



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2006-0130731
A61K 48/00 (2006.01) (43) 공개일자 2006년12월19일

(21) 출원번호	10-2006-7021139	(87) 국제공개번호	WO 2005/090573
(22) 출원일자	2006년10월11일	(43) 공개일자	2006년12월19일
심사청구일자	없음		
번역문 제출일자	2006년10월11일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2005/008423	(87) 국제공개번호	WO 2005/090573
국제출원일자	2005년03월14일	국제공개일자	2005년09월29일

(30) 우선권주장	60/552,523	2004년03월12일	미국(US)
	60/622,559	2004년10월27일	미국(US)

(71) 출원인
더 브리검 앤드 우먼즈 하스피털, 인크.
미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75
베스 이스라엘 데코니스 메디칼 센터
미합중국, 메사추세츠 02215, 보스턴, 부르클린 예비뉴 330

(72) 발명자
쿠취루, 비제이, 케이.
미국 02459-3424 메사추세츠주 뉴턴 페어하벤 로드 30
차크라바르티, 수몬
미국 02138 메사추세츠주 캠브리지 그레이 스트리트 32 비
스트롬, 테리
미국 02446 메사추세츠주 브루클린 켄나드 로드 22
썩, 신 샤오
미국 02139 메사추세츠주 캠브리지 하바드 스트리트 334
메이어스, 제니퍼
미국 02135 메사추세츠주 브라이언튼 #15 치즈웍 로드 66

(74) 대리인
주성민
김영

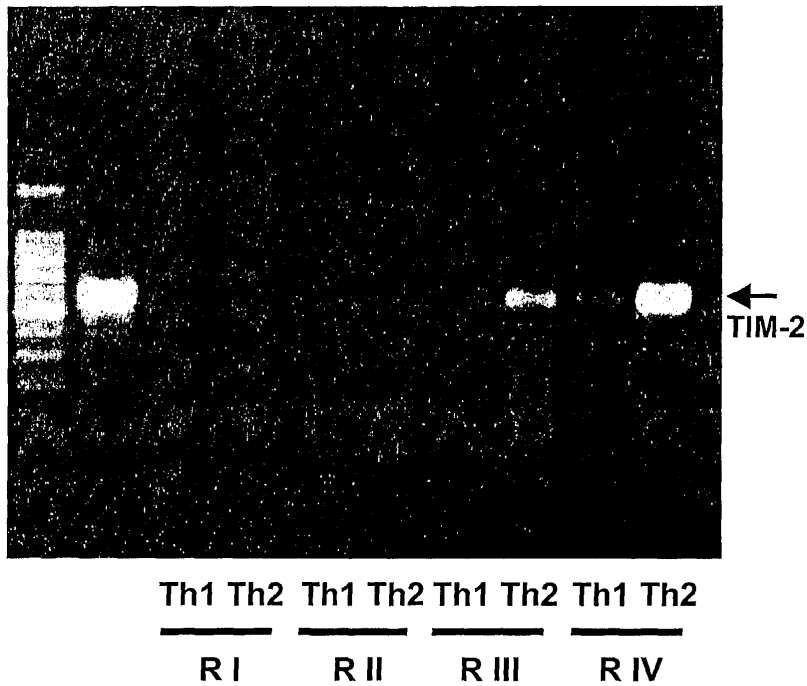
전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) T I M-1, T I M-2 및 T I M-4 기능을 조절하여 면역반응을 조절하는 방법

(57) 요약

본 발명은 예를 들어 대상에게 tim-1, tim-2 또는 tim-4 활성을 조절하거나 tim-1과 tim-4 사이 또는 tim-2와 tim-2 리간드 사이의 물리적 상호작용을 조절하는 작용제를 투여함으로써 대상에서 면역 반응을 조절하는 방법에 관한 것이다. 면역 반응은 자가면역 질환, 이식 관용, 및 Th1 및 Th2-매개 반응 및 질환을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 본 발명은 tim-1과 tim-4 사이의 물리적 상호작용을 조절하는 작용제를 확인하기 위한 신규한 분석에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 신규한 가용성 tim-4 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 핵산에 관한 것이다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1.

대상에서 tim-1, tim-2 또는 tim-4의 발현 또는 활성을 감소시키는 작용제의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 Th1 매개 질환의 치료 또는 예방 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, Th1 매개 질환이 자가면역 질병인 방법.

청구항 3.

제2항에 있어서, 자가면역 질병이 다발 경화증, 1형 당뇨병, 하시노토 갑상선염, 크론병, 류마티스성 관절염, 전신 홍반 루푸스, 위염, 자가면역성 간염, 용혈성 빈혈, 자가면역성 혈우병, 자가면역성 림프 증식 증후군 (ALPS), 자가면역성 포도막막염 (uveoretinitis), 사구체신염, 길랑-바레 증후군, 건선 및 중증 근육 무력증으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, Th1 매개 질환이 숙주대이식편 질병 (HVG D)인 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, Th1 매개 질환이 이식편대숙주 질병 (GVHD)인 방법.

청구항 6.

제4항에 있어서, 대상이 장기 이식 수령자인 방법.

청구항 7.

제4항에 있어서, 대상이 동종이형 세포의 수령자인 방법.

청구항 8.

제1항에 있어서, 작용제가 tim-1, tim-2 또는 tim-4 폴리뉴클레오티드에 특이적인 RNAi 안티센스 올리고뉴클레오티드인 방법.

청구항 9.

제1항에 있어서, 작용제가 tim-4에 대한 tim-1의 결합을 감소시키는 것인 방법.

청구항 10.

제9항에 있어서, 작용제가 tim-4에 대한 tim-1의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것인 방법.

청구항 11.

제9항에 있어서, 작용제가 tim-1 또는 tim-4에 특이적으로 결합할 수 있는 (i) 항체; 또는 (ii) 그의 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 12.

제9항에 있어서, 작용제가 tim-1 또는 tim-4에 특이적으로 결합할 수 있는 (i) 항체; 또는 (ii) 그의 단편을 포함하지 않는 것인 방법.

청구항 13.

제9항에 있어서, 작용제가 (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; (iv) 서열 4의 아미노산 31-134에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 14.

제13항에 있어서, 작용제가 (a) 인간 혈청 알부민; 또는 (b) 면역글로불린의 Fc 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 15.

제9항에 있어서, 작용제가 (i) 서열 1의 아미노산 21-126; (ii) 서열 2의 아미노산 21-129; (iii) 서열 1의 아미노산 21-126에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 2의 아미노산 21-129에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 16.

제1항에 있어서, 작용제가 세마포린4A에 대한 tim-2의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것인 방법.

청구항 17.

제16항에 있어서, 작용제가 (i) 서열 13의 아미노산 25-127; 또는 (iii) 서열 13의 아미노산 25-127에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 18.

제17항에 있어서, 작용제가 (a) 인간 혈청 알부민; 또는 (b) 면역글로불린의 Fc 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 19.

대상에서 tim-1, tim-2 또는 tim-4의 발현 또는 활성을 증가시키는 작용제의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 Th2 매개 질환의 치료 또는 예방 방법.

청구항 20.

제19항에 있어서, Th2-매개 질환이 아토피 질환인 방법.

청구항 21.

제19항에 있어서, Th2 매개 질환이 천식, 알레르기, 알레르기성 비염, 위장관 알레르기, 식품 알레르기, 호산구 증가증, 결막염 또는 사구체신염인 방법.

청구항 22.

제19항에 있어서, 작용제가 (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; (iv) 서열 4의 아미노산 31-134에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 23.

제22항에 있어서, 작용제가 (a) 인간 혈청 알부민; 또는 (b) 면역글로불린의 Fc 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 24.

제19항에 있어서, 작용제가 tim-1의 세포내 도메인의 인산화를 증가시키는 것인 방법.

청구항 25.

tim-1, tim-2 또는 tim-4의 활성을 증가시키는 작용제의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 Th1 면역 반응을 촉진시키는 방법.

청구항 26.

제25항에 있어서, 대상이 증식 질병으로 고통받는 상태인 방법.

청구항 27.

제26항에 있어서, 증식 질병이 신장암, 카포시 육종, 만성 백혈병, 전립선암, 유방암, 육종, 췌장암, 백혈병, 난소암종, 직장암, 인후암, 흑색종, 결장암, 방광암, 림프종, 비만세포종, 폐암, 유선암종, 인두 편평 세포 암종, 고환암, 위장관암, 또는 위암, 또는 이들의 조합 질병인 방법.

청구항 28.

tim-1, tim-2 또는 tim-4의 활성을 감소시켜 대상에서 이식 관용을 증가시키는 작용제의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 이식 관용을 증가시키는 방법.

청구항 29.

제28항에 있어서, 작용제가 (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; (iv) 서열 4의 아미노산 31-134에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 30.

제21항에 있어서, 작용제가 (a) 인간 혈청 알부민; 또는 (b) 면역글로불린의 Fc 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 31.

(a) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드를 시험 작용제의 존재 하에 접촉시키고; (b) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드의 결합에 대한 시험 작용제의 효과를 결정하여 tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합을 조절하는 작용제를 확인하는 것을 포함하는, tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합을 조절하는 작용제의 확인 방법.

청구항 32.

(a) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드를 시험 작용제의 존재 하에 접촉시키고; (b) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드의 결합에 대한 시험 작용제의 효과를 결정하여 면역 반응을 조절하는 작용제를 확인하는 것을 포함하는, 면역 반응을 조절하는 작용제의 확인 방법.

청구항 33.

제31항 또는 제32항에 있어서, 단계 (b)가 시험 작용제의 존재 하에서의 tim-1/tim-4 복합체 형성을 적합한 대조군과 비교하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 34.

제33항에 있어서, 적합한 대조군이 시험 작용제의 부재 하에서 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 포함하는 것인 방법.

청구항 35.

제31항 또는 제32항에 있어서, 작용제가 tim-1과 tim-4 사이의 결합을 증가시키는 것인 방법.

청구항 36.

제31항 또는 제32항에 있어서, 작용제가 tim-1과 tim-4 사이의 결합을 감소시키는 것인 방법.

청구항 37.

제31항 또는 제32항에 있어서, 작용제가 작은 화합물, 항체 또는 폴리펩티드인 방법.

청구항 38.

제31항 또는 제32항에 있어서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드 또는 둘 모두가 세포에서 발현되는 것인 방법.

청구항 39.

제38항에 있어서, 복합체 형성의 검출이 리포터 유전자의 발현을 검출하는 것을 포함하고, 상기 리포터 유전자의 발현이 복합체의 형성에 의존하는 것인 방법.

청구항 40.

제31항 또는 제32항에 있어서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드 또는 둘 모두가 형광 분자로 표시되는 것인 방법.

청구항 41.

제31항 또는 제32항에 있어서, tim-4 폴리펩티드가 (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; (iv) 서열 4의 아미노산 31-134에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 42.

제31항 또는 제32항에 있어서, tim-1 폴리펩티드가 (i) 서열 1의 아미노산 21-126; (ii) 서열 2의 아미노산 21-129; (iii) 서열 1의 아미노산 21-126에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 2의 아미노산 21-129에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 43.

(a) (i) 서열 4의 잔기 31-134에 기재된 바와 같이 tim-4 IgV 도메인에 대해 1 내지 10개의 아미노산 치환체를 갖는 tim-4 IgV 도메인을 포함하는 폴리펩티드; 및 (ii) tim-4에 결합할 수 있는 tim-1 폴리펩티드를 접촉시키고; (b) 상기 폴리펩티드와 tim-1 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하고; (c) 복합체의 형성을 적합한 대조군에 비교하는 것을 포함하며, 복합체 형성 정도가 적합한 대조군과 상이하면 아미노산이 tim-1에 대한 결합에 기여하는 것으로 확인하는, tim-1에 대한 tim-4의 결합에 기여하는 tim-4 내의 아미노산 잔기의 확인 방법.

청구항 44.

제43항에 있어서, 적합한 대조군이 (i) tim-1 폴리펩티드, 및 (ii) 서열 3의 아미노산 31-133 또는 서열 4의 아미노산 31-134를 포함하는 대조군 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 포함하는 것인 방법.

청구항 45.

제43항에 있어서, tim-1 폴리펩티드가 (i) 서열 1의 아미노산 21-126; (ii) 서열 2의 아미노산 21-129; (iii) 서열 1의 아미노산 21-126에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 2의 아미노산 21-129에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 46.

(a) 시험 폴리펩티드를 tim-1 폴리펩티드와 접촉시키고; (b) 시험 폴리펩티드와 tim-1 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함하고; 상기 시험 폴리펩티드가 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 복합체가 검출되면 시험 폴리펩티드가 tim-1 폴리펩티드에 결합하는 것으로 결정하는, 시험 폴리펩티드가 tim-1 폴리펩티드에 결합하는지 여부를 결정하는 방법.

청구항 47.

제46항에 있어서, tim-1 폴리펩티드가 (i) 서열 1의 아미노산 21-126; (ii) 서열 2의 아미노산 21-129; (iii) 서열 1의 아미노산 21-126에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 2의 아미노산 21-129에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 48.

(a) 시험 폴리펩티드를 tim-4 폴리펩티드와 접촉시키고; (b) 시험 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함하고; 상기 시험 폴리펩티드가 서열 1의 아미노산 21-126에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 복합체가 검출되면 시험 폴리펩티드가 tim-4 폴리펩티드에 결합하는 것으로 결정하는, 시험 폴리펩티드가 tim-4 폴리펩티드에 결합하는지 여부를 결정하는 방법.

청구항 49.

제48항에 있어서, tim-4 폴리펩티드가 (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; (iv) 서열 4의 아미노산 31-134에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 50.

(i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; (iv) 서열 4의 아미노산 31-134에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 아토피 질병의 예방 방법.

청구항 51.

(i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; (iv) 서열 4의 아미노산 31-134에 90% 이상 동일한 아미노산 서열; (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 치료 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 A형 간염 감염증의 치료 또는 예방 방법.

청구항 52.

제51항에 있어서, 대상이 A형 간염으로 고통받지 않는 상태인 방법.

청구항 53.

제51항에 있어서, 대상이 A형 간염 바이러스에 감염되지 않은 상태인 방법.

청구항 54.

제51항에 있어서, 대상이 항-A형 간염 항체에 대해 혈청반응 음성인 방법.

청구항 55.

제51항에 있어서, 대상이 아동인 방법.

청구항 56.

제51항에 있어서, 아토피 질병이 천식, 비염, 습진 및 건초열로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 57.

tim-4 IgV 도메인, tim-4 세포내 도메인 및 절단된 tim-4 뮤신 도메인을 포함하며, tim-4 트랜스멤브레인 도메인을 포함하지 않는 단리된 폴리펩티드.

청구항 58.

제57항에 있어서, 폴리펩티드가 인간 또는 마우스 폴리펩티드인 폴리펩티드.

청구항 59.

제57항에 있어서, tim-4 IgV 도메인이 서열 3의 아미노산 31-133을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 60.

제57항에 있어서, tim-4 IgV 도메인이 서열 4의 아미노산 31-134를 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 61.

제57항에 있어서, 서열 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 폴리펩티드.

청구항 62.

제57항에 있어서, 서열 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 폴리펩티드.

청구항 63.

제57항에 있어서, 면역글로불린의 Fc 도메인 또는 알부민 폴리펩티드를 추가로 포함하는 것인 단리된 폴리펩티드.

청구항 64.

제57항의 단리된 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 65.

제57항의 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 66.

tim-4 IgV 도메인 및 절단된 tim-4 뮤신 도메인을 포함하며, tim-4 트랜스멤브레인 도메인 또는 tim-4 세포내 도메인을 포함하지 않는 단리된 폴리펩티드.

청구항 67.

제66항에 있어서, 서열 10에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드.

청구항 68.

제66항에 있어서, 면역글로불린의 Fc 도메인 또는 알부민 폴리펩티드를 추가로 포함하는 것인 단리된 폴리펩티드.

청구항 69.

제66항의 단리된 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 70.

제66항의 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 71.

T-세포 팽창을 증강시키기에 충분한 양의 tim-4 폴리펩티드를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 T-세포 팽창을 증강시키는 방법.

청구항 72.

제71항에 있어서, 대상이 병원체로 고통받는 상태인 방법.

청구항 73.

T-세포 팽창을 억제하기에 충분한 양의 tim-4 폴리펩티드를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 T-세포 팽창을 억제하는 방법.

청구항 74.

제73항에 있어서, 대상이 Th1-매개 또는 Th2-매개 질환으로 고통받는 상태인 방법.

명세서

배경기술

외부 또는 내부 인자에 대한 과도한 면역 반응은 Th1- 또는 Th2-매개 질병으로서 특징지을 수 있는 질병을 일으킬 수 있다. Th2-매개 질병의 예인 천식, 알레르기성 비염 (건초열), 아토피 피부염 (습진) 및 식품 알레르기는 굉장히 유행하여, 전체 인구집단의 20-40%에 영향을 미치고 주요 공중 보건 문제가 되고 있다. 이들 질환에 대한 경제적 비용은 막대하다. 천식에 대해서만, 1996년에 추정된 의료 비용은 140억불이었다. 또한, 모든 아토피 질환의 유병률은 산업화된 국가에서 지난 20년에 걸쳐 아직까지 명백하지 않은 이유로 극적으로 증가하고 있다. 수치가 가장 정확한 산업화된 국가에서 천식의 유병률은 1982년 이래로 2배가 되었고, 2020년에 유병률이 다시 2배가 될 것으로 예상된다.

Th1 질환인 류마티스성 관절염 (RA)은 코카서스인의 약 1%의 유병률을 갖는 일반적인 인간 자가면역 질병이고 (Harris, B. J. et al., 1997, In Textbook of Rheumatology 898-932), 현재 250만명의 미국인에게 영향을 끼친다. RA는 관절 연골의 진행성 파괴를 일으키는, 윤활 관절의 만성 염증 및 활성화된 T세포, 대식세포 및 형질 세포에 의한 침윤을 특징으로 한다. 이는 관절 질병의 가장 중증 형태이다. 또다른 Th1 질환인 다발 경화증 (MS)은 북미에서 350,000명 (0.1%)의 개인, 전세계에서 110만명에 영향을 미치는 가장 일반적인 중추신경계 (CNS) 탈수초 질병이다. 일반적으로, MS는 부분적으로 항원 (Ag) 제시 세포 (APC) 상에 발현된 MHC 클래스 II 분자와 관련하여 특이적 미엘린 폴리펩티드를 인지하는 전염증 CD4 T (Th1) 세포에 의해 매개되는 자가면역 질병인 것으로 여겨진다. Th1 매개 질환의 또다른 예인 인간 I형 또는 인슐린 의존성 당뇨병 (IDDM)은 췌장 랑게르한스섬에서 베타 세포의 자가면역 파괴를 특징으로 한다. 베타 세포 결핍으로 혈액 내 글루코스 수준을 조절하지 못하게 된다. 인간에서, 당뇨병의 발병 전에 긴 전증상 기간이 존재한다. 이 기간 동안, 췌장 베타 세포 기능이 점진적으로 상실된다. 당뇨병의 발생은 인슐린, 글루탐산 데카르복실라제 및 티로신 포스포타제 IA2 (IA2)에 대한 자가항체의 존재와 밀접하게 관련된다.

T 헬퍼 (Th) 서브셋은 특유한 시토킨 패턴을 생산하고 특이적 면역 반응을 촉진하는 능력에 의해 구분된다. Th1 세포는 IFN γ 를 생산하고, 세포내 병원체를 향해 지정된 세포 매개 면역을 촉진한다. 반대로, Th2 세포는 시토킨 IL-4, IL-5 및 IL-13을 생산하고, 비만세포 및 호산구를 활성화하고, 세포의 병원체에 대항하여 B세포를 지정한다.

분극화된 Th 세포에 의해 생산된 특이적 시토킨은 전구체 Th 세포의 분화를 촉진하는 일차적 효과제이지만, 이들 세포는 또한 다른 서브셋 기능 활성을 교차조절한다. 예를 들어 IL-4는 Th2 효과제로 Thp 세포의 분화를 촉진하는데 있어서 효능있는 인자로 보고되었다. 추가로, IL-4는 IFN γ 의 생산을 길항한다. Th2 세포에 의해 생산된 또다른 시토킨인 IL-10은 또한 Th1 발생 및 IFN γ -유도된 대식세포 기능을 억제하는 것으로 설명되었다. 반대로, Th1 세포에 의해 생산된 IFN γ 는 Th1 발생을 증대시키고 Th2 세포의 팽창을 억제한다. 교대 발생 운명을 동시에 억제하면서 특이적 Th 세포 서브셋의 발생을 촉진하는 이들 시토킨의 능력은 점진적으로 분극화된 반응을 생성시킨다.

따라서, Th1 또는 Th2 반응의 발생을 촉진하거나 억제하는 신규한 치료법이 필요하다. 상기한 신규한 치료법은 자가면역 및 알레르기 질병을 치료하거나, 이식된 조직의 면역 관용을 향상시키거나, 암으로 고통받는 개인에서 면역 관용을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

발명의 개요

본 발명은 넓게는 Th1 및 Th2 세포의 활성화를 조절하고 면역 반응을 조절하기 위한 시약, 조성물 및 방법에 관한 것이다. 부분적으로 본 발명은 tim-1 및 tim-4가 폴리펩티드 복합체를 형성하고, 상기 복합체의 형성이 T세포 활성화 및 면역 반응을 조절한다는 본원에 설명된 예기치 않은 발견에 기초한다. 일부 측면에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에게 치료 유효량의 tim-1, tim-2 또는 tim-4 발현 또는 활성을 감소시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 Th1-매개 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 대상은 자가면역 질병에 걸려 있다. 본 발명의 관련 측면은 치료를 필요로 하는 대상, 예를 들어 암과 같은 증식 질병으로 고통받는 대상에서 Th1 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 본 발명의 관련 측면은 또한 Th2 질환, 예를 들어 천식 또는 알레르기 질병으로 고통받는 대상을 치료하거나, Th2 반응이 유익한 대상, 예를 들어 자가면역 질병으로 고통받는 대상에서 Th2 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

본 발명은 대상에게 치료 유효량의 tim-1, tim-2 또는 tim-4 활성을 조절하여, 면역 관용을 조절하는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 면역/이식 관용을 조절하는 방법을 추가로 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 작용제는 tim-1, tim-2 또는 tim-4 발현 또는 활성을 감소시킴으로써 면역/이식 관용을 증가시킨다. 다른 실시태양에서, 작용제는 tim-1, tim-2 또는 tim-4 발현 또는 활성을 증가시킴으로써 면역 관용을 감소시킨다.

본 발명은 대상에게 T-세포 팽창을 향상시키거나 억제하기에 충분한 양의 tim-4 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 T-세포 팽창을 향상시키거나 억제하는 방법을 추가로 제공한다.

본 발명의 다른 측면은 치료를 필요로 하는 대상에서 A형 간염 감염증에 걸릴 가능성을 치료하거나, 예방하거나 감소시키는 방법을 제공한다. 한 실시태양에서, A형 간염 감염증은 대상에게 치료 유효량의 (i) tim-4 IgV 도메인을 포함하는 폴리펩티드, 또는 (ii) tim-4 IgV 도메인 및/또는 tim-4 뮤신 도메인에 높은 정도의 아미노산 서열 동일성, 또는 아미노산 서열 유사성을 갖는 서열을 포함하는 폴리펩티드를 투여함으로써 치료되거나 예방된다. 본 발명의 관련 측면은 대상에게 치료 유효량의 tim-4 IgV 도메인을 포함하는 폴리펩티드 또는 tim-4 IgV 도메인에, tim-4 뮤신 도메인에, 또는 둘 모두에 높은 정도의 아미노산 서열 동일성 또는 아미노산 서열 유사성을 갖는 서열을 포함하는 치료 유효량의 폴리펩티드를 투여함으로써, 대상에서 아토피 질병에 걸릴 가능성을 예방하거나 감소시키는 방법을 제공한다. 다른 실시태양에서, 폴리펩티드는 tim-4 뮤신 도메인, 또는 tim-4 IgV 뮤신 도메인에 높은 정도의 아미노산 서열 동일성 또는 아미노산 서열 유사성을 공유하는 도메인을 포함한다.

본 발명은 또한 tim-1/tim-4 복합체의 형성을 조절하는 작용제를 확인하는 방법, 예를 들어 복합체 형성을 촉진하거나 차단하는, 또는 tim-4 결합시 tim-1의 활성화를 방지하는 작용제를 확인하는 방법을 제공한다. 본 발명의 다른 측면은 tim-1에 대한 tim-4의 결합을 흉내내는 작용제, 예를 들어 tim-1의 활성화를 촉진하는데 있어서 tim-4의 대용품으로 작용하여 면역 반응을 조절할 수 있는 작용제를 확인하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 신규한 tim-4 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 포함하는 조성물, 및 이를 코딩하는 핵산을 제공한다. 특정한 측면은 멤브레인에 고정되지 않은 가용성 tim-4 폴리펩티드를 제공한다. 바람직한 가용성 펩티드는 IgV 및 뮤신 도메인의 N-말단부를 포함하지만, tim-4 트랜스멤브레인 도메인을 포함하지 않는 것을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 tim-4의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 가용성 tim-4 폴리펩티드는 tim-1에 결합하여 면역 반응을 조절하는 작용제로서 사용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

I. 개요

본 발명은 일반적으로 면역 반응을 조절하는 신규한 방법 및 작용제를 제공한다. 본 발명의 방법은 Th1 또는 Th2 반응에 향한 대상의 면역 반응의 조절을 허용한다. 나이브 CD4⁺ T 헬퍼가 각각 상이한 시토킨 프로파일을 분비하는 Th1 및 Th2 효과제 세포로 발달하므로, Th1 및 Th2 반응은 부분적으로 상호 배제적이다. 따라서, Th1-매개 질환을 유도하는 본 발명의 방법은 Th2-매개 질환을 갖는 대상에게 유용할 수 있는 한편, 대상에서 Th2 반응을 유도하는 방법은 Th2 질환을 갖는 대상에게 유용할 수 있다.

본 발명의 한 측면은 대상에게 치료 유효량의 tim-1과 tim-4 사이의 결합을 조절하는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 방법의 한 실시태양에서, 면역 반응은 Th1 면역 반응의 증가이고, 작용제는 tim-1, tim-2 또는 tim-4의 활성 또는 발현을 증가시키고, 예를 들어 tim-1과 tim-4 사이의 결합을 증가시킨다. 본원에 기재된 방법의 또다른 실시태양에서, 면역 반응은 Th2 면역 반응의 증가이고, 작용제는 tim-1, tim-2 또는 tim-4의 활성 또는 발현을 감소시키고, 예를 들어 작용제는 tim-1과 tim-4 사이의 결합을 감소시킨다.

본 발명은 대상에게 치료 유효량의 tim-1, tim-2 또는 tim-4의 발현 또는 활성을 감소시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 Th1 매개 질환에 걸릴 가능성을 치료하거나 예방하거나 감소시키는 방법을 추가로 제공한다. Th1 매개 질환은 자가면역 질병, 예를 들어 다발 경화증, 1형 당뇨병, 하시모토 갑상선염, 크론병, 류마티스성 관절염, 전신 홍반 루푸스, 위염, 자가면역성 간염, 용혈성 빈혈, 자가면역성 혈우병, 자가면역성 림프 증식 증후군 (ALPS), 자가면역성 포도막염 (retinitis), 사구체신염, 길랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 건선 및 중증 근육 무력증을 포함한다. Th1 매개 질환은 또한 숙주대식세포 질병 (HVG) 및 이식편대숙주 질병을 포함한다.

본 발명은 대상에게 치료 유효량의 tim-1, tim-2 또는 tim-4 또는 그 중 둘의 발현 또는 활성을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 Th2 매개 질환에 걸릴 가능성을 치료하거나 예방하거나 감소시키는 방법을 추가로 제공한다. 한 실시태양에서, Th2-매개 질환은 아토피 질환이다. 또다른 실시태양에서, Th2 매개 질환은 천식, 알레르기, 알레르기성 비염, 위장관 알레르기, 식품 알레르기, 호산구 증가증, 결막염 또는 사구체신염이다.

한 특정 실시태양에서, 면역 반응을 조절하기 위한 본원에 기재된 방법에 사용된 작용제는 (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (iv)

서열 4의 아미노산 31-134에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

다른 특정 실시태양에서, 면역 반응을 조절하기 위한 본원에 기재된 방법에 사용된 작용제는 (i) 서열 1의 아미노산 21-126; (ii) 서열 2의 아미노산 21-129; (iii) 서열 1의 아미노산 21-126에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 2의 아미노산 21-129에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 작용제는 서열 1의 아미노산 130-237, 서열 2의 127-288, 서열 3의 134-318 또는 서열 4의 136-281에 80%, 85% 또는 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함한다.

본원에 기재된 방법의 한 실시태양에서, 면역 반응을 조절하기 위한 본원에 기재된 방법에 사용된 작용제는 tim-1, tim-2 또는 tim-4에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 실시태양에서, 작용제는 tim-4에 결합하는 항체이고; 항체 또는 단편은 예를 들어 tim-4 IgV 및/또는 뮤신 도메인에 결합할 수 있다. 또다른 실시태양에서, 작용제는 tim-1과 tim-4, 또는 tim-2와 세마포린-4A에 대해 특이적인 이중특이적 항체이다. tim-1, tim-2 및 tim-4 활성을 감소시키는 작용제는 안티센스 RNA 시약을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 작용제는 서열 1의 아미노산 130-237, 서열 2의 127-288, 서열 3의 134-318 또는 서열 4의 136-281에 80%, 85% 또는 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 작용제는 또한 펩티드 모방체 및 소분자, 즉 2 kDa 미만의 비펩티드 화합물을 포함한다.

본 발명은 부분적으로 tim-1 및 tim-4가 물리적 복합체를 형성하고, 상기 상호작용이 면역 반응을 조절한다는 예기치 않은 발견에 기초하는, 약물 발견 방법을 추가로 제공한다. 본 발명의 한 측면은 (a) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드를 시험 작용제의 존재 하에 접촉시키고; (b) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드의 결합에 대한 시험 작용제의 효과를 결정하여; tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합을 조절하는 작용제를 확인하는 것을 포함하는, tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합을 조절하는 작용제를 확인하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 면역 반응을 조절하는 작용제를 확인하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드를 시험 작용제의 존재 하에 접촉시키고; (b) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드의 결합에 대한 시험 작용제의 효과를 결정하여; 면역 반응을 조절하는 작용제를 확인하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 단계 (b)는 시험 작용제의 존재 하에 tim-1/tim-4 복합체의 형성을 적합한 대조군과 비교하는 것을 포함한다. 특정 실시태양에서, 적합한 대조군은 시험 작용제의 부재 하에 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 포함한다.

또다른 실시태양에서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드 또는 둘 모두는 세포에서 발현된다. 또다른 실시태양에서, 복합체의 형성을 검출하는 것은 리포터 (reporter) 유전자의 발현을 검출하는 것을 포함하고, 여기서 리포터 유전자의 발현은 복합체의 형성에 의존한다. 또다른 실시태양에서, 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드 또는 둘 모두는 형광 분자로 표지된다. 또다른 실시태양에서, tim-4 폴리펩티드는 (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 4의 아미노산 31-134에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또다른 실시태양에서, tim-1 폴리펩티드는 (i) 서열 1의 아미노산 21-126; (ii) 서열 2의 아미노산 21-129; (iii) 서열 1의 아미노산 21-126에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 2의 아미노산 21-129에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함한다. 또다른 실시태양에서, tim-1 폴리펩티드는 서열 1의 아미노산 130-237 또는 서열 2의 127-288에 80%, 85% 또는 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함한다.

tim-1과 tim-4 사이의 결합을 조절하는 작용제를 확인하는 방법은 tim-1과 tim-4 사이의 결합을 증가시키는 작용제, 및 tim-1과 tim-4 사이의 결합을 감소시키는 작용제를 확인하기 위해 사용할 수 있다. 방법은 임의의 특정한 종류의 작용제를 확인하는 것으로 제한되지는 않는다. 작용제는 예를 들어 작은 화합물, 항체, 폴리펩티드, 핵산 또는 탄수화물일 수 있다.

추가로, 본 발명의 한 측면은 tim-1에 대한 tim-4의 결합에 기여하는 tim-4 내의 아미노산 잔기를 확인하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) (i) tim-4 IgV 도메인을 포함하는 폴리펩티드 (여기서 상기 tim-4 IgV 도메인은 서열 3의 잔기 31-133 또는 서열 4의 31-134에 제시된 바와 같은 tim-4 IgV 도메인에 대해 1 내지 10개의 아미노산 치환체를 갖는다); 및 (ii) tim-4에 결합할 수 있는 tim-1 폴리펩티드를 접촉시키고; (b) 상기 폴리펩티드와 tim-1 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하고; (c) 복합체의 형성을 적합한 대조군에 비교하는 것을 포함하고, 여기서 복합체 형성 정도가 적합한 대조군과 상이하면 아미노산은 tim-1에 대한 결합에 기여하는 것으로 확인된다.

본 발명의 관련 측면은 tim-1에 대한 tim-4의 결합에 기여하는 tim-4 내의 아미노산 잔기를 확인하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) (i) tim-4 뮤신 도메인을 포함하는 폴리펩티드 (여기서 상기 tim-4 뮤신 도메인은 서열 3의 잔기 134-318 또는 서열 4의 136-281에 제시된 바와 같은 tim-4 뮤신 도메인에 대해 1 내지 10개의 아미노산 치환체를 갖는다); 및 (ii) tim-4에 결합할 수 있는 tim-1 폴리펩티드를 접촉시키고; (b) 상기 폴리펩티드와 tim-1 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하고; (c) 복합체의 형성을 적합한 대조군에 비교하는 것을 포함하고, 여기서 복합체 형성 정도가 적합한 대조군과 상이하면 아미노산은 tim-1에 대한 결합에 기여하는 것으로 확인된다.

tim-1에 대한 tim-4의 결합에 기여하는 tim-4 내의 아미노산 잔기를 확인하는 방법의 한 실시태양에서, 적합한 대조군은 (i) tim-1 폴리펩티드, 및 (ii) 서열 3의 아미노산 31-133 및/또는 서열 3의 134-318을 포함하는 대조군 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 포함한다. 또다른 실시태양에서, tim-1 폴리펩티드는 (i) 서열 1의 아미노산 21-126; (ii) 서열 2의 아미노산 21-129; (iii) 서열 1의 아미노산 21-126 또는 서열 1의 130-237에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 2의 아미노산 21-129 또는 서열 2의 127-288에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 다른 측면은 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함하는 시험 폴리펩티드가 tim-1 폴리펩티드에 결합하는지 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 시험 폴리펩티드를 tim-1 폴리펩티드와 접촉시키고; (b) 시험 폴리펩티드와 tim-1 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함하고; 여기서 복합체가 검출되면 시험 폴리펩티드는 tim-1 폴리펩티드에 결합하는 것으로 결정된다. 한 예시적인 실시태양에서, tim-1 폴리펩티드는 (i) 서열 1의 아미노산 21-126; (ii) 서열 2의 아미노산 21-129; (iii) 서열 1의 아미노산 21-126 또는 서열 1의 130-237에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 2의 아미노산 21-129 또는 서열 2의 127-288에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 다른 측면은 서열 1의 아미노산 21-126 또는 서열 1의 130-237에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함하는 시험 폴리펩티드가 tim-4 폴리펩티드에 결합하는지 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 시험 폴리펩티드를 tim-4 폴리펩티드와 접촉시키고; (b) 시험 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함하고; 여기서 복합체가 검출되면 시험 폴리펩티드는 tim-4 폴리펩티드에 결합하는 것으로 결정된다. 한 실시태양에서, tim-4 폴리펩티드는 (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133 또는 서열 3의 134-318에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 4의 아미노산 31-134 또는 서열 4의 136-281에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 다른 측면은 대상에서 아토피 질병에 걸릴 가능성을 예방하거나 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상에게 치료 유효량의, (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 4의 아미노산 31-134 또는 서열 4의 136-281에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함한다.

본 발명의 다른 측면은 치료를 필요로 하는 대상에서 A형 간염 감염증에 걸릴 가능성을 치료하거나 예방하거나 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상에게 치료 유효량의, (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133 또는 서열 3의 134-318에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 4의 아미노산 31-134 또는 서열 4의 136-281에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 대상은 A형 간염으로 고통받지 않았다. 또다른 실시태양에서, 대상은 A형 간염 바이러스에 감염되지 않았다. 또다른 실시태양에서, 대상은 항-A형 간염 항체에 대한 혈청반응 음성이다. 또다른 실시태양에서, 대상은 아동이다. 또다른 실시태양에서, 아토피 질병은 천식, 비염, 습진 및 건초열로 이루어진 군 중에서 선택된다.

본 발명의 다른 측면은 신규한 가용성 tim-4 폴리펩티드를 제공한다. 한 측면은 tim-4 IgV 도메인, tim-4 세포내 도메인 및 절단된 (truncated) tim-4 뮤신 도메인을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 폴리펩티드는 tim-4 트랜스메μβ레인 도메인을 포함하지 않는다. 본 발명의 다른 측면은 tim-4 IgV 도메인 및 절단된 tim-4 뮤신 도메인을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 폴리펩티드는 tim-4 트랜스메μβ레인 도메인 또는 tim-4 세포내 도메인을 포함하지 않는다. 바람직한 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 포유동물 폴리펩티드, 예를 들어 인간 또는 마우스 폴리펩

티드이다. 한 특정 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 서열 3의 아미노산 31-133 또는 서열 4의 아미노산 31-134를 포함한다. 또다른 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 서열 9, 10, 11 또는 12에 기재된 서열을 포함하지만, 다른 실시태양에서 가용성 tim-4 폴리펩티드는 시그널 (signal) 서열을 포함하지 않는다. 몇몇 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 다른 폴리펩티드, 예를 들어 그의 생체내 안정성을 증가시키는 폴리펩티드에 융합된다. 몇몇 실시태양에서, 융합 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 도메인 또는 알부민 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명은 추가로 본원에 기재된 가용성 tim-4 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 및 tim-4 가용성 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

II. 정의

편의상, 명세서, 실시예 및 청구의 범위에 사용되는 특정 용어를 여기에 모아둔다. 다르게 정의하지 않으면, 본원에 사용된 모든 기술 및 학술 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.

부정관사 ("a" 및 "an")는 하나 또는 하나 초과 (즉, 적어도 하나)의 관사의 문법 대상을 나타내도록 본원에서 사용된다. 예를 들어 "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.

용어 "포함하는"은 어구 "포함하지만 제한되지 않는"을 의미하도록 본원에서 사용되고 상기 어구와 상호교환가능하게 사용된다.

용어 "또는"은 문맥상 명백하게 다르게 나타내지 않는 한 용어 "및(또는)"을 의미하도록 본원에서 사용되고 상기 용어와 상호교환가능하게 사용된다.

용어 "예를 들어"는 어구 "비제한적인 예를 들어"를 의미하도록 본원에서 사용되고 상기 용어와 상호교환가능하게 사용된다.

용어 "핵산"은 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 데옥시리보핵산(DNA) 및 적절하게 리보핵산(RNA)을 나타낸다. 상기 용어는 또한 동등한 의미로서 뉴클레오티드 유사체로부터 만들어진 RNA 또는 DNA의 유사체와, 설명되는 실시태양에 적용가능한 것으로서 단쇄 (센스 또는 안티센스) 및 이중쇄 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로 이해해야 한다.

용어 "예방"은 당업계에서 인정되고, 병, 예를 들어 국소적 재발 (예를 들어, 통증), 질병, 예를 들어 암, 복합 증후군, 예를 들어 심부전증 또는 임의의 다른 의학적 상태에 관련하여 사용될 때 당업계에서 잘 이해되고, 병의 발병에 앞서 조성물을 투여받지 않는 대상에 비해 대상에서 의학적 상태의 빈도를 감소시키거나, 심도를 감소시키거나, 증상의 발병을 지연시키는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 암의 예방은 예를 들어 비처리 대조 집단에 비해 예방적 치료를 받는 환자 집단에서 검출가능한 암성 성장의 수를 감소시키고(시키거나), 예를 들어 통계학적으로 및(또는) 임상적으로 유의한 양으로 비처리 대조 집단에 대해 처리된 집단에서 검출가능한 암성 성장의 발현을 지연시키는 것을 포함한다. 감염증의 예방은 예를 들어 비처리 대조 집단에 대해 처리된 집단에서 감염증의 진단의 수를 감소시키고(시키거나) 비처리 대조 집단에 대해 처리된 집단에서 감염증의 증상의 발병을 지연시키는 것을 포함한다. 통증의 예방은 예를 들어 비처리 대조 집단에 대해 처리된 집단에서 대상이 경험하는 통증 감각의 빈도를 감소시키거나, 심도를 감소시키거나 또는 별법으로 지연시키는 것을 포함한다.

본원에서 사용되는 용어 "유효량"은 바람직한 결과를 달성하기 위해 필요한 시간 동안 및 복용량에서 효과적인 양으로 정의된다. 본 발명의 화합물의 유효량은 동물의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 투약 계획은 최적 치료 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 분할 투여량이 매일 투여될 수 있거나, 투여량은 치료 상황의 요구에 의해 나타내지는 바와 같이 비례적으로 감소시킬 수 있다.

본원에서 사용되는 "대상"은 임의의 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간을 나타낸다. 대상의 예는 인간, 비인간 영장류, 설치류, 기니아 피그, 토끼, 양, 돼지, 염소, 소, 말, 개, 고양이, 새 및 어류를 포함한다.

본원에서 사용되는 관심있는 폴리펩티드의 "변이체"는 하나 이상의 아미노산에 의해 변경된 아미노산 서열을 나타낸다. 변이체는 "보존적" 변화를 가질 수 있고, 여기서 치환된 아미노산은 유사한 구조적 또는 화학적 특성을 갖는다 (예를 들어, 류신을 이소류신으로 교체). 보다 드물게는, 변이체는 "비보존적" 변화를 가질 수 있다 (예를 들어, 글리신을 트립토판으로 교체). 유사한 근소한 변동은 또한 아미노산 결실 또는 삽입, 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 생물학적 또는 면역학적 활성을 파괴하지 않으면서 어떠한 아미노산 잔기가 치환, 삽입 또는 결실될 수 있는지 결정하는데 있어서 지침은 당업계에 잘 알려진 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 DNASTAR 소프트웨어를 사용하여 찾을 수 있다.

본원에서 사용되는 "Th1 관련 질환"은 기준, 예를 들어 정상 대조군에 비교하여 비정상적, 예를 들어 증가된 Th1 세포 활성 (예를 들어 증가된 Th1 세포 반응) 또는 수와 관련된 질병 또는 병이다. Th1 관련 질환의 예는 예를 들어, 자가면역 질환 (예를 들어 다발 경화증, 류마티스성 관절염, 1형 당뇨병 및 크론병)을 포함한다.

본원에서 사용되는 "Th2 관련 질환"은 기준, 예를 들어 정상 대조군에 비교하여 비정상적, 예를 들어 증가된 Th2 세포 활성 (예를 들어, 증가된 Th2 세포 반응) 또는 수와 관련된 질병 또는 병이다. Th2 질환의 예는 예를 들어 천식, 알레르기 및 항체 성분과 연관된 질환 (예를 들어 류마티스성 관절염)을 포함한다.

본원에서 사용되는 용어 "유사체"는 기준 서열로부터 하나 이상의 아미노산의 치환, 삽입 및(또는) 결실을 포함하는 아미노산 서열을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 아미노산 치환은 보존적 또는 비보존적 특성일 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 본 발명의 폴리펩티드의 하나 이상의 아미노산을 유사한 전하, 크기 및(또는) 소수성 특성의 아미노산으로 교체하는 것을 포함한다. 단지 보존적 치환만 이루어질 때, 생성되는 유사체는 기능적으로 동등할 것이다. 비보존적 치환은 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산을 유사하지 않은 전하, 크기 및(또는) 소수성 특성을 갖는 하나 이상의 아미노산으로 교체하는 것을 포함한다. 아미노산 삽입은 단일 아미노산 잔기, 또는 2 내지 15개의 아미노산 길이의 순차적 아미노산으로 이루어질 수 있다. 결실은 아미노산 서열로부터 하나 이상의 아미노산, 또는 별개의 부분의 제거로 이루어질 수 있다. 결실된 아미노산은 인접할 수 있거나 인접하지 않을 수 있다.

III. Tim 아미노산 및 핵산 서열

인간 및 마우스 tim 폴리펩티드의 서열은 서열 1-14, 및 그 개시 내용 전부가 본원에 참고로 포함된 PCT 공개 WO 03/002722, 미국 특허 6,066,498, 6,204,371, 6,288,218, 6,084,083, 6,414,117 및 6,562,343과 미국 특허 출원 공개 2003/0069196 및 2003/0124114에 기재되어 있다. tim-1, tim-2 및 tim-4 핵산 및 본 발명의 폴리펩티드는 하기 설명되는 서열의 핵산 및 변이체를 포함하는 것으로 추가로 이해된다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 치환, 부가 또는 결실에 의한 것과 같은 하나 이상의 뉴클레오티드가 상이한 서열, 예를 들어 대립유전자 변이체를 포함하고; 따라서, 예를 들어 유전자 코드의 다의성 (degeneracy)으로 인해 야생형 tim-1, tim-2 또는 tim-4 뉴클레오티드의 코딩 서열의 뉴클레오티드 서열과 상이한 코딩 서열을 포함할 것이다. 예를 들어, tim-1의 IgV 도메인을 코딩하는 핵산은 야생형 tim-1의 서열에 적어도 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 핵산일 수 있다.

마우스 및 인간 tim-1 폴리펩티드 및 핵산의 서열은 그 개시 내용 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 공개 2003/0124114에 기재되어 있다. 인간 tim-1 폴리펩티드도 Genbank 기탁 번호 NP_036338 (서열 1)로서 개시되어 있고, cDNA의 핵산 서열은 NM_012206 (서열 5)로서 개시되어 있다. 마우스 tim-1의 아미노산 및 핵산 (cDNA) 서열은 각각 Genbank 기탁 번호 NP_599009 (서열 2) 및 NM_134248 (서열 6)으로 개시되어 있다. 또한, tim-1은 HAVCR1, KIM1, TIM1, HAVCR, KIM-1 및 TIMD1로서 학술 문헌에서 언급되었다.

tim-1의 천연 인간 대립유전자 변이체의 아미노산 및 핵산 서열은 미국 특허 출원 공개 2003/0124114에 서열 17-28로서 개시되어 있다. 이들 서열은 본원에 참고로 포함된다. 인간 tim-1의 IgV 도메인은 서열 1의 잔기 21-126에 걸치는 한편, 마우스 tim-1의 IgV 도메인은 서열 2의 잔기 21-129에 걸친다. 인간 tim-1의 뮤신 도메인은 잔기 130-237에 걸친다. 마우스 tim-1의 뮤신 도메인은 잔기 127-288에 걸친다. 인간 및 마우스 tim-1의 추가의 도메인, 예를 들어 시그널 서열, 트랜스멤브레인 도메인 및 세포내 도메인은 본원에 참고로 포함하는 문헌 [McIntire et. al., Nat. Immunol. (2001); 2 (12): 1109-16]에 기재되어 있다.

마우스 TIM-2 (유사한 305 아미노산 멤브레인 단백질)은 마우스 TIM-1에 64% 동일성, 래트 KIM-1에 60% 동일성, hHAVcr-1에 32% 동일성을 갖는다. Tim-1과 같이, Tim-2는 2개의 세포외 N-연결된 글리코실화 부위, 및 많은 O-연결된 글리코실화 부위를 갖는 세린, 트레오닌-풍부 뮤신 도메인을 갖는다. TIM-2는 또한 세포내 티로신 키나제 인산화 모티프 RTRCEDQVY를 갖는다. 마우스 TIM-2 폴리펩티드 및 핵산 서열은 미국 특허 출원 공개 2003/0124114에 각각 서열 5 및 8로서 기재되어 있다. 추가의 마우스 tim-2 서열은 Genbank 기탁 번호 NP_599010 및 NM_134249로서 기재되어 있다. 마우스 tim-2의 IgV 도메인은 서열 13의 대략 위치 25 내지 127에 해당한다.

마우스 및 인간 tim-4 폴리펩티드 및 핵산의 서열은 그의 내용 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 공개 2003/0124114에 기재되어 있다. 인간 tim-4의 아미노산 (서열 3) 및 핵산 (cDNA) (서열 7) 서열은 미국 특허 출원 공개 2003/0124114에 각각 서열 33 및 34로서 개시되어 있는 한편, tim-4의 대립유전자 변이체의 아미노산 및 핵산 (cDNA) 서열은 또한 여기에 각각 서열 35 및 36으로서 개시되어 있다. 마우스 tim-4의 2개의 아미노산 서열은 서열 4 (NP_848874) 및

서열 12로서 개시되어 있다. 서열 12에 대응하는 핵산 서열은 서열 3 (NM_178759)로 나타낸다. 인간 tim-4의 IgV 도메인은 서열 3의 잔기 31-133에 걸치는 한편, 마우스 tim-4의 IgV 도메인은 서열 4의 잔기 31-134에 걸친다. 인간 tim-4의 뮤신 도메인은 서열 3의 잔기 134-318에 걸친다. 마우스 tim-4의 뮤신 도메인은 서열 4의 잔기 134-281에 걸친다.

본 발명은 또한 신규한 tim-4 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 핵산을 제공한다. 본 발명의 한 측면에서, 신규한 tim-4 폴리펩티드는 하나 이상의 엑손이 결핍되어, N-말단, C-말단 또는 내부 서열이 결핍되거나, 결실된 엑손(들)의 결과로서 프레임이동된 관독 프레임을 갖는 폴리펩티드를 생성시킨다. 한 실시태양에서, 본 발명은 트랜스멤브레인 도메인이 결핍된 가용성 tim-4 폴리펩티드를 제공한다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 트랜스멤브레인 도메인이 결핍되고 전부 또는 일부의 뮤신 도메인이 결핍된 가용성 tim-4 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 뮤신 도메인의 C-말단 단부로부터 10-40개의 아미노산, 15-30개의 아미노산, 보다 바람직하게는 18-25개의 아미노산이 결핍된다. 한 실시태양에서, 신규한 가용성 tim-4 폴리펩티드는 서열 9, 10 또는 11에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 가용성 인간 tim-4 폴리펩티드는 서열 3의 잔기 282-337이 결핍된다. 본 발명은 또한 상기 가용성 tim-4 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 제공한다.

본 발명의 핵산은 상기한 폴리펩티드의 변이체를 포함하는 핵산을 포함하는 것으로 추가로 이해된다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 치환, 부가 또는 결실에 의한 것과 같은 하나 이상의 뉴클레오티드가 상이한 서열, 예를 들어 대립유전자 변이체를 포함하고; 따라서, 예를 들어 유전자 코드의 다의성으로 인해 야생형 tim-1 또는 tim-4 뉴클레오티드의 코딩 서열의 뉴클레오티드 서열과 상이한 코딩 서열을 포함할 것이다. 예를 들어, tim-1의 IgV 도메인을 코딩하는 핵산은 야생형 tim-1 IgV 도메인의 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하거나 유사한 서열을 포함하는 핵산일 수 있다. 인간 및 마우스 tim 폴리펩티드의 서열은 tim-1, tim-2, tim-3 및 tim-4, 그의 변이체 및 단편에 대한 임의의 핵산 또는 아미노산 서열을 포함하여, 그 개시 내용 전부가 본원에 참고로 포함된 PCT 공개 WO 03/002722, 미국 특허 6,066,498, 6,204,371, 6,288,218, 6,084,083, 6,414,117 및 6,562,343와 미국 특허 출원 공개 2003/0069196 및 2003/0124114에 기재되어 있다.

