화도를 나타내는 항원-결합 가변 영역, 및 (ii) C1q 결합을 통해 보체계를 활성화시키고 몇몇 상이한 Fc 수용체에 결합하는 데 효과적인 불변 영역을 포함하는 완전 인간 단일클론 Ab(mAb)의 개발에 기초한다. 본원에 기재된 IL-1 α 특이적 mAb는 인간 IL-1 α 에 특이적인 가변 영역을 갖는 인간 IgG4 mAb의 불변 영역을 인간 IgG1 mAb의 불변 영역으로 대체함으로써 만들어졌다.

[0006] 이에, 본 발명은 인간 IL-1 α 에 특이적으로 결합하는 정제된 인간 IgG1 mAb를 특징으로 하며, mAb는 경쇄에 공유 결합된 중쇄를 포함한다. 중쇄는 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 경쇄는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 일 양태에서, 본 발명은 (i) 인간 IL-1 α 에 대해 매우 높은 결합 친화도를 나타내는 항원-결합 가변 영역, 및 (ii) C1q 결합을 통해 보체계를 활성화시키고 몇몇 상이한 Fc 수용체에 결합하는 데 효과적인 불변 영역을 포함하는 완전 인간 mAb를 특징으로 한다. 인간 Ab는 바람직하게는 IgG1이다. Ab의 K_a 는 바람직하게는 적어도 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 또는 그 이상(예를 들어 $9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 또는 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 초과)이다.

[0036] 본 발명은 세포를 인간 IL-1 α -특이적 mAb 와 접촉시키는 단계 및 세포에 결합된 mAb 를 검출하는 단계에 의해 샘플 내 인간 IL-1 α -발현 세포를 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 세포를 인간 IL-1 α -특이적 mAb 와 접촉시키는 단계에 의해 인간 IL-1 α -발현 세포를 사멸화시키는 방법을 제공한다. 이러한 사멸화는 보체-매개 사멸화, Ab-의존적 세포-매개 세포독성, 또는 세포독소의 Ab-매개 전달에 의해 달성될 수 있다. 본원에 기재된 Ab 는 또한 다른 방법에 유용한 것으로 제시되었다. 예를 들어, MABp1 은 내피 세포상에서 IL-1 α 유도 ICAM1 및 E-셀렉틴 발현을 저하시켜 왔다. MABp1 은 또한 생물학적 샘플에서 IL-1 α 를 검출하고 정량화하기 위해 면역검정법에서 사용되는 것으로 제시되어 왔다.

실시에 4

암세포의 Ab-매개 사멸화

[0046] 표준 Ficoll Paque 제제에 의해 연층으로부터 분리된 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 RPMI-1640 CM 또는 rhIL-2(30 ng/ml, ebioscience)를 함유하는 RPMI-1640-CM에서 37°C 및 5% CO₂로 하룻밤 동안 배양하였으며, 이펙터 세포(E)로 사용되었다. THP1 세포들은 표적(T)으로 사용되었다. 검정은 96-웰 플레이트에서 각 점에서 3회씩 수행되었다. 15 분 동안 다른 농도의 MABp1과 함께 1×10^4 표적들을 인큐베이션한 이후에, 작동 세포들은 25:1 및 50:1의 ET 비율로 1×10^4 표적들에 첨가되었으며 4시간 더 인큐베이션되었다. 75 μ l의 검정법 부피를 새로운 96웰 플레이트로 옮기고, 세포독성을 LDH 세포독성 검출 키트(Roche)를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 검정하였다. % 특이적 용해=(평균 실험적 방출-항체 없는 평균 자발적 방출) $\times 100$ /(표적으로부터의 평균 최대 방출-표적으로부터의 평균 자발적 방출) A. 비처리된 PBMC를 이펙터 세포로서 사용하였다. B. rhIL-2-처리된 PBMC를 이펙터 세포로서 사용하였다. 두 경우 모두에서, MABp1의 농도를 증가시키면(1.25에서 20 μ g/ml로) 양쪽 ET 비율에서 표적 세포 사멸화가 증가하게 되었다.

