



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0159847
(43) 공개일자 2023년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/90 (2006.01) A61K 38/52 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/90 (2013.01)
A61K 38/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7035521
(22) 출원일자(국제) 2022년03월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년10월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/020991
(87) 국제공개번호 WO 2022/198073
국제공개일자 2022년09월22일
(30) 우선권주장
63/162,714 2021년03월18일 미국(US)

(71) 출원인
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미합중국 캘리포니아 94607-5200 오클랜드 프랭클
린 스트리트 1111, 5층
(72) 발명자
밀러 유리
미국, 캘리포니아 92093, 라 호야, 9500 길먼 드
라이브
최 수호
미국, 캘리포니아 92093, 라 호야, 9500 길먼 드
라이브
(74) 대리인
특허법인한얼

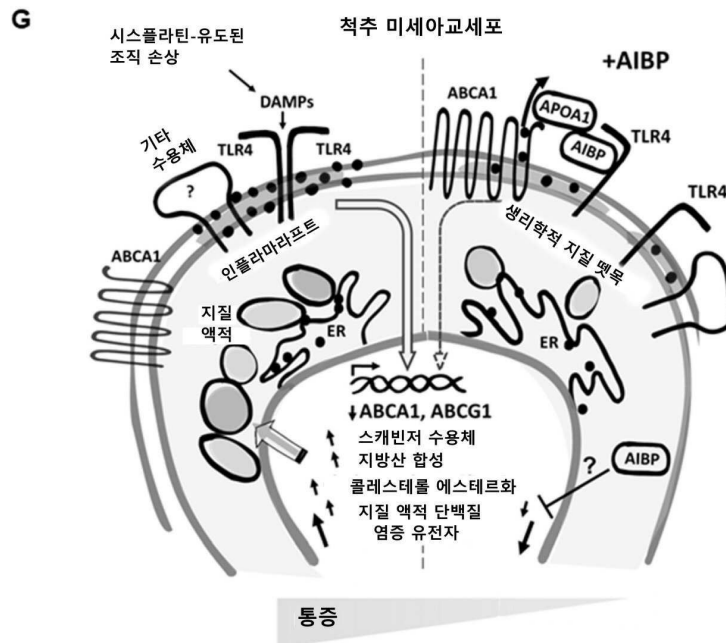
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 염증성 또는 활성화된 세포를 표적으로 하고 염증성 상태 및 통증을 치료 또는 개선하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

아미노산 서열을 변형하고, ApoA-I 결합 단백질의 발현 수준을 증가시켜, 신경병증성 통증, CNS 염증, 이질통, 신경 손상 후 통증, 수술 후 통증, 화학요법 유발 말초 신경병증, 예를 들어, 신경퇴행성 질환 또는 상태, 예를 들어, 알츠하이머병을 포함하는 신경퇴행, 통각과민증, 원발성 두통, 예를 들어, 편두통 및 군발성 두통, 녹내장 (뒷면에 계속)

대표도 - 도10g



또는 눈의 다른 염증성 질환, 폐 염증, 천식, HIV 감염, 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 신경병증성 통증, 이질통, 통각과민증, 신경퇴행성 질환, 원발성 두통, 예를 들어, 편두통, 녹내장, 폐 염증 및 천식, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 패혈증, 인플루엔자, 코로나바이러스(예: COVID-19) 또는 HIV 감염 또는 이의 동반 질환을 포함한 바이러스 감염, 및/또는 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환을 치료하기 위해 재조합 변형된 APOA1BP 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

C07K 2319/21 (2013.01)

C07K 2319/43 (2013.01)

C12Y 501/99006 (2015.07)

명세서

청구범위

청구항 1

단리된 또는 재조합 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드가 ApoA-I 결합 단백질(AIBP) 아미노산 서열, 및 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단으로 구성되고,

상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단이 적어도 8개의 아미노산으로 구성되거나, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단이 길이가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개 이상의 아미노산이고,

상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단이 관련 생리학적 조건하에서 폴리펩티드의 TLR4에 대한 결합을 위한 AIBP 아미노산 서열 내의 암호화 도메인(cryptic domain)을 전개(unfolding) 또는 노출시키거나, 이를 달리 접근 가능하게 유도할 수 있고,

임의로 "관련 생리학적 조건"은 폴리펩티드 화합물이 투여에 의해 이를 필요로 하는 대상체에게 제공시 생체 내에서 경험하게 되는 조건을 지칭하고,

단, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 His-태그 및 상기 조건하에서 작용될 때 His-태그의 손실을 초래하는 단백질 분해 절단 부위로 구성되지 않는, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단이 8 내지 40개의 인접 아미노산 잔기(contiguous amino acid residue acid)으로 구성되고, 그 중 3 내지 12개의 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 히스티딘(H) 및 리신(K)으로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되는, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단의 N-말단이 분비 신호 아미노산 서열인, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 화합물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 분비 신호 아미노산 서열이 피브로넥틴 분비 신호 도메인, 면역글로불린 중쇄 분비 신호 도메인, 면역글로불린 카파 경쇄 분비 신호 도메인 또는 인터루킨-2 신호 펩티드 분비 신호 도메인인, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 화합물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 피브로넥틴 분비 신호 도메인이 MLRGPGPGRLLLLAVLCLGTSVRCCTETGKSKR(서열번호 24)인, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 AIBP 서열이 hAIBP(서열번호 6) 또는 d24hAIBP(서열번호 8)인, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단이 6개의 연속 히스티딘 아미노산 잔기(HHHHHH; 서열번호 1), AIBP 아미노산 서열의 TLR4 결합 도메인에 대한 N-말단으로 구성되는, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 ApoA-I 결합 단백질 서열의 TLR4 결합 도메인의 N-말단 사이에 개재 (intervening)하는 트롬빈 절단 도메인을 가지며, 상기 트롬빈 절단 도메인이 기능적으로 작동 불가능하게 되도록 이 도메인 내에 하나 이상의 아미노산 결실 및/또는 돌연변이를 갖는, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 화합물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단이, 각각 기능적으로 작동 불가능하게 되도록 이의 트롬빈 절단 도메인의 아미노산 돌연변이를 갖는,

MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR(서열번호 2) 또는

MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSDGDDGDDDR(서열번호 19)인, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 화합물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단이 TETGKSKR(서열번호 26),

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKLAANS(서열번호 33), 및

MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPAASPLDGICSR(서열번호 7)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 AIBP 아미노산 서열이 포유류 AIBP 아미노산 서열의 것인, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 화합물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 포유류 AIBP 아미노산 서열이 인간 AIBP 아미노산 서열의 것인, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 화합물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 인간 AIBP 아미노산 서열이 NCBI 참조 서열: NP_658985.2를 갖는 288개의 아미노산 잔기의 전장(full-length) 아미노산 서열인, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 화합물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 인간 AIBP 아미노산 서열이 상기 AIBP 아미노산 서열의 아미노산 1-24가 결실된 NCBI 참조 서열: NP_658985.2를 갖는 인간 AIBP 아미노산 서열인, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 화합물.

청구항 15

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 화합물, 및 비경구 투여에 적합한 적어도 하나의 부형제(excipient)로 구성되는 약제학적 조성물.

청구항 16

제16항에 있어서, 비경구 투여가 척수강내 주사 또는 척수강내 임플란트에 의해 이루어지는, 약제학적 조성물.

청구항 17

핵산 화합물로서, 상기 핵산 화합물이 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 화합물을 인코딩(encoding)하는 핵산 서열로 구성되는, 핵산 화합물.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 화합물을 인코딩하는 핵산 서열로 구성되는 발현 벡터

(expression vector).

청구항 19

제19항에 있어서, 상기 발현 벡터가 재조합 아데노바이러스인, 발현 벡터.

청구항 20

ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP)을 첨가하거나 이의 수준을 증가시킴으로써 대상체(subject)에서 다음을 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 다음의 중증도 또는 지속 기간을 감소시키거나 다음의 증상의 중증도를 감소시키기 위한 방법으로서:

- 신경병증성 통증(neuropathic pain),
- 염증 유발 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 염증 유발 신경병증성 통증이 Toll 유사 수용체 4(TLR4) 매개 염증 유발 신경병증성 통증을 포함하는, 염증 유발 신경병증성 통증,
- 신경 또는 CNS 염증으로서, 임의로 상기 신경 또는 CNS 염증이 TLR4 매개 신경 또는 CNS 염증을 포함하는, 신경 또는 CNS 염증,
- 이질통(allodynia)으로서, 임의로 상기 이질통이 TLR4 매개 이질통을 포함하는, 이질통,
- 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증이 외상(trauma), 화학요법(chemotherapy), 관절염(arthritis), 당뇨병(diabetes) 또는 바이러스 감염에 의해 생성 또는 유발되거나 이의 후유증(sequelae)인, 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- 수술 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)(예: 시스플라틴 유발 CIPN 또는 이질통),
- 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 만성 또는 진행성 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 또는 만성 외상성 뇌병증(Chronic Traumatic Encephalopathy; CTE) 또는 관련 타우병증(tauopathy), 외상성 뇌 손상(traumatic brain injury; TBI), 외상 후 스트레스 장애(posttraumatic stress disorder), 외상성 전쟁 신경증(traumatic war neurosis) 또는 외상 후 스트레스 증후군(post-traumatic stress syndrome; PTSS),
- 원발성 두통(primary headache), 임의로 편두통(migraine) 또는 군발성 두통(cluster headache),
- 통각과민증(hyperalgesia),
- 녹내장(glaucoma) 또는 눈의 다른 염증성 질환,
- 폐 염증 및 천식(asthma),
- 급성 호흡 곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome; ARDS),
- 패혈증(sepsis),
- 바이러스 감염으로서, 임의로 상기 바이러스가 인플루엔자 또는 코로나바이러스(임의로 코로나바이러스는 COVID-19임) 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 HIV 감염을 일으키는 바이러스(임의로 인플루엔자 A, B 또는 C), 또는 간염 바이러스(hepatitis virus), 라우스 육종 바이러스(rous sarcoma virus; RSV), 파라믹소바이러스과(Paramyxoviridae) 또는 홍역 바이러스(measles virus), 파라믹소바이러스(Paramyxovirus) 또는 볼거리 바이러스(mumps virus), 단순 포진 바이러스(Herpes simplex virus; HSV), 사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus; CMV), 루비바이러스(Rubivirus) 또는 풍진 바이러스(rubella virus), 엔테로바이러스(Enterovirus), 바이러스성 수막염(viral meningitis), 리노바이러스(rhinovirus), 수두-대상 포진(varicella-zoster) 또는 수두 바이러스(chickenpox virus), 오르토폭스바이러스(Orthopoxvirus) 또는 천연두(variola) 또는 천연두 바이러스(smallerpox virus), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus; EBV), 아데노바이러스(Adenovirus), 한타바이러스(Hantavirus), 플라비바이러스과(Flaviviridae) 또는 뎡기열 바이러스(Dengue virus), 지카 바이러스(Zika virus) 또는 치쿤구냐 바이러스 감염(chikungunya virus infection) 또는 이의 동반 질환을 포함하는, 바이러스 감염, 및/또는

- 혈관 염증(vascular inflammation), 죽상 동맥 경화증(atherosclerosis) 및 심혈관 질환(cardiovascular disease);

상기 방법이

(a) (i) 적어도 약 10개의 아미노산, 또는 약 5 내지 20개 아미노산 사이, 또는 약 10 내지 100개 아미노산 사이, 또는 약 20 내지 80개 아미노산 사이, 또는 약 30 내지 50개 아미노산 사이의 이중 아미노 말단 아미노산 서열을 갖거나, AIBP 아미노 말단에 wt AIBP에 존재하지 않거나 비-천연(AIBP에 대해) 아미노산 잔기 또는 펩티드(본원에 제공된 AIBP 변이체(variant)로 지칭되기도 함)인 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 이상의 아미노산 잔기를 갖는 재조합 또는 합성 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 화합물 또는 조성물로서,

임의로, 상기 이중 아미노 말단 아미노산 서열이 펩티드 태그를 포함하고, 임의로 펩티드 태그가 다중 히스티딘(다중-his) 태그를 포함하며, 임의로 다중-his 태그가 6개의 히스티딘(HHHHHH (서열번호 1)), 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 이상의 히스티딘 잔기를 포함하며,

임의로, 상기 이중 아미노 말단 아미노산 서열이 효소 절단 부위를 포함하고, 임의로 상기 효소 절단 부위가 트로빈 절단 부위를 포함하고,

임의로, 상기 이중 아미노 말단 아미노산 서열이 분비 신호를 포함하고, 임의로 상기 분비 신호가 피브로넥틴 분비 신호, 면역글로불린 중쇄 분비 신호 또는 면역글로불린 카파 경쇄 분비 펩티드 또는 인터루킨-2 신호 펩티드를 포함하고,

임의로, 상기 이중 아미노 말단 아미노산 서열이 아미노산 서열(서열번호 2) MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR을 포함하고,

상기 변이체가 TLR4에 대한 AIBP 결합을 매개하는, 아미노산 25-51로 구성된 AIBP 분자 내의 암호화 도메인을 전개 또는 노출시키거나 접근 가능하게 할 수 있는, 재조합 또는 합성 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 화합물 또는 조성물;

(ii) (i)의 APOA1BP 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 핵산으로서,

임의로, APOA1BP 폴리펩티드 또는 APOA1BP 폴리펩티드 활성을 갖는 폴리펩티드를 발현 또는 인코딩하는 상기 핵산이 발현 비히클, 벡터, 재조합 바이러스 또는 등가물에 함유되어 있고,

임의로, 상기 벡터 또는 바이러스가 아데노바이러스 벡터 또는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터, 레트로바이러스, 렌티바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 합성 벡터이거나 이들을 포함하고,

임의로, 상기 AAV 벡터가

아데노 관련 바이러스(AAV) 또는 아데노바이러스 벡터,

AAV 혈청형 또는 변이체 AAV5, AAV6, AAV8 또는 AAV9, AAV-DJ 또는 AAV-DJ/8TM(Cell Biolabs, Inc.; 캘리포니아주 샌디에이고 소재),

레서스 유래(rhesus-derived) AAV 또는 레서스 유래 AAV AAVrh.10hCLN2,

AAV 캡시드 돌연변이체(mutant) 또는 AAV 하이브리드 혈청형,

기관-친화성(organ-tropic) AAV, 또는 심장친화성(cardiotropic) AAV 또는 심장친화성 AAVM41 돌연변이체를 포함하거나, 이들과,

임의로, 상기 AAV가 야생형(wt) AAV에 허용되지 않는 특정 세포 유형을 표적화하는 효율성을 증가시키고/시키거나 관심 세포 유형만 감염시키는 효능을 개선하도록 조작(engineering)되고,

임의로, 상기 하이브리드 AAV가 1) 트랜스캡시드화, 2) 캡시드 표면에 이중특이적 항체의 흡착, 3) 모자이크(mosaic) 캡시드 조작 및/또는 4) 키메라 캡시드 조작을 포함하는 하나 이상의 변형에 의해 하이브리드 혈청형으로서 재표적화(retargeting)되거나 조작되는, 재조합 핵산;

(iii) (i) 내지 (ii) 중 어느 하나의 제형 또는 약제학적 조성물로서, 상기 재조합 또는 합성 ApoA-I 결합 단백

질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 또는 단백질이 인간 또는 포유류 APOA1BP, 또는 AIBP1 또는 AIBP2 서열의 전부 또는 일부이거나 이를 포함하는, 제형 또는 약제학적 조성물;

(iv) 생체내 투여용으로 제형화되거나; 또는 장 또는 비경구 투여용으로 제형화되거나, 또는 경구, 정맥내(IV) 또는 척수강내(IT) 투여용으로 제형화된, (i) 내지 (iii) 중 어느 하나의 제형 또는 약제학적 조성물로서,

임의로, 상기 제형 또는 약제학적 조성물, 또는 상기 제조합, 펩티도미메틱(peptidomimetic) 또는 합성 APOA1BP, 또는 APOA1BP의 바이오이소스테어(bioisostere), 또는 APOA1BP를 인코딩하는 핵산, 또는 APOA1BP를 인코딩하는 핵산이 그 안에 함유된 벡터가 나노 입자, 입자, 미셀 또는 리포솜 또는 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스 또는 덴드리머로 운반되며, 임의로 세포 또는 CNS 침투 모이어티 또는 펩티드 또는 CNS 표적 모이어티 또는 펩티드를 추가로 포함하거나 발현할 수 있는, 제형 또는 약제학적 조성물; 또는

(v) 나노 입자, 리포솜, 정제, 환제, 캡슐, 젤, 젤탭(gel tab), 액체, 분말, 에멀전, 로션, 에어로졸, 스프레이, 로젠지, 수성 또는 멸균 또는 주사 가능한 용액 또는 임플란트(예: 척수강내 임플란트)로 제형화된, (i) 내지 (iv) 중 어느 하나의 제형 또는 약제학적 조성물을 포함하는 제형 또는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및

(b) (a)의 제형 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써, 다음을 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 다음의 중증도 또는 지속 기간을 감소시키거나 다음의 증상의 중증도를 감소시키는 단계로서, 임의로 상기 대상체가 인간 또는 동물인, 단계를 포함하는, 방법:

- 신경병증성 통증,
- 염증 유발 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 염증 유발 신경병증성 통증이 톨 유사 수용체 4(TLR4) 매개 염증 유발 신경병증성 통증을 포함하는, 염증 유발 신경병증성 통증,
- 신경 또는 CNS 염증으로서, 임의로 상기 신경 또는 CNS 염증이 TLR4 매개 신경 또는 CNS 염증을 포함하는, 신경 또는 CNS 염증,
- 이질통으로서, 임의로 상기 이질통이 TLR4 매개 이질통을 포함하는, 이질통,
- 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증이 외상, 화학요법, 관절염, 당뇨병 또는 바이러스 감염에 의해 생성 또는 유발되거나 이의 후 유증인, 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- 수술 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)(예: 시스플라틴 유발 CIPN 또는 이질통),
- 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 만성 또는 진행성 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 알츠하이머병 또는 만성 외상성 뇌병증(CTE) 또는 관련 타우병증, 외상성 뇌 손상(TBI), 외상 후 스트레스 장애, 외상성 전쟁 신경증 또는 외상 후 스트레스 증후군(PTSS),
- 원발성 두통, 임의로 편두통 또는 군발성 두통,
- 통각과민증,
- 녹내장 또는 눈의 다른 염증성 질환,
- 폐 염증 및 천식,
- 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS),
- 패혈증,
- 바이러스 감염으로서, 임의로 상기 바이러스가 인플루엔자 또는 코로나바이러스(임의로 코로나바이러스는 COVID-19임) 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 HIV 감염을 일으키는 바이러스(임의로 인플루엔자 A, B 또는 C), 또는 간염 바이러스, 라우스 육종 바이러스(RSV), 파라믹소바이러스과 또는 홍역 바이러스, 파라믹소바이러스 또는 볼거리 바이러스, 단순 포진 바이러스(HSV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 루비바이러스 또는 풍진 바이러스, 엔테로바이러스, 바이러스성 수막염, 리노바이러스, 수두-대상 포진 또는 수두 바이러스, 오르토폭스 바이러스 또는 천연두 또는 천연두 바이러스, 엡스타인-바 바이러스(EBV), 아데노바이러스, 한타바이러스, 플라비바이러스과 또는 뎅기열 바이러스, 지카 바이러스 또는 치쿤구니아 바이러스 감염 또는 이의 동반 질환을 포함하는, 바이러스 감염, 및/또는

- 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환.

청구항 21

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 제조합 또는 단리된 폴리펩티드, 제15항 또는 제16항의 제형 또는 약제학적 조성물, 또는 제20항에서 사용된 바와 같은 제형 또는 약제학적 조성물을 포함하고, 임의로 제20항의 방법의 실시에 관한 설명서를 포함하는 키트(kit).

청구항 22

의약의 제조에서 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 제조합 또는 단리된 폴리펩티드, 제15항 또는 제16항의 제형 또는 약제학적 조성물, 또는 제20항에서 사용된 제형 또는 약제학적 조성물의 용도.

청구항 23

다음은 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 다음의 중증도 또는 지속 기간을 감소시키거나 다음의 증상의 중증도를 감소시키기 위한 의약의 제조에서의, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 제조합 또는 단리된 폴리펩티드, 제15항 또는 제16항의 제형 또는 약제학적 조성물, 또는 제1항에서 사용된 제형 또는 약제학적 조성물의 용도:

- 신경병증성 통증,
- 염증 유발 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 염증 유발 신경병증성 통증이 톨 유사 수용체 4(TLR4) 매개 염증 유발 신경병증성 통증을 포함하는, 염증 유발 신경병증성 통증,
- 신경 또는 CNS 염증으로서, 임의로 상기 신경 또는 CNS 염증이 TLR4 매개 신경 또는 CNS 염증을 포함하는, 신경 또는 CNS 염증,
- 이질통으로서, 임의로 상기 이질통이 TLR4 매개 이질통을 포함하는, 이질통,
- 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증이 외상, 화학요법, 관절염, 당뇨병 또는 바이러스 감염에 의해 생성 또는 유발되거나 이의 후 유증인, 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- 수술 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)(예: 시스플라틴 유발 CIPN 또는 이질통),
- 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 만성 또는 진행성 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 알츠하이머병 또는 만성 외상성 뇌병증(CTE) 또는 관련 타우병증, 외상성 뇌 손상(TBI), 외상 후 스트레스 장애, 외상성 전쟁 신경증 또는 외상 후 스트레스 증후군(PTSS),
- 원발성 두통, 임의로 편두통 또는 군발성 두통,
- 통각과민증,
- 녹내장 또는 눈의 다른 염증성 질환,
- 폐 염증 및 천식,
- 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS),
- 패혈증,
- 바이러스 감염으로서, 임의로 상기 바이러스가 인플루엔자 또는 코로나바이러스(임의로 코로나바이러스는 COVID-19임) 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 HIV 감염을 일으키는 바이러스(임의로 인플루엔자 A, B 또는 C), 또는 간염 바이러스, 라우스 육종 바이러스(RSV), 파라믹소바이러스과 또는 홍역 바이러스, 파라믹소바이러스 또는 볼거리 바이러스, 단순 포진 바이러스(HSV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 루비바이러스 또는 풍진 바이러스, 엔테로바이러스, 바이러스성 수막염, 리노바이러스, 수두-대상 포진 또는 수두 바이러스, 오르토폭스 바이러스 또는 천연두 또는 천연두 바이러스, 엡스타인-바 바이러스(EBV), 아데노바이러스, 한타바이러스, 플라비바이러스과 또는 뎅기열 바이러스, 지카 바이러스 또는 치쿤구니아 바이러스 감염, 또는 이의 동반 질환을 포함하는, 바이러스 감염, 및/또는

- 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환.

청구항 24

다음은 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 다음의 증증도 또는 지속 기간을 감소시키거나 다음의 증상의 증증도를 감소시키기 위한 방법에 사용하기 위한 제형, 약제학적 조성물 또는 치료적 조합(therapeutic combination)으로서:

- 신경병증성 통증,
- 염증 유발 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 염증 유발 신경병증성 통증이 톨 유사 수용체 4(TLR4) 매개 염증 유발 신경병증성 통증을 포함하는, 염증 유발 신경병증성 통증,
- 신경 또는 CNS 염증으로서, 임의로 상기 신경 또는 CNS 염증이 TLR4 매개 신경 또는 CNS 염증을 포함하는, 신경 또는 CNS 염증,
- 이질통으로서, 임의로 상기 이질통이 TLR4 매개 이질통을 포함하는, 이질통,
- 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증이 외상, 화학요법, 관절염, 당뇨병 또는 바이러스 감염에 의해 생성 또는 유발되거나 이의 후 유증인, 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- 수술 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)(예: 시스플라틴 유발 CIPN 또는 이질통),
- 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 만성 또는 진행성 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 알츠하이머병 또는 만성 외상성 뇌병증(CTE) 또는 관련 타우병증, 외상성 뇌 손상(TBI), 외상 후 스트레스 장애, 외상성 전쟁 신경증 또는 외상 후 스트레스 증후군(PSS),
- 원발성 두통, 임의로 편두통 또는 군발성 두통,
- 통각과민증,
- 녹내장 또는 눈의 다른 염증성 질환,
- 폐 염증 및 천식,
- 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS),
- 패혈증,
- 바이러스 감염으로서, 임의로 상기 바이러스가 인플루엔자 또는 코로나바이러스(임의로 코로나바이러스는 COVID-19임) 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 HIV 감염을 일으키는 바이러스(임의로 인플루엔자 A, B 또는 C), 또는 간염 바이러스, 라우스 육종 바이러스(RSV), 파라믹소바이러스 또는 홍역 바이러스, 파라믹소바이러스 또는 볼거리 바이러스, 단순 포진 바이러스(HSV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 루비바이러스 또는 풍진 바이러스, 엔테로바이러스, 바이러스성 수막염, 리노바이러스, 수두-대상 포진 또는 수두 바이러스, 오르토폭스 바이러스 또는 천연두 또는 천연두 바이러스, 엡스타인-바 바이러스(EBV), 아데노바이러스, 한타바이러스, 플라비바이러스 또는 뎡기열 바이러스, 지카 바이러스 또는 치쿤구냐 바이러스 감염, 또는 이의 동반 질환을 포함하는, 바이러스 감염, 및/또는
- 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환;

상기 제형 또는 치료적 조합이 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 제조합 또는 분리된 폴리펩티드, 제15항 또는 제16항의 제형 또는 약제학적 조성물, 또는 제20항의 제형 또는 치료적 조합을 포함하고,

상기 제형 또는 치료적 조합이 이를 필요로 하는 개체(individual) 또는 환자에게 투여되는, 제형, 약제학적 조성물 또는 치료적 조합.

청구항 25

ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP, 또는 AI-BP) 폴리펩티드의 암호화 (또는 숨겨진, 노출되지 않은, 접근 불가능한) N-말단 TLR4 결합 도메인을 노출시키는 방법으로서,

천연 AIBP 폴리펩티드에 적어도 약 10개 아미노산, 또는 약 5 내지 50개 아미노산 사이, 또는 약 10 내지 100개 아미노산 사이의 이중 아미노 말단 아미노산 서열을 첨가하거나, 또는 약 20 내지 80개 아미노산 사이, 또는 약 30 내지 50개 아미노산 사이를 첨가하거나, 또는 아미노 말단에 wt AIBP에 존재하지 않거나 비-천연(비-AIBP) 아미노산 잔기 또는 펩티드인 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 이상의 아미노산 잔기를 첨가하는 단계를 포함하며,

임의로, 상기 이중 아미노 말단 아미노산 서열이 펩티드 태그를 포함하고, 임의로 상기 펩티드 태그가 다중 히스티딘(다중-his) 태그를 포함하고, 임의로 상기 다중-his 태그가 적어도 6개의 히스티딘(HHHHHH(서열번호 1)), 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 이상의 히스티딘 잔기를 포함하고,

임의로, 상기 이중 아미노 말단 아미노산 서열이 효소 절단 부위를 포함하고, 임의로 상기 효소 절단 부위가 트롬빈 절단 부위를 포함하고,

임의로, 상기 이중 아미노 말단 아미노산 서열이 분비 신호를 포함하고, 임의로 상기 분비 신호가 피브로넥틴 분비 신호, 면역글로불린 중쇄 분비 신호 또는 면역글로불린 카파 경쇄 분비 펩티드 또는 인터루킨-2 신호 펩티드를 포함하고,

임의로, 상기 이중 아미노 말단 아미노산 서열이 아미노산 서열(서열번호 2) MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 특허 협약 조약(PCT) 국제 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에 따라 2021년 3월 18일에 출원된 미국 가출원 번호(USSN) 63/162,714의 우선권의 이점을 주장한다. 전술된 출원은 그 전체가 모든 목적을 위해 참조로 본원에 명시적으로 포함된다. 본원에 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원은 모든 목적을 위해 본원에 참조로 명시적으로 포함된다.

[0003]

정부 권리

[0004]

본 발명은 국립 보건원(NIH)이 수여한 보조금 NS102432, NS104769, HL135737, AI147879 및 HL136275 하의 정부 지원을 받아 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

[0005]

기술분야

[0006]

본 발명은 일반적으로 의학, 염증, 통증 조절 및 세포 생물학에 관한 것이다. 특히, 대안적인 구현예에서, ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP, NAD(P)HX 에피머라제 또는 NAXE로서 공지되기도 함)의 구조를 변형하고 이의 발현 수준을 증가시켜, 신경병증성 통증(neuropathic pain), CNS 염증, 이질통(allodynia), 신경 손상 후 통증(post nerve injury pain), 수술 후 통증(post-surgical pain), 화학요법 유발 말초 신경병증(chemotherapeutic-induced peripheral neuropathy; CIPN)(예: 시스플라틴 유발 이질통), 예를 들어, 신경퇴행성 질환 또는 상태(neurodegenerative disease or condition), 예를 들어, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)을 포함하는 신경퇴행, 통각과민증(hyperalgesia), 원발성 두통(primary headache), 예를 들어, 편두통(migraine) 및 군발성 두통(cluster headache), 녹내장(glaucoma), 폐 염증(lung inflammation) 및 천식(asthma), HIV 감염 및 이의 동반 질환, 및/또는 혈관 염증(vascular inflammation) 및 심혈관 질환(cardiovascular disease)을 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 이의 중증도 및/또는 기간을 감소시키기 위한 방법이 제공된다. 대안적인 구현예에서, 신경병증성 통증, 이질통, 통각과민증, 신경퇴행성 질환 또는 상태, 예를 들어, 알츠하이머병, 원발성 두통, 예를 들어, 편두통, 녹내장 또는 눈의 다른 염증성 질환, 폐 염증 및 천식, 급성 호흡 곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome; ARDS), 패혈증(sepsis), 인플루엔자(influenza), 코로나바이러스(coronavirus)(예: COVID-19) 또는 HIV 감염을 포함한 바이러스 감염 또는 이의 동반 질환 및/또는 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증(atherosclerosis) 및 심혈관 질환을 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 이의 중증도를 감소시키기 위해 인간 또는 포유류 APOA1BP, 펩티도미메틱(peptidomimetic) 또는 합성 APOA1BP 또는 이들의 바이오이소스테어(bioisostere)인 재조합적으로 변형된 APOA1BP 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하는 제형 및 약제학적 조성물의 구조적 변형 및 투여 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

배경 기술

- [0007] 아포지단백 A-I 결합 단백질, 또는 NAXE, NAD(P)HX 에피머라제라고도 하는 ApoA-I 결합 단백질(AIBP)은 apoA-I와 물리적으로 결합하는 단백질의 스크린에서 발견되는 단백질이다.
- [0008] 신경퇴행, 구체적으로 알츠하이머병(AD)의 맥락에서 콜레스테롤 대사의 조절은 부분적으로 *APOE* 다형성과 AD 위험 사이의 강한 연관성으로 인해 충분한 관심을 받았다. 그러나, 만성 통증 상태의 발병 요인으로서 콜레스테롤 조절의 역할은 아직 밝혀지지 않았다. 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)은 암 치료 중 항종양제 사용으로 인한 쇠약해지는 부작용 중 하나이며, 화학요법을 받는 환자의 50% 이상에 영향을 미친다(Seretny et al., 2014). 척수 및 후근 신경절의 신경교 세포 활성화 및 침윤성 면역 세포에 의해 매개되는 신경염증은 CIPN 및 기타 신경병증의 중요한 구성 요소이다(Lees et al., 2017; Makker et al., 2017). 신경교 세포는 염증성 사이토카인, 케모카인 및 생리활성 지질의 분비를 매개하는 toll 유사 수용체 -4(TLR4)를 발현한다(Bruno et al., 2018; Gregus et al., 2018; Papageorgiou et al., 2016). 또한, TLR4 신호전달의 CIPN 관련 활성화가 후근 신경절 통각 수용체에서 보고되었다(Chen et al., 2017; Li et al., 2021). TLR4 또는 이의 신호전달 어댑터 분자 MyD88 및 TRIF의 전신 결핍은 단독으로 또는 조합하여 시스플라틴으로 치료받은 마우스에서 통각과민증 및 이질통을 약화시키고 예방한다(Hu et al., 2018; Pevida et al., 2013; Yan et al., 2019). 그러나, TLR4 활성화가 이질통을 유발하는 세포 유형은 공지되어 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 대안적인 구현예에서, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 또는 키메라 폴리펩티드가 제공되며, 여기서 상기 폴리펩티드는 ApoA-I 결합 단백질(AIBP) 아미노산 서열, 및 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단으로 구성되고(또는 포함하고),
- [0010] 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 적어도 8개의 아미노산으로 구성되거나, AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 길이가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16 이상의 아미노산이고,
- [0011] 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 관련 생리학적 조건하에서 폴리펩티드를 TLR4에 결합시키기 위한 AIBP 아미노산 서열 내의 암호 도메인(cryptic domain)의 전개(unfolding) 또는 노출시키거나, 이를 달리 접근 가능하게 유도할 수 있고,
- [0012] 임의로, "관련 생리학적 조건"은 폴리펩티드 화합물이 투여에 의해 이를 필요로 하는 대상체(subject)에게 제공될 때 생체내에서 경험하게 되는 조건을 지칭하고,
- [0013] 단, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단이 His-태그 및 상기 조건하에서 작용할 때 His-태그의 손실을 초래하는 단백질 분해 절단 부위로 구성되지 않는다.

과제의 해결 수단

- [0014] 대안적인 구현예에서, 단리된 또는 재조합 폴리펩티드 또는 키메라 폴리펩티드는, 본원에 제공된 바와 같다:
- [0015] - AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 약 8 내지 약 40개의 인접 아미노산 잔기(또는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 이상의 인접 아미노산 잔기)로 구성되고, 이 중 약 3개 내지 약 12개, 또는 약 8개 내지 20개, 또는 약 10개 내지 40개 사이의 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 히스티딘(H) 및 리신(K)으로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0016] - AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단의 N-말단은 분비 신호 아미노산 서열이거나 이를 포함하며, 임의로 상기 분비 신호 아미노산 서열은 피브로넥틴 분비 신호 도메인, 면역글로불린 중쇄 분비 신호 도메인, 면역글로불린 카파 경쇄 분비 신호 도메인, 또는 인터루킨-2 신호 펩티드 분비 신호 도메인이고(또는 이를 포함하고), 임의로 상기 피브로넥틴 분비 신호 도메인은 MLRGPGPGRLLLLAVLCLGTSVRCETETGSKR(서열번호 24)이고;
- [0017] - AIBP 서열은 hAIBP(서열번호 6, 또는 서열번호 5에 의해 인코딩(encoding)됨) 또는 d24hAIBP(서열번호 21, 또는 서열번호 20에 의해 인코딩됨)이고;
- [0018] - AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 약 6개 또는 약 5 내지 40개 사이의 연속 히스티딘 아미

노산 잔기(예: HHHHHH(서열번호 1)), AIBP 아미노산 서열의 TLR4 결합 도메인에 대한 N-말단으로 구성되고;

- [0019] - 폴리펩티드는 ApoA-I 결합 단백질 서열의 TLR4 결합 도메인의 N-말단 사이에 개재(intervening)하는 트롬빈 절단 도메인을 갖고(또는 포함하고), 여기서 트롬빈 절단 도메인은 기능적으로 작동 불가능하게 되도록 이 도메인 내에 하나 이상의 아미노산 결실 및/또는 돌연변이를 갖고;
- [0020] - AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 MSPIDPMGHHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR(서열번호 2) 또는 MSPIDPMGHHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSDGDDGDDDR(서열번호 19)이며, 각각은 기능적으로 작동 불가능하게 되도록 이의 트롬빈 절단 도메인의 아미노산 돌연변이를 갖고;
- [0021] - AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은
- [0022] TETGKSKR(서열번호 26);
- [0023] MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKLAANS(서열번호 33), 또는
- [0024] MSPIDPMGHHHHHHGRRRASVAAGILVPAASPGLDGICSR(서열번호 7)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
- [0025] - AIBP 아미노산 서열은 포유류 AIBP 아미노산 서열의 (또는 그로부터 유래된) 서열이고, 임의로, 상기 포유류 AIBP 아미노산 서열은 인간 AIBP 아미노산 서열의 (또는 그로부터 유래된) 서열이고/이거나;
- [0026] - 인간 AIBP 아미노산 서열은 NCBI 참조 서열: NP_658985.2를 갖는 288개 아미노산 잔기의 전장(full-length) 아미노산 서열이거나(또는 이를 포함하거나), 임의로 인간 AIBP 아미노산 서열은 상기 AIBP 아미노산 서열에서 아미노산 1-24가 결실된 NCBI 참조 서열: NP_658985.2를 갖는 인간 AIBP 아미노산 서열이다.
- [0027] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 폴리펩티드 화합물, 및 비경구 투여에 적합한 (비경구 투여를 위해 제형화된) 적어도 하나의 부형제(excipient)로 구성되는(또는 이를 포함하는) 약제학적 조성물 또는 제형이 제공된다. 대안적인 구현예에서, 비경구 투여는 척수강내 주사 또는 척수강내 임플란트, 또는 정맥내 또는 안구내 주사에 의해 이루어진다.
- [0028] 대안적인 구현예에서, 핵산이 제공되며, 여기서 핵산 화합물은 본원에 제공된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열로 구성된다(또는 포함한다).
- [0029] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열로 구성된 (또는 이를 포함하거나 이에 함유된) 발현 벡터(expression vector)가 제공된다. 발현 벡터는 재조합 아데노바이러스 또는 재조합 렌티바이러스와 같은 재조합 바이러스일 수 있다.
- [0030] 대안적인 구현예에서, ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP)을 첨가하거나 이의 수준을 증가시킴으로써 대상체에서 다음을 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 다음의 중증도 또는 지속 기간을 감소시키거나 다음의 증상의 중증도를 감소시키기 위한 방법 및 용도가 제공되고:
- [0031] - 신경병증성 통증,
- [0032] - 염증 유발 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 염증 유발 신경병증성 통증이 톨 유사 수용체 4(TLR4) 매개 염증 유발 신경병증성 통증을 포함하는, 염증 유발 신경병증성 통증,
- [0033] - 신경 또는 CNS 염증으로서, 임의로 상기 신경 또는 CNS 염증이 TLR4 매개 신경 또는 CNS 염증을 포함하는, 신경 또는 CNS 염증,
- [0034] - 이질통으로서, 임의로 상기 이질통이 TLR4 매개 이질통을 포함하는, 이질통,
- [0035] - 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증이 외상(trauma), 화학요법(chemotherapy), 관절염(arthritis), 당뇨병(diabetes) 또는 바이러스 감염에 의해 생성 또는 유발되거나 이의 후유증(sequelae)인, 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- [0036] - 수술 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- [0037] - 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)(예: 시스플라틴 유발 CIPN 또는 이질통),
- [0038] - 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 만성 또는 진행성 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 알츠하이머병 또는 만성 외상성 뇌병증(Chronic Traumatic Encephalopathy; CTE) 또는 관련 타우병증(tauopathy), 외상성 뇌 손상

(traumatic brain injury; TBI), 외상 후 스트레스 장애(posttraumatic stress disorder), 외상성 전쟁 신경증(traumatic war neurosis) 또는 외상 후 스트레스 증후군(post-traumatic stress syndrome; PTSS),

- 원발성 두통, 임의로 편두통 또는 군발성 두통,

- 통각과민증,

- 녹내장 또는 눈의 다른 염증성 질환,

- 폐 염증 및 천식,

- 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS),

- 패혈증,

- 바이러스 감염으로서, 임의로 상기 바이러스가 인플루엔자 또는 코로나바이러스(임의로 코로나바이러스는 COVID-19임) 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 HIV 감염을 일으키는 바이러스(임의로 인플루엔자 A, B 또는 C), 또는 간염 바이러스(hepatitis virus), 라우스 육종 바이러스(rous sarcoma virus; RSV), 파라믹소바이러스과(*Paramyxoviridae*) 또는 홍역 바이러스(measles virus), 파라믹소바이러스(*Paramyxovirus*) 또는 볼거리 바이러스(mumps virus), 단순 포진 바이러스(*Herpes simplex virus*; HSV), 사이토메갈로바이러스(*Cytomegalovirus*; CMV), 루비바이러스(*Rubivirus*) 또는 풍진 바이러스(rubella virus), 엔테로바이러스(*Enterovirus*), 바이러스성 수막염(viral meningitis), 리노바이러스(rhinovirus), 수두-대상 포진(varicella-zoster) 또는 수두 바이러스(chickenpox virus), 오르토폭스바이러스(*Orthopoxvirus*) 또는 천연두(variola) 또는 천연두 바이러스(smallpox virus), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus; EBV), 아데노바이러스(*Adenovirus*), 한타바이러스(*Hantavirus*), 플라비바이러스과(*Flaviviridae*) 또는 뎡기열 바이러스(Dengue virus), 지카 바이러스(Zika virus) 또는 치쿤구니야 바이러스 감염(chikungunya virus infection) 또는 이의 동반 질환을 포함하는, 바이러스 감염, 및/또는

- 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환;

상기 방법은 다음을 포함한다:

(a) (i) 적어도 약 10개의 아미노산, 또는 약 5 내지 20개 아미노산 사이, 또는 약 10 내지 100개 아미노산 사이, 또는 약 20 내지 80개 아미노산 사이, 또는 약 30 내지 50개 아미노산 사이의 이중 (또는 비-천연, 또는 비-AIBP, 또는 비-야생형(wt), 또는 야생형(wt) AIBP에 존재하지 않는 임의의 서열) 아미노 말단 아미노산 서열을 갖거나, AIBP 아미노 말단에 wt AIBP에 존재하지 않거나 비-천연(AIBP에 대해) 아미노산 잔기 또는 펩티드(본원에 제공된 AIBP 변이체(variant)로 지칭되기도 함)인 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 이상의 아미노산 잔기를 갖는 재조합 또는 합성 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 화합물 또는 조성물로서,

임의로, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단이 His-태그 및 생리적 조건(예: 세포 환경 또는 등가물, 또는 세포내)에서 작용할 때 His-태그의 손실을 초래하는 단백질 분해 절단 부위로 구성되어 있지 않고,

임의로, 이중 (또는 비야생형 또는 비천연) 아미노 말단 아미노산 서열(또는 아미노산 잔기)은 펩티드 태그를 포함하고, 임의로 펩티드 태그는 다중 히스티딘(다중-his) 태그를 포함하며, 임의로 다중-his 태그는 6개의 히스티딘(HHHHHH (서열번호 1)), 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 이상의 히스티딘 잔기를 포함하며,

임의로, 이중(또는 비야생형) 아미노 말단 아미노산 서열은 효소 절단 부위를 포함하고, 임의로 효소 절단 부위는 트롬빈 절단 부위를 포함하고,

임의로, 이중(또는 비야생형) 아미노 말단 아미노산 서열은 분비 신호를 포함하고, 임의로 분비 신호는 피브로넥틴 분비 신호(예: 서열번호 24), 면역글로불린 중쇄 분비 신호 또는 면역글로불린 카파 경쇄 분비 펩티드 또는 인터루킨-2 신호 펩티드를 포함하고,

임의로, 이중(또는 비야생형) 아미노 말단 아미노산 서열은 아미노산 서열 MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR (서열번호 2)을 포함하고,

본원에 제공된 이러한 모든 AIBP 변이체(또는, wt AIBP에 존재하지 않는 아미노 말단 서열을 또한 포함하거나

이중 아미노 말단 펩티드 또는 아미노산 잔기를 포함하는 모든 AIBP 아미노산)는 생리적 조건에서 아미노산 25-51로 구성된 AIBP 분자의 암호화 도메인을 전개 또는 노출시키거나 접근 가능하게 할 수 있거나 그러한 목적을 제공할 수 있고, 이는 톨 유사 수용체-4(TLR4) 폴리펩티드에 대한 AIBP 결합을 매개하는(즉, 본원에 제공된 AIBP 변이체는 세포의 환경에 노출된 TLR4 결합 도메인을 가져 본원에 제공된 AIBP 변이체가 생리적 조건하에서 TLR4 폴리펩티드에 결합할 수 있도록 한다), 재조합 또는 합성 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 화합물 또는 조성물;

- [0055] (ii) (i)의 APOA1BP 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 핵산으로서,
- [0056] 임의로, APOA1BP 폴리펩티드 또는 APOA1BP 폴리펩티드 활성을 갖는 폴리펩티드를 발현 또는 인코딩하는 핵산이 발현 비히클, 벡터, 재조합 바이러스 또는 등가물에 함유되어 있고,
- [0057] 임의로, 벡터 또는 바이러스는 아데노바이러스 벡터 또는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터, 레트로바이러스, 렌티바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 합성 벡터이거나 이들을 포함하고,
- [0058] 임의로, AAV 벡터는
- [0059] 아데노 관련 바이러스(AAV) 또는 아데노바이러스 벡터,
- [0060] AAV 혈청형 또는 변이체 AAV5, AAV6, AAV8 또는 AAV9, AAV-DJ 또는 AAV-DJ/8TM(Cell Biolabs, Inc.; 캘리포니아 주 샌디에이고 소재),
- [0061] 레서스 유래(rhesus-derived) AAV 또는 레서스 유래 AAV AAVrh.10hCLN2,
- [0062] AAV 캡시드 돌연변이체(mutant) 또는 AAV 하이브리드 혈청형,
- [0063] 기관-친화성 AAV, 심장친화성 AAV 또는 심장친화성 AAVM41 돌연변이체를 포함하거나, 이들이고,
- [0064] 임의로, AAV는 야생형(wt) AAV에 허용되지 않는 특정 세포 유형을 표적화하는 효율성을 증가시키고/시키거나 관심 세포 유형만 감염시키는 효능을 개선하도록 조작(engineering)되고,
- [0065] 임의로, 하이브리드 AAV는 1) 트랜스캡시드화, 2) 캡시드 표면에 이중특이적 항체의 흡착, 3) 모자이크(mosaic) 캡시드 조작 및/또는 4) 키메라 캡시드 조작을 포함하는 하나 이상의 변형에 의해 하이브리드 혈청형으로서 재표적화(retargeting)되거나 조작되는, 재조합 핵산;
- [0066] (iii) (i)의 재조합 또는 합성 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 (ii)의 재조합 핵산을 포함하는 제형 또는 약제학적 조성물로서, 임의로, 상기 재조합 또는 합성 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 또는 단백질이 인간 또는 포유류 APOA1BP, 또는 AIBP1 또는 AIBP2 서열의 전부 또는 일부이거나 이를 포함하는, 제형 또는 약제학적 조성물;
- [0067] (iv) 생체내 투여용으로 제형화되거나; 장 또는 비경구 투여용으로 제형화되거나, 경구, 정맥내(IV) 또는 척수강내(IT) 투여용으로 제형화된 (iii)의 제형 또는 약제학적 조성물로서,
- [0068] 임의로, 제형 또는 약제학적 조성물, 또는 재조합, 펩티도미메틱 또는 합성 APOA1BP, 또는 APOA1BP의 바이오이소스테어, 또는 APOA1BP를 인코딩하는 핵산, 또는 APOA1BP를 인코딩하는 핵산이 그 안에 함유된 벡터가 나노 입자, 입자, 미셀 또는 리포솜 또는 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스 또는 덴드리머로 운반되며, 임의로 세포 또는 CNS 침투 모이어티 또는 펩티드 또는 CNS 표적 모이어티 또는 펩티드를 추가로 포함하거나 발현할 수 있는, 제형 또는 약제학적 조성물; 또는
- [0069] (v) 나노 입자, 리포솜, 정제, 환제, 캡슐, 젤, 젤탭(gel tab), 액체, 분말, 에멀전, 로션, 에어로졸, 스프레이, 로젠지, 수성 또는 멸균 또는 주사 가능한 용액 또는 임플란트(예: 척수강내 임플란트)로 제형화된, (iii) 내지 (iv) 중 어느 하나의 제형 또는 약제학적 조성물을 포함하는 제형 또는 약제학적 조성물을 제공하는 단계; 및
- [0070] (b) (a)(i)의 재조합 또는 합성 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 (a)(ii)의 재조합 핵산, 또는 (a)(iii) 또는 (a)(iv)의 제형 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체 또는 개체(individual)에게 투여함으로써, 다음을 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 다음의 중증도 또는 지속 기간을 감소시키거나 다음의 증상의 중증도를 감소시키는 단계로서, 임의로 상기 대상체 또는 개체가 포유류, 인간 또는 동물인, 단계를 포함한다:
- [0071] - 신경병증성 통증,

- [0072] - 염증 유발 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 염증 유발 신경병증성 통증이 툴 유사 수용체 4(TLR4) 매개 염증 유발 신경병증성 통증을 포함하는, 염증 유발 신경병증성 통증,
- [0073] - 신경 또는 CNS 염증으로서, 임의로 상기 신경 또는 CNS 염증이 TLR4 매개 신경 또는 CNS 염증을 포함하는, 신경 또는 CNS 염증,
- [0074] - 이질통으로서, 임의로 상기 이질통이 TLR4 매개 이질통을 포함하는, 이질통,
- [0075] - 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증이 외상, 화학요법, 관절염, 당뇨병 또는 바이러스 감염에 의해 생성 또는 유발되거나 이의 후 유증인, 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- [0076] - 수술 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- [0077] - 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)(예: 시스플라틴 유발 CIPN 또는 이질통),
- [0078] - 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 만성 또는 진행성 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 알츠하이머병 또는 만성 외상성 뇌병증(CTE) 또는 관련 타우병증, 외상성 뇌 손상(TBI), 외상 후 스트레스 장애, 외상성 전쟁 신경증 또는 외상 후 스트레스 증후군(PTSS),
- [0079] - 원발성 두통, 임의로 편두통 또는 군발성 두통,
- [0080] - 통각과민증,
- [0081] - 녹내장 또는 눈의 다른 염증성 질환,
- [0082] - 폐 염증 및 천식,
- [0083] - 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS),
- [0084] - 패혈증,
- [0085] - 바이러스 감염으로서, 임의로 상기 바이러스가 인플루엔자 또는 코로나바이러스(임의로 코로나바이러스는 COVID-19임) 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 HIV 감염을 일으키는 바이러스(임의로 인플루엔자 A, B 또는 C), 또는 간염 바이러스, 라우스 육종 바이러스(RSV), 파라믹소바이러스 또는 홍역 바이러스, 파라믹소바이러스 또는 볼거리 바이러스, 단순 포진 바이러스(HSV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 루비바이러스 또는 풍진 바이러스, 엔테로바이러스, 바이러스성 수막염, 리노바이러스, 수두-대상 포진 또는 수두 바이러스, 오르토폭스 바이러스 또는 천연두 또는 천연두 바이러스, 엡스타인-바 바이러스(EBV), 아데노바이러스, 한타바이러스, 플라비바이러스 또는 뎡기열 바이러스, 지카 바이러스 또는 치쿤구니야 바이러스 감염을 포함하는, 바이러스 감염, 및/또는
- [0086] - 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환.
- [0087] 대안적인 구현예에서, 재조합 또는 합성 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 또는 단백질; 재조합 핵산; 및/또는 본원에 제공된 방법에 사용된 제형 또는 약제학적 조성물을 포함하고, 임의로 본원에 제공된 방법의 실시와 관한 설명서를 포함하는 키트(kit)가 제공된다.
- [0088] 대안적인 구현예에서, 의약의 제조에서 본원에 제공된 제형 또는 약제학적 조성물의 용도가 제공된다.
- [0089] 대안적인 구현예에서, 다음을 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 다음의 증증도 또는 지속 기간을 감소시키거나 다음의 증상의 증증도를 감소시키기 위한 의약의 제조에서 본원에 제공된 제형 또는 약제학적 조성물의 용도가 제공된다:
- [0090] - 신경병증성 통증,
- [0091] - 염증 유발 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 염증 유발 신경병증성 통증이 툴 유사 수용체 4(TLR4) 매개 염증 유발 신경병증성 통증을 포함하는, 염증 유발 신경병증성 통증,
- [0092] - 신경 또는 CNS 염증으로서, 임의로 상기 신경 또는 CNS 염증이 TLR4 매개 신경 또는 CNS 염증을 포함하는, 신경 또는 CNS 염증,
- [0093] - 이질통으로서, 임의로 상기 이질통이 TLR4 매개 이질통을 포함하는, 이질통,

