



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0130664
 (43) 공개일자 2014년11월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7016 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7019234

(22) 출원일자(국제) 2012년12월17일
 심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2014년07월10일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/075831

(87) 국제공개번호 WO 2013/092509
 국제공개일자 2013년06월27일

(30) 우선권주장
 11382392.6 2011년12월22일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 61/579,242 2011년12월22일 미국(US)

(71) 출원인
 라보라토리オス 렐 드라. 에스테브.에스.에이.
 스페인, 바르셀로나 이-08041, 221, 아베니다 마
 레 드 두 데 몬테세라트
 인스티튜시오 카탈라나 드 르세르카 아이 에스투
 디스 아반카츠(아이크레아)
 스페인 이-08010 바르셀로나, 23, 파세이그 루이
 스 캄페니즈
 (뒷면에 계속)

(72) 발명자
 이즈퀴에르도 유세로스, 누리아
 스페인 바르셀로나 이-08013 3오 3에이 시/ 레반
 트 192
 크라우슬리히, 한스-게오르그
 독일 하이델베르그 69120 블라이흐스트라세 10
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
 박장원

전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 외피 바이러스에 의해 야기되는 질병의 치료를 위한 시알로어드히신의 억제제들

(57) 요약

본 발명은 바이러스 막 강글리오시드들에 포함된 시알릴락토오스 분자와 CD169/시알로어드히신 수용체의 커플링을 억제시킴으로써 상기 CD169/시알로어드히신 표면 수용체를 발현하는 세포들로의 바이러스 침투를 억제하는 방법 및 조성물들에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 백신이 상기 CD169/시알로어드히신을 발현하는 세포들로의 바이러스 침투를 예방할 수 있는 조성물과 함께 제공됨으로써 목적 항원으로 로딩된 수지상세포들에 기반된 백신 조성물에 관련된다. 더욱이, 본 발명은 외피 비리온들에 특이적으로 운반될 수 있는 진단 및 치료 조성물에 관한 것으로, 상기 진단제/치료제는 CD169/시알로어드히신과 커플링된다.

(71) 출원인

푼다시오 프리바다 인스티튜트 데 레세르사 데 라
시다 - 카이사

스페인, 이-08916 바달로나, 에스/엔, 까르레테라
데 칸예트, 호스피탈 유니버시타리 게르만스 트리
아스 이 푸홀

루프레히트-칼스-유니페어지테트 하이델베르크

독일 하이델베르크 69117 그라벤가쎄 1

(72) 발명자

로리자테, 마이에르

스페인 포르투갈레테 이-48920 3오디 시/ 카실다
이투리자르 17

마르티네즈 피카도, 하비에르

스페인 빌라사르 텔 마르 이-08340 3-2 이에스시.
6 시/ 텔 몬트 95

특허청구의 범위

청구항 1

외피 바이러스(enveloped virus)에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 시알로어드히신(sialoadhesin)과 시알로락토오스 간 상호작용의 억제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 억제제는 시알릴락토오스, 시알릴락토오스 모이어티(moiety)를 포함하는 분자, 항-시알로어드히신 항체 및 시알릴락토오스-결합 분자로 구성된 군으로부터 선택되거나, 또는 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 분자를 포함하는 소포(vesicle)인 것인 억제제.

청구항 3

제2항에 있어서, 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 상기 분자는 4개 미만의 시알산을 가지는 강글리오시드(ganglioside)인 것인 억제제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 외피 바이러스의 외피 내 지질의 최소 일부는 시알릴락토오스를 포함하는 것인 억제제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 외피 바이러스는 레트로바이러스, 바람직하게는 HIV, 및 필로비리대 패밀리에 속하는 바이러스로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 억제제.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 HIV는 HIV-1인 것인 억제제.

청구항 7

제4항에 있어서, HIV에 의한 감염과 연관된 상기 질환은 AIDS인 것인 억제제.

청구항 8

항원-로딩된 항원-제시 세포 및 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제를 포함하는 조성물 또는 부품 키트(kit-of-parts).

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 억제제는 시알릴락토오스, 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 분자, 항-시알로어드히신 항체 및 시알릴락토오스-결합 분자로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물 또는 부품 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 상기 분자는 4개 미만의 시알산을 가지는 강글리오시드인 것인 조성물 또는 부품 키트.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항원-제시 세포는 수지상세포인 것인 조성물 또는 부품 키트.

청구항 12

제8항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항원은 바이러스 항원인 것인 조성물 또는 부품 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 바이러스 항원은 HIV 항원인 것인 조성물 또는 부품 키트.

청구항 14

의약(medicine)에 사용하기 위한 제8항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 따른 조성물 또는 부품 키트.

청구항 15

제8항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 따른 조성물 또는 부품 키트를 포함하는 면역원(immunogen) 또는 백신.

청구항 16

상기 항원-제시 세포에 로딩된 상기 항원에 대한 면역반응을 필요로 하는 질병의 치료에 사용하기 위한 제8항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 따른 조성물 또는 부품 키트.

청구항 17

상기 항원-제시 세포에 로딩된 상기 항원에 대한 면역반응을 유도하는 방법에 사용하기 위한 제8항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 따른 조성물 또는 부품 키트.

청구항 18

다음의 단계를 포함하는 시료 내 외피 바이러스를 검출하거나 또는 분리하는 방법:

(i) 상기 시료를 시알로어드히신 또는 실질적으로 시알릴락토오스에 결합하는 능력을 유지하고 있는 기능적으로 동등한 이의 변이체와 접촉시키는 단계, 및

(ii) 상기 시알로어드히신 또는 상기 기능적으로 동등한 이의 변이체에 결합된 바이러스를 검출하거나 또는 분리하는 단계.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 시알로어드히신은 고정되어 있는 것인 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 외피 바이러스는 레트로바이러스 및 필로비리대 패밀리에 속하는 바이러스로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 레트로바이러스는 HIV인 것인 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 HIV는 HIV-1인 것인 방법.

청구항 23

고정된 시알로어드히신 또는 실질적으로 시알릴락토오스에 결합하는 능력을 유지하고 있는 기능적으로 동등한 이의 변이체를 포함하는 키트.

청구항 24

시알로어드히신 또는 실질적으로 시알릴락토오스에 결합하는 능력을 유지하고 있는 기능적으로 동등한 이의 변이체, 그리고 치료제 또는 진단제를 포함하는 컨쥬게이트(conjugate).

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 치료제는 항-HIV제인 것인 컨쥬게이트.

청구항 26

의약에 사용하기 위한 제24항 또는 제25항에 따른 컨쥬게이트.

청구항 27

HIV 감염에 의해 야기되는 질병의 치료에 사용하기 위한 제24항 또는 제25항에 따른 컨쥬게이트.

청구항 28

제24항에 있어서, 상기 진단제는 검출가능한 표지(detectable label)인 것인 컨쥬게이트.

청구항 29

목적 화합물(compound of interest)을 포함하는 지질 미세입자와 항원-제시 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 상기 목적 화합물을 상기 항원-제시 세포로 운반하는 방법으로, 상기 지질 입자는 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 최소 하나의 분자를 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 상기 분자는 4개 미만의 시알산 그룹들을 포함하는 강글리오시드인 것인 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 항원-제시 세포는 수지상세포인 것인 방법.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 목적 화합물은 항원 또는 항레트로바이러스제(antiretroviral agent)인 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 항원은 HIV 항원인 것인 방법.

청구항 34

외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 시알로어드하신 억제제.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 시알로어드하신 억제제는 시알로어드하신-특이적 간섭(interference) RNA, 시알로어드하신-특이적 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 시알로어드하신-특이적 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 시알로어드하신 억제제.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 외피 바이러스의 외피 내 지질의 최소 일부는 시알릴락토오스를 포함하는 것인 시알로어드하신 억제제.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 외피 바이러스는 레트로바이러스 및 필로비리대 패밀리에 속하는 바이러스로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 시알로어드하신 억제제.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 레트로바이러스는 HIV인 것인 시알로어드하신 억제제.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 HIV는 HIV-1인 것인 시알로어드하신 억제제.

청구항 40

제39항에 있어서, HIV에 의한 감염과 연관된 상기 질병은 AIDS인 것인 시알로어드히신 억제제.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 CD169 세포 표면 수용체와 바이러스 막 강글리오시드 내 시알릴락토오스(sialyllactose) 분자들 간의 커플링을 억제시켜 상기 CD169 수용체를 발현하는 세포로의 바이러스 침투(entry)를 예방하기 위한 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 커플링에 대한 억제제들 뿐 아니라 본 발명의 억제제들을 포함하는 약제학적 조성물, 이들의 제조방법 및 진단 응용들에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

수지상세포들(Dendritic cells, DCs)은 점막에서 병원체들을 포획(capture)한 후, 적응성 면역반응들을 효과적으로 유도하기 위해 요구되는 성숙한 표현형을 획득하는 장소인 2차 림프조직으로 이동한다. 항원 제시를 위해 성숙한 DCs(mDCs) 흡수(uptake)의 잠재적인 역할은 효율적인 항원 포획 및 항원 제시 경로로의 전달을 의미한다. 엔도사이토시스(endocytosis)의 하향 조절은 DC 성숙의 지표(hallmark)로 생각되지만, 염증 조건 하에서 mDCs는 사전 병원체 노출에 전적으로 의존하지 않고 항원을 포획, 프로세싱하여 제시한다는 증거가 증가하고 있다. Mellman I, 등, Cell 2001; 106:255-258, Platt C, 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010; 107:4287-4292 및 Drutman S, 등, J. Immunol. 2010; 185:2140-2146을 참조하라. 소장 루멘으로부터 박테리아의 증가된 이동(translocation)이 전신적으로 DCs를 자극하여 지속된 항바이러스 면역반응들에 기여할 수 있는 경우에, 이러한 시나리오는 HIV-1에 의해 야기된 감염들 중 하나인 만성 감염들과 특히 관련되어 있을 것이다. Brenchley J, 등, Nat. Med. 2006; 12:1365-1371을 참조하라.

[0003]

역설적으로, mDCs 내로의 HIV-1 포획은 DC-T-세포 시냅스 내 T-세포로의 감염된 바이러스의 효율적인 제시에 의해 림프조직 내 바이러스 전파도 현저하게 증가시켜 트랜스-감염(trans-infection)을 통해 발병과정(pathogenesis) 및 질병 진행을 촉진시키는 것으로 보인다. 인 비트로 연구들은 HIV가 낮은 MOI에서 T 세포들과 반응되는 경우 DC의 포함이 상기 T 세포들의 보다 더 효과적인 감염을 초래한다는 것을 보였다. 트랜스-감염에 대한 기작은 어느 정도 논란을 포함하는 주제였다. DC 성숙 시에 상향조절되는 바이러스 결합 및 흡수의 HIV-1 gp120-비의존적 기작은 당업계에서 이전에 증명되었다. Izquierdo-Useros N, J. Virol. 2007; 81: 7559-7570을 참조하라. 또한, HIV-1 Gag eGFP-발현 형광성 바이러스-유사 입자들(VLP_{HIV-Gag-eGFP})은 mDCs에서 야생형 HIV-1처럼 동일한 트래픽킹 경로를 이용하기 때문에 mDCs로의 침투를 지배하는 공통적인 분자적 패턴을 공유한다. Izquierdo-Useros N, 등, Blood 2009; 113:2732-2741을 참조하라. 하지만, HIV-1이 mDCs 내로 내재화되고 축적되는 정확한 기작은 아직까지 알려져 있지 않았다.

[0004]

따라서, DCs에 의한 HIV의 흡수가 일어나는 기작의 규명은 상기 흡수를 예방하여 DCs에 의한 CD4+ T 세포들의 트랜스-감염을 감소시키는 데 유용한 수단들의 개발을 용이하게 할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

발명의 요약

[0006]

첫 번째 양태에서, 본 발명은 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 시알로어드히신(sialoadhesin)과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제에 관한 것이다.

[0007]

다른 양태에서, 본 발명은 항원-로딩된 항원-제시 세포(antigen-presenting cell) 및 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제를 포함하는 조성물 또는 부품 키트(kit-of-parts)에 관한 것이다.

[0008]

또 다른 양태에서, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 시료 내 외피 바이러스를 검출하거나 또는 분리하는 방법에 관한 것이다:

[0009]

(i) 시료를 시알로어드히신 또는 실질적으로 시알릴락토오스에 결합하는 능력을 유지하고 있는 기능적으로 동등한 이의 변이체와 접촉시키는 단계, 및

- [0010] (ii) 상기 시알로어드하신 또는 상기 기능적으로 동등한 이의 변이체에 결합된 바이러스를 검출하거나 또는 분리하는 단계.
- [0011] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고정된 시알로어드하신 또는 실질적으로 시알릴락토오스에 결합하는 능력을 유지하고 있는 기능적으로 동등한 이의 변이체를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0012] 다른 양태에서, 본 발명은 시알로어드하신 또는 실질적으로 시알릴락토오스에 결합하는 능력을 유지하고 있는 기능적으로 동등한 이의 변이체, 그리고 치료제 또는 진단제를 포함하는 컨쥬게이트(conjugate)에 관한 것이다.
- [0013] 보다 다른 양태에서, 본 발명은 목적 화합물(compound of interest)을 포함하는 지질 미세입자와 항원-제시 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 상기 목적 화합물을 상기 항원-제시 세포로 운반하는 인 비트로 방법에 관한 것으로, 상기 지질 입자는 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 최소 하나의 분자를 포함한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 mDCs에 의한 특이적 포획의 결정인자(determinants)로서 바이러스 또는 소포들의 막 내 시알화된(sialylated) 강글리오시드들의 신규한 기능을 명확하게 보여준다. 이러한 포획은 노출된 시알릴락토오스 모이어티에 의존적인데, 상기 모이어티는 신규한 병원체-연관된 문자 패턴으로서 본 명세서에서 처음으로 동정된다. 강글리오시드들은 감염된 세포의 세포막으로부터 파생되는 세포막 지질체(lipidome)의 중요한 구성성분인데, 이는 모든 외피 바이러스들이 시알릴락토오스 포함 강글리오시드들을 배제하지 않는 한 보고된 기작에 의해 mDCs 내로 포획된다는 것을 의미한다.
- [0015] CD169 세포 표면 수용체 같은 mDCs(및 가능한 다른 세포들)의 세포 표면에 존재하는 특이적 수용체가 비리온(virion) 또는 소포 막 상의 시알릴락토오스 모이어티를 인지한다면, 강글리오시드-운반 소포 또는 비리온들의 효율적인 포획이 본 발명에 개시된 포획과 같은 모델을 지지한다. 이후, 소포성 강글리오시드들에 대한 특이적 인지는 세포 내 구획으로의 흡수를 촉발시킬 것이다. 그 뒤에, 내재화된(internalized) 물질이 상기 표면으로 다시 사용되거나(예컨대, T-세포로의 HIV-1 전파) 또는 상기 항원 제시 경로 내로 공급될 수 있을 것이다.

1. 일반적인 용어 및 표현의 정의

- [0016] 본 명세서에서 사용되는 용어 "AIDS"는 HIV 감염의 증상을 나타내는 단계를 의미하고, 후천성 면역결핍증후군(일반적으로 AIDS로 알려짐) 및 "ARC", 또는 AIDS-관련 복합증 모두를 포함한다. Adler M, 등, Brit. Med. J. 1987; 294: 1145-1147을 참조하라. AIDS의 면역학적 및 임상적 정후들은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 면역결핍에 따라 야기되는 기회감염(opportunistic infections) 및 암들을 포함한다.
- [0017] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체(antibody)"는 공인된 면역글로불린 유전자들의 전체 또는 일부에 의해 실질적으로 인코딩되는 하나 이상의 단백질들로 구성된 단백질을 의미하고, 상기 단백질은 다중클론항체, 단일클론항체 및 예를 들어 $F(ab')_2$ 및 Fab 단편 같은 이의 항원-결합 단편들, 그리고 단일 체인 항체를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 용어 항체는 어떠한 타입의 알려진 항체, 예를 들어 다중클론항체, 단일클론항체 및 키메라 항체 같은 유전적으로 조작된 항체, 인간화된 항체, 영장류화된 항체, 인간 항체 및 이중특이적(bispecific) 항체들을 포함한다.
- [0018] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항-HIV체", "HIV-억제제(inhibiting agent)" 및 "HIV 항바이러스제(antiviral agent)"는 세포, 예컨대 포유동물의 세포에서 HIV의 복제를 억제할 수 있거나, 또는 HIV 감염 또는 AIDS 또는 이로부터 야기되거나 또는 이와 연관된 질병 또는 상태의 개시 또는 진행을 치료, 예방 또는 지연시키는 데 효과적인 어떠한 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 의미한다. 본 발명에 따른 용도를 위해 적합한 항-HIV체는 HIV 프로테아제 억제제, HIV 역전사효소 억제제, HIV 침투 억제제 및 HIV 면역원을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 항체의 "항원-결합 부위(antigen-binding region)"는 경쇄 가변부위(light chain variable region)로 구성된 폴리펩타이드, 중쇄 및 경쇄의 가변부위로 구성된 "Fv" 단편, 경쇄 가변부위와 중쇄 가변부위가 펩타이드 링커로 연결된 재조합 단일 체인 폴리펩타이드 분자("scFv 단백질"), 및 과가변부위(hypervariable region)를 모방하는 아미노산 잔기들로 구성된 최소 인지 유니트(minimal recognition units)

같은 특이적 항원에 결합하는 합성 또는 유전적으로 조작된 폴리펩타이드를 포함한다.

- [0021] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원 로딩(antigen loading)"은 수지상세포 또는 전구세포를 펩타이드, 폴리펩타이드, 리포펩타이드, DNA(네이키드 또는 플라스미드 벡터 내) 또는 RNA; 또는 항원-발현 재조합 박테리아 또는 바이러스(예를 들어, 백시니아, 아데노바이러스 또는 렌티바이러스)와 반응시켜 항원들을 수지상세포로 운반하는 방법과 관련되어 있고, 그 결과 상기 항원의 항원성 에피토프들이 로딩되어 MHC에 의해 세포 표면으로 제시된다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원-제시 세포(antigen-presenting cell, APC)"는 MHC 분자(MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자)를 통해 항원을 프로세싱하고 제시할 수 있는 어떠한 세포를 의미한다. 상기 APC는 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자를 통해 항원을 프로세싱하고 제시할 수 있다. 특히, 항원 제시 세포는 수지상세포, 대식세포, B 세포, 상피세포, 섬유아세포, 아교세포 및 당엽자에 의해 인식될 수 있는 추가적인 세포들을 포함한다. 바람직하게는, APV는 수지상세포이다.
- [0023] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항레트로바이러스제(antiretroviral agent)"는 레트로바이러스에 대한 능력을 증명한 어떤 약리학적, 생물학적 또는 세포성 제제를 포함한다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 "안티센스 핵산(antisense nucleic acid)"은 암유전자(oncogene)-인코딩 DNA 및 RNA의 염기 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것이다. 타겟 세포에서 발현되는 경우, 안티센스 핵산은 그들의 타겟 핵산에 특이적으로 결합하여 전사, RNA 프로세싱, 이동 및/또는 번역을 방해한다. 폴리뉴클레오타이드로 이중-가닥(double-stranded, ds) DNA를 타겟팅하는 것은 트리플-헬릭스(triple-helix) 형성을 유발하고; RNA를 타겟팅하는 것은 더블-헬릭스 형성을 야기할 것이다.
- [0025] 본 명세서에서 사용되는 용어 "자가의(autologous)"는 공여체 대상자(donor subject)로부터 유래된 어떠한 물질로, 이후 동일한 개체에 다시 도입되는 물질이다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 "조성물(composition)"은 최소 2개의 구성성분들 뿐 아니라 어떠한 양의 다른 성분들과의 조합으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 초래되는 어떠한 산물을 포함하는 물질 조성물을 의미한다. 당엽자는 상기 조성물이 단일 제형으로 제조되거나 조합된 제조물로서 공동 사용(joint use)을 위해 조합되는 상기 성분들 각각의 분리된 제형으로 제시될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 상기 조성물은 각각의 성분들이 개별적으로 제형화되고 패키징되는 특징을 가지는 부품 키트(kit-of-parts)일 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 "포함하는(comprising)" 또는 "포함하다(comprises)"는 일반적으로 수용된 특허 실무에 따라 "구성되는(consisting of)"도 의미한다.
- [0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 "컨쥬게이트(conjugate)"는 각 화합물의 기능이 컨쥬게이트 내에서 유지되는 공유 결합적으로 함께 연결된 2개 이상의 화합물들을 의미한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "수지상세포(dendritic cell)"(DC)는 인 비보, 인 비트로, 엑스 비보, 또는 숙주 또는 대상자에 존재하거나, 또는 조혈모세포(hematopoietic stem cell) 또는 단핵구로부터 유래될 수 있는 항원-제시 세포이다. 수지상세포 및 이의 전구체들은 다양한 림프기관(예컨대, 비장, 림프절) 뿐 아니라 골수 및 말초 혈액으로부터 분리될 수 있다. DC는 수지상 세포체(dendritic cell body)로부터 다양한 방향으로 뻗어나오는 얇은 판들(라멜리포디아(lamellipodia))을 포함하는 특징적인 형태를 가진다. 전형적으로, 수지상세포는 높은 레벨의 MHC 분자들 및 공동자극 분자들(예컨대, B7-1 및 B7-2)을 발현한다. 수지상세포는 인 비트로에서 T 세포의 항원 특이적 분화를 유도할 수 있고, 인 비트로 및 인 비보에서 1차 T 세포 반응들을 개시할 수 있다. 상기 용어 "수지상세포"는 미성숙 수지상세포 및 성숙 수지상세포일 수 있는 분화된 수지상세포를 포함한다. 상술한 세포들은 특정 세포 표면 마커들의 발현에 의해 특징화될 수 있다(예를 들어, CD 11c, MHC 클래스 II, 그리고 최소 낮은 레벨의 CD80 및 CD86). 또한, 수지상세포는 동종반응(alloresponses) 및 혼합된 림프구 반응(mixed lymphocyte reactions, MLR)을 자극하는 능력에 의해 기능적으로 특징화될 수 있다. 상기 표현 "수지상세포 제조물(preparation)"은 수지상세포의 펄싱(pulsing)에 적합한 배지에 대상자로부터 얻어진 수지상세포를 포함하는 조성물을 의미한다.
- [0030] 본 명세서에서 사용되는 표현 "HIV 감염과 연관된 질병(disease)"은 대상자에서 AIDS가 발병된 상태 뿐 아니라 HIV로 감염된 대상자가 상기 질병의 어떠한 사인 또는 증상을 나타내지 않는 상태도 포함한다. 따라서, 감염에 대한 어떠한 임상적 사인들을 가지지 않는 대상자에게 투여되는 경우 본 발명의 조성물은 상기 질병의 개시를 예방할 수 있기 때문에 예방적 활성을 가질 수 있다. 상기 조성물들은 그러한 대상자에서 건강한 CD4+ T 세포의 감염 및 파괴를 예방하거나 느리게 할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 극도로 낮은 CD4+ T 세포 카운트 같은 후

천성 면역결핍 질병의 증상들의 개시, 및 마이코박테리아 아종들인 뉴모시스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*) 및 뉴모시스티스 크립토코커스(*Pneumocystis cryptoccoccus*) 같은 기회 병원체들에 의한 반복 감염의 증상들의 예방 및 상기 증상들의 개시를 느리게 하는 것도 포함한다. 유익하거나 또는 소망된 임상 결과들은 절대적인 나이브 CD4+ T-세포 카운트(10-3520 범위)에서의 증가, 순환하는 전체 면역세포들(1-50 퍼센트) 중 CD4+ T-세포의 백분율에서의 증가, 및/또는 감염되지 않은 대상자에서 정상 CD4+ T-세포 카운트의 백분율(1-161 퍼센트)과 같이 CD4+ T-세포 카운트에서의 증가를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, "치료(treatment)"는 상기 대상자가 어떠한 HIV-타겟된 치료를 받지 않는 경우에 예상되는 생존과 비교되어 감염된 대상자의 생존을 연장하는 것을 의미할 수 있다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이중 가닥(double stranded) RNA" 또는 "dsRNA"은 2개의 가닥으로 구성된 RNA 분자를 의미한다. 이중-가닥된 분자들은 자신 위에서 다시 돌아가 두-가닥된(two-stranded) 구조를 형성하는 단일 RNA 분자로 구성된 분자들을 포함한다. 예를 들어, 프리-miRNA(pre-miRNA)로 불리는(Bartel 등 2004. Cell 116:281-297) 단일-가닥된 miRNA가 유래되는 조상 분자들의 스템 루프 구조는 dsRNA 분자를 포함한다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 표현 "외피 바이러스에 의해 야기된 감염과 연관된 질병"은:

1) 필로비리대(filoviridae) 패밀리에 속하는 외피 바이러스들에 의해 야기된 질병들로, 마르부르그 바이러스(Marburgvirus)에 의해 야기되는 마르부르그 바이러스 질병(마르부르그 출혈열 또는 MHF) 및 에볼라 바이러스에 의해 야기되는 에볼라 바이러스 질병(에볼라 출혈열 또는 EHF)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니고

2) 레트로비리대(retroviridae) 패밀리에 속하는 외피 바이러스에 의해 야기된 질병들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

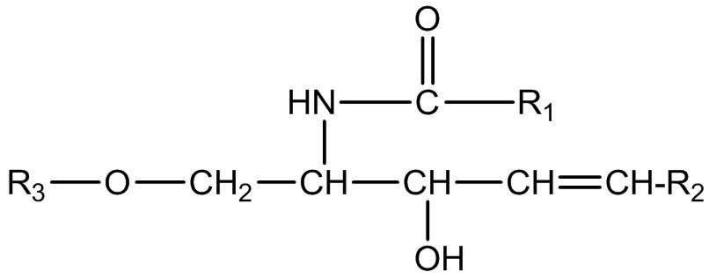
[0035] 외피 바이러스 감염에 의해 야기된 다른 질병들은 뎅기열(Dengue fever), 뎅기 출혈열(Dengue hemorrhagic fever, DHF), 황열, 뎅기열, 급성 및 만성 C형 간염, 베네주엘라 출혈열, 브라질 출혈열, 볼리비아 출혈열, 림프구성 맥락수막염, 라사열(Lassa fever), 한타바이러스 폐 증후군(HPS), 수막염 및 인플루엔자를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는 용어 "외피 바이러스(enveloped virus)"는 바이러스 캡시드를 둘러싸고 있는 바이러스 단백질들을 포함하는 지질 이중층인 외막(outer membrane) 또는 외피를 가지는 어떠한 동물 바이러스를 의미한다. 예시적인 외피 바이러스들은 폭스비리대, 헤파드나비리대(hepadnaviridae), 토가비리대, 아레나비리대, 플라비비리대(flaviviriae), 오소믹소비리대(orthomyxoviridae), 파라믹소비리대, 분야비리대(bunyaviridae), 랍도비리대(rhabdoviridae), 필로비리대, 코로나비리대, 레트로비리대 및 보르나비리대 바이러스 패밀리의 멤버들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 "에피토프(epitope)"는 면역글로불린에 특이적으로 결합할 수 있거나 또는 T 세포로 주조직 적합 복합체(Major Histocompatibility Complex, MHC) 단백질(예컨대, 클래스 I 또는 클래스 II)에 의해 제시될 수 있는 어떠한 단백질 결정인자(determinant)를 의미한다. 일반적으로, 에피토프 결정인자들은 T 세포 수용체를 향해 어떤 아미노산 측기(side groups)를 제시하는 상기 MHC 분자의 그루브(groove) 내에 적합한(예를 들어, 상기 그루브에 특징적인 특정 전하로 인해) 5-30개의 아미노산 길이의 짧은 펩타이드들로, 상기 그루브, 상기 펩타이드 측기 및 상기 T 세포 수용체에서 일부 다른 잔기들을 가진다.

[0038] 본 명세서에서 사용되는 용어 "강글리오시드(ganglioside)" 또는 "시알로강글리오시드(sialogangliosides)"는 분자 당 여러 개의 단당류 단위를 포함하는 글리코스핑고지질(glycosphingolipids)을 의미한다. 상기 강글리오시드 또는 강글리오시드 유도체들에 포함될 수 있는 적합한 단당류 단위의 예들은 D-갈락토오스, N-아세틸 D-갈락토사민, 글루코오스 및 N-아세틸뉴라마이신이다. 강글리오시드에 특히 선호되는 것(preference)은 스팽고신(sphingosine; 2-아미노-4-옥타데세네-1,3-디올, 스팽-4-에닌)의 유도체들이고, 보다 특별하게는 C-1의 산소를 통해 결합된 당 잔기들 및 C-2의 질소를 통해 결합된 포화되거나 또는 불포화된 짧은 지방산(특히 C₂-C₁₈)을 가지는 스팽고신의 유도체들이다. 더 나아가, 강글리오시드에 선호되는 것(preference)은:

[0039] (i) 다음의 일반 구조식을 가지는 N-아실스핑고신(세라마이드):



[0040]

[0041] R_1 은 긴-체인 지방산 잔기로, 특히 $\text{C}_6\text{-}\text{C}_{30}$ 지방산 잔기이고, 보다 바람직하게는 $\text{C}_8\text{-}\text{C}_{24}$ 지방산 잔기이며, R_2 는 긴-체인 알킬 잔기로, 특히 $\text{C}_6\text{-}\text{C}_{30}$ 알킬 잔기이고, 보다 바람직하게는 $\text{C}_8\text{-}\text{C}_{24}$ 알킬 잔기이며, R_3 는 H이고,

[0042]

(ii) 상기 세라마이드의 말단 1차 하이드록시기에 연결된 하나 이상의 N-아세틸뉴라미산(예를 들어, N-아세틸뉴라미산, NANA, 시알산)을 가지는 올리고당 체인(oligosaccharide chain)인 것을 특징으로 한다. 상기 N-아세틸뉴라미산 잔기 또는 잔기들은 시알산 내 어떠한 가능한 위치에 의해 상기 올리고당에 커플링되고 상기 올리고당 분자 내 어떠한 위치에 커플링될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 N-아세틸뉴라미산은 시알산의 2번째 위치의 하이드록시기를 통해 상기 올리고당에 연결된다(상기 시알산 구조의 넘버링은 하이드록시기를 가지는 탄소에서 시작하여 상기 체인을 둘러서 지속된다). 다른 바람직한 구현예에서, 상기 시알산은 상기 올리고당의 일부를 형성하는 갈락토오스 잔기 내 3번째 또는 6번째 위치의 하이드록시기에 의해 상기 올리고당에 연결된다. 바람직한 구현예들에서, 상기 "N-아세틸뉴라미산(N-acetylneurameric acid)"은 α 2,3-시알릴-올리고당 또는 α 2,6-시알릴-올리고당을 형성한다.

[0043]

본 명세서에서 사용되는 용어 "HIV"는 HIV-1 및 HIV-2 및 SIV를 포함한다. "HIV-1"은 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus) 타입-1을 의미한다. HIV-1은 세포외 바이러스 입자들 및 HIV-1 감염된 세포와 연관된 HIV-1의 형태들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 HIV-1 바이러스는 알려진 주요 서브타입들(클래스 A, B, C, D E, F, G 및 H), 또는 실험실 스트레인들 및 1차 분리체들(isolates)을 포함하는 기타(outlying) 서브타입(그룹 O) 중 어느 것을 나타낼 수 있다. "HIV-2"는 인간 면역결핍 바이러스 타입-2를 의미한다. HIV-2는 세포외 바이러스 입자들 및 HIV-2 감염된 세포와 연관된 HIV-2의 형태들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 용어 "SIV"는 원숭이, 침팬지 및 다른 비인간 영장류를 감염시키는 HIV-유사 바이러스인 유인원 면역결핍 바이러스를 의미한다. SIV는 세포외 바이러스 입자들 및 SIV 감염된 세포와 연관된 SIV의 형태들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044]

본 명세서에서 사용되는 용어 "HIV 면역원(immunogen)"은 대상자에 면역반응을 발생시킬 수 있는 HIV로부터 유래된 단백질 또는 웨პ타이드 항원을 의미한다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 HIV 면역원들은 어떠한 HIV 분리체(예를 들어, 어떠한 1차 또는 배양된 HIV-1, HIV-2 또는 HIV-3 분리체, 스트레인 또는 클레이드)로부터 선택될 수 있다.

[0045]

본 명세서에서 사용되는 용어 "HIV 감염(infection)"은 당업자에게 알려진 HIV 테스트(예를 들어, HIV EIA, 웨스턴 블랏, PCR 테스트)를 이용하여 바이러스의 존재의 검출로 확인되는 바와 같이 대상자에서 HIV 항체, HIV 항원 또는 HIV 핵산의 검증된 존재를 의미한다.

[0046]

본 명세서에서 사용되는 용어 "면역원"은 단독 또는 보조제(adjuvant)와 함께 면역반응을 유도할 수 있는 물질 또는 재료(항원 포함)를 의미한다. 이해되는 것처럼, 상기 백신에 의해 유발되는 상기 면역반응은 체액성 면역반응 또는 세포성 면역반응일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 표현 "체액성 면역반응"은 T-세포 및 이의 분비산물들에 의해 매개되는 외래 항원(들)에 대한 면역반응을 기재하는 것이다. 본 명세서에서 사용되는 상기 "세포성 면역반응"은 B-세포에 의해 생산된 항체들에 의해 매개되는 외래 항원(들)에 대한 면역반응을 기재하는 것이다. 상기 백신은 전신적으로 또는 국부적으로 투여된다. 상기 백신은 단일 투여에 의해 투여되거나 또는 본 발명의 조성물의 투여를 위해 이전에 기재되었던 바와 같이 복수의 투여를 통해 촉발(boost)되어 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "예방하다(prevent)", "예방하는(preventing)" 및 "예방(prevention)"은 동물 내 병리학적 세포들의 발생에서의 감소를 의미한다. 상기 예방은 완전(예를 들어, 대상자에서 병리학적 세포들의 완전한 부재)할 수 있다. 상기 예방은, 예를 들어 대상자에서 병리학적 세포들의 발생이 본 발명의 조성물의 투여 없이 발생되었던 것보다 덜 한 것과 같이 부분적일 수도 있다. 또한, 예방은 임상 상태에 대한 감소된

민감성(susceptibility)을 의미한다.

[0047] 본 명세서에서 사용되는 용어 "시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제(inhibitor of the interaction between sialoadhesin and sialyllectose)"는 시알로어드히신과 시알릴락토오스 또는 시알릴락토오스를 포함하는 어떠한 다른 화합물 간의 결합을 억제할 수 있는 어떠한 분자 또는 화합물을 의미한다. 억제제들은 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간의 결합 친화도(affinity)보다 더 높은 친화도로 시알로어드히신 및 시알릴락토오스 중 어느 하나에 특이적으로 결합할 수 있다. 본 발명에서 이용되는 바와 같이, 상기 표현 "특이적 결합(specific binding)"은 비-특이적 결합에 대해 실질적으로 더 높은 친화도를 가지는 2개의 분자들의 3차원 구조들 간의 상보성(complementarity)의 존재에 의해 두 번째 분자에 특이적으로 결합하는 첫 번째 분자의 능력을 의미하고, 상기 첫 번째 분자와 두 번째 분자 간의 결합은 바람직하게는 반응 혼합물 내 존재하는 다른 분자들과 상기 분자를 중 어느 하나의 결합이 발생하기 전에 일어난다. 두 분자의 결합으로부터 초래되는 복합체가 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만, 또는 10^{-15} M 미만의 해리상수(dissociation constant, K_D)를 가지는 경우 상기 2개의 분자의 결합에서 높은 친화도가 존재한다는 것으로 이해된다.

[0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 "간섭하는 RNA(interfering RNA)"는 mRNA에 결합하여 이의 프로세싱을 억제하는 분자들, 예를 들어 mRNA 번역을 억제하거나 또는 mRNA 분해를 초래하는 분자들에 의한 특정 mRNA의 파괴를 통한 선택적 전사-후 유전자 사일런싱의 수단을 의미한다. 적합한 간섭하는 RNA는 siRNA, shRNA, 내인성 마이크로RNA 및 인위적 마이크로RNA를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 간섭하는 RNA는 RNA 다운-스트림 프로세싱의 기작에도 불구하고 siRNA로서 이전에 동정된 서열들을 포함한다(즉, siRNA들이 인 비보 프로세싱의 특이적 방법을 가진 mRNA 절단을 초래하는 것으로 여겨질 지라도, 그러한 서열들은 본 명세서에 기재된 플랭킹 서열들의 맥락에서 본 발명의 벡터들에 포함될 수 있다).

[0049] 본 명세서에서 사용되는 용어 "분리(isolation)"는 바이러스 입자들이 생산된 배지로부터 상기 입자들의 부분적 또는 완전한 제거를 의미한다.

[0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 "렉틴(lectin)"은 항체와 다른 어떠한 단백질로, 카르보하이드레이트 또는 당단백질 및 당화된 나노구조체를 포함하는 카르보하이드레이트에 의해 변형된 구조에 결합할 수 있는 단백질을 의미한다.

[0051] 본 명세서에서 사용되는 용어 "지질성 미세소포(lipidic microvesicle)" 또는 "리포좀(liposome)"은 바깥쪽 지질층을 포함하는 미시적 소포(microscopic vesicle)을 의미한다. 상기 바깥쪽 지질층은 지질 단일층 또는 이중 층일 수 있다. 상기 바깥쪽 지질층이 지질 단일층인 경우, 상기 리포좀은 또한 마이셀(micelles)로도 언급된다. 리포좀들은 하나 이상의 지질막들을 가질 수 있다. 본 발명은 단일라벨라로 언급되는 단일-층 리포좀 및 멀티라벨라로 언급되는 다중-층(multiple-layered) 리포좀 모두를 고려한다.

[0052] 본 명세서에서 상호혼용되어 사용되는 용어 "마이크로RNA(microRNA)" 또는 "miRNA"는 내인성 RNA들로, 이를 중 일부는 전사후 레벨에서 단백질-코딩 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 내인성 마이크로RNA는 mRNA의 산출적 이용을 조절할 수 있는 게놈에 천연적으로 존재하는 작은 RNA들이다. 상기 용어 인위적 마이크로RNA는 내인성 마이크로RNA와는 다른 mRNA의 산출적 이용을 조절할 수 있는 어떠한 타입의 RNA 서열을 포함한다. 마이크로RNA 서열들은 Lim, 등, Genes and Development, 17, p. 991-1008 (2003), Lim 등, Science 299, 1540 (2003), Lee and Ambros Science, 294, 862 (2001), Lau 등, Science 294, 858-861 (2001), Lagos-Quintana 등, Current Biology, 12, 735-739 (2002), Lagos Quintana 등, Science 294, 853-857 (2001), 및 Lagos-Quintana 등, RNA, 9, 175-179 (2003) 같은 공개문헌들에 기재되어 있으며, 이는 참조로서 삽입된다. 또한, 많은 마이크로RNA들이 전구체 분자로 포함될 수 있다. 더 나아가, miRNA-유사 스템-루프들은 miRNA 및/또는 RNAi 경로들을 통해 내인성 유전자들의 발현을 조절하고자 하는 목적으로 인위적인 miRNA들 및 짧은 간섭하는 RNA들(siRNAs)을 운반하기 위한 운반체(vehicle)로서 세포에서 발현될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 분자"는 구조 내에 시알산 모이어티에 결합된 β -D-갈락토파라노실-(1 \rightarrow 4)-D-글루코오스 모이어티를 포함하는 어떠한 분자를 의미한다. 바람직한 구현예에서, β -D-갈락토파라노실-(1 \rightarrow 4)-D-글루코오스 모이어티는 올리고당의 일부를 구성하고, 상기 갈락토파라노실-(1 \rightarrow 4)-D-글루코오스 모이어티는 상기 체인 내에 2개의 말단 단당류 잔기들을 형성하거나 또는 양 말단 상에 추가적인 단당류 잔기들에 결합될 수 있다. 상기 갈락토파라노실-(1 \rightarrow 4)-D-글루코오스 모이어티를 포함하는 올리고당은 최소 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 이상의 단당류 잔기들을 포함할 수 있다. 상기 올리고당은 그러한 강글리오시드 또는 강글리오시

드의 일부 형태로서 제공될 수 있다.

[0053]

본 명세서에서 사용되는 용어 "% 서열 동일성(sequence identity)"은 비교 원도우 상에서 2개의 최적으로 정렬된 서열들을 비교시킴으로써 결정되는데, 상기 비교 원도우에서 상기 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열의 단편은 상기 2개의 서열들의 최적 정렬을 위해 레퍼런스 서열(첨가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교 시 첨가 또는 결실(예를 들어, 캡 또는 오버행)을 포함할 수 있다. 상기 백분율은 동일한 아미노산 잔기 또는 핵산 잔기가 양 서열들에서 일어나는 위치들의 수를 결정하여 매치된 위치들의 수를 산출하며 비교 원도우에서 총 위치들의 수로 상기 매치된 위치들의 수를 나누고 그 결과에 100을 곱해서 계산됨으로써 서열 동일성의 백분율을 제공한다. 서열을 정렬시키기 위한 알고리즘은 당업계에 알려져 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들어 스미스-워터맨 국부 상동성 알고리즘, 니들맨-분쉬(Needleman-Wunsch) 상동성 정렬 알고리즘, 피어슨-리프만 유사성 검색 방법, 상술한 알고리즘들의 컴퓨터화된 실행 또는 수동 정렬 및 시각적 검사에 의해 실시될 수 있다. Smith T, Waterman M, Adv. Appl. Math. 1981; 2:482-489; Needleman S, Wunsch C, J. Mol. Biol. 1970; 48:443-453; Pearson W, Lipman D, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:2444-2448; Tatusova T, Madden T, FEMS Microbiol. Lett. 1999; 174:247-250; the GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA programs, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI, US; Ausubel F, 등, Eds., "Short Protocols in Molecular Biology", 4th Ed.(John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, US, 1997)을 참조하라.