실시에 7

MABp1은 기저막 매트릭스로의 종양 세포 침범을 저해한다

[0051] 기저막 매트릭스인 마트리겔(BD)을 4°C에서 밤새 해동시키고, 혈청 무함유 냉각 세포 배양 배지 내 희석물(5 mg/ml 내지 1 mg/ml)이 있었다. 100 μ l의 희석된 마트리겔을 24웰 트랜스웰(Costar)의 상부(upper) 챔버 내로 배치하고, 트랜스웰을 겔화를 위해 37°C에서 적어도 4시간 내지 5시간 동안 인큐베이션하였다. 종양 세포(MDA-MB-231 및 THP-1)를 트립신/EDTA에 의해 조직 배양 플라스크로부터 수확하고, 배양 배지로 세척하고, 1% FBS를 함유하는 배지에 1×10^6 개 세포/ml의 밀도로 재현탁시켰다. 겔화된(gelled) 마트리겔을 가온 혈청 무함유 배양 배지로 부드럽게 세척하고, 100 μ l의 세포 현탁액을 각각의 웰에 첨가하

였다. 트랜스웰의 하부(lower) 챔버를 600 μ l의 배양 배지로 채우고, 플레이트를 37°C에서 12시간 내지 24시간 동안 인큐베이션하였다. 매트릭셀을 침범하지 않은 세포를 각각의 트랜스웰의 상부에서 면봉으로 부드럽게 긁어내었다. 이어서, 트랜스웰을 24웰 플레이트로부터 제거하고, 침범된 세포를 70% 에탄올 또는 메탄올로 고정한 후 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 침범된 세포를 광 현미경 하에 계수하였다. 매트릭셀을 침범하는 세포의 퍼센트는 MABp1의 존재 하에 유의하게 저해되었다.

실시에 8

MABp1은 내피 세포에서 ICAM1 발현의 증가를 차단한다

[0052] 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)(BD Biosciences)를 24웰 플레이트에 저혈청 성장 보충제(Invitrogen)로 보충된 1 mL의 M-200 배지에서 웰당 5×10^5 개로 시딩하였다. 세포를 3시간 내지 4시간 동안 침강되게 하였다. 배지를 흡인하고, 1 mL의 신선한 M-200을 웰당 첨가하였다. MABp1을 세포에 4.26 μ g/mL로 직접 첨가하고, 실온에서 15분 동안 공동인큐베이션한 다음, 재조합 인간 IL-1 α (rhIL1A, eBioscience)를 40 pg/mL의 최종 농도까지 첨가하였다. 양성 대조군은 IL-1 α 만 첨가되었다. IL-1 α 의 부재 또는 MABp1의 부재 하에서의 HUVEC 세포는 음성 대조군으로서 역할을 하였다. 37°C, 5% CO₂에서 17시간내지 20시간 인큐베이션한 후, 세포를 CellStripper 시약(Cellgro Mediatech)을 사용하여 20분 동안 비효소적 처리에 의해 플레이트로부터 들어낸 다음, 표준 유세포분석법 프로토콜을 사용하여 CD54(ICAM-1) 발현에 대해 즉시 검정하였다. 염색 완충액은 2% 가열-불활성화된 우태 혈청이 보충된 Dulbecco's PBS를 포함하였다. PE-접합 마우스 항-인간 CD54(ICAM-1) mAb(eBioscience, 클론 HA58) 또는 PE-접합 마우스 IgG1k 이소타입 대조군(eBioscience, #12-4714)을 제조업체의 설명서에 따라 사용하여 실온의 암실에서 20분 동안 100 마이크로리터 염색 부피에서 HUVEC 세포를 염색하였다. 후속적으로 염색 완충액에서 2회 세척을 수행한 다음, 샘플을 FACSCalibur 유세포분석기(BD Biosciences) 상에서 획득하였다. 몇몇 독립적인 실험(n=5) 후, HUVEC 세포의 표면 상에서 rhIL1A에 의해 유도된 ICAM-1 접착 분자의 상향조절은, 비자극 HUVEC 세포에 의해 나타난 기준선 수준까지 MABp1에 의해 중화되었다.