유전자 코드의 다의성으로 인해 야생형 서열과 상이한 단리된 핵산 또는 그들이 생성하는 폴리펩티드 생성물도 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들어 많은 아미노산은 하나 초과와 트리플렛 (triplet)에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 특정하는 코돈, 또는 동의코돈 (synonym) (예를 들어 CAU 및 CAC는 히스티딘에 대한 동의코돈이다)은 폴리펩티드의 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 "침묵 (silent)" 돌연변이를 생성시킬 수 있다. 당업계의 숙련인은 천연 대립유전자 변동으로 인해, 특정 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드에서 이들 변동이 주어진 종의 개체들 사이에 존재할 수 있음을 알 것이다. 임의의 모든 상기 뉴클레오티드 변동 및 생성되는 아미노산 다형성 (polymorphism)은 본 발명의 범위 내에 있다.

본 발명은 폴리펩티드 또는 핵산을 사용하는 방법을 제공하고, 여기서 핵산 또는 폴리펩티드는 또다른 핵산 또는 폴리펩티드에 특정한 정도의 서열 동일성 또는 유사성을 공유한다. 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 동일성%를 결정하기 위해, 서열을 최적 비교 목적을 위해 정렬시킨다 (예를 들어, 최적 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 모두에 갭 (gap)을 도입할 수 있고, 비상동성 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 바람직한 실시태양에서, 기준 서열 길이의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 이상을 비교 목적을 위해 정렬시킨다. 이어서 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열에서의 위치가 제2 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점령되면, 분자는 그 위치에서 동일하다 (본원에서 사용되는 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동등하다). 2개의 서열 사이의 동일성%는 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려하여, 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다.

서열의 비교 및 2개의 서열 사이의 동일성 및 유사성%의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성할 수 있다 (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 및 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

한 실시태양에서, 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성%는 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램 (<http://www.gcg.com>)에서 이용가능함) 내로 포함된 문헌 (Needleman and Wunsch, J Mol. Biol. (48): 444-453 (1970))의 알고리즘을 사용하여 결정한다. 특정 실시태양에서, GAP 프로그램에서 다음 파라미터가 사용된다: Blossom 62 매트릭스 또는 PAM 250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량. 또다른 실시태양

에서, 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성%는 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 사용하여 결정한다 (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Res. 12(1): 387 (1984)) (<http://www.gcg.com>에서 이용가능함). 예시적인 파라미터는 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 사용하는 것을 포함한다.

또다른 실시태양에서, 2개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성%는 PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 (penalty) 및 4의 갭 페널티를 사용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 포함된 문헌 (E. Myers and W. Miller CABIOS, 4:11-17 (1989))의 알고리즘을 사용하여 결정된다.

2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 최상의 전체 정렬을 결정하기 위한 또다른 실시태양은 문헌 (Brutlag et al., Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990))의 알고리즘에 기초한 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다. 서열 정렬에서, 질문 및 대상 서열은 모두 뉴클레오티드 서열이거나 모두 아미노산 서열이다. 상기 포괄적 서열 정렬의 결과는 동일성%로 제시된다. 한 실시태양에서, 아미노산 서열 동일성은 문헌 (Brutlag et al., Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990))의 알고리즘에 기초한 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다. 특정 실시태양에서, 아미노산 정렬의 동일성 및 유사성%를 계산하기 위해 사용된 파라미터는: 매트릭스 = PAM 150, k-tuple = 2, 미스매치 페널티 = 1, 연결 페널티 = 20, 랜덤화 그룹 길이 = 0, 컷오프 (Cutoff) 스코어 = 1, 갭 페널티 = 5, 및 갭 사이즈 페널티 = 0.05를 포함한다.

몇몇 실시태양에서, 본 발명은 또한 보다 낮은 정도의 동일성, 예를 들어 60% 이상 동일성을 갖지만, tim-1 또는 tim-4 폴리펩티드에 의해 수행된 하나 이상의 동일한 기능을 수행하도록 충분한 유사성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 유사성은 보존적 아미노산 치환에 의해 결정된다. 상기 치환은 폴리펩티드 내의 주어진 아미노산을 유사한 특성의 또다른 아미노산에 의해 치환하는 것이다. 보존적 치환은 표현형상 침묵적일 것이다. 일반적으로 보존적 치환으로 보이는 것에는 지방족 아미노산 Ala, Val, Leu 및 Ile 사이의 서로간의 교체, 히드록실 잔기 Ser 및 Thr의 상호교환, 산성 잔기 Asp 및 Glu의 교환, 아미드 잔기 Asn과 Gln 사이의 치환, 염기성 잔기 Lys 및 Arg의 교환, 및 방향족 잔기 Phe, Tyr 사이의 교체가 있다. 아미노산 변화가 표현형상 침묵적일 것에 관한 추가의 지침은 문헌 (Bowie et al., Science 247: 1306-1310 (1990))에서 찾을 수 있다.

본 발명의 일부 측면은 폴리펩티드를 제공하거나, 또는 상기 폴리펩티드를 사용하는 치료 방법을 제공하고, 여기서 상기 폴리펩티드는 적어도 부분적으로 기준 서열에 대해 정의된다. 예를 들어, 본 발명에 의해 제공되는 일부 방법은 대상에게서 서열 3의 아미노산 31-133 (기준 서열)에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다. 따라서, 상기 폴리펩티드는 기준 서열에 동일하지 않은 아미노산 잔기를 특정 비율로 가질 수 있다. 한 바람직한 실시태양에서, 동일하지 않은 잔기는 그들이 동일하지 않은 기준 서열의 잔기와 유사한 화학적 특성을 갖는다. 유사한 특성을 갖는 그룹은 다음 아미노산을 포함한다: E, D, N, Q; H, K, R; Y, F 및 W; I, L, V, M, C, A; 및 S, T, C, P, A. 또다른 실시태양에서, 동일하지 않은 잔기는 적어도 하나의 진화적으로 관련된 종, 예를 들어 동일한 목 (order) 내의 종에서 기준 서열과 오르토로그 (orthologous) 서열 사이에 진화적으로 보존되지 않는 것이다. 포유동물 기준 서열의 경우, 바람직한 실시태양에서 돌연변이될 수 있는 아미노산은 또다른 포유동물종에서 기준 서열과 오르토로그 서열 사이에 보존되지 않는 것이다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 사용된 폴리펩티드가 인간 tim-4의 IgV 도메인에 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것으로 말해지면, 상기 폴리펩티드는 tim-4의 IgV 도메인 및 마우스, 래트, 돼지 및(또는) 닭의 것이 상이한 위치에 대해 동일하지 않은 잔기를 가질 수 있다.

본 발명은 추가로 본원에 기재된 임의의 질환을 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 작용제를 제공한다. 대상에게 작용제를 투여함으로써 질환을 치료하거나 예방하는 본원에 개시된 임의의 방법은 질환을 치료하기 위한 의약의 제조에서 작용제의 용도에 적용될 수 있다. 예를 들어, 한 특정 실시태양에서, tim-1 IgV-Fc 융합 폴리펩티드는 Th1 매개 질환 치료용 의약의 제조에 사용될 수 있다.

특정 측면에서, 본원 개시 내용은 정상적으로 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드를 포함하는 특정 복합체와 연관될 수도 있는 다른 폴리펩티드로부터 단리되거나 또는 상기 폴리펩티드가 실질적으로 없는 가용성 tim-4 폴리펩티드의 단리되고(되거나) 정제된 형태를 이용가능하게 한다. 특정 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 서열 2, 4, 6 또는 8의 아미노산 서열에 적어도 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 2개의 폴리펩티드 사이의 아미노산 동일성은 먼저 2개의 폴리펩티드 서열을 정렬 알고리즘, 예를 들어 PAM250 매트릭스에 기초한 것을 사용하여 정렬시킴으로써 결정할 수 있다.

특정 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 임의의 서열 9, 10, 11 또는 12에 적어도 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열의 일부를 포함하는 폴리펩티드이고, 바람직하게는 여기서 상기 일부는 기능적 부분, 예를 들

어 Th1/Th2 활성화를 조절하기에 충분하거나 tim-1에 결합할 수 있는 부분이다. 한 실시태양에서, 상기 일부는 tim-4의 IgV 도메인을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 보존적 아미노산 치환을 포함한다. 특정 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 정제되거나 부분적으로 정제된다. 몇몇 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 서열 9-12에 기재된 서열을 시그널 서열과 함께 또는 그 없이 포함한다.

본 발명은 추가로 가용성 tim-4 폴리펩티드 및 이중 폴리펩티드를 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함한다. 한 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 IgV 도메인을 포함하지만 뮤신 도메인의 적어도 일부가 결핍되고, 트랜스메브레인 및 임의로 세포내 도메인이 결핍된다. 특정 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드 및 면역글로불린 요소를 포함하는 융합 폴리펩티드가 제공된다. 예시적인 면역글로불린 요소는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 도메인과 같은 불변 영역이다 (Browning et al., J. Immunol., 154, pp. 33-46 (1995)). 가용성 수용체-IgG 융합 폴리펩티드는 일반적인 면역학적 시약이고, 그의 구성 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 모두 본원에 참고로 포함하는 미국 특허 5,225,538, 5,766,883 및 5,876,969 참조). 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 가용성 펩티드는 Fc 변이체에 융합된다.

관련 실시태양에서, 본 발명의 변형된 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 영역을 갖는 tim-4 융합 폴리펩티드를 포함한다. 공지된 바와 같이, 각각의 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 4 또는 5개의 도메인을 포함한다. 도메인은 순차적으로 다음과 같이 불린다: CH1-힌지 (hinge)-CH2-CH3(-CH4). 중쇄 도메인의 DNA 서열은 면역글로불린 클래스 사이에 교차-상동성을 갖고, 예를 들어 IgG의 CH2 도메인은 IgA 및 IgD의 CH2 도메인, 및 IgM 및 IgE의 CH3 도메인에 상동성이다. 본원에서 사용되는 용어 "면역글로불린 Fc 영역"은 면역글로불린 사슬 불변 영역, 바람직하게는 면역글로불린 중쇄 불변 영역, 또는 그의 일부의 카르복실-말단부를 의미하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역은 1) CH1 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 또는 5) 2 이상의 도메인 및 면역글로불린 힌지 영역의 조합을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 면역글로불린 Fc 영역은 적어도 면역글로불린 힌지 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고, 바람직하게는 CH1 도메인이 결핍된다.

한 실시태양에서, 중쇄 불변 영역이 유래되는 면역글로불린의 클래스는 IgG (Ig γ) (γ 서브클래스 1, 2, 3 또는 4)이다. 다른 클래스의 면역글로불린 IgA (Ig α), IgD (Ig δ), IgE (Ig ϵ) 및 IgM (Ig μ)가 사용될 수 있다. 적절한 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 선택은 미국 특허 5,541,087 및 5,726,044에 상세히 논의되어 있다. 특정 결과를 달성하기 위한 몇몇 면역글로불린 클래스 및 서브클래스로부터 특정 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열의 선택은 당업계의 기술 수준 내에 있는 것으로 간주된다. 면역글로불린 Fc 영역을 코딩하는 DNA 구성체의 일부는 바람직하게는 힌지 도메인의 적어도 일부, 바람직하게는 Fc γ 의 CH₃ 도메인 또는 임의의 IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 상동성 도메인의 적어도 일부를 포함한다.

또한, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 내에서 아미노산의 치환 또는 결실이 본 발명의 실시예에 유용할 수 있는 것으로 생각된다. 한 예는 상부 CH2 영역에 아미노산 치환을 도입하여 Fc 수용체에 대한 친화도가 감소된 Fc 변이체를 생성시키는 것이다 (Cole et al. (1997) J. IMMUNOL. 159: 3613). 당업계의 통상의 기술자는 잘 공지된 분자생물학 기술을 사용하여 상기 구성체를 제조할 수 있다.

추가 실시태양에서, 융합 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드의 생체내 안정성을 증가시키기 위해, 또는 그의 생물학적 활성 또는 위치설정 (localization)을 조절하기 위해, 또는 융합 폴리펩티드의 정제를 용이하게 하기 위해 가용성 tim-4 폴리펩티드 및 제2 이중 폴리펩티드를 포함한다. tim-4 가용성 융합 폴리펩티드를 생성하기 위해 사용될 수 있는 다른 예시적인 이중 폴리펩티드는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타티온 S 트랜스퍼라제 (GST), 티오레독신, 폴리펩티드 A, 폴리펩티드 G, 및 면역글로불린 중쇄 불변 영역 (Fc), 말토스 결합 폴리펩티드 (MBP) (이는 친화도 크로마토그래피에 의한 융합 폴리펩티드의 단리에 특히 유용하다)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 친화도 정제를 위해, 친화도 크로마토그래피용 관련 매트릭스, 예를 들어 글루타티온-, 아밀라제-, 및 니켈- 또는 코발트-키즈게이팅된 수지가 사용된다. 당업계에 잘 공지된 또다른 융합 도메인은 녹색 형광 폴리펩티드 (GFP)이다. 융합 도메인은 또한 보통 그에 대해 특이적 항체가 이용가능한 대체로 짧은 펩티드 서열인 "에피토프 태그 (tag)"를 포함한다. 그에 대해 특이적 모노클로날 항체가 쉽게 이용가능한 잘 공지된 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 (HA) 및 c-myc 태그를 포함한다. 몇몇 경우에, 융합 도메인은 인자 Xa 또는 트롬빈에 대한 것과 같은 프로테아제 절단 부위를 갖고, 이는 관련 프로테아제가 융합 폴리펩티드를 부분적으로 소화시켜 그로부터 재조합 폴리펩티드를 유리시키도록 한다. 이어서 유리된 폴리펩티드는 후속적인 크로마토그래피 분리에 의해 융합 도메인으로부터 단리될 수 있다.

바람직하게는, 일반적으로 순환혈에서 반감기가 20시간보다 긴 안정한 혈장 폴리펩티드가 tim-4와 융합 폴리펩티드를 구성하기 위해 사용된다. 상기 혈장 폴리펩티드는 면역글로불린, 혈청 알부민, 리포폴리펩티드, 아포리포폴리펩티드 및 트랜스페린을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 가용성 tim-4 분자를 특정 세포 또는 조직 종류에 표적화할 수 있는 서열이 또한 가용성 tim-4에 부착되어 특이적으로 위치선정된 가용성 tim-4 융합 폴리펩티드를 생성시킬 수 있다.

한 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 알부민에 대한 tim-4 융합체를 제공한다. 본원에서 사용되는 "알부민"은 알부민 폴리펩티드 또는 아미노산 서열, 또는 알부민의 하나 이상의 기능적 활성 (예를 들어 생물학적 활성)을 갖는 알부민 단편 또는 변이체를 총칭하여 나타낸다. 특히, "알부민"은 인간 알부민 또는 그의 단편 (EP 201 239, EP 322 094, WO 97/24445, WO 95/23857 참조), 특히 인간 알부민의 성숙한 형태, 또는 다른 척추동물의 알부민을 나타낸다. 특히, 본 발명의 알부민 융합 폴리펩티드는 인간 알부민 및 인간 알부민의 단편의 천연 다형 변이체 (WO95/23857 참조), 예를 들어 EP 322 094에 개시된 단편 (즉 HA (Pn), 여기서 n은 369 내지 419임)을 포함할 수 있다. 알부민은 임의의 척추동물, 특히 임의의 포유동물, 예를 들어 인간, 소, 양 또는 돼지로부터 유래할 수 있다. 비포유동물 알부민은 닭 및 연어를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 알부민 융합 폴리펩티드의 알부민 부분은 tim-4 또는 tim-1 폴리펩티드와 상이한 동물로부터 유래할 수 있다.

몇몇 실시태양에서, 알부민 융합 폴리펩티드의 알부민 폴리펩티드 부분은 혈청 알부민의 단편에 대응한다. 혈청 알부민 폴리펩티드의 단편은 하나 이상의 잔기가 아미노 말단 또는 C-말단으로부터 결실된 폴리펩티드를 포함한다. 일반적으로, HA 단편 또는 변이체는 길이가 적어도 100 아미노산, 바람직하게는 적어도 150 아미노산일 것이다. HA 변이체는 HA의 적어도 하나의 전체 도메인으로 이루어지거나 별법으로 포함할 수 있다. 인간 알부민의 도메인은 미국 특허 출원 공개 2004/0171123에 기재되어 있다.

특정 실시태양에서, 본 발명은 가용성 tim-4 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명은 또한 가용성 tim-4 폴리펩티드 및 관련 유도체를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 세균 세포, 예를 들어 이. 콜리 (E. coli), 곤충 세포 (예를 들어, 바콜로바 바이러스 발현계를 사용하여), 효모 또는 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 한 실시태양에서, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 포유동물 세포에 의해 제조되어 분비되고, 가용성 tim-4 폴리펩티드는 배양 배지로부터 정제된다. 다른 적합한 숙주 세포는 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다. 따라서, 본 발명의 일부 실시태양은 추가로 가용성 tim-4 폴리펩티드를 생산하는 방법에 관한 것이다.

치료 또는 예방 효능, 또는 안정성 (예를 들어 생체의 저장 수명 및 생체내 단백질 분해에 대한 내성)을 강화시키기 위한 목적을 위해 대상 tim-4 폴리펩티드의 구조를 변형하는 것도 또한 가능하다. 천연 형태의 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 보유하도록 설계될 때 상기 변형된 폴리펩티드는 본원에 보다 상세히 설명된 tim-4 폴리펩티드의 기능적 동등물로 간주된다. 상기 변형된 폴리펩티드는 예를 들어 아미노산 치환, 결실 또는 부가에 의해 생산할 수 있다.

예를 들어, 류신을 이소류신 또는 발린으로, 아스파르테이트를 글루타메이트로, 트레오닌을 세린으로의 단리된 교체, 또는 아미노산을 구조상 관련된 아미노산으로의 유사한 교체 (즉, 보존적 돌연변이)는 생성되는 분자의 생물학적 활성에 중요한 영향을 미치지 않을 것으로 예상하는 것이 합리적이다. 보존적 교체는 그들의 측쇄에 관련되는 아미노산의 패밀리 내에 일어나는 것이다. 유전적으로 코딩되는 아미노산은 4개의 패밀리로 분류될 수 있다: (1) 산성 = 아스파르테이트, 글루타메이트; (2) 염기성 = 리신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 비극성 = 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판; 및 (4) 비하전 극성 = 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스틴, 세린, 트레오닌, 티로신. 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 때때로 함께 방향족 아미노산으로 분류된다. 유사한 방식으로, 아미노산 레퍼토리는 (1) 산성 = 아스파르테이트, 글루타메이트; (2) 염기성 = 리신, 아르기닌, 히스티딘, (3) 지방족 = 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 세린, 트레오닌 (세린 및 트레오닌은 임의로 개별적으로 지방족-히드록실로서 분류된다); (4) 방향족 = 페닐알라닌, 티로신, 트립토판; (5) 아미드 = 아스파라긴, 글루타민; 및 (6) 황 함유 = 시스틴 및 메티오닌으로 분류될 수 있다 (예를 들어, Biochemistry, 2nd ed., Ed. by L. Stryer, W.H. Freeman and Co., 1981 참조). 폴리펩티드의 아미노산 서열에서의 변화는 기능적 상동체를 생성시키고, 이는 야생형 폴리펩티드와 유사한 방식으로 세포에서 반응을 생성시키는 변이체 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써 쉽게 결정될 수 있다. 예를 들어, tim-4 폴리펩티드의 상기 변이체 형태는 예를 들어 Th1 또는 Th2 세포에 의한 시토킨의 분비를 조절하는 그들의 능력, 또는 tim-1 폴리펩티드에 결합하는 그들의 능력에 대해 평가될 수 있다. 하나 초과의 교체가 일어난 폴리펩티드는 동일한 방식으로 쉽게 시험될 수 있다.

본 발명에 의해 제공되거나 본 발명의 방법에서 사용되는 tim-1, tim-2 또는 tim-4 폴리펩티드의 일부는 번역후 변형을 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 번역후 폴리펩티드 변형은 인산화, 아세틸화, 메틸화, ADP-리보실화, 유비퀴틴화, 글리코실화, 카르보닐화, 수모일화, 비오틴화, 또는 폴리펩티드 측쇄 또는 소수성기의 부가를 포함한다. 그 결과, 변형된 가용성 폴리펩티드는 비아미노산 요소, 예를 들어 지질, 다당체 또는 단당체, 및 인산염을 함유할 수 있다.

본 발명의 한 특정한 실시태양에서, 대상 tim-1, tim-2 또는 tim-4 폴리펩티드, 예를 들어 tim-4 가용성 폴리펩티드의 변형된 형태는 대상 가용성 폴리펩티드를 비폴리펩티드 중합체에 연결시키는 것을 포함한다. 한 특정한 실시태양에서, 중합체는 미국 특허 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 기재된 방식으로 폴리에틸렌 글리콜 ("PEG"), 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌이다. PEG는 상업적으로 입수가가능하거나 당업계에 잘 공지된 방법에 따라 에틸렌 글리콜의 개환 중합반응에 의해 제조할 수 있는 잘 공지된 수용성 중합체이다 (Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). 용어 "PEG"는 PEG의 단부에서의 변형 또는 크기에 상관없이 임의의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 포함하도록 넓게 사용되고, 화학식 $X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$

(1) (여기서, n은 20 내지 2300이고, X는 H 또는 단부 변형, 예를 들어 C_{1-4} 알킬임)로 나타낼 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 PEG는 한 단부 상에서 히드록시 또는 메톡시로 종결되고, 즉, X는 H 또는 CH_3 이다 ("메톡시 PEG"). PEG는 결합 반응에 필요한 추가의 화학기를 함유할 수 있고; 이는 분자의 화학 합성으로 생성되거나; 분자의 부분들의 최적 거리를 위한 스페이서 (spacer)이다. 또한, 상기 PEG는 함께 연결된 하나 이상의 PEG 측쇄로 이루어질 수 있다. 하나 초과와 PEG 사슬을 갖는 PEG는 멀티암드 (multiarmed) 또는 분지형 PEG로 불린다. 분지형 PEG는 예를 들어 폴리에틸렌 옥시드를 글리세롤, 펜타에리스리톨 및 소르비톨을 포함한 다양한 폴리올에 부가하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 4-암드 분지형 PEG는 펜타에리스리톨 및 에틸렌 옥시드로부터 제조할 수 있다. 분지형 PEG는 예를 들어 EP-0473084 및 미국 특허 5,932,462에 기재되어 있다. PEG의 하나의 형태는 리신의 일차 아미노기를 통해 연결된 2개의 PEG 측쇄 (PEG2)를 포함한다 (Monfardini, C., et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69).

펩티드 또는 폴리펩티드에 대한 PEG 컨쥬게이션은 일반적으로 PEG의 활성화 및 활성화된 PEG-중간체를 표적 폴리펩티드/펩티드에 직접, 또는 후속적으로 활성화되고 표적 폴리펩티드/펩티드에 커플링되는 링커 (linker)에 커플링하는 것을 포함한다 (Abuchowski, A. et al, J. Biol. Chem., 252, 3571 (1977) and J. Biol. Chem., 252, 3582 (1977), Zalipsky, et al., and Harris et. al., in: Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications; (J. M. Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Chap. 21 and 22 참조).

당업계의 숙련인은 예를 들어 PEG화 (pegylated) tim-4 또는 tim-1 폴리펩티드를 치료적으로 사용할 방법, 바람직한 용량, 순환 시간, 단백질 분해에 대한 내성, 면역원성, 및 다른 고려사항을 기준으로 PEG에 대한 적합한 분자 질량을 선택할 수 있다. PEG 및 폴리펩티드의 특성을 향상시키기 위한 그의 용도에 대한 논의는 문헌 (N. V. Katre, Advanced Drug Delivery Reviews 10: 91-114 (1993))을 참조한다.

본 발명의 한 실시태양에서, PEG 분자는 tim-4 또는 tim-1 폴리펩티드 상의 아미노기, 예를 들어 리신과 반응하도록 활성화될 수 있다 (Bencham C. O. et al., Anal. Biochem., 131, 25 (1983); Veronese, F. M. et al., Appl. Biochem., 11, 141 (1985); Zalipsky, S. et al., Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky, S. et al., Europ. Polym. J., 19, 1177-1183 (1983); Delgado, C. et al., Biotechnology and Applied Biochemistry, 12, 119-128 (1990)). 또다른 실시태양에서, PEG 분자는 tim-4 또는 tim-1 상의 술포히드릴기에 커플링될 수 있다 (Sartore, L., et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 27, 45 (1991); Mörpurgo et al., Biocon. Chem., 7, 363-368 (1996); Goodson et al., Bio/Technology (1990) 8, 343; 미국 특허 5,766,897). 미국 특허 6,610,281와 5,766,897에는 술포히드릴기에 커플링될 수 있는 예시적인 반응성 PEG 종이 기재되어 있다. 몇몇 실시태양에서, PEG화된 tim-4 또는 tim-1 폴리펩티드는 N-말단 아미노산의 알파 아미노기에 공유 결합된 PEG 분자를 포함한다. 부위 특이적 N-말단 환원적 아민화는 문헌 [Pepinsky et al., (2001) JPET, 297, 1059] 및 미국 특허 5,824,784에 기재되어 있다. 다른 이용가능한 친핵성 아미노기를 이용하는 폴리펩티드의 환원적 아민화를 위한 PEG-알데히드의 사용은 미국 특허 4,002,531, 문헌 [Wieder et al., (1979) J. Biol. Chem. 254, 12579 및 Chamow et al., (1994) Bioconjugate Chem. 5,133]에 기재되어 있다.

IV. 면역 반응을 조절하는 방법

본 발명의 한 측면은 대상에서 면역 반응을 조절하는 방법, 비제한적인 예를 들어 Th1 또는 Th2 반응, 면역 관용 및 이식 관용을 조절하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "조절하는"은 "증가시키는" 또는 "감소시키는"을 의미한다. 바람직한 실시태양에서, 대상은 인간이다. 또다른 실시태양에서, 대상은 포유동물, 예를 들어 마우스이다.

본 발명의 한 특정한 측면은 치료를 필요로 하는 대상에서 Th1 매개 질환에 걸릴 가능성을 치료하거나 예방하거나 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상에게 치료 유효량의 tim-1, tim-2, tim-4의 발현 또는 활성 또는 둘 모두를 감소시키거나, tim-4에 대한 tim-1의 결합 또는 세마포린4A에 대한 tim-2의 결합을 감소시키는 작용제를 투여하는 것을 포함한다. 세마포린4A의 아미노산 서열은 Genbank 기탁 번호 NP_071762로서 기재되어 있다. 본 발명의 다른 측면은 대상에게 tim-1, tim-2 또는 tim-4 길항제, 예를 들어 대상에서 Th1-매개 면역 반응을 감소시키거나, 저해하거나, 억제하거나, 개량하거나 지연시키기 위해 충분한 양의 tim-1, tim-2 또는 tim-4 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 Th1-매개 면역 반응을 감소시키거나, 저해하거나, 억제하거나, 개량하거나 지연시키는 방법을 특징으로 한다.

Th2-매개 질환과 반대로, 본원에서 사용되는 "Th1-매개 질환"은 Th1 면역 반응의 발생과 연관된 질병을 나타낸다. 본원에서 사용되는 "Th1 면역 반응"은 적어도 하나의 Th1-시토킨 또는 Th1-항체의 유도를 나타낸다. 바람직한 실시태양에서, 하나 초과 Th1-시토킨 또는 Th1-항체가 유도된다. 따라서, Th1-매개 질환은 Th1 반응의 유도와 연관된 질병이고, 적어도 하나의 Th1-시토킨 또는 Th1-항체의 부분적 또는 완전한 유도, 또는 적어도 하나의 Th1-시토킨 또는 Th1-항체의 수준의 증가를 의미한다. 이들 질환은 당업계에서 공지되어 있고, 예를 들어 자가면역성 (특히 장기 특이적) 질병, 건선, Th1 염증성 질환, 세포외 기생충의 감염 (예를 들어, 연충 (helminth)에 대한 반응), 고형 장기 동종이식 거부반응 (예를 들어, 급성 신장 동종이식 거부반응), B형 간염 (HBV) 감염증과 연관된 증상 (예를 들어 HBV 급성상 또는 회복상), 만성 C형 간염 (HCV) 감염증, 인슐린 의존성 당뇨병 (IDDM), 다발 경화증 (MS), 아급성 림프구성 갑상선염 ("침묵 갑상선염"), 크론병, 일차 담관성 간경화증, 일차 경화 담관염, 사르코이드증 (sarcoidosis), 아테롬성 동맥경화증, 급성 이식편대숙주 질병 (GvHD), 사구체신염, 항-사구체 기저막 질병, 베게너 (Wegener) 육아종증, 염증성 근염, 쇼그렌 (Sjogren) 증후군, 베체트 (Behcet) 증후군, 류마티스성 관절염, 라임 (Lyme) 관절염 및 설명되지 않는 재발성 유산을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

몇몇 실시태양에서, Th1-매개 질환은 아테롬성 동맥경화증, 세포외 기생충의 감염, B형 간염 (HBV) 감염증과 연관된 증상 (예를 들어 HBV 급성상 또는 회복상), 만성 C형 간염 (HCV) 감염증, 침묵 갑상선염, 일차 담관성 간경화증, 일차 경화 담관염, 사구체신염, 항-사구체 기저막 질병, 베게너 육아종증, 염증성 근염, 쇼그렌 증후군, 베체트 증후군, 류마티스성 관절염, 및 설명되지 않는 재발성 유산으로 이루어진 군 중에서 선택된다.

Th1-매개 면역 반응을 감소시키는 본원에 기재된 방법은 대상에서 자가면역 질병을 치료하기 위해 특히 유용할 수 있다. 한 실시태양에서, 대상에서 Th1 반응을 감소시키는 본 발명의 방법은 자가면역 질병에 걸리거나 발병할 위험이 큰 대상에 적용된다. "자가면역 질병"은 대상 자신의 항체가 숙주 조직과 반응하거나 면역 효과제 T세포가 내재성 자가 펩티드에 자가반응성이어서 조직의 파괴를 일으키는 질병의 클래스이다. 따라서, 면역 반응은 자가 항원으로 불리는 대상 자신의 항원에 대항하여 준비된다. 본원에서 사용되는 "자가 항원"은 정상 숙주 조직의 항원을 의미한다. 정상 숙주 조직은 암 세포를 포함하지 않는다. 따라서, 자가면역 질병의 맥락에서 자가 항원에 대항하여 준비된 면역 반응은 바람직하지 않은 면역 반응이고 정상 조직의 파괴 및 손상에 기여하는 반면, 암 항원에 대항하여 준비된 면역 반응은 바람직한 면역 반응이고 종양 또는 암의 파괴에 기여한다.

자가면역 질병은 류마티스성 관절염, 크론병, 다발 경화증, 전신 홍반 루푸스 (SLE), 자가면역성 뇌척수염, 중증 근육 무력증 (MG), 하시모토 갑상선염, 구드패스츄어 (Goodpasture) 증후군, 천포창 (예를 들어 보통 천포창), 그레이브 (Grave) 질병, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 혈소판감소성 자반증, 항-콜라겐 항체를 갖는 피부경화증, 혼합 결합 조직 질병, 다발근염, 악성 빈혈, 특발성 애디슨 (Addison) 질병, 자가면역-연관 불임증, 사구체신염 (예를 들어, 초소달 사구체신염, 증식성 사구체신염), 수포성 유사천포창, 쇼그렌 증후군, 인슐린 저항 및 자가면역성 당뇨병 (1형 당뇨병; 인슐린 의존성 당뇨병)을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 최근에 자가면역 질병은 또한 아테롬성 동맥경화증 및 알츠하이머병을 포함하는 것으로 인정되고 있다. 한 특정 실시태양에서, 자가면역 질병은 다발 경화증, 1형 당뇨병, 하시모토 갑상선염, 크론병, 류마티스성 관절염, 전신 홍반 루푸스, 위염, 자가면역성 간염, 용혈성 빈혈, 자가면역성 혈우병, 자가면역성 림프 증식 증후군 (ALPS), 자가면역성 포도막염, 사구체신염, 길랑-바레 증후군, 건선 및 중증 근육 무력증으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또다른 실시태양에서, Th1-매개 질환은 숙주대이식편 질병 (HVGD)이다. 관련 실시태양에서, 대상은 장기 또는 조직 이식 수령자이다.

본 발명의 또다른 측면은 대상에게 치료 유효량의 tim-1, tim-2 또는 tim-4 기능을 감소시키는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 이식 관용을 증가시키는 방법을 제공한다. 한 특정한 실시태양에서, 대상은 동종이형 이식의 수령자이다. 이식은 심장, 신장, 간, 피부, 췌장, 골수, 피부 또는 연골을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 장기 또는 조직 이식일 수 있다. 본원에서 사용되는 "이식 관용"은 수령자의 면역계에 의한 공여자 장기의 거부반응이 없는 것을 의미한다. 또한, 작용제는 조직 또는 세포 이식물의 거부반응이 일어날 가능성을 예방하거나 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

본 발명의 다른 측면은 치료를 필요로 하는 대상에서 면역 관용을 감소시키고 Th1 활성화를 증가시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상에게 치료 유효량의 tim-1, tim-2 또는 tim-4의 발현 또는 활성을 증가시키는 작용제, 즉, tim-1, tim-2 또는 tim-4 효능제, 또는 tim-4에 대한 tim-1의 결합 또는 세마포린4A에 대한 tim-2의 결합을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함한다. 면역 관용의 감소는 암 면역요법에서 유익할 수 있다. 면역계는 종양 항원에 대항하여 관용성을 발생시켜, 종양이 면역 감시를 피할 수 있도록 한다. 본 발명의 한 측면에서, tim-1, tim-2 또는 tim-4 활성을 증가시키거나, tim-4에 대한 tim-1의 결합 또는 세마포린4A에 대한 tim-2의 결합을 증가시키는 작용제가 증식 질병으로 고통받는 대상에게 투여된다.

용어 "암" 및 "종양"은 상호교환가능하게 사용되고, 두 용어는 증식 질병을 나타낸다. 한 실시태양에서, 암은 카포시(Kaposi) 육종, 만성 백혈병, 전립선암, 유방암, 육종, 췌장암, 백혈병, 난소암종, 직장암, 인후암, 흑색종, 결장암, 방광암, 림프종, 비만세포종, 폐암, 유선암종, 인두 편평세포 암종, 및 위장관 또는 위암으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 또다른 실시태양에서, 암은 기저세포 암종, 담관암; 방광암; 뼈암; 뇌 및 CNS 암; 유방암; 경부암; 용모막암종; 결장 및 직장암; 결합 조직암; 소화기계의 암; 자궁내막암; 식도암; 눈 암; 두경부 암; 위암; 상피내 종양; 신장암; 후두암; 백혈병; 간암; 폐암 (예를 들어 소세포 및 비-소세포); 호지킨 (Hodgkin) 및 비호지킨 림프종을 포함하는 림프종; 흑색종; 골수종; 신경모세포종; 구강암 (예를 들어 입술, 혀, 입 및 인두); 난소암; 췌장암; 전립선암; 망막모세포종; 횡문근육종; 직장암; 호흡기계의 암; 육종; 피부암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁암; 비뇨기계의 암, 및 다른 암종 및 육종으로 이루어진 군 중에서 선택된다.

다른 측면에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에서 Th2-연관 반응 (예를 들어, 알레르기 또는 천식 반응)을 감소시키거나, 저해하거나, 억제하거나, 개량하거나 지연시키는 방법을 특징으로 하고, 상기 방법은 대상에게 tim-1, tim-2, tim-4의 발현 또는 활성을 증가시키는 작용제, 즉, tim-1, tim-2 또는 tim-4 효능제, 또는 tim-1에 대한 tim-4의 결합 또는 세마포린4A에 대한 tim-2의 결합을 증가시키는 작용제를 투여하는 것을 포함한다.

본원에서 사용되는 "Th2-매개 질환"은 Th2 면역 반응의 발생과 연관된 질병을 나타낸다. 본원에서 사용되는 "Th2 면역 반응"은 적어도 하나의 Th2-시토킨 또는 Th2-항체의 유도를 나타낸다. 바람직한 실시태양에서, 하나 초과 Th2-시토킨 또는 Th2-항체가 유도된다. 따라서, Th2-매개 질환은 Th2 반응의 유도와 연관된 질병이고, 적어도 하나의 Th2-시토킨 또는 Th2-항체의 부분적 또는 완전한 유도 또는 적어도 하나의 Th2-시토킨 또는 Th2-항체의 수준의 증가를 의미한다. 이들 질환은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 아토피 병, 예를 들어 천식 및 알레르기, 예를 들어 알레르기성 비염, 위장관 알레르기, 예를 들어 식품 알레르기, 호산구 증가증, 결막염, 사구체신염, 특정 병원체 감수성, 예를 들어 연충증 (예를 들어, 리슈만편모충증) 및 특정 바이러스 감염증, 예를 들어 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 및 특정 세균 감염증, 예를 들어 결핵 나병증 나병을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 바람직한 실시태양에서, Th2-연관 반응은 천식 또는 알레르기이다.

본원에서 사용되는 천식은 장기간에 걸쳐 개인에서 가역적인 기류 제한이다. 천식은 기도 벽에서 호산구, 비만세포, 호염기구 및 CD25⁺ T 림프구와 같은 세포의 존재를 특징으로 한다. 매우 다양한 신호전달 및 생물학적 유효기 특성을 갖는 시토킨의 활성화 때문에 이들 세포 사이에 밀접한 상호작용이 있다. 케모킨은 세포를 염증 부위로 잡아당기고, 시토킨은 이들을 활성화시켜, 점막층에 염증 및 손상을 일으킨다. 과정이 만성적이기 때문에, 2차적인 변화, 예를 들어 기저막의 비후 및 섬유증이 일어난다. 상기 질병은 다양한 자극에 대한 증가된 기도 과반응도, 및 기도 염증을 특징으로 한다. 천식으로 진단받은 환자는 일반적으로 시간이 지남에 따라 다수의 징후, 예를 들어 쌉쌉거림, 천식 발작, 및 메타콜린 챌린지에 대한 양성 반응, 즉, 약 메타콜린 챌린지에 대한 4 mg/ml 미만의 PC20을 나타낼 것이다. 진단 지침은 예를 들어 문헌 [National Asthma Education Program Expert Panel Guidelines for Diagnosis and Management of Asthma, National Institutes of Health, 1991, Pub. No. 91-3042]에서 찾을 수 있다.

본원에서 사용되는 "알레르기"는 물질 (알레르겐)에 대한 획득된 과민성을 나타낼 것이다. 알레르기 병은 습진, 알레르기성 비염 또는 비염, 건초열, 기관지 천식, 두드러기 및 식품 알레르기, 및 다른 아토피 병을 포함한다. "알레르기를 갖는 대상"은 알레르겐에 반응하여 알레르기 반응을 나타내는 또는 나타낼 위험이 있는 대상이다. "알레르겐"은 감수성 대상에서 알레르기 또는 천식 반응을 유도할 수 있는 물질을 의미한다. 알레르겐의 목록은 엄청나고, 꽃가루, 곤충 독물, 동물 비듬, 먼지, 곰팡이 포자 및 약물 (예를 들어 페니실린)을 포함할 수 있다.

관심있는 알레르겐은 식품, 예를 들어 딸기, 땅콩, 우유 폴리펩티드, 달걀 흰자 등에서 발견된 항원을 포함한다. 다른 관심 있는 알레르겐은 다양한 공기매개 항원, 예를 들어 꽃가루, 동물 비듬, 집진드기 배설물 등을 포함한다. 분자적으로 클로닝된 알레르겐은 세로무늬 먼지진드기 (Dermatophagoides pteronyssinus: DerP1); 호밀 (rye grass) 꽃가루로부터의 Lol pl-V; 많은 곤충 독물, 예를 들어 점프 개미 (jumper ant) 미르메시아 필로술라 (Myrmecia pilosula)의 독물; 아피스

멜리페라 (*Apis mellifera*) 벌 독물 포스포리파제 A2 (PLA₂) 및 항원 5S; 말벌 베스폴라 마쿨리프론스 (*Vespula maculifrons*) 및 흰얼굴 호박벌 돌리코베스폴라 마쿨라타 (*Dolichovespula maculata*)로부터 포스포리파제; 매우 많은 꽃가루 폴리펩티드, 예를 들어 자작나무 꽃가루, 두드러기쭉 꽃가루, Parol (개물통이 (*Parietaria officinalis*)의 주 알레르겐) 및 교차-반응성 알레르겐 Parj1 (파리에타리아 (*Parietaria judaica*)로부터), 및 다른 대기 중 꽃가루, 예를 들어 올리브 (*Olea europaea*), 아르테미시아 (*Artemisia*) 속 식물, 벼과식물 등을 포함한다. 관심있는 다른 알레르겐은 흡혈 절지동물, 예를 들어 파리목 (Diptera), 예를 들어 모기 (아노펠레스 (*Anopheles*) 종, 애데스 (*Aedes*) 종, 쿨리세타 (*Culiseta*) 종, 쿨렉스 (*Culex*) 종); 파리 (플레보토무스 (*Phlebotomus*) 종, 쿨리코이데스 (*Culicoides*) 종), 특히 먹파리, 사슴 파리 및 등에 모기; 진드기 (데르마센터 (*Dermacenter*) 종, 오르니토도로스 (*Ornithodoros*) 종, 오토비우스 (*Otobius*) 종); 벼룩, 예를 들어 목 시포납테라 (*Siphonaptera*), 예를 들어 속 제노실라 (*Xenopsylla*), 풀렉스 (*Pulex*) 및 고양이 벼룩 (*Ctenocephalides felis*)에 의해 유발된 알레르기 피부염의 원인이 되는 것이다. 특이적 알레르겐은 다당체, 지방산 잔기, 폴리펩티드 등일 수 있다.

본 발명에 따라, tim-1, tim-2 또는 tim-4 활성을 조절하거나, tim-1과 tim-4 사이의 복합체 형성을 조절하는 작용제는 면역 반응의 조절을 위해 또는 질환 또는 병의 치료를 위해 다른 조성물 및 절차와 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 종양은 통상적으로 수술, 방사선 또는 화학요법을 사용하여 치료될 수 있다. tim-1 활성을 증가시키는 작용제, 예를 들어 tim-4-IgG 융합 폴리펩티드는 미세전이의 휴지기를 연장시키고 임의의 잔류 일차 종양을 안정화시키기 위해 환자에게 후속적으로 투여될 수 있다.

또한, 본원에 기재된 방법은 면역 반응을 조절하기 위해 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 60/508319에 기재된 방법과 조합시킬 수 있다. 예를 들어, 대상에서 Th1 반응을 증가시키는 방법은 대상에게 (i) tim-3에 대한 갈렉틴-9의 결합을 차단하는 작용제, 예를 들어 tim-3Ig 폴리펩티드, 및 (ii) tim-1 활성을 증가시키는 작용제, 예를 들어 tim-4-Ig 융합체를 투여하는 것을 포함한다. 당업계의 숙련인은 작용제의 많은 조합이 가능함을 알 것이다. 바람직한 방법의 조합은 tim-3의 활성 및 tim-1/tim-4의 활성이 반대 방향으로 조절되는, 예를 들어 tim-3 활성을 증가시키고 tim-1/tim-4 활성을 감소시키거나, 또는 그 반대인 조합이다. 미국 특허 출원 공개 2004/0005322에서는 또한 본원에 기재된 방법과 함께 사용할 수 있는 tim-3 관련 작용제 및 조성물을 기재하고 있다.

본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에서 T-세포 팽창을 향상시키거나 억제하는 방법을 추가로 제공하고, 상기 방법은 대상에게 T-세포 팽창을 향상시키거나 억제하기에 충분한 양의 tim-4 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함한다. 상기 방법은 부분적으로 tim-4:Ig 융합 단백질이 용량 의존 방식으로 T-세포의 증식을 억제하거나 강화시킬 수 있다는 본 발명자들의 예상치 않은 발견에서 유래된다. T-세포 반응의 강화는 병원체, 예를 들어 감염제, 예를 들어 바이러스로 고통받는 대상에게 유익할 수 있다. T-세포 반응의 억제는 Th1 또는 Th2 매개 질환으로 고통받는 환자에게 유익할 수 있다.

tim-4 폴리펩티드, 예를 들어 tim-4:Ig 융합체의 적절한 용량은 실시예 16에 제공된 것과 같은 시험관내 또는 생체내 데이터로부터 외삽될 수 있다. 당업계의 통상의 기술자는 대상을 치료하기 위해 요구되는 양을 결정하기 위해 간단한 적정 실험을 수행할 수 있다. 예를 들어, T-세포의 샘플을 대상으로부터 얻을 수 있고, 대상에서 T-세포 팽창을 향상시키거나 억제하기 위한 최적 용량을 확인하기 위해 tim-4 작용제에 대한 투여량 반응 곡선을 생성할 수 있다. 본 발명의 조성물의 투여량은 대상에 따라 및 사용된 특정 투여 경로에 따라 변할 것이다. 조성물을 기초로, 투여량은 예를 들어 연속 펌프에 의해 연속적으로, 또는 주기적 간격, 예를 들어 1, 2 또는 그 이상의 개별적인 경우로 전달할 수 있다. 특정 조성물의 다수 투여량의 바람직한 시간 간격은 당업계의 숙련인이 과도한 실험 없이 결정할 수 있다.

본 발명의 다른 측면은 아토피 질병에 걸리게 되는 가능성을 예방하거나 감소시키는 방법을 제공한다. 아토피 질병은 유전적 소인이 있는 개인에서 환경적으로 유발된 면역 반응의 결과로 발병하는 복잡한 유전 형질이다. 아토피 및 비아토피 개인은 모두 동일한 환경 인자에 노출되지만, 아토피 개인을 비아토피 개인과 구분하는 유전적 차이는 기도, 피부 또는 위장관에서 알레르기 염증에 의해, 및 상승된 혈청 IgE, 호산구 증가증 및 쉼쉼거림, 재채기 또는 두드러기의 증상에 의해 나타나는, 일부 개인에서 아토피 질병을 일으킨다. 또한, 알레르기 염증 반응은 고수준의 IL-4, IL-5, IL-9 및 IL-13을 생산하는 Th2 림프구의 존재를 특징으로 하고, 이는 호산구, 비만 세포, 호염기구 및 IgE를 생산하는 B세포의 성장, 분화 및(또는) 점증현상을 향상시킨다.

본 발명의 한 특정한 측면은 대상에서 아토피 질병에 걸릴 가능성을 예방하거나 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상에게 치료 유효량의 (i) 서열 3의 아미노산 31-133; (ii) 서열 4의 아미노산 31-134; (iii) 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (iv) 서열 4의 아미노산 31-134에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열; 또는 (v) 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함한다.

몇몇 실시태양에서, 폴리펩티드는 서열 3 또는 4에 기재된 서열, 또는 상기 서열의 분절, 예를 들어 IgV 도메인 또는 뮤신 도메인에 적어도 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5% 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함한다. 폴리펩티드는 예를 들어, 서열 3의 잔기 31-133에 98% 동일하거나 유사한 서열을 갖는 도메인, 뒤이어 그의 서열이 서열 3에 대한 상동성이 거의 또는 전혀 없는 분절, 예를 들어 면역글로불린의 Fc 도메인을 포함할 수 있다.

아토피 질병에 걸릴 가능성을 예방하거나 감소시키는 본 발명에 의해 제공되는 방법은 부분적으로 tim-1에 결합하는 A형 간염 바이러스의 감염과 그 결과로서 아토피 질병에 걸릴 가능성의 감소 사이의 관련과 함께 tim-4가 tim-1에 결합한다는 본 발명자들의 발견에 기초한다 (McIntire JJ et al., (2003) Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease. Nature; 425(6958): 576; von Hertzen LC, (2000) Puzzling associations between childhood infections and the later occurrence of asthma and atopy Ann Med.; 32(6): 397-400; Bodner C et al. (2000) Childhood exposure to infection and risk of adult onset wheeze and atopy. Thorax. 55(5): 383-7). 따라서, 몇몇 실시태양에서, 아토피 질병에 걸릴 가능성을 예방하거나 감소시키는 방법은 이전에 A형 간염 바이러스로 감염된 적이 없는 대상에서 아토피 질병에 걸릴 가능성을 예방하거나 감소시키는 방법인 한편, 관련 실시태양에서, 대상은 항-A형 간염 항체에 대해 혈청반응 음성이다. 또다른 실시태양에서, 대상은 아동 또는 10세 미만의 대상이다. 본원에 기재된 방법의 또다른 실시태양에서, 아토피 질병은 천식, 비염, 습진 및 건조열로 이루어진 군 중에서 선택된다.

본원에 기재된 방법의 몇몇은 tim-1, tim-2, tim-4의 발현 또는 활성 또는 둘 모두를 감소시키거나, tim-4에 대한 tim-1의 결합 또는 세마포린4A에 대한 tim-2의 결합을 감소시키는 작용제, 즉 tim-1, tim-2 또는 tim-4 길항제를 사용한다. 본원에 기재된 방법의 몇몇 실시태양에서, 치료제는 tim-1, tim-2 또는 tim-4에 특이적으로 결합할 수 있는 (i) 항체; 또는 (ii) 그의 단편을 포함하지 않는다. 또다른 실시태양에서, 치료제는 바이러스 단백질, 예를 들어 간염 바이러스로부터의 바이러스 단백질을 포함하지 않는다.

일부 실시태양에서, tim-1, tim-2 또는 tim-4 길항제는 RNAi 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 이중가닥 RNA 분자, 또는 이중가닥 RNA를 생성할 수 있는 DNA 구성체를 포함한다. 이중가닥 RNA는 헤어핀 (hairpin) RNA, 및 2개의 상보성 단일가닥 RNA 분자에 의해 형성된 RNA를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 코딩 스트랜드 (센스 스트랜드)에 상보성 (또는 안티센스)인 비교적 짧은 핵산이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 RNA에 기초하지만, 또한 DNA에 기초할 수 있다. 추가로, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 종종 그들의 안정성을 증가시키기 위해 변형된다.

이론에 매이지는 않지만, mRNA에 대한 이들 비교적 짧은 올리고뉴클레오타이드의 결합은 내인성 RNase에 의한 메세지의 분해를 촉발하는 이중가닥 RNA의 스트레치 (stretch)를 유도하는 것으로 생각된다. 추가로, 때때로 올리고뉴클레오타이드는 메세지의 프로모터 (promoter) 부근에 결합하도록 특이적으로 설계되고, 이러한 상황 하에 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 메세지의 번역을 추가로 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 기능하는 특이적 메카니즘에 상관없이, 세포, 조직 또는 유기체에 이들을 투여하면 특이적 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA를 분해시킨다. 따라서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 폴리펩티드의 발현 및(또는) 활성을 감소시킨다.

