



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0040796
(43) 공개일자 2017년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 38/1732 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7003994

(22) 출원일자(국제) 2015년07월14일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2017년02월13일

(86) 국제출원번호 PCT/AU2015/050393

(87) 국제공개번호 WO 2016/008005
국제공개일자 2016년01월21일

(30) 우선권주장
2014902709 2014년07월14일 오스트레일리아(A)
2014904466 2014년11월06일 오스트레일리아(A)

(71) 출원인
더 카운슬 오브 더 퀸즐랜드 인스티튜트 오브 메디컬 리서치
오스트레일리아 4006 퀸즐랜드 허스톤 허스톤 로드 300

(72) 발명자
와이스 미셸
오스트레일리아 4006 퀸즐랜드 브리즈번 허스톤 로드 300

(74) 대리인
특허법의 태평양

(74) 대리인
특허법의 태평양

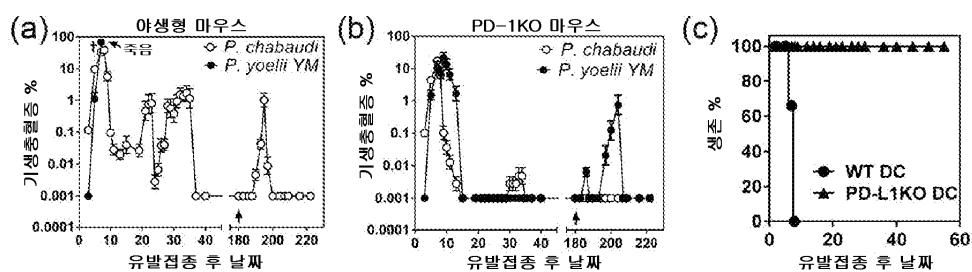
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 갈레틴 면역치료법

(57) 요약

포유류에서 면역성의 조정 방법은 포유류에서 갈렉틴-9 활성의 조정에 의해 제공된다. 면역성의 촉진 또는 증강은 포유류에서 갈렉틴-9 활성의 활성화 또는 자극에 의해, 예컨대 포유류에 대한 갈렉틴-9 작동체의 투여에 의해 시행될 수 있다. 작동체는 갈렉틴-9에 결합하는 다양체성, 가용성 PD-L2 또는 작동체 항체일 수 있다. 면역성의 억제 또는 방지는 포유류에서 갈렉틴-9 활성의 저해 또는 차단에 의해, 예컨대 갈렉틴-9에 결합하거나 PD-L2 다양체화 및/또는 갈렉틴-9에 대한 결합을 방지하거나 저해하는 길항체 항체 또는 항체 단편의 투여에 의해 달성될 수 있다. 상기 언급된 방법은 갈렉틴-9 활성의 조정에 반응하는 질환, 장애 또는 상태의 방지 또는 치료를 위해 적합할 수 있다. 또한, 갈렉틴-9 활성의 조정에 의해 면역성을 조정하기 위해 유용할 수 있는 갈렉틴-9 작동체, 저해제 또는 길항체의 설계, 스크리닝, 조작 또는 다른 경우의 생산 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/1774 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 16/2827 (2013.01)

C07K 16/2851 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

포유류에서 갈렉틴-9 활성을 조정함으로써 포유류에서 면역성을 조정하는 단계를 포함하는, 포유류에서 면역성의 조정 방법.

청구항 2

포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극함으로써 포유류에서 면역성을 자극하거나 증강시키는 단계를 포함하는, 포유류에서 면역성의 촉진 또는 증강 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

갈렉틴-9 작동제를 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

Th1-매개 면역 반응 및/또는 면역 기억을 자극하고/하거나 개시하는 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 다량체성, 가용성 PD-L2 또는 이들의 하나 이상의 다량체성 생물학적 활성 단편; 및/또는 (ii) 생체내 PD-L2 다량체화를 유도하거나 다량체성 PD-L2를 모방하는 제제를 포유류에 투여하는 단계를 포함하며, 다량체성 PD-L2는 이량체성이 아닌 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

생체내 PD-L2 다량체화를 유도하는 제제는 항체인 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

다량체성 PD-L2를 모방하는 제제는 앱타머인 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

갈렉틴-9에 결합하는 작동제 항체 또는 항체 단편을 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

포유류에서 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나 방지하는 방법.

청구항 10

포유류에서 갈렉틴-9 활성을 적어도 부분적으로 저해하거나 차단함으로써 포유류에서 면역성을 억제하거나 방지

하는 단계를 포함하는, 포유류에서 면역성의 억제 또는 방지 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

갈렉틴-9 저해제 또는 길항체를 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 저해하거나 차단하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

청구항 10 또는 청구항 11에 있어서,

상기 갈렉틴-9 저해제 또는 길항체는 PD-L2 및 갈렉틴-9 간의 결합 상호작용을 방해하는 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 갈렉틴-9 저해제 또는 길항체는 PD-L2에 결합함으로써 갈렉틴-9에 대한 결합을 저해하는 방법.

청구항 14

청구항 10 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,

상기 갈렉틴-9 저해제 또는 길항체는 PD-L2에 결합하여 PD-L2 다량체화를 방지하거나 저해하는 방법.

청구항 15

청구항 12 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 갈렉틴-9 저해제 또는 길항체는 항-PD-L2 항체 또는 항체 단편인 방법.

청구항 16

청구항 10 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서,

상기 갈렉틴-9 저해제 또는 길항체는 가용성 갈렉틴-9 또는 그의 생물학적 활성 단편 및/또는 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 저해하거나 차단하는 PD-L2의 단량체성 또는 이량체성 형태를 포함하는 방법.

청구항 17

청구항 10 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서,

상기 갈렉틴-9 저해제 또는 길항체는 갈렉틴-9에 결합함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 저해하거나 차단하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 방법.

청구항 18

청구항 11 내지 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서,

포유류에서 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나 방지하는 방법.

청구항 19

포유류에서 갈렉틴-9 활성을 조정함으로써 질환, 장애 또는 상태를 방지하거나 치료하는 단계를 포함하는, 포유류에서 질환, 장애 또는 상태의 치료 또는 방지 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서,

상기 질환, 장애 또는 상태는 포유류에서 갈렉틴-9 활성의 활성화 또는 자극에 의한 면역성의 촉진 또는 증강에 반응하는 방법.

청구항 21

청구항 19 또는 청구항 20에 있어서,
갈렉틴-9 작동체를 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 22

청구항 9 또는 청구항 19 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서,
상기 질환, 장애 또는 상태는 암이고/하거나 병원체에 의해 유도되는 방법.

청구항 23

청구항 19 있어서,
상기 질환, 장애 또는 상태는 포유류에서 갈렉틴-9 활성의 저해 또는 차단에 의한 면역성의 억제 또는 방지에 반응하는 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서,
갈렉틴-9 길항제 또는 저해제를 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 25

청구항 18, 청구항 19, 청구항 23 또는 청구항 24 중 어느 한 항에 있어서,
상기 질환, 장애 또는 상태는 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환인 방법.

청구항 26

(i) 후보 분자가 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극함으로써 포유류에서 면역성을 자극하거나 증강시킬 수 있는 작동체인지 여부를 결정하는 단계; 또는 (ii) 후보 분자가 갈렉틴-9 활성을 차단하거나 저해함으로써 포유류에서 면역성을 적어도 부분적으로 억제하거나 방지할 수 있는 길항제 또는 저해제인지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 갈렉틴-9 작동체, 저해제 또는 길항제의 설계, 스크리닝, 조작 또는 다른 경우의 생산 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서,
단계 (i)에서, 상기 후보 분자는 PD-L2 자극 또는 갈렉틴-9의 활성화를 모방하는 방법.

청구항 28

청구항 26 또는 청구항 27에 있어서,
단계 (ii)에서, 상기 후보 분자는 PD-L2 자극 또는 갈렉틴-9의 활성화를 차단하거나 저해하는 방법.

청구항 29

청구항 1 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서,
갈렉틴-9는 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, B 세포 또는 NK 세포에 의해 발현되는 방법.

청구항 30

청구항 1 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,
상기 포유류는 인간인 방법.

청구항 31

청구항 26 내지 청구항 30 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산되는 갈렉틴-9 작동체, 길항제 또는 저해제.

청구항 32

갈렉틴-9 작동제 및 면역원을 포함하는 조성물.

청구항 33

갈렉틴-9 길항제 또는 저해제를 포함하는 조성물.

청구항 34

청구항 32 또는 청구항 33에 있어서,

상기 갈렉틴-9 작동제, 길항제 또는 저해제는 청구항 31에 따른 것인 조성물.

청구항 35

청구항 1 내지 청구항 25 중 어느 한 항의 방법에 따라 이용하기 위한, 청구항 31의 갈렉틴-9 작동제, 길항제 또는 저해제, 또는 청구항 32, 청구항 33 또는 청구항 34의 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 면역치료법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 면역 반응을 조정함으로써 하나 이상의 질환, 장애 또는 상태를 방지하거나 치료하기 위한 갈렉틴-9의 표적화에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

PD-1은 T 세포 기능을 하향조절하는 것으로 알려져 있는 확장된 분자 패밀리의 구성원이다. PD-1은 2가지 공지된 리간드, PD-L1(B7-H1)(Dong et al., 1999; Freeman et al., 2000) 및 PD-L2(B7-DC)(Latchman et al., 2001; Tseng et al., 2001)를 가지며, 둘 다 B7 공동-신호전달 분자 패밀리에 속한다. PD-1의 발현은 T 세포, B 세포, 천연 살해 T 세포, 수지상 세포(DCs), 및 활성화된 단핵구(Keir et al., 2008) 상에서 관찰될 수 있다. PD-1은 휴지 T 세포 상에서는 발현되지 않지만, 활성화 시 유도될 수 있다(Agata et al., 1996). PD-1 결찰의 기능적 효과는 T 세포 활성화 후 수 시간 내에 관찰될 수 있지만, PD-1 세포 표면 단백질 상향조절에는 24 h이 필요하다(Chemnitz et al., 2004). PD-1이 T 세포 수용체 신호와 동시에 관여되는 경우, 이는 저해 신호를 유발할 수 있지만, PD-1만 가교되는 경우에는 신호 전달이 일어나지 않는다(Sharpe et al., 2007). 일반적으로 T 세포 상의 PD-1 및 그 리간드, PD-L1 간의 상호작용은 말초 T-세포 관용성의 유도 및 유지를 제어하며, 병원체 또는 암에 대한 면역 반응 동안 T 세포에 의한 사이토카인 생산 및 증식을 부정적으로 조절한다(Sharpe et al., 2007). PD-L2는 일반적으로 PD-1로의 결합에 대해 PD-L1과 경쟁하는 것으로 여겨지는 PD-1에 대한 또 다른 리간드이다. 일반적으로, PD-L2의 면역학적 기능은 PD-L1에서와 중복되는 것으로 나타나며, PD-L2 자체에 기인한 수 있는 특정한 역할 또는 기능은 없는 것으로 나타난다.

발명의 내용**과제의 해결 수단**

[0003]

본 발명은 적어도 부분적으로, 갈렉틴-9(Galectin-9)가 PD-L2에 대한 수용체라는 예상치 못한 발견에서 생겨났다. 따라서, PD-L2의 적어도 일부의 면역학적 효과는 PD-1을 통해서가 아니라 갈렉틴-9에 대한 다양체성 PD-L2의 결합을 통해 매개될 수 있다. 따라서 본 발명은 광의적으로는 갈렉틴-9를 표적화함으로써 면역계를 조정하는 것이 대한 것이다. 하나의 광의의 구현예에서, 본 발명은 갈렉틴-9의 활성화 또는 자극에 의한 포유류에서 면역성의 촉진 또는 증강에 대한 것이다. 또 다른 광의의 구현예에서, 본 발명은 갈렉틴-9의 저해 또는 차단에 의한 포유류에서 면역성의 억제 또는 방지에 대한 것이다.

[0004]

본 발명의 하나의 측면은 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 조정함으로써 포유류에서 면역성을 조정하는 단계를 포함하는, 포유류에서 면역성의 조정 방법을 제공한다.

[0005]

본 발명의 특정한 측면은 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화 또는 자극함으로써 포유류에서 면역성을 자극하거나 증강시키는 단계를 포함하는, 포유류에서 면역성의 촉진 또는 증강 방법을 제공한다.

- [0006] 적합하게는, 방법에는 포유류에 갈렉틴-9 작동제를 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극하는 단계가 포함된다.
- [0007] 하나의 구현예에서, 방법에는 가용성 PD-L2 또는 그의 생물학적 활성 단편을 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극하는 단계가 포함된다.
- [0008] 적합하게는, 가용성 PD-L2는 n 개 단량체를 포함하는 다량체이며, 여기서 $n \geq 3$ 이다.
- [0009] 하나의 구현예에서, 방법에는 갈렉틴-9에 결합하는 작동제 항체 또는 항체 단편을 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극하는 단계가 포함된다.
- [0010] 적합하게는, 이는 Th1-매개 면역 반응 및/또는 면역 기억을 자극하고/하거나 개시한다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 특정한 측면은 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 적어도 부분적으로 저해하거나 차단함으로써 포유류에서 면역성을 억제하거나 방지하는 단계를 포함하는, 포유류에서 면역성의 적어도 부분적 억제 또는 방지 방법을 제공한다.
- [0012] 적합하게는, 방법에는 갈렉틴-9 저해제 또는 길항제를 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 저해하거나 차단하는 단계가 포함된다. 바람직하게는, 저해제 또는 길항제는 PD-L2 및 갈렉틴-9 간의 결합 상호작용을 적어도 부분적으로 방지하거나 방해한다.
- [0013] 하나의 구현예에서, 방법에는 포유류에 가용성 갈렉틴-9 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 저해하거나 차단하는 단계가 포함된다.
- [0014] 하나의 구현예에서, 방법에는 갈렉틴-9에 결합하는 길항제 항체 또는 항체 단편을 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 저해하거나 차단하는 단계가 포함된다.
- [0015] 본 발명의 관련 측면은 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 조정함으로써 질환 또는 상태를 방지하거나 치료하는 단계를 포함하는, 포유류에서 질환, 장애 또는 상태의 치료 또는 방지 방법을 제공한다.
- [0016] 하나의 구현예에서, 질환, 장애 또는 상태는 포유류에서 갈렉틴-9 활성화 또는 자극에 의한 면역성의 촉진 또는 증강에 반응한다. 바람직하게는, 방법에는 갈렉틴-9에 결합하는 작동제 항체 또는 항체 단편을 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극하는 단계가 포함된다.
- [0017] 또 다른 구현예에서, 질환, 장애 또는 상태는 포유류에서 갈렉틴-9 활성의 저해 또는 차단에 의한 면역성의 억제 또는 방지에 반응한다. 하나의 특정한 구현예에서, 방법에는 포유류에 가용성 갈렉틴-9 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 저해하거나 차단하는 단계가 포함된다. 또 다른 특정한 구현예에서, 방법에는 갈렉틴-9에 결합하는 길항제 항체 또는 항체 단편을 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 저해하거나 차단하는 단계가 포함된다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 측면은 갈렉틴-9 작동제 및 면역원을 포함하는 조성물을 제공한다. 적합하게는, 조성물은 조성물에 대한 면역 반응을 야기하는 면역원성 조성물 또는 백신이다. 면역원은 병원체(예로, 불활성화된 바이러스 또는 약독화된 박테리아) 또는 병원체의 분자 성분일 수 있다. 적합하게는, 조성물은 적합한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0019] 본 발명의 추가 측면은 갈렉틴-9 작동제, 저해제 또는 길항제의 설계, 스크리닝, 조작 또는 다른 경우의 생산 방법을 제공하며, 상기 방법에는 (i) 후보 문자가 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극함으로써 포유류에서 면역성을 자극하거나 증강시킬 수 있는 작동제인지 여부를 결정하는 단계; 또는 (ii) 후보 문자가 갈렉틴-9 활성을 차단하거나 저해함으로써 포유류에서 면역성을 적어도 부분적으로 억제하거나 방지할 수 있는 길항제 또는 저해제인지 여부를 결정하는 단계가 포함된다.
- [0020] 하나의 구현예에서, 단계 (i)에서, 후보 문자는 PD-L2 자극 또는 갈렉틴-9의 활성화를 모방한다.
- [0021] 하나의 구현예에서, 단계 (ii)에서, 후보 문자는 PD-L2 자극 또는 갈렉틴-9의 활성화를 차단하거나 저해한다.
- [0022] 본 발명의 추가 측면은 상기 측면의 방법에 따라 생산되는 갈렉틴-9 작동제, 저해제 또는 길항제를 제공한다.
- [0023] 본 발명의 추가 측면은 상기 측면의 갈렉틴-9 작동제, 저해제 또는 길항제를 포함하는 조성물을 제공한다. 적합하게는, 조성물은 적합한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0024] 본 명세서에 걸쳐, 달리 나타내지 않는 경우, "포함한다", "포함하다" 및 "포함하는"은 배타적이 아니라 포괄적

으로 이용되며, 이에 따라 언급되는 정수 또는 정수 군에는 하나 이상의 다른 언급되지 않은 정수 또는 정수 군이 포함될 수 있다.

[0025] 본원에서 이용되는 부정판사는 단일 또는 단수 요소를 나타내거나 표시하지 않고, 하나 또는 복수의 요소를 나타내거나 표시할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1: PD-1 및 PD-L1은 피. 샤바우디(*P. chabaudi*) 및 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*) 말라리아에 대한 보호 면역성을 조절한다. (a) WT 코호트($n \geq 9$) 및 (b) PD-1KO 마우스를 비-치사 10^5 개 피. 샤바우디(*P. chabaudi*) 또는 치사 10^4 개 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)으로 감염시키고, pRBC 및 혈액 도말을 1-2일마다 취해서 기생충 혈증을 모니터링하였다. 40일 후, 모든 생존 마우스를 140일 동안 휴식시킨 뒤, 동일한 기생충으로 재-유발접종하였다(**x-축 상의 화살표**). 오차 막대: $\pm S.E.M.$ Log 척도는 임상-미만 감염을 강조한다. 모든 야생형 마우스는 치사 유발접종 7일 내에 사망하였다(†). (c) 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)으로 감염시킨 B6 WT(●) 및 PD-L1 KO(▲) 마우스로부터의 총 $CD11c^+$ DC를 미치료 마우스로 전달한 뒤 치사 용량의 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)으로 감염시키고, 마우스를 60일 초과 동안 1-3일마다 조사하였다(총 $n=9$). WT DC를 수여받은 모든 마우스가 9일까지 모두 죽은 반면, PD-L1KO DC를 수여받은 모든 마우스는 생존하였다.

도 2: 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*) 및 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii 17XNL*)로의 감염 7일 후 총 비장 DC에서 실시간 PCR에 의해 PD-L2 mRNA를 3가지 하우스키핑 유전자의 평균과 비교하였다. 데이터는 2회 독립 실험에서 제조된 RNA를 이용하여 수득되는 mRNA 수준의 평균 및 범위로 나타낸다. 유의성은 반복 실험으로부터 풀링된 데이터 상에서 비-파라미터성 t-테스트를 이용하여 분석하였다.