실시에 9

MABp1은 내피 세포에서 E-셀렉틴 발현의 증가를 차단한다

[0053] ICAM-1 유도에 미치는 이의 효과와 유사하게, HUVEC 세포 상에서 CD62E(E-셀렉틴)의 유도의 MABp1-매개 중화를 또한 관찰하였다. 이 효과는 HUVEC 세포가 가용성 rhIL-1 α 에 의해서가 아니라 DG44 CHO 세포(GPI-IL1A 세포)의 표면에 글리코실-포스파티딜이노시

톨에 의해 앵커링된 막성 IL-1 α 에 의해 자극되었을 때 가장 두드러졌다. 이 실험에서, 6웰 플레이트 내 HUVEC 세포의 합류성(confluent) 배양물을 M-200 배지에서 단독으로, 10 μ g/mL MABp1의 존재 하에, 또는 10 μ g/mL D5 이소타입 대조군 Ab의 존재 하에 5 $\times$ 10⁶ GPI-IL1A DG44 세포와 함께 밤새 공동배양하였다. 17시간 내지 20시간 후, HUVEC 단층을 Dulbecco's PBS로 광범위하게 세척한 다음, CellStripper 시약(Cellgro Mediatech)을 이용하여 20분 동안 비효소적 처리에 의해 들어낸 다음, 표준 유세포분석법 프로토콜을 사용하여 CD62E(E-셀렉틴) 발현에 대해 즉시 검정하였다. 염색 완충액은 2% 가열-불활성화된 우태 혈청이 보충된 Dulbecco's PBS를 포함하였다. PE-접합 마우스 항-인간 CD62E mAb(eBioscience, 클론 P2H3) 또는 PE-접합 마우스 IgG1k 이소타입 대조군(eBioscience, 클론 P3)을 제조업체의 설명서에 따라 사용하여 실온의 암실에서 20분 동안 100 마이크로리터 염색 부피에서 HUVEC 세포를 염색하였다. 후속적으로 염색 완충액에서 2회 세척을 수행한 다음, 샘플을 FACSCalibur 유세포분석기(BD Biosciences) 상에서 획득하였다. 막성 GPI-IL-1 α 에 의해 유도된 HUVEC 세포의 표면 상에서의 상향조절된 E-셀렉틴 발현은, 비자극 HUVEC 세포에 의해 나타난 기준선 수준까지 MABp1에 의해 중화되었다.

선행발명 2의 주요 내용

① 요약

환자를 암 치료로서 항-IL-1 α 항체 또는 항-IL-1 α 면역화로 치료한다.

② 청구범위

청구항 1

암을 치료하는 방법으로서, 치료를 필요로 하는 포유류 환자에게 치료적 유효량의 항-IL-1 α 항체를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 환자는 인간인, 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 암은 전이성인, 방법.

③ 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0006] 항체를 이용한 IL-1 α 표적화는 암 치료법으로 사용될 수 있다. 특히, 항-IL-1 α 항체는 종양 전이에서 종양 유래 IL-1 α 가 수행하는 생리학적 역할을 방해함으로써 종양의 전이 가능성을 억제할 수 있다. 더욱이 IL-1 α 는 종양에서 발현되기 때문에 IL-1 α 를 표적으로 하는 항체는 항체 지휘(directed) 세포성 세포독성(보통 ADCC 라고 함)을 통해 직접적인 종양 세포 독성을 유발할 수 있다.

[0007] 인터류킨-1 알파(IL-1 α)가 암 치료법을 위한 표적일 수 있음은 예상치 못한 것이다.

[0009] 그러므로, 항-IL-1 α 항체를 이용한 동물의 처리가 공격성 형태의 암으로부터 동물을 보호할 수 있다는 것은 상당히 예상치 못한 것이다. 유사하게는, 항-IL-1 α 항체 역가를 유도하기 위한 동물의 면역화는 종양으로부터 동물을 보호할 수 있다. 작용 메커니즘은 아직 명확하지 않으며, 항체 지휘 세포독성(ADCC) 또는 보체 매개 사멸화(ADCK)를 통한 숙주 전종양(pro-tumor) IL-1 α 생산의 중화, 종양 IL-1 α 생산의 중화 또는 종양의 직접적 세포독성 중 하나 이상의 조합을 수반할 수 있다.