- [0094] - 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증이 외상, 화학요법, 관절염, 당뇨병 또는 바이러스 감염에 의해 생성 또는 유발되거나 이의 후 유증인, 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- [0095] - 수술 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- [0096] - 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)(예: 시스플라틴 유발 CIPN 또는 이질통),
- [0097] - 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 만성 또는 진행성 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 알츠하이머병 또는 만성 외상성 뇌병증(CTE) 또는 관련 타우병증, 외상성 뇌 손상(TBI), 외상 후 스트레스 장애, 외상성 전쟁 신경증 또는 외상 후 스트레스 증후군(PTSS),
- [0098] - 원발성 두통, 임의로 편두통 또는 군발성 두통,
- [0099] - 통각과민증,
- [0100] - 녹내장 또는 눈의 다른 염증성 질환,
- [0101] - 폐 염증 및 천식,
- [0102] - 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS),
- [0103] - 패혈증,
- [0104] - 바이러스 감염으로서, 임의로 상기 바이러스가 인플루엔자 또는 코로나바이러스(임의로 코로나바이러스는 COVID-19임) 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 HIV 감염을 일으키는 바이러스(임의로 인플루엔자 A, B 또는 C), 또는 간염 바이러스, 라우스 육종 바이러스(RSV), 파라믹소바이러스과 또는 홍역 바이러스, 파라믹소바이러스 또는 볼거리 바이러스, 단순 포진 바이러스(HSV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 루비바이러스 또는 풍진 바이러스, 엔테로바이러스, 바이러스성 수막염, 리노바이러스, 수두-대상 포진 또는 수두 바이러스, 오르토폭스 바이러스 또는 천연두 또는 천연두 바이러스, 엡스타인-바 바이러스(EBV), 아데노바이러스, 한타바이러스, 플라비바이러스과 또는 뎡기열 바이러스, 지카 바이러스 또는 치쿤구니아 바이러스 감염, 또는 이의 동반 질환을 포함하는, 바이러스 감염, 및/또는
- [0105] - 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환.
- [0106] 대안적인 구현예에서, 다음을 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 다음의 중증도 또는 지속 기간을 감소시키거나 다음의 증상의 중증도를 감소시키기 위한 방법에 사용하기 위한 제형, 약제학적 조성물 또는 치료적 조합(therapeutic combination)이 제공되며:
- [0107] - 신경병증성 통증,
- [0108] - 염증 유발 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 염증 유발 신경병증성 통증이 톨 유사 수용체 4(TLR4) 매개 염증 유발 신경병증성 통증을 포함하는, 염증 유발 신경병증성 통증,
- [0109] - 신경 또는 CNS 염증으로서, 임의로 상기 신경 또는 CNS 염증이 TLR4 매개 신경 또는 CNS 염증을 포함하는, 신경 또는 CNS 염증,
- [0110] - 이질통으로서, 임의로 상기 이질통이 TLR4 매개 이질통을 포함하는, 이질통,
- [0111] - 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증으로서, 임의로 상기 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증이 외상, 화학요법, 관절염, 당뇨병 또는 바이러스 감염에 의해 생성 또는 유발되거나 이의 후 유증인, 신경 또는 조직 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- [0112] - 수술 후 통증 또는 신경병증성 통증,
- [0113] - 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)(예: 시스플라틴 유발 CIPN 또는 이질통),
- [0114] - 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 만성 또는 진행성 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 알츠하이머병 또는 만성 외상성 뇌병증(CTE) 또는 관련 타우병증, 외상성 뇌 손상(TBI), 외상 후 스트레스 장애, 외상성 전쟁 신경증 또는 외상 후 스트레스 증후군(PTSS),
- [0115] - 원발성 두통, 임의로 편두통 또는 군발성 두통,

- [0116] - 통각과민증,
- [0117] - 녹내장 또는 눈의 다른 염증성 질환,
- [0118] - 폐 염증 및 천식,
- [0119] - 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS),
- [0120] - 패혈증,
- [0121] - 바이러스 감염으로서, 임의로 상기 바이러스가 인플루엔자 또는 코로나바이러스(임의로 코로나바이러스는 COVID-19임) 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 HIV 감염을 일으키는 바이러스(임의로 인플루엔자 A, B 또는 C), 또는 간염 바이러스, 라우스 육종 바이러스(RSV), 파라믹소바이러스와 또는 홍역 바이러스, 파라믹소바이러스 또는 볼거리 바이러스, 단순 포진 바이러스(HSV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 루비바이러스 또는 풍진 바이러스, 엔테로바이러스, 바이러스성 수막염, 리노바이러스, 수두-대상 포진 또는 수두 바이러스, 오르토폭스 바이러스 또는 천연두 또는 천연두 바이러스, 엡스타인-바 바이러스(EBV), 아데노바이러스, 한타바이러스, 플라비바이러스와 또는 뎅기열 바이러스, 지카 바이러스 또는 치쿤구니아 바이러스 감염, 또는 이의 동반 질환을 포함하는, 바이러스 감염, 및/또는
- [0122] - 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환;
- [0123] 여기서, 상기 제형 또는 치료적 조합은 본원에 제공된 바와 같은 제형 또는 치료적 조합을 포함하며,
- [0124] 상기 제형 또는 치료적 조합은 이를 필요로 하는 개체 또는 환자에게 투여된다.
- [0125] 대안적인 구현예에서, 이는 천연 (또는 야생형) AIBP 폴리펩티드에 적어도 약 10개 아미노산, 또는 약 5 내지 50개 아미노산 사이, 또는 약 10 내지 100개 아미노산 사이, 또는 약 20 내지 80개 아미노산 사이, 또는 약 30 내지 50개 아미노산 사이의 이중 (또는 비천연 또는 비야생형) 아미노 말단 아미노산 서열을 첨가하는 단계 또는 AIBP 아미노 말단에 wt AIBP에 존재하지 않거나 비천연(비-AIBP) 아미노산 잔기 또는 펩티드인 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 이상의 아미노산 잔기를 첨가하는 단계를 포함하는, ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP, 또는 AI-BP) 폴리펩티드의 암호 (또는 숨겨진, 노출되지 않은, 접근 불가능한) N-말단 TLR4 결합 도메인을 노출시키는 방법이 제공되며,
- [0126] 임의로, 이중 아미노 말단 아미노산 서열은 펩티드 태그를 포함하고, 임의로 펩티드 태그는 다중 히스티딘(다중-his) 태그를 포함하고, 임의로 다중-his 태그는 적어도 6개의 히스티딘(HHHHHH(서열번호 1)), 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 이상의 히스티딘 잔기를 포함하고,
- [0127] 임의로, 이중 아미노 말단 아미노산 서열은 효소 절단 부위를 포함하고, 임의로 효소 절단 부위는 트롬빈 절단 부위를 포함하고,
- [0128] 임의로 이중 아미노 말단 아미노산 서열은 분비 신호를 포함하고, 임의로 분비 신호는 피브로넥틴 분비 신호, 면역글로불린 중쇄 분비 신호 또는 면역글로불린 카파 경쇄 분비 펩티드 또는 인터루킨-2 신호 펩티드를 포함하고,
- [0129] 임의로, 이중 아미노 말단 아미노산 서열은 아미노산 서열 MSPIDPMGHHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR(서열번호 2)을 포함한다.
- [0130] 대안적인 구현예에서, 폴리펩티드 화합물이 제공되며, 여기서 폴리펩티드 화합물은 ApoA-I 결합 단백질(AIBP) 아미노산 서열, 및 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단으로 구성되고, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 적어도 8개의 아미노산, 또는 4 내지 12개의 아미노산, 또는 5 내지 10개의 아미노산으로 구성되며, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 관련 생리학적 조건하에서 TLR4에 폴리펩티드를 결합시키기 위한 AIBP 아미노산 서열의 암호화 도메인을 전개 또는 노출시키거나, 이를 달리 접근 가능하게 함을 유도할 수 있고, 단, 상기 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 His-태그 및 상기 생리학적 조건하에서 작용될 때 His-태이의 손실을 초래하는 단백질 분해 절단 부위로 구성되지 않는다.
- [0131] 대안적인 구현예에서, 이를 필요로 하는 대상체에게 본원에 제공된 폴리펩티드 화합물 또는 핵산 화합물을 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 제공함으로써 TLR4 매개 질환 또는 상태를 치료, 개선, 예방, 역전시키거나 다음의 중증도 또는 지속 기간을 감소시키기 위한 방법이 제공되며, 여기서 핵산 화합물의 핵산 서열은 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열을 인코딩하고,

[0132] TLR4 매개 질환 또는 상태는 염증 유발 통증, CNS 염증 질환 및 상태, 관절염, 신경퇴행성 질환 및 상태, 이질통, 통각과민증, 폐 염증 질환 또는 상태, 안구 염증 질환 및 상태, 폐혈증, 혈관 염증 질환 및 상태, 외상 후 스트레스 장애, 외상성 전쟁 신경증, 외상 후 스트레스 증후군(PTSS) 및 바이러스 감염에 의해 생성 또는 유발되는 질환 또는 상태, 또는 이의 후유증을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0133] 본 발명의 하나 이상의 구현예에 대한 상세함은 첨부된 도면 및 아래의 설명에 제시되어 있다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 설명 및 도면, 청구범위로부터 명백해질 것이다.

[0134] 본원에 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원은 각 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참조로 표시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 명시적으로 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0135] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 실행된 적어도 하나의 도면을 함유한다. 컬러 도면(들)을 갖는 본 특허 또는 특허 출원 간행물의 사본은 요청 및 필요한 수수료 지불시 특허청이 제공할 것이다.

본원에 제시된 도면은 본원에 제공된 구현예를 예시하는 것이며, 청구범위에 의해 포함되는 본 발명의 범위를 제한하는 것을 의미하지 않는다.

도 1A-F는 화학요법 유발 말초 신경병증이 척추 미세아교세포에서 TLR4 이량체화 및 지질 뗏목(lipid raft)을 변화시키고, AIBP에 의한 역전을 변화시킴을 나타내는 데이터를 도시한다:

도 1A는 복강내(i.p.) 시스플라틴(2.3mg/kg/일 2회 주사), 이어서 척수강내(i.t.) 식염수(5 μ l) 또는 AIBP(0.5 μ g/5 μ l)의 단일 투여에 대한 반응으로 야생형(WT) 마우스; 주사가 투여되지 않은 나이브 마우스의 회피 역치(withdrawal threshold)를 나타내는 데이터를 그래프로 도시하고;

도 1B-C는 i.t. 식염수 또는 AIBP 24시간 후, 즉 도 1A에 도시된 시간 경과와 8일째에 TLR4 이량체화(도 1B)와 CTxB 염색으로 측정된 지질 뗏목 함량(도 1C)을 나타내는 척추 미세아교세포의 CD11b⁺/TMEM119⁺의 분석을 나타내는 데이터를 그래프로 도시하고;

도 1C는 완전 배지에서 AIBP(0.2 μ g/mL) 또는 비히클과 함께 30분 동안 배양한 후, LPS(100ng/mL)와 함께 5분 배양한 BV-2 미세아교세포(왼쪽 패널)의 이미지를 도시하고, LPS 및/또는 AIBP 유무에 따른 맨더스 계수(Manders' coefficient)(공동 국소화 분석)를 나타내는 데이터를 그래프로 도시하고(오른쪽 패널);

도 1E-F는 CSF(도 1E)와 요추 척수(도 1F)의 시간 경과에 따른 AIBP 수준을 나타내는 데이터를 그래프로 도시하며, 이하 실시예 1에서 상세히 논의되는 바와 같다.

도 2A-C는 CIPN 마우스의 척추 미세아교세포에서 유전자 발현을 보여주는 데이터를 도시한다:

도 2A-B는 미세아교세포(CD11b⁺TMEM119⁺)가 도 1A에 표시된 3개 그룹에서 FACS 분류된 연구 데이터를 도시하고,

도 1A는 모든 샘플에 대한 DEG의 히트맵 플롯의 이미지를 도시하고;

도 1B는 유의한 DEG의 그룹이 상이한 치료 조건에서 발현 프로파일 패턴에 기초하여 클러스터링되었음을 나타내는 데이터를 그래프로 도시하고;

도 1C는 시스플라틴 치료에 의해 유도된 상향조절(오른쪽 패널의 그룹 1) 및 하향조절(왼쪽 패널의 그룹 2) 유전자의 경로 및 GO 농축 분석을 나타내는 데이터를 그래프로 도시하고, 상향조절 경로는 오른쪽 패널의 "그룹 1"(빨간색)에, 하향조절 경로는 왼쪽 패널의 "그룹 2"(파란색)에 표시되어 있고, 이하 실시예 1에 상세히 논의되는 바와 같다.

도 3A-H는 CIPN 마우스의 척추 미세아교세포에서 질환 관련 미세아교세포(DAM) 및 지질 관련 유전자 발현과 지질 액적을 나타내는 데이터를 도시한다:

도 3A-C는 도 2와 동일한 그룹을 도시한다: 도 3A는 시스플라틴 처리 마우스 대 나이브 마우스의 척추 미세아교세포에서 상향조절 및 하향조절 유전자의 화산 플롯의 이미지를 도시하고; 도 3B는 질병 관련 미세아교세포(DAM) 시그니처 유전자를 묘사하는 히트맵의 이미지를 도시하고; 도 3B는 지질 관련 유전자 세트를 나타내는 행에 의해 스케일링된 log2 정규화된 유전자 계수의 히트맵의 이미지를 도시하고;

도 3D-H는 도 3D가 도시하는 IBA1 및 DAPI로 공동염색된 척추 절편에서 PLIN2 면역염색에 의해 측정된 척추 미세아교세포에서의 지질 액적 축적을 나타내는 데이터를 그래프로 도시하며; 도 3E는 시스플라틴 및/또는 AIBP의 유무에 따라 필드당 총 IBA1+ 세포의 IBA1+/PLIN2+ 세포를 그래프로 도시하고; 도 3F는 AIBP 유무에 따른 평균 LD 수/세포를 그래프로 도시하고; 도 3G는 시스플라틴 및/또는 AIBP 유무에 따른 평균 LD 크기를 그래프로 도시하고; 도 3H는 AIBP 유무에 따른 정규화된 Plin2 유전자 계수를 그래프로 도시하며, 이하 실시예 1에 상세하게 논의되는 바와 같다.

도 4A-H는 CIPN 마우스의 척추 미세아교세포에서 유전자 발현과 AIBP의 효과를 보여주는 데이터를 도시한다:

도 4A는 AIBP에 의해 하향조절된 CIPN 상향조절 유전자(도 2B의 그룹 3 참조)와 AIBP에 의해 상향조절된 CIPN 하향조절 유전자(그룹 4)의 경로 및 유전자 온톨로지(GO) 농축 분석을 도시하고;

도 4B는 i.t. AIBP, 시스플라틴/AIBP 대 시스플라틴/식염수 처리 마우스에서 상향 및 하향조절된 유전자의 화산 플롯에 의해 척추 미세아교세포에서 차등 발현된 유전자(DEG)를 도시하고;

도 4C는 CIPN에서 상향조절되고 AIBP에 의해 하향조절되는 그룹 3의 염증 유전자의 히트맵을 도시하고;

도 4D는 WT 나이브, 시스플라틴/식염수 및 시스플라틴/AIBP 그룹의 척추 조직에서 사이토카인 단백질 발현을 보여주는 데이터를 그래프로 도시하고;

도 4E는 시스플라틴에 의해 유도되지 않지만 AIBP에 의해 하향조절되는 염증 유전자의 히트맵을 도시하고;

도 4F는 AIBP에 의해 하향조절된 모든 유전자의 경로 및 GO 농축 분석을 그래프로 도시하고;

도 4G는 가장 풍부한 경로: 펩티다제 억제제 활성 경로에 포함된 AIBP에 의해 하향조절된 비염증 유전자의 히트맵을 도시하고;

도 4H는 CIPN에서의 하향조절이 AIBP에 의해 역전된 유전자의 히트맵을 도시하고, 아래 실시예 1에서 상세하게 논의된 바와 같다.

도 5A-J는 미세아교세포에서 ABCA1 및 ABCG1 발현이 통각을 조절하며, CIPN 마우스 모델에서 이질통의 AIBP 매개 역전에 필요함을 보여주는 데이터를 도시한다:

도 5A-B는 완전 배지에서 AIBP(0.2 µg/mL) 또는 비히클과 함께 30분 동안 배양한 후 LPS(100ng/mL)와 함께 5분 배양한 BV-2 세포의 데이터를 보여주는 데이터를 도시하며, 지질 뗏목에서 ABCA1(도 5A) 및 APOA1(도 5B)에 의한 접근 가능한 콜레스테롤의 공동 국소화를 나타내며;

도 5C는 마우스에 타목시펜, 시스플라틴, AIBP 또는 식염수 주사의 예시적인 실험 설계 및 타임라인을 개략적으로 도시하고;

도 5D는 시스플라틴 개재 시작 전 기준선(0일) 회피 역치를 보여주는 데이터를 그래프로 도시하고;

도 5E는 두 그룹의 TLR4 표면 발현 및 지질 뗏목 함량 분석에 대해 기준선(0일째)(n=5)에서 나이브 WT 및 ABC-imKO 마우스의 CD11b⁺TMEM119⁺ 척추 미세아교세포에서 TLR4 표면 발현과 이량체화 및 지질 뗏목(CTXB)을 보여주는 데이터를 그래프로 도시하고;

도 5F는 TAM 유도 ABC-imKO 마우스에서 i.t. 식염수 또는 AIBP(0.5 µg/5 µl)에 이어, i.t. LPS(0.1 µg/5 µl) 후 회피 역치를 보여주는 데이터를 그래프로 도시하고;

도 5G-H는 TAM 유도 ABC-imKO(도 5G) 및 비유도(비히클) ABC-imKO(도 5H) 마우스에서 i.p. 시스플라틴 및 i.t. 식염수 또는 AIBP(0.5 µg/5 µl) 주사 후 회피 역치를 나타내는 데이터를 그래프로 도시하고;

도 5I-J는 패널 도 5G 및 도 5H에 표시된 그룹에서 8일째에 CD11b⁺TMEM119⁺ 척추 미세아교세포에서의 TLR4 이량체화(도 5I) 및 지질 뗏목(도 5J)을 보여주는 데이터를 그래프로 도시하고, 아래 실시예 1에서 상세하게 논의된 바와 같다.

도 6A-G는 ABC-imKO 마우스의 척추 미세아교세포에서의 발현을 보여주는 데이터를 도시한다:

도 6A 상단 이미지는 시스플라틴으로 처리된 마우스에서 나이브 ABC-imKO 미세아교세포에서 유도되고 WT 미세아교세포와 공유되는 중복 유전자 및 경로를 개략적으로 도시하고, 중첩 유전자를 연결하는 보라색(더 어두움, 위쪽) 선과 중첩 농축 경로를 연결하는 파란색(더 밝음, 아래쪽) 선으로 나타냈고, 도 6A 하단 이미지는 WT 시스

플라틴 및 ABC-imKO 나이브 마우스의 척추 미세아교세포의 상향조절된 유전자의 벤 다이어그램이며;

도 6B는 미세아교세포에서 ABCA1 및 ABCG1 녹다운에 의해 유도된 상향 및 하향조절 유전자의 농축 경로 분석을 도시하고;

도 6C는 TAM 유도 ABC-imKO 마우스의 나이브 척추 미세아교세포에서 DEG를 도시하고;

도 6D는 ABC-imKO 미세아교세포에서 시스플라틴 처리에 의해 유도되고 시스플라틴으로 처리된 마우스에서 WT 미세아교세포와 공유된 중첩 유전자 및 경로를 개략적으로 도시하고;

도 6E는 시스플라틴 처리된 WT 마우스와 비교하여 시스플라틴 처리된, TAM 유도 ABC-imKO 마우스의 척추 미세아교세포에서 DEG를 도시하고;

도 6F-G는 나이브 상태 또는 시스플라틴 상태의 ABC-imKO 미세아교세포에서 DEG의 상향조절 유전자(도 6F) 또는 하향조절 유전자(도 6G)의 히트맵을 도시하고, 이하 실시예 1에서 상세하게 논의된 바와 같다.

도 7A-F는 AIBP에 의한 미세아교세포 재프로그래밍이 ABCA1/ABCG1 발현에 의존한다는 것을 보여주는 데이터를 도시한다:

도 7A는 CIPN이 시스플라틴에 의해 유도된 WT 및 ABC-imKO 마우스에서 유전자 발현에 대한 AIBP 처리의 효과를 비교하는 벤 다이어그램을 개략적으로 도시하고;

도 7B는 ABC-imKO 마우스 대 WT 마우스에 대한 AIBP 효과를 비교하는 CIPN에서 AIBP 처리에 의해 상향 및 하향조절된 유전자의 화산 플롯을 개략적으로 도시하고;

도 7C는 ABC 의존적 방식으로 AIBP에 의해 변경된 염증 유전자의 log2 정규화된 유전자 계수의 히트맵을 개략적으로 도시하고(WT 미세아교세포에서는 AIBP에 의해 하향조절되지만 ABC-imKO에서는 AIBP에 의해 상향조절됨);

도 7D는 야생형 및 ABC-imKO에서 시스플라틴과 AIBP 효과를 비교한 콜레스테롤 합성 및 LXR 관련 유전자의 히트맵을 개략적으로 도시하고;

도 7E는 ABC 의존 방식으로 AIBP에 의해 조절되는 비염증 유전자의 히트맵을 개략적으로 도시하고;

도 7F는 ABC-imKO 미세아교세포에서 AIBP에 의해 상향조절된 유전자의 농축 경로 분석을 개략적으로 도시하며, 이하 실시예 1에서 상세하게 논의된 바와 같다.

도 8A-G는 미세아교세포의 내인성 AIBP와 TLR4가 통각에 중요하다는 것을 도시한다:

도 8A는 예시적인 실험 설계 및 타임라인을 개략적으로 도시하고: 타목시펜; 시스플라틴; AIBP; 및/또는 식염수가 주입되고;

도 8B는 시스플라틴 개제 시작 전 기준선(도 8A의 0일째) 회피 역치를 그래프로 도시하고;

도 8C는 타목시펜 주사 섭생 전(나이브, 패널 A 타임라인에서 -7일째) 및 후(TAM, 0일째) 회피 역치에 대해 테스트된 WT 및 *Cx3cr1-Cre^{ERT2}* (플록싱된 유전자 없음) 마우스를 그래프로 도시하고;

도 8D-F는 i.p. 시스플라틴 및 i.t. 식염수 또는 AIBP 주사 후 회피 역치를 그래프로 도시하고: (도 8D) TAM 유도 AIBP-imKO 마우스; 비유도된(비히클) AIBP-imKO 마우스(도 8E); 인-하우스 사육 전신 AIBP 녹아웃 마우스(도 8F);

도 8G는 시스플라틴 주사 후 WT 및 타목시펜 유도 TLR4-imKO 마우스의 회피 역치를 그래프로 도시하고, 이하 실시예 1에서 상세하게 논의된 바와 같다.

도 9A-H는 TLR4 결함을 담당하는 AIBP 분자에서 도메인의 식별을 나타내는 데이터를 도시한다:

도 9A는 신호 펩티드, 아미노산(aa) 1-24, 이전에 특성화되지 않은 N-말단 도메인(aa 25-51) 및 YjeF_N 도메인(aa 52-288)을 갖는 인간 AIBP를 개략적으로 도시하고;

도 9B는 인간 AIBP의 flag-태깅 결실 돌연변이체의 PAGE 분리 이미지를 도시하며, 이는 HEK293 세포에서 Flag-태깅 TLR4 엑토도메인(eTLR4)과 함께 공동 발현되고; 세포 용해물은 항-TLR4 항체로 면역침전되고(IP), 항-Flag 항체로 면역블롯팅되었고(IB);

도 9C는 바칼로바이러스/곤충 세포 시스템에서 발현되고, 테스트-튜브에서 eTLR4-His에 이어, 항-TLR4 항체가

있는 IP 및 항-His 항체가 있는 IB와 결합된, 신호 펩티드가 모두 결합된 his-태깅된 인간(hu), 마우스(mo) 및 제브라피쉬(zf) AIBP의 PAGE 분리 이미지를 도시하고;

도 9D-H는 His 태깅된 야생형(wt, 25-288 aa) 및 결실 돌연변이체(mut, 52-288 aa) 인간 AIBP의 eTLR4, APOA1 및 미세아교세포에의 결합 및 테스트 튜브에서 항-AIBP 항체에 의한 eTLR4 및 wtAIBP 또는 mutAIBP의 면역침전(IP), 블롯 및 3회의 독립적인 실험으로부터 정량화를 나타내는 데이터를 도시한다;

도 9D는 (왼쪽 이미지) PAGE 분리를 도시하며, 여기서 ELISA는 eTLR4로 코팅된 플레이트로 수행되고 wtAIBP 또는 mutAIBP와 함께 배양되었고, 오른쪽 이미지는 wt 및 mu AIBP에 대한 TLR4/AIBP의 양을 그래프로 도시하고;

도 9E는 wt 또는 돌연변이 AIBP(또는 AIBP 없음)에 의한 고정화된 eTLR4 상의 AIBP 결합을 그래프로 도시하고, 여기서 ELISA는 BSA, wtAIBP 또는 mutAIBP로 코팅된 플레이트로 수행되었고 APOA1와 함께 배양되었으며;

도 9F는 AIBP에 결합된 APOA1을 그래프로 도시하고;

도 9G는 유세포 분석법(상부 그래프)을 사용하여 AIBP에 결합된 APOA1이 있는 세포의 수와 (하부 그래프) 비 자극된 LPS 자극 세포에서 wt 및 mut AIBP에 대한 AIBP 결합(배수 변화)을 그래프로 도시하고;

도 9H는 공초점 이미지를 사용하여 AIBP에 결합된 APOA1을 도시하며, 자극되지 않거나 15분 동안 LPS로 처리된 BV-2 미세아교세포에 대한 wtAIBP 및 mutAIBP의 결합을 보여주고, 이하 실시예 1에서 상세하게 논의된 바와 같다.

도 10A-G는 TLR4 결합 도메인이 결합된 AIBP의 척수강내 전달이 CIPN 이질통증을 완화할 수 없음을 보여주는 데이터를 도시한다;

도 10A-B는 wt AIBP 또는 mut AIBP로 전처리되고 LPS로 자극된 BV-2 세포에서 TLR4 이량체화(도 10A) 및 지질 뱃목(도 10B)을 그래프로 도시하고;

도 10C는 i.t. AIBP(0.5 µg/5 µL) 또는 식염수(5 µL)에 이어 i.t. LPS를 투여받은 WT 마우스의 회피 역치를 그래프로 도시하고;

도 10D는 i.p. 시스플라틴에 이어, i.t. wtAIBP, mutAIBP 또는 식염수에 대한 반응으로 WT 마우스의 회피 역치를 그래프로 도시하고;

도 10E-F는 21일째, 도 10D 패널에 도시된 실험군 마우스의 요추 척수로부터의 CD11b⁺/TMEM119⁺ 미세아교세포에서 TLR4 이량체화(도 10E) 및 지질 뱃목(도 10F)을 그래프로 도시하고;

도 10G는 미세아교세포 유전자 발현 및 지질 액적 축적에 대한 시스플라틴 유도 조직 손상(손상 관련 분자 패턴(DAMP)) 및 AIBP 처리를 사용하는 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)의 영향을 예시하는 다이어그램을 개략적으로 도시하며, 원형질막 및 ER의 검은 점은 콜레스테롤을 나타내며, 이하 실시예 1에서 상세하게 논의된 바와 같다.

도 11은 AIBP 분자에서 암호화 N-말단 도메인을 전개시키거나 노출시키는 모델을 개략적으로 도시하고; 다이어그램은 도 12 내지 14에 제시된 실험 결과를 요약하고 설명하며, 이는 천연 AIBP에서 N-말단 도메인(녹색)은 숨겨져 있거나 암호화되거나 충분히 노출되지 않아 TLR4에 대한 AIBP 결합을 매개하여(상단 패널), 추가 아미노산(주황색)으로 N-말단을 확장하면 AIBP 형태가 변화하고 AIBP(녹색)의 N-말단 도메인이 TLR4 결합에 접근할 수 있게 한다(하단 패널)는 것을 입증한다.

도 12는 본원에 제공된 바와 같이(서열번호 7) 조작된 AIBP의 예시적인 아미노산 서열을 도시한다: 도 11의 하단 패널에 묘사된 확장된 AIBP 분자의 아미노산 서열, 파란색 문자, 천연 AIBP 서열의 아미노산; 녹색 상자, TLR4 결합 서열(인간 AIBP 서열의 아미노산 25-51); 검정 문자 및 (빨간색) 상자, 부가된 아미노산.

도 13은 AIBP의 다양한 예시적인 조작된 형태의 TLR4 결합을 개략적으로 도시한다: 모든 단백질은 바클로바이러스/곤충 세포 시스템으로부터 발현되고 정제되었다:

His-d24AIBP: 도 12에 표시된 아미노산 서열에 상응하며, 아미노산 서열은 주황색 상자 "절단 가능한 His 태그"의 서열을 나타내고,

다른 모든 도면은 AIBP 분자에 도입된 아미노산 서열의 상이한 변형과 상응하는 변화를 나타내고, 녹색 "N-말단 도메인" 상자는 천연 AIBP의 아미노산 25-51 서열을 묘사하고, 오른쪽 열은 TLR4의 재조합 엑토도메인,

His-24 AIBP의 경우: MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR(서열번호 2)

"절단된 His-d24 AIBP"의 경우, GSPGLDGICSR(서열번호 9),

"5xD mut His-d24 AIBP"의 경우:

MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSDGDDGDDDR(서열번호 19),

"절단된 5xD His-d24 AIBP"의 경우, GSDGDDGDDDR(서열번호 10),

"2xD mut His-d24 AIBP"의 경우,

MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSDGDDGICSR(서열번호 11) 및

"절단된 His-d24 AIBP"의 경우, GSPGLDGICSR(서열번호 9)을 갖는 AIBP 변이체의 공동 면역침전 실험 결과를 나타낸다.

도 14는 AIBP의 다양한 조작된 형태의 TLR4 결합을 개략적으로 도시한다: 모든 단백질은 포유류 시스템에서 전장 TLR4로 공동 발현되었다: SS, 분비 신호, 인간 AIBP 서열의 아미노산 1-24에 상응함; 오른쪽 열은 TLR4,

"Flag-전장"의 경우 MDYKDHKGKYKDHDIDYKDDDDKLAANS(서열번호 14), 및

피브로넥틴 신호 펩티드의 경우 MLRGPGPGRLLLLAVLCLGTSVRCTETGKSKR(서열번호 24)을 갖는 AIBP 변이체의 세포 용해물로부터의 공동 면역침전 결과를 나타낸다.

도 15는 TLR4 친화도에 대한 구조를 최적화하기 위한 다양한 AIBP 작제물을 개략적으로 도시한다: 바콜로바이러스/곤충 세포 발현 시스템:

"PKA 부위 + 트롬빈 절단 부위"의 경우

GSDGDDGDDDR(서열번호 11),

MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR(서열번호 2):

"트롬빈 절단 부위"의 경우MGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR(서열번호 17)

"3x FLAG"의 경우 MAGILVPRGSPGLDGICSR(서열번호 18)

"5XD"의 경우 GSDGDDGDDDR(서열번호 11).

도 16은 AIBP의 다양한 조작된 형태의 TLR4 결합을 개략적으로 도시한다: 모든 단백질은 이. 콜리로부터 발현 및 정제되었으며, 오른쪽 열은 TLR4의 재조합 엑토도메인을 갖는 AIBP 변이체의 공동 면역침전 실험 결과를 나타낸다.

도 17A-D는 유세포 분석법 및 현미경 검사에 사용되는 TLR4 항체의 특이성의 검증을 제공하고 후군 신경절 대식세포에서 측정된 TLR4 이량체화 및 지질 뱃목을 나타낸다:

도 17A는 CD11b+(PercP-Cy5.5)/TMEM119+(Pe-Cy7) 미세아교세포의 TLR4-APC 및 TLR4/MD2-PE 항체 염색을 보여주는 WT(왼쪽 이미지) 및 *Tlr4*^{-/-} 마우스(오른쪽 이미지)의 척수에서 유래된 단일 세포 현탁액의 유세포 분석법을 그래프로 도시하고;

도 17B는 F4/80-FITC 및 TLR4-647 항체; 눈금 막대, 5 μm로 공동 염색된 WT 및 *Tlr4*^{-/-} 마우스의 복막 유도 대식세포의 공초점 이미지를 도시하고;

도 17C-D는 i.t. 식염수 또는 AIBP 24시간 후 TLR4 이량체화(도 17C)와 CTxB 염색으로 측정된 지질 뱃목 함량(도 17D)을 보여주는 CD11b+ DRG 대식세포의 유세포 분석법 분석을 그래프로 도시하고, 이하 실시예 1에서 논의된 바와 같다.

도 18A-E(또는 도 S2 또는 보충 도 2)는 척추 미세아교세포에 대한 FACS 분류 전략, RNA-seq에 대한 품질 관리 및 표현형 제어를 도시한다:

도 18A는 SSC-A 및 FSC-A, SSC-W 및 SSC-H, UVE/DEAD(APC-Cy7-A) 및 SSC-A, GLAST1 및 CD24, 및 CD11b 및 TMEM119를 포함하는 요추 CD11b+TMEM119+ 척추 미세아교세포에 대한 분류 전략을 도시하고;

도 18B는 TMEM119 및 CD11b, SSC-A 및 GLAST1, SSC-1 및 CD24를 포함한 GLAST1+ 성상교세포 또는 CD24+ 뉴런의

부재 및 분류된 세포의 순도를 측정하는 분류된 미세아교세포의 유세포 분석법 분석을 도시하고;

도 18C는 미세아교세포 특이적 유전자의 히트맵을 사용한 미세아교세포 계통 분석을 도시하고;

도 18D-E는 야생형 마우스에서 AIBP(그룹 4)에 의해 상향조절된 CIPN 억제 유전자의 히트맵(도 18D)과 AIBP(그룹 3)에 의해 하향조절된 CIPN 유도 유전자의 히트맵(도 18E)을 도시하고, 이하 실시예 1에서 논의된 바와 같다.

도 19A-D는 타목시펜 유도 ABC-imKO 마우스의 척추 미세아교세포에서 ABCA1 및 ABCG1의 조건부 녹아웃의 면역조직화학적 검증을 제공한다:

도 19A는 타목시펜을 사용한 경우와 사용하지 않은 경우의 DAPI, IBA1, ABCA1, MERGE 및 COLOC MASK를 도시하고,

도 19B는 타목시펜을 사용한 경우와 사용하지 않은 경우의 DAPI, IBA1, ABCG1, MERGE 및 COLOC MASK를 도시하고,

도 19C는 타목시펜을 사용한 경우와 사용하지 않은 경우의 DAPI, NeuN, ABCA1, MERGE 및 COLOC MASK를 도시하고,

도 19D는 타목시펜을 사용한 경우와 사용하지 않은 경우의 DAPI, GFAP, ABCA1, MERGE 및 COLOC MASK를 도시하고, 이하 실시예 1에서 추가로 상세하게 논의된 바와 같다,

도 20A-E는 i.t. LPS 및 CIPN 실험에서 타목시펜 처리된 WT 마우스에 대한 측각 이질통 데이터를 도시하고, ABC-imKO 의존성 유전자에 대한 추가 RNA-seq 데이터와 ABC-imKO 대 WT 마우스에 대한 시스플라틴 효과를 제공한다:

도 20A-B는 ABC-imKO 마우스의 대조군으로 인하우스 사육된 WT 한배 새끼 마우스를 타목시펜 섭생(TAM, 200 μ L/일, 10mg/mL, 5일 연속)에 노출시킨 후, (도 20A) AIBP(0.5 μ g/5 μ L) 또는 식염수(5 μ L)의 i.t. 주사 및 2시간 후 i.t. LPS(0.1 μ g/5 μ L); (도 20B) 1일째 및 3일째에 시스플라틴(2.3mg/Kg)의 i.p. 주사에 이어, 7일째에 AIBP(0.5 μ g/5 μ L) 또는 식염수(5 μ L)의 i.t. 주사한 데이터를 도시하고;

도 20C는 ABC-imKO 마우스에 상기와 같이 TAM을 주입한 후 시스플라틴을 주입하고, 이어서 7일째에 i.t. 식염수(5 μ L), AIBP(0.5 μ g/5 μ L) 또는 hp- β -CD(0.25mg/5 μ L)를 주입한 데이터를 그래프로 도시하고;

도 20D는 ABC-imKO 방식으로 조절되는 모든 상태(나이프, 시스플라틴/식염수 또는 시스플라틴/AIBP에 의해 유도됨)에 걸쳐 차등적으로 조절된 유전자의 히트맵을 도시하고;

도 20D는 상호작용 항목이 없는 축소된 모델을 사용한 우도비 테스트로부터의 모든 유의한 유전자를 도시하고 (조건: 유전자형);

도 20E는 컷오프 $P < 0.05$, 농축 > 1.5 및 경로에서 3개 유전자의 최소 중첩을 사용하여 WT 및 ABC-imKO 미세아교세포에서 시스플라틴 상향조절 유전자의 경로 농축의 히트맵을 도시하고, 이하 실시예 1에서 보다 상세하게 논의된 바와 같다.

도 21A-B는 타목시펜 유도 AIBP-imKO 마우스의 척추 미세아교세포에서 AIBP 녹아웃의 면역조직화학적 검증을 제공하며, BE-1 모노클로날 항체가 wtAIBP 및 mutAIBP와 유사한 친화도를 갖는다는 것을 입증한다:

도 21A는 비히클 및 타목시펜 유도 AIBP-imKO 마우스의 척추 동결 절편의 IHC 이미지를 도시하며, IBA1(미세아교세포), NeuN(뉴런) 및 GFAP(성상교세포)에 의한 AIBP 염색의 공동 국소화를 보여주며;

도 21B는 마이크로타이터 플레이트에서 포획 항체로서 BE-1을 사용한 샌드위치 ELISA의 데이터를 그래프로 도시하고, wtAIBP 및 mutAIBP에 대한 투여량 반응 곡선은 토끼 폴리클로날 항-AIBP 항체를 사용하여 검출되었고, 이하 실시예 1에서 추가로 상세하게 논의된 바와 같다.

도 22A-C는 기관지 상피에서 감소된 AIBP 발현을 그래프로 도시한다:

도 22A는 비천식 및 천식 샘플의 AIBP+ 기관지 상피를 그래프로 도시하고;

도 22B는 비천식 및 천식 샘플의 APOA1BP/HPRT1 mRNA를 그래프로 도시하고;

도 22C는 기관지 상피에서 AIBP 발현을 그래프로 도시하며, 이하 실시예 3에서 더 상세하게 논의된 바와 같다.

도 23A-F는 이하 실시예 3에서 더 상세하게 논의된 바와 같이, 화합물 7이 암컷 및 수컷 마우스의 천식 HDM 모델에서 기도 과민성(airway hyper-responsiveness) 및 호산구성 폐 염증(eosinophilic pulmonary inflammation)을 감소시킨다는 것을 그래프로 도시한다.

도 24A-M은 이하 실시예 4에서 더 상세하게 논의된 바와 같이, AIPB가 D2 녹내장 마우스에서 망막 신경퇴행(retinal neurodegeneration)을 감소시킨다는 것을 예시한다.

도 25A-D는 이하 실시예 4에서 더 상세하게 논의된 바와 같이, AIPB가 마이크로비드 유도 고혈압(hypertension) 마우스 모델에서 망막 신경퇴행을 감소시키고 시각 기능을 개선하는 것을 예시한다.

도 26A-B는 이하 실시예 4에서 더 상세하게 논의된 바와 같이, AIPB가 마우스 신경 충돌 모델에서 망막 신경퇴행을 감소시킨다는 것을 예시한다.

다양한 도면의 유사 참조 기호는 유사한 요소를 나타낸다.

이제 본원에 제공된 다양한 예시적인 구현예를 상세히 참조할 것이며, 이의 예는 첨부된 도면에 예시되어 있다. 다음의 상세한 설명은 독자에게 본 발명의 양태 및 구현예의 특정 세부 사항에 대한 더 나은 이해를 제공하기 위해 제공된 것이며, 본 발명의 범위에 대한 제한으로 해석되어서는 안 된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0136] 대안적인 구현예에서, 조성물 및 아미노산 서열의 변형, 첨가, 유지, 강화 또는 상향조절을 포함하여, 재조합 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP)의 발현을 조절 또는 조작하기 위한 핵산, 폴리펩티드, 유전자 및 폴리펩티드 비히클을 포함하는 약제학적 화합물 및 제형을 사용하는 방법, 및 이러한 조성물 및 방법을 실시하기 위한 구성 요소의 전부 또는 일부를 포함하는 키트가 제공된다. 대안적인 구현예에서, AIBP 서열 및 구조를 변경하고, 혈액 내 장벽을 표적화하고/하거나 관통할 수 있는 전달 비히클, 및 AIBP 발현 핵산 내에 함유된 핵산(유전자) 전달 비히클, 예를 들어, 벡터 및 바이러스, 예를 들어, 아데노 관련 바이러스(AAV) 전달 비히클의 사용을 포함하는, 치료적 수준의 재조합 AIBP를 뇌 및 CNS를 포함한 신체에 전달하고, AIBP 폴리펩티드 또는 AIBP 발현 핵산을 척수강내(i.t.) 투여를 통해 직접 전달하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다.
- [0137] 실시예 1은 화학요법 유발 말초 신경병증의 마우스 모델을 사용하는 연구를 기재하고, 여기서 척추 미세아교세포 또는 염증 반응을 조직하는 확대된 콜레스테롤 풍부 지질 뗏목인 인플라마라프트(inflammaraft)의 존재를 특징으로 한다. 특정 메커니즘의 조작은 콜레스테롤 대사를 조절하고 인플라마라프트를 정상화하고 미세아교세포를 제프로그래밍하여 오래 지속하는 신경병증성 통증의 완화를 초래한다.
- [0138] 본 발명자들은 또한 TLR4 결합 도메인이 결여된 AIBP의 결실 돌연변이가 화학요법 유발 말초 신경병증의 마우스 모델에서 신경병증성 통증을 역전시키지 않는다는 것을 보여준다. 이 선천성 면역 수용체는 염증 세포에서 고도로 발현되고 세포 표면의 지질 뗏목에 집중되어 염증 반응을 매개하기 때문에, TLR4에 대한 AIBP 결합이 중요하다. TLR4의 증가된 함량 및 TLR4 이량체화의 증거를 갖는 확대된/클러스터링된 지질 뗏목은 "인플라마라프트"라고 지칭된다. TLR4에 대한 결합에 의해, AIBP는 염증 세포를 표적으로 하고, 인플라마라프트를 파괴하고 척추 신경염증과 신경병증성 통증인 염증을 억제하며, 이 효과는 TLR4에 의해 매개되는 많은 염증성 질환 상태에 적용할 수 있다.
- [0139] 본 발명자들은 또한 천연 AIBP에서 N-말단 TLR4 결합 도메인은 암호화되고, 천연 AIBP는 TLR4에 결합하지 않는다는 것을 밝혀냈다. 도 13에 예시된 바와 같이, 본원에 제공된 재조합적으로 조작된 형태의 AIBP에서와 같이 N-말단이 추가의 아미노산으로 확장될 때 AIBP의 TLR4 결합 도메인이 노출된다. 도 11은 이 모델을 그래프 표현이다.
- [0140] 대안적인 구현예에서, 상업용 pAcHLT-C 벡터(BD Biosciences)의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 AIBP가 제공된다.
- [0141] TLR4 수용체는 막 지질 뗏목에 국한되고 이량체화된다. 활성화된 수용체와 어댑터 분자를 보유하는 확대된 콜레스테롤 풍부 지질 뗏목 - 여기서 인플라마라프트로서 지정됨(Miller et al., 2020) - 은 염증 신호전달 및 세포 반응을 개시하는 조직화 플랫폼 역할을 한다. 원형질막 중 콜레스테롤 함량의 조절은 다양한 세포 유형에서 인플라마라프트와 TLR4 이량체화, 신호전달 및 염증 반응에 영향을 미칠 수 있다((Karasinska et al., 2013; Tall and Yvan-Charvet, 2015; Yvan-Charvet et al., 2008). TLR4 외에, 인플라마라프트는 문헌(Miller et

al., 2020)에서 검토된 바와 같이, 다수의 다른 수용체와 신호전달 경로의 구성 요소의 활성화를 조절한다. 따라서, 본 발명자들은 CIPN이 척수 미세아교세포의 변경된 콜레스테롤 역학과 관련되어 척수에서 인플라마라프트 형성 및 지속적인 신경염증으로 이어진다고 가설을 세웠다.

[0142] 이 가설을 테스트하기 위해, 본 발명자들은 CIPN 마우스에서 척수 미세아교세포 지질 뗏목과 TLR4 이량체화를 측정했다. 콜레스테롤 역학을 조작하기 위해, 본 발명자들은 여러 세포 유형에서 콜레스테롤 제거의 효과적인 멀티플라이어(multiplier)인 apoA-I 결합 단백질(AIBP)을 척수강내 주사(Choi et al., 2018; Fang et al., 2013; Woller et al., 2018) 및 콜레스테롤 수송체 *Abca1* 및 *Abcg1*의 유도성 미세아교세포 특이적 녹다운을 갖는 마우스를 사용했다. 본 발명자들은 AIBP가 미세아교세포 막에서 콜레스테롤의 재분배를 유도하여 콜레스테롤 수송체 ABCA1에 의한 접근 가능한 콜레스테롤의 공동 국소화를 향상시킨다는 사실을 입증한다. 이러한 재분배는 원형질막에서 콜레스테롤 고갈 및 인플라마라프트의 다시 생리적 지질 뗏목으로의 역전을 위한 조건을 설정한다. 미세아교세포 특이적 *Abca1/Abcg1* 녹다운은 나이브 마우스에서 통증을 유발하고 AIBP가 CIPN 이질통을 역전시키는 것을 방지하여 신경병증성 통증의 발생에서 미세아교세포 콜레스테롤 항상성의 중요성을 강조한다. 또한, 미세아교세포에서 유전자 발현의 CIPN 관련 변화의 특성화는 손상된 콜레스테롤 대사를 시사한다.

[0143] 제조합 AIBP 서열

[0144] 대안적인 구현예에서, ApoA-I 결합 단백질(AIBP) 아미노산 서열, 및 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단으로 구성된 조작된 단백질 서열이 개시되며, 여기서 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 펩티드 태그를 포함하고, 펩티드 태그는 다중-히스티딘(다중-his) 태그를 포함하며, 특히 다중-his 태그는 6개의 인접 히스티딘 잔기(HHHHHH(서열번호 1))를 포함한다.

[0145] 대안적인 구현예에서, 이중 아미노 말단 아미노산 서열은 트롬빈 절단 부위에 돌연변이를 가져 작동 불능 상태로 만드는 아미노산 서열 MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR(서열번호 2)을 포함한다.

[0146] 일부 구현예에서, 상업용 pAcHLT-C 벡터(BD Biosciences)로부터 생성된 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 제공되며, 여기서 아미노산 서열은 ApoA-I 결합 단백질(AIBP) 아미노산 서열, 및 AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단으로 구성되고, AIBP 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열 N-말단은 펩티드 태그를 포함하고, 펩티드 태그는 다중 히스티딘(다중-his) 태그를 포함한다.

[0147] 대안적인 구현예에서, 적어도 약 10개의 아미노산, 또는 약 10 내지 100개의 아미노산 사이, 또는 약 20 내지 80개의 아미노산 사이, 또는 약 30 내지 50개의 아미노산 사이의 이중 아미노 말단 아미노산 서열, 또는 AIBP 폴리펩티드의 암호화(또는 숨겨진, 노출되지 않은) N-말단 TLR4 결합 도메인의 전개 및 노출을 초래하기에 충분한 임의의 이중 아미노산 서열을 갖는 제조합 또는 합성 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 화합물 또는 조성물을 생체내에서 투여하는 방법이 제공된다.