[0054]

본 명세서에서 상호혼용되어 사용되는 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체(carrier)", "약제학적으로 허용가능한 희석제(diluent)", "약제학적으로 허용가능한 부형제(excipient)" 또는 "약제학적으로 허용가능한 운반체(vehicle)"는 비-독성 고형, 반고형 또는 액체 필러, 희석제, 포집성 물질 또는 어떠한 통상적인 타입의 보조성 제형을 의미한다. 약제학적으로 허용가능한 담체는 이용되는 투여량 및 농도에서 수령자(recipients)에게 본질적으로 비-독성이고, 상기 제형의 다른 유효성분들과 양립할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드를 포함하는 제형을 위한 담체는 폴리펩타이드에 해로운 것으로 알려진 산화제 및 다른 화합물들을 정상적으로는 포함하지 않을 것이다.

[0055]

본 명세서에서 사용되는 용어 "인지질(phospholipid)"은 하나 이상의 인산 기를 포함하는 지질을 의미한다. 인지질은 천연적으로 양친매성이다; 즉, 각 분자는 친수성 부위와 소수성 부위로 구성된다. 본 명세서에서 용어 "인지질"은 약제학적으로 허용가능한 염 및 그러한 화합물의 에스테르 유도체들을 포함한다. 인지질들이 글리세롤 백본 및 스팽고지질을 운반하고 상기 지질들이 스팽고신을 포함하는 경우, 인지질들은 포스포글리세라이드(또는 글리세로인지질) 내 알코올 타입에 따라 분류될 수 있다. 두 개의 클래스들이 생물학적 막에 존재한다. 포스포글리세라이드는 자연에서 발견되는 가장 풍부한 클래스의 인지질들이고, 포스파티딜콜린(예컨대, 레시틴), 포스파티딜에타놀아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜글리세롤 및 카르디올리핀(cardiolipin)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 각 타입의 포스포글리세라이드 내 구조적 다양성(diversity)은 상기 체인 길이의 가변성(variability) 및 상기 지방산 에스테르 기의 포화 정도로 인한 것이다.

[0056]

본 명세서에서 사용되는 용어 "프로테아제 억제제"는 감염성 HIV-1에서 발견되는 개개의 기능적 단백질들로의 바이러스 폴리단백질 전구체들(예를 들어, 바이러스 GAG 및 GAG Pol 폴리단백질)의 단백질 분해성 절단(proteolytic cleavage)에 필요한 효소인 HIV-1 프로테아제를 의미한다.

[0057]

본 명세서에서 사용되는 용어 "레트로바이러스"는 바이러스의 RNA 계놈으로부터 DNA를 생산하는 역전사효소를 통해 숙주세포에서 복제되는 RNA 바이러스로 특징화되는 레트로바이러스 패밀리에 속하는 바이러스들을 의미한다.

[0058]

본 명세서에서 사용되는 용어 "역전사효소 억제제(reverse transcriptase inhibitors)"는 바이러스 계놈 HIV-1 RNA의 프로바이러스 HIV-1 DNA로의 전환을 촉진하는 효소인 HIV-1 역전사효소의 활성을 억제하는 어떠한 화합물을 의미한다.

[0059]

용어 "리보자임(ribozyme)"은 DNA 또는 보다 특징적으로는 RNA 내 특정 염기 서열들을 타겟팅하고 절단시킬 수 있는 RNA-기반된 효소를 의미한다.

[0060]

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "shRNA" 또는 "작은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA)"(스텝 루프로도 불림)는 siRNA의 하나의 타입이다. 하나의 구현예에서, 상술한 shRNA들은 짧은 안티센스 가닥, 예를 들어 약 19 내지 약 25개의 뉴클레오타이드의 안티센스 가닥(strand), 그 이후에 약 5 내지 약 9개의 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 루프가 이어지며 이와 유사한 센스 가닥으로 이루어져 있다. 택일적으로, 상기 센스 가닥은 상기 뉴클레오

타이드 루프 구조를 선행하고 상기 안티센스 가닥이 그 뒤에 위치할 수 있다.

[0061] 본 명세서에서 사용되는 용어 "siRNA"는 이중-가닥을 형성하는 핵산을 의미한다.

[0062] 타겟 유전자가 sEH인 siRNA가 동일한 세포에 존재하거나 또는 발현되는 경우 RNA, 즉 이중-가닥 RNA는 유전자 또는 타겟 유전자의 발현을 감소시키거나 또는 억제시키는 능력을 가진다. 상기 이중-가닥 RNA siRNA는 상보적 가닥들에 의해 형성될 수 있다. 하나의 구현예에서, siRNA는 이중-가닥 siRNA를 형성할 수 있는 핵산을 의미한다. siRNA의 서열은 전장 타겟 유전자 또는 이의 서브서열에 해당할 수 있다. 전형적으로는, siRNA는 최소 약 15-50 뉴클레오타이드 길이이다(예를 들어, 상기 이중-가닥 siRNA의 각 상보적 서열은 약 15-50 뉴클레오타이드 길이이고, 상기 이중-가닥 siRNA는 약 15-50 염기쌍의 길이이고, 바람직하게는 약 19-30 염기 뉴클레오타이드 길이며, 바람직하게는 약 20-25 뉴클레오타이드 길이이고, 예를 들어 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 뉴클레오타이드 길이이다). 본 명세서에서 상호혼용되어 사용되는 용어 "시알로어드하신(sialoadhesin)", "시알산 결합 Ig-유사 렙틴 1(sialic acid binding Ig-like lectin 1)", "시글렉-1(siglec-1)", CD169는 시알산의 매우 보존성이 높은 아르기닌 잔기와 카르복실기를 가지는 그룹 간의 염 브릿지를 형성하는 시알산에 결합하는 17개의 면역글로불린(Ig) 도메이들로 구성된 I-타입 렙틴을 의미한다. May A, 등, Mol. Cell 1998; 1:719-728을 참조하라. 본 발명에 따른 용도를 위해 적합한 시알로어드하신 변이체들은 인간 시알로어드하신(UniProt 데이터베이스에 접근번호 Q9BZZ2로 기재됨), 돼지 시알로어드하신(UniProt 데이터베이스에 접근번호 A7LCJ3로 기재됨) 및 마우스 시알로어드하신(UniProt 데이터베이스에 접근번호 Q62230로 기재됨)을 포함한다.

[0063] 본 명세서에서 사용되는 용어 "시알로어드하신 억제제"는 시알로어드하신의 레벨 및/또는 활성의 감소를 초래하는 어떠한 분자를 의미한다. 억제제들은 시알로어드하신 단백질의 양에서의 감소를 유발하는 분자들 및 시알로어드하신을 인코딩하는 mRNA의 양에서의 감소를 초래하는 분자들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 본 명세서에서 사용되는 용어 "시알릴락토오스(sialyl lactose)"는 시알산 모이어티에 결합된 락토오스 모이어티(β -D-갈락토파라노실-(1 \rightarrow 4)-D-글루코오스)를 포함하는 분자를 의미한다. 상기 시알산은 시알산 내 어떠한 가능한 위치에 의해 락토오스와 커플링되고 상기 락토오스 분자 내 어떤 가능한 위치에 커플링될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 시알산은 시알산의 2번째 위치의 하이드록시기를 통해 상기 락토오스에 결합된다(상기 시알산 구조의 넘버링은 하이드록시기를 가지는 탄소에서 시작하여 상기 체인을 둘러서 지속된다). 다른 바람직한 구현예에서, 상기 시알산은 상기 락토오스 분자 내 3번째 또는 6번째 위치의 하이드록시기에 의해 상기 락토오스에 결합된다. 바람직한 구현예들에서, 상기 "시알릴락토오스"는 α 2,3-시알릴-락토오스 또는 α 2,6-시알릴-락토오스이다. 시알릴락토오스는 진핵세포 또는 원핵세포 기원일 수 있다. 바람직하게는, 시알릴락토오스는 진핵세포 기원이다. 상기 진핵세포 또는 원핵세포는 병원성이거나 또는 비-병원성일 수 있다.

[0065] 본 명세서에서 사용되는 용어 "대상자(subject)"는 항원 제시 세포들을 가지는 것으로 보여지거나 또는 예상되는 모든 동물들을 포함한다. 특정 구현예들에서, 상기 대상자는 포유동물, 인간 또는 비인간 영장류, 개, 고양이, 말, 소, 다른 가금 동물류, 또는 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 기니 피그)이다. 상기 용어 "대상자" 및 "개체(individual)"은 본 명세서에서 상호혼용되어 사용된다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료(treatment)"는 본 명세서에 기재된 바와 같이 임상 상태에 대한 민감성을 종결시키거나, 예방시키거나, 약화시키거나 도는 감소시키는 것을 목표로 하는 어떠한 타입의 치료법을 의미한다. 바람직한 구현예에서, 상기 용어 치료는 본 명세서에서 특정된 바와 같은 질환 또는 상태의 예방을 위한 치료(즉, 임상 상태의 민감성을 감소시키는 치료법)에 관한 것이다. 따라서, "치료", "치료하는(treating)" 및 이와 동등한 용어들은 소망된 약리학적 또는 생리학적 효과를 얻는 것, 인간을 포함하는 포유동물에서 병리학적 상태 또는 질환의 어떠한 치료를 포함하는 것을 의미한다. 상기 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전하게 또는 부분적으로 예방한다는 측면에서 예방적일 수 있고/있거나, 질환 및/또는 상기 질환에서 기인하는 부작용에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 측면에서 치료적일 수 있다. 즉, "치료"는 (1) 대상자에서 상기 질환이 발생하거나 또는 재발하는 것을 예방하는 것, (2) 질환의 발병을 어레스트하는 것과 같은 질환을 억제하는 것, (3) 질환 또는 이와 연관된 최소 하나의 증상들을 멈추거나 종결시켜 상기 숙주가 더 이상 상기 질환 또는 이의 증상들로 고통받지 않는 것, 예를 들어 상실되거나, 없어지거나 또는 결손된 기능을 회복하거나 수선시키거나 또는 비효율적인 과정을 자극시킴으로써 상기 질환 또는 이의 증상들의 퇴행을 야기하는 것, 또는 (4) 상기 질환 또는 이와 연관된 증상들을 없애거나, 약화시키거나 또는 개선시키는(ameliorating) 것으로, 상기 개선시키는 것이 넓은 의미로 이용되는 경우 염증, 고통 또는 면역결핍 같은 매개변수의 규모(magnitude)에서의 적어도 하나의 감소를 의미한다.

- [0067] 본 명세서에서 사용되는 용어 "백신" 및 "백신 조성물"은 척추동물로의 투여를 위한 적합한 형태에서 본 발명에 따른 컨쥬게이트 또는 조성물을 포함하는 제형을 의미하고 예방적 면역반응을 유도한다. 상기 컨쥬게이트 또는 조성물은 감염을 예방하거나 또는 개선시키는 면역성(immunity)을 유도하기에 충분하거나 또는 감염의 최소 하나의 증상을 감소시키거나 또는 본 발명의 다른 투여량의 컨쥬게이트 또는 조성물의 효능을 증가시키기에 충분하다.
- [0068] 본 명세서에서 사용되는 용어 "질 크림(varginal cream)"은 질관에 적용하기에 적합한 반-고형 제조물을 의미한다. 당업계에 알려진 다양한 클래스의 부형제 또는 운반체들이 상기 제조물에 이용될 수 있다. 상기 부형제는 상기 제형의 구성성분에 해로운 영향을 미치지 않는 천연 또는 합성 기원의 물질들을 포함한다. 본 명세서에서의 용도를 위한 적합한 담체들은 이용되는 특정 타입의 제형에 따라 정제된 물, 희고 부드러운 파라핀, 점막부 착성 폴리머, 액체 파라핀, 폴리소르베이트 60, 소르비탄 스테아레이트 실리콘, 왁스, 페트roleum, 젤리, 폴리에틸렌 글리콜 및 많은 다른 재료들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0069] 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현벡터"는 벡터 내 전사 조절 서열들에 결합된 서열들로부터 RNA 또는 폴리펩타이드의 발현을 지시하는 벡터를 의미한다. 발현된 상기 서열들은 종종 세포에 이중적일 것이지만, 반드시 그런 것은 아니다. 발현벡터는 추가적인 엘리먼트들을 포함할 수 있는데, 예를 들어 2개의 복제 시스템들을 가져 2개의 생물체들, 예를 들어 발현을 위한 인간 세포 및 클로닝 및 증폭을 위한 원핵 숙주에서 유지될 수 있게 해준다.
- [0070] 본 명세서에서 사용되는 용어 "바이러스 침투 억제제(viral entry inhibitor)"는 세포 내로의 바이러스의 침입을 간섭할 수 있는 어떠한 화합물을 의미한다.
- [0071] 본 명세서에서 사용되는 용어 "바이러스 면역원(viral immunogens)"은 본 발명의 비활성화 과정에 의해 얻어진 전체 HIV-비활성화된 비리온(virions)을 의미한다.
- [0072] 2. 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제들을 이용한 본 발명의 치료방법들
- [0073] 본 발명은 HIV-1 막 내 강글리오시드가 성숙한 수지상세포들(mDCs)에 의한 바이러스의 흡수를 위해 필요하다는 것을 개시한다. 특히, 특이적 바이러스 강글리오시드에 존재하는 시알릴락토오스 분자가 mDC 흡수를 위한 결정인자 모이어티로서 동정되었다. 또한, 본 발명은 DCs 같은 여러 면역시스템 세포들의 표면에 위치되는 세포 부착 단백질인 시알로어드히신(CD169, 시글렉-1)이 HIV-1 표면에 시알릴락토오스 분자에 부착하여 mDCs에 의한 바이러스 섭취(intake)를 가능하게 한다는 것을 개시한다. 따라서, 시알로어드히신과 시알릴락토오스의 상호작용은 mDCs로의 HIV-1 침투를 가능하게 하는 것이다. 결과적으로, 이러한 상호작용의 억제는 mDCs에 의한 CD4+ T 세포의 트랜스-감염을 차단시킴으로써 HIV의 전파를 억제하는 데 이용될 수 있다. 외피 바이러스들은 감염된 세포의 막으로부터의 파생(budding)으로부터 외피를 획득하고 이에 바이러스 외피의 조성물은 바이러스가 파생된 세포의 조성물을 반영할 것이다. 생물학적 막들이 강글리오시드를 포함하기 때문에, 바이러스 외피들도 강글리오시드를 포함할 것으로 예측된다. 더욱이, 강글리오시드 GM3는 이전에 HIV 및 여러 다른 바이러스들(예를 들어, SFV, VSV, MuLV)의 막에서 검출되었다. Chan R, 등, J. Virol. 2008; 82:11228-11238 및 Kalvodova L, 등, J. Virol. 2009; 83: 7996-8003을 참조하라. 따라서, 본 발명에서 확인된 mDCs에 의한 HIV 흡수에 대한 기작은 어떠한 외피 바이러스들의 흡수와 관련되어 있을 것이며, 이에 따라, 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용에 대한 억제제들의 이용은 어떠한 외피 바이러스에 의한 감염을 예방하는 데 유용할 것이다. 따라서, 첫 번째 양태에서, 본 발명은 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병의 치료 또는 예방에 이용하기 위해 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제에 관한 것이다.
- [0074] 다른 구현예에서, 본 발명은 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병의 치료를 위한 의약품(medicament)의 제조에 있어서 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제의 용도에 관한 것이다.
- [0075] 다른 양태에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상자에서 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병의 치료 또는 예방을 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 시알로어드히신과 시알로락토오스 간 상호작용의 억제제를 상기 대상자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0076] 본 발명에서 이용되기에 적합한 억제제들은 시알로어드히신과 시알릴락토오스 또는 시알로락토오스를 포함하는 어떠한 다른 화합물 간의 상호작용을 검출하기 위해 어느 하나의 알려진 어세이를 이용하여 동정될 수 있다. 예

를 들어, 본 발명에 따라 사용하기 위한 억제제들은 구조 내에 시알릴락토오스를 포함하는 지질을 포함하는 단일라멜라 소포들의 성숙한 수지상세포에 의한 포획을 감소시키는 억제제의 능력에 대한 결정에 기반된 본 발명의 실시예 5에 기재되어 있는 어세이를 이용하여 동정될 수 있다. 큰 단일라멜라 소포들 내에 포함되어 있는 구조 내에 시알릴락토오스를 포함하는 지질은 GM1, GM2, GM3, GD1b 및 GT1b 같은 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 모노-, 디- 및 트리시알릴강글리오시드를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0077] 본 발명에 따라 사용하기 위해 적합한 억제제들은 시알릴락토오스, 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 문자, 항-시알로어드히신 항체, 항-시알릴락토오스 항체 및 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 문자를 포함하는 소포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0078] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 억제제는 시알릴락토오스이다.

[0079] 바람직한 구현예에서, 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 문자는 4개 미만의 시알산을 가지는 강글리오시드이다.

[0080] 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제로서 사용하기에 적합한 강글리오시드는 표 1에 예시되어 있다.

표 1

GM3	aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GM2	bDGa1pNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-3)]bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GM2a	aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GM1/GM1a	bDGa1p(1-3)bDGa1NAc[aNeu5Ac(2-3)]bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GM1b	aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-3)bDGa1NAc(1-4)bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GD3	aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GD2	bDGa1pNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GD1a	aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-3)bDGa1NAc(1-4)[aNeu5Ac(2-3)]bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GD1알파	aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-3)bDGa1NAc(1-4)[aNeu5Ac(2-6)]bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GD1b	bDGa1p(1-3)bDGa1NAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GT1a	aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-3)bDGa1NAc(1-4)[aNeu5Ac(2-3)]bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GT1, GT1b	aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-3)bDGa1NAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
OAc-GT1b	aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-3)bDGa1NAc(1-4)aXNeu5Ac9Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GT1c	bDGa1p(1-3)bDGa1NAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer
GT3	aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGa1p(1-4)bDG1cp(1-1)Cer

[0082] 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간의 상호작용을 억제하는 시알릴락토오스 잔기들을 포함하는 강글리오시드들. aNeu5Ac = 5-아세틸-알파-뉴라믹산; aNeu5Ac9Ac = 5,9-디아세틸-알파-뉴라믹산; bDGa1p = 베타-D-갈락토파라노오스; bDGa1pNAc = N-아세틸-베타-D-갈락토파라노오스; bDG1cp = 베타-D-글루코파라노오스 및 Cer = 세라마이드(일반적인 N-아실화된 스팽고이드).

[0083] 또한, 본 발명은 하나 이상의 하기 작용기들이 백본 체인, 특히 세라마이드 백본 체인에 치환되거나 또는 첨가된 강글리오시드 유도체들의 이용도 고려한다:

[0084] 1) 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 아릴 래디컬에 결합된 할로젠 원자,

[0085] 2) 알코올기(1차, 2차 또는 3차),

[0086] 3) 에테르기,

[0087] 4) 카르보닐 기능(예를 들어, 알데하이드 또는 케톤),

[0088] 5) 카르복실산,

[0089] 6) 카르복실성 무수물기,

[0090] 7) 카르바모일기,

[0091] 8) 할로포르밀기,

- [0092] 9) 시아노기, 락톤기를 포함하는 에스테르기,
- [0093] 10) 벤질기, 페닐기, 토실기, 톨릴(tolyl) 또는 설포닐기,
- [0094] 11) 아미노기(1차, 2차 또는 3차),
- [0095] 12) 이소시아네이트, 시아네이트, 티오이소시아네이트, 티오시아네이트, 카르바메이트, 또는
- [0096] 13) 아지드기 또는 디아조기.
- [0097] 다른 구현예에서, 상기 "시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제"는 시알로어드히신 또는 시알릴락토오스에 대해 특이적인 항체이다.
- [0098] 또한, 본 발명은 시알로어드히신에 결합하여 시알릴락토오스를 포함하는 분자들과의 상호작용을 억제하는 능력을 실질적으로 유지하는 상기 언급된 다른 타입의 항체들의 단편들의 사용을 포함한다. 상기 용어 "항체 단편(antibody fragment)"은 Fab, F(ab')₂, Fab', 단일 체인 Fv 단편들(scFv), 이중항체(diabodies) 및 나노바디 같은 항체 단편들을 포함한다.
- [0099] 다른 구현예에서, 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제는 항-시알리어드히신 특이적 항체 7D2(Abcam으로부터 이용가능함, 카탈로그 넘버; ab18619) 또는 이의 단편이다. 다른 구현예에서, 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간의 상호작용 억제제는 항-시알리어드히신 특이적 항체 7-239(eBioscience로부터 이용가능함, 카탈로그 넘버; 12-1699-41) 또는 이의 단편이다.
- [0100] 다른 구현예에서, 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제는 시알릴락토오스-결합 분자이다. 이러한 타입의 분자들은 외피 바이러스의 표면에서 발견되는 시알릴락토오스에 결합할 수 있고, 이의 시알로어드히신과의 상호작용을 방해한다. 적합한 시알릴락토오스-결합 분자들은 시알릴락토오스-결합 렉틴 및 항-시알릴락토오스 항체들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 적합한 시알릴락토오스-결합 렉틴은 시알로어드히신 또는 이의 세포외 도메인, 삼부쿠스 니그라(*Sambucus nigra*; 딱총나무 열매) 나무껍질 렉틴(α 2,6-결합(linkage)을 가지는 시알릴락토오스에 특이적임), 막키아 아무렌시스(*Maackia amurensis*) 렉틴(α 2,3-시알릴 결합을 가지는 시알릴락토오스에 특이적임) 및 비브리오 콜레리(*Vibrio cholerae*) 뉴라미니다제 또는 이의 렉틴-유사 도메인을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0101] 다른 구현예에서, 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제는 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 분자를 포함하는 소포이다.
- [0102] 하나의 구현예에서, 상기 소포는 리포좀, 리포플렉스 또는 지질 나노입자이다. 하나의 구현예에서, 상기 소포는 리포좀이다. 리포좀은 인위적으로-제조된 소포들로, 주로 지질 이중층으로 구성되며 영양물질 및 약제학적 제형들의 투여를 위한 전달 운반체(delivery vehicle)로서 이용될 수 있다. 리포좀은 직경이 수백 나노미터일 수 있고 좁은 수용성 구획에 의해 분리된 일련의 집중 이중층들(concentric bilayers)을 포함하는 다중라멜라 소포(multilamellar vesicle, MLV), 직경이 50 nm보다 작은 단일라멜라 소포(small unicellular vesicle, SUV), 및 직경이 50 nm 내지 500 nm 사이일 수 있는 큰 단일라멜라 소포(large unilamellar vesicle, LUV) 같이 다른 크기일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 건강하지 않은 조직으로의 리포좀의 부착을 개선시키거나 또는 엔도사이토시스를 포함하지만 이에 한정되지 않는 이벤트들을 활성화시키기 위해 리포좀 디자인은 옵소닌(opsonins) 또는 리간드를 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 리포좀은 약제학적 제형들의 전달을 향상시키기 위해 낮은 pH 또는 높은 pH를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 소포는 큰 단일라멜라 소포이다.
- [0103] MLVs는 용매 주입, 지질 수화, 역증발, 동결건조, 또는 반복된 동결 및 해동에 의해 제조될 수 있다. SUVs 또는 LUVs는 예를 들어 초음파 처리, 제한된 동공 크기를 가지는 폴리카르보네이트 필터를 통한 압출(extrusion), 프렌치압력 세포, 즉 고압 하에서 작은 구멍을 통해 MLV를 통과시키거나, 또는 에테르 또는 알코올 같은 용매와 함께 용매 주입 방법에 의해 제조될 수 있다. 제조될 수 있는 다른 타입의 소포들은 단일라멜라 소포(ULV), 큰 단일라멜라 소포(LUV); 투석, 컬럼 크로마토그래피, 바이오-비드 SM-2를 이용한 세제 제거에 의해 제조되거나 또는 역상증류법(reverse phase evaporation, REV) 중 어느 것에 의해 제조되든지 간에 안정적인 다중라멜라 소포(stable plurilamellar vesicles, SPLV), 올리고라멜라 소포(OLV); 고압 압출에 의해 제조되는 중간-크기의 단일라멜라 소포 또는 지질 필름을 적합한 염(예를 들어, 황산암모늄)의 수용성 용액과 함께 볼텍싱하고 상기 결과적인 혼탁액을 균질화시켜 작은 단일라멜라 소포(SUV)를 형성시킨 후, 상기 SUV 혼탁액을 액체 질소에서 반복적으로 동결-해동시키고 물에서 반복적으로 동결-해동시키 MW(multivesicular vesicles)를 형성시킴으로써 제

조되는 최소 1 마이크론의 직경을 가지는 거대 멀티소포성 소포(MW 또는 GMW, 미국 특허번호 제6,162,462호) 리포좀을 포함한다. 리포좀 제조의 모든 상술한 방법 및 다른 방법들이 당업계에 알려져 있다.

[0104] 본 발명에 따른 적합한 소도들은 디올레오일포스파티딜에타놀아민(dioleoylphosphatidylethanolamine; 이후 "DOPE"로 지칭됨), 팔미토일올레오일글리세로포스포콜린(palmitoyloleoylglycerophosphocholine; 이후 "POPC"로 지칭됨), 콜레스테롤(이후 "CHOL"로 지칭됨), 0,0'-디테트라데카노일-N-(α -트리메틸암모니오아세틸)디에타놀아민클로라이드(이후, "DC-6-14"로 지칭됨), 수소화된 정제 난황(yolk) 포스파티딜콜린, 수소화된 정제 대두 포스파티딜콜린, 디팔미토일 포스파티딜콜린, 디스테아로일 포스파티딜콜린 및 1-팔미토일-2-올레오일 포스파티딜콜린으로 구성된 군으로부터 선택된 최소 하나의 인지질로 구성된 하나 이상의 막을 포함한다. 바람직하게는, 상기 리포좀은 POPC, DPPC, CHOL 및 스팽고미엘린(SM)을 포함하는 LUV이다. 본 발명에 따른 LUV에서 POPC, DPPC, CHOL, SM 및 시알릴락토오스-포함 모이어티의 함량 비율(몰 비율)은 POPC:DPPC:CHOL:SM:시알릴락토오스-포함 모이어티 = 25:16:10:45:4이다. 본 발명에서의 용도를 위해 소포들에 삽입될 수 있는 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 적합한 분자는 표 1에 기재된 어떠한 강글리오사이들 뿐 아니라 이의 유도체들을 포함하는 상기 언급된 어떠한 분자들을 포함한다. 일부 구현예들에서, LUV 내로 삽입될 수 있는 구조 내에 시알릴락토오스를 포함하는 분자는 GM1, GM2, GM3, GD1b 및 GT1b 같은 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 모노-, 디- 및 트리시알릴강글리오시드들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0105] 하나의 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 타입 I의 필로비리대 바이러스에 의해 야기되는 질병이다. 타입 I의 필로비리대 바이러스는 단일-가닥, 비분절된 (-) 센스 RNA 게놈을 가지고 인간 및 비-인간 영장류에서 심각한 출혈열을 야기한다. 일부 양태들에서, 상기 필로비리대 바이러스는 에볼라 바이러스 중 코트디부아르(Cote d'Ivoire, CI), 수단(S), 자이르(Z) 또는 레스톤(R) 종 같은 에볼라 바이러스이다. 추가적인 양태들에서, 상기 필로비리대 바이러스는 마르부르그 바이러스이다.

[0106] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 인플루엔자 바이러스, 토크토바이러스, 도리(Dhori) 바이러스, 또는 전염성 연어빈혈 바이러스 같은 오르토믹소비리대 바이러스에 의해 야기되는 질병이다. 예를 들어, 일부 양태들에서, 본 명세서에서 제공된 방법들은 인플루엔자 타입 A 바이러스, 인플루엔자 타입 B 바이러스, 또는 인플루엔자 타입 C 바이러스의 인간 대상자의 감염을 치료하거나 또는 예방하기 위해 이용된다. 일부 양태들에서, 상기 인플루엔자 A 바이러스는 서브타입 H1N1, H2N2, H3N2 또는 H5N1에 속한다.

[0107] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 인간 파라인플루엔자 바이러스, 인간 호흡기 세포융합 바이러스(human respiratory syncytial virus, RSV), 센다이 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 루벨라(홍역) 바이러스, 핸드라 바이러스, 니파 바이러스, 조류 뉴모(avian pneumo) 바이러스 또는 개 디스템퍼(canine distemper) 바이러스 같은 파라믹소비리대 바이러스에 의해 야기되는 질병이다.

[0108] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 광견병 바이러스, 소수포성 구내염 바이러스(VSV), 모콜라 바이러스, 듀벤헤이즈 바이러스, 유럽 박쥐 바이러스, 연어 전염성 조혈괴사 바이러스, 바이러스 출혈성 폐혈증 바이러스, 잉어 바이러스의 봄 바이러스병(spring viremia of carp virus) 또는 가물치 랍도바이러스 같은 랍도비리대 바이러스에 의해 야기되는 질병이다.

[0109] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 보르나병 바이러스 같은 보으나비리대 바이러스에 의해 야기되는 질병이다.

[0110] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 분암웨라(Bunyamwera) 바이러스, 한탄 바이러스, 크리미안 콩고 바이러스, 캘리포니아 뇌염 바이러스, 리프트 밸리열 바이러스, 샌드플라이 열 바이러스 같은 분야비리대 바이러스에 의해 야기되는 질병이다.

[0111] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 라사열 바이러스, 이피(Ippy) 바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 모발라 바이러스, 모페이아 바이러스 같은 Old World 아레나바이러스, 또는 후닌 바이러스(Junin virus; 아르헨티나 출혈열), 사비아(브라질 출혈열), 아마파리 바이러스, 플렉산(Flexal) 바이러스, 구아나리토 바이러스(베네수엘라 출혈열), 마추포(Machupo) 바이러스(볼리비아 출혈열), 라티노 바이러스, 볼리베로스 바이러스, 파라나 바이러스, 피친데(Pichinde) 바이러스, 피리탈 바이러스, 타카리베 바이러스, 타미아미 바이러스 또는 화이트워터 아로요 바이러스 같은 New World 아레나바이러스인 아레나비리대 바이러스에 의해 야기되는 질병이다. 일부 양태들에서, 아레나비리대 바이러스는 림프구성 맥락수막염 바이러스, 라사 바이러스, 후닌 바이러스, 마추포 바이러스, 사비아 바이러스 또는 구아나리토 바이러스이다.

- [0112] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 아르보바이러스(arbovirus)에 의해 야기되는 질병이다. 아르보바이러스는 절지동물 매개체(예를 들어, 모기, 샌드-플라이, 벼룩, 이)에 의해 일차적으로 전파되는 400 이상의 외피 RNA 바이러스들의 큰 그룹을 포함한다. 일부 양태들에서, 아르보바이러스는 알파바이러스(예를 들어, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 또는 신드비스(Sindbis) 바이러스) 또는 루비바이러스(예를 들어, 루벨라 바이러스)같은 토가비리대 바이러스이다. 예를 들어, 일부 양태들에서, 본 명세서에서 제공되는 화합물은 선천성 풍진증후군(congenital rubella syndrome, CRS) 및 저출생체중, 귀머거리 및 유산 같은 이와 관계된 증상들을 치료 또는 예방하기 위해 임신한 대상자에게 투여된다.
- [0113] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 플라비바이러스, 폐스티바이러스, 해파드바이러스, 황열 바이러스, 템기열 바이러스 또는 일본 뇌염(Japanese encaphilitis, JE) 바이러스 같은 플라비비리대 바이러스에 의해 야기되는 질병이다.
- [0114] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 간염 C형 바이러스 또는 간염 C형-유사 바이러스 같은 혜파시바이러스에 의해 야기되는 질병이다.
- [0115] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 핸드라 바이러스 또는 니파 바이러스 같은 헤니파바이러스에 의해 야기되는 질병이다.
- [0116] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 오르토분야바이러스, 한타바이러스, 플레보바이러스 또는 나이로바이러스 같은 분야비리대 (-)-센스 RNA 바이러스에 의해 야기되는 질병이다.
- [0117] 다른 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 라사 바이러스, 후닌 바이러스, 마추포 바이러스 또는 구아나리토 바이러스 같은 아레나바이러스에 의해 야기되는 질병이다.
- [0118] 일부 양태들에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 알푸이(Alfuy) 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 코코베라 바이러스, 코우탕고(Koutango) 바이러스, 쿤진 바이러스, 머레이 뱌리 뇌염 바이러스, 세인트루이스 뇌염 바이러스, 스트래트포드(Stratford) 바이러스, 우수투(Usutu) 바이러스 또는 웨스트 나일 바이러스 같은 일본 뇌염 바이러스에 의해 야기되는 질병이다.
- [0119] 바람직한 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 레트로비리대 패밀리에 속하는 바이러스에 의해 야기되는 질병이다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 오르토레트로비리내(orthoretrovirinae) 서브패밀리에 속하는 바이러스이다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 렌티바리어스 속에 속한다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 영장류 렌티바이러스이고, 특히 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 유인원 면역결핍 바이러스(SIV)이다.
- [0120] 일부 양태들에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 알푸이 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 코코베라 바이러스, 코우탕고 바이러스, 쿤진 바이러스, 머레이 뱌리 뇌염 바이러스, 세인트루이스 뇌염 바이러스, 스트래트포드 바이러스, 우수투(Usutu) 바이러스 또는 웨스트 나일 바이러스 같은 일본 뇌염 바이러스에 의해 야기되는 질병이다.
- [0121] 바람직한 구현예에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병은 레트로비리대 패밀리에 속하는 바이러스에 의해 야기되는 질병이다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 오르토레트로비리내 서브패밀리에 속하는 바이러스이다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 렌티바리어스 속에 속한다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 영장류 렌티바이러스이고, 특히 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 유인원 면역결핍 바이러스(SIV)이다.
- [0122] 레트로바이러스의 예들은 다음의 바이러스 속들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다: 알파레트로바이러스(예를 들어, 조류 백혈병 바이러스(avian leukosis virus, ALV) 및 라우스 육종 바이러스(rous sarcoma virus, RSV)), 베타레트로바이러스(예를 들어, 마우스 유방 종양 바이러스(mouse mammary tumour virus, MMTV), SRV, HERV-K 및 JRSV), 감마레트로바이러스(예를 들어, 마우스 백혈병 바이러스(MLV), 고양이 백혈병 바이러스(FeLV), GALV, PERV, 및 HERV-W), 엘타레트로바이러스(예를 들어, 소 백혈병 바이러스(BLV), 및 암-야기성 인간 T-세포 림프친화성 바이러스(HTLV-1 및 HTLV-11)), 앱실론레트로바이러스(예를 들어, 각막백반 진피 육종 바이러스(Walleye dermal sarcoma virus, WDSV) 및 SnRV), 렌티바이러스(예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스 1(HIV-1), 인간 면역결핍 바이러스 2(HIV-2), 유인원 면역결핍 바이러스(SIVmac 및 SIV), 고양이 면역결핍 바이러스(FIV), EIAV 및 MVV) 및 스푸마바이러스(예를 들어, 유인원 포말상 바이러스(simian foamy virus)(SFVcpz

및 SFVagm), FFV 및 BFV).

[0123] 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 외피 내 지질의 최소 일부가 시알릴락토오스를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이러스이다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 바이러스 외피 내에 강글리오시드를 포함하고, 상기 강글리오시드는 최소 하나의 시알릴락토오스 모이어티를 포함한다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 상기 강글리오시드는 4개 미만의 시알릴락토오스 분자들을 포함한다. 보다 다른 구현예에서, 상기 바이러스는 외피 내에 상기 표 1에서 보여진 하나 이상의 강글리오시드들을 포함한다.

[0124] 바람직한 구현예에서, 상기 "외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병"은 HIV 바이러스와 연관된 질병이다.

[0125] 본 발명은 추가적으로 HIV 감염과 연관된 증상들을 예방하거나 또는 감소시키는 것에 관한 것이다. 이들은 HIV 감염의 마이너 증상 단계와 연관된 증상들, 예를 들어 대상포진, 피부 발진 및 손톱 감염, 구강 점막질환, 재발성 코 및 목 감염 및 체중 감소를 포함한다. 또한, HIV 감염의 주요 증상 단계와 연관된 추가적인 증상들은, 예를 들어 구강 및 질 아구창(칸디다), 지속적 설사, 체중 감소, 지속성 기침 및 재활성화된 결핵 또는 입술 발진(cold sores) 같은 재발성 헤르페스 감염(헤르페스 심플렉스(*herpes simplex*))을 포함한다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 완전히 진행된 AIDS의 다른 증상들은, 예를 들어 설사, 메스꺼움 및 구토, 아구창 및 구강 점막질환, 지속성 또는 재발성 질 감염 및 자궁경부암, PGL(persistent generalized lymphadenopathy), 심각한 피부 감염, 무사마귀 및 백선, 호흡기 감염, 폐렴, 특히 주폐포자총 폐렴(*Pneumocystis carinii pneumonia*, PCP), 대상포진(헤르페스 조스터(*herpes zoster*) 또는 shingles), 통증, 마비 또는 손과 발에서 "저리는 느낌(pins and needles)" 같은 신경 시스템 문제, 신경학적 비정상, 카포시 육종, 림프종, 결핵 또는 다른 유사 기회감염을 포함한다.

[0126] 본 발명의 억제제들의 이로운 효과들은, 예를 들어 HIV에 노출된 개체의 초기 감염을 예방하거나 또는 지연시키는 것, HIV로 감염된 개체에서 바이러스 짐(burden)을 감소시키는 것, HIV 감염의 증상이 없는 단계를 연장시키는 것, 바이러스 레벨이 항-레트로바이러스 치료법(anti-retroviral therapy, ART)을 통해 낮추어졌던 HIV 감염된 환자들에서 낮은 바이러스 로드(load)를 유지시키는 것, 약물을 투여받지 않은(drug naive) 환자 및 ART로 처리된 환자 모두에서 HIV-1 특이적 및 비-특이적으로 CD4 T 세포의 레벨을 증가시키거나 CD4 T 세포에서의 감소를 약화시키는 것, AIDS에 감염된 개체에서 삶의 건강 또는 질을 전체적으로 증진시키는 것, 및 AIDS에 감염된 개체의 기대수명(life expectancy)을 연장시키는 것을 포함한다. 임상의는 면역화의 효과를 치료 전에 환자의 상태 또는 치료되지 않은 환자의 예측된 상태와 비교하거나, 또는 백신으로 처리되고 치료되지 않은 개체들의 임상적 시도에서 비교함으로써 상기 치료가 AIDS를 억제하는 데 효과적인지 여부를 결정할 수 있다.

[0127] 본 발명의 화합물들은 하나 이상의 추가적인 항-HIV제 또는 제제와 조합하여 본 발명의 방법들에서 이용될 수 있다. 상술한 추가적인 화합물은 본 발명의 화합물들 또는 예를 들어 HIV 감염의 증상들을 치료, 예방 또는 감소시키는 것으로 알려진 상업적으로 이용가능한 화합물들을 같은 화합물들을 포함할 수 있다.

[0128] 비-제한적인 예들에서, 본 발명의 화합물들은 하나 이상의 하기 항-HIV 약물들과 조합하여 이용될 수 있다:

[0129] 1) 병용 약물들: 에파비렌즈, 엠프리시타빈, 또는 테노포비르 디소프록실 푸마레이트(Atripla(R)/BMS, Gilead); 라미부딘 또는 지도부딘(Combivir(R)/GSK); 아바카비르 또는 라미부딘(Epzicom(R)/GSK); 아바카비르, 라미부딘 또는 지도부딘(Trizivir(R)/GSK); 엠프리시타빈, 테노포비르 디소프록실 푸마레이트(Truvada(R)/Gilead).

[0130] 2) 침투 및 융합 억제제들: 마라비록(maraviroc)(Celsentri(R), Selzentry(R)/Pfizer); 펜타퓨시드(pentafuside) 또는 엔푸비르티드(enfuvirtide)(Fuzeon(R)/Roche, Trimeris). 일부 구현예에서, 상기 바이러스 침투 억제제는 융합 억제제, CD4 수용체 결합 억제제, CD4 모방체(mimic) 또는 pg120 모방체이다. 일부 추가적인 구현예에서, 상기 바이러스 침투 억제제는 gp41 길항체, a CD4 단일클론 항체 또는 예를 들어 징크 핑거 억제제들 같은 CCR5 길항체 서브클래스들을 포함하는 CCR5 길항제이다. 또 다른 구현예에서, 상기 바이러스 침투 억제제는 CXCR4 공동-수용체 길항제이다.