[0010] 발명에 따라 처리될 수 있는 환자는 인간과 비인간 포유류, 예컨대 애완 동물, 실험 동물, 동물 모델(예를 들어 고양이, 개, 양, 돼지, 염소) 등을 둘 다 포함한다.

실시에 1

[0023] 동물 및 종양 세포

[0024] 데이터는 무흉선 nu/nu 마우스(8 주령 내지 10 주령, NCI, Frederick, Md.)를 사용하여 생성되었다. 마우스에게 200 μ l 의 DMEM 에 현탁된 5×10^6 개 종양 세포로 옆구리에 피하 주사하였다. 본 발명자들은 IL-1 α 가 종양 세포 생존력에 대한 일반적인 메커니즘을 제공할 것으로 예상하기 때문에, IL-1 α 를 발현하는 것으로 이전에 제시된 유방(MDA-MB-436 또는 MDA-MB-231, 문헌[Nozaki et al. Biochem Biophys Res Comm 275, 60-62 (2000)]) 또는 전립선(PC-3, 문헌[Chung et al. The Prostate 38:199-207 (1999)]; 문헌[Singer C F et al. Clin Cancer Res. 2003 Oct. 15; 9(13):4877-83]) 계열(lineage)로부터 유래된 종양 세포로 동물을 주사하여 항-IL-1 α 를 이용한 저해에 대해 몇몇 종양 세포주를 시험하였다.

[0025] 마우스에게 마우스 항-인간 IL-1 α 항체를 주사하여 종양 IL-1 α 생산을 길항시켰다. 마우스는 5 mg/kg IgG1 단일클론 항체(클론 364-3B3-14, BioLegend) 또는 5 mg/kg IgG2a 단일클론 항체(클론 1F3B3, ProMab)를, 종양 이식일에 또는 적어도 약 3 mm³ 의 1 차 종양 병변의 증거 후에 출발하여 주당 2 회 복강내 투여받는다. 2 개의 다른 그룹의 마우스는 내인성 IL-1 α 생산을 중화시키기 위해 IgG1 단일클론 항체 또는 IgG2a 단일클론 항체뿐만 아니라 5 mg/kg 의 항-마우스 항-IL-1 α 단일클론 항체(햄스터 항-마우스 IL-1 α 는 BD PharMingen(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)으로부터 구매됨)를 받는다.

[0026] 동물은 과도한 종양 부담으로 인해 인도적 이유로 보다 이르게 희생되지 않는 한 56 일 동안 살아 있도록 유지되었다. 매주 동물 체중을 기록하고, 관찰 가능한 종양 부피를 측정하였다. 명백한 종양-관련 이환율(morbidity)(체중 손실, 무기력)이 있을 때 동물을 희생시켰다. 마우스를 CO₂ 챔버를 사용하여 희생시켰다. 전이를 수확하고, 복부 및 복막강 및 간, 림프절, 비장 및 폐를 포함한 주요 기관의 철저한 검사 후에 별개로 보관하였다. 총 종양 질량을 계산하였다. 생존율 및 종양 부담 결과를 평균 $\pm$ SE 로서 표현하였다.

실시예 4

[0032] aIL-1 α 항체는 전이 발생률을 저하시킨다.

[0033] 확립된 전이성 종양을 보유하는 nu/nu 마우스를 PBS, 5 mg/kg 의 *m*_a*h*IL-1 α b, 또는 5 mg/kg 의 *h*_a*m*IL-1 α b 와 함께 5 mg/kg 의 *h*_a*m*IL-1 α b 의 복강내 주사로 매주 2 회 처리하였다. $\times 10^6$ 개의 MDA-MB-436 또는 PC-3 종양 세포를 피하 주사한 2 개 그룹의 종양 보유 마우스를 사용하였다. 종양 세포의 피하 주사일에 또는 3 mm³ 의 종양 성장 후에 출발하여 매주 2 회 항체를 주사하였다. 표 1 을 참조한다.