[0148] 대안적인 구현예에서, 퓨린 AIBP, 예를 들어, 임의로 N-말단에 피브로넥틴 분비 신호(이텔릭체) 및/또는 C-말단에 His 태그(밑줄 씌움)로 보충될 수 있는(즉, 추가로 포함할 수 있는) 서열번호 3으로 인코딩된 서열 및/또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 퓨린 AIBP가 사용되며; 이 생성물은 FIB-mAIBP-His로 약칭된다:

[0149] 서열번호 3:

[0150] ATG CTC AGG GGT CCG GGA CCC GGG CGG CTG CTG CTG CTA GCA GTC CTG TGC CTG GGG ACA TCG GTG CGC TGC ACC
GAA ACC GGG AAG AGC AGC AAG
CAGCAGAGTGTGTCTGTCGCAAGGCCATCTGGTGGGGAACACAGCGCGGGGCTCGGAGACCATGGCGGGCGCTGCGGTGAAGTACTTAAGTCAGGAGGAG
GCTCAGGCCGTGGACCAAGAGCTTTTAAACGAGTATCAGTTCAGCGTGGATCAACTCATGGAGCTGGCCGGGTGAGCTGTGCCACGGCTATTGCCAAGGCT
TATCCCCCAGCTCTATGTCCAAGAGTCCCCGACTGTCTTGGTCATCTGTGCCCCGAAATAACGAGGGGATGGGCTGGTCTGTGCGCGACACCTCAAA
CTTTTGGTTACCAGCCAATCTATTACCCCAAAAGACCTAACAAGCCCCCTTCACTGGGCTAGTGACTCAGTGTGAGAAATGGACATTCTTTCTCTT
GGTGAATGCCCCAGAGCCCATGATGGTGGACGAGCTGTATGAGCTGGTGGTGGACGCCATCTTCGGCTTCAGTTTCAAGGTGACGTTCTGGGAGCCATTC
CACAGCATCTGAGTGTCTTGTAGTGGACTACTGTGCCCCATTGCTAGCATCGACATTCCTCAGGATGGGATGTAGAGAAGGGAAACCCTAGCGGAATCCAA
CCAGACTTACTATCTCACTGACGGCACCCAAAGTCTGCAACTCACTTTACTGGCCGATATCATTACCTTGGGGGTGCGTTTGTACCACCTGCTCTAGAG
AAGAAGTACCAGCTGAACCTGCCATCTTACCCTGACACAGAGTGTGTCTACCGTCTACAGCATCATCATCATCATTA

[0151] 서열번호 4:

[0152] MLRGPGRLLLLAVLCLGTSVRCTETGKSKRQSVCRARPIWWGTQRRGSETMAGAAVKYLSQEEAQAQVDFNEFYQFVSDQLMELAGLSCATAIAKAYP
PTSMKSPPTVLVICPGPNNGDGLVCARHLKLFYQPTIYYPKRPNKPLFTGLVTQCQKMDIPFLGEMPPPEPMMVDELYELVVDIAFGFSFGKDVREPFHS

ILSVLSGLTVPIASIDIPSGWDVEKGNPSGIQPDLLISLTAPKKSATHFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPSPDTECVYRLQH~~HHHHHH~~

[0153] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 인간 AIBP(hAIBP) 폴리펩티드의 변이체(예를 들어, TLR4(그렇지 않으면 암호화) 결합 부위의 노출을 초래하는 이중 아미노산 서열을 갖는 인간 AIBP), 또는 본원에 제공된 바와 같은 변이체 AIBP를 인코딩하는 핵산은 이를 필요로 하는 환자 또는 개체에게 투여되거나, 제형 또는 의약을 제조하는 데 사용되거나, 투여를 위한 벡터 또는 발현 비히클을 제조하는 데 사용되거나, 본원에 제공된 키트에 포함되며, AIBP 변이체는 다음을 포함하거나 다음에 의해 인코딩될 수 있다:

[0154] 인간 AIBP 인코딩 핵산(cDNA)(서열번호 5)

[0155] GGGCCGGGCGGGCGGGGGCGCGCTCTGCGAGCTGGATGTCCAGGCTGCGGGCGCTGCTGGGCCTCGGGCTGCTGGTTGCGGGCTCGCGCGTGCCGCGGATCAAAAGCCAGACCATCGCTGTGCTCGGGACCCACCTGGTGGGGACCGCAGCGGCTGAACTCGGGTGGCCGCTGGGACTCAGAGGTCATGGCGAGCACGTGGTGAAGTACCTGAGCCAGGAGGAGGCCAGGCCGTGGACAGGAGCTATTTAACGAATACCAGTTTCAGCGTGGACCAACTATGGAAGTGGCCGGGCTGAGCTGTGCTACAGCCATCGCCAAGGCATATCCCCACGTCCATGTCCAGGAGCCCCCTACTGTCTGGTTCATCTGTGGCCCGGGGAATAATGGAGGAGATGGTCTGGTCTGTGCTCGACACCTCAAACCTCTTTGGCTACGAGCCAACCATCTATTACCCAAAAGGCCTAACAGCCCTCTTCACTGCATTGGTGACCCAGTGTCAGAAAAATGGACATCCCTTTCTTTGGGAAATGCCCGCAGAGCCCATGACGATTGATGAACTGTATGAGCTGGTGGTGGATGCCATCTTTGGCTTCAGCTTCAAGGGCGATGTTTCGGGAACCGTTCACAGCATCCTGAGTGTCTGAAGGGACTCACTGTGCCCATTGCCAGCATCGACATTCCCTCAGGATGGGACGTGGAGAAGGAAATGTGGAGGATCCAGCCAGACTTGCTCATATCCCTCACAGCCCCAAAAATCTGCAACCCAGTTTACCGTGCCTACCATTACCTGGGGGTCTGTTTGTGCCACCTGCTCTG

[0156] GAGAAGAAGTACCAGCTGAACCTGCCACCCTACCCTGACACCGAGTGTGTCTATCGTCTGCAGTGAGGAAGGTGGTGGTATTCTTCCCAATAAAGACTTAGAGCCCTCTCTCCAGAACTGTGGATTCTGGGAGCTCTCTGGCAATAAAAGTCAGTGAATGGTGAAGTCAGAGACCAACCTGGGGATTGGGTGCCATCTCTAGGGTAACACAAAGGGCAAGAGGTGTATGGTATTGGAAACAATGAAATGGACTGTTAGATGCCAA

[0157] 인간 AIBP 폴리펩티드(서열번호: 6)

[0158] MSRLRALLGLLLVAGSRVPRIKSQTIACRSGPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMAS~~TVVKYLSQEEAQAVDQELFNEYQFSVDQLMELAGLSCATAIAKAYPPT~~SMSRSPPTVLVICGPNNGDGLV~~CARHLKLFGEYPTIYYPKRPNKPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPM~~IDE~~LYELVVD~~AI~~FGFSFKGDVREPFHSILSVLKGLTVPIASIDIPSGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPYPDTECVYRLQ~~

[0159] 일부 구현예에서, TLR4 결합 도메인을 보유하고 N-말단 잔기가 천연 신호 펩티드로 대체된 변형된 hAIBP가 사용되며, 예를 들어, hAIBP는 d24hAIBP(인코딩 핵산)로도 공지된 hAIBP 서열의 아미노산 25-288을 포함한다:

[0160] CAGACCATCGCTGTGCTCGGGACCCACCTGGTGGGGACCGCAGCGGCTGAACTCGGGTGGCCGCTGGGACTCAGAGGTCATGGCGAGCACGGTGGTGAAGTACCTGAGCCAGGAGGAGGCCAGGCCGTGGACAGGAGCTATTTAACGAATACCAGTTTCAGCGTGGACCAACTATGGAAGTGGCCGGGCTGAGCTGTGCTACAGCCATCGCCAAGGCATATCCCCACGTCCATGTCCAGGAGCCCCCTACTGTCTGGTTCATCTGTGGCCCGGGGAATAATGGAGGAGATGGTCTGGTCTGTGCTCGACACCTCAAACCTCTTTGGCTACGAGCCAACCATCTATTACCCAAAAGGCCTAACAGCCCTCTTCACTGCATTGGTGACCCAGTGTGAGAAATGGACATCCCTTTCTTTGGGAAATGCCCGCAGAGCCCATGACGATTGATGAACTGTATGAGCTGGTGGTGGATGCCATCTTTGGCTTCAGCTTCAAGGGCGATGTTTCGGGAACCGTTCACAGCATCCTGAGTGTCTGAAGGGACTCACTGTGCCCATTGCCAGCATCGACATTCCCTCAGGATGGGACGTGGAGAAGGGAATGTGGAGGATCCAGCCAGACTTGCTCATATCCCTCACAGCCCCAAAAATCTGCAACCCAGTTTACCGTGCCTACCATTACCTGGGGGGTCGTTTTGTGCCACCTGCTCTGGAGAAGAAGTACCAGTGAACCTGCCACCCTACCCTGACACCGAGTGTGTCTATCGTCTGCAG(서열번호 20)

[0161] 여기서, 상응하는 d24hAIBP 폴리펩티드는 다음과 같다:

[0162] QTIACRSGPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMAS~~TVVKYLSQEEAQAVDQELFNEYQFSVDQLMELAGLSCATAIAKAYPPT~~SMSRSPPTVLVICGPNNGDGLV~~CARHLKLFGEYPTIYYPKRPNKPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPM~~IDE~~LYELVVD~~AI~~FGFSFKGDVREPFHSILSVLKGLTVPIASIDIPSGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPYPDTECVYRLQ~~(서열번호 21).

[0163] 일부 구현예에서, AIBP의 N-말단(아미노산 1-24, d24hAIBP)의 일부가 피브로넥틴 분비 신호(이탈릭체)로 대체된(또는 추가로 포함한) 인간 AIBP가 제공되며, 이 생성물은 FIB-d24hAIBP로 약칭되고 화합물 1로 명명된다:

[0164] 인간 FIB-d24hAIBP(화합물 1)-인코딩 핵산(cDNA):

[0165] ATGCTCAGGGGTCCGGGACCCGGGCGGCTGCTGCTAGCAGTCTGTGCTGGGGACATCGGTGCGCTGCACCGAAACCGGAAGAGCAAGAGGCAGACCATCGCTGTGCTCGGGACCCACCTGGTGGGGACCGCAGCGGCTGAACTCGGGTGGCCGCTGGGACTCAGAGGTCATGGCGAGCACGGTGGTGAAGTACCTGAGCCAGGAGGAGGCCAGGCCGTGGACAGGAGCTATTTAACGAATACCAGTTTCAGCGTGGACCAACTATGGAAGTGGCCGGGCTGAGCTGTGCTACAGCCATCGCCAAGGCATATCCCCACGTCCATGTCCAGGAGCCCCCTACTGTCTGGTTCATCTGTGGCCCGGGGAATAATGGAGGAGATGGTCTGGTCTGTGCTCGACACCTCAAACCTTTGGCTACGAGCCAACCATCTATTACCCAAAAGGCCTAACAGCCCTCTTCACTGCATTGGTGACCCAGTGTGAGAAAATGGAC

ATCCCTTTCTTGGGAAATGCCCGCAGAGCCCATGACGATTGATGAAGTGTATGAGCTGGTGGTGGATGCCATCTTTGGCTTCAGCTTCAAGGGCGATGTT
CGGGAACCGTTCCACAGCATCCTGAGTGTCTGAAGGGACTACTGTGCCCATTGCCAGCATCGACATTCCTCAGGATGGGACGTGGAGAAGGGAATGCT
GGAGGGATCCAGCCAGACTTGCTCATATCCCTCACAGCCCCAAAAATCTGCAACCCAGTTTACCGGTCGCTACCATTACCTGGGGGGTCGTTTGTGCCA
CCTGCTCTGGAGAAGAAGTACCAGCTGAACCTGCCACCTACCTGACACCGAGTGTGTCTATCGTCTGCAG(서열번호 22)

[0166] *MLRGPGRLLLLAVLCLGTSVRCTETGKSKRQTIACRSGPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMASSTVVKYLSEEAQAVDQELFNEYQFSVDQLMELAGLSCATA
IAKAYPPTSMRSRSPPTVLVICGPGNNGDGLVLCARHLKLFGEYPTIYYPKRPKNPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPMTIDELYELVDDAIFGFSFKGDV
REPFHSILSVLKGLTVPIASIDIPSGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPPYPDTECVYRLQ(서열번호
23).*

[0167] 이 구현예에서, hAIBP 단편은 아미노산 25 내지 288(d24hAIBP로서 공지되기도 함)을 포함하며, N-말단 변형은 다음과 같다: MLRGPGRLLLLAVLCLGTSVRCTETGKSKR(서열번호 24).

[0168] 하나의 구현예에서, 분비 신호는 AIBP의 강력한 분비를 보장하기 위해 첨가되고, 예를 들어, 피브로넥틴 분비 신호는 AIBP의 N 말단에 첨가되거나(서열번호 3 및 서열번호 4의 이탤릭체 서열 참조); 분비 신호를 인코딩하는 핵산은 AIBP 코딩 서열에 첨가된다. 대안적인 구현예에서, 분비 신호는 피브로넥틴 분비 신호, 면역글로불린 중쇄 분비 신호 또는 면역글로불린 카파 경쇄 분비 펩티드이다(참조: 예를 들어, PLoS One. 2015; 10(2): e0116878), 또는 인터루킨-2 신호 펩티드(참조: 예를 들어, J. Gene Med. 2005 Mar;7(3):354-65)이다.

[0169] 대안적인 구현예에서, 폴리펩티드 코딩 서열은 프로모터, 예를 들어 구성적, 유도성, 조직 특이적(예: 신경 또는 뇌 조직 특이적) 또는 유비쿼터스 프로모터 또는 다른 전사 활성화제에 작동적으로 연결된다.

[0170] 대안적인 구현예에서, 피브로넥틴-hAIBP 작제물의 번역 후 변형으로부터의 생성물은 아미노산 서열을 갖는다(화합물 2):

[0171] *TETGKSKRQTIACRSGPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMASSTVVKYLSEEAQAVDQELFNEYQFSVDQLMELAGLSCATAIAKAYPPTSMRSRSPPTVLVICGPG
NNGDGLVLCARHLKLFGEYPTIYYPKRPKNPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPMTIDELYELVDDAIFGFSFKGDVREPFHSILSVLKGLTVPIASIDIP
SGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPPYPDTECVYRLQ(서열번호 25),*

[0172] 여기서, hAIBP 단편은 d24hAIBP이고, N-말단 변형은 TETGKSKR(서열번호 26)이다.

[0173] 대안적인 구현예에서, AIBP 폴리펩티드의 서열은 추가 펩티드 단편을 통합하기 위해 C-말단에서 변형된다. 이는 C-말단 His 태그(상응하는 아미노산 서열에 밑줄 친 부분)의 첨가로 예시된다:

[0174] (화합물 3 인코딩 핵산 서열):

[0175] *ATGCTCAGGGGTCCGGGACCCGGGCGGCTGCTGCTAGCAGTCTGTGCCTGGGGACATCGGTGCGCTGCACCGAAACCGGAAGCAAGAGGCAGACC
ATCGCTGTGCTCGGGACCCACCTGTTGGGACCGCAGCGGCTGAAGTTCGGGTGGCCGCTGGGACTCAGAGGTCATGGCAGCACGGTGTGAAGTACCTG
AGCCAGGAGGAGGCCAGGCGGTGGACAGGAGCTATTTAACGAATACCAGTTCAGCGTGGACCAACTTATGGAAGTGGCCGGGCTGAGCTGTGCTACAGCC
ATCGCAAGGCATATCCCCACGTCCATGTCCAGGAGCCCCCTACTGTCTGGTCATCTGTGGCCCGGGAATAATGGAGGAGATGGTGTGCTGTGCT
CGACACCTCAAACCTTTGGCTACGAGCCAACCATCTATTACCCAAAAGGCCAACAAGCCCTCTTACTGCATTGGTGACCCAGTGTGAGAAAATGGAC
ATCCCTTTCTTGGGAAATGCCCGCAGAGCCCATGACGATTGATGAAGTGTATGAGCTGGTGGTGGATGCCATCTTTGGCTTCAGCTTCAAGGGCGATGTT
CGGGAACCGTTCCACAGCATCCTGAGTGTCTGAAGGGACTACTGTGCCCATTGCCAGCATCGACATTCCTCAGGATGGGACGTGGAGAAGGGAATGCT
GGAGGGATCCAGCCAGACTTGCTCATATCCCTCACAGCCCCAAAAATCTGCAACCCAGTTTACCGGTCGCTACCATTACCTGGGGGGTCGTTTGTGCCA
CCTGCTCTGGAGAAGAAGTACCAGCTGAACCTGCCACCTACCTGACACCGAGTGTGTCTATCGTCTGCAGTTGGTCCCTCGTGAAGCCATCATCATCAT
CATCA(서열번호 27)*

[0176] 아미노산 서열 (화합물 3):

[0177] *MLRGPGRLLLLAVLCLGTSVRCTETGKSKRQTIACRSGPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMASSTVVKYLSEEAQAVDQELFNEYQFSVDQLMELAGLSCATA
IAKAYPPTSMRSRSPPTVLVICGPGNNGDGLVLCARHLKLFGEYPTIYYPKRPKNPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPMTIDELYELVDDAIFGFSFKGDV
REPFHSILSVLKGLTVPIASIDIPSGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPPYPDTECVYRLQLVPRGSHHHH
H(서열번호 28).*

[0178] 여기서, hAIBP 단편은 His 태그(FIB-d24 AIBP-His)와 N-말단 변형을 함유하는 d24hAIBP이다:

[0179] LRGPGRLLLLAVLCLGTSVRCTETGKSKR(서열번호 29).

[0180] 대안적인 구현예에서, 신호 펩티드의 번역 후 변형은 화합물(화합물 4)을 제공한다:

- [0181] *TETGKSKRQTIACRSGPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMAS TVVKYLSQEEAQAVDQELFNEYQFSVDQLMELAGLSCATAIAKAYPPTSMRSRSPPTVLVICGPG*
NNGGDGLVCARHLKLFGEYPTIYYPKRPNKPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPM TIDELYELVVD AIFGFSFKG D VREP FHSILSVLKGLTVPIASIDIP
*SGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPPYDTECVYRLQLVPRGS*HHHHH (서열번호 30),
- [0182] 여기서, hAIBP 단편은 d24hAIBP-His이고, N-말단 변형은 TETGKSKR(서열번호 26)이다.
- [0183] 대안적인 구현예에서, 폴리펩티드 코딩 서열은 프로모터, 예를 들어, 구성적, 유도성, 조직 특이적(예: 신경 또는 뇌 조직 특이적) 또는 유비쿼터스 프로모터 또는 다른 전사 활성화제에 조작적으로 연결된다.
- [0184] 대안적인 구현예에서, 전장 인간 AIBP는 N-말단에서 변형되며, 여기서 이러한 변형은 TLR4 결합, 예를 들어, 화합물 5-인코딩 핵산(cDNA)을 용이하게 한다:
- [0185] ATGGA CTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGCTTGCGGCCGCGAATTCAGGGCCGGGGCGCGC
GCTCTGCGAGCTGGATGTCCAGGCTGCGGGCGCTGCTGGGCTCGGGCTGCTGGTTCGCGGCTCGCGCGATCAAAAGCCAGACCATCGCCTGTC
GCTCGGGACCCACCTGGTGGGACCGCAGCGGTGAAC TCGGGTGGCCGCTGGGACTCAGAGGTCATGGCGAGCACGGTGGTGAAGTACCTGAGCCAGGAGG
AGGCCCAGGCCGTGGACAGGAGCTATTTAACGAATACCAGTTCAGCGTGGACCACTTATGGAAGTGGCCGGGTGAGCTGTGCTACAGCCATCGCCAAGG
CATATCCCCCACGTCCATGTCCAGGAGCCCCCTACTGTCTGGTCTATCTGTGGCCGGGGAATAATGGAGGAGATGGTCTGGTCTGTGCTCGACACCTCA
AACTCTTTGGCTACGAGCCAACCATCTATTACCCCAAAAGGCCAACAAGCCCTCTTCACTGCATTGGTGACCCAGTGTCAGAAAATGGACATCCCTTTCC
TTGGGGAAATGCCCGCAGAGCCCATGACGATTGATGAAGTGTATGAGCTGGTGGTGGATGCCATCTTTGGCTTCAGCTTCAAGGGCGATGTTCCGGGAACCGT
TCCACAGCATCCTGAGTGTCTGAAGGACTCACTGTGCCATTGCCAGCATCGACATTCCTCAGGATGGGACGTGGAGAAGGGAATGCTGGAGGGATCC
AGCCAGACTTGCTCATATCCCTACAGCCCCAAAAATCTGCAACCCAGTTTACCGGTGCTACCATTACCTGGGGGGTCGTTTTGTGCCACCTGCTCTGG
AGAAGAAGTACCAGCTGAACCTGCCACCCTACCCTGACACCGAGTGTGTCTATCGTGTGAGTGAAGGAGTGGTGGGTATTCTTCCCAATAAAGACTTA
GAGCCCTCTCTTCCAGAACTGTGGATTCTTGGGAGCTCCTCTGGCAATAAAAGTCAGTGAATGGTGAAGTCAGAGACCAACCTGGGGATTGGGTGCCAT
CTCTCTAGGGGTAACACAAAGGCAAGAGGTGCTATGGTATTTGGAACAATGAAAATGGACTGTTAGATGCCAA(서열번호 31).
- [0186] 이는 다음 아미노산(화합물 5)을 인코딩한다:
- [0187] MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKLAANSMSRLRALLGLLLVAGSRVPRIKSQTIACRSGPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMAS TVVKYLSQEEAQAVDQELF
NEYQFSVDQLMELAGLSCATAIAKAYPPTSMRSRSPPTVLVICGPGNNGDGLVCARHLKLFGEYPTIYYPKRPNKPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPM
TIDELYELVVD AIFGFSFKG D VREP FHSILSVLKGLTVPIASIDIPSGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPP
YPDTECVYRLQ(서열번호 32),
- [0188] 여기서, hAIBP 단편은 전장 및 N-말단 변형이다: MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKLAANS(서열번호 33).
- [0189] 대안적인 구현예에서, 암호화 TLR4 결합 도메인을 보유하는 hAIBP 서열은 N-말단에서 변형된다. 예시적인 서열은 hAIBP(d24hAIBP)의 아미노산 25-288에 대한 DNA 및 펩티드 서열을 포함한다:
- [0190] (화합물 6-인코딩 핵산 서열):
- [0191] ATGGA CTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGCTTGCGGCCGCGAATTCAGACCATCGCCTGT
CGTCTGGGACCCACCTGGTGGGACCGCAGCGGTGAAC TCGGGTGGCCGCTGGGACTCAGAGGTCATGGCGAGCACGGTGGTGAAGTACCTGAGCCAGGAG
GAGGCCCAGGCCGTGGACAGGAGCTATTTAACGAATACCAGTTCAGCGTGGACCACTTATGGAAGTGGCCGGGTGAGCTGTGCTACAGCCATCGCCAAG
GCATATCCCCCACGTCCATGTCCAGGAGCCCCCTACTGTCTGGTCTATCTGTGGCCCGGGAATAATGGAGGAGATGGTCTGGTCTGTGCTCGACACCTC
AAACTCTTTGGCTACGAGCCAACCATCTATTACCCCAAAAGGCCAACAAGCCCTCTTCACTGCATTGGTGACCCAGTGTCAGAAAATGGACATCCCTTTTC
CTTGGGGAAATGCCCGCAGAGCCCATGACGATTGATGAAGTGTATGAGCTGGTGGTGGATGCCATCTTTGGCTTCAGCTTCAAGGGCGATGTTCCGGGAACCG
TTCCACAGCATCCTGAGTGTCTGAAGGACTCACTGTGCCATTGCCAGCATCGACATTCCTCAGGATGGGACGTGGAGAAGGGAATGCTGGAGGGATC
CAGCCAGACTTGCTCATATCCCTACAGCCCCAAAAATCTGCAACCCAGTTTACCGGTGCTACCATTACCTGGGGGGTCGTTTTGTGCCACCTGCTCTG
GAGAAGAAGTACCAGCTGAACCTGCCACCCTACCCTGACACCGAGTGTGTCTATCGTCTGCAG(서열번호 34),
- [0192] 아미노산 서열(화합물 7):
- [0193] MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKLAANSQTIACRSGPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMAS TVVKYLSQEEAQAVDQELFNEYQFSVDQLMELAGLSCATAIAK
AYPPTSMRSRSPPTVLVICGPGNNGDGLVCARHLKLFGEYPTIYYPKRPNKPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPM TIDELYELVVD AIFGFSFKG D VREP
FHSILSVLKGLTVPIASIDIPSGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPPYDTECVYRLQ(서열번호 35),
- [0194] 여기서, hAIBP 단편은 d24hAIBP이고 N-말단 변형은 다음과 같다:

- [0195] MDYKDHGDYKDHDI DYKDDDDKLAAANS(서열번호 33).
- [0196] (화합물 7-인코딩 핵산 서열): ATG TCC CCT ATA GAT CCG ATG GGA CAT CAT CAT CAT CAT CAC GGA AGG AGA AGG GCC AGT GTT GCG GCG GGA ATT TTG GTC CCT CGT GGA AGC CCA GGA CTC GAT GGC ATA TGC TCG AGGCAGACCATCGCCTGTCGCTCGGGACCCACCTGGTGGGGACCGCAGCGGTGAACTCGGGTGGCCGCTGGGACTCAGAGGTCATGGCGAGCACGGTGGTG AAGTACCTGAGCCAGGAGGAGGCCAGGCCGTGGACCAGGAGCTATTTAACGAATACCAGTTCAGCGTGGACCAACTTATGGAAGTGGCCGGGCTGAGCTGT GCTACAGCCATCGCAAGGCATATCCCCCAGTCCATGTCCAGGAGCCCCCTACTGTCTGGTCATCTGTGGCCCGGGGAATAATGGAGGAGATGGTCTG GTCTGTGCTCGACACCTCAAACCTCTTTGGCTACGAGCCAACCATCTATTACCCAAAAGGCTAACAAGCCCCCTTCACTGCATTGGTGACCCAGTGTGAG AAAATGGACATCCCTTTCTTGGGGAATGCCCCGAGAGCCCATGACGATTGATGAACTGTATGAGCTGGTGGTGATGCCATCTTTGGCTTCAGCTTCAAG GCGCATGTTCCGGAACCGTTCCACAGCATCTGAGTGTCTGAAGGACTACTGTGCCATTGCCAGCATCGACATTCCCTCAGGATGGGACGTGGAGAAG GGAATGCTGGAGGATCCAGCCAGACTTGCTCATATCCCTCACAGCCCCAAAAATCTGCAACCCAGTTTACCGGTCGCTACCATTACCTGGGGGGTGTG TTTGTGCCACCTGCTCTGGAGAAGAAGTACCAGCTGAACCTGCCACCCTACCTGACACCGAGTGTGTCTATCGTCTGCAG(서열번호 34),
- [0197] 여기서, hAIBP 단편은 d24hAIBP이고, N-말단 변형은 다음과 같다:
- [0198] MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSR(서열번호 2).
- [0199] (화합물 8-인코딩 핵산 서열):
- [0200] ATG TCC CCT ATA GAT CCG ATG GGA CAT CAT CAT CAT CAT CAC GGA AGG AGA AGG GCC AGT GTT GCG GCG GGA ATT TTG GTC CCT CGT GGA AGC GAT GGA GAC GAT GGC GAT GAC GAC AGG CAGACCATCGCCTGTCGCTCGGGACCCACCTGGTGGGGACCGCAGCGGTGAACTCGGGTGGCCGCTGGGACTCAGAGGTCATGGCGAGCACGGTGGTGAAG TACCTGAGCCAGGAGGAGGCCAGGCCGTGGACCAGGAGCTATTTAACGAATACCAGTTCAGCGTGGACCAACTTATGGAAGTGGCCGGGCTGAGCTGTGCT ACAGCCATCGCAAGGCATATCCCCCAGTCCATGTCCAGGAGCCCCCTACTGTCTGGTCATCTGTGGCCCGGGGAATAATGGAGGAGATGGTCTGGTC TGTGCTCGACACCTCAAACCTCTTTGGCTACGAGCCAACCATCTATTACCCAAAAGGCTAACAAGCCCCCTTCACTGCATTGGTGACCCAGTGTGAGAAA ATGGACATCCCTTTCTTGGGGAATGCCCCGAGAGCCCATGACGATTGATGAACTGTATGAGCTGGTGGTGATGCCATCTTTGGCTTCAGCTTCAAGGGC GATGTTCCGGAACCGTTCCACAGCATCTGAGTGTCTGAAGGACTACTGTGCCATTGCCAGCATCGACATTCCCTCAGGATGGGACGTGGAGAAGGGA AATGCTGGAGGATCCAGCCAGACTTGCTCATATCCCTCACAGCCCCAAAAATCTGCAACCCAGTTTACCGGTCGCTACCATTACCTGGGGGGTGTGTTT GTGCCACCTGCTCTGGAGAAGAAGTACCAGCTGAACCTGCCACCCTACCTGACACCGAGTGTGTCTATCGTCTGCAG(서열번호 37),
- [0201] (화합물 6):
- [0202] MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSDGDDGDDRRQT IACRSGPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMAS TVVKYLSQEEAQAVDQELFNEYQFSVDQLMEL AGLSCATAIAKAYPPTSMRSPPTVLVICPGNNGDGDLVCARHLKLFGEPTIYYPKRPKNPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPMTIDELYELVVD AIFGFSFKGDVREPFHSILSVLKGLTVP IASIDIPSGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPPYPDTECVYRLQ (서열번호 36),
- [0203] 여기서, hAIBP 단편은 d24hAIBP이고, N-말단 변형은 다음과 같다: MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSDGDDGDDRR(서열번호 19),
- [0204] (화합물 7-인코딩 핵산 서열):
- [0205] ATG TCC CCT ATA GAT CCG ATG GGA CAT CAT CAT CAT CAT CAC GGA AGG AGA AGG GCC AGT GTT GCG GCG GGA ATT TTG GTC CCT CGT GGA AGC GAT GGA GAC GAT GGC ATA TGC TCG AGG CAGACCATCGCCTGTCGCTCGGGACCCACCTGGTGGGGACCGCAGCGGTGAACTCGGGTGGCCGCTGGGACTCAGAGGTCATGGCGAGCACGGTGGTGAAG TACCTGAGCCAGGAGGAGGCCAGGCCGTGGACCAGGAGCTATTTAACGAATACCAGTTCAGCGTGGACCAACTTATGGAAGTGGCCGGGCTGAGCTGTGCT ACAGCCATCGCAAGGCATATCCCCCAGTCCATGTCCAGGAGCCCCCTACTGTCTGGTCATCTGTGGCCCGGGGAATAATGGAGGAGATGGTCTGGTC TGTGCTCGACACCTCAAACCTCTTTGGCTACGAGCCAACCATCTATTACCCAAAAGGCTAACAAGCCCCCTTCACTGCATTGGTGACCCAGTGTGAGAAA ATGGACATCCCTTTCTTGGGGAATGCCCCGAGAGCCCATGACGATTGATGAACTGTATGAGCTGGTGGTGATGCCATCTTTGGCTTCAGCTTCAAGGGC GATGTTCCGGAACCGTTCCACAGCATCTGAGTGTCTGAAGGACTACTGTGCCATTGCCAGCATCGACATTCCCTCAGGATGGGACGTGGAGAAGGGA AATGCTGGAGGATCCAGCCAGACTTGCTCATATCCCTCACAGCCCCAAAAATCTGCAACCCAGTTTACCGGTCGCTACCATTACCTGGGGGGTGTGTTT GTGCCACCTGCTCTGGAGAAGAAGTACCAGCTGAACCTGCCACCCTACCTGACACCGAGTGTGTCTATCGTCTGCAG(서열번호 16),
- [0206] 아미노산 서열(화합물 7):
- [0207] MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSDGDDGICSRQT IACRSGPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMAS TVVKYLSQEEAQAVDQELFNEYQFSVDQLMEL AGLSCATAIAKAYPPTSMRSPPTVLVICPGNNGDGDLVCARHLKLFGEPTIYYPKRPKNPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPMTIDELYELVVD AIFGFSFKGDVREPFHSILSVLKGLTVP IASIDIPSGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPPYPDTECVYRLQ

(서열번호 15),

[0208] 여기서, hAIBP 단편은 d24hAIBP이고, N-말단 변형은 다음과 같다:

[0209] MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSDGDDGDDDR(서열번호 19),

[0210] 다른 구현예에서, 적어도 약 8개의 아미노산, 또는 약 8 내지 100개의 아미노산, 또는 약 8 내지 40개의 아미노산, 또는 약 30 내지 50개의 아미노산의 이중 아미노 말단 아미노산 서열, 또는 AIBP 폴리펩티드의 암호화(또는 숨겨진, 노출되지 않은) N-말단 TLR4 결합 도메인의 전개 및 노출을 초래하기에 충분한 임의의 이중 아미노산 서열을 갖는 재조합, 합성 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP) 폴리펩티드 화합물 또는 조성물을 위한 조성물이 제공된다.

[0211] 대안적인 구현예에서, 아미노산 N-말단 서열은 히스티딘(H), 리신(K) 또는 아르기닌(R)으로부터 선택된 3개 내지 12개의 염기성 아미노산을 포함한다.

[0212] 다른 구현예에서, 본원에 기재된 화합물은, 예를 들어, 추정 펩티드 절단 부위의 제거로 생리활성에 대한 특성을 개선하도록 추가로 변형될 수 있다. 예시적인 서열은 다음과 같이 표시된다:

[0213] (화합물 8 인코딩 핵산 서열): ATG TCC CCT ATA GAT CCG ATG GGA CAT CAT CAT CAT CAC GGA AGG AGA AGG GCC AGT GTT GCG GCG GGA ATT TTG GTC CCT **GCT GCA** AGC CCA GGA CTC GAT GGC ATA TGC TCG AGG CAGACCATCGCCTGTCGCTCGGGACCCACCTGGTGGGACCGCAGCGGTGAACCTCGGGTGGCCGCTGGGACTCAGAGGTCATGGCGAGCACGGTGGTGAAG TACCTGAGCCAGGAGGAGGCCAGGCCGTGGACAGGAGCTATTACGAATACCACTTCAGCGTGGACCAACTATGGAACCTGGCCGGGCTGAGCTGTGCT ACAGCCATCGCCAAGGCATATCCCCCAGTCCATGTCCAGGAGCCCCCTACTGTCTGTGTCATCTGTGGCCGGGGAATAATGGAGGAGATGGTCTGGTC TGTGCTCGACACCTCAAACCTCTTTGGCTACGAGCCAACCATCTATTACCCAAAAGGCTAACAAGCCCTCTTCACTGCATTGGTGACCCAGTGCAGAAA ATGGACATCCCTTTCCTTGGGGAATGCCCGCAGAGCCCATGACGATTGATGAAGTGTATGAGCTGGTGGTGGATGCCATCTTTGGCTTCAGCTTCAAGGGC GATGTTCCGGGAACCGTTCCACAGCATCTGAGTGTCTGAAGGACTCACTGTGCCATTGCCAGCATCGACATTCCTCAGGATGGGACGTGGAGAAGGGA AATGCTGGAGGGATCCAGCCAGACTTGCTCATATCCCTCACAGCCCCAAAAATCTGCAACCCAGTTTACCGGTCGCTACCATACCTGGGGGGTCGTTTT GTGCCACCTGCTCTGGAGAAGAAGTACCAGCTGAACCTGCCACCTACCCTGACACCGAGTGTGTCTATCGTCTGCAG(서열번호 12),

[0214] 아미노산 서열 (화합물 8):

[0215] MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPAASPLDGI CSRQTIACRSPTWWGPQRLNSGGRWDSEVMASVVKYLSQEEAQAVDQELFNEYQFSVDQLMEL AGLSCATAIAKAYPPTSMRSRPTVLVICGPGNNGDGLVCAHLKLFGEPTIYYPKRPNKPLFTALVTQCQKMDIPFLGEMPAEPMITIDELYELVVDIAIF GFSFKGDVREPFHSILSVLKGLTVPIASIDIPSGWDVEKGNAGGIQPDLLISLTAPKKSATQFTGRYHYLGGRFVPPALEKKYQLNLPYPDTECVYRLQ (서열번호 8),

[0216] 여기서, hAIBP 단편은 d24hAIBP이고, N-말단 변형은 다음과 같다: MSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGILVPAASPLDGI CSR (서열번호 7).

[0217] 이 서열에서, 트롬빈 절단 부위 LVPRGS(서열번호 13)는 기재된 아미노산 돌연변이를 혼입하고, 실시예 2에 기재된 바와 같이 TLR4 결합 활성의 절단 및 예기치 않은 손실을 방지한다.

[0218] 이러한 서열은 예시적인 것이며 본 발명에 제한되지 않는다는 것을 인정해야 한다.

[0219] 다른 구현예에서, hAIBP의 N-말단 변형에서 임의의 아미노산은 부자연스럽고, 당업자에게 공지된 방법에 의해 삽입될 수 있다.

[0220] 제조 제품, 키트

[0221] 본원에 제공된 방법의 실시하기 위한 임플란트 또는 펌프와 같은 제조 제품, 키트 및 의약품이 또한 제공된다.

대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법을 실시하는 데 필요한 모든 구성 요소를 포함하는 제조 제품, 키트 및/또는 의약품이 제공된다. 대안적인 구현예에서, 키트는 또한 본원에 제공된 방법을 실시하기 위한 설명서를 포함한다.

[0222] 제형 및 약제학적 조성물

[0223] 대안적인 구현예에서, 신경병증성 통증을 조절하기 위해 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하기 위한 핵산 및 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 제형 또는 조성물이 제공되며, 상기 방법은 재조합 ApoA-I 결합 단백질(APOA1BP, AIBP 또는 AI-BP)의 발현을 상향조절하는 단계를 포함한다. 대안적인 구현예에서, 신경병증성 통증을 치료, 예방, 역전 및/또는 개선하기 위한 생체내, 시험관내 또는 생체외 방법에 사용하기 위한 약제학적 제

형 또는 조성물이 제공된다. 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하기 위해 사용되는 약제학적 조성물 및 제형은 재조합 APOA1BP 핵산 및 폴리펩티드를 포함하거나, 예를 들어, 신경병증성 통증, 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 만성 또는 진행성 신경퇴행성 질환, 임의로 알츠하이머병 또는 만성 외상성 뇌병증(CTE) 또는 관련 타우병증, 외상성 뇌 손상(TBI), 외상 후 스트레스 장애, 외상성 전쟁 신경증, 또는 외상 후 스트레스 증후군(PTSS), 임의로 녹내장 또는 눈의 다른 염증성 질환, 임의로 폐 염증 및 천식, 임의로 HIV 감염 또는 이의 동반 질환 및/또는 임의로 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환을 치료, 예방, 역전 및/또는 개선시키기에 충분한 양으로 이를 필요로 하는 개체에게 투여되는 재조합 APOA1BP 핵산 및 폴리펩티드의 발현 또는 활성의 증가를 초래한다. 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하기 위해 사용되는 약제학적 조성물 및 제형은 재조합 APOA1BP 핵산 및 폴리펩티드를 포함하거나, 예를 들어, 신경병증성 통증 또는 신경퇴행성 질환 또는 상태의 강도 및/또는 빈도를 예방 또는 감소시키기에 충분한 양으로 이를 필요로 하는 개체에게 투여된다.

[0224] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하기 위해 사용되는 약제학적 조성물은 비경구, 국소, 경구 또는 국소 투여, 예를 들어, 에어로졸 또는 경피로 투여될 수 있다. 약제학적 조성물은 임의의 방식으로 제형화될 수 있으며, 상태 또는 질병 및 질병의 정도, 각 환자의 일반적인 의학적 상태, 생성되는 바람직한 투여 방법 등에 따라 다양한 단위 투여 형태로 투여될 수 있다. 제형화 및 투여 기술에 대한 상세함은 과학 및 특허 문헌에 잘 기재되어 있으며, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co., Easton PA ("Remington's")]의 최신판을 참조한다.

[0225] 예를 들어, 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하기 위해 사용되는 이들 조성물은 완충액, 식염수 용액, 분말, 에멀전, 소포, 리포솜, 나노 입자, 나노 지방 입자 등으로 제형화된다. 대안적인 구현예에서, 조성물은 임의의 방식으로 제형화될 수 있으며, 목적하는 생체내, 시험관내 또는 생체의 조건, 목적하는 생체내, 시험관내 또는 생체의 투여 방법 등에 따라 다양한 농도 및 형태로 적용될 수 있다. 생체내, 시험관내 또는 생체의 제형 및 투여 기술에 대한 상세함은 과학 및 특허 문헌에 잘 기재되어 있다. 본원에 제공된 방법 또는 용도를 실시하는 데 사용되는 제형 및/또는 담체는 생체내, 시험관내 또는 생체의 적용에 적합한 정제, 환제, 분말, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등과 같은 형태일 수 있다.

[0226] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하기 위해 사용되는 제제 및 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체에서 처분되거나 이에 용해된 조성물의 용액(펩티도미메틱, 라세미 혼합물 또는 라세미체, 이성체, 입체 이성체, 화합물의 유도체 및/또는 유사체를 포함)을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 사용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매는 물 및 링거 용액, 등장성 염화나트륨을 포함한다. 또한, 멸균 불휘발성 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용될 수 있다. 이를 위해, 합성 모노- 또는 디글리세라이드, 또는 지방산, 예를 들어, 올레산을 포함한 임의의 불휘발성 오일이 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 방법 및 용도를 실시하기 위해 사용되는 용액 및 제형은 멸균성이며, 일반적으로 바람직하지 않은 물질이 없도록 제조될 수 있다. 하나의 구현예에서, 이러한 용액 및 제형은 종래의 익히 공지된 멸균 기술에 의해 멸균된다.

[0227] 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하는 데 사용되는 용액 및 제형은 pH 조절제 및 완충액, 독성 조절제, 예를 들어, 나트륨 아세테이트, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 나트륨 락테이트 등과 같은 생리학적 조건을 근사화하는 데 필요한 보조 물질을 포함할 수 있다. 이러한 제형에서 활성제의 농도는 매우 다양할 수 있으며, 주로 선택된 생체내, 시험관내 또는 생체의 투여의 특정 모드 및 목적하는 결과에 따라 유체 용적, 점도 등을 기준으로 하여 선택될 수 있다.

[0228] 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하기 위해 사용되는 조성물 및 제형은 리포솜을 사용하여 전달될 수 있다. 리포솜을 사용함으로써, 특히 리포솜 표면이 표적 세포(예를 들어, 손상되거나 병든 신경 세포 또는 CNS 조직)에 특이적인 리간드를 수반하거나, 달리 특정 조직 또는 기관 유형에 우선적으로 지시되는 경우, 생체내, 시험관내 또는 생체의 적용에서 활성제의 표적 세포로의 전달에 집중할 수 있다.

[0229] 나노 입자, 나노 지방 입자 및 리포솜

[0230] 또한, 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하기 위해, 예를 들어, 생체내에서 재조합 APOA1BP 핵산 및 폴리펩티드를 포함하는 조성물을, 예를 들어, CNS 및 뇌에 전달하기 위해 사용되는 화합물을 포함하는 나노 입자, 나노 지방 입자, 소포 및 리포솜 막이 제공된다. 대안적인 구현예에서, 이들 조성물은, 예를 들어, 목적하는 세포 유형 또는 기관, 예를 들어, 신경 세포 또는 CNS 등을 표적화하기 위한 세포 표면 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드와 같은 생물학적 분자를 포함하는 특정 분자를 표적화하도록 설계된다.

- [0231] 예를 들어, 문헌(Park, et al., U.S. Pat. Pub. No. 20070082042)에 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하는 데 사용되는 화합물을 포함하는 다층 리포솜이 제공된다. 다층 리포솜은 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하는 데 사용되는 조성물을 포획하기 위해 스쿠알란, 스테롤, 세라마이드, 중성 지질 또는 오일, 지방산 및 레시틴을 포함하는 오일상 성분의 혼합물을 약 200 내지 500nm의 입자 크기로 제조될 수 있다.
- [0232] 리포솜은, 예를 들어, 활성제(예: 재조합 APOA1BP 핵산 및 폴리펩티드)를 캡슐화하여 리포솜을 제조하는 방법을 포함하여 문헌(Park, et al., U.S. Pat. Pub. No. 20070042031)에 기재된 바와 같이 임의의 방법을 사용하여 제조될 수 있고, 상기 방법은 제1 저장소에 수용액을 제공하는 단계; 제2 저장소에 유기 지질 용액을 제공한 다음, 제1 혼합 영역에서 수용액을 유기 지질 용액과 혼합하여 리포솜 용액을 생성하는 단계로서, 여기서 유기 지질 용액을 수용액과 혼합하여 활성제를 캡슐화하는 리포솜을 실질적으로 순간적으로 생성하는, 단계; 그리고 즉시 리포솜 용액을 완충 용액과 혼합하여 희석된 리포솜 용액을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0233] 하나의 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하기 위해 사용되는 리포솜 조성물은, 예를 들어, 미국 특허 공보 제20070110798호에 기재된 바와 같이, 예를 들어, 화합물(예: 재조합 APOA1BP 핵산 및 폴리펩티드)를 목적하는 세포 유형(예: 내피 세포, 신경 세포 또는 이를 필요로 하는 임의의 조직 또는 영역, 예를 들어, CNS)에 표적화 전달하기 위한 치환된 암모늄 및/또는 폴리음이온을 포함한다.
- [0234] 예를 들어, 미국 특허 공보 제20070077286에 기재된 바와 같이, 활성제 함유 나노 입자(예: 2차 나노 입자)의 형태로 화합물(예: 본원에 제공된 방법을 실시하기 위해 사용되는 재조합 APOA1BP 핵산 및 폴리펩티드)을 포함하는 나노 입자가 제공된다. 하나의 구현예에서, 2가 또는 3가 금속염과 함께 작용하는 지용성 활성제 또는 지용성화 수용성 활성제를 포함하는 나노 입자가 제공된다.
- [0235] 하나의 구현예에서, 고체 지질 현탁액을 사용하여 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하기 위해 사용되는 조성물을 제형화하고 생체내에서 포유류 세포에, 예를 들어, 미국 특허 공보 제20050136121호에 기재된 바와 같이, CNS로 전달할 수 있다.
- [0236] 전달 비히클 변형 및 AIBP의 변형
- [0237] 대안적인 구현예에서, 재조합 AIBP 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 AIBP 포함 나노 입자, 리포솜 등(예를 들어, 본원에 제공된 방법을 실시하기 위해 사용되는 재조합 APOA1BP 핵산 또는 폴리펩티드를 포함하거나 내부에 함유하는)은 뇌척수액 또는 뇌로의 전달과 같은 척수강내 주사를 용이하게 하도록 변형된다. 예를 들어, 대안적인 구현예에서, AIBP 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 재조합 AIBP 포함 나노 입자, 리포솜 등은 AIBP 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 AIBP 포함 나노 입자, 리포솜 등이, 예를 들어, CNS 또는 뇌로의 전달을 용이하게 하는 수용체 또는 세포막 구조에 결합하도록 허용하는 모이어티를 포함하도록 조작되고, 여기서 모이어티는 만노스-6-포스페이트 수용체, 멜라노트랜스페린 수용체, LRP 수용체 또는 임의의 CNS 또는 뇌 세포의 표면에서 편재적으로 발현되는 임의의 다른 수용체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 만노스-6-포스페이트 모이어티의 접합은 만노스-6-포스페이트 수용체를 발현하는 CNS 세포에 의해 AIBP 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 재조합 AIBP 포함 나노 입자, 리포솜 등이 흡수되도록 허용한다. 대안적인 구현예에서, 생체내 CNS 또는 뇌로의 진입 또는 전달을 용이하게 하는 AIBP 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 AIBP 포함 나노 입자, 리포솜 등의 임의의 프로토콜 또는 변형이, 예를 들어, USPN 9,089,566에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.
- [0238] 대안적인 구현예에서, 재조합 AIBP 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 AIBP 포함 나노 입자, 리포솜 등(예를 들어, 본원에 제공된 방법을 실시하기 위해 사용되는 재조합 APOA1BP 핵산 또는 폴리펩티드를 포함하거나 내부에 함유하는)은 임의의 혈액 뇌 장벽(BBB)-표적화제, 예를 들어, 트랜스페린, 인슐린, 렙틴, 인슐린 유사 성장 인자, 양이온성 펩티드, 렉틴, 수용체 관련 단백질(RAP)(소포체 및 골지에 국한된 39kD 샤페론, 지단백질 수용체 관련 단백질(LRP) 수용체 계열 리간드), 아포지단백질 B-100 유래 펩티드, 트랜스페린 수용체에 대한 항체(예: 펩티드 모방 모노클로날 항체), 인슐린 수용체에 대한 항체(예: 펩티드 모방 모노클로날 항체), 인슐린 유사 성장 인자 수용체에 대한 항체(예: 펩티드 모방 모노클로날 항체), 렙틴 수용체에 대한 항체(예: 펩티드 모방 모노클로날 항체) 등에 직접 또는 간접적으로 연결되거나 접합된다. 대안적인 구현예에서, BBB의 교차를 용이하게 하는 AIBP 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 AIBP 포함 나노 입자, 리포솜 등의 임의의 프로토콜 또는 변형이, 예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 20050142141; 20050042227에 기재된 바와 같이, 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 방법을 실시하는 데 사용되는 조성물의 CNS 또는 뇌 전달을 향상시키기 위해, 임의의 프로토콜, 예를 들어, 직접 두개내 주사, BBB의 일시적 투과화, 및/또는 AIBP 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 AIBP 포함 나노 입자, 리포솜 등의 변형을 사용하여 조직 분포를 변경할 수 있다.

- [0239] 전달 세포 및 전달 비히클
- [0240] 대안적인 구현예에서, 임의의 전달 비히클은 본원에 제공된 방법 또는 용도를 실시하기 위해, 예를 들어, 조성물(예: 재조합 APOA1BP 핵산 및 폴리펩티드)을 생체내에서 CNS 또는 뇌로 전달하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리양이온, 양이온성 중합체 및/또는 양이온성 펩티드, 예를 들어, 폴리에틸렌이민 유도체를 포함하는 전달 비히클은, 예를 들어, 미국 특허 공보 번호 20060083737에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 전달 비히클은 내인성 또는 외인성 AIBP를 발현 또는 과발현한 다음 분비하도록 조작된 형질전환된 세포이다.
- [0241] 하나의 구현예에서, 건조된 폴리펩티드-계면활성제 복합체는, 예를 들어, 예를 들어, 미국 특허 공보 번호 20040151766에 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 방법을 실시하는데 사용되는 조성물을 제형화하는 데 사용된다.
- [0242] 하나의 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하는 데 사용되는 조성물은, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,306,783; 6,589,503에 기재된 바와 같이, 세포막 투과성 펩티드 접합체를 갖는 비히클을 사용하여 세포에 적용될 수 있다. 하나의 양태에서, 전달될 조성물은 세포막 투과성 펩티드에 접합된다. 하나의 구현예에서, 전달될 조성물 및/또는 전달 비히클은, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,846,743에 기재된 바와 같이, 수송 매개 펩티드에 접합되며, 이는 매우 염기성이며 폴리-포스포이노시티타이드에 결합하는 수송 매개 펩티드를 기재한다.
- [0243] 하나의 구현예에서, 후속적으로 CNS 또는 뇌로 전달될 세포는, 예를 들어, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,109,034; 6,261,815; 5,874,268에 기재된 바와 같이 임의의 전기 천공 시스템을 사용하여 세포에 조성물을 전달하기 위한 주요 또는 보조 수단으로 사용될 수 있는 전기 투과화에 의해 AIBP-발현 핵산, 예를 들어, 벡터로 형질감염 또는 형질도입된다.
- [0244] AIBP 인코딩 핵산의 생체내 전달
- [0245] 대안적인 구현예에서, AIBP 펩티드 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산, 또는 AIBP 활성을 갖는 펩티드 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산, 또는 내부에 이러한 핵산이 함유된 벡터 또는 재조합 바이러스를 전달하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 대안적인 구현예에서, 핵산, 벡터 또는 재조합 바이러스는 생체내 또는 CNS 전달 및 발현을 위해 설계된다.
- [0246] 대안적인 구현예에서, 재조합 AIBP-인코딩 핵산 또는 유전자, 또는 재조합 AIBP 인코딩 핵산 또는 유전자를 포함하는(그 안에 함유되는) 발현 비히클(예: 벡터, 재조합 바이러스 등)의 전달 및 제어된 발현을 위한 조성물 및 방법이 제공되며, 그 결과 AIBP 단백질이 혈류 또는 일반 순환으로 방출되어, 예를 들어, CNS, 뇌 또는 다른 표적과 같은 신체에서 유익한 효과를 가질 수 있다.
- [0247] 대안적인 구현예에서, 맞춤형 치료 및 최적의 안전성의 보장을 위해 AIBP 발현 핵산 또는 유전자 발현을 쉽고 효율적으로 켜고 끌 수 있는 방법이 제공된다.
- [0248] 대안적인 구현예에서, 재조합 AIBP 단백질 또는 AIBP 발현 핵산(들) 또는 유전자(들)에 의해 발현되는 단백질은, 비록 그들의 부위 또는 작용 부위로부터 멀리(예를 들어, 해부학적으로 멀리 떨어진) 혈액 또는 일반 순환으로 분비되더라도, 조직 또는 기관, 예를 들어, 뇌, CNS 또는 다른 표적에 유익하거나 유익한 효과(예를 들어, 치료적 또는 예방적)를 갖는다.
- [0249] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 방법을 실시하기 위해 재조합 AIBP-인코딩 핵산 또는 유전자의 생체내 발현을 위한 발현 비히클, 벡터, 재조합 바이러스 등이 제공된다. 대안적인 구현예에서, AIBP 핵산 또는 유전자를 발현하는 발현 비히클, 벡터, 재조합 바이러스 등은, 예를 들어, 외래 환자, 예를 들어, 진료실 방문시 근육내(IM) 주사, 정맥내(IV) 주사, 피하 주사, 흡입, 생물학적 입자 전달 시스템(예: 소위 "유전자 총") 등에 의해 전달될 수 있다.
- [0250] 대안적인 구현예에서, 이러한 "말초" 전달 방식, 예를 들어, IM 또는 IV 주사된 발현 비히클, 벡터, 재조합 바이러스 등은 유전자 또는 핵산이 기관(예: 뇌 또는 CNS) 자체에서 직접 발현될 때 발생하는 문제를 회피할 수 있다. 혈류 또는 일반 순환계에서 AIBP의 지속적인 분비는 또한 주입에 의한 단백질 투여의 어려움과 비용을 회피할 수 있다.
- [0251] 대안적인 구현예에서, 재조합 바이러스(예: 장기 바이러스 또는 바이러스 벡터), 또는 벡터, 또는 발현 벡터 등은, 예를 들어, 외래 환자로서, 예를 들어, 의사 진료실에서, 예를 들어, 전신 정맥(예: IV), 또는 근육내(IM)

주사, 흡입, 또는 생물학적 입자 전달 시스템(예: 소위 "유전자 총")에 의해 주입될 수 있다. 대안적인 구현예에서, 수 일 또는 수 주 후(예: 4주 후), 개체, 환자 또는 대상체는 AIBP 발현 핵산 또는 유전자의 발현을 유도하는 화학물질 또는 의약품을 투여되고(예: 흡입, 주사되거나 삼킴); 예를 들어, 경구 항생제(예를 들어, 독시사이클린 또는 라파마이신)은 매일 1회(또는 다소 자주) 투여되며, 이는 유전자의 발현을 활성화한다. 대안적인 구현예에서, 핵산 또는 유전자의 "활성화" 또는 발현 유도(예: 유도성 프로모터에 의해) 후, AIBP 단백질은 합성되어 대상체의 순환계(예: 혈액 내)로 방출되고, 후속적으로 개체 또는 환자에게 유익한(예: 심장, 신장 또는 폐 기능에 유익한) 생리학적 효과, 예를 들어, 치료적 또는 예방적 효과를 갖는다. 의사 또는 대상체가 AIBP 치료의 중단을 원하는 경우, 대상체는 단순히 활성화 화학물질 또는 의약품, 예를 들어, 항생제의 복용을 중단한다. 대안적인 구현예는, 예를 들어, 본원에 제공된 방법을 실시하는 데 사용되는 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, 이러한 서열과 상용성인 숙주에서, 예를 들어, 구조적 유전자 또는 전사체(예를 들어, AIBP 단백질을 인코딩하는)로서 핵산의 발현에 영향을 미칠 수 있는 AIBP 발현 핵산을 포함하거나 그 안에 함유하는 "발현 카세트"의 사용을 포함한다. 발현 카세트는 적어도 폴리펩티드 코딩 서열 또는 억제 서열과, 하나의 양태에서, 다른 서열, 예를 들어, 전사 종결 신호와 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 발현에 영향을 미치는 데 필요하거나 도움이 되는 추가의 인자, 예를 들어, 인핸서도 또한 사용될 수 있다.