[0131] 3) 인테그라제 억제제들: 랄테그라비르 또는 MK-0518(Isentress(R)/Merck).

[0132] 4) 역전사효소 억제제들: 본 발명에 따른 조성물에서 사용하기에 적합한 역전사효소 억제제는 엠프리시타빈, 카프라비린, 테노포비르, 라미부딘, 잘시타빈, 엘라비르딘, 네비라핀, 디다노신, 스타부딘, 아바카비르, 알로부딘, 지도부딘, 라세미산의 엠프라시타빈, 아프리시타빈, 에미비린, 엘부시타빈, TMC-278, DPC-083, 암독소비르, (-)-베타-D-2,6-디아미노-퓨린 디옥소레인, MIV-210(FLG), DFC(데셀부시타빈), 디옥소레인 티미딘, 칼라놀리드 A, 에트라비린(TMC-125), L697639, 아테비르딘(U87201E), MIV-150, GSK-695634, GSK-678248, TMC-

278, KP1461, KP-1212, 로데노신(adenosine)(FddA), 5-[(3,5-디클로로페닐)티오]-4-이소프로필-1-(4-페리딜메틸)이미다졸-2-메탄올, 카르바민산, (-)-I²-D-2,6-디아미노퓨린 디옥소레인, AVX-754, BCH-13520, BMS-56190((4S)-6-클로로-4-[(1E)-사이클로프로필에테닐]-3,-4-디하이드로-4-트리플루오로메틸-2(1H)-퀴나졸리논), TMC-120, 및 L697639로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물로, 상기 화합물들이 병용 치료법에서 이용되는 경우 HIV의 치료를 위해 효과적인 양으로 존재한다.

[0133] 5) 프로테아제 억제제들: 본 발명에 따른 miRNAs 또는 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드와 조합될 수 있는 적합한 프로테아제 억제제는 리토나비르, 로피나비르, 사퀴나비르(saquinavir), 암프레나비르, 포삼프레나비르, 넬프마비르(nelfmavir), 티프라나비르, 인디나비르, 아타자나비르, TMC-126, 다루나비르, 모제나비르(DMP-450), JE-2147(AG1776), L-756423, KNI-272, DPC-681, DPC-684, 텔리나비르(SC-52151), BMS 186318, 드록시나비르(droxinavir)(SC- 55389a), DMP-323, KNI-227, 1-[(2-하이드록시에톡시)메틸]-6-(페닐티오)-티민, AG-1859, RO-033-4649, R-944, DMP-850, DMP-851, 및 브레카나비르(GW640385)로 구성된 군으로부터 선택된다. 본 발명의 화합물과 병용하여 사용되기에 바람직한 프로테아제 억제제들은 사퀴나비르, 리토나비르, 인디나비르, 넬프하미르(nelfhavir), 암프레나비르, 로피나비르, 아타자나비르, 다루나비르, 브레카나비르, 포삼프레나비르 및 티프라나비르를 포함한다. 특히 유용한 그런 병용들은, 예를 들어 AZT+3TC; TDF+3TC; TDF+FTC; ABC+3TC; 및 Abacavir+3TC을 포함한다.

[0134] 또한, 본 발명에 따른 조성물이 병용 치료법에 이용되는 경우에 추가적으로 백신, 유전자 치료법 치료, 사이토카인, TAT 억제제 및 면역조절제로 구성된 군으로부터 선택된 항레트로바이러스제를 HIV의 치료에 효과적인 양으로 포함할 수 있다.

[0135] 또한, 본 발명에 따른 조성물이 병용 치료법에 이용되는 경우에 추가적으로 항진균제, 항박테리아제, 항-종양제, 항-원생동물제, DNA 폴리머라제 억제제, DNA 합성 억제제, 항-HIV 항체, HIV 안티센스 약물, IL-2 아고니스트(agonists), α -글루코시다제 억제제, 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 억제제로 구성된 군으로부터 선택된 항감염 제제를 HIV의 치료에 효과적인 양으로 포함할 수 있다.

[0136] 또한, 본 발명에 따른 조성물이 병용 치료법에 이용되는 경우에 추가적으로 펜타미딘, 이세티오네이트, 자가 CD8+ 주입(infusion), γ -인터페론 면역글로불린, 흉선 웨타이드, IGF-I, 항-Leu3A, 자가백신접종(auto vaccination), 생체자극(biostimulation), 체외 광영동(extracorporeal photophoresis), 사이클로스포린, 라파미신, FK-565, FK-506, GCSF, GM-CSF, 이상고열요법(hyperthermia), 이소피노신, rVIG, HIVIG, 수동 면역치료법 및 폴리오 백신 과다면역화로 구성된 군으로부터 선택된 면역조절제를 HIV의 치료에 효과적인 양으로 포함할 수 있다.

[0137] 본 발명에 따른 억제제와 항-HIV제들의 병용은 항-HIV 활성의 측면에서 상승 효과(synergistic effect)를 초래 할 수 있다. 상승 효과는, 예를 들어 시그모이드-이맥스(Sigmoid-Emax), 로우 및 중간값-효과 방정식 같은 적합한 방법을 이용하여 계산될 수 있다. Holford K, Scheiner L, Clin. Pharmacokinet. 1981; 6:429-453, Loewe S, Muischnek H, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 1926; 114:313-326 및 Chou T, Talalay C, Adv. Enzyme Regul. 1984; 22:27-55를 참조하라. 위에서 언급된 각 방정식은 실험적 데이터에 적용될 수 있어 약물 조합의 효과를 평가하는 데 도움을 주는 상응하는 그래프를 제공한다. 위에서 언급된 상기 방정식과 연관된 상응하는 그래프들은 각각 농도-효과 곡선, 아이소볼로그램(isobogram) 곡선 및 조합 지수 곡선이다.

[0138] 본 발명에 따른 억제제들은 추가적으로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 적합한 담체들은 물, 덱스트로오스, 글리세롤, 염, 에탄올, 및 이의 조합들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 담체는 습윤제(wetting agents) 또는 유화제, pH 완충제, 또는 보조제(adjuvants) 같은 제형의 효과성을 증진시키는 추가적인 제제들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 보조제들은 Al(OH)₃, Ca₃(PO₄)₂, 카올린, 탄소, 수산화알루미늄, 뮤라밀 디펩타이드(muramyl dipeptides), N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-DMP), N-아세틸-노르누라밀-L-알라닐-D-이소글루타민(CGP 11687, nor-MDP로도 지칭됨), N-아세틸뮤라밀-L-알라닐-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-하이드록시포스포릴록시(hydroxylphosphoryloxy)-에틸아민(CGP 19835A, MTP-PE로도 지칭됨), 2% 스쿠알렌/Tween-80[®] 에멀젼 내 RIBI(MPL+TDM+CWS), 지질다당류(lipopolysaccharides) 및 지질 A를 포함하는 이의 다양한 유도체들, 프로인트 완전 보조제(Freund's Complete Adjuvant, FCA), 프로인트 불완전 보조제(Freund's Incomplete Adjuvants), 머크 보조제 65, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 폴리 IC 및 폴리 AU 산), 미코박테리움, 튜버클로시스(*Mycobacterium, tuberculosis*)으로부터 유래된 왁스 D, 코리네박테리움 파르븀(*Corynebacterium parvum*), 보데텔라 퍼튜시스(*Bordetella pertussis*) 및 브루셀라 속의 멤버들에서 발견되는 물질, 티터맥스(Titermax),

ISCOMS, 퀄(Quil) A, ALUN, 지질 A 유도체, 콜레라톡신 유도체, HSP 유도체, LPS 유도체, 합성 웨타이드 매트릭스 또는 GMDP, 인터루킨(interleukin) 1, 인터루킨 2, 몬타니드 ISA-51 및 QS-21, CpG 올리고뉴클레오타이드, 폴리 I:C 및 GM-CSF로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. Hunter R, US 5,554,372, 및 Jager E, Knuth A, WO1997028816을 참조하라.

[0139] 본 발명에 따른 억제제들은 당업자에게 알려진 어떠한 방법들, 예를 들어 근육내, 피하내 또는 정맥내 주입 및 구강, 비강 또는 항문 투여에 의해 투여될 수 있다. Banga A, Parenteral controlled delivery of therapeutic peptides and proteins, "Therapeutic Peptides and Proteins" (Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, US, 1995)을 참조하라. 억제제가 효과를 나타내기에 이용가능한 시간을 연장하기 위해, 억제제는 임플란트, 오일 주입 또는 미립자(particulate) 시스템으로서 제공될 수 있다. 상기 미립자 시스템은 마이크로입자, 마이크로캡슐, 마이크로스피어, 나노캡슐, 또는 유사한 입자일 수 있다. 앞에서 인용된 Banga, 1995를 참조하라. 합성 폴리머에 기반된 미립자 담체는 조절된 방출을 제공하는 것 외에도 면역반응을 증진시키는 보조제로서 기능하는 것으로 알려졌다. 알루미늄 염류(salts)도 면역반응을 생산하는 보조제로서 이용될 수 있다.

[0140] 본 발명에 따른 억제제들은 살균제 조성물로서 제형화될 수 있다. 살균제 조성물은 정확한 투여량의 개체 투여에 적합한 단위 투여량(unit dosage) 형태로 제형화될 수 있다. 펠스 투여에서, 개시된 면역원을 포함하는 면역원성 조성물의 볼루스 투여가 제공된 후 시한(time-period)까지 어떠한 개시된 면역원이 상기 대상자에게 투여되지 않고, 이후 2차 볼루스 투여가 실시되었다. 억제제의 치료학적으로 유효한 양은 치료 과정 동안 단일 투여량 또는 복수의 투여량, 예를 들어 매일 투여될 수 있다. 특이적으로는, 개시된 면역원을 포함하는 면역원성 조성물의 펠스 투여량이 하루의 과정 동안, 한 주의 과정 동안, 또는 한 달의 과정 동안 투여된다. 살균제 조성물은 효과가 바람직하면(예컨대, HIV-1 감염의 감소된 사인, 증상 또는 실험적 결과들) 언제든지 투여될 수 있다. 일반적으로, 상기 투여량은 대상자에게 받아들여질 수 없는 독성을 나타내지 않고 질병의 증상 또는 사인들을 치료하거나 또는 개선시키기에 충분하다. 전신성 또는 국소적 투여가 사용될 수 있다.

[0141] 치료적 용도를 위해 효과적인 양은 병의 심각성 및 나이, 몸무게, 환자의 일반적인 상태, 및 다른 임상적 인자들에 따라 결정될 수 있다. 따라서, 적절한 치료 계획(treatment regimen)의 최종 결정은 주치의(attending clinician)에 의해 행해질 것이다. 전형적으로, 인 비트로에서 이용된 투여량은 약제학적 조성물의 인 시류 투여에 유용한 양에 대한 도움이 되는 가이드라인을 제공할 수 있고, 동물 모델은 특정 질환들의 치료를 위해 효과적인 투여량을 결정하는 데 이용될 수 있다. Gilman R, 등, Eds., "Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics", 8th Ed. (Pergamon Press, New York, NY, US, 1990), 및 Gennaro A, Ed., "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA, US, 1990)을 참조하라. 전형적으로, 억제제에 대한 투여량 범위는 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 몸무게부터 약 100 mg/kg 몸무게까지이다. 다른 적합한 범위는 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 몸무게부터 10 mg/kg 몸무게의 투여량을 포함한다. 하나의 예에서, 상기 투여량은 약 1.0 μg 내지 약 50 mg 이고, 예를 들어 대상자 당 1 mg 웨타이드 같이 1 μg 내지 1 mg 이다. 투여 일정은 대상자의 웨타이드에 대한 민감성(sensitivity) 및 질환의 템포(tempo) 같은 임상적 인자들에 따라 매일부터 매우 드물게 일 년에 한 번까지 다양할 수 있다. 따라서, 대상자는 개시된 치료 분자의 첫 번째 투여량을 받고 어떤 시간(들) 후에, 예컨대 최소 하루, 예컨대 최소 일주일 후에 두 번째 투여량(또는 더 많은 투여량들)을 받을 수 있다.

[0142] 본 명세서에서 개시된 약제학적 조성물은 투여량 단위에서 제조되어 투여될 수 있다. 고형 투여 단위는 정제, 캡슐, 경피전달시스템(transdermal delivery systems) 및 좌약을 포함한다. 치료량의 투여는 개체 투여량 단위 또는 다른 여러 더 작은 투여량 단위의 형태에서 단일 투여로 실시될 수 있고, 특정 간격에서 세분된 투여량들의 복수 투여에 의해서도 실시될 수 있다. 적합한 단일 또는 분리된 투여량은 약 0.01, 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 또는 50 μg 단백질/kg/하루를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0143] 치료 응용에 있어서, 상기 억제제의 치료학적으로 효과적인 양은 HIV에 대한 노출 또는 HIV에 의한 감염 전 또는 후에 대상자에게 투여된다. 노출 전에 투여되는 경우에, 상기 치료적 적용은 예방적(prophylactic) 투여(예컨대, 백신의 형태)로서 언급될 수 있다. 상기 조성물의 단일 또는 복수 투여는 상기 대상자에게 필요하고 견뎌질 수 있는 투여량 및 빈도에 의존하여 투여된다. 하나의 구현예에서, 상기 투여량은 볼루스로서 한번 투여되지만, 다른 구현예에서는 보호성 면역반응 같은 치료 결과가 달성될 때까지 주기적으로 적용될 수 있다. 일반적으로, 상기 투여량은 대상자에게 받아들여질 수 없는 독성을 나타내지 않고 질병의 증상 또는 사인들을 치료하거나 또는 개선시키기에 충분하다. 전신성 또는 국소적 투여가 이용될 수 있다.

[0144] 본 명세서에 개시된 살균제 조성물을 단백질, 웨타이드, 항체 및 다른 항-HIV 제제들 같은 다른 제제들과 투여

하는 것이 이로울 수 있다. 그러한 항-HIV 치료제의 예들은 아바카비르, AZT, 디다노신, 엠트리시타빈, 라미부딘, 스타부딘, 테노포비르, 잘시타빈 또는 지도부딘 같은 뉴클레오시드 역전사효소 억제제; 멜라비르딘, 에파비렌즈, 또는 네비라핀 같은 비-뉴클레오시드 역전사효소 억제제; 암프레나비르, 아타자나비르, 인디나비르, 로피나비르, 넬피나비르 오삼프레나비르(nelfinavir osamprenavir), 리토나비르, 사퀴나비르, 또는 티프라나비르 같은 프로테아제 억제제; 또는 엔푸비르티드(enfuvirtide) 같은 융합 단백질 억제제를 포함한다. 어떤 구현예들에서, 상기 억제제들은 다른 항-HIV 치료제들과 동시에 투여된다. 어떤 구현예들에서, 상기 면역원성 조성물들은 다른 항-HIV 치료제들과 순차적으로, 예컨대 다른 제제의 전 또는 후에 투여된다. 당업자는 순차적 투여가 즉시 실시하거나 또는 적절한 시간 기간 후, 예컨대 수시간, 수일, 수주, 수개월 또는 심지어 수년 후에 실시되는 것을 의미할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0145] 본 발명의 약제학적 조성물은 에어로졸, 거품, 스프레이, 페이스트(pastes), 젤, 젤리, 크림, 좌약, 정제, 폐서리(pessaries), 탐폰 또는 질내 고리 같은 장치를 포함하는 다수의 형태로 질에 적용될 수 있다. 상기 조성물들은 즉시 방출 또는 조절된 방출의 형태일 수 있다. 거품, 크림 및 젤이 선호되는 형태들이다. 질내 적용에 적합한 조성물들 및 이들의 제조방법은 당업계에 알려져 있다. Vickery B, 등, US 4,368,186, Gazzani G, US 4,371,518, Tice T, 등, US 4,389,330, Joyce C, 등, US 4,415,585, 및 Riley T, 등, US 4,551,148을 참조하라.

[0146] 특히 바람직한 구현예에서, 상기 약제학적 조성물은 질에 국소적으로 적용된다. 전형적으로 상기 국소 적용은 질을 통한 성교의 시작 전, 적합하게는 질을 통한 성교의 시작 전 0 내지 60분, 바람직하게는 0 내지 5분에 실시된다. 적용은 여성(female)의 질 내 및 질 주위, 그리고 질 부위(예를 들어, 대음순, 소음순, 클리토리스 같은 개체의 해부학적 부분들)에서 실시될 수 있다.

[0147] 당업계에 알려진 대로, 약제학적 크림은 오일-인-물(oil-in-water) 또는 물-인-오일 중 하나의 점성이 있는 액체 또는 반고형 애멸전이다. 크림 베이스는 수세가능한(water-washable) 오일 상, 유화제 및 수성 상을 포함한다. 때때로 "내부" 상("internal" phase)이라고도 불리는 오일 상은 일반적으로 바셀린(petrolatum) 및 세틸 또는 스테아릴 알코올 같은 지방 알코올로 구성된다; 반드시 필요로 되지는 않을 지라도 수성 상은 항상 부피 내 상기 오일 상을 초과하고 일반적으로 보습제(humectant)를 포함한다. 크림 제형에서 유화제는 일반적으로 비이온성, 음이온성, 양이온성 또는 양쪽성(amphoteric) 계면활성제이다.

[0148] 예를 들어, 적합한 운반체(vehicle) 베이스는 탄화수소 베이스 또는 유지성(oleaginous) 베이스, 흡수 베이스, 물-제거가능 베이스 및 물-용해성 베이스를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 구현예들에서, 상기 운반체 베이스는 비-자극적, 비-염색성, 안정적, 비-pH 의존적이고/하거나 본 발명에 따른 억제제들과 양립할 수 있다.

[0149] 담체가 고형인 직장 투여에 적합한 약제학적 제형은 단위 투여량 좌약들로 가장 바람직하게 제시된다. 적합한 담체는 코코아 버터 및 당업계에서 일반적으로 이용되는 다른 물질들을 포함한다. 통상적으로, 상기 좌약은 활성성분과 부드러워지거나 또는 녹여진 담체(들)의 혼합물(admixture)이 냉각 및 주형에서 성형됨에 따라 형성될 수 있다.

[0150] 다른 구현예에서, 본 발명은 항문으로의 조성물의 국부 투여를 포함한다. 항문으로 투여되는 조성물은 질 적용에 관해 상술한 바와 같이 적합하게는 거품, 크림 또는 젤리이다. 항문 적용의 경우에, 상기 조성물이 항문 전반에 걸쳐서 실질적으로 고르게 분포시키는 도포용 도구(applicator)를 이용하는 것이 바람직 할 수 있다. 예를 들어, 적합한 도포용 도구는 길이를 따라 규칙적으로 분포된 구멍(holes)을 가지는 2.5 cm 내지 25 cm 길이의 튜브, 바람직하게는 5 cm 내지 10 cm 길이의 튜브이다.

[0151] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 상기 약제학적 조성물을 구강으로 적용시켜 실시될 수 있다. 구강 적용은 적합하게는 구강 청결제 또는 가글의 형태인 조성물을 적용시켜 실시된다. 구강 적용은 치과의 치료 과정(dental procedure) 동안 감염을 예방하는 데 특히 바람직하다. 적합하게는, 상기 조성물은 치과의 치료 과정의 시작 바로 전에 적용되고 상기 과정 동안 주기적으로 적용된다. 구강 내 국부 투여에 적합한 제형들은 풍미성 베이스, 보통 수크로오스 및 아카시아 또는 트라가칸트(tragacanth)에 상기 활성 성분을 포함하는 로젠지 (lozenges); 젤라틴 및 글리세린 같은 불활성(inert) 베이스 또는 수그로오스 및 아카시아에 상기 활성 성분을 포함하는 파스틸(pastilles); 및 적합한 액체 담체에 상기 활성 성분을 포함하는 구강 청결제를 포함한다.

[0152] 상기 조성물이 좌약(질 좌약을 포함하는)의 형태인 경우, 상기 좌약이 주로 1 내지 5 그램, 바람직하게는 약 3 그램이고 좌약 전체가 적용될 것이라는 것이 주지된다. 질 정제는 적합하게는 1 내지 5 그램, 바람직하게는 약

2 그램이고 정제 전체가 적용될 것이다. 상기 조성물이 질 크림인 경우, 적합하게는 상기 크림의 0.1 내지 2 그램, 바람직하게는 약 0.5 그램이 적용될 것이다. 상기 조성물이 물-용해성 질 크림인 경우, 적합하게는 0.1 내지 2 그램, 바람직하게는 약 0.6 그램이 적용된다. 상기 조성물이 질 스프레이-거품인 경우, 적합하게는 상기 스프레이-거품의 0.1 내지 2 그램, 바람직하게는 약 0.5 그램이 적용된다. 상기 조성물이 항문 크림인 경우, 적합하게는 상기 크림의 0.1 내지 2 그램, 바람직하게는 약 0.5 그램이 적용된다. 상기 조성물이 항문 스프레이-거품인 경우, 적합하게는 상기 스프레이-거품의 0.1 내지 2 그램, 바람직하게는 약 0.5 그램이 적용된다. 상기 조성물이 구강 청결제 또는 가글인 경우, 적합하게는 1 내지 10 ml, 바람직하게는 약 5 ml이 적용된다.

[0153] 또한, 본 발명의 조성물은 시간-방출(time-release) 조성물의 형태일 수 있다. 이러한 구현예에서, 상기 억제제는 활성 성분의 효과적인 질 또는 항문 농도를 초래하는 속도로 상기 활성 성분을 방출하는 조성물 내에 삽입된다. Lew D, Ed., "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, NY, US 1981), Pfister J, 등., J. Contr. Rel. 1986; 3:229-233, Lance W, US 5,248,700, Behan J, 등, US 5,185,155, 및 Viegas T, 등, US 5,143,731을 참조하라.

[0154] 또한, 본 발명의 조성물은 질 또는 항문을 통한 성교 같은 어떤 이벤트에 대한 반응에서 본 발명의 억제제를 방출하는 형태일 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 성교의 기계적 행위(action)에 의해 파괴되는 운반체 또는 리포좀 내에 억제제를 포함할 수 있다. 리포좀을 포함하는 조성물은 당업계에 알려져 있다. Deamer D, Uster P, Liposome preparation: methods and mechanisms, Ostro M, Ed., "Liposomes" (Marcel Dekker Inc., New York, NY, US, 1983, pp. 27-51), Breimer D, Speiser P, Eds., "Topics in Pharmaceutical Sciences" Elsevier Science Publishers B.V., New York, NY, US, 1985, pp. 345-358), Sessa J, 등, J. Biol. Chem. 1970; 245:3295-3300, 및 Janoff A, 등, US 5,231,112를 참조하라.

[0155] 또한, 본 발명의 조성물은 자궁내 장치(intrauterine device, IUD), 질 격막, 질 링, 질 스폰지, 폐서리 또는 콘돔 같은 물품과 연관될 수 있다는 것이 이해될 수 있다. IUD 또는 격막의 경우에, 시간-방출 또는 기계적-방출 조성물이 선호될 수 있는 반면에, 콘돔의 경우, 기계적-방출 조성물이 선호된다.

[0156] 다른 구현예에서, 본 발명은 HIV 감염의 예방에 유용한 신규 장치들을 제공한다. 특히, 본 발명의 장치는 적절한 신체 부분(body part) 또는 체강(body cavity)에 위치되는 경우 상기 억제제를 방출하는 장치이다. 따라서, 본 발명은 억제제를 포함하거나 또는 이와 연관되어 있는 IUDs, 질 격막, 질 스폰지, 폐서리 또는 콘돔을 제공한다.

[0157] 따라서, 본 발명에 따른 장치는 하나 이상의 억제제들을 포함하는 IUD일 수 있다. Ramwell P, US 3,888,975 및 Berthet J, 등, US 4,283,325를 참조하라. 이러한 장치는 억제하는 화합물을 포함하고 시간-조절된 패션으로 이를 방출하는 질내 스폰지일 수 있다. Robinson T, US 3,916,898 및 Barrows T, US 4,360,013을 참조하라. 또한, 상기 장치는 억제제를 방출하는 질 디스펜서일 수 있다. Wong P, US 4,961,931을 참조하라.

[0158] 또한, 본 발명의 장치는 억제제로 코팅된 콘돔일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 콘돔은 윤활제 또는 억제제 및 살정제를 포함하는 투과 증진 제제로 코팅되고, 상기 살정제는 벤잘코니움 클로라이드, 벤제토니움 클로라이드, 세틸 피리디니움 클로라이드, 메틸벤제토니움 클로라이드, 테트라-데실트리메틸 암모니움 브로마이드, 벤잘코니움 브로마이드, 모닐페닐 에테르, 라우릴 에테르, 및 옥톡시놀로부터 자유롭게 선택된다. 하지만, 콘돔의 사용은 적절한 윤활성 제제(즉, 콘돔의 기계적 강도 특성을 분해시키지 않고 공격받는 라텍스로 인해 라텍스의 다공성이 증가되지 않는 윤활성 제제)의 이용과 연관되는 것이 추천된다. 예를 들어, EP-A-0 457 127은 콘돔의 라텍스를 처리하기 위한 실리콘 오일에 기반된 윤활제를 기술하고 있고, EP-A-0 475 664는 윤활성 조성물 및 이의 콘돔과의 사용을 기재하고 있으며, FR-A-2 666 587은 폴리디메틸실록세인을 포함하는 윤활제를 기재하고 있다. 다른 윤활제 및 투과 증진 제제의 조성물 및 제조는 당업계에 알려져 있다. Copper E, US 4,557,934, Cooper E, US 4,954,487; James M, 등, US 4,499,154, 및 Kelly P, US 5,208,031을 참조하라.

[0159] 3. 시알로어드히신의 억제제들을 이용한 본 발명의 치료 방법.

[0160] 본 발명은 DCs 같은 여러 가지 면역계 세포들의 표면에 위치된 세포 부착 단백질인 시알로어드히신(CD169, 시글렉-1)이 HIV-1 표면에 존재하는 시알릴락토오스 분자에 부착하여 mDCs에 의한 바이러스 섭취를 가능하게 한다는 것을 개시한다. 따라서, 세포 내로의 HIV-1 침투를 예방하여 결과적으로 mDCs에 의한 CD4+ T 세포의 트랜스-감염을 차단시켜 HIV의 전파를 예방하기 위해 세포에서 시알로어드히신의 발현을 감소시키는 것이 이용될 수

있다. 이것은 시알로어드히신-특이적 shRNA를 이용하여 DC에서 시알로어드히신 발현을 사일런싱시키는 것이 시알로어드히신의 발현 상의 현저한 감소 및 상기 세포에 의한 시알릴락토오스-포함 강글리오시드를 포함하는 VLPs의 포획의 상실로 이어진다는 것을 보이는 본 발명의 실시예 7에서 예로서 제시된다. 따라서, 다른 양태에서, 본 발명은 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 시알로어드히신 억제제에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 관계된 질병의 치료를 위한 의약품의 제조를 위한 시알로어드히신 억제제의 용도에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 대상자에서 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 관계된 질병의 치료 또는 예방을 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상자에게 시알로어드히신 억제제를 투여하는 것을 포함한다.

[0161] 일부 구현예들에서, 상기 시알로어드히신 억제제는 시알로어드히신에 특이적인 간섭하는 RNA 또는 그러한 간섭하는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 백터이다.

[0162] 일부 구현예들에서, 상기 시알로어드히신 억제제는 시알로어드히신-특이적 siRNA이다. 상기 siRNA는 화학적으로 합성될 수 있거나 또는 인 비트로 전사를 통해 얻어질 수 있다. 전형적으로, siRNA는 15 내지 40개의 뉴클레오타이드 길이를 가지는 이중 RNA 가닥으로 구성되고 1 내지 6개의 뉴클레오타이드의 3' 및/또는 5' 오버행 부위(overhanging region)를 포함할 수 있다. 상기 오버행 부위의 길이는 상기 siRNA 분자의 총 길이와 무관하다. 본 발명의 siRNA는 시알로어드히신 mRNA의 전-선택된 부위와 실질적으로 상동적이다. 상기 간섭을 야기하기에 적합한 siRNAs는 RNA에 의해 형성된 siRNAs 뿐 아니라 다음과 같은 다른 화학적 변형을 포함하는 siRNAs를 포함한다:

[0163] - 뉴클레오타이드들 간의 결합이 포스포로티오에이트 결합 같은 천연에서 일어나는 결합들과 다른 siRNAs,

[0164] - siRNA 가닥의 형광단(fluorophore) 같은 기능성 시약과의 컨쥬게이트,

[0165] - 2' 위치의 하이드록시에서 다른 작용기들로의 변형을 통한 siRNA 가닥들의 말단, 특히 3' 말단의 변형들,

[0166] - 2' 위치에서 0-알킬화된 모이어티 같은 변형된 당들, 예컨대 2' -0-메틸리보오스 p 2' -0-플루오로리보오스를 가지는 뉴클레오타이드들,

[0167] - 할로겐화된 염기(예를 들어, 5-브로모우라실 및 5-이오도우라실), 알킬화된 염기(예를 들어, 7-메틸구아노신) 같은 변형된 염기들을 가지는 뉴클레오타이드들.

[0168] 본 발명의 siRNAs는 당업자에게 잘 알려진 일련의 기술들을 이용하여 얻어질 수 있다. 예를 들어, siRNA는 종래의 DNA/RNA 합성기(synthesizer)에서 포스포아미다이트로 보호된 리보뉴클레오타이드들로 시작하여 화학적으로 합성될 수 있다.

[0169] 다른 구현예에서, 상기 시알로어드히신 억제제는 shRNA(짧은 헤어핀 RNA)이다. 전형적으로, shRNAs는 짧은 안티센스 서열(19 내지 25개의 뉴클레오타이드를 가짐), 이후 5 내지 9개의 뉴클레오타이드로 이루어진 루프, 그리고 센스 가닥으로 구성된다. shRNAs는 종래의 DNA/RNA 합성기에서 포스포아미다이트로 보호된 리보뉴클레오타이드들로부터 화학적으로 합성되거나 또는 인 비트로 전사에 의해 폴리뉴클레오타이드로부터 얻어질 수 있다. shRNAs는 이전에 기술되었던 대로 상기 헤어핀 부위를 제거하여 siRNAs를 발생시키는 RNase 다이서(Dicer)에 의해 세포 내부에서 프로세싱된다. 또한, shRNAs는 이전 siRNAs의 경우에 기재되었던 대로 독특한 화학적 변형들을 포함할 수 있다.

[0170] 다른 구현예에서, 상기 시알로어드히신 억제제는 miRNA이다. 본 발명에서 miRNAs를 사용하기에 적합한 miRNAs는 19 내지 약 24개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 21 또는 22개의 뉴클레오타이드들로 구성된다. miRNAs는 높은 정도의 특이성으로 RNA 전사체(transcript)에 혼성화할 정도로 고안될 수 있다. miRNA 가닥 내 위치에 따라 오직 하나의 비-상보적인 뉴클레오타이드가 억제 레벨을 감소시킨다는 것을 고려할 때 miRNA는 타겟 mRNA와 바람직하게는 100% 동일성 또는 실질적인 동일성(즉, 최소 1, 최소 2, 최소 3 또는 이상의 미스매치들)을 나타내도록 디자인된다. miRNAs는 타겟 mRNA의 비-번역된 5' 부위, 인코딩 부위 또는 3' 부위를 타겟하도록 디자인될 수 있다.

[0171] 전형적으로, miRNA의 효과적인 프로세싱 및 기능화(functioning)는 Zeng 등(RNA, 2003, 9:112-123)에 의해 기재된 것처럼 특정 구조적 요건(requirements)을 가지는 경우에만 가능하다. 바람직하게는, 본 발명의 miRNAs는 스템 부위가 전-선택된 mRNAs의 타겟 서열들로 대체된 mirR-30 구조에 기반된다. 바람직 할지라도, 루프 부위 내

miR-30의 존재가 절대적으로 필요한 것은 아닌데, 왜냐하면 루프 부위가 miR-30에서 나타나는 루프 서열에 대한 70% 이상, 바람직하게는 79% 이상, 보다 더 바람직하게는 86%, 그리고 보다 더 바람직하게는 93% 동일성을 가지는 정도의 어떤 변이들을 miR-30이 견딜 수 있기 때문이다. 동일성 퍼센트의 결정은 상기 언급된 방법들 중 어느 하나를 이용하여 결정될 수 있다.

[0172] 다른 구현예에서, 상기 시알로어드히신 억제제는 시알로어드히신-특이적 siRNA, shRNA 또는 miRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드이다. shRNA 또는 miRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드들의 경우, 상기 폴리뉴클레오타이드들은 헤어핀 또는 스템-루프 부위에 의해 연결된 shRNAs 또는 miRNAs의 센스 및 안티센스 가닥들로 구성된 서열을 포함한다. siRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드들의 경우, 상기 폴리뉴클레오타이드들은 2개의 전사 단위들(transcriptional units)로 구성되며, 각각은 siRNA 내 형성된 가닥들(센스 및 안티센스) 중 하나의 전사를 조절하는 프로모터에 의해 형성된다. siRNAs를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드들은 수렴성(convergent) 또는 분기성(divergent) 전사 단위를 포함할 수 있다. 분기성 전사 폴리뉴클레오타이드들에 있어서, siRNA를 형성하는 각 DNA 가닥들을 인코딩하는 전사 단위들은 폴리뉴클레오타이드 내에 나란히 위치하여 동일 또는 다를 수 있는 각 DNA 가닥의 전사가 각자의 프로모터에 의존한다(Wang, J. et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:5103-5106 and Lee, N.S., et al., 2002, Nat. Biotechnol., 20:500-505). 수렴성 전사 폴리뉴클레오타이드들에서, siRNAs를 발생시키는 DNA 부위들이 2개의 역방향(inverted) 프로모터들에 의해 플랭킹된 센스 및 안티센스 가닥들의 DNA 부위를 형성한다. 상기 센스 및 안티센스 RNA 가닥들의 전사 후, 그들은 기능적 siRNA에 해당하는 하이브리드를 형성할 것이다.

[0173] 원칙적으로, 프로모터가 siRNAs이 발현될 세포와 양립할 수 있다면, 어떠한 프로모터도 shRNAs, miRNAs 및 siRNAs의 발현에 이용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 시알로어드히신-특이적 siRNA, shRNA 또는 miRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 CD11c 프로모터, DC-STAMP 프로모터 및 파신(fascin) 프로모터 같은 수지상세포에 대해 특이적인 프로모터를 포함한다. 역방향 전사 단위를 포함하는 상기 폴리뉴클레오타이드들에 적합한 다른 프로모터 조합들은 2 U6 프로모터들(Tran, N. et al., 2003, BMC Biotechnol., 3:21), 마우스 U6 프로모터와 인간 H1 프로모터(Zheng, L., et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:135-140 and WO2005026322) 그리고 인간 U6 프로모터와 마우스 H1 프로모터(Kaykas, A. & Moon, R., 2004, BMC Cell Biol., 5:16)를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 상기 센스 및 안티센스 siRNA 가닥들은 다른 프로모터들에 의해 조절된다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 양 전사 단위들은 수렴적으로 오리엔테이션된다.

[0174] 일부 구현예들에서, 상기 시알로어드히신 억제제는 시알로어드히신에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

[0175] 안티센스 컨스트럭트들은 상기 시알로어드히신 유전자의 프로모터 및 다른 조절 부위, 엑손, 인트론 또는 심지어 엑손-인트론 경계들에 결합하도록 디자인될 수 있다. 안티센스 RNA 컨스트럭트들, 또는 그러한 안티센스 RNAs를 인코딩하는 DNA는 숙주세포, 예를 들어 인간 대상자를 포함하는 숙주 동물 내에서 유전자 전사 또는 번역, 또는 모두를 인 비트로 또는 인 비보에서 억제시키는 데 이용될 수 있다. "상보적인 뉴클레오타이드(complementary nucleotides)"를 포함하는 핵산 서열들은 표준 왓슨-크릭 상보적 규칙에 따른 염기-쌍(base-pairing)을 이를 수 있는 서열들이다. 즉, 더 큰 퓨린은 더 작은 피리미딘과 염기 쌍을 이루어 시토신과 쌍을 이룬 구아닌(G:C) 및 DNA의 경우에는 티민과 쌍을 이룬 아데닌(A:T), 또는 RNA의 경우에는 우라실과 쌍을 이룬 우라실(A:U)의 조합만을 형성할 것이다.

[0176] 유전자 서열의 전체 또는 일부가 안티센스 구축의 상황(context)에서 이용될 수 있지만, 통계학적으로 17개의 염기 길이를 가지는 어떠한 서열이 인간 게놈에서 꼭 한번만 발생함으로 인해, 유일한 타겟 서열을 특화시키기에 충분할 것이다. 비록 더 짧은 올리고머들이 제조하고 인 비보 접근성(accessibility)을 증가시키기 더 용이 할 지라도, 많은 다른 인자들이 혼성화의 특이성을 결정하는 데 포함된다. 상보적인 타겟에 대한 올리고뉴클레오타이드의 결합 친화도 및 서열 특이성은 모두 증가하는 길이와 함께 증가한다. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 이상의 염기쌍들의 올리고뉴클레오타이드들이 이용될 것이 고려된다. 한 사람(one)은 단지 내인성 유전자의 기능에 영향을 주는지 또는 상보적 서열들을 가지는 관계된 유전자들의 발현이 영향을 받는지를 결정하기 위해 인 비트로에서 상기 컨스트럭트를 테스팅함으로써, 주어진 안티센스 핵산이 효과적으로 상응하는 숙주세포 유전자의 타겟팅에 효과적인지를 손쉽게 결정할 수 있다.

[0177] 어떤 구현예들에서, 한 사람(one)은 다른 엘리먼트들을 포함하는 안티센스 컨스트럭트들, 예를 들어 C-5 프로핀(propyne) 피리미딘을 포함하는 안티센스 컨스트럭트를 이용하기를 원할 수 있다. 우리딘 및 시티딘의 C-5 프로핀 유사체들을 포함하는 올리고뉴클레오타이드들은 높은 친화도를 가지고 RNA에 결합하고 유전자 발현의 강력한

안티센스 억제제들인 것으로 밝혀졌다(Wagner et al., Science, 260:1510–1513, 1993, 본 명세서에 참조로서 삽입됨).

[0178] 일부 구현예들에서, 상기 시알로어드히신 억제제는 시알로어드히신에 특이적인 타겟팅된 리보자임이다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 리보자임은 식물 비로이드로부터 유래된 작은 RNA 분자인 망치머리형 리보자임(Symons, Ann. Rev. Biochem. 61: 641-671, 1992; Clouet-D'Orval and Uhlenbeck, RNA, 2:483-491, 1996; Haseloff and Gerlach, Nature 334:585-591, 1988; Jeffries and Symons, Nucleic Acids Res. 17: 1371-1377, 1989; Uhlenbeck, Nature 328:596-600, 1987; 모든 문헌이 본 명세서에 참조로서 삽입됨)이다. 다른 구현예들에서, 상기 리보자임은 그룹 I 인트론, 헤어핀 리보자임, VS RNA, 간염 엘타 바이러스 리보자임 또는 Rnase P-RNA 리보자임(RNA 가이드 서열과 공동으로)일 수 있다. 헤어핀 모티프의 예들은 Hampel 등, Nucleic Acids Res. 18:299, 1990 및 Hampel and Tritz, Biochemistry 28:4929, 1989에 기재되어 있다; 간염 엘타 바이러스 모티프의 예는 Perrotta and Been, Biochemistry 31:16, 1992에 의해 기재되어 있다; RNaseP 모티프(외부 가이드 서열과 연관된)의 예는 Yuan 등(미국특허 번호 제5,624,824호)에 의해 기술되어 있다; 뉴로스포라 VS RNA 리보자임은 Saville and Collins, Cell 61: 685-696, 1990, Saville and Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8826-8830, 1991, Collins and Olive, Biochemistry 32: 2795-2799, 1993에 기재되어 있다; 그룹 I 인트론은 Cech 등, 미국특허 번호 제5,354,855호에 기재되어 있다. 상기-언급된 모티프들은 본 발명에 관해 제한하는 것으로 고려되지 않으며, 당업자는 본 명세서에서 이용될 수 있는 리보임들이 타겟 mRNA에 상보적인 특이적 기질 결합 위치를 포함한다는 것을 인식할 것이다. 또한, 그러한 리보자임들은 분자로부터 RNA 절단 활성을 가하는 효소적 부분(portion)을 포함한다. 상기 효소적 부분은 상기 기질 결합 위치 내 또는 주위에 위치한다.

[0179] 시알로어드히신 억제제들을 이용하는 본 발명에 따라 치료 및/또는 예방될 수 있는 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병들은 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간의 상호작용 억제제를 이용하는 방법의 맥락에서 상기 언급된 질병들 중 어떠한 것을 포함한다.

