



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0106085
(43) 공개일자 2016년09월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 9/20 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/40 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7020208
- (22) 출원일자(국제) 2014년12월22일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년07월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2014/078969
- (87) 국제공개번호 WO 2015/097140
국제공개일자 2015년07월02일
- (30) 우선권주장
61/920,137 2013년12월23일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
앵스티띠 파스퇴르
프랑스공화국 파리 세텍스 15 에프-75724 튀 드닥
터르 루 25-28
- (72) 발명자
테제, 자끄스
프랑스 에프-75007 파리 루 드 라 플라체 3
로즈, 티에리
프랑스 에프-75015 파리 루 조지 버나드 쇼 11
부겔트, 플로렌스
프랑스 에프-28000 샤프트르 루 생 브리스 1
- (74) 대리인
김순용

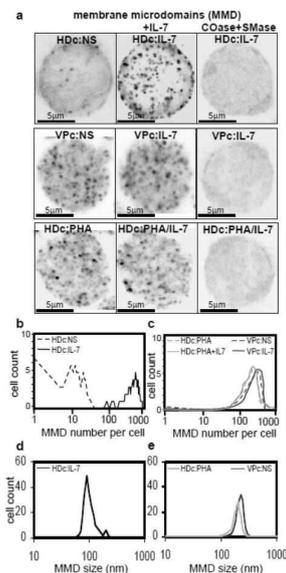
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 치료 방법 및 조성물

(57) 요약

개체의 면역 질환을 진단 또는 치료하기 위한 방법이 제공된다. 방법은 불응상태 유도인자(Refractory State Inducing Factor; RIF)의 검출 또는 조절을 기반으로 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/20 (2013.01)
C12Y 301/01004 (2013.01)
G01N 33/573 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
G01N 2333/92 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/017,457 2014년06월26일 미국(US)
14174599.2 2014년06월26일
유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

이를 필요로 하는 개체에 있어 면역 반응을 조절하는데 사용하기 위하여 GIBsPLA2의 양 또는 활성을 조절하는 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 GIBsPLA2 억제제 또는 리간드인 것인 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물은 상기 면역 반응을 유도 또는 자극하는 것인, 화합물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 GIBsPLA2 억제제 또는 리간드는 항-GIBsPLA2 항체 또는 이들의 유도체, 억제 핵산, 수용성 수용기, 펩티드, 또는 작은 약물로부터 선택된 것인, 화합물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 GIBsPLA2 억제제 또는 리간드는 재조합 및 합성적으로 제조된 결합 파트너, 인간 항체 또는 인간화된 항체(humanized antibody) 또는 이들의 단편뿐만 아니라, 항-GIBsPLA2 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, F(ab')₂ 및 Fab 단편으로부터 선택된 이들의 단편, 단사슬 가변 단편(single-chain variable fragments; scFvs), 단일 도메인 항체 단편(VHhs 또는 Nanobodies), 2가 항체 단편(디아바디; diabodies)로부터 선택된 것인, 화합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 개체의 CD4 T 세포를 유도 또는 자극하기 위해 사용하는 것인, 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 면역-결핍 또는 면역-억제된 것인, 화합물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 감염성 질병을 갖는 것인, 화합물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 개체는 바이러스성 감염을 갖는 것인, 화합물.

청구항 10

이전 청구항 중 한 항에 있어서, HIV-감염된 개체의 AIDS를 치료하기 위해 사용하는 것인, 화합물.

청구항 11

제10항에 있어서, HIV-매개된 면역결핍을 억제하거나 반전시키기 위한 것인, 화합물.

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 암을 갖는 것인, 화합물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 화합물은 GIBsPLA2 작용제 또는 활성제이며, 상기 화합물은 면역 반응을 감소시키는 것인 화합물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 GIBsPLA2 작용제 또는 활성제는 GIBsPLA2 단백질 또는 이들의 단편인 것인, 화합물.

청구항 15

제13항 또는 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 병리학적 또는 비정상적인 면역 반응에 의해 유발되는, 바람직하게는 자가면역 질환, 염증성 질환, 암, 두드러기(urticarial), 습진(eczema), 알러지(allergy), 또는 천식(asthma)으로부터 선택된 질병을 갖는 것인, 화합물.

청구항 16

제1항 또는 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 개체의 이식편 거부반응(graft rejection)을 감소시키거나 GVHD를 감소시키기 위해 사용하는 것인, 화합물.

청구항 17

이전 청구항 중 한 항에 있어서, 상기 화합물은 주사(injection), 바람직하게는 근육내(intramuscular), 피하(subcutaneous), 경피(transdermal), 정맥내(intravenous) 또는 동맥내(intraarterial) 주사에 의해; 비강(nasal), 구강(oral), 점막(mucosal), 직장(rectal) 투여에 의해 또는 흡입(inhalation)에 의해 투여되는 것인, 화합물.

청구항 18

GIBsPLA2 조절제 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 19

이를 필요로 하는 개체의 면역계를 조절하기 위해 사용하는, 항-GIBsPLA2 면역 반응을 유도하는 면역원.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 면역원은 인간 또는 동물 GIBsPLA2 단백질, 단백질 단편 또는 펩티드, 또는 이들의 항원 단편 또는 구조적 유사체(mimotope)를 포함하는 것인, 면역원.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 면역원은 자유로운 형태, 중합된, 또는 화학적 또는 물리적으로 변형된, 및 /또는 담체에 결합된 것인, 면역원.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원은 에피토프와 결합된 것인, 면역원.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원은 항체의 중화를 유도하는 것인, 면역원.

청구항 24

항-GIBsPLA2 면역 반응을 유도하는 면역원, 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제 및, 선택적으로, 에피토프를 포함하는 백신 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 면역원은 GIBsPLA2 단백질 또는 펩티드, 또는 이들의 항원 단편 또는 구조적 유사체를 포함하는 것인, 면역원.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 GIBsPLA2 단백질 또는 이들의 항원 단편 또는 구조적 유사체는 자유로운 형태, 중합된, 또는 화학적 또는 물리적으로 변형된, 또는 담체에 결합된 것이며, 선택적으로 에주번트와 결합된 것인, 백신 조성물.

청구항 27

하기를 포함하는 T 세포 변형과 관련된 인간 면역 결핍을 진단하기 위한 방법:

- (a) 개체로부터 체액 또는 조직 단편 또는 세포를 포함하는 시료를 제공하는 단계, 및
- (b) 시료에서 GIBsPLA2를 검출 또는 정량하는 단계.

청구항 28

제조함 세포로서, 상기 세포 또는 이들의 전구세포(ancestor)는 GIBsPLA2를 암호화하는 핵산을 포함하도록 변형된 것인, 세포.

청구항 29

GIBsPLA2의 발현, 및 GIBsPLA2의 수거를 허용하는 조건 하에서 제28항의 세포를 배양하는 단계를 포함하는, GIBsPLA2를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이를 필요로 하는 개체의 면역계를 조절하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 더욱 상세하게는 면역 반응의 주요 내인성 인자의 존재와 특성을 개시하며 이 인자의 조절에 기반한 신규한 치료 및 진단 방법과 조성물을 제공한다. 본 발명은 특히 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus; HIV) 감염과 관련된 면역결핍을 포함하는 면역결핍을 감시하기 위한 방법 및 조성물뿐만 아니라 개체의 CD4 T 세포-매개 면역 반응을 자극하거나 억제하기에 적절한 조성물 및 방법을 제공한다. 또한 제공된 것은 구체적으로 이러한 면역결핍을 치료할 수 있는 약물을 개발하기 위한 방법뿐만 아니라 항레트로바이러스 치료 후 지속되는 CD4 T-세포-결핍을 진단 및 분석하기 위한 방법 및 조성물이다.

배경 기술

[0002] CD4 T 림프구는 면역계(세포성 및 체액성 반응 모두)를 조절하는데 탁월한 역할을 하며 다양한 질병 상태에서 중요하다.

[0003] HIV 발병과 관련된 면역학적 질병 중 모든 CD4 T 세포의 0.5% 미만이 실제로 감염되지만(말초 혈액에서 측정된 바와 같이), CD4 T 세포의 대다수는 주요 조절 장애를 나타낸다. 감염되지 않은 CD4 T 림프구는 점진적으로 그 기능을 잃어 면역성이 결핍(nergic)되고, 그 수의 감소는 CD4 림프구 감소(lymphopenia)를 유발한다. 면역성 결핍과 림프구 감소는 HIV-감염된 환자를 특징하는 면역결핍의 특징이다. 이러한 현상의 메커니즘은 충분히 밝혀진 적이 없다(1).

[0004] 면역 활성화 및 염증은 또한 HIV 발병시 중요한 역할을 한다(2, 3). 본 발명자들은 이전에 인터루킨-2(interleukin-2; IL-2)에 대한 민감성 감소는, CD4 면역성 결핍으로 이어지고(4), 인터루킨-7(IL-7)에 대한 민감성 감소는 IL-7/CD4 조절 루프를 방해함으로써, CD4 림프구 감소로 이어지는 메커니즘에 참여함을 증명하였다(5). 연관된 메커니즘은 야누스 키나아제(Janus kinase; Jak)/신호전달 및 전사 활성화 인자(Signal Transducer and Activator of Transcription; STAT) 경로의 결합에 기인하였다(6, 7). 유사한 결과가 다른 실험실에서 얻어졌다(8, 9). 이와 관련하여, IL-7 수용기(IL-7R)의 구획화(compartmentalization)는 정상 CD4 T 세포 반응의 개시를 위해 요구된다(10). IL-7 결합에 있어서, IL-7R(IL-7R 알파 및 감마-c)의 두개의 사슬은 먼저 막 미세영역(membrane microdomains; MMD)으로 가게된다. 이들은 지질 뗏목(lipid rafts)처럼 콜레스테롤 및 스펅고미엘린(sphingomyelin)에 풍부한 세포 구획이나, 이들은 또한 매우 많은 양의 구조적 및 기능적 단백질을 포함하

고 있다(11). IL-7R 복합체는 세포 골격의 재구성을 유도하며, 그 후 이의 망상구조(meshwork)와 상호작용한다. 이들 두개의 연속적인 단계는 Jak/STAT 경로의 개시를 위해 요구될 수 있다(12).

[0005] 본 발명자들은 바이러스 혈증성(viremic) HIV-감염된 환자(VP)의 CD4 T 림프구의 불감응성 뒤의 메커니즘을 조사하였다. 본원에 제공된 실험은 CD4 T 림프구의 만성 활성화가 인터루킨-7에 의해 전달되는 것과 같은 특정 생리학적 신호에 불응하도록 하는 활성화/분화의 비정상적인 상태를 유도한다는 것을 증명한다. 또한, 본 발명은 CD4 T 세포 활성화의 비정상적인 상태의 원인인 단백질의 인간 혈장으로부터의 식별, 분리 및 특정화를 보고한다. 따라서, 본 발명은 먼저, 발현에 있어 CD4-T 세포의 변형 및 활성화를 유도할 수 있고, 억제에 있어 개체의 면역계를 자극할 수 있는, 내인성 순환 단백질에 의해 면역억제가 매개될 수 있음을 개시한다.

[0006] 이 놀라운 발견에 부분적으로 기반하여, 본 발명은 이제 면역계를 조절하기 위한, 특히 변형된 면역(예를 들어; 면역-억제된 또는 병리학적 면역 반응)을 갖는 개체의 면역계를 조절하기 위한 새로운 방법, 조성물 및 화합물을 제공한다. 본 발명은 또한 CD4 T 세포 조절에 의해 면역 질환을 치료하기 위한 신규한 방법을 제공한다. 본 발명은 특히 HIV-감염과 관련된 면역결핍 증후군과 같은 CD4 T 세포 손상과 연결된 면역결핍을 치료하기에 적합하다. 본 발명은 또한 비정상적인 활성화 상태, IL7에 대한 반응성을 특정하기 위한 및/또는 HIV 감염된 환자의 손상된 면역 반응을 감지하기 위한 시약 및 방법을 제공한다. CD4 T 세포의 반응은 항레트로바이러스성 약물로 비처리 또는 처리된 환자에서 평가될 수 있으며, 치료에 대한 이들의 반응을 제한하고 이들의 CD4 T 세포의 능력을 평가할 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RMM, Paul WE (2002) CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? Nat Med 8(4):319-323.
- (비특허문헌 0002) Catalfamo M, et al. (2008) HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. PNAS 105(50):19851-19856.
- (비특허문헌 0003) Armah KA, et al. (2012) HIV status, burden of comorbid disease and biomarkers of inflammation, altered coagulation, and monocyte activation. Clin Infec Dis 55(1):126-36.
- (비특허문헌 0004) David D, et al. (1998) Regulatory dysfunction of the Interleukin-2 receptor during HIV-infection and the impact of triple combination therapy. PNAS 95:11348-11353.
- (비특허문헌 0005) Colle JH, et al. (2006) Regulatory dysfunction of the interleukin-7 receptor in CD4 and CD8 lymphocytes from HIV-infected patients - effects of antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 42(3):277-285.
- (비특허문헌 0006) Kryworuchko M, Pasquier V, Theze J (2003). Human Immunodeficiency Virus - 1 envelope glycoproteins and anti-CD4 antibodies inhibit Interleukin-2 induced Jack/STAT signaling in human CD4 T lymphocytes. Clinical and Experimental Immunology 131(3):422-427.
- (비특허문헌 0007) Landires I, et al. (2011) HIV infection perturbs IL-7 signaling at the step of STAT5 nuclear relocalization. AIDS 25(15):1443-1453.
- (비특허문헌 0008) Vranjkovic A, Crawley AM, Patey A, Angel JB (2011) IL-7 dependent STAT-5 activation and CD8+ T cell proliferation are impaired in HIV infection. J Leukoc Biol 89(4):499-506.
- (비특허문헌 0009) Benoit A, et al. (2009) Inverse association of repressor growth factor independent-1 with CD8 T cell interleukin (IL)-7 receptor [alpha] expression and limited signal transducers and activators of transcription signaling in response to IL-7 among [gamma]-chain cytokines in HIV patients. AIDS 23(11):1341-7.
- (비특허문헌 0010) Rose T, et al. (2010) Interleukine-7 compartmentilizes its receptor signaling complex to initiate CD4 T lymphocyte response. J Biol Chem 285(20):14898-14908.
- (비특허문헌 0011) Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. Science

327(5961):46-50.

(비특허문헌 0012) Tamarit B, et al. (2013) Membrane microdomains and cytoskeleton organisation shape and regulate the IL-7-receptor signalosome in human CD4 T-cells. J Biol Chem.

(비특허문헌 0013) Beq S, et al. (2004) HIV infection: pre-highly active antiretroviral therapy IL-7 plasma levels correlate with long term CD4 cell count increase after treatment. AIDS 18(3):563-5.

(비특허문헌 0014) Rose T, Lambotte O, Pallier C, Delfraissy JF, Colle JH (2009) Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1 infected patients. J Immunol 182(12):7389-97.

(비특허문헌 0015) Sauce D, Elbim C, Appay V (2013) Monitoring cellular immune markers in HIV infection: from activation to exhaustion. Curr Opin HIV AIDS 8:125-131.

(비특허문헌 0016) Younes SA, et al. (2003) HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin-2 producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. J Exp Med 198:1909-1922.

(비특허문헌 0017) Sirskyj D, Theze J, Kumar A, Kryworuchko M (2008) Disruption of the gamma c cytokine network in T cells during HIV infection. Cytokine 43(1):1-14.

(비특허문헌 0018) Pallikkuth S, Parmigiani A, Pahwa S (2012) The role of interleukin-21 in HIV infection. Cytokine 23(4-5):173-80.

(비특허문헌 0019) Vingert B, et al. (2012) HIV Controllers maintain a population of highly efficient TH1 effector in contrast to patients treated in the long term. J Virol 86(19):10661-10674.

(비특허문헌 0020) Sandler NG, Douek DC (2012) Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. Nat Rev Microbiol 10(9):655-66.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 목적은 GIBsPLA2의 양(예를 들어, 발현) 또는 활성을 조절하는 화합물에 개체를 노출시키는 단계를 포함하는, 개체의 면역 반응을 조절하는 방법에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명의 추가적 목적은 GIBsPLA2의 양(예를 들어, 발현) 또는 활성을 조절하는 화합물에 개체를 노출시키는 단계를 포함하는, 개체의 면역 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0010] 본 발명의 추가적 목적은 개체의 GIBsPLA2의 양(예를 들어, 발현) 또는 활성을 조절하는 단계를 포함하는 개체의 면역 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0011] 본 발명의 또다른 목적은 개체의 면역 반응을 조절 또는 면역 질환을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한, GIBsPLA2의 양(예를 들어, 발현) 또는 활성을 조절하는 화합물의 사용에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명의 또다른 목적은 개체의 면역 반응의 조절 또는 면역 질환의 치료방법에 사용하기 위한 GIBsPLA2 조절제에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명의 또다른 목적은 개체의 백혈구를 조절하기 위해 사용하기 위한 GIBsPLA2 조절제에 관한 것이다.
- [0014] 제1 구현예에서, 본 발명은 개체의 면역 반응을 유도 또는 자극하기 위해 사용되며, 상기 개체의 GIBsPLA2를 억제하는 단계, 또는 GIBsPLA2 억제제에 개체를 노출하는 단계를 포함한다. 이러한 구현예는 특히 면역-결핍 개체 또는 자극된 면역을 필요로 하는 개체(예를 들어, 감염성 질병, 암, 등)를 치료하기에 적합하다.
- [0015] 본 발명의 특정 목적은 따라서 개체의 면역 반응의 자극 방법이며, 상기 개체의 GIBsPLA2를 억제하는 단계 또는 GIBsPLA2 억제제에 개체를 노출시키는 단계를 포함한다.
- [0016] 본 발명의 추가적 목적은 개체의 감염성 질병의 치료 방법에 관한 것으로, 상기 개체의 GIBsPLA2를 억제하는 단

계 또는 GIBsPLA2 억제제에 개체를 노출시키는 단계를 포함한다.

- [0017] 본 발명의 구체적인 구현에는 HIV-감염된 개체의 AIDS의 치료 방법에 관한 것으로, 상기 개체의 GIBsPLA2를 억제하는 단계 또는 GIBsPLA2 억제제에 개체를 노출시키는 단계를 포함한다.
- [0018] 특정 구현예에서, 억제제에 개체를 노출시키는 단계는 개체에 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 또다른 구현예에서, 억제제에 개체를 노출시키는 단계는 GIBsPLA2에 대하여 개체를 예방 접종하는(vaccinating) 단계를 포함한다.
- [0019] 이와 관련하여, 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체의 면역계를 자극하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 GIBsPLA2에 대하여 개체를 예방 접종하는 단계를 포함한다.
- [0020] 또다른 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체를 예방 접종하기 위해 사용하는 GIBsPLA2 항원에 관한 것이다.
- [0021] 또다른 측면에서, 본 발명은 개체의 원치 않는 또는 해로운 면역 반응을 감소 또는 억제하기 위해 사용되며, 상기 개체의 GIBsPLA2를 유발 또는 증가시키는 단계, 또는 GIBsPLA2 작용제 또는 활성제에 개체를 노출시키는 단계를 포함한다. 이러한 구현예는 비정상적인 및/또는 병리학적 면역 반응(예를 들어, 자가-면역 질환, 염증, 두드러기(urticarial), 습진(eczema), 알러지(allergies), 천식(asthma), 등)을 갖는 개체를 치료하기에 특히 적합하다.
- [0022] 추가적 측면에서, 본 발명은 CD4 T 세포 변형과 관련된 인간 면역결핍을 진단하기 위한 방법을 제공한다. 일부 구현예에서 방법은 하기를 포함한다: (a) 개체로부터 채혈, 바람직하게는 혈장을 포함하는 시료를 제공하는 단계, 및 (b) 시료에서 GIBsPLA2의 존재를 검출하는 단계. 상기 방법의 일부 구현예에서 면역결핍은 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염과 관련된 면역결핍이다. 일부 구현예에서 방법은 GIBsPLA2에 대해 특이적인 항체를 갖는 시료와 접촉하는 단계를 포함한다. 상기 방법의 일부 구현예에서, 시료 내 GIBsPLA2의 존재는 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)에 의해 검출된다.
- [0023] 또다른 측면에서, 본 발명은 후보 면역결핍 치료제를 식별하기 위한 방법을 제공한다. 일부 구현예에서 면역결핍은 CD4 T 세포 변형과 관련된다. 상기 방법의 일부 구현예에서, CD4 T 세포 변형과 관련된 인간 면역결핍은 바이러스성 감염, 특히 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염에 의해 유발된다. 일부 구현예에서 방법은 하기를 포함한다: (a) 제제의 존재시 GIBsPLA2와 CD4 T 림프구를 접촉시키는 단계, (b) GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화를 측정하는 단계, 및 (c) 제제의 존재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치와 제제의 부재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치를 비교하는 단계. 방법의 일부 구현예에서, 만일 제제의 존재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치가 제제의 부재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치보다 낮은 경우, 제제는 후보 면역결핍 치료제로서 식별된다. 방법의 일부 구현예에서, 만일 제제의 존재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치가 제제의 부재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치보다 낮지 않은 경우, 제제는 후보 면역억제 치료제로서 식별된다. 일부 구현예에서 방법은 CD4 T 세포당 MMD의 수를 판단함으로써 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화를 측정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서 방법은 CD4 T 세포에서 MMD의 직경의 평균을 판단함으로써 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화를 측정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서 방법은 CD4 T 세포의 IL-7 민감성을 판단함으로써 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화를 측정하는 단계를 포함한다.
- [0024] 또다른 측면에서, 본 발명은 GIBsPLA2 조절제 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, GIBsPLA2 조절제는 GIBsPLA2 억제제이며, 더 바람직하게는 항체 또는 단편 또는 이들의 유도체, 억제 핵산, 펩티드 또는 작은 약물로부터 선택된다. 또다른 특정 구현예에서, GIBsPLA2 조절제는 GIBsPLA2 작용제 또는 활성제이며, 더욱 구체적으로 GIBsPLA2 단백질이다.
- [0025] 또다른 측면에서, 본 발명은 GIBsPLA2 항원(예를 들어, 면역성 GIBsPLA2 단백질 또는 항원결정부위(에피토프)-포함 이들의 단편), 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제 및, 선택적으로, 에쥬번트를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, GIBsPLA2 항원은 (i) 인간 개체의 면역성을 증가 및/또는 (ii) 이의 생물학적 활성이 감소되도록 처리된 GIBsPLA2 단백질 또는 이들의 단편이다.
- [0026] 본 발명은 임의의 포유동물에서 사용될 수 있다. 이는 특히 인간 개체에서 사용되기 적합하다. 이는 임의의 포유동물에서 면역 반응을 증가시키기 위해 사용될 수 있으며, 이는 특히 면역-억제된 개체에서 강한 CD4-T 세포 활성을 유도하기에 적합하다.

도면의 간단한 설명

[0027]

도 1a 내지 1e는 임의의 자극 전, VP의 CD4 T 세포가 IL-7에 의해 영향을 받지 않는 많은 거대 막 미세 영역을 갖는 활성화의 비정상적인 상태를 보임을 나타낸다.

(a) 막 미세 영역(MMD)은 콜레라 독소 서브유닛 B(CtxB-AF488)으로 표지하고 STED 현미경에 의해 분석하였다. 위에서부터 아래까지, HD, VP 및 PHA-활성화된(40 µg/ml, 30분) HD T 세포로부터 CD4 T 세포를 정제하였다. 각 군에서 IL-7 자극(2 nM, 15분) 전 후 대표적인 CD4 T-세포의 상단 절반은 Z-stack 연속 이미지로 나타내었다. CD4 T 림프구를 또한 IL-7에 의한 자극 전 콜레스테롤 옥시다아제(cholesterol oxidase)(COase, 31 µM, 25분) 및 스펅고미엘리나아제(sphingomyelinase)(SMase, 2.7 µM, 5분)로 처리하였다.

(b, c) MMD는 정제된 CD4 T 세포의 전체 표면상에서 그 수가 계수되었다. 50개의 세포의 평균을 조사하였다. (b) IL-7 자극 전(HDc: NS) 및 후(HDc: IL-7)의 HD 세포. (c) IL-7 자극 전(VPc: NS) 및 후(VPc: IL-7)의 VP 세포, IL-7 자극 전(HDc: PHA) 및 후(HDc: PHA/IL-7)의 PHA-활성화된 HD 세포.

(d, e) MMD 크기는 정제된 CD4 T 세포의 표면에서 측정되었다 (d) IL-7-자극된 HD 세포(HDc: IL-7), (e) IL-7-자극된 VP 세포(VPc: IL-7) 및 IL-7-자극된 PHA-전-활성화된 HD 세포(HDc: IL-7).

도 2a 내지 2c는 VP CD4 T-세포의 IL-7R 사슬은 IL-7에 의해 영향을 받지 않는 계면활성제-내성 미세영역(detergent-resistant microdomains; DRM)에 내포됨을 나타낸다. 정제된 CD4 T 림프구는 용해되고(0.5% Triton X-100) 용해물의 200 µl를 5-40% 수크로오스 구배(sucrose gradient)에 담았다. 40 °C에서 16시간 동안 원심 분리(50krpm) 후, 18 분획을 수거하였다(#1 왼쪽 = 튜브 상단 = 5% 수크로오스; #18 오른쪽 = 튜브 바닥 = 40% 수크로오스). 각 분획은 SDS-PAGE(7% acrylamide-bis)에서 분석하였다. Flottilin, IL-7R 알파 및 감마-c는 면역블롯팅으로 검출하였다(10).

(a) Flottilin은 DRM 및 고-밀도 분획 외부 래프트에 따른 저밀도 분획을 나타내는 마커로서 사용된다.

(b) IL-7R알파 및 (c) 감마-c 밴드는 정제된 비-자극된 HD CD4 T-세포(HDc: NS), IL-7-자극된 HD 세포(HDc:IL-7), 비자극된 VP 세포(VPc:NS) 및 PHA-활성화된 HD 세포(HDc:PHA)를 나타낸다.

도 3a 내지 3e는 IL-7R 기능이 VP CD4 T-세포의 막 미세영역에서 변형됨을 나타낸다.

(a) 도 7에서 전개된 IL-7R알파에 대한 이차원 유효 확산률 D_{eff} 을 측정하였다. 확산률은 또한 다양한 약물을 첨가한 후 측정하였다: COase(31 µM, 30분) 및 SMase(2.7 µM, 5분)(CO/SM), Col(10 µM, 30분) 및 CytD(20 µM, 30분)(CytD/Col), 또는 모든 이들 억제제(모든)의 존재시. PHA-활성화된 HD CD4 T 세포(HDc: PHA)와 마찬가지로 HD(HDc) 및 VP(VPc)의 CD4 T 세포를 연구하였다. 막대는 5개의 독립적인 실험의 SEM을 나타낸다. 추가 실험 데이터는 도 8에 나타내었다.

(b) IL-7-유도된 인산화 및 STAT5의 핵 전위는 염소 항-래빗-Atto642로 표지된 래빗 포스포-STAT5로 표지되고 펄스-STED 현미경(0.5 µm slices)으로 분석하였다. 실험은 정제된 비자극된 HD CD4 T 세포(HDc: NS), IL-7-자극된 HD CD4 T 세포(HDc: IL-7), 비자극된 VP CD4 T 세포(VPc: NS), IL-7-자극된 VP CD4 T 세포(VPc:IL-7), PHA-활성화된 HD CD4 T 세포(HDc:PHA) 및 IL-7에 의해 자극된 PHA-활성화된 HD CD4 T 세포(HDc:PHA/IL-7)를 포함하였다. 콜키신(colchicin) 및 시토크알라신 D(cytochalasin D)의 효과는 왼쪽 패널에 나타낸다.

(c, d, e) IL-7 자극 후, 세포질에서의 포스포-STAT5 출현의 동력학(kinetics) 및 핵에서의 축적을 이미지J 소프트웨어를 이용하여 측정하였다. (c) HD CD4 T 세포(검은색 선) 및 Col 및 CytD으로 처리된 HD CD4 T 세포(파란색 선), (d) VP CD4 T 세포(빨간색 선) 및 (e) PHA-활성화된 HD CD4 T 세포(초록색 선).

도 4a 내지 4d는 VP의 혈장이 MMD의 수로써 측정한 바와 같이 HD CD4 T 세포에서 비정상적인 활성화 패턴을 유도함을 나타낸다.

(a) VP(HDc: VPp), HIC(HDc: HICp) 또는 ART 환자(HDc: ARTp)의 혈장(10%)으로 처리된 HD CD4 T 세포의 대표적인 이미지를 나타낸다. MMD를 콜레라 독소(CtxB-AF488)로 염색하였다. 각 군에서 IL-7 자극(2nM, 15분) 전(왼쪽) 및 후(오른쪽)의 Z-stack 이미지로부터 대표적인 CD4 T-세포의 상단 절반을 나타낸다.

(b) MMD는 5개의 다른 VP(VPp1 내지 VPp5)의 혈장(10%)에 의해 CD4 T-세포(HDc)의 표면에서 유도된다. 결과는 IL-7 자극 전(흰색) 및 후(파란색)의 50개의 세포의 분석으로부터 얻었다. 평균값 및 사분위를 나타낸다.

(c) IL-7 자극 후(파란색) 및 전(흰색)의 HD(HDp), VP(VPp), HIC(HICp) 및 ART 환자(ARTp)의 혈장의 효과의 비

교.

(d) c에 나타낸 혈장으로 얻은 투여량(0.01% 내지 10%)-반응. HDc CD4 T-세포의 표면에서 유도된 MMD의 수를 나타낸다. VP 혈장의 효과는 일반 빨간색 선으로 나타낸다.

도 5a 내지 5d는 VP의 혈장이 HD CD4 T 림프구에서 IL-7-유도된 STAT5 인산화 및 포스포-STAT5의 핵 전위를 억제함을 나타낸다.

(a) IL-7 자극 전, 정제된 HD CD4 T 세포를 혈장(10%)과 함께 전-배양하였다. 그 후 IL-7-유도된 인산화 및 포스포-STAT5의 핵 전위를 펄스-STED 현미경(0.5 μm slice)으로 측정하였다. 다음 혈장(10%)을 연구하였다: 대조군(HDc: NS), VP(HDc: VPp), HIC(HDc: HICp) 및 ART 환자(HDc: ARTp).

(b) 5개의 다른 VP(10%)의 혈장으로 전-처리된 IL-7-자극된 HD CD4 T-세포의 세포질(파란색) 및 핵(빨간색)에서 회복된 포스포-STAT5의 분석.

