(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
A61K 38/00

(11) 공개번호 특2002-0079983
(43) 공개일자 2002년10월21일

(21) 출원번호 10-2002-7011547
(22) 출원일자 2002년09월03일
번역문 제출일자 2002년09월03일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2001/02326
(86) 국제출원출원일자 2001년03월01일
(87) 국제공개번호 WO 2001/64008
(87) 국제공개일자 2001년09월06일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구아바부다, 코스타리카, 도미니카연방, 알제리, 모로코, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 탄자니아, 그레나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 유고슬라비아, 짐바브웨, 콜롬비아,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스, 터어키,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비쏘,

(30) 우선권주장
0005240.7 2000년03월03일 영국(GB)
0022005.3 2000년09월07일 영국(GB)

(71) 출원인 스미스클라인 비이참 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89

(72) 발명자 플루차트,쟝-카를르스
프랑스에프-59019릴르세덱스비피2451뤼듀프로페서칼메트인스티튜트파스테르드릴르몬테인,필리페
벨기에비-1330릭센사르트뤼드린스티튜트89글락소스미스클라인
팔만티에르,레미
벨기에비-1330릭센사르트뤼드린스티튜트89글락소스미스클라인
반메첼렌,마르셀르,파울레트
벨기에비-1330릭센사르트뤼드린스티튜트89글락소스미스클라인

(74) 대리인 남상선

심사청구 : 없음

(54) 죽상경화증의 치료를 위한 백신

요약

본 발명은 신규한 백신 치료 및 죽상경화 질환의 예방적 치료에 관한 것이다. 따라서, 아포리포단백질 또는 이의 단편 또는 유도체를 포함하는 면역원을 제공하고, 완전한 아포리포단백질은 천연 형태에서 (a) 아포리포단백질 B의 이의 수용체와의 결합의 저해 및/또는 (b) 리포단백질 리파아제의 저해 중 하나 이상의 활성을 가진다. 상기 아포리포단백질의 바람직한 예는 아포리포단백질 C-III (ApoCIII)이다. 상기 면역원을 포함하는 본 발명의 백신은 장기간에 걸친 죽상경화증 플라크 형성의 예방 또는 감소에 효능이 있어서, 관상 또는 대뇌혈관 질환의 원인이 되는 죽상경화증의 가능성을 감소시킨다. 따라서, 인간의 아포리포단백질 활성의 선택적인 저해를 유도하는 제제를 투여하는 것을 포함하여, 인간 숙주의 특이적 죽상경화증의 활성을 선택적으로 저해함에 의해서 죽상경화증을 치료하는 신규한 방법을 제공하고, 본 발명의 바람직한 한 면에서, 아포리포단백질은 ApoCIII이다. 또한, (a) 아포리포단백질 B의 이의 수용체와의 결합의 저해 및/또는 (b) 리포단백질 리파아제의 저해 중 하나 이상의 활성을 가지는 아포리포단백질에 결합할 수 있는 항체를 환자에게 투여하는 능동적 백신화 또는 수동적 백신화에 의해 죽상경화증을 치료하거나 예방하는 방법을 제공하고; 본 발명의 상기 면에서 항체는 바람직하게는 ApoCIII와 결합하여 ApoCIII의 활성을 제거한다. 또한, 본 발명의 면역원 또는 백신의 약제 및 이들의 생산용 용도를 제공한다.

명세서

기술분야

본 발명은 신규한 백신 치료 및 죽상경화 질환의 예방적 치료에 관한 것이다. 따라서, 아포리포단백질 또는 이의 단편 또는 유도체를 포함하는 면역원을 제공하고, 완전한 아포리포단백질은 천연 형태에서 (a) 아포리포단백질 B의 이의 수용체와의 결합의 저해 및/또는 (b) 리포단백질 리파아제의 저해 중 하나 이상의 활성을 가진다. 상기 아포리포단백질의 바람직한 예는 아포리포단백질 C-III (ApoCIII)이다. 상기 면역원을 포함하는 본 발명의 백신은 장기간에 걸친 죽상경화증 플라크 형성의 예방 또는 감소에 효능이 있어서, 관상 또는 대뇌혈관 질환의 원인이 되는 죽상경화증의 가능성을 감소시킨다. 따라서, 인간의 아포리포단백질 활성의 선택적인 저해를 유도하는 제제를 투여하는 것을 포함하여, 인간 숙주의 특이적 죽상경화증의 활성을 선택적으로 저해함에 의해서 죽상경화증을 치료하는 신규한 방법을 제공하고, 본 발명의 바람직한 한 면에서, 아포리포단백질은 ApoCIII이다. 또한, (a) 아포리포단백질 B의 이의 수용체와의 결합의 저해 및/또는 (b) 리포단백질 리파아제의 저해 중 하나 이상의 활성을 가지는 아포리포단백질에 결합할 수 있는 항체를 환자에게 투여하는 능동적 백신화 또는 수동적 백신화에 의해 죽상경화증을 치료하거나 예방하는 방법을 제공하고; 본 발명의 상기 면에서 항체는 바람직하게는 ApoCIII와 결합하여 ApoCIII의 활성을 제거한다. 또한, 본 발명의 면역원 또는 백신의 약제 및 이들의 생산용 용도를 제공한다.

배경기술

죽상경화증은 선진국의 사망 및 장애의 주된 원인이고, 관상 및 대뇌혈관 질환의 사망의 주된 원인으로 각각 세계적으로 연간 약 7백2십 및 4백6십만명이 이를 이유로 사망하고 있다[참고 문헌 (죽상경화증에 대한): Harrison's Principles of Internal Medicine, 14 th Edition, McGraw Hill, p1345-1352; Berliner, J. et al., 1995, Circulation 91: 2488-2496; Ross, R., 1993, Nature 362: 801]. 그리스어의 이름은 병반에 있어서 동맥 혈관내막의 비후(sclerosis) 및 지질(athere)의 축적을 의미한다.

일반화되거나 전신적인 많은 위험 인자, 예를 들어 높은 콜레스테롤 섭취 및흡연이 이의 발생의 소인이 되나, 상기 질환은 혈액순환의 상이한 별개 영역에 영향을 미친다. 예를 들어, 관상 동맥의 죽상경화증은 일반적으로 협심증 및 심근경색증을 유발한다. 그런데, 중추신경계에 제공하는 동맥의 죽상경화증은 종종 대뇌 빈혈 및 발작을 야기한다. 말초 순환에서, 죽상경화증은 간헐적인 파행 (claudication) 및 탈저(gangrene)를 유발하고 사지 생존력을 위험하게 한다. 내장 순환의 개입은 장간막 허혈 및 장 경색을 유발한다. 죽상경화증은 신장에 직접적으로 영향을 주고(예를 들어 신장 동맥 협착을 유발), 또한, 신장은 죽종색전병(atheroembolic disease)이 자주 일어나는 위치이다.

인간의 죽종형성(artherogenesis)은 일반적으로 수년, 보통 수십년에 걸쳐서 일어난다. 맥관구조의 내층의 죽종형성 플라크의 저속 형성은 혈류 제한(예를들어, 안정한 노작성 협심증 또는 예측가능하고 재발가능한 간헐적 파행)을 통해 만성적인 임상적 발현에 이르게 한다. 선택적으로, 많은 극적인 급성 임상 사건 예를 들어, 심근 경색 또는 대뇌 혈관 사고는 플라크 파열후에 발생한다. 죽상경화증이 동맥 분절에 영향을 주는 방식은 또한 상기 질환의 이질성 및 복잡성의 특징을 변화시킨다. 죽종(atheroma)은 일반적으로 혈류를 제한하는 협착성 병반 또는 플라크로서 생각되지만, 죽상경화증은 또한 내강 직경의 증가와 함께 동맥류 질환의 확장 및 발생을 유발한다. 죽상경화증의 상기 발현은 협착 또는 폐색이라기 보다는 파열 또는 박리에 대한 소질을 보이며 대동맥에서 자주 일어난다.

죽종 플라크의 형성은 깊이 연구되어 왔다. 정상 어른 인간에서, 동맥의 내막층은 세포외 기질에 함몰된 고유 민무늬근 세포를 함유하고, 상기 혈관 내피 세포의 단층에 의해 덮혀있다. 죽상경화증의 초기 단계는 동맥 내막층의 영역에서의 리포단백질의 축적 및 침착에 기인한 혈관 벽의 " 지방 선조(fatty acid streaks)" 의 발달을 포함한다. 콜레스테롤에 많은 저밀도 리포단백질(LDL) 입자는 상기 지방 선조를 형성하는 혈관벽내에 침착될 수 있다.

일단 혈관벽내에 침착되면, 리포단백질 입자는 산화 및 비효소적인 단백질경화(glycation)를 포함하는 화학적 개질을 거친다. 상기 산화 및 단백질경화된 리포단백질은 병변 발달의 많은 후속과정에 기여한다. 화학적 개질은 혈관 벽의 마크로파지를 유인하고, 마크로파지는 산화된 LDL을 흡수하고 플라크라고 불리는 병변을 일으키는 포말세포(foam cell)가 된다. 죽상경화증의 임상적 징후를 초래하는 것은 죽상경화증 플라크이고, 이들은 혈류를 제한하거나, 동맥류를 가능하게 하거나, 관상 또는 대뇌 혈관의 발병을 야기하며 파열된다.

죽상경화증의 발달은 수십년에 걸쳐 일어나는 장기 과정이고, 이는 죽종형성성 리포단백질 및 보호성 리포단백질간의 불균형에 의해 시작된다. 예를 들어, 순환혈 내의 고밀도 리포단백질 또는 HDL(" 좋은" 콜레스테롤이라고 불림) 및 저밀도 리포단백질 또는 LDL(" 나쁜" 콜레스테롤이라고 불림) 수준과 관련된 콜레스테롤은 죽상경화증 가능성 증가의 마커이다(참고 문헌: Harrison's Principles of Internal Medicine, 14 th edition, McGraw Hill, p1345-1352).

콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 트리글리세롤 및 다른 리피드는 킬로마이크로, 초저, 저, 중간, 및 고 밀도 리포단백질(각각 CM, VLDL, LDL, IDL 및 HDL)로서 밀도의 증가에 따라 분류된 리포단백질 시리즈에 의해 체액으로 이동된다. 상기 리포단백질-복합체는 극성 리피드에 의해 둘러싸여 있고 다음에 아포리포단백질의 외각에 의해 둘러싸인 소수성 리피드의 코아로 구성된다. 현재, A-I, A-II, B, CI, CII, CIII, D, E, H 및 J로 공지된 10가지 타입의 아포리포단백질이 있다. 모든 리포단백질 복합체에 공통적인 상기 아포리포단백질의 2개 이상의 기능이 있는데, 첫번째는 이들은 이들이 지니는 소수성 리피드를 용해하는 기능을 하는 것이고, 두번째는 이들이 또한 특이적 세포에 의한 콜레스테롤 리포단백질 섭취의 조절에 관여한다는 것이다. 리포단백질의 상이한 타입은 상이한 기능을 가지는데, 예를 들어, 콜레스테롤 에스테르가 풍부한 LDL은 새로운 막 합성을 위한 말초 조직에 콜레스테롤을 이동시키는 것과 관련되는 것으로 생각된다.

상기 아포리포단백질의 하나인 아포리포단백질 C-III(ApoCIII)은 간 및 장에서 생산된 79 아미노산 단백질이다(참고 문헌: Brewer et al., J. Biol. Chem., 1974, 249: 4975-4984; Protter, A.A., et al., 1984, DNA 3: 449-456; Fruchart, J.C. et al., 1996, Drugs Affecting Lipid Metabolism, Eds. Gotto, A.M. et al., Kluwer Academic Publishers and Fordazione Giovanni Lorenzini, Netherlands, p631-638; Claveny, V. et al., Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 15, 7, 963-971; 미국 특허 제 4,801,531호; McConathy, W.J. et al., 1992, Journal of Lipid Research, 33, 995-1003). ApoCIII는 CM, VLDL 및 LDL의 구성성분으로 apo CIII0, apo CIII1 및 apo CIII2의 세가지 이성체로 존재한다(참고 문헌: Lenich et al., C., J. Lip. Res., 1998, 29, 755-764). ApoCIII는 당화되지 않으나, apo CIII1 및 apo CIII2는 당화되고, 각각 한개 또는 두개의 시알린산 잔기를 가진다(참고 문헌: Ito et al., 1989 J.lipd. Res. Nov 30:11 1781-1787). 당 잔기는 O-글리코시드 결합에 의한 단백질 사슬의 트레오닌 74에 부착된 디사카라이드 β-D 갈락토실(1-3) α-N-아세틸-D-갈락토사민으로 구성된다(참고 문헌: Assman et al., 1989, BBA 541: 234-240). 인간 정상지방혈증 혈장에서, apo CIII0, apo CIII1 및 apo CIII2는 각각 전체 ApoCIII의 14%, 59%, 27%이다. 인간 ApoCIII의 당화 위치의 돌연변이는 이의 분비 및 지질 결합에 영향을 미치지 않는다(참고 문헌: Roghani et al., 1988, JBC 34: 17925-32).