[0180] 일부 구현예들에서, 외피 바이러스에 의해 야기되는 감염과 연관된 질병들은 타입 I 필로비리대 바이러스, 오르토믹소비리대 바이러스, 파라믹소비리대 바이러스, 랍도비리대 바이러스, 보르나비리대 바이러스, 분야비리대 바이러스, 아레나비리대 바이러스, 아르보바이러스, 플라비비리대 바이러스, 헤파시바이러스, 헤니파바이러스, 레트로비리대에 속하는 바이러스에 의해 야기되는 질병이다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 오르토레트로바이러스 서브페밀리에 속하는 바이러스이다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 렌티바이러스 속에 속한다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 영장류 렌티바이러스이고, 특히 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 유인원 면역결핍 바이러스(SIV)이다.

[0181] 일부 구현예들에서, 상기 시알로어드히신 억제제는 하나 이상의 추가적인 항-HIV제 또는 제제들과 병용하여 이용될 수 있다. 상술한 추가적인 화합물은 본 발명의 화합물들 또는 예를 들어 HIV 감염의 증상들을 치료, 예방 또는 감소시키는 것으로 알려진 상업적으로 이용가능한 화합물들을 같은 화합물들을 포함할 수 있다. 적합한 항-HIV제는 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제를 이용하는 본 발명의 방법의 맥락에서 기재된 제제들이다.

[0182] 일부 구현예들에서, 상기 시알로어드히신 억제제는 항감염 제제와 병용하여 사용될 수 있다. 일부 구현예들에서, 상기 시알로어드히신 억제제는 면역조절제와 병용하여 사용될 수 있다.

[0183] 적합한 약제학적 담체, 투여 경로, 제형 및 투여량 계획은 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제를 이용하는 본 발명의 방법의 맥락에서 상세하게 기재되었고 본 발명의 방법들에 동일하게 적용가능하다.

[0184] 4. 본 발명의 조성물 및 이의 치료 용도들

[0185] 본 발명은 수지상세포에 의한 HIV의 흡수에 관한 것이다. 이러한 흡수는 바이러스 외피에서 발견되는 강글리오시드와 수지상세포의 표면에 존재하는 CD169 간의 상호작용을 필요로 하는 것을 밝혀졌다. 내재화된 바이러스는 프로세싱되어 상기 수지상세포의 표면에 제시됨에 따라 적응성 면역반응을 유도하거나 또는 CD4+ T 세포로 전달될 수 있다. 따라서, 목적 항원(antigen of interest), 및 바이러스 외피 위의 강글리오시드와 CD169 간의 상호작용에 대한 억제제가 로딩된 수지상세포를 포함하는 조성물을 제공함으로써, HIV를 내재화시켜 이들의 능력을 차단하고 CD4+ T 세포로의 트랜스-감염을 촉진시키는 동안 수지상세포가 적응성 면역반응의 발생에 기여하도록 하는 것이 가능할 것이다. 따라서, 다른 양태에서, 본 발명은 항원-로딩된 항원-제시 세포, 그리고 시알로어드

허신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제를 포함하는 조성물 또는 부품 키트에 관한 것이다.

[0186] 본 발명에 적합한 수지상세포는 다른 타입에 속할 수 있으며, 예를 들어 골수성 DCs(myeloid DCs, myDCs), 형질세포양 DCs(plasmacytoid DCs, pDCs), 랑게르ハン스 세포 및 사이질(insterstitial) 수지상세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 강력한 전문적 APCs는 골수 기원의 DCs이다. 따라서, 바람직한 구현예에서 DCs는 골수성 DCs이다.

[0187] 수지상세포 전구체 및/또는 수지상세포를 포함하는 시작 세포군(starting cell populations)을 얻기 위해, 수지상세포 전구체 또는 수지상세포를 포함하는 세포, 조직 또는 기관의 시료들이 당업계에 알려진 방법들을 이용하여 하나 이상의 대상자로부터 분리되었다. 그러한 시작 세포군들은 하나 이상의 공여체들로부터 풀링될 수 있다.

[0188] 하나의 구현예에서, 수지상세포 또는 수지상세포 전구체들을 포함하는 시작 개체군은 비장 조직으로부터 유래된다. 하나의 구현예에서, 수지상세포 또는 수지상세포 전구체들을 포함하는 시작 세포군은 흉선 조직으로부터 유래된다. 하나의 구현예에서, 수지상세포 또는 수지상세포 전구체들을 포함하는 시작 세포군은 골수로부터 유래된다. 하나의 구현예에서, 수지상세포 또는 수지상세포 전구체들을 포함하는 시작 세포군은 말초 혈액(예를 들어, 총 혈액)으로부터 유래되거나 백혈구성분채집술(leukopheresis)을 이용하여 얻어진다. 하나의 구현예에서, 시작 세포군은 수지상세포 전구체를 포함한다. 하나의 구현예에서, 수지상세포 전구체를 포함하는 세포의 군(population)은 당업계에 잘 알려져 있는 표준 단핵세포 백혈구성분채집술(leukopheresis)을 이용하여 말초 혈액으로부터 수득될 수 있다. 이후, 수지상세포 전구체가 모아질 수 있다(예컨대, 순차적 부력밀도 원심분리 단계들을 이용). 예를 들어, 백혈구성분채집술 산물은 부력밀도 용액에서 층을 이룰 수 있고(특정 중력 = 1.077 g/mL), 1,000 g에서 20분 동안 원심분리시켜 적혈구 및 과립구를 제거할 수 있다. 인터페이스 세포들이 수거되어 세척된 후 2차 부력밀도 용액에서 층화되었으며(특정 중력 = 1.065 g/mL), 805 g에서 30분 동안 원심분리시켜 혈소판 및 저-밀도 단핵구 및 백혈구들을 제거하였다. 결과적인 세포 펠렛은 수지상세포 전구체들에 대해 풍부화되어 있다.

[0189] 다른 구현예에서, 수지상세포를 포함하는 시작 세포군은 당업계에 알려진 방법들을 이용하여 얻어질 수 있다. 그러한 군은 골수성 수지상세포, 형질세포양 수지상세포 또는 단핵구로부터 배양 중에 발생되는 수지상세포(예를 들어, MO-DCs, MDDCs)를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 수지상세포 또는 수지상세포 전구체들은 그러한 세포들을 포함하는 혼합된 세포군(예를 들어, 순환계(circulation), 또는 조직 또는 기관)으로부터도 유래될 수 있다. 어떤 구현예들에서, DCs 또는 수지상세포 전구체들을 포함하는 상기 혼합된 세포군은 DCs 또는 수지상세포 전구체들이 상기 세포군의 50% 이상(예컨대, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 이상)을 구성할 정도로 풍부화된다. 일부 구현예들에서, 본 명세서에 기재된 수지상세포는 세포군에서 일부 또는 모든 비-수지상세포들로부터 분리시켜 정제된다. 예시적인 구현예들에서, 세포는 수지상세포 또는 수지상세포 전구체들을 포함하는 시작 군이 정제되어 최소 50% 이상의 수지상세포 또는 수지상세포 전구체들(예컨대, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 이상의 순도)을 포함한다.

[0190] 하나의 구현예에서, 수지상세포는 당업계에 알려진 기술들을 이용하여 분리될 수 있다. Inaba K, 등, Curr. Protoc. Immunol. 2009; 86:3.7.1-3.7.19 및 Woo J, 등, Transplantation 1994; 58:484-4914를 참조하라. 당업자는 과도한 실험의 실행 없이 수지상세포 또는 수지상세포 전구체들을 포함하는 세포들을 분리하는 상술한 방법들에 변형을 실시할 수 있다. 하나의 구현예에서, 수지상세포는 이의 표면에 존재하는 항원들에 대한 형광-활성화된 세포 분류를 이용하여 정제될 수 있다(예를 들어, 특정 수지상세포들의 경우에 CD11c). 하나의 구현예에서, 시작 세포군에 존재하는 DCs는 CD11c를 발현한다. 다른 구현예에서, 시작 세포군에 존재하는 DCs 또는 수지상세포 전구체는 클래스 II 분자들을 발현한다. 시작 세포군은 당업계에 알려진 기술들을 이용하여 다양한 세포 표면 마커들(예컨대, CD11c 포함)의 발현에 대해 모니터링될 수 있다.

[0191] 다른 구현예에서, 수지상세포 및/또는 수지상세포 전구체들을 포함하는 세포군은 PBMCs 같은 혈액에 존재하는 다능성세포(pluripotential cells)로부터 얻어질 수 있다. 비록 혈액으로부터 가장 용이하게 얻을 수 있을지도, 상기 다능성세포들은 이들이 존재하는 골수 및 비장 조직을 포함하는 어떠한 조직으로부터도 얻을 수 있다. 전형적으로, 상술한 다능성세포들은 CD83, p55 또는 CD40 및 CD86 같은 보조분자들의 낮은 발현 또는 발현 부재와 함께 CD14, CD32, CD68 및 CD115 단핵구 마커들을 발현한다.

[0192] 하나의 구현예에서, 수지상세포 전구체들은 유도된 관용원(tolerogenic) 수지상세포 또는 유도된 면역원 수지상세포를 제조하기 위한 프로토콜에서 최소 하나의 제제의 처리 전, 처리 동안 또는 처리 후에 당업계에서 알려진

방법들을 이용하여 수지상세포로 분화될 수 있다. 예를 들어, GM-CSF와 IL-4 또는 IL-13의 조합 같은 사이토카인의 존재 하에서 배양되는 경우, 상기 다능성세포는 미성숙한 수지상세포를 발생시킨다. 다른 구현예에서, FLT3 리간드는 이러한 목적을 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 구현예에서 수지상세포 또는 수지상세포 전구체들을 포함하는 시작 세포군은 DCs의 분화를 촉진시키는 하나 이상의 제제들의 존재 하에서 엑스 비보로 배양될 수 있다. 하나의 구현예에서, 하나 이상의 GM-CSF 또는 IL-4가 엑스 비보에서 DCs의 발생을 촉진시키는데 이용된다(예컨대, 1-15일, 2-10일, 3-9일, 4-8일, 또는 5-6일 또는 충분한 분화를 거치는 그러한 다른 시간 동안 배양). 하나의 구현예에서, 유도된 수지상세포들은 완전히 분화된다(유도된 관용원성 수지상세포 또는 유도된 면역원성 수지상세포를 생산하기 위한 유도 전, 유도 동안 또는 유도 후 중 어느 하나에서).

[0193] 다른 구현예에서, DCs 또는 DC 전구체들을 포함하는 시작 세포군은 PBMCs로부터 얻어질 수 있다. 적합한 배지를 통한 분별 침강 같은 방법(예를 들어, Ficoll-Hypaque™, Pharmacia Biotech, Uppsala, SE)을 이용하여 혈액으로부터 PBMCs를 얻는 방법들은 잘 알려져 있으며, 본 발명에서 사용하기에 적합하다. 본 발명의 바람직한 구현 예에서, 상기 다능성세포는 혈소판의 PBMCs 및 T 및 B 림프구들의 개체군들을 제거함으로써 얻어진다. 비-다능성세포들의 제거를 달성하기 위해 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 하나의 방법에 따르면, 제거될 세포(예컨대, T 또는 B 림프구)에 특이적인 항체로 표지된 면역자성 비드들이 BPMC 개체군으로부터 T 또는 B 세포를 제거하기 위해 직접적이거나 또는 간접적으로 사용될 수 있다. 또한, T 세포는 뉴라미미다제 처리된 적혈구 세포들로부터 로젯팅(rosetting)시킴으로써 PBMC 개체군으로부터 제거될 수 있다. O'Doherty U, 등, J. Exp. Med. 1993; 178:1067-1078을 참조하라.

[0194] 앞에서 설명된 대로, 미성숙 수지상세포의 배양은 원하는 레벨의 분화를 달성하기에 충분한 시간(예컨대, 1-10일, 2-9일, 3-8일, 또는 4-7일로부터) 동안 상기 세포의 분화를 촉진시키는 사이토카인의 존재 하에서 다능성 세포를 배양함으로써 얻어질 수 있다. 하나의 예로서, 각각 약 200 내지 약 2000 U/ml의 농도, 약 500 내지 1000 U/ml의 농도, 또는 약 800 U/ml(GM-CSF) 및 1000 U/ml(IL-4)의 농도에서 GM-CSF 및 IL-4의 조합이 미성숙 수지상세포들의 유의한 양을 생산한다. 또한, GM-CSF(10-200 ng/ml) 및 IL-4(5-50 ng/ml)도 사용될 수 있다. 또한, 신규하게 배양된 세포들이 확립된 배양(배양 2일 후에 500 U/ml IL-4)보다 더 높은 농도의 IL-4(1000 U/ml)의 존재 하에서 배양되는 것과 같이 배양의 다른 단계들에서 사이토카인의 농도를 다양하게 하는 것도 바람직할 수 있다. IL-13 같은 다른 사이토카인들이 IL-4를 대체하는 것이 가능할 수 있다. 다른 구현예에서, FLT3 리간드는 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위한 다른 프로토콜들이 당업계에서 알려져 있다.

[0195] 부착성 혈액 단핵구 분획들로부터 상술한 미성숙 수지상세포를 얻는 방법들이 당업계에 알려져 있다. Romani N, 등, J. Exp. Med. 1994; 180(1):83-93 및 Sallusto F, Lanzavecchia A, J. Exp. Med. 1994; 179:1109-1118를 참조하라. 간략하게는, 림프구 제거된 PBMCs이 GM-CSF 및 IL-4 같은 사이토카인을 각각 약 800 내지 1000 U/ml의 농도로 포함하는 완전 배양 배지에서 약 1백만 세포/cm²의 밀도로 조직 배양 플레이트에 플레이팅되고, IL-4는 약 1000 U/ml로 존재한다. 미성숙 수지상세포의 다른 소스(source)는 증식하는 수지상세포 전구체들의 배양 액이다. Steinman R, 등, WO1993020185을 참조하라. 성숙한 특징을 발현하는 수지상세포로 성숙되는 CD34⁺ 증식 전구체들로부터 수지상세포들이 제조되었기 때문에, 상기 수지상세포들은 다능성인 발생 단계도 거치는 것으로 보인다.

[0196] 하나의 구현예에서, 수지상세포들을 포함하는 시작 세포군은 미성숙 수지상세포들을 수지상세포 성숙 인자(dendritic cell maturation factor)와 접촉시킴으로써 성숙한 수지상세포들의 존재를 위해 풍부화될 수 있다. 본 명세서에서 언급되는 대로, 상기 수지상세포 성숙 인자는 미성숙 수지상세포의 성숙을 야기하기 위해 단독으로 또는 다른 제제, 예를 들어 하나 이상의 보조제, TLR 아고니스트, CD40 아고니스트, 인플라마좀(inflammasome) 활성인자, 염증성 사이토카인 또는 이들의 조합과 함께 기능하는 실질적으로 하나 이상의 특이적 물질일 수 있다.

[0197] 수지상세포들은 기본적으로 PBMCs의 부착이 허용되는 배양 병에 상기 세포들을 분주하는 것으로 구성된 프로토콜을 이용하여 말초 혈액 단핵세포들(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)로부터 인 비트로에서 제조될 수 있다. 이후, 세포에 인터루킨 4(IL4) 및 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)를 처리하여 미성숙 수지상세포(immature dendritic cells, iDCs)로의 분화를 약 1주 동안 유도시킨다. 선택적으로, 상기 세포들은 종양괴사인자 알파(tumor necrosis factor alpha, TNF α)로 처리함으로써 성숙될 수 있다.

[0198] 수지상세포들은 많은 적합한 소스들로부터 표준 방법들을 이용하여 얻어질 수 있다. 수지상세포들의 분리를 위

한 상기 소스들은 말초 혈액, 척수, 종양-침윤성 세포, 종양주위 조직-침윤성 세포, 램프절의 생검, 흉선, 비장, 피부, 제대혈액, 말초 혈액으로부터 얻어진 단핵구, 말초 혈액으로부터 얻어진 CD34- 또는 CD14-양성 세포 뿐 아니라 다른 적합한 어떠한 조직 또는 유체(fluid)를 포함한다.

[0199] 선택적으로, 수지상세포의 안정적 세포 배양들이 이용될 수 있다. 예를 들어, 수지상-유사 세포/종양 세포 하이브리도마들 및 다수의 수지상-유사 세포/종양 세포 하이브리드들이 이용될 수 있다. Falo L, 등., EP 1168924를 참조하라. 상술한 하이브리드 및 하이브리도마들은 수지상-유사 세포들과 종양 세포들의 융합을 통해 제조된다. 예를 들어, 자가(autologous) 종양세포주로부터 얻어진 불사의 종양세포들이 자가 HLA-매칭되는 타인 유래 동종(allogenic) 수지상-유사 세포들과 융합될 수 있다. 상기 자가 종양세포주는 1차 종양 및 이들의 전이체로부터 얻어질 수 있다. 택일적으로, 자가 또는 이종 HLA-매칭된 수지상-유사 세포주가 자가 종양세포들과 융합될 수 있다. Fitzpatrick D, 등., WO2002048167을 참조하라. 이용될 수 있는 다른 세포주는 CB1이다. Paglia P, 등., J. Exp. Med. 1993; 178:1893-1901을 참조하라.

[0200] 본 발명에 따른 조성물의 항원-로딩된 수지상세포는 바이러스 면역원을 세포에 필성하기에 적합한 조건 하에서 수지상세포 제조물을 소망된 항원을 포함하는 면역원성 조성물과 접촉시킴으로써 제조된다.

[0201] 본 명세서에서 고려된 대로, 본 발명은 면역반응을 촉진시키는 APC 내로의 로딩에 적합한 어떠한 항원의 이용을 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 미생물 항원들이 이용될 수 있다. 예를 들어, 상기 항원성 분자는 바이러스 항원, 박테리아 항원, 곰팡이 항원, 종양 항원, 배아성 항원, 암유전자 및 돌연변이된 종양-억제된 유전자들의 항원, 염색체 전좌를 초래하는 독특한 종양 항원 또는 이의 유도체들일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 항원성 폴리펩타이드가 바이러스 항원, 박테리아 항원, 곰팡이 항원, 원생동물성(protozoal) 항원, 알레르겐 또는 환경성 항원, 분화 항원 또는 종양 항원의 면역원성 단편인 것이 가능하다. 적합한 항원들의 예는 다음을 포함한다:

[0202] 1) 바이러스 항원들: 바이러스에 대한 면역반응을 촉발할 수 있는 바이러스 항원들은 동물 및 인간 레트로- 및 렌티바이러스 항원들로, HIV-1 항원들 즉 HIV-1 항원들(예를 들어, tat, nef, gp120 or gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev) 또는 IE(Immediate Early) 단백질(예를 들어, HSV1 또는 HSV2로부터 유래하는 ICP27, ICP47, ICP4, ICP36), B형 간염 바이러스(예를 들어, B형 간염 표면 항원 또는 간염 코어 항원), C형 간염 바이러스(예를 들어, 코어, E1, NS3 또는 NS5 항원), 파라믹소바이러스(예를 들어, F 및 G 단백질 또는 이의 유도체 같은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV))로부터 유래된 항원들, 파라인플루엔자 바이러스로부터 유래된 항원들, 루벨라 바이러스(예를 들어, 단백질 E1 및 E2), 홍역 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 인간 파필로마 바이러스(예를 들어, HPV6, 11, 16, 18, eg LI, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), 플라비바이러스(예를 들어, 황열 바이러스, 템기열 바이러스, 진드기 매개(Tick-borne) 뇌염 바이러스 또는 인플루엔자 바이러스 세포들, 로타바이러스 항원들(예를 들어, VP7sc 및 다른 로타바이러스 구성성분들)), 및 유사한 바이러스들을 포함한다. Fields B, Knipe D. Eds., "Fundamental Virology", 2nd Edition (Raven Press, New York, NY, 1991)을 참조하라.

[0203] 2) 박테리아 항원들: 나이세리아 고노레아(*Neisseria gonorrhoea*) 및 나이세리아 메닝기티디스(*N. meningitidis*)를 포함하는 나이세리아 종으로부터 유래된 항원들(예를 들어, 트랜스페린-결합 단백질들, 락토페린 결합 단백질들, PiIC 및 어드히신들); 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터 유래된 항원들(예를 들어, M 단백질 또는 이의 단편들, 및 C5A 프로테아제); 스트렙토코커스 아갈락티에(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)로부터 유래된 항원들; 해모필러스 듀크레이(*Haemophilus ducreyi*); 브란하멜라 카타랄리스(*Branhamella catarrhalis*)로도 알려진 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*)를 포함하는 모락셀라 종으로부터 유래된 항원들(예를 들어, 고분자량 및 저분자량 어드히신들 및 인베이신들); 보데텔라 퍼튜시스, 보데텔라 파라퍼튜시스 및 보데텔라 브론키셉터카(*Bordetella bronchiseptica*)를 포함하는 보데텔라 종으로부터 유래된 항원들(예를 들어, 퍼탁틴, 퍼튜시스 독소 또는 이의 유도체들, 필라멘투스 헤마글루티닌, 아데닐레이트 사이클라제, 섬모(fimbriae)); 미코박테리움 류버큘로시스, 미코박테리움 보비스, 미코박테리움 레프레, 미코박테리움 아비움, 미코박테리움 파라튜버큘로시스, 미코박테리움 스메그마티스를 포함하는 미코박테리아 종들로부터 유래된 항원들; 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*)를 포함하는 레지오넬라 종으로부터 유래된 항원들(예를 들어, ESAT6, 항원 85A, -B 또는 -C, MPT 44, MPT59, MPT45, HSPIO, HSP65, HSP70, HSP 75, HSP90, PPD 19kDa[Rv3763], PPD 38kDa[Rv0934]); 장독소형 대장균(enterotoxic *E. coli*)(예를 들어, 집락화 인자들, 열-민감 독소 또는 이의 유도체들, 열-안정성 독소 또는 이의 유도체들), 장출혈성 대장균 및 장병원성 대장균(예를 들어, 쇠가 독소-유사 독소 또는 이의 유도체들)을 포함하는 대장균 종으로부터 유래된 항원들; 비브리오 콜레라를 포함하는 비브리오 종으로부터 유래된 항

원들(예를 들어, 콜레라 독소 또는 이의 유도체들); 쉬겔라 소네이, 쉬겔라 디센테리에, 쉬겔라 플렉스네리를 포함하는 쉬겔라 종으로부터 유래된 항원들; 예시니아 엔테로콜리티카(예를 들어, Yop 단백질)를 포함하는 예시니아 종으로부터 유래된 항원들; 예시니아 페스티스, 예시니아 슈도튜버클로시스로부터 유래된 항원들; 캄필로박터 제주니를 포함하는 캄필로박터 종(예를 들어, 독소들, 어드히신들 및 이베이신들); 살모넬라 티피, 살모넬라 엔테리카 및 살모넬라 봉고리를 포함하는 살모넬라 종으로부터 유래된 항원들; 리스테리아 모노시토게네스를 포함하는 리스테리아 종; 헬리코박터 필로리를 포함하는 헬리코박터 종(예를 들어 우레아제, 카탈라제, 공포화독소(vacuolating toxin)); 슈도모나스 에루기노사를 포함하는 슈도모나스 종으로부터 유래된 항원들; 스타필로코커스 아우레우스, 스타필로코커스 에피데미디스를 포함하는 스타필로코커스 종; 엔테로코커스 파에칼리스, 엔테로코커스 파에시움을 포함하는 엔테로코커스 종; 클로스트리디움 테타니를 포함하는 클로스트리디움 종(예를 들어, 테타투스 독소 및 이의 유도체); 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)으로부터 유래된 항원들(예를 들어, 보툴리눔 독소 및 이의 유도체), 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*)로부터 유래된 항원들(예를 들어, 클로스트리디움 독소 A 또는 B 및 이의 유도체들); 바실러스 안트라시스를 포함하는 바실러스 종으로부터 유래된 항원들(예를 들어, 안트락스 독소 및 이의 유도체들); 코라이네박테리움 디프테리에(*Corynebacterium diphtheriae*)를 포함하는 코라이네박테리움 종(예를 들어, 디프테리아 독소 및 이의 유도체들); 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB)를 포함하는 보렐리아 종; 보렐리아 가리니(*B. garinii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 보렐리아 아프젤리아(*B. afzelii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 보렐리아 안데르손피(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 및 보렐리아 헤름시로부터 유래된 항원들; 엘리키아 이퀴(*Ehrlichia equi*)를 포함하는 엘리키아 종으로부터 유래된 항원들 및 인간 과립구 엘리키아증(human granulocytic ehrlichiosis)의 중개물질(agent); 리켓치아 리켓치(*Rickettsia rickettsii*)를 포함하는 리켓치아 종; 클라미디아 트라코마티스(예를 들어, MOMP, 해파린-결합 단백질들); 클라미디아 뉴모니에(예를 들어, MOMP, 해파린-결합 단백질들); 클라미디아 프시타키(*Chlamydia psittaci*)를 포함하는 클라미디아 종으로부터 유래된 항원들; 웹토스파라 인테로간스를 포함하는 웹토스파라 종; 트레포네마 팔리듐(예를 들어, 드문 외막 단백질(rare outer membrane proteins)), 트레포니아 텐티콜라, 트레포니아 히오디센테리에을 포함하는 트레포니아 종으로부터 유래된 항원들, 미코박테리움 튜버클로시스로부터 유래된 항원들(예를 들어, Rv2557, Rv2558, RPFs: Rv0837c, Rv1884c, Rv2389c, Rv2450, Rv1009, aceA (Rv0467), PstS1, (Rv0932), SodA (Rv3846), Rv2031c 16kDa1., Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 및 hTCC1); 클라미디아로부터 유래된 항원들(예를 들어, HWMP(High Molecular Weight Protein), ORF3 (EP 366 412), 및 Pmps(putative membrane proteins)); 스트렙토코커스 뉴모니에를 포함하는 스트렙토코커스 종들로부터 유래된 항원들(예를 들어, PsaA, PspA, 스트렙토리신(streptolysin), 콜린-결합 단백질들, 단백질 항원 뉴몰리신(pneumolysin) 및 돌연변이-탈독소화된(mutant detoxified) 이의 유도체들); 혈모필러스 인플루엔자 타입 B(예를 들어, PRP 및 이의 컨쥬게이트)를 포함하는 혈모필러스 종으로부터 유래된 항원들; 비-정형화된 혈모필러스 인플루엔제로부터 유래된 항원들(예를 들어, OMP26, 고분자량 어드히신들, P5, P6, 단백질 D 및 지질단백질 D, 그리고 펌브린 및 펌브린 유래된 펩타이드들, 또는 이의 복수 카페 변이체들 또는 융합 단백질들) 같은 박테리아 항원들.

[0204] 3) 곰팡이 항원들: 칸디다 알비칸스를 포함하는 칸디다 종으로부터 유래된 항원들; 히스토플라스마 곰팡이 항원들(예를 들어, 열충격 단백질 60(HSP60) 및 다른 히스토플라스마 곰팡이 항원 구성성분들); 크립토코커스 네오포르만스를 포함하는 크립토코커스 종들로부터 유래된 항원들(예를 들어, 캡슐 폴리사카라이드 및 다른 크립토코커스 곰팡이 항원 구성성분들); 콕시디오이데스(*coccidioides*) 곰팡이 항원들(예를 들어, 스페룰 항원들 및 다른 콕시디오이데스 곰팡이 항원 구성성분들); 및 티네아 곰팡이 항원들(예를 들어, 트리코피틴 및 다른 콕시디오이데스 곰팡이 항원 구성성분들) 같은 곰팡이 항원들.

[0205] 4) 원생동물성 항원들: 플라스모디움 팔시파룸(예를 들어, 메로조이트 표면 항원들, 스포로조이트 표면 항원들, 포자소체 항원들, 생식모세포/생식세포 표면 항원들, 혈액-단계 항원 pf, 55/RESA) 및 다른 플라스모디움 항원 구성성분들(예를 들어, RTS.S, TRAP, MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrin, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 및 플라스모디움 종 내 이들의 유사체들(analogues))을 포함하는 플라스모디움 종으로부터 유래된 항원들; 톡소플라스마종 및 톡소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*)로부터 유래된 항원들(예를 들어, SAG2, SAGS, Tg34, p30 및 다른 톡소플라스마 항원 구성성분들); 쉬스토조메(schistosomae) 항원들(예를 들어, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 파라미오신, 및 다른 쉬스토조메 항원 구성성분들); 리슈마니아(*leishmania*) 주요 항원 및 다른 리슈마니아 항원들(예를 들어, gp63, 리포포스포글리칸 및 이와 연관된 단백질 및 다른 리슈마니아 항원 구성성분들); 및 트리파노조마 크루지(*Trypanosoma cruzi*) 항원들(예를 들어, 75-77 kDa 항원, 56 kDa 항원 및 다른 트리파노조마 항

원 구성성분들), 엔타모에바 히스톨리티카를 포함하는 엔타모에바 종으로부터 유래된 항원들; 바베시아 미크로티를 포함하는 바베시아 종; 트리파노조마 크루지를 포함하는 트리파노조마 종; 기아르디아 람블리아를 포함하는 기아르디아 종; 리쉬마니아 메이저(*Leishmania major*)를 포함하는 리쉬마니아; 뉴모시스티스 카리니를 포함하는 뉴모시스티스 종; 트리코모나스 바기날리스를 포함하는 트리코모나스 종; 쇠소스토마 만소니를 포함하는 쇠소스토마 종으로부터 유래된 항원들 같은 원생동물성 항원들.

[0206]

5) 알레르겐 또는 환경성 항원들: 화분 알레르겐들(예를 들어, 나무-, 허브, 갈대- 및 풀 화분 알레르겐들), 곤충 알레르겐들(예를 들어, 흡입 인자, 타액 및 독성(venom) 알레르겐들), 동물 털 및 비듬 알레르겐들, 및 식품 알레르겐들 같은 천연 알레르겐 같은 알레르겐 또는 환경성 항원들. 나무, 풀 및 허브로부터 유래된 중요한 화분 알레르겐들은 라 빠르치(La birch)(베틀라(*Betula*)), 알데르(alder)(알누스(*Alnus*)), 하젤(코릴루스(*Corylus*)), 호른빔(카르피누스(*Carpinus*)) 및 올리브(올레아(*Olea*)), 세다르(cedar)(크립토메리아(*Cryptomeria*) 및 주니페루스(*Juniperus*)), 벼증나무(플라타누스(*Platanus*))를 포함하는 참나무목(Fagales), 물푸레나무목(Oleales), 피놀레스(Pinales) 및 벼증나무과(platanaceae)의 분류학적 목들, 벼목(Poales)(예를 들어, 롤리움, 플레움, 포아, 시노돈, 닥틸리스, 홀쿠스, 팔라리스, 세칼레, 및 수수(*Sorghum*) 속의 풀들), 아스테랄레스 및 우르티칼레스의 목들(예를 들어, 암브로시아, 아르테미시아 및 파리에타리아 속의 허브들)로부터 유래되었다. 이용될 수 있는 다른 알레르겐 항원들은 데마토파고이데스 및 유로글리푸스 속의 집먼지 진드기들로부터 유래된 알레르겐들, 저장 진드기(예를 들어, 레페도글리피스, 글리시파구스 및 티로파구스)로부터 유래된 알레르겐들, 바퀴류(cockroaches), 각다귀(midges) 및 벼룩들(예를 들어, 블라텔라, 페리풀라네타, 키로노무스 및 크테노세팔리데스)로부터 유래된 알레르겐들, 포유동물들(예를 들어, 고양이, 개 및 말)로부터 유래된 알레르겐들, 새들로부터 유래된 알레르겐들, 찌르거나 또는 무는 곤충들(벌들(아피데 상과), 말벌들, 및 개미(포르미코이데 상과))로부터 유래된 그러한 알레르겐들을 포함하는 독성 알레르겐들을 포함한다. 이용될 수 있는 보다 다른 알레르겐 항원들은 곰팡이들(예를 들어, 알테르나리아 및 클라도스포리움 속으로부터 유래된 곰팡이들)로부터 유래되는 흡입(inhalation) 알레르겐을 포함한다.

[0207]

6) 종양 항원들: MAGE, MART-1/멜란(Melan)-A, gp100, 디펩티딜 웨პ티다제 IV(DPPIV), 아데노신 디아미나제-결합 단백질(ADAbp), 사이클로필린 b, 대장 연관된 항원(Colorectal associated antigen, CRC)-0017-1A/GA733, 암배아항원(CEA) 및 이의 항원성 에피토프들인 CAP-1 및 CAP-2, etv6, am11, 전립선 특이적 항원(PSA) 및 이의 항원성 에피토프들인 PSA-1, PSA-2, 및 PSA-3, 전립선-특이적 막 항원(PSMA), T-세포 수용체/CD3- σ 체인, MAGE-페밀리의 종양 항원들(예를 들어, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGEA4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), GAGE-페밀리의 종양 항원들(예를 들어, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, 티로시나제, p53, MUC 패밀리, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -페토단백질(fetoprotein), E-카데린, α -카테닌, 13-카테닌, γ -카테닌, p120ctn, gp10^{_{Pme1117}}, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, APC(adenomatous polyposis coli) 단백질, 포드린(fodrin), 코넥신 37, 면역글로불린-개별특이형(Ig-idiotype), p15, gp75, GM2 및 GD2 강글리오시드들, 인간 패밀리 바이러스 단백질들 같은 바이러스 산물들, Smad 패밀리의 종양 항원들, lmp-1, P1A, EBV-인코딩된 핵 항원(EBNA)-1, 뇌 글리코겐 포스포릴라제, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 및 CT-7, 및 c-erbB-2, 급성 림프모구 백혈병(etv6, am11, 사이클로필린 b), B 세포 림프종(Ig-idiotype), 신경교종(E-카데린, α -카테닌, 13-카테닌, 7-카테닌, p120ctn), 방광암(p21ras), 담도암(p21ras), 유방암(MUC 패밀리, HER2/neu, c-erbB-2), 자궁경부암(cervical carcinoma)(p53, p21ras), 대장 암종(p21ras, HER2/neu, c-erbB-2, MUC 패밀리), 직장암(직장 연관된 항원(CRC)-0017-1A/GA733, APC), 음모암종(CEA), 상피세포암(사이클로필린 b), 위암(gastric cancer)(HER2/neu, c-erbB-2, ga733 당단백질), 간세포암, 호지킨스 림프종(lmp-1, EBNA-1), 폐암(CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), 림프세포-유래된 백혈병(사이클로필린 b), 흑색종(p15 단백질, gp75, 종양태아성 항원, GM2 및 GD2 강글리오시드들, 멜란A/MART-1, cdc27, MAGE-3, p21ras, gp100^{_{Pme1117}}), 골수종(MUC 패밀리, p21ras), 비소세포 폐암종(HER2/neu, c-erbB-2), 비인두암(lmp-1, EBNA-1), 난소암(MUC 패밀리, HER2/neu, c-erbB-2), 전립선암(전립선 특이적 항원(PSA) 및 이의 항원성 에피토프들인 PSA-1, PSA-2, 및 PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, ga733 당단백질), 신장암(HER2/neu, c-erbB-2), 자궁경부 및 식도의 편평세포암(인간 패밀리 바이러스 단백질들과 같은 바이러스 산물들), 고환암(NY-ESO-1), 및 T 세포 백혈병(HTLV-1 에피토프) 같은 종양 항원들.

[0208]

바람직한 구현예에서, 본 발명의 항원-로딩된 수지상세포를 얻기 위해 이용된 항원은 바이러스 항원이다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 바이러스 항원은 HIV 항원이다.

[0209]

이전에 개시된 대로, HIV 분리체들(isolates)은 별개의 유전적 서브타입들로 분류된다. HIV-1은 최소 10개의 서브타입들(A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, PL F2, G, H, j 및 K)을 포함하는 것으로 알려져 있다. Taylor B, 등, *N. Engl. J. Med.* 2008; 359(18):1965-1966을 참조하라. HIV-2는 최소 5개의 서브타입들(A, B, C, D, 및 E)을 포함하는 것으로 알려져 있다. 서브타입 B는 전세계적으로 동성애 남성들 및 정액내 약물 사용자들에서 HIV 전염성과 연관되어 있었다. 대부분의 HIV-1 면역원들, 실험실 적응된 분리체들, 시약들 및 맵핑된 에피토프들은 서브타입 B에 속한다. 신규 HIV 감염의 발생이 높은 사하라 사막 이남의 아프리카, 인도 및 중국 지역들에서, HIV-1 서브타입 B는 오직 작은 소수의 감염들만을 설명하고, 서브타입 HIV-1 C가 가장 일반적인 감염 서브타입인 것처럼 보인다. 이에 따라, 어떤 구현예들에서 특정 서브타입들(예를 들어, HIV-1 서브타입 B 또는 C)로부터 유래한 면역원들을 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 단일 면역학적 조성물에서 다양한 HIV 서브타입들(예를 들어, HIV-1 서브타입 B 및 C, HIV-2 서브타입 A 및 B 또는 HIV-1, HIV-2 또는 HIV-3 서브타입들의 조합)로부터 유래된 면역원들을 포함하는 것이 바람직할 것이다.

[0210]

적합한 HIV 면역원들은 HIV 외피(env; 예를 들어, NCBI 참고 서열 NPJ357856), gag(예를 들어, p6, p7, p17, p24, GenBank AAD39400J), pol(예를 들어, UniProt P03366)에 의해 인코딩되는 프로테아제, nef(예를 들어, fenBank -CAA4I 585J, Shugars D, 등, *J. Virol.* 1993; 67(8):4639-4650) 뿐 아니라 이들의 변이체, 유도체 및 융합 단백질들을 포함한다. Gomez C, 등, *Vaccine* 2007; 25:1969-1992을 참조하라. 적합한 스트레인 및 조합들은 소망된 대로 당업자에 의해 선택될 수 있다.

[0211]

달리 본 발명의 "펄스된 수지상세포(pulsed dendritic cell)"로 알려진 상기 항원-로딩된 수지상세포는 항원에 수지상세포의 인비트로 또는 인비보 노출에 의해 생산된다. 수지상세포가 인비트로에서 펄스된 경우에, 수지상세포는 배양 디쉬에 플레이팅되어 충분한 양의 항원에 노출될 수 있으며, 상기 항원이 수지상세포에 결합하는 충분한 기간의 시간 동안 노출될 수 있다. 상기 항원의 수지상세포로의 결합을 달성하기에 필요한 양 및 시간은 당업계에 알려진 방법들 또는 그렇지 않다면 본 명세서에 개시된 방법들을 이용하여 결정될 수 있다. 당업자에게 알려진 다른 방법들, 예를 들어 면역어세이 또는 결합 어세이들이 항원에 노출시킴으로써 상기 수지상세포 상에 항원의 존재를 검출하는 데 이용될 수 있다.

[0212]

본 발명의 추가적인 구현예에서, 상기 수지상세포는 수지상세포에 의한 특정 단백질의 발현을 허용하는 벡터로 트랜스펙션될 수 있다. 이후, 상기 수지상세포에 의해 발현된 단백질은 프로세싱되어 세포 표면에 제시될 수 있다. 상기 트랜스펙션된 수지상세포는 면역원성 조성물로서 이용되어 상기 벡터에 의해 인코딩된 단백질에 대한 면역반응을 일으킬 수 있다. 벡터들은 면역원성 반응이 소망되는 단백질을 인코딩하고 발현시키는 특정 폴리뉴클레오타이드를 포함하도록 제조될 수 있다. 바람직하게는, 레트로바이러스 벡터가 세포를 감염시키는 데 사용된다. 더욱 바람직하게는, 아데노바이러스 벡터가 세포를 감염시키는 데 이용된다.

[0213]

다른 구현예에서, 벡터는 수지상세포 상의 수용체에 의해 인지되는 단백질 또는 이의 일부들을 인코딩하도록 바이러스 벡터를 변형시킴으로써 수지상세포로 타겟팅될 수 있는데, 이를 통해 상기 벡터에 의한 수지상세포 수용체의 점유가 벡터의 엔도사이토시스를 개시하고 상기 바이러스 벡터의 핵산에 의해 인코딩되는 항원의 프로세싱 및 제시로 이어질 것이다. 바이러스에 의해 운반되는 상기 핵산은 상기 수지상세포에서 발현되는 경우 프로세싱되어 수지상세포의 MHC 수용체 상에 제시되는 바이러스 단백질들을 인코딩하는 바이러스 고유의 것일 수 있다.

[0214]

본 명세서에서 고려된 대로, 다양한 방법들이 숙주세포로 폴리뉴클레오타이드를 트랜스펙션시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 방법들은 칼슘 포스페이트 침전, 리포펙션, 입자 충돌(particle bombardment), 마이크로인젝션, 전기천공, 콜로이드 분산 시스템들(즉, 오일-인-물 에멀젼들, 마이셀들, 혼합된 마이셀들 및 리포좀들을 포함하는 거대분자 복합체들, 나노캡슐들, 마이크로스피어, 비드 및 지질-기반된 시스템들)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상술한 방법들은 당업자가 상술한 방법들을 실시할 수 있을 정도로 당업계에서 이해되고 있고 공개된 문헌에 기재되어 있다.