(c) IL-7-자극된 HD CD4 T 세포에서 혈장(10%) 전-배양의 효과의 비교. HD(HDp), VP(VPp), HIC(HICp) 및 ART 환자(ARTp)의 혈장.

(d) IL-7-자극된 HD CD4 T-세포에서 포스포-STAT5 핵 전위의 억제에 의해 측정된 바와 같이 혈장으로 얻은 투여량(0.01%-10%)-반응. VP 혈장의 효과는 일반 빨간색 선으로 나타낸다.

도 6a 내지 6d는 VP 혈장에서 회복된 불응상태 유도인자(Refractory State Inducing Factor; RIF)의 분자적 특징을 나타낸다.

(a) 트립신, DNase, RNase 및 PNGase에 의한 VP 혈장의 처리. RIF 활성은 MMD의 수 및 HD CD4 T-세포에서 IL-7-유도된 핵 포스포-STAT5에 대한 효과를 측정함으로써 확인하였다.

(b) RIF MW는 세파텍스 G100 컬럼에서 겔 여과에 의해 측정하였다. HD CD4 T-세포에서 RIF 활성은 컬럼의 다른 분획에 의해 유도된 MMD의 수를 측정함으로써 확인하였다(진한 빨간색 곡선). 각 분획은 VP 혈장의 폴리클로날 항체를 이용하여 도트 블롯에 의해 바이러스성 단백질의 존재를 위해 시험되었다. HD 혈장으로 얻은 배경값을 감하였다. 실험은 3번 반복하였다.

(c) RIF MW는 또한 세파텍스 G100 컬럼상에서 겔 여과 후 측정하였으며 이의 활성은 FACS에 의해 측정된 바와 같이 IL-7-유도된 포스포-STAT5의 억제로 이어졌다. 최대 IL-7-유도된 포스포-STAT5의 백분율을 기록하였다. 각 분획의 단백질의 양 또한 기록하였다. 실험은 2번 반복하였다.

(d) 다음 등전점(Isoelectric point)을 측정하였다. 세파텍스 G100 컬럼으로부터 용출된 RIF를 음이온(MonoQ) 또는 양이온(MonoS) 교환 컬럼에 채웠다. RIF 활성은 pH-단계 완충액에 의해 용출되었다. HD CD4 T-세포상의 MMD의 수는 pH에 대하여 도시하였다.

도 7a 내지 7c는 HD, VP 및 IL-7-자극된 HD 세포로부터 정제된 CD4 T 세포에서 IL-7 시그날로솜(signalosome)의 2D 겔 분석을 나타낸다. (a) 비-자극된(NS) HD CD4 T-세포. (b) VP CD4 T-세포. (c) IL-7-자극된 HD CD4 T-세포.

도 8a 내지 8g는 HD, VP 및 PHA-자극된 HD 세포로부터 정제된 CD4 T 세포의 표면에서 IL-7R알파의 확산 속도의 분석을 나타낸다. (a, d) HD CD4 T-세포의 표면에서, (b, e) VP CD4 T 세포의 표면에서, (c, f) PHA(1 μg/ml)로 전-활성화된 HD CD4 T 세포의 표면에서. (g) MMD 억제제 또는 세포골격 억제제 처리 전 및 후 MMD에 포함된 IL-7R알파 확산의 메커니즘의 도식.

도 9a 내지 9d는 HD CD4 T 세포상의 RIF의 작용 및 IL-7 불감응성의 메커니즘의 가상적 모드의 도식적 표현을 나타낸다. RIF는 비 기능성인 비정상적인 MMD를 유도한다. IL-7 시그날로솜은 따라서 변형되고 세포는 VP CD4 T 세포에서처럼 사이토카인에 대해 무반응으로 남는다. RIF-유도된 HD CD4 T 세포 및 VP CD4 T 세포에서 비정상적인 활성화 패턴 및 신호 결합은 구별하기 어렵다. 도식의 왼쪽 부분은 HD에서 IL-7 신호 전달의 메커니즘의 다른 단계를 나타낸다(10, 12).

(a) 휴지(resting) CD4 T 세포에서, IL-7 인식 전, IL-7R 사슬은 연관되어 있으나 이들의 세포질내 영역은 멀리 떨어져 있으며 신호 분자 Jak1 및 Jak3는 상호작용하지 않는다.

(b) IL-7-활성화된 CD4 T 세포에서, IL-7R은 정상적 MMD(90 nm의 직경)에서 구분되며 시그날로솜(signalosome)은 기능적이 된다. 세포골격 조직화(organization)한 후, STAT5A 및 STAT5B는 IL-7R/Jak1/Jak3 복합체와 접

축하여 인산화되고 이전에 논의된 마이크로튜브을 따라 이동함으로써 핵으로 이동한다(12).

도식의 오른쪽 부분은 RIF의 활성화의 가상적 메커니즘을 나타낸다. 활성화의 제안된 메커니즘은 예비 데이터 및 VP(비공개된 데이터)로부터 정제된 CD4 T 세포에서 특정된 변형을 갖는 RIF-유도된 결합의 비교로부터 유래된다.

(c) RIF는 많은 큰 비정상적인 MMDs를 유도한다. IL-7R는 비정상적인 MMD에 포함되며 기능적 시그널로섬을 유도하기 위한 이들의 능력은 변형된다.

(d) RIF-처리된 HD CD4 T 세포는 IL-7에 대하여 무반응성이다. Jak1 및 Jak3는 감소된 운동성에도 불구하고 STAT5를 인산화하나, 포스포-STAT5는 세포골격의 부재 및 미세소관 조직화로 인하여 핵으로 이동하지 않는다.

패널 a, b, c 및 d는 CtxB: AF488(CW-STED에서 Z-stack의 half pile)로 표지된 MMD의 STED 현미경 이미지를 나타낸다. 패널 b 및 d는 래빗 항-튜블린/염소 항-래빗-Atto642로 염색된 튜블린, 마우스 항-액틴/염소-항-마우스-Chr494로 염색된 액틴 및 래빗 항-포스포-STAT5/염소-항-래빗-Atto642로 염색된 포스포-STAT5를 나타낸다. 펄스-STED 현미경은 메탄올-투과된 CD4 T-세포의 0.5 μm 슬라이스를 나타낸다. IL-7 자극 후, RIF-처리된 HD CD4 T 림프구의 MMD 세포질 영역의 액틴은 구조화된 패드로서 농축을 실패하고 HD에서와 다르게, 핵 주위에 피질을 형성하지 않는다. 또한, VP CD4 T 세포에서와 같이, 이들 RIF-처리된 HD CD4 T 세포에서 튜블린은 세포질 및 핵 막과 결합하는 중요한 로드(rods)가 된다는 가정이 세워진 미세소관을 형성하는데 실패함으로써 STAT5 핵 전좌에 필수적이다.

결합의 요약: 동그라미쳐진 숫자 1, 2, 3 및 4는 RIF-처리된 HD T 세포에서 비정상적인 활성화 패턴 및 IL-7 불감응성과 관련된 다른 결합이 있는 단계를 나타낸다: (1) 2D-겔에 의해 설명되는 신호 복합체의 비정상적인 단백질 패턴, (2) STED 현미경에 의해 나타난 큰 MMD와 같은 비정상적인 막 구조, (3) 확산 운동성 및 STED 현미경에 의해 측정된 바와 같은 비정상적인 세포골격 조직화, 및 (4) STED 현미경에 의해 나타난 비정상적인 신호 중간체 및 포스포-STAT5 핵 전위의 억제.

도 10: PLA2sGIB는 건강한 공여자(healthy donors; HD)의 CD4 T 세포에서 IL-2 유도된 PStat5 핵 전위를 억제한다: 4개의 건강한 공여자로부터 정제된 휴지 CD4 T 세포를 37 °C에서 30분 동안 5개의 VP(VP63, VP68, VP69, VP74 및 VP75) 및 대조군으로 사용된 3개의 HD 유래의 3% 또는 1% 혈장과 함께 처리하였다. 필요시에는 37 °C에서 15분 동안 2nM IL-2으로 자극되었다. 전체 CD4 T 세포에서 (a) 및 CD4+ CD25+ T 세포에서 (b), IL-2 전(파란색 점) 및 후(빨간색 점)에서 평균 및 SD와 함께 핵 PStat5에 대해 양성 세포의 백분율을 나타낸다. 래빗 항 인간 PStat5(pY694) 다음 당나귀 항 래빗 IgG-Die light 405로 간접적으로 염색한 후 레이저 주사 공초점 현미경(Laser Scanning Confocal Microscopy; LSM 700, Zeiss)을 이용하여 PStat5의 세포 내 위치를 확인하였다. 총 CD4 T 세포를 염소 항 인간 b-튜블린 다음 당나귀 항 염소 IgG-AF555으로 염색하였다. CD25+ CD4 T 세포를 마우스 항 인간 CD25 다음 당나귀 항 마우스 IgG-AF488로 표적하였다.

도 11: PLA2sGIB는 건강한 공여자(HD)의 CD4 T 세포에서 IL-4 유도된 PStat6 핵 전위를 억제한다: 4개의 건강한 공여자로부터 정제된 휴지 CD4 T 세포를 37 °C에서 30분 동안 5개의 VP(VP63, VP68, VP69, VP74 및 VP75) 및 대조군으로 사용된 3개의 HD 유래의 3% 또는 1%의 혈장과 함께 처리하였다. 필요시에는 37 °C에서 15분 동안 2nM IL-4로 자극되었다. 전체 CD4 T 세포에서 IL-2 전(파란색 점) 및 후(빨간색 점)에서 평균 및 SD와 함께 핵 PStat6에 대해 양성 세포의 백분율을 나타낸다. PStat6의 세포 내 위치는 래빗 항 인간 PStat6(pY694) 다음 염소 항 래빗 IgG-AF488로 간접적으로 염색한 후 레이저 주사 공초점 현미경(LSM 700, Zeiss)을 이용하여 확인하였다. 총 CD4 T 세포를 마우스 항 인간 a-튜블린 다음 염소 항 마우스 IgG-AF647로 염색하였다.

도 12: 돌연변이 pPLA2GIB H48Q의 활성화의 부재.

도 13: 야생형 복제 돼지 PLA2 GIB 및 이의 돌연변이 H48Q의 활성화의 비교. A: 비정상적인 막 미세 영역(aMMD)의 유도; B: 포스포STAT5(pSTAT5의 NT)의 IL-7 유도된 핵 전위에 대한 효과.

도 14는 세파로오스 비즈에 결합된 염소 항-PLA2의 G1B 항체를 갖는 바이러스 혈증성 환자의 혈장의 처리를 나타낸다. 초록색: VP68; 분홍색: VP69; 파란색: VP LJT. 처리(실온에서 30분) 후 혈장을 시험하였다:

- a. 비정상적인 MMD/세포를 나타내는 CD4 T 세포의 백분율을 콜레라 독소 B(CtxB-AF488)로 염색한 후 측정하였다
- b. pSTAT5의 핵 전위를 IL-7 자극 후 측정하고 양성 핵의 백분율을 계산하였다.

도 15: MMD의 유도 및 NT pSTAT5의 억제에 대한 항-PLA2 GIB 항체의 효과.

도 16 : 수용성 PLA2G1B 마우스 수용기(sMR)는 PStat5의 핵 전위에 대하여 양성 세포의 백분율로 나타내는, 건강한 공여자의 CD4 T 세포의 IL-7에 대한 반응에 있어 인간 PLA2G1B(huPLA2G1B)의 활성을 억제한다. 반응의 회복은 하기와 같이 계산한다:

$$100 \times (\% \text{Pos 세포}_{\text{huG1B+sMR}} - \% \text{Pos 세포}_{\text{huG1B}}) / (\% \text{Pos 세포}_{\text{배양 배지}} - \% \text{Pos 세포}_{\text{huG1B}})$$

도 17은 CD4 비-반응성(non-responder)(CD4-NR) 환자의 혈장은 HD CD4 T 세포에서 비정상적인 MMD를 유도한다 - (a) 구조화 조명 현미경(Structured Illumination Microscope; SIM)을 이용하여 얻은 CD4-NR 환자의 혈장 (1%)으로 처리된 HD CD4 T 세포의 이미지. MMD를 콜레라 독소 B(CtxB-AF488)로 염색하였다. 대표적인 CD4 T 세포의 Z-stacks 이미지의 투영(projection)을 나타내었다. IL-7 자극(2nM, 15분) 후 이미지(오른쪽)의 변형은 없다. (b) 5명의 CD4-NR 환자(파란색 곡선, 평균 및 SD) 및 대표적인 바이러스 혈증성 환자(빨간색 곡선)의 혈장으로 얻은 투여량 곡선 반응(0.0001% 내지 1%). 비정상적인 MMD의 수는 HD CD4 T 세포의 표면에서 유도하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명은 이를 필요로 하는 개체의 면역계를 조절하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 구체적으로 면역 반응의 주요 내인성 인자로서 GIBsPLA2의 동정을 개시하며 이 인자의 조절에 기반한 신규한 치료 및 진단 방법 및 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 가정은 주변의 99.5% 이상의 CD4 T 세포가 비감염되었다는 사실에도 불구하고, HIV-감염된 환자의 면역계의 만성적 활성화는 비정상적이며 CD4 T 세포를 CD4 구획의 면역 방어 및 항상성의 많은 측면에서 조절에 관여하는 감마-c 사이토카인에 대해 비반응성인 활성화/분화의 비정상적인 상태가 되도록 한다는 것이다. 이 가정은 발명자들에 의해 평가되며 본 발명은 활성화의 이러한 비정상적인 상태의 성질과 중요성을 설명한다.
- [0030] 더욱 구체적으로, 제1 측면에서, 본 발명은 하기와 같이 요약될 수 있는 상태의 특성을 입증한다: 1) 임의의 자극 전, 바이러스 혈증성 HIV-감염된 환자(VP)에서 모든 CD4 T 세포는 이들의 표면에 많은 거대한 MMD를 갖고, 2) 이들 비정상적인 MMD는 모든 세포의 IL-7R알파 및 감마-c 사슬을 격리시키며 3) 비정상적인 MMD에서 사슬을 격리시키는 것은 기능적 시그널로섬의 형성을 유도하는 이들의 능력을 변형시키고, 4) 이는 STAT5 인산화의 둔화 및 감소와 5) 포스포-STAT5 핵 도입의 감소를 유발한다. VP CD4 T 림프구의 표면 상의 기존의 MMD의 이 비정상적인 패턴은 다수의 결과를 가지며 이는 HIV-감염된 환자에서 면역결핍의 다양한 징후를 설명하는 기본적인 메커니즘이다. IL-7 민감성의 손실은 확인된 CD4 림프구 감소를 설명하는 중요한 인자이다. VP에서 이들 세포의 영구적 손실은 - 아포토시스에 대한 이들의 민감성 및 낮은 수치이나 지속적인 바이러스 증식으로 인한 이들의 파괴로 인하여 - IL-7의 증가된 수치에도 불구하고 보상될 수 없다. 또한, 비기능적 상태에서 비정상적인 MMD가 모든 감마-c 사슬을 격리시키기 때문에, 이는 이들 계열에서 다른 사이토카인의 기능을 막는다.
- [0031] 본 발명은 또한 감염된 개체에서 면역계의 비정상적인 상태의 원인인, 더욱 일반적으로 다양한 병리생리학적 조건에서 면역 반응의 급격한 조절의 원인인 주요 내인성 인자의 동정을 개시한다. VP의 혈장 시료가 건강한 공여자(Healthy Donors; HD) CD4 T 림프구의 비정상적인 활성화를 유도할 수 있는 - 용어 RIF - 활성을 포함하는 것을 실제로 나타내었다. RIF는 실험된 VP의 모든 혈장 시료에서 발견되었다. 활성의 병리생리학적 중요성은 IL-7/IL-7R 시스템이 정상적이고 면역 활성화가 유리한 경우에 HIV 조절(HIC) 환자에서 이의 부재에 의해 증명되었다. RIF는 또한 감소된 면역 활성화, 회복된 IL-7R 기능 및 회수된 CD4 수 > 500 / mm³(5)를 갖는 ART 환자의 혈장에서 부재한다.
- [0032] RIF는 따라서, 특히 CD4 T 림프구의 조절을 통해 면역 반응을 조절하는 주요 인자를 나타낸다. RIF가 체외에서 정제된 VP CD4 T 세포에서 발견되는 것과 구별하기 어려운 HD CD4 T 세포 내 활성화의 비정상적인 패턴을 유도한다는 것은 주목할만하다. 본 발명은 또한 RIF가 군 I B의 분비 포스포리파아제 A2("PLA2 GIB")임을 나타낸다. 본 출원에서 개시된 결과는 (i) PLA2 GIB의 과발현이 강한 면역억제를 유도하고 (ii) PLA2 GIB의 억제제 면역 기능의 주목할만한 증가 또는 자극을 유도함을 나타낸다. GIBsPLA2 억제제는 개체의 혈장에서 면역 세포의 부적절한 상태를 교정할 수 있으며 따라서 포유동물에서 면역결핍 또는 면역 질환을 치료(예를 들어, 예방, 교정)하기 위해 사용될 수 있다. GIBsPLA2 억제제는 또한 CD4 T 세포 수와 기능 유지를 유도, 자극 또는 도움이 될 수 있으며, 이로써 환자에서 효율적인 면역 반응을 자극하는데 도움을 준다. 특히, HIV-감염된 환자에서, ART는 예비용이거나, 보류될 수 있으며, 환자 면역 방어 및 바이러스 사이에 도달할 수 있는 평형이다. ART는 최근 연구에서 제시된 바와 같이, 감염 후 매우 초기에 RIF 억제제와 결합될 수 있으며, 이는 면역계의 임의의 RIF-유도된

변형을 방지할 수 있다. 또한, ART의 일부 최근 실패의 맥락에서, 장기적 ART 후 낮은 CD4 수를 갖는 환자가 이들 억제제로부터 혜택을 받을 수 있다. 따라서, 본 발명은 개체의 GIBsPLA2 발현 또는 활성을 조절함으로써 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 상기 개체에서 GIBsPLA2 활성 또는 발현을 조절하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 개체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다.

[0033] 실시예에서 제공된 데이터는 또한 CD4 T 세포의 HIV-유도된 발병 상태를 나타내는 개체의 혈장에서 RIF의 존재를 증명한다. 따라서, 본 발명은 다른 것들 중, 개체의 혈장에서 RIF의 수치를 검출함으로써 개체의 HIV 감염을 감시 및/또는 진단하는 방법을 제공한다.

[0034] 실시예에서 제공된 데이터는 또한 CD4 T 세포의 HIV-유도된 발병 상태를 나타내는 개체의 T-세포 상에서 막 미세 영역(MMD)의 수 및/또는 크기를 증명한다. 따라서, 본 개시사항은 또한 다른 것들 중, 개체의 T-세포 상에서 막 미세 영역(MMD)의 수 및/또는 크기를 측정함으로써 개체의 HIV 감염을 감시 및/또는 진단하는 방법을 제공한다.

[0035] 실시예에서 제공된 데이터는 또한 HIV 감염된 개체에서 CD4 T 세포 질병 상태를 야기 및/또는 유지하는데 있어 RIF의 역할을 나타낸다. 따라서, 본 개시사항은 또한 제제의 존재시 RIF-유도된 CD4 T 세포 활성화를 측정하는 단계를 포함하는 후보 HIV 치료제를 식별하기 위한 방법을 제공한다. 일부 구현예에서 본 방법은 제제의 존재시 RIF-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치와 제제의 부재시 RIF-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치를 비교하는 단계를 포함한다.

[0036] **정의**

[0037] 핵산 또는 단백질 서열에 적용되는, 용어 "동일성(sequence identity)"은 Smith-Waterman alignment(Smith and Waterman(1981) J Mol Biol 147:195-197), CLUSTALW(Thompson 등(1994) Nucleic Acids Res 22:4673-4680), 또는 BLAST2(Altschul 등(1997) Nucleic Acids Res 25:3389-3402)와 같은 표준화된 알고리즘을 이용하여 나열된 최소한 두개의 서열 사이에 일치하는 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 정량(일반적으로 백분율)을 말한다. BLAST2는 정렬을 최적화하기 위하여 및 이들 사이의 더욱 의미있는 비교를 달성하기 위하여 서열 중 하나에 간격을 삽입하는 표준화된 재현가능한 방법에 사용될 수 있다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, "치료(treatment)" 또는 "치료하다(treat)"는 치료되는 개인의 자연적 과정을 변형하기 위한 시도에 있어 임상적 조작을 말하며, 예방 또는 치료 목적을 위해 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는, 질병의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 완화, 임의의 직접 또는 간접적인 질병의 병리학적 결과의 감소, 전이의 예방, 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선(amelioration) 또는 일시적 완화(palliation), 및 경감 또는 개선된 예후를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 질병 또는 장애의 발전을 지연시키거나 또는 질병 또는 장애의 진행을 느리게 하는데 사용된다.

[0039] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "분리된(isolated)"은 분리 또는 격리되는 이들의 자연적 환경의 구성 요소로부터 제거되는 분자(예를 들어, 핵산 또는 아미노산)를 말하며, 자연적으로 결합되어 있는 다른 구성 요소로부터 최소한 60%, 바람직하게는 75%, 및 가장 바람직하게는 90% 자유롭다. "분리된" 폴리펩티드(또는 단백질)는 예를 들어 이의 자연적 환경의 구성 요소로부터 분리된 폴리펩티드이며, 바람직하게는, 예를 들어, 전기영동(예를 들어, SDS-PAGE, 등전 포커싱(isoelectric focusing; IEF), 모튜브 전기영동(capillary electrophoresis)) 또는 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC) 이동에 의해 판단된 바와 같이 90% 또는 95% 초과 순도로 정제된다. "분리된" 핵산은 이의 자연적 환경의 구성 요소로부터 분리된 및/또는 다른 구조에 이식된(예를 들어, 벡터, 발현 카세트(cassette), 재조합 숙주, 등) 핵산 분자를 말한다.

[0040] "항-GIBsPLA2 항체를 암호화하는 핵산(Nucleic acid encoding an anti-GIBsPLA2 antibody)"은 단일 벡터 또는 분리 벡터 내 핵산 분자(들), 및 숙주 세포 내 하나 이상의 위치에 존재하는 핵산 분자(들)을 포함하는 항체 중쇄(heavy chain) 및 경쇄(light chain)(또는 이들의 단편)를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자를 말한다.

[0041] "개체(subject)"는 포유동물을 말한다. 포유동물의 예시는 인간 및 가축화된 동물(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개, 및 말), 비-인간 영장류(원숭이와 같은), 토끼, 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 랫트)와 같은 비-인간 동물을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0042] "면역 반응의 조절(modulation of an immune response)"은 본 발명의 맥락에서, 면역 세포, 바람직하게는 백혈구(예를 들어, T 림프구, B 림프구, NK, NKT 세포, 대식세포, 수지상 세포)의 양 또는 활성 또는 비율의 임의의 변형을 나타낸다. 특정 구현예에서, 면역 반응의 조절은 T 림프구, 바람직하게는 CD4-T 림프구의 양 또는 활성

의 조절을 포함한다.

- [0043] **불응상태 유도인자(Refractory State Inducing Factor; RIF) 또는 포스포리파아제 A2 군 IB**
- [0044] 용어 RIF는 포스포리파아제 A2 군 IB, GIBsPLA2(또는 PLA2 GIB)와 같은 의미로 사용된다. 포스포리파아제 A2 군 IB는 약 15 kDa 이상의 MW 및 약 6.5 내지 약 8.0의 등전점을 갖는 분비 단백질이다.
- [0045] 본 발명의 맥락 내에서, 용어 "GIBsPLA2" 또는 "phospholipase A2 group IB"는 달리 언급하지 않는한 영장류(예를 들어 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 랫트)와 같은 포유동물을 포함하는 임의의 선천적인 척추동물 출처의 GIBsPLA2 단백질을 나타낸다. 용어는 세포 내부 또는 외부 처리 결과인 임의의 형태의 GIBsPLA2뿐만 아니라 "전체-길이(full-length),"의 미처리된 GIBsPLA2를 포함한다. 용어는 또한 자연적으로 발생하는 GIBsPLA2의 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립 형질의 변이체를 포함한다.
- [0046] 예시적 인간 GIBsPLA2의 아미노산 서열은 하기에 나타낸다(서열번호: 2).
- [0047] MKLLYLAVLL TVAAADSGIS PRAVWQFRKM IKCVIPGSDP FLEYNNGCY CGLGGSGTPV DELDKCCQTH DNCYDQAKKL DSCKFLLDNP YHTYSSYSCS GSAITCSSKN KECEAFICNC DRNAAICFSK APYNKAHKNL DTKKYCQS
- [0048] 서열번호: 2(밑줄)의 아미노산 1 내지 15(밑줄)는 신호 서열이며, 서열번호: 2(볼드)의 아미노산 16 내지 22는 프로펩티드 서열이다. 성숙 단백질은 예시적으로 처리된 인간 GIBsPLA2 단백질인 서열번호: 2의 아미노산 잔기 23-148에 해당한다.
- [0049] 자연적으로 발생하는 변이체는 하나 또는 여러 개의(일반적으로 1, 2 또는 3) 아미노산 잔기의 하나 이상의 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실, 바람직하게는 하나 또는 여러 개의(일반적으로 1, 2 또는 3) 아미노산 잔기의 10개 이하의 구별되는 아미노산 치환(들), 추가(들), 및/또는 결실(들)을 갖는 서열번호: 2의 서열, 또는 서열번호: 2의 아미노산 잔기 23-148의 서열을 포함하는 임의의 단백질을 포함한다. 일반적으로 자연적으로 발생하는 변이체는 서열번호: 2의 생물학적 활성을 유지한다.
- [0050] 이와 관련하여, 일부 구현예에서, GIBsPLA2는 건강한 개체의 CD4 T 세포에서 막 미세 영역(MMD)의 형성을 유도, 또는 IL-2 신호 또는 IL-7 신호에 대해 불응성(refractory)과 같은 인터루킨 신호에 대해 불응적인 건강한 개체의 CD4 T 세포를 렌더링(rendering)하는 것으로부터 선택된 최소한 하나의 활성을 갖는다.
- [0051] 일부 구현예에서 MMD 형성의 유도는 세포당 최소한 약 80, 세포당 최소한 약 90, 세포당 최소한 약 100, 세포당 최소한 약 110, 또는 세포당 최소한 약 120개에 대하여 건강한 개체의 CD4 T 세포 상의 MMD 수의 증가를 포함한다. 비-제한적인 바람직한 구현예에서, MMD 형성의 유도는 세포당 100개를 초과하는 MMD에 대하여 건강한 개체의 CD4 T 세포 상의 MMD 수의 증가를 포함한다.
- [0052] 일부 구현예에서 MMD 형성의 유도는 거대 MMD 형성의 자극을 포함하며 그렇지 않으면 CD4 T 세포 상에 존재할 것이다. 일부 구현예에서 거대 MMD 형성의 유도는 최소한 100 nm, 최소한 110 nm, 최소한 120 nm, 최소한 130 nm, 또는 최소한 140 nm의 직경을 갖는 MMD 형성의 자극을 포함한다. 비-제한적인 바람직한 구현예에서, 거대 MMD 형성의 유도는 120 nm보다 큰 직경을 갖는 MMD 형성의 자극을 포함한다.
- [0053] 일부 구현예에서 인터루킨-7 신호에 대해 불응적인 건강한 개체의 CD4 T 세포의 렌더링은 상기 세포에서 STAT5A 및/또는 B 인산화의 최소한 약 10%, 최소한 약 20%, 최소한 약 30%, 또는 최소한 약 40% 감소를 포함한다. 일부 구현예에서 인터루킨-7 신호에 대해 불응적인 건강한 개체의 CD4 T 세포의 렌더링은 포스포-STAT5A 및/또는 포스포-STAT5B의 최소한 약 20%, 최소한 약 30%, 최소한 약 40%, 또는 최소한 약 50%의 핵 전위율의 감소를 포함한다.
- [0054] GIBsPLA2 활성은 실시예에 나타난 바와 같이 당업계에서 공지된, 또는 후에 개발될 임의의 적절한 방법에 의해 측정될 수 있다. GIBsPLA2 활성은 예를 들어, 리간드 유입 분석, 면역분석 및/또는 효소 분석을 이용하여 예를 들어 분획된 혈장 시료와 같은 혈장 시료에서 측정될 수 있다.
- [0055] 특정 구현예에서, 용어 GIBsPLA2는 인간 단백질, 특히 서열번호: 2를 포함하는 또는 갖는 단백질, 또는 자연적으로 발생하는 이들의 변이체를 나타낸다.
- [0056] 본 개시사항에 따른 GIBsPLA2는 분리, 정제, 및/또는 재조합될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명은 GIBsPLA2 단백질 대신에, 또는 추가로, GIBsPLA2를 암호화하는 핵산을 사용할 수 있다. 핵산은 DNA 또는 RNA, 단일- 또는 이중-가닥일 수 있다.

[0057] GIBsPLA2를 암호화하는 예시적 핵산 서열은 하기 서열번호: 1로 나타낸다.

[0058] ATGAAACTCCTTGTGCTAGCTGTGCTGCTCACAGTGGCCGCCGCCGACAGCGGCATCAGC

[0059] CCTCGGGCCGTGTGGCAGTTCGCAAAATGATCAAGTGCATGCCGGGGAGTGACCCC

[0060] TTCTTGAATACAACAACACTACGGCTGCTACTGTGGCTTGGGGGGCTCAGGCACCCCCGTG

[0061] GATGAACTGGACAAGTGCTGCCAGACACATGACAACCTGCTACGACCAGGCCAAGAAGCTG

[0062] GACAGCTGTAATTTCTGCTGGACAACCCGTACCCACACCTATTCATACTCGTGTCTCT

[0063] GGCTCGCAATCACCTGTAGCAGCAAAAACAAAGAGTGTGAGGCCTTCATTTGCAACTGC

[0064] GACCGCAACGCTGCCATCTGCTTTTCAAAGCTCCATATAACAAGGCACACAAGAACCTG

[0065] GACACCAAGAAGTATTGTCAGAGTTGA

[0066] GIBsPLA2를 암호화하는 대안적 핵산 분자는 더욱 바람직하게는 서열번호: 1과 최소한 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 가지며, 엄격한 조건 하에서 GIBsPLA2 단백질을 암호화하는 서열번호: 1에 혼성화하는 임의의 서열뿐만 아니라 유전적 암호의 퇴화로 인한 서열번호: 1의 임의의 변이체를 포함한다.