인간 ApoCIII는 하기의 아미노산 서열을 가진다:

SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQESQVAQQARGWVTDGFSSLK

DYWSTVKDKFSEFWDLDPEVRPTSAVAA (SEQ ID.NO. 1)

ApoCIII의 혈장내 농도는 혈장 트리글리세라이드의 수준과 양성적으로 서로 관련된다(참고 문헌: Schonfeld et al., Metabolism, 1979, 28: 1001-1010; Kaslyp et al., J. Lip. Res., 1981, 22: 800-810). 간 관류 연구는 ApoCIII가 트리글리세리드-풍부 리포단백질(TRL) 및 이의 잔여분의 간의 섭취를 저해한다는 것을 증명한다(참고 문헌: Shelburne et al., J. Clin. Inves., 1980, 65: 652-658; Windler et al., J. Lip. Res., 1985, 26: 556-563). 또한, 체외 실험은 ApoCIII가 리포단백질 리파아제(LPL) 및 간 리파아제 둘 모두의 활성을 저해함을 보여준다(참고 문헌: Brown and Bakinsky, Biochim. Biophs. Acta., 1972, 46: 375-382; Krauss et al., Circ. Res, 1973 33: 403-411; Wang et al., J. Clin. Inves. 1985, 75: 384-390; Mc Conathy et al., J. Lip. REs. 1972, 33: 995-1003; Kinnemen and Enhlm, FEBS 1976 64: 354-357). 또한, ApoCIII는 ApoB를 통해 LDL 수용체에 결합하는 LDL의 저해에 관련된다고 한다(참고 문헌: Fruchart et al. supra).

혈장 TRL 대사에서 ApoCIII의 역활은 형질전환 동물의 최근 연구 결과에 의해 보다 많이 규명되었다(참고 문헌: Aalto-Setala et al., J. Clin. Invest. 1992 90:5 1889-1900). apoCIII를 과량 발현하는 마우스에서, TRL의 혈장 축적은 감소된 혈장 VLDL 및 키모마이크론 제거와 관련되는 것으로 보이고(참고 문헌: Harrold et al., J. Lip. Res. 1996 37: 754-760), 또한 B-함유 리포단백질의 LDL 수용체에 대한 C 아포리포단백질의 저해 효과가 증명된 바 있다(참고 문헌: Clavey et al., Arth. Thromb. and Vasc. Biol. 1995 15: 963-971).

죽상경화증의 면역치료 분야의 종래의 백신은 혈청내 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위한 면역원으로서 콜레스테롤의 사용에 집중되었다(참고 문헌: Bailey, J.M. et al., 1994, Biochemical Society Transactions, 22, 433S; Alving, C. and Swartz, G.M., 1991, Crit. Rev. Immunol., 10, 441-453; Alving, C. and Wassef, N.M., 1999, Immunology Today, 20, 8, 362-366). 다른 발명자들은 백신화(국제 출원 공개번호 제 99/15655호)에 의해 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질(CEPT)의 활성을 변경하려고 시도하였다. 선택적으로, 일부 저자들은 고콜레스테롤혈증 토끼에 풍선 손상 후의 플라크 형성을 저해하기 위하여 산화된 LDL을 면역원으로서 사용하는 백신을 기술한 바 있다(참고 문헌: Nilsson, J. et al., 1997, JACC, 30, 7, 1886-1891).

놀랍게도, 죽상경화증이 아포리포단백질을 증가시키는 특정 죽상경화증의 기능을 감소시키거나 차단함에 의하여 능동적 또는 수동적 면역치료에 의해 예방되거나 제거될 수 있다는 것이 발견되었다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 죽상경화증의 예방 또는 치료에 효과적인 면역원을 제공하고, 또한, 필요시에 개체에 본 발명의 면역원의 투여에 의한 죽상경화증의 치료방법을 제공한다.

본 발명의 면역원은 죽상경화증을 앓거나 앓기 쉬운 개체의 죽상경화증 플라크의 형성을 촉진시키는 상기 아포리포단백질로부터 선택된 아포리포단백질을 포함한다. 본 발명의 바람직한 면역원의 기초를 형성하기 위하여 선택된 아포리포단백질은, 천연의 아포리포단백질의 (a) 아포리포단백질 B의 이의 수용체와의 결합을 억제하고/거나, (b) 효소 리포단백질 리파아제의 저해를 억제할 수 있는 두가지 특성중 하나 이상을 가지는 아포리포단백질이다.

본 발명의 면역원으로서 사용되는 아포리포단백질은 상기 활성 중 하나를 가지지만, 가장 바람직하게는 두 활성 모두를 가진다. 두 활성 모두를 가지는 가장 바람직한 면역원은 아포리포단백질 CIII(ApoCIII)를 포함한다.

수용체에 결합된 아포리포단백질을 함유하는 apo B의 저해 및 리포단백질 리파아제의 효소적 활성에 대한 임의의 소정 아포리포단백질의 활성은, 본원에서 당 기술분야에서 공지된 기술을 사용하여 연구된다. 상기 기술의 예는 문헌(Fruchart et al, supra; McConathy et al., supra; Shelburne et al., supra and Windler et al., supra)에 기술되어 있다.

본 발명의 면역원은 완전한 길이의 천연 아포리포단백질을 포함하거나, 선택적으로 죽상경화증의 치료 또는 예방의 기능적 활성을 유지하는 이의 단편, 펩티드 또는 미모토프(mimotope)를 포함한다.

예를 들어, 면역원은 전장(full length), 또는 천연 아포리포단백질의 전체 길이보다 짧은 천연 아포리포단백질의 단편을 포함한다. 바람직하게는, 전체 길이 단백질의 단편은 80 아미노산 미만의 길이이고, 보다 바람직하게는 50 아미노산 미만, 보다 더 바람직하게는 40 아미노산 미만 및 가장 바람직하게는 4 내지 25 아미노산의 범위이내이다.

본 발명의 면역원으로 사용되는 아포리포단백질 단편은 아포리포단백질 항체를 유도할 수 있고(면역 체계에 적절하게 제시된 경우에), 전체 길이 아포리포단백질의 기능을 공유한다. 또한, 단편에 의해 유도된 항체는 죽상경화증의 치료에 기능적이고, 본 발명의 바람직한 형태에서, 이들은 ApoB의 이의 수용체와의 결합, 및/또는 리포단백질 리파아제의 활성에 대한 아포리포단백질에 의한 저해를 제거한다.

본 발명의 면역원으로 제형되는 펩티드는 표면에 노출된 아포리포단백질의 에피토프로부터 분리된다. 본 발명은 본 발명에 유용한 펩티드가 표면에 많이 노출된 에피토프로 관찰된다는 것을 발견하였다. 상기 관찰에서, 본 발명자들은 에피토프가 5개의 잔기의 이동윈도(sliding window)에 대하여 계산된 가장 접근가능한 영역을 가지는 다른 적절한 에피토프를 제공하는 방법을 설계하였다. 본 발명자들은 아포리포단백질의 바람직한 영역이 50 $Å^2$ 초과 및 바람직하게는 80 $Å^2$ 초과의 분자 시뮬레이션 소프트웨어(MSI)를 사용하여 5개의 잔기의 이동윈도에 대하여 계산된 접근가능한 표면을 가진다는 것을 발견하였다.

상기 표면에 노출된 에피토프의 아미노산 서열을 편입하는 펩티드는 본 발명의 한 면을 형성한다. 상기 펩티드와 동일한 특징을 가지는 미모토프 및 아포리포단백질과 교차-반응하는 면역 반응을 유발하는 상기 미모토프를 포함하는 면역원 또한 본 발명의 일부를 형성한다.

따라서, 본 발명의 면역원은 아포리포단백질 에피토프를 포함하는 분리된 펩티드 및 이의 임의의 미모토프를 포함한다. 미모토프의 의미는 아포리포단백질을 인지하는 항체에 의해 인지될 수 있는 아포리포단백질 에피토프와 충분히 유사하거나(참고 문헌: Gheysen, H.M., et al., 1986, Synthetic peptides as antigen, Wiley, Chichester, Ciba Founda

tion symposium 119, p130-149; Gheysen, H.M., 1986, Molecular Immunology, 23, 7, 709-715); 적절한 담체에 컨쥬게이션(conjugation)된 경우에 천연 아포리포단백질과 교차결합할 수 있는 항체를 생산하게 할 수 있는 실체로서 정의된다.

상기 동정된 아포리포단백질 에피토프의 펩티드 미모토프는 선택된 아미노산의 부가, 결실 또는 치환에 의해 특정 목적을 위해 설계된다. 따라서, 본 발명의 펩티드는 단백질 담체에 대한 컨쥬게이션의 용이를 위한 목적으로 수식된다. 예를 들어, 일부 화학적 결합 방법은 아포리포단백질 에피토프에 터미날 시스테인을 포함하는 것이 바람직하다. 또한, 단백질 담체에 컨쥬게이션된 펩티드는 펩티드의 결합 말단으로부터 원거리에 위치하는 소수성 말단을 포함하여, 펩티드의 컨쥬게이션되지 않은 유리 말단이 담체 단백질의 표면과 회합된 상태로 있는 것이 바람직하다. 이것은 펩티드의 입체구조의 자유도를 감소시켜서, 펩티드가 전체 아포리포단백질의 환경에서 관찰될 수 있는 바와 같이 아포리포단백질 펩티드의 입체구조와 가장 유사한 구조로 제시되는 가능성을 감소시킨다. 예를 들어, 펩티드는 N-터미날 시스테인 및 C-터미날 소수성 아미드화 테일(tail)을 가지도록 변경된다. 선택적으로, 하나 이상의 아미노산의 D-입체이성질체 형태의 추가 또는 치환을 수행하여, 예를 들어 펩티드의 안정성을 증강시키는 유익한 유도체를 생산한다. 당업자는 상기 수식된 펩티드, 또는 미모토프가 전체적 또는 부분적으로 비펩티드 미모토프일 수 있고, 구성요소가 20개의 천연 아미노산에 반드시 제한되지 않는다. 또한, 이는 펩티드 서열이 완전한 아포리포단백질의 환경에 있는 경우에 이의 모양과 가장 유사하 입체구조로 펩티드를 만들기 위하여 당기술분야에 공지된 기술에 의하여 고리화된다.

또한, 펩티드 미모토프는, 서열 방향이 역방향이거나; 선택적으로 서열이 전 체 또는 일부분 이상이 D-입체이성질체 아미노산(반대 서열)로 구성된다는 점에서, 천연 아포리포단백질 펩티드 서열의 역방향의 서열이다. 또한, 펩티드 서열은 서열 방향의 역방향이고 아미노산이 D-입체이성질체 형태라는 점에서 레트로-역방향이다. 상기 레트로- 또는 레트로-역방향 펩티드는 비자기이고, 면역 시스템에서 자가 면역관용(self-tolerance)의 문제점을 극복할 수 있는 이점이 있다.

선택적으로, 펩티드 미모토프는 파아지 디스플레이 기술(EP 0 552 267 B1)를 사용하여, 아포리포단백질에 스스로 결합할 수 있는 항체를 사용하여 동정될 수 있다. 상기 기술은, 천연 펩티드의 구조를 모방한 많은 펩티드 서열을 만들수 있어서, 항-천연 펩티드 항체에 결합될 수 있으나, 반드시 스스로가 천연 아포리포단백질과 중요한 서열 상동성을 가지지는 않는다.

본 발명의 가장 바람직한 면역원은 ApoCIII 또는 이의 단편, 펩티드 또는 미모토프를 포함한다.

ApoCIII 면역원은 전장의 천연 단백질이다: 인간 ApoCIII 1-79,

SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQESQVAQQARGWVTDGFSSLK

DYWSTVKDKFSEFWDLDPEVRPTSAVAA (SEQ ID NO. 1).