도 3: 비-치사 감염에서 PD-L2의 차단은 감염을 악화시킨다. 대조군 IgG(검은 원), 또는 차단 항-PD-L2 항체(흰 사각형)를 이용한 치료 후 WT 마우스에서 기생충혈증의 평균 백분율. 데이터는 WT(총 $n=10$ 마우스) 또는 PD-1 KO(총 $n=10$) 마우스에서 2회 독립 실험 중 하나를 나타낸다(* $p=0.0048$).

도 4: 가용성 합성 다량체성 PD-L2는 치사 말라리아에 대해 보호하고 지속되는 면역성을 생성한다. B6 마우스 코호트($n=12$)를 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)으로 감염시키고 3, 5 및 7일째에 마우스에 가용성 팔량체성 PD-L2 또는 인간 IgG(대조군 Ig)를 제공하였다. 감염 제거 및 3개월 휴식 후, 생존 마우스를 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*) 감염으로 다시 재-유발접종하였다(**화살표**; 추가 sPDL2 없음).

도 5: 가용성 합성 다량체성 PD-L2는 뇌 말라리아 증상에 대해 보호하고 생존을 연장시킨다. B6 마우스 코호트($n=9$)를 8일까지 뇌 증상을 유도하는 피. 베르게이(*P. berghei*) 말라리아로 감염시키고, 3, 5 및 7일째에 마우스에 가용성 PD-L2 또는 인간 IgG(대조군 Ig)를 제공하였다. 마우스를 (a) 뇌 증상 및 (b) 생존에 대해 매일 모니터링하였다. 마우스는 과량의 TNF로 인한 DC 기능의 부재로 최종 사망하였다(Wykes, 2007).

도 6: $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 결핍 연구는 종종 말라리아에 대한 보호에서 이들 세포의 역할을 나타낸다. (a) $CD4^+$ T 세포(흰 사각형) 또는 $CD8^+$ T 세포(흰 원)의 결핍을 갖는, 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)으로의 감염 및 rIg(검은 원)로의 치료, 또는 sPDL2(검은색 사각형)로의 치료 후 WT 마우스에서 마우스의 평균 생존 백분율.

도 7: sPDL2에 의한 보호는 PD-L1의 차단을 통하지 않는다. WT 코호트 및 PD-L1 녹아웃 마우스를 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)으로 감염시키고 대조군 IgG 또는 sPDL2로 치료하였다. 마우스를 기생충혈증에 대해 모니터링하였다.

도 8: 갈렉틴-9는 고정화된 PD-L2에 의해 T 세포로부터 면역침전된다. 총 마우스 T 세포 집단의 용해물을 고정화된 IgG 또는 PD-L2-Fc 융합 단백질과 혼합하였다. 밴드를 절단하고, 질량 분광측정기 분석을 위해 소화시켰다. 갈렉틴-9(2)는 PD-L2와의 면역침전에 대해 독특하였다.

도 9: 고정화된 PD-L2에 의한, T 세포로부터 면역침전된 갈렉틴-9의 웨스턴 블로트. 총 마우스 T 세포 집단의 용해물을 고정화된 IgG 또는 PD-L2-Fc 융합 단백질과 혼합하였다. 겔 상 단백질을 갈렉틴-9에 대해 면역-표지된 니트로셀룰로오스로 옮겼다.

도 10: sPDL2는 T 세포 상에서 갈렉틴-9에 결합한다. 총 T 세포 집단을 미치료 마우스의 비장으로부터 단리하고 바이오틴화된 sPDL2 및 APC-스트렙타비딘 또는 PE-항-갈렉틴-9와 인큐베이션하였다. T 세포를 또한 바이오

탄화된 sPD-L2 및 APC-스트렙타비딘으로의 표지 전에, 표지되지 않은 항-갈렉틴-9 항체와 인큐베이션하였다. 모든 샘플을 또한 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 확인하기 위해 표지하였다.

도 11: 가용성 PD-L2는 갈렉틴 9에 의해 매개되는 미치료 마우스 CD4+ T 세포의 분화 및 이들의 T_{BET} 수준을 증가시킨다. 미치료 CD4⁺ T 세포를 그래프 상에 나타낸 항-CD3, IL-2 및 자극과 함께 배양하였다. (a) sPD-L2는 T_{BET} 을 발현하는 CD4+CD62L^{lo} 세포의 백분율 및 (b) 세포 내의 T_{BET} 수준을 래트 IgG 치료에 비해 증가시켰다. 상기 효과는 갈렉틴-9 저해제인 것으로 결정된 항-갈렉틴-9(클론 108A) 항체에 의해 차단되었다. 클론 RG9.1은 또한 T_{BET} 을 발현하는 마우스 CD4+CD62L^{lo} 세포의 백분율을 증가시켰다.

도 12: 가용성 합성 PD-L2 및 항-갈렉틴-9 항체는 치사 말라리아의 증상에 대해 보호한다. B6 마우스 코호트 (n=3)를 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)으로 감염시키고, 3, 5 및 7일째에 마우스에 가용성 PD-L2, 항-갈렉틴-9 또는 인간 IgG(대조군 Ig)를 제공하였다. 마우스를 매일 모니터링하고, 질환 증상 및 생존에 대해 스코어링하였다. 스코어가 4에 도달하면, 마우스를 안락사시켰다. 임상 스코어에 대한 sPDL2의 긍정적 효과는 갈렉틴-9 자극인자(작동 항체)로 결정된 RG1에 의해 모방되고 개선된다.

도 13: 마우스 PD-L2-갈렉틴-9는 매우 안정하며, 갈렉틴-9 및 PD-L2의 다양체화에 관여한다. 갈렉틴-9 및 PD-L2 간 결합의 생화학적 성질을 결정하기 위해 옥텟트 레드(Octet red) 연구를 수행하였다. sPD-L2는 탐침에 결합하였고, sPD-1 및 s갈렉틴-9와 그 상호작용을 측정하였다. PD-L2-PD1 결합 곡선은 PD-L2가 0.02초 미만(검정 감도)에 PD-1에 결합하며 0.02 초 미만에 해리하는 것으로 나타난다. PD-L2-Gal-9 곡선은 갈렉틴-9 결합이 연합하는데 299.99 초 및 해리하는데 614.21 초가 걸림을 나타내어 PD-L2 및 갈렉틴-9 간의 매우 안정한 상호작용을 시사한다. 피크의 높이는 PD-1과 함께가 아니라 갈렉틴-9와 큰 응집을 나타내어, 갈렉틴-9 및 PDL2가 결합 동안 다양체화함을 시사한다.

도 14: 마우스 sPD-L2 또는 항-갈렉틴-9 항체로 치료한 마우스 CD4⁺ T 세포로부터 분비되는 사이토카인. CD4⁺ T 세포를 마우스 비장으로부터 단리하고 3일 동안 항-CD3 및 자극과 함께 배양하고, 상청액을 수집하여 사이토카인, 인터페론- γ , IL-2 및 TNF- α 를 측정하였다. 오차 막대는 SEM을 나타내며, 데이터는 2회 실험 중 하나를 나타낸다.

도 15: (A) 인간 sPD-L2로 치료한 인간 CD4⁺ T 세포로부터 분비되는 사이토카인. CD4⁺ T 세포를 인간 PBMC로부터 단리하고 3일 동안 TCR의 활성화를 모방하기 위해 PMA 및 이오노마이신과 배양하였다. 이어서 세포를 sPD-L2 또는 대조군과 배양하고, 3일째에, 상청액을 수집하여 사이토카인 인터페론- γ (IFN- γ), IL-2, TNF- α 및 IL-4를 측정하였다. 오차 막대는 SEM을 나타내며, 데이터는 2회 실험에서 풀링된 데이터를 나타낸다. (B) 항-마우스 갈렉틴-9로 치료한 인간 CD4⁺ T 세포로부터 분비되는 IFN- γ . CD4⁺ T 세포를 인간 PBMC로부터 단리하고 3일 동안 TCR의 활성화를 모방하기 위해 최적 미만 농도의 항-CD3과 배양하였다. 이어서 세포를 sPD-L2 또는 항-마우스 갈렉틴-9와 배양하고, 3일째에, 상청액을 수집하여 사이토카인을 측정하였다. 오차 막대는 SEM을 나타내며, 데이터는 1회 실험을 나타낸다.

도 16: 항-Tim3 차단 항체가 아닌 -갈렉틴-9 활성화 항체가 치사 말라리아에 대해 보호한다. 감염 후 3, 5 및 7 일째에 대조군 래트 IgG, 차단 항-Tim-3 항체 또는 활성화 항-갈렉틴-9 항체로 치료한 WT 마우스에서 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*) 말라리아의 전형적 경과에 대한 평균 기생충혈증 백분율. 오차 막대는 SEM을 나타내며, 데이터는 Tim3에 대해서는 2회 실험 중 하나 및 항-갈렉틴-9에 대해서는 3회 실험 중 하나를 나타낸다.

도 17: 항-갈렉틴-9 치료는 유방암 진행을 감소시킨다. 마우스 코호트에 (a) PYMT-유래 또는 (b) E0771.LMB 유방 암종을 자궁의 이식하고 대조군 IgG 또는 항-갈렉틴-9 항체로 치료하였다. 마우스를 1-2일마다 모니터링하여 종양 진행을 모니터링하였다. QIMR-B 윤리학은 유방에 이식된 종양이 ~525 mm³에 도달했을 때 마우스를 안락사시킬 것을 요구한다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 18: PD-L2의 차단은 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii 17XNL*)로 감염된 마우스의 비장에서 기생충-특이적 CD4⁺ T 세포의 증식을 저해한다. 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii 17XNL*)로 감염되고 래트 IgG 또는 항-PD-L2 차단 항체로 치료한 WT 마우스에서의 다양한 파라미터 분석. 모든 데이터를 산개도에 나타내며, 막대는 중앙값을 나타낸다. (a, b) (a) 7일째(n=4) (b) 14일째(n=7)에 비장 당 Tbet-발현 CD4⁺CD62L^{hi} 및 CD4⁺CD62L^{lo} T 세포의 수.

(c) 미치료 DC(n=7)의 존재 하에 기생충 항원(MSP1₁₉)에 반응하여 ELISPOT 배양에서 인터페론- γ (IFN- γ)를 분비한 CD4⁺ T 세포의 수. (d, e) 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL)-감염 마우스(n=7)의 혈청 중 (d) IFN- γ 및 (e) IL-10의 수준. (f) 비장(n=7) 당 CD25 및 FoxP3을 발현하는 CD4⁺ T 세포(조절 T 세포)의 수. 14일에 대한 데이터는 2회 풀링된, 독립 실험을 나타낸다. 유의성은 2-측 테일에 기반하는 비-파라미터성 Mann-Whitney *U* 평가를 이용해서 분석하였다(*P<0.05; **P<0.005; ***P<0.0005). F 평가는 군 간에 유의미하게 상이한 분산을 확인하였다.

도 19: PD-L2는 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL) 말라리아 동안 Th1 면역성을 조절한다. (A, B) (A) WT 마우스 및 PD-L2KO 마우스(n=4) 또는 (B) 래트 IgG 또는 항-PD-L2 차단 항체로 치료한 WT 마우스(n=5)에서 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL) 말라리아의 전형적 경과 동안의 임상 증상 스코어. (C-F) 산개도는 래트 IgG 또는 항-PD-L2 차단 항체로 치료한 WT 마우스 또는 14일 동안 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL)로 감염된 PD-L2KO 마우스에서 CD4⁺ T 세포의 분석을 나타낸다. (C) 비장 당 T_{bet}-발현 CD4⁺CD62L^{hi} 또는 CD4⁺CD62L^{lo} T 세포의 평균 수. (D) 미치료 DC의 존재 하에, 기생충 항원(MSP1₁₉)에 반응하여 ELISPOT 배양에서 IFN- γ 를 분비한, 비장 당 CD4⁺ T 세포의 평균 수. (E-F) 미치료 DC의 존재 하에, 기생충 항원(Pb1)에 반응하여 ELISPOT 배양에서 IFN- γ 를 분비한, 비장 당 CD8⁺ T 세포의 평균 수. (E) PD-L2 차단을 포함하고 및 포함하지 않고(n=7) 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL)을 이용한 감염 14일 후 취한 세포. (F) PD-L2KO 마우스 및 대조군으로부터 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL)을 이용한 감염 14일 후 취한 세포. 1회 수행된 PD-L2KO 마우스에 대한 데이터를 제외하고, 데이터는 2회 독립 실험으로부터 풀링된다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다(*P<0.05). 유의성은 비-파라미터성 Mann-Whitney *U* 평가를 이용해서 분석하였다.

도 20: sPD-L2는 CD4⁺ T 세포를 통한 보호 및 생존을 매개한다. 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM)을 이용한 감염 3, 5 및 7일 후, 대조군 인간 IgG(hIg) 또는 sPD-L2로 치료한 WT 마우스에서의 (a) 생존 곡선 및 (b-d) 평균 기생충혈증 백분율. 이어서 마우스를 (b) 래트 Ig, (c) 결핍 항-CD4 항체 또는 (d) 결핍 항-CD8 항체(n=4)로 감염 1일 후에 시작하여 감염 후 14-18일까지 3-4일마다 공동-치료하였다. 데이터는 유사한 결과를 수득한 2회 독립 실험 중 하나를 나타낸다. sPD-L2⁺ 래트 IgG 치료군 및 대조군(래트 및 인간 IgG가 수여됨) 또는 CD4⁺ T 세포 결핍을 갖는 sPD-L2 치료군 간의 생존 유의성을 풀링된 실험으로부터의 데이터에 근거한 Log-순위(Mantel-Cox) 평가를 이용해서 분석하였다.

도 21: sPD-L2는 Th1 CD4⁺ 및 CD8+ T 세포 기능의 촉진에 의해 치사 말라리아로부터 마우스를 보호한다. 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM)으로 감염되고 감염 후 3, 5 및 7일째에 대조군 인간 IgG 또는 sPD-L2로 치료한 WT 마우스(n=8)에서의 다양한 파라미터(감염 후 7일째) 분석. 모든 데이터를 산개도에 나타내며, 막대는 중앙값을 나타낸다. (a) 미치료 DC의 존재 하에 기생충 항원 MSP1₁₉에 반응하여 ELISPOT 배양에서 IFN- γ 를 분비한 CD4⁺ T 세포의 수; (b) EdU 흔입에 의해 측정되는, 미치료 DC의 존재 하에 기생충 항원 MSP1₁₉에 반응하여 배양에서 증식한 CD4⁺ T 세포의 수; (c) 비장 당 CD25 및 FoxP3을 발현하는 CD4⁺ T 세포의 수. (d) 비장 당 기생충-특이적 Pb1-사량체⁺ CD8⁺ T 세포의 수, 및 (e) 미치료 DC의 존재 하에 기생충 항원 Pb1에 반응하여 배양에서 IFN- γ 를 분비한 CD8⁺ T 세포의 수(ELISPOT에 의해 결정); (f) 최근 활성화 마커인 CD11a 및 그랜자임 B를 발현한 CD8⁺ T 세포의 수. 데이터는 1회 수행된 사량체 및 그랜자임 B 표지를 제외하고, 2회 풀링된 독립 실험을 나타낸다. 유의성은 2-측 테일에 근거하여 비-파라미터성 Mann-Whitney *U* 평가를 이용해서 분석하였다(*P<0.05; **P<0.005). F 평가로 군 간 유의미하게 상이한 분산을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

DETAILED DESCRIPTION

[0028]

PD-L2는 프로그래밍된 사멸 수용체-1(PD1) 및 RGMb에 대한 리간드이며, 본원에서 갈렉틴-9(Ga1-9)은 PD-L2에 대해 지금까지 알려지지 않은 수용체인 것으로 제안된다. 가용성 PD-L2 치료 마우스는 치사 말라리아 균주로 유발 접종되었을 때 죽지 않으며, CD4⁺ T 세포가 결핍되는 경우 PD-L2-매개 보호가 소실되므로 PD-L2는 CD4⁺ T 세포를 통한 보호를 매개하는 것으로 제안된다. 따라서, 가용성 PD-L2(sPDL2) 또는 작동성 항-갈렉틴-9 항체의 투여

는 면역자극제로서 작용하고/하거나 Th1-매개 면역 반응 및/또는 면역 기억을 개시할 수 있는 것으로 제안된다. 이는 특히 암에 대한, 면역 기억의 생성 및 유지를 포함하는, 암, 감염성 제제 및 기생충에 반응하여 면역 반응의 자극에서 효능을 가질 수 있다. 또한 갈렉틴-9에 대한 차단 또는 길항제 항체의 투여는 PD-L2로 나타난 효과를 방지하거나 저해할 수 있는 것으로 제안된다. PD-L2에 결합하고 갈렉틴-9와의 그 상호작용을 차단하는 항체는 갈렉틴-9 길항제 항체에 대해 유사한 효과를 가질 수 있다. 이는 자가면역 질환, 염증 및/또는 알러지의 치료 또는 방지에서 유용할 수 있는 것과 같은 면역성의 역할을 보조할 수 있다.