(그림 삽입을 위한 여백)

표 1

실험 설계 및 동물 수의 설명				
	PBS	$ma_hIL-1\alpha + ha_mIL-1\alpha$	$ma_hIL-1\alpha$	$ha_mIL-1\alpha$
D1MDA-MB436	6	6	6	6
D1PC-3	6	6	6	6
EstMDA-MB436	6	6	6	6
EstPC-3	6	6	6	6

[0034] 가시적인 종양 콜로니를 희생 시 기관 상에서 계수하였다. 표면 간 전이의 수를 조직 검사에 의해 결정하여 종양 병소를 시각화하였다. 횡경막, 장(intestine) 및 복막 벽 그리고 림프절 상의 전이성 병소의 수를 유사한 방식으로 결정하였다.

[0035] 유방 종양 모델에서, 가시적인 림프절, 폐 및 간 전이는 $ma_hIL-1\alpha$ 를 이용한 처리에 의해 또는 $ma_hIL-1\alpha$ b+ $ha_mIL-1\alpha$ b 를 이용한 조합 처리에 의해 저하되었다. 단지 10%의 항-IL-1 α 처리된 마우스에서의 복수 형성과 대조적으로 100%의 대조군 처리된 마우스는 복수를 발생시켰다. 유사한 관찰이 전립선 종양 모델에서 이루어졌고, 여기서 $ma_hIL-1\alpha$ 또는 $ma_hIL-1\alpha$ b+ $ha_mIL-1\alpha$ b 를 받고 있는 마우스는 전이성 부담을 저하시켰다. 유방 종양 모델과 전립선 종양 모델 둘 다에서, $ha_mIL-1\alpha$ b 가 투여된 마우스는 희생 시 전이에서 어떠한 뚜렷한 저하를 보여주지 않았다. 표 2 를 참조한다.

표 2

aIL-1 α 항체를 이용한 처리에 의한 이중이식된 종양의 제어				
	PBS	$ma_hIL-1\alpha + ha_mIL-1\alpha$	$ma_hIL-1\alpha$	$ha_mIL-1\alpha$
D1MDA-MB436				
복수	6(100)	0(0)	1(17)	4(66)
림프절	6(100)	1(17)	2(33)	6(100)
복막	6(100)	0(0)	1(17)	6(100)
간	6(100)	1(17)	3(50)	6(100)
EstMDA-MB436				
복수	6(100)	0(0)	0(0)	4(66)
림프절	6(100)	4(66)	5(83)	6(100)
복막	6(100)	3(50)	5(83)	6(100)
간	6(100)	3(50)	5(83)	6(100)
D1PC-3				
복수	6(100)	0(0)	0(0)	3(50)
림프절	6(100)	0(0)	3(33)	5(83)
복막	6(100)	1(17)	2(33)	6(100)
간	6(100)	0(0)	1(17)	6(100)
EstPC3				
복수	6(100)	0	0	5(83)
림프절	6(100)	3(50)	3(50)	6(100)
복막	6(100)	4(66)	2(33)	6(100)
간	6(100)	3(50)	2(33)	6(100)

[0036] 모든 PBS-처리된 마우스를 제50일에 희생시켰고, 반면 어떠한 aIL-1 α -처리된 마우스도 60일 후에 유방 또는 전립선 이종이식된 종양에 굴복하지 않았다. 종양 발현된 IL-1 α 또는 내인성(주로 백혈구) 유래 IL-1 α 를 표적화하는 aIL-1 α 치료는 유방 또는 전립선 이종이식된 암을 보유하는 마우스에서 전이성 부담을 저하시킨다. 종양 발현된 IL-1 α 를 표적화하는 aIL-1 α 처리는 통계적으로 더 강력한 항종양 효과를 가지며, 반면 조합된 항종양 및 항-내인성 aIL-1 α 항체 처리는 유방 또는 전립선 종양을 보유하는 nu/nu 마우스에서 전이성 종양 성장의 거의 완전한 차단을 제공한다. 도 1을 참조한다.