선택적으로, 면역원은 78 아미노산 이하, 바람직하게는 50 아미노산 이하, 보다 바람직하게는 40 아미노산 이하, 및 가장 바람직하게는 4 내지 25 아미노산의 범의내인 전체 ApoCIII의 단편을 포함한다. 특히 바람직한 단편 또는 펩티드는 성숙 ApoCIII의 아미노산 1-17, 1-40, 12-35, 41-79, 45-65, 또는 45-76으로 정의된 영역을 포함한다. 바람직한 펩티드의 일부에 대한 펩티드 서열은 하기와 같다:

인간 ApoCIII 1-17, SEAEDASLLSFMQGYMK (SEQ ID NO. 2)

인간 ApoCIII 1-40, SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSV QESQVAQQAR (SEQ ID NO. 3)

인간 ApoCIII 12-35, MQGYMKHATKTAKDALSSVQESQV (SEQ ID NO. 4)

인간 ApoCIII 41-79, GWVTDGFSSLKDYWSTVKDKFSEFWDLD PEVRPTSAVAA (SEQ ID NO. 5)

인간 ApoCIII 45-65, DGFSSLKDYWSTVKDKFSEFW (SEQ ID NO. 6)

인간 ApoCIII 45-76, DGFSSLKDYWSTVKDKFSEFWDLDPEVRPTSA (SEQ ID NO. 7)

ApoCIII의 면역적으로 동등한 단편은 천연 ApoCIII를 인지하는 면역 반응을 유발할 수 있고, 죽상경화증의 치료 또는 예방에 기능하는, ApoCIII 그 자체보다 더 작은 폴리펩티드로서 정의된다.

본 발명의 면역원에서 사용된 다른 아포리포단백질은 아포리포단백질 CII 또는 아포리포단백질 E이다.

본 발명의 특히 바람직한 일 구체예에서, 아포리포단백질 또는 이의 단편은 아포리포단백질 또는 이의 단편의 면역원성을 증강시키는 담체 분자에 연결되어 있다. 따라서, 펩티드 또는 미모토프가 화학적 공유결합 또는 유전적으로 조작된 융합 상대물의 발현, 선택적으로 링커 서열에 의해 연결된다. 펩티드는 링커 서열로서 2 이상의 글리신 잔기를 가지고, 종종 연결 목적으로 터미날 노출된 시스테인 잔기를 가진다. 예를 들어, 이들 바람직한 펩티드를 하기에 나열한다:

MQGYMKHATKTAKDALSSVQESQV*GGC* (SEQ ID NO. 8)

*CGG*MQGYMKHATKTAKDALSSVQESQV (SEQ ID NO. 9)

DGFSSLKDYWSTVKDKFSEFW*GGC* (SEQ ID NO. 10)

*CGG*DGFSSLKDYWSTVKDKFSEFW (SEQ ID NO. 11)

아포리포단백질, 예를 들어 ApoCIII의 담체 단백질로의 공유결합은 당 기술에 널리 공지된 방식으로 수행된다. 따라서, 직접적인 공유 커플링에 대해서 CDAP 및 SPDP와 같은 상업적으로 입수가능한 이질적인 두가지 기능을 가지는 링커를 이용하면서(제조자의 지시를 따름) 카르보디이미드, 글루타르알데하이드 또는 (N-[γ-말레이미도부티릴옥시])숙신이미드 에스테르를 이용할 수 있다. 커플링 반응 후에, 면역원은 투석 방법, 겔여과 방법, 분별 방법 등의 수단에 의하여 용이하게 분리되고 정제된다.

본 발명의 면역원에 사용된 담체의 타입은 당업자에 용이하게 알려져 있다. 담체의 기능은 아포리포단백질 또는 아포리포단백질 펩티드에 대한 면역 반응을 증강시키기 위하여 시토카인을 제공하는 것이다. 본 발명에 사용된 담체의 일부의 예는, 키홀 림페트 헤모시아닌(Keyhole Limpet Haemocyanin, KLH), 우혈청 알부민(BSA)와 같은 혈청 알부민, 테타누스 또는 디프테리아 독소(TT 및 DT)와 같은 불활성화된 박테리아 단편, 또는 이들의 재조합 단편(예를 들어, TT의 단편 C의 도메인 1 또는 DT의 전위 도메인), 또는 튜베르쿨린의 정제 단백질 유도체(PPD)이다. 선택적으로 아포리포단백질 또는 미모토프 또는 에피토프는 알루미늄 염에 함께 흡착되거나 리포솜 담체를 통해 회합과 같은 비공유 방식으로 담체에 연결되고, 이는 추가로 T-세포 지원 또는 추가 애쥬번트 면역자극제를 제공할 수 있는 면역원을 포함한다. 바람직하게는, 담체 단백질에 대한 아포리포단백질 또는 이의 단편 또는 펩티드의 수의 비율은 1:1 또는 20:1이고, 바람직하게는 각 담체는 3-15 아포리포단백질 또는 이의 펩티드 또는 단편을 운반한다.

본 발명의 구체예에서, 담체는 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae)의 단백질 D이다(참고 문헌: EP 0 594 610 B1). 단백질 D는 헤모필러스 인플루엔자의 IgD-결합 단백질이고 폴스그렌에 의해 특허되었다(참고 문헌: WO 91/18926, EP 0 584 610 B1으로 등록됨). 일부 환경 예를 들어, 재조합 면역원 발현 시스템에서, 단백질 D의 단편, 예를 들어 단백질 D 1/3 rd (단백질 D의 N-터미날 100-120 아미노산을 포함)를 사용하는 것이 바람직하다(참고 문헌: WO 99/10375; WO 00/50077).

ApoCIII 또는 본 발명의 펩티드와 같은 아포리포단백질 또는 펩티드를 제시하는 다른 바람직한 방법은 재조합 융합 분자의 환경에서이다. 예를 들어 문헌(EP 0 421 635 B)는 바이러스 유사 입자의 외래 펩티드 서열을 제시하는 키메라 헤파드나바이러스(hepadnavirus) 코아 항원의 사용을 기술한다. 이와 같이, 본 발명의 면역원은 간염 B 코아(HepB core) 항원으로 구성된 키메라 입자에 제시된 아포리포단백질 또는 아포리포단백질 펩티드를 포함한다. 추가로, 재조합 융합 단백질은 본 발명의 미모토프 및 인플루엔자 바이러스의 NS1과 같은 담체 단백질을 포함한다. 본 발명의 일부를 형성하는 임의의 재조합에 의해 발현된 단백질에 대해서, 상기 면역원을 엔코딩하는 핵산은 본 발명의 일 면을 구성한다.

따라서, 본 발명의 바람직한 면역원은 재조합 발현 시스템(예: HepB 코아)에 제시되거나 담체 단백질에 컨쥬게이션된 펩티드 SEQ ID NO. 2 내지 7을 포함하고, 재조합 발현 시스템 또는 담체 단백질은 SEQ ID NO.1 또는 SEQ ID NO. 2 내지 7에 대한 면역 반응의 유발에 위한 T-세포의 지원을 제공한다. 특히, 바람직한 면역원은 SEQ ID NO.4만을 포함하거나 SEQ ID NO.4에 대한 면역 반응의 유발을 위한 T-세포 지원을 제공하도록 담체 단백질에 컨쥬게이션되거나 융합된 SEQ ID NO. 4를 포함한다.

본 발명의 선택적인 구체예에서, 펩티드의 면역원성은 T-헬퍼(Th) 에피토프의 추가에 의해 증강된다. 따라서, 본 발명의 면역원성은 앞서 기술된 바와 같은 펩티드 및 화학적 컨쥬게이트(conjugate) 또는 순수하게 합성된 펩티드 구조물과 같은 혼효의 Th 에피토프를 포함한다. 아포리포단백질 펩티드는 바람직하게는 아포리포단백질의 N- 또는 C-말단에서 스페이서(예: Gly-Gly)를 통해 Th 에피토프에 결합된다. 면역원은 하나 이상의 혼효의 Th 에피토프, 보다 바람직하게는 2 내지 5 에피토프를 포함한다. Th 에피토프는 Th 에피토프를 포함하는 아미노산의 서열이다. Th 에피토프는 연속적이거나 불연속적인 에피토프로 구성된다. 그러므로, Th의 모든 아미노산이 반드시 에피토프의 일부는 아니다. 혼효의 Th-에피토프는 널리 다른 HMC 타입을 가지는 동물 및 인간에서 매우 널리 반응성을 가진다(참고 문헌: Partidos et al., 1991, " Immune Response in Mice Following Immunization with Chimeric Synthetic Peptides Representing B and T Cell Epitope of Measles Virus Protein" , J. of Gen. Virol. 72: 1293-1299; 미국 특허 제 5,759,551호). 본 발명에 따라 사용된 Th 도메인은 약 10 내지 50 아미노산 및 바람직하게는 약 10 내지 30 아미노산을 가진다. 다수의 Th 에피토프가 존재하는 경우에, 각 Th 에피토프는 독립적으로 같거나 다르다.

에피토프는 예를 들어, 병원체 유래 에피토프 예를 들어, 간염 바이러스 표면 또는 코아(펩티드 50-69) (참고 문헌: Ferrari et al., J. Clin. Invest, 1991, 88, 214-222) 항원 Th 에피토프, 페르투시스(Pertussis) 독소 Th 에피토프, 테타누스 독소 Th 바이러스 예를 들어 P2(참고 문헌: EP 0 378 881 B1) 및 P3(참고 문헌: WO 96/34888, WO 95/31480, WO 95/26365), 홍역 바이러스 F 단백질 Th 에피토프, 클라미디아 트라코마티스 주외막 단밸질 Th 에피토프 예를 들어 P11(참고 문헌: Stagg et al., Immunology, 1993, 79, 1-9), 예르시나 인바진(Yersina invasin)을 포함한다. 다른 Th 에피토프는 미국 특허 제 5,759,551호 및 문헌(Cease et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 4249-4253); WO 95/26365 및 EP 0 752 886 B에 기술되어 있다.

본 발명에 사용된 펩티드는 당 기술분야에 공지된 고체상 방법에 의해 용이하게 합성된다. " T-boc" 또는 " F-moc"

방법을 이용하여 적절하게 합성된다. 고리형 펩티드는 완전히 자동화된 장치에서 널리 공지된 "F-moc" 방법 및 폴리아미드 수지를 사용하여 고체상 방법에 의해서 합성된다. 선택적으로, 당업자는 방법을 수동으로 수행하는 필요한 실험실 방법을 알 것이다. 고체상 합성을 위한 기술 및 방법은 문헌('Solid Phase Peptide Synthesis: A Pratical Approach', E. Atherton and R.C. Sheppard, IRL at Oxford University)에 기술되어 있다. 선택적으로, 펩티드는 박테리아 또는 포유동물 세포주에서 미모토프를 엔코딩하는 핵산 분자를 발현하고 발현된 미모토프를 정제하는 것을 포함하는 재조합 방법에 의하여 생산된다. 펩티드 및 단백질의 재조합 발현을 위한 기술은 당 기술분야에 공지되어 있고, 문헌(Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New york, 1989)에 기술되어 있다.

또한, 본 발명의 면역원 또는 펩티드, 이들의 미모토프 또는 유도체 또는 면역원을 포함하는 재조합 융합 단백질을 엔코딩하는 핵산의 일부는 본 발명의 일부를 형성한다. 특히, SEQ ID NO. 1 내지 7을 엔코딩하는 분리된 핵산 분자 또는 SEQ ID NO. 1 내지 7을 포함하는 면역원을 제공한다.

본 발명의 면역원은 약제용 용도, 죽상경화증의 치료용 용도 및 본 발명의 면역원성의 조성물 또는 백신으로의 제형을 위하여 제공된다.

본 발명의 면역원은 죽상경화증의 예방 또는 치료에 효과적인 면역원성의 조성물 또는 백신으로 제형된다. 면역원성 조성물 및 백신은 앞서 기술된 바와 같이 본 발명의 하나 이상의 면역원을 포함한다. 따라서, 백신은 죽상경화증 플라크의 형성을 촉진하는 아포리포단백질로부터 선택된 아포리포단백질을 포함한다. 바람직한 백신은 하기의 두가지 특성 중 하나 이상을 가지는, 아포리포단백질을 포함하는 면역원을 포함한다: 천연 아포리포단백질은 ApoB의 이의 수용체로의 결합을 억제하는데 활성을 가지고/거나 리포단백질 리파아제의 효소 활성을 저해할 수 있다.

본 발명의 가장 바람직한 백신 또는 면역원성 조성물은 ApoCIII, 또는 이의 단편 또는 펩티드를 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 백신은 ApoCIII 또는 이의 단편에 대한 면역성 반응의 발생을 위한 T-세포 지원을 제공하기 위해 담체 단백질에 컨쥬게이션되거나 융합된 ApoCIII 또는 이의 단편를 포함한다.