[0215]

다른 구현예에서, 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 발현벡터 내로 클로닝될 수 있고, 상기 벡터는 수지상세포로 도입되어 다르게 로딩된 수지상세포를 발생시킬 것이다. 핵산을 세포 내로 도입시키는 다양한 타입의 벡터들 및 방법들이 이용가능한 공개된 문헌에 논의되어 있다. 예를 들어, 발현벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단들에 의해 숙주세포 내로 옮겨질 수 있다. Brown T, "Gene Cloning" (Chapman & Hall, London, GB, 1995); Watson R, 등, "Recombinant DNA", 2nd Ed. (Scientific American Books, New York, NY, US, 1992); Alberts B, 등, "Molecular Biology of the Cell" (Garland Publishing Inc., New York, NY, US, 2008); Innis M, 등, Eds., "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (Academic Press Inc., San Diego, CA, US, 1990); Erlich H, Ed., "PCR Technology. Principles and Applications for DNA

Amplification" (Stockton Press, New York, NY, US, 1989); Sambrook J, 등, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US, 1989); Bishop T, 등, "Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach" (IRL Press, Oxford, GB, 1987); Reznikoff W, Ed., "Maximizing Gene Expression" (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, US, 1987); Davis L, 등, "Basic Methods in Molecular Biology" (Elsevier Science Publishing Co., New York, NY, US, 1986), Schleef M, Ed., "Plasmid for Therapy and Vaccination" (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE, 2001)을 참조하라.

[0216] 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터의 도입이 펠스된 세포를 산출한다는 것이 쉽게 이해된다. 본 발명은 단백질, cDNA 또는 mRNA 형태의 전체 항원을 수지상세포에 로딩하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 수지상세포를 펠싱하기 위한 다양한 방법들을 포함한다. 하지만, 본 발명은 수지상세포를 펠싱하는 데 이용되는 항원의 특이적 형태에 국한되는 것으로 해석되지 않을 것이다. 오히려, 본 발명은 항원 로딩된 수지상세포를 제조하기 위해 당업계에 알려진 다른 방법들을 포함한다. 바람직하게는, 상기 수지상세포는 특정된 항원을 인코딩하는 mRNA로 트랜스펙션된다. 서열이 알려져 있는 유전자 산물에 해당하는 mRNA가 적절한 프라이머들과 전사 반응과 커플링된 RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 이용하여 인비트로에서 손쉽게 제조될 수 있다. 펠스된 APC를 발생시키기 위해 mRNA를 이용한 수지상세포의 트랜스펙션은 다른 항원-로딩 기술들보다 이점을 제공한다. 예를 들어, 미세한 양의 조직(즉, 종양 조직)으로부터 RNA를 증폭하는 능력은 많은 수의 환자들에 대한 백신화를 위한 APC의 이용을 확장시킨다.

[0217] 일단 수지상세포들이 목적 항원으로 펠스되었다면, 상기 면역원-펠스된 수지상세포들이 회수된다. 상기 면역원-펠스된 수지상세포들을 회수하기 위해 다른 전략들, 성숙한 세포에 의해 발현되는 어떠한 마커, 예를 들어 CD80을 이용하는 면역분리 같은 전략이 이용될 수 있다.

[0218] 목적 항원이 미성숙 수지상세포들 내로 로딩되면, 상기 세포들은 사이토카인들, TLR(toll-like receptor) 리간드들 및 다른 제제들과 함께 인비트로에서 성숙될 수 있다. 예를 들어, 당업자는 프로스타글란딘 E₂와 조합한 친-염증성 사이토카인들인 IL-1 β , IL-6 및 TNF α 가 HIV의 면역치료를 위해 DC를 성숙시키는 데 이용될 수 있다는 것을 알고 있다. 다른 대안은 염증성 사이토카인들인 TNF α , IL-2, IFN γ 및 IFN α 와 dsRNA 폴리 I:C(aDCI로 명명됨)의 조합으로 DC를 성숙시키는 것이다. 얻어진 산물을 치료적 또는 예방적 백신으로서 사용되기에 적합하다.

[0219] 세포 표면 마커들의 발현이 예를 들어 종래의 방법 및 장치들을 이용한 유세포분석에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 상업적으로 이용가능한 항체들 및 당업계에 알려진 통상의 프로토콜들을 이용하는 칼리버(Calibur) FACS(fluorescent-activated cell sorting, Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, US) 시스템이 이용될 수 있다. 따라서, 특이적 세포 표면 마커에 대한 백그라운드 시그널보다 높은 시그널을 제시하는 세포들이 유세포분석에서 선택될 수 있다. 종래의 FACS 분석에서 특이적 항체가 각 표면 마커를 검출하기 위해 이용되는 것처럼 상기 백그라운드 시그널은 동일한 동위원소의 비-특이적 항체에 의해 주어지는 시그널 강도로서 정의된다. 마커가 양성으로 간주되기 위해서, 상기 관찰된 특이적 시그널은 종래의 방법 및 장치들을 이용한 백그라운드 시그널의 강도에 대해 상대적으로 20% 이상, 바람직하게는 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 500%, 1000%, 5000%, 10000% 또는 이상의 강도를 가져야만 한다.

[0220] 바람직하게는, 상기 수지상세포 백신은 대상자에 대해 자가(autologous)이다. 가장 효과적인 면역치료적 백신들은 자가 HIV(즉, 각 숙주에 독특한 유사종(quasi-species) 바이러스)에 기반된 항원을 이용한다. 현재까지 항-HIV 면역치료법 임상들에서 가장 놀라운 결과들은 환자의 자가 바이러스로부터 유래되는 불활성화된 전체 HIV 바리온들로 로딩된 수지상세포들(DCs)을 이용하였다. 또한, 상기 수지상세포들은 동일한 환자로부터 얻어진다. 바람직한 구현예에서, 상기 수지상세포 제조물은 대상자에 대해 자가이고, 이로부터 CD4+ T 세포 및 CD14+ 단핵구들이 분리되었다.

[0221] 상기 용어 "시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제"는 상기에 특정되었다. 바람직한 구현예에서, 상기 억제제는 시알릴락토오스, 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 분자 및 항-시알로어드히신 항체로 구성된 군으로부터 선택된다. 다른 바람직한 구현예에서, 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 상기 분자는 4개 미만의 시알산을 가지는 강글리오시드이다. 다른 바람직한 구현예에서, 시알릴락토오스를 포함하고 4개 미만의 시알산을 가지는 강글리오시드는 표 1에 보여지는 어떠한 강글리오시드, 또는 표 1에 보여지는 어떠한 조합 강글리오시드들로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 조성물들은 최소 2, 최소 3, 최소 4, 최소 5, 최소 6, 최소 7, 최소 8, 최소 9, 최소 10 또는 이상의 강글리오시드들을 포함하고, 상기 강글리오시드들은 표

1의 강글리오시드들로부터 선택되거나 또는 시알릴락토오스를 운반하는 다른 어떠한 강글리오시드들에 해당한다.

[0222] 본 발명에 따른 조성물 및 부품 키트는 대상자에서 항원-제시 세포에 로딩된 항원에 대한 면역반응을 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 항원-제시 세포는 대상자에서 CD4+ 및 CD8+ 세포들의 프라이밍을 유도하는 백신으로서 기능하는 반면에, 시알로어드히신과 시알릴락토오스 간 상호작용의 억제제의 존재는 대상자가 HIV에 감염되어 있는 경우 상기 항원-제시 세포가 어떠한 바이러스를 흡수하여 환자의 CD4+ T 세포를 재-감염시키지 않도록 예방할 것이다. 따라서, 상기 조성물 및 부품 키트는 HIV 감염과 연관된 질병의 치료에 특히 유용하고(HIB 항원 또는 항원들의 혼합물들로 로딩된 항원-제시 세포들을 이용함), 또한 그들은 상기 질병을 야기하는 세포들의 일부를 형성하는 항원에 대한 면역반응의 자극을 촉진시켜 HIV 감염을 수반하는 질병들의 치료에 유용할 뿐 아니라 상기 면역원/백신 조성물의 일부를 형성하는 항원-제시 세포들에 의해 HIV의 흡수를 억제함으로써 HIV의 추가적인 전파를 최소화시키는 데도 유용하다.

[0223] 따라서, 다른 양태에서, 본 발명은 의약으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 조성물 또는 부품 키트에 관한 것이다.

[0224] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 조성물 또는 부품 키트를 포함하는 면역원 또는 백신에 관한 것이다.

[0225] 다른 양태에서, 본 발명은 항원-제시 세포에 로딩된 항원에 대한 면역반응을 필요로 하는 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 따른 조성물 또는 부품 키트에 관한 것이다.

[0226] 다른 양태에서, 본 발명은 항원-제시 세포에 로딩된 항원에 대한 면역반응을 필요로 하는 것과 연관된 질병의 대상자에 대한 치료를 위한 의약품의 제조를 위해 본 발명에 따른 조성을 또는 부품 키트에 관한 것이다.

[0227] 바람직한 구현예에서, 상기 조성물 또는 부품 키트가 투여되는 대상자는 HIV-감염된 환자이다.

[0228] 다른 양태에서 본 발명은 대상자에게 본 발명에 따른 조성물 또는 부품 키트의 투여를 포함하는 항원 또는 항원들에 대한 면역반응을 필요로 하는 질병으로 고통받는 대상자의 치료 방법에 관한 것으로, 상기 조성물 또는 부품 키트 내 항원-제시 세포들은 요구되는 면역반응에 대한 상기 항원 또는 항원들로 로딩되어 있다.

[0229] 본 발명의 수지상세포 백신은 치료적 백신, 즉 AIDS가 발병되었던 이미 HIV-감염된 대상자들에게 주어지는 물질로, 이들의 면역반응들을 조절하여 상기 질병과 싸우는데 도움을 줄 수 있다. 치료적 HIV 백신들은 HIV에 대한 최근의 항레트로바이러스 치료 선택에 대한 부속 또는 대안으로서 유망한 전략을 제시한다.

[0230] 본 발명의 수지상세포 백신은 AIDS가 발병되지 않았던 이미 HIV 감염된 대상자에 투여되도록 디자인된 예방적 AIDS 백신일 수 있다.

[0231] HIV에 대한 면역반응의 발생은, 예를 들어 바이러스 로딩, T-세포 증식, T-세포 생존, T-세포에 의한 사이토카인 분비 또는 항원-특이적 항체들의 생산에서의 증가(예컨대, 항체 농도)를 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0232] 자극된 T 세포들의 검출을 위한 방법들은 당업자에게 알려져 있다. 그런데, 당업자는 항원(Ag)에 대한 반응에서 T 세포들의 자극을 평가하기에 적합한 어떤 방법이 이용될 수 있다는 것을 용이하게 이해할 것이다. 하기에 기재된 과정들은 적합한 방법들에 대한 소수의 예들을 제공한다:

[0233] 1) ELISpot(Enzyme-linked immunospot): 전-배양 웨들로부터 비-부착 세포들이 소망하는 항-사이토카인 포획 항체들(Abs: 예를 들어, 항-IFN, -IL-10, -IL-2, -IL-4)로 코팅되었던 플레이트로 옮겨진다. 검출(revelation)은 바이오틴화된 2차 항체들(Abs)과 스트렙타비딘-알칼린 포스파타제 및 NBT-BCIP 같은 표준 비색 또는 형광 검출 방법들로 실시되고 스팟들이 카운팅된다. 이후 ELISpot 판독 결과들은 스팟-형성 세포(spot-forming cells, SFC)/ 10^6 PBMCs로 표현된다.

[0234] 2) 상층액 사이토카인 어세이: 배양 상층액에 배출된 사이토카인들이 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assays), BD CBA(cytometric bead array), 바이오래드 바이오-플렉스(Biorad Bio-Plex) 어세이 및 다른 어세이들 같은 다른 기술들에 의해 측정된다.

[0235] 3) HLA 클래스 II 테트라머들: 이러한 과정과 함께, 특이적 웨타이드 에피토프들을 인지하는 Ag-반응성 T 세포들이 상업적으로 이용가능한 시약들(예를 들어, MHC 클래스 II Ultimers™, ProImmune Ltd, Oxford, GB) 또는 자체적으로(in-house) 제작된 시약들(예를 들어, Novak E, et al., J. Clin. Invest. 1999; 104:R63-R67)을 이용하여 검출된다.

- [0236] 4) 활성화 마커들(예를 들어, CD69, CD25, CD137)의 상향조절: 이러한 과정과 함께, Ag-특이적 T 세포 반응들이 Ag-인지에 따라 막 위로 노출된 활성화 마커들의 서로 다른 발현에 의해 겹쳐된다.
- [0237] 5) 사이토카인 포획 어세이들: 이러한 시스템은 사이토카인 반응에 따른 Ag-특이적 T 세포들을 시각화시키는 상기 ELISpot에 대해 유효한 대안이다(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE). 또한, 상기 시스템은 목적 T 세포들의 직접적 분류(sorting) 및 클로닝을 가능하게 한다.
- [0238] 6) CD154 어세이: 이러한 과정은 Ag-특이적 CD4+ T 세포들의 겹출에 제한된다. Chattopadhyay P, 등, Nat. Med. 2005; 11:1113-1117 및 Frentsch M, 등, Nat. Med. 2005; 11:1118-1124를 참조하라.
- [0239] 7) CD107 어세이: 이러한 과정은 세포독성 가능성과 함께 Ag-특이적 CD8+ T 세포들의 시각화를 가능하게 한다. Betts M, 등, J. Immunol. Methods 2003; 281:65-78을 참조하라.
- [0240] 8) CFSE 희석 어세이: 이러한 과정은 Ag 인지 후 증식에 따라 Ag-특이적 T 세포들(CD4+ 및 CD8+)을 겹출한다. Mannerig S, 등, J. Immunol. Methods 2003; 283:173-183을 참조하라.

[0241] 5. 외피 바이러스의 겹출 및 분리를 위한 방법들

[0242] 시알로어드히신과 외피 바이러스의 외피에서 발견되는 어떤 강글리오시드들에 존재하는 시알릴락토오스 모이어티들 간의 상호작용의 확인은 시알로어드히신에 대한 결합능을 결정하여 상기 바이러스의 겹출을 가능하게 할 뿐 아니라 시료 내 존재하는 다른 구성성분으로부터 시알로어드히신에 결합된 바이러스를 분리함으로써 상기 바이러스의 분리를 가능하게 해 준다. 본 발명의 겹출 및 분리 방법은 단백질 마커들보다는 오히려 외피의 지질성 마커를 이용하여 HIV 비리온들을 동정할 수 있다. 이것은 바이러스 단백질 마커들이 감염 시 높은 비율로 돌연변이되어 어떠한 단일 바이러스 겹출 시스템도 다른 환자들에서 바이러스 감염을 겹출하거나 또는 개별 환자로부터 바이러스를 분리하는 데 효과적이지 않을 것이기 때문에 중요하다. 따라서, 이러한 방법은 시료로부터 HIV의 겹출 또는 동정 뿐 아니라 HIV의 분리를 위한 진단 어세이로서도 유용하다. 이에 따라, 다른 구현예에서, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 시료 내 외피 바이러스를 겹출하기 위한 방법에 관한 것이다:

- [0243] (i) 상기 시료를 시알로어드히신 또는 실질적으로 시알릴락토오스에 결합하는 능력을 유지하고 있는 기능적으로 동등한 이의 변이체와 접촉시키는 단계, 및
- [0244] (ii) 상기 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체에 결합된 바이러스를 겹출하는 단계.

[0245] 시알로어드히신에 대해 언급하는 경우, 상기 용어 "기능적으로 동등한 변이체(functionally equivalent variant)"는 시알릴락토오스 또는 백본 내에 시알릴락토오스를 포함하는 분자들에 결합하는 기능이 실질적으로 유지되는 한, 변형, 하나 이상의 아미노산들의 삽입 또는 결실에 의해 시알로어드히신으로부터 유래된 모든 폴리펩타이드들로서 이해된다.

[0246] 시알릴락토오스에 대한 실질적인 결합 활성을 보유하는 시알로어드히신의 기능적으로 동등한 변이체들은 시알릴락토오스에 대한 친화도가 최소 10^{15} M^{-1} , 10^{14} M^{-1} , 10^{13} M^{-1} , 10^{12} M^{-1} , 10^{10} M^{-1} 또는 10^9 M^{-1} 인 것들이다. 다른 구현예에서, 본 발명에서 사용하기에 적합한 시알로어드히신의 기능적으로 동등한 변이체들은 시알릴락토오스 또는 시알릭락토오스 포함 분자들에 대한 천연 시알로어드히신의 결합 활성의 최소 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30% 또는 미만인 것들이다.

[0247] 시알로어드히신의 적합한 기능적으로 동등한 변이체들은 시알릴락토오스, 또는 표면에 시알릴락토오스-포함 강글리오시드들을 포함하는 강글리오시드들을 포함하는 세포들에 대한 결합 친화도를 측정하기 위한 표준 어세이들을 이용하여 동정될 수 있다. 예를 들어, 시알로어드히신의 적합한 기능적으로 동등한 변이체들은 다른 결합들(linkages; 예를 들어, NeuAca2-3Galb1-3GalNAc, NeuAca2-3Galb1-3(4)GlcNAc, 또는 NeuAca2-6Galb1-4GlcNAc) 내에 시알산을 포함하도록 유도체화되었던 인간 적혈구들에 결합하는 고정화된 시알로어드히신의 능력에 기반된 고체-상(solid-phase) 어세이를 이용하여 동정될 수 있다. Vinson M, 등, J. Biol. Chem. 1996; 271:9267-9272를 참조하라. 상기 어세이에 대한 대조군으로서, 유도체화되지 않은 적혈구들이 이용되었다. 택일적으로, 시알로어드히신의 적합한 기능적으로 동등한 변이체들은 폴리아크릴아미드-포함 글리코컨쥬게이트들(예를 들어, NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc 또는 NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc)의 어드히신을 포함하는 고정화된 융합 단백질들

에 의한 결합 검출에 기반된 고체-상 어세이를 이용하여 동정될 수 있다. Hartnell A, 등, Blood 2001; 97:288-296을 참조하라.

[0248] 또한, 기능적으로 동등한 변이체들은 최소 25%, 최소 40%, 최소 60%, 최소 70%, 최소 80%, 최소 90%, 최소 95%, 최소 96%, 최소 97%, 최소 98% 또는 최소 99%보다 더 높은 시알로어드히신에 대한 동일성 정도를 나타내는 것들일 수 있다.

[0249] 첫 번째 단계에서, 본 발명에 따른 진단 방법은 시알로어드히신을 가진 외피 바이러스를 포함되는 것으로 의심되는 시료의 접촉을 포함한다.

[0250] 본 발명의 방법에 따라 분석될 시료는 유체인 생물학적 시료들(예컨대, 혈청, 혈액, 소변, 타액, 체장 주스, 뇌 척수액, 정액)을 포함할 뿐 아니라, 어떠한 유체성 생물학적 시료들(예를 들어, 조직 또는 생검 추출물, 배설물의 추출물, 객담)이 본 발명의 어세이에서 유사하게 이용될 수 있다. 가장 바람직하게는, 어세이될 생물학적 시료는 혈청 또는 혈장일 것이다.

[0251] 전형적으로 결합에 기반된 검출 어세이들은 검출 시약이 결합되어 있는 고체 상 물질의 이용을 포함하지만 비-고정화된 항원들 및 항체들의 결합(즉, 용액-상 면역어세이)을 포함하도록 조정될 수 있다. 반응 산물은 반응 혼합물로부터 상기 고체 상을 제거(예컨대, 세척)함으로써, 과량의 시료, 어세이 시약들 및 다른 물질들로부터 분리된다. 이에 따라, 바람직한 구현예에서 상기 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체는 고정화된다.

[0252] 매우 다양한 고체 지지체들(solid supports) 중 어떠한 것이 본 발명의 어세이들에서 이용될 수 있다. 상기 고체 지지체를 위해 적합한 물질들은 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리아미드 또는 다른 합성 폴리머들 같은 합성물(synthetics), 셀룰로오스 같은 천연 폴리머들 뿐 아니라 셀룰로오스 아세테이트 또는 니트로셀룰로오스 및 유리, 특히 유리 섬유들 같은 유도체화된 천연 폴리머들이다. 상기 지지체는 스파이어, 막대, 튜브 및 마이크로어세이 또는 마이크로타이터 플레이트의 형태를 취할 수 있다. 페이퍼 스트립, 작은 플레이트 및 막 같은 시트-형 구조들도 유사하게 적합하다. 담체들의 표면은 수용성 용액에 대해 투과가능할 수 있고 통과가능하지 않을 수 있다.

[0253] 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 HIV 또는 에볼라 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 상기 HIV는 HIV-1이다.

[0254] 두 번째 단계에서, 본 발명에 따른 검출 방법은 상기 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체에 결합된 상기 외피 바이러스들의 검출을 포함한다.

[0255] 외피 비리온들의 검출은 당업계에 알려진 많은 기술들을 이용하여 실시될 수 있고, 상기 외피 바이러스 계놈의 검출을 포함하며, 보다 바람직하게는 외피 바이러스 핵산들(즉, 상기 케이스일 수 있는 것처럼 RNA 또는 DNA)의 검출이고, 외피 바이러스 단백질들의 검출이다. RNA 및 단백질 발현을 검출하는 방법들도 당업계에 잘 알려져 있으며, 앞서 일반적으로 기재되었다. 하나의 양태에서, 상기 외피 바이러스는 HIV이다. 다른 구현예에서, HIV의 검출은 하나 이상의 HIV 단백질들에 대한 항체의 결합을 통해 실시된다. 검출에 이용될 수 있는 HIV의 적합한 단백질들은 HIV 외피에 존재하는 폴리펩타이드들(env; 예를 들어, NCBI 참고 서열 NPJ357856), gag(예를 들어, p6, p7, p17, p24, GenBank AAD39400J), pol(예를 들어, UniProt P03366)에 의해 인코딩되는 프로테아제, nef(예를 들어, fenBank -CAA4I 585J, 앞에서 인용된 Shugars D, 1993)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0256] 본 발명의 바람직한 구현예에 따라서, 상기 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체가 고체 지지체에 결합되고(즉, 고정화되고) 항-HIV 항체의 존재에 대해 테스팅될 생물학적 시료와 접촉 하에서 반응된다. 블록킹제(blocking agent)가 비-특이적 결합을 감소시키기 위해 첨가될 수 있다.

[0257] 이해되는 것처럼, 상기 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체는 비결합 상태에서 상기 생물학적 시료와 반응될 것이고, 이후에 상기 고체 지지체(즉, 고정 가능한)에 결합할 것이다. 이후, 상기 지지체들은 바람직하게는 비특이적으로 결합된 구성성분들을 실질적으로 제거하기 위해 폭넓게 처리(예컨대, 세척)된다. 그러한 처리의 결과에서, 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체와 상기 외피 바이러스 간의 복합체들이 형성될 수 있다.

[0258] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 고체 상 어세이의 하나의 타입은 샌드위치 어세이이다. 샌드위치 어세이에서, 고체 상위에 존재하는 표지는 시료 내에 존재하는 분석물의 양에 직접적으로 비례한다. 이러한 타입의 어세이

포멧은 일반적으로 고체 상위에 존재하는 표지의 출현이 보다 쉽게 검출되기 때문에 바람직하며, 낮은 분석물 농도의 시작화에 특히 바람직하다.

[0259] 바람직하게는, 검출가능한 표지된 항체(상기 외피 바이러스의 구성성분에 결합할 수 있는)가 이후 첨가되고 상기 지지체는 항체가 존재할 수 있는 어떠한 외피 바이러스에 결합하기에 충분한 조건 하에서 반응된다. 바람직하게는, 상기 지지체는 이후 어떠한 비결합 항체를 실질적으로 제거하기 위해 광범위하게 처리(예를 들어, 세척)된다. 외피 바이러스들이 테스트 시료 내에 존재한다면, 상기 항체와 외피 바이러스가 면역 복합체를 형성할 것이다. 그러한 어세이에서, 상기 지지체에 결합된 항체의 검출은 테스팅되는 시료 내에 외피 바이러스의 존재를 나타낸다. Schuurs A, 등, US 4,016,043 및 Pankratz T, 등, US 5,876,935를 참조하라. 상기 항체는 비인간 종들로부터 분리된 천연 면역글로불린(예를 들어, 항-인간 IgG 마우스 항체, 항인간 IgG 염소 항체, 항-인간 IgM 염소 항체)일 수 있거나, 또는 재조합적 또는 합성적으로 제조될 수 있다. 상기 항체는 온전한 면역글로불린 또는 면역글로불린 단편(예를 들어, FAb, F(ab)₂)일 수 있다. 소망된 대로, 다른 결합 분자들(외피 바이러스에 결합할 수 있는)이 그러한 항체들과 함께 이용되거나 또는 그러한 항체들 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체들은 바이오틴화될 수 있고, 2차 항체는 표지된 아비딘 또는 스트렙타비딘으로 대체될 수 있다.

[0260] 결합-부재(bound-free) 분리 단계를 제거하고 화학적 결합 어세이에 요구되는 시간 및 장비를 축소시키기 위해, 균질성 어세이 포멧이 택일적으로 이용될 수 있다. 그러한 어세이에서, 결합 쌍의 하나의 구성성분은 여전히 고정화될 수 있다; 하지만, 상기 결합 쌍의 2차 구성성분의 존재는 결합-부재 분리 없이 검출된다. 균질성 광학 방법의 예들은 형광 퀸칭의 검출을 통해 작동하는 EMIT 방법(Syva, Inc., Sunnyvale, CA, US); 광 산란에서의 변화들을 검출함으로써 작동하는 레이저 비탁 라텍스 입자 응집 방법(laser nephelometry latex particle agglutination method)(Behringwerke GmbH, Marburg, DE); LPIA 라텍스 입자 응집 방법(Mitsubishi Chemical Industries Ltd., Tokyo, JP); TDX 형광 탈분극 방법(Abbott Laboratories, Inc., Abbott Park, IL, US); 및 형광 에너지 전달 방법(CisBio International SA, Paris, FR)이다. 그러한 어세이들 중 어떠한 것도 본 발명의 목적에 따라 사용하기 위해 조정될 수 있다.

[0261] 본 발명의 결합 어세이는 경쟁 어세이(competitive assay)로서 구성될 수 있다. 경쟁 어세이에서, 테스트 시료 내에 존재하는 외피 바이러스의 농도가 더 높을수록, 고체 상위에 존재하는 표지의 양은 더 낮아진다.

[0262] 상기 샌드위치 어세이와 유사한 방식에서, 상기 경쟁 어세이는 제한된 양의 표지된 외피 바이러스를 제공하고 테스팅되는 유체가 상기 지지체와 결합하기 위해 상기 표지된 항체와 결합하는 동일한 타입의 외피 바이러스를 포함하는지를 결정함으로써 실시될 수 있다. 그러한 경쟁 어세이에서, 포획된 표지된 외피 바이러스의 양은 상기 테스트 시료 내 존재하는 분석물의 양과 역으로 비례한다.

[0263] 모든 그러한 어세이 포멧들에서, 어세이 시약들 중 최소 하나의 구성성분이 바람직하게는 표지되거나 또는 달리 광의 발생(evolution) 또는 퀸칭에 의해 검출가능할 것이다. 그러한 구성성분은 사용되는 면역어세이 포멧에 따라 2차 항체, 항-HIV 항체 또는 항-HIV 항체에 결합하는 웹타이드일 수 있다. 방사선동위원소-결합 어세이 포멧들(예를 들어, 방사성면역어세이)이 그러한 표지로서 방사성동원원소를 이용한다; 시그널은 형광성(fluorescent or fluorogenic) 모이어티의 존재 하에서 광의 발생에 의해 검출가능하다. Lucas F, 등, US 5,698,411 및 Landrum E, 등, US 5,976,822를 참조하라. 효소적-결합 어세이 포멧들(예를 들어, ELISA)는 표지로서 효소를 이용한다; 시그널은 발색성 또는 형광성(fluorogenic) 모이어티의 존재 하에서 색 또는 광의 발생에 의해 검출가능하다. 다른 표지들, 예를 들어 상자성 표지들, 색을 가지는 입자들로서 이용된 물질들, 라텍스 입자들, 셀레니움 및 금 같은 콜로이드 금속들 및 염료(dye) 입자들도 이용될 수 있다. Leuvering J, US 4,313,734, Gribnau T, 등, US 4,373,932, 및 Baugher B, 등, US 5,501,985를 참조하라. 검출가능한 표지로서 효소들(특히, 알칼린 포스파타제, β -갈락토시다제, 호스 래디쉬 퍼록시다제, 또는 우레아제)의 이용(즉, 효소 면역어세이 또는 EM)이 선호된다.

[0264] 효소적 표지들의 존재는 상기 효소에 의해 촉매 반응에 대응하는 발색성 기질들(형광, UV, 가시광선을 발생하거나 또는 흡수하는 것을 포함함)의 이용을 통해 검출될 수 있다. 상기 효소가 알칼린 포스파타제인 경우, 상기 기질은 화학발광성 기질들, 예를 들어 AMPPD^(R)(3-(2'-스페로아다만탄)-4-메톡시-4-(3"-포스포릴록시)페닐-1,2-디옥세탄), CDP-star^(R)(디소디움 4-클로로-3-(메톡시스페로{1,2-디옥세탄-3,2'-(5'-클로로)트리사이클로[3.3.1.13,7]데칸}-4-일)페닐 포스페이트) 및 CSPD^(R)(디소디움 3-(4-메톡시스페로{1,2-디옥세탄-3,2-(5'-클로로)트리사이클로[3.3.1.13,7]데칸}-4-일)페닐 포스페이트); 발색성 기질들, 예를 들어 p-니트로페닐 포스페이트, 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트(BCIP), 4-니트로블루

테트라졸리움 클로라이드(NBT) 및 이오도 니트로 테트라졸리움(INT)을 포함할 수 있다.

[0265] 보다 바람직하게는, 화학적 표지들이 이용될 수 있다(예를 들어, 콜로이드 금, 라텍스 비드 표지들). 표지의 검출은 복수의 검출기, 멀티패스 필터, 회절 격자(gratings) 또는 스펙트럼적으로 독특한 형광체들(fluors)을 이용하여 완성될 수 있다. Ward D, 등, US 5,759,781을 참조하라. 효소 표지로서 페록시다제를, 특히 발색성 기질인 3,3', 5, 5'-테트라메틸벤지딘(TMB), OPD, 또는 ABTS와 함께 이용하는 것이 더욱 바람직하다. 효소로서 페록시다제와 함께 항체들을 표지하는 경우에, 페리오데이트 기술 또는 이중이작용성(heterobifunctional) 시약을 이용하는 것이 가능하다. Nakane P, 등, J. Histochem. Cytochem. 1974; 22:1084-1090 및 Ishikawa E, 등, J. Immunoassay. 1983; 49(3):209-327을 참조하라.

[0266] 본 발명의 어세이에 사용하기 위한 물질들은 키트의 제조에 이상적으로 적합하다. 그러한 키트는 하나 이상의 컨테이너 수단들, 예컨대 바이얼 또는 튜브들을 포함할 수 있다; 상기 컨테이너 수단들 각각은 상기 어세이 테스트의 실현에 이용되는 개별 엘리먼트들 중 하나를 포함한다. 예를 들어, 상기 컨테이너 수단들 중 하나는 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체를 포함할 수 있고, 두 번째 컨테이너는 용해가능하고 검출가능하게 표지된 항-외피 바이러스를, 바람직하게는 동결건조된 형태 또는 용액 상태로 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트는 하나 이상의 컨테이너들도 포함할 수 있는데, 이를 각각은 (다른) 전결정된 양의 외피 바이러스, 또는 시알릴락토오스 모이어티들을 포함하는 강글리오시드들을 포함하는 지질 입자를 포함한다. 상술한 후자의 컨테이너들은 알 수 없는 양의 외피 바이러스를 포함하는 시료로부터 얻어진 결과들이 보충될 수 있는 표준 곡선을 제조하는데 이용될 수 있다.

[0267] 상기 키트를 이용함에 있어, 사용자는 단지 측정가능한 아직 알지 못하는 양의 외피 바이러스를 포함하는 것으로 의심되는 미리 측정된 양의 시료, 2차 컨테이너에 존재하는 미리 측정된 양의 검출가능하게 표지된 항체를 컨테이너에 첨가하는 것을 필요로 한다. 반응을 위한 적절한 시간 후에, 면역 복합체가 형성되고 상층액 유체로부터 분리되며, 상기 면역복합체 또는 상층액 유체는 방사성 카운팅, 효소 기질의 첨가, 및 색 발생, 또는 화학적 표지(예컨대, 콜로이드 금, 라텍스 비드들)의 함유에 의한 것처럼 검출된다.

[0268] 다른 구현예에서, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 시료로부터 외피 바이러스의 분리를 위한 방법을 제공한다:

[0269] (i) 상기 시료를 시알로어드히신 또는 실질적으로 시알릴락토오스에 결합하는 능력을 유지하고 있는 기능적으로 동등한 이의 변이체와 접촉시키는 단계, 및

[0270] (ii) 상기 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체에 결합된 바이러스를 분리하는 단계.

[0271] 바람직한 구현예에서, 상기 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체는 매트릭스에 결합되어 예를 들어 세포 배양물 또는 혈액 및 간 같은 생물학적 조직들로부터 외피 바이러스들의 친화도 정제를 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 상기 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체는 기질 또는 지지체 상에 부착되거나 또는 고정화될 수 있다. 이후, 상기 외피 바이러스 결정인자들을 포함하는 용액은 상기 시알로어드히신과 외피 바이러스들 간에 복합체의 형성에 적합한 시간 및 조건 하에서 고정화된 시알로어드히신과 접촉된다. 상기 접촉 단계 동안 이용되는 조건들은 조절된다(예를 들어, pH 또는 염 농도, 즉 용액 내 이온 강도에 의해). 시알로어드히신 또는 이의 변이체의 양의 능력을 초과하는 것을 조심해야 한다(즉, 플로우(flow)가 만족할만한 흡수를 허용할 정도로 충분히 천천히 진행돼야 한다. 이러한 단계에서, 용액의 다른 구성성분들은 원칙적으로 방해되지 않도록 통과할 것이다. 선택적으로, 상기 매트릭스는 보유되거나 또는 느슨하게 결합된 물질들을 제거하기 위해 세척된다(예를 들어, 수용성 용액으로).

[0272] 다음 단계에서, 결합되지 않은 물질은 상기 결합된 복합체들로부터 분리된다. 이후, 상기 외피 바이러스들은 상기 지지체로부터 분리된다. 분리(아카 용출(aka elution))는 탈착(즉, 시알로어드히신 또는 이의 변이체로부터 HIV의 배출)을 제공하는 조건 하에서 상기 매트릭스를 지나가는 용출액을 의미하는 2차 용액을 이용하여 일반적으로 실시된다. 그러한 조건들은 공통적으로 pH 또는 염 농도의 변화(예를 들어, 이온 강도, 소수성)에 의해 제공된다. 농도구배 용출 및 단계별(step-wise) 용출 같은 다양한 용출 계획들이 알려져 있다. 또한, 용출은 매트릭스 상에 HIV를 대체하는 경쟁 물질을 포함하는 2차 용액에 의해 제공될 수 있다.

[0273] 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 HIV 또는 에볼라 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 상기 HIV는 HIV-1이다.

[0274] 다른 구현예에서, 본 발명은 고정화된 시알로어드히신 또는 시알릴락토오스에 결합하는 능력을 유지하고 있는 기능적으로 동등한 이의 변이체를 포함하는 키트를 제공한다. 상기 고정화된 시알로어드히신 또는 기능적으로

동등한 이의 변이체는 시료에서 외피 바이러스의 검출에 유용할 뿐 아니라 외피 바이러스의 분리에도 유용하다.

[0275] 상기 시알로어드히신이 결합된 지지체는, 예를 들어 개별 입자들, 바람직하게는 다공성 및 분질적으로 구형의 입자들; 모놀리스(monolith); 또는 막의 형태일 수 있다. 또한, 상기 특정된 대로 분리 매트릭스 컬럼의 이용을 포함하는 친화도 크로마토그래피를 실시하기에 적합한 시스템이 본 발명에 의해 포괄된다. 상기 컬럼은 분석적 규모 또는 큰 규모의 크로마토그래피에 적합한 크기일 것이다.

[0276] 적합한 지지체 물질들은 잘 알려져 있다. 하나의 구현예에서, 상기 지지체는 천연 폴리머(예를 들어, 아가로오스, 알기네이트, 카라기난(carrageenan), 젤라틴)이다. 그러한 천연 폴리머들은 냉각 또는 2가의 금속 이온들의 첨가 하에서 물리적으로 교차-연결된 네트워크를 자발적으로 형성하는 것으로 알려져 있고, 원한다면 화학적 교차-연결자들이 첨가될 수 있다. 상술한 지지체들은 역 혼탁액 젤화(inverse suspension gelation) 같은 표준 방법들에 따라 쉽게 제조된다. Hjerten S, Biochim. Biophys. Acta 1964; 79(2):393-398을 참조하라. 다른 구현 예에서, 상기 지지체는 교차-연결된 합성 폴리머들(예를 들어, 스티렌 또는 스티렌 유도체들, 디비닐벤젠, 아크릴아미드들, 아크릴레이트 에스테르류, 메타크릴레이트 에스테르류, 비닐 에스테르류, 비닐 아미드류)로 이루어진다. 그러한 폴리머들도 표준 방법들에 따라 용이하게 제조된다. Arshady R, Chimica e L'Industria 1988; 70(9):70-75를 참조하라. 따라서, 요약하면, 상기 지지체 물질은 원칙적으로 본 발명의 gp120 결합 화합물들에 공유결합적 커플링을 허용하는 어떠한 물질일 수 있다(예를 들어, 상기-논의된 폴리머들, 실리카, 세라믹 같은 무기 물질들).

[0277] 적합한 작용기를 통해 지지체에 리간드를 고정하기 위해 많은 잘-알려진 방법들이 이용가능하다. 커플링 방법의 정확한 선택은 고정될 리간드의 구조에 의존할 것이다. 하나의 구현예에서, 상기 지지체는 친수성 표면을 가지고 다공성이 있다면 상기 동공의 표면도 친수성이다. 이것은 어떠한 비-특이적 단백질 상호작용을 없애거나 또는 최소한 감소시키는 데 유리하다. 또한, 상기 표면이 리간드의 커플링에 이용가능한 높은 밀도의 기들(groups)을 가지는 것도 유익하다. 그러한 커플링 기들은 공통적으로 하이드록시기들이지만, 그라프팅(grafting)에 이용가능한 이중 결합을 가지는 기들, 아민, 티올 또는 에폭시 같은 다른 라디컬들을 포함할 수 있다. 지지체 물질이 바람직하지 않은 표면 특성들을 가지는 경우, 리간드와의 커플링 전에 친수성 폴리하이드록시-기능성 물질로 상기 지지체를 코팅하는 것이 가능하다. 분리 매트릭스를 제조하기 위해 적합한 지지체에 친화도 리간드들을 커플링하기 위한 기술 및 고려사항들이 당업계에 알려져 있다. Berg H, 등, WO1998033572를 참조하라.

6. 본 발명의 컨쥬케이트들

[0278] 외피바이러스의 외피에서 발견되는 강글리오시드들에 존재하는 시알릴락토오스 잔기들에 특이적인 리간드로서 시알로어드히신의 동정은 목적 화합물을 시알로어드히신에 커플링시켜 상기 화합물의 외피 바이러스로의 타겟팅에 이 분자의 이용을 가능하게 한다. 더 나아가, 상기 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체는 치료 약물 또는 염료, 형광성 분자, 진단 효소 또는 방사능표지된 실체(entity)에 연결(즉, 직접적으로 또는 스페이서 분자를 통해)시켜 외피 바이러스의 동정을 가능하게 하거나 또는 외피 바이러스를 치료적으로 타겟팅할 수 있다.

[0279] 따라서, 다른 구현예에서 본 발명은 시알로어드히신 또는 실질적으로 시알릴락토오스에 결합하는 능력을 유지하고 있는 기능적으로 동등한 이의 변이체 및 치료제를 포함하는 컨쥬케이트에 관한 것이다.

[0280] 바람직한 구현예에서, 상기 치료제는 항-HIV제이다. 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-HIV제는 침투 및 융합 억제제, 인테그라제 억제제, 역전사효소 억제제 및 프로테아제 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0281] 본 발명의 컨쥬케이트는 당업자에게 알려진 어떠한 방법을 이용하여 얻어질 수 있다. 따라서, 어떠한 표준 방법에 의해 시알로어드히신 또는 상기 단백질의 변이체를 얻는 것이 가능하다. 예를 들어, 시알로어드히신은 세포로부터 정제에 의해 얻어질 수 있는데, 상기 폴리펩타이드는 천연적으로(예를 들어, 대식세포들) 또는 이종 생물체, 예를 들어 대장균(*Escherichia coli*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서의 발현에 의해 cDNA로부터 재조합 방법에 의해 발생한다. 충분한 양의 정제된 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체가 이용가능하다면, 후자는 목적 화합물에 컨쥬케이션되어야만 한다. 상기 컨쥬케이션은 다른 방법으로 실시될 수 있다. 하나의 가능성은 목적 제제의 활성을 방해하지 않는 위치에서 상기 제제와 작용기의 직접 컨쥬케이션이다. 본 발명에서 이해된 바와 같이, 작용기들은 분자

의 특징적인 화학적 반응을 책임지는 상지 분자 내 특이적 원자들의 그룹을 의미한다. 작용기의 예들은 하이드록시, 알데하이드, 알킬, 알케닐, 알키닐, 아미드, 카르복사미드, 1차, 2차, 3차 및 4차 아민, 아미녹시, 아지드, 아조(디이미드), 벤질, 카르보네이트, 에스테르, 에테르, 글리옥실릴, 할로알킬, 할로포르밀, 이민, 이미드, 케톤, 말레이미드, 이소시아니드, 이소시아네이트, 카르보닐, 니트레이트, 니트리트, 니트로, 니트로소, 페록사이드, 페닐, 포스핀, 포스페이트, 포스포노, 피리딜, 세파이드, 세포닐, 세피닐, 티오에스테르, 티올 및 산화된 3,4-디하이드록시페닐알라닌(DOPA) 기들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 기의 예들은 Apo A 분자 내 티올기들과 특이적으로 반응하는 말레이미드 또는 글리옥실릴 기들 및 EDA 분자 내 1차 아미노 기들과 반응하는 산화된 3,4-디하이드록시페닐알라닌(DOPA) 기들이다.