[0067] **GIBsPLA2의 제조 방법**

[0068] GIBsPLA2는 임의의 종래의 공지된 단백질 발현 방법 및 정제 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어: (i) 펩티드를 합성하는 방법; (ii) 생체 또는 배양된 세포로부터 이들을 정제 및 분리하는 방법; 또는 (iii) 유전자 재조합 기술을 이용하여 이들을 제조하는 방법; 및 이들의 조합 및 유사한 것(예를 들어, Molecular Cloning(Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press)(1989) 및 Current Protocol in Molecular Biology(Ausubel, F. M., John Wiley and Sons, Inc.(1989)에서 개시된 표준 기술).

[0069] 특정 구현예에서, 본 발명은 숙주 세포에서 암호화 핵산의 발현, 및 GIBsPLA2의 수거 또는 정제에 의해 GIBsPLA2를 제조하는 방법에 관한 것이다. 이와 관련하여, 본 발명은 또한 GIBsPLA2를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 숙주 세포를 설명한다. 이러한 세포는 원핵생물(prokaryotic)(박테리아와 같은) 또는 진핵생물(eukaryotic)(효모 세포, 곤충 세포, 식물 세포 또는 포유동물 세포와 같은)일 수 있다. 핵산은 프로모터, 종결자(terminator), 및 이와 유사한 것과 같은 임의의 적합한 조절 서열(regulatory sequence)의 조절 하에 위치할 수 있다. 대안적으로, 핵산은 내인성 프로모터에 의해 발현되는 위치에서 숙주 세포 내에 삽입될 수 있다. 세포 내에 핵산을 삽입하기 위한 기술은 당업계에 잘 알려져있다.

[0070] **GIBsPLA2 조절**

[0071] 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 GIBsPLA2의 조절을 포함하는 신규한 방법을 제공한다. 용어 "조절(modulation)"은 개체에서 GIBsPLA2의 수치(예를 들어, 발현) 또는 활성의 임의의 변형을 나타낸다. 또한, 조절은 GIBsPLA2 수치 또는 활성의 증가 또는 감소를 나타낸다. 조절은 더욱 바람직하게는 비-조절된 상황과 비교하여 최소한 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 그 이상의 변화를 나타낸다. 결과적으로, GIBsPLA2의 억제제는 GIBsPLA2 수치 또는 활성을 완전히 차단하거나 억제할뿐만 아니라 GIBsPLA2 수치 또는 활성을 최소한 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 그 이상 감소시키는 것을 나타낸다. 반대로, GIBsPLA2의 자극은 GIBsPLA2 수치 또는 활성을 최소한 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 그 이상 증가시키는 것을 나타낸다. 상황에 따라, 조절은 일시적, 지속적 또는 영구적일 수 있다. 또한 활성의 조절은 개체에서, 특히 체액에서 GIBsPLA2를 조절하는 것, 단백질의 능력을 조절(예를 들어 개체 내 공동-인자 또는 기질의 수치를 조절함으로써)하는 것, 및 GIBsPLA2에 의해 제조되는 분해 생성물의 수치 또는 활성을 조절하는 것을 포함한다.

[0072] **GIBsPLA2 억제**

[0073] 특정 구현예에서, 본 발명은 개체에서 GIBsPLA2를 억제하는 조성물 및 방법을 제공한다. GIBsPLA2 억제는 GIBsPLA2 억제제, 즉, GIBsPLA2의 발현 또는 활성을 억제하는 임의의 화합물의 사용에 의해 얻어질 수 있다. GIBsPLA2 억제제는 발현 억제제, 길항제, 분리자(sequesterators), 또는 표적 차폐 화합물을 포함한다. 바람직한 유형의 GIBsPLA2 억제제는 GIBsPLA2 리간드(공유 또는 비공유), 항-GIBsPLA2 항체(및 이들의 단편 및 유도체), 항-GIBsPLA2 항체(또는 이들의 단편 및 유도체)를 암호화하는 핵산, 억제 핵산, 펩티드, 또는 작은 약물, 또는 이들의 조합(들)을 포함한다. 대안적으로, 또는 추가적으로, GIBsPLA2 억제제는 GIBsPLA2 항원에 대하여 개체를

예방 접종함으로써 얻을 수 있으므로, 항체는 PLA2-GIB 억제제가 필요한 개체에 의해 제조된다.

- [0074] *GIBsPLA2에 대한 항체*
- [0075] GIBsPLA2 억제제의 특정 실시예는 구체적으로 GIBsPLA2에 결합된 항체이다.
- [0076] 항체는 합성, 모노클로날, 또는 폴리클로날일 수 있으며 당업계에서 잘 알려진 기술에 의해 제조될 수 있다. 이러한 항체는 구체적으로 항체의 항원-결합 부위를 통해 결합한다(비-특정 결합과는 대조적으로). GIBsPLA2 폴리펩티드, 단편, 변이체, 융합 단백질, 등은 이와 함께 면역반응성인 항체를 제조하는 면역원으로서 사용될 수 있다. 더욱 구체적으로, 폴리펩티드, 단편, 변이체, 융합 단백질, 등은 항체의 형성을 유도하는 항원 결정인자(determinants) 또는 에피토프를 포함한다.
- [0077] 이들 항원 결정인자 또는 에피토프는 선형 또는 입체 구조적(불연속적)일 수 있다. 선형 에피토프는 폴리펩티드의 아미노산의 단일 부분으로 구성되는 반면, 입체 구조적 또는 불연속적 에피토프는 단백질 접힘(folding)에 있어 근접성을 가져오는 폴리펩티드 사슬의 다른 영역의 아미노산 부분으로 구성된다(C. A. Janeway, Jr. and P. Travers, *Immuno Biology* 3:9(Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). 접힌 단백질이 복잡한 표면을 갖기 때문에, 가능한 에피토프의 수는 매우 많다; 그러나, 단백질의 입체 구조 및 입체적 장애로 인하여, 실질적으로 에피토프에 결합하는 항체의 수는 가능한 에피토프의 수보다 적다(C. A. Janeway, Jr. and P. Travers, *Immuno Biology* 2:14(Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). 에피토프는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 확인될 수 있다. 폴리클로날 및 모노클로날 항체는 모두 종래 기술에 의해 제조될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 바람직한 항체는 GIBsPLA2 에피토프에 직접적이며, 및/또는 성숙 GIBsPLA2 단백질, 서열번호: 2의 최소한 8개의 연속적 아미노산 잔기를 포함하는 GIBsPLA2의 단편(또는 서열번호: 2의 자연적 변이체의 잔기에 해당), 최소한 아미노산 70, 아미노산 121, 아미노산 50, 아미노산 52, 아미노산 54, 아미노산 71, 또는 이들의 조합을 포함하는 상기 단편로부터 선택된 GIBsPLA2 에피토프를 포함하는 폴리펩티드에 대한 면역법에 의해 생성되었다. 본 발명의 바람직한 항체는 서열번호: 2의 아미노산 잔기 50-71 사이 또는 서열번호: 2의 자연적 변이체의 해당 잔기에 포함되는 에피토프를 연결한다.
- [0079] 용어 "항체(antibodies)"는 임의로 재조합 및 합성적으로 제조된 결합 파트너, 인간 항체 또는 인간화된 항체(humanized antibody)뿐만 아니라, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, F(ab')₂ 및 Fab 단편, 단사슬 가변 단편(single chain variable fragments; scFvs), 단일 도메인 항체 단편(VHHs 또는 Nanobodies), 2가 항체 단편(디아바디; diabodies)과 같은 이들의 단편을 포함하는 것을 의미한다.
- [0080] 바람직하게는 만일 항체가 약 10⁷ M⁻¹보다 크거나 동일한 K_a를 갖는 GIBsPLA2와 결합하는 경우, 항체는 특이적으로 결합하는 것으로 정의된다. 항체의 친화도는 종래 기술, 예를 들어 Scatchard 등, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51:660(1949)에 설명된 것들을 이용하여 쉽게 결정될 수 있다.
- [0081] 폴리클로날 항체는 다양한 출처, 예를 들어, 말, 소, 당나귀, 염소, 양, 개, 닭, 토끼, 마우스, 또는 랫트로부터, 당업계에 잘 알려진 공정을 이용하여 쉽게 생성될 수 있다. 일반적으로, 적절하게 결합된 GIBsPLA2의 아미노산 서열에 기반한 정제된 GIBsPLA2 또는 펩티드는 일반적으로 비경구 주사를 통해 숙주 동물로 투여된다. GIBsPLA2의 면역원성은 에쥬번트, 예를 들어, Freund의 완전 또는 불완전 에쥬번트의 사용을 통해 향상될 수 있다. 하기 가속 면역법(booster immunizations)은, 혈청의 작은 시료를 수거하고 GIBsPLA2 폴리펩티드에 대한 반응성을 시험하였다. 이러한 판단에 유용한 다양한 분석의 예시는 역류면역전기영동(countercurrent immunoelectrophoresis; CIEP), 방사면역분석(radioimmunoassay), 방사성-면역침강(radio-immunoprecipitation), 효소-결합 면역흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA), 도트 블롯 분석, 및 샌드위치 분석(sandwich assays)과 같은 과정뿐만 아니라, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane(eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988에 설명된 것들을 포함한다. 미국 특허번호 4,376,110 및 4,486,530을 참조하라.
- [0082] 모노클로날 항체는 잘 알려진 절차를 이용하여 쉽게 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허번호 RE 32,011, 4,902,614, 4,543,439, 및 4,411,993; *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKeam, and Bechtol(eds.), 1980에 설명된 절차를 참고하라.
- [0083] 예를 들어, 마우스와 같은 숙주 동물은 약 3주 간격으로 최소한 한번 및 바람직하게는 최소한 두번 분리되고 정제된 야생형 또는 돌연변이 GIBsPLA2 단백질 또는 결합된 GIBsPLA2 펩티드를 선택적으로 에쥬번트의 존재시 복강 내 주입할 수 있다. 그 후 어떠한 동물이 융합에 가장 적절한지 결정하기 위하여 종래의 도트 블롯 기술 또

는 항체 포획(antibody capture; ABC)에 의해 마우스 혈청을 분석하였다. 대략 2주 내지 3주 후, 마우스는 단백질 또는 펩티드가 정맥 내에서 증가되었다. 마우스는 그 후 희생되고 확립된 프로토콜에 따라 Ag8.653(ATCC)와 같은 상업적으로 이용가능한 골수종 세포와 융합된다. 간단하게, 골수종 세포는 배지에서 여러 번 세척되고 하나의 골수종 세포에 대해 약 3개의 비장 세포의 비율로 마우스 비장 세포에 융합된다. 융합제(fusing agent)는 당업계에서 사용되는 임의의 적절한 제제, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol; PEG)일 수 있다. 융합은 융합된 세포의 선택적 성장을 위하여 허용되는 배지를 포함하는 플레이트에서 얻어진다. 융합된 세포는 그 후 대략 8일 동안 성장시킬 수 있다. 결과로 생긴 융합 세포로부터 상층액을 수거하고 이는 염소 항-마우스 Ig로 먼저 코팅된 플레이트에 추가된다. 세척 후, 표지된 GIBsPLA2 폴리펩티드와 같은 표지는, 각 웰에 추가되고 이를 배양한다. 양성 웰은 연속적으로 검출될 수 있다. 양성 클론은 대량 배지에서 성장할 수 있고 상층액은 이후에 단백질 A 컬럼(Pharmacia)에서 정제된다.

[0084] 본 개시사항의 모노클로날 항체는 본원에 참조로 인용된 Alting-Mees 등, "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", *Strategies in Molecular Biology* 3:1-9(1990)에 의해 설명된 것들과 같은 대안적 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 유사하게, 결합 파트너는 특정 결합 항체를 암호화하는 유전자의 가변 영역을 포함하도록 재조합 DNA 기술을 이용하여 구성될 수 있다. 이러한 기술은 Larrick 등, *Biotechnology*, 7:394(1989)에서 설명된다.

[0085] 종래의 기술에 의해 제조될 수 있는 이러한 항체의 항원-결합 단편은 또한 본 발명에 포함된다. 이러한 단편의 예시는 Fab 및 F(ab')₂ 단편을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 유전자 조작 기술에 의해 제조된 항체 단편 및 유도체 또한 제공된다.

[0086] 본 개시사항의 모노클로날 항체는 키메라 항체, 예를 들어, 쥐의 모노클로날 항체의 인간화된 버전을 포함한다. 이러한 인간화 항체는 공지된 기술에 의해 제조될 수 있으며, 항체가 인간에 투여될 때 감소된 면역원성의 이점을 제공할 수 있다. 일 구현예에서, 인간화된 모노클로날 항체는 쥐의 항체(또는 단지 이들의 항원 결합 부위)의 가변 부위 및 인간 항체로부터 유래된 불변 부위를 포함한다. 대안적으로, 인간화 항체 단편은 쥐의 모노클로날 항체의 항원 결합 부위 및 인간 항체로부터 유래된 가변 영역 단편(항원-결합 부위의 부재)을 포함할 수 있다. 키메라 및 추가적으로 조작된 모노클로날 항체의 제조를 위한 절차는 Riechmann 등(*Nature* 332:323, 1988), Liu 등(*PNAS* 84:3439, 1987), Larrick 등(*Bio/Technology* 7:934, 1989), 및 Winter와 Harris(*TIPS* 14:139, May, 1993)에서 설명한 것들을 포함한다. 형질 전환 항체를 생성하기 위한 절차는 GB 2,272,440, 미국 특허번호 5,569,825 및 5,545,806에서 발견될 수 있다.

[0087] 표준 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조될 수 있는 인간 및 비-인간 부분을 모두 포함하는 키메라 및 인간화된 모노클로날 항체와 같은, 유전적 조작 방법에 의해 제조되는 항체가 사용될 수 있다. 이러한 키메라 및 인간화된 모노클로날 항체는 당업계에 공지된 표준 DNA 기술, 예를 들어 Robinson 등 국제 공개번호 WO 87/02671; Akira 등 유럽 특허출원 0184187; Taniguchi, M., 유럽 특허출원 0171496; Morrison 등 유럽 특허출원 0173494; Neuberger 등 PCT 국제 공개번호 WO 86/01533; Cabilly 등 미국 특허번호 4,816,567; Cabilly 등 유럽 특허출원 0125023; Better 등, *Science* 240:1041 1043, 1988; Liu 등, *PNAS* 84:3439 3443, 1987; Liu 등, *J. Immunol.* 139:3521 3526, 1987; Sun 등 *PNAS* 84:214 218, 1987; Nishimura 등, *Canc. Res.* 47:999 1005, 1987; Wood 등, *Nature* 314:446 449, 1985; 및 Shaw 등, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553 1559, 1988); Morrison, S. L., *Science* 229:1202 1207, 1985; Oi 등, *BioTechniques* 4:214, 1986; Winter 미국 특허번호 5,225,539; Jones 등, *Nature* 321:552 525, 1986; Verhoeyan 등, *Science* 239:1534, 1988; 및 Beidler 등, *J. Immunol.* 141:4053 4060, 1988에 설명된 방법을 이용한 유전자 조작에 의해 제조될 수 있다.

[0088] 합성 및 반합성 항체와 관련하여, 이러한 용어는 항체 단편, 이소형(isotype) 전환(switched) 항체, 인간화 항체(예를 들어, 마우스-인간, 인간-마우스), 하이브리드, 복수의 특이성을 갖는 항체, 및 완전 합성 항체-유사 분자를 포함하기 위한 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0089] 치료적 적용에 있어서, 인간 불변 및 가변 영역을 갖는 "인간(human)" 모노클로날 항체는 항체에 대한 환자의 면역 반응을 최소화하기 위해 종종 바람직하다. 이러한 항체는 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 형질전환 동물을 면역화함으로써 생성될 수 있다. Jakobovits 등 *Ann NY Acad Sci* 764:525-535(1995)을 참조하라.

[0090] GIBsPLA2 폴리펩티드에 대한 인간 모노클로날 항체는 또한 개체의 림프구로부터 유래된 mRNA로부터 제조된 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 cDNAs를 이용하는 Fab 파지 디스플레이 라이브러리(phage display library) 또는 scFv 파지 디스플레이 라이브러리와 같은 조합 면역글로불린 라이브러리를 구성함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, McCafferty 등 PCT 공보 WO 92/01047; Marks 등(1991) *J. Mol. Biol.* 222:581 597; 및 Griffiths 등(1993)

EMBO J 12:725 734을 참조하라. 또한, 항체 가변 영역의 조합 라이브러리는 공지된 인간 항체를 돌연변이시킴으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, GIBsPLA2에 결합된 공지된 인간 항체의 가변 영역은 예를 들어, GIBsPLA2에 결합되었는지 스크리닝될 수 있는 돌연변이화된 가변 영역의 라이브러리를 생성하기 위하여 무작위로 변형된 돌연변이가 일어난 올리고뉴클레오티드를 이용함으로써, 돌연변이화될 수 있다. 면역글로빈(immunoglobulin) 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR 영역 내 무작위 돌연변이 유발의 방법, 페어링(pairings)을 형성하기 위한 무작위적 중쇄 및 경쇄의 교차(crossing) 방법 및 스크리닝 방법은, 예를 들어, Barbas 등 PCT 공보 WO 96/07754; Barbas 등 (1992) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4457 4461에서 발견될 수 있다.

[0091] 면역글로불린 라이브러리는 항체 디스플레이 라이브러리를 형성하기 위하여, 바람직하게는 사상성(filamentous) 파지로부터 유래된 디스플레이 패키지의 집단에 의해 발현될 수 있다. 특히 항체 디스플레이 라이브러리의 생성에 사용될 수 있는 방법 및 시약의 예시는, 예를 들어, Ladner 등 미국 특허번호 5,223,409; Kang 등 PCT 공보 WO 92/18619; Dower 등 PCT 공보 WO 91/17271; Winter 등 PCT 공보 WO 92/20791; Markland 등 PCT 공보 WO 92/15679; Breitling 등 PCT 공보 WO 93/01288; McCafferty 등 PCT 공보 WO 92/01047; Garrard 등 PCT 공보 WO 92/09690; Ladner 등 PCT 공보 WO 90/02809; Fuchs 등(1991) Bio/Technology 9:1370 1372; Hay 등(1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81 85; Huse 등(1989) Science 246:1275 1281; Griffiths 등(1993) supra; Hawkins 등(1992) J Mol Biol 226:889 896; Clackson 등(1991) Nature 352:624 628; Gram 등(1992) PNAS 89:3576 3580; Garrard 등(1991) Bio/Technology 9:1373 1377; Hoogenboom 등(1991) Nuc Acid Res 19:4133 4137; 및 Barbas 등(1991) PNAS 88:7978 7982에서 발견될 수 있다. 디스플레이 패키지(예를 들어, 사상성 파지)의 표면상에 표시되면, 항체 라이브러리는 GIBsPLA2 폴리펩티드에 결합하는 항체를 발현하는 패키지를 식별하고 분리하도록 스크리닝된다. 바람직한 구현예에서, 라이브러리의 기본적 스크리닝은 고정된 GIBsPLA2 폴리펩티드를 패닝(panning)하는 것을 포함하며 고정된 GIBsPLA2 폴리펩티드에 결합하는 항체를 발현하는 디스플레이 패키지가 선택된다.

[0092] 특정 구현예에서, 본 발명은 항-GIBsPLA2 항체(또는 단편 또는 이들의 유도체) 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0093] 기존 항-포스포리파아제 A2-GIB 모노클로날 항체는 Mab CH-7(Labome), MAB5018(Labome), EPR5186(Genetex); LS-C138332(Lifespan) 또는 CABT-17153MH(creative biomart)를 포함한다. 폴리클로날 항체의 예시는 예를 들어 GeneTex의 N1C3을 포함한다. 상기에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바람직한 항-GIBsPLA2 항체는 성숙 GIBsPLA2, 더욱 바람직하게는 아미노산 70, 아미노산 121, 아미노산 50, 아미노산 52, 아미노산 54, 아미노산 71, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 아미노산을 포함하는 GIBsPLA2의 영역에 포함된 에피토프에 결합한다. 본 발명의 바람직한 항체는 서열번호: 2의 아미노산 잔기 50-71 사이 또는 서열번호: 2의 자연적 변이체의 해당 잔기에 포함되는 에피토프에 결합한다.

[0094] 대안적인 구현예에서, 본 발명은 항-GIBsPLA2 항체(또는 단편 또는 이들의 유도체)를 암호화하는 핵산 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물 및 이의 사용에 관한 것이다.

[0095] *억제 핵산*

[0096] 대안적인 구현예에서, GIBsPLA2 억제제는 GIBsPLA2 유전자 또는 단백질 발현을 억제하는 억제 핵산, 즉 임의의 핵산 분자이다. 바람직한 억제 핵산은 안티센스 핵산, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 작은 헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로RNA, 앵타머, 또는 리보자임을 포함한다. 특정 구현예에서, 억제 핵산은 GIBsPLA2 mRNA의 번역을 방지하는 작은 간섭 RNA이다. 또다른 특정 구현예에서, 억제 핵산은 GIBsPLA2 mRNA의 번역을 방지하는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 또다른 특정 구현예에서, 억제 핵산은 GIBsPLA2 mRNA의 번역을 방지하는 작은 헤어핀 RNA이다.

[0097] siRNA는 목적하는 폴리뉴클레오티드의 센스 핵산 서열 및 안티센스 핵산 서열을 포함한다. siRNA는 단일 전사물(이중 가닥 RNA)이 센스 및 표적 유전자로부터 상보적인 안티센스 서열을 모두 포함하도록 구성된다. siRNA의 뉴클레오티드 서열은 예를 들어, 월드와이드웹(world wide web) 상의 Ambion 웹사이트에서 가능한 siRNA 디자인 컴퓨터 프로그램을 이용하여 설계될 수 있다.

[0098] 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 siRNAs의 길이는 10개의 뉴클레오티드보다 작거나 동일하다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 siRNA의 길이는 자연적으로 발생하는 전사물과 같다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 siRNA는 18-30개의 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 구현예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 siRNA는 25개의 뉴클레오티드의 길이보다 작다.

[0099] 바람직한 억제 핵산 분자는 GIBsPLA2 유전자 또는 RNA의 영역에 대해 완벽히 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖

는 영역을 포함한다. 이러한 영역은 일반적으로 유전자 전사 또는 RNA 번역의 특정 혼성화 및 최적 억제를 허용하는 4 내지 20개의 뉴클레오티드를 포함한다. 억제 핵산의 서열은 서열번호: 1과 같은 GIBsPLA2를 암호화하는 유전자의 서열로부터 직접적으로 유래될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 억제 핵산은 프로모터, 스플라이싱 부위, 등과 같은 GIBsPLA2 유전자 또는 RNA에서 조절 요소와 혼성화할 수 있으며, 이들의 효과적인 조절을 방지한다.

[0100] 본 발명의 억제 핵산 분자의 특정 실시예는 서열번호: 1의 10 내지 50개의 연속적 뉴클레오티드로 구성되는 분리된 단일 가닥 핵산 분자를 포함한다. 본 발명의 억제 핵산 분자의 특정 실시예는 하기 뉴클레오티드 서열 또는 이들의 완벽히 상보적인 가닥으로 구성되는 안티센스 핵산이다:

[0101] ATGAAACTCCTTGTGCTAG(서열번호: 3)

[0102] ACAGCGGCATCAGC(서열번호: 4)

[0103] TTCCGCAAAATGATCAA(서열번호: 5)

[0104] CCCGGGGAGTGACCCC(서열번호: 6)

[0105] TACGGCTGCTACTGTGGCTT(서열번호: 7)

[0106] GACACATGACAACCTGCTACGACC(서열번호: 8)

[0107] ACCCACCTATTTCATACTCGT(서열번호: 9)

[0108] ATCACCTGTAGCAGCA(서열번호: 10)

[0109] AGCTCCATATAACAAGGCA(서열번호: 11)

[0110] CAAGAAGTATTGTCAGAG(서열번호: 12)

[0111] 펩티드 및 작은 약물

[0112] 대안적인 구현예에서, GIBsPLA2 억제제는 GIBsPLA2의 활성을 억제하는 펩티드 또는 작은 약물이다. 펩티드 또는 작은 약물은 일반적으로 GIBsPLA2, 또는 GIBsPLA2의 기질, 또는 GIBsPLA2의 공동-인자, 또는 GIBsPLA2 경로의 분해 생성물 또는 대사물과 선택적으로 결합하는 문자이다.

[0113] 펩티드는 바람직하게는 3 내지 20 아미노산 잔기를 포함하고, 이들의 서열은 GIBsPLA2(bait 펩티드)의 영역 또는 GIBsPLA2 기질, 공동-인자, 분해 생성물 또는 대사물의 영역과 동일할 수 있다. 본 발명의 바람직한 펩티드는 서열번호 2(또는 서열번호: 2의 자연적 변이체의 해당 서열)의 4 내지 30개의 연속적 아미노산 잔기를 포함한다. 본 발명의 가장 바람직한 펩티드는 서열번호: 2(또는 서열번호: 2의 자연적 변이체의 해당 서열)의 5 내지 25개의 연속적 아미노산 잔기를 포함하며 서열번호: 2(또는 서열번호: 2의 자연적 변이체의 해당 서열)의 하기 아미노산 잔기 중 최소한 하나를 더 포함한다: 아미노산 70, 아미노산 121, 아미노산 50, 아미노산 52, 아미노산 54, 아미노산 71, 또는 이들의 조합. 본 발명의 펩티드의 특정 실시예는 하기 서열 중 어느 하나를 포함하는 25개 미만의 아미노산의 펩티드이다:

[0114] NNYGCV(서열번호: 13)

[0115] CYCGLG(서열번호: 14)

[0116] YNNYGCYGLGGSG(서열번호: 15)

[0117] FLEYNNYGCYGLGGSGTPV(서열번호: 16)

[0118] QTHDN(서열번호: 17)

[0119] CQTHDNC(서열번호: 18)

[0120] ECEAFICNC(서열번호: 19)

[0121] DRNAAI(서열번호: 20)

[0122] DRNAAICFSKAPYINKAHKNL(서열번호: 21)

[0123] 본 발명의 펩티드는 펩티드, 비-펩티드 및/또는 변형된 펩티드 결합을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 펩티

드는 메틸렌(-CH₂-) 또는 인산(-PO₂-)기, 2차 아민(-NH-) 또는 산소(-O-), 알파-아자펩티드, 알파-알킬펩티드, N-알킬펩티드, 포스폰아미데이트(phosphonamidates), 데시펩티드(depsipeptides), 히드록시메틸렌, 히드록시에틸렌, 디히드록시에틸렌, 히드록시에틸아민, 레트로-인버소 펩티드(retro-inverso peptides), 메틸렌옥시, 케토 메틸렌(cetomethylene), 에스터(esters), 포스피네이트(phosphinates), 포스피닉(phosphinics), 또는 포스폰아미드(phosphonamides)의 삽입(intercalation)으로부터 선택된 최소한 하나의 펩티도미메틱 결합(peptidomimetic bond)을 포함한다. 또한, 펩티드는 예를 들어, 아실화, 및/또는 아미드화 및/또는 에스터화에 의해 보호된 N-ter 및/또는 C-ter 기능을 포함할 수 있다.

- [0124] 본 발명의 펩티드는 화학적, 생물학적, 및/또는 유전적 합성과 같은 당업계에서 그 자체로 공지된 기술에 의해 제조될 수 있다.
- [0125] 분리된 형태의 각각의 이들 펩티드는 본 발명의 특정 목적을 나타낸다.
- [0126] 바람직한 작은 약물은 선택적으로 GIBsPLA2에 결합하는 탄화수소 화합물이다.
- [0127] 작은 약물 및 펩티드는 바람직하게는 하기를 포함하는 방법에 의해 얻을 수 있다: (i) 시험 화합물을 GIBsPLA2 또는 이들의 단편과 접촉시키는 단계, (ii) GIBsPLA2 또는 상기 이들의 단편에 결합하는 시험 화합물을 선택하는 단계, 및 (iii) GIBsPLA2의 활성을 억제하는 (ii)의 화합물을 선택하는 단계. 이러한 방법은 본 발명의 특정 목적을 나타낸다.
- [0128] 작은 약물 및 펩티드는 또한 하기를 포함하는 방법에 의해 얻을 수 있다: (i) 시험 화합물을 GIBsPLA2 기질, 공동-인자, 또는 분해 생성물, 또는 이들의 단편과 접촉시키는 단계, (ii) 상기 GIBsPLA2 기질, 공동-인자, 또는 분해 생성물, 또는 이들의 단편과 결합하는 시험 화합물을 선택하는 단계, 및 (iii) GIBsPLA2의 활성을 억제하는 (ii)의 화합물을 선택하는 단계. 이러한 방법은 본 발명의 특정 목적을 나타낸다.
- [0129] *GIBsPLA2 수용성 수용기*
- [0130] 대안적인 구현예에서, GIBsPLA2 억제제는 GIBsPLA2 수용기의 수용성 형태이다. 이러한 수용성 수용기 화합물은 GIBsPLA2에 결합할 수 있으므로, 배이트(bait) 또는 차폐제로서 작용함으로써 이의 활성을 억제한다.
- [0131] 이러한 억제제의 특정 구현예는 인간 또는 쥐의 GIBsPLA2 수용기, 또는 이들의 GIBsPLA2-결합 단편의 수용성 형태이다.
- [0132] 쥐 및 인간 수용성 수용기의 아미노산 서열은 각각 서열번호: 22 및 23으로 나타낸다. 따라서 용어 수용성 수용기는 서열번호: 22 또는 23의 서열의 모든 또는 단편을 포함하는 임의의 GIBsPLA2-결합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0133] GIBsPLA2-결합 단편은 특이적으로 PLA2GIB에 결합하는, 바람직하게는 이들의 최소한 5개, 더욱 바람직하게는 최소한 8, 10, 또는 12 개의 연속적 아미노산 잔기를 포함하는 이러한 폴리펩티드의 임의의 단편을 지정한다. 수용기 분자의 특이적 결합은 수용기 분자가 PLA2-IIA 또는 IID에 비하여 높은 친화도(예를 들어, 최소한 5배의)로 PLA2GIB에 결합하는 것을 나타낸다. 상기에 정의된 단편은 가장 바람직하게는 50개 미만의 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0134] GIBsPLA2-결합 폴리펩티드의 예시는 제한 없이, 하기 아미노산 서열 중 최소한 하나를 포함하는 폴리펩티드이다:
- [0135] LSLYECDSTLVSLWRRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKW(서열번호: 24)
- [0136] WEKDLNSHICYQFNLLS(서열번호: 25)
- [0137] DCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEK(서열번호: 26)
- [0138] QYKVQKSDNTVVARQIHRWIAYTSSGGDICE(서열번호: 27)
- [0139] LSYLNWSQEITPGPFVEHHCGLTEVVSA(서열번호: 28)
- [0140] SRFEQAFITSLISSVAEKDSYFW(서열번호: 29)
- [0141] WICRIPRDVPRKFPDQYDAPWLFYQNA(서열번호: 30)
- [0142] AFHQAFLLVLLSRLGHTHWIGLSTTDNGQT(서열번호: 31)
- [0143] 서열번호: 24-26은 인간 수용성 PLA2GIB 수용기의 서열로부터 유래되는 반면, 서열번호: 27-31은 쥐의 수용성

PLA2GIB 수용기의 서열로부터 유래된다.