유리하게는, 본 발명의 백신 또는 면역원성 조성물은 또한 애쥬번트를 포함할 수 있다. 본 발명의 백신을 위한 적절한 애쥬번트는 상기 아포리포단백질 면역원에 대한 항체 반응을 강화할 수 있는 애쥬번트를 포함한다. 애쥬번트는 당기술분야에 공지되어 있다(참고 문헌: 백신 설계 - The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M. F.와 Newman, M. J., Plenum Press, Newyork and London, ISBN 0-306-44867-X). 본 발명의 면역원과 함께 사용하기 위한 바람직한 애쥬번트는 알루미늄 또는 칼슘 염(예를 들면 수산화물 또는 인산염)을 포함한다. 본 발명의 면역원으로 사용하기 위한 바람직한 애쥬번트는 하기를 포함한다: 알루미늄 또는 칼슘 염(예를 들면 수산화물 또는 인산염), 수중유(oil in water) (참고 문헌: WO 95/17210, EP 0 399 843), 또는 리포좀과 같은 특정 담체(참고 문헌: WO 96/33739). 남아메리카 나무 퀼라자 사포나리아 몰리나(Quillaja Saponaria Molina)의 껍질로부터 추출된 애쥬번트 활성을 갖는 면역학적 활성 사포닌 분획(예를 들면 Quil A)이 특히 바람직하다. 예를 들면 QS21(HPLC 정제된 분획 Quil A의 유도체)과 같은 Quil A의 유도체와, 그 생산 방법은 미국 특허 제 5,057,540 호에서 개시된다. QS21(QA21로 알려짐) 중 QA17과 같은 다른 분획이 또한 개시된다. 3 디-O-아실화 모노포스포릴 리피드 A(3D-MPL)은 몬타나의 리비(Ribi) 면역화학에 의해 제조된 잘 알려진 애쥬번트이다. 이것은 문헌(GB 2122204B) 에서 알려진 방법들에 의해 준비될 수 있다. 3D-MPL의 바람직한 형태는 상기 3D-MPL이 0.2㎛의 직경보다 작은 입자 크기를 갖는 에멀젼의 형태이다(참고 문헌: EP 0 689 454 B1).

애쥬번트는 또한 Quil A와 같은 뮤라닐 디펩티드(muramyl dipeptide) 및 사포닌, 3D-MPL와 같은 박테리아성 지질 다당류 또는 TDM을 포함하지만, 그에 제한되지 않는다. 추가의 대안적인 실시예로서, 상기 단백질은 리포좀과 같은 미세입자들 내에, 또는 폴리옥시에틸렌 에테르의 비입자성 현탁액 내에 캡슐화될 수 있다(참고 문헌: WO 99/52549). 특

히 바람직한 애쥬번트는 3D-MPL 및 QS21(참고 문헌: EP 0 671 948 B1), 3D-MPL 및 QS21을 포함하는 수중유 에멀젼(참고 문헌: WO 95/17210, PCT/EP98/05714), 다른 담체로 제형화된 3D-MPL(참고 문헌: EP 0 689 454 B1), 또는 리포좀(참고 문헌: WO 96/33739), 또는 면역자극성 올리고핵산염(참고 문헌: WO 96/02555)을 포함하는 콜레스테롤 내에서 제형화된 QS21의 화합물이다.

본 발명의 상기 백신은 대개는 초회감작 및 추가감작 (boosting) 투여 모두를 위해 투여될 것이다. 추가감작 투여는 적절한 간격을 갖거나, 바람직하게는 해마다 또는 순환 항체의 수준이 원하는 수준 아래로 떨어지는 시점에 주어질 것이다. 추가감작 투여는 상기 원래의 담체 분자들이 없는 펩티드로 구성될 것이다. 상기 부스터(booster)는 대체적인 담체를 포함할 수 있거나 어떠한 담체도 없을 수 있다.

본 발명의 다른 면에서 본원에서 기술된 바와 같이 약제용 백신 또는 면역원성 조성물이 제공된다.

본 발명의 상기 면역원성 조성물 또는 백신 제조물은 조직 또는 점막 경로를 통하여 상기 백신을 투여함으로써 죽상경화증에 감염되기 쉬운, 또는 죽상경화증을 앓는 포유 동물을 보호하거나 치료하기 위해 사용된다. 이러한 투여는 근육내, 복강 내, 진피 내 또는 피하 경로를 통하여; 또는 구강/소화기, 호흡기, 비뇨생식기의 관(tract)을 통한 주입을 포함할 수 있다.

각 백신 또는 면역원성 조성물 투여량 내의 단백질의 양은 대개의 백신에 있어서 불리한 부작용 없이 면역보호성 반응을 유발하는 양으로 선택된다. 상기 양은 특정한 면역원이 사용되는가와 그것이 어떻게 제시되는가에 따라 변화할 것이다. 일반적으로, 각 투여량은 단백질을 1-1000μg, 바람직하게는 1-500μg, 바람직하게는 1-100μg, 그리고 가장 바람직하게는 1-50μg을 포함할 것이다. 특정한 백신을 위한 최적의 양은 환자의 적절한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준적인 연구에 의해 확인된다. 초기의 백신 접종에 이어, 환자들은 적절한 간격으로 하나 또는 몇몇의 추가감작 면역화를 수용할 수 있다.

백신 제조물은 일반적으로 문헌(New Trends and Developments in Vaccines, Voller 외, University Park Press, Baltimore, Maryland, USA, 1978)에 기술된다. 거대 분자에의 단백질의 컨쥬게이션은 리크하이트(Likhite)의 미국 특허 제 4,372,945호 및 알모르(Armor) 외의 미국 특허 제 4,474,757호에 의해 개시된다.

본 발명의 면역원을 위한 주성분을 형성하는 동일한 아포리포단백질에 대해 결합할 수 있는 리간드는 본 발명의 중요한 실시예의 일부를 형성한다. 상기 리간드는 죽종형성성 질병의 완화를 위한 환자에게의 상기 리간드의 투여에 의해, 수동적인 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

따라서, 본 발명의 상기 바람직한 리간드는 다음의 두 가지 특성 중 하나 이상을 갖는 아포리포단백질의 기능에 대해 결합하고 상기 기능을 제한할 수 있다: 원래의 아포리포단백질이 그 수용체에 대한 아포리포단백질 B의 결합을 억제할 수 있고/있거나 리포단백질 리파제의 효소 작용을 억제할 수 있다.

본 발명의 상기 리간드는 바람직하게는 상기 기능 중 하나를 갖지만, 가장 바람직하게는 양쪽 기능 모두를 갖는 아포리포단백질에 대해 결합한다. 특히 바람직한 리간드는 아포리포단백질 CIII(ApoCIII)에 대해 결합하는 리간드이다.

상기 유용한 리간드 중 바람직한 예들은 단세포의 또는 다세포의 항체들을 포함한다. 예를 들면, 어떤 동물 내에서 유발된 항체들은 정제되어 죽상경화증의 예방 및 치료을 위해 다른 동물에 수동적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 면역원은 또한 공지의 기술에 의해 단세포 항체 하이브리도마(공지 기술을 사용함, 예를 들면 Koehler and Milstein, Nature, 1975, 256, p495), 인체 적응성 단세포 항체 또는 CDR 이식 단세포의 발생을 위해 사용될 수 있다.

여기서 상기 용어 " 항체" 는 유용한 항원 결합 특이성을 갖는 분자를 언급하기 위해 사용된다. 당업자라면 이 용어가 또한 동일 또는 매우 유사한 기능을 보여줄 수 있는 항체들의 단편 또는 유도체인 폴리펩티드를 포괄할 수 있음을 쉽게 인식할 것이다. 상기 항체 단편 또는 유도체는 여기서 사용된 바와 같은 항체라는 용어에 의해 포괄되도록 한다.

따라서 본 발명의 분리된 면역원에 대항하여 발생된 분리된 항체가 본 발명에 의해 제공된다.

ApoCIII에 대해 결합한 다세포 또는 단세포의 항체 제조물이 본 발명에 의해 또한 제공된다. 특히 바람직한 다세포 또는 단세포의 항체는 다음과 같은 완전한 천연의 ApoCIII의 단편을 인식한다:

인간 ApoCIII 1-17, SEAEDASLLSFMQGYMK(SEQ ID NO.2)

인간 ApoCIII 1-40, SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSV

QESQVAQQAR(SEQ ID NO.3)

인간 ApoCIII 12-35, MQGYMKHATKTAKDALSSVQESQV(SEQ ID NO.4)

인간 ApoCIII 41-79, GWVTDGFSSLKDYWSTVKDKFSEFWDLD

PEVRPTSAVAA(SEQ ID NO.5)

인간 ApoCIII 45-65, DGFSSLKDYWSTVKDKFSEFW(SEQ ID NO.6)

인간 ApoCIII 45-76, DGFSSLKDYWSTVKDKFSEFWDLDPEVRPTSA(SEQ ID NO.7)

본 발명의 단세포 항체 리간드를 분비하는 하이브리도마가 또한 제공된다.

위에서 기술된 상기 리간드를 포함하는 제약 조성물은 또한 본 발명의 태양을 형성한다. 치료시, 그리고 죽상경화증의 치료를 위한 약품의 제조시에 상기 리간드가 또한 사용된다.

본원에서 제공된 바와 같은 죽상경화증의 수동적 치료에서, 본 발명의 리간드 또는 항체의 투여는 그 필요성이 있는 환자들에게 정맥 내로 투여될 것이다. 투여의 빈도는 시간에 따른 환자들의 혈청 내의 항체 적정량의 감소에 따름으로써 임상적으로 결정되지만, 어떤 경우에도 1년에 1 내지 52회이고, 가장 바람직하게는 1년에 1 내지 12회이다. 항체 또는 리간드의 양은 질병의 심한 정도, 또는 상기 혈청 내의 항체의 반감기에 따라 변화할 수 있지만, 바람직하게는 환자의 체중에 대해 1 내지 10 mg/kg의 범위이고, 바람직하게는 1 내지 5 mg/kg이며, 가장 바람직하게는 1 내지 2 mg/kg일 것이다.

본 발명의 면역원, 면역원성 조성물, 백신 또는 리간드는 죽상경화증을 앓는, 또는 그럴 위험이 있는 환자에 투여될 수 있고, " 양호한" 리포단백질(apo A-I 함유 리포단백질)에 대한 " 양호하지 않은" 리포단백질(apo B 함유 리포단백질)의 균형의 정확한 평형을 재설정하기에 효율적일 수 있으며, apo B 함유 리포단백질 의 순환 시간을 최소화할 수 있다. 이론에 의해 제한되기를 바라지 않으므로, 본 발명자들은 이런 기능들이 혈관 벽 내의 apo B 함유 리포단백질의 침전 및 산화의 가능성을 최소화하고, 나아가 죽상경화증 플라크 형성 또는 성장의 위험을 감소시킨다고 믿는다.

그러므로, 본 발명은 죽상경화증의 예방 또는 치료를 위한 본 발명의 아포리포단백질 면역원의 제약학적 조성물의 제조용 용도 (위에서 정의됨)를 제공한다. 본 발명의 아포리포단백질 또는 펩티드를 포함하는 면역원 및 담체 분자는 또한 죽상경화증의 면역예방 또는 치료를 위한 백신의 제조용 용도를 제공된다. 따라서, 본 발명의 죽상경화증의 의학적 치료 또는 예방에 있어, 본 발명의 아포리포단백질 면역원의 약제용 용도를 제공한다.

본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신 또는 리간드의, 죽상경화증을 앓는 또는 죽상경화증에 감염되기 쉬운 환자에의 투여를 포함하는 죽상경화증의 치료 또는 예방 방법이 또한 제공된다.

본 발명의 백신의 환자에의 투여에 의한, 환자의 총 순환 중성지방 수준의 감소를 포함하는 죽상경화증의 예방 또는 치료 방법이 제공된다. 특히 본 발명의 상기 백신 또는 리간드의 환자에의 투여에 의한, 환자의 순환 VLDL 및 LDL의 양을 감소시키는 방법이 제공된다.

ApoB 함유 리포단백질의 평균 순환 시간을 감소시킬 수 있는 백신의 환자에의 투여에 의한 죽상경화증의 예방 또는 치료 방법이 또한 제공된다. 이 점에 있어서 ApoB 함유 리포단백질의 평균 순환 시간은 포유류의 혈장으로부터의 라벨링된 ApoB 함유 리포단백질의 정화(clearance) 속도(라벨된 ApoB 함유 리포단백질의 반감기)를 측정함으로써 생체 동물 모델에서 조사될 수 있다.

본 발명의 치료 태양의 이러한 방법을 위한 바람직한 면역원은 ApoCIII를 포함한다. 놀랍게도, 상기 백신 또는 상기 리간드에 의한 ApoCIII을 표적하는 상기 " 양호하지 않은" 콜레스테롤(LDL)의 부정적인 영향을 억제하는 반면, 상기 " 양호한" 콜레스테롤(HDL)에 부정적인 영향을 주지 않는다.