[0283] 다른 가능성은 호모- 또는 혜테로-이작용기(bifunctional groups)의 이용에 의해 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체에 치료제를 컨쥬게이션시키는 것이다. 상기 이작용기는 우선 치료적으로 활성을 가지는 화합물에 컨쥬게이션되고, 이후에 시알로어드히신에 컨쥬게이션될 수 있거나 또는 택일적으로 상기 이작용기를 상기 시알로어드히신에 컨쥬게이션시키고 후에 그 산물을 상기 치료제에 컨쥬게이션시키는 것이 가능하다. 이러한 타입의 컨쥬게이트의 예시적인 예들은 케톤-옥сим(ketone-oxime)으로 알려진 컨쥬게이트를 포함하고, 상기 컨쥬게이트의 첫 번째 구성성분은 혜테로이작용기에 존재하는 케톤기에 결합하는 아미녹시기를 포함하고, 상기 혜테로이작용기는 상기 컨쥬게이트의 두 번째 구성성분에 존재하는 아미노기에 차례로 결합한다. Lam K, 등, US20050255042를 참조하라.

[0284] 다른 구현예에서, 상기 시알로어드히신과 치료제를 컨쥬게이션시키는 데 이용되는 제제는 광분해적으로, 화학적으로, 열적으로, 또는 효소적으로 프로세싱될 수 있다. 특히, 상기 치료적으로 활성을 가지는 화합물만이 세포내로 배출되도록 타겟 세포 내에 존재하는 효소들에 의해 가수분해될 수 있는 연결제(linking agents)의 사용이 흥미롭다. McCall J, 등, WO2004054622, Chien H, 등, WO2006107617, Chan C, 등, WO2007046893 및 Govindan S, WO2007112193을 참조하라.

[0285] 바람직한 구현예에서, 상기 치료적으로 활성을 가지는 화합물이 올리고펩타이드들인 펩타이드 및 단백질 모두를 포함하는 펩타이드 특성의 화합물인 경우 단백질이 2차 폴리펩타이드에 공유결합적으로 커플링될 수 있기 위해 당업자에게 널리 알려진 방법들을 이용하여 상기 폴리펩타이드 체인을 화학적으로 변형시키는 것이 가능하다. 이에 따라, 시스테인 모이어티들에 존재하는 티올기들을 통한 컨쥬게이션에 기반된 방법들, 라이신 모이어티들에 존재하는 1차 아미노기들을 통한 컨쥬게이션에 기반된 방법들, N- 및 C-말단 모이어티들이 이용될 수 있는 컨쥬게이션에 기반된 방법들을 포함하는 2개의 폴리펩타이드들을 공유결합적으로 커플링시키는 적합한 방법들이 이용될 수 있다. Morseman J, 등, US 6,809,186을 참조하라. 다른 화합물들과의 커플링을 허용하는 폴리펩타이드들의 변형에 적합한 시약들은 글루타르알데하이드(즉, 폴리펩타이드들의 N-말단 끝에 화합물을 결합시킴), 카르보디이미드(즉, 폴리펩타이드들의 C-말단 끝에 화합물을 결합시킴), N-말단 끝 및 시스테인 모이어티들을 활성화시키는 석신이미드 에스테르(예를 들어, MBS, SMCC), 타이로신 모이어티들을 활성화시키는 벤지딘(BDB), 및 당화된 단백질들 내 카르보하이드레이트 모이어티들을 활성화시키는 페리오데이트(periodate)를 포함한다.

[0286] 치료적으로 활성을 가지는 화합물이 펩타이드 특성에 속하는 특별한 경우에서, 컨쥬게이트를 인코딩하는 본 발명의 유전자 컨스트럭트를 이용하여 단일 단계로 상기 컨쥬게이트를 발현시키는 것이 가능하며, 상기 유전자 컨스트럭트는 전사 및 선택적으로 번역 조절 엘리먼트들과 함께 이종 생물체에서의 발현에 적합한 백터에 도입된다. 본 발명의 발현 카세트 내에 존재하는 상기 전사 및 선택적으로 번역 조절 엘리먼트들은 프로모터에 작동적으로 연결되어 있는 뉴클레오타이드 서열의 전사를 지시하는 프로모터들 및 전사에 필요하거나 적합하고 시간 및 장소에서 전사의 적합한 다른 서열들, 예를 들어 개시 및 종결 시그널, 절단 위치들, 폴리아데닐화 시그널, 복제 기원, 전사적 인해서들 또는 전사적 사일런서를 포함한다. 본 발명에 따른 발현 카세트 및 재조합 백터들을 구축하기에 이용되는 백터들 뿐 아니라 상기 엘리먼트들은 이용되는 숙주세포에 따라 일반적으로 선택된다.

[0287] 본 발명의 조성물들은 치료될 포유동물(인간 포함)에 당업계에 잘 알려진 어떠한 방법(예를 들어, 구강, 비강내, 피하내, 근육내, 피내, 정맥내, 동맥내, 비경구 또는 카테터 삽입에 의해)에 의해 투여될 수 있다.

[0288] 추가적으로, 본 발명은 바이러스 감염, 바람직하게는 HIV/AIDS 바이러스 감염에 대한 상승 효과를 제공하기 위해 하나 이상의 바이러스 억제제를 타겟팅하기 위한 담체로서 시알로어드히신 또는 기능적으로 동등한 이의 변이체를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 이러한 구현예의 관점에서, 상기 바이러스 억제제는 침투 및 융합 억제제, 인테그라제 억제제, 역전사효소 억제제 및 프로테아제 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0289] 보다 일반적으로, 본 발명은 시알로어드히신과 종래에 이용되었던 적합한 검출가능한 표지, 예컨대 형광성 표지, 발광성 표지, 화학발광성 표지, 효소 표지, 방사성 표지 또는 흡광 표지(absorbance label)의 컨쥬게이트

들에 관한 것이다.

- [0290] 본 발명의 컨쥬케이트들은 외피 바이러스에 의한 감염과 연관된 질병들의 치료 또는 예방을 위해 이를 필요로 하는 대상자에게 투여될 수 있다. 따라서, 다른 양태에서, 본 발명은 외피 바이러스에 의한 감염으로 야기되는 질병의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 컨쥬케이트에 관한 것이다.
- [0291] 다른 양태에서, 본 발명은 외피 바이러스에 의한 감염으로 야기되는 질병의 치료를 위한 의약품의 제조용 본 발명에 따른 컨쥬케이트의 용도에 관한 것이다.
- [0292] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 컨쥬케이트의 대상자로 투여하는 단계를 포함하는 이를 필요로 하는 대상자에서 외피 바이러스에 의한 감염으로 야기되는 질병의 치료 방법에 관한 것이다.
- [0293] 바람직한 구현예에서, 외피 바이러스에 의한 감염으로 야기되는 상기 질병은 필로비리대 패밀리의 바이러스에 의해 야기되는 질병 및 레트로바이러스에 의해 야기되는 질병으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0294] 바람직한 구현예에서, 상기 외피 바이러스는 HIV로, 이러한 경우에 상기 컨쥬케이트는 HIV 감염과 연관된 질병의 치료에 이용된다.

7. 목적 화합물을 항원-제시 세포로 운반하는 방법들

- [0295] 다른 구현예에서, 본 발명은 목적 화합물을 항원-제시 세포에 운반하는 방법에 관한 것으로, 상기 항원-제시 세포를 상기 화합물을 포함하는 지질 미세소포와 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 지질 입자는 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 최소 하나의 분자를 포함한다.
- [0296] 본 발명의 방법을 이용하여 항원-제시 세포들에 운반될 수 있는 화합물들은:
- [0297] 1) 항원들. 적합한 항원들은 상기 특정된 하나 이상의 바이러스 항원들, 박테리아 항원들, 곰팡이 항원들, 원생 동물성 항원들, 알레르겐 또는 환경성 항원들 또는 종양 항원들.
- [0298] 2) 상기 특정된 항레트로바이러스체. 바람직하게는, 상기 항레트로바이러스체는 침투 및 융합 억제제, 인테그라제 억제제, 역전사효소 억제제 및 프로테아제 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0299] 3) 핵산(예를 들어, dsRNA, 면역-자극성 올리고뉴클레오타이드, 플라스미드, 안티센스 및 리보자임)
- [0300] 4) ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , ^{99m}Tc , 및 ^{32}P 같은 방사성동위원소. 그러한 조성물은, 예를 들어 이상 수지상세포 활성을 가지는 자가면역질환을 가지는 대상자들을 치료하는 데 유용하다. 독소들에 의한 수지상세포의 제거는 자가면역질환을 완화시킬 것이다(예를 들어, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 자가면역질환).
- [0301] 5) 효소적 활성을 가지는 독소들 및 이의 단편으로, 예를 들어 디프테리아 A 체인, 디프테리아 독소의 비결합 활성을 가지는 독소들, 엑소독신 A 체인(슈도모나스 에루기노사), 리신 A 체인, 압린 A 체인, 모데신 A 체인, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질들, 디안틴 단백질들, 피톨라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질들(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 커신(curcin), 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*Sapaonaria officinalis*) 억제제, 갤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 폐노미신, 애노미신 및 트리코테센들. 그러한 조성물들은, 예를 들어 이상 수지상세포 활성을 가지는 자가면역질환을 가지는 대상자들을 치료하는 데 유용하다. 독소들에 의한 수지상세포의 제거는 자가면역질환을 완화시킬 수 있다(예를 들어, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염).
- [0302] 6) 면역억제성 약물들로, 예를 들어 공동-자극성 분자들(즉, CD80 및 CD86)의 발현 및 염증성 사이토카인들(즉, IL-6 및 TNF- α)의 분비를 하향조절하여 DCs의 성숙 및 이성자극(allostimulatory) 능력을 억제하는 특정 글루코티코이드들(예를 들어, 텍사메타손, 타크롤리무스, 사이클로스포린 A).
- [0303] 7) 검출가능한 기를 가지는 화합물. 상기 검출가능한 기는 분광적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단들 같은 검출가능한 물리적 또는 화학적 특성을 가지는 어떠한 물질일 수 있다. 본 발명에서 유용한 표지들은 형광성 염료들(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트, Alexa 염료들, 텍사스 레드, 로다민), 방사성표지들 및 콜로이드 금 같은 열량 측정 표지들 또는 색을 가지는 유리 또는 플라스틱(예를 들어, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스) 비드들을 포함한다.

- [0305] 바람직한 구현예에서, 목적 화합물은 항원이다. 두 번째 양태에서, 상기 화합물은 항레트로바이러스제이다. 바람직하게는, 상기 화합물은 항원이다.
- [0306] 리포좀들을 제조하기에 적합한 시약들은 인지질을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 리포좀들은 글리세로인지질, 스팽고지질 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.
- [0307] 본 발명에 따른 리포좀들을 제조하기에 적합한 글리세로인지질은:
- [0308] 1) 디스테아로일-포스파티딜글리세롤(DSPG), 1,2-디스테아로일-sn-z-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 디올레오일 포스파티딜 콜린(DOPC), 디올레오일 포스파티딜글리세롤(DOPG), 포스파티딜글리세롤(PC), 포스파티드산(PA), 및 /또는 포스파티딜글리세롤(PG) 같은 불포화 지방산을 포함하는 글리세로인지질,
- [0309] 2) 또한, 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC), 디팔미토일 포스파티드산(DPPA), 및 디팔미토일 포스파티딜글리세롤(DMPG) 같은 포화 지방산을 포함하는 글리세로인지질이 리포좀 제조에 이용될 수 있으며,
- [0310] 3) 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC) 및 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC) 같은 포화 및 불포화 지질을 포함하는 글리세로인지질
- [0311] 을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0312] 본 발명에 따른 리포좀들을 제조하기에 적합한 스팽고지질은 스팽고미엘린을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0313] 스테아릴아민은 양이온성 리포좀들이 선호되는 경우에 이용될 수 있으며, 포스파티딜세린(PS), PG, 포스파티딜 이노시톨(PI), PA, 및 카르디올리핀(CL) 같은 천연 산성 지질들은 음이온성 리포좀들이 소망되는 경우에 첨가될 수 있다. 일부 구현예들에서, 콜레스테롤은 리포좀 이중층을 안정화시키는 데 포함될 수 있다. α -토코페롤 또는 β -하이드록시톨루이딘(BHT)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 작은 양의 항산화제들이 다중불포화 중성 지질들이 이용되는 경우에 포함될 수 있다.
- [0314] 리포좀들은 20 나노미터부터 1000 나노미터 이상의 크기 범위이다. 따라서, 리포좀들은 20 nm, 25 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 150 nm, 200 nm, 250 nm, 300 nm, 350 nm, 400 nm, 450 nm, 500 nm, 550 nm, 600 nm, 650 nm, 700 nm, 750 nm, 800 nm, 850 nm, 950 nm, 또는 100 nm일 수 있다. 예시적인 구현예들에서, 상기 리포좀들은 100 nm부터 200 nm의 범위이다. 상기 리포좀들의 크기는 초음파 처리 및 여과(filtration) 같은 방법들에 의해 조절될 수 있다. 리포좀들은 다양하고 다른 크기 및 지질 조성물들로 형성될 수 있다. Basu S, Basu M, Liposome methods and protocols, methods in molecular biology, Vol. 199, "Liposome Technology", 3rd Ed., Gregoriadis G, Ed. (Informa HealthCare Inc., New York, NY, US, 2006)을 참조하라.
- [0315] 다른 구성성분들의 비율이 마음대로 조정될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 바람직한 구현예에서, 상기 리포좀들은 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 분자들 이외에도 글리세로지질, 콜레스테롤 및 스팽고미엘린을 포함한다.
- [0316] 바람직한 구현예에서, 글리세로지질 대 콜레스테롤의 비율은 41/45이다. 바람직한 구현예에서, 글리세로지질 대 스팽고지질(바람직하게는, 스팽고미엘린)의 비율은 41/10이다. 다른 구현예에서, 콜레스테롤 대 스팽고지질의 비율은 9/2(w/w)이다.
- [0317] 바람직한 구현예에서, 상기 글리세로지질은 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC) 또는 이의 조합이다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 상기 리포좀들은 25/16 비율의 POPC 대 DPPC를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 리포좀들은 25%몰의 POPC, 16%몰의 DPPC, 45%몰의 콜레스테롤 및 충분한 스팽고미엘린을 포함하여 100%몰에 도달한다. 바람직한 구현예에서, 상기 리포좀들은 4%의 강글리오시드들을 포함하는데, 이 경우에 스팽고미엘린의 함량은 10%이다.
- [0318] 본 발명에서 사용하기에 적합한 강글리오시드들은 시알릴락토오스 잔기와 4개 미만의 시알산 잔기들을 포함하는 어떠한 강글리오시드를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 분자는 4개 미만의 시알산 기를 포함하는 강글리오시드이다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 강글리오시드들은 표 1에 제시된 바와 같다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 상기 강글리오시드는 GM1, GM2, GM3, GD1b 및 GT1b로 구성된 군으로부터 선택된다.

- [0319] 상기 리포좀의 코어는 수용성이고 항원-제시 세포에 운반될 화합물을 유지하기 위해 이용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 곰팡이 항원, 원생생물성 항원, 알레르겐 또는 환경성 항원, 분화 항원 또는 종양 항원의 면역원성 단편 같은 항원성 폴리펩타이드이다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 항원은 바이러스 항원이다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 상기 항원은 HIV 항원이다.
- [0320] 바람직한 구현예에서, 상기 항원-제시 세포는 시알로어드히신-발현 세포이다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 항원-제시 세포는 수지상세포이다.
- [0321] 하나의 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 방법들은 엑스 비보 치료법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 목적 화합물을 포함하고 지질 입자가 시알릴락토오스 모이어티를 포함하는 최소 하나의 분자를 포함하는 지질 미세소포가 상기 화합물이 세포에 의해 흡수되도록 면역세포(예를 들어, 시알로어드히신-발현 세포 및 보다 바람직하게는, 수지상세포)와 인 비트로에서 접촉될 수 있다. 상기 세포는 이후 환자에게 전달(예컨대, 주사에 의해)되어 질환(예를 들어, 암 또는 자가면역질환)을 치료한다. 하나의 구현예에서, 면역세포들(예컨대, 수지상세포들)은 상기 환자로부터 추출되고 목적 화합물을 포함하는 지질 미세소포와 접촉되어 상기 제제가 세포들 내로 흡수된다.
- [0322] 택일적으로, 목적 화합물을 포함하는 상기 지질 미세소포들은 당업자에게 알려진 방법들을 이용하여 인 비보에서 세포로 상기 화합물의 운반을 위해서도 사용될 수 있다. 인 비보 투여를 위해, 전형적으로 상기 지질 미세소포들은 비경구적으로(즉, 임플란트 장치에 의한 것과 같이 동맥내, 정맥내, 복강내, 피하내(subcutaneously), 근육내, 또는 피하내(subdermally)) 투여된다. 특별한 구현예들에서, 상기 약제학적 조성물들은 블루스 주입에 의해 정맥내 또는 복강내 투여된다. Stadler J, 등, US 5,286,634을 참조하라. 또한, 세포내 핵산 운반의 방법들도 당업계에서 알려져 있다. Straubringer K, 등, "Methods in Enzymology" (Academic Press, New York, NY, US, 1983, pp. 512-527), Mannino R, 등, Biotechniques 1988; 6:682-690, Nicolau C, 등, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 1989; 6:239-271을 참조하라. 지질-기반된 치료제들을 투여하는 또 다른 방법들이 이전에 기재되었다. Rahman Y, 등, US 3,993,754, Sears B, US 4,145,410, Schneider S, US 4,224,179, Papahadjopoulos D, 등, US 4,235,871, Lenk R, 등, US 4,522,803, 및 Fountain M, 등, US 4,588,578을 참조하라.
- [0323] 다른 구현예에서, 목적 화합물을 포함하는 지질 미세소포들은 인 비트로에서 세포로 상기 화합물들의 운반에도 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0324] 도 1. 강글리오시드들은 mDC에 의해 매개된 바이러스 포획에 필요하다. MT4 유래된 HIV_{NL4.3}으로부터 얻어진 지질 추출물 내 강글리오시드 검출. (A) UPLC/TOF ESI(+) 분석에 의해 얻어진 3개의 다른 바이러스 분리체들을 대표하는 5.3분 내지 6.5분 범위의 크로마토그램에 상응하는 부분 질량 스펙트럼(850부터 1550 amu까지). 동정된 목적 화합물 각각에 있어서, 이의 [M+H]⁺ 및 [M+Na]⁺ 이온들이 지시된다. 각 화합물의 머무름 시간(retention time)은 상기 화합물의 약어 다음에 표시된다. 선택된 시간 범위는 N 헥사데카노일(hexadecanoyl)(N-C16) 종들에 해당한다. (B) GD1에 대해 5.56분에 얻어진 정확한 질량 이온 클러스터. (C) 2의 전하 상태(charge state)를 가진 화학식 C82H144N4O39에 상응하는 정확한 질량 이온 클러스터. N-C22, N-C24 및 N-C24:1 종들도 관찰되었다. (D) VLP_{HIV-Gag-eGFP} 및 Cer, GM3, GM2, GM1 또는 PS를 포함하는 독특한 형광성 LUV_{HIV-tRed}의 mDC 포획 비교. 총 2×10^5 개의 DCs가 100 μM의 LUV 또는 75 ng의 VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag로 37°C에서 4시간 동안 0.2 ml에서 펼 스되고 PBS로 세척된 후 FACS로 분석하여 tRed 또는 eGFP 양성 세포들의 백분율을 얻었다. 데이터는 최소 6개의 공여체들(donors)로부터 유래된 세포들을 포함하는 5개의 독립적 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차(SE M)를 나타낸다. 성숙한 DCs는 Cer 또는 Ø LUV_{HIV-tRed}보다 더 많은 양의 GM3-포함 LUV_{HIV-tRed}를 유의하게 포획한다 ($P < 0.0001$, 쌍체비교(paired) t 검정). 성숙한 DCs는 음적 전하된 PS-LUV_{HIV-tRed}보다 더 많은 양의 GM1-포함 LUV_{HIV-tRed}를 유의하게 포획한다($P = 0.0081$, 쌍체비교 t 검정). (E) 75 ng의 VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag와 감소하는 양(μM)의 GM2-포함 LUV_{HIV-tRed} 간의 포획 경쟁. 대조군들로서, 본 발명자들은 Cer을 가지거나 또는 가지지 않는 LUV_{HIV-tRed}의 최대 농도(100 μM)를 사용하였다. 세포들은 37°C에서 4시간 동안 반응되고 세척된 후 FACS로 분석하여 eGFP- 및 tRed-양성 세포들의 백분율을 얻었다. 데이터는 최소 4개의 공여체들로부터 유래된 세포들을 포함하는 3개의 독립적 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다. mDCs는 더 많은 양의 GM2-포함 LUV_{HIV-tRed}의

존재 하에서 더 적은 VLP_{HIV-Gag-eGFP}를 포획한다($P<0.0001$, 쌍체비교 t 검정).

도 2. 강글리오시드-포함 LUV_{HIV-tRed}는 mDCs에서 VLP_{HIV-Gag-eGFP}와 동일한 구획으로 트래픽킹한다. (A) VLP_{HIV-Gag-eGFP} 또는 강글리오시드-포함 LUV_{HIV-tRed}와 독립적으로 4시간 동안 반응시킨 후 독특한 포획 패턴을 가지는 mDCs의 백분율. 데이터는 최소 5개의 공여체들로부터 얻어진 100개 이상의 세포들의 평균값 및 표준오차를 나타낸다. (B) 강글리오시드-포함 LUV_{HIV-tRed}와 공동-위치하는 VLP_{HIV-Gag-eGFP} 및 그 반대에 대한 결과를 백분율로 정량화한 결과이고, 상기 결과는 3개의 다른 공여체들의 mDCs로부터 얻어진 10개 이상의 소포들을 분석하여 얻어졌다.

도 3. mDCs에 의한 강글리오시드-포함 LUV_{HIV-tRed} 포획의 액체 정돈된(liquid ordered) 독립성. (A) Cer, GM3, GM2 또는 GM1을 포함하거나 또는 포함하지 않는 LUV_{POPC-tRed}의 mDC 포획 비교. 총 2×10^5 개의 DCs가 100 μM 의 LUVs로 37°C에서 4시간 동안 펠스되고 PBS로 세척된 후 FACS로 분석하여 tRed 양성 세포들의 백분율을 얻었다. 데이터는 최소 6개의 공여체들로부터 유래된 세포들을 포함하는 3개의 독립적 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다. 성숙한 DCs는 Cer 또는 LUV_{POPC-tRed}보다 더 많은 양의 GM3-포함 LUV_{POPC-tRed}를 유의하게 포획한다(그래프 상의 P 값, 쌍체비교 t 검정). (B) 강글리오시드-포함 LUV_{POPC-tRed}와 4시간 동안 반응된 후 독특한 리포좀 포획 패턴을 가지는 mDCs의 백분율.

도 4. 복잡한 강글리오시드의 mDC 포획 패턴. (A) GM1, GD1b, GT1b 및 GQ1b 같은 폴리시알로강글리오시드; PS; 및 Cer를 포함하는 독특한 LUV_{HIV-tRed}의 mDC 포획 비교. 총 2×10^5 개의 DCs가 100 μM 의 LUVs로 37°C에서 4시간 동안 펠스되고 PBS로 세척된 후 FACS로 분석하여 tRed 양성 세포들의 백분율을 얻었다. 데이터는 6개의 공여체들로부터 유래된 세포들을 포함하는 2개의 독립적 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다. 성숙한 DCs는 GQ1b-포함 LUV_{HIV-tRed}보다 더 많은 양의 GM1-포함 LUV_{HIV-tRed}를 유의하게 포획한다($P<0.0001$, 쌍체비교 t 검정). 상술한 실험들에 이용된 LUVs 내 강글리오시드의 도식 표시가 본 발명의 예시 옆에 제시된다. (B) 75 ng의 VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag 및 100 μM 의 다른 폴리시알로강글리오시드 LUV_{HIV-tRed}로 펠스된 mDCs 간의 포획 경쟁. 세포들은 37°C에서 4시간 동안 반응되고 세척된 후 FACS로 분석하여 eGFP- 및 tRed-양성 세포들의 백분율을 결정하였다. 데이터는 6개의 공여체들로부터 유래된 세포들을 포함하는 2개의 독립적 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다. mDCs는 동일 농도에서 GQ1b-포함 LUV_{HIV-tRed}보다 GM1-포함 LUV_{HIV-tRed}의 존재 하에서 더 적은 VLP_{HIV-Gag-eGFP}를 포획한다($P<0.0001$, 쌍체비교 t 검정).

도 5. 강글리오시드들에 존재하는 바이러스 부착 도메인의 동정. (A) Cer, GM1 또는 시알산이 없는 GM1(아시알로(Asialo) GM1)을 포함하는 독특한 LUV_{HIV-tRed}의 mDC 포획 비교. 총 2×10^5 개의 DCs가 100 μM 의 LUVs로 37°C에서 4시간 동안 펠스되고 PBS로 세척된 후 FACS로 분석하여 tRed 양성 세포들의 백분율을 얻었다. 데이터는 9개의 공여체들로부터 유래된 세포들을 포함하는 3개의 독립적 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다. 성숙한 DCs는 아시알로 GM1-포함 LUV_{HIV-tRed}보다 더 많은 양의 GM1-포함 LUV_{HIV-tRed}를 유의하게 포획한다($P<0.0001$, 쌍체비교 t 검정). (B) 시알산을 제거하기 위해 뉴라미니다제로 처리되거나 또는 처리되지 않은 GM3-포함 LUV_{HIV-tRed} 및 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 mDC 포획 비교. 총 2×10^5 개의 DCs가 클로스트리디움 퍼프린겐스 (*Clostridium perfringens*) 뉴라미니다제 ON으로 처리되거나 또는 처리되지 않은 25 μM 의 LUVs 및 75 ng의 VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag로 37°C에서 2시간 동안 펠스되고 PBS로 세척된 후 FACS로 분석하여 tRed 및 eGFP 양성 세포들의 백분율을 얻었다. 데이터는 5개의 공여체들로부터 유래된 세포들을 포함하는 2개의 독립적 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다. 성숙한 DCs는 뉴라미니다제 처리된 입자들보다 더 많은 양의 처리되지 않은 입자들을 유의하게 포획한다(그래프 상의 P 값, 쌍체비교 t 검정). (C) GalCer, GM4, GM3 또는 GM1를 포함하는 독특한 LUV_{HIV-tRed}의 mDC 포획 비교. 총 2×10^5 개의 DCs가 100 μM 의 LUVs로 37°C에서 4시간 동안 펠스되고 세척된 후 FACS로 분석하여 tRed 양성 세포들의 백분율을 얻었다. 데이터는 9개의 공여체들로부터 유래된 세포들을 포함하는 3개의 독립적 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다. 성숙한 DCs는 GalCer 또는 GM4-포함 LUV_{HIV-tRed}보다 더 많은 양의 GM1-포함 LUV_{HIV-tRed}를 유의하게 포획한다($P<0.0001$, 쌍체비교 t 검정). 상술한 실험들에 이용된 LUVs에 존재하는 분자들의 도식 표시가 본 발명의 예시 아래에 제시된다. (D) 10 mM 용해성 락토오스 또는 5 내지 10 mM의 GM3 카르보하이드레이트 극성 머리기(polar head group)으로 전-처리된 mDC에

의한 GM3-포함 LUV_{HIV-tRed} 및 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 상대적 포획을 보여주는 그래프로, 목(mock)-처리된 mDCs에 의한 LUV/VLP 포획 레벨(100%로 설정됨)로 표준화되었다. mDCs는 GM3 국성 머리기로 처리되는 경우에 입자들을 덜 포획하였다(그래프 상의 *P* 값, 쌍체비교 *t* 검정). 데이터는 최소 9개의 공여체들로부터 유래된 세포들을 포함하는 3개의 독립적 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다.

도 6. 강글리오시드 구조. 본 연구에서 이용된 아시알로-, 모노-, 디-, 트리- 및 테트라-시알로강글리오시드들의 2D 모델.

도 7. 텍사스 레드(Texas Red)-포함 LUVs의 형광 비교. 그래프에 지시된 분자들을 포함하는 LUV_{HIV-tRed} 또는 LUV_{POPC-tRed}의 608 nm에서의 최대 방출 형광. (A) 도 1 및 도 2에서 이용된 LUV_{HIV-tRed}의 비교, (B) 도 3에서 이용된 LUV_{POPC-tRed}, (C) 도 4에서 이용된 LUV_{HIV-tRed}의 비교, (D) 도 5에서 이용된 LUV_{HIV-tRed}의 비교. 데이터는 최소 2개의 독특한 LUV 제조물들로부터 유래된 독립적 측정들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다.

도 8. CHO 세포주에서 생산된 VLPs의 포획. GM3까지의 강글리오시드만을 합성할 수 있는 CHO 세포주에서 생산된 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 포획. 총 2×10^5 개의 mDCs가 75 ng의 수크로오스-펠렛팅된 VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag와 37°C에서 4시간 동안 반응되고 세척된 후 FACS로 분석하여 eGFP 양성 세포들의 백분율을 결정하였다. 데이터는 3개의 공여체들로부터 유래된 세포들을 포함하는 2개를 제외한 하나의 대표적인 실험으로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다.

도 9. 라지(Raji) B 세포에서 시글렉들(Siglecs)의 트랜스펙션. 시글렉들에 대한 지시된 발현 플라스미드로 트랜스펙션되거나 또는 목(mock)-트랜스펙션된 라지 세포에 의한 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 포획. 트랜스펙션된 라지 세포들은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 지시된 mAb들과 전반응되고 VLPs에 노출되었다. 데이터는 4개의 트랜스펙션들로부터 얻어진 세포들을 포함하는 2개의 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다.

도 10. 시알릴락토오스의 차단 효과. 시글렉-1 발현 플라스미드로 트랜스펙션되거나 또는 목-트랜스펙션된 라지 세포에 의한 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 포획. 세포들은 지시된 농도의 시알릴락토오스 또는 용해성 락토오스와 전-반응되고 VLPs에 노출되었다. 데이터는 하나의 트랜스펙션 내 세 쌍들(triplicates)로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다.

도 11. LPS mDCs에서 발현된 시글렉-1은 HIV-1 바이러스-유사 입자(VLP), 리포좀 및 엑소좀 같은 독특한 강글리오시드 포함 소포들을 포획한다. 37°C에서 30분 동안 VLP 노출 전에 감소하는 농도의 α -시글렉-1 mAb 7D2와 전-반응되었던 LPS mDCs에 의한 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 포획. 데이터는 6개의 공여체들로부터 얻어진 세포들을 포함하는 3개의 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다.

도 12. 이전에 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 α -시글렉-1 mAb 7D2와 전-반응되거나 또는 전-반응되지 않았던 LPS mDCs에 최소 100-배의 과량 몰 농도의 지시된 인간 재조합 단백질들로 처리되거나 또는 처리되지 않은 경우, LPS mDCs에 의한 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 포획. 매우 흥미롭게도, 시글렉-14는 V-세트 도메인에서 시글렉-5와 100%의 아미노산 상동성을 공유한다. 데이터는 9개의 공여체들로부터 얻어진 세포들을 포함하는 3개의 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다.

도 13. α -시글렉-1 mAb 7-239의 차단 효과. (A) VLP 노출 전에 감소하는 농도의 α -시글렉-1 mAb 7-239와 37°C에서 30분 동안 전-반응되었던 LPS mDCs에 의한 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 포획. 데이터는 4개의 공여체들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다. (B) VLP 노출 전에 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 지시된 mAb들과 37°C에서 3시간 동안 전-반응되었던 LPS mDCs에 의한 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 포획. 데이터는 4개의 공여체들로부터 얻어진 세포들을 포함하는 2개의 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다.

도 14. 시글렉-1 사일런싱은 바이러스 포획 및 트랜스-감염을 차단하지만, 시글렉1(SIGLEC1)의 *de novo* 발현은 이를 회복시킨다. 시글렉-1의 간접. 목 트랜스덕션, 또는 비타겟 shRNA 또는 2개의 다른 시글렉-1-특이적 shRNA들에 의한 트랜스덕션에 따른 CD14, HLA-DR, 시글렉-1 또는 VLP 포획에 대해 양성인 LPS mDCs의 백분율. 데이터는 최소 4개의 공여체들로부터 얻어진 세포들을 포함하는 4개의 실험들로부터 얻어진 평균값 및 표준오차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0325] 상기 본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌들이 참조로서 전문으로 여기에 삽입된다.
- [0326] 본 발명이 일반적으로 기재한 바와 같이, 동일한 것이 예시에 의해 제공되는 다음의 실시예들에 대해 참고를 통해 보다 용이하게 이해될 것이고 특별하게 언급되지 않는 한 본 발명을 이에 한정하고자 하는 것은 아니다.
- [0327] 일반적 과정들
- [0328] 1. HIV-1의 분리 및 질량 분석(*mass spectrometry analysis*)
- [0329] MT-4 세포에 HIV-1_{NL4-3}을 감염시키고 감염되지 않은 세포들과 공동-배양시켰다. 세포변성 효과가 관찰되기 전에 바이러스를 수거하여 정제하였다. 앞에서 인용된 Lorizate, 2009를 참조하라. 간략하게는, 배지는 여과에 의해 깨끗하게 하고 입자들은 20%(w/w) 수크로오스의 쿠션을 통한 초원심분리에 의해 농축되었다. 농축된 HIV-1이 OptiPrep™ 농도구배(Axis-Shield PoC, Oslo, NO) 상의 속도 농도구배 원심분리에 의해 추가적으로 정제되었다.
- [0330] 가시적 바이러스 분획이 수득되어 원심분리에 의해 농축되었다. 최종 펠렛은 10 mM Hepes, 150 mM NaCl(pH 7.4) 완충액에 재현탁되어 액체 질소에서 신속하게 동결되어 -80°C에서 저장되었다. 지질 조성물 분석을 위해, 시료들이 해동 중에 메탄올에 재현탁된 후 전기스프레이 이온화 인터페이스를 가지는 직교의 가속 이동시보(time-of-flight) 질량분석기(LCT Premier; Waters Corp., Milford, MA, US)에 커플링된 UPLC에서 평가되었다. 데이터는 W-모드에서 m/z 50-1500의 질량 범위를 넘어서는 양성 이온화 모드를 이용하여 획득되었다. 0.15초의 스캔 시간 및 0.01초의 스캔과 스캔 사이의 지연(interscan delay)은 11500(FWHM)의 명목상 기구 해상도에서 이용되었다. 루이신-엔케팔린(enkephalin)이 락 스프레이 표준물질(calibrant)로서 이용되었다.
- [0331] 2. 1차 세포 배양
- [0332] 말초 혈액 단핵세포들(PBMCs)이 HIV-1-혈청음성 대상자들로부터 얻어졌고 단핵구 개체군들(>97% CD14⁺)은 CD14⁺ 양성 선택 자성 비드들(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE)을 이용하여 분리되었다. DCs는 1,000 U/ml의 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 및 IL-4(R&D)의 존재 하에서 상술한 세포들을 배양시켜 얻어졌다. iDCs를 100 ng/ml의 지질다당류(LPS; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US)의 존재 하에서 2일 이상 배양시키는 것을 포함하여 5일 동안 배양시켜 mDCs가 분화되었다. 상기 DCs는 이전에 기재된 대로 7일 째에 면역표현형이 분석되었다. 앞에서 인용된 Izquierdo-Useros, 2007을 참조하라. 단핵구들로부터 iDCs까지의 적절한 분화는 CD14의 손실 및 DC-SIGN의 획득에 기반되는 반면에, DC 성숙은 CD83, CD86, 및 HLA-DR의 상향조절된 발현에 기반되었다.
- [0333] 말초 혈액 단핵세포들(PBMCs)이 HIV-1-혈청음성(seronegative) 공여체들로부터 얻어졌고 단핵구 개체군들 또는 골수성 DCs는 Izquierdo-Useros N. 등(J Virol., 2007, 81: 7559-7570)에 기재된 바와 같이 분리되고 배양되었다. 단핵구-유래된 성숙한 DCs는 100 ng/ml의 LPS(Sigma-Aldrich) 또는 ITIP(300 IU/ml IL-1β, 1,000 IU/ml IL-6, 1,000 IU/ml TNF-알파, 모두 CellGenix로부터 구매되고, Sigma-Aldrich로부터 얻어진 1 μg/ml PGE2)로 48시간 동안 분화되었다. LPS 골수성 DCs는 100 ng/ml의 LPS로 24시간 동안 분화되었다. 자가 또는 이종 CD4+ T 세포들은 RosetteSep α-CD8⁺ 칙테일(Stem cell)을 이용하여 PBMCs로부터 풍부화되었으며, 10 IU/ml의 IL-2(Roche)가 보충된 10% 소태아혈청(FBS, Invitrogen)을 포함하는 RPMI에서 유지되었다.
- [0334] 3. 세포주들, 플라스미드들 및 바이러스 스톡들
- [0335] HEK-293T 세포주는 D-MEM 배지(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, US)에서 유지되는 반면에, CHO 및 MT4 세포주들은 각각 α-MEM 및 RPMI 배지에서 유지되었다. 모든 배지들은 10% 소태아혈청, 100 U/ml의 페니실린 및 10 μ

g/ml 의 스트렙토마이신(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, US)을 포함하였다. VLP_{HIV-Gag-eGFP}는 분자적 클론 pGag-eGFP(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH, Bethesda, MD, US)를 트랜스펙션시켜 얻어졌다. HEK-293T 세포들은 T75 플라스크에서 30 μg 의 플라스미드 DNA를 사용하여 칼슘 포스페이트(CalPhos; BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, US)로 트랜스펙션되었다. CHO 세포들은 7×10^6 개의 세포들과 40 μg 의 플라스미드 DNA를 이용하여 전기천공되었다(0.24 Kv 및 950 μF). VLPs를 포함하는 상층액이 여과(Milllex HV, 0.45 μm ; Millipore Corp., Billerica, MA, US)되어 이용할 때까지 -80°C에서 동결되었다. 농축된 VLPs를 이용한 연구들을 위해, 배지가 수거되어 여과에 의해 깨끗하게 되고 입자들이 20%(w/w) 수크로오스를 통한 초원심분리(SW32 로터에서 28,000 rpm, 2시간, 4°C)로 농축되었다. 최종 펠렛이 150 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7.4(Hepes-Sodium buffer)에 재현탁되고, 액체 질소로 신속하게 동결되어 -80°C에서 저장되었다. 감염성 바이러스 스톡의 p24^{Gag} 함량과 VLP_{HIV-Gag-eGFP}가 ELISA(PerkinElmer Inc., Waltham, MA, US) 및 정량적 웨스턴 블랏에 의해 결정되었다. 검출은 내부적으로 발생된 토끼 항-캡시드 pAb와 표준으로서 정제된 Gag 단백질을 이용하는 LiCoR 오디세이 시스템으로 실시되었다.

[0336]

HEK-293T 및 TZM-bl(U.S. National Institutes of Health [NIH] AIDS Research and Reference Reagent Program을 통해 JC Kappes, X Wu, 및 Tranzyme Inc.로부터 얻어짐)은 D-MEM(Invitrogen)에서 유지되었다. 라지(Raji) B 세포주(Y. van Kooyk에 의해 친절하게도 제공됨)는 RPMI(Invitrogen)에서 배양되었다. 라지 DC-SIGN B 세포주(Y. van Kooyk에 의해 친절하게도 제공됨)는 1 mg/ml의 G418(Invitrogen)를 가지는 RPMI에서 유지되었다. 모든 배지는 10% FBS, 100 IU/ml의 페니실린 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 스트렙토마이신(모두 Invitrogen으로부터 구매됨)을 포함하였다. VLP_{HIV-Gag-eGFP} 및 VLP_{HIV-Gag-Cherry}는 이전에 기재된 대로 얻어졌다(Izquierdo-Useros N. 등, Blood 113: 2732-2741). HIV_{NL4-3}은 분자적 클론 pNL4-3(M. Martin의 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)의 트랜스펙션에 따라 얻어졌다. HIV_{NL4-3-Cherry}는 1:1 비율의 pCHIV 및 pCHIV mCherry의 공동트랜스펙션에 따라 얻어졌다[Lampe M. 등 Virology 360: 92-104]. 외피 당단백질이 없는 HIV_{NL4-3}는 다른 곳에서 기재된 대로 얻어졌다[앞에서 인용된 Izquierdo-Useros N. 등]. 상기 바이러스 스톡들의 p24Gag 함량 및 VLP는 ELISA(Perkin-Elmer) 또는 정량적 웨스턴 블랏에 의해 결정되었다[Izquierdo-Useros N. 등 PLoS Biol 10: e1001315. doi:10.1371/journal.pbio.1001315]. 감염 어세이들에서 사용된 HIV_{NL4-3}은 [Li M. 등, 2005, J. Virol. 79: 10108-10125]에 기재된 대로 TZM-bl 리포터 세포주를 이용하여 적정되었다.