- [0144] *예방접종(Vaccination)*
- [0145] 대안적인(또는 누적되는) 구현예에서, 개체에서 GIBsPLA2의 억제제는 GIBsPLA2 항원을 갖는 개체를 예방접종(또는 면역화)함으로써 얻는다. 이러한 예방접종 또는 면역법의 결과로서, 개체는 GIBsPLA2를 억제하는 항체(또는 세포)를 생성한다. 특히, GIBsPLA2 항원(예를 들어, 본질적으로 생물학적 활성이 없는 면역성 GIBsPLA2)의 주사(들)는 치료되는 개체에서 항체를 생성할 수 있다. 이들 항체는 과량의 GIBsPLA2 발현을 방지할 수 있고 면역치료 또는 백신 프로필락시(prophylaxy)에 사용될 수 있다.
- [0146] 따라서 본 발명의 목적은 개체에 GIBsPLA2 항원을 투여하는 단계를 포함하는 개체를 예방접종하는 방법에 있다.
- [0147] 본 발명의 추가적 목적은 이를 필요로 하는 개체를 예방접종하는데 사용하기 위한 GIBsPLA2 항원에 관한 것이다.
- [0148] 특정 구현예에서, 예방접종에 사용되는 GIBsPLA2 항원은 개체에서 GIBsPLA2에 대한 면역 반응을 유도하는 불활성화된 면역성 분자이다. 불활성화는 예를 들어, GIBsPLA2를 화학적 또는 물리적으로 변형함으로써 또는 단백질을 돌연변이 또는 절단함으로써, 또는 둘다에 의해 얻을 수 있으며; 면역원성은 불활성화 및/또는 KLH, HSA, 폴리리신, 바이러스성 아나톡신(anatoxin)과 같은 적절한 담체 또는 합텐(hapten), 또는 유사한 것에 단백질을 더 접합함으로써 및/또는 중합반응함으로써, 또는 유사한 것에 의한 결과로서 얻을 수 있다. 따라서 항원은 예를 들어, 이의 면역원성이 개선되도록 화학적 또는 물리적으로 변형될 수 있다.
- [0149] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 GIBsPLA2 항원은 GIBsPLA2 또는 에피토프-포함 단편 또는 이들의 구조적 유사체를 포함한다.
- [0150] 특정 구현예에서, GIBsPLA2 항원은 전체 길이의 GIBsPLA2 단백질을 포함한다. 추가적 특정 구현예에서, GIBsPLA2 항원은 서열번호: 2, 또는 서열번호: 2와 최소한 90%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단백질을 포함한다.
- [0151] 대안적인 구현예에서, GIBsPLA2 항원은 최소한 6개의 연속적 아미노산 잔기를 포함하며 면역성 에피토프, 또는 이들의 구조적 유사체를 포함하는 GIBsPLA2의 단편을 포함한다. 바람직한 구현예에서, GIBsPLA2 항원은 최소한 6 내지 20개의 아미노산 잔기를 포함한다. 본 발명의 바람직한 펩티드는 서열번호: 2(또는 서열번호: 2의 자연적 변이체의 해당 서열)의 4 내지 30개의 연속적 아미노산 잔기를 포함한다. 본 발명의 가장 바람직한 펩티드는 서열번호: 2(또는 서열번호: 2의 자연적 변이체의 해당 서열)의 5 내지 25개의 연속적 아미노산 잔기를 포함하며 서열번호: 2(또는 서열번호: 2의 자연적 변이체의 해당 서열)의 하기 아미노산 잔기 중 최소한 하나를 더 포함한다: 아미노산 70, 아미노산 121, 아미노산 50, 아미노산 52, 아미노산 54, 아미노산 71, 또는 이들의 조합. 본 발명의 펩티드의 특정 실시예는 하기 서열 중 어느 하나를 포함하는 50개 미만의 아미노산의 펩티드이다:
- [0152] NNYGCV(서열번호: 13)
- [0153] CYCGLG(서열번호: 14)
- [0154] YNNYGCYGLGGSG(서열번호: 15)
- [0155] FLEYNNYGCYGLGGSTPV(서열번호: 16)
- [0156] QTHDN(서열번호: 17)
- [0157] CQTHDNC(서열번호: 18)
- [0158] ECEAFICNC(서열번호: 19)
- [0159] DRNAAI(서열번호: 20)
- [0160] DRNAAICFSKAPYNKAHKNL(서열번호: 21)
- [0161] GIBsPLA2 항원은 자유로운 형태의 중합된, 화학적 또는 물리적으로 변형된, 및/또는 담체 분자에 결합된(즉, 연결된) 것과 같은 다양한 형태일 수 있다. 담체에 결합되는 것은 면역원성을 증가시키고 (또한) GIBsPLA2 폴리펩티드의 생물학적 활성을 억제할 수 있다. 이와 관련하여, 담체 분자는 예를 들어 KLH(Keyhole limpet hemocyanin), 난알부민(ovalbumin), 소혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)과 같은 면역학, 독소이드 테타노스(toxoid tetanus), 독소이드 디프테릭 B(toxoid diphteric B) 콜레라 독소와 같은 바이러스성 또는 박테리

아 아나톡신, 디프테리아(diphtheria) 독소 CRM 197, 외부 막 소포(outer membrane vesicle) 단백질, 폴리리신 분자, 또는 바이러스 유사입자(virus like particle; VLP)와 같은 이들의 돌연변이에 있어 종래에 사용된 임의의 담체 분자 또는 단백질일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 담체는 KLH 또는 CRM197 또는 VLP이다.

[0162] GIBsPLA2와 담체의 결합은 예를 들어 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 비오틴(biotin), 등과 같은 화학적 작용기의 연결 또는 반응을 이용한 공유적 화학반응에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 결합체 또는 GIBsPLA2 단백질 또는 단편 또는 구조적 유사체는 GIBsPLA2의 완전한 불활성화를 위하여 포름알데히드로 처리될 수 있다.

[0163] 특정 구현예에서, GIBsPLA2 항원은 선택적으로 담체 단백질에 결합된, 전체 길이의 GIBsPLA2 단백질을 포함한다. 바람직한 구현예에서, GIBsPLA2 항원은 담체 단백질에 결합된, 서열번호: 2, 또는 서열번호: 2와 최소한 90%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 단백질을 포함한다.

[0164] 또다른 특정 구현예에서, GIBsPLA2 항원은 담체 단백질에 결합된, GIBsPLA2의 면역성 펩티드 또는 구조적 유사체를 포함한다. 더욱 바람직한 구현예에서, GIBsPLA2 항원은 선택적으로 담체 분자에 결합된, 서열번호: 2(또는 서열번호: 2의 자연적 변이체의 해당 서열)의 하기 아미노산 잔기 중 최소한 하나를 포함하는 최소한 10개의 아미노산 길이의 폴리펩티드를 포함한다: 아미노산 70, 아미노산 121, 아미노산 50, 아미노산 52, 아미노산 54, 아미노산 71, 또는 이들의 조합.

[0165] GIBsPLA2 항원의 면역원성은 예를 들어, 인간 면역 세포에 접촉된 비-인간 동물의 면역 후, 항체의 존재를 확인하거나, 또는 인간 또는 인간화 항체를 이용한 샌드위치 ELISA에 의해 시험될 수 있다. 생물학적 활성의 부재는 본 명세서 내에 개시된 임의의 활성 시험에 의해 확인될 수 있다. 바람직한 구현예에서, GIBsPLA2 항원은 CD4 T 세포 내 막 미세 영역(MMD)의 형성을 유도하거나 또는 (ii) IL-2 신호에 대해 불응성 또는 IL-7 신호에 대해 불응성인 CD4 T 세포를 렌더링하는 생체 외 방법에 있어 야생형 GIBsPLA2 단백질의 활성의 20% 미만, 더욱 바람직하게는 15%, 10%, 5% 또는 1% 미만을 갖는다.

[0166] 특정 구현예에서, 본 발명은 불활성 및 면역성 GIBsPLA2에 관한 것이다.

[0167] 추가적 특정 구현예에서, 본 발명은 담체 분자, 바람직하게는 KLH에 결합된 GIBsPLA2 단백질 또는 단편 또는 이들의 구조적 유사체에 관한 것이다.

[0168] 추가적 측면에서, 본 발명은 GIBsPLA2 항원, 적합한 부형제 및, 선택적으로, 적합한 에뮤번트를 포함하는 백신에 관한 것이다.

[0169] 이러한 분자 및 복합체 및 백신은 개체를 면역화하는데 사용되는 강한 체제를 나타냄으로써, 지속되는 GIBsPLA2 억제제를 유발한다. 반복시, 이러한 방법은 영구적인 GIBsPLA2 억제제를 유발하는데 사용될 수 있다.

[0170] 본 발명의 추가적 목적은 이를 필요로 하는 개체에서 내인성 GIBsPLA2의 활성을 중화하는 항체의 생성을 유도하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 GIBsPLA2 항원 또는 백신의 치료적 유효량을 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0171] 본 발명의 항원 또는 백신의 투여는 바람직하게는 근육 내, 피하, 경피, 정맥 내 또는 동맥 내 주사; 비강, 구강, 점막 또는 직장 투여와 같은 임의의 적합한 경로에 의할 수 있다.

[0172] GIBsPLA2 항원 또는 백신은 GIBsPLA2의 과-생성과 연관된 임의의 질병을 치료하는데 사용될 수 있다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 GIBsPLA2의 과-생성과 연관된 질병을 치료하는 방법에 관한 것이며, GIBsPLA2 항원 또는 GIBsPLA2 항원을 포함하는 백신 조성물의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0173] GIBsPLA2 작용제 또는 활성제

[0174] 본 발명의 맥락 내에서 용어 GIBsPLA2 "작용제(agonist)"는 펩티드, 폴리펩티드, 재조합 단백질, 결합체, 자연적 또는 인공적 리간드, 분해 생성물, 동족체, 핵산, DNA, RNA, 앵타머, 등, 또는 이들의 조합과 같은 GIBsPLA2 활성을 갖는, 또는 매개하는 또는 상향-조절하는 임의의 물질을 제한 없이 포함한다. 용어 "작용제"는 전체 및 부분적 작용제를 모두 포함한다. GIBsPLA2 작용제의 특정 예시는 GIBsPLA2 단백질 또는 GIBsPLA2 단백질을 암호화하는 핵산이다.

[0175] 특정 구현예에서, 본 발명은 개체에서 면역 반응을 억제하는 방법에 관한 것이며것으로, 상기 방법은 GIBsPLA2 단백질 또는 GIBsPLA2 단백질을 암호화하는 핵산을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0176] 조성물

[0177] 본 발명은 또한 유효 성분으로서 본원에 설명된 GIBsPLA2 조절제 또는 항원, 및 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0178] "약학적 조성물(pharmaceutical composition)"은 본 발명의 화합물(유효 성분) 및 이를 필요로 하는 개체에 생물학적으로 활성인 화합물의 전달을 위하여 당업계에서 일반적으로 허용되는 배지의 제형을 말한다. 이러한 담체는 모든 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 배지 또는 이의 보조제를 포함한다. 종래의 약제학적 관행은 개체에 적합한 제형 또는 조성물을, 예를 들어 단위 투여 형태로 제공하기 위해 사용될 수 있다.

[0179] 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물은 연고, 젤, 페이스트, 액체 용액, 현탁액, 정제, 젤라틴 캡슐, 캡슐, 좌제, 분말, 점비액, 또는 에어로졸의 형태, 바람직하게는 주사가능한 용액 또는 현탁액의 형태로 제형화될 수 있다. 주사에 있어서, 화합물은 일반적으로, 예를 들어 주사기 또는 관류를 통하여 주사될 수 있는 액체 현탁액의 형태로 포장된다. 이러한 관점에서, 화합물은 일반적으로 약제학적으로 호환가능하고 당업자에게 공지된 식염수, 생리학적, 등장성 또는 완충성 용액에 용해된다. 따라서, 조성물은 분산제, 가용화제, 안정화제, 보존제, 등으로부터 선택된 하나 이상의 제제 또는 부형제를 포함할 수 있다. 액체 및/또는 주사가능한 제형에 사용될 수 있는 제제 또는 부형제는 특히 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 카복시메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트 80, 만니톨, 젤라틴, 락토오스, 식물성 오일, 아카시아, 등이다. 담체는 또한 예를 들어 메틸-베타-시클로덱스트린, 아크릴산의 중합체(카보폴(carbopol)과 같은), 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜, 모노에탄올 아민 및 히드록시메틸 셀룰로오스의 혼합물로부터 선택될 수 있다.

[0180] 조성물은 일반적으로 본 발명의 화합물의 유효량, 예를 들어, GIBsPLA2를 조절하기에 효과적인 양을 포함한다. 일반적으로, 본 발명에 따른 조성물은 0.001-0.01, 0.01-0.1, 0.05-100, 0.05-10, 0.05-5, 0.05-1, 0.1-100, 0.1-1.0, 0.1-5, 1.0-10, 5-10, 10-20, 20-50, 및 50-100 mg, 예를 들어 0.05 내지 100 mg 사이, 바람직하게는 0.05 내지 5 mg 사이, 예를 들어 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 3, 4 또는 5 mg과 같은 약 1 µg 내지 1000 mg의 GIBsPLA2 조절제를 포함한다. 투여량은 조절제 및 질병에 따라 당업자가 조절할 수 있다.

[0181] 본 발명의 조성물은 동시 또는 순차적 사용을 위하여 하나 이상의 추가적 활성 화합물을 더 포함할 수 있다.

[0182] 본 발명은 또한 전술한 GIBsPLA2 조절제 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 혼합하는 단계, 및 임의의 적합한 형태 또는 용기(주사기, 앰플, 플라스크, 병, 파우치, 등) 내 조성물을 제형화하는 단계를 포함하는 약학적 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0183] 본 발명 또한 (i) 전술한 GIBsPLA2 조절제를 포함하는 조성물, (ii) 최소한 하나의 용기, 및 선택적으로 (iii) 키트를 사용하기 위하여 작성된 지침을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0184] 질병

[0185] 본 발명의 화합물 및 조성물은 개체 상태가 개선될 때, 증가된 면역성을 갖는 임의의 질병뿐만 아니라, 특히 부적합한 CD4 T 세포 활성화에 대하여 부적합한(예를 들어, 결함 또는 부적절) 면역 반응과 관련된 임의의 질병을 치료하는데 사용될 수 있다. 이들 질병은 때때로 본 출원에서 "면역 질환(immune disorders)"이라고 한다. 이는 면역 결함 상태(예를 들어, 바이러스성 감염, 병원성 감염, 암, 등에 의해 유발되는), 자가면역 질환, 이식, 당뇨병, 염증성 질환, 암, 알러지, 천식, 건선, 두드러기, 습진 및 이와 유사한 것을 포함한다.

[0186] 면역 결함 및 관련 장애

[0187] 제1 측면에서, 본 발명은 개체 내 GIBsPLA2의 억제에 기반함으로써, 면역활성, 특히 CD4-T 세포-매개 활성을 증가 또는 회복한다.

[0188] 특정 구현예에서, 본 발명은 따라서 이를 필요로 하는 개체에서 면역 반응을 자극하는 방법에 관한 것이며, 상기 개체에서 GIBsPLA2를 억제하는 단계를 포함한다.

[0189] 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 백혈구를 조절하는 방법에 관한 것이며, 상기 개체에서 GIBsPLA2를 억제하는 단계를 포함한다.

[0190] GIBsPLA2 억제제로부터 혜택을 받을 수 있는 질병의 예시는 HIV-매개된 면역결핍과 같은 면역결핍을 갖는 모든 질병이다. 이와 관련하여, 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 면역결핍 또는 관련 장애를 치료하기 위한 방법에 관한 것이며, 상기 개체에서 GIBsPLA2를 억제하는 단계를 포함한다.

- [0191] 또다른 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 면역결핍 또는 관련 장애를 치료하기 위하여 사용되는 GIBsPLA2 억제제에 관한 것이다.
- [0192] 면역 결핍 및 관련 장애는 개체에서 감소된 면역기능 또는 반응에 의해 특정되는 및/또는 유발되는 임의의 상태 또는 병리를 나타낸다. 면역 결핍은 예를 들어, 바이러스성 감염(예를 들어, HIV, B형 간염, 등), 박테리아 감염, 암, 또는 다른 병리학적 조건에 의해 유발될 수 있다. 용어 "면역결핍-관련 장애(immunodeficiency-associated disorder)"는 따라서 면역결핍에 의해 유발되는 또는 관련된 임의의 질병을 나타낸다. 본 발명은 특히 CD4-T 세포에 관련된 면역 결핍, 및 관련 질환을 치료하는데 적합하다. 본 출원은 실제로 GIBsPLA2의 생물학적 효과가 CD4 T 세포 질병 상태에 관여함을 입증한다. 따라서, GIBsPLA2의 활성을 차단하는 것은 HIV에 감염된 환자에서 종종 발견되는 사이토카인이 유발하는 면역결핍에 대하여 변형된 반응을 갖는 개체에 있어 치료적 효과를 갖는다.
- [0193] 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명은 개체에서 GIBsPLA2를 억제함으로써, 바람직하게는 개체에 GIBsPLA2 억제제 또는 백신을 투여함으로써, 개체에서 HIV 감염을 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서 개체는 초기 HIV 환자이며 본 방법은 환자가 HIV 조절자일 가능성을 증가시키는 결과를 가져온다. 일부 구현예에서 개체는 항레트로바이러스 치료 후 낮은 면역재구성(immunoreconstitution)을 갖는 및/또는 심각한 특발성(idiopathic) CD4 T 림프구 감소(ICL)를 갖는 환자이다. 본 발명은 또한 개체에서 GIBsPLA2를 억제함으로써, 바람직하게는 개체에 GIBsPLA2 억제제 또는 백신을 투여함으로써 HIV-감염된 개체에서 CD4-T 세포 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0194] 또다른 구현예에서, 본 발명은 항-염증 약물과 직접적으로 또는 관련이 있는 개체에서 GIBsPLA2를 주사함으로써 개체에서 염증 반응으로부터 유래되는 심각한 및/또는 만성적 염증 및 돌기(processus)를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0195] 본 발명은 또한 개체에서 면역 반응을 증가시킴으로써 암을 치료하는 방법을 제공하며, 바람직하게는 개체에 GIBsPLA2 억제제 또는 백신을 투여함으로써 개체에서 GIBsPLA2를 억제하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 개체에서 GIBsPLA2를 억제함으로써, 바람직하게는 개체에 GIBsPLA2 억제제 또는 백신을 투여함으로써 개체에서 암과 관련된 CD4 T 세포-연관 면역결핍을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0196] 병리학적 면역 반응 및 관련 질병
- [0197] 본 발명은 특히 부적합한 CD4 T 세포 활성화에 대하여 면역계의 부적합한(예를 들어, 병리학적 또는 부적절) 면역 반응 또는 바람직하지 않은 (과잉(hyper))활성 또는 (과잉)활성화에 관련된 임의의 질병을 치료하는데 사용될 수 있다. 이들 질병은, 예를 들어, 자가면역 질환, 이식, 당뇨병, 알러지, 천식, 건선, 두드러기, 습진 및 이와 유사한 것을 포함한다.
- [0198] 추가적 측면에서, 본 발명은 따라서 개체에서 GIBsPLA2의 활성화 또는 유도에 기반함으로써, 면역 활성화, 특히 CD4-T 세포-매개 활성을 억제한다.
- [0199] 특정 구현예에서, 본 발명은 따라서 이를 필요로 하는 개체에서 면역 반응을 억제하는 방법에 관한 것이며, 상기 개체에서 GIBsPLA2를 유도 또는 활성화하는 단계를 포함한다.
- [0200] 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 백혈구를 억제하는 방법에 관한 것이며, 상기 개체에서 GIBsPLA2를 억제하는 단계를 포함한다.
- [0201] 또다른 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 바람직하지 않은 면역 반응에 의해 유발되는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 개체에서 GIBsPLA2를 유도 또는 활성화하는 단계를 포함한다.
- [0202] 개체에서 GIBsPLA2를 유도 또는 활성화하는 것은 바람직하게는 GIBsPLA2 작용제, 예를 들어 GIBsPLA2 단백질 또는 이들의 기능적인 단편을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0203] 또다른 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 바람직하지 않은 면역 반응에 의해 유발되는 장애를 치료하는데 사용되는 GIBsPLA2 작용제 또는 활성제에 관한 것이다.
- [0204] GIBsPLA2 작용제로부터 혜택을 받을 수 있는 질병의 예시는 자가면역 질환, 암, 바이러스성 질환, 박테리아 감염, 등이다.
- [0205] 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 자가-면역 질환을 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기

개체에서 GIBsPLA2를 자극 또는 유도하는 단계를 포함한다.

- [0206] 또다른 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 자가-면역 질환을 치료하는데 사용되는 본 발명의 화합물 또는 조성물에 관한 것이다.
- [0207] 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 개체에서 GIBsPLA2를 자극 또는 유도하는 단계를 포함한다.
- [0208] 또다른 특정 구현예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는데 사용되는 본 발명의 화합물 또는 조성물에 관한 것이다.
- [0209] 본 발명의 또다른 특정 구현예는 이식된 개체에서 이식편 거부반응(graft rejection)을 치료(예를 들어, 감소 또는 예방 또는 억제), 또는 이식편대숙주병(graft vs host disease)을 치료하기 위한 방법에 관한 것이며, 상기 개체에서 GIBsPLA2를 자극 또는 유도하는 단계를 포함한다. 본 발명의 추가적 목적은 개체에서 동종이식내성(allogeneic graft tolerance)을 개선시키기 위한 방법이며, 상기 개체에서 GIBsPLA2를 자극 또는 유도하는 단계를 포함한다.
- [0210] 항균 활성
- [0211] 본 출원은 또한, 추가적 측면에서, GIBsPLA2를 이용하여 세균을 죽이기 위한 방법을 제공한다. 막 상에서 직접 작용함으로써, GIBsPLA2는 박테리아, 외막형 바이러스, 기생충 및 이와 유사한 것을 파괴 또는 죽일 수 있다.
- [0212] 급성 감염 또는 감염에 있어서, GIBsPLA2는 단독으로 또는 항생제, 항-바이러스, 항-레트로바이러스성 및 항-기생충 약물과 함께 사용될 수 있다. 공지된 항균 약물에 대하여 내성이 있는 세균의 경우, GIBsPLA2는 대안적 치료를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 매우 위험하고 급한 임상적 상황에서, 매우 단기간 치료에 사용될 수 있다.
- [0213] 본 발명에 따른 GIBsPLA2에 의한 치료로부터 혜택을 받을 수 있는 질병의 특정 실시예는 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 중증 근무력증(Myasthenia gravis), Guillain-Barre와 같은 자가면역 신경병증(Autoimmune neuropathies), 자가면역 포도막염(Autoimmune uveitis), 포도막염(Uveitis), 자가면역 용혈성 빈혈(Autoimmune hemolytic anemia), 악성 빈혈(Pernicious anemia), 자가면역 혈소판 감소증(Autoimmune thrombocytopenia), 측두 동맥염(Temporal arteritis), 항-인지질 증후군(Anti-phospholipid syndrome), 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis)과 같은 혈관염(Vasculitides), 베체트병(Behcet's disease), 동맥경화증(Atherosclerosis), 건선(Psoriasis), 포진성 피부염(Dermatitis herpetiformis), 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 백반증(Vitiligo), 심상성 천포창(Pemphigus Vulgaris), 균상식육종(Mycosis Fungoides), 알러지 접촉성 피부염(Allergic Contact Dermatitis), 아토피 피부염(Atopic Dermatitis), 편평태선(Lichen Planus), PLEVA, 습진(eczema), 크론병(Crohn's Disease), 궤양성 대장염(Ulcerative colitis), 원발성 담즙성 간경변(Primary biliary cirrhosis), 자가면역성 감염(Autoimmune hepatitis), 1형 진성 당뇨병(Type 1 diabetes mellitus), 에디슨병(Addison's Disease), 그레이브스병(Grave's Disease), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 자가면역 난소염(Autoimmune oophoritis) 및 고환염(orchitis), 자가면역 갑상선염(Autoimmune Thyroiditis), 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis), 전신성 홍반성 낭창(Systemic lupus erythematosus), 경피증(Scleroderma), 다발성 근염(Polymyositis), 피부근염(Dermatomyositis), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)과 같은 척추관절병증(Spondyloarthropathies), 또는 쇼그렌 증후군(Sjogren's Syndrome)과 같이 면역계의 과잉 활성 또는 만성적 염증을 갖는 모든 임상적 상황이다.
- [0214] 본 발명의 화합물 또는 조성물 투여의 기간, 투여량 및 빈도는 개체 및 대상 질병에 따라 달라질 수 있다. 치료는 단독으로 또는 다른 유효 성분과 조합하여, 동시에 또는 개별적으로 또는 순차적으로 사용될 수 있다.
- [0215] 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물은 전신 주사, 근육 내, 정맥 내, 복강 내, 피부 내, 피하, 피부, 피부상(transdermic), 척수강내, 안구(예를 들어 각막) 또는 직장 내 전신 주사, 또는 염증 부위에 국소 투여, 및 바람직하게는 근육 내 또는 정맥 내 주사와 같은 제한 없는 다양한 방법 또는 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0216] 전형적인 치료법은 하루 또는 며칠, 1년까지, 및 1주 내지 약 6달을 포함 하는 기간에 걸쳐 GIBsPLA2 조절제의 유효량을 단일 또는 반복 투여하는 것을 포함한다. 체내에 투여되는 본 발명의 약제학적 화합물 또는 조성물의 투여량은 수용자(개체)의 나이, 건강, 성별 및 무게, 만일 있다면, 병행하는 치료의 종류, 치료의 빈도, 및 바람직한 약제학적 효과의 성질이 고려될 것으로 이해된다. 본원에 제공된 유효 투여량의 범위는 제한되지 않으며 바람직한 투여량 범위를 나타낸다. 그러나, 가장 바람직한 투여량은 개개의 개체에 맞춰질 수 있으며, 이는 해당 분야에서 당업자에 의해 이해되고 결정된다(예를 들어, Berkow et al., eds., The Merck Manual, 16th

edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodmanetna., eds., Goodman and Cilman's The pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edition, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y.,(2001)를 참조하라).

[0217] **진단**

[0218] 본 발명은 또한 개체로부터 얻은 시료에서 GIBsPLA2의 존재 또는 양 또는 부재의 검출에 기반하여 개체의 면역 결핍을 검출하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 제한 없이, 캡처 분석(Capture assay), 샌드위치 분석(Sandwich assay), 경쟁 분석(Competition assay), 방사선-변역 분석(Radio-immuno assays), 색을 생성하는 기질을 갖는 효소 표지(Enzyme labels), 형광(fluorescent), 화학발광(chemiluminescent), 또는 전기화학적-활성 생성물(electrochemically-active products), 형광 편광(fluorescent polarization), 화학발광(Chemiluminescence), 광학(Optical) 및 색채(colorimetric), 전기화학(Electrochemiluminescence), 시간-분해 형광(Time-resolved fluorescence), 표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance), 에바네센트파(Evanescent wave), 멀티웰 플레이트(Multiwell plate(ELISA)), 개별 분석(Individual assay), 복합 분석(Multiplex assay), 라텍스 비드(Latex bead) - 복합 분석, 마이크로어레이(Microarray)(층상 표면(Laminar surface)) - 복합 분석, 유리, 플레이트 기반 분석 또는 스트립 기반 분석과 같은 당업계에서 그 자체로 공지된 다양한 검출 기술 또는 플랫폼을 이용하여 수행될 수 있다.

[0219] 특정 구현예에서, 방법은 GIBsPLA2 유전자, RNA 또는 단백질에서 다형성(polymorphism)의 존재, 또는 양, 또는 부재를 판단하는 단계를 포함한다. 우리의 결과는 GIBsPLA2가 높은 다형성을 가지며 이는 개체의 생리학적 상태와 관련이 있다는 것을 보여준다. 본 발명은 따라서 (i) GIBsPLA2의 특정 다형성 이성질형(isoform)의 존재, 또는 양, 또는 부재를 판단하는 단계, 및/또는 (ii) 개체에서 GIBsPLA2의 다형성의 전체적 비율을 판단하는 단계를 포함하고, 상기 데이터는 개체의 생리적 상태와 관련된다. 특히, 특정 이성질형은 상기에 설명한 바와 같이 개체에서 장애의 성향(predisposition), 존재 또는 발병의 특성일 수 있다. 이러한 판단은 또한 치료를 조정하기 위한 맞춤 약에 사용될 수 있다.

[0220] GIBsPLA2 검출을 포함하는 CD4 T 결핍과 관련된 면역결핍의 감시 및/또는 진단 방법

[0221] 개체의 CD4 T 결핍과 관련된 면역결핍, 특히 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염의 감시 및/또는 진단 방법이 본 개시사항에 의해 제공된다. 일부 구현예에서 방법은 (a) 개체의 체액, 바람직하게는 혈장을 포함하는 시료를 제공하는 단계, 및 (b) 임계값 위의 시료 내 GIBsPLA2의 수치를 검출하는 단계를 포함한다. 시료 내 GIBsPLA2의 존재는 효소 분석, 리간드-캡처 분석 및/또는 면역분석을 포함하는 방법과 같은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 검출될 수 있다 .

[0222] 일부 구현예에서 방법은 개체로부터 얻은 혈장을 포함하는 시료를 얻는 단계 및 건강한 개체로부터 얻은 CD4 T 세포의 비정상적인 막 미세 영역(MMD)의 형성을 유도 및 인터루킨-7(IL-7) 신호에 불응성인 건강한 개체의 CD4 T 세포를 렌더링하는 것으로부터 선택된 최소한 하나의 활성을 갖는지 여부를 판단하는 단계를 포함한다. 만일 개체의 혈장이 이러한 활성을 포함하는 경우 개체는 일부 구현예에서 HIV-감염된 환자에서 종종 발견되는 CD4 T 세포-관련 면역결핍을 갖는지 판단된다. 만일 혈장 분획이 이러한 활성을 포함하지 않는다면 개체는 일부 구현예에서 사이토카인-조절된 항상성에 대한 T CD4 세포의 변형과 관련된 면역 결핍에 적게 노출된 것으로 판단된다.