(a) 아포리포단백질 B의 그 수용체에 대한 결합의 억제, 및, 또는 (b) 리포단백질 리파제의 억제와 같은 치료 또는 예방의 필요성이 있는 인간 숙주에서의 상기 죽상형성성 아포리포단백질의 다음의 기능 중 하나 이상의 억제를 야기하는 제제의 투여를 포함하여, 인간 숙주에서의 죽종형성성 아포리포단백질의 기능을 선택적으로 억제함으로써 본 발명에 의해 죽상경화증의 치료 또는 예방 방법이 제공된다. 본 발명의 연관된 태양에서 치료 또는 예방의 필요가 있는 인간 숙주에의 ApoCIII 기능의 선택적인 억제를 야기하는 제제의 투여를 포함하여, 인간 숙주에서의 ApoCIII 기능을 선택적으로 억제함으로써 죽상경화증의 치료 또는 예방 방법이 제공된다. 이 점에 있어서, 상기 제제는 면역원으로서 ApoCIII 또는 그 단편를 포함하는 면역원성 조성물 또는 백신일 수 있거나, 대체적으로 상기 제제는 ApoCIII의 기능을 차단할 수 있는 리간드일 수 있다(즉, 리포단백질 리파제의 ApoCIII 중개 억제와 ApoB의 그 수용체에의 결합을 폐기함). 본 발명의 이러한 면에서 상기 바람직한 리간드는 다클론 또는 단클론 항체이다.

혈장 내에 순환 ApoCIII의 높은 수준을 갖는 죽상경화증 환자들을 치료하는 바람직한 방법은 상기 환자 개인에게 면역원으로서 ApoCIII, 또는 그 단편를 포함하는 백신의 투여에 의해 순환 ApoCIII의 수준을 감소시키는 단계를 포함한다. 대체적으로, 본 발명의 관련된 면에서 환자의 혈장 내의 순환 ApoCIII의 수준을 감소시킴으로써, 그리고 상기 환자에게, ApoCIII의 기능을 차단할 수 있는 리간드의 투여함으로써, 즉, 리포단백질 리파제의 ApoCIII 매개 억제와 ApoB의 그 수용체에의 결합을 폐기함으로써 죽상경화증의 치료 또는 예방의 방법이 제공된다. 본 발명의 이런 면에서 상기 바람직한 리간드는 다클론 또는 단클론 항체이다.

또한 리포단백질의 환경에서 제 자리의 ApoB 분자와 회합된 ApoCIII 분자들의 숫자를 감소시킴으로써 죽상경화증의 치료 또는 예방의 방법이 본 발명에 의해 또한 제공된다. 일반적인 환자의 경우 LDL 입자 내에 대략 하나의 ApoB가 존재하고, 1-5 ApoCIII 분자들 사이에서 상기 ApoB가 회합된다. 감염된 환자의 경우 ApoCIII 분자의 숫자가 25까지 증가할 수 있다. 따라서, 높은 질병 상태 수준(대략 20 내지 25:1)을로부터 감소된 치료 수준 바람직하게는 15:1, 더욱 바람직하게는 10:1 및 더욱 바람직하게는 5:1 이하, 더욱 바람직하게는 3:1 이하, 그리고 가장 바람직하게는 대략 1:1의 ApoC:ApoB 비율로 죽상경화증 환자의 LDL 내의 ApoB 분자들에 대한 ApoCIII 분자들의 비율을 감소시킴으로써 죽상경화증을 치료 또는 예방하는 방법이 본 발명에 의해 제공된다. ApoB 함유 리포단백질 내의 계속된 ApoCIII의 수준은 혼탁측정법 또는 전기-면역확산법에 의해 측정될 수 있다(일반적인 범위는 2 내지 3 mg/dL이다). 또한 치료시의 사용을 위한 합성 또는 재조합에 의해 생산된 ApoCIII가 본 발명에 의해 제공된다. 본 발명은 하기의 실시예들에 의해 설명된다:

실시예

실시예 1: 펩티드 합성

ApoCIII 펩티드 [1-79, 1-17, 12-35, 45-65 및 45-76(각각 SEQ ID NO.s 1, 2, 4, 6 및 7)를 전체 apo CIII에 대한 Boc-Ala-PAM 수지 및 다른 단편에 대한 MBHA 수지를 사용하여 자동 합성기 모델 ABI 433A(Applied Biosystems Inc.)로 고체상 방법(solid phase synthesiser, applied Biosystems Inc)에 의해 합성하였다. 각 아미노산을 캡핑(capping)없이 디시클로헥실카르보디이미드/히드록시벤조트리아졸에 의해 2회 커플링하였다. 측쇄 보호기는 Arg(Ts), Asp(Ochex), Glu(Ochex), Lys(2-Cl-Z), His(Dnp), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Met(O) 및 Tyr(Br-Z)과 같다. 서열에 따르면, His의 Dnp기를, DCM중의 10% β-메르캅토에탄올, 5% 디이소프로필에틸아민 및 NMP중의 10% β-메르캅토에탄올, 5% 디이소프로필에틸아민을 각각 2시간씩 처리하여 담체로부터 절단하기 전에, 펩티드로부터 제거하였다. 다음에, 펩티드 수지에 아미노-터미날 Boc를 제거하기 위하여 20분 동안 DCM 중의 50% TFA를 처리하였다. 펩티드를 수지로부터 절단하고 낮은 HF 및 높은 HF 방법에 따라 동시에 탈보호하였다: 수지 (1g)을 0℃에서 p-크레졸(0.75g), p-티오크레졸(0.25g) 및 디메틸설파이드(6.5㎖)의 존재하에 무수 HF(2.5㎖)로 처리하였다. 3시간 후에, 하이드로겐 플루오라이드 및 디메틸설파이드를 진공 증발 및 잔류물 스카벤저(scavenger)에 의해 제거하고 부산물을 디메틸에테르로 추출하였다. 반응 용기를 p-크레졸(0.72g), p-티오크레졸(0.25g) 및 무수 HF 10 ㎖로 재충전하여 혼합물을 1.5시간동안 0℃에서 반응시켰다. 하이드로겐 플루오라이드를 증류에 의해 제거하고 잔류물을 디에틸 에테르로 적정하였다. 잔류물을 여과하여 제거하고, 디에틸 에테르로 세척하고, 10% 아세트산 수용액 200㎖로 추출하여 동결건조하였다. 원액 생산물을 0.7㎖/min의 유속으로 완충액 B(완충액 A: 0.05% 물 중의 TFA 및 완충액 B: 물 중의 0.05% TFA, 60% CH_3CN)의 0 내지 100%의 60분에 걸친 1차 농도구배로 Vydac C18 칼럼(4,6 ×250mm, 5μ, 100A)상에서 역상 HPLC에 의해 분석하였다. 합성 펩티드를 역상 HPLC에 의해 정제하고, HPLC로 특성을 규명하고 분석하며, 분자량을 분광계에 의하여 측정하였다.

실시예 2: 항체 생산

실시예 1에서 합성된 합성 완전한 ApoCIII를 토끼에서 다클론 항체를 발생시키는데 사용하였다. 상기 보다 더 짧은 다른 합성 펩티드에 대한 다클론 항-완전 ApoCIII 항혈청의 활성을 검정하고, 각 펩티드에 특이적인 항체 단편을 항혈청으로부터 정제하였다.

면역화: 펩티드 ApoCIII(1-79)를 프로인드 완전 애쥬번트(complete Freund's adjuvant, CFA)로 에멀젼화하고, 최초 2회의 주사에는 주사당 500μg로 피하로 주사하고, 펩티드 250μg을 사용하는 것을 제외하고 동일한 애쥬번트로 15일 간격으로 추가자극하였다. 면역 반응을 시험 혈액을 취하여 모니터링하고 ELISA 분석법을 항-펩티드 활성을 스크리닝하는 데 사용하였다.

혈청으로부터 항체의 분리: 양성 혈액을 취합하고 다클론 항체를 27% 황산 나트륨으로 침전시켜 분리하였다. 펩티드 특이적 항체는 친화성 크로마토그래피에 의한 상기 항체 풀(pool)로부터 정제하였다. 실시예 1에서 생산된 펩티드를 CH 활성화 세파로오스 4B 친화성 칼럼 크로마토그래피(Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 커플링하고(참조: Axen et al, 1967), 모든 정제된 항체 풀을 상기 칼럼을 통과시켰다. 항원 겔에 보유되지 않은 단백질은 인산 완충 등장 식염수(PBS: 인산염 50mmol/L, pH 7.2, NaCl 150mmol/L)로 세척하여 제거하였다. 펩티드 겔에 비특이적으로 결합된 분획은 25 mmol/L PBS로 제거하였다. 다클론의 특이적 IgG의 용출은 0.2M 글리신, pH 2.8을 사용하여 수행하였다. 정제된 항체를 즉시 10mmol/L의 PBS에 대해서 투석하고, 아미콘 시스템(컷오프 100kD) (Amicon, Beverly, USA)을 사용하여 한외여과에 의해 농축하여, 단백질 양(참조: Lowry et al, 1951)을 측정한 다음에, -30℃에서 1㎖ 분취량(0.5㎎)으로 보관하였다.

실시예 3: ApoCIII의 에피토프 맵핑

ELISA: 미량역가 플레이트(Flat-bottom 96-well EIA; Costar, Dutsher)를 0.1 mol/L 인산-완충 식염수(PBS, pH 7.2) 0.1 mol/L로 세척한 다음, 유리 펩티드(5μg/㎖)의 100μl/웰로 코팅하고 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이드를 완충액으로 4회 세척하고, 미량역가 웰과의 비특이적 결합을 최소화하기 위하여 플레이트를 0.1M PBS 완충액중의 3%로 우혈청 알부민 250μl/웰로 포화시키고 37℃에서 1시간동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 다시 4회 세척하여 정제된 항-완전한 ApoCIII 항체(실시예 2에서 생산)의 100μl로 37℃에서 2시간동안 인큐베이션하고, 1% 우

혈청 알부민을 함유한 0.1M PBS 완충액으로 희석한 다음에, PBS로 4회 세척하였다. 면역 반응을 평가하기 위하여, 0.1% BSA를 함유한 PBS 완충액 중의 10,000배 희석된, 페록시다아제로 라벨링된 항-토끼 IgG 100㎕(Sanofi-Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coqueette, France)를 각 웰에 첨가하였다. 37℃에서 2시간동안 인큐베이션 한 후에, 플레이트를 PBS로 4회 세척하여 기질 용액 100㎕를 첨가하였다. 기질 용액을 하기와 같이 준비하였다: 30% 하이드로겐 페록시다아제 20㎕을 함유하는 0.1 mmol/L의 인산 시트레이트 완충액 20㎖, pH 5.5중에 o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드 30㎎를 용해하였다. 암실에서 실온으로 30분동안 반응시킨 후에, 반응을 1mmol/L의 HCl 100㎕를 각 웰에 첨가하여 중단하였다.

결과

전체 합성 apo CIII에 대하여 발생된 정제된 다클론 항체를 사용하여 ELISA에서 펩티드와의 반응성을 시험하고, 완전한 ApoCIII(" 전체 ApoCIII")에 대한 것도 시험하였다. 결과는 도 1과 같다. 결과는 전체 ApoCIII에 대하여 발생한 항체가 모두 펩티드 1-17, 12-35, 45-65 및 45-76를 인지한다는 것을 보여주었다.

실시예 4: 리포단백질에 존재하는 ApoCIII에 대한 항체의 친화성

목적은 펩티드에 대응하는 상이한 에피토프가 리포단백질에 접근 가능한지 여부를 검사하고 인간 혈장-정제된 리포단백질(HDL, VLDL) 및 완전한 ApoCIII에 대한 각각의 항체 분획의 친화성을 결정하기 위한 것이다.

재료 및 방법

펩티드 특이적 항체 분획을 실시예 2에 기술된 CH 세파로오스에 커플링된 상이한 펩티드에 대한 면역친화성에 의해 준비하였다.

샌드위치 ELISA: 미량역가 플레이트(flat-bottom 96-웰 EIA; Costar, Dutscher)를 0.1 mol/L 인산 완충 식염수(PBS, pH 7.2)로 세척한 다음에, 친화성 정제된 펩티드 특이적 항체 (10㎎/L) 100㎕/웰로 코팅하고, 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음에, 플레이트를 완충액으로 4회 세척하고, 시료 희석액 100㎕로 37℃에서 2시간동안 인큐베이션하였다[1. 정제된 인간 혈장 ApoCIII, 2. 인간 HDL, 3. 인간 VLDL 및 4. 합성 ApoCIII(1-79)의 4개의 다른 시료를 시딩하였다]. 미량역가 웰에 대한 비특이적 결합을 최소화하기 위하여, 항원을 우혈청 알부민 1%를 함유한 0.1M PBS 완충액 중에서 희석하였다. 면역 반응을 평가하기 위하여, 2,500배 희석된, 0.1% BSA를 함유한 PBS 완충액 중의 페록시다아제로 라벨링된 다클론 항-완전한 ApoCIII 항체를 각 웰에 첨가하였다. 37℃에서 2시간동안 인큐베이션한 후에, 플레이트를 PBS로 4회 세척하고 기질 용액 100㎕를 첨가하였다. 기질 용액을 하기와 같이 준비하였다: o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드(Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 30㎎를 30% 하이드로겐 페록시다아제 20㎕을 함유한 0.1mmol/L의 인산-시트레이트 완충액, pH 5.5중에 용해하였다. 암실에서 실온으로 30분간 반응시킨 후에, 1mol/L HCl의 100㎕를 각 웰에 첨가하여 반응을 중단시켰다.