[0252] 대안적인 양태에서, 발현 카세트는 또한 플라스미드, 발현 벡터, 재조합 바이러스, 재조합 "네이키드 DNA" 벡터의 임의의 형태 등을 포함할 수 있다. 대안적인 양태에서, "벡터"는 세포를 감염, 형질감염, 일시적 또는 영구적으로 형질도입할 수 있는 핵산을 포함할 수 있다. 대안적인 양태에서, 벡터는 네이키드 핵산 또는 단백질 또는 지질과 복합체화된 핵산일 수 있다. 대안적인 양태에서, 벡터는 바이러스 또는 박테리아 핵산 및/또는 단백질 및/또는 막(예: 세포막, 바이러스 지질 외피 등)을 포함할 수 있다. 대안적인 양태에서, 벡터는 DNA의 단편이 부착되어 복제될 수 있는 레플리콘(예: RNA 레플리콘, 박테리오파지)을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 벡터는 RNA, 자율적 자가 복제 원형 또는 선형 DNA 또는 RNA(예: 플라스미드, 바이러스 등, 예를 들어, 미국 특허 제5,217,879호 참조)를 포함하지만, 이에 제한되지 않고, 발현 플라스미드와 비발현 플라스미드를 모두 포함할 수 있다. 대안적인 양태에서, 벡터는 유사분열 동안 세포에 의해 자율 구조로서 안정하게 복제될 수 있거나, 또는 숙주의 게놈 내에 통합될 수 있다.

[0253] 대안적인 양태에서, "프로모터"는 세포, 예를 들어, 근육, 신경 또는 뇌 세포와 같은 포유류 세포에서 코딩 서열의 전사를 구동할 수 있는 모든 서열을 포함한다. 본원에 제공된 작제물에 사용되는 프로모터는 핵산, 예를 들어, AIBP 인코딩 핵산의 전사 타이밍 및/또는 속도를 조절하거나 변조하는 데 관여하는 시스-작용성 전사 제어 요소 및 조절 서열을 포함한다. 예를 들어, 프로모터는 인핸서, 프로모터, 전사 종결자, 복제 기원, 염색체 통합 서열, 5' 및 3' 비번역 영역 또는 전사 조절에 관여하는 인트론 서열을 포함하는 시스 작용성 전사 제어 요소일 수 있다. 이러한 시스 작용성 서열은 전형적으로 단백질 또는 기타 생체 분자와 상호 작용하여 전사를 수행(켜기/끄기, 조절, 변조 등)한다.

[0254] 대안적인 구현예에서, "구성적" 프로모터는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화 하에서 지속적으로 발현을 구동하는 프로모터일 수 있다. 대안적인 구현예에서, "유도성" 또는 "조절 가능한" 프로모터는 환경 조건, 투여된 화학적 제제 또는 발달 조건의 영향하에 핵산, 예를 들어, AIBP 인코딩 핵산의 발현을 지시할 수 있다.

[0255]

[0256] 유전자 요법 및 유전자 전달 비히클

[0257] 대안적인 구현예에서, 본 발명의 방법은 핵산(예: 재조합 AIBP-인코딩 핵산을 인코딩하는 유전자 또는 폴리펩티드) 전달 시스템을 사용하여 핵산 또는 유전자, 또는 AIBP 발현 핵산, 전사체 또는 메시지의 페이로드를, 예를 들어, 유전자 요법 전달 비히클로서 세포 또는 시험관내, 생체의 또는 생체내 세포에 전달하는 것을 포함한다.

[0258] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법을 실시하기 위해 사용되는 발현 비히클, 벡터, 재조합 바이러스 또는 등가물은 아데노 관련 바이러스(AAV), 렌티바이러스 벡터 또는 아데노바이러스 벡터; AAV 혈청형 AAV5, AAV6, AAV8 또는 AAV9; 레서스 유래 AAV 또는 레서스 유래 AAV AAVrh.10hCLN2; 기관-친화성 AAV, 또는 신경친화성 AAV; 및/또는 AAV 캡시드 돌연변이체 또는 AAV 하이브리드 혈청형이거나이들을 포함한다. 대안적인 구현예에서, AAV는 야생형(wt) AAV에 허용되지 않는 특정 세포 유형을 표적으로 하는 효율성을 증가시키고/시키거나 관심 세포 유형만을 감염시키는 효능을 향상시키도록 조작된다. 대안적인 구현예에서, 하이브리드 AAV는 다음을 포함하는 하나 이상의 변형에 의해 하이브리드 혈청형으로 재표적화되거나 조작된다: 1) 트랜스캡시드화, 2) 캡시드 표면에 대한 이중특이적 항체의 흡착, 3) 모자이크 캡시드의 조작 및/또는 4) 키메

라 캡시드의 조작. 야생형(wt) 바이러스에 허용되지 않는 특정 세포 유형을 표적으로 하는 효율성을 증가시키고 관심 세포 유형만을 감염시키는 효능을 향상시키기 위해 아데노 관련 바이러스(AAV) 캡시드를 조작하는 방법은 당업자에게 익히 공지되어 있고; 예를 들어, 문헌(Wu et al., Mol. Ther. 2006 Sep;14(3):316-27. Epub 2006 Jul 7; Choi, et al., Curr. Gene Ther. 2005 Jun;5(3):299-310)을 참조한다.

[0259] 예를 들어, 대안적인 구현예에서, 생체내 뇌 조직에서의 흡수가 증가된 혈청형 AAV-8, AAV-9, AAV-DJ 또는 AAV-DJ/8TM(Cell Biolabs, Inc.; 캘리포니아주 샌디에이고 소재)은 CNS에서의 발현을 위한 AIBP 인코딩 핵산 페이로드를 전달하기 위해 사용된다. 대안적인 구현예에서, 특정 조직을 표적화하기 위해 다음의 혈청형 또는 이들의 변이체가 사용된다:

[0260] **조직 최적의 혈청형**

[0261] CNS AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9

[0262] 심장 AAV1, AAV8, AAV9

[0263] 신장 AAV2

[0264] 간 AAV7, AAV8, AAV9

[0265] 폐 AAV4, AAV5, AAV6, AAV9

[0266] 췌장 AAV8

[0267] 광수용체 세포 AAV2, AAV5, AAV8

[0268] RPE(망막 색소 상피) AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV8

[0269] 골격근 AAV1, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9

[0270] 대안적인 구현예에서, 레서스 유래 AAV AAVrh.10hCLN2 또는 이의 등가물이 사용될 수 있으며, 여기서 레서스 유래 AAV는 인간의 임의의 기준 면역에 의해 억제되지 않을 수 있고다; 예를 들어, 인간에게 확장 가능한 투여량으로 래트 및 비인간 영장류의 CNS에 AAVrh.10hCLN2의 직접 투여가 허용 가능한 안전성 프로파일을 가지며 CNS에서 상당한 페이로드 발현을 매개한다고 교시하는 문헌(Sondhi, et al., Hum Gene Ther. Methods. 2012 Oct;23(5):324-35, Epub 2012 Nov 6; Sondhi, et al., Hum Gene Ther. Methods. 2012 Oct 17)을 참조한다.

[0271] 아데노 관련 바이러스(AAV)는 영장류의 일반적인 감염원이며, 따라서 건강한 영장류는 AAV 매개 유전자 전달 치료 전략을 억제하는 AAV 특이적 중화 항체(NAb)의 큰 풀을 수반하기 때문에, 본원에 제공된 방법은 개별화된 치료 설계를 용이하게 하고 치료 효능을 향상시키기 위해 특히 자주 사용되는 AAV8 캡시드 성분과 함께 치료 전에 AAV 특이적 NAbp 대한 환자 후보의 스크리닝을 포함할 수 있고; 예를 들어, 문헌(Sun, et al., J. Immunol. Methods. 2013 Jan 31;387(1-2):114-20, Epub 2012 Oct 11)을 참조한다.

[0272] 복용량

[0273] 본원에 제공된 방법 및 용도를 실시하는 데 사용되는 약제학적 조성물 및 제형은 예방적 및/또는 치료적 치료를 위해 투여될 수 있다. 치료적 적용에서, 조성물은 이미 질환, 상태, 감염 또는 결함을 앓고 있는 대상체에게, 예를 들어, 신경병증성 통증을 포함하여 질환, 상태, 감염 또는 질환 및 이의 합병증의 임상 증상을 치료, 완화 또는 부분적으로 정지시키기에 충분한 양("치료적 유효량")으로 투여된다. 예를 들어, 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 재조합 APOA1BP 핵산- 또는 폴리펩티드-포함 약제학적 조성물 및 제형은 신경병증성 통증, 염증 유발 신경병증성 통증, 염증 유발 신경병증성 통증, 신경 또는 CNS 염증, 이질통, 신경 손상 후 통증 또는 신경병증성 통증, 수술 후 통증 또는 신경병증성 통증, 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)(예: 시스플라틴 유발 이질통), 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 만성 또는 진행성 신경퇴행성 질환 또는 상태, 임의로 알츠하이머병 또는 만성 외상성 뇌병증(CTE) 또는 관련 타우병증, 외상성 뇌 손상(TBI), 외상 후 스트레스 장애, 외상성 전쟁 신경증, 또는 외상 후 스트레스 증후군(PTSS), 편두통, 통각과민증, 임의로 녹내장 또는 눈의 다른 염증성 질환, 임의로 폐 염증 및 천식, 임의로 HIV 감염 또는 이의 동반 질환, 및/또는 임의로 혈관 염증, 죽상 동맥 경화증 및 심혈관 질환을 치료, 예방, 역전 및/또는 개선하기에 충분한 양으로 이를 필요로 하는 개체에게 투여된다.

[0274] 이를 달성하기에 적합한 약제학적 조성물의 양은 "치료적 유효량"으로 정의된다. 이러한 용도에 효과적인 투여 일정과 양, 즉 "투여 섭생"은 질환 또는 상태의 단계, 질환 또는 상태의 중증도, 환자의 일반적인 건강 상태,

환자의 신체 상태, 연령 등을 포함하는 다양한 요인에 따라 달라질 것이다. 환자의 투여 섭생을 계산할 때 투여 방식도 고려된다.

[0275] 대안적인 구현예에서, 아데노 바이러스 또는 AAV 벡터와 같은 바이러스 벡터가 그 안에서 필요로 하는 개체에게 투여되고, 대안적인 구현예에서, 인간에게 투여되는 용량은 체중 kg당 약 2×10^{12} 벡터 게놈(vg/kg), 또는 체중 kg당 약 10^{10} 내지 10^{14} 벡터 게놈(vg/kg), 또는 약 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} 또는 그 이상의 vg/kg 을 포함하고, 이는 필요에 따라 단일 용량으로 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 대안적인 구현예에서, 이러한 용량은 경구, IM, IV 또는 척수강내로 투여된다. 대안적인 구현예에서, 벡터는, 예를 들어, 벡터가 나노 입자, 입자, 미셀 또는 리포솜 또는 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스 또는 덴드리머에 함유되어 있는 제형 또는 약제학적 제제로서 전달된다. 대안적인 구현예에서, 이러한 용량은 재조합 AIBP의 생체내 발현 수준을 유지하기 위해 필요에 따라 1일 1회, 1주일 1회 또는 이의 임의의 변형으로 투여되며, 이는 실제로 AIBP의 발현을 측정하거나 치료 효과, 예를 들어, 통증의 감소를 모니터링함으로써 모니터링될 수 있다. 투여 섭생은 또한 당 업계에 익히 공지된 약동학적 파라미터, 즉 활성제의 흡수 속도, 생체이용률, 대사, 클리어런스 등을 고려한다 (참조: 예를 들어, Hidalgo-Aragones (1996) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617; Groning (1996) Pharmazie 51:337-341; Fotherby (1996) Contraception 54:59-69; Johnson (1995) J. Pharm. Sci. 84:1144-1146; Rohatagi (1995) Pharmazie 50:610-613; Brophy (1983) Eur. J. Clin. Pharmacol. 24:103-108; the latest Remington's, supra). 최신 기술은 임상의가 각 개별 환자, 활성제 및 치료되는 질환 또는 상태에 대한 투여 섭생을 결정할 수 있게 한다. 의약품으로 사용되는 유사한 조성물에 대해 제공된 설명서는 투여 섭생을 결정하기 위한 설명서로서 사용될 수 있고, 즉 본원에 제공된 방법을 실시하는 투여된 투여 스케줄 및 투여 수준은 정확하고 적절하다.

[0276] 제형의 단일 또는 다중 투여는 환자에 의해 요구되고 허용되는 용량 및 빈도에 따라 제공될 수 있다. 제형은 본원에 기재된 바와 같은 상태, 질환 또는 증상을 효과적으로 치료, 예방 또는 개선하기에 충분한 양의 활성제를 제공해야 한다. 예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 방법을 실시하기 위해 사용되는 조성물의 경구 투여를 위한 대안적인 예시적 약제학적 제형은 1일 체중 킬로그램당 약 0.1 내지 0.5 내지 약 20, 50, 100 또는 1000 이상의 μg 의 1일 양으로 존재한다. 대안적인 구현예에서, 용량은 1일당 환자당 체중 킬로그램당 약 1mg 내지 약 4mg이다. 경구 투여와는 대조적으로, 더 낮은 용량이 혈류, 체강 또는 기관의 내강으로 사용될 수 있다. 실질적으로 더 높은 용량이 국소 또는 경구 투여 또는 분말, 스프레이 또는 흡입에 의한 투여에 사용될 수 있다. 비경구 또는 비-비경구 투여 가능한 제형을 제조하는 실제 방법은 당업자에게 공지되거나 명백할 것이며, 상기 Remington's 과 같은 간행물에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0277] 본원에 제공된 방법은 다른 약물 또는 의약품, 예를 들어, 관련 염증성 및 자가면역 질환 및 상태 등을 포함하는 임의의 신경학적 또는 신경근육 질환, 상태, 감염 또는 부상을 치료하기 위한 조성물과의 공동 투여를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 방법 및/또는 조성물 및 제형은 유체, 항생제, 사이토카인, 면역조절제, 항염증제, 통증 완화 화합물, 보체 활성화제, 예를 들어, 콜라겐 유사 도메인 또는 피브리노겐 유사 도메인(예: 피콜린), 탄수화물 결합 도메인 등을 포함하는 펩티드 또는 단백질 및 이들의 조합과 함께 공동 제형화되고/되거나 공동 투여될 수 있다.

[0278] 화합물의 바이오이소스테어

[0279] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법을 실시하기 위해 사용되는 화합물의 바이오이소스테어, 예를 들어, 재조합 APOA1BP 활성을 갖는 폴리펩티드도 제공된다. 본원에 제공된 방법을 실시하기 위해 사용되는 바이오이소스테어는, 예를 들어, 재조합 APOA1BP 핵산 및 폴리펩티드의 바이오이소스테어를 포함하며, 이는, 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법 또는 용도를 실시하기 위해 사용되는 화합물과 실질적으로 유사한 생물학적 특성을 생성하는 실질적으로 유사한 물리적 또는 화학적 특성을 갖는 치환체 및/또는 그룹으로 하나 이상의 치환체 및/또는 그룹 대체를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 하나의 바이오이소스테어를 다른 바이오이소스테어로 교환하는 목적은 화학 구조에 상당한 변화를 주지 않으면서 화합물의 목적하는 생물학적 또는 물리적 특성을 향상시키는 것이다.

[0280] 예를 들어, 하나의 구현예에서, 하나 이상의 수소 원자(들)는, 예를 들어, 대사 산화 부위에서 하나 이상의 불소 원자(들)로 대체되며; 이는 대사(이화 작용)가 일어나는 것을 방지할 수 있다. 불소 원자는 수소 원자와 크기가 비슷하기 때문에, 분자의 전체 토폴로지는 크게 영향을 받지 않아 목적하는 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는다. 그러나, 대사를 위한 차단된 경로로, 분자는 더 긴 반감기를 갖거나 덜 독성일 수 있는 등이다.

- [0281] 치료제를 CNS 또는 뇌에 직접 전달하는 장치
- [0282] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법을 실시하는 데 사용되는 나노 입자 및 리포솜을 포함하는 약제학적 조성물 및 제형은, 예를 들어, 정맥내 또는 척수강내 주사로 또는 당업자에게 공지된 다양한 장치에 의해 CNS 또는 뇌로 직접 전달된다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 20080140056은 의약품 및 제형의 직접 뇌 전달을 위한 척수강내 공간에서 뱃부리 전진 카테터를 기재한다. 이식 가능한 주입 장치도 또한 사용될 수 있고; 예를 들어, 주입 장치에서 뇌로 유체를 전달하는 카테터는 복부에서 환자의 두개골까지 피하 터널링될 수 있고, 여기서 카테터는 천공된 구멍을 통해 개체의 뇌에 접근할 수 있도록 할 수 있다. 대안적으로, 카테터는 환자의 척추관 내에서 제제를 척수강내로 전달하도록 이식될 수 있다. 예를 들어, 환자의 두개골 아래에 도입하기 위한 원위 말단부 및 환자의 외부에 잔류하는 근위 말단부를 갖는 가요성 가이드 카테터가 또한 사용될 수 있으며, 예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 20060129126을 참조한다.
- [0283] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법을 실시하기 위해 사용되는 약제학적 조성물 및 제형은 나노 입자 및 리포솜을 포함하는 약제학적 조성물 및 제형의 직접 전달, 또는, 예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 20080132878에 기재된 바와 같이, 예를 들어, 임의의 세포 이식 캐놀라, 주사기 등; 또는, 예를 들어, 미국 특허 제7,343,205호에 기재된 연장 의료용 삽입 장치; 또는, 예를 들어, 미국 특허 제4,899,729호에 기재된 수술용 캐놀라를 사용하여 AIBP를 발현하는 세포의 뇌로의 직접 이식을 통해 전달된다. 이식용 캐놀라, 주사기 등은 또한 액체, 예를 들어, 유체 현탁액으로 직접 주사에 사용될 수 있다.
- [0284] 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 방법을 실시하기 위해 사용되는 약제학적 조성물 및 제형은, 예를 들어, 자기 공명 영상(MRI) 및/또는 X-선 컴퓨터 단층촬영(CT)에 의해 검출 가능한 추적자로 전달되고; 추적자는 치료제와 함께 공동 주입될 수 있고, 예를 들어, 미국 특허 제7,371,225호에 기재된 바와 같이, 치료제가 표적 조직을 통해 이동할 때 치료제의 분포를 모니터링하기 위해 사용될 수 있다.
- [0285] 키트 및 설명서
- [0286] 예를 들어, 신경병증성 통증을 치료, 개선 또는 예방하기 위해 본원에 제공된 방법을 실시하기 위한 조성물(본원에 기재된 바와 같은 장치 포함) 및/또는 설명서를 포함하는 키트가 제공된다. 이와 같이, 키트, 세포, 벡터 등이 또한 제공될 수 있다. 대안적인 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 방법을 실시하는 데 사용되는 조성물, 또는 본원에 제공된 바와 같은 조성물, 약제학적 조성물 또는 제형을 포함하고, 임의로 이의 사용 설명서를 포함하는 키트가 제공된다.
- [0287] 본 발명은 본원에 기재된 실시예를 참조하여 추가로 기재될 것이지만; 본 발명이 이러한 실시예에 제한되는 것은 아님을 이해해야 한다.
- [0288] 실시예
- [0289] 실시예 1: 통증을 치료하기 위한 예시적인 방법에서 입증된 효능
- [0290] 본 실시예는 예시적인 구현예 및, 예를 들어, 이질통 및 TLR4 매개 염증 유발 신경병증성 통증을 포함하는 신경병증성 통증을, 예를 들어, 치료 또는 개선하기 위한 본원에 제공된 방법의 효능을 기재하고 입증한다.
- [0291] 신경염증은 신경병증성 통증 상태로의 전환 및 영구화의 주요 구성 요소이다. 척추 신경염증은 여기서 인플라마라프트로서 지정된 확대된 콜레스테롤 풍부 지질 뗏목에 국한된 TLR4의 활성화를 포함한다. 인플라마라프트 형성으로 이어지는 미세아교세포에서 콜레스테롤 수송체 ABCA1 및 ABCG1의 조건부 결실은 나이트 마우스에서 측각 이질통을 유도했다. apoA-I 결합 단백질(AIBP)은 인플라마라프트로부터 콜레스테롤 고갈을 촉진시키고, 야생형 마우스에서 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN) 모델에서 신경병증성 통증을 역전시켰지만, AIBP(화합물 7)는 ABCA1/ABCG1 결핍 미세아교세포가 있는 마우스에서 이질통을 역전시키지 못하여 콜레스테롤 의존성 메커니즘을 시사했다. TLR4 결합 도메인이 결여된 AIBP 돌연변이체는 미세아교세포와 결합하지도 않았고 CIPN 이질통을 역전시키지도 않았다. CIPN에서 단일 AIBP(화합물 7) 투여량의 오래 지속되는 치료 효과는 항염증 및 콜레스테롤 대사 재프로그래밍 및 미세아교세포에서 지질 액적 축적 감소와 관련이 있었다. 이러한 결과는 미세아교세포에서 TLR4 인플라마라프트 및 유전자 발현 프로그램을 제어하고 신경염증의 영구화를 차단함으로써 신경병증성 통증 조절의 콜레스테롤 구동 메커니즘을 시사한다.
- [0292] 결과
- [0293] 화학요법 유발 말초 신경병증은 척추 미세아교세포에서 지질 뗏목과 TLR4 이량체화를 변경한다

- [0294] 화학요법 유발 말초 신경병증 모델(Woller et al., 2018)에서, 시스플라틴의 복강내 주사는 수컷 마우스에서 심각한 축삭 이질통을 유발했다(도 1A). 이 상태는 척추 미세아교세포에서 지질 뿔의 형성 증가와 관련이 있었으며, 막 콜레스테롤 역학의 변경 및 TLR4의 이량체화 증가를 시사한다(도 1B 및 1C). 척수강내 AIBP(화합물 7)는 CIPN 관련 이질통을 역전시키고 척추 미세아교세포의 지질 뿔 및 TLR4 이량체 수준을 정규화했다(도 1A-C). 이러한 데이터는 다른 세포 유형에서 입증된 바와 같이, TLR4 염증 캐스케이드 활성화의 첫 번째 단계인 TLR4 수용체 이량체화가 미세아교세포 지질 뿔에서 발생한다는 것을 시사한다(Cheng et al., 2012; Zhu et al., 2010). 이러한 개념은 지질 뿔에서 TLR4의 국소화가 LPS로 처리된 BV-2 미세아교세포에서 현저히 증가되었고, AIBP(화합물 7)가 LPS 유도 TLR4-CTxB 공동 국소화를 방지한 시험관내 실험에서 뒷받침되었다(도 1D). 유세포 분석법 및 현미경 실험에 사용된 TLR4 항체의 특이성은 *Tlr4*^{-/-} 마우스의 세포로 검증되었다(도 S1A 및 B). 후근 신경절(DRG)에 있는 대식세포도 통각 반응에 관여하고 TLR4를 발현하기 때문에, 본 발명자들은 TLR4 이량체화 및 지질 뿔 함량을 평가했다. 그러나, 이 시점에서 DRG CD11b⁺ 글루 세포에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다(도 S1C 및 D).
- [0295]
- [0296] CSF 및 척수에서 AIBP(화합물 7)의 단시간 노출
- [0297] AIBP(화합물 7)의 단일 척수강내 투여량은 적어도 2개월 동안 지속된 CIPN 마우스에서 이질통을 역전시키는 오래 지속되는 치료 효과를 보였다(Woller et al., 2018). 이는 i.t. 전달시 척수에서 AIBP(화합물 7) 장기간 노출에 의해 또는 유전자 발현 프로파일의 변화에 반영된 질환 변경 효과로 설명될 수 있다. 전자를 테스트하기 위해, 본 발명자들은 재조합 AIBP의 i.t. 전달 후 CSF 및 요추 척수 균질액에서 AIBP의 약물동력학을 측정했다. 본 발명자들은 척수 조직에서 내인성 마우스 AIBP와 함께 사용하는 항체의 교차 반응성을 피하기 위해 이들 실험에서 *Apoa1bp*^{-/-} 마우스를 사용했다. 이 연구는 CSF와 척수 조직에서 AIBP(화합물 7) 단시간 노출을 입증했으며, 최고 수준은 30분까지 도달하고, 4시간 후에는 이미 검출할 수 없다(도 1E 및 1F). 이러한 결과는 CSF에서 거대분자의 신속한 제거에 대한 최근 보고와 일치하며(Ahn et al., 2019), 막에서 TLR4 역학의 완화 및 AIBP의 가능한 다른 효과가 척수 미세아교세포 및/또는 다른 세포 유형의 재프로그래밍을 초래한다는 것을 시사한다.
- [0298] 화학요법 유발 말초 신경병증은 척추 미세아교세포의 유전자 발현 프로파일을 변경한다
- [0299] CIPN에서 척추 미세아교세포를 특성화하기 위해, 본 발명자들은 나이브, 시스플라틴/식염수 및 시스플라틴/AIBP(화합물 7) 처리 야생형(WT) 마우스로부터 단리된 척추 미세아교세포의 RNA-seq 및 차등 유전자 발현 분석을 수행했다(품질 관리 및 데이터 세트 특성화에 대해서는 방법 및 도 S2 참조). 본 발명자들은 모든 샘플에 걸쳐 임의의 조건에 의해 조절되는 유전자를 식별하기 위해 우도비 테스트(LRT)를 사용하고 척추 미세아교세포 전사체에서 CIPN 및 AIBP(화합물 7)의 주요 효과를 나타내는 3254개의 차등 발현 유전자(DEG)를 확인했다(도 2A). 이러한 변화의 대부분은 CIPN 조건에 의해 구동되었고, AIBP(화합물 7)의 영향은 거의 없었다(도 2A 및 2B, 그룹 1 및 그룹 2). 그러나, 더 적은 그룹의 CIPN 조절 유전자가 있었고, 이 변화는 AIBP(화합물 7) 처리에 의해 완전히 역전되었다(도 2A 및 B, 그룹 3 및 그룹 4). CIPN에서 상향조절된 경로와 유전자 온톨로지(GO) 생물학적 과정 중에는 복제, 번역 및 미토콘드리아 기능이 있었다. 여러 풍부한 경로는 파킨슨병 및 알츠하이머병과 같은 CNS 질환과 관련된 미세아교세포 표현형 변화와 관련이 있었다(도 2C). 콜레스테롤 수송체 *Abca1* 및 *Abcg1*은 막 콜레스테롤 트래킹 손상을 나타내는 시스플라틴 처리 마우스의 미세아교세포에서 하향조절되었다(도 3A 및 3C). 다른 하향조절된 유전자 중에는 자가포식 및 지방포식에 중요한 리소좀 유전자가 있었고, 이는 지질 저장 조절 장애를 시사한다. 아라키돈산 대사 유전자도 상향조절되었고(도 3C), 이는 생리활성 지질 매개체와 염증의 방출을 시사한다.
- [0300] LRT 분석 후 CIPN과 나이브 그룹의 쌍별 비교를 사용하여, 본 발명자들은 신경퇴행성 질환 관련 미세아교세포(DAM)로의 전환과 관련된 표현형인 *Cx3cr1*, *P2ry12* 및 *Tmem119* 항상성 마커(도 3A 및 B)의 하향조절도 관찰했다(Masuda et al., 2019; Nugent et al., 2020; Prinz et al., 2019). 미세아교세포 DAM 시그니처 유전자의 하위 집합은 항상성 유전자의 감소와 염증 및 콜레스테롤 대사 유전자의 증가와 함께 DAM 시그니처를 나타냈다. 식세포 TAM 수용체 *Tyrobp*, *Axl* 및 *Mertk*의 조절은 부분적으로 신경퇴행성 질환의 DAM 특성을 모방했지만, CIPN 미세아교세포에서 본 발명자들은 *Trem2*에 대한 하향조절을 관찰했으며 파트너 수용체 유전자 *Tyrobp*에 대한 유의한 영향을 관찰하지 않았고(도 3B), 이는 미세아교세포 및 대식세포에서 변경된 지질 항상성 및 증가된 지질 축적과 관련된 덜 식세포 표현형을 시사한다(Jaitin et al., 2019; Marschallinger et al., 2020).

- [0301] 흥미롭게도, CIPN에서 농축된 지질 저장 유전자와 관련된 DAM 시그니처의 일부가 지질 액적 단백질 PLIN2를 인코딩하는 유전자를 포함하여 AIBP(화합물 7)에 의해 하향조절되었다(도 3B 및 3C). PLIN2 번역조절화학은 시스플라틴 처리 마우스의 척추 미세아교세포에서 지질 액적의 수 및 크기의 증가 및 AIBP(화합물 7)에 의한 이 효과의 역전을 나타내는 RNA-seq 결과를 검증했다(도 3D-H).
- [0302] 염증 유전자 발현에서 CIPN 유도된 변화의 AIBP(화합물 7)에 의한 선택적 역전
- [0303] CIPN에 의해 상향조절되고 AIBP에 의해 역전된 유전자 그룹을 분석하여(도 2B 및 도 S2F의 그룹 3), 본 발명자들은 염증 반응, 백혈구 화학 주성 및 호중구 탈과립화 경로의 농축된 경로를 발견했다(도 4A). 이러한 농축된 경로의 유전자 중 일부는 *Il1b*, *Ccl2*, *Glpr1* 및 *Glpr2*, *Gpmb*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *S100a8*, *Il22ra2*, *Il1r2*, *Fpr1*, *Apoe*, *Ccl9* 및 TLR4 상호 작용 유전자 *Tril*을 포함한다(도 4B 및 C). 척수 조직에서 사이토카인 단백질 발현을 조사하여, 본 발명자들은 AIBP(화합물 7)에 의한 CCL2(MCP-1) 및 CXCL2(MIP2) 발현의 조절을 확인했다(도 4D). AIBP(화합물 7)는 또한 시스플라틴에 의해 유도되지 않는 염증성 및 비염증 유전자를 하향조절했다. 이들은 *Ccl24*, *Il3ra*, *Xcr1* 및 TLR4 경로 관련 유전자 *Ptpn22*를 포함한다(도 4E). AIBP(화합물 7)에 의해 하향조절된 모든 유전자의 경로 및 GO 분석은 사이토카인-사이토카인 수용체 상호 작용, 단백질 키나제 A 및 C 및 MAPK 조절 경로, 수용체 매개 세포내섭취(endocytosis) 및 기타 막 신호전달 경로와 함께 TLR4 신호전달 경로의 농축을 나타낸다(도 4F). 칼슘 및 막 전위 조절도 또한 하향조절되었으며, 펩티다제 억제 경로의 농축은 지질 막과 상호 작용하고 소포 트래피킹 및 신경 전달 물질 방출을 조절하는 *Pil6* 및 알파-시누클레인 유전자 *Snca*와 같은 최근 보고된 통증 관련 펩티다제 억제 관련 유전자에서 AIBP(화합물 7) 효과를 나타낸다(도 4G).
- [0304] CIPN 모델에서 AIBP(화합물 7) 처리된 마우스의 미세아교세포의 차등 발현 분석은 또한 CIPN에서 하향조절되고 AIBP(화합물 7)에 의해 역전된 40개의 유전자를 나타냈다(도 S2E). 농축된 경로에는 키나제 및 포스포타제 활성의 조절(도 4A), 및 액틴 세포골격, 막 재구성 및 핵 신호전달 유전자 *Bin1*, *Pak1*, *Vav2* 및 *Ccdc88a*와 막 지질 신호전달 캐스케이드 관련 단백질 *Dgka*(도 4H)가 포함되었다. 전반적으로, 이러한 결과는 CIPN 마우스에서 유도된 미세아교세포 재프로그래밍의 AIBP(화합물 7) 역전이 지질 대사의 조절과 막에서 지질 액적 및/또는 세포의 수용체로의 트래피킹을 포함한다는 것을 시사한다.
- [0305] AIBP(화합물 7)는 ABCA1/ABCG1 결핍 미세아교세포를 갖는 마우스의 이질통을 역전시킬 수 없다
- [0306] 통각에서 미세아교세포 콜레스테롤 동역학의 역할을 평가하기 위해, 본 발명자들은 먼저 ALOD4의 결합에 의해 검출된 바와 같이 유출 또는 소포체로의 수송에 접근할 수 있는 막 콜레스테롤에 의한 ABCA1 콜레스테롤 수송체의 공동 국소화를 측정했다(He et al., 2017). LPS에 의한 BV-2 세포의 처리는 지질 뱃속 도메인에서 ABCA1 및 APOA1에 의한 ALOD4의 공동 국소화를 감소시켰고, 이 효과는 AIBP(화합물 7)에 의해 역전되었다(도 5A 및 B).
- [0307] 다음으로, 본 발명자들은 타목시펜 유도성, 미세아교세포 특이적 ABCA1 및 ABCG1 이중 녹아웃 마우스(ABC-imKO, 도 5C)를 생성하고, ABCA1 및 ABCG1 녹다운이 척수 IBA1⁺ 미세아교세포에서는 관찰되었지만, GFAP⁺ 성상교세포 또는 NeuN⁺ 뉴런에서는 관찰되지 않았음을 검증했다(도 S3). 미세아교세포에서 ABCA1 및 ABCG1 콜레스테롤 수송체를 녹다운시키면 임의의 자극적 도전 없이 기저 이질통(0일째)의 발생을 초래했다(도 5D). 이러한 결과는 미세아교세포 콜레스테롤 트래피킹의 손상이 촉진된 상태로 이어진다는 증거에 추가된다. 실제로, 본 발명자들은 나이브 ABC-imKO 마우스의 척추 미세아교세포가 WT 마우스에 비해 TLR4의 표면 발현이 증가하고, TLR4 이량체화가 증가하며, 지질 뱃속 함량이 더 높다는 것을 관찰했다(도 5E).
- [0308] 놀랍게도, WT 마우스에서와 달리, i.t. AIBP(화합물 7)는 ABC-imKO 마우스에서 i.t. LPS에 의해 유도된 기계적 이질통을 예방할 수 없었다(도 5F 및 S5A). 그런 다음, 본 발명자들은 시스플라틴으로 ABC-imKO 마우스에서 CIPN을 유도하고, 이질통의 더 빠른 발병을 관찰했다. 또한, CIPN 모델 7일째에 ABC-imKO 마우스에서 AIBP의 i.t. 전달은 기계적 이질통을 역전시키지 않은 반면(도 5G), i.t. AIBP는 타목시펜 대신 비히클로 처리된 유전자 도입(한배 새끼) 마우스(도 5H)와 타목시펜을 처리된 야생형 마우스(도 S5B)에서 CIPN 이질통을 역전시키는 데 효과적이었다. 원형질막으로부터 콜레스테롤을 고갈시키지만 ABCA1 또는 ABCG1 발현이 필요하지 않은 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린(hp-β-CD)의 i.t. 주사는 ABC-imKO 마우스의 이질통을 완화시켰다(도 S4C). 나이브 ABC-imKO 마우스에서, TLR4 이량체화 및 지질 뱃속 풍부도는 나이브 WT 마우스에서보다 유의하게 높았으며, 그들은 ABC-imKO 미세아교세포에서 시스플라틴에 의해서도 AIBP에 의해서도 유의하게 변경되지 않았다(도 5I 및 J). 이러한 결과는 AIBP가 미세아교세포에서 인플라마라프트와 TLR4 이량체화 동역학을 변경하고 이질통을 역전시키기 위해 콜레스테롤 수송체를 필요로 한다는 개념을 뒷받침한다.

[0309] ABCA1/ABCG1 결핍은 미세아교세포를 CIPN 유사 표현형으로 재프로그래밍한다

[0310] CIPN과 AIBP에 의해 유도된 전사 변화에서 콜레스테롤 수송의 효과를 이해하기 위해, 본 발명자들은 ABC-imKO 미세아교세포에서 차등 유전자 발현을 분석했다. 본 발명자들은 두 가지 유전자형과 세 가지 실험 조건에 걸쳐 유의하게 변화된 121개의 유전자를 식별했다(도 S4D). 시스플라틴 ABC-imKO 마우스로 도전되지 않은 나이브의 척추 미세아교세포에서, 대부분의 상향조절된 유전자와 농축된 경로는 WT 마우스에서 시스플라틴에 의해 유도된 상향조절된 유전자와 중첩되었다(도 6A 및 B). 나이브 ABC-imKO 마우스의 농축된 경로 중, 본 발명자들은 인터페론에 대한 반응, 염증 반응, 보체 활성화 및 아라키돈산 대사 경로를 식별했다(도 6B). 상향조절된 인터페론 유전자는 *Ifi207* 및 *Ifi2712a*, 염증 유전자 *Xcr1*, *Cb4*, *C3* 및 *Klrb1b*를 포함했다. 지질 대사 관련 유전자 *Apoe*와 *Ch25h*는 WT 마우스에서 시스플라틴에 의해 유도된 변화와 유사하게 나이브 ABC-imKO에서 유의하게 상향조절되었다(도 6C 및 F). 이러한 미세아교세포 재프로그래밍은 나이브 ABC-imKO 마우스에서 관찰된 통증 거동 적어도 부분적으로 설명할 수 있다.

[0311] ABC-imKO 마우스에서 CIPN의 유도는 또한 ABC-imKO 및 WT 미세아교세포 모두에 공통적인 여러 세트의 유전자 및 경로를 상향조절하였다. 그러나, WT에서와 달리, 파고솜, 식세포 캡 형성을 위한 액틴 동역학 및 세포 주기 경로와 같은 이러한 경로는 시스플라틴 처리 마우스의 ABC-imKO 미세아교세포에서는 농축되지 않았다(도 6D 및 S5E). ABC-imKO 미세아교세포에서 시스플라틴은 여러 염증 유전자의 발현을 유도하지 못했으며, *Cxcl3*, *Xrip1*, 파고솜 관련 *Fcrls* 및 *Cybb(NOX2)*의 발현을 하향조절했다(도 6F 및 G). 콜레스테롤 수송체의 부재하에, 시스플라틴은 콜레스테롤 합성 경로 유전자를 유도하지 않았고, *Ch25h* 및 *Dhcr24*를 하향조절하였고, 이는 과량의 유리 콜레스테롤이 존재하여 LXR 작용제이자 죽상 동맥 경화증에서 대식세포 발포체 세포 전사체의 주요 조절 인자(Span et al., 2012)인 데스모스테롤의 축적을 촉진하는 것으로 나타났다(도 6E 및 G). 손상된 식균 작용과 *Tnfrsf26*, *Trpv4*, *Il13ra*, *Il15a* 및 *Shtn1*의 상향조절(도 6E-G)은 ABC-imKO 마우스에서 통각 과정에 대한 막 동역학의 차등적 역할을 나타낼 수 있다.

[0312] AIBP(화합물 7)에 의한 미세아교세포 재프로그래밍은 ABCA1 및 ABCG1 발현에 의존한다.

[0313] WT 및 ABC-imKO 마우스에서 AIBP(화합물 7)의 차등 효과를 이해하기 위해, 본 발명자들은 두 유전자형 모두에서 AIBP 처리에 의해 유도된 상향 및 하향조절된 유전자를 비교했다(도 7A 및 B). 유전자 조절에 대한 AIBP(화합물 7)의 효과는 현저하게 상이했으며, 두 유전자형 모두에서 소수의 공통 유전자만 하향조절되었다(도 7A). 콜레스테롤 트래피킹 기계의 부재하에, AIBP는 염증 유전자를 조절하지 못하고, 대신 발현을 유도했다(도 7B 및 C). 염증 유전자의 유도는 증가된 *Dhcr24* 및 WT 미세아교세포에서 하향조절된 *Srebf2*를 포함한 다른 콜레스테롤 생합성 유전자와 상관관계가 있다(도 7D). 이는 감소된 데스모스테롤과 증가된 콜레스테롤 함량이 미세아교세포에서 염증 유전자 발현을 조절한다는 것을 시사한다. 이에 동의하여, *Apoe*, *Apoc1* 및 *Pparg*와 같은 LXR에 의해 제어되는 유전자의 유도는 ABC-imKO의 미세아교세포에서는 관찰되었지만 WT 마우스는 관찰되지 않았다(도 7D). WT와 대조적으로 AIBP(화합물 7)에 의해 ABC-imKO에서 반대 방향으로 조절되는 다른 비염증 유전자는 엔도렙티다제 활성 유전자 *Pi16* 및 *Capn11*과 AMPA 수용체 및 시냅스 조절 인자 *Arc*를 포함한다(도 7E). ABC-imKO 미세아교세포에서, AIBP(화합물 7)는 콜레스테롤 대사 경로, 사이토카인 방출 및 케모카인 신호전달 조절, 키나제 및 엔도렙티다제 활성, 및 라멜리포디아 및 섬유 조직 경로를 상향조절했다(도 7F). 이러한 경로의 대부분은 WT 미세아교세포에서 AIBP에 의해 하향조절되었다(도 4F). 전체적으로, 이러한 데이터는 AIBP(화합물 7)에 의해 유도된 미세아교세포 유전자 발현의 재프로그래밍이 콜레스테롤 수송체 ABCA1 및 ABCG1에 의해 조절되는 콜레스테롤 항상성에 의존적이라는 것을 나타낸다.

[0314] 미세아교세포 AIBP 및 TLR4는 통각을 조절한다

[0315] 상기 실험은 통각에서 AIBP(화합물 7) 조절 콜레스테롤 항상성 및 미세아교세포 TLR4의 활성화와 관련이 있기 때문에, 본 발명자들은 AIBP 또는 TLR4의 미세아교세포 특이적 녹아웃이 CIPN 이질통에 영향을 미치는지 여부를 조사했다. 본 발명자들은 타목시펜 유도성, 미세아교세포 특이적 *Apoalbp* 및 *Tlr4* 녹아웃 마우스를 생성했다(AIBP-imKO 및 TLR4-imKO, 도 8A). 미세아교세포에서 내인성 AIBP를 녹다운시키면 마우스가 시스플라틴으로 도전되기 전에도 기계적 이질통이 유도되었다(0일, 도 8B). 이는 AIBP가 기계적 통각에서 미세아교세포 항상성 기능의 유지에 역할을 한다는 것을 시사한다. 플록싱된 유전자가 없는 대조군 *Cx3cr1-Cre^{ERT2}* 마우스에서, 타목시펜의 주사는 기계적 이질통을 유발하지 않았다(도 8C). 시스플라틴 도전 후, 미세아교세포 AIBP 녹다운은 대조군 마우스에서보다 기계적 역치의 더 빠른 감소를 초래했고(도 8D의 2일째와 도 8E의 6일째 비교), 미세아교세포 AIBP 녹다운 마우스에서 더 높은 감작을 나타냈다. 7일째에 재조합 AIBP의 척수강내 주사는 비히클 및 타목시펜 유도 AIBP-imKO 마우스 모두에서 CIPN 관련 이질통이 동일하게 역전시켰다(도 8C 및 D). 전신 *Apoalbp*

녹아웃 마우스에서, 본 발명자들은 WT 마우스와 비교하여 기저 이질통을 관찰하지 않았으며, i.t. AIBP는 CIPN 유발 이질통을 구출했다(도 8F). AIBP-imKO 또는 ABC-imKO와 대조적으로, TLR4-imKO 마우스는 시스플라틴 유발 이질통의 빠른 발병으로부터 보호되었으며 지연되고 덜 심한 이질통을 나타내었으며(도 8G), 이는 통증 감각을 매개하는 데 있어 미세아교세포에서 TLR4 발현의 역할을 시사한다.

[0316] TLR4 결합을 담당하는 AIBP 도메인의 식별

[0317] TLR4-imKO 마우스는 초기/급성 CIPN으로부터 보호되었기 때문에(도 8G), 본 발명자들은 본 발명자들이 이전에 보호한 AIBP-TLR4 결합의 생체내 유의성을 평가하기 위해 이 모델을 사용할 수 없었다(Woller et al., 2018). 여기서, 본 발명자들은 다른 접근법을 취하여 TLR4와 결합하지 않는 AIBP 돌연변이체를 만들었다. AIBP에서 어떤 도메인이 TLR4에 대한 결합을 담당하는지를 밝히기 위해, 본 발명자들은 AIBP의 YjeF_N 도메인(도 9A)의 결정 구조(Jha et al., 2008)로부터 예측된 돌연변이 아미노산으로부터 시작하여 단백질-단백질 상호작용에 참여하였지만, 이러한 돌연변이체는 TLR4 결합 특성을 유지했다(표시되지 않음). 다음으로, 본 발명자들은 단백질의 전장을 스캐닝하는 AIBP의 일련의 결실 돌연변이체를 개발하고, TLR4 엑토도메인(eTLR4)을 이용한 풀다운 검정에서 그들을 테스트했다(도 9B). 이러한 실험은 aa 1-24 신호 펩티드 뒤에 위치한 25-51 아미노산 N-말단 도메인이 eTLR4 결합에 관여한다는 것을 시사했다(도 9A 및 B). aa 25-51 N-말단 도메인은 마우스 AIBP의 공개된 결정 구조에서 구조화되지 않았다(Jha et al., 2008). 인간과 마우스 AIBP는 모두 상동성 aa 25-51 N-말단 도메인을 함유하지만 체브라피쉬 AIBP는 그렇지 않다. 실제로, 인간 및 마우스와 달리, 체브라피쉬 AIBP는 인간 eTLR4와 결합하지 않았다(도 9C). 추가 실험을 위해, 본 발명자들은 바쿨로바이러스/곤충 세포 시스템에서 신호 펩티드가 결여된 wtAIBP(aa 25-288)와 신호 펩티드와 N-말단 도메인이 모두 결여된 mutAIBP(aa 52-288)를 발현 및 정제했다.

[0318] wtAIBP와 달리, mutAIBP는 풀다운 검정(도 9D)이나 eTLR4 코팅 플레이트를 사용한 ELISA 및 본 실험실에서 개발된 BE-1 항-AIBP 모노클로날 항체(mAb)를 사용한 결합된 AIBP의 검출에서 eTLR4에 결합하지 않았다(Choi et al., 2020)(도 9E). BE-1 mAb는 wtAIBP 및 mutAIBP에 대해 동일한 친화도를 가졌다(도 S5B). APOA1에 대한 mutAIBP의 결합은 wtAIBP와 비교했을 때 변하지 않고 유지되었다(도 9F). 세포 배양 실험에서, BV-2 미세아교세포에 결합된 mutAIBP가 아닌 wtAIBP는 LPS로 자극되었다(도 9G 및 H). LPS에 대한 반응으로 wtAIBP 결합의 증가는 세포 표면으로의 TLR4의 모집 및 인플라마라프트에 대한 이의 국소화에 의해 설명될 수 있다(Yvan-Charvet et al., 2008; Zhang et al., 2018; Zhu et al., 2010). 종합적으로, 이러한 결과는 TLR4 결합에서 AIBP의 aa 25-51 N-말단 도메인의 역할을 시사한다.

[0319] TLR4 결합 도메인이 결여된 AIBP는 CIPN 이질통을 완화할 수 없다

[0320] wtAIBP와 달리, TLR4 결합 부위가 결여된 mutAIBP는 BV-2 미세아교세포에서 LPS 유도 TLR4 이량체화를 억제할 수 없었지만(도 10A), 지질 뗏목을 감소시키는 전반적인 능력은 유지했다(도 10B). 다음으로, 본 발명자들은 이 TLR4 표적화가 AIBP의 치료 효과를 매개한다는 가설을 테스트했다. i.t. LPS 전에 i.t. 식염수 또는 mutAIBP를 투여한 마우스는 이질통을 빠르게 그리고 동일한 정도로 발달시킨 반면, i.t. wtAIBP는 LPS에 의해 유발된 기계적 이질통을 예방했다(도 10C). CIPN 마우스 모델에서, i.t. wtAIBP는 확립된 이질통을 역전시켰고, 지속적인 치료 효과는 적어도 14일 동안 지속되었다(도 10D). 그러나, i.t. mutAIBP는 나이브 또는 기준선 수준에 도달하지 않고 2 내지 3일 동안만 지속되는 기계적 역치에서 완만하고 일시적인 반전만을 유도했다(도 10D). 21일째에, 마우스를 종료시키고, 요추 척수를 분석했다. 놀랍게도, 이 후기 시점에서, 시스플라틴 유도된 다발성신경병증은 척추 미세아교세포에서 증가된 TLR4 이량체화 및 지질 뗏목과 계속 연관되었으며, 이는 8일째에 관찰된 효과와 유사하게(도 1B 및 C), mutAIBP에 의해서가 아니라 i.t. wtAIBP에 의해 유의하게 감소되었다(도 10E 및 F). 이러한 결과는 TLR4 인플라마라프트의 AIBP 표적화가 CIPN의 마우스 모델에서 AIBP의 치료 효과를 대 부분 매개한다는 가설을 뒷받침한다.