[0223] 일부 구현예에서 개체는 HIV 감염을 갖는지 판단된다. 반대로, 만일 단백질 분획이 이러한 활성을 포함하지 않는다면 개체는 일부 구현예에서 본원에 개시된 CD4 T 세포 결핍과 관련된 면역결핍을 갖지 않는 것으로 판단된다. 일부 구현예에서 개체는 HIV 감염되지 않은 것으로 판단된다.

[0224] 일부 구현예에서 방법은 GIBsPLA2에 특이적인 항체를 개체의 체액, 바람직하게는 혈장을 포함하는 시료에 접촉시키는 단계 및 면역학적 반응의 존재 또는 부재를 판단하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서 면역학적 반응성의 존재 또는 부재는 효소면역측정법(ELISA)을 포함하는 방법에 의해 판단된다. GIBsPLA2에 특이적인 항체 및 시료 사이의 면역학적 반응성의 존재는 시료 내 GIBsPLA2의 존재를 나타내며, 이는 결국 개체가 CD4 T 세포 결핍과 관련된 면역결핍을 갖는다는 것을 나타내는 것이다. 일부 구현예에서 개체는 HIV 감염된 것으로 판단된다. 반대로, GIBsPLA2에 특이적인 항체 및 시료 사이의 면역학적 반응성의 부재는 개체가 본원에 개시된 CD4 T 세포 결핍과 관련된 면역결핍을 갖지 않는다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서 개체는 HIV 감염되지 않은 것으로 판단된다.

[0225] 일부 구현예에서 시료 내 GIBsPLA2의 존재 분석은 정성적이다. 일부 구현예에서 시료 내 GIBsPLA2의 존재 분석

은 정량적이다.

- [0226] 일부 구현예에서 방법은 분석의 결과를 CD4 T 세포 결핍과 관련된 면역결핍을 갖는 개체의 혈장을 포함하는 대조군 시료의 유사한 분석의 결과와 비교하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서 방법은 분석의 결과를 일찍 수거된 동일한 개체의 혈장을 포함하는 시료의 유사한 분석의 결과와 비교하는 단계를 포함한다.
- [0227] CD4 T 세포상의 막 미세영역을 특징하는 단계를 포함하는 CD4 T 세포 변형과 관련된 면역결핍의 감시 및/또는 진단 방법
- [0228] 실시예의 데이터는 매우 적은 세포가 HIV에 실제로 감염되었음에도 불구하고 HIV-감염된 환자가 CD4 T 세포의 표면에 특유의 막 미세 영역(MMD)의 형성이 존재하는 것을 증명한다. 따라서, 본 개시사항은 또한 예를 들어 개체에서 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염에 의해 유발되는 면역결핍과 같은 CD4 T 세포 변형과 관련된 면역결핍을 진단하기 위한 방법을 제공한다. 일부 구현예에서 방법은 하기를 포함한다: (a) 개체로부터 CD4 T 림프구를 분리하는 단계, 및 (b) T-세포 상의 막 미세 영역(MMD)의 수 및/또는 크기를 측정하는 단계. 일부 구현예에서 방법은 (c) T-세포 내 포스포-STAT5의 양을 측정하는 단계 및 (d) T-세포 내 포스포-STAT5의 핵 도입 분석을 분석하는 단계 중 최소한 하나를 더 포함한다. 일부 구현예에서 T-세포 상의 MMD의 수 및/또는 크기는 인터루킨의 부재시 측정된다. 일부 구현예에서 T-세포 상의 MMD의 수 및/또는 크기는 IL-2의 부재시 측정된다. 일부 구현예에서 T-세포 상의 MMD의 수 및/또는 크기는 IL-7의 부재시 측정된다. 일부 구현예에서 T-세포 상의 MMD의 수 및/또는 크기는 인터루킨의 임계값 수치의 존재시 측정된다.
- [0229] 일부 구현예는 만일 개체로부터 분리된 T-세포 상의 MMD의 수가 최소한 임계값인 경우 개체가 CD4 T 세포 변형과 관련된 면역결핍을 갖는다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서 이는 개체가 HIV 감염된 것을 나타낸다. 일부 구현예에서 만일 개체로부터 분리된 T-세포 상의 MMD의 수가 최소한 임계값이 아닌 경우 개체가 본원에 개시된 CD4 T 세포 변형과 관련된 면역결핍을 갖지 않는다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서 개체가 사이토카인 신호에 대해 손상된 CD-4 T 세포 반응을 갖지 않는다는 것을 의미한다. 일부 구현예에서 개체가 인터루킨-7에서 손상된 CD-4 T 세포 반응을 갖지 않는다는 것을 의미한다. 일부 구현예에서 이는 개체가 HIV 감염되지 않은 것을 나타낸다. 일부 구현예에서 임계값이 세포당 최소한 약 80, 세포당 최소한 약 90, 세포당 최소한 약 100, 세포당 최소한 약 110, 또는 세포당 최소한 약 120이다. 비-제한적인 바람직한 구현예에서, 임계값은 세포당 약 100이다. 일부 구현예에서 만일 개체로부터 분리된 T-세포 상의 MMD가 최소한 임계값의 직경을 갖는다면 개체가 HIV 감염된 것을 나타낸다. 일부 구현예에서 만일 개체로부터 분리된 T-세포 상의 MMD가 최소한 임계값을 갖지 않는다면 개체가 인터루킨-7에 대해 그리고 더욱 일반적으로 사이토카인에 대해 손상된 반응을 갖는다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서 이는 개체가 HIV 감염을 갖지 않는다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서 임계값은 최소한 100 nm, 최소한 110 nm, 최소한 120 nm, 최소한 130 nm, 또는 최소한 140 nm의 직경이다. 비-제한적인 바람직한 구현예에서, 임계값은 최소한 약 120 nm의 직경이다.
- [0230] RIF가 비정상적으로 거대한 MMD에서 막 수용기를 응집함으로써 IL-7에 대한 CD4 T 세포의 민감성을 변형시킬 수 있기 때문에, 다른 감마-c 및 사이토카인에 대한 반응이 영향을 받을 수 있을 뿐만 아니라 RIF는 또한 변형된 CD4 T 세포 반응을 포함하는 다른 병변과 관련될 수 있다.
- [0231] **후보 치료제의 식별 방법**
- [0232] 본 발명은 또한 하기를 포함하는, 후보 치료제를 식별하기 위한 방법을 제공한다: (a) 제제의 존재시 CD4 T 림프구를 GIBsPLA2와 접촉시키는 단계, 및 (b) GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화를 측정하는 단계. 일부 구현예에서 방법은 (c) 제제의 존재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치를 제제의 부재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치와 비교하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 만일 제제의 존재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치가 제제의 부재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치보다 낮다면, 제제는 후보 면역결핍 치료제로서 식별된다. 일부 구현예에서 제제는 후보 HIV 치료제로서 식별된다. 일부 구현예에서, 만일 제제의 존재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 수치가 제제의 부재시 GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화보다 높다면, 제제는 후보 면역억제 치료제로서 식별된다.
- [0233] 일부 구현예에서, GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 측정은 CD4 T 세포당 MMD의 수를 판단하는 단계를 포함한다.
- [0234] 일부 구현예에서, GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 측정은 CD4 T 세포 상의 MMD의 평균 직경을 판단하는 단계를 포함한다.
- [0235] 일부 구현예에서, GIBsPLA2-유도된 CD4 T 세포 활성화의 측정은 STAT5 인산화 및/또는 핵 도입에 의해 분석되는

CD4 T 세포의 IL-7 민감성을 판단하는 단계를 포함한다.

- [0236] 본원에 사용된 바와 같이 "제제(agent)"는 가능한 치료제로서 평가된 임의의 화학물질일 수 있다. 일부 구현예에서 제제는 유기 분자이다. 일부 구현예에서 제제는 2 내지 50 탄소 원자, 5 내지 50 탄소 원자, 또는 10 내지 50 탄소 원자와 같은, 2 내지 100 탄소 원자를 포함한다. 일부 구현예에서 제제는 펩티드, 단백질, 당-단백질(glyco-protein), 또는 지질단백질(lipoprotein)이다. 일부 구현예에서 제제는 항체이다.
- [0237] 일부 구현예에서 제제는 종종 HIV 감염과 관련된 것과 같은 면역결핍의 치료를 위한 치료제로서 유용성을 시사하는 생물학적 활성을 갖는다고 이전에 판단되지 않았다. 일부 구현예에서 제제는 종종 HIV 감염과 관련된 것과 같은 면역결핍의 치료를 위한 치료제로서의 유용성을 시사하는 생물학적 활성을 갖는다고 이전에 판단되었다.
- [0238] 본원에 사용된 바와 같이, "후보 면역결핍 치료제(candidate immunodeficiency therapeutic agent)" 또는 "후보 HIV 치료제(candidate HIV therapeutic agent)"는 최소한 하나의 분석에서 CD4 T 세포를 활성화시키기 위한 RIF의 능력을 억제하는 제제이다. 본원에 보고된 데이터와 일치하는, 최소한 하나의 분석에서 CD4 T 세포를 활성화시키기 위한 GIBsPLA2의 능력을 억제하는 제제의 능력은 HIV 감염과 관련된 면역 결함을 포함하는 면역 결함을 치료하는데 치료적으로 유용할 것 같은 제제를 식별하기 위하여 유용한 방법이다. 따라서, 이는 또한 HIV 감염을 치료하는데 치료적으로 유용할 것 같은 제제를 식별하는 유용한 방법이다. 물론, 모든 치료적 분자와 마찬가지로 추가적 특징이 요구될 것이다. 그러나, 이는 본 개시사항의 후보 HIV 치료제의 유용성을 손상시키지 않는다.
- [0239] 본 발명의 추가적 측면 및 이점은 하기 실험 부분에 개시되었으며, 이는 예시적으로 고려되어야 한다.
- [0240] 실시예
- [0241] **1. 재료 및 방법**
- [0242] 1.1. 환자
- [0243] 연구에 포함된 VP는 1년 이상 HIV-양성이었다. 그들은 임의의 항레트로바이러스성 약물을 투여받은 적이 없으며 혈액 수거시 CD4 개수가 > 200/ μ l인 바이러스성 로드(load) > 10,000 RNA를 가졌다(ANRS EP 33 및 EP20 연구). VP의 모든 혈액 시료는 Centre Hospitalier de Gonesse에서 얻었다. HD의 혈액은 Etablissement Francais du Sang(Centre Necker-Cabanel, Paris)에서 제공받았다. ART 환자의 혈장 시료는 최소한 1년 동안의 치료를 받은 개인으로부터 얻었다. 이들의 바이러스성 로드는 최소한 6달 동안 검출되지 않았으며 혈액 수거시 이들의 CD4 개수는 > 500/ μ l이었다. HIC 환자의 혈장 시료는 감염 10년 후 검출되지 않는 바이러스성 로드를 갖는 개인으로부터 얻었다. 혈장 시료는 Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur에서 수거되었다.
- [0244] 1.2. 정제된 CD4 T 림프구에서 막 미세 영역(MMD), 수용기 확산물 및 포스포-STAT5 세포성 구획(cellular compartmentalization)의 분석
- [0245] CD4 T-세포는 이미 설명한(10) 음성 선별(negative selection)에 의해 정제되고 2 nM 재조합 글리코실화된 인간 IL-7(Cytheris) 또는 40 μ g PHA(Sigma)으로 활성화된다. 세포 표면 미세영역(MMD) 및 포스포-STAT5 세포성 구획 분포를 연구하기 위해 사용되는 공초점 및 STED 현미경은 이미 설명되었다(10, 12). 살아있는 세포의 표면에서 단백질 확산의 FCS 분석은 또한 설명되었다(10, 12)
- [0246] 1.3. 계면활성제-내성 미세영역(detergent-resistant microdomains; DRM)의 제조 및 분석
- [0247] HD 또는 VP의 CD4 T 림프구의 Triton-X100 용해물의 제조 후, 수거된 분획의 수크로오스 구배 및 웨스턴 블롯 분석을 통한 원심분리를 전술하였다(12). flotillin, IL-7R α 와 및 감마 c에 특이적인 mAb는 웨스턴 블롯에 의해 해당 밴드를 검출하는데 사용된다(12).
- [0248] 1.4. VP 혈장의 RIF의 특성
- [0249] 1.4.1. 생물학적 검정
- [0250] MMD 유도 분석은 하기와 같다: VP 혈장(5 또는 10%)을 먼저 정제된 HD CD4 T 세포를 포함하는 배지에서 배양하였다(20분). 그 후 세포를 10분 동안 폴리리신-코팅된 유리 슬라이드 위에 두고 IL-7(2nM)로 15분 동안 활성화시키고 이를 대조군(NS)에는 처리하지 않았으며, 콜레라 독소 B(CtxB-AF488)에 의해 염색하기 전 PBS/SVF 5%에서 1시간 동안 평형화된 PFA(PFA, 1.5 %, 37°C에서 15분, 그 후 실온에서 15분)로 고정하였다. MMD를 STED 현미경에서 계수하였다.

- [0251] STAT 인산화의 억제 및 핵 전위의 분석은 하기와 같다: IL-7에 의한 자극(2 nM, 15 분) 전 VP 혈장(5 또는 10 %)을 먼저 정제된 HD CD4 T 세포와 함께 배양하였다(20분). 그 후 세포를 10분 동안 폴리리신-코팅된 유리 슬라이드 위에 두고 IL-7(2nM)로 15분 동안 활성화시키고 이를 대조군(NS)에는 처리하지 않았으며, PFA(PFA, 1.5 %, 37°C에서 15분, 그 후 실온에서 15분)에 의해 고정 및 메탄올에 의해 투과(-20°C에서 90%)하였다. 세포를 PBS/SVF 5%에서 1시간 동안 평형화하고 포스포-STAT5를 염소 항-래빗-Atto642로 표지된 래빗 항-STAT5로 염색하고 FACS 또는 STED 현미경으로 분석하였다.
- [0252] 1.4.2. 효소 치료
- [0253] RIF 활성화에 대한 효소 소화의 효과는 30 kDa 막에서 여과된 VP 혈장을 처리함으로써 평가하였다. MW < 10 kDa인 혈장 화합물을 음성 대조군으로서 사용하였다. 돼지 트립신(1 U/ml, 37°C에서 30분 그 후 PMSF 억제 및 Millipore 5kDa-막 원심분리기로 완충액 교환), 또는 DNase I(1 U/ml, 37°C에서 30분), 또는 RNase(1 U/ml, 37°C에서 30분) 또는 펩티드 N-글리카나아제(N-glycanase)(1 U/ml, 37°C에서 30분)의 효과를 시험하였다. 모든 제제는 10% 최종 농도에서 분석되었다.
- [0254] 1.4.3. MW 판단 또는 RIF 정제
- [0255] 크기 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography)는 탄산암모늄(ammonium carbonate)(0.1M) 또는 PBS으로 전-평형화된 85-ml 세파텍스 G100 컬럼에서 1.6ml의 혈장을 로딩함으로써 수행되었으며, 그 후 0.8 ml 분획의 용출액을 수거하였다. 컬럼을 단백질 세트(GE-Healthcare)를 이용하여 보정하였다. 단백질 농도를 Bradford 방법에 의해 측정하였다. 100 kDa 막에서 미리 여과된 VP 혈장 및 총 VP 혈장을 실험하고 동일한 결과를 얻었다. 반-정제된 RIF를 포함하는 13-17kDa 사이의 분획을 수거하였다.
- [0256]
- [0257] 1.4.4. 등전점 판단
- [0258] 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피를 연속적인 pH 단계(탄산암모늄/암모늄 아세테이트 완충액)에 의한 용출액을 갖는 MonoQ 또는 MonoS 1ml 컬럼(GE-Healthcare)에서 수행하였다. 각 용출된 분획의 pH를 측정 후 이들의 생물학적 효과를 시험하기 전 이를 pH 7.4에 맞추었다. RIF 활성화는 용출 후 즉시 해당 분획에서 측정하였다.
- [0259] 1.4.5. MS 분석
- [0260] 겔 여과(G100)로부터 얻은 시료를 당업계에 그 자체로 공지된 방법에 따라, 동결건조한 후 재현탁하고, 이를 모아 돼지 트립신으로 단백질 가수분해하였다. 그 후 단백질 가수분해 펩티드를 암모늄 아세테이트에서 용출된 C18 컬럼을 통한 크로마토그래피에 의해 12 분획으로 나누었다. 12 분획을 역상(아세토니트릴(acetonitrile))에서 용출된 C18을 통해 분리하고 이차 Ar-분절화를 갖는 MS 분석 및 그 후 MS 스캔 당 10개의 고-강도 피크에 대한 MS/MS를 위하여 orbitrap Velos(Thermo Scientific)에서 전기분무에 의해 직접적으로 주사되었다.
- [0261] 표준 Mascot 및 X-Tandem 프로그램이 사용되었다. 데이터베이스 서브 세트의 각각의 단백질에 대하여, 3개의 기준을 계산하였다:
- [0262] - i-score: 신호 펩티드 절단(고유의 펩티드/단백질의 수)을 갖는 성숙 단백질이 풍부한 NextProt 데이터베이스에서 단일 단백질의 트립신 소화로부터 모든 펩티드의 이론적 특이성의 계산: 전체 인간 서열(모든), 단백질 당 N-말단 신호 펩티드(sec)를 갖는 서열에 대한 특정 펩티드의 수
- [0263] - 모든 MS 스캔 시리즈(이론적 펩티드 매칭 피크/단백질) 유래의 피크와 호환가능한 펩티드의 이론적 발생의 계산
- [0264] - 피크-매칭 펩티드를 갖는 단백질 서열의 이론적 범위의 계산
- [0265] 각 단백질에서 *p score* 는 모든 3개의 점수의 계산으로 결정되었다.
- [0266] **실시예 1: 비정상적인 막 미세 영역(MMD)의 존재에 의해 측정된 VP의 CD4 T 림프구의 비정상적인 활성화.**
- [0267] 본 실시예는 만성적으로 HIV-감염된 환자의 CD4 T 림프구에서 보이는 비정상적인 반응의 일부를 설명하는 새로운 분자 및 세포내 매개변수의 조사를 설명한다. 면역계의 만성적 활성화는 일반적으로 CD4 기능장애의 주요 마커로서 고려되는 CD38, HLA-DR 및 CD25와 같은 세포 표면 분자의 과발현을 평가함으로써 측정된다(15). 그러나, 많은 노력에도 불구하고, 이들 데이터는 여전히 명확하지 않기 때문에, CD4 T 세포의 표현형은 직접적으로 이들

의 면역 결함을 설명할 수 없다.

- [0268] STED 현미경 및 콜레라 독소 B(CtxB-AF488)을 이용한 표지는 MMD의 존재를 검출하기 위해 사용되었다(12). 임의의 자극 전, VP로부터 정제된 CD4 T 림프구의 표면은 HD로부터 정제된 휴지상태(quiescent) CD4 T 림프구보다 꽤 많이 MMD로 향해있다는 것을 발견하였다(도 1a). 그리고 가장 중요한 것은, VP로부터 얻은 모든 CD4 T 세포는 증가된 MMD의 수를 나타내었다는 것이다. 혈장(0.4 pM) 내 평균 IL-7 농도가 단지 IL-7R의 100번째 Kd이기 때문에 이러한 비정상적인 패턴은 VP 혈장에서 IL-7에 의한 자극의 결과가 아니었다(13, 14). HD로부터 정제된 CD4 T 세포가 IL-7에 의해 자극되는 경우, 많은 수의 MMD가 발견되었다. 반대로, VP로부터 얻은 CD4 T 세포의 MMD 패턴은 IL-7에 의해 영향을 받지 않았다(도 1a). IL-7에 대한 어떠한 반응도 없는 비정상적인 활성화는 식물성 혈구응집소(phytohemagglutinin; PHA)와 같은 비생리적인 자극에 의해 모방될 수 있다(도 1a).
- [0269] 이들 다양한 비정상적인 MMD는 그 후 계수하였다. PHA-자극된 HD CD4 T 세포와 같이, VP로부터 얻은 CD4 T 세포 당 대략 150-200의 MMD가 발견되었다(도 1c). 여기서 다시, 얻은 결과는 VP로부터 얻은 모든 CD4 T 세포가 모든 주요 CD4 소집단을 포함하는 MMD를 발현함을 나타낸다(도 1c). IL-7는 VP에서 MMD의 수를 증가시키는데 실패하였다. 반대로, HD CD4 T 세포에서 MMD 수는 IL-7 자극 후 대략 10 MMD/세포의 배경 수치에서 300으로 증가하였다. MMD 크기의 연구는 또한 수행되었다(도 1d 및 e). 이는 VP로부터 얻은 CD4 T 세포 및 PHA-자극된 HD CD4 T 세포 상의 MMD가 IL-7에 자극된 HD CD4 T 세포의 그것(90 nm)보다 훨씬 크다(250 nm)는 것을 나타내었다.
- [0270] **실시예 2: 모든 IL-7R 알파 및 감마-c 사슬은 VP CD4 T 세포로부터 분리된 비정상적인 계면활성제-내성 막 미세 영역(DRM)에서 격리된다**
- [0271] IL-7R 알파 및 감마-c 사슬이 고-밀도 분획 외부 MMD에 위치한다는 것을 증명하기 위해 휴지 HD CD4 T 세포를 분석하였다. 이들 HD CD4 T 세포가 IL-7에 의해 자극되는 경우, 이들 두개의 사슬은 MMD 내 격리된 모든 단백질을 포함하는 계면활성제-내성 MMD 또는 DRM에 해당하는 저-밀도 분획 내 위치한다(도 2).
- [0272] 연구가 VP로부터 정제된 CD4 T 세포 상에서 반복되는 경우, 패턴은 달랐다(도 2). 임의의 자극 전, 모든 IL-7R 알파 및 감마-c 사슬은 이미 DRM에 격리되었다; 어떤 것도 MMD 외부의 자유 수용기에 해당하는 고-밀도 분획 내에 위치하지 않는다. 또한, DRM 제조 전 IL-7에 의한 CD4 T 세포의 사전-자극은 이러한 패턴에 영향을 미치지 않는다(데이터로 나타내지 않음). 여기서 다시, 비생리학적 PHA에 의한 HD CD4 T 세포의 사전-자극은 이러한 병리학적 상황을 재현한다. 이는 도 1의 데이터를 확인하며 VP 내 CD4 T 세포가 임의의 자극 전 비정상적 활성화가 될 수 있음을 증명한다. 또한, 이들 비정상적인 MMD는 모든 IL-7R 사슬을 포함한다(도 2).
- [0273] **실시예 3: HD, VP로부터 얻은 정제된 CD4 T 세포 및 IL-7-자극된 HD 세포에서 IL-7 시그날로섬의 2D 겔 분석. 면역침강(immunoprecipitation) 후 회수된 단백질 패턴에 의한 활성화의 비정상적인 상태의 특성**
- [0274] 2D-전기영동은 VP 내 IL-7 시그날로섬의 조성물이 비정상적이며 휴지 및 IL-7-활성화된 HD CD4 T 세포와 다르다는 것을 증명하기 위해 사용되었다(도 7a, 7b 및 7c).
- [0275] 단백질은 정제된 CD4 T-세포 용해물로부터 얻은 단백질G-세포파오스 4G 상에 고정된 항-IL-7R알파(마우스 mAb 40131, R&D System)로 면역침강되고 2D-PAGE(on pH 3-10 겔 스트립상에서 IEF 후 12% 아크릴아미드-비스(acrylamide-bis)로 SDS-겔)상에서 분리되었다. pH 및 MW(kDa) 규모가 표시된다. 겔은 Sypro-Ruby로 염색하였다. 나타난 겔은 HD로부터 얻은 8개의 NS/IL-7 쌍 및 VP로부터 얻은 3개의 겔 중 대표적이다.
- [0276] (도 7a) 비-자극된(NS) HD CD4 T-세포.
- [0277] (도 7b) VP CD4 T-세포. HD로부터 제조된 것보다 VP로부터 제조된 Sypro Ruby-염색된 2D-겔에서 더 많은 점(spots)이 발견되었다. 또한 우리는 2D-겔이 VP 추출로 제조되는 경우 일반적인 점이 더욱 강렬함을 발견하였다.
- [0278] (도 7c) IL-7-자극된 HD CD4 T-세포. IL-7에 의해 자극된 HD CD4 T 세포의 패턴은 VP CD4 T 세포의 그것과 다르다. 이는 또한 VP에서 발견되는 비정상적인 활성화가 높은 수치의 IL-7를 갖는 장기, 예를 들어 IL-7-생성 장기에서 발생하는 IL-7 자극의 결과가 아니라는 제안을 뒷받침한다.
- [0279] VP CD4 T 세포에서 IL-7R 사슬은 비정상적인 MMD의 일부일뿐만 아니라 정상적 IL-7 시그날로섬에서 발견되는 것들과 다른 단백질 복합체와 상호작용한다는 것을 이 분석으로부터 결론 내릴 수 있다.
- [0280] **실시예 4: HD, VP 및 PHA-자극된 HD 세포로부터 얻은 정제된 CD4 T 세포의 표면에서 IL-7R알파의 확산률. VP CD4 T 세포 내 IL-7R알파는 지질-풍부 비정상적인 MMD에 포함되며, 따라서 이의 확산률을 제한하고 세포골격과의 어**

떠한 상호작용을 배제함으로써 신호를 전송하는 능력을 제한한다

[0281] AF488-항-IL-7R알파 mAb로 염색된 IL-7R알파의 이차원 확산을 살아있는 CD4 T-세포의 표면에서 FCS에 의해 측정하였다. 결과는 도 8에 나타난다. 확산 시간 $\tau_D(10^{-3}$ 초 내)은 설명한 바와 같이, IL-7의 부재(○, 자기상관 (autocorrelation)) 또는 IL-7-비오틴·SAF633의 존재(●, 상호상관(crosscorrelation))시 측정하였다(10, 12). 이들 시간은 그 후 공초점 부피에 의해 차단되는 세포 표면 영역 $\omega \sigma^2(10^3 \text{ nm}^2 \text{ 내})$ 에 대해 플롯팅되었다. MMD 억제제(30분 동안 COase 1 $\mu\text{g/ml}$ 및 SMase 0.1 $\mu\text{g/ml}$) 또는 세포골격 억제제(30분 동안 CytD 20 μM 및 Col 10 μM)로 전-처리된 및 처리되지 않은 확산 플롯을 나타내었다.

[0282] 막대는 5개의 독립적인 실험의 SEM을 나타낸다. 전송한 바와 같이 선형 회귀 슬로프는 제한 시간 τ_0 으로부터 추론한 유효 확산률 D_{eff} 및 y-절편(12)을 보여준다. D_{eff} 는 막대 그래프 도 3a에 나타난다.

[0283] (도 8a, 8d) HD CD4 T-세포의 표면에서,

[0284] (도 8b, 8e) VP CD4 T 세포의 표면에서,

[0285] (도 8c, 8f) PHA(1 $\mu\text{g/ml}$)로 전-활성화된 HD CD4 T 세포의 표면에서.

[0286] (도 8g) MMD 억제제 또는 세포골격 억제제에 처리 전 및 후 MMD에 포함된 IL-7R알파 확산의 메커니즘의 도식. MMD는 디스크로 나타내고, 수용기는 막대로, 세포골격은 그물(net)로 나타낸다. 확산률(빠르게, 느리게, 매우 느리게)은 데이터 해석을 용이하게 하기 위해 표시된다. 이 도식은 또한 도 3a에 나타난 결과를 도식한다.

실시예 5:VP CD4 T 세포의 비정상적인 MMD에서 격리된 IL-7R 사슬은 비기능적이다

[0287] IL-7R 알파 확산률은 전송 및 실시예 4에 기재한 바와 같이 CD4 T 세포의 표면에서 측정하였다(10, 12). 임의의 자극 전, 이들 확산률은 HD CD4 T 세포보다 VP 에서 3배 느린 것으로 나타났다(도 3a). 이는 또한 IL-7R 알파 사슬이 이들 CD4 T 세포의 표면에서 비정상적인 MMD 내 포함되는 것을 증명한다(도 3a). COase 및 SMase 치료는 이의 MMD 제약으로부터 수용기를 벗어나게 하였으며 따라서 이의 확산률이 증가되었다(도 3a). 반면에, 세포골격을 파괴시키는 - 시토크랄린 D(cytochalasin D; Cyt D) 및 콜키신(colchicin; Col)을 이용한 치료는 VP CD4 T 세포 내 IL-7R 알파 사슬의 확산률에 있어 효과를 가지지 않았다(도 3a). 세포골격 조직화가 신호 전달에 절대적으로 필요하기 때문에, IL-7R 알파 및 세포골격 그물구조(meshwork) 사이의 임의의 기능적 또는 구조적 연결의 부재는 IL-7R 복합체가 VP CD4 T 세포에서의 경우와 같이 비정상적인 MMD에서 격리되는 경우 신호가 진행될 수 없음을 제시한다.

[0288] 펄스-STED 현미경은 그 후 STAT5 인산화(포스포-STAT5) 및 세포질 및 HD 및 VP CD4 T 세포 모두의 핵 내 포스포-STAT5 분할을 연구하기 위해 사용된다. 도 3b는 15분 동안의 IL-7 자극 전 및 후 포스포-STAT5 분포의 STED 이미지를 나타낸다. 우리는 포스포-STAT5가 HD CD4 T 세포의 핵에 축적되며, 이 현상은 세포골격 해체에 의해 억제됨을 주목하였다. 반면에, 핵에 대한 포스포-STAT5 전위는 VP CD4 T 세포 또는 PHA 전-자극된 HD CD4 T 세포에서 발생하지 않는다(도 3b).

[0290] 세포질 및 핵에서 포스포-STAT5 출현의 동력학은 한시간 후에 이어졌다(도 3c, d, e). 이는 PHA-자극된 HD CD4 T 세포에서와 같이(도 3e), VP CD4 T 세포 내 포스포-STAT5가 세포질에 대부분 축적되었으며 핵으로 이동하지 않음을 나타낸다(도 3d). 이는 특히 상기 결과를 핵에서 50%의 포스포-STAT5가 발견되는 HD CD4 T 세포의 IL-7 자극 후 5분 내 얻은 결과와 비교하는 경우 특히 명백하다(도 3c).