- [0029] 본 발명의 목적을 위해, "단리된"이란 그 천연 상태로부터 제거되거나 다른 경우 인간 조작을 거친 물질을 의미한다. 단리된 물질은 그 천연 상태에서 이와 보통 동반되는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없을 수도 있고, 또는 그 천연 상태에서 이와 보통 동반되는 성분과 함께 인공 상태에 있도록 조작될 수도 있다. 단리된 물질은 원상태, 화학적 합성 또는 재조합 형태에 있을 수 있다.
- [0030] "단백질"이란 아미노산 중합체를 의미한다. 아미노산은 당분야에서 널리 이해되는 바와 같은 천연 또는 비-천연 아미노산, D- 또는 L- 아미노산일 수 있다.
- [0031] "펩타이드"는 50개 이하의 아미노산을 갖는 단백질이다.
- [0032] "폴리펩타이드"는 50개 초과의 아미노산을 갖는 단백질이다.
- [0033] 본원에서 이용되는 "갈렉틴-9" 또는 "Gal-9"는 β -갈락토사이드 당, 예컨대 N-아세틸락토스아민(Gal β 1-3GlcNAc 또는 Gal β 1-4GlcNAc)에 대한 이들의 결합 특이성에 의해 정의되는 단백질의 갈렉틴 패밀리의 단백질을 나타낸다. 이들 단백질은 안정성 및 탄수화물 결합을 위한 디설파이드 결합에 대한 이들의 의존으로 인해 S-형 턱턴으로도 명명된다. 포유류에서는, LGALS 유전자에 의해 인코딩되는 15개의 갈렉틴이 발견되었으며, 그 중 갈렉틴-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9, -10, -12 및 -13이 인간에서 확인되었다. 인간 갈렉틴 9는 잔기 149-180이 없는 "짧은 형태" 변이체가 존재하지만, 전형적으로 355개 아미노산 서열을 포함한다(정규 또는 "긴 형태" 서열로 불림). 적합하게는, 본 발명의 맥락에서 갈렉틴-9는 럼프구 또는 NK 세포에 의해 발현된다. 럼프구는 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 또는 B 세포일 수 있다. 인간 갈렉틴-9 아미노산 서열의 비제한적 예는 Uniprot KB 접근 번호 000182 하에 확인될 수 있으며, 마우스 갈렉틴-9 아미노산 서열의 비제한적 예는 Uniprot KB 접근 번호 008573 하에 확인될 수 있다.
- [0034] 본원에서 이용되는 "항체"는 면역글로불린이거나 이를 포함한다. 용어 "면역글로불린"에는 면역글로불린 이소형 IgA, IgD, IgM, IgG 및 IgE 및 그의 항원-결합 단편을 포함하여, 포유류 면역글로불린 유전자 복합체의 임의의 항원-결합 단백질 산물이 포함된다. 용어 "면역글로불린"에는 키메라 또는 인간화 또는 다른 경우 변경된 또는 변이체 아미노산 잔기, 서열 및/또는 글리코실화를 포함하는 면역글로불린이, 천연 생성이건 인간 개입에 의해 (예로 재조합 DNA 기술에 의해) 생산되건, 포함된다.
- [0035] 항체 단편에는 Fab 및 Fab'2 단편, 디아바디, 트리아바디 및 단일쇄 항체 단편(예로, scVs)이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 전형적으로, 항체는 각각 CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열을 포함하는 각각의 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직한 항체 단편은 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 CDR 및/또는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.
- [0036] 항체 및 항체 단편은 폴리클로날 또는 바람직하게는 모노클로날일 수 있다. 모노클로날 항체는, 예를 들어, 문헌[Koehler & Milstein, 1975, Nature 256, 495-497]에 기재된 것과 같은 표준 방법을 이용하여, 또는 예를 들어 문헌[Chapter 2 of Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY]에 기재된 바와 같은 이들의 보다 최근 개정에 의해, 갈렉틴-9 또는 그의 단편이 접종된 생산 종으로부터 유래된 다른 항체 생산 세포 또는 비장의 불멸화에 의해 생산될 수 있다. 또한 항체는 적절한 숙주 세포에서 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 핵산을 발현시켜 재조합 합성 항체 또는 항체 단편으로서 생산될 수 있음이 이해될 것이다. 재조합 합성 항체 또는 항체 단편 중쇄 및 경쇄는 동일한 숙주 세포에서 상이한 발현 벡터로부터 공동-발현될 수도 있고 또는 숙주 세포에서 단일쇄 항체로 발현될 수도 있다. 재조합 항체 발현 및 선택 기법의 비제한적 예는 문헌[Chapter 17 of Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY and Zuberbuhler *et al.*, 2009, Protein Engineering, Design & Selection 22 169]에 제공된다.
- [0037] 항체 및 항체 단편은 "외래" 항체에 대한 유해한 면역 반응의 야기 없이, 또 다른 종에서 생산되었거나 이로부터 기원하는 하나의 종에 투여 가능하도록 개질될 수 있다. 인간의 맥락에서, 이는, 또 다른 종에서 생산되거나 이로부터 기원하는 항체의 "인간화"이다. 이러한 방법은 당분야에 널리 공지되어 있고, 일반적으로 인간 항체 스캐폴드 또는 골격 상으로 비-인간 항체 상보성 결정 영역(CDR)의 재조합 "그래프팅"이 관여된다.

- [0038] 일부 구현예에서, 항체 또는 항체 단편은 표지화된다.
- [0039] 표지는 발색원, 촉매, 비아오틴, 디옥시제닌, 효소, 형광단, 화학발광 분자, 방사선 동위원소, 약물 또는 다른 화학치료제, 자기 비드 및/또는 직접적인 시각적 표지를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 하나의 측면은 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 조정함으로써 포유류에서 면역성을 조정하는 단계를 포함하는, 포유류에서 면역성의 조정 방법을 제공한다.
- [0041] 하나의 구현예에서, "면역성 조정"은 포유류에서 면역성의 촉진 또는 증강을 의미한다. 상기 맥락에서, 갈렉틴-9 활성은, 예컨대 작동제에 의해, 자극되거나 증가된다.
- [0042] 또 다른 구현예에서, "면역성 조정"은 포유류에서 면역성의 적어도 부분적 억제, 저해 또는 방지를 의미한다. 상기 맥락에서, 갈렉틴-9 활성은, 예컨대 갈렉틴-9 길항제 또는 저해제에 의해, 적어도 부분적으로 차단되거나 저해된다.
- [0043] 따라서 본 발명의 하나의 특정한 측면은 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나, 증가시키거나, 자극함으로써 포유류에서 면역성을 자극하거나 증강시키는 단계를 포함하는, 포유류에서 면역성의 촉진 또는 증강 방법을 제공한다.
- [0044] 적합하게는, 방법에는 갈렉틴-9 작동제를 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극하는 단계가 포함된다.
- [0045] 상기 맥락에서 "작동제"란 갈렉틴-9 활성을 적어도 부분적으로 활성화하거나, 증가시키거나, 자극하는 분자를 의미한다. 작동제는 갈렉틴-9에 대한 천연 리간드, 예컨대 PD-L2일 수도 있고, 또는 천연 리간드, 예컨대 PD-L2의 작용을 모방할 수도 있다. 하나의 특정한 구현예에서, 방법에는 포유류에 가용성 PD-L2 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극하는 단계가 포함된다. 적합하게는, PD-L2는, 바람직하게는 n 개 단량체를 포함하는 다량체이며, 여기서 $n > 3$ 이다. 바람직하게는, 다량체 PD-L2는 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 PD-L2 단량체를 포함한다. 하나의 특정한 구현예에서, PD-L2는 8개 단량체를 포함한다 (즉, $n = 8$ 또는 팔량체성임). 상기 맥락에서, 다량체성 PD-L2는 각 모노머의 공유 커플링을 촉진하기 위한 링 커 아미노산 또는 웹타이드의 이용을 포함하는 단량체의 가교에 의한 것과 같이, 공유 형성되거나 유도될 수 있다. 다른 구현예에서, 다량체성 PD-L2의 효과는 웹타이드 또는 핵산(예로, 올리고뉴클레오타이드) 앱타미와 같은 제제에 의해 또는 PD-L2 및 갈렉틴-9 둘 다에 결합하는 이중-특이적 항체에 의해 모방되거나, 웹타이드 또는 핵산(예로, 올리고뉴클레오타이드) 앱타미와 같은 제제에 의해 모방될 수 있다. 작동제는 갈렉틴-9에 결합함으로써 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극할 수 있는 임의의 다른 분자, 예컨대 작동제 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 하나의 특정한 구현예에서, 방법에는 갈렉틴-9에 결합하는 작동제 항체 또는 항체 단편을 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극하는 단계가 포함된다.
- [0046] 일부 구현예에서, 작동제는 포유류에 대한 투여 시 면역 반응을 자극하거나 증강시킬 수 있다. 면역 반응에는 특히 병원체가 면역 기억을 회피하거나, 소거하거나, 기피함으로써 면역계를 기피하는 경우, 감염성 및/또는 기생성을 유도하는 것과 같은 병원체 또는 암에 대한 면역 기억의 유도가 포함될 수 있다. 비제한적 예는 면역 기억을 소거함으로써 이후 재-감염을 허용하는 말라리아이다.
- [0047] 암의 맥락에서, 암 환자에 대한 작동제의 투여는 비-자가 신호가 다른 경우 적거나 부재하는 경우, 종양 세포가 외래로 인식되도록 면역 기억을 생성, 유도 및/또는 유지할 수 있다.
- [0048] 또 다른 구현예에서, 갈렉틴-9 작동제는 백신 또는 다른 면역원성 조성물 중 면역원과 조합되어 아쥬반트로서 투여될 수 있다. 이는 백신 또는 면역원성 조성물의 효과를 증대시킬 수 있고 또한 추가 백신접종의 필요성을 제거하거나 최소화할 수 있다. 상기 구현예의 특정한 형태에서, 작동제의 투여는 면역원 또는 병원체의 면역 기억을 충분히 자극하지 않는 실패하거나 최적 미만인 백신 또는 백신접종을 구제하거나 소생시킬 수 있다. 면역원은 병원체의 성분 분자(예로, 세포 표면 단백질, 면역원성 웹타이드 또는 "서브유닛 백신"에서와 같은 이들의 다른 성분, 복수의 B- 및/또는 T-에피토프를 포함하는 폴리토프, VLP, 캡시드 또는 캡소미어), 불활성화된 병원체(예로, 불활성화된 바이러스, 약독화된 기생충-감염 RBC, 또는 약독화된 박테리아) 또는 병원체에 대해 면역 반응을 야기할 수 있는 임의의 다른 분자 또는 구조일 수 있다. 예를 들어, 말라리아 면역접종의 개선에서 PD-L2 및 항-갈렉틴-9 항체 작동제 투여의 효능을 나타내는 실시예를 참조한다.
- [0049] 포유류에 대한 작동제의 투여는 미치료 T 세포를 자극하여 Th1 계통 선택 및/또는 수임을 수행할 수 있다. 당분야 숙련가에 의해 이해될 바와 같이, Th1 계통에는 인터페론 γ (IFN- γ), IL-2 및 TNF- α 를 포함하는 하나 이상

의 인자를 생산하고 분비하는 CD4+ T 세포가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. Th1 세포는 세포내 박테리아, 원생동물 기생충 및 바이러스에 대한 면역 반응에서 특히 중요하다. Th1 세포는 IL-12 및 IL-2에 의해 유발되며, 다시 대식구, 과립구, CD8+ T 세포, IgG-발현 B 세포, 수지상 세포 및 다른 CD4+ T 세포와 같은 면역 효과기 세포를 자극한다.

[0050] 상기로부터, 본원에 개시된 작동체에 의한 것과 같은, 갈렉틴-9의 활성화 또는 자극이 포유류에서 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나 방지할 수 있음이 이해될 것이다.

[0051] 본원에서 이용되는, "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 증상이 적어도 발생하기 시작한 뒤 질환, 장애 또는 상태의 증상을 적어도 완화시키는 치료적 개입, 작용 경과 또는 프로토콜을 나타낸다. 본원에서 이용되는, "방지하는", "방지한다" 또는 "방지"는 질환, 장애 또는 상태의 발생 또는 진행 또는 증상을 방지하거나, 저해하거나, 자연하기 위해 질환, 장애 또는 상태의 증상 개시 전에 개시되는 치료적 개입, 작용 경과 또는 프로토콜을 나타낸다. 이러한 방지적 치료법은 "예방" 또는 "예방적" 치료로 불릴 수 있다. 특정한 구현예에서, 면역접종 또는 백신접종은 방지적 또는 예방적 면역치료법이다.

[0052] 광의의 구현예에서, 질환, 장애 또는 상태는 병원체에 의해 유도된다. 병원체는 바이러스, 박테리아 또는 기생충일 수 있다. 기생충의 비제한적 예에는 플라스모디움 종, 예컨대 피, 팔시파람(*P. falciparum*), 피. 오발레(*P. ovale*), 피, 노우레시이(*P. knowlesi*), 피. 말라리애(*P. malariae*) 및 피. 비박스(*P. vivax*)를 포함하는 말라리아 기생충과 같은 원생동물이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 기생충에는 바베시아 종, 엔타모에바 종, 기아르디아 종 및 레이슈마니아 종을 포함하는 트립파노좀이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 바이러스 병원체의 비제한적 예에는 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 에볼라 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 헤르페스 바이러스, 파필로마 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, B형 간염 바이러스, 풍진 바이러스, 리노바이러스, 플라비바이러스, 예컨대 C형 간염 바이러스(HCV), 웨스트 나일 바이러스, 일본 뇌염 바이러스 및 뎅기 바이러스, 사이토메갈로바이러스(CMV) 및 앰스타인 바 바이러스(EBV)가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 박테리아 병원체의 비제한적 예는, 예컨대 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 보르다텔라 퍼투시스(*Bordatella pertussis*), 코리네박테리움 디프테리애(*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움 슈도투베르콜로시스(*Corynebacterium pseudotuberculosis*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리듐 보툴리듐(*Clostridium botulinum*), 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 오랄리스(*Streptococcus oralis*), 스트렙토코커스 파라상귀스(*Streptococcus parasanguis*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 비리단스(*Streptococcus viridans*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 헤모필러스 인플루엔제(*Hemophilus influenzae*), 파스퇴렐라 멀티시다(*Pasteurella multiceps*), 시겔라 다이센테리애(*Shigella dysenteriae*), 미코박테리움 투베르콜로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 미코박테리움 레프래(*Mycobacterium leprae*), 미코박테리움 아시아티쿰(*Mycobacterium asiaticum*), 미코박테리움 인트라셀룰레어(*Mycobacterium intracellulare*), 미코플라즈마 뉴모니애(*Mycoplasma pneumoniae*), 미코플라즈마 호미니스(*Mycoplasma hominis*), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 나이세리아 고노뢰애(*Neisseria gonorrhoeae*), 리케차 리케치이(*Rickettsia rickettsii*), 브루셀라 아보티스(*Brucella abortis*), 브루셀라 카니스(*Brucella canis*), 브루셀라 수이스(*Brucella suis*), 레지오넬라 뉴오필라(*Legionella pneumophila*), 클레브시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 트레포네마 팔리덤(*Treponema pallidum*), 트레포네마 퍼타누에(*Treponema pertanue*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 비브리오 콜레래(*Vibrio cholerae*), 트레포네마 카라테움(*Treponema carateum*), 살로넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*), 볼레리아 버르그도페리(*Borrelia burgdorferi*) 및 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*) 종을 포함하는 나이세리아, 보르다텔라, 슈도모나스, 코리네박테리움, 살모넬라, 스트렙토코커스, 시겔라, 미코박테리움, 미코플라즈마, 클로스트리듐, 헬리코박터, 보렐리아, 예르시니아, 레지오넬라, 헤모필러스, 리케차, 리스테리아, 브루셀라, 비브리오 및 트레포네마 속의 것일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 또 다른 광의의 구현예에서, 질환, 장애 또는 상태는 암이다. 본원에서 일반적으로 이용되는 바와 같이, 용어 "암", "종양", "악성" 및 "악성물"은 종양발생, 종양 마커의 발현, 종양 억제인자 발현 또는 활성의 손실 및/

또는 이상 또는 비정상 세포 표면 마커 발현을 포함하는 이상 또는 비정상 분자 표현형이 종종 동반되는 이상 또는 비정상 세포 증식, 분화 및/또는 이동을 특징으로 하는, 질환 또는 상태, 또는 질환 또는 상태와 연관된 세포 또는 조직을 나타낸다. 암 및 종양의 비제한적 예에는 육종, 암종, 선종, 백혈병 및 림프종, 폐암, 결장암, 간암, 식도암, 위암, 췌장암, 신경모세포종, 교모세포종 및 다른 신경암, 뇌암, 유방암, 자궁경부암, 자궁암, 두부경부암, 신장암, 전립선암 및 흑색종이 포함된다. 적합하게는, 암은 본원에 개시된 작동제에 의한 것과 같은, 갈렉틴-9의 활성화 또는 자극에 반응한다. 일부 구현예에서, 암은 갈렉틴-9의 활성화 또는 자극에서 생성되는 면역 기억의 유도 또는 증강에 반응한다.

[0056] 본 발명의 또 다른 특정한 측면은 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 적어도 부분적으로 저해하거나 차단함으로써 포유류에서 면역성을 억제하거나 방지하는 단계를 포함하는, 포유류에서 면역성의 적어도 부분적인 억제 또는 방지 방법을 제공한다.

[0057] 적합하게는, 방법에는 갈렉틴-9 저해제 또는 길항제를 포유류에 투여함으로써 포유류에서 갈렉틴-9 활성을 저해하거나 차단하는 단계가 포함된다. 바람직하게는, 저해제 또는 길항제는 PD-L2 및 갈렉틴-9 간 결합 상호작용을 적어도 부분적으로 방지하거나 방해한다. 추가적으로 또는 대안적으로, 갈렉틴-9 저해제 또는 길항제는 PD-L2에 반응하여 보통 일어날 갈렉틴-9 신호전달을 적어도 부분적으로 방지하거나 방해한다. 일부 구현예에서, 갈렉틴-9 저해제 또는 길항제는 PD-L2 다양체화 및/또는 갈렉틴-9에 대한 결합을 저해하거나 차단하기 위해, 갈렉틴-9에 직접 결합하는 제제(예컨대 항-갈렉틴-9 항체 또는 항체 단편)일 수도 있고 또는 PD-L2에 직접 결합하는 제제(예컨대 항-PD-L2 항체 단편)일 수도 있다. 특정한 구현예에서, 갈렉틴-9 저해제 또는 길항제에는 하기가 포함될 수 있다: (i) 가용성 갈렉틴-9 또는 그의 저해 단편; (ii) 길항제 항체 또는 항체 단편 또는 갈렉틴-9에 결합함으로써 PD-L2 및 갈렉틴-9 간 결합 및/또는 갈렉틴-9 신호전달을 저해하거나 차단하는 다른 제제; (iii) PD-L2 및 갈렉틴-9 간 결합 및/또는 갈렉틴-9 신호전달을 저해하거나 차단하는 단량체성 또는 이량체성 PD-L2; (iv) PD-L2에 결합함으로써 PD-L2가 갈렉틴-9에 결합하는 것을 방지하는 항체 또는 항체 단편 또는 다른 제제; 및/또는 (v) PD-L2에 결합하여 PD-L2 다양체화를 방지하거나 저해하는 항체 또는 항체 단편 또는 다른 제제.

[0058] 따라서 하나의 구현예에서, 방법에는 포유류에 가용성 갈렉틴-9 또는 그의 저해 단편을 투여함으로써 포유류에서 PD-L2 및 갈렉틴-9 간 결합을 저해하거나 차단하는 단계가 포함된다. 하나의 구현예에서, 방법에는 갈렉틴-9에 결합하는 길항제 항체 또는 항체 단편을 포유류에 투여함으로써 포유류에서 PD-L2 및 갈렉틴-9 간 결합 및/또는 갈렉틴-9 신호전달을 저해하거나 차단하는 단계가 포함된다. 또 다른 구현예에서, 방법에는 단량체성 또는 이량체성 PD-L2를 포유류에 투여함으로써 포유류에서 PD-L2 및 갈렉틴-9 간 결합 및/또는 갈렉틴-9 신호전달을 저해하거나 차단하는 단계가 포함된다. 추가 구현예에서, 방법에는 PD-L2에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포유류에 투여함으로써 PD-L2가 갈렉틴-9에 결합하는 것을 방지하는 단계가 포함된다. 추가 구현예에서, 방법에는 PD-L2에 결합하는 항체 또는 항체 단편 또는 다른 제제를 포유류에 투여하여 포유류에서 PD-L2 다양체화를 방지하거나 저해하는 단계가 포함된다.