결과

결과는 모든 항체 항-12-35(도 2), 항-45-65(도 3) 및 항-45-76(도 4)가 전체 ApoCIII (" 전체 Ac" -완전한 토끼 면역글로불린)에 대해서 발생한 다클론 항체와 거의 동일한 친화성을 가지면서 용액 중의 유리 합성 ApoCIII를 인지함을 보여 주었다(그래프 A). 그래프 B에 VLDL의 인지를 도시하고, 그래프 C에 HDL의 인지를 도시하고, 그래프 D에 ApoCIII(1-79)의 인지를 도시하였다. 펩티드 특이적 항체 항체중에서, 표준 혈장 및 HDL중의 항-12-35가 가장 높은 친화성을 가졌다. 또한 항(12-35)의 반응성이 완전한 항-apo CIII 토끼 다클론 항체로 얻어진 것과 유사하였다.

실시예 5: apo CIII의 VLDL중으로의 삽입에 대한 상이한 항체의 효과

목적은 VLDL과 ApoCIII의 회합을 억제하는 각 항체의 능력을 측정하는 것이다. VLDL 단편을 통상적인 기술을 사용하여 정상트리글리세리드혈증(NTG) 및 고트리글리세리드혈증(HTG) 환자로부터 초원심분리에 의해서 준비하였다. VLDL의 제 3 분획을 NTG 군으로부터 준비하고, 여기서 추가 ApoCIII를 VLDL 입자(VLDL 풍부 또는 VLDL E-CIII)로 체외에서 로딩하였다.

방사선라벨링: 정제된 ApoCIII를 맥파르란 방법의 일헤이머의 개량 방법 (Bilheimer's modification of McFarlane's Method)에 의해 방사선 요오드로 라벨링하였다(참고 문헌: Bilheimer et al., 1972. Biochem. Biophys. Acta, 260, 212-221). 수지 AG 2-X8을 1M NaOH로 재생하고 증류수로 세척하고 난 후에, PBS 0.01M BSA 1%(W/V)로 포화시켰다. ApoCIII를 PBS-EDTA 0.01M에 대해 투석하였다. 0.5m Ci ^{125}I를 0.033M ICl 용액 5㎕를 함유하는 0.1㎖ 방사선라벨링된 완충액(글리신 1M, NaCl 1M)에 첨가하였다. 제조된 용액의 양을 세척된 수지 50㎕로 혼합하였다. 다음에, 유리^{125}I를 지닌 수지를 원심분리에 의하여 제거한 다음에, 회수된 apo CIII를 PBS-ADTA 0.01M에 대해 투석하였다.

apo CIII의 VLDL로의 삽입(항 apo CIII의 존재 또는 부재하에): 각 항 apo CIII 항체의 20㎍을 ^{125}I-apo CIII의 등가량으로 37℃에서 2시간동안 인큐베이션하였다. 리포단백질(VLDL NTG, VLDL HTG 또는 VLDL E-CIII) 및 항체-^{125}I-apo CIII를 혼합하고 37℃에서 1시간 동안 혼합하고, 비결합 ^{125}I-apo CIII를 투석하였다. 지질 입자에 결합된 ^{125}I-apo CIII 및 비결합된 ^{125}I-apo CIII의 ^{125}I의 방사능을 측정하여 apo CIII 및 리포단백질간의 회합에 대한 항체의 저해율을 측정하였다.

결과

도 5의 결과는 모든 항체(항-완전한 ApoCIII 또는 펩티드 특이적임)는 항-apoCIII 다클론 항체에 비해 VLDL 중의 ApoCIII의 삽입에 대한 영향을 가진다는 것을 보여주었다.

실시예 6: 리포단백질 리파아제 활성에 대한 ApoCIII 특이적 항체의 효과

목적은 apoCIII에 의한 저해 효과로부터 아포단백질 리파아제를 보호하는 항체의 활성을 시험하기 위한 것이다.

헤파란 설페이트 프로테오글리칸-결합 리포단백질 리파아제에 의한 지방 분해의 검정

96 웰 미량역가 플레이트에서 검정을 수행하였다. 웰을 4℃에서 18시간동안 0.1M PBS 0.15M NaCl 100㎕중의 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(HSPG) 0.50㎕ pH 7.2-7.4로 인큐베이션하고, PBS로 3회 세척하고, 후속하여 1%(W/V) 본래 유리 지방산 우혈청 알부민(BSA)을 함유하는 PBS로 37℃에서 1시간동안 차단하였다. 다음에, 웰을 4℃에서 2시간동안 0.1M Tris 20% 글리세롤(v/v) 100㎕, pH8.5로 리포단백질의 2㎍으로 인큐베이션하였다. 비고정된 LPL을 Tris 완충액(0.1M, pH8.5)으로 3회 희석하였다. VLDL의 4 분획을 제조하였다: P1은 ApoB로 체외에서 강화된 인간 혈장-정제된 VLDL을 포함하고; P2는 ApoB 및 ApoC로 체외에서 강화된 인간 혈장-정제된 VLDL을 포함하였다. 다른 분획을 ApoCIII로 강화하여 P1 및 P2로부터 제조하였다(P1/ApoCIII 강화 및 P2/ApoCIII 강화됨). 상기 4개의 분획을 토끼 항-완전한 ApoCIII로 인큐베이션하였다. 다음에, LPl 코팅된 플레이트[0.1M Tris 0.005 내지 0.5㎎/㎖, pH 8.4 및 1.5% BSA (w/v)]에 리포단백질 단편 100㎕를 첨가하여 지방 분해를 시작하고, 인큐베이션을 37℃에서 시작하였다. 반응을 20분후에 Tris 완충액, Triton X-100[2% (v/v), 최종 농도] 100㎕를 첨가하여 중단하였다. 지방 분해된 리포단백질 100㎕를 각 웰로부터 채취하여 -20℃에서 냉각시킨 다음, 지방산 농도를 제조자의 지시에 따라 NEFA-C 키트(Wako Chemicals Neuss, Germany)를 사용하여 측정하였다.

결과

모든 경우의 결과를 도 6에 도시하였고, 리포단백질 리파아제의 활성은 항-ApoCIII 항체의 존재하에서 증가하였다.

실시예 7: 콜레스테롤 유출에 대한 항체의 효능

목적은 HDL에 대한 항-ApoCIII 항체의 가능한 음성 효과에 대해 시험하기 위함이다.

1. 리포단백질의 분리: HDL을 밀도 교정을 위해서 Kbr을 사용하여 연속적인 초원심분리에 의하여 밀도 1,063-1,21의 신선한 정상지방혈증 인간 혈장으로부터 분리하고, d=1,21에서 재부유에 의해 세척하고 0.01M 인산 완충 식염수, pH 7.4에 대하여 투석하였다.

2. 면역친화성 크로마토그래피에 의한 리포단백질 함유 ApoCIII의 분리:

HDL 함유 ApoCIII 및 HDL을 함유하지 않은 ApoCIII를 활성화된 세파로스 4B에 커플링하여 항-CIII 항체를 사용하여 면역친화성 크로마토그래피에 의해 준비하였다. ApoCIII 함유 HDL을 3M 소듐 티오시아네이트를 사용하여 용출하였다. ApoCIII 함유 HDL을 0.01M 인산 완충 식염수, pH 7.4, EDTA 0.1g/L에 대하여 투석하였다. HDL의 순수 분획을 HDLt라고 칭하고, HDL을 함유하는 ApoCIII의 잔류 분획을 HCL CIII라 칭하고, 비흡착된 HDL 분획을 "HDL CIII 비함유" 라고 칭하였다.

3. 시딩(seeding) 조건: 랫트 간 세포인 Fu5AH를 25000 세포/㎖의 12 웰 플레이트의 각 웰에 2㎖씩 시딩하고, 페니실린(100㎍/㎖), 스트렙토마이신(100g/㎖), 글루타민(2mM) 및 5%(vol/vol) 신생 송아지 혈청으로 보강된 최소 필수 배지 95%(GIBCOBRL)중에서 배양하였다. 세포를 세포질 지방 방사선라벨링하기 전에 습윤한 5% CO_2 대기하에서 37℃에서 2일 동안 증식시켰다.

본 발명자들은 시료당 3개의 웰을 사용하였고, 유출량 검증을 조절하기 위해 본 발명자들은 하기를 사용하였다:

- 음성 대조군: 최소필수배지 1㎖

- 양성 대조군: 100㎍/㎖ HDL_3

- 내적 대조군: -20℃에서 저장되고 2.5%(vol/vol)로 사용되는 인간 정상지방혈증 혈장 풀

- 라벨링된 콜레스테롤 로딩의 대조군: 세포의 방사선활성을 시료의 인큐베이션 전에 측정하였다.

4. Fu5AH 세포의 방사선라벨링: 방사선라벨링 콜레스테롤 [1α, 2α, (n)-^{3}H]콜레스테롤을 1㎕Ci/웰의 최종 농도가 되도록 세포에 첨가하였다:

- N_2 하에서 X㎕Ci를 증발시키고

- 에탄올 1㎖을 첨가하고, 60℃에서 45 내지 60분동안 인큐베이션하였다.

- N_2 하에서 증발시키고,

- 에탄올 50㎕를 첨가하고, 60℃에서 15 내지 30분동안 인큐베이션하였다.

- MEM에서 5%의 최종 농도가 되도록 최소필수배지 및 신생 송아지 혈청의 동일한 양을 첨가하고, 37℃에서 30분간 인큐베이션하였다.

- 최종 부피가 되도록 MEM을 첨가한다.

- 방사선라벨(2㎖/웰)의 존재하에 3일동안 세포를 증식시켰다.

5. 콜레스테롤 유출량: 라벨이 세포 풀중에 균등하게 분배되었는지를 확인하기 위해, 라벨링 배지를 유출전에 24시간동안 0.5% 우혈청 알부민(BSA)을 함유하는 MEM으로 교환하였다.

- 세포 인산-완충 식염수(PBS)로 1회 세척하고, 50μg/㎖의 최종 농도(500μℓ웰)로 HDL을 5% CO_2, 37℃에서 3시간동안 인큐베이션하였다. 세포를 인큐베이션 하기 전에, HDL을 37℃에서 2시간동안 15μg/㎖로 상이한 항체로 사전 인큐베이션하였다.

- 유출 단계를 각 웰로부터 혈청 함유 배지를 제거하여 종결하고, 본 발명자들은 세포를 PBS로 3회 세척하고 세포를 웰당 수산화나트륨(0.1mol/L) 500μℓ중에서 제거하였다.

- 신틸레이션 칵테일(scintillation cocktail) (Optiphase 'Hisafe' 3, WALLAC) 4㎖을 첨가한 배지 또는 세포 현탁액 250μℓ상에서, 1분 동안 액체 신틸레이션 카운터(WALLAC 1410)로 계수하였다.

유출 퍼센트는 하기와 같이 계산되었다:

[dpm 배지 / (dpm 배지 + dpm 세포)]×100

결과

HDL을 함유하는 ApoCIII를 면역친화성에 의하여 HDL을 함유하는 비-ApoCIII로부터 분리하였다. 콜레스테롤 유출을 다른 농도에서 항-완전한 ApoCIII 또는 항 12-35 항체의 존재하에 또는 부재하에 다른 분획(HDL 단독, HDL-CIII 및 HDH CIII무첨가)에서 측정하였다. 상기 결과는 도 7 및 도 8에 도시하였다. 콜레스테롤 유출량에 의해 항체가 HDL 기능에 영향을 주지 않는 것을 모든 실험에서 확인하였다.