올리고뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA 또는 키메라 혼합물, 또는 이들의 유도체 또는 변형된 버전 (단일가닥 또는 이중가닥)일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 분자의 안정성, 혼성화 등을 개선하기 위해 염기 잔기, 당 잔기 또는 포스페이트 주쇄에서 변형될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 다른 매달린 기, 예를 들어 펩티드 (예를 들어, 숙주 세포 수용체를 표적화하기 위한), 또는 세포막 (예를 들어 Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652; 1988년 12월 15일자 공개된 PCT 공개 W088/09810 참조) 또는 허혈액 관문 (예를 들어 1988년 4월 25일자 공개된 PCT 공개 W089/10134 참조)을 가로질러 수송을 용이하게 하는 화합물, 혼성화-촉발된 절단제 (예를 들어 Krol et al., 1988, BioTechniques 6: 958-976 참조) 또는 인터칼레이팅제 (예를 들어 Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549 참조)를 포함할 수 있다. 이러한 목적에서, 올리고뉴클레오타이드는 다른 분자에 컨쥬게이팅될 수 있다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 하이포잔틴, 잔틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록시트리에틸) 우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실쿠에오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실쿠에오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 와이부톡소신, 슈도우라실, 쿠에오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸 에스

테르, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필) 우라실, (acp3)w, 및 2,6-디아미노퓨린을 포함하지만 이로 제한되지 않는 군 중에서 선택되는 적어도 하나의 변형된 염기 잔기를 포함할 수 있다

안티센스 올리고뉴클레오타이드는 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 자일루로스 및 핵소스를 포함하지만 이로 제한되지 않는 군 중에서 선택되는 적어도 하나의 변형된 당 잔기를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한 중성 펩티드 유사 주쇄를 함유할 수 있다. 상기 분자는 펩티드 핵산(PNA)-올리고머로 불리고, 예를 들어 문헌 [Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 14670 및 Eglom et al. (1993) Nature 365: 566]에 기재되어 있다. PNA 올리고머의 하나의 잇점은 DNA의 중성 주쇄로 인해 본질적으로 매질의 이온 강도와 관계없이 상보성 DNA에 결합하는 그들의 능력이다. 또다른 실시태양에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포르아미도티오에이트, 포스포르아미데이트, 포스포르디아미데이트, 메틸포스포네이트, 알킬포스포트리에스테르 및 포름아세트알 또는 그의 유사체로 이루어진 군 중에서 선택된 적어도 하나의 변형된 포스페이트 주쇄를 포함한다.

또다른 실시태양에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 -아노머성 (anomeric) 올리고뉴클레오타이드이다. -아노머성 올리고뉴클레오타이드는 상보성 RNA와 특이적 이중가닥 하이브리드를 형성하고, 여기서 보통의 단위와는 달리, 스트랜드는 서로 평행하다 (Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641). 올리고뉴클레오타이드는 2'-O-메틸리보뉴클레오타이드 (Inoue et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148), 또는 키메릭 RNA-DNA 유사체 (Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215: 327-330)이다.

본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예를 들어 자동화 DNA 합성기 (예를 들어 바이오서치 (Biosearch), 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems) 등으로부터 상업적으로 입수가 가능한)를 사용하여 합성할 수 있다. 예로서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 스테인 (Stein) 등 (1988, Nucl. Acids Res. 16: 3209)의 방법에 의해 합성할 수 있고, 메틸포스포네이트 올리고뉴클레오타이드는 제어된 공극 유리 중합체 지지체 (Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 7448-7451) 등을 사용하여 제조할 수 있다.

적절한 올리고뉴클레오타이드의 선택은 당업계의 숙련인이 쉽게 수행할 수 있다. 특정 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열이 주어지면, 당업계의 숙련인은 상기 서열에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 설계하고, 특정 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA에 결합하고 그의 분해를 매개하는지 확인하기 위해 이들 올리고뉴클레오타이드를 시험관내 또는 생체내 시스템에서 시험할 수 있다. 특정 mRNA에 특이적으로 결합하고 그의 분해를 매개하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 설계하기 위해, 올리고뉴클레오타이드에 의해 인지되는 서열이 그 특정 mRNA에 대해 유일하거나 실질적으로 유일한 것이 중요하다. 예를 들어, mRNA 전체에 종종 반복되는 서열은 특정 메시지를 특이적으로 인지하고 분해하는 올리고뉴클레오타이드의 설계를 위한 이상적인 선택이 될 수 없다. 당업계의 숙련인은 올리고뉴클레오타이드를 설계하고, 상기 올리고뉴클레오타이드의 서열을 서열이 특정 폴리펩티드에 특이적이거나 실질적으로 특이적인 것을 확인하기 위해 공개적으로 이용가능한 데이터베이스에 기탁된 핵산 서열에 비교할 수 있다.

다른 예에서, 하나 초과 메시지에 결합하고 그의 분해를 매개하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 설계하는 것이 바람직할 수 있다. 한 예에서, 메시지는 관련된 폴리펩티드, 예를 들어 이소형 또는 기능적으로 중복되는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 그러한 경우, 당업계의 숙련인은 이들 관련된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 정렬시키고, 두 메시지를 인지하는 올리고뉴클레오타이드를 설계할 수 있다.

안티센스 DNA 또는 RNA를 세포에 전달하기 위한 많은 방법이 개발되고 있고; 예를 들어 안티센스 분자는 조직 부위 내로 직접 주사될 수 있거나, 또는 목적하는 세포를 표적화하도록 설계된 변형된 안티센스 분자 (예를 들어, 표적 세포 표면 상에 발현된 항원 또는 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩티드에 연결된 안티센스)는 전신 투여될 수 있다.

그러나, 특정 경우에 내인성 tim-1, tim-2 또는 tim-4 mRNA의 번역을 억제하기에 충분한 안티센스의 세포내 농도를 달성하기 어려울 수 있다. 따라서, 또다른 방법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 강한 pol III 또는 pol II 프로모터의 제어 하에 놓이는 재조합 DNA 구성체를 이용한다. 예를 들어, 벡터가 세포에 의해 흡입되어 안티센스 RNA의 전사를 지시하도록 생체 내에 도입될 수 있다. 상기 벡터는 목적하는 안티센스 RNA를 생산하도록 전사될 수 있는 한, 에피솜으로 유지되거나 염색체에 통합될 수 있다. 상기 벡터는 당업계의 표준인 재조합 DNA 기술 방법에 의해 구성할 수 있다. 벡터는 플라스미드, 바이러스, 또는 포유동물 세포에서 복제 및 발현을 위해 사용되는 당업계에 공지된 다른 것일 수 있다. 안티센스 RNA를 코딩하는 서열의 발현은 포유동물 세포, 바람직하게는 인간 세포에서 작용하도록 당업계에 공지된 임의의 프로모터에 의해 이루어질 수 있다. 상기 프로모터는 유도성이거나 구성적일 수 있다. 상기 프로모터는 SV40 초기 프로모터 영역 (Berneist and Chambon, 1981, Nature 290: 304-310), 라우스 (Rous) 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복부에 함유된 프로모터 (Yamamoto et al., 1980, Cell 22: 787-797), 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터 (Wagner et al., 1981, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA. 78: 1441-1445), 메탈로티오네인 유전자의 조절 서열 (Brinster et al, 1982, Nature 296: 39-42) 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 조직 부위 내로 직접 도입될 수 있는 재조합 DNA 구성체를 제조하기 위해 임의의 종류의 플라스미드, 코스미드, YAC 또는 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 별법으로, 목적하는 조직을 선택적으로 감염시키는 바이러스 벡터가 사용될 수 있고, 이 경우 투여는 다른 경로로 달성될 수 있다 (예를 들어 전신).

RNAi 구성체는 표적 유전자의 발현을 특이적으로 차단할 수 있는 이중가닥 RNA를 포함한다. "RNA 간섭" 또는 "RNAi"는 이중가닥 RNA (dsRNA)가 특이적 및 전사후 방식으로 유전자 발현을 차단하는 식물 및 기생충에서 관찰된 현상에 대해 초기에 적용된 용어이다. 이론에 매이지는 않지만, RNAi는 mRNA 분해를 포함하는 것으로 보이지만, 생화학 메커니즘은 현재 활발하게 연구중이다. 작용 메커니즘에 관한 일부 수수께끼에도 불구하고, RNAi는 시험관내 또는 생체내 유전자 발현을 억제하는 유용한 방법을 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "dsRNA"는 siRNA 분자, 또는 이중가닥 특징을 포함하고 세포 내에서 siRNA, 예를 들어 헤어핀 RNA 잔기로 프로세싱될 수 있는 다른 RNA 분자를 나타낸다. 대상 RNAi 방법에 의해 억제된 유전자를 나타낼 때 용어 "기능 손실 (loss-of-function)"은 RNAi 구성체의 부재 하의 수준에 비교할 때 유전자 발현 수준의 감소를 나타낸다.

본원에서 사용되는 어구 "RNAi를 매개하는"은 RNAi 과정에 의해 분해되어야 하는 RNA를 구분하는 능력을 의미하고 (나타내고), 예를 들어 분해는 서열-독립적 dsRNA 반응, 예를 들어 PKR 반응에 의하기보다는 서열 특이적 방식으로 일어난다.

본원에서 사용되는 용어 "RNAi 구성체"는 작은 간섭 RNA (siRNA), 헤어핀 RNA, 및 생체 내에서 절단되어 siRNA를 형성할 수 있는 다른 RNA종을 포함하도록 명세서 전체에 사용되는 일반 용어이다. 본원에서 RNAi 구성체는 또한 세포에서 dsRNA 또는 헤어핀 RNA를 형성하는 전사체, 및(또는) 생체 내에서 siRNA를 생산할 수 있는 전사체를 생성시킬 수 있는 발현 벡터 (또한 RNAi 발현 벡터로도 불림)를 포함한다.

"RNAi 발현 벡터" (본원에서 또한 "dsRNA-코딩 플라스미드"로도 불림)는 구성체가 발현되는 세포 내에서 siRNA 잔기를 생산하는 RNA를 발현시키기 (전사시키기) 위해 사용된 복제가능 핵산 구성체를 의미한다. 상기 벡터는 (2) 전사되어 이중가닥 RNA (세포 내에서 어닐링되어 siRNA를 형성하는 2개의 RNA 잔기, 또는 siRNA로 프로세싱될 수 있는 단일 헤어핀 RNA)를 생산하는 "코딩" 서열에 작동가능하게 연결된, (1) 유전자 발현에서 조절기 역할을 하는 유전 성분(들), 예를 들어, 프로모터, 오퍼레이터, 또는 인핸서 (enhancer), 및 (3) 적절한 전사 개시 및 종결 서열의 조립체를 포함하는 전사 단위를 포함한다. 프로모터 및 다른 조절기 성분의 선택은 일반적으로 의도된 숙주 세포에 따라 변한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종 그들의 벡터 형태로 염색체에 결합되지 않는 원형 이중가닥 DNA 루프를 나타내는 "플라스미드" 형태로 존재한다. 플라스미드가 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태이므로 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용된다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 하고 이후에 당업계에 공지되는 다른 형태의 발현 벡터를 포함하도록 의도된다.

RNAi 구성체는 유전자가 억제되도록 (즉, "표적" 유전자) 세포의 생리학적 조건 하에 mRNA 전사체의 적어도 일부의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화하는 뉴클레오타이드 서열을 함유한다. 이중가닥 RNA는 RNAi를 매개하는 능력을 갖도록 단지 천연 RNA와 충분히 유사해야 한다. 따라서, 본 발명은 유전적 돌연변이, 군주 다형 또는 진화 분기성으로 인해 예상될 수 있는 서열 변동을 견딜 수 있는 잇점이 있다. 표적 서열과 RNAi 구성체 서열 사이의 관용되는 뉴클레오타이드 미스매치 (mismatch)의 수는 5 염기쌍 중 1, 또는 10 염기쌍 중 1, 또는 20 염기쌍 중 1, 또는 50 염기쌍 중 1 이하이다. siRNA 듀플렉스의 중심에서 미스매치가 가장 중요하고, 표적 RNA의 절단을 본질적으로 없앨 수 있다. 반대로, 표적 RNA에 상보성인 siRNA 스트랜드의 3' 말단에서 뉴클레오타이드는 표적 인지의 특이성에 유의하게 기여하지 않는다.

서열 동일성은 당업계에 공지된 서열 비교 및 정렬 알고리즘 (Gribskov and Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991과 여기에 인용된 참고문헌 참조)에 의해, 및 뉴클레오타이드 서열 사이의 차이%는 예를 들어, 디폴트 (default) 파라미터를 사용하는 BESTFIT 소프트웨어 프로그램에서 실행된 것과 같은 Smith-Waterman 알고리즘 (예를 들어 University of Wisconsin Genetic Computing Group)에 의해 계산함으로써 최적화할 수 있다. 억제 RNA와 표적 유전자의 일부 사이에 90% 초과와 서열 동일성 또는 심지어 100%의 서열 동일성이 바람직하다. 별법으로, RNA의 듀플렉스 영역은 표적 유전자 전사체의 일부와 혼성화할 수 있는 뉴클레오타이드 서열로서 기능적으로 규정될 수 있다 (예를 들어, 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 12-16시간 동안 50°C 또는 70°C 혼성화; 이어서 세척).

RNAi 구성체의 생산은 화학적 합성 방법에 의해 또는 재조합 핵산 기술에 의해 수행할 수 있다. 처리된 세포의 내인성 RNA 폴리머라제가 생체 내에서 전사를 매개할 수 있거나, 클로닝된 RNA 폴리머라제가 시험관 내에서 전사를 위해 사용될 수 있다. RNAi 구성체는 예를 들어 세포성 뉴클레아제에 대한 감수성을 감소시키고(시키거나), 생체이용성을 개선하고(하거나), 제형화 특징을 개선하고(하거나) 다른 약물운동학적 특성을 변화시키기 위해 포스페이트-당 주쇄 또는 뉴클레

오시드의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 천연 RNA의 포스포디에스테르 연결기는 질소 또는 황 헤테로원자 중 적어도 하나를 포함하도록 변형될 수 있다. RNA 구조에서 변형은 dsRNA에 대한 전반적인 반응을 피하면서 특이적 유전적 억제 를 허용하도록 맞추어질 수 있다. 마찬가지로, 염기는 아데노신 데아미나제의 활성을 차단하도록 변형될 수 있다. RNAi 구성체는 효소적으로 또는 부분/완전 유기 합성에 의해 생산될 수 있고, 임의의 변형된 리보뉴클레오타이드는 시험관내 효소적 또는 유기 합성에 의해 도입될 수 있다.

RNA 분자를 화학적으로 변형하는 방법은 RNAi 구성체를 변형하도록 채택될 수 있다 (예를 들어, Heidenreich et al. (1997) *Nucleic Acids Res*, 25: 776-780; Wilson et al. (1994) *J Mol Recog* 7: 89-98; Chen et al. (1995) *Nucleic Acids Res* 23:2661-2668; Hirschbein et al. (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7:55-61 참조). 단지 예시하기 위해, RNAi 구성체의 주쇄는 포스포로티오에이트, 포스포르아미테이트, 포스포디티오에이트, 키메릭 메틸포스포네이트-포스포디에스테르, 펩티드 핵산, 5-프로피닐-피리미딘 함유 올리고머 또는 당 변형체 (예를 들어 2'-치환 리보뉴클레오시드, α-배열)로 변형될 수 있다.

이중가닥 구조는 단일 자가-상보성 RNA 스트랜드 또는 2개의 상보성 RNA 스트랜드에 의해 형성될 수 있다. RNA 듀플렉스 형성은 세포 내부 또는 외부에서 개시될 수 있다. RNA는 세포당 적어도 1 카피의 전달을 허용하는 양으로 도입될 수 있다. 보다 고용량 (예를 들어 세포당 적어도 5, 10, 100, 500 또는 1000 카피)의 이중가닥 물질은 보다 효과적인 억제를 일으킬 수 있는 한편, 보다 저용량도 특이적 용도에 유용할 수 있다. 억제는 RNA의 듀플렉스 영역에 대응하는 뉴클레오타이드 서열이 유전적 억제를 위해 표적화되는 점에서 서열 특이적이다.

특정 실시태양에서, 대상 RNAi 구성체는 "작은 간섭 RNA" 또는 "siRNA"이다. 이들 핵산은 길이가 약 19-30 뉴클레오타이드이고, 훨씬 더 바람직하게는 길이가 21-23 뉴클레오타이드, 예를 들어 길이가 보다 긴 이중가닥 RNA의 뉴클레아제 "다이스 (dicing)"에 의해 생성된 단편에 상응한다. siRNA는 뉴클레아제 복합체를 모집하고, 특이적 서열에 짝지음으로써 복합체를 표적 mRNA에 안내하는 것으로 이해된다. 그 결과, 표적 mRNA는 폴리펩티드 복합체에서 뉴클레아제에 의해 분해된다. 특정 실시태양에서, 21-23 뉴클레오타이드 siRNA 분자는 3' 히드록실기를 포함한다.

본 발명의 siRNA 분자는 당업계의 숙련인에게 공지된 많은 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 예를 들어, siRNA는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성되거나 재조합적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 짧은 센스 및 안티센스 RNA 올리고머는 합성되고 어닐링되어 2-뉴클레오타이드가 각 단부에 걸쳐져 있는 이중가닥 RNA 구조를 형성할 수 있다 (Caplen, et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 9742-9747; Elbashir, et al. (2001) *EMBO J*, 20: 6877-88). 이어서 이들 이중가닥 siRNA 구조는 수동 흡수 (passive uptake) 또는 예를 들어 아래 설명되는 선택된 전달체에 의해 세포에 직접 도입될 수 있다.

특정 실시태양에서, siRNA 구성체는 예를 들어 효소 다이스 (dicer)의 존재 하에 보다 긴 이중가닥 RNA의 프로세싱에 의해 생성될 수 있다. 한 실시태양에서, 초파리 (*Drosophila*) 시험관내 시스템이 사용된다. 이 실시태양에서, dsRNA는 초파리 배아로부터 유래된 가용성 추출물과 혼합되어 조합물을 생성한다. 조합물을 dsRNA가 약 21 내지 약 23 뉴클레오타이드의 RNA 분자로 프로세싱되는 조건 하에 유지시킨다.

siRNA 분자는 당업계의 숙련인에게 공지된 많은 기술을 사용하여 정제할 수 있다. 예를 들어, 겔 전기영동을 사용하여 siRNA를 정제할 수 있다. 별법으로, 비변성 방법, 예를 들어 비변성 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 siRNA를 정제할 수 있다. 또한, 크로마토그래피 (예를 들어 크기 배제 크로마토그래피), 글리세롤 구배 원심분리, 항체를 사용하는 친화도 정제를 사용하여 siRNA를 정제할 수 있다.

특정 바람직한 실시태양에서, siRNA 분자의 적어도 하나의 스트랜드는 약 1 내지 약 6 뉴클레오타이드 길이의 3' 오버행 (overhang)을 갖지만, 2 내지 4 뉴클레오타이드 길이일 수도 있다. 보다 바람직하게는, 3' 오버행은 1-3 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시태양에서, 하나의 스트랜드는 3' 오버행을 갖고, 다른 스트랜드는 블런트 엔딩 (blunt-ending)되거나 또한 오버행을 갖는다. 오버행의 길이는 각 스트랜드에 대해 동일하거나 상이할 수 있다. siRNA의 안정성을 더욱 향상시키기 위해, 3' 오버행은 분해에 대해 안정화될 수 있다. 한 실시태양에서, RNA는 퓨린 뉴클레오타이드, 예를 들어 아데노신 또는 구아노신 뉴클레오타이드를 포함함으로써 안정화된다. 별법으로, 변형된 유사체에 의한 피리미딘 뉴클레오타이드의 치환, 예를 들어 2'-데옥시티미딘에 의한 우라딘 뉴클레오타이드 3' 오버행의 치환이 관용되고 RNAi의 효능에 영향을 미치지 않는다. 2' 히드록실의 부재는 조직 배양 배지 내에서 오버행의 뉴클레아제 내성을 유의하게 향상시키고, 생체 내에서 유지할 수 있다.

다른 실시태양에서, RNAi 구성체는 긴 이중가닥 RNA 형태이다. 특정 실시태양에서, RNAi 구성체는 적어도 25, 50, 100, 200, 300 또는 400 염기이다. 특정 실시태양에서, RNAi 구성체는 400-800 염기 길이이다. 이중가닥 RNA는 세포내 소화

되어, 예를 들어 세포 내에서 siRNA 서열을 생산한다. 그러나, 아마도 서열-독립적 dsRNA 반응에 의해 유발될 수 있는 유해한 효과 때문에 생체 내에서 긴 이중가닥 RNA를 사용하는 것은 항상 실용적이지는 않다. 상기 실시태양에서, 인터페론 또는 PKR의 영향을 감소시키는 작용제 및(또는) 국소 전달계를 사용하는 것이 바람직하다.

특정 실시태양에서, RNAi 구성체는 헤어핀 구조 형태로 존재한다 (헤어핀 RNA로 부름). 헤어핀 RNA는 외인성으로 합성될 수 있거나, 생체 내에서 RNA 폴리머라제 III 프로모터로부터 전사시킴으로써 형성될 수 있다. 유전자가 포유동물 세포에서 침묵하도록 하기 위해 상기 헤어핀 RNA를 제조하고 사용하는 예는 예를 들어 문헌 (Paddison et al., *Genes Dev*, 2002, 16: 948-58; McCaffrey et al., *Nature*, 2002, 418: 38-9; McManus et al., *RNA*, 2002, 8: 842-50; Yu et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99:6047-52)에 기재되어 있다. 바람직하게는, 상기 헤어핀 RNA는 목적하는 유전자의 연속적이고 안정한 억제제를 보장하도록 세포 내 또는 동물 내에서 유전공학처리된다. siRNA는 세포 내에서 헤어핀 RNA를 프로세싱하여 생산될 수 있음이 당업계에 공지되어 있다.

또다른 실시태양에서, 플라스미드가 이중가닥 RNA를 예를 들어 전사 산물로서 전달하기 위해 사용된다. 상기 실시태양에서, 플라스미드는 RNAi 구성체의 센스 및 안티센스 스트랜드 각각에 대한 "코딩 서열"을 포함하도록 설계된다. 코딩 서열은 예를 들어 역 (inverted) 프로모터에 의해 접하는 동일한 서열일 수 있거나, 각각 별개의 프로모터의 전사 제어 하의 2개의 별개의 서열일 수 있다. 코딩 서열이 전사된 후, 상보성 RNA 전사체는 염기쌍을 형성하여 이중 가닥 RNA를 형성한다.

PCT 출원 WO01/77350에서는 진핵 세포에서 동일한 형질전환유전자 (transgene)의 센스 및 안티센스 RNA 전사체를 수득하기 위해 형질전환유전자의 2방향 전사를 위한 예시적인 벡터를 기재하고 있다. 따라서, 특정 실시태양에서, 본 발명은 다음 독특한 특징을 갖는 재조합 벡터를 제공한다: 이는 반대 배향으로 배열된 2개의 겹치는 전사 단위를 갖고 관심있는 RNAi 구성체를 위한 형질전환유전자에 접하는 바이러스 레플리콘 (replicon)을 포함하고, 여기서 2개의 겹치는 전사 단위는 숙주 세포에서 동일한 형질전환유전자 단편으로부터 센스 및 안티센스 RNA 전사체를 생성시킨다.

RNAi 구성체는 표적 핵산 서열에 동일하거나 실질적으로 동일한 이중가닥 RNA의 긴 스트레치, 또는 표적 핵산 서열의 한 영역에만 동일 내지 실질적으로 동일한 이중가닥 RNA의 짧은 스트레치를 포함할 수 있다. 긴 또는 짧은 RNAi 구성체를 제조하고 전달하는 예시적인 방법은 예를 들어 WO01/68836 및 WO01/75164에서 찾을 수 있다.

또다른 실시태양에서, tim-1, tim-2 또는 tim-4 길항제는 tim-1, tim-2 또는 tim-4의 발현 수준을 감소시키는 리보자임 분자이다. mRNA 전사체를 촉매적으로 절단하도록 설계된 리보자임 분자는 tim-1, tim-2 또는 tim-4 mRNA의 번역을 방지하기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어 1990년 10월 4일자 공개된 PCT 공개 WO90/11364; Sarver et al., 1990, *Science* 247: 1222-1225 및 미국 특허 5,093,246 참조). 부위-특이적 인지 서열에서 mRNA를 절단하는 리보자임이 특정 mRNA를 파괴하기 위해 사용될 수 있지만, 해머헤드 (hammerhead) 리보자임의 사용이 바람직하다. 해머헤드 리보자임은 표적 mRNA와 상보성 염기쌍을 형성하는 플랭킹 영역에 의해 지시된 위치에서 mRNA를 절단한다. 유일한 요건은 표적 mRNA가 다음 2개의 염기 서열을 갖는 것이다: 5'-UG-3'. 해머헤드 리보자임의 구성 및 생산은 당업계에 공지되고 문헌 [Haseloff and Gerlach, 1988, *Nature*, 334: 585-591]에 보다 상세히 기재되어 있다.

본원에 기재된 방법에서 사용할 수 있는 리보자임은 또한 RNA 엔도리보뉴클레아제 (이후 "체크형 (Cech-type) 리보자임"), 예를 들어 테트라히메나 썬모필라 (*Tetrahymena thermophila*)에서 자연 발생되고 (IVS, 또는 L-19 IVS RNA로서 공지됨), 토마스 체크 (Thomas Cech)와 공동연구자에 의해 광범하게 설명된 것을 포함한다 (Zaug, et al., 1984, *Science*, 224: 574-578; Zaug and Cech, 1986, *Science*, 231: 470-475; Zaug, et al., 1986, *Nature*, 324: 429-433; 국제 특허 출원 공개 W088/04300 (University Patents Inc.); Been and Cech, 1986, *Cell*, 47: 207-216). 체크형 리보자임은 이후 표적 RNA의 절단이 일어나는 표적 RNA 서열에 혼성화하는 8개 염기쌍 활성 부위를 갖는다. 본 발명은 8개 염기쌍 활성 부위 서열을 표적화하는 체크형 리보자임을 포함한다.

안티센스 방법에서와 같이, 리보자임은 변형된 올리고뉴클레오타이드로 구성될 수 있고 (예를 들어 개선된 안정성, 표적화 등을 위해), 시험관내 또는 생체 내에서 세포에 전달될 수 있다. 바람직한 전달 방법은 형질감염된 세포가 표적화된 메시지를 파괴하고 번역을 억제하기 위해 충분한 양의 리보자임을 생산하도록 강한 구성적 pol III 또는 pol II 프로모터의 제어 하에 리보자임을 "코딩하는" DNA 구성체를 사용하는 것을 포함한다. 안티센스 분자와 달리 리보자임은 촉매적이기 때문에, 효율을 위해 보다 낮은 세포내 농도가 요구된다.

본원에 기재된 방법의 또다른 실시태양에서, tim-1, tim-2 또는 tim-4 길항제는 항-Tim-1, 항-Tim-2 또는 항-Tim-4 항체를 포함한다. tim-1, tim-2 또는 tim-4 세포의 도메인에 결합하는 항체, 예를 들어 모노클로날 항체는 당업계의 숙련인에 의해 생성될 수 있고, 이들 항체를 본 발명에 의해 제공되는 방법을 이용하여 tim-4에 대한 tim-1의 결합을 차단하는

그들의 능력에 대해 추가로 시험할 수 있다. 바람직한 길항제 항체는 자체가 tim-1 활성화 또는 tim-4 활성화의 활성화제로서 작용하지 않으면서 tim-1 또는 tim-4 사이의 결합 상호작용을 차단할 것이다. 예를 들어 실험 절차에 기재된 분석을 이용하여, 당업계의 숙련인은 후보 항체가 tim-1의 활성화제이고 따라서 Th1 반응의 유도제겸 Th2 반응의 억제제인지 결정할 수 있다. 상기 시험은 항체를 면역화된 마우스에 투여하고, 마우스의 비장에 대해 단리된 T세포에 의한 시험관내 증식 및 시토킨 생산에 대해 시험함으로써 수행할 수 있다. Th2 반응을 증가시키기 위한 (또는 Th1 반응을 감소시키기 위한) 바람직한 항체는 tim-4 리간드에 대한 tim-1의 결합을 차단하고 tim-1의 활성화를 유도하지 않을 것이다. tim-1의 활성화는 예를 들어 tim-1의 세포내 티로신 인산화를 모니터링함으로써 모니터링될 수 있다.

본원에서 사용되는 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 (Ig) 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 항원에 특이적으로 결합하는 (항원과 면역반응하는) 항원 결합 부위를 포함하는 분자를 의미한다. 상기 항체는 예를 들어 폴리클로날, 모노클로날, 키메릭, 단일가닥, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편, 및 Fab 발현 라이브러리를 포함한다. 일반적으로, 인간으로부터 얻은 항체 분자는 분자에 존재하는 중쇄의 특성에 의해 서로 상이한 클래스 IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD 중 어느 하나에 관련된다. 특정 클래스는 또한 예를 들어 IgG₁, IgG₂ 및 기타 클래스와 같은 서브클래스를 갖는다. 또한, 인간에서, 경쇄는 카파 사슬 또는 람다 사슬일 수 있다. 항체에 대한 언급은 인간 항체종의 상기 모든 클래스, 서브클래스 및 종류에 대한 언급을 포함한다. 또한, Tim-1 또는 Tim-4 폴리펩티드에 대한 항체는 Tim-1 또는 Tim-4 폴리펩티드 또는 Tim-1 또는 Tim-4 폴리펩티드의 단편을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함한다.

Tim-1, Tim-2 또는 Tim-4 폴리펩티드는 항원, 또는 그의 일부 또는 단편으로서 사용될 수 있고, 추가로 폴리클로날 및 모노클로날 항체 제조를 위한 표준 기술을 사용하여 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체를 생성시키는 면역원으로서 사용될 수 있다. 면역원으로서 사용하기 위한 항원의 항원성 펩티드 단편은 예를 들어 아미노 말단 구역의 아미노산 서열, 예를 들어 서열 1-4에 제시된 아미노산 서열의 적어도 7개의 아미노산 잔기를 포함하고, 펩티드에 대항하여 생성된 항체가 전체 길이의 폴리펩티드와 또는 에피토프를 포함하는 임의의 단편과 특이적 면역 복합체를 형성하도록 그의 에피토프를 포함한다. 바람직하게는, 항원성 펩티드는 적어도 10개의 아미노산 잔기, 또는 적어도 15개의 아미노산 잔기, 또는 적어도 20개의 아미노산 잔기 또는 적어도 30개의 아미노산 잔기를 포함한다. 항원성 펩티드에 포함되는 바람직한 에피토프는 그 표면 상에 위치하는 폴리펩티드의 구역이고, 이들은 통상 친수성 구역이다. 바람직한 실시태양에서, 항원성 펩티드는 Tim-1, Tim-2 또는 Tim-4의 IgV 및/또는 뮤신 도메인의 분절 또는 전체를 포함한다.

몇몇 실시태양에서, 항원성 펩티드에 포함되는 적어도 하나의 에피토프는 폴리펩티드의 표면 상에 위치하는 Tim-1, Tim-2 또는 Tim-4 폴리펩티드의 영역, 예를 들어 친수성 영역이다. Tim-1 또는 Tim-4 폴리펩티드의 소수성 분석은 Tim-1 또는 Tim-4 폴리펩티드의 영역이 특히 친수성이고, 따라서, 항체 생산을 표적화하기 위해 유용한 표면 잔기를 코딩하기 쉽다는 것을 나타낼 것이다. 항체 생산을 표적화하기 위한 수단으로서, 친수성 및 소수성의 영역을 보여주는 수치법 (hydropathy) 플롯을 당업계에 잘 공지된 임의의 방법, 예를 들어 푸리에 (Fourier) 변환을 갖거나 갖지 않는 카이트 두리틀 (Kyte Doolittle) 또는 호프 우즈 (Hopp Woods) 방법에 의해 생성할 수 있다 (예를 들어 Hopp and Woods (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828; Kyte and Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-142 참조). 항원성 폴리펩티드 내의 하나 이상의 도메인에 특이적인 항체, 또는 그의 유도체, 단편, 유사체 또는 상동체가 또한 본원에서 제공된다. 몇몇 실시태양에서, Tim-1 또는 Tim-4의 유도체, 단편, 유사체, 상동체 또는 오르토로그 (ortholog)는 이들 폴리펩티드 성분에 면역특이적으로 결합하는 항체의 생성에서 면역원으로서 사용될 수 있다.

당업계에 공지된 다양한 절차를 본 발명의 폴리펩티드에 대해, 또는 그의 유도체, 단편, 유사체, 상동체 또는 오르토로그에 대해 작용하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체의 생산을 위해 사용할 수 있다 (예를 들어, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Harlow and Lane (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y 참조). 이들 항체의 일부를 아래 논의한다.

본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체" (MAb) 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 독특한 경쇄 유전자 생성물 및 독특한 중쇄 유전자 생성물로 이루어진 단 한가지 종류의 항체 분자만을 함유하는 항체 분자의 집단을 나타낸다. 특히, 모노클로날 항체의 상보성 결정 영역 (CDR)은 집단의 모든 분자에서 동일하다. 따라서, MAb는 독특한 결합 친화도를 특징으로 하는 항원의 특정 에피토프와 면역반응할 수 있는 항원 결합 부위를 함유한다.

모노클로날 항체는 하이브리도마 (hybridoma) 방법, 예를 들어 문헌 [Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스, 햄스터, 또는 다른 적절한 숙주 동물은 일반적으로 면역화제에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도하도록 면역화제를 사용하여 면역화된다. 별법으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드 항원에 대항하여 작용하는 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체를 추가로 포함할 수 있다. 이들 항체는 투여된 면역글로불린에 대항하여 인간에 의한 면역 반응을 야기하지 않으면서 인간에게 투여하기에 적합하다. 항체의 인간화 형태는 주로 인간 면역글로불린의 서열로 이루어지고, 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소의 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 그의 단편이다 (예를 들어 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원 결합 부분서열). 인간화는 윈터 (Winter) 및 동료 (Jones et al. (1986) Nature, 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) Nature, 332: 323-327; Verhoeyen et al (1988) Science, 239: 1534-1536)의 방법에 따라 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 치환함으로써 수행할 수 있다 (또한 미국 특허 5,445,539 참조).

tim-1, tim-2 또는 tim-4에 대한 특이형 (idiotype)을 함유하는 항체 단편은 (i) 항체 분자의 펩신 소화에 의해 생산된 F(ab')₂ 단편; (ii) F(ab')₂ 단편의 디설피드 브릿지를 환원시켜 생성된 Fab 단편; (iii) 항체 분자를 과산화 및 환원제로 처리하여 생성된 Fab 단편; 및 (iv) Fv 단편을 포함하지만 이로 제한되지 않는 당업계에 공지된 기술에 의해 생산할 수 있다.

본원에 기재된 방법의 몇몇 실시태양에서, tim-1, tim-2 또는 tim-4 길항제는 모노클로날 항체, 바람직하게는 적어도 2개의 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 갖는 인간 또는 인간화 항체를 포함한다. 이 경우, 결합 특이성 중 하나는 tim-1, tim-2 또는 tim-4에 대한 것이다. 제2 결합 표적은 임의의 다른 항원이고, 유리하게는 세포 표면 폴리펩티드 또는 수용체 또는 수용체 서브유닛이다.

본원에 기재된 방법의 몇몇 실시태양에서, tim-1, tim-2 또는 tim-4 길항제는 tim-1, tim-2 또는 tim-4 폴리펩티드, 그의 유사체, 변이체 또는 단편을 포함한다. 한 실시태양에서, 길항제는 tim-1 IgV 도메인, tim-2 IgV 도메인, tim-4 IgV 도메인, tim-1 뮤신 도메인, tim-2 뮤신 도메인, tim-4 뮤신 도메인 또는 이들의 조합물을 포함한다. 다른 실시태양에서, 길항제는 tim-1 IgV 도메인, tim-4 IgV 도메인, tim-2 IgV 도메인, tim-1 뮤신 도메인, tim-2 뮤신 도메인 또는 tim-4 뮤신 도메인 서열에 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 이론에 매이지는 않지만, 상기 길항제는 tim 폴리펩티드에 결합할 수 없도록 tim 리간드 중 하나를 적정함으로써 작용할 수 있다. 상기 적정은 예를 들어, 결합 부위의 입체적 폐쇄에 의해 일어날 수 있다.

본 발명에서 사용하기 위한 키메라 또는 융합 폴리펩티드는 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생산할 수 있다. 예를 들어 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 DNA 단편은 통상적인 기술에 따라, 예를 들어 라이게이션을 위해 블런트 엔딩된 또는 스태거 엔딩된 (stagger-ended) 말단, 적절한 말단을 제공하기 위해 제한 효소 소화, 적절한 경우 코헤시브 (cohesive) 말단의 충전, 바람직하지 않은 연결을 피하기 위해 알칼리성 포스포타타제 처리, 및 효소적 라이게이션을 사용함으로써 인-프레임 (in-frame)으로 함께 라이게이션된다. 또다른 실시태양에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성기를 포함하는 통상적인 기술로 합성할 수 있다. 별법으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 후속적으로 어닐링되고 재증폭되어 키메라 유전자 서열을 생성할 수 있는 2개의 연속적인 유전자 단편 사이에 상보성-오버행을 야기하는 앵커 (anchor) 프라이머를 사용하여 수행할 수 있다 (예를 들어 Ausubel et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992 참조). 더욱이, 융합 잔기를 코딩하는 많은 발현 벡터는 상업적으로 입수가능하다 (예를 들어, 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역). Tim-1, Tim-2 또는 Tim-4 코딩 핵산은 융합 잔기가 면역글로불린 폴리펩티드에 인-프레임으로 연결되도록 상기 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다.

몇몇 실시태양에서, 길항제는 돌연변이되지 않은 서열에 비해 돌연변이된 형태와 그의 결합 대상 사이에 보다 큰 친화도 결합을 생성시키는 천연 Tim-1, Tim-2 또는 Tim-4 서열에서 돌연변이를 갖는 Tim-1, Tim-2 또는 Tim-4 변이체 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, Tim 폴리펩티드 또는 Tim 폴리펩티드 잔기는 (돌연변이되지 않은 서열에 비해) 단백질 분해에 대해 보다 내성인 Tim 서열을 생성시키는 천연 Tim 서열 (야생형)에서 돌연변이를 갖는 변이체 Tim 폴리펩티드로서 제공된다.

제2 폴리펩티드, 즉, Tim-1, Tim-2 또는 Tim-4 서열이 융합되는 폴리펩티드는 바람직하게는 가용성이다. 몇몇 실시태양에서, 제2 폴리펩티드는 연결된 폴리펩티드의 반감기 (예를 들어 혈청 반감기)를 향상시킨다. 몇몇 실시태양에서, 제2 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드의 제2 Tim-1 폴리펩티드와의 회합을 용이하게 하는 서열을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 제2 폴리펩티드는 면역글로불린 폴리펩티드의 적어도 한 영역을 포함한다. 면역글로불린 융합 폴리펩티드는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; 및 5,455,165에 기재되어 있다. 몇몇 실시태양에서, 제2 폴리펩티드는 전체 길이 면역글로불린 폴리펩티드를 포함한다. 별법으로, 제2 폴리펩티드는 전체 길이 미만의 면역글로불린 폴리펩티드, 예를 들어 중쇄, 경쇄, Fab, Fab₂, Fv 또는 Fc를 포함한다. 바람직하게는, 제2 폴리펩티드는 면역글로불린 폴리펩티드의 중쇄를 포함한다. 보다 바람직하게는, 제2 폴리펩티드는 면역글로불린

폴리펩티드의 Fc 영역을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 제2 폴리펩티드의 효과제 기능은 야생형 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 효과제 기능보다 더 작다. Fc 효과제 기능은 예를 들어, Fc 수용체 결합, 보체 고정 및 T세포 고갈 활성을 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 6,136,310 참조). T세포 고갈 활성, Fc 효과제 기능, 및 항체 안정성을 분석하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 한 실시태양에서, 제2 폴리펩티드는 Fc 수용체에 대한 친화도가 낮거나 없다. 다른 실시태양에서, 제2 폴리펩티드는 보체 폴리펩티드 C1q에 대한 친화도가 낮거나 없다.

한 바람직한 실시태양에서, 본원에 기재된 방법에서 사용된 길항제는 tim-4에 대한 tim-1의 결합, 세마포린4A에 대한 tim-2의 결합을 차단하거나, tim-4 결합시 tim-1 활성화를 방지하는, 분자량이 약 2,000 달톤 미만인 작은 유기 분자, 예를 들어 펩티드 또는 올리고뉴클레오타이드 이외의 것이다. 상기 작용제는 예를 들어 본 발명에 의해 제공되는 방법을 사용하여 확인할 수 있다. 또다른 실시태양에서, 작용제는 tim-4에 결합하는 tim-1의 부분을 구조적으로 모방하거나, 또는 그 반대인 펩티드 또는 펩티드 유도체이다. 본원에 기재된 방법 중 몇몇은 tim-1, tim-4 또는 둘 모두의 발현 또는 활성을 증가시키거나, tim-4에 대한 tim-1의 결합을 감소시키는 작용제, 즉 tim-1 또는 tim-4 길항제를 사용한다.

몇몇 실시태양에서, 본원에 기재된 방법에서 tim-1 또는 tim-4 활성을 증가시키는 작용제는 항체이다. tim-1에 결합하고 tim-4의 결합을 모방하여, 세포내 신호전달 및 Th2 반응의 억제를 일으키는 항체를 생성할 수 있다. tim-1 및 tim-4에 대한 항체는 선행 섹션에 기재된 바와 같이 생성할 수 있다. 예를 들어, tim-1의 세포외 도메인에 결합하는 항체가 생성될 수 있고, 상기 항체는 항체가 tim-1의 활성화를 촉진하는지 또는 억제하는지 결정하기 위해 시험될 수 있다.

한 특정한 실시태양에서, 효능제는 tim-1/tim-4 복합체에 결합하는 항체를 포함한다. 이론에 매이기를 의도하지 않지만, tim-1/tim-4 복합체에 결합하는 항체는 복합체 형성을 안정화시키거나 촉진하여, tim-1 및(또는) tim-4 신호전달을 증가시킬 수 있다. tim-1/tim-4 복합체에 결합하는 항체는 tim-1/tim-4 폴리펩티드 복합체, 예를 들어 그들의 세포외 도메인들 사이의 복합체를 갖는 동물을 면역화시켜 생성할 수 있다. 별법으로, 항체는 tim-1/tim-4 복합체에 결합하는 항체를 선택함으로써 랜덤화된 항체 라이브러리로부터 시험관내 선별 기술에 의해 생성할 수 있다.

본원에 기재된 방법의 몇몇 실시태양에서, tim-1, tim-2 또는 tim-4 효능제는 tim-1, tim-2 또는 tim-4 폴리펩티드, 그의 유사체, 변이체, 또는 단편을 포함한다. 한 실시태양에서, 효능제는 tim-1 IgV 도메인, tim-2 IgV 도메인, tim-4 IgV 도메인, tim-1 뮤신 도메인, tim-2 뮤신 도메인, tim-4 뮤신 도메인, 또는 이들의 조합물을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 효능제는 tim-1 IgV 도메인, tim-4 IgV 도메인, tim-1 뮤신 도메인, 또는 tim-4 뮤신 도메인에 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 이론에 매이지는 않지만, 상기 효능제는 tim-1, tim-2 또는 tim-4의 활성을 구조적으로 모방함으로써 작용할 수 있다. 한 실시태양에서, 효능제는 tim-4 IgV 및/또는 tim-4 뮤신 도메인을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 효능제는 각각 tim-4 IgV 및/또는 tim-4 뮤신 도메인 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드의 이량체를 포함한다. 상기 효능제는 tim-1 수용체에 가교결합하여 활성화시키기 위해 사용될 수 있다. 다른 실시태양에서, 폴리펩티드 효능제는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로서, 예를 들어 아테노바이러스를 통해 투여될 수 있다.

효능제로서 사용된 Tim-1, tim-2 또는 Tim-4, 또는 이들 폴리펩티드의 활성 단편은 본원에 기재된 방법에 사용하기 위해 담체 분자, 예를 들어 면역글로불린에 융합될 수 있다. 예를 들어, Tim-1의 가용성 형태는 면역글로불린의 Fc 부분에 "링커 (linker)" 서열을 통해 또는 면역글로불린의 Fc 부분에 융합될 수 있다. 다른 융합체 폴리펩티드, 예를 들어 GST (즉, 글루타티온 S-트랜스퍼라제), LexA 또는 MBP (즉, 말토스 결합 폴리펩티드)를 갖는 것을 또한 사용할 수 있다. 추가의 실시태양에서, Tim-4 또는 Tim-1 효능제 융합 폴리펩티드는 하나 이상의 추가의 잔기에 연결될 수 있다. 예를 들어, Tim-4 또는 Tim-1 융합 폴리펩티드는 추가로 GST 융합 폴리펩티드에 연결될 수 있고, 여기서 Tim-1 융합 폴리펩티드 서열은 GST 서열의 C-말단에 융합된다. 상기 융합 폴리펩티드는 Tim-4 또는 Tim-1 융합 폴리펩티드의 정제를 용이하게 할 수 있다. 또다른 실시태양에서, 융합 폴리펩티드는 그의 N-말단에서 이중 시그널 서열 (즉, Tim-4 또는 Tim-1 핵산에 의해 천연적으로 코딩되는 폴리펩티드 내에 존재하지 않는 폴리펩티드 서열)을 포함한다. 예를 들어, 천연 Tim-4 또는 Tim-1 시그널 서열은 제거되고 다른 폴리펩티드로부터 시그널 서열로 교체될 수 있다.

몇몇 실시태양에서, 효능제는 돌연변이되지 않은 서열에 비해 돌연변이된 형태와 그의 결합 상대 사이의 보다 큰 친화도 결합, 예를 들어 Tim-4에 대한 돌연변이된 Tim-1 폴리펩티드의 보다 큰 친화도 결합을 생성시키는 천연 Tim-4 또는 Tim-1 서열에서 돌연변이를 갖는 Tim-1, Tim-2 또는 Tim-4 변이체 서열을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, Tim-1, Tim-2 또는 Tim-4 잔기는 (돌연변이되지 않은 서열에 비해) 단백질 분해에 대한 보다 큰 내성을 갖는 폴리펩티드를 생성시키는 천연 tim 서열 (야생형)에서 돌연변이를 갖는 변이체 폴리펩티드로서 제공된다. 예를 들어, tim 단백질 상의 세린, 아스파르트레이트 또는 시스테인 프로테아제에 대한 프로테아제 절단 부위가 제거될 수 있다.

한 바람직한 실시태양에서, 본원에 기재된 방법에 사용된 효능제는 tim-4에 대한 tim-1의 결합을 촉진하거나 tim-1에 대한 tim-4 결합의 부재 하에 tim-1 활성화를 일으키는, 분자량이 약 2,000 달톤 미만인 작은 유기 분자, 예를 들어 펩티드 또는 올리고뉴클레오타이드 이외의 것이다. 상기 작용제는 예를 들어 본 발명에 의해 제공되는 방법을 사용하여 확인할 수 있다. 또다른 실시태양에서, 작용제는 tim-1에 결합하는 tim-4의 부분, 또는 세마포린4A에 결합하는 tim-2의 부분을 구조적으로 모방하는 펩티드 또는 펩티드 유도체이다. 상기 펩티드는 tim-1 또는 tim-4 및 그들의 리간드(들)의 활성화의 유도에 의해 효능제로서, 또는 tim 단백질 사이의 결합에 경쟁함으로써 길항제로서 작용할 수 있다.

V. Tim-1과 Tim-4 사이의 결합을 조절하는 작용제의 확인

본 발명의 다른 측면은 예를 들어 tim-1과 tim-4 사이의 결합을 조절하는 작용제를 확인함으로써, 면역 반응을 조절하는 작용제를 확인하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 방법을 이용하여 확인된 작용제는 치료를 필요로 하는 대상에서 T_H1 또는 T_H2 반응을 조절하기 위해 사용될 수 있다. tim-1/tim-4 상호작용을 차단하는 작용제는 tim-1의 활성화를 방지하여, 증가된 $Th2$ 활성화 및 감소된 $Th1$ 활성화를 일으키는 것으로 예상될 것이다.

한 측면에서, 본 발명에 기재된 바와 같은 tim-1/tim-4 복합체의 확인은 X-선 결정학, 중성자 회절, 핵자기 공명 분광법, 및 당업계의 숙련인에게 잘 공지된 다른 기술을 사용하여 결정될 수 있는 tim-1 및 tim-4 폴리펩티드의 구조 특징을 기초로 복합체 형성의 효능제 및 길항제의 합리적인 설계를 용이하게 한다. 합리적인 약물 설계를 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다 (Chemical and Structural Approaches to Rational Drug Design, David B. Weiner, William V. Williams, CRC Press (1994); Rational Drug Design: Novel Methodology and Practical Applications, Vol. 719, Abby L. Parrill (Editor), American Chemical Society (1999); Structure-based Ligand Design, Klaus Gubernator, Wiley, John & Sons, Incorporated (1998) 참조).

본 발명의 다른 측면은 tim-1과 tim-4 사이의 복합체 형성을 촉진하거나 차단하는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 시험관 내에서 또는 세포에서 수행할 수 있고, 전체 길이 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드 중 하나 또는 모두의 가용성 형태를 사용하여 수행할 수 있다. 본원에 기재된 스크리닝 방법의 몇몇 실시태양에서, tim-1 또는 tim-4의 IgV 도메인 및 임의로 뮤신 도메인을 포함하는 가용성 폴리펩티드를 사용할 수 있다. 다양한 다른 시약이 스크리닝 분석에 포함될 수 있다. 이들은 최적 폴리펩티드-폴리펩티드 결합을 용이하게 하고(하거나) 비-특이적 또는 배경 상호작용을 감소시키기 위해 사용되는 염, 중성 폴리펩티드, 예를 들어 알부민, 세제 등과 같은 시약을 포함한다. 분석의 효능을 개선하는 시약, 예를 들어 프로테아제 억제제, 뉴클레아제 억제제, 항균제 등이 또한 사용될 수 있다. 성분의 혼합물은 필수 결합을 제공하는 임의의 순서로 첨가된다. 인큐베이션은 임의의 적합한 온도, 일반적으로 4°C 내지 40°C에서 수행한다. 인큐베이션 기간은 최적 활성을 위해 선택되지만, 또한 신속한 고효율 (high-throughput) 스크리닝을 용이하게 하도록 최적화될 수 있다. 일반적으로, 0.1 내지 1시간이 시험관내 분석을 위해 충분할 것이다.

본 발명의 작용제의 확인 방법은 화합물의 라이브러리를 각 웰에 상이한 시험 화합물 또는 시험 화합물들의 군을 갖는 다수-웰 플레이트 (예를 들어 96-웰 플레이트)에서 스크리닝하기에 적합하다. 특히, 방법은 조합적 라이브러리에서 사용될 수 있다. 이들 방법은 다수-웰 플레이트, 예를 들어 플레이트, 마이크로칩 또는 슬라이드당 24, 48, 96 또는 384-웰을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 허용되는 소형화 방법을 통한 분석 시스템에서 "소형화될" 수 있다. 분석은 유리하게 보다 소량의 시약 및 다른 물질을 포함하는 마이크로칩 지지체 상에서 수행되도록 크기가 감소될 수 있다. 고효율 스크리닝에 도움이 되는 공정의 임의의 소형화는 본 발명의 범위 내에 있다.

본 발명의 한 특정한 측면은 (a) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드를 시험 작용제의 존재 하에 접촉시키고; (b) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드의 결합에 대한 시험 작용제의 영향을 결정하여; tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합을 조절하는 작용제를 확인하는 것을 포함하는, tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합을 조절하는 작용제를 확인하는 방법을 제공한다.

본 발명의 관련 측면은 면역 반응을 조절하는 작용제를 확인하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드를 시험 작용제의 존재 하에 접촉시키고; (b) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드의 결합에 대한 시험 작용제의 영향을 결정하여; 면역 반응을 조절하는 작용제를 확인하는 것을 포함한다.