[0337]

4. 리포좀들의 제조

[0338]

큰 단일라멜라 소포들(LUVs)은 이전에 기재된 압출 방법에 따라 제조되었다. Mayer L. 등, Vesicles Biochim. Biophys. Acta 1986; 858:161-168을 참조하라. 지질 및 강글리오시드들은 상업적으로 획득되었다(Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, US; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, US). LUV_{HIV-tRed} 지질 조성물은 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC) 25몰%:1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC) 16몰%: 뇌 스팅고미엘린(SM) 14몰%:콜레스테롤(Chol) 45몰%였으며 Cer, PS 또는 강글리오시드들이 존재(4몰%)하는 경우 SM 양은 10몰%까지 감소되었다. LUV_{POPC-tRed} 지질 조성물은 4몰%의 Cer, GM3, GM2 또는 GM1을 포함하거나 또는 포함하지 않는 96몰%의 POPC였다. 모든 LUVs는 2mol%의 1,2-디헥사데카노일-sn-글리세로-3-포스포에타놀아민(DHPE)-텍사스 레드(Molecular Probes; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, US)를 포함하였다. 지질들은 클로로포름:메탄올(2:1)에서 혼합되어 질소 하에서 건조되었다. 유기 용매의 자취들이 1시간 내지 2시간 동안의 진공 펌핑에 의해 제거되었다. 이후, 상기 건조된 지질 박막(lipid film)이 10 mM Hepes, 150 mM NaCl(pH 7.4)에 분산되고 압출성형기(Thermo-barrel extruder)(Lipex extruder; Northern Lipids, Inc., Burnaby, CA)를 이용하여 100 nm 동공 크기의 2층의(two stacked) 폴리카르보네이트 막들(Nucleopore, Inc., Pleasanton, CA, US)을 통해 압출하기 전에 10개의 동결-해동 사이클들을 거쳤다. 유사한 형광 강도를 나타내는 동일한 농도의 LUV로 mDC 펠스를 실시하기 위해, LUVs 농축을 포함하는 텍사스 레드는 보처 포스페이트 결정 방법(Bottcher's phosphate determination method)에 따라 정량되고 상기 형광 방출 스펙트럼이 SLM 아민코 시리즈 2 분광형광계(Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY, US)에서 580 nm의 여기

과장 세팅으로 기록되었다. Bottcher C, 등, Anal. Chimica Acta 1961; 24:203-204를 참조하라.

[0339] 5. 리포좀 및 VLP 포획 어세이들

[0340] 모든 포획 실험들은 2×10^5 개의 세포 당 100 μM 의 특정 LUV_{tRed} 제형들과 웨스턴 블랏에 의해 정량된 75 ng의 VLP_{HIV-Gag-eGFP}Gag(ELISA에 의해 측정된 2,500 pg의 VLP_{HIV-Gag-eGFP} p24^{Gag})를 일정한 속도로 동시에 mDCs를 37°C에서 4시간 동안 펄싱하여 실시되었다. 광범위한 세척 후, 양성 DCs는 FACSCalibur를 가진 FACS(Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, US)에 의해 획득되어 CellQuest 소프트웨어(Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, US)를 이용하여 상기 수집된 데이터를 분석하였다. 전방산란 및 측면산란 게이팅이 모든 분석으로부터 유래하는 죽은 세포 및 테브리스(debris)를 배제하기 위해 이용되었다.

[0341] 경쟁 실험들은 감소하는 양의 GM2-포함 LUV_{HIV-tRed} 또는 100 μM 의 Cer- 및 PS-포함 LUV_{HIV-tRed}의 존재 하에서 2×10^5 개의 mDCs를 75 ng의 VLP_{HIV-Gag-eGFP}Gag와 37°C에서 4시간 동안 반응시켜 최종 농도 1×10^6 세포/ml에서 실시되었다. 택일적으로, 세포들은 75 ng의 VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag 및 GM1, GD1b, GT1b, GQ1b, Cer 및 PS를 포함하거나 또는 포함하지 않는 100 μM 의 LUV_{HIV-tRed}와 반응되었다. 이후에, 세포들은 이전에 기재된 대로 FACS로 분석되었다.

[0342] 6. VLPs 및 LUVs의 뉴라미니다제 처리

[0343] 총 2×10^5 개의 DCs가 100 또는 50 mM의 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)로부터 유래된 뉴라미니다제(Factor X; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US)로 37°C에서 12시간 동안 처리되거나 또는 처리되지 않은 25 μM 의 GM3-포함 LUV_{HIV-tRed} 및 75 ng의 수크로오스-펠렛된 VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag로 37°C에서 2시간 동안 펄스되었다. 상기 12시간 반응은 글라스(glass)-코팅된 플레이트(SMI-LabHut Ltd., Churcham, Gloucestershire, GB) 내 Hepes-Sodium 완충액에서 실시되었으며, 상기 반응은 FCS를 포함하는 RPMI 배지를 첨가하여 중단되었다. 세포들이 세척된 후 FACS에 의해 평가되어 tRed 및 eGFP 양성 세포들의 백분율을 얻는다.

[0344] 7. mDCs의 락토오스 및 GM3 구성 머리기 처리

[0345] mDCs는 5 또는 10 mM의 락토오스(Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US) 및 용해성 GM3 카르보하이드레이트 머리기(Carbosynth Ltd., Compton, Berkshire, GB)로 상온에서 30분 동안 전처리되거나 또는 처리되지 않았다. 이후, 세포들은 테스트되는 상기 화합물의 최종 농도 5 또는 10 mM에서 50 μM 의 GM3-포함 LUV_{HIV-tRed} 및 75 ng의 수크로오스-펠렛된 VLP_{HIV-Gag-eGFP} Gag로 37°C에서 2시간 동안 펄스되었다. 세포들은 이전에 기재된 대로 FACS에 의해 분석되었다.

[0346] 8. 강글리오시드 에너지 구조의 최소화(Minimization) 및 통계적 분석

[0347] 진공 하에서 최소 에너지 구조는 MM2-힘의 장(force field) 및 최대경사 알고리즘(steepest-descent-algorithm)을 이용하는 Chem3D Ultra 소프트웨어(CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA, US)를 사용하여 컴퓨팅되었다. 최소 제곱평균제곱근은 0.1까지 셋팅되었고; 최소 및 최대 이동(move)은 각각 0.00001 및 1.0까지로 셋팅되었다. 통계학은 GraphPad Prism v.5 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, US)를 이용하여 실시되었다.

[0348]

9. DCs의 트랜스펙션

[0349]

VSV-G-슈도타입된(Pseudotyped) SIV3 렌티벡터(A. Cimarelli에 의해 친절하게도 제공됨)가 Goujon C. 등, Gene Ther., 2006, 13: 991-994에서처럼 제조되었다. 분리된 단핵구들(5×10^5)에 SIV3 입자들을 감염시키고 MOI = 50의 2개의 다른 시글렉1-특이적 shRNA 또는 하나의 비타겟 shRNA 대조군 MISSION 렌티바이러스 트랜스డ션 입자들(Sigma-Aldrich)로 트랜스డ션되었다. 트랜스ડ션된 단핵구들은 LPS mDCs로 분화되었으며, 상기 기재된 대로 VLP 포획 및 HIV-1 트랜스-감염에 대해 평가되었다. DCs의 적절한 표현형적 성숙이 앞에서 인용된 Izquierdo-Useros N. 등에 기재된 대로 평가되었다. 동일한 pLKO.1-puro 벡터 백본에 클론된 GFP 리포터 유전자를 운반하는 렌티바이러스 트랜스డ션 입자들(MISSION TurboGFP Control Transduction Particles)이 FACS를 통한 트랜스డ션 효율을 평가하는 데 이용되었다(세포들이 이용되는 경우, 7일째에 75%-98%로 평가됨).

[0350]

10. FACS에 의한 시글렉-1 표면 발현 분석

[0351]

DCs는 1 mg/ml의 인간 IgG(Baxter, Hyland Immuno)로 블록킹되고 제조자의 지시에 따라 항-시글렉-1-PE 7-239 mAb(AbD Serotec)로 4°C에서 20분 동안 염색되었다. 시료들은 CellQuest 및 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 FACSCalibur(Becton-Dickinson)로 분석되어 수집된 데이터를 평가하였다.

[0352]

11. 트랜스-감염 어세이들

[0353]

DCs는 상기 기재된 대로 HIV_{NL4-3}로 처리되어 펄스되었다. 광범위한 세척 후, 세포들은 트랜스-감염을 측정하기 위해 TZM-bl CD4⁺ 타겟 세포주와 공동-배양되었다. 펄스된 단핵구-유래된 DCs 또는 골수성 DCs는 각각 1:1 또는 5:1의 비율로 네 쌍 또는 두 쌍으로 공동-배양되었다. 세포들은 48시간 후에 Fluoroskan Ascent FL 발광분석기(Thermo Labsystems)에서 루시퍼라제 활성(BrightGlo Luciferase System; Promega)에 대해 어세이되었다. 비-HIV-1-펄스된 공동-배양물 또는 리포터 CD4+ 세포 단독으로 구성된 백그라운드 값들이 각 시료에 대해 공제됐다. 펄스된 세포들 또는 재-감염 이벤트들의 가능한 생산적 감염을 검출하기 위해, 일부 DCs는 0.5 μM의 프로테아제 억제제인 사퀴나비르(Saquinavir)의 존재 하에서 공동배양되었다.

[0354]

12. 시글렉 컨스트럭트의 트랜스펙션

[0355]

라지 세포들(2×10^6)에 시글렉-1, 시글렉-5 또는 시글렉-7의 코딩 부위를 포함하는 pCMV6-Entry 벡터 백본(Origene)이 제조자에 의해 추천된 대로 아막사 뉴클레오팩터(Amaxa nucleofector)를 이용하여 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 36시간 후, 세포들은 상술한 대로 VLP 포획 및 HIV-1 트랜스-감염(2:1 비율에서)에 대해 평가되었다. 지시되는 경우, 세포들은 VLP 펄스 전에 감소하는 농도의 3'-시알릴락토오스(Carbosynth) 또는 락토오스(Sigma-Aldrich)로 30분 동안 전-처리되었다. 외피-결핍 바이러스들을 이용한 실험들에서, 5×10^5 의 세포들은 ELISA에 의해 추정된 100 ng의 p24^{Gag}로 37°C에서 4시간 동안 펄스되었고 상술한 대로 포획 및 트랜스-감염(2:1 비율에서)에 대해 평가되었다. HEK-293T 세포들은 Fugene HD(Promega)를 이용하여 트랜스펙션되었으며 라지 세포들에 대해 기재된 대로 트랜스펙션 24시간 후에 평가되었다. HEK-293T의 트랜스-감염은 다른 발광분석기(Luminoskan Ascent, Thermo Labsystems)에서 테스팅되었고, 수집된 데이터는 100%로 표준화되었다. 두 개의 세포 타입들에서 트랜스펙션 효율들은 항-시글렉-1-PE 7-239 mAb, 항-시글렉-7-PE 5-386 mAb(ABD Serotec), 및 항-시글렉-5/14-PE 1A5 mAb(Biolegend)로 세포들을 염색하여 FACS로 평가되었다. 안정적인 라지 DC-SIGN 세포들은 항-DC-SIGN-PE DCN46 mAb(BD Pharmigen)로 표지되었다.

[0356]

13. 통계적 분석

[0357]

통계학은 쌍체비교(paired) t 검정($p \leq 0.01$ 에서 유의하게 고려됨) 또는 스피어만 상관계수(Spearman correlation)를 이용하여 GraphPad Prism v.5 소프트웨어로 실시되었다.

[0358]

실시예 1

[0359]

HIV-1 또는 소포성 막들의 바깥쪽 리플렛(leaflet) 내 강글리오시드들은 mDC 흡수를 유발하는 바이러스 부착 인자들로서 기능할 수 있다

[0360]

글리코스핑고지질들은 HIV-1이 파생(bud)할 것으로 생각되는 라프트-유사 세포막 도메인들(raft-like plasma membrane domains)에 풍부화되어 있다. 이러한 약속에 기반하여, mDCs의 HIV-1 포획에 대한 글리코스핑고지질들의 잠재적인 역할이 조사되었다. T-세포주 MT-4로부터 유래된 HIV_{NL4.3} 내 GM3의 존재가 질량분석에 의해 확인되었다. 또한, GM1, GM2 및 GD1을 포함하는 여러 가지 다른 강글리오시드들도 상기 HIV-1 막에서 검출되었다. 도 1a, 도 1b 및 도 1c를 참조하라.

[0361]

HIV-1 또는 소포성 막들의 바깥쪽 리플렛(leaflet) 내 강글리오시드들이 mDC 흡수를 유발하는 바이러스 부착 인자들로서 기능할 수 있는지를 테스트하기 위해, HIV-1 (LUV_{HIV-tRed})의 크기 및 지질 조성물을 모방(mimic)하고 다른 강글리오시드들을 포함하는 텍사스 레드(tRed) 표지된 큰 단일라벨라 소포들(LUV)이 제조되었다. 도 6, Lorizate M, 등, J. Biol. Chem. 2009; 284:22238-22247을 참조하라. 모든 LUVs는 동일한 형광 강도를 나타냈다. 도 7을 참조하라. 성숙한 DCs는 LUV_{HIV-tRed} 또는 VLPs로 37°C에서 4시간 동안 펄스되었고, 형광성 세포들의 백분율이 FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting)로 결정되었다. 높은 백분율의 mDCs는 형광성 VLP_{HIV-Gag-eGFP}를 포획하였다. 도 1d를 참조하라. CHO 세포주에서 생산된 VLPs도 mDCs에 의해 효과적으로 포획되었다. 도 8을 참조하라. mDCs 내로의 흡수는 이전에 강글리오시드들을 포함하는 것으로 보여진 마우스 레트로바이러스 MuLV에서도 추가적으로 관찰되었다. Chan R, 등, J. Virol. 2008; 82:11228-11238을 참조하라.

[0362]

한편, mDCs 내로의 유의한 흡수가 HIV-1의 주요 지질 구성요소들을 포함하지만 강글리오시드들을 포함하지 않는 LUV_{HIV-tRed}에서 관찰되지 않았다. 도 1d를 참조하라. mDCs 내로의 흡수는 세라마이드(Cer)를 포함하는 LUV_{HIV-tRed}에 대해서 음성인 상태였다($P < 0.0001$, 쌍체비교 t 검정). 도 1d를 참조하라. 이것은 GM3, GM2 또는 GM1 같은 모노시알로강글리오시드들이 상기 LUVs로 삽입된 경우에 완전히 달라졌다; mDCs는 상술한 리포좀들을 VLP_{HIV-Gag-eGFP}와 동일한 효율로 포획할 수 있었다. 도 1d를 참조하라. 이러한 포획이 단지 음적 전하된 강글리오시드들과 mDCs의 표면 전하들 간의 정전기적 상호작용에 기인한 것을 확인하기 위해, LUV_{HIV-tRed} 포함 음적 전하된 포스파티딜세린(PS)이 동시에 분석되었으며, mDC 포획에 대해 음성이라는 것을 확인하였다($P = 0.0081$, 쌍체비교 t 검정). 도 1d를 참조하라. 상술한 결과들은 모노시알로강글리오시드들이 mDCs에 의한 소포 포획을 매개하고 상기 카르보하이드레이트 머리기가 이러한 과정에서 중요하다는 것을 보여줬다.

[0363]

실시예 2

[0364]

강글리오시드-포함 큰 단일라벨라 소포들 및 VLPs는 mDCs 내로의 공통적 침투 기작을 이용하고 mDCs에서 동일한 구획에 도달한다

[0365]

강글리오시드-포함 LUV_{HIV-tRed} 및 VLP_{HIV-Gag-eGFP} (및 HIV-1)가 mDCs 내로 공통적인 침투 기작을 이용하는지를 조사하기 위해, 여러 가지 경쟁 실험들이 실시되었다. 성숙한 DCs가 감소하는 양의 GM2-포함 LUV_{HIV-tRed} 및 일정한 양의 VLP_{HIV-Gag-eGFP}로 37°C에서 4시간 동안 펄스되었다. 과도한 세척 후, eGFP- 및 tRed-양성 세포들의 백분율이 FACS에 의해 결정되었다. GM2-포함 LUV_{HIV-tRed}가 투여량-의존적으로 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 mDCs 내로의 흡수에 대해 효과적으로 경쟁하였다($P < 0.0001$, 쌍체비교 t 검정). 도 1e를 참조하라. Cer를 포함하거나 또는 글리코스핑고지질을

가지지 않는 LUV_{HIV-tRed}에서 VLP 흡수에 대해서는 어떠한 경쟁도 관찰되지 않았다. 도 1e를 참조하라. 따라서, GM-포함 LUV_{HIV-tRed} 및 VLP_{HIV-Gag-eGFP}는 mDCs 내로 들어가기 위한 공통적 침투 기작을 이용하고, 상기 기작은 상기 카르보하이드레이트 머리기에 의존적이다.

[0366] 다음으로, GM-포함 LUV_{HIV-tRed} 및 VLP_{HIV-Gag-eGFP}가 mDCs 내에서 동일한 구획(compartment)에 도달하는 지가 회전-디스크(spinning-disk) 공초점 현미경을 이용하여 조사되었다. 이전에, mDC 내로 포획된 HIV-1에 대한 세 가지 태입의 패턴들이 기술되었다: 임의적, 양극화된 또는 낭-유사(sac-like) 구획들. Izquierdo-Useros N, 등, J. Virol. 2007; 81: 7559-7570을 참조하라. 또한, 동일한 패턴들이 GM-포함 LUV_{HIV-tRed}에서 관찰되었으며, 다른 패턴들을 보이는 mDCs의 백분율이 이용된 입자와 상관없이 유사하였다. 따라서, VLP_{HIV-Gag-eGFP} 및 GM-포함 LUV_{HIV-tRed}는 내재화(internalization)에 대해서 경쟁할 뿐 아니라, mDCs 안의 유사 구획으로 트래픽된다. VLP_{HIV-Gag-eGFP} 및 GM-포함 LUV_{HIV-tRed}가 동일한 구획으로 포획되는지를 결정하기 위해, mDCs는 GM-포함 LUV_{HIV-tRed}로 37°C에서 3시간 동안 전-처리된 후, VLP_{HIV-Gag-eGFP}와 3시간 동안 추가적으로 반응되었다. 고정된 세포들의 공초점 현미경은 VLPs가 GM-포함 LUV_{HIV-tRed}(GM1, GM2 또는 GM3 중 어느 것을 포함함)와 동일한 세포내 구획에서 광범위하게 공동-위치된다는 것을 보여줬다. 도 2를 참조하라.

[0367] 실시예 3

[0368] 소포들의 측면 지질 구성은 mDC 포획에 영향을 미치지 않는다

[0369] HIV-1 막 내에서, 장글리오시드들은 액체-정돈된(liquid-ordered) 막 내에 존재한다. 앞에서 인용된 Lorizate, 2009 및 Chan, 2008을 참조하라. 따라서, 상기 입자 막의 액체 정돈 또는 특이적 지질 조성물(장글리오시드와 다른)이 mDC 포획에 영향을 미치는지가 평가되었다. 지질 라프트 내 콜레스테롤과의 장글리오시드 상호작용은 장글리오시드 형태(conformation)에 영향을 미치고 세포내 수용체로서 이의 활성을 변화시킨다고 알려져 있다. Lingwood D, 등, Nat. Chem. Biol. 2011; 7:260-262, Simons K, 등, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011, 그리고 앞에서 인용된 Simons, 2000 및 Brown, 2000을 참조하라. 성숙한 DCs가 다른 장글리오시드들과 함께 또는 없이 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC)으로 구성된 LUV_{POPC-tRed}와 반응되었다. 도 3A를 참조하라. LUV_{HIV-tRed}와 달리, LUV_{POPC-tRed}는 액체-비정돈된(liquid-disordered) 막 구조를 가진다. LUV_{POPC-tRed}에 대한 결과들은 GM1, GM2 또는 GM3 중 어느 것이 존재하는 경우 효과적인 포획을 보이는 LUV_{HIV-tRed}와 매우 유사하였지만 Cer 포함 LUV_{POPC-tRed} 또는 장글리오시드가 없는 LUV_{POPC-tRed}에서는 어떠한 흡수도 관찰되지 않았다. 도 3B를 참조하라. 더 나아가, 임의적, 양극화된 또는 낭-유사 구획들 내로 포획된 입자들을 보이는 mDCs의 백분율이 다른 입자들에 대해서 매우 유사하였다. 도 3B를 참조하라. 상술한 결과들은 장글리오시드-포함 LUVs가 측면 지질 구획에 상관없이 VLP_{HIV-Gag-eGFP}처럼 동일한 포획 및 트래픽킹 경로를 이용한다는 것을 보였으며, 장글리오시드들 자체가 mDC 포획을 담당하는 핵심 분자들이라는 것을 나타냈다.

[0370] 실시예 4

[0371] 카르보하이드레이트 머리기의 특정 자리에 위치된 3개까지의 시알산을 가진 복잡한 장글리오시드들이 mDC 흡수를 위한 공통적 구조 결정인자를 공유한다

[0372] mDCs에 의한 효율적 인지에 필요한 분자 구조에 대한 추가적인 이해를 얻기 위해, 보다 복잡한 장글리오시드들을 운반하는 LUV_{HIV-tRed}가 제조되었다. 상술한 LUVs는 카르보하이드레이트 머리기 내 다양한 위치들에서 2개, 3개 및 4개의 시알산 기들을 포함하였다(디-, 트리- 및 테트라-시알로장글리오시드들). 2개 또는 3개의 시알산을 가지는 장글리오시드들(각각, GD1b 및 GT1b)을 포함하는 동일한 양의 LUV_{HIV-tRed}로 펠스된 성숙한 DCs가 GM1-LUV_{HIV-tRed}처럼 동일한 효율을 가지고 상술한 입자들을 포획하였다. 포획은 4개의 시알산을 가지는 장글리오시드(GQ1b)

를 포함하는 LUV_{HIV-tRed}에서 거의 완전하게 상실되었다. 도 4A를 참조하라. 따라서, GD1b 또는 GT1b을 운반하는 LUV_{HIV-tRed}는 VLP_{HIV-Gag-eGFP}를 이용하는 mDC 흡수와 효과적으로 경쟁하는 반면에, GQ1b, PS 또는 Cer를 운반하는 LUV_{HIV-tRed}는 어떠한 경쟁도 보이지 않았다. 도 4B를 참조하라. 상술한 결과들은 카르보하이드레이트 머리기의 특정 자리에 위치된 3개까지의 시알산을 가지는 복잡한 강글리오시드들이 mDC 흡수를 위한 공통적 구조 결정인자를 공유한다는 것을 나타냈다.

[0373] Cer-포함 LUVs의 음성 표현형은 카르보하이드레이트 머리기가 mDC 포획을 위해 특이적으로 필요하다는 것을 나타냈다. 시알산은 특정 바이러스들에 대한 세포내 수용체로서 이전에 동정되었다. Weis W, 등, Nature 1988; 333:426-431을 참조하라. 따라서, mDC 포획에 있어서 이의 중요성이 테스트되었다. Cer, GM1 또는 시알산 기가 없는 GM1(아시알로 GM1)을 포함하는 동일한 농도의 LUV_{HIV-tRed}와 mDCs와의 반응은 시알산-의존적 포획을 나타냈다. 도 5a를 참조하라. 또한, GM3-포함 LUV_{HIV-tRed} 및 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 인 시류 뉴로미니다제 처리는 mDCs에 의한 입자 포획을 현저하게 감소시켰다. 도 5b를 참조하라. 따라서, 강글리오시드들 내 시알산 모이어티는 mDCs에 의한 특이적 인지에 필요하다. GM4(GM3의 글루코오스 모이어티가 없는) 또는 Ga1Cer(GM3의 글루코오스 및 시알산 모이어티들 모두가 없는) 중 어느 하나를 포함하는 LUV_{HIV-tRed}가 제조되어 카르보하이드레이트 머리기의 다른 구성성분들의 기여도를 평가하였다. 도 5c를 참조하라. GM4- 또는 Ga1Cer-포함 LUV_{HIV-tRed}와 반응된 성숙한 DCs는 오직 백그라운드 레벨의 리포좀 포획만을 나타냈는데, 이는 스팽고지질의 글루코오스 모이어티도 DC 포획에 필요하다는 것을 의미한다. 도 5c를 참조하라.

[0374] 실시예 5

[0375] 용해성 카르보하이드레이트들은 mDCs에 의한 HIV-1의 분자적 인지와 경쟁한다

[0376] 카르보하이드레이트 모이어티가 HIV-1 포획을 위한 분자적 인지 결정인자를 구성한다면, 용해성 카르보하이드레이트들이 VLP 및 LUV 흡수에 대해 경쟁해야만 한다. mDCs에 의한 GM3-포함 LUV_{HIV-tRed} 또는 VLP_{HIV-Gag-eGFP}의 포획은 용해성 GM3의 존재 하에서 완전히 차단되는 반면에, 동일한 농도의 락토오스(시알산 기가 없음)는 어떠한 효과도 없었다. 도 5d를 참조하라. 종합해보면, 상술한 데이터는 강글리오시드들의 시알릴락토오스 모이어티가 mDCs에 의한 효과적인 HIV-1 인지 및 포획에 필요한 분자적 결정인자라는 것을 명확하게 보여주었다. 경쟁을 위해 LUVs에서 저농도의 강글리오시드들이 요구되는 것(\approx 1000배 미만; 도 1c)과 비교하여, 도 5d에서는 고농도의 용해성 GM3가 요구되었는데, 이는 막 내에 Cer에 대한 시알릴락토오스의 부착이 더 높은 결합 친화도를 부여한다는 것을 의미하였다. 또한, Cer 자체의 친수성 모이어티가 mDCs에 대한 결합 친화도를 직접적으로 증가시키기 위한 인지 도메인의 일부일 수 있다.

[0377] 인지 도메인의 구조적 결정인자들을 추가적으로 이해하기 위해, 테스트된 강글리오시드들의 에너지-최소화된 (energy-minimized) 3D 모델들이 구축되었다. 도 5e를 참조하라. 상술한 모델들은 시알릴락토오스가 GM1, GM2, GM3, GD1b 및 GT1b에 노출되지만, GM4 및 아시알로 GM1에는 부재하다는 것을 나타냈다. 도 6을 참조하라.

[0378] 실시예 6

[0379] 시글렉-1을 발현하는 세포들은 VLP_{HIV-Gag-eGFP}을 효과적으로 포획할 수 있다

[0380] 시글렉-1의 내인성 발현이 부재하고 시글렉-1의 비특이적 상향-조절 없이 효율적으로 트랜스펙션될 수 있는 라지 B 세포주가 트랜스펙션을 위해 사용되었다. 라지 B 세포주에서 시글렉-1 발현벡터의 트랜스펙션은 시글렉-1-양성 세포군에서 VLP_{HIV-Gag-eGFP} 포획을 유의하게 증가시켰고, 이러한 효과는 항-시글렉-1 mAb 7D2의 전처리에 의해 없어졌다($p=0.0005$; 도 9). 시글렉-1 트랜스펙션된 세포들 또는 시글렉-5 또는 시글렉-7 발현 플라스미드들의 트랜스펙션 후의 시글렉-1-음성 개체군에서 어떠한 증가된 포획도 보여지지 않았다(도 9). 시알릴락토오스의 전-처리도 시글렉-1 트랜스펙션된 라지 세포들에서 VLP 포획을 차단하였다(도 10).

[0381] 항-시글렉-1 mAb 7D2의 적정(titration)은 VLP 포획의 투여량-의존적 억제를 나타냈다(도 11). 상기 mAb 7D2-매개된 억제의 특이성은 다른 시글렉 단백질들과 함께 이 mAb의 전-처리에 의해 확인되었다. 정제된 시글렉-1의 전-처리는 VLP 포획을 완벽하게 회복시켰지만, 정제된 시글렉-7, -5/14 또는 CD83의 전-처리는 어떠한 효과도 나타내지 못 했다(도 12). 7D2 Fab 단편들이 VLP 포획의 차단을 유발하지 않았기 때문에 7D2 mAb에 의해 인지된 에피토프가 실제적인 바이러스 결합 위치를 구성하지 않을 지라도, 다른 a-시글렉-1 mAb인 7-239를 이용한 적정은 VLP 포획의 투여량-의존적 억제를 확인시켜 주었다(도 13a).

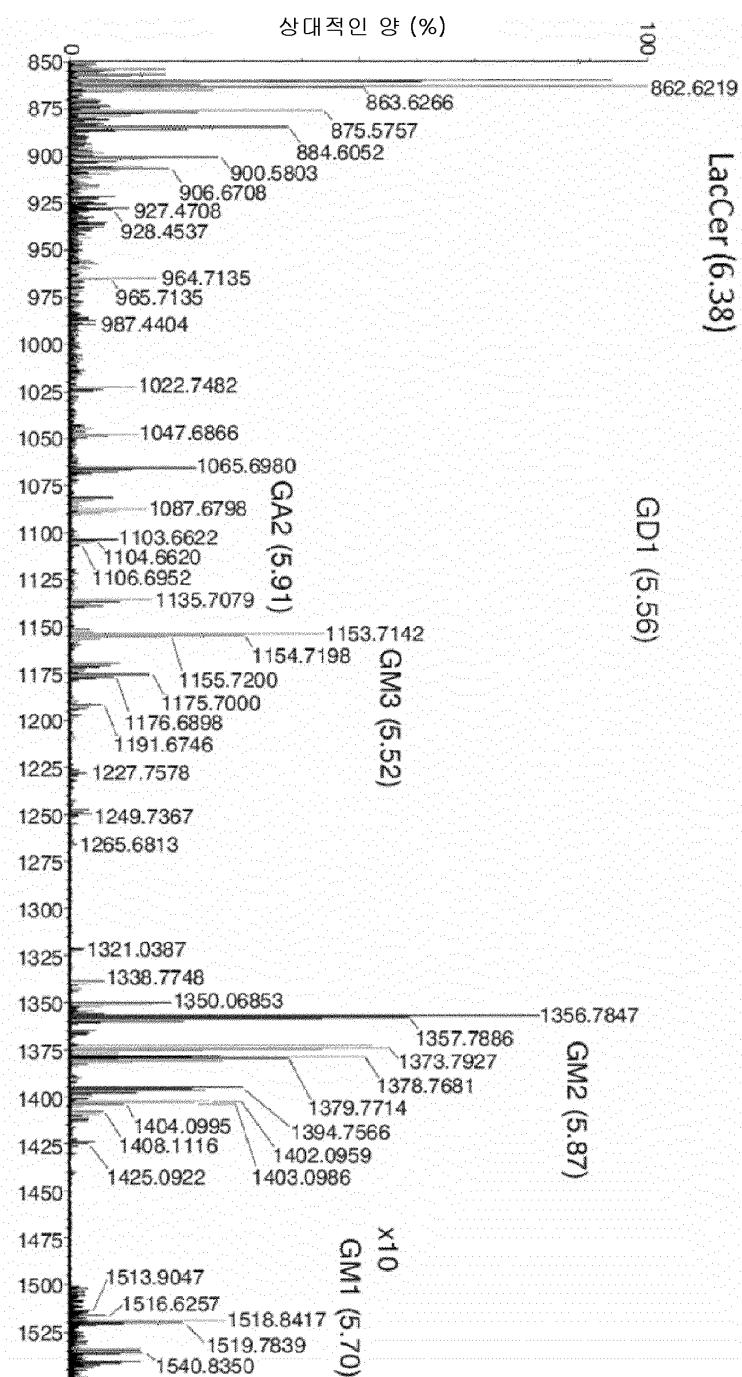
[0382] 실시예 7

[0383] 시글렉-1을 사일런싱시키는 것은 DCs에 의한 $VLP_{HIV-Gag-eGFP}$ 의 포획에서의 감소를 유발한다

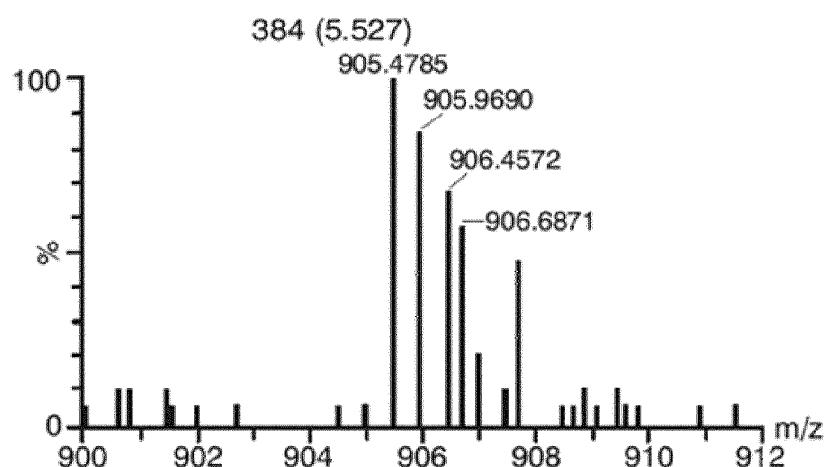
[0384] HIV-1 포획 및 트랜스-감염 동안 시글렉-1의 핵심적인 역할을 확인하기 위해, 상보적인 실험 전략이 적용되었다: LPS mDCs에서 시글렉-1 발현 레벨을 감소시키는 RNA 간섭 및 이러한 수용체가 결핍된 세포로의 시글렉-1의 트랜스펙션. 이러한 접근방법에서, 다른 shRNAs를 코딩하는 렌티바이러스 입자들을 가지는 DCs이 제한인자(restriction factor) SAMHD1에 대응하고 DC 생산적 감염을 촉진하는 vpx-발현 렌티바이러스들로 공동-감염 시킴으로써 트랜스덕션되었다. 두 개의 서로 다른 시글렉-1-특이적 shRNAs의 트랜스덕션은 시글렉-1 표면 발현에서 현저한 감소 및 $VLP_{HIV-Gag-eGFP}$ 포획의 동시 상실을 유발하였지만, 비-타겟 shRNA 대조군은 그렇지 않았다(도 14).