[0321] 토론

[0322] 이 연구에서, 본 발명자들은 화학요법 유발 말초 신경병증(도 10G) 및 아마도 다른 신경병증에서 신경병증성 통증의 새로운 수준의 조절로서 척추 미세아교세포에서 TLR4-호스팅 인플라마라프트로부터 선택적 콜레스테롤 고갈의 새로운 메커니즘을 보고한다. 미세아교세포에서 콜레스테롤 수송체 ABCA1 및 ABCG1의 조건부 결실은 시스플라틴 효과와 유사성을 나타내는 나이브 마우스에서 자발적인 이질통을 유도했으며, 중요하게는 미세아교세포에서 ABCA1 및 ABCG1 발현의 부족은 LPS- 또는 시스플라틴-유도 이질통을 역전시키거나 척추 미세아교세포에서 인플라마라프트 및 TLR4 이량체화를 감소시키는 AIBP 능력을 폐지하였다. 거동 및 TLR4 동역학에서의 이러한 차등 효과는 ABC-imKO 미세아교세포에서 차등적 유전자 발현 및 염증 유전자를 억제하는 AIBP의 무능력을 동반

했다.

[0323] AIBP는 활성화된 세포에서 인플라마라프트를 파괴하는 특이한 능력을 가지고 있지만, 정지된 세포의 생리학적 지질 뗏목에는 거의 영향을 미치지 않는다. 본 발명자들은 이는 염증 세포의 표면에서 고도로 발현되는 TLR4에 대한 AIBP 결합으로 이들 세포에서 콜레스테롤 고갈을 지시하기 때문이라고 제안했다(Miller et al., 2020; Woller et al., 2018). 이 연구에서, 본 발명자들은 AIBP의 N-말단 도메인을 TLR4의 결합 부위로 식별했으며, 활성화된 미세아교세포에 AIBP 결합과 CIPN에서의 이의 치료 효과를 가능하게 하는 이 도메인의 중요한 역할을 입증했다. 본 발명자들은 이것이 AIBP를 사이클로텍스트린, APOA1 및 APOA1 모방 펩티드 또는 LXR 작용제에 의해 영향을 받는 비선택적 콜레스테롤 제거와 대조적으로 인플라마라프트에 지시된 선택적 요법이기도 하다고 제안한다. N-말단 도메인이 결합된 돌연변이된 인간 AIBP는 여전히 APOA1에 결합하고, 이 N-말단 도메인이 자연적으로 부재하는 야생형 제브라피쉬 *Aibp*는 여전히 내피 세포에서 콜레스테롤 유출을 증가시키고 혈관신생을 조절하고 조혈 내피로부터 조혈 줄기 및 전구 세포의 출현을 조절하고(Fang et al., 2013; Gu et al., 2019), 이는 내피 세포와 AIBP 상호 작용의 상이한 TLR4 독립적 메커니즘을 시사한다.

[0324] AIBP의 척수강내 전달은 CIPN의 마우스 모델에서 지속적인 치료 효과를 보였으며, 이전 연구에서 최대 10주 동안(Woller et al., 2018), 이 연구에서는 2주 동안 관찰되었다. 이는 i.t. AIBP의 단시간 노출과 대조적이며, 30분에 정점에 도달하고 CSF 및 요추 척수 조직 모두로부터 4시간까지 크게 사라졌다. 노출과 치료 효과 사이의 해리는 AIBP의 질환 변경 작용을 시사한다. 척추 미세아교세포에서 감소된 CTxB 결합과 감소된 백분율의 TLR4 이량체는 단일 i.t. AIBP 주사 후 24시간, 심지어 2주 동안 관찰되었으며, 이는 i.t. 식염수 주입 CIPN 마우스의 미세아교세포에서 지속적 존재와 대조적으로 AIBP에 의한 인플라마라프트의 지속적인 중단을 나타낸다. TLR4 인플라마라프트에 대한 표적 효과 이외에, AIBP 질환 변형 효과는 척추 미세아교세포에서 유전자 발현 프로파일의 재프로그래밍을 포함할 가능성이 있다. AIBP는 척추 미세아교세포에서의 발현이 CIPN에 의해 영향을 받은 모든 유전자의 3%만을 역전시켰지만, AIBP는 시스플라틴 섭생에 의해 유도된 척추 조직에서 염증 유전자 발현과 염증성 사이토카인의 수준을 유의하게 감소시켰다. 이들은 *I11b*, *Cxcl2* 및 *Ccl2*와 같이 CIPN에서 역할을 하는 것으로 기재된 사이토카인과 케모카인을 인코딩하는 유전자를 포함한다(Brandolini et al., 2019; Oliveira et al., 2014; Pevida et al., 2013; Yan et al., 2019).

[0325] 염증 유전자 이외에, 시스플라틴 섭생은 관련된 질환 및 신경퇴행성 미세아교세포(DAM)의 유전자 시그니처와 유사한 전사적 변화를 유도했다. CIPN은 미세아교세포에서 지질 대사 유전자의 변경된 발현 및 지질 액적의 축적과 관련이 있었으며, 이는 AIBP(화합물 7) 처리에 의해 감소되었다. 유사한 미세아교세포 지질 액적 표현형과 전사체는 최근 노화 및 신경퇴행과 관련이 있는 것으로 기재되었다(Marschallinger et al., 2020; Nugent et al., 2020). 이러한 병리학적 표현형으로 미세아교세포 전이 동안 하향조절되는 항상성 유전자(Masuda et al., 2019; Nugent et al., 2020; Prinz et al., 2019)는 CIPN 마우스의 미세아교세포에서 또한 하향조절되었다. CIPN에 의해 유도된 미세아교세포 *Abca1* 및 *Abcg1* 발현의 하향조절은 AIBP 효과를 이해하는 핵심 요소이다. AIBP(화합물 7)는 CIPN에 의한 *Abca1* 또는 *Abcg1* mRNA의 CIPN 관련 감소를 역전시키지는 못했지만, ABCA1 단백질을 안정화시키고 콜레스테롤 유출을 촉진하는 능력(Zhang et al., 2016)은 미세아교세포 콜레스테롤 대사를 정규화하기에 충분할 수 있다. 이질통에 대한 AIBP(화합물 7)의 효과는 일시적이기는 하지만 i.t. APOA1 또는 LXR 작용제에 의해 복제되었다(Woller et al., 2018). 또한, *ABCA1* 단일 뉴클레오타이드 변이체의 부정적인 연관성이 고통스러운 골 전이 환자의 삶의 질 점수와 함께 발견되었다(Furfari et al., 2017). 그러나, 본 발명자들은 AIBP(화합물 7)가 촉진된 통증 상태에서 보호 표현형을 부여하기 위해 미세아교세포를 재프로그래밍하는 CIPN 영향 유전자의 하위 집합의 역전과 관련이 없는 다른 메커니즘을 배제할 수는 없다.

[0326] 이 연구의 주요 결과 중 하나는 미세아교세포에 ABCA1과 ABCG1의 부재하에 AIBP가 염증 유전자를 하향조절하지 못하고 심지어 그 중 일부를 상향조절하고 시냅스 가소성을 조절하는 비염증성, 통증 관련 *Arc* 및 *Pil6* 유전자를 상향조절한다는 것이다(Hossaini et al., 2010; Singhmar et al., 2020). WT 및 ABCA1/ABCG1 결핍 미세아교세포의 AIBP에 의한 차등 재프로그래밍은 데스모스테롤과 콜레스테롤 함량을 조절하는 데스모스테롤 전환 효소 *Dhcr24*에 의존할 수 있으며, 감소된 발포체 세포 형성 및 항상성 항염증 반응과 관련이 있다(Spann et al., 2012). 중요하게는, AIBP(화합물 7)는 또한 ABC-imKO 마우스에서 CIPN 또는 LPS 유발된 이질통을 역전시키지 못했다. 이러한 결과는 AIBP 항염증 및 항통각 효과가 원형질막으로부터의 콜레스테롤 고갈에 의존하며, 유출 기계 부재하에 AIBP가 실제로 염증 및 세포독성 효과를 촉진할 수 있음을 나타낸다.

[0327] 전반적으로, 이 연구 결과는 척추 미세아교세포의 원형질막에서 콜레스테롤 함량의 조절이 인플라마라프트에서 유래되는 세포 신호전달과 염증 및 지질 대사 유전자의 후속 유전자 발현에 중대한 영향을 미쳐 다발성 신경병

증 상태하에 통각 조절에 절정에 달한다는 것을 시사한다.

[0328] 재료 및 방법

[0329] 동물. C57BL/6 배경 위의 야생형, $Abca1^{f1/f1} Abcg1^{f1/f1}$, $Tlr4^{f1/f1}$, $Slc1a3-Cre^{ERT}$ 및 $Cx3cr1-Cre^{ERT2}$ 마우스는 모두 잭슨 연구소(Jackson Lab)(Bar Harbor, ME)에서 구입하였거나 사내에서 사육 및 이유시켰다. $Tlr4^{-/-}$ 마우스는 아키라 박사(Dr. Akira)(오사카 대학교)로부터 선물로 받았다. $Apoa1bp^{f1/f1}$ 마우스는 이전에 C57BL/6 마우스에서 유래된 ES 세포를 사용하여 본 실험실에서 생성되었다. 다음 마우스 라인은 본 실험실에서 교배되었다: $Apoa1bp^{f1/f1} Cx3cr1-Cre^{ERT2}$ (AIBP-imKO), $Tlr4^{f1/f1} Cx3cr1-Cre^{ERT2}$ (TLR4-imKO), $Abca1^{f1/f1} Abcg1^{f1/f1} Cx3cr1-Cre^{ERT2}$ (ABC-imKO), 및 $Abca1^{f1/f1} Abcg1^{f1/f1} Slc1a3-Cre^{ERT}$ (ABC-iaKO). 실험에 사용된 모든 미세아교세포 조건부 녹아웃 마우스는 $Cx3cr1$ 녹아웃 생성을 피하기 위해 $Cx3cr1-Cre^{ERT2}$ 의 하나의 대립유전자만을 가졌다. 마우스는 실온에서 표준 케이지당 최대 4마리까지 사육되고 12:12시간의 명암 주기를 유지했다. 모든 거동 테스트는 조명 주기 동안 수행되었다. 음식 및 물은 모두 자유롭게 제공되었다. 모든 실험은 수컷 마우스를 대상으로 캘리포니아 대학의 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)에서 승인한 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0330] 세포. BV-2 불멸화 미세아교세포주(Blasi et al., 1990)를 5% 태아 소 혈청(FBS)과 함께 돌베코의 MEM에서 배양했다. 티오글리콜레이트 유도 복막 대식세포는 C57BL/6 또는 $Tlr4^{-/-}$ 마우스에서 채취하고 10% 열 불활성화 FBS(Cellgro) 및 50 μ g/mL 겐타마이신(Omega Scientific)이 보충된 DMEM(Cellgro)에서 유지했다. HEK293 세포(RRID:CVCL_0045)를 10% FBS와 50 μ g/mL 겐타마이신이 보충된 DMEM에서 배양했다. 모든 세포는 37°C에서 5% CO₂ 분위기에서 배양했다. 세포주는 계대 1 내지 3 사이에 사용되었다.

[0331] 화학요법 유발 말초 신경병증 모델. 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)을 발병시키기 위해, 시스플라틴(2.3mg/kg/주사, Spectrum Chemical MFG)의 복강내(i.p.) 주사를 1일째 및 3일째에 수행했다. 시스플라틴 투여 기간 동안, 체중 감소, 거동 변화 및 기계적 이질통을 모니터링하고 측정했다. 안락사의 기준은 체중의 20% 초과와 체중 감소와 불규칙한 거동이었지만, 안락사가 필요한 동물은 없었다.

[0332] 기계적 이질통 측정. 동물을 와이어 메쉬 표면 위에 바닥이 없는 투명한 플라스틱 케이지에 넣고 테스트를 시작하기 전에 적어도 30분 동안 적응시켰다. 촉각 역치는 2.44-4.31(0.02-2.00g) 범위의 일련의 폰 프레이 필라멘트(Bioseb)를 사용하여 측정했다. 50% 확률의 회피 역치가 기록되었다. 기계적 회피 역치는 치료 전(기준선 또는 0일째)과 치료 후 진입 시점에서 업-다운 방법(up-down method)을 사용하여 평가했다(Chaplan et al., 1994).

[0333] AIBP(화합물 7) 또는 식염수의 척수강내 전달. 마우스는 유도를 위해 산소 중 5% 이소플루란을, 마취 유지를 위해 산소 중 2% 이소플루란을 사용하여 마취시켰다. 척수강내 주사는 문헌(Hylden and Wilcox, 1980)에 따라 수행하였다. 간단히, 허리를 면도하고 소독하고, 동물을 엄지와 집게손가락 사이에 골반을 잡고 엎드린 자세로 놓았다. L5 및 L6 척추는 촉진으로 식별되었고, L5 및 L6 척추 사이의 중앙선에 30G 바늘을 경피적으로 삽입했다. 성공적인 진입은 꼬리 치기의 관찰에 의해 평가했다. 5 μ L의 주사를 약 30초 간격으로 투여했다. 척수강내 전달을 위한 약물은 생리학적 멸균 0.9% NaCl로 제형화되었다. 이전 연구에 기초하여(Woller et al., 2018), 이 연구에서 척추 전달을 위한 AIBP(화합물 7) 투여량은 0.5 μ g/5 μ L였다. 마취에서 회복 후, 마우스는 정상적인 운동 조정과 근긴장도에 대해 평가했다.

[0334] 유도성 Cre-드라이버 라인에 대한 타목시펜의 복강내 주사. 이 연구에서, 본 발명자들은 잭슨 연구소의 타목시펜 유도 프로토콜을 따랐다. 타목시펜(시그마-알드리치)을 37°C에서 밤새 진탕시켜 옥수수유에 10mg/mL 농도로 용해시키고, 알루미늄 호일로 싸서 4°C에 저장했다. 200 μ L의 타목시펜 또는 비히클(옥수수유)을 5일 연속으로 24시간마다 복강내 주사했다.

[0335] 생체의 및 시험관내 TLR4 이량체화 및 지질 뱃목 검정. TLR4 이량체화 검정은 유세포 분석을 위해 2개의 TLR4 항체를 사용한다: MTS510은 TLR4/MD2를 이량체로써가 아니라 단량체(TLR4 단위)로 인식하며; SA15-21은 이의 이량체화 상태와 관계없이 임의의 세포 표면 TLR4에 결합한다(Akashi et al., 2003; Zanoni et al., 2016). 그런 다음, TLR4 이량체의 비율은 동일한 세포 현탁액에서 측정된 MTS510과 SA15-21로부터 계산했다. 지질 뱃목 함량은 강글리오사이드 GM1에 결합하는 CTxB를 사용하여 측정했다. 시험관내 TLR4 이량체화를 평가하기 위해, BV-2 세포를 혈청 함유 배지에서 0.2 μ g/ml AIBP(화합물 7)와 함께 30분 동안 사전 배양한 후, LPS 100ng/mL와

함께 15분 동안 배양했다. 배양이 종료시, 세포를 즉시 얼음 위에 놓고, PBS로 한 번 세척한 후 4% 포름알데히드로 10분 동안 고정시켰다. 그런 다음, 세포를 빙냉 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 항-CD16/CD32 항체(Fc γ R 차단제, BD Bioscience)를 함유하는 2% 정상 마우스 혈청과 함께 얼음 위에서 30분 동안 배양한 다음, CTxB-FITC(ThermoFisher)의 1:200 희석과 함께 얼음 위에서 30분 동안 PE-접합 MTS510 항체와 APC-접합 SA15-21 항체(각각, ThermoFisher 및 Biolegend, RRID:AB_2562503 및 RRID:AB_466263)의 1:100 희석으로 염색했다. 세포를 세척하고 FACSCanto II(BD Biosciences) 유세포 분석기를 사용하여 분석했다.

[0336] 생체의 검정을 위해, 척수는 하이드로 압출에 의해 채취하고(Kennedy et al., 2013), 4% 포름알데히드로 고정시키고, 처리하는 동안 얼음 위에 놓았다. 요추 조직으로부터의 단일 세포 현탁액을 제조업체의 프로토콜에 따라 신경 조직 해리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 수득했다. 미엘린을 제거하기 위해, 미엘린 제거 비드 II(Miltenyi Biotec)를 샘플에 첨가하고, 4°C에서 15분 동안 배양한 후, LS 컬럼과 MACS 분리기(Miltenyi Biotec)로 분리했다. 분리 후, 세포를 항-CD16/CD32 항체(Fc γ R 차단제, BD Biosciences)를 함유하는 2% 정상 마우스 혈청과 함께 얼음 위에서 30분 동안 배양한 다음, 1:100 PerCP-Cy5.5-접합 CD11b 항체(Biolegend, RRID:AB_893232), 1:100 토끼 항-마우스 TMEM119 항체(Abcam, RRID:AB_2744673), PE-접합 MTS510, APC-접합 SA15-21 항체(ThermoFisher, RRID:AB_2562503 및 Biolegend, RRID:AB_466263) 및 CTxB-FITC(ThermoFisher)의 1:200 희석의 항체 혼합물로 얼음 위에서 45분 동안 배양한 후, 세포를 세척하고 (1:250) 2차 Alexa PEcy7 접합 항토끼 항체와 함께 얼음 위에서 30분 동안 배양했다. 세포를 세척하고 FACSCanto II(BD Biosciences) 유세포 분석기를 사용하여 분석했다.

[0337] 시험관내 및 생체의 염색 보상 비드 및/또는 단일 염색 세포의 경우, 본 발명자들은 FMO와 함께 CD11b, MTS510 및 SA15-21 항체에 대한 채널과 동형 대조군 사이의 신호 중첩을 보상하기 위해 사용하여 게이트를 설명하는데 사용했다. 데이터는 FlowJo(BD Biosciences, RRID: SCR_008520)로 분석했다. 이러한 데이터로부터, 본 발명자들은 척추 미세아교세포에서 지질 뗏목의 풍부도와 TLR4 이량체 수의 상대적 변화를 계산했다(제로 이량체는 자극되지 않거나 나이브 세포에 임의로 할당되었다).

[0338] 면역형광, 공초점 이미징 및 공동 국소화 분석. BV-2 세포를 12웰 플레이트의 커버슬립에 플레이팅하고, 5% 혈청 함유 배지에서 0.2 μ g/ml AIBP와 함께 30분간 사전 배양한 후 100ng/mL LPS와 함께 5분 또는 15분 배양했다. 배양 완료시, 세포를 즉시 얼음 위에 놓고 PBS로 한 번 세척한 후 4% 포름알데히드로 10분 동안 고정했다. 세포를 빙냉 PBS로 2회 세척하고, 5% FBS를 함유하는 차단 완충액과 함께 30분 동안 배양한 후 1:200 희석의 CTxB-Alexa555 및 1:100 희석의 마우스 항-TLR4 항체(Abcam, RRID:AB_446735) 또는 1:100 토끼 항-APOA1 항체(Abcam) 또는 1:100 토끼 항-ABCA1 항체(Novus Biological RRID:AB_10000630)로 염색하고, 세척하고 항-토끼 Alexa 647 접합 이차 항체와 함께 배양하고, 막에서 접근 가능한 콜레스테롤의 염색을 위해 재조합, His-태그 ALOD4 및 1:100 FITC 접합 항-His 이차 항체(LSbio)와 함께 배양했다. 세포를 세척하고, 커버슬립을 Prolong Gold로 슬라이드에 장착하고 밀봉했다. 슬라이드는 라이트닝 디콘볼루션(Lightening deconvolution) 또는 STED가 탑재된 Leica SP8 초해상도 공초점 현미경을 사용하여 분석했다.

[0339] 미세아교세포 특이적 AIBP 또는 ABCA1/ABCG1 녹아웃을 검증하기 위해, 척수 조직을 수집하고 4°C에서 4% 포름알데히드에 후고정시켰다. 그런 다음, 조직을 30% 수크로스로 탈수시키고 절편화할 때까지 OCT에서 동결시켰다. 저온 유지 장치를 사용하여 척수를 10 μ m 절편으로 슬라이싱하고, 슬라이드를 -20°C에서 저장했다. 동결된 절편은 2% FBS와 0.3% 트리톤 X100 용액으로 차단한 후, 1:100 토끼 항-AIBP 항체(룽후우 팡 박사(Dr. Longhou Fang)의 친절한 선물)와 함께 배양했다. 별도의 절편을 1:100 토끼 항-ABCA1 또는 1:100 토끼 항-ABCG1 항체(Novus Biological, RRID:AB_10000630 및 RRID:AB_10125717)로 4°C에서 밤새 염색했다. 슬라이드를 세척하고 1:200 희석의 항-토끼 Alexa488(Abcam, RRID:AB_2630356) 또는 Alexa647 접합 이차 항체와 함께 2시간 동안 배양한 후, 3번 세척하고 모든 절편을 Alexa488 접합 IBA-1 항체(Milipore-Sigma) 또는 Alexa633 접합 IBA1 항체(Wako Chemicals, RRID: AB_2687911)와 함께 배양했다. 대안적으로, 슬라이드를 1:100 Alexa488 접합 항-NeuN 항체(Cell Signaling, RRID:AB_2799470) 또는 1:100 Alexa488 접합 항-GFAP 항체(Cell Signaling, RRID:AB_2263284)와 함께 배양했다. 슬라이드를 PBS로 3번 세척한 후, DAPI(세포 신호전달)가 있는 Prolonged Gold로 장착시켰다. 각 동물의 적어도 하나의 슬라이드의 이미지 획득은 63배 대물렌즈와 라이트닝 디콘볼루션이 탑재된 Leica SP8 공초점 현미경을 사용하여 수행했다. 공동 국소화 분석은 Coloc2 도구를 사용하여 ImageJ/FIJI(NIH, RRID:SCR_003070/SCR_002285)에서 수행되었다. 각 이미지에 대해 역치, 역치 이상의 피어슨 R 및 맨더스 계수, 마스크된 공동 국소화 마법사, Costes P 값 및 픽셀 산점도를 생성했다. 세포 마커를 나타내는 채널에 따라 tM1 또는 tM2가 사용되었다.

[0340] ALOD4 발현 및 정제. pALOD4 플라스미드(Gay A., 2015)는 Addgene(Cat no #111026, RRID:Addgene_111026)에서

수득하여 이. 코리 적격 세포 BL21(DE3)을 형질전환하는 데 사용하였고, 양성 콜로니를 Amp⁺ LB 플레이트에서 선택했다. 1mM 이소프로필 β-d-1-티오갈락토피라노사이드(IPTG)로의 발현 및 용해의 유도 후, 이미다졸 용출과 함께 Ni-NTA 아가로스 컬럼을 사용하여 His-태깅된 ALD4를 정제했다. 단백질을 PBS에 대해 투석하고 농도를 측정했다. 분취량은 -80℃에서 저장했다.

[0341] 바콜로바이러스/곤충 세포 시스템에서 wtAIBP 및 mutAIBP의 클로닝 및 발현. AIBP(화합물 7)는 바콜로바이러스/곤충 세포 시스템에서 생산되어 문헌(Choi et al., 2018; Woller et al., 2018)에 기재된 바와 같이 번역 후 변형 및 내독소 비함유 제제를 보장했다. 인간 야생형(wt) AIBP 및 돌연변이체(mut) AIBP, 마우스 야생형 AIBP 및 제브라피쉬 야생형 AIBP(Fang et al., 2013)를 폴리헤드린 프로모터 뒤에 있는 pAcHLT-C 벡터에 클로닝했다. 벡터는 정제 및 검출을 가능하게 하는 N-말단 His-태그를 함유한다. 곤충 Sf9 세포는 BestBac 바콜로바이러스 DNA(발현 시스템) 및 AIBP 벡터로 형질감염시켰다. 4 내지 5일 후, 상청액을 수집하여 바콜로바이러스 스톱을 수득했다. 신선한 Sf9 세포를 AIBP 생성 바콜로바이러스로 감염시키고, 세포 펠릿을 3일 후 수집하고, 용해시키고, 초음파 처리하고, 원심분리로 제거한 후 상청액을 이미다졸로 용출된 Ni-NTA 아가로스 컬럼에 로딩했다. 단백질을 식염수에 대해 투석하고 농도를 측정했다. 분취량은 -80℃에서 저장했다.

[0342] 척추 조직에서 AIBP(화합물 7)의 약동학. 녹아웃 AIBP 마우스를 약동학 연구에 사용했다. AIBP(2.5 μg/5 μL)의 척수강내 주사는 이전에 기재된 바와 같이(Hylden and Wilcox, 1980) 수행되었고, CSF는 기재된 바와 같이(Liu and Duff, 2008) 15분, 30분, 1시간, 4시간 또는 8시간 후에 수집했다. 간단히 말해서, 모세관(0.8x100mm)을 마이크로피펫 풀러를 사용하여 당겼다. 마우스는 50% 산소와 50% 실내 공기의 혼합물과 함께 3% 이소플루란을 사용하여 마취시켰다. 목의 피부를 면도하고, 마우스를 정위 기구 위에 놓았다. 수술 부위를 면봉으로 닦은 후, 후두부보다 아래쪽 피부를 시상 절개했다. 피하 조직과 근육을 절개하여 경막을 노출시켰다. 당겨진 모세관을 수조 마그나에 직접 천공하고, 오염되지 않은 샘플을 채취했다. CSF 수집 후, 모세관을 50 μL의 NaCl 0.09%를 함유하는 PCR 튜브로 플러싱한 다음, 마우스를 0.9% NaCl 35mL를 관류시켰다. 척수를 0.9% NaCl 5mL로 하이드로 압출하여 플러싱했다. 척수 조직을 칭량하고, 얼음 위에서 1g/10mL의 완전 N-PERTM 뉴런 단백질 추출 시약(Thermo Fisher)으로 추출했다. 얼음 위에서 10분 배양 후, 샘플을 원심분리(4℃에서 10분 동안 10,000xg)하여 세포 파편을 펠릿화하고, 상청액을 1% BSA-TBS를 사용하여 1:1 희석했다. 플레이트를 BE-1 항-AIBP 모노클로날 항체(5 μg/mL)로 코팅하고, 척수 추출물 또는 CSF 샘플과 함께 3시간 동안 배양한 후 토끼 폴리클로날 항-AIBP 항체에 이어, 염소 항-토끼-ALP 항체(시그마 알드리치, RRID: AB_258103)로 검출했다. 플레이트는 위와 같이 판독하였다.

[0343] RNA-seq을 위한 척추 미세아교세포의 FACS 분류. 요추 척수의 세포 현탁액은 고정 단계를 제외하고 상기 기재된 바와 같이 제조했다. 신선한 조직을 처리하고 항-CD16/CD32 항체(FcγR 차단제, BD Biosciences)를 함유하는 2% 정상 마우스 혈청으로 30분 동안 차단한 다음, 1:50 PE-Cy7 접합 CD11b 항체(Biolegend, RRID: AB_312799), 1:50 토끼 항-마우스 TMEM119 항체(Abcam, RRID:AB_2744673), 1:50 PerCP-Cy5.5 접합 CD24 항체(Biolegend, RRID:AB_1595491)의 혼합물로 염색한 다음, 세포를 세척하고, (1:200) 2차 Alexa488 접합 항-토끼 항체(Abcam, RRID:AB_2630356)와 함께 배양하고, 얼음 위에서 30분 동안 배양한 후, 그 세포를 세척하고 1:50 Alexa 647 접합 Glast1 항체(Novus Biologicals)와 1:100 희석의 Life/Death Ghost Red 780 염료(Cell Signaling)와 함께 얼음 위에서 30분 동안 배양했다. 세포를 분류 완충액으로 세척하고, 여과한 후 BD FACS-Aria 세포 분류기(BD Biosciences)를 사용하여 용해 완충액으로 분류했다. 동일한 동물로부터 각각 400개의 세포를 갖는 3개의 기술적 복제본을 분류했다. 분류된 미세아교세포의 분류 전략 및 순도 분석을 위한 도 S2A 및 B를 참조한다.

[0344] RNA-seq 라이브러리 제조, 서열분석 및 품질 관리. 본 발명자들은 낮은 입력벌크 서열 SmartSeq2 프로토콜(Rosales et al., 2018)을 따랐다. 트리톤 X-100, RNase 억제제 및 올리고(dT)30-VN을 함유하는 용해 완충액으로 분류된 세포를 올리고(dT)+를 사용하여 mRNA의 폴리(A) 꼬리에 혼성화했다. 역전사 시약을 첨가하여 PCR 증폭 시약을 첨가한 후 cDNA 라이브러리를 작제했다(이 시점에서 qPCR은 수행되지 않았다). 라이브러리를 정량화하고, Qubit 이중 가닥 고감도 검정과 더불어 TapeStation 고감도 D5000 스크린테이프를 사용하여 QC를 수행했다. 모든 샘플은 NexteraXT 프로토콜에 입력하기 위해 1ng의 cDNA로 조정되었다. QC 검사는 Qubit 이중 가닥 고감도 검정과 더불어 TapeStation 고감도 D1000 스크린 테이프를 수행되었다. 샘플은 qPCR 및 풀링을 거쳐 NovaSeq S1 100 사이클 키트를 사용하여 쌍단 50x50 판독을 위해 NovaSeq에 로딩했다.

[0345] FASTQ 데이터의 스플라이스 인식 정렬은 STAR를 사용하여 수행되었고(Dobin et al., 2013), 서열분석된 데이터 및 정렬의 품질 관리는 FASTQC(RRID:SCR_014583), QoRT(RRID:SCR_018665)(Hartley and Mullikin, 2015) 및 MultiQC 도구(RRID:SCR_014982)(Ewels et al., 2016)에 의해 수행되었다. 판독과 관련된 유전자의 계수는

STAR(RRID:SCR_015899)를 사용하여 수행되었다.

- [0346] 서열분석 품질 관리는 우수한 데이터 품질을 나타냈다(MultiQC 보고서). 2개의 기술적 복제본(Y_10 및 Y_30)은 최적이지 아닌 유전자 커버리지로 인해 제거되었다. 본 발명자들은 R 패키지, DESeq2(RRID:SCR_015687)를 사용하여 차등 발현을 분석했다(Love et al., 2014). 본 발명자들은 적어도 3개의 샘플에 대해 백만 매핑 관독 CPM당 10회 이상의 계수로 설정된 컷오프로 요추 미세아교세포에서 총 18,818개의 유전자를 식별했다. 한 샘플은 PCA에서 극도로 불규칙한 분포와 다른 모든 샘플과 비교했을 때 상위 500개의 가장 가변적인 유전자에서 클러스터링을 나타냈기 때문에 추가 분석에서 제거되었다. 본 발명자들은 본 샘플과 데이터에서 미세아교세포 농축을 확인하기 위해 문헌(Butovsky et al., 2014)에 보고된 40개의 미세아교세포 특이적 유전자의 하위 집합과 뉴런(*Nefl*), 희소돌기아교세포(*Omg*) 및 성상교세포(*Slc6a1*)에 특이적인 유전자를 사용했다(도 S2D). DEG의 결정은 모든 요인에 걸쳐 모든 샘플을 포함하는 우도비 테스트(LRT)를 사용하고 조건 인자가 없는 축소 설계를 사용하여 시스플라틴 및 AIBP의 주요 효과와 이러한 조건에 의해 변경된 모든 유의한 유전자를 결정하는 DESeq2 이항 모델링으로 수행되었다. 본 발명자들은 유전자형(ABC-imK0) 의존 방식으로 조절되는 유전자를 식별하기 위해 상호 작용 조건 및 유전자형이 없는 축소 설계와 비교하는 LRT 모델을 사용했다. 조정된 $P < 0.05$ 와 5%의 FDR을 사용하여 유의한 유전자를 필터링했다. 식별된 유의한 유전자의 유전자 발현 패턴에 의한 유전자 클러스터의 결정은 DESeq2 기능: degpattern에 의해 수행되었다. 실험군의 LRT 후 쌍간 비교는 Wald 테스트로 수행했으며, 5%의 FDR을 차지했다. 화산 플롯은 절대 배수 변화 > 1.5 로 유의하게 상이한 유전자를 포함한다. 경로 농축 및 GO 분석은 최소 3개의 유전자와 $P < 0.05$ 를 사용하여 metascape.org(RRID:SCR_016620)에서 수행되었다(Zhou et al., 2019).
- [0347] TLR4 결합에 대한 공동-면역침전 검정. 시험관에서 eTLR4 및 wtAIBP 또는 mutAIBP의 폴다운 검정은 0.5% 트리트론 X-100을 함유하는 PBS 중의 1 μ g의 eTLR4(Sino Biological)와 AIBP를 혼합하고 실온에서 1시간 동안 배양하여 수행했다. 샘플을 실온에서 30분 동안 단백질 A/G 세파로스 비드를 첨가한 후, 1 μ g의 BE-1 모노클로날 항-AIBP 항체를 첨가하고 2시간 동안 배양하여 사전 투영화했다. 단백질 A/G 세파로스 비드를 첨가하고 1시간 더 배양한 후 0.5% 트리트론 X-100을 함유한 PBS로 5회 세척하고 샘플을 면역 블롯팅했다.
- [0348] HEK293 세포(RRID:CVCL_0045)를 Flag-eTLR4 및 Flag-AIBP(야생형 또는 돌연변이체 중 하나) 작제물로 형질감염 시켰다. 형질감염 36시간 후, 세포를 수확하고 방냉 용해 완충액(50mM Tris-HCl, pH7.5, 1% NP-40, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 5mM Na3VO4, 1mM NaF 및 시그마의 프로테아제 억제제 콕테일)으로 용해시켰다. 세포 용해물을 4°C에서 30분 동안 단백질 A/G 세파로스 비드와 함께 사전 배양하고, 4°C에서 밤새 마우스 항-TLR4 항체(Abcam)로 면역 침전시켰다. 다음 날, 용해물을 단백질 A/G 비드와 함께 4°C에서 1시간 동안 배양했다. 용해 완충액으로 세척하여 결합되지 않은 단백질을 제거하고, 비드를 볼트 비스-트리스(Bolt Bis-Tris) 젤(Invitrogen)에서 실행하였고, 항-Flag 항체(Sigma)로 면역 블롯팅하여 결합된 AIBP를 검출했다.
- [0349] ELISA 결합 검정. AIBP-TLR4 결합을 평가하기 위해, 96웰 플레이트에 5 μ g/ml의 eTLR4로 코팅하고, 0.05% Tween-20을 함유하는 PBS로 3회 세척하고, 1% BSA를 함유하는 PBS로 차단하고, wtAIBP 또는 mutAIBP와 함께 배양한 후, 2 μ g/ml의 비오틴화 BE-1 항-AIBP 모노클로날 항체와 함께 배양했다. AIBP-APOA1 결합을 평가하기 위해, 플레이트를 BSA, wtAIBP 또는 mutAIBP로 코팅하고, 세척하고, 차단하고, 5 μ g/ml의 인간 APOA1(드미트리 스비리도프(Dmitri Sviridov)의 선물, 베이커 심장 및 당뇨병 연구소, 호주 멜버른 소재)에 이어, 비오틴화 항-APOA1 항체(Academy Bio-Medical Company, RRID:AB_1238781)와 함께 배양했다. 두 검정에서, 뉴트라비딘-AP를 첨가하고, 실온에서 45분 동안 배양한 후, LumiPhos 530(Lumigen)과 함께 90분 동안 배양하고, 발광 플레이트 판독기(BioTek, 버몬트주 위노스키 소재)를 사용하여 발광을 측정했다.
- [0350] AIBP 세포 결합을 위한 유세포 분석법 검정. 15분 동안 100ng/mL LPS로 자극되거나 자극되지 않은 BV-2 미세아교세포를 얼음 위에서 60분 동안 1% BSA를 함유하는 트리스 완충 식염수(TBS)로 차단하고, 2 μ g/mL BSA 또는 2 μ g/mL AIBP와 함께 얼음 위에서 2시간 동안 배양했다. 세포를 고정하고 4°C에서 1시간 동안 1 μ g/mL FITC-접합 항-His 항체(LSBio)와 함께 배양하고, FACSCanto II(BD Biosciences) 유세포 분석기 및 FlowJo 소프트웨어(RRID: SCR_008520)를 사용하여 분석했다.
- [0351] ELISA에 의한 척수 조직 내 사이토카인 측정. 척수 용해물 중 IL-6(DY406), IL-1 β (DY401), MCP-1(DY479) 및 MIP2(DY452)의 수준은 제조업체의 설명서에 따라 마우스 DuoSet ELISA(R&D Systems)를 사용하여 측정했다.
- [0352] 통계 분석. RNAseq 데이터 세트 이외의 경우, 결과는 GraphPad 프리즘(RRID:SCR_002798)을 사용하여 스튜던츠 t-테스트(2개 그룹 사이의 차이), 일원 ANOVA(다수 그룹의 경우) 또는 본페로니 사후 테스트(Bonferroni post hoc test)를 사용하는 2원 ANOVA(다수 그룹 시간 경과 실험의 경우)를 사용하여 분석했다. $P < 0.05$ 인 그룹 간

의 차이는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0353] 도면 범위

[0354] 도 1은 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN) 마우스 모델에서 야생형(wt) AIBP 단백질에 의한 통증 거동의 역전 및 전염증성 지질 뱃목(인플라마라프트)과 관련된 활성화된 TLR4 이량체의 감소를 보여준다:

[0355] 도 1. 화학요법 유발 말초 신경병증은 척추 미세아교세포에서 TLR4 이량체화 및 지질 뱃목을 변경한다: AIBP에 의한 역전. **A**, i.p. 시스플라틴(2.3mg/kg/일의 2회 주사)에 이어 i.t. 식염수(5 μ l) 또는 AIBP(화합물 7)(0.5 μ g/5 μ l)의 단일 투여에 반응하는 WT 마우스의 회피 역치(회피 역치). 나이브 마우스는 주사를 받지 않았다. 2개의 독립적인 실험의 데이터(그룹당 n=6) 2개의 독립적인 실험의 데이터. **B-C**, i.t. 식염수 또는 AIBP 후 24 시간, 즉 **A**에 표시된 시간 과정의 8일째에 TLR4 이량체화(**B**) 및 CTxB 염색으로 측정된 지질 뱃목 함량(**C**)을 보여주는 CD11b⁺/TMEM119⁺ 척추 미세아교세포의 분석. 3개의 독립적인 실험의 데이터(TLR4 이량체화의 경우 그룹당 n=9, 지질 뱃목 염색의 경우 n=12). **D**, BV-2 미세아교세포를 완전 배지에서 AIBP(화합물 7)(0.2 μ g/mL) 또는 비히클과 함께 30분 동안 배양한 후, LPS(100ng/mL)와 함께 5분간 배양했다. 눈금 막대, 5 μ m. 막대 그래프는 口매맨더스의 tM1 계수를 나타낸다. **E-F**, CSF(**E**) 및 요추 척수(**F**)(n=5)에서 수컷 *Apoa1bp*^{-/-} 마우스의 i.t. AIBP(2.5 μ g/5 μ L)의 약동학. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. 그룹화 분석에서 다중 비교를 위한 본페로니 사후 테스트를 사용한 일원 ANOVA; 3개 그룹의 다중 비교 및 영상 정량화를 위한 투키 사후 테스트(Tukey post-hoc test)를 사용한 일원 ANOVA.

[0356] 도 2는 나이브 마우스 대 화학요법제 시스플라틴으로 치료된 마우스 대 시스플라틴과 야생형(wt) AIBP 단백질로 치료된 마우스의 유전자 시그니처 변화를 비교한다:

[0357] 도 2. CIPN 마우스의 척추 미세아교세포에서 유전자 발현. **A-B**, 미세아교세포(CD11b⁺TMEM119⁺)는 도 1A에 제시된 3개 그룹으로부터 FACS 분류했다: WT 나이브 또는 시스플라틴 주사(1일째 및 3일째), 이어서 7일째에 i.t. 식염수(5 μ L) 또는 AIBP(화합물 7)(0.5 μ g/5 μ L), 8일째에 종료되고, RNA-seq을 실시함; 나이브 및 시스플라틴/식염수에 대해 n=3 생물학적 복제본(마우스) 및 시스플라틴/AIBP에 대해 n=2(각 생물학적 복제본은 동일한 동물의 3개의 기술적 복제본으로부터 붕괴됨). **A**, 모든 샘플에 대한 DEG의 히트맵(모든 기술적 복제본은 컬럼에 제시된다). LRT(우도비 테스트)로 테스트된 주요 효과를 보여주는 유의한 (조정된 $P < 0.01$) 상향 또는 하향조절 유전자. Log2 상대적 발현, **B**, 상이한 치료 조건에서 발현 프로파일 패턴에 따라 클러스터링된 유의한 DEG 그룹. **C**, 분석 조정된 $P < 0.05$ 및 절대 배수 변화 > 1.5 및 경로에서 3개 유전자의 최소 중첩을 사용하여 시스플라틴 치료에 의해 유도된 상향조절(패널 2B의 그룹 1) 및 하향조절(그룹 2) 유전자의 경로 및 GO 농축 분석. 상향조절된 경로는 빨간색으로, 하향조절된 경로는 파란색으로 표시된다.

[0358] 도 3은 화학요법을 받고 있는 마우스 대 나이브 마우스 및 wt AIBP로 치료된 CIPN 마우스에서 질환 관련 미세아교세포(DAM) 유전자 발현 시그니처 및 지질 액적의 차이를 비교한다:

[0359] 도 3. CIPN 마우스의 척추 미세아교세포에서 DAM 및 지질 관련 유전자 발현 및 지질 액적. **A-C**, 도 2와 동일한 그룹. **A**, 시스플라틴 처리 마우스 대 나이브 마우스의 척추 미세아교세포에서 상향조절 및 하향조절된 유전자의 화산 플롯. 조정된 $P < 0.05$ 및 절대 배수 변화 > 1.5 의 컷오프는 연한 녹색 점으로 표시된다. **B**, 질환 관련 미세아교세포(DAM) 시그니처 유전자를 묘사하는 히트맵. **C**, 지질 관련 유전자 세트를 보여주는 행별로 스케일링된 log2 정규화된 유전자 계수의 히트맵. **D-H**, IBA1 및 DAPI로 공동 염색된 척추 절편에서 PLIN2 면역염색으로 측정된 척추 미세아교세포의 지질 액적 축적. 도 1A와 같은 실험 조건; 2개의 독립적인 실험에서 그룹당 5마리의 마우스로부터의 n=5 시야. 눈금 막대, 20 μ m. 평균 $\pm$ S.E.M.; *, $P < 0.05$, 나이브 그룹과 비교하고 그룹화 분석에서 다중 비교를 위한 투키 테스트를 사용하는 일원 ANOVA로 테스트됨.

[0360] 도 4는 wt AIBP 단백질로 처리한 CIPN 마우스에서 유전자 발현의 변화를 요약한다:

[0361] 도 4. CIPN 마우스의 척추 미세아교세포에서 유전자 발현: AIBP(화합물 7)의 효과. 도 1에서와 같은 실험 조건 및 분석; 그룹당 n= 2-3의 생물학적 복제본(각 생물학적 복제본은 3개의 기술적 복제본으로부터 붕괴됨). **A**, 조정된 $P < 0.05$ 및 절대 배수 변화 > 1.5 및 경로에서 3개 유전자의 최소 중첩을 사용하여 AIBP(화합물 7)에 의해 하향조절된 CIPN 상향조절 유전자(도 2B)의 그룹 3) 및 AIBP(화합물 7)에 의해 상향조절된 CIPN 하향조절 유전자(그룹 4)의 경로 및 GO 농축 분석. 상향조절된 경로는 빨간색으로, 하향조절된 경로는 파란색으로 표시된다. **B**, i.t. AIBP에 의해 유도된 척추 미세아교세포의 DEG. 조정된 $P < 0.05$ 및 벤자미니-호크버그 FDR $< 5\%$ 는 시스플라틴/AIBP 처리 마우스 대 시스플라틴/식염수 처리 마우스에서 상향 및 하향조절 유전자의 화산 플롯에서 나타

난다. 컷오프 조정된 $P < 0.05$ 및 절대 배수 변화 > 1.5 는 연한 녹색 점으로 표시된다. **C**, CIPN에 의해 상향조절되고 AIBP에 의해 하향조절된 그룹 3의 염증 유전자의 히트맵. **D**, WT 나이브, 시스플라틴/식염수 및 시스플라틴/AIBP 그룹의 척추 조직에서 사이토카인 단백질 발현; 그룹당 $n=5$. **E**, 시스플라틴에 의해 유도되지 않지만 AIBP(화합물 7)에 의해 하향조절되는 염증 유전자의 히트맵. **F**, 조정된 $P < 0.05$ 및 절대 배수 변화 > 1.5 및 경로에서 3개의 유전자의 최소 중첩을 사용하여 AIBP(화합물 7)에 의해 하향조절된 모든 유전자의 경로 및 GO 농축 분석. **G**, 가장 농축된 경로: 펩티다제 억제제 활성화 경로에 포함된 AIBP(화합물 7)에 의해 하향조절되는 비염증 유전자의 히트맵. **H**, CIPN에서 하향조절이 AIBP(화합물 7)에 의해 역전된 유전자의 히트맵. 평균 $\pm$ S.E.M.; * $P < 0.05$, 나이브 그룹 및 시스플라틴/i.t. 식염수 그룹과 비교.

[0362] 도 5는 콜레스테롤 수송체 ABCA1 및 ABCG1이 마우스 CIPN 모델에서 통증의 AIBP 매개 역전에 필요하다는 것을 입증한다:

[0363] 도 5. 미세아교세포에서 ABCA1 및 ABCG1 발현은 통증을 조절하고, CIPN의 마우스 모델에서 이질통의 AIBP(화합물 7) 매개 역전에 필요하다. **A-B**, BV-2 세포를 완전 배지에서 AIBP(화합물 7)($0.2 \mu\text{g/mL}$) 또는 비히클과 함께 30분 동안 배양한 후 LPS(100ng/mL)와 함께 5분간 배양했다. 지질 뗏목에서 ABCA1(**A**) 및 APOA1(**B**)에 의한 접근 가능한 콜레스테롤의 공동 국소화. 눈금 막대, $7 \mu\text{m}$. 막대 그래프는 맨더스의 tM1 계수를 나타낸다. **C**, 실험 설계 및 타임라인: 타목시펜(TAM, 10mg/mL , $200 \mu\text{L/일}$), 시스플라틴(2.3mg/Kg), AIBP(화합물 7)($0.5 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) 또는 식염수($5 \mu\text{L}$). **D**, 시스플라틴 개재 시작 전 기준선(0일째) 회피 역치. 3개의 독립적인 실험 데이터(비히클 처리된 ABC-imKO 마우스의 경우 $n=8$, TAM 처리된 ABC-imKO 마우스의 경우 $n=16$, TAM으로 처리된 한배 새끼 *Abca1^{fl/fl} Abcg1^{fl/fl}* no-Cre [WT] 마우스의 경우 $n=15$). **E**, 기준선(0일째)의 나이브 WT 및 ABC-imKO 마우스의 $\text{CD11b}^+ \text{TMEM119}^+$ 척추 미세아교세포에서 TLR4 표면 발현 및 이량체화 및 지질 뗏목(CTXB)(두 그룹에 대한 TLR4 표면 발현 및 지질 뗏목 함량 분석의 경우 $n=5$; TLR4 이량체화를 위한 WT의 경우 $n=8$ 및 ABC-imKO의 경우 $n=9$). **F**, TAM 유도 ABC-imKO 마우스(그룹당 $n=4$)에서 i.t. 식염수 또는 AIBP(화합물 7)($0.5 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$)에 이어, i.t. LPS($0.1 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) 후 회피 역치. **G-H**, TAM 유도 ABC-imKO(**G**) 및 비유도(비히클) ABC-imKO(**H**) 마우스(그룹당 $n=6$)에서 i.p. 시스플라틴 및 i.t. 식염수 또는 AIBP($0.5 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) 주사 후 회피 역치; 2개의 독립적인 실험 **I-J**로부터의 데이터, 패널 G 및 H에 제시된 그룹에서 8일째에 $\text{CD11b}^+ \text{TMEM119}^+$ 척추 미세아교세포에서 TLR4 이량체화(**I**) 및 지질 뗏목(**J**). 2개의 독립적인 실험으로부터의 평균 $\pm$ S.E.M. ($n=7-8$). *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. 시간 경과 분석에서 다중 비교를 위한 본페로니 사후 테스트를 사용한 일원 ANOVA; 2개 그룹에 대한 t-테스트, 2개 이상의 그룹의 다중 비교를 위한 투키 사후 테스트를 사용한 일원 ANOVA.

[0364] 도 6은 ABC 유전자 녹아웃 마우스의 유전자 발현을 특성화한다:

[0365] 도 6. ABC-imKO 마우스의 척추 미세아교세포에서 유전자 발현. 미세아교세포($\text{CD11b}^+ \text{TMEM119}^+$)는 ABC-imKO 마우스의 3개 그룹으로부터 FACS 분류되었다: 나이브 또는 시스플라틴으로 주사됨(1일째 및 3일째), 7일째에 i.t. 식염수($5 \mu\text{L}$) 또는 AIBP(화합물 7)($0.5 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$)에 이어짐, 8일째에 종료됨; $n=3$ 생물학적 복제본(각 생물학적 복제본은 3개의 기술적 복제본으로부터 붕괴됨). ABC-imKO 및 WT(한배 새끼가 아님) 마우스의 RNA-seq 데이터 세트는 동일한 실험에서 획득했다. **A**, 상부: 나이브 ABC-imKO 미세아교세포에서 유도되고 시스플라틴으로 처리된 마우스에서 WT 미세아교세포와 공유되는 중첩 유전자 및 경로는 중첩 유전자를 연결하는 보라색 선으로, 중첩 농축 경로를 연결하는 파란색 선으로 나타났다. 하부: WT 시스플라틴 및 ABC-imKO 나이브 마우스의 척추 미세아교세포에서 상향조절된 유전자의 벤 다이어그램. **B**, 컷오프 $P < 0.05$, 농축 > 1.5 및 경로에서 3개 유전자의 최소 중첩을 사용하여 미세아교세포에서 ABCA1 및 ABCG1 녹다운에 의해 유도된 상향 및 하향조절 유전자의 농축 경로 분석. **C**, TAM-유도 ABC-imKO 마우스의 나이브 척추 미세아교세포의 DEG. 조정된 $P < 0.05$ 및 벤자미니-호크버그 FDR $< 5\%$. **D**, ABC-imKO 미세아교세포에서 시스플라틴 처리에 의해 유도되고 시스플라틴으로 처리된 마우스에서 WT 미세아교세포와 공유되는 중첩 유전자 및 경로. **E**, 시스플라틴으로 처리된 WT 마우스와 비교한 시스플라틴으로 처리된, TAM 유도 ABC-imKO 마우스의 척추 미세아교세포 내 DEG. 조정된 $P < 0.05$ 및 벤자미니-호크버그 FDR $< 5\%$. **F-G**, 나이브 또는 시스플라틴 상태의 ABC-imKO 미세아교세포에서 상향조절(**F**) 또는 하향조절된(**G**) DEG의 히트맵.

[0366] 도 7: 본원에 제공된 바와 같이 야생형 및 AIBP 단백질(화합물 7)로 처리된 ABC 녹아웃 마우스의 유전자 발현을 비교한다:

[0367] 도 7. AIBP에 의한 미세아교세포 재프로그래밍은 ABCA1/ABCG1 발현에 의존한다. **A**, WT 및 CIPN이 시스플라틴

에 의해 유도된 ABC-imKO 마우스에서 유전자 발현에 대한 AIBP 처리의 효과를 비교하는 벤 다이어그램. **B**, ABC-imKO 마우스 대 WT 마우스에 대한 AIBP 효과를 비교하는 CIPN에서 AIBP 처리에 의해 상향 및 하향조절된 유전자의 화산 플롯 표현. 조정된 $P < 0.05$ 및 절대 배수 변화 > 1.5 의 컷오프는 연한 녹색 점으로 표시된다. **C**, ABC 의존 방식으로 AIBP에 의해 변경된 염증 유전자의 $\log_2$ 정규화된 유전자 계수의 히트맵(WT 미세아교세포에서 AIBP에 의해 하향조절되지만 ABC-imKO에서는 AIBP에 의해 상향조절됨). **D**, 야생형 및 ABC-imKO에서 시스플라틴과 AIBP 효과를 비교하는 콜레스테롤 합성 및 LXR 관련 유전자의 히트맵. **E**, ABC 의존 방식으로 AIBP에 의해 조절된 비염증 유전자의 히트맵. **F**, 컷오프 $P < 0.05$, 농축 > 1.5 및 경로에서 3개의 유전자의 최소 중첩을 사용하여 ABC-imKO 미세아교세포에서 AIBP에 의해 상향조절된 유전자의 농축 경로 분석.