본 발명의 몇몇 측면에서, 작용제는 시험관내 분석을 통해 확인된다. 다양한 분석 포맷이 충분할 것이고, 본 명세서에 비추어, 본원에서 명시적으로 설명하지 않은 것도 역시 당업계의 통상의 기술자가 이해할 것이다. 폴리펩티드 복합체의 형성, 효소적 활성화와 같은 조건을 모방하는 분석 포맷은 많은 상이한 형태로 생성될 수 있고, 무세포 시스템, 예를 들어 정제된

폴리펩티드 또는 세포 용해물에 기초한 분석, 및 무손상 세포를 이용하는 세포계 분석을 포함한다. 단순한 결합 분석이 또한 tim-1 또는 tim-4에 결합하는 작용제를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 상기 결합 분석은 또한 tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 상호작용을 파괴함으로써 작용하는 작용제를 확인할 수 있다. 시험되는 작용제는 예를 들어 세균, 효모 또는 다른 유기체에 의해 생산되거나 (예를 들어 천연 생성물), 화학적으로 생산되거나 (예를 들어 소분자, 예를 들어 펩티드 모방체), 재조합적으로 생산될 수 있다. tim-1 및 tim-4는 트랜스멤브레인 폴리펩티드이기 때문에, tim-1과 tim-4 사이의 복합체 형성을 조절하는 작용제를 확인하기 위해 설명된 방법 및 분석의 바람직한 실시태양은 전체 길이 폴리펩티드보다는 이들 폴리펩티드의 가용성 형태를 사용한다. 가용성 형태는 트랜스멤브레인 도메인이 결핍되는 것 및(또는) IgV 도메인 또는 결합하는 능력을 보유하는 그의 단편을 포함하는 것을 포함한다.

화합물의 라이브러리 및 천연 추출물을 시험하는 많은 약물 스크리닝 프로그램에서, 주어진 시간 내에 조사된 화합물의 수를 최대화하기 위해 고효율 분석이 바람직하다. 정제 또는 반정제 폴리펩티드 또는 용해물을 사용하여 발생될 수 있는, 무세포 시스템에서 수행되는 본 발명의 분석은 시험 화합물에 의해 매개되는 분자 표적에서 변경의 비교적 용이한 검출 및 신속한 발생을 허용하도록 생성될 수 있다는 점에서 "일차적" 스크린으로서 종종 바람직하다. 또한, 시험 화합물의 세포 독성 및(또는) 생체이용성의 효과는 시험관내 시스템에서 일반적으로 무시될 수 있고, 대신 분석은 다른 폴리펩티드와의 결합 친화도의 변경 또는 분자 표적의 효소적 특성의 변화에서 증명될 수 있는 바와 같은 분자 표적에 대한 약물의 효과에 주로 집중한다.

본 분석의 바람직한 시험관내 실시태양에서, 재구성된 tim-1/tim-4 복합체는 적어도 반정제된 폴리펩티드의 재구성된 혼합물을 포함한다. "반정제된"은 재구성된 혼합물에서 사용된 폴리펩티드가 앞서 다른 세포 또는 바이러스 폴리펩티드로부터 분리된 것을 의미한다. 예를 들어, 세포 용해물과 반대로, tim-1/tim-4 복합체 형성에 관여하는 폴리펩티드는 혼합물 내의 모든 다른 폴리펩티드에 대해 50% 이상 순도로 혼합물 내에 존재하고, 보다 바람직하게는 90-95% 순도로 존재한다. 대상 방법의 특정 실시태양에서, 재구성된 폴리펩티드 혼합물은 재구성된 혼합물이 tim-1/tim-4 복합체 조립 및(또는) 해체를 측정하는 능력을 저해하거나 변경시키는 다른 폴리펩티드 (예를 들어 세포 또는 바이러스 기원의)를 실질적으로 포함하지 않도록 고도 정제된 폴리펩티드를 혼합함으로써 유도된다.

시험 작용제의 존재 및 부재 하에 tim-1/tim-4 복합체를 분석하는 것은 반응물을 담기에 적합한 임의의 용기 내에서 수행할 수 있다. 그 예는 미세적정판, 시험관, 및 마이크로-원심분리관을 포함한다. 스크리닝 분석에서, 시험 작용제의 효과는 예를 들어, 반응의 운동학, 정상 상태 및(또는) 종점에 대한 시험 작용제의 효과를 평가함으로써 평가할 수 있다.

본 발명의 한 실시태양에서, tim-1/tim-4 복합체의 조립 또는 안정성을 저해하는 능력을 기초로 억제 작용제를 검출하는 약물 스크리닝 분석이 생성될 수 있다. 예시적인 결합 분석에서, 관심있는 화합물을 tim-1/tim-4 복합체를 포함하는 혼합물과 접촉시킨다. tim-1/tim-4 복합체의 검출 및 정량은 2개의 폴리펩티드 사이의 상호작용을 억제하는 (또는 강화시키는) 데에서 화합물의 효능을 결정하기 위한 수단을 제공한다. 화합물의 효능은 다양한 농도의 시험 화합물을 사용하여 얻은 데이터로부터 용량 반응 곡선을 생성하여 평가할 수 있다. 또한, 비교를 위한 기준선을 제공하기 위해 대조군 분석을 또한 수행할 수 있다. 대조군 분석에서, 복합체의 형성은 시험 화합물의 부재 하에 정량된다.

복합체 형성은 다양한 기술로 검출할 수 있다. 예를 들어, 복합체의 형성에서의 조절은 예를 들어, 검출가능하게 표지된 폴리펩티드 (예를 들어 방사성표지된, 형광 표지된, 또는 효소적 표지된)를 사용하여 면역분석에 의해, 또는 크로마토그래피 검출에 의해 정량할 수 있다. 표면 플라즈몬 공명 시스템, 예를 들어 바이아코어 인터내셔널 아베 (Biacore © International AB, 스웨덴 옉살라)로부터 입수가 가능한 것을 또한 폴리펩티드-폴리펩티드 상호작용을 검출하기 위해 사용할 수 있다.

본원에 기재된 폴리펩티드 및 펩티드는 고정될 수 있다. 폴리펩티드 중 하나의 비복합 형태로부터 복합체의 분리를 용이하게 하기 위해 및 분석의 자동화를 채용하기 위해, 종종 펩티드 및 폴리펩티드를 고정하는 것이 바람직할 것이다. 펩티드 및 폴리펩티드는 임의의 고체 매트릭스, 예를 들어 플레이트, 비드 또는 필터 상에 고정될 수 있다. 펩티드 또는 폴리펩티드는 폴리펩티드에 결합하는 반응성기를 함유하는 매트릭스 상에 고정될 수 있다. 별법으로 또는 조합으로, 폴리펩티드 내의 반응성기, 예를 들어 시스템은 매트릭스와 반응하고 결합할 수 있다. 또다른 실시태양에서, 폴리펩티드는 매트릭스에 대해 높은 결합 친화도를 갖는 다른 폴리펩티드와 융합 폴리펩티드, 예를 들어 고친화도로 비오틴에 결합하는 스트렙타비딘에 대한 융합 폴리펩티드로서 발현될 수 있다.

예시적인 실시태양에서, 폴리펩티드가 불용성 매트릭스에 결합되도록 허용하는 도메인을 첨가하는 융합 폴리펩티드가 제공될 수 있다. 예를 들어, 글루타티온 트랜스퍼라제에 융합된 tim-1의 IgV 도메인으로 구성된 GST-TIM-1-IgV-도메인 융합 폴리펩티드가 글루타티온 세파로즈 비드 (시그마 케미칼 (Sigma Chemical), 미국 미주리주 세인트루이스) 또는 글루

타티온 유도체화 미세적정판 상으로 흡착될 수 있고, 이어서 이는 tim-4 또는 그의 가용성 단편, 예를 들어 ^{35}S -표지된 폴리펩티드, 및 시험 화합물과 혼합되고 복합체 형성에 기여하는 조건 하에 인큐베이션된다. 인큐베이션 후, 비드를 세척하여 임의의 비결합된 상호작용 폴리펩티드를 제거하고, 매트릭스 비드-결합된 방사성표지를 직접 (예를 들어 섬광에 놓인 비드), 또는 예를 들어 미세적정판이 사용되는 경우 복합체가 해리된 후 상등액에서 결정한다. 별법으로, 비결합된 폴리펩티드를 세척하여 제거한 후, 복합체를 매트릭스로부터 해리시키고, SDS-PAGE 겔로 분리하고, 표준 전기영동 기술을 사용하여 겔로부터 매트릭스-결합된 분획에서 발견된 상호작용 폴리펩티드의 수준을 정량한다.

상기한 분석의 다양한 변형이 본 발명의 범위 내에 포함됨이 이해될 것이다. 예를 들어, 폴리펩티드의 역할은 교체될 수 있다. 즉, tim-4 폴리펩티드를 고체 지지체에 고정시킬 수 있고, tim-1 폴리펩티드를 함유하는 용액을 결합된 tim-4 폴리펩티드와 접촉시킬 수 있다. 추가로, 고정된 폴리펩티드 또는 유리 폴리펩티드는 결합 분석에 앞서 시험 화합물에 노출될 수 있고, 상기 예비노출의 효과를 대조군에 비해 평가할 수 있다. 본 방식으로 확인된 화합물은 또한 tim-4에 대한 tim-1의 결합 또는 그 반대를 억제한다. 별법으로, 시험 화합물은 tim-1 및 tim-4의 혼합에 이어 첨가될 수 있다. 상기 분석에서 결합 수준을 감소시키는데 효과적인 화합물은 tim-4 폴리펩티드로부터 tim-1 폴리펩티드를 교체하거나 그 반대로 교체한다.

웨스턴 (Western) 블롯 외에, 다른 보다 신속한 검출 방식, 예를 들어 다수-웰 ELISA형 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 부분-정제된 (예를 들어 상기 GST 방법에 의해) tim-1 폴리펩티드를 다수-웰 플레이트 (예를 들어 96-웰 플레이트)에서 폴리펩티드를 함유하는 용액을 플레이트 내로 도입하고 폴리펩티드를 플라스틱에 결합시킴으로써 웰의 바닥에 부착시킬 수 있다. 이어서 과잉의 폴리펩티드-함유 용액을 세척해 버리고, 비-특이적 결합 부위를 차단하기 위해 블로킹 용액 (예를 들어, 소 혈청 알부민 (BSA)을 함유하는)을 도입한다. 이어서 플레이트를 수회 더 세척하고, tim-4 폴리펩티드, 및 실험 (대조군에 비교를 위해) 웰의 경우, 시험 화합물을 함유하는 용액을 첨가한다. 상이한 웰은 상이한 시험 화합물, 상이한 농도의 동일한 시험 물질, 상이한 tim-1 폴리펩티드 또는 tim-4 폴리펩티드, 또는 상이한 농도의 tim-1 폴리펩티드 또는 tim-4 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 추가로, 상기 검출 방식에 다양한 변형이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 다수-웰 플레이트의 웰은 tim-1 폴리펩티드 대신 tim-4 폴리펩티드를 함유하는 폴리펩티드로 코팅될 수 있고, 결합 상호작용은 유리 tim-1 폴리펩티드의 부가시 분석된다. 웰은 또한 고정된 폴리펩티드의 부착을 향상시키고(시키거나) 비-특이적 결합의 수준을 감소시키는 화합물(들)로 예비코팅될 수 있다. 예를 들어, 웰은 글루타타티온을 함유하도록 유도체화될 수 있고, 결합 부위(들)이 노출된 공지의 배향으로 고정된 폴리펩티드의 부착을 촉진하기 위해 BSA로 예비코팅될 수 있다.

상기 분석에서 유용한 검출 방법은 항체-기준 방법 (즉, "유리" 폴리펩티드에 대해 작용하는 항체), "유리" 폴리펩티드 내로 포함된 리포터 잔기의 직접 검출 (예를 들어 형광 표지), 및 근접 에너지 전달 방법 (예를 들어, 고정된 폴리펩티드 또는 고체 지지체 내로 포함된 분자의 형광 또는 섬광을 일으키는 방사성 "유리" 폴리펩티드)을 포함한다.

tim-4 폴리펩티드에 대한 tim-1 폴리펩티드의 결합에 영향을 끼칠 수 있는 화합물을 확인하는 본 발명의 방법의 또다른 변형은 친화도 바이오센서 (biosensor) 방법의 사용을 통한 것이다. 상기 방법은 압전 효과, 전기화학법, 또는 광학적 방법, 예를 들어 타원편광분석법 (ellipsometry), 광학 파동 유도, 및 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 기초할 수 있다. SPR이 분자 상호작용을 실시간으로 모니터링하기 위해 특히 유리하고, 상기 논의한 방법보다 2개의 폴리펩티드의 결합 상호작용에 대한 시험 화합물의 효과의 민감하고 포괄적인 분석을 가능하게 한다. 그러나 상기 잇점은 보다 저효율의 기술 (다수-웰 플레이트-기초 방법과 비교할 때)에 의해 다소 상쇄된다.

본원에서 앞서 언급된 바와 같이, 시험 화합물은 화합물이 tim-4 폴리펩티드에 대한 tim-1의 결합에 대해 임의의 효과를 갖고 (즉, 화합물이 결합을 증가시키거나 감소시키고), 그 효과가 역치값 (상기한 바와 같은 본 발명의 실행자가 목적하는 수준으로 설정한 값; 예를 들어 결합에서 수배 증가 또는 수배 감소)을 초과하는 경우 tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합에 대한 효과를 갖는 것으로 말할 수 있다. 바람직하게는, 결합에 대한 효과는 유의한 효과이다. 특히 "유의한 효과"의 면에서 본원에서 사용되는 용어 "유의한"은 표준 통계 시험을 사용하여 통계학적으로 유의한 비교되는 2개의 군 사이의 정량가능한 파라미터의 차이를 나타낸다. 본원에 기재된 방법의 몇몇 실시태양에서, 단계 (b)는 시험 작용제의 존재 하에 tim-1/tim-4 복합체의 형성을 적합한 대조군과 비교하는 것을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 적합한 대조군은 시험되는 작용제 또는 화합물의 부재 하에 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 포함한다.

따라서, 본 발명의 실시태양에서, tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합에 영향을 미치는 화합물을 스크리닝하는 방법이 제공되고, 이 방법은 (a) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드를 시험 화합물의 존재 하에 접촉시키고; (b) tim-1 폴리펩티드 및 tim-4 폴리펩티드의 결합에 대한 시험 화합물의 효과를 결정하고; (c) 화합물을 결합 정도에 대한 그의 측정된 효과가 역치 수준을 넘으면 효과적인 것으로서 확인하는 것을 포함한다.

용어 "tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합에 영향을 미치는"은 시험 화합물이 그의 부재시 tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합 (대조군)과 그의 존재시 tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합 사이에 차이를 생성시킴을 의미한다. 바람직하게는, 상기 결합의 차이는 유의한 차이이다. 특정 실시태양에서, 유의한 차이는 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200% 또는 500%의 결합의 증가 또는 감소를 포함한다. 화합물은 결합을 억제 또는 향상시킬 수 있거나, tim-1에 대한 영향의 면에서 길항제 또는 효능제로서 작용하거나 다른 효능제 또는 길항제의 효과를 강화하는 화합물로서 작용한다. tim-1 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합에 대한 시험 화합물의 효과를 정량하기 위해 사용되는 측정법의 종류는 사용된 분석 및 검출 방법의 종류에 따를 것이고 당업계의 숙련인이 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들어, 검출 수단으로서 웨스턴 블롯팅을 이용하는 생물학적 스크린을 사용할 때, 결합은 밀도계를 사용하여 측정할 수 있다. 밀도계 값은 표준화될 수 있고, 역치 수준은 일련의 대조군 샘플 (즉, 시험 화합물의 부재) 사이의 시그널에서 변동의 양을 기초로 설정될 수 있다. 변동이 더 작을수록, 신뢰성있게 검출할 수 있는 시험 화합물의 효과는 더 작다.

본 분석의 추가의 다른 실시태양에서, tim-1/tim-4 복합체는 대상 분석을 지지하기 위해 세포 배양 기술을 이용하여, 전체 세포에서 생성된다. 예를 들어, 아래에서 설명하는 바와 같이 tim-1/tim-4 복합체는 진핵 세포 배양 시스템, 예를 들어 포유동물 세포 및 효모 세포 내에서 구성될 수 있다. 당업계의 숙련인에게 공지된 다른 세포를 사용할 수 있다. 전체 세포에서 대상 분석을 생성하는 잇점은 세포 내로 유입할 수 있는 작용제의 능력을 포함하여, 억제제의 치료 용도에서 요구되는 것에 보다 밀접하게 유사한 환경에서 기능성인 억제제를 검출하는 능력을 포함한다. 또한, 분석의 생체내 실시태양, 예를 들어 하기 제시된 실시예의 몇몇은 시험 작용제의 고효율 분석에 적합하다. tim-1/tim-4 복합체의 성분은 분석을 지지하기 위해 선택된 세포에 내인성일 수 있다. 별법으로, 일부 또는 모든 성분은 외인성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 융합 폴리펩티드는 재조합 기술 (예를 들어 발현 벡터를 사용하여)에 의해, 및 융합 폴리펩티드 자체 또는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA를 미세주사함으로써 세포 내로 도입될 수 있다.

또다른 실시태양에서, tim-1 및 tim-4 폴리펩티드는 서로에 대한 폴리펩티드의 결합을 파괴하는 작용제를 후속적으로 검출하기 위한 상호작용 트랩 (trap) 분석을 생성하기 위해 사용할 수 있다 (또한 미국 특허 6,200,759 및 5,925,523; Zervos et al. (1993) Cell 72: 223-232; Madura et al. (1993) J. Biol Chem 268: 12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14: 920-924; 및 Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8: 1693-1696 참조).

효모 2-하이브리드 폴리펩티드 상호작용 분석이 또한 tim-4 폴리펩티드에 대한 tim-1 폴리펩티드의 결합에 영향을 미치는 화합물을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 본 분석은 대부분의 진핵 전사 활성화제가 모듈형 (modular)이라는, 즉, 활성화제가 일반적으로 전사를 활성화시키는 활성화 도메인, 및 활성화제를 DNA 분자의 적절한 영역에 국소화시키는 DNA 결합 도메인을 함유한다는 발견에 기초한 것이다.

2 하이브리드 시스템에서, 제1 융합 폴리펩티드는 DNA 결합 도메인에 융합된 상호작용 폴리펩티드 쌍의 하나를 함유하고, 제2 융합 폴리펩티드는 전사 활성화 도메인에 융합된 상호작용 폴리펩티드 쌍의 다른 하나를 함유한다. 2개의 융합 폴리펩티드는 동일한 세포에서 독립적으로 발현되고, 융합체의 "상호작용 폴리펩티드" 부분 사이의 상호작용이 전사 활성화 인자의 기능을 재구성하고, 이는 리포터 유전자의 전사 활성화에 의해 검출된다. 적어도 2개의 상이한 세포-기초 2 하이브리드 폴리펩티드-폴리펩티드 상호작용 분석 시스템이 결합 상호작용을 평가하고(하거나) 상호작용 폴리펩티드를 확인하기 위해 사용되었다. 둘 모두 융합 하이브리드 폴리펩티드 쌍을 사용하며, 여기서 상기 쌍의 하나는 전사 활성화 인자의 전사 활성화 도메인에 융합된 2개의 "상호작용" 폴리펩티드의 첫번째 것을 함유하고, 상기 쌍의 다른 것은 전사 활성화 인자의 DNA 결합 도메인에 융합된 2개의 "상호작용" 폴리펩티드 중 두번째 것을 함유한다.

또다른 실시태양에서, 하나의 폴리펩티드는 세포, 예를 들어 세포 표면 상에서 발현되는 반면, 다른 폴리펩티드는 정제되거나 부분적으로 정제되고 복합체 형성을 허용하도록 세포와 접촉되는 천연 또는 재조합 폴리펩티드이다.

몇몇 실시태양에서, tim-1과 tim-4 사이의 결합 상호작용을 조절하는 것으로 확인된 작용제는 예를 들어 실험 섹션에 설명된 분석을 사용함으로써 기능적 효과, 예를 들어 시험관내 또는 생체 내에서 T세포에 의한 Th1/Th2 반응의 유도에 대한 효과에 대해 추가로 평가할 수 있다.

시험 작용제 또는 시험 화합물은 폴리펩티드 (항체 포함), 펩티드, 핵산 (RNA, DNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 핵산 포함), 탄수화물, 유기 화합물, 무기 화합물, 천연 생성물, 라이브러리 추출물, 체액 및 tim-1과 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합에 영향을 미치는 것에 대해 시험하기 원하는 다른 샘플을 포함하지만 이로 제한되지 않는, 시험하기 원하는 임의의 작용제 또는 화합물일 수 있다. 특히, 시험 화합물은 tim-1 폴리펩티드의 펩티드 모방체 또는 그의 단편일 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 시험 작용제는 정제되거나 부분적으로 정제된 작용제인 한편, 다른 실시태양에서 정제되지 않는다.

시험 작용제는 수많은 화학 클래스를 포함하지만, 일반적으로 유기 분자, 바람직하게는 50 초과 및 약 2,500 Da 미만의 분자량을 갖는 작은 유기 화합물이다. 시험 작용제는 폴리펩티드와 구조적 상호작용에 필요한 관능기, 특히 수소 결합을 포함하고, 일반적으로 적어도 아민, 카르보닐, 히드록실 또는 카르복실기, 바람직하게는 적어도 2개의 관능적 화학기를 포함한다. 시험 작용제는 종종 환식 탄소 또는 헤테로시클릭 구조 및(또는) 하나 이상의 상기 관능기로 치환된 방향족 또는 다핵방향족 구조를 포함한다. 시험 작용제는 또한 펩티드, 당류, 지방산, 스테로이드, 퓨린, 피리미딘, 유도체, 구조적 유사체 또는 이들의 조합물을 포함하지만 이로 제한되지 않는 생분자 중에서 발견된다.

시험 작용제는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리를 포함하는 다양한 공급원으로부터 얻는다. 예를 들어, 수많은 수단이 랜덤화된 올리고뉴클레오타이드 및 올리고펩티드의 발현을 포함하는 다양한 유기 화합물 및 생분자의 랜덤 및 지정 합성을 위해 이용가능하다. 작은 유기/펩티드의 라이브러리는 조합적 기술, 예를 들어 문헌 (Blondelle et al. (1995) Trends Anal. Chem. 14:83; 아피맥스 (Affymax)의 미국 특허 5,359,115 및 5,362,899; 엘만 (Ellman)의 미국 특허 5,288,514; 스틸 (Still) 등의 PCT 공개 WO94/08051; Chen et al. (1994) JACS 116:2661; Kerr et al. (1993) JACS 115:252; PCT 공개 WO92/10092, WO93/09668 및 W091/07087; 및 레르너 (Lerner) 등의 PCT 공개 WO93/20242)에 기재된 기술을 사용하여 생성할 수 있다.

대안적으로, 세균, 진균, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리가 이용가능하거나 쉽게 생산된다. 추가로, 천연 또는 합성적으로 생산된 라이브러리 및 화합물은 통상적인 화학적, 물리적 및 생화학적 수단을 통해 쉽게 변형되고, 조합적 라이브러리를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 공지의 약물학적 작용제를 구조적 유사체를 제조하기 위해 지정 또는 랜덤 화학 변형, 예를 들어 아실화, 알킬화, 에스테르화, 아마이드화 등으로 반응시킬 수 있다.

다른 실시태양에서, 시험 작용제는 tim-1, tim-4의 펩티드 모방체 또는 그의 단편이다. 펩티드 모방체는 펩티드 및 폴리펩티드에 기초하거나 그로부터 유래된 화합물이다. 본 발명에서 사용할 수 있는 펩티드 모방체는 일반적으로 비천연 아미노산을 사용하는 공지의 유사 펩티드 서열의 구조적 변형, 배위적 구속, 등입체적 교체 등에 의해 얻을 수 있다. 대상 펩티드 모방체는 펩티드 및 비-펩티드 합성 구조체 사이의 구조적 공간의 연속체를 구성하고; 따라서 유사 펩티드 모방체는 약물 작용단 (pharmacophore)을 묘사하는데 및 펩티드를 모 유사 펩티드의 활성을 갖는 비펩티드 화합물로 번역하는 것을 돕는데 유용할 수 있다.

또한, 본 명세서로부터 명백한 바와 같이, 대상 tim-1 및 tim-4 서열의 모방체 (mimotope)가 제공될 수 있다. 상기 펩티드 모방체는 비-가수분해성 (예를 들어 프로테아제, 또는 대응하는 펩티드를 분해하는 다른 생리학적 조건에 대한 증가된 안정성), 증가된 특이성 및(또는) 효력, 및 펩티드 모방체의 세포내 국소화를 위한 증가된 세포 투과성과 같은 속성을 가질 수 있다. 예시 목적으로, 본 발명의 펩티드 유사체는 예를 들어, 벤조디아제핀 (예를 들어, Freidinger et al. in Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988 참조), 치환된 감마 락탐 고리 (Garvey et al. in Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p123), C-7 모방체 (Huffman et al. in Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p.105), 케토-메틸렌 슈도펩티드 (Ewenson et al. (1986) J Med Chem 29:295; 및 Ewenson et al. in Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), β -턴 (turn) 디펩티드 코어 (Nagai et al. (1985) Tetrahedron Lett 26:647; 및 Sato et al. (1986) J Chem Soc Perkin Trans 1:1231), α -아미노알콜 (Gordon et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126:419; 및 Dann et al. (1986) Biochem Biophys Res Commun 134:71), 디아미노케톤 (Natarajan et al. (1984) Biochem Biophys Res Commun 124:141), 및 메틸렌아미노-변형 (Roark et al. in Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p134)을 사용하여 생성할 수 있다. 또한, 일반적으로 문헌 (Session III: Analytic and synthetic methods, in Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)을 참조한다.

대상 유사 펩티드 모방체를 생성하기 위해 사용할 수 있는 다양한 측쇄 교체에 추가하여, 본 발명은 특히 펩티드 2차 구조의 배위적으로 구속된 모방체의 사용을 고려한다. 펩티드의 아마이드 결합에 대해 수많은 대응물이 개발되었다. 아마이드 결합에 대한 자주 개발된 대응물은 (i) 트랜스-올레핀, (ii) 플루오로알켄, (iii) 메틸렌아미노, (iv) 포스포아미드, 및 (v) 술폰아미드를 포함한다.

몇몇 실시태양에서, 시험 작용제는 tim-1 또는 tim-4 폴리펩티드 사이의 결합에 영향을 미칠 수 있는지 결정하기에 앞서 tim-1 또는 tim-4 폴리펩티드에 결합하는 능력에 대해 예비선택된다. 한 실시태양에서, 시험 작용제는 먼저 tim-1 또는 tim-4 폴리펩티드에 결합하는 그의 능력에 대해 선택될 수 있다. 시험 작용제는 시험 작용제의 라이브러리, 예를 들어 펩티드 라이브러리 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝함으로써 예비선택될 수 있다.

VI. Tim-1 및 Tim-4 변이체 및 유사체를 확인하는 방법

본 발명의 다른 측면은 변경된 결합 활성 또는 변경된 기능을 갖는 tim-1 또는 tim-4 폴리펩티드의 변이체 형태를 확인하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 야생형 tim-4에 비해 변경된 결합 특성을 갖는 tim-4 폴리펩티드를 확인하는 방법을 제공한다. 한 실시태양에서, N- 또는 C-말단에서, 또는 둘 모두에서 끝이 절단된 (truncated) tim-4 폴리펩티드는 tim-1 폴리펩티드에 대한 결합에 대해 시험된다. 상기 방법은 예를 들어 tim-1에 결합하는 그의 능력을 보유하는 최소 tim-4 단편을 확인하는 것을 허용한다. tim-4 단편은 분석을 위해 제2 폴리펩티드, 예를 들어 Ig 도메인 또는 GST 융합 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 또한, 비제한적으로 하나 이상의 아미노산 위치에서 결실, 삽입 또는 치환을 일으키는 것과 같은 돌연변이가 (a) 전체 길이 tim-4 폴리펩티드 또는 (b) tim-1 폴리펩티드에 결합할 수 있는 tim-4 단편을 코딩하는 DNA 분절 내로 도입될 수 있고, 돌연변이체 폴리펩티드가 tim-1 폴리펩티드에 대해 변경된 결합 친화도를 갖는지 결정하기 위해 돌연변이체 tim-4 단편의 능력이 시험된다. 다른 측면에서, 본 발명은 야생형 tim-4에 비해 변경된 결합 특성을 갖는 tim-4 폴리펩티드의 확인과 유사하게, 야생형 tim-1에 비해 변경된 결합 특성을 갖는 tim-1 폴리펩티드를 확인하는 방법을 제공한다.

tim-4 및 tim-1 돌연변이체의 생성은 예를 들어 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 기술을 통해 돌연변이체 폴리펩티드의 라이브러리를 생성함으로써 달성할 수 있다. 클로닝된 유전자의 시험관내 돌연변이유발을 위한 기술은 공지되어 있다. 돌연변이를 스캐닝하기 위한 프로토콜의 예는 문헌 (Gustin et al., *Biotechniques* 14:22 (1993); Barany, *Gene* 37:111-23 (1985); Colicelli et al., *Mol Gen Genet* 199:537-9(1985); 및 Prentki et al., *Gene* 29:303-13 (1984))에서 찾을 수 있다. 부위 특이적 돌연변이유발을 위한 방법은 문헌 (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press 1989, pp.15.3-15.108; Weiner et al., *Gene* 126:35-41 (1993); Sayers et al., *Biotechniques* 13:592-6 (1992); Tones and Winistorfer, *Biotechniques* 12:528-30 (1992); Barton et al., *Nucleic Acids Res* 18:7349-55 (1990); Marotti and Tomich, *Gene Anal Tech* 6:67-70 (1989); 및 Zhu Anal Biochem 177:120-4 (1989))에서 찾을 수 있다. 아미노산 치환은 포함된 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성, 및(또는) 양극성 (amphipathic)에서의 유사성을 기초로 이루어질 수 있다. 다른 실시태양에서, 돌연변이(들)은 랜덤하게 생성된다.

변경된 결합 특성을 갖는 tim-1 또는 tim-4 폴리펩티드는 각각 tim-4 또는 tim-1에 대한 변경된 친화도를 갖는 폴리펩티드를 나타낸다. 몇몇 특정한 실시태양에서, 돌연변이체 폴리펩티드는 일부 생리학적 조건 하에 비-돌연변이체 형태와 동일한 결합 친화도를 갖지만, 다른 조건 하에는 상이한 친화도를 갖는다. 예를 들어, (a) 적어도 하나의 아미노산 치환체를 갖는 tim-4 IgV 도메인; (b) 임의로 tim-4 뮤신 도메인; 및 (c) 임의로 인간 Ig 도메인 또는 친화도 태그로 이루어지는 tim-4 폴리펩티드는 tim-1 폴리펩티드에 대한 결합에 대해 시험할 수 있다. 상기 tim-4 폴리펩티드는 돌연변이를 갖지 않는 동등한 tim-4 폴리펩티드와 37°C에서 동일한 결합 친화도로 tim-1에 결합하는 것으로 밝혀질 수 있지만, 35°C에서 상이한 결합 친화도를 보인다. 유사하게, pH 또는 1가 또는 2가 이온의 존재 또는 부재와 같은 다른 파라미터를 변화시킬 때 돌연변이체 펩티드는 차별적인 활성을 보일 수 있다.

본 발명의 다른 측면은 tim-1에 대한 tim-4의 결합에 기여하는 tim-4 내의 아미노산 잔기를 확인하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) (i) tim-4 IgV 도메인을 포함하는 폴리펩티드 (여기서 상기 tim-4 IgV 도메인은 서열 3의 잔기 31-133에 기재된 바와 같이 tim-4 IgV 도메인에 비해 1 내지 10개의 아미노산 치환체를 갖는다); 및 (ii) tim-4에 결합할 수 있는 tim-1 폴리펩티드를 접촉시키고; (b) 폴리펩티드와 tim-1 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하고; (c) 복합체의 형성을 적합한 대조군에 비교하는 것을 포함하고, 여기서 복합체 형성 정도가 적합한 대조군과 상이하면 아미노산은 tim-1에 대한 결합에 기여하는 것으로서 확인된다.

한 실시태양에서, 적합한 대조군은 (i) tim-1 폴리펩티드, 및 (ii) 서열 3에 기재된 tim-4 IgV 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 대조군 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 적합한 대조군은 소정의 역치 수준을 포함한다. 또다른 실시태양에서, tim-1 폴리펩티드는 서열 1의 잔기 21-126에 기재된 바와 같이 tim-1 IgV 도메인의 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나 유사한 서열을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 폴리펩티드는 tim-4 뮤신 도메인을 추가로 포함한다. 관련 실시태양에서, 폴리펩티드는 tim-4 뮤신 도메인의 아미노산 서열에 90% 이상 동일하거나 유사한 서열을 포함한다.

본 발명의 다른 측면은 tim-4에 대한 tim-1의 결합에 기여하는 tim-1 내의 아미노산 잔기를 확인하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) (i) tim-1 IgV 도메인을 포함하는 폴리펩티드 (여기서 상기 tim-1 IgV 도메인은 서열 1의 잔기 21-126에 기재된 바와 같이 tim-1 IgV 도메인에 비해 1 내지 10개의 아미노산 치환체를 갖는다); 및 (ii) tim-4 폴리펩티드 또는 그

의 단편 (여기서 상기 tim-4 폴리펩티드 또는 그의 단편은 tim-2에 결합할 수 있다)을 접촉시키고; (b) 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하고; (c) 복합체의 형성을 적합한 대조군에 비교하는 것을 포함하고, 여기서 복합체 형성 정도가 적합한 대조군과 상이하면 아미노산은 tim-4에 대한 결합에 기여하는 것으로서 확인된다.

본 발명의 관련 측면은 서열 3의 아미노산 31-133에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함하는 시험 폴리펩티드가 tim-1 폴리펩티드에 결합하는지 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 시험 폴리펩티드를 tim-1 폴리펩티드와 접촉시키고; (b) 시험 폴리펩티드와 tim-1 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함하고; 여기서 복합체가 검출되면 시험 폴리펩티드는 tim-1 폴리펩티드에 결합하는 것으로 결정된다. 한 실시태양에서, 시험 폴리펩티드는 서열 3의 잔기 31-133 또는 서열 4의 잔기 31-134에 기재된 tim-4 IgV 도메인에 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95% 동일하거나 유사한 서열을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 시험 폴리펩티드는 서열 3, 서열 4, 서열 9, 서열 10, 서열 11 및 서열 12로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 tim-4 폴리펩티드에 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95% 동일하거나 유사한 서열을 포함한다.

또다른 실시태양에서, 시험 폴리펩티드는 그의 정제를 용이하게 하거나, 생체 내에서 향상된 안정성 또는 활성을 부여하는 폴리펩티드 서열, 예를 들어 Fc 면역글로불린 도메인 또는 친화도 태그를 포함한다.

본 발명의 다른 측면은 서열 1의 아미노산 21-126에 90% 이상 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함하는 시험 폴리펩티드가 tim-4 폴리펩티드에 결합하는지 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 시험 폴리펩티드를 tim-4 폴리펩티드와 접촉시키고; (b) 시험 폴리펩티드와 tim-4 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함하고; 여기서 복합체가 검출되면 시험 폴리펩티드는 tim-4 폴리펩티드에 결합하는 것으로 결정된다. 한 실시태양에서, 시험 폴리펩티드는 서열 1의 잔기 21-126 또는 서열 2의 잔기 21-129에 기재된 바와 같은 tim-1 IgV 도메인에 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95% 동일하거나 유사한 서열을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 시험 폴리펩티드는 그의 정제를 용이하게 하거나, 생체 내에서 향상된 안정성 또는 활성을 부여하는 서열, 예를 들어 Fc 면역글로불린 도메인 또는 친화도 태그를 포함한다.

시험 폴리펩티드가 tim-1 또는 tim-4 폴리펩티드에 결합하는지 결정하는 본원에 기재된 방법의 한 실시태양에서, 시험 폴리펩티드는 tim-1 또는 tim-4의 펩티드 모방체, 예를 들어 선행 섹션에 설명된 것이다. 잠재적인 생활성 펩티드 모방체를 설계하는데 유용한 컴퓨터 프로그램은 그 개시내용이 본원에 참고로 포함된 미국 특허 5,331,573에 설명된다.

VII. 제제화

본원에 기재된 치료제는 약학 조성물로 제제화될 수 있다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학 조성물은 하나 이상의 생리학상 허용되는 담체 또는 부형제를 사용하여 통상적인 방식으로 제제화될 수 있다. 따라서, 화합물 및 그의 생리학상 허용되는 염 및 용매화물은 예를 들어, 에어로졸, 정맥내, 경구 또는 국소 경로로 투여하기 위해 제제화될 수 있다. 투여는 병변 내, 복강내, 피하, 근육내 또는 정맥내 주사; 주입; 리포솜-매개 전달; 국소, 경막내, 치은낭, 경직장, 기관지내, 코, 경점막, 장관, 경구, 눈 또는 귀 전달을 포함할 수 있다.

본 발명의 예시적인 조성물은 전달 시스템, 예를 들어 리포솜 시스템과 혼합되고 임의로 허용되는 부형제를 포함하는 RNAi를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 조성물은 주사를 위해 제제화된다.

기술 및 제제화는 일반적으로 문헌 (Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA)에서 찾을 수 있다. 진신 투여를 위해, 근육내, 정맥내, 복강내, 및 피하를 포함하는 주사가 바람직하다. 주사를 위해, 본 발명의 화합물은 액체 용액 내에, 바람직하게는 생리학상 적합한 완충제, 예를 들어 헵크 (Hank) 용액 또는 링거 (Ringer) 용액 내에 제제화된다. 또한, 화합물은 고체 형태로 제제화되고 사용하기 직전에 재용해되거나 현탁될 수 있다. 동결건조된 형태도 또한 포함된다.

경구 투여를 위해, 약학 조성물은 예를 들어, 약제학적으로 허용가능한 부형제, 예를 들어 결합제 (예를 들어 예비젤라틴화 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제 (예를 들어 락토스, 미결정질 셀룰로스 또는 인산수소칼슘); 윤활제 (예를 들어 마그네슘 스테아레이트, 활석 또는 실리카); 붕해제 (예를 들어 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제 (예를 들어 나트륨 라우릴 술페이트)를 사용하여 통상적인 수단으로 제조된 정제 또는 캡슐제 형태를 취할 수 있다. 정제는 당업계에 공지된 방법으로 코팅될 수 있다. 경구 투여용 액체 제제는 예를 들어, 용액제, 시럽제 또는 현탁액제 형태를 취할 수 있거나, 사용하기 전에 물 또는 다른 적합한 비히클로 구성하기 위한 건조 제품으로서 제공될 수 있다. 상기 액체 제제는 약제학적으로 허용가능한 첨가제, 예를 들어 현탁액제 (예를 들어 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화 식물 지방); 유화제 (예를 들어 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클 (예를 들어 아티온드

(ationd) 오일, 유성 에스테르, 에틸 알콜 또는 분별된 식물유); 및 보존제 (예를 들어 메틸 또는 프로필-p-히드록시벤조이트 또는 소르브산)를 사용하여 통상적인 수단으로 제조할 수 있다. 제제는 또한 완충염, 향미제, 착색제 및 감미제를 적절하게 함유할 수 있다.

경구 투여용 제제는 활성 화합물의 제어 방출을 제공하도록 적합하게 제제화될 수 있다. 구강 (buccal) 투여를 위해, 조성물은 통상적인 방식으로 제제화된 정제 또는 로젠지제의 형태를 취할 수 있다. 흡입 투여를 위해, 본 발명에 따라 사용하기 위한 화합물은 적합한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여 가압식 팩 또는 네블라이저 (nebuliser)로부터 에어로졸 스프레이 제시의 형태로 편리하게 전달된다. 가압식 에어로졸의 경우에, 투여량 단위는 계량된 양을 전달하기 위해 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 화합물 및 적합한 분말 베이스, 예를 들어 락토스 또는 전분의 분말 혼합물을 함유하는 흡입기 또는 취입기 (insufflator)에서 사용하기 위한, 예를 들어 젤라틴의 캡슐 및 카트리지가 제제화될 수 있다.

화합물은 주사, 예를 들어 볼러스 (bolus) 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여용으로 제제화될 수 있다. 주사용 제제는 보존제를 첨가한 단위 투여형으로, 예를 들어 앰플 내에 또는 다수투여 용기 내에 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액제, 용액제 또는 에멀전의 형태를 취할 수 있고, 제제화제, 예를 들어 현탁제, 안정화제 및(또는) 분산제를 함유할 수 있다. 별법으로, 활성 성분은 사용하기 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균 파이로젠 (pyrogen) 제거 증류수로 구성하기 위한 분말 형태로 존재할 수 있다.

화합물은 또한 직장 조성물, 예를 들어 예를 들어 통상적인 좌제 베이스, 예를 들어 코코아 버터 또는 다른 글리세리드를 함유하는 좌제 또는 정제 관장제로 제제화될 수 있다.

앞서 설명한 제제에 추가로, 화합물은 또한 데포 (depot) 제제로서 제제화될 수 있다. 상기 지속성 제제는 매식 (예를 들어 피하 또는 근육내) 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어 화합물은 적합한 중합성 또는 소수성 물질 (예를 들어 허용되는 오일 중 에멀전으로서) 또는 이온 교환 수지를 사용하여, 또는 난용성 유도체로서, 예를 들어 난용성 염으로서 제제화될 수 있다.

전신 투여는 또한 점막 또는 경피 수단에 의할 수 있다. 경점막 또는 경피 투여를 위해, 침투시킬 배리어에 적절한 침투제가 제제에 사용된다. 상기 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 경점막 투여를 위해 담즙산 및 푸시딘산 유도체를 포함한다. 또한, 침투를 용이하게 하기 위해 세제가 사용될 수 있다. 경점막 투여는 코 스프레이를 통해 또는 좌제를 사용하여 이루어질 수 있다. 국소 투여를 위해, 본 발명의 올리고머는 일반적으로 당업계에 공지된 바와 같이 연고, 고약, 젤 또는 크림으로 제제화된다. 세척 용액은 치유를 촉진하기 위해 손상 또는 염증을 치료하기 위해 국소적으로 사용될 수 있다.

조성물은 원하는 경우 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여형을 함유할 수 있는 팩 또는 분배기 장치 내에 제공될 수 있다. 팩은 예를 들어 금속 또는 플라스틱 호일, 예를 들어 블리스터 (blister) 팩을 포함할 수 있다. 팩 또는 분배기 장치에는 투여 지시서가 함께 제공될 수 있다.

핵산의 투여를 포함한 치료를 위해, 본 발명의 올리고머는 다양한 투여 방식, 예를 들어 전신 및 국소 또는 국소화 투여를 위해 제제화될 수 있다. 기술 및 제제화는 일반적으로 문헌 (Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA)에서 찾을 수 있다. 전신 투여를 위해, 근육내, 정맥내, 복강내, 노드내 (intranodal) 및 피하를 포함하는 주사가 바람직하고, 주사를 위해, 본 발명의 올리고머는 액체 용액 내에, 바람직하게는 생리학상 적합한 완충제, 예를 들어 헹크 용액 또는 링거 용액 내에 제제화될 수 있다. 또한, 올리고머는 고체 형태로 제제화되고 사용하기 직전에 재용해되거나 현탁될 수 있다. 동결건조된 형태도 또한 포함된다.

전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의해 이루어질 수 있거나, 화합물은 경구 투여될 수 있다. 경점막 또는 경피 투여를 위해, 침투시킬 배리어에 적절한 침투제가 제제에 사용된다. 상기 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 경점막 투여를 위해 담즙산 및 푸시딘산 유도체를 포함한다. 또한, 침투를 용이하게 하기 위해 세제가 사용될 수 있다. 경점막 투여는 코 스프레이를 통해 또는 좌제를 사용하여 이루어질 수 있다. 경구 투여를 위해, 올리고머는 통상적인 경구 투여형, 예를 들어 캡슐제, 정제 및 강장제 (tonic)로 제제화된다. 국소 투여를 위해, 본 발명의 올리고머는 일반적으로 당업계에 공지된 바와 같이 연고, 고약, 젤 또는 크림으로 제제화된다.

본 발명의 작용제 및 조성물의 독성 및 치료 효능은 예를 들어 LD₅₀ (집단의 50%에 대한 치사 투여량) 및 ED₅₀ (집단의 50%에서 치료 효과 투여량)를 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 제약 절차에 의해 결정할 수 있다. 독

성 및 치료 효과 사이의 투여량비는 치료 지수이고, 비율 LD_{50}/ED_{50} 로서 표현될 수 있다. 큰 치료 효과를 나타내는 화합물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 화합물을 사용할 수 있지만, 감염되지 않은 세포에 잠재적인 손상을 최소화하기 위해 상기 화합물을 침범된 조직 부위에 표적화하여, 부작용을 감소시키는 전달 시스템을 설계하도록 주의가 기울여야 한다.

세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인간에서 사용하기 위한 투여량 범위를 제제화하는데 사용될 수 있다. 상기 화합물의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED_{50} 를 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 투여량은 사용된 투여형 및 이용된 투여 경로에 따라 상기 범위 내에서 변할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 임의의 화합물에 대해, 치료 유효 투여량은 초기에 세포 배양 분석으로부터 추정될 수 있다. 투여량은 세포 배양에서 결정된 IC_{50} (즉, 증상의 최대 억제 1/2을 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하도록 동물 모델에서 제제화될 수 있다. 상기 정보는 인간에서 유용한 투여량을 보다 정확하게 결정하기 위해 사용될 수 있다. 혈장내 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정할 수 있다.

본원에서 설명하는 방법의 한 실시태양에서, 작용제의 유효량은 약 1 mg 내지 약 50 mg/kg (대상의 체중)이다. 한 실시태양에서, 작용제의 유효량은 약 2 mg 내지 약 40 mg/kg (대상의 체중)이다. 한 실시태양에서, 작용제의 유효량은 약 3 mg 내지 약 30 mg/kg (대상의 체중)이다. 한 실시태양에서, 작용제의 유효량은 약 4 mg 내지 약 20 mg/kg (대상의 체중)이다. 한 실시태양에서, 작용제의 유효량은 약 5 mg 내지 약 10 mg/kg (대상의 체중)이다.

본원에 기재된 방법의 한 실시태양에서, 작용제는 적어도 1일 1회 투여된다. 한 실시태양에서, 작용제는 매일 투여된다. 한 실시태양에서, 작용제는 격일로 투여된다. 한 실시태양에서, 작용제는 6 내지 8일마다 투여된다. 한 실시태양에서, 작용제는 매주 투여된다.

대상에게 투여하기 위한 화합물 및(또는) 작용제의 양에 대해, 당업계의 숙련인은 적절한 양을 결정하는 방법을 알 것이다. 본원에서 사용되는 투여량 또는 양은 질환을 억제하거나, 질환을 치료하거나, 대상을 치료하거나 질환으로 고통받지 않도록 대상을 보호하기 위해 충분한 양 중 하나일 것이다. 상기 양은 유효량으로 간주될 수 있다. 당업계의 통상의 기술자는 대상을 치료하기 위해 필요한 양을 결정하기 위해 간단한 적정 실험을 수행할 수 있다. 본 발명의 조성물의 투여량은 대상 및 이용된 특정 투여 경로에 따라 변할 것이다. 한 실시태양에서, 투여량은 약 0.1 내지 약 100,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (대상의 체중)일 수 있다. 조성물을 기초로, 투여량은 연속적으로, 예를 들어 연속 펌프에 의해, 또는 주기적 간격으로, 예를 들어, 하나 이상의 개별 투여로 전달될 수 있다. 특정 조성물의 다수 투여량의 바람직한 시간 간격은 당업계의 숙련인이 과도한 실험 없이 결정할 수 있다.

유효량은 특히 화합물의 크기, 화합물의 생분해성, 화합물의 생활성 및 화합물의 생체이용성에 기초할 수 있다. 화합물이 빨리 분해되지 않고, 생체이용가능하고 매우 효과적이면, 효과적이기 위해 보다 적은 양이 필요할 것이다. 유효량은 당업계의 숙련인에게 알려질 것이고; 또한 화합물의 형태, 화합물의 크기 및 화합물의 생활성에 따를 것이다. 당업계의 숙련인은 생분해성으로 생활성을 결정하여 유효량을 결정하기 위해 화합물에 대해 실험적 활성 시험을 일상적으로 수행할 수 있다. 상기 방법의 한 실시태양에서, 화합물의 유효량은 약 1.0 ng/kg 내지 약 100 mg/kg (대상의 체중)을 포함한다. 상기 방법의 또다른 실시태양에서, 화합물의 유효량은 약 100 ng/kg 내지 약 50 mg/kg (대상의 체중)을 포함한다. 상기 방법의 또다른 실시태양에서, 화합물의 유효량은 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 10 mg/kg (대상의 체중)을 포함한다. 상기 방법의 또다른 실시태양에서, 화합물의 유효량은 약 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 1 mg/kg (대상의 체중)을 포함한다.

화합물, 조성물 및(또는) 작용제를 투여해야 하는 시간에 대해, 당업계의 숙련인은 상기 화합물 및(또는) 작용제를 투여하는 시간을 결정할 수 있다. 투여는 특정 기간 동안 지속적이거나 특정한 간격에서 주기적일 수 있다. 화합물은 매시간, 매일, 매주, 매달, 매년 (예를 들어 시간 방출 제형으로) 또는 1회 전달로서 전달될 수 있다. 전달은 일정 시간 동안의 연속 전달, 예를 들어 정맥내 전달일 수 있다. 본원에 기재된 방법의 한 실시태양에서, 작용제는 적어도 1일 1회 투여된다. 본원에 기재된 방법의 한 실시태양에서, 작용제는 매일 투여된다. 본원에 기재된 방법의 한 실시태양에서, 작용제는 격일로 투여된다. 본원에 기재된 방법의 한 실시태양에서, 작용제는 6 내지 8일마다 투여된다. 본원에 기재된 방법의 한 실시태양에서, 작용제는 매주 투여된다.

폴리펩티드를 포함하는 작용제가 대상에게 투여되는 본원에 기재된 방법의 몇몇 실시태양에서, 폴리펩티드는 대상에게 상기 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 투여함으로써 투여된다. 치료 폴리펩티드 (예를 들어 야생형 또는 돌연변이체 tim-4 IgV 도메인을 포함하는 폴리펩티드)의 발현 구성체는 임의의 생물학상 효과적인 담체, 예를 들어 세포를 생체 내에서 재조합 융합 유전자로 효과적으로 형질감염시킬 수 있는 임의의 제제 또는 조성물 내에서 투여할 수 있다. 방법은 대상 융합 유전자를 재조합 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 및 단순 포진 바이러스-1, 또는 재조합 세균 또는

진행 플라스미드를 포함하는 바이러스 벡터에 삽입하는 것을 포함한다. 바이러스 벡터는 세포를 직접 형질감염시키기 위해 사용될 수 있고; 플라스미드 DNA는 예를 들어, 양이온성 리포좀 (리포펙틴) 또는 유도체화 (예를 들어 컨쥬게이팅된 항체), 폴리리신 컨쥬게이트, 그라마시딘 S, 인공 바이러스 엔벨롭 또는 다른 상기한 세포내 담체, 및 유전자 구성체의 직접 주입 또는 생체내 수행된 CaPO_4 침전의 도움으로 전달될 수 있다. 적절한 표적 세포의 형질도입이 유전자 치료에서 중요한 제1 단계를 나타내므로, 특정 유전자 전달 시스템의 선택은 의도된 표적의 표현형 및 투여 경로, 예를 들어 국소 또는 전신 투여와 같은 인자에 따를 것임이 이해될 것이다. 추가로, 예를 들어 바이러스 벡터 내에 함유된 cDNA에 의해 바이러스 벡터 내에서 코딩된 분자는 바이러스 벡터 핵산을 흡수한 세포 내에서 효과적으로 발현된다.