[0037] *mah*IL-1 α , *ham*IL-1 α 또는 두 항체의 조합을 투여받은 동물은 질병의 임상 경과 중증도가 감소했다. 모든 대조 동물은 결국 빈사 상태를 나타내 연구가 끝나기 전에 희생이 필요하다. 대조적으로, *mah*IL-1 α + *ham*IL-1 α 를 투여받은 동물은 외모가 예외적이지 않고 그루밍이 양호하고 활동적이며 어떠한 스트레스 징후도 보이지 않고 정상적인 성장과 체중 증가를 나타내며 모두 실험 기간 동안 생존한다. 그러나 항체 조합을 투여받은 생쥐에서는 장기에 대한 사후 부검 조사를 통해 관찰할 수 있는 전이성 병변이 나타났다. 이는 치료를 시작하기 전에 전이성 종양이 발생한 동물에서 특히 두드러진다. 확립된 전이성 병변이 발생한 후에만 치료를 받은 마우스는 이후 확립된 병변을 모두 제거할 수는 없는 것으로 보인다. 그러나 이러한 치료를 받은 쥐의 전이성 병변은 뚜렷하게 억제된다.

[0038] 이 효과는 마우스에 유방 또는 전립선 종양을 접종하고 전이성 질환이 감지될 때 동물을 희생시킨 후 분석할 수 있다. 이는 동물이 치료를 받은 질병 과정과 동일하다. 전이성 병변의 풍부함과 크기는 *mah*IL-1 α + *ham*IL-1 α 조합을 투여받은 동물의 사후 관찰된 것보다 이들 마우스에서 눈에 띄게 더 크다. 항체 치료로 인해 확립된 전이성 질환이 퇴행(regression)되는 것으로 보인다.

[0039] 종양 접종 후 제1일에 출발하여 항체 주사를 받는 *mah*IL-1 α + *ham*IL-1 α 처리된 마우스는 발증하는 전이로부터 거의 완전히 예방된다. 유방 또는 전립선 종양 그룹 각각에서 단지 단일 동물(17%)만 전이성 병변을 발증시킨다.

[0042] 종양에서 발현되는 IL-1 α 에 대한 항체는 강력한 항종양 효과를 나타낸다. 항종양-IL-1 α 항체를 투여받은 동물에서의 강한 항종양 효과는 종양 전이에서 IL-1 α 의 생리학적 차단을 포함하는 것으로 보일 뿐 아니라 항체의 직접적인 종양 사멸 작용(tumoricidal action)을 포함할 수 있다. 본 발명자들은, 보체 고정 및 항체 지휘 세포성 세포독성(ADCC)을 효율적으로 유도하는 항체 하위부류인 IgG1 항체를 사용하여 종양-발현 IL-1 α 를 표적화하는 것은 누드 마우스 모델에서 IL-1 α 발현 종양에 대한 상당한 살종양 작용을 나타낼 수 있음을 예상한다. 그러나, 종양-유래 IL-1 α 에 대한 항체의 항종양 효과가 ADCC 또는 다른

세포독성 메커니즘을 통해서만 작동한다면, 2개 항체를 이용한 상승작용 효과에 대한 기대는 있지 않을 것이다. 내인성 IL-1 α 에 대한 항체가 생존율에 영향을 미칠 것이라는 것도 예상치 못한 것이며; 반면, 내인성 IL-1 α 에 대한 항체로 치료된 동물에서 관찰된, 비록 중간 정도지만 일관된 생존율 이익이 있다. *h*a_mIL-1 α 항체를 이용하여 항-내인성 IL-1 α 를 표적화하는 것으로부터 관찰되는 생존율 이익은 인간 IL-1 α 와의 *h*a_mIL-1 α 교차반응성 및 이로써 종양을 직접적으로 표적화한 결과일 수 있다.

[0044] 단일클론 항체를 사용하여 종양 세포에 의한 IL-1 α 생산을 표적화하는 것은 생존율을 연장시키고 전이성 부담을 저하시키는 효과적인 수단이다. IL-1 α 발현 종양의 항체 표적화는 인간 질환 설정에서 잠재적인 치료적 가치일 것이고, 초기 또는 진행성 질환 병기의 수많은 형태의 암에 대한 효과적인 치료 표적을 나타낼 수 있다.