[0368] 도 8은 AIBP 또는 TLR4의 녹아웃이 통증 거동(통각)에 기여한다는 것을 입증한다:

[0369] 도 8. 미세아교세포의 내인성 AIBP 및 TLR4는 통각에 중요하다. **A**, 실험 설계 및 타임라인. 타목시펜(TAM, 10mg/mL, 200 μ L/일); 시스플라틴(2.3mg/kg/일); AIBP(화합물 7)(0.5 μ g/5 μ L); 식염수(5 μ L). **B**, 시스플라틴 개재 시작 전 기준선(A에서 0일째) 회피 역치. 평균 $\pm$ S.E.M.(비히클 처리된 경우 $n=15$, TAM 처리된 AIBP-imKO 마우스의 경우 $n=16$, TAM으로 처리된 한배 새끼 *Apoa1bp^{f1/f1}* no-Cre [WT] 마우스의 경우 $n=8$). **C**, WT 및 *Cx3cr1-Cre^{ERT2}* (플록싱된 유전자 없음) 마우스를 타목시펜 주사 섭생(10mg/mL, 5일 동안 200 μ L/일) 전(패널 A 타임라인에서 -7일째) 및 후(TAM, 0일째)에 회피 역치에 대해 테스트했다. (그룹당 $n=5$. WT + TAM 그룹의 경우, 동물 1마리가 죽은 채로 발견됨). 통계적 차이는 발견되지 않았다. **D-F**, TAM 유도 AIBP-imKO 마우스(**C**; $n=6-7$, 2개의 독립적인 실험의 데이터), 비유도(비히클) AIBP-imKO 마우스(**D**; $n=4-5$, 2개의 독립적인 실험의 데이터), 사내 사육된 전신 AIBP 녹아웃 마우스(**E**; 그룹당 $n=4$)에서 i.p. 시스플라틴 및 i.t. 식염수 또는 AIBP(화합물 7) 주사 후의 회피 역치. **G**, 시스플라틴 주사 후 WT 및 타목시펜 유도 TLR4-imKO 마우스의 회피 역치(사내 사육된 야생형의 경우 $n=4$, TLR4-imKO 마우스의 경우 $n=7$). 평균 $\pm$ S.E.M. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. 그룹화 분석에서 다중 비교를 위한 본페로니 사후 테스트를 사용한 이원 ANOVA; > 2 그룹의 다중 비교를 위한 투키 사후 테스트를 사용한 일원 ANOVA.

[0370] 도 9: TLR4에 대한 AIBP 결합에 기여하는 서열 모티프를 식별한다:

[0371] 도 9. TLR4 결합을 담당하는 AIBP 분자에서 도메인의 식별. **A**, 인간 AIBP: 신호 펩티드(aa 1-24), 이전에 특성화되지 않은 N-말단 도메인(aa 25-51) 및 YjeF_N 도메인(aa 52-288). **B**, 인간 AIBP의 Flag-태깅된 결실 돌연변이체를 HEK293 세포에서 Flag-태깅된 TLR4 엑토도메인(eTLR4)으로 공동 발현시켰다. 세포 용해물을 항-TLR4 항체로 면역침전시키고(IP), 항-Flag 항체로 면역블롯팅했다(IB). **C**, 바쿨로바이러스/곤충 세포 시스템에서 발현된, 모두 신호 펩티드가 결여된 His-태깅된 인간(hu), 마우스(mu) 및 제브라피쉬(zf) AIBP를 시험관에서 eTLR4-His와 조합한 후, 항-TLR4 항체로의 IP 및 항-His 항체로의 IB가 이어졌다. **D-H**, eTLR4, APOA1 및 미세아교세포에 대한 His 태깅된 야생형(wt, 25-288 aa) 및 결실 돌연변이체(mut, 52-288 aa) 인간 AIBP의 결합. 항-AIBP 항체가 있는 시험관에서 eTLR4 및 wtAIBP 또는 mutAIBP의 IP; 3개의 독립적인 실험에서 블롯 및 정량화(**D**). eTLR4로 코팅되고 wtAIBP 또는 mutAIBP($n=3$)와 함께 배양된 플레이트에 의한 ELISA(**E**). BSA, wtAIBP 또는 mutAIBP로 코팅되고 APOA1과 함께 배양된 플레이트에 의한 ELISA(**F**). 자극되지 않거나 15분 동안 LPS(100ng/mL)로 처리된 BV-2 미세아교세포에 대한 wtAIBP 및 mutAIBP(2 μ g/mL)의 결합을 나타내는 유세포 분석($n=6$)(**F**) 및 공초점 이미징(**G**). 항-His 항체(유동) 및 항-TLR4 항체(이미징)에 의한 검출. 스케일 막대, 10 μ m. 평균 $\pm$ S.E.M. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; n.s., 유의하지 않음. 시간 경과 분석에서 다중 비교를 위한 본페로니 사후 테스트를 사용한 이원 ANOVA; 2개 그룹에 대한 t-테스트; 및 2개 이상의 그룹에 대한 다중 비교를 위한 투키 사후 테스트를 사용한 일원 ANOVA.

[0372] 도 10은 TLR4에 결합하지 않는 돌연변이체 AIBP가 CIPN 마우스에서 통증 거동을 역전시키지 않는다는 것을 입증하며, TLR 매개 통증의 AIBP 조절에 대한 모델을 시사한다:

[0373] 도 10. TLR4 결합 도메인이 결여된 AIBP의 척수강내 전달은 CIPN 이질통을 완화할 수 없다. **A-B**, wtAIBP 또는 mutAIBP(0.2 μ g/mL)로 전처리되고 15분 동안 100ng/mL LPS로 자극된 BV-2 세포에서 TLR4 이량체화(**A**) 및 지질 뱃목(**B**). 평균 $\pm$ S.E.M.(TLR4 이량체화 분석에서 대조군의 경우 $n=7$, mutAIBP 그룹의 경우 $n=5$, LPS그룹의 경우 $n=9$, wtAIBP 그룹의 경우 $n=8$; 지질 뱃목 분석에서 대조군의 경우 $n=8$, mutAIBP, LPS 및 wtAIBP 그룹의 경우 $n=13$; 2개의 독립적인 실험의 데이터). **C**, i.t. AIBP(0.5 μ g/5 μ L) 또는 식염수(5 μ L)에 이어, i.t. LPS(0.1 μ g/5 μ L)를 투여받은 WT 마우스의 회피 역치; 그룹당 $n=5$. **D**, i.t. 시스플라틴(2.3mg/kg/일)에 이어, i.t. wtAIBP(0.5 μ g/5 μ L), mutAIBP(0.5 μ g/5 μ L) 또는 식염수(5 μ L)에 대한 반응으로 WT 마우스의 회피 역치. 나이

브 마우스는 어떤 주사도 투여받지 않았다(나이프 그룹의 경우 n=7, wtAIBP 및 mutAIBP 그룹의 경우 n=8, i.t. 식염수 그룹의 경우 n=9; 2개의 독립적인 실험의 데이터). **E-F**, 21일째에 패널 D에 제시된 실험군 마우스의 요추 척수로부터의 CD11b⁺/TMEM119⁺ 미세아교세포에서 TLR4 이량체화(**E**) 및 지질 뱃목(**F**)(n=7-9; 2개의 독립적인 실험의 데이터). *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.005. 시간 경과 분석에서 다중 비교를 위한 본페로니 사후 테스트를 사용한 일원 ANOVA; 및 > 2 그룹의 다중 비교를 위한 투키 사후 테스트를 사용한 일원 ANOVA. **G**, 미세아교세포 유전자 발현 및 지질 액적 축적에 대한 CIPN 및 AIBP(화합물 7) 처리의 효과를 보여주는 다이어그램. 원형질막과 ER의 검은 점은 콜레스테롤을 묘사한다.

[0374] 도 11은 변형된 AIBP 서열에서 AIBP의 TLR4 결합 부위의 노출에 대한 모델을 가정한다: 도 11. AIBP 분자의 암호화 N-말단 도메인을 전개 또는 노출시키는 모델. 이 다이어그램은 도 12-14에 제시된 실험 결과를 요약하고 예시하고, 이는 천연 AIBP에서 N-말단 도메인(녹색)이 숨겨져 있거나 암호화되거나 TLR4에 대한 AIBP 결합을 매개하기에 충분히 노출되지 않는다는 것을 입증한다(상부 패널). 추가의 아미노산(주황색)으로 N-말단을 확장하면 AIBP의 형태가 변경되고 AIBP의 N-말단 도메인(녹색)이 TLR4 결합에 접근할 수 있게 된다(하단 패널). 도 12. 본원에 제공된 바와 같은 예시적인 조작된 AIBP의 아미노산 서열의 일례. 확장된 AIBP 분자의 아미노산 서열은 도 11의 하단 패널에 묘사된다. 파란색 문자, 천연 AIBP 서열의 아미노산, 녹색 상자, TLR4 결합 서열(인간 AIBP 서열의 아미노산 25-51); 검은색 문자 및 빨간색 상자, 첨가된 아미노산. 도 13은 바클로바이러스 발현 시스템에서 유래된 특정 변형된 AIBP 서열의 TLR4 결합을 입증한다:

[0375] 도 13. AIBP의 다양한 조작된 형태의 TLR4 결합. 모든 단백질은 바클로바이러스/곤충 세포 시스템으로부터 발현 및 정제되었다. His-d24AIBP의 상부 도면은 도 12에 제시된 아미노산 서열에 상응한다. 상단 도면 아래의 아미노산 서열은 주황색 상자 "절단 가능한 His 태그"의 서열을 나타낸다. 다른 모든 도면은 AIBP 분자에 도입된 아미노산 서열의 상이한 변형 및 상응하는 변화를 나타낸다. 녹색 "N-말단 도메인" 상자는 천연 AIBP의 아미노산 25-51 서열을 묘사한다. 오른쪽 컬럼은 TLR4의 제조함 엑토도메인을 갖는 AIBP 변이체의 공동 면역침전 실험 결과를 나타낸다. 도 14는 포유류 발현 시스템으로부터 특정 변형된 AIBP 서열의 TLR4 결합을 입증한다:

[0376] 도 14. AIBP의 다양한 조작된 형태의 TLR4 결합, 계속됨 1. 모든 단백질은 포유류 시스템에서 전장 TLR4와 공동 발현되었다. SS, 분비 신호, 인간 AIBP 서열의 아미노산 1-24에 상응한다. 오른쪽 컬럼은 TLR4를 갖는 AIBP 변이체의 세포 용해물로부터 공동 면역침전 결과를 나타낸다.

[0377] 도 15. TLR4 친화도에 대한 구조를 최적화하기 위한 다양한 AIBP 작제물: 바클로바이러스/곤충 세포 발현 시스템.

[0378] 도 16은 이. 콜리 발현 시스템에서 TLR4 결합을 위해 AIBP에 대한 N-말단 변형이 필요하다는 것을 확인한다:

[0379] 도 16. AIBP의 다양한 조작된 형태의 TLR4 결합, 계속 2. 모든 단백질은 이. 콜리로부터 발현 및 정제되었다. 오른쪽 컬럼은 TLR4의 제조함 엑토도메인을 갖는 AIBP 변이체의 공동 면역침전 실험 결과를 나타내고, AIBP 변이체 d24 AIBP-his 또는 d51 AIBP-his를 사용한 TLR4 결합은 없었다.

[0380] 도 17A-D(또는 도 S1 또는 보충 도 1)는 유세포 분석 및 현미경 검사에 사용되는 TLR4 항체의 특이성의 검증을 제공하고 후근 신경절 대식세포에서 측정된 TLR4 이량체화 및 지질 뱃목을 나타낸다:

[0381] 도 17A는 CD11b+(PercP-Cy5.5)/TMEM119+(Pe-Cy7) 미세아교세포의 TLR4-APC 및 TLR4/MD2-PE 항체 염색을 나타내는 WT(왼쪽 이미지) 및 *Tlr4*^{-/-} 마우스(오른쪽 이미지)의 척수로부터의 단일 세포 현탁액의 유세포 분석을 그래프로 도시하고;

[0382] 도 17B는 F4/80-FITC 및 TLR4-647 항체로 공동 염색된 WT 및 *Tlr4*^{-/-} 마우스의 복막 유도 대식세포의 공초점 이미지를 도시하고; 스케일 막대, 5 μm;

[0383] 도 17C-D는 i.t. 식염수 또는 AIBP 후 24시간, 즉 도 17A에 제시된 시간 경과와 8일째에 TLR4 이량체화(도 17C) 및 CTxB 염색에 의해 측정된 지질 뱃목 함량(도 17D)을 나타내는 CD11b⁺ DRG 대식세포의 유세포 분석법 분석을 그래프로 도시한다; 2개의 독립적인 실험의 데이터(대조군 및 AIBP 그룹의 경우 n=5, 시스플라틴 i.t. 식염수 그룹의 경우 n=9).

[0384] 도 18A-E(또는 도 S2 또는 보충 도 2)는 척추 미세아교세포에 대한 FACS 분류 전략, 품질 관리 및 RNA-seq에 대한 표현형 제어를 도시하고;

[0385] 도 18A는 SSC-A 및 FSC-A, SSC-W 및 SSC-H, UVE/DEAD(APC-Cy7-A) 및 SSC-A, GLAST1 및 CD24, 및 CD11b 및

TMEM119를 포함하는 요추 CD11b+TMEM119+ 척추 미세아교세포에 대한 분류 전략을 도시하고;

- [0386] 도 18B는 분류된 세포의 순도 및 TMEM119 및 CD11b, SSC-A 및 GLAST1, SSC-1 및 CD24를 포함한 GLAST1+ 성상교세포 또는 CD24+ 뉴런의 부재를 측정하는 분류된 미세아교세포의 유세포 분석법 분석을 도시하고;
- [0387] 도 18C는 미세아교세포 특이적 유전자의 히트맵을 사용한 미세아교세포 계통 분석을 도시한다. 모든 샘플로부터 정규화된 계수의 Log+1은 문헌(Butovsky et. al, 2014)에 나열된 40개의 미세아교세포 특이적 유전자뿐만 아니라 미세아교세포에서는 낮은 수준으로 발현되지만 뉴런(*Nefl*), 희소돌기아교세포(*Omg*) 또는 성상교세포(*Slc6a1*)에서는 높은 수준으로 특이적으로 발현되는 3개의 유전자에 대해 계산되었다;
- [0388] 도 18D-E는 AIBP(그룹 4)에 의해 상향조절된 CIPN 억제 유전자(도 18D)와 야생형 마우스에서 AIBP(그룹 3)에 의해 하향조절된 CIPN 유도 유전자(도 18E)의 히트맵을 도시하고; 행 및 컬럼에 의해 스케일링된 Log2 정규화된 유전자 계수는 3개의 생물학적 샘플의 모든 기술적 복제본을 나타낸다.
- [0389] 도 19A-D(또는 도 S3 또는 보충 도 3)는 타목시펜 유도 ABC-imKO 마우스의 척추 미세아교세포에서 ABCA1 및 ABCG1의 조건부 녹아웃을 면역조직화학적 검증을 제공한다:
- [0390] 비히클 및 타목시펜 유도 ABC-imKO 마우스의 척추 동결 절편의 IHC는 IBA1(미세아교세포), NeuN(뉴런) 및 GFAP(성상교세포)에 의한 ABCA1 및 ABCG1 염색의 공동 국소화를 나타낸다. 슬라이드는 DAPI가 포함된 Prolog Gold로 장착되었다. 공초점 이미지는 63x 대물렌즈로 획득하고, 공동 국소화를 위해 ImageJ 소프트웨어로 분석했다. 공동 국소화 마스크 및 피어슨의 R-값(Pearson's R-value), 역치 이상의 맨더스의 공동 국소화 계수 무작위화 코스트 P 값은 실험의 각 동물에 대해 적어도 1개 슬라이드에 대한 방법에 기재된 바와 같이 계산했다. 제시된 대표적 이미지와 값은 조건당 한 마리의 동물에 상응한다. 스케일 막대, 50 μ m.
- [0391] 도 20A-E(또는 도 S4 또는 보충 도 4)는 i.t. LPS 및 CIPN 실험에서 타목시펜 처리된 WT 마우스의 측각 이질통 데이터를 나타낸다. 또한, ABC-imKO 의존성 유전자에 대한 추가 RNA-seq 데이터와 ABC-imKO 대 WT 마우스에 대한 시스플라틴 효과도 제공한다. ABC-imKO 마우스에 대한 대조군으로서, 사내 사육된 WT 한배 새끼 마우스를 타목시펜 섭생(TAM, 200 μ L/일, 10mg/mL, 5일 연속)에 노출시킨 후, (도 20A) AIBP(0.5 μ g/5 μ L) 또는 식염수(5 μ L)의 i.t. 주사 및 2시간 후 i.t. LPS(0.1 μ g/5 μ L)(i.t. 식염수의 경우 n=4, i.t. AIBP의 경우 n=5); (도 20B) 1일째 및 3일째에 시스플라틴(2.3mg/Kg)의 i.p. 주사에 이어, 7일째에 AIBP(0.5 μ g/5 μ L) 또는 식염수(5 μ L)의 i.t. 주사(그룹당 n=4)가 이어졌다. 측각 이질통(회피 역치)은 폰 프레이 필라멘트를 사용하여 측정했다. 평균 $\pm$ S.E.M. *, $P<0.05$. 시간 경과 분석에서 다중 비교를 위한 본페로니 사후 테스트를 사용한 일원 ANOVA. C, ABC-imKO 마우스에 위와 같이 TAM에 이어 시스플라틴을 주입한 후, 7일째에 i.t. 식염수(5 μ L), AIBP(0.5 μ g/5 μ L) 또는 hp- β -CD(0.25mg/5 μ L)를 주입했다. i.t. 주사 24시간 후의 측각 역치가 제시된다. 평균 $\pm$ S.E.M.(그룹당 n=3-4). **, $P<0.01$. 던넛(Dunnett)의 다중 비교 테스트를 사용한 일원 ANOVA. 도 20D, ABC-imKO 방식으로 조절되는 모든 조건(나이브, 시스플라틴/식염수 또는 시스플라틴/AIBP에 의해 유도됨)에 걸쳐 차등적으로 조절된 유전자의 히트맵. 상호작용 항목(조건: 유전자형) 없이 감소된 모델을 사용한 우도비 테스트에서 유의한 모든 유전자. 행과 컬럼에 따라 스케일링된 Log2 정규화된 유전자 계수는 각 그룹의 2-3개 생물학적 샘플의 모든 기술적 복제본을 나타낸다. 도 20E, 컷오프 $P<0.05$, 농축 >1.5 및 경로에서 3개 유전자의 최소 중첩을 사용하여 WT 및 ABC-imKO 미세아교세포에서 시스플라틴 상향조절 유전자의 경로 농축 히트맵. 히트맵은 두 유전자형 모두에서 시스플라틴에 의해 농축된 공통 및 특정 경로를 묘사한다.
- [0392] 도 21(또는 도 S5 또는 보충 도 5)은 타목시펜 유도된 AIBP-imKO 마우스의 척추 미세아교세포에서 AIBP 녹아웃의 면역조직화학적 검증을 제공한다. 또한, BE-1 모노클로날 항체가 wtAIBP 및 mutAIBP와 유사한 친화도를 갖는다는 것을 입증한다. 도 21A: 비히클 및 타목시펜 유도된 AIBP-imKO 마우스의 척추 동결 절편의 IHC로, IBA1(미세아교세포), NeuN(뉴런) 및 GFAP(성상교세포)에 의한 AIBP 염색의 공동 국소화를 나타낸다. 슬라이드는 DAPI가 포함된 Prolog Gold로 장착되었다. 공초점 이미지는 63x 대물렌즈로 획득하고, 공동 국소화를 위해 ImageJ 소프트웨어로 분석했다. 공동 국소화 마스크 및 피어슨의 R-값, 맨더스의 공동 국소화 계수 및 무작위화 코스트의 P 값은 실험에서 각 동물에 대해 적어도 1개 슬라이드에 대한 방법에 기재된 바와 같이 계산되었다. 제시된 대표적인 이미지와 값은 조건당 한 마리의 동물에 상응한다. 눈금 막대, 50 μ m. 도 21B: 미세역가 플레이트에서 포획 항체로서 BE-1을 사용하는 샌드위치 ELISA. wtAIBP 및 mutAIBP에 대한 용량 반응 곡선은 토끼 폴리클로날 항-AIBP 항체를 사용하여 검출했다. 다중 비교를 위한 본페로니 사후 테스트를 사용한 일원 ANOVA를 사용하여 wtAIBP 및 mutAIBP에 대한 BE-1 친화성도 대한 통계적 차이는 발견되지 않았다.

- [0393] 실시예 2. TLR4에 대한 AIBP 결합의 구조적 결정 인자
- [0394] 이 실시예는 곤충, 포유류 또는 박테리아 시스템에서 발견되는 상이한 AIBP 변이체의 TLR4의 엑토도메인에 대한 결합을 테스트하기 위한 풀다운 실험의 결과를 요약한다. 이 실시예의 결과는 도 13 및 14에서 활성에 대한 묘사가 모든 N-말단 변형이 TLR4 결합 도메인에 노출되는 것은 아님을 입증한다는 점에서 예상치 못하다. 예로써, 절단 부위를 함유하는 N-말단 His-태이의 추정 절단 산물은 TLR4 결합을 입증하지 않는다. 이러한 예상치 못한 데이터는 AIBP 폴리펩티드에 대한 N-말단 변형이 특정 아미노산 구성 요건을 갖는다는 것을 시사한다.
- [0395] 풀다운 검정은 본원에 제공된 화합물을 사용하여 수행했다. 화합물 3, 7, 8 또는 9 및 도 13 및 14에 기재된 다른 작제물은 바칼로바이러스(BD Biosciences) 또는 CHO(ExpCHO, Expression Systems, ThermoFisher) 세포 발현 시스템으로부터 정제하고 TLR4 단백질(Sino biological)과 함께 배양했다. 풀다운은 기재된 항-AIBP 항체를 사용하여 수행했다. AIBP에 결합된 TLR4는 항-his 항체를 사용한 웨스턴 블롯으로 검출했다(변형된 AIBP와 TLR4 모두 his-태그를 갖음). 풀다운 방법에 대한 자세한 실험 정보는 실시예 1에 제공되어 있다.
- [0396] 대안적인 검정은 변형된 AIBP 및 TLR4의 HEK293 세포로의 형질감염을 사용했다. 이 연구를 위해, 형질감염된 Flag-AIBP(화합물 5 및 6에 대해 예시됨) 및 Flag-TLR4-his 작제물을 발현시키고, 형질전환된 세포를 수확하고 용해시켰다. 세포 용해물을 항-TLR4 항체로 공동 면역침전시킨 다음, 항-flag 항체로 면역블롯팅했다. 풀다운 방법에 대한 자세한 실험 정보는 실시예 1에 제공되어 있다.
- [0397] 실시예 3: 예시적인 모델에서 입증된 효능: 천식
- [0398] 천식 환자의 기관지 상피 세포에서 AIBP 발현 감소:
- [0399] 아포지단백 A-I 결합 단백질(AIBP; 유전자명 *APOA1BP* 또는 *NAXE*)은 분비된 단백질이며(1), 이는 원발성 폐포 대식세포, 내피 세포 및 미세아교세포를 포함한 활성화된 세포에서 과도한 콜레스테롤의 제거를 촉진한다(2-4). 본 발명자들은 폐 계면활성제가 폐포 대식세포와 함께 배양될 때 콜레스테롤 수용체 역할을 할 수 있음을 입증했다(4). 또한, ApoA-I는 기관지폐포 세척액(BALF)에서 발견된다(5). 이러한 결과는 콜레스테롤 유출이 혈액 및 조직뿐만 아니라 폐 공간에서도 발생한다는 것을 시사한다. AIBP는 계면활성제 단백질 B에 결합하여 폐포 대식세포에서 계면활성제로의 콜레스테롤 유출을 증가시킨다(4). 이는 원형질막에서 지질 뗏목 함량의 정규화, 염증 신호전달의 감소 및 폐포 대식세포에서 염증성 사이토카인의 발현 감소를 초래한다. 흡입된 LPS 폐 손상에 대한 반응으로, AIBP가 BALF로 분비된다(4). 또한, AIBP는 미토파지(mitophagy)를 촉진하고 미토콘드리아 기능 유지를 도우며 대식세포의 산화 스트레스를 감소시킨다(6). AIBP 발현이 염증으로부터 보호하는 역할을 한다는 가설은 폐의 AIBP 수치를 높이는 것이 치료 효과를 가질 수 있음을 의미한다.
- [0400] 폐(4) 및 다른 조직(3, 7)에서 AIBP에 의해 제공되는 광범위한 항염증 보호 기능으로 인해, 본 연구에서는 본 발명자들은 내인성 AIBP의 폐 발현이 천식 환자에서 영향을 받는지, 그리고 흡입된 AIBP가 천식 마우스 모델에서 폐 염증을 감소시키고 기도 과민성을 완화할 수 있는지 여부를 조사했다.
- [0401] 비천식 대상체로부터 수득된 사후 인간 폐 조직의 면역조직화학은 기관지 상피 세포에서 우세한 AIBP 단백질 발현 패턴을 나타냈다. 흥미롭게도, AIBP 발현은 천식 대상체의 사후 폐의 기관지 상피 세포에서 유의하게 감소되었다(도 22A 참조). 또한, 천식이 있는 대상체의 사후 폐에서 단리된 원발성 기관지 상피 세포는 비천식 대상체와 비교하여 유의하게 낮은 *APOA1BP* mRNA 발현을 가졌다(도 21D 참조). 인간 천식과 유사하게, 기관지 상피에서 내인성 AIBP의 발현은 비강내 PBS가 투여된 대조군과 비교하여 집먼지 진드기(HDM)-챌린지 마우스에서 유의하게 감소했다(도 22C 참조). 마우스의 급성 HDM 챌린지 후 기관지 상피에서 이러한 패턴의 AIBP 발현 감소는 마우스 급성 폐 손상 모델에서는 관찰되지 않았다(4). 또한, 최고 수준의 AIBP를 발현하는 폐 세포 유형은 두 모델에서 달랐으며, 급성 폐 손상에서 최고 AIBP 발현은 모집된 염증 세포(즉, 호중구 및 대식세포)에서 관찰되었다(4). 대조적으로, 급성 HDM 챌린지 후 우세한 모집된 염증 세포(즉, 호산구)는 높은 수준의 AIBP를 발현하지 않았다.
- [0402] 천식에서 내인성 AIBP 발현이 감소하고(도 21) 재조합 단백질로서 또는 아데노 관련 바이러스 전달을 통해 AIBP의 투여가 신경염증 및 신경병증성 통증(7), 혈관 염증 및 죽상 동맥 경화증(3) 및 급성 폐 손상(4)에서 항염증 및 보호 효과를 생성했기 때문에, 본 발명자들은 재조합 AIBP(화합물 7)의 비강내 전달이 천식 마우스 모델에서 치료 효과를 갖는지 여부를 테스트했다.
- [0403] 화합물 7은 HDM 투여 2시간 전에 투여했다.
- [0404] 암컷 마우스에 비강내 HDM의 4주 투여는 폐 호산구 염증 및 메타콜린 챌린지에 대한 기도 과민성(AHR)을 유도한

다(8). 두 가지 투여량의 화합물 7, 2.5 및 25 μ g 또는 비히클(PBS)을 8주령 C57BL/6J 암컷 및 수컷 마우스에 매주 비강내 HDM 2시간 전에 비강내 점적을 통해 투여했다. 비강내 화합물 7은 명백한 부작용을 일으키지 않았다. 예상대로, PBS로 전처리된 HDM 챌린지된 암컷 마우스는 AHR을 발생시켰다. 대조적으로, 화합물 7 전처리는 용량 의존 방식으로 HDM 유도 AHR을 감소시켰으며, 25 μ g 투여량은 AHR이 거의 완전한 억제에 초래하고(도 23A), HDM 유도 폐 및 BAL 호산구 증가증의 용량 의존적 감소를 유도했다(도 23B-C). 이 모델에서, HDM은 폐포 대식세포 또는 호중구 수에 눈에 띄는 변화를 유도하지 않았다(8). 수컷 마우스에서 화합물 7에 대해 유사한 결과가 획득되었다(도 23D-F).

[0405] 종합하면, 본 연구는 비천식 환자와 비교하여 천식 환자의 인간 기관지 상피 세포에서 뿐만 아니라 천식 마우스 모델에서 HDM 챌린지 후 기관지 상피 세포에서 유의하게 감소된 AIBP 발현을 입증한다. 이 결과는 비천식 환자와 비교하여 비폐 천식 환자의 BALF에서 감소된 ApoA-I 수준의 결과에 상응한다(5). 기도 상피 및 기관지 염증은 기도 평활근 수축, 기도 폐쇄 및 천식 악화로 이어지는 천식의 주요 구성 요소이기 때문에(9), 항염증 특성을 갖는 AIBP의 수준을 회복하는 것은 천식에 대한 새로운 치료 전략을 제시할 수 있다. 천식의 급성 HDM 마우스 모델에서 치료 효과를 나타내는 화합물 7의 비강내 투여에 의한 본 결과는 이 제안을 뒷받침한다. 흡입용 코르티코스테로이드(ICS)는 중등도/중증 천식 치료의 초석이므로, 화합물 7이 ICS와 병용될 때 천식 조절에 추가적인 항염증 효과를 갖는지, 및/또는 ICS에 잘 반응하지 않거나 부작용을 갖는 천식 대상체에서 ICS에 대한 다른 항염증제인지 여부를 결정하기 위해 전임상 모델과 이후 인간 천식 대상체에 대한 추가 연구가 필요하다.

[0406] 실시예 3의 재료 및 방법

[0407] 인간 폐 시험편

[0408] 천식 환자와 비천식 환자의 사후 인간 폐는 아칸소 지역 장기 회수 기관(Arkansas Regional Organ Recovery Agency)과 국립 질환 연구 교환 기관(National Disease Research Interchange)에서 조달하여 아칸소 어린이 연구소(Arkansas Children's Research Institute)의 폐 세포 생물학 연구소(Lung Cell Biology Laboratory)에 전달했다. 면역조직화학은 UC 샌디에이고에서 수행되었다. 대상체는 병원 의료 기록에 의사 천식 진단을 받았고 사망 당시 천식 약물을 사용한 경우 천식 환자로 분류되었다. 대상체는 사망 당시 병원 의료 기록에 내열된 천식 약물 사용뿐만 아니라 의사 천식 진단을 받지 않은 경우 비천식 환자로 분류되었다. 사망한 공여자 조직의 획득은 아칸소대학교 의과학 검토위원회에 의해 검토되었고 인간 대상체 연구가 아닌 것으로 결정되었다. 이 연구는 캘리포니아 대학교 샌디에이고 인간 연구 보호 프로그램의 승인을 받았다.

[0409] 인간 기관지 상피 세포

[0410] 원발성 기관지 상피 세포를 사후 폐의 기관지로부터 분리시켰다. 간단히 말해, 기관지를 해부하고 각 기관지의 내부를 세포 리프터(Corning, Inc.)로 긁어내어 기관지 상피 세포를 수득했다. 기관지 상피 세포를 수집하고 CnT-17 배지(CelIntec, 스위스 베른)에서 배양했다. 이러한 원발성 기관지 상피 세포는 유세포 분석법에 의한 E-카데린 발현에 의해 평가된 바와 같이 >95% 순수하였다.

[0411] 인간 및 마우스 폐 면역조직화학

[0412] 파라핀 매립 폐 절편은 본 실험실에서 개발된 마우스 항-인간 및 항-마우스 AIBP 모노클로날 항체 A7과 BE-1의 콕테일을 사용하여 염색하고(6, 7), 1:2 비율로 혼합했다. 마우스와 인간 AIBP의 밀접한 상동성으로 인해, 두 항체는 모두 마우스와 인간 단백질을 인식한다. 상피 세포의 AIBP 양성 염색의 정량화는 이미지 분석 시스템(Image-Pro plus, Media Cybernetics)을 사용하여 각 폐 절편에 대해 수행했으며, 결과는 인간 시험편에서 기관지 기저막의 μ m 길이당 기관지 상피의 AIBP 양성 영역으로 표현되었다. 마우스 폐에서 AIBP 발현은 Image J(NIH)의 평균 회색 값 도구를 사용하여 측정했으며, 내경 150-200 μ m의 세기관지의 기관지 상피의 세포질 내의 값은 인접한 폐포의 값으로 정규화되었다. 작업자는 샘플의 정제에 맹검화되었다.

[0413] APOA1BP mRNA 정량화

[0414] 천식 환자와 비천식 환자의 인간 기관지 상피 세포에서 APOA1BP mRNA를 정량화하기 위해, 각 세포 샘플의 총 RNA를 이전에 기재된 바와 같이 RT-qPCR에 대해 처리했다(8). 간단히 말해서, 샘플을 RNA-STAT-60(TelTest)으로 처리하고, Oligo-dT 및 SuperScript II 키트(Life Technologies)로 역전사시켰다. qPCR은 인간 APOA1BP(Hs.PT.58.22278956, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)에 대한 TaqMan PCR 마스터 믹스 및 TaqMan 프라이머를 사용하여 수행했다. APOA1BP mRNA의 상대적 양은 하우스키핑 유전자 하이포크산틴 포스포리보실트랜스퍼라제-1(HPRT1)의 양으로 정규화되었다.

- [0415] 화합물 7의 생산
- [0416] 간단히 말해, 화합물 7은 바콜로바이러스/곤충 세포 시스템에서 발현되어 번역 후 변형 및 내독소 비함유 제제를 보장하고, Ni-NTA 아가로스 컬럼을 사용한 친화성 크로마토그래피로 정제한 다음, 이온 교환 크로마토그래피 및 완충액 교체로 정제하였다. 이 제품은 90% 초과 순수하였으며, 검출 가능한 응집체(HPLC-SEC)가 없었고 잔류 내독소가 0.2 EU/mg 미만이었다. -80℃에서 최대 6개월 또는 4℃에서 1주일 동안 화합물 7의 저장 안정성 연구는 이의 역가 또는 순도의 임의의 손실을 나타내지 않았다.
- [0417] 천식의 급성 HDM 마우스 모델
- [0418] 모든 실험은 샌디에이고 캘리포니아 대학교의 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)가 승인한 프로토콜에 따라 수행되었다. 8주령의 야생형 C57BL/6J 마우스(수컷 및 암컷)에 이전에 기재된 바와 같이 0, 7, 14, 21일째에 100 µg의 비강내 HDM(더마토파고이데스 프테로니시누스(*Dermatophagoides pteronyssinus*)) 추출물(Greer Laboratories)을 투여했다(8). 각 HDM 투여 2시간 전에, 50 µl의 PBS 대조군 또는 화합물 7 용액 2.5 µg 또는 25 µg 투여량을 비강내로 투여했다. 대조군은 HDM 대신 비강내 PBS를 투여했다. 24일째에, 메타콜린에 대한 기도 과민성을 기재된 바와 같이 평가하고(8), 마우스를 희생시켜 BAL 및 폐를 수집했다. BAL을 기관 카테터를 통해 1ml PBS의 세척으로 수집하고 원심분리한 후, 펠릿을 1ml PBS에 재현탁시켰다. BAL 총 세포 계수를 결정한 후, Wright-Giemsa 염색 슬라이드에서 차등 세포 계수를 정량화했다(8). 폐 호산구 계수는 항-마우스 주요 염기성 단백질(MBP) 토끼 폴리클로날 항체(메이요 의학 교육 및 연구 재단(Mayo Foundation for Medical Education and Research)에서 친절하게 제공)로 염색된 폐 파라핀 매립 절편의 기관지 주위 공간에서 정량화했다. 결과는 내경이 150-200 µm인 세기관지당 양성으로 염색된 기관지 주위 세포의 수로 표시된다. 각 슬라이드에서 적어도 5개의 세기관지를 계수했다. 작업자는 샘플의 정체에 맹검화되었다.
- [0419] 통계: 모든 결과는 평균±SEM으로 제시된다. 통계 소프트웨어 패키지(GraphPad Prism)가 분석에 사용되었다. 두 그룹의 분석에는 맨-휘트니 테스트(Mann-Whitney test)가 사용되었다. 두 개 이상의 그룹이 비교되는 경우에 사후 투기 다중 비교 테스트를 사용한 이원 또는 일원 AVOVA이 사용되었다. 0.05 미만의 P-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.
- [0420] 실시예 3의 도면 범례
- [0421] 도 22. 기관지 상피에서 감소된 AIBP 발현. A, 항-AIBP 항체로 염색된 천식이 없는 인간 대상체와 천식이 있는 인간 대상체의 사후 폐 시험편. AIBP 양성 기관지 상피의 정량화(n=6). B, *HPRT1*로 정규화된 비천식 환자(n=9) 및 천식 환자(n=11)로부터 단리된 기관지 상피 세포의 *APOA1BP* mRNA. C, 항-AIBP 항체로 염색된 비히클 또는 100 µg HDM의 비강내 투여량을 4주마다 투여받은 마우스의 폐. 기관지 상피에서 AIBP 염색의 정량화(n=8). 평균±SEM; *, $P<0.05$; ***, $P<0.001$.
- [0422] 도 23. RFT1081은 암컷 및 수컷 마우스의 급성 HDM 천식 모델에서 기도 과민성 및 호산구 폐 염증을 감소시킨다. 암컷(A-C) 및 수컷(D-F) C57BL/6J 마우스는 4주마다 2.5 µg 또는 25.0 µg의 RFT1081 또는 PBS를 비강내 점적하였다. 2시간 후, 마우스는 100 µg HDM 또는 비히클을 비강내 점적하였다. 마지막 켈린지 3일 후, 마우스를 메타콜린에 대한 기도 내성(A, D)에 대해 테스트하고, 폐(B, E) 및 BAL(C, F)은 지시된 바와 같은 분석을 위해 수집했다. 평균±SEM; 그룹당 n=8 마우스. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ****, $P<0.001$; ***, $P<0.0001$
- [0423] 실시예 4: 예시적인 방법에서 입증된 효능: 녹내장
- [0424] AAV-AIBP는 망막 신경절 세포와 축삭을 보호하고, 실험용 녹내장에서 시각 기능을 개선한다:
- [0425] 녹내장 DBA/2J(D2) 마우스 모델. 연령이 일치된 비녹내장 대조군 $D2-Gpnmb^{+}$ 마우스와 함께 유전자 D2 모델을 사용할 때의 장점은 약 9~10개월에 나이가 들면서 망막 병리가 발생하는 인간 녹내장의 만성 IOP 상승을 복제한다는 점이다(1, 2). 본 발명자들은 임의의 동물 모델과 마찬가지로, 이러한 마우스에서 녹내장 유사 병리가 유착(synechiae)과 색소 분산(pigment dispersion)을 동반한 전안부 이상(anterior segment anomaly)에 이차적으로 발생하기 때문에 D2가 제한이 있다는 것을 알고 있다(1, 2). 예비 연구에서, 본 발명자들은 WT 마우스와 비교하여 $Apoa1bp^{-/-}$ 의 망막에서 유의하게 상승된 콜레스테롤 함량을 관찰했으며(도 24A 참조), 이는 AIBP 결핍이 망막에 과도한 콜레스테롤 축적을 유도한다는 것을 시사한다. 참고로, 10개월령 녹내장 D2 마우스에서, 본 발명자들은 콜레스테롤 함량이 또한 $D2-Gpnmb^{+}$ 마우스와 비교하여 망막에서 유의하게 상승했음을 발견했다(도 24B).

따라서, 본 발명자들은 AAV-AIBP의 생체내 전달에 의한 AIBP의 과발현이 녹내장 D2 마우스에서 과도한 콜레스테롤 축적을 역전시키고, RGC와 축삭을 보호하며, 중심 시각 경로를 보존할 수 있는지 여부를 테스트했다. 본 발명자들이 마우스 모델에 사용한 AAV 혈청형은 AAV-DJ/8이었고, 피브로넥틴 신호 펩티드가 강력한 단백질 분비를 보장하는 마우스 AIBP를 발현시켰다. 본 발명자들은 5개월령에 AAV-Null 또는 AAV-AIBP를 유리체내에 주사하고, 10개월령에 조직 샘플(망막, 시신경 머리, 뇌)을 분석했다. 본 발명자들은 다중 스플라이싱(RBPMs) 및 신경필라멘트 68(NF68)을 사용한 RNA 결합 단백질에 대한 염색과 활성 흡수 및 수송을 통한 전체 망막 투영을 보여주는 우수한 구체(SC)의 콜레라 독소 아단위 B(cholera toxin subunit B; CTB) 표지에 의한 중심 시각 경로의 보존을 통해 RGC와 이의 축삭 생존을 평가했다^{3, 4}.

[0426] AAV-AIBP 주사 후, 10개월령에 망막에서 AIBP 단백질 발현이 검출되었다(도 24E). AAV-Null이 아닌 AAV-AIBP는 콜레스테롤 함량을 유의하게 감소시켰으며(도 24 C 및 D), 녹내장 D2 망막의 중심부 및 주변부에서 RGC를 보호했다(도 24G 및 H). 또한, 본 발명자들은 SC로의 CTB 수송에서 상당한 개선을 관찰했으며(도 24J-M), 이는 AAV-AIBP가 시신경의 구조적 및 기능적 무결성을 보존하는 데 도움이 되었음을 시사한다.

[0427] 마이크로비드 유도 안구 고혈압 모델. 최근에, 본 발명자들은 마이크로비드 유도 안구 고혈압 마우스 모델을 성공적으로 개발했으며, 이는 4개월령 C57BL/6J 마우스에서 시술 후 6주째에 RGC의 상당한 손실을 나타냈다(도 25). RGC 및 생체내 시각 기능에 대한 AAV-AIBP의 보호 효과를 추가로 검증하기 위해, 본 발명자들은 마이크로비드 주사 3주 전에 AAV-Null 또는 AAV-AIBP를 유리체내 주입했다. AAV-AIBP는 RGC 사멸을 현저히 감소시켰으며(도 25C 참조), 중요하게는 시각 기능 장애를 개선했다(도 25D 참조).

[0428] 시신경 압박(ONC) 모델. ONC는 RGC 사망과 변성을 유사하게 유도하기 때문에 외상성 시신경병증(tramatic optic neuropathy)뿐만 아니라 녹내장 손상의 유용한 모델 역할을 한다⁵. 본 발명자들은 ONC 3주 전에 AAV-Null 또는 AAV-AIBP를 유리체내 주입한 후, ONC 1주 후 RBPMs 염색으로 RGC 생존을 평가했다. AIBP의 과발현은 ONC 손상으로부터 RGC를 보호하는 것으로 밝혀졌다(도 26).

[0429] 종합적으로, 이러한 발견은 녹내장성 신경퇴행의 세 가지 상이한 생체내 모델에서, AAV 전달 AIBP 발현이 콜레스테롤 함량을 감소시키고, RGC와 그들의 축삭을 보호하며, 미세아교세포 활성화를 억제하고(표시되지 않음), 시각 기능을 보존한다는 것을 입증한다.

[0430] 실시예 4의 도면 범례:

[0431] 도 24. AAV-AIBP는 녹내장 DBA/2J (D2) 마우스에서 망막 신경퇴행을 감소시킨다. A 및 B, *Apoa1bp*^{-/-} 마우스. 콜레스테롤에 대한 필리핀 염색(A). 내부 망막에서 필리핀 강도의 정량화(B). C-M, 녹내장 D2 마우스. 콜레스테롤에 대한 필리핀 염색(C). 내부 망막에서 필리핀 강도의 정량화(D). 항-His 항체를 사용한 면역블롯에 의한 망막내 AIBP 발현의 확인(E). IOP 측정(F). 망막 말초 영역의 RBPMs(녹색) 양성 RGC(G). 중간 및 말초 망막에서 RGC 생존율의 정량적 분석(H). 신경교층에서 NF68(녹색) 양성 축삭(I). 망막의 CTB 표지(빨간색) 및 Brn3a(녹색)(J). SC의 CTB 표지(K 및 L). SC에서 CTB 강도의 정량화(M). 평균±SEM; n = 5-8 망막. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, 및 ****P<0.0001(일원 ANOVA, 투키의 다중 비교 테스트). 눈금 막대: 20 μm(A 및 C) 및 50 μm(G 및 I).

[0432] 도 25. AAV-AIBP는 마이크로비드 유도 고혈압 마우스 모델에서 망막 신경퇴행을 감소시키고 시각 기능을 개선한다. A, 마이크로비드 주입 눈의 IOP 시간 경과. B, 마이크로비드 주사 6주 후 TUJ1 염색에 의한 망막 주변부의 대표 이미지. C, 망막 중심부에서 RGC 생존율의 정량적 분석. D, PERG 분석에 의한 시각 기능 측정. 평균±SM; n = 5-8 망막. *P<0.05, ***P<0.001 및 ****P<0.0001 (일원 ANOVA, 투키의 다중 비교 테스트). 막대: 50 μm.

[0433] 도 26. AAV-AIBP는 망막 신경퇴행 및 마우스 시신경 압박 모델을 감소시킨다. A, ONC 손상 후 망막 중심부에서 RBPMs 양성 RGC의 대표 이미지; B, 망막 중심부 및 주변부에서 RGC 생존율의 정량적 분석. 평균±SEM; n = 5-8 망막. *P<0.05 **P<0.01, ****P<0.0001(일원 ANOVA, 투키의 다중 비교 테스트). 막대: 50 μm.

[0434] 참조문헌 예 1

- Ahn, J.H., *et al.* (2019). Meningeal lymphatic vessels at the skull base drain cerebrospinal fluid. *Nature* 572, 62-66.
- Akashi, S., *et al.* (2003). Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med* 198, 1035-1042.
- Blasi, E., *et al.*, (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27, 229-237.
- Brandolini, L., *et al.*, (2019). Chemokine Signaling in Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci* 20, 2904.
- Bruno, K., *et al.* (2018). Targeting toll-like receptor-4 (TLR4)-an emerging therapeutic target for persistent pain states. *Pain* 159, 1908-1915.
- Chaplan, S.R., *et al.* (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53, 55-63.
- Chen, T., *et al.* (2017). Interactions of Notch1 and TLR4 signaling pathways in DRG neurons of in vivo and in vitro models of diabetic neuropathy. *Sci Rep* 7, 14923.
- Cheng, A.M., *et al.*, (2012). Apolipoprotein A-I attenuates palmitate-mediated NF-kappaB activation by reducing Toll-like receptor-4 recruitment into lipid rafts. *PLoS One* 7, e33917.
- Choi, S.-H., *et al.*, (2020). Intracellular AIBP (Apolipoprotein A-I Binding Protein) Regulates Oxidized LDL (Low-Density Lipoprotein)-Induced Mitophagy in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 0, ATVB.AHA.120.315485.

[0435]

- Choi, S.H., *et al.* (2018). AIBP augments cholesterol efflux from alveolar macrophages to surfactant and reduces acute lung inflammation. *JCI Insight* 3, e120519.
- Dobin, A., *et al.*, (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.
- Ewels, P., *et al.* (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32, 3047-3048.
- Fang, L., *et al.* (2013). Control of angiogenesis by AIBP-mediated cholesterol efflux. *Nature* 498, 118-122.
- Furfari, A., *et al.* (2017). Genetic biomarkers associated with changes in quality of life and pain following palliative radiotherapy in patients with bone metastases. *Ann Palliat Med* 6, S248-S256.
- Gay A., R.D., and Arun Radhakrishnan (2015). Switch-like Responses of Two Cholesterol Sensors Do Not Require Protein Oligomerization in Membranes. *Biophysical Journal* 108, 1459-1469.
- Gregus, A.M., *et al.* (2018). Inhibition of spinal 15-LOX-1 attenuates TLR4-dependent, nonsteroidal anti-inflammatory drug-unresponsive hyperalgesia in male rats. *Pain* 159, 2620-2629.
- Gu, Q., *et al.* (2019). AIBP-mediated cholesterol efflux instructs hematopoietic stem and progenitor cell fate. *Science* 363, 1085-1088.
- Hartley, S.W., and Mullikin, J.C. (2015). QoRTs: a comprehensive toolset for quality control and data processing of RNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 16, 224.
- He, C., *et al.*, (2017). High-resolution imaging and quantification of plasma membrane cholesterol by NanoSIMS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 2000-2005.
- Hossaini, M., *et al.* (2010). Nociceptive stimulation induces expression of Arc/Arg3.1 in the spinal cord with a preference for neurons containing enkephalin. *Mol Pain* 6, 43.
- Hu, L.Y., *et al.* (2018). Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) dependent microglial activation promotes cisplatin-induced peripheral neuropathy in mice. *Brain Behav Immun* 68, 132-145.
- Hylden, J.L., and Wilcox, G.L. (1980). Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 67, 313-316.
- Jaitin, D.A., *et al.* (2019). Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner. *Cell* 178, 686-698 e614.

[0436]

- Jha, K.N., et al. (2008). Biochemical and structural characterization of apolipoprotein A-I binding protein, a novel phosphoprotein with a potential role in sperm capacitation. *Endocrinology* 149, 2108-2120.
- Karasinska, J.M., et al. (2013). ABCA1 influences neuroinflammation and neuronal death. *Neurobiol Dis* 54, 445-455.
- Kennedy, H.S., et al. (2013). Comparison of standard laminectomy with an optimized ejection method for the removal of spinal cords from rats and mice. *J Histotechnol* 36, 86-91.
- Lees, J.G., et al. (2017). Immune-mediated processes implicated in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Eur J Cancer* 73, 22-29.
- Li, Y., et al. (2021). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a dish: dorsal root ganglion cells treated in vitro with paclitaxel show biochemical and physiological responses parallel to that seen in vivo. *Pain* 162, 84-96.
- Liu, L., and Duff, K. (2008). A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. *Journal of Visualized Experiments* 21, 960.
- Love, M.I., et al. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.
- Makker, P.G., et al. (2017). Characterisation of Immune and Neuroinflammatory Changes Associated with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *PLoS One* 12, e0170814.
- Marschallinger, J. et al. (2020). Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nat Neurosci* 23, 194-208.
- Masuda, T., et al. (2019). Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566, 388-392.
- Miller, Y.I., et al. (2020). Lipid rafts in glial cells: role in neuroinflammation and pain processing. *J Lipid Res* 61, 655-666.
- Nugent, A.A., et al. (2020). TREM2 Regulates Microglial Cholesterol Metabolism upon Chronic Phagocytic Challenge. *Neuron* 105, 837-854 e839.
- Oliveira, A., et al. (2014). Interleukin-1beta genotype and circulating levels in cancer patients: metastatic status and pain perception. *Clin Biochem* 47, 1209-1213.
- Papageorgiou, I.E., et al. (2016). TLR4-activated microglia require IFN-gamma to induce severe neuronal dysfunction and death in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 212-217.
- Pevida, M., et al. (2013). Spinal CCL2 and microglial activation are involved in paclitaxel-evoked cold hyperalgesia. *Brain Res Bull* 95, 21-27.