[0059] 특정한 구현예에서, 포유류에서 면역성의 억제 또는 방지는 질환, 장애 또는 상태의 방지 또는 치료를 촉진하거나 보조할 수 있다. 특정한 구현예에서, 질환, 장애 또는 상태는 자가면역 질환, 장애 또는 상태, 알러지성 질환, 장애 또는 상태를 포함하는 염증성 질환, 장애 또는 상태일 수 있다.

[0060] 자가면역 및/또는 염증성 질환, 장애 및 상태로 이어지는 내재된 면역 기전에서의 공통성으로 인해 자가면역 및 염증성 질환, 장애 및 상태 간에 중복이 있을 수 있음이 이해될 것이다. 그러나 단지 예로서, 자가면역 질환, 장애 또는 상태에는 쇼그렌 증후군, 1형 당뇨병, 강직성 척추염, 하시모토 갑상샘염, 크론병, 근위축 측삭 경화증, 전신 홍반성 루푸스, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 그레이브스 질환, 애디슨 질환, 바체트 증후군, VKH(VogtKoyanagi-Harada) 질환, 류마티스성 관절염 및 건선 관절염이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 염증성 질환, 장애 또는 상태의 비제한적 예에는 염증성 장 질환, 죽상경화, 골반 염증성 질환, 셀리악 질환, 천식, 만성 폐색성 폐 질환 및 알러지가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0061] 하나의 특정한 구현예에서, 질환, 장애 또는 상태는 T-bet 또는 T-bet를 포함하는 신호전달 경로의 차단 또는 저해에 반응한다.

[0062] 임의의 특정한 이론에 구애받고자 하지 않고, T-박스 전사 인자 T-bet는 1형 유사 면역성의 주요 조절인자로, T 및 B 림프구뿐만 아니라 수지상 세포 및 천연 살해 세포에서 효과기 세포 운명의 구축 및/또는 유지에 중추적 역할을 담당한다. T-bet는 CD4 및 γ δ T 세포에서의 IFN- γ 생산을 포함하는, Th1 효과기 기능 및 분화의 유지에서 역할을 담당할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, T-bet 결핍은 자가면역 및/또는 염증성 질환에 대해 보호하지만, T-bet 과발현은 이를 촉진한다. 실시예에서 더욱 상세히 기재될 바와 같이, PD-L2/갈

렉틴-9 경로의 차단은 T-bet를 차단하며, 이에 따라 자가면역 및/또는 염증성 질환의 치료를 위한 신규한 방법을 제공할 가능성을 갖는다.

[0063] 본원에서 전술된 바와 같은 갈렉틴-9 작동제, 길항제 및 저해제의 투여는 적합한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 갈렉틴-9 작동제, 길항제 및 저해제를 포함하는 약학 조성물의 투여에 의해 실시될 수 있다.

[0064] 일반적 관점에서, 담체, 희석제 또는 부형제는 전신 투여에서 안전하게 이용될 수 있는 고체 또는 액체 충전제, 희석제, 완충제, 결합제 또는 캡슐화 성분일 수 있다. 특정한 투여 경로에 따라, 당분야에 널리 공지된 다양한 담체, 희석제 및 부형제가 이용될 수 있다. 이들은 당, 전분, 셀룰로오스 및 그 유도체, 맥아, 젤라틴, 헐석, 칼슘 설페이트, 식물성 오일, 합성 오일, 폴리올, 알긴산, 포스페이트 완충 용액, 유화제, 등장성 식염수 및 염, 예컨대 하이드로클로라이드, 브로마이드 및 설페이트를 포함하는 미네랄 산 염, 당, 당 알코올, 유기 산, 예컨대 아세테이트, 프로페오네이트 및 말로네이트, 및 발열원-비함유 물을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 및 부형제를 기재하는 유용한 참고문헌은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co. NJ USA, 1991)]이다.

[0065] 일부 구현예에서, 조성물은 비제한적으로 TLR 작동제, 지질다당류 및 그의 유도체, 예컨대 MPL, 프로인트 완전 또는 불완전 아쥬반트, 헥사데실아민, 옥타데실아민, 옥타데실 아미노산 에스테르, 라이소레시틴, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, N,N-디옥타데실-N', N'비스(2-하이드록시에틸-프로판디아민), 메톡시헥사데실글리세롤, 및 플루로낙 폴리올; 폴리아민, 예컨대 피란, 텍스트란설페이트, 폴리 IC 카보풀, 웨타이드, 예컨대 무라밀 디웨타이드 및 유도체, 디메틸글리신, 터프트신, 오일 에멀젼, 미네랄 젤, 예컨대 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드 또는 알룸, 림포카인, Imiquimod, Guardiquimod, Quila 및 면역 자극 복합체(ISCOMS)를 포함하는 면역자극 핵산 및 아쥬반트를 포함하는 하나 이상의 면역조정제를 추가로 포함할 수 있다.

[0066] 대상체에 갈렉틴-9 작동제, 길항제 또는 저해제를 포함하는 조성물을 제공하기 위해 임의의 안전한 투여 경로가 채용될 수 있다, 예를 들어 경구, 직장, 비경구, 설하, 협측, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 피하, 흡입, 안내, 복강내, 뇌실내, 경피 등이 채용될 수 있다.

[0067] 포유류에 투여될 갈렉틴-9 작동제, 길항제 또는 저해제의 농도 또는 양은 당분야 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 치료될 질환, 장애 또는 상태의 성질 및/또는 포유류의 체중, 연령, 성별 및/또는 일반 건강 및 웰빙과 같은 요인을 고려할 것이다.

[0068] 하나의 구현예에서, 약학 조성물은 백신 또는 다른 면역원성 조성물일 수 있다. 적합하게는, 백신 또는 면역원성 조성물은 갈렉틴-9 작동제, 적합한 담체, 희석제 또는 부형제 및 포유류에서 면역 반응을 야기할 수 있는 면역원을 포함한다. 바람직하게는, 면역 반응은 면역 기억의 야기를 포함하는 보호 면역 반응이다. 면역원은 병원체의 성분 분자(예로, 세포 표면 단백질, 면역원성 웨타이드 또는 "서브유닛 백신"에서와 같은 이들의 다른 성분, 다중 B- 및/또는 T-에피토프를 포함하는 폴리토프, VLP, 캡시드, 또는 캡소미어), 불활성화된 병원체(예로, 불활성화된 바이러스, 약독화된 기생충-감염 RBC, 또는 약독화된 박테리아) 또는 병원체에 대한 면역 반응을 야기할 수 있는 임의의 다른 분자일 수 있다. 예를 들어, 말라리아 면역접종의 개선에서 PD-L2 및 항-갈렉틴-9 항체 작동제의 투여 효능을 나타내는 실시예가 참조된다.

[0069] 본 발명의 추가 측면은 갈렉틴-9 작동제, 저해제 및/또는 길항제의 설계, 스크리닝, 조작 또는 다른 경우의 생산 방법을 제공하며, 상기 방법에는 (i) 후보 분자가 갈렉틴-9 활성을 활성화하거나 자극함으로써 포유류에서 면역성을 자극하거나 증강시킬 수 있는 작동제인지 여부를 결정하는 단계; 또는 (ii) 후보 분자가 갈렉틴-9 활성을 차단하거나 저해함으로써 포유류에서 면역성을 적어도 부분적으로 억제하거나 방지할 수 있는 길항제 또는 저해제인지 여부를 결정하는 단계가 포함된다.

[0070] 광의적으로, 상기 방법에 따라 설계되거나, 스크리닝되거나, 조작되거나, 다른 경우 생산된 갈렉틴-9 작동제, 저해제 및/또는 길항제는 본원에서 상술된 바와 같이 포유류에서 면역성을 자극하거나 증강시킬 수 있거나 포유류에서 면역성을 적어도 부분적으로 억제하거나 방지할 수 있다.

[0071] 하나의 특정한 구현예에서, 단계 (i)에서, 후보 분자는 PD-L2 자극 또는 갈렉틴-9의 활성화를 모방한다.

[0072] 하나의 특정한 구현예에서, 단계 (ii)에서, 후보 분자는 PD-L2 자극 또는 갈렉틴-9의 활성화를 적어도 부분적으로 차단하거나 저해한다.

[0073] 후보 분자는 본원에서 전술된 바와 같은 항체 또는 항체 단편과 같은 웨타이드 또는 폴리웨타이드를 포함하는 단백질, 유기 소분자, 탄수화물, 예컨대 단당류, 이당류, 삼당류 또는 다당류, 지질, 핵산, 앱타미, 또는 이들

중 하나 이상을 포함하는 임의의 문자일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0074] 후보 조정물질의 설계 및/또는 스크리닝에 적용 가능한 기법의 비제한적 예는 X-선 결정학, NMR 분광측정, 구조 데이터베이스의 컴퓨터 보조 스크리닝, 컴퓨터-보조 모델링 또는 당분야에 널리 공지된 바와 같은 문자 결합 상호작용을 검출하는 생화학적 또는 생물리적 기법을 채용할 수 있다.

[0075] 문자 상호작용을 확인하는 생물리적 및 생화학적 기법에는 경쟁적 방사성 리간드 결합 검정, 공동-면역침전, 형광 공명 에너지 전달(FRET) 결합 검정을 포함하는 형광-기반 검정, 전기생리학, 분석용 초원심분리, 표지 전달, 화학적 가교, 질량 분광측정, 미세열량측정, 문헌[Chapter 20 of CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, 1997-2013)]에서 제공된 바와 같은 표면 플라즈몬 공명 및 광학 바이오센서-기반 방법 및 양자 도트 바이오센서가 포함된다. 생화학적 기법, 예컨대 2-하이브리드 및 파지 디스플레이 스크리닝 방법은 문헌[Chapter 19 of CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, 1997-2013)]에 제공된다.

[0076] 따라서, 방법의 초기 단계에는 광의의 구조적 및/또는 기능적 속성, 예컨대 갈렉틴-9에 결합하고/하거나 다른 경우 갈렉틴-9에 대한 PD-L2 결합과 경쟁하거나 PD-L2 다량체화를 방지하거나 저해하는 능력에 따라 선택되는 복수의 후보 문자의 확인 단계가 포함될 수 있다.

[0077] 방법에는 후보 문자(들)에 반응하여 갈렉틴-9와 연관되는 하나 이상의 생물학적 활성에서의 변화를 측정하거나 검출하는 추가 단계가 포함될 수 있다. 이들에는 갈렉틴-9 세포내 신호전달의 활성화 또는 저해, 사이토카인 생산, 종양 유발접종으로부터의 보호, 병원체 또는 병원체-유래 문자(예로, 백신)를 이용한 면역접종의 증강, 자가면역, 염증성 또는 알러지성 반응의 억제, 시험관내 또는 생체내 T 세포 기억의 유도가 포함될 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 갈렉틴-9와 연관되는 하나 이상의 생물학적 활성에서의 변화를 측정하거나 검출하기 위한 방법 및 프로토콜은 당분야 숙련가에게 널리 공지되어 있으며, 그 중 적어도 일부가 후술되는 실시예에 상세히 기재된다.

[0078] 갈렉틴-9 작동제, 길항제 및/또는 저해제가 본원에서 전술된 방법에 따라 유용할 수 있음이 이해될 것이다.

[0079] 본원에 개시된 발명은 갈렉틴-9 또는 그의 기능적 동족체를 발현하는 임의의 포유류에서 실시될 수 있다. 바람직하게는, 포유류는 인간이다.

[0080] 따라서 본 발명의 특정한 구현예가 쉽게 이해되고 실제 효과에 도입될 수 있으며, 하기 비제한적 실시예가 참조된다.

실시예

PD-L2 및 갈렉틴-9

[0083] sPD-L2가 유익한 효과를 가질 수 있지만 이것은 PD1에 대한 리간드 경쟁을 통한다는 것이 과학적 공감대였다: PD-L1이 PD1에 결합하면, 이는 면역 반응을 중단시키는 반면, PDL2는 PD1 결합에 대한 PD-L1과의 경쟁에 의해 반대 효과를 가질 수 있다. 이는 PD-L2 자체의 긍정적 자극 효과의 몇몇 보고에서 나타난다. 갈렉틴-9에 관해, 이는 Tim3에 대한 리간드로 간주되며, Tim3은 갈렉틴-9 결합에 의해 유도되거나 매개되는 T 세포 고갈에 기여하는 면역조정물질이다. T 세포 고갈을 회피하기 위해, 항체와 갈렉틴-9/Tim3 상호작용의 차단을 통해 면역 반응을 증대시키기 위해 여러 개발 작업이 연동된다. 이는 개선된 면역 반응을 달성하기 위해 갈렉틴-9를 작동시키고자 하는 본 발명과 다소 반대로 작용한다. 그러나 최근 논문에서는 갈렉틴-9 및 Tim3이 상호작용하지 않음을 확인하였으므로(적어도 인간에서) 공감대는 변할 수 있다(Leitner *et al.*, 2013). 문헌[Gabriel *et al.*, 2009]에 의한 리뷰에서, 마우스, 토끼 및 래트에 대한 갈렉틴-9의 투여는 본원에 기재된 것과 반대 효과를 가지는 것으로 제시되었으며(적어도 활성화된 T 세포에서) 미치료 T 세포에서 또한 반대 효과를 갖는 것으로 예상된다. 또한, 문헌[Gabriel *et al.*]에서는 가슴샘 미세환경에서, 갈렉틴 1, 갈렉틴 3, 갈렉틴 8 및 갈렉틴 9가 이중-음성($CD4^-CD8^-$) 또는 이중-양성($CD4^+CD8^+$) 가슴샘세포에서 아폽토시스를 유도하는 것으로 결론지어, 중추 관용성의 조절에서 이들 갈렉틴에 대한 가능한 역할을 제시하였다. 역시, 상기 관점은 본 발명과 대조된다.

말라리아

[0085] 몇몇 질환, 예컨대 말라리아, HIV 및 TB는 매년 전세계에 걸쳐 수백만 명의 개인에서 사망률 및 유병률을 유도한다. 이들 병원체가 면역성을 기피하기 위해 몇몇 기전을 진화시킴에 따라 백신의 개발이 크게 어려운 것으로 입증되었다. 프로그래밍된 세포사-1(PD-1) 경로는 HIV 및 플라스모디움 종(말라리아에 대한 원인 제제)이 면역

성을 탈출하는 기전으로서 시사되었다. 따라서 본 발명자들은 상기 경로가 면역성을 어떻게 손상시킬 수 있는지를 조사하기 위해 말라리아의 마우스 모델을 이용하였다.

[0086] 말라리아는 매년 3억 내지 5억 명의 개인을 감염시키고, 수백만 명을 죽인다. 말라리아 백신에 대해 대부분 항체-매개 보호에 기반하는 40건을 초과하는 임상 시험이 있었으며, 하나만 IIIb상에 도달하였다. 말라리아에 대한 일생 동안의 노출에도 보호 항체 반응을 유도하지 않을 수 있고(Egan et al., 1995; Egan et al., 1996) 혈액-단계 플라스모디움 팔시파럼(*Plasmodium falciparum*(Pf))이 감염된 어린 아이는 기존 항-말라리아 항체 수준에서 급속한 감소를 경험한다(Akpogheneta et al., 2008; Kinyanjui et al., 2007). 220명 개인으로부터의 혈장을 탐침으로 이용한 피. 팔시파럼(*P. falciparum*) 단백질 프로테옴의 대략 23%를 함유하는 단백질 마이크로어레이를 이용한 보다 최근 연구에서 이들 단백질에 대한 항체 반응성이 말라리아 시즌 동안에 급속히 상승하지만 꽃기 유지됨을 확인하였다(Crompton et al., 2010). 말라리아-풍토 지역의 어린이로부터 항원-특이적 기억 B 세포(MBC)를 측정한 이전 연구에서는 말라리아에 대한 다회 노출이 순환하는 항원-특이적 MBC의 안정한 집단을 생성하지 않음을 확인하였다(Dorfman et al., 2005). 또한, 경시적 연구에서는 최근에 Pf-특이적 MBC 및 항체 역가가 모두 급성 말라리아 후 증가된 뒤, 6개월 내에 감염-전 수준에 비해 약간 더 높은 지점까지 후퇴함을 나타내어, 면역성이 왜 어린이에서 불량하고 발생하는데 여러 해가 걸리는지를 설명할 수 있는 Pf-특이적 MBC 및 장기 생존 항체 구획 둘 다의 비효율적인, 단계적 증식을 시사하였다(Weiss et al., 2010). 주로 아프리카에 기반한 이들 연구와는 대조적으로, 말라리아의 풍토성이 훨씬 더 낮은 태국에서 최근 6년 동안 피. 팔시파럼(*P. falciparum*) 및/또는 피. 비박스(*P. vivax*)의 임상적 발병을 보고한 것이 알려진 개인은 항원-특이적 항체 및/또는 안정한 빈도의 항원-특이적 MBC를 가졌다(Wipasa et al., 2010).

[0087] $CD4^+$ T 세포는 특정한 병원체에 대한 면역 반응을 형상화하는 몇몇 혈액-서브타입으로 구성된다. 말라리아 동안, $CD4^+$ T 세포 하위세트는 보호, 발병 및 또한 면역 반응으로부터의 탈출에서 여러 역할을 갖는다. $CD4^+$ T 세포는 상기 질환에 대한 보호에 시사되는 마우스에서의 실험적 말라리아 동안 인터페론- γ (IFN- γ) 및 종양 피사 인자 알파(TNF- α) 모두의 주요 원천인 것으로 나타났다(Muxel et al., 2011). 피. 샤바우디(*P. chabaudi*) 말라리아가 감염된 마우스에서의 연구는 IFN- γ 및 TNF- α 가 피크 기생충 부담을 제어하기 위해 비장에서의 산화질소 합성효소 발현을 협력적으로 유도하는 것으로 나타났다(Jacobs et al., 1996). 유사하게, 인간에서, Pf에 대한 초기 IFN- γ 반응은 더 우수한 항-기생충 면역성과 연관된다(McCall et al., 2010). IFN- γ 는 말라리아에 대한 보호 반응의 광대한 네트워크에 기여하며, 문헌[McCall 및 Sauerwein, 2010]에 의해 요약된다. 특히 주목할 것은 MSP1-특이적 트랜스제닉 $CD4^+$ T 세포에 대한 만성 말라리아의 효과를 조사한 연구이다(Stephens and Langhorne, 2010). 이들 기생충-특이적 T 세포를 Thy1.1 유사유전자형 마우스 내로 씨드접종한 뒤 10⁵개 플라스모디움 샤바우디(*Plasmodium chabaudi*) 감염 적혈구로 감염시켰다. 마우스의 절반은 만성 말라리아를 제거하기 위해 30-34일째에 클로로퀸으로 치료하였다. 60일 후, 트랜스제닉 T 세포의 유세포측정 분석은 감염이 제거된 약물-치료 마우스에 비해 기억 $CD44^+ IL-7R^+ CD4^+$ T 세포의 대략 25%가 미치료 마우스에서 소실됨을 확인하였다(Stephens and Langhorne, 2010). 상기 연구는 진행 중인 감염이 재-감염으로부터 보호할 수 있는 일부 기생충-특이적 기억 T 세포의 손실을 유도함을 강조한다.