실시예 6:VP의 혈장은 정제된 HD CD4 T 세포의 표면에서 비정상적인 MMD를 유도한다

[0292] 그 후 VP CD4 T 세포의 비정상적인 활성화의 원인을 조사하였다. 모든 CD4 T 세포가 참여하며 PHA와 같은 비생리적 신호가 그 결과처럼 보인다는 사실은 VP의 혈장의 조사로 이어졌다. 정제된 HD CD4 T 세포를 10% VP 혈장과 함께 30분 동안 배양하고 콜레라 독소 B(CtxB-AF488)로 표지하여 검출된 CD4 T 세포의 표면에서 MMD를 계수하였다. 도 4a는 얻은 이미지를 나타낸다. VP 혈장 단독은 HD CD4 T 세포상의 MMD의 많은 수를 유도하였다. IL-7의 첨가는 이들 MMD의 크기 또는 수에 영향을 미치지 않았다(도 4a). 이들 결과는 5개의 다른 VP로부터 얻은 혈장에서 나타내었으며(도 4b) 이들 VP로부터 얻은 더 많은 혈장 시료(> 15)를 이용하여 검증하였다. 실험은 또한 다른 HD(> 5)로부터 얻은 CD4 T 세포를 이용하여 반복되었다. 대조군은 정제된 HD CD4 T 세포에서 HIV-조절자(HIC) 및 항레트로바이러스-처리된(ART) 환자의 검사용 혈장 시료로 구성되었다. 이들 중 어느 것도 MMD를 유도하거나 또는 MMD의 IL-7 유도를 억제하지 않았다(도 4c).

- [0293] 이것은 또한 다양한 혈장의 많은 희석액을 검사함으로써 더 검증되었다(도 4d). VP 혈장을 0.1%로 희석화한 것은 세포 표면에 흡착된 MMD의 형성으로 이어진다. 50 내지 100 배로 희석된 VP 혈장은 50% 최대 활성으로 이어진다. HIC 또는 ART 환자로부터 얻은 혈장 시료 중 어느 것도 임의의 희석에 있어 MMD를 유도하지 않았다.
- [0294]
- [0295] **실시예 7: VP의 혈장은 IL-7-유도된 포스포-STAT5 핵 전좌를 억제한다**
- [0296] VP 혈장으로 처리된 HD CD4 T 세포에서 IL-7R의 기능은 하기 STAT5 인산화 및 핵 전좌로 확인하였다. 도 5a에 나타난 바와 같이, VP 혈장(10% 농도)과 함께 HD CD4 T 세포의 전-배양은 IL-7-유도된 STAT5 인산화 및 이의 핵 전좌를 억제하였다. 도 5b는 5개의 VP 혈장 시료로 수득한 결과를 나타낸다. 모든 10% 희석액은 포스포-STAT5의 핵 전좌를 억제하였다. 이들 결과는 다른 VP (> 15) 및 다양한 출처의 HD CD4 T 세포(>5)의 혈장으로 확인하였다.
- [0297] 또한 HIC 및 ART 환자로부터 유래된 혈장의 효과를 정제된 HD CD4 T 세포를 갖는 이들을 전-배양함으로써 시험하였다(도 5a 및 5c). 여기서 다시, 단지 VP 혈장만이 포스포-STAT5의 IL-7-유도된 핵 전좌를 억제할 수 있었다. 이는 또한 VP 혈장이 0.1% 희석액까지 활성이 있으며, 최대 활성의 절반은 50 내지 100 배 희석액에서 얻었으므로, 따라서 비정상적인 MMD를 유도하는 능력과 관련된다(도 4d)고 판단된다(도 5d).
- [0298] ART-처리된 환자로부터 유래되었으나, 이러한 처리(적은 수의 바이러스성 RNA 및 적은 수의 CD4 T-세포)에 대해 불응성(CD4-NR)인 혈장의 효과는 또한 정제된 HD CD4 T 세포와 함께 이들을 전-배양함으로써 시험하였다. 여기서 다시, 단지 CD4-NR 혈장만이 포스포-STAT5의 IL-7-유도된 핵 전좌를 억제할 수 있었다. 이는 또한 CD4-NR 혈장은 0.1% 희석액까지 활성이 있으며, 최대 활성의 절반은 50 내지 100배 희석액에서 얻었으므로, 따라서 VP에서 발견되는 비정상적인 MMD를 유도하는 능력과 관련된다.
- [0299] **실시예 8: 불응상태 유도인자의 분자적 특성**
- [0300] RIF의 화학적 성질을 조사하였다. 수행된 연구는 이의 활성이 트립신에 의해 파괴되므로(도 6a) RIF가 단백질이라는 것을 나타내었다. 펩티드 N-글리카나아제(PNGase)로 처리하는 것은 효과가 없으며, N-글리코실레이션(N-당 분해; N-glycosylation)이 RIF 활성을 위해 요구되지 않는다는 것을 나타낸다.
- [0301] RIF의 분자량은 세파텍스 G-100에서 크기-배제 크로마토그래피에 의해 측정하였다. MMD의 유도(도 6b) 및 IL-7-유도된 포스포-STAT5 핵 전좌의 억제(도 6c)는 컬럼으로부터 용출된 모든 분획에 대해 측정하였다. 두개의 대표적인 컬럼 프로파일은 도 6에 나타내었다. 두가지 모두 RIF가 10 내지 15 kDa의 MW를 가진 단일 인자라는 것을 나타낸다.
- [0302] 도 6b는 세파텍스 G100 컬럼으로부터 수거된 100개의 각 분획에서 도트 블랏을 통해 측정된 바이러스성 펩티드 또는 단백질의 밀도를 나타낸다. 측정은 바이러스성 단백질에 대한 이들의 높은 활성에 의해 특징되는 VP 혈장 시료로부터 얻은 다른 폴리클로날 항체를 이용하여 3번 반복하였다. 각 실험에서 t HD 혈장으로 얻은 신호는 그 후 값으로부터 차감하였다. 도 6b에 나타난 패턴은, 도트 블랏 분석은 높은 MW(190 내지 32 kDa)에서 바이러스성 단백질을 검출할 수 있었으나, 바이러스성 단백질 또는 단편이 RIF 활성을 포함하는 분획에서 검출되지 않음을 증명한다.
- [0303] 세파텍스 G100 컬럼으로부터 얻은 10 내지 15 kDa의 활성, 풍부 분획은 그 후 음이온(MonoQ) 또는 양이온(MonoS) 교환 컬럼상에서 유지하고 pH 용출(MonoS로 pH 증가 또는 MonoQ로 pH 감소)함으로써 RIF의 등전점을 만드는데 사용되었다(도 6d). 다양한 pH 분획의 MMD-유도 활성은 그 후 pH를 7.4로 조정된 후 측정하였다. 모두에서, 25 내지 30%의 초기 활성은 두개의 분획에서 회복하였으며, 결과는 등전점 6.5 내지 8.0의 등전점과 일치한다.
- [0304] RIF는 따라서 이황화물 다리(disulfide bridge)를 포함하는, 약 15kDa의 MW, pI 대략 7.5-8.0을 갖는 분비 단백질이다. 상기 구조적 및 기능적 특성에 따라, RIF는 직접적으로 식별하였다. 특히, 36853개의 공지된 인간 단백질 모두 중, 62개만이 RIF의 상기 4개의 특성을 갖는다. 3명의 바이러스 혈증성 환자 및 3개의 HD로부터 제조된 반-정제된 물질은 질량분석기 및 표준 마스코트 프로그램(standard Mascot program)을 이용하여 분석하였다. 재료 및 방법에서 설명한 *p score*에 따라 회수된 단백질의 순서를 결정하였다. 하기 표1에 나타난 결과는 분명히 그리고 직접적으로 RIF는 GIBsPLA2임을 나타낸다.

표 1

연상 기호	ID	PI	MW	i_s	p_점수	설명
PA21B_HUMAN	P04054	7.95	14138.99	9	0.64	포스포리파아제 A2 군 1
TMEM9_HUMAN	Q9P0T7	6.23	18568.37	5	0.29	막관통 단백질 9(TM)
ESM1_HUMAN	Q9NQ30	6.83	18122.42	5	0.10	내피 세포-spe 분자 1
CYTD_HUMAN	P28325	6.76	13858.6	3	0.08	시스타틴-D(Cystatin-D)
SSRB_HUMAN	P43308	7.03	18273.74	7	0.05	신호 서열 R 서브 베타(TM)
GPIX_HUMAN	P14770	6.14	17316.06	6	0.04	혈소판 당단백질 IX
B2MG_HUMAN	P61769	7.67	18510.47	4	0.03	베타-2-마이크로글로불린
EPGN_HUMAN	Q6UW09	7.72	14724.99	1	0.02	에피젠(Epigen)
IL19_HUMAN	Q9UHD0	7.8	17812.56	5	0.02	인터루킨-19
IL3_HUMAN	P08700	7.05	15091.38	3	0.02	인터루킨-3
GML_HUMAN	Q99445	6.67	15918.41	7	0.02	글리코실-PPI-anc 유사 단백질
CYTM_HUMAN	P05113	7.02	13149.22	4	0.017	시스타틴-M(Cystatin-M)

[0306] 바이러스 혈증성 환자의 혈장에서 발견된 단백질은 따라서 GIBsPLA2의 분비 형태이다. 성숙 단백질은 125 aa(MW14138), PI 7.95 및 7 이황화물 다리를 갖는다. 상업용 정제된 돼지 GIBsPLA2를 이용하여, 우리는 이 단백질이 바이러스 혈증성 환자의 혈장에서 IL-7 pSTAT5 핵 전위를 차단하는 비정상적인 MDM를 유도하는지 여부를 실험실에서 확인할 수 있었으며, RIF가 GIBsPLA2이고, 더욱 구체적으로 이들의 분비 형태라는 것을 더 확인하였다. 인간 GIBsPLA2의 아미노산 서열은 서열번호: 2로서 제공된다.

[0307] 실시예 9: PLA2sGIB는 CD4 림프구의 불감응성(면역성 결핍; anergy)을 유도한다

[0308] 실시예 7는 PLA2sGIB가 MMD의 유도를 통해, 포스포 STAT5(NT pSTAT5)의 IL-7-유도된 핵 전위의 차폐를 유도한다는 것을 나타낸다. 결과적으로, CD4 T 림프구는 IL-7에 반응하지 않으며 HIV 환자의 혈장 내 이 사이토카인의 높은 수치에도 불구하고, 이들 수의 감소는 HIV-감염된 환자의 특징인 CD4 림프구 감소로 이어진다.

[0309] 여기서 우리는 PLA2sGIB가 또한 만성적으로 HIV-감염된 환자로부터 얻은 CD4 림프구의 또다른 특성인, 면역성 결핍의 유도에 참여할 가능성을 조사하였다.

[0310] 생물학적 검정

[0311] MMD 유도:

[0312] PLA2sGIB를 포함하는 VP 혈장을 먼저 정제된 HD CD4 T 세포와 함께 배지에서 배양하였다(20분). 그 후 세포를 폴리리신-코팅된 유리 슬라이드 상에서 추가적으로 10분 동안 두었다. 이들을 콜레라 독소 B(CtxB-AF488)로 염색하기 전 파라포름알데히드(PFA, 1.5%, 37°C에서 15분 그 후 실온에서 15분)로 고정하였으며, MMD는 CW-STED 현미경으로 계수하였다.

[0313] STAT 인산화 및 핵 전좌의 억제:

[0314] PLA2sGIB를 포함하는 VP 혈장을 IL-7(2 nM, 15분)에 의한 자극 전 먼저 정제된 HD CD4 T 세포와 함께 배양하였다(20분). 그 후 세포를 PFA(1.5%)로 고정 및 메탄올(-20°C에서 90%)로 투과하기 전 폴리리신-코팅된 유리 슬라이드 상에 두었다. pSTAT5를 염소 항-래빗-Atto642으로 표지된 래빗 항-STAT5으로 염색하고 FACS 또는 펄스 STED 현미경에 의해 분석하였다.

[0315] 결과

[0316] 도 10a는 PLA2 GIB(바이러스 혈증성 환자의 혈장)에 노출 후, 건강한 공여자(HD)로부터 얻은 CD4 림프구는 IL-2-유도된 NT pSTAT5를 억제함으로써 측정된 바와 같이, IL-2에 반응할 수 없게 된다. 이 억제는 3% 혈장을 포함하는 전체에서 나타났으며, 가장 유의한 결과는 1% 혈장(p<0.0001)이다.

[0317] 우리는 또한 PLA2 GIB에 대한 CD4⁺ CD25⁺ T reg 림프구의 반응을 연구하였다. 결과는 도 10b에 나타낸다. 설명한 바와 같이, NT pSTAT5에 의해 100%의 건강한 세포가 IL-2에 대하여 반응하는 반면, PLA2 GIB(바이러스 혈증성 환자의 1% 혈장)는 이러한 신호 전달 메커니즘을 완전히 억제하였다. CD4⁺ CD25⁺ 세포는 총 CD4 T 세포의 5% 미만을 나타내기 때문에, 이들은 도 10a에서 나타낸 데이터에 중요한 영향을 미칠 수 없다.

[0318] IL-7 및 IL-2는 감마 c 사이토카인 계열의 일원이다. 사이토카인에 대한 불감응성이 감마 c와 관련된 것인지 확인하기 위하여, 우리는 IL-4에 대한 반응을 시험하였다. IL-4 반응은 pSTAT6의 IL-4 유도된 NT에 의해 측정하였다(도 11). 우리의 결과는 IL-4 반응이 PLA2 GIB에 의해 억제된다(3% 혈장의 경우 완전히 및 1% 혈장의 경우 크게)는 것을 분명히 나타낸다.

[0319] 이들 결과는 따라서 감마 c 계열의 사이토카인에 의해 유도된 신호 메커니즘이 PLA2 GIB에 의해 변형된다는 것을 나타낸다. 이는 감마 c 수용기 사슬이 HIV-환자로부터 얻은 CD4 림프구의 표면에서 자발적으로 발견되는 MMD에서 완전히 격리된 채 발견된다는(데이터로 나타내지 않음) 우리의 발견과 완전히 일치한다

[0320] **실시예 10: PLA2 GIB의 재조합 형태의 활성**

[0321] 본 실시예에서, 면역계에서 정제된 형태의 단백질의 효과를 더 확인하고 이의 특성을 더 확인하기 위하여, PLA2 GIB 단백질의 다양한 정제된 형태의 활성을 시험하였다.

[0322] 효소 분석

[0323] 본 분석은 Life Technologies(ref.: E102147)의 Enz Check PLA2 분석 키트로 수행하였다. 본 분석은 PLA2 효소 활성의 지속적으로 빠른 실시간 감시를 제공한다. PLA2 활성은 515 nm의 단일 파장의 강도 증가로 이어진다. PLA2는 460nm에서의 여기(excitation)를 갖는 515/575nm에서의 발광(emission) 강도율의 변화에 의해 검출된다. 특이적 활성은 용액에서 효소의 초당 및 µg 당 수득하는 형광기질(U)의 양으로 발현된다.

[0324]

[0325] 결과

[0326] 결과는 하기 표 2에 제공된다.

표 2

재조합 PLA2 GIB 단백질의 활성

[0327]

PLA2	종류	초기농도 (mg/ml)	최종농도 (ug/ml)	양 (ug)	특이적 활성 (U/ug/s)
ppPLA2 IB	정제된 돼지 췌장	2.90	0.58	0.06	7694.31
pPLA2 IB	재조합 돼지(in E. coli)	1.40	2.80	0.14	10353.57
hPLA2 IB	재조합 인간 (in E.coli)	0.70	1.40	0.07	10694.57
hPLA2 IIA	재조합 인간 (in E. coli)	1.45	2.90	0.15	214.93
hPLA2 IID	재조합 인간(E. coli)	0.70	1.40	0.07	445.21
hPLA2 X	재조합 인간(in E. coli)	0.68	1.36	0.07	3318.97

[0328] 결과는 E. Coli 내에서 생성된 재조합 인간 PLA2 GIB가 강한 효소 활성을 나타낸다는 것을 나타낸다. 또한, 결과는 또한 E. Coli에서 제조된 재조합 돼지 PLA2GIB가 재조합 인간 PLA2GIB의 그것과 유사한 특이적 활성을 갖는다는 것을 나타낸다. 반면, 재조합 PLA2GIIA 및 PLA2GIID는 활성이 없으며 PLA2GX는 매우 제한된 활성을 갖는다.

[0329] 재조합 PLA2 GIB는 따라서 본 발명에서 사용되기 위한 강한 활성 제제를 나타낸다.

[0330] **실시예 11: CD4 림프구에서 PLA2sGIB의 효과는 이의 효소 활성을 포함한다**

[0331] 본 실시예에서, 우리는 CD4 림프구상에서 PLA2sGIB의 활성이 PLA2sGIB의 효소적(예를 들어, 촉매적) 활성을 포함(예를 들어, 이의 결과가)하는지 여부를 조사하였다. 이러한 효소적 활성은 CD4 림프구의 표면에서 다수의 MMD 형성을 유도하는 막 구조를 변형할 수 있다.

[0332] 이들 실험에서, 우리는 위치 48에서 중요한 히스티딘이 글루타민(돌연변이 H48Q)에 의해 대체되는 PLA2sGIB의 돌연변이를 시험하였다. 실시예 10에서 설명한 효소적 시험을 이용하여, 우리는 E. Coli에서 제조된 재조합 돼지 PLA2 GIB의 효소적 활성을 E. Coli에서 제조된 돌연변이 H48Q의 활성과 비교하였다. 각 단백질은 200microm에서 사용되었다. 도 12에 나타난 바와 같이, 돌연변이는 PLA2 GIB 내 위치 48에서 히스티딘의 중요한 역할을

나타내는 이의 모든 효소적 활성을 잃었다.

- [0333] 우리는 그 후 생물학적 검정에서 야생형 돼지 PLA2 GIB의 활성을 이의 돌연변이 H48Q와 비교하였다. 도 13에 나타난 결과는 MMD를 유도하기 위하여 또는 pSTAT5(NT pSTAT5)의 IL-7 유도된 핵 전위를 줄이거나 없애기 위하여 돌연변이가 wtPLA2 GIB의 능력을 잃었다는 것을 나타낸다.
- [0334] 이들 결과는 따라서 효소적 활성이 CD4 림프구상에서 PL2 GIB의 병원성 효과에 관여한다는 것을 나타낸다.
- [0335] **실시예 12: 항-GIBsPLA2 항체는 HIV 바이러스 혈증성 환자의 혈장에서 CD4-T 세포 활성을 회복한다.**
- [0336] 본 실시예는 바이러스 혈증성 환자의 혈장에서, GIBsPLA2가 HIV-감염된 환자의 혈액에서 특정되는 것들과 비교할 수 있는 "병든(sick)" 림프구로 HD로부터 얻은 CD4 림프구를 변형시킨다는 것을 나타낸다. 이 실시예는 또한 항-GIBsPLA2 항체가 병원성 활성을 효과적으로 억제함을 나타낸다.
- [0337] 실험의 첫번째 시리즈에서, 혈장은 인간 GIBsPLA2에 대한 염소 항체 또는 관련성이 없는 항원에 대한 두개의 대조군 염소 항체로 코팅된 세파로오스 비즈로 처리되었다. 도 14(a)는 항-GIBsPLA2 항체가 HD로부터 얻은 CD4 림프구 내 비정상적인 MMD를 유도할 수 없는, 혈장의 활성을 완전히 없애거나 제거한다는 것을 분명히 나타낸다. 대조군 I 및 대조군 II 항체는 효과가 없었다. 이들 실험은 각 혈장에서 3번 반복되었으며, 바이러스 혈증성 환자의 3개의 다른 혈장이 연구되었다.
- [0338] 도 14(b)는 동일한 결과를 나타낸다. 여기서 혈장은 상기와 같이 실험하였으나 제2 생물학적 검정을 이용하여 분석하였다. 항-GIBsPLA2 항체로 코팅된 세파로오스 비즈에 의해 처리된 혈장은 더 이상 IL-7-유도된 pSTAT5 핵 전좌를 억제하지 않는다. 대조군 I 및 대조군 II 염소 항체는 IL-7 유도된 pSTAT5 핵 전좌를 억제하기 위한 바이러스 혈증성 환자의 혈장의 능력에 영향을 미치지 않았다.
- [0339] 실험의 두번째 시리즈에서, 우리는 구체적으로 인간 GIBsPLA2, -GIIA 및 -GIID에 대한 중화 래빗 항체의 효과를 시험하였다. 이들 항체는 생물학적 검정 동안 혈장 및 세포와 함께 배양하였다. 결과는 항-GIBsPLA2 항체가 비정상적인 MMD의 유도 및 IL-7-유도된 pSTAT5 핵 전좌의 억제에 의해 측정된 바와 같이 바이러스 혈증성 혈장의 효과를 중화함을 나타낸다. GIBsPLA2와 매우 관련된, 2개의 포스포리파아제, 분비 PLA2-GIIA 또는 분비 PLA2-GIID에 대한 항체가 본 시험에 있어 효과가 없다는 것은 주목할만하다.
- [0340] 이들 결과는 항-GIBsPLA2 항체 바이러스 혈증성 혈장의 면역억제 효과를 회복하거나 예방할 수 있다는 것을 나타낸다. 이들 결과는 항-GIBsPLA2 항체가 면역-방어 개체에서 면역결핍을 예방하고 면역 반응을 재자극할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0341] 이들 결과는 또한 반응이 특정된 것임을 입증한다. GIBsPLA2는 바이러스 혈증성 환자의 혈장을 특정하는, 검사된 병원성 효과에 관여하는 이펙터(effector)일 뿐이다.
- [0342] **실시예 13: 항-PLA2GIB 항체는 CD4 세포에서 PLA2 GIB 효과를 억제한다.**
- [0343] 복제된 및 정제된 인간 PLA2GIB를 래빗을 면역화하는데 이용하였다. 해당 혈청의 면역글로불린 분획을 제조하였다. PLA2GIB의 효소적 활성을 억제하는 이들의 능력은 방사성 표지된 E. Coli 막에서 측정하였다. 활성 면역글로불린 분획은 건강한 공여자의 혈액으로부터 정제된 CD4 림프구를 포함하는 생물학적 검정에 첨가되었다. 복제되고 정제된 분비 PLA2(GIB, GIIA, GIID and GX)는 그 후 배지에 첨가하였다. 다양한 분비 PLA2로 면역화된 래빗으로부터 제조된 면역글로불린 분획이 대조군으로서 사용되었다.
- [0344] 도 15는 다른 농도의 폴리클로날 항체가 MMD의 유도를 억제하고(도 15a) IL-7-유도된 NT pSTAT5을 차단하는(도 15b) 것을 나타낸다. 이 활성은 항-PLA2 GIB 항체를 포함하는 1 ?/ml 내지 100 ?/ml의 Ig로부터 얻을 수 있다. PLA2 GIIA, PLA2GIID 또는 PLA2GX에 대한 항체가 생물학적 검정에서 효과를 나타내지 않기 때문에(도 15 a 및 b) 이 활성은 전체적으로 특이적이다.
- [0345] 이들 결과는 따라서 PLA2GIB의 억제가 면역 결핍을 치료하고 CD4 활성을 회복하기 위하여 사용될 수 있다는 것을 추가적으로 입증한다.
- [0346] **실시예 14: 수용성 PLA2GIB 수용기는 CD4 T 세포에서 PLA2 GIB 효과를 억제한다.**
- [0347] PLA2GIB의 억제체가 치료적 효과를 발휘할 수 있음을 나타내는 추가적 증명과 같이, 우리는 PLA2GIB 수용기의 수용성 형태를 시험하였다.
- [0348] 실험의 첫번째 시리즈에서, 우리는 하기 아미노산 서열(서열번호: 22)을 갖는 PLA2 GIB에 특이적인 수용성 쥐의

수용기를 사용하였다:

[0349] MVQWLAMLQLLWLQQLLLGIHQGIAQDLTHIQEPSLEWRDKGIFIIQSESLKTCIQAGK
 [0350] SVLTLENCKQPNEHMLWKWVSDHDLFNVGGSGCLGLNISALEQPLKLYECDSTLISLRWH
 [0351] CDRKMIIEGLPYKQVQVKSNDTIVARKQIHRWIAYTSSGGDICEHPSRDLYTLKGNHGMF
 [0352] CVFPFQFKGHWHDICIREGQKEHLLWCATTSRYEEDEKWFCDPPTSMKVFCDATWQRNG
 [0353] SSRICYQFNLLSSLSWNQAHSSCLMQGGALLSIADEDEEDFIRKHLKVVKEVWIGLNQL
 [0354] DEKAGWQWSDGTPLSYLNSWQEI TPGPFVEHHCGTLEVVSAAWRSRDCESTLPYICKRDL
 [0355] NHTAQGILEKDSWKYHATHCDPDWTPFNKCYKLLKDRKSWLGALHSCQSNDSVLMDVAS
 [0356] LAEVEFLVSLLRDENASETWIGLSSNKIPVSEWSSGSSVIFTNWWYPLEPRILPNRRQLC
 [0357] VSAEESDGRWVKDKCKERLFYICKKAGQVPADEQSGCPAGWERHGRFCYKIDTVLRSFEE
 [0358] ASSGYCSPALLTITSRFEQAFITSLISSVAEKDSYFWIALQDQNTGEYTWKTVGQREP
 [0359] VQYTYWNTRQPSNRGGCVVVRGGSSLRWEVKDCSDFKAMSLCKTPVKIWEKTELEERWP
 [0360] FHPCYMDWESATGLASCFKVFHSEKVLKRSWREAEAFCEEFGAHLASFAHIEEENFVNE
 [0361] LLHSKFNWTQERQFVIGFNRRNPLNAGSWAWSDGSPVVSFLDNAYFEEDAKNCAVYKAN
 [0362] KTLPLSNCASKHEWICRIPRDVPRKFPDWYQYDAPWLFYQNAEYLFHHPAEWATFEFVC
 [0363] GWLRSDFLTIIYSAEQEFIHSKIKGLTKYGVKWWIGLEEGGARDQIQWSNGSPVIFQNW
 [0364] KGREERVDSQRKRCVFISSITGLWGTENCSPVLPVICKRVKIWVIEKEKPPTQPGTCKPKG
 [0365] WLYFNKCFVLVTPKDPRELKTWTGAQEFVAKGGTLVSIKSELEQAFITMNLFGQTTNV
 [0366] WIGLQSTNHEKWVNGKPLVYSNWSPSDIINIPSYNTTEFQKHIPCALMSSNPNFHTGK
 [0367] WYFDDCGKEGYGFVCEKMQDTLEHHVNVSDTSAIPSTLEYGNRTYKIRGNMTWYAAGKS
 [0368] CRMHRAELASIPDAFHQAFLTVLLSRLGHTHWIGLSTTDNGQTFDWSGTGKSPFTYWKDE
 [0369] ESAFLGDCAFADTNGRWHSTACESFLQGAICHVVTETKAFEHPGLCSETSVPWIKFKGNC
 [0370] YSFSTVLDSRSFEDAHEFCKSEGSNLLAIRDAAENSFLEELLAFGSSVQMVWLNQAFDN
 [0371] NNKTLRWFDTGTPTEQSNWGLRKPDMHDKPHPCVVLRIPEGIWHFTPCEDKKGFICKMEA
 [0372] GIPAVTAQPEKGLSHSIVPVTVTLTLIIALGIFMLCFWIYKQKSDIFQRLTGSRGSYYPT
 [0373] LNFSTAHLLENILISDLEKNTNDEEVRDAPATESKRGHKGRPICISP

[0374] 100nM의 농도에서 실시예 9에서 설명된 생물학적 검정으로 억제제를 시험하였다. 결과는 도 16에 나타낸다. 이는 재조합 PLA2 수용성 수용기가 강한 길항제로서 사용될 수 있으며 이러한 분자가 pSTAT5의 NT에서 PLA2sGIB의 부정적인 효과를 현저히 차단할 수 있음을 나타낸다(도 16).

[0375] 유사한 결과는 서열번호: 25 또는 28의 서열을 포함하는 PLA2-GIB-결합 폴리펩티드를 이용하는 실험의 추가적 세트에서 얻을 수 있다.

[0376] **실시예 15: GIBsPLA2의 과발현은 면역학적 결함을 유도한다**

[0377] 바이러스성 로드를 감소시키는 고효성 항-레트로바이러스성 치료(Highly Active Anti-Retroviral Therapy; HAART)가 또한 대부분의 환자에서 CD4 수 증가를 유도한다는 것은 이전에 나타내었다. 그러나, 일부 환자에서, HIV가 검출되지 않는다는 사실에도 불구하고, CD4 수는 증가하지 않는다. 우리는 이전에 이러한 임상적 상황을 연구하였고 CD4 Non Responders(CD4-NR)로 불리는 이들 환자에서 CD4 T 림프구의 강력하고 지속적인 결함이 발견된다는 것을 나타내었다.

[0378] 도 17은 CD4-NR 환자의 혈장이 대조군으로서 바이러스 혈증성 환자의 혈장에 비해 더욱 큰 PLA2 GIB 활성을 포

함한다는 것을 나타낸다. 이는 먼저 세포당 비정상적인 MMD의 유도에 의해 측정하였다. 이들 데이터는 또한 IL-7-유도된 pSTAT5 핵 전좌를 억제하기 위한 능력을 측정함으로써 확인되었다.

[0379] 전부, 결과는 CD4-NR 환자의 혈장이 바이러스 혈증성 환자의 혈장에 비해 100배 더 큰 PLA2 GIB 활성을 포함한다는 것을 나타낸다.

[0380] 논의

[0381] 우리의 결과는 PLA2 GIB가 바이러스 혈증성 환자로부터 얻은 CD4 T 세포를 특징하는 것과 유사한 면역억제를 유도하며, 이는 IL-2(면역성 결핍; anergy) 및 IL-7(CD4 림프구 감소를 향한 중심 메커니즘)에 대한 반응에 있어 불능을 포함한다는 것을 나타낸다. 따라서, HIV 감염 도중 GIBsPLA2의 발현은 이들 환자를 특징하는 면역 질병의 병태생리에 있어 중심적 역할을 한다. HIV 환자의 CD8 T 림프구가 비정상적인 MMD를 나타내지 않으며 IL-7에 대한 반응을 지속하지 않기 때문에(데이터로 나타내지 않음), 이들 결합은 세포-유형 특이적이다. PLA2 GIB의 활성 모드는 아마도 이의 효소적 활성의 결과이다. CD4 림프구의 막을 공격함으로써, 이는 이의 유동성을 변형하고 비정상적이고 매우 거대한 MMD의 형성을 허용한다.