레트로바이러스 벡터 및 아데노 관련 바이러스 벡터가 일반적으로 외인성 유전자를 생체내, 특히 인간에게 전달하기 위한 선택되는 재조합 유전자 전달 시스템임이 이해된다. 이들 벡터는 세포 내로 유전자의 효율적인 전달을 제공하고, 전달된 핵산은 숙주의 염색체 DNA 내로 안정하게 통합된다. 레트로바이러스를 사용하기 위한 주요 필수조건은 특히 세포 집단에서 야생형 바이러스의 확산 가능성에 관하여 이들의 사용 안정성을 보장하는 것이다. 복제-결합 레트로바이러스만을 생산하는 특수화된 세포주 ("패키징 (packaging) 세포"로 불림)의 개발은 유전자 치료를 위한 레트로바이러스의 효용성을 증가시켰고, 결합 레트로바이러스는 유전자 치료 목적을 위한 유전자 전달에서 사용을 위해 잘 특성화되었다 (Miller, A.D. (1990) Blood 76:271 참조). 따라서, 레트로바이러스 코딩 서열의 일부 (gag, pol, env)가 CKI 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로 교체되어, 레트로바이러스를 복제 결합으로 만드는 재조합 레트로바이러스가 구성될 수 있다. 이어서 복제 결합 레트로바이러스는 헬퍼 바이러스의 사용을 통해 표준기술에 의해 표적 세포를 감염시키기 위해 사용될 수 있는 비리온 내로 패키징된다. 재조합 레트로바이러스를 생산하고 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 상기 바이러스로 감염시키기 위한 프로토콜은 문헌 (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14) 및 다른 표준 실험실 매뉴얼에서 찾을 수 있다. 적합한 레트로바이러스의 예는 당업계의 숙련인에게 잘 공지된 pLJ, pZIP, pWE 및 pEM을 포함한다. 에코트로픽 (ecotropic) 및 암포트로픽 (amphotropic) 레트로바이러스 시스템을 제조하기 위한 적합한 패키징 바이러스 세포주의 예는 ψCrip , ψCre , $\psi 2$ 및 ψAm 을 포함한다. 레트로바이러스는 다양한 유전자를 많은 상이한 세포 종류, 예를 들어 신경세포, 상피세포, 내피세포, 림프구, 근교세포, 간세포, 골수 세포 내로 시험관내 및(또는) 생체내 도입시키기 위해 사용되었다 (예를 들어 Eglitis et al. (1985) Science 230:1395-1; Danes and Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; 미국 특허 4,868,116; 미국 특허 4,980,286; PCT 공개 WO89/07136; PCT 공개 WO89/02468; PCT 공개 WO89/05345; 및 PCT 공개 WO92/07573 참조).

또한, 바이러스 입자의 표면 상에서 바이러스 패키징 폴리펩티드를 변형함으로써 레트로바이러스 및 따라서 레트로바이러스-기반 벡터의 감염 스펙트럼을 제한하는 것이 가능한 것으로 나타났다 (예를 들어 PCT 공개 W093/25234, W094/06920 및 W094/11524 참조). 예를 들어, 레트로바이러스 벡터의 감염 스펙트럼의 변형을 위한 방법은 세포 표면 항원에 특이적인 항체를 바이러스 env 폴리펩티드에 커플링시키거나 (Roux et al. (1989) PNAS 86:9079-9083; Julian et al. (1992) J. Gen Virol 73:3251-3255; 및 Goud et al. (1983) Virology 163:251-254); 세포 표면 리간드를 바이러스 env 폴리펩티드에 커플링시키는 것을 포함한다 (Neda et al. (1991) J Biol Chem 266:14143-14146). 커플링은 폴리펩티드 또는 다른 변종 (예를 들어, env 폴리펩티드를 아시아로글리코폴리펩티드로 전환시키기 위한 락토스)과의 화학적 가교결합의 형태로, 및 융합 폴리펩티드 (예를 들어 단쇄 항체/env 융합 폴리펩티드)를 생성함으로써 존재할 수 있다. 상기 기술은 감염을 특정 조직 종류에 제한하거나 지시하는데 유용하면서, 또한 에코트로픽 벡터를 암포트로픽 벡터로 전환시키기 위해 사용될 수 있다.

상기한 바와 같은 바이러스 전달 방법에 추가하여, 동물의 조직에서 대상 폴리펩티드의 발현을 유발시키기 위해 비-바이러스 방법이 또한 사용될 수 있다. 대부분의 유전자 전달의 비-바이러스 방법은 거대분자의 흡수 및 세포내 수송을 위해 포유동물 세포에서 사용되는 정상 메카니즘에 의존한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 비-바이러스 유전자 전달 시스템은 표적화 세포에 의한 유전자의 흡수를 위해 세포내 경로에 의존한다. 상기한 종류의 예시적인 유전자 전달 시스템은 리포좀 유래 시스템, 폴리-리신 컨쥬게이트, 및 인공 바이러스 엔벨롭을 포함한다.

대표적인 실시태양에서, 대상 폴리펩티드 중 하나를 코딩하는 유전자는 그들의 표면 상에 양전하를 갖고 (임의로) 표적 조직의 세포 표면 항원에 대한 항체로 태깅된 리포좀 (예를 들어 리포펙틴) 내로 포획될 수 있다 (Mizuno et al. (1992) No

Shinkei Geka 20:547-551; PCT 공개 WO91/06309; 일본 특허 출원 1047381; 및 유럽 특허 공개 EP-A-43075). 예를 들어, 신경교종 세포의 리포펙틴은 교종-연관 항원에 대한 모노클로날 항체로 태깅된 리포솜을 사용하여 수행될 수 있다 (Mizuno et al. (1992) Neurol. Med. Chir. 32:873-876).

임상 세팅에서, 유전자 전달 시스템은 각각 당업계에 친숙한 임의의 수의 방법에 의해 환자에게 도입될 수 있다. 예를 들어, 유전자 전달 시스템의 제약 제제는 예를 들어 정맥내 주사에 의해 전신적으로 도입될 수 있고, 표적 세포의 특이적 형질도입은 유전자의 발현을 조절하는 전사 조절 서열 때문에 유전자 전달 비히클, 세포-종류 또는 조직-종류 발현, 또는 이들의 조합에 의해 제공된 형질감염의 특이성으로부터 주로 일어난다. 다른 실시태양에서, 재조합 유전자의 초기 전달은 동물 내로의 도입이 완전히 국소화되어 보다 제한된다. 예를 들어, 유전자 전달 비히클은 카테터 (catheter)에 의해 (미국 특허 5,328,470 참조) 또는 정위 (stereotactic) 주사에 의해 (예를 들어 Chen et al. (1994) PNAS91:3054-3057) 도입될 수 있다.

서열 목록에 관한 설명

서열 1은 Tim-1 인간 폴리펩티드이다. 이 서열은 Genbank 기탁 번호 NP_036338로서 나열된다.

서열 2는 Tim-1 마우스 폴리펩티드이다. 이 서열은 Genbank 기탁 번호 NP_599009로서 나열된다.

서열 3은 Tim-4 인간 폴리펩티드 변이체 #1이다.

서열 4는 Tim-4 마우스 폴리펩티드이다. 이 서열은 Genbank 기탁 번호 NP_848874로서 나열된다.

서열 5는 Tim-1 인간 핵산이다. 이 서열은 Genbank 기탁 번호 NM_012206으로서 나열된다.

서열 6은 Tim-1 마우스 핵산이다. 이 서열은 Genbank 기탁 번호 NM_134248로서 나열된다.

서열 7은 Tim-4 인간 핵산 변이체 #1이다.

서열 8은 Tim-4 마우스 핵산이다. 이 서열은 Genbank 기탁 번호 NM_178759로서 나열된다.

서열 9는 엑손 6 및 7이 결실된 마우스 tim-4의 가용성 형태이다.

서열 10은 엑손 6이 결실된 마우스 tim-4의 이소형이다. 엑손 6의 결실은 엑손 5 이후의 프레임시프트를 초래한다.

서열 11은 엑손 6 및 7이 결실된 마우스 tim-4의 가용성 형태에 유사한 인간 tim-4의 가용성 형태이다.

서열 12는 Tim-4 마우스 폴리펩티드 변이체이다.

서열 13은 Tim-2 마우스 폴리펩티드 (NP_599010)이다.

예시

본 발명을 이제 일반적으로 설명하고, 하기 실시예를 참고로 하여 보다 쉽게 이해될 것이나, 이들 실시예는 본 발명의 특정 측면 및 실시태양을 단지 예시하고자 한 것으로서 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니며, 당업계의 숙련인은 상기 개시 내용 및 하기 실시예로부터 인식하는 바와 같이, 특허청구된 본 발명의 범위로부터 벗어나지 않으면서 다른 DNA 마이크로어레이, 세포 종류, 물질, 구성체 또는 데이터 분석 방법 (이로 제한되지 않음)을 사용할 수 있다.

본원에서 언급된 임의의 특허, 특허 출원, 특허 공보 또는 과학 문헌의 내용은 그 전부가 본원에 포함된다.

실험 부분의 개요

본원에서 설명되는 실시예는 Tim-2가 Th2 세포에 대해 우선적으로 상향조절됨을 보여준다. Tim-2의 기능적 역할을 설명하기 위해서, tim-2에서 유도되는 모노클로날 항체, 및 Tim-2의 도메인 및 Fc 면역글로불린 사슬을 포함하는 융합 폴리펩티드를 생성시켰다. 실시예는 Tim-2Ig의 투여가 T세포 활성화 및 Th2 시토킨 생산을 유도함을 보여준다. 또한, Tim-2Ig가 Th1 매개 질병, 예를 들어 실험적 자가면역성 뇌척수염 (EAE)의 유도 동안 투여될 때, 질병의 임상 징후가 크게 저하된다. 말초 관용의 유도 동안 투여될 때, Tim-2Ig는 이식 관용을 촉진시킬 수 있다. 이들 데이터는 함께 Tim-2가 Th2 분화 세포 상에서 발현되고, Tim-2와 그의 리간드 사이의 상호작용의 차단이 Th2 반응을 팽창시켜 자가면역 질병 EAE의 발병 및 심도를 지연시키고 이식 관용을 증강시킴을 시사한다. 또한, 실시예는 Tim1/Fc 융합 폴리펩티드의 투여가 마우스 섬세포 이식 모델에서 동종이식 관용을 촉진시킴을 보여준다.

또한, 실시예는 Tim-4가 Tim-1에 대한 천연 리간드임을 입증하고, Tim-4 발현이 면역 구획으로 제한되고, 이 구획 내에서 Tim-4이 발현이 대식세포 및 수지상 세포 (DC)로 한정됨을 보여준다. 가용성 Ig 융합 폴리펩티드를 사용하여, Tim-4는 Tim-1에 특이적으로 결합하고, 이러한 상호작용은 항-Tim-1 항체에 의해 억제됨이 밝혀졌다. 또한, Tim-1-Ig의 생체내 투여는 T_H2 세포의 우선적인 팽창을 야기하지만, Tim-4-Ig는 T세포 증식을 자극하였다. 이들 실시예는 Tim-4-Tim-1 상호작용이 T세포의 팽창에 필요한 시그널을 전달한다는 모델을 지지한다.

실험 과정

항체, 마우스 및 Ig 융합 폴리펩티드

모든 동물 실험은 하버드 동물 의료 분야 상설 위원회 (Harvard Medical Area Standing Committee on Animals) (프로토콜 696)의 승인에 부합하도록 실시하였다. 모든 마우스는 잭슨 래보라토리즈 (Jackson Laboratories)에서 구입하였다. FACS 분석에 사용된 항체 (비디 파밍겐 (BD Pharmingen))는 FITC-표지된 항-마우스: B220, CD3e, CD11b, CD11c 및 CD4; PE-표지된 항-마우스: IFN- γ , IL-4, IL-10; 스트렙타비딘-PE, 및 특이적 동종형 대조군이었다. 2차 PE-표지된 검출 시약 염소 F(ab')₂ 항-인간 IgG, 염소 항-랫 Ig (H+L), 및 염소 항-마우스 IgG2a는 서던 바이오테크놀로지 (Southern Biotechnology)에서 입수하였다. 항-HA-비오틴 (클론 12CA5)는 로쉐 (Roche)에서 입수하였다. 항-Tim-3 (2C12)은 문헌 [Monney et al. (2002). Nature 415, 536-541]에 기재된 바 있고, 항-Tim-1 (3B3)은 최근에 생성되었다. 모든 Ig 융합 폴리펩티드는 키메리겐 (Chimerigen)에서 제조하였고, 목적하는 폴리펩티드의 세포외 영역을 huIgG Fc 테일에 융합한 것이다.

T_H1 및 T_H2 세포주 및 클론

AE7, 비둘기 시토크롬 c 특이적 T_H1 클론 및 D10.G4, 콘알부민 A 특이적 T_H2 클론을 문헌 [Sabatos et al. (2003). Nat Immunol 4, 1102-1110]에 기재된 바와 같이 휴지-자극 프로토콜에서 유지하였다. DO11.10 TcR Tg T_H1 및 T_H2 세포주를 문헌에 기재된 바와 같이 시험관 내에서 생성시키고, 성공적인 분극화를 세포내 시토킨 염색에 의해 각 라운드의 재자극 후에 확인하였다 (Monney et al. (2002). Nature 415, 536-541).

형질감염체

Tim-4 및 Tim-1 형질감염체를 pDisplay 벡터 (인비트로젠 (Invitrogen))에서 제조하였다. Tim-4를 프라이머: 5'-AGTCAGATCTGGGTTTTTGGGCCAGCCGGTG-3' (BglIII 부위는 이탤릭체로 표시됨) 및 5'-AGTCCTGCAGTCAGAGAGTGAAGATCCCG-3' (PstI 부위는 이탤릭체로 표시됨)를 사용하여 클로닝된 cDNA로부터 증폭하였다. 증폭 생성물에는 벡터의 N-말단 HA 태그의 절단을 방지하고 벡터의 시그널 서열을 이용하기 위해서 Tim-4 시그널 서열이 결합되었다. Tim-4-pDisplay 구성체를 GeneJuice (노바젠 (Novagen))을 사용하여 CHO 또는 HEK293 세포에 형질감염시키고, 안정한 형질감염체를 1.5 μ g/ml G-418 (김코 (Gibco))로 선택하였다. Tim-1을 프라이머 5'-AGTCAGATCTATGAATCAGATTCAAGTCTTC-3' (BglIII 부위는 이탤릭체로 표시됨) 및 5'-AGTCCTGCAGAGGTCTATCTTCAACAATG-3' (PstI 부위는 이탤릭체로 표시됨)를 사용하여 클로닝된 cDNA로부터 증폭하고, Tim-1-pDisplay 구성체를 상기한 바와 같이 HEK293 세포에 형질감염시켰다. CHO-Tim-1 세포는 FuGENE (로쉐)를 사용하여 CHO-K1 세포를 쥐 Tim-1 cDNA 및 푸로마이신-내성 유전자를 함유하는 pEF6으로 동시형질감염시켜 제조하였다. 세포를 푸로마이신 및 블라스티시딘을 사용하여 선택하고, 폴리클로날 래트 항-Tim-1 혈청을 사용하여 Tim-1 발현에 대해 유동 세포분석으로 분류한 후, 서브클로닝하였다. CHO-Tim-3 형질감염체는 문헌에 기재된 바 있다 (Monney et al. (2002). Nature 415, 536-541).

세포 분리 및 자극

CD11b⁺, CD11c⁺ 및 B220⁺ 세포를 MACS LS 분리 컬럼 (밀테니 바이오텍 (Miltenyi Biotec))에서 MACS 분류 (Sort) 자기 비드에 의한 양성 선택을 통해 비장 및 림프절로부터 정제하고, CD3⁺ T세포를 음성 선택 컬럼 (알앤디 시스템즈 (R&D Systems))에 의해 정제하였다. 세포의 순도를 유동 세포분석으로 조사하였다.

전체 비장세포 또는 정제된 CD11b⁺ 또는 CD11c⁺ 집단을 1 ng/ml LPS (시그마) 및 10 ng/ml IFN- γ (알앤디)로 42-48h 동안 자극하였다. T세포를 활성화시키기 위해서, 전체 비장세포 또는 정제된 CD3⁺ T세포를 42-48h 동안 1 μ g/ml 콘카나발린 A (ConA) (시그마)로 자극하였다. 또한, 정제된 CD3⁺ T세포를 37°C에서 2시간 동안 5 μ g/웰 항-CD3 (클론 145-2C11, 비디 파밍겐) 및 0.5 μ g/웰 항-CD28 (클론 37.51, 비디 파밍겐)으로 코팅된 24웰 플레이트에서 42-48h 동안 자극하였다. 모든 자극은 문헌 [Sabatos et al. (2003), Nat Immunol 4, 1102-1110]에 기재된, rIL-2 결여 완전 배지에서 수행하였다.

DC 생성

시험관내 DC 생성을 위해, 골수 세포를 CB6F1 대퇴골로부터 씻어내고, RBC를 용해시키고, 나머지 세포를 20 ng/ml GM-CSF 또는 200 ng/ml Flt3L을 사용하여 10⁶/ml로 플레이팅하였다. GM-CSF 자극을 위해 5일 또는 Flt3L 자극을 위해 8일 후에, 40 ng/ml LPS를 12-14시간 동안 일부 배양액에 첨가하였다. GM-CSF에 대해 6일 및 Flt3L에 대해 9일 후에 세포를 수거하였다. 상기한 MACS 자기 비드를 사용하여 CD86⁺ 세포에 대한 양성 선택에 의해 성숙 미엘로이드 세포를 GM-CSF 유도 DC로부터 분리하였다. Gr-1 항체를 사용한 MACS 음성 선택에 의해 Flt3L 유도 세포에서 과립구를 고갈시켰다 (주로 CD11c⁺ 집단을 생성시킴). 일부 Flt3L 유도 DC에는 MACS에 의한 B220⁺ 형질세포양 분획을 고갈시켰다.

생체내 DC 생성을 위해, CB6F1 마우스에게 2x10⁶개의 Flt3L 분비 CMS5 세포 (데빈 터너 (Devin Turner)로부터 기증받음)를 피하 주사하였다. 9일 후에 비장을 수거하고, 총 CD11c⁺ 집단을 상기 과립구 고갈에 의해 얻고, MACS 양성 선택을 사용하여 세포 표면 마커에 의해 DC 종류를 분리하였다.

정량적 TaqMan RT-PCR

트리졸 (Trizol) 방법 (인비트로젠)을 사용하여 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. 이어서, RNA를 RNeasy Mini 키트 (키아젠)을 사용하여 실온에서 15분 동안 0.6 단위/ μ g DNAase 1 (키아젠)을 사용하여 소화시켰다. ABI Prism TaqMan (등록상표) 역전사 시약 (프라이머로서 랜덤 헥사머 및 올리고 dT를 모두 사용)을 사용하여 1-2 μ g의 소화된 RNA에 대해 역전사를 수행하였다. Tim-4 및 내부 참조물 GAPDH의 발현 수준은 각각 6-카복시플루오레세인 (FAM) 또는 VIC (등록상표) (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems)) 및 켄쳐로서 TAMRA로 표지된 프로브를 사용하여 다중 PCR에 의해 동시에 측정하였다. Taqman 프라이머/프로브는 Tim-4 엑손 3:엑손 4 연결부를 커버하기 위해 Primer Express v1.0 소프트웨어 (어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 설계하였다. 프라이머는 5'-CACCTGGCTCCTTCTCACAA-3' 및 5'-TGATTGGATGCAGGCAGAGTT-3'이었고, 프로브는 6FAM-5'-AAAAGGGTCCGCCATCACTACAGAATCAG-3'-TAMRA이었다. GAPDH 프라이머 및 프로브 세트는 어플라이드 바이오시스템즈로부터 구입하였다. PCR은 Taqman (등록상표) Universal PCR Master Mix (어플라이드 바이오시스템즈) 및 ABI PRISM 7700 서열 검출 시스템을 사용하여 수행하였다. 비교 역치 사이클 (C_T)를 사용하여 유전자 발현을 측정하였다. 각각의 샘플에 대해, Tim-4 C_T 값은 식 $\Delta C_T = C_{T\text{TIM-4}} - C_{T\text{GAPDH}}$ 를 사용하여 정규화하였다. 상대적 발현을 결정하기 위해서, 평균 ΔC_T 를 결정하고, 상대적인 Tim-4 발현은 발현 2^{- ΔT} 를 사용하여 계산하였다.

항-Tim-1을 사용한 차단

350 μ g/ml 항-Tim-1 또는 항-Tim-3과 함께 병상에서 1시간 동안 미리 인큐베이션한 5 μ g/ml Tim-1-Ig로 Tim-4를 발현하는 세포를 염색하였다. 항-마우스 IgG2a-PE를 검출에 사용하였다. Tim-1을 발현하는 세포를 병상에서 350 μ g/ml 항-Tim-1 또는 항-Tim-3과 함께 1시간 동안 인큐베이션한 후에, 1 μ g/ml Tim-4-Ig를 혼합물에 첨가하고, 항-huIgG-PE로 검출하였다.

증식 분석 및 ELISA

암컷 SJL/J 마우스 (6-12주령)에게 각각의 옆구리에 완전 프로인트 보조제 (CFA) (디프코 (Difco)) 중에 유화시킨 50-100 μg PLP 139-151 펩티드 (HSLGKWLGHDPKF) (칼리티 콘트롤드 바이오케미칼스 (Quality Controlled Biochemicals))를 피하 주사하였다. 마우스에게 격일로 (면역처리와 동일한 날로 시작하여 0일 내지 8일까지) 100 μg Tim-1-Ig 또는 Tim-4-Ig, 100 μg 대조군 hIgG1 (시그마), 또는 PBS (Ig 융합 폴리펩티드와 동일한 부피로)을 복강내 (i.p.) 주사하였다. 마우스를 10일에 희생시키고, 비장을 분리하였다. 세포를 둥근 바닥 96웰 플레이트 (비디 팔콘 (BD Falcon))에서 PLP 139-151이 0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가된 완전 배지 중에서 5×10^5 세포/웰로 플레이팅하였다. 48h 후에, 배양 상등액을 시토킨 ELISA를 위해 분리하고, 플레이트를 $1 \mu\text{Ci}$ ^3H 티미딘/웰로 16-18h 동안 펠싱하였다. 도입된 방사성 티미딘을 베타 플레이트 섬광 계수기 (퍼킨 엘머 월락 인크 (Perkin Elmer Wallac Inc))를 사용하여 측정하였다. 데이터는 3중 웰에서 분당 평균 계수 (c.p.m.)로서 제시한다. 시토킨 생성은 문헌 [Sabatos et al. (2003). Nat Immunol 4, 1102-1110]에 기재된 바와 같이 정량적 포획 ELISA에 의해 측정하였다.

어떤 세포가 증식하였는지를 결정하기 위해서, 전체 비장세포를 상기한 바와 같이 B220⁺, CD11b⁺ 및 CD3⁺ 집단으로 분리하였다. 이어서, 3중 웰에서 총 부피 200 μl /웰로 2×10^5 의 각 종류의 APC와 함께 10^5 T세포를 사용하여 세포를 재조합하였다. 상기한 바와 같이 48시간 후에 증식을 측정하였다.

동시자극 분석

CD3⁺ T세포를 전체 림프절 세포로부터 정제한 후, 1시간 동안 37°C에서 조직 배양 접시 상에 플레이팅하여 임의의 잔류 APC를 제거하였다. 비부착 세포를 제거하고, 웰당 10^5 세포를 명세서에 나타난 농도의 항체 또는 융합 폴리펩티드로 코팅된 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 접종하였다. 플레이트를 37°C에서 2h 동안 코팅한 후, PBS로 2-3회 세척하였다. 48h 후에, 플레이트를 $1 \mu\text{Ci}$ ^3H 티미딘/웰로 16-18h 동안 펠싱하고, T세포의 증식을 3중 웰에서 ^3H 티미딘 도입에 의해 결정하였다. 통계적 유의성은 모든 반복 실험의 데이터를 사용하여 만-휘트니 (Mann-Whitney) 시험에 의해 결정하였다.

실시예 1: Th2 세포에서 Tim-2 발현의 확인

RNA 수준에서 Tim-2의 발현을 결정하기 위해서, 본 발명자들은 사이클 샘플 반정량적 PCR을 이용하였다. Tim-2은 비자극된 Th2 세포 클론에서 발현되었지만, Th1에서는 발현되지 않았다 (도 1A). Tim-2 메시지의 수준은 Th2 표현형을 향한 DO11.10 CD4⁺ T세포의 분극화시에 증가하였다 (도 1B). 이와 대조적으로, Tim-2 메시지의 양은 Th1 경로 하류에서 분극화된 세포에서 검출되지 않을 정도로 낮았다 (도 1B). 이들 데이터는 Tim-2가 Th1 세포보다 Th2 세포 상에서 차별적으로 발현됨을 시사한다.

실시예 2: Tim-1Ig 및 Tim-2Ig 융합 폴리펩티드의 제조

Tim-1 및 Tim-2의 잠재적인 리간드를 확인하고 Tim-1 및 Tim-2와 이들의 리간드(들) 사이의 생체내 기능적 관계를 확인하기 위해서, 본 발명자들은 Tim-1Ig 및 Tim-2Ig 융합 폴리펩티드를 제조하였다. 각 경우에, 세포외 IgV 및 뮤신 도메인을 코딩하는 cDNA를 인간 IgG1 Fc 테일을 코딩하는 cDNA에 융합시켰다. Tim-2 구성체는 NS.1 세포 내로 안정적으로 형질감염되고, Tim-1 구성체는 CHO 세포 내로 안정적으로 형질감염되었다. 생성되는 상등액으로부터 융합 폴리펩티드를 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

실시예 3: Tim-1 및 Tim-2 리간드의 활성화된 항원 제시 세포 상에서의 발현

Tim-1 및 Tim-2의 역할을 조사하기 위해서, 본 발명자들은 Tim-2 리간드를 발현하는 세포 집단을 확인하기 위해 Tim-2 융합 폴리펩티드를 이용하였다. 다양한 세포주를 Tim-1Ig 및 Tim-2Ig 융합 폴리펩티드로 염색하였다. 비활성화된 수지상 세포와 대식세포는 모두 Tim-1 리간드(들)의 낮은 발현을 보였다. 흥미롭게도, 무활동 집단은 Tim-2 리간드를 발현하지 않았다. 그러나, LPS 및 인터페론 감마 (IFN γ)로 활성화될 때, 수지상 및 대식세포 세포주는 Tim-1 리간드의 발현을 상향조절하고, Tim-2 리간드의 발현을 유도하였다 (도 2A 및 2B). Tim-1 및 Tim-2 리간드의 발현 증가는 상기 세포 서브셋에 대한 MHC 클래스 II, 및 B7-1 및 B7-2 발현의 상향조절과 동시에 발생하였다. 나이브하거나 특이적으로 활성화

되었거나를 불문하고 조사된 모든 정제된 T세포 집단은 Tim-1 및 Tim-2 리간드 모두에 대해 음성으로 염색되었다. 이 데이터는 함께 Tim-1 및 Tim-2 리간드(들)이 활성화된 수지상 세포 및 대식세포 상에서 발현됨을 나타내고, 이는 상호작용이 T세포 및 활성화된 항원-제시 세포를 수반함을 시사한다.

실시예 4. Tim-1 및 Tim-2 융합 폴리펩티드에 의한 T세포 증식 및 Th2 시토킨 생성의 유도

Tim-1 및 Tim-2가 Th2 세포 상에 발현되기 때문에, 본 발명자들은 생체내 면역 반응 내에서 상기 분자의 역할에 관심을 갖게 되었다. 이를 조사하기 위해서, SJL/J 마우스를 CFA 중의 PLP 139-151로 면역처리하고, Tim-1Ig, Tim-2Ig, 인간 IgG 또는 PBS (희석 대조군)를 투여하였다. 비장 및 림프절을 회수하고, 융합 폴리펩티드의 존재 하에 증식성 반응 및 시토킨 프로ファイルを 조사하기 위해 시험관 내에서 재자극하였다. 대조군 마우스로부터의 비장세포는 PLP 139-151에 대한 투여량 의존적 증가를 보였다 (도 3B 및 4B). 이와 대조적으로, Tim-1Ig 또는 Tim-2Ig로 처리된 마우스는 항원의 부재 하에 유의하게 더 높은 기초 증식성 반응을 보였고 (도 3A 및 4A), PLP 139-151의 존재 하에 약한 투여량 의존적 증식 증가를 보였다 (도 3B 및 4B). 상기 데이터는 Tim-1Ig 또는 Tim-2Ig로 처리하면 생체 내에서 세포가 과다활성화되어 세포가 시험관 내에서 항원의 부재 하에 계속 증식함을 시사한다.

상기 실험으로부터의 상등액을 재자극 48시간 후에 ELISA에 의해 IL-2, IFN γ , IL-4 및 IL-10의 생성에 대해 분석하였다. Tim-1Ig 및 Tim-2Ig 처리된 마우스로부터의 전체 비장세포는 관찰된 높은 기초 증식과 일치하게 다량의 IL-2를 분비하였다 (도 3C 및 4C). 흥미롭게도, 다량의 IL-4 및 IL-10, 및 거의 없거나 존재하지 않는 IFN γ 이 또한 Tim-1Ig 및 Tim-2Ig 처리된 마우스 모두로부터의 상등액에서 검출되었다 (도 3C 및 4C). hIgG 및 PBS 처리된 마우스 모두로부터의 세포는 IL-2 및 IFN γ 의 발현과 함께 Th1 프로ファイルを 보였다 (도 3C 및 4C). 항원의 부재하에 검출가능한 수준의 시토킨이 상등액에 존재하지 않았다. Tim-1Ig 및 Tim-2Ig 처리된 마우스로부터의 세포는 IL-2 분비 및 낮은 수준의 IL-4 및 IL-10을 보였지만, 이들은 항원성 재자극 시에 현저하게 증가하였다 (도 3C 및 4C). 이에 반해, 대조군 마우스로부터의 세포는 항원의 부재 하에 IL-2를 거의 내지 전혀 보이지 않았고 검출가능한 IFN γ 을 전혀 보이지 않았다 (도 3C 및 4C). 이들 결과는 함께 Tim-1Ig 및 Tim-2Ig가 Th2 타입 T세포 및 시토킨의 팽창을 야기할 수 있음을 시사한다. 또한, 상기 두 융합 폴리펩티드의 투여는 고편향 Th1 동물 모델에서 Th2 반응을 생성시킨다.

Tim-2Ig, hIgG 또는 PBS 마우스의 비장 및 림프절로부터의 넓은 항원 제시 세포 집단 및 T세포의 정제는 어떠한 세포 세트 (T, B, 대식세포 또는 DC)도 증식 항원 단독의 부재 하에 높은 기초 수준의 증식에 기능하지 않음을 보여주었다. 또한, 세포 서브셋도 항원의 부재 하에 관찰된 시토킨 프로ファイル에 기능하지 않았다. Tim-2Ig 처리된 마우스로부터의 세포에서 관찰된 배경 증식성 반응은 Tim-2Ig 처리된 동물 또는 대조군 동물로부터의 항원 제시 세포의 존재 하에 Tim-2Ig T세포를 사용하여 재구성될 수 있었다. Tim-2Ig 처리된 마우스로부터의 APC 집단을 대조군 마우스로부터의 T세포와 인큐베이션하면 높은 기초 증식성 반응이 생성되지 않았고, 이것은 APC가 관찰된 높은 증식성 배경에 기능하지 않음을 나타낸다. 또한, 시토킨 생성은 T세포가 항원 제시 세포와 배양될 때에만 검출되었고, TIM-2Ig 처리된 마우스로부터의 세포에서 관찰된 증식 및 Th2 시토킨 생성은 T세포와 APC 사이의 상호작용에 의존함을 시사한다.

실시예 5. EAE의 발병 및 심도를 지연시키기 위한 Tim-1 또는 Tim-2 융합 폴리펩티드의 투여

Th1계 환경에서 Th2 편향 면역 반응을 생성시키는 Tim-1Ig 및 Tim-2Ig의 능력 때문에, 본 발명자들은 Tim-1-Tim-1 리간드 및 Tim-2-Tim-2 리간드 상호작용이 Th1계 자가면역 질병의 유도 및 발병에 대해 갖는 영향에 관심을 갖게 되었다. 이 문제에 접근하기 위해, 본 발명자들은 실험적 자가면역성 뇌척수염 (EAE), Th1-매개 자가면역 질병 및 인간 질병 다발 경화증을 위한 마우스 모델을 유도하기 위해서 SJL/J 마우스를 뇌염유발 (encephalogenic) 펩티드 PLP 139-151로 면역화시켰다. 질병을 유도하기 위해서 SJL/J 마우스를 완전 프로인트 보조제 중의 PLP 139-151로 면역화시켰다. 질병에 대해 면역화시킨 마우스에도 Tim-1Ig, Tim-2Ig, hIgG 또는 PBS를 투여하고, 30일에 걸쳐 임상 징후를 모니터링하였다. hIgG 또는 PBS를 투여한 마우스는 예상된 재발형 질병 경로를 보였다 (도 5 및 6). 이와 대조적으로, Tim-2Ig 융합 폴리펩티드를 투여한 마우스는 면역화 24일 후까지 약간의 마비를 보이거나 전혀 보이지 않았다. Tim-2Ig 처리된 마우스는 대조군 처리 마우스보다 유의하게 더 낮은 1.5의 피크 임상 질병 스코어를 보였다 (도 5). Tim-1 Ig 처리된 마우스는 약간 지연된 질병 발병을 보였고, 또한 유의하게 더 낮은 질병 심도를 보였다 (도 6).

상기 데이터는 함께 Tim-1 및 tim-2가 Th2 세포 상에서 차별적으로 발현되고, 상기 융합 폴리펩티드의 생체내 투여가 Th1 편향 시스템에서도 Th2 반응을 생성시킴을 보여준다. 또한, Th1 매개 자가면역 질병의 유도 동안 마우스를 Tim-1Ig 또는 Tim-2Ig로 처리하면 임상 증상의 발병 및 심도를 지연시키고, 이는 치료 처리를 위한 가능한 표적을 제공한다.

실시예 6. Tim-2는 Th2 세포 상에 차별적으로 발현된다.

IL-12 및 항-IL-4 (Th1) 또는 IL-4 및 항-IL-12 (Th2) 조건 하에 항-CD3/CD28 자극을 사용하여 C57BL/6 및 Balb/c 마우스로부터의 나이브 T세포를 분극화시켰다. RNA를 세포를 추출하고, cDNA를 생성시켰다. 특이적 Taqman 프라이머 및 프로브를 사용하여 Tim-2 발현을 GAPDH에 대해 결정하였다. Tim-2 발현은 Th1 세포보다 Th2 세포에서 우선적으로 상향조절되었다 (도 7).

실시예 7. Tim-1 및 tim-2 리간드(들)은 활성화된 항원 제시 세포 상에서 발현된다.

B220 (B세포), GD11b (대식세포 및 수지상 세포) 및 CD11c (수지상 세포)를 Balb/c 마우스의 비장으로부터 정제하고, LPS 및 인터페론 감마로 활성화시켰다. 활성화 24시간 후에 세포를 hIgG (적색선), 비오틴화 Tim-1Ig (녹색선), 또는 비오틴화 Tim-2Ig (청색선)으로 염색하였다. 스트렙타비딘-PE를 2차 검출 시약으로 사용하였다. 모든 샘플은 유동 세포분석기로 분석하였다. Tim-1 리간드 및 Tim-2 리간드 발현 모두가 활성화된 항원 제시 세포 상에서 상향조절되었다 (도 8).

실시예 8. Tim1/Fc 융합 폴리펩티드의 투여는 마우스 섬세포 이식 모델에서 동종이식 관용을 촉진시킨다.

T세포 의존성 동종면역 반응, 거부 또는 관용의 결과는 종종 i) 세포병변 대 ii) 면역조절 T세포 사이의 균형에 의존한다. 본 발명자들의 이전 연구는 동종이식 관용을 촉진시키기 위한 Th1에서 Th2로의 면역 변형 메카니즘이 적어도 부분적으로 T 조절 기능의 증강에 있음을 제시한다. Tim1/Fc 또는 Tim2/Fc의 투여가 Th1에서 Th2로의 면역 변형을 유도할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 Tim1/Fc 및 Tim2/Fc 처리가 동종이식 관용을 촉진시킬 것이라고 가정한다.

본 발명자들은 부조직 및 주조직 적합성 장벽을 가로지른 섬세포 동종이식 모델을 이용하였다. 단일 요법으로서, Tim1/Fc를 사용한 짧은 경로 처리가 비처리군에서 28일의 평균 이식편 생존에 비해 부조직 적합성 장벽을 가로지른 3명 모두의 수령자에서 거부 방지 및 영구적인 섬세포 동종이식 생존에 충분하다 (도 9). 유사한 결과가 Tim2/Fc 처리된 수령자에서 관찰된다. Tim2/Fc 투여는 3마리의 수령자에서 섬세포 동종이식 거부의 유의한 지연 및 1마리의 수령자에서 영구적인 생착을 유도하였다 (도 10). 또한, 최적 투여량 미만의 항-CD154 (MR1) 항체와 조합한 Tim2/Fc 처리는 충분히 MHC-미스매칭된 엄격한 (stringent) 마우스 종 조합에서 5마리의 모든 수령자에서 영구적인 섬세포 동종이식 생착을 유도한다 (도 11).

상기 데이터는 Tim1/Fc 및 Tim2/Fc 처리가 Th1에서 Th2로의 면역 변형을 촉진하여 T 조절 기능을 증강시키고 동종이식 관용을 촉진시킴을 시사한다.

실시예 9: T 헬퍼 서브셋에서는 발현되지 않는 Tim-4의 대식세포 및 성숙 수지상 세포에서의 발현

지금까지 특성화된 Tim 분자는 T세포 반응에 관련되기 때문에 (Kuchroo et al. (2003). Nat Rev Immunol 3, 454-462), 본 발명자들은 먼저 Tim-4도 면역 장기에서 발현되는지를 결정하였다. 다중 조직 cDNA 패널에 대한 실시간 정량적 PCR은 Tim-4 mRNA가 마우스 비장 및 림프절에서 발현되고, 폐, 간 및 흉선에서는 매우 낮게 발현됨을 보여주었다 (도 12A). 면역 장기에 대한 이러한 명백한 제한은 Tim-4가 면역학적으로 관련되는 분자임을 시사하였다.

다음으로 본 발명자들은 Tim-4가 또한 T_H1 대 T_H2 서브셋에서 차별적으로 발현될 수 있는지를 분석하였다. 본 발명자들은 T_H1 (AE7) 및 T_H2 (D10.G4) 클론에서 및 T_H1 또는 T_H2 계통으로 시험관 내에서 분극화시킨 DO11.10 트랜스제닉 T세포 내에서 Tim-4 mRNA 발현을 검출하기 위해서 정량적 PCR을 사용하였다. 이들 세포는 Tim-4 발현의 동역학을 결정하기 위해서 각 라운드의 분극화 후에 분석하였다. 제3 라운드의 시험관내 분극화 시에 상기 T_H1 세포가 Tim-3을 특이적으로 발현하고, T_H2 세포가 Tim-2를 특이적으로 발현하지만 (Monney et al. (2002). Nature 415, 536-541), 4라운드의 분극화를 통해 Tim-4 mRNA가 T_H1 또는 T_H2 세포에서 검출되지 않았다 (도 12B). 따라서, Tim-4는 지금까지 특성화된 다른 Tim 분자와는 상이한 면역계 내의 발현 패턴을 갖는 것으로 보였다. Tim-4 mRNA가 비장에서 고도로 발현되기 때문에, 본 발명자들은 다음으로 비장 내의 어느 세포 종류가 Tim-4 mRNA를 발현하는 지를 분석하였다. CD11b⁺, CD11c⁺ 및 B220⁺ 세포 (주로 각각 대식세포, 수지상 세포 및 B세포를 나타냄)를 SJL/J 또는 C57BL/6 마우스의 비장으로부터의 양성 선택에 의해 분리하였다. 상기 세포에 대해 수행한 정량적 RT-PCR은 CD11b⁺ 및 CD11c⁺ 세포에서 높은,

그리고 B220⁺ 서브셋에서는 보다 낮은 정도의 Tim-4 mRNA 발현을 보였다 (도 12C). 그러나, 본 발명자들은 T세포에서 Tim-4 mRNA를 검출하지 못했다. 따라서, Tim-4는 비장의 항원 제시 세포 (APC)에서는 발현되지만 T세포에서는 발현되지 않는 것으로 보였다.

항원 제시 세포가 극히 이종성의 세포군을 제시하기 때문에, 본 발명자들은 어떤 종류의 APC가 Tim-4 mRNA를 우세하게 발현할 수 있는지를 확인하고자 하였다. 상기 전문적인 항원 제시 세포의 상이한 집단이 상이한 종류의 T 헬퍼 세포 반응을 우선적으로 유도하는 것으로 보고되었기 때문에 (Eisenbarth et al. (2003). Curr Opin Immunol 15, 620-626; Rissoan et al. (1999). Science 283, 1183-1186), 본 발명자들은 수지상 세포 서브셋에 주목하였다. 수지상 세포는 지질 다당체 (LPS)가 부가되거나 부가되지 않은 상태로 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF) 또는 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드 (Flt3L)와 함께 인큐베이션된 골수세포로부터 시험관 내에서 생성시켰다. GM-CSF-유래 DC는 주로 골수양 계통인 반면, Flt3L 처리는 골수양 및 림프양 DC 종류의 혼합 세포를 생성시킨다 (Brasel et al. (2000). Blood 96, 3029-3039; Gilliet et al. (2002). J Exp Med 195, 953-958; Maraskovsky et al. (1996) J Exp Med 184, 1953-1962). LPS 처리는 Flt3L-처리된 배양액에서 DC를 성숙시키고 림프양 DC를 우선적으로 성장시킨다 (Brasel et al. (2000). Blood 96, 3029-3039). Tim-4 mRNA는 Flt3L에 의해 생성되고 LPS로 성숙시킨 세포에서 가장 크게 발현되었다 (도 12D). 상기 Tim-4 양성 세포는 이들 집단에 B220⁺ 세포가 고갈되었기 때문에 림프양 계통이고, 형질세포양 계통이 아니었다. 발현은 미성숙 또는 성숙 골수양-종류 DC에서 발견되지 않았다. 상기 Tim-4 mRNA 발현의 관찰을 성숙 림프양 수지상 세포에서 추가로 조사하기 위해서, 마우스를 Flt3L-생성 세포로 처리하고, 처리된 마우스로부터의 비장세포를 상이한 집단으로 분류하였다. 이전의 관찰과 일관되게, 가장 높은 Tim-4 발현은 CD11c 및 CD8을 모두 발현하는 가장 성숙한 수지상 세포에서 관찰되었다 (Martinez del Hoyo et al. (2002). Blood 99, 999-1004) (도 12E). 상기 데이터는 함께 Tim 패밀리의 다른 멤버와는 달리 Tim-4가 T세포에서 발현되지 않고, 대신에 APC, 특히 성숙 DC에 존재함을 나타낸다.

Tim-4가 폴리펩티드로서 발현될 수 있는지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 N-말단 HA 태그를 갖는 Tim-4를 코딩하는 cDNA로 CHO 및 HEK293 세포를 형질감염시키고, 항-HA 항체 염색에 의해 두 세포 종류의 표면 상에서 그의 발현을 관찰할 수 있었다 (도 14, 15). 또한, 본 발명자들은 항-HA를 사용하여 상기 세포로부터 ~60 kDa의 밴드를 면역블롯팅시킬 수 있음을 입증할 수 있었다. 상기 데이터는 Tim-4가 mRNA 수준에서 존재할 뿐만 아니라 기능적 폴리펩티드로 번역될 수 있음을 시사한다.

실시예 11: 활성화된 T세포 및 B세포 상의 Tim-4 리간드의 발현

잠재적인 Tim-4 리간드 (Tim-4L)의 발현 패턴을 확인 및 분석하기 위해, 본 발명자들은 인간 IgG1 Fc 테일에 융합된, Tim-4의 세포외 IgV 및 뮤신 도메인으로 구성된 가용성 Ig 융합 폴리펩티드 (Tim-4-Ig)를 생성시켰다. 상기 융합 폴리펩티드를 SJL/J 마우스 비장에서 Tim-4L의 발현을 검출하기 위해 유동 세포분석에 사용하였다. 비자극된 비장에서, Tim-4L은 B (B220⁺) 세포 집단에서 발견되었지만, T (CD3⁺) 세포에서는 발견되지 않았으나, LPS 및 인터페론 (IFN)- γ 처리에 의한 활성화시에 Tim-4L은 대부분의 B세포에서 및 대부분의 ConA-활성화된 T세포에서 발견되었다 (도 13). 따라서, Tim-4가 항원 제시 세포에서 발현되지만, Tim-4L은 활성화된 B 및 T세포에서 발현되는 것으로 보였다. 이러한 발현 패턴 및 Tim 패밀리 멤버 사이의 구조적 유사성 때문에, 본 발명자들은 Tim-4가 활성화된 T세포 상에서 발현되는 기확인된 Tim 분자의 하나와 상호작용할 수 있는지를 조사하였다. Tim-3은 모든 활성화된 T세포 상에서 발현되지 않고, 말단 분화된 T_H1 세포 상에서만 상향조절되고, B세포 상에서 발현되지 않는다. 따라서, Tim-3은 Tim-4에 대한 리간드로서 기능하는 것으로 보이지 않지만, Tim-1 및 Tim-2는 Tim-4와의 상호작용을 위한 잠재적인 후보자이었다.

실시예 12: Tim-4에 대한 내인성 리간드로서 Tim-1의 확인

Tim-4가 다른 Tim 분자와 상호작용할 수 있는지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 Tim-1, Tim-3 또는 Tim-4를 세포 표면에 발현하는 CHO 세포 형질감염체를 이용하고, 세포 표면 염색을 위해 상이한 Tim 융합 폴리펩티드 (Tim-1-Ig, Tim-2-Ig, Tim-4-Ig)를 이용하였다. Tim-4-Ig는 Tim-1 형질감염체에 결합하지만 Tim-3 또는 Tim-4에는 결합하지 않았다 (도 14A). 반대로, Tim-1-Ig는 Tim-4 형질감염체에는 결합하지만 Tim-1 또는 Tim-3 형질감염체에는 결합하지 않았다 (도 14A). Tim-1 IgV 및 뮤신 도메인을 포함하는 전체 길이 Tim-1-Ig 또는 IgV 도메인만을 포함하는 Tim-1-Ig을 이용할 때, Tim-1-Ig 융합 폴리펩티드에 의한 Tim-4 형질감염체의 염색이 관찰되었다 (도 14A). 이와 대조적으로, Tim-2-Ig 융합 폴리펩티드 (또한 세포외 IgV 및 뮤신 도메인으로 구성됨)는 분석된 어떠한 형질감염체도 염색하지 않았고, 어느 융합 폴리펩티드도 CHO-Tim-2 형질감염체에 결합하지 않았다. 이 데이터는 Tim-4가 Tim-1과 상호작용하지만, Tim-1과 상동성을 갖는 Tim-2와는 상호작용하지 않음을 보여준다 (McIntire et al. (2003). Nature 425, 576).

상기 상호작용의 특이성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 항-Tim-1 모노클로날 항체가 Tim-1-Tim-4 결합을 차단할 수 있는지 시험하였다. 상기 항체는 Tim-1 분자의 IgV 구역에 대하여 생성시켰고, 따라서 Tim-1 뮤신 도메인과는 상호작용하지 않아야 한다. 먼저, 전체 길이 Tim-1을 발현하는 Tim-1 형질감염체를 항-Tim-1과 인큐베이션한 후, Tim-4-Ig로 염색하였다. 상기 항-Tim-1과의 예비 인큐베이션은 Tim-1 형질감염체에 대한 Tim-4-Ig 결합을 감소시켰지만, 결합을 완전히 제거하지는 않았다. 이와 대조적으로, 항-Tim-3 (대조군으로서) (Monney et al. (2002). Nature 415, 536-541)과의 인큐베이션은 Tim-4-Ig 결합에 거의 영향을 주지 않았다 (도 14B). 상기 차단 불완전한 특성은 Tim-1 형질감염체가 전체 길이 Tim-1 분자를 발현하지만, 항체가 IgV 도메인에만 결합한다는 사실에 기인할 가능성이 있고, 따라서 Tim-4와 Tim-1 사이의 상호작용의 일부는 Tim-1 뮤신 도메인을 수반할 수 있음을 나타낸다. 대등한 실험에서, Tim-1-Ig 융합 폴리펩티드 (Tim-1 IgV 도메인만을 포함)를 항-Tim-1과 예비 인큐베이션한 후, Tim-4 형질감염체 염색에 이용하였다. 항-Tim-1과 Tim-1-Ig의 인큐베이션은 Tim-4 형질감염체에 대한 융합 폴리펩티드의 결합을 완전히 제거하였지만, 항-Tim-3과의 인큐베이션은 그의 결합을 변경시키지 않았다 (도 14B). 상기 실험은 함께 형질감염체에서 관찰된 염색이 Tim-4와 Tim-1 사이의 특이적인 상호작용을 나타내고, 이것은 항-Tim-1 항체와의 사전 인큐베이션에 의해 차단될 수 있음을 나타내었다.

실시예 13: Tim-4가 Tim-1-함유 T세포에 특이적으로 결합함의 입증

형질감염된 세포에 대한 Tim-4와 Tim-1 사이의 시험관내 상호작용을 관찰한 후에, 본 발명자들은 상기 상호작용이 T세포 상에서 자연 발현되는 Tim-1과도 발생할 수 있는지 결정하고자 하였다. 본 발명자들은 이전에 Tim-4-Ig가 활성화된 T세포를 염색한 것을 관찰하였기 때문에 (도 13), 나이브 SJL/J 마우스로부터의 CD3⁺ T세포가 활성화된 후, Tim-1의 발현 및 Tim-4-Ig에 결합하는 그의 능력에 대해 평가하였다. Tim-1은 비활성화된 T세포에서 최소로 발현되었고, 활성화시에 T세포에서 상향조절되었다 (도 15A). 이러한 Tim-1 발현 패턴은 다른 연구자에 의해 관찰된 것과 일치하였다. Tim-4-Ig의 상기 T세포에 대한 결합은 Tim-4-Ig가 활성화된 T세포는 염색하지만 비활성화된 T세포는 염색하지 않았다는 점에서 Tim-1 발현과 직접적인 밀접한 관계가 있다. 이러한 Tim-4-Ig의 활성화된 T세포에 대한 결합은 항-Tim-1에 의해 부분적으로 차단되지만 항-Tim-3에 의해 차단되지 않았다 (도 15B). Tim-1 형질감염체에서 관찰된 바와 같이, Tim-4-Ig의 활성화된 T세포에 대한 차단은 완전하지는 않았다. 이것은 IgV에 추가하여, Tim-1 뮤신 도메인도 Tim-1-Tim-4 상호작용에 관련되어, IgV 도메인에만 결합하는 항체가 활성화된 T세포 상에서 Tim-4-Ig의 Tim-1에 대한 결합을 완전히 억제할 수는 없다는 개념을 추가로 지지한다.