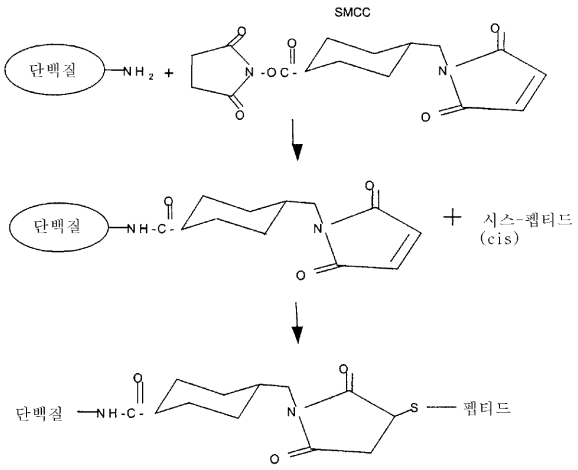
실시예 8: 펩티드 컨쥬게이트의 제조 및 면역원성

우혈청 알부민(BSA)에 결합된 펩티드 12-35 및 45-65를 포함하는 면역원을 제조하여, 백신으로 제형하고 마우스에 근내로 투여하였다.

4개의 펩티드, ApoCIII의 서열 12-35에 기초한 한 쌍의 펩티드 및 서열 45-65에 기초한 다른 쌍의 펩티드을 합성하였다. 펩티드의 각 쌍은 펩티드의 N- 또는 C- 말단 각각에 삽입된 GCC 링커를 가졌다:

$12\text{-}35_{COOH}$	MQGYMKHATKTAKDALSSVQESQV*GGC*	(SEQ ID NO. 8)
$12\text{-}35_{NH2}$	*CGG*MQGYMKHATKTAKDALSSVQESQV	(SEQ ID NO. 9)
$45\text{-}65_{COOH}$	DGFSSLKDYWSTVKDKFSEFW*GGC*	(SEQ ID NO. 10)
$45\text{-}65_{NH2}$	*CGG*DGFSSLKDYWSTVKDKFSEFW	(SEQ ID NO. 11)

펩티드를 말레이미드(Maleimide) 화학에 의해 단백질 담체로서의 BSA에 컨쥬게이션하였다. BSA를 피어스(Pierce)로부터 구입하고 숙시닐 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC) 링커로 사전-활성화시킨다. 또한, SMCC를 주요 제조사로부터 구입하고 제조자의 지시에 따라 사용하였다. SMCC를 통한 BSA의 커플링을, 과량 시스테인과의 반응으로 퀀치(quench)하기 전에, 과량의 펩티드로 실온에서 2시간에 거쳐 수행하고, 인산 완충액으로 투석하였다.



결과로 생산된 융해성 컨쥬게이트 면역원의 분석은 각 BSA 담체 분자에 컨쥬게이션된 약 19 펩티드가 있다는 것을 보여주었다.

문헌(WO 95/17210)에 기술된 바와 같이, 사포닌 QS21, 3-디-O-아실화된 모노포스포릴 리피드 A(3D-MPL)을 포함하는 애쥬번트 시스템 및 (스쿠알렌 및 α-토코페롤 오일 상을 가진) 수중유 에멀젼의 혼합물에 의해 면역원을 모두 백신으로 제형하였다. 다음에, 면역원 25μg을 함유하는 백신을 0, 14, 28일째에 10 BalbC 마우스의 군에 근내로 투여하고, 28일 및 42일 째에 혈청 시료를 취하였다. 다음에, ELASA 분석에 의해 항-펩티드 적정량 및 항-완전한 ApoCIII 적정량에 대해 분석하고 (플레이트를 완전한 ApoCIII또는 해당하는 펩티드로 코팅하였다), 결과를 적정량의 중간값으로 표현하였다.

결과

결과는 생산된 펩티드 면역원이 높은 면역원성을 가지고 천연의 완전한 ApoCIII와 강하게 교차반응하는 항체를 유발함을 보여주었다. 군으로부터 획득된 결과는 매우 균일하고 3차 투여후에 강한 추가접종 반응을 보였다. 10개의 군의 각 마우스에 대한 결과를 표 1에 도시하였다.

표 1. 2차투여 후의 쥐피의 항-펩티드 IgG (28일째)

	항-펩티드 IgG 반응 (2차 투여후)			
마우스 번호	12-35$_{COOH}$-BSA	12-35$_{NH2}$-BSA	45-65$_{COOH}$-BSA	45-65$_{NH2}$-BSA
1	8930	7147	3481	6091
2	74950	10459	1128	12112
3	24889	8825	1847	3780
4	51084	11922	1907	9289
5	34756	9084	2217	6563
6	19427	3346	1068	4283
7	66607	1677	1794	773
8	13579	7020	907	3269
9	14493	15311	2434	939
10	30499	43065	1318	12667
평균	**33921**	**11786**	**1810**	**5977**
기하평균	**27297**	**8450**	**1672**	**4305**
표준 편차	**23013**	**11673**	**777**	**4232**

표 2. 3차 투여후의 취과의 항-쾌터드 IgG 적정량 (42일째)

	항-쾌터드 IgG 반응(3차 투여후)			
마우스 번호	12-35$_{COOH}$-BSA	12-35$_{NH2}$-BSA	45-65$_{COOH}$-BSA	45-65$_{NH2}$-BSA
1	69735	11369	9667	3005
2	123458	17581	3440	15804
3	68283	7867	17535	5826
4	75884	22679	20866	23188
5	34135	12938	16917	11930
6	82473	11664	7353	8013
7	163248	7996	3620	172
8	51196	10605	7859	2464
9	65127	11165	6122	2026
10	59430	25079	6304	23379
평균	**79297**	**13894**	**9968**	**9581**
기하평균	**72590**	**12902**	**8357**	**5117**
표준 편차	**37501**	**5940**	**6208**	**8666**

표3. 2차 투여 후의 취과의 항-완전한 ApoCIII IgG 적정량 (28일째)

	항-완전한 ApoCIII IgG 반응 (2차 투여후)			
마우스 번호	12-35$_{COOH}$-BSA	12-35$_{NH2}$-BSA	45-65$_{COOH}$-BSA	45-65$_{NH2}$-BSA
1	607	2618	9531	786
2	4471	2176	7997	3854
3	2193	250	763	2370
4	6118	649	4728	475
5	3587	775	6890	3816
6	3012	1223	9924	3627
7	3350	250	8340	250
8	1853	718	6079	250
9	1155	4791	10037	2618
10	1056	2730	1948	6067
평균	**2740**	**1618**	**6624**	**2411**
기하평균	**1718**	**1452**	**3266**	**1963**
표준 편차	**2225**	**1075**	**5334**	**1469**

표 4. 3차 투여후의 쥐과의 항-완전한 ApoCIII IgG 적정량 (42일째)

	항-완전한 ApoCIII IgG반응 (3차 투여후)			
마우스 번호	12-35$_{COOH}$-BSA	12-35$_{NH2}$-BSA	45-65$_{COOH}$-BSA	45-65$_{NH2}$-BSA
1	14231	16618	18010	1182
2	46994	26128	10152	6866
3	19189	5342	2392	5460
4	32417	18256	12061	635
5	7506	10740	17636	7448
6	35724	9794	13494	4490
7	24471	5681	9274	50
8	13474	4658	11230	606
9	25203	23127	12450	9445
10	5196	24516	1744	24066
평균	**22441**	**14486**	**10844**	**6025**
기하평균	**13205**	**8322**	**5436**	**7150**
표준편차	**18547**	**12092**	**8817**	**2405**

(57) 청구의 범위

청구항 1.

전장(full length)의 천연 형태에서 (a) 아포리포단백질 B의 수용체와의 결합의 저해 및/또는 (b) 리포단백질 리파아제의 저해의 활성 중 하나 이상을 가지는 아포리포단백질, 이의 펩티드 또는 단편을 포함하는, 죽상경화증 치료용 면역원.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 아포리포단백질이 두가지 활성 모두를 가짐을 특징으로 하는 면역원.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 아포리포단백질이 ApoCIII, 이의 단편, 펩티드 또는 미모토프임을 특징으로 하는 면역원.

청구항 4.

제 3항에 있어서, ApoCIII이 단백질 담체에 컨쥬게이션(conjugation)되거나 융합됨을 특징으로 하는 면역원.

청구항 5.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원이 SEQ ID NO. 1 내지 7 에서 선택된 서열 중 하나임을 특징으로 하는 면역원.

청구항 6.

제 1항 또는 제 5항 중 어느 한 항에 따른 면역원 및 애쥬번트를 포함하는 백신.

청구항 7.

(a) 아포리포단백질 B의 수용체와의 결합의 저해 및/또는 (b) 리포단백질 리파아제의 저해의 활성 중 하나 이상을 저해하는 제제를 죽상경화증의 치료 또는 예방을 필요로 하는 인간 숙주에 투여하는 단계를 포함하는, 인간 숙주의 죽종형성성 아포리포단백질의 활성을 선택적으로 저해함에 의한 죽상경화증의 치료 또는 예방 방법.

청구항 8.

ApoCIII 활성을 선택적으로 저해하는 제제를 죽상경화증의 치료 및 예방을 필요로 하는 인간 숙주에 투여하는 단계를 포함하는, 인간 숙주의 ApoCIII 활성을 선택적으로 저해함에 의한 죽상경화증의 치료 또는 예방 방법.

청구항 9.

제 7항 또는 제 8항에 있어서, 제제가 ApoCIII 또는 이의 단편을 면역원으로서 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제 7항 또는 제 8항에 있어서, 제제가 ApoCIII의 리간드임을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

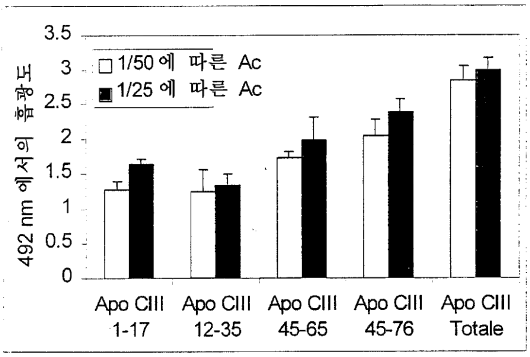
제 10항에 있어서, 리간드가 항체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제 7항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 제제가 리포단백질 리파아제의 ApoCIII 매개 저해 및 ApoB의 이의 수용체와의 결합을 차단함을 특징으로 하는 방법.

도면

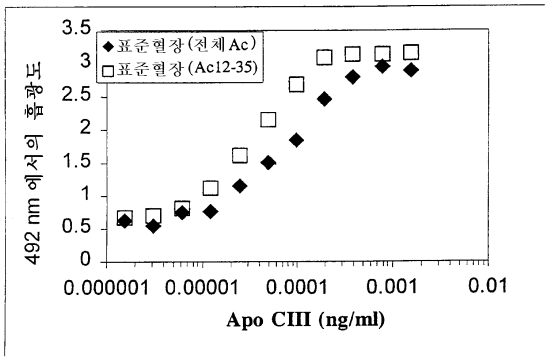
도면 1



도면 2a

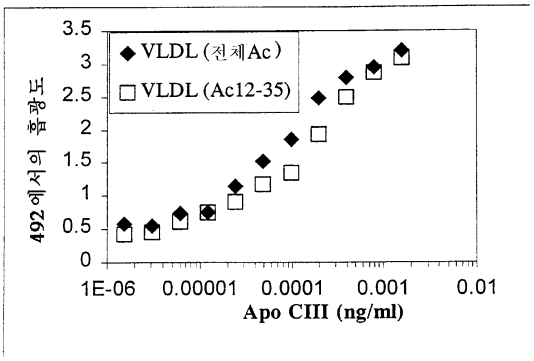
항 12-35 및 항-전체 apo CIII 의 반응성

A.



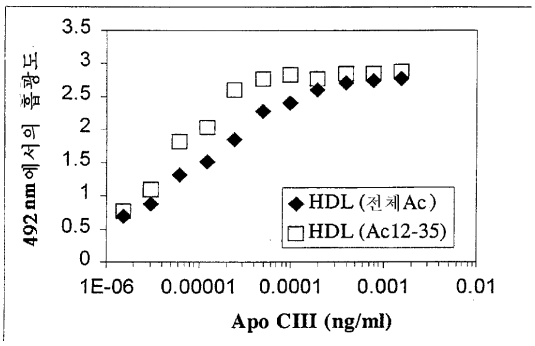
도면 2b

B.



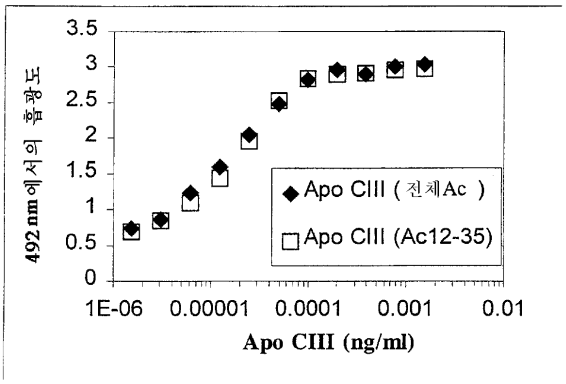
도면 2c

C.