[0382] 염증 반응은 HIV 감염시 중요한 역할을 한다. 그러나, HIV 발병시 이들의 정확한 역할은 밝혀지지 않은 채로 남아있다. 우리의 데이터를 고려하여, HIV 감염이 GIBsPLA2를 유도하는 염증의 매우 독특한 형태를 유도한다는 가설을 세울 수 있다. 또한, PLA2 GIB 유도 후, 이의 분비가 정상적 규제 절차를 벗어나 CD4 T 림프구 기능장애의 직접적 결과인 만성적 생산 및 면역학적 장애로 이어졌다는 가설을 세울 수 있다. CD4 T 림프구 기능장애의 간접적 결과로서, 다른 결합이 또한 관찰될 수 있다. 예를 들어, 인터페론 감마의 생산 감소는 단핵구/대식세포 및 자연살해 세포(natural killers)의 기능을 감소시킬 것이다.

[0383] 혈장의 PLA2 GIB 활성의 회복 및 환자의 다른 군의 특성과의 관계는 또한 매우 유익하다. "HIV 조절자(HIV controllers)"는 몇 년에 걸쳐 검출되지 않는 바이러스성 로드 및 거의 정상적 CD4 수를 유지하는 희귀한 환자이다. 우리의 결과는 이들이 이들의 혈장에서 PLA2 GIB 활성을 발현하지 않는다는 것을 나타낸다. 반면, 대부분의 환자에서, 이 효소는 발현되고 면역학적 질병으로 이어지는 염증의 부정적인 측면을 나타낸다. 전체적으로, 이는 PLA2 GIB가 HIV 감염의 병태생리에 있어 매우 중요한 매개변수라는 것을 분명히 설정한다.

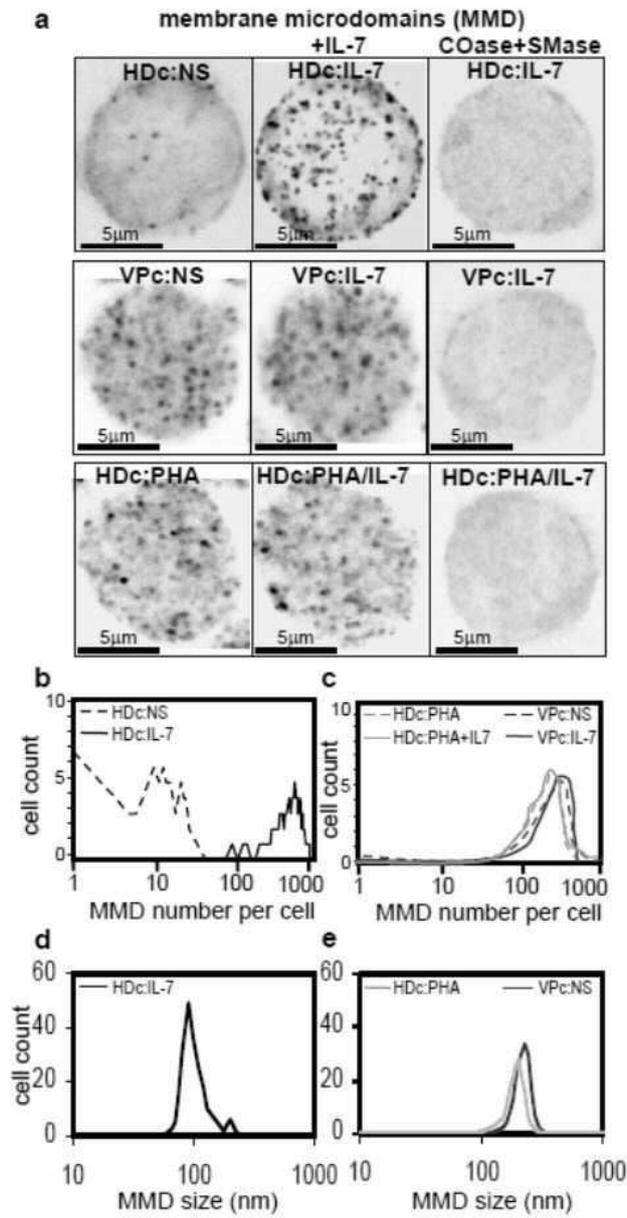
[0384] HAART 바이러스성 로드 감소 후 CD4 수의 증가를 포함하는 면역 회복이 뒤따른다. 치료 중, PLA2 GIB 활성은 환자의 혈장에서 사라진다. HAART가 염증 반응을 감소시키는 것으로 고려되기 때문에, 이는 또한 PLA2 GIB가 이들 염증 과정의 일부라는 것을 제시한다. 더욱 중요한 것은, 우리는 HAART가 이들의 바이러스성 로드를 조절하는 동안, 매우 낮은 CD4 수가 남아있는 CD4-NR 환자의 경우를 여기서 설명한다. 이들 개인에서 발견되는 PLA2 GIB의 과생산은 이들 임상적 상태를 특징하는 면역 질병의 지속성을 설명할 수 있다. 따라서, HAART 후, 면역 회복으로 이어지는 PLA2 GIB의 생산 감소 또는 면역 질환의 비가역성으로 이어지는 이의 지속적 과생산 사이에 강한 관계가 있다.

[0385] 이 발견의 치료적 결과 및 활용은 거대하다. PLA2 GIB의 억제는 더욱 일반적으로, 면역 억제된 개체뿐만 아니라 HIV 환자의 면역학적 질병을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다. 감염시 초기 적용을 위하여, PLA2 GIB의 억제제는 HIV 조절자 상태를 향해 환자를 이끈다. 이후의 적용은, 단독 또는 HAART와 함께/교대로, CD4 T 림프구 기능의 회복을 촉진하고 숙주 방어를 강화함으로써, PLA2 GIB의 억제제가 많은 다른 바이러스성 만성적 감염에서와 같이 바이러스 및 면역계 사이의 평형으로 이어진다. 따라서, PLA2 GIB의 억제제는, 단독 또는 결합하여, 비정상적인 면역 반응 또는 활성과 관련된 장애를 치료하기 위한 사용을 위한 매우 강한 체제를 나타낸다. 이들은 또한 HAART 절약에 도움이 될 수 있으며 이들의 심각한 악영향에 대하여 알려져 있는 이들 치료의 중단으로 이어질 수 있다.

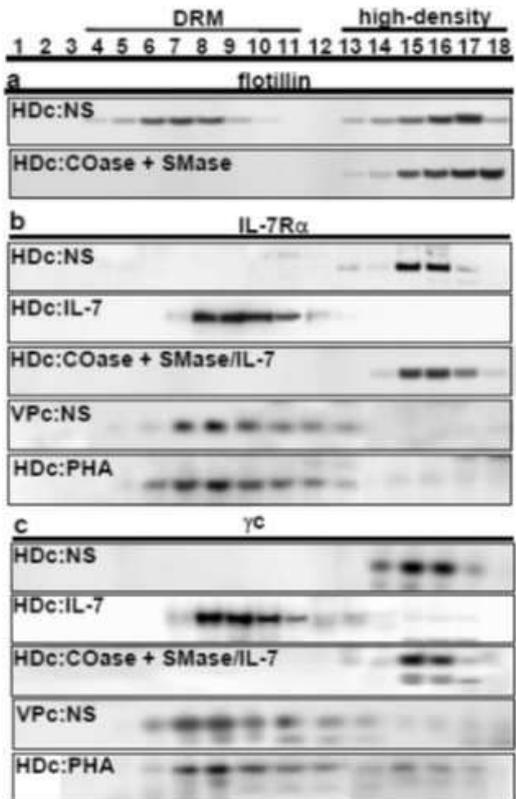
[0386] 또한, GIBsPLA2 발현의 부족(해당 유전자에 대해 마우스 KO에서와 같이)이 잘 용인되기 때문에, 억제제를 이용하거나 예방접종을 통한 GIBsPLA2의 일시적이거나 영구적인 억제는 면역 질환, 특히 HIV 환자의 강력하고 유효한 면역치료를 나타낸다.