활성화된 T세포 상의 Tim-4와 Tim-1 사이의 명백한 상호작용을 가정하여, 본 발명자들은 상기 상호작용이 활성화된 T_H1 또는 T_H2 세포 상에서 우선적으로 발생하는지 조사하고자 하였다. 이러한 목적에서, 본 발명자들은 활성화된, 시험관내-분극화된 DO11.10 TCR 트랜스제닉 T_H1 및 T_H2 세포 상에서 Tim-4-Ig의 결합을 시험하고, 동시에 상기 세포를 Tim-1의 발현에 대해 조사하였다. Tim-1이 활성화된 T_H1 및 T_H2 세포 모두에서 발현되지만, T_H1 세포에 비해 활성화된 T_H2 상에서 보다 크게 발현되었다 (도 15C 및 15D). Tim-1 발현과 일치하게, Tim-4-Ig는 T_H1 세포보다 보다 큰 비율의 T_H2 세포를 염색하였다. 상기 세포의 T_H1 및 T_H2 서브셋의 성공적인 분극화는 세포내 염색에 의해 확인하였고, 이는 분극화된 T_H1 세포가 다량의 IFN- γ 를 생성하지만 인터류킨 (IL)-4 또는 IL-10은 거의 생산하지 않았고, 이와 대조적으로 T_H2 세포는 다량의 IL-4 및 IL-10을 생성하지만, IFN- γ 는 거의 생성하지 않았음을 보여주었다 (도 15C 및 15D). 상기 데이터는 Tim-4-Ig가 활성화된 T세포에 결합할 수 있고, 분극화 시에 T_H1 세포보다 T_H2에 보다 큰 결합이 존재함을 입증하였다.

실시예 14: 수지상 세포 및 대식세포 상의 Tim-1L의 발현

Tim-4가 대식세포 및 DC에서 발현되지만 T세포에서는 발현되지 않기 때문에, 본 발명자들은 가용성 Tim-1-Ig가 정상적인, 생체 내에서 유래한 대식세포 및 DC에 결합하는지 분석하였다. 실제로, 생체 내에서 유래한 대식세포 및 DC (정제된 CD11b⁺ 및 CD11c⁺ 비장 서브셋)는 Tim-1-Ig에 특이적으로 결합한 후, LPS 및 IFN- γ 로 활성화되었다. 이와 대조적으로, 비활성화되거나 활성화되거나를 불문하고 조사된 어떠한 정제된 T세포 집단 (CD4⁺ 또는 CD8⁺)도 Tim-1-Ig에 결합하지 않았다. 관찰된 염색이 특이적인지를 확인하기 위해, 본 발명자들은 항-Tim-3을 대조군으로 사용하여 항-Tim-1을 사용한 차단 연구를 수행하였다. 항-Tim-1과 함께 Tim-1-Ig의 예비 인큐베이션은 활성화된 CD11b⁺ 및 CD11c⁺ 세포에 대해 관찰된 염색을 억제하였다 (도 16). 항-Tim-3을 사용한 예비 인큐베이션에 의해 어떠한 염색 억제도 관찰되지 않았고, 이것은 관찰된 염색이 Tim-1과 그의 리간드를 발현하는 대식세포 및 DC 사이의 특이적인 상호작용에 의한 것임

을 확인한 것이다. 이들 연구는 생체 내에서 유래한 CHO 형질감염체에 대해 결합을 조사할 때 Tim-1 및 Tim-4가 상호작용할 뿐만 아니라 Tim-4-Ig가 활성화된 T_H2 세포에 강력하게 결합하고 (T_H1 세포에 대한 약한 결합도 관찰되지만), Tim-1-Ig이 생체 내에서 유래한 활성화된 대식세포 및 DC에 결합함을 입증하였다.

실시예 15: 생체내 Tim-1-Ig 투여는 $Th2$ 반응을 증가시킨다.

Tim-1이 모든 활성화된 T세포 상에서 발현되기 때문에, 본 발명자들은 Tim-1과 Tim-4의 상호작용이 모든 T세포의 팽창 및 효과제 기능을 조절하는 기능을 수행할 수 있는 것으로 가정하였다. 그러나, Tim-1이 T_H1 세포보다 T_H2 세포 상에서 보다 크게 발현되기 때문에 상기 효과는 T_H2 세포에 대해 더 클 수 있다. Tim-1은 많은 조직에서 발현되고, 그의 세포 내 테일은 추정되는 티로신 인산화 모티프를 포함하지만, Tim-4 mRNA 발현은 주로 비장 및 림프절로 제한되고, 그의 테일에는 추정되는 신호전달 모티프가 결여되어 있다. 따라서, 본 발명자들은 APC의 표면 상의 Tim-4에 특이적으로 결합하고 Tim-4와 클러스터를 함께 형성하고 Tim-1을 통해 T세포로 전달되는 시그널을 증강시키거나 Tim-1과 Tim-4 사이의 상호작용을 차단할 것으로 예상되는 가용성 Tim-1-Ig로 마우스를 처리하기로 하였다. 생체내 면역 반응 동안 Tim-1-Ig 투여의 기능적 효과를 조사하기 위해서, 본 발명자들은 효능있는 T_H1 반응을 유도하는 단백질 폴리펩티드 (PLP) 139-151 펩티드로 면역화시킨 SJL/J 마우스에서 T세포 반응에 대한 Tim-1-Ig 처리 효과를 시험하였다.

완전 프로인트 보조제 (CFA) 중에 유화시킨 PLP 139-151 펩티드로 면역화시킨 SJL/J 마우스에게 Tim-1-Ig 또는 대조시약 (PBS 또는 인간 IgG1)을 투여하였다. 면역화시키고 처리된 마우스로부터의 비장세포를 시험관 내에서 증식성 및 시토킨 반응에 대해 시험하였다. 대조군 인간 IgG1 (hIgG) 또는 PBS로 면역화시키고 처리된 마우스로부터의 비장세포는 항원의 부재 하에 배경 증식을 거의 보이지 않았다. 이와 대조적으로, Tim-1-Ig-처리된 마우스는 시험관내 항원성 재자극의 부재시에도 현저한 기초 증식을 보였다 (도 6a). PLP 항원을 사용한 재자극 시에, 두 대조군으로부터의 세포는 PLP 139-151에 대해 특이적인 투여량 의존적 증식을 보였다. 그러나, Tim-1-Ig-처리된 마우스로부터의 비장세포는 항원 부가시에 배경보다 약간 더 큰 증식의 증가를 보였다 (도 17A). 유사하게, 높은 배경 증식은 임의의 펩티드 없이 CFA 단독으로 면역화되고 Tim-1-Ig로 처리된 마우스로부터 관찰되었고, 이것은 상기 증식성 반응이 특이적 항원으로 제한되지 않음을 나타낸다. 상기 데이터는 Tim-1-Ig를 사용한 처리가 생체 내에서 세포의 과다활성화를 야기하여 세포가 항원성 자극 없이 시험관 내에서 계속 증식함을 시사한다.

상기 실험으로부터의 상등액을 IL-2, IFN- γ , IL-4 및 IL-10의 생성에 대해 ELISA로 분석하였다. Tim-1-Ig-처리된 마우스로부터의 비장세포는 항원성 자극의 부재시에 다량의 IL-2를 분비하였고, 이것은 관찰된 높은 기초 증식과 일치하였다. 다량의 IL-10 및 IFN- γ 도 재활성화 없이 생산되었고, 면역화된, 대조군 (hIgG 및 PBS)-처리된 마우스로부터의 비장세포는 시험관내 항원성 자극의 부재 시에 훨씬 더 낮은 배경 시토킨 생성을 보였다. 단지 소량의 IL-4가 재활성화 없이 Tim-1-Ig-처리된 세포에서 생성되었지만, 어느 것도 대조군-처리된 세포로부터 검출될 수 없었다. 이것은 PLP 펩티드를 사용한 SJL/J 마우스의 면역화가 효능있는 T_H1 반응을 유도하고 T_H2 반응을 억제한다는 사실 때문일 수 있다. 시험관 내에서 PLP 139-151을 사용한 재자극시에, 대조군 처리된 마우스로부터의 세포는 IL-2 및 IFN- γ 의 생성을 보이는 예상된 T_H1 프로필을 보였다 (도 17B). Tim-1-Ig 처리된 마우스로부터의 비장세포는 상기 세포에서 관찰된 지속적인 비투여량 의존적 증식과 일치하게 재자극 시에 IL-2를 계속 생산하였다 (도 17C). 대조군 처리된 마우스로부터의 세포와 대조적으로, Tim-1-Ig-처리된 마우스로부터의 비장세포는 항원성 재자극시에 다량의 IL-4 및 IL-10을 생산하였고, 이것은 Tim-1-Ig 처리가 재활성화시에 T_H2 세포를 우선적으로 팽창시킴을 나타낸다. SJL/J 마우스를 너염유발 PLP 펩티드로 면역화시키면, T_H1 세포 및 시토킨을 유도하지만 (PBS 및 hIgG-처리된 대조군 마우스에서 보이는 바와 같이), Tim-1-Ig 처리는 항원-특이적 IFN- γ 생성을 억제하였다 (도 17B). CFA 중의 PLP 139-151로 면역화시킨 SJL/J 마우스는 현저한 T_H1 반응을 발생시키고, 이러한 세팅으로 투여된 Tim-1-Ig은 IFN- γ 생성을 억제하면서 T_H2 시토킨 (IL-4 및 IL-10)을 생성시켰다.

T_H2 -편향 면역 반응에서도 이와 같은 사실이 적용되는지를 결정하기 위해서, 본 발명자들은 Balb/c 마우스를 명반 중 OVA 323-339 펩티드로 면역화시키고, 상기과 같이 Tim-1-Ig를 투여하였다. 상기 T_H2 편향 조건 하에서, Tim-1-Ig은 또한 IL-2, IL-4 및 IL-10 시토킨의 생산이 증가하지만 IFN- γ 는 증가하지 않으면서 기초 증식을 증강시켰다 (도 19). 상기 결과는 함께 Tim-1-Ig이 생체내 Tim-1-Tim-4 상호작용에 영향을 끼쳐 T세포의 과다활성화를 야기하여 이들 세포는 생체 외에서 계속 증식하고 T_H1 (IL-2 및 IFN- γ) 및 T_H2 (IL-4 및 IL-10) 시토킨을 모두 생산하였다. Tim-1-Ig-처리된 마우스로부터의 비장세포는 항원성 재자극이 없는 상태에서 유의한 양의 IL-2, IFN- γ 및 IL-10을 계속 생산하였지만, 시험관 내에서 항원을 사용한 상기 세포의 재활성화는 T_H1 -편향 면역화 프로토콜에서도 T_H1 반응 및 T_H2 세포 팽창

의 억제를 야기하였다. 이것이 활성화-유도된 세포 사멸에 의한 T_H1 세포의 우선적인 고갈 또는 T_H2 세포의 팽창에 의한 것인지는 미해결 상태이다. 상기 데이터로부터, Tim-1이 음성 또는 양성 시그널을 생체 내에서 전달하는지, 즉 Tim-1-Ig이 음성 상호작용을 차단하거나 Tim-1과 Tim-4 사이의 양성 상호작용을 촉진시키는 지는 불명확하였다. 본 발명자들은 따라서 Tim-1에 직접 결합하는 시약이 생체내 및 시험관 내에서 가질 수 있는 효과를 밝히기 위해서 Tim-1에 결합하는 Tim-4-Ig을 사용하였다.

실시예 16: Tim-4-Ig은 T세포 팽창을 동시자극한다.

Tim-4-Ig이 T세포 증식 및 시토킨 생성을 자극하거나 억제할 수 있는지를 밝히기 위해, 본 발명자들은 CFA 중의 PLP 139-151로 면역화시킨 SJL/J 마우스를 상기한 바와 같이 Tim-4-Ig, hIgG 또는 PBS로 처리하였다. 처리된 마우스로부터의 비장세포를 다시 증식성 및 시토킨 반응에 대해 시험관 내에서 시험하였다. Tim-1-Ig-처리된 비장세포에 유사하게, Tim-4-Ig-처리된 비장세포는 항원 재자극의 부재 하에 높은 기초 증식을 보였다 (도 18A). 또한, Tim-4-Ig-처리된 비장세포는 재자극 없이 다량의 IL-2 및 IFN- γ 를 생산하지만, 저농도의 IL-4 및 IL-10을 생성시켰다. Tim-4가 T세포 상에서 발현되는 Tim-1에 결합하기 때문에, 본 발명자들은 높은 배경 증식이 T세포 또는 다른 세포 종류의 과다증식에 의한 것인지 의문시하였다. 상기 높은 배경 반응의 원인이 되는 세포의 정체를 밝히기 위해서, 본 발명자들은 Tim-4-Ig 및 hIgG-처리된 비장세포를 CD11b⁺, B220⁺ 및 CD3⁺ 집단으로 분리한 후, 이들을 단독으로 배양하거나 시험관 내에서 재조합하여 항원성 재자극 없이 증식하는 그들의 능력을 측정하였다. Tim-4-Ig-처리되었으나 hIgG-처리되지 않은 T세포는 APC의 부재 하에 증식하였고, APC 집단은 단독으로 증식하지 못했다 (도 18B). 그러나, Tim-4-Ig-처리된 T세포를 임의의 APC 집단과 조합할 때, 훨씬 더 높은 증식이 검출되었다. 이러한 T세포 증식의 결과는 Tim-4-Ig 또는 hIgG-처리된 마우스로부터의 APC가 대등한 양의 T세포 증식을 유도할 수 있기 때문에 APC 공급원에 의존하지 않았다. hIgG-처리된 T세포를 포함하는 임의의 배양액으로부터는 유사한 증식성 반응이 관찰되지 않았다. 상기 데이터는 Tim-4-Ig-처리된 비장세포에 의한 과다 증식이 전적으로 T세포에 대한 Tim-4-Ig의 효과 때문임을 나타내었다.

T세포가 Tim-4-Ig에 의해 가장 많이 영향받는 집단임을 확인한 후에, 본 발명자들은 Tim-4-Ig가 T세포를 시험관 내에서 직접 동시 자극할 수 있는지 평가하였다. 정제된 SJL/J CD3⁺ T세포를 Tim-4-Ig (또는 대조군으로서 hIgG 또는 hCTLA4-Ig)와 함께 항-CD3 및 항-CD28로 자극하였다. Tim-4-Ig가 T세포 상의 Tim-1에 결합하고 APC가 시스템에 존재하지 않기 때문에, 차단되는 천연 Tim-4-Tim-1 상호작용은 존재하지 않았다. 따라서, 관찰된 임의의 효과는 T세포 내로의 Tim-1 신호전달을 통해 매개되는 것으로 예상되었다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 사용된 Tim-4-Ig의 농도에 따라 정량적으로 상이한 결과를 관찰하였다. T세포가 항-CD3 + 항-CD28로 최적 미만으로 자극될 경우 (도 18C, 좌측 패널), 본 발명자들은 Tim-4-Ig의 부가시에 증식의 큰 증가를 관찰하였다. 본 발명자들은 또한 Tim-4-Ig의 낮은 농도에서 증식의 경미한 억제를 관찰하였다 ($p=0.03$). 대조군 hIgG 또는 hCTLA4-Ig의 부가는 항-CD3 + 항-CD28-매개 증식에 거의 효과를 보이지 않았다. 또한, Tim-4-Ig은 항-CD3 단독과 조합될 때 증식을 변경시키지 않았고, 이것은 T세포 팽창을 자극하기 위해서 CD3 및 CD28 모두의 신호전달을 필요로 함을 나타낸다. Tim-4-Ig가 실제로 저농도에서 T세포 증식을 억제하는지 밝히기 위해, 정제된 CD3⁺ T세포를 보다 고농도의 항-CD3 + 항-CD28로 자극하고 (도 18C, 우측 패널), 다시 Tim-4-Ig가 T세포 팽창에 어떻게 영향을 끼치는지 조사하기 위해 분석하였다. 항-CD3 + 항-CD28 단독은 상기 T세포로부터의 다량의 증식을 유도하였고, 보다 저농도의 Tim-4-Ig의 부가는 상기 증식을 강하게 억제하였다 ($p=0.007$). 보다 고농도의 Tim-4-Ig에서, 증식은 정상으로 복귀하거나, 항-CD3 + 항-CD28 단독시에 관찰된 것보다 증가되었다 (도 18C). 종합적으로 판단할 때, 가장 가능성 있게는 T세포 상에서 그의 리간드를 가교결합시켜 활성화 시그널을 전달함으로써 Tim-4-Ig이 T세포 증식을 동시 자극할 수 있는 것임이 분명하다.

서열 목록

서열 1: Tim-1 인간 폴리펩티드 (NP_036338)

MHPQVVLISLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCHYSGAVTSMCWNRRGS
CSLFTCQNGIVWTNGTHVTYRKDTRYKLLGDLSSRDVSLTIENTAVSDSGV
YCCRVEHRGWFNMDKITVSLEIVPPKVTTTPIVTTVPTVTTVRTSTTVPTTTT
VPTTTVPTTMSIPTTTTVPPTMTVSTTTSVPTTTTSIPTTTTSVPVTTTVSTFVPPM
PLPRQNHEPVATSPSSPQPAETHPTTLQGAIRREPTSSPLYSYTTDGNDDTVTES
SDGLWNNNQTLFLEHSLLTANTTKGIYAGVCISVLVLLALLGVIIAKKYFF
KKEVQQLSVSFSSSLQIKALQNAVEKEVQAEDNIYIENSLYATD

서열 2; Tim-1 마우스 폴리펩티드 (NP_599009)

MNQIQVFISGLILLPGTVDSYVEVKGVVGHVPTLPCTYSTYRGITTCWGR
GQCPSSACQNTLIWTNGHRVTYQKSSRYNLKGHISEGDVSLTIENSVESDSG
LYCCRVEIPGWFNDQKVTFSLQVKPEIPTRPPTRPTTTRPTATGRPTTISTRST
HVPTSIRVSTSTPPTSTHTWTHKPEPTTFCPHETTAEVTGIPSHPTDWNQTV
TSSGDTWSNHTEAIPPGKPQKNPTKGFYVGICIAALLLLLVTVAITRYILM
KRKSASLSVVAFRVSKIEALQNAAVVHSRAEDNIYIVEDRP

서열 3; Tim-4 인간 폴리펩티드 변이체 #1

MSKEPLILWLMIEFWWLYLTPVTSETVVTEVLGHRVTLPCLYSSWSHNSNS
MCWKGDKCPYSGCKEALIRTDGMRVTSRKSADYRLQGTIPRGDVSLTILNP
SESDSGVYCCRIEVPWFNDVKINVRNLQRASTTTHTATTTTTRTTTTSP
TTTRQMTTTPAALPTTVVTPDLTTGTPLQMTTIAVFTTANTCLSLTPSTLPE
EATGLLTPEPSKEGPILTAESVTLPSDSWSSAESTSADTVLLTSKESKVWDL
PSTSHVSMWKTSDSVSSPQPGASDTAVPEQNKTKTGQMDGIPMSMKNE
PISQLLMIIAPSLGFVLFALFVAFLLRGKLMETVCSQKHTRLDYIGDSKNVLN
DVQHGREDGLFTL

서열 4; Tim-4 마우스 폴리펩티드

MSKGLLLLWLVMELWWLYLTPAASEDTIGFLGQPVTLPCHYLSWSQSRNS
MCWKGKSCPNKCNALRLTDGTRIISRKSTKYTLGKVQFGEVSLTISNTN
RGDSGVYCCRIEVPWFNDVKKNRLELRRATTTKKPTTTTRPTTTPYVTT
TTPELLPTTVMTTSVLPTTTPPQTLATTAFASTAVTTCPTTPGSFSQETTKGSA
ITTESETLPASNHSQRSMMTISTDIAVLRPTGSNPGLPSTSQLTTQKTTLTSE
SLQKTTKSHQINSRQTILIIACCVGFVLMVLLFLAFLLRGKVTGANCLQRHK
RPDNTEDSDSVLNDMSHGRDDEDGIFTL

서열 5; Tim-1 인간 핵산 (NM_012206)

GTTACCCAGCATTGTGAGTGACAGAGCCTGGATCTGAACGCTGATCCCA
 TAATGCATCCTCAAGTGGTCATCTTAAGCCTCATCCTACATCTGGCAGAT
 TCTGTAGCTGGTTCTGTAAAGGTTGGTGGAGAGGCAGGTCCATCTGTCAC
 ACTACCCTGCCACTACAGTGGAGCTGTCACATCAATGTGCTGGAATAGA
 GGCTCATGTTCTCTATTACATGCCAAAATGGCATTGTCTGGACCAATGG
 AACCCACGTCACCTATCGGAAGGACACACGCTATAAGCTATTGGGGGAC
 CTTTCAAGAAGGGATGTCTCTTTGACCATAGAAAATACAGCTGTGTCTGA
 CAGTGGCGTATATTGTTGCCGTGTTGAGCACCGTGGGTGGTTCAATGACA
 TGAAAATCACCGTATCATTGGAGATTGTGCCACCCAAGGTCACGACTAC
 TCCAATTGTCACAACTGTTCCAACCGTCACGACTGTTCTGAACGAGCACCA
 CTGTTCCAACGACAACGACTGTTCCAACGACAACGTTCCAACAACAAT
 GAGCATTCCAACGACAACGACTGTTCCGACGACAATGACTGTTTCAACG
 ACAACGAGCGTTCCAACGACAACGAGCATTCCAACAACAACAAGTGTTTC
 CAGTGACAACAACGGTCTCTACCTTTGTTCTCCAATGCCTTTGCCCAGG
 CAGAACCATGAACCAGTAGCCACTTCACCATCTTCACCTCAGCCAGCAG
 AAACCCACCTACGACACTGCAGGGAGCAATAAGGAGAGAACCCACCA
 GCTCACCATTGTACTCTTACACAACAGATGGGAATGACACCGTGACAGA
 GTCTTCAGATGGCCTTTGGAATAACAATCAAACCTCAACTGTTCTAGAAC
 ATAGTCTACTGACGGCCAATACCACTAAAGGAATCTATGCTGGAGTCTG
 TATTTCTGTCTTGGTGCTTCTTGCTCTTTGGGTGTCATCATTGCCAAAA
 GTATTTCTTCAAAAAGGAGGTTCAACAACCTAAGTGTTTCATTTAGCAGCC
 TTCAAATTAAGCTTTGCAAAATGCAGTTGAAAAGGAAGTCCAAGCAGA
 AGACAATATCTACATTGAGAATAGTCTTTATGCCACGGACTAAGACCCA
 GTGGTGCTCTTTGAGAGTTTACGCCCATGACTGCAGAAGACTGAACAGG
 TATCAGCACATCAGATGTCTTTAGACTCCAAGACAATTTTTCTGTTTCA
 GTTTCATCTGGCATTCCAACATGTCAGTGATACTGGGTAGAGTAACTCTC

 CCACTCCAAACTGTGTATAGTCAACCTCATCATTAATGTAGTCCTAATTT
 GTTTTGCTAAAACTGGCTCAATCCTTCTGATCATTGCAGAGTTTTCTCTCA
 AACATGAACACTTTAGAATTGTATGTTCTCTTTAGACCCCATAAATCCTG
 TAT

서열 6; Tim-1 마우스 핵산 (NM_134248)

ATGAATCAGATTCAAGTCTTCATTTTCAGGCCTCATACTGCTTCTCCCAGG
 CACTGTGGATTCTTATGTGGAAGTAAAGGGGGTAGTGGGTCACCCTGTC
 ACACITCCATGTACTTACTCAACATATCGTGGAATCACAACGACATGTTG
 GGGCCGAGGGCAATGCCCATCTTCTGCTTGTCAAAAATACACTTATTTGGA
 CCAATGGACATCGTGTACCTATCAGAAGAGCAGTCGGTACAACCTAAA
 GGGGCATATTTCAGAAGGAGATGTGTCCTTGACGATAGAGAACTCTGTT
 GAGAGTGACAGTGGTCTGTATTGTTGTGCGAGTGGAGATTCCTGGATGGTT
 TAATGATCAGAAAGTGACCTTTTCATTGCAAGTTAAACCAGAGATTCCCA
 CACGTCCTCCAACAAGACCCACAACCTACAAGGCCCACAGCTACAGGAAG
 ACCCAGACTATTTCAACAAGATCCACACATGTACCAACATCAATCAGA
 GTCTCTACCTCCACTCCTCCAACATCTACACACACATGGACTCACAAACC
 AGAACCCACTACATTTTGTCCCCATGAGACAACAGCTGAGGTGACAGGA
 ATCCCATCCCATACTCCTACAGACTGGAATGGCACTGTGACATCCTCAGG
 AGATACCTGGAGTAATCACACTGAAGCAATCCCTCCAGGGAAGCCGCAG
 AAAAACCCCTACTAAGGGCTTCTATGTTGGCATCTGCATCGCAGCCCTGCT
 GCTACTGCTCCTTGTGAGCACCCTGGCTATCACCAGGTACATACTTATGA
 AAAGGAAGTCAGCATCTCTAAGCGTGGTTGCCTTCCGTGTCTCTAAGATT
 GAAGCTTTGCAGAACGCAGCGGTTGTGCATTCCCGAGCTGAAGACAACA
 TCTACATTGTTGAAGATAGACCTTGA

서열 7; Tim-4 인간 핵산 변이체 #1

ATGTCCAAAGAACCTCTCATTCTCTGGCTGATGATTGAGTTTGGTGGCT
 TTACCTGACACCAGTCACTTCAGAGACTGTTGTGACGGAGGTTTTGGGTC
 ACCGGGTGACTTTGCCCTGTCTGTACTCATCCTGGTCTCACAAACAGCAAC
 AGCATGTGCTGGGGGAAAGACCAGTGCCCTACTCCGGTTGCAAGGAGG
 CGCTCATCCGCACTGATGGAATGAGGGTGACCTCAAGAAAGTCAGCAAA

ATATAGACTTCAGGGGACTATCCCGAGAGGTGATGTCTCCTTGACCATCT
 TAAACCCAGTGAAAGTGACAGCGGTGTGTACTGCTGCCGCATAGAAGT
 GCCTGGCTGGTTCAACGATGTAAAGATAAAÇGTGCGCCTGAATCTACAG
 AGAGCCTCAACAACCACGCACAGAACAGCAACCACCACCACACGCAGA
 ACAACAACAACAAGCCCCACCACCACCCGACAAATGACAACAACCCCA
 GCTGCACTTCCAACAACAGTCGTGACCACACCCGATCTCACAACCGGAA
 CACCACTCCAGATGACAACCATTTGCCGTCTTCACAACAGCAAACACGTG
 CCTTTCACTAACCCCAAGCACCTTCCGGAGGAAGCCACAGGTCTTCTGA
 CTCCCGAGCCTTCTAAGGAAGGGCCCATCCTCACTGCAGAATCAGAAAC
 TGTCTCCCCAGTGATTCTCTGGAGTAGTGCTGAGTCTACTTCTGCTGACA
 CTGTCCTGCTGACATCCAAAGAGTCCAAAGTTTGGGATCTCCCATCAACA
 TCCCACGTGTCAATGTGGAAAACGAGTGATTCTGTGTCTTCTCCTCAGCC
 TGGAGCATCTGATACAGCAGTTCTGAGCAGAACAAAACAACAAAACA
 GGACAGATGGATGGAATACCCATGTCAATGAAGAATGAAATGCCCATCT
 CCCAACTACTGATGATCATCGCCCCCTCCTTGGGATTTGTGCTCTTCGCA
 TTGTTTGTGGCGTTTCTCCTGAGAGGGAAACTCATGGAAACCTATTGTTC
 GCAGAAACACACAAGGCTAGACTACATTGGAGATAGTAAAAATGTCCTC
 AATGACGTGCAGCATGGAAGGGAAGACGAAGACGGCCTTTTTACCCTCT
 AACAACGCAGTAGCATGTTAG

서열 8; Tim-4 마우스 핵산 (NM_178759)

AGGAAATGGAGAAAGCAGCTCAGAGAAAGGGAGGACGGAGATAAGGG
AAGGCATGGCACACAACAGAGATGGATGGACAGTCTGAGGCTGAGAGA
GGGCTAGTGATTTCTCGGACACTTGGGCAGTAGAACCCATACCACCCTGT
TCTCTGGGATCCGATGGCCTTGGAGAGGGGGCTGCAGGGCCCCGAGGACA
CCAACTCTTCCCAGAGCGCTGGCATGGAGCCAGACTGAAATTACCATGT
GTCCAAATTAAAATTGCGTACTTCAAGGATTATTTGAAGGACTATTCTTA
GACCCTTTTAAGAAGATTTTTTAAAAAACAGTTACTGGCTGCAGACAC
GGAAATGCTCTGACTGCTGTAGAGCCAGTGGGCCCTTTAGGGGAGCTCC
AGCCCTGTGGAAGCCAGACAACCAACTTGAAGCCATTTCCAAATTGTGG
GTGGTGATCCATTTCAAGTTATGAAATGAATTTGATGATTCAAGGCCATC
GTTTATTAAAACTAATTACCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGGGGCTTCTC

ATCCTCTGGCTGGTGACGGAGCTCTGGTGGCTTTATCTGACACCAGCTGC
CTCAGAGGATACAATAATAGGGTTTTTGGGCCAGCCGGTGACTTTGCCTT
GTCATTACCTCTCGTGGTCCCAGAGCCGCAACAGTATGTGCTGGGGCAA
AGGTTTCATGTCCCAATTCCAAGTGCAATGCAGAGCTTCTCCGTACAGATG
GAACAAGAATCATCTCCAGGAAGTCAACAAAATATACACTTTTGGGGAA
GGTCCAGTTTGGTGAAGTGTCTTGAACCATCTCAAACACCAATCGAGGTG
ACAGTGGGGTGTACTGCTGCCGTATAGAGGTGCCTGGCTGGTTCAATGA
TGTCAGAAGAATGTGCGCTTGGAGCTGAGGAGAGCCACAACAACCAA
AAAACCAACAACAACCACCCGGCCAACCACCACCCCTTATGTGACCACC
ACCACCCAGAGCTGCTTCCAACAACAGTCATGACCACATCTGTTCTCCC
AACCACCACACCACCCAGACACTAGCCACCACTGCCTTCAGTACAGCA
GTGACCACGTGCCCCCTCAACAACACCTGGCTCCTTCTCACAAGAAACCA
CAAAAGGGTCCGCCTTCACTACAGAATCAGAAACTCTGCCTGCATCCAA
TCACTCTCAAAGAAGCATGATGACCATATCTACAGACATAGCCGTACTC
AGGCCCACAGGCTCTAACCTGGGATTCTCCCATCCACTTCACAGCTGAC
GACACAGAAAACAACATTAACAACAAGTGAGTCTTGCAGAAGACAACACT
AAATCACATCAGATCAACAGCAGACAGACCATCTTGATCATTGCCTGCT
GTGTGGGATTTGTGCTAATGGTGTTATTGTTTCTGGCGTTTCTCCTTCGAG
GGAAAGTCACAGGAGCCAACCTGTTTGAGAGACACAAGAGGCCAGACA
ACACTGAAGATAGTGACAGCGTCTCAATGACATGTCACACGGGAGGGA
TGATGAAGACGGGATCTTCACTCTCTGACTCACCATCTTTATTTAGGATT
AAGGATAGGGAATGGCACTTGAATTGTCAAAATAAGTTTGGGGACATTG
TAATTTCCGTTTAAAGTCTCACTCTGTTTACTGATGCTGTGGGTCCTGTCT
GGTTGTATCTTCCCACATGAAGGTGTTTTAGAGACACATCTTCCCTGCCT
CGTGCCTTAGTCCTCTTCGTTGTTTTGTGGCTAGGTGACTTTTCACACTGG
GCTTGAACACTGTGAGTGATGGTGAAATCCTTGCCACAGCTTTGGGAGTC
TCTTGACAGTCTCCCAGCAGTAGAGGGAGTTAGAAATATCCAGAGGGGAA
AAAAAATCTCTCTTTTCAGACAGTATCTGCTTTATTGGTGGTAGCTGAAT
TTCATTTATACAGAGCTCCTTTAACCTGTCTGTCTTCTTCTTGGTATCTAA
GCTGCCTTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTATGATATTAACCTCTTTT
CACATTCAAGTTTCTTTAAAGTTGACTATAGTGCCTTCTGAACTCTTGCA
GAGAGTTTGGATTTTGAAGCTGCCAGGTACCTATCACAGCAGGGGTGC

CAGTGACAAGGATGGTGTACAAATGAAACACTGAAGCTATCCAAATAAA
TTCCTCTAAGTGTAATTCATTTTACTGCAGCACAGGAAGAACAAATTTGT
CTTACAACCTTAATAATTAGTACCATTATGAACCCCTAGGAGAGAAATAA
GAGCAAATACCTGTTGAATAAATGAATGTAAGAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAA

서열 9; 마우스 Tim-4의 가용성 형태;

MSKGLLLLWLVMELWWLYLTPAASEDTIGFLGQPVTLPCHYLSWSQSRNS
MCWGKGSCPNKSKNAELLRTDGTIRSRKSTKYTLGKVQFGEVSLTISNTN
RGDSGVYCCRIEVPWFNDVKKNVRLRLRRATTTKKPTTTTRPTTTPYVTT
TTPPELLPTTVMTTSVLPTTTPPQTLATTAFASTAVTTCPTTPGSFSQETTKGSA
FTTESETLPASNHSQRSMMTISTDIAVLRPTGSGNPILPSTSQLTTQKTRKVTG
ANCLQRHKRPDNTEDSDSVLNDMSHGRDDEDGIFTL

서열 10; 엑손 6이 결실된 마우스 Tim-4 스플라이싱 변이체;

MSKGLLLLWLVMELWWLYLTPAASEDTIGFLGQPVTLPCHYLSWSQSRNS
MCWGKGSCPNKSKNAELLRTDGTIRSRKSTKYTLGKVQFGEVSLTISNTN
RGDSGVYCCRIEVPWFNDVKKNVRLRLRRATTTKKPTTTTRPTTTPYVTT
TTPPELLPTTVMTTSVLPTTTPPQTLATTAFASTAVTTCPTTPGSFSQETTKGSA
ITTESETLPASNHSQRSMMTISTDIAVLRPTGSGNPILPSTSQLTTQKTNNQQT
DHLHDHCLLCGICANGVIVSGVSPSRESHRSQLFAETQEARQH

서열 11; 인간 가용성 Tim-4 이소형;

MSKEPLILWLMIEFWWLYLTPVTSETVTVTEVLGHRVTLPCLYSSWSHNSNS
MCWGKQDQCPYSGCKEALRTDGMVTSRKSAYRLQGTPRGDVSLTILNP
SESDSGVYCCRIEVPWFNDVKINVRNLQRASTTTHRTATTTTTRTTTTSP
TTTRQMTTTPAALPTTVVTPDLTTGTPLQMTTIAVFTTANTCLSLTPSTLPE
EATGLLTPEPSKEGPILTAESSETVLPDSWSSAESTSADTVLLTSKESKVWDL
PSTSHVSMWKTSDSVSPQPGASDTAVPEQNKTTKTGQMDGIPMSMKNEM
PISQLLMIAPSLGFVLFALFVAFLLRGKLMETCYCSQKHTRLDYIGDSKNVLN
DVQHGREDEDGLFTL

서열 12; 마우스 Tim-4 교대 (Alternate) N-말단 이소형 (NP_848874)

MNLMIQGHRLLKLITSCRIRHEGLLLWLVTTELWWLYLTPAASEDTIGFLGQ
PVTLPCHYLSWSQSRNSMCWGKGSCPNKSKNAELLRTDGTIRSRKSTKYTL
LGKVQFGEVSLTISNTNRRGDSGVYCCRIEVPWFNDVKKNVRLRLRRATTT
KKPTTTTRPTTTPYVTTTTPELLPTTVMTTSVLPTTTPPQTLATTAFASTAVTTC
PSTTPGSFSQETTKGSAFTTESETLPASNHSQRSMMTISTDIAVLRPTGSGNPI
LPSTSQLTTQKTTLTSESQKTTKSHQINSRQTILIIACCVGFVLMVLLFLAF
LLRGKVTGANCLQRHKRPDNTEDSDSVLNDMSHGRDDEDGIFTL

서열 13; 마우스 Tim-2 폴리펩티드 (NP_599010)

MNQIQVFISGLILLPLGAVESHTAVQGLAGHPVTLPCIYSTHLGGIVPMCWG
LGECRHSYCIRSLIWTNGYTVTHQRNSRYQLKGNISEGNVSLTIENTVVGDG
GPYCCVVEIPGAFHFVDYMLEVKPEISTSPPTRPTATGRPTTISTRSTHVPTST
RVSTSTSPTPAHTETKYKPEATTFFYPDQTTAEVTETLPDTPADWHNTVTSSDD
PWDDNTEVIPPQKPQKNLNKGFYVVGISIAALLILMLLSTMVITRYVVMKRKS
ESLSFVAFPIKIGASPKKVVERTCEDQVYIIEDTPYPEEES

도면의 간단한 설명

도 1은 Tim-2 mRNA가 Th2 세포에서 우선적으로 발현됨을 보여준다. (A) Th1 (AE7) 및 Th2 (D10G4) 클론으로부터 생성된 cDNA를 Tim-2 및 Tim-3 프라이머를 사용하여 RT-PCR시켰다. 생성물을 1.2% 아가로스 겔 상에 용해시켰다. (B) D011.10 TCR 트랜스제닉 CD4 T세포를 Th1 또는 Th2 분극 조건의 존재 하에 OVA 323-339로 자극하였다. RNA를 각 자극 라운드의 끝에 추출하고, cDNA를 생성시켰다. cDNA를 특이적 Tim-2 프라이머를 사용하여 사이클-샘플 PCR시켰다. 생성물을 1.5% 아가로스 겔 상에 용해시켰다.

도 2는 Tim-2 리간드가 활성화된 APC 상에서 발현됨을 보여준다. 수지상 세포주 D2SC/1 및 대식세포 세포주 RAW264를 20 ng/mL LPS 및 5 ng/mL IFN γ 의 존재 또는 부재 하에 인큐베이션하였다. 활성화 48시간 후, 세포를 수거하고 2차 검출 시약으로서 스트렙타비딘-PE 및 비오틴화 Tim-2Ig, 비오틴화 Tim-1Ig, 비오틴화 Tim-3Ig 또는 비오틴화 hIgG로 염색하였다. 세포를 유동 세포분석에 의해 분석하였다.

도 3은 Tim-2Ig의 투여가 과다증식 및 Th2 시토킨을 유도함을 보여준다. SJL 마우스를 PLP 139-151로 면역화시키고 Tim-2Ig, 또는 대조군으로서 hIgG 또는 PBS로 처리하였다. 장기를 면역처리 10일 후에 수거하고, 증식 및 시토킨 생산에 대해 평가하였다. Tim-2Ig (열린 삼각형); PBS (닫힌 원); hIgG (닫힌 정사각형). (A) 전체 비장세포를 항원의 부재 하에 48시간 동안 배양하였다. 증식은 H³-티미딘 도입으로 평가하였다. (B) 전체 비장세포를 PLP 139-151 펩티드의 농도를 증가시키면서 48시간 동안 배양하였다. 증식은 H³-티미딘 도입으로 평가하였다. (C) 상등액을 3(A) 및 (B)에 설명한 배양액으로부터 수집하고, IL-2, IFN γ , IL-4 및 IL-10 발현을 ELISA에 의해 평가하였다.

도 4는 Tim-1Ig의 투여가 과다증식 및 Th2 시토킨을 유도함을 보여준다. SJL 마우스를 PLP 139-151로 면역화시키고 Tim-1Ig, 또는 대조군으로서 hIgG 또는 PBS로 처리하였다. 장기를 면역처리 10일 후에 수거하고, 증식 및 시토킨 생산에 대해 평가하였다. Tim-1Ig (열린 원); PBS (닫힌 다이아몬드); hIgG (닫힌 정사각형). (A) 전체 비장세포를 항원의 부재 하에 48시간 동안 배양하였다. 증식은 H³-티미딘 도입으로 평가하였다. (B) 전체 비장세포를 PLP 139-151 펩티드의 농도를 증가시키면서 48시간 동안 배양하였다. 증식은 H³-티미딘 도입으로 평가하였다. (C) 상등액을 4(A) 및 (B)에 설명한 배양액으로부터 수집하고, IL-2, IFN γ , IL-4 및 IL-10 발현을 ELISA에 의해 평가하였다.

도 5는 EAE의 유도 동안 Tim-2Ig의 투여가 질병의 발병 및 심도를 지연시킴을 보여준다. SJL/J 마우스를 CFA 중의 75 μ g PLP 139-151 펩티드로 면역화시키고, 백일해 독소를 정맥내 주사하였다. 마우스를 Tim-2Ig, 또는 대조군으로서 PBS 또는 hIgG로 0일에서 8일까지 이틀마다 처리하였다. 마우스를 EAE의 임상 징후에 대해 모니터링하였다.

도 6은 EAE의 유도 동안 Tim-1Ig의 투여가 질병의 발병 및 심도를 지연시킴을 보여준다. SJL/J 마우스를 CFA 중의 75 μ g PLP 139-151 펩티드로 면역화시키고, 백일해 독소를 정맥내 주사하였다. 마우스를 Tim-1Ig, 또는 대조군으로서 PBS 또는 hIgG로 0일에서 8일까지 이틀마다 처리하였다. 마우스를 EAE의 임상 징후에 대해 모니터링하였다.

도 7은 Tim-1 및 Tim-2 리간드(들)이 활성화된 항원 제시 세포 상에 발현됨을 보여준다. B220 (B세포), CD11b (대식세포 및 수지상 세포) 및 CD11c (수지상 세포)를 Balb/c 마우스의 비장으로부터 정제하고 LPS 및 인터페론 감마로 활성화시켰다. 활성화 24시간 후, 세포를 hIgG (적색선), 비오틴화 Tim-1Ig (녹색선) 또는 비오틴화 Tim-2Ig (청색선)로 염색하였다. 스트렙타비딘-PE를 2차 검출 시약으로 사용하였다. 모든 샘플을 유동 세포분석에 의해 분석하였다. Tim-1 리간드 및 Tim-2 리간드 발현은 활성화된 항원 제시 세포 상에서 상향조절되었다.

도 8은 Th1 및 Th2 분극화된 세포주에서 Tim-2의 발현을 보여준다. C57BL/6 및 Balb/c 마우스로부터 나이브 (naive) T 세포를 IL-12와 항-IL-4 (Th1) 또는 IL-4와 항-IL-12 (Th2) 조건의 존재 하에 항-CD3/CD28 자극을 이용하여 분극화시켰다. RNA를 세포로부터 추출하였고, cDNA가 생성되었다. 특이적 Taqman 프라이머 및 프로브를 사용하여, Tim-2 발현을 GAPDH에 대해 결정하였다. Tim-2 발현은 Th1 세포에 비해 Th2 세포에서 우선적으로 상향조절되었다.

도 9는 Tim1/Fc 단제치료가 소량 미스매칭된 (mismatched) 섬세포 동종이식편의 생착을 허용함을 보여준다. Balb/c 마우스를 스트랩토코토신 240 mg/kg 용량의 단일 i.p. 주사에 의해 당뇨병으로 만들었다. DBA/2 공여자로부터 섬세포 동종이식편을 우측 신장의 신장피막 아래에 이식하였다. 수령자를 Tim1/Fc로 0.25 mg/마우스의 용량으로 이식 0, 2 및 4일에 처리하였다.

도 10은 Tim2/Fc 단제치료가 소량 미스매칭된 섬세포 동종이식편의 거부반응을 지연시키고 생착을 허용함을 보여준다. Balb/c 마우스를 스트랩토코토신 240 mg/kg의 용량의 단일 i.p. 주사에 의해 당뇨병으로 만들었다. DBA/2 공여자로부터 섬세포 동종이식편을 우측 신장의 신장피막 아래에 이식하였다. 수령자를 Tim2/Fc로 0.25 mg/마우스의 용량으로 이식 0, 2 및 4일에 처리하였다.

도 11은 Tim2/Fc가 항-CD154와 상승작용하여 MHC 미스매칭된 동종이식 관용을 촉진함을 보여준다. C57BL/6 마우스를 스트랩토코토신 260 mg/kg의 용량의 단일 i.p. 주사에 의해 당뇨병으로 만들었다. DBA/2 공여자로부터 섬세포 동종이식편을 우측 신장의 신장피막 아래에 이식하였다. 수령자를 Tim2/Fc로 0.25 mg/마우스의 용량으로 이식 0, 2 및 4일에 및 MR1로 0.25 mg/마우스의 용량으로 이식 0 및 2일에 처리하였다.

도 12는 Tim-4가 대식세포 및 성숙한 수지상 세포에서 발현되지만, T세포에서 발현되지 않음을 보여준다. (a) 다양한 마우스 장기 내의 Tim-4 mRNA를 분석하기 위해 Taqman 정량적 PCR을 Clontech 다중 조직 cDNA 패널 상에서 중복 웰에서 수행하였다. (b) DO11.10 TcR 트랜스제닉 T세포를 T_H1 또는 T_H2 계통 (lineage)에 대해 시험관 내에서 분극화시키고, 각각의 재자극 라운드 후 휴지 세포로부터 RNA를 제조하였다. RNA를 장기 (long-term) T세포 클론 AE7 (T_H1) 및 D10.G4 (T_H2)와 CHO-Tim-4 안정한 형질감염체로부터 또한 제조하였다. 데이터는 2개의 실험을 대표한다. (c) SJL/J

비장 및 림프절 세포를 $CD11b^+$, $CD11c^+$, $B220^+$ 및 $CD3^+$ 집단 내로 정제하였다. 데이터는 5개 초과 실험을 대표한다. (d) 수지상 세포를 GM-CSF 또는 Flt3L을 사용하여 골수 세포로부터 시험관 내에서 생성하고, 일부 세포를 LPS로 자극하였다. Flt3L-생성된 세포는 형질세포양 (plasmacytoid) 분획이 결핍되었다. 데이터는 2개의 실험을 대표한다. (e) 수지상 세포는 CMS5 Flt3L-생산 종양 세포를 주사한 CB6F1 마우스로부터 생체 내에서 생성되었다. T 및 B세포가 결핍된 비장세포를 표시된 집단으로 나누었다. 표시된 모든 세포 종류를 Tim-4 mRNA 발현을 정량하기 위해 Tim-4 Taqman RT-PCR하였다. 모든 데이터는 3중 웰에서 수행된 GAPDH 발현에 상대적인 Tim-4 발현으로 표현한다.

도 13은 Tim-4 리간드가 B세포 및 활성화된 T세포 상에서 발현됨을 보여준다. 비자극되거나 LPS 및 IFN- γ (B세포에 대해) 또는 ConA (T세포에 대해)로 활성화된 전체 SJL/J 비장세포를 B220-FITC 또는 CD3-FITC 및 Tim-4-Ig로 염색하였다 (검출을 위해 항-인간 IgG-PE를 사용함). 데이터는 4개의 별개 실험을 대표한다.

도 14는 Tim-4가 Tim-1과 특이적으로 상호작용함을 보여준다. (a) Tim-1, Tim-3 또는 Tim-4 cDNA로 형질감염시킨 CHO 세포를 Tim-1-Ig (항-mIgG2a-PE로 검출함, 대조군으로서 2차 항체만을 사용함), Tim-2-Ig 또는 Tim-4-Ig (둘 모두 항-hIgG-PE로 검출함, 대조군으로서 hIgG를 사용함)으로 염색하였다. Tim-1 및 Tim-3을 세포 표면 상에서 각각 모노클로날 항-Tim-1 또는 항-Tim-3을 사용하여 가시화하고, Tim-4는 비오틴화 항-HA를 사용하여 검출하였다 (스트렙타비딘-PE를 사용하여 가시화시킴; 모두 동종형 (isotype) 대조군에 비교한다). 데이터는 10개 초과 실험을 대표한다. (b) Tim-1 또는 Tim-4로 형질감염시킨 HEK293 세포를 상기한 바와 같이 Tim-1-Ig 또는 Tim-4-Ig로 염색하였다. 특이적 염색을 평가하기 위해, Tim-1-Ig를 항-Tim-1 또는 항-Tim-3과 함께 예비인큐베이션한 다음 Tim-4 형질감염체를 염색하기 위해 사용하였다. 추가로, Tim-1 형질감염체를 항-Tim-1 또는 항-Tim-3과 함께 예비인큐베이션한 다음 Tim-4-Ig로 염색하였다. 데이터는 5개 초과 실험을 대표한다.

도 15는 Tim-4-Tim-1 상호작용이 정상 T세포 상에서 관찰될 수 있음을 보여준다. (a) $CD3^+$ 세포를 전체 비장세포로부터 정제하고 항-CD3 및 항-CD28로 활성화시켰다. 세포를 상기한 바와 같이 항-Tim-1 또는 Tim-4-Ig로 염색하였다. (b) 총 비장세포를 ConA로 자극하고 상기한 바와 같이 항-CD3 또는 Tim-4-Ig로 염색하였다. 세포를 항-Tim-1 또는 항-Tim-3과 함께 예비인큐베이션한 후, Tim-4-Ig로 염색하여 나타난 Tim-4-Ig 결합의 Tim-1 특이성을 평가하였다. (c,d) 시험관 내에서 T_H1 또는 T_H2 계통으로 분극화된 DO11.10 TCR 트랜스제닉 T세포를 3시간 동안 PMA + 이오노마

이신 + Golgi Stop을 사용하여 활성화시킨 다음, 상기한 바와 같이 항-Tim-1 또는 Tim-4-Ig로 염색하였다. 자극된 세포를 또한 항-CD4로 세포외에서, 시토킨 항체로 세포내에서 염색하여 T_H1 또는 T_H2 계통으로의 분극화를 확인하였다. 모든 데이터는 4개 이상의 실험을 대표한다.

도 16은 Tim-1-Ig가 생체 외에서 활성화된 $CD11b^+$ 및 $CD11c^+$ 세포에 특이적으로 결합함을 보여준다. DO11.10 TcR 트랜스제닉 마우스 또는 Balb/c 마우스로부터의 비장세포를 LPS 및 IFN- γ 로 자극하였다. $CD11b^+$ 및 $CD11c^+$ 세포를 MACS 컬럼 정제에 의해 정제하고 항-Tim-1 또는 항-Tim-3 모노클로날 항체의 존재 또는 부재 하에 비오틴화 Tim-1-Ig로 염색하였다. 스트렙타비딘-PE를 2차 검출 시약으로 사용하였다. 데이터는 2개의 실험을 대표한다.

도 17은 Tim-1-Ig를 투여하면 T세포 과다증식을 일으킴을 보여준다. (a) 생체 내에서 Tim-1-Ig, 또는 대조군으로서 hIgG 또는 PBS로 처리한 면역화시킨 SJL/J 마우스로부터의 비장세포를 시험관 내에서 48시간 동안 PLP 139-151 펩티드 재자극과 함께 배양하였다. 증식은 3중 웰에서 48시간 후 $^3[H]$ 티미딘 도입에 의해 측정하였다. (b) 6a에 설명된 실험으로부터 배양 상등액을 시험관 내에서 PLP 139-151 항원 자극과 함께 48시간 배양 후 취하고 시토킨 ELISA에서 사용하였다; IL-2, IL-4, IL-10 및 IFN- γ 생산이 제시된다. 개별 마우스 ($n=6$)로부터의 비장세포를 개별적으로 분석하였고, 모든 마우스에 대한 평균 데이터를 나타낸다. 에러 (error) 막대는 S.E.M. 값을 나타낸다. 데이터는 4개의 개별 실험을 대표한다. 흑색 다이아몬드, PBS; 흑색 정사각형, hIgG; 열린 삼각형, Tim-1-Ig 처리.