3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
492 nm에서의 흡광도
HDL (전체Ac)
HDL (Ac12-35)
1E-06
0.00001
0.0001
0.001
0.01
Apo CIII (ng/ml)

도면 2d

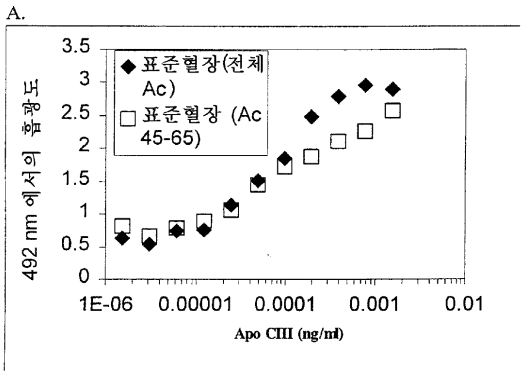
D.


3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
492 nm에서의 흡광도
Apo CIII (전체Ac)
Apo CIII (Ac12-35)
1E-06
0.00001
0.0001
0.001
0.01
Apo CIII (ng/ml)

도면 3a

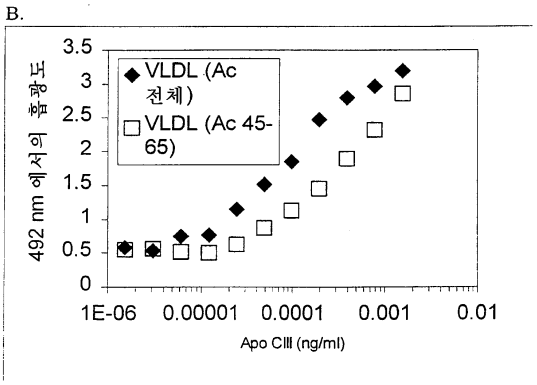
항 45-65 및 항-전체 apo CIII 의 반응성

A.



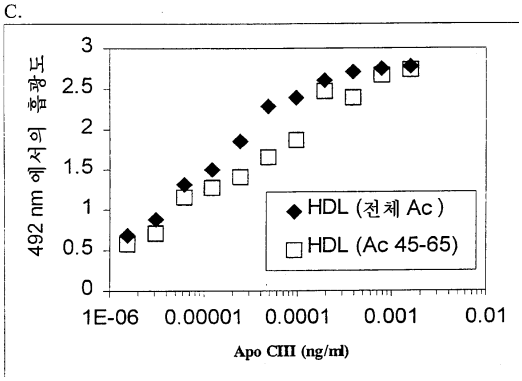
도면 3b

B.



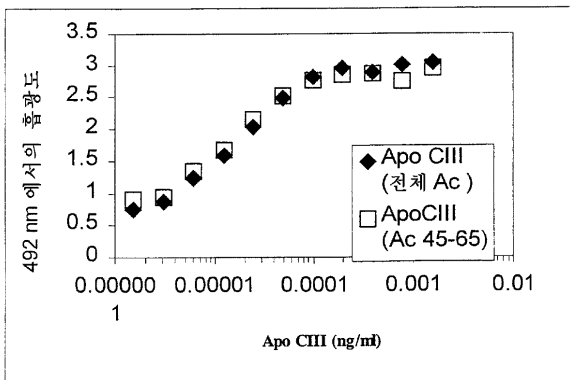
도면 3c

C.



도면 3d

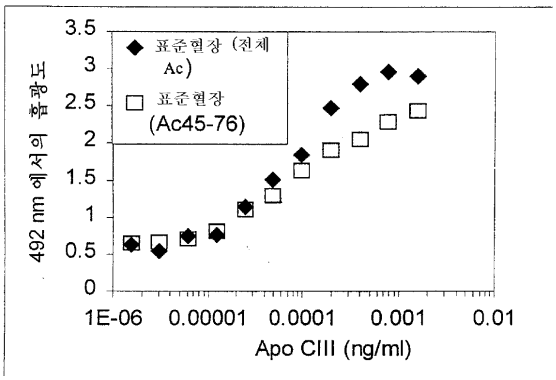
D.



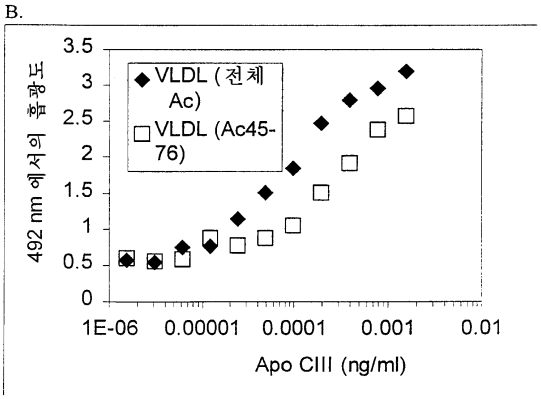
도면 4a

항 45-76 및 항-전체 apo CIII 의 반응성

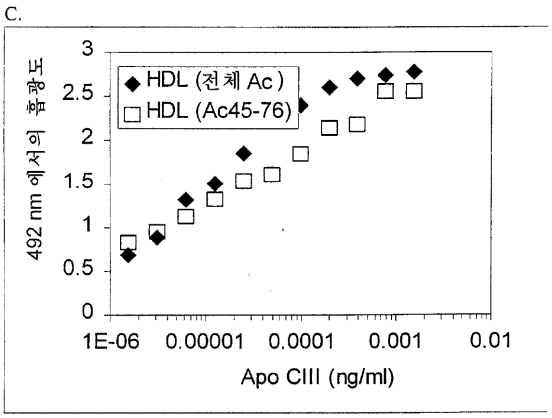
A.



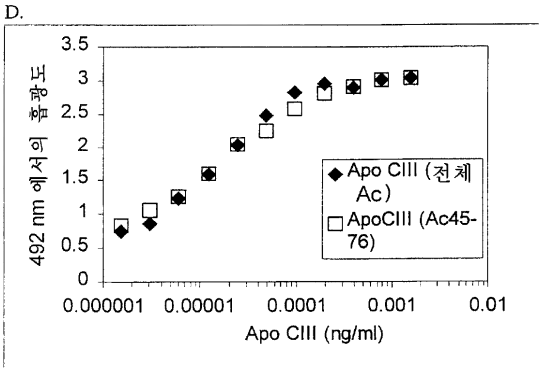
도면 4b


B.
492 nm 에서의 흡광도
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
VLDL (전체 Ac)
VLDL (Ac45-76)
1E-06
0.00001
0.0001
0.001
0.01
Apo CIII (ng/ml)

도면 4c

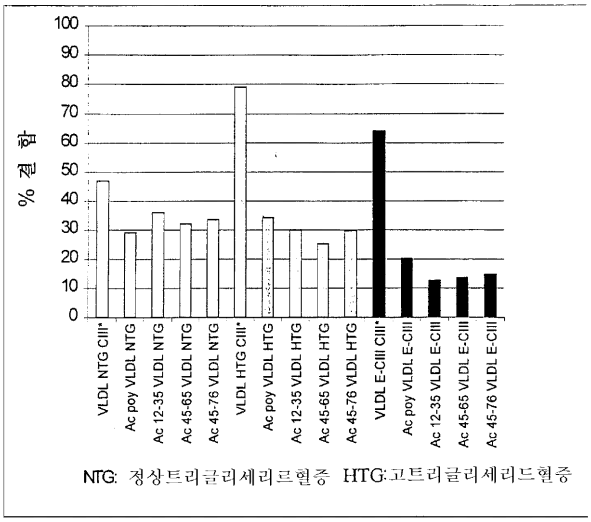

C.
492 nm 에서의 흡광도
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
HDL (전체 Ac)
HDL (Ac45-76)
1E-06
0.00001
0.0001
0.001
0.01
Apo CIII (ng/ml)

도면 4d



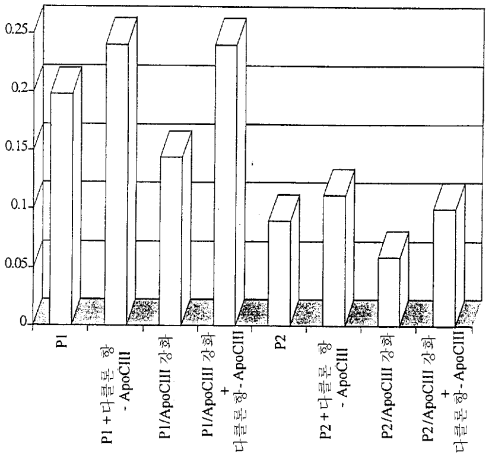
도면 5

NTG 또는 HTG 환자의 혈장으로부터 정제된 ApoCIII 의 VLDL 로의 삽입에 대한 항체의 효과



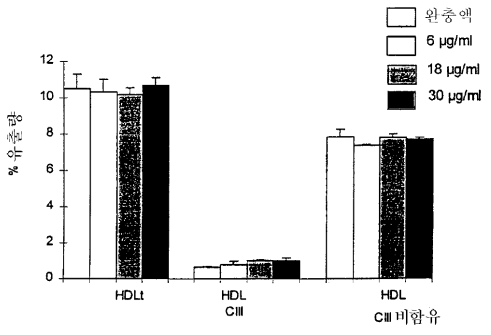
도면 6

ApoCIII 의 존재하에서 리포란백질 리파아제에 대한 다클론 항- ApoCIII 항체의 영향

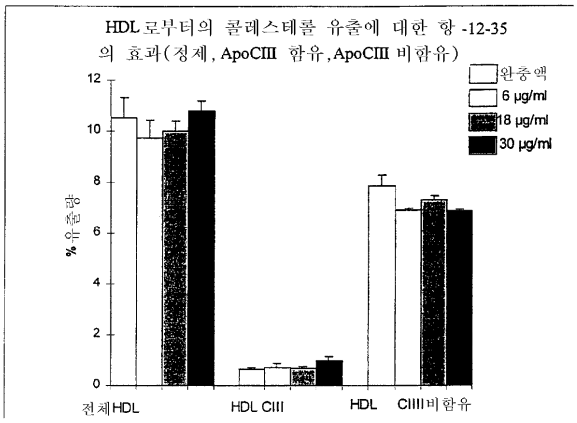


도면 7

HDL로부터의 콜레스테롤 유출에 대한 다클론 항-완전한 Apo CIII 의 효과(정제, Apo CIII 함유 및 Apo CIII 비 함유)



도면 8



SEQUENCE LISTING

<110> SmithKline Beecham Biologicals S.A.

<120> Vqccine

<130> B45212

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 79

<212> PRT

<213> Human ApoCIII peptides

<400> 1

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

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Human ApoCIII peptides

<400> 2

```
Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met Gln Gly Tyr Met
 1               5                  10                  15
Lys
```

<210> 3

<211> 40

<212> PRT
<213> Human ApoCIII peptides
<400> 3
Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met Gln Gly Tyr Met
1 5 10 15
Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser Ser Val Gln Glu
20 25 30
Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg
35 40
<210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Human ApoCIII peptides
<400> 4
Met Gln Gly Tyr Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu
1 5 10 15
Ser Ser Val Gln Glu Ser Gln Val
20
<210> 5
<211> 39
<212> PRT
<213> Human ApoCIII peptides
<400> 5
Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr
1 5 10 15
Val Lys Asp Lys Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg
20 25 30
Pro Thr Ser Ala Val Ala Ala
35
<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> Human ApoCIII peptides
<400> 6
Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys
1 5 10 15
Phe Ser Glu Phe Trp
20
<210> 7
<211> 32
<212> PRT
<213> Human ApoCIII peptides
<400> 7
Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys
1 5 10 15
Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala
20 25 30
<210> 8
<211> 27
<212> PRT

<213> Human ApoCIII peptides
<400> 8

```
Met Gln Gly Tyr Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu
 1               5                  10                  15
Ser Ser Val Gln Glu Ser Gln Val Gly Gly Cys
            20                  25
```

<210> 9
<211> 27
<212> PRT
<213> Human ApoCIII peptides
<400> 9

```
Cys Gly Gly Met Gln Gly Tyr Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys
 1               5                  10                  15
Asp Ala Leu Ser Ser Val Gln Glu Ser Gln Val
            20                  25
```

<210> 10
<211> 24
<212> PRT
<213> Human ApoCIII peptides
<400> 10

```
Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys
 1               5                  10                  15
Phe Ser Glu Phe Trp Gly Gly Cys
            20
```

<210> 11
<211> 24
<212> PRT
<213> Human ApoCIII peptides
<400> 11

```
Cys Gly Gly Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val
 1               5                  10                  15
Lys Asp Lys Phe Ser Glu Phe Trp
            20
```