도면

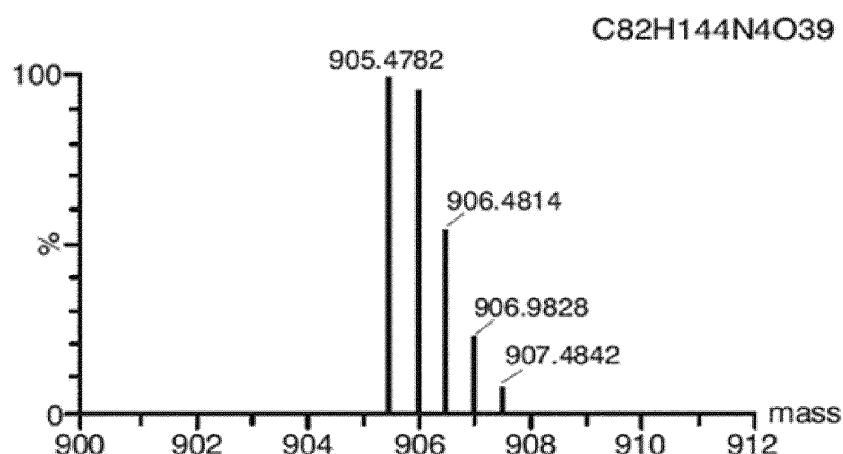
도면1a



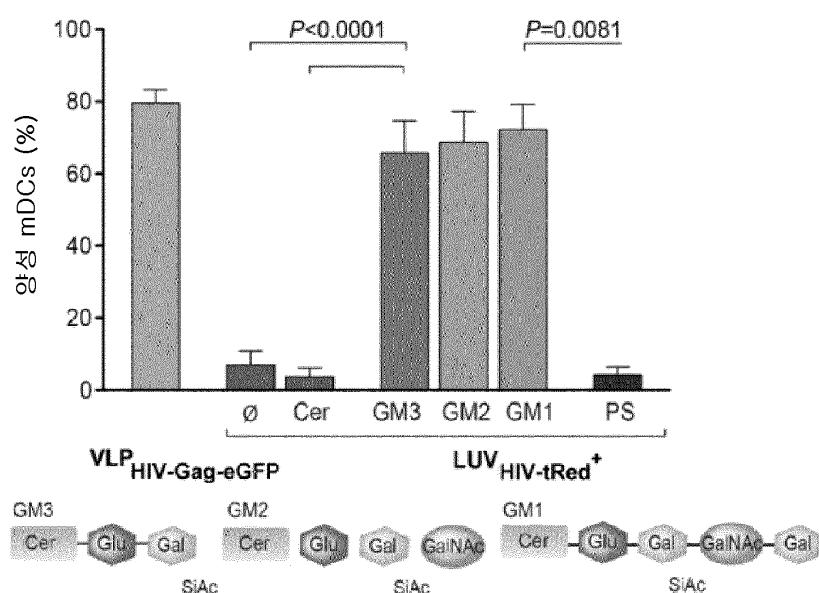
도면1b



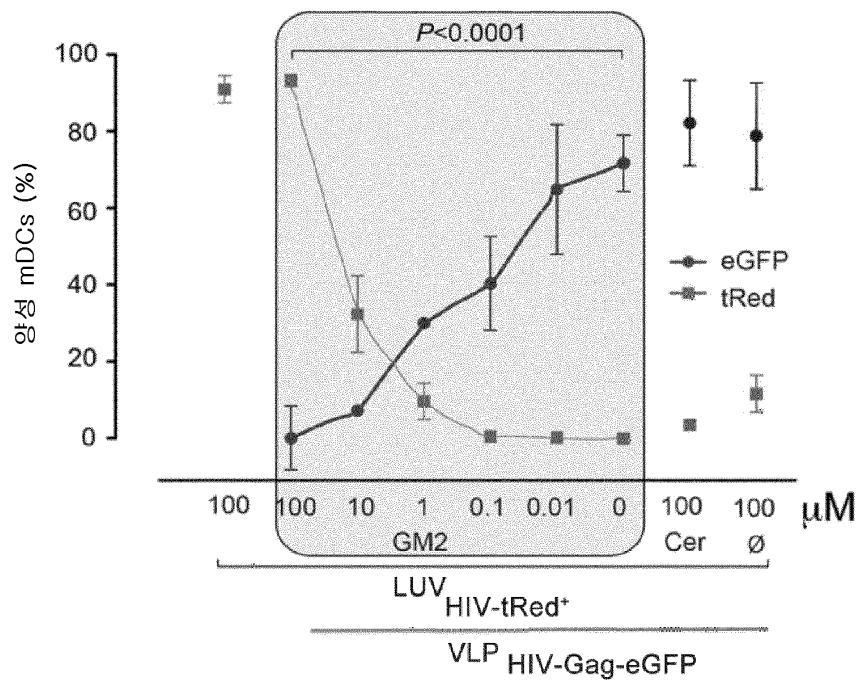
도면1c



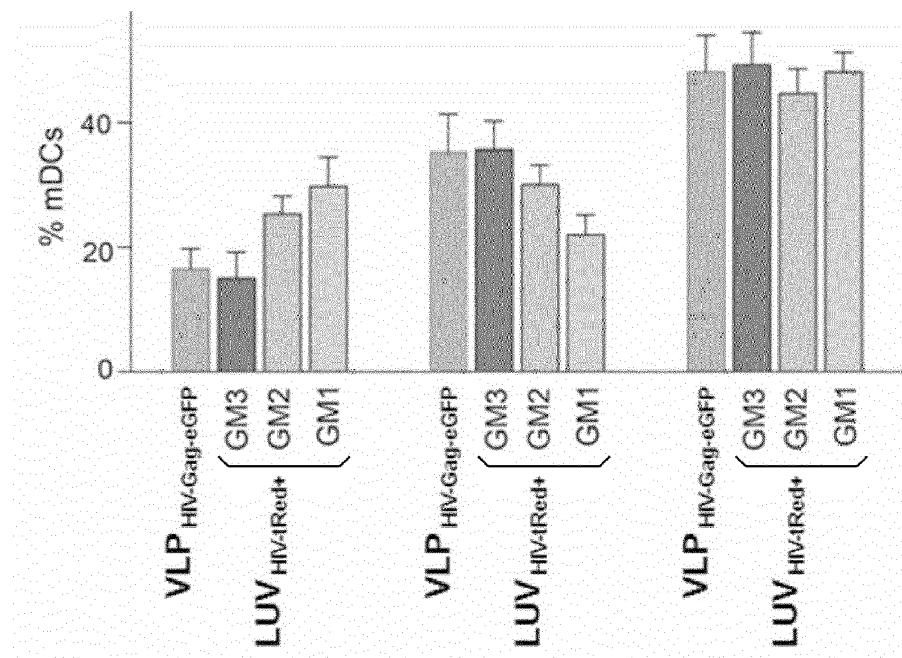
도면1d



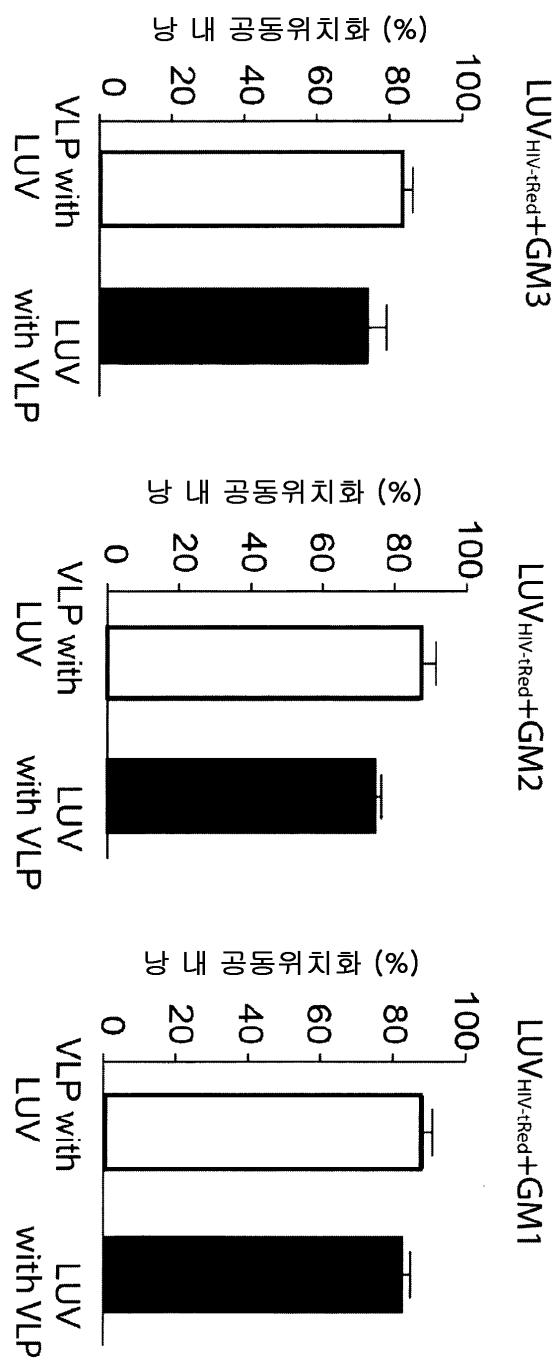
도면1e



도면2a

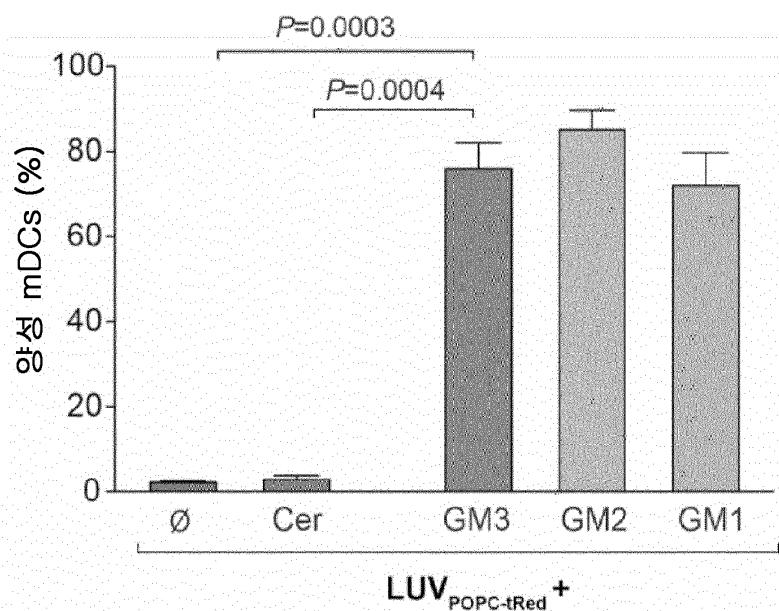


도면2b

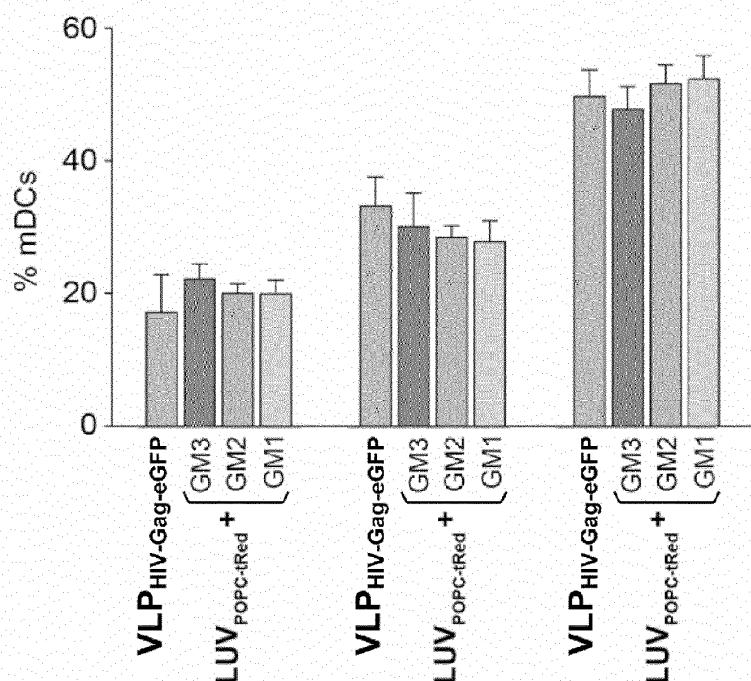


도면3

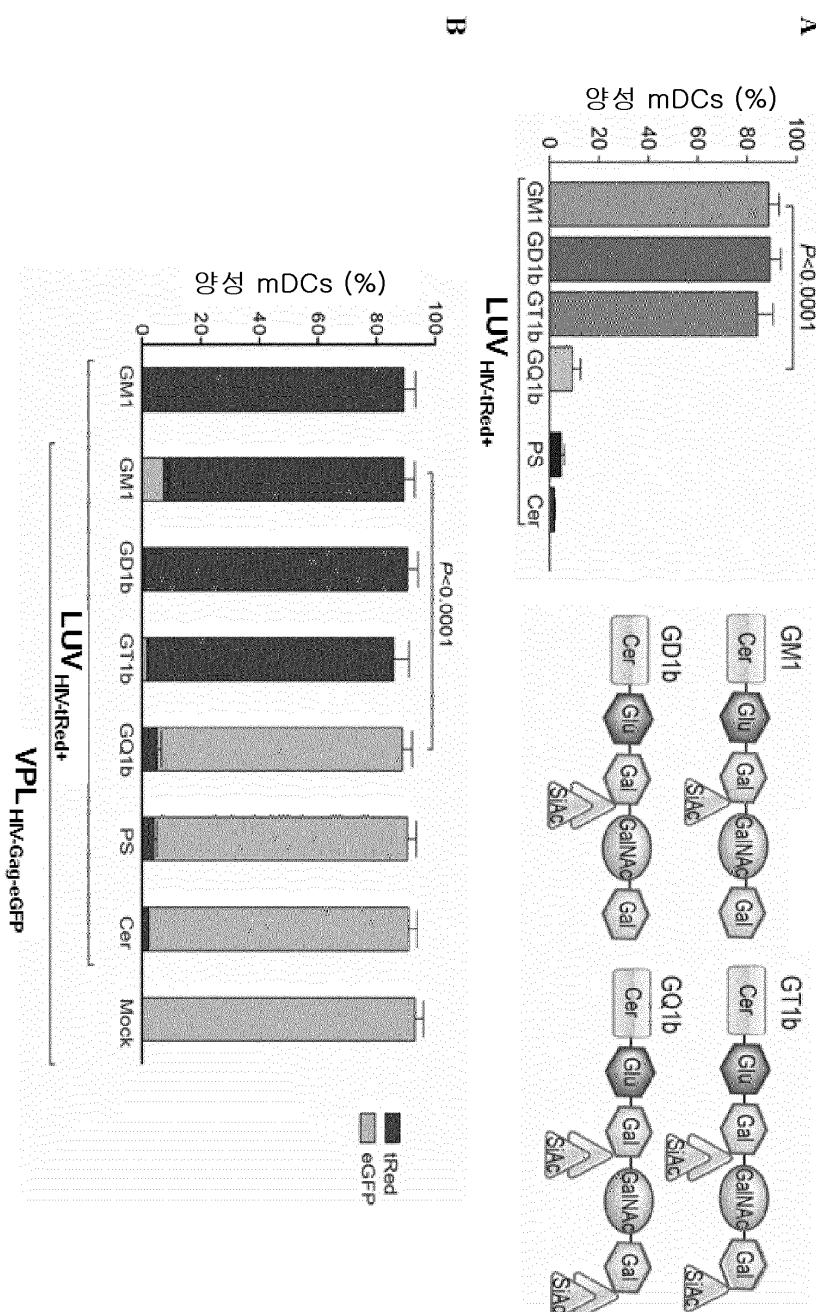
A



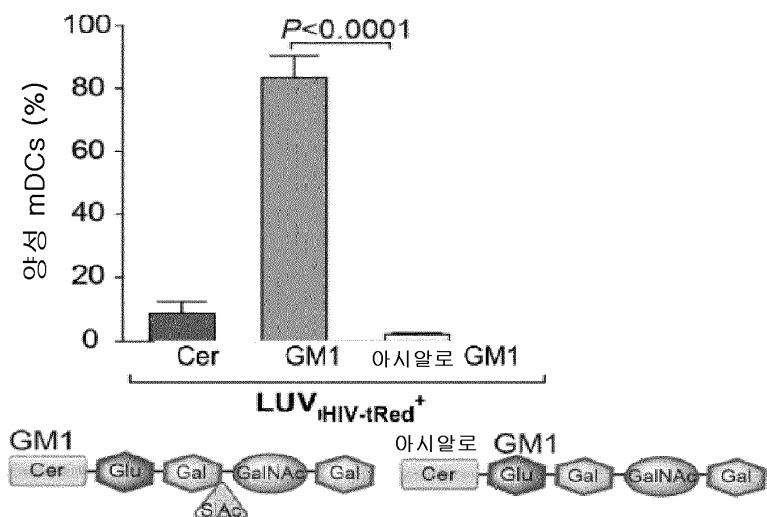
B



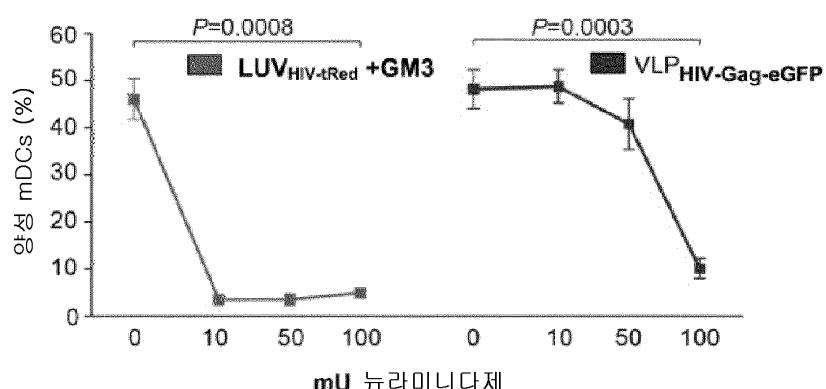
도면4



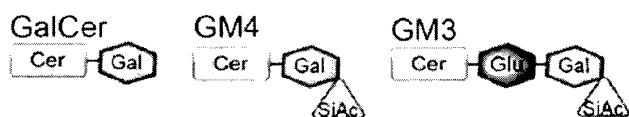
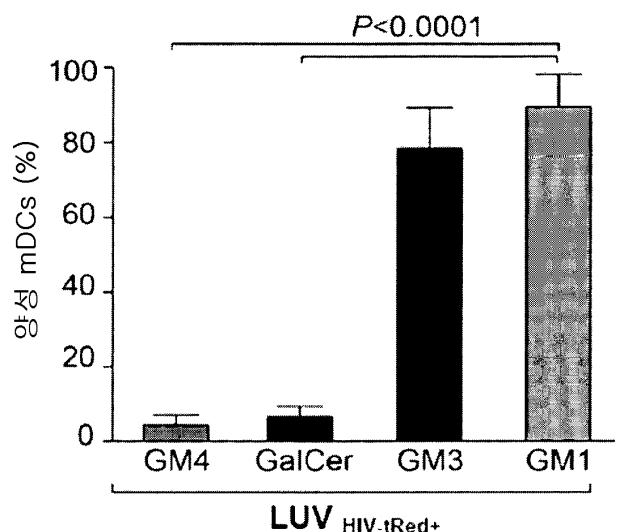
도면5a



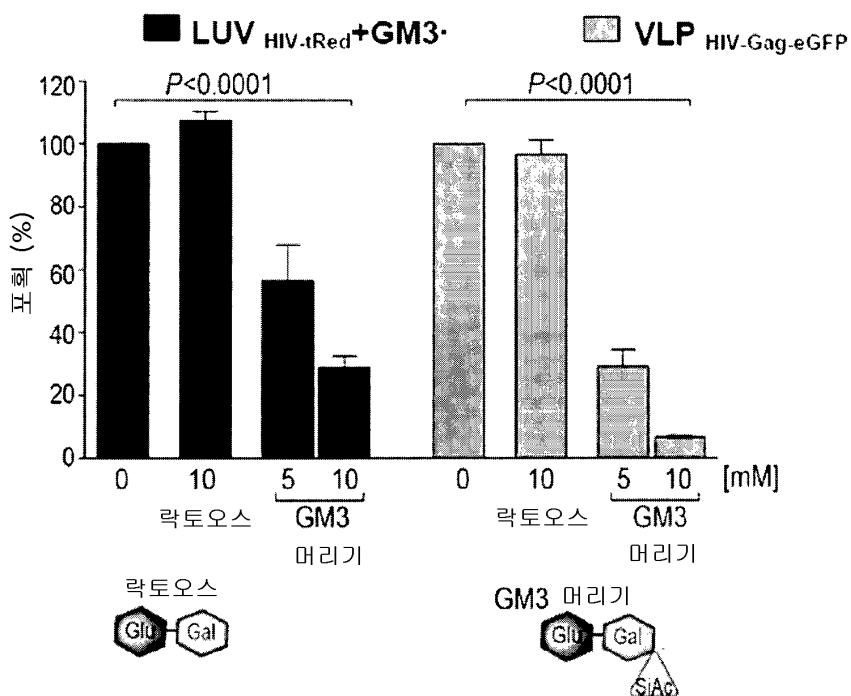
도면5b



도면5c



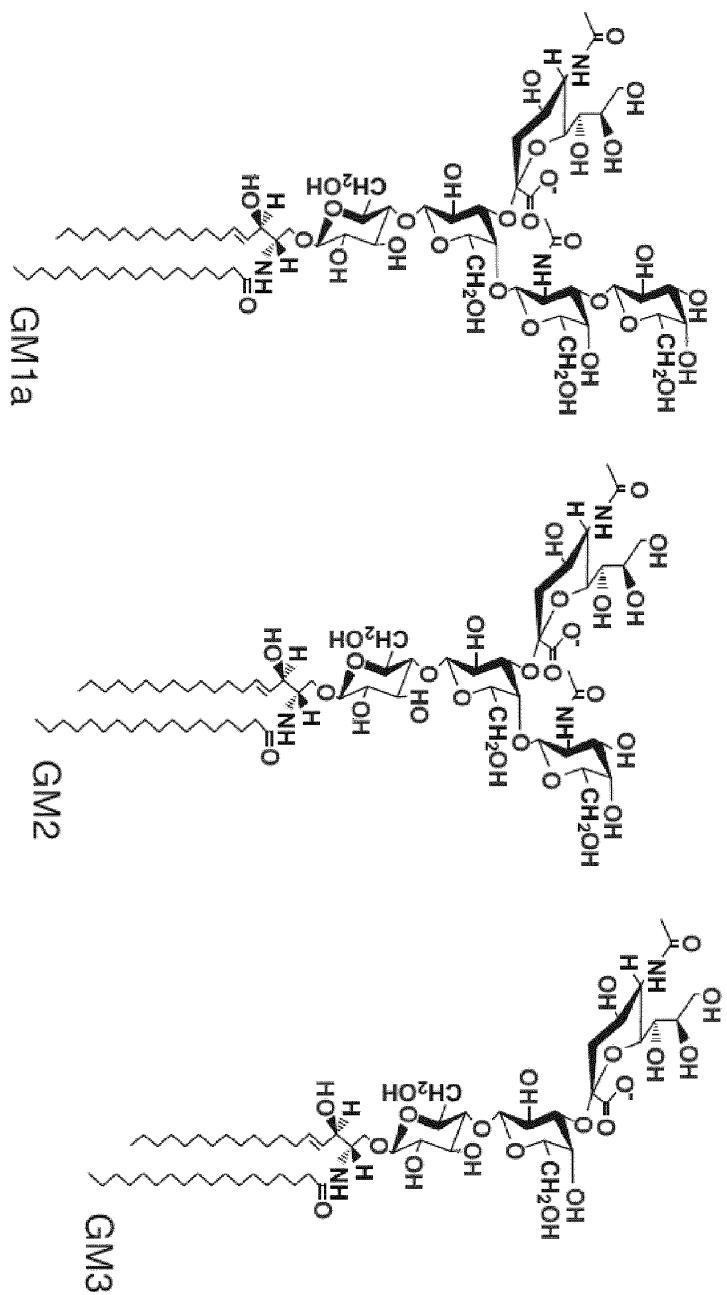
도면5d



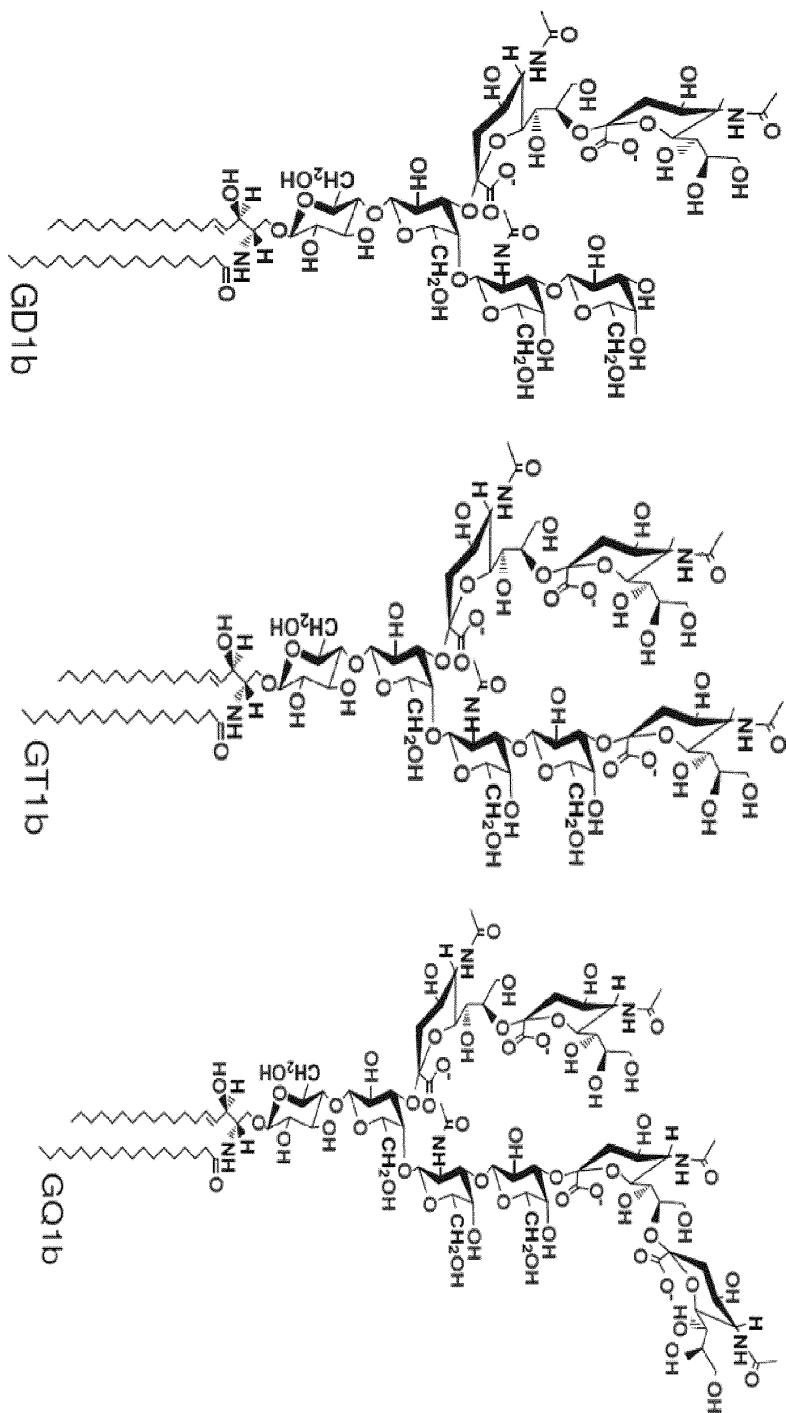
도면5e

도 5e에 대한 어떠한 참조도
존재하지 않는 것으로 고려될 것이다

도면6

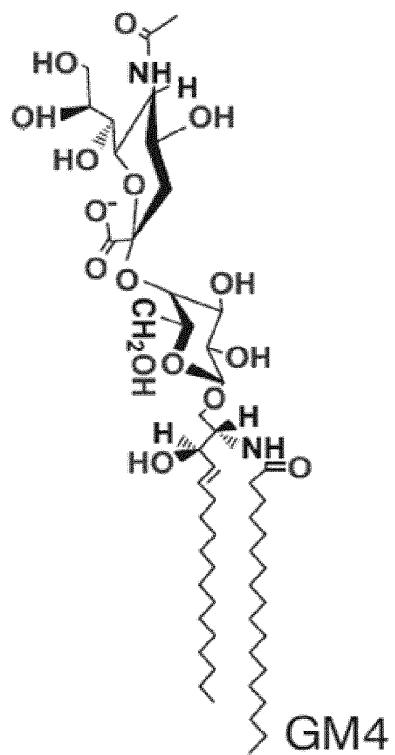
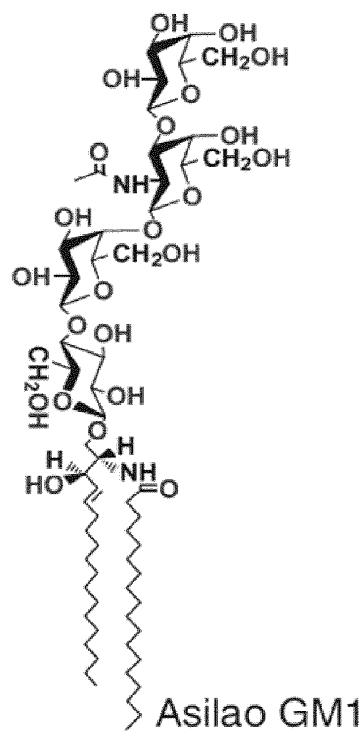


도면6a



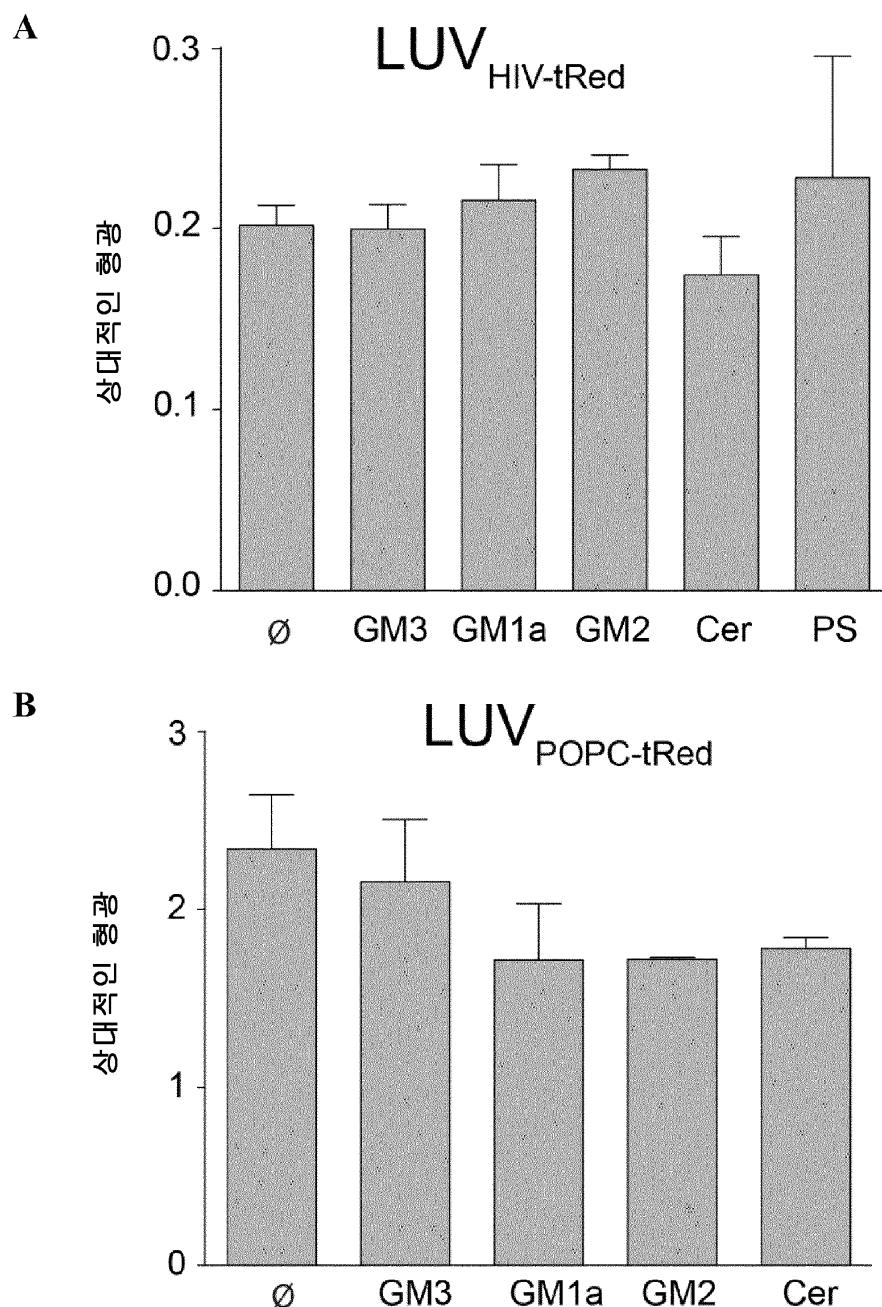
(도 6의 계속)

도면6b



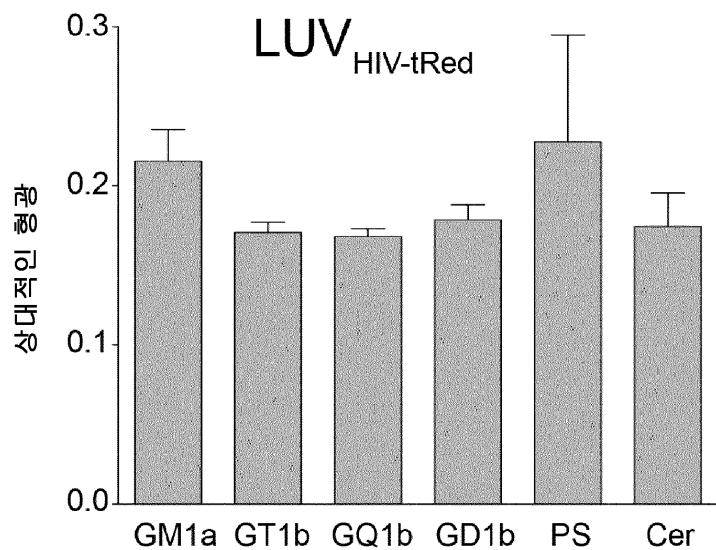
(도 6의 계속)

도면7

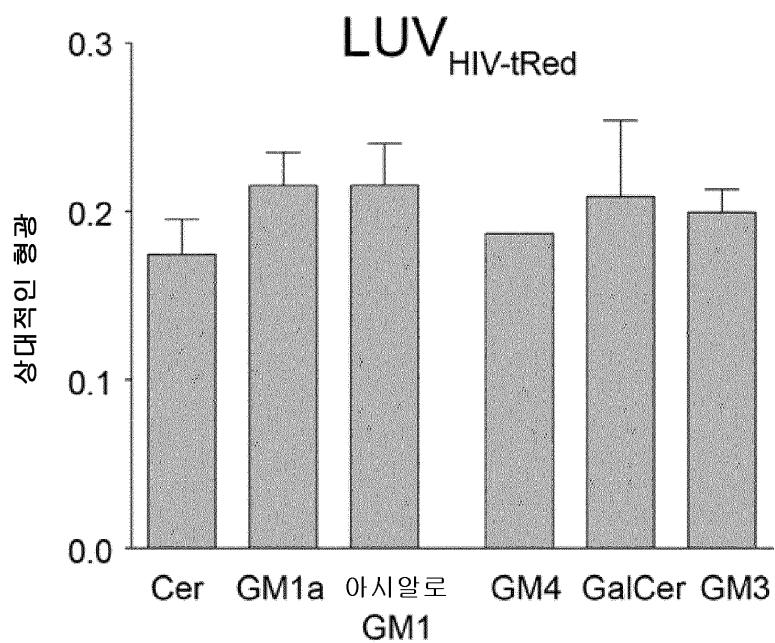


도면7a

C

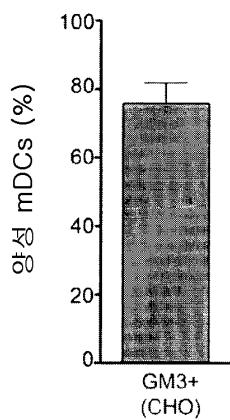


D

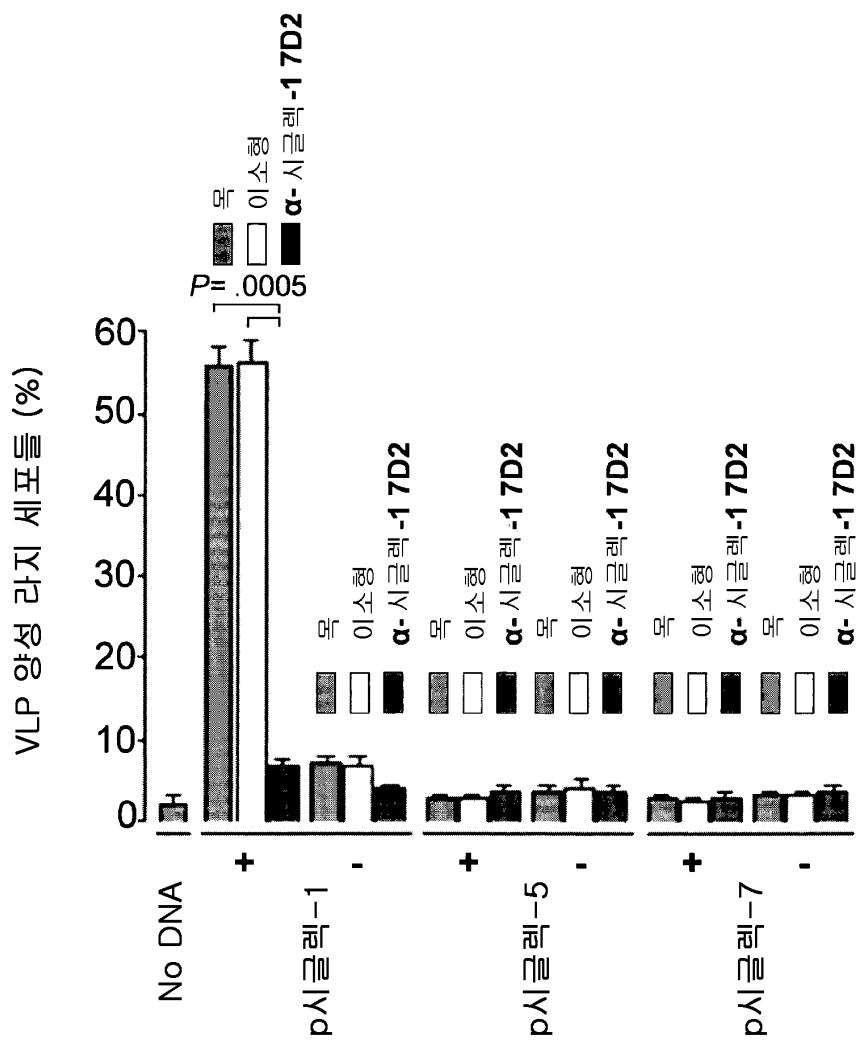


(도 7의 계속)

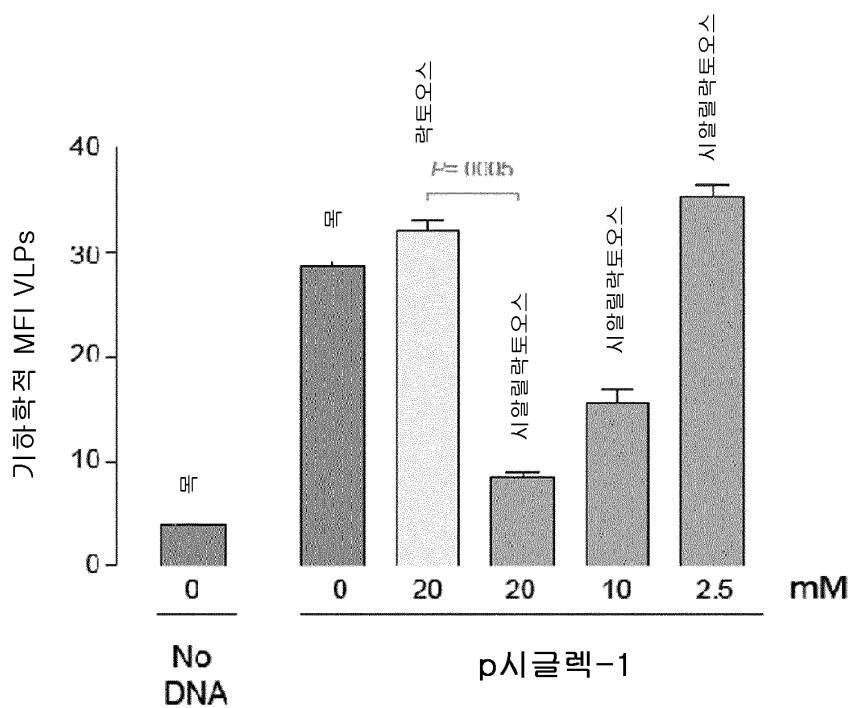
도면8



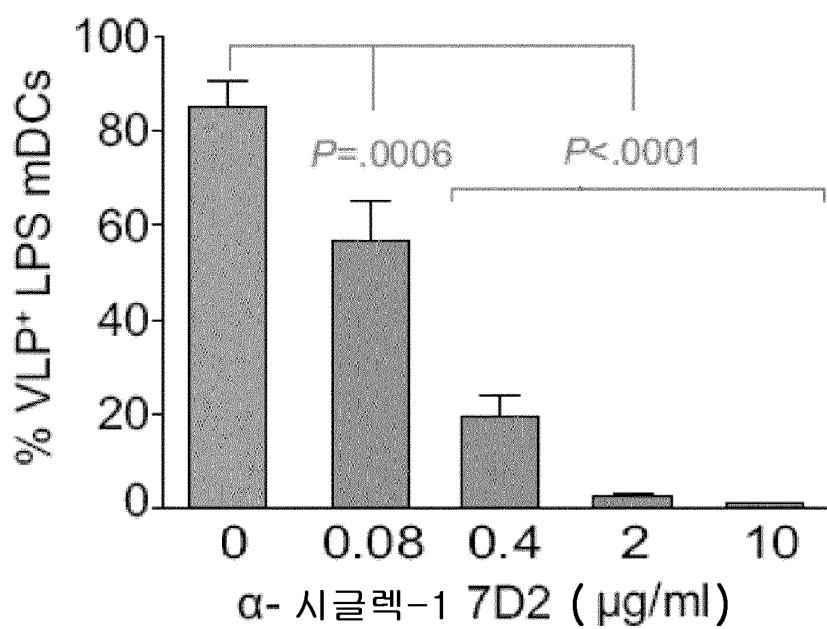
도면9



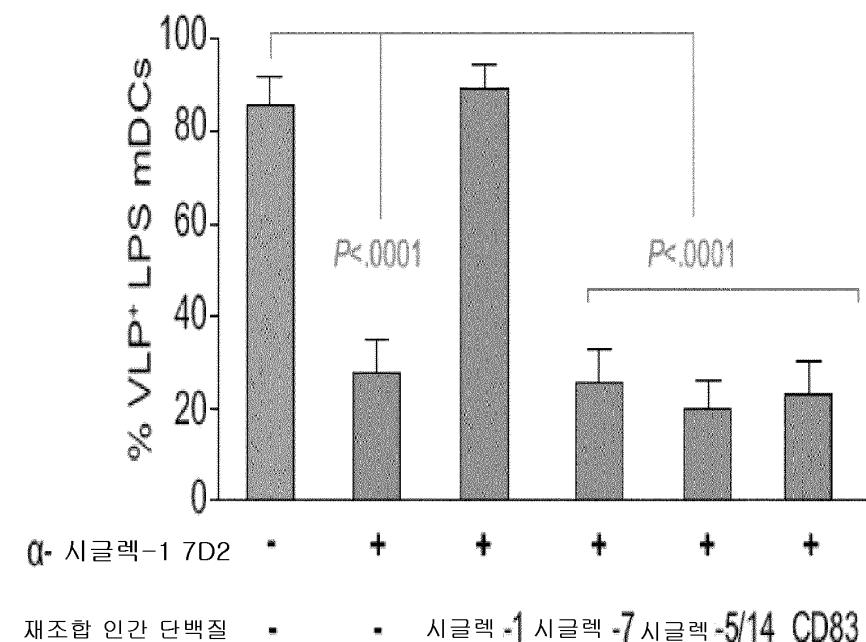
도면10



도면11

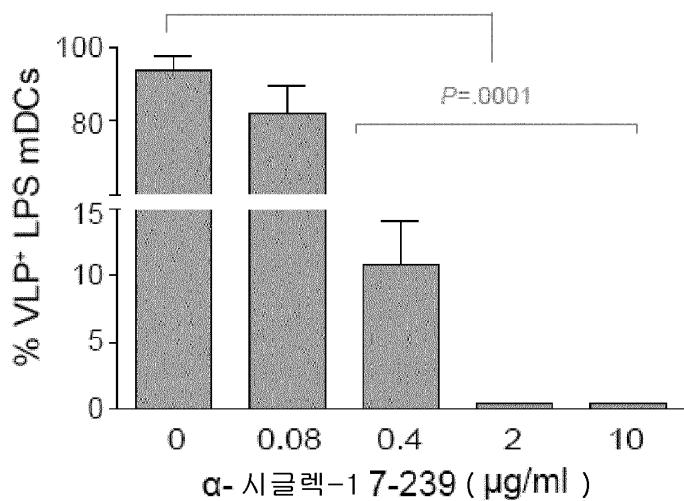


도면12

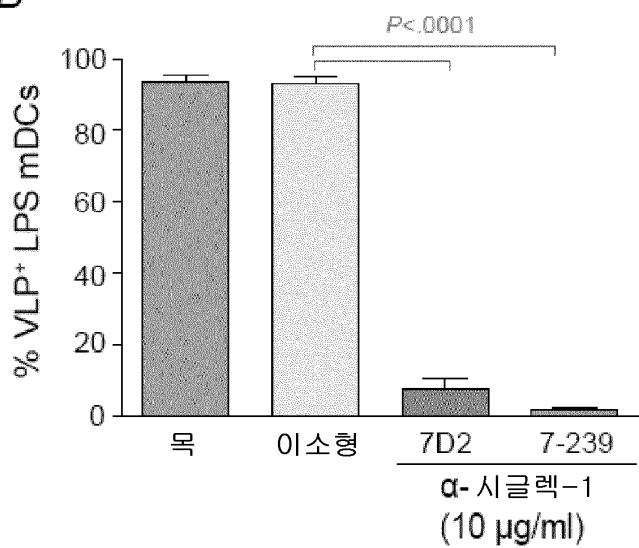


도면13

A



B



도면14