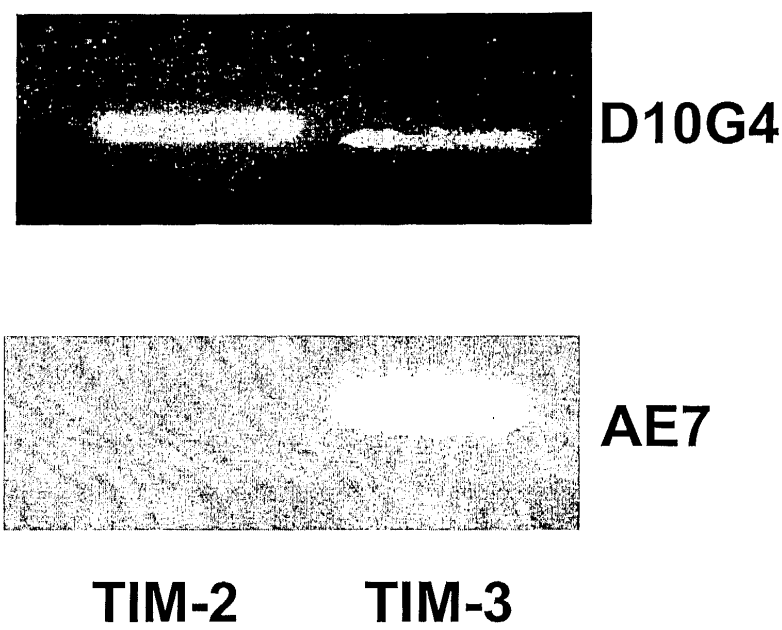
도 18은 Tim-4-Ig가 생체 내에서 T세포의 과다증식을 유도하고 시험관 내에서 T세포 증식을 동시자극함을 보여준다. (a) 생체 내에서 Tim-4-Ig, 또는 대조군으로서 hIgG 또는 PBS로 처리한 면역화시킨 SJL/J 마우스로부터의 비장세포를 시험관 내에서 48시간 동안 펩티드 재자극 없이 배양하였다. 증식은 3중 웰에서 48시간 후 $^3[H]$ 티미딘 도입에 의해 측정하였다. 이들 웰로부터 상등액을 시험관 내에서 펩티드 재자극 없이 48시간 배양 후 취하고, 항원 자극 없이 자발적으로 생산된 시토킨의 양을 시험하기 위해 시토킨 ELISA에서 사용하였다. 2가지 상이한 마우스로부터의 비장세포를 각각 3중으로 분석하였고, 평균 값을 나타낸다. (b) 생체 내에서 Tim-4-Ig (T4) 또는 hIgG (Hu)로 처리한 2마리의 면역화시킨 SJL/J 마우스로부터 모은 비장세포를 $CD11b^+$ (Mac), $B220^+$ (B) 및 $CD3^+$ (T) 집단으로 분리하고 펩티드 재자극 없이 재결합시켰다. 증식은 48시간 후 $^3[H]$ 티미딘 도입에 의해 측정하였다. (c) 정제된 SJL/J T세포를 표시된 농도로 항-CD3, 항-CD28 및 Tim-4-Ig 또는 대조군 Ig로 코팅된 플레이트 상에서 자극하였다. 증식은 3중 웰에서 48시간 후 $^3[H]$ 티미딘 도입에 의해 측정하였다. 데이터는 2개의 동일한 실험 (좌측 패널) 또는 5개의 동일한 실험 (우측 패널)을 대표한다. 모든 에러 막대는 복제 웰로부터 S.E.M. 값을 나타낸다.

도 19는 생체내 Tim-1-Ig 투여가 과다증식 및 T_H2 -편향 (biased) 시스템에서 T_H2 반응의 강화를 유도함을 보여준다. 암컷 Balb/c 마우스에 50 μg OVA 323-339 및 4 mg Imject 명반 (피어스 (Pierce))를 i.p. 주사한 다음, 7일 후 50 μg OVA 323-339 및 2 mg 명반으로 i.p. 부스팅하였다. 마우스에 100 μg Tim-1-Ig, hIgG 또는 250 μl PBS를 5회 i.p. 주사하였다: 면역화 4시간 전, 제7일의 부스팅 4시간 전, 면역화 후 2, 4 및 10일. 14일에 마우스를 희생시키고, 비장세포를 증식 및 시토킨에 대해 분석하였다. (a) 비장세포를 시험관 내에서 48시간 동안 OVA 323-339 펩티드와 함께 배양하였다. 증식은 3중 웰에서 48시간 후 $^3[H]$ 티미딘 도입에 의해 측정하였다. (b) 배양 상등액을 시험관 내에서 OVA 323-339 재자극 48시간 후 취하고, 시토킨 ELISA에서 사용하였다; IL-2, IL-4 및 IL-10 생산이 제시된다. 유의한 IFN- γ 생산은 관찰되지 않았다. 개별 마우스 ($n=3$)로부터의 비장세포를 3중 웰에서 개별적으로 분석하고, 3마리 모든 마우스에 대한 평균값을 나타낸다. 흑색 정사각형, PBS; 흑색 다이아몬드, hIgG; 열린 삼각형, 생체내 Tim-1-Ig 처리.

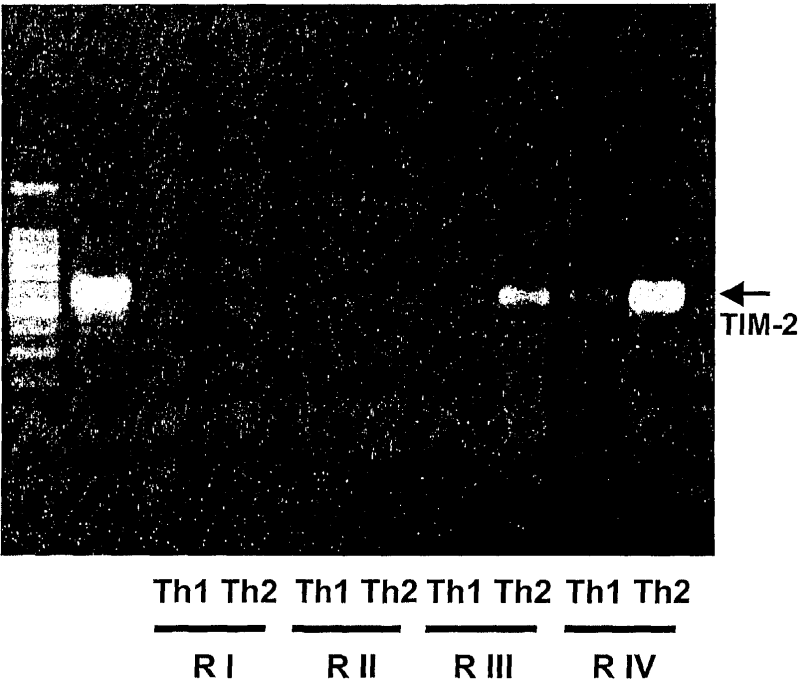
도 20은 tim-4의 2개의 가용성 형태를 생성하기 위한 마우스 tim-4 로커스의 대안적인 스플라이싱의 모식도이다.