[0437]

- Prinz, M., Jung, S., and Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* 179, 292-311.
- Rosales, S.L., et al. (2018). A Sensitive and Integrated Approach to Profile Messenger RNA from Samples with Low Cell Numbers. *Methods Mol Biol* 1799, 275-302.
- Seretny, M., et al. (2014). Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain* 155, 2461-2470.
- Singhmar, P., et al., (2020). The fibroblast-derived protein PI16 controls neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 5463-5471.
- Spann, N.J., et al. (2012). Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* 151, 138-152.
- Stokes, J.A., et al. T.L. (2013). Spinal toll-like receptor signaling and nociceptive processing: regulatory balance between TIRAP and TRIF cascades mediated by TNF and IFNbeta. *Pain* 154, 733-742.
- Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 15, 104-116.
- Woller, S.A., et al. (2018). Inhibition of Neuroinflammation by AIBP: Spinal Effects upon Facilitated Pain States. *Cell reports* 23, 2667-2677.
- Woller, S.A., Ravula, S.B., Tucci, F.C., Beaton, G., Corr, M., Isseroff, R.R., Soulika, A.M., Chigbrow, M., Eddinger, K.A., and Yaksh, T.L. (2016). *Brain Behav Immun* 56, 271-280.
- Yan, X., et al., (2019). Interleukin-1beta released by microglia initiates the enhanced glutamatergic activity in the spinal dorsal horn during paclitaxel-associated acute pain syndrome. *Glia* 67, 482-497.
- Yvan-Charvet, L., et al., (2008). Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation* 118, 1837-1847.
- Zanoni, I., Tan, Y., Di Gioia, M., Broggi, A., Ruan, J., Shi, J., Donado, C.A., Shao, F., Wu, H., Springstead, J.R., et al. (2016). An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science* 352, 1232-1236.
- Zhang, M., Li, L., Xie, W., Wu, J.F., Yao, F., Tan, Y.L., Xia, X.D., Liu, X.Y., Liu, D., Lan, G., et al. (2016). Apolipoprotein A-1 binding protein promotes macrophage

cholesterol efflux by facilitating apolipoprotein A-1 binding to ABCA1 and preventing ABCA1 degradation. *Atherosclerosis* 248, 149-159.

Zhang, M., et al. (2018). Apolipoprotein A-1 Binding Protein Inhibits Inflammatory Signaling Pathways by Binding to Apolipoprotein A-1 in THP-1 Macrophages. *Circ J* 82, 1396-1404.

Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S.K. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 10, 1523.

Zhu, X., et al., (2010). *J Lipid Res* 51, 3196-3206.

[0440] 실시예 3의 참조문헌

1. Ritter M, et al. Genomics. 2002;79(5):693-702.
2. Fang L, et al. Control of angiogenesis by AIBP-mediated cholesterol efflux. Nature. 2013;498(7452):118-22.
3. Schneider DA, et al. AIBP protects against metabolic abnormalities and atherosclerosis. J Lipid Res. 2018;59(5):854-63.
4. Choi SH, et al. JCI Insight. 2018;3(16):pii: 120519.
5. Park S-W, et al. Clinical & Experimental Allergy. 2013;43(8):914-27.
6. Choi S-H, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2021;41(2): e82-e96.
7. Das S, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016;113(46):13132-7.
8. Akdis CA. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? Nat Rev Immunol. 2021;21(11):739-51.

[0441]

[0442] 실시예 4의 참조문헌

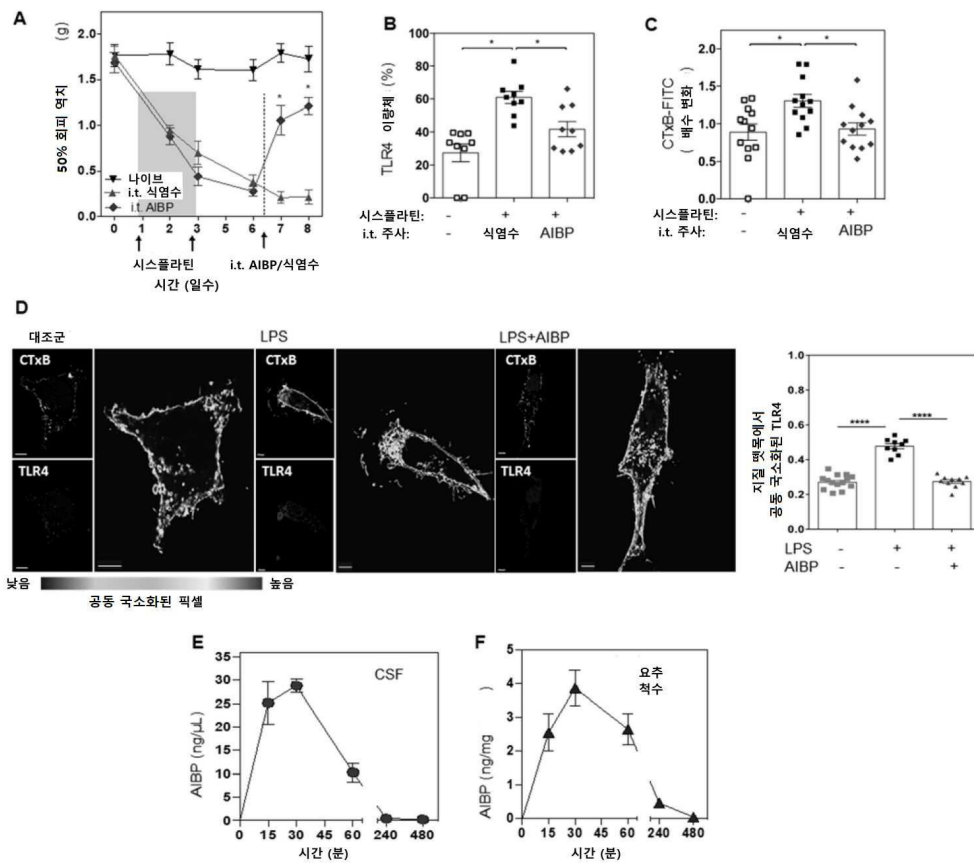
1. John SW, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997;38:249-53.
2. Libby RT, et al. Vis Neurosci. 2005;22:637-48.
3. Crish SD, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:5196-201.
4. Angelucci A, et al. J Neurosci Methods. 1996;65:101-12.
5. Cameron EG, et al. Bio Protoc. 2020;10.

[0443]

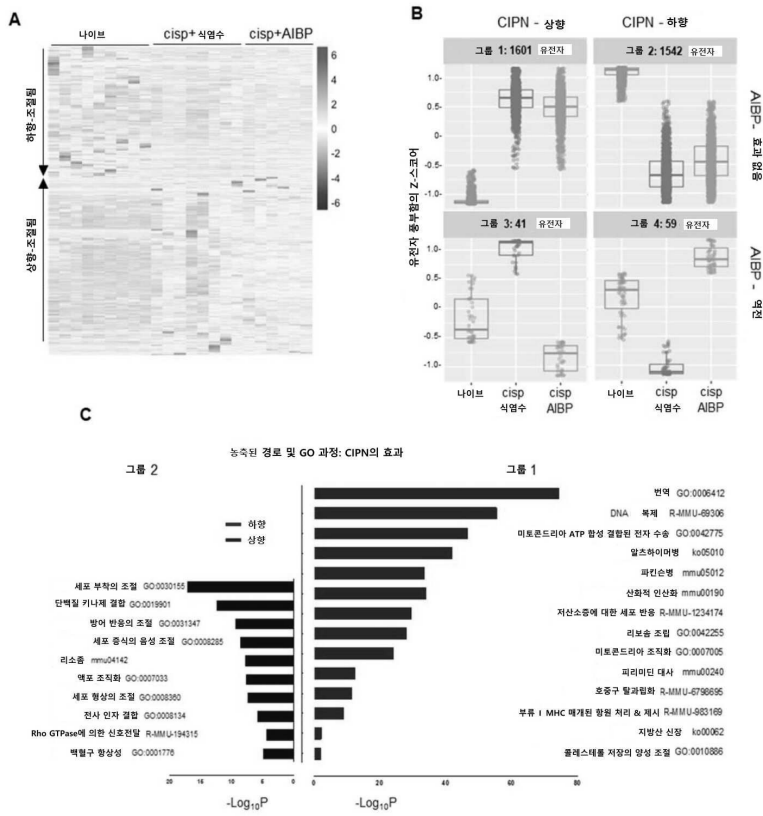
[0444] 본 발명의 다수의 구현예가 기재되어 있다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 사상 및 범위로부터 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 다른 구현예는 다음 청구범위의 범위 내에 있다.