프로그래밍된 사멸-1(PD-1) 및 말라리아

[0089] PD-1이 말라리아에 대한 발병에서 시사되었다. 만성 및 치사 말라리아에 대한 면역성 및 재-감염으로부터의 장기 보호에서 PD-1의 역할을 이해하기 위해, C57/B16(WT) 마우스 코호트 및 PD-1 유전자가 결실된 C57/B16 마우스(PD-1KO)를 비-치사 10⁵개 피. 샤바우디(*P. chabaudi*)(만성 말라리아) 또는 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*) 기생 적혈구(pRBC)로 감염시키고 혈액을 1-2일마다 기생충혈증에 대해 조사하였다. 40일 후, 모든 생존 마우스를 140일 동안 휴식시켜 기억 세포만 생존하고 일차 면역 세포는 감소되도록 하였다. 이어서 이들 마우스를 180일째에 해당 기생충으로 재-감염시켰다(도 1a 및 b에서의 화살표). 본 발명자들은 비-치사 피. 샤바우디(*P. chabaudi*)가 감염된 모든 WT 마우스에서 대략 35일에 일차 감염이 제거됨을 확인하였다(도 1a). 이들 WT 마우스를 180일째에 재-감염시켰을 때, 첫 번째 감염보다는 훨씬 더 낮은 수준이지만 모든 마우스에서 기생충혈증이 발생하였다(도 1a). 대조적으로, PD-1KO 마우스에서는 15일에 피. 샤바우디(*P. chabaudi*) 감염이 제거되었고, 30일경에는 20%의 마우스만 낮은 등급의 재발 감염을 경험하였다(도 1b). 재-감염 시, 9/9 PD-1-KO 마우스는 기생충혈증을 나타내지 않았고(도 1b) 미치료 마우스로 수혈하였을 때 멸균 면역성을 가졌다(데이터는 나타내지 않음).

[0090] WT 마우스를 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)으로 감염시켰을 때, 모든 마우스가 감염 7일 내에 사망하였다

(도 1a). 대조적으로, 10/10 PD-1KO 마우스는 치사 피. 요엘리이 *YM*(*P. yoelii YM*) 감염 및 180일 후의 재-감염으로부터 생존하였다. 유의미하게는, 40%의 재-유발접종된 마우스만 낮은 수준의 기생충혈증을 경험하였다(도 1b). 이들 연구는 PD-1 경로가 만성 및 치사 말라리아를 유도하며, 재-감염에 대한 최적 장기 보호를 방지함을 나타낸다.

[0091] 말라리아 동안 $CD4^+$ T 세포의 고갈

[0092] 말라리아 동안 PD-1 발현을 조사하기 위한 최초 연구 중 하나에서는 $IL-7R^{10}$ -발현 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 상 PD-1 발현을 나타내기 위해 마우스 모델을 이용하였다(Chandele et al., 2011). 이들 PD-1-발현 세포(특히 $CD8^+$ T 세포)는 감염 30일 내에 거의 완전히 소실되었다(Chandele et al., 2011). 그러나 연구에서는 T 세포 고갈을 확인하기 위해 기능적 반응을 측정하지 않았다. 유사하게, 후속 연구에서는 PD-1이 또한 말리 및 케냐에서 *Pf*-감염된 개인의 혈액 중 $CD4^+$ (Butler et al., 2012; Illingworth et al., 2013) 및 $CD8^+$ T 세포(Illingworth et al., 2013) 상에서 발현됨을 나타내었지만, 고갈의 기능적 증거는 제공되지 않았다.

[0093] 이들 관찰을 검증하기 위해, 혈액 단계 말라리아의 쥐과 모델을 채용하여 $CD4^+$ T 세포 상에서 PD-1 및 LAG-3의 증가된 발현의 효과를 탐색하였다(Butler et al., 2012). 항체를 이용한 PD-L1 및 LAG-3 저해 분자의 조합 차단은, 마우스에서의 피. 요엘리이(*P. yoelii*) 및 피. 샤바우디(*P. chabaudi*) 말라리아 동안 기생충혈증의 제거를 가속화하였다(Butler et al., 2012). 상기 PD-L1 및 Lag-3의 이중 차단은 증강된 항체-매개 면역성과 연관되는 $CD4^+$ 소포 T 헬퍼 세포(T_{FH}) 수를 개선하였다(Butler et al., 2012). 또한, 감염 8 및 9일 후 항-말라리아 약물 클로로퀸으로 치료한 감염 마우스는 더 낮은 수준의 $CD4^+$ T 세포 기능부전을 나타내었다(Butler et al., 2012). 이들 연구는 림프구 고갈이 말라리아에 대한 면역성을 조정함을 나타내었다.

[0094] PD-1은 T 세포 활성화를 저해하기 위해 B7-1(Butte et al., 2007) 및 PD-1(Iwai et al., 2003) 모두와 특이적으로 상호작용할 수 있으므로, 후속 연구에서는 PD-1이 면역성의 조정에서 역할을 갖는지를 확실히 결정하기 위해 PD-1의 결실을 갖는 마우스(PD-1KO)를 이용하였다. 피. 샤바우디(*P. chabaudi*) 말라리아 감염은 만성 감염으로 발생하므로, 이를 조사하였다. PD-1이 말라리아의 만성 상(35일) 동안 $IFN-\gamma$ 및 $TNF-\alpha$ 를 분비하고 증식하는 기생충-특이적 $CD4^+$ T 세포의 능력 감소를 매개하는 것으로 나타나, 이들 세포의 고갈을 시사하였다(Horne-Debets et al., 2013). 그러나 조합된 PD-L1/Lag-3 차단 연구와는 대조적으로, T_{FH} 수에 대한 변화는 관찰되지 않았다. 상기 명백한 모순에 대한 하나의 가능한 설명은 WT 마우스에 비해 PD-1 KO 마우스가 유의미하게 더 높은 비율의 조절성 T 소포 세포(T_{FR} 세포)를 가졌다는 것이다(Horne-Debets et al., 2013). T_{FR} 세포는 시험관내에서 억제성이며 생체내 T_{FH} 세포 및 GC B 세포의 수를 제한하는 것으로 알려져 있다(Linterman et al., 2011). 대안적으로, PD-L1은 또한 T 세포 활성화를 저해하기 위해 B7-1과 특이적으로 상호작용할 수 있으므로(Butte et al., 2007), 상기 경로는 PD-1 KO 마우스에서 T_{FH} 수를 제어할 수 있다.

[0095] $CD8^+$ T 세포 및 고갈

[0096] PD-1-매개 세포 고갈은 $CD8^+$ T 세포의 고갈과 가장 잘 연관되었다. 그러나 이전에 기재된 바와 같이, 뇌 말라리아의 발병 및 비장 구조에 대한 손상에서 이들의 역할(Beattie et al., 2006)이 알려져 있음도 불구하고 혈액-단계 말라리아의 제거에서 $CD8^+$ T 세포에 대한 역할은 널리 인식되어 있지 않다. 결정적으로, PD-1은 최근에 말라리아의 급성 상 동안 기생충-특이적 $CD8^+$ T 세포의 수 및 기능적 능력에서 95% 손실을 매개하며, 이는 감염을 악화시켜 만성 말라리아로 이어지는 것으로 나타났다(Horne-Debets et al., 2013). 상기 연구는 100% 마우스에서 만성 감염이 발생한 야생형(WT)에 대비하여 PD-1 KO 마우스에서 만성 말라리아의 진행을 조사하였다. 흥미롭게도, PD-1 KO 마우스의 30% 미만에서 만성 감염이 발생하였고, 이들 마우스에서의 기생충혈증 수준은 WT 마우스에서보다 100배 넘게 더 낮았다. 그러나 PD-1 KO 마우스에서 $CD8^+$ T 세포의 결핍은 퍼크 기생충혈증을 2배 증가시켰고, 100%의 PD-1 KO 마우스에서 만성 말라리아가 발생하였다(Horne-Debets et al., 2013). 전반적으로, 말라리아의 만성 상 동안 PD-1은 사량체 $CD8^+CD62L^-$ T 세포 수의 80% 감소 및 기생충에 반응한 $CD8^+$ 세포 증식능의 95% 감소를 매개하였다(Horne-Debets et al., 2013). 특히 주지할 것은, PD-1 KO 마우스가 WT 마우스에 비

해 더 많은 기능적 CD4⁺ T 세포 및 유사한 역가의 기생충-특이적 항체를 가졌음에도 불구하고, CD8⁺ T 세포가 결핍된 경우 이들에서는 여전히 만성 말라리아가 발생했다는 것이다.

[0097] 마지막으로, PD-1 KO 마우스는 WT 마우스에 비해 더 많은 그랜자임 B-발현 CD8⁺ T 세포를 가져서, 감염된 세포의 세포독성-사멸이 관여됨을 제시하였다. 이들 관찰은 만성 말라리아에 대한 보호에서 CD8⁺ T 세포의 중추적 역할을 강조한다. 대조적으로, 이전 연구에서는 PD-L1의 차단이 병원성 CD8⁺ T 세포에 의해 매개되는 실험적 뇌말라리아를 증대시키는 것으로 나타나서(Hafalla et al., 2012), 경로가 뇌 말라리아에 대해 보호함을 시사하였다. 이들 발견의 임상적 유의성은 말라리아로 감염된 개인으로부터의 인간 CD8⁺ T 세포가 PD-1을 발현함을 확인한 케냐에서의 연구에 의해 강조된다(Illingworth et al., 2013). 따라서 CD8⁺ T 세포의 역할은 이것이 집중적인 *Pf* 전달에 대한 수년 간의 노출에도 불구하고 획득된 멸균 면역성의 증거가 없는지에 대한 이유를 설명할 수 있는 특정한 고려사항을 필요로 한다(Tran et al., 2013). 항체 및 CD4⁺ T 세포가 증상성 말라리아에 대해 보호를 제공하지만 CD8⁺ T 세포가 멸균 면역성을 위해 필요할 수 있다. 따라서 CD8⁺ T 세포의 PD-1 매개 고갈로, 최근 보고된 바와 같이 멸균 면역성이 획득되지 않는다(Tran et al., 2013).

DC 및 말라리아

[0099] 말라리아 동안, CD4+ T 세포가 일차 피크 기생충혈증을 제거하고 B 세포가 잔여 기생충을 제거하는 것은 잘 구축되어 있다. T 세포 활성화는 DC를 필요로 하므로, 본 발명자들은 마우스 기생충의 5가지 균주에서 DC 기능을 비교하였고, 치사 및 비-치사 균주 및 기생충 종 간 DC의 표현형 및 기능에서의 이분법을(Wykes et al., 2007a; Wykes et al., 2007b) 리뷰된 바와 같이(Wykes and Good, 2008) 확인하였다. 이들 연구는 또한 비-치사 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL) 및 피. 샤바우디(*P. chabaudi*)의 감염으로부터의 DC가 완전히 기능적이고 특히 풍부한 IL-12를 분비하였음을 확인하였다(Wykes et al., 2007a; Wykes et al., 2007b). 대조적으로, 기생충의 3가지 치사 균주, 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM), 피. 빈케이(*P. vinckeii*) 및 피. 베르케이(*P. berghei*)가 감염된 마우스로부터의 DC는 이들이 T 세포를 감작하거나 IL-12를 분비할 수 없었으므로 기능성이 없었다(Wykes et al., 2007a; Wykes et al., 2007b). 비-치사 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL)-감염 마우스로부터의 DC를 미치료 마우스에 전달했을 때, 수신체 마우스는 치사 감염으로의 유발접종에서 생존하였고, 상기 효과는 IL-12에 의해 매개되었다(Wykes et al., 2007a). 또한, 다른 균들도 말라리아 동안 DC 기능이 손상된 것으로 나타났다(Good et al., 2005; Ocana-Morgner et al., 2003; Urban et al., 1999; Urban et al., 2001).

[0100] PD-L2는 주로 DC에 의해 발현되는 것으로 알려져 있는 반면, PD-L1은 DC를 포함하는 일정 범위의 세포 상에서 발현된다. 따라서 미치료 및 감염된 마우스로부터의 DC를 PD-L2 발현에 대해 조사하였다. PD-L2 mRNA 수준을 비-치사 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL) 또는 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM)이 감염된 마우스 및 미치료 마우스로부터의 DC에서 측정하였다(도 2). 치사 감염으로부터의 DC는 PD-L2 mRNA에서 대략 50% 증가를 나타낸 반면, 비-치사 감염으로부터의 DC는 단백질 발현에서 거의 300% 증가로 반응하였다. 상기 연구는 더 높은 PD-L2 발현이 말라리아로부터의 더 우수한 생존과 연관됨을 나타내었다.

말라리아 동안 PD-L2의 보호 역할

[0102] DC에 의해 발현된 PD-L2가 보호성인지 여부를 확인하기 위해, WT 마우스를 비-치사 말라리아로 감염시키고 PD-L2-특이적 차단 항체로 치료하여 상기 분자의 기능을 저해하였다. 상기 실험을 위해, 몇몇 WT 마우스 코호트를 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL) 및 피. 샤바우디(*P. chabaudi*)로 감염시키고, 감염 1일 후부터 감염 14일 내지 18일 후까지 3-4일마다 항-PD-L2 또는 대조군 래트 IgG(대조군 Ig)로 치료하였다.

[0103] 대조군 Ig를 수여받은 모든 WT 마우스(도 3a 및 b)에서 30-37일에 잠재 감염이 제거되었다. 그러나 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL) 및 PD-L2 차단 항체를 수여받은 모든 마우스는 사망하거나 25일 내에 중증 증상으로 인해 안락사되었다(도 3a). 대조적으로, 만성 피. 샤바우디(*P. chabaudi*) 말라리아를 가진 모든 마우스는 PD-L2 차단에도 생존하였으나, 이들은 만성 감염 상 동안 더 높은 기생충혈증인, 대조군 마우스에 비해 16% 더 높은 일차 피크 기생충혈증을 가졌으며(log 척도 주지; *은 p=0.0048을 나타냄) 감염을 제거하는 데 4일이 더 걸렸다(도 3b).

[0104] 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM) 또는 피. 베르케이(*P. berghei*) 감염이 DC 상의 PD-L2 발현 부재 또는 낮은 수준으로 인해 치사성인지 여부를 결정하기 위해, 이들 마우스에 sPD-L2를 보충하였다(도 4 및 5). 이를 위해, 몇몇 WT 마우스 코호트를 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM) 또는 피. 베르케이(*P. berghei*)로 감염시키고, 감염 3,

5 및 7일 후 가용성 재조합 PD-L2-인간-Fc 합성 단백질을 제공하였다. 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)이 감염되고 대조군 인간 IgG(대조군 Ig)가 수여된 모든 WT 마우스는 11일 내에 사망하였으나, 다량체성 sPD-L2를 수여받은 마우스의 92%는 생존하였고 유의미하게 더 낮은 피크 기생충혈증을 가지며 25일 내에 감염이 제거되었다(도 4a 및 b; $p<0.001$). 이어서 모든 생존 마우스를 150일 동안 휴식시키고, 동일한 용량의 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*) 말라리아로 재유발접종하였다(추가 PD-L2 없음; 도 4a). 모든 마우스는 최소 기생충혈증(<1%)을 가지며 생존한 반면, 모든 새로운 대조군 마우스(대조군 Ig-R)는 감염으로 죽었다. 흥미롭게도, 이량체성 PD-L2는 부정적 효과를 가졌던 반면, 더 다량체(예로, 팔량체성 sPD-L2)는 강한 유익 효과를 가졌다.

[0105] 피. 베르게이(*P. berghei*) 말라리아를 이용한 마우스 분석은 모든 대조군 마우스에서 8일 내에 뇌 말라리아 증상(주름진 털, 경련, 혼수상태 포함)이 발생하여(도 5a) 10일까지 감염으로 죽은 것으로 나타났다(도 5b). 대조적으로, sPD-L2로 치료한 모든 피. 베르게이(*P. berghei*)-감염 마우스에서는 뇌 증상이 발생하지 않았고, 대략 15일 동안 감염이 제어되었지만 제어되지 않는 기생충혈증으로 25일째에 모두 사망하였다. 추가 용량은 평가하지 않았다.

[0106] 이들 연구로 PD-L2 발현이 말라리아로부터의 면역성 및 생존을 위해 필요함을 확인하였다. 상기 단백질을 발현하는 마우스에서 PD-L2의 차단은 사망을 매개하거나 감염을 악화시켰다. 대조적으로, 이들의 DC가 PD-L2를 발현하지 않을 때 마우스에 sPD-L2를 보충한 경우, 이들은 치사 감염에서 생존하거나 뇌 증상이 없이 유지되었다.

PD-L2는 CD4 T 세포에 의해 보호를 매개함

[0108] sPD-L2가 T 세포를 통해 면역성을 개선했는지를 결정하기 위해, 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)-감염 마우스에 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포의 부재 또는 존재 하에 sPD-L2를 제공하였다. 상기 실험을 위해, WT 마우스에 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*) 감염 1일 전부터 감염 14-18일 후까지 3-4일마다 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포-결핍 항체를 제공하거나 래트 Ig(래트 Ig)로 치료하였다. 이어서 마우스에 감염 3, 5 및 7일 후 sPD-L2 또는 대조군 인간 Ig를 제공하였다.

[0109] 대조군 Ig를 수여받은 모든 WT 마우스(도 6a)는 14일까지 사망하거나 안락사시켜야 했다. 대조적으로, sPD-L2를 수여받은 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)-감염 마우스의 60%가 생존하였고, 30일 내에 감염이 제거되었다. 그러나 감염된 WT 마우스에 sPD-L2를 제공했지만 $CD4^+$ T 세포가 결핍된 경우, 모든 마우스에서 중증 임상 증상이 발생하였으므로 사망하거나 안락사시켜야 했다(도 6a 및 b). 대조적으로, $CD8^+$ T 세포의 결핍은 sPD-L2 치료에 의해 치사 말라리아로부터의 생존에 영향을 미치지 못했지만, 마우스가 더 높은 기생충혈증을 경험하였다(도 6c). 종합하면, 이들 관찰은 sPD-L2가 $CD8^+$ T 세포 기능에 대한 일부 효과와 함께, $CD4^+$ T 세포에 의해 보호 및 생존을 매개함을 나타내었다. 이들 연구는 sPD-L2 치료 후 중앙값 생존이 성체 마우스에서보다 낮은 매우 어린 마우스(성숙 마우스의 이용 가능성 부재로 인해)에서 수행하였다.

sPD-L2에 의한 보호는 PD-L1 기능의 차단에 의해 매개되지 않음

[0111] DC 상의 PD-L2의 발현 또는 sPD-L2 치료가 보호 면역성을 매개할 수 있으므로, 본 발명자들은 PD-L2가 면역성의 PD-L1-매개 저해의 차단에 의해 보호를 매개할 수 있다고 가정하였다. 상기 가정을 평가하기 위해, PD-L1 녹아웃 마우스의 두 코호트(PD-L1KO; $n=4$)를 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii YM*)으로 감염시키고 3 용량의 PD-L2 또는 대조군 IgG로 치료하였다. 모든 대조군 마우스가 7일까지 중증 임상 증상 및 높은 기생충혈증 수준(~78%)을 가지며 사망하였다(도 7). 대조적으로, PD-L2로 치료한 감염 PD-L1KO 마우스에서는 기생충혈증이 제어되었으나 (24%) 10일까지 사망하였다. 상기 연구는 PD-L2에 의해 매개된 보호가 PD-L1과 무관함을 시사하였다.