도면

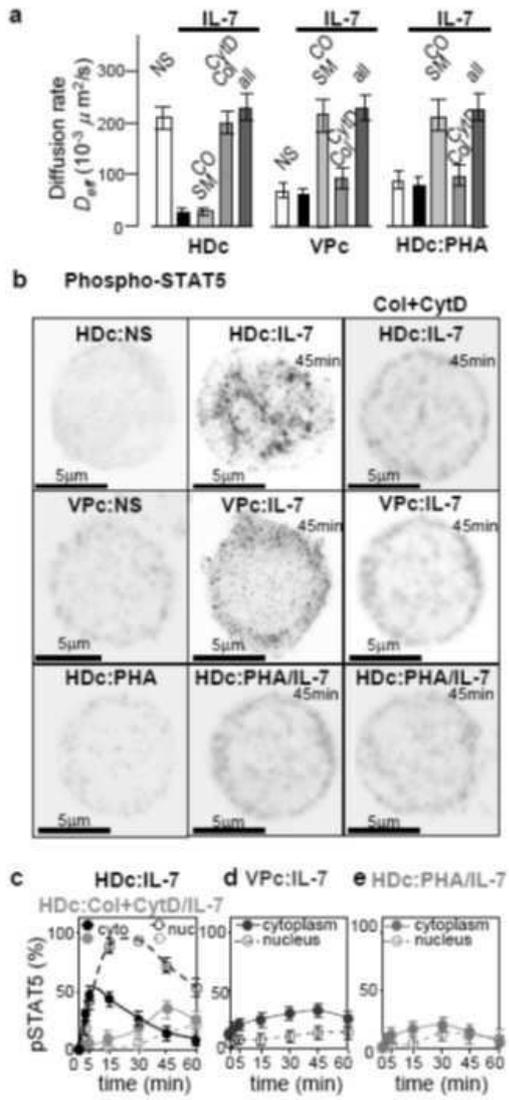
도면1



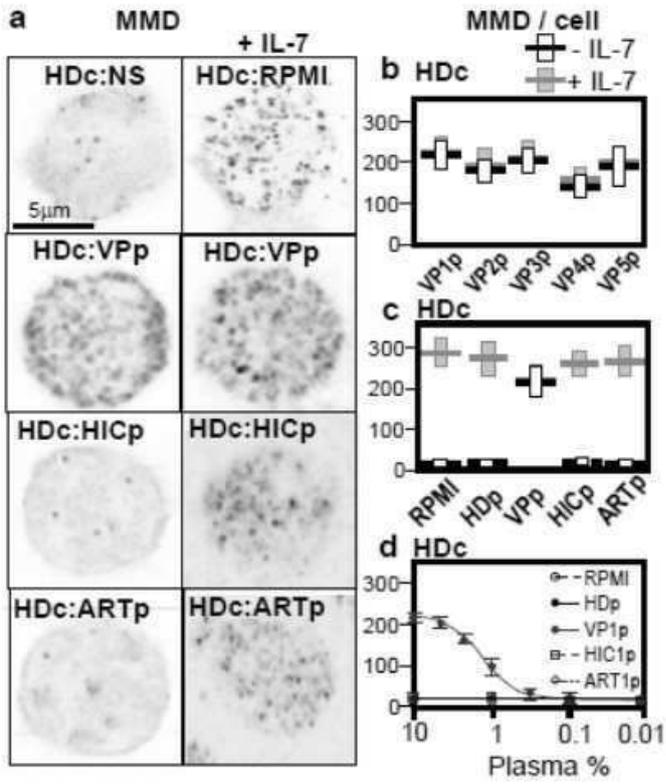
도면2



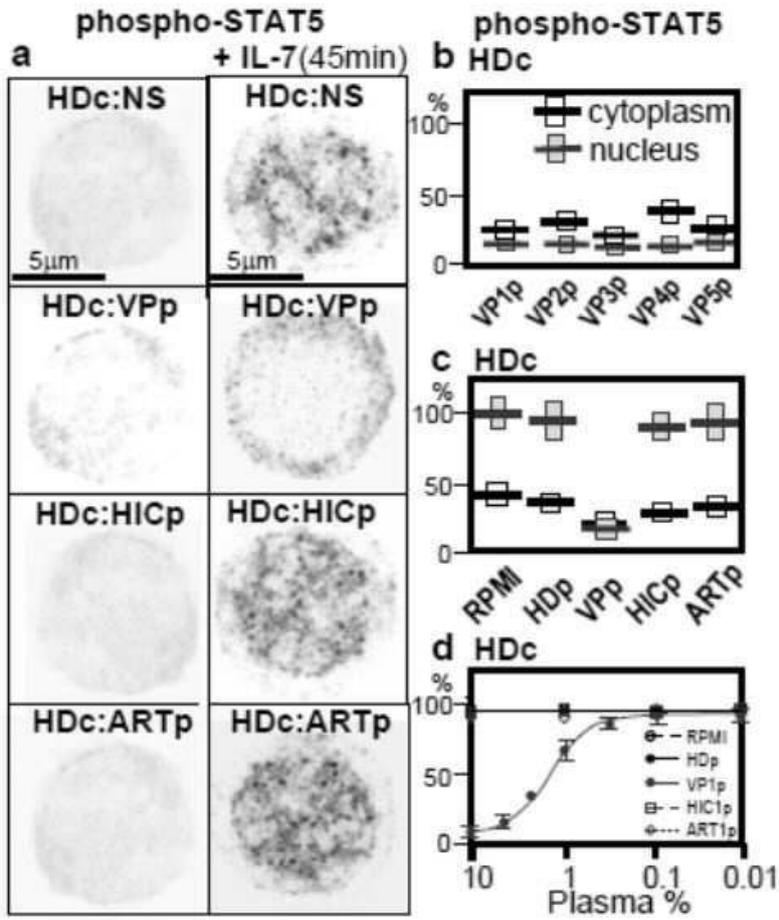
도면3



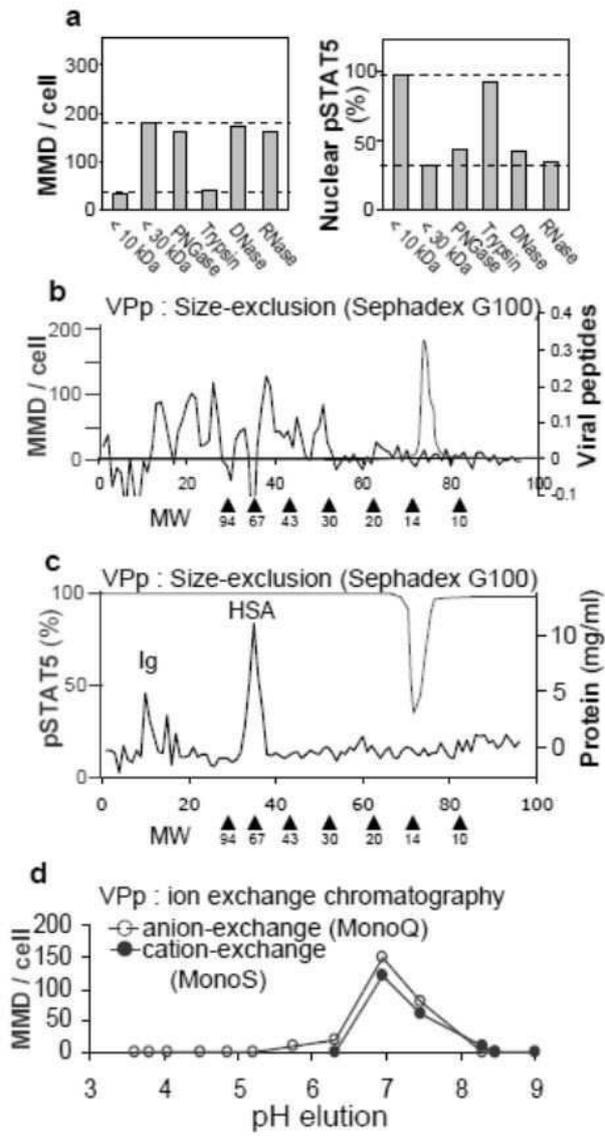
도면4



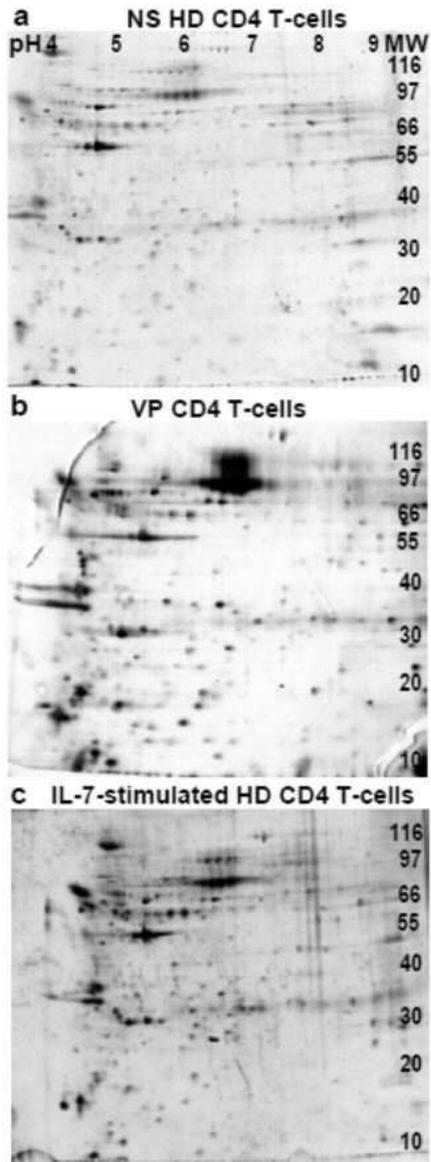
도면5



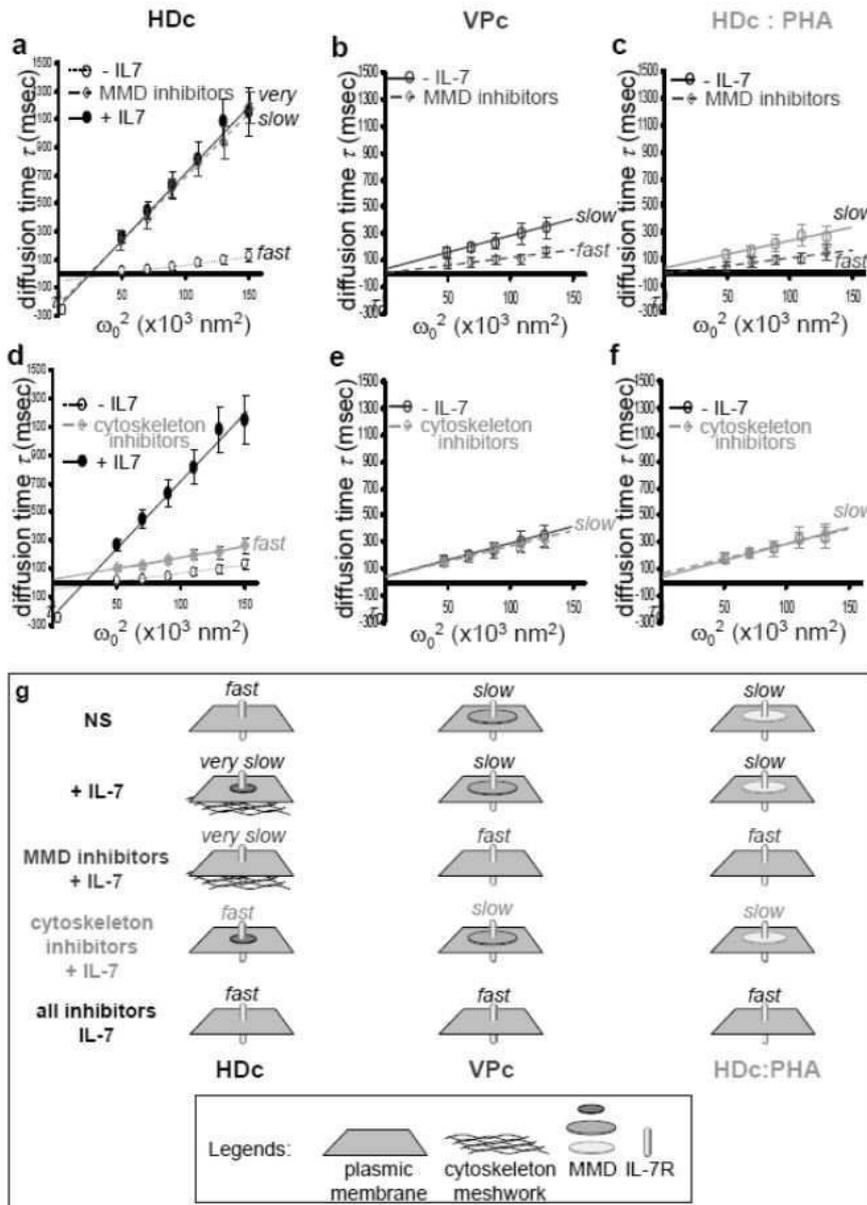
도면6



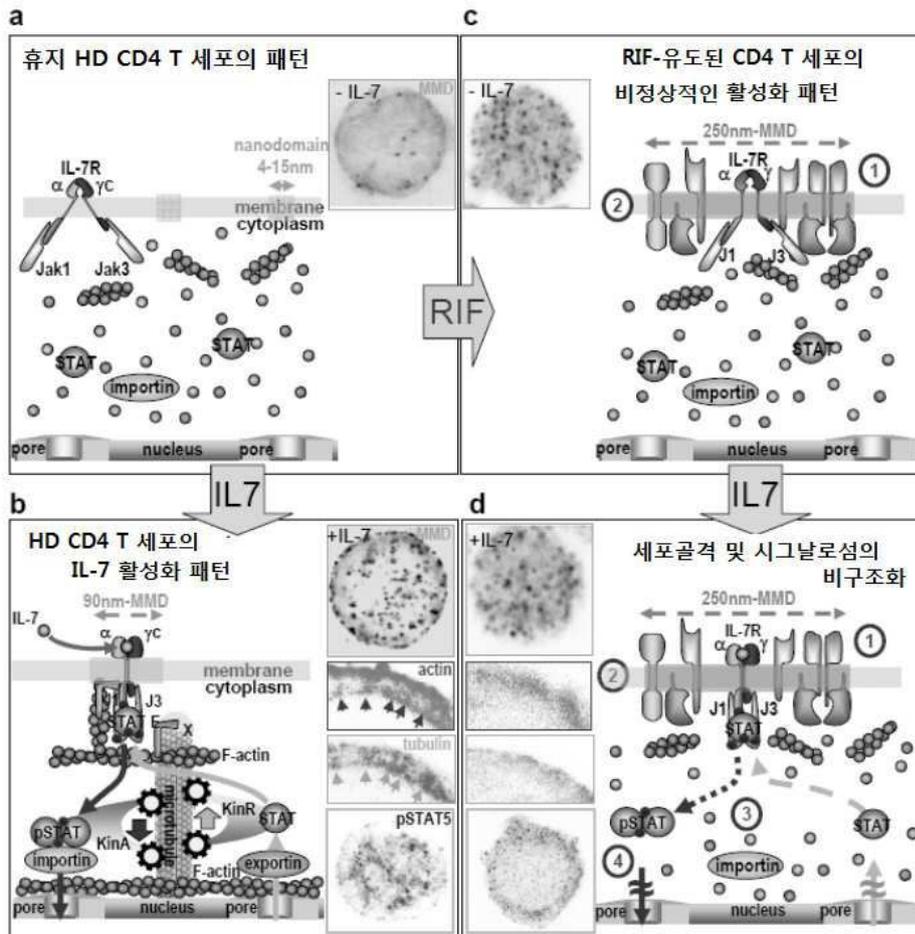
도면7



도면8

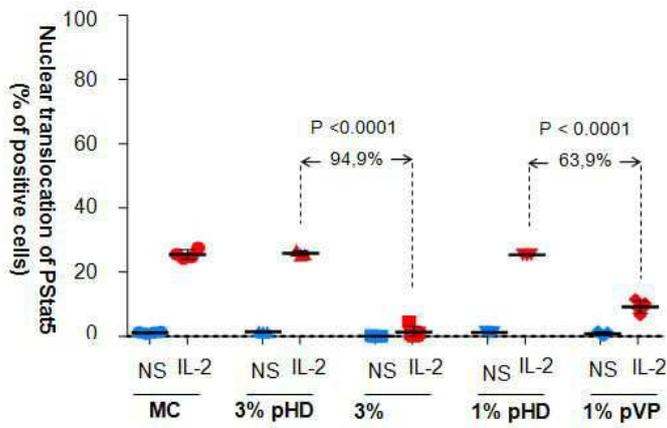


도면9

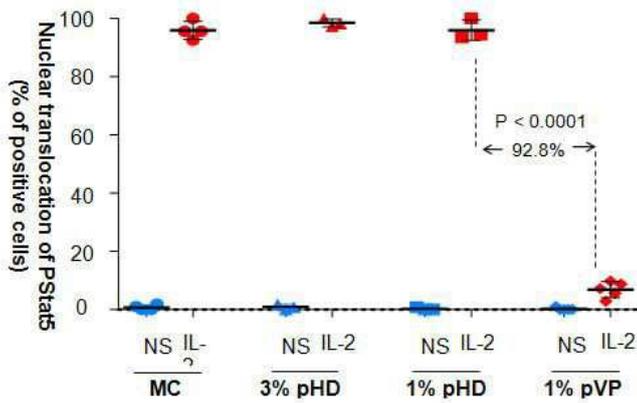


도면10

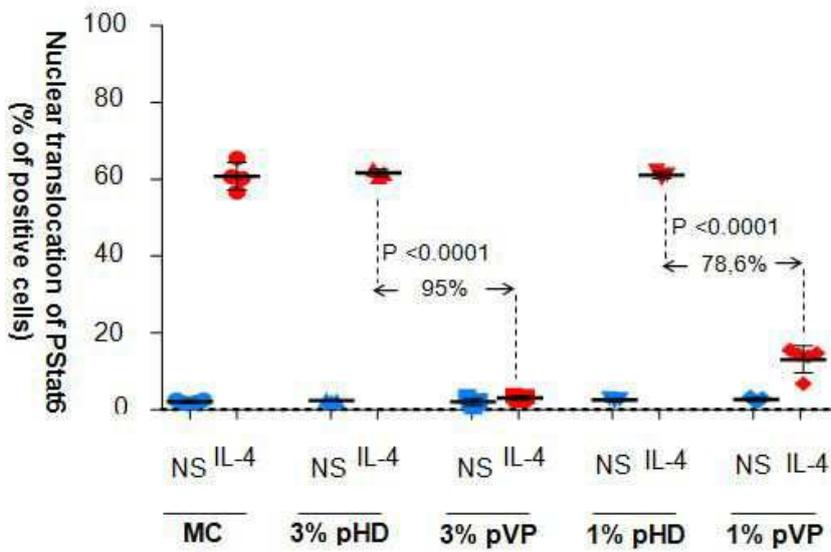
a. Total CD4 T cells



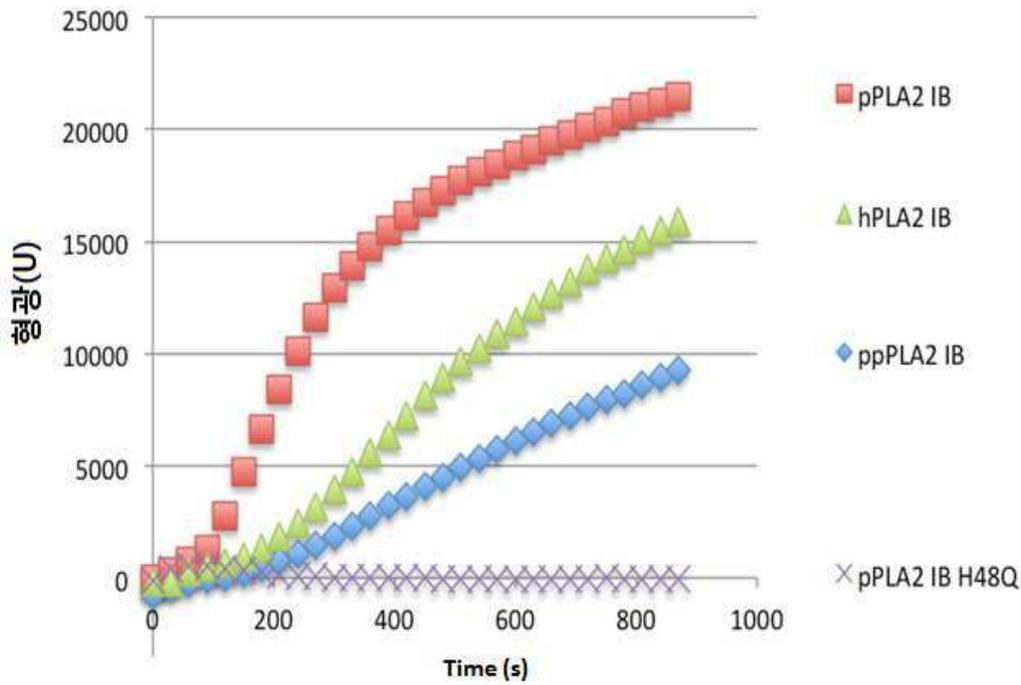
b. CD4⁺CD25⁺T cells



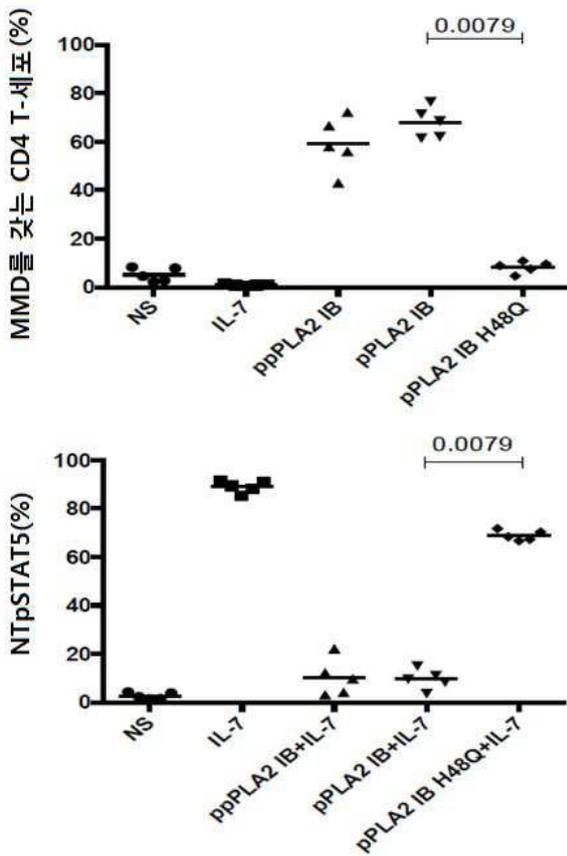
도면11



도면12

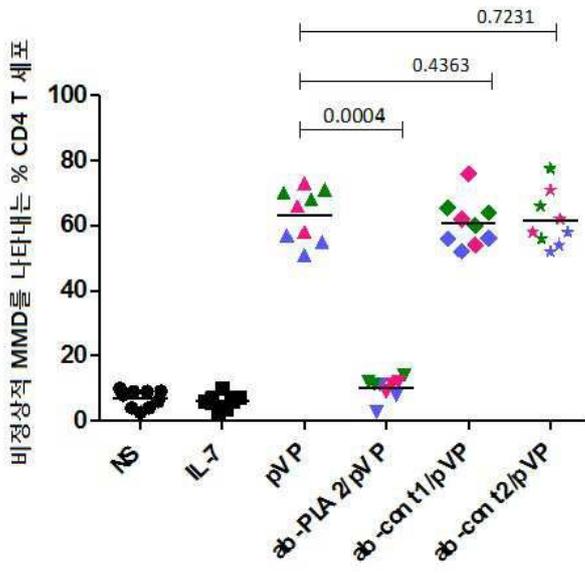


도면13

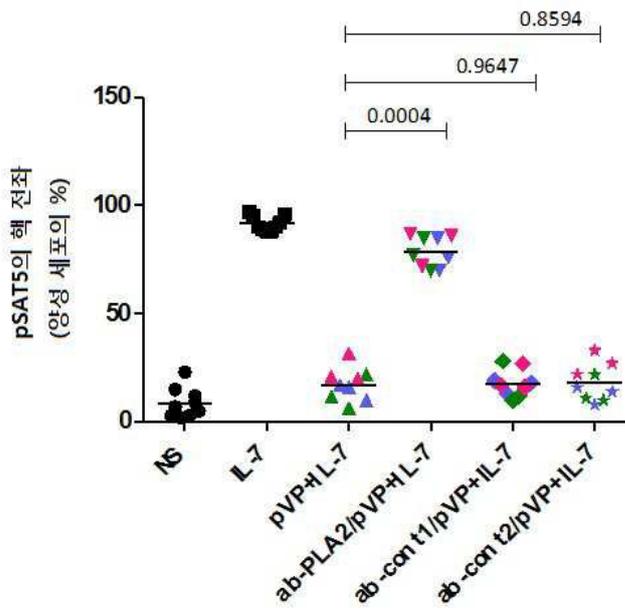


도면14

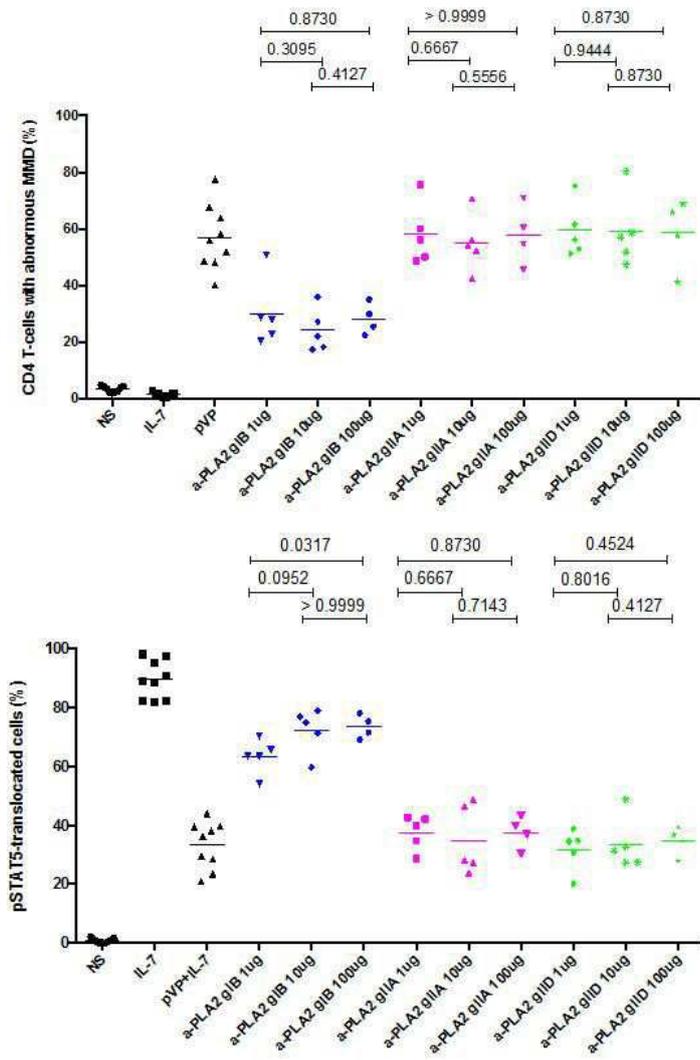
a.



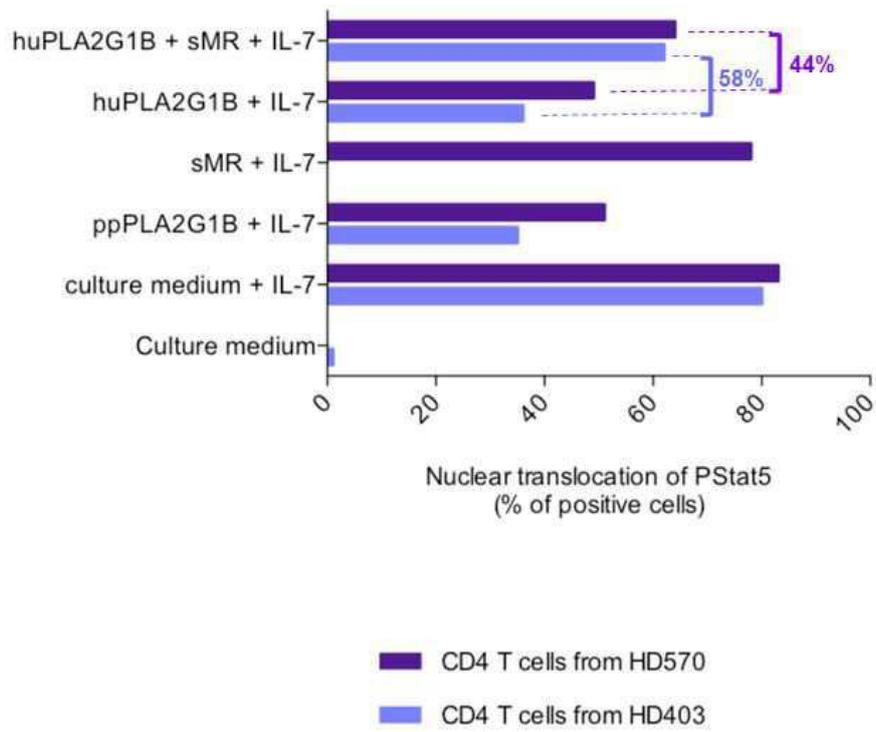
b.



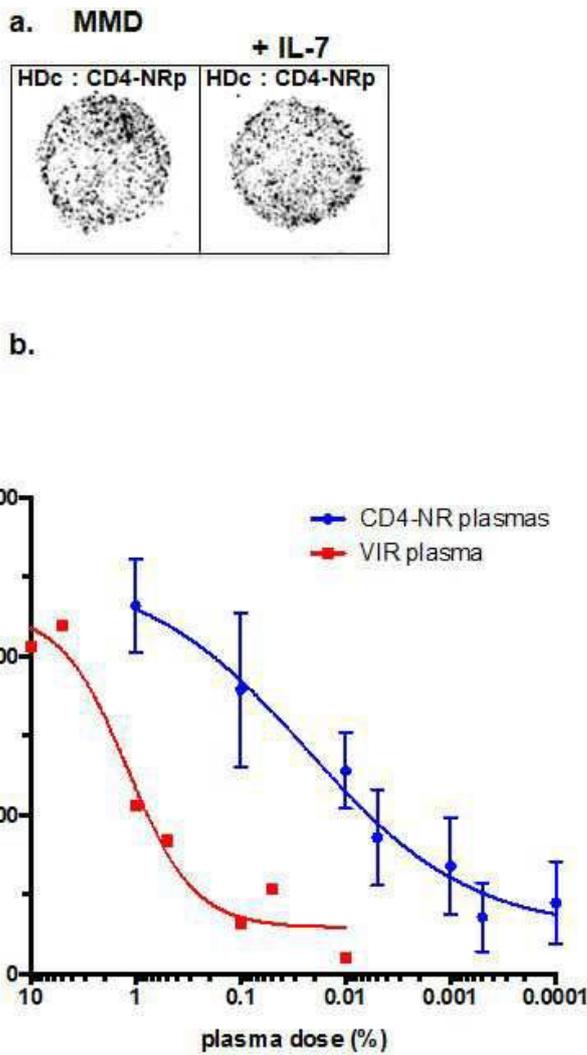
도면15



도면16



도면17



서열목록

- <110> INSTITUT PASTEUR
- <120> THERAPEUTIC METHODS AND COMPOSITIONS
- <130> beas1607
- <150> PCT/EP 2014/078969
- <151> 2014-12-22
- <160> 31
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 447
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> cDNA encoding hGIBsPLA2
- <400> 1

atgaaactcc ttgtgctagc tgtgctgctc acagtggccg cgcgcgacag cggcatcagc 60
 cctcgggccc tgtggcagtt cgcgaaaatg atcaagtgcg tgatcccggg gaggtagcccc 120
 ttcttggaat acaacaacta cggctgctac tgtggcttgg ggggctcagg cacccccgtg 180

 gatgaactgg acaagtgtcg ccagacacat gacaactgct acgaccaggc caagaagctg 240
 gacagctgta aatttctgct ggacaacccg tacaccacac cctattcata ctctgtctct 300
 ggctcggcaa tcacctgtag cagcaaaaac aaagagtgtg aggccttcat ttgcaactgc 360
 gaccgcaacg ctgcatctg cttttcaaaa gctccatata acaaggcaca caagaacctg 420
 gacaccaaga agtattgtca gaggttga 447

<210> 2
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hGIBsPLA2
 <400> 2

Met Lys Leu Leu Val Leu Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Ala Ala Asp

1	5	10	15	
Ser Gly Ile Ser Pro Arg Ala Val Trp Gln Phe Arg Lys Met Ile Lys				
	20	25	30	
Cys Val Ile Pro Gly Ser Asp Pro Phe Leu Glu Tyr Asn Asn Tyr Gly				
	35	40	45	
Cys Tyr Cys Gly Leu Gly Gly Ser Gly Thr Pro Val Asp Glu Leu Asp				
	50	55	60	
Lys Cys Cys Gln Thr His Asp Asn Cys Tyr Asp Gln Ala Lys Lys Leu				
	65	70	75	80
Asp Ser Cys Lys Phe Leu Leu Asp Asn Pro Tyr Thr His Thr Tyr Ser				
	85	90	95	
Tyr Ser Cys Ser Gly Ser Ala Ile Thr Cys Ser Ser Lys Asn Lys Glu				
	100	105	110	
Cys Glu Ala Phe Ile Cys Asn Cys Asp Arg Asn Ala Ala Ile Cys Phe				
	115	120	125	
Ser Lys Ala Pro Tyr Asn Lys Ala His Lys Asn Leu Asp Thr Lys Lys				
	130	135	140	

Tyr Cys Gln Ser

145

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory nucleic acid molecule

<400> 3

atgaaactcc ttgtgctag

19

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory nucleic acid molecule

<400> 4

acagcggcat cagc

14

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory nucleic acid molecule

<400> 5

ttccgcaaaa tgatcaa

17

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inhibitory nucleic acid molecule

<400> 6

cccggggagt gacccc

16

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Inhibitory nucleic acid molecule
 <400> 7
 tacggctgct actgtggctt 20

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Inhibitory nucleic acid molecule
 <400> 8
 gacacatgac aactgctacg acc 23

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Inhibitory nucleic acid molecule
 <400> 9
 acccacacct attcatactc gt 22

<210> 10
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Inhibitory nucleic acid molecule
 <400> 10
 atcacctgta gcagca 16

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Inhibitory nucleic acid molecule
 <400> 11
 agctccatat aacaaggca 19

<210> 12

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Inhibitory nucleic acid molecule
 <400> 12
 caagaagtat tgtcagag

18

<210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Immunogenic peptide
 <400> 13
 Asn Asn Tyr Gly Cys Tyr
 1 5

<210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Immunogenic peptide
 <400> 14
 Cys Tyr Cys Gly Leu Gly
 1 5

<210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Immunogenic peptide
 <400> 15
 Tyr Asn Asn Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Leu Gly Gly Ser Gly

1 5 10
 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Immunogenic peptide

<400> 16

Phe Leu Glu Tyr Asn Asn Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Leu Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Thr Pro Val

20

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Immunogenic peptide

<400> 17

Gln Thr His Asp Asn

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Immunogenic peptide

<400> 18

Cys Gln Thr His Asp Asn Cys

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Immunogenic peptide

<400> 19

Glu Cys Glu Ala Phe Ile Cys Asn Cys

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Immunogenic peptide

<400> 20

Asp Arg Asn Ala Ala Ile

1 5

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Immunogenic peptide

<400> 21

Asp Arg Asn Ala Ala Ile Cys Phe Ser Lys Ala Pro Tyr Asn Lys Ala

1 5 10 15

His Lys Asn Leu

20

<210> 22

<211> 1487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> soluble receptor

<400> 22

Met Val Gln Trp Leu Ala Met Leu Gln Leu Leu Trp Leu Gln Gln Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Ile His Gln Gly Ile Ala Gln Asp Leu Thr His Ile

20 25 30

Gln Glu Pro Ser Leu Glu Trp Arg Asp Lys Gly Ile Phe Ile Ile Gln

35 40 45

Ser Glu Ser Leu Lys Thr Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr

50 55 60

Leu Glu Asn Cys Lys Gln Pro Asn Glu His Met Leu Trp Lys Trp Val

65 70 75 80

Ser Asp Asp His Leu Phe Asn Val Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu

Lys Thr Val Gly Gln Arg Glu Pro Val Gln Tyr Thr Tyr Trp Asn Thr
 595 600 605
 Arg Gln Pro Ser Asn Arg Gly Gly Cys Val Val Val Arg Gly Gly Ser
 610 615 620
 Ser Leu Gly Arg Trp Glu Val Lys Asp Cys Ser Asp Phe Lys Ala Met
 625 630 635 640
 Ser Leu Cys Lys Thr Pro Val Lys Ile Trp Glu Lys Thr Glu Leu Glu
 645 650 655
 Glu Arg Trp Pro Phe His Pro Cys Tyr Met Asp Trp Glu Ser Ala Thr
 660 665 670
 Gly Leu Ala Ser Cys Phe Lys Val Phe His Ser Glu Lys Val Leu Met
 675 680 685
 Lys Arg Ser Trp Arg Glu Ala Glu Ala Phe Cys Glu Glu Phe Gly Ala
 690 695 700
 His Leu Ala Ser Phe Ala His Ile Glu Glu Glu Asn Phe Val Asn Glu
 705 710 715 720
 Leu Leu His Ser Lys Phe Asn Trp Thr Gln Glu Arg Gln Phe Trp Ile
 725 730 735
 Gly Phe Asn Arg Arg Asn Pro Leu Asn Ala Gly Ser Trp Ala Trp Ser
 740 745 750
 Asp Gly Ser Pro Val Val Ser Ser Phe Leu Asp Asn Ala Tyr Phe Glu
 755 760 765
 Glu Asp Ala Lys Asn Cys Ala Val Tyr Lys Ala Asn Lys Thr Leu Leu
 770 775 780
 Pro Ser Asn Cys Ala Ser Lys His Glu Trp Ile Cys Arg Ile Pro Arg
 785 790 795 800
 Asp Val Arg Pro Lys Phe Pro Asp Trp Tyr Gln Tyr Asp Ala Pro Trp
 805 810 815
 Leu Phe Tyr Gln Asn Ala Glu Tyr Leu Phe His Thr His Pro Ala Glu
 820 825 830
 Trp Ala Thr Phe Glu Phe Val Cys Gly Trp Leu Arg Ser Asp Phe Leu
 835 840 845

Thr Ile Tyr Ser Ala Gln Glu Gln Glu Phe Ile His Ser Lys Ile Lys
 850 855 860
 Gly Leu Thr Lys Tyr Gly Val Lys Trp Trp Ile Gly Leu Glu Glu Gly
 865 870 875 880

 Gly Ala Arg Asp Gln Ile Gln Trp Ser Asn Gly Ser Pro Val Ile Phe
 885 890 895
 Gln Asn Trp Asp Lys Gly Arg Glu Glu Arg Val Asp Ser Gln Arg Lys
 900 905 910
 Arg Cys Val Phe Ile Ser Ser Ile Thr Gly Leu Trp Gly Thr Glu Asn
 915 920 925
 Cys Ser Val Pro Leu Pro Ser Ile Cys Lys Arg Val Lys Ile Trp Val
 930 935 940
 Ile Glu Lys Glu Lys Pro Pro Thr Gln Pro Gly Thr Cys Pro Lys Gly

 945 950 955 960
 Trp Leu Tyr Phe Asn Tyr Lys Cys Phe Leu Val Thr Ile Pro Lys Asp
 965 970 975
 Pro Arg Glu Leu Lys Thr Trp Thr Gly Ala Gln Glu Phe Cys Val Ala
 980 985 990
 Lys Gly Gly Thr Leu Val Ser Ile Lys Ser Glu Leu Glu Gln Ala Phe
 995 1000 1005
 Ile Thr Met Asn Leu Phe Gly Gln Thr Thr Asn Val Trp Ile Gly Leu
 1010 1015 1020

 Gln Ser Thr Asn His Glu Lys Trp Val Asn Gly Lys Pro Leu Val Tyr
 1025 1030 1035 1040
 Ser Asn Trp Ser Pro Ser Asp Ile Ile Asn Ile Pro Ser Tyr Asn Thr
 1045 1050 1055
 Thr Glu Phe Gln Lys His Ile Pro Leu Cys Ala Leu Met Ser Ser Asn
 1060 1065 1070
 Pro Asn Phe His Phe Thr Gly Lys Trp Tyr Phe Asp Asp Cys Gly Lys
 1075 1080 1085
 Glu Gly Tyr Gly Phe Val Cys Glu Lys Met Gln Asp Thr Leu Glu His

1090 1095 1100
 His Val Asn Val Ser Asp Thr Ser Ala Ile Pro Ser Thr Leu Glu Tyr
 1105 1110 1115 1120
 Gly Asn Arg Thr Tyr Lys Ile Ile Arg Gly Asn Met Thr Trp Tyr Ala
 1125 1130 1135
 Ala Gly Lys Ser Cys Arg Met His Arg Ala Glu Leu Ala Ser Ile Pro
 1140 1145 1150
 Asp Ala Phe His Gln Ala Phe Leu Thr Val Leu Leu Ser Arg Leu Gly
 1155 1160 1165

 His Thr His Trp Ile Gly Leu Ser Thr Thr Asp Asn Gly Gln Thr Phe
 1170 1175 1180
 Asp Trp Ser Asp Gly Thr Lys Ser Pro Phe Thr Tyr Trp Lys Asp Glu
 1185 1190 1195 1200
 Glu Ser Ala Phe Leu Gly Asp Cys Ala Phe Ala Asp Thr Asn Gly Arg
 1205 1210 1215
 Trp His Ser Thr Ala Cys Glu Ser Phe Leu Gln Gly Ala Ile Cys His
 1220 1225 1230
 Val Val Thr Glu Thr Lys Ala Phe Glu His Pro Gly Leu Cys Ser Glu

 1235 1240 1245
 Thr Ser Val Pro Trp Ile Lys Phe Lys Gly Asn Cys Tyr Ser Phe Ser
 1250 1255 1260
 Thr Val Leu Asp Ser Arg Ser Phe Glu Asp Ala His Glu Phe Cys Lys
 1265 1270 1275 1280
 Ser Glu Gly Ser Asn Leu Leu Ala Ile Arg Asp Ala Ala Glu Asn Ser
 1285 1290 1295
 Phe Leu Leu Glu Glu Leu Leu Ala Phe Gly Ser Ser Val Gln Met Val
 1300 1305 1310

 Trp Leu Asn Ala Gln Phe Asp Asn Asn Asn Lys Thr Leu Arg Trp Phe
 1315 1320 1325
 Asp Gly Thr Pro Thr Glu Gln Ser Asn Trp Gly Leu Arg Lys Pro Asp
 1330 1335 1340
 Met Asp His Leu Lys Pro His Pro Cys Val Val Leu Arg Ile Pro Glu

1345 1350 1355 1360
 Gly Ile Trp His Phe Thr Pro Cys Glu Asp Lys Lys Gly Phe Ile Cys
 1365 1370 1375
 Lys Met Glu Ala Gly Ile Pro Ala Val Thr Ala Gln Pro Glu Lys Gly

 1380 1385 1390
 Leu Ser His Ser Ile Val Pro Val Thr Val Thr Leu Thr Leu Ile Ile
 1395 1400 1405
 Ala Leu Gly Ile Phe Met Leu Cys Phe Trp Ile Tyr Lys Gln Lys Ser
 1410 1415 1420
 Asp Ile Phe Gln Arg Leu Thr Gly Ser Arg Gly Ser Tyr Tyr Pro Thr
 1425 1430 1435 1440
 Leu Asn Phe Ser Thr Ala His Leu Glu Glu Asn Ile Leu Ile Ser Asp
 1445 1450 1455

 Leu Glu Lys Asn Thr Asn Asp Glu Glu Val Arg Asp Ala Pro Ala Thr
 1460 1465 1470
 Glu Ser Lys Arg Gly His Lys Gly Arg Pro Ile Cys Ile Ser Pro
 1475 1480 1485

 <210> 23
 <211> 1326
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> soluble receptor
 <400> 23

 Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu

 20 25 30
 Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu
 35 40 45
 Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Gly Arg Thr
 50 55 60
 Gly Ser Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn

Glu Val Asn Phe Glu Pro Phe Val Glu Asp His Cys Gly Thr Phe Ser
 325 330 335
 Ser Phe Met Pro Ser Ala Trp Arg Ser Arg Asp Cys Glu Ser Thr Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Ile Cys Lys Lys Tyr Leu Asn His Ile Asp His Glu Ile Val
 355 360 365
 Glu Lys Asp Ala Trp Lys Tyr Tyr Ala Thr His Cys Glu Pro Gly Trp
 370 375 380

 Asn Pro Tyr Asn Arg Asn Cys Tyr Lys Leu Gln Lys Glu Glu Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp His Glu Ala Leu Arg Ser Cys Gln Ala Asp Asn Ser Ala Leu Ile
 405 410 415
 Asp Ile Thr Ser Leu Ala Glu Val Glu Phe Leu Val Thr Leu Leu Gly
 420 425 430
 Asp Glu Asn Ala Ser Glu Thr Trp Ile Gly Leu Ser Ser Asn Lys Ile
 435 440 445
 Pro Val Ser Phe Glu Trp Ser Asn Asp Ser Ser Val Ile Phe Thr Asn

 450 455 460
 Trp His Thr Leu Glu Pro His Ile Phe Pro Asn Arg Ser Gln Leu Cys
 465 470 475 480
 Val Ser Ala Glu Gln Ser Glu Gly His Trp Lys Val Lys Asn Cys Glu
 485 490 495
 Glu Arg Leu Phe Tyr Ile Cys Lys Lys Ala Gly His Val Leu Ser Asp
 500 505 510
 Ala Glu Ser Gly Cys Gln Glu Gly Trp Glu Glu Thr Cys Gly Phe Cys
 515 520 525

 Tyr Lys Ile Asp Thr Val Leu Arg Ser Phe Asp Gln Ala Ser Ser Gly
 530 535 540
 Tyr Tyr Cys Pro Pro Ala Leu Val Thr Ile Thr Asn Arg Phe Glu Gln
 545 550 555 560
 Ala Phe Ile Thr Ser Leu Ile Ser Ser Val Val Lys Met Lys Asp Ser
 565 570 575

Tyr Phe Trp Ile Ala Leu Gln Asp Gln Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Thr
 580 585 590
 Trp Lys Pro Val Gly Gln Lys Pro Glu Pro Val Gln Tyr Thr His Trp
 595 600 605
 Asn Thr His Gln Pro Arg Tyr Ser Gly Gly Cys Val Ala Met Arg Gly
 610 615 620
 Arg His Pro Leu Gly Arg Trp Glu Val Lys His Cys Arg His Phe Lys
 625 630 635 640
 Ala Met Ser Leu Cys Lys Gln Pro Val Glu Asn Gln Glu Lys Ala Glu
 645 650 655
 Tyr Glu Glu Arg Trp Pro Phe His Pro Cys Tyr Leu Asp Trp Glu Ser
 660 665 670

 Glu Pro Gly Leu Ala Ser Cys Phe Lys Val Phe His Ser Glu Lys Val
 675 680 685
 Leu Met Lys Arg Thr Trp Arg Glu Ala Glu Ala Phe Cys Glu Glu Phe
 690 695 700
 Gly Ala His Leu Ala Ser Phe Ala His Ile Glu Glu Glu Asn Phe Val
 705 710 715 720
 Asn Glu Leu Leu His Pro Lys Phe Asn Trp Thr Glu Glu Arg Gln Phe
 725 730 735
 Trp Ile Gly Phe Asn Lys Arg Asn Pro Leu Asn Ala Gly Ser Trp Glu
 740 745 750
 Trp Ser Asp Arg Thr Pro Val Val Ser Ser Phe Leu Asp Asn Thr Tyr
 755 760 765
 Phe Gly Glu Asp Ala Arg Asn Cys Ala Val Tyr Lys Pro Asn Lys Thr
 770 775 780
 Leu Leu Pro Leu His Cys Gly Ser Lys Arg Glu Trp Ile Cys Lys Ile
 785 790 795 800
 Pro Arg Asp Val Lys Pro Lys Ile Pro Phe Trp Tyr Gln Tyr Asp Val
 805 810 815

 Pro Trp Leu Phe Tyr Gln Asp Ala Glu Tyr Leu Phe His Thr Phe Ala

1075 1080 1085
 Cys Gly Lys Glu Gly Tyr Gly Phe Val Cys Glu Lys Met Gln Asp Thr
 1090 1095 1100

 Ser Gly His Gly Val Asn Thr Ser Asp Met Tyr Pro Met Pro Asn Thr
 1105 1110 1115 1120
 Leu Glu Tyr Gly Asn Arg Thr Tyr Lys Ile Ile Asn Ala Asn Met Thr
 1125 1130 1135
 Trp Tyr Ala Ala Ile Lys Thr Cys Leu Met His Lys Ala Gln Leu Val
 1140 1145 1150
 Ser Ile Thr Asp Gln Tyr His Gln Ser Phe Leu Thr Val Val Leu Asn
 1155 1160 1165
 Arg Leu Gly Tyr Ala His Trp Ile Gly Leu Phe Thr Thr Asp Asn Gly

 1170 1175 1180
 Leu Asn Phe Asp Trp Ser Asp Gly Thr Lys Ser Ser Phe Thr Phe Trp
 1185 1190 1195 1200
 Lys Asp Glu Glu Ser Ser Leu Leu Gly Asp Cys Val Phe Ala Asp Ser
 1205 1210 1215
 Asn Gly Arg Trp His Ser Thr Ala Cys Asp Ser Phe Leu Gln Gly Ala
 1220 1225 1230
 Ile Cys His Val Pro Pro Glu Thr Arg Gln Ser Glu His Pro Glu Leu
 1235 1240 1245

 Cys Ser Glu Thr Ser Ile Pro Trp Ile Lys Phe Lys Ser Asn Cys Tyr
 1250 1255 1260
 Lys Phe Ser Thr Val Leu Asp Ser Met Ser Phe Glu Ala Ala His Glu
 1265 1270 1275 1280
 Phe Cys Lys Lys Glu Gly Ser Asn Leu Leu Thr Ile Lys Asp Glu Ala
 1285 1290 1295
 Glu Asn Ala Phe Leu Leu Glu Glu Leu Phe Ala Phe Gly Ser Ser Val
 1300 1305 1310
 Gln Met Val Trp Leu Asn Ala Gln Phe Asp Gly Asn Ser Lys

 1315 1320 1325

<210> 24
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> inhibitor peptide
 <400> 24
 Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser Leu Arg Trp Arg
 1 5 10 15
 Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr Ser Val Gln Val
 20 25 30
 Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr Ile His Lys Trp
 35 40 45

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> inhibitor peptide
 <400> 25
 Trp Glu Lys Asp Leu Asn Ser His Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser

<210> 26
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> inhibitor peptide
 <400> 26
 Asp Cys Glu Ser Thr Leu Pro Tyr Ile Cys Lys Lys Tyr Leu Asn His
 1 5 10 15
 Ile Asp His Glu Ile Val Glu Lys

20
 <210> 27

<211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> inhibitor peptide
 <400> 27

Gln Tyr Lys Val Gln Val Lys Ser Asp Asn Thr Val Val Ala Arg Lys
 1 5 10 15
 Gln Ile His Arg Trp Ile Ala Tyr Thr Ser Ser Gly Gly Asp Ile Cys
 20 25 30
 Glu

<210> 28
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> inhibitor peptide

<400> 28
 Leu Ser Tyr Leu Asn Trp Ser Gln Glu Ile Thr Pro Gly Pro Phe Val
 1 5 10 15
 Glu His His Cys Gly Thr Leu Glu Val Val Ser Ala
 20 25

<210> 29
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> inhibitor peptide

<400> 29
 Ser Arg Phe Glu Gln Ala Phe Ile Thr Ser Leu Ile Ser Ser Val Ala
 1 5 10 15
 Glu Lys Asp Ser Tyr Phe Trp

20
 <210> 30
 <211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> inhibitor peptide

<400> 30

Trp Ile Cys Arg Ile Pro Arg Asp Val Arg Pro Lys Phe Pro Asp Trp

1 5 10 15

Tyr Gln Tyr Asp Ala Pro Trp Leu Phe Tyr Gln Asn Ala

20 25

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> inhibitor peptide

<400> 31

Ala Phe His Gln Ala Phe Leu Thr Val Leu Leu Ser Arg Leu Gly His

1 5 10 15

Thr His Trp Ile Gly Leu Ser Thr Thr Asp Asn Gly Gln Thr

20 25 30