도면

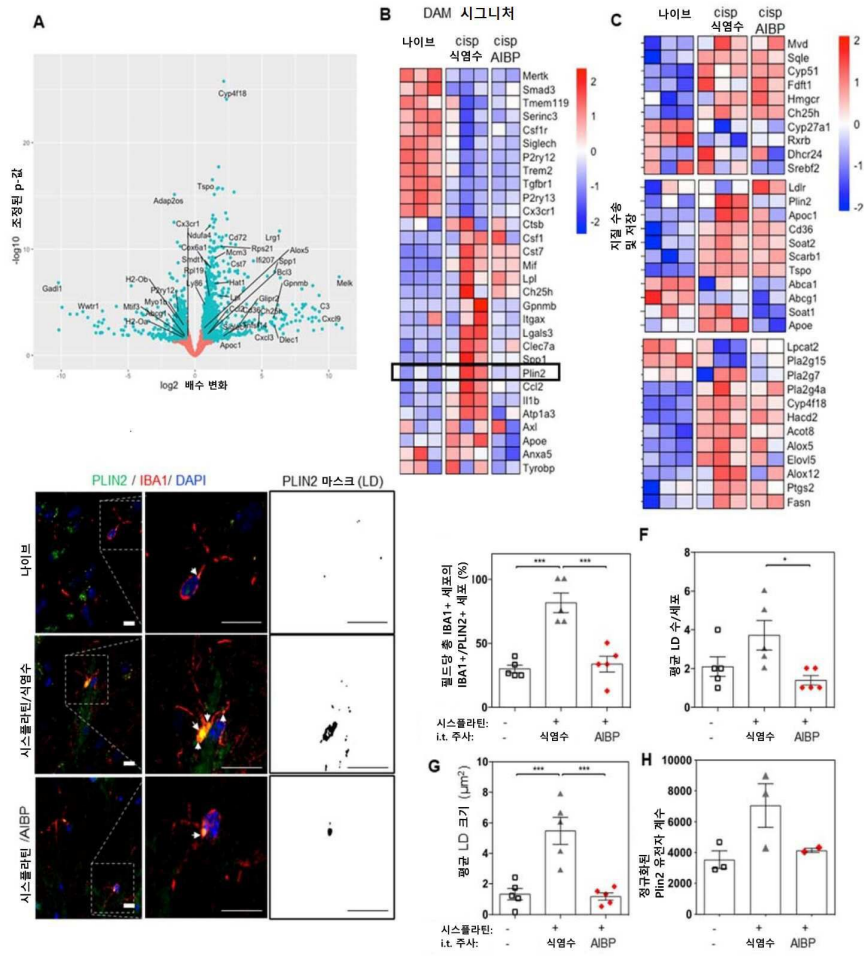
도면1



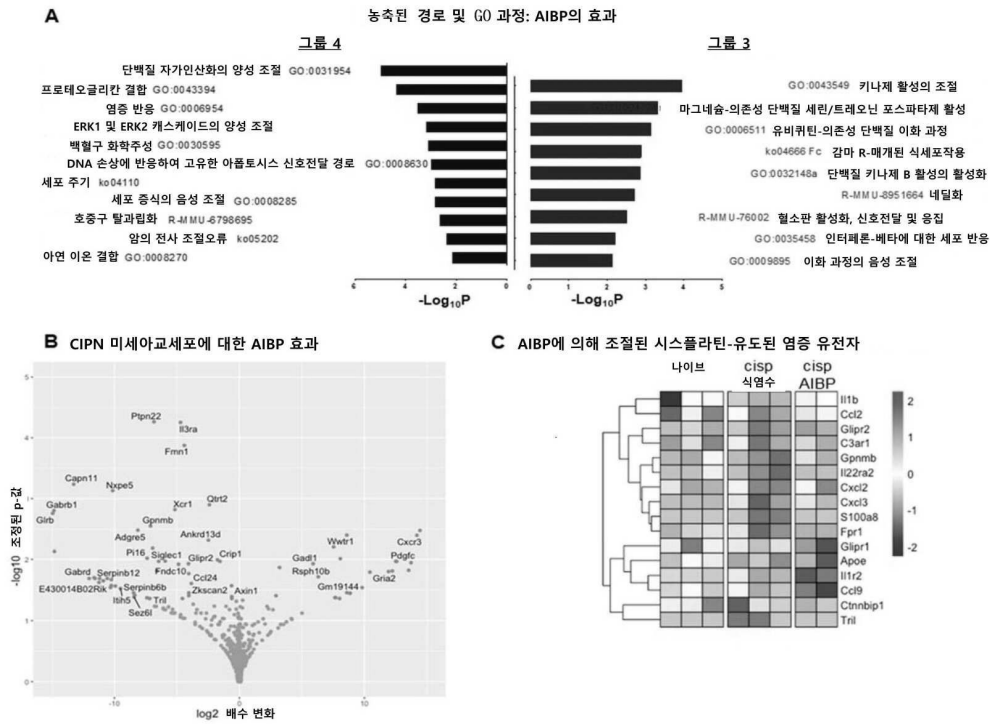
도면2



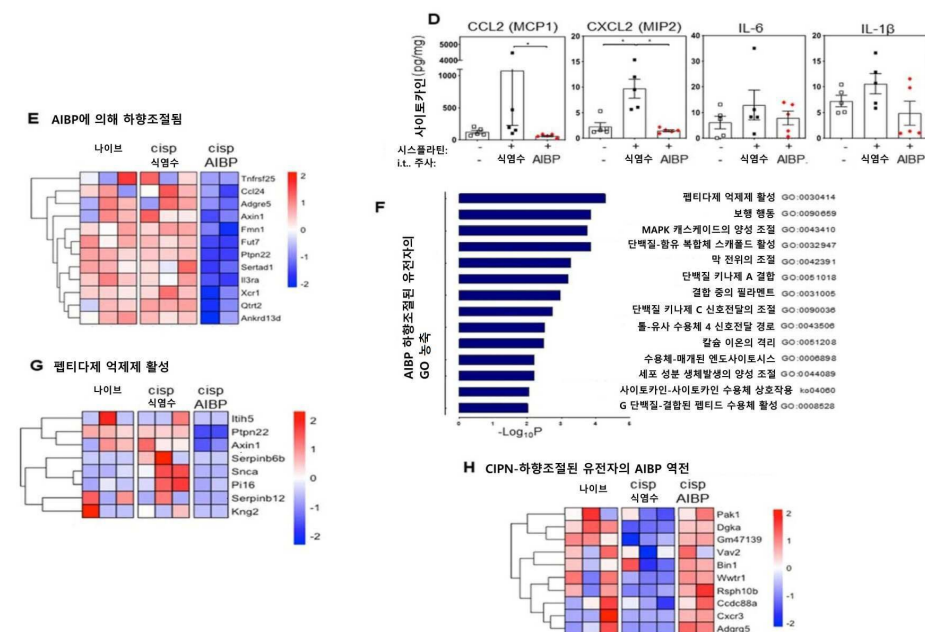
도면3



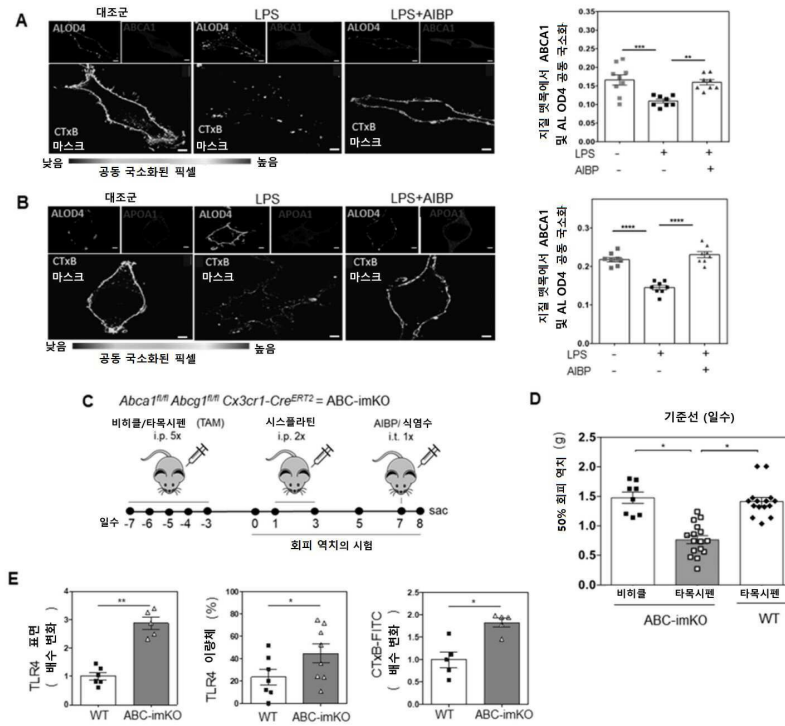
도면4ac



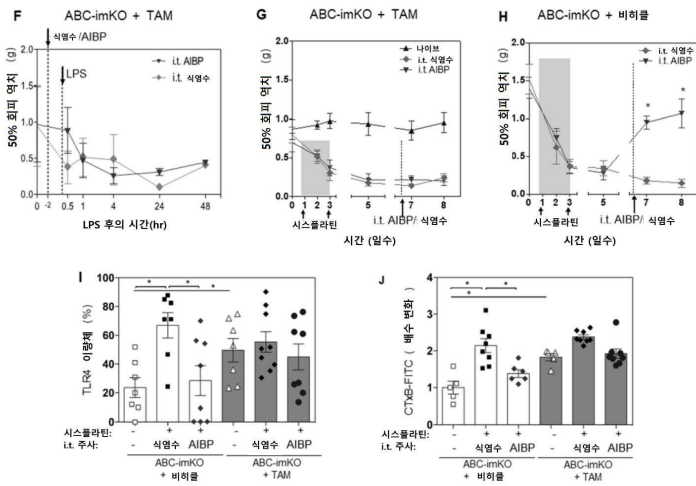
도면4dh



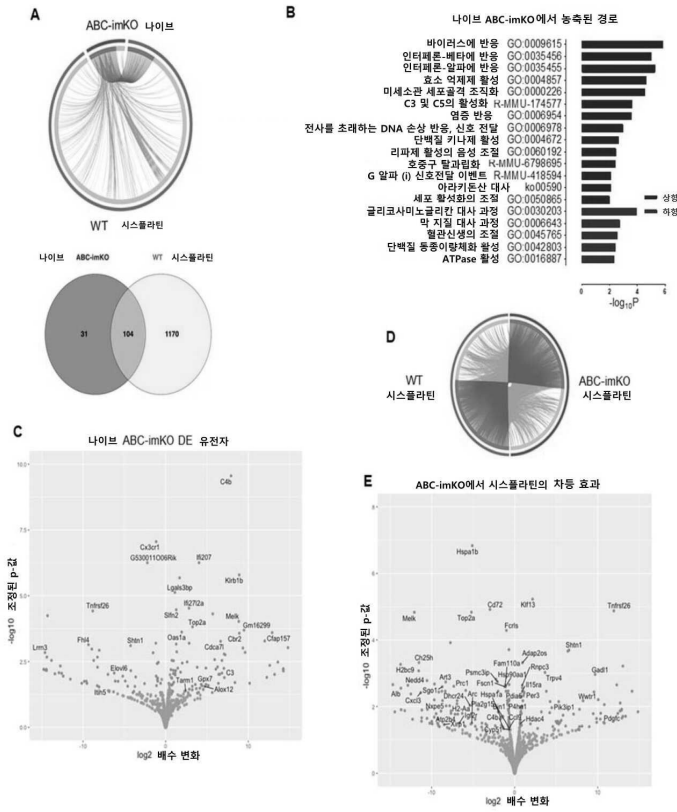
도면5ae



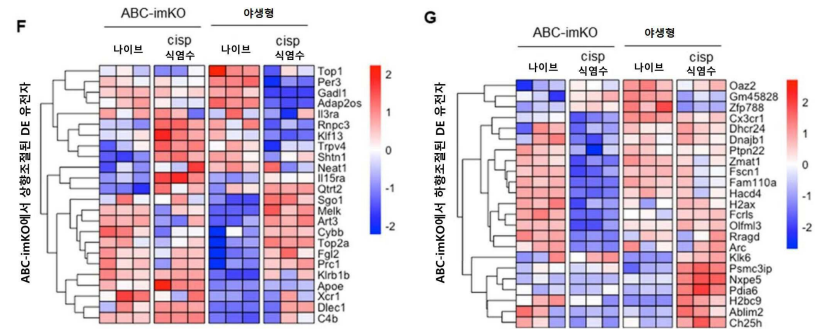
도면5fj



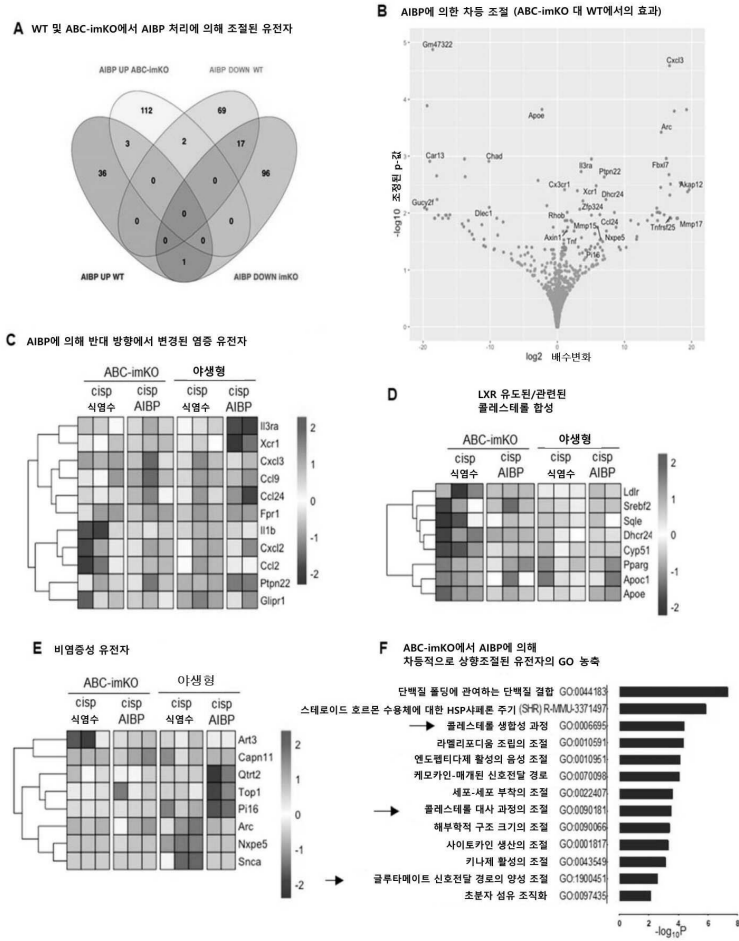
도면6ae



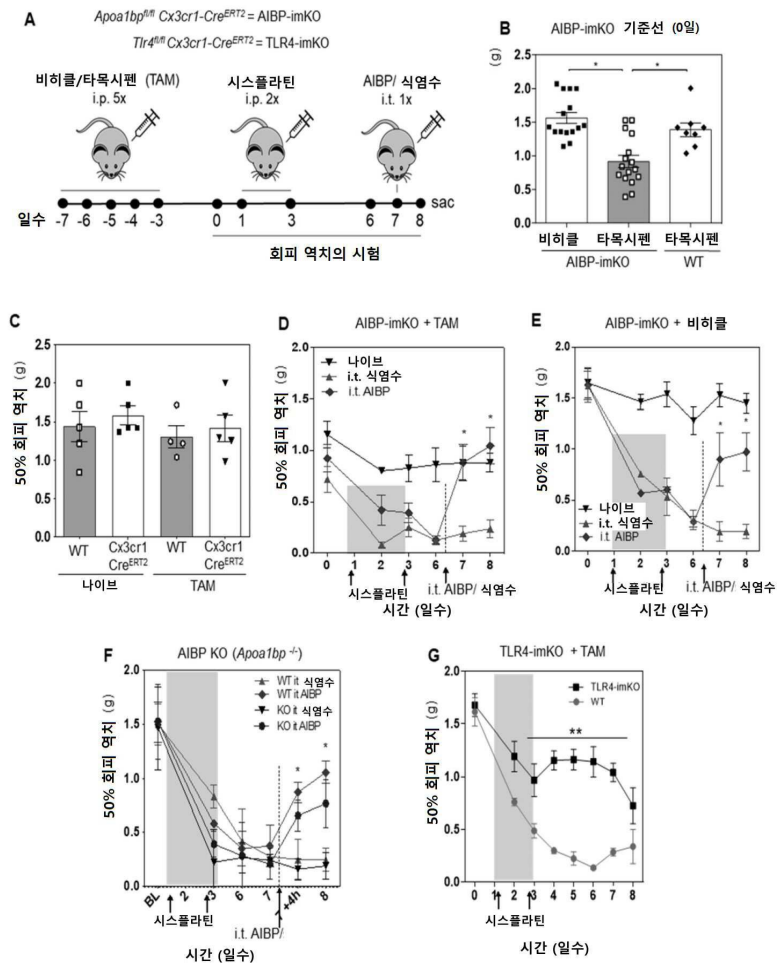
도면6fg



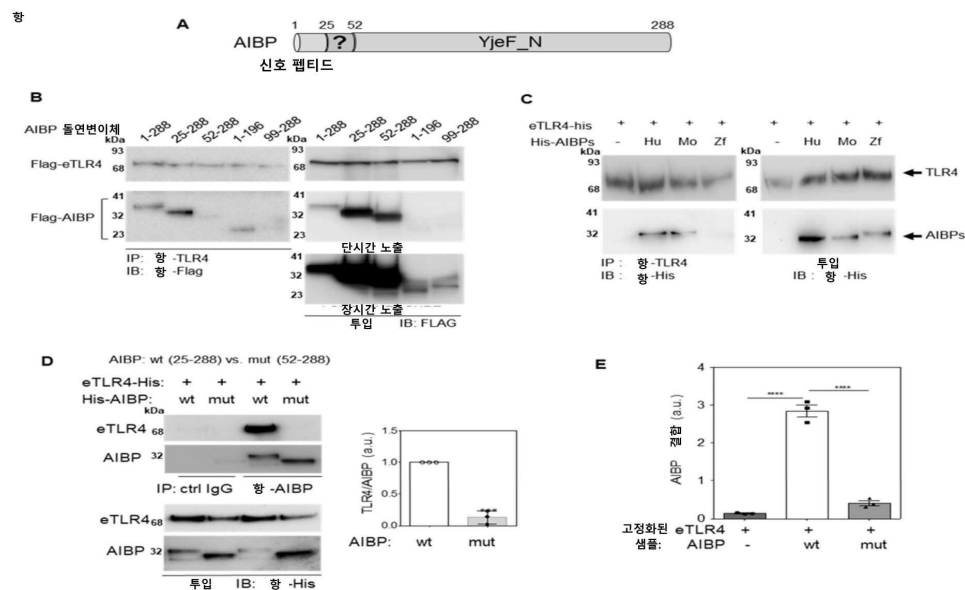
도면7



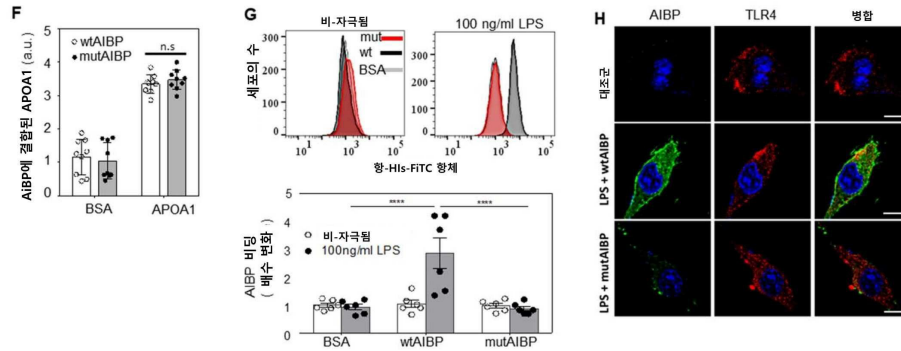
도면8



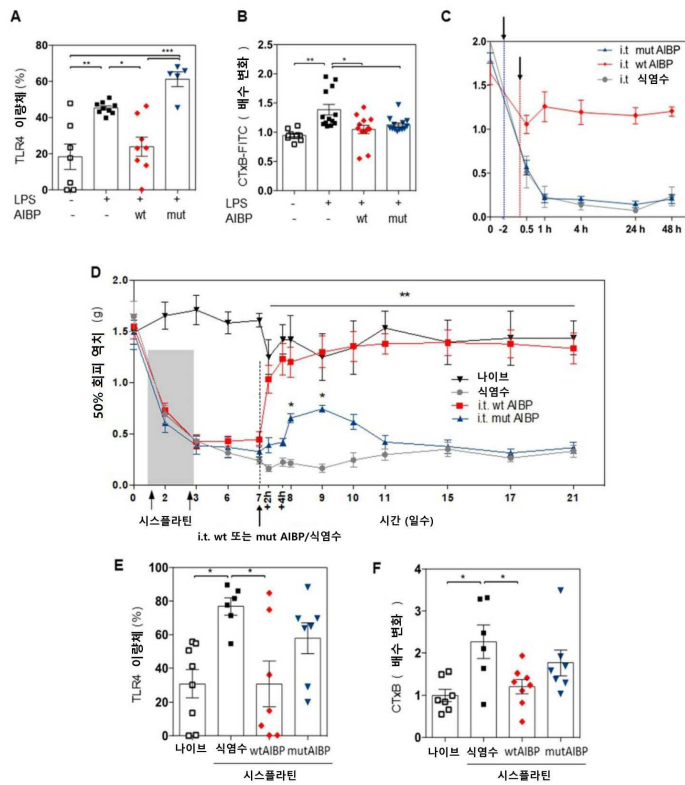
도면9ae



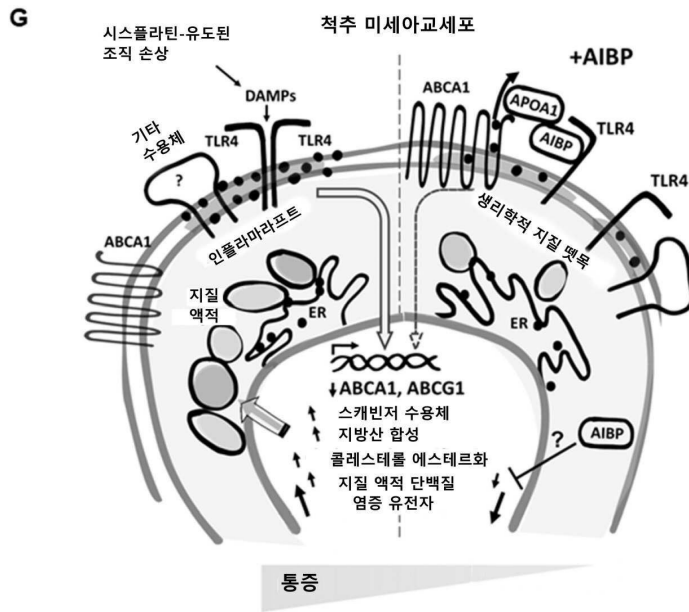
도면9fh



도면10af



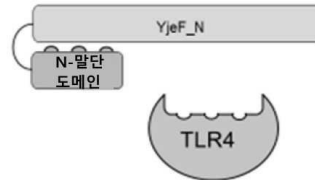
도면10g



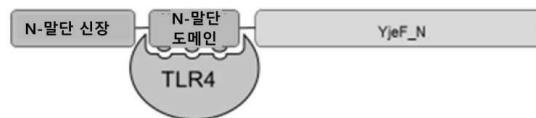
도면11

TLR4에 결합하는 천연 AIBP가 아닌 조작된 AIBP에 대한 모델

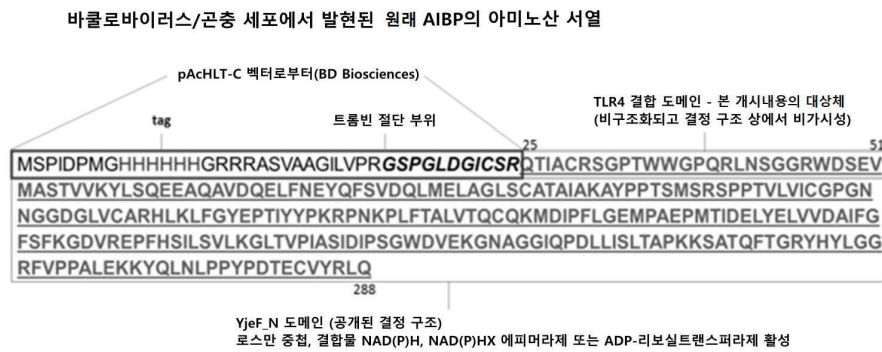
천연 AIBP에서
암호화 N-말단
TLR4 결합 도메인



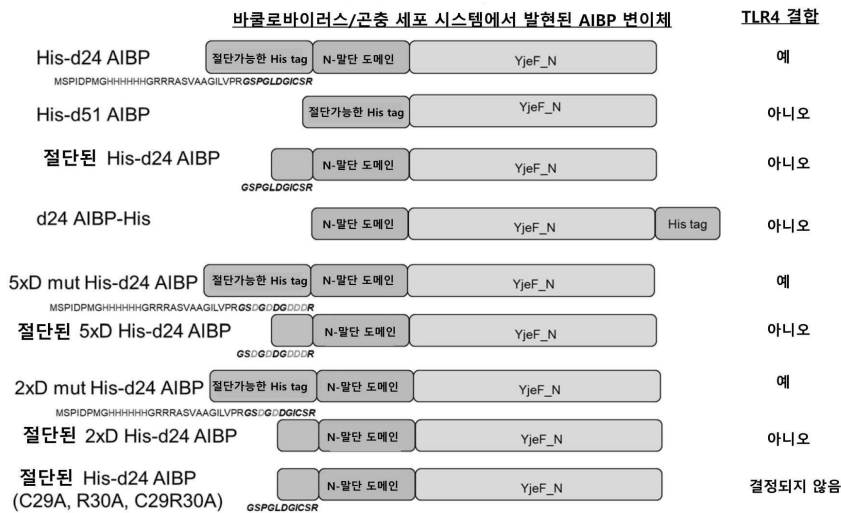
조작된 AIBP에서
노출된 N-말단
TLR4 결합 도메인



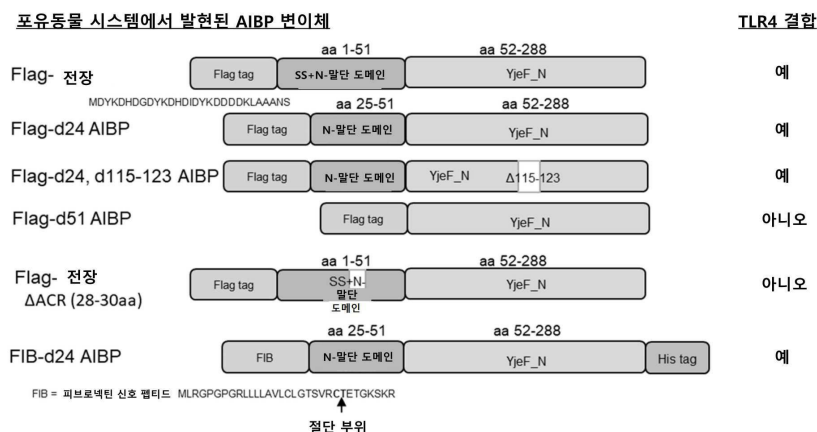
도면12



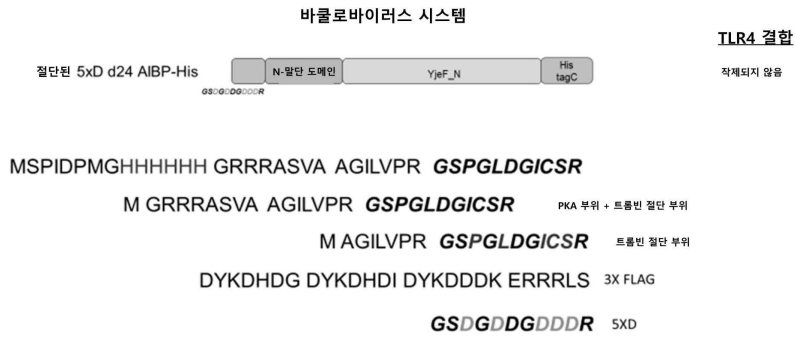
도면13



도면14



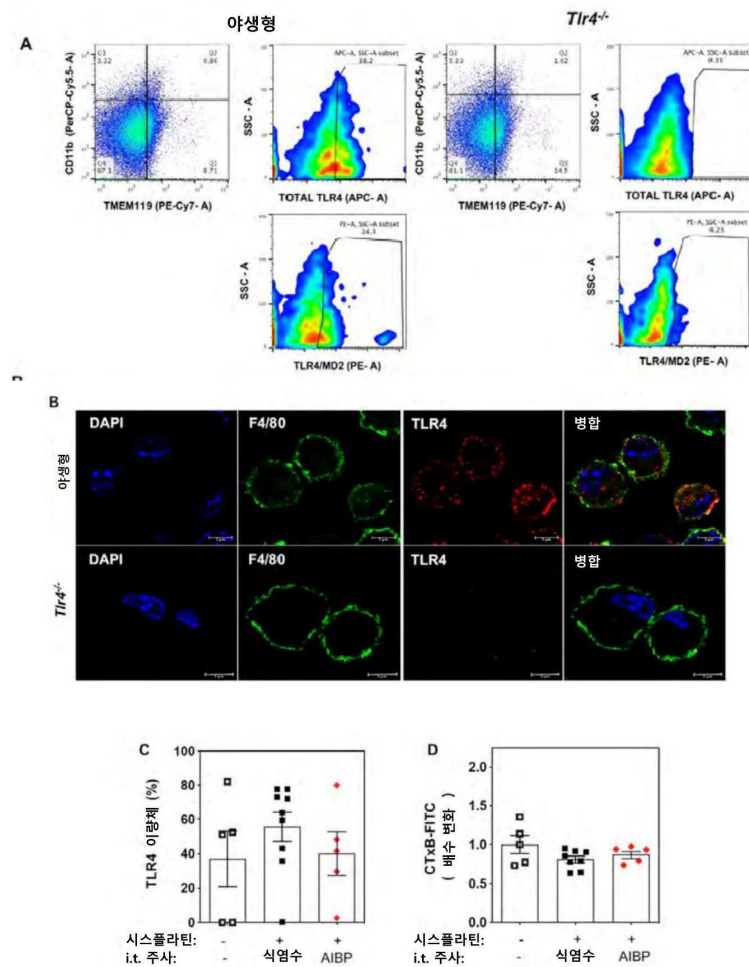
도면15



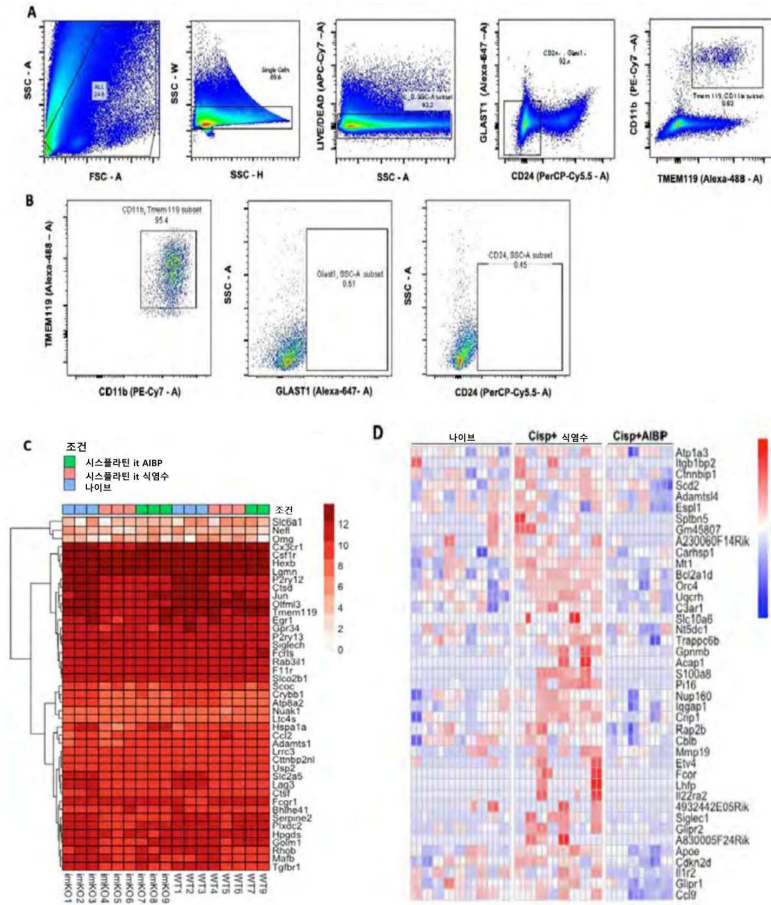
도면16



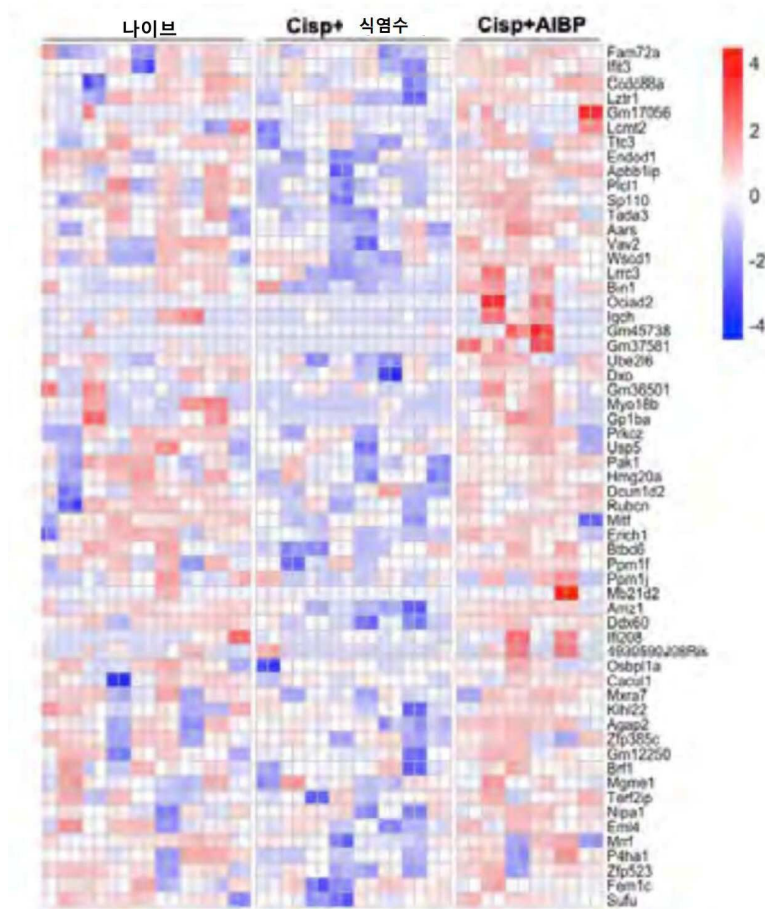
도면17



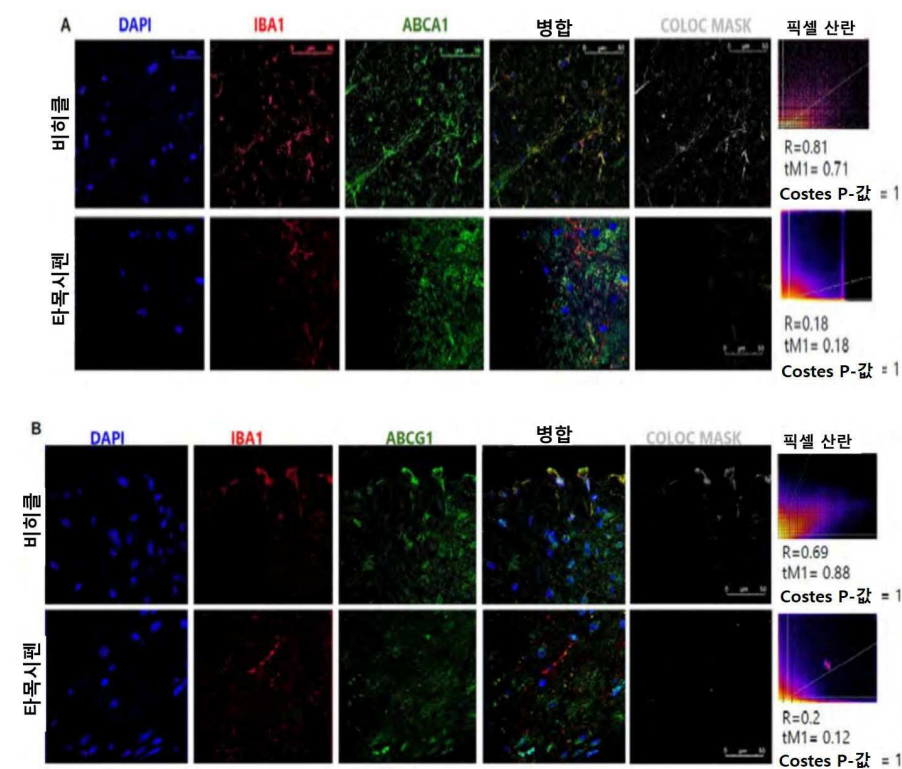
도면18ad



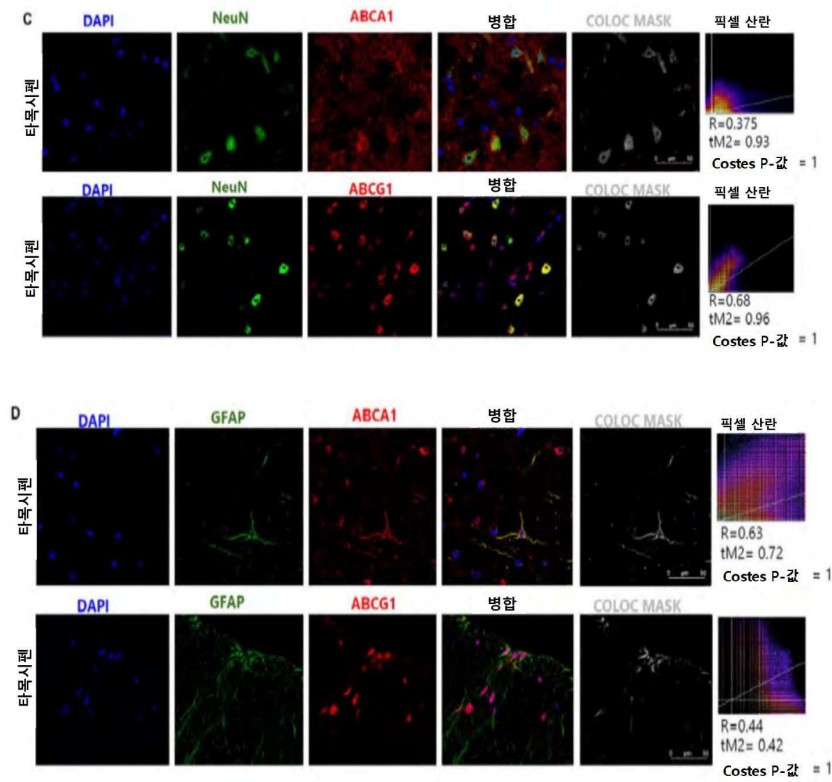
도면18e



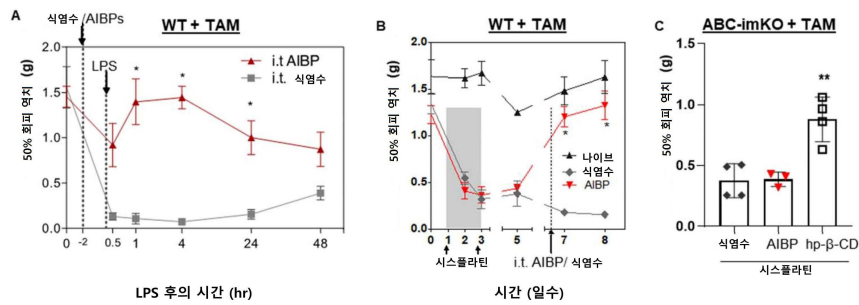
도면19ab



도면19cd

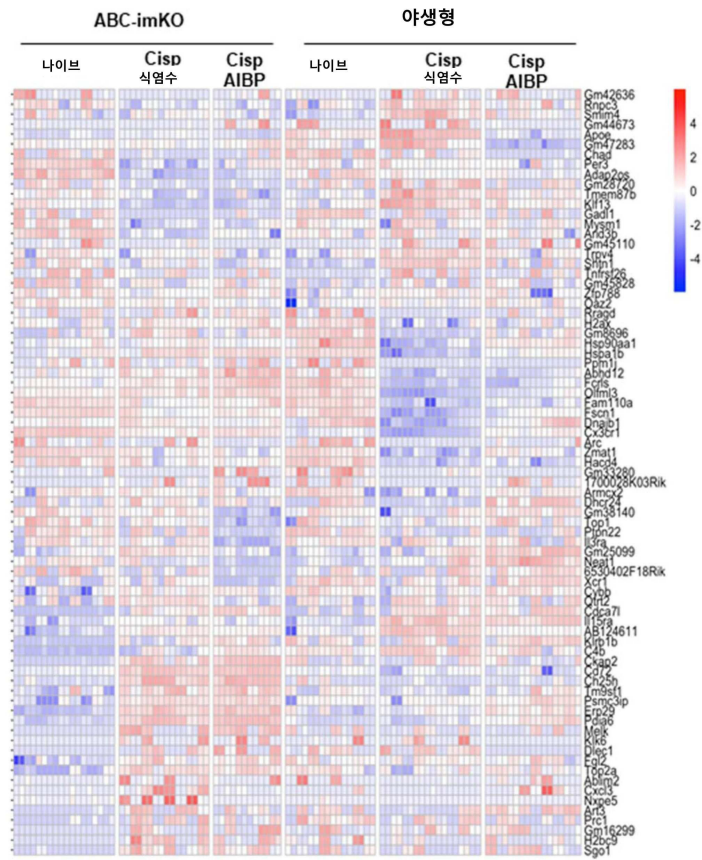


도면20ac



도면20d

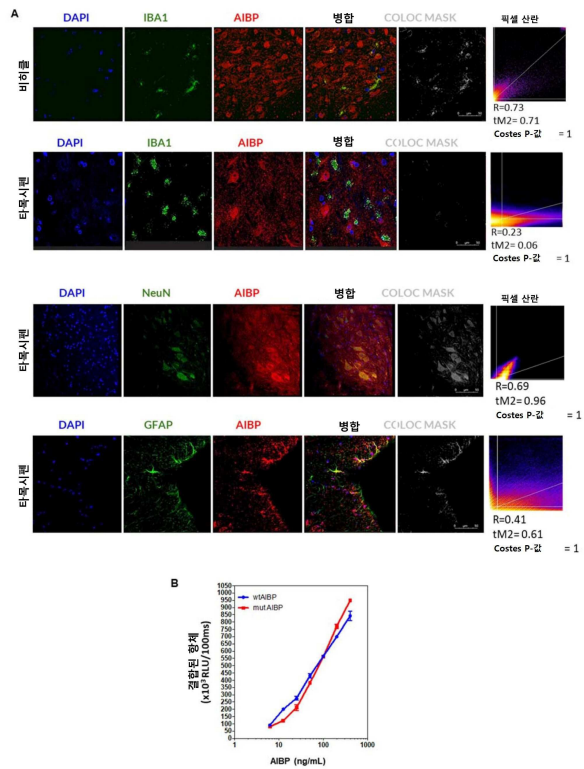
D



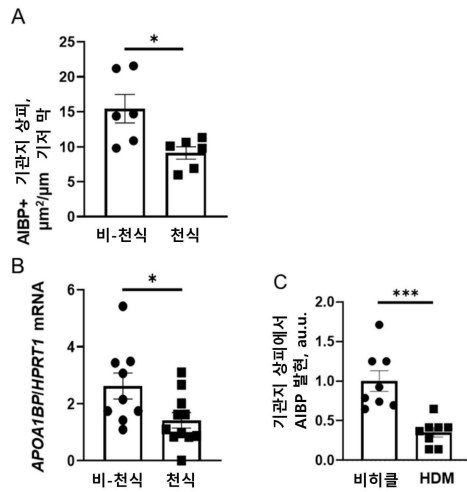
도면20e



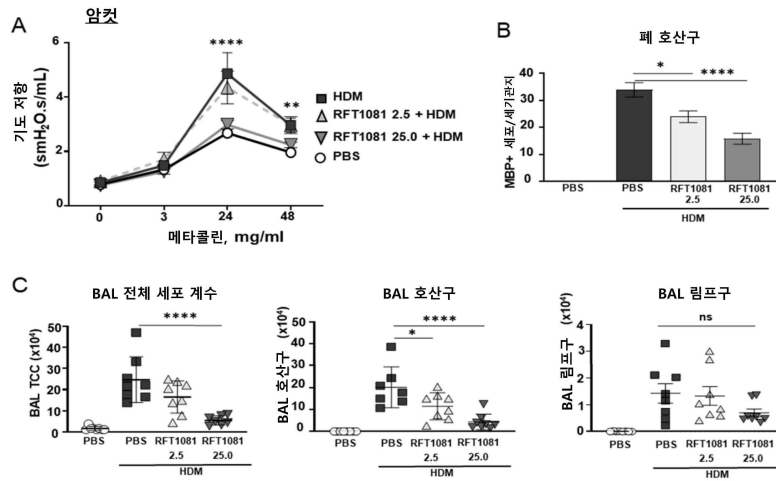
도면21



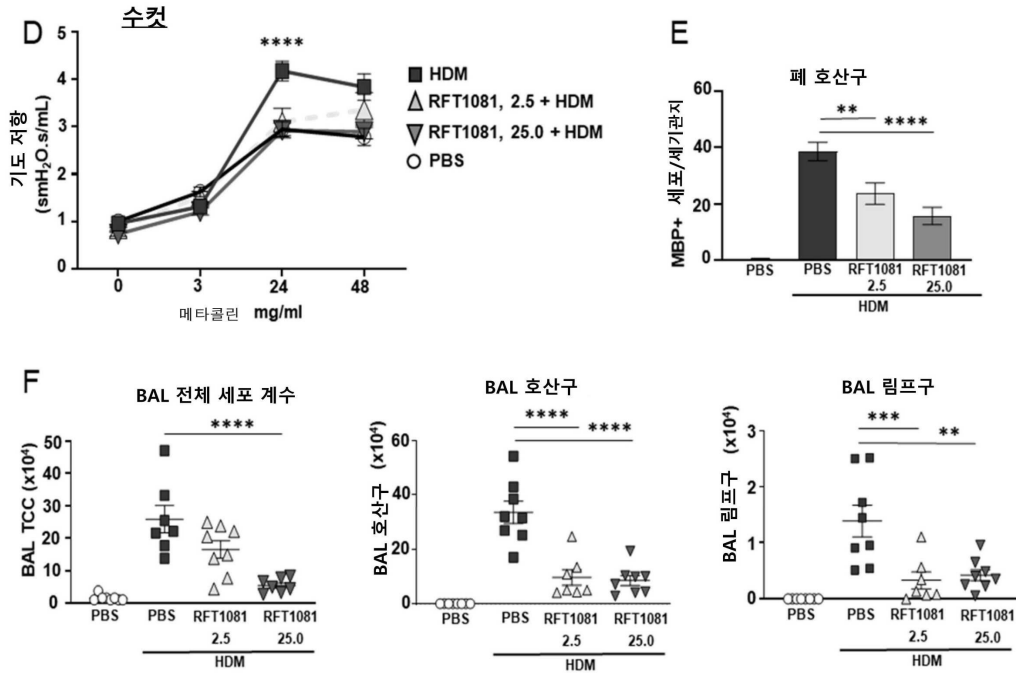
도면22



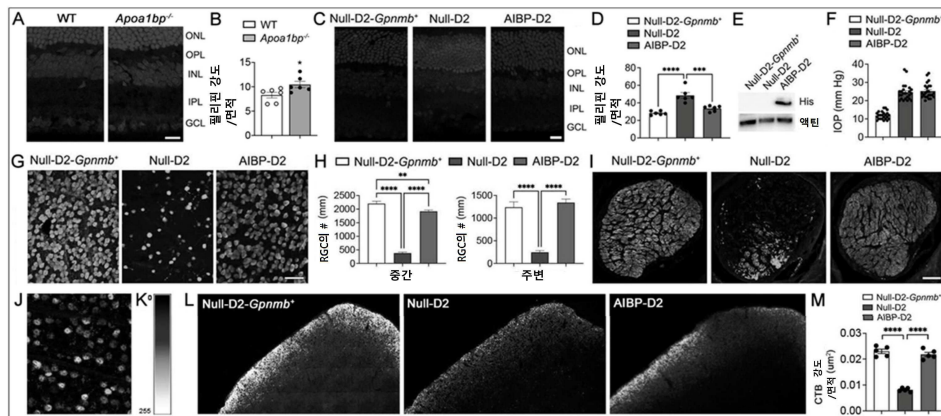
도면23ac



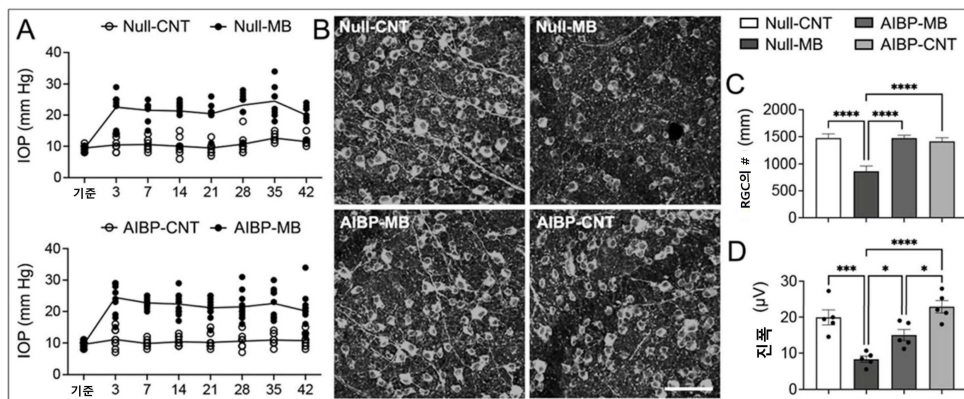
도면23df



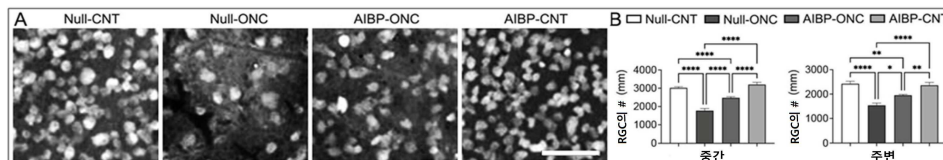
도면24



도면25



도면26



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TARGETING INFLAMMATORY OR ACTIVATED CELLS AND TREATING OR AMELIORATING INFLAMMATORY CONDITIONS AND PAIN

<130> 0321.145310PCT/SD2021-302-1

<140> to be assigned

<141> 2022-03-18

<150> 63/162,714
 <151> 2021-03-18
 <160> 37
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> synthetic peptide
 <400> 1
 His His His His His His

1 5
 <210> 2
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> synthetic peptide
 <400> 2
 Met Ser Pro Ile Asp Pro Met Gly His His His His His His Gly Arg
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ile Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro
 20 25 30
 Gly Leu Asp Gly Ile Cys Ser Arg
 35 40

<210> 3
 <211> 891
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220><223> synthetic polynucleotide
 <400> 3

atgctcaggg gtccgggacc cgggcggctg ctgctgctag cagtcctgtg cctggggaca 60
 tcggtgcgct gcaccgaac cgggaagagc aagaggcagc agagtgtgtg tcgtgcaagg 120
 cccatctggt ggggaacaca gcgccggggc tcggagacca tggcggggcgc tgcggtgaag 180

tacttaagtc aggaggaggc tcaggccgtg gaccaagagc tttttaacga gtatcagttc 240
agcgtggatc aactcatgga gctggccggg ttgagctgtg ccacggctat tgccaaggct 300
tatccccca cgtctatgtc caagagtccc ccgactgtct tggatcatctg tggccccgga 360
aataacggag gggatgggct ggtctgtgcg cgacacctca aactttttgg ttaccagcca 420

actatctatt accccaaaag acctaacaag cccctcttca ctgggctagt gactcagtgt 480
cagaaaatgg acattccttt ccttgggtgaa atgccccag agcccatgat ggtggacgag 540
ctgtatgagc tgggtgggga cgccatcttc ggcttcagtt tcaagggtga cgttcgggag 600
ccattccaca gcatcctgag tgtcttgagt ggactcactg tgcccatgac tagcatcgac 660
attccctcag gatgggatgt agagaaggga aaccctagcg gaatccaacc agacttactc 720
atctcactga cggcacccaa gaagctgca actcacttta ctggccgata tcattacctt 780
gggggtcgct ttgtaccacc tgctctagag aagaagtacc agctgaacct gccatcttac 840

cctgacacag agtgtgtcta ccgtctacag catcatcatc atcatcatta a 891

<210> 4

<211> 296

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 4

Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Leu Ala Val Leu

1 5 10 15

Cys Leu Gly Thr Ser Val Arg Cys Thr Glu Thr Gly Lys Ser Lys Arg

20 25 30

Gln Gln Ser Val Cys Arg Ala Arg Pro Ile Trp Trp Gly Thr Gln Arg

35 40 45

Arg Gly Ser Glu Thr Met Ala Gly Ala Ala Val Lys Tyr Leu Ser Gln

50 55 60

Glu Glu Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu Phe Asn Glu Tyr Gln Phe

65 70 75 80

Ser Val Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly Leu Ser Cys Ala Thr Ala

85 90 95

Ile Ala Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met Ser Lys Ser Pro Pro Thr

100 105 110
Val Leu Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn Gly Gly Asp Gly Leu Val
115 120 125
Cys Ala Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr Gln Pro Thr Ile Tyr Tyr
130 135 140
Pro Lys Arg Pro Asn Lys Pro Leu Phe Thr Gly Leu Val Thr Gln Cys
145 150 155 160
Gln Lys Met Asp Ile Pro Phe Leu Gly Glu Met Pro Pro Glu Pro Met

165 170 175
Met Val Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Val Val Asp Ala Ile Phe Gly Phe
180 185 190
Ser Phe Lys Gly Asp Val Arg Glu Pro Phe His Ser Ile Leu Ser Val
195 200 205
Leu Ser Gly Leu Thr Val Pro Ile Ala Ser Ile Asp Ile Pro Ser Gly
210 215 220
Trp Asp Val Glu Lys Gly Asn Pro Ser Gly Ile Gln Pro Asp Leu Leu

225 230 235 240
Ile Ser Leu Thr Ala Pro Lys Lys Ser Ala Thr His Phe Thr Gly Arg
245 250 255
Tyr His Tyr Leu Gly Gly Arg Phe Val Pro Pro Ala Leu Glu Lys Lys
260 265 270
Tyr Gln Leu Asn Leu Pro Ser Tyr Pro Asp Thr Glu Cys Val Tyr Arg
275 280 285
Leu Gln His His His His His His

290 295

<210> 5

<211> 1121

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 5

gggccggggcc gggccggggg cgcgcgctct gcgagctgga tgtccaggct gcgggcgctg 60

ctgggcctcg ggctgctggt tgcgggctcg cgcgtgccgc ggatcaaaag ccagaccatc 120

gcctgtcgct cgggacccac ctggtgggga cgcagcggc tgaactcggg tggccgctgg 180
gactcagagg tcatggcgag cacggtggtg aagtacctga gccaggagga ggcccaggcc 240
gtggaccagg agctatttaa cgaataccag ttcagcgtgg accaacttat ggaactggcc 300
gggctgagct gtgctacagc catcgccaag gcatatcccc ccacgtccat gtccaggagc 360

ccccctactg tcttggatcat ctgtggcccg gggaataatg gaggagatgg tctggtctgt 420
gtctgacacc tcaaactctt tggctacgag ccaaccatct attaccccaa aaggcctaac 480
aagccccctt tcaactgcatt ggtgaccag tgcagaaaa tggacatccc tttccttggg 540
gaaatgcccc cagagcccat gacgattgat gaactgtatg agctggtggt ggatgccatc 600
tttggcttca gcttcaaggg cgatgttcgg gaaccgttcc acagcatcct gagtgtcctg 660
aagggactca ctgtgcccatt tggcagcatc gacattccct caggatggga cgtggagaag 720
ggaaatgctg gagggatcca gccagacttg ctcatatccc tcacagcccc caaaaaatct 780

gcaaccagct ttaccggtcg ctaccattac ctggggggtc gttttgtgcc acctgctctg 840
gagaagaagt accagctgaa cctgccaccc tacctgaca ccgagtgtgt ctatcgtctg 900
cagtggagga aggtgggtgg gtattcttcc caataaagac ttagagcccc tctcttcag 960
aactgtggat tcttgggagc tctcttgca ataaaagtca gtgaatggtg gaagtcagag 1020
accaaccctg gggattgggt gccatctctc taggggtaac acaaaggga agaggttgct 1080
atggtatttg gaaacaatga aaatggactg ttagatgcca a 1121

<210> 6

<211> 288

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

Met Ser Arg Leu Arg Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly

1 5 10 15

Ser Arg Val Pro Arg Ile Lys Ser Gln Thr Ile Ala Cys Arg Ser Gly

20 25 30

Pro Thr Trp Trp Gly Pro Gln Arg Leu Asn Ser Gly Gly Arg Trp Asp

35 40 45

Ser Glu Val Met Ala Ser Thr Val Val Lys Tyr Leu Ser Gln Glu Glu

50 55 60

Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Ser Val

65 70 75 80
 Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly Leu Ser Cys Ala Thr Ala Ile Ala
 85 90 95
 Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Pro Pro Thr Val Leu
 100 105 110
 Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn Gly Gly Asp Gly Leu Val Cys Ala
 115 120 125

 Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr Glu Pro Thr Ile Tyr Tyr Pro Lys
 130 135 140
 Arg Pro Asn Lys Pro Leu Phe Thr Ala Leu Val Thr Gln Cys Gln Lys
 145 150 155 160
 Met Asp Ile Pro Phe Leu Gly Glu Met Pro Ala Glu Pro Met Thr Ile
 165 170 175
 Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Val Val Asp Ala Ile Phe Gly Phe Ser Phe
 180 185 190

 Lys Gly Asp Val Arg Glu Pro Phe His Ser Ile Leu Ser Val Leu Lys
 195 200 205
 Gly Leu Thr Val Pro Ile Ala Ser Ile Asp Ile Pro Ser Gly Trp Asp
 210 215 220
 Val Glu Lys Gly Asn Ala Gly Gly Ile Gln Pro Asp Leu Leu Ile Ser
 225 230 235 240
 Leu Thr Ala Pro Lys Lys Ser Ala Thr Gln Phe Thr Gly Arg Tyr His
 245 250 255

 Tyr Leu Gly Gly Arg Phe Val Pro Pro Ala Leu Glu Lys Lys Tyr Gln
 260 265 270
 Leu Asn Leu Pro Pro Tyr Pro Asp Thr Glu Cys Val Tyr Arg Leu Gln
 275 280 285

 <210> 7
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> synthetic peptide

<400> 7

Met Ser Pro Ile Asp Pro Met Gly His His His His His His Gly Arg

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ile Leu Val Pro Ala Ala Ser Pro

20 25 30

Gly Leu Asp Gly Ile Cys Ser Arg

35 40

<210> 8

<211> 304

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 8

Met Ser Pro Ile Asp Pro Met Gly His His His His His His Gly Arg

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ile Leu Val Pro Ala Ala Ser Pro

20 25 30

Gly Leu Asp Gly Ile Cys Ser Arg Gln Thr Ile Ala Cys Arg Ser Gly

35 40 45

Pro Thr Trp Trp Gly Pro Gln Arg Leu Asn Ser Gly Gly Arg Trp Asp

50 55 60

Ser Glu Val Met Ala Ser Thr Val Val Lys Tyr Leu Ser Gln Glu Glu

65 70 75 80

Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Ser Val

85 90 95

Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly Leu Ser Cys Ala Thr Ala Ile Ala

100 105 110

Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Pro Pro Thr Val Leu

115 120 125

Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn Gly Gly Asp Gly Leu Val Cys Ala

130 135 140

Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr Glu Pro Thr Ile Tyr Tyr Pro Lys

145					150					155					160
Arg	Pro	Asn	Lys	Pro	Leu	Phe	Thr	Ala	Leu	Val	Thr	Gln	Cys	Gln	Lys
				165					170					175	
Met	Asp	Ile	Pro	Phe	Leu	Gly	Glu	Met	Pro	Ala	Glu	Pro	Met	Thr	Ile
				180					185					190	
Asp	Glu	Leu	Tyr	Glu	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Ile	Phe	Gly	Phe	Ser	Phe
				195					200					205	
Lys	Gly	Asp	Val	Arg	Glu	Pro	Phe	His	Ser	Ile	Leu	Ser	Val	Leu	Lys
				210					215					220	

Gly	Leu	Thr	Val	Pro	Ile	Ala	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Ser	Gly	Trp	Asp
225					230				235						240
Val	Glu	Lys	Gly	Asn	Ala	Gly	Gly	Ile	Gln	Pro	Asp	Leu	Leu	Ile	Ser
				245					250					255	
Leu	Thr	Ala	Pro	Lys	Lys	Ser	Ala	Thr	Gln	Phe	Thr	Gly	Arg	Tyr	His
			260						265				270		
Tyr	Leu	Gly	Gly	Arg	Phe	Val	Pro	Pro	Ala	Leu	Glu	Lys	Lys	Tyr	Gln
		275						280				285			

Leu Asn Leu Pro Pro Tyr Pro Asp Thr Glu Cys Val Tyr Arg Leu Gln
290 295 300

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 9

Gly Ser Pro Gly Leu Asp Gly Ile Cys Ser Arg

1 5 10

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 10

Met Asp Tyr Lys Asp His Lys Gly Lys Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Ala Ala Asn Ser

20 25

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 11

Gly Ser Asp Gly Asp Asp Gly Asp Asp Asp Arg

1 5 10

<210> 12

<211> 912

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 12

atgtcccta tagatccgat gggacatcat catcatcatc acggaaggag aagggccagt 60

gttgccggcg gaatttttgt ccctgctgca agcccaggac tcgatggcat atgctcgagg 120

cagaccatcg cctgtcgtc gggacccacc tgggtggggac cgcagcggct gaactcgggt 180

ggccgctggg actcagaggt catggcgagc acggtggtga agtacctgag ccaggaggag 240

gcccaggccg tggaccagga gctatttaac gaataccagt tcagcgtgga ccaattatg 300

gaactggcgg ggcctgagctg tgctacagcc atcgccaagg catacccc cactccatg 360

tccaggagcc ccctactgt cctggtcatc tgtggcccgg ggaataatgg aggagatggt 420

ctggtctgtg ctgcacacct caaactcttt ggctacgagc caaccatcta ttacccaaa 480

aggcctaaca agcccctctt cactgcattg gtgaccaggt gtcagaaaat ggacatccct 540

ttccttgggg aaatgccgc agagcccatg acgattgatg aactgtatga gctggtggtg 600

gatgccatct ttggcttcag cttcaagggc gatgttcggg aaccgttcca cagcatcctg 660

agtgtcctga agggactcac tgtgcccatt gccagcatcg acattccctc aggatgggac 720

gtggagaagg gaaatgctgg agggatccag ccagacttgc tcatatccct cacagccccc 780

aaaaaatctg caaccagtt taccggtcgc taccattacc tggggggtcg tttgtgcca 840
cctgctctgg agaagaagta ccagctgaac ctgccacct accctgacac cgagtgtgtc 900
tatcgtctgc ag 912

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 13

Leu Val Pro Arg Gly Ser

1 5

<210> 14

<211> 29

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 14

Met Asp Tyr Lys Asp His Lys Gly Lys Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Ala Ala Asn Ser

20 25

<210> 15

<211> 304

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 15

Met Ser Pro Ile Asp Pro Met Gly His His His His His His Gly Arg

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ile Leu Val Pro Arg Gly Ser Asp

20 25 30

Gly Asp Asp Gly Ile Cys Ser Arg Gln Thr Ile Ala Cys Arg Ser Gly

35 40 45
 Pro Thr Trp Trp Gly Pro Gln Arg Leu Asn Ser Gly Gly Arg Trp Asp
 50 55 60
 Ser Glu Val Met Ala Ser Thr Val Val Lys Tyr Leu Ser Gln Glu Glu
 65 70 75 80
 Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Ser Val
 85 90 95
 Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly Leu Ser Cys Ala Thr Ala Ile Ala
 100 105 110

 Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Pro Pro Thr Val Leu
 115 120 125
 Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn Gly Gly Asp Gly Leu Val Cys Ala
 130 135 140
 Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr Glu Pro Thr Ile Tyr Tyr Pro Lys
 145 150 155 160
 Arg Pro Asn Lys Pro Leu Phe Thr Ala Leu Val Thr Gln Cys Gln Lys
 165 170 175

 Met Asp Ile Pro Phe Leu Gly Glu Met Pro Ala Glu Pro Met Thr Ile
 180 185 190
 Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Val Val Asp Ala Ile Phe Gly Phe Ser Phe
 195 200 205
 Lys Gly Asp Val Arg Glu Pro Phe His Ser Ile Leu Ser Val Leu Lys
 210 215 220
 Gly Leu Thr Val Pro Ile Ala Ser Ile Asp Ile Pro Ser Gly Trp Asp
 225 230 235 240

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

Leu Asn Leu Pro Pro Tyr Pro Asp Thr Glu Cys Val Tyr Arg Leu Gln

290

295

300

<210> 16

<211> 912

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 16

atgtccccta tagatccgat gggacatcat catcatcatc acggaaggag aagggccagt 60
gttgcggcgg gaatTTTggT ccctcgtgga agcgaTggag acgaTggcat atgctcgagg 120
cagaccatcg cctgtcgctc gggaccacc tggTggggac cgcagcggct gaactcgggt 180
ggccgctggg actcagaggt catggcgagc acggtggtga agtacctgag ccaggaggag 240
gcccaggccg tggaccagga gctatttaac gaataccagt tcagcgtgga ccaacttatg 300
gaactggccg ggctgagctg tgctacagcc atcgccaagg cataTcccc cacgtccatg 360

tccaggagcc ccctactgt cctggtcatc tgtggcccgg ggaataatgg aggagatggt 420
ctggtctgtg ctcgacacct caaactcttt ggctacgagc caaccatcta ttaccccaaa 480
aggcctaaca agccctctt cactgcattg gtgaccaggt gtcagaaaat ggacatccct 540
ttccttgggg aaatgccgc agagcccatg acgattgatg aactgtatga gctggTggTg 600
gatgccatct ttggcttcag ctTcaagggc gatgtTcggg aaccgtTcca cagcatcctg 660
agtgtcctga agggactcac tgtgcccatt gccagcatcg acattccctc aggatgggac 720
gtggagaagg gaaatgctgg agggatccag ccagacttgc tcataTccct cacagcccc 780

aaaaaatctg caaccagtt taccggtcgc taccattacc tggggggTcg tttTgtgcca 840
cctgctctgg agaagaagta ccagctgaac ctgccaccct accctgacac cgagtgtgtc 900
tatcgtctgc ag 912

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 17

Met Gly Arg Arg Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ile Leu Val Pro Arg

1

5

10

15

Gly Ser Pro Gly Leu Asp Gly Ile Cys Ser Arg

20 25

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 18

Met Ala Gly Ile Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Leu Asp Gly Ile

1 5 10 15

Cys Ser Arg

<210> 19

<211> 40

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 19

Met Ser Pro Ile Asp Pro Met Gly His His His His His Gly Arg

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ile Leu Val Pro Arg Gly Ser Asp

20 25 30

Gly Asp Asp Gly Asp Asp Asp Arg

35 40

<210> 20

<211> 792

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 20

cagaccatcg cctgtectc gggaccacc tggtagggac cgcagcggt gaactcgggt 60

ggccgctggg actcagaggt catggcgagc acggtggtga agtacctgag ccaggaggag 120

gcccaggccg tggaccagga gctatttaac gaataccagt tcagcgtgga ccaacttatg 180

gaactggccg ggctgagctg tgctacagcc atcgccaagg catacccc cacttccatg 240

tccaggagcc ccctaactgt cctggtcatc tgtggcccgg ggaataatgg aggagatggt 300

ctggtctgtg ctcgacacct caaactcttt ggctacgagc caaccatcta ttaccccaaa 360

aggcctaaca agccctctt cactgcattg gtgaccaggt gtcagaaaat ggacatccct 420

ttccttgggg aaatgccgc agagcccatg acgattgatg aactgtatga gctggtggtg 480

gatgccatct ttggcttcag cttcaagggc gatgttcggg aaccgttcca cagcatcctg 540

agtgtcctga agggactcac tgtgccatt gccagcatcg acattccctc aggatgggac 600

gtggagaagg gaaatgctgg agggatccag ccagacttgc tcatatccct cacagccccc 660

aaaaaatctg caaccagtt taccggtcgc taccattacc tggggggtcg ttttgtcca 720

cctgctctgg agaagaagta ccagctgaac ctgccaccct accctgacac cgagtgtgtc 780

tatcgtctgc ag 792

<210> 21

<211> 264

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 21

Gln Thr Ile Ala Cys Arg Ser Gly Pro Thr Trp Trp Gly Pro Gln Arg

1 5 10 15

Leu Asn Ser Gly Gly Arg Trp Asp Ser Glu Val Met Ala Ser Thr Val

20 25 30

Val Lys Tyr Leu Ser Gln Glu Glu Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu

35 40 45

Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Ser Val Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly

50 55 60

Leu Ser Cys Ala Thr Ala Ile Ala Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met

65 70 75 80

Ser Arg Ser Pro Pro Thr Val Leu Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn

85 90 95

Gly Gly Asp Gly Leu Val Cys Ala Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr

100 105 110
 Glu Pro Thr Ile Tyr Tyr Pro Lys Arg Pro Asn Lys Pro Leu Phe Thr
 115 120 125
 Ala Leu Val Thr Gln Cys Gln Lys Met Asp Ile Pro Phe Leu Gly Glu
 130 135 140

 Met Pro Ala Glu Pro Met Thr Ile Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Val Val
 145 150 155 160
 Asp Ala Ile Phe Gly Phe Ser Phe Lys Gly Asp Val Arg Glu Pro Phe
 165 170 175
 His Ser Ile Leu Ser Val Leu Lys Gly Leu Thr Val Pro Ile Ala Ser
 180 185 190
 Ile Asp Ile Pro Ser Gly Trp Asp Val Glu Lys Gly Asn Ala Gly Gly
 195 200 205

 Ile Gln Pro Asp Leu Leu Ile Ser Leu Thr Ala Pro Lys Lys Ser Ala
 210 215 220
 Thr Gln Phe Thr Gly Arg Tyr His Tyr Leu Gly Gly Arg Phe Val Pro
 225 230 235 240
 Pro Ala Leu Glu Lys Lys Tyr Gln Leu Asn Leu Pro Pro Tyr Pro Asp
 245 250 255
 Thr Glu Cys Val Tyr Arg Leu Gln
 260

<210> 22

<211> 888

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 22

atgctcaggg gtcgggacc cgggcggctg ctgctgctag cagtcctgtg cctggggaca 60
 tcggtgcgct gcaccgaaac cgggaagagc aagaggcaga ccatcgctg tcgctcggga 120
 cccacctggt ggggaccgca gcggctgaac tcgggtggcc gctgggactc agaggtcatg 180
 gcgagcacgg tggatgaagta cctgagccag gaggaggccc aggccgtgga ccaggagcta 240
 tttacgaat accagttcag cgtggaccaa cttatggaac tggccgggct gagctgtgct 300

acagccatcg ccaaggcata tccccccacg tccatgtcca ggagccccc tactgtcctg 360

gtcatctgtg gcccggggaa taatggagga gatggtcttg tctgtgctcg acacctcaaa 420

ctctttggct acgagccaac catctattac cccaaaagge ctaacaagcc cctcttcaact 480

gcattggtga ccagtgica gaaaatggac atccctttcc ttggggaaat gcccgagag 540

cccatgacga ttgatgaact gtatgagctg gtggtggatg ccatctttgg cttcagcttc 600

aaggcgatg ttcgggaacc gtccacagc atcctgagtg tcctgaaggg actcactgtg 660

cccattgcca gcatcgacat tccctcagga tgggacgtgg agaagggaaa tgctggaggg 720

atccagccag acttgtcat atccctcaca gcccccaaaa aatctgaac ccagtttacc 780

ggtcgctacc attacctggg gggtcgtttt gtgccacctg ctcaggagaa gaagtaccag 840

ctgaacctgc caccctaccc tgacaccgag tgtgtctatc gtctgcag 888

<210> 23

<211> 296

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 23

Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Leu Ala Val Leu

1 5 10 15

Cys Leu Gly Thr Ser Val Arg Cys Thr Glu Thr Gly Lys Ser Lys Arg

20 25 30

Gln Thr Ile Ala Cys Arg Ser Gly Pro Thr Trp Trp Gly Pro Gln Arg

35 40 45

Leu Asn Ser Gly Gly Arg Trp Asp Ser Glu Val Met Ala Ser Thr Val

50 55 60

Val Lys Tyr Leu Ser Gln Glu Glu Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu

65 70 75 80

Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Ser Val Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly

85 90 95

Leu Ser Cys Ala Thr Ala Ile Ala Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met

100 105 110

Ser Arg Ser Pro Pro Thr Val Leu Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn

115 120 125
 Gly Gly Asp Gly Leu Val Cys Ala Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr
 130 135 140
 Glu Pro Thr Ile Tyr Tyr Pro Lys Arg Pro Asn Lys Pro Leu Phe Thr
 145 150 155 160

Ala Leu Val Thr Gln Cys Gln Lys Met Asp Ile Pro Phe Leu Gly Glu
 165 170 175
 Met Pro Ala Glu Pro Met Thr Ile Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Val Val
 180 185 190
 Asp Ala Ile Phe Gly Phe Ser Phe Lys Gly Asp Val Arg Glu Pro Phe
 195 200 205
 His Ser Ile Leu Ser Val Leu Lys Gly Leu Thr Val Pro Ile Ala Ser
 210 215 220

Ile Asp Ile Pro Ser Gly Trp Asp Val Glu Lys Gly Asn Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Ile Gln Pro Asp Leu Leu Ile Ser Leu Thr Ala Pro Lys Lys Ser Ala
 245 250 255
 Thr Gln Phe Thr Gly Arg Tyr His Tyr Leu Gly Gly Arg Phe Val Pro
 260 265 270
 Pro Ala Leu Glu Lys Lys Tyr Gln Leu Asn Leu Pro Pro Tyr Pro Asp
 275 280 285

Thr Glu Cys Val Tyr Arg Leu Gln

290 295

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 24

Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Leu Ala Val Leu

1 5 10 15

Cys Leu Gly Thr Ser Val Arg Cys Thr Glu Thr Gly Lys Ser Lys Arg

20 25 30

<210> 25

<211> 272

<212> PRT

<213> artificial sequence

<

220><223> synthetic polypeptide

<400> 25

Thr Glu Thr Gly Lys Ser Lys Arg Gln Thr Ile Ala Cys Arg Ser Gly

1 5 10 15

Pro Thr Trp Trp Gly Pro Gln Arg Leu Asn Ser Gly Gly Arg Trp Asp

20 25 30

Ser Glu Val Met Ala Ser Thr Val Val Lys Tyr Leu Ser Gln Glu Glu

35 40 45

Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Ser Val

50 55 60

Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly Leu Ser Cys Ala Thr Ala Ile Ala

65 70 75 80

Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Pro Pro Thr Val Leu

85 90 95

Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn Gly Gly Asp Gly Leu Val Cys Ala

100 105 110

Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr Glu Pro Thr Ile Tyr Tyr Pro Lys

115 120 125

Arg Pro Asn Lys Pro Leu Phe Thr Ala Leu Val Thr Gln Cys Gln Lys

130 135 140

Met Asp Ile Pro Phe Leu Gly Glu Met Pro Ala Glu Pro Met Thr Ile

145 150 155 160

Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Val Val Asp Ala Ile Phe Gly Phe Ser Phe

165 170 175

Lys Gly Asp Val Arg Glu Pro Phe His Ser Ile Leu Ser Val Leu Lys

180 185 190

Gly Leu Thr Val Pro Ile Ala Ser Ile Asp Ile Pro Ser Gly Trp Asp
195 200 205
Val Glu Lys Gly Asn Ala Gly Gly Ile Gln Pro Asp Leu Leu Ile Ser
210 215 220
Leu Thr Ala Pro Lys Lys Ser Ala Thr Gln Phe Thr Gly Arg Tyr His
225 230 235 240
Tyr Leu Gly Gly Arg Phe Val Pro Pro Ala Leu Glu Lys Lys Tyr Gln
245 250 255

Leu Asn Leu Pro Pro Tyr Pro Asp Thr Glu Cys Val Tyr Arg Leu Gln
260 265 270

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 26

Thr Glu Thr Gly Lys Ser Lys Arg

1 5

<210> 27

<211> 923

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 27

atgctcaggg gtccgggacc cgggcggctg ctgctgctag cagtcctgtg cctggggaca 60

tcggtgcgct gcaccgaac cgggaagagc aagaggcaga ccatcgctg tcgctcgga 120

cccacctggt ggggaccgca gcggtgaac tcgggtggcc gctgggactc agaggtcatg 180

gcgagcacgg tggatgaagta cctgagccag gaggaggccc aggccgtgga ccaggagcta 240

tttaacgaat accagttcag cgtggaccaa cttatggaac tggccgggct gagctgtgct 300

acagccatcg ccaaggcata tccccccacg tccatgtcca ggagccccc tactgtcctg 360

gtcatctgtg gcccggggaa taatggagga gatggtctgg tctgtgctcg acacctcaaa 420

ctctttggct acgagccaac catctattac cccaaaaggc ctaacaagcc cctcttact 480

gcattgggtga cccagtgta gaaaatggac atccctttcc ttggggaaat gcccgcagag 540

cccatgacga ttgatgaact gtatgagctg gtggtggatg ccatctttgg cttcagcttc 600

aagggcgatg ttcggaacc gttccacagc atcctgagtg tctgaaggg actcactgtg 660

cccatggcca gcatcgacat tccctcagga tgggacgtgg agaagggaaa tgctggaggg 720

atccagccag acttgctcat atccctcaca gccccaaaa aatctgcaac ccagtttacc 780

ggtcgctacc attacctggg gggtcgtttt gtgccacctg ctctggagaa gaagtaccag 840

ctgaacctgc caccctaccc tgacaccgag tgtgtctatc gtctgcagtt ggtccctcgt 900

ggaagccatc atcatcatca tca 923

<210> 28

<211> 307

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 28

Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Leu Ala Val Leu

1 5 10 15

Cys Leu Gly Thr Ser Val Arg Cys Thr Glu Thr Gly Lys Ser Lys Arg

20 25 30

Gln Thr Ile Ala Cys Arg Ser Gly Pro Thr Trp Trp Gly Pro Gln Arg

35 40 45

Leu Asn Ser Gly Gly Arg Trp Asp Ser Glu Val Met Ala Ser Thr Val

50 55 60

Val Lys Tyr Leu Ser Gln Glu Glu Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu

65 70 75 80

Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Ser Val Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly

85 90 95

Leu Ser Cys Ala Thr Ala Ile Ala Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met

100 105 110

Ser Arg Ser Pro Pro Thr Val Leu Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn

115 120 125

Gly Gly Asp Gly Leu Val Cys Ala Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr

130 135 140
 Glu Pro Thr Ile Tyr Tyr Pro Lys Arg Pro Asn Lys Pro Leu Phe Thr
 145 150 155 160
 Ala Leu Val Thr Gln Cys Gln Lys Met Asp Ile Pro Phe Leu Gly Glu
 165 170 175

 Met Pro Ala Glu Pro Met Thr Ile Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Val Val
 180 185 190
 Asp Ala Ile Phe Gly Phe Ser Phe Lys Gly Asp Val Arg Glu Pro Phe
 195 200 205
 His Ser Ile Leu Ser Val Leu Lys Gly Leu Thr Val Pro Ile Ala Ser
 210 215 220
 Ile Asp Ile Pro Ser Gly Trp Asp Val Glu Lys Gly Asn Ala Gly Gly
 225 230 235 240

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

 His His His
 305
 <210> 29
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> synthetic peptide
 <400> 29

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

20 25 30

<210> 30

<211> 283

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 30

Thr Glu Thr Gly Lys Ser Lys Arg Gln Thr Ile Ala Cys Arg Ser Gly

1 5 10 15

Pro Thr Trp Trp Gly Pro Gln Arg Leu Asn Ser Gly Gly Arg Trp Asp

20 25 30

Ser Glu Val Met Ala Ser Thr Val Val Lys Tyr Leu Ser Gln Glu Glu

35 40 45

Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Ser Val

50 55 60

Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly Leu Ser Cys Ala Thr Ala Ile Ala

65 70 75 80

Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Pro Pro Thr Val Leu

85 90 95

Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn Gly Gly Asp Gly Leu Val Cys Ala

100 105 110

Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr Glu Pro Thr Ile Tyr Tyr Pro Lys

115 120 125

Arg Pro Asn Lys Pro Leu Phe Thr Ala Leu Val Thr Gln Cys Gln Lys

130 135 140

Met Asp Ile Pro Phe Leu Gly Glu Met Pro Ala Glu Pro Met Thr Ile

145 150 155 160

Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Val Val Asp Ala Ile Phe Gly Phe Ser Phe

165 170 175

Lys Gly Asp Val Arg Glu Pro Phe His Ser Ile Leu Ser Val Leu Lys

180 185 190

Gly Leu Thr Val Pro Ile Ala Ser Ile Asp Ile Pro Ser Gly Trp Asp

195 200 205
Val Glu Lys Gly Asn Ala Gly Gly Ile Gln Pro Asp Leu Leu Ile Ser
210 215 220
Leu Thr Ala Pro Lys Lys Ser Ala Thr Gln Phe Thr Gly Arg Tyr His
225 230 235 240
Tyr Leu Gly Gly Arg Phe Val Pro Pro Ala Leu Glu Lys Lys Tyr Gln
245 250 255
Leu Asn Leu Pro Pro Tyr Pro Asp Thr Glu Cys Val Tyr Arg Leu Gln

260 265 270
Leu Val Pro Arg Gly Ser His His His His His

275 280
<210> 31
<211> 1198
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220><223> synthetic polynucleotide
<400> 31

atggactaca aagaccatga cgggtgattat aaagatcatg acatcgatta caaggatgac 60
gatgacaagc ttgcggccgc gaattcaggg ccgggggccc gcgctctgcg agctggatgt 120
ccaggctgcg ggcgctgctg ggcctcgggc tgctggttgc gggctcgcgc gtgccgcgga 180
tcaaaagcca gaccatcgcc tgcgctcgg gaccacctg gtggggaccg cagcggtga 240

actcgggtgg ccgctgggac tcagaggtca tggcgagcac ggtggtgaag tacctgagcc 300
aggaggaggc ccaggccgtg gaccaggagc tatttaacga ataccagttc agcgtggacc 360
aacttatgga actggccggg ctgagctgtg ctacagccat cgccaaggca tatccccca 420
cgtccatgtc caggagcccc cctactgtcc tggatcatctg tggcccgggg aataatggag 480
gagatggtct ggtctgtgct cgacacctca aactctttgg ctacgagcca accatctatt 540
accccaaaag gcctaacaag cccctcttca ctgcatttgt gaccagtgat cagaaaatgg 600
acatcccttt ccttggggaa atgcccgcag agcccatgac gattgatgaa ctgtatgagc 660

tggtggtgga tgccatcttt ggcttcagct tcaaggcgga tgttcgggaa ccgttcacaa 720
gcacccctgag tgcctgaag ggactcactg tgccattgc cagcatcgac attccctcag 780

gatgggacgt ggagaaggga aatgctggag ggatccagcc agacttgctc ataccctca 840
cagcccccac aaaaatctgca acccagttta ccggtcgcta ccattacctg gggggtcgtt 900
ttgtgccacc tgctctggag aagaagtacc agctgaacct gccaccctac cctgacaccg 960
agtgtgtcta tcgtctgcag tgagggaagg tgggtgggta ttcttccaa taaagactta 1020
gagccctctt cttccagaac tgtggattcc tgggagctcc tctggcaata aaagtcagtg 1080

aatgggtggaa gtcagagacc aacctgggg attgggtgcc atctctctag gggtaacaca 1140
aagggaaga ggttgctatg gtatttggaa acaatgaaa tggactgtta gatgcaa 1198

<210> 32

<211> 317

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 32

Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Ala Ala Asn Ser Met Ser Arg

20 25 30

Leu Arg Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Ser Arg Val

35 40 45

Pro Arg Ile Lys Ser Gln Thr Ile Ala Cys Arg Ser Gly Pro Thr Trp

50 55 60

Trp Gly Pro Gln Arg Leu Asn Ser Gly Gly Arg Trp Asp Ser Glu Val

65 70 75 80

Met Ala Ser Thr Val Val Lys Tyr Leu Ser Gln Glu Glu Ala Gln Ala

85 90 95

Val Asp Gln Glu Leu Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Ser Val Asp Gln Leu

100 105 110

Met Glu Leu Ala Gly Leu Ser Cys Ala Thr Ala Ile Ala Lys Ala Tyr

115 120 125

Pro Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Pro Pro Thr Val Leu Val Ile Cys

130 135 140

Gly Pro Gly Asn Asn Gly Gly Asp Gly Leu Val Cys Ala Arg His Leu

145 150 155 160

Lys Leu Phe Gly Tyr Glu Pro Thr Ile Tyr Tyr Pro Lys Arg Pro Asn

165 170 175

Lys Pro Leu Phe Thr Ala Leu Val Thr Gln Cys Gln Lys Met Asp Ile

180 185 190

Pro Phe Leu Gly Glu Met Pro Ala Glu Pro Met Thr Ile Asp Glu Leu

195 200 205

Tyr Glu Leu Val Val Asp Ala Ile Phe Gly Phe Ser Phe Lys Gly Asp

210 215 220

Val Arg Glu Pro Phe His Ser Ile Leu Ser Val Leu Lys Gly Leu Thr

225 230 235 240

Val Pro Ile Ala Ser Ile Asp Ile Pro Ser Gly Trp Asp Val Glu Lys

245 250 255

Gly Asn Ala Gly Gly Ile Gln Pro Asp Leu Leu Ile Ser Leu Thr Ala

260 265 270

Pro Lys Lys Ser Ala Thr Gln Phe Thr Gly Arg Tyr His Tyr Leu Gly

275 280 285

Gly Arg Phe Val Pro Pro Ala Leu Glu Lys Lys Tyr Gln Leu Asn Leu

290 295 300

Pro Pro Tyr Pro Asp Thr Glu Cys Val Tyr Arg Leu Gln

305 310 315

<210> 33

<211> 29

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 33

Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Leu Ala Ala Ala Asn Ser

20

25

<210> 34

<211> 879

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 34

atggactaca aagaccatga cgggtgattat aaagatcatg acatcgatta caaggatgac	60
gatgacaagc ttgcggccgc gaattcacag accatgcct gtcgctcggg acccacctgg	120
tggggaccgc agcggctgaa ctcggtggc cgtgggact cagaggtcat ggcgagcacg	180
gtggtgaagt acctgagcca ggaggaggcc caggccgtgg accaggagct atttaacgaa	240
taccagttca gcgtggacca acttatggaa ctggccgggc tgagctgtgc tacagccatc	300
gccaaggcat atccccccac gtccatgtcc aggagcccc ctactgtcct ggtcatctgt	360
ggccccggga ataattggagg agatggtctg gtctgtgtc gacacctcaa actctttggc	420
tagagccaa ccatctatta ccccaaaagg cctaacaagc cctcttcac tgcattggtg	480
accagtgtc agaaaatgga catccctttc ctggggaaa tgcccgcaga gcccatgacg	540
attgatgaac tgtatgagct ggtggtggat gccatctttg gcttcagctt caaggcgat	600
gttcgggaac cgttcacag catctgagt gtctgaagg gactactgt gccattgcc	660
agcatcgaca ttccctcagg atgggacgtg gagaaggga atgctggagg gatccagcca	720
gacttgetca tatccctcac agccccaaa aaatctgcaa ccagtttac cggtcgctac	780
cattacctgg ggggtcgttt tgtgccacct gctctggaga agaagtacca gctgaacctg	840
ccacctacc ctgacaccga gtgtgtctat cgtctgcag	879

<210> 35

<211> 293

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 35

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

35 40 45
 Gly Gly Arg Trp Asp Ser Glu Val Met Ala Ser Thr Val Val Lys Tyr
 50 55 60
 Leu Ser Gln Glu Glu Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu Phe Asn Glu
 65 70 75 80
 Tyr Gln Phe Ser Val Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly Leu Ser Cys

 85 90 95
 Ala Thr Ala Ile Ala Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser
 100 105 110
 Pro Pro Thr Val Leu Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn Gly Gly Asp
 115 120 125
 Gly Leu Val Cys Ala Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr Glu Pro Thr
 130 135 140
 Ile Tyr Tyr Pro Lys Arg Pro Asn Lys Pro Leu Phe Thr Ala Leu Val

 145 150 155 160
 Thr Gln Cys Gln Lys Met Asp Ile Pro Phe Leu Gly Glu Met Pro Ala
 165 170 175
 Glu Pro Met Thr Ile Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Val Val Asp Ala Ile
 180 185 190
 Phe Gly Phe Ser Phe Lys Gly Asp Val Arg Glu Pro Phe His Ser Ile
 195 200 205
 Leu Ser Val Leu Lys Gly Leu Thr Val Pro Ile Ala Ser Ile Asp Ile

 210 215 220
 Pro Ser Gly Trp Asp Val Glu Lys Gly Asn Ala Gly Gly Ile Gln Pro
 225 230 235 240
 Asp Leu Leu Ile Ser Leu Thr Ala Pro Lys Lys Ser Ala Thr Gln Phe
 245 250 255
 Thr Gly Arg Tyr His Tyr Leu Gly Gly Arg Phe Val Pro Pro Ala Leu
 260 265 270
 Glu Lys Lys Tyr Gln Leu Asn Leu Pro Pro Tyr Pro Asp Thr Glu Cys

 275 280 285

Val Tyr Arg Leu Gln

290

<210> 36

<211> 304

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 36

Met Ser Pro Ile Asp Pro Met Gly His His His His His His Gly Arg

1 5 10 15

Arg Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ile Leu Val Pro Arg Gly Ser Asp

20 25 30

Gly Asp Asp Gly Asp Asp Asp Arg Gln Thr Ile Ala Cys Arg Ser Gly

35 40 45

Pro Thr Trp Trp Gly Pro Gln Arg Leu Asn Ser Gly Gly Arg Trp Asp

50 55 60

Ser Glu Val Met Ala Ser Thr Val Val Lys Tyr Leu Ser Gln Glu Glu

65 70 75 80

Ala Gln Ala Val Asp Gln Glu Leu Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Ser Val

85 90 95

Asp Gln Leu Met Glu Leu Ala Gly Leu Ser Cys Ala Thr Ala Ile Ala

100 105 110

Lys Ala Tyr Pro Pro Thr Ser Met Ser Arg Ser Pro Pro Thr Val Leu

115 120 125

Val Ile Cys Gly Pro Gly Asn Asn Gly Gly Asp Gly Leu Val Cys Ala

130 135 140

Arg His Leu Lys Leu Phe Gly Tyr Glu Pro Thr Ile Tyr Tyr Pro Lys

145 150 155 160

Arg Pro Asn Lys Pro Leu Phe Thr Ala Leu Val Thr Gln Cys Gln Lys

165 170 175

Met Asp Ile Pro Phe Leu Gly Glu Met Pro Ala Glu Pro Met Thr Ile

180 185 190

Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Val Val Asp Ala Ile Phe Gly Phe Ser Phe
195 200 205

Lys Gly Asp Val Arg Glu Pro Phe His Ser Ile Leu Ser Val Leu Lys
210 215 220

Gly Leu Thr Val Pro Ile Ala Ser Ile Asp Ile Pro Ser Gly Trp Asp

225 230 235 240
Val Glu Lys Gly Asn Ala Gly Gly Ile Gln Pro Asp Leu Leu Ile Ser
245 250 255

Leu Thr Ala Pro Lys Lys Ser Ala Thr Gln Phe Thr Gly Arg Tyr His
260 265 270

Tyr Leu Gly Gly Arg Phe Val Pro Pro Ala Leu Glu Lys Lys Tyr Gln
275 280 285

Leu Asn Leu Pro Pro Tyr Pro Asp Thr Glu Cys Val Tyr Arg Leu Gln

290 295 300

<210> 37

<211> 912

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 37

atgtcccta tagatccgat gggacatcat catcatcatc acggaaggag aagggccagt 60
gttgcggcgg gaatttttgt ccctcgtgga agcgaaggag acgatggcga tgacgacagg 120
cagaccatcg ccgtcgcgc gggacccacc tgggtggggac cgcagcggct gaactcgggt 180
ggccgctggg actcagaggt catggcgagc acggtggtga agtacctgag ccaggaggag 240
gcccaggcgg tggaccagga gctatttaac gaataccagt tcagcgtgga ccaacttatg 300

gaactggcgg ggctgagctg tgctacagcc atcgccaagg catatcccc cactccatg 360
tccaggagcc cccctactgt cctggtcgc tgtggcccgg ggaataatgg aggagatggt 420
ctggtctgtg ctgcacacct caaactcttt ggctacgagc caaccatcta ttacccaaa 480
aggcctaaca agcccccttt cactgcattg gtgaccaggt gtcagaaaat ggacatccct 540
ttccttgggg aaatgccgc agagcccatg acgattgatg aactgtatga gctggtggtg 600
gatgccatct ttggcttcag cttcaagggc gatgttcggg aaccgttcca cagcatcctg 660

agtgtcctga agggactcac tgtgcccatt gccagcatcg acattccctc aggatgggac	720
gtggagaagg gaaatgctgg agggatccag ccagacttgc tcatatccct cacagccccc	780
aaaaaatctg caacccagtt taccggctgc taccattacc tggggggtcg ttttgtcca	840
cctgctctgg agaagaagta ccagctgaac ctgccacct accctgacac cgagtgtgtc	900
tatcgtctgc ag	912