CD4+ T 세포 상의 갈렉틴-9는 PD-L2에 대한 신규 수용체임.

[0113] PD-L2가 PD-L1과 무관하게 말라리아에 대해 보호성임이므로, 본 발명자들은 이것이 미치료 T 세포 상에 제2 수용체를 갖는다고 가정하였다. 상기 가정을 평가하기 위해, 본 발명자들은 미치료 C57BL/6 마우스로부터 단리된 T 세포의 용해물을 제조하고 고정화된 PD-L2 또는 인간 IgG를 이용하여 수용체를 면역-침전시켰다(도 8). 3회 독립 실험에서 5개의 재현성 밴드가 반복적으로 면역 침전되었고, 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 사슬(밴드 1 및 4), sPD-L2(밴드 5) 및 액틴(밴드 3)이 포함되었다. 갈렉틴-9(밴드 2)는 PD-L2에 의해 면역침전되었지만, 3회의 독립 실험에서 인간 IgG에 의해 면역침전된 동등한 밴드를 갖지 않았다. 대조군에서 N2^o 및 N2로 명명된 밴드는 히스톤 단백질이었다. 마지막으로, sPD-L2에 의해 면역침전된 밴드 2가 갈렉틴-9임을 확인하기 위해, 실험을 반복하였으나 젤을 니트로셀룰로오스로 옮기고 항-갈렉틴-9 항체로 웨스턴 블롯 표지하였다(도 9). 이들 연구에서

T 세포로부터 면역침전된 밴드 2의 서열분석에 의해 확인된 39 kD 밴드가 갈렉틴-9이며 PD-L2에 대한 신규한 결합 파트너일 수 있음을 확인하였다.

[0114] 미치료 T 세포 상의 갈렉틴-9는 PD-L2에 대한 수용체임.

sPD-L2가 온전한 T 세포 상의 갈렉틴-9에 결합하였는지를 결정하기 위해, 총 T 세포 집단을 미치료 마우스의 비장으로부터 단리하고 바이오틴화된 sPD-L2 및 APC-스트렙타비딘 또는 PE-항-갈렉틴-9와 인큐베이션하였다(도 10). 유세포측정 분석으로 sPD-L2가 미치료 CD4+ T 세포의 대략 12.8%에 결합한 반면, 갈렉틴-9는 이들 세포의 대략 1.9%에서만 발현됨을 확인하였다. 과량의 표지되지 않은 항-갈렉틴-9 항체를 이용한 미치료 T 세포의 사전-처리는 sPD-L2에 의한 표지를 대략 3% 감소시켜 sPD-L2가 T 세포 상의 갈렉틴-9에 결합함을 확인시켰다. 이전에 공개된 연구에서는 미치료 마우스의 비장으로부터 취한 CD4+ T 세포의 대략 10-20%가 PD-L2에 결합할 수 있는 PD-1을 발현함을 나타내었다. 마지막으로, sPD-L2는 상기 검정에서 유의미한 수의 CD8+ T 세포에 결합하지 않았다.

[0116] sPD-L2 및 항-갈렉틴-9는 미치료 CD4+ & CD8+ T 세포에서 생존 및 분화를 매개함.

미치료 마우스로부터 단리된 T 세포를 항-CD3(5 μ g/ml)으로 코팅된 96 웰 플레이트에서 배양하여 IL-2와 함께 항원 신호를 제공하였다. 배양에 또한 (a) 대조군으로서 래트 IgG가 결합된 플레이트, (b) sPD-L2가 결합된 플레이트; (c) sPD-L2 및 항-갈렉틴-9(클론 108A) 항체 형태의 갈렉틴-9 저해제가 처리된 세포가 결합된 플레이트 (d) 갈렉틴-9 작동제 항체(클론 RG9.1) 및 (e) 항-갈렉틴-9(클론 RG9.35)를 보충하였다. sPD-L2는 T_{BET}를 발현하는 CD4+CD62L¹⁰ 세포의 백분율(도 11a) 및 (b) 세포 내 T_{BET}의 수준을 래트 IgG 대조군에 비해(도 11b) 증가시켰다. 상기 효과는 항-갈렉틴-9(클론 108A) 항체에 의해 차단되었다. 클론 RG9.1도 T_{BET}를 발현하는 CD4+CD62L¹⁰ 세포의 백분율 및 세포 내 T_{BET}의 수준을 증가시켰다(도 11a 및 b).

[0118] PD-L2 및 RG.1(RG9.1)이 결합된 플레이트로 처리된 세포의 생활성은 36시간 후 다른 배양에 비해 높아서, 이들 배양 실험 중 일부를 훨씬 더 낮은 CD3 수준 자극(1 μ g/ml)과 함께 72시간 배양으로 반복하였다. 도 12에서 알 수 있듯이, sPD-L2 및 RG1(RG9.1) 항체는 모두 대조군 배양에 비해 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 생활성을 개선시킨다.

[0119] 가용성 PD-L2 및 항 갈렉틴-9 항체는 치사 말라리아에 대해 보호함

신호전달 갈렉틴-9가 가용성 PD-L2와 동일한 효과를 갖는지를 결정하기 위해, WT 마우스의 3 코호트를 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM)으로 감염시키고 감염 3, 5 및 7일 후 200 μ g sPD-L2, 항-갈렉틴-9 또는 래트 IgG를 정맥내 제공하였다. 마우스를 매일 모니터링하고, 주름진 털, 구부림 또는 활동 부재를 포함하는 질환의 임상 증상에 대해 스코어링하였다. sPD-L2 또는 작동성 항-갈렉틴 9(클론 RG9.1)를 제공한 마우스는 최소 증상을 나타내었고, 모든 대조군 마우스가 사망하거나 안락사되었을 때 이들 군의 2/3 마우스가 생존하였다(도 12).

[0121] 갈렉틴-9는 sPD-L2에 대한 결합 파트너임

마우스 갈렉틴-9 및 마우스 PD-L2 간 결합의 생화학적 성질을 결정하기 위해 옥테트 레드 연구를 수행하였다. sPD-L2를 탐침에 결합시키고, sPD-1 및 s갈렉틴-9와 그 상호작용을 측정하였다. 도 13에 나타낸 바와 같이, 결과는 PD-L2 및 PD-1 간 거의 즉각적인 연합 및 해리를 나타낸다. 대조적으로, 갈렉틴-9 결합은 PD-L2와 연합하는데 약 200초가 걸렸고 해리하는데 614초 초과가 걸려서 매우 안정한 상호작용을 시사하였다. 가장 유의미하게는, PD-L2-PD-1 상호작용이 1:1의 분자 비인 반면, 갈렉틴-9 및 PD-L2 상호작용에는 결합 동안 갈렉틴-9의 응집 또는 다량체화가 관여된다. 이는 왜 sPD-L2의 다량체성 형태가 말라리아에 대해 보호성인 반면, 단량체성 또는 이량체성 형태는 보호성이 아닐 수 있는지를 설명하는 것을 돋는다. 단량체성 및 다량체성 sPD-L2에 의한 보호를 비교하는 본 발명자들의 연구에서는 77-92%의 마우스가 보호된 다량체성 sPD-L2에 비해 단량체성 sPD-L2가 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM) 말라리아(n=4)로부터 마우스를 보호하거나 뇌 말라리아(n=3)를 방지하지 못함을 확인하였다. 또한, 단량체성 sPD-L2는 뇌 말라리아를 악화시켜, 이것이 갈렉틴-9와 sPD-L2의 상호작용을 차단함을 제시하였다. 이와 같이, 적용되는 sPD-L2의 형태가 면역 반응의 성질을 제어하기 위해 이용될 수 있다(예로, 다량체성 형태는 말라리아 또는 암에 대해 보호하기 위해 투여될 수 있고, 단량체성 형태는 면역계를 하향 조절하여 천식 또는 크론 병과 같은 염증성 또는 자가면역 질환을 치료하기 위해 투여될 수 있다). 이에 관해, 앱타며 및 이중특이적 항체의 이용과 같은 생체내 PD-L2의 다량체화를 촉진하는 제제도 본 발명에서 유용하다. 앱타며는 광의의 표적 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 소형 올리고뉴클레오타이드이며, 치료제로서 항체

에 비해 일부 장점을 제공한다. 이들은 다양체성 PD-L2를 모방할 수 있다.

[0123] 항-갈렉틴-9 항체는 배양 중 마우스 CD4⁺ T 세포를 활성화하여 Th1 사이토카인을 분비함

DC에 의해 발현되는 갈렉틴-9는 또한 T 세포 상의 TIM-3에 대한 리간드이다(Zhu et al., 2005). Th1 세포의 가용성 갈렉틴-9-유도된 사멸은 시험관내 TIM-3에 의존적이었으며, 생체내 갈렉틴-9 단백질의 투여는 인터페론-감마 생산 T 세포의 선택적 손실을 일으켰다(Zhu et al., 2005). T 세포에 의해 발현된 갈렉틴-9의 역할은 그다지 명확하지 않다. 본 발명자들은 처음에 3가지 항-갈렉틴-9 항체를 평가하였고, 2/3이 활성화시킴을 확인하였다(데이터는 나타내지 않음). 시험관내 정제된 T 세포 상에서 가장 강한 자극 활성을 갖는 공동-자극성 항-갈렉틴-9 항체의 효과를 분석하였다. 마우스 비장으로부터 단리되고 항-CD3 항체가 코팅된 플라스틱 플레이트 상에서 배양된 CD4⁺ T 세포 상에서 대조군 IgG, 가용성 마우스 PD-L2-Ig 또는 항-마우스 갈렉틴-9 mAb의 효과를 평가하였다. 배양 3일 후, 상청액을 사이토카인에 대해 평가하였다. IgG를 이용한 대조군 배양에 비해, 고정화된 PD-L2 및 항-갈렉틴-9는 모두 IL-2(~4-배), IFN-γ (~4-배) 및 TNF-α (60%) 분비를 유의미하게 증가시킬 수 있었다. 이들 연구에서는 PD-L2 및 항-갈렉틴-9가 모두 마우스 T 세포에 공동-자극 신호를 제공하여 마우스 PD-L2에 대해 이전에 보고된 바와 같이(Shin et al., 2003) Th1 반응을 개선함을 확인하였다.

[0125] 인간 CD4⁺ T 세포에 대해 수행한 유사한 검정도 sPD-L2가 Th1 사이토카인의 분비를 증가시킬 수 있음을 나타내었다(도 15a).

본 발명자들은 인간 CD4+ T 세포에 의해 사이토카인 생산을 자극하는 항-인간 갈렉틴-9 항체를 찾지 못했으므로, 항-마우스 갈렉틴-9 항체를 평가하였다(도 15b). 상기 항-마우스 갈렉틴-9 항체는 인간 sPD-L2에 의해 유도되는 수준까지 인터페론-γ의 분비를 유도하였다(그러나 다른 사이토카인은 유도하지 않음).

항-갈렉틴-9는 말라리아에 대해 보호함

[0128] 항-갈렉틴-9 항체가 가용성 PD-L2를 이용한 치료로 나타난 것과 동일한 보호를 제공할 수 있었음을 확인하기 위해(도 4), WT 마우스를 치사 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM)으로 감염시키고 대조군 래트 Ig, 차단 항-Tim-3, 또는 항-마우스 갈렉틴-9로 치료하였다(도 16a 및 b). 반복 실험에서, 3 용량의 항-갈렉틴-9 항체는 갈렉틴-9에 대한 또 다른 수용체인 TIM-3의 항체-매개 차단에 의해 부여되는 보호가 없는 상태에 비해 75% 마우스의 생존을 매개하였다. Tim-3 차단은 대조군 래트 Ig 치료 마우스에 비해 유의미한 보호를 제공하지 않았다.

항-갈렉틴-9는 종양 진행을 감소시킴

[0130] Th1 CD4⁺ T 세포 면역성이 또한 종양 제거를 위해 필수적이므로, 항-갈렉틴-9 항체의 활성화를 2 동계 마우스 유방암 모델에서 평가하였다. 4 용량의 항-갈렉틴-9 항체는 각각의 수신체 마우스의 4번째 좌측 유방 지방층 내로 직교이방성으로 주사한, 촉진 가능한 PYMT-유래 유방 암종의 성장을 지연시킬 수 있었다(도 17a). 16-22일에 제공한 항-갈렉틴-9 치료는 이소형 대조군에 비해 27일 내지 35일 사이에 종양 진행을 완화시켰다. 이전 연구에서는 CTLA-4 또는 PD-1/PD-L1 차단과 조합된 Treg 세포 제거가 동일한 직교이방성으로 삽입된 PYMT-유래 유방 암종에 영향을 미치는지를 조사하였다(Bos et al., 2013). Treg 세포 제거가 일차 및 전이 종양 진행을 유의미하게 지연시킨 반면, 체크포인트 차단은 종양유전자-유도된 종양 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이어서 8-10일에 제공한 3 용량의 항-갈렉틴-9가 공격성 전이 E0771.LMB 유방 선암종의 성장을 지연시킬 수 있는지를 평가하였다(Johnstone et al., 2015). 모든 대조군 마우스를 15일까지 안락사시킨 반면, 치료받은 마우스는 대조군의 15일에 비해 15-16일에 35% 더 작은 종양을 가졌다(도 17b). 전반적으로, 활성화 항-갈렉틴-9 치료는 직교이방성으로 삽입된 유방 암종의 진행을 감소시켰다.

[0131] PD-L2의 차단은 *Tbet*+ Th1 반응을 저해할 수 있음

[0132] PD-L2가 생체내 *Tbet* 및 Th1 면역성을 제어했는지를 확인하기 위해, 본 발명자들은 마우스를 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL) 말라리아로 감염시키고 기생충이 혈중 검출 가능해졌을 때 모노클로날 항체로 PD-L2를 차단하였다. 상기 실험을 위해, WT 마우스를 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL)로 감염시키고 감염 4일 후부터 감염 14-18일 후까지 3-4일마다 항-PD-L2 또는 대조군 래트 IgG를 제공하였다. 먼저, CD4⁺ T 세포를 말라리아에 대한 보호를 매개하는 것으로 알려져 있는, Th1 CD4⁺ T 세포의 효과기 기능을 위해 필요한 전사 인자인 *Tbet*의 발현에 대해 조사했다(Ing and Stevenson, 2009; Stephens and Langhorne, 2010). T 세포를 또한 미치료 T 세포에서 확인되는 마커이며 또한 중추 기억(CD62L^{hi}) 세포를 효과기 기억(CD62L^{lo}) T 세포로부터 구별하는

CD62L의 발현에 대해 평가하였다. 감염 7일 후 PD-L2 차단으로, 비장 Tbet-발현 CD4⁺ T 세포의 수가 더 적어지는 경향이 있었다(도 18a). 그러나 14일까지, 대조군 마우스는 PD-L2가 차단된 마우스에 비해, 비장 당 각각 2.2 및 3-배 더 많은 Tbet-발현 CD62L^{hi} 및 CD62L^{lo} CD4⁺ T 세포를 가졌다(도 18b). 유사하게, 대조군 마우스는 PD-L2가 차단된 마우스에 비해, 14일째에 ELISPOT 검정으로 측정되는, 5배를 초과하는 더 많은 수의 IFN-γ-분비, 기생충-특이적 CD4⁺ T 세포를 가졌다(도 18c). 몇몇 세포 유형에 의해 분비될 수 있는 혈청 IFN-γ의 수준은 PD-L2가 차단된 마우스에서 7일째에 감소되었고, 14일째에는 두 마우스 군에서 모두 낮았다(도 18d). 대조적으로, PD-L2가 차단된 마우스는 14일째에 대조군 마우스에 비해 2배를 초과하는 더 많은 혈청 IL-10을 가졌다(도 18e). 상기 결과는 비장 당 2.6배 더 많은 수의 조절 T 세포(T_{REG})와 연관된다(도 18f). 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL)-감염 PD-L2KO 마우스를 이용한 연구에서는 또한 감염된 WT 마우스에 비해 14일째에 비장 당 유의미하게 더 적은 수의 Tbet-발현 및 IFN-γ-분비, 기생충-특이적 CD4⁺ T 세포를 확인하였다(도 19c, d). 마지막으로, PD-L2KO 마우스 또는 항체를 이용한 PD-L2 차단으로, 감염 14일까지 IFN-γ-분비, 기생충-특이적 CD8⁺ T 세포의 수가 더 적어지는 경향이 있었다(도 19e, f).

[0133] 종합하면, 본 발명자들의 데이터는 PD-L2 발현이 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL) 말라리아 감염 동안 효과적인 Th1 CD4⁺ T 세포 반응을 위해 필요함을 나타내었다. 유의미하게, PD-L2의 차단은 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL) 감염 7 내지 14일 사이에 이들 세포의 수 증가를 방지하였으므로, PD-L2가 Tbet-발현 CD4⁺ T 세포의 최적 증식을 위해 요구되었다. 주지할 것은, 기능적인, 기생충-특이적 IFN-γ-분비 CD4⁺ T 세포가 7일째에는 존재하지만 PD-L2 신호의 부재 하에 14일까지 감소되어, 상기 신호가 이들 핵심 효과기 세포의 증식 및 생존을 개선함을 시사하였다. 이러한 발견의 견지에서, 대부분의 기생충은 10일 내에 제거되었지만 피. 요엘리이 17XNL(*P. yoelii* 17XNL) 실험에서 PD-L2는 첫 주 후 장기 면역성만을 개선함을 나타내었으므로, 피. 샤바우디(*P. chabaudi*)-감염 마우스가 PD-L2-차단에 가장 잘 생존할 수 있을 것이다. 따라서, PD-L2는 감염 첫 주 후에만 Th1 CD4⁺ T 세포 수를 유지하기 위해 필요하다.

[0134] T-박스 전사 인자 T-bet는 1형-유사 면역성의 핵심 조절인자로서 도출되었으며, T 및 B 럼프구뿐만 아니라 수지상 세포 및 천연 살해 세포에서 효과기 세포 운명의 구축 및/또는 유지에 중추적인 역할을 담당한다. T-bet는 Th1 효과기 기능의 유지에서 중추적 역할을 담당하는 것으로 보인다. T-bet-결핍 마우스는 주로 CD4 및 γδ 세포에서의 IFN-γ 생산 결함을 포함하는 Th1 분화 손상을 나타낸다.