도면

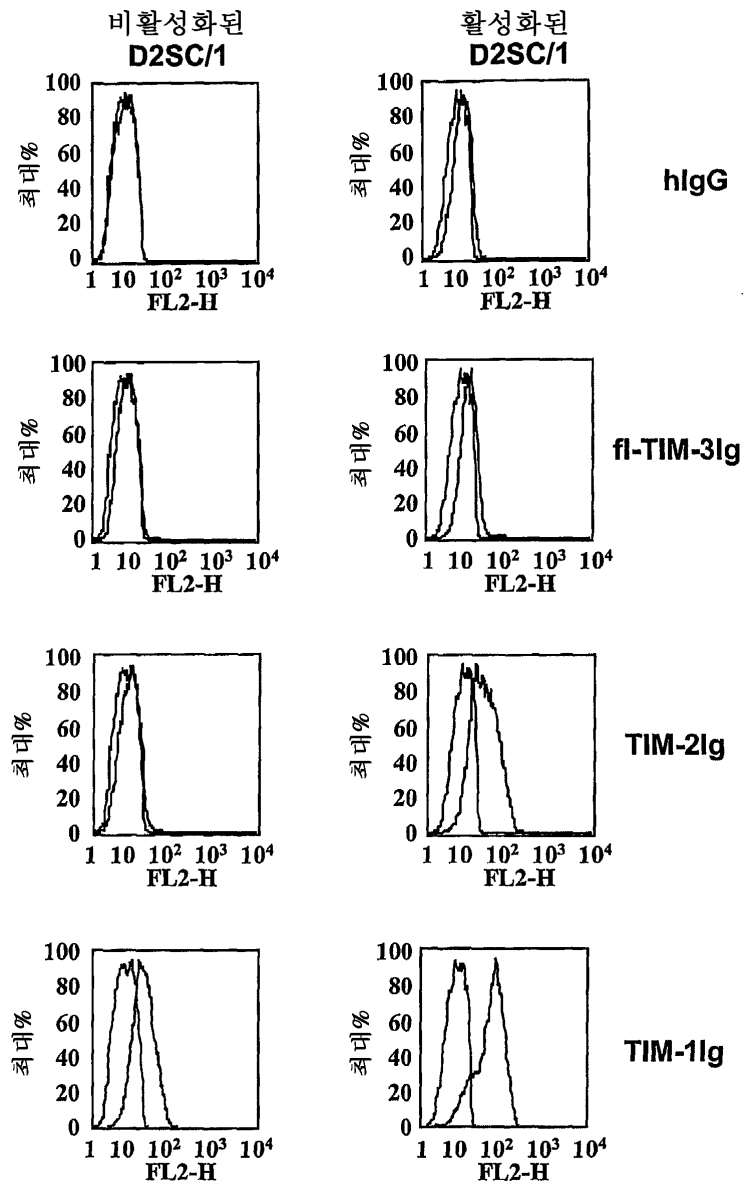
도면1A



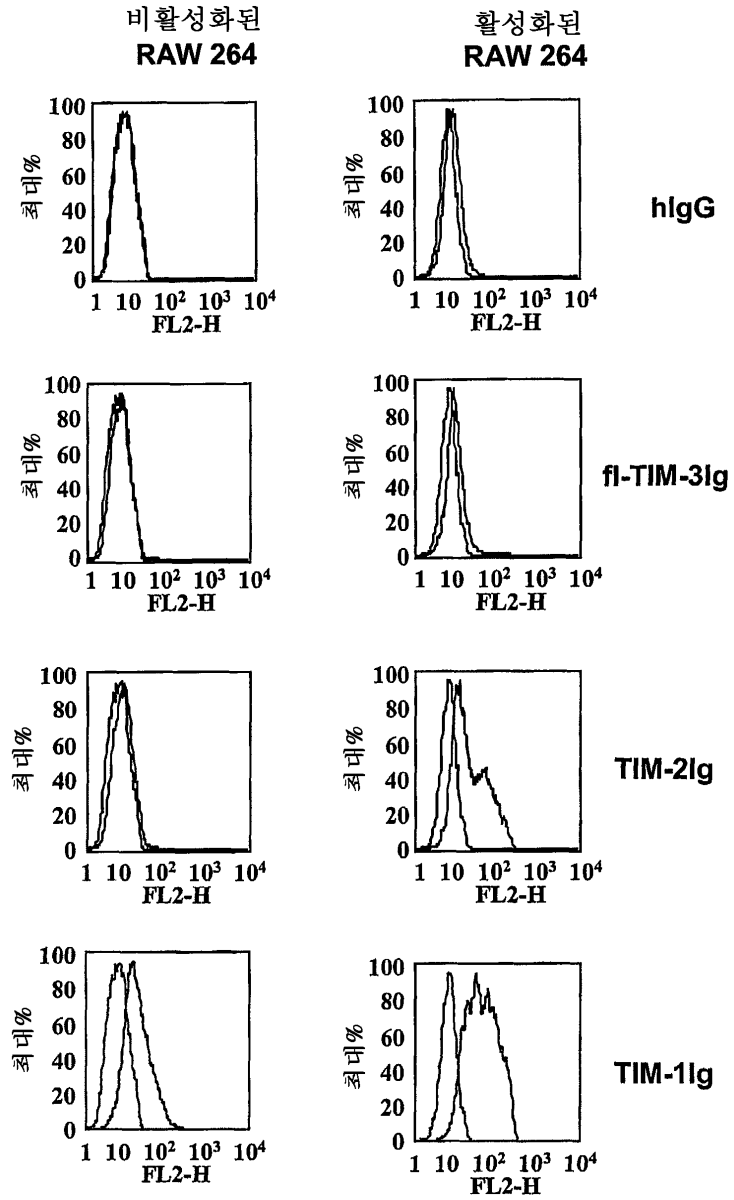
도면1B



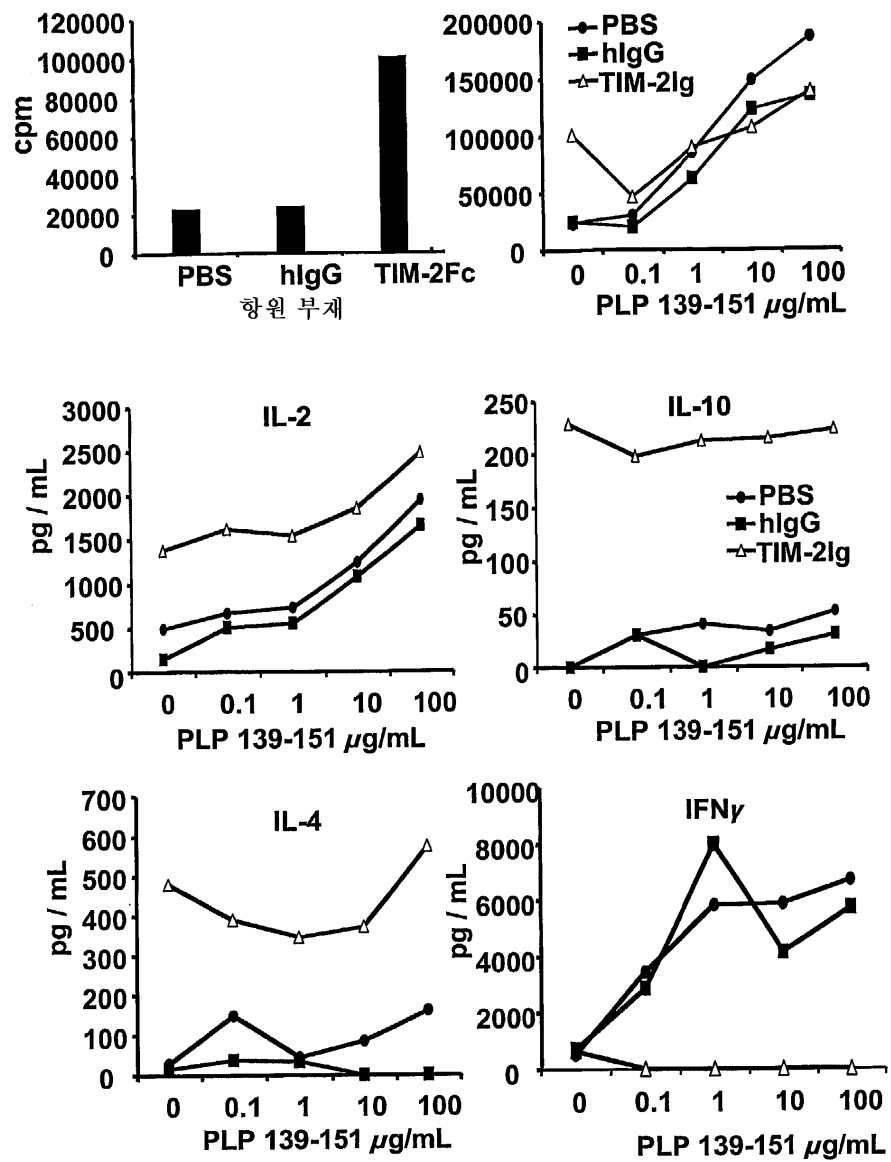
도면2A



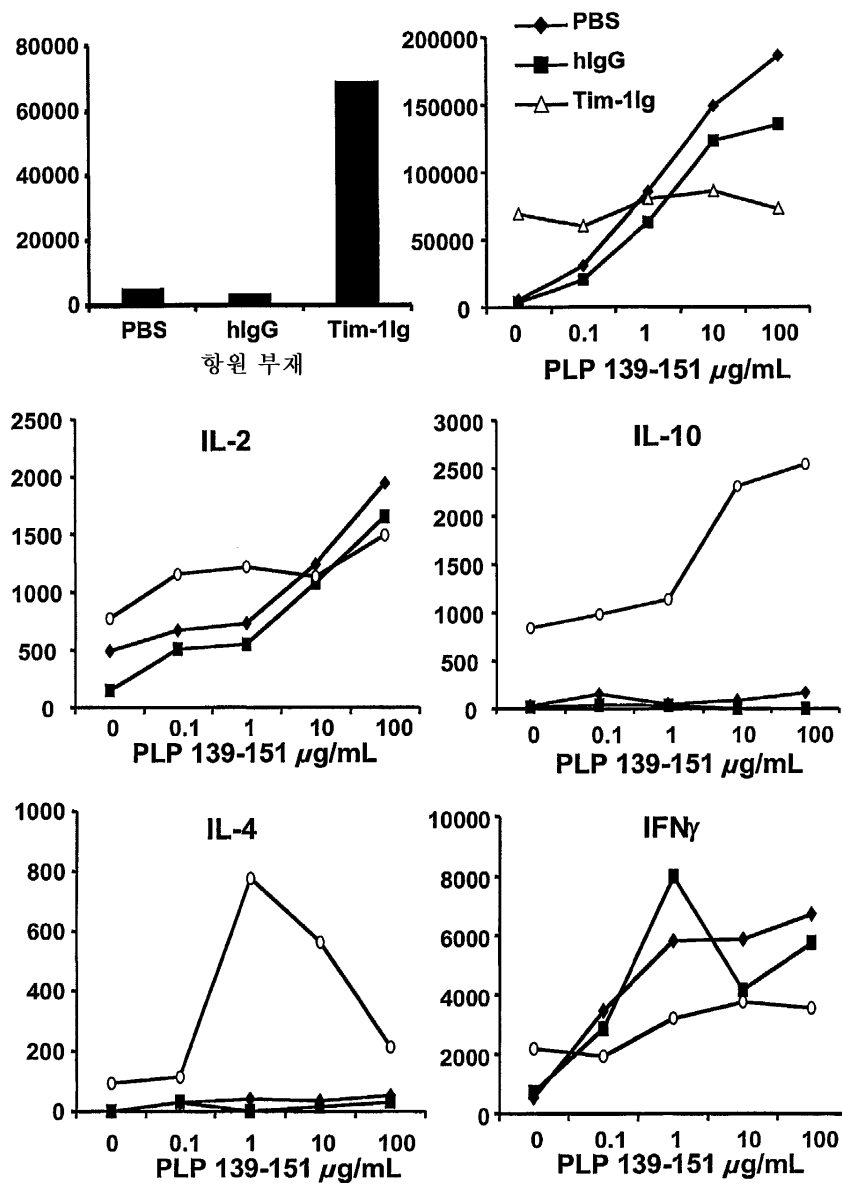
도면2B



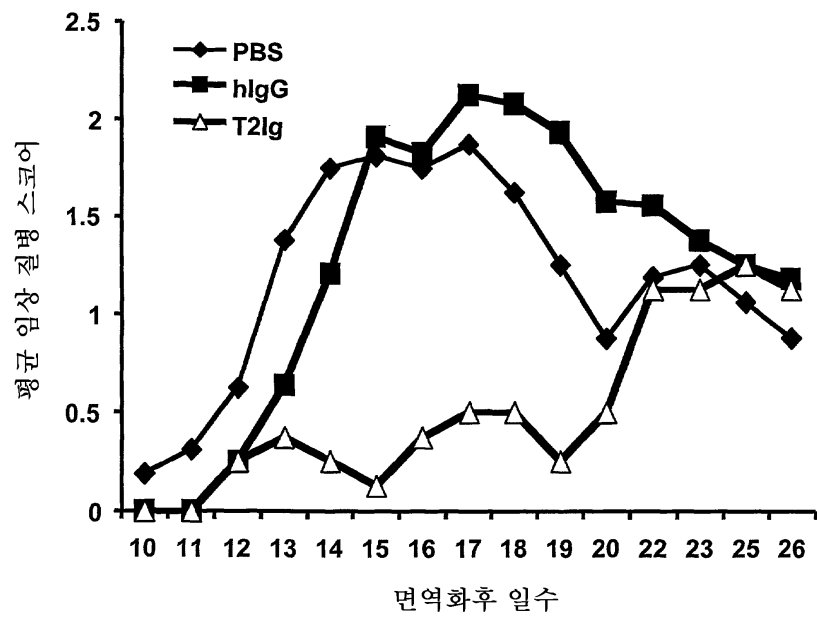
도면3



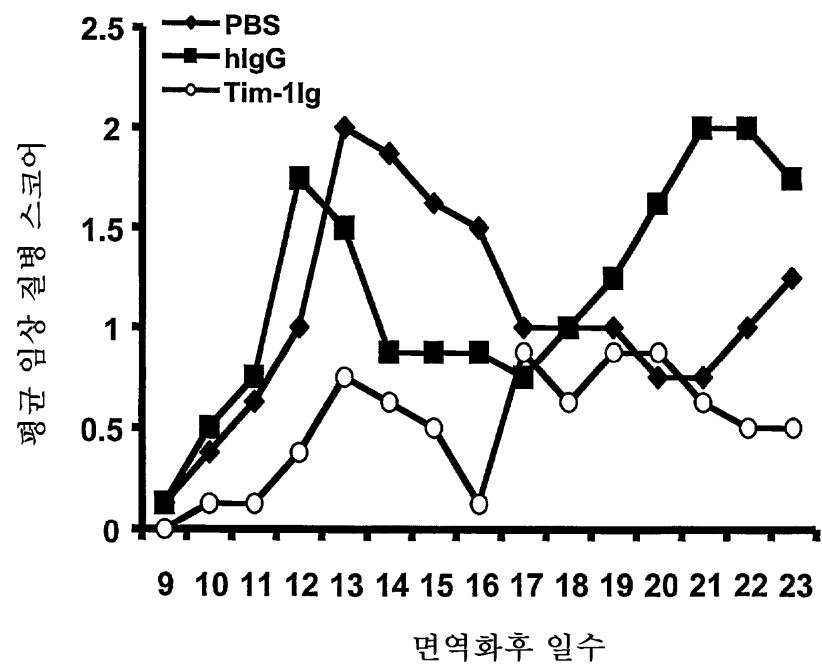
도면4



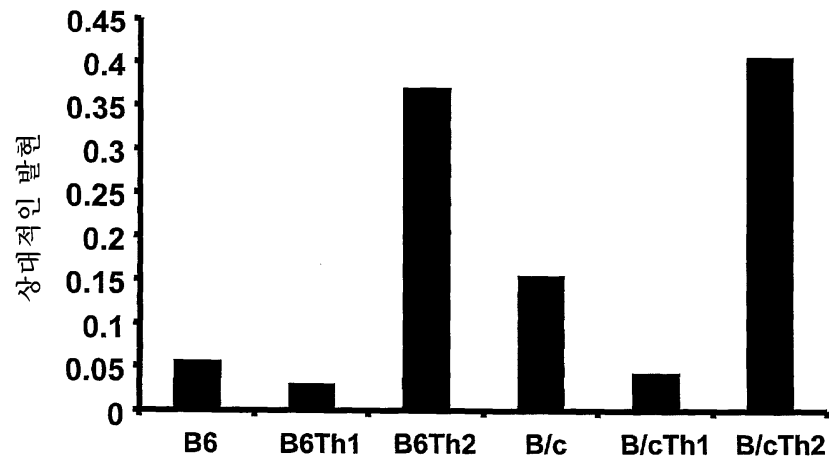
도면5



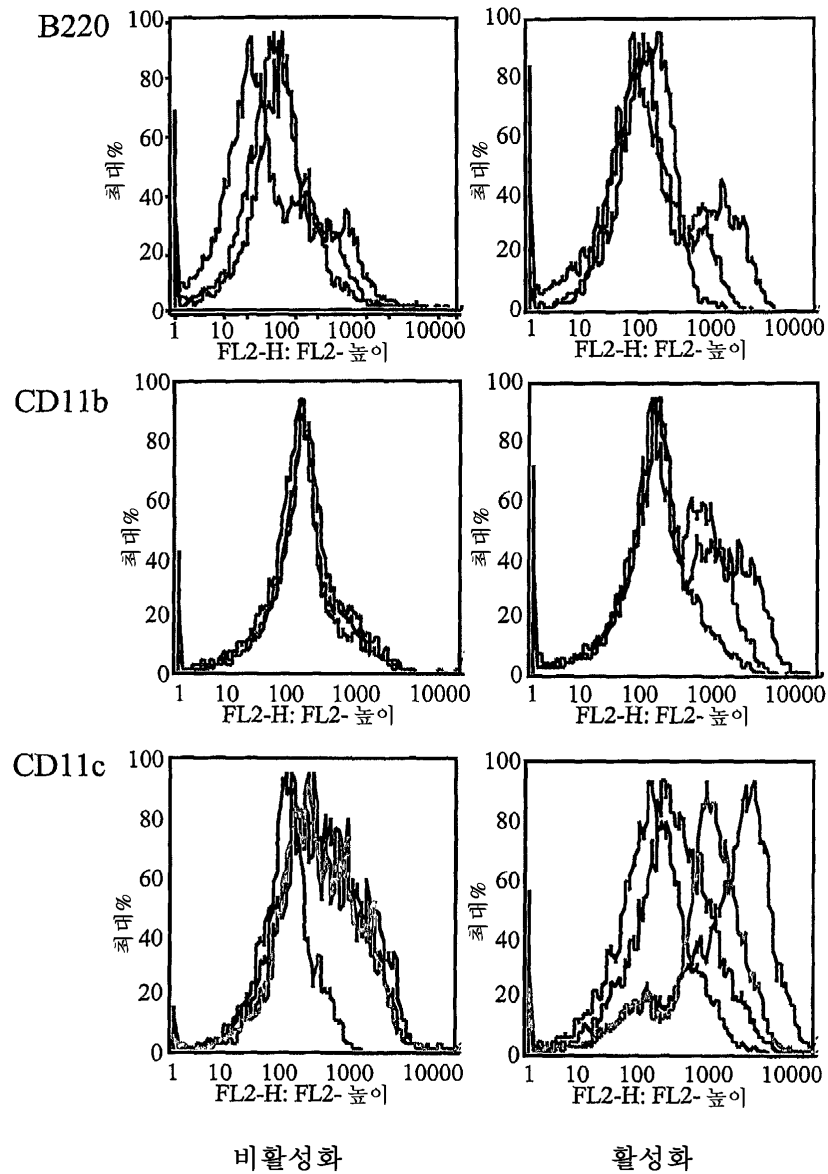
도면6



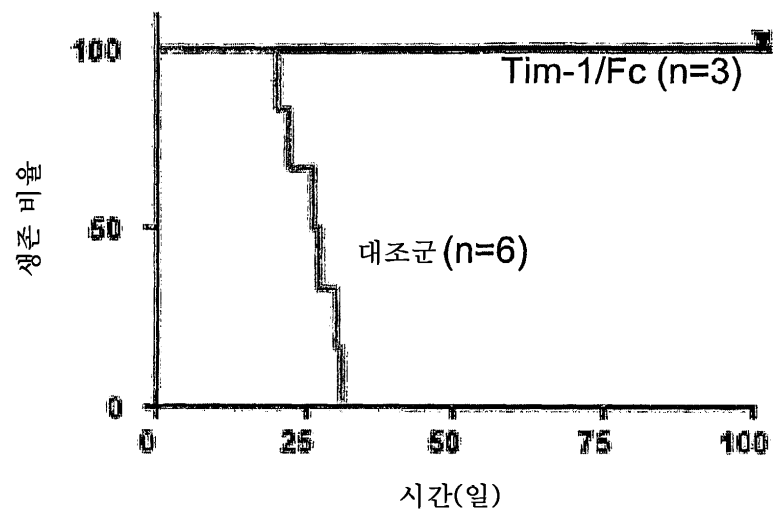
도면7



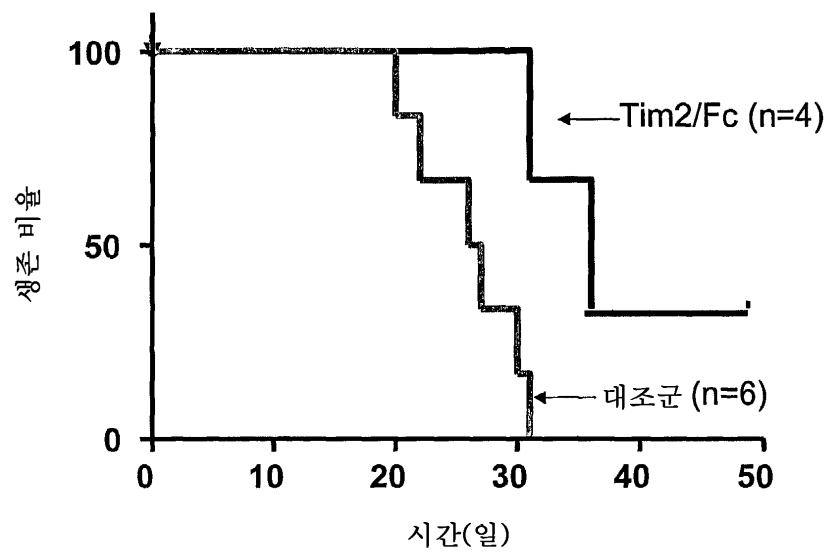
도면8



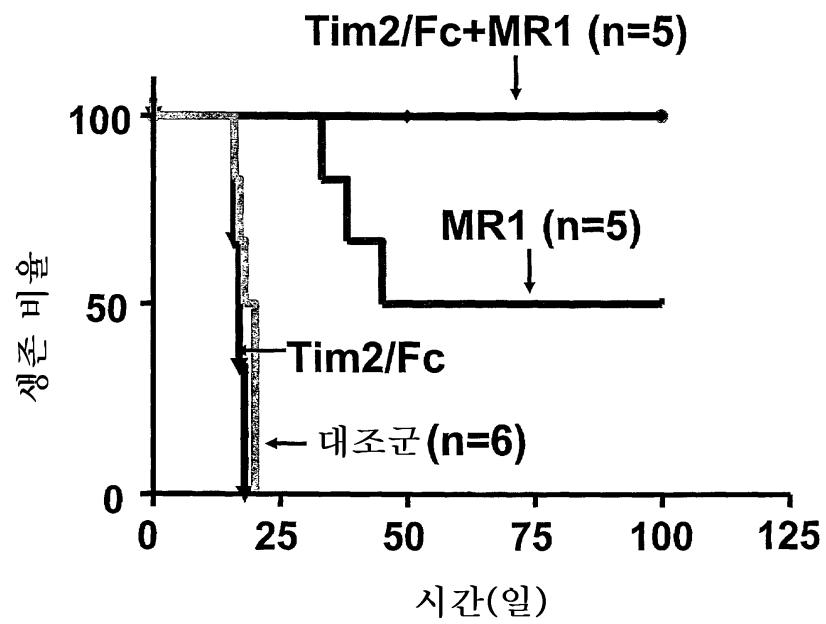
도면9



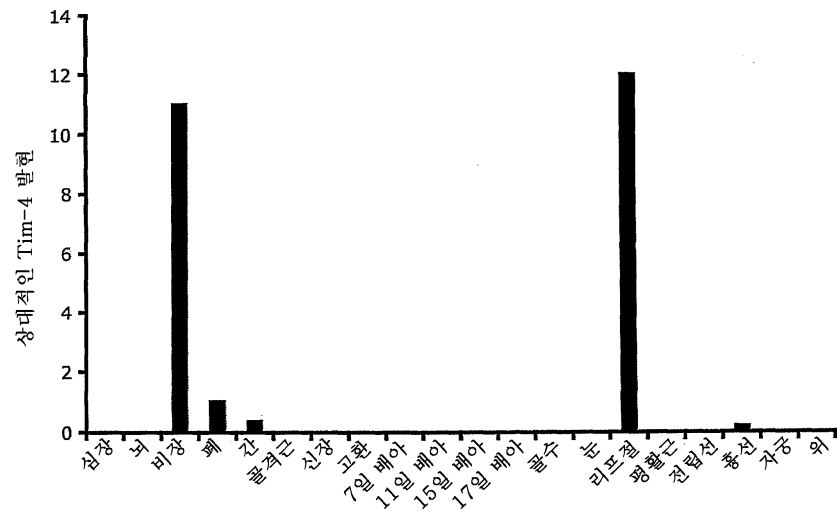
도면10



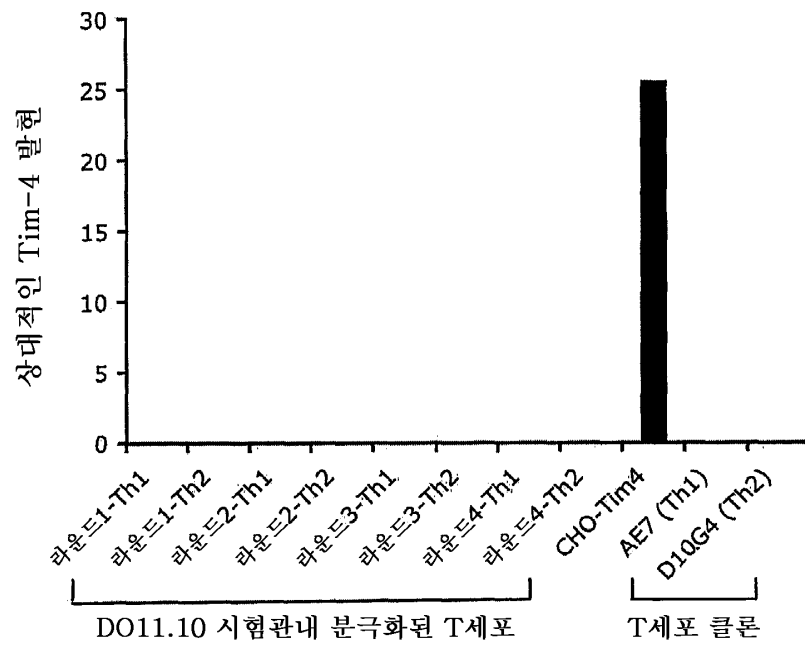
도면11



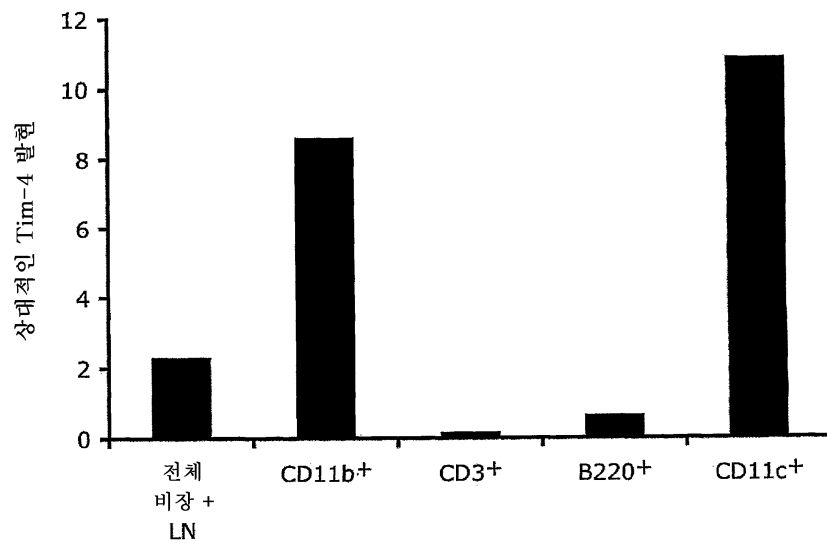
도면12A



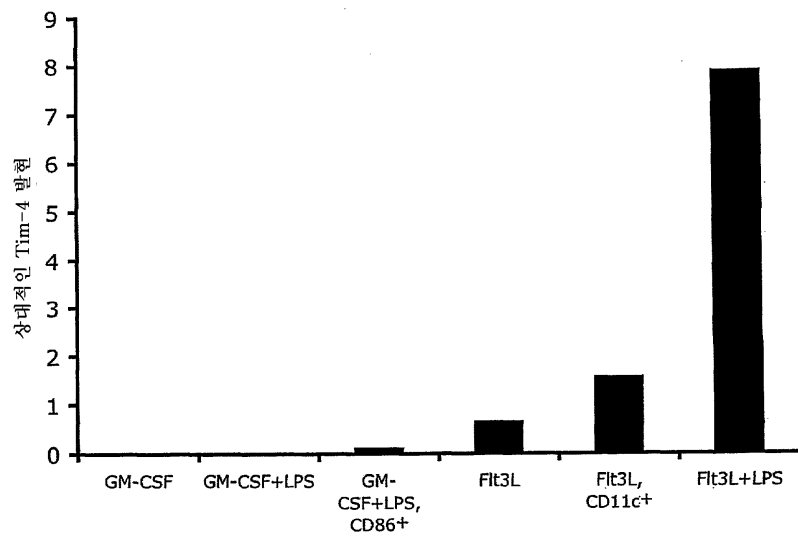
도면12B



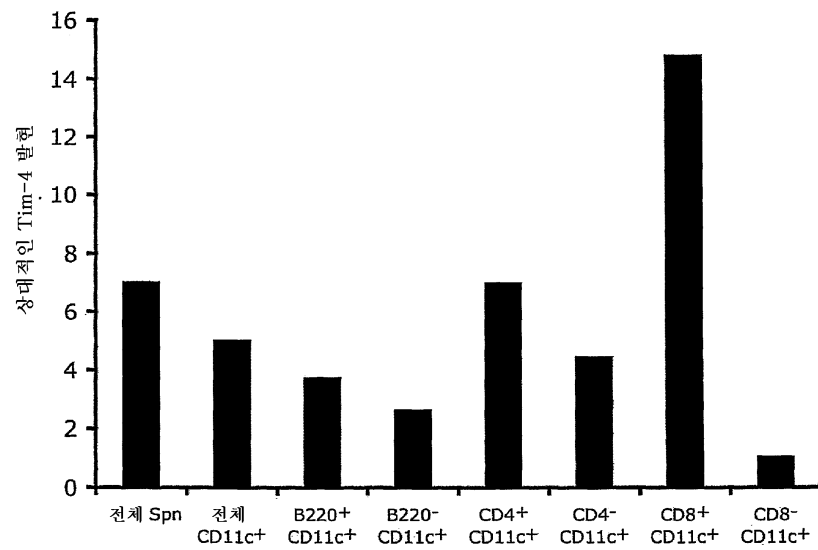
도면12C



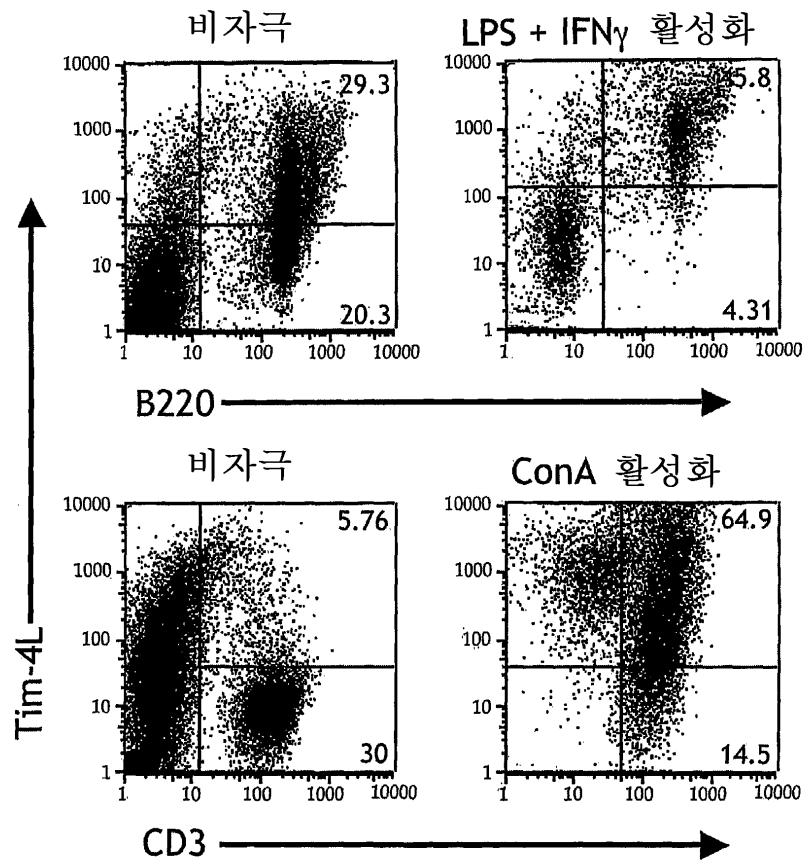
도면12D



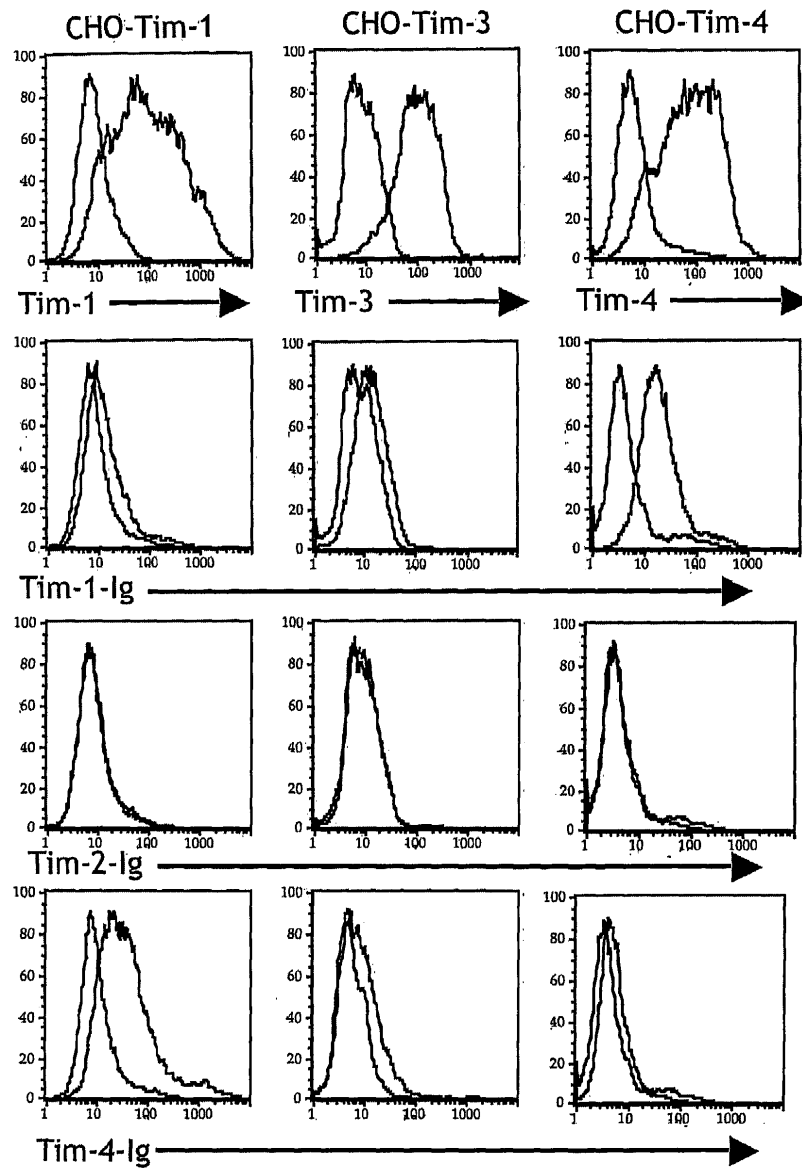
도면12E



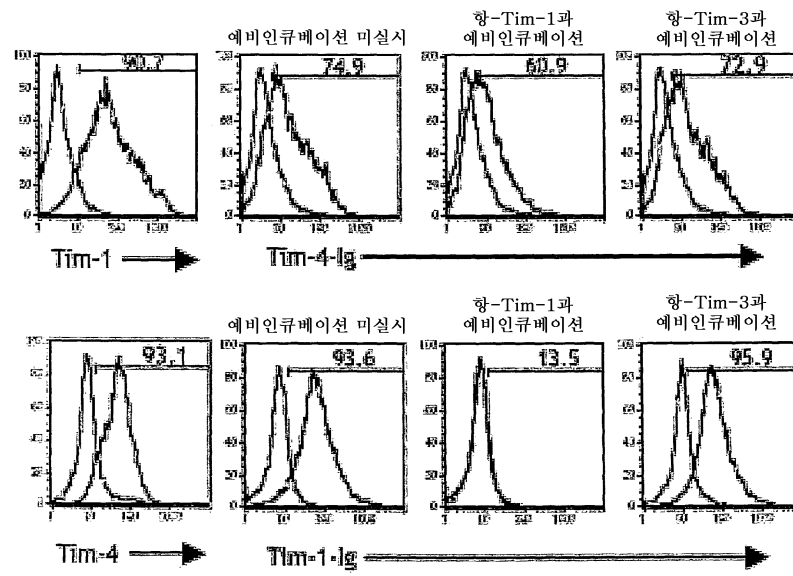
도면13



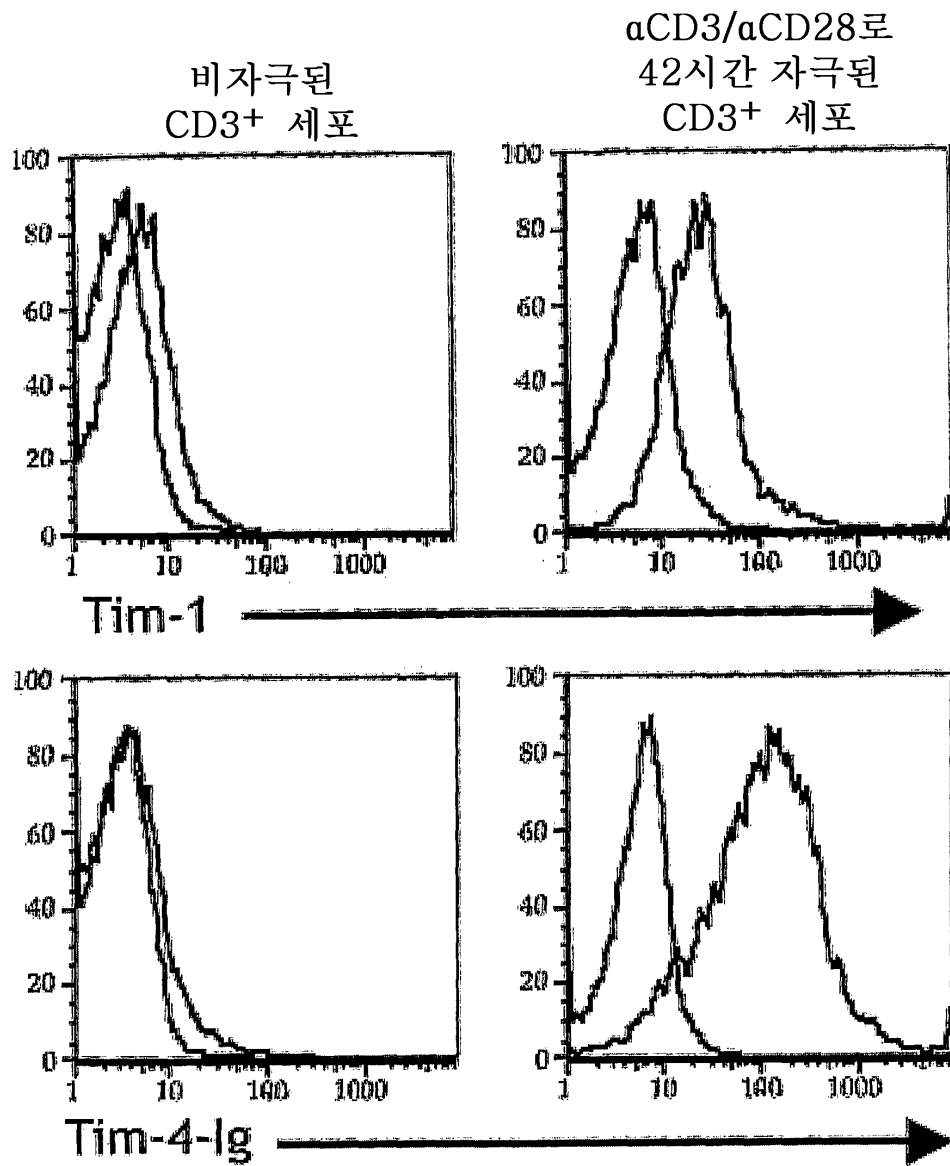
도면14A



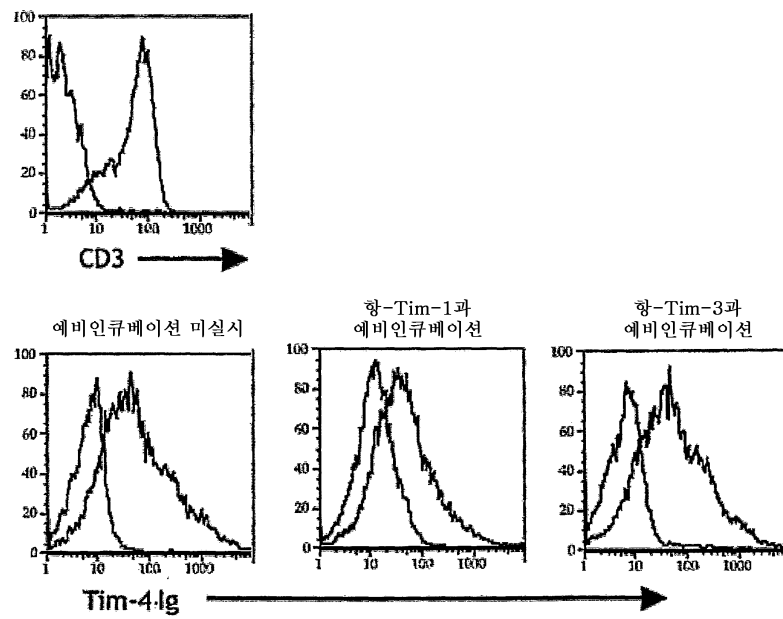
도면14B



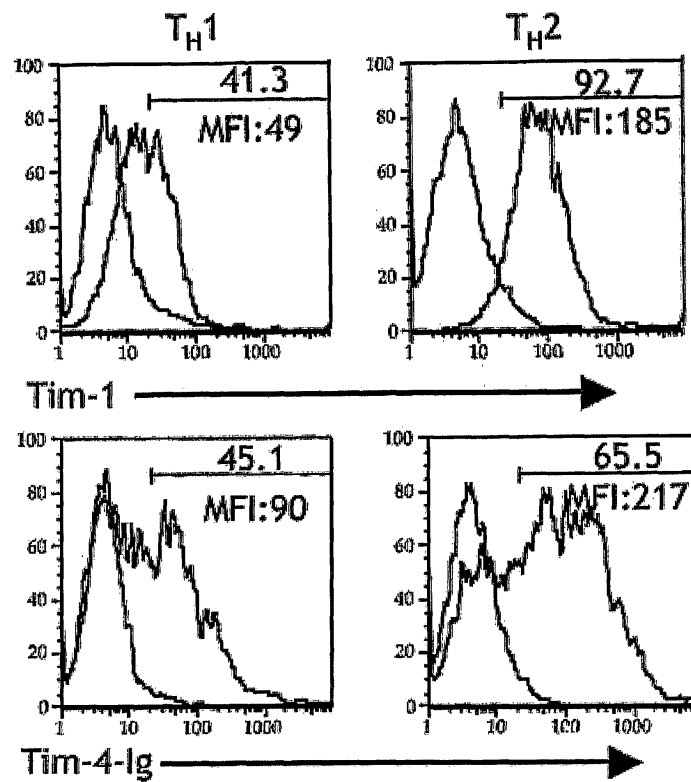
도면15A



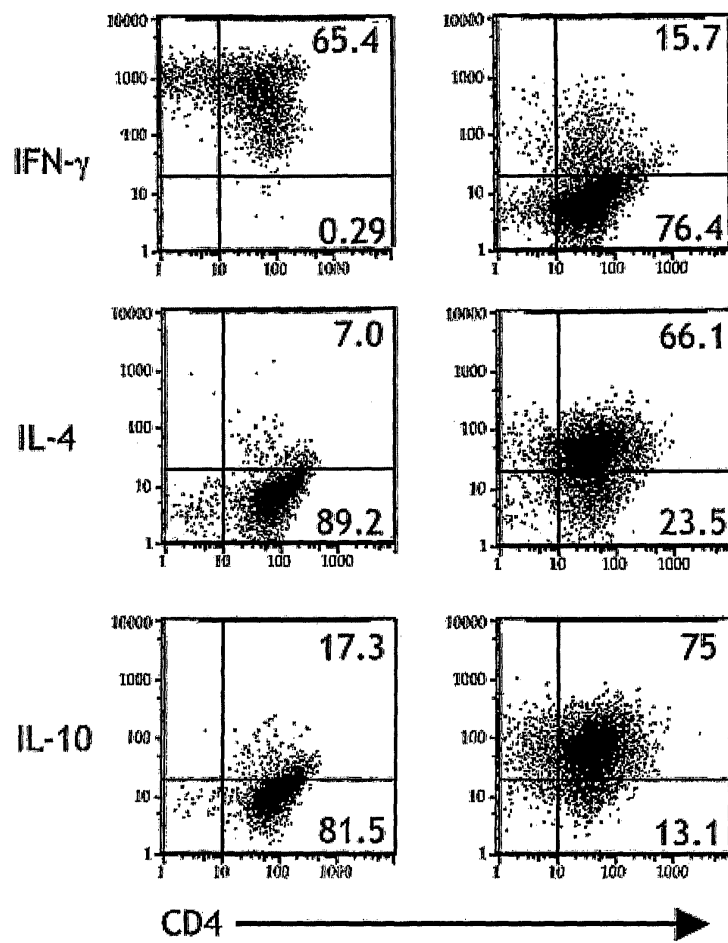
도면15B



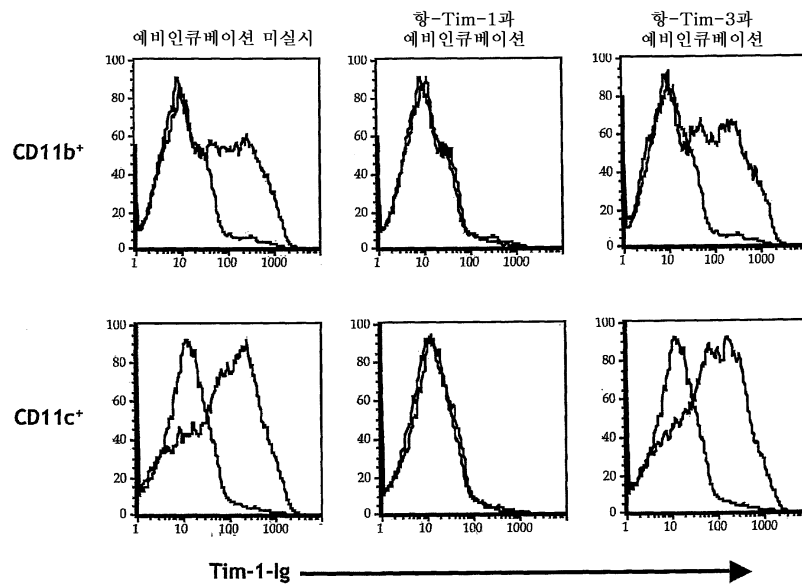
도면15C



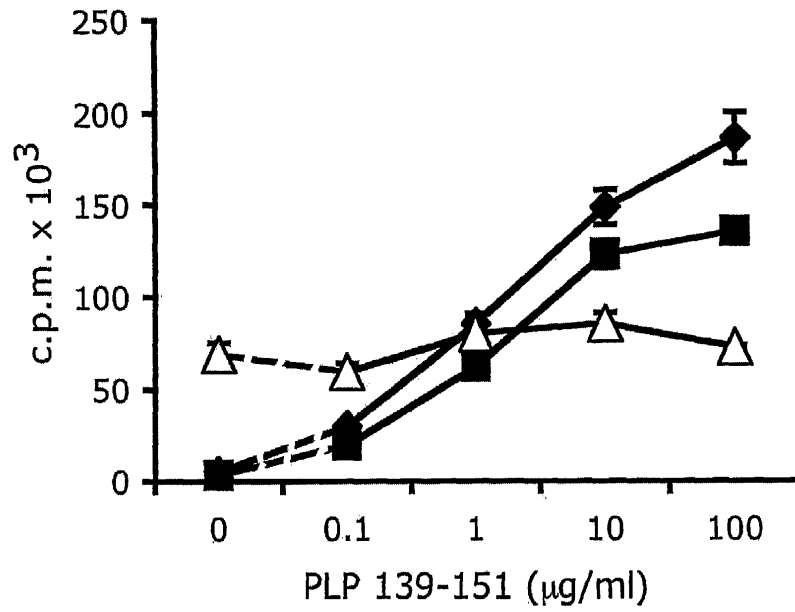
도면15D



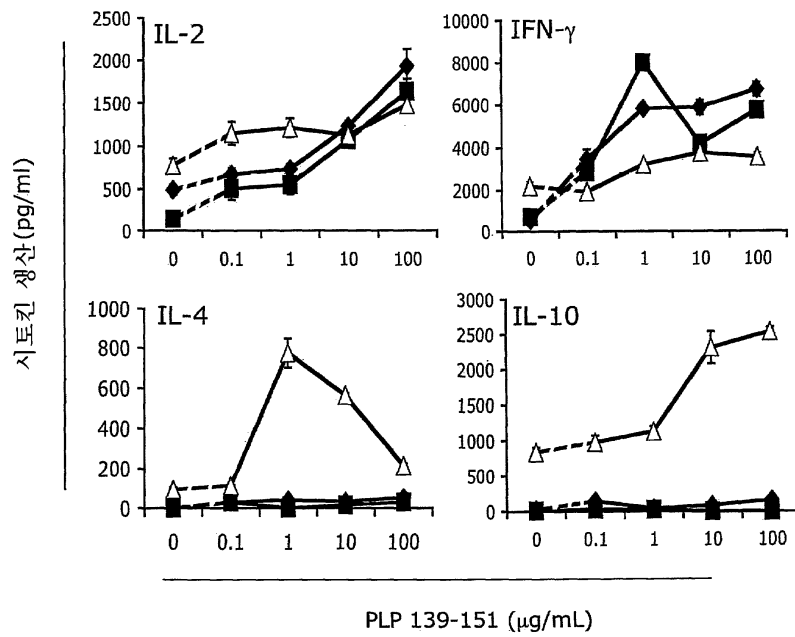
도면16



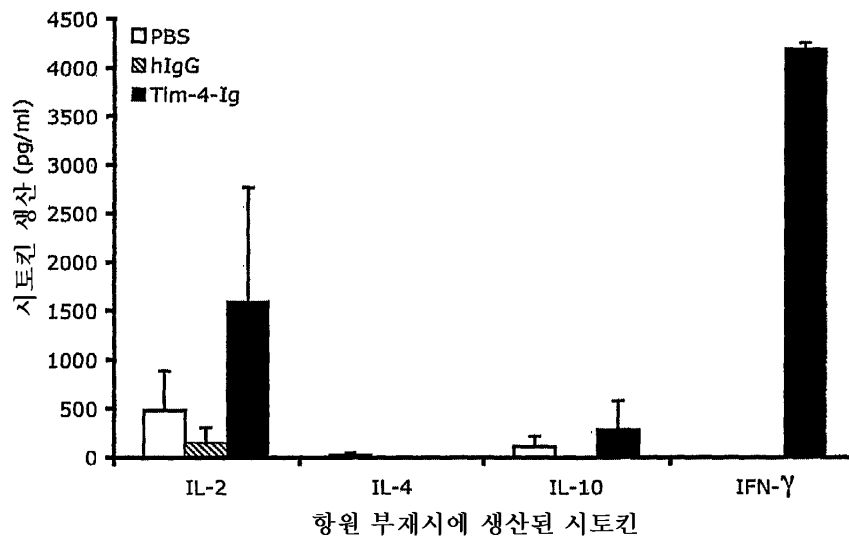
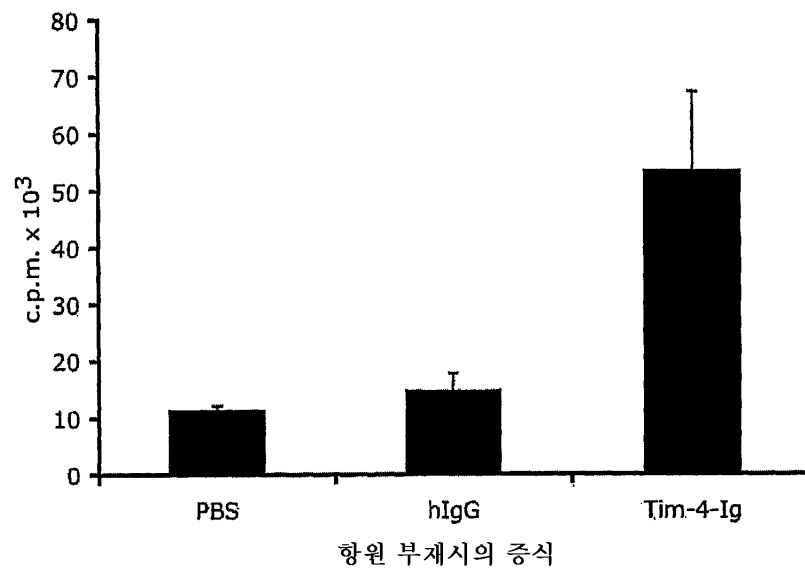
도면17A



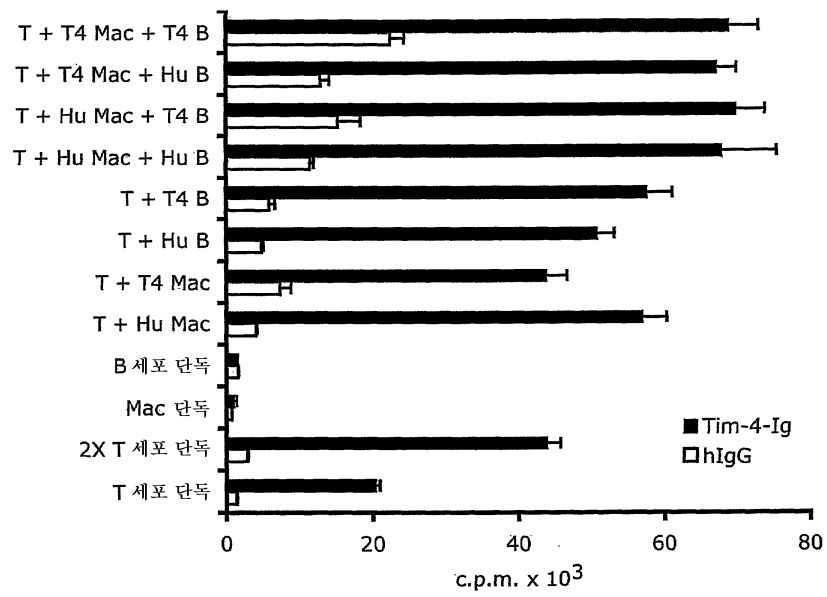
도면17B



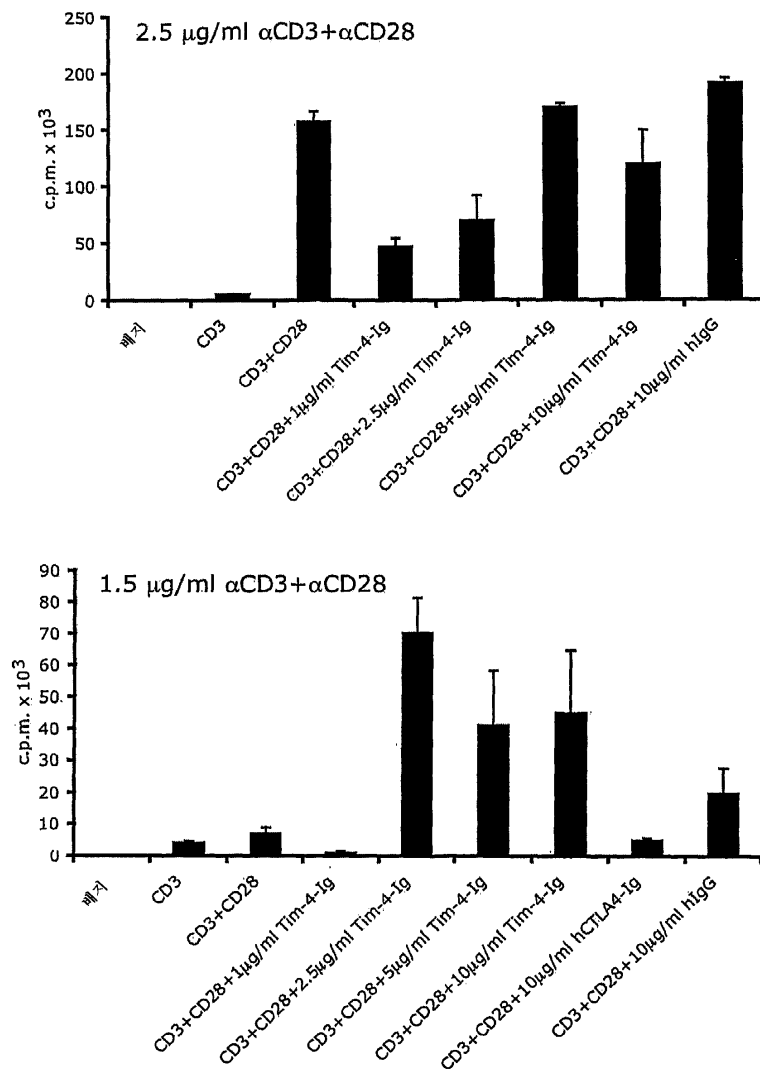
도면18A



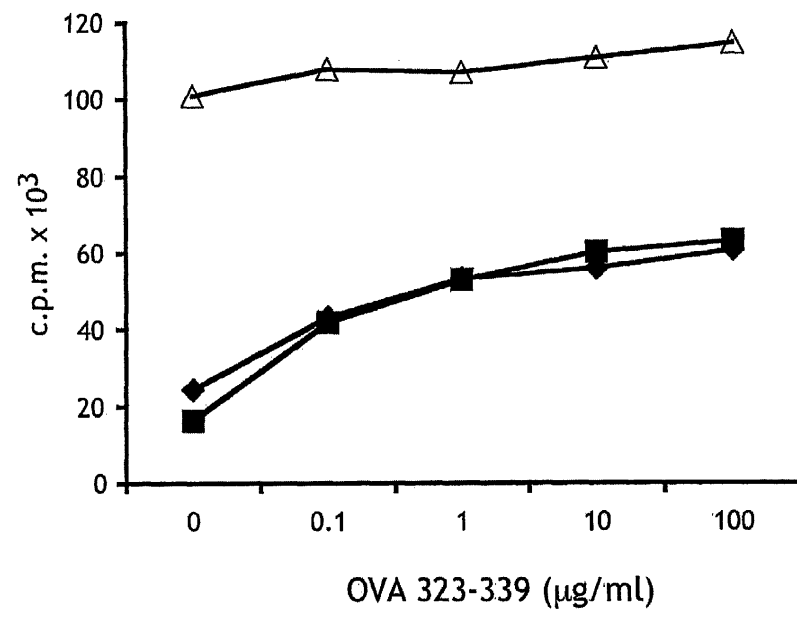
도면18B



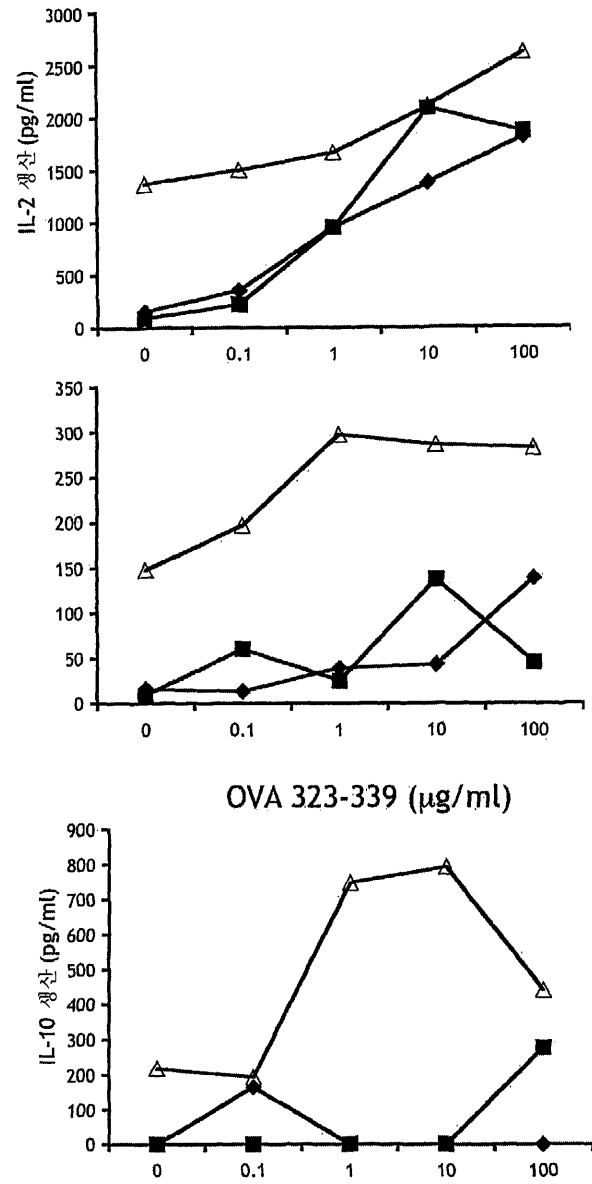
도면18C



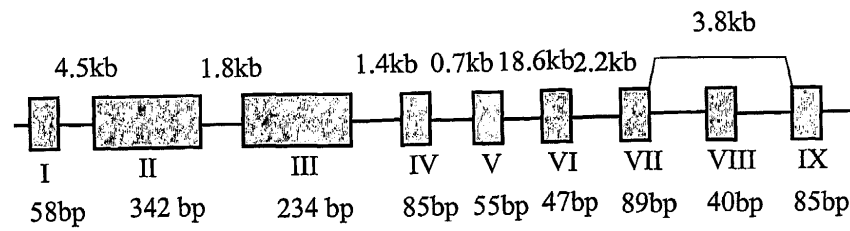
도면19A



도면19B



도면20



전체 길이



뮤신의 일부 결여 --> 프레임시프트, 조기 정지



가능한 스플라이싱 변이체



뮤신의 일부 및 모든 트랜스멤브레인 도메인 결여

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.
Beth Israel Deaconess Medical Center
Kuchroo, Vijay K.
Chakravarti, Sumone
Strom, Terry
Zheng, Xin Ziao
Meyers, Jennifer

<120> METHODS OF MODULATING IMMUNE RESPONSES
BY MODULATING TIM-1, TIM-2 AND TIM-4 FUNCTION

<130> BWOC-PWO-002

<140> PCT/US05/008423

<141> 2005-03-14

<150> US 60/552,523

<151> 2004-03-12

<150> US 60/622,559

<151> 2004-10-27

<160> 13

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 359

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met His Pro Gln Val Val Ile Leu Ser Leu Ile Leu His Leu Ala Asp
 1             5             10             15
Ser Val Ala Gly Ser Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro Ser Val
      20             25             30
Thr Leu Pro Cys His Tyr Ser Gly Ala Val Thr Ser Met Cys Trp Asn
      35             40             45
Arg Gly Ser Cys Ser Leu Phe Thr Cys Gln Asn Gly Ile Val Trp Thr
      50             55             60
Asn Gly Thr His Val Thr Tyr Arg Lys Asp Thr Arg Tyr Lys Leu Leu
65             70             75             80
Gly Asp Leu Ser Arg Arg Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Thr Ala
      85             90             95
Val Ser Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys Arg Val Glu His Arg Gly Trp
      100            105            110
Phe Asn Asp Met Lys Ile Thr Val Ser Leu Glu Ile Val Pro Pro Lys
      115            120            125
Val Thr Thr Thr Pro Ile Val Thr Thr Val Pro Thr Val Thr Thr Val
      130            135            140
Arg Thr Ser Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr
145            150            155            160
Val Pro Thr Thr Met Ser Ile Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr
      165            170            175
Met Thr Val Ser Thr Thr Thr Ser Val Pro Thr Thr Thr Ser Ile Pro
      180            185            190
Thr Thr Thr Ser Val Pro Val Thr Thr Thr Val Ser Thr Phe Val Pro
      195            200            205
Pro Met Pro Leu Pro Arg Gln Asn His Glu Pro Val Ala Thr Ser Pro
      210            215            220
Ser Ser Pro Gln Pro Ala Glu Thr His Pro Thr Thr Leu Gln Gly Ala
225            230            235            240
Ile Arg Arg Glu Pro Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Ser Tyr Thr Thr Asp
      245            250            255

```

Gly Asn Asp Thr Val Thr Glu Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn
 260 265 270
 Gln Thr Gln Leu Phe Leu Glu His Ser Leu Leu Thr Ala Asn Thr Thr
 275 280 285
 Lys Gly Ile Tyr Ala Gly Val Cys Ile Ser Val Leu Val Leu Leu Ala
 290 295 300
 Leu Leu Gly Val Ile Ile Ala Lys Lys Tyr Phe Phe Lys Lys Glu Val
 305 310 315 320
 Gln Gln Leu Ser Val Ser Phe Ser Ser Leu Gln Ile Lys Ala Leu Gln
 325 330 335
 Asn Ala Val Glu Lys Glu Val Gln Ala Glu Asp Asn Ile Tyr Ile Glu
 340 345 350
 Asn Ser Leu Tyr Ala Thr Asp
 355

<210> 2
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 2
 Met Asn Gln Ile Gln Val Phe Ile Ser Gly Leu Ile Leu Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Asp Ser Tyr Val Glu Val Lys Gly Val Val Gly His Pro
 20 25 30
 Val Thr Leu Pro Cys Thr Tyr Ser Thr Tyr Arg Gly Ile Thr Thr Thr
 35 40 45
 Cys Trp Gly Arg Gly Gln Cys Pro Ser Ser Ala Cys Gln Asn Thr Leu
 50 55 60
 Ile Trp Thr Asn Gly His Arg Val Thr Tyr Gln Lys Ser Ser Arg Tyr
 65 70 75 80
 Asn Leu Lys Gly His Ile Ser Glu Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu
 85 90 95
 Asn Ser Val Glu Ser Asp Ser Gly Leu Tyr Cys Cys Arg Val Glu Ile
 100 105 110
 Pro Gly Trp Phe Asn Asp Gln Lys Val Thr Phe Ser Leu Gln Val Lys
 115 120 125
 Pro Glu Ile Pro Thr Arg Pro Pro Thr Arg Pro Thr Thr Thr Arg Pro
 130 135 140
 Thr Ala Thr Gly Arg Pro Thr Thr Ile Ser Thr Arg Ser Thr His Val
 145 150 155 160
 Pro Thr Ser Ile Arg Val Ser Thr Ser Thr Pro Pro Thr Ser Thr His
 165 170 175
 Thr Trp Thr His Lys Pro Glu Pro Thr Thr Phe Cys Pro His Glu Thr
 180 185 190
 Thr Ala Glu Val Thr Gly Ile Pro Ser His Thr Pro Thr Asp Trp Asn
 195 200 205
 Gly Thr Val Thr Ser Ser Gly Asp Thr Trp Ser Asn His Thr Glu Ala
 210 215 220
 Ile Pro Pro Gly Lys Pro Gln Lys Asn Pro Thr Lys Gly Phe Tyr Val
 225 230 235 240

Gly Ile Cys Ile Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ser Thr Val
245 250 255
Ala Ile Thr Arg Tyr Ile Leu Met Lys Arg Lys Ser Ala Ser Leu Ser
260 265 270
Val Val Ala Phe Arg Val Ser Lys Ile Glu Ala Leu Gln Asn Ala Ala
275 280 285
Val Val His Ser Arg Ala Glu Asp Asn Ile Tyr Ile Val Glu Asp Arg
290 295 300
Pro
305

<210> 3
<211> 378
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Met Ser Lys Glu Pro Leu Ile Leu Trp Leu Met Ile Glu Phe Trp Trp
1 5 10 15
Leu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Glu Val Leu
20 25 30
Gly His Arg Val Thr Leu Pro Cys Leu Tyr Ser Ser Trp Ser His Asn
35 40 45
Ser Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Asp Gln Cys Pro Tyr Ser Gly Cys
50 55 60
Lys Glu Ala Leu Ile Arg Thr Asp Gly Met Arg Val Thr Ser Arg Lys
65 70 75 80
Ser Ala Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Thr Ile Pro Arg Gly Asp Val Ser
85 90 95
Leu Thr Ile Leu Asn Pro Ser Glu Ser Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys
100 105 110
Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Ile Asn Val Arg
115 120 125
Leu Asn Leu Gln Arg Ala Ser Thr Thr Thr His Arg Thr Ala Thr Thr
130 135 140
Thr Thr Arg Arg Thr Thr Thr Thr Ser Pro Thr Thr Thr Arg Gln Met
145 150 155 160
Thr Thr Thr Pro Ala Ala Leu Pro Thr Thr Val Val Thr Thr Pro Asp
165 170 175
Leu Thr Thr Gly Thr Pro Leu Gln Met Thr Thr Ile Ala Val Phe Thr
180 185 190
Thr Ala Asn Thr Cys Leu Ser Leu Thr Pro Ser Thr Leu Pro Glu Glu
195 200 205
Ala Thr Gly Leu Leu Thr Pro Glu Pro Ser Lys Glu Gly Pro Ile Leu
210 215 220
Thr Ala Glu Ser Glu Thr Val Leu Pro Ser Asp Ser Trp Ser Ser Ala
225 230 235 240
Glu Ser Thr Ser Ala Asp Thr Val Leu Leu Thr Ser Lys Glu Ser Lys
245 250 255
Val Trp Asp Leu Pro Ser Thr Ser His Val Ser Met Trp Lys Thr Ser
260 265 270

```

Asp Ser Val Ser Ser Pro Gln Pro Gly Ala Ser Asp Thr Ala Val Pro
    275                      280                      285
Glu Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly Gln Met Asp Gly Ile Pro Met
    290                      295                      300
Ser Met Lys Asn Glu Met Pro Ile Ser Gln Leu Leu Met Ile Ile Ala
    305                      310                      315                      320
Pro Ser Leu Gly Phe Val Leu Phe Ala Leu Phe Val Ala Phe Leu Leu
    325                      330                      335
Arg Gly Lys Leu Met Glu Thr Tyr Cys Ser Gln Lys His Thr Arg Leu
    340                      345                      350
Asp Tyr Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val Leu Asn Asp Val Gln His Gly
    355                      360                      365
Arg Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr Leu
    370                      375

```

<210> 4
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Mouse

```

<400> 4
Met Ser Lys Gly Leu Leu Leu Trp Leu Val Met Glu Leu Trp Trp
    1                      5                      10                      15
Leu Tyr Leu Thr Pro Ala Ala Ser Glu Asp Thr Ile Ile Gly Phe Leu
    20                      25                      30
Gly Gln Pro Val Thr Leu Pro Cys His Tyr Leu Ser Trp Ser Gln Ser
    35                      40                      45
Arg Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Gly Ser Cys Pro Asn Ser Lys Cys
    50                      55                      60
Asn Ala Glu Leu Leu Arg Thr Asp Gly Thr Arg Ile Ile Ser Arg Lys
    65                      70                      75                      80
Ser Thr Lys Tyr Thr Leu Leu Gly Lys Val Gln Phe Gly Glu Val Ser
    85                      90                      95
Leu Thr Ile Ser Asn Thr Asn Arg Gly Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys
    100                     105                     110
Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Lys Asn Val Arg
    115                     120                     125
Leu Glu Leu Arg Arg Ala Thr Thr Thr Lys Lys Pro Thr Thr Thr Thr
    130                     135                     140
Arg Pro Thr Thr Thr Pro Tyr Val Thr Thr Thr Pro Glu Leu Leu
    145                     150                     155                     160
Pro Thr Thr Val Met Thr Thr Ser Val Leu Pro Thr Thr Thr Pro Pro
    165                     170                     175
Gln Thr Leu Ala Thr Thr Ala Phe Ser Thr Ala Val Thr Thr Cys Pro
    180                     185                     190
Ser Thr Thr Pro Gly Ser Phe Ser Gln Glu Thr Thr Lys Gly Ser Ala
    195                     200                     205
Ile Thr Thr Glu Ser Glu Thr Leu Pro Ala Ser Asn His Ser Gln Arg
    210                     215                     220
Ser Met Met Thr Ile Ser Thr Asp Ile Ala Val Leu Arg Pro Thr Gly
    225                     230                     235                     240

```

Ser Asn Pro Gly Ile Leu Pro Ser Thr Ser Gln Leu Thr Thr Gln Lys
 245 250 255
 Thr Thr Leu Thr Thr Ser Glu Ser Leu Gln Lys Thr Thr Lys Ser His
 260 265 270
 Gln Ile Asn Ser Arg Gln Thr Ile Leu Ile Ile Ala Cys Cys Val Gly
 275 280 285
 Phe Val Leu Met Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Leu Leu Arg Gly Lys
 290 295 300
 Val Thr Gly Ala Asn Cys Leu Gln Arg His Lys Arg Pro Asp Asn Thr
 305 310 315 320
 Glu Asp Ser Asp Ser Val Leu Asn Asp Met Ser His Gly Arg Asp Asp
 325 330 335
 Glu Asp Gly Ile Phe Thr Leu
 340

<210> 5
 <211> 1440
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gttacccagc attgtgagtg acagagcctg gatctgaacg ctgatcccat aatgcatcct 60
 caagtgggtca tcttaagcct catcctacat ctggcagatt ctgtagctgg ttctgttaaag 120
 gttggtggag aggcaggtcc atctgtcaca ctaccctgcc actacagtgg agctgtcaca 180
 tcaatgtgct ggaatagagg ctcatgttct ctattcacat gccaaaatgg cattgtcttg 240
 accaatggaa cccacgtcac ctatcggaag gacacacgct ataagctatt gggggacctt 300
 tcaagaaggg atgtctcttt gaccatagaa aatacagctg tgtctgacag tggcgtatat 360
 tgttgccgtg ttgagcaccg tgggtggttc aatgacatga aaatcaccgt atcattggag 420
 attgtgccac ccaaggtcac gactactcca attgtcacaa ctgttccaac cgtcacgact 480
 gttcgaacga gcaccactgt tccaacgaca acgactgttc caacgacaac tgttccaaca 540
 acaatgagca ttccaacgac aacgactgtt ccgacgacaa tgactgtttc aacgacaacg 600
 agcgttccaa cgacaacgag cattccaaca acaacaagtg ttccagtgc aacaacggtc 660
 tctacctttg ttctccaat gcctttgccc aggcagaacc atgaaccagt agccacttca 720
 ccatcttcac ctcagccagc agaaaccac cctacgacac tgcagggagc aataaggaga 780
 gaaccaccca gctcaccatt gtactcttac acaacagatg ggaatgacac cgtgacagag 840
 tcttcagatg gcctttggaa taacaatcaa actcaactgt tcctagaaca tagtctactg 900
 acggccaata ccactaaagg aatctatgct ggagtctgta tttctgtctt ggtgcttctt 960
 gctcttttgg gtgtcatcat tgccaaaaag tatttcttca aaaaggaggt tcaacaacta 1020
 agtgtttcat ttagcagcct tcaaattaaa gctttgcaa atgcagttga aaaggaagtc 1080
 caagcagaag acaatatcta cattgagaat agtctttatg ccacggacta agaccagtg 1140
 gtgctctttg agagtttacg cccatgactg cagaagactg aacaggtatc agcacatcag 1200
 atgtctttta gactccaaga caatttttct gtttcagttt catctggcat tccaacatgt 1260
 cagtgatact gggtagagta actctcccac tccaaactgt gtatagtcaa cctcatcatt 1320
 aatgtagtcc taatttgttt tgctaaaact gggtcaatcc ttctgatcat tgcagagttt 1380
 tctctcaaac atgaacactt tagaattgta tgttctcttt agaccccata aatcctgtat 1440

<210> 6
 <211> 918
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 6

```

atgaatcaga ttcaagtctt catttcaggc ctcatactgc ttctcccagg cactgtggat 60
tcttatgtgg aagtaaaggg ggtagtgggt caccctgtca cacttccatg tacttactca 120
acatatcgtg gaatcacacaac gacatgttgg ggccgagggc aatgcccac ttctgcttgt 180
caaaatacac ttatttggac caatggacat cgtgtcacct atcagaagag cagtcggtac 240
aacttaaagg ggcataatttc agaaggagat gtgtccttga cgatagagaa ctctgttgag 300
agtgcacgtg gtctgtattg ttgtcgagtg gagattcctg gatggtttaa tgatcagaaa 360
gtgacctttt cattgcaagt taaaccagag attcccacac gtcctccaac aagaccaca 420
actacaaggc ccacagctac aggaagaccc acgactatct caacaagatc cacacatgta 480
ccaacatcaa tcagagtctc tacctccact cctccaacat ctacacacac atggactcac 540
aaaccagaac ccactacatt ttgtccccat gagacaacag ctgaggtgac aggaatccca 600
tcccatactc ctacagactg gaatggcact gtgacatcct caggagatac ctggagtaat 660
cacactgaag caatccctcc agggaagccg cagaaaaacc ctactaaggg cttctatgtt 720
ggcatctgca tcgcagccct gctgctactg ctcttgtga gcaccgtggc tatcaccagg 780
tacatactta tgaaaaggaa gtcagcatct ctaagcgtgg ttgccttccg tgtctctaag 840
attgaagctt tgcagaacgc agcggttgtg cattcccgag ctgaagacaa catctacatt 900
gttgaagata gaccttga                                     918

```

<210> 7

<211> 1156

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

atgtccaaag aacctctcat tctctggctg atgattgagt tttggtggtt ttacctgaca 60
ccagtcactt cagagactgt tgtgacggag gttttgggtc accgggtgac tttgccctgt 120
ctgtactcat cctgggtctca caacagcaac agcatgtgct gggggaaaga ccagtgcccc 180
tactccggtt gcaaggaggc gctcatccgc actgatggaa tgagggtgac ctcaagaaag 240
tcagcaaaat atagacttca ggggactatc ccgagagggt atgtctcctt gaccatctta 300
aaccaccagt aaagtgcag cggtgtgtac tgctgccgca tagaagtgcc tggctgggtc 360
aacgatgtaa agataaacgt gcgcctgaat ctacagagag cctcaacaac cagcacaga 420
acagcaacca ccaccacacg cagaacaaca acaacaagcc ccaccaccac ccgacaaatg 480
acaacaaccc cagctgcact tccaacaaca gtcgtgacca caccgatct cacaaccgga 540
acaccactcc agatgacaac cattgccgtc ttcacaacag caaacacgtg cttttcacta 600
accccaagca cccttccgga ggaagccaca ggtcttctga ctcccgagcc ttctaaggaa 660
gggcccaccc tcaactgcaga atcagaaact gtcctcccca gtgattcctg gagtagtgct 720
gagtctactt ctgctgacac tgtcctgctg acatccaaag agtccaaagt ttgggatctc 780
ccatcaacat cccacgtgtc aatgtggaaa acgagtgatt ctgtgtcttc tcctcagcct 840
ggagcatctg atacagcagt tcctgagcag aacaaaacaa caaaaacagg acagatggat 900
ggaataccca tgtcaatgaa gaatgaaatg cccatctccc aactactgat gatcatcgcc 960
ccctccttgg gatattgtgct ctctgcattg tttgtggcgt ttctcctgag agggaaactc 1020
atggaaacct attgttcgca gaaacacaca aggctagact acattggaga tagtaaaaat 1080
gtcctcaatg acgtgcagca tggaagggaa gacgaagacg gcctttttac cctctaacaa 1140
cgcagtagca tgtagg                                     1156

```

<210> 8

<211> 2331

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 8

```

aggaaatgga gaaagcagct cagagaaagg gaggacggag ataagggaag gcatggcaca 60
caacagagat ggatggacag tctgaggctg agagagggct agtgatttct cggacacttg 120
ggcagtagaa cccataccac cctgttctct gggatccgat ggccttggag agggggctgc 180
agggcccgag gacaccaact cttccagag cgtgtgcatg gagccagact gaaattacca 240
tgtgtccaaa ttaaaattgc gtacttcaag gattatttga aggactattc ttagaccctt 300
ttaagaagat tttttaaaaa aacagttact ggctgcagac acggaaatgc tctgactgct 360
gtagagccag tgggcccttt aggggagctc cagccctgtg gaagccagac aaccaacttg 420
aagccatttc caaattgtgg gtggtgatcc atttcaagtt atgaaatgaa tttgatgatt 480
caaggccatc gtttattaaa actaattacc tctgtccgaa ttcggcacga ggggcttctc 540
atcctctggc tgggtgacgga gctctggtgg ctttatctga caccagctgc ctcagaggat 600
acaataatag ggtttttggg ccagccggtg actttgcctt gtcattacct ctcgtggtcc 660
cagagccgca acagtatgtg ctggggcaaa ggttcatgtc ccaattccaa gtgcaatgca 720
gagcttctcc gtacagatgg aacaagaatc atctccagga agtcaacaaa atatacactt 780
ttggggaagg tccagtttg tgaagtgtcc ttgaccatct caaacaccaa tcgaggtgac 840
agtggggtgt actgctgccg tatagagggt cctggctggt tcaatgatgt caagaagaat 900
gtgcgcttgg agctgaggag agccacaaca accaaaaaac caacaacaac caccgcca 960
accaccacc cttatgtgac caccaccacc ccagagctgc ttccaacaac agtcatgacc 1020
acatctgttc tcccaaccac cacaccacc cagacactag ccaccactgc cttcagtaca 1080
gcagtgacca cgtgccctc aacaacacct ggctccttct cacaagaaac cacaaaagg 1140
tccgccttca ctacagaatc agaaactctg cctgcatcca atcactctca aagaagcatg 1200
atgaccatat ctacagacat agccgtactc aggccacag gctctaacc tgggattctc 1260
ccatccactt cacagctgac gacacagaaa acaacattaa caacaagtga gtctttgcag 1320
aagacaacta aatcacatca gatcaacagc agacagacca tcttgatcat tgcctgctgt 1380
gtgggatttg tgctaattgg gttattgttt ctggcgcttc tccttcgagg gaaagtcaca 1440
ggagccaact gtttgcagag acacaagagg ccagacaaca ctgaagatag tgacagcgtc 1500
ctcaatgaca tgtcacacgg gagggatgat gaagacggga tcttactct ctgactcacc 1560
atctttatth aggattaagg ataggggaatg gcacttgaat tgtcaaaata agtttgggga 1620
cattgttaatt tccgtttaaa gtctcactct gtttactgat gctgtgggtc ctgtctggtt 1680
gtatcttccc acatgaagggt gtttttagaga cacatcttcc ctgcctcgtg ccttagtcct 1740
cttcgttgtt ttgtggctag gtgacttttc aactgggct tgaacactgt cagtgatggt 1800
gaaatccttg ccacagcttt gggagtctct tgcagtctcc cagcagtaga gggagttaga 1860
aatatccaga ggggaaaaaa aatctctctt ttcagacagt atctgcttta ttggtggtag 1920
ctgaatttca tttatacaga gtccttttaa cctgtctgtc ttcttcttgg tatctaagct 1980
gccttttgtt tttgtttttg tttttgttt tatgatatta acttcttttc acattcaagt 2040
ttctttaaaag ttgactatag tgccttctga actcttgag agagtttgga ttttggaagc 2100
tgccaggtac ctatcacagc aggggtgcca gtgacaagga tgggtgtaca atgaaacact 2160
gaagctatcc aaataaattc ctctaagtg aattcatttt actgcagcac aggaagaaca 2220
aatttgtctt acaactttta taattagtag cattatgaac cctaggagag aaataagagc 2280
aaatacctgt tgaataaatg aatgtaagaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa a 2331

```

<210> 9
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 9
 Met Ser Lys Gly Leu Leu Leu Trp Leu Val Met Glu Leu Trp Trp
 1 5 10 15
 Leu Tyr Leu Thr Pro Ala Ala Ser Glu Asp Thr Ile Ile Gly Phe Leu
 20 25 30
 Gly Gln Pro Val Thr Leu Pro Cys His Tyr Leu Ser Trp Ser Gln Ser
 35 40 45

```

Arg Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Gly Ser Cys Pro Asn Ser Lys Cys
 50                      55                      60
Asn Ala Glu Leu Leu Arg Thr Asp Gly Thr Arg Ile Ile Ser Arg Lys
65                      70                      75                      80
Ser Thr Lys Tyr Thr Leu Leu Gly Lys Val Gln Phe Gly Glu Val Ser
                      85                      90                      95
Leu Thr Ile Ser Asn Thr Asn Arg Gly Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys
100                      105                      110
Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Lys Asn Val Arg
115                      120                      125
Leu Glu Leu Arg Arg Ala Thr Thr Thr Lys Lys Pro Thr Thr Thr Thr
130                      135                      140
Arg Pro Thr Thr Thr Pro Tyr Val Thr Thr Thr Thr Pro Glu Leu Leu
145                      150                      155                      160
Pro Thr Thr Val Met Thr Thr Ser Val Leu Pro Thr Thr Thr Pro Pro
165                      170                      175
Gln Thr Leu Ala Thr Thr Ala Phe Ser Thr Ala Val Thr Thr Cys Pro
180                      185                      190
Ser Thr Thr Pro Gly Ser Phe Ser Gln Glu Thr Thr Lys Gly Ser Ala
195                      200                      205
Phe Thr Thr Glu Ser Glu Thr Leu Pro Ala Ser Asn His Ser Gln Arg
210                      215                      220
Ser Met Met Thr Ile Ser Thr Asp Ile Ala Val Leu Arg Pro Thr Gly
225                      230                      235                      240
Ser Asn Pro Gly Ile Leu Pro Ser Thr Ser Gln Leu Thr Thr Gln Lys
245                      250                      255
Thr Arg Lys Val Thr Gly Ala Asn Cys Leu Gln Arg His Lys Arg Pro
260                      265                      270
Asp Asn Thr Glu Asp Ser Asp Ser Val Leu Asn Asp Met Ser His Gly
275                      280                      285
Arg Asp Asp Glu Asp Gly Ile Phe Thr Leu
290                      295

```

<210> 10

<211> 304

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 10

```

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

```

```

Leu Thr Ile Ser Asn Thr Asn Arg Gly Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys
    100                      105                      110
Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Lys Asn Val Arg
    115                      120                      125
Leu Glu Leu Arg Arg Ala Thr Thr Thr Lys Lys Pro Thr Thr Thr Thr
    130                      135                      140
Arg Pro Thr Thr Thr Pro Tyr Val Thr Thr Thr Thr Pro Glu Leu Leu
    145                      150                      155                      160
Pro Thr Thr Val Met Thr Thr Ser Val Leu Pro Thr Thr Thr Pro Pro
    165                      170                      175
Gln Thr Leu Ala Thr Thr Ala Phe Ser Thr Ala Val Thr Thr Cys Pro
    180                      185                      190
Ser Thr Thr Pro Gly Ser Phe Ser Gln Glu Thr Thr Lys Gly Ser Ala
    195                      200                      205
Ile Thr Thr Glu Ser Glu Thr Leu Pro Ala Ser Asn His Ser Gln Arg
    210                      215                      220
Ser Met Met Thr Ile Ser Thr Asp Ile Ala Val Leu Arg Pro Thr Gly
    225                      230                      235                      240
Ser Asn Pro Gly Ile Leu Pro Ser Thr Ser Gln Leu Thr Thr Gln Lys
    245                      250                      255
Thr Asn Gln Gln Gln Thr Asp His Leu Asp His Cys Leu Leu Cys Gly
    260                      265                      270
Ile Cys Ala Asn Gly Val Ile Val Ser Gly Val Ser Pro Ser Arg Glu
    275                      280                      285
Ser His Arg Ser Gln Leu Phe Ala Glu Thr Gln Glu Ala Arg Gln His
    290                      295                      300

```

<210> 11

<211> 378

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

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

```

```

Thr Thr Arg Arg Thr Thr Thr Thr Ser Pro Thr Thr Thr Arg Gln Met
145                150                155                160
Thr Thr Thr Pro Ala Ala Leu Pro Thr Thr Val Val Thr Thr Pro Asp
                165                170                175
Leu Thr Thr Gly Thr Pro Leu Gln Met Thr Thr Ile Ala Val Phe Thr
                180                185                190
Thr Ala Asn Thr Cys Leu Ser Leu Thr Pro Ser Thr Leu Pro Glu Glu
                195                200                205
Ala Thr Gly Leu Leu Thr Pro Glu Pro Ser Lys Glu Gly Pro Ile Leu
                210                215                220
Thr Ala Glu Ser Glu Thr Val Leu Pro Ser Asp Ser Trp Ser Ser Ala
225                230                235                240
Glu Ser Thr Ser Ala Asp Thr Val Leu Leu Thr Ser Lys Glu Ser Lys
                245                250                255
Val Trp Asp Leu Pro Ser Thr Ser His Val Ser Met Trp Lys Thr Ser
                260                265                270
Asp Ser Val Ser Ser Pro Gln Pro Gly Ala Ser Asp Thr Ala Val Pro
                275                280                285
Glu Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly Gln Met Asp Gly Ile Pro Met
                290                295                300
Ser Met Lys Asn Glu Met Pro Ile Ser Gln Leu Leu Met Ile Ile Ala
305                310                315                320
Pro Ser Leu Gly Phe Val Leu Phe Ala Leu Phe Val Ala Phe Leu Leu
                325                330                335
Arg Gly Lys Leu Met Glu Thr Tyr Cys Ser Gln Lys His Thr Arg Leu
                340                345                350
Asp Tyr Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val Leu Asn Asp Val Gln His Gly
                355                360                365
Arg Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr Leu
                370                375

```

<210> 12
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> Mouse

```

<400> 12
Met Asn Leu Met Ile Gln Gly His Arg Leu Leu Lys Leu Ile Thr Ser
 1                5                10                15
Cys Arg Ile Arg His Glu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Val Thr Glu
                20                25                30
Leu Trp Trp Leu Tyr Leu Thr Pro Ala Ala Ser Glu Asp Thr Ile Ile
                35                40                45
Gly Phe Leu Gly Gln Pro Val Thr Leu Pro Cys His Tyr Leu Ser Trp
 50                55                60
Ser Gln Ser Arg Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Gly Ser Cys Pro Asn
 65                70                75                80
Ser Lys Cys Asn Ala Glu Leu Leu Arg Thr Asp Gly Thr Arg Ile Ile
                85                90                95
Ser Arg Lys Ser Thr Lys Tyr Thr Leu Leu Gly Lys Val Gln Phe Gly
                100                105                110

```

Glu Val Ser Leu Thr Ile Ser Asn Thr Asn Arg Gly Asp Ser Gly Val
 115 120 125
 Tyr Cys Cys Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Lys
 130 135 140
 Asn Val Arg Leu Glu Leu Arg Arg Ala Thr Thr Thr Lys Lys Pro Thr
 145 150 155 160
 Thr Thr Thr Arg Pro Thr Thr Thr Pro Tyr Val Thr Thr Thr Thr Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Pro Thr Thr Val Met Thr Thr Ser Val Leu Pro Thr Thr
 180 185 190
 Thr Pro Pro Gln Thr Leu Ala Thr Thr Ala Phe Ser Thr Ala Val Thr
 195 200 205
 Thr Cys Pro Ser Thr Thr Pro Gly Ser Phe Ser Gln Glu Thr Thr Lys
 210 215 220
 Gly Ser Ala Phe Thr Thr Glu Ser Glu Thr Leu Pro Ala Ser Asn His
 225 230 235 240
 Ser Gln Arg Ser Met Met Thr Ile Ser Thr Asp Ile Ala Val Leu Arg
 245 250 255
 Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gly Ile Leu Pro Ser Thr Ser Gln Leu Thr
 260 265 270
 Thr Gln Lys Thr Thr Leu Thr Thr Ser Glu Ser Leu Gln Lys Thr Thr
 275 280 285
 Lys Ser His Gln Ile Asn Ser Arg Gln Thr Ile Leu Ile Ile Ala Cys
 290 295 300
 Cys Val Gly Phe Val Leu Met Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Leu Leu
 305 310 315 320
 Arg Gly Lys Val Thr Gly Ala Asn Cys Leu Gln Arg His Lys Arg Pro
 325 330 335
 Asp Asn Thr Glu Asp Ser Asp Ser Val Leu Asn Asp Met Ser His Gly
 340 345 350
 Arg Asp Asp Glu Asp Gly Ile Phe Thr Leu
 355 360

<210> 13
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 13
 Met Asn Gln Ile Gln Val Phe Ile Ser Gly Leu Ile Leu Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Val Glu Ser His Thr Ala Val Gln Gly Leu Ala Gly His Pro
 20 25 30
 Val Thr Leu Pro Cys Ile Tyr Ser Thr His Leu Gly Gly Ile Val Pro
 35 40 45
 Met Cys Trp Gly Leu Gly Glu Cys Arg His Ser Tyr Cys Ile Arg Ser
 50 55 60
 Leu Ile Trp Thr Asn Gly Tyr Thr Val Thr His Gln Arg Asn Ser Arg
 65 70 75 80
 Tyr Gln Leu Lys Gly Asn Ile Ser Glu Gly Asn Val Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

Glu Asn Thr Val Val Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Cys Cys Val Val Glu
 100 105 110
 Ile Pro Gly Ala Phe His Phe Val Asp Tyr Met Leu Glu Val Lys Pro
 115 120 125
 Glu Ile Ser Thr Ser Pro Pro Thr Arg Pro Thr Ala Thr Gly Arg Pro
 130 135 140
 Thr Thr Ile Ser Thr Arg Ser Thr His Val Pro Thr Ser Thr Arg Val
 145 150 155 160
 Ser Thr Ser Thr Ser Pro Thr Pro Ala His Thr Glu Thr Tyr Lys Pro
 165 170 175
 Glu Ala Thr Thr Phe Tyr Pro Asp Gln Thr Thr Ala Glu Val Thr Glu
 180 185 190
 Thr Leu Pro Asp Thr Pro Ala Asp Trp His Asn Thr Val Thr Ser Ser
 195 200 205
 Asp Asp Pro Trp Asp Asp Asn Thr Glu Val Ile Pro Pro Gln Lys Pro
 210 215 220
 Gln Lys Asn Leu Asn Lys Gly Phe Tyr Val Gly Ile Ser Ile Ala Ala
 225 230 235 240
 Leu Leu Ile Leu Met Leu Leu Ser Thr Met Val Ile Thr Arg Tyr Val
 245 250 255
 Val Met Lys Arg Lys Ser Glu Ser Leu Ser Phe Val Ala Phe Pro Ile
 260 265 270
 Ser Lys Ile Gly Ala Ser Pro Lys Lys Val Val Glu Arg Thr Arg Cys
 275 280 285
 Glu Asp Gln Val Tyr Ile Ile Glu Asp Thr Pro Tyr Pro Glu Glu Glu
 290 295 300
 Ser
 305