[0135] Th1 반응은 오랫동안 자가면역 증후군과 연관되어 왔다. 셀리악 질환 및 크론병 모두 일반적으로 Th1-관련 증후군으로 간주되어 왔고, 증강된 T-bet 활성 및/또는 발현을 나타낸다. Th1-관련 IBD 마우스 모델에서, 중증 조합면역결핍(scid) 수신체 내로의 CD4⁺ CD62L⁺ 세포의 차용 전달은 T-bet 결핍이 질환에 대해 보호하는 반면, T-bet 과발현이 질환을 촉진함을 나타내었다. 이는 또한 다발성 경화증(Rack et al. 2014), 염증성 관절염(Wang et al., 2006,), 당뇨병(Juedes et al., 2004,), 베체트 증후군(Li et al., 2006 T), 및 VKH(VogtKoyanagi-Harada) 질환(Li et al., 2005)에도 해당된다. PD-L2/갈랙틴-9 경로의 차단이 Tbet를 차단하므로, 이것이 자가면역 질환의 치료를 위한 신규한 방법을 제공할 가능성을 갖는다.

치사 말라리아로부터의 sPD-L2-매개 생존은 CD4⁺ T 세포를 필요로 함

[0136] 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM) 말라리아로부터의 다량체성 sPD-L2-매개 생존에 대한 T 세포의 기여를 결정하기 위해, CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포를 sPD-L2-치료, 감염 마우스에서 결핍시켰다. 상기 실험을 위해, 여러 군의 WT 마우스를 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM)으로 감염시키고 sPD-L2 또는 인간 IgG(hIg)로 치료하였다. 이들 마우스에 또한 1일부터, 감염 14-18일 후까지 3-4일마다 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포-결핍 항체 또는 래트 Ig를 제공하였다. 이전 연구에서는 이용된 항체가 이들 세포를 결핍시킬 것임을 확인하였다. hIg 및 래트 Ig를 수여 받은 모든 감염 WT 마우스는 14일까지 사망하거나 안락사시켜야 했다(도 20a 및 b). 대조적으로, sPD-L2 및 대조군 래트 Ig를 제공한 75%의 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM)-감염 마우스에서는 30일 내에 기생충혈증이 제거되었고, 모니터링을 중단할 때까지 50일을 초과하여 생존하였다(도 6a 및 b). 그러나, CD4⁺ T 세포가 결핍된 경우 마우스는 sPD-L2에 의해 보호되지 않았고 임상 증상의 중증도로 인해 안락사시켜야 했다(도 20a, c). 대조적으로, CD8⁺ T 세포의 결핍은 이들 마우스가 대조군 마우스에 비해 11-21일경에 지속적으로 더 높은 기생충혈증

을 가졌음에도 불구하고, sPD-L2에 의해 제공되는 보호 효과에 유의미한 영향을 미치지 않았다(도 20a, d). 종합하면, 이들 발견은 sPD-L2가 CD4⁺ T 세포를 통해 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM) 감염으로부터의 보호, 생존, 및 기생충 제어를 촉진할 수 있고, CD8⁺ T 세포로부터 소규모 기여가 있을 수 있음을 나타낸다.

[0138] sPD-L2는 개선된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 기능을 통해 보호 및 생존을 매개함

sPD-L2가 그 치료 효과를 발휘하는 기전을 결정하기 위해, 피. 요엘리이 YM(*P. yoelii* YM)-감염 마우스를 3 및 5일째에 대조군 Ig 또는 sPD-L2로 치료하고, 비장을 대조군 마우스에서의 중증 임상 증상의 개시 전인 7일째에 수집하였다. T 세포를 비장으로부터 단리하고, 미치료 마우스로부터의 비장 DC 및 기생충-특이적 항원(MSP1₁₉) 또는 펩타이드(Pb1, SQLLNAYKL)와 또는 추가 항원 없이 배양하였다. sPD-L2를 이용한 치료는 배양 중 MSP1₁₉에 반응할 수 있는 기생충-특이적 CD4⁺ T 세포의 수를 증가시켰고, ELISPOT 검정에 의해 측정되는 대조군 Ig로 치료한 마우스에 비해 ~2.7배 더 높은 수의 IFN-γ 분비 CD4⁺ T 세포를 가졌다(도 21a). 유사하게, 시험관내 EdU-섭취 검정으로 sPD-L2-치료 마우스가 기생충 항원에 반응하여 증식한 더 많은 수의 기생충-특이적 T 세포를 가졌음을 확인하였다(도 21b). 그러나 코호트 간 T_{REGs} 수에는 차이가 없었다(도 21c). 또한, sPD-L2-치료 마우스 도 대조군에 비해 6배 많은 수의 기생충-특이적 CD8⁺ T 세포(즉, 기생충-특이적 펩타이드 F4를 나타내는 MHC 사량체(D^b)에 결합된 세포(Lau et al., 2011))를 나타내었다(도 21d). 그러나 7일 내에는 이들 세포에 의한 IFN-γ 분비(도 21e) 또는 그랜자임 B 발현(도 21f)에서 유의미한 증가가 없었다. 종합하면, 이들 결과는 sPD-L2가 말라리아에 대한 보호를 위해 중추적인 것으로 알려져 있는 개선된 Th1 효과기 기능을 시사하는 IFN-γ 분비 CD4⁺ T 세포의 발생을 촉진함으로써 마우스를 치사 말라리아로부터 보호함을 나타낸다(Kumar and Miller, 1990; Stephens and Langhorne, 2010; Su and Stevenson, 2002). 유사하게, 증가된 CD8⁺ T 세포는 11 내지 21일 경 sPD-L2로 치료한 마우스에서 나타난 보호의 온전한 개선을 설명하였다(도 18d).

[0140] 본 명세서를 통해, 본 발명을 임의의 한 구현예 또는 특정한 특징의 집합으로 제한하지 않고, 본 발명의 바람직한 구현예를 설명하고자 하였다. 본 발명의 광의의 정신과 범위에서 벗어나지 않고 본원에 기재되고 예시된 구현예에 대해 다양한 변화 및 개질이 수행될 수 있다.

[0141] 본원에서 언급된 모든 컴퓨터 프로그램, 알고리즘, 특히 및 과학 문헌은 이들의 전문이 참조로 본원에 포함된다.

참고문헌

- [0143]** Agata, Y., A. Kawasaki, H. Nishimura, Y. Ishida, T. Tsubata, H. Yagita, and T. Honjo. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8:765-772.
- [0144]** Akpogheneta, O.J., N.O. Duah, K.K. Tetteh, S. Dunyo, D.E. Lanar, M. Pinder, and D.J. Conway. 2008. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infect Immun* 76:1748-1755.
- [0145]** Beattie, L., C.R. Engwerda, M. Wykes, and M.F. Good. 2006. CD8⁺ T lymphocyte-mediated loss of marginal metallophilic macrophages following infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *J Immunol* 177:2518-2526.
- [0146]** Bos, P.D., Plitas, G., Rudra, D., Lee, S.Y., and Rudensky, A.Y. (2013). Transient regulatory T cell ablation deters oncogene-driven breast cancer and enhances radiotherapy. *J Exp Med* 210, 2435-2466.
- [0147]** Butler, N.S., J. Moebius, L.L. Pewe, B. Traore, O.K. Doumbo, L.T. Tygrett, T.J. Waldschmidt, P.D. Crompton, and J.T. Harty. 2012. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nat Immunol* 13:188-195.
- [0148]** Butte, M.J., M.E. Keir, T.B. Phamduy, A.H. Sharpe, and G.J. Freeman. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27:111-122.
- [0149]** Chandele, A., P. Mukerjee, G. Das, R. Ahmed, and V.S. Chauhan. 2011. Phenotypic and functional

profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with *Plasmodium yoelii*. *Immunology* 132:273-286.

- [0150] Chemnitz, J.M., R.V. Parry, K.E. Nichols, C.H. June, and J.L. Riley. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 173:945-954.
- [0151] Crompton, P.D., M.A. Kayala, B. Traore, K. Kayentao, A. Ongoiba, G.E. Weiss, D.M. Molina, C.R. Burk, M. Waisberg, A. Jasinskas, X. Tan, S. Doumbo, D. Doumtabe, Y. Kone, D.L. Narum, X. Liang, O.K. Doumbo, L.H. Miller, D.L. Doolan, P. Baldi, P.L. Felgner, and S.K. Pierce. 2010. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6958-6963.
- [0152] Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5:1365-1369.
- [0153] Dorfman, J.R., P. Bejon, F.M. Ndungu, J. Langhorne, M.M. Kortok, B.S. Lowe, T.W. Mwangi, T.N. Williams, and K. Marsh. 2005. B Cell Memory to 3 *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Antigens in a Malaria-Endemic Area. *J Infect Dis* 191:1623-1630.
- [0154] Egan, A.F., J.A. Chappel, P.A. Burghaus, J.S. Morris, J.S. McBride, A.A. Holder, D.C. Kaslow, and E.M. Riley. 1995. Serum antibodies from malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motifs of MSP1(19), the carboxy-terminal fragment of the major merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 63:456-466.
- [0155] Egan, A.F., J. Morris, G. Barnish, S. Allen, B.M. Greenwood, D.C. Kaslow, A.A. Holder, E.M. Riley, J.A. Chappel, P.A. Burghaus, J.S. Morris, and J.S. McBride. 1996. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis* 173:765-769.
- [0156] Freeman, G.J., A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L.J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M.C. Byrne, H.F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M.R. Bowman, B.M. Carreno, M. Collins, C.R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-1034.
- [0157] Good, M.F., H. Xu, M. Wykes, and C.R. Engwerda. 2005. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol* 23:69-99.
- [0158] Hafalla, J.C., C. Claser, K.N. Couper, G.E. Grau, L. Renia, J.B. de Souza, and E.M. Riley. 2012. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Inhibitory Pathways Independently Regulate Host Resistance to *Plasmodium*-induced Acute Immune Pathology. *PLoS Pathog* 8:e1002504.
- [0159] Horne-Debets, J.M., R. Faleiro, D.S. Karunaratne, X.Q. Liu, K.E. Lineburg, C.M. Poh, G.M. Grottenbreg, G.R. Hill, K.P. Macdonald, M.F. Good, L. Renia, R. Ahmed, A.H. Sharpe, and M.N. Wykes. 2013. PD-1 Dependent Exhaustion of CD8(+) T Cells Drives Chronic Malaria. *Cell Reports* 5:1204-1213.
- [0160] Illingworth, J., N.S. Butler, S. Roetynck, J. Mwacharo, S.K. Pierce, P. Bejon, P.D. Crompton, K. Marsh, and F.M. Ndungu. 2013. Chronic exposure to *Plasmodium falciparum* is associated with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion. *J Immunol* 190:1038-1047.
- [0161] Ing, R., and Stevenson, M.M. (2009). Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice. *Infect Immun* 77, 770-782.
- [0162] Iwai, Y., S. Terawaki, M. Ikegawa, T. Okazaki, and T. Honjo. 2003. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 198:39-50.
- [0163] Jacobs, P., D. Radzioch, and M.M. Stevenson. 1996. A Th1-associated increase in tumor necrosis factor

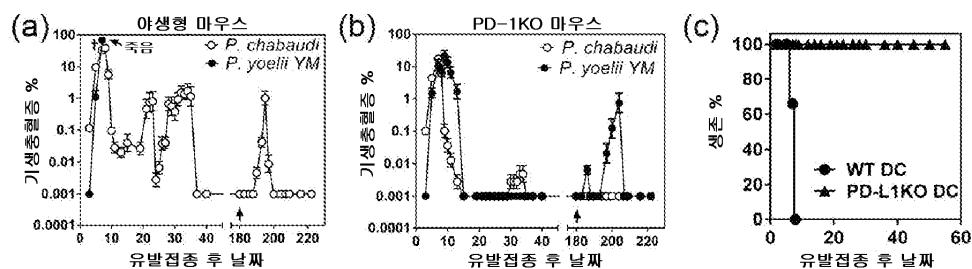
alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *Infect Immun* 64:535-541.

- [0164] Johnstone, C.N., Smith, Y.E., Cao, Y., Burrows, A.D., Cross, R.S., Ling, X., Redvers, R.P., Doherty, J.P., Eckhardt, B.L., Natoli, A.L., *et al.* (2015). Functional and molecular characterisation of E0771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. *Disease models & mechanisms* 8, 237-251.
- [0165] Juedes et al, 2004, T-bet Controls Autoaggressive CD8 Lymphocyte Responses in Type 1 Diabetes. *J Exp Med.* 2004 Apr 19; 199(8): 1153-1162
- [0166] Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26:677-704.
- [0167] Kinyanjui, S.M., D.J. Conway, D.E. Lanar, and K. Marsh. 2007. IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malar J* 6:82.
- [0168] Kumar, S., and Miller, L.H. (1990). Cellular mechanisms in immunity to blood stage infection. *Immunol Lett* 25, 109-114.
- [0169] Latchman, Y., C.R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A.J. Long, J.A. Brown, R. Nunes, E.A. Greenfield, K. Bourque, V.A. Boussiotis, L.L. Carter, B.M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A.H. Sharpe, and G.J. Freeman. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2:261-268.
- [0170] Lau, L.S., Fernandez Ruiz, D., Davey, G.M., de Koning-Ward, T.F., Papenfuss, A.T., Carbone, F.R., Brooks, A.G., Crabb, B.S., and Heath, W.R. (2011). Blood-stage *Plasmodium berghei* infection generates a potent, specific CD8+ T-cell response despite residence largely in cells lacking MHC I processing machinery. *J Infect Dis* 204, 1989-1996.
- [0171] Li B et al, T-bet expression is upregulated in active Behcet's disease. *Br J Ophthalmol.* 2003 Oct;87(10):1264-7
- [0172] Li B et al., Upregulation of T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells during Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Br J Ophthalmol.* 2005 Nov;89(11):1410-2.
- [0173] Linterman, M.A., W. Pierson, S.K. Lee, A. Kallies, S. Kawamoto, T.F. Rayner, M. Srivastava, D.P. Divekar, L. Beaton, J.J. Hogan, S. Fagarasan, A. Liston, K.G. Smith, and C.G. Vinuesa. 2011. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 17:975-982.
- [0174] McCall, M.B., J. Hopman, M. Daou, B. Maiga, V. Dara, I. Ploemen, K. Nganou-Makamdop, A. Niangaly, Y. Tolo, C. Arama, J.T. Bousema, J.W. van der Meer, A.J. van der Ven, M. Troye-Blomberg, A. Dolo, O.K. Doumbo, and R.W. Sauerwein. 2010. Early interferon-gamma response against *Plasmodium falciparum* correlates with interethnic differences in susceptibility to parasitemia between sympatric Fulani and Dogon in Mali. *J Infect Dis* 201:142-152.
- [0175] McCall, M.B., and R.W. Sauerwein. 2010. Interferon-gamma--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *J Leukoc Biol* 88:1131-1143.
- [0176] Muxel, S.M., A.P. Freitas do Rosario, C.A. Zago, S.I. Castillo-Mendez, L.R. Sardinha, S.M. Rodriguez-Malaga, N.O. Camara, J.M. Alvarez, and M.R. Lima. 2011. The spleen CD4+ T cell response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria develops in two phases characterized by different properties. *PLoS One* 6:e22434.
- [0177] Ocana-Morgner, C., M.M. Mota, and A. Rodriguez. 2003. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med* 197:143-151.
- [0178] Sharpe, A.H., E.J. Wherry, R. Ahmed, and G.J. Freeman. 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8:239-245.

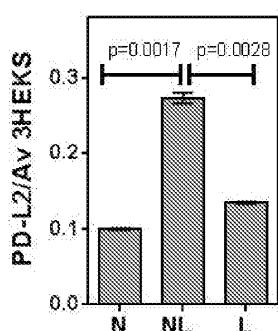
- [0179] Shin, T., Kennedy, G., Gorski, K., Tsuchiya, H., Koseki, H., Azuma, M., Yagita, H., Chen, L., Powell, J., Pardoll, D., and Housseau, F. 2003. Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of CD4+ T cells independent of the PD-1 receptor. *J Exp Med* 198, 31-38.
- [0180] Stephens, R., and J. Langhorne. 2010. Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. *PLoS Pathog* 6:e1001208.
- [0181] Su, Z., and Stevenson, M.M. 2002. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *J Immunol* 168, 1348-1355.
- [0182] Tran, T.M., S. Li, S. Doumbo, D. Doumtable, C.Y. Huang, S. Dia, A. Bathily, J. Sangala, Y. Kone, A. Traore, M. Niangaly, C. Dara, K. Kayentao, A. Ongoiba, O.K. Doumbo, B. Traore, and P.D. Crompton. 2013. An Intensive Longitudinal Cohort Study of Malian Children and Adults Reveals No Evidence of Acquired Immunity to *Plasmodium falciparum* Infection. *Clin Infect Dis* 57:40-47.
- [0183] Tseng, S.Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J.E. Slansky, S.I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D.M. Pardoll, and H. Tsuchiya. 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193:839-846.
- [0184] Urban, B.C., D.J. Ferguson, A. Pain, N. Willcox, M. Plebanski, J.M. Austyn, and D.J. Roberts. 1999. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells [see comments]. *Nature* 400:73-77.
- [0185] Urban, B.C., N. Willcox, and D.J. Roberts. 2001. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8750-8755.
- [0186] Wang et al, 2006, Transcription factor T-bet regulates inflammatory arthritis through its function in dendritic cells, *JCI* Feb; 116(2) 414-421
- [0187] Weiss, G.E., B. Traore, K. Kayentao, A. Ongoiba, S. Doumbo, D. Doumtable, Y. Kone, S. Dia, A. Guindo, A. Traore, C.Y. Huang, K. Miura, M. Mircetic, S. Li, A. Baughman, D.L. Narum, L.H. Miller, O.K. Doumbo, S.K. Pierce, and P.D. Crompton. 2010. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathog* 6:e1000912.
- [0188] Wipasa, J., C. Suphavilai, L.C. Okell, J. Cook, P.H. Corran, K. Thaikla, W. Liewsaree, E.M. Riley, and J.C. Hafalla. 2010. Long-lived antibody and B cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathog* 6:e1000770.
- [0189] Wykes, M.N., and M.F. Good. 2008. What really happens to dendritic cells during malaria? *Nat Rev Microbiol* 6:864-867.
- [0190] Wykes, M.N., X.Q. Liu, L. Beattie, D.I. Stanisic, K.J. Stacey, M.J. Smyth, R. Thomas, and M.F. Good. 2007a. Plasmodium Strain Determines Dendritic Cell Function Essential for Survival from Malaria. *PLoS Pathog* 3:e96.
- [0191] Wykes, M.N., X.Q. Liu, S. Jiang, C. Hirunpetcharat, and M.F. Good. 2007b. Systemic tumor necrosis factor generated during lethal *Plasmodium* infections impairs dendritic cell function. *J Immunol* 179:3982-3987.
- [0192] Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khouri, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6, 1245-1252.

도면

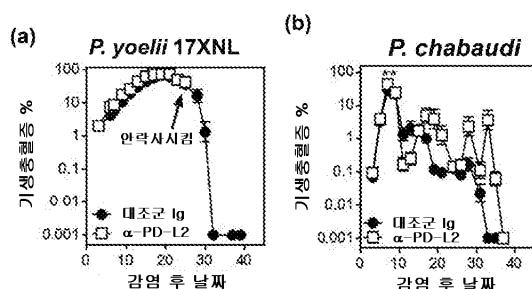
도면1



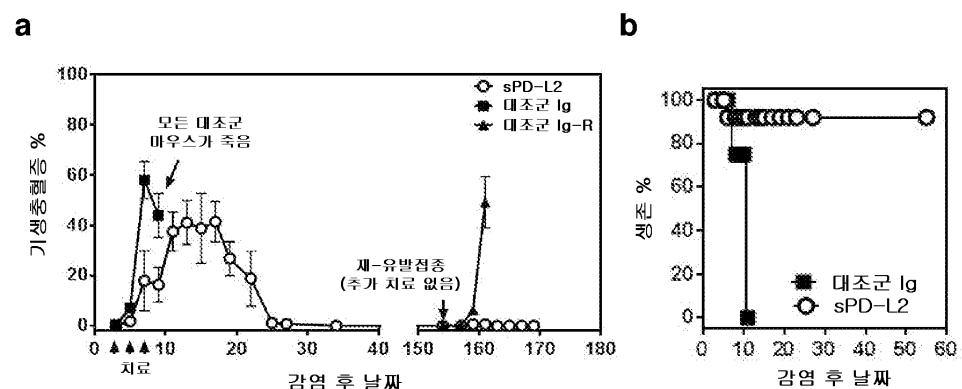
도면2



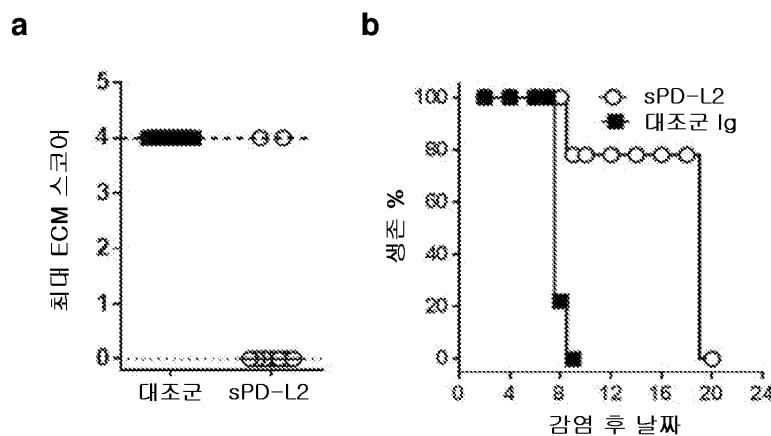
도면3



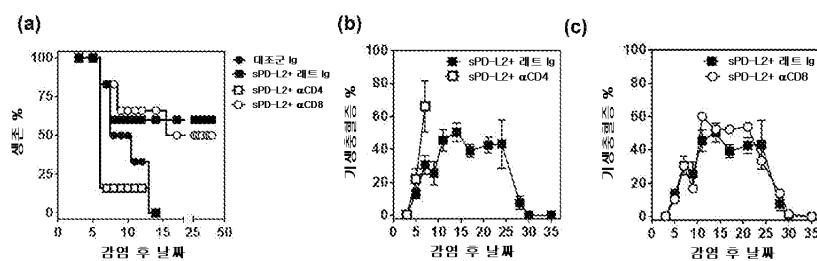
도면4



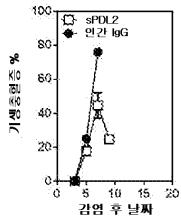
도면5



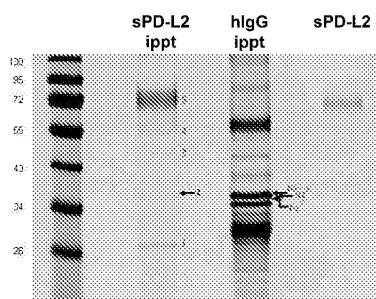
도면6



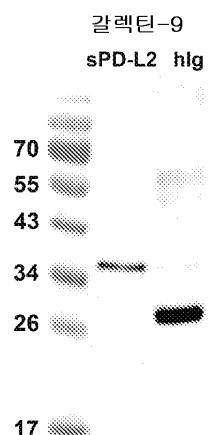
도면7



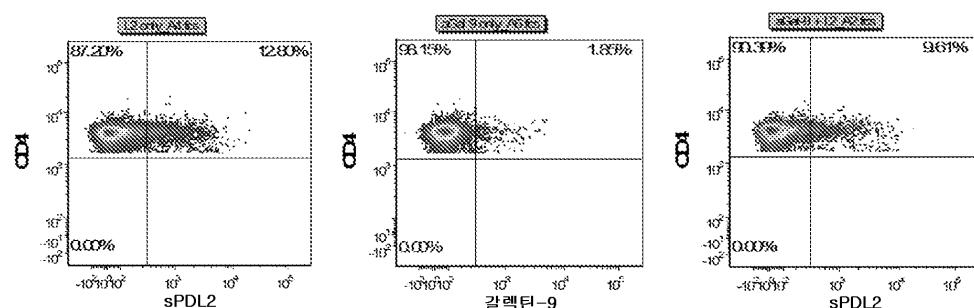
도면8



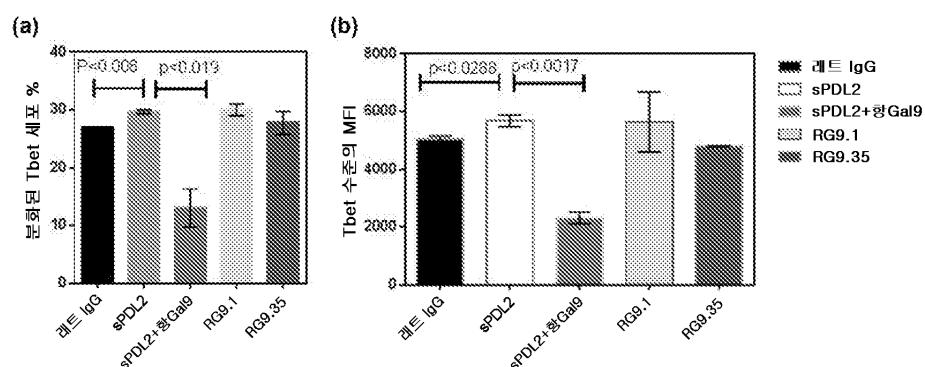
도면9



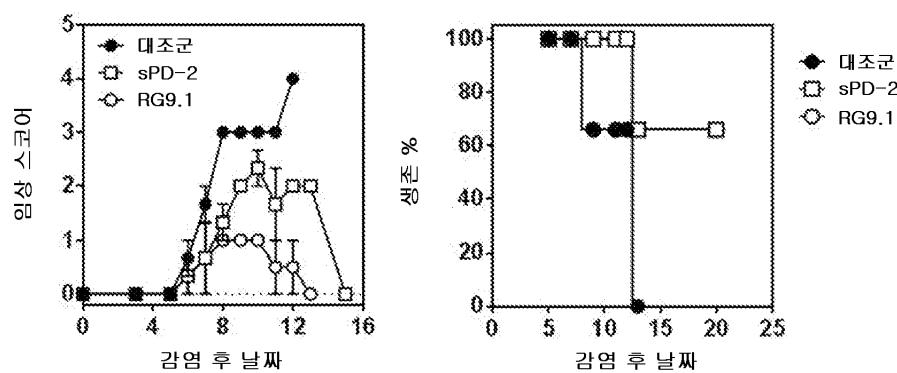
도면10



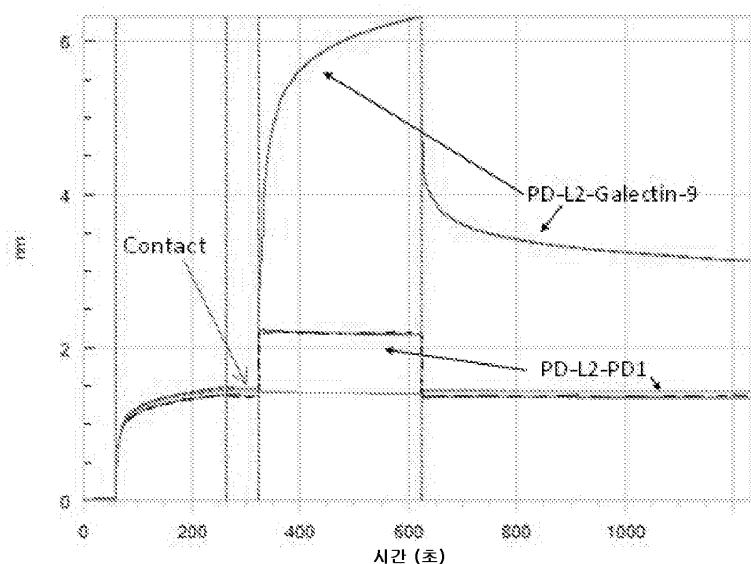
도면11



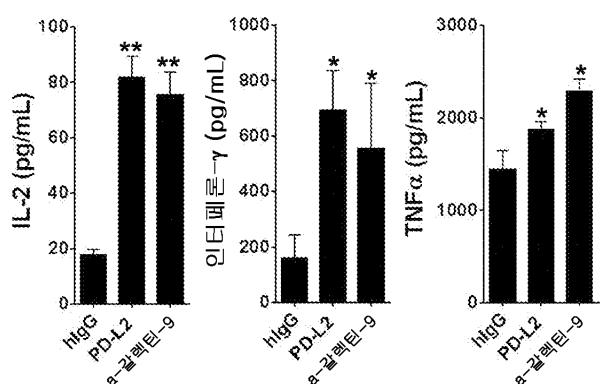
도면12



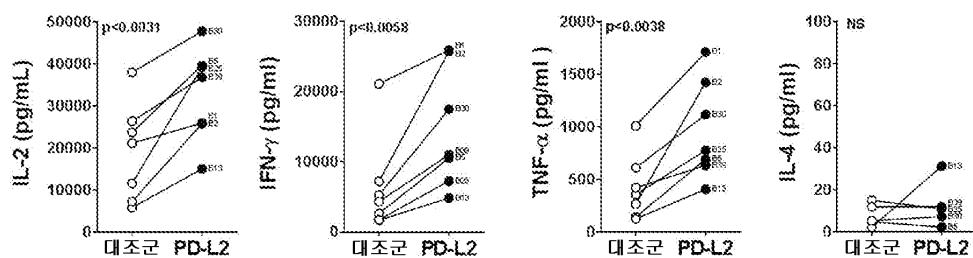
도면13



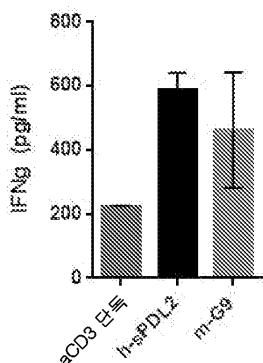
도면14



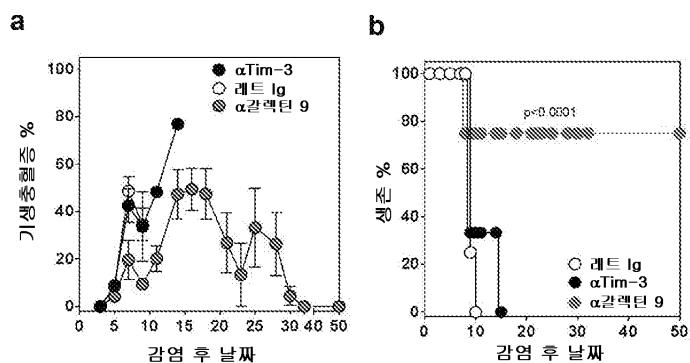
도면15a



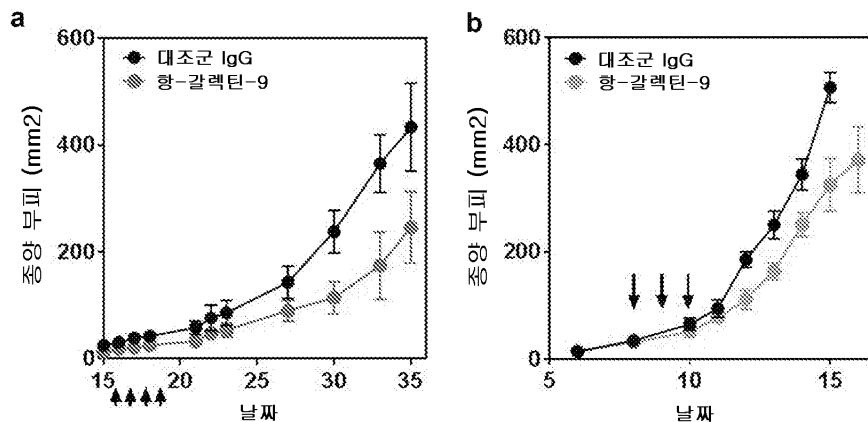
도면15b



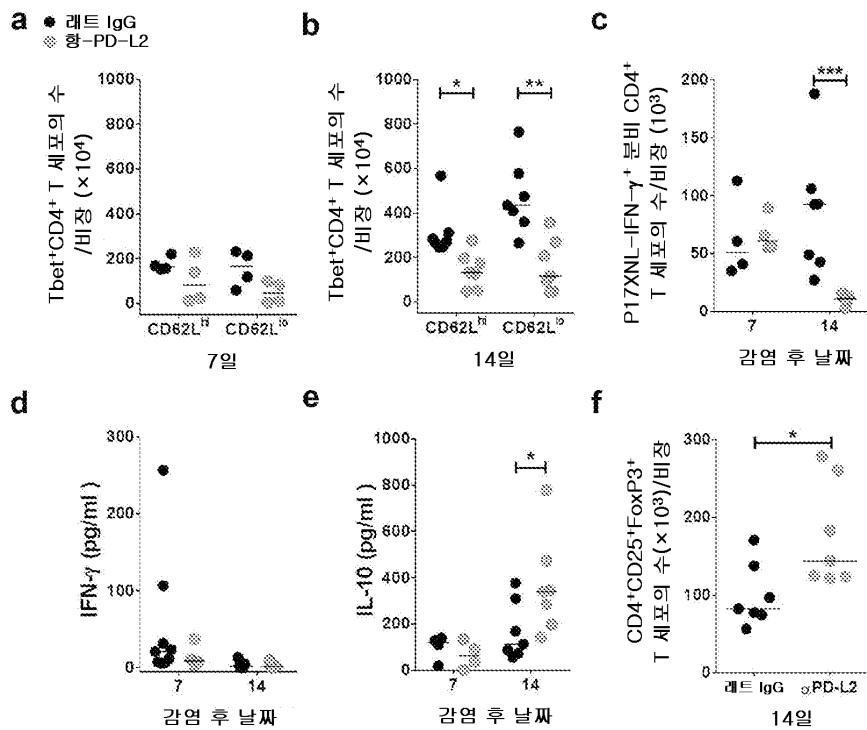
도면16



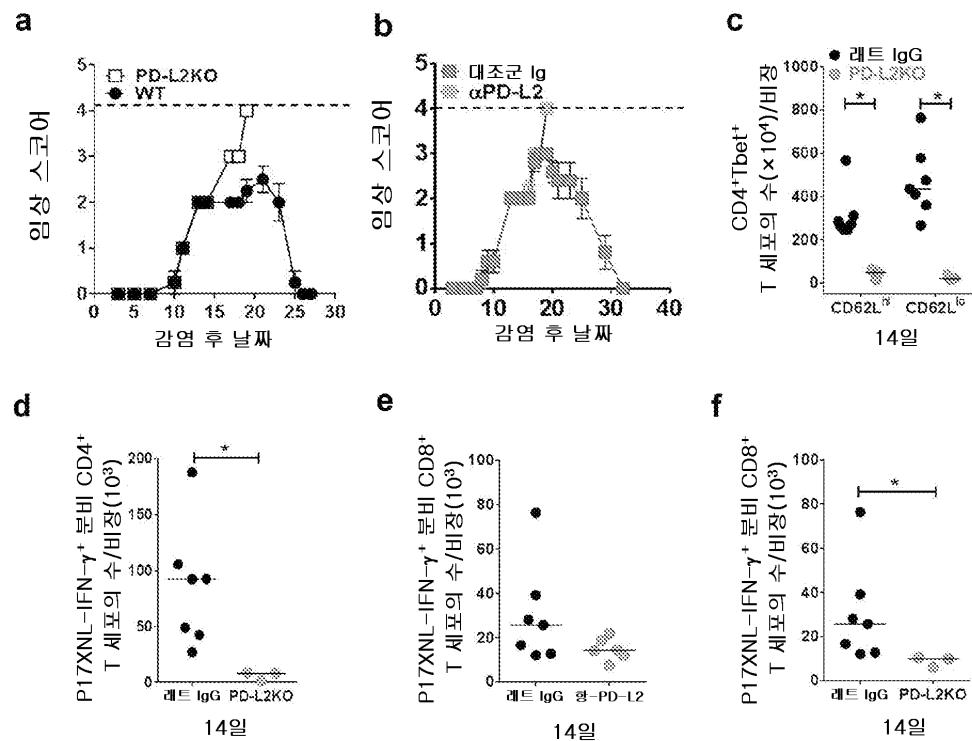
도면17



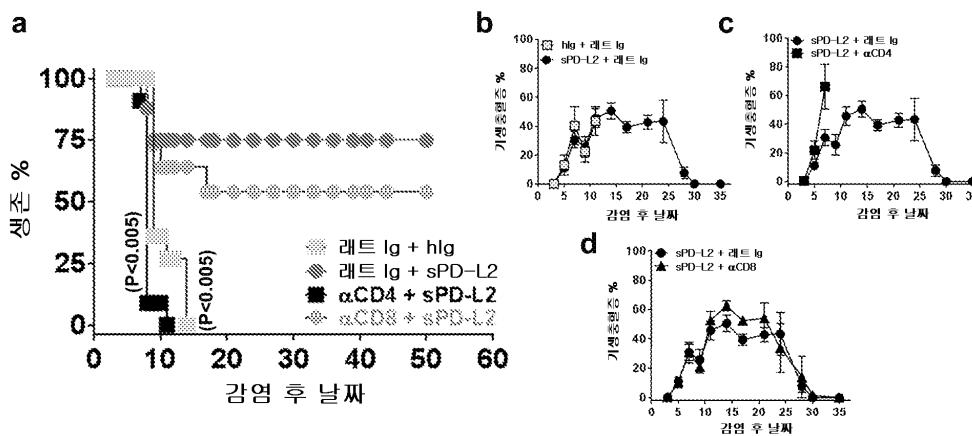
도면18



도면19



도면20